

## 花生响应干旱胁迫的FERONIA类受体蛋白激酶基因克隆与表达分析

张欣悦<sup>#</sup>, 李佳婷<sup>#</sup>, 邹婷, 黄婉茹, 莫爱琼<sup>\*</sup>, 万小荣<sup>\*</sup>, 郑奕雄

仲恺农业工程学院农业与生物学院, 广州510225

**摘要:** FERONIA (FER)类受体蛋白激酶是CrRLK1L (*Catharanthus roseus* RLK1-like)激酶亚家族成员, 在植物受精、细胞伸长、顶端生长以及非生物胁迫响应等方面起重要作用。本研究克隆了两个花生(*Arachis hypogaea*) FER类受体蛋白激酶基因*AhFER1*和*AhFER2*, 它们的完整编码序列(CDS)和相应基因组DNA序列完全一致, 说明*AhFER1*和*AhFER2*基因编码区均无内含子, 分别包括2 655和2 640 bp的完整开放阅读框, 编码的蛋白分别含885和880个氨基酸, 分子量分别为99.58和98.96 kDa, 等电点分别为6.5和6.22。生物信息学分析发现, *AhFER1*及*AhFER2*的氨基酸序列与其他植物FER蛋白均具有较高同源性, 都包含malectin-like和蛋白激酶催化域两个保守结构域。*AhFER1*和*AhFER2*基因在花生幼苗的叶、茎和根中的表达水平有差异: *AhFER1*基因在叶中表达量最高, 其次是根, 茎中表达量最低; 而*AhFER2*基因则在茎中表达量最高, 其次是叶, 表达量最低是根。干旱胁迫对花生茎和根中*AhFER1*基因的表达以及花生叶、茎和根中*AhFER2*基因的表达均无影响, 但干旱胁迫显著增强花生叶中*AhFER1*基因的表达, 说明*AhFER1*基因可能在花生叶响应干旱胁迫时起重要作用。

**关键词:** 花生; 类受体蛋白激酶; FERONIA; 基因克隆与表达分析; 干旱胁迫

类受体蛋白激酶(receptor-like protein kinase, RLK)属于丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶。尽管大部分该类激酶特异结合的胞外信号分子或配体尚未被鉴定或分离, 但其分子结构、功能与动物受体(酪氨酸)蛋白激酶相似, 故称RLK (Lally等2001)。同受体蛋白激酶类似, 植物RLK是信号传递的重要载体, 可感受发育和外界环境胁迫的信号, 并通过催化功能蛋白的磷酸化导致其构象发生改变, 从而在植物生长发育、信号转导以及多种逆境胁迫响应过程中发挥重要调控作用(林彦萍等2015; 曹玉婷等2014; Lally等2001)。

RLK具有3个典型的结构域: 蛋白激酶催化域(protein kinase catalytic domain, PKC)、跨膜结构域(transmembrane domain, TM)和胞外配体结合域(extracellular ligand-binding domain, ECD) (Wrzaczek等2010)。蛋白激酶催化域具有高度保守性, 包含一个由0~70个氨基酸组成的C末端丝氨酸/苏氨酸活性区, 含有11个高度保守的氨基酸序列结构区(Hong等1997), 并有磷酸化结合位点。蛋白激酶催化域负责传递外界信号到下游, 通过磷酸化和去磷酸化改变蛋白质电荷和蛋白质构象, 从而开启或关闭下游基因的表达(石雅丽等2012)。跨膜结构域连接着细胞膜内外2个结构域, 并将胞外信号传导到胞内, 起到定位蛋白的作用。不同RLKs的ECD差异较大, 但一般均包含一个N末端信号肽, 具有识别并结合胞外信号分子的功能(Wrzaczek等2010)。

ECD可使植物对多种胞外信号做出响应, 如植物自身信号: 小分子蛋白配体CLAVATA3 (与RLK结合)和CLAVATA1 (限制分生组织的增生) (Müller等2008), 来自外界的微生物鞭毛蛋白(Albert等2010)、几丁质和肽聚糖(Miya等2007)以及干旱胁迫和重金属等信号。不同的类受体蛋白激酶ECD差异较大, ECD的多样性使得RLK家族成为最具功能的植物基因家族之一。编码RLK的基因是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)中最大的基因家族, 分别至少有610和1 130个家族成员(Lehti-Shiu等2009)。根据ECD的不同, RLK可分为15个亚家族, 其中包括富含亮氨酸重复(leucine-rich repeat, LRR)和*Catharanthus roseus* RLK1-like (CrRLK1L)亚家族(Shiu和Bleecker 2003)。CrRLK1L亚家族RLK含有由2个串联的malectin结构域组成的类malectin结构域(malectin-like domain, MLD), MLD为植物和藻类所特有(Galindo-Trigo等2016)。Malectin是动物细胞内质网中调控N-糖基化的关键蛋白(Schallus等2008)。

收稿 2017-08-10 修定 2018-01-09

资助 2017年度广东大学生科技创新培育专项资金重点项目(pdjh2017a0247)、广东省自然科学基金项目(2016A-030313370)、广东省农业技术需求研究与示范项目和国家级大学生创新创业训练计划项目(201611347011和2017-11347014)。

<sup>#</sup> 并列第一作者。

<sup>\*</sup> 共同通讯作者: 莫爱琼(ihepu@126.com)、万小荣(biowxr@126.com)。

FERONIA (FER)和其他16个相似的含MLD的类受体蛋白激酶均是CrRLK1L亚家族成员(Li等2016)。遗传学上第一个鉴定的FER是拟南芥AtFER (At3g51550), AtFER调控育性(Rotman等2003; Escobar-Restrepo等2007; Cheung和Wu 2011), 此后引起了研究人员对植物FER及其相似的RLK的高度关注(Galindo-Trigo等2016)。已有研究表明, FER及其相关RLK调节植物细胞伸长、细胞形状、极性生长以及生物和非生物胁迫(Cheung和Wu 2011; Lindner等2012; Nissen等2016)。

尽管目前已在多种高等植物中分离出一系列RLKs, 并分析了它们的基因特征和表达特性, 但相对于动物中受体蛋白激酶的研究来说, 植物RLK的研究相对滞后。首先, 研究对象不广泛, 多集中在拟南芥、水稻、烟草(*Nicotiana tabacum*)等模式植物上, 大量其他农作物中RLK基因没有得到克隆, RLK在不同植物中可能会表现出不同的功能, 其表达模式也会有差异。其次, 大部分已克隆的RLK基因没有得到全面的分析, 如水稻中的1130个RLK基因只有200多个基因的功能得以明确。干旱胁迫是影响植物生长发育的主要逆境因子, 能诱导许多参与逆境响应基因的表达, 干旱胁迫及其信号转导机制虽然在模式植物拟南芥中已有广泛研究(Shinozaki等2003; Shinozaki和Yamaguchi 1997, 2000), 但农作物响应干旱信号时, 其中RLK基因表达模式及RLK在干旱信号转导途径中的地位和作用, 均有待研究与阐明。

本研究利用分子生物学手段, 根据RLK蛋白激酶催化保守域的序列设计引物, 从经过干旱胁迫处理的花生叶中, 克隆了两个花生RLK基因, 序列分析显示这两个基因编码的RLK均为FER类受体蛋白激酶。分析这两个FER类受体蛋白激酶基因的结构及其在花生响应干旱胁迫时的表达模式, 旨在为进一步利用基因工程改善花生抗旱性、进行抗旱分子育种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

供试材料为花生品种‘仲恺花1号’(*Arachis hypogaea* L. ‘Zhongkai Hua No. 1’)。按Wan和Li (2006)的方法对三叶期花生幼苗进行干旱胁迫处理0、

1、4、10、24 h, 取叶、根及茎, 用液氮速冻, 于-80°C中冻存储用。每个处理重复3次。

### 1.2 花生类受体蛋白激酶基因克隆

干旱处理10 h的花生叶片总RNA提取和cDNA合成按Wan和Li (2005)的方法进行。根据RLK蛋白激酶催化域的保守序列设计一对简并引物(degenerate primer) DP-F (5'-ATHCAYMGIGAYGTIAAR-3')和DP-R (5'-CCRAANSWRRTAIACRTC-3')。以上述cDNA为模板进行PCR扩增花生RLK基因片段, 将PCR产物进行“TA”克隆至pMD 19-T载体(大连TaKaRa公司), 阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 结果克隆到2个不同的花生RLK基因片段。然后根据快速扩增cDNA末端方法(rapid amplification of cDNA ends, RACE)分别克隆这两个花生RLK基因的全长cDNAs (表1)。采用Gene Runner (V3.05)软件预测基因开放阅读框(open reading frame, ORF)以及蛋白质的分子量和等电点。

### 1.3 花生RLK基因组序列克隆

采用SDS法提取花生基因组DNA (Wan和Li 2006)。根据克隆的花生RLK基因cDNA序列设计2对特异性引物ORF-1F和ORF-1R及ORF-2F和ORF-2R (表1), 以基因组DNA为模板, 采用LA Taq DNA聚合酶(大连TaKaRa公司)进行PCR扩增反应。切胶回收纯化特异性PCR产物并测序, 比较cDNA和相应基因组DNA序列的异同。

### 1.4 生物信息学分析

利用BioEdit 7.0软件进行RLK氨基酸序列的多重序列比对(multiple sequence alignment); 通过MEGA 4.0 (Tamura等2011)软件的邻近法(neighbor-joining method)构建RLK蛋白的系统发育树; 通过在线工具iPSORT (<http://ipsort.hgc.jp>)进行蛋白亚细胞定位分析。

### 1.5 实时荧光定量RT-PCR (qRT-PCR)

以经上述干旱胁迫处理0、1、4、10、24 h花生叶、根及茎中提取的RNA反转录得到的cDNA为模板。根据花生RLK基因序列设计特异性荧光定量引物(表1), 以花生18S rRNA基因为内参基因(Liu等2014)。按照SYBR Premix Ex Taq试剂盒(大连TaKaRa公司)的操作说明进行qRT-PCR, MiniOpticon™ Real-Time PCR System (Bio-Rad)作为荧光定量PCR平台, 检测花生RLK基因的组织器官和响

表1 本研究所用的引物  
Table 1 Primers used in the present study

名称	序列(5'→3')	用途
3GSP1-outer	CCTGAGTACTACAAGCGTC	<i>AhFER1</i> 基因3' RACE
3GSP1-inner	GACGTGTACTCTTTCGGTG	
5GSP1-outer	GGTTTGGAAGTCCGGTG	<i>AhFER1</i> 基因5' RACE
5GSP1-inner	GAAGTCCGGTGGGTCCTAC	
3GSP2-outer	TTGTGAAGGGTAGCCTTGGG	<i>AhFER2</i> 基因3' RACE
3GSP2-inner	TTGTGAAGGGTAGCCTTGGG	
5GSP2-outer	TTGTGGACATACCCGTAGG	<i>AhFER2</i> 基因5' RACE
5GSP2-inner	GTGGGTTGTGGACATACCCG	
ORF1-F	ATGGGGTACCCAAGAAACATAGTAGTC	扩增 <i>AhFER1</i> cDNA完整ORF及其相对应基因组区域DNA序列
ORF1-R	CCTGCCTTTATTAATACTAATAACCGG	
ORF2-F	CTCTTCGAGCATGTATGGTACGG	扩增 <i>AhFER2</i> cDNA完整ORF及其相对应基因组区域DNA序列
ORF2-R	GGTCATAACAGACACAACGTTTTACC	
18S-F	ATTCTAGTAAGCGCGAGTCATCAG	qRT-PCR检测内参基因
18S-R	CAATGATCCTCCGAGGTTAC	
qFER1-F	CACCGTCGTGTTTTCCCTGAC	qRT-PCR检测 <i>AhFER1</i>
qFER1-R	GATGATGCACCTGCGCAGGA	
qFER2-F	AGCTGCGGCTACTCCGGT	qRT-PCR检测 <i>AhFER2</i>
qFER2-R	GGTGTCTTCGCCGTCGCG	

应干旱胁迫表达情况。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量(Muller等2002)。相对表达量结果为3次重复的平均值 $\pm$ 标准误(SE)。

## 2 实验结果

### 2.1 花生类受体蛋白激酶基因克隆

利用设计的一对简并引物DP-F和DP-R扩增到约250 bp的PCR产物, 测序及序列分析结果表明克隆到的为两个不同的花生*RLK*基因片段, 经BLASTn及BLASTp分析表明其均编码FER类受体蛋白激酶, 故分别将其命名为*AhFER1*和*AhFER2*。根据*AhFER1*已知序列设计引物扩增*AhFER1*基因3'端974 bp的序列和5'端2 534 bp的序列; 根据*AhFER2*已知序列设计引物扩增*AhFER2*基因3'端的842 bp序列和5'端的2 155 bp序列(图1)。拼接后获得*AhFER1*和*AhFER2*基因的全长cDNA序列, 分别包含2 655和2 640 bp的完整ORF, 编码的蛋白分别含885和880个氨基酸, 分子量分别为99.58和98.96 kDa, 等电点分别为6.5和6.22。

### 2.2 *AhFER1*和*AhFER2*基因全长cDNA及相应基因组序列克隆

用特异性引物ORF-1F和ORF-1R以及ORF-2F和ORF-2R(表1), 以cDNA和基因组DNA为模板, 采用LA *Taq* DNA聚合酶进行PCR扩增, 并测序

PCR产物。结果显示, *AhFER1*及*AhFER2*基因的完整编码序列(complete coding sequence, CDS)和相应基因组DNA序列完全一致, PCR产物大小均分别为2 800和2 740 bp(图2), 表明*AhFER1*和*AhFER2*基因在其编码区均无内含子。

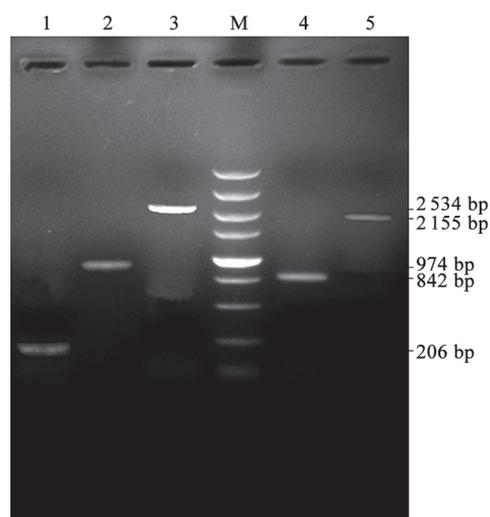


图1 花生中*RLK*基因的克隆

Fig.1 Molecular cloning of *RLK* genes from peanut

1: 简并引物DP-F及DP-R的RT-PCR扩增花生中*RLK*片段; 2: *AhFER1*基因3' RACE扩增; 3: *AhFER1*基因5' RACE扩增; M: DL5000 DNA marker (TaKaRa); 4: *AhFER2*基因3' RACE扩增; 5: *AhFER2*基因5' RACE扩增。

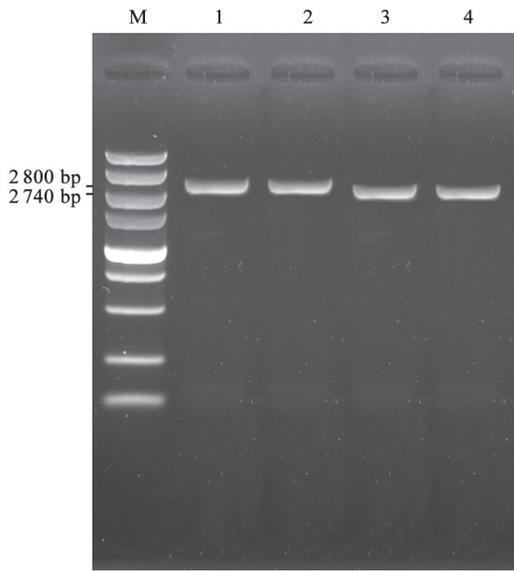


图2 *AhFER1*和*AhFER2*基因CDS及其相应基因组DNA扩增  
Fig.2 PCR amplification of CDSs and corresponding genomic DNAs of *AhFER1* and *AhFER2*

M: DL5000 DNA marker (TaKaRa); 1: *AhFER1* CDS; 2: 与*AhFER1* CDS相应基因组DNA; 3: *AhFER2* CDS; 4: 与*AhFER2* CDS相应基因组DNA。

### 2.3 花生*AhFER1*和*AhFER2*生物信息学分析

我们利用BioEdit软件中的Clustal W程序对花生*AhFER1*及*AhFER2*、拟南芥*AtFER* (At3g51550)、大豆(*Glycine max*) *GmFER* (XM\_003531820.3)、野生大豆(*G. soja*) *GsFER* (KN667267)和苜蓿(*Medicago truncatula*) *MtFER* (XM\_013592189)蛋白进行多重序列比对分析。结果显示, *AhFER1*与*AhFER2*的氨基酸序列一致性为71.9%; *AhFER1*蛋白与苜蓿*MtFER*、大豆*GmFER*、野生大豆*GsFER*和拟南芥*AtFER*的氨基酸序列一致性分别为57.7%、48.3%、45.7%和40.7%; *AhFER2*与苜蓿*MtFER*、大豆*GmFER*、野生大豆*GsFER*和拟南芥*AtFER*的氨基酸序列一致性分别为58.5%、48.3%、45.9%和42.0% (图3)。说明花生FER蛋白与其他几种豆科植物(苜蓿、大豆和野生大豆) FER蛋白同源性更高。从图3可看出, 所有FER蛋白N端的同源性最低, 中间蛋白激酶催化域同源性最高。iPSORT预测蛋白的亚细胞定位表明*AhFER1*及*AhFER2*均在其N端有膜定位信号肽。

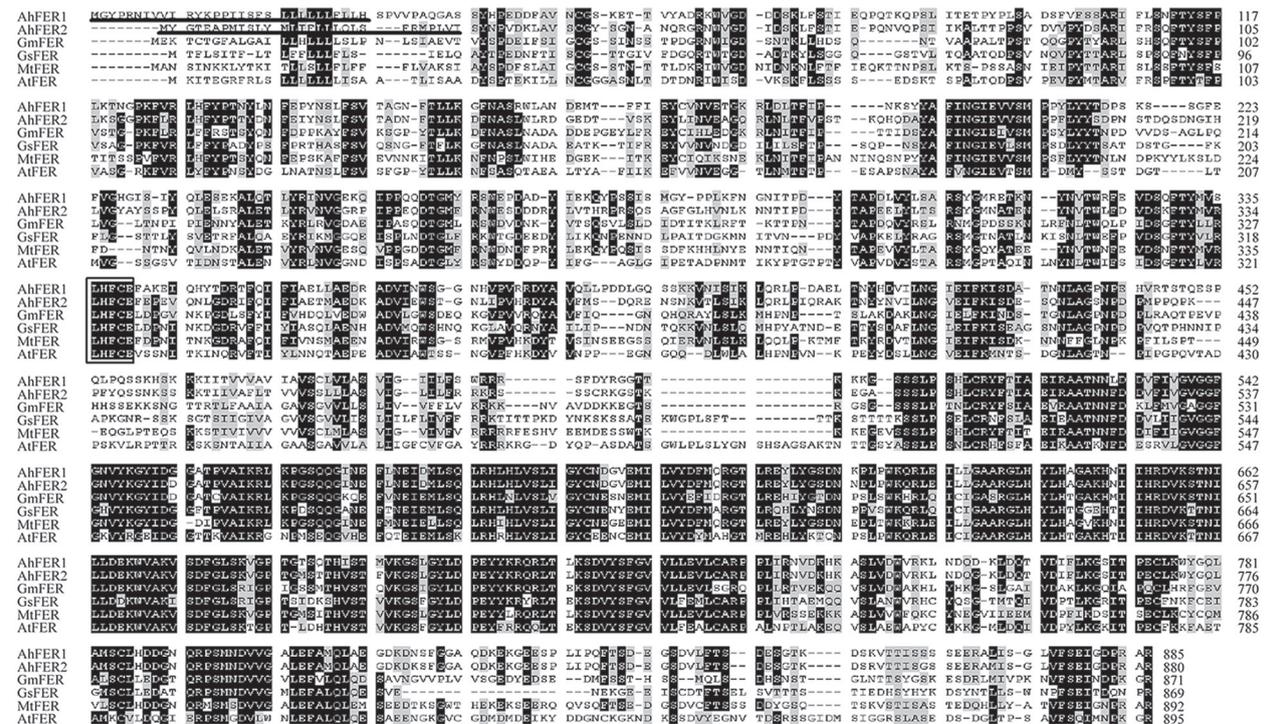


图3 花生*AhFER1*及*AhFER2*与其他植物FER蛋白的多重序列比对

Fig.3 Multiple sequence alignment of peanut *AhFER1* and *AhFER2* with other plant FERs

*GmFER*: 大豆FER; *GsFER*: 野生大豆FER; *MtFER*: 苜蓿FER; *AtFER*: 拟南芥FER。下划线序列为预测的跨膜蛋白信号肽; 方框序列为FER蛋白的MLD。

利用MEGA 4.0对花生AhFER1及AhFER2与GenBank数据库中的苜蓿、大豆、野生大豆、木豆(*Cajanus cajan*)、可可(*Theobroma cacao*)、水稻、玉米(*Zea mays*)和二穗短柄草(*Brachypodium distachyum*)的FER蛋白进行系统进化分析(phylogenetic analysis), 结果显示, 在双子叶植物中, 花生和其他几种豆科植物的FER蛋白聚为一类, 可可FER为单独一类; 3种单子叶植物FER蛋白聚为另一大类(图4)。说明花生的FER蛋白与其他4种豆科植物的FER蛋白进化亲缘关系较近, 与前面FER蛋白氨基酸序列的多重比对结果一致(图3)。

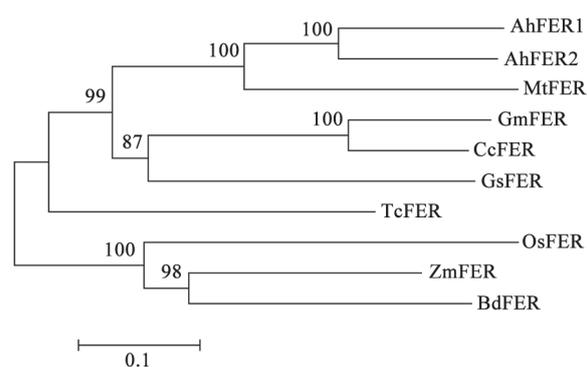


图4 花生AhFER1及AhFER2与其他植物FER蛋白的系统进化分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of peanut AhFER1 and AhFER2 with other plant FERs

MtFER: 苜蓿FER; GsFER: 野生大豆FER; GmFER: 大豆FER; CcFER: 木豆FER; TcFER: 可可FER; OsFER: 水稻FER; ZmFER: 玉米FER; BdFER: 二穗短柄草FER。标尺指遗传距离为10%的长度。

## 2.4 花生响应干旱胁迫时AhFER1和AhFER2基因的表达

qRT-PCR检测花生幼苗响应干旱胁迫时AhFER1和AhFER2基因表达的结果显示, AhFER1和AhFER2基因在叶、茎和根中均有表达, 但表达水平有差异。正常条件下, AhFER1基因在叶中表达量最高, 是表达量最低的茎的5.39倍, 其次是根(图5-A); 而AhFER2基因则在茎中表达量最高(是根的4.78倍), 其次是叶, 根中表达量最低(图5-B)。干旱胁迫显著增强花生叶中AhFER1基因的表达, 胁迫处理1、4和10 h时AhFER1表达量分别是对照的1.46、2.19和4.06倍, 但对茎和根中AhFER1的表达无影响(图5-A); 而花生叶、茎和根中AhFER2的表达均不受干旱胁迫的影响(图5-B)。和干旱处理10 h相比, 处理24 h时花生叶、茎和根中AhFER1及AhFER2的表达均明显下降, 可能与此时幼苗已明显萎蔫接近死亡有关(图5)。

## 3 讨论

植物FER及其相关RLKs含有与双葡萄糖结合蛋白malectin同源的胞外基序(motifs), 能与细胞壁糖类相互作用及介导细胞壁相关活性, 对于正常细胞壁的维持是必需的(Li等2016)。FER蛋白是RALFs (rapid alkalization factors, 是一类小分子量肽调节因子)的受体, 两者结合后能使FER蛋白和细胞重要生长调节因子H<sup>+</sup>-ATPase磷酸化, 调控植物的生长和育性(Li等2016)。

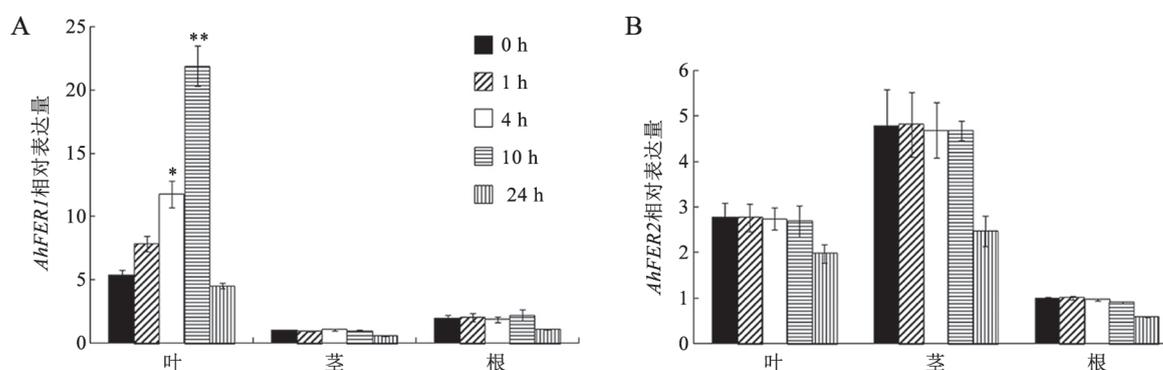


图5 干旱胁迫对花生叶、茎和根中AhFER1 (A)及AhFER2 (B)基因表达的影响

Fig.5 Effects of drought stress on expressions of AhFER1 (A) and AhFER2 (B) genes in peanut leaves, stems and roots  
基因相对表达量均为3次重复的平均值±标准误。采用单因素方差分析, 并进行LSD/SNK事后检验, 误差线上方的\*和\*\*分别表示处理与对照差异显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ )。

本研究克隆了花生中两个FER蛋白基因*AhFER1*和*AhFER2* (图1和2), 并分析了其序列生物学、组织器官表达及干旱胁迫对这两个基因表达的影响。生物信息学分析结果发现, 花生AhFER1及AhFER2的氨基酸水平与其他植物的FER蛋白均具有较高同源性, 都包含MLD和蛋白激酶催化域两个保守功能结构域(图3)。说明*AhFER1*和*AhFER2*均属于CrRLK1L亚家族成员的一类受体蛋白激酶同源基因。

已有的研究结果表明, 拟南芥FER类受体激酶除了参与花粉管和助细胞的识别、调控花粉管伸长外(Escobar-Restrepo等2007; Rotman等2003), 还在促进营养组织细胞伸长(Guo等2009)、调节气孔开度(Kessler等2010)等方面发挥作用。王凉洁等(2014)的研究表明巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*) *HbEFR*基因在不同组织中的表达水平存在差异, 叶和花中的表达丰度最高, 胶乳中的表达丰度最低, 且水杨酸能诱导该基因在叶中的表达, 推测*HbEFR*基因在调控花粉管伸长和气孔开度方面有生物学功能。我们的实验结果显示, *AhFER1*和*AhFER2*基因在花生幼苗的叶、茎和根中的表达水平有差异。*AhFER1*基因在叶中表达量最高, 其次是根, 茎中表达量最低; 而*AhFER2*基因则在茎中表达量最高, 其次是叶, 表达量最低是根(图5)。

Lindner等(2012)研究发现, 非生物胁迫(特别是热激和厌氧胁迫)一般都下调*CrRLK1Ls*基因的表达。*CrRLK1L*亚家族蛋白能调节NADPH-氧化酶-依赖型的活性氧(reactive oxygen species, ROS)形成, 植物响应生物胁迫时*CrRLK1Ls*基因转录本下调, 有利于减少ROS的形成。本研究发现, 干旱胁迫对花生茎和根中*AhFER1*基因的表达以及花生叶、茎和根中*AhFER2*基因的表达均无影响(图5); 与Lindner等(2012)发现干旱胁迫下拟南芥At5g39030 (一种*CrRLK1L*)基因的转录水平无明显变化的结果相一致。有趣的是, 本研究中干旱胁迫显著增强花生叶中*AhFER1*基因的表达, 与Lindner等(2012)研究发现非生物胁迫(包括干旱)一般都下调*CrRLK1Ls*基因的表达不一致, 说明*AhFER1*基因可能在花生叶响应干旱胁迫信号时起重要作用。

现已鉴定的FER蛋白信号转导下游组分中包括鸟嘌呤交换因子RAC/ROP (ROP GEFs), FER与其

结合能将GDP转换成GTP并激活RAC/ROPs (Carol等2005)。拟南芥中FER (At5g39030)能与RAC/ROP (ROP11; At5g62880)相互作用并将其激活, 激活的ROP11可使脱落酸(abscisic acid, ABA)信号转导中的负调控蛋白——蛋白磷酸酶2C (protein phosphatase 2C, PP2C)磷酸化, 并使其激活, 进而抑制ABA信号转导(Chen等2016; Yu等2012)。逆境胁迫下, ABA与其受体结合进而抑制PP2C活性, 激活ABA响应。Chen等(2016)进一步发现, 拟南芥*fer*功能丧失突变体(loss of function)对ABA和非生物胁迫超敏(hypersensitivity), 说明FER对植株ABA和逆境响应起关键作用。本研究中干旱胁迫显著增强花生叶中*AhFER1*基因表达的结果(图5), 也说明*AhFER1*可能在花生叶响应干旱信号时起作用。接下来通过转基因实验(knock in and knock out)将有助于了解花生FER基因的功能, 如分析其在花生响应干旱时的可能作用。Chen等(2016)研究发现, PP2C能直接与FER相互作用并使其去磷酸化, 进而抑制FER的活性, 从而反馈调控FER对PP2C蛋白的激活。可见, 植物体中有维持FER和PP2P蛋白活性动态平衡的机制, 进而维持ABA信号响应的稳态(homeostasis)。

RALF1能直接结合FER蛋白的胞外结构域(Li等2016)。然而, RALF1具体在FER蛋白胞外结构域什么位点结合, 它如何诱导FER蛋白磷酸化, 是直接诱导其自我磷酸化, 还是通过另一激酶, 以及FER蛋白磷酸化后的直接结果均有待阐明。

### 参考文献(References)

- Albert M, Jehle AK, Mueller K, et al (2010). *Arabidopsis thaliana* pattern recognition receptors for bacterial elongation factor Tu and flagellin can be combined to form functional chimeric receptors. *J Biol Chem*, 285 (25): 19035–19042
- Cao YT, Ding YF, Zhu C (2014). Role of receptor-like kinases in plant response to abiotic stress. *Chin J Biochem Mol Biol*, 30 (3): 241–247 (in Chinese with English abstract) [曹玉婷, 丁艳菲, 朱诚(2014). 类受体蛋白激酶与植物非生物胁迫应答. *中国生物化学与分子生物学报*, 30 (3): 241–247]
- Carol RJ, Takeda S, Linstead P, et al (2005). A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature*, 438: 1013–1016
- Chen J, Yu F, Liu Y, et al (2016). FERONIA interacts with ABI2-type phosphatases to facilitate signaling cross-talk

- between abscisic acid and RALF peptide in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 113 (37): e5519–e5527
- Cheung AY, Wu HM (2011). THESEUS 1, FERONIA and relatives: a family of cell wall-sensing receptor kinases? Curr Opin Plant Biol, 14: 632–641
- Escobar-Restrepo JM, Huck N, Kessler S, et al (2007). The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception. Science, 317: 656–660
- Galindo-Trigo S, Gray JE, Smith LM (2016). Conserved roles of CrRLK1L receptor-like kinases in cell expansion and reproduction from algae to angiosperms. Front Plant Sci, 7: 1269
- Guo H, Li L, Ye H, et al (2009). Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 106: 7648–7653
- Hong SW, Jon JH, Kwak JM, et al (1997). Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 113 (4): 1203–1212
- Kessler SA, Shimosato-Asano H, Keinath NF, et al (2010). Conserved molecular components for pollen tube reception and fungal invasion. Science, 330: 968–971
- Lally D, Ingmire P, Tong HY, et al (2001). Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. Plant Cell, 13 (6): 1317–1332
- Lehti-Shiu MD, Zou C, Hanada K, et al (2009). Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. Plant Physiol, 150 (1): 12–26
- Li C, Wu HM, Cheung AY (2016). FERONIA and her pals: functions and mechanisms. Plant Physiol, 171: 2379–2392
- Lin YP, Wang Y, Jiang SC, et al (2015). Advance in research of plant receptor-like protein kinases. Genom Appl Biol, 34 (2): 429–437 (in Chinese with English abstract) [林彦萍, 王义, 蒋世翠等(2015). 植物类受体蛋白激酶研究进展. 基因组学与应用生物学, 34 (2): 429–437]
- Lindner H, Müller LM, Boisson-Dernier A, et al (2012). CrRLK1L receptor-like kinases: not just another brick in the wall. Curr Opin Plant Biol, 15: 659–669
- Liu S, Lv Y, Wan XR, et al (2014). Cloning and expression analysis of cDNAs encoding ABA 8'-hydroxylase in peanut plants in response to osmotic stress. PLoS ONE, 9 (5): e97025
- Miya A, Albert P, Shinya T, et al (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 104 (49): 19613–19618
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, et al (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. Biotechniques, 32: 1372–1379
- Müller R, Bleckmann A, Simon R (2008). The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. Plant Cell, 20 (4): 934–946
- Nissen KS, Willats WGT, Malinovsky FG (2016). Understanding CrRLK1L function: cell walls and growth control. Trends Plant Sci, 21: 516–527
- Rotman N, Rozier F, Boavida L, et al (2003). Female control of male gamete delivery during fertilization in *Arabidopsis thaliana*. Curr Biol, 13: 432–436
- Schallus T, Jaeckh C, Fehér K, et al (2008). Malectin: a novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation. Mol Biol Cell, 19: 3404–3414
- Shi YL, Zhang R, Lin Q (2012). Biological function of the somatic embryogenesis receptor-like kinase in plant. Hereditas, 34 (5): 551–559 (in Chinese with English abstract) [石雅丽, 张锐, 林芹(2012). 植物体细胞胚胎发生类受体蛋白激酶的生物学功能. 遗传, 34 (5): 551–559]
- Shinozaki K, Yamaguchi SK (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. Plant Physiol, 115: 327–334
- Shinozaki K, Yamaguchi SK (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and crosstalk between two stress signaling pathways. Curr Opin Plant Biol, 3: 217–223
- Shinozaki K, Yamaguchi SK, Seki M (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Curr Opin Plant Biol, 6: 410–417
- Shiu SH, Bleecker AB (2003). Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 132: 530–543
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, 24: 1596–1599
- Wan XR, Li L (2005). Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea* L. DNA Seq, 16 (3): 217–223
- Wan XR, Li L (2006). Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. Biochem Biophys Res Commun, 347 (4): 1030–1038
- Wang LJ, Qin YX, Luo HL (2014). Cloning and expression analysis of FERONIA receptor kinase gene (*HbFER*) in *Hevea brasiliensis*. Chin J Tropical Crops, 35 (7): 1347–1353 (in Chinese with English abstract) [王凉洁, 秦云霞, 罗红丽(2014). 巴西橡胶树FERONIA类受体激酶基因(*HbFER*)的克隆及表达分析. 热带作物学报, 35 (7): 1347–1353]
- Wrzaczek M, Brosché M, Salojrvi J, et al (2010). Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of recep-

tor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*. BMC Plant Biol, 10 (1): 95  
Yu F, Qian L, Nibau C, et al (2012). FERONIA receptor ki-

nase pathway suppresses abscisic acid signaling in *Arabidopsis* by activating ABI2 phosphatase. Proc Natl Acad Sci USA, 109: 14693–14698

## Cloning and expression analysis of FERONIA receptor-like kinase genes in peanut in response to drought

ZHANG Xin-Yue<sup>#</sup>, LI Jia-Ting<sup>#</sup>, ZOU Ting, HUANG Wan-Ru, MO Ai-Qiong<sup>\*</sup>, WAN Xiao-Rong<sup>\*</sup>, ZHENG Yi-Xiong

College of Agriculture and Biology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China

**Abstract:** FERONIA (FER) receptor-like kinase (RLK), one member of the *Catharanthus roseus* RLK1-like (CrRLK1L) protein kinase subfamily, plays a vital role in plant fertilization, cell elongation and tip growth, as well as in response to abiotic stresses. In the present study, two genes encoding FER receptor-like kinase were cloned from peanut (*Arachis hypogaea*), named as *AhFER1* and *AhFER2*, respectively. The complete coding sequences of *AhFER1* and *AhFER2* were fully identical to their corresponding genomic DNA sequences, suggesting no introns in the coding sequences of *AhFER1* and *AhFER2*. The open read frames (ORF) of *AhFER1* and *AhFER2* consist of 2 655 and 2 640 bp nucleotides, separately, encoding a polypeptide of 885 and 880 amino acid residues with a calculated molecular weight of 99.58 and 98.96 kDa and an isoelectric point of 6.5 and 6.22, respectively. Bioinformatics analysis showed that AhFER1 and AhFER2 proteins shared high sequence identity with the reported plant FER proteins, with two extracellular domains, annotated as malectin-like domain (MLD), and typical kinase catalytic domain. Expression analysis showed that *AhFER1* and *AhFER2* were expressed ubiquitously in leaf, stem and root of peanut seedling with different transcript levels. *AhFER1* gene was predominantly expressed in leaf with lower and lowest mRNA levels in root and stem, respectively. However, the transcript level of *AhFER2* gene was highest in stem, followed by leaf and root. The expressions of *AhFER1* in stem and root, and *AhFER2* in all detected organs were not affected by drought stress, whereas the expression of *AhFER1* in leaf was significantly up-regulated by drought stress, suggesting that AhFER1 might play an important role in leaf of peanut in response to drought.

**Key words:** peanut; receptor-like kinase; FERONIA; gene cloning and expression analysis; drought stress

Received 2017-08-10 Accepted 2018-01-09

This work was jointly supported by the “Climbing Program” Special Funds (pdjh2017a0247), Guangdong Natural Science Foundation (2016A030313370), the Funds for Investigation and Demonstration of Guangdong Agro-Technology Demands, and the National College Students’ Innovation Training Program (201611347011 and 201711347014).

<sup>#</sup>Co-first authors.

<sup>\*</sup>Co-corresponding authors: Mo AQ (ihepu@126.com), Wan XR (biowxr@126.com).