

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2020.11.011

甘蓝 *BoRALF_{A1}* 基因的克隆与表达分析

高启国, 李 帅, 姚智广, 梁 潇

西南大学 园艺园林学院/南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要: 基于前期转录组测序结果, 从甘蓝自交不亲和系“*A1*”材料中克隆了 1 个 RALF(Rapid alkalization factor) 蛋白编码基因, 命名为 *BoRALF_{A1}*; 该基因没有内含子, CDS 全长为 240 bp, 编码 79 个氨基酸, 包含 1 个信号肽和 5 个翻译后修饰位点; 成熟肽具有 RALF 家族典型保守的 4 个半胱氨酸、YIXY、YXRGC 以及 RCG 基序. *BoRALF_{A1}* 基因主要在花粉中表达. 同源序列分析表明该基因在芸薹属中高度保守, 表达模式一致, 推测 *BoRALF_{A1}* 蛋白可能在花粉发育和育性方面具有重要的功能.

关键词: 甘蓝; *BoRALF_{A1}* 基因; 同源基因; 序列分析; 表达分析

中图分类号: Q786; S635.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2020)11-0095-07

小分子分泌型多肽是重要的胞间信号分子, 广泛地参与调节植物生长发育、抗病和抗逆等生理过程^[1-2]. 快速碱化因子(Rapid alkalization factor, RALF)属于植物小分子多肽的一种, 最早是由 Pearce 等^[3]从烟草叶片提取物中发现, 该蛋白能引起烟草悬浮细胞的培养基快速碱化, 过表达时能抑制番茄和拟南芥根的生长和发育. 至今已在 51 种植物中鉴定出 795 个 RALF 基因^[4]. 研究表明烟草 *NaRALF* 基因沉默后主根更长且毛状体细胞发育成不正常的根毛^[5]. 蒺藜苜蓿根中过表达 *MtRALF1* 基因时结节发育不正常^[6]. 在细胞悬浮培养基中加入纯化的甘蔗 *SacRALF1* 蛋白能抑制愈伤组织细胞的延伸, 在培养基加入 *AtRALF1* 导致黑暗条件下萌发的拟南芥幼苗下胚轴伸长受到抑制, 幼苗放到没有 *AtRALF1* 的培养基时下胚轴的伸长得到恢复^[7]. 拟南芥中过表达 *AtRALK8* 基因可以显著增强植株抗干旱和线虫侵染的能力^[8]. 拟南芥 *AtRALF34* 调控中柱鞘形成细胞的分化进而影响侧根发育^[9]. 拟南芥 *AtS1P* 切割内源的 *AtRALF23* 以抑制植物免疫响应, 而 *AtFER* 可以促进配体诱导的 *AtEFR*, *AtFLS2* 和 *AtBAK1* 形成复合体进而激活免疫信号^[10].

在生殖发育方面, 人工合成的番茄 *SIPRALF* 蛋白能抑制花粉管的伸长, 但不影响花粉水化和花粉活力^[11]. 拟南芥 *AtRALF4* 可强烈抑制花粉萌发^[12]. 拟南芥花粉 *AtRALF4/19* 与 *BUPS1/2* 和 *ANX1/2* 形成复合体维持花粉管的完整性, 柱头 *AtRALF34* 与 *AtRALF4/19* 竞争性结合 *BUPS-ANX* 复合体, 在纳摩尔水平就可以引起花粉管破裂^[13]. Shi 等^[14]从白菜中鉴定出 38 个 RALF 基因, 有 14 个在核雄性不育和可育性材料间差异表达. 前期笔者通过甘蓝转录组测序从自交不亲和甘蓝“*A1*”花粉中获取了一个 RALF 基因的编码序列, 命名为 *BoRALF_{A1}*, 在甘蓝 02-12 系基因组 CDS 数据库(<http://brassicadb.org/brad/>)中检索不到同源序列. 本文从甘蓝“*A1*”克隆了 *BoRALF_{A1}* 的 CDS 序列, 进行了生物信息学分析, 对 *BoRALF_{A1}* 及其同源基因组织表达模式进行了分析, 以期为深入研究的 *BoRALF_{A1}* 基因的生物学术功能提供基础.

收稿日期: 2020-03-30

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(cstc2019cyj-msxmX0340); 大学生创新创业训练计划项目(201910635056).

作者简介: 高启国(1978-), 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究.

1 材料与方法

1.1 供试材料

甘蓝高度自交不亲和系“A1”种植在西南大学十字花科歇马实验基地隔离网内, 2019年3月底甘蓝花期, 采集开花当天且长势一致的柱头、花粉、萼片、花瓣和叶片, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

利用RNAprep Pure Plant kit(天根, 北京)提取RNA, 经琼脂糖电泳检测RNA的完整性, 用NanoVue Plus超微量分光光度计(Gen, 美国)测定RNA的浓度, 然后采用Primescript RT Reagent Kit(TaKaRa, 日本)进行反转录合成cDNA的第一条链, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。以叶片为材料, 利用Plant Genomic DNA Kit(天根, 北京)提取甘蓝基因组DNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2 引物设计和目的基因克隆

利用前期甘蓝转录组测序获得的*BoRALF_{A1}*序列在NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和BRAD(<http://brassicadb.org/brad/>)数据库进行BlastN检索, 依据检索结果用Primer Primer 5.0软件设计基因特异性引物RALF-1和RALF-2。RALF-1的序列为ATTAATAATAATATGGGGATGTCT-GAAAG, RALF-2的序列为TGGTACTCTACTTGGTCGATTCACA。以甘蓝花粉cDNA和基因组DNA为模板, 参照PrimerSTAR Max DNA polymerase说明书配制 $25\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系。PCR循环参数为: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变形 3 min ; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min 。PCR扩增产物经 1% 琼脂糖电泳, 回收目的条带送重庆擎科公司测序。

1.3 甘蓝*BoRALF_{A1}*基因生物信息学分析

利用在线软件MultAlin(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)进行cDNA和gDNA序列比对, 用DNASTAR软件推导*BoRALF_{A1}*基因编码的氨基酸序列及其理化性质。利用在线软件SOSUI(http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)分析蛋白的跨膜运域。利用在线软件SignalP-5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析信号肽序列, 利用在线Prosite(<https://prosite.expasy.org/>)分析蛋白活性位点。用BRAD在线数据库进行BlastN检索, 分析甘蓝02-12系基因组*BoRALF_{A1}*基因编码位点, 检索白菜、油菜、拟南芥和琴叶拟南芥基因组中高度同源序列。利用在线数据库Phytozome 12(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>)查找*Brassica oleracea capitata* V1.0基因组中同源序列。多序列比对利用MultAlin软件进行, 参照高启国等^[15]的方法利用MEGA软件并采用邻接法构建系统发育树。利用在线软件SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>), 以AtRALF8空间结构为模板, 构建甘蓝*BoRALF_{A1}*d的空间结构, 用DeepView软件查看和分析生成的空间结构。

1.4 甘蓝*BoRALF_{A1}*和白菜*Bra027081*基因表达分析

以*Ubiquitin*作为内参基因, RT-PCR分析甘蓝*BoRALF_{A1}*基因在柱头、花粉、萼片、花瓣和叶片5个组织的表达情况, PCR反应体系和循环参数参照1.2, 其中循环为30个。*Ubiquitin*基因的循环参照Gao等^[16]的方法, 循环数为22。基于Wang等^[17]对白菜Chiifu-401-42的愈伤组织、根、茎、叶、花和果荚6个组织的转录组分析, 从GEO数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载转录组分析结果(收录号: GSE43245), 利用FPKM值绘制白菜*Bra027081*基因在6个组织中表达的柱形图。

2 结果与分析

2.1 甘蓝*BoRALF_{A1}*基因序列与编码位点分析

依据前期转录组测序结果设计特异引物RALF-1和RALF-2, 从自交不亲和甘蓝“A1”花粉cDNA和基因组DNA中扩增其cDNA和gDNA序列。测序后序列比对分析表明, *BoRALF_{A1}*基因没有内含子, 其全长CDS为 240 bp , 共编码79个氨基酸, 理论分子量为 8.73 kD , 等电点为 7.80 , 其中包含9个碱性氨基酸残基(K和R)、8个酸性氨基酸残基(D和E)、25个疏水性氨基酸残基(A, I, L, E, W和N)和23个极性氨基酸残基(N, C, Q, S, T和Y)(图1)。

在线软件SOSUI分析表明, *BoRALF_{A1}*蛋白包含1个跨膜结构域, 其序列为第4位丝氨酸位到第25位谷氨酰胺。在线软件SignalP-5.0分析表明, *BoRALF_{A1}*蛋白具有一个N-端信号肽, 可信值达 0.992

7, 最可能的前体蛋白剪切位点为第 28 位丝氨酸和第 29 位精氨酸之间。通过在线 PROSITE 分析发现: *BoRALF_{A1}* 蛋白含有 1 个 N-端豆蔻酰基化位点, 位于第 2 到第 7 位氨基酸; 2 个蛋白激酶(PKC)磷酸化位点, 分别位于第 6 到第 8 位氨基酸以及第 51 到第 53 位氨基酸; 1 个酪蛋白激酶 2(CK2)磷酸化位点, 位于第 24 到第 27 位氨基酸; 1 个酪氨酸激酶(TYP)磷酸化位点, 位于第 53 到第 60 位氨基酸。

ATTAATAATAATATGGGGATGTCTGAAAGTATCAAGTTATTGTCTCTCTTCTTCTGTGGTGTATTGGCTCTTGCAGCAACTCAGACAGA
 M G M S E S I K V I V S L F L V V L L A L A A T Q T E
 GTCAAGATACATAAAATTATCATGCCCTTCATGGAGATCACAGTTTGATTGTGTATAAGCGAACCAAGCACCTGCAAGAAGGAAGAAGCCA
 S R Y I N Y H A L H G D H S L I C D K A N P S T C K K E E A
 ATCCTTATACAGAGGATGCGAGATAATCGATCGTTGTCTGTGTCATCTAGGCCAAAAATGGAATCGACCAAGTAGAGTACCA
 N P Y T R G C E I I D R C R G Q S L G P K M .

单划部分为引物 RALF-1 和 RALF-2 序列, 双下划线部分为信号肽序列。

图 1 甘蓝 *BoRALF_{A1}* 基因的 cDNA 及其推导的氨基酸序列

利用 *BoRALF_{A1}* 基因序列在甘蓝 02-12 系基因组数据库进行 BlastN 检索, 发现该基因定位在 C09 号染色体上, 且在该染色体长度为 14 134 bp 的片段上存在 6 个 *BoRALF_{A1}* 基因的完整编码框串联排列, 分别位于 C09: 34543886..34544125, C09: 34546665..34546904, C09: 34549444..34549683, C09: 34552223..34552462, C09: 34555002..34555241 和 C09: 34557781..34558020, 多序列比对表明 6 个位点编码的序列与甘蓝“*A1*”中 *BoRALF_{A1}* 基因序列完全一致, 没有核苷酸差异(图 2)。

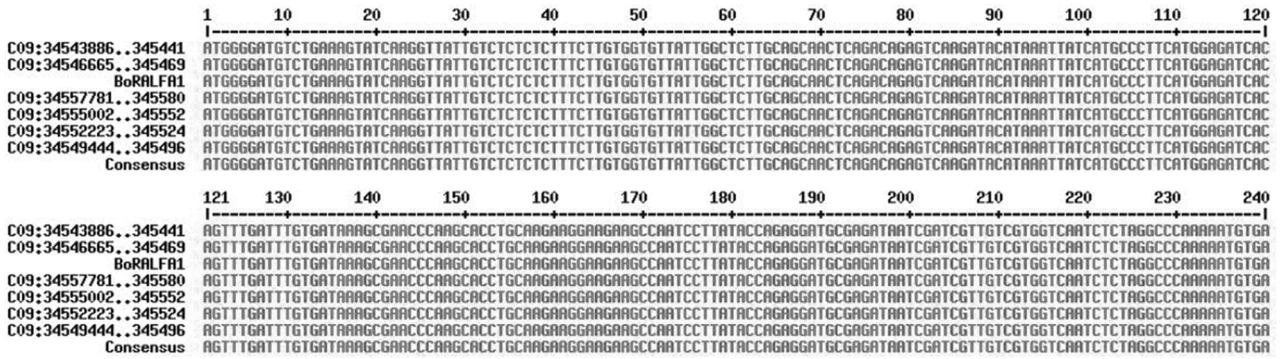


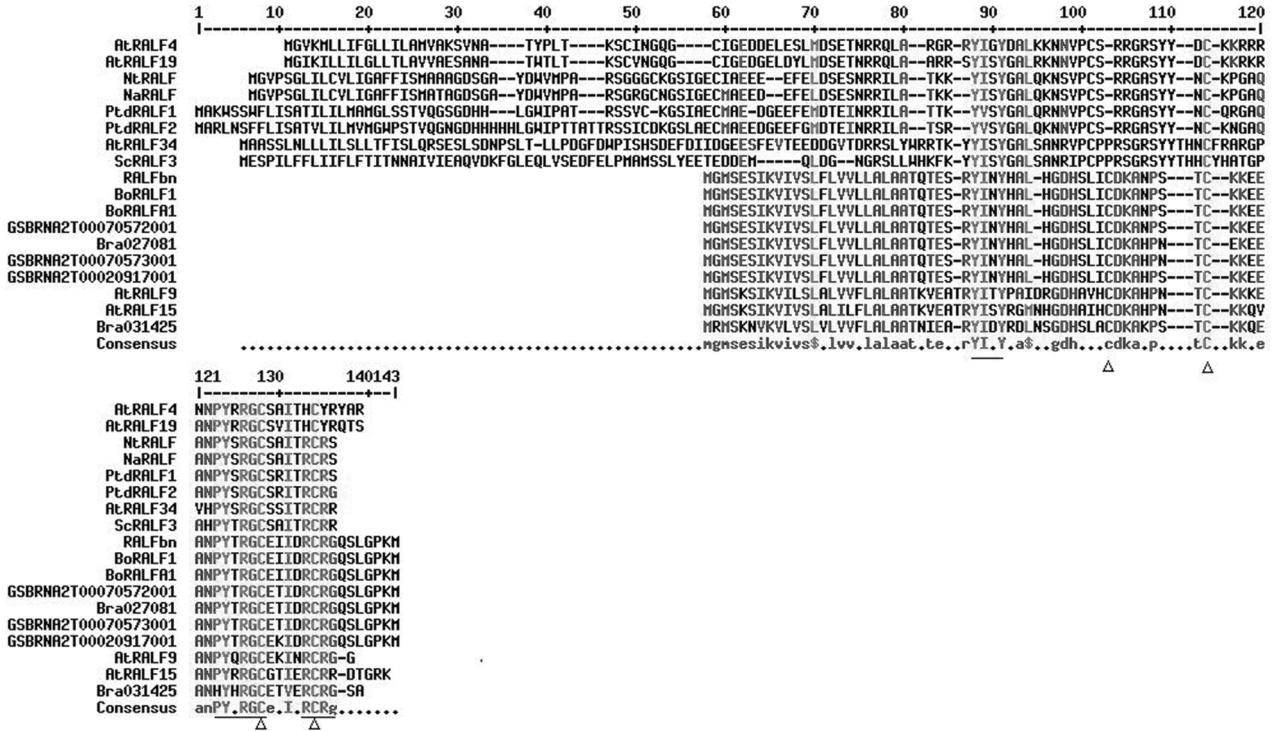
图 2 甘蓝 *BoRALF_{A1}* 基因 gDNA 和甘蓝 02-12 系 6 个编码位点多序列比对

2.2 甘蓝 *BoRALF_{A1}* 同源基因分析

利用甘蓝 *BoRALF_{A1}* 基因 cDNA 序列在芸薹属基因组 CDS 数据库进行 BlastN 检索, 结果显示甘蓝 02-12 系基因组中没有注释的相似序列。白菜 Chiifu-401-42 基因组中 *Bra027081* 基因与 *BoRALF_{A1}* 的一致性最高, 为 97%。油菜中有 3 个基因 *GSBRNA2T00070572001*, *GSBRNA2T00020917001* 和 *GSBRNA2T00070573001*, 均与 *BoRALF_{A1}* 的一致性较高, 分别为 99%, 98% 和 97%。在 NCBI 数据库检索结果表明, *BoRALF_{A1}* 基因 cDNA 与已报到的油菜 *RALFbn* 基因(GeneBank 登录号: KC149515)和青花菜 *BoRALF1* 基因(GeneBank 登录号: DQO59310)完全一致。在拟南芥基因组数据库中检索发现 *BoRALF_{A1}* 与 *AtRALF9* 和 *AtRALF15* 的相似性较高, 分别为 77% 和 75%。下载已完成功能分析的拟南芥 *AtRALF4*, *AtRALF19* 和 *AtRALF34*, 烟草 *NaRALF* 和 *NtRALF*, 马铃薯 *ScRALF3* 以及杨树 *PtdRALF1* 和 *PtdRALF2* 的蛋白序列, 进行多序列比对, 结果见图 3。甘蓝 *BoRALF_{A1}* 与油菜 *RALFbn* 和 *GSBRNA2T00070572001*、青花菜 *BoRALF1* 氨基酸序列完全一致, 与上述已进行功能研究的 8 个 *RALF* 蛋白相比, *BoRALF_{A1}* 及其高度同源氨基酸序列的 N-端明显较短, 且缺少 N-保守的 RRXL 基序^[18]。在所有的氨基酸序列中 C-端序列的相似性较高, 有 4 个高度保守的半胱氨酸、3 个高度保守的基序(分别为 YIXY, YXRGC 以及 RCG)。

利用 *BoRALF_{A1}* 氨基酸序列在琴叶拟南芥基因数据库中进行 BlastP 检索, 结果显示 scaffold_200432.1 和 scaffold_200431.1 与 *BoRALF_{A1}* 一致性最高, 分别为 69% 和 65%。在甘蓝 *Brassica oleracea capitata* V1.0 基因组数据库中进行 BlastP 检索, 结果显示 Bo2g011740 与 *BoRALF_{A1}* 蛋白序列相似性最

高为 58%。将来自甘蓝、白菜、油菜、拟南芥和琴叶拟南芥中与 BoRALF_{A1} 相似性较高及其上述已进行功能研究的 23 个 RALF 蛋白序列构建系统发育树(图 4)。结果显示,共形成了 2 个主要分支,分支 A 和 B。其中甘蓝的 BoRALF_{A1} 与来自青花菜、白菜和油菜 3 个物种的 5 个高度相似性的基因聚合在分支 A2 中,表明该基因的分化可能早于物种的分化。已完成功能研究来自拟南芥、烟草、杨树和马铃薯的 7 个基因聚合在分支 B 中,与 BoRALF_{A1} 的遗传关系较远。



三角形指示保守的半胱氨酸残基,方框内为保守的 RRXL 基序、下划线表示保守的 YIXY、PYXRGC 和 RCG 基序; NaRALF 和 NtRALF 的 Genbank 登录号分别 AY456269 和 AF407278, ScRALF3 的为 AY422826, PtdRALF1 和 PtdRALF2 的为 AY172330 和 AY172331。

图 3 甘蓝 BoRALF_{A1} 与其他物种 RALF 蛋白氨基酸序列对比

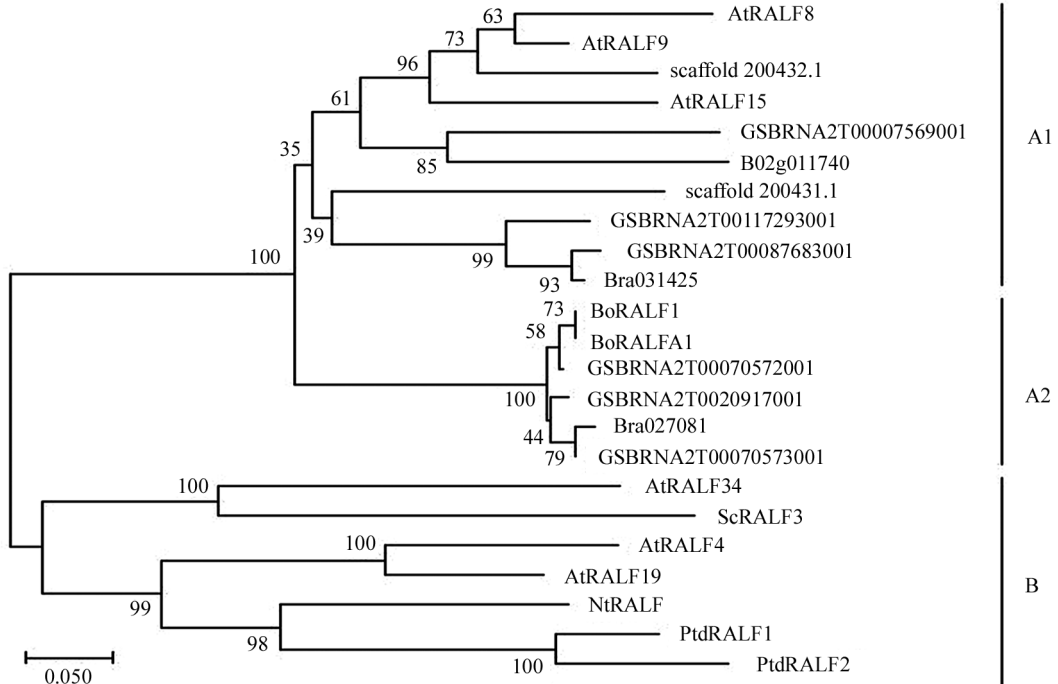


图 4 甘蓝 BoRALF_{A1} 与其他物种 RALF 蛋白氨基酸序列系统进化树

2.3 甘蓝 *BoRALF_{A1}* 和白菜 *Bra027081* 基因表达分析

为了进一步确认 *BoRALF_{A1}* 基因在甘蓝中的表达情况, 分别提取了甘蓝“*A1*”开花当天柱头、花粉、萼片、花瓣和叶片的总 RNA, 然后进行 RT-PCR 分析. 产物的凝胶电泳结果表明 *BoRALF_{A1}* 基因在甘蓝“*A1*”花粉中表达量较高, 在柱头和花萼中表达量较低, 在花瓣中表达量极低, 在叶片中几乎没有表达(图 5a). 甘蓝 *BoRALF_{A1}* 基因与白菜 *Bra027081* 基因相似度达 97%, 系统进化分析表明两者在进化上高度保守. Wang 等^[17] 2011 年进行了白菜 Chiifu-401-42 的愈伤组织、根、茎、叶、花和果荚 6 个组织的转录组分析, 笔者从 GEO 数据库下载其转录组结果, 从中分析 *Bra027081* 基因在 6 个组织表达情况, 结果表明 *Bra027081* 基因主要在花中表达(图 5b). 拟南芥中 *AtRALF9* 与 *BoRALF_{A1}* 基因相似性最高, 笔者利用 TRAVA 网站分析发现 *AtRALF9* 基因也主要是在花粉中表达.

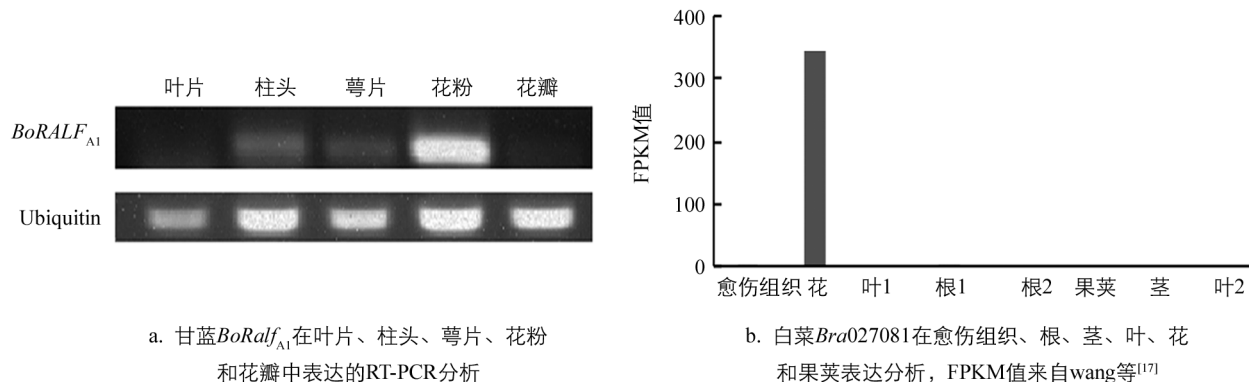
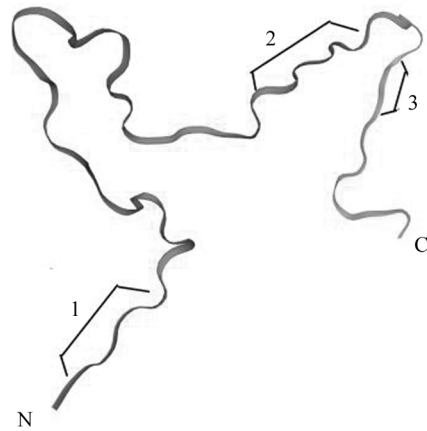


图 5 甘蓝 *BoRALF_{A1}* 和白菜 *Bra027081* 基因表达分析

2.4 甘蓝 *BoRALF_{A1}* 蛋白空间结构分析

利用在线软件 GOR 分析表明, *BoRALF_{A1}* 蛋白的二级结构由 37.97% 的 α -螺旋(30 个氨基酸)、45.57% 的无规卷曲(36 个氨基酸)和 16.46% 的延伸主链(13 个氨基酸)组成. Frederick 等^[19] 分析了 *AtRALF8* 蛋白的三维空间结构. *BoRALF_{A1}* 和 *AtRALF8* 氨基酸序列长度仅存在 1 对氨基酸差异, 分别为 79 和 80 个氨基酸, 两者全长一致性为 59%. 利用在线软件 SWISS-MODEL, 以 *AtRALF8* 为模板生成 *BoRALF_{A1}* 三维结构. 其包含了 *BoRALF_{A1}* 成熟肽全部序列, 空间上类似于大写字母“M”, 序列上高度保守的基序 YIXY 位于 N-端起始位置, 裸露于外面, YXRGC 和 RCG 基序分别位于靠近 C 端“M”顶角的内外两侧, N-端 YIXY 基序是 RALF 蛋白与受体结合的核心功能域, C-端可以增强 N 的活力^[20-21](图 6).



1, 2 和 3 分别代表保守的 YIXY, YXRGC 和 RCG 基序.

图 6 甘蓝 *BoRALF_{A1}* 蛋白空间结构

3 结论与讨论

RALF 蛋白作为重要的胞间信号因子广泛参与植物的多种生理过程. 然而至今关于甘蓝 RALF 蛋白还鲜有报道. 本文从甘蓝“*A1*”材料中克隆的 1 个 RALF 蛋白编码基因, 命名为 *BoRALF_{A1}*, 其全长 CDS 为 240 bp, 编码 79 个氨基酸, 包含 1 个信号肽和 5 个翻译后修饰位点. 在甘蓝 02-12 系基因组 C09 号染色体上存在 6 个串联重复编码位点. 序列比对表明 *BoRALF_{A1}* 具有 RALF 蛋白家族典型保守基序^[4], 包含 4 个保守的半胱氨酸残基、N-端 YIXY 基序、C-端 YXRGC 和 RCG 基序. 与已经功能鉴定的拟南芥 *AtRALF4*, *AtRALF19* 和 *AtRALF34*^[13], 烟草 *NaRALF* 和 *NtRALF*^[3-5], 及杨树 *PtdRALF1* 和 *PtdRALF2*^[22] 的氨基酸序列相比, *BoRALF_{A1}* 蛋白 N-端明显较短, 且缺失保守的 RRXL 基序, 该基序是 RALF 前体蛋白加工过程中丝氨酸蛋白酶 *AtSIP1* 的识别位点^[18, 23], 由此推测 *BoRALF_{A1}* 可能存在不同的加工过程.

甘蓝 *BoRALF_{A1}* 与白菜 *Bra027081*、油菜 *RALFbn* 和青花菜 *BoRALF1* 序列高度一致且在进化上高

度保守,表明它们可能具有相似的生物学功能.李焰焰等^[24]分析表明油菜 *RALFbn* 主要在雄蕊中表达,而在雌蕊、花瓣和萼片中没有表达.Zhang 等^[25]从青花菜中克隆了 *BoRALF1* 基因,发现其主要在花粉中表达.Wang 等^[17]转录组分析显示白菜 *Bra027081* 主要在花中表达,Shi 等^[14]进一步分析表明白菜 *Bra027081* 在可育材料花蕾中大量表达,在核雄性不育材料花蕾中不表达.本文结果显示甘蓝 *BoRALF_{A1}* 主要在花粉中表达.因此推测 *BoRALF_{A1}* 可能在花粉发育和育性方面具有重要的功能.*BoRALF_{A1}* 蛋白具有保守的 N-端 YIXY 基序,在三维空间结构上裸露于表面.研究表明 YIXY 基序是 RALF 蛋白与受体结合的核心功能域^[20-21].在已经鉴定的与生殖有关的 RALF 蛋白中,AtRALF4/19 与 BUPS-ANX 受体复合体结合维持花粉管的完整性,AtRALF34 与 AtRALF4/19 竞争性结合 BUPS-ANX 复合体,致使花粉管破裂^[13-26].先前研究显示拟南芥 FERONIA (FER)与 AtRALF1 作用调控主根细胞伸长,与 AtxRALF23 作用调控植物免疫反应^[10-27],最新研究表明 AtRALF1-FER 调控拟南芥的开花时间^[28].因此,接下来工作的重点是进一步明确 *BoRALF_{A1}* 蛋白的功能,分离其互作蛋白并探究其作用机理.

参考文献:

- [1] MURPHY E, SMITH S, DE SMET I. Small Signaling Peptides in Arabidopsis Development: How Cells Communicate over a Short Distance [J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(8): 3198-3217.
- [2] CZYZEWICZ N, YUE K, BEECKMAN T, et al. Message in a Bottle: Small Signalling Peptide Outputs during Growth and Development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(17): 5281-5296.
- [3] PEARCE G, MOURA D S, STRATMANN J, et al. RALF, a 5-kDa Ubiquitous Polypeptide in Plants, Arrests Root Growth and Development [J]. *PNAS*, 2001, 98(22): 12843-12847.
- [4] CAMPBELL L, TURNER S R. A Comprehensive Analysis of RALF Proteins in Green Plants Suggests there are Two Distinct Functional Groups [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 37. DOI: 10. 3389/fpls. 2017. 00037.
- [5] WU J S, KURTEN E L, MONSHAUSEN G, et al. NaRALF, a Peptide Signal Essential for the Regulation of Root Hair Tip Apoplastic pH in *Nicotiana attenuata*, is Required for Root Hair Development and Plant Growth in Native Soils [J]. *The Plant Journal*, 2007, 52(5): 877-890.
- [6] COMBIER J P, KÜSTER H, JOURNET E P, et al. Evidence for the Involvement in Nodulation of the Two Small Putative Regulatory Peptide-Encoding Genes MtRALFL1 and MtDVL1 [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], 2008, 21(8): 1118-1127.
- [7] MINGOSSI F B, MATOS J L, RIZZATO A P, et al. SacRALF1, a Peptide Signal from the Grass Sugarcane (*Saccharum SPP.*), is Potentially Involved in the Regulation of Tissue Expansion [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 73(3): 271-281.
- [8] ATKINSON N J, LILLEY C J, URWIN P E. Identification of Genes Involved in the Response of *Arabidopsis* to Simultaneous Biotic and Abiotic Stresses [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(4): 2028-2041.
- [9] MURPHY E, VU L D, VAN DEN BROECK L, et al. RALFL34 Regulates Formative Cell Divisions in *Arabidopsis* Pericycle during Lateral Root Initiation [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(16): 4863-4875.
- [10] STEGMANN M, MONAGHAN J, SMAKOWSKA-LUZAN E, et al. The Receptor Kinase FER is a RALF-regulated Scaffold Controlling Plant Immune Signaling [J]. *Science*, 2017, 355(6322): 287-289.
- [11] COVEY P A, SUBBIAH C C, PARSONS R L, et al. A Pollen-specific RALF from Tomato that Regulates Pollen Tube Elongation [J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(2): 703-715.
- [12] MORATO DO CANTO A, CECILIATO P H O, RIBEIRO B, et al. Biological Activity of Nine Recombinant AtRALF Peptides: Implications for Their Perception and Function in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 75: 45-54.
- [13] GE Z X, BERGONCI T, ZHAO Y L, et al. *Arabidopsis* Pollen Tube Integrity and Sperm Release are Regulated by RALF-mediated Signaling [J]. *Science*, 2017, 358(6370): 1596-1600.
- [14] SHI F Y, ZHOU X, LIU Z Y, et al. Rapid Alkalinization Factor (RALF) Genes are Related to Genic Male Sterility in Chinese Cabbage (*Brassica rapa L. SSP. pekinensis*) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 225: 480-489.
- [15] 高启国, 雷镇泽, 梁云飞, 等. 基于家族基因分析的甘蓝 MLPK 互作 PUB 蛋白的筛选 [J]. *园艺学报*, 2019, 46(4): 714-722.
- [16] GAO Q G, SHI S M, LIU Y D, et al. Identification of a Novel MLPK Homologous Gene *MLPKn1* and Its Expression

- Analysis in *Brassica oleracea* [J]. *Plant Reproduction*, 2016, 29(3): 239-250.
- [17] WANG X, WANG H, WANG J, et al. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa* [J]. *Nat Genet*, 2011, 43: 1035-1039.
- [18] SHARMA A, HUSSAIN A, MUN B G, et al. Comprehensive Analysis of Plant Rapid Alkalinization Factor (RALF) Genes [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 106: 82-90.
- [19] FREDERICK R O, HARUTA M, TONELLI M, et al. Function and Solution Structure of the *Arabidopsis thaliana* RALF₈ Peptide [J]. *Protein Science*, 2019, 28(6): 1115-1126.
- [20] PEARCE G, YAMAGUCHI Y, MUNSKÉ G, et al. Structure-Activity Studies of RALF, Rapid Alkalinization Factor, Reveal an Essential-YISY-Motif [J]. *Peptides*, 2010, 31(11): 1973-1977.
- [21] XIAO Y, STEGMANN M, HAN Z F, et al. Mechanisms of RALF Peptide Perception by a Heterotypic Receptor Complex [J]. *Nature*, 2019, 572(7768): 270-274.
- [22] HARUTA M, CONSTABEL C P. Rapid Alkalinization Factors in Poplar Cell Cultures. Peptide Isolation, cDNA Cloning, and Differential Expression in Leaves and Methyl Jasmonate-Treated Cells [J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(2): 814-823.
- [23] SRIVASTAVA R, LIU J X, GUO H Q, et al. Regulation and Processing of a Plant Peptide Hormone, AtRALF23, in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2009, 59(6): 930-939.
- [24] 李焰焰, 刘瑞娇, 范亚丽, 等. 油菜花粉发育相关基因 *RALFbn* 的克隆与表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2013, 33(2): 235-239.
- [25] ZHANG G Y, WU J, WANG X W. Cloning and Expression Analysis of a Pollen Preferential Rapid Alkalinization Factor Gene, *BoRALF1*, from Broccoli Flowers [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(7): 3273-3281.
- [26] MECCHIA M A, SANTOS-FERNANDEZ G, DUSS N N, et al. RALF4/19 Peptides Interact with LRX Proteins to Control Pollen Tube Growth in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2017, 358(6370): 1600-1603.
- [27] HARUTA M, SABAT G, STECKER K, et al. A Peptide Hormone and Its Receptor Protein Kinase Regulate Plant Cell Expansion [J]. *Science*, 2014, 343(6169): 408-411.
- [28] WANG L, YANG T, LIN Q L, et al. Receptor Kinase FERONIA Regulates Flowering Time in *Arabidopsis* [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 26.

Cloning and Expression Analysis of *BoRALF_{A1}* Gene in *Brassica oleracea*

GAO Qi-guo, LI Shuai, YAO Zhi-guang, LIANG Xiao

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715, China

Abstract: A rapid alkalinization factor (RALF) gene, named as *BoRALF_{A1}*, has been cloned from the self-incompatible 'A1' line of *Brassica oleracea* based on our former transcriptome analysis result. *BoRALF_{A1}* has no intron, its full length of CDS is 240 bp, encoding 79 amino acids. It contains 1 signaling peptide and 5 post-translational modification sites. The mature *BoRALF_{A1}* peptide comprises four highly conserved cysteine residues characteristic of the RALF family, a conservative YIXY motif, a YXRGC motif and a RCG motif. *BoRALF_{A1}* gene is mainly expressed in pollen. Homologous sequence analysis shows that their sequences are highly conserved in *Brassica* species, and their expression patterns are identical. It is speculated that *BoRALF_{A1}* protein may function in pollen development and pollen fertility.

Key words: *Brassica oleracea*; *BoRALF_{A1}*; homologous gene; sequence analysis; expression analysis