

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.51068

大麦亮氨酸富集重复型类受体激酶基因 *HvLRR-RLK-510* 的克隆和表达分析

余开航** 周洪斌** 罗亮扎 王玫邴 姜瑞梅 董陈文华 李仕金
毛孝强 陈升位*

云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201

摘要: 解析亮氨酸富集重复型类受体激酶(leucine rich repeat receptor-like kinase, LRR-RLK)基因的功能和作用机制有利于揭示大麦发育和胁迫响应的分子机制。本研究以北青 7 号、Ynbs 突变体和 Morex 等 8 个大麦品种(或品系)为材料, 克隆了 *HvLRR-RLK-510* 基因的 2904 bp CDS 序列。8 个材料 *HvLRR-RLK-510* 基因的 CDS 序列和编码蛋白氨基酸序列的相似性均高于 99.00%。该蛋白具有亮氨酸富集重复结构域、跨膜结构域和激酶结构域等 LRR-RLK 的关键结构域, 与小麦、水稻和拟南芥等作物 LRR-RLK 聚为 1 个亚类。RT-PCR 检测和荧光定量检测结果表明, 该基因在 8 个材料拔节期幼穗、叶鞘、叶、根和茎中差异表达, 具有器官特异性和基因型依赖性, 在幼穗中的表达更高效、基因型依赖性更低; 亚细胞定位结果表明, 编码蛋白位于本氏烟草叶细胞的细胞膜和液泡膜上。本研究为全面解析大麦 *HvLRR-RLK-510* 基因的功能和作用机制提供了基因资源和理论支持。

关键词: 大麦; 亮氨酸富集重复型类受体激酶; 基因克隆; 亚细胞定位; 表达特性

Cloning and expression analysis of the *HvLRR-RLK-510* gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase in barley

Yu Kai-Hang**, Zhou Hong-Bin**, Luo Liang-Zha, Wang Mei-Li, Jiang Rui-Mei, Dong-Chen Wen-Hua, Li Shi-Jin, Mao Xiao-Qiang, and Chen Sheng-Wei*

College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China

Abstract: Elucidating the function and regulatory mechanisms of LRR-RLK (leucine-rich repeat receptor-like kinase) genes is essential for understanding the developmental processes and stress responses in barley. In this study, eight barley varieties or lines, including Beiqing 7, the Ynbs mutant, and Morex, were used as experimental materials. A 2904 bp coding sequence (CDS) of the *HvLRR-RLK-510* gene was successfully cloned. The CDS and corresponding amino acid sequences of *HvLRR-RLK-510* all showed over 99.00% similarity, across the eight genotypes. The encoded protein contains key conserved domains typical of LRR-RLKs, including leucine-rich repeat domains, transmembrane regions, and a kinase domain. Phylogenetic analysis grouped this protein into a subclass shared with LRR-RLKs from wheat, rice, and *Arabidopsis*. RT-PCR and quantitative real-time PCR analyses revealed that *HvLRR-RLK-510* was differentially expressed in young spikes, leaf sheaths, leaves, roots, and stems of the above-mentioned eight materials at the jointing stage, exhibiting both organ specificity and genotype dependence. Notably, expression in young spikes was consistently higher and less affected by genotype. Subcellular localization experiments showed that the protein is localized to the plasma membrane and vacuolar membrane in *Nicotiana benthamiana* leaf cells. This study provides a valuable gene resource and theoretical foundation for further investigation into the functional roles and molecular mechanisms of *HvLRR-RLK-510* in barley.

Keywords: barley; LRR-RLK; gene clone; subcellular localization; expression characteristics

本研究由国家自然科学基金项目(32360469)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (32360469).

* 通信作者(Corresponding author): 陈升位, E-mail: ynkmsw@ynau.edu.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 余开航, E-mail: ynau_ykh@163.com; 周洪斌, E-mail: 2021210133@stu.ynau.edu.cn

Received (收稿日期): 2025-07-21; Accepted (接受日期): 2025-10-30; Published online (网络出版日期): 2025-11-13.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.s.20251112.1139.003>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

亮氨酸富集重复型类受体激酶(leucine rich repeat receptor-like kinase, LRR-RLK)是数量较多的植物类受体激酶(receptor-like kinase, RLK),具有胞外域、跨膜域和胞内激酶域 3 个关键结构域^[1]。胞内激酶域高度保守,含有 250~300 个氨基酸残基,15 个保守氨基酸分布在 11~12 个保守亚区^[2-5]。跨膜结构域连接胞外域和激酶域,约含 17~28 个保守氨基酸残基^[6-7]。胞外域携带富含亮氨酸的串联重复保守基序 LXXLXLXXNXL^[6,8](L 代表亮氨酸残基, X 代表任意氨基酸)。大多数 LRR 基序携带大约 22~24 个氨基酸,可重复 1~51 次^[2,9],由 1 α 螺旋、 β 折叠和连接环构成^[4,8]。多个 LRR 基序围绕 1 个轴平行排列,可组成 1 个马蹄状的非球形结构^[4]。

胞外域与配体结合后 LRR-RLK 可通过受体磷酸化或去磷酸化传递信号,进而调节植物生长发育或信号响应^[10]。拟南芥 LRR-RLK 家族成员基因 *CVL1*^[11-14]及其水稻同源基因 *FON1*^[15-16]编码蛋白通过磷酸化过程发挥作用,突变后可导致花器官改变、穗(或茎)分枝和颖果增加。与 *CVL1* 相反,拟南芥 LRR-RLK 家族基因编码蛋白 *BRI1* 通过去磷酸化激活油菜素甾醇(brassinosteroid, BR)信号通路发挥作用^[17]。除上述作用方式外,已报道的 LRR-RLK 家族基因大多具有一因多效特性,如水稻 LRR-RLK 家族基因 *COE1* 突变后会导致植株矮化、花序减少、结实率下降^[18]。由于表达的时空特性、胞外域的结构差异及配体和互作蛋白差异,大多数 LRR-RLK 的生物学功能和作用机制不同。

截至目前,已鉴定了拟南芥^[19]、短柄草^[20]和水稻^[21]等 10 多种植物全基因组的 LRR-RLK 家族基因。其中,大豆 LRR-RLK 家族基因最多^[22](467 个)、草莓的最少(201 个)^[23]。在不同植物中鉴定的 LRR-RLK 家族基因分布在对应植物的所有染色体上,但其染色体分布高度不均^[19-21]。在大多数植物中 LRR-RLK 家族基因大多分布在染色体近末端区域^[24]。根据编码蛋白胞外域、跨膜结构域和胞内激酶域的结构特性,已将所鉴定的 LRR-RLK 家族基因分为 12 个亚家族^[24]。不同亚家族基因编码蛋白胞外域的 LRR 数量和位置不同,但胞内激酶域差异较小。胞外域 LRR 的结构差异决定了 LRR-RLK 与配体的不同结合特性^[25]。

大麦幼穗发育受转录因子基因、激素合成与转运基因、黄酮类化合物代谢酶基因等多基因互作调控^[26]。类受体蛋白激酶,如 LRR-RLK 可通过磷酸化

或去磷酸化调节上述幼穗发育基因编码蛋白活性,因此鉴定幼穗发育进程中 LRR-RLK 家族基因并解析其功能和作用机制,有助于大麦穗发育机制解析和分子育种设计。基于 Ynbs 突变体与保大麦 8 号的杂交 F₂ 和 F_{5,6} 群体, Zhou 等^[27]、Wang 等^[28]和王新天等^[29]将大麦穗分枝、多联小穗退化和小穗小花数等性状的基因位点定位在 HvSSR4 和 HvSSR20 标记间,该区间携带 *HORVU.MOREX.r3.2HG0114510* 基因。GO 注释结果表明 *HORVU.MOREX.r3.2HG0114510* 属 LRR-RLK 家族,可调控穗发育^[27-29],并将其暂时命名为 *HvLRR-RLK-510*。董陈文华等^[30]发现 *HvLRR-RLK-510* 启动子携带茉莉酸、脱落酸和光响应元件及干旱和低温胁迫的响应元件(已在线发表)。基于前人研究结果,作者推测该基因可能是大麦穗发育和非生物胁迫的调控基因。因此,本研究拟分离、克隆 *HvLRR-RLK-510* 基因,分析该基因的表达特性及其编码蛋白的结构特性、系统发生关系,以期为 *HvLRR-RLK-510* 基因的功能和作用机制解析、编码蛋白配体鉴定等研究提供基因资源和理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料包括北青 7 号、Ynbs 突变体、Bowman、Morex、Prbs 突变体、保大麦 8 号、Golden promise 和云南黑大麦。北青 7 号由云南省迪庆州农业科学研究所提供; Ynbs 突变体是课题组创制的高世代(M₁₂代)穗分枝突变体;保大麦 8 号由云南省保山市农业科学研究所提供;云南黑大麦由云南省农业科学院粮食作物研究所提供;其余材料均由浙江省农业科学院国家大麦改良中心提供。所有材料均为遗传稳定品种或品系,由课题组繁殖和保存。

1.2 方法

1.2.1 材料种植 试验大麦材料均种植于云南农业大学昆明市盘龙区教学试验农场。于 2023 年 11 月上旬播种,每个材料种植 5 行,每行 20 株,株距 5 cm,行距 25 cm。其他管理措施同常规大田生产。

1.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成 参照王梦玥等^[31]的方法提取并检测试验材料叶、茎、幼穗、根和叶鞘的总 RNA,采用 His III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(诺唯赞,南京)和 HisScript III RT Super Mix for qPCR 试剂盒(诺唯赞,南京)合成 cDNA,置于 -20℃ 保存备用。

1.2.3 特异性 PCR 扩增引物设计 从大麦基因组 Ensembl (https://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/Info/Index)数据库下载 *HvLRR-RLK-510* 基因的 CDS 序列, 采用 Bio XM 及 Primer premier 5.0 软件设计 *HvLRR-RLK-510* 基因 CDS 序列的克隆、RT-PCR 和 qRT-PCR 引物(表 1)。利用 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线软件 primer-BLAST 验证所设计引物的特异性。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成所需引物。

1.2.4 *HvLRR-RLK-510* 基因的 CDS 序列克隆 以

北青 7 号、Ynbs 突变体和 Bowman 等 8 个材料的 cDNA 为模板, 采用 *HvLRR-RLK510*-F/R (表 1)引物, 以大肠杆菌 Trans1-T1 菌株为宿主, 参照王梦玥等^[31]报道的 PCR 扩增(退火温度 58℃, 延伸时间 15 s, 35 个循环)、重组子构建、遗传转化和阳性克隆筛选等方法, 扩增、克隆并测序验证 8 个材料 *HvLRR-RLK-510* 基因 CDS 序列。采用 StarPrep Plasmid Miniprep Kit 试剂盒(康润生物, 北京)提取阳性菌液质粒, 于 -20℃ 保存。采用 SnapGene 软件和 DNAMAN 软件分别预测、比对氨基酸序列。

表 1 所使用引物的编号、序列和用途
Table 1 Number, sequence, and usage of primers used in the study

引物编号 Primer number	引物序列 Primer sequence (5'-3')	引物用途 Primer usage
<i>HvLRR-RLK510</i> -F	ATGACTCCCCTGCTCCCCCTCC	基因克隆 Gene clone
<i>HvLRR-RLK510</i> -R	TCACGCACCAAGAGGTTCTTCTC	
q <i>HvLRR-RLK510</i> -F	GCGTCACTCGCTGATTGTGTC	RT-PCR 和 qRT-PCR 检测
q <i>HvLRR-RLK510</i> -R	AAGGTCGAGCTGTGTAAGCC	RT-PCR and qRT-PCR detection
HvActin-F	GGTCCATCCTAGCCTCACTC	RT-PCR 和 qRT-PCR 检测
HvActin-R	GATAACAGCAGTGGAGCGCT	RT-PCR and qRT-PCR detection
Hg-F	GCTCCACCATGTTGGCAAGC	农杆菌阳性克隆鉴定
Hg <i>HvLRR-RLK510</i> -R	GCCTTTCGAAACAGAAAAATTGCTT	Identification of agrobacterium positive clone
M13-F	GAGGAAACAGCTATGAC	大肠杆菌阳性克隆鉴定
M13-R	ACTGGCCGTCGTTTTAC	Identification of agrobacterium positive clone
BS-F	TTCATTTGGAGAGAACACGGGGGAC	亚细胞定位 Subcellular localization
BS- <i>HvLRR-RLK510</i> -R	CGGTATCTGGCCGACGAG	

1.2.5 *HvLRR-RLK-510* 基因的生物信息分析 采用 Bio XM 软件, 基于北青 7 号突变体的 *HvLRR-RLK-510* 基因 CDS 序列预测其编码蛋白的氨基酸序列。利用在线软件 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)预测 *HvLRR-RLK-510* 编码蛋白的保守结构域。利用在线软件 SOPMA (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)和 Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)分别预测 *HvLRR-RLK510* 蛋白的三级结构。采用 NCBI-Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线软件收集不同物种的 *HvLRR-RLK-510* 同源基因编码蛋白的氨基酸序列, 采用 DNAMAN 软件比对不同基因编码蛋白的氨基酸序列, 基于 Neighbor-Joining 分析不同蛋白的进化关系, 采用 MEGA11 软件绘制系统发生树。

1.2.6 *HvLRR-RLK-510* 基因的表达特性分析 以大麦 *HVActin* 基因为内参, 参照王梦玥等^[31]报道的

RT-PCR (退火温度 58℃, 延伸时间 5 min, 35 个循环)和 qRT-PCR 方法(退火温度 60℃, 延伸时间 30 s, 40 个循环), 检测北青 7 号、Ynbs 突变体和 Bowman 等 8 个材料拔节期根、茎、叶、叶鞘和幼穗的 *HvLRR-RLK-510* 表达量。每个样品重复 3 次, 基于 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量。以 4 个材料茎的 ΔCt 均值为对照计算 5 种器官 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量, 分别以北青 7 号各器官的 ΔCt 均值为对照计算不同材料对应器官 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量。采用 SPSS20.0 软件的方差分析模块分析数据, 显著和极显著水平分别为 5%和 1%。采用 Graphprism 软件绘图。

1.2.7 *HvLRR-RLK-510* 基因编码蛋白的亚细胞定位 以 1.2.4 中获得的北青 7 号 *HvLRR-RLK-510* 基因克隆质粒为模板, 采用特异 PCR 引物 *HvLRR-RLK510*-F 和 *HvLRR-RLK510*-R (表 1)扩增 *HvLRR-RLK-510* 基因的 CDS 序列。参照王梦玥等^[31]报道

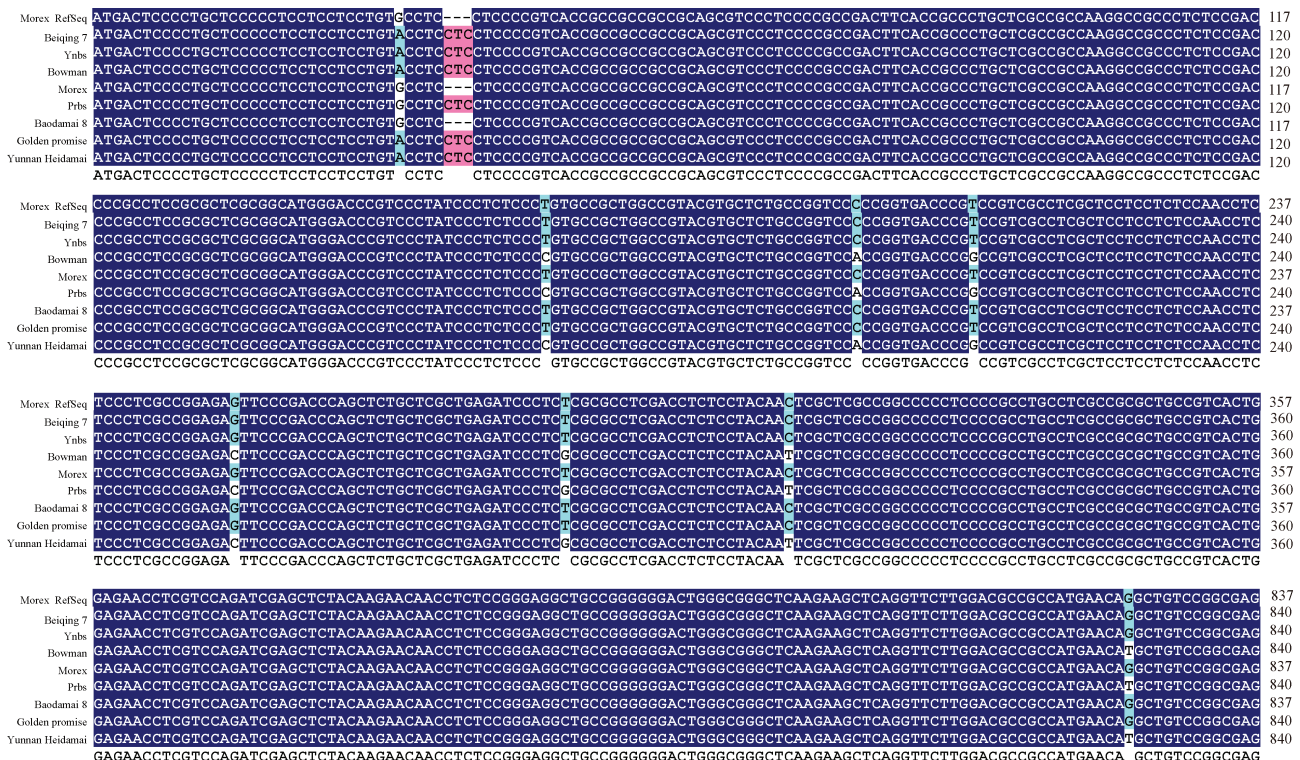
的方法构建 pBWA(V)HG-*HvLRR-RLK510-GFP* 融合表达载体, 采用热激转化法将重组产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。将转化细胞接种到添加卡那霉素的 LB 固体培养基, 于 37℃ 暗培养 12~24 h。挑取单菌落, 采用基于引物 BS-F 和 BS-*HvLRR-RLK510-R* (表 1) 的菌落原位 PCR 筛选阳性克隆。将阳性单菌落接种于添加卡那霉素的 LB 液体培养基扩繁并测序验证, 提取阳性菌液的重组质粒 pBWA(V)HG-*HvLRR-RLK510-GFP*。参照王梦玥等^[31]报道的方法种植本氏烟草。将 pBWA(V)HG-*HvLRR-RLK510-GFP* 质粒和空载体 pBWA(V)HG 质粒分别与细胞核 marker 共转化本氏烟草叶片下表皮细胞, 在弱光(70 $\pm$ 5) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 下培养 2 d, 通过荧光显微镜观察并记录 GFP 信号。

2 结果与分析

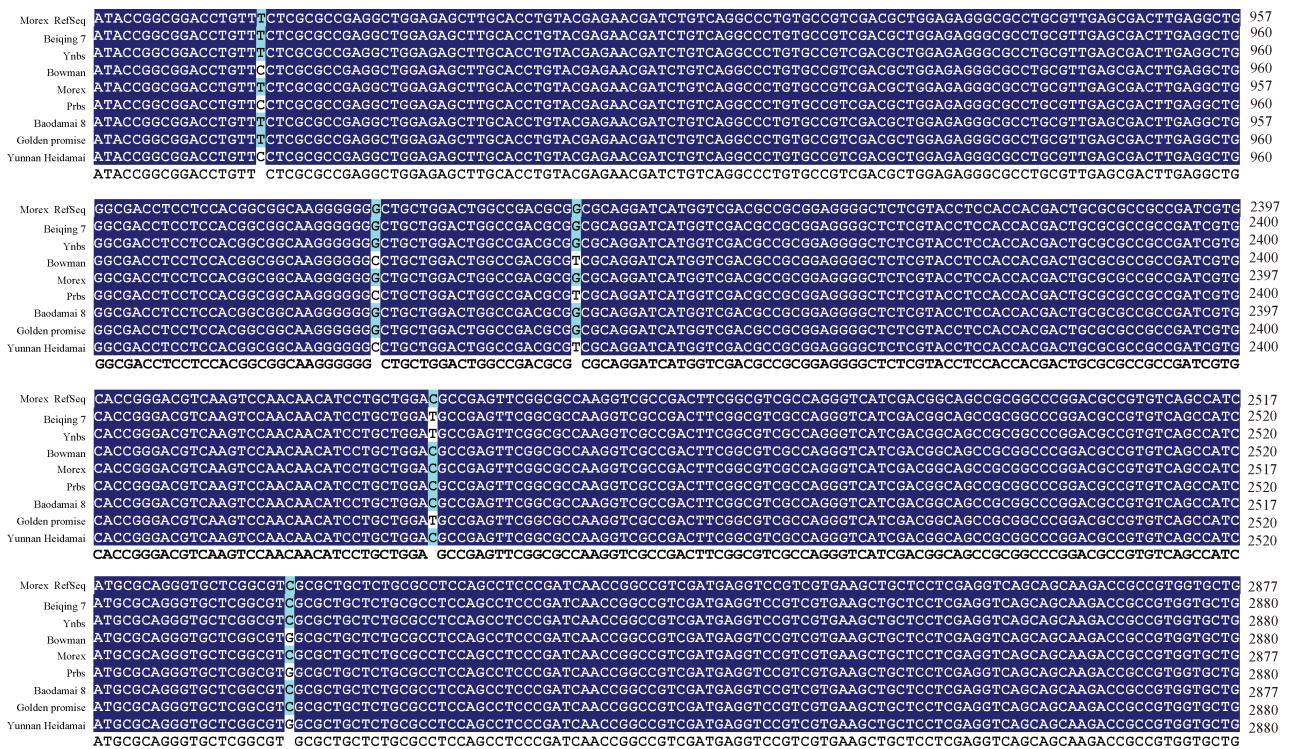
2.1 *HvLRR-RLK-510* 基因 CDS 序列的克隆和差异分析

基于 Golden promise、Bowman 和 Ynbs 突变体等 8 个材料幼穗的 cDNA 模板, 本研究克隆了约 2900 bp 的 DNA 片段。测序结果表明, 所克隆的 2904 bp 序列为 *HvLRR-RLK-510* 基因 CDS 序列(图 1), 可

编码 968 个氨基酸。序列比对结果表明, 基于 Morex cDNA 模板扩增的 *HvLRR-RLK-510* 基因 CDS 序列与 Ensembl 数据库 Morex.v4 的参考序列完全一致; 8 个试验材料 CDS 序列的相似性可达 99.80% 以上, 仅有 14 个碱基突变位点。北青 7 号与 Ynbs 突变体、Morex 与 Baodamai 8、Bowman 与云南黑大麦 3 对材料的 CDS 序列完全一致, 其余材料的 CDS 序列至少有 1 个碱基差异。在 14 个突变位点中 1 个为插入突变, 5 个为转换突变, 8 个为颠换突变。其中, c.32、c.39-40、c.164、c.196、c.208、c.252、c.286 和 c.824 位点为错义突变, 其余为同义突变。在 5 个转换位点中仅有 c.32 为嘌呤碱替换, 其余均为嘧啶碱替换。在 8 个颠换位点中只有 c.196 位点为嘌呤碱(A)替换嘧啶碱(C), 其余均为嘧啶碱与 G 碱基替换。在 7 个材料中 *HvLRR-RLK-510* 基因编码蛋白的氨基酸序列相似度也较高, 可达 99.70% 以上(图 2)。与 Morex 相比, Bowman、Prbs 突变体和云南黑大麦 3 个材料发生了 p.L56P、p.P67T、p.S71A、p.E85D、p.S97A 和 p.R276M 突变, 其余材料仅发生 p.C11Y、p.11-12insL 突变(图 2)。p.C11Y 和 p.11-12insL 属 N-端非保守基序, p.P67T 属亮氨酸重复结构域间的间隔序列, 其余 5 个突变氨基酸属亮氨酸重复结构域序列(图 2)。



(图 1)

图 1 8 个大麦材料 *HvLRR-RLK-510* 基因 CDS 序列的碱基突变Fig. 1 Base mutations in the CDS sequence of the *HvLRR-RLK-510* gene in eight barley materials图 2 8 个大麦材料 *HvLRR-RLK-510* 基因编码蛋白的氨基酸序列突变Fig. 2 Amino acid mutations in the protein encoded by the *HvLRR-RLK-510* gene in eight barley materials

2.2 *LRR-RLK-510* 基因编码蛋白的生物信息分析

蛋白质保守结构域和三级结构预测表明, *HvLRR-RLK-510* 基因编码蛋白具有 1 个 N-末端亮氨酸富集重复结构域、1 个跨膜结构域和 1 个激酶结构域。激酶结构域携带丝氨酸-苏氨酸激酶活性位点 (p.P798~p.L810) (图 3-A)。在 N-末端亮氨酸富集重复结构域和跨膜结构域间存在 7 种亮氨酸富集重复结构。在三级结构中, *HvLRR-RLK-510* 基因编码蛋白

具有 1 个典型的马蹄形结构和 1 个由 N-端 β 片层和 C-端 α 螺旋构成的较深的槽状结构(图 3-B)。

为了进一步验证 *HvLRR-RLK-510* 基因的受体蛋白激酶属性, 本研究鉴定了大麦、小麦、玉米、水稻和拟南芥 5 种作物 LRR-RLK 家族基因编码的 450 个蛋白序列, 从中筛选到序列相似性大于 35% 的 38 个蛋白。系统发生分析表明(图 4), 38 个蛋白可分为 4 个大类, 第 I 大类包括 AT5G65710 1 个蛋白; 第 II 包括

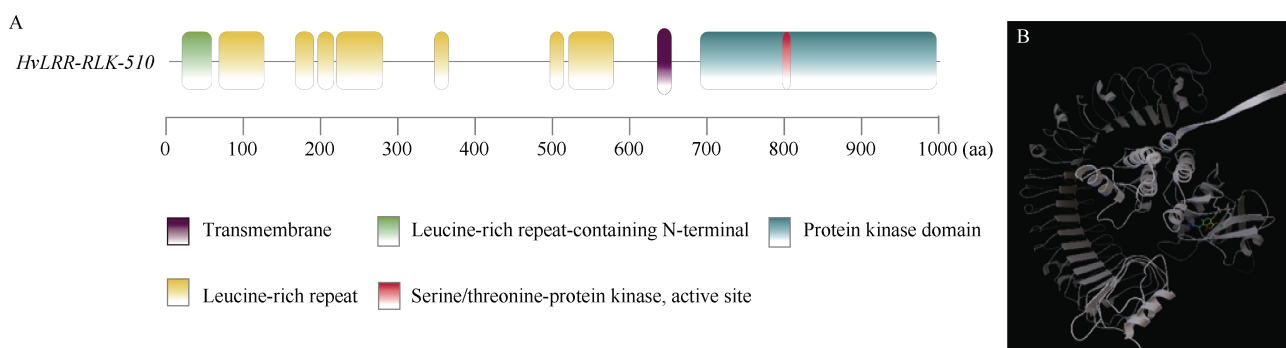


图 3 *HvLRR-RLK-510* 基因编码蛋白的保守结构域(A)和三级结构(B)

Fig. 3 Conserved domains (A) and predicted tertiary structure (B) of the protein encoded by the *HvLRR-RLK-510* gene

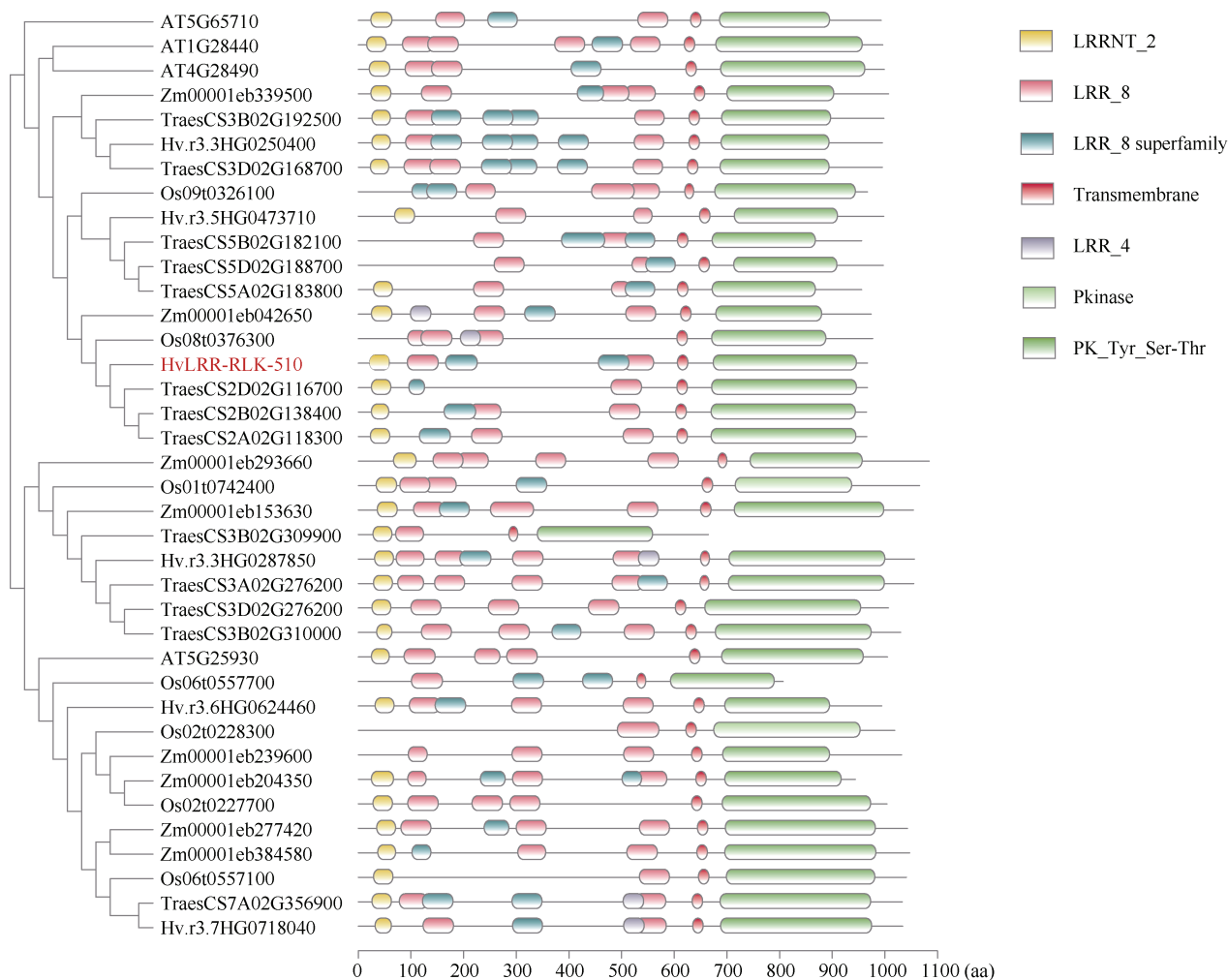


图 4 38 个亮氨酸富集重复类受体蛋白激酶的系统发生关系和保守结构域

Fig. 4 Phylogenetic relationships and conserved domains of 38 leucine-rich repeat receptor-like kinases

AT1G28440 和 AT4G28490 等 17 个蛋白, 第 III 类包括 Zm00001eb293660、Os01t0742400 和 Zm00001eb153630 等 8 个蛋白, 第 IV 类包括 AT5G25930、Os06t0557700 和 Hv.r3.6HG0624460 等 12 个蛋白。*HvLRR-RLK-510*、Zm0001eb 042650 和 Oso8t0376300 等 6 个基因的编码蛋白组成第 II 大类的第 IV 个亚类。38 个基

因编码蛋白至少携带 1 个亮氨酸富集重复结构域-8、跨膜结构域和激酶结构域, 但 N-末端亮氨酸富集重复结构域、亮氨酸富集重复结构域-8 和亮氨酸富集重复结构域-8 超家族的数量和位置存在差异。上述研究结果表明, *HvLRR-RLK-510* 基因属亮氨酸富集重复型类受体蛋白激酶基因家族。

2.3 *HvLRR-RLK-510* 基因的表达特性

为了探索 *HvLRR-RLK-510* 基因表达的器官特性, 本研究检测 4 个材料的 5 种器官中该基因的表达量。RT-PCR 检测结果表明(图 5), 在 4 个材料 5 种器官中内参基因 *HvActin* 的表达量基本一致, 表明不同样本的 cDNA 模板浓度基本一致, 可用于后续的 qRT-PCR 试验。4 个材料幼穗中的 *HvLRR-RLK-510* 基因表达量均高于其余 4 种器官; 在 4 个材料的叶中表达量较低, 甚至未检测到其表达产物; 在北青 7 号、Golden promise、Ynbs 突变体和 Morex 叶鞘中可检测 *HvLRR-RLK-510* 基因表达, 但北青 7 号叶鞘中的基因表达量明显高于 Golden promise、Ynbs 突变体叶鞘, Morex 叶鞘中的表达量最低。在北青 7 号茎和根、Ynbs 突变体茎中可检测到 *HvLRR-RLK-510* 基因表达, 在其余材料根和茎中未检测到该基因表达。在 4 个材料的 5 种器官中 *HvLRR-RLK-510* 的表达具有明显差异。

为了进一步验证 *HvLRR-RLK-510* 基因的表达差

异, 本研究分析了 4 个材料的 5 种器官中该基因的相对表达量(图 6)。检测结果表明, 北青 7 号、Ynbs 突变体的穗和叶鞘中 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量无显著差异, 但均极显著高于叶、茎、根; 北青 7 号的茎和根中 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量无显著差异, 但极显著高于叶; Ynbs 突变体的茎、根、叶中的 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量依次极显著下降; Golden promise 的穗、叶鞘、茎、根和叶中 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量依次极显著降低; Morex 的穗中 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量极显著高于叶鞘, 叶鞘中 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量极显著高于叶、茎和根, 叶、茎和根中表达没有明显差异。总体而言, *HvLRR-RLK-510* 基因具有明显的器官表达特性。

在不同材料相同器官中 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量也存在不同程度的差异(图 7)。北青 7 号叶片中 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量极显著高于 Golden promise、Morex、Ynbs, 后三者叶片的相对

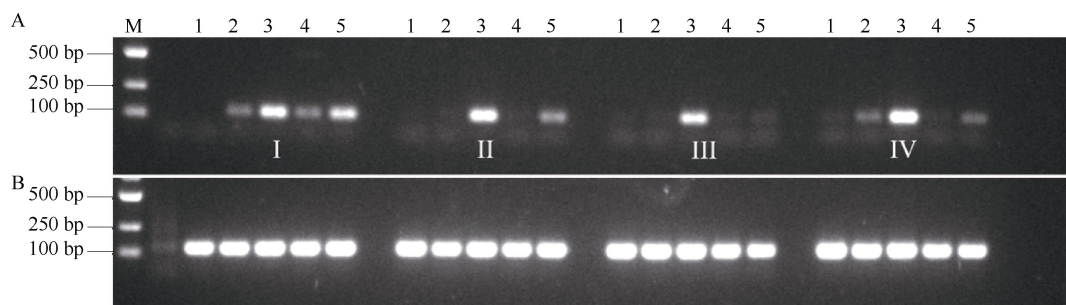


图 5 4 个大麦材料不同器官中 *HvLRR-RLK-510* 基因的差异表达

Fig. 5 Differential expression of the *HvLRR-RLK-510* gene in different organs of four barley materials

A: *HvLRR-RLK-510* 基因; B: 内参基因 *HvActin*。M: marker; 1: 叶; 2: 茎; 3: 穗; 4: 根; 5: 叶鞘。I: 北青 7 号; II: Golden promise; III: Morex; IV: Ynbs。

A: *HvLRR-RLK-510* gene; B: internal reference gene *HvActin*。M: marker; 1: leaves; 2: stems; 3: spikes; 4: root; 5: leaf sheaths. I: Beiqing 7; II: Golden promise; III: Morex; IV: Ynbs。

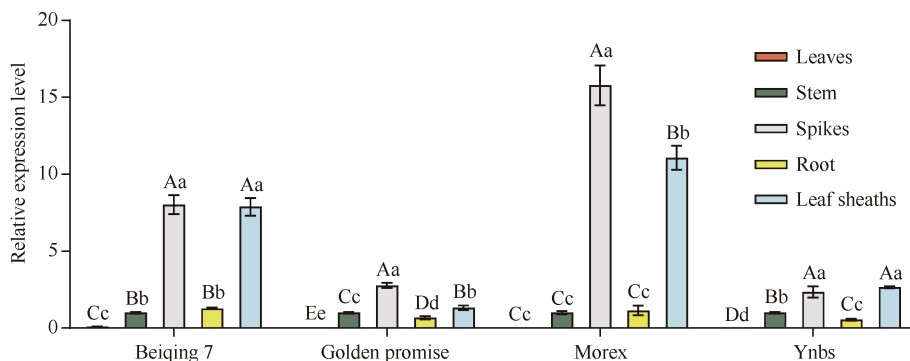


图 6 4 个大麦材料不同器官中 *HvLRR-RLK-510* 基因的表达差异

Fig. 6 Organ-specific expression patterns of the *HvLRR-RLK-510* gene in four barley materials

小写字母表示 5% 的显著性, 大写字母表示 1% 的显著性。

Lowercase letters indicate significance at the 5% level, uppercase letters indicate significance at the 1% level.

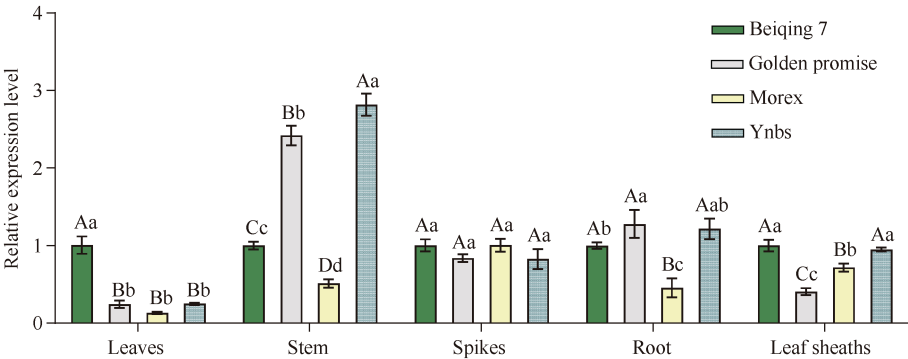


图 7 4 个大麦材料相同器官中 *HvLRR-RLK-510* 基因的表达差异
Fig. 7 Genotype-specific expression patterns of the *HvLRR-RLK-510* gene in the same organ of four barley materials
小写字母表示 5% 的显著性, 大写字母表示 1% 的显著性。
Lowercase letters indicate significance at the 5% level, uppercase letters indicate significance at the 1% level.

表达量没有明显差异。4 个材料的茎中 *HvLRR-RLK-510* 基因相对表达量间存在极显著差异, 但幼穗中的 *HvLRR-RLK-510* 基因相对表达量没有明显差异。Golden promise 与 Ynbs 突变体的根中相对表达量没有明显差异, 但显著高于北青 7 号; 北青 7 号、Golden promise 和 Ynbs 的根中 *HvLRR-RLK-510* 基因相对表达量均极显著高于 Morex。北青 7 号和 Ynbs 突变体的叶鞘中 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量没有明

显差异, 二者极显著高于 Morex; Morex 叶鞘的相对表达量极显著高于 Golden promise。上述结果表明, *HvLRR-RLK-510* 基因的表达受基因型影响。与茎相比, 叶、穗、根和叶鞘中 *HvLRR-RLK-510* 的表达特性受基因型的影响相对较小。

2.4 *HvLRR-RLK-510* 编码蛋白的亚细胞定位

本氏烟草叶片下表皮细胞的 *HvLRR-RLK-510* 基因编码蛋白的亚细胞定位表明(图 8), 在 3 次重复试

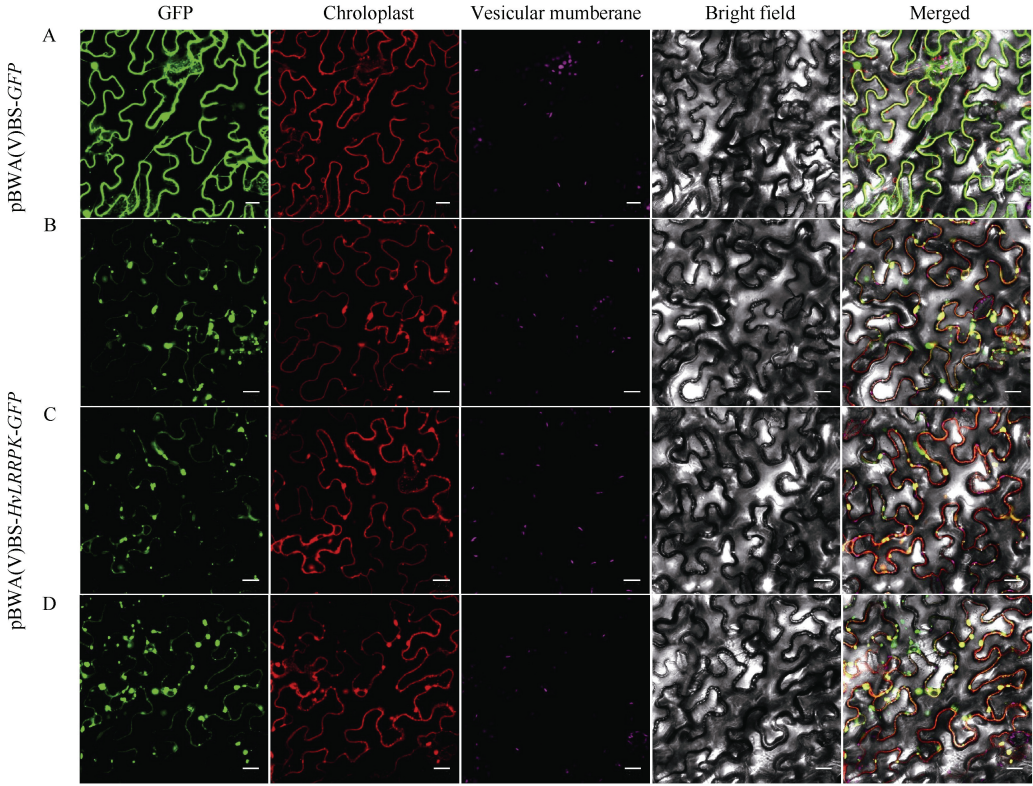


图 8 *HvLRR-RLK-510* 基因编码蛋白的亚细胞共定位
Fig. 8 Subcellular co-localization of the protein encoded by the *HvLRR-RLK-510* gene
A: 转化空白载体 pBWA(V)BS-GFP 的对照细胞; B~D: 转化 pBWA(V)BS-*HvLRRPK-GFP* 载体的细胞, 即 3 个独立的生物学重复视图。
标尺为 20 μm 。
A: pBWA(V)BS-GFP; B~D: pBWA(V)BS-*HvLRRPK-GFP*. Scale bar = 20 μm .

验中 pBWA(V)BS 空载体的绿色荧光信号均定位在本氏烟草叶的细胞膜上, 重组质粒 pBWA(V)BS-*HvLRR-RLK-510* 携带的 *HvLRR-RLK-510* 与 *GFP* 基因编码的融合蛋白绿色荧光信号呈颗粒状聚集, 位于细胞膜和液泡膜上。

3 讨论

本研究克隆了 8 个大麦材料 *HvLRR-RLK-510* 基因的 CDS 序列(2904 bp), 可编码 968 个氨基酸。编码蛋白质的保守基序和三级结构分析以及基于水稻、小麦、玉米和拟南芥 LRR-RLK 的系统发生分析表明, *HvLRR-RLK-510* 基因编码蛋白与调控花器官发育的拟南芥 LRR-RLK 基因 *HSL1* (*AT1G28440*) 和 *HAESA* (*AT4G28490*) 及其水稻、玉米同源基因 *Os08g0376300*、*Os09g0326100*、*Zm00001eb339500* 和 *Zm00001eb042650* 基因的编码蛋白具有较高的序列相似性^[32-34], 携带 LRR-RLK 的特征结构域和丝氨酸-苏氨酸活性位点(图 2 和图 3)。因此, 作者认为 *HvLRR-RLK-510* 基因属亮氨酸富集重复型类受体蛋白丝氨酸-苏氨酸激酶基因。

虽然在 8 个大麦材料中检测到 14 个碱基位点突变, 但 *Morex HvLRR-RLK-510* 基因参考序列和扩增序列的碱基完全一致, 14 个突变均为真实突变(图 1)。在 14 个碱基突变中仅 8 个为错义突变, 其中 3 个属亮氨酸富集重复结构域间的间隔序列, 其余 5 个属亮氨酸富集重复结构域序列(图 2)。虽然激酶结构域氨基酸(图 1 和图 3)的 4 个编码碱基位点(c.2328、c.2307、c.2433 和 c.2778)也发生了突变, 但均为同义突变。上述结果表明, 亮氨酸富集重复结构域及其间隔区序列的保守性低于跨膜结构域和激酶结构域。在玉米^[35]、拟南芥^[36]和水稻^[16]的 LRR-RLK 突变研究中, 研究人员也发现了相似的现象。在激酶结构域 295 个氨基酸对应的碱基中发生了 4 个同义突变(图 2 和图 3), 其频率远高于其他区域。激酶结构域的碱基错义突变易导致 LRR-RLK 的功能缺损, 在选择中易丢失。与此相反, 碱基同义突变易固定。虽然只有 Bowman、云南黑大麦(二棱大麦)和 Prbs 突变体(二棱大麦浦大麦 2 号的突变体)携带上述 4 个亮氨酸富集重复结构域的氨基酸突变及 c. G2307C 和 c. G2328T 碱基突变(图 2 和图 3), 但不能核实 3 个材料的亲缘关系, 因此难以判断上述突变是否是二棱大麦特有的单倍型。

玉米类受体蛋白激酶家族成员基因 *ZmSERK1*、

Zm00001d020183 和 *Zm00001d020185* 可在叶、雌蕊或根等不同器官中表达、具有组织(或器官)特异性^[37]。另外, Parrott 等^[38]发现大麦叶片中 LRR-RLK 基因 *AK249842* 的表达也具有组织(或器官)特异性和基因型依赖性。*HvLRR-RLK-510* 基因在 4 个材料的 5 种器官中的表达特性与前人研究结果相似。在 5 种器官中拔节期幼穗中 *HvLRR-RLK-510* 基因的相对表达量较高。拔节期是大麦营养生长向生殖生长转换的关键期, 需要抑制前期营养生长的调节蛋白, 激活后续生殖生长所需蛋白。作者推测上述功能需求导致了大麦拔节期幼穗中 *HvLRR-RLK-510* 基因的高表达。虽然董陈文华等^[30]发现 *HvLRR-RLK-510* 基因启动子携带光、脱落酸、茉莉酸等非生物胁迫响应元件和增强子, 但无组织(或器官)特异性元件, 在 *Morex* 和保大麦 8 号中该基因启动子序列没有差异。因此, 作者推测不同材料或不同组织中与上述顺式元件结合的反式因子的差异可能导致了 *HvLRR-RLK-510* 基因表达的器官特异性和基因型依赖性。

细胞膜被认为是 LRR-RLK 感受胞外信号的主要场所。以空载 PBWA(A)BS 为对照, 本研究将 *HvLRR-RLK-510* 编码蛋白定位在本氏烟草叶细胞的细胞膜上, 与前人报道的 *Ghd6PKL2*^[39]、*HAESA-Like*^[32] 和 *CaCRK5*^[40] 编码蛋白的定位结果一致。此外, *HvLRR-RLK-510* 编码蛋白也被定位在本氏烟草叶细胞的液泡膜上。截至目前, 仅有少数基因, 如马尾松 *PmSWEET* 基因^[41] 编码的苹果糖转运蛋白和水稻 *OsABCC10* 基因编码的 ABC 转运蛋白^[42] 定位在烟草叶细胞的液泡膜上。比较同源基因 *AtCRK6* (编码蛋白被定位在本氏烟草叶细胞膜上)和 *HvCRK1* (编码蛋白被定位在本氏烟草内质网膜上)基因编码蛋白的氨基酸序列后, Rayapuram 等^[7]发现 *AtCRK6* 的跨膜结构域有 23 个氨基酸, 而 *HvCRK1* 仅有 17 个氨基酸; *AtCRK6* 跨膜结构域的 17~19 位置是强疏水的 LVG 氨基酸, *HvCRK1* 以弱疏水性 AAA 为主。*HvLRR-RLK-510* 基因编码蛋白的跨膜结构域由 15 个疏水氨基酸和 4 个水溶性氨基酸(包括 1 个脂肪族氨基酸)构成(图 2)。因此, 作者推测跨膜结构域长度、疏水和亲水氨基酸数量及其分布特性决定了 *HvLRR-RLK-510* 编码蛋白的膜定位特性。定位于植物液泡膜上的蛋白, 如苹果糖转运蛋白^[43-44]、ABC 转运蛋白^[37]、 Na^+ (K^+) / H^+ 逆向转运蛋白^[45]、RgMATE6 转运蛋白^[46] 等, 可调控蛋白质、多糖和花色苷等物质在液泡中的储存、转运或分解代谢^[37,43-46]。通过磷

酸化或去磷酸化作用,类钙调素结构域蛋白激酶(calmodulin-like domain protein kinase, CDPK)通过磷酸化可激活 H^+ -ATPase 活性,进而调控液泡中 H^+ 浓度^[47]。因此,作者推测 *HvLRR-RLK-510* 编码蛋白可能参与了液泡膜蛋白,如糖类化合物转运蛋白、ABC 转运蛋白或 H^+ -ATPase 等化合物的活性调节,但需要进一步试验验证。

到目前为止,已报道了 *HvLysMR1*^[48]、*HvCPK2a*^[49]和*HvCRK1*^[7]等大麦类受体蛋白激酶基因,但大多与金属离子、非生物或白粉病等因素的胁迫响应有关。鉴定幼穗发育调控基因,特别是蛋白激酶基因有助于大麦幼穗发育机制解析。*HvLRR-RLK-510* 基因与拟南芥基因 *HSL1* (*ATIG28440*)和 *HAESA* (*ATIG28490*)、水稻 *Os08g0376300* 和 *Os09g0326100*、玉米 *Zm00001eb339500* 和 *Zm00001eb042650* 等植物的穗发育基因同源^[32-34],具有相似的保守基序(图 4),在大麦拔节期幼穗中高效表达(图 6)。因此,作者推测该基因参与了大麦幼穗的发育调控。为了验证上述推论,作者敲除了 *HvLRR-RLK-510* 基因的水稻同源基因 *OsLRR-RLK-510*,发现敲除突变体具有部分不育、穗分枝(包括一级和二级分枝)减少且缩短等穗部突变性状(待发表)。上述研究表明,*HvLRR-RLK-510* 是大麦幼穗发育的调控基因,解析在幼穗发育中该基因的功能和作用机制有助于揭示大麦幼穗发育机制。

4 结论

本研究成功克隆了大麦 *HvLRR-RLK-510* 基因 2904 bp 的 CDS 序列。该基因在大麦拔节期叶、茎、幼穗、叶鞘和根中差异表达,具有器官特异性和基因型依赖性,但以幼穗中的表达更高效、基因型依赖性更低。该基因编码蛋白携带 LRR-RLK 激酶的 N-端亮氨酸富集重复结构域、跨膜结构域和胞内激酶结构域等保守结构域,属亮氨酸富集重复型类受体丝氨酸-苏氨酸受体激酶,位于本氏烟草叶细胞膜和液泡膜上。

References

- [1] Chakraborty S, Nguyen B, Wasti S D, et al. Plant leucine-rich repeat receptor kinase (LRR-RK): structure, ligand perception, and activation mechanism. *Molecules*, 2019, 24: 3081.
- [2] 马媛媛, 甘睿, 王宁宁. 植物富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白激酶的生物功能. *植物生理与分子生物学报*, 2005, 31: 331–339.
Ma Y Y, Gan R, Wang N N. Biological functions of leucine-rich repeat class of receptor-like protein kinases in plants. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2005, 31: 331–339 (in Chinese with English abstract).
- [3] Morillo S A, Tax F E. Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9: 460–469.
- [4] Kobe B, Deisenhofer J. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, 5: 409–416.
- [5] Liu P L, Du L, Huang Y, et al. Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants. *BMC Evol Biol*, 2017, 17: 47.
- [6] 林彦萍, 王义, 蒋世翠, 等. 植物类受体蛋白激酶研究进展. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34: 429–437.
Lin Y P, Wang Y, Jiang S C, et al. Advance in research of plant receptor-like protein kinases. *Genomics Appl Biol*, 2015, 34: 429–437 (in Chinese with English abstract).
- [7] Rayapuram C, Jensen M K, Maiser F, et al. Regulation of basal resistance by a powdery mildew-induced cysteine-rich receptor-like protein kinase in barley. *Mol Plant Pathol*, 2012, 13: 135–147.
- [8] Zhang X R. Leucine-rich repeat receptor-like kinases in plants. *Plant Mol Biol Report*, 1998, 16: 301–311.
- [9] Shiu S H, Bleecker A B. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2003, 132: 530–543.
- [10] Soltabayeva A, Dauletova N, Serik S, et al. Receptor-like kinases (LRR-RLKs) in response of plants to biotic and abiotic stresses. *Plants (Basel)*, 2022, 11: 2660.
- [11] Schoof H, Lenhard M, Haecker A, et al. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 2000, 100: 635–644.
- [12] Durbak A R, Tax F E. CLAVATA signaling pathway receptors of *Arabidopsis* regulate cell proliferation in fruit organ formation as well as in meristems. *Genetics*, 2011, 189: 177–194.
- [13] Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y, et al. *Arabidopsis* CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*, 2008, 319: 294.
- [14] Nimchuk Z L, Zhou Y, Tarr P T, et al. Plant stem cell maintenance by transcriptional cross-regulation of related receptor kinases. *Development*, 2015, 142: 1043–1049.
- [15] Moon S, Jung K H, Lee D E, et al. The rice *FON1* gene controls vegetative and reproductive development by regulating shoot apical meristem size. *Mol Cells*, 2006, 21: 147–152.
- [16] Suzaki T, Sato M, Ashikari M, et al. The gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to *Arabidopsis* *CLAVATA1*. *Development*, 2004, 131: 5649–5657.
- [17] Wang Z Y, Seto H, Fujioka S, et al. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, 2001, 410: 380–383.
- [18] Sakaguchi J, Itoh J I, Ito Y, et al. COE1, an LRR-RLK responsible for commissural vein pattern formation in rice. *Plant J*, 2010, 63: 405–416.
- [19] Shiu S H, Bleecker A B. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10763–10768.

- [20] Sakai K, Citerne S, Antelme S, et al. BdERECTA controls vasculature patterning and phloem-xylem organization in *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol*, 2021, 21: 196.
- [21] Fischer I, Diévert A, Droc G, et al. Evolutionary dynamics of the leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) subfamily in angiosperms. *Plant Physiol*, 2016, 170: 1595–1610.
- [22] Zhou F L, Guo Y, Qiu L J. Genome-wide identification and evolutionary analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in soybean. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 58.
- [23] Sun J M, Li L T, Wang P, et al. Genome-wide characterization, evolution, and expression analysis of the leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) gene family in Rosaceae genomes. *BMC Genomics*, 2017, 18: 763.
- [24] Shiu S H, Blecker A B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE*, 2001, 2001: re22.
- [25] Stone J M, Walker J C. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol*, 1995, 108: 451–457.
- [26] Shen L P, Liu Y Y, Zhang L L, et al. A transcriptional atlas identifies key regulators and networks for the development of spike tissues in barley. *Cell Rep*, 2023, 42: 113441.
- [27] Zhou H B, He J Y, Wang M Y, et al. Gene locus mapping and candidate gene screening for branched spike and its associated traits of the Ynbs mutant in barley. *Agriculture*, 2023, 13: 1934.
- [28] Wang W B, He J Y, Chen S W, et al. Construction of a high-density genetic map and fine mapping of a candidate gene locus for a novel branched-spike mutant in barley. *PLoS One*, 2020, 15: e0227617.
- [29] 王新天, 王卫斌, 陈升位, 等. 裸大麦突变体 Ynbs-1 的分枝穗特性及其遗传分析. *麦类作物学报*, 2019, 39: 574–580.
- Wang X T, Wang W B, Chen S W, et al. Characteristics of branched-spike of hullless barley mutant-Ynbs-1 and its genetic analysis. *J Triticeae Crops*, 2019, 39: 574–580 (in Chinese with English abstract).
- [30] 董陈文华, 周洪斌, 郎雨萌, 等. 大麦 LRR 型类受体蛋白激酶基因 *HvLRR-RLK510* 启动子的克隆与功能验证. *麦类作物学报*, 2026, 46: 90–100.
- Dong-Chen W H, Zhou H B, Lang Y M, et al. Cloning and functional validation of the promoter of the LRR-type receptor-like protein kinase gene *HvLRR-RLK510* in barley. *J Triticeae Crops*, 2026, 46: 90–100 (in Chinese with English abstract).
- [31] 王梦玥, 罗振蒙, 詹开旺, 等. 大麦核仁蛋白基因 *HvNOP58* 的克隆和表达分析. *麦类作物学报*, 2024, 44: 1087–1095.
- Wang M Y, Luo Z M, Zhan K W, et al. Cloning and expression characteristics of a nucleolar protein gene *HvNOP58* in barley. *J Triticeae Crops*, 2024, 44: 1087–1095 (in Chinese with English abstract).
- [32] Roman A O, Jimenez-Sandoval P, Augustin S, et al. HSL1 and BAM1/2 impact epidermal cell development by sensing distinct signaling peptides. *Nat Commun*, 2022, 13: 876.
- [33] Jinn T L, Stone J M, Walker J C. HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev*, 2000, 14: 108–117.
- [34] Chen D, Guo H, Chen S, et al. Receptor-like kinase HAESA-like 1 positively regulates seed longevity in *Arabidopsis*. *Planta*, 2022, 256: 21.
- [35] 孙泽丹, 曾世荣, 孙小孟, 等. 玉米 LRR-RLK 基因家族鉴定和 SIF 亚家族表达模式分析. *玉米科学*, 2024, 32(4): 19–30.
- Sun Z D, Zeng S R, Sun X M, et al. Genome-wide identification of the LRR-RLK gene family and SIF subfamily gene expression profiling in maize. *J Maize Sci*, 2024, 32(4): 19–30 (in Chinese with English abstract).
- [36] 阿依江·哈拜克, 杨敏, 韩玉珍. 拟南芥 LRR-RLKs 亚家族蛋白 RLK6 的亚细胞定位及 *RLK6* 的组织表达. *西北植物学报*, 2014, 34: 1–6.
- A-Yi-Jiang H B K, Yang M, Han Y Z. Subcellular localization of RLK6, a protein of LRR-RLK subfamily and tissue expression pattern of the *RLK6* in *Arabidopsis*. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2014, 34: 1–6 (in Chinese with English abstract).
- [37] Baudino S, Hansen S, Bretschneider R, et al. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta*, 2001, 213: 1–10.
- [38] Parrott D L, Huang L, Fischer A M. Downregulation of a barley (*Hordeum vulgare*) leucine-rich repeat, non-arginine-aspartate receptor-like protein kinase reduces expression of numerous genes involved in plant pathogen defense. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 100: 130–140.
- [39] 刘媛媛, 杨冬杰, 左东云, 等. 棉花 *GhD6PKL2* 的克隆及功能验证. *生物技术通报*, 2021, 37(8): 111–120.
- Liu Y Y, Yang D J, Zuo D Y, et al. Cloning and functional verification of *GhD6PKL2* from *Gossypium hirsutum*. *Biotechnol Bull*, 2021, 37(8): 111–120 (in Chinese with English abstract).
- [40] Mou S L, Meng Q Q, Gao F, et al. A cysteine-rich receptor-like protein kinase CaCKR5 modulates immune response against *Ralstonia solanacearum* infection in pepper. *BMC Plant Biol*, 2021, 21: 382.
- [41] 梁大曲, 石长双, 涂晶晶, 等. 马尾松 *PmSWEET* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析. *植物生理学报*, 2022, 58: 447–457.
- Liang D Q, Shi C S, Tu J J, et al. Cloning, subcellular localization and expression analysis of *PmSWEET* gene in *Pinus massoniana*. *Plant Physiol J*, 2022, 58: 447–457 (in Chinese with English abstract).
- [42] 陆优社, 时明星, 王小虎, 等. 水稻 *OsABCC10* 基因的克隆及其功能分析. *分子植物育种*, 2020, 18: 2776–2784.
- Lu Y S, Shi M X, Wang X H, et al. Cloning and functional analysis of *OsABCC10* gene in rice. *Mol Plant Breed*, 2020, 18: 2776–2784 (in Chinese with English abstract).
- [43] 杨官显, 许海峰, 张静, 等. 苹果糖转运蛋白基因 *MdSWEET17* 的功能鉴定. *植物生理学报*, 2018, 54: 1737–1745.
- Yang G X, Xu H F, Zhang J, et al. Functional identification of a sugar transporter gene *MdSWEET17* in apple. *Plant Physiol J*, 2018, 54: 1737–1745 (in Chinese with English abstract).
- [44] 卢梦琪, 谭晓风, 周俊琴, 等. 油茶 *CoALMT9* 基因的克隆与表达分析. *植物生理学报*, 2020, 56: 837–846.
- Lu M Q, Tan X F, Zhou J Q, et al. Cloning and expressional analysis of *CoALMT9* gene in *Camellia oleifera* Abel. *Plant Physiol J*, 2020, 56: 837–846 (in Chinese with English abstract).
- [45] 徐亚, 滕梦鑫, 何岳东, 等. 香蕉 NHX 基因家族的鉴定及表达分析. *植物生理学报*, 2021, 57: 681–691.
- Xu Y, Teng M X, He Y D, et al. Identification and expression analysis of NHX genes family in banana. *Plant Physiol J*, 2021, 57: 681–691 (in Chinese with English abstract).

- [46] 杨艳会, 杨恒, 张重义, 等. 地黄 *RgMATE6* 转运蛋白基因的克隆、亚细胞定位与表达分析. 中草药, 2021, 52: 1728–1734.
Yang Y H, Yang H, Zhang Z Y, et al. Clone, subcellular localization and expression analysis of *RgMATE6* transporter protein gene from *Rehmannia glutinosa*. Chin Trad Herbal Drugs, 2021, 52: 1728–1734 (in Chinese with English abstract).
- [47] Chen S, Chen J, Wang X C. Existence and characteristics of tonoplast-bound protein kinase in the tip cell of maize root. Acta Bot Sin, 2002, 44: 661–666.
- [48] Ouelhadj A, Kaminski M, Mittag M, et al. Receptor-like protein kinase *HvLysMRI* of barley (*Hordeum vulgare* L.) is induced during leaf senescence and heavy metal stress. J Experimental Botany, 2007, 58: 1381–1396.
- [49] Ciesla A, Mitula F, Misztal L, et al. A role for barley calcium-dependent protein kinase CPK2a in the response to drought. Plant Sci, 2016, 7: 1550.