

小麦和水稻 auxin 基因家族的生物信息学比较分析

张俊红¹, 孟成生^{1,2}, 张彩英¹, 史 峥¹, 王笑颖¹, 李爱丽², 马峙英¹

(1. 河北农业大学, 河北省作物种质资源重点实验室, 河北 保定 071001;

2. 中国农业科学院 作物科学研究所, 农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

摘要:根据测序获得的 1 条 260 bp cDNA 片段, 通过预测发现其包含小麦植物生长素 (AUXIN) 基因的部分编码序列, 通过电子延伸、设计引物, 从小麦 Mardler/7 * 百农 3217 的 cDNA 中扩增获得一条 608 bp 的 cDNA 片段, 该基因序列数据库 (GenBank) 登录号为 AY902381 (基因) 和 (蛋白)。编码 202 个氨基酸, 预计蛋白的分子量为 23.0 kDa, 等电点为 9.93。利用已经分离的小麦生长素 (AUXIN) 基因的保守序列为检索序列, 对小麦和水稻中的 AUXIN 基因家族成员进行分析, 利用这些基因编码蛋白序列构建系统发生树, 查找在 GenBank 的 EST 数据库中查找这些基因的 ESTs 表达序列, 分析了这些基因在细胞中的定位情况和蛋白结构的相似性, 根据已知相似基因的功能, 分析该基因有进一步深入研究的必要。

关键词:小麦; 水稻; 植物生长素

中图分类号: Q811 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)06-0015-05

Bioinformatic Analysis of the auxin Gene Family in Wheat and Rice

ZHANG Jun-hong¹, MENG Cheng-sheng^{1,2}, ZHANG Cai-ying¹, SHI Zheng¹,
WANG Xiao-ying¹, LI Ai-li², MA Zhi-ying¹

(1. Agricultural University of Hebei, Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Key Laboratory of Crop Germplasm and Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: One of the sequenced 260 bp cDNA fragments was highly identified with auxin. The EST was extended using CAP3 software in the lab local net. Based on the extended sequence, a pair of primers was designed in the two side regions of its predicted sequence and a cDNA fragment of 608 bp was isolated from Mardler/7 * Bainong 3217 using RT-PCR method. The sequence encoded a peptide of 202 deduced amino acid residues. The accession numbers were AY902381 (gene) and (protein). The deduced molecular weight of protein was 23.0 kDa and the theoretical pI was 9.93. We used the Auxin response domain sequences identified from the auxin genes in plants as queries to search for auxin genes in both wheat and rice, and a polygenetic tree was constructed based on the corresponding auxin proteins from wheat and rice. The cell location and protein structure similarity of these genes were analyzed by searching the EST sequences of these genes, and it is essential to study this gene further based on the function of known similar genes.

Key words: Wheat; Rice; Auxin

植物生长素 (AUXIN) 是指能引起与吲哚-3-乙酸有同样生理作用的物质之总称^[1]。生长素是最早发现的一类植物激素^[2], 它能促进植物细胞的伸长生长、根和茎的发育和生长, 诱导插枝生根和愈伤组织根的分化、维管束的形成和发育、器官的衰老, 参与

植物茎尖的向光性及根的向地性的调控, 诱导花的雌性化^[3]。植物细胞内存在复杂的信号转导网络体系 (Networks), 了解不同信号之间的相互作用对于理解这一复杂的信号转导网络体系越来越重要。这一类研究已成为信号转导领域的研究热点^[4]。生长素

收稿日期: 2009-10-26

基金项目: 国家“973”计划项目 (222092)

作者简介: 张俊红 (1980-), 女, 河北东光人, 硕士, 主要从事作物分子生物学方面的研究。

孟成生 (1978-), 男, 河北涉县人, 硕士, 主要从事分子生物学方面的研究。

通讯作者: 马峙英 (1958-), 男, 河北新乐人, 教授, 农学博士, 主要从事棉花遗传育种和分子生物学研究工作。

在植物复杂的信号转导网络体系中发挥关键性作用,它不仅与其他信号相互作用,协同调节分裂、伸长和分化等胞内过程,而且作为非细胞自主信号,与其他信号转导途径相互作用,调节胞外发育过程^[2]。研究证明 *auxin* 基因在水稻、小麦、拟南芥、玉米、豌豆、大麦和番茄等植物中均有存在^[5-12]。

本试验通过对获得的小麦 *auxin* 基因的 cDNA 序列的分析,利用 Interproscan 和 Pfam 软件预测这些基因所编码的蛋白质序列的结构域^[13]。以所得到的这 2 个 *AUXIN* 结构域序列为搜索对象,在 TIGR 公布的国际水稻基因组计划的注释蛋白质库中搜索相似的蛋白序列, $E = 10^{-10}$ 的序列被认为是候选蛋白。在 NCBI 数据库中得到了 3 条小麦和 8 条水稻的 *auxin* 基因及其编码的蛋白质序列。对 cDNA 序列进行通读框分析,揭示了此基因在小麦中的表达、三级结构、亚细胞定位以及与水稻 *auxin* 基因的同源性等信息。但是至今为止, *auxin* 基因的表达调控和信号传导研究虽然有较深入的研究,但植物生长素作为一类调控激素的信号网络机制还不清楚,有待于进一步深入研究。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为中国农业科学院作物科学研究所农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室培育的小麦抗白粉病近等基因系 Mardler/7 百农 3217 (Pm2),在对其 cDNA 片段进行序列分析时发现一条 261 bp 的 cDNA 片段,对此片段电子延伸、扩增获得长度约 0.6 kb 的 cDNA 片段。

1.2 方法

1.2.1 小麦和水稻 *auxin* 基因的获得 对克隆得到的 608 bp 核苷酸序列在 <http://wheat.pw.usda.gov/wEST> 网站的小麦 EST 库中进行 BlastN 比对,检索发现与 *auxin* 基因有较高的同源性并具有典型 IAA 结构域的 EST 序列。小麦和水稻中已经分离出的 *auxin* 基因及其编码的蛋白质序列来源于 NCBI^[14] 数据库。利用 Interproscan 和 Pfam 等^[15] 软件预测这些基因所编码的蛋白质序列的 *AUXIN* 结构域。以所得到的这 2 个 *auxin* 基因结构域序列为搜索对象,在 TIGR 公布的国际水稻基因组计划的注释蛋白质库中搜索相似的蛋白序列, $E = 10^{-10}$ 的序列被认为是候选蛋白。

1.2.2 *auxin* 基因的表达分析和聚类分析 水稻的

EST 数据来源于 Genbank 的 EST 数据库。通过对水稻的 *auxin* 蛋白所对应的编码序列对 EST 数据库进行 Blastn 搜索,取匹配率大于 90%、长度大于 160 bp,且 $E = 10^{-10}$ 的结果作为对应的 EST 序列,对序列联配的结果按组织器官的来源进行分类,从而获得水稻中的 *auxin* 基因家族成员的表达信息。*auxin* 基因的聚类分析利用 DNA Star Megalin 软件进行。

1.2.3 *auxin* 基因的亚细胞定位和结构预测 水稻和小麦的 *auxin* 蛋白亚细胞定位预测通过工具 PSORT(<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>) 进行预测。利用 SWISSMODEL 程序对肽链的三维结构进行预测分析(<http://au.expasy.org/tools>)^[3,16]。

2 结果与分析

2.1 小麦 *auxin* 基因序列的获得

本研究在测序过程中获得一条 261 bp 的 cDNA 片段,对电子延伸获得的核苷酸序列设计引物,扩增获得长度大于 0.6 kb 的 cDNA 片段,克隆、测序 cDNA 片段得到 608 bp 的核苷酸序列(图 1),经预测发现该基因片段为 *auxin* 基因的部分序列(202 个氨基酸)。此基因序列数据库(GenBank)登录号为 AY902381(基因)和(蛋白),序列分析发现其与网上已经公布的生长素反应因子 2(auxin response factor 2)基因序列具有较高的一致性。通过 ExPASy Proteomics Server 网站的预测发现该序列在 1~97 处含有 1 个 B₃ DNA 蛋白结合位点,分析该序列所编码的氨基酸序列及其分子量、等电点等生物学特征,发现其分子量为 23.0 kDa,氨基酸的理论等电点为 9.93。

2.2 小麦和水稻拟南芥中的 *auxin* 基因的鉴定

在 TIGR 的全基因组注释数据库中筛选得到 20 条水稻候选蛋白序列,根据小麦中获得的 AY902381 基因序列的保守结构域,去除 12 条不含保守结构域或 E 值大于 10^{-10} 的序列,共得到 8 条非冗余序列(表 1)。8 条 *auxin* 基因信息中均含有 B₃ DNA 结合蛋白位点和 *auxin* 应答因子,而在 *RIC5*、*RIC7* 和 *RIC8* 三个基因中不含 AUX/IAA 保守结构域。在 NCBI 数据库中根据已知的 AY902381 基因序列检索小麦 EST 库,共获得 4 条 E 值小于 10^{-10} 的序列,利用 Pfam 软件鉴定 4 条序列,发现其中 1 条不含生长素反应因子(auxin response factor 2)保守结构域,共鉴定出 3 个非冗余 *auxin* 基因编码的 3 段蛋白序列,为了方便分析和描述,根据其 AY902381 基因编码蛋白的亲缘关系,分别命名为 wheat1~wheat3。

表 1 水稻中的 *auxin* 基因及其基本信息

Tab. 1 The basic information of <i>auxin</i> genes from <i>Oryza sativa</i>						
基因名称 Gene name	位点 Locus	氨基酸长度 Length of amino	染色体 Chromosome	B ₃ DNA binding domain	Auxin response factor	AUX/ IAA
RIC1	LOC_Os01g70270	809	1	+	+	+
RIC2	LOC_Os11g32110	854	11	+	+	+
RIC3	LOC_Os12g29520	842	12	+	+	+
RIC4	LOC_Os02g35140	679	2	+	+	+
RIC5	LOC_Os10g33940	699	10	+	+	
RIC6	LOC_Os04g36054	674	4	+	+	+
RIC7	LOC_Os06g47150	701	6	+	+	
RIC8	LOC_Os02g41800	682	2	+	+	

2.3 小麦和水稻中的 AUXIN蛋白的系统发生分析

利用 DNA Star Megalin 软件对 AY902381 基因序列、小麦和水稻中 AUXIN 蛋白的进化关系进行了系统发生分析,获得系统发生树(图 1)。根据图 1 进化关系的远近,将所有获得的小麦和水稻中 AUXIN 蛋白分成 A 和 B2 个亚族,A 亚族中包含小麦和水稻的 AUXIN 蛋白,B 亚族中仅包含 1 个水稻的 AUXIN 蛋白。为了详细分析 AY902381 基因的功能,根据进化树将 A 亚族细分为 4 个亚组,A1 亚组中包含

AY902381 基因和 3 个小麦的 AUXIN 蛋白,A2 亚组和 A3 亚组中各有 2 个水稻的 AUXIN 蛋白,A4 亚组中含 3 个水稻的 *auxin* 基因。根据聚类分析发现,AY902381 基因与小麦中获得的另外 3 个基因聚到 A 亚族中的 A1 亚组中,说明 AUXIN 蛋白在小麦的进化过程中具有较高的保守性,且与其他基因的进化距离相对较远,并且发现水稻 *auxin* 基因在进化过程中的变异比小麦的 *auxin* 基因大一些。

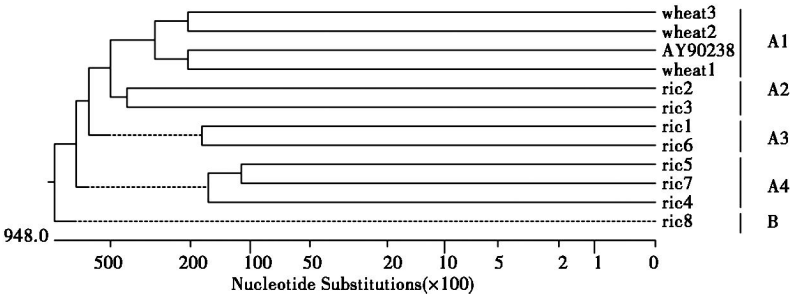


图 1 小麦和水稻中 AUXIN蛋白的系统发生树

Fig. 1 The phylogenetic tree of AUXIN proteins from wheat and *O. sativa*

表 2 *auxin* 基因在小麦和水稻中的 EST 表达模式

Tab. 2 EST-based expression profiles of <i>auxin</i> genes from wheat and <i>O. sativa</i>						
基因 Gene	器官 Organ					备注 Remark
	种子 Seed	根 Rood	叶 Leaf	花 Flower	成熟胚 Mature embryo	
RIC1		+	+	+	+	Whole plant
RIC2			+	+		
RIC3			+	+	+	
RIC4			+	+	+	
RIC5			+	+	+	
RIC6			+	+		
RIC7			+	+		
RIC8			+	+	+	
WHEAT1	+	+	+	+		Seedling
WHEAT2	+		+	+		Spike kernel
WHEAT3	+	+	+	+		Spike
WHEAT4	+	+	+			shoot

2.4 小麦和水稻中 *auxin* 基因家族的 EST 表达分析

水稻和小麦的 *auxin* 基因分别在水稻和小麦的

EST 数据库中找到了匹配的 ESTs 序列(表 1)。其中 RIC6、RIC7 仅找到 2 条相匹配的 EST 序列,其在水

稻的叶和花中表达,其余找到相匹配的 EST 序列的基因全部在叶中表达,且大部分基因(*WHEAT4* 除外)能在植物的花中表达,水稻中大部分基因能在成熟胚中表达,而小麦的 *auxin* 基因并未发现在成熟胚中表达的证据。相反,小麦的 *auxin* 基因均在种子中表达。

2.5 水稻和小麦 *auxin* 基因蛋白亚细胞定位预测

表 3 水稻和小麦的 *auxin* 基因蛋白亚细胞定位预测

	细胞核 Nuclear	细胞质 Cytoplasmic	细胞骨架 Cytoskeleton	线粒体 Mitochondrial	液泡 Vacuole	囊泡分泌系统 Vesicle secretion system	高尔基体 Golgi	细胞壁 Cell wall	内质网 Endoplasmic reticulum	质膜 Plasmalemma
Ric1	69.6	17.4		4.3	8.7					
Ric2	52.2	21.7	8.7	4.3		8.7	4.3			
Ric3	65.2	13.0	8.7		4.3		4.3	4.3		
Ric4	60.9	17.4	8.7	8.7	4.3					
Ric5	17.4	73.9		4.3		4.3				
Ric6	56.5	21.7	8.7			4.3	8.7			
Ric7	21.7	73.9				4.3				
Ric8	26.1	52.2		4.3		4.3				
Wheat1	26.1	52.2		4.3		4.3			4.3	4.3
Wheat2	11.1	11.1		33.3				44.4		
Wheat3	69.6	4.3	4.3	21.7						
Wheat4	69.6		4.3	26.1						
AY902381	26.1	52.2		17.4					4.3	

2.6 获得序列与小麦、水稻同源序列的肽链结构分析

通过 SWISS-MODEL 程序对推测的肽链进行结构预测分析(图 2),发现 AY902381 与小麦 ETIN-like *auxin* response factor 和水稻的 OsARF2 相似性较高。根据以上预测结果,可以确定此 cDNA 片段编码小麦基因为生长素反应因子 2(*auxin* response factor 2)。



图 2 小麦 *auxin* response factor 2(ARF2) 三级结构示意图
Fig.2 Tertiary structure of wheat *auxin* response factor 2(ARF2)

3 讨论

生长素作为植物体内最重要的激素,调控着植物生长和发育等重要过程,如影响细胞的伸长、分裂和分化,促进根茎叶的生长、维管组织分化、顶端优势和向地性以及向光反应等^[17]。植物生长激素调节着植物生长发育的方方面面,通过激活信号传导途径最终调节控制特定发育进程的下游基因的表达

采用最新发展起来的生物信息学分析方法对水稻和小麦的 *auxin* 基因的蛋白进行亚细胞定位预测(表 2),AY902381 基因序列预测结果如下:52.2 %胞质;26.1 %细胞核;17.4 %线粒体;4.3 %内质网。根据生物信息学预测的结果可以发现,*auxin* 基因在小麦和水稻中的表达分布比较广泛,对两种作物的生长发育发挥着不可替代的作用。

来发挥其生物学功能^[18]。植物生长激素可影响植物茎的向光性和背地性生长。在细胞分裂和分化、果实发育、插条时根的形成和落叶过程中也发挥了重要作用^[19,20]。其在植物的形态建成和阶段发育过程中发挥了不可或缺的作用。

作物株型对作物产量具有重要影响^[21],改良作物的株型和生长模式成为提高产量的重要途径之一。植物激素处于诸多调控信号所构成的网络系统的中心,它们在植物株型形成过程中发挥着重要作用^[22]。通过基因功能研究揭示植物株型建成的机制不仅能促进对于植物发育模式的理解,而且能为作物遗传改良提供理论基础。植物生长应答因子基因家族似乎控制着植物生长素和荷尔蒙的水平,该基因在拟南芥中的沉默或超表达直接影响下胚轴的伸长和根的生长^[18]。Ellis CM 的研究发现 ARF2 可以促进拟南芥发育的进度,*arf2* 突变体则表现出植株衰老延缓,其中主要表现在开花、叶片衰老、花器官脱落和角果成熟等阶段。*arf2* 基因的诱导表达可以加速叶片衰老^[23]。Andrew W^[17] 的阐述表明生长素信号及时终止是至关重要,生长素与其他激素信号的互作增加了对生长素发挥作用理解的挑战。IAA 分子结构鉴定近 60 年后,生长素代谢的途径和机理等方面的研究已经基本明确,但一些基本问题和无数细节问题仍有待于解决。

综上所述,植物生长激素在植物的生长发育过程中发挥着重要作用,目前 *auxin* 基因的表达调控和信号传导研究虽然有较深入的研究,但植物生长素作为一类调控激素的信号网络还没有完全研究清楚,针对该基因的功能分析还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] <http://www.biox.cn/content/20050703/22645.htm>.
- [2] 赵普庆,於维维,汪俏梅. 生长素与其他信号之间的相互作用[J]. 植物生理学通讯,2004,40:246 - 250.
- [3] 程 鹏,蒋 泓,欧阳琳,等. 生物信息学技术分析并克隆超级稻生长素结合蛋白 cDNA[J]. 农业现代化研究,2008,29(4):506 - 509.
- [4] Chory J, Wu D. Weaving the complex web of signal transduction[J]. Plant Physiol, 2001, 125:77 - 80.
- [5] Tory Chhunl, Shin Taketa, Seiji Tsurumi, et al. Interaction between two auxin-resistant mutants and their effects on lateral root formation in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54:2701 - 2708.
- [6] Bhunika Singla, Archana Chugh, Jitendra P, et al. An early auxin-responsive Aux/ IAA gene from wheat (*Triticum aestivum*) is induced by epibrassinolide and differentially regulated by light and calcium[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(15):4059 - 4070.
- [7] Baluska F, Barlow P W, Volkmann D. Complete disintegration of the microtubular cytoskeleton precedes its auxin-mediated reconstruction in postmitotic maize root cells[J]. Plant Cell Physiol, 1996, 37:1013 - 1021.
- [8] Xianting Wu, Paula McSteen. The role of auxin transport during inflorescence development in maize (*Zea mays*, Poaceae) [J]. American Journal of Botany, 2007, 94 (11): 1745 - 1755.
- [9] Hironori Fujita, Kunihiro Syono. Genetic analysis of the effects of polar auxin transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Physiol, 1996, 37:1094 - 1101.
- [10] Ken Haga, Moritoshi Iino. Asymmetric distribution of auxin correlates with gravitropism and phototropism but not with autostraightening (autotropism) in pea epicotyls[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(4):837 - 847.
- [11] Naoki Sakurai, Yoshio Masuda. Auxin-induced changes in barley coleoptile cell wall composition[J]. Plant Cell Physiology, 1978, 19:1217 - 1223.
- [12] Maaike de Jong, Celestina Mariani, Wim H. Vriezen. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set[J]. J Exp Bot, 2009, 60:1523 - 1532.
- [13] 杨泽峰, 顾世梁, 许 花, 等. 拟南芥和水稻 *cystatin* 基因家族的生物信息学分析[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 28(3):51 - 57.
- [14] Sonnhammer E L, Eddy S R, Durbin R. Pfam: A comprehensive database of protein families based on seed alignments[J]. Proteins, 1997, 28(3):405 - 420.
- [15] Quevillon E, Silventinen V, Pillai S, et al. Interproscan: Protein domains identifies [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33:116 - 120.
- [16] 陈 磊, 李学伟, 朱 砾, 等. 猪 *CystatinB* 基因 cDNA 克隆及遗传多态性分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(7):2120 - 2127.
- [17] Andrew W, Woodward, Bartel B. Auxin: regulation, action and interaction[J]. Annals of Botany, 2005, 95:707 - 735.
- [18] Tian C, Muto H, Higuchi K, et al. Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition [J]. The Plant Journal, 2004, 40(3).
- [19] 牛西午, 詹海仙, 畅志坚, 等. 不同激素浓度对柠条茎段组织培养及植株再生的影响[J]. 华北农学报, 2005, 20(1):35 - 37.
- [20] <http://baike.baidu.com/view/1714201.htm>.
- [21] 苏中滨, 战守义, 郑 萍, 等. 作物高光效株型数字化设计方法研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(1):203 - 207.
- [22] 王 冰, 李家洋, 王永红. 生长素调控植物株型形成的研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(5):443 - 458.
- [23] Ellis C M, Nagpal P, Young J C, et al. Auxin response factor1 and auxin response factor2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana* [J]. Development, 2005, 132:4563 - 4574.