

文章编号: 1674-148X(2009)04-0309-04

几种作物 GA 受体的同源性比较

隋炯明

(青岛农业大学生命科学学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 目前, 在水稻中已克隆出 GA 受体 *GID1* 基因, 其功能丧失会导致植株矮化。同时, 在拟南芥中也克隆出 3 个相关的 GA 受体基因。根据它们氨基酸序列的保守区设计简并引物, 在不同作物中进行扩增。扩增产物进行回收及测序, 根据这些片段的序列从数据库中得到对应的 EST 序列和氨基酸序列。结果表明: 水稻与高粱、小麦、玉米(*GID1A*和*GID1B*)和棉花中 GA 受体的氨基酸序列具有较高的同源性, 分别为 81.44%、81.36%、80.50%、79.14%和 63.13%。

关键词: GA 受体; 同源基因; 进化分析

中图分类号: Q349

文献标识码: A

Homologous Comparison of GA Acceptor Among Several Crops

SUI Jiong-ming

(College of Life Science, QAU, Qingdao 266109, China)

Abstract *GID1* as gibberellin acid (GA) acceptor has been cloned in rice. Loss of its function can cause dwarfing of plant height. Meanwhile, three GA acceptors have been cloned in *Arabidopsis*. According to the conserved domains, a pair of degenerate primers was designed. Amplifications were carried out among several different crops with those pairs of degenerate primers. Subsequently, these fragments were purified and sequenced, and these sequences were compared with a software to find their corresponding expressed sequence tag (EST). According to those EST sequences, amino acid sequences coding these genes were deduced in sorghum, wheat, maize (*GID1A* and *GID1B*) and cotton. Their amino acid sequences had higher similarity to rice with 81.44%, 81.36%, 80.50%, 79.14%, 63.13%, respectively.

Key words gibberellin acid (GA) acceptor; homologous gene; evolutionary analysis

赤霉素 (简称 GA) 作为植物激素的地位是在 20 世纪 50 年代确立的。虽然在高等植物、真菌和细菌中已经鉴定的 GA 有 120 多种, 但其中只有少数具有生物活性, 如 GA_1 、 GA_3 、 GA_4 和 GA_7 ^[1], 其它种类是活性 GA 生物合成过程的中间产物或分解代谢产物。具生物活性的 GA 影响植物发育的许多进程, 在种子萌发到开花结果的整个生育进程中扮演着重要的角色, 如种子的萌发、叶片的扩展、茎的伸长、开花、性别分化及果实的发育等。赤霉素的生物合成具有明显的器官特异性, 并受到发育的调控, 赤霉素

的调控作用与其自身的合成和代谢密切相关。此外, 赤霉素的代谢及应答途径与其它信号途径协同作用, 相互影响, 构成了高等植物的复杂调控应答体系, 共同调控着植物的生长和发育^[2]。

Ueguchi 等 (2005)^[3]报道了一个水稻已知的受体蛋白 *GID1*, *gid1* 突变体表现出对外源 GA 完全不响应的种种特征:^① GA 响应的一个明显特征是诱导禾谷类植物糊粉层中 α -淀粉酶的合成;^④在 *gid1-1* 突变体中积累大量有活性的内源 GA, 如 *gid1-1* 和 *gid1-2* 突变体中内源赤霉素含量分别

收稿日期: 2009-06-09

基金项目: 青岛农业大学博士启动基金 (630716)

作者简介: 隋炯明 (1978-), 男, 山东潍坊人, 博士, 讲师, 现主要从事作物分子育种研究工作。

是野生型品种的 120 和 95 倍; (四)水稻中有活性的 GA 至少有 10 个折叠区与 G D1 蛋白有很高的亲和性,且在 G D1 蛋白中即使只有一个氨基酸发生改变也会使其不能与 GA 结合; ¼ 在水稻中采用酵母双杂交实验的结果表明 G D1 蛋白位于 SLR1 蛋白的上游并与 DELLA 蛋白 SLR1 相互作用。这些都表明 G D1 蛋白是 GA 的一种可溶性受体。同时,在拟南芥中也发现 3 个 *GID1* 同源基因^[4], 本研究根据水稻和拟南芥中 GA 受体的保守区设计简并引物,运用 PCR 技术在玉米、小麦、高粱和棉花中进行扩增和分析,以期从分子水平探讨它们的亲缘和进化关系。

1 材料与方法

1. 1 基因组 DNA 的提取

将玉米、小麦、棉花和高粱种子发芽培养 1 周左右,取 2cm 长的叶片,按 CTAB 法^[5] (略有改动)提取叶片的 DNA。

1. 2 简并引物的设计和 PCR 扩增

利用 ClustalW 软件对水稻和拟南芥中 GA 受体的氨基酸序列进行多重比对,找到它们的保守序列,根据其设计简并引物。25µl 的 PCR 反应体系包含 10mmol/L Tris-HCl (pH8. 3)、50mmol/L KCl、1. 5 mmol/L MgCl₂、1U 的 Taq 酶、4mmol/L dNTP、10pmol/L 引物和 20ng 模板 DNA; 在 B iometra PCR 仪上进行扩增。

1. 3 PCR 产物的回收及测序

PCR 扩增产物在 0. 8% 琼脂糖凝胶电泳上分离后,用 DNA 回收试剂盒 (PCR Fragment Recovery Kit TaKaRa 公司)回收特异 DNA 片段,分别克隆到 pGEM-T easy 载体上,转入 DH5α 大肠杆菌中。经过蓝白斑筛选出阳性克隆,挑取单个白色菌落,以碱裂解法抽提质粒,进行酶切和 PCR 鉴定后,送上海生物工程有限公司测序。

1. 4 系统树的构建

根据已获得的 GA 受体的氨基酸序列,利用 ClustalW 软件进行多序列对齐和排序,经 Nt sys 软件分析得到矩阵图,用该软件的 UPGMA (Unweighted pair group method arithmetic averages)聚类分析法生成几种作物遗传相似系数的树状图。

2 结果与分析

2. 1 水稻 GA 受体的同源基因在不同作物中的

扩增

目前在水稻和拟南芥中已发现 GA 的受体,它们的基因和氨基酸序列都能从数据库中查到。利用 ClustalW 软件对水稻与拟南芥中 GA 受体的氨基酸序列进行多重比对,找到它们的保守序列,根据其设计简并引物。

利用设计的简并引物,在玉米、小麦、棉花和高粱中进行 PCR 扩增,分别得到 250bp 左右的目的条带 (图 1)。

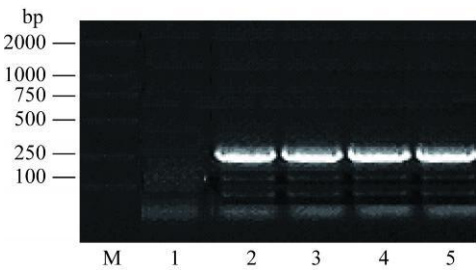


图 1 PCR 扩增结果

1. 空白对照; 2~ 5 分别为玉米、小麦、棉花和高粱中的 PCR 扩增结果。

2. 2 几种作物 GA 受体的氨基酸同源序列比对分析

回收上述扩增片段测序,然后通过 [http // www. ncbi. nh. nh. gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 的 BLAST 工具,通过拼接后找到它们对应的 EST 序列。结果在小麦、棉花、高粱中各找到 1 个与水稻 GA 受体具有较高同源性的 EST 序列,而在玉米中却找到 2 个与水稻 GA 受体具有较高同源性的 EST 序列,分别为 *GID1A* 和 *GID1B*。根据它们的 EST 序列,利用软件找到其对应的氨基酸序列,并与水稻 GA 受体的氨基酸序列进行同源比对。结果发现水稻 GA 受体与高粱、小麦、玉米 (*GID1A* 和 *GID1B*)、棉花中的 GA 受体氨基酸序列具有较高的同源性,分别为 81. 44%、81. 36%、80. 50%、79. 14% 和 63. 13% (附表、图 2),而且它们都具有激素敏感脂肪酶 (Hormone-sensitive lipase, HSL) 保守的基序: HGG 和 GDSSG。

附表 几种作物 GA 受体氨基酸序列的同源性分析

作物名称	O s	Zm A	Zm B	W h	G h
Zm A	0. 8050				
Zm B	0. 7914	0. 8797			
W h	0. 8136	0. 8138	0. 7914		
G h	0. 6313	0. 6224	0. 6224	0. 6283	
Sb	0. 8144	0. 9132	0. 8563	0. 8174	0. 6018

ZmA	MAGSDEVNRNECKGAVPIHTWVLISNFKLAYNMLRRADGTFDRDLAEFLDRRVPPDARAQ
Sb	MAGSDEVNRNECKGAVPIHTWVLISNFKLAYNMLRRADGTFDRDLAEFLDRRVPPDARAQ
ZmB	MAGSDEVNRNECKGAVPIHTWVLISNFKLAYNMLRRADGTFDRDLAEFLDRRVAPDARAQ
Wh	MAGSDEVNRNECKTVVPLHTWVLISNFKVSYHMLRRPDGTFERDLAEYMDRRVPANPRPV
Os	MAGSDEVNRNECKTVVPLHTWVLISNFKLSYNILRRADGTFERDLGEYLDRRVPANARPL
Gh	MAGSNEVNLNESKRVVPLNTWVLISNFKLSYNLQRRPDGTFNRDLSEFLDRRVANINPV ****:* **.*.***:*****:***: **.****:***.*:****.:. .
ZmA	EGVSSSDHVIDTSTGLEVRIYRA-----AANNNGAGAGAAAVLDFLGGGPSP-DPPFVIL
Sb	EGVSSFDHVIDTSTGLEVRIYRAGA-AAANNNGGAAAVTLPILDFLAGAPSP-DPPFVIL
ZmB	EGVSSFDHVIDTSTGLEVRIYRA-----AANNNGGGATLPILDLFGGTPAASTPFPVIL
Wh	EGVSSFDHFIDLSVGLEARIYRAVAGNAAGAAEGAAALTLPILEFLGGAPSP-DLPVVI
Os	EGVSSFDHIIDQSVGLEVRIYRAAAEG--DAEEGAAAVTRPILEFLTDAPAA-EPFPVVI
Gh	DGVFSFDHVDGATGLLNR-----VYQSPKNEAQWGIVDLEKPLSTTEIVPVIV :** * **. . : *: . : : * :. .****:
ZmA	FFHGGSAFHSSSGTAIYDNLCCRFRVKLSKGVVSVNYRRAPEHRYPCAYDDGWAALKWAT
Sb	FFHGGSAFHSSSGTAIYDNLCCRFRVKLSKGVVSVNYRRAPEHRYPCAYDDGWTALKWAM
ZmB	FFHGGSAFHSSSGTAIYDNLCCRRLVRLSKGVVSVNYRRAPEHRYPCAYDDGWAALKWAT
Wh	FFHGGSAFHASSTTIYDNLCRQLVKLSKGVVSVNYRRAPEHRYPCAYDDGWAALKWAQ
Os	FFHGGSFVHSSASSTIYDSLCCRFRVKLSKGVVSVNYRRAPEHRYPCAYDDGWTALKWVM
Gh	FFHGGSFTHSSANSIAIYDTFCRRLVNICKAVVSVNYRRSPEHRYPCAYDDGWAALKWVK *****.**: :. :.***.**: :. .*.*****:*****:*****.
ZmA	SQPFLRSG--GDGRPRVFLSGDSSGGNIAHHVAVRAADAGINICGNILLNAMFGGTERTE
Sb	SQPFLRSGRGGDARPRVFLSGDSSGGNIAHHVAVRAADAGINICGNILLNAMFGGTERTE
ZmB	SQPSLGS--SSGARVFLSGDSSGGNIAHHVAVRAAVAGIRVRGNVLLNAMFGGAERTE
Wh	AQPFLRSG--SDARLRVFLAGDSSGGNIAHHVAVRAAEEGIKHGNILLNAMFGGVERTE
Os	SQPFMRSG--GDAQARVFLSGDSSGGNIAHHVAVRAADEGVKVCGNILLNAMFGGTERTE
Gh	SRTLWLQSG--KDSKVHVYLAGDSSGGNIAHHVAVRAAEADVEVLGNILLHPMFGGQMRTE : : . : ** . . :*: :*****. :. :. **:***.**** **
ZmA	SERRLDGKYFVTLQDRDWYWKAYLPEDADRDHPACNPFPGNGRRLRGLPFPKSLIIVSGL
Sb	SERRLDGKYFVTLQDRDWYWKAYLPEDADRDHPACNPFPGNGRRLRGLPFTKSLIIVSGL
ZmB	SERRLDGKYFVTLQDRDWYWKAYLPEDADRDHPACNPFPGNGRRLAGLPFPRSLIIVSGL
Wh	SERRLDGKYFVTLQDRDWYWKAYLPEDADRDHPACNPFPGNGRRLRGLPFAKSLIIVSGL
Os	SERRLDGKYFVTLQDRDWYWKAYLPEDADRDHPACNPFPGNGRRLGGLPFAKSLIIVSGL
Gh	SEKRLDGKYFVTLHDRDWYWRAYLPEGEDRDHPACNPFGPRGRTLEGLKFPKSLVVVAGL **:* *****:*****:*****. *****.* ** * *.**:* :*:**
ZmA	DLTCDRQLAYAEGLQQDGHVVKVYREKATVGFYLLSNTDHYHEVMEEIGDFLANL--
Sb	DLTCDRQLAYAEGLQEDGHHAKLVYREKATVGFYLL-----
ZmB	DLTCDRQLAYADGLREDGHPVKLVYREKATVGFYLLPNTNHYHEVMEEIADFLRANL--
Wh	DLTCDRQLGYAEGLREDGHDVKLVHREKATIGFYLLSNTNHYHEVMEEIAEFVRANLL-
Os	DLTCDRQLAYADALREDGHHVKVVCENATVGFYLLPNTVHYHEVMEEISDFLNANLYY
Gh	DLIQDWQLAYVEGLKKSGQEVKLLFLEKATIGFYFLPNNDHFYCLMEEMNFI----- ** * **. *. :. *: :. *: :. *: :. *: :. *: :. *: :. *: :. *: :. *

图 2 几种作物 GA 受体的氨基酸序列同源比对结果

注: Os (*Oryza sativa*, AC105319) 水稻, ZmA (*Zea mays* GID1A, BN001194) 玉米, ZmB (*Zea mays* GID1B, BN001195), GH (*Gossypium hirsutum*, EST1085574) 棉花, TA (*Triticum aestivum*, BN001201) 小麦, Sb (*Sorghum bicolor*, AW745910) 高粱。

* 代表两者相同的氨基酸, 底纹代表 HSL 的保守序列。

2 3 几种作物 GA 受体的进化分析

利用 UPGMA 聚类分析法对水稻、玉米、小麦、棉花和高粱的 GA 受体氨基酸同源序列进行分析, 构

建其进化树 (图 3)。从图 3 中可以看出: 水稻与小麦的 GA 受体氨基酸序列同源性最高, 而玉米与高粱的 GA 受体氨基酸序列同源性最高, 而棉花单独

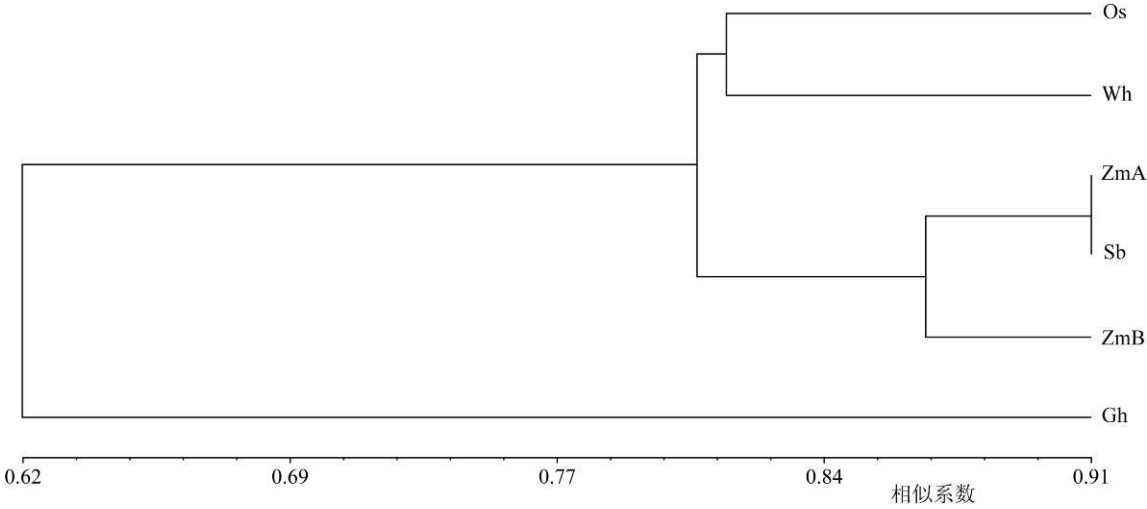


图 3 几种作物 GA 受体氨基酸序列同源性的聚类分析图

归为一类。

3 小结与讨论

生物学家长期以来主要从形态学性状和解剖学的方法来划分物种, 但是形态性状易受环境的影响, 普遍存在趋同和平行进化现象, 而且形态学观察受主客观条件影响也较大。而 DNA 序列携带的是物种的遗传信息, 直接的反映物种的基因型, 含有丰富可靠的进化信息, 为鉴定亲缘关系、研究系统发育和演化提供可靠的分子生物学证据。随着 PCR 和 DNA 测序、基因芯片等技术的发展, 越来越多的基因可进行进化分析, 这些分子数据将为物种的系统学和分类研究提供丰富可靠的资料证据^[6]。

目前在拟南芥中, 已发现 3 个编码 GA 受体的基因, 分别是 *GID 1A*、*GID 1B*、*GID 1C*。它们共同作用应答 GA 信号, 并且与 *SLY1*、*GAI*和 *RGA* 蛋白相互作用^[4]。本研究根据它们与水稻的氨基酸序列的保守区设计简并引物, 在不同作物中进行同源扩增, 结果扩增出了相应的条带。根据其 EST 序列和对应的基因组序列, 发现只有水稻的 GA 受体基因具有一个内含子, 而其它几种作物的 GA 受体基因都没有内含子。经过氨基酸序列的同源性比对后发现, 水稻与高粱、小麦、玉米 (*GID 1A* 和 *GID 1B*)、棉花中的 GA 受体氨基酸序列具有较高的同源性, 分别为 81.44%、81.36%、80.50%、79.14%、

63.13%。从附表可以看出, 禾本科作物之间 GA 受体氨基酸序列的同源性比较高, 变化范围为 79.14% ~ 91.32%, 其中玉米 GA 受体 *GID 1A* 与高粱 GA 受体同源性最高, 为 91.32%, 其次为玉米 GA 受体 *GID 1A* 和 *GID 1B* 的同源性为 87.97%, 玉米 GA 受体 *GID 1B* 与高粱 GA 受体的同源性为 85.63%, 这也间接说明了禾本科作物之间的亲缘关系比较近, 尤其是玉米和高粱之间; 而锦葵科的棉花与禾本科作物之间 GA 受体氨基酸序列的同源性相对较低, 变化范围为 60.18% ~ 63.13%, 表明它们的亲缘关系稍远。

参考文献:

[1] Hedden P, Phillips A L. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes [J]. Trends Plant Sci. 2000, 5: 523-530.
[2] 罗震, 康宗利, 樊金娟, 等. 赤霉素的信号转导途径 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1): 191-194.
[3] Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, et al. Gibberellin insensitive dwarf1 encodes a soluble receptor for gibberellin [J]. Science. 2005, 437: 693-698.
[4] Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, et al. Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors [J]. Plant J. 2006, 46(5): 880-889.
[5] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation high molecular weight plant DNA [J]. Natl Acad Res. 1980, 8: 4321-4325.
[6] 丁淑丽, 卢钢, 李建勇, 等. 十字花科植物 SAMDC 基因同源序列的克隆与进化分析 [J]. 遗传, 2007, 29(1): 109-117.