

文章编号: 1674-7054(2012)04-0298-07

木薯赤霉素途径 DELLA 蛋白基因克隆及其对干旱胁迫的响应

廖文彬 彭 明

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所以农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室 海南 海口 571101)

摘 要: 赤霉素(GA)信号转导途径是通过 DELLA 抑制蛋白来调控的。笔者利用拟南芥 DELLA 蛋白基因序列通过电子克隆方法首次克隆了 1 个木薯 DELLA 蛋白基因,长度为 1 857 bp,具有完整的蛋白编码框的 cDNA 序列,命名为 *MeGAI*。生物信息学分析显示,该蛋白具有与拟南芥 DELLA 蛋白一样的保守结构域,如 DELLA 结构域、VHYNP 结构域、POLY(S/T) 结构域、核定位信号、VHVID 结构域、亮氨酸结构域、GRAS 结构域;该基因在干旱胁迫下的表达模式研究结果表明,该基因在干旱胁迫下是下调表达的;GA 生物合成重要基因 GA20-氧化酶基因在干旱胁迫下的表达模式研究结果表明,两者在干旱胁迫下的表达模式具有良好的相关性,这说明 GA 途径可能参与木薯抗旱机制。

关键词: 木薯 DELLA 蛋白;基因克隆;生物信息学分析;干旱胁迫响应

中图分类号: Q 344+.12

文献标志码: A

在植物体内赤霉素(GA)是通过合成途径与信号转导途径来调控植物的生长与发育的。高等植物 GA 的生物合成前体是牻牛儿基焦磷酸(GGPP)^[1]。GA 生物合成的相关酶主要有:牻牛儿基焦磷酸合成酶(GGFS)、内根-贝壳杉烯合酶(CPS)、内根-贝壳杉烯合酶(ent-kaurene synthase,KS)、内根-贝壳杉烯氧化酶(ent-kaurene oxidase)、内根-贝壳杉烯酸-7 β -羟化酶(ent-kaurene acid-7 β -hydroxylase)、GA12 醛合酶和 GA13-羟化酶、GA 20-氧化酶、GA2 氧化酶(GA2ox)和 GA3 氧化酶(GA3ox)等。在高等植物中,GA 的生物合成可以划分为 3 个阶段:第 1 阶段是在原质体中合成内根-贝壳杉烯(ent-kaurene)。合成过程为 GGPP 在古巴焦磷酸合成酶(CPS)和内根-贝壳杉烯合酶(KS)的催化下环化为赤霉素的前体内根-贝壳杉烯。内根-贝壳杉烯的 C-19 的甲基在内根-贝壳杉烯氧化酶(KO)催化下不断被氧化,分别形成内根-贝壳杉烯醇、内根-贝壳杉烯醛和内根-贝壳杉烯酸。第 2 阶段是通过微粒体色素 P450 单加氧酶将内根-贝壳杉烯生成转换到 GA12-醛,合成过程为内根-贝壳杉烯在内根-贝壳杉烯氧化酶(KO)和内根-贝壳杉烯酸氧化酶(KAO)的作用下生成,GA12-醛是 GA 的最初产物,可在 13-水解酶作用下转变成 GA53,这主要在内质网的膜上进行。第 3 阶段是在细胞质内形成 C20 和 C19 的 GAs。合成过程为 GA12-醛在 GA20 氧化酶、GA3 氧化酶和 GA2 氧化酶作用下转变为其他种类 GA,这主要在细胞质中完成^[2]。在植物体内,GA20 氧化酶、GA3 氧化酶和 GA2 氧化酶在 GA 的生物合成中有一定程序的分工,其中 GA20 氧化酶是在 GA 生物合成中起重要调控作用的关键酶,其催化 C20 的每一步氧化反应和主要催化 GA24 $\rightarrow$ GA25 和 GA19 $\rightarrow$ GA17 反应;GA3 氧化酶的作用位点主要是 GA20 氧化酶的产物,如 GA20 $\rightarrow$ GA1 和 GA9 $\rightarrow$ GA1;GA2 氧化酶则主要作用于有生物活性的 GA1 和 GA4^[2]。GA20 氧化

收稿日期: 2012-10-10

基金项目: 国家国际科技合作专项(2013DFA32020); 国家 863 计划项目资助(2012AA101204-2)

作者简介: 廖文彬(1975-),男,湖南邵阳人,中国热带农业科学院热带生物技术研究所以副研究员。

通信作者: 彭明, E-mail: mmpeng_2000@yahoo.com

酶、GA3 氧化酶主要调节有生物活性的 GA 的合成;GA2 氧化酶主要导致有生物活性的 GA 降解,属于 GA 代谢关键酶^[2-3]。因此,GA20 氧化酶是 GA 生物合成过程中的关键酶。

在高等植物体内,当 GA 受体感知到 GA 信号后,通过植物体内一系列激活信号,使信号传递通道中的各基因均获得表达,从而调节植株的形态建成和发育。当编码这些激活信号因子的基因及其识别的顺式作用的位点发生突变时,下游基因的表达和相关蛋白间的相互作用发生相应的变化,导致植物对 GA 反应的改变^[3]。赤霉素信号转导是一个复杂的过程,包括有 GA 受体(*GID*)对 GA 信号的感知、信号的传递以及最终引起特定的 GA 反应等一系列过程^[4]。在拟南芥中,GA 信号转导的模型如图 1 所示^[5]。在此模型中,中心是 DELLA 蛋白(*GAI*,*RGA*,*RGL1*,*RGL2*,*RGL3*),它们是 GA 下游响应基因的抑制子。在模式植物拟南芥中,所有 DELLA 蛋白在调节拟南芥生长与发育中有冗余的作用。植物产生的生物活性 GA 信号系统通过位于质膜上的 GA 受体 *GID* 感知信号,从而启动一系列信号传递。通过在水稻中对 DELLA 蛋白的研究,认为激酶对 DELLA 蛋白的磷酸化是整个信号传递的起始,当然,一些其他形式的转录后修饰也在过程中发生,随后,被修饰后的 DELLA 蛋白通过 GRAS 结构域被 SCF^{SLY1} E3 Ub 连接酶中的 SLY1 亚基识别与结合,导致 DELLA 蛋白的多聚泛素化,从而启动 26S 蛋白酶降解系统,使 DELLA 蛋白发生降解,DELLA 蛋白的水平减少致使下游基因的表达,导致了 GA 响应的发生,从而使植物生长与发育^[6]。

笔者首次从木薯中克隆到 1 个 DELLA 蛋白,并对其进行生物信息学分析和研究其在干旱胁迫下的表达模式,生物信息学分析结果显示,该蛋白具有与拟南芥中的 DELLA 蛋白一样的保守结构域;表达模式结果表明,该基因在干旱胁迫下是下调表达的,这说明 GA 信号可能参与木薯抗旱机制,为木薯抗旱机制研究提供研究基础。

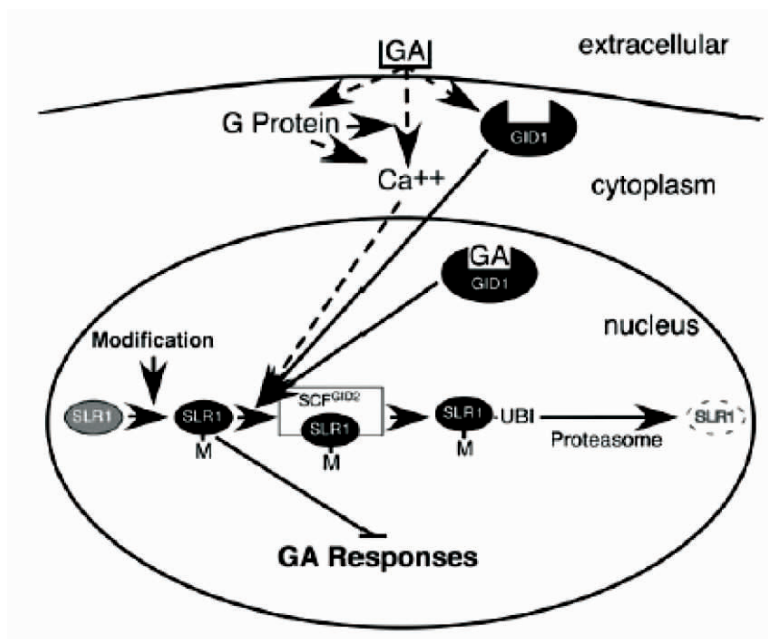


图1 水稻 GA 信号传导模式图

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 试验用的木薯品种为华南 5 号,采自中国热带农业科学院热带生物技术研究所实验基地温室大棚。

1.1.2 菌株和质粒 克隆载体 pMD18-T Simple Vector 购自 Takara 公司;感受态细胞 *E. coli* 购自天根生

化科技有限公司。DNase I, *Taq* DNA 聚合酶以及反转录酶购自 Takara 生物工程公司; DL2000, DL15000 + 2000 核酸分子量标准购自上海生工。

1.2 实验方法

1.2.1 木薯干旱胁迫处理及取样 待木薯在温室大棚长到 3 个月时进行干旱胁迫处理, 分别于干旱胁迫处理 0, 2, 4, 6, 8, 10 d 进行取样, 取样部位为木薯叶柄部位的离区部分。

1.2.2 木薯总 RNA 的提取 提取方法参考植物总 RNA 提取试剂(RNAPlant Reagent) 说明(Invitrogen, Catalog no. 12322-012)。

1.2.3 木薯 *MeGA20ox*, *MeGAI* 基因克隆 利用拟南芥 *AtGA20ox*, *AtGAI* 基因序列, 通过 tBlastx 搜索 JGI 木薯数据库, 对搜索到的同源序列片段通过 Vector NTI 软件进行组装, 对含有完整 ORF 的基因片段进行扩增并测序, 测序后将其与 *AtGA20ox*, *AtGAI* 基因进行同源性分析, 同时进行基因克隆。

1.2.4 序列分析 对克隆基因采用 Vector NTI 软件进行生物信息学分析。

1.2.5 木薯 *MeGA20ox*, *MeGAI* 响应干旱信号的定量 PCR 分析 待木薯在温室大棚长到 3 个月时, 按 6 个时间点进行干旱处理, 对不同时间点的木薯离区进行采样, 并进行总 RNA 分离。每次采样均采集植株中部的离层 3 段, 并对样品进行了 3 次重复实验, 对 6 个来源于干旱处理后不同时间点的样品进行木薯赤霉素途径相关基因表达模式分析, 并进行了 3 次技术重复。所有样品经提取 RNA 后, 均反转录成 cDNA, 以 *ACTIN2* 基因为对照, 采用相对定量的方法对木薯赤霉素途径相关基因响应干旱信号的表达模式进行了定量 PCR 分析^[7]。

1.2.6 定量 PCR 条件与定量方法 所有样品的 RNA 都用 RNase-free DNase I (TaKaRa Biotechnology Co., Ltd., Dalian) 进行消化, 以排除基因组 DNA 的污染。所有样品的 cDNAs 合成采用 PrimeScriptTM RT reagent Kit (TaKaRa Biotechnology Co., Ltd., Dalian) 合成。cDNAs 来源于 3 次生物学重复, 均用来进行定量 PCR 分析, 所有样品的 PCR 反应均进行了 3 次重复, 且均设置了无模板与无反转录的对照, 所有样品的定量 PCR 分析均采用 Stratagene Mx3000P QPCR System 进行。定量 RT-PCR 的反应体系为 25 μ L, 包括 12.5 μ L FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche Ltd.), hydrolysis probe 0.25 μ L (25 μ mol $\cdot$ L⁻¹), 0.9 μ L forward primer (50 μ mol $\cdot$ L⁻¹), 0.9 μ L reverse primer (50 μ mol $\cdot$ L⁻¹), 9.45 μ L ddH₂O, 2 μ L 模板 cDNA (5 ng $\cdot$ L⁻¹)。定量 PCR 的反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 15 sec, 95 $^{\circ}$ C, 1 min, 60 $^{\circ}$ C, 共进行 40 个循环。所有样品采用 MxProTM QPCR Software Version 3.00 (STRATAGENE) 进行数据收集与分析。定量结果用循环阈值(CT) 表示, 样品中基因的相对表达量的确定按文献[8]的方法进行。简而言之, 不同样品的 CT 值由公式 $\Delta CT = CT^{\text{target}} - CT^{\text{control}}$ 进行计算, 目标基因相对于内对照基因的表达差异用 $2^{-\Delta CT}$ 公式确定, 每个样品 PCR 反应重复 3 次, 以 3 次重复的 $2^{-\Delta CT}$ 的平均值来确定目标基因与内对照基因的表达差异。

2 结果与分析

2.1 基因克隆与生物信息学分析 在拟南芥基因组中, 共有 GAI, RGA, RGL1, RGL2 和 RGL3 5 个 DELLA 蛋白编码基因作为 GA 信号的负调控子调节植物 GA 信号^[9]。因为不同物种的 DELLA 蛋白质具有很高的序列同源性, 因此, 笔者通过对拟南芥 DELLA 蛋白基因序列在 JGI 数据库上进行 Blast 搜索, 发现 1 条来源于 *Manihot esculenta* cDNA 文库的木薯核酸序列(CASSAVA4.1_003741M) 与拟南芥 DELLA 蛋白基因 *AtGAI* 基因具有很高的序列相似性, 并且这条序列的长度为 2 276 bp, 其完整 ORF 长度为 1 857 bp。

根据这条核酸序列, 笔者设计了特异引物(正向: 5' - AT-GAAGAGAGATCGCCCTGAAAG - 3', 反向: 5' - TCATTTCCTGCGAACCAC -

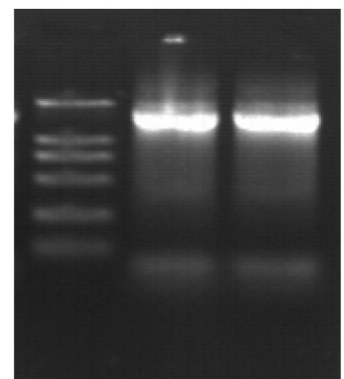


图2 木薯 *MeGAI* 基因电泳图

CAC -3′) 利用木薯叶片 mRNA 反转录产物 cDNA 为模板 扩增相应的核酸序列 结果得到 1 条长约 1.8 kp 的片段(如图 2) 。对该片段测序后进行序列分析发现 该核酸序列长为 1 857 bp ,并含有 1 854 bp 完整读码框的 cDNA 序列。通过 Vector NTI 软件分析 该核酸序列编码 618 个氨基酸 ,同时 相应序列从木薯基因组中也克隆得到 ,序列分析发现该序列没有内含子。通过 Blast 搜索 该核酸序列与 *AtGAI* 具有很高的同源性 通过序列比较 发现含有完整的 *MeGAI* 基因的核酸序列与 *AtGAI* 有 59.6% 核酸相似性 由此推测它可能是 *AtGAI* 的同源蛋白。

为进一步确认该基因为木薯中的 DELLA 蛋白编码基因 ,笔者对 *MeGAI* 蛋白序列与拟南芥中所有的 DELLA 蛋白(*GAI* ,*RGA* ,*RGL1* ,*RGL2* 和 *RGL3*) 进行了相似性分析 ,结果表明 ,它与拟南芥中的 5 个 DELLA 蛋白的氨基酸相似度分别为 65.6% 65.6% 66.7% 67.6% 和 62.1% 。*MeGAI* 蛋白序列与拟南芥中所有的 DELLA 蛋白(*GAI* ,*RGA* ,*RGL1* ,*RGL2* 和 *RGL3*) 的进化关系如图 3 所示。

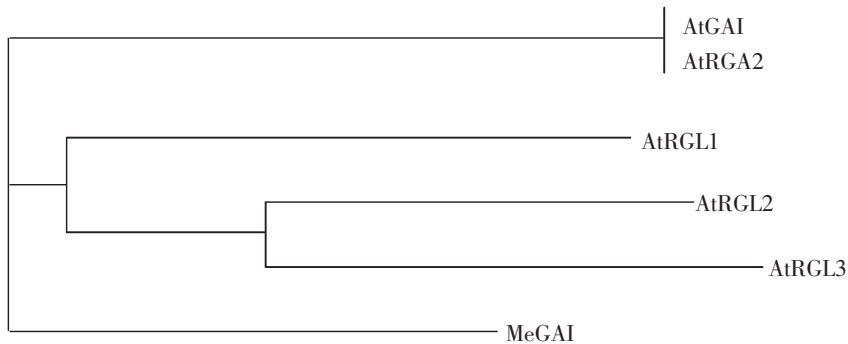


图 3 木薯 *MeGAI* 蛋白与拟南芥 5 个 DELLA 蛋白进化分析

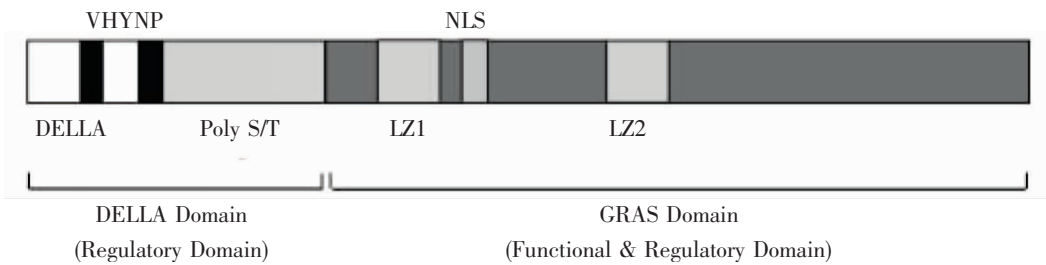


图 4 DELLA 蛋白的主要结构域

由于 DELLA 蛋白编码基因属于 GRAS 家族中的一员^[8] ,DELLA 蛋白与 GRAS 家族的其他蛋白在 C 端具有高度的同源性 ,但在 N 端的同源性较差。然而 ,来源于不同植物的所有 DELLA 蛋白 ,在氨基酸序列的 N 端均具有较高的同源性 ,包括高度保守的 DELLA 结构域、VHYNP 结构域和 1 个多变的 Poly S/T 保守区。除了 DELLA 结构域 ,这些蛋白还具有多个保守的结构域 ,包括 1 个核定位信号(NLS) 、2 个亮氨酸拉链保守区和 1 个高度保守的 GRAS 结构域^[9] (见图 4) 。

通过生物信息学分析 ,在 *MeGAI* 多肽序列中 ,与拟南芥中的 DELLA 蛋白一样 ,同样发现有预测的功能结构域。如图 5 所示 ,在 *MeGAI* 蛋白的 N 端 ,具有高度保守的 DELLA domain 与 VHYNP domain ,它们对感知 GA 信号是必须的。在 *MeGAI* 的 N 端同样具有多变的 Ser/Thr 富集区 ,此保守区可能调节 DELLA 蛋白的抑制活性。在 *MeGAI* 蛋白的 C 端发现有高度保守的 GRAS 结构域 ,该结构域对 DELLA 蛋白的功能与调节活性都是必须的。在 *MeGAI* 的 C 端 ,同样具有 2 个亮氨酸拉链 ,它们也许对形成 DELLA 蛋白的同型二聚体是重要的。在 *MeGAI* 的 C 端 ,同样发现具有 1 个推测的核定位信号(NLS) ,它被证明对该蛋白质的核定位具有重要作用。通过以上分析 ,笔者认为 *MeGAI* 为来源于木薯的 DELLA 蛋白。

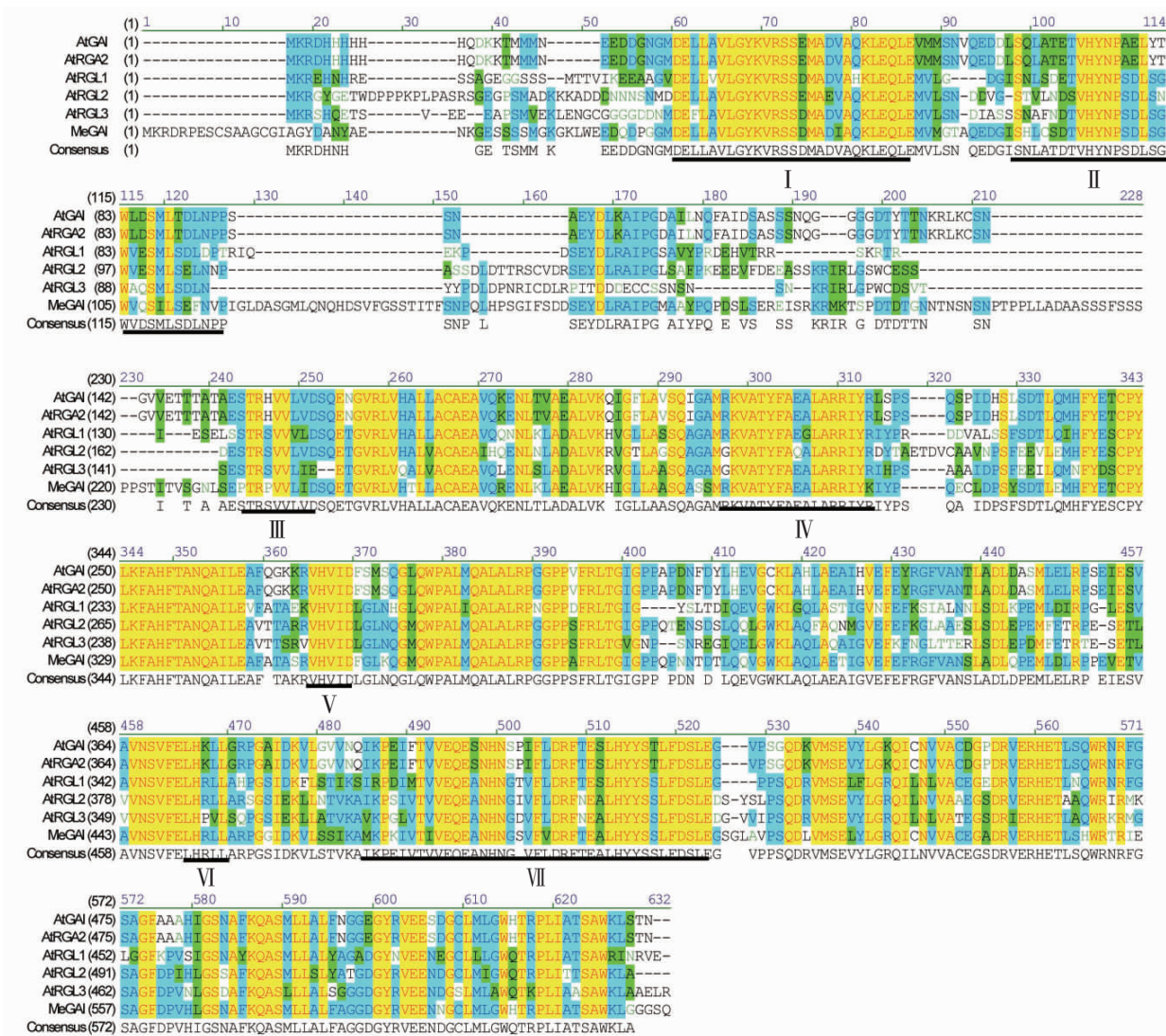


图5 MeGA1 蛋白质序列与拟南芥 5 个 DELLA 蛋白氨基酸序列比对分析及其保守结构域

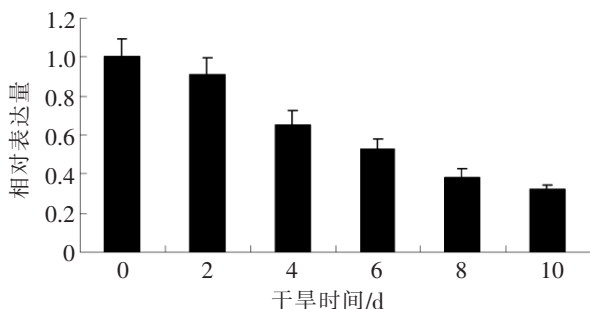


图6 MeGA1 在干旱胁迫下的表达模式分析

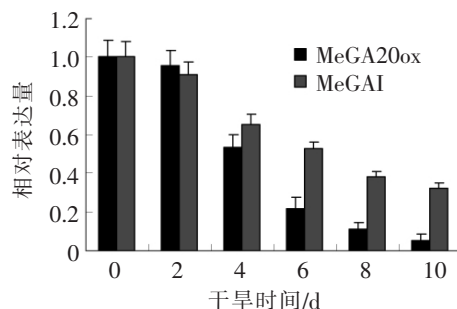


图7 MeGA1 和 MeGA20ox 在干旱胁迫下的表达模式分析

2.2 MeGA1 对干旱胁迫的响应 GA 信号途径在植物生长发育过程中起着重要的调节作用,为了研究克隆到的木薯 DELLA 蛋白的功能,笔者通过定量 PCR 技术研究了 MeGA1 基因对干旱胁迫的响应。通过对不同干旱时间点的木薯叶柄离区(在胁迫条件下木薯叶片脱落处,见图 6)的总 RNA 分离,以 6 个时间点的干旱样品来分析木薯 MeGA1 基因响应干旱信号表达模式,包括干旱处理后 0 2 4 6 8 10 d 的组织样品,以木薯 ACTIN2 基因为对照,采用相对定量的方法对木薯 MeGA1 基因响应干旱信号的表达模式进行定

量 PCR 的分析结果(见图6)显示,木薯 *MeGAI* 基因在所有样品中均有表达,且在干旱条件下都是下调表达的。随着干旱时间的延长,木薯 *MeGAI* 基因的表达量也逐渐降低,在干旱的末期,其表达量也降到了最低点。这些结果显示,木薯 *MeGAI* 基因能够响应干旱信号,暗示木薯 *MeGAI* 基因可能对木薯干旱胁迫起着重要的调控作用。

3 讨论

通过对 JGI 数据库进行 Blast 比较,笔者首次克隆到木薯 DELLA 蛋白基因,长度为 1 857 bp,对其进行生物信息学分析的结果显示,该蛋白具有与拟南芥中的 DELLA 蛋白一样的保守结构域。同时,笔者还克隆到赤霉素合成途径上的另一个重要的基因 GA20-氧化酶基因,该基因是在 GA 生物合成中具有重要作用的调控酶;该基因在干旱胁迫下的响应研究。结果表明,木薯 GA20-氧化酶基因与 *MeGAI* 基因在干旱条件下具有同样的表达模式(见图7)。这说明在干旱胁迫下,木薯中 GA 生物合成与信号转导相关基因都是下调表达的,且随着干旱程度的不断加强,木薯 GA20-氧化酶基因的表达量相对 *MeGAI* 基因下降得更明显。在拟南芥中,在外源 GA 的作用下,GA 能诱导 DELLA 蛋白的降解,也能导致 GA 生物合成基因 GA20-氧化酶基因等基因的下调表达,并且 DELLA 蛋白的降解可能先于 GA 生物合成基因 GA20-氧化酶基因的下调表达,这说明 DELLA 蛋白存在对 GA 生物合成基因的反向调节作用^[9]。在植物正常生长的条件下,DELLA 蛋白在 GA 信号中的重要作用之一,是在植物体内通过直接反馈调节 GA 生物合成基因及其 GA 受体基因来建立 GA 的动态平衡^[8]。水稻中,在正常生长条件下,DELLA 蛋白基因与 GA20-氧化酶基因有同样的表达模式,这说明 GA 合成与信号接收是在同一位置进行的^[10-11],但有关 DELLA 蛋白与 GA 生物合成的反馈调节的详尽机制还不清楚。此前,在研究 DELLA 蛋白基因及 GA 生物合成相关基因时都是在植物正常生长条件下进行的,而对在非正常的胁迫条件下,DELLA 蛋白基因与 GA 合成相关基因的调控研究还鲜有报道。笔者认为,在木薯干旱胁迫下,可能存在着如下的机理,即在干旱胁迫下(非正常条件下)植物合成 GA 的能力下降,木薯体内 GA 含量下降,致使木薯信号转导关键基因 *MeGAI* 基因的表达量下调,导致 GA 响应的信号下调,使植物生长与发育受阻,这有利于木薯安全度过干旱胁迫的不利环境。

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] OLSZEWSKI N, SUN T P, GUBLER F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways [J]. Plant Cell, 2002(14): S61-S80.
- [3] 黄先忠, 蒋才富, 廖立力, 等. 赤霉素作用机理的分子基础与调控模式研究进展 [J]. 植物学通报, 2006, 23(5): 499-510.
- [4] 王荣, 崔百明, 彭明, 等. 赤霉素信号转导与棉纤维的分子发育 [J]. 遗传, 2007, 29(3): 276-282.
- [5] HARTWECK L M, OLSZEWSKI N E. Rice GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling [J]. Plant cell, 2006, 18(2): 278-282.
- [6] THOMAS S G, SUN T P. Update on Gibberellin Signaling. A Tale of the Tall and the Short [J]. Plant Physiology, 2004, 135(2): 668-676.
- [7] LIAO W B, RUAN M B, CUI B M, et al. Isolation and Characterization of a GAI/RGA-like gene from *Gossypium hirsutum* [J]. Plant Growth Regulation, 2009, 58(1): 34-45.
- [8] HUSSAIN A, PENG J R. DELLA Proteins and GA Signalling in Arabidopsis [J]. J Plant Growth Regul, 2003, 22: 134-140.
- [9] FU X, SUDHAKAR D, PENG J, et al. Expression of *Arabidopsis* GAI in transgenic rice represses multiple gibberellin responses [J]. Plant Cell, 2001, 13(8): 1791-802.
- [10] ZENTELLA W, ZHANG Z L, PARK M, et al. Global Analysis of DELLA Direct Targets in Early Gibberellin Signaling in Ar-

abidopsis [J]. The Plant Cell, 2007 (19): 3037 – 305.

[11] KANEKO M, ITOH H, INUKAI Y, et al. Where do gibberellin biosynthesis and signaling occur in rice plants? [J]. Plant J 2003, 34: 1 – 12.

Gene Cloning of DELLA Protein from Cassava and Its Expression Patterns Under Drought Stress

LIAO Wen-bin, PENG Ming

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences; Ministry of Agriculture Key Laboratory for Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Haikou 571101, China)

Abstract: The GA signaling pathway is regulated by the DELLA proteins. A cassava nucleotide with high sequence homology to *Arabidopsis thaliana* *GAI* (*AtGAI*) was identified in the JGI database with the NCBI BLAST program. This nucleotide, named *MeGAI*, has a full length of 1 857 bp and contained genomic coding sequences. Sequence comparisons between the *MeGAI* sequence and all of DELLA proteins in *Arabidopsis* indicated that *MeGAI* also has similar conserved domains to the DELLA proteins of the *Arabidopsis*, such as DELLA domain, VHYNP domain, POLY(S/T) domain, NLS domain, VHVID domain, leu zipper domain, GRAS domain. All these domains indicted that *MeGAI* is an ortholog of *AtGAI*. Analysis of expression patterns of this gene in response to drought stress treatment showed that this gene is down regulated. Moreover, analysis of the expression patterns of the *GA20ox* gene, a key gene on GA biosynthesis process, indicated that the *GA20ox* gene has similar expression patterns to *MeGAI*. All these results give the clues to possible involvement of GA signal in resistance to drought stress.

Key words: DELLA protein; gene cloning; bioinformatics analysis; drought stress