

白及 *Aux/IAA* 基因的鉴定及分析

刘厚伯¹, 李 春², 李 林¹, 上官艳妮¹, 黄恻隐¹, 刘 怡¹, 郑明辉¹, 徐德林^{1,①}

(1. 遵义医科大学 细胞生物学教研室, 贵州 遵义 563099; 2. 河南省农业科学院 芝麻研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 基于白及 [*Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rehb. f.] 的全转录组数据, 采用生物信息学方法对白及 *Aux/IAA* 基因进行鉴定和序列分析, 对白及 *Aux/IAA* 蛋白的一级和二级结构、基序、保守结构域、GO 功能分类和 KEGG 富集结果进行分析, 并对其与拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 和铁皮石斛 (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) 的 *Aux/IAA* 蛋白进行系统发育分析。结果表明: 在白及的全转录组中共筛选出 5 个 *Aux/IAA* 基因, 分别命名为 *BsAux/IAA1* 至 *BsAux/IAA5*, 开放阅读框 (ORF) 长度为 492~2 739 bp。5 个 *BsAux/IAA* 蛋白的氨基酸残基数为 163~912, 理论相对分子质量为 18 172.97~101 442.89, 理论等电点为 pI 4.40 至 pI 11.51, 亚细胞定位于细胞核中, 二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主。5 个 *BsAux/IAA* 蛋白共有 Domain I、Domain II、Domain III 和 Domain IV 4 个完整的保守结构域, 依次对应保守基序 motif9、motif3、motif2 和 motif1。5 个 *BsAux/IAA* 蛋白的功能均包括细胞组分、生物学过程和分子功能 3 个大类, 并参与植物激素信号转导通路。系统发育分析结果表明: 5 个 *BsAux/IAA* 蛋白均属于 Group I 亚家族, 并进一步分成 a 和 b 2 个亚群, 其中, *BsAux/IAA3*、*BsAux/IAA4* 和 *BsAux/IAA5* 属于 a 亚群, *BsAux/IAA1* 和 *BsAux/IAA2* 属于 b 亚群; 并且, *BsAux/IAA1*、*BsAux/IAA2*、*BsAux/IAA4* 和 *BsAux/IAA5* 与铁皮石斛 *Aux/IAA* 的亲缘关系较近。研究结果显示: 白及 *Aux/IAA* 蛋白具有一定的保守性, 可能在细胞核中发挥作用, 并具有组织特异性、发育依赖性和非生物胁迫应答性。

关键词: 白及; *Aux/IAA* 基因; 基因鉴定; 序列分析; 系统发育分析

中图分类号: Q943.2; S567.23⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)03-0011-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.03.02

Identification and analysis on *Aux/IAA* genes of *Bletilla striata* LIU Houbo¹, LI Chun², LI Lin¹, SHANGGUAN Yanni¹, HUANG Ceyin¹, LIU Yi¹, ZHENG Minghui¹, XU Delin^{1,①} (1. Department of Cell Biology, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China; 2. Sesame Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(3): 11-18

Abstract: Based on the whole transcriptome data of *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rehb. f., identification and sequence analysis on *Aux/IAA* genes of *B. striata* were conducted by using bioinformatics methods, and primary and secondary structures, motif, conserved domain, GO function classification, and KEGG enrichment result of *Aux/IAA* proteins of *B. striata* were analyzed, meanwhile phylogenetic analysis on them with *Aux/IAA* proteins of *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. and *Dendrobium officinale* Kimura et Migo were performed. The results show that 5 *Aux/IAA* genes are screened from the whole transcriptome of *B. striata*, named as *BsAux/IAA1* to *BsAux/IAA5*, respectively, with an open reading frame (ORF) length of 492-2 739 bp. The amino acid residue numbers of 5 *BsAux/IAA* proteins are 163-912, with theoretical relative molecular mass of 18 172.97-101 442.89 and theoretical isoelectric point of pI 4.40 to pI 11.51, their subcellular locations are in the nucleus, and their secondary structures are mainly α -helix and random coil. There are 4 complete conserved domains of

收稿日期: 2019-09-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31560079; 31560102); 贵州省科学技术基金项目(黔科合平台人才[2017]5733-050; 黔科合平台人才[2017]5733-001); 贵州省中医药管理局项目(QZYY-2019-060); 贵州省教育厅人才项目(KY[2017]194)

作者简介: 刘厚伯(1994—), 女, 四川成都人, 硕士研究生, 主要从事中药材的遗传研究。

①通信作者 E-mail: xudel2000@163.com

Domain I, Domain II, Domain III, and Domain IV in 5 BsAux/IAA proteins, corresponding to conserved motifs of motif9, motif3, motif2, and motif1 in order. The functions of 5 BsAux/IAA proteins all include 3 categories of cellular component, biological process, and molecular function, and are involved in signal transduction pathways of plant hormones. The phylogenetic analysis result shows that 5 BsAux/IAA proteins all belong to Group I subfamily, and can be divided into 2 subgroups of a and b, in which, BsAux/IAA3, BsAux/IAA4, and BsAux/IAA5 belong to a subgroup, while BsAux/IAA1 and BsAux/IAA2 do to b subgroup; in addition, there are close genetic relationships in BsAux/IAA1, BsAux/IAA2, BsAux/IAA4, and BsAux/IAA5 with Aux/IAA of *D. officinale*. It is suggested that there is a certain conservation in Aux/IAA proteins of *B. striata*, the proteins may play roles in nucleus, and possess tissue specificity, development dependence, and abiotic stress response.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rehb. f.; Aux/IAA gene; gene identification; sequence analysis; phylogenetic analysis

生长素又称吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA),在植物生长发育过程中具有重要作用,不但能调节植物细胞和器官的生长发育^[1],还能够单独或与其他激素协同作用参与植物对环境胁迫的应激反应^[2-3]。Aux/IAA 基因可调控生长素信号转导过程^[4],且 Aux/IAA 蛋白具有 4 个保守结构域,其中,Domain I 具有转录抑制功能,包含 1 个两亲性基序 LxLxLx^[5]; Domain II 具有稳定蛋白质结构的作用,含有蛋白质泛素化降解的靶位点,核心序列为 VGWPP; Domain III 和 Domain IV 负责蛋白质的二聚化^[6],前者含有 $\beta\alpha\alpha$ 基序^[1],后者含有酸性区域和 SV40 核定位序列(NLS,PKKKRKV)^[6]。研究表明:Aux/IAA 基因可参与调控植物生长发育,并可调控植物体内多个信号转导通路^[7-12],为近年的研究热点。

白及〔*Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rehb. f.〕为多年生草本植物,具有抗菌、止血和抗肿瘤等功效^[13],且观赏价值较高^[14]。近年来,随着环境不断恶化和人类过度采挖,白及的野生资源越来越少,加上其人工培育品种质量参差不齐^[15]、遗传背景不清,严重制约了白及的研究和开发利用。由于 Aux/IAA 基因对植物的生长发育和遗传改良有重要作用,因此,有必要对其 Aux/IAA 基因进行研究。

鉴于此,基于白及的全转录组数据,作者采用生物信息学方法对白及 Aux/IAA 基因进行分析,以期对白及 Aux/IAA 基因的表达调控和功能鉴定以及白及生长繁育相关代谢途径研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

以采自贵州省正安县的白及成熟种子萌发获得

的组培苗为实验材料。从拟南芥〔*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.〕信息资源(TAIR)数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)中获得拟南芥 Aux/IAA 蛋白序列,并从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo) Aux/IAA 蛋白序列。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 随机采集组培苗的原球茎、移栽前组培苗(包括根、茎和叶)、移栽 2 个月的组培苗(包括根、茎和叶)及移栽 1 年后的组培苗(包括根、茎、叶、花和种子),每个阶段采集的组培苗均为同一区域内形状、色泽和大小基本一致的植株,各采集 3 株。采集后迅速运回实验室,提取单株总 RNA,用液氮速冻后保存于-80 °C 冰箱中。

1.2.2 基因鉴定和序列分析 经质量检测合格后,将不同生长时期所有的单株总 RNA 进行等量混合,先进行转录组测序,再拼接组装成 unigenes^[16]。利用 BLASTp 工具进行比对搜索(设置缺省参数),手动去除错配序列;利用 Pfam 32.0 在线软件(<http://pfam.xfam.org/>)检索白及的转录组序列(登录号 PF02309),对检索结果进行整合和去冗余,并去除不完整序列,得到候选序列;利用 ORFfinder 在线软件(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)分析上述序列的开放阅读框(ORF)。利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)在线软件分析白及 Aux/IAA 蛋白的保守结构域。

1.2.3 蛋白质序列分析 利用 ProtParam 在线软件(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析预测白及 Aux/IAA 蛋白的理论相对分子质量、理论等电点、不稳定指数、脂肪族氨基酸指数和总平均亲水性等理化

性质;利用 Plant-mPLOC server 在线软件 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/#>) 进行蛋白质的亚细胞定位;利用 SOPMA 在线软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 分析蛋白质的二级结构;运用 MEME 5.0.5 在线软件 (<http://meme-suite.org/>) 分析蛋白质的基序,设定基序宽度最大值为 50,基序数为 20^[17],其余参数为默认值;利用 DNAMAN v9 软件对蛋白质的保守结构域进行比对。

1.2.4 GO 功能分类和 KEGG 富集分析 利用 String 在线软件 (<https://string-db.org/>) 对白及 *Aux/IAA* 蛋白的氨基酸序列进行 GO 功能分类和 KEGG 富集分析,以 1×10^{-5} 为界限^[16]。

1.2.5 系统发育分析 利用 MEGA 7.0 软件的 Clustal W 程序,采用邻接法构建模式植物拟南芥 32 条 *Aux/IAA* 蛋白已知序列、近缘植物铁皮石斛 16 条 *Aux/IAA* 蛋白已知序列和白及 *Aux/IAA* 蛋白预测序列的系统发育树,并进行自举评估 (bootstrapping),重复检测 1 000 次,其他参数为默认值。

2 结果和分析

2.1 基因鉴定及序列分析

研究结果表明:在拼接组装的 132 502 条 unigenes 中,共发现 142 条 unigenes 与生长素有关;经过对 Pfam 检索结果的整合、去冗余和去除不完整序列,共筛选出 5 个 *Aux/IAA* 基因,按照其在白及转录组中对应序列的 ID 顺序依次命名为 *BsAux/IAA1*、*BsAux/IAA2*、*BsAux/IAA3*、*BsAux/IAA4* 和 *BsAux/IAA5*,序列长度分别为 5 985、2 427、942、879 和 780 bp,开放阅读框 (ORF) 长度分别为 2 739、1 053、537、492 和 492 bp。

2.2 蛋白质序列分析

2.2.1 一级和二级结构分析 蛋白质一级结构分析结果 (表 1) 表明:*BsAux/IAA1*、*BsAux/IAA2*、*BsAux/IAA3*、*BsAux/IAA4* 和 *BsAux/IAA5* 的氨基酸残基数为 163~912。上述 5 个 *BsAux/IAA* 蛋白的理论相对分子质量为 18 172.97~101 442.89,理论等电点为 pI4.40 至 pI11.51,且 *BsAux/IAA1*、*BsAux/IAA3*、*BsAux/IAA4* 和 *BsAux/IAA5* 的 pI 值小于 7,据此推测这 4 个 *BsAux/IAA* 蛋白可在酸性亚细胞环境中发挥作用。上述 5 个 *BsAux/IAA* 蛋白中,*BsAux/IAA2* 和 *BsAux/IAA4* 的不稳定指数较低 (分别为 33.17 和 33.14),其余 3 个 *BsAux/IAA* 蛋白的不稳定指数较高 (48.10~63.81),据此判定 *BsAux/IAA2* 和 *BsAux/IAA4* 为稳定蛋白 (不稳定指数小于 40^[18]),其余 3 个 *BsAux/IAA* 蛋白为不稳定蛋白 (不稳定指数大于 40^[18])。脂肪族氨基酸指数能够反映蛋白质的热稳定性,上述 5 个 *BsAux/IAA* 蛋白的脂肪族氨基酸指数为 69.45~79.63,说明这 5 个 *BsAux/IAA* 蛋白的热稳定性较高。疏水性分析结果表明:上述 5 个 *BsAux/IAA* 蛋白的总平均亲水性为 -0.577~-0.006,说明这 5 个 *BsAux/IAA* 蛋白为亲水性蛋白。亚细胞定位结果表明:5 个 *BsAux/IAA* 蛋白均定位于细胞核中。

蛋白质二级结构分析结果 (表 2) 表明:*BsAux/IAA1*、*BsAux/IAA3* 和 *BsAux/IAA5* 均表现为无规则卷曲所占比例最大, α -螺旋所占比例次之,延伸链所占比例较小, β -转角所占比例最小;而 *BsAux/IAA2* 则表现为 α -螺旋所占比例均最大,无规则卷曲所占比例次之,延伸链所占比例较小, β -转角所占比例最小;*BsAux/IAA4* 表现为无规则卷曲所占比例最大,延伸链所占比例次之, α -螺旋所占比例较小, β -转角所占比例最小。

表 1 白及 *Aux/IAA* 蛋白的一级结构分析

Table 1 Analysis on primary structure of *Aux/IAA* proteins of *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.

蛋白质 Protein	ID	氨基酸残基数 Amino acid residue number	分子式 Molecular formula	理论相对分子质量 Theoretical relative molecular mass	理论等电点 Theoretical isoelectric point (pI)	不稳定指数 Instability index	脂肪族 氨基酸指数 Aliphatic amino acid index	总平均亲水性 Grand average of hydropathicity
<i>BsAux/IAA1</i>	c67850_g1	912	C ₄₄₇₅ H ₆₉₇₁ N ₁₂₆₃ O ₁₃₈₀ S ₂₈	101 442.89	5.93	63.81	79.63	-0.450
<i>BsAux/IAA2</i>	c67584_g2	350	C ₁₆₄₄ H ₂₇₆₅ N ₅₅₃ O ₄₀₁ S ₄₆	38 169.26	11.51	33.17	74.20	-0.006
<i>BsAux/IAA3</i>	c52097_g1	178	C ₈₅₈ H ₁₃₆₉ N ₂₃₉ O ₂₇₁ S ₁₁	19 721.41	5.21	53.63	77.81	-0.400
<i>BsAux/IAA4</i>	c53159_g1	163	C ₇₉₀ H ₁₂₃₇ N ₂₁₉ O ₂₄₃ S ₈	17 947.31	5.94	33.14	69.45	-0.448
<i>BsAux/IAA5</i>	c48979_g1	163	C ₇₈₀ H ₁₂₂₇ N ₂₁₇ O ₂₇₁ S ₆	18 172.97	4.40	48.10	72.88	-0.577

表 2 白及 Aux/IAA 蛋白的二级结构分析
Table 2 Analysis on secondary structure of Aux/IAA proteins of *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.

蛋白质 Protein	比例/% Percentage			
	α-螺旋 α-helix	延伸链 Extended strand	β-转角 β-turn	无规则卷曲 Random coil
BsAux/IAA1	30.26	15.35	5.70	48.68
BsAux/IAA2	56.57	12.29	6.86	24.29
BsAux/IAA3	25.28	24.72	6.18	43.82
BsAux/IAA4	16.56	20.25	5.52	57.67
BsAux/IAA5	31.90	19.63	6.13	42.33

2.2.2 基序和保守结构域分析 蛋白质保守性分析结果(图 1、图 2、图 3 和表 3)表明:5 个 BsAux/IAA 蛋白共有 20 个 motif, 分别命名为 motif1 至 motif20, 其中 motif1、motif2、motif3 和 motif9 为保守基序;但是,仅 BsAux/IAA1 具有 4 个完整的典型保守结构域, 分别为 Domain I、Domain II、Domain III 和 Domain IV, 依次对应保守基序 motif9、motif3、motif2 和 motif1。并且,5 个 BsAux/IAA 蛋白均含有 motif1, BsAux/IAA3 至 BsAux/IAA5 均含有 motif2, BsAux/



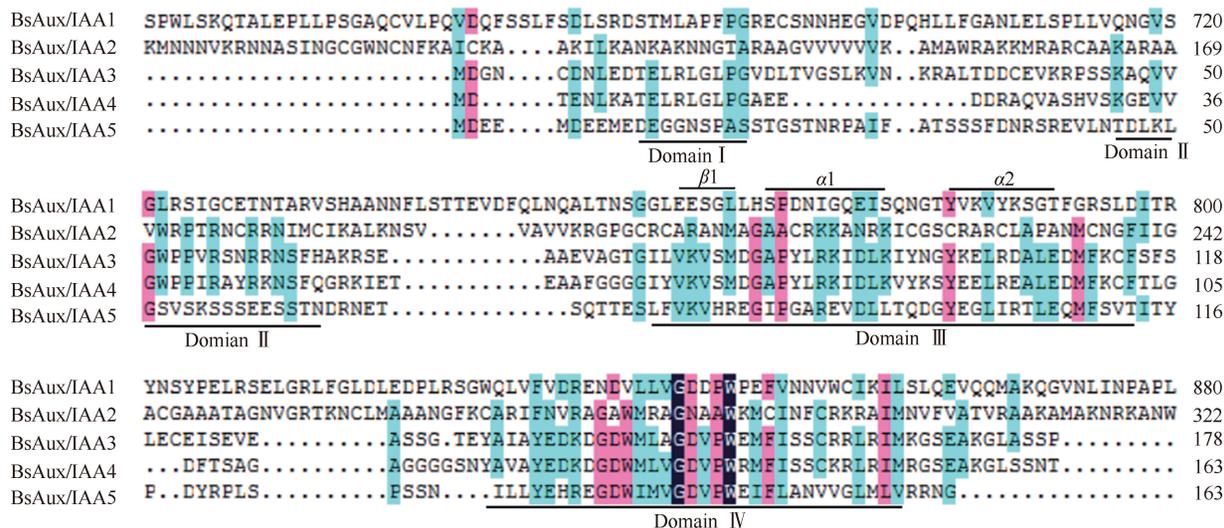
不同色块的长度和顺序分别代表各基序在蛋白质序列中的实际大小和位置 The length and order of the boxes with different colors represent the actual size and location of each motif in protein sequence, respectively.

图 1 白及 Aux/IAA 蛋白的基序序列 (A) 及位置 (B)
Fig. 1 Motif sequence (A) and location (B) of Aux/IAA proteins of *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.

标志 Symbol	共有基序 Motif consensus
motif1	YAJAYEDREGDWMLVGDVPWEMFISNCRRLRIM
motif2	IFVKVSMGDGAPYLKIDLKVYDGYEELRDALEDMFKCF
motif3	KAQVVGWPPVRSNRRNSFQ
motif4	ITFPDY
motif5	DEEMDE
motif6	WAPCCG
motif7	KNRKANWRCR
motif8	DGNCDN
motif9	TELRGLPG
motif10	WNRFRFCVFFKNRRC
motif11	QCNGFG
motif12	ICRLAGVARI
motif13	CWFCKI
motif14	FKAICK
motif15	VVWKNMAWRAKCM
motif16	TKVVVF
motif17	JNGCEW
motif18	THGGFS
motif19	ETEVDV
motif20	ATQSSFDN

不同色块的长度和顺序分别代表各基序在蛋白质序列中的实际大小和位置 The length and order of the boxes with different colors represent the actual size and location of each motif in protein sequence, respectively.

图 2 白及 *Aux/IAA* 蛋白的基序标志及共有基序
Fig. 2 Motif symbol and consensus of *Aux/IAA* proteins of *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.



下划线示保守域 The underlines represent conserved domains. 黑色、红色和蓝色分别表示同源性 100%、75%~100% 和 50%~75% 的氨基酸残基 Black, red, and blue represent the amino acid residues with homology of 100%, 75%-100%, and 50%-75%, respectively.

图 3 白及 *Aux/IAA* 蛋白的结构域分析
Fig. 3 Analysis on domains of *Aux/IAA* proteins of *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.

表 3 白及 *Aux/IAA* 蛋白的基序分布
Table 3 Motif distribution of *Aux/IAA* proteins of *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.

基序 Motif	氨基酸残基数 Amino acid residue number	序列 Sequence	对应结构域 Corresponding domain
motif1	33	YAJAYEDREGDWMLVGDVPWEMFISNCRRLRIM	Domain IV
motif2	38	IFVKVSMGDGAPYLKIDLKVYDGYEELRDALEDMFKCF	Domain III
motif3	19	KAQVVGWPPVRSNRRNSFQ	Domain II
motif9	9	TELRGLPG	Domain I

IAA2 至 BsAux/IAA4 均含有 motif3, BsAux/IAA3 和 BsAux/IAA4 均含有 motif9, 其余基序只存在于 2 个 BsAux/IAA 蛋白中。上述结果表明; motif1 为 BsAux/IAA 蛋白中非常重要的保守基序。

2.2.3 GO 功能分类和 KEGG 富集分析 GO 功能分类(表 4)结果表明; 5 个 BsAux/IAA 蛋白的功能均包含细胞组分、生物学过程和分子功能 3 个大类。在细胞组分大类中, 5 个 BsAux/IAA 蛋白均被注释到细胞

核和细胞器; 在生物学过程大类中, 被注释到信号通路、发育过程、细胞过程、转录、代谢过程、激素反应和钠离子转运相关的 BsAux/IAA 蛋白分别有 5、5、5、5、5、3 和 1 个; 在分子功能大类中, 被注释到结合、DNA 结合转录因子活性、催化活性、蛋白结合转录因子活性和电压门控钠通道活性的 BsAux/IAA 蛋白分别有 5、4、1、1 和 1 个。KEGG 富集分析结果表明; 5 个 BsAux/IAA 蛋白均参与植物激素信号转导通路。

表 4 白及 Aux/IAA 蛋白的 GO 功能分类¹⁾

Table 4 GO function classification of Aux/IAA proteins of *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.¹⁾

GO 功能分类 GO function classification	BsAux/IAA1	BsAux/IAA2	BsAux/IAA3	BsAux/IAA4	BsAux/IAA5
细胞组分 Cellular component					
细胞核 Nucleus	✓	✓	✓	✓	✓
细胞器 Organelle	✓	✓	✓	✓	✓
生物学过程 Biological process					
信号通路 Signaling pathway	✓	✓	✓	✓	✓
发育过程 Development process	✓	✓	✓	✓	✓
细胞过程 Cellular process	✓	✓	✓	✓	✓
转录 Transcription	✓	✓	✓	✓	✓
激素反应 Response to hormone	✓		✓	✓	
钠离子转运相关 Sodium ion transport-associated					✓
代谢过程 Metabolic process	✓	✓	✓	✓	✓
分子功能 Molecular function					
结合 Binding	✓	✓	✓	✓	✓
DNA 结合转录因子活性 DNA binding transcription factor activity	✓	✓	✓	✓	
催化活性 Catalytic activity	✓				
蛋白结合转录因子活性 Protein binding transcription factor activity				✓	
电压门控钠通道活性 Voltage-gated sodium channel activity					✓

¹⁾ ✓: 表示蛋白质具有该功能 Indicating the protein has this function.

2.3 系统发育分析

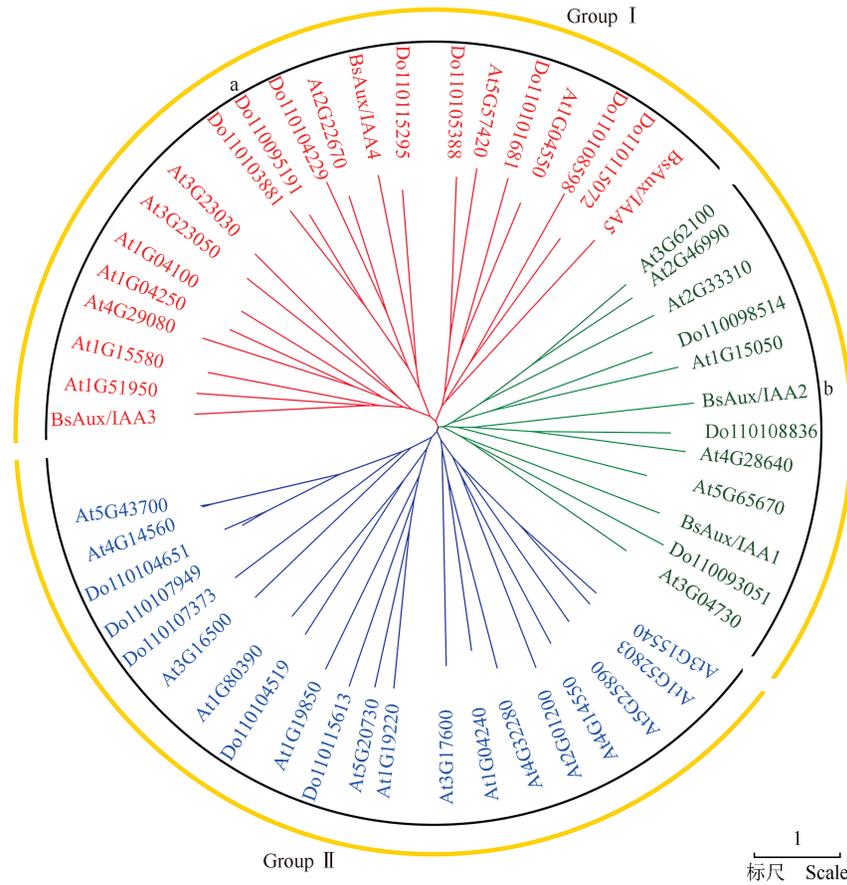
系统发育分析结果(图 4)表明: 这些 Aux/IAA 蛋白被分成 Group I 和 Group II 2 个亚家族, 且 Group I 又被分成 a 和 b 2 个亚群; 供试 5 个 BsAux/IAA 蛋白均属于 Group I 亚家族, 其中 BsAux/IAA3、BsAux/IAA4 和 BsAux/IAA5 属于 a 亚群, 而 BsAux/IAA1 和 BsAux/IAA2 属于 b 亚群。总体来看, BsAux/IAA1、BsAux/IAA2、BsAux/IAA4 和 BsAux/IAA5 与铁皮石斛 Aux/IAA 的亲缘关系较近, 而 BsAux/IAA3 与拟南芥 Aux/IAA 的亲缘关系较近。

3 讨论和结论

生长素是调控植物生长发育的主要内源激素, Aux/IAA 基因是调控植物体内生长素信号转导的关

键基因^[19]。本研究共鉴定出 5 个白及 Aux/IAA 基因, 明显低于黄瓜 (*Cucumis sativus* Linn.)^[20]、水稻 (*Oryza sativa* Linn.)^[21]、油菜 (*Brassica napus* Linn.)^[1]、木瓜 (*Carica papaya* Linn.)^[22] 和土豆 (*Solanum tuberosum* Linn.)^[23], 这可能与本研究基于转录组数据结果(受到取样和测序限制)进行分析有关, 具体原因有待深入研究。亚细胞定位分析结果表明: 5 个白及 Aux/IAA 蛋白均被定位在细胞核中, 说明白及 Aux/IAA 蛋白可能在细胞核中起作用, 推测这可能是因为 Aux/IAA 蛋白含有 2 个核定位信号 (NLS)^[24]。

根据保守结构域分析结果, 仅有 BsAux/IAA1 蛋白包含 Domain I、Domain II、Domain III 和 Domain IV 4 个保守结构域, 与拟南芥^[25]、水稻^[26]、玉米 (*Zea mays* Linn.)^[10] 和黄瓜^[27] 等植物的 Aux/IAA 蛋白保



Bs: 白及 *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Do: 铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo.

图 4 白及与拟南芥和铁皮石斛 *Aux/IAA* 蛋白的系统发育树
 Fig. 4 Phylogenetic tree of *AUX/IAA* proteins of *Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f., *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., and *Dendrobium officinale* Kimura et Migo

守结构域相似,可见,植物 *Aux/IAA* 蛋白具有一定的保守性。但 *BsAux/IAA2*、*BsAux/IAA3*、*BsAux/IAA4* 和 *BsAux/IAA5* 蛋白却存在不同程度的保守结构域缺失。例如:*BsAux/IAA2*、*BsAux/IAA3* 和 *BsAux/IAA5* 均缺少具有转录抑制功能的保守结构域 Domain I (motif9)^[5], *BsAux/IAA2* 和 *BsAux/IAA3* 缺少具有蛋白质降解功能的保守结构域 Domain II (motif3)^[28], *BsAux/IAA2* 和 *BsAux/IAA5* 缺少具有自身二聚化功能的保守结构域 Domain III (motif2)^[29]。推测造成 *BsAux/IAA* 蛋白部分保守结构域缺失的原因可能是在白及生长繁育进化过程中发生了基因突变导致的序列改变,致使部分 *BsAux/IAA* 蛋白只具备 *Aux/IAA* 蛋白的典型功能或拥有新功能,且不再参与生长素的信号响应。

系统发育分析结果表明:*BsAux/IAA1*、*BsAux/*

IAA2、*BsAux/IAA4* 和 *BsAux/IAA5* 与铁皮石斛 *Aux/IAA* 的亲缘关系较近,而 *BsAux/IAA3* 与拟南芥 *Aux/IAA* 的亲缘关系较近,说明多数 *BsAux/IAA* 蛋白与铁皮石斛 *Aux/IAA* 蛋白的功能相似。

GO 功能分类结果表明:5 个 *BsAux/IAA* 蛋白具有细胞组分、生物学过程和分子功能 3 大类功能,且均具有结合功能,说明 *BsAux/IAA* 基因具有组织特异性、发育依赖性和非生物胁迫应答性,这为白及新品种的遗传改良及在转录水平控制 *Aux/IAA* 基因表达等研究提供了新方向。然而,由于取样和测序的局限性,本研究仅鉴定出白及部分 *Aux/IAA* 蛋白的序列,关于白及 *Aux/IAA* 蛋白的研究还有待深入。

综上所述,白及 *Aux/IAA* 蛋白具有一定的保守性,可能在细胞核中发挥作用,并具有组织特异性、发育依赖性和非生物胁迫应答性。

参考文献:

- [1] LI H, WANG B, ZHANG Q, et al. Genome-wide analysis of the auxin/indoleacetic acid (*Aux/IAA*) gene family in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. BMC Plant Biology, 2017, 17: 204.
- [2] HU W, ZUO J, HOU X, et al. The auxin response factor gene family in banana: genome-wide identification and expression analyses during development, ripening, and abiotic stress [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 742–757.
- [3] SALEHIN M, LI B, TANG M, et al. Auxin-sensitive *Aux/IAA* proteins mediate drought tolerance in Arabidopsis by regulating glucosinolate levels [J]. Nature Communications, 2019, 10: 4021.
- [4] NGUYEN C T, TRAN G-B, NGUYEN N H. Homeostasis of histone acetylation is critical for auxin signaling and root morphogenesis [J]. Plant Molecular Biology, 2020, 103(1/2): 1–7.
- [5] LI H, TIWARI S B, HAGEN G, et al. Identical amino acid substitutions in the repression domain of auxin/indole-3-acetic acid proteins have contrasting effects on auxin signaling [J]. Plant Physiology, 2011, 155: 1252–1263.
- [6] GUILFOYLE T J, HAGEN G. Getting a grasp on domain III/IV responsible for Auxin Response Factor-IAA protein interactions [J]. Plant Science, 2012, 190: 82–88.
- [7] CHEN L, ZHENG X, GUO X, et al. The roles of *Aux/IAA* gene family in development of *Dendrocalamus sinicus* (Poaceae: Bambusoideae) inferred by comprehensive analysis and expression profiling [J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46: 1625–1634.
- [8] YUAN H, ZHAN L, CHEN J, et al. Identification and expression profiling of the *Aux/IAA* gene family in Chinese hickory (*Carya cathayensis* Sarg.) during the grafting process [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 127: 55–63.
- [9] YU H, SOLER M, CLEMENTE H S, et al. Comprehensive genome-wide analysis of the *Aux/IAA* gene family in *Eucalyptus*: evidence for the role of *EgrIAA4* in wood formation [J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(4): 700–714.
- [10] WANG Y, DENG D, BIAN Y, et al. Genome-wide analysis of primary auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in maize (*Zea mays* L.) [J]. Molecular Biology Reports, 2010, 37: 3991–4001.
- [11] SINGH V K, JAIN M. Genome-wide survey and comprehensive expression profiling of *Aux/IAA* gene family in chickpea and soybean [J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 918.
- [12] SHEN C, YUE R, YANG Y, et al. Genome-wide identification and expression profiling analysis of the *Aux/IAA* gene family in *Medicago truncatula* during the early phase of *Sinorhizobium meliloti* infection [J]. PLOS ONE, 2014, 9(9): e107495.
- [13] 赵银, 孙钟毓, 毛碧增. 白及组织培养技术及药理作用的研究进展 [J]. 药物生物技术, 2019, 26(3): 269–272.
- [14] CHEN Z, CHENG L, HE Y, et al. Extraction, characterization, utilization as wound dressing and drug delivery of *Bletilla striata* polysaccharide: a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 2076–2085.
- [15] 张曼, 韩亭亭, 胡春芳, 等. 白及产业现状及可持续发展策略 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 5103–5108.
- [16] XU D, CHEN H, ACI M, et al. *De Novo* assembly, characterization and development of EST-SSRs from *Bletilla striata* transcriptomes profiled throughout the whole growing period [J]. PLOS ONE, 2018, 13(10): e205954.
- [17] LIU H, WU M, ZHU D, et al. Genome-wide analysis of the AAAP gene family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. BMC Plant Biology, 2017, 17: 29.
- [18] 郑斌, 武红霞, 王松标, 等. 基于转录组的芒果 MYB 家族基因的鉴定及分析 [J]. 热带作物学报, 2017, 38(7): 1285–1294.
- [19] LJUNG K. Auxin metabolism and homeostasis during plant development [J]. Development, 2013, 140(5): 1–12.
- [20] 王垒, 陈劲枫, 贾利. 黄瓜 *Aux/IAA* 基因家族的生物信息学分析 [J]. 中国瓜菜, 2010, 23(6): 7–10.
- [21] SHEN C, WANG S, BAI Y, et al. Functional analysis of the structural domain of ARF proteins in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(14): 3971–3981.
- [22] LIU K, YUAN C, FENG S, et al. Genome-wide analysis and characterization of *Aux/IAA* family genes related to fruit ripening in papaya (*Carica papaya* L.) [J]. BMC Genomics, 2017, 18: 351.
- [23] GAO J, CAO X, SHI S, et al. Genome-wide survey of *Aux/IAA* gene family members in potato (*Solanum tuberosum*): identification, expression analysis, and evaluation of their roles in tuber development [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 471: 320–327.
- [24] WU W, LIU Y, WANG Y, et al. Evolution analysis of the *Aux/IAA* gene family in plants shows dual origins and variable nuclear localization signals [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18: 2107.
- [25] CARRIER D J, BAKAR N T A, SWARUP R, et al. The binding of auxin to the Arabidopsis auxin influx transporter AUX1 [J]. Plant Physiology, 2008, 148: 529–535.
- [26] JAIN M, KAUR N, GARG R, et al. Structure and expression analysis of early auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. Functional and Integrative Genomics, 2006, 6: 47–59.
- [27] GAN D, ZHUANG D, DING F, et al. Identification and expression analysis of primary auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in cucumber (*Cucumis sativus*) [J]. Journal of Genetics, 2013, 92(3): 513–521.
- [28] DREHER K A, BROWN J, SAW R E, et al. The *Arabidopsis* *Aux/IAA* protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness [J]. The Plant Cell, 2006, 18: 699–714.
- [29] CHAPMAN E J, ESTELLE M. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants [J]. Annual Review of Genetics, 2009, 43: 265–285.

(责任编辑: 佟金凤)