

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201403040

聂传朋 李尚擘 刘瑞姣 等. 十字花科多肽激素类基因 *RALF* 的同源基因克隆及进化分析[J]. 广西植物 2015, 35(2):156-160Nie CP Li SB Liu RJ *et al.* Cloning and evolutionary analysis of homologous sequences of *RALF* in Cruciferae[J]. *Guihaia* 2015, 35(2):156-160

## 十字花科多肽激素类基因 *RALF* 的同源基因克隆及进化分析

聂传朋<sup>1</sup>, 李尚擘<sup>1,2</sup>, 刘瑞姣<sup>1,2</sup>, 李焰焰<sup>1\*</sup>

(1. 阜阳师范学院 生物与食品工程学院, 阜阳 236041; 2. 安徽大学 生命科学学院, 合肥 230601)

**摘要:** 多肽激素类基因是对植物生长发育起重要作用的一类基因, *RALF* 是其中的重要一员, 而十字花科在中国蔬菜作物中是重要的一大类群。为了摸清十字花科多种蔬菜作物的 *RALF* 同源基因信息, 该文根据前期研究从油菜中扩增到的多肽激素类基因 *RALFbn* 的序列设计引物, 从提取的十字花科芸薹属、萝卜属、蔊菜属、山芥属的 7 份重要蔬菜作物的基因组 DNA 中分别克隆到了 *RALF* 的同源序列。结果表明: 7 种蔬菜作物的 *RALF* 同源基因编码区均在 300 bp 左右, 且无内含子, 编码的蛋白质由 79 个氨基酸组成, 说明 *RALF* 在十字花科 4 个属内的保守性较强; 对 *RALF* 同源基因在十字花科 4 个属中的表达分析表明, 该类基因在根、茎、叶、花序轴等营养器官中不表达或弱表达, 但主要在生殖器官中表达, 其中在总花蕾和开放花中的表达量普遍高于嫩角果中的表达量, 表明该类基因在十字花科中的生理活跃期是花发育时期。同时, 构建了十字花科 4 个属中 *RALF* 同源基因的系统树, 芸薹属的油菜、甘蓝和芥蓝形成一个分支, 而茎瘤芥和分蘖芥形成另外一个分支, 且与萝卜属、山芥属、蔊菜属的材料聚在一支, 该基因的进化途径在一定程度上也反映出这几种作物的遗传背景关系。该研究结果丰富了 *RALF* 家族信息, 增添了十字花科植物的分子进化数据。

**关键词:** 十字花科; 多肽激素类基因; *RALF*; 同源基因; 进化分析

中图分类号: Q941; Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2015)02-0156-05

## Cloning and evolutionary analysis of homologous sequences of *RALF* in Cruciferae

NIE Chuan-Peng<sup>1</sup>, LI Shang-Bo<sup>1,2</sup>, LIU Rui-Jiao<sup>1,2</sup>, LI Yan-Yan<sup>1\*</sup>

(1. School of Biological and Food Engineering, Fuyang Teachers College, Fuyang 236041, China;

2. College of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, China)

**Abstract:** Peptide hormones genes are important in plant growth and development and *RALF* (rapid alkalization factor) is one of them. Cruciferae is a big family in Chinese vegetable crops. Polypeptide hormone gene *RALFbn* was cloned from *Brassica campestris* (rape) in the authors' previous work. In order to find out the information of *RALF* homologous genes in Cruciferae vegetable crops, this experiment was done. At this time, the primers were designed according to the sequence of *RALFbn* gene. The genomic DNAs of 7 important vegetable crops were extracted in advance. The vegetable materials were selected from *Brassica*, *Raphanus*, *Rorippa* and *Barbarea* and they all belonged to the same family of Cruciferae. Seven sequences homologous to *RALF* were cloned from the 7 materials from important vegetable crops with the primers designed from *RALFbn*. Then the 7 DNA sequences together with the *RALFbn* gene were analyzed. The results showed that all the DNA sequences' open reading frames were about 300 bp long. There was no intron in the 7 genes.

收稿日期: 2014-06-24 修回日期: 2014-09-10

基金项目: 国家自然科学基金(31000132); 国家大学生创新创业训练计划项目(201310371015)。

作者简介: 聂传朋(1974-) 男, 安徽长丰人, 博士, 副教授, 研究方向为生态学及分子系统学, (E-mail) fuyangshy@126.com。

\* 通讯作者: 李焰焰, 博士, 教授, 研究方向为植物分子生物学, (E-mail) li\_yanyan126@126.com。

The 7 proteins encoded by them were all made by 73 amino acids. All these indicated that the *RALF* homologous genes were very conservative in the 4 genera of cruciferous species. At the same time, the 7 *RALF* homologous genes expression analyses were done in four genera in Cruciferae. The result indicated that these genes were not or weakly expressed in root, stem, leaf, inflorescence axis and other vegetative organs, while mainly expressed in reproductive organs, in which, the total amounts of the expression in flower buds and open flowers were generally higher than those in tender siliques. All the expression indicated that the physiological active period of these genes in Cruciferae was in the flower growth period. The system tree was constructed with the 7 *RALF* homologous genes in the 4 genera of Cruciferae. The NJ tree of *RALF* homologous genes reflected that *RALFbn*, *BoRALFjx* and *BoRALFzh* formed a branch while *BjRALFdn4* and *BjRALFxlh* formed another branch with the rest *RALF* homologous genes from *Raphanus*, *Rorippa*, *Barbarea* clustered in the same branch. The evolutionary pathway of these *RALF* homologous genes in a certain extent also reflected the genetic background relationships between these crops. In all, this study enriched the information of the rapid alkalization factor (*RALF*) family and expanded the knowledge of the molecular evolution data of Cruciferae.

**Key words:** Cruciferae; polypeptide hormone gene; *RALF*; homologous gene; evolutionary analysis

植物多肽激素是一类非常重要的植物激素,与其它小分子激素一样,调控植物的生长发育过程 (Lucrezia *et al.* 2012; Ricchiuto *et al.* 2011)。肽类激素在动物、细菌和真菌中发现较早,而植物肽类激素发现的较晚。1991 年系统素的首次报道后,又陆续发现了多种植物肽类生长调节因子 (Loivamäki *et al.* 2010; Kouchi *et al.* 1999), 快速碱化因子 (rapid alkalization factor, *RALF*) 是其中的一种 (Pearce *et al.* 2001; Germain *et al.* 2005)。它在植物中广泛存在,使植物组织生长的培养基碱化、抑制胚根生长、调控植物花器官发育等 (Haruta *et al.* 2003; Olsen *et al.* 2002; 李焰焰等 2009)。

李焰焰等 (2008, 2010) 的研究小组发现,在十字花科芸薹属中 *RALF* 与小孢子发育相关。因此,本文研究了从十字花科 4 个属中克隆到的 *RALF* 同源基因,并分析了基因的核苷酸、氨基酸以及进化特征,推测其参与植物花器官发育的调控,为深入发掘此类 *RALF* 的基因功能提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

7 种材料均由浙江大学蔬菜研究所提供,包括芸薹属的 4 种植物和萝卜属、蔊菜属、山芥属各 1 种植物 (表 1)。材料播于培养室内并进行常规管理,苗龄 45 d 时,随机选取 5 株植株的嫩叶,用 75% 的酒精擦净叶片表面的灰尘,用锡箔纸包好,立即放进液氮瓶中带回实验室进行 DNA 提取。

### 1.2 DNA 提取及同源基因克隆

DNA 提取用 CTAB 法。根据我们先前在油菜中

表 1 所用的植物材料  
Table 1 Materials in the experiment

属 Genus	种 Species	品种 Cultivar	基因名称 Gene name
芸薹属 <i>Brassica</i> L.	茎瘤芥 <i>B. juncea</i> var. <i>tumida</i>	桐农 4 号 Tongnong 4	<i>BjRALFdn4</i>
	分蘖芥 <i>B. juncea</i> var. <i>multiceps</i>	雪里蕻 Xuelihong	<i>BjRALFxlh</i>
	甘蓝 <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	鸡心 Jixin	<i>BoRALFjx</i>
	芥蓝 <i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>	中花 Zhonghua	<i>BoRALFzh</i>
萝卜属 <i>Raphanus</i>	萝卜 <i>R. sativus</i>	圆白 Yuanbai	<i>RsRALF</i>
蔊菜属 <i>Rorippa</i> Scop.	高蔊菜 <i>R. indica</i>	-	<i>RiRALF</i>
山芥属 <i>Barbarea</i> R. Br.	欧洲山芥 <i>B. vulgaris</i>	-	<i>BoRALF</i>

扩增到的多肽激素类基因 *RALFbn* (GenBank 登陆号: KC149515) 的 DNA 序列,设计上下游引物 P1: 5'-CGTATGGGGGATGTCTGAAAGT-3'、P2: 5'-GTA-AAATTAACCAAGGGTGGTG-3',两者所含区域包括起始密码子和终止密码子。以 P1 和 P2 为引物,在以上 7 种实验材料中扩增 *RALF* 的同源基因。PCR 反应加入 DNA 模板 (20 ng · μL<sup>-1</sup>) 1 μL, dNTP (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 0.5 μL, 10 × PCR 反应缓冲液 2.5 μL, 上下游引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 各 0.5 μL, *Taq* 酶 (5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL。PCR 反应条件设定为在 94 °C 条件下预变性 2 min 后;开始循环:94 °C 变性 30 s,退火温度 56 °C 保持 30 s,72 °C 延伸 2 min,72 °C 延伸 2 min,循环 30 次,72 °C 延伸 10 min。电泳检测采用 1.0% 的琼脂糖凝胶,用北京道普生物技术有限公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收,在 4 °C 低温下用 T4 连接酶连接过夜,然后把连接产物转入 DH5α 大肠杆菌菌株中。并对菌落质粒进行 *EcoRI* 单酶切鉴定

和 PCR 鉴定,符合条件的菌样送到上海生工生物工程公司测序。

### 1.3 *RALF* 同源基因的序列分析

对 8 种物种中得到的 *RALF* 同源基因的最大开放阅读框(ORF)用 DNASTar 软件分析,并用 DNAsist 2.2 软件推测其氨基酸序列,用 MegAlign 软件分析其在基因水平以及蛋白质水平上的差异程度,用 ClustalX 软件对 8 种同源基因预测蛋白的氨基酸序列进行比对(Nie *et al.* 2013)。

### 1.4 *RALF* 同源基因的进化分析

据 Kimura 双参数模型用 MEGA 4.1 软件进行遗传距离分析,用 MEGA 4.1 分别绘制 NJ、ME 和 MP 系统进化树,树中节点的置信水平用自举值(Bootstrap)估算,共 1 000 次循环(Nie *et al.* 2012)。

### 1.5 *RALF* 同源基因的表达分析

考察 *RALF* 同源基因在十字花科四个属中的表达情况。选取芸薹属的“中花”芥蓝(*BoRALFzh*)、萝卜属的“圆白”萝卜(*RsRALF*)、蔊菜属的“高蔊菜”(*RiRALF*)、山芥属的“欧洲山芥”(*BvRALF*)等四种植物,分别取其根、茎、叶、花序轴、总花蕾、开放的花、嫩角果等 7 种组织,分别提取 RNA(按 Life Technologies 公司 TRIzol<sup>®</sup> 的说明书进行操作),并反转录成 cDNA,(cDNA 第一链和第二链的合成参照 SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit 说明书方法进行)。以 RT-PCR 用之前得到的双链 cDNA 为模板,引物 P1、P2 进行 PCR,体系为(10 ng · μL<sup>-1</sup>) cDNA 模板 1 μL,引物 P1、P2(20 μmol · L<sup>-1</sup>)各 2 μL,Taq 酶 Buffer(10 ×)5 μL,Mg<sup>2+</sup>(25 mmol · L<sup>-1</sup>)4 μL,dNTPs(10 mmol · L<sup>-1</sup>)1 μL,Taq 酶(5 U · μL<sup>-1</sup>)0.5 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL。PCR 反应条件:预变性 94 °C 2 min;变性 94 °C 30 s;56 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 1 min,循环 30 次;72 °C 延伸 10 min。内参对照选用 β-actin,其引物为 pActin1 和 pActin2,序列分别为 5'-TCGGAATGGGCCAGAAGGAC-3' 和 5'-TC-CACGTC-GCACTTCATGATG-3'。

## 2 结果与分析

### 2.1 克隆 *RALF* 同源基因

分别提取十字花科芸薹属的 4 种植物和萝卜属、蔊菜属、山芥属各 1 种植物的基因组 DNA,用引物 P1、P2 对 7 份 DNA 分别进行 PCR 扩增,克隆 *RALF* 的同源基因。在 7 个物种中的扩增条带均在

300 bp 左右(图 1)。回收扩增产物,连接到 T-easy 载体,然后转化到大肠杆菌 DH5a 中,蓝白斑筛选后,随机挑出白斑,再分别进行菌液 PCR 和 *EcoRI* 酶切鉴定,确定无误后测序,各条序列的测序结果经分析表明 DNA 编码区的序列长度在 300 bp 左右,均包含起始和终止密码子。

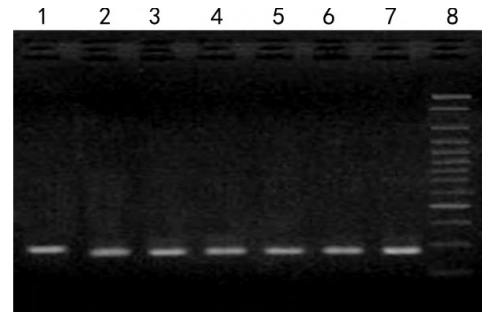


图 1 *RALF* 同源基因片段的扩增结果 1-7. 分别为桐农 4 号茎瘤芥、雪里蕻分蘖芥、鸡心甘蓝、中花芥蓝、圆白萝卜、蔊菜属的高蔊菜和山芥属的欧洲山芥; 8. 3 kb DNA 标准分子质量。

Fig. 1 Amplification of the homologous *RALF* gene 1-7. Represent *B. juncea* cv. Dongnong 4, *B. juncea* cv. Xuelihong, *B. oleracea* cv. Jixin, *B. oleracea* cv. Zhonghua, *R. sativus* cv. Yuanbai, *R. indica* Hiern and *Barbarea vulgaris*, respectively; 8. 3 kb DNA ladder.

### 2.2 *RALF* 同源基因的序列特征分析

对十字花科 4 个属 7 个物种的 *RALF* 同源基因编码氨基酸的分析发现,氨基酸序列变化不大,氨基酸组成频率相似。疏水性氨基酸含量最高,约占总蛋白质含量的 30%;酸性氨基酸含量为 10%,碱性氨基酸含量略高,达 11.4%;芳香族氨基酸含量 5% 左右。通过网上软件分析,分别得到 7 个物种的 *RALF* 预测蛋白,加上油菜中的 *RALF* 同源基因 *RALFbn*(图 2),一共有 8 个 *RALF* 同源蛋白,分析结果发现 8 个蛋白都具有快速碱化因子蛋白的 5 大特征:1 个保守的“YIXY”区和 4 个保守的半胱氨酸残基。同时,在网上用 blast 分别对 7 个蛋白序列进行比对,结果证明均属于 *RALF* 家族蛋白(图 3)。通常认为,当不同物种中的两个同源蛋白在 80 个氨基酸的区域中相似性达到 25%,则它们很有可能具有相同的功能(李焰焰等,2011)。我们发现 *RALF* 与小孢子发育过程密切相关(李焰焰等,2008)。据此可推定十字花科的这 8 种 *RALF* 同源基因在花粉发育过程中的功能。

用 8 个物种 *RALF* 同源基因的核苷酸序列做了进化分析。分别用 NJ、ME 和 MP 法分别构建了

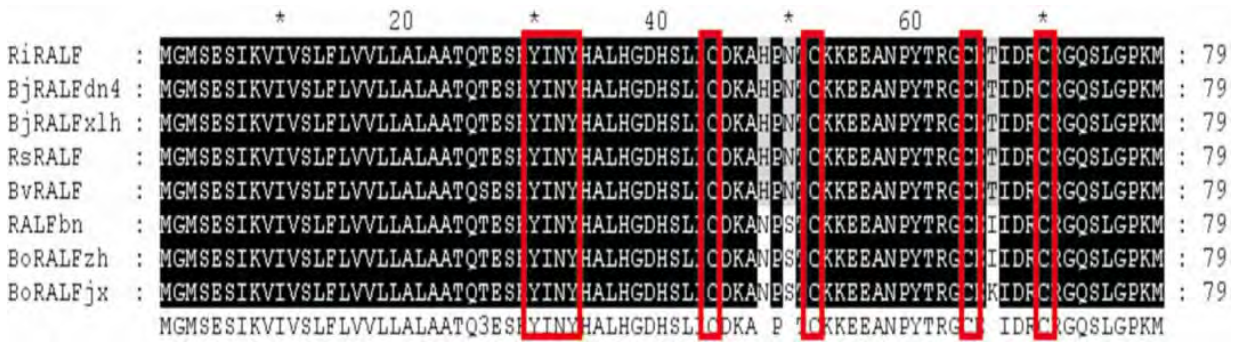


图 2 对 8 种十字花科植物 *RALF* 同源基因编码蛋白的氨基酸序列比对 框内是保守的“YINY”区和四个半胱氨酸。  
 Fig. 2 Alignment of the amino acid from *RALF* homologous gene Conserved “YINY” motifs and 4 cysteines are showed in frames.

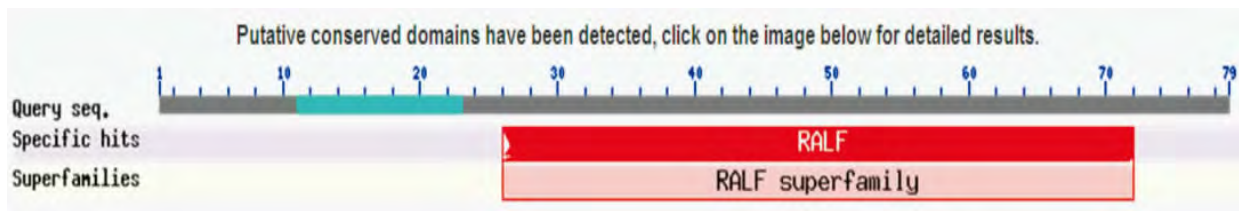


图 3 对 *RALF* 编码蛋白 Blast 的结果 8 个氨基酸序列的结果均显示是“RALF superfamily” ,图中仅展示其中的 1 个。  
 Fig. 3 Blast result of *RALF* protein Blast results of 8 *RALF* proteins are the same “RALF superfamily” ,only one is showed.

*RALF* 同源基因的系统树 3 种系统树一致性较高 , 由于在对亲缘关系相近群体的研究中 ,NJ 法 (无根网状树 ,并能给出分支长度) 的应用更为普遍。并且研究中的 8 个材料来自同一科内的四个属 ,属于亲缘关系相近群体 ,因此 ,以 NJ 树进行分析 (图 4)。

从图 4 看出 ,在十字花科的 4 个属中 ,*RALF* 同源基因的分子进化可初步分为三大类群。萝卜属、蔊菜属、山芥属的材料形成一个分支 ;芸薹属的桐农 4 号茎瘤芥和雪里蕻分蔊芥聚成一个分支 ;油菜 *RALFbn* 和鸡心甘蓝以及中花芥蓝聚在一起 ,这与氨基酸的分析结果一致 ,说明油菜的 *RALFbn* 很可能来源于甘蓝型油菜的种子资源。

2.3 *RALF* 同源基因的表达分析

以芸薹属“中花”芥蓝、萝卜属的“圆白”萝卜、蔊菜属的“高蔊菜”、山芥属的“欧洲山芥”四种植物的根、茎、叶、花序轴、总花蕾、开放的花、嫩角果等组织的双链 cDNA 为模板 ,内参对照选用  $\beta$ -actin ,用引物 P1、P2 进行 RT-PCR 表达分析 (图 5)。对十字花科 4 个属中 *RALF* 同源基因的表达分析发现 ,*RALF* 类基因在十字花科 4 个属的根、茎、叶、花序轴等营养器官中不表达或有弱的表达 ,比如在高蔊菜 (*RiRALF*) 的根中和欧洲山芥 (*BvRALF*) 的花序轴中出现微弱的表达条带 ;在生殖器官中检测到不同程

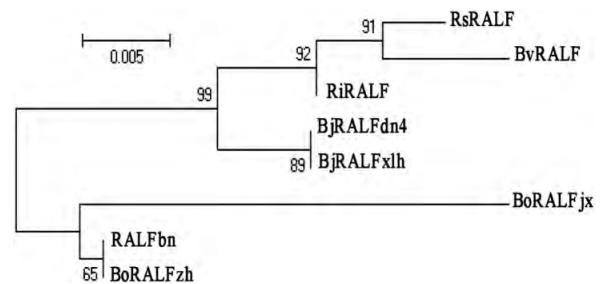


图 4 8 种十字花科植物 *RALF* 同源基因的 NJ 树 用 MEGA4.1 做出 数字为自举检验置信值 (1 000 个复制序列)。  
 Fig. 4 NJ tree of 8 homologous *RALF* sequences Made by MEGA4.1. numbers on the tree represent confidence values from bootstrap test (1 000 replicates).

度的表达 ,其中 ,在总花蕾和开放的花中的表达量普遍高于嫩角果中的表达量。

3 讨论与结论

在对十字花科植物花粉发育相关基因的研究中 ,本实验室报道了多肽激素类基因 *RALF* ,我们先前的研究表明该类基因与小孢子发育密切相关 ,在植物花粉发育过程中的具有重要的调控功能 (李焰焰等 2008;2010)。本文根据油菜 *RALFbn* 的 DNA 编码区序列特征 ,进行同源基因扩增引物设计 ,并从

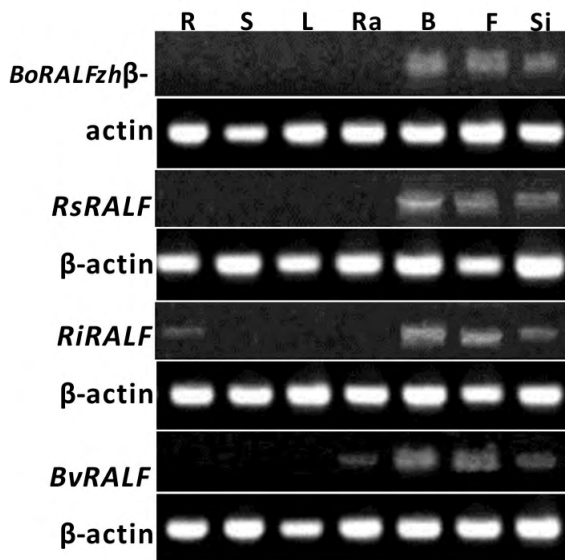


图5 *RALF* 同源基因在十字花科四属中的表达 R、S、L、Ra、B、F、Si 分别指根、茎、叶、花序轴、总花蕾、开放的花、嫩角果; Actin 为内参对照。

Fig. 5 Expression patterns of homologous *RALF* in four genera of Cruciferae R S L Ra B F Si indicated roots stems, leaves rachis, the total buds, open flowers and siliques respectively;  $\beta$ -actin was internal control.

十字花科四个属的7个物种中成功克隆到其同源序列,说明 *RALF* 在十字花科中广泛存在。对其氨基酸和核苷酸序列进行的分析表明 *RALF* 同源基因的保守性很高 根据对同源基因的普遍认识,当同源蛋白的氨基酸序列相似性极高时,则它们极有可能在不同物种中执行相同功能,据此可以推测 *RALF* 同源基因具有类似的功能。

*RALF* 同源基因在十字花科4个属中的表达分析表明该类基因主要在生殖器官中表达,而在营养器官中不表达或弱表达。这些同源基因的获得,丰富了 *RALF* 家族信息,为明晰该类基因在十字花科植物花粉发育中作用机制提供研究基础。同时,对 *RALF* 同源基因的进化分析丰富了十字花科植物的分子进化数据。

#### 参考文献:

Germain H, Chevalier E, Caron S *et al.* 2005. Characterization of

five *RALF*-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants [J]. *Planta*, **220** (3): 447-454

Haruta M, Constabel CP. 2003. Rapid alkalization factors in Poplar cell cultures peptide isolation cDNA cloning and differential expression in leaves and methyl Jasmonate-treated cells [J]. *Plant Physiol*, **131** (2): 814-823

Kouchi H, Takane K, So RB *et al.* 1999. Rice ENOD40: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules [J]. *Plant J*, **18** (2): 121-129

Li YY (李焰焰), Cao JS (曹家树). 2010. Isolation and Molecular Characterization of *RALF*-Like Gene *BcRALF* from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *parachinensis* (快速碱化因子基因 *BcRALF* 在菜心中的克隆及序列分析) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究) **32** (2): 147-150

Li YY (李焰焰), Cao JS (曹家树). 2008. Molecular Characterization and expression pattern of *RALF*-Like Gene *BcMF14p* from *Brassica campestris* var. *purpurea* (紫菜薹快速碱化因子基因 *BcMF14p* 的克隆、表达及序列分析) [J]. *J Nucl Agric Sci* (核农学报) **22** (1): 41-44

Li YY (李焰焰), Nie CP (聂传朋). 2009. The process of the research on plant rapid alkalization factor in Solanaceae (快速碱化因子类基因在茄科植物中的研究进展) [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究) **31** (2): 157-162

Li YY (李焰焰), Nie CP (聂传朋), Cao JS (曹家树). 2011. Cloning and evolutionary analysis of homologous sequences of *BcMF13* gene in Cruciferous vegetables (十字花科蔬菜 *BcMF13* 同源基因的克隆及进化分析) [J]. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报) **17** (2): 207-210

Loivamäki M, Stührwohldt N, Deeken R *et al.* 2010. A role for PSK signaling in wounding and microbial interactions in *Arabidopsis* [J]. *Physiol Plant*, **139** (4): 348-357

Lucrezia DD, Slanzi D, Poli I *et al.* 2012. Do natural proteins differ from random sequences polypeptides? Natural vs. random proteins classification using an evolutionary neural network [J]. *PLoS One*, **7** (5): 1-10

Nie CP, Li YY, Zhao J, *et al.* 2012. Extremely high major histocompatibility complex class IIb gene intron 2 variation and population structure in Chinese alligator [J]. *J Genetics*, **91**: e86-e91

Nie CP, Zhao J, Li YY *et al.* 2013. Diversity and selection of MHC class IIb gene exon3 in Chinese alligator [J]. *Mol Biol Rep*, **40**: 295-301

Olsen AN, Mundy J, Skriver K. 2002. Peptomics identification of novel cationic *Arabidopsis* peptides with conserved sequence motifs [J]. *In Silico Biol*, **2** (4): 177-180

Pearce G, Moura DS, Stratmann J, *et al.* 2001. *RALF*, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98** (22): 12843-12847

Ricchiuto P, Brukhno AV, Paci E *et al.* 2011. Conformation state diagram of polypeptides: A chain length induced  $\alpha$ - $\beta$  transition [J]. *J Chem Phys*, **135** (6): 135-139