

柑橘类植物和其它植物的 GPAT 和 SOD 基因分子进化分析

吴波¹ 刘勇^{2*}

(1. 江西中医学院/江西省中药种质资源工程技术研究中心, 江西 南昌 330004; 2. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)基因和超氧化物歧化酶(SOD)基因是与植物抗寒和抗逆密切相关的2个基因。为了研究柑橘类植物之间以及和其它植物之间上述两基因的分子进化的异同,已经获得的数种柑橘类植物的GPAT基因、SOD基因氨基酸序列和通过检索GenBank数据库获得的相关序列为试验数据,使用PAUP4.0软件,通过最大简约法,分别构建GPAT基因、Fe/Mn-SOD基因、Cu/Zn-SOD基因和总SOD基因的系统进化树。GPAT基因分子系统进化树分析结果表明,GPAT基因在单子叶和双子叶植物中的进化差异不大,在柑橘类植物中的进化差异较大;Fe/Mn-SOD基因分子系统进化树分析结果表明,该基因分子进化与植物自身的抗逆能力有密切关系;Cu/Zn-SOD基因分子系统进化树分析结果表明,该基因在进化上是相当保守的。总SOD基因分子系统进化树分析结果表明,SOD基因的进化和聚类并不是以植物的科属是否相同或相近为依据的,而是以该基因所结合的金属离子的不同来分类的;Cu/Zn-SOD基因和Fe/Mn-SOD基因来源于不同的祖先基因,前者较后者保守。

关键词: 柑橘类植物; GPAT; SOD; 分子进化分析

中图分类号: Q943.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)01-0162-06

Molecular Evolution Analysis of GPAT and SOD Genes in Citrus and Other Plants

WU Bo¹, LIU Yong^{2*}

(1. Research Center of Traditional Chinese Medicine Germplasm Resource, JXTCMI, Nanchang 330004, China; 2. College of Agronomy, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: GPAT and SOD are very important genes closely related with cold resistance and stress resistance of plants. In order to study the similarities and differences of GPAT and SOD genes, molecular evolution, the systemic evolution trees of GPAT gene and Fe/Mn-SOD and Cu/Zn-SOD and total SOD gene were established by using the software of PAUP4.0 and the method of MP in GPAT and SOD genes, amino acids sequences of several citrus and other plants in database of GenBank. The analysis of GPAT gene's systemic evolution tree showed that the molecular evolution difference in monocotyledons and dicotyledons was not so large but the difference was relatively large in citrus plants. The analysis of Fe/Mn-SOD gene's systemic evolution tree showed that this gene's molecular evolution had close connection with stress resistance of the plant itself. The analysis of Cu/Zn-SOD gene's systemic evolution tree showed that the gene's evolution was very

收稿日期: 2010-09-20 修回日期: 2010-11-03

基金项目: 江西省自然科学基金项目(2009GZN0024)、江西省教育厅科技项目(GJJ09542)和江西农业大学博士启动基金项目(1791)

作者简介: 吴波(1980—),男,讲师,硕士,主要从事药用植物生物技术研究; * 通讯作者: 刘勇,教授。

conservative. The analysis of total SOD gene's systemic evolution tree showed that the foundation of the evolution and clustering in SOD gene was not plants, family and genus but the metal ions of SOD gene. Cu/Zn - SOD gene and Fe/Mn - SOD gene rooted in distinct ancestral gene and the former was more conservative than the latter.

Key words: citrus; GPAT; SOD; molecular evolution analysis

生物进化本质是遗传物质的进化。对绝大多数真核而言,核基因组是遗传物质的主要载体,不但包含了生物体生长、发育、繁殖和适应生境所需的各种信息和指令,而且能够通过有性繁殖和无性繁殖把这些信息和指令传递给后代,氨基酸正是基因组中的功能基因根据三联体密码子编码原则翻译而成,以执行具体的生理生化功能。从进化的角度看,基因组不仅记录了生物进化中的各个历史事件,而且是各类生物进一步演化的基础和起点。功能基因的上述变化使得生物学性状的产生和变化成为可能,也导致了基因的拷贝数目在种间和种内不同个体间产生差异^[1-3],最终导致了所编码氨基酸的差异。因此,在分子层面上,特别是从蛋白质方面比较同科属植物、近缘种或不同科属植物在基因分子进化上的差异,不仅有助于全面理解遗传、变异和进化的本质,而且能够为阐明植物物种形成和物种多样性产生的机制奠定基础。

甘油-3-磷酸酰基转移酶(Glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT, EC2.3.1.15)基因是植物生物膜中磷脂酰甘油生物合成过程中的第一个酰基酯化酶基因,与植物抗寒性密切相关。目前,国内外学者已经先后从拟南芥^[4]、甜椒^[5]、红花^[6]、水稻^[7]等植物中克隆了该基因的 cDNA 全长序列或片段序列。在柑橘类植物中,则从温州蜜柑^[8]中获得了 cDNA 全长序列,从新干特早柚^[9]、柠檬、飞龙枳、兴国甜橙、莽山野橘^[10]中获得了 cDNA 片段序列。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, EC1.15.1.1, SOD)基因生物体防御氧毒性的关键性屏障基因,对生物体抗衰老、抗逆境起着至关重要的作用。根据 SOD 结合的金属离子的不同,可分为 Fe-SOD、Mn-SOD 和 Cu/Zn-SOD 3 种类型。目前,国内外学者已经先后从白杨^[11]、甘薯^[12]、木薯^[13]、桃等^[14]等作物中克隆出该基因的 cDNA 全长序列或片段序列。在柑橘类植物中,则从甜橙和柠檬中获得了 cDNA 全长序列,从飞龙枳、琯溪蜜柚、岭南沙田柚、新干特早柚等 6 种柑橘类植物中获得了 cDNA 片段序列^[15]。

为了研究柑橘类植物的 GPAT 基因及 SOD 基因和其它植物的 GPAT 基因及 SOD 基因之间的分子进化关系以及 3 种不同类型 SOD 基因的分子进化关系,本研究以本文作者已经克隆所得的数种柑橘类植物 GPAT 基因和 SOD 基因所编码的氨基酸序列以及从 GenBank 数据库中检索出的其他植物 GPAT 基因和 SOD 基因的氨基酸序列为研究对象,运用生物信息学技术,比较分析它们之间的差异,构建上述 2 种基因的系统进化树,为深入理解不同科属植物以及同科属植物近缘种在基因层面上的异同、探讨基因进化和生物多样性形成的机制等提供新思路。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 GPAT 基因氨基酸序列的获得与整理 登录美国国立生物信息中心网站(www.ncbi.nlm.nih.gov),用 BLAST 的方法在 GenBank 中搜寻了水稻、玉米、菠菜、红花、辣椒、芥菜、温州蜜柑等植物 GPAT 基因的氨基酸序列,结合本文作者已经克隆所得的 5 种柑橘类植物 GPAT 基因的氨基酸序列,组成分析 GPAT 基因分子进化所用的序列(表 1)。

1.1.2 SOD 基因氨基酸序列的获得与整理 登录美国国立生物信息中心网站(www.ncbi.nlm.nih.gov),用 BLAST 的方法在 GenBank 中搜寻了海带、小麦、油橄榄、烟草、山茶、水稻、柠檬等植物 SOD 基因的氨基酸序列,结合本文作者已经克隆所得的 5 种柑橘类植物 SOD 基因的氨基酸序列,并适当选取相对古老的褐藻海带和海洋软体动物海参组成分析 SOD 基因分子进化所用的序列(表 2)。

1.2 方法

序列比对和基因分子进化树的构建:利用 CLUSTALX1.83 软件,先对上述 2 个表格中的氨基酸序列

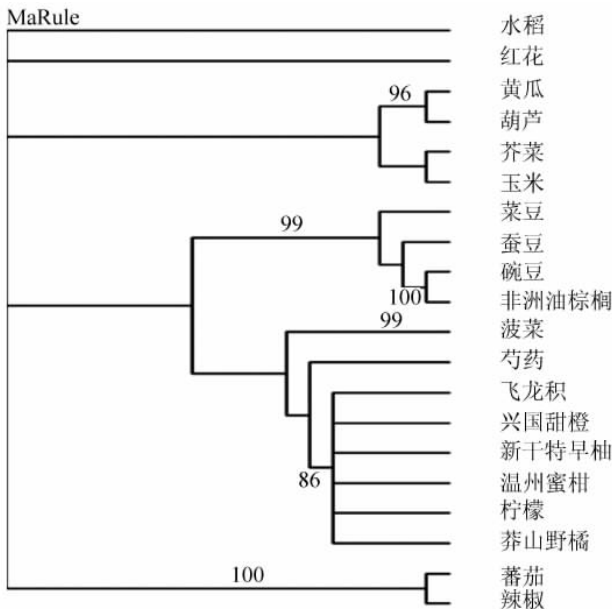
进行多重比对,生成原始的矩阵,然后用 DAMBE 软件转换原始矩阵的文件格式,生成相应的氨基酸序列矩阵。在基因分子进化分析中,采用 PAUP4.0 软件,通过最大简约法(Maximum - Parsimony,简称 MP),经过自展法(Bootstrap) 1 000 次重复验证,以保证树拓扑结构的可靠性,构建基因分子进化树。

2 结果与分析

2.1 GPAT 基因分子进化

选取单子叶植物水稻和双子叶植物红花分别作为树形图外部分枝,通过 MP 法构建的 GPAT 基因分子系统进化树(图 1),其一致性指数达 0.857,保持性指数达 0.713 5(表 3),表明树形可靠。对该进化树进行分析,结果显示:该系统进化树分为五大分枝,水稻和红花各为一个分枝;黄瓜、芥菜等 4 种植物归为一个分枝;菜豆、蚕豆、柑橘类植物等 12

种植物合为一个分枝;番茄、辣椒等合为一个分枝;分子进化自展值为 86% ~ 100%,在同科植物中的差异更小,如在茄科植物番茄和辣椒间的自展值达 100%;在豆科植物菜豆、蚕豆和豌豆间的自展值达 99%;在芸香科植物飞龙枳、兴国甜橙、新干特早柚、温州蜜柑、柠檬和莽山野橘间的自展值为 86%。



(图中数字为自展值)

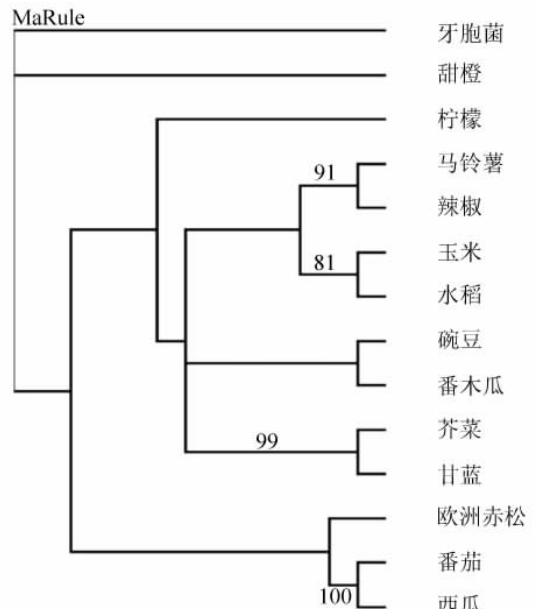
图 1 MP 法构建的 GPAT 基因系统进化树

Fig. 1 MP phylogenetic tree of GPAT gene

表 1 GPAT 基因进化分析所用到的序列

Tab.1 GPAT amino acids used in the molecular evolution analysis

序号 No.	氨基酸序列登录号 Amino acid accession numbers in GenBank	物种名称 Species
1	CAB45298	稻
2	AAS89974	玉米
3	Q43869	菠菜
4	Q43822	菜豆
5	Q42713	红花
6	Q39639	黄瓜
7	P10349	葫芦
8	CAD19318	芥菜
9	CAB75874	非洲油棕桐
10	AAQ63646	番茄
11	AAP79443	辣椒
12	BAB79529	温州蜜柑
13	AAK15854	芍药
14	AAD05164	蚕豆
15	ABA82122	莽山野橘
16	ABA82134	新干特早柚
17	ABA82123	柠檬
18	ABA82126	飞龙枳
19	ABA82124	兴国甜橙
20	CAA41769	豌豆



(图中数字为自展值)

图 2 MP 法构建的 Cu/Zn - SOD 基因系统进化树

Fig. 2 MP phylogenetic tree of Cu/Zn - SOD gene

2.2 SOD 基因分子进化

选择微生物芽孢菌和芸香科柑橘属植物甜橙分别作为树形图外部分枝,通过 MP 法构建的 Cu/Zn - SOD 基因分子系统进化树(图 2) 其一致性指数达 0.813 754, 保持性指数达 0.768 561(表 4), 表明树形可靠度高。对该进化树进行分析 结果表明:该系统进化树分为三大分枝,芽孢菌和甜橙各为一个分枝;其余 12 种植物合为一个分枝。分子进化自展值在 81% ~ 100% 在单子叶植物玉米和水稻间的自展值为 81%;在十字花科植物甘蓝和芥菜间的自展值为 99%。

选择海洋软体动物海参作为树形图外部分枝,通过 MP 法构建的 Fe/Mn - SOD 基因分子系统进化树(图 3) 其一致性指数为 0.964 353,保持性指数为 0.941 358(表 5) 表明树形结果相当可靠。对该进化树进行分析 结果显示:该系统进化树分为三大分枝,海参单独为一个分枝;小麦、辣椒和 6 种柑橘类植物合成一个分枝;番茄、豌豆、大豆、玉米、水稻等 5 种植物合成一个分枝。基因分子进化自展值为 80% ~ 100%,在豆科植物豌豆和大豆间的自展值为 80%;在 6 种芸香科植物间的自展值高达 100%。

把构建 Cu/Zn - SOD 基因和 Fe/Mn - SOD 基因分枝系统进化树的材料合并,选择藻类生物海带作为树形图外部分枝,通过 MP 法构建的总 SOD 基因分子系统进化树(图 4) 其一致性指数达 0.884 615 保持性指数为 0.894 628(表 6) 表明该进化树结果可信、可靠。对该进化树进行分析,结果显示:该系统进化树分为四大分枝,海带单独成一个分枝;海参、小麦、葫芦、山茶、樟树、洋橄榄、飞龙枳、琯溪蜜柚、柠檬、马家柚、岭南沙田柚、新干特早柚、辣椒和烟草等 14 种生物合成一个分枝;甜橙、柠檬 1、向日葵、甘蓝、落花生和番木瓜等 6 种植物归成一个分枝;

表 2 SOD 基因进化分析所用到的序列

Tab.2 SOD amino acids used in the molecular evolution analysis

序号 No.	氨基酸序列登录号 Amino acid accession numbers in GenBank	物种名称 Species
1	AAQ22734	海带
2	CAA45416	海参
3	AAC62115	小麦
4	AAL24044	洋橄榄
5	CAC19487	桃
6	AAC35356	樟树
7	BAC75399	烟草
8	AAT68778	山茶
9	CAA03881	甜橙
10	AAQ14591	柠檬 2
11	CAH06454	向日葵
12	P09678	甘蓝
13	AAZ20281	落花生
14	CAA73929	番木瓜
15	P28759	大豆
16	AAR05657	豌豆
17	CAH69704	玉米
18	XP550626	水稻
19	AAB88870	辣椒
20	AAS48178	葫芦
21	ABA82128	飞龙枳
22	ABA82129	琯溪蜜柚
23	ABA82130	岭南沙田柚
24	ABA82132	柠檬 1
25	ABA82131	马家柚
26	ABA82133	新干特早柚

表 3 GPAT 基因系统进化树指标

Tab.3 Index of GPAT gene's phylogentic tree

长度 Length	一致性指数 CI	保持性指数 RI
1 409	0.857	0.713 5

表 4 Cu/Zn - SOD 基因系统进化树指标

Tab.4 Index of Cu/Zn - SOD's phylogentic tree

树长 Length	一致性指数 CI	保持性指数 RI
349	0.813 754	0.768 561

表 5 Fe / Mn - SOD 基因系统进化树指标

Tab.5 Index of Mn/Fe - SOD's phylogentic tree

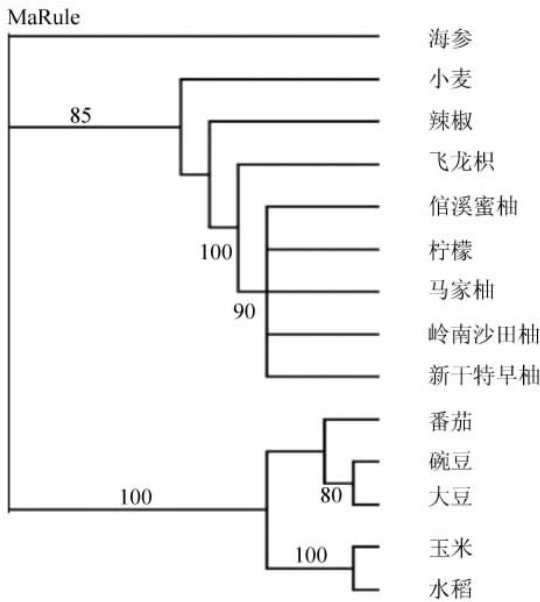
树长 Length	一致性指数 CI	保持性指数 RI
533	0.964 353	0.941 358

玉米、大豆、豌豆和水稻合成一个分枝。总 SOD 基因分子进化自展值为 78% ~ 100% ,在第 2 个分枝中,6 种柑橘类植物的自展值为 100% 。

表 6 总 SOD 基因系统进化树指标

Tab.6 Index of totalphylogentic tree of SOD gene

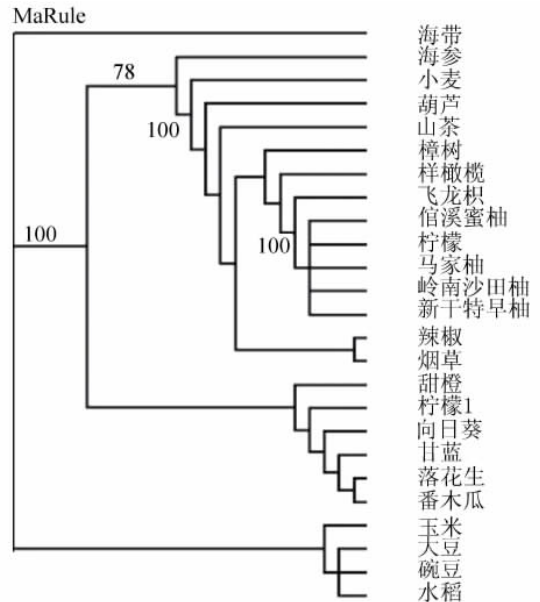
树长 Length	一致性指数 CI	保持性指数 RI
884	0.884 615	0.894 628



(图中数字为自展值)

图 3 MP 法构建的 Fe/Mn-SOD 基因系统进化树

Fig.3 MP phylogenetic tree of Fe/Mn-SOD gene



(图中数字为自展值)

图 4 MP 法构建的总 SOD 基因系统进化树

Fig.4 MP phylogenetic tree of total SOD gene

3 讨论

3.1 GPAT 基因分子进化

通过对系统进化树的分析,发现 GPAT 基因在单子叶和双子叶植物中的进化差异不大,在有的同科植物中的差异很小,如在茄科植物番茄和辣椒间的自展值达 100%。但是,GPAT 基因在柑橘类植物中的进化差异较大,本研究结果显示:6 种柑橘类植物中的自展值仅为 86%,说明该基因在芸香科中的进化差异较大。一般认为,近缘种在遗传物质上应该说是非常相似的^[16],因此 GPAT 基因在近缘种之间的差别应该不会太大。但是通过研究我们发现事实并非想象的如此简单,基因的重复、置换或缺失在进化过程中实际上是频繁发生的,直接导致了所编码的氨基酸产生差异^[17],并且 6 种柑橘类植物分属芸香科的枳属和柑橘属,其生长环境差别较大。所以,我们推测近缘种植物 GPAT 基因间的差异不仅与生长环境和自身的抗寒性有着密切的联系,并且可能存在多基因家族。如刘继梅等^[18]在不同抗寒性水稻 GPAT 基因差异时发现:抗寒性相差越大的品种其核苷酸序列差异越大;Bertrams 和 Heinz^[19]在不同产地的豌豆叶绿体中发现了 2 种不同分子量和等电点的 GPAT 基因同源异构体;Frentzen 等^[20]在南瓜叶绿体中发现了 3 种不同的 GPAT 蛋白,它们在氨基酸的 N 端有明显的差异。

3.2 SOD 基因分子进化

SOD 基因根据结合的金属离子不同,分为 Fe-SOD 基因、Mn-SOD 基因和 Cu/Zn-SOD 基因^[21]。由于众多研究成果表明:Fe-SOD 基因和 Mn-SOD 基因同源性很高^[22]。因此,我们以这 2 种 SOD 基因的物种为试验材料,构建 Fe/Mn-SOD 基因分子系统进化树;以 Cu/Zn-SOD 基因的物种构建 Cu/Zn-SOD 基因分子系统进化树,并综合上述树形图试验材料,构建总 SOD 基因分子系统进化树。

在 Fe/Mn-SOD 基因分子系统进化树中,飞龙枳和其余 5 种柑橘类植物没有聚合在一起,说明 Fe/Mn-SOD 基因的分子进化与植物自身的抗逆能力有密切关系。张博润等^[23]研究认为,不同抗性植物体内 Fe/Mn-SOD 基因在蛋白质一级结构、空间结构、分子量、光谱性质等方面有较大差异。

在 Cu/Zn - SOD 基因分子系统进化树中, 欧洲赤松作为树形图中仅有的裸子植物并没有单独成为一个分枝, 而是与双子叶被子植物番茄和西瓜聚合成一个分枝, 表明 Cu/Zn - SOD 基因在进化上是相当保守的。Feng 等^[24]根据 Cu/Zn - SOD 基因序列, 绘制了系统进化树, 结果显示从原始细菌到高等动植物, 其 Cu/Zn - SOD 基因的氨基酸序列都很保守。

在总 SOD 基因分子系统进化树中, 属于 Cu/Zn - SOD 类型的甜橙和柠檬没有和属于 Fe/Mn - SOD 类型的飞龙枳、琯溪蜜柚等柑橘类植物聚合在一起, 而是属于 2 个不同的大分枝, 说明 SOD 基因进化并不是以科属分类, 而是依据 SOD 基因结合的金属离子不同来分类的。陈惠芳等^[25]认为 Fe - SOD 基因和 Mn - SOD 的基因来源于共同的祖先基因, 两者基因的核苷酸和氨基酸都具有很高的相似性, 两者存在共同的保守序列, 这与 Cu/Zn - SOD 基因与 Fe/Mn - SOD 基因来源于不同的祖先基因的结论是相符的。

参考文献:

- [1] Nozawa M, Kawahara Y, Nei M. Genomic drift and copy number variation of sensory receptor genes in humans [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* 2007, 104: 20421 - 20426.
- [2] Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and non-synonymous and nucleotide substitutions [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1986, 3: 418 - 426.
- [3] Nozawa M, Nei M. Genomic drift and copy number variation of chemosensory receptor genes in humans and mice [J]. *Cytogenetic and Genome Research* 2008, 123: 263 - 269.
- [4] Nishida I, Tasaka Y, Shiraiishi H, et al, The gene and the RNA for the precursor to the plastid - located glycerol - 3 - phosphate acyltransferase of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 267 - 277.
- [5] 陈娜, 郭尚敬, 颜坤, 等. 甜椒甘油 - 3 - 磷酸酰基转移酶基因的克隆与表达分析 [J]. *园艺学报* 2005, 32(5): 823 - 827.
- [6] Bhilla R S, Mackenzie S L. Nucleotide sequence of a cDNA from *Carthamus tinctorius* encoding a glycerol - 3 - phosphate acyltransferase [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106(94): 1713 - 1714.
- [7] 刘继梅, 陈善娜, 鄢波, 等. 水稻中编码甘油 - 3 - 磷酸转酰酶部分 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. *云南植物研究*, 1998, 20(3): 339 - 342.
- [8] Ataka M, E Kato H, Wakayama N I. Magnetic orientation as a tool to study the initial stage of crystallization of lysozyme [J]. *J Crystal Growth*, 1997, 173(8): 592 - 596.
- [9] 吴波, 刘勇. 新干特早柚 GPAT 基因 5' 端克隆及序列分析 [J]. *江西农业大学学报* 2009, 31(5): 915 - 918.
- [10] 吴波, 刘勇. 柑橘类植物 GPAT 基因片段克隆和 SNP 分析 [J]. *江西农业大学学报* 2010, 32(1): 51 - 56.
- [11] Rika Murai, Koji Murai. Different transcriptional regulation of cytosolic and plastidic Cu/Zn - superoxide dismutase genes in *Solidago altissima* (Asteraceae) [J]. *Plant Science*, 1996, 120: 71 - 79.
- [12] 黄明, 郝学勤, 邵寒霜. 甘薯叶片超氧化物歧化酶基因克隆及测序 [J]. *广西植物*, 199(2): 165 - 168.
- [13] H - S Lee, K - Y Kim, S - H You. Molecular characterization and expression of a cDNA encoding copper/zinc superoxidase dismutase from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 262: 807 - 814.
- [14] Bagnoli F, Giannino D, Caparrini S, et al. Molecular cloning, characterisation and expression of a mangauese superoxide dismutase gene from peach (*Prunus persica* L. Batsch) [J]. *Mol Genet Genomics*, 2002, 267: 321 - 328.
- [15] 吴波, 刘勇. 柑橘类植物 SOD 基因片段克隆和 SNP 分析 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(22): 11719 - 11721.
- [16] Wapinski I, Pfeffer A, Friedman N, et al. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi [J]. *Nature* 2007, 449: 54 - 61.
- [17] Kianian S F, Quiros C F. Generation of a Brassica oleracea composite RFLP map: linkage arrangements among various population and evolutionary implications [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 84: 544 - 554.
- [18] 刘继梅, 陈善娜, 鄢波, 等. 不同抗冷性水稻中编码甘油 - 3 - 磷酸转酰酶的部分 cDNA 的序列比较研究 [J]. *云南植物研究* 2000, 22(3): 317 - 321.
- [19] Bertrams M, Heinz E. Positional specificity and fatty acid selectivity of purified sn - glycerol 3 - phosphate acyltransferases from chloroplasts [J]. *Plant Physiol*, 1981, 68: 653 - 657.
- [20] Frentzen M, Nishida I, Murata N. Properties of the plastidial acyl - (acyl - carrier - protein) : glycerol - 3 - phosphate acyltransferase from the chilling - sensitive plant squash *Cucurbita moschata* [J]. *Plant Cell Physiol*, 1987, 28: 1195 - 1201.
- [21] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase [M]. *Anal Biochem*, 1971, 44: 267 - 287.
- [22] 汪本勤. 植物 SOD 的研究进展 [J]. *河北农业科学* 2008, 12(3): 6 - 9.
- [23] 张博润, 谭华荣. SOD 研究进展与应用前景 [J]. *微生物学通报*, 1992, 19(6): 352 - 357.
- [24] Feng D F, Doolittle R. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic tree [J]. *J Mol Evol*, 1987, 25: 351 - 360.
- [25] 陈惠芳, 王琦, 付学池, 等. 超氧化物歧化酶 (SOD) 的分子生物学 [J]. *生命的化学* 2003, 23(4): 291 - 293.