



藜麦生长素结合蛋白基因ABP1的鉴定与表达分析

徐宏申[#], 姜晓东^{*,#}, 王锡亮[#], 孙慧琼, 窦苗苗, 王新宇, 刘卓君, 杨博慧, 柴文婷, 赵珊珊, 张春来^{*}

山西农业大学农学院, 省部共建黄土高原特色作物协同创新共建中心, 山西晋中030801

[#]并列第一作者

^{*}共同通信作者: 姜晓东(sxaujiangxd@163.com)、张春来(chunlaiz@hotmail.com)

摘要: 生长素结合蛋白ABP1已被证实具有生长素受体功能。以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的ABP1为基础, 通过BLAST筛选藜麦的ABP1基因、蛋白质序列, 并结合生物信息学方法对其理化性质以及亚细胞定位、二级和三级结构、蛋白序列的motif及domain、系统进化树、启动子顺式作用元件进行了分析。结果显示: 藜麦基因组有2个编码ABP1基因*CqABP1.7g*和*CqABP1.17g*, 位于Chr07和Chr17, 等电点为6.03到6.35, 蛋白质中脂肪族侧链氨基酸含量的相对值为90.88%到96.22%, 且亚细胞定位在细胞质、内质网上; 二级结构以延伸链、无规则卷曲和 α -螺旋为主。藜麦的ABP1与甜菜的同源关系更近, 在进化上出现了单双子叶的分化。*CqABP1.17g*在藜麦花中高水平表达, 而*CqABP1.7g*在籽粒发育过程高水平表达; 在*CqABP1.17g*中发现多个插入缺失(INDEL)变异, *CqABP1.7g*中只发现1个INDEL变异, 未检测到移码突变; 预测的互作蛋白有生长素外排载体、鸟嘌呤核苷酸交换因子SPIKE1、含CRIB结构域的蛋白等。该研究结果为进一步探讨*CqABP1s*基因功能, 调控藜麦生长发育提供一定的理论基础与试验依据。

关键词: 藜麦; ABP1; 基因表达; 系统进化; 顺式作用元件

Identification and characterisation of auxin-binding protein gene *ABP1* in *Chenopodium quinoa*

XU Hongshen[#], JIANG Xiaodong^{*,#}, WANG Xiliang[#], SUN Huiqiong, DOU Miaomiao, WANG Xinyu, LIU Zhuojun, YANG Bohui, CHAI Wenting, ZHAO Shanshan, ZHANG Chunlai^{*}

Ministry of Education and Shanxi Province Co-Funded Collaboration and Innovation Centre for Speciality Crops, College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801, China

[#]Co-first authors

^{*}Co-corresponding authors: Jiang XD (sxaujiangxd@163.com), Zhang CL (chunlaiz@hotmail.com)

Abstract: The growth hormone binding protein ABP1 has been shown to function as a growth hormone receptor. Based on ABP1 from *Arabidopsis thaliana*, we screened the ABP1 gene and protein sequences of quinoa by BLAST, and analyzed its physicochemical properties, subcellular localization, secondary and tertiary structure, motif and domain analysis, phylogenetic tree, and promoter *cis*-acting elements by bioinformatics methods. The results showed that: quinoa genome has two genes encoding ABP1, *CqABP1.7g* and *CqABP1.17g*, which are located in Chr07 and Chr17; the isoelectric points of *CqABP1s* are from 6.03 to

收稿 2023-11-15 修定 2024-04-16

资助 山西农业大学生物育种工程项目(YZGC104)、黄土高原特色作物优质高效生产省部共建协同创新中心基金项目(SBGJXTZX-KF-11)、国家自然科学基金(31971994)、山西省重点研发计划(201803D221012-2)和中国科技部中巴援助项目(KY202-002002)。

6.35, and the relative values of the content of aliphatic side-chain amino acids in the proteins are from 90.88% to 96.22%, and the subcellular localization is in the cytoplasm and endoplasmic reticulum. The secondary structure is dominated by extended chains, irregular curls and α -helices; the ABP1 of quinoa is more closely homologous to that of sugar beet, and evolutionarily diverged into monocotyledons. *CqABP1.17g* is expressed at a high level in quinoa flowers, whereas *CqABP1.7g* is expressed at a high level in seed development; multiple insertion deletion (INDEL) variants have been found in *CqABP1.17g*, only one INDEL variant was detected in *CqABP1.7g*, and no code-shifting mutation was detected; the predicted interacting proteins included Auxin efflux carrier, Guanine nucleotide exchange factor SPIKE 1, CRIB domain-containing protein, etc. The results of this study provide a theoretical foundation and experimental basis for further exploring the function of *CqABP1s* gene and regulating the growth and development of quinoa.

Key words: quinoa (*Chenopodium quinoa*); ABP1; gene expression; phylogeny; *cis*-acting elements

藜麦(*Chenopodium quinoa*)是一种藜科藜属的假谷物植物,被联合国粮食及农业组织(FAO)认定为唯一的单体农作物。它是四倍体(即 $2n=4x=36$),其基因组大小为1.45~1.50 Gb (Jarvis等2017)。藜麦的营养性很强,蛋白质含量高,可达到14%~22%,氨基酸含量类型多,其中有9种必需氨基酸,特别是赖氨酸的含量相对丰富(钱广涛等2021)。随着藜麦种植规模的不断变大,对藜麦基因组学及其他组学、遗传图谱及产量相关性状的QTL定位研究等也显得愈发重要。藜麦基因组的测序工作在2016年完成,可在基因组水平上发掘藜麦重要基因和了解其结构、功能(Yasui等2016)。

生长素(auxin)是一种重要的植物内源激素,化学本质是吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA),参与植物生长发育的许多过程,如植物根的向地生长、茎的向光反应等。而IAA主要由色氨酸(Trp)产生,而IPA途径是植物中主要且普遍保守的生物合成途径,而其他利用Trp前体的冗余途径则并行运行(Casanova-Sáez等2021; Normanly等1993)。而植物中色氨酸依赖性合成途径主要有4种:吲哚-3-丙酮酸(indole-3-pyruvic acid, IPA)途径、吲哚-3-乙酰胺途径、色胺途径和吲哚-3-乙缩脲途径(Woodward和Bartel 2005)。

生长素结合蛋白(auxin-binding protein, ABP)于1985年中从玉米中首先被鉴定出来,被命名为ABP1 (Löbner和Klämbt 1985)。近些年来,随着新技术的发展,对ABP1不断地深入研究,已经有越来越

越多的证据表明ABP1可以行使生长素受体的功能(Joo等2005)。Steffens等(2001)表明位于原生质体外的ABP1能感知促使原生质体膨胀的生长素信号;并且ABP1的C末端含有可以模拟高浓度的生长素对内向的钾离子通道的失活作用的多肽。ABP1在高等植物中有2个保守的关键基序:羧基末端KDEL序列和2个半胱氨酸残基,一个靠近成熟ABP1的氨基末端,第二个仅位于Trp151的羧基末端(Napier 2021)。Friml等(2022)通过*abp1*突变体在几种生长素触发的快速细胞过程和生长素相关发育过程中的缺陷有力证明了ABP1是基于跨膜激酶1 (transmembrane kinase 1, TMK1)的细胞表面信号传导的生长素受体,介导全局磷酸化反应和生长素管化。作为一个生长素受体,ABP1可以通过质子泵将膜内的质子泵到膜外,造成细胞质膜超极化。最新的研究发现,存在着新的具有与ABP1重叠但不同功能的生长素受体ABL1 (ABP1-like protein 1)和ABL2 (Yu等2023),并且ABP1和ABL可以通过蛋白结构的相似性实现功能补偿效应,进而与TMK在细胞膜上形成复合体,作为胞外生长素的共受体介导生长素信号驱动的快速反应(孔祥培等2023)。

本研究对藜麦ABP1的理化性质以及亚细胞定位、二级和三级结构、蛋白序列的motif及domain、系统进化树及启动子顺式作用元件进行了分析,为通过*ABP1*基因调控藜麦生长发育提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 基因检索

以拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]的ABP1氨基酸序列作为参考,在Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>)数据库和NCBI数据库中进行Blast搜寻和比对,获得*ABP1*基因的基因序列、编码序列(coding sequence, CDS)、氨基酸序列。藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd.)与甜菜(*Beta vulgaris* L.)的ABP1蛋白质序列来自NCBI;高粱[*Sorghum bicolor* (L.) Moench.]、小麦(*Triticum aestivum* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)的ABP1蛋白质序列来自Ensembl Plants数据库(<http://plants.ensembl.org/index.html>)。

1.2 生物信息学分析

1.2.1 藜麦*ABP1*基因的基本信息和蛋白理化性质分析

使用数据库Phytozome v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)对藜麦的*ABP1*基因的基本信息进行分析(赵珊珊等2023)。并将获取到的藜麦的ABP1蛋白序列使用在线软件aExPasyProtParm (<https://web.expasy.org/protparam/>)对其等电点、相对分子质量、脂肪系数等理化性质进行分析(武懿茂等2020)。

1.2.2 藜麦*ABP1*基因的基因结构分析

使用GSDS 2.0在线软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)上传CDS结构、基因结构文件,对*CqABP1s*基因结构进行可视化分析(Hu等2015)。

1.2.3 藜麦ABP1蛋白的信号肽、亚细胞定位及跨膜结构域的预测

利用SignalP-4.1 Server (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)在线工具对藜麦ABP1蛋白的信号肽进行预测;通过PSORT Prediction (<http://psort1.hgc.jp/form.html>)工具对藜麦ABP1进行亚细胞定位;利用TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对藜麦ABP1蛋白跨膜螺旋进行预测。

1.2.4 藜麦ABP1蛋白的二级及三级结构预测

采用SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对藜麦ABP1进行二级结构的预测;使用Phyre2 ([www.sbg.bio.ic.](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/)

[ac.uk/](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/))进行藜麦ABP1蛋白质三级结构模型的预测。

1.2.5 藜麦ABP1蛋白序列的motif分析及domain分析

利用在线工具MEME (<https://meme-suite.org/meme/>)对藜麦的ABP1序列进行motif分析序列保守特征,然后使用TBtools进行可视化(赵艳等2016)。使用NCBI数据库在线工具Batch CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)对藜麦的ABP1序列进行domain分析,然后使用软件TBtools进行可视化。

1.2.6 藜麦ABP1系统进化树的构建

使用软件MEGA 7.0对藜麦、甜菜、拟南芥、水稻、小麦和高粱的ABP1蛋白序列进行比对,并选择NJ邻接法构建系统进化树。

1.2.7 藜麦*ABP1*基因序列的启动子顺式作用元件分析

利用在线工具PlantCARE (李援亚2011)对藜麦*ABP1*基因序列启动子的顺式作用元件进行分析,并对藜麦*ABP1*启动子元件的种类与数量进行汇总。

1.2.8 藜麦*ABP1*基因在不同组织中的表达分析

从NCBI的GEO网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载已经经过处理的普通白甜藜麦和黄色苦藜麦的花、果实2种组织的转录组数据(GSE-139174);再获取*CqABP1*的表达量,并使用TBTools软件绘制*CqABP1*基因表达热图,进行*CqABP1*的表达模式的分析(张东亮等2011)。

1.2.9 藜麦籽粒发育时期*ABP1*基因的表达分析

将红藜麦、黑藜麦和白藜麦3种藜麦材料于2022年5月20号播种于山西农业大学农学院实践教学基地,于授粉后8、16、24和32 d取籽粒提取RNA(姜晓东等2018),送百迈客生物科技公司进行RNA-Seq,测定藜麦*ABP1*基因的表达水平,所用引物见表1。红藜麦、黑藜麦和白藜麦均由本课题组收集、保存。

1.2.10 4个藜麦品种*CqABP1*的INDEL DNA变异分析

将Q3、Q6、Q8和Q9 4个藜麦品种于2022年5月20号种植于山西农业大学农学院实践教学基地,取新鲜叶片,液氮迅速冷冻保存,送至百迈客生物科技公司进行DNA重测序,用BMKcloud.com平台

表1 RNA-Seq引物
Table 1 Primers used for RNA-Seq

基因	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
<i>CqABP1.17g</i>	ATCCTGGCCAACCTAAAGCC	TGCTGTCAGTGTTTCGAGACC
<i>CqABP1.7g</i>	TGCTTCAGACTCGCATGGAA	AGCCAACAGTTGCAGATCCT

分析*CqABP1*的DNA变异分析。Q3、Q6、Q8和Q9 4个籽粒食用品系均为特色种质资源,由本课题组收集、保存。

1.3 藜麦ABP1蛋白互作预测

利用STRING (<https://cn.string-db.org/>)数据库,以菠菜(*Spinacia oleracea* L.)为参照,对藜麦ABP1蛋白进行互作分析。

2 实验结果

2.1 藜麦ABP1基因成员的基本信息

通过NCBI数据库、Ensembl Plants数据库进行BLAST比较,获得了藜麦的2条蛋白序列(AUR62033690-RA、AUR62036778-RA)、甜菜的2条蛋白序列、拟南芥的1条蛋白序列、水稻的3条蛋白序列、小麦的3条蛋白序列、高粱的1条蛋白序列。藜麦*ABP1*基因有*AUR62033690*和*AUR62036778* 2个成员,分别分布在17、7号染色体上,且均位于染色体的中部区域,分别命名为*CqABP1.17g*和*CqABP1.7g*;其中基因*AUR62033690*在17号染色体的55049597~55055111位置,编码序列长度为276 bp,编码蛋白AUR62033690-RA,命名为*CqABP1.17g*;基因*AUR62036778*在7号染色体的51665322~51678836位置,编码序列长度为1 041 bp,编码蛋白AUR62036778-RA,命名为*CqABP1.7g*。

2.2 藜麦ABP1蛋白的理化性质分析

通过在线软件ExPasy-ProtParm分析藜麦ABP1的2条蛋白序列的相对分子质量、等电点、氨基酸

数目等理化性质,可知,藜麦的*ABP1*基因编码的蛋白由91~238个氨基酸组成,等电点(pI)为6.03~6.35,分子质量达9 961.28~26 799.93 Da,脂肪系数为90.88~96.22,总平均亲水性为-0.055~0.19,不稳定系数为47.78~62.66,大于40,2个蛋白均为不稳定蛋白。

2.3 藜麦ABP1的基因结构可视化

基因结构图(图1)表明, *CqABP1.17g*和*CqABP1.7g*的CDS序列均被内含子分隔开,且内含子片段很长;但是*CqABP1.17g*只含有2个CDS序列片段,并不存在上下游编码区,而*CqABP1.7g*则含有6个CDS序列片段,且存在上下游编码区。

2.4 藜麦ABP1蛋白二级结构分析和信号肽、亚细胞定位及跨膜结构域的预测

运用SOPMA、SignalP-4.1 Server、PSORT Prediction和TMHMM Server v2.0分别对*CqABP1*蛋白质的二级结构、信号肽、亚细胞定位和跨膜螺旋进行预测。结果如表2和图2所示, *CqABP1.17g*主要由延伸链、无规则卷曲构成, *CqABP1.7g*则由α-螺旋、延伸链、无规则卷曲三者构成;即延伸链、无规则卷曲和α-螺旋是藜麦ABP1蛋白的主要结构元件,而β-折叠则散乱地分布在蛋白质各处。 *CqABP1.17g*存在于细胞质中,没有信号肽,也不存在跨膜结构域;而*CqABP1.7g*存在于内质网中,含一个信号肽,存在一个跨膜结构域。

2.5 藜麦ABP1蛋白三级结构模型

采用Phyre 2软件对藜麦ABP1蛋白的三级结

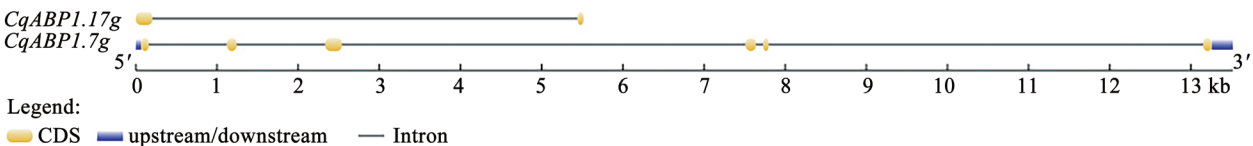


图1 藜麦ABP1基因结构分析
Fig. 1 The gene structure of *CqABP1*

表2 藜麦ABP1蛋白信息分析
Table 2 Analysis of domain of quinoa ABP1 proteins

蛋白	比例/%				亚细胞定位	信号肽	跨膜结构域
	α -螺旋	延伸链	β -折叠	无规则卷曲			
CqABP1.17g	6.59	35.16	8.79	49.45	细胞质	无	0
CqABP1.7g	36.97	16.39	5.04	41.60	内质网	有	1 (7~26)

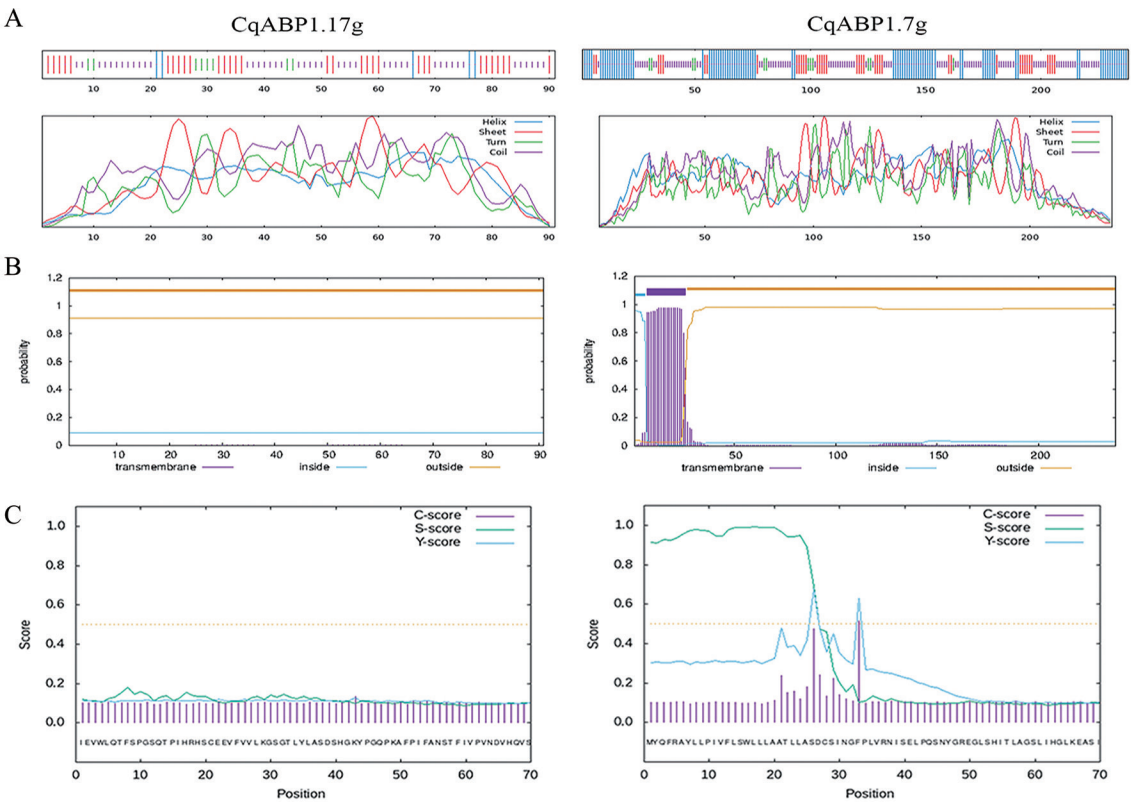


图2 藜麦的ABP1蛋白二级结构(A)、信号肽(B)和跨膜结构域(C)分析

Fig. 2 Analysis of the secondary structure (A), prediction of signal peptide (B) and transmembrane domain (C) of quinoa ABP1 protein

构进行预测获得CqABP1蛋白的pdb文件, 再使用PyMOL可视化, 结果如图3显示, CqABP1蛋白三级结构主要是由 α -螺旋、延伸链和无规则卷曲组成的, 与之前二级结构预测的结果一样。

2.6 藜麦ABP1的motif分析以及domain分析

为了进一步了解藜麦ABP1, 对其蛋白序列进行保守基序和结构域分析, 保守基序分别命名为motif1~3。结果如图4显示, 藜麦ABP1中不同的蛋白序列所含有的motif在数量和类型上不存在差异,

但是motif的相对位置有差异。藜麦ABP1的所有蛋白序列均含有motif1、motif2和motif3, 值得关注的是2个藜麦ABP1蛋白序列中, 保守基序排布顺序均为motif1、motif2和motif3。这说明藜麦ABP1保守基序的保守性很强, 而藜麦ABP1的2个蛋白均只有一个cupin_Rmic-like superfamily的domain, 推测CqABP1可能参与了鼠李糖途径。

2.7 藜麦ABP1系统进化树的构建

为了研究阐明藜麦ABP1的进化关系, 采用邻

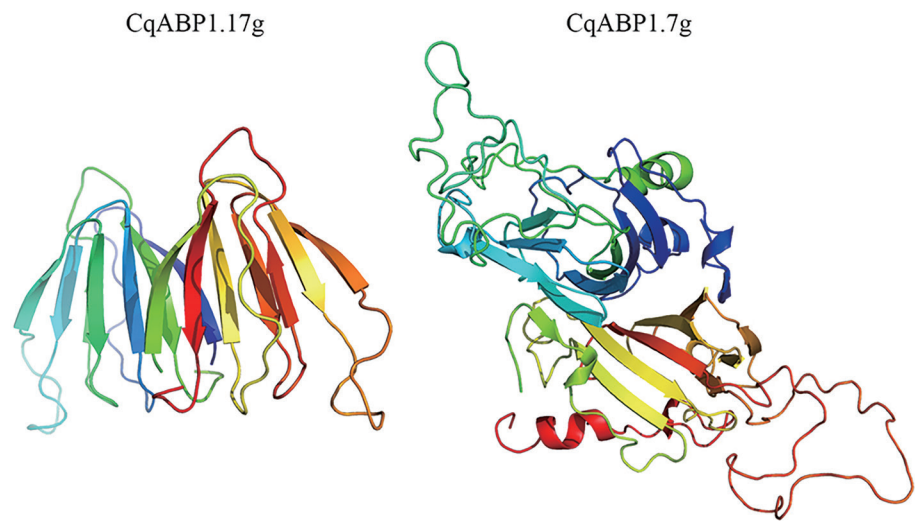


图3 藜麦的ABP1蛋白三级结构分析
Fig. 3 Analysis of tertiary structure of quinoa ABP1 protein

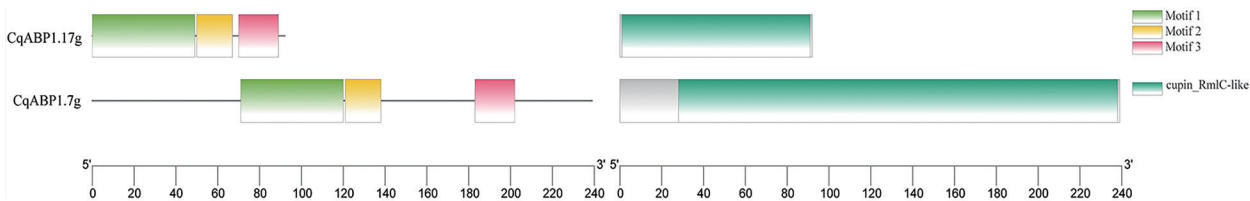


图4 藜麦ABP1氨基酸序列保守基序和domain分析可视化
Fig. 4 Visualization of amino acid sequence conserved motifs and domain of quinoa ABP1

接法将藜麦、甜菜、拟南芥、水稻、小麦和高粱一共12个ABP1蛋白的序列进行系统进化发育树的构建(图5)。通过对系统进化树的分支情况的观察与分析,发现ABP1被分为三大类:第一大类中包含藜麦、甜菜及拟南芥,其中有藜麦ABP1成员CqABP1.17g、CqABP1.7g,甜菜ABP1成员KMS9-7028、KMS97029以及拟南芥ABP1的AT4G02980.1;第二大类中包含水稻和高粱,其中有水稻ABP1成员BGIOGA037504-TA、Os12t0529400-01、Os12-t0529300-00以及高粱ABP1的EES16076;第三类只含有小麦的ABP1成员TraesCS5A02G098900.1、TraesCS5B02G104100.1和TraesCS5D02G111200.1。进化树中的双子叶植物(藜麦、甜菜和拟南芥)与单子叶植物(小麦、水稻和高粱)不能聚集在同一分支下,说明ABP1基因在进化过程中出现了单双子叶的分化。

2.8 藜麦ABP1基因的顺式作用调控元件分析

为了能够更深入地了解藜麦ABP1的潜在功能,对CqABP1启动子区的顺式作用元件进行了分析。由表3可知,2个CqABP1的基因启动子区域所包含的顺式作用元件主要包含3类,第一大类是关于植物生长发育、激素调节等植物生长发育相关的顺式作用元件,多与光反应有关,这主要与生长素的运输与光照有关(Liu等1993),包括G-box元件、GATA-motif元件、ACE元件、3-AF1 binding site元件、Box 4元件、Box II元件;第二大类是关于植物抗逆性、抗病相关的顺式作用元件,有ABRE元件、ARE元件、LTR元件;第三大类是不属于前两种,植物中普遍存在的顺式作用元件,包括CAAT-box元件、TATA-box元件。藜麦ABP1基因启动子元件中除了植物普遍含有的CAAT-box元件和TATA-box元件外,含有与光反应相关的元件

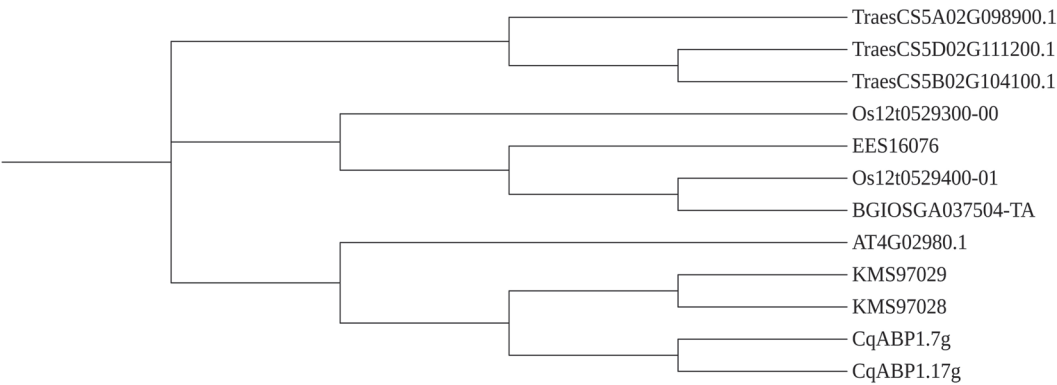


图5 藜麦、甜菜、拟南芥、小麦、水稻和高粱ABP1构建的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree constructed for ABP1 in *C. quinoa*, *B. vulgaris*, *A. thaliana*, *T. aestivum*, *O. sativa* and *S. bicolor*

表3 藜麦ABP1基因的启动子顺式作用调控元件以及功能
Table 3 Promoter *cis*-action regulatory elements and functions of quinoa ABP1 genes

元件名称	物种	序列	功能	<i>CqABP1.17g</i>	<i>CqABP1.7g</i>
3-AF1 binding site	马铃薯(<i>Solanum tuberosum</i>)	TAAGAGAGGAA	光响应元件	0	1
3-AF3 binding site	豌豆(<i>Pisum sativum</i>)	CACTATCTAAC	CMA3的一部分	1	0
ABRE	拟南芥	CACGTG	参与脱落酸反应性	0	2
ACE	欧芹(<i>Petroselinum crispum</i>)	CTAACGTATT	参与光响应	0	1
ARE	玉米(<i>Zea mays</i>)	AAACCA	对厌氧诱导至关重要 的调节元件	2	2
AT1-motif	马铃薯	AATTATTTTTTATT	光响应模块的一部分	0	1
ATC-motif	菠菜	AGTAATCT	参与光响应	0	1
AT-rich element	大豆(<i>Glycine max</i>)	ATAGAAATCAA	ATBP-1的结合位点	0	1
Box 4	欧芹	ATTAAT	参与光响应	0	3
Box II	马铃薯	TGGTAATAA	参与光响应	1	0
TATC-box	水稻	TATCCCA	参与赤霉素反应	1	0
CAT-box	拟南芥	GCCACT	与分生组织表达相关	0	2
CGTCA-motif	大麦(<i>Hordeum vulgare</i>)	CGTCA	茉莉酸反应性调节	1	0
chs-CMA1a	胡萝卜(<i>Daucus carota</i>)	TTACTTAA	参与光响应	0	1
GATA-motif	拟南芥	AAGATAAGATT	参与光响应	0	1
G-box	拟南芥	CACGTC	参与光响应	1	2
GT1-motif	燕麦(<i>Avena sativa</i>)	GGTTAAT	光响应元件	0	1
LTR	大麦	CCGAAA	低温响应元件	0	1
TATA-box	拟南芥	TATATA	转录开始-30 bp左右 的核心启动子元件	20	26
CAAT-box	拟南芥	CCAAT、CAAAT	启动子和增强子区 域中常见的元件	14	12

类型与数量最多, 推测ABP1蛋白与植物的光反应功能有关。

2.9 藜麦*ABP1*基因在不同组织中的表达分析
藜麦*ABP1*基因在白藜麦、黄藜麦不同组织中

的基因表达情况(图6)可看出, *CqABP1.17g*与*Cq-ABP1.7g*基因在黄藜麦中的表达水平明显高于白藜麦, 不过*CqABP1.17g*在藜麦花的表达水平高, 而*CqABP1.7g*在藜麦果实的表达水平相对较高, 说明藜麦*ABP1*基因的表达具有品种和组织的特异性, 猜测*CqABP1.17g*在花的形成中发挥作用, 而*Cq-ABP1.7g*则参与藜麦籽粒的形成。

2.10 藜麦*ABP1*基因在籽粒发育不同阶段的表达分析

检测了*CqABP1s*在不同基因型藜麦的不同籽粒发育期上的表达水平(图7), 发现2个基因均高水平表达, 除了授粉后32 d的红藜麦籽粒*CqABP1.17g*表达水平高于*CqABP1.7g*外, *CqABP1.7g*的表达水平均高于*CqABP1.17g*。并且随着籽粒的发育, 黑藜麦和红藜麦的*CqABP1.17g*表达水平上升, 白藜麦*CqABP1.17g*表达水平呈现先升后降的趋势; 黑藜麦和红藜麦的*CqABP1.7g*表达先升后降, 白藜麦

则呈下降。*CqABP1.7g*基因表达大多高于*CqABP1.17g*基因, 与之前分析通过GEO下载的藜麦转录组数据的结果一致; 又*CqABP1.7g*基因的表达水平在藜麦籽粒形成的早期明显高于*CqABP1.17g*基因, 进一步猜测*CqABP1.7g*基因在藜麦籽粒形成的早期发生作用。

2.11 4个藜麦品种*CqABP1*的INDEL DNA变异分析

对Q3、Q6、Q8和Q9共4个藜麦品种的*CqABP1*的DNA变异进行分析(表4), *CqABP1.17g*仅发现Cq17: 55052366一处, 而*CqABP1.7g*发现多处InDel变异, 注释为内含子和下游效应, 未检测到移码突变, 翻译出的蛋白质和原来一样, 蛋白结构和功能没有发生改变。

2.12 *CqABP1*的互作蛋白

通过STRING对*CqABP1*互作功能蛋白进行预测(表5), 有生长素外排载体组分2、生长素外排载体组分5、鸟苷置换因子SPIKE、组成型活性ROPs 4的互作子、CCG结合蛋白1、含CRIB域蛋白等蛋白与*CqABP1*互作, 多数与生长素的运输、调控基因表达等相关。

3 讨论

通过对藜麦*ABP1*序列的研究, 发现藜麦的*ABP1*的等电点(pI)为6.03~6.35, 基本分布在藜麦细胞的细胞质与内质网上, 细胞核上没有*ABP1*的分布, 这与Baully等(2000)的研究一致。*CqABP1.17g*和*CqABP1.7g*基因长度相差很大, 可能是因为*AUR-62033690 (LOC110713343)*没能测到全基因, cDNA 5'端缺少400多个碱基, 进而导致肽链缺了100多个

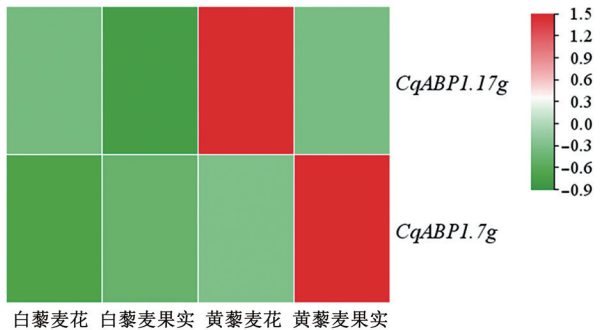


图6 *CqABP1*在藜麦不同组织中的表达分析
Fig. 6 Analysis of expression of *CqABP1* in different tissues of quinoa

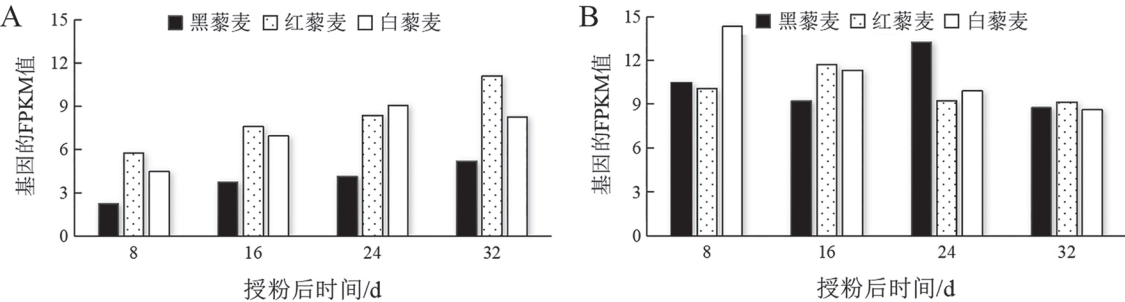


图7 不同藜麦品种籽粒发育时期*CqABP1.17g* (A)和*CqABP1.7g* (B)的表达
Fig. 7 Expression of *CqABP1.17g* (A) and *CqABP1.7g* (B) during grain development in different quinoa cultivars

表4 四个藜麦品种*CqABP1*的INDEL DNA变异分析
Table 4 Analysis of INDEL DNA variation of *CqABP1* in four quinoa cultivars

基因名	位置	Ref	Q3	Q6	Q8	Q9	变异效果
<i>CqABP1.17g</i>	55052366	TAAC	TAAC, TAAC	T, T	T, T	T, T	内含子
<i>CqABP1.7g</i>	51679805	TA	TA, TA	TA, TA	TA, TA	T, T	下游效应
<i>CqABP1.7g</i>	51672610	A	A, AT	AT, AT	A, A	A, AT	内含子
<i>CqABP1.7g</i>	51681294	CA	C, C	C, C	C, C	N, N	下游效应
<i>CqABP1.7g</i>	51674510	A	A, A	A, A	A, A	A, AT	内含子
<i>CqABP1.7g</i>	51679619	CA	C, C	C, C	N	N	下游效应
<i>CqABP1.7g</i>	51681619	AG	AG, AG	A, A	AG, AG	AG, AG	下游效应
<i>CqABP1.7g</i>	51674442	TC	TC, TC	T, T	TC, TC	TC, TC	内含子
<i>CqABP1.7g</i>	51680488	C	C, C	CT, CT	C, C	CT, CT	下游效应
<i>CqABP1.7g</i>	51683093	GGGAACACTTCCTTG- AAAAAGCAGTC, X	GGGAACACTTCCTTG- AAAAAGCAGTC, X	G, G	GGGAACACTTCCTTG- AAAAAGCAGTC, X	GGGAACACTTCCTTG- AAAAAGCAGTC, X	下游效应

表中“X”指代序列“GGGAACACTTCCTTGAAAAAGCAGTC”。

氨基酸, 蛋白*CqABP1.17g*比*CqABP1.7g*短太多。

通过对藜麦这2条*ABP1*的蛋白序列进行motif分析得到3个保守基序, 并且发现2个藜麦的*ABP1*的蛋白序列的保守基序的排布顺序均为motif1、motif2及motif3, 这充分说明了藜麦的*ABP1*中的保守基序的强保守性。通过对甜菜、拟南芥、水稻、小麦和高粱的保守基序分析得到其保守基序也为3个从而可以推断藜麦跟甜菜等作物的*ABP1*保守基序可能有着一定的关系。对藜麦的*ABP1*蛋白序列进行多系列比对, 则发现3个相似性比较大的序列区域。

通过对藜麦、甜菜、拟南芥、水稻、小麦和高粱的*ABP1*构建的进化树, 推测藜麦与甜菜的亲缘关系较为密切, 这与藜麦与甜菜同属藜科相一致, 从而可以推测藜麦与甜菜*ABP1*的功能可能会有着相似的功能; 并且进化树中的双子叶植物与单子叶植物不能聚集在同一分支下, 推测*ABP1*基因在进化过程中出现单双子叶的分化情况。

通过对藜麦*ABP1*基因顺式启动子元件进行分析, 发现含有的顺式作用调控元件有参与光响应中涉及的调节元件包括G-box元件、GATA-motif元件、MRE元件、LAMP-element元件、Box 4元件等, 参与脱落酸反应的ABRE元件和其他参与植物抗逆性、抗病相关的MBS元件、LTR元件, 以及植物中普遍存在的顺式作用元件, 包括CAAT-box元件、TATA-box元件。藜麦*ABP1*的基因启动子元件中除了植物普遍含有的CAAT-box元件和TATA-box元件外, 与光反应相关的元件类型与数量最多, 推测*ABP1*蛋白与植物光反应的功能有关。

*CqABP1.17g*基因在藜麦花中高水平表达, 而*CqABP1.7g*在籽粒发育过程高水平表达, 且在籽粒发育的早期*CqABP1.7g*的表达水平明显比*CqABP1.17g*高, 推测*CqABP1.7g*在藜麦籽粒的发育过程中起作用, 增强生长素结合蛋白的形成, 促进籽粒细胞分裂。

对4个藜麦品种*CqABP1s*的DNA变异进行分析, 发现*CqABP1.7g*较*CqABP1.17g*有更多INDEL变异, 注释为内含子和下游效应, 而SNP变异在编码区发生较少(数据未显示)。通过分析更多品种的变异和性状表现, 可能找到其参与性状, 开发分

表5 STRING预测CqABP1.17g互作功能蛋白
Table 5 STRING predicted functional partners of CqABP1.17g

基因	注解	得分
XP_021738496.1	CCG结合蛋白1 (CCG-binding protein 1)	0.470
XP_021751302.1	生长素外排载体2 (auxin efflux carrier component 2-like)	0.426
XP_021714826.1	鸟嘌呤核苷酸交换因子SPIKE1 (guanine nucleotide exchange factor SPIKE 1)	0.426
XP_021764668.1	组成型活性ROPs 4的相互作用者(interactor of constitutive active ROPs 4)	0.426
XP_021772346.1	生长素外排载体5 (auxin efflux carrier component 5-like)	0.426
XP_021734382.1	含CRIB结构域的RIC4-like蛋白(CRIB domain-containing protein RIC4-like)	0.420

子标记用于标记指示辅助选择。

STRING预测CqABP1.17g互作功能蛋白有生长素外排载体组分2、5、鸟苷置换因子SPIKE、组成型活性ROPs 4的相互作用子、CCG结合蛋白1、含CRIB域蛋白等,多数与生长素的运输、调控基因表达等相关,与启动子元件分析呼应,也与发表文献结果一致(Friml等2022; Napier 2021; Ang和Østergaard 2023; Gelová等2021; Paponov等2019)。

目前对藜麦ABP1蛋白的研究还较为贫乏,本研究对藜麦ABP1蛋白进行了初步的分析,并对藜麦ABP1的启动子顺式作用元件等方面进行了初步的研究,从而为以后更加深入研究藜麦的其他蛋白提供了一定的参考。

参考文献(References)

Ang ACH, Østergaard L (2023). Save your TIRs – more to auxin than meets the eye. *New Phytol*, 238 (3): 971–976

Baully JM, Sealy IM, Macdonald H, et al (2000). Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin. *Plant Physiol*, 124: 1229–1238

Casanova-Sáez R, Mateo-Bonmatí E, Ljung K (2021). Auxin metabolism in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 13 (3): a039867

Friml J, Gallei M, Gelová Z, et al (2022). ABP1-TMK auxin perception for global phosphorylation and auxin canalization. *Nature*, 609 (7927): 575–581

Gelová Z, Gallei M, Pernisová M, et al (2021). Developmental roles of auxin binding protein 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 303: 110750

Hu B, Jin J, Guo AY, et al (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31 (8): 1296–1297

Jarvis DE, Ho YS, Lightfoot DJ, et al (2017). The genome of

Chenopodium quinoa. *Nature*, 542 (7641): 307–312

Jiang XD, Li XF, Hao YP, et al (2018). Gene cloning and express of squalene synthase and β -amyrin synthase from *Chenopodium quinoa*. *Soils*, 50 (6): 1214–1221 (in Chinese with English abstract) [姜晓东, 李新风, 郝艳平等 (2018). 藜麦 β -香树酯醇合酶和鲨烯合酶基因的克隆与表达. *土壤*, 50 (6): 1214–1221]

Joo JH, Yoo HJ, Hwang I, et al (2005). Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett*, 579 (5): 1243–1248

Kong XP, Zhang MY, Ding ZJ (2023). There is a way out-new breakthroughs in extracellular auxin sensing. *Chin Bull Bot*, 58 (6): 861–865 (in Chinese with English abstract) [孔祥培, 张蒙悦, 丁兆军(2023). 柳暗花明: 胞外生长素信号感受的新突破. *植物学报*, 58 (6): 861–865]

Li YY (2011). Cloning of the root-specific expression genes in rice (*Oryza sativa* L.) and analysis of their promoters (dissertation). Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [李援亚(2011). 水稻根特异表达基因的克隆及启动子元件分析(学位论文). 杭州: 浙江大学]

Liu CM, Xu ZH, Chua NH, et al (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell*, 5: 621–630

Löbner M, Klämbt D (1985). Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.). II. Localization of a putative auxin receptor. *J Biol Chem*, 260 (17): 9854–9859

Napier R (2021). The story of auxin-binding protein 1 (ABP1). *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 13 (12): a039909

Normanly J, Cohen ID, Fink GR (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 10355–10359

Paponov IA, Dindas J, Król E, et al (2019). Auxin-induced plasma membrane depolarization is regulated by auxin transport and not by AUXIN BINDING PROTEIN1.

- Front Plant Sci, 9: 1953
- Qian GT, Li XY, Zhou JW, et al (2021). Metabonomic analysis of amino acids and derivatives in three types of quinoa grains with different colors. *Plant Physiol J*, 57 (11): 2192–2202 (in Chinese with English abstract) [钱广涛, 李祥羽, 周静雯等(2021). 三种不同颜色藜麦籽粒中氨基酸及其衍生物的代谢组学分析. *植物生理学报*, 57 (11): 2192–2202]
- Steffens B, Feckler C, Palme K, et al (2001). The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABP1. *Plant J*, 27 (6): 591–599
- Woodward AW, Bartel B (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot*, 95 (5): 707–735
- Wu YM, Fan WZ, Li HY, et al (2020). Identification and expression of protein kinase gene family related to drought resistance in *Setaria italica*. *J Shanxi Agric Univ (Nat Sci Ed)*, 40 (1): 1–10 (in Chinese with English abstract) [武懿茂, 樊武哲, 李红英等(2020). 谷子抗旱相关蛋白激酶基因家族鉴定及表达分析. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 40 (1): 1–10]
- Yasui Y, Hirakawa H, Oikawa T, et al (2016). Draft genome sequence of an inbred line of *Chenopodium quinoa*, an allotetraploid crop with great environmental adaptability and outstanding nutritional properties. *DNA Res*, 23 (6): 535–546
- Yu Y, Tang W, Lin W, et al (2023). ABLs and TMKs are co-receptors for extracellular auxin. *Cell*, 186 (25): 5457–5471
- Zhang DL, Wu XL, Tian XQ, et al (2021). Identification and expression of *CqKEA* gene family in *Chenopodium quinoa*. *J Yantai Univ (Nat Sci Eng Ed)*, 34 (4): 400–405 (in Chinese with English abstract) [张东亮, 吴筱林, 田晓芹等(2021). 藜麦*CqKEA*基因家族的鉴定及表达. *烟台大学学报(自然科学与工程版)*, 34 (4): 400–405]
- Zhao SS, Guo ZQ, Zhu LX, et al (2023). Identification, expression and DNA variation analysis of high affinity nitrate transporter *NRT2/3* gene family in *Sorghum bicolor*. *Chin J Biotechnol*, 39 (7): 2743–2761 (in Chinese with English abstract) [赵珊珊, 郭志强, 朱立勋等(2023). 高粱高亲和硝酸盐转运蛋白*NRT2/3*基因家族鉴定、表达与DNA变异分析. *生物工程学报*, 39 (7): 2743–2761]
- Zhao Y, Weng QY, Ma HL, et al (2016). Genome-wide identification and bioinformatics analysis of ARF gene family in foxtail millet *Setaria italica*. *J Plant Genet Resour*, 17 (3): 547–554 (in Chinese with English abstract) [赵艳, 瓮巧云, 马海莲等(2016). 谷子ARF基因家族的鉴定与生物信息学分析. *植物遗传资源学报*, 17 (3): 547–554]