

龙眼 *DIKU1* 基因的克隆与功能分析姜帆¹, 田真真², 陈雪玮², 郑少泉¹, 陈亮^{2*}

(1. 福建省农业科学院果树研究所, 福建 福州 350003;

2. 厦门大学 生命科学学院, 厦门市植物遗传重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *IKU1* 基因突变可以产生较小的种子. 根据植物 *IKU1* 同源基因的高度保守性, 设计引物, PCR 扩增获得龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 同源基因 *DIKU1* 的编码序列, 其编码的蛋白含有 VQ 保守基序, 与其他物种中同源蛋白的氨基酸序列存在较高的同源性; 由于龙眼遗传转化的限制, 构建 *DIKU1* 基因的超量表达载体并转化拟南芥 *iku1* 突变体, 统计转基因植株子代种子的长宽变化, 结果表明: 龙眼 *DIKU1* 基因的超量表达可以显著增加拟南芥种子的大小, 说明龙眼 *DIKU1* 基因可以影响种子发育. 上述结果为研究龙眼种子发育机理提供了理论和实验依据, 有助于龙眼产业的发展.

关键词: 龙眼; *DIKU1* 基因; 克隆; 生物信息学分析

中图分类号: Q 356. 1

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2016) 05-0679-07

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.) 又称桂圆, 是我国亚热带名贵果树, 广泛分布于福建、广东、广西等省, 其果实经济价值高, 富含多种维生素、果糖和矿物质等对人体有益的营养成分, 且有一定的药用保健功效^[1-3]. 近年来, 随着龙眼相关产业的逐步发展, 人们对其果实品质的要求也越来越高, 其中味甜、核小等特征已经成为筛选龙眼新品种的标准^[4]. 培育小核优良品种一直倍受重视. 随着龙眼焦核(成熟时种子皱缩焦小的现象) 研究的深入, 目前已发现多个优良的龙眼单株, 它们均具有焦核的性状, 但多数生产性状不够稳定, 难以推广, 严重影响龙眼焦核的选育进程^[5]. 因此, 对于龙眼种子发育等方面的研究有助于阐明其发育过程中存在的规律、改善龙眼品质等, 为最终实现调控龙眼种子发育过程奠定基础.

VQ 蛋白是一类植物特有的蛋白, 其序列中含有保守的 VQ 基序^[6]. Garcia 等^[7] 已经报道了 2 个拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 突变体 *iku1* 和 *iku2*, 突变体中过早的细胞化引起胚乳发育缺陷, 间接抑制了胚的增殖和珠被细胞的伸长, 产生较小的种子. 此外, Luo

等^[8] 的研究进一步证明了 *IKU1* 基因突变能够产生较小的种子, 且发现该基因没有内含子, 其编码的蛋白含有 1 个保守的 VQ 基序, 在多种组织中均能检测到该基因的表达, 但其主要是在胚乳中发挥作用. 本研究根据模式生物拟南芥种子发育相关基因的分析, 挑选拟南芥 *IKU1* 基因作为参照, 通过设计保守区引物开展龙眼中 *IKU1* 同源基因 *DIKU1* 的克隆工作; 进而构建超量表达载体, 通过拟南芥的遗传转化研究克隆的 *DIKU1* 基因的生物学功能.

1 材料与方法

1.1 材料

生物材料: 龙眼由福建省农业科学院果树研究所提供; 拟南芥生态型 *Landsberg erecta* (*Ler*) 由本实验室保存, 拟南芥 *iku1* 突变体材料由澳大利亚联邦科工组织植物研究所罗明教授课题组惠赠; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101 均由本实验室保存.

收稿日期: 2016-04-06 录用日期: 2016-06-17

基金项目: 农业科研杰出人才及其创新团队项目(20120911); 国家产业技术体系项目(CARS-33-05); 福建省自然科学基金(2014J01100)

* 通信作者: chenlg@xmu.edu.cn

引文格式: 姜帆, 田真真, 陈雪玮, 等. 龙眼 *DIKU1* 基因的克隆与功能分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2016, 55(5): 679-685.

Citation: JIANG F, TIAN Z Z, CHEN X W, et al. Cloning and functional analysis of *DIKU1* gene in *Dimocarpus longan* Lour. [J]. Journal of Xiamen University(Natural Science), 2016, 55(5): 679-685. (in Chinese)



<http://jxmu.xmu.edu.cn>

主要试剂: Gateway[®] 供体载体 pDONR207 和目标载体 pK7WG2 均由本实验室保存; pMD-19T 克隆载体、T4 DNA 连接酶、PrimeStar 高保真 DNA 聚合酶、Ex Taq DNA 聚合酶、连接试剂 Solution I 均购自大连宝生物有限公司; HS[™] Mix、DNA 分子质量标记 DL5000、质粒提取试剂盒购自广州东盛生物科技有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒 (AxyPrep AP-GX-50) 购自 Axygen 公司; 植物 RNA 提取试剂盒 (E.Z.N.A[™] plant RNA kit) 购自 Omega 公司; 反转录试剂盒 (M-MLV first strand kit)、Gateway[®] BP 重组克隆酶 BP Clonase[™] II Enzyme mix、LR 重组克隆酶 LR Clonase[™] II Enzyme mix 均购自 Invitrogen 公司; 氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kan)、利福平、庆大霉素等抗生素购自上海生工生物工程股份有限公司, 壮观霉素购自 Sigma 公司。

主要仪器: DSH-系列超净工作台(上海淀山湖净化设备厂), W7022J 型微波炉(顺德美的微波炉制造有限公司), GI54DS 型高压灭菌器(厦门致微仪器有限公司), PYX-400G-C 型光照培养箱(广东韶关科力实验仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 龙眼叶片基因组 DNA (gDNA) 的提取及质量检测

gDNA 提取: 由于龙眼组织中含有单宁、多酚等多种代谢产物, 其 gDNA 的提取具有一定的困难。有研究指出改良 3×十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法能有效防止多酚类物质的氧化, 去除细胞中的多酚、多糖等次生代谢物质的影响, 最终得到呈无色透明状的 DNA 溶液^[9]。本实验采用改良 3×CTAB 法提取龙眼 gDNA, 具体步骤参照文献 [9]。

质量检测: 选取龙眼内参基因 *Actin* (GenBank 登陆号为 EU340557.1)^[10], 用 Primer5 软件设计引物 *DlActin-F* (5'-ATCCAGGCTGTTCTCTCCCTTTATG-3') 和 *DlActin-R* (5'-GAGAAACAAAGGTACATCAAAGC-AA-3') 进行 PCR 扩增。

1.2.2 龙眼叶片总 RNA 的提取和反转录

参照 Omega 公司的 E.Z.N.A[™] 植物 RNA 提取试剂盒说明书, 提取龙眼叶片总 RNA; 利用 M-MLV 反转录酶, 根据 Invitrogen 公司的 M-MLV 反转录试剂盒说明书, 合成 cDNA 第一链。

1.2.3 *DIUK1* 基因保守区第 1 次克隆

Lai 等^[11] 在龙眼胚性愈伤组织转录组测序分析的研究中发现一个编码蛋白序列含有 VQ 基序的基因。根

据此序列设计特异引物 *DIUK1-F1* (5'-CGGAGGTGGT-CTAATCTTCTGCAA-3') 和 *DIUK1-R1* (5'-CAGCAACC-TCAGCCTCAAGTTTACA-3'), 扩增 *DIUK1* 基因保守区。

PCR 反应体系: 5×PrimeStar buffer (含 Mg²⁺) 2 μL, 正向引物 1 μL, 反向引物 1 μL, dNTP mixture (10 mmol/L) 0.8 μL, gDNA 模板 1 μL, PrimeStar 高保真 DNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.1 μL, ddH₂O 4.1 μL。反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 50~60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

扩增结束后, 取 5 μL 产物, 1% (质量分数, 下同) 琼脂糖凝胶电泳检测。根据电泳检测结果, 将 PCR 反应体系扩大 5 或 10 倍进行扩增, 全部扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下切割含有目的片段的凝胶, 使用 Axygen 公司的 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段; 取适量经过纯化的终产物加 A-tail 后, 与 pMD-19T 载体在 T4 DNA 连接酶催化下 16 °C 连接过夜。连接产物分别转化 DH5α 感受态细胞, 在含 Amp 终质量浓度为 100 μg/mL 的新鲜固体 LB 平板上进行筛选培养。

37 °C 培养过夜, 挑取平板上生长的单菌落, 放入无菌的含 3 μL ddH₂O 的 PCR 管中, 混匀后吸取 1 μL 菌液作为 PCR 鉴定的模板, 另外 2 μL 转入含 100 μg/mL Amp 的 500 μL LB 液体培养基中, 37 °C、190~200 r/min 培养过夜; 将经电泳检测验证与目标片段大小一致的菌液, 提取质粒送深圳华大基因科技有限公司进行测序。

1.2.4 *DIUK1* 基因保守区第 2 次克隆

根据拟南芥中已克隆的 *IKU1* 基因 (*AT2G35230*) 的核酸序列和蛋白序列, 在 NCBI 网站进行 BLAST 比对 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 选取 5 个参考物种 (蓖麻 (*Ricinus communis*)、克莱门柚 (*Citrus clementina*)、脐橙 (*Citrus sinensis*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)) 序列以及龙眼中第 1 次保守区克隆获得的序列, 用软件 Vector NTI 11.5 进行多重序列比对, 设计引物 *DIUK1-F3* (5'-GATGATT-TGATTGTGGGAGTGTT-3') 和 *DIUK1-R3* (5'-ATAGACATGGGAAAAGTAGACTACAAACT-3') 进行 PCR 扩增。

PCR 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 50~60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应体系、目的产物的回收与纯化、与 pMD-19T 连接、转化 DH5α 感受态细胞以及重组子质粒提取等步骤参见 1.2.3。

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

以龙眼 cDNA 第一链产物为模板,选择 *DIUKU1*-F3 和 *DIUKU1*-R3 引物进行 PCR 扩增,反应体系和程序同上,回收 PCR 产物,连接 pMD-19T 转化 DH5 α 感受态细胞,将鉴定正确的重组质粒送样测序。

1.2.5 生物信息学分析

对于已经获得的龙眼 *DIUKU1* 基因序列进行生物信息学分析:

1) 通过 DNAMAN 6.0 软件比对目的基因的 gDNA 扩增产物和 cDNA 扩增产物,分析已知保守序列是否有内含子;

2) 使用 Vector NTI 11.5 软件预测 *DIUKU1* 基因的开放阅读框(ORF),并分析其编码蛋白质的序列;

3) 在 InterProScan 网站(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>)进行保守结构域预测分析;

4) 利用 DNAMAN 6.0 软件对 *DIUKU1* 基因和参考物种的同源基因进行相似性分析。

1.2.6 超量表达载体的构建

设计引物 *DIUKU1*-ORF-F (5'-ATGGATG-GCTCGAAAAACCGTCAT-3') 和 *DIUKU1*-ORF-R (5'-CTATTGATCCCTCCATCTTGGACT-3') 扩增 *DIUKU1* 基因的 ORF 区,与 pMD-19T 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞后,挑取单菌落进行 PCR 验证,鉴定正确的菌落扩大培养提取质粒并送样测序。测序正确的质粒命名为 pMD19T-*DIUKU1*。根据龙眼 *DIUKU1* 基因的 ORF 区序列,设计含 attB 接头的引物 *DIUKU1*-OE-F (5'-CA-AAAAAGCAGGCTATGGATGGCTCGAAAAACCGTC-ATA-3') 和 *DIUKU1*-OE-R (5'-CAAGAAAGCTGGGTC-TATTGATCCCTCCATCTTGGACTT-3'); 以 pMD19T-*DIUKU1* 质粒为模板扩增目的片段,回收 PCR 产物,通过 BP 重组反应构建到供体载体 pDONR207 上,转化 DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定,获得的阳性克隆测序正确后与目标载体 pK7WG2 进行 LR 重组反应,构建得超量表达质粒 pK7WG2-*DIUKU1*; 将构建成功的质粒转化 GV3101 感受态细胞,28 °C 暗培养 2 d,待单克隆长出后挑取单菌落进行 PCR 鉴定获得阳性克隆。取阳性克隆菌液保菌,-80 °C 保存备用。

1.2.7 根癌农杆菌介导的拟南芥遗传转化

拟南芥的培养、GV3101 感受态细胞的制备、超量表达质粒(pK7WG2-*DIUKU1*)转化 GV3101 感受态细胞、根癌农杆菌侵染液的制备和侵染步骤参照文献[12]。转化受体材料为 *Ler* 野生型植株和 *iku1* 突变体植株,侵染后的植株用透明罩盖住 24 h 后移去,继续按照土培条件

培养;一周后,制备根癌农杆菌侵染液再侵染一次;侵染后植株继续按土培条件培养拟南芥直至结出果荚,收获成熟的种子,37 °C 烘箱中放置约一周烘干,之后将种子(T_1 代)存于含干燥剂的容器内备用。

1.2.8 转基因植株鉴定与种子长宽测量

DIUKU1 基因是从龙眼中克隆的基因,因此通过扩增 *DIUKU1* 基因来鉴定阳性拟南芥转基因植株。以转基因植株的 gDNA 为模板进行 PCR 鉴定,以野生型植株的 gDNA 为阴性对照。

取 200 粒拟南芥 T_3 代种子,惠普扫描仪扫描后用 Scion Image 软件测量种子的长、宽,每组测量 50 粒种子,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 龙眼 gDNA 提取及质量检测

3 \times CTAB 法提取龙眼 gDNA,提取到的 gDNA 无明显降解现象,条带清晰;电泳结果显示:以 gDNA 扩增内参基因 *Actin* 时,能够获得单一的条带,说明改良 3 \times CTAB 法提取的 gDNA 质量较好(图 1)。

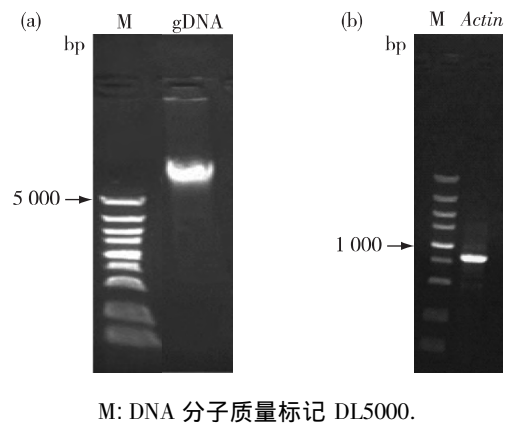


图 1 龙眼叶片基因组 gDNA(a) 和内参基因 *Actin* 扩增产物(b) 电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of gDNA of longan leaf (a) and the PCR product of control gene *Actin* (b)

2.2 *DIUKU1* 保守区第 1 次克隆分析

以 gDNA 为模板,用 *DIUKU1* 保守区的引物进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳检测,割胶纯化目的片段,与 pMD19-T 载体进行 TA 克隆,转化 DH5 α 感受态细胞,获得的阳性克隆提取质粒送样测序,结果如图 2 所示。

测序结果表明,第 1 次保守区克隆获得的片段大小为 159 bp,与转录组测序结果^[11]完全相同,且以

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

```

1   CGGAGGTGGT CTAATCTTCT GCAACCGTAG ACTTTGAGGT
41  TTCGGTGGAT TTTGGGGAGG TCTAGGCAGA GGCTCTTGTC
81  AAGGTGAACC AGTGAGCTGC TGCACAATGT TCCTAAAATC
121 GTTCTTGCTT ATGTTGTAAA CTTGAGGCTG AGGTTGCTG
    
```

图2 *DIKU1* 保守区第1次扩增测序结果
Fig. 2 First amplification of *DIKU1* conserved region

gDNA 和 cDNA 为模板均能够成功扩增到目的条带,说明该序列是龙眼 *DIKU1* 基因的部分序列.

2.3 *DIKU1* 保守区第2次克隆分析

根据5个参考物种核酸序列比对结果设计反向简并引物,并根据第1次保守区克隆结果设计正向引物进行PCR扩增.切胶回收纯化目的片段,经连接、转化、菌落PCR鉴定等步骤,获得阳性克隆.提取重组质粒,对质粒进行测序,结果如图3所示.结果表明龙眼基因 *DIKU1* 第2次保守区扩增得到的目的片段长度为1 108 bp.

2.4 *DIKU1* 基因及蛋白的生物信息学分析

目的基因以 gDNA 和 cDNA 为模板扩增产物的测序结果通过 DNAMAN 6.0 软件分析,除存在个别碱基不同外,其他序列均相同,说明克隆的 *DIKU1* 基因片段不含内含子.

使用 DNAMAN 6.0 软件推测出 *DIKU1* 基因 ORF 共有 990 bp,编码 330 个氨基酸,等电点为 11.45 的蛋白质.将推导的氨基酸序列递交到 InterProScan5 网站进行蛋白结构预测,结果显示, *DIKU1* 与拟南芥 *IKU1* 一样,含有 VQ 基序.推测该基因可能与拟南芥 *IKU1* 基因具有相似的功能.

将 *DIKU1* 与 5 个参考物种中同源蛋白的氨基酸序列通过 DNAMAN 6.0 软件进行多序列比对(图4).结果显示: *DIKU1* 与脐橙、克莱门柚、毛果杨、蓖麻、葡萄中同源蛋白序列都含有相同的保守结构域.比对结果显示: *DIKU1* 与脐橙、克莱门柚、蓖麻、葡萄、毛果杨中同源蛋白的覆盖率分别为 99%、99%、89%、93%、99%;匹配率分别为 80%、80%、75%、68%、75%.

2.5 *DIKU1* 超量表达载体的拟南芥遗传转化

龙眼属于木本植物,其组织培养和植株再生比较困难,而且遗传转化的效率非常低^[3,11],因此将 *DIKU1* 基因导入拟南芥中进行功能的初步验证.

利用 Gateway 技术构建了超量表达质粒 pK7WG2-*DIKU1*(图5),将其转化 GV3101 感受态细

```

1   GTTTCTCGAA ATGGATGGCT CGAAAAACCG TCATAATAAT
41  GATCATTGGT GTGTGAATAA GATGGGGAAA AATATAAGGA
81  AGAGTCCGTT GCACCAACCT AATTTTGTCTG CTAATAATAA
121 TGCTAACAGG CAGCAACCTC AGCCTCAAGT TTACAACATA
161 AGCAAGAACG ATTTTAGGAA CATTGTGCAG CAGCTCACTG
201 GTTCACCTTC ACAAGAGCCT CTGCCTAGAC CTCCCCAAAA
241 TCCACCGAAA CCTCAAAGTC TACGGTTGCA GAAGATTAGA
281 CCACCTCCGT TAACACCCAT GAACCGACCT CTTGTACCTC
321 CTATGGTCCA GGCTCCAGCT CCTGCGCCAA TTCCCCCACC
361 CATTCCGTAC AATAATACCT TAGCTAGGCC TCCTCCTCCT
401 CCTCCTCAGT ATGGTCAAGC AATGCTGCAC TATGGACAAC
441 TACAACCTGT GGCACCCTGG GACTCGGCTT GGCCAAATAT
481 AGCTGAGTCT CCTATCTCAG CTTATATGCG TGACCTTCAA
521 AATGTTATTA CAGATCCTGG TCCAAGGGGA AACCATGTTT
561 CTCCTCATCC ACAAGCACGT GCACAACCTG AGCCACAGGT
601 TCCGGGGCAA ATCCCTCCTC ACCCACCATC ATCTGGTTTA
641 CTTCTAACC CACATATTCC TGCTTTTCCC TCTCTAGGG
681 TAAATGGTCC TGTCCCAATG ATGCCGAATC TCCCTTCCCC
721 ACGAATGAAT GGACCTGCAC TTTTACCCTC TCCAACTTCT
761 CAGTTCCTTT TGCACTCTCC TACCGGTTAC ATGAACCTGT
801 TGTCACCTAG ATCACCTTAC CCACTGCTTT CACCGGGCAT
841 GCAGTTTCTT CCACCGCTGA CACCCAATTT TGCATTTTCA
881 CCCATGGGGC AGTCTGGCAT TTTAGGTCCG GGTCCACATC
921 CACCGCCATC CCCTGGCTTT TTTCCATTAT CACCTTCAGC
961 GTTTTTCCTT ATCTCAAGTC CAAGATGGAG GGATCAATAG
1 001 GCATGAACAG TATGTTGTCT TCATGAGTTC ATAATTGATG
1 041 AGGAGCTGGT ACCTGCTTTA TGCTGACTCT ATCTCCTCAT
1 081 GGGAGCAACG TTTGTGAAAA TGTAATGT
    
```

图3 *DIKU1* 保守区第2次扩增测序结果
Fig. 3 Second amplification of *DIKU1* conserved regions

胞,PCR 鉴定得到阳性克隆;制备根癌农杆菌侵染液侵染拟南芥,获得超量表达转基因植株.分别提取转基因植株和野生型植株叶片 gDNA,以转基因植株 gDNA 为模板、野生型植株 gDNA 为阴性对照,扩增 *DIKU1* 基因片段,筛选阳性转基因植株.

2.6 *DIKU1* 基因对种子大小的影响

为了研究 *DIKU1* 基因是否能够影响种子发育,分别统计超量表达株系(OE,侵染转化 *Ler* 野生型植株后的株系)和回补株系(*iku1/DIKU1*,侵染转化 *iku1* 突变体后的株系) T_3 代种子的长宽.使用 Scion Image 软件测量种子的长、宽;使用 SPSS 软件进行差异统计

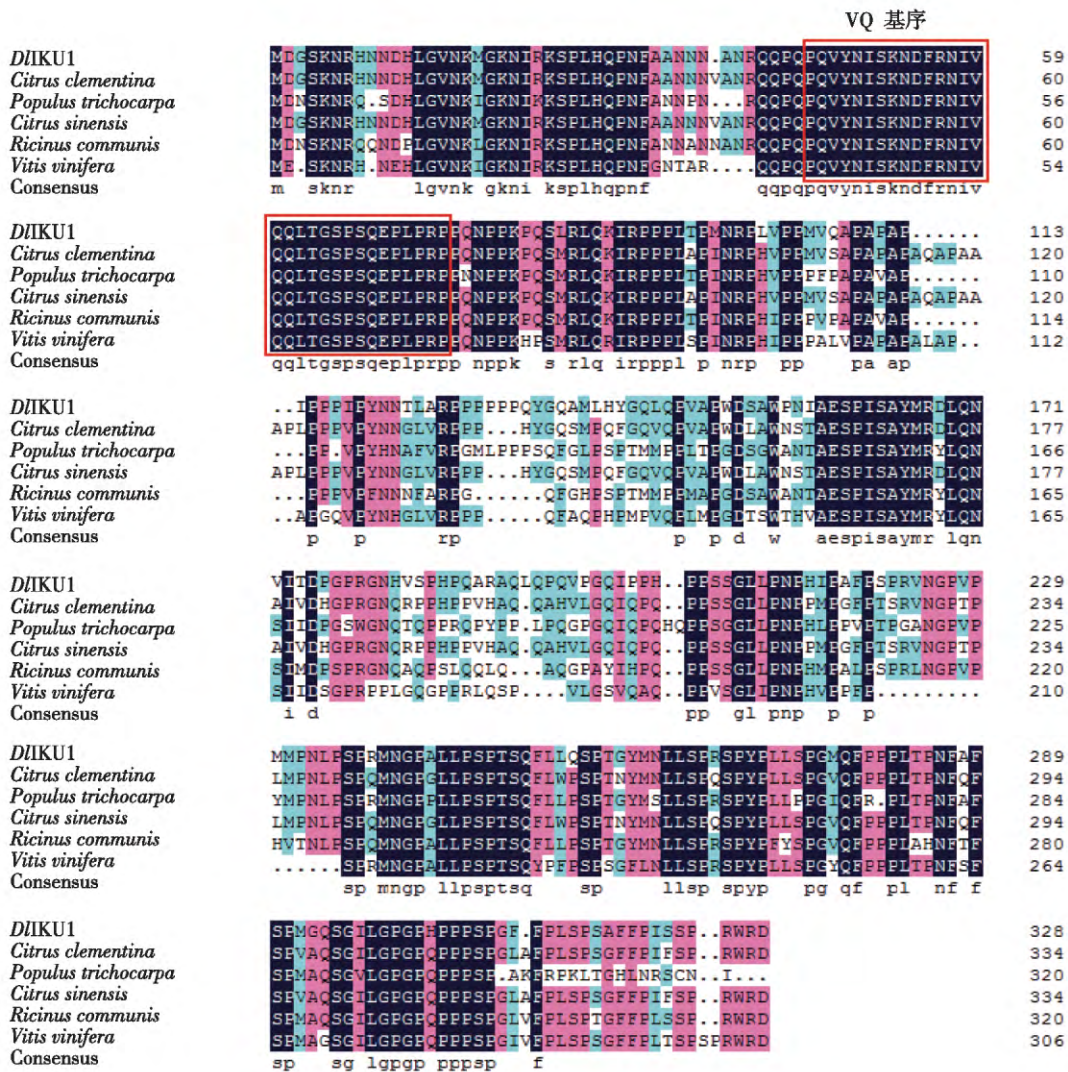


图 4 VQ 蛋白多序列比对
Fig. 4 Multiple sequence alignment of VQ proteins

分析.结果表明:当 *DIKU1* 超量表达的目的质粒转入野生型 *Ler* 植株时,超量表达株系的种子与野生型种子相比,长和宽均显著增大(图 6(a));与之类似,回补株系的 T_3 代种子与 *iku1* 突变体种子相比也有一定变大(图 6(b)).由此说明 *DIKU1* 基因在一定程度上能够影响种子发育.

3 讨论

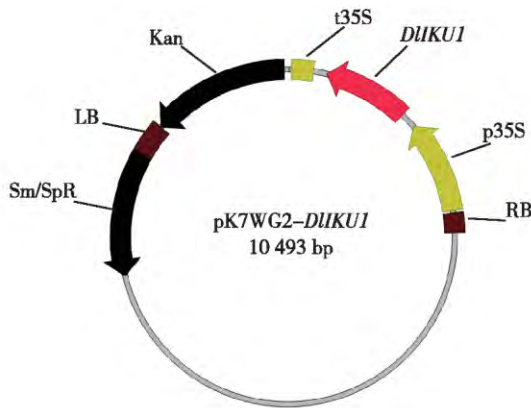
3.1 VQ 蛋白家族

近年来,VQ 蛋白已陆续在拟南芥、大豆、蓖麻、杨树、葡萄和水稻等植物中鉴定出来,在水稻中发现 39 个成员,拟南芥中发现 34 个成员,而在大豆中发现 74 个成员^[13-44].对于 VQ 蛋白家族成员的功能研究主要

集中在拟南芥中,而对于大豆、水稻中 VQ 家族成员的研究主要在一些关于逆境胁迫下基因的表达分析^[14].

拟南芥中大部分 VQ 基因没有内含子,一般编码的蛋白序列小于 300 个氨基酸.在拟南芥 VQ 蛋白家族的功能研究中,发现 *AtVQ29* 基因参与砷酸盐的抗性,表明 *AtVQ29* 可能在逆境防御反应中发挥重要作用^[15];同时 *AtVQ29* 表达受到光的影响,并参与植物的开花时间调控,证实 *AtVQ29* 可能是光形态建成中一个新的调节因子^[16].

此外,*IKU1*(*AtVQ14*)也是一个含 VQ 基序的蛋白,它能够与 WRKY10 转录因子存在相互作用.虽然 *IKU1* 基因在拟南芥的不同组织中都有表达,但它主要是在胚乳中发挥作用,*IKU1* 基因通过影响种子发育过程中胚乳的发育,使胚乳细胞化时间提前,*iku1* 突变



LB.T-DNA 左边界; RB.T-DNA 右边界;
Sm/spR.壮观霉素抗性基因; Kan.卡那霉素抗性基因;
p35S.35S 启动子; t35S.35S 终止子.

图5 pK7WG2-DIKU1 质粒结构

Fig. 5 Plasmid structure of pK7WG2-DIKU1

体产生较小的种子;进化树分析发现 *IKU1* 基因与拟南芥中另一个基因 (*AT1G32610*) 处在同一组中,二者蛋白序列存在很大的同源性,可能导致二者基因功能的冗余,掩盖了 *IKU1* 基因的其他功能^[8].

VQ 基因的功能缺失突变体或者超量表达转基因植株在种子大小、生物胁迫、抗病等方面发生一定的改变,说明 VQ 蛋白家族在植物生长、发育和环境胁迫等方面具有重要的作用.

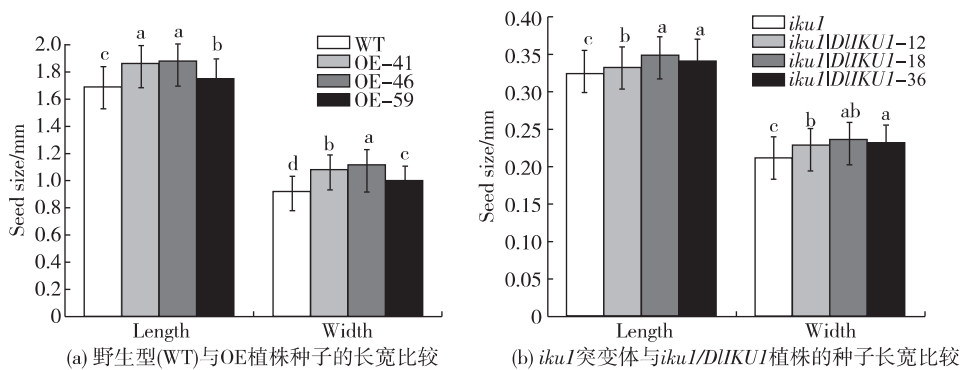
3.2 龙眼 *DIKU1* 基因功能

本研究根据拟南芥及其他物种的 *IKU1* 基因序列,克隆了龙眼 *DIKU1* 基因,并对其在种子发育中的功能进行了研究.目前得到的 *DIKU1* 基因 ORF 区为 990 bp,编码 330 个氨基酸的蛋白,与其他物种中 VQ 蛋白在氨基酸序列上存在高度同源性.由于龙眼遗传

转化效率较低,将 *DIKU1* 基因导入拟南芥野生型植株以及 *iku1* 突变体植株进行初步功能验证.通过统计超量表达株系和回补株系后代种子长宽变化,发现超量表达株系以及突变体回补株系后代种子的长和宽均有增加,表明 *DIKU1* 基因在一定程度上与种子发育相关.后续将进一步研究 *DIKU1* 影响种子发育的分子机制,以求为龙眼种子遗传改良奠定基础.

参考文献:

- [1] 肖更生,黄儒强,曾庆孝,等.龙眼核的营养成分[J].食品科技,2004(1):93-94.
- [2] 邓九生.我国龙眼果实品质性状与改良途径的探讨[J].广西热作科技,1995(1):7-11.
- [3] 赖钟雄,桑庆亮,陈春玲,等.龙眼的遗传学研究[J].福建农林大学学报(自然科学版),2000,29(4):416-420.
- [4] 古小玲,李玉萍,梁伟红,等.中国龙眼产业发展概况[J].中国农学通报,2008(9):470-4.
- [5] 杨永青,陈志峰.焦核龙眼果实遗传性状及胚培养的研究[J].园艺学报,1987(4):217-22.
- [6] XIE Y D, LI W, GUO D, et al. The Arabidopsis gene *SIGMA FACTOR BINDING PROTEIN 1* plays a role in the salicylate and jasmonate-mediated defence responses [J]. Plant Cell & Environment, 2010, 33(5): 828-839.
- [7] GARCIA D, SAINGERY V, CHAMBRIER P, et al. Arabidopsis *haiku* mutants reveal new controls of seed size by endosperm [J]. Plant Physiology, 2003, 131(4): 1661-1670.
- [8] LUO M, DENNIS E S, BERGER F, et al. *MINISEED3 (MINI3)*, a *WRKY* family gene and *HAIKU2 (IKU2)*, a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene are regulators of seed size in Arabidopsis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(48):



不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$).

图6 转基因植株种子的平均长宽变化

Fig. 6 Changes of average seed lengths and widths of the transgenic plants

- 17531-17536.
- [9] 肖璇, 孙敏, 王心燕, 等. 顽拗植物龙眼基因组 DNA 提取方法的研究 [J]. 生物技术, 2005, 15(1): 44-47.
- [10] 蔡英卿, 赖钟雄, 陈义挺. 龙眼 14-3-3 基因及其启动子的克隆以及在体胚发生过程中的表达分析 [J]. 热带作物学报, 2011, 32(5): 845-853.
- [11] LAI Z X A, LIN Y L. Analysis of the global transcriptome of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) embryogenic callus using Illumina paired-end sequencing [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 561.
- [12] 王晓娟. *AtST39* 和 *AtST39H* 在盐胁迫干旱胁迫中的功能研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2014: 29-31.
- [13] KIM D, KWON S, CHOI C, et al. Expression analysis of rice *VQ* genes in response to biotic and abiotic stresses [J]. Gene, 2013, 529(2): 208-214.
- [14] WANG X, ZHANG H, SUN G, et al. Identification of active *VQ* motif-containing genes and the expression patterns under low nitrogen treatment in soybean [J]. Gene, 2014, 543(2): 237-243.
- [15] 刘安娜, 腾瑶, 徐文忠, 等. 一个编码含 *VQ* 模序蛋白的基因 *AtARVQ1* 参与拟南芥对硫酸盐的响应调控 [J]. 科学通报, 2011, 56(23): 1891-1898.
- [16] 刘清, 唐蛟, 曾娟, 等. 拟南芥 *AtVQ29* 基因的克隆与植物表达载体构建 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(35): 6814-6817.

Cloning and Functional Analysis of *DIKU1* Gene in *Dimocarpus longan* Lour.

JIANG Fan¹, TIAN Zhenzhen², CHEN Xuewei², ZHENG Shaoquan¹, CHEN Liang^{2*}

(1. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China;

2. Xiamen Key Laboratory for Plant Genetics, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: *IKU1* gene mutation in *Arabidopsis thaliana* produced small seeds. The primers were designed according to the highly conservative sequence of *IKU1* homologous genes. The longan *DIKU1* gene was obtained via PCR amplification. The amplified sequences of Longan *DIKU1* 990 bp contained *VQ* motif and had high homology with the other species. Because of low efficiency of the longan genetic transformation, we constructed the overexpression vector of *DIKU1* gene for genetic transformation in *Arabidopsis*. Then we summarized changes in length and width of the progeny seed to study the function of *DIKU1* gene. The results showed that *DIKU1* gene might affect seed development to a certain extent. This study provided theoretical and experimental basis for the development of longan seed, and it will be helpful to the development of longan industry.

Key words: *Dimocarpus longan* Lour.; *DIKU1* gene; cloning; bioinformatic analysis