

文章编号: 1674-7054(2020)02-0190-10

荔枝‘妃子笑’AP2同源基因的克隆及表达

门佳丽^{1,2}, 李芳², 孙进华², 许云¹

(1. 海南大学 生命科学与药学院, 海口 570100; 2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海口 571101)

摘要: 根据笔者课题组荔枝基因组数据库, 从‘妃子笑’荔枝中克隆了1个AP2同源基因 *LcANT*, 其cDNA全长2 087 bp, 编码695个氨基酸, 含有2个保守的AP2/EREBP结构域。生物信息学分析结果表明, *LcANT*含有7个内含子, 亚细胞定位预测于细胞核, *LcANT*蛋白为疏水性蛋白, 二级结构多为无规则卷曲。通过BLAST比对发现, *LcANT*与许多植物的ANT转录因子具有高度同源性, 与开心果相似度最高, 高达82%。利用q-PCR, 对*LcANT*在‘妃子笑’荔枝中的表达模式进行了表征, 发现其在春梢、秋梢和花序中表达量较高, 暗示其可能参与调控花器官及其他植物营养器官的发育。*LcANT*基因的获得为后续研究其对荔枝营养器官生长发育的调控作用奠定了基础。

关键词: 荔枝; ANT转录因子; 表达分析

中图分类号: S 188.2; S 667.1; Q 786

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.02.009

AP2亚族在植物的生长发育过程中起着至关重要的作用。ANT是一类重要的植物转录因子, 与植物器官的发育过程密切相关, 属于AP2/EREBP转录因子超家族中花卉同源基因AP2亚族, 于1996年由Elliott等人从拟南芥中首次发现^[1]。有研究表明, ANT基因的突变会影响拟南芥花瓣的数量, 萼片的融合及花器官的位置和生长^[2]; ANT基因受到生长素信号的诱导影响花器官中营养物质的积累^[3]; ANT基因的缺失会导致植物叶片器官发育的矮小^[4]; ANT基因超表达会导致拟南芥各种营养器官, 如叶、茎、花梗、萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊、胚珠、果实等形态大小的增加^[5]; ANT基因突变会导致胚珠不正常发育以及雌配子消失^[6]; ANT基因促进了开花植物叶尖侧器官的生长及极性发育^[7]; ANT基因参与番茄花器官发育、果实初期颜色和果实大小的发育^[8], 参与葡萄的浆果大小^[9], 以及油菜、大白菜叶球的大小的发育^[10]。ANT家族在众多植物生长发育中的功能已经得到证实, 但在荔枝中的研究尚未见报道。荔枝(*Litchi chinensis* Soon.)为华南地区产量最大的热带果树之一, 在经济、文化和食用价值上都具有不可忽视的地位。在荔枝实际生产过程中常因雄、雌花周期相遇短造成授粉困难, 导致坐果不佳, 严重影响荔枝果实产量, 从而制约了荔枝产业的发展。‘妃子笑’荔枝为偏早熟品种, 以肉多、味美、品相佳, 产量好等优点在华南地区广泛种植, 因雄花比例大, 雌花比例小, 易受天气影响等问题导致产量不稳定, 有研究表明‘妃子笑’胚珠的发育与花型的形成密切相关^[11]。随着生物技术的发展, 转基因技术不断成熟, 已经成为改良作物的主要手段之一^[12], 挖掘荔枝开花, 营养器官发育相关基因, 将有助于利用分子育种手段改良荔枝开花及发育过程, 从而改良荔枝果实品质。本研究拟从筛选并克隆荔枝花器官相关基因ANT基因入手, 通过生物信息学分析手段初步了解荔枝ANT(*LcANT*)的生物学特征, 构建系统进化树, 分析起源分化, 进行组织特异性表达分析探究*LcANT*基因在‘妃子笑’荔枝中的表达模式, 从而有助于推测ANT类转录因子在‘妃子笑’荔枝发育过程的机理, 为调控‘妃子笑’荔枝品种开花结果提供分子水平上的理论基础。

收稿日期: 2020-02-13

修回日期: 2020-03-03

基金项目: 中国现代农业产业技术体系(CARS-32-03)

第一作者: 门佳丽(1996-), 女, 海南大学生命科学与药学院硕士研究生. E-mail: 18255038490@163.com

通信作者: 许云(1979-), 女, 副教授. 研究方向: 生化与分子生物学. E-mail: xuyun2000513@126.com

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料 ‘妃子笑’荔枝不同组织材料均采自海南省农业科学院热带果树研究所永发基地,包括一年生根、茎、春梢(12 月份采摘)、秋梢(9 月份采摘)、花序、花药、果皮、果肉、种子,共 9 个植物组织材料。采摘后清洗所有样品,立即在液氮中冷冻,−80 °C 保存。每个材料采集 3 份用于重复。

1.2 RNA 提取与 cDNA 合成 按照植物 RNA 快速提取试剂盒说明书(中国华越洋生物技术有限公司)分离植物总 RNA,用微量紫外分光光度计(NanoDrop 2000c,美国赛默飞)测量 RNA 浓度与质量, OD_{260} / OD_{280} 吸收比(1.9 ~ 2.0),并通过在 1.0% 琼脂糖凝胶中的电泳鉴定 RNA 的完整性。使用约 1 μg 总 RNA,1 μL Oligo(dT)引物和 1 μL 反向逆转录酶(200 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$,Takara,日本)在 20 μL 反应混合物中参照反转录试剂盒(宝生物工程有限公司,大连)说明,合成第一链 cDNA。

1.3 LcANT 基因的克隆 参照本课题组荔枝基因组数据库,通过 Primer 5.0 进行 cDNA 全长引物设计,上游引物为 5'-GCACCGAGAGATACTGCTAAGT-3',下游引物为 5'-CTGGCAAGTGTGACATGGAGAT-3',委托上海生工生物合成有限公司进行引物合成。以提取的‘妃子笑’cDNA 为模板,根据普通 PCR 试剂盒说明,进行 50 μL PCR 反应体系扩增全长,扩增体系如下:5 \times buffer 5 μL ,10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs 1 mL,上下游引物各 1 μL ,模板 5 ~ 100 ng,F8 高保真酶 1 μL ,无菌无酶水补足至 50 μL ;反应程序为:95 °C 预变性 10 min,95 °C 持续 30 s,60 °C 退火 2 min,72 °C 延伸 30 s,40 个循环,72 °C 维持 10 min,4 °C 保存。

通过在 1.0% 琼脂糖凝胶中的电泳鉴定 DNA 的完整性和准确性,并将单一条带电泳产物切胶回收、纯化后与 T 载体(PMD18-T)连接。T 载体的连接体系为:PMD18-T Vector 1 μL ,目的片段 1 μL ,dH₂O 3 μL ,Solution 5 μL ;16 °C 反应 30 min。T 载体的连接体系全量 10 μL 加入到已提前冰上融化的 100 μL 大肠杆菌感受态(DH5 α)中,继续冰上放置 30 min,42 °C 热激 45 s,再置于冰上 1 min,加入 890 μL LB 液体培养基,37 °C,180 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 60 min,将 100 μL 菌悬液涂布于含 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37 °C 倒置培养 12 h。挑取 3 ~ 4 个白色菌落加 1 mL LB 液体培养基于 25 °C、180 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下振荡培养 8 ~ 12 h,将菌液进行 PCR 扩增,PCR 体系为 20 μL 的混合液(1 μL 菌液,上下游引物各 1 μL ,10 μL 2 \times Master Mix,dH₂O 补足至 20 μL)。

1.4 LcANT 转录因子的生物信息学分析 通过 GSDS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) 进行内含子外显子分析;通过 NCBI 的 CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 数据库进行蛋白质保守结构域预测;通过 protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 进行蛋白质分子量和等电点预测;通过 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 进行蛋白质亲水疏水分析;通过 PSORT II (<https://www.genscript.com/psort.html>) 进行核定位信号的预测;通过 softberry (<http://linux1.softberry.com/all.htm>) 进行蛋白质亚细胞定位;通过 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 进行蛋白质二级结构的预测;通过 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 与其他植物进行 BLASTP 同源性比对;通过 MEGA7.0 软件构建系统发育树;通过 DNAMAN8 软件进行克隆基因的序列比对。

1.5 定量表达分析 通过 Primer 5.0 进行设计,上游引物为 5'-GCTTCTGCCTCCGTTGGTTCCAT-3',下游引物为 5'-TCTGCCTTGGAGCCGTGACACA-3',使用 SYBR Green 实时荧光定量试剂盒在 QuantStudio 6 Flex 荧光定量 PCR 仪(American)上进行实时定量 PCR(q-PCR)。该反应体系的体系和扩增参数如下:SYBR Green10 μL ,上下游引物各 0.4 μL ,模板 2 μL ,无菌无酶水 7.2 μL 。在 95 °C 预变性 10 min,然后在 95 °C 持续 30 s,55 °C 退火 30 s 和 72 °C 持续 30 s,40 个循环。肌动蛋白基因 *Actin* 作为内参基因^[13],上游引物 5'-TGCATGAGCGATCAAGTTTCAAG-3',下游引物 5'-TGTCCCATGTCTGGT TGATGACT-3'^[14],所有反应重复 3 次。*Ct* 值通过 QuantStudioTM 实时 PCR 软件以默认设置进行测量。

基因的相对表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算^[15]。Q-PCR 用于验证 Litc12A14880 在 9 种‘妃子笑’荔枝 9 种营养器官组织中的相对表达水平。

2 结果与分析

2.1 荔枝 *LcANT* 基因的克隆 根据课题组的前期转录组数据设计了扩增 cDNA 全长的引物 12AF 和 12AR, 进行荔枝 *LcANT* 基因的克隆, PCR 产物在 0.9% 的琼脂糖凝胶上进行 30 min 电泳, 在 2 000 bp 处观察到目的条带(图 1), 将目的条带进行切胶回收, 进行 TA 克隆, 将阳性克隆菌液送测序公司进行测序。该基因基因组全长 5 331 bp, cDNA 编码区全长为 2 087 bp, 与转录组数据进行序列比对(图 2), 发现测序结果在序列的 5'段 43 bp 左右, 和 3'端 45 bp 左右与转录组数据有所不同, 可能是因为基因序列较长, 测序结果误差导致, 此段序列以转录组数据结果为准, 此外, 测序结果中间段也与转录组数据有少许不同, 经过 3 次阳性菌落重复测序, 结果均一致, 推测序列中间段误差可能是由于转录组数据并不完全准确。目的序列与转录组匹配度高达 99.71%, 可认为成功克隆了荔枝 *LcANT* 基因。

2.2 荔枝 *LcANT* 基因的生物信息学分析 *LcANT* 基因具有 7 个内含子(图 3), 与拟南芥 ANT 类转录因子基因结构内含子个数相似, 表明 AP2 亚组在长远的历史进化中高度保守。该基因共编码 695 个氨基酸, 在 337~406 位置和 437~500 位置有 2 个保守的 AP2/ERE BP 结构域(图 4), 每个 AP2/ERE BP 保守结构域上都具有 11 个 DNA 结合位点, 这些位点作为 AP2/ERE BP 结构域的特征性结合位点, 与 GCC-box 顺式作用元件结合, 启动植物乙烯应答反应、参与植物应激反应调节及植物生长发育的调控等^[16], 此外, 在 362~395 位置还有 1 个包含 31 个氨基酸残基的核定位信号(NLS), 该序列为非典型核信号序列, 通过与核蛋白相互结合完成 *LcANT* 蛋白向细胞核内的转移^[17]。

2.3 荔枝 *LcANT* 蛋白的生物信息学分析 *LcANT* 蛋白相对分子量为 76.57 kDa, 等电点为 6.34, 亚细胞定位预测其定位于细胞核中。从亲水性分析预测结果来看, *LcANT* 蛋白质多肽链中包含亲水性氨基酸和疏水性氨基酸, 其中最大值为 1.71, 最小值为-3.09, 整体来看, 疏水性氨基酸明显多于亲水氨基酸, 且分值更大, 更具有疏水性, 因此 *LcANT* 蛋白质属于疏水性蛋白(图 5), 这更有助于结合其他蛋白发挥调控及运输功能作用。通过对 *LcANT* 蛋白进行二级结构预测, *LcANT* 蛋白质二级结构不同类型占比分别是: α -螺旋 23.02%, β -折叠 12.52%, β -转角 3.74%, 无规则卷曲 60.72%(图 6)。发现 *LcANT* 蛋白质二级结构不同于其他花发育基因蛋白, 例如参与花发育的 MADS-box 蛋白的二级结构主要由 60% 的 α -螺旋构成, 而 *LcANT* 蛋白的二级结构中的比例高达 60% 的结构类型是无规则卷曲, 而 α -螺旋的比例则明显低于大多数花发育相关基因^[18]。

2.4 荔枝 *LcANT* 的系统进化分析 *LcANT* 属于 AP2/ERE BP 转录因子家族的 AP2 亚族成员。根据 2018 年丁谦等人的 AP2 转录因子结构分类^[19], AP2 亚族可细分为 euAP2 亚组和 ANT 亚组, 可将

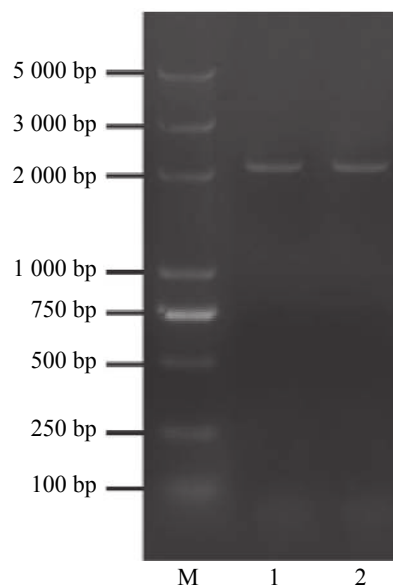


图 1 荔枝 *LcANT* 基因的克隆

泳道 M 为 5 000 bp 规格的 Marker, 泳道 1, 2 为 *LcANT* cDNA 片段 PCR 扩增的 2 次平行重复。

Fig. 1 Cloning of *LcANT* from Litchi

M: Marker 5 000 bp; Lanes 1, 2: Two parallel repetitions of PCR amplification of *LcANT* cDNA fragments.

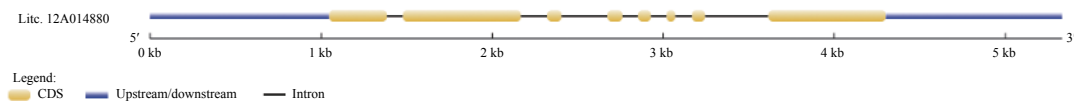


图3 *LcANT* 基因结构

黄色矩形框代表外显子, 黑色实线标示代表内含子, 蓝色矩形框代表上游下游非编码区, 基因长度以 kb 为单位。

Fig. 3 The structure of *LcANT* gene

The yellow area represents the exon, the black line represents the intron, and the blue area represents the UTRs. Gene length is shown in kb.

```

MKS MNDDSNGN NKNWLGFSLSPHMKMEVNSDPHHPHHHHHHQYHHQSQ 50
APSA AVSN AVPTSEFMSSHLNSTGICYGYGENGAFHSPTSYMPLKSDGSL 100
CIMEALTRSQPEGMVPSSSPKLEDFLGGATMETHHQQYGSHERLTMALSLD 150
SMYYIHIAFSETNRQHSLDLLQEQLRQQEQFPPTHTPSYVVGMPCHGMVQ 200
TPMLELTKDTSSLAHCDSQIPQMSDDAMPFLKNWVARHYSTTPHNALDQQ 250
MSSGMVDDGGGASASVGSINCGDLQSLSLMSSPGSSSCVTAPRQISPAQ 300
ADCVAMLTKKRGSVKVGGVKQPVIRKSIDTIGQRI SQY RGV LRURWLR 350
EAHLWDNSCKKEGQTRKGRQGGYDMFEKAAARAYDIAAIKYWGPSTHINFP 400
LLNYRLLLLEMKNMSRQYVAHLRRKSSGFSRGASM YRGVTRHIIQIQRW 450
ARIGRYAGNKDLYLGTFS TOEEAAEAYDIAAIKERGVNAVTFNEDITRYDV 500
ERIMASNTLLAGELARRNKETLASNEAIDYNPPTHTNTGETVQPESINNGN 550
GSDWKMVLYQTPEQQPNSSGIGSLDQKSMdTATATYRNAPISVALQDLIGI 600
DSANSSQPMYDISSSANKLEGGTHSNPSSLYTSLSSSREASPDKAGSMLE 650
ARPPLASKFISPTTGVGSWFPSAAQLRPAAISMSHLPVFAAWNDT 695
    
```

图4 *LcANT* 蛋白质保守结构域分析

虚线框表示 AP2/EREBP 保守结构域, 粗体表示 DNA 结合位点, 斜体区域表示核定位信号。

Fig. 4 Analysis of conserved domain of *LcANT* protein

The dotted box represents AP2/EREBP conserved domain, the bold font represents DNA-binding site and the italics represents nuclear localization signal.

LcANT 划分为 ANT 亚组。为了进一步确定 *LcANT* 的身份, 将 *LcANT* 蛋白序列与其他物种的 AP2、ERF、DREB、RAV 蛋白进行序列比对, 并通过 MEGA7.0 软件以 NJ 算法进行 1 000 次自举重复构建系统发育进化树(图 7)。结果显示, *LcANT* 蛋白与 AP2 家族蛋白聚集到 1 个分支, 于 ANT 亚组距离较近, 而与 AP2 其他亚组成员, 如 AIL、BBM 等距离较远, 与 ERF 亚族、DREB 亚族、RAV 亚族等距离更远。除此之外, 荔枝 *LcANT* 蛋白与木本植物开心果 *PvANT* 蛋白亲缘最近, 其次是榴莲 *DzANT*、可可 *TcANT* 及草本植物锦葵 *HuANT*。

为了弄清 *LcANT* 蛋白与众多植物 ANT 转录因子氨基酸序列的相似度, 从 NCBI 中选取了 8 个物种的共 10 个 ANT 蛋白(*ANT-Pistaciavera* (XP_03

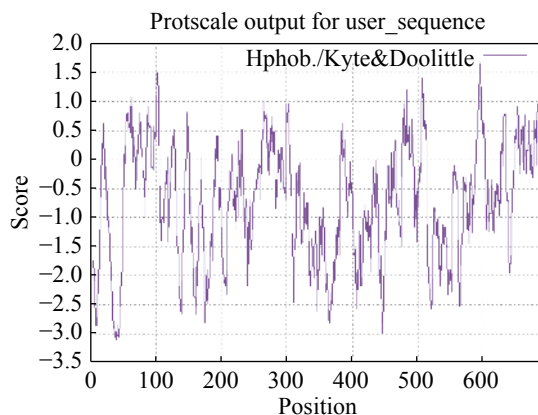


图5 *LcANT* 蛋白的亲水性分析

正值说明为亲水性残基, 负值为疏水性残基。

Fig. 5 Hydropathy analysis of *LcANT* protein

Positive score indicates hydrophilic amino acid residue, and negative score the hydrophobic amino acid residue.

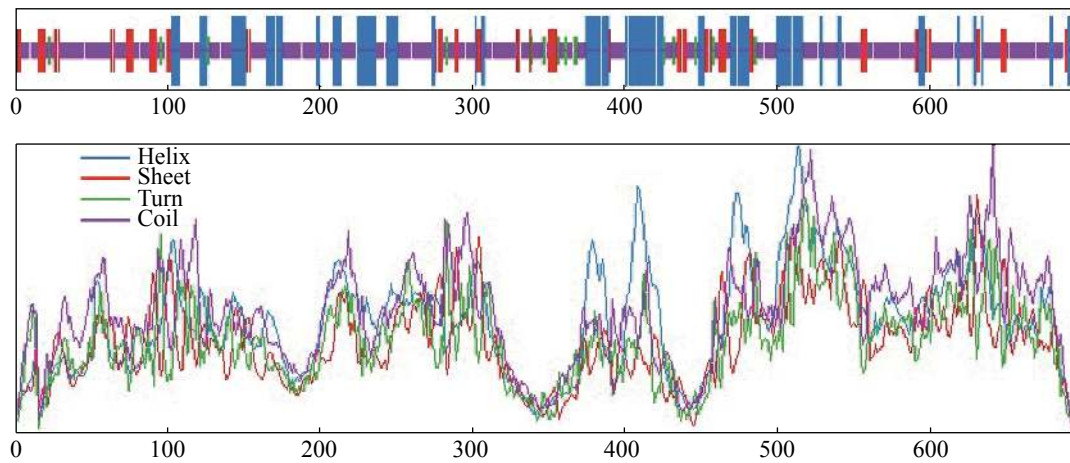


图 6 LcANT 蛋白的二级结构分析

蓝色区域表示 α -螺旋, 红色区域表示 β -折叠, 绿色区域表示 β -转角, 紫色区域表示无规则卷曲。

Fig. 6 Prediction of secondary structure of *LcANT* protein.

The color blue, red, green and purple represent alpha helix, beta-sheet, beta-turn and random coil, respectively.

1273069.1), ANT-*Herrania umbratica* (XP_021284854.1), ANT-*Theobromacacao* (XP_007018428.2), ANT-*Duriozibethinus* (XP_022766436.1), ANT-*Duriozibethinus* (XP_022772252.1), ANT-*Juglans regia* (XP_018810432.1), ANT-*Vitis vinifera* (RVX22674.1), ANT-*Vitis vinifera* (XP_002285467.2), ANT-*Ricinus communis* (XP_002510048.), ANT-*Quercus suber* (XP_023872648.1)) 进行氨基酸序列比对 (图 8), 结果显示, *LcANT* 蛋白与众多植物 ANT 转录因子的氨基酸序列具有高度相似性, 其中与开心果的同源性最高, 高达 82%, 与哥伦比亚锦葵同源性为 79%, 与可可、葡萄、榴莲、胡桃、欧洲栓皮栎、苜蓿的同源性分别为 79%, 78%, 77%, 76%, 76%, 75%, 并且在 2 个 AP2/ERE BP 保守结构域范围 337~406, 436~500 氨基酸残基位置也完全保守。由此说明, *LcANT* 蛋白为荔枝 AP2 亚族中的 ANT 亚组成员。

2.5 *LcANT* 表达分析 植物体不同器官和组织的生长发育过程受到多种基因的调控和协同作用, 荔枝花器官发育也不例外。以肌动球蛋白 Actin 为内参基因, 通过 q-PCR 分析 *LcANT* 基因在‘妃子笑’荔枝 9 个不同组织(根、茎、春梢、秋梢、花序、花药、果皮、果肉、种子)的相对表达量, 并绘制柱状图 (图 9A)。结果显示, *LcANT* 基因在大多数组织中都有不同程度的表达量, 其中在春梢、秋梢和花序中相对表达量较高; 而相对于叶片组织, 在春梢中相对表达量较秋梢更高; 相对于其他组织, 在花器官中的表达量较其他组织更高。以上结果与转录组数据趋势基本一致 (图 9B)。

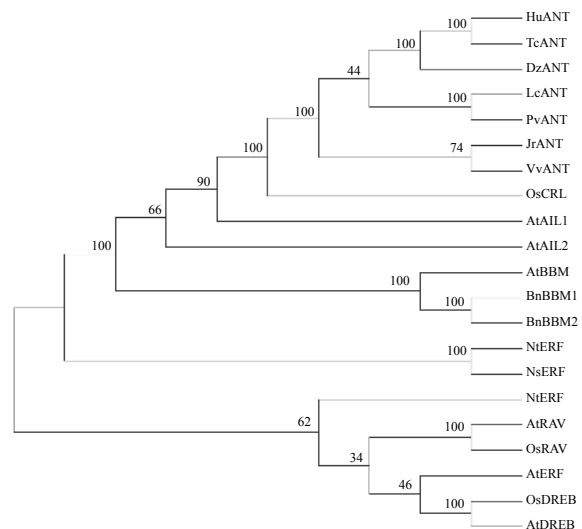


图 7 LcANT 与其他物种 ANT 蛋白的系统进化关系

Hu: 哥伦比亚锦葵; Tc: 可可; Dz: 榴莲; Pv: 开心果; Jr: 胡桃; Vv: 葡萄; Os: 水稻; At: 拟南芥; Bn: 甘蓝型油菜; Nt: 美花烟草; Ns: 红花烟草; Mt: 蒺藜苜蓿。

Fig. 7 Phylogenetic relationship of *LcANT* with *ANT* of other plant species

Hu: *Herrania umbratica*; Tc: *Theobroma cacao*; Dz: *Duriozibethinus*; Pv: *Pistacia vera*; Jr: *Juglans regia*; Vv: *Vitis vinifera*; Os: *Oryza sativa*; At: *Arabidopsis thaliana*; Bn: *Brassica napus*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Ns: *Nicotiana sylvestris*; Mt: *Medicago truncatula*.



图 8 1个蛋白的氨基酸序列对比

黑色区域表示 100% 的匹配,红色区域表示 75% 的匹配,蓝色区域表示 50% 的匹配。

Fig. 8 Multiple alignments between *LcANT* sequences and other ANT sequences

The black background denotes the conserved amino acid residues (100%); the red background denotes the conserved amino acid residues (>75%); the blue background denotes the conserved amino acid residues (>50%).

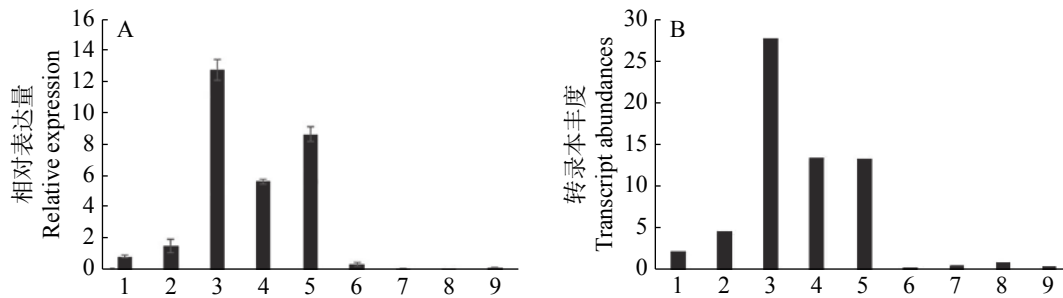


图 9 荔枝 *LcANT* 基因在不同器官组织中的相对表达量

1. 根; 2. 茎; 3. 春梢; 4. 秋梢; 5. 花序; 6. 花药; 7. 果皮; 8. 果肉; 9. 种子。

Fig. 9 Relative expression and transcript abundances of *LcANT* in different organs of litchi

1. Root; 2. Stem; 3. Leaves of spring shoot; 4. Leaves of autumn shoot; 5. Inflorescence; 6. Anther; 7. Pericarp; 8. Pulp; 9. Seed.

3 讨 论

AP2/EREBP 转录因子是植物中最大的转录因子家族之一, 迄今为止, 研究过的 AP2 亚家族的成员均在植物细胞增殖和分化方面起到重要作用^[20]。而 ANT 作为 AP2 亚组的分支之一, 参与植物生长发育的精确调控^[21], ANT 基因不仅在分生旺盛组织如腋芽中表达, 还在胚珠、子房、花等营养器官中表达, 甚至还在根中表达, 说明整个植物生命周期的发育都离不开 ANT 基因的参与。ANT 基因的参与方式为可通过与其他转录因子如 BBM, AIL 等相互协同促进响应生长激素的 LFY 上调表达, 从而提前植物开花时间^[22]; 有可能抑制生长素信号传导的阻遏物 ARF2 基因的表达, 从而延缓植物叶片衰老^[23]; 也有可能作用于靶标之一的 cyclinCYCD3 : 1 基因^[24], 调节植物细胞的分裂过程; 还有可能通过异位转录使 ARGOS(一种生长素诱导型编码跨膜蛋白的基因)表达增强, 从而控制植物器官的大小^[25]。

荔枝 *LcANT* 基因 cDNA 长 2 088 bp, 编码 695 个氨基酸, 包含 2 个由 60 ~ 70 个氨基酸残基构成的 AP2/EREBP 保守结构域, 这些结构域上的结构位点可特异性识别并结合 GCC-box 顺式元件, 精准调控植物对内外环境的响应。荔枝 *LcANT* 蛋白序列上包含 1 个非典型核定位信号并且预测该蛋白定位于细胞核中, 表明 *LcANT* 基因可能在细胞核中实现对下游基因转录水平的调控^[26], 且其编码蛋白属于疏水性蛋白, 蛋白侧链可能具有更多的疏水性残基, 而这些残基往往为蛋白质的活性位点, 可结合其他分子或基因, 促进 *LcANT* 作用的发挥。另外, *LcANT* 蛋白质二级结构中无规则卷曲构象类型比例较多, 卷曲的柔性构象可使肽链改变走向, 更利于与结构相对刚性的 α 螺旋和 β 折叠进行连接, 形成多样化的蛋白质三级空间结构, 揭示了该蛋白在植物体中可能发挥着多种功能作用^[27]。这与荔枝植物基因组中的大部分 ANT 基因结构和性质是类似的。通过系统发育分析可见, 荔枝 *LcANT* 蛋白与许多物种中的 AP2 亚家族成员亲缘距离较近, 与 AP2 亚族的 ANT 亚组基因都具有高度同源性, 表明由于蛋白质结构相似, ANT 转录因子可能在这些物种之间发挥相同或相似的作用, 说明这些物种可能源于同一祖先。此外, 这些不同物种间也存在差异性, 在植物繁衍过程中经过数百万年的进化, 为适应不同环境生存进化出特有的基因组, 这些基因通过外界信号刺激调控网络, 为运应不同生物及非生物的胁迫, 从而产生了功能的分化^[28]。春季长出的新梢称为春梢, 分裂期较旺盛, 营养物质较丰富, 夏季后长出的新梢称为秋梢, 由于夏季炎热, 生长受到抑制。q-PCR 结果表明, 在叶片组织中, *LcANT* 基因在荔枝春梢中丰度更高, 说明 *LcANT* 基因在植物组织细胞分裂生长的阶段发挥一定的作用, 可能是通过调控生长因子和细胞周期因子来促进细胞分化, 增加细胞数量和大小, 从而调控营养器官的生长和发育; 此外, *LcANT* 基因在花序中丰度较其他组织(根, 茎, 花药, 果肉, 果皮, 种子)高, 表明 ANT 家族在植物花发育中起关键作用。兰花^[29], 菊花^[26], 红掌^[30], 拟南芥^[31] 中的研究也有类似的现象, 例如在 ANT 基因可与 *MADS-box* 基因协同控制兰花的颜色, 拟南芥 ANT 和 AIL 转录因子可与 B 类转录因子并行作用于拟南芥花卉器官的萌发, 形状和性状的改变。花器官发育

的 ABC 模型决定了花发育的过程。荔枝 *LcANT* 究竟在荔枝花发育的哪个阶段起作用, 以及与 A, B, C 3 类基因如何发挥作用, 还有待进一步研究。

本研究成功克隆了荔枝 *LcANT* 基因, 分析了荔枝 *LcANT* 基因的结构及蛋白性质, 并确定了荔枝 *Litc12A14880* 基因参与调控荔枝花器官及幼嫩组织的生长发育, 后期将进一步确定基因功能, 为后续研究 *LcANT* 基因的具体功能及其他 ANT 亚组成员提供分子水平理论基础。

参考文献:

- [1] ELLIOTT R C, BETZNER A S, HUTTNER E, et al. AINTEGUMENTA, an APETALA2-like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(2): 155 – 168.
- [2] KRIZEK B A. AINTEGUMENTA-LIKE genes have partly overlapping functions with AINTEGUMENTA but make distinct contributions to *Arabidopsis thaliana* flower development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(15): 4537 – 4549.
- [3] YAMAGUCHI N, JEONG C W, NOLE-WILSON S, et al. AINTEGUMENTA and AINTEGUMENTA-LIKE6/ PLETHORA3 induce LEAFY expression in response to auxin to promote the onset of flower formation in Arabidopsis1 [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(1): 283 – 293.
- [4] MIZUKAMI Y, FISCHER R L. Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(2): 942 – 947.
- [5] DASH M, MALLADI A. The AINTEGUMENTA genes, MdANT1 and MdANT2, are associated with the regulation of cell production during fruit growth in apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 98.
- [6] KLUCHER K M, CHOW H, REISER L, et al. The AINTEGUMENTA gene of Arabidopsis required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene APETALA2 [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(2): 137 – 153.
- [7] NOLE-WILSON S, KRIZEK B A. AINTEGUMENTA contributes to organ polarity and regulates growth of lateral organs in combination with YABBY genes [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(3): 977 – 987.
- [8] 杨蔚然. 番茄 ANT 基因家族的鉴定及 SIAL1_2 基因的功能研究[D]. 重庆: 重庆大学 2014.
- [9] CHIALVA C, EICHLER E, GRISSI C, et al. Expression of grapevine AINTEGUMENTA-like genes is associated with variation in ovary and berry size [J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 91(1/2): 67 – 80.
- [10] 丁谦. 大白菜 *BrANT* 基因克隆及功能分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学 2015.
- [11] SINICA A H. The relationship between the ovule development and flowertypes of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) [J]. 1999, 26: 397 – 399.
- [12] 毕名亮, 王丹, 王钰婷. 观赏植物分子育种研究进展 [J]. *黑龙江科技信息*, 2017(4): 270 – 270.
- [13] KUMAR K, MUTHAMILARASAN M, PRASAD M. Reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.) subjected to abiotic stress conditions [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2013, 115(1): 13 – 22.
- [14] FERRADÁS Y, REY L, MARTÍNEZ Ó, et al. Identification and validation of reference genes for accurate normalization of real-time quantitative PCR data in kiwifruit [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 102: 27 – 36.
- [15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 – 408.
- [16] 刘昌, 关小雨, 林燕, 等. 甜瓜 CmERFV-4 基因 cDNA 克隆及特性分析 [J]. *分子植物育种*, 2018, 16(5): 1390 – 1395.
- [17] 陈琳琳. 小鼠 TET1 蛋白核定位信号的鉴定 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学 2016.
- [18] 郭蓓. 荷花成花相关基因 NnAP1 的克隆与表达 [D]. 郑州: 河南农业大学 2014.
- [19] 丁谦, 宋晴晴, 杨发斌, 等. 植物 ANT 类转录因子研究进展 [J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(9): 1601 – 1610.
- [20] HORSTMAN A, FUKUOKA H, MUINO J M, et al. AIL and HDG proteins act antagonistically to control cell proliferation [J]. *The Company of Biologists*, 2015, 142: 454 – 464.
- [21] KULUEV B, AVALBAEV A, NURGALEEVA E, et al. Role of AINTEGUMENTA-like gene NtANTL in the regulation of tobacco organ growth [J]. *Journal of Plant Physiology*, Elsevier GmbH., 2015, 189: 11 – 23.
- [22] YAMAGUCHI N, JEONG C W, NOLE-WILSON S, et al. AINTEGUMENTA and AINTEGUMENTA-LIKE6/PLETHORA3 induce LEAFY expression in response to auxin to promote the onset of flower formation in Arabidopsis 1 [OPEN] [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170: 283 – 293.
- [23] FENG G, XU Q, WANG Z, et al. AINTEGUMENTA negatively regulates age-dependent leaf senescence downstream of AUXIN RESPONSE FACTOR 2 in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Biotechnology*, 2016, 33: 71 – 76.
- [24] WHITE M A, KITANO J, PEICHEL C L. Evolution of the APETALA2 gene lineage in seed plants [J]. *Molecular Biology*, 2012(860): 1 – 47.

- [25] H U, X IE, CH UA. The Arabidopsis auxin-inducible gene [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(9): 1951 – 1961.
- [26] 温立柱, 孙霞, 樊红梅, 等. 菊花 AINTEGUMENTA 克隆与功能分析[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(9): 1771 – 1782.
- [27] 黎青. 蛋白质结构与功能的关系[J]. *中国农资*, 2013(44): 308.
- [28] SHARONI A M, NURUZZAMAN M, SATOH K, et al. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(2): 344 – 360.
- [29] TEIXEIRA J A, ACETO S, LIU W, et al. Genetic control of flower development, color and senescence of *Dendrobium* orchids [J]. *Scientia Horticulturae, Elsevier B.V.*, 2014, 175: 74 – 86.
- [30] 史小华, 邹清成, 田丹青, 等. 红掌 AP2 类转录因子 AaSNB 编码基因的克隆及表达分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(4): 1130 – 1137.
- [31] KRIZEK B A, BEQUETTE C J, XU K, et al. RNA-seq links the transcription factors AINTEGUMENTA and AINTEGUMENTA-LIKE6 to cell wall remodeling and plant defense pathways [J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(3): 2069 – 2084.

Cloning and Expression Profiling of an AP2 Homologous Gene of Litchi ‘Feizixiao’

Men Jiali^{1,2}, LI Fang², SUN Jinhua², XU Yun¹

(1. School of Life and Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570100; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: An AP2 homologous gene *LcANT* was cloned from Litchi ‘Feizixiao’ (*Litchi chinensis* Sonn. Feizixiao) based on the litchi whole genome database available from the Environment and Plant Protection Institute. The gene *LcANT* was 2 087 bp in full-length cDNA, encoded 695 amino acids and contained two AP2/EREBP conserved domains. Bioinformatics analysis showed that the *LcANT* contained 7 introns, and that the subcellular localization was predicted in the nuclear. The *LcANT* protein was hydrophobic and its secondary structure was mostly random coils. BLAST sequence alignment analysis showed that the *LcANT* had a high homology in amino acid sequences with the *ANT* transcription factors from other plants, and had a maximum identity of up to 82% with the *ANT* from pistachio (*Pistacia vera*). The q-PCR was used to characterize the expression pattern of the *LcANT* in the tissues of Litchi ‘Feizixiao’, and the results showed that the *LcANT* had higher expression levels in spring shoots, ovary, inflorescence, and flower buds, implying that this gene may regulate the growth and development of floral organs and other plant vegetative organs. The acquisition of the *LcANT* gene provides a molecular basis for further research focused on its function on the growth and development of vegetative organs of Litchi.

Keywords: *Litchi chinensis* Sonn.; *ANT* transcription factor; expression analysis

(责任编辑:叶静)