

枸杞 *Lb14-3-3c* 基因克隆及转化马铃薯的研究

张兴^{1,2}, 周丽^{1,2}, 乔亚蕊¹, 徐蕊³, 岳思君¹, 杨淑娟¹, 姚新灵^{1,2}, 杨立明⁴, 郑蕊^{1,2}

(¹宁夏大学生命科学学院 / 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021; ²宁夏大学 / 宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室, 银川 750021; ³宁夏气象局科研所, 银川 750002; ⁴南京林业大学生物与环境学院, 南京 210037)

摘要: 在开花植物中, 14-3-3 蛋白对植物生长发育具有重要的调控作用。本试验利用逆转录 PCR (RT-PCR) 技术, 从宁夏枸杞宁杞 1 号花药中克隆了一个 14-3-3 蛋白家族基因 *Lb14-3-3c*。利用荧光定量 PCR 技术分析 *Lb14-3-3c* 基因在花药发育不同时期的表达特征, 构建 *Lb14-3-3c* 基因的植物过表达载体 pCambia1305.1-35s-*Lb14-3-3c*(+) 及植物抑制表达载体 pCambia1305.1-35s-*Lb14-3-3c*(-), 继而经农杆菌介导法将过表达载体转化马铃薯紫花白幼茎, 获得了阳性转基因马铃薯植株。结果表明, *Lb14-3-3c* 基因编码的蛋白与番茄处于进化树同一分枝上, 亲缘关系最近。荧光定量 PCR 分析表明, 该基因在枸杞各器官都有表达, 在雄蕊中的表达量最高。在花药发育的各个时期均表达, 且在小孢子母细胞时期表达量最高。成功将外源基因 *Lb14-3-3c* 载入含强启动子 CaMV35s 的植物表达载体中, 并将该基因的植物过表达载体转化马铃薯, 通过表型观察与 PCR 阳性鉴定得到 5 株转基因植株, 发现转基因植株长势优于野生型植株, 苗期野生型与转基因型淀粉含量相差不大, 结薯期和成熟期转基因型马铃薯的叶片淀粉含量均高于野生型, 且差异显著。本研究为进一步探讨 *Lb14-3-3c* 基因对枸杞花药发育过程中淀粉供能的调控提供了参考依据, 并且为阐明 *Lb14-3-3c* 基因在植物发育过程中的功能及枸杞的分子遗传改良提供了研究基础。

关键词: 枸杞; *Lb14-3-3* 蛋白; 基因克隆; 转基因; 马铃薯; 淀粉含量

Clone and Transformation into Potato (*Solanum tuberosum*) of *Lb14-3-3c* Gene from Wolfberry (*Lycium barbarum*)

ZHANG Xing^{1,2}, ZHOU Li^{1,2}, QIAO Ya-rui¹, XU Rui³, YUE Si-jun¹,
YANG Shu-juan¹, YAO Xin-ling^{1,2}, YANG Li-ming⁴, ZHENG Rui^{1,2}

(¹College of Life Science, Ningxia University/Western Biological Resources Protection and Utilization Lab of National Education Ministry, Yinchuan 750021; ²Ningxia University/Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops in Ningxiay, Yinchuan 750021;
³Ningxia Meteorological Bureau Research Institute, Yinchuan 750002;
⁴College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037)

Abstract: In flowering plants, 14-3-3 protein plays an important regulatory role in plant growth and development. In this experiment, a 14-3-3 protein family gene *Lb14-3-3c* was cloned from the anther of *Ningqi No.1* by reverse transcription PCR (RT-PCR). The expression characteristics of *Lb14-3-3c* gene in different stages of anther development were analyzed by real-time PCR. Plant gene construction *Lb14-3-3c* overexpression vector pCambia1305.1-35s-*Lb14-3-3c*(+) expression vector and the plant inhibition pCambia1305.1-35s-*Lb14-3-3c*(-). The over-expression vector was transformed into the young stem of potato Zihubai by mediated method, and a positive transgenic potato plant was obtained. Bioinformatics analysis showed that the protein encoded by

收稿日期: 2019-05-06 修回日期: 2019-05-21 网络出版日期: 2019-07-11

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190506005>

第一作者研究方向为植物基因工程, E-mail: 1144293850@qq.com; 周丽为共同第一作者

通信作者: 郑蕊, 研究方向为植物生物技术, E-mail: xlzheng@126.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31360361, 31560418, 31360025); 宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室创新平台专项资金 (2018DPC05019)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (31360361, 31560418, 31360025), Innovation Platform Special Funds of Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops in Ningxia (2018DPC05019)

Lb14-3-3c gene is on the same branch of tomato as the phylogenetic tree, and has the closest relationship. Real-time PCR analysis showed that the gene was expressed in all organs of the sputum, and the expression was highest in the stamens. It is expressed in all stages of anther development and has the highest expression during microspore mother cell. The exogenous gene *Lb14-3-3c* was successfully loaded into the plant expression vector containing the strong promoter CaMV35s, and the plant overexpression vector of the gene was transformed into potato. Five transgenic plants were identified by phenotypic observation and PCR positive identification. The growth rate of transgenic plants was better than that of wild-type plants. The content of wild-type and transgenic starch in seedling stage was similar. The starch content of transgenic potato in potato and mature stage was higher than that in wild type. This study provides a reference for the further study of *Lb14-3-3c* gene regulation of starch supply during the development of anthers, and provides a demonstration of the function of *Lb14-3-3c* gene during plant development and molecular genetic improvement.

Key words: *Lycium barbarum* L.; Lb14-3-3 protein; gene cloning; transgenic; potato; starch content

宁夏枸杞(茄科,枸杞属,科拉丁名: *Solanaceae*, 种拉丁名: *Lycium barbarum* L.)是我国传统的名贵中药材和重要经济作物,具有调节免疫、润肺明目等功效,枸杞叶、果和根中都含有人体所需的蛋白质、氨基酸和微量元素。枸杞子是一味常用的补肝益肾中药,现代医学研究证实其含有胡萝卜素、维生素A、维生素C、维生素B1及钙、磷、铁、锌、锰等营养成分,对造血功能有促进作用^[1],还能抗衰老、抗突变、抗肿瘤、抗脂肪肝及降血糖等作用^[2]。为了促进生长提高产量,枸杞种植过程中农药和化肥使用量偏高,既增加了生产成本,造成了环境污染,也给枸杞产品的质量安全带来了隐患。所以,培育高产、优质的枸杞品种对于提高我国国民收入、促进农业及相关产业的可持续性发展有着重要的作用。花药作为植物生殖器官的重要组成部分,其正常发育是植物成功形成种子及果实,进而完成繁衍所必备的条件,研究枸杞花器官及花药发育的机制,对提高枸杞的品质及产量具有重要的意义。

14-3-3蛋白是一类多基因家族蛋白,几乎存在于所有真核生物细胞生物体内,不同生物体中存在不同的亚型^[3]。作为植物体内重要的信号转导调节因子,它调节许多生命活动,包括植物生长发育、碳水化合物代谢、逆境胁迫等多种生理过程的信号通路^[4]。14-3-3蛋白通过与H⁺-ATPase和离子通道蛋白相互作用来调节质膜间的营养运输,并参与防御反应,在提高作物的品质和抗性方面有着广泛的应用^[5]。大豆14-3-3蛋白基因*GsGF14o*在拟南芥中过表达,导致种子萌发和幼苗生长期间的耐旱性下降^[6]。在拟南芥花药磷酸化蛋白质组中发现了39个丝氨酸和6个苏氨酸磷酸化蛋白,推测丝氨酸蛋白激酶和14-3-3蛋白的磷酸化参与花药发育的

关键调节过程^[7]。同时发现,PMH与ATPase通过与14-3-3蛋白相互作用来调节花粉萌芽和花粉管生长速率^[8]。在长日照条件下,*PvGF14b*、*PvGF14c*和*PvGF14e*的过表达显著延迟转基因拟南芥的开花时间^[9]。在棉花生长发育过程中,Gh14-3-3蛋白参与调节BR信号通路,通过改变BR信号相关基因的表达水平来影响棉花纤维起始和伸长发育过程^[10]。14-3-3蛋白家族基因在模式植物中的表达特性与功能已有较深入的研究,但是在枸杞中,对该基因分子调控机制以及调控网络方面的研究甚少,深入研究该基因对枸杞花药及花粉发育的调控机制对枸杞育种有重要意义与价值。

本试验前期采用差异蛋白组分析,发现宁夏枸杞1号与枸杞5号花药发育四分体前后时期,14-3-3蛋白是差异表达蛋白之一,进一步实时定量PCR分析发现,*Lb14-3-3a*基因在花药、果实和花中优势表达,而在根茎叶中的表达量很低,初步推测Lb14-3-3a蛋白可能在枸杞生殖发育过程中起调控作用^[11]。本研究通过逆转录PCR(RT-PCR)技术,从宁夏枸杞枸杞1号花药中克隆了14-3-3蛋白家族的一个新基因,命名为*Lb14-3-3c*,采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)技术分析*Lb14-3-3c*基因在枸杞不同组织中的表达,运用生物信息学分析了编码该基因的蛋白质的性质、二级结构、三级结构、多序列比对和亲缘关系,并构建*Lb14-3-3c*基因的植物过表达载体pCambia1305.1-35s-Lb14-3-3c(+)及植物抑制表达载体pCambia1305.1-35s-Lb14-3-3c(-),成功将外源基因Lb14-3-3c载入含强启动子CaMV35s的植物表达载体中,并将该基因的植物过表达载体转化马铃薯(茄科,科拉丁名: *Solanaceae*, 种拉丁名: *Solanum tuberosum* L.),通过表型观察与

PCR 阳性鉴定得到 5 株转基因植株,发现转基因植株长势优于野生型植株,苗期野生型与转基因型淀粉含量相差不大,结薯期和成熟期转基因型马铃薯的叶片淀粉含量均高于野生型,为进一步探讨枸杞 *Lb14-3-3c* 基因在枸杞花药发育过程中的功能以及为枸杞的分子遗传改良提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 材料

宁夏枸杞宁杞 1 号,于 2017 年 6 月采自宁夏育新枸杞有限公司试验田。参照徐青等^[12]的方法,分别采集枸杞根、茎、叶、花、青果、红果及不同发育时期的花蕾(雄蕊原基时期、造孢细胞时期、小孢子母细胞时期、四分体时期、单核花粉时期、二核花粉时期和花粉成熟时期),将不同发育时期的花蕾利用测量纵横径、观察形态和花药压片法于干冰上剥离花药,装于离心管中,液氮速冻后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

马铃薯品种紫花白无菌苗,由本实验室保存。在超净工作台中,将无菌瓶苗,剪成 1~2 cm 的茎段,两端留有叶腋,插入马铃薯 MS 基础培养基上,在温度 $24 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光照强度 1000~3000 Lx 的条件下,培养大约 30 d 后,即可获得马铃薯无菌苗。

1.2 *Lb14-3-3c* 基因的分离

将存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱里备用的各个时期的枸杞花药取出,立即速冻于液氮中,将其磨成粉末,利用植物总 RNA 提取试剂盒(北京吉百特生物技术有限公司)提取花药总 RNA,详细步骤参照试剂盒说明书进行,并利用超微量分光光度计测定 RNA 浓度及纯度。用 Takara 公司 PrimeScriptTM RT Master Mix 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链,整个操作于冰盒上进行,防止 RNA 降解。反转录体系如下: RNA 1~2 μg 、5 \times PrimeScriptTM RT Master Mix 2 μL ,加入 ddH₂O 使总体积为 10 μL 。PCR 反应程序为: $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, cDNA 合成后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

利用 Primer5.1 软件设计引物,引物序列为: Lb14-3-3c-F: atggcgtctccacgcgagga; Lb14-3-3c-R: ttcattattatctggttg。上海生工生物有限公司合成引物。以 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备存的枸杞花药 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为 25 μL 2 \times Master Mix、2 μL 上游引物(引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)、2 μL 下游引物(引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)、2 μL cDNA 和 19 μL ddH₂O。扩增条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;

$94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, 产物经切胶回收后连接至 pGEM-T Easy 载体(Takara),阳性质粒菌液送上海生工生物工程公司测序。

1.3 生物信息学分析

利用 BioXM2.6 软件, NCBI-BlastP 及 ExPASy (<http://www.expasy.org>) 在线软件分析预测蛋白质基本性质,用 SOPMA 软件分析蛋白质二级结构, SWISS-MODEL 在线软件进行三级结构预测,用 DNAMAN8 软件对 *Lb14-3-3c* 基因编码的蛋白进行多序列对比,用 MEGA5.1 软件的邻接法构建进化树。

1.4 时空表达分析

利用 Primer 5.1 软件设计枸杞 *Lb14-3-3c* 荧光定量 PCR 上下游引物(Lb14-3-3c-F: tccgaactaacctcgaaga; Lb14-3-3c-R: tgatgccactgttcttcat),以枸杞组成型表达基因 *Actin* 为内参,其引物序列为: Lbactin-F: gaccttcaatgttcccgtatg, Lbactin-R: gccatcaccagagtccaacac,进行实时荧光定量 PCR。反应结束后分析荧光值变化曲线及溶解曲线,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析相对表达量,每个样品重复 3 次^[13]。

1.5 植物表达载体的构建

以测序正确的 Lb14-3-3c-pGEM-T Easy Vector 质粒为模板,进行 PCR 扩增,反应体系的总体积为 50 μL ,包括 25 μL 2 \times Master Mix、2 μL 上游引物(引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)、2 μL 下游引物(引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$)、2 μL cDNA 和 19 μL ddH₂O。扩增条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, 纯化回收目的片段连接到 pMD18-T Vector 中转化大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含有 50 mg/mL 氨苄青霉素的平板上,过夜生长,挑取单克隆,以基因全长引物进行单克隆 PCR 阳性鉴定。

以鉴定结果为阳性的重组单克隆为模板,采用通用引物 M13 (F: tgtaaacgacggccagt; R: caggaaacagctatgacc) 和 *Lb14-3-3c* 基因上下游引物,并结合 *EcoR* I 单酶切来判断目的片段的连接方向。确定了重组载体目的片段的连接方向后,用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切 Lb14-3-3c-pMD18-T 重组载体、反向 Lb14-3-3c-pMD18-T 重组载体和植物表达载体 pCambia1305.1-35s, 胶回收目的片段,用 T4 连接酶过夜连接 Lb14-3-3c-pMD18-T 重组载体和植物表达载体 pCambia1305.1-35s、反向 Lb14-3-3c-pMD18-T 重组载体和植物表达载体

pCambia1305.1-35 s, 分别转化大肠杆菌 DH5 a。涂布于含有 50 mg/mL 卡那霉素的平板上, 过夜生长, 经抗性筛选及菌落 PCR 鉴定后选取阳性单克隆, 小摇后提取重组质粒进行双酶切鉴定, 用液氮冻融法将重组质粒转入根瘤农杆菌 GV3101 中, PCR 检测获得阳性克隆。

1.6 农杆菌介导转化马铃薯

选取 4~5 周生长状况良好的马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 紫花白无菌苗, 在无菌条件下, 剪取马铃薯茎段, 置于 MS 预培养培养基平板上, 完全封口后, 在光照条件下培养 2 d 后。将植物过表达载体 pCambia1305.1-35s-Lb14-3-3c 的农杆菌菌液培养至对数期, 侵染预培养的马铃薯茎段, 侵染结束后, 将茎段置于共培养培养基中, 在温度为 22 °C 的条件下, 避光培养 2 d, 使菌液能充分进入茎段, 提高侵染效率。后将共培养的外植体用无菌水漂洗、滤纸吸干, 转移到含有卡那霉素的诱导愈伤组织培养基中, 培养 15 d 左右, 茎两端长出明显的愈伤组织, 将愈伤移入含卡那霉素的芽分化培养基中, 30 d 左右长出 3~4 cm 的不定芽, 将不定芽移入生根培养基中进行生根培养, 整个过程以未侵染的马铃薯茎段为对照。

1.7 阳性植株的表型观察与分子鉴定

炼苗结束后, 将马铃薯植株进行土培, 及时观察植株生长状况, 待植株茎段较粗且叶片数目较多时, 采摘叶片, 液氮速冻后提取植物全基因组, 以野生型的基因组 DNA 为阴性对照, 以 CaMV35s-F: 5' -gagcagcttgccaacatg-3', Lb14-3-3c-R: 5' -ttcattattctgtgttg-3' 为上下游引物, 将叶片基因组稀释 50 倍后进行 PCR 阳性鉴定。PCR 反应体系的总体积为 25 μ L, 含有 2 \times Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L 和 dd H₂O 9.5 μ L。扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 72 °C 10 min, 35 个循环。

1.8 转基因马铃薯淀粉含量测定

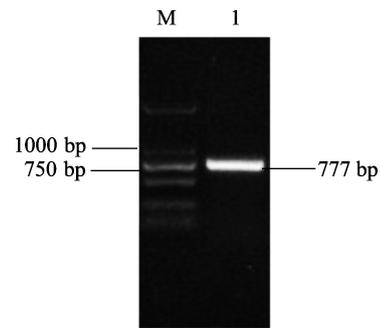
去掉阴性植株, 将检测为阳性转基因马铃薯土培苗与野生型植株继续培养, 分别采集苗期 (25 d)、结薯期 (35 d) 和成熟期 (60 d) 的叶片, 测定淀粉含量, 整个过程以同时期的野生型马铃薯为对照, 试验设置 3 次重复。参照北京索莱宝公司的试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 *Lb14-3-3c* 基因的克隆

以宁杞 1 号枸杞花药的 7 个时期 (雄蕊原基

时期、造孢细胞时期、小孢子母细胞时期、四分体时期、单核花粉时期、二核花粉时期和花粉成熟时期) 的混合 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 方法, 分离到 Lb14-3-3 蛋白的基因片段, 命名为 *Lb14-3-3c*, 将其连接到 pGEM-T Easy 载体并转化大肠杆菌 DH5 α , 将阳性质粒菌液进行测序, 测序表明该片段长 777 bp (图 1)。



M: DNA 分子量 DL2000; 1: PCR 产物
M: DNA Marker DL2000, 1: PCR products

图 1 *Lb14-3-3c* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 The PCR fragment of *Lb14-3-3c*

2.2 *Lb14-3-3c* 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 *Lb14-3-3c* 蛋白的理化性质和结构预测 用 BioXM2.6 软件分析表明, *Lb14-3-3c* 基因的 ORF 全长为 777 bp, 可编码 260 个氨基酸。ExPASy 网站预测, *Lb14-3-3c* 编码蛋白的理论分子量为 64.14 kD, 等电点为 4.95, 其二级结构由 175 个 α -螺旋、4 个 β -转角和 62 个无规则卷曲组成。使用在线软件 SWISS-MODEL 预测 *Lb14-3-3c* 蛋白的三级结构, 获得其主要由 α -螺旋构成的对称三维结构 (图 2)。

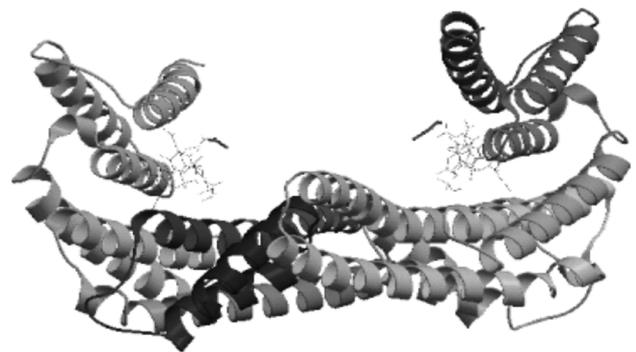


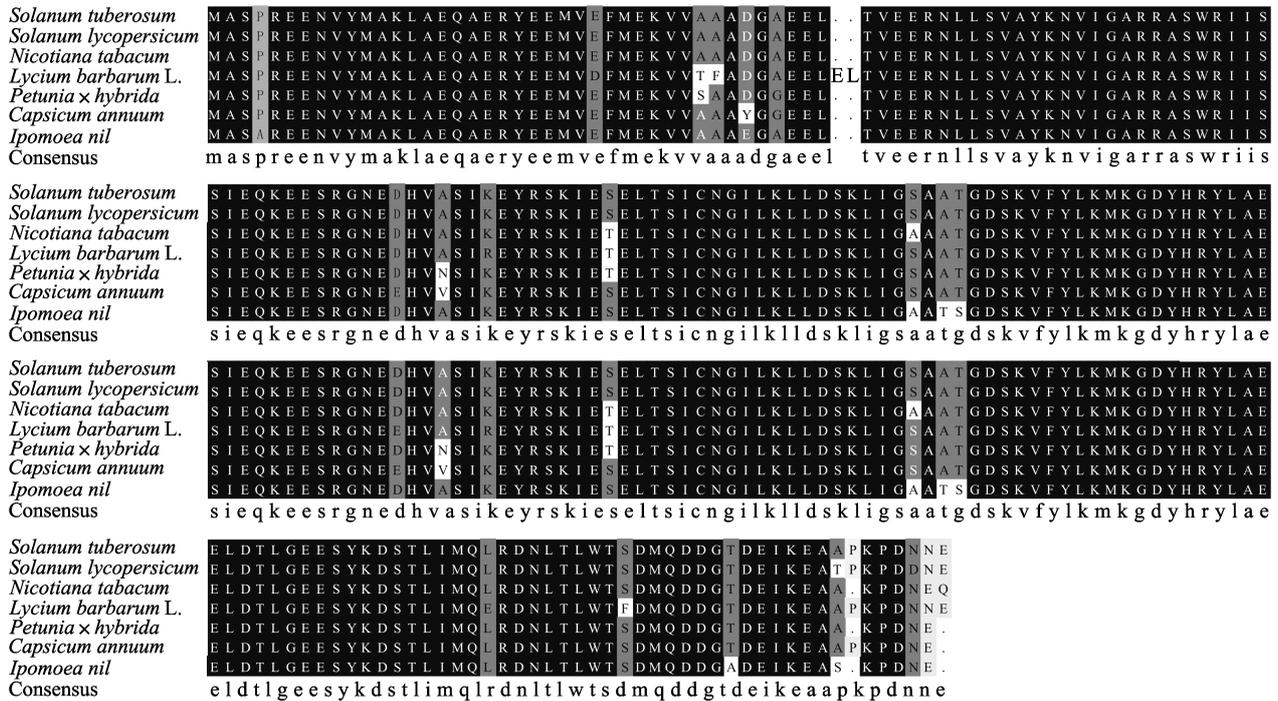
图 2 预测的 *Lb14-3-3c* 蛋白三级结构

Fig.2 The predicted tertiary structure of *Lb14-3-3c* protein

2.2.2 *Lb14-3-3c* 蛋白的同源序列比对 用 *Lb14-3-3c* 基因编码蛋白氨基酸序列信息在 NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库中 BlastP, 发现该序列与马铃薯

(*Solanum tuberosum* L., BAV67085.1)、番茄 (*Solanum lycopersicum* L., NP_001234097.1)、矮牵牛 (*Petunia × hybrida* hort.ex E.Vilm., AGJ98234.1)、辣椒 (*Capsicum annuum* L., XP_016550580.1)、红花烟草 (*Nicotiana tabacum* L., NP_001312922.1)、牵牛花 (*Ipomoea nil* (L.) Roth, XP_019172389.1) 等物种的相似度分别为 96%、96%、95%、95%、95%、94%、93%，与咖啡 (*Coffea arabica* L., XP_027078282.1)、风铃辣椒 (*Capsicum annuum* var.

conoides (Mill.) Irish, XP_016572083.1)、大豆 (*Glycine max* (L.) Merr., NP_001340970.1)、芝麻 (*Sesamum indicum* L., XP_011097537.1)、苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaerth., AFK34151.1)、莴苣 (*Lactuca sativa* L., XP_023735473.1)、胡桃 (*Juglans regia* L., XP_018806495.1) 等其他物种的氨基酸序列相似度在 86% 以上, 表明克隆的 *Lb14-3-3c* 基因, 属于 14-3-3 蛋白家族基因, 其氨基酸序列具有保守性 (图 3)。



Solanum tuberosum L.: 马铃薯 BAV67085.1, *Solanum lycopersicum* L.: 番茄 NP_001234097.1, *Nicotiana tabacum* L.: 红花烟草 NP_001312922.1, *Lycium barbarum* L.: 枸杞, *Petunia × hybrida* hort.ex E.Vilm.: 矮牵牛 AGJ98234.1, *Capsicum annuum* L.: 甜辣椒 XP_016550580.1, *Ipomoea nil* (L.) Roth: 牵牛花 XP_019172389.1
Solanum tuberosum L.: potato BAV67085.1, *Solanum lycopersicum* L.: tomato NP_001234097.1, *Nicotiana tabacum* L.: safflower tobacco NP_001312922.1, *Lycium barbarum* L.: wolfberry, *Petunia × hybrida* Hort.ex E.Vilm.: petunia AGJ98234.1, *Capsicum annuum* L.: Sweet Pepper XP_016550580.1, *Ipomoea nil* (L.) Roth: Morning Glory XP_019172389.1

图 3 14-3-3 蛋白的多序列比对

Fig.3 Sequence alignment of *Lb14-3-3c* protein with other known 14-3-3 proteins

2.2.3 *Lb14-3-3c* 蛋白的系统进化分析 为了进一步研究枸杞 *Lb14-3-3c* 蛋白和其他物种 14-3-3 类蛋白的亲缘关系, 利用 MEGA5.1 软件构建了包括枸杞 *Lb14-3-3c* 及其他植物 14-3-3 蛋白的系统发生树 (图 4)。可将这几种植物的 14-3-3 蛋白共分成两大类: 第一大类包括红花烟草 (*Nicotiana tabacum* L., NP_001312922.1)、牵牛花 (*Ipomoea nil* (L.) Roth, XP_019172389.1)、野生型马铃薯 (*Solanum chacoense* Bitter, AAS78777.1)、美花烟草 (*Nicotiana sylvestris* Speg., XP_009786458.1)、矮牵牛 (*Petunia × hybrida* Hort.ex E. Vilm., AGJ98234.1)、辣椒 (*Capsicum annuum* L.,

XP_016550580.1)、枸杞 (*Lycium barbarum* L.)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L., BAV67085.1)、番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill., NP_001234097.1)。第二大类包括中粒咖啡 (*Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner, CDP 01506.1)、野生橄榄 (*Olea europaea* L.var. Coratina, XP_022855003.1)、虾衣花 (*Erythranthe guttata* (DC.) G. L. Nesom, XP_012840822.1)、紫花风铃木 (*Handroanthus impetiginosus* (Mart.ex DC.) Mattos, PIN12914.1)、芝麻 (*Sesamum indicum* L., XP_011097537.1), 枸杞与马铃薯、番茄处于同一进化枝上, 表明它们具有比较近的亲缘关系, 这与多序列比对的序列一致性结果一致。

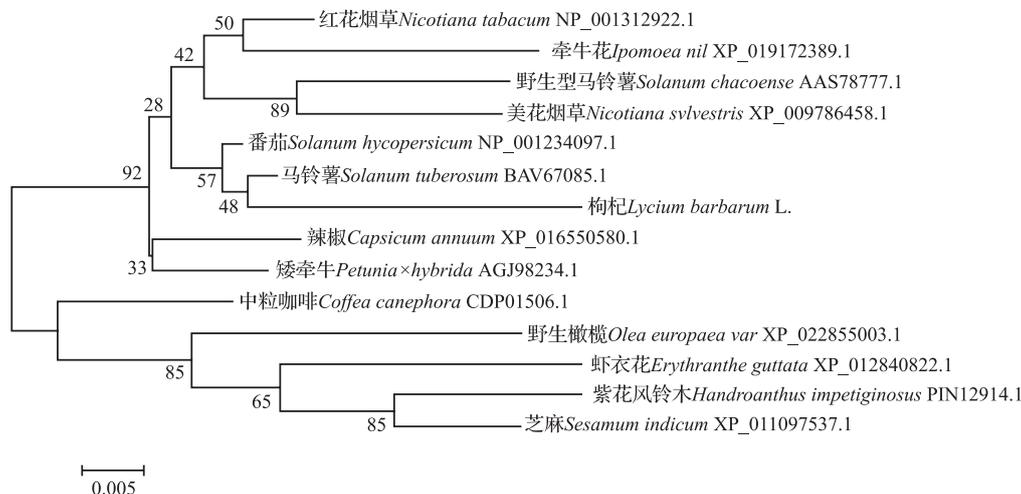


图4 Lb14-3-3c 蛋白系统进化树分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of Lb14-3-3c protein sequences

2.3 Lb14-3-3c 基因的时空表达特性

以枸杞 *Actin* 基因为内参,通过荧光定量 PCR 分析,了解 *Lb14-3-3c* 基因在枸杞各器官中转录水平的时空表达特征,发现 *Lb14-3-3c* 基因在枸杞不同器官中都有表达,但表达量存在明显差异。在雄蕊中的表达量最高,其次为花,在根、茎、叶、青果、红果、雌蕊、花瓣和花萼中的表达均较低(图5)。

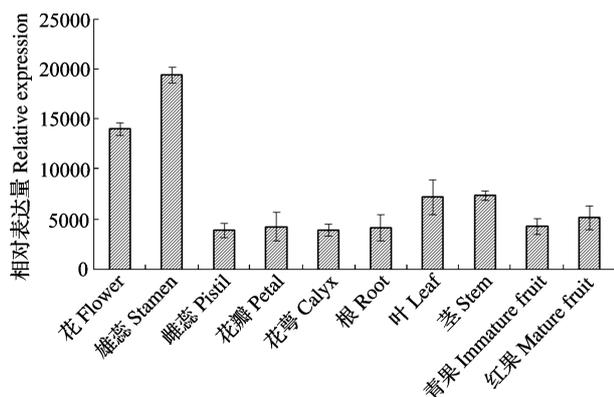


图5 Lb14-3-3c 基因在枸杞不同器官中的表达

Fig.5 The transcriptional level of *Lb14-3-3c* in different organs of wolfberry

同时,分析了 *Lb14-3-3c* 基因随着花药发育过程的表达特征。结果发现,在枸杞花药不同发育时期, *Lb14-3-3c* 基因都有表达。在小孢子母细胞时期表达量最高。雄蕊原基时期、造孢细胞时期、四分体时期和单核花粉粒时期表达量相差不明显,均低于小孢子母细胞时期。成熟花粉粒时期表达量最低(图6)。

2.4 植物重组表达载体的构建

2.4.1 过表达载体与抑制表达载体连接方向的鉴定以 *Lb14-3-3c* 重组质粒为模板,采用 M13 上下游引

物位点和单酶切相结合,对重组单克隆载体进行连接方向的判断,若以 M13-F/M13-R、M13-R/Lb14-3-3c-R 和 M13-R/Lb14-3-3c-R 为引物,PCR 结果为阳性;以 M13-F/Lb14-3-3c-R 为引物,PCR 结果为阴性, *EcoR* I 单酶切重组质粒,得到一条 500 bp 的特异性条带,则目的片段为正向连接(图7)。若 M13-F/M13-R、M13-R/Lb14-3-3c-R 和 M13-F/Lb14-3-3c-R PCR 为阳性, M13-R/Lb14-3-3c-R PCR 为阴性, *EcoR* I 单酶切重组质粒,得到一条 250 bp 的特异性条带,则目的片段为反向连接(图8)。PCR 过程中,可能由于退火温度偏低,致使出现了两条非特异电泳条带,其中一条可能为引物二聚体(图8B)。

2.4.2 植物重组表达载体的验证 确定 *Lb14-3-3c*-pMD18-T 重组质粒的连接方向后,用 *Bam* H I 和 *Sal* I 分别双酶切 pCambia1305.1-35s、过表达重组质粒 *Lb14-3-3c*-pMD18-T 和抑制表达重组质粒 *Lb14-3-3c*-pMD18-T,使其具有相同的粘性末端。胶回目的片段,用 T4 连接酶过夜连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取单克隆,以其为模板,进行 PCR 阳性检测,得到一条 777 bp 的目的条带(图9A, 10A)。提取构建成功的重组质粒,转化农杆菌 GV3101,挑取单克隆,以其为模板,进行 PCR 检测,进一步将 PCR 结果为阳性的重组质粒用限制性内切酶 *Bam* H I、*Sal* I 双酶切,得到一条 777 bp 的特异条带(图9B, 10B),插入片段与克隆片段大小一致,表明已成功构建 *Lb14-3-3c* 基因的植物过表达载体 pCambia1305.1-35s-*Lb14-3-3c* 和植物抑制表达载体 pCambia1305.1-35s-*Lb14-3-3c*,为下一步通过转化模式植物和枸杞,验证 *Lb14-3-3c* 基因的功能提供了研究基础。

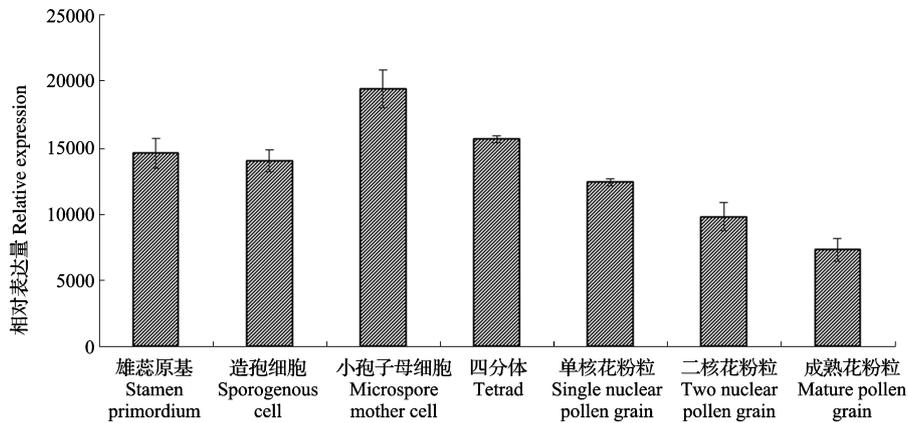
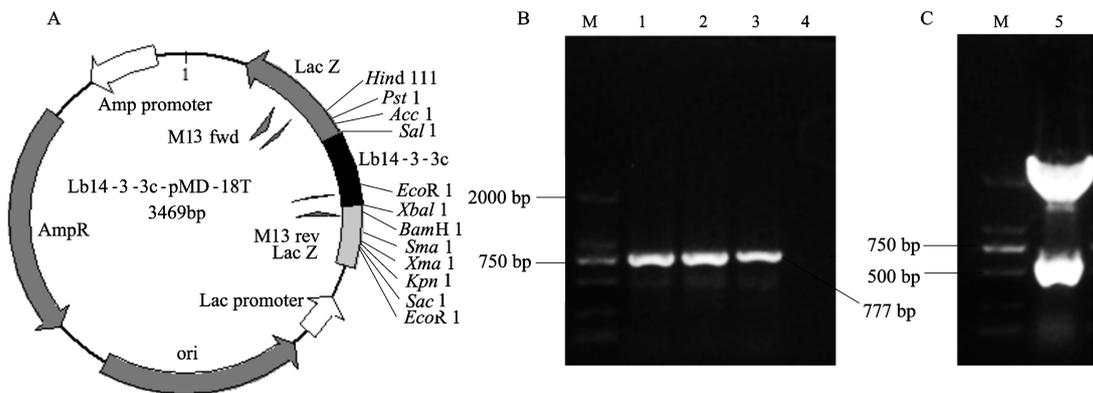


图 6 *Lb14-3-3c* 基因在枸杞花药不同发育时期的表达

Fig.6 Expression level of *Lb14-3-3c* at different developmental anthers of wolfberry

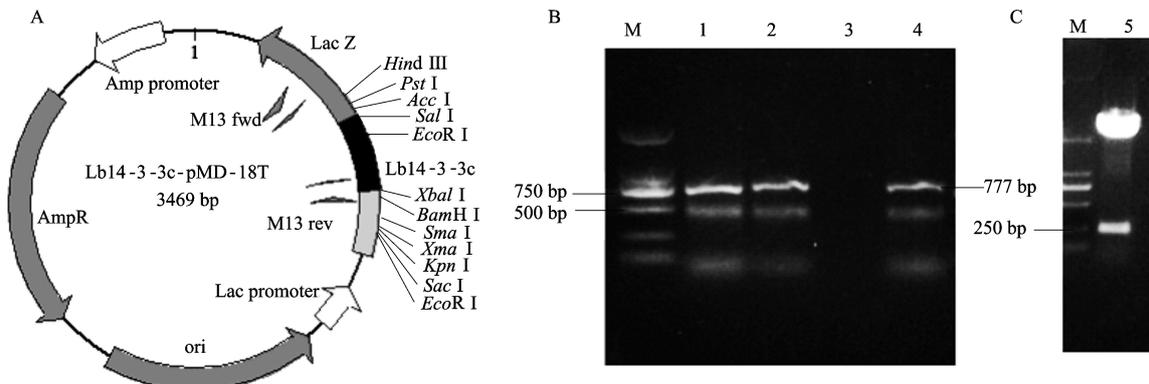


A: 过表达 *Lb14-3-3c*-pMD18-T 质粒, B: PCR 鉴定, C: 单酶切鉴定; M: DNA 分子量 DL2000, 1: *Lb14-3-3c*-F/*Lb14-3-3c*-R, 2: M13-F/M13-R, 3: M13-R/*Lb14-3-3c*-R, 4: M13-F/*Lb14-3-3c*-R, 5: *EcoR* I 单酶切

A: overexpression recombinant plasmid of *Lb14-3-3c*-pMD18-T, B: PCR identification, C: single enzyme digestion assay, M: DNA molecular weight DL2000, 1: *Lb14-3-3c*-F/*Lb14-3-3c*-R PCR, 2: M13-F/M13-R PCR, 3: M13-R/*Lb14-3-3c*-R PCR, 4: M13-F/*Lb14-3-3c*-R PCR, 5: *EcoR* I single enzyme digestion

图 7 过表达重组质粒 *Lb14-3-3c*-pMD18-T 及目的片段连接方向鉴定

Fig.7 Identification of over-expressing recombinant plasmid *Lb14-3-3c*-pMD18-T

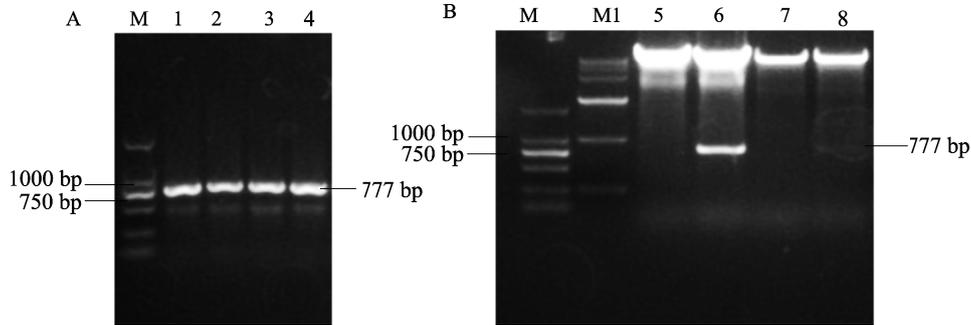


A: 抑制表达重组质粒 *Lb14-3-3c*-pMD18-T, B: PCR 鉴定, C: 酶切鉴定; M: DNA 分子量 DL2000; 1: *Lb14-3-3c*-F/*Lb14-3-3c*-R, 2: M13-F/M13-R, 3: M13-R/*Lb14-3-3c*-R, 4: M13-F/*Lb14-3-3c*-R, 5: *EcoR* I 单酶切

A: Inhibition expression recombinant plasmid of *Lb14-3-3c*-pMD18-T, B: PCR identification, C: single enzyme digestion assay, M: DNA molecular weight DL2000, 1: *Lb14-3-3c*-F/*Lb14-3-3c*-R PCR, 2: M13-F/M13-R PCR, 3: M13-R/*Lb14-3-3c*-R PCR, 4: M13-F/*Lb14-3-3c*-R PCR, 5: *EcoR* I single enzyme digestion

图 8 抑制表达重组质粒 *Lb14-3-3c*-pMD18-T 及目的片段连接方向鉴定

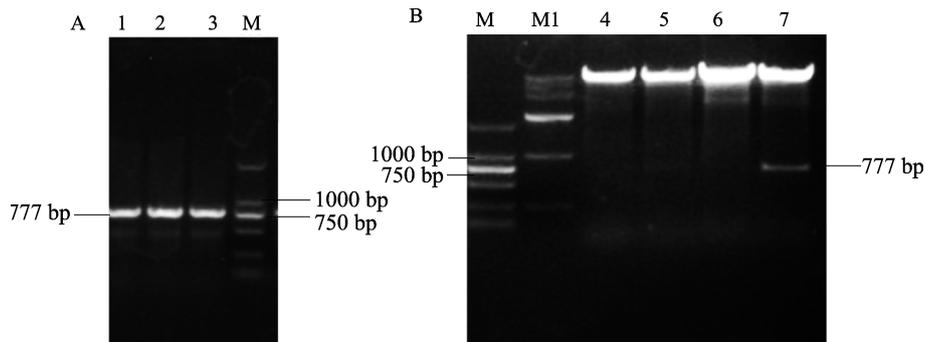
Fig.8 Identification of suppressed-expression recombinant plasmid *Lb14-3-3c*-pMD18-T



A: PCR 鉴定, B: 酶切鉴定, M: DL2000 DNA 分子量标准, M1: DL15000 DNA 分子量标准, 1~4: 菌落 PCR 鉴定, 5: *EcoR* I 单酶切重组质粒, 6: *Bam* H I, *Sal* I 双酶切重组质粒, 7: *EcoR* I 单酶切质粒, 8: *Bam* H I, *Sal* I 双酶切质粒
A: PCR identification, B: Identification by enzyme digestion, M: DL2000 DNA molecular weight standards, M1: DL15000 DNA molecular weight standards, 1-4: colony PCR identification, 5: *EcoR* I single enzyme digestion of the recombinant plasmid, 6: *Bam* H I, *Sal* I double enzyme digestion of the recombinant plasmid, 7: *EcoR* I single enzyme digestion plasmid, 8: *Bam* H I, *Sal* I double enzyme cutting plasmid

图 9 过表达单克隆 pCambia1305.1-35s-Lb14-3-3c PCR 阳性检测及酶切鉴定

Fig.9 Identification of overexpression plasmid pCambia1305.1-35s-Lb14-3-3c by colony PCR and digestion



A: PCR 鉴定, B: 酶切鉴定; M: DL2000 DNA 分子量标准, M1: DL15000 DNA 分子量标准, 1~3: 菌落 PCR, 4: *EcoR* I 单酶切质粒, 5: *Bam* H I, *Sal* I 双酶切质粒, 6: *EcoR* I 单酶切重组质粒, 7: *Bam* H I, *Sal* I 双酶切重组质粒
A: PCR identification, B: identification by enzyme digestion, M: DL2000 DNA molecular weight standard, M1: DL15000 DNA molecular weight standard, 1-3: colony PCR, 4: *EcoR* I single enzyme digestion plasmid, 5: *Bam* H I, *Sal* I double restriction plasmid, 6: *EcoR* I single enzyme digestion of the recombinant plasmid, 7: *Bam* H I, *Sal* I double digestion of the recombinant plasmid

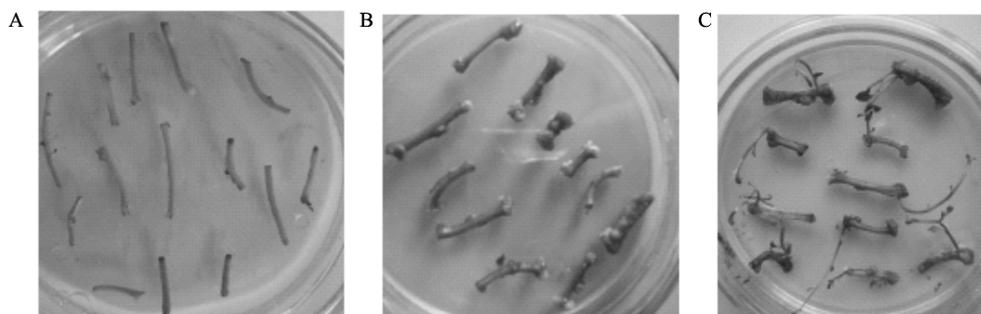
图 10 抑制表达单克隆 pCambia130.1-35s-Lb14-3-3c PCR 阳性检测及酶切鉴定

Fig.10 Identification of suppressed-expression plasmid pCambia130.1-35s-Lb14-3-3c by colony PCR and digestion

2.5 农杆菌介导转化马铃薯

将根瘤农杆菌转化法侵染的马铃薯茎段(图 11A),置于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 MS 培养基上诱导愈伤, 15 d 左右长出愈伤组织(图 11B), 30 d

左右陆续分化不定芽(图 11C),待不定芽生长至 3~4 cm 时,将其轻轻剪下,插入到含卡那霉素的生根培养基中进行生根培养,整个过程以野生型马铃薯为对照。



A: 外植体, B: 愈伤组织, C: 不定芽
A: Explants, B: Callus, C: Adventitious buds

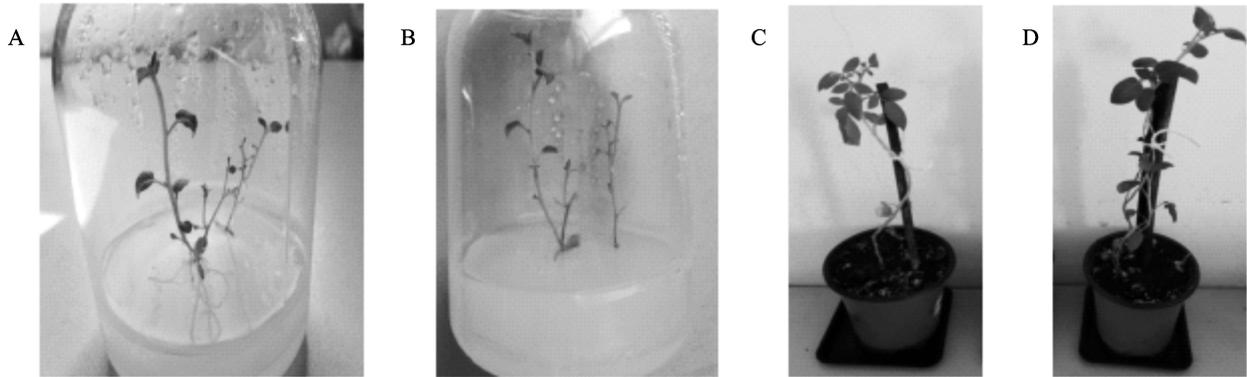
图 11 农杆菌介导法转化马铃薯

Fig.11 Agrobacterium-mediated transformation of potato

2.6 转基因植株表型观察与阳性鉴定

将不定芽移入生根培养基后, 植株逐渐生根 (图 12A、B), 等到无菌苗生长至瓶盖时, 进行炼苗, 炼苗结束后, 将瓶苗移栽至土中进行培养 (图 12C、D), 待植株茎段较粗且叶片数目较多时, 取其叶片, 提取叶片全基因组 DNA, 进行 PCR 阳性鉴定

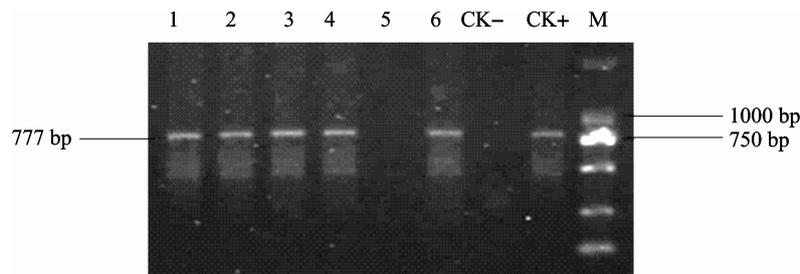
(图 13), 整个过程以野生型马铃薯植株为对照。由图可知, 瓶苗时期, 转基因马铃薯苗与野生型苗长势相差不大, 到生长后期, 转基因植株生长较快, 株高明显高于野生型。通过 PCR 阳性鉴定后, 得到 5 株阳性转基因植株, 1 株阴性植株, 去掉阴性植株, 继续培养阳性植株与野生型植株。



A、C: 野生型, B、D: 转基因植株
A and C: Wild type, B and D: Transgenic plants

图 12 转基因马铃薯植株

Fig.12 Transgenic potato plants



M: DNA 分子量标准 DL2000, CK+: 阳性对照, CK-: 阴性对照, 5: 非转化植株, 1~4, 6: 阳性转化植株
M: DNA marker DL2000, CK+: Positive control, CK-: Nega-tive control, 5: Non-positive transformation plants, 1-4, 6: Positive transformation plants

图 13 转基因马铃薯 PCR 鉴定

Fig.13 PCR identification of transgenic potato plants

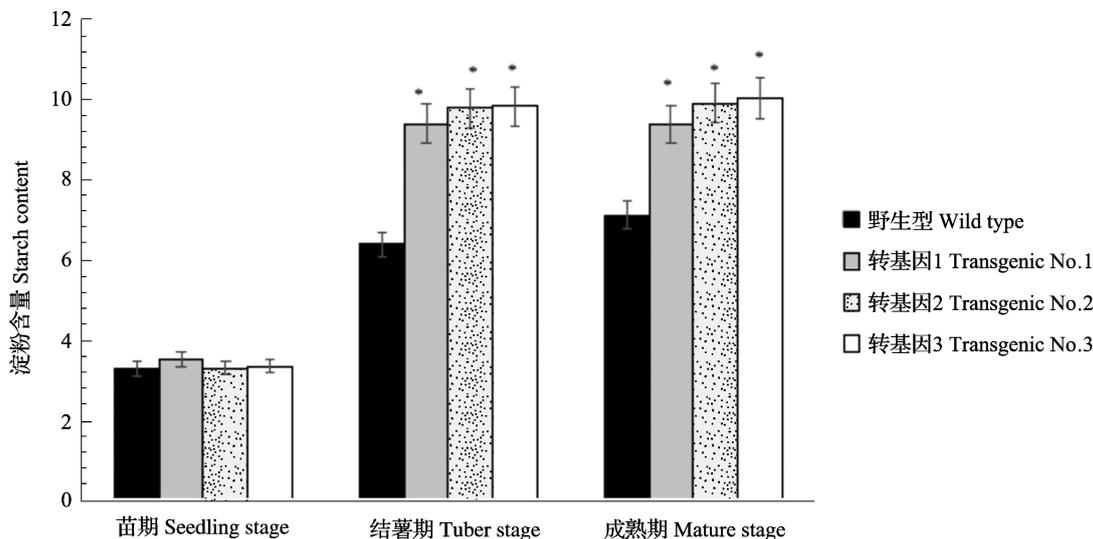
2.7 转基因马铃薯淀粉含量测定

随机选取 3 株转基因阳性植株, 以野生型马铃薯植株的苗期、结薯期和成熟期淀粉含量作对照, 分别测定转化株系各个时期淀粉的含量, 由图 14 可以看出, 除苗期之外, 这 3 株转化植株结薯期和成熟期植株叶片淀粉含量显著, 都高于野生型植株叶片, 高出 6~7, 表明 *Lb14-3-3c* 基因可能正向调控淀粉的累积。

3 讨论

在开花植物中, 由雄蕊花药中的二倍体微孢子

细胞产生的高度特化的单倍体花粉或雄配子体, 是有性繁殖的关键调节者, 花粉是一种对环境高度敏感的雄性配子, 如冷和热气候。在开花阶段热处理 1~2 d 后, 由于抑制了萼裂开裂, 花粉粒发芽的能力下降^[14], 作为雄配子, 花粉对小穗育性很重要, 最终与作物产量息息相关, 但是由于花粉的物理尺寸非常小, 因此从花粉中提取蛋白质比较困难, 一般情况下研究花药, 花药位于雄蕊, 具双核或多核结构, 细胞内含较多的 RNA 和蛋白质, 并有油脂和类胡萝卜素等营养物质, 具有供应花粉粒发育所需的养料^[15]。



*: 转基因植株相比于野生型, 差异显著 ($P \leq 0.05$)

*: The transgenic plants were significantly different from the wild type ($P \leq 0.05$)

图 14 转基因马铃薯淀粉含量

Fig.14 Starch content of transgenic potato

14-3-3 蛋白是形成同源或异源二聚复合物的支架分子, 来调节细胞内信号传导途径、蛋白质运输、细胞周期和细胞凋亡、调节核编码的叶绿体蛋白质的进出、转录因子复合物的组装和响应细胞内信号转导级联的酶活性等过程^[16]。同时, 14-3-3 蛋白在植物防御、环境胁迫应答、碳氮代谢、种子萌发等方面, 作为一种衔接分子发挥着重要的作用, 也使之成为生物化学及信号途径领域中的焦点^[17]。

14-3-3 蛋白家族对植物激素信号通路转导、淀粉代谢和花发育等过程具有重要的调控作用。14-3-3 蛋白可以通过负调控 GA 合成相关的转录因子 RSG, 来调控植物体内的 GA 水平。酵母杂交实验发现^[18], 水稻 14-3-3 蛋白可以与乙烯合成酶 ACS 互作, 其作用的机制可能是 14-3-3 蛋白通过结合磷酸化的 ACS 的 C 末端来调节 ACS 的活性, 保护 ACS 在乙烯生物合成时不被降解^[19]。在玉米和高粱中, 14-3-3 蛋白通过和酶互作调控淀粉的合成, 蛋白表达量的降低引起细胞内糖类物质水平的下降, 使得淀粉合成途径异常, 花药发育相关基因的表达也受到影响, 最终导致玉米、高粱雄性不育^[20]。木薯 14-3-3 基因转化拟南芥发现, 转基因植株淀粉含量增加, 推测 14-3-3 蛋白及其结合酶在木薯根的糖代谢和淀粉积累中起重要调控作用^[21]。用反义技术降低拟南芥中 14-3-3e 型蛋白基因的表达可使叶片中的淀粉含量增加 2~4 倍, 并且在黑暗条件下转基因植株淀粉降解过程受到阻抑^[22]。桑树 14-3-3 蛋白家族基因 *MaGF14a*、*MaGF14c* 和

MaGF14h 在种子萌发开始时被激活, *MaGF14s* 在整个植株发育时期都有表达, 且在幼嫩组织如雌花, 嫩叶和顶芽中表达量最高。在花被凋落后期, *MaGF14a*、*MaGF14e* 和 *MaGF14h* 亚型表达量增加。推测 MaGF14 蛋白家族在桑树的生长、发育和凋亡过程中起着重要作用^[23]。玉米 14-3-3s 基因在花粉粒发育过程中发挥作用的机制包括离子通道渗透调节, 蛋白质从内质网和高尔基体到质膜的转运, 以及花粉管生长过程中线粒体能量的产生。玉米花粉成熟过程中, 14-3-3s 基因在雄性不育系中 RNA 和蛋白质水平的表达都下调, 推测 14-3-3s 基因在花粉育性方面发挥作用^[24]。

为了检测 14-3-3 蛋白表达是否影响植物表型和代谢, 对过表达内源 14-3-3 蛋白亚型的转基因植株进行了分析, 结果发现转基因植株的块茎数目增加, 块茎大小减小, 转基因马铃薯比对照含有更多的叶绿素, 当它们转入黑暗环境时, 叶绿素的流失速度比对照植物慢; 14-3-3 抑制的转基因植株块茎数量减少, 块茎大小增加, 转基因块茎的鲜重也有所增加, 过表达植株中儿茶酚胺水平的升高伴随着可溶性糖与淀粉比例的增加而增加, 抑制表达的转基因植物中结果相反, 所有抑制表达的植物硝酸还原酶 (NR) 活性均显著增加, 说明 NR 的调控发生在体内, 且不依赖于同型, NR 活性的增加导致硝酸盐水平显著下降, 在所有 14-3-3 过表达的马铃薯中, 蔗糖磷酸酶合酶活性水平也显著升高, 而且酶活性的显著提高伴随着块茎中蔗糖水平的相应变化^[25]; 将

南瓜的 *14-3-3* 基因过表达于马铃薯中,发现 *14-3-3* 蛋白过表达使转基因马铃薯叶片和块茎中可溶性糖和儿茶酚胺含量的增加,且转基因马铃薯块茎中脂肪含量达到 69%,远高于野生型植株^[26]。

目前,烟草、小麦、火把梨、甘蔗、龙眼、巴西橡胶树、杉木、菠菜和雷竹等植物的 *14-3-3* 蛋白的基因已有克隆^[27-30],但是,有关于 *14-3-3* 基因在枸杞中研究鲜有报道,因此探讨枸杞 *Lb14-3-3c* 基因在枸杞生长发育过程中可能发挥的调控作用,进而揭示枸杞发育的分子机制,对改良枸杞的品质及产量具有重要的意义。本试验前期研究了宁夏枸杞宁杞 1 号及其突变体宁杞 5 号花药发育差异蛋白质组学差异表达的蛋白,分析鉴定了多个差异表达蛋白,其中 *14-3-3* 蛋白为重要的差异蛋白。本试验利用逆转录 RT-PCR 技术,从宁夏枸杞宁杞 1 号花药中克隆了一个 *14-3-3* 蛋白家族基因 *Lb14-3-3c*,参考孙玉燕等^[31]和翟莹等^[32]的研究方法进行生物信息学分析,分析了该基因在枸杞不同发育时期各器官和组织中的时空表达特性,成功构建了该基因的植物过表达载体及抑制表达载体,进一步将过表达载体通过农杆菌介导法转化马铃薯,得到 5 株阳性转基因植株,通过对转基因植株的表型观察, DNA 分子水平鉴定,淀粉含量测定。推测 *Lb14-3-3c* 基因可能参与调控花药发育过程,这为进一步验证该基因在植物花药发育过程中可能的调控作用提供了研究思路。并推测 *Lb14-3-3* 蛋白家族可能在淀粉发育过程中确实具有调控功能,为下一步采用根瘤农杆菌介导法将表达载体转化枸杞,研究该蛋白家族在枸杞生长发育中的作用以及调控花药发育过程提供了试验材料。在本研究中,仅分析了枸杞 *Lb14-3-3c* 基因的表达特性及构建了其植物表达载体。与模式植物相比,枸杞 *14-3-3* 蛋白还知之甚少。因此,今后还需开展克隆 *14-3-3* 同工型基因及明确其功能、转基因体系和功能基因组学方面的研究。

参考文献

- [1] 钱彦丛,宇文萍. 枸杞子的化学成分及药理研究新进展. 中医药学报, 2000 (4): 33-35
Qian Y C, Yu W P. New progress in chemical composition and pharmacology of Gardenia. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2000 (4): 33-35
- [2] 王建华,王汉中,张民,张生华. 枸杞多糖延缓衰老的作用. 营养学报, 2002, 24 (2): 189-191
Wang J H, Wang H Z, Zhang M, Zhang S H. The role of *Lycium barbarum* polysaccharides in delaying aging. Journal of Nutrition, 2002, 24 (2): 189-191
- [3] Daugherty C J, Rooney M F, Miller P W, Ferl R J. Molecular organization and tissue-specific expression of an Arabidopsis *14-3-3* gene. Plant Cell, 1996, 8 (8): 1239-1248
- [4] Yaffe M B. How do *14-3-3* proteins work?—Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. Febs Letters, 2002, 513 (1): 53-57
- [5] Liu F, Li M Y, Xu B Y. The function of *14-3-3* protein in plant and its application in crop breeding. Guangxi Agricultural Sciences, 2008, 39 (3): 6
- [6] Sun X L, Luo X, Sun M Z, Chen C, Ding X D, Wang X D, Yang S S, Yu Q Y, Jia B W, Ji W W, Cai H, Zhu Y M. A *Glycine soja* *14-3-3* protein GsGF14o participates in stomatal and root hair development and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant & Cell Physiology, 2014, 55 (1): 99
- [7] Roberts M R. *14-3-3* proteins find new partners in plant cell signalling. Trends in Plant Science, 2003, 8 (5): 218-223
- [8] Pertl H, Himly M, Gehwolf R, Kriebchaumer R, Strasser D, Michalke W, Richter K, Ferreira F, Obermeyer G. Molecular and physiological characterisation of a *14-3-3* protein from lily pollen grains regulating the activity of the plasma membrane H⁺ATPase during pollen grain germination and tube growth. Planta, 2001, 213 (1): 132-141
- [9] Liu S N, Zhu L F, Lin X C, Ma L Y. Overexpression of the repressor gene PvFRI-L, from *Phyllostachys violascens*, delays flowering time in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Biologia Plantarum, 2016, 60 (3): 1-9
- [10] 周颖. *14-3-3* 蛋白参与 BR 信号调控及其在棉花 (*Gossypium hirsutum*) 纤维发育中的功能研究. 武汉: 华中师范大学, 2014: 14-30
Zhou Y. *14-3-3* protein is involved in the regulation of BR signaling and its function in the development of cotton (*Gossypium hirsutum*) fiber. Wuhan: Central China Normal University, 2014: 14-30
- [11] 郑蕊. 枸杞雄性不育花药差异蛋白质组分析及 3 个相关基因的克隆. 南京: 南京农业大学, 2012: 62-74
Zheng R. Differential proteome analysis of male sterile male anther and cloning of three related genes. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012: 62-74
- [12] 徐青,秦垦,冯爱玲,祁建钊,韩会龙,黄昊. 枸杞不育系与可育系花药发育的细胞学研究. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2009, 30 (3): 263-267
Xu Q, Qin K, Feng A L, Qi J Z, Han H L, Huang H. Cytological study on anther development of indica and fertile lines. Journal of Ningxia University: Natural Science Edition, 2009, 30 (3): 263-267
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. Methods, 2001, 25 (4): 402-408
- [14] Müller F, Rieu I. Acclimation to high temperature during pollen development. Plant Reproduction, 2016, 29 (1-2): 107-118
- [15] Dai S, Li L, Chen T, Chong K, Xue Y. Proteomic analyses of *Oryza sativa* mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth. Proteomics, 2006, 6 (8): 2504-2529
- [16] Datta R, Chamusco K C, Chourey P S. Starch Biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. Plant Physiology, 2002, 130 (4):

- 1645-1656
- [17] 文彬,王小菁.14-3-3蛋白研究进展.生命科学,2004,16(4):226-230
Wen B, Wang X J. Progress in 14-3-3 protein research. Life Science, 2004, 16(4): 226-230
- [18] Ishida S, Fukazawa J, Yuasa T, Takahashi Y. Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator REPRESSION OF SHOOT GROWTH by gibberellins. Plant Cell, 2004, 16(10): 2641-2651
- [19] Yao Y, Du Y, Jiang L, Liu J Y. Interaction between ACC synthase 1 and 14-3-3 proteins in rice: a new insight. Biochemistry Biokhimia, 2007, 72(9): 1003-1007
- [20] Datta R, Chourey P S, Pring D R, Tang H V. Gene-expression analysis of sucrose-starch metabolism during pollen maturation in cytoplasmic male-sterile and fertile lines of sorghum. Sexual Plant Reproduction, 2001, 14(3): 127-134
- [21] Wang X, Chang L, Tong Z, Wang D, Yin Q, Wang D, Jin X, Yang Q, Wang L, Sun Y, Huang Q, Guo A, Peng M. Proteomics profiling reveals carbohydrate metabolic enzymes and 14-3-3 proteins play important roles for starch accumulation during cassava root tuberization. Scientific Reports, 2016, 6: 19643
- [22] Sehnke P C, Chung H J, Wu K, Ferl R J. Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(2): 765-770
- [23] Yang Y, Yu M, Xu F, Yu Y, Liu C, Li J, Wang X. Identification and expression analysis of the 14-3-3 gene family in the mulberry tree. Plant Molecular Biology Reporter, 2015, 33(6): 1-10
- [24] Roberts M R. Regulatory 14-3-3 protein-protein interactions in plant cells. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3(5): 400
- [25] Szopa J. Transgenic 14-3-3 isoforms in plants: the metabolite profiling of repressed 14-3-3 protein synthesis in transgenic potato plants. Biochemical Society Transactions, 2002, 30(4): 405
- [26] May T, Soll J. 14-3-3 Proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. The Plant Cell, 2000, 12(1): 53-63
- [27] 李兵娟. 雷竹 14-3-3 基因家族克隆和功能分析. 杭州: 浙江农林大学, 2014: 11-22
Li B J. Molecular cloning and functional analysis of 14-3-3 gene family of *Phyllostachys praecox*. Hangzhou: Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2014: 11-22
- [28] 戴双, 李豪圣, 程敦公, 刘爱峰, 曹新有, 刘建军, 宋健民. 小麦胚乳 14-3-3 基因的克隆及其重组蛋白的原核表达. 中国农业科学, 2012, 45(10): 2076-2084
Dai S, Li H S, Cheng D G, Liu A F, Cao X Y, Liu J J, Song J M. Cloning of 14-3-3 gene in wheat endosperm and prokaryotic expression of its recombinant protein. Chinese Agricultural Sciences, 2012, 45(10): 2076-2084
- [29] 王光勇, 刘迪秋, 李旻, 饶健, 孙兵召, 丁元明. 火把梨 14-3-3 基因的克隆与序列分析. 华北农学报, 2012, 27(3): 55-61
Wang G Y, Liu D Q, Li W, Rao J, Sun B Z, Ding Y M. Isolation and expression analysis of a 14-3-3 gene from *Pyrus pyrifolia* Nakai cv. Huobali. North China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 27(3): 55-61
- [30] 罗炼芳, 孔冉, 苏俊波. 甘蔗 14-3-3 基因克隆及表达分析. 南方农业学报, 2013, 44(11): 1757-1764
Luo L F, Kong R, Su J B. Cloning and expression analysis of 14-3-3 gene of sugarcane. South Agricultural Journal, 2013, 44(11): 1757-1764
- [31] 孙玉燕, 段蒙蒙, 邱杨, 张晓辉, 沈镛, 王海平, 李锡香. 心里美萝卜花青素合成酶基因 *RsANS* 克隆及花青素生物合成相关基因表达分析. 植物遗传资源学报, 2016, 17(5): 889-896
Sun Y Y, Duan M M, Qiu Y, Zhang X H, Shen D, Wang H P, Li X X. Cloning of anthocyanin synthase gene *RsANS* and expression analysis of anthocyanin biosynthesis related genes in the heart. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(5): 889-896
- [32] 翟莹, 张军, 赵艳, 任巍巍, 张闯, 孙婉姝, 高士童. 大豆 ERF 转录因子基因 *GmERF8* 的克隆与表达分析. 植物遗传资源学报, 2016, 17(6): 1036-1040
Zhai Y, Zhang J, Zhao Y, Ren W W, Zhang C, Sun W S, Gao S T. Cloning and expression analysis of soybean ERF transcription factor gene *GmERF8*. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(6): 1036-1040