

龙眼 *ELF4* 同源基因的克隆与功能研究

付志远, 贾天琦, 彭媛, Saquib Weheed, 曾黎辉*

(福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

摘要: 以‘红核子’龙眼 (*Dimocarpus longan*) 叶芽为材料, 克隆了 *ELF4* 同源基因 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 的 cDNA 全长序列, 对序列进行了生物信息学分析, 并通过转化拟南芥以及实时荧光定量 PCR 研究基因功能。蛋白序列比对结果表明, *DIELF4-2* 与 *AtELF4-L1* 有较高相似度, 而 *DIELF4-1* 与 *AtELF4* 相似度更高; 构建两个基因的植物表达载体转化拟南芥, 转基因植株都表现出延迟开花以及不定根生长的现象, 表明 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 可能有抑制开花和促进生长素合成功能; *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 在龙眼花芽分化过程的表达模式不同, 推测其在龙眼花芽分化过程中有不同的功能。

关键词: 龙眼; *ELF4*; 花芽分化; 基因克隆; 基因表达

中图分类号: S 667.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 05-0875-12

Cloning and Function Analysis of *ELF4* Homolog Genes in *Dimocarpus longan*

FU Zhiyuan, JIA Tianqi, PENG Yuan, Saquib Weheed, and ZENG Lihui*

(College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The full length of cDNA sequences of two *ELF4* homolog genes were cloned from *Dimocarpus longan* ‘Red Seed’, named *DIELF4-1* and *DIELF4-2*. The functions of these two genes were analyzed by bioinformatics analysis and real-time quantitative PCR. To further study the function of the *DIELF4* genes, *DIELF4-1* and *DIELF4-2* were overexpressed in *Arabidopsis thaliana*. Sequence analysis and cluster analysis showed that *DIELF4-2* was similar to *AtELF4-L1*, while *DIELF4-1* and *AtELF4* showed higher similarity. Overexpression of two *DIELF4* genes separately in *Arabidopsis thaliana* resulted in delaying flowering and adventitious roots phenotypes, suggesting that *DIELF4* genes may be repressors of flowering and promoting auxin synthesis. However, expression patterns of *DIELF4-1* and *DIELF4-2* genes were different during bud differentiation of longan, indicating that the two genes may have different functions in longan.

Keywords: longan; *ELF4*; flowering bud differentiation; gene cloning; gene expression

植物开花受成花相关基因和外界环境因素共同影响。目前涉及植物成花调控的诱导途径主要有光周期途径、春化途径、温度途径、赤霉素途径、自主途径和年龄途径等 (Bergonzi et al., 2013), 这些诱导途径与外界营养和内部代谢物等因子相互作用, 将开花信号汇聚到几个关键的整合因子上,

收稿日期: 2017-12-18; 修回日期: 2018-04-08

基金项目: 福建农林大学科技创新基金项目 (KF2015107)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lhzheng@hotmail.com)

激活花分生组织特性基因表达,启动植物成花(周琴等,2017)。在拟南芥成花光周期途径中,光受体感受光信号,把信号传递给生物节律基因(Covington et al., 2008),由生物节律基因产生生物节律,并将节律输出给下游的节律调节基因,节律调节基因通过调控下游开花时间基因的表达,进一步激活或抑制花分生组织基因和花器官基因的表达,从而调控拟南芥的开花(彭凌涛,2006)。*CO*是光周期途径中受节律调节且影响开花时间的关键基因,在植物叶片中光周期途径主要通过*GI*和*CO*传递信号(Komeda, 2004; Mishra & Panigrahi, 2015)。*CO*蛋白的活性受昼夜节律和光信号调控。在诱导性光信号调控下,*CO*蛋白稳定积累,从而诱导其直接下游基因*FLOWERING LOCUS T*(*FT*)和*TWIN SISTER OF FT*(*TSF*) 在叶片中表达,同时诱导*FT*运输到顶芽(Shim et al., 2017; 周琴等, 2017)。

EARLY FLOWERING 4(*ELF4*)基因最早由Doyle发现和命名。研究表明,它的表达与拟南芥的光周期调控、开花时间以及去黄化功能密切相关(Doyle et al., 2002; Khanna et al., 2003)。*ELF*家族是一个植物特有的基因家族,在拟南芥中这个家族还包括其他4个基因(Khanna et al., 2003) *ELF4-LIKE1*(*ELF4-L1*)、*ELF4-LIKE2*(*ELF4-L2*)、*ELF4-LIKE3*(*ELF4-L3*)和*ELF4-LIKE4*(*ELF4-L4*)。拟南芥中,*ELF4*、*EARLY FLOWERING 3*(*ELF3*)及*LUX ARRHYTHMO*(*LUX*)组成的蛋白复合体调控*PIF4*(*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4*)和*PIF5*的表达,进而调控植物的生长(Nusinow et al., 2011)。除此之外,*ELF4*还能调控拟南芥的开花时间,在非诱导的光周期条件下,*elf4*突变体表现出早花性状(Khanna et al., 2003)。在拟南芥中,光照下*ELF4*促进*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*(*CCA1*)和*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*(*LHY*)的表达,而*CCA1*和*LHY*抑制*ELF4*的表达(Kikis et al., 2005)。除此之外,*ELF4*蛋白通过调控*GI*的亚细胞定位来调控开花(Kim et al., 2013),而*GI*能够结合到*CO*基因的启动子上来调控*CO*的表达(Sawa & Kay, 2011);兰花中*ELF4*同源基因*DhELF4*转入拟南芥中过量表达,在长日照和短日照条件下均延迟开花,表明*DhELF4*可能参与植物成花调控(Chen et al., 2016);大豆中*ELF4*同源基因*GmELF4*在拟南芥中过量表达出现晚花现象,并发现过表达植株中拟南芥成花关键基因*AtCO*和*AtFT*表达下调,这可能是造成晚花现象的关键因素(Marcolino-Gomes et al., 2017)。

在龙眼成花调控的生理生化以及分子机制研究方面发现,花芽生理分化前20d是诱导反季节成花的关键时期,C/N值高有利于花芽分化(常强,2006);多效唑和乙烯利处理能增加树体内IPA/IAA的比值,抑制树体的营养生长,促进花芽分化(邱宏业,2016)。从龙眼中分离出*LEAFY*同源基因,其表达量在花序分化过程中有逐渐升高的趋势,在“冲梢”过程中则随着变态叶的展开而下降,推测该基因可能与花序分化及发育有关(官磊,2008);从龙眼中还分离出2个与拟南芥*FT*基因高度同源的基因*DIFT1*和*DIFT2*,在拟南芥中异位表达可影响开花时间,推测*DIFT1*使叶分生组织向花转变并促进开花,而*DIFT2*可能抑制开花并参与叶的形成(Winterhagen et al., 2013);本课题组前期克隆了龙眼*GI*和*FKF1*同源基因*DIGI*和*DIFKF1*,在长日照条件下,*DIGI*和*DIFKF1*过量表达导致转基因拟南芥不定根的形成和早花现象,推测*DIGI*和*DIFKF1*在龙眼中可能通过调节内源激素水平促进花芽分化(Huang et al., 2017)。

本课题组前期以具有连续开花特性的‘四季蜜’龙眼和普通‘立冬本’龙眼嫁接新梢为材料进行转录组测序,发现‘四季蜜’龙眼*ELF4*编码区序列与普通龙眼没有区别,但是表达量显著上调,其可能是调控‘四季蜜’龙眼特殊开花性状的一个关键基因(Jia et al., 2014)。在RNA-seq数据库(孟珊,2013)中,获得了两个*ELF4*的拼接序列(Unigene4309和Unigene5963),其中Unigene4309包含完整的编码区,命名为*DIELF4-1*;Unigene5963包含部分编码区,命名为*DIELF4-2*。为研究

DIELF4 在普通龙眼成花调控中的功能, 本研究中以普通龙眼品种‘红核子’为试材, 克隆 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 基因编码区全长 cDNA 序列, 并通过序列生物信息学分析、实时荧光定量 PCR 以及拟南芥的遗传转化等方法进行功能分析, 研究 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 的功能, 为进一步了解龙眼成花调控的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2015 年 9 月至 2017 年 9 月在福建农林大学园艺学院遗传育种实验室进行。

龙眼材料取自福建农林大学校园内的‘红核子’龙眼 (*Dimocarpus longan* ‘Red Seed’) 树。2014 年 9 月至 2015 年 3 月取叶芽、叶片以及结果母枝顶芽, 分别装入离心管, 在液氮中速冻后放入 -80 °C 冰箱中保存, 备用于提取 RNA。

拟南芥为哥伦比亚野生型, 种子由本实验室保存。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

龙眼 RNA 的提取参照 Huang 等 (2017) 的方法。cDNA 全长克隆的模板参照北京全式金生物科技有限公司的 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒说明书进行。3'及 5'RACE cDNA 第一链的合成参照 Clontech 公司的 Super SMARTer™ RACE 试剂盒说明书进行。用于定量的 cDNA 的合成参照 PrimeScript® RT reagent Kit 试剂盒说明书。

1.3 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 编码区全长克隆

根据龙眼转录组数据库 Unigene4309 中的拼接序列设计 *DIELF4-1* 上、下游特异引物, 扩增 cDNA 编码区全长序列 (表 1)。

表 1 用于基因克隆和定量 PCR 的引物
 Table 1 Primers used for gene cloning and qPCR

用途 Purpose	引物名称 Primer name	序列 (5' → 3') Sequence
基因克隆 Gene cloning	<i>DIELF4-1</i> -up	ATGACACCTGCACCCCTCGATTCC
	<i>DIELF4-1</i> -down	GACACATTAACACTTGAATAATACTC
	<i>DIELF4-2</i> -31	GGAGGTTTGGGATTGCGTG
	<i>DIELF4-2</i> -32	GCTTATCCGTAGAGCCAAC
	<i>DIELF4-2</i> -51	ACGACAAATCGGAGTAGAT
	<i>DIELF4-2</i> -52	TGGTGATTGTCGTTGGCTC
	<i>DIELF4-2</i> -up	GAGGAGACTACTACGATGGAC
	<i>DIELF4-2</i> -down	TGTAGAATGAGCAGTCCCAAC
	Long UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTTCAACGCAGAGT
	Short UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC
qPCR	<i>DIELF4-1</i> -qup	GTCACTCAACTGCGGCTTCAAGG
	<i>DIELF4-1</i> -qdown	TTGATGGAAAGCAGAGGAGAAGTCAG
	<i>DIELF4-2</i> -qup	GTGGAGACGTGGAGGTTTGG
	<i>DIELF4-2</i> -qdown	TGATCTGGCGGATGAGAGAG
	<i>Actin</i> -qup	TTCCGCTGCCAGAAGTCCTCTT
	<i>Actin</i> -qdown	CATTGAACATAGTTGAACCACCCTGAG

PCR 反应体系如下: 模板 1 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , dNTPs 2 μL , 10 \times Ex *Taq* buffer 2.5 μL , Ex *Taq* polymerase 0.2 μL , RNA-free H₂O 18.3 μL , 总体积 25 μL ; 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

RACE 方法克隆 *DIELF4-2* cDNA 全长, 根据 Unigene5963 已知序列设计 3'及 5'RACE 引物, 具体方法参照 Super SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书进行。

1.4 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 蛋白序列比对分析

利用 DNAMAN 软件对 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 蛋白与拟南芥 *ELF4* 家族蛋白进行多序列比对; 同时利用 MEGA 5.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析, 并且进行了 1 000 次 bootstrap 统计学检验。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

以龙眼 *Actin* 为内参基因进行 *DIELF4-1*、*DIELF4-2* 荧光定量 PCR 分析 (引物见表 1)。PCR 反应体系 (25 μL): 模板 2 μL , 上、下游引物各 0.5 μL , 2 \times SYBR Premix Ex *Taq* (Tli RNaseH Plus) 12.5 μL , RNA-free H₂O 9.5 μL 。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。

每个基因重复 3 次, 每个荧光定量 PCR 结束时将获得相对应的循环数值, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。

1.6 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 表达载体的构建

用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sac* I 对 pMD18T-*DIELF4-1* 质粒和 pBI121 质粒分别进行双酶切, 酶切产物进行凝胶电泳后回收, 回收产物用 T₄ DNA 连接酶连接, 获得重组质粒 pBI121-*DIELF4-1*。用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Pst* I 对 pMD18T-*DIELF4-2* 质粒和 pCAMBIA2300 质粒分别进行双酶切, 酶切产物用 T₄ DNA 连接酶连接后获得重组质粒 pCAMBIA2300-*DIELF4-2*, 然后分别进行菌液 PCR 和双酶切验证。将验证正确的 pBI121-*DIELF4-1* 质粒和 pCAMBIA2300-*DIELF4-2* 质粒转化根癌农杆菌 GV3101。

1.7 拟南芥的遗传转化和转基因植株表型观测统计

营养土和蛭石以 3:1 的比例混合, 用营养液充分浸湿后填入穴盘, 将拟南芥种子直接播入穴盘, 用保鲜膜覆盖, 长出小苗后揭膜。待拟南芥生长到盛花期时进行遗传转化。培养条件: 光周期 16 h/8 h, 光强: 12 000 lx, 温度 22 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 75%。利用“浸花法” (Clough & Bent, 1998), 分别将带有 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 的表达载体转入拟南芥中, 经过 100 mg \cdot L⁻¹ Kan 筛选获得抗性植株, PCR 检测得到转基因拟南芥植株, 经连续 3 代筛选培养得到 T₃ 代纯合转基因植株。

将 T₃ 代纯合体各 3 个株系播种在含 100 mg \cdot L⁻¹ Kan 的筛选培养基上, 将野生型种子播种在 1/2 MS 培养基上, 置于 22 $^{\circ}\text{C}$ 长日照 (12 000 lx, 16 h/8 h) 和短日照 (12 000 lx, 8 h/16 h) 条件下生长, 将长出 4 片及以上的小苗转移到湿润的基质中, 覆膜, 每 3 d 浇水 1 次, 确定小苗转绿成活后揭膜。观察并记录野生型和转基因植株各个时期表型的变化, 按株系统统计开花时间、莲座叶数、不定根数以及根系长度。

2 结果与分析

2.1 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 基因 cDNA 全长克隆

利用 *DIELF4-1-up* 和 *DIELF4-1-down* 引物进行 *DIELF4-1* 编码区全长扩增, 得到大约 550 bp 的条带 (图 1, A), 测序获得 544 bp 的序列, 序列比对后与转录组序列完全一致, 证明转录组测得的 Unigene4309 序列是正确的。该基因编码 140 个氨基酸。用 DNA 进行该基因编码区基因组全长序列的扩增, 结果显示获得的基因组序列与 cDNA 序列完全一致, 该基因的编码区内不存在内含子。

以 3' RACE cDNA 为模板, 利用 *DIELF4-2-31*、*DIELF4-2-32* 和接头引物 UPM, 进行两轮巢式 PCR, 得到一条约 500 bp 的条带 (图 1, B); 以 5' RACE cDNA 为模板, 利用 *DIELF4-2-51*、*DIELF4-2-52* 和接头引物 UPM, 进行两轮巢式 PCR, 得到一条约 250 bp 的条带 (图 1, C); 将两序列进行拼接获得 *DIELF4-2* 基因 cDNA 序列 731 bp。根据拼接序列设计 *DIELF4-2-up* 和 *DIELF4-2-down* 特异引物扩增编码区全长后, 证明得到了正确的 *DIELF4-2* 基因 (图 1, D)。该基因编码 144 个氨基酸, GenBank 登录号为 KM362363.1。同样, 进行 *DIELF4-2* 编码区基因组全长序列的扩增, 结果和 cDNA 序列完全一致, 该基因的编码区内也不存在内含子。

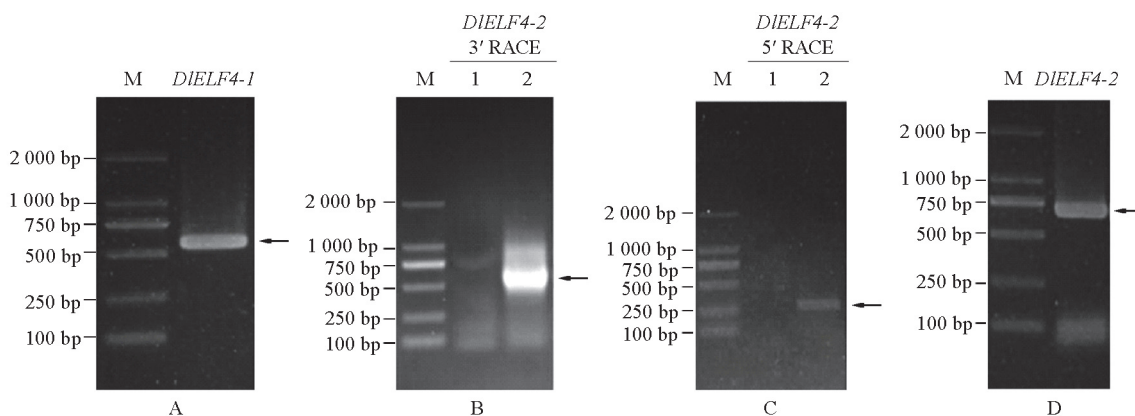


图 1 龙眼 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 编码区 cDNA 全长扩增

A: *DIELF4-1* 编码区全长 PCR 产物; B: *DIELF4-2* 基因 3' PCR 扩增 (1: 第 1 轮产物, 2: 第 2 轮产物);
C: *DIELF4-2* 基因 5' PCR 扩增 (1: 第 1 轮产物, 2: 第 2 轮产物);
D: *DIELF4-2* 基因编码区全长 PCR 产物; M: DL2000 marker.

Fig. 1 Cloning of longan *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* genes

A: *DIELF4-1* full length of coding region; B: 3' PCR cloning of *DIELF4-2* (1: First round, 2: Second round);
C: 5' PCR cloning of *DIELF4-2* (1: First round, 2: Second round);
D: *DIELF4-2* full length of coding region; M: DL2000 marker.

2.2 *DIELF4* 生物信息学分析

为了解 *DIELF4* 蛋白与其他 *ELF4* 蛋白家族成员之间的关系, 采用 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析。结果表明, *DIELF4-1* 与拟南芥的 *AtELF4* 的亲缘关系最近; *DIELF4-2* 和大豆、棉花的亲缘关系较近, 与拟南芥的 *AtELF4-L1* 也有较高相似度 (图 2)。

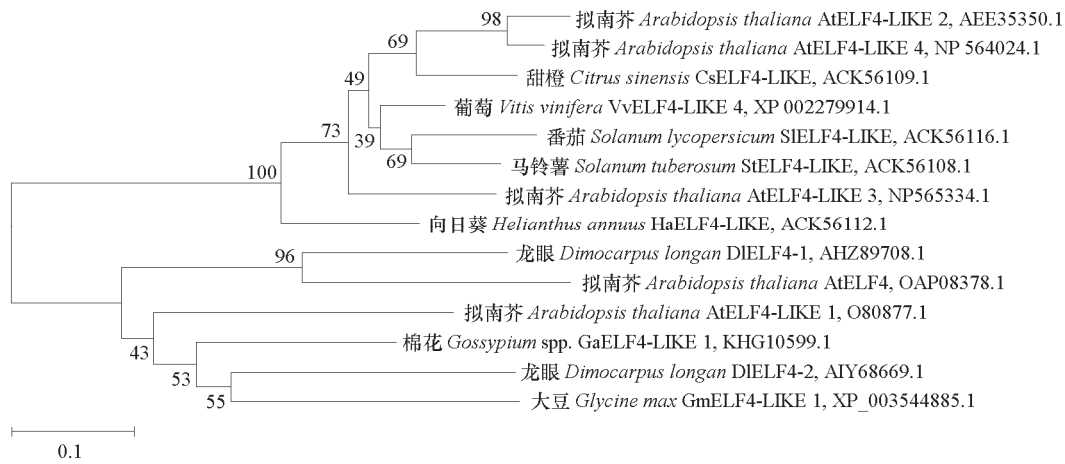


图2 植物 ELF4 家族进化树分析

自展值 (1 ~ 1000) 标记各个节点。

Fig. 2 Phylogenetic tree of plant ELF4 family

Boot-strap values from 1000 - replicates are indicated at each node.

DIELF4-1 和 DIELF4-2 的氨基酸序列与拟南芥的 AtELF4、AtELF4-L1、AtELF4-L2、AtELF4-L3、AtELF4-L4 氨基酸序列的同源性分别为 61%和 57%、58%和 61%、43%和 47%、44%和 47%、47%和 46%。DIELF4-1 和 DIELF4-2 的同源性为 31%。利用 DNAMAN 软件对龙眼 2 个 DIELF4 的氨基酸序列和 5 个 AtELF4 的氨基酸序列进行比对, 结果表明 2 个 DIELF4 都含有 ELF4 家族功能未知的保守作用域 DUF1313 (图 3)。

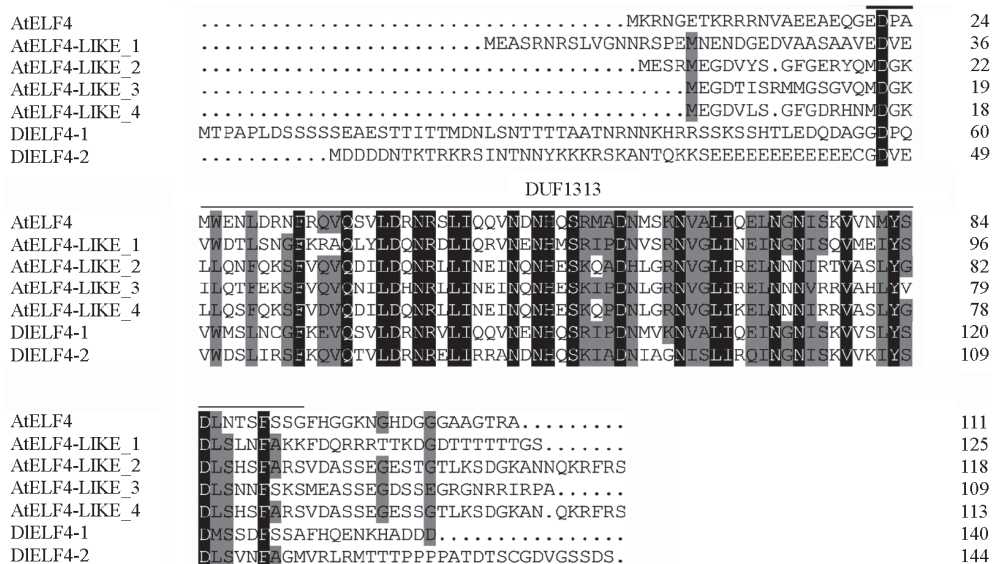


图3 龙眼 (Dl) 和拟南芥 (At) 的 ELF4 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of ELF4 proteins of longan (Dl) and *Arabidopsis thaliana* (At)

2.3 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 植物表达载体的构建和转基因拟南芥鉴定

通过 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切对重组质粒 pBI121-*DIELF4-1* 进行验证 (图 4, A), 小片段长度约 550 bp, 与 *DIELF4-1* 编码区全长大小一致, 表明 *DIELF4-1* 已成功连接到表达载体 pBI121 上。通过 *Kpn* I 和 *Pst* I 双酶切对重组质粒 pCAMBIA2300-*DIELF4-2* 进行验证 (图 4, B), 小片段长度约 730 bp, 与 *DIELF4-2* 编码区全长大小一致, 表明 *DIELF4-2* 已成功连接到表达载体 pCAMBIA2300-35S-OCS 上。

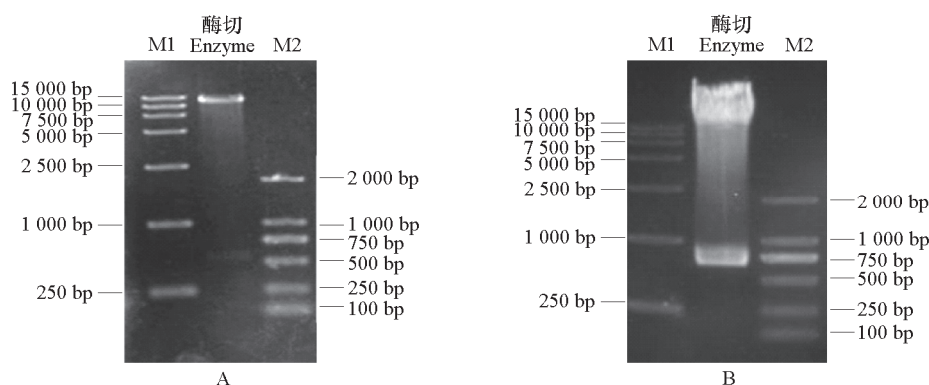


图 4 pBI121-*DIELF4-1* (A) 和 pCAMBIA2300-*DIELF4-2* (B) 重组质粒双酶切鉴定

Fig. 4 Detection of recombinant expression plasmid of pBI121-*DIELF4-1* (A) and pCAMBIA2300-*DIELF4-2* (B)

M1: DL15000 marker; M2: DL2000 marker.

以野生型拟南芥 DNA 为负对照, 重组载体质粒为正对照, PCR 鉴定转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 拟南芥 T₁ 代抗性植株。由图 5 可知, 转基因拟南芥扩增出与重组质粒条带大小一致的目的条带, 分别为 550 bp 和 731 bp, 而野生型拟南芥没有扩增出条带, 说明 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 已转入拟南芥中。

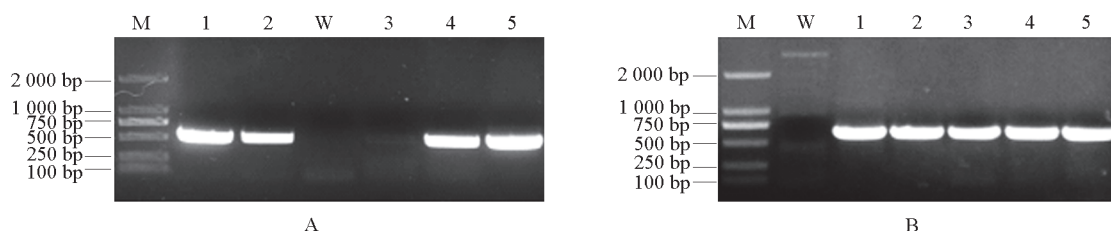


图 5 转 *DIELF4* 基因拟南芥抗性植株 PCR 检测

A: 1、2、4: 转 *DIELF4-1* 抗性植株; 3: 抗性筛选假阳性植株; W: 野生型植株 (CK⁻); 5: *DIELF4-1* 重组质粒 (CK⁺);

B: 1~4: 转 *DIELF4-2* 抗性植株; W: 野生型植株 (CK⁻); 5: *DIELF4-2* 重组质粒 (CK⁺);

M: DL2000 marker.

Fig. 5 Identification of transgenic *Arabidopsis* plants by PCR

A: 1, 2, 4: *DIELF4-1* transgenic plant; 3: False positive transgenic plant; W: Wild type plant (CK⁻);

5: *DIELF4-1* recombinant plasmid (CK⁺); B: 1 - 4: *DIELF4-2* transgenic plants;

W: Wild type plant (CK⁻); 5: *DIELF4-2* recombinant

plasmid (CK⁺); M: DL2000 marker.

2.4 不同日照下转 *DIELF4* 基因拟南芥表型变化

2.4.1 长日照

在 16 h 长日照条件下, 转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 拟南芥均有不定根生长, 平均根数多于野生型, 且根长显著短于野生型, 3 个株系根长平均值比野生型短约 4.0 cm (表 2; 图 6, A)。

此外还发现, 转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 植株开花时间均出现延迟 (表 2; 图 6, B)。野生型拟南芥的开花时间最早, 平均为播种后 (27.0 ± 1.0) d; 转 *DIELF4-1* 的 3 个株系开花时间分别为播种后 (38.7 ± 1.2)、(35.3 ± 2.3) 和 (40.3 ± 0.6) d; 转 *DIELF4-2* 的 3 个株系分别为播种后 (33.0 ± 1.0)、(37.7 ± 0.6) 和 (34.3 ± 3.2) d。同时发现, 转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 基因植株莲座叶数明显多于野生型。

2.4.2 短日照

在 8 h 短日照条件下, 转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 基因拟南芥植株同样出现不定根生长现象, 平均根数多于野生型, 且根长显著短于野生型, 3 个株系根长平均值比野生型短 3.5 cm (表 2; 图 6, C)。

此外还发现, 转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 植株开花时间也出现延迟 (表 2; 图 6, D)。野生型开花最早, 平均为播种后 (39.7 ± 1.5) d; 转 *DIELF4-1* 的 3 个株系开花时间分别为播种后 (49.7 ± 0.6)、(47.3 ± 1.5) 和 (56.0 ± 3.6) d; 转 *DIELF4-2* 的 3 个株系分别为播种后 (44.0 ± 1.7)、(46.3 ± 0.6) 和 (52.7 ± 2.5) d, 且转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 基因植株莲座叶数明显多于野生型。

表 2 转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 拟南芥植株的各项形态指标
Table 2 Morphological indexes in *DIELF4-1* and *DIELF4-2* transgenic *Arabidopsis* plants

日照时间 Daylight time	转基因植株 Transgenic plant		根系数量 Root number	根系长度/cm Root length	开花时间/d Bolting time	莲座叶数 Rosette leaf number	
	基因 Gene	株系 Line					
长日照 Long-day	<i>DIELF4-1</i>	L1	6.0 ± 1.0 a	1.6 ± 0.2 b	38.7 ± 1.2 a	16.7 ± 1.5 a	
		L2	4.3 ± 0.6 ab	1.0 ± 0.1 b	35.3 ± 2.3 a	14.0 ± 1.7 a	
		L3	5.0 ± 1.0 a	0.9 ± 0.1 b	40.3 ± 0.6 a	13.3 ± 2.5 a	
	<i>DIELF4-2</i>	L1	9.0 ± 1.0 a	1.1 ± 0.3 b	33.0 ± 1.0 ab	13.0 ± 3.0 a	
		L2	5.0 ± 1.0 a	1.3 ± 0.2 b	37.7 ± 0.6 a	16.7 ± 1.2 a	
		L3	4.3 ± 0.6 ab	1.6 ± 0.13 b	34.3 ± 3.2 a	10.0 ± 1.7 b	
		野生型 Wild type		2.3 ± 0.6 b	5.3 ± 0.6 a	27.0 ± 1.0 b	10.3 ± 1.1 b
	短日照 Short-day	<i>DIELF4-1</i>	L1	6.0 ± 1.0 a	1.3 ± 0.3 b	49.7 ± 0.6 a	26.0 ± 1.0 a
			L2	8.3 ± 0.6 a	1.3 ± 0.3 b	47.3 ± 1.5 ab	24.3 ± 1.2 a
L3			5.7 ± 0.6 a	1.3 ± 0.5 b	56.0 ± 3.6 a	26.3 ± 1.2 a	
<i>DIELF4-2</i>		L1	6.0 ± 1.0 a	1.2 ± 0.3 b	44.0 ± 1.7 ab	21.3 ± 1.2 a	
		L2	5.3 ± 0.6 ab	1.5 ± 0.5 b	46.3 ± 0.6 a	24.0 ± 2.0 a	
		L3	8.0 ± 1.0 a	1.5 ± 0.5 b	52.7 ± 2.5 a	24.7 ± 1.5 a	
		野生型 Wild type		3.3 ± 0.6 b	4.8 ± 1.0 a	39.7 ± 1.5 b	14.0 ± 2.8 b

注: 同列不同小写字母表示各处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different small letters in the same column mean significant difference at 5%.

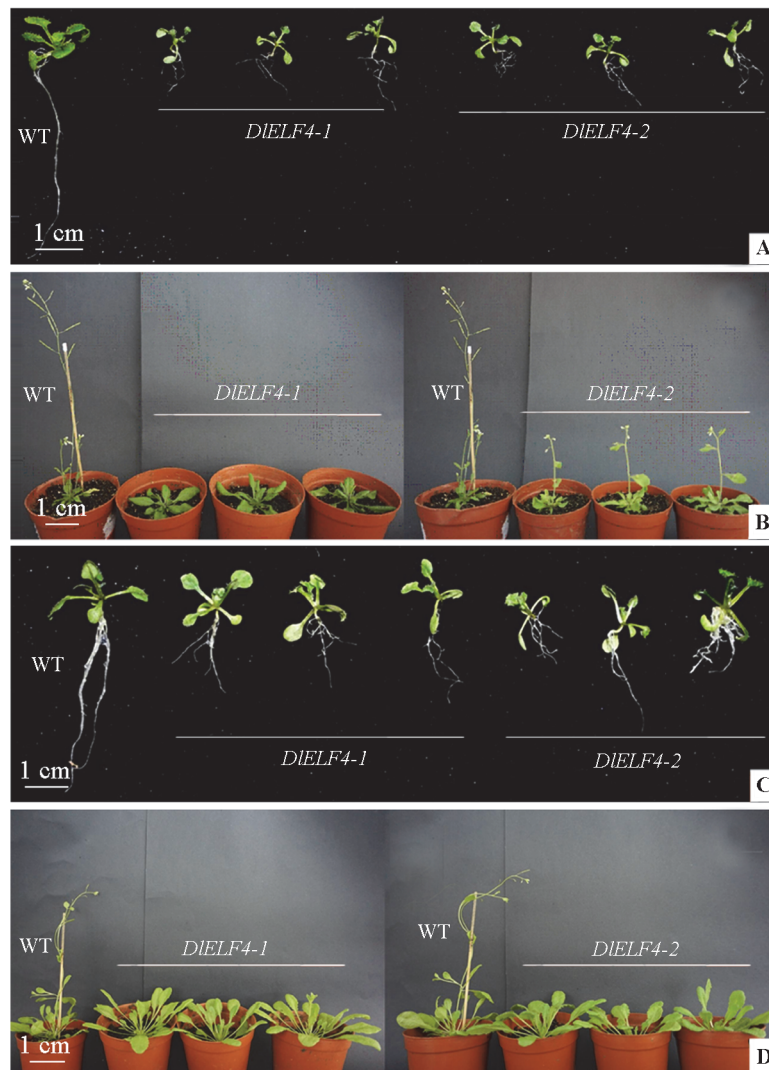


图 6 转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 拟南芥植株在长日照 (A、B) 和短日照 (C、D) 下不定根的生长和开花表型

WT: 野生型。

Fig. 6 Adventitious roots and flowering phenotypes of *DIELF4-1* and *DIELF4-2* transgenic *Arabidopsis* plants under long-day condition (A, B) and short-day condition (C, D)

WT: Wild type.

2.5 荧光定量 PCR 分析 *DIELF4* 在龙眼花芽分化过程中的表达

DIELF4-1 和 *DIELF4-2* 在龙眼花芽分化过程中的表达模式不同 (图 7)。*DIELF4-1* 从 9 月到第 2 年 3 月表达量呈逐步下降趋势, 而 *DIELF4-2* 从 9 月到第 2 年 3 月的表达量呈上升后下降趋势, 在 12 月达到最高值。

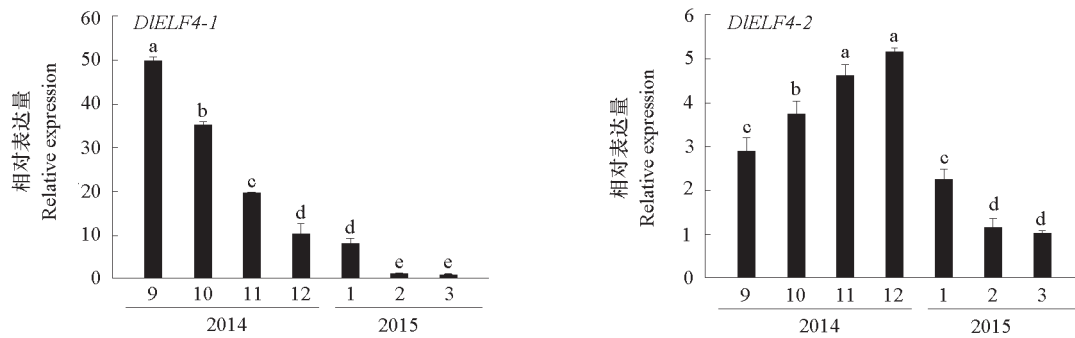


图7 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 在‘红核子’龙眼花芽分化过程中的表达
Fig. 7 Expression of ‘Red Seed’ longan *ELF4* genes during flower bud differentiation

3 讨论

本研究中得到了两个龙眼 *ELF4* 基因 cDNA 全长，并命名为 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2*。序列分析和聚类结果表明，*DIELF4-1* 和 *AtELF4* 聚在一起，而 *DIELF4-2* 和大豆、棉花的亲缘关系较近，和拟南芥 *AtELF4-L1* 也有较高相似度。两个基因都含有 *ELF4* 家族蛋白结构域 DUF1313，DUF1313 基因家族蛋白只在植物中发现，且含有一个高度保守的未知功能结构域，在植物生长发育过程中起重要作用 (Li et al., 2015)。

转基因拟南芥表型分析发现，转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 基因拟南芥均有延迟开花的现象，说明 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 与 *AtELF4* 相似，有抑制开花的功能 (Khanna et al., 2003)，转 *DIELF4-1* 植株开花时间更晚，说明 *DIELF4-1* 抑制开花的能力比 *DIELF4-2* 强。此外，转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 拟南芥均有不定根的生长。植物中的生长素可以促进不定根的形成 (Sukumar et al., 2013)，有报道在突变的拟南芥中检测到高水平的生长素导致植株长出大量的不定根 (Boerjan et al., 1995; Celenza et al., 1995)。因此，转 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 植株可能产生了较高水平的生长素。龙眼 *GI* 和 *FKF1* 在拟南芥中过量表达同样出现不定根生长的现象 (Huang et al., 2017)，说明 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 可能与 *DIGI* 以及 *DIFKF1* 一样有促进生长素合成和运输的功能。与 *DIGI* 和 *DIFKF1* 不同的是，*DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 在短日照条件下没有促进下胚轴的伸长。在春大麦中，*ELF3* 分别调控赤霉素的合成和开花基因 *FT* 的表达，抑制开花 (Boden et al., 2014)。*DIELF4* 可能也有分别调控生长素和开花基因的功能，这个推断有待进一步验证。Jia 等 (2014) 在转录组测序分析中发现，‘四季蜜’龙眼 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 基因编码区序列与普通龙眼没有区别，但是表达量显著上调。*DIELF4* 在‘四季蜜’龙眼中有可能因为调控激素（生长素）的合成而导致开花特性发生变化，这个推测有待进一步研究。

在福建省，龙眼的花芽分化生理期在 11 月至 12 月初，形态分化期在 1 到 3 月份 (王长春和柯冠武, 1992)。有研究表明，龙眼花芽生理分化阶段与内源激素的变化有关 (黄羌维, 1996)。在基因的表达分析中，*DIELF4-2* 从 9 月到 12 月表达量逐渐上升，12 月达到最高值，翌年 1—3 月表达量下降，暗示着 *DIELF4-2* 的功能可能与龙眼花芽的生理分化有关，可能通过调控激素（生长素）的合成影响花芽分化；而 *DIELF4-1* 从 9 月到第 2 年 3 月表达量呈逐步下降趋势，似乎 *DIELF4-1* 是开花过程的抑制基因。转基因拟南芥中 *DIELF4-1* 和 *DIELF4-2* 有抑制开花和促进生长素合成的功能，推测在龙眼花芽分化过程中，可能 *DIELF4-1* 主要起抑制开花的作用，而 *DIELF4-2* 主要调控生长素

的合成, 但这个推测需要进一步的验证。

References

- Bergonzi S, Albani M C, Ver Loren van Themaat E, Nordström K J, Wang R, Schneeberger K, Moerland P D, Coupland G. 2013. Mechanisms of age-dependent response to winter temperature in pe-rennial flowering of *Arabidopsis alpine*. *Science*, 340: 1094 - 1097.
- Boden S A, Weiss D, Ross J J, Davies N W, Trevaskis B, Chandler P M, Swain S M. 2014. *EARLY FLOWERING 3* regulates flowering in spring barley by mediating gibberellin production and *FLOWERING LOCUS T* expression. *Plant Cell*, 26 (4): 1557 - 1569.
- Boerjan W, Cervera M T, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Onckelen H, Montagu, Inzé D. 1995. Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell*, 7 (9): 1405 - 1419.
- Celenza J L, Grisafi P L, Fink G R. 1995. A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, 9: 2131 - 2142.
- Chang Qiang. 2006. Study on relationship between off-season floral induction in longan and nutrition of the carbon and nitrogen[M. D. Dissertation]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. (in Chinese)
- 常 强. 2006. 龙眼反季节成花诱导与碳氮营养关系的研究[硕士论文]. 福州: 福建农林大学.
- Chen W W, Qin Q P, Zheng Y P, Wang C, Wang S, Zhou M B, Zhang C, Cui Y Y. 2016. Overexpression of *Doritaenopsis* hybrid *EARLY FLOWERING 4-like4* gene, *DhEFL4*, postpones flowering in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34 (1): 103 - 117.
- Clough S J, Bent A F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16 (6): 735 - 743.
- Covington M F, Maloof J N, Straume M, Kay S A, Harmer S L. 2008. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biology*, 9 (8): 130.
- Doyle M R, Davis S J, Bastow R M, McWatters H G, Kozma-Bognár L, Nagy F, Millar A J, Amasino R M. 2002. The *ELF4* gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 419 (6902): 74 - 77.
- Guan Lei. 2008. Characterization and functional analysis of a *LEAFY* homologous gene[M. D. Dissertation]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. (in Chinese)
- 官 磊. 2008. 龙眼 *LEAFY* 基因克隆与功能研究[硕士论文]. 福州: 福建农林大学.
- Huang F N, Fu Z Y, Zeng L H, Michael M B. 2017. Isolation and characterization of *G1* and *FKF1* homologous genes in the subtropical fruit tree *Dimocarpus longan*. *Molecular Breeding*, 37 (7): 90.
- Huang Qiang-wei. 1996. The relationship between changes of endogenous hormones and flower bud differentiation with biennial fruiting in longan. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2 (2): 58 - 62. (in Chinese)
- 黄羌维. 1996. 龙眼内源激素变化和花芽分化及大小年结果的关系. *热带亚热带植物学报*, 2 (2): 58 - 62.
- Jia T Q, Wei D F, Meng S, Zeng L H. 2014. Identification of regulatory genes implicated in continuous flowering of longan (*Dimocarpus longan* L.). *PLoS ONE*, 9 (12): e114568.
- Khanna R, Kikis E A, Quail P H. 2003. *EARLY FLOWERING 4* functions in phytochrome B-regulated seedling de-etiolation. *Plant Physiology*, 133 (4): 1530 - 1538.
- Kikis E A, Khanna R, Quail P H. 2005. *ELF4* is a phytochrome regulated component of a negative feedback loop involving the central oscillator components *CCA1* and *LHY*. *The Plant Journal*, 44 (2): 300 - 313.
- Kim Y, Lim J, Yeom M, Kim H, Kim J, Wang L, Kim W Y, Somers D E, Nam H G. 2013. *ELF4* regulates *GIGANTEA* chromatin access through subnuclear sequestration. *Cell Rep*, 3 (3): 671 - 677.
- Komeda Y. 2004. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 521 - 535.
- Li J, Chen X, Xu J, Lan H, Li C, Hu Y, Lu Y. 2015. Evolution of DUF1313 family members across plant species and their association with maize photoperiod sensitivity. *Genomics*, 107: 199 - 207.
- Marcolino-Gomes J, Nakayama T J, Molinari H B C, Basso M F, Henning L M M, Fuganti-Pagliarini R, Harmon F G, Nepomuceno A L.

2017. Functional characterization of a putative *Glycine max* *ELF4* in transgenic *Arabidopsis* and its role during flowering control. *Frontiers in Plant Science*, 8 (618): 1 - 14.
- Meng Shan. 2013. Promoter cloning of *LFY* gene and transcriptome sequencing and analysis of grafting new shoots in 'Sijimi' longan [M. D. Dissertation]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. (in Chinese)
- 孟 珊. 2013. 四季蜜龙眼 *LFY* 基因启动子克隆及嫁接新梢转录组测序与分析 [硕士学位论文]. 福州: 福建农林大学.
- Mishra P, Panigrahi K C. 2015. GIGANTEA - an emerging story. *Front Plant Sci*, 6 (8): 1 - 15.
- Nusinow D, Helfer A, Hamilton E E, King J J, Imaizumi T, Schultz T F, Farre E M, Kay S A. 2011. The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*, 475 (7356): 398 - 402.
- Peng Ling-tao. 2006. Molecular mechanism of flowering time controlling photoperiod pathway in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology Communication*, 42 (6): 1021 - 1031. (in Chinese)
- 彭凌涛. 2006. 控制拟南芥和水稻开花时间光周期途径的分子机制. *植物生理学通讯*, 42 (6): 1021 - 1031.
- Qiu Hong-ye. 2016. Preliminary study on the flowering mechanism of longan cv. Sijimi flowering in summer regulated with growth regulators [M. D. Dissertation]. Nanning: Guangxi University. (in Chinese)
- 邱宏业. 2016. 生长调节剂调控四季蜜龙眼夏季成花机理的初步研究 [硕士学位论文]. 南宁: 广西大学.
- Sawa M, Kay S A. 2011. *GIGANTEA* directly activates *Flowering Locus T* in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (28): 11698 - 11703.
- Shim J S, Kubota A, Imaizumi T. 2017. Circadian clock and photoperiodic flowering in *Arabidopsis*: CONSTANS is a hub for signal integration. *Plant Physiol*, 173 (1): 5 - 15.
- Sukumar P, Maloney G S, Muday G K. 2013. Localized induction of the ATP-Binding cassette B19 auxin transporter enhances adventitious root formation in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 162: 1392 - 1405.
- Wang Chang-chun, Ke Guan-wu. 1992. Research on flower buds morphological differentiation. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 7 (1): 55 - 58. (in Chinese)
- 王长春, 柯冠武. 1992. 龙眼花芽形态分化的研究. *福建省农科院学报*, 7 (1): 55 - 58.
- Winterhagen P, Tiyyayon P, Samach A, Hegele M, Wünsche J N. 2013. Isolation and characterization of *FLOWERING LOCUS T* subforms and *APETALA1* of the subtropical fruit tree *Dimocarpus longan*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 71: 184 - 5190.
- Zhou Qin, Zhang Si-si, Bao Man-zhu, Liu Guo-feng. 2017. Advances on molecular mechanism of floral initiation in higher plants. *Molecular Plant Breeding*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20171107.1719.004.html>. (in Chinese)
- 周 琴, 张思思, 包满珠, 刘国锋. 2017. 高等植物成花诱导的分子机理研究进展. *分子植物育种*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20171107.1719.004.html>