

龙眼 *DCL* 家族基因的启动子分析及时空表达

陈晓慧, 白玉, 李汉生, 陈旭, 林玉玲, 赖钟雄*

(福建农林大学 园艺植物生物工程研究所, 福州 350002)

摘要: 为了解龙眼 *DCL* 基因的功能, 该试验对龙眼基因组数据提取的 *DiDCL1*、*DiDCL2*、*DiDCL3* 和 *DiDCL4* 基因序列进行启动子顺式作用元件及其受 miRNA 调控的分析; 并以龙眼胚性愈伤组织为材料, 研究了 *DiDCLs* 不同基因成员在非生物胁迫和外源激素处理下的表达情况。结果显示: (1) 龙眼 *DCL* 基因启动子中除了 TATA 和 CAAT 外, 还具有大量的光反应元件、激素应答元件、胁迫响应元件、组织特异性调控元件及植物生长发育相关的顺式调控元件, 提示龙眼 *DCL* 基因启动子转录活性可能受到光、激素信号及逆境胁迫因素的诱导。(2) 对调控龙眼 *DCL* 基因的 miRNA 进行筛选, 结果显示 *DiDCL1* 受 miR162 和 miR1024 调控, *DiDCL4* 受 miR390 和 miR396 调控。(3) 实时荧光定量 PCR 显示, 在一定浓度范围内, 外源激素 GA_3 、ABA 和 ETH 均能下调 *DiDCLs* 基因的表达, 而高浓度 ETH 处理则显著上调 *DiDCLs* 的表达。(4) 高浓度蔗糖 (6%) 处理时 *DiDCL2*、*DiDCL3* 和 *DiDCL4* 显著上调表达, 而低浓度 (0.1%) 处理时 *DiDCL1* 显著上调表达; 不同温度处理下, *DiDCL1* 在 34 °C 时显著上升, *DiDCL3* 随着温度的提高相对表达量逐渐减低; 而 *DiDCL2* 和 *DiDCL4* 表达量差异不明显; NaCl 胁迫处理下, *DiDCLs* 在 1 h 处理时表达量下调, 但在其他不同时间点则上调表达。研究表明, 龙眼 *DCL* 基因在外源激素及非生物胁迫处理下, 并非是简单的一对一响应, 而是存在较为复杂的响应机制。

关键词: 龙眼; *DCL* 基因; 启动子; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: Q786; Q789; S667.2

文献标志码: A

Promoter Analysis and Spatial and Temporal Expression of the *DCL* Family Genes in *Dimocarpus longan* Lour.

CHEN Xiaohui, BAI Yu, LI Hansheng, CHEN Xu, LIN Yuling, LAI Zhongxiong*

(Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: In order to investigate the functions of *DCL* genes in *Dimocarpus longan*, we isolated gene sequences of *DiDCL1*, *DiDCL2*, *DiDCL3* and *DiDCL4* from *D. longan* genome data. Analysis of *cis*-acting elements and regulation of miRNA were performed on the *DiDCLs* family members. Expression of *DiDCLs* were analyzed in embryogenic callus (EC) under abiotic stress and exogenous hormone treatment in *D. longan*. The results showed that: (1) the promoters of *D. longan DCL* genes not only included the *cis*-acting elements of TATA and CAAT box, but also had a large number of light response elements, hormone response elements, stress response elements, tissue specific regulatory elements and other *cis*-elements for plant growth and development. These results suggested that the transcriptional activity of the

收稿日期: 2017-06-29; 修改稿收到日期: 2017-09-16

基金项目: 国家自然科学基金 (31572088, 31672127); 福建省新世纪人才项目 (20151104); 福建省重大专项 (2015NZ0002-1); 福建省自然科学基金杰出青年项目 (2015J06004); 福建农林大学“杰出青年科研人才”培养专项基金 (xjq201405)

作者简介: 陈晓慧 (1991—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事果树生物技术研究。E-mail: 172883157@qq.com

* 通信作者: 赖钟雄, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事园艺植物生物技术研究。E-mail: laizx01@163.com

promoters of *D. longan DCL* gene might be induced by the signals of light, phytohormones and abiotic stresses. (2) The miRNAs were screened for their effect in regulating *D. longan DCL* genes, and the results showed that *DiDCL1* was regulated by miR162 and miR1024, while *DiDCL4* was regulated by miR390 and miR396. (3) The expression of *DiDCLs* was analyzed by real-time quantitative PCR. It was found that after GA₃, ABA and ETH treatments, *DiDCLs* gene were down-regulated. However, they were dramatically up-regulated under high concentration of ETH treatment. (4) *DiDCL2*, *DiDCL3* and *DiDCL4* were up-regulated when they were treated with high concentration of sucrose (6%), in the exception of *DiDCL1*, which was significantly increased at 0.1% sucrose concentration. During heat treatment, *DiDCL1* was significantly up-regulated at 34 °C, while the *DiDCL3* gradually decreased with rising temperature. The expression level of *DiDCL2* and *DiDCL4* exhibited slight variations. NaCl treatment induced the response of *DiDCLs* at different time intervals, however, inhibited the expression of *DiDCLs* at 1 h. The expression patterns of *D. longan DCL* genes response to hormones and abiotic stresses suggested that *DiDCLs* gene were not of a simple one to one correspondence but rather a complex response mechanism.

Key words: *Dimocarpus longan*; *DCL* gene; promoter; real-time quantitative PCR

小 RNA (microRNA, miRNA/siRNA) 为长度 20~24 nt 的核苷酸,它在植物中有许多功能,特别是在维持基因组稳定性、基因表达调控以及生物胁迫和非生物胁迫响应等方面发挥着重要作用^[1-2]。植物 miRNA 是一类重要的内源性小 RNA,已成为植物发育、逆境应答和养分平衡等的重要转录后调控因子^[3-4]。miRNA 是由 Dicer-like (DCL) 切割具有茎环结构的 miRNA 前体 (precursor miRNA, pre-miRNA) 形成的^[3]。而小分子干扰 RNA (siRNA),则是通过 DCL 切割长双链 RNA 前体 (long double-stranded RNA precursors) 产生^[5],并作用于基因调控、病毒防御和转座子活性等方面^[6-7]。

Dicer 或 DCL 蛋白是典型的多域核糖核酸酶,是 RNase III 家族成员之一,在 RNA 沉默途径中起重要作用^[8]。首先,在 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 的启动过程中 Dicer 切割 dsRNA,形成 21~24 nt 的双链 siRNA,随后 siRNA 与解旋酶及其它因子结合,形成 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC),并作用于转录后基因沉默^[9-10]。在线虫、果蝇和人的细胞核里,miRNA 首先由 Drosha 和 Pasha 加工,而后被转运到细胞质中,并在 Dicer 酶的作用下形成成熟的 miRNA^[11-12]。在植物中,miRNA 的加工则在细胞核中由 DCL 切割形成^[13-14]。Dicer 或 DCL 蛋白的结构域是高度保守的,其结构通常为 N 端是 1 个 DEAD/helicase-C 结构域,随后是 1 个 PAZ 结构域,在 C 末端是 2 个 RNase III 结构域和 1 个 dsRBD 结合结构域^[15]。然而,在不同的生物体中 DCL 蛋白数量是变化的。很多动物都只有 1 种 Dicer,昆虫

和真菌有 2 种 Dicer,然而植物中至少存在 4 种 DCL。例如,在拟南芥中有 4 种不同类型的 DCL (DCL1-4)^[16],DCL1 负责大部分 miRNA 的产生,DCL 2、DCL 3 和 DCL 4 则分别负责 22、24 和 21nt 的 siRNA^[17]。另外,拟南芥基因组还编码 6 种不同 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 和 10 种成员的 AGO (Argonaute) 蛋白,这些小 RNA 合成相关的蛋白因子与 DCL 通过各种排列组合完成了复杂多样的小 RNA 介导的基因沉默现象^[18]。

龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 是无患子科 (Sapindaceae) 常绿木本果树,是中国亚热带名贵特产,历史上有南方“桂圆”北“人参”之称。但其在生长发育过程中,易受到低温、干旱、盐害等环境胁迫的影响,导致生长发育受阻或影响果实品质和产量,甚至全株死亡的现象。龙眼体胚 (胚胎) 发育内在的分子和基因调控机制的研究发现,miRNA 在龙眼体胚发生中具有重要作用,并且龙眼体胚中小 RNA 的长度以 20~24 nt 为主^[19-20],而小 RNA 的产生需要 DCL 酶的切割,这意味着 DCL 在龙眼体胚中同样起着调控作用。然而,关于龙眼 *DCL* 基因启动子的分析以及表达调控方面的研究还较少。近期,随着龙眼基因组数据库的公布^[21],为龙眼 *DCL* 的进一步研究提供了良好平台。因此,本研究以龙眼基因组数据中获得的 *DCL* 基因为参考,对其不同家族成员启动子序列的顺式元件种类和数量进行分析,初步探索龙眼 *DCL* 基因启动子在龙眼体胚中可能具有的调控作用。另外,从龙眼胚性愈伤组织转录组数据库中获得龙眼 *DCL* 基因 cDNA

序列^[22],并对调控不同成员 *DCL* 基因的 miRNA 进行筛选,以期为后续研究龙眼 *DCL* 基因在 miRNA 加工合成途径及分子调控机制提供线索;同时结合 qPCR 分析的方法,研究它们在应答非生物胁迫和外源激素处理下的响应机制等,旨在为进一步研究龙眼 *DCL* 基因家族成员表达调控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以福建农林大学园艺植物生物工程研究所诱导并继代培养的龙眼 LC2 胚性愈伤组织(EC)为材料,对其进行不同激素及不同非生物胁迫处理。选取松散、浅黄且颗粒较细的龙眼愈伤组织约 0.5 g 分别添加于不同浓度激素和不同浓度蔗糖的 MS 液体培养基(50 mL)中,其中赤霉素(gibberellin A3, GA₃)和脱落酸(abscisic acid, ABA)浓度均分别为 0、3、6、9 和 12 mg/L,乙烯(ethylene, ETH)浓度为 0、10、30、50、100 mg/L。蔗糖浓度为 0%、0.1%、0.5%、1%、2%、4%和 6%,并将它们放置于 25 ℃、110 r/min 摇床中,黑暗培养 24 h。温度处理为将 EC 置于 32、34、36 和 40 ℃下进行黑暗培养 24 h,对照为 25 ℃。盐胁迫处理为:将 EC 置于 NaCl 浓度为 150 mmol/L MS 液体培养基中摇床震荡培养 0、1、2、4、8、12、16 和 24 h。上述处理均重复 3 次,最后分别收集上述处理的材料,经液氮速冻后,保存于-80 ℃冰箱中,用于后续 RNA 提取和 *DlDCLs* 基因的实时荧光定量 PCR 分析。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成 不同处理的龙眼愈伤组织总 RNA 采用 TriPure 试剂盒(Invitrogen)进行提取;qPCR 所需 cDNA 合成采用 PrimerScript RT Reagent Kit(Takara)进行,具体步骤参照试剂使用说明书。

1.2.2 龙眼 *DCL* 基因家族不同成员启动子序列的获得和分析 从龙眼基因组数据库中获得 *DCL* 基因序列(*DlDCL1*、*DlDCL2*、*DlDCL3* 和 *DlDCL4*),并取起始密码子 ATG 上游序列(5'端侧翼序列)作为 *DlDCLs* 基因的预测启动子,它们的长度分别为 2 947、2 687、2 702 和 2 829 bp。利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析它们 5'端侧翼序列区域启动子顺式元件的种类和数量。

1.2.3 调控龙眼 *DCL* 基因的 miRNA 预测 从龙眼转录组 Unigene 序列筛选获得 *DlDCL1*、*DlDCL2*、*DlDCL3* 和 *DlDCL4* cDNA 序列^[22],采用在线分析软件 psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/?function=3>)对调控 *DlDCLs* 基因的 miRNA 进行预测,运行程序时设定最大期望值为 5,其他参数为默认值。

1.2.4 龙眼 *DCL* 基因 qPCR 引物设计和分析 参考本实验室 Lin 等的方法^[23],分别以龙眼 *EIF4 α* 、*EF-1 α* 和 *FSD* 为内参基因。根据 qRT-PCR 引物设计原则,采用 DNAMAN6 软件设计 *DlDCLs* 基因的荧光定量引物(表 1)。qRT-PCR 反应体系为:10 μ L SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)、上下游特异性引物各 0.8 μ L、不同处理样品的 cDNA 1.0 μ L,并补足 ddH₂O 至 20 μ L。实验反应程序为:94 ℃预变性 30 s;94 ℃变性 5 s;退火时间 30 s;72 ℃延伸 10 s;循环数 40 个,4 个基因的具体退火温度见表 1。使用 Excel 和 GraphPad Prism 6 进行数据分析和图表制作。

2 结果与分析

2.1 龙眼 *DCL* 基因家族启动子分析

从龙眼基因组数据提取了 *DlDCL1*、*DlDCL2*、*DlDCL3* 和 *DlDCL4* 基因的 5'端侧翼序列(起始密

表 1 *DlDCLs* qPCR 引物序列及相关信息
Table 1 qPCR primers of *DlDCLs* in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	退火温度 Annealing temperatures/℃	产物大小 Product size/bp
<i>DlDCL1</i> -qFor <i>DlDCL1</i> -qRev	GTCACTCCAGAACTCTCCCATG AGCAACTCCTACCTGAACACCATC	61	150
<i>DlDCL2</i> -qFor <i>DlDCL2</i> -qRev	CATCTTCCTCTACACACTCTGGA GGGTCACTCTCTGTCACTCTACA	60	128
<i>DlDCL3</i> -qFor <i>DlDCL3</i> -qRev	TGCTGAAGGTCTTTGAAGTCG GATGAACAAGGTGGACGGAC	61	172
<i>DlDCL4</i> -qFor <i>DlDCL4</i> -qRev	CAAGAAAGCGGTGGAGGAGAAC CTGATGAACGAGAGCAACTGTAGG	60	160

码子 ATG 上游序列),它们的长度分别为 2 947、2 687、2 702 和 2 829 bp。对获得到的 *DiDCLs* 启动子序列两两进行序列比对,发现 *DiDCL1* 和 *DiDCL3* 序列具有较高一致性,它们有一段 1 676 bp 序列完全匹配,说明 *DiDCL1* 和 *DiDCL3* 在功能上的作用可能较为接近。而其他成员之间的一致性较低,说明它们的进化水平可能存在差异。为进一步了解龙眼 *DCL* 基因的功能,对 *DiDCLs* 启动子顺式元件进行分析,结果表明 *DiDCLs* 基因启动子中除了 TATA 和 CAAT 外,还具有大量的光反应元件、激素应答元件、胁迫响应元件、组织特异性调控元件及植物生长发育相关的顺式调控元件。对具有相同或类似功能的不同顺式元件及其位点数进行分类和统计,结果如图 1。

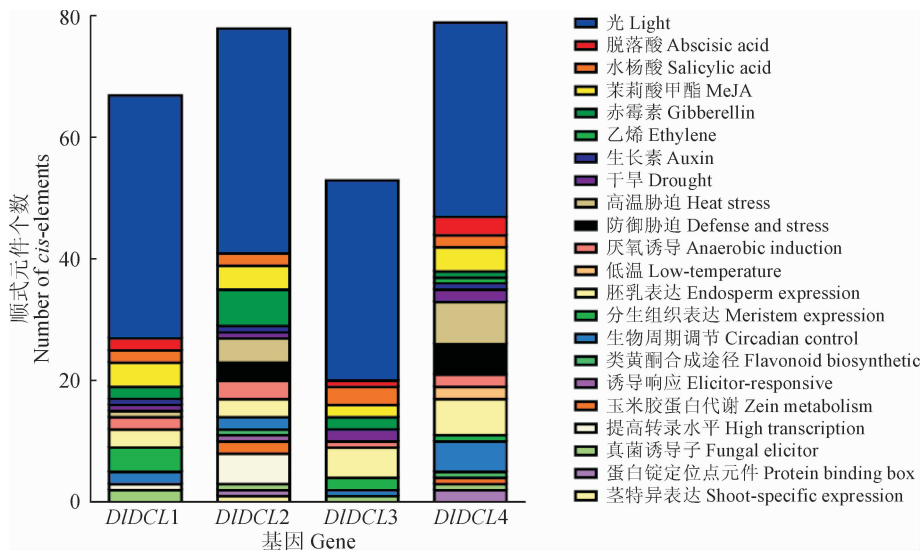
DiDCLs 基因启动子序列中的光反应元件,总共有 25 种类型,并且不同成员所含的光反应元件种类和数量各不相同。其中, *DiDCL1*、*DiDCL2*、*DiDCL3* 和 *DiDCL4* 基因 5'调控序列光反应元件个数分别为 40、37、33 和 32 个。*DiDCLs* 不同成员所含的光反应元件种类和数量各不相同,反映了 *DiDCLs* 基因对光的响应程度可能不同。

同时, *DiDCLs* 基因启动子序列也预测到了多个激素响应元件,其中 *DiDCL1* 含有水杨酸、脱落酸、茉莉酸甲酯、赤霉素和生长素等顺式作用元件; *DiDCL2* 含有水杨酸、茉莉酸甲酯、赤霉素和生长素等顺式作用元件; *DiDCL3* 含有水杨酸、脱落酸、茉

莉酸甲酯和赤霉素等顺式作用元件; *DiDCL4* 含有水杨酸、脱落酸、茉莉酸甲酯、赤霉素、生长素和乙烯等顺式作用元件。从以上结果可以发现 *DiDCLs* 基因启动子序列均含有水杨酸、茉莉酸甲酯和赤霉素等顺式作用元件,并且茉莉酸甲酯和赤霉素的位点最多。而 *DiDCL2* 和 *DiDCL4* 分别缺少响应脱落酸应答的 ABRE 元件和生长素响应的 TGA 元件,仅 *DiDCL4* 含参与乙烯响应的 ERE 元件。以上结果表明, *DiDCLs* 基因的表达调控可能受多种激素的调控,并且不同成员之间可能具有相互补充和促进的作用。

此外,对龙眼 *DiDCLs* 家族不同成员基因上游调控序列中所含的逆境响应元件进行分析,发现龙眼 *DiDCLs* 家族不同基因启动子序列中所含的逆境响应元件共有 6 种类型,分别为厌氧诱导响应元件 ARE、高温胁迫相关的应答元件 HSE、干旱相关的应答元件 MBS、真菌诱导子响应相关的元件 Box-W1、防御和胁迫相关的应答元件 TC-rich repeats 以及低温胁迫相关的应答元件 LTR 等。其中, *DiDCL4* 基因的启动子序列所含的逆境响应元件种类和数量最多;其次是 *DiDCL2* 和 *DiDCL1*,分别含有 5 种和 4 种类型的逆境响应元件; *DiDCL3* 基因最少,种类和数量分别为 3 个和 4 个。多种逆境响应元件的存在反映了 *DiDCLs* 可能参与多种逆境胁迫。

除上述作用元件外,龙眼 *DiDCLs* 家族不同成员



具有相同或相似功能的不同顺式作用元件用同一颜色显示

图 1 龙眼 *DiDCLs* 启动子顺式作用元件分析

Different *cis*-elements with the same or similar functions are shown in the same color

Fig. 1 *Cis*-element analysis of *DiDCLs* promoters

基因上游调控序列中还含有许多与植物生长相关的作用元件,例如分生组织表达相关的调控元件 CAT-box、生物钟周期调节元件 circadian、激活最大诱导调控元件 AT-rich sequence、参与胚乳表达的 GCN4_motif 和 Skn-1_motif、提高转录水平功能的作用元件 5UTR Py-rich stretch、玉米胶蛋白代谢调控相关元件 O2-site、蛋白锭定位点 Box III、诱发子应答元件 EIRE、参与茎特异表达元件 as-2-box 以及与类黄酮类合成途径相关的调控元件 MBSI 和 MBSII 等。

以上的结果表明龙眼 *DCL* 基因在植物中生长发育以及响应激素刺激等过程中可能存在多样的调控方式。

2.2 调控龙眼 *DCL* 基因家族 miRNA 预测与分析

以本实验室构建的龙眼体胚发生过程的 miRNA 文库为数据库^[19],以龙眼 *DCL* 基因家族不同成员为靶基因预测的候选序列,利用 psRNA Target 在线软件对调控龙眼 *DCL* 基因不同成员的 miRNA 进行预测。结果(表 2)显示,*DiDCL1* 受到 miR162 和 miR1024 的调控,*DiDCL4* 受到 miR390 和 miR396 的调控。而 *DiDCL2* 和 *DiDCL3* 并未预测受到 miRNA 调控。在拟南芥中发现 miR162 存在与 *DCL1* mRNA 互补的序列,其可以通过负反馈调控 *DCL1* 基因的表达^[16],*DCL4* 是 miR822 和 miR839 的形成所必需的^[24]。在大豆和苜蓿 *DCL2* mRNA 中含 22 nt miR1515 和 miR1507 靶向位点,从而可以引发 21 nt siRNA 的产生^[25-26]。可见,miRNA 与 *DCL* 基因之间存在着复杂的网络调控系统。对调控 *DiDCLs* 不同成员基因的 miRNA 进

行预测,有助于为后续研究龙眼 *DCL* 基因在 miRNA 加工合成途径及其相互调控关系提供线索。

2.3 *DiDCLs* 在不同激素和非生物胁迫处理下表达模式分析

2.3.1 不同激素处理下 *DiDCLs* 的表达模式分析

不同浓度 GA₃、ABA 和 ETH 处理下龙眼 EC 中 *DiDCLs* 基因的表达结果如图 2 所示。在 GA₃ 处理下,*DiDCL2*、*DiDCL3* 和 *DiDCL4* 整体转录水平变化趋势基本一致,均先下降后上升,在浓度为 3 mg/L 处理时转录表达量最低;*DiDCL1* 则呈现了不同的表达模式,在 3 mg/L 处理时转录表达量最低,6 mg/L 处理时表达量有所上升,随着浓度进一步升高,其表达量又降低(图 2,A)。在脱落酸处理下,龙眼 EC 中 *DiDCLs* 基因的表达呈现明显下调趋势,提示脱落酸对 *DiDCLs* 可能具有负调控作用(图 2,B)。乙烯处理下,*DiDCLs* 基因的表达呈“U”型模式,在低浓度处理时(10、30 和 50 mg/L),其表达明显受到抑制;而高浓度(100 mg/L)时,表达量又显著上升,提示 *DiDCLs* 基因能够响应高浓度 ETH 处理(图 2,C)。

2.3.2 非生物胁迫处理下 *DiDCLs* 的表达模式分析

不同浓度蔗糖、温度及盐胁迫处理下 *DiDCLs* 基因的相对表达差异结果如图 3 所示。在蔗糖处理下,*DiDCL2*、*DiDCL3* 和 *DiDCL4* 的表达模式基本一致,随着浓度的提高,呈先升后降再上升,并在 6%处理时表达量最高;*DiDCL1* 则在 0.1%蔗糖浓度处理时表达量明显上升,随着浓度提高其表达量一直保持着较低水平。提示 *DiDCLs* 能够响应蔗糖的诱导(图 3,A)。不同温度处理下,*DiDCL1* 在

表 2 调控龙眼 *DCL* 基因的 miRNA 预测
Table 2 Prediction of regulation miRNA of *D. longan* *DCL* family

名称 Name	靶 miRNA 编号 miRNA Acc	期望 Expect	比对 Alignment			抑制 Inhibition
<i>DiDCL1</i>	miR162	3.0	miRNA	21	GACCUACGUCUCCA-AAUAGCU 1	cleavage
			Target	3682	CUGGAUGCAGAGGUGUUAUCGA 3703	
	miR1024	4.5	miRNA	19	AUCGGAUUAUAGGUUGGUCU 1	cleavage
			Target	4919	AAUCAUAUAUCCAAGCAGA 4937	
<i>DiDCL4</i>	miR390	4.5	miRNA	21	CCGCGAUAGGGAGGACUCGAA 1	cleavage
			Target	3195	UAUGAUUUGCCUCCUGAGCUU 3215	
	miR396	4.5	miRNA	21	GUCAAGUUCUUUCGACACCUU 1	cleavage
			Target	471	CUAUGCAAGAAAGCGGUGGAG 491	

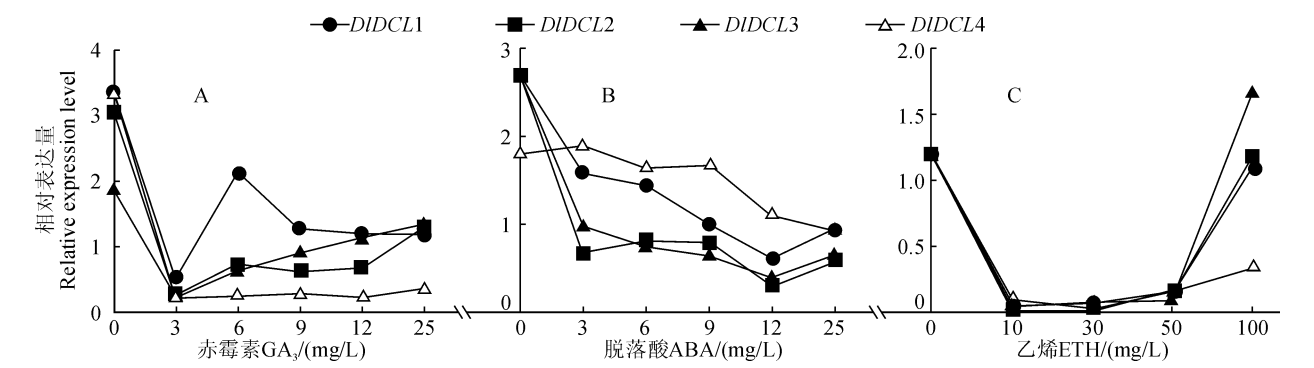


图 2 赤霉素(A)、脱落酸(B)和乙烯(C)处理对 *DiDCLs* 基因表达的影响
Fig. 2 Effect of GA₃ (A), ABA(B) and ETH(C) treatments on relative expression patterns of *DiDCLs*

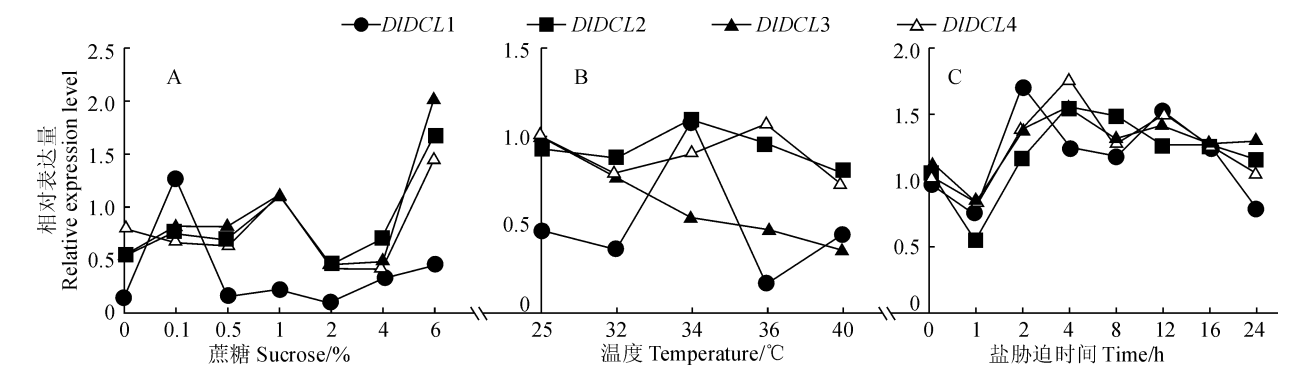


图 3 蔗糖(A)、温度(B)和盐(C)处理对 *DiDCLs* 表达模式的影响
Fig. 3 Effect of sugar(A), temperature(B) and salt(C) on relative expression patterns of *DiDCLs*

34 ℃ 时表达量最高,在 36 ℃ 时表达量最低;*DiDCL3* 随着温度的提高相对表达量逐渐降低;*DiDCL2* 和 *DiDCL4* 在温度处理下的相对表达量变化并不显著,提示 *DiDCLs* 在温度处理下的应答机制可能不尽相同(图 3,B)。NaCl 处理下,*DiDCLs* 不同基因成员整体转录水平变化趋势较为一致,均以 NaCl 1 h 处理转录表达量最低,不同的是 *DiDCL1* 在 2 h 处理时转录表达量最高,而 *DiDCL2*、*DiDCL3* 和 *DiDCL4* 在 4 h 处理时才出现最高转录表达量,提示随着盐胁迫处理时间延长, *DiDCLs* 基因的表达受到促进(图 3,C)。

3 讨 论

3.1 龙眼 *DCL* 基因家族启动子特性分析

启动子是位于翻译起始位点上游的序列,它可以特异性结合 RNA 聚合酶和识别 DNA 序列,是直接调控基因转录表达的重要区域,对其进行顺式作用元件分析,有助于为理解基因表达调控机制提供信息。已有研究表明,水稻、拟南芥和葡萄 *DCL* 基因启动子上游 1 000 bp 中,Sp1 是水稻 *DCL* 基因中最为丰富的光反应元件,GT1 也是重复位点数较多

的光反应元件;同样在拟南芥和葡萄的启动子区域中也存在 Sp1 和 GT1 光反应元件^[27]。同时,在它们的启动子区域中还发现 ABRE、GARE、P-box、TCA、CGTCA 和 TGACG 等元件,表明植物 *DCL* 基因可能响应脱落酸、赤霉素、水杨酸、茉莉酸甲酯等信号转导通路^[27]。在本研究中, *DiDCLs* 基因启动子序列以 Sp1、G-Box、Box 4 和 G-Box 元件最为丰富。至于激素响应元件,龙眼 *DCL* 基因除了上述含有的作用元件 ABRE、GARE、P-box、TCA、CGTCA 和 TGACG 外,还含有 TGA-element 和 ERE 元件,提示龙眼 *DCL* 基因还响应生长素和乙烯的调控。这些证据说明不同物种间 *DCL* 基因的启动子既具有一定的保守性,同时又有功能差异性。

除了具有光响应、激素应答等调控元件外,水稻、拟南芥和葡萄 *DCL* 基因还存在厌氧、防御与逆境等调控元件,如 GC motif、HSE、LTR、和 TC-rich^[27]。虽然龙眼 *DCL* 基因启动子序列不存在 GC motif 元件,但取而代之的是 ARE,并且这两个作用元件功能相同,说明不同物种的 *DCL* 基因启动子序列可能不具有保守性,但是它们可以通过拥有不同类型的元件维持相同或相似的功能。对 *DiDCLs*

基因家族不同成员的启动子顺式元件分析,还发现具有许多与植物生长相关的作用元件,如生物钟周期调节元件 circadian 和参与胚乳表达的 Skn-1_{motif} 元件。这些应答元件类型齐全、数量充足的分散在龙眼 *DiDCLs* 家族不同基因上游调控序列中,说明 *DiDCLs* 可能参与龙眼胚胎发生过程中的多种代谢活动,并且各成员之间具有功能的协同和分工。

3.2 龙眼 *DCL* 基因可能响应多种激素和非生物胁迫的应答

植物激素在植物生长发育过程中起着重要的作用,在离体培养条件下,施加外源激素可以影响基因活动,调控植物愈伤组织的维持和表达^[28-29]。然而,关于激素与 *DCL* 基因表达之间关系的报道还较少。在本试验中,对不同浓度 GA₃、ABA 和 ETH 处理下的 *DiDCLs* 定量表达进行分析,发现 *DiDCLs* 对上述激素处理均有响应且表达模式不尽相同。其中,GA₃ 在低浓度范围时 *DiDCLs* 相对表达量下降,浓度提高时表达量有所上调,但是总体而言 GA₃ 对 *DiDCLs* 具有下调表达,表明 *DiDCLs* 的表达可能受到 GA₃ 浓度调控。在玉米的研究中发现,ABA 处理幼苗 24 h 后,*ZmDCL1* 下调表达^[30]与上述 *DiDCLs* 在 ABA 处理下表达量下调一致,提示 ABA 对 *DiDCLs* 的表达量有显著负调控作用。虽然响应 ETH 的作用元件 ERE 只在 *DiDCL4* 中存

在,但是 *DiDCLs* 4 个成员均受到 ETH 的诱导,推测 ETH 可能是通过某些调控因子间接作用于其信号转导途径。综上所述,*DiDCLs* 基因对不同激素处理的响应效果各不相同,且不同成员之间也存在调控差异,推测 *DiDCLs* 基因可能具有复杂的激素响应机制。

蔗糖一直被认为是植物组织培养中最有效的碳源,其浓度对龙眼体胚发生的数量和质量有极大的影响,低浓度蔗糖可以提高体胚发生的数量,还可以减少畸形胚的形成,维持体胚形态^[29]。而本试验表明,高浓度蔗糖胁迫处理下,*DiDCL2*、*DiDCL3* 和 *DiDCL4* 的表达量显著升高,提示龙眼 *DCL* 基因对愈伤组织和产生体细胞胚有着重要意义。已有大量研究表明,植物 *DCL* 基因的表达受到环境因子的诱导或抑制,但同一物种不同 *DCL* 成员的表达模式存在差异,且不同物种同种类型的 *DCL* 基因表达模式也不同^[27]。本研究表明,*DiDCLs* 基因在高温、盐胁迫处理下的表达具有特异性,且同一种非生物胁迫下不同 *DiDCLs* 基因的响应表达情况也存在差异;甚至对同一种非生物胁迫随着胁迫时间和强度的不同,*DiDCLs* 基因也有不同的变化趋势来响应胁迫应答。*DiDCLs* 基因对不同胁迫的响应表达模式与 *DiDCLs* 基因启动子区存在多个胁迫响应元件相对应,进一步体现了 *DiDCLs* 在应对非生物胁迫时具有专门和完善的调控机制。

参考文献:

[1] AXTELL M J. Classification and comparison of small RNAs from plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, **64** (1): 137-159.

[2] LLAVE C. MicroRNAs: more than a role in plant development? [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2004, **5** (4): 361-366.

[3] JONES-RHOADES M W, BARTEL D P, BARTEL B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, **57**(1): 19-53.

[4] SUNKAR R, LI Y F, JAGADEESWARAN G. Functions of microRNAs in plant stress responses[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, **17**(4): 196-203.

[5] REINHART B J, WEINSTEIN E G, RHOADES M W, et al. MicroRNAs in plants[J]. *Genes and Development*, 2002, **16**(13): 1 616-1 626.

[6] GHILDIYAL M, ZAMORE P D. Small silencing RNAs: an

expanding universe[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, **10** (2): 94-108.

[7] MALONE C D, HANNON G J. Small RNAs as guardians of the genome[J]. *Cell*, 2009, **136**(4): 656-668.

[8] TIJSTERMAN M, PLASTERK R H. Dicers at RISC: the mechanism of RNAi[J]. *Cell*, 2004, **117**(1): 1-3.

[9] HANNON G J. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, **418** (6 894): 244-251.

[10] TOMARI Y, DU T, HALEY B, et al. RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage[J]. *Cell*, 2004, **116**(6): 831-841.

[11] LEE Y S, NAKAHARA K, PHAM J W, et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways[J]. *Cell*, 2004, **117**(1): 69-81.

[12] DENLI A M, TOPS B B, PLASTERK R H, et al. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex [J]. *Nature*, 2004, **432**(7 014): 231-235.

[13] KURIHARA Y, WATANABE Y. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004,**101**(34): 12 753-12 758.

[14] PARK M Y, WU G, GONZALEZ-SULSER A, *et al.* Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005,**102**(10): 3 691-3 696.

[15] MACRAE I J, ZHOU K, LI F, *et al.* Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer [J]. *Science*, 2006,**311**(5 758): 195-198.

[16] XIE Z, JOHANSEN L K, GUSTAFSON A M, *et al.* Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants[J]. *Plos Biology*, 2004,**2**(2): E104.

[17] TWORAK A, URBANOWICZ A, PODKOWINSKI J, *et al.* Animal dicer and plant dicer-like proteins[J]. *Biotechnology*, 2013,**1**(1): 22-26.

[18] VAZQUEZ F, LEGRAND S, WINDELS D. The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs[J]. *Trends in Plant Science*, 2010,**15**(6): 337-345.

[19] LIN Y, LAI Z. Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. *PloS One*, 2013,**8**(4): e60337.

[20] LIN Y, LAI Z, LIN L, *et al.* Endogenous target mimics, microRNA167, and its targets ARF6 and ARF8 during somatic embryo development in *Dimocarpus longan* Lour[J]. *Molecular Breeding*, 2015,**35**(12):227.

[21] LIN Y, MIN J, LAI R, *et al.* Genome-wide sequencing of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) provides insights into molecular basis of its polyphenol-rich characteristics [J]. *Gigascience*, 2017,**6**(5):1-14.

[22] LAI Z, LIN Y. Analysis of the global transcriptome of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) embryogenic callus using Illumina paired-end sequencing[J]. *BMC Genomics*, 2013,**14**(1): 561.

[23] LIN Y L, LAI Z X. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree[J]. *Plant Science*, 2010,**178**(4): 359-365.

[24] GASCIOLLI V, MALLORY A C, BARTEL D P, *et al.* Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs [J]. *Current Biology*, 2005,**15**(16): 1 494-1 500.

[25] LI H, DENG Y, WU T, *et al.* Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation [J]. *Plant Physiology*, 2010,**153**(4):1 759-1 770.

[26] ZHAI J, JEONG D H, DE P E, *et al.* MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs[J]. *Genes & Development*, 2011,**25**(23): 2 540-2 553.

[27] LIU Q, YING F, ZHU Z. Dicer-like (DCL) proteins in plants[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2009,**9**(3): 277-286.

[28] 林鸿宣. 植物激素领域最新力作——《植物激素作用的分子机理》[J]. 植物生理学报, 2013,**49**(2): 598-599.

LIN H X. Plant hormones function and molecular mechanism [J]. *Plant Physiology Journal Plant Physiology Journal*, 2013,**49**(2): 598-599.

[29] 赖钟雄. 龙眼生物技术研究[M]. 福州:福建科学技术出版社, 2003:18-26.

[30] 徐东东, 赵永平, 王建华,等. 玉米 DCL1 基因鉴定及其自然等位变异分析[J]. 玉米科学, 2015,**23**(1):17-25.

XU D D, ZAHO Y P, WANG J H, *et al.* Identification of maize DCL1 gene and analysis of its natural alleles[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2015,**23**(1):17-25.

(编辑:宋亚珍)