

# 藜麦 *LOC110717159* 基因克隆、生物信息学分析及其在拟南芥过表达分析

陶小所<sup>1</sup>, 姚晓华<sup>1,2</sup>, 姚有华<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>青海大学农林科学院, 西宁 810016; <sup>2</sup>青藏高原种质资源研究与利用实验室, 西宁 810016

**摘要** 糖基水解酶家族在调控植物籽粒大小方面起关键作用。本研究通过克隆藜麦 (*Chenopodium quinoa*) 糖基水解酶家族 *LOC110717159* 基因, 并通过生物信息学、表达模式分析和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 异源表达实验, 解析其在籽粒充实过程中的生物学功能。生物信息学分析表明, 大、小粒藜麦种质 *LOC110717159* 编码序列全长为 1 023 bp, 编码 339 个氨基酸, 存在 1 个碱基差异; 其启动子区 (~2 000 bp) 含有 119 个顺式作用元件, 包括 3 个激素响应元件(茉莉酸甲酯、水杨酸和赤霉素)。系统进化分析显示, 该基因与甜菜 (*Beta vulgaris*)、菠菜 (*Spinacia oleracea*) 和苋 (*Amaranthus tricolor*) 的亲缘关系较近。qRT-PCR 分析表明, 灌浆 21 天时, *LOC110717159* 在大粒藜麦种质的籽粒中高表达。拟南芥过表达株系的千粒重显著低于野生型 ( $P<0.05$ ), 但粒长和粒宽无显著差异。单倍型分析发现, *LOC110717159* 编码序列在 17 个藜麦种质中存在差异, 62.5% 的千粒重大于 4.0 g 的种质与大粒藜麦种质碱基一致, 而 77.8% 的千粒重小于 3.0 g 的种质与小粒藜麦种质碱基一致。综上, *LOC110717159* 可能负调控藜麦籽粒的充实过程。

**关键词** 藜麦, *LOC110717159* 基因, 克隆, 生物信息学分析, 过表达分析

藜麦 (*Chenopodium quinoa*) ( $2n=4x=36$ ) 隶属苋科 (Amaranthaceae) 藜属 (*Chenopodium*) 的一年生双子叶植物, 其籽粒富含必需氨基酸、优质蛋白、可溶性糖、健康油脂和多种微量元素等, 能够满足人体生命活动的需求 (Escuredo et al., 2014; Guo et al., 2021; Ain et al., 2023)。鉴于此, 联合国粮农组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 将其视为 21 世纪应对粮食安全的重要谷物之一 (张紫薇, 2017; 胡一晨等, 2018)。在影响藜麦产量的诸多因素中, 籽粒大小尤为关键。探究影响藜麦籽粒大小发育和形成的相关因素, 对提高其产量和商品性具有重要意义。因此, 选育大粒藜麦品种并深入探究其调控机制, 对加速藜麦育种进程具有重要意义。本研究基于前期大、小粒藜麦籽粒灌浆不同发育时期的转录组数据 (Tao et al., 2025), 成功筛选出差异显著的糖基水解酶 *LOC110717159* 基因。糖基水解酶 (glycoside hydrolase, GH) 作为碳水化合物活性酶 (carbohydrate-active enzymes, CAZy) 数据库中数量最庞大的一类酶, 目前已被划分为 189 个家族, 其中纤维素酶类至少分布于 17 个 GHs (Chen et al., 2024)。在植物体内, 糖基水解酶主要集中分布于 GH1、GH3、GH5、GH9 和 GH17 等家族, 广泛参与植物细胞壁修复、逆境响应、激素信号转导和次生代谢等诸多生理过程的调控 (李媛等, 2024)。在植物果实及籽粒大小的研究范畴内,

收稿日期: 2025-03-19; 接受日期: 2025-06-03

基金项目: 青海省科技成果转化专项项目 (No.2022-NK-112)

\*通讯作者。E-mail: youhua8888@126.com

已有关于 GHs 的研究成果报道。Buchner 等(2002)研究证实, 豌豆(*Pisum sativum*)  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因 *PsGNS2* 在种皮组织中呈现特异性表达模式。通过将该基因 5'端调控区转入蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)进行启动子活性分析, 发现其在种皮和胚乳组织中表现出最强的转录活性, 这表明 *PsGNS2* 可能通过特定的调控机制参与豌豆籽粒的发育过程。Wan 等(2011)对水稻(*Oryza sativa*)花粉发育相关的  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因(*Osg1*)进行研究, 发现该基因在小花、叶鞘及叶片中表达量较高, 尤其是在减数分裂后期以及小花的小孢子早期和中期阶段显著高表达。Roy Choudhury 等(2009)研究发现, 香蕉(*Musa 'Hybrids'*)果实成熟过程中, 不同品种的  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因的表达量、酶活性与果肉的软化率相关。在草莓(*Fragaria × ananassa*)果实成熟过程中, 内切葡聚糖酶 *FaEG1* 和 *FaEG2* 表达显著上调, 其中 *FaEG1* 特异性在成熟期积累(Trainotti et al., 1999; Llop-Tous et al., 1999)。韩小行(2020)研究显示, GH5 家族的 *DXS* 基因被敲除后, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)转化株系的籽粒明显变小。王真珍(2023)对 *AtGH9* 突变体表型展开研究, 发现突变体的角果长度和结籽数量相较于野生型显著增加, 并且 *pZjGH9C3* 在拟南芥中的过表达对角果发育产生了影响。通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除番茄(*Solanum lycopersicum*) GH17 家族基因 *SIA6* 后, 获得的 *sla6* 突变体表现出果实重量和种子数量显著减少的表型(Chen et al., 2024)。综上研究充分表明, GHs 在籽粒发育过程中发挥着不可或缺的作用。2017 年, 藜麦高质量基因组数据的公开发布, 为挖掘与籽粒大小相关的基因奠定了基础(Jarvis et al., 2017)。然而, 目前藜麦中还没有糖基水解酶家族相关基因的研究报道。本研究从大、小粒藜麦种质资源中克隆了 *LOC110717159* 基因, 通过生物信息学、表达模式分析和拟南芥过表达等方法来分析该基因的功能, 为进一步解析 *LOC110717159* 基因在藜麦籽粒充实和大小的调控功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

以千粒重大于 5.0 g 的大粒藜麦(*Chenopodium quinoa*)种质(HGW-B, 以 W 符号表示)和千粒重小于 3.0 g 的小粒藜麦种质(LGW-A, 以 X 符号表示)为材料, HGW-B 为青海省农林科学院作物栽培研究所自主选育, 生育期约 120 天, 灌浆期约 30 天, 籽粒颜色为白色。LGW-A 为中国农科院作物所引进, 生育期约 150 天, 灌浆期约 30 天, 籽粒颜色为黄色。试验于 2023 年 3–9 月在青海省农林科学院种质资源创新试验基地进行(36°62'N, 101°77'E), 取自藜麦籽粒灌浆期始 7、21 和 28 天的根、茎、叶、籽粒, 3 次生物学重复。所有样品经液氮速冻后保存在−80°C 冰箱。

### 1.2 *LOC110717159* 基因的克隆

使用 9769-TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (Takara, Tokyo, Japan)试剂盒和天根 DNA 试剂盒分别提取样本 RNA 和 DNA。以 RNA 为模板, 利用 RR036A-PrimeScript RT Master Mix (Takara, Tokyo, Japan)试剂盒逆转录成 cDNA。从 NCBI 下载 *LOC110717159* 基因编码序列, 通过 Primer5.0 设计扩增引物(表 1), PCR 扩增体系为 50  $\mu$ L, 其中 2x Phanta Max Master Mix 为 25  $\mu$ L, 上下引物各为 1  $\mu$ L, cDNA 模板为 2  $\mu$ L, PCR Enhancer 为 5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 为 16  $\mu$ L。参照李青洋等(2025)的方法调整 PCR 反应程序: 94°C 预变性 3 分钟; 94°C 变性 30 秒, 56°C 退火 1 分钟, 72°C 延伸 25 秒, 循环 34 次, 最后 72°C 延伸 5 分钟。使用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 胶回收纯化后用 pEASY®-Blunt

Zero Clong Kit 试剂盒转化, 挑取克隆菌液送至生工生物工程股份有限公司(上海)进行测序验证。

表 1 研究所涉及的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Function
159-F	ATGGGGTTAATAAGCAAACCTTCTGCG	Gene cloning
159-R	TCAATTGAAACTGAGTTGGTATTTGGGCT	
C159-F1	GACACGGTGTATGCTGC	
C159-R1	TACTGTCCTGCGTTACCA	
Q159-F	TCTGCGGTTGCTACTTT	qRT-PCR
Q159-R	ACTTCTTGTGGGATGGT	
TUB6-F	TGAGAACGCAGATGAGTGTATG	Reference gene
TUB6-R	GAAACGAAGACAGCAAGTGACA	
159F	<u>actagggctctcgacc</u> ATGGGGTTAATAAGCAAACCTTCTGCG	Overexpression vector
159R	<u>actagggctctctaccg</u> TCAATTGAAACTGAGTTGGTATTTGGGCT	
35S-F	CACGGGGGACTCTTGCCACC	
NOS-R	ATCATCGCAAGACCGGCAAC	
Bar-F	CGGCGACGAGCCAGGGATA	Identification of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> positive seedlings
Bar-R	GCACCATCGTCAACCACTACAT	

表中小写字母为引物接头序列。

Lowercase letters in the table are primer junction sequences.

1.3 LOC110717159 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 分析 LOC110717159 的保守结构域。利用 ExpasyProtparma (<http://www.expasy.org/toolsprotparam.html>)预测 LOC110717159 蛋白理化性质。利用 SMART 在线软件(SMART: Main page ([embl.de](http://embl.de)))分析 LOC110717159 基因编码蛋白氨基酸的结构域。利用 SignalP-5.0 (SignalP 5.0-DTU Health Tech-Bioinformatic Services)和 TMHMM-2.0 (TMHMM 2.0 - DTU Health Tech - Bioinformatic Services)预测 LOC110717159 蛋白的信号肽和跨膜结构。利用在线网站 SOPMA ([https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl))和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测 LOC110717159 蛋白二级结构、三级结构。利用 NCBI 中的 BLASTP 工具与 LOC110717159 蛋白高度同源的其它科植物的氨基酸比对。利用 MEGA 10.0 软件中的邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建系统进化树。

1.4 LOC110717159 基因的表达模式分析

以 Q159-F/R (表 1)为引物, TUB6 为内参基因(贾冰晨等, 2020), qRT-PCR 扩增反应体系和反应条件参照 Yao 等(2021)方法, 结果用公式  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 LOC110717159 基因的相对表达量。

1.5 过表达拟南芥载体的构建及转化株系籽粒性状鉴定

将大粒藜麦种质 LOC110717159 基因插入到空载 pEGOEP35S-B 中, 构建重组质粒。将其连接转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 通过菌液 PCR 阳性克隆, 并提取质粒进行测序比对。经测序结果确认, 成功构建了 pEGOEP35S-B-基因 110717159 过表达载体质粒。质粒转化和拟南芥遗传转化试验参照赵阳(2022)的方法进行。经过筛选

和鉴定, 获得阳性转基因拟南芥植株, 单株收种后种植至 T3 代并再次进行 PCR 鉴定。最后, 采用杭州万深科技 SC-G 自动考种分析及千粒重仪系统测定转基因拟南芥的粒长、宽、千粒重, 3 次生物学重复。

1.6 LOC110717159 基因的差异片段在藜麦种质资源中的克隆

根据大、小粒藜麦种质 LOC110717159 基因序列在 700–800 bp 区段存在差异, 设计特异性引物 C159-F1/R1 (表 1)。从中国农业科学院引进的藜麦资源中, 筛选出千粒重大于 4.0 g 的 8 个大粒藜麦和千粒重小于 3.0 g 的 9 个小粒藜麦(表 2), 利用引物 C159-F1/R1 进行目的片段的 PCR 克隆。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离后, 使用 DNA Gel Extraction Kit 试剂盒进行胶回收, 送至生工生物工程股份有限公司(上海)进行测序。

表 2 藜麦种质资源材料

Table 2 Quinoa germplasm material

Material number	Thousand kernel weight (g)	Material number	Thousand kernel weight (g)
23_382	4.90	23_59	2.03
23_347	4.64	23_303	2.26
23_352	4.81	23_211	2.34
23_354	4.69	23_289	2.10
23_369	4.61	23_150	2.53
23_373	4.50	23_221	2.11
23_366	4.47	23_5	2.27
23_308	4.14	23_315	2.26
		23_254	2.08

1.7 数据处理

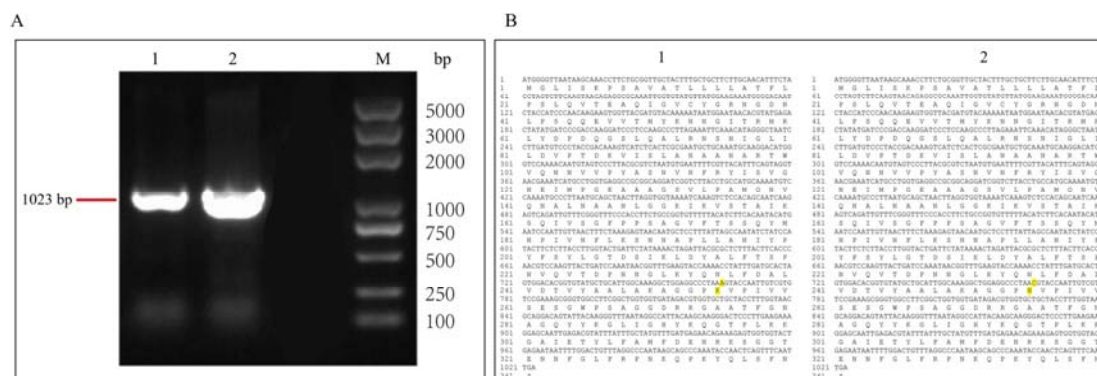
采用 Excel 21.0 和 SPSS 16.0 软件进行数据统计与显著性分析。

2 结果与分析

2.1 LOC110717159 基因的克隆和序列分析

以大、小粒藜麦种质的籽粒 cDNA 为模板, 使用 159-F/R 引物扩增, 获得一条全长 1 023 bp 的条带(开放阅读框), 共编码 339 个氨基酸(图 1A)。经序列比对, 大、小粒藜麦种质的核苷酸在 765 bp 存在 1 个位点差异, 序列一致性为 99.90%; 导致氨基酸序列差异, 一致性为 99.71% (图 1B)。保守结构域预测结果表明, 该基因含有 “Glyco\_hydro superfamily” 结构域(图 2A), 属 GH17s 家族。

LOC110717159 蛋白理化性质预测, 大粒藜麦种质的 LOC110717159 蛋白分子式为 C<sub>1642</sub>H<sub>2569</sub>N<sub>441</sub>O<sub>489</sub>S<sub>8</sub>, 分子量为 36568.6 Da, 不稳定指数为 35.51, 脂溶指数为 87.24, 理论等电点为 9.34, 其中正负电荷残基分别为 28 个和 20 个, 正电荷残基为 28 个。小粒藜麦种质的 LOC110717159 蛋白分子式为 C<sub>1640</sub>H<sub>2563</sub>N<sub>441</sub>O<sub>489</sub>S<sub>8</sub>, 分子量为 36554.53 Da, 不稳定指数为 35.76, 脂溶指数为 87.24, 理论等电点为 9.27, 其中正负电荷残基分别为 27 个和 20 个。LOC110717159 蛋白二级结构预测结果表明, 大粒藜麦种质蛋白主要二级结构依次为 α-螺旋(35.59%)、无规卷曲(45.29%)和延伸链(19.12%); 小粒藜麦种质蛋白主要二级结构依次为 α-螺旋(35.29%)、无规卷曲(44.71%)和延伸链(20.00%)。三级结构预测表明, α-螺旋占比较大, 形成的三维结构较为紧凑(图 2B)。此外, 信号肽和跨膜结构预测结果显示, LOC110717159 蛋白存在跨膜结构和信号肽(图 3)。

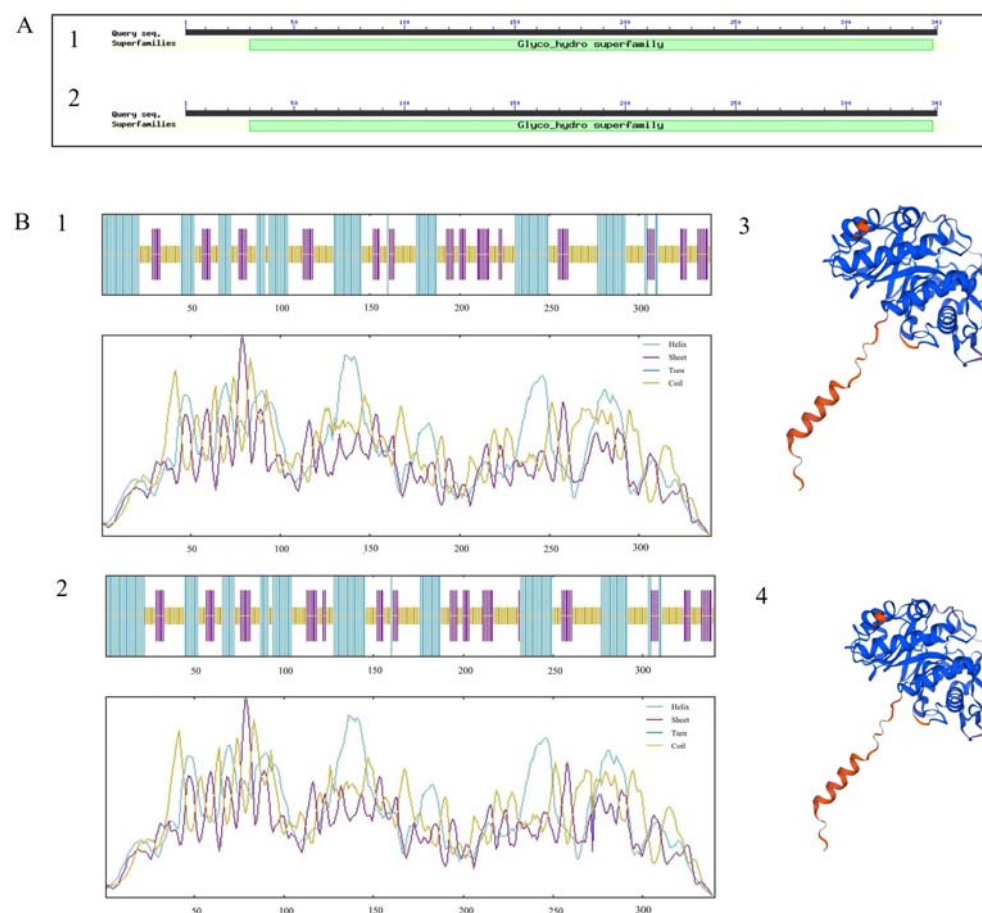


**图 1** *LOC110717159* 基因的 PCR 扩增产物(A)和推导的氨基酸序列(B)

1: 大粒藜麦种质; 2: 小粒藜麦种质; M: Marker。B 图中黄颜色代表差异。

**Figure 1** PCR amplified product (A) of *LOC110717159* gene and deduced amino sequences (B)

1: Large-grain quinoa germplasm; 2: Small-grain quinoa germplasm; M: Marker. Yellow colors in Figure B represent differences.



**图 2** *LOC110717159* 蛋白的保守结构域、二级和三级结构预测

(A) 大小粒藜麦保守结构域; (B) 大小粒藜麦二级和三级结构。1 和 2 同图 1。

**Figure 2** Prediction of conserved domains, secondary and tertiary structures of the *LOC110717159*

protein

(A) Conserved structural domains in small and large grain quinoa; (B) Secondary and tertiary structure of large and small grain quinoa. 1 and 2 are the same as shown in Figure 1.

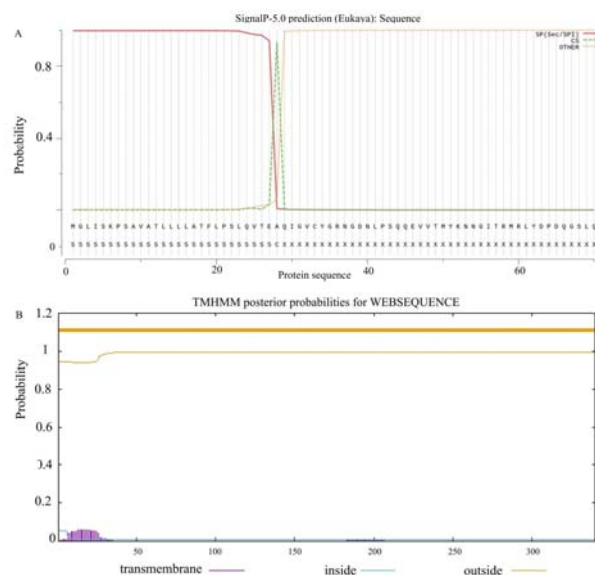


图 3 LOC110717159 蛋白信号肽(A)和跨膜结构预测(B)

Figure 3 Prediction of signal (A) and transmembrane structure (B) of LOC110717159 protein

## 2.2 LOC110717159 基因的启动子顺势作用元件分析

以大、小粒藜麦种质的籽粒 DNA 为模板, 利用 PCR 技术扩增 LOC110717159 基因上游约 2 000 bp 序列。测序结果经 DNAMAN 比对, 发现大、小粒藜麦种质 LOC110717159 基因启动子序列存在 10 处差异(图 4)。通过 plantCARE 进行顺式作用元件分析, 结果显示, LOC110717159 基因的启动子区域共含有 119 个顺式作用元件, 其中包括 2 个茉莉酸甲酯响应元件(TGACG-motif/CGTCA), 1 个水杨酸反应的顺式作用元件(SARE), 1 个赤霉素反应的顺式作用元件(ABRE), 1 个生长素反应的顺式作用元件(GGTCCAT), 同时还包括参与光响应、御寒和应激反应等顺式作用元件(表 3)。进一步分析发现, 大、小粒藜麦种质之间的差异位置未直接落在特殊顺式作用元件, 但部分差异处位点位于某些顺式作用元件附近。例如, 大粒藜麦种质中缺失的 6 个碱基位于 CAAT-box 下游。大、小粒藜麦 LOC110717159 启动子区域的差异对藜麦籽粒大小的调控有待研究。

表 3 藜麦 LOC110717159 基因启动子区域元件分析

Table 3 Structure of cis-acting elements in the promoter region of LOC110717159 gene





图 4 LOC110717159 基因启动子区域

图中红框表示核苷酸差异。

Figure 4 LOC110717159 gene promoter region

The red boxes in the figure indicate nucleotide differences.

## 2.3 LOC110717159 蛋白的同源比对及系统进化分析

通过 DNAMAN 对大、小粒藜麦种质的 LOC110717159 蛋白序列与其它植物的同源蛋白序列进行多重比对, 结果显示(图 5A), 大粒藜麦种质的 LOC110717159 蛋白与菠菜 (*Spinacia oleracea*) KNA05536.1、甜菜(*Beta vulgaris*) NP\_001306941.1、苋(*Amaranthus tricolor*) XP\_057515597.1 序列一致性为 75.80%、74.34%和 62.82%; 而小粒藜麦种质的 LOC110717159 蛋白与菠菜 KNA05536.1、甜菜 NP\_001306941.1 和苋 XP\_057515597.1 序列一致性为 76.09%、74.64%和 63.10%。系统进化树分析表明, 藜麦 LOC110717159 与同属藜科和苋科的甜菜 NP\_001306941.1、菠菜 KNA05536.1、苋 XP\_057515597.1 位于同一分支, 表明它们之间的亲缘关系较近(图 5B)。

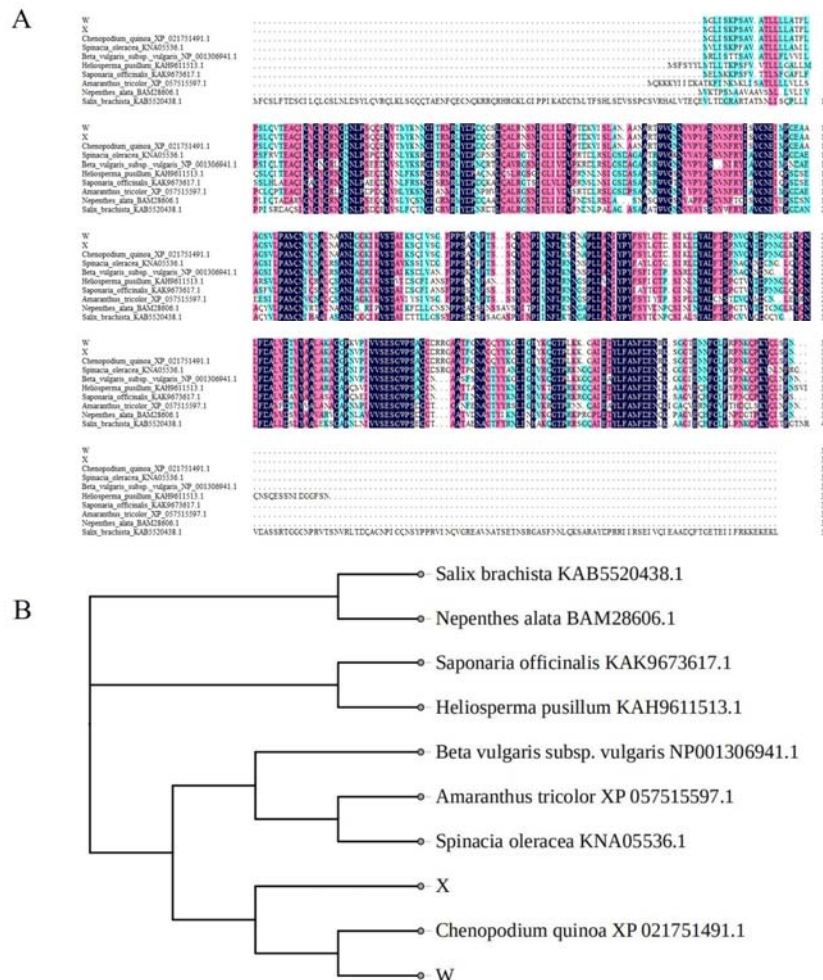


图 5 LOC110717159 蛋白的氨基酸多重序列比对(A)和系统发育树(B)

Figure 5 Multiple-sequence alignment (A) and phylogenetic tree analysis (B) of the amino acid sequence of the LOC110717159 protein



## 2.4 *LOC110717159* 基因的表达模式分析

使用 qRT-PCR 技术检测了 *LOC110717159* 基因在大、小粒藜麦种质的根、茎、叶和籽粒中的相对表达水平。结果显示(图 6), 该基因在大、小粒藜麦种质的根、茎、叶和籽粒以及灌浆 7 天和 28 天的籽粒中几乎不表达; 而在灌浆 21 天, 小粒藜麦种质的根中较高表达, 大粒藜麦种质的籽粒中表达显著升高。基于以上结果, 推测该基因可能在藜麦灌浆中后期发挥重要作用。

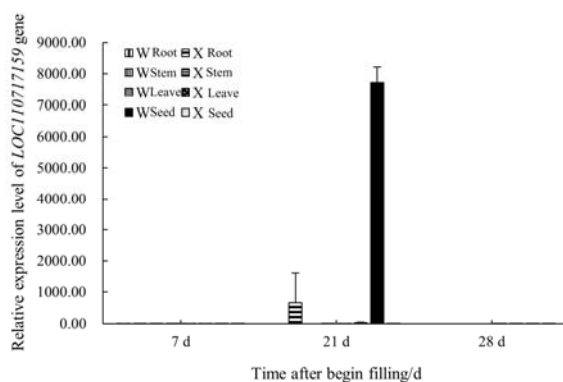


图 6 *LOC110717159* 在各个组织的表达量

Figure 6 Expression level of the *LOC110717159* in different tissue

## 2.5 *LOC110717159* 基因的遗传转化及转化株系籽粒性状分析

为分析 *LOC110717159* 基因在植物体内的功能, 在拟南芥中过表达了 *LOC110717159* 基因, 通过 PCR 鉴定后筛选出 3 个过表达 *LOC110717159* 基因的拟南芥株系 AtOE1、AtOE2 和 AtOE3(图 7)。从过表达拟南芥与野生型的籽粒性状分析, 过表达拟南芥植株籽粒的长、宽与野生型籽粒无显著差异, 但过表达拟南芥植株籽粒的千粒重显著低于野生型籽粒(图 7)。因此, 推测该基因在植物籽粒发育过程中可能呈负调控作用。

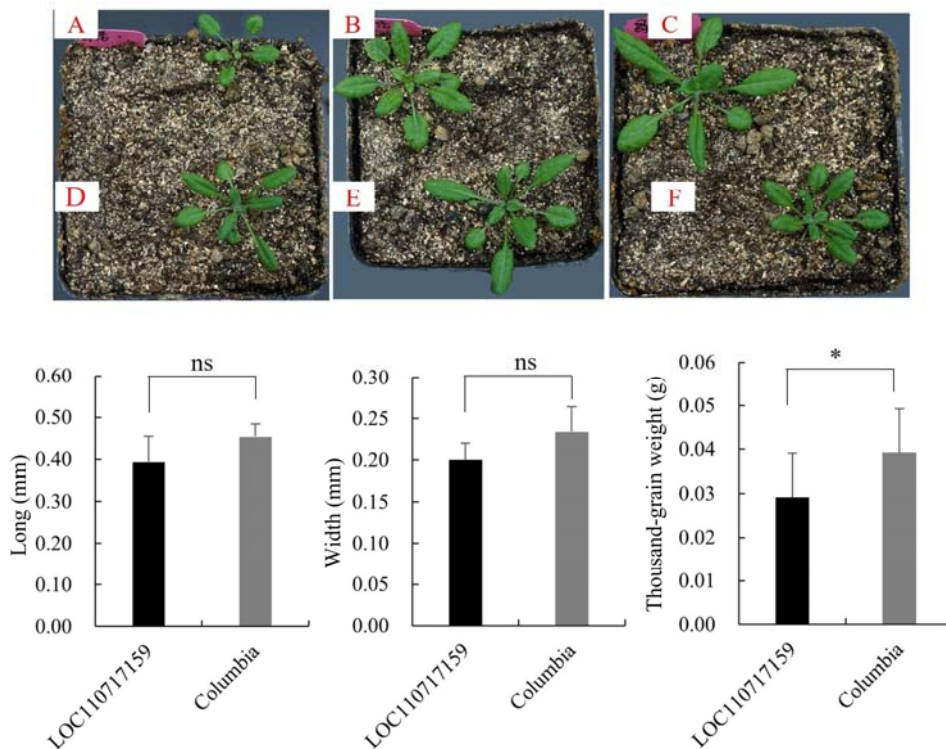


图 7 T3 代转基因拟南芥株系及籽粒性状

(A)–(C) 野生型; (D)–(F) AtOE1、AtOE2、AtOE3; ns: 无显著差异; \* $P \leq 0.05$

Figure 7 T3-generation transgenic Arabidopsis lines and seed morphological characteristics

(A)–(C) Wild-type plants; (D)–(F) AtOE1、AtOE2、AtOE3; ns: No significant difference; \* $P \leq 0.05$

## 2.6 LOC110717159 差异片段在藜麦种质中的分析

从 17 个藜麦种质中成功克隆了 *LOC110717159* 基因在 700–800 bp 片段的序列。如图 8 所示, 62.5% 的千粒重大于 5.0 g 的藜麦种质与大粒藜麦种质的碱基序列一致; 77.8% 的千粒重小于 3.0 g 的藜麦种质与小粒藜麦种质的碱基序列一致。因此, *LOC110717159* 基因 765 bp 处的突变是否具有调控藜麦籽粒充实的功能, 仍需进一步研究。



图 8 藜麦种质资源克隆序列比对

红框为千粒重大于 4.0 g 的藜麦, 绿框为千粒重小于 3.0 g 的藜麦。

Figure 8 Clonal sequence comparison of quinoa germplasm resources

The red boxes in the figure show quinoa resources with a thousand-grain weight greater than 4.0 g, and the green boxes show

### 3 讨论

本研究使用生物信息学方法分析藜麦 *LOC110717159* 基因, 该基因含有 1 个典型 *Gyco*\_\_*hydro superfamily* 结构域。SMART 分析结果显示, *LOC110717159* 属于 GH17s 家族, 该家族是  $\beta$ -1, 3-葡聚糖基转移酶(<https://www.cazy.org/GH17.html>)的一部分, 在高等植物 (Müller et al., 1998; Receveur-Bréchet et al., 2006; Rodríguez-Romero et al., 2014)、真菌 (Gastebois et al., 2010; Qin et al., 2015)、细菌 (Stubbs et al., 1999) 中广泛分布, 家族成员多达 1 300 个。GH17 家族在水稻 (wan et al., 2011)、香蕉 (Roy Choudhury et al., 2009)、葡萄 (*Vitis vinifera*) (Pervaiz et al., 2021)、番茄 (Chen et al., 2024)、谷子 (*Setaria italica*) (范玉杰等, 2024) 等植物种主要是参与花药调控、果实软化、芽发育、胁迫、果实发育、籽粒重量及抗性过程。特别是在葡萄中, 已鉴定出的 GH17s 家族的 *VviGH17-16*、*VviGH17-30*、*VviGH17-37* 和 *VviGH17-44* 基因在果实发育阶段的表达存在显著差异 (Pervaiz et al., 2021); 在番茄中, *Sla6* 突变体的果实重量和种子数显著降低 (Chen et al., 2024)。这些研究表明, GH17s 家族的基因在调控籽粒大小方面发挥着重要作用。然而, 关于 GH17s 在藜麦灌浆期籽粒发育中的研究尚未见报道。本研究克隆的 *LOC110717159* 基因全长序列为 1 023 bp, 编码 339 个氨基酸。通过同源比对发现, *LOC110717159* 蛋白与菠菜、甜菜、苋的蛋白序列相似性较高, 分别为 76.09%、74.64% 和 63.10%。这一结果与林彤等 (2024) 关于 *STK* (*SEEDSTICK*) 同源性比对结果一致。此外, 李爱莉 (2021) 在藜麦中克隆到 1 个 GH64 家族的糖苷水解酶基因 *CqAI*, 其蛋白与菠菜、甜菜的同源比对结果与 *LOC110717159* 的同源性比对结果相符。因此, 可以推断出藜麦的基因与同科的菠菜和甜菜具有较近的亲缘关系。

*LOC110717159* 基因的启动子中检测到茉莉酸、水杨酸、赤霉素和生长素等响应元件, 这与范玉杰等 (2024) 关于 GH17s 家族大部分的基因都含激素响应元件的结果基本一致。植物激素是影响植物发育的重要因素之一, 已鉴定到调控籽粒发育的许多植物激素基因 (董庆坤和刘慧丽, 2015)。因此, 推测茉莉酸、水杨酸、赤霉素和生长素会影响藜麦 *LOC110717159* 基因的功能, 进而调控籽粒发育。此外, 不同家族基因的表达模式受环境、取样时期和取样部位等不同而呈现不同的表达模式。例如, 水稻花粉发育相关的  $\beta$ -1, 3-葡聚糖酶基因 (*Osg1*) 在小花的小孢子早期和中期阶段高表达 (wan et al., 2011); 水稻 *RIP4* 在抽穗时期的剑叶表达量最高 (叶凯, 2020); 以及水稻 GH5 的 *DXS* 在叶中的转录水平要显著高于根、茎和穗等 (韩小行, 2020)。本研究发现, *LOC110717159* 基因在大粒藜麦种质灌浆中后期的籽粒极显著表达, 在小粒藜麦种质中几乎不表达, 表明 *LOC110717159* 基因可能在籽粒充实过程发挥重要作用。

最后, 我们在拟南芥中过表达 *LOC110717159* 基因, 并对 T3 代转化株系的籽粒性状进行分析。结果显示, 转基因株系的千粒重显著低于野生型, 提示该基因在拟南芥中可能负调控籽粒发育。值得注意的是, 本研究中野生型的千粒重测定值约 40 mg 与已有文献报道约 20 mg 存在显著差异 (Jiang et al., 2013; Liu et al., 2015)。原因可能是: 本研究采用未进行标准干燥处理的种子直接测定, 以及所涉及的转基因株系数量有限。后续 *LOC110717159* 具体调控功能的研究需要通过扩大样本量进行更多实验加以验证。单倍型分析揭示, *LOC*-

**LOC110717159** 基因 765 bp 碱基的突变可能是造成籽粒大小差异的原因之一。然而, 由于本研究中所用藜麦资源有限且初始来源地未知, 具体的突变机制尚不清楚, 有待进一步探索。本研究对 **LOC110717159** 基因进行了初步研究, 但其在藜麦籽粒大小调控中的功能仍需进一步验证。藜麦灌浆是个复杂过程, 其中转录调控在控制籽粒发育中起关键作用。因此, 鉴定更多控制藜麦籽粒大小的关键基因, 并深入了解其调控机制, 将为揭示藜麦籽粒发育的分子机制提供新思路。

## 4 结论

本研究从大、小粒藜麦种质中成功克隆了 **LOC110717159** 基因的编码序列, 其全长为 1 023 bp, 编码 339 个氨基酸, 该基因属于 GH17s 家族。qRT-PCR 结果显示, **LOC110717159** 基因在大粒藜麦种质的籽粒灌浆中后期表达量最高, 而在小粒藜麦种质中几乎不表达。**LOC110717159** 基因在拟南芥中过表达后, 转化株系籽粒的千粒重显著低于野生型籽粒。因此, 推测 **LOC110717159** 基因可能负调控藜麦籽粒大小。

## 作者贡献声明

陶小所: 实验设计, 完成实验和数据分析, 论文初稿写作; 姚晓华: 指导实验设计和提供论文写作意见; 姚有华: 指导实验设计, 提供写作意见和论文初稿修改。全体作者已阅读并同意论文最终版本。

## 参考文献

- Ain QT, Siddique K, Bawazeer S, Ali I, Mazhar M, Rasool R, Mubeen B, Ullah F, Unar A, Jafar TH (2023). Adaptive mechanisms in quinoa for coping in stressful environments: an update. *PeerJ* **11**, e14832.
- Buchner P, Rochat C, Wuillème S, Boutin JP (2002). Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated beta-1,3-glucanase gene in pea (*Pisum sativum*). *Plant Mol Biol* **49**, 171–186.
- Chen D, Zeng ZH, Yu CY, Hu HM, Lin YX, Wu CY, Yang YH, Zhong QX, Zhang XY, Huang CH, Yao YW, Qiu ZK, Wang XM, Xia R, Ma CJ, Chen RY, Hao YW, Guan HL (2024). Genome-wide identification of GH17s family genes and biological function analysis of SIA6 in tomato. *Plants (Basel)* **13**, 2443
- Roy Choudhury S, Roy S, Sengupta DN (2009). Characterization of cultivar differences in  $\beta$ -1,3 glucanase gene expression, glucanase activity and fruit pulp softening rates during fruit ripening in three naturally occurring banana cultivars. *Plant Cell Rep* **28**, 1641–1653.
- Dong QK, Liu HL (2015). Progress on the plant hormone regulation related to seed development. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)* **47**, 72–78. (in Chinese)
- 董庆坤, 刘慧丽 (2015). 植物激素调控籽粒大小的研究进展. 华南师范大学学报 **47**, 72–78.
- Escuredo O, Martín MIG, Moncada GW, Fischer S, Hierro JMH (2014). Amino acid profile of the quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using near infrared spectroscopy and chemometric techniques. *Journal of Cereal Science* **60**, 67–74.

- Fan YJ, Wu XX, Dong MD, Gao Q, Han YQ, Han YH** (2024). Identification of Glycosyl hydrolases family 17 in foxtail millet and expression analysis under adversity stress. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences* **38**, 1660–1673. (in Chinese)
- 范玉杰, 武晓雄, 董梦迪, 高茜, 韩彦卿, 韩渊怀 (2024). 谷子 Glycosyl hydrolases family 17 鉴定及在逆境胁迫下的表达分析. *核农学报* **38**, 1660–1673.
- Gastebois A, Mouyna I, Simenel C, Clavaud C, Coddeville B, Delepierre M, Latgé JP, Fontaine T** (2010). Characterization of a new  $\beta$  (1–3)-glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 2386–2396.
- Guo HM, Hao YQ, Yang XS, Ren GX, Richel A** (2021). Exploration on bioactive properties of quinoa protein hydrolysate and peptides: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **63**, 11–14.
- Hu YC, Zhao G, Qin PY, Cheng YF, Cao YN, Zhou L, Ren GX** (2018). Research progress on bioactive components of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Acta Agronomica Sinica* **44**, 1579–1591. (in Chinese)
- 胡一晨, 赵钢, 秦培友, 成颜芬, 曹亚楠, 邹亮, 任贵兴 (2018). 藜麦活性成分研究进展. *作物学报* **44**, 1579–1591.
- Han XX** (2020). Genetic Analysis and Gene Cloning of Grain Type and Spike Number Mutant *dxs* in Rice. Master's thesis. Chengdu: Sichuan Agricultural University. pp. 36–37. (in Chinese)
- 韩小行 (2020). 水稻粒型、穗粒数突变体 *dxs* 的遗传分析和基因克隆. 硕士论文. 成都: 四川农业大学. pp. 36–37.
- Jarvis DE, Ho YS, Lightfoot DJ, Schmöckel SM, Li B, Borm TJ, Ohyanagi H, Mineta K, Michell CT, Saber N, Kharbatia NM, Rupper RR, Sharp AR, Dally N, Boughton BA, Woo YH, Gao G, Schijlen EG, Guo X, Momin AA, Negrão S, Al-Babili S, Gehring C, Roessner U, Jung C, Murphy K, Arold ST, Gojobori T, Linden CG, van Loo EN, Jellen EN, Maughan PJ, Tester M** (2017). The genome of *Chenopodium Quinoa*. *Nature* **542**, 307–312.
- Jia BC, Wang Y, Zhang DL, Wu XL, Yi HB, Chen SH, Guo SL** (2020). Screening of reference genes and analysis of gene expression under salt stress in *Chenopodium quinoa*. *Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition)* **33**, 283–288. (in Chinese)
- 贾冰晨, 王宇, 张东亮, 吴筱林, 尹海波, 陈世华, 郭善利 (2020). 藜麦内参基因筛选及盐胁迫相关基因表达分析. *烟台大学学报(自然科学与工程版)* **33**, 283–288.
- Jiang WB, Huang HY, Hu YW, Zhu SW, Wang ZY, Lin WH** (2013). Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **162**, 1965–1977.
- Li AL** (2021). Cloning of quinoa  $\alpha$ -amylase inhibitor gene and research on germination characteristics of transgenic rice. Master's thesis. Chengdu: Chengdu University. pp. 16–17. (in Chinese)
- 李爱莉 (2021). 藜麦  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂基因的克隆及对转基因水稻发芽特性的研究. 硕士论文. 成都: 成都大学. pp. 16–17.
- Li Y, Ren GX, Kang YQ, Wang MN, Fan Y, Jiang D, Liu CS** (2024). Cloning, bioinformatics analysis, and expression of a glucoside hydrolase gene *ApGH* from and *rographis paniculata*. *Modern Chinese Medicine* **26**, 1141–1149. (in Chinese)



- 李媛, 任广喜, 康颖泉, 王迷娜, 范勇, 姜丹, 刘春生 (2024). 穿心莲糖苷水解酶基因 *ApGH* 的克隆、生物信息学分析及表达研究. *中国现代中药* **26**, 1141–1149.
- Lin D, Yuan C, Dongchen WH, Zeng MQ, Yang Y, Mao ZC, Lin C (2024). Screening and functional analysis of gene *CqSTK* associated with gametophyte development of quinoa. *Biotechnology Bulletin* **40**, 83–94. (in Chinese)
- 林彤, 袁程, 董陈文华, 曾孟琼, 杨燕, 毛自朝, 林春 (2024). 藜麦配子发育相关基因 *CqSTK* 的筛选及功能分析. *生物技术通报* **40**, 83–94.
- Liu J, Hua W, Hu ZY, Yang HL, Zhang L, Li RJ, Deng LB, Sun XC, Wang XF, Wang HZ (2015). Natural variation in *ARF18* gene simultaneously affects seed weight and silique length in polyploid rapeseed. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, E5123–5132.
- Li QY, Liu C, He L, Peng S, Ma JY, Hu ZY, Liu HB (2025). Cloning and functional analysis of the *BnaA02.CPSF6* gene from *Brassica napus*. *Chinese Bulletin of Botany* **60**, 62–73. (in Chinese)
- 李青洋, 刘翠, 何李, 彭姗, 马嘉吟, 胡子祎, 刘宏波 (2025). 甘蓝型油菜 *BnaA02.CPSF6* 基因的克隆及功能分析. *植物学报* **60**, 62–73.
- Llop-Tous I, Dominguez-Puigjaner E, Palomer X, Vendrell M (1999). Characterization of two divergent beta-1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiol* **119**, 1415–1422.
- Müller JJ, Thomsen KK, Heinemann U (1998). Crystal structure of barley 1,3-1,4-beta-glucanase at 2.0-Å resolution and comparison with *Bacillus* 1,3-1,4-beta-glucanase. *J Biol Chem* **273**, 3438–3446.
- Pervaiz T, Liu TH, Fang X, Ren YH, Li XY, Liu ZJ, Fiaz M, Fang JG, Shangguan LF (2021). Identification of *GH17* gene family in *Vitis vinifera* and expression analysis of *GH17* under various adversities. *Physiol Mol Biol Plants* **27**, 1423–1436.
- Qin Z, Yan QJ, Lei J, Yang SQ, Jiang ZQ, Wu SW (2015). The first crystal structure of a glycoside hydrolase family 17  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase displays a unique catalytic cleft. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **71**, 1714–1724.
- Receveur-Bréchet V, Czjzek M, Barre A, Roussel A, Peumans WJ, Van Damme EJ, Rougé P (2006). Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo-beta-1,3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Proteins* **63**, 235–242.
- Rodríguez-Romero A, Hernández-Santoyo A, Fuentes-Silva D, Palomares LA, Muñoz-Cruz S, Yépez-Mulia L, Orozco-Martínez S (2014). Structural analysis of the endogenous glycoallergen Hev b 2 (endo- $\beta$ -1,3-glucanase) from *Hevea brasiliensis* and its recognition by human basophils. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**, 329–341.
- Stubbs HJ, Brasch DJ, Emerson GW, Sullivan PA (1999). Hydrolase and transferase activities of the beta-1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. *Eur J Biochem* **263**, 889–895.
- Tao XS, Yao XH, Cui YM, Li X, An LK, Yao YH, Wu KL (2025). Transcriptomic and proteomic response to grain filling reveal potential grain size regulation mechanisms in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Plant Breeding*. <https://doi.org/10.1111/pbr.13275>

- Trainotti L, Spolaore S, Pavanello A, Baldan B, Casadoro G** (1999). A novel E-type endo-beta-1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Mol Biol* **40**, 323–332.
- Wan LL, Zha WJ, Cheng XY, Liu C, Lv L, Liu CX, Wang ZQ, Du B, Chen RZ, Zhu LL, He GC** (2011). A rice  $\beta$ -1,3-glucanase gene *Osg1* is required for callose degradation in pollen development. *Planta* **233**, 309–323.
- Wang ZZ** (2023). The molecular basis of glycoside hydrolase *GH9* gene family in the development stages in peel of *Ziziphus jujube* ‘Goutouzao’ fruit. Master’s thesis. Yanan: Yanan University. pp. 38–41. (in Chinese)
- 王真珍** (2023). 糖苷水解酶 *GH9* 基因家族在狗头枣果皮发育过程中的分子基础. 硕士论文. 延安: 延安大学. pp. 38–41.
- Yao XH, Su LP, Yao YH, An LK, Bai YX, Li X, Wu KL** (2021). Isolation, sequencing of the *HvnHID* gene and its role in the purple-grain colour development in Tibetan hulless barley. *Czech J Genet Plant Breed* **58**, 1–9.
- Ye K** (2020). Preliminary analysis of rice gene *RIP4* function. Master’s thesis. Guanzhou: South China Agricultural University. pp. 28–32. (in Chinese)
- 叶凯** (2020). 水稻基因 *RIP4* 功能的初步分析. 硕士论文. 广州: 华南农业大学. pp. 28–32.
- Zhang ZW** (2017). Effects of water and phosphorus coupling on growth physiology, yield and grain traits of quinoa. Master’s thesis. Shanxi: Shanxi Normal University. pp.1–2. (in Chinese)
- 张紫薇** (2017). 水磷耦合对藜麦生长生理、产量及籽粒性状的影响. 硕士论文. 山西: 山西师范大学. pp. 1–2.
- Zhao Y** (2022). Study on key functional genes and mechanism of salt tolerance in *Spartina alterniflora*. Master’s thesis. Qingdao: First Institute of Oceanography. pp. 58–68. (in Chinese)
- 赵阳** (2022). 互花米草(*Spartina alterniflora*)耐盐关键功能基因及其耐盐机制研究. 硕士论文. 青岛: 自然资源部第一海洋研究所. pp. 58–68.

# Cloning, Bioinformatics Analysis of *LOC110717159* Gene from *Chenopodium Quinoa* and Overexpression in *Transgenic Arabidopsis*

Xiaosuo Tao<sup>1</sup>, Xiaohua Yao<sup>1, 2</sup>, Youhua Yao<sup>1, 2</sup>

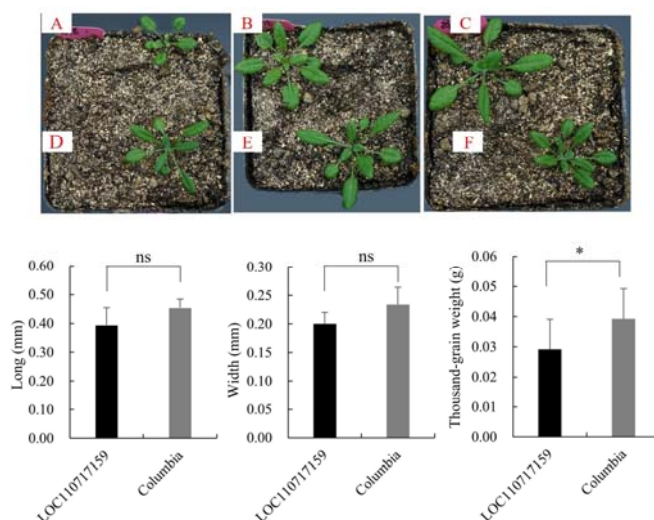
<sup>1</sup>Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China; <sup>2</sup>Qinghai-Tibet Plateau Germplasm Resources Research and Utilization Laboratory, Qinghai Province, Xining 810016, China

**INTRODUCTION:** The glycoside hydrolase (GH) gene family plays a crucial role in regulating plant grain size.

**RATIONALE:** To elucidate its biological role during grain filling, we cloning and functionally characterized *LOC110717159*, a GH gene in quinoa, through bioinformatics analysis, spatiotemporal expression profiling, and heterologous expression experiments in *Arabidopsis*.

**RESULTS:** *LOC110717159* has a 1 023 bp coding sequence (encoding 339 amino acids) in both germplasms, differing by a single nucleotide. Analysis of the ~ 2 000 bp *LOC110717159* promoter identified 119 *cis*-elements, including three hormone-responsive elements (MeJA, SA, and GA). Phylogenetically, it is closely related to *Beta vulgaris*, *Spinacia oleracea* and *Amaranthus tricolor*. qRT-PCR revealed high expression of *LOC110717159* in large-grained quinoa at 21 days after anthesis (21 DAA). *Arabidopsis* overexpression lines showed significantly reduced 1 000-grain weight ( $P < 0.05$ ) but no change in grain length and width. Haplotype analysis of 17 quinoa germplasms indicated that 62.5% of large germplasms ( $\geq 4.0$  g/1 000 grains) carried the large-grained haplotype, while 77.8% of small germplasms ( $\leq 3.0$  g) shared the small-grained haplotype.

**CONCLUSION:** In conclusion, *LOC110717159* likely functions as a negative regulator in quinoa grain filling.



**T3-generation transgenic *Arabidopsis* lines and seed morphological characteristics. (A)–(C) Wild-**

type plants; (D)–(F) AtOE1、AtOE2、AtOE3; ns: No significant difference; \* $P \leq 0.05$

**Key words** Quinoa, *LOC110717159* gene, clone, bioinformatics analysis, overexpression

-----  
\* Author for correspondence. E-mail: youhua8888@126.com

#### 通讯作者/团队简介

姚有华, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事麦类作物育种与高产栽培。主持国家自然科学基金地区基金项目 1 项, 中华人民共和国科学技术部重点研发计划子课题 4 项, 农业部科教司育种攻关课题 1 项, 青海省科学技术厅农业科技成果转化项目 2 项、科技特派员专项 1 项, 中国国家标准化管理委员会农业标准化专项 1 项。第一或通讯作者发表论文 20 余篇, 其中 SCI 收录期刊论文 7 篇, 主编(藜麦)和副主编(小麦)参编著作 7 部。主持审(认)定农作物品种 5 个; 第 1 完成人鉴定国际领先和国内先进成果各 1 项、登记省级成果 19 项; 第 1 完成人制定地方和团体标准 16 项; 申请和授权发明、实用新型专利各 1 项。