

· 研究论文 ·

藜麦LOC110717159基因克隆及功能分析

陶小所¹, 姚晓华^{1,2}, 姚有华^{1,2*}

¹青海大学农林科学院, 西宁 810016; ²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。该研究克隆了藜麦(*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, 解析了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基因编码序列全长为1 023 bp, 编码339个氨基酸残基, 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%千粒重大于4.0 g的种质与大粒藜麦种质碱基序列一致, 77.8%千粒重小于3.0 g的种质与小粒藜麦种质碱基序列一致。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

陶小所, 姚晓华, 姚有华 (2026). 藜麦LOC110717159基因克隆及功能分析. 植物学报 61, 53–67.

藜麦(*Chenopodium quinoa*) ($2n=4x=36$)隶属苋科(Amaranthaceae)藜属(*Chenopodium*), 为一年生双子叶植物, 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, 能够满足人体生命活动需求(Escuredo et al., 2014; Guo et al., 2023; 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)。影响藜麦产量的诸多因素中, 籽粒大小尤为关键。探究影响藜麦籽粒发育和形成的相关因素, 对于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, 对于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), 成功筛选出表达差异显著的糖基水解酶(glycoside hydrolase, GH) LOC110717159基因。糖基水解酶作为碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZymes)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, 广泛参与调控植物的细胞壁修复、逆境响应、激素信号转导和次生代谢等诸多生理过程(李媛等, 2024)。在植物果实及籽粒大小研究中, 已有关于GHs研究成果的报道。Buchner等(2002)研究证实, 豌豆(*Pisum sativum*) β -1,3-葡聚糖酶基因PsGNS2在种皮组织中特异性表达。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的转录活性最强, 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 β -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 paradisiaca*)果实成熟

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(No.2022-NK-112)

* 通讯作者。E-mail: youhua8888@126.com

过程中,不同品种的 β -1,3-葡聚糖酶基因表达量和酶活性与果肉的软化率相关。在草莓(*Fragaria x ananassa*)果实成熟过程中,内切葡聚糖酶基因*FaEG1*和*FaEG2*显著上调表达,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*在拟南芥中过表达影响角果发育。通过CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除番茄(*Solanum lycopersicum*)GH17家族基因*SIA6*,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)。综上表明,GHs在籽粒发育过程中发挥不可或缺的作用。2017年,藜麦高质量基因组数据公布,为挖掘籽粒大小相关基因奠定了基础(Jarvis et al., 2017)。然而,目前藜麦尚未见糖基水解酶家族相关基因的报道。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、表达模式和拟南芥过表达等方法分析了该基因的功能,为进一步解析*LOC110717159*基因在藜麦籽粒充实和大小调控中的功能奠定了基础。

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 quinua*)种质(用字母W表示)和千粒重小于3.0 g的小粒藜麦种质(用字母X表示)为材料,W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。X为中国农业科学院作物科学研究所引进,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),选取藜麦籽粒灌浆期始7、21和28天的根、茎、叶和籽粒,设3次生物学重复。所有样品经液氮速冻后于-80°C冰箱保存,备用。

1.2 *LOC110717159*基因克隆

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-Prime-Script RT Master Mix (Takara, Tokyo, Japan)试剂盒反转录成cDNA。从NCBI网站下载*LOC110717159*基因编码序列,通过Primer5.0软件设计扩增引物序列(表1),PCR扩增体系为50 μ L,其中2 \times Phanta Max Master Mix为25 μ L,上下游引物各1 μ L, 2 μ L cDNA模板, 5 μ L PCR Enhancer, 16 μ L ddH₂O。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。

1.3 *LOC110717159*基因的生物信息学分析

利用NCBI网站分析*LOC110717159*的保守结构域。利用ExPASyProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)软件预测*LOC110717159*蛋白理化性质。利用SMART在线软件(SMART: Main page (embl.de))分析*LOC110717159*基因编码蛋白的结构域。利用SignalP-5.0 (SignalP 5.0-DTU Health Tech-Bioinformatic Services)以及TMHMM-2.0 (TMHMM 2.0-DTU Health Tech-Bioinformatic Services)软件预测*LOC110717159*蛋白的信号肽和跨膜结构。利用网站SOPMA (https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/second_pred_sopma.pl)和SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)预测*LOC110717159*蛋白的二级结构以及三级结构。利用NCBI中的BLASTP工具比对与*LOC110717159*蛋白高度同源的其它科植物的氨基酸序列。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)的方法。用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算*LOC110717159*基因的相对表达量。

1.5 过表达拟南芥载体构建及转化株系籽粒性状鉴定

将大粒藜麦种质*LOC110717159*基因插入空载体

表1 本研究所涉及的引物

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	qRT-PCR
C159-R1	TACTGTCCTGCGTTACCA	
Q159-F	TCTGCGGTTGCTACTTT	
Q159-R	ACTTCTTGTGGGATGGT	
<i>TUB6</i> -F	TGAGAACGCAGATGAGTGTATG	Reference gene
<i>TUB6</i> -R	GAAACGAAGACAGCAAGTGACA	
159F	<u>actagggtctcgacc</u> ATGGGGTTAATAAGCAAACCTTCTGCG	Overexpression vector
159R	<u>actagggtctctaccg</u> TCAATTGAAACTGAGTTGGTATTTGGGCT	
35S-F	CACGGGGGACTCTTGCCACC	Identification of transgenic <i>Arabidopsis thaliana</i> positive seedlings
NOS-R	ATCATCGCAAGACCGGCAAC	
Bar-F	CGGCGACGAGCCAGGGATA	
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.

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 α 中, 通过菌液PCR检测阳性克隆, 并提取质粒进行测序比对。测序结果确认, 成功构建了pEGOEP35S-B-*LOC110717159*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自动考种分析仪及千粒重仪系统测定转基因拟南芥的粒长、粒宽和千粒重, 设3次生物学重复。

1.6 藜麦种质资源中*LOC110717159*基因的差异片段克隆

根据大、小粒藜麦种质*LOC110717159*基因在700–800 bp区段序列差异, 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种质资源中, 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)测序。

1.7 数据处理

使用Excel 2021和SPSS 16.0软件进行数据统计与差

表2 藜麦种质资源

Table 2 Quinoa germplasm material

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

异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *LOC110717159*基因克隆及序列分析

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1条全长(开放阅读框)为1 023 bp的条带, 共编码339个氨基酸残基(图1A)。经序列比对, 大、小粒藜麦种质的核苷酸在765 bp处存在1个位点差异, 序列一致性为99.90%; 导致氨基酸序列差异, 氨基酸序列一致性为99.71%(图1B)。保守结构域预测结果表明, 该基因含有“Glyco_hydro super-

family” 结构域(图2A), 属于GH17s家族。

LOC110717159蛋白理化性质预测结果表明, 大粒藜麦种质的LOC110717159蛋白分子式为C₁₆₄₂-H₂₅₆₉N₄₄₁O₄₈₉S₈, 分子量为36 568.6 Da, 不稳定指数为35.51, 脂溶性指数为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。小粒藜麦种质的LOC110717159蛋白分子式为C₁₆₄₀H₂₅₆₃N₄₄₁O₄₈₉-S₈, 分子量为36 554.53 Da, 不稳定指数为35.76, 脂溶性指数为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%)、无规则卷曲(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%)、无规则卷曲(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)。

2.2 LOC110717159基因启动子顺式作用元件分析

以大、小粒藜麦种质的籽粒DNA为模板, 利用PCR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LOC-110717159基因启动子序列存在10处差异(图4)。通过PlantCARE网站进行顺式作用元件分析, 结果显

示, LOC110717159基因启动子区域共含有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个水杨酸响应的顺式作用元件(SARE), 1个赤霉素响应的顺式作用元件(ABRE), 1个生长素响应的顺式作用元件(GGTCCAT), 同时还包括参与光响应和应激响应等顺式作用元件(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探究。

2.3 LOC110717159氨基酸序列同源比对及系统进化分析

通过DNAMAN对大、小粒藜麦种质的LOC110717159氨基酸序列与其它植物的同源蛋白氨基酸序列进行多重比对, 结果显示, 大粒藜麦种质的LOC110717-159蛋白与菠菜(*Spinacia oleracea*) KNA05536.1、甜菜(*Beta vulgaris*) NP_001306941.1、苋(*Amaranthus tricolor*) XP_057515597.1序列一致性分别为75.80%、74.34%和62.82%; 而小粒藜麦种质的LOC110717-159蛋白与菠菜KNA05536.1、甜菜NP_001306941.1和苋XP_057515597.1序列的一致性分别为76.09%、74.64%以及63.10% (图5A)。系统进化分析表

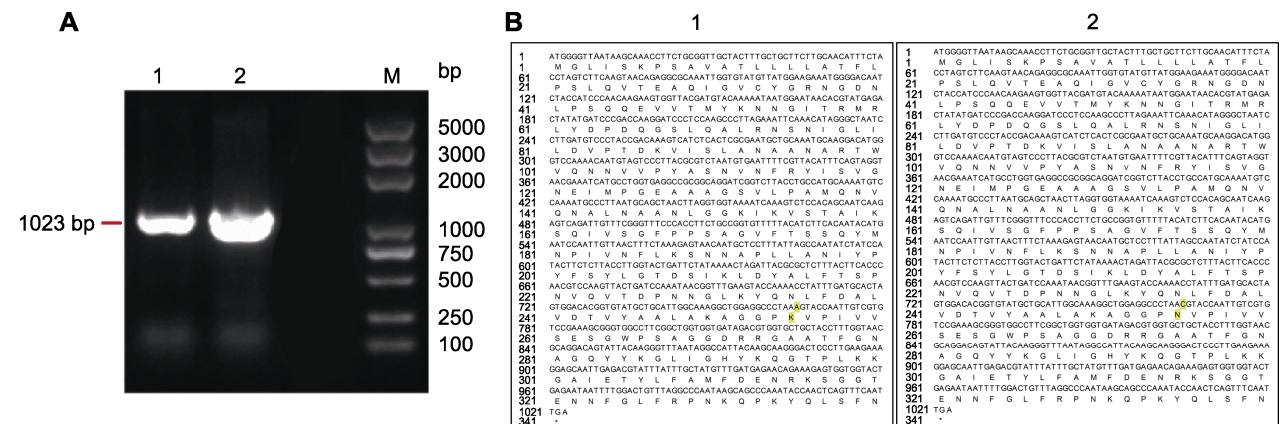


图1 LOC110717159基因的PCR扩增产物和推导的氨基酸序列 (A) LOC110717159基因的PCR扩增产物(M: Marker); (B) 推导的氨基酸序列(黄颜色代表差异)。1: 大粒藜麦种质; 2: 小粒藜麦种质

Figure 1 PCR amplified product of LOC110717159 gene and deduced amino sequences (A) PCR amplified product of LOC110717159 gene (M: Marker); (B) Deduced amino sequences (yellow colors represent differences). 1: Large-grain quinoa germplasm; 2: Small-grain quinoa germplasm

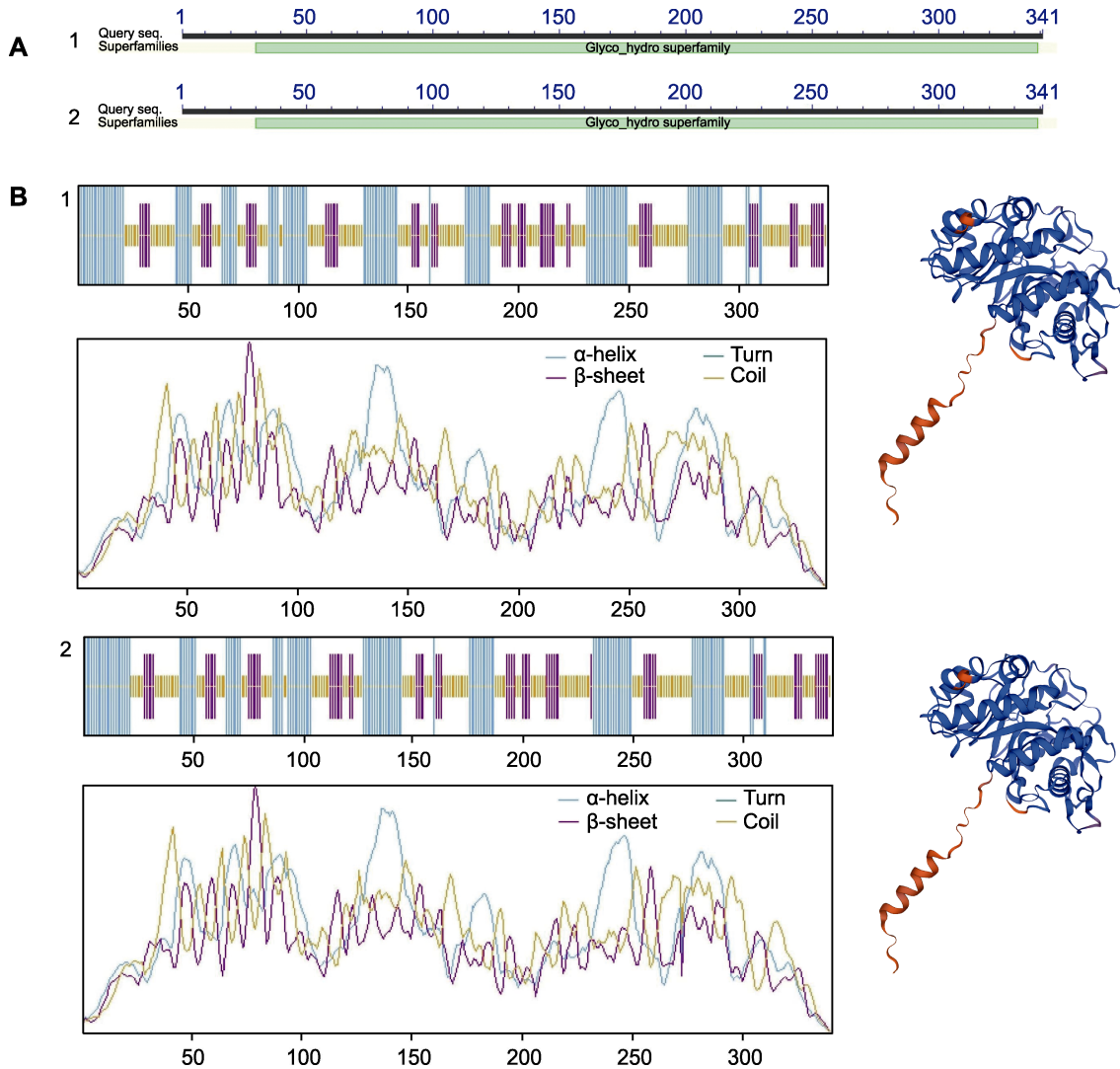


图2 *LOC110717159*蛋白的保守结构域、二级和三级结构预测
(A) 大小粒藜麦保守结构域; (B) 大小粒藜麦二级(左)和三级(右)结构。1和2同图1。

Figure 2 Prediction of conserved domains, secondary and tertiary structures of the *LOC110717159* protein
(A) Conserved structural domains in large and small grain quinoa; (B) Secondary (left) and tertiary (right) structure of large and small grain quinoa. 1 and 2 are the same as shown in Figure 1.

明, 藜麦*LOC110717159*与同属藜科和苋科的甜菜NP_001306941.1、菠菜KNA05536.1、苋XP_057515-597.1位于同一分支, 表明它们之间的亲缘关系较近(图5B)。

2.4 *LOC110717159*基因的表达模式分析

采用qRT-PCR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, 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表达量较高, 在大粒藜麦种质籽粒中的表达量显著升高(图6)。上述结果表明, 该基因可能在藜麦灌浆中后期发挥重要作用。

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*LOC110717159*基因, 通过PCR鉴

表3 (续)
Table 3 (continued)

Site name	Sequence	Number	Function
CAAT-box	CAAT/CAAAT	50	Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions
Box4	ATTAAT	7	Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
AuxRR-core	GGTCCAT	1	<i>Cis</i> -acting regulatory element involved in auxin responsiveness
ATC-motif	AGTAATCT	1	Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
ABRE	ACGTG	1	<i>Cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness
A-box	CCGTCC	1	<i>Cis</i> -acting regulatory element
ACE	CTAACGTATT	3	<i>Cis</i> -acting element involved in light responsiveness

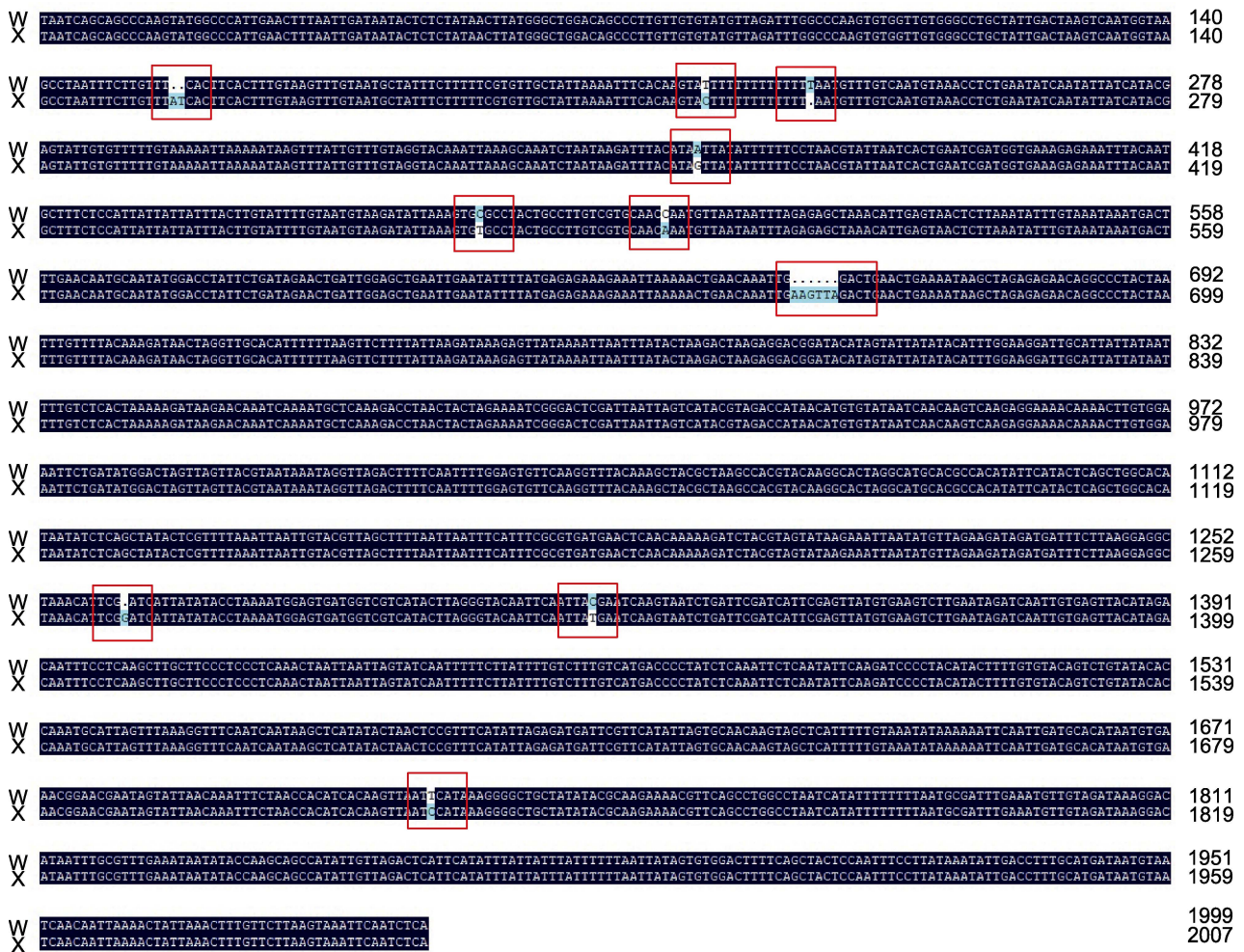


图4 *LOC110717159*基因启动子区域
红框表示核苷酸差异。W: 大粒藜麦种质; X: 小粒藜麦种质

Figure 4 *LOC110717159* gene promoter region
The red boxes in the figure indicate nucleotide differences. W: Large-grain quinoa germplasm; X: Small-grain quinoa germplasm

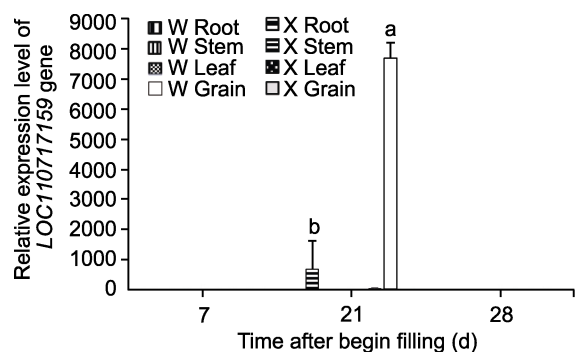


图6 *LOC110717159*在各个组织中的表达量
W和X同图4。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

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

W and X are the same as shown in Figure 4. Different lowercase letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level.

中可能发挥负调控作用。

2.6 藜麦种质中的*LOC110717159*差异片段分析

从17个藜麦种质中成功克隆了*LOC110717159*基因序列(长度为700–800 bp)。分析发现, 62.5%的千粒重大于4.0 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(图8)。因此, *LOC110717159*基因765 bp处的突变是否具有调控藜麦籽粒充实的作用, 仍需深入研究。

3 讨论

本研究通过生物信息学方法分析了藜麦*LOC110717159*基因, 该基因含有1个典型的Gyco_hydro superfamily

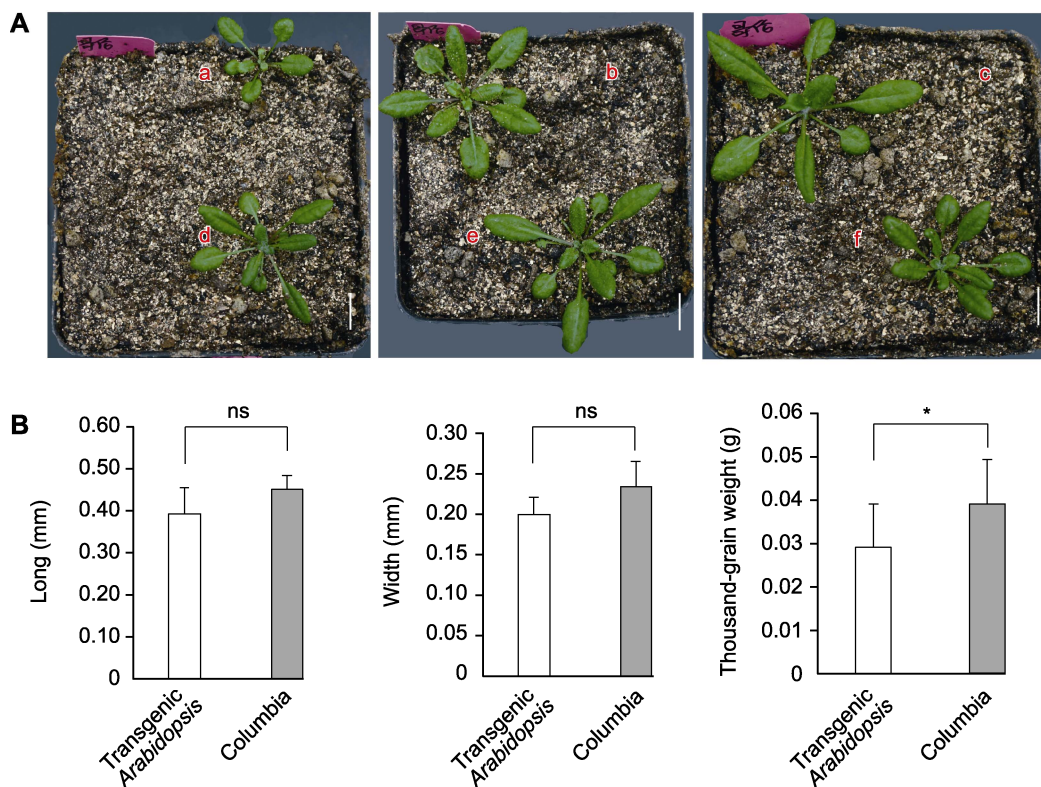


图7 T_3 代转基因拟南芥株系及籽粒性状

(A) T_3 代转基因拟南芥株系(a–c: 野生型; d–f: AtOE1、AtOE2和AtOE3) (bars=1 cm); (B) 籽粒长、宽和千粒重。* $P \leq 0.05$; ns: 无显著差异

Figure 7 T_3 generation transgenic *Arabidopsis* lines and seed morphological characteristics

(A) T_3 generation transgenic *Arabidopsis* lines (a–c: Wild-type plants; d–f: AtOE1, AtOE2, and AtOE3) (bars=1 cm); (B) Grain length, width, and 1 000 grain weight. * $P \leq 0.05$; ns: No significant difference



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。W和X同图4。

Figure 8 Clonal sequence comparison of quinoa germplasm resources

The red box in the figure shows quinoa resources with a thousand-grain weight greater than 4.0 g, and the green box shows quinoa resources with a thousand-grain weight less than 3.0 g. W and X are the same as shown in Figure 4.

结构域。SMART分析结果显示，*LOC110717159*属于GH17s家族，该家族是 β -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)和细菌(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)和谷子(*Setaria italica*) (范玉杰等, 2024)等植物中主要参与花药调控、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GH17s家族的*VviGH17-16*、*VviGH17-30*、*VviGH17-37*和*VviGH17-44*基因在果实发育阶段表达量存在显著差异(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)。上述研究表明，GH17s家族基因在调控籽粒大小方面发挥重要作用。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个氨基酸残基。通过同源比对，发现*LOC110717159*蛋白与菠菜、甜菜和苋的蛋白序列相似性较高，分别为76.09%、74.64%以及63.10%。这一结果与林彤等(2024)进行的*STK (SEE-DSTICK)*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*CqAl*，其蛋白与菠菜和甜菜的同源性比对结果与同*LOC110717159*的同源性比对结果相符。因此，推测藜麦与同科的菠菜和甜菜具有较近的亲缘关系。

在*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)认为GH17s家族大部分基因都含有激素响应元件的结果一致。植物激素是影响植物发育的重要因素之一，已鉴定到许多植物激素基因调控籽粒发育(董庆坤和刘慧丽, 2015)。因此，推测茉莉酸、水杨酸、赤霉素和生长素通过影响藜麦*LOC110717159*基因的功能调控籽粒发育。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因素影响。例如，水稻花粉发育相关的 β -1,3-葡聚糖酶基因(*Osg1*)在小花的小孢子早期以及中期阶段高表达(Wan et al.,

2011); 水稻 *RIP4* 在抽穗时期剑叶中的表达量最高 (叶凯, 2020); 水稻 *GH5* 的 *DXS* 在叶中的转录水平显著高于根、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中极显著高表达, 在小粒藜麦种质中几乎不表达, 表明该基因可能在籽粒充实过程中发挥重要作用。

最后, 我们在拟南芥中过表达 *LOC110717159* 基因, 并对 T_3 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, 本研究中野生型拟南芥的千粒重测定值约为 40 mg, 与 Jiang 等 (2013) 和 Liu 等 (2015) 报道的约为 20 mg 存在显著差异。究其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, 以及所使用的转基因株系数数量较少。后续 *LOC110717159* 具体调控机制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, *LOC110717159* 基因 765 bp 碱基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* 基因进行了初步探究, 但其在藜麦籽粒大小调控中的功能仍需进一步验证。藜麦灌浆是个复杂的过程, 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, 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 个氨基酸残基, 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, 转基因株系籽粒的千粒重显著低于野生型, 故推测 *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。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests: The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

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 β -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.
- Dong QK, Liu HL (2015). Progress on the plant hormone regulation related to seed development. *J South China Normal Univ (Nat Sci Ed)* 47(6), 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(自然科学版) 47(6), 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. *J Cereal Sci* 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. *J Nucl Agric Sci* 38, 1660–1670. (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, 1660–1670.
- Gastebois A, Mouyna I, Simenel C, Clavaud C, Coddeville B, Delepierre M, Latgé JP, Fontaine T (2010). Characterization of a new β (1–3)-glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 285, 2386–2396.

- Guo HM, Hao YQ, Yang XS, Ren GX, Richel A** (2023). Exploration on bioactive properties of quinoa protein hydrolysate and peptides: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **63**, 2896–2909.
- Han XH** (2020). Genetic Analysis and Gene Cloning of Grain Type and Spike Number Mutant *dxs* in Rice. Master's thesis. Wenjiang: 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. 温江: 四川农业大学. pp. 36–37.
- 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 Agron Sin* **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.
- Jarvis DE, Ho YS, Lightfoot DJ, Schmöckel SM, Li B, Borm TJA, Ohyanagi H, Mineta K, Michell CT, Saber N, Kharbatia NM, Rupper RR, Sharp AR, Dally N, Boughton BA, Woo YH, Gao G, Schijlen EGWM, Guo XJ, Momin AA, Negrão S, Al-Babili S, Gehring C, Roessner U, Jung C, Murphy K, Arold ST, Gojobori T, van der 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, Yin HB, Chen SH, Guo SL** (2020). Screening of reference genes and analysis of gene expression under salt stress in *Chenopodium quinoa*. *J Yantai Univ (Nat Sci Eng Ed)* **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 α -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 α -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 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*. *Chin Bull Bot* **60**, 62–73. (in Chinese with English abstract)
- 李青洋, 刘翠, 何李, 彭珊, 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.
- 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 *Andrographis paniculata*. *Mod Chin Med* **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 T, 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. *Biotechnol Bull* **40**(8), 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**(8), 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.
- Llop-Tous I, Dominguez-Puigjaner E, Palomer X, Vendrell M** (1999). Characterization of two divergent endo- β -1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiol* **119**, 1415–1421.
- Müller JJ, Thomsen KK, Heinemann U** (1998). Crystal structure of barley 1,3-1,4- β -glucanase at 2.0-Å resolution and comparison with *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase. *J Biol Chem* **273**, 3438–3446.
- Pervaiz T, Liu TH, Fang X, Ren YH, Li XY, Liu ZJ, Fiaz M, Fang JG, Shanguan 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 β -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 EJM, Rougé P** (2006). Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo- β -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- β -1,3-glucanase) from *Hevea brasiliensis* and its recognition by human basophils. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**, 329–341.
- Roy Choudhury S, Roy S, Sengupta DN** (2009). Characterization of cultivar differences in β -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.
- Stubbs HJ, Brasch DJ, Emerson GW, Sullivan PA** (1999). Hydrolase and transferase activities of the β -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* **144**, 580–594.
- Trainotti L, Spolaore S, Pavanello A, Baldan B, Casadoro G** (1999). A novel E-type endo- β -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 β -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 Hydrolyase *GH9* Gene Family in the Development Stages in Peel of *Ziziphus jujube* 'Goutouzao' Fruit. Master's thesis. Yan'an: Yan'an 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 hullless barley. *Czech J Genet Plant Breed* **58**, 1–9.
- Ye K** (2020). Preliminary Analysis of Rice Gene *RIP4* Function. Master's thesis. Guangzhou: 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. Taiyuan: 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. 太原: 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, MNR. 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 and Functional Analysis of *LOC110717159* Gene from *Chenopodium quinoa*

Xiaosuo Tao¹, Xiaohua Yao^{1,2}, Youhua Yao^{1,2*}

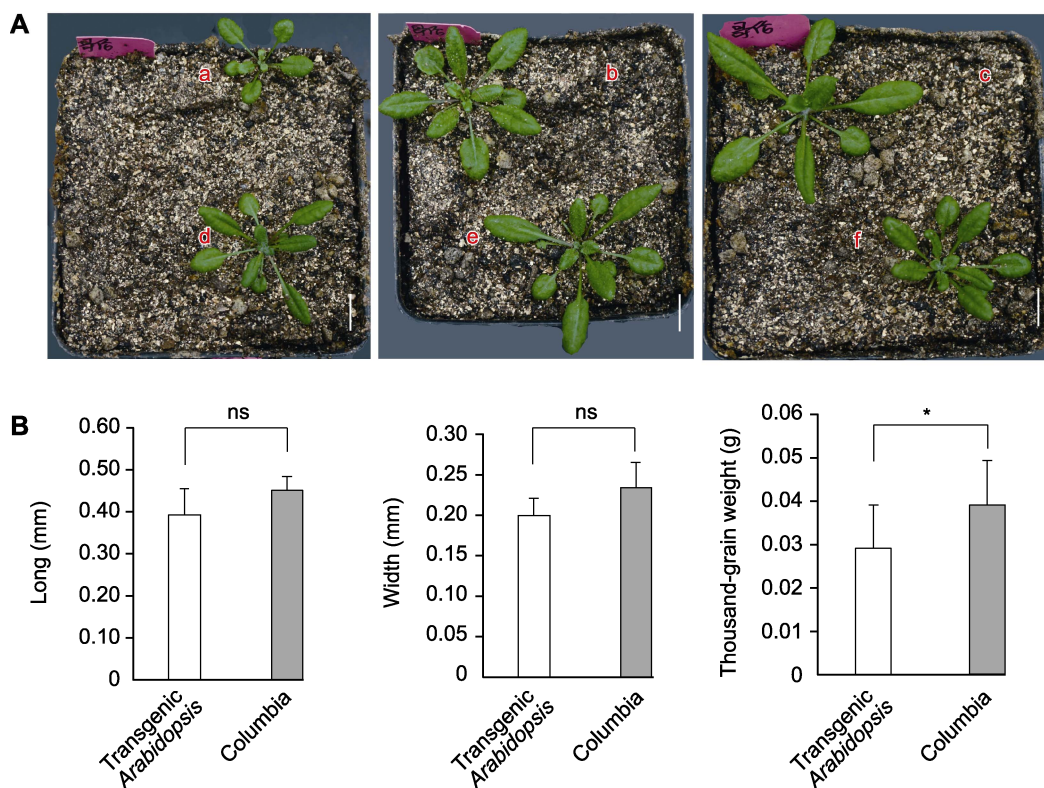
¹Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China; ²Qinghai-Tibet Plateau Germplasm Resources Research and Utilization Laboratory, Xining 810016, China

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 cloned 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 (≥ 4.0 g/1 000 grains) carried the large-grained haplotype, while 77.8% of small germplasms (≤ 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) T₃ generation transgenic

Arabidopsis lines (a–c: Wild-type plants; d–f: AtOE1, AtOE2, and AtOE3) (bars=1 cm); **(B)** Grain length, width, and 1 000 grain weight (* $P \leq 0.05$; ns: No significant difference).

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

Tao XS, Yao XH, Yao YH (2026). Cloning and functional analysis of *LOC110717159* gene from *Chenopodium quinoa*. *Chin Bull Bot* **61**, 53–67.

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

(责任编辑: 孙冬花)

通讯作者/团队简介

姚有华, 土族, 中共党员, 研究员, 博士, 博、硕士生导师, 青海省“昆仑英才·高端创新创业人才”培养领军、拔尖人才, 中亚种质改良推广科技创新院特聘专家、中国作物学会藜麦专业委员会常务委员。长期从事麦类作物育种与栽培工作, 主持国家自然科学基金项目2项, 其它省部级及以上科研项目11项; 获青海省科技进步二等奖1项, 青海省自然科学三等奖1项, 安徽省科技进步三等奖1项; 主持审(认)定和登记农作物新品种9个; 鉴定国际先进和国内领先成果各1项、登记省级成果19项; 制定地方和团体标准16项, 授权专利2项; 发表论文90余篇, 主编和副主编(参编)著作7部。