

## 荸荠球茎膨大相关基因 *COL5* 的克隆及表达分析

赵若男<sup>1,2</sup>, 玉万国<sup>2</sup>, 陈振林<sup>1</sup>, 宋慕波<sup>1,2</sup>, 刘英健<sup>1\*</sup>

1. 贺州学院食品科学与工程技术研究院, 广西贺州 542899; 2. 广西科技大学生物与化学工程学院, 广西柳州 545616

**摘要:** 荸荠 (*Eleocharis dulcis*) 的膨大球茎是其主要的可食部位, 而参与膨大过程调控的相关基因尚不清楚。*COL5* (*CONSTANS-Like 5*) 基因是 COL 基因家族成员之一, 可能在植物储存器官发育和膨大过程中发挥重要作用。为了研究荸荠 *COL5* 在球茎膨大过程中的表达模式及可能的作用, 从荸荠转录组数据库中筛选与其它植物 *COL* 基因同源性较高的转录本片段并克隆其 cDNA 序列以及 DNA 全长, 进而对其进行生物信息学分析和时空表达模式分析。结果表明: 克隆得到的荸荠膨大相关 *COL* 基因 ORF 长度为 1017 bp, 可编码 338 个氨基酸, DNA 序列长 1275 bp, 包含 1 个长度为 257 bp 的内含子, 将其命名为 *CwCOL5* (ON934922)。生物信息学分析显示, *CwCOL5* 蛋白分子式为  $C_{1592}H_{2515}N_{477}O_{508}S_{17}$ , 预测蛋白质相对分子量为 37 010.39 Da, 理论等电点为 5.89, 总平均亲水值 (gravy) 为 -0.462, 不稳定系数为 45.63, 属亲水性不稳定蛋白质, 有 31 个磷酸位点, 无跨膜结构, 无信号肽, 亚细胞预测分析显示其定位于细胞核。*CwCOL5* 含有 2 个 B-box Zinc finger 和 1 个高度保守 CCT 结构域。系统进化分析表明, *CwCOL5* 与莲藕 (*Nelumbo nucifera*)、拟南芥 (*Arabidopsis*) 的 *COL5* 蛋白亲缘关系较近。荧光定量 PCR 结果显示, *CwCOL5* 在叶片与荸荠皮中有较高的表达量, 在球茎膨大前期表达快速上升。荸荠 *COL5* 属于典型的锌指蛋白转录因子家族, 推测该基因可能参与荸荠球茎膨大过程。本研究在荸荠球茎中克隆 *COL5* 基因并分析其表达模式, 为植物球茎膨大的分子机制研究提供基础。

**关键词:** 荸荠; *CwCOL5*; 克隆; 表达分析

中图分类号: S645.3 文献标识码: A

## Cloning and Expression Analysis of Corm Enlargement Related Gene *COL5* of Chinese Water-chestnut

ZHAO Ruonan<sup>1,2</sup>, YU Wanguo<sup>2</sup>, CHEN Zhenlin<sup>1</sup>, SONG Mubo<sup>1,2</sup>, LIU Yingjian<sup>1\*</sup>

1. Institute of Food Science and Engineering Technology, Hezhou University, Hezhou, Guangxi 542899, China; 2. College of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou, Guangxi 545616, China

**Abstract:** The enlarged corm of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) is the main edible part, and the related genes involved in the regulation of the corm enlargement process remain unclear. *COL5* (*CONSTANS-Like 5*) gene is a member of COL gene family, which may play an important role in the development of plant storage organs. The transcript fragment with high homology to *COL* gene in other plants was screened from the Chinese water-chestnut transcriptome databases and cloned its cDNA sequence and full-length DNA, and then the bioinformatics analysis and spatiotemporal expression pattern analysis were analyzed to study the expression pattern and possible role of Chinese water-chestnut *COL5* during corm enlargement. The results showed that the cloned *COL5* gene related to Chinese water-chestnut enlargement had an ORF of 1017 bp, encoding 338 amino acids, and the DNA sequence was 1275 bp, containing an intron of 257 bp, which was named *CwCOL5* (ON934922). Bioinformatics analysis showed that the *CwCOL5* protein with the formula  $C_{1592}H_{2515}N_{477}O_{508}S_{17}$ , the relative molecular weight of the predicted protein was 37 010.39 Da, and a theoretical isoelectric point of 5.89. The total average hydrophilic value (gravy) was -0.462, the instability coefficient

收稿日期 2022-10-20; 修回日期 2022-12-19

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2018YFD0901003); 国家自然科学基金项目 (No. 31801607)。

作者简介 赵若男 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工与保鲜。\*通信作者 (Corresponding author): 刘英健 (LIU Yingjian), E-mail: yingjian.liu@hzxy.edu.cn。

was 45.63, which was a hydrophilic unstable protein. There were 31 phosphosites, no transmembrane structure, and no signal peptide, and additionally subcellular prediction analysis showed that it was located in the nucleus. *CwCOL5* contained two B-box Zinc fingers and a highly conserved CCT domain. Phylogenetic analysis showed that *CwCOL5* was closely related to the COL protein of *Nelumbo nucifera* and *Arabidopsis*. The results of PCR showed that *CwCOL5* had a high expression in the leaves and water-chestnut peel, and the expression of *CwCOL5* increased rapidly in the early stage of corm enlargement. The *CwCOL5* gene belongs to a typical transcription factor family of zinc finger protein, and the gene may be involved in the process of corm enlargement of Chinese water-chestnut. In this study, *COL5* gene was cloned from the corm of Chinese water-chestnut and its expression pattern was analyzed, which would provide a theoretical basis for molecular mechanism of plant corm enlargement.

**Keywords:** Chinese water-chestnut; *CwCOL5*; cloning; expression analysis

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.10.004

荸荠 (*Eleocharis dulcis*) 也称马蹄, 是禾本科莎草科荸荠属的一种浅水植物<sup>[1]</sup>。作为中国特有水生蔬菜, 荸荠在广西、福建、海南等地均有大面积种植<sup>[2]</sup>。荸荠的球茎与莲藕的根茎、马铃薯的块茎、洋葱的鳞茎等都属于地下变态茎<sup>[3]</sup>。膨大的荸荠球茎可供食用, 口感清脆、汁多味甜, 富含碳水化合物、蛋白质、维生素等多种营养物质, 具有很高的营养价值<sup>[1, 4]</sup>。荸荠球茎的膨大过程是一个复杂的发育过程, 需要经历 4 个阶段<sup>[5]</sup>。球茎膨大的第一个阶段是匍匐茎阶段, 此阶段球茎顶端开始膨大, 淀粉积累较少; 之后是膨大初期, 此时球茎开始生长, 淀粉逐渐积累; 接下来是膨大中期, 球茎生长速度减缓; 最后是膨大后期, 此阶段球茎生长速度又加快, 淀粉快速积累<sup>[6-8]</sup>。球茎的发育直接关系到荸荠的产量。因此, 开展荸荠球茎膨大的分子机理研究对优化荸荠育种有重要意义。

近期研究中发现 CONSTANS-Like (COL) 基因家族成员可能在变态茎发育过程中起主要的调控作用。COL 属于锌指蛋白转录因子家族, 已知其家族成员在植物生长发育过程中扮演重要角色<sup>[9-10]</sup>。COL 基因包含 2~3 个保守结构域, 靠近 N 端有 1 个或者 2 个 B-box Zinc finger 结构域, 另外一个靠近 C 端的由约 43 个氨基酸组成的 CCT 保守结构域<sup>[5, 11]</sup>。目前, COL 基因家族已经在许多物种中相继报道。在拟南芥中发现了 17 个 COL 基因家族成员<sup>[12]</sup>, 在水稻 (*Oryza sativa*) 中至少有 16 个<sup>[13]</sup>, 大麦 (*Hordeum vulgare*) 中有 9 个<sup>[13]</sup>, 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中有 15 个<sup>[14]</sup>, 杜仲 (*Eucommia ulmoides*) 有 8 个 COL 基因<sup>[9]</sup>。以往研究发现, COL 基因家族不同成员的功能各不相同。在拟南芥中的一系列研究发现, *AtCOL4* 通过脱落酸依赖性信号参与植物非生物胁迫反应, 增强植物的耐受性<sup>[15]</sup>。过表达 *AtCOL9* 可以

延迟拟南芥开花<sup>[16]</sup>。*AtCOL3* 是侧根发育和形成的正调控因子, 另外在短日光条件下, 抑制芽的伸长, 促进分支芽的形成<sup>[17]</sup>。*AtCOL7* 在拟南芥分支形成和下胚轴的伸长中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。烟草中有 3 个 COL 基因在低温环境中表现出较大的差异, *NtCOL13b* 在叶片中有较高的表达量, 而 *NtCOL16c* 和 *NtCOL16d* 刚好相反<sup>[14]</sup>。最近研究发现, COL 基因在植物贮藏器官发育中扮演着重要角色。莲藕 *NnCOL5* 基因参与根茎的膨大, 尤其在根茎膨大中期 (S3 时期) 表达量最高, 并且在马铃薯中过表达 *NnCOL5* 可明显促进块茎单薯重和淀粉显著升高<sup>[19]</sup>。通过反义基因技术证实马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 中的 1 个 COL 家族成员在块茎膨大发育过程中起负调控作用<sup>[20]</sup>。虽然在部分植物变态茎的发育过程中证实了 COL 基因的重要作用, 但荸荠球茎中仅对淀粉合成过程中关键酶编码基因进行了克隆<sup>[21-24]</sup>, 膨大过程中 COL 基因的作用尚未有相关研究。

鉴于此, 本研究从前期转录组数据中筛选并克隆荸荠球茎膨大相关 COL 基因, 并对该基因序列进行生物信息学分析, 同时利用荧光定量 PCR 分析该基因在球茎膨大过程中以及在不同组织中的表达模式。为进一步研究 COL 家族基因在荸荠膨大这一过程的分子机制和基因功能研究提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料选取广西地方品种桂林荸荠, 采自广西贺州市八步区荸荠种植田, 根据荸荠球茎不同发育时期 (S<sub>1</sub>~S<sub>4</sub> 时期, 球茎最宽处直径分别约为 10、20、35、50 mm) 进行取样。同时采集球茎膨大后期的根、叶片、荸荠皮和荸荠肉样品。

液氮速冻于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱备用。植物 RNA 提取试剂盒购自华越洋生物科技(北京)有限公司;植物基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;反转录试剂盒、载体 PMD18-T、DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态均购自 TaKaRa 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 荸荠基因组 DNA、总 RNA 和 cDNA 的合成 从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中取出步骤 1.1 所储存的样品,按照植物基因组 DNA 提取试剂盒的使用说明书分别进行荸荠样品 DNA、总 RNA 的提取。用超微量紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和含量。对合格的 RNA 进行反转录从而获得 cDNA 第一链, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存。

1.2.2 荸荠 *COL5* 基因的克隆 前期取荸荠叶、茎、根和球茎不同膨大时期的组织采用 Pacbio 平台进行全长转录组测序(Pacbio full-length cDNA sequencing),测序共获得 154 398 个转录本序列信息。在此荸荠转录组中筛选得到的 *CwCOL5* 基因序列信息设计引物(*CwCOL5*-F: 5'-ATGGG-AATAGAAAAAGGAGCCAAGT-3', *CwCOL5*-R: 5'-TCAAATGTCTGGCACCACACTGTAC-3')。

分别以荸荠球茎组织的 DNA、cDNA 为模板进行 PCR 扩增,具体反应体系及反应程序见表 1 和表 2。通过 1%琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行

检测,切胶,使用 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化回收,将回收产物连接至 PMD18-T 载体后转入 DN5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞中,经过菌液 PCR 后,挑选阳性克隆进行送测。

1.2.3 荸荠 *COL5* 基因生物信息学分析 生物信息学分析参考董伟清等<sup>[24]</sup>和宋慕波等<sup>[25]</sup>的方法进行。利用 ORF finder、BLASTN、BLASTP、DNAMAN、ProtParam Tool、ExPaSy-SOPMA、SWISS-MODEL、SignalP 4.1 Server、Conserved Domains、TMHMM Server v.2.0 以及 NetPhos 2.0 Server 软件进行生物信息学分析;利用 ClustaW 1.83 和 Mega 5 软件构建系统进化树。

1.2.4 荸荠 *COL5* 基因实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析 依据获得的 *CwCOL5* 基因序列设计荧光定量引物(*CwCOL5*-F: 5'-ACGCTAAGT-CTGGCTATAGCTCTCT-3', *CwCOL5*-R: (5'-ATGCATAGCGGATTGTCTTCTC-3'), 该引物位于 COL 家族序列保守度低的区域,以避免该家族其它成员的干扰。以荸荠不同膨大时期( $S_1\sim S_4$ 时期)和不同组织(荸荠皮、荸荠根、荸荠肉和荸荠叶片)的 cDNA 为模板,以 18s rRNA (登录号: MG742686) 为内参,进行 RT-qPCR 扩增。测定方法参考何芳练等<sup>[22]</sup>的方法进行,采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算相对表达量。

## 1.3 数据处理

采用 Microsoft Office 2019 软件进行数据处理和分析,使用 Origin 2018 和 Adobe Photoshop 2021 软件进行图片处理及美化。

## 2 结果与分析

### 2.1 荸荠 *COL5* 基因的克隆

在荸荠转录组数据库中筛选被注释为 COL 家族成员的转录本片段,其中编号为 isoform\_7928 的转录本预测蛋白与同为莎草科的蒿草(*Carex littledalei*) COL 家族成员同源性高达 87%。在 NCBI 中的序列比对结果显示,该基因片段与其他物种的 COL 基因核苷酸序列同源性较高,其中与油棕(*Elaeis guineensis*)和生姜(*Zingiber officinale*)的核苷酸同源性分别为 78.82%、77.97%。以该片段设计特异性引物,分别以荸荠球茎组织的 DNA、cDNA 为模板,通过 PCR 扩增克隆分别得到长度约为 1000 bp 和 1200 bp 的片段(图 1)。经回收测序结果表明,以 cDNA 为模板扩增得到的 cDNA 片段长为

表 1 PCR 扩增反应体系

Tab. 1 PCR amplification reaction system

| 试剂名称 Reagent name  | 用量 Dosage/ $\mu\text{L}$ |
|--------------------|--------------------------|
| Premix Taq 酶       | 25                       |
| 模板 cDNA            | 1                        |
| M13-F              | 1                        |
| M13-R              | 1                        |
| ddH <sub>2</sub> O | 22                       |

表 2 PCR 扩增反应程序

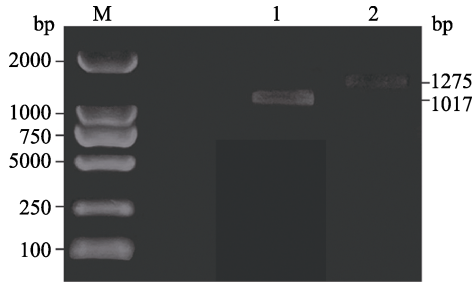
Tab. 2 PCR amplification reaction procedure

| 步骤 Step | 温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$ | 时间 Time/min |
|---------|------------------------------------|-------------|
| 1       | 94                                 | 3           |
| 2       | 95                                 | 0.25        |
| 3       | 55                                 | 0.5         |
| 4       | 72                                 | 1.5         |
| 5       | 72                                 | 10          |
| 6       | 4                                  | $\infty$    |

注:步骤 2~4, 35 个循环。

Note: Step 2 to 4, 35 cycles.

1017 bp, 编码 338 个氨基酸 (图 2), 将其命名为 *CwCOL5*, 登录号为 ON934922。以荸荠基因组 DNA 为模板扩增得到的 DNA 片段长为 1275 bp, 其含有 1 个长度为 257 bp 的内含子 (图 3)。



M: DL 2000 DNA marker; 1: 以 cDNA 为模板的扩增产物; 2: 以基因组 DNA 为模板的扩增产物。

M: DL 2000 DNA marker; 1: PCR amplification product of cDNA; 2: PCR amplification product of genomic DNA.

图 1 *CwCOL5* 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR amplification products of *CwCOL5* gene

```

1 ATGGGAATAGAAAAAGGACCAAGTGTGGGGCATCGAATCGGCCCGCTGCGACTCGTGC
1 M G I E K G A K C W G I E S R R C D S C
61 AAGAGCGCGCTGCTCTCTACTGCCGCGCGACTCCGCTTCTCTGTGGCACGTGC
21 K S G A A L L Y C R A D S A F L C G T C
121 GATGCAGTGTGCACTCCGCCAACCTCTCTCGACGCCACGACCGTGTCTTGTCTGC
41 D A R V H S A N L L S R R H D R V L L C
181 GAGGTCTGTGAGCAAGTCTCTGCTGTGACGTGCAAGGCGATGACAGTCCGCTCTGT
61 E V C E Q A P A S V T C K A D A A A L C
241 GCCACGTGCGACTCCGATATCCACTCCGTAATCCGTTGTCCTCGCCACGAGCGGTT
81 A T C D S D I H S A N P L S R R H E R V
301 CCTGTCAATCCCTTCTGGATTCCGCACACTCCGGCGGATCCGCATCCGTGTAGGCTC
101 P V I P F L D S P H S G G S A S V D R L
361 TTCGTCATGATGAAGACGGGAGCCAAAGGAGGAGAAACGAGGCCGAGCGGAGTCG
121 F G H D E D G E A K G E E N E A E A E S
421 TGGATCTTACCGAACCGGGCGTGAACAACACGAACCTGAACTCGAACAAATGGGCAAC
141 W I L P N A G V N N T N L N S N N G N
481 GTGTCAGTTTCAATTTGAACAAGGGCGTGGTTGAGATGGAGAAATTCGGTTCCGGGAG
161 V F S F N L N K G L V E M E E F G F G E
541 GCTGAACTCGACCCGTTTGTGATCTGGAGAGTTGCAACAGCAGATGGATAGTCTCGTG
181 A E L D P F V D L E R L Q Q Q M D S V V
601 CCGTACGAGCTGGTAATAACGGTACTGGTAGTGGCTGTGTCATGTGGGGTCCACTGTC
201 P V R A G N N G T G S G S V H V G S T V
661 ATGCTAGATTTTGGTCCCAACGCTAAGTCTGGCTATAGCTCTCCCTCGAACTCCCTC
221 M L D F G A N A K S G Y S S L P A N S F
721 AGTCAAAGTTTGTCTCTCTGAGGTGGTGGTGGCTGATGTAACAAAGCCTATCAGC
241 S Q S L S S S E V G V V P D V T K P I T
781 AAGGCTGAGCTGGCGTTGACAGGGAAGCGAGGCTTATGCGCTACCGAGAGAGCGCAAG
261 K A E L A V D R E A R L M R Y R E K R K
841 AACCGCCGTTGAGAGACAATCCGCTATGATCCCGCAAGCGTATGCTGAGACACGG
281 N R R F E K T I R Y A S R K A Y A E T R
901 CCACGCATCAAGGCGGTTTGAAGAAGGAGATGCCAGCCTGAGGTGGAGCAGTTT
301 P R I K G R F A K R R D A E P E V E Q F
961 GACCGTGTGTTCCGATTCATGATCGATCCTGGGTACAGTGTGTTGCCGACATTTTGA
321 D R V F D F M I D P G Y S V V P T F *
  
```

图 2 *CwCOL5* 基因 ORF 序列及其编码的氨基酸序列  
Fig. 2 *CwCOL5* gene ORF sequence and its encoded amino acid sequence

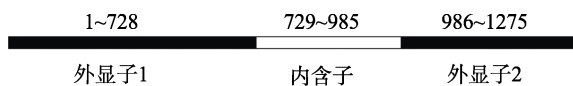


图 3 *CwCOL5* 基因结构图

Fig. 3 Structure diagram of the *CwCOL5* gene

## 2.2 *CwCOL5* 基因的生物信息学分析

2.2.1 *CwCOL5* 蛋白理化性质分析 利用 ExPaSy-SOPMA 软件对 *CwCOL5* 氨基酸序列的

理化性质进行预测。结果表明, *CwCOL5* 蛋白质由 338 个氨基酸组成, 其中丙氨酸 (Ala) 和丝氨酸 (Ser) 占比最高, 分别为 9.8% 和 9.5%, 其次是精氨酸 (Arg), 为 8.3%, 不含吡咯赖氨酸 (Pyl)、晒半胱氨酸 (Sec)。分子式为  $C_{1592}H_{2515}N_{477}O_{508}S_{17}$ , 总原子数 5109, 理论等电点为 5.89, 相对分子质量为 37 010.39, 有 43 个带正电荷 (Asp+Lys) 的氨基酸残基, 有 48 个带负电荷 (Asp+Glu) 的氨基酸残基。亲疏水性分析发现 (图 4), *CwCOL5* 蛋白质第 218 位氨基酸残基疏水性最强 (Score=1.467), 第 279 位氨基酸残基亲水性最强 (Score=-3.789), 总平均亲水值 (GRAVY) 为 -0.462, 不稳定系数为 45.63, 推测为亲水性不稳定蛋白质。

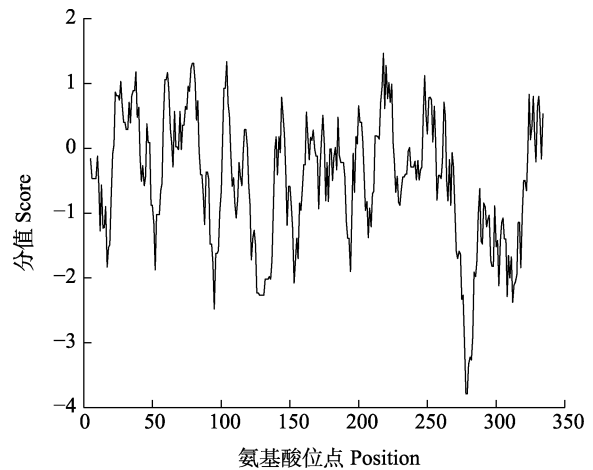


图 4 *CwCOL5* 蛋白氨基酸的亲/疏水性分析

Fig. 4 Prohibicity/hydrophobicity analysis of amino acids for *CwCOL5* protein

2.2.2 *CwCOL5* 蛋白质结构预测分析 利用 Plant-mPloc server 在线软件对 *CwCOL5* 蛋白质序列进行亚细胞定位分析, 发现该蛋白定位于细胞核。对 *CwCOL5* 蛋白质进行磷酸化位点预测, 结果发现, 该蛋白有 31 个磷酸化位点, 丝氨酸 (Ser) 23 个, 苏氨酸 (Thr) 5 个, 酪氨酸 (Tyr) 3 个, 其中第 292 位丝氨酸预测得分最高, 为 0.996。利用 SignalP 4.1 Server 软件预测蛋白质信号肽, 并利用 TMHMM Server v.2.0 软件预测蛋白质跨膜结构。结果显示, *CwCOL5* 编码的蛋白质无信号肽, 且不含跨膜结构域。

*CwCOL5* 蛋白质的二级结构显示, 该蛋白具有 113 个 (33.43%)  $\alpha$ -螺旋、13 个 (3.85%)  $\beta$ -折叠、178 个 (52.66%) 无规则卷曲和 34 个 (10.06%) 延伸链。使用 Swiss-Model 软件对

CwCOL5 蛋白的三级结构进行同源建模, 以系统自动匹配度最高的 7wsj.2.A 为参考建模时发现, 其三级结构模型中无规则卷曲所占比例最高, 与二级结构预测结果一致。

2.2.3 CwCOL5 保守结构域分析 将 CwCOL5 基因编码的蛋白氨基酸序列提交至 Pfam 网站在 NCBI 进行蛋白结构域预测, 结果发现 (图 5), CwCOL5 编码的蛋白序列有 2 个高度保守的 B-box Zinc finger 和 1 个 CCT 结构域。从结构域位置来分析, CCT 结构域位于 CwCOL5 蛋白的 C 端, 基序长为 43 个氨基酸, 2 个 B-box Zinc finger 位于 N 端且紧密相邻。

2.2.4 多序列比对分析和系统进化树构建 使用

GENEDOC 对 CwCOL5 蛋白质序列同在 NCBI 数据库中下载的 19 个其他植物 COL 蛋白质序列进行多序列比对分析 (图 6)。结果中黑色部分表示蛋白序列同源性最高, 其次是深灰色、浅灰色。荸荠 COL5 与其他植物同源蛋白氨基酸有较高的一致性, 在 C 端和 N 端的序列都相对保守。采用 MEGA 5.0 软件中的 Neighbor-Joining 法构建 CwCOL5 氨基酸序列与拟南芥、烟草、番茄 (Solanum lycopersicum)、高粱 (Sorghum bicolor)、小米 (Setaria italica)、大麦等 19 个物种 COL 氨基酸序列的系统进化树 (图 7), 结果发现, 依据拟南芥 COL 蛋白可以分为 2 个不同的分支, 其中荸荠 CwCOL5 蛋白与 ATCOL5 等物种 COL

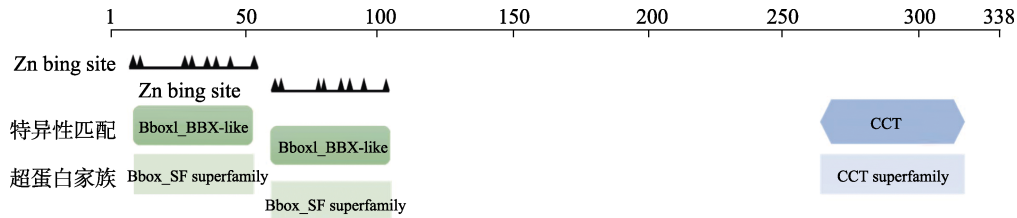


图 5 CwCOL5 蛋白结构域预测

Fig. 5 CwCOL5 protein domain prediction

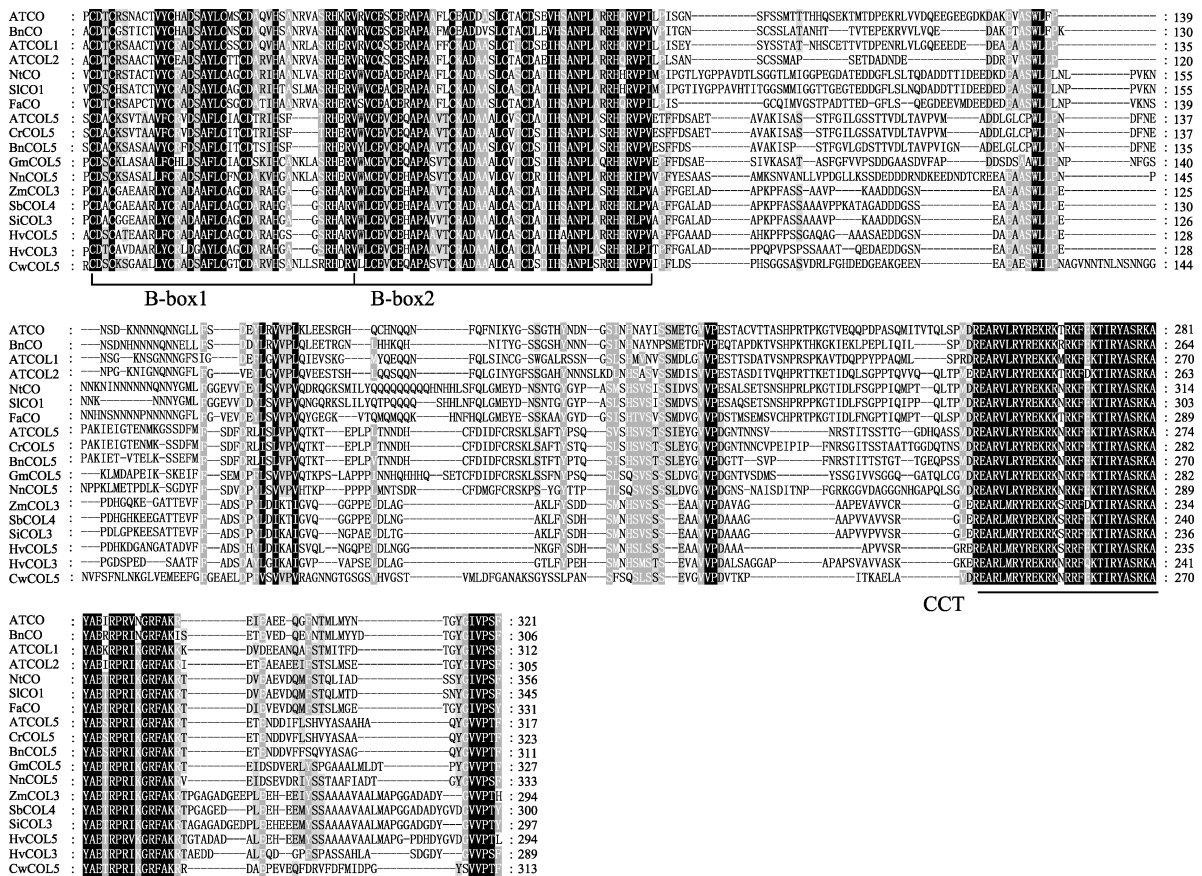


图 6 CwCOL5 氨基酸序列比对

Fig. 6 CwCOL5 amino acid sequence alignment

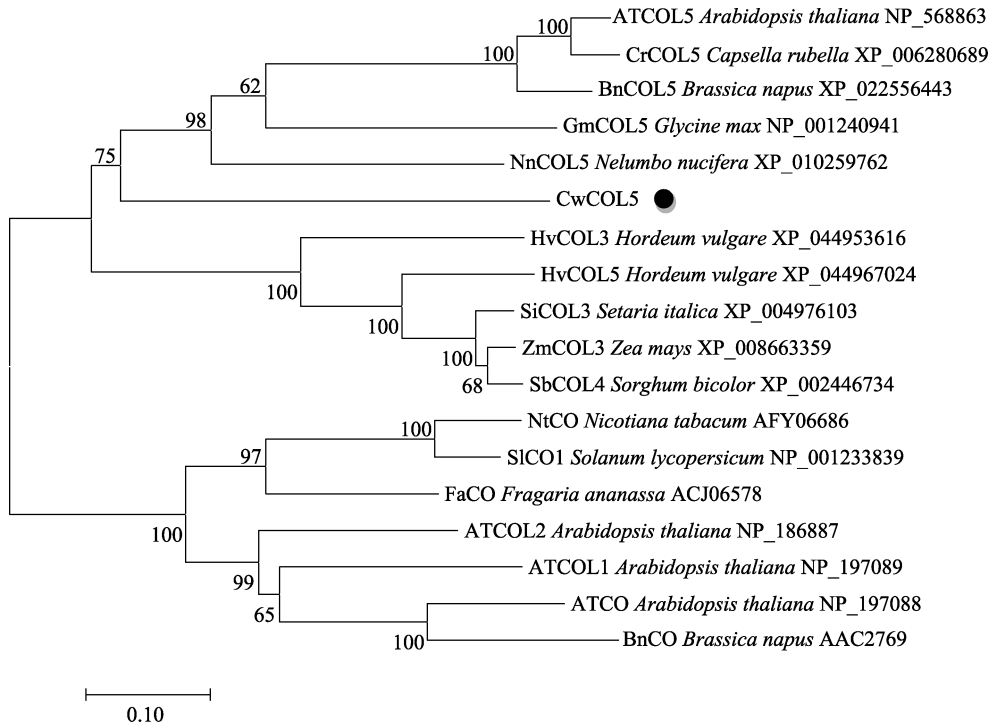
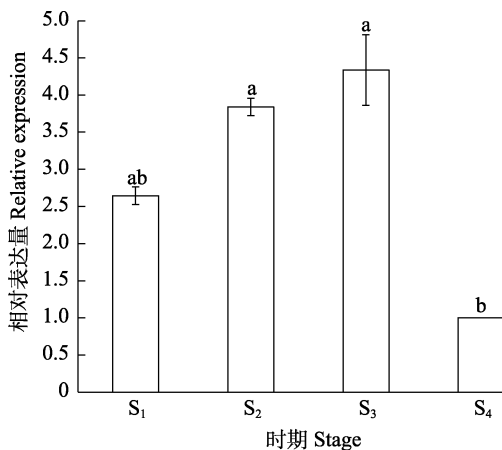


图 7 CwCOL5 蛋白系统发育进化树  
Fig. 7 CwCOL5 protein phylogenetic evolutionary tree

蛋白亲缘关系较近。

### 2.3 CwCOL5 基因在球茎膨大过程中的表达分析

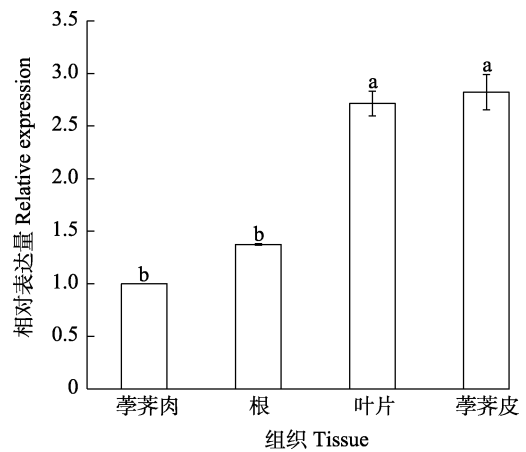
为了解 CwCOL5 基因在荸荠球茎膨大 4 个时期的表达情况，根据序列结果设计引物进行 RT-qPCR 检测，结果显示，CwCOL5 基因 S<sub>4</sub> 时期的表达量显著低于 S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub> 时期 (P<0.05)，S<sub>3</sub> 时期的表达量最高 (图 8)。



不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。  
Different lowercase letters indicate significant difference (P<0.05).  
图 8 CwCOL5 基因在荸荠球茎膨大过程中的表达分析  
Fig. 8 Expression analysis of CwCOL5 gene during corm enlargement in Chinese water-chestnut

### 2.4 荸荠 CwCOL5 基因组织表达模式分析

由图 9 可知，CwCOL5 基因在荸荠肉、根、叶片和荸荠皮中均有并表达，其中，在叶片和荸荠皮中的表达非常显著且表达水平相当 (P<0.05)，在荸荠肉和根部位表达水平相当。



不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。  
Different lowercase letters indicate significant difference (P<0.05).  
图 9 CwCOL5 基因在荸荠不同组织中的表达  
Fig. 9 Expression of CwCOL5 gene in different tissues of Chinese water-chestnut

## 3 讨论

荸荠在我国长江流域以及广西、广东等南方

各省(区)都有大面积种植,被广泛用于食品、医药等领域,具有较高的营养价值、生态价值和经济价值<sup>[1,4]</sup>。研究发现 *COL* (*CONSTANS-Like*) 基因是植物储存器官发育的重要调控基因<sup>[26-27]</sup>。然而,荸荠球茎作为一种典型的贮藏器官和变态茎,其球茎膨大调控机制的相关研究较少。本研究克隆得到可能参与荸荠球茎膨大调控的 *CwCOL5* 基因,该序列 ORF 长度为 1017 bp,可编码 338 个氨基酸,其 DNA 序列长 1275 bp,包含 1 个内含子。*CwCOL5* 基因结构特征以及长度均与莲藕 *COL5* 和马铃薯 *COL* 相似<sup>[20,28]</sup>。

目前研究认为 CO-FT 通路在植物变态茎发育的调控中起重要作用,而在该通路中 *COL* 基因家族扮演重要角色<sup>[29-30]</sup>。在拟南芥中,*COL* 基因家族蛋白根据其结构可分为 3 组,第 I 组包含 2 个 B-box 结构域和 1 个 CCT 结构域;第 II 组只包含 1 个 B-box 域和 1 个 CCT 域;而第 III 组包含 1 个 B-box 结构域、1 个次级锌指蛋白结构域和 1 个 CCT 结构域<sup>[13,19,25]</sup>。*CwCOL5* 与拟南芥 *COL* 基因家族第 I 组的结构相同。马铃薯 *COL* 蛋白包含 2 个 B-box 结构域和 1 个 CCT 结构域,也属于第 I 组<sup>[20]</sup>。*COL* 蛋白在许多植物中参与光信号的感受与转导进而影响植物开花,例如过表达 *AtCOL5* 时,*FT*、*SOC1* 相关开花基因表达上调,从而导致拟南芥可以在短时间内开花<sup>[31]</sup>。然而,有研究表明 *COL* 在马铃薯和莲藕中参与了马铃薯块茎膨大以及淀粉含量积累的调控<sup>[19]</sup>。因此,本课题组推测与 *AtCOL5* 和 *NnCOL5* 近缘的 *CwCOL5* 可能参与荸荠球茎的发育调控。

*CwCOL5* 在荸荠不同组织和球茎不同发育阶段均有明显表达,*CwCOL5* 在荸荠叶片和荸荠皮中表达量较高,在荸荠果肉中的表达量相对较低。马铃薯 *COL* 基因在叶片中的表达高于其他组织<sup>[32]</sup>,水稻、大豆、杨树中的 *COL* 基因作用的主要部位也是在叶片<sup>[30,33-34]</sup>,本研究发现 *CwCOL5* 的表达模式与上述结果大体一致。在球茎发育过程中 *CwCOL5* 在球茎膨大前期表达量快速上升,而在膨大后期显著下调,这一表达模式与马铃薯 *StCOL*、莲藕 *NnCOL5* 相似<sup>[19,31]</sup>。基于上述结果,推测 *CwCOL5* 可能参与了荸荠球茎膨大过程,但球茎膨大过程存在复杂的调控机制,*CwCOL5* 与 CO-FT 途径其它关键基因如 *FKF1*、*CDF1* 和 *SP6A* 等的相互影响有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 江文,李杨瑞,杨丽涛,陈丽娟,蒙平. 荸荠球茎主要性状观察及营养品质分析[J]. 中国蔬菜, 2009(2): 51-54.  
JIANG W, LI Y R, YANG L T, CHEN L J, MENG P. Study on agronomic characters and nutrition of Chinese water-chestnut (*Eleocharis tuberosa*)[J]. China Vegetables, 2009(2): 51-54. (in Chinese)
- [2] 欧昆鹏,陈丽娟,郭畅,江文,蔡炳华,韦绍龙,苏宾,林贵美,严华兵. 广西荸荠产业现状与发展建议[J]. 南方农业学报, 2013, 44(2): 356-359.  
OU K P, CHEN L J, GUO C, JIANG W, CAI B H, WEI S L, SU B, LIN G M, YAN H B. Current status of Guangxi water chestnut industrial development and its developing suggestions[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(2): 356-359. (in Chinese)
- [3] 陈丽娟,江文,蔡炳华,蒙平,闭志强,翟品球,桂杰,苏宾,苏国秀,张露,赵明. 淀粉型荸荠新品种桂粉蹄 1 号选育[J]. 中国蔬菜, 2011(2): 107-109.  
CHEN L J, JIANG W, CAI B H, MENG P, BI Z Q, ZHAI P Q, GUI J, SU B, SU G X, ZHANG L, ZHAO M. A starch-based water chestnut Variety-Guifenti No.1[J]. China Vegetables, 2011(2): 107-109. (in Chinese)
- [4] 张怡,胡月珍,李小根. 荸荠营养成分及保健价值的研究[J]. 科技创业家, 2013(6): 198.  
ZHANG Y, HU Y Z, LI X G. Study on nutritional ingredients and health care value of Chinese water chestnut[J]. Technological Pioneers, 2013(6): 198. (in Chinese)
- [5] 朱世东,李曙轩. 荸荠球茎萌发与形成过程的生化变化[J]. 园艺学报, 1987(3): 179-184.  
ZHU S D, LI S X. Biochemical change during sprouting and formation of the corms of Chinese water chestnut[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1987(3): 179-184. (in Chinese)
- [6] 朱世东,李曙轩. 荸荠球茎的形成与膨大[J]. 中国蔬菜, 1987(2): 5.  
ZHU S D, LI S X. Corm formation and expansion of Chinese water chestnut[J]. China Vegetables, 1987(2): 5. (in Chinese)
- [7] 徐国鑫,李效尊,杨百战,杜绍印,尹静静,吴修. 荸荠球茎膨大及淀粉积累规律研究[J]. 长江蔬菜, 2015(22): 81-83.  
XU G X, LI X Z, YANG B Z, DU S Y, YIN J J, WU X. Study on expansion and amyloids accumulation of water chestnut corm[J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2015(22): 81-83. (in Chinese)
- [8] 朱世东. 荸荠球茎膨大生理的研究[J]. 安徽农业科学, 1996(1): 51-54.  
ZHU S D. Physiological studies on corm expansion of Chinese water-chestnut (*Eleocharis tuberosa* Schult)[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 1996(1): 51-54. (in Chinese)

- [9] 刘俊, 李龙, 陈玉龙, 刘燕, 吴耀松, 任闪闪. 杜仲 *CONSTANS-like* 全基因组鉴定、系统进化及表达模式分析[J]. 浙江农林大学学报, 2022, 39(3): 475-485.  
LIU J, LI L, CHEN Y L, LIU Y, WU Y S, REN S S. Genome-wide identification, system evolution and expression pattern analysis of *CONSTANS-like* in *Eucommia ulmoides*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2022, 39(3): 475-485. (in Chinese)
- [10] 蔡雨蒙, 何崇单, 李萌, 董金金, 刘伟, 王俊焱, 王义强. 银杏 *CONSTANS-Like* 基因的克隆与序列分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2018, 38(12): 121-128.  
CAI Y M, HE C D, LI M, DONG J J, LIU W, WANG J Y, WANG Y Q. Cloning and sequence analysis of a *CONSTANS-Like* gene in *Ginkgo biloba*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2018, 38(12): 121-128. (in Chinese)
- [11] 孔进喜, 韩文芳, 吕广英, 熊善柏, 赵思明. 荸荠食品加工研究进展[J]. 保鲜与加工, 2011, 11(1): 43-46.  
KONG J X, HAN W F, LYU G Y, XIONG S B, ZHAO S M. Research progress of Chinese water chestnut processing[J]. Storage and Process, 2011, 11(1): 43-46. (in Chinese)
- [12] ROBSON F, COSTA M M, HEPWORTH S R, VIZIR I, PINEIRO M, REEVES P H. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants[J]. The Plant Journal, 2001, 28(6): 619-631.
- [13] GRIFFITHS S, DUNFORD R P, COUPLAND G, LAURIE D A. The evolution of *CONSTANS-Like* gene families in *Barley*, *Rice*, and *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2003, 131(4): 1855-1867.
- [14] 张雅文, 梁山, 徐国云, 郭无暇, 邓书林. 烟草 *CONSTANS-like* 基因家族的鉴定与分析[J]. 植物学报, 2021, 56(1): 33-43.  
ZHANG Y W, LIANG S, XU G Y, GUO W X, DENG S L. Genome-wide identification and analysis of *CONSTANS-like* gene family in *Nicotiana tabacum*[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2021, 56(1): 33-43. (in Chinese)
- [15] MIN J H, CHUNG J S, LEE K H, KIM C S. The *CONSTANS-like 4* transcription factor, *AtCOL4*, positively regulates abiotic stress tolerance through an abscisic acid-dependent manner in *Arabidopsis*[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2015, 57(3): 313-324.
- [16] CHENG X F, WANG Z Y. Overexpression of *COL9*, a *CONSTANS-Like* gene, delays flowering by reducing expression of *CO* and *FT* in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2005, 43(5): 758-768.
- [17] DATTA S, HETTIARACHCHI G H C M, DENG X M, HOLM M. *Arabidopsis CONSTANS-Like 3* is a positive regulator of red light signaling and root growth[J]. The Plant Cell, 2006, 18(1): 70-84.
- [18] WANG H G, ZHANG Z L, LI H Y, ZHAO X Y, LIU X M, ORTIZ M, LIN C T, LIU B. *CONSTANS-Like 7* regulates branching and shade avoidance response in *Arabidopsis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(4): 1017-1024.
- [19] CAO D, LIN Z Y, HUANG L Y, DAMARIS R N, YANG P F. A *CONSTANS-Like* gene of *Nelumbo nucifera* could promote potato tuberization[J]. Planta, 2021, 253(3): 1-11.
- [20] 郭建林. 马铃薯 *StCOL* 和 *StTFL1* 的克隆及其在块茎形成中的功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.  
GUO J L. Cloning and functional analysis of *StCOL* and *StTFL1* in potato tuberization[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2008. (in Chinese)
- [21] 俞梅珍. 荸荠颗粒结合型淀粉合成酶基因的克隆与表达分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.  
YU M Z. Cloning and expression analysis of granule-bound starch synthase gene in Chinese water chestnut (*Eleocharis tuberosa*)[D]. Yangzhou: The Yangzhou University, 2017. (in Chinese)
- [22] 何芳练, 邱祖杨, 董伟清, 刘莉莉. 荸荠 *EdAGPL1* 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(17): 5654-5661.  
HE F L, QIU Z Y, DONG W Q, LIU L L. Cloning and expression analysis of *EdAGPL1* gene in *Eleocharis dulcis*[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(17): 5654-5661. (in Chinese)
- [23] 赵若男, 刘英健, 帅良, 刘云芬, 殷菲胧, 陈振林, 宋慕波. 荸荠 *CwSSI* 基因克隆及其在球茎膨大过程中的表达分析[J/OL]. 分子植物育种, 2022: 1-16[2023-09-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220812.1057.002.html>.  
ZHAO R N, LIU Y J, SHUAI L, LIU Y F, YIN F L, CHEN Z L, SONG M B. Cloning and expression analysis of the *CwSSI* gene in Chinese water-chestnut during corm swelling[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2022: 1-16. [2023-09-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220812.1057.002.html>. (in Chinese)
- [24] 董伟清, 江文, 何芳练, 邱祖杨, 蒋慧萍, 黄诗宇, 刘莉莉, 何春红, 杨干德. 荸荠淀粉合成酶 *AGPase* 的基因克隆及表达分析[J]. 西南农业学报, 2021, 34(5): 956-963.  
DONG W Q, JIANG W, HE F L, QIU Z Y, JIANG H P, HUANG S Y, LIU L L, HE C H, YANG G D. Gene cloning and expression analysis of *ADP-Glucose pyrophosphorylase* in *Eleocharis dulcis*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(5): 956-963. (in Chinese)
- [25] 宋慕波, 帅良, 段振华, 覃丽, 李淋, 陈振林, 方方. 荸荠苯丙氨酸解氨酶基因的克隆和表达[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(1): 77-83.

- SONG M B, SHUAI L, DUAN Z H, QIN L, LI L, CHEN Z L, FANG F. Cloning and expression of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) gene in Chinese water chestnut[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(1): 77-83. (in Chinese)
- [26] 刘丹青, 金玉环, 郭力, 李永光, 黄先忠. 四种十字花科植物 *CONSTANS-like* 基因家族的鉴定和进化分析[J]. 植物生理学报, 2021, 57(6): 1241-1260.
- LIU D Q, JIN Y H, GUO L, LI Y G, HUANG X Z. Identification and evolutionary analysis of *CONSTANS-like* gene family in four cruciferous plants[J]. Plant Physiology Journal, 2021, 57(6): 1241-1260. (in Chinese)
- [27] 叶雪凌, 刘志勇, 王孝宣, 杜永臣, 国艳梅. 番茄 *CONSTANS* 类似基因的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2008(11): 1607-1612.
- YE X L, LIU Z Y, WANG X X, DU Y C, GUO Y M. Molecular cloning and expression analysis of a *CONSTANS-like* gene *SICO1* from *Solanum lycopersicum*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008(11): 1607-1612. (in Chinese)
- [28] 曹钉钉. 莲藕膨大的蛋白质组和磷酸化蛋白质组研究及莲 *CONSTANS-like* 基因家族分析[D]. 北京: 中国科学院大学, 2020.
- CAO D D. Proteomics and phosphoproteomics studies on rhizome enlargement and analysis of *CONSTANS-like* gene family in *Nelumbo nucifera*[D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2020. (in Chinese)
- [29] 蒋翼杰, 江美彦, 姚菲, 黄文娟, 陈晨, 吴卫. 川白芷 *CONSTANS-like* 蛋白家族生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(12): 3923-3931.
- JIANG Y J, JIANG M Y, YAO F, HUANG W J, CHEN C, WU W. Bioinformatics analysis on the *CONSTANS-like* protein family in *Angelica dahurica var. formosana*[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19 (12): 3923-3931. (in Chinese)
- [30] 帅敏敏, 张启香, 黄有军. 光周期途径成花关键基因 *CONSTANS* 的进化机制[J]. 浙江农林大学学报, 2019, 36(1): 7-13.
- SHUAI M M, ZHANG Q X, HUANG Y J. Evolution of the flowering time gene *CONSTANS* in a photoperiod pathway[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2019, 36(1): 7-13. (in Chinese)
- [31] HASSIDIM M, HARIR Y, YAKIR E, KRON I, GREEN R M. Over-expression of *CONSTANS-Like 5* can induce flowering in short-day grown *Arabidopsis*[J]. Planta, 2009, 230(3): 481-491.
- [32] GUO J L, YANG Q, LIANG F, XING Y J, WANG Z. Molecular cloning and expression analysis of a novel *CONSTANS-like* gene from potato[J]. Biochemistry (Mosc), 2007, 72(11): 1241-1246.
- [33] LIU J Y, YU J P, MCINTOSH L, KENDE H, ZEEVAART J A D. Isolation of a *CONSTANS* ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering[J]. Plant physiology (Bethesda), 2001, 125(4): 1821-1830.
- [34] LI J, GAO K, YANG X Y, KHAN W, DUO B, DUO T, AN X. Identification and characterization of the *CONSTANS-like* gene family and its expression profiling under light treatment in *Populus*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161: 999-1010.