

枸杞 *Lb14-3-3b* 基因的表达分析及转烟草研究

徐蕊, 周丽, 李瑞国, 冯嘉馨, 岳思君, 毛桂莲, 郑蕊

(宁夏大学生命科学学院/西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021)

摘要:在宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)品种宁杞1号花药发育差异蛋白质组学研究的基础上,克隆了一个花药发育相关基因 *Lb14-3-3b*,证实该基因在花器官中优势表达。本试验进一步利用荧光定量PCR技术分析枸杞 *Lb14-3-3b* 基因在花药发育过程中不同时期的表达特征,并通过构建植物过表达载体 *Lb14-3-3b*-pCambia1305.1-35S,经根瘤农杆菌介导法转化模式植物烟草,探究该基因在植物生长发育中的功能。结果表明,在枸杞花药发育的各个时期,*Lb14-3-3b* 都有表达,在花药二核花粉时期表达量最高。与野生型烟草相比,转 *Lb14-3-3b* 基因烟草生长发育迟缓,植株矮小,花器官畸变,花瓣缺少致使花型趋于四角化,雄蕊及花丝数目缺少且发育异常。推测枸杞 *Lb14-3-3b* 基因在烟草生长发育及花器官发育中起调控作用,研究结果为进一步探讨该基因在枸杞生长发育中的调控作用提供参考依据。

关键词:枸杞; *Lb14-3-3b*; 烟草; 遗传转化

Transcriptional Analysis of the Gene *Lb14-3-3b* in Wolfberry and Functional Characterization of the Transgenic Lines in Tobacco

XU Rui, ZHOU Li, LI Rui-guo, FENG Jia-xin, YUE Si-jun, MAO Gui-lian, ZHENG Rui

(Western Biological Resources Protection and Utilization Lab of National Education Ministry/
College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract: By analyzing the proteome datasets during the anther development in wolfberry variety 'Ning Qi No. 1', we identified and isolated an anther development related gene *Lb14-3-3b* that is observed in floral organs. In order to further understand its transcriptional characteristics in floral organs, we determined by real-time quantitative PCR approach the transcriptional level of *Lb14-3-3b* at different stages of wolfberry anther development. In addition, we transformed this gene into model plant tobacco via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation, driven by the constitutive 35S promoter. The results showed that *Lb14-3-3b* expressed at all stages of the wolfberry anther development, particularly at the stage of two-nuclear pollen grain with the highest expression level. Compared with wild type, transgenic tobacco plants grew delayed growth and dwarfed phenotype, floral organ distortion, such as one petals and stamen absent, four angle flower patterns. We speculate that *Lb14-3-3b* gene might play a role in regulation of tobacco plant growth and floral organ development, despite that its functional mechanism in wolfberry remained unclearly. Thus this work provided a starting point to further explore its functional mechanism involved in the growth and development of *Lycium barbarum* L.

Key words: wolfberry; *Lb14-3-3b*; tobacco; transformation

14-3-3 蛋白是一类高度保守的小分子调节蛋白,普遍存在于所有真核生物细胞中,其分子量为

50~60 kD,在多数物种中由一个基因家族编码,该家族蛋白无论是在体外还是体内均以同源或异源二

收稿日期:2018-03-24 修回日期:2018-04-05 网络出版日期:2018-07-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180717.1026.001.html>

基金项目:国家自然科学基金(31560418);国家自然科学基金(31360361);国家自然科学基金(31360025)

第一作者主要从事植物基因工程方面的研究。E-mail: 1412807332@qq.com

通信作者:岳思君,研究方向为微生物与发酵。E-mail: sijunyue@126.com

郑蕊,研究方向为植物生物技术与品质改良。E-mail: xlzheng@126.com

聚体的形式与靶蛋白相互作用。14-3-3 蛋白有“蛋白桥梁”之称,不同的蛋白同工型具有不同的细胞特异性,通过识别特异性的磷酸化序列与靶蛋白结合,参与调控许多重要的生理生化过程,如参与植物激素信号通路转导、营养代谢调控、光信号应答、细胞信号转导、细胞周期调控和细胞凋亡等^[1-2]。

目前,植物 14-3-3 蛋白在植物防御、环境胁迫应答、碳氮代谢、种子萌发等方面都取得了较好的研究进展,它作为一种衔接分子在信号转导途径中发挥重要作用,也使之成为生物化学及信号途径领域中的焦点^[3]。棉花 Gh14-3-3 蛋白参与调控 BR 信号通路,通过调节 BR 信号相关基因的表达量而影响棉花纤维的起始和生长发育^[4];在大麦糊粉细胞中,14-3-3 蛋白和 ABF(脱落酸反应元件结合因子)转录因子家族成员在赤霉素途径中有调控功能,二者相互作用,使 ABF 转录因子与 ABA 应答激酶 PK-ABA1 相互作用从而介导脱落酸和赤霉素途径^[5];木薯 14-3-3 基因转化拟南芥中发现,转基因植株淀粉含量增加,推测 14-3-3 蛋白及其结合酶在木薯根的糖代谢和淀粉积累中起重要调控作用^[6]。除此之外,14-3-3 家族的蛋白还参与植物花器官和花药及花粉的发育过程。大麦花药中 14-3-3 蛋白的 3 种同工型蛋白 14-3-3A、14-3-3B 和 14-3-3C 的免疫定位和表达水平研究表明,3 种异构体均在小孢子和花药壁上表达^[7];对拟南芥 14-3-3 家族 *GRF1-GF14* 基因的研究表明,在未成熟的花中 *GF14* 启动子活性位于芽,成熟后的活性仅位于柱头、花药和花粉,原位杂交结果显示 *GF14* 在根、花瓣、花萼萼片、花乳头细胞、长角果胚乳和未成熟种子胚乳表皮层组织中优势表达^[8];对百合花粉基因 14-3-3 研究发现,14-3-3 蛋白具有高度组织特异性,在叶、球茎、茎、花药细丝、花粉粒和柱头中优势表达,通过研究副卡霉素(FC)刺激质膜(PM)H⁺ATP 酶活性后的发芽频率和花粉管生长速率表明,与 14-3-3 蛋白相互作用调节 PM H⁺ATPase 活性可能调节百合花粉的萌发和花粉管生长^[9]。然而,枸杞 14-3-3 蛋白的研究报道还比较少。

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)是茄科枸杞属多年落叶生灌木,有宁夏五宝之首——“红宝”之称,被《中国药典》和《神农本草经》均记载为传统名贵药材。宁夏枸杞含有枸杞多糖、甜菜碱、莨菪碱、硫胺素、核黄素、维生素 A、烟酸、芸香苷和枸杞叶蛋白等有效成分^[10]。现代医学表明,宁夏枸杞具有降血糖、抗脂肪肝、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、延缓衰

老、增强免疫等功效^[11]。枸杞的特殊药用成分使其在食品和中药领域得到广泛应用,也使其发展成我国独具特色且具有国际竞争优势的农产品之一。研究枸杞花药及花粉发育的调控网络和分子机制对利用基因工程等手段提高枸杞产量和品质有重要意义。

本实验室前期通过分析宁夏枸杞宁杞 1 号及其雄性不育突变体宁杞 5 号花药发育蛋白质组学,鉴定克隆了一个差异表达的 14-3-3 蛋白家族基因 *Lb14-3-3b*,经生物信息学分析,该基因 ORF 全长 747 bp,其编码的蛋白具有典型的 14-3-3 蛋白家族结构域,与马铃薯和番茄亲缘关系最近,亚细胞定位分析发现,此基因只在细胞质中表达。荧光定量 PCR 分析其时空表达特性发现,*Lb14-3-3b* 基因在枸杞花器官中优势表达,推测枸杞 *Lb14-3-3b* 基因可能参与花器官的发育过程^[12]。本研究进一步利用荧光定量 PCR 分析枸杞 *Lb14-3-3b* 基因在花药发育过程中的表达特性,并构建植物过表达载体转化模式植物烟草,探究该基因的功能,为阐明 *Lb14-3-3b* 蛋白家族在枸杞花器官发育过程中可能的调控功能提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料是 2017 年采自宁夏育新枸杞有限公司试验田的宁夏枸杞品种宁杞 1 号新枝,新枝带有不同发育期的花蕾。参照徐青等^[13]的方法将枸杞花药发育过程分为雄蕊原基时期、造孢细胞时期、小孢子母细胞时期、四分体时期、单核花粉期、二核花粉期和花粉成熟期 7 个时期。利用测量纵横径、观察形态和花药压片法,于干冰上从花蕾中剥离不同发育时期的花药,液氮速冻后存 -80 °C 备用。

利用北京吉百特生物技术有限公司通用型总 RNA 提取试剂盒提取不同发育时期的花药 RNA,用上海 Invitrogen 公司的反转录酶合成 cDNA 第一链,详细步骤参照试剂盒说明书进行。花药 cDNA 保存于 -20 °C 备用。

烟草材料为本实验保存的三生烟烟草种子,经 NaClO 消毒后播种于基础 MS 培养基上,待其生长到 5 ~ 7 cm 时可用。

1.2 *Lb14-3-3b* 基因在花药发育中的表达分析

利用 Primer 5.1 软件设计枸杞 *Lb14-3-3b* 荧光定量 PCR 上下游引物, qLb14-3-3b-F: tcaatctgagcta-accgttgaaga, qLb14-3-3b-R: cactaataccacatgtcatcgt。

以枸杞组成型表达基因 *Actin* 为内参,上下游引物分别为 Lbactin-F: gaccttcaatgttcccgetatg, Lbactin-R: gc-cacaccagagtccaacac,以枸杞不同发育时期花药 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 检测,每个样品重复 3 次。反应结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析^[14]。

1.3 *Lb14-3-3b* 基因植物过表达载体的构建

以测序正确的 Lb14-3-3b-pGEM-T Easy Vector 为模板,PCR 扩增后回收目的片段连入 pMD18-T 载体并判断连接方向,用 Takara 公司快切酶 Quickcut *BamH I* 和 *Sal I* 双酶切正向 Lb14-3-3b-pMD18-T 和载体 pCambia1305.1-35s,分别纯化回收后过夜连接,转化 DH5a 大肠杆菌,筛选阳性菌落,具体方法参照徐蕊等^[12]。

1.4 转 *Lb14-3-3b* 基因烟草的获得及阳性检测

用液氮冻融法将 Lb14-3-3b-pCambia1305.1-35s 重组质粒转入根瘤农杆菌 GV3101 中,以未转化的农杆菌做空白对照进行菌落 PCR 检测,筛选阳性单克隆并保留菌种。用培养至 OD 0.6 左右的阳性农杆菌侵染预培养 2 d 的三生烟烟草叶片外植体,侵染后暗培养 2 d 再转接入含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 头孢霉素的抗性筛选诱导培养基上,筛选愈伤组织,愈伤长出 14~20 d 后转接到抗性分化培养基上分化不定芽,不定芽长到 1~2 cm 时接入生根培养基,幼苗长至 5~7 cm 时炼苗土培,提取叶片基因组 DNA 进行 PCR 鉴定,筛选阳性植株。

1.5 转 *Lb14-3-3b* 基因烟草的 Real time-PCR 检测

随机选取 T₁、T₂ 代阳性转 *Lb14-3-3b* 基因烟草植株,提取花蕾 RNA 并反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR,检测烟草中 *Lb14-3-3b* 的表达情况。引物、内参、操作及分析方法参照 1.2。

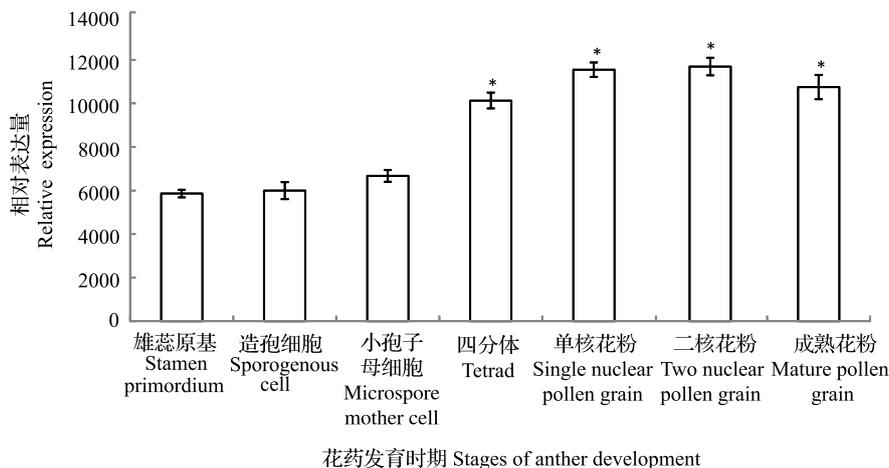
1.6 转 *Lb14-3-3b* 基因烟草植株的表型观察

将 T₁ 代收获的烟草种子经 NaClO 消毒后播种于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 MS 基础培养基上,萌发后除去白化幼芽,将存活的幼芽培养长大后炼苗土培,PCR 筛选获得 T₂ 代转基因烟草,观察记录植株生长发育状态和花器官及花药发育特征。

2 结果与分析

2.1 *Lb14-3-3b* 基因在枸杞花药发育过程中的表达

Lb14-3-3b 基因已被证实在花器官中表达量最高,青果、红果次之,根、茎、叶中的最低^[12]。本研究继续利用荧光定量 PCR 技术分析该基因随着花药发育过程的表达特征,发现 *Lb14-3-3b* 基因在枸杞花药不同发育时期都有表达,在花药发育早期阶段,包括雄蕊原基时期、造孢细胞时期、小孢子母细胞时期,表达量相对较低,四分体时期开始表达量增加,到二核花粉时期,表达量达到峰值(图 1)。t-检验分析发现,相较于雄蕊原基时期,造孢细胞时期和小孢子母细胞时期表达差异不显著,后 4 个时期差异显著。



*: 相较于雄蕊原基时期表达量差异显著 ($P \leq 0.05$)

*: Compared with the stamen primordium period, the expression levels were significantly different ($P \leq 0.05$)

图 1 枸杞花药不同发育时期 *Lb14-3-3b* 基因的表达

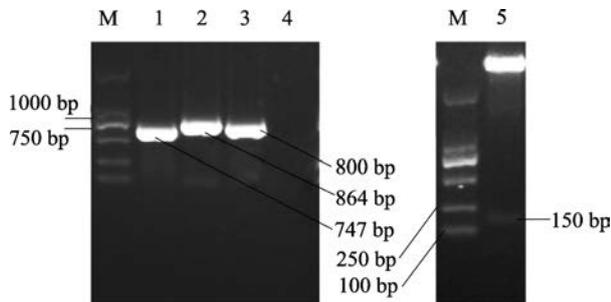
Fig. 1 Expression level of *Lb14-3-3b* at different development stages of wolfberry anthers

2.2 *Lb14-3-3b* 基因植物过表达载体的构建和鉴定

以 Lb14-3-3b-pMD18-T 为模板,用 *Lb14-3-3b*

和 M13 的引物分别进行菌落 PCR 鉴定,分别扩增到 747 bp、864 bp 的特异性条带,表明该重组质粒构建

成功。用 M13-R/Lb14-3-3b-R 和 M13-F/Lb14-3-3b-R 分别对多个阳性克隆进行 PCR,选择检测结果为阳性-阴性的单克隆提取质粒用 *Sph* I 酶切验证,结果得到一条 150 bp 大小的特异性条带。对 *Lb14-3-3b* 序列酶切位点分析得知,在序列 596 bp 处有 *Sph* I 酶切位点,结合 pMD18-T 载体上 *Sph* I 位点位置分析,若 *Sph* I 酶切 Lb14-3-3b-pMD18-T 得到一条 150 bp 的条带,*Lb14-3-3b* 则正向连接。检测结果表明 PCR 结果和酶切结果一致,正义重组载体构建成功(图 2)。进一步用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切正义重组载体连接到 pCambia1305. 1-35s 上,PCR 菌检和 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切检测均得到一条 747 bp 的条带^[12],表明 Lb14-3-3b-pCambia1305. 1-35s 构建成功(图 3)。

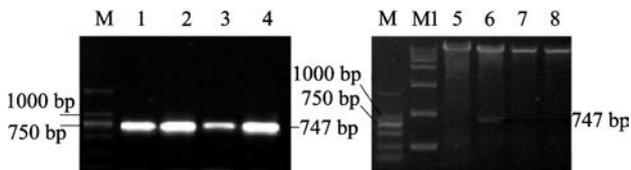


M:DL2000 marker;1:14-3-3b-F/14-3-3b-R 引物 PCR;
2:M13-F/M13-R 引物 PCR;3:M13-R/14-3-3b-R 引物 PCR;
4:M13-F/14-3-3b-R 引物 PCR;5:*Sph* I 单酶切重组质粒

M:DL2000marker,1:PCR by 14-3-3b-F/14-3-3b-R,
2:PCR by M13-F/M13-R,3:PCR by M13-R/14-3-3b-R,
4:PCR by M13-F/14-3-3b-R,5:Digested recombinant plasmid by *Sph* I

图 2 Lb14-3-3b-pMD18-T 载体方向确定

Fig. 2 Direction determination of Lb14-3-3b-pMD18-T



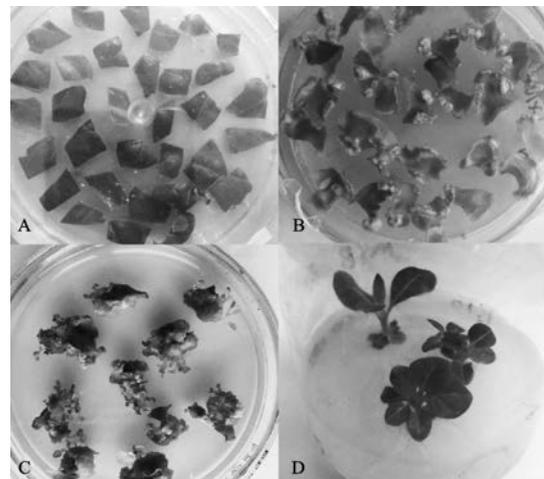
M:DL2000marker;M1:DL15000marker;1~4:菌落 PCR 鉴定;
5:*Bam*H I 单酶切重组质粒;6:*Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切重组质粒;
7:*Bam*H I 单酶切质粒;8:*Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切质粒

M:DL2000marker,M1:DL15000marker,1-4:Colony PCR identification,
5:Digested recombinant plasmid by *Bam*H I ,6:Digested recombinant
plasmid by *Bam*H I and *Sal* I ,7:Digested plasmid by *Bam*H I ,
8:Digested plasmid by *Bam*H I and *Sal* I

图 3 Lb14-3-3b-pCambia1305. 1-35s 质粒 PCR 及酶切验证
Fig. 3 PCR and digestion identification of
Lb14-3-3b-pCambia1305. 1-35s

2.3 转 *Lb14-3-3b* 基因烟草的获得和鉴定

利用根瘤农杆菌介导法侵染三生烟烟草叶片外植体(图 4A),7~14 d 后,大部分叶片剪切部位长出嫩绿致密的愈伤组织且长势良好,有部分剪切部位没有形成愈伤组织,推测可能是培养基中卡那霉素和头孢霉素胁迫所致(图 4B)。将愈伤组织接入分化培养基中 14~20 d 后,陆续分化出不定芽(图 4C)。有个别愈伤组织出现白化现象,致密组织逐渐松散,有玻璃化倾向。将不定芽转接到生根培养基上,15~20 d 后开始生根,叶片长大变绿(图 4D)。

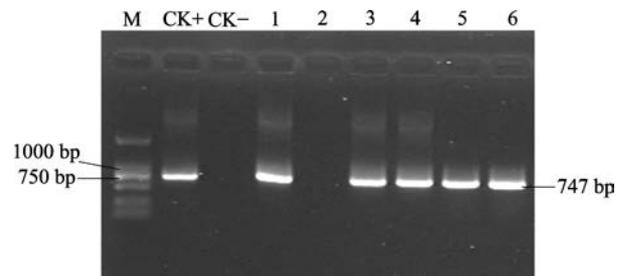


A:叶片外植体;B:愈伤组织;C:不定芽;D:再生植株
A: Leaf explants, B: Callus, C: Adventive buds, D: Regenerated plants

图 4 农杆菌介导转化烟草

Fig. 4 *A. bacterium* mediated transformation in tobacco

随机提取 6 株转基因烟草叶片基因组 DNA,以 Lb14-3-3b-pCambia1305. 1-35s 质粒为阳性对照,野生型烟草基因组为阴性对照,进行 PCR 检测,其中有 5 株为阳性,1 株为阴性(图 5),除去阴性苗保留阳性植株继续培养,观察性状。



M:DL2000 marker;CK+:阳性对照(重组质粒);
CK-:阴性对照(野生型);1~6:转基因植株
M:DL2000 marker,CK+:Positive control(recombinant plasmid),
CK-:Negative control(wild type),1-6:Transgenic plants

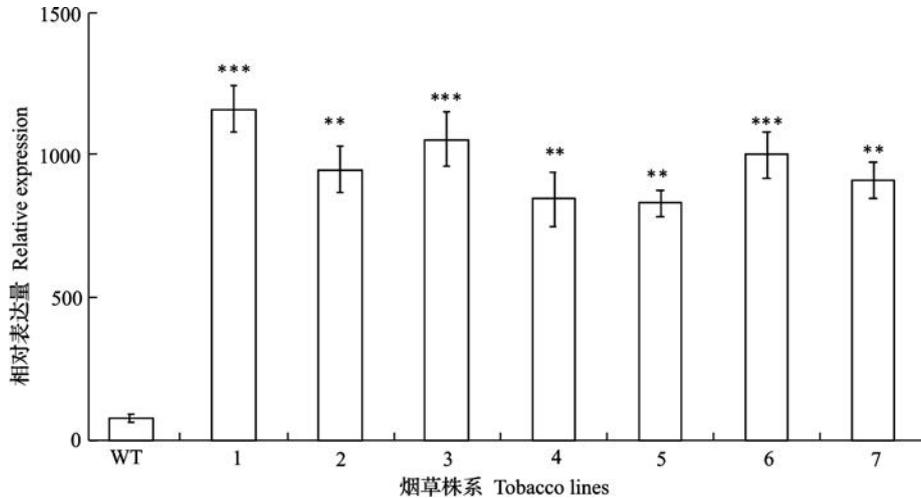
图 5 转基因烟草 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of transgenic tobacco plants

2.4 *Lb14-3-3b* 基因在烟草中的表达

随机选取 7 株 PCR 检测阳性的 T_1 、 T_2 代转 *Lb14-3-3b* 基因烟草花蕾,进行荧光定量 PCR 分析。结果显示枸杞 *Lb14-3-3b* 基因在转基因烟草中稳定

表达,不同转基因株系间表达量相差不明显(图 6)。经 *t*-检验发现,转基因株系 1、3 和 6 与野生型相对表达量差异极显著,转基因株系 2、4、5 和 7 与野生型差异显著。



WT:野生型烟草;1~7:转基因烟草株系;***:转基因植株相较野生型差异极显著($P \leq 0.01$);

** :转基因植株相较野生型差异显著($P \leq 0.05$)

WT: Wild type tobacco, 1-7: Transgenic tobaccos, ***: Transgenic plants showed significant differences extremely compared to wild type ($P \leq 0.01$), **: Transgenic plants showed significant differences compared to wild type ($P \leq 0.05$)

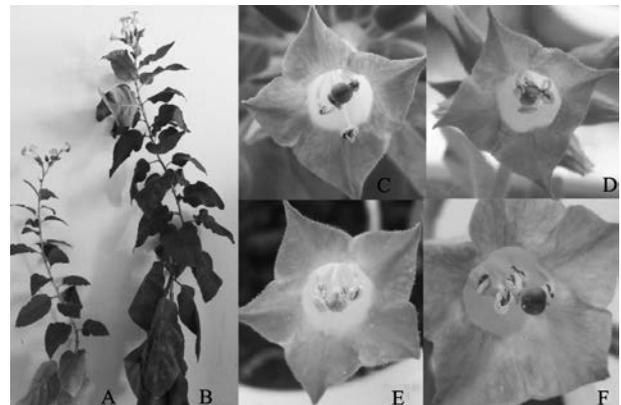
图 6 *Lb14-3-3b* 基因在烟草中的表达

Fig. 6 Expression level of *Lb14-3-3b* in transgenic tobacco plants

2.5 转 *Lb14-3-3b* 基因烟草表型变化

将 T_1 代收获的阳性转基因烟草种子消毒后播种于加有卡那霉素的基础培养基上,5~7 d 开始萌发出幼芽,幼芽有部分白化致死现象。待发育正常的幼苗长大,提取基因组 DNA 检测阳性植株,以野生型烟草植株为对照,对 15 株阳性转基因烟草进行性状观察,转基因植株整体生长发育较为缓慢,开花数量较少,叶片稀疏,叶面积较小且从根部逐渐变黄,株高明显低于野生型(图 7A~B)。将 15 株盛花期烟草植株按照株高进行排列,每 3 株为一组,进行株高差异统计,经 *t*-检验分析,5 组转基因植株中有 3 组与野生型株高差异极显著,1 组差异显著,1 组不显著(图 8)。转基因烟草植株花器官出现畸变现象,在盛花期,对 15 株转基因苗开花数目进行统计发现,其花器官一共 74 朵,其中正常花器官有 39 朵,缺少 1 片花瓣的有 21 朵,缺少 2 片的有 14 朵。只有 4 片花瓣的花型呈四角状,有 4 个雄蕊及花丝,其中有 1 个花丝明显异常生长,雄蕊高出雌蕊许多

(图 7C~D)。而野生型烟草的花由 5 片花瓣组成,呈喇叭状花型,具有 5 个雄蕊及花丝,雄蕊围绕在雌蕊周围便于授粉(图 7E~F)。这些表型在 T_1 、 T_2 代中均可观察到。

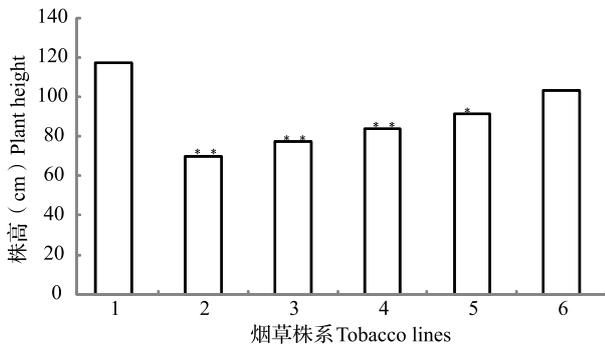


A、C、D:转基因植株;B、E、F 野生型烟草

A、C、D: Transgenic plants, B、E、F: Wild type

图 7 转基因植株性状表型

Fig. 7 Phenotypic variation of transgenic tobacco plants



1:野生型烟草;2~6:转基因烟草株系;*:转基因植株
 相较野生型差异极显著($P \leq 0.01$);*:转基因植株
 相较野生型差异显著($P \leq 0.05$)

1: Wild type tobacco, 2-6: Transgenic tobaccos,
 ** : Transgenic plants showed significant differences extremely
 compared to wild type ($P \leq 0.01$), * : Transgenic plants
 showed significant differences compared to wild type ($P \leq 0.05$)

图8 转 *Lb14-3-3b* 基因烟草植株株高

Fig. 8 Plant height of tobacco transformed
 with *Lb14-3-3b* gene

3 讨论

开花是高等植物生长发育过程中最主要的一个特点^[15],而花药及花粉是花器官的重要组成部分,它的正常发育是植物成功结种完成繁衍的必备条件。模式植物拟南芥花药发育从雄蕊原基的孢原细胞生发开始到花粉释放花药衰败脱落为止分为15个时期^[16]。每个时期都相对独立又紧密联系,是众多基因共同调控的结果。如拟南芥小孢子母细胞在第七期时完成减数分裂形成四分体,第八期时小孢子周围的绒毡层细胞就会分泌出胼胝体酶降解包裹着四分体的胼胝体层释放四分体并且自身程序性凋亡,其中调控任何一个步骤的基因发生突变都会导致发育的紊乱,引起花药败育,最终致使植物雄性不育。例如,定位于叶绿体中的脂肪酰基还原酶 *LbMS2-2* 基因在枸杞花器官中表达,尤其在其四分体时期、单核花粉时期和双核花粉时期表达量最高,其失调表达可能会影响花器官及花药的发育^[17]。

14-3-3 蛋白是一类重要的小分子调节蛋白,在植物的生长发育和代谢及其相关信号转导中发挥重要作用,它具有时间和空间特异性,不同同工型都具有各自独特的功能^[2,18]。该家族蛋白可通过和相关的酶互作调控淀粉代谢,14-3-3 蛋白表达量下降导致淀粉合成途径异常,花药发育过程的能量需求受到影响,引起玉米、高粱雄性不育^[19]。前人研究发

现桑树的8个14-3-3基因(*MaGF14a-MaGF14h*),在桑树所有器官中均有表达且雌蕊中最高。这8个基因在种子萌发和花发育过程中的表达量也不同,*MaGF14a*、*MaGF14c*和*MaGF14h*在种子萌发前3d高度表达,其余的5个基因在后期表达水平高^[20]。前期研究发现枸杞 *Lb14-3-3b* 基因在花器官中优势表达,表达量明显高于其他组织^[12]。

本研究发现 *Lb14-3-3b* 基因在枸杞花药发育各个时期都有表达,但是在发育早期的雄蕊原基、造孢细胞和小孢子母细胞时期表达量相对较低,而从四分体时期开始,表达水平增加,至二核花粉时期表达量最高,到成熟花粉时期又有所降低。伴随枸杞生殖发育过程,*Lb14-3-3b* 基因的表达量发生变化,推测 *Lb14-3-3b* 蛋白可能参与枸杞花器官、花药发育过程。*Lb14-3-3b* 基因转化烟草进一步发现,转基因烟草发育迟缓,植株矮小,花器官发育异常,花型畸变,缺少一片花瓣致使整个花型呈四角形,缺少一个雄蕊且花丝发育异常。结果证明枸杞 *Lb14-3-3b* 基因影响了烟草花器官和花药的发育。而枸杞14-3-3蛋白家族如何参与调控枸杞花器官发育,进而影响后期的果实发育,以及与其互作蛋白有哪些,它们是如何共同调控花器官发育的,这都尚需进一步深入探讨。本研究结果为进一步通过枸杞遗传转化解析该基因的功能提供了理论依据。

参考文献

- [1] 文彬,王小菁. 14-3-3 蛋白研究进展. 生命科学,2004,16(4): 226-230
- [2] 周颖,李冰樱,李学宝. 14-3-3 蛋白对植物发育的调控作用. 植物学报,2012,47(1):55-64
- [3] Yaffe M B. How do 14-3-3 proteins work? -Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. Febs Letters,2002, 513(1):53-57
- [4] 周颖. 14-3-3 蛋白参与 BR 信号调控及其在棉花 (*Gossypium hirsutum*) 纤维发育中的功能研究. 武汉:华中师范大学,2014
- [5] Schoonheim P J, Pereira D D C, Boer A H D. Dual role for 14-3-3 proteins and ABF transcription factors in gibberellic acid and abscisic acid signaling in barley (*Hordeum vulgare*) aleurone cells. Plant Cell & Environment,2009,32(5):439-447
- [6] Wang X C, Chang L L, Tong Z, Wang D Y, Yin Q, Wang D, Jin X, Yang Q, Wang L M, Sun Y, Huang Q, Guo A P, Peng M. Proteomics profiling reveals carbohydrate metabolic enzymes and 14-3-3 proteins play important roles for starch accumulation during cassava root tuberization. Scientific Reports,2016,6:19643
- [7] Maraschin S D F, Lamers G E M, Wang M. Cell death and 14-3-3 proteins during the induction of barley microspore and rogenesis. Biologia,2003,58(1):59-68
- [8] Daugherty C J, Rooney M F, Miller P W, Ferl R J. Molecular organization and tissue-specific expression of an Arabidopsis 14-3-3 gene. Plant Cell,1996,8(8):1239
- [9] Pertl-Obermeyer H, Himly M, Gehwolf R, Kriechbaumer R, Stras-ser D, Michalke W, Richter K, Ferreira F, Obermeyer G. Molecular and physiological characterisation of a 14-3-3 protein from lily

- pollen grains regulating the activity of the plasma membrane H⁺ ATPase during pollen grain germination and tube growth. *Planta*, 2001, 213(1):132
- [10] 白寿宁. 宁夏枸杞研究. 银川: 宁夏人民出版社, 1998: 420-424, 520-523
- [11] 王静. 枸杞子的药理作用和临床应用价值分析. 亚太传统医药, 2014, 10(7): 50-51
- [12] 徐蕊, 周丽, 郑玉娥, 石晶, 岳思君, 王丽娟, 郑蕊. 枸杞 *Lb14-3-3b* 基因的克隆及其在不同组织中的表达. 分子植物育种, 2018, 16(5): 1417-1425
- [13] 徐青, 秦垦, 冯爱玲, 祁建钊, 韩会龙, 黄昊. 枸杞不育系与可育系花药发育的细胞学研究. 宁夏大学学报: 自然科学版, 2009, 30(3): 263-267
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [15] 张云, 刘青林. 植物花发育的分子机理研究进展. 植物学报, 2003, 20(5): 589-601
- [16] Sanders P M, Bui A Q, Weterings K, McIntire K N, Hsu Y C, Lee P Y, Truong M T, Beals T P, Goldberg R B. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction*, 1999, 11(6): 297-322
- [17] 石晶, 石鑫强, 管翠萍, 郑蕊, 杨亚珺, 梁文裕. 枸杞脂肪酰基还原酶基因的克隆及表达分析. 植物资源遗传学报, 2018, 19(2): 351-360
- [18] 崔娜, 李天来, 李悦. 植物中 14-3-3 蛋白的主要功能. 生物技术, 2007, 17(2): 86-89
- [19] Datta R, Chamusco K C, Chourey P S. Starch biosynthesis during pollen maturation is associated with altered patterns of gene expression in maize. *Plant Physiology*, 2002, 130(4): 1645-1656
- [20] Yang Y, Yu M D, Xu F X, YU Y S, Liu C Y, Li J, Wang X L. Identification and expression analysis of the 14-3-3 gene family in the mulberry tree. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015, 33(6): 1-10

《植物遗传资源学报》2018 年审稿专家名单

安调过	安新民	蔡士宾	蔡志全	陈海荣	陈金焕	陈静	陈勤	陈晓玲	陈新
陈信波	陈学军	陈学珍	程炳文	程式华	程须珍	程在全	程治军	崔国贤	邓馨
邓祖湖	刁现民	董文轩	董文召	董英山	杜庆章	杜雄明	范楚川	方从兵	方洵
房伟民	冯宗云	付东辉	傅玉凡	高爱农	高三基	高中山	葛红	管延安	郭玉海
韩龙植	韩渊怀	何承忠	洪德林	侯喜林	胡英考	黄长玲	黄骥	黄玉碧	季孔庶
贾桂霞	江玲	姜慧芳	姜奇彦	孔秋生	雷财林	雷家军	雷开荣	黎星辉	黎裕
李德军	李桂英	李洪杰	李辉	李火根	李金花	李进才	李平	李平华	李容柏
李锡香	李先平	李小娟	李小湘	李雪梅	李杨瑞	李颖岳	李永平	李玉秋	李悦
李云	李再云	梁燕	林福呈	林顺权	林义章	刘崇怀	刘大会	刘凡	刘凤之
刘宏伟	刘立峰	刘列钊	刘青林	刘庆昌	刘庆忠	刘文德	刘文国	刘雄伦	刘洋
刘志勇	卢宝荣	卢新雄	陆国权	陆平	吕英民	罗成刚	麻浩	马双武	孟昭东
米福贵	明军	宁海龙	潘光堂	潘会堂	庞晓明	裴东	祁旭升	钱前	秦玉芝
阮仁超	沈火林	沈文飏	舒庆艳	司怀军	宋波涛	宋经元	宋宪亮	宋跃朋	粟建光
汤继华	汤圣祥	唐灿明	陶跃之	滕元文	田静	汪仁	王才林	王晨	王传堂
王春明	王道文	王洪刚	王慧中	王建华	王克晶	王坤波	王兰芬	王林海	王茅雁
王茂林	王绍辉	王天宇	王西成	王西平	王晓鸣	王兴军	王秀娥	王迎涛	王跃进
王照兰	王振华	危文亮	魏兴华	文国松	文颖强	翁建峰	吴斌	吴建利	伍晓明
武菊英	夏先春	肖凯	肖璇	谢传晓	谢皓	谢文刚	辛海平	辛霞	徐建龙
徐跃进	徐兆师	许永华	薛达元	晏月明	杨爱国	杨光宇	杨海灵	杨敏生	杨培志
杨平	杨清辉	杨庆文	杨天育	杨佑明	杨志敏	姚玉新	伊华林	于静娟	于拴仓
余有本	喻德跃	袁涛	袁希汉	曾黎辉	曾宪宝	曾亚文	张宝玺	张冰冰	张超凡
张福耀	张洪亮	张家明	张金凤	张京	张静	张军	张克诚	张力思	张丽
张玲	张鲁燕	张鹏	张平冬	张喜春	张猷龙	张相岐	张晓科	张晓伟	张新全
张新忠	张学昆	张延明	张扬勇	张正斌	张志东	张志胜	张忠华	张宗文	张宗文
赵冬兰	赵桂琴	赵洪锟	赵久然	赵凯歌	赵丽丽	赵仁	赵团结	赵云	赵志刚
赵智中	郑天清	郑王义	郑晓明	郑勇奇	郑用琏	周永力	周志春	庄飞云	宗娜
宗绪晓	邹桂花	邹学校							