

龙眼胚性愈伤组织Remorin家族成员的克隆及其在体胚发生过程中的表达分析

陈裕坤, 徐洋, 屈莹, 林玉玲, 姚文, 赖钟雄*

(福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福州 350002)

摘要: 以龙眼松散形胚性愈伤组织为材料, 采用 RT-PCR 结合 RACE 法克隆 Remorin 家族 5 个成员的 cDNA 全长, *DIRemorin1* 全长 2 127 bp, 编码 572 个氨基酸; *DIRemorin2* 全长 1 829 bp, 编码 444 个氨基酸; *DIRemorin3* 全长 1 937 bp, 编码 541 个氨基酸; *DIRemorin4* 全长 1 743 bp, 编码 466 个氨基酸; *DIRemorin5* 全长 1 043 bp, 编码 181 个氨基酸。*DIRemorin1* ~ 5 DNA 序列长度分别为: 4 054、3 097、3 505、4 690 和 1 935 bp, 所有内含子剪切位点均符合真核生物“GT-AG”规则。所有成员均是不稳定亲水性蛋白, 都不具有信号肽, 只有 *DIRemorin1* 具有跨膜结构, 都具有 Remorin 家族保守结构域, 与其它植物的 Remorin 具有较高的同源性。系统进化树分析结果表明, *DIRemorin5* 为经典的 Remorin 蛋白, *DIRemorin1* 与 *DIRemorin2* 属于长链 Remorin。qRT-PCR 结果显示, 随着龙眼体胚的发育, *DIRemorin1* 的表达量呈类“N”状趋势, 在心形胚时期和子叶形胚时期较高; *DIRemorin2* 在心形胚和子叶形胚时期迅速下降; *DIRemorin3* 在发育中后期迅速升高, 并在子叶形胚时期最高; *DIRemorin4* 在球形胚和鱼雷形胚时期最低, 而 *DIRemorin5* 在不完全胚性紧实结构时期最低。说明 *DIRemorin1* ~ 5 在龙眼体胚发生过程的转录水平具有一定的组织特异性和时序性。psRNA Target 预测显示 *DIRemorin* 还可能受到 miRNA 家族的调控。

关键词: 龙眼; 体胚发生; Remorin 基因家族; 克隆; qRT-PCR

中图分类号: S 667.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2014) 11-2299-14

Cloning of the Genes of Remorin Family from Embryogenic Callus and Their Expression Analysis During Somatic Embryogenesis in *Dimocarpus longan*

CHEN Yu-kun, XU Yang, QU Ying, LIN Yu-ling, YAO Wen, and LAI Zhong-xiong*

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

Abstract: The RT-PCR combined with RACE method was used to clone the complete cDNA sequences of 5 members of Remorin family from embryogenic callus in *Dimocarpus longan*. The complete cDNA sequences of *DIRemorin1* - 5 were 2 127, 1 829, 1 937, 1 743 and 1 043 bp, *DIRemorin1* - 5 encoding 572, 444, 541, 466 and 181 amino acids, respectively. The DNA sequences of *DIRemorin1* - 5 were 4 054, 3 097, 3 505, 4 690 and 1 935 bp, and all the splice sites of the introns contained were obeyed to the “GT-AG” rule. *DIRemorin1* - 5 belong to the instability and hydrophilous proteins, they all had the Remorin

收稿日期: 2014-06-06; 修回日期: 2014-09-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272149, 31071787); 福建省科技平台建设项目 (2008N2001)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: laizx01@163.com)

conserved domain, and had no signal peptide, only *DIRemorin1* had transmembrane structure. The sequences of both nucleotides and amino acids of the five members were high homologous with those of the known *Remorin* genes in other species. Anglicizing phylogenetic tree of *Remorin* in plants indicated that *DIRemorin5* belonged to the classical *Remorin*, *DIRemorin1* and *DIRemorin2* belonged to the long *Remorin*. The results of qRT-PCR indicated that *DIRemorin1* showed approximately an “N” curve, it expressed at the highest levels in the heart embryos and cotyledonary embryos cultures. *DIRemorin2* expressed at the lowest levels in heart embryos and cotyledonary embryos cultures. The expression of *DIRemorin3* increased rapidly at the middle and late developmental stages and peaked at the cotyledonary embryos cultures. *DIRemorin4* expressed at the lowest levels in globular embryos and topedo embryos cultures. *DIRemorin5* expressed at the lowest levels in incomplete compact pro-embryogenic cultures. Suggesting that *DIRemorin1 - 5* expressed with tissue specific and sequential characteristics during longan somatic embryogenesis. psRNA Target projections show *DIRemorin* may be regulated by miRNAs.

Key words: longan; somatic embryogenesis; *Remorin* family; cloning; qRT-PCR

Remorin 蛋白最初在马铃薯质膜中发现, 被命名为 pp34, 它可以响应植物防御及生长发育基因的激活而发生磷酸化, 参与植物信号转导途径 (Jacinto et al., 1993)。Raffaele 等 (2007) 的研究表明, *Remorin* 是植物特异蛋白, 在被子植物、裸子植物, 甚至苔藓和蕨类植物中都有发现, 而在藻类植物中没有发现此蛋白, 推测其与植物从水生向陆生进化有关。植物中的 *Remorin* 家族成员众多 (Reymond et al., 1996), 在水稻、拟南芥和毛果杨中 *Remorin* 家族的成员分别为 19、16 和 8 个, 并且可以分成 6 个明显的发育进化组 (Raffaele et al., 2007)。 *Remorin* 在番茄和马铃薯的根、茎和叶中都有分布, 在顶端分生组织、维管组织韧皮部、叶原基、叶腋花芽处有强烈的 *Remorin* 蛋白信号, 而这些组织有很强的分裂能力, 具有胚胎的特点。 *Remorin* 蛋白可能与植物的顶端组织、维管组织和胚性组织的形成有关 (Bariola et al., 2004)。 *Remorin* 存在于质膜上并且是植物脂筏的主要成分 (Mongrand et al., 2004)。 *Remorin* 的 C 端含有一个保守的 PFAM 结构域 (*Remorin* C_PF03763), 氨基酸残基 70 ~ 80 个 (Reymond et al., 1996; Wolf et al., 1997)。马铃薯 StREM1.3 C 端锚 (RemCA) 由 28 个氨基酸残基组成, 它对该蛋白锚定质膜是必不可少的 (Perraki et al., 2012)。膜结合域的 RemCA 仅限于 *Remorin* 家族中, 对丙氨酸、赖氨酸和谷氨酸具有偏好性, 是植物在趋同进化过程中形成的 (Raffaele et al., 2013)。 *Remorin* N 端含一个脯氨酸富集区, 其序列长度和核酸组成变化很大, 是不同成员之间的主要区别, 被认为是内在无序区域 (intrinsic disorder, ID), 对蛋白磷酸化具有重要的作用 (Iakoucheva et al., 2004; Marín & Ott, 2012)。 Marín 等 (2012) 在研究 AtREM1.3 的 N 端的 ID 时发现它能促进植物体内的蛋白质相互作用。 *Remorin* 单体蛋白可以形成二聚体、四聚体及更多的聚合状态, 多聚化后可以形成纤维, 说明 *Remorin* 蛋白可能在膜骨架及细胞骨架中发挥重要作用 (Bariola et al., 2004)。

目前 *Remorin* 功能的研究还比较少, 至今未在拟南芥中得到 *Remorin* 基因缺失突变体, 也尚未见关于调控植物 *Remorin* 表达的 miRNA 的相关研究, 阻碍了对该基因家族功能的深入研究。Raffaele 等 (2007) 认为, *Remorin* 可能是植物不可缺少的基因, 其缺失会造成植物的死亡, 说明 *Remorin* 蛋白在植物中又具有重要的功能。目前相关研究以推测其功能为主, 如 *Remorin* 在植物的抗逆胁迫过程中可能起着重要的作用 (Kreps et al., 2002; Reddy et al., 2002; Lin et al., 2003; Malakshah et al., 2007; Vibha et al., 2013); 早酥梨 *Remorin* 可能参与了梨黑星病原菌与植物的互作过程, 在抗病防御反应过程中起重要作用 (付镇芳 等, 2012); *Remorin* 家族某些成员可能具有与半乳糖醛酸结合的活性, 参与寡聚半乳糖醛酸 (OGA) 信号途径 (Chen & An, 2006)。

虽然 *Remorin* 家族成员众多, 但已知确切功能的成员却未见报道, 尤其是 *Remorin* 在植物体胚发育过程中的调控作用研究十分有限。本研究借助龙眼体胚发生系统, 分离和克隆龙眼胚性愈伤组织中 *Remorin* 基因家族的 5 个成员的 cDNA 和 gDNA 全长序列, 分析其序列特征, 并借助生物信息学的方法初步推测 *Remorin* 的功能, 对调控该家族基因的 miRNA 进行预测, 探讨龙眼 *Remorin* 基因的差异表达对体胚发育的可能调控作用。

1 材料与方法

1.1 供试材料及其DNA和RNA提取与cDNA合成

龙眼松散型胚性愈伤组织(‘红核子’品种 LC2 细胞系)由福建农林大学园艺植物生物工程研究所提供。按龙眼体胚发生同步化调控的方法(陈春玲和赖钟雄, 2002; 方智振和赖钟雄, 2009; Lai & Lin, 2013; Lin & Lai, 2013), 获得松散型胚性愈伤组织、不完全胚性紧实结构、球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶形胚等 6 个连续发育阶段的培养物, 作为荧光定量分析的供试材料。龙眼胚性愈伤组织的转录组由本研究所提供, SRR accession numbers: SRA050205。

2012 年 6 月至 2013 年 7 月, 参照 Lin 和 Lai (2010)、李惠华等 (2010) 和赖呈纯等 (2010) 的方法, 提取龙眼体细胞胚发育过程中 6 个连续发育阶段培养物的总 RNA, 分别用于合成 RT-PCR 扩增和 qRT-PCR 扩增的 cDNA。松散形胚性愈伤组织总 DNA 的提取参考王凤华等 (2003) 的方法。

1.2 引物设计及PCR扩增

保守区序列扩增: 根据本实验室龙眼转录组数据库及 GenBank 数据库中与植物 *Remorin* 相关的核酸序列信息, 采用 DNAMAN 6.0 分别设计保守区上下游引物, 以龙眼松散型胚性愈伤组织 cDNA 为模板扩增保守区序列。

3'-RACE 和 5'-RACE: 采用 RACE 法, 根据已获得的保守区序列分别设计两条 3'-RACE 引物, 结合 GeneRacer™ 3'Primer 和 GeneRacer™ 3'Nested Primer 引物, 以龙眼松散型胚性愈伤组织 cDNA 为模板, 进行巢式 PCR 反应扩增 3'末端序列; 根据已获得的保守区序列分别设计两条 5'-RACE 引物, 并结合 GeneRacer™ 5'Primer 和 GeneRacer™ 5'Nested Primer 引物, 以龙眼松散型胚性愈伤组织 cDNA 为模板, 进行巢式 PCR 反应扩增 5'末端序列。

拼接验证和 DNA 序列扩增: 对保守区、3'末端序列和 5'末端序列的测序结果进行全长拼接, 分别设计拼接的验证引物, 进行 PCR 反应验证拼接结果。同时以龙眼松散型胚性愈伤组织的 DNA 为模板, 以拼接验证的引物进行 PCR 反应, 以扩增各成员的 DNA 序列。以上引物均由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。所有引物的序列及扩增用途见表 1。

PCR 反应体系和扩增程序参照李惠华等 (2010) 和赖呈纯等 (2010) 的方法, 根据扩增不同的目的片段, 对 PCR 扩增程序进行相应的调整。获得目的片段后切胶回收, TA 克隆后挑取阳性克隆子的菌液进行 PCR 扩增, 将有目的条带的菌液送至华大基因公司测序。

1.3 生物信息学分析

采用 ExPASy ProtParam 预测编码蛋白的理化性质; 以 PSORT 进行亚细胞定位; 采用 SignalP 3.0 Server 预测蛋白质信号肽; 采用 EMBnet TMpred 预测蛋白质跨膜结构; NetPhos2.0 预测蛋白质磷酸化位点; PredictProtein 预测蛋白质的功能位点。经 InterProScan4 预测蛋白质的保守结构域, 以

表 1 基因克隆及 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers used in gene cloning and qRT-PCR

| 用途 Description | 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence (5' - 3') |
|---|---|--|
| 保守区扩增 Amplification of conserved region | <i>DIRemorin1</i> -F <i>DIRemorin1</i> -R | ATGAGATCCGGTTACAGAGC TCAGAAAGCATGGCAGGTA |
| 3'-RACE | <i>DIRemorin1</i> 3'GSP1 <i>DIRemorin1</i> 3'GSP2 | CTTGCTATTGTGGAACCTCC CAATACGGAACTGGAGATG |
| 5'-RACE | <i>DIRemorin1</i> 5'GSP1 <i>DIRemorin1</i> 5'GSP2 | GCACCCACTTGTCTCTATT GGTCGCCGTCTATCTAACTT |
| 拼接验证, DNA 扩增 Splice verification; Amplification of DNA | <i>DIRemorin1</i> -ORF-F <i>DIRemorin1</i> -ORF-R | ATGCCAGAGCAGCAGAGGTC TCAGAAAGCATGGCAGGTA |
| qRT-PCR | <i>DIRemorin1</i> -qF <i>DIRemorin1</i> -qR | TGCCTTTCTCTGTGTCCACTC TGTACCCTATCATCCACCTG |
| 保守区扩增 Amplification of conserved region | <i>DIRemorin2</i> -F <i>DIRemorin2</i> -R | CTCCTCCTCTATTTCTCTCA GCTTGTTCCGGTAGCACTCT |
| 3'-RACE | <i>DIRemorin2</i> 3'GSP1 <i>DIRemorin2</i> 3'GSP2 | GACACTTGAACAGCACCAAT TAAATGCTGCCTCAGGTATC |
| 5'-RACE | <i>DIRemorin2</i> 5'GSP1 <i>DIRemorin2</i> 5'GSP2 | GATGAACTCTTGAATGGCGT TGAGAAGACCCTCCACTTGCT |
| 拼接验证, DNA 扩增 Splice verification; Amplification of DNA | <i>DIRemorin2</i> -ORF-F <i>DIRemorin2</i> -ORF-R | ATGGATCTTTCACTCCAAACTACT TTAGTTATTGCAAGGGAAGCAAC |
| qRT-PCR | <i>DIRemorin2</i> -qF <i>DIRemorin2</i> -qR | CTTTCGGCTTCAGTGTTCG CTTGATTGGATGAGCAGGTG |
| 保守区扩增 Amplification of conserved region | <i>DIRemorin3</i> -F <i>DIRemorin3</i> -R | CATAATAGAAAGAAGGAAGGGTC CAGCAAGTGAATGGGATG |
| 3'-RACE | <i>DIRemorin3</i> 3'GSP1 <i>DIRemorin3</i> 3'GSP2 | GGATAACACCACAGATGATGAGT CCGAAGTTGAACAAATGAGAGC |
| 5'-RACE | <i>DIRemorin3</i> 5'GSP1 <i>DIRemorin3</i> 5'GSP2 | CATTTGGATGGCATAAGGTCT GACCAACATCGGCACTTTCTCTA |
| 拼接验证, DNA 扩增 Splice verification; Amplification of DNA | <i>DIRemorin3</i> -ORF-F <i>DIRemorin3</i> -ORF-R | ATGGACTACGAGAGAATACAAAAG TTATGACAACCAACCACAGCAAG |
| qRT-PCR | <i>DIRemorin3</i> -qF <i>DIRemorin3</i> -qR | TCGTGAGAGTTGTTCCAGAGC TGCCTTGATACGGGTTG |
| 保守区扩增 Amplification of conserved region | <i>DIRemorin4</i> -F <i>DIRemorin4</i> -R | TTCTCCAGGGAAGTTGAGG GCCAGTTCTGCGAATAAAC |
| 3'-RACE | <i>DIRemorin4</i> 3'GSP1 <i>DIRemorin4</i> 3'GSP2 | GCAAAGAGGAGGAGGAGGATAAG ACACAAAGCGGAAGAGAAGAGAG |
| 5'-RACE | <i>DIRemorin4</i> 5'GSP1 <i>DIRemorin4</i> 5'GSP2 | GTTGAAGGAGGTGGAATAATCGT CTTACGGGAAGGAGGGAGTTGAT |
| 拼接验证, DNA 扩增 Splice verification; Amplification of DNA | <i>DIRemorin4</i> -ORF-F <i>DIRemorin4</i> -ORF-R | ATGCTATTGGGAATGGAGAAGA TCAGGAGCACCAACTCCAG |
| qRT-PCR | <i>DIRemorin4</i> -qF <i>DIRemorin4</i> -qR | AAGGTCTCCAGGCAGTCATC TCAATAGGGTCGGAATCAGC |
| 保守区扩增 Amplification of conserved region | <i>DIRemorin5</i> -F <i>DIRemorin5</i> -R | TCATCATCCTCTGTCTCTC GCAGTCTCCTCTATCTTGA |
| 3'-RACE | <i>DIRemorin5</i> 3'GSP1 <i>DIRemorin5</i> 3'GSP2 | TCATCATCCTCTGTCTCTC TTTGACAGAGACACTATCCTTG |
| 5'-RACE | <i>DIRemorin5</i> 5'GSP1 <i>DIRemorin5</i> 5'GSP2 | GCAGTCTCCTCTATCTTGA GTCTCTGTCAAATGAAGCCT |
| 拼接验证, DNA 扩增 Splice verification; Amplification of DNA | <i>DIRemorin5</i> -ORF-F <i>DIRemorin5</i> -ORF-R | ATGGCAGAGGAGGATCACAA CTAGCCACTAAAGCAAGCAAGA |
| qRT-PCR | <i>DIRemorin5</i> -qF <i>DIRemorin5</i> -qR | GTGCCTCTGTCCATTTCTCAC CCTCCTCTGCCATAACCAAC |
| 3'-RACE | GeneRacer TM 3'Primer GeneRacer TM 3'Nested Primer | GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG CGCTACGTAACGGCATGACAGTG |
| 5'-RACE | GeneRacer TM 5'Primer GeneRacer TM 5'Nested Primer | CGACTGGAGCACGAGGACACTGA GGACTGACATGGACTGAAGGAGTA |

PSIPRED 在线软件预测蛋白质二级结构。经 MEGA 5.10 软件中的 Neighbor-Joining (邻位相连法, NJ 法) 构建核苷酸序列的分子系统进化树 (P-distance 法), 并用 bootstrap 法 (重复 1 000 次) 评估系统进化树。

1.4 龙眼体胚发育过程的 *DlRemorin* 的 qRT-PCR 分析

采用 TaKaRa SYBR ExScriptTM 试剂和罗氏 LightCycler480 仪器, 以龙眼体胚发育过程中 6 个连续阶段的稀释后的 cDNA 为模板, 根据荧光引物设计的原则, 在获得 cDNA 全长的基础上设计特异的上下游引物 (表 1) 进行 qRT-PCR 扩增。qRT-PCR 反应体系和扩增程序参照 Lin 和 Lai (2010) 的方法。待反应结束后进行扩增曲线、溶解曲线 (60~95 °C) 和凝胶电泳分析, 检测引物特异性; 每个反应包括 3 个重复, 在样品扩增的同时, 将试验中 6 个时期的 cDNA 模板的混合样进行 5 倍梯度系列稀释制作标准曲线。从扩增曲线图中得到 Ct 值, 并根据标准曲线获得不同阶段 *DlRemorin* 基因的 mRNA 相对含量, 通过内参基因的校正最终得到目的基因的相对表达量。

根据软件自动分析的 *DlRemorins* 标准曲线的斜率可得 PCR 扩增效率 (E), $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ 。利用 Excel 和 geNORM (version 3.5) 软件进行数据分析 (Vandesompele et al., 2002)。

1.5 调控 *DlRemorin* 基因家族的 miRNA 预测

为了解 miRNA 和 *Remorin* 的相互调控关系, 以 Lin 和 Lai (2013) 新鉴定的龙眼中保守或特异的 miRNA 序列为探针, 以龙眼 *Remorin* 基因家族不同成员为靶基因预测的候选序列, 采用 psRNA Target 在线软件, 预测可能参与调控龙眼 *Remorin* 基因表达的 miRNA。

2 结果与分析

2.1 龙眼胚性愈伤组织 *DlRemorin* 家族成员 cDNA 和 DNA 全长序列获得

以龙眼松散型胚性愈伤组织 cDNA 为模板, 扩增保守区序列, 经 PCR 均可扩增出与预期目标片段相符的单一片段, 测序结果显示 *DlRemorin* 家族的 5 个成员的片段大小分别为: 1 698、1 219、1 532、1 381 和 449 bp (图 1, A)。这 5 个序列的核苷酸和氨基酸序列分别在 NCBI 上经 Blast 和 Blastn, 均与数据库中已有的 *Remorin* 核苷酸和氨基酸序列高度同源, 可初步推断这些片段均为龙眼胚性愈伤组织 *DlRemorin* 家族不同成员的 cDNA 的部分序列。

根据所获得的保守区序列, 分别设计 3'-RACE 和 5'-RACE 引物, 采用 RACE 法扩增 *DlRemorin* 家族 5 个成员的 3'末端序列和 5'末端序列, 经二轮 PCR 后均可扩增出与预期相符的片段。测序结果表明: *DlRemorin* 家族的 5 个成员 3'-RACE 片段大小分别为 557、468、385、369 和 685 bp (图 1, B); *DlRemorin* 家族的 5 个成员 5'-RACE 片段大小分别为 542、409、466、529 和 370 bp (图 1, C), 所有 RACE 所得片段与保守区片段均有大于 100 bp 以上的重叠, 表明是试验所扩增的片段。经 DNAMAN6.0 拼接, *DlRemorin* 家族 5 个成员的 cDNA 全长分别为: 2 127、1 829、1 937、1 743 和 1 043 bp, GenBank 登录号分别为: JX977850、JX977851、JX977852、JX977848 和 JX977849。

采用相同的引物进行拼接验证 (图 1, D) 和 DNA 序列扩增 (图 1, E), 测序结果表明 *DlRemorin1* ~ 5 的拼接验证的序列长分别为: 1 719、1 335、1 626、1 401 和 546 bp, 与拼接结果相同; 以龙眼胚性愈伤组织的 DNA 为模板, *DlRemorin1* ~ 5 DNA 序列经测序长度分别是: 4 054、3 097、3 505、4 690 和 1 935 bp, *DlRemorin1* ~ 5 的 DNA 序列 GenBank 登录号分别为: KC492121、KC492122、KC492123、KC492124 和 KC492125。

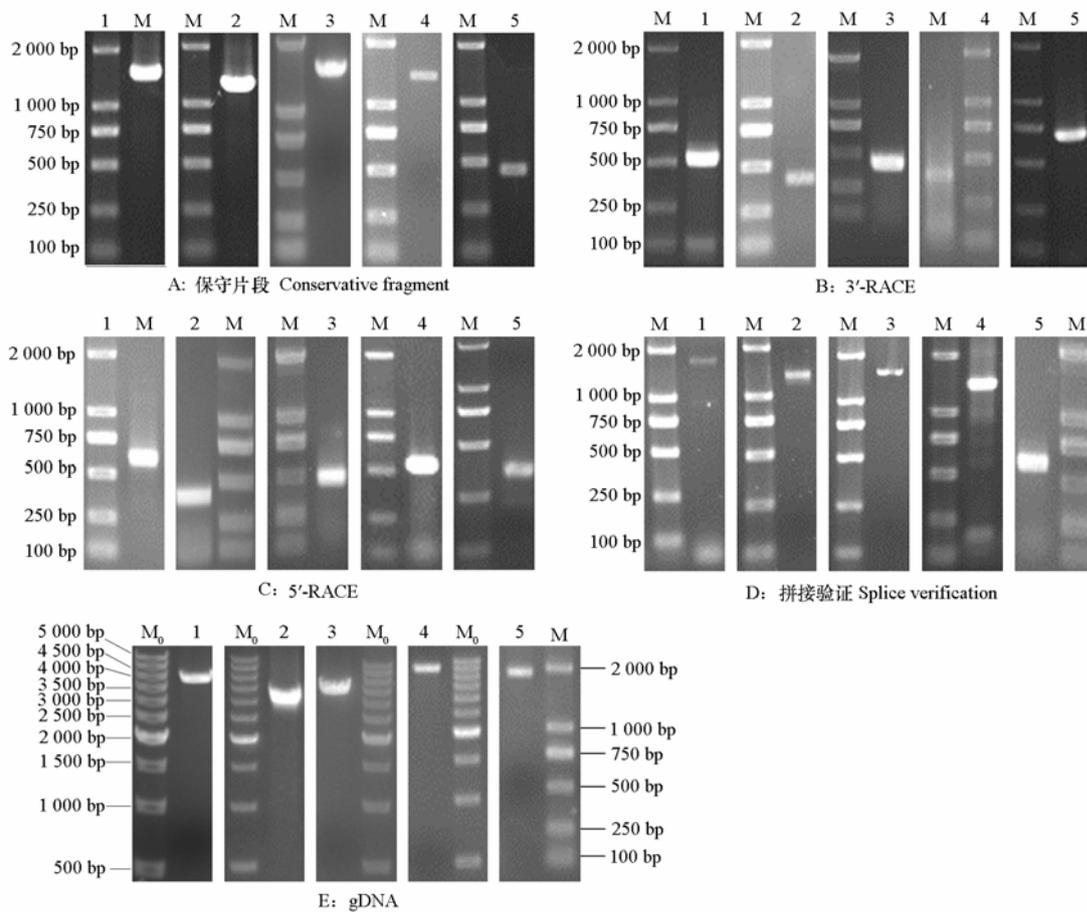
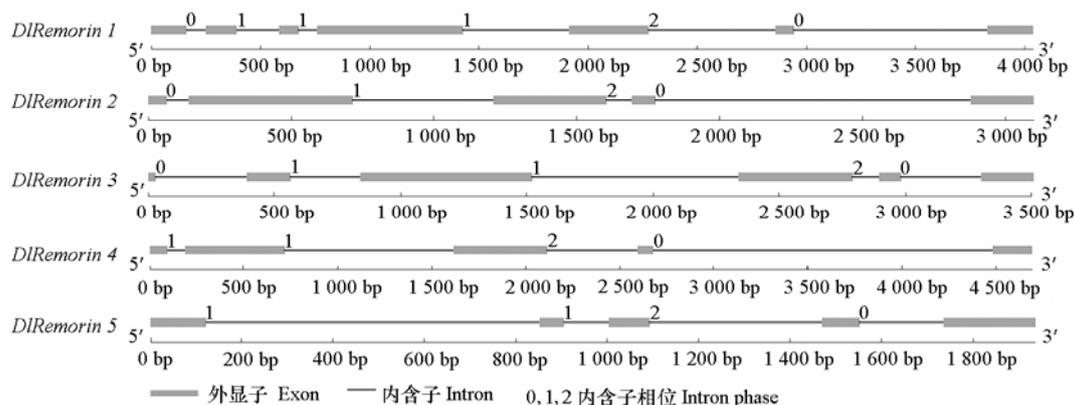


图 1 *D1Remorin1-5* 的 PCR 扩增
 Fig. 1 PCR amplification of *D1Remorin1-5*

2.2 龙眼胚性愈伤组织 *D1Remorin* 家族成员的序列分析

D1Remorin1 cDNA 全长 2 127 bp, 开放阅读框 (ORF) 1 719 bp, 编码 572 个氨基酸, 5'-UTR 为 75 bp, 3'-UTR 为 333 bp, PolyA 尾巴为 25 bp; *D1Remorin2* 全长 1 829 bp, ORF 1 335 bp, 编码 444 个氨基酸, 5'-UTR 为 339 bp, 3'-UTR 为 155 bp, PolyA 尾巴为 37 bp; *D1Remorin3* 全长 1 937 bp, ORF 1 626 bp, 编码 541 个氨基酸, 5'-UTR 为 132 bp, 3'-UTR 为 179 bp, PolyA 尾巴为 43 bp; *D1Remorin4* 全长 1 743 bp, ORF 1 401 bp, 编码 466 个氨基酸, 5'-UTR 为 112 bp, 3'-UTR 为 230 bp, PolyA 尾巴为 24 bp; *D1Remorin5* 全长 1 043 bp, ORF 546 bp, 编码 181 个氨基酸, 5'-UTR 为 193 bp, 3'-UTR 为 304 bp, PolyA 尾巴为 25 bp。

应用基因结构预测软件分析 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 可知, *D1Remorin1-5* 扩增的 DNA 序列中内含子的个数为 4~6 个 (图 2), 所有内含子的剪切位点均符合真核生物 “GT-AG” 规则。外显子序列与 cDNA 序列相一致, 从而也验证了 cDNA 序列的正确性。外显子和内含子的序列长度相差较大。其中 *D1Remorin3* 的一个外显子序列最短, 只有 30 bp, 另一个外显子序列最长, 为 681 bp; *D1Remorin2* 的内含子序列最短, 只有 76 bp; 而 *D1Remorin4* 的内含子序列最长, 为 1 808 bp。通过对外显子与内含子个数的统计还发现, *D1Remorin1-5* 的 C 端的内含子的剪切方式具有较强的保守性 (图 3), 推测可能与 *Remorin* 的 cDNA 序列 C 端的 coiled-coil 模体的保守性很强有关。

图 2 *DlRemorin1* ~ 5 的 DNA 结构Fig. 2 DNA structure of *DlRemorin1* -5

$$\begin{aligned}
 \text{DlRemorin1: } & 183 + (92) + 136 + (199) + 87 + (87) + 663 + (488) + 361 + (582) + \boxed{82 + (887) + 207} \\
 \text{DlRemorin2: } & 66 + (76) + 574 + (491) + 397 + (94) + \boxed{82 + (1104) + 216} \\
 \text{DlRemorin3: } & 30 + (362) + 172 + (276) + 681 + (816) + 454 + (107) + \boxed{82 + (318) + 207} \\
 \text{DlRemorin4: } & 91 + (96) + 528 + (901) + 496 + (484) + \boxed{82 + (1808) + 204} \\
 \text{DlRemorin5: } & 121 + (729) + 53 + (99) + 88 + (378) + \boxed{82 + (183) + 201}
 \end{aligned}$$

图 3 *DlRemorin1* ~ 5 的外显子/内含子碱基数统计

括号内数字代表内含子个数; 方框用于说明 *DlRemorins-C* 端内含子剪切的保守性。

Fig. 3 The number of exon/intron in *DlRemorin1* -5

Numbers in brackets represent the number of introns; The pane use for illustrating the conservatism of the introns shear in *DlRemorins-C*.

2.3 龙眼胚性愈伤组织 *DlRemorin* 家族成员的生物信息学分析

利用 ExPASy Protparam 预测 *DlRemorin1* ~ 5 家族的理化性质见表 2。SignalP3.0 Server 软件预测可知 *DlRemorin1* ~ 5 都没有信号肽。PSORT 亚细胞定位预测 *DlRemorin1*、*DlRemorin3*、*DlRemorin4* 定位于细胞核, *DlRemorin2* 定位于线粒体基质空间, *DlRemorin5* 定位于细胞质。经 EMBnet TMpred 预测只有 *DlRemorin1* 具有跨膜结构; NetPhos 2.0 软件预测结果显示 *DlRemorin1* 含有 50 个蛋白磷酸化位点 (Ser: 47, Thr: 3, Tyr: 0), *DlRemorin2* 含有 32 个蛋白磷酸化位点 (Ser: 22, Thr: 8, Tyr: 2), *DlRemorin3* 含有 47 个蛋白磷酸化位点 (Ser: 30, Thr: 13, Tyr: 4), *DlRemorin4* 含有 44 个蛋白磷酸化位点 (Ser: 33, Thr: 9, Tyr: 2), *DlRemorin5* 含有 14 个蛋白磷酸化位点 (Ser: 13, Thr: 0, Tyr: 1); 经 PredictProtein 预测其它功能位点可知, *DlRemorin1* 含有 4 个 N-糖基化位点、3 个 cAMP 与 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、14 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、11 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、9 个 N-酰基化位点; *DlRemorin2* 含有 7 个 N-糖基化位点、1 个 cAMP 与 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、9 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、9 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、两个 N-酰基化位点; *DlRemorin3* 含有 4 个 N-糖基化位点、9 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、8 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点、6 个 N-酰基化位点; *DlRemorin4* 含有 1 个 N-糖基化位点、1 个 cAMP 与 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、12 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、11 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点、2 个 N-酰基化位点; *DlRemorin5* 含

有 2 个 cAMP 与 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点、1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、1 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点、2 个 N-乙酰化位点和 1 个 ATP/GTP 结合位点 A 基序 (P-loop); 如图 4 所示, 经 InterProScan 预测 DIRemorin1 ~ 4 均含有 Remorin-C 保守结构域, DIRemorin5 的 C 端 68 ~ 175 aa 处含有一个 Remorin-C 保守结构域, 而 N 端的 42 ~ 65 aa 处是一个 Remorin-N 保守结构域。采用 PSIPRED 在线软件预测蛋白质的二级结构, DIRemorin1 ~ 5 主要由无规则卷曲和 α -螺旋组成, DIRemorin1 含 3 个 β -折叠, DIRemorin2 和 DIRemorin4 只含 1 个 β -折叠, 而 DIRemorin3 和 DIRemorin5 则没有 β -折叠。

表 2 龙眼 Remorins 理化性质
Table 2 Physicochemical properties of DIRemorins

| 蛋白名称 Protein name | 总氨基酸/aa Number of total amino acids | 分子量/kD Molecular weight | 分子式 Formula | 等电点 pI | 不稳定系数 Instability index | 带正电氨基酸 Positively charged residues | 带负电氨基酸 Negatively charged residue: | 总亲水性值 GRAVY |
|----------------------|--|----------------------------|---|-----------|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| DIRemorin1 | 572 | 63 200.6 | C ₂₆₈₄ H ₄₃₅₄ N ₈₅₂ O ₈₇₁ S ₂₂ | 9.81 | 62.91 | 89 | 66 | -0.835 |
| DIRemorin2 | 444 | 41 288.9 | C ₁₇₇₁ H ₂₇₉₇ N ₅₄₇ O ₅₆₆ S ₁₅ | 8.79 | 64.45 | 49 | 43 | -0.875 |
| DIRemorin3 | 541 | 60 426.4 | C ₂₅₇₁ H ₄₁₃₃ N ₇₈₅ O ₈₄₇ S ₂₆ | 7.18 | 53.23 | 79 | 79 | -0.889 |
| DIRemorin4 | 466 | 52 215.6 | C ₂₂₄₅ H ₃₆₁₁ N ₆₇₇ O ₇₂₀ S ₁₉ | 8.56 | 62.26 | 71 | 67 | -0.918 |
| DIRemorin5 | 181 | 20 187.5 | C ₈₆₉ H ₁₃₉₅ N ₂₆₁ O ₂₈₃ S ₅ | 6.62 | 47.45 | 33 | 34 | -0.943 |

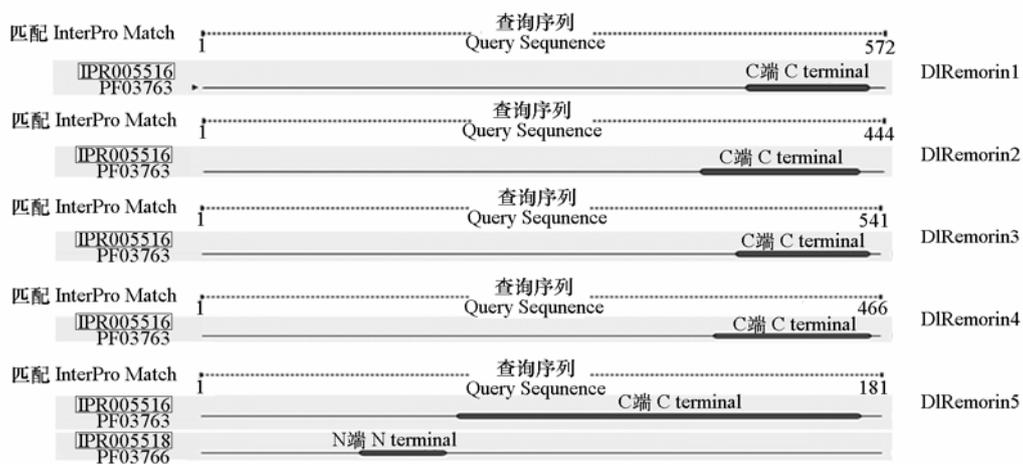


图 4 龙眼 DIRemorin 的保守结构域预测
Fig. 4 Conservative domain structure prediction of DIRemorins

为了研究 Remorin 的进化关系, 根据 NCBI 数据库中拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*) 和早酥梨 (*Pyrus bretschneideri* 'Zaosuli') 的 34 条 Remorin 氨基酸序列, 利用 Mega5.21 软件的邻近相邻法 (NJ 法) 构建植物的 Remorin 的系统进化树 (图 5), 结果表明 39 条蛋白序列分成 5 组, 其中 DIRemorin5 处于第 I 组, 属于经典的 Remorin 蛋白, 含有一个 Remorin-C 保守结构域和 Remorin-N 保守结构域。DIRemorin1 与 DIRemorin2 处于第 V 组, 属于长链 Remorin, DIRemorin1 与 SIRem5.4 在同一分枝, DIRemorin2 与 SIRem5.1 在同一分枝; DIRemorin3 和 DIRemorin4 处于第 IV 组、DIRemorin3 与 AtRem4.1 处于同一分枝, DIRemorin4 与 AtRem4.2 处在同一分枝。

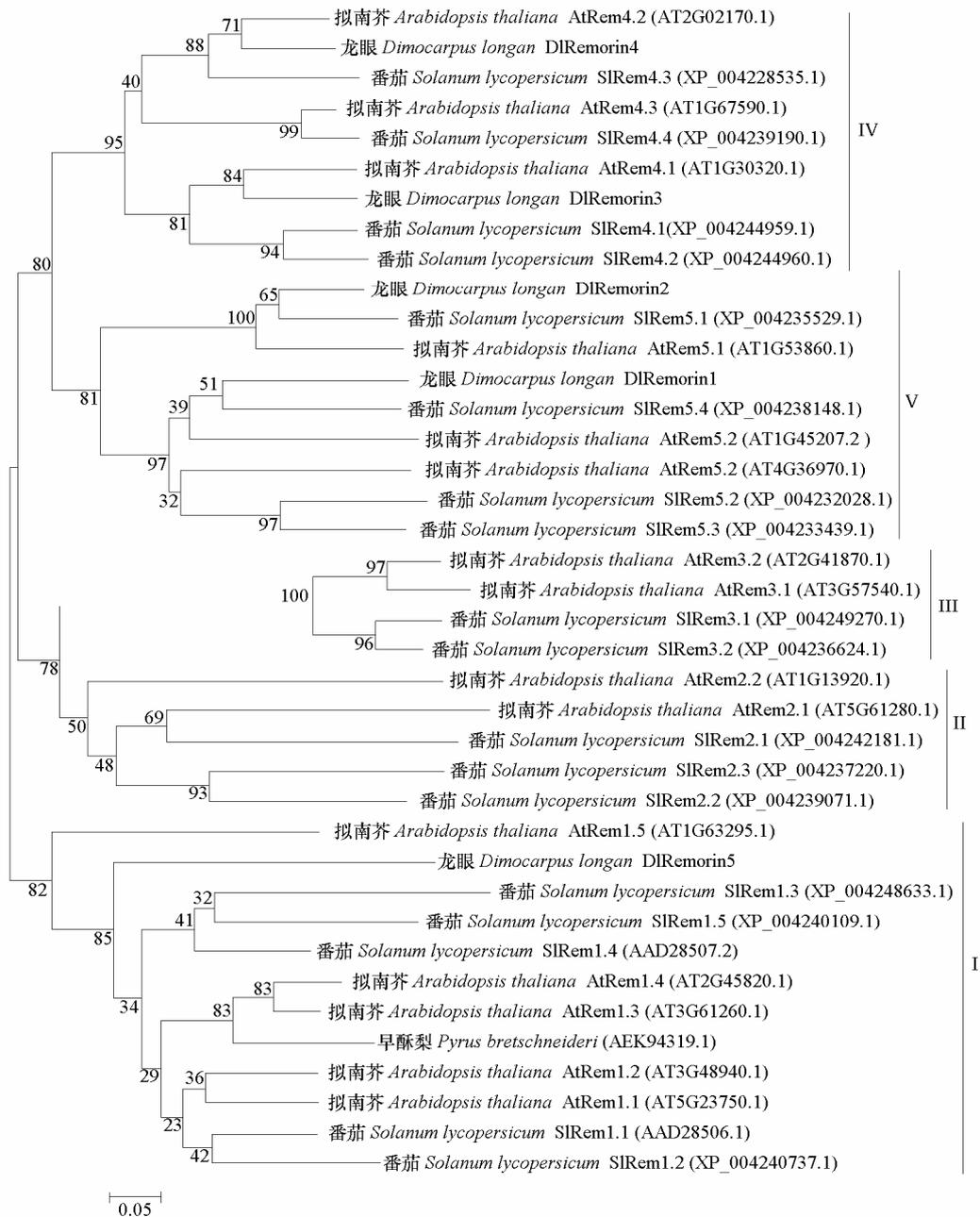


图 5 植物 Remorin 进化树分析

图中分支点的数字表示 Bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点可信度的百分比 (%)。

Fig. 5 Phylogenetic tree of plant Remorin

The number at the nodes represents the reliability percent of Bootstrap values based on 1 000 replications (%) .

2.4 龙眼体胚发育过程不同阶段 *DIRemorin* 家族成员的转录水平分析

选用 *EIF4 α* 、*EF-1 α* 和 *FSD* 为内参基因一起来平衡化 qRT-PCR 的数据, 以校正 *DIRemorins* 在龙眼体胚发育过程中的相对表达量。分别设计一对特异引物用于龙眼体胚发育过程中的 qRT-PCR 扩增。如图 6 所示, 随着龙眼体胚的进一步发育, *DIRemorin1* mRNA 转录水平变化剧烈, 总体呈现

“N”状趋势，从松散型的胚性愈伤组织时期到球形胚时期表达量的增速较慢，从球形胚时期到心形胚时期表达量迅速升高，并在心形胚时期达到峰值，而从心形胚时期至鱼雷形胚时期的表达水平快速下降至与松散型胚性愈伤组织相当，并在子叶形胚时期又急剧升高；*DIRemorin2* 从松散型的胚性愈伤组织时期到球形胚时期的表达量波动较小，从球形胚时期到心形胚时期表达量迅速下降，从心形胚时期鱼雷形胚时期的表达水平迅速升高，随后又急剧下降，在子叶形胚时期的表达量下降至整个发育时期的最低值。*DIRemorin3* 的 mRNA 转录水平在前两个时期缓慢提升，从球形胚到心形胚时期迅速升高，随后到鱼雷形胚时期虽略有下降，但从鱼雷形胚时期到子叶形胚时期再次迅速升高，并在子叶形胚时期达到最高，表达量是松散型胚性愈伤组织时期的 4 倍左右；*DIRemorin4* 和 *DIRemorin5* 的 mRNA 转录水平在整个发育时期相对稳定，*DIRemorin4* 在球形胚和鱼雷形胚时期的表达水平相对较低，*DIRemorin5* 在不完全胚性紧实结构时期的表达量下降到最低值，*DIRemorin4* 和 *DIRemorin5* 在其它发育阶段都能维持在较高的水平。

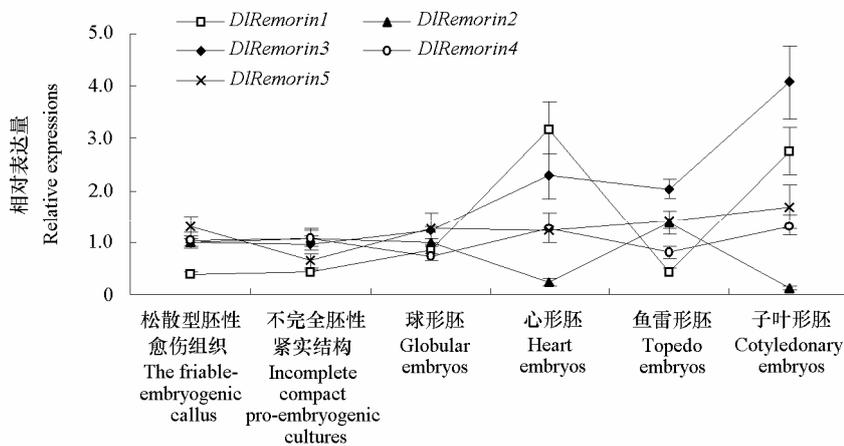


图 6 龙眼体胚发生不同阶段 *DIRemorin* 基因的转录水平

Fig. 6 Transcription levels of the *DIRemorin* family genes at different stages of longan somatic embryogenesis

2.5 调控 *DIRemorin* 基因家族的 miRNA 预测

psRNA Target 预测结果 (表 3) 表明, 龙眼 *Remorin* 基因家族受到 miRNA 的调控。*DIRemorin1* ~ 5 均可能同时受到多种 miRNA 的调控, 如 *DIRemorin1* 同时受到 dlo-miR1444/1520/1854/2083/2103/2123/2873/3449/4397/5052/5083 的调控; *DIRemorin2* 可能同时受到 dlo-miR1072/1222/2673/3520/3699/4344/5021/5182/831/918 的调控; *DIRemorin3* 可能同时受到 dlo-miR1169/1847/2098/3632/4415 的调控; *DIRemorin4* 可能同时受到 dlo-miR1027/1314/1534/2124/3707/413/5169/773/806/823/833 的调控; *DIRemorin5* 可能同时受到 dlo-miR1027/2619/2663/446/5021 的调控; 有些以抑制靶标基因的翻译方式调控 *DIRemorins* 的表达, 有些则以裂解 mRNA 的方式抑制靶标基因的表达, 而 miR1027 能同时以这两种方式对 *DIRemorin4* 进行调控。一个 miRNA 可同时调控多个靶标, 如 miR1027 可能同时调控 *DIRemorin4* 和 *DIRemorin5*; miR5021 可能同时调控 *DIRemorin2* 和 *DIRemorin5*。

表 3 潜在调控 *DIRemorins* 的 miRNAs
Table 3 Potential miRNAs regulating *DIRemorins*

| 靶标基因 Target gene | 序号 Code | 龙眼 miRNA dlo-miRNA | 期望值/E Expectation/E | 目标可接入性/UPE Target accessibility/UPE | 抑制方式 Inhibition | 多样性 Multiplicity |
|---------------------|------------|-----------------------|------------------------|--|--------------------|---------------------|
| <i>DIRemorin1</i> | 1 | miR1444 | 4.5 | 19.811 | 翻译 Translation | 1 |
| | 2 | miR1520 | 4.5 | 14.539 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 3 | miR1854 | 5.0 | 11.500 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 4 | miR2083 | 4.5 | 23.689 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 5 | miR2103 | 4.5 | 16.787 | 翻译 Translation | 1 |
| | 6 | miR2123 | 5.0 | 18.333 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 7 | miR2873 | 3.5 | 12.073 | 翻译 Translation | 1 |
| | 8 | miR3449 | 5.0 | 16.751 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 9 | miR4397 | 5.0 | 18.891 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 10 | miR5052 | 5.0 | 21.188 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 11 | miR5083 | 5.0 | 19.684 | 翻译 Translation | 1 |
| <i>DIRemorin2</i> | 1 | miR1072 | 5.0 | 15.208 | 翻译 Translation | 1 |
| | 2 | miR1222 | 4.5 | 6.505 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 3 | miR2673 | 5.0 | 17.771 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 4 | miR3520 | 5.0 | 15.788 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 5 | miR3699 | 4.5 | 17.342 | 翻译 Translation | 1 |
| | 6 | miR4344 | 5.0 | 16.837 | 翻译 Translation | 1 |
| | 7 | miR5021 | 5.0 | 11.280 | 翻译 Translation | 1 |
| | 8 | miR5182 | 5.0 | 10.619 | 翻译 Translation | 1 |
| | 9 | miR831 | 5.0 | 7.049 | 翻译 Translation | 1 |
| | 10 | miR918 | 5.0 | 20.384 | 翻译 Translation | 1 |
| <i>DIRemorin3</i> | 1 | miR1169 | 5.0 | 17.090 | 翻译 Translation | 1 |
| | 2 | miR1847 | 5.0 | 13.275 | 翻译 Translation | 1 |
| | 3 | miR2098 | 5.0 | 23.255 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 4 | miR3632 | 5.0 | 15.444 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 5 | miR4415 | 4.0 | 15.620 | 裂解 Cleavage | 1 |
| <i>DIRemorin4</i> | 1 | miR1027 | 4.5 | 17.726 | 翻译 Translation | 2 |
| | 2 | miR1027 | 5.0 | 15.301 | 裂解 Cleavage | 2 |
| | 3 | miR1314 | 5.0 | 14.439 | 翻译 Translation | 1 |
| | 4 | miR1534 | 5.0 | 16.322 | 翻译 Translation | 1 |
| | 5 | miR2124 | 5.0 | 11.942 | 翻译 Translation | 1 |
| | 6 | miR3707 | 5.0 | 14.128 | 翻译 Translation | 1 |
| | 7 | miR413 | 5.0 | 21.743 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 8 | miR5169 | 5.0 | 17.936 | 翻译 Translation | 1 |
| | 9 | miR773 | 5.0 | 10.149 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 10 | miR806 | 5.0 | 10.901 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 11 | miR823 | 5.0 | 14.232 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 12 | miR833 | 4.5 | 11.518 | 翻译 Translation | 1 |
| <i>DIRemorin5</i> | 1 | miR1027 | 5.0 | 13.676 | 翻译 Translation | 1 |
| | 2 | miR2619 | 5.0 | 15.675 | 翻译 Translation | 1 |
| | 3 | miR2663 | 5.0 | 16.800 | 翻译 Translation | 1 |
| | 4 | miR446 | 5.0 | 14.270 | 裂解 Cleavage | 1 |
| | 5 | miR5021 | 4.5 | 15.387 | 裂解 Cleavage | 1 |

3 讨论

3.1 利用生物信息学推测 *DIRemorin* 家族的功能

Remorin 蛋白存在于质膜上, 是脂筏的主要成分, 无跨膜结构域, 具有膜结构 (Mongrand et al., 2004; Iris & Thomas, 2011)。Lefebvre 等 (2010) 的研究表明 Remorin 蛋白可能作为支架蛋白在植物的生长发育过程中起作用。王大海 (2008) 推测 *Remorin* 可能是细胞骨架的末端受体, 有利于细胞骨架末端在细胞质膜上的锚定。通过生物信息学分析可知, *DIRemorin1* ~ 5 与其它植物 *Remorin* 核苷酸序列和对应的氨基酸序列的同源性较高; *DIRemorin1* ~ 5 均为不稳定的亲水蛋白, 都不含信

号肽, 只有 *DIRemorin1* 具有跨膜结构; *DIRemorin1*、*DIRemorin3*、*DIRemorin4* 定位于细胞核, *DIRemorin2* 定位于线粒体基质空间, *DIRemorin5* 定位于细胞质。*DIRemorin1 ~ 5* 都含有典型的 *Remorin-C* 保守结构域, *DIRemorin5* N 端含有一个典型的 *Remorin-N* 保守结构域; *DIRemorin1 ~ 5* 基因组序列 C-端的内含子剪切方式有很强的保守性, 这可能与 *Remorin* 家族的 *Remorin-C* 端的保守性强有关。初步推断 *DIRemorin1 ~ 5* 为 *Remorin* 家族的 5 个成员, 可能具有与脂筏相关的功能。

蛋白质磷酸化是一种普遍的翻译后共价修饰, 在氨基酸侧链加入一个带强负电的磷酸基团后蛋白质会发生酯化作用, 使蛋白质的空间构型、分子间相互作用力及其活性等发生改变, 从而在细胞的信号转导、基因的转录和生长发育等代谢过程中起调控作用(姜铮等, 2009)。生物信息学预测结果可知, *DIRemorin1 ~ 5* 均含有极其丰富的蛋白磷酸化位点, 分别含有 50 个、32 个、47 个、44 个和 14 个蛋白磷酸化位点; 此外, *DIRemorin1 ~ 5* 含有大量的其他潜在功能位点, 如 N-糖基化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、N-酰基化位点、cAMP 与 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点等。同时, *Remorin-N* 端的内在无序区域(intrinsic disorder, ID), 对蛋白磷酸化具有重要的作用(Iakoucheva et al., 2004; Marin et al., 2012)。*Remorin* 可通过蛋白磷酸化方式参与植物的信号转导途径, 某些成员可能具有与半乳糖醛酸结合的活性, 参与 OGA 信号途径(Jacinto et al., 1993)。龙眼胚性愈伤组织 *DIRemorin1 ~ 5* 可能通过蛋白磷酸化或与半乳糖醛酸结合等方式, 参与信号转导等途径。Chugh 和 Khurana (2002) 的研究认为信号转导相关基因, 是控制体细胞胚发育的 9 类关键基因之一, 推测 *DIRemorin1 ~ 5* 可能是质膜的重要元件参与信号转导途径, 从而进一步调控龙眼体胚的发育过程。

3.2 *DIRemorin* 家族成员在龙眼体胚发育过程的调控作用

Raffaele 等(2009)的研究表明 *Remorin* 蛋白遍布植物的各种组织器官中, 在植物叶片和花的发育过程以及在分裂的组织中 *remorin* 基因的表达量明显增加, *Remorin* 对植物的细胞分裂和成熟可能有促进作用。Bariola 等(2004)的研究也表明, *Remorin* 可能与植物顶端组织、维管组织和胚性组织的形成有关。目前, 关于植物体胚发生的机理普遍认为, 体胚发生过程是细胞内基因差异表达的结果。在龙眼体胚发育过程中, *DIRemorin1* mRNA 转录水平变化剧烈, 心形胚时期的表达量是胚性愈伤组织时期的 8 倍左右, 子叶形胚时期的表达量是胚性愈伤组织时期的 7 倍左右, 均达到了极显著水平, 推测 *DIRemorin1* 的表达能促进心形胚和子叶形胚的发育。与 *DIRemorin1* 相反, *DIRemorin2* 在心形胚和子叶形胚时期的表达量极低, 心形胚时期的表达量是胚性愈伤组织时期的 1/4 左右, 子叶形胚时期的表达量是胚性愈伤组织时期的 1/9 左右, 推测 *DIRemorin2* 对心形胚和子叶形胚的发育起负调节作用。*DIRemorin3* 在体胚发育的中后期表现较为活跃, 在心形胚和鱼雷形胚时期的表达量是胚性愈伤组织时期的 2 倍左右, 随着龙眼体胚进一步发育至子叶形胚时期, 表达量达最大值, 是胚性愈伤组织时期的 4 倍左右, 推测 *DIRemorin3* 能促进龙眼体胚的发育, 尤其是对心形胚、鱼雷形和子叶形胚的形成起重要的促进作用。*DIRemorin4* 在球形胚和鱼雷形胚时期的表达水平相对较低, *DIRemorin5* 在不完全胚性紧实结构时期的表达量下降到最低值, 只有胚性愈伤组织时期的 1/2 左右。因此, 在龙眼体胚的发生过程中, *DIRemorin* 家族不同成员的表达量均表现出不同程度的变化, 在龙眼体胚发生过程中其转录水平具有一定的组织特异性和时序性, 每个成员在龙眼体胚发育过程中可能扮演不同角色, 因此, 结合前人的研究结果推测 *DIRemorin* 基因的差异表达对龙眼体胚的发育可能具有调控作用。

基因的表达受转录后水平上多种因子的调控, 如 mRNA 的加工、成熟、降解和翻译等, 而 miRNA 在转录后水平上的调控作用极其重要。本研究中, 通过对调控龙眼 *Remorin* 基因家族的 miRNA 的预测可知 *DIRemorin* 家族可能受到 miRNA 家族的调控, 其中每个成员同时受到多个 miRNA 的调

控, 其调控方式即有抑制 *Remorin* 的翻译, 也有裂解 mRNA; 有些 miRNA 可同时调控 *Remorin* 家族的两个成员。这些预测结果提示植物 *Remorin* 家族的表达还可能受到 miRNA 的调控。当然, 植物体内的每一个生理生化现象的机理是十分复杂的, 要探索 *Remorin* 对龙眼体胚发生的调控作用, 还需要进行亚细胞定位、遗传转化、突变体获得、miRNA 的鉴定与前体克隆等后续的功能研究。

References

- Bariola P A, Retelska D, Stasiak A, Kammerer R A, Fleming A, Hijri M, Frank S, Farmer E E. 2004. Remorins form a novel family of coiled coil forming oligomeric and filamentous proteins associated with apical, vascular and embryonic tissues in plants. *Plant Molecular Biology*, 55 (4): 579 - 594.
- Chen Chun-ling, Lai Zhong-xiong. 2002. Synchronization regulation of embryogenesis of embryogenic calli and their histological observations in longan. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition*, 31 (2): 192 - 194. (in Chinese)
陈春玲, 赖钟雄. 2002. 龙眼胚性愈伤组织体胚发生同步化调控及组织细胞学观察. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 31 (2): 192 - 194.
- Chen K G, An Y Q. 2006. Transcriptional responses to gibberellin and abscisic acid in barley aleurone. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48 (5): 591 - 612.
- Chugh A, Khurana P. 2002. Gene expression during somatic embryogenesis: Recent advances. *Curr Sci*, 83: 715 - 730.
- Fu Zhen-fang, Yao Chun-chao, Zhang Chao-hong, Wang Yue-jin. 2012. Cloning and functional analysis of *PbzsREMORIN* gene related to *Venturia nashicola* resistance in 'Zaosuli' pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (1): 13 - 22. (in Chinese)
付镇芳, 姚春潮, 张朝红, 王跃进. 2012. 早酥梨抗黑星病相关基因 *PbzsREMORIN* 的克隆及功能分析. *园艺学报*, 39 (1): 13 - 22.
- Fang Zhi-zhen, Lai Zhong-xiong. 2009. Preliminary synchronization regulation at the middle developmental stage during longan somatic embryogenesis. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 25 (1): 152 - 155. (in Chinese)
方智振, 赖钟雄. 2009. 龙眼体胚发生中期发育同步化的初步调控. *中国农学通报*, 25 (1): 152 - 155.
- Iakoucheva L M, Radivojac P, Brown C J, O'Connor T R, Sikes J G, Obradovic Z, Dunker A K. 2004. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res*, 32: 1037 - 1049.
- Iris K Jarsch, Thomas Ott. 2011. Perspectives on remorin proteins, membrane rafts, and their role during plant-microbe interactions. *MPMI*, 24 (1): 7 - 12.
- Jacinto T, Farmer E E, Ryan C A. 1993. Purification of potato leaf plasma membrane protein pp34, a protein phosphorylated in response to oligogalacturonide signals for defense and development. *Plant Physiol*, 103 (4): 1393 - 1397.
- Jiang Zheng, Wang Fang, He Xiang, Liu Da-wei, Chen Xuan-nan, Zhao Hong-qing, Huang Liu-yu, Yuan Jing. 2009. Progress on protein/peptide phosphorylation. *Lett Biotechnol*, 20 (2): 233 - 237. (in Chinese)
姜 铮, 王 芳, 何 湘, 刘大伟, 陈宣男, 赵红庆, 黄留玉, 袁 静. 2009. 蛋白质磷酸化修饰的研究进展. *生物技术通讯*, 20 (2): 233 - 237.
- Kreps J A, Wu Y, Chang H S, Zhu T, Wang X, Harper J F. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic and cold stress. *Plant Physiology*, 130 (4): 2129 - 2141.
- Lai Cheng-chun, Lai Zhong-xiong, Fang Zhi-zhen, Lin Yu-ling, Jiang Shun-ri. 2010. Cloning of mitochondrial *F1-ATPase beta subunit* gene from embryogenic callus and its expression analysis by q-PCR during somatic embryogenesis in longan. *Sci Agric Sin*, 43 (16): 3392 - 3401. (in Chinese)
赖呈纯, 赖钟雄, 方智振, 林玉玲, 姜顺日. 2010. 龙眼胚性愈伤组织线粒体 ATP 合酶 β 亚基基因克隆及其在龙眼体胚发生过程中的表达分析. *中国农业科学*, 43 (16): 3392 - 3401.
- Lai Z X, Lin Y L. 2013. Analysis of the global transcriptome of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) embryogenic callus using Illumina paired-end sequencing. *BMC Genomics*, 14: 561.
- Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Hervé C, Tóth K, Bittencourt-Silvestre J, Klaus D, Deslandes L, Godiard L, Murray J D, Udvardi M K, Raffaele S, Mongrand S, Cullimore J, Gamas P, Niebel A, Ott T. 2010. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (2): 2343 - 2348.
- Li Hui-hua, Lai Zhong-xiong, Lin Yu-ling, Su Ming-hua. 2010. Cloning of *ACO* gene from embryogenic calli of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) and its expression during longan somatic embryogenesis. *Sci Agric Sin*, 43 (18): 3798 - 3808. (in Chinese)
李惠华, 赖钟雄, 林玉玲, 苏明华. 2010. 龙眼胚性愈伤组织 ACC 氧化酶基因的克隆及其在龙眼体胚发生过程中的表达分析. *中国农业科学*, 43 (18): 3798 - 3808.

- Lin Fang, Xu Shou-ling, Ni Wei-min, Chu Zhao-qing, Xu Zhi-hong, Xue Hong-wei. 2003. Identification of ABA-responsive genes in rice shoots via cDNA macroarray. *Cell Res*, 13 (1): 59 - 68.
- Lin Y L, Lai Z X. 2010. Reference genes selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree. *Plant Science*, 178 (4): 359 - 365.
- Lin Y L, Lai Z X. 2013. Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *PLoS ONE*, 8 (4): e60337.
- Malakshah S N, Rezaei M H, Heidary M, Salekdeh G H. 2007. Proteomics reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71 (9): 2144 - 2154.
- Marín M, Ott T. 2012. Phosphorylation of intrinsically disordered regions in Remorin proteins. *Plant Sci*, (3): 86.
- Marín M, Thallmair V, Ott T. 2012. The intrinsically disordered N-terminal region of AtREM1.3 remorin protein mediates protein-protein interactions. *Biol Chem*, 287: 39982 - 39991.
- Mongrand S, More L J, Laroche J, Claverol S, Carde J P, Hartmann M A, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule J J. 2004. Lipid rafts in higher plant cells: Purification and characterization of Triton X-100-insoluble micro domains from tobacco plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (35): 36277 - 36286.
- Perraki A, Cacas J L, Crowet J M, Lins L, Castroviejo M, Sylvie G R, Mongrand S, Raffaele S. 2012. Plasma membrane localization of StREM1.3 Remorin is mediated by conformational changes in a novel C-terminal anchor and required for the restriction of PVX movement. *Plant Physiol*, 160: 624 - 637.
- Raffaele S, Bayer E, Mongrand S. 2009. Upregulation of the plant protein remorin correlates with dehiscence and cell maturation: A link with the maturation of plasmodesmata? *Plant Signal Behav*, 4 (10): 915 - 919.
- Raffaele S, Mongrand S, Gamas P, Niebel A, Thomas Ott. 2007. Genome-wide annotation of remorins, a plant-specific protein family: Evolutionary and functional perspectives. *Plant Physiol*, 145 (3): 593 - 600.
- Raffaele S, Perraki A, Mongrand S. 2013. The remorin C-terminal anchor was shaped by convergent evolution among membrane binding domains. *Plant Signal Behav*, 8 (3): e23207.
- Reddy A R, Ramakrishna W, Sekhar A C, Ithal N, Babu P R, Bonaldo M F, Soares M B, Bennetzen J L. 2002. Novel genes are enriched in normalized cDNA libraries from drought-stressed seedlings of rice (*Oryza sativa* L. subsp *indica* cv. Nagina 22). *Genome*, 45 (1): 204 - 214.
- Reymond P, Kunz B, Paul-pletzer K, Grimm R, Eckerskorn C, Farmer E E. 1996. Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphor-protein with physical properties similar to viral movement proteins. *The Plant Cell Online*, 8 (12): 2265 - 2276.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Nadine Van Roy, Paepe A D, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3 (7): 0034.1 - 0034.11.
- Vibha G, Checker, Paramjit Khurana. 2013. Molecular and functional characterization of mulberry EST encoding remorin (MiREM) involved in abiotic stress. *Plant Cell Rep*, 32: 1729 - 1741.
- Wang Da-hai. 2008. Cloning and functional analysis of wood properties candidate genes in *Populus deltoides* [Ph. D. Dissertation]. Beijing: The Chinese Academy of Forestry Sciences. (in Chinese)
- 王大海. 2008. 美洲黑杨材性候选基因的克隆和功能分析[博士论文]. 北京: 中国林业科学研究院.
- Wang Feng-hua, Lai Zhong-xiong, Zheng Jin-gui, Lü Liu-xin. 2003. Synchronization control of somatic embryogenesis from embryogenic calli and extraction of DNA and RNA in longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *Chinese Journal of Tropical Crops*, 24 (3): 33 - 37. (in Chinese)
- 王风华, 赖钟雄, 郑金贵, 吕柳新. 2003. 龙眼胚性愈伤组织体胚发生的同步化调控及其 DNA 与 RNA 的提取方法. *热带作物学报*, 24 (3): 33 - 37.
- Wolf E, Kim P S, Berger B. 1997. MultiCoil: A program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Science*, 6 (6): 1179 - 1189.