

普通油茶两个 Δ -12 脂肪酸脱氢酶基因序列特征及表达模式研究

林萍¹, 周长富², 姚小华^{1*}, 曹永庆¹

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 杭州 311400; 2. 湖南省农业科学院园艺研究所, 湖南 长沙 410125)

摘要: [目的] 研究普通油茶油脂成分形成的调控机制。[方法] 通过转录组测序获得 2 条普通油茶 Δ -12 脂肪酸脱氢酶基因序列, 分别命名为 *Cofad6* 和 *Cofad2-2*, 并对这两个基因及其编码蛋白的序列特征进行比较, 对其基因表达量与脂肪酸成分含量的相关性进行分析。[结果] *Cofad6* 基因 cDNA 编码区全长 1 347 bp, 编码 448 个氨基酸; *Cofad2-2* 基因 cDNA 编码区全长 1 152 bp, 编码 383 个氨基酸。经比对, CoFAD6 蛋白与其余物种 FAD6 蛋白有 65.7%~83.68% 的氨基酸同源, CoFAD2-2 与浙江红花油茶 FAD2-2 蛋白有 99.22% 的氨基酸同源, 与其余物种的蛋白质 78.59%~81.72% 同源。蛋白质二级结构分析表明, CoFAD6 和 CoFAD2-2 均具有一个脂肪酸去饱和酶结构域, 属于脂酰-CoA 去饱和酶基因家族; 两者均为跨膜蛋白, 且 CoFAD2-2 具有定位于内质网的保守模序。定量 PCR 检测发现, 在普通油茶‘长林 4 号’无性系未成熟种子中, *Cofad6* 表达量随着种子发育先升高后降低, 而 *Cofad2-2* 基因随着种子发育表达量逐渐降低, 与种子油脂中亚油酸、亚麻酸含量变化趋势呈显著正相关, 与油酸含量变化呈显著负相关。[结论] 推测 *Cofad2-2* 基因是调控普通油茶种子油脂中油酸和亚油酸含量的关键基因之一, 该研究为普通油茶油脂改良基因工程育种奠定了基础。

关键词: 普通油茶; Δ -12 脂肪酸脱氢酶基因; 表达模式; 实时定量 PCR

中图分类号: S794.4

文献标识码: A

Sequence and Expression Characterization of Two Genes Encoding Δ -12 Fatty Acid Desaturases from *Camellia oleifera*

LIN Ping¹, ZHOU Chang-fu², YAO Xiao-hua¹, CAO Yong-qing¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, Zhejiang, China;

2. Institute of Horticulture, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, Hunan, China)

Abstract: [Objective] Exploring the fatty acids contents regulation mechanism is needed. [Method] Two Δ -12 fatty acid desaturase gene sequences were got from *Camellia oleifera* developing seeds by transcriptome sequencing method, which named *Cofad6* and *Cofad2-2*. The traits of the two genes and encoding proteins were compared, and the correlation of gene expression level and fatty acids contents were analyzed. [Result] *Cofad6* has an open reading frame (ORF) of 1 347 bp and encodes a 448 amino acid (AA) protein; *Cofad2-2* has an 1 152 bp ORF and encodes 383 AA protein. According to the alignment results, the CoFAD6 has the 65.7%~83.68% amino acid sequence similarity with the FAD6 from other species, CoFAD2-2 amino acid sequence exhibits the highest similarity with *C. chekiangoleosa* (99.22%), and has the 78.59%~81.72% amino acid sequence similarity with FAD2 from other species. CoFAD6 and CoFAD2-2 have a fatty acid desaturase domain both, which means they belong to

收稿日期: 2016-03-08

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31400580); 中国林业科学研究院基本科研业务费专项资金青年项目 (CAFYBB2014QB037)

作者简介: 林萍 (1980—), 女, 山东烟台人, 助理研究员, 博士, 主要从事木本油料树种遗传育种研究。

* 通讯作者: 姚小华, 研究员, 博士生导师, 主要从事经济林育种与栽培研究。E-mail: yaohx168@163.com

acyl-CoA desaturase family. CoFAD6 and CoFAD2-2 are transmembrane proteins and the CoFAD2-2 has a microbody C-terminal targeting signal motif. Real-time PCR analysis shows that *Cofad6* and *Cofad2-2* are both expressed in the developing seed of *C. oleifera* ‘Changlin No. 4’. The expression level of *Cofad2-2* is on the decline with the developing of seed, the variation trend is similar with that of linoleic acid content and opposite with that of oleic acid content. [Conclusion] It is indicated that *Cofad2-2* gene might be one of the key genes to regulate oil quality in *C. oleifera* seed. This research provides scientific basis for oil quality improvement and molecular breeding in *C. oleifera*.

Keywords: *Camellia oleifera*; Δ -12 fatty acid desaturase gene; expression characterization; real-time PCR

在植物油脂合成途径中,脂肪酸脱氢酶的含量和活性决定着油脂中不饱和脂肪酸的成分和比例。 Δ -12脂肪酸脱氢酶是存在于植物细胞内质网膜和质体膜上的一种膜结合蛋白^[1]。其功能是在油酸(18:1, Δ -9)的 Δ -12位脱氢引入双键,形成双不饱和脂肪酸亚油酸(18:2, Δ -9,12)^[2-3],是调控植物多不饱和脂肪酸含量的关键酶^[4-5]。 Δ -12脂肪酸脱氢酶根据电子供体不同分为2类:一类位于植物细胞内质网的微粒体中(FAD2),以还原型辅酶(NADH)、NADH:细胞色素b5氧化还原酶和细胞色素b5组成的系统为电子供体;另一类定位于植物细胞质体(FAD6),以还原型辅酶II(NADPH)、NADPH:铁合蛋白氧化还原酶和铁合蛋白为电子供体^[6-7]。

普通油茶(*Camellia oleifera* Abel.),隶属山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia* L.),是我国南方重要的木本食用油料物种^[8]。油茶籽油营养保健价值较高,其品质可与橄榄油相媲美,是一种优质的食用油。其不饱和脂肪酸含量达90%以上,以油酸(80%以上)和亚油酸(约8%)为主,且具有抗肿瘤、降血脂等功效^[9]。茶油明显优于其它植物油的高油酸含量的特点,使得普通油茶不饱和脂肪酸合成关键步骤及相关基因的研究一直是科研工作者关注的热点之一。油茶籽油中油酸和亚油酸含量虽然受环境因素影响,但主要由遗传因素决定,因此研究普通油茶 Δ -12脂肪酸脱氢酶基因的表达调控模式,在基因水平上研究油茶籽中油酸和亚油酸的积累,对以改良油茶籽油及其它油料作物品质为目的的育种具有重要意义。

本课题组在以普通油茶‘长林4号’未成熟种子为材料的转录组测序结果中,获得了2个 Δ -12脂肪酸脱氢酶基因的全长cDNA序列,本研究对其cDNA及所编码蛋白质的性质进行预测分析,并研究其在种子不同发育时期的表达量变化,分析表达量变化趋势与普通油茶种子中脂肪酸成分变化的相关性,为进一步研究基因功能、调控植物种子油脂成分的基因工程育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料采集与制备

本研究所用的普通油茶‘长林4号’未成熟种子采自浙江省金华市婺城区东方红林场油茶种质资源收集圃,分别在7月、8月、9月和10月采集果实,剥取种仁,一部分用液氮速冻后存于-80℃冰箱中,备用于RNA提取和qRT-PCR分析,另一部分用烘箱80℃烘至恒质量,测定油脂脂肪酸成分。

1.2 实验方法

1.2.1 *Cofad6*、*Cofad2-2* 全长 cDNA 序列的获取

本研究中的2个基因序列及RPKM数据来源于本课题组前期测定的普通油茶‘长林4号’未成熟种子转录组数据及相关基因的表达谱测定分析^[10]。经过Blast比对分析,两条序列均编码普通油茶 Δ -12脂肪酸去饱和酶,分别命名为*Cofad6*和*Cofad2-2*。

1.2.2 RNA的提取及一链cDNA合成

种子发育各时期样品总RNA提取参照北京艾德莱生物技术有限公司RN38 EASYspinplus Plant RNA kit试剂盒说明书进行。总RNA用1%的琼脂糖凝胶检测质量,用Nanodrop 2000分光光度计检测RNA纯度和浓度,并计算含量。

各时期样品取4 μ L RNA为模板,一链cDNA的合成参照美国Invitrogen公司的First-Strand Synthesis System试剂盒说明书进行。

1.2.3 qRT-PCR引物合成及分析

根据*Cofad6*、*Cofad2-2*的特异性序列用Primer Premier 5.0设计qRT-PCR引物:*Cofad6*F:5'-CGGATGGCCACTGAT-TATCT-3',*Cofad6*R:5'-GAGATATGGTGGGGGATGTC-3';*Cofad2-2*F:5'-CCCATTGTTTTCTCGATCT-3',*Cofad2-2*R:5'-TGTGTCATCAAGCCATTGGT-3'。使用CESA为内参^[11],引物为:CESAF:5'-AAGGAC-CGCTGATACTCGAA-3',CESAR:5'-ACACCATG-GCCTGGAAATAA-3'。

反应体系采用大连宝生物SYBR[®] Premix Ex Taq[™]说明书中的20 μ L体系,利用ABI7300 qRT-

PCR 仪采用 2 步法进行 qRT-PCR。PCR 反应程序为:第一步,95 °C 30 s;第二步,95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 个循环;反应结束后生成溶解曲线并分析。

1.2.4 CoFAD6、CoFAD2-2 序列比对及进化树构建

采用 ClustalX 软件对 CoFAD6、CoFAD2-2 与其它物种的响应蛋白序列进行同源性比对,采用 MEGA 软件的 neighbor-joining analysis 功能进行系统进化树构建分析,相关参数使用软件默认值。

1.2.5 CoFAD6、CoFAD2-2 蛋白保守结构域分析 采用 InterPro(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)在线分析。

1.2.6 CoFAD6、CoFAD2-2 蛋白跨膜结构分析 跨膜区域及方向采用在线分析工具 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分析。

1.2.7 CoFAD6、CoFAD2-2 蛋白二级结构分析 采用在线分析工具 PredictProtein(<http://www.predict-protein.org/>)分析。 α 螺旋, β 折叠等基本二级结构预测采用 PROFsec 算法,特征基序 Motif 识别采用 ProSite 算法。

1.2.8 油脂脂肪酸成分测定及与基因表达量相关性分析 油脂脂肪酸成分测定采用周长富等^[12]的方法进行,脂肪酸成分含量与基因表达量相关性分析利用 DPS 分析。

2 结果与分析

2.1 Cofad6、Cofad2-2 全长 cDNA 序列分析

分析结果表明,Cofad6 基因 cDNA 全长 1 687 bp,5' UTR 长 127 bp,3' UTR 长 213 bp,编码区全长 1 347 bp,编码 448 个氨基酸。推测编码的蛋白质分子量为 52.11 kD,编码的所有氨基酸中包括 49 个强碱性 AA(K,R),36 个强酸性 AA(D,E),172 个疏水性 AA(A,I,L,F,W,V)和 101 个极性 AA(N,C,Q,S,T,Y),等电点为 9.247。

经比对,普通油茶 Cofad6 基因的 cDNA 序列与

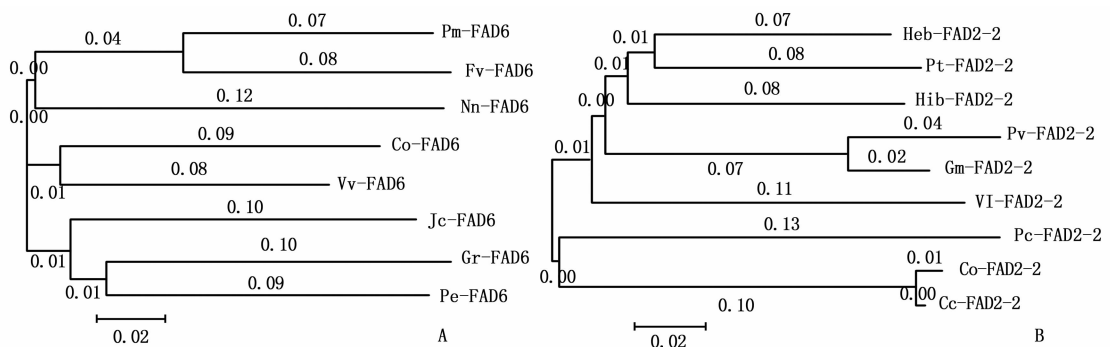
葡萄 (*Vitis vinifera* L.)、雷蒙德氏棉 (*Gossypium raimondii* L.)、乌梅 (*Prunus mume* Apricot)、野草莓 (*Fragaria vesca* L.)、麻风树 (*Jatropha curcass* L.)、莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.)、胡杨 (*Populus euphratica* Oliv.) 等植物的 Δ -12 脂肪酸去饱和酶的 cDNA 序列分别有 85%、84%、81%、84%、83%、83% 和 82% 的同源。

Cofad2-2 基因 cDNA 全长 1 658 bp,并带有 polyA 尾巴,5' UTR 长 274 bp,3' UTR 长 232 bp,编码区全长 1 152 bp,编码 383 个氨基酸。推测编码的蛋白质分子量为 44.17 kD,编码的所有氨基酸中包括 36 个强碱性 AA(K,R),32 个强酸性 AA(D,E),147 个疏水性 AA(A,I,L,F,W,V)和 96 个极性 AA(N,C,Q,S,T,Y),等电点为 8.20。

经比对,普通油茶 Cofad2-2 基因的 cDNA 序列已经在 GenBank 中登录 (GenBank 登录号: JQ739518.1),但其它相关研究未见报道。该基因与浙江红花油茶 (*C. chekiangoleosa* Hu) 同源性最高,达到 99%,与美洲葡萄 (*V. labrusca* L.)、巴西橡胶 (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.)、大豆 (*Glycine max* (L.) Merr)、胡杨、欧芹 (*Petroselinum crispum* (Mill.) Hill)、毛果杨 (*P. trichocarpa* Torr. & Gray)、风车藤 (*Hiptage benghalensis* (L.) Kurz)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 等分别达到了 79%、78%、78%、77%、78%、77%、77% 和 77% 的同源。

2.2 CoFAD6、CoFAD2-2 的进化树构建

采用 MEGA 软件 neighbor-joining analysis 功能对 8 个物种 FAD6 的氨基酸序列进行进化树构建分析表明(图 1-A),普通油茶与葡萄的进化关系相对较近。而普通油茶 CoFAD2-2 的氨基酸序列除了与浙江红花油茶进化关系较近外,跟其它 7 个物种的进化关系相当(图 1-B)。



Co: 普通油茶; Vv: 葡萄; Pm: 乌梅; Fv: 野草莓; Nn: 莲; Gr: 雷蒙德氏棉; Pe: 胡杨; Jc: 麻风树; Cc: 浙江红花油茶; Pv: 菜豆; Gm: 大豆; Heb: 巴西橡胶; Pt: 毛果杨; Hib: 风车藤; VI: 美洲葡萄; Pc: 欧芹

图 1 CoFAD6、CoFAD2-2 的系统进化关系

2.3 CoFAD6、CoFAD2-2 蛋白氨基酸序列分析

对 CoFAD6 的氨基酸序列进行同源性比对分析显示(图 2-A),普通油茶... FAD6 氨基酸序列相似性在 65.7%~83.68% 之间,说明 FAD6 的氨基酸序列在不同物种中具有较高的保守性。

普通油茶 CoFAD2-2 与浙江红花油茶 FAD2 的氨基酸达到 99.22% 同源,全序列中只有 3 个氨基酸残基不同,与其余 7 个物种 FAD2 氨基酸序列相似性在 78.59%~81.72% 之间(图 2-B),可见, FAD2 相对于 FAD6 在不同物种间氨基酸序列保守性更高。

Table A: Multiple sequence alignment of FAD6 amino acid sequences from 8 species. The table lists species (Cv-FAD6, Vv-FAD6, Pm-FAD6, Fv-FAD6, Nn-FAD6, Gr-FAD6, Pe-FAD6, Jc-FAD6) and their corresponding amino acid sequences, with asterisks indicating conserved positions.

Table B: Multiple sequence alignment of FAD2 amino acid sequences from 9 species. The table lists species (Cv-FAD2, Cc-FAD2, Pv-FAD2, Gm-FAD2, Heb-FAD2, Hib-FAD2, V1-FAD2, Pc-FAD2) and their corresponding amino acid sequences, with asterisks indicating conserved positions.

A: 8 个物种的 FAD6 氨基酸序列比对结果; B: 9 个物种的 FAD2 氨基酸序列比对结果

图 2 物种间 FAD6 和 FAD2 氨基酸序列比对结果(物种编号同图 1)

2.4 CoFAD6、CoFAD2-2 蛋白保守结构域分析

蛋白质的保守结构域分析结果表明,CoFAD6 和 CoFAD2-2 均有一个脂肪酸去饱和酶结构域(图3),但两者的结构域长度不同,CoFAD6 蛋白的 150~396 个氨基酸残基是该结构域的区域,涵盖了 247 个 AA,CoFAD2-2 蛋白的 85~344 个 AA 是该结构域的区域,涵盖了 260 个 AA。对该结构域的进一步分析发现,具有该结构域的蛋白均属于脂酰-CoA 去饱和酶基因家族,而非脂酰-ACP 去饱和酶基因家族。此外,CoFAD2-2 蛋白在 25~64AA 位置还存在一个典型的植物去饱和酶 N-端保守结构域。

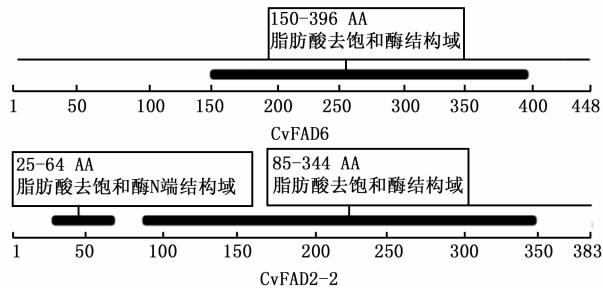


图3 普通油茶 CoFAD6、CoFAD2-2 蛋白保守结构域图

2.5 CoFAD6、CoFAD2-2 蛋白跨膜结构分析

TMHMM 预测跨膜结构结果表明,普通油茶 CoFAD6 蛋白 N 端的 60 个氨基酸残基处于跨膜螺旋的可能性极低,小于 0.01,说明该蛋白无信号肽,且 N 端位于质体膜外。整个蛋白肽链形成了 3 个跨膜螺旋,约有 70 个 AA 处于跨膜螺旋区,蛋白质的 C 端全部处于质体内腔(图 4)。

普通油茶 CoFAD2-2 蛋白 N 端也无信号肽,且 N 端位于内质网膜外。整个蛋白肽链约有 115 个 AA 处于跨膜螺旋区,形成了 4 个跨膜螺旋,C 端全部处于内质网膜外(图 4)。同时,普通油茶 CoFAD2-2 蛋白在第 3 次跨膜结构的两侧还形成了 2 个膜嵌合结构,分别位于多肽链的 118~140 位和 227~249 位。

普通油茶 CoFAD2-2 形成 4 次跨膜结构,而 CoFAD6 酶只有 3 个跨膜结构域,这与油橄榄(*Olea europaea* L.)等相似,且 CoFAD2-2 的 4 次跨膜结构的位置与油橄榄完全相同^[13-14]。普通油茶 CoFAD2-2 形成的 4 次跨膜结构和 2 个膜嵌合结构,与棉花(*Gossypium hirsutum* L.) FAD2-2 和 FAD2-3 的跨膜结构相似^[15-16]。

2.6 CoFAD6、CoFAD2-2 蛋白二级结构分析结果

ProSite 分析结果表明,CoFAD6 和 CoFAD2-2 蛋

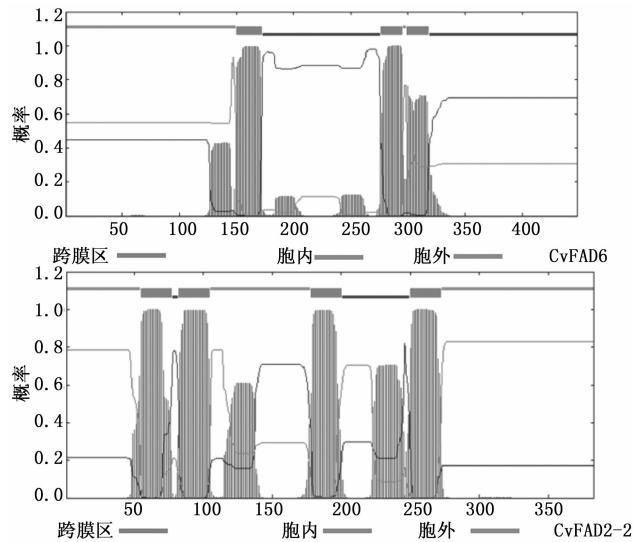


图4 CoFAD6、CoFAD2-2 蛋白跨膜区预测结果

白的二级结构均以 α 螺旋和 β 转角为主, β 折叠较少。在 CoFAD6 的二级结构中 α 螺旋占 49.11%, β 转角占 47.99%, β 折叠仅为 2.90%;CoFAD2-2 二级结构中 α 螺旋占 53.79%, β 折叠为 5.74%, β 转角占 40.47%。

两个蛋白序列中存在的模序(motif)及位置见表 1。这些模序可分为 3 大类,第一类为两个蛋白共有,且数量相同,包括 N-糖基化位点和酪蛋白激酶 II 磷酸化位点。第二类为两个蛋白共有但数量不同的模序,主要包括蛋白激酶 C 磷酸化位点和 N-豆蔻酰化位点;第三类为某个蛋白独有的模序,主要有 CoFAD2-2 蛋白独有的酰胺化位点、酪氨酸激酶磷酸化位点和微体 C-末端的定位信号各 1 个,CoFAD6 蛋白独有的 cAMP-和 cGMP-依赖性蛋白激酶磷酸化位点 1 个等。其中,CoFAD2-2 蛋白独有的、芳香族氨基酸富集的微体 C-末端的定位信号模序是使其定位至内质网上所必需的^[17],其余的模序位点则为蛋白的翻译后加工修饰位点,与酶活性密切相关。

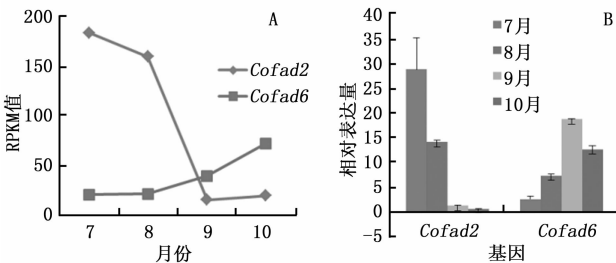
2.7 普通油茶种子发育不同时期 *Cofad6*、*Cofad2-2* 基因表达量分析

根据 RPKM 法测定两个基因表达量,结果表明(图 5-A),*Cofad2-2* 在种仁中的表达量随着种子发育逐渐降低,7 月份种仁中该基因的表达量是 9 月份表达量的 11.78 倍,至 10 月份该基因的表达量略有升高;而 *Cofad6* 基因在种仁中的表达量的变化趋势与 *Cofad2-2* 完全相反,随着种子发育该基因的表达量逐渐升高,变化幅度比 *Cofad2-2* 的变化幅度小,*Cofad6* 表达量最高在 10 月份,其表达量是表达量最低的 7 月份的 3.44 倍。

表1 CoFAD6、CoFAD2-2 蛋白模序类型及分布位置

序号	模序名称	模序序列	CoFAD6		CoFAD2-2	
			位置	序列	位置	序列
1	N-糖基化位点	N[[^] P][ST][[^] P]	105	NVTL	197	NVSG
			347	NGTV	310	NITD
			60	TVR	16	SDR
			107	TLK	136	SWK
2	蛋白激酶 C 磷酸化位点	[ST].[RK]	374	SPR	140	SHR
			388	SLR	199	SGR
					218	SDR
			71	SPAD	16	SDRD
3	酪蛋白激酶 II 磷酸化位点	[ST].[2][DE]	78	SPAE	32	TVGE
			107	TLKD	218	SDRE
			388	SLRE	285	SEWD
			161	GTAITG	4	GGRMSV
4	N-豆蔻酸化位点	G[[^] EDRKHPFYW].[2] [STAGCN][[^] P]	348	GTVHCD	94	GCVLTG
					292	GALATC
					12	EGKK
5	酰胺化位点	.G[RK][RK]			12	EGKK
6	微体 C-末端的定位信号	[STAGCN][RKH][LIVMAFY]\$			381	NKL
7	酪氨酸激酶磷酸化位点	[RK].[2,3][DE].[2,3]Y			357	REAKECIY
8	cAMP-和 cGMP-依赖性蛋白激酶磷酸化位点	[RK]{2].[ST]	56	RRIT		

进一步采用 qRT-PCR 技术对这两个基因的表达量趋势进行分析验证,结果表明(图5-B),两种方法分析出的基因表达量变化趋势基本一致。



A:RPKM 法测定结果;B:qRT-PCR 分析结果

图5 普通油茶种子发育不同时期 *Cofad6*、*Cofad2-2* 基因相对表达量

关系数在 0.866 4 ~ 0.893 5 之间,但相关性未达到显著水平;*Cofad2-2* 的相对表达量与普通油茶油脂中油酸、亚油酸和亚麻酸含量的相关性均在 0.01 水平上达到极显著水平,且相关系数趋近于 1,与硬脂酸含量的相关系数为 0.751 6,但相关性不显著。可见,*Cofad2-2* 基因的相对表达量不仅直接决定了其编码酶的底物油酸和产物亚油酸的含量,而且对其直接产物的下游产物亚麻酸含量也起到决定作用,是调控普通油茶种子油脂中不饱和脂肪酸含量的主要关键基因之一。*Cofad6* 基因的相对表达量与种子中不饱和脂肪酸含量无显著相关性。

Cofad2-2 基因的相对表达量与油酸含量负相关,与亚油酸及亚麻酸含量成正相关,回归分析得出回归方程分别为 $y = 79.5510 - 1.4854x$ (图6-A)、 $y = 8.0836 + 1.1359x$ (图6-B) 和 $y = 0.2493 + 0.1469x$ (图6-C)。可见,在普通油茶种子发育过程中,随着 *Cofad2-2* 基因表达量锐减,油酸去饱和和生成的亚油酸含量逐渐降低,油酸逐渐累积,作为底物的亚油酸含量减低,也降低了亚油酸脱氢生成亚麻酸的反应水平。

2.8 *Cofad6*、*Cofad2-2* 基因表达量与种子油脂成分的相关性分析

Cofad2-2 和 *Cofad6* 是催化油酸生成亚油酸的酶,对 *Cofad2-2* 和 *Cofad6* 的相对表达量与普通油茶种子中不同脂肪酸成分含量进行相关性分析表明(表2),*Cofad6* 的相对表达量与普通油茶种子油脂中的油酸、亚油酸和亚麻酸含量的相关性均较高,相

表2 *Cofad6*、*Cofad2-2* 基因表达量与种子脂肪酸成分含量的相关性

项目	<i>Cofad2-2</i> 基因相对表达量				<i>Cofad6</i> 基因相对表达量			
	硬脂酸	油酸	亚油酸	亚麻酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	亚麻酸
相关系数 r	0.751 6	0.992 7	0.993 5	0.998 3	0.463 0	0.869 3	0.866 4	0.893 5
显著水平 p	0.248 4	0.007 3 **	0.006 5 **	0.001 6 **	0.537 0	0.130 7	0.133 6	0.106 5
决定系数 r^2	0.564 9	0.985 5	0.987 0	0.996 8	0.214 4	0.755 6	0.750 6	0.798 4

注: ** 表示在 0.01 水平极显著相关。

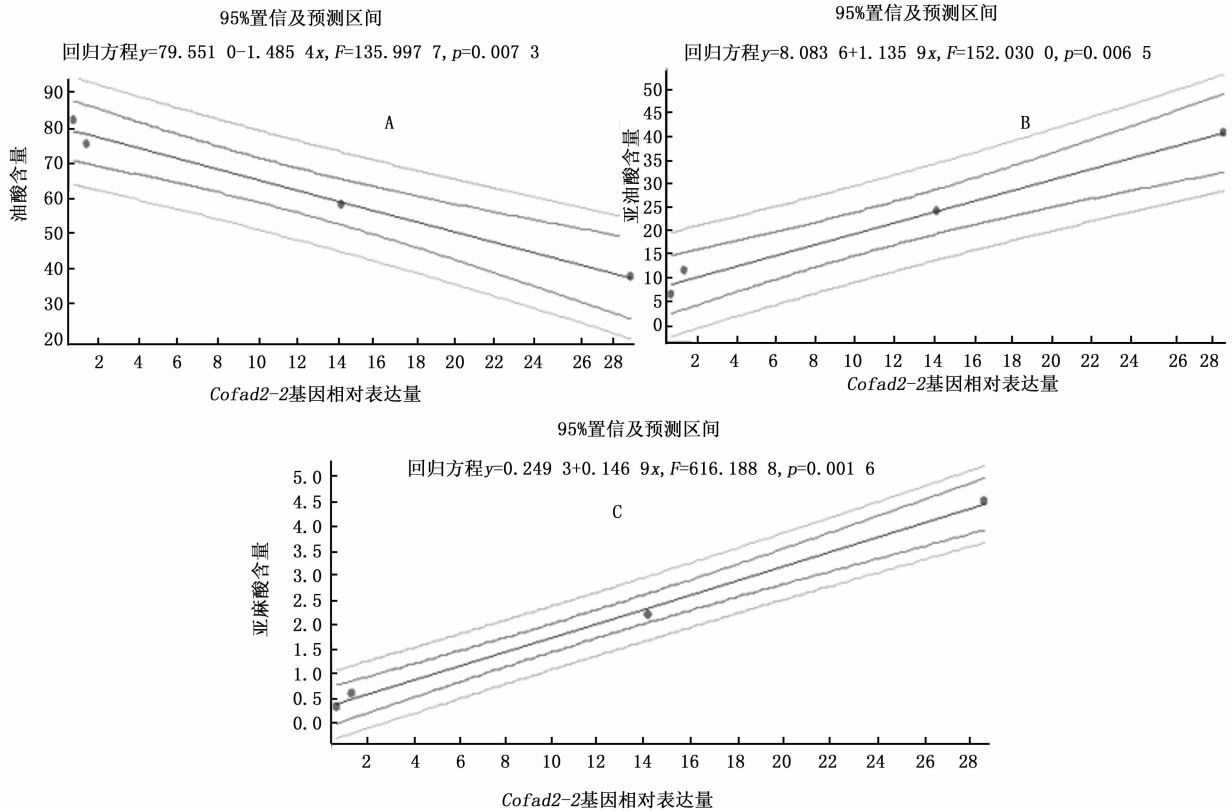


图6 *Cofad2-2* 基因表达量与油酸、亚油酸和亚麻酸含量的回归拟合

3 讨论

3.1 Δ -12 脂肪酸脱氢酶基因的拷贝数

大多数高等植物的 *fad2* 基因均存在多个拷贝^[18-26],同一植物中 *fad2* 不同的拷贝间同源性较低,而不同植物中相同功能的基因拷贝同源性较高^[27]。谭晓风等^[28]克隆并在 GenBank 中登录了一个普通油茶 *fad2* 基因(GenBank: KJ995981.1),该基因编码区全长 1 149 bp,编码 382 个 AA,比本研究中的 *Cofad2-2* 基因少一个氨基酸残基。*fad2* 与 *Cofad2-2* 编码区 cDNA 同源性为 73.54%,所编码的蛋白质同源性为 75.92%。推测应与本研究中的 *Cofad2-2* 是 *fad2* 基因的不同拷贝。

植物脂肪酸去饱和酶基因拷贝数研究最多的是 *fad2* 基因,*fad6* 基因研究较少。Scheffler 等推测甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)的单倍体基因组中有 6~8 个 *fad6* 拷贝^[29],在其它植物中目前大多只发现一个 *fad6* 拷贝。胡姣^[30]克隆并在 GenBank 中注册了一个普通油茶 *fad6* 基因(GenBank: GU594060),该基因与本研究中的 *Cofad6* 基因编码蛋白质的长度相同,但两者 cDNA 序列的相似性仅为 38.7%,蛋

白质序列相似性为 12.7%。这两个基因是否为 *fad6* 基因的不同拷贝还有待于进一步研究。

3.2 Δ -12 脂肪酸脱氢酶基因的表达模式

目前许多植物^[19-26,24]的研究结果表明, Δ -12 脂肪酸脱氢酶基因分为 3 大类,分别为在所有组织中均表达的持家型 *fad2*、只在种子中表达的种子特异性的 *fad2* 和 *fad6* 型。通常认为,持家型 *fad2* 基因编码的酶主要与膜脂脱饱和有关,而种子特异性表达的 *fad2* 和 *fad6* 蛋白可能控制种子存储油脂的脱饱和过程^[19]。本研究中,在‘长林 4 号’种子发育过程中,*Cofad2* 基因的表达量变化趋势与其底物油酸含量变化趋势明显相反,与产物亚油酸含量变化趋势相同,说明该基因是调控普通油茶种子贮脂成分的关键基因之一,而 *Cofad6* 基因的表达量变化趋势与油脂成分的变化趋势未发现显著的相关性。这两个基因是否在其他组织中也有表达,还有待于进一步研究。

3.3 Δ -12 脂肪酸去饱和酶基因在普通油茶育种中的应用前景

30 多年来对油酸含量调控机理研究结果表明,*fad2* 基因是控制植物种子油酸含量的关键基

因^[31-33]。利用基因工程技术对普通油茶的茶油品质进行改良具有广阔的前景,但也同时存在诸多挑战。因为 Δ -12脂肪酸去饱和酶基因在普通油茶中以多拷贝形式存在,有些拷贝可能为*fad2*假基因^[34],而且控制油酸含量的基因除了主效基因外,可能还存在3个或更多的微效基因^[35],根据本研究中的基因相对表达量与脂肪酸含量的相关性分析结果,推测*Cofad2-2*极有可能是控制普通油茶种子油脂中不饱和脂肪酸含量的主效基因,这还有待于进一步的实验验证。揭示基因组中所有*fad2*基因拷贝的结构和功能,对于进一步开展相应的分子育种工作是有必要的。

4 小结

普通油茶 CoFAD2-2 比 CoFAD6 的氨基酸序列保守性更高,且两者均有脂酰-CoA 去饱和酶结构域,是形成多次跨膜区的膜结合蛋白。*Cofad6* 在种子发育过程中的相对表达量与种子油脂中油酸、亚油酸和亚麻酸含量的相关性较高,但未达到显著水平;而*Cofad2-2*的相对表达量与油酸、亚油酸和亚麻酸含量均达到极显著水平,相关系数趋近于1,因此,*Cofad2-2*是调控普通油茶种子油脂中不饱和脂肪酸含量的主要关键基因之一,可作为普通油茶油脂改良基因工程育种的靶标基因。

参考文献:

- [1] Alonso D L, Maroto F G, Ruiz J R, et al. Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2003, 31(10): 1111 - 1124.
- [2] Liu Q, Brubaker C L, Green A G, et al. Evolution of the FAD2-1 fatty acid desaturase 5' UTR intron and the molecular systematics of *Gossypium* (Malvaceae) [J]. *American Journal of Botany*, 2001, 88(1): 92 - 102.
- [3] Takeno S, Sakuradani E, Tomi A, et al. Improvement of the fatty acid composition of an oil-producing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, through RNA interference with Δ 12-desaturase gene expression [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5124 - 5128.
- [4] 张琦,李明春,孙红妍,等. Δ 6-脂肪酸脱氢酶的分子生物学研究进展[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(3): 319 - 324.
- [5] Jung S, Swift D, Sengoku E, et al. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). I. Isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl-PC desaturases [J]. *Molecular and General Genetics*, 2000, 263(5): 796 - 805.
- [6] Sperling P, Schmidt H, Heinz E. A cytochrome-b5-containing fusion protein similar to plant acyl-lipid desaturases [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 232(3): 798 - 805.
- [7] Sayamrat P, Dmitry A L, Norio M. Biochemical characterization of a acyl-lipid desaturase after overexpression of the enzyme in *Escherichia coli* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1390(3): 323 - 332.
- [8] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 2版. 北京:中国林业出版社, 2008.
- [9] 姚小华,王开良,任华东,等. 油茶资源与科学利用研究[M]. 北京:科学出版社, 2012.
- [10] 林萍,曹永庆,姚小华,等. 普通油茶种子4个发育时期的转录组分析[J]. *分子植物育种*, 2011, 9(4): 498 - 505.
- [11] Zhou C F, Lin P, Yao X H, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in six oil-tea camellia based on RNA-seq [J]. *Molecular Biology*, 2013, 47(6): 836 - 851.
- [12] 周长富,姚小华,林萍,等. 油茶种子发育过程组分含量动态研究[J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35(6): 680 - 685.
- [13] Smith M A, Cross A R, Jones O T G, et al. Electron-transport components of the 1-acyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine Δ 12-desaturase in microsomal preparations from developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cotyledons [J]. *The Biochemical Journal*, 1990, 272(1): 23 - 29.
- [14] 戴晓峰,肖玲,武玉花,等. 植物脂肪酸去饱和酶及其编码基因研究进展[J]. *植物学通报*, 2007, 24(1): 105 - 113.
- [15] Liu Q, Singh S P, Brubaker C L, et al. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a microsomal ω -6 fatty acid desaturase from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1999, 26: 101 - 106.
- [16] Pirtle I L, Kongcharoensuntorn W, Nampaisansuk M, et al. Molecular cloning and functional expression of the gene for a cotton Δ -12 fatty acid desaturase (FAD2) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1522(2): 122 - 129.
- [17] Mccartney A W, Dyer J M, Dhanoa P K, et al. Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini [J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(2): 156 - 173.
- [18] 林萍,汪阳东,齐力旺,等. 中间锦鸡儿*fad2*基因克隆及序列分析[J]. *分子植物育种*, 2008, 6(1): 148 - 154.
- [19] Martinez-rivas J M, Sperling P, Luhs W, et al. Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (FAD2) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. *Molecular Breeding*, 2001, 8: 159 - 168.
- [20] Mikkilineni V, Rocheford T R. Sequence variation and genomic organization of fatty acid desaturase-2 (*fad2*) and fatty acid desaturase-6 (*fad6*) cDNAs in maize [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(7): 1326 - 1332.
- [21] Heppard E P, Kinney A J, Stecca K L, et al. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans [J]. *Plant Physiology*, 1996, 110(1): 311 - 319.
- [22] Schlueter J A, Vasylenko-sanders I F, Deshpande S, et al. The FAD2 gene family of soybean: Insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome [J]. *Crop Science*, 2007, 47(suppl 1): 14 - 26.

- [23] Pham A T, Shannon G J, Bilyeu K D. Combinations of mutant FAD2 and FAD3 genes to produce high oleic acid and low linolenic acid soybean oil[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 125(3):503-515.
- [24] Hernandez M L, Mancha M, Martinez-rivas J M. Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from olive [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(12):1417-1426.
- [25] 林萍,汪阳东,齐力旺,等. 中间锦鸡儿 FAD2 基因拷贝数检测及组织表达谱分析[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2010, 38(1):119-124.
- [26] 肖钢,张宏军,彭琪,等. 甘蓝型油菜油酸脱氢酶基因 (*fad2*) 多个拷贝的发现及分析[J]. *作物学报*, 2008, 34(9):1563-1568.
- [27] 刘永红,张丽静,张洪荣,等. Δ -12 脂肪酸脱氢酶及其编码基因研究进展[J]. *草业学报*, 2011, 20(3):256-267.
- [28] 谭晓风,陈鸿鹏,张党权,等. 油茶 FAD2 基因全长 cDNA 的克隆和序列分析[J]. *林业科学*, 2008, 4(3):70-75.
- [29] Scheffler J A, Sharpe A G, Schmidt H, *et al.* Desaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 94(5):583-591.
- [30] 胡姣. 油茶 *AACT* 基因和 *FAD6* 基因的全长 cDNA 克隆及原核表达[D]. 长沙:中南林业科技大学, 2010
- [31] Okuley J, Lightner J, Feldmann K, *et al.* Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis[J]. *Plant Cell*, 1996, 6(1):147-158.
- [32] Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7):957-970.
- [33] Ohlrogge J, Jaworski J G. Regulation of fatty acid synthesis[J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 48(48):109-136.
- [34] 肖钢,张振乾,邬贤梦. 六个甘蓝型油菜油酸脱氢酶 (*fad2*) 假基因的克隆与分析[J]. *作物学报*, 2010, 36(3):435-441.
- [35] Schierholt A, Becker H C, Ecker W. Mapping a high oleic acid mutation in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101(5):897-901.

(责任编辑:金立新)