

孙 静, 陈 明, 孟家松, 等. 一个凤丹 *PoFAD2* 基因家族新成员 *PoFAD2-2* 的克隆及表达模式分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1339-1346.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.06.020

一个凤丹 *PoFAD2* 基因家族新成员 *PoFAD2-2* 的克隆及表达模式分析

孙 静, 陈 明, 孟家松, 张克亮, 陶 俊

(扬州大学园艺与植物保护学院/江苏省作物遗传生理重点实验室, 江苏 扬州 225009)

摘要: 脂肪酸脱氢酶 2 (*FAD2*) 能将油酸催化成亚油酸, 是单不饱和脂肪酸转化为多不饱和脂肪酸的关键酶。本研究根据筛选到的 *PoFAD2-2* 基因序列, 克隆到凤丹 *PoFAD2-2* 基因全长的 cDNA, 命名为 *PoFAD2-2*。其开放阅读框为 1 155 bp, 编码 384 个氨基酸, 蛋白质分子量为 44 000, 等电点为 8.51。生物信息学分析结果显示, 该基因编码的蛋白质偏亲水性, 包含 5 个跨膜结构域, 属于膜结合型的 *FAD* 超家族。多序列比对与系统进化树分析结果发现, *PoFAD2-2* 基因与 *PoFAD2-1* 基因亲缘关系较远, 对于 *PoFAD2-2* 基因, 凤丹在进化上与油橄榄 [*Olea europaea* (common olive) (KY652929.1)]、砵木 [*Wrightia tinctoria* (GU190864.1)] 的相似性较高。荧光定量分析结果表明, *PoFAD2-2* 在根和子房中没有表达, 在花中的相对表达量最高, 随着种子逐渐成熟, *PoFAD2-2* 在种子中的表达量先逐渐降低再升高然后再降低, 表明此基因表达具有组织特异性。*PoFAD2-2* 基因在种子发育进程中的表达趋势与 *PoFAD2-1* 相同。

关键词: 凤丹; 脂肪酸脱氢酶 2; 生物信息学; 荧光定量

中图分类号: S565.9; S685.11

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2018)06-1339-08

Cloning and bioinformatics analysis of a new *PoFAD2* family member *PoFAD2-2* from *Paeonia ostii* T. Hong & J. X. Zhang

SUN Jing, CHEN Ming, MENG Jia-song, ZHANG Ke-liang, TAO Jun

(College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University/Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Fatty acid desaturase 2 (*FAD2*) catalyzes the conversion of oleic acid to linoleic acid, and it is a key enzyme which converts monounsaturated fatty acids to polyunsaturated fatty acids. In this study, the full-length cDNA of *PoFAD2-2* gene was cloned from *PoFAD2-2* gene and named *PoFAD2-2*. Its open reading frame was 1 155 bp, 384 amino acids were encoded, the molecular weight of protein was 44 000, the isoelectric point was 8.51. Bioinformatics analysis results showed that the protein encoded by the gene was hydrophilic, contained five transmembrane domains, and belonged to the membrane-bound *FAD* superfamily. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis found that, *PoFAD2-2* gene was more distantly related to *PoFAD2-1* gene. *PoFAD2-2* was evolutionarily similar to *Olea europaea* and *Wrightia tinctoria*. Quan-

titative real-time PCR results showed that *PoFAD2-2* was not expressed in roots and ovaries, and the expression level of *PoFAD2-2* was highest in petals. With the gradual maturation of seeds, the expression of *PoFAD2-2* in the seeds was gradually decreased, then increased and then decreased. This gene expression was tissue-specific. The gene expression trend of *PoFAD2-2* in seed development was the same as that of *PoFAD2-1*.

收稿日期: 2018-02-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31600564); 江苏省自然科学基金项目(BK20160460); 江苏省林业三新工程项目[LYSX(2016)45]

作者简介: 孙 静(1985-), 女, 黑龙江牡丹江人, 博士, 讲师, 主要从事观赏园艺植物遗传育种与分子生物学研究。(Tel) 18352766730; (E-mail) jingsun@yzu.edu.cn

通讯作者: 陶 俊, (E-mail) taojun@yzu.edu.cn

Key words: *Paeonia ostii* T. Hong & J. X. Zhang; fatty acid desaturase 2 (*FAD2*); bioinformatics; quantitative real-time PCR

脂肪酸去饱和酶(*FAD*)是植物脂肪代谢的关键酶,它能促使脂肪酸转化为不饱和脂肪酸。目前,人们已经通过对拟南芥等植物的研究,分离出多种参与脂肪酸去饱和和代谢过程中相关酶的编码基因,分别为 *FAD2*、*FAD3*、*FAD6*、*FAD7*、*FAD8*^[1]。根据双键位置的不同,将其分为 $\Delta 9$ 脂肪酸去饱和酶、 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶和 $\Delta 15$ 脂肪酸去饱和酶^[2-4]。其中, $\Delta 9$ 脂肪酸去饱和酶是唯一可溶的去饱和酶,它仅包括硬脂酰(18:0)-ACP 去饱和酶(*Stearoyl-ACP desaturase*, *SAD*), $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶和 $\Delta 15$ 脂肪酸去饱和酶为膜蛋白^[1],编码 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶的基因有 *FAD2*、*FAD6*,编码 $\Delta 15$ 脂肪酸去饱和酶的基因有 *FAD3*、*FAD7*、*FAD8*^[5-7]。

FAD2 基因编码的 $\Delta 12$ 脂肪酸去饱和酶是合成不饱和脂肪酸的关键酶,也是植物合成不饱和脂肪酸的限速酶。*FAD2* 位于内质网膜上,主要催化脂肪酸链第 12 位和第 13 位碳原子之间形成双键,将油酸转化成亚油酸,使油酸能够进一步去饱和^[8-10]。目前,人们已经从很多植物中克隆出 *FAD2* 的基因序列^[11-18],在拟南芥等少数植物中,只含有 1 个 *FAD2* 基因,而在其他大多数植物中发现有多个 *FAD2* 基因。如大豆中有 4 个,油橄榄中有 2 个,玉米中有 3 个。同一物种中 *FAD2* 基因不同,其作用也不尽相同。由于在种子油脂储存和植物膜构成中均有多不饱和脂肪酸参与,因此可将不同 *FAD2* 基因分为种子储存油脂的种子特异型和维持细胞质膜脂肪酸代谢所需要的组成型 2 种。

凤丹(*Paeonia ostii* T. Hong & J. X. Zhang)又名铜陵牡丹、铜陵凤丹,产自安徽省铜陵县凤凰山,芍药科芍药属,属于油用牡丹的主要品种。近年来,人们发现凤丹中 α -亚麻酸含量特别高,作为一种新型的油料作物,分离牡丹植物中的 *FAD2* 基因,研究其表达模式是十分必要的。目前,少有研究报道凤丹 *PoFAD2* 基因的表达模式及功能,查阅文献后发现,宋淑香^[19]曾做过一些研究。

本研究拟对 *PoFAD2* 新成员进行克隆和生物信息学分析,及其在植物体不同部位和时期的相对表达分析,以期进一步探究 *PoFAD2* 在凤丹中的作用,为牡丹种子高 α -亚麻酸含量的进一步研究提供参

考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用江苏省扬州市扬州大学牡丹种质资源圃(32°23'N, 119°24'E)种植的风丹为试验材料,采集盛花期的根、茎、叶、花、子房及种子(花后 40 d、60 d、80 d、100 d、120 d),立即置于液氮中速冻, -80 °C 超低温冰箱中保存备用。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, pMD19-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶、快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、RNA 提取试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 合成 按照 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit 试剂盒说明书提取风丹种子及叶片的总 RNA, 提取 RNA 后, 取 1 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳, 检测其质量及浓度, 剩余的保存在 -80 °C 冰箱中。cDNA 第一链的合成利用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒(TaKaRa 公司产品)完成。

1.2.2 引物设计 根据 NCBI 报道的风丹转录组数据(登录号: SRP051810), 筛选到 *PoFAD2-1* 和 *PoFAD2-2* 2 个基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 *PoFAD2-1F*: 5'-CAATGGGAGCCCGTG-GTCCAATGGC-3' 和 *PoFAD2-1R*: 5'-ACTCGTTCCGATACCAAAACACACC-3' 以及 *PoFAD2-2F*: 5'-AT-TGTGGAACAATGGGTGCCCGGTGG-3' 和 *PoFAD2-2R*: 5'-TTATTCAAACCTTATTCTTGTAACCAG-3', 扩增风丹 *PoFAD2-1*、*PoFAD2-2* 基因的开放阅读框(ORF)。

1.2.3 风丹 *PoFAD2-2* 基因全长的获得 利用设计的引物对 *PoFAD2-1* 和 *PoFAD2-2* 的 cDNA 进行扩增, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 2 次扩增的 PCR 产物进行检测, 目的条带采用 MiniBEST AgaroseGel DNA Extraction Kit 试剂盒(TaKaRa 公司产品)进行回收, 然后采用 pEASY™-T5 Zero Cloning Kit 试剂盒(全式金公司产品)进行 TA 克隆, 转化至大肠杆菌感受态 DH5 α 体内, 然后进行抗生素(氨苄西林)筛选, 抗生素质量浓度为 100 mg/ml。最后将阳性克隆送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

1.2.4 生物信息学分析 cDNA 全长的开放阅读框及编码氨基酸利用 Bioedit 软件来预测。利用生物学软件 DNAMAN5.0 进行序列的拼接和翻译,利用在线工具 NCBI Blast 进行序列的同源性比对,并采用 MEGA5.0 的邻接法(NJ)利用获得基因将凤丹与目前主要的几个油料作物进行系统进化树的构建。利用软件 Prot Param、Prot Scale、TMHMM2.0、SMART 分别对基因编码蛋白质的理化性质、亲疏水性、跨膜结构域、保守功能域进行分析。

1.2.5 基因表达模式的分析 利用荧光定量 PCR 仪 CFX96 Real Time System(Bio-Rad 公司产品),采用实时定量 PCR(qRT-PCR)技术分析 *PoFAD2-2* 基因在凤丹根、茎、叶、花、子房和种子中的表达差异,并与 *PoFAD2-1* 做对比。实时定量 PCR 采用 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒(TaKaRa 公司产品),内参为凤丹的 *ubiquitin* 基因,特异性表达引物如表 1 显示。扩增条件:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。使用 Bio-Rad CFX Manager V1.6.541.1028 软件收集反应的 *Ct* 值。每个样品重复 3 次,最终结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[20]进行计算。

表 1 凤丹 *PoFAD2-1*、*PoFAD2-2* 基因克隆所用引物及其序列

Table 1 Primers and sequence of *PoFAD2-1* and *PoFAD2-2* gene cloning

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>ubiquitin</i>	GACCTATACCAAGCCGAAG	CGTTCACGACCCACAATC
<i>qFAD2-1</i>	AACGGTCCCTCATTCACCTCA-TTCTC	ACCCATTGGTACTGACT-GAAGGCAT
<i>qFAD2-2</i>	AGAAACCAAGACACCAGAT-TCCCCT	ATGCGAGGTAAGGAAA-AGGGTGAGG

2 结果与分析

2.1 凤丹 *PoFAD2-2* 基因克隆及序列分析

以凤丹叶片 cDNA 为模板,经 PCR 扩增后获得基因片段,经琼脂糖凝胶电泳检测,结果与预期相符,测序后经 Blast 比对确定其为凤丹 *PoFAD2-2* 基因。序列分析结果表明,该基因 OFR 全长为 1 155 bp,编码 384 个氨基酸,蛋白质分子量为 44 000,等电点为 8.51。

为对比 *PoFAD2-1* 与 *PoFAD2-2* 序列上的差异,用 DNAMAN 软件对 *PoFAD2-1* 及 *PoFAD2-2* 基因编

码的氨基酸进行氨基酸组成与数目对比以及氨基酸序列比对(图 1)。

表 2 显示,*PoFAD2-1* 编码的氨基酸序列长度为 383,酸性氨基酸及酰胺个数为 52,碱性带正电荷的 R 基氨基酸个数为 55。*PoFAD2-2* 编码的氨基酸序列长度为 384,酸性氨基酸及酰胺个数为 50,碱性带正电荷的 R 基氨基酸个数为 57。2 个基因编码的氨基酸一致性为 77.43%,相似性一般。

为了探讨凤丹 *PoFAD2-1* 基因、*PoFAD2-2* 基因与其他植物同类基因的亲缘关系及可能的作用方式,用 MEGA 软件对 *PoFAD2-1* 和 *PoFAD2-2* 基因编码的氨基酸序列与柑橘、油茶、大豆、南瓜等已报道 24 个物种 *FAD2* 基因编码的氨基酸序列进行比对,构建 Neighbor-Joining 系统进化树,设定重复抽样次数为 1 000。聚类分析结果(图 2)表明,对于 *PoFAD2-1* 基因,凤丹在进化上与油茶 [*Camellia oleifera* (KJ995981.1)]、珙桐 [*Davidia involucrata* (EU275211.1)]、毛果杨 [*Populus trichocarpa* (*Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa*) (XM_002297624.2)]、欧榛 [*Corylus avellana* (KF856626.1)]、大豆 [*Glycine max* (soybean) (AY954300.1)]、大豆 [*Glycine max* (soybean) (BT098510.1)] 的亲缘关系较近。对于 *PoFAD2-2* 基因,凤丹在进化上与油橄榄 [*Olea europaea* (common olive) (KY652929.1)]、榉木 [*Wrightia tinctoria* (GU190864.1)] 具有较高的相似性。*PoFAD2-1* 与 *PoFAD2-2* 亲缘关系较远。

表 2 *PoFAD2-1* 和 *PoFAD2-2* 基因编码的氨基酸组成及数目

Table 2 Amino acid composition and number of products encoded by *PoFAD2-1* and *PoFAD2-2* genes

氨基酸	数目		氨基酸	数目	
	<i>PoFAD2-1</i>	<i>PoFAD2-2</i>		<i>PoFAD2-1</i>	<i>PoFAD2-2</i>
丙氨酸	23	25	亮氨酸	38	37
精氨酸	16	16	赖氨酸	15	20
天冬酰胺	13	10	甲硫氨酸	8	5
天冬氨酸	17	21	苯丙氨酸	20	25
半胱氨酸	6	6	脯氨酸	26	25
谷氨酰胺	6	8	丝氨酸	24	24
谷氨酸	16	11	苏氨酸	19	20
甘氨酸	22	25	色氨酸	13	12
组氨酸	24	21	酪氨酸	28	25
异亮氨酸	16	18	缬氨酸	33	30

PoFAD2-1	MGAGGRMAVPTSNAVEQEKEIKRVPCSKPPFTLGEVKKAVPPHCFERSLIHSFSYVYDL	60
PoFAD2-2	MGAGGRMSVRPETKTPDSPVLKRVPM SKPPFTLGEVKKALPPHCFQRSVIHSFSYVYDL	60
PoFAD2-1	SIAFLLYYISTSYEHLLPHFPFYVAWPIYALQGCNLTGVVWVIAHECGHHAFFSDYQWVDD	120
PoFAD2-2	PIATIFYIATINVIHLLPHFPFYLAWEVYWFACQGCNLTGVVWVIAHECGHHAFFSDYQWVDD	120
PoFAD2-1	TVGLILHSSLLVPYFSWKESHRRHHSNTGSLRDEVFVPKFKSQVGVNYSKYLNPPGRLL	180
PoFAD2-2	TVGLILHSSLLVPYFSWKESHRRHHSNTGSLRDEVFVPKFKSNISWESKYLNPPGRVI	180
PoFAD2-1	TLVITLTLGLWPLYLVFNVSGRPYDRFACHDYPYGPFIYSRERLQIFISDAGILAMTSHLY	240
PoFAD2-2	TLAVITLTLGLWPLYLVFNVSGRPYDRFACHDYPYGPFIYSRERLQILISDAGVLAWTYGLF	240
PoFAD2-1	HVVWAKGFPAWLVNYYVPLLIIVNAFLVMITYLQHTHTLPHYDSSEWDWIRGALATMDRD	300
PoFAD2-2	RLAAAKGLAVVFCVYGGPLLIIVNGFLVLTFLQHTHPSLPHYDSSEWDWIRGALATVDRD	300
PoFAD2-1	YGVLNKVVFHNITDTHVAHHLFSTMPHYHAMEATKAIRPVLGYYNFDGTPFYKAMWREAR	360
PoFAD2-2	YGVFNKVVFHNITDTHVAHHLFSTMPHYHAMEATKAIRPVLDYYCFDGTSVFKAMWRETK	360
PoFAD2-1	ECFYVEPDEGDVNGGVFWYRNEY	383
PoFAD2-2	ECFYVDQDEGEKDKGVFWYKNEF	383

图 1 凤丹 PoFAD2-1 与 PoFAD2-2 蛋白质氨基酸序列对比
Fig.1 Amino acid sequences comparison of PoFAD2-1 and PoFAD2-2

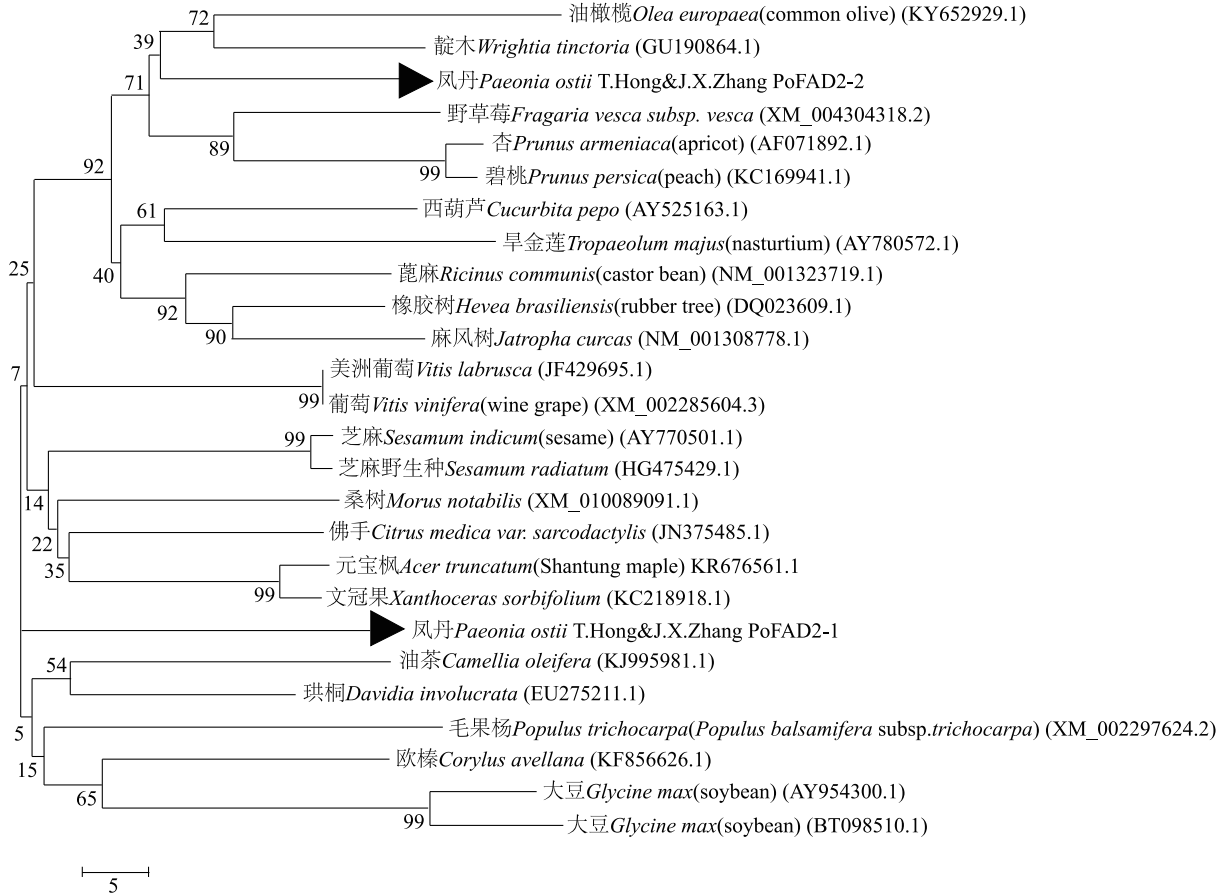


图 2 凤丹 PoFAD2-1 和 PoFAD2-2 系统进化树
Fig.2 Phylogenetic tree of PoFAD2-1 and PoFAD2-2

2.2 *PoFAD2-2* 生物信息学分析

用 NCBI 软件对 *PoFAD2-2* 的保守结构域进行分析,用 TMHMM 软件对 *PoFAD2-2* 的跨膜结构域进行分析,结果(图 3)表明,*PoFAD2-2* 蛋白质属于膜结合型的 *FAD* 超家族,在第 105~110 个氨基酸

位点、第 140~145 个氨基酸位点、第 315~320 氨基酸位点 3 处共有 3 个可能的 Fe^{2+} 结合位点,可能起催化作用。*PoFAD2-2* 有 5 个跨膜结构域,分别为 49~71、81~102、179~196、223~245、250~272 位的氨基酸,第 5 个跨膜区疏水性较强。

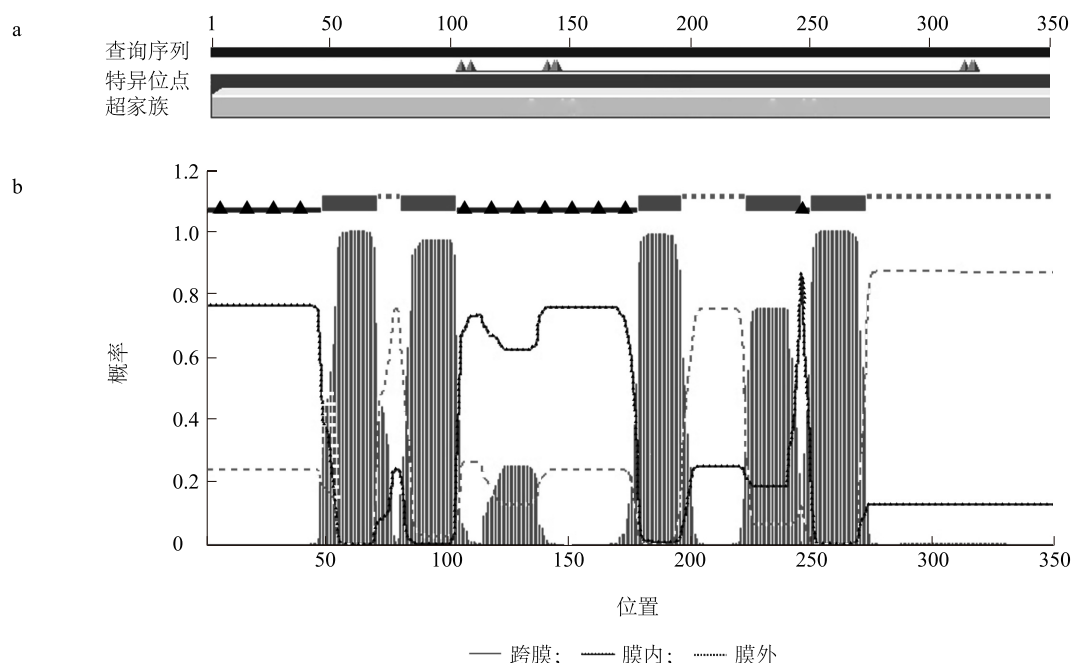


图 3 *PoFAD2-2* 编码蛋白质的保守结构域 (a) 和跨膜结构域 (b) 分析

Fig.3 Analysis of the conserved domain of *PoFAD2-2*-encoded proteins (a) and transmembrane domain (b)

2.3 *PoFAD2* 疏水性分析

利用 Hydrophobicity ProtScale 软件预测 *PoFAD2* 蛋白质的疏水性。图 4 显示,*PoFAD2-2* 基因所编码的蛋白质疏水性最小为-3.244,最大值为 2.744,说明该蛋白质为偏亲水性蛋白质。其中 49~102、179~272 位的氨基酸残基区域构成了 2 个疏水性区域,1~48、103~178、273~384 位的氨基酸残基区域构成了 3 个亲水性区域。

2.4 凤丹 *PoFAD2-1* 和 *PoFAD2-2* 基因在植株不同组织中的表达分析

采用 qRT-PCR 方法测量了 *PoFAD2-1* 和 *PoFAD2-2* 在凤丹根、茎、叶、花、子房、种子中的表达量,以及开花后 40 d、60 d、80 d、100 d、120 d 时 *PoFAD2-1* 和 *PoFAD2-2* 在种子中的表达量。图 5 显示,*PoFAD2-1* 在凤丹的根、茎、叶、花、子房、种子中均有表达,而 *PoFAD2-2* 在根和子房中没有表达。*PoFAD2-1* 主要在子房和种子中表达,

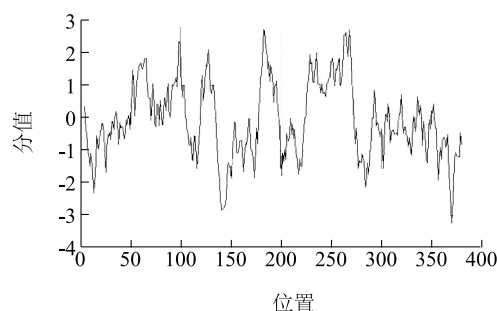
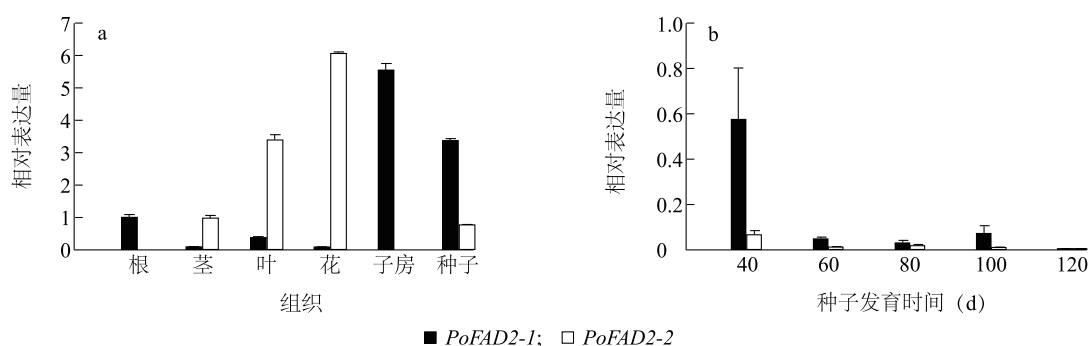


图 4 *PoFAD2-2* 基因编码蛋白质的疏水性

Fig.4 Hydrophobicity analysis of the protein encoded by the *PoFAD2-2* gene

PoFAD2-2 主要在花和叶表达。随着种子逐渐成熟,*PoFAD2-1* 和 *PoFAD2-2* 在种子中的表达量均是先降低再升高然后再降低,*PoFAD2-1* 表达量在 100 d 升高,而 *PoFAD2-2* 表达量在 80 d 升高。*PoFAD2-2* 在种子中不同时期的表达量均低于 *PoFAD2-1* (图 5)。

图 5 *PoFAD2* 在各组织中的相对表达量Fig.5 The expression level of *PoFAD2* in each tissue

3 讨论

脂肪酸有饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸,不饱和脂肪酸又分为单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸。油酸作为单不饱和脂肪酸同饱和脂肪酸一样能由人体合成,而亚油酸则需要从食物中获取。亚油酸是单不饱和油酸转化为多不饱和酸的第一步中间产物,因此,*FAD2* 基因作为将油酸转化为亚油酸的关键基因,是非常重要的。

关于 *FAD2* 基因的研究很多,人们已经从芝麻、橄榄树、油茶、文冠果、油葵、黄瓜、油桐、花生等植物中克隆出 *FAD2* 基因,而且这些植物中大多不止 1 个 *FAD2* 基因。在黄瓜中发现了 2 个不同拷贝的 *FAD2* 基因^[21],从花生中分离出了 6 个不同拷贝的 *FAD2* 基因^[22]。不同 *FAD2* 基因在植物体中的作用可能也不同。它们在序列特点、表达调控和功能机理方面都存在着显著差异^[23-24]。王仲伟等^[25]发现,油茶 *CoFAD2-2* 基因的表达模式比较特异,在开花后 42 周到 44 周之间(油茶种子趋于成熟)高表达,其他阶段表达水平一直维持在较低水平,尤其在种子成熟后期趋于更低水平的表达。Liu 等^[26]发现,在低温胁迫下,棉花 *FAD2-2* 基因表达量显著升高,而 *FAD2-3* 基因的表达则被抑制,*FAD2-4* 和 *FAD2-5* 基因的表达量只是轻微上升。Hernández 等^[16]发现,油橄榄中的 *FAD2-1* 使幼小种子中储存的脂质去饱和,而 *FAD2-2* 使成熟的种子和中果皮中的脂肪去饱和。Suresha 等^[27]指出,*FAD2* 在芥菜的所有组织中表达,在油的合成过程中受到调控。*FAD2-1* 和 *FAD2-3-1* 在亚麻芥中的表达主要集中在花和种子上^[28]。对花生中 *FAD2* 转录本分布进行分析,发现 *FAD2-1* 基因在发育种子中的表达量比 *FAD2-2*

基因高 70 倍,但是 *FAD2-2* 基因在花中大量表达^[22]。

根据 *FAD2* 基因的位置和表达模式将它分为 4 种类型,即 *FAD2-1*、*FAD2-2*、*FAD2-3* 和 *FAD2-4*。*FAD2* 基因的 4 个变异显示出高度的序列相似性,但在脂肪酸修饰中的表达模式和功能存在差异^[29]。*FAD2-1* 是一种种子特异性去饱和酶,可合成幼苗和花芽中的多不饱和脂肪酸^[30]。*FAD2-2* 基因在大豆的营养组织和整个种子发育中呈组成型表达^[31]。*FAD2-2* 是负责亚油酸合成的主要基因^[32]。几乎在所有组织中 *FAD2-3* 和 *FAD2-4* 均主要合成多不饱和脂肪酸。据报道,*FAD2-3* 多肽与 *FAD2-4* 多肽具有 98% 的相似性^[33]。

PoFAD2-1 基因在花中表达量最低,在子房中表达量最高,在花后 40 d、60 d、80 d、100 d、120 d 的种子中 *PoFAD2-1* 表达量分别为 *PoFAD2-2* 的 8.8 倍、5.7 倍、2.8 倍、9.0 倍、1.0 倍,而且在种子发育进程中,刚开始表达量比较高,然后快速下降,在花后 80 d 时又开始上升,花后 100 d 又急剧下降。这与宋淑香^[19]所测的风丹 *PoFAD2-1* 荧光定量结果相似。*PoFAD2-1* 基因表达量在种子发育 100 d 时开始急剧下降,这与风丹不饱和脂肪酸含量在种子发育 100 d 时最高,随后不饱和脂肪酸含量又下降的趋势一致^[19]。说明,*PoFAD2-1* 基因确实是种子特异性基因。

本研究发现,*PoFAD2-2* 基因在风丹茎、叶、花、种子中均有表达,在根、子房中却没有表达,在种子整个发育期中的表达量都很低,在花中的表达量最高,说明此基因表达具有组织特异性。*PoFAD2-2* 基因在种子发育进程中的表达趋势与 *PoFAD2-1* 相同。而 *PoFAD2-2* 基因在叶和花中的表达量都较

高,分别是 *PoFAD2-1* 表达量的 8.4 倍、71.0 倍。这可能是因为 *PoFAD2-2* 基因是负责亚油酸合成的主要基因。

参考文献:

- [1] 曹福亮,王欢利,郁万文,等. 高等植物脂肪酸去饱和酶及编码基因研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2012,36(2):125-132.
- [2] 曾硕士,江黎明,元冬娟. 脂肪酸去饱和酶的研究进展[J]. 生物技术通报,1998,20(4):816-820.
- [3] SABETTA W, BLANCO A, ZELASCO S, et al. *FAD7* gene identification and fatty acids phenotypic variation in an olive collection by EcoTILLING and sequencing approaches[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2013, 69(8):1-8.
- [4] RAJWADE A V, KADDOO N Y, BORIKAR S P, et al. Differential transcriptional activity of *SAD*, *FAD2*, and *FAD3*, desaturase genes in developing seeds of linseed contributes to varietal variation in α -linolenic acid content[J]. Phytochemistry, 2014, 98:41-53.
- [5] 王 萍,张银波,江木兰. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 中国油脂,2008,33(12):42-46.
- [6] 夏 晗,王兴军,李孟军,等. 利用基因工程改良植物脂肪酸和提高植物含油量的研究进展[J]. 生物工程学报,2010,26(6):735-743.
- [7] 叶 静,胡海涛,王长春,等. 植物脂肪酸去饱和酶与抗冷性研究进展[J]. 广东农业科学,2011,38(12):131-134.
- [8] YANG M, ZHENG G, ZHANG F, et al. *FAD2*-silencing has pleiotropic effect on polar lipids of leaves and varied effect in different organs of transgenic tobacco[J]. Plant Science, 2006, 170(1):170-177.
- [9] YUAN. Abiotic stresses and phytohormones regulate expression of *FAD2* gene in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(1):62-72.
- [10] 官玲亮,侯 凯,陈郡雯,等. ω -6 和 ω -3 脂肪酸脱氢酶家族系统进化与功能分化[J]. 遗传,2013,35(5):643-654.
- [11] 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.
- [12] TANG G Q, NOVITZKY W P, CAROL G H, et al. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation[J]. Plant Journal, 2005, 44(3):433-446.
- [13] KISHORE K, SINHA S K, KUMAR R, et al. Isolation and characterization of microsomal omega-6-desaturase gene (*FAD2-1*) from soybean[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2007, 45(4):390-397.
- [14] LI L, WANG X, GAI J, et al. Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(11):1516-1526.
- [15] LI L, WANG X, GAI J, et al. Isolation and characterization of a seed-specific isoform of microsomal omega-6 fatty acid desaturase gene (*FAD2-1B*) from soybean[J]. DNA Sequence, 2008, 19(1):28-36.
- [16] HERNÁNDEZ M L, MANCHA M, MARTÍNEZ-RIVAS J M. Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (*FAD2*) from olive[J]. Phytochemistry, 2005, 66(12):1417-1426.
- [17] TAO F, ZHU S W, FAN J, et al. Cloning and sequence analysis of maize *FAD2* gene[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(6):649-656.
- [18] 何早柯,周茜萍,王梦瑶,等. 油葵脂肪酸去饱和酶基因 *HaFAD2-1* 的克隆与功能鉴定[J]. 江苏农业学报,2017,33(2):273-279.
- [19] 宋淑香. 凤丹脂肪酸去饱和酶基因 *PoFAD2* 的克隆及其表达分析[D]. 泰安:山东农业大学,2016.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [21] DONG C J, CAO N, ZHANG Z G, et al. Characterization of the fatty acid desaturase genes in cucumber: structure, phylogeny, and expression patterns[J]. PLoS ONE, 2016, 11(3):e0149917.
- [22] WANG Y, ZHANG X, ZHAO Y, et al. Insights into the novel members of the *FAD2* gene family involved in high-oleate fluxes in peanut[J]. Genome, 2015, 58(8):375-383.
- [23] JUNG J H, KIM H, GO Y S, et al. Identification of functional *BrFAD2-1* gene encoding microsomal delta-12 fatty acid desaturase from *Brassica rapa* and development of *Brassica napus* containing high oleic acid contents[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(10):1881-1892.
- [24] LEE K R, SOHN S I, JIN H J, et al. Functional analysis and tissue-differential expression of four *FAD2* genes in amphidiploid *Brassica napus*, derived from *Brassica rapa*, and *Brassica oleracea*[J]. Gene, 2013, 531(2):253-262.
- [25] 王仲伟,温 强,汤诗杰,等. 一个油茶 *FAD2* 基因家族新成员的克隆及分析[J]. 分子植物育种,2017,15(1):84-90.
- [26] LIU W, LI W, HE Q, et al. Characterization of 19 genes encoding membrane-bound fatty acid desaturases and their expression profiles in *Gossypium raimondii* under low temperature[J]. PLoS ONE, 2015, 10(4):e0123281.
- [27] SURESHA G S, RAI R D, SANTHA I M. Molecular cloning, expression analysis and growth temperature dependent regulation of a novel oleate desaturase gene (*FAD2*) homologue from *Brassica juncea*[J]. Australian Journal of Crop Science, 2012, 6(2):296-308.
- [28] KIM H, GO Y S, KIM A Y, et al. Isolation and functional analysis of three microsomal delta-12 fatty acid desaturase genes from *Camelina sativa* (L.) cv. CAME[J]. Journal of Plant Biotechnology, 2014, 41(3):146-158.

- [29] KONGCHAROENSUNTORN W. Isolation and analysis of cotton genomic clones encompassing a fatty acid desaturase (*FAD2*) gene [D]. Denton:University of North Texas, 2001.
- [30] 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.
- [31] HEPPARD E P, KINNEY A J, STECCA K L, et al. Development and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans [J]. Plant Physiology, 1996, 110(1):311-319.
- [32] HERNÁNDEZ M L, PADILLA M N, MANCHA M, et al. Expression analysis identifies *FAD2-2* as the olive oleate desaturase gene mainly responsible for the linoleic acid content in virgin olive oil [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(14): 6199-6206.
- [33] ZHANG D, PIRTLE I L, PARK S J, et al. Identification and expression of a new delta-12 fatty acid desaturase (*FAD2-4*) gene in upland cotton and its functional expression in yeast and *Arabidopsis thaliana* plants [J]. Plant Physiology Biochemistry, 2009, 47(6):462-471.

(责任编辑:王 妮)