

研究报告

Reserch Report

花花柴蜡质合成相关基因的克隆及分析

许疆维 王彦芹*

塔里木大学生命科学学院, 阿拉尔, 843300

* 通信作者, wyqwx@126.com

摘要 植物表皮蜡质是由脂肪酸、烷烃、醇类等物质组成的一类有机混合物, 在植物抵御逆境胁迫中起着至关重要的作用。为深入研究花花柴(*Karelinia caspica*)蜡质合成相关基因 *P450-77A*, *HHT* 和 *FAD2* 的结构与功能, 运用分子克隆技术, 获得花花柴蜡质合成相关基因 *P450-77A* 和 *HHT* 和 *FAD2* 的 CDS 全长, 命名为 *KcP450-77A*, *KcHHT* 和 *KcFAD2*, Genebank 登录号分别为 MW528399, MW528400 和 MW528401。并对以上基因的编码蛋白进行生物信息学分析, 利用 RT-PCR 技术对其在高温处理下不同时间点进行表达模式分析。结果发现 *KcP450-77A* 全长 1 521bp, 编码 507 个氨基酸; *KcHHT* 全长 1 347 bp, 编码 449 个氨基酸; *KcFAD2* 全长 1 152 bp, 编码 384 个氨基酸。通过对上述 3 个基因在高温处理下不同时间点的表达模式分析发现, 3 个基因的表达均表现为高-低-高的趋势, 其中, *KcP450-77A* 基因在 40 °C 处理 8 h 时表达量最高, *KcHHT* 基因在处理 4 h 时表达量最高, *KcFAD2* 基因在处理 16 h 时表达最为显著。本研究结果表明, 花花柴表皮蜡质合成相关基因的表达受高温影响, 表现出胁迫-诱导-适应的特性, 这种应激反应与植物受到环境胁迫时的生理反应一致。

关键词 花花柴; 表皮蜡质; *KcP450-77A*; *KcHHT*; *KcFAD2*

Cloning and Analysis of Genes Related to Waxy Synthesis in *Karelinia caspia*

Xu Jiangwei Wang Yanqin *

College of Life Science, Tarim University, Alar, 843300

* Corresponding author, wyqwx@126.com

DOI: 10.13417/j.gab.040.003199

Abstract Plant epicuticular wax is a kind of organic mixture composed of fatty acids, alkanes and alcohols, which plays an important role in plant resistance to adversity stress. In order to study the structure and function of the genes *P450-77A*, *HHT* and *FAD2* related to paraffin wax synthesis in *Karelinia caspia*, the full-length coding sequence of the genes *P450-77A*, *HHT* and *FAD2* were obtained by molecular cloning technique. These genes were named as *KcP450-77A*, *KcHHT* and *KcFAD2*, and submitted to GenBank, the entry numbers were MW-528399, MW528400 and MW528401, respectively. Bioinformatics analysis was performed on those genes, and RT-PCR technology was employed to analyze their expression patterns at different time points under the condition of high temperature. The full lengths of *KcP450-77A*, *KcHHT* and *KcFAD2* were 1 521 bp, 1 347 bp and 1 152 bp, encoding 507, 449 and 384 amino acids, respectively. The expression patterns of above three genes were analyzed at different time points under the condition of high temperature, and it was found that the expression of the three genes showed a trend of high-low-high. Under 40 °C condition, *KcP450-77A*, *KcHHT* and *KcFAD2* genes had the highest expression at 8 h, 4 h and 16 h, respectively. The results showed that the expression of above genes related to epidermal wax synthesis of *K. caspia* was affected by high temperature and

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(31660085)及塔里木大学研究生创新项目(TDGRI201904)共同资助

引用格式: Xu J.W., and Wang Y.Q., 2021, Cloning and analysis of genes related to waxy synthesis in *Karelinia caspia*, *Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 40(9-10 combined issue): 3199-3208. (许疆维, 王彦芹, 2021, 花花柴蜡质合成相关基因的克隆及分析, 基因组学与应用生物学, 40(第9-10期合刊): 3199-3208.)

showed a character of stress-induction-adaptation, which was consistent with the physiological response of plants under environmental stress.

Keywords *Karelinia caspia*; Cuticular wax; *KcP450-77A*; *KcHHT*; *KcFAD2*

大多数植物叶片上都有一层表皮蜡,这是与外部环境的第一个接触面(Shepherd and Wynne, 2006),具备保水、消减紫外辐射、抗高温、抗冷冻、抗干旱等功能。Cytochromes P450 (P450s/CYPs)是一类以血红素为辅基的末端加氧酶(Mizutani and Sato, 2011),广泛存在于人、动物、植物和微生物之间,参与许多外源性物质(药物、除草剂、杀虫剂、毒物和环境污染物等)和内源性物质(激素、脂肪酸等)的代谢(宋展等, 2020)。P450对植物的次生代谢、生长发育、防御生物免受外界侵害等方面有重要作用,这对于改良作物的抗逆性以及提高生物量有广阔的应用前景(崔会婷等, 2020)。 ω -羟基棕榈酸脂 O-阿魏酰转移酶(ω -hydroxypalmitate O-feruloyl transferase, HHT)是调控苯丙烷-阿魏酸生物合成路径中的关键酶,它能够催化阿魏酰辅酶 A 生成 ω -羟基棕榈酸和 1-伯醇(Bernards, 2002)。HHT 基因能够直接或间接影响阿魏酸及其衍生物的表达,在关于拟南芥中合成次芳基化合物的羟肉桂基转移酶的研究中,通过对拟南芥 HHT 基因的体外试验,证实了 HHT 基因会促进阿魏酰棕榈酸和烷基阿魏酸酯的合成(Gou et al., 2009)。在花柴(*Karelinia caspica*)表皮蜡质的合成途径中,*KcP450-77A* 和 *KcHHT* 基因共同参与角质、软木脂和蜡质的合成。*KcP450-77A* 有两条代谢路径,其中一条与 *KcHHT* 在同一个代谢路径上,在此代谢路径中 *KcP450-77A*、*KcHHT* 均表现为上调表达,分别促进 10, 16-二羟基棕榈酸酯和 16-阿魏酰氧基棕榈酸的生成;在 *KcP450-77A* 的另一条代谢路径中,*KcP450-77A* 上调表达,促进多羟基脂肪酸的生成。脂肪酸去饱和酶 FAD2 (fatty acid desaturase 2)是广泛存在于植物中的一种能催化油酸脱氢生成亚油酸(linoleic acid, LA)的还原酶(梁倩等, 2018),该酶存在于内质网的膜表面,是饱和脂肪酸反应中最为关键的酶(Luisa et al., 2020) (Zhou et al., 2019)。在花柴不饱和脂肪酸的代谢路径中,饱和脂肪酸可在 Δ^9 -脂肪酸脱氢酶(FAD1)的催化下,在碳链第9~10个碳原子之间脱氢,形成第一个不饱和双键,去饱和产生油酸,油酸又在 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶(FAD2)的催化下,在第12~13个碳原子之间再脱氢,转化生成多不饱和脂肪酸-亚油酸,亚油酸又在 Δ^{15} -脂肪酸去饱和酶(FA-D3)的催化下,在第15~16个碳原子之间产生第三个双键,生成含有三个不饱和双键的亚麻酸(18:3 ^{$\Delta^9, \Delta^{12}, \Delta^{15}$})。

高温是所有非生物胁迫因子中非常重要的逆境胁迫因子(王小菁等, 2017)。研究表明温度在 *CYP450* 的酶促效率中起着关键作用,高温通过诱导/抑制 P450 的特异活性,从而影响烟粉虱 Q 型对噻虫嗪的耐受性(Guo et al., 2018)。通过使用 RT-PCR 和 RT-qPCR 对不同样本中莲草直胸跳甲(*Agasicles hygrophila*) *AhCYP* 基因的表达模式进行了全面分析,结果表明,高温处理后 *AhCYP* 基因在雌性和雄性成虫中有多个表达水平(Zhang et al., 2018)。*HHT* 基因能够直接或间接影响阿魏酸及其衍生物的生成,高温处理可能影响阿魏酸等木栓质成分的生成,从而造成沙梨果皮呈现褐色(吕照清等, 2016)。但是目前关于 *HHT* 基因在抗逆性尤其是耐高温方面的报道较少,故本研究将对其耐高温性进行了初步的探索和研究。

花柴(*Karelinia caspia*)是菊科花柴属多年生草本植物,具有耐盐碱、耐干旱、耐高温等广谱抗逆性,是珍贵的抗逆植物天然种质资源。花柴幼苗在 40 °C 下的高温耐受性评估结果表明,幼苗的 CAT 和 SOD 活性随胁迫时间的延长而逐渐升高,MDA 和相对电导率随着胁迫时间的延长先升高后下降(王彦芹等, 2017)。由此,我们对花柴表皮蜡质合成相关基因的抗逆性尤其对高温胁迫响应以及耐高温分子机理的研究显得尤为重要,这不仅对将来缓解由高温引起的如陆地棉花蕾铃脱落等重要经济作物的耐高温育种提供理论支撑及基因资源,而且对于提高农作物对高温的耐受性、稳定性和提高产量具有重要意义。

1 结果与分析

1.1 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2* 基因的克隆

以花柴逆转录 cDNA 为模板,通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物(图 1)。分别扩增出 1 521、1 347 和 1 152 bp 三条带,条带大小与预期相符。

1.2 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2* 的生物信息学分析

1.2.1 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2* 的 CDS 全长序列分析

运用分子克隆技术,获得花柴上述基因的 CDS 全长,其中 *KcP450-77A* 基因 CDS 为 1 521 bp,编码 507 个氨基酸;*KcHHT* 基因 CDS 为 1 347 bp,编

码 449 个氨基酸; *KcFAD2* 基因 CDS 为 1 152 bp, 编码 384 个氨基酸。通过对其编码蛋白的氨基酸序列比对, 与 NCBI 数据库中多种植物的 P450-77A, HHT, FAD2 蛋白具有较高的同源性, 说明花花柴以上 3 个基因为 *P450-77A*, *HHT*, *FAD2* 的同源基因, 故对其命名为 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2*, 提交至 GenBank, 获得登录号分别为 MW528399, MW528400、MW528401。

1.2.2 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2* 的系统发育树分析及亚细胞定位预测

将花花柴 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2* 编码蛋白与其他物种同源序列进行比对并构建系统发育树(图 2), 分析发现花花柴 *KcP450-77A* 与向日葵 (*Helianthus annuus*) 的 *P450-77A* 基因同源性最高, 为 90.32%, 其后与花花柴同源性从高到低依次为莴苣 (*Lactuca sativa*)、除虫菊 (*Tanacetum cinerariifolium*)、菜蓟 (*Cynara scolymus*)、黄花蒿 (*Artemisia annua*) 等菊科植物, 其同源性在 86.17%~89.40% 之间; 花花柴 *KcHHT* 与莴苣的 *HHT* 基因同源性最高, 为 86.50%, 其后与花花柴同源性从高到低依次为向日葵、黄花蒿、菜蓟、微甘菊 (*Mikania micrantha*) 等菊科植物, 其同源性在 82.34%~86.06% 之间; 花花柴 *KcFAD2* 与向日葵 (*Helianthus annuus*) 的 *FAD2* 基因同源性最高, 为 90.86%, 其后与花花柴同源性从高到低依次为除虫菊、黄花蒿、斑鸠菊 (*Vernonia galamensis*)、菜蓟等菊科植物, 其同源性在 88.74%~90.34% 之间。花花柴、向日葵、莴苣、除虫菊、洋蓟、黄花蒿、斑鸠菊、微甘菊等均为菊科植物, 表明花花柴表皮蜡质合成相关基因 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2* 在进化中维持着较保守的结构和功能。用 WolfPsort 方法预测了 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2* 的亚细胞定位, 推测 *KcP450-77A* 的亚细胞定位可能在叶绿体上、*KcHHT* 的

亚细胞定位预计在细胞质, *KcFAD2* 的亚细胞定位预计在内质网(表 1)。

1.2.3 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2* 的基本理化性质

KcP450-77A 分子量是 56 875.23, 理论等电点(pI) 为 9.35, 分子式为 $C_{2565}H_{4079}N_{689}O_{721}S_{24}$, 原子总数为 8 078, 为稳定的亲水蛋白, 不存在跨膜结构域; *KcFAD2* 的分子量为 49 644.08, 理论等电点(pI) 为 5.68, 分子式为 $C_{2252}H_{3505}N_{583}O_{694}S_{16}$, 原子总数为 7 050, 为稳定的亲水蛋白, 不存在跨膜结构域; *KcHHT* 的分子量为 43 979.76, 理论等电点(pI) 为 8.72, 分子式为 $C_{2046}H_{3071}N_{519}O_{541}S_{12}$, 原子总数为 6 189, 为不稳定的亲水蛋白, *KcFAD2* 有 5 个跨膜结构域(图 3): 第 1~4 位、第 57~128 位、第 197~200 位氨基酸位于细胞膜表面, 第 5~27 位、第 34~56 位、第 129~151 位、第 174~196 位、第 201~223 位氨基酸形成一个典型的跨膜螺旋区, 第 28~33 位、第 152~173 位、第 224~33 位氨基酸位于细胞膜内。

1.3 *KcP450-77A*、*KcHHT*、*KcFAD2* 的表达模式分析

通过对 40 °C 高温处理下花花柴叶片在不同时间段的形态特性观察(图 4A), 发现伴随处理时间的延长, 叶片的损伤程度逐渐增加。在处理 0, 0.5, 2, 4, 8, 16 h 时, 花花柴表现出了良好的耐高温特性, 其叶片表型没有明显的变化; 在处理 24 h 时仍具有一定的耐高温能力, 仅叶片发生轻微的卷叶且叶片停止伸展; 当高温处理 48 h 时, 花花柴植株生长点明显脱水萎蔫, 新叶脱水黄化, 植株开始倒伏。此现象表明在高温胁迫下, 植物在一定的时间内可以通过自身的调控能力来适应逆境胁迫, 但随着时间的延长, 植物体由于受伤而使得自身调控能力失衡, 导致叶片细胞受到伤害、植株大量失水, 严重时植物会发生不可逆的伤害而直接死亡。

通过对上述 3 个基因在 40 °C 高温处理下不同时间点的表达模式分析发现, 3 个基因的表达均表现为高-低-高的趋势, 其中, *KcP450-77A* 基因在 40 °C 处理 8 h 时表达量最高, *KcHHT* 基因在处理 4 h 时表达量最高, *KcFAD2* 基因在处理 16 h 时表达最为显著。表明花花柴表皮蜡质合成相关基因的表达受高温影响, 表现出胁迫-诱导-适应的特性, 这种应激反应与植物受到环境胁迫时的生理反应一致(图 4B)。

2 讨论

面对气候变化导致的全球极端温度范围和频率的不断增加, 为了维持农业生产, 了解植物温度胁迫

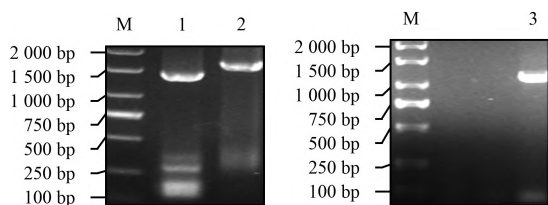
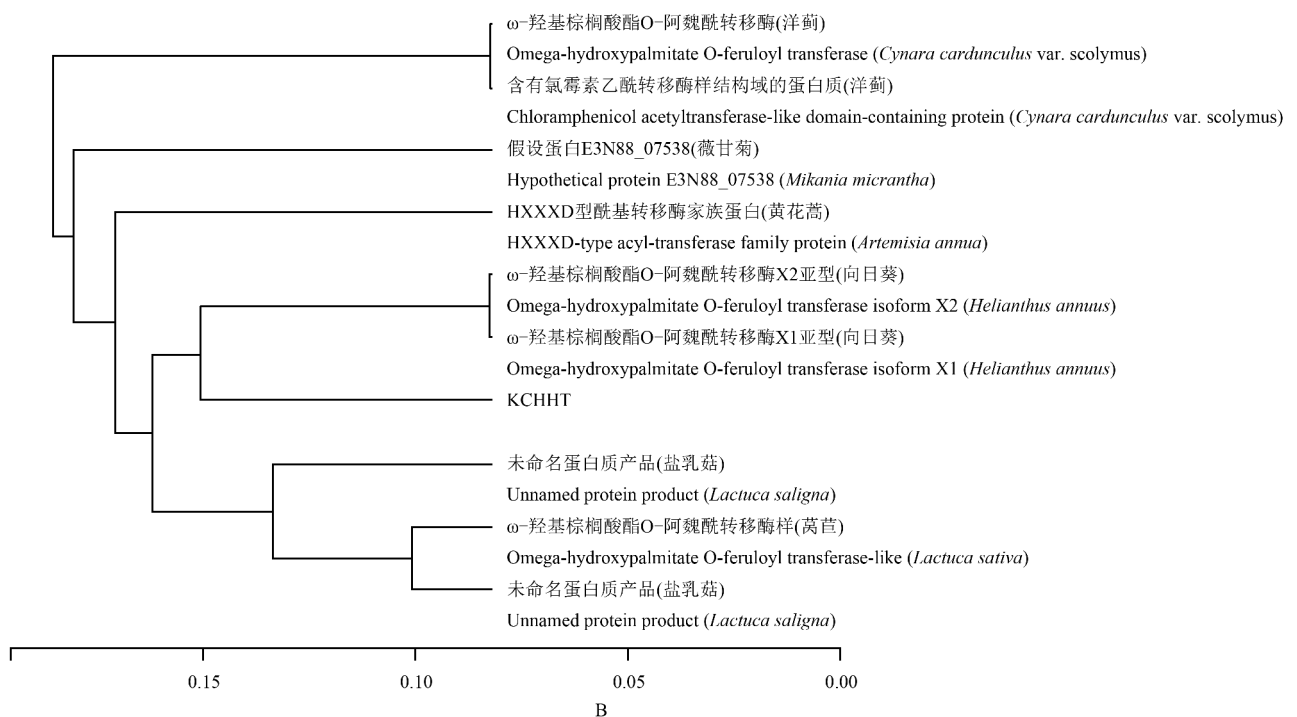
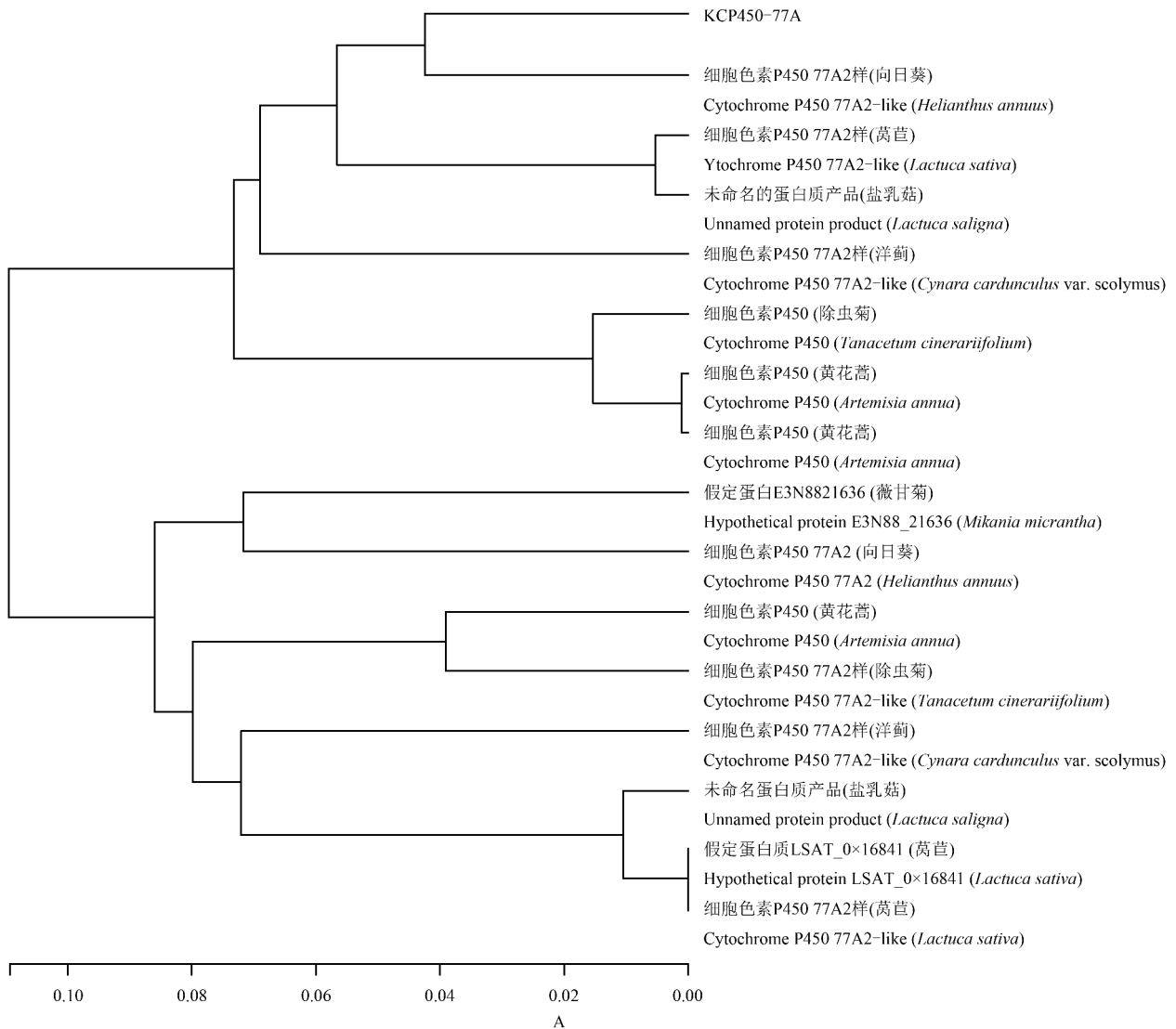


图 1 *KcP450-77A*、*KcHHT*、*KcFAD2* PCR 扩增结果

注: M 代表 DL2000 DNA Marker; 1 代表 *KcHHT*; 2 代表 *KcP450-77A*; 3 代表 *KcFAD2*

Figure 1 PCR amplification results of *KcP450-77A*, *KcHHT* and *KcFAD2*

Note: M represents DL2000 DNA Marker; 1 represents *KcHHT*; 2 represents *KcP450-77A*; 3 represents *KcFAD2*



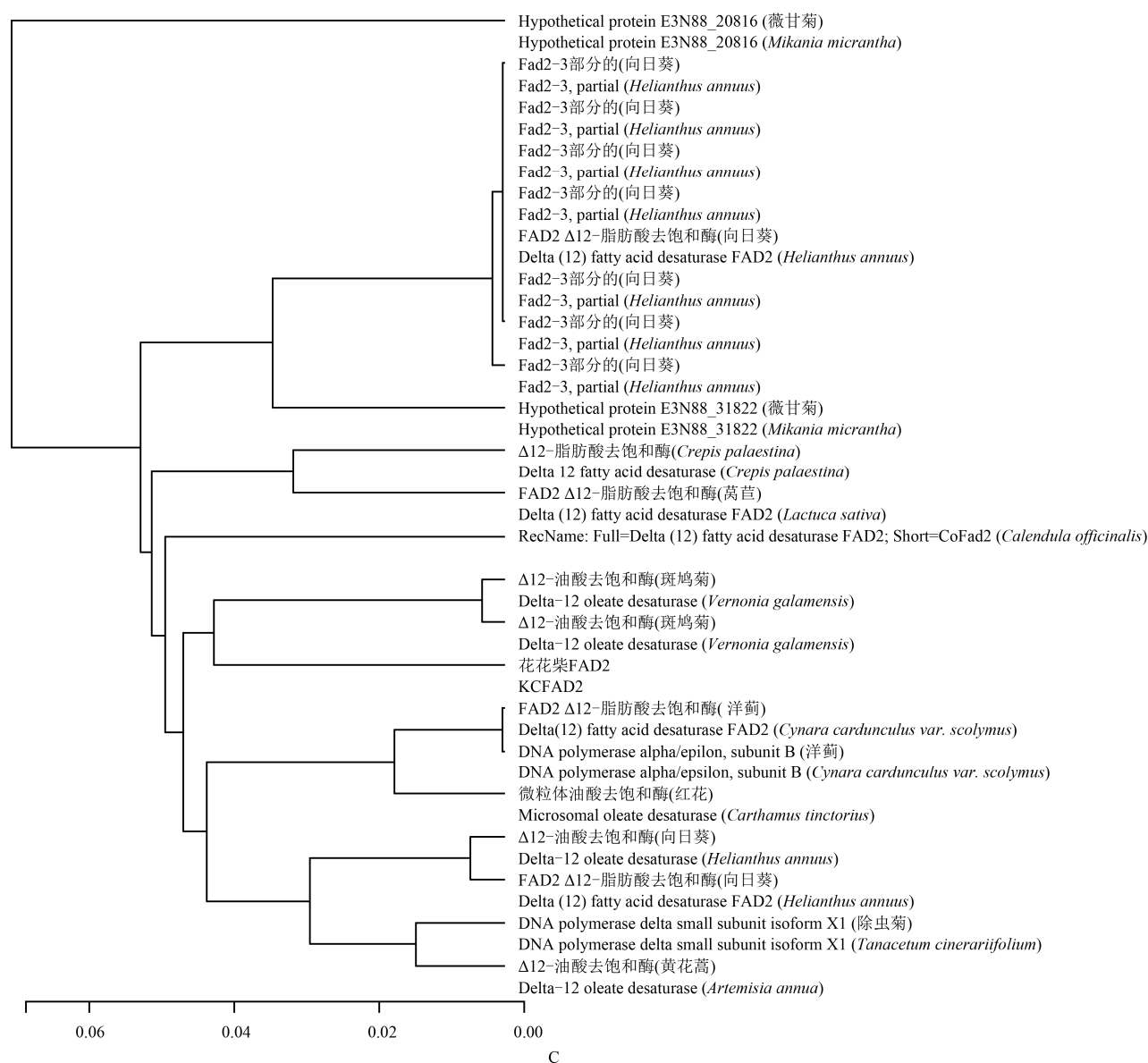


图2 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2* 的系统发育树

注: A 代表 *KcP450-77A*; B 代表 *KcHHT*; C 代表 *KcFAD2*

Figure 2: Phylogenetic tree of *KcP450-77A*, *KcHHT* and *KcFAD2*

Note: A represents *KcP450-77A*; B represents *KcHHT*; C represents *KcFAD2*

反应的机制是很重要的(Gong et al., 2020)。植物中的 *CYP450* 基因家族可通过控制植物内源激素的合成及降解来应对各种非生物胁迫和不利生长环境。鼠耳芥中过表达蒺藜苜蓿 *CYP94* 基因在盐胁迫处理后,发现转基因鼠耳芥根长显著长于野生型,表明该基因可能提高了转基因鼠耳芥根系的耐盐性(Poudel et al., 2016)。干旱胁迫下烟草中 ABA 羟化酶基因 *CYP707A1*, *CYP94C1*, *CYP94B3* 等显著上调,说明 *CYP450s* 基因可能受干旱胁迫诱导。以上研究表明,植物 *CYP450* 基因在抵御盐碱和干旱等非生物胁迫中具有重要作用,但是目前植物中 P450 对高温胁迫的响

应机制研究较少。

ω - 羟基棕榈酸是 *HHT* 在体外形成的主要产物,是长链 1- 链烯醇类的前体,它构成了阳芋块茎皮的部分蜡质,并且在与软木脂(Espelie et al., 1986)相关的蜡质中经常检测到 1- 烷醇阿魏酸酯。脂肪酸去饱和酶(FAD)家族成员的活性可能在温暖的条件下受到抑制(Martinière et al., 2011)。当把向日葵全株或其头状花序转移到高温下, *FAD2* 活性降低,而低温条件下 *FAD2* 活性水平增加(Martínez-Rivas et al., 2000)。了解 *FAD2* 基因,对其在植物体内的表达、调控机制、提高油质和抗逆性具有重要意义(Yuan et al., 2012)。

表 1 KcP450-77A, KcHHT 和 KcFAD2 的亚细胞定位预测
Table 1 Prediction of subcellular localization of KcP450-77A, KcHHT, and KcFAD2

位置 Site	邻近基因个数 Number of nearest neighbors gene		
	KcP450-77A	KcHHT	KcFAD2
细胞核 Nuclear	2.00	3.00	0.00
质膜 Plasmamembrane	1.00	0.00	3.00
细胞外 Extracellular	1.00	0.00	0.00
细胞质 Cytoplasmic	1.00	6.00	0.00
线粒体 Mitochondrial	0.00	1.00	0.00
内质网 Endoplasm. retic.	3.00	0.00	6.00
过氧化物酶体 Peroxisomal	0.00	0.00	1.00
高尔基体 Dictyosome	0.00	0.00	2.00
叶绿体 Chloroplast	5.00	3.00	1.00
液泡 Vacuolar	2.00	1.00	1.00

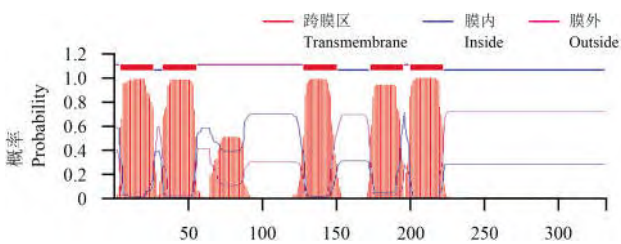


图 3 KcFAD2 编码蛋白的跨膜结构域
Figure 3 The transmembrane domain of KcFAD2 encoding protein

荒漠植物花火柴具有很强的耐高温能力, 通过本课题组前期对花火柴幼苗耐高温性的评价, 其相对电导率及 MDA, CAT, POD, SOD 在高温胁迫下都呈现先升高后降低的趋势, 表明高温胁迫初期花火柴的细胞膜系统受到破坏, 随着高温胁迫时间的延长, 植物通过调整表皮蜡质的含量等一系列保护系统逐渐修复受损细胞, 以此来适应高温环境。该胁迫响应与植物在受到环境胁迫时的生理响应一致, 并且与本研究中表皮蜡质合成相关基因的表达模式分析结果一致。通过对高温处理下花火柴表皮蜡质

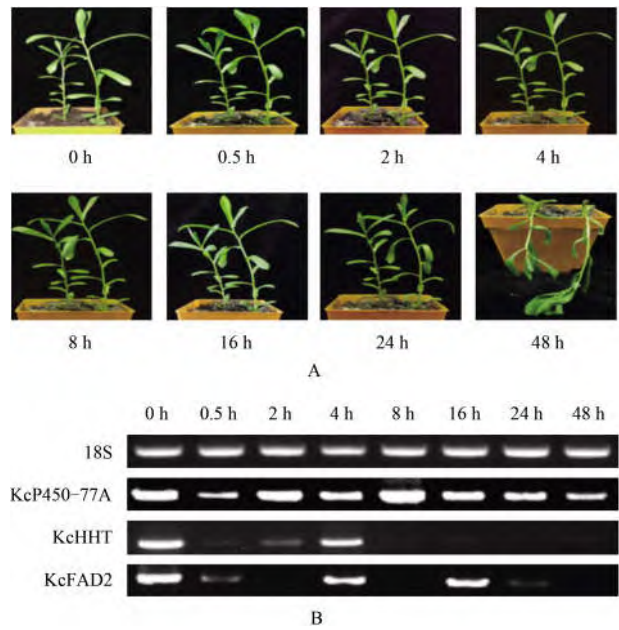


图 4 KcP450-77A, KcHHT 和 KcFAD2 的表达模式分析
注: A 图示高温处理下不同时间点花火柴植株的生长状况; B 图示 KcP450-77A, KcHHT, KcFAD2 的表达模式分析电泳检测
Figure 4 Analysis of expression patterns of KcP450-77A, KcHHT and KcFAD2

Note: A represents growth of *Karelinia caspia* at the different time points under condition of high temperature; B represents the expression pattern analysis of KcP450-77A, KcHHT and KcFAD2

提取分析检测发现, 随着高温处理时间的延长, 烷烃的总含量随之增加, 且烷烃总含量的顺序为野外沙漠 > 校园人工绿地 > 室内种植, 这表明高温影响了花火柴表皮蜡质合成相关基因的表达(王磊, 2019)。

在本研究中, 以花火柴作为实验材料克隆并获得了表皮蜡质合成相关基因 KcP450-77A, KcHHT 和 KcFAD2 的全长 CDS, 并对上述基因的编码蛋白进行了生物信息学分析, 结果表明:

(1) 花火柴 KcP450-77A 基因所编码的蛋白质是由 20 种氨基酸组成的亲水性蛋白质, 其亲水性与橡胶树 HbCYP450 基因(李晓娜等, 2017)、白桦 BpCYP4, BpCYP5, BpCYP14 基因一致(杨杰等, 2018)。花火柴 KcP450-77A 基因的亮氨酸含量与芜菁、白菜、拟南芥等植物中的 CYP450 基因含量一致均占 9.3%, 且在氨基酸组成中含量最高; 与白菜、大麦、胡椒薄荷、金银花、梨果仙人掌、龙胆、陆地棉、罗勒、人参、甜菜、甜椒、彩虹菊、烟草、拟南芥、银杏、紫茉莉等植物中的 P450 基因相比, 都不含有吡咯赖氨酸、硒半胱氨酸(赵志新等, 2019)。植物细胞色素 P450 主要存在于高等植物的质膜、叶绿体膜、高尔基体膜、液泡膜、微粒体等部位, 其中微粒体的含量最高。利用原生质体

进行亚细胞定位分析显示,传统药用植物雷公藤(*Trip-terygium wilfordii*)中的10个CYP450蛋白有8个在叶绿体中表达,2个在质体中表达,这与本研究中花柴 *KcP450-77A* 的亚细胞定位预测结果一致。还有研究发现,大豆(*Glycine max*)CYP450定位在液泡膜上。由此可见,不同植物中CYP450蛋白的分布有所差异,表明CYP450家族在不同植物中可能行使不同功能(崔会婷等,2020)。

(2)花柴 *KcFAD2* 由20种氨基酸组成,其中亮氨酸最多,占9.70%,半胱氨酸最少。对花柴的亲水性及跨膜结构域分析显示,*KcFAD2*是一个典型的膜整合蛋白,暗示了其转运功能的发挥具有重要作用。这符合 ω -6脂肪酸脱氢酶的特性,说明克隆获得的*KcFAD2*基因编码的是 ω -6脂肪酸脱氢酶。其氨基酸组成、亲水性与凤丹 *PoFAD2*一致,且都不含有吡咯赖氨酸、硒半胱氨酸。花柴 *KcFAD2*理论等电点(pI)为8.72,这与花生‘粤油13’*FAD2*、亚麻荠 *CsFAD2*、油菜 *BnFAD2*等的理论等电点相似。 Δ 12-脂肪酸脱氢酶(*FAD2*)的氨基酸序列结构具有许多相似性,如两端的同源性很低,而中部序列相对保守,在亲水区具有特征性的3个保守组氨酸富集区。经预测花柴 *KcFAD2*定位于内质网上,这与凤丹 *PoFAD2*(宋淑香等,2016)、茶树 *CsFAD2*(陈丹等,2017)、花生(*AhFAD2-7*, *AhFAD2-8*, *AhFAD2-9*)(孙金波,2020)等的亚细胞定位一致,主要功能是在单不饱和脂肪酸油酸的第12和第13位碳原子之间引入1个双键,形成含有2个双键的多不饱和脂肪酸——亚油酸,主要作用是负责除质体膜和内膜膜脂之外所有不饱和甘油脂的合成。*FAD2*通常包含有5个跨膜结构,3个组氨酸盒子和内质网检索基序(张喻,2019)。研究表明,落花生‘航花2号’和‘粤油13’都只有4个跨膜结构域,凤丹 *PoFAD2*有4个跨膜结构域,茶 *CsFAD2*有6个跨膜结构域,花柴 *KcFAD2*有5个跨膜结构域,呈现出不同来源的*FAD2*蛋白的跨膜结构域的数量不同,可能与底物的特异性有关。

(3)花柴 *KcHHT*亚细胞定位预计在细胞质,表明其在此可能发挥的作用最大,理论等电点(pI)为5.68,是稳定的亲水蛋白,不存在跨膜结构域。然而目前对于*HHT*基因的功能及其生物信息学分析较少,而本研究还未进行相关的功能验证,故目前还无法对其特性和功能进行阐述。

(4)经同源性分析和系统发育树分析,花柴 *KcP450-77A*, *KcHHT*和 *KcFAD2*基因与向日葵、茼蒿、除虫菊、菜蓟、黄花蒿、斑鸠菊、微甘菊等菊科植物

的 *P450-77A*, *HHT*和 *FAD2*核苷酸序列高度一致,说明基因的进化与物种进化是一致的,表明它们的遗传关系与该物种的遗传关系相符,符合物种进化规律,预示着花柴表皮蜡质合成相关基因 *KcP450-77A*, *KcHHT*和 *KcFAD2*在进化中维持着较保守的结构和功能。

处于逆境胁迫条件下的植物,其外观形态的变化能够直接反映出植物对逆境胁迫的受伤程度,同时也可作为评价植物对逆境胁迫耐受性的指标(孟聪睿,2013)。通过对高温处理下不同时间点花柴叶片表型形态特征观察发现,高温处理下的花柴在一定时间内表现出很好的耐高温性,但是随着处理时间的增加,其叶片组织细胞受到迫害,出现叶片失水萎蔫和植株倒伏现象,表明花柴在40℃条件下能够耐受48h。利用RT-PCR技术分析表达模式,发现与花柴有关的表皮蜡质合成相关基因的表达受高温影响,其表达量均呈现为高-低-高的趋势,表现出胁迫-诱导-适应的特性,这种应激反应与植物受到环境胁迫时的生理反应一致。以上研究表明,花柴具有很强的耐高温性,表皮蜡质合成相关基因 *KcP450-77A*, *KcHHT*和 *KcFAD2*与花柴的耐高温性密切相关,本研究结果为经济作物的高温分子育种提供了遗传资源和理论参考。

3 材料与方法

3.1 实验材料

花柴种子于2020年8月从塔克拉玛干沙漠采集。选取饱满成熟的花柴种子,将其按照营养土:蛭石=2:1种入下口直径为7cm、上口直径为10cm、盆高8.5cm的花盆中,每盆采取间苗的方式种植2~4粒种子,放置于环境温度为25℃、空气相对湿度为50%及16h光照/8h黑暗的室内环境条件下培养。待其叶长至8~10片时转入空气相对湿度为50%及16h光照/8h黑暗的人工气候培养箱中,40℃条件下高温处理0,0.5,2,4,8,16,24,48h,每个高温处理进行3个重复,以高温处理前(环境温度为25℃)采集的叶片为对照(CK),取其功能叶用液氮速冻后于-80℃超低温冰箱留存备用。

3.2 花柴总RNA的提取及反转录cDNA模板的制备

利用RNAprep Pure Plant Kit(天根生化科技(北京)有限公司)试剂盒提取花柴叶片总RNA,并利

用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA,利用超微量分光光度计 NanoDrop one 检测总 RNA 的浓度与纯度。选取质量好的 RNA 进行反转录。反转录参照 Prime-Script RT reagent Kit with gDNA Eaaser (Perfect Real Time) (宝日医生物技术(北京)有限公司)试剂盒。

3.2.1 *KcP450-77A*, *KcHHT* 和 *KcFAD2* 的克隆

根据本研究组的转录组数据设计引物(表 2),并将该引物发送给北京睿博兴科生物技术有限公司。以反转录 cDNA 为模板,PCR 扩增 *P450-77A*、*HHT*、*FAD2*,并通过电泳检测。PCR 扩增反应体系如表 3,PCR 扩增程序如下:(1) *KcP450-77A*: 94 °C 4 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min 10 cycle, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min 10 cycle, 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1 min 20 cycle, 72 °C 7 min, 4 °C+∞;(2) *KcHHT*: 94 °C 4 min, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min 10 cycle, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min 10 cycle, 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min 20 cycle, 72 °C 8 min, 4 °C+∞;(3) *KcFAD2*: 94 °C 4 min, 94 °C 30 s, 63 °C 30 s, 72 °C 1 min 10 cycle, 94 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 1 min 10 cycle, 94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 1 min 20 cycle, 72 °C 7 min, 4 °C+∞。

将检测成功的目的基因回收后与 pMD@19-T Simple Vector 连接,然后转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α (CaCl₂ 制备感受态细胞,热激法转化)并鉴定阳性转化子,送去北京睿博兴科生物技术有限公司测序,随后对测序成功的 *P450-77A*、*HHT* 和 *FAD2* 基因进行 Blast 比对,并将其命名为 *KcP450-77A*、*KcHHT* 和 *KcFAD2*。

3.2.2 *KcP450-77A*, *KcHHT* 和 *KcFAD2* 的生物信息学分析

在对基因 CDS 的全长序列进行测序后,利用 NC-

表 3 *KcP450-77A*, *KcHHT*, *KcFAD2* 的 PCR 扩增反应体系
Table 3 PCR amplification reaction system of *KcP450-77A*, *KcHHT* and *KcFAD2*

试剂名称 Reagent name	加样量(μL) Add sample (μL)
2×Taq PCR Supper Mix	5
cDNA	1
F+R	0.5+0.5
ddH ₂ O	Up to 10

BI 在线工具 blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 和 MEGA 6.0 对 *KcP450-77A*、*KcHHT* 和 *KcFAD2* 基因编码蛋白的氨基酸序列与已报道物种 *P450-77A*、*HHT* 和 *FAD2* 基因编码蛋白的氨基酸序列进行多序列比对,采用 Neighbor-Joining (邻接法)构建系统进化树,设置重复抽样参数为 1 000,分析其近缘物种间的同源性。使用在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质基本物理和化学性质;使用在线软件 kyte&Doolittle (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/>)分析蛋白质亲疏水性;利用在线软件 wolfPsort (<https://wolfsort.hgc.jp/>)进行亚细胞定位;使用在线软件 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TM-HMM/>)预测跨膜结构。

3.2.3 *KcP450-77A*, *KcHHT* 和 *KcFAD2* 的 RT-PCR 表达模式分析

将 40 °C 高温处理下不同时间点及对照 (CK)的叶片按照 3.2.1 所述方法分别提取总 RNA 并反转录为 cDNA,利用超微量分光光度计 NanoDrop one 检测总 RNA 和反转录后 cDNA 的浓度与纯度,以 18S rRNA 为内部参照基因进行 PCR 电泳,将凝胶电泳得到的扩增条带利用 Quantity one 软件进行灰度分析,并进行内参矫正,使内参电泳条带亮度保持一致。以

表 2 *KcP450-77A*, *KcHHT* 和 *KcFAD2* 的引物序列

Table 2 Primer sequences of *KcP450-77A*, *KcHHT* and *KcFAD2*

引物 Primer	产物长度(bp) Product length (bp)	引物序列 Primer sequence
<i>KcP450-77A</i> -F	1 521	5'-ATGGATGTTTCTCTCGATTATCATATGATCTTTGCT-3'
<i>KcP450-77A</i> -R	1 521	5'-TTAAACTCGCGGTTTGATTGTAGCTCT-3'
<i>KcHHT</i> -F	1 347	5'-ATGGGTACCCTTTGCAAATCTACAATC-3'
<i>KcHHT</i> -R	1 347	5'-TCATGCCAAGAACTTATTAACAAGGCCCTC-3'
<i>KcFAD2</i> -F	1 152	5'-ATGGGTGCAGGTGGGCGAATG-3'
<i>KcFAD2</i> -R	1 152	5'-TGGTACAGCAATAAGATCTGA-3'
18s-F	446	GAGTCTGGTAATTGGAATGAG
18s-R	446	TTCGAGTTGTTCTGCTT

此来分析花柴 *KcP450-77A*, *KcHHT* 和 *KcFAD2* 基因在 40 °C 高温处理下不同时间点的表达量。

作者贡献

许疆维是本研究的执行人, 完成数据分析和论文初稿的写作; 王彦芹是项目的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析和论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31660085)及塔里木大学研究生创新项目(TDGR1201904)共同资助。

参考文献

- Bernards M.A., 2002, Demystifying suberin, *Can. J. Bot.*, 80(3): 227-240.
- Chen D., Yu Y., Yue C., Wang P.J., Chen J., Chen G.X., and Ye N.X., 2017, Cloning and expression analysis of $\Delta 12$ -fatty acid desaturase in tea plants, *Chaye Kexue (Journal of Tea Science)*, 37(6):541-550. (陈丹, 俞滢, 岳川, 王鹏杰, 陈静, 陈桂信, 叶乃兴, 2017, 茶树 $\Delta 12$ -脂肪酸去饱和酶基因 *FAD2* 和 *FAD6* 的克隆与表达分析, *茶叶科学*, 37(6): 541-550.)
- Cui H.T., Jiang X., Zhang T.J., Wang Z., Long R.C., Yang Q.C., and Kang J.M., 2020, The research progress of plant cytochrome P450 family, *Zhongguo Caodi Xuebao (Chinese Journal of Grassland)*, 42(5): 173-180. (崔会婷, 蒋旭, 张铁军, 王珍, 龙瑞才, 杨青川, 康俊梅, 2020, 植物 CYP450 家族研究进展, *中国草地学报*, 42(5): 173-180.)
- Espelie K.E., Franceschi V.R., and Kolattukudy P.E., 1986, Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue, *Plant Physiol.*, 81(2): 487-492.
- Gong Z.Z., Xiong L.M., Shi H.Z., Yang S.H., Herrera-Estrella L.R., Xu G.H., Chao D.Y., Li J.R., Wang P.Y., Qin F., Li J., Ding Y.L., Shi Y.T., Wang Y., Yang Y.Q., Guo Y., and Zhu J.K., 2020, Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency, *Sci. China Life Sci.*, 63(5): 635-674.
- Gou J.Y., Yu X.H., and Liu C.J., 2009, A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(44): 18855-18860.
- Guo L., Su M.M., Liang P., Li S., and Chu D., 2018, Effects of high temperature on insecticide tolerance in whitefly *Bemisia tabaci* (Gennadius) Q biotype, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 150: 97-104.
- Li X.N., Xiao H.Z., Wan S.L., Zhang D., and Zhang Y., 2017, Cloning and expression analysis of *HbP450* gene in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg., *Redai Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Tropical Crops)*, 38(11): 2100-2105. (李晓娜, 肖厚贞, 万三连, 张冬, 张宇, 2017, 巴西橡胶树 *HbP450* 基因克隆与表达分析, *热带作物学报*, 38(11): 2100-2105.)
- Liang Q., Li L., An X., Zhou Y.L., and Wang J.P., 2018, Analysis on bioinformatics and expression of fatty acid desaturase gene *FAD2* in *Perilla frutescens*, *Shanxi Nongye Kexue (Journal of Shanxi Agricultural Sciences)*, 46(3): 316-319. (梁倩, 李璐, 安茜, 周雅莉, 王计平, 2018, 紫苏脂肪酸去饱和酶基因 *PfFAD2* 的生物信息学及表达特性分析, *山西农业科学*, 46(3): 316-319.)
- Lü Z.Q., Ren D.D., Zhou H., and Qiao Y.S., 2016, Cloning and expression of *HHT* gene in 'HuangHua' Pear and its bud mutant 'LüHuangHua' pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai), *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 36(6): 1105-1109. (吕照清, 任丹丹, 周贺, 乔玉山, 2016, '黄花'梨及其芽变'绿黄花'梨 *HHT* 基因克隆与表达分析, *西北植物学报*, 36(6): 1105-1109.)
- Luisa Hernández M., Dolores-Sicardo M., Arjona P.M., and Martínez-Rivas J.M., 2020, Specialized functions of olive *FAD2* gene family members related to fruit development and the abiotic stress response, *Plant Cell Physiol.*, 61(2): 427-441.
- Martínez-Rivas J.M., García-Díaz M.T., and Mancha M., 2000, Temperature and oxygen regulation of microsomal oleate desaturase (*FAD2*) from sunflower, *Biochem. Soc. Trans.*, 28(6): 890-892.
- Martinière A., Shvedunova M., Thomson A.J.W., Evans N.H., Penfield S., Runions J., and McWatters H.G., 2011, Homeostasis of plasma membrane viscosity in fluctuating temperatures, *New Phytol.*, 192(2): 328-337.
- Meng C.R., 2013, Drought and heat stress on cherry physiological effects, Thesis for M.S., Shanxi Agricultural University, Supervisor: Yao Y.T., pp.16-17. (孟聪睿, 2013, 干旱高温胁迫对樱桃的生理影响, 硕士学位论文, 山西农业大学, 导师: 姚延涛, pp.16-17.)
- Mizutani M., and Sato F., 2011, Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.*, 507(1): 194-203.
- Poudel A.N., Zhang T., Kwasniewski M., Nakabayashi R., Saito K., and Koo A.J., 2016, Mutations in jasmonoyl-L-isoleucine-12-hydroxylases suppress multiple JA-dependent wound responses in *Arabidopsis thaliana*, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, 1861(9): 1396-1408.
- Shepherd T., and Wynne-Griffiths D., 2006, The effects of stress on plant cuticular waxes, *New Phytol.*, 171(3): 469-499.

- Song S.X., Guo X.F., Ma Y., Li J.J., and Han L.L., 2016, Isolation and expression analysis of *PoFAD₂* gene in *Paeonia ostii*, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 43(2):347-355. (宋淑香, 郭先锋, 马燕, 李俊杰, 韩璐璐, 2016, 凤丹 (*Paeonia ostii*)脂肪酸去饱和酶基因 *PoFAD₂* 的克隆及表达分析, *园艺学报*, 43(2):347-355.)
- Song Z., Gao X., Wu M., Lu F.P., and Qin H.M., 2020, Structure, function, and application of cytochrome P450 enzymes, *Weishengwuxue Tongbao (Microbiology China)*, 47(7): 2245-2254. (宋展, 高鑫, 吴冕, 路福平, 秦慧民, 2020, 细胞色素 P450 酶的结构、功能与应用研究进展, *微生物学通报*, 47(7): 2245-2254.)
- Sun J.B., 2020, Study on the mechanism of *FAD2* gene family regulating oleic acid accumulation in peanut seeds with different maturity, Thesis for M.S., Shandong Normal University, Supervisor: Zhao S.Z., pp.1-54. (孙金波, 2020, *FAD2* 基因家族调控不同成熟度花生种子油酸积累中的机理研究, 硕士学位论文, 山东师范大学, 导师: 赵术珍, pp. 1-54.)
- Wang L., 2019, Study on synthesis of epidermal wax and resistance to high temperature in *Karelinia caspia*, Thesis for M.S., Tarim University, Supervisor: Wang Y.Q., pp.16-28. (王磊, 2019, 花柴表皮蜡质的合成及其对植物耐高温的研究, 硕士学位论文, 塔里木大学, 导师: 王彦芹, pp.16-28.)
- Wang X.J., Xiao L.T., Dong A.W., Wang T., Qian Q., Qi X.Q., Chen F., Zuo J.R., Yang S.H., Gu H.Y., Chen Z.D., Jiang L.W., Bai Y.F., Kong H.Z., and Chong K., 2017, Research advances in plant science in China in 2016, *Zhiwu Xuebao (Chinese Bulletin of Botany)*, 52(4): 394-452. (王小菁, 萧浪涛, 董爱武, 王台, 钱前, 漆小泉, 陈凡, 左建儒, 杨淑华, 顾红雅, 陈之端, 姜里文, 白永飞, 孔宏智, 种康, 2017, 2016 年中国植物科学若干领域重要研究进展, *植物学报*, 52(4): 394-452.)
- Wang Y.Q., Shi X.J., and Li Z.J., 2017, An evaluation on heat tolerance of a desert plant *Karelinia caspia* seedlings, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 33(4): 157-163. (王彦芹, 石新建, 李志军, 2017, 沙漠植物花柴幼苗对高温耐受性评价, *生物技术通报*, 33(4): 157-163.)
- Yang J., Sun L., Wang S.Y., Li Y., Zhai R., Lin X.Y., Zhan Y.G., and Yin J., 2018, Tissue specificity and hormone induced expression of three cytochrome *P450* genes from *Betula platyphylla* Suk, *Nanjing Linye Daxue Xuebao (Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition))*, 42(6): 27-34. (杨杰, 孙璐, 王思瑶, 李影, 翟睿, 林香雨, 詹亚光, 尹静, 2018, 3 个白桦细胞色素 *P450* 基因生物信息学及表达分析, *南京林业大学学报(自然科学版)*, 42(6): 27-34.)
- Yuan S.W., Wu X.L., Liu Z.H., Luo H.B., and Huang R.Z., 2012, Abiotic stresses and phytohormones regulate expression of *FAD2* gene in *Arabidopsis thaliana*, *J. Integr. Agric.*, 11(1): 62-72.
- Zhang H., Zhao M.T., Liu Y.R., Zhou Z.S., and Guo J.Y., 2018, Identification of cytochrome P450 monooxygenase genes and their expression in response to high temperature in the alligatorweed flea beetle *Agasicles hygrophila* (Coleoptera: Chrysomelidae), *Sci. Rep.*, 8(1): 17847.
- Zhang Y., 2019, CRISPR-Cas9 system mediated for genome targeted editing and functional analysis of *FAD2* in flax (*Linum usitatissimum* L.), Thesis for M.S., Xinjiang University, Supervisor: Xie L.Q., pp.1-52. (张喻, 2019, CRISPR-Cas9 系统对亚麻 *FAD2* 基因定点编辑及功能分析, 硕士学位论文, 新疆大学, 导师: 谢丽琼, pp.1-52.)
- Zhao Z.X., Lu P.P., and Wang T., 2019, Bioinformatics analysis of cytochrome *P450* in triterpenoid saponins metabolism in plants, *Xinan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences)*, 32(10): 2304-2312. (赵志新, 鹿鹏鹏, 王通, 2019, 植物三萜皂苷代谢中细胞色素 *P450* 的生物信息学分析, *西南农业学报*, 32(10): 2304-2312.)
- Zhou M.Y., Song L.L., Ye S., Zeng W., Hannien H., Yu W.W., Suo J.W., Hu Y.Y., and Wu J.S., 2019, New sights into lipid metabolism regulation by low temperature in harvested *Torreya grandis* nuts, *J. Sci. Food Agric.*, 99(9): 4226-4234.

(责任编辑 庞晓鑫 甘凤琼)