

十字花科植物芥酸合成基因 *FAEI-closest* 的克隆及功能分析

王月¹, 薛佳宇², 周广灿³, 杭悦宇¹, 孙小芹^{1,①}

[1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省植物资源研究与利用重点实验室, 江苏 南京 210014;
2. 南京农业大学, 江苏 南京 210095; 3. 菏泽学院, 山东 菏泽 274015]

摘要: 对十字花科(Brassicaceae)中具代表性的高、低芥酸植物的 *FAEI-closest* 基因进行扩增, 并对其编码的氨基酸序列进行序列比对; 基于 *FAEI-closest* 氨基酸序列构建遗传关系树; 将具有代表性的 *FAEI-closest* 基因在酵母中进行转化, 比较不同植物来源的该基因调控芥酸合成能力的差异。结果显示: 十字花科高、低芥酸植物 *FAEI-closest* 基因编码的氨基酸序列主要有 A 和 B 2 种类型, 其对应的编码区全长分别约为 1 461 和 1 389 bp, 且 B 类型的氨基酸序列仅出现在高芥酸植物中; 比较氨基酸序列的变异位点发现, 高、低芥酸植物中共存在 150 个变异位点, 高芥酸植物中第 320 位的氨基酸为赖氨酸(K), 低芥酸植物中该位点为苏氨酸(T)。遗传关系树显示: 12 种芥酸植物可聚为 I 和 II 2 个分支, 大部分高芥酸植物的 *FAEI-closest* 氨基酸序列聚在分支 I; 高芥酸植物银扇草(*Lunaria annua* Linn.) 以及低芥酸植物涩芥(*Malcolmia africana* (Linn.) R. Br.)、鸟头芥(*Euclidium syriacum* (Linn.) R. Br.) 和四齿芥(*Tetracme quadricornis* (Stephan) Bunge) 的 *FAEI-closest* 氨基酸序列聚在分支 II。酵母转化实验结果显示: 蔓菁(*Brassica rapa* Linn.) 和洋基芥(*Brassica tournefortii* Gouan) 的 *FAEI-closest* 基因转酵母产物中检测到了芥酸, 涩芥、鸟头芥、四齿芥和银扇草的 *FAEI-closest* 基因转酵母产物中均未检测到芥酸, 说明只有部分十字花科植物的 *FAEI-closest* 基因与芥酸合成相关。综上所述, 低芥酸植物来源的 *FAEI-closest* 基因均不能合成芥酸, 部分高芥酸植物来源的 *FAEI-closest* 基因能合成芥酸, 不同十字花科植物中的 *FAEI-closest* 基因在芥酸合成过程中发挥作用的程度不同; *FAEI-closest* 基因是否为芥酸合成过程中的主效基因, 有待进一步验证。

关键词: 十字花科; 芥酸; *FAEI-closest* 基因; 克隆; 功能分析

中图分类号: Q785; Q943.2; Q949.784.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2023)03-0045-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2023.03.05

Cloning and functional analysis on erucic acid synthesis gene *FAEI-closest* in Brassicaceae plants WANG Yue¹, XUE Jiayu², ZHOU Guangcan³, HANG Yueyu¹, SUN Xiaoqin^{1,①} [1. Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China; 2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Heze University, Heze 274015, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2023, 32(3): 45-51

Abstract: Amplification was conducted for *FAEI-closest* genes of representative high and low erucic acid plants in Brassicaceae, and sequence alignment of the amino acid sequences encoded by *FAEI-closest* genes was performed; a genetic relation tree was constructed based on the amino acid sequences of *FAEI-closest*; representative *FAEI-closest* genes were transformed into yeast, and the differences in regulation of erucic acid synthesis ability among *FAEI-closest* genes from different plants were compared. The results

收稿日期: 2022-04-20

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20200292); 江苏省自然科学基金项目(BE2022340)

作者简介: 王月(1988—), 女, 江苏宿迁人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物分子遗传与进化方面的研究。

①通信作者 E-mail: xiaoqinsun@cnbg.net

引用格式: 王月, 薛佳宇, 周广灿, 等. 十字花科植物芥酸合成基因 *FAEI-closest* 的克隆及功能分析[J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(3): 45-51.

show that the amino acid sequences encoded by *FAEI-closest* genes of high and low erucic acid plants in Brassicaceae have two types namely A and B, the full length of their corresponding coding regions are about 1 461 and 1 389 bp respectively, and amino acid sequences of B type only appear in high erucic acid plants; by comparing the amino acid sequence variation sites shows that there are 150 variation sites in high and low erucic acid plants in total, and the 320th amino acid in high erucic acid plants is lysine (K), while that in low erucic acid plants is threonine (T). The genetic relation tree shows that 12 erucic acid plants can be divided into two clades namely I and II, and the amino acid sequences of *FAEI-closest* of most high erucic acid plants are clustered into clade I; those of high erucic acid plant *Lunaria annua* Linn. and low erucic acid plants *Malcolmia africana* (Linn.) R. Br., *Euclidium syriacum* (Linn.) R. Br., and *Tetracme quadricornis* (Stephan) Bunge are clustered into clade II. The yeast transformation experiment result shows that erucic acid can be detected in yeast transformed products of *FAEI-closest* genes from *Brassica rapa* Linn. and *Brassica tournefortii* Gouan, but not in yeast transformed products of *FAEI-closest* genes from *M. africana*, *E. syriacum*, *T. quadricornis*, and *L. annua*, indicating that only *FAEI-closest* genes of some Brassicaceae plants are associated with erucic acid synthesis. In conclusion, *FAEI-closest* genes from all low erucic acid plants cannot synthesize erucic acid, and *FAEI-closest* genes from some high erucic acid plants can synthesize erucic acid; the function degree of *FAEI-closest* genes in different Brassicaceae plants are different in process of erucic acid synthesis; whether *FAEI-closest* gene is the major gene involved in erucic acid synthesis needs to be further verified.

Key words: Brassicaceae; erucic acid; *FAEI-closest* gene; cloning; functional analysis

芥酸(erucic acid, C22:1)是存在于十字花科(Brassicaceae)植物种子中的特有长链脂肪酸^[1],具有重要的工业生产价值,广泛应用于油漆、塑料、化妆品和医药等行业,被称为“21世纪的原料”。但由于芥酸是十字花科油料作物中的抗营养成分,因此在育种中多选择低芥酸种质,从而导致对于芥酸合成相关基因的研究较少,不利于芥酸工业化应用的开展。

芥酸由脂肪酸延长酶(fatty acid elongase)复合体催化合成,其中3-酮脂酰-CoA合酶(3-ketoacyl-CoA synthase, KCS)是脂肪酸延长反应的限速酶^[2-3],编码该酶的基因家族被命名为KCS基因家族。KCS基因家族在进化过程中,随着多次复制和不同复制拷贝上变异的积累,其家族中的各个成员也相应地发生了序列的变异,从而在功能上产生差异^[4-8]。

前期的研究结果显示:KCS基因家族中有7个成员为十字花科植物特有^[3],包括*FAEI-closest*和*FAEI*等基因,其中*FAEI*基因是唯一一个被实验验证参与调控芥酸合成的KCS基因。如拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]*fae1*突变体种子中芥酸含量大幅度降低^[9-11]。除十字花科植物外,在旱金莲科(Tropaeolaceae)旱金莲(*Tropaeolum majus* Linn.)和油蜡树科(Simmondsiaceae)油蜡树[*Simmondsia chinensis* (Link) C. K. Schneid.]中各发现了1个具有调控芥酸合成的功能KCS基因,虽然该基因也被命名为*FAEI*,但其在进化上与十字花科

的*FAEI*基因是旁系同源基因,属于KCS基因家族中的不同成员^[12],这暗示了KCS基因家族中其他成员也可能具有调控芥酸合成的能力,也暗示了十字花科存在其他调控芥酸合成的KCS基因的可能性。

*FAEI-closest*基因在7个基因中与*FAEI*基因同源性最高,其在模式植物拟南芥中发生了丢失,因此在以往的研究中被忽视。本研究推测*FAEI-closest*基因可能也具有调控芥酸合成的能力。基于上述推测,本研究选择十字花科中具代表性的高、低芥酸植物,对其*FAEI-closest*基因进行扩增,并对其编码的氨基酸序列进行序列比对,分析不同植物*FAEI-closest*氨基酸序列差异;并基于构建的遗传关系树选择具有代表性的*FAEI-closest*基因在酵母中进行转化,比较不同植物来源的该基因调控芥酸合成能力的差异,以期为芥酸的应用提供更多的基因源。

1 材料和方法

1.1 材料

根据课题组前期测定的结果^[13],选择十字花科植物中高芥酸(芥酸含量高于40%)植物9种和低芥酸(芥酸含量低于3%)植物3种(包含1种零芥酸植物),材料基本信息见表1。上述材料均保存于江苏省中国科学院植物研究所,并由江苏省中国科学院植物研究所杭悦宇研究员鉴定。

表1 供试12个十字花科材料的基本信息

Table 1 Basic information of 12 test materials in Brassicaceae

属 Genus	种类 Species	芥酸含量/% Erucic acid content	类型 Type	来源地 Origin
芸薹属 <i>Brassica</i>	洋基芥 <i>B. tournefortii</i>	48.08	高芥酸植物 High erucic acid plant	美国 America
	蔓菁 <i>B. rapa</i>	48.32	高芥酸植物 High erucic acid plant	美国 America
	花椰菜 <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	48.03	高芥酸植物 High erucic acid plant	美国 America
	擘蓝 <i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i>	47.94	高芥酸植物 High erucic acid plant	美国 America
	蔓菁甘蓝 <i>B. napus</i> var. <i>napobrassica</i>	46.41	高芥酸植物 High erucic acid plant	美国 America
	白花甘蓝 <i>B. oleracea</i> var. <i>albiflora</i>	45.81	高芥酸植物 High erucic acid plant	美国 America
	抱子甘蓝 <i>B. oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>	44.00	高芥酸植物 High erucic acid plant	美国 America
	欧洲油菜 <i>B. napus</i>	49.00	高芥酸植物 High erucic acid plant	美国 America
	银扇草属 <i>Lunaria</i>	银扇草 <i>L. annua</i>	44.96	高芥酸植物 High erucic acid plant
乌头芥属 <i>Euclidium</i>	乌头芥 <i>E. syriacum</i>	0.62	低芥酸植物 Low erucic acid plant	中国 China
四齿芥属 <i>Tetracme</i>	四齿芥 <i>T. quadricornis</i>	0.25	低芥酸植物 Low erucic acid plant	中国 China
涩芥属 <i>Malcolmia</i>	涩芥 <i>M. africana</i>	0.00	低芥酸植物 Low erucic acid plant	中国 China

1.2 方法

1.2.1 植物 DNA 提取 将上述 12 个材料在温室 (15 °C ~ 20 °C) 中进行种子萌发, 种植在装有营养土 [pH 6.0, 品氏托普园艺 (上海) 有限公司] 的培养盆 (直径 10 cm、高 8 cm) 中, 每盆播种 10 粒种子, 每种材料种植 3 盆。培养 30 d 后, 每盆随机取 100 mg 真叶, 采用 CTAB 法^[14] 提取叶片 DNA。使用质量体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品的浓度和纯度, 将 DNA 样品保存于 -20 °C 冰箱中备用。

1.2.2 基因扩增 结合基因保守区, 使用 Primer Premier 5 软件设计 *FAE1-closest* 基因 PCR 扩增的简并引物 (*FAE1-closest-F*: 5'-CTT VTTTACTAYYACC TCATWCCCACTTTTTC A-3'; *FAE1-closest-R*: 5'-CGGGTAYTTRKCAAYRCAATGTT C-3'), 引物由南京锐真生物科技有限公司合成。使用高保真 *Taq* 酶 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 进行 PCR 扩增。扩增体系总体积为 25.0 μL, 包括 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL, 2×Phanta Max Buffer 12.5 μL, *dNTP* Mix (10 mmol · L⁻¹ each) 0.5 μL, 10 μmol · L⁻¹ 上游和下游引物各 0.8 μL, DNA 模板 1.0 μL, 加双蒸水补足至 25.0 μL。扩增程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (离心柱型) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 对扩增产物进行回收。TA 克隆后送北京擎科生物科技股份有限公司测序, 确定扩增产物的准确性。

1.2.3 遗传关系树构建 使用 Sequencher 4.5 程序

(美国 Gene Codes Corporation 公司) 对测序返回的序列进行拼接和编辑。组装参数 (assembly parameter) 设置为 85% ~ 95%, 如果组装成了 n 个 contig ($n \geq 2$), 则说明该种植物 *FAE1-closest* 基因可能存在多个拷贝。拼接完成后, 使用 MEGA 6.0 软件进行序列比对分析。在默认参数下, 以涩芥 [*Malcolmia africana* (Linn.) R. Br.] 的 *FAE1-closest* 氨基酸序列为参考序列, 将氨基酸序列使用 MEGA 6.0 软件进行多重比对排序, 并进行校正。

使用 MEGA 6.0 软件, 采用 ML 法构建系统进化树, 同时采用自举法对进化树内各分支节点进行 500 次重复检验, 计算各节点的支持率, 完成 ML 遗传关系树的构建。

1.2.4 *FAE1-closest* 基因的酵母转化 以本实验室保存的 pYES2/NT C 为载体骨架, 在基因两端设计添加相应酶切位点的引物。以上述扩增产物为模板, 按照上述 1.2.2 中的扩增体系和程序进行 PCR 扩增, 经过 TA 克隆获得中间载体, 经过酶切、连接的方式获得带有目的基因的 pYES2/NT C 表达载体。酵母转化参照文献^[15] 中的方法进行, 以 pYES2/NT C 空载体作为阴性对照, 将上述构建好的载体转化到本实验室保存的酵母菌株 InvSc1 中, 于 28 °C 条件下培养 2~3 d, 挑取酵母转化后获得的阳性克隆, 接种到含有质量体积分数 2% 葡萄糖的 SC-Ura 液体培养基 (pH 5.9, 北京泛基诺科技有限公司) 中, 在 28 °C、250 r · min⁻¹ 条件下过夜培养。用含有质量体积分数 2% 半乳糖的 SC-Ura 液体培养基将其稀释到 OD₆₀₀ 值为 0.02, 并继续在 28 °C、250 r · min⁻¹ 条件下培养, OD₆₀₀

值达到 1.4 后进行脂肪酸提取。

1.2.5 酵母脂肪酸提取及含量分析 酵母脂肪酸提取及含量测定参照文献[15]中的方法进行。脂肪酸提取过程如下:5 000 r·min⁻¹条件下离心收集酵母细胞,用无菌超纯水洗涤酵母细胞沉淀 2 次;用 KOH-甲醇溶液(含质量体积分数 10% KOH 和体积分数 5% H₂O)重悬酵母细胞,80 °C 条件下皂化 2 h 后置于冰上冷冻;用正己烷(分析纯)洗涤以去除未皂化物;剩余的水相用 6 mol·L⁻¹ HCl 酸化。正己烷萃取游离脂肪酸,抽真空去除多余溶剂。游离脂肪酸在含有体积分数 1% H₂SO₄ 的甲醇溶液(2 mL)中 60 °C 甲基化 1 h。用正己烷萃取酵母脂肪酸甲酯,抽真空去除多余溶剂,剩余物溶解在 0.5 mL 正己烷中用于气相色谱分析。

气相色谱条件:自动进样器(美国 Agilent 公司),进样口温度为 250 °C;HPINNOWAX 色谱柱(15.0 m×250 μm×0.25 μm),恒压;柱流量为 1.0 mL·min⁻¹,平均线速度为 38 cm·s⁻¹;柱温箱温度为 200 °C(恒温);程序升温 180 °C,保留 1.5 min,180 °C~210 °C(10 °C·min⁻¹),210 °C~220 °C(5 °C·min⁻¹)。FID 检测器温度为 300 °C,氢气 30 mL·min⁻¹,空气 350 mL·min⁻¹;进样量为 1 mL。脂肪酸含量采用峰面积

归一化法^[13]计算。

2 结果和分析

2.1 FAE1-closest 氨基酸序列的比较和同源性分析

2.1.1 十字花科高、低芥酸植物中 FAE1-closest 氨基酸序列的比较 对十字花科高、低芥酸植物中的 FAE1-closest 基因进行了扩增,发现其编码的氨基酸序列主要有 A 和 B 2 种类型,结果见表 2。结果显示:A 类型的氨基酸序列约有 487 个氨基酸,对应的编码区全长约为 1 461 bp;B 类型的氨基酸序列约有 463 个氨基酸,对应的编码区全长约为 1 389 bp;与 A 类型的氨基酸序列相比,B 类型的氨基酸序列在第 36 至第 52 的位置存在 17 个氨基酸的缺失(缺失的氨基酸序列为 QEDFHNLWFHLQHNLQT),在第 92 至第 98 的位置存在 7 个氨基酸缺失(缺失的氨基酸序列为 TVQMIRD)。

结果(表 2)显示:高芥酸植物蔓菁(*Brassica rapa* Linn.)、洋基芥(*Brassica tournefortii* Gouan)^[13]、银扇草(*Lunaria annua* Linn.)及低芥酸植物乌头芥[*Euclidium syriacum* (Linn.) R. Br.]、四齿芥[*Tetracme quadricornis* (Stephan) Bunge]和涩芥仅有 A 类型的

表 2 十字花科高、低芥酸植物中 FAE1-closest 氨基酸序列变异位点的比较

Table 2 Comparison on variation sites of amino acid sequences of FAE1-closest in high and low erucic acid plants in Brassicaceae

种类 ¹⁾ Species ¹⁾	TA ²⁾	各位点的氨基酸 ³⁾ Amino acid at each site ³⁾																															
		36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	92	93	94	95	96	97	98	320							
Ma	A	Q	E	D	I	H	N	L	W	F	H	L	Q	H	N	L	V	T	T	V	Q	K	I	I	D	T							
Tq	A	K	F							
Es	A	K	F	A	.	M								
La	A	.	.	.	F	P	A	Y	K								
Bt	A	.	.	.	F	Q	L	M	.	R	.	K							
Br	A	.	.	.	F	H	L	.	A	.	.	M	.	R	.	K							
Bn	A	.	.	.	F	Q	M	.	R	.	K							
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K							
Bob	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K							
Bog	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K							
Bnn	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K							
Boa	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K							
Bo	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K							

¹⁾ Ma: 涩芥 *Malcolmia africana* (Linn.) R. Br.; Tq: 四齿芥 *Tetracme quadricornis* (Stephan) Bunge; Es: 乌头芥 *Euclidium syriacum* (Linn.) R. Br.; La: 银扇草 *Lunaria annua* Linn.; Bt: 洋基芥 *Brassica tournefortii* Gouan; Br: 蔓菁 *Brassica rapa* Linn.; Bn: 欧洲油菜 *Brassica napus* Linn.; Bob: 花椰菜 *Brassica oleracea* var. *botrytis* Linn.; Bog: 擘蓝 *Brassica oleracea* var. *gongyloides* Linn.; Bnn: 蔓菁甘蓝 *Brassica napus* var. *napobrassica* (Linn.) Reichenbach; Boa: 白花甘蓝 *Brassica oleracea* var. *albiflora* Kuntze; Bo: 抱子甘蓝 *Brassica oleracea* var. *gemmifera* Zenker.

²⁾ TA: 氨基酸序列类型 Type of amino acid sequence. A 和 B 表示不同的 FAE1-closest 氨基酸序列类型 A and B represent different types of amino acid sequences of FAE1-closest.

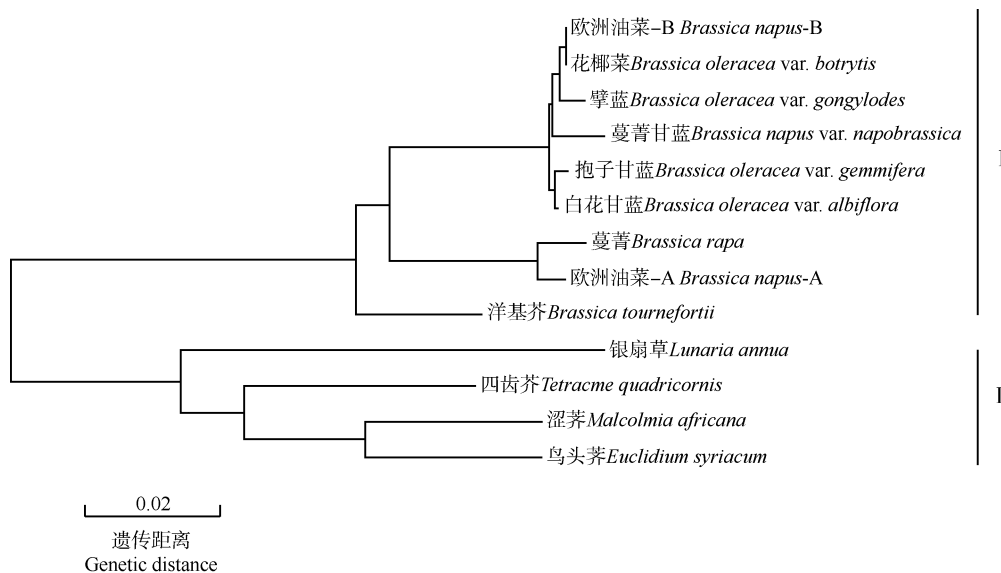
³⁾ 以涩芥 FAE1-closest 氨基酸序列为基准,“.”表示一致性位点,“-”表示 InDel 位点 Based on amino acid sequence of FAE1-closest in *M. africana*,“.” represents the concordant site, and“-” represents the InDel site.

氨基酸序列;高芥酸植物花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis* Linn.)、擘蓝 (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* Linn.)、蔓菁甘蓝 [*Brassica napus* var. *napobrassica* (Linn.) Reichenbach]、白花甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *albiflora* Kuntze) 和抱子甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* Zenker) 仅有 B 类型的氨基酸序列;而异源四倍体的高芥酸植物欧洲油菜 (*Brassica napus* Linn.) 有 A 和 B 2 种类型的氨基酸序列。

进一步对高、低芥酸植物中 *FAE1-closest* 氨基酸序列的变异位点进行统计,发现高、低芥酸植物中共存在 150 个变异位点,其中 149 个氨基酸变异位点在高、低芥酸植物中无明显的分布规律,仅 1 个位点(第 320 位)可能与十字花科植物中芥酸合成相关,即在高芥酸植物中该位点的氨基酸为赖氨酸(K),在低芥酸植物中则为苏氨酸(T)(表 2)。

2.1.2 十字花科高、低芥酸植物中 *FAE1-closest* 氨基酸序列的同源性分析 基于 *FAE1-closest* 氨基酸序列构建十字花科高、低芥酸植物的 ML 遗传关系树(图 1)。结果显示:12 种芥酸植物聚为 I 和 II 2 个分支。大部分高芥酸植物的 *FAE1-closest* 氨基酸序列聚在分支 I;低芥酸植物涩芥、乌头芥和四齿芥的 *FAE1-closest* 氨基酸序列聚在分支 II;仅高芥酸植物银扇草例外,其 *FAE1-closest* 氨基酸序列与低芥酸植物具有较高的同源性,聚在分支 II。

同源关系较近的基因,功能也可能相近,因此从分支 I 上随机选择抱子甘蓝、蔓菁和洋基芥作为高芥酸植物的代表物种,选择分支 II 上全部物种(银扇草以及四齿芥、涩芥和乌头芥),将这 7 种植物的 *FAE1-closest* 基因作为候选基因在酵母菌株 InvSc1 中进行异源表达。



A 和 B 表示不同的 *FAE1-closest* 氨基酸序列类型 A and B represent different types of amino acid sequences of *FAE1-closest*.

图 1 基于 *FAE1-closest* 氨基酸序列构建十字花科高、低芥酸植物的 ML 遗传关系树

Fig. 1 ML genetic relationship tree of high and low erucic acid plants in Brassicaceae based on amino acid sequences of *FAE1-closest*

2.2 异源表达 *FAE1-closest* 基因的酵母中脂肪酸含量测定

将抱子甘蓝、蔓菁、洋基芥、银扇草、四齿芥、涩芥和乌头芥中的 *FAE1-closest* 基因在酵母中进行异源表达后,对从酵母中提取的 14 种脂肪酸组分(月桂酸、肉蔻酸、肉豆蔻油酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生酸、二十碳烯酸、芥酸、木蜡酸和神经酸)的含量进行分析,结果见表 3。结果

显示:对照酵母菌株(转化 pYES2/NT C 空载体)中无芥酸积累,分支 I 中蔓菁和洋基芥的 *FAE1-closest* 基因转酵母产物中检测到了芥酸,但抱子甘蓝 *FAE1-closest* 基因转酵母产物中未检测到芥酸;分支 II 上低芥酸植物四齿芥、涩芥和乌头芥的 *FAE1-closest* 基因转酵母产物中均未检测到芥酸,与这 3 个近缘的高芥酸植物银扇草 *FAE1-closest* 基因转酵母产物中也未检测到芥酸。

表3 十字花科高、低芥酸植物 *FAE1-closest* 基因转酵母产物的脂肪酸组分分析Table 3 Analysis on fatty acid components in yeast transformed products of *FAE1-closest* genes from high and low erucic acid plants in Brassicaceae

编号 ¹⁾ No. ¹⁾	各脂肪酸组分的含量/% ²⁾ Content of each fatty acid component ²⁾														其他 Other
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	
1	2.45	2.58	1.31	15.66	1.89	11.12	38.62	16.40	3.57	—	—	—	—	—	6.41
2	4.58	4.54	1.96	19.65	1.68	15.19	26.44	16.30	3.79	0.94	—	—	—	—	4.95
3	3.28	2.06	1.55	21.70	24.91	13.33	5.77	22.51	0.53	—	0.55	1.25	1.15	—	1.44
4	7.95	6.08	3.71	24.93	14.14	15.66	12.34	9.69	2.54	0.38	—	2.35	—	—	0.23
5	5.44	4.79	2.00	20.74	20.49	18.72	18.20	1.65	—	—	—	—	—	—	7.98
6	2.44	1.68	1.03	21.41	30.13	14.19	26.07	—	—	—	—	—	0.95	—	2.11
7	2.43	1.72	1.03	21.06	30.47	14.14	26.07	—	—	—	—	—	0.97	—	2.11
8	3.59	2.13	1.42	21.68	31.99	13.27	25.17	—	—	—	0.14	—	—	—	0.61

¹⁾ 1: 对照酵母菌株(转化 pYES2/NT C 空载体) Control yeast strain (transformed pYES2/NT C empty vector); 2: 抱子甘蓝 *Brassica oleracea* var. *gemmifera* Zenker; 3: 蔓菁 *Brassica rapa* Linn.; 4: 洋基芥 *Brassica tournefortii* Gouan; 5: 银扇草 *Lunaria annua* Linn.; 6: 四齿芥 *Tetradlea quadricornis* (Stephan) Bunge; 7: 涩芥 *Malcolmia africana* (Linn.) R. Br.; 8: 乌头芥 *Euclidium syriacum* (Linn.) R. Br.

²⁾ C1: 月桂酸 Lauric acid; C2: 肉蔻酸 Myristic acid; C3: 肉豆蔻油酸 Myristoleic acid; C4: 棕榈酸 Palmitic acid; C5: 棕榈油酸 Palmitoleic acid; C6: 硬脂酸 Stearic acid; C7: 油酸 Oleic acid; C8: 亚油酸 Linoleic acid; C9: 亚麻酸 Linolenic acid; C10: 花生酸 Arachidic acid; C11: 二十碳烯酸 Eicosenoic acid; C12: 芥酸 Erucic acid; C13: 木蜡酸 Lignoceric acid; C14: 神经酸 Nervonic acid. —: 未检测到 Undetected.

3 讨论和结论

3.1 部分十字花科植物的 *FAE1-closest* 基因与芥酸合成存在相关性

基于 *FAE1-closest* 氨基酸序列构建的遗传关系树显示:高芥酸植物银扇草与低芥酸植物处于同一分支,且银扇草 *FAE1-closest* 基因转酵母后不能够合成芥酸;高芥酸植物抱子甘蓝与其他高芥酸植物聚在分支 I 中,其 *FAE1-closest* 基因转酵母后同样不能够合成芥酸。说明可能只有部分十字花科植物的 *FAE1-closest* 基因与芥酸合成相关。

在 *KCS* 基因家族中, *FAE1-closest* 基因与 *FAE1* 基因同源性最高。研究表明:不同十字花科植物来源的 *FAE1* 基因在芥酸合成能力上也存在差异。如低芥酸植物新疆白芥 [*Rhaphospermum arvense* (Linn.) Andr. ex Besser] 与高芥酸植物欧洲油菜处于同一分支,二者 *FAE1* 基因转酵母后都能够合成芥酸^[1];低芥酸植物芥 [*Capsella bursa-pastoris* (Linn.) Medic.] 的 *FAE1* 基因转化酵母后可使酵母中的芥酸显著积累(芥酸含量为 4.63%),而龙骨芥 (*Brassica carinata* A. Braun)、洋基芥和野萝卜 (*Raphanus raphanistrum* Linn.) 等高芥酸植物中的 *FAE1* 基因转酵母后,酵母中芥酸含量仅为 0.27%~2.50%^[16]。因此,推测不同十字花科植物中的 *FAE1-closest* 基因在芥酸合成过程中发挥作用的程度也不同。此外,脂肪酸含量是多

基因控制的数量性状^[17-18],这也间接说明了银扇草和抱子甘蓝中的 *FAE1-closest* 基因不是芥酸合成过程中的主效基因,有可能主要起辅助作用。

3.2 氨基酸活性位点改变对基因功能的影响

很多研究表明,氨基酸活性位点的改变可以影响基因功能的发挥,如十字花科植物甘蓝型油菜高芥酸品种‘Askari’ *FAE1* 蛋白的第 282 位氨基酸为丝氨酸,低芥酸品种‘Drakkar’的为苯丙氨酸^[19-20];水稻 (*Oryza sativa* Linn.) *Pi-ta* 基因编码的 NBS-LRR 类蛋白,其第 918 位氨基酸由丙氨酸突变为丝氨酸时会导致 *Pi-ta* 基因功能的丧失,从而导致水稻感染稻瘟病^[21];拟南芥与根毛发育相关的 *AtGDPD-Like3* 蛋白第 538 位氨基酸是丝氨酸,将该位点的丝氨酸替换成丙氨酸以后, *AtGDPD-Like3* 蛋白功能缺失,说明第 538 位的丝氨酸是 *AtGDPD-Like3* 蛋白功能发挥的关键位点^[22]。相反的是,在其他研究中,将低芥酸甘蓝型油菜中 *FAE1* 蛋白第 282 位的苯丙氨酸替换成丝氨酸后, *KCS* 蛋白活性恢复;但是将丝氨酸替换成中性氨基酸,该蛋白活性仍可保持,而且替换成半胱氨酸还可以使 *FAE1* 蛋白的活性提高,表明 *FAE1* 蛋白第 282 位丝氨酸并不是其活性所必需的位点^[23-24]。说明氨基酸位点的改变对基因功能的影响不同。本研究中,十字花科高芥酸植物 *FAE1-closest* 蛋白第 320 位氨基酸为赖氨酸,低芥酸植物的则为苏氨酸,该位点是否是 *FAE1-closest* 蛋白发挥功能的关键位点,还需要进一步在植物体内进行功能验证后

确定。

综上所述,低芥酸植物来源的 *FAEI-closest* 基因均不能合成芥酸,部分高芥酸植物来源的 *FAEI-closest* 基因能合成芥酸,说明只有部分十字花科植物的 *FAEI-closest* 基因与芥酸合成相关,*FAEI-closest* 基因是否为芥酸合成过程中的主效基因,有待进一步验证。

参考文献:

- [1] 武玉花, 吴刚, 肖玲, 等. 十字花科植物中低芥酸野生种的发掘和 *FAEI* 基因的功能验证[J]. 中国农业科学, 2009, 42(11): 3819-3827.
- [2] LASSNER M W, LARDIZABAL K, METZ J G. A jojoba β -ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants[J]. The Plant Cell, 1996, 8: 281-292.
- [3] MILLAR A A, KUNST L. Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme[J]. The Plant Journal, 1997, 12: 121-131.
- [4] TRENKAMP S, MARTIN W, TIETJEN K. Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(32): 11903-11908.
- [5] YEPHREMOV A, WISMAN E, HUIJSER P, et al. Characterization of the *FIDDLEHEAD* gene of *Arabidopsis* reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis[J]. The Plant Cell, 1999, 11: 2187-2201.
- [6] PRUITT R E, VIELLE-CALZADA J-P, PLOENSE S E, et al. *FIDDLEHEAD*, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(3): 1311-1316.
- [7] FIEBIG A, MAYFIELD J A, MILEY N L, et al. Alterations in *CER6*, a gene identical to *CUT1*, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems[J]. The Plant Cell, 2000, 12(10): 2001-2008.
- [8] GRAY J E, HOLROYD G H, VAN DER LEE F M, et al. The *HIC* signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development[J]. Nature, 2000, 408: 713-716.
- [9] LEMIEUX B, MIQUEL M, SOMERVILLE C, et al. Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1990, 80: 234-240.
- [10] KUNST L, TAYLOR D C, UNDERHILL E W. Fatty acid elongation in developing seed of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1992, 30(4): 425-434.
- [11] JAMES D W, Jr., LIM E, KELLER J, et al. Directed tagging of the *Arabidopsis FATTY ACID ELONGATION1 (FAEI)* gene with the maize transposon *Activator* [J]. The Plant Cell, 1995, 7: 309-319.
- [12] GUO H S, ZHANG Y M, SUN X Q, et al. Evolution of the KCS gene family in plants: the history of gene duplication, sub/neofunctionalization and redundancy [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2016, 291: 739-752.
- [13] 孙小芹, 庞慧, 郭建林, 等. 十字花科 58 属 94 种野生植物种子脂肪酸组分分析[J]. 林产化学与工业, 2011, 31(6): 46-54.
- [14] PATERSON A H, BRUBAKER C L, WENDEL J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2): 122-127.
- [15] MIETKIEWSKA E, GIBLIN E M, WANG S, et al. Seed-specific heterologous expression of a nasturtium *FAE* gene in *Arabidopsis* results in a dramatic increase in the proportion of erucic acid [J]. Plant Physiology, 2004, 136: 2665-2675.
- [16] 庞慧, 李莹, 李密密, 等. 十字花科植物 *FAEI* 基因的克隆与功能验证[J]. 植物资源与环境学报, 2013, 22(1): 8-13.
- [17] WANG M L, KHERA P, PANDEY M K, et al. Genetic mapping of QTLs controlling fatty acids provided insights into the genetic control of fatty acid synthesis pathway in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. PLoS ONE, 2015, 10: e0119454.
- [18] CHEN F, ZHANG W, YU K, et al. Unconditional and conditional QTL analyses of seed fatty acid composition in *Brassica napus* L. [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18: 49.
- [19] HAN J, LÜEHS W, SONNTAG K, et al. Functional characterization of β -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 46: 229-239.
- [20] WANG B, WU Z, LI Z, et al. Dissection of the genetic architecture of three seed-quality traits and consequences for breeding in *Brassica napus* [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 16: 1336-1348.
- [21] BRYAN G T, WU K-S, FARRALL L, et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta* [J]. The Plant Cell, 2000, 12: 2033-2045.
- [22] 王爽, 程玉祥, 夏德安. 拟南芥根毛功能基因 *AtGDPD-Like3* 关键氨基酸位点鉴定[J]. 植物研究, 2020, 40(1): 79-84.
- [23] KATAVIC V, MIETKIEWSKA E, BARTON D L, et al. Restoring enzyme activity in nonfunctional low erucic acid *Brassica napus* fatty acid elongase 1 by a single amino acid substitution [J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269: 5625-5631.
- [24] KATAVIC V, BARTON D L, GIBLIN E M, et al. Gaining insight into the role of serine 282 in *B. napus FAEI* condensing enzyme [J]. FEBS Letters, 2004, 562: 118-124.

(责任编辑: 郭严冬)