植物资源与环境学报，2020，**29**(5)：1-8
Journal of Plant Resources and Environment

浙江红山茶 *CcFAD2* 基因克隆及其在籽仁发育中的表达分析

王仲伟[1,2]，王　波[1]，董　乐[3]，徐立安[3]，汤诗杰[2]，温　强[1,①]

〔1. 江西省林业科学院 植物生物技术重点实验室，江西 南昌 330032；
2. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园)，江苏 南京 210014；3. 南京林业大学林学院，江苏 南京 210037〕

摘要：基于浙江红山茶(*Camellia chekiangoleosa* Hu)转录组数据，克隆得到浙江红山茶 *CcFAD2* 基因。*CcFAD2* 基因全长 1 482 bp，开放阅读框长度为 1 149 bp，编码 383 个氨基酸。CcFAD2 蛋白的理论相对分子质量为 44 240，理论等电点为 pI 8.43，具有 4 个跨膜结构域，无信号肽，亚细胞定位于内质网膜。CcFAD2 蛋白二级结构包含 44.39%的 α 螺旋、11.49%的延伸链、3.92%的 β 折叠和 40.21%的无规卷曲。*CcFAD2* 基因编码的氨基酸序列具有 3 个保守的组氨酸簇，分别为 HECGHH、HRRHH 和 HVAHH。同源性比对和系统进化树分析结果显示：浙江红山茶 CcFAD2 蛋白与其他油料植物 FAD2 蛋白存在高度的保守性，浙江红山茶与油茶(*Camellia oleifera* Abel.)先聚为一亚组，再与油橄榄(*Olea europaea* Linn.)聚为一组，明显区别于草本油料植物。实时荧光定量 PCR 结果显示：*CcFAD2* 基因在整个籽仁发育过程均有表达，其中 7 月 14 日(籽仁形成初期)的相对表达量显著高于其他时期。随着浙江红山茶籽仁的发育，籽仁中油酸相对含量在籽仁形成初期最低，之后维持在较高的水平；而亚油酸相对含量在籽仁形成初期最高，之后维持在较低的水平。上述研究结果显示：浙江红山茶籽仁发育过程中，*CcFAD2* 基因相对表达量与亚油酸相对含量的变化趋势一致，推测该基因在浙江红山茶籽仁发育过程中具有调控功能。

关键词：浙江红山茶；*FAD2* 基因；籽仁发育；基因表达；脂肪酸含量

中图分类号：Q943.2；S565.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674-7895(2020)05-0001-08

DOI：10.3969/j.issn.1674-7895.2020.05.01

Cloning of *CcFAD2* gene from *Camellia chekiangoleosa* and analysis on its expression during kernel development

WANG Zhongwei[1,2], WANG Bo[1], DONG Le[3], XU Li'an[3], TANG Shijie[2], WEN Qiang[1,①] (1. Key Laboratory of Plant Biotechnology, Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330032, China; 2. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 3. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, **29**(5): 1-8

Abstract: *CcFAD2* gene from *Camellia chekiangoleosa* Hu was cloned based on its transcriptome data. The full-length of *CcFAD2* gene is 1 482 bp, and the length of open reading frame is 1 149 bp, which encodes 383 amino acids. The theoretical relative molecular mass of CcFAD2 protein is 44 240 and its theoretical isoelectric point is pI 8.43. It has 4 transmembrane domains and no signal peptide, and its subcellular localization is in the endoplasmic reticulum membrane. The secondary structure of CcFAD2 protein includes 44.39% of α-helix, 11.49% of extended strand, 3.92% of β-turn, and 40.21% of random coil. The amino acid sequence encoded by *CcFAD2* gene has 3 conservative histidine clusters, which are HECGHH, HRRHH, and HVAHH, respectively. The homology alignment and phylogenetic tree analysis results show that CcFAD2 protein from *C. chekiangoleosa* is highly conserved with FAD2

收稿日期：2020-01-13
基金项目：国家自然科学基金资助项目(31860179)；江西省重点研发计划项目(2016IBBF60122；20201BBF61003)；江西省林业科学院省部级平台开放项目(2019542001)
作者简介：王仲伟(1986—)，男，江苏泰州人，博士，助理研究员，主要从事木本油料遗传育种方面的研究。
①通信作者 E-mail：jxwenqiang@aliyun.com

proteins from other oil plants, and *C. chekiangoleosa* and *Camellia oleifera* Abel. are clustered into one subgroup first, and then clustered into one group with *Olea europaea* Linn., which is evidently different from herbaceous oil plants. The real-time fluorescence quantitative PCR result shows that *CcFAD2* gene is expressed throughout the development process of kernel, in which, its relative expression is significantly higher in July 14 (early development stage of kernel) than that in other stages. With the development of *C. chekiangoleosa* kernel, relative content of oleic acid in kernel is the lowest in early development stage of kernel and maintains at a relatively high level later, while relative content of linoleic acid is the highest in early development stage of kernel and maintains at a relatively low level later. It is suggested that during the development process of *C. chekiangoleosa* kernel, the variation tendency of relative expression of *CcFAD2* gene is consistent with that of relative content of linoleic acid, indicating that this gene may have a regulatory function in the development process of *C. chekiangoleosa* kernel.

Key words: *Camellia chekiangoleosa* Hu; *FAD2* gene; kernel development; gene expression; fatty acid content

浙江红山茶(*Camellia chekiangoleosa* Hu)隶属于山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia* Linn.)红山茶组〔Sect. *Camellia* (Linn.) Dyer〕,又名浙江红花油茶,自然分布于江西东部至西部、浙江南部、福建北部和湖南东部海拔600~1 300 m的山地[1]。浙江红山茶的种植面积和年产量在具有油用价值的山茶属种类中居第4位[2],属高油酸型山茶属种类[3],其籽油率及油质普遍高于栽培面积最广的油茶(*Camellia oleifera* Abel.)[4],且其油脂的理化指标和主要营养成分的综合评分与南山茶(*Camellia semiserrata* Chi,又名广宁红花油茶)和滇山茶(*Camellia reticulata* Lindl.,又名腾冲红花油茶)相比也较高,分别为0.892和1.000[5]。植物种子的脂肪酸组成决定油的品质和用途[6]。茶油中不饱和脂肪酸主要包括油酸和亚油酸等,具有降低胆固醇和血脂、改善血液流变性及预防冠心病等功能[7]。油酸是单不饱和脂肪酸,其氧化稳定性高于多不饱和脂肪酸亚油酸,且亚油酸含量高会降低茶油的贮藏稳定性。近年来,如何提高浙江红山茶的油酸含量成为品种选育的一个重要方向。

FAD(fatty acid desaturase)基因是重要的脂肪酸脱氢酶基因,按反应底物和催化产物可分为催化单不饱和脂肪酸向双不饱和脂肪酸转化的ω-6型(*FAD2*和*FAD6*)和催化三不饱和脂肪酸合成的ω-3型(*FAD3*、*FAD7*和*FAD8*)2大类。Δ12-脂肪酸脱氢酶FAD2催化油酸脱氢形成亚油酸[8],而FAD6是其质体型同工酶[9]。Byfield等[10]研究环境温度对大豆〔*Glycine max* (Linn.) Merr.〕不同品种种子发育过程中脂肪酸变化的影响,结果显示:环境温度差异可造成大豆*FAD2-1*基因表达存在差异,从而调节油酸与亚油酸含量的变化,其中,低温下*FAD2*基因的mRNA水平显著升高,且与油酸含量呈负相关。Chen等[11]研究*FAD2*基因表达对欧洲油菜(*Brassica napus* Linn.) W-4株系脂肪酸及品质的影响,发现*FAD2*基因表达水平显著影响种子中脂肪酸的合成和积累,该基因表达下调时种子中油酸含量明显升高,而亚油酸含量显著降低。这些研究结果表明通过诱导*FAD2*基因表达可引起油料植物中油酸与亚油酸含量的变化,为浙江红山茶*FAD2*基因的功能研究提供了借鉴。

浙江红山茶作为典型的高油酸型油茶树种,3月开花,9月果熟[12]。目前,已有研究人员从同属植物油茶中克隆得到2个*FAD2*家族成员(登录号分别为KJ995981和JQ739518)[13-14],林萍等[15]随后对其进行了序列比较和表达模式分析,并通过表达载体的构建初步分析了其功能。对浙江红山茶*FAD2*基因功能进行深入研究不仅可为今后定向调控不饱和脂肪酸的含量和组分奠定基础,还可为该树种油质改良提供技术支持。鉴于此,本研究基于转录组数据[16]克隆得到了浙江红山茶*FAD2*基因,并进行生物信息学分析,通过分析浙江红山茶籽仁中油酸与亚油酸相对含量的变化规律及该基因在籽仁发育不同阶段的表达模式,为进一步阐明浙江红山茶籽仁中*FAD2*基因对油脂成分形成的影响提供科学依据,并为通过分子手段选育高油酸含量浙江红山茶品种奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试浙江红山茶种植于江西省林木育种中心山茶属种质基因库(东经115°39′36″、北纬28°54′36″,

平均海拔 30 m)，选择生长健壮且无病虫害的同龄成年植株，分别于 7 月 14 日(籽仁形成初期)、7 月 29 日(籽仁快速生长期)、8 月 11 日(籽仁快速生长期)、8 月 25 日(籽仁内含物充实转化期)、9 月 9 日(籽仁内含物充实转化期)和 9 月 23 日(籽仁脱水成熟期)进行取样，每次选择 3 株，每株取 3 个果实，鲜果采摘后立即去壳取出籽仁，置于液氮中冷冻带回，然后置于-80 ℃冰箱中保存、备用。

1.2　方法

1.2.1　总 RNA 提取及反转录　称取浙江红山茶籽仁发育过程中不同时间相同质量的籽仁，液氮速冻研磨成粉末后，称取 0.3 g，采用改良的 CTAB 法[17]提取总 RNA。总 RNA 中的基因组 DNA 污染利用 DNase Ⅰ〔宝生物工程(大连)有限公司〕去除，采用质量体积分数 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量，剩余的置于-80 ℃冰箱保存、备用。利用购自宝生物工程(大连)有限公司的 3′-Full RACE Core Set Ver.2.0 和 5′-Full RACE Kit 合成 cDNA 第 1 链。

1.2.2　基因全长的克隆与序列分析　根据转录组测序获得的浙江红山茶 *FAD2* 基因的 EST 序列，设计特异性引物进行巢式 PCR(nested PCR)。反应体系总体积 50.0 μL，包含 10×*Ex Taq* Buffer Ⅱ(Mg^{2+} Free) 5.0 μL、25 mmol · L^{-1} $MgCl_2$ 4.0 μL、10 mmol · L^{-1} *d*NTP Mixture(each) 4.0 μL、*Ex Taq* DNA Polymerase 0.3 μL、正向和反向引物各 2.0 μL、模板 cDNA 2.0 μL 及 ddH_2O 30.7 μL。扩增程序：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s、58 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 2 min，共 32 个循环；72 ℃延伸 10 min。使用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP209)〔天根(北京)生化科技有限公司〕回收目的条带，与 pMD19-T 载体〔宝生物工程(大连)有限公司〕连接，转化大肠杆菌 Top10 菌株，选取阳性克隆送南京金斯瑞生物科技公司测序。

使用 BioEdit 软件预测浙江红山茶 *FAD2* 基因全长的开放阅读框及编码氨基酸。使用 NCBI 数据库中的 BLASTn(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行序列相似性比对。使用 ProtParam(http://web.expasy.org/protparam/)分析蛋白质的理化性质。使用 Pfam(http://pfam.xfam.org/)数据库推测蛋白质的结构域。使用 SinalP(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)和 TMHMM(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)分别预测蛋白质的信号肽及跨膜区。使用 SOPMA 工具(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)预测蛋白质的二级结构。使用 I-TASSER(http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER)预测蛋白质的三级结构。使用 ClustalX2 进行氨基酸序列的同源性比对。使用 MEGA 5.0 中的邻接法构建系统进化树。使用 Wolf PSORT(https://wolfpsort.hgc.jp/)预测亚细胞定位。

1.2.3　基因表达分析　采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析 *FAD2* 基因在浙江红山茶籽仁发育 6 个阶段中的表达差异。qRT-PCR 采用 SYBR® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ〔宝生物工程(大连)有限公司〕，在 ABI 7500 Real-time PCR System(美国 ABI 公司)上完成，内参基因为 *α-tubulin* 基因，每个样品 3 次重复。qRT-PCR 引物见表 1。反应体系总体积 20.0 μL，包含 SYBR® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ 10.0 μL、正向和反向引物各 0.4 μL、模板 cDNA 2.0 μL、ROX Reference Dye Ⅱ(50×) 0.4 μL 及 ddH_2O 6.8 μL。扩增程序：94 ℃预变性 30 s；94 ℃变性 5 s、60 ℃退火 34 s、95 ℃延伸 15 s，共 40 个循环。

表 1　用于实时荧光定量 PCR 的引物
Table 1　Primers used for real-time fluorescence quantitative PCR

基因 Gene	正向引物序列(5′→3′) Sequence of forward primer (5′→3′)	反向引物序列(5′→3′) Sequence of reverse primer (5′→3′)
α-tubulin	GTTCCTGGTGGTGATCTT	CTCCTTCCATACCCT
FAD2	TGACACAGTCGGTCTCGT	GAACATTAGGTATAGCGG

1.2.4　籽油提取及主要不饱和脂肪酸含量测定　参照 GB/T 14488.1—2008 的方法，采用索氏提取法提取浙江红山茶籽仁的籽油并测定脂肪酸总量，参照 GB 5009.168—2016 的方法对籽油样品进行甲酯化，参考 Zhong 等[18]的方法，使用 GC2010-Plus 气相色谱仪(日本岛津公司)进行检测。色谱条件：Elite-WAX 色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm，德国 PerkinElmer 公司)，进样口温度 220 ℃；FID 检测器，检测器温度 280 ℃，氮气流速 1.0 mL · min^{-1}，分流比 30∶1。升温程序：初始温度 150 ℃，保持 2 min；以 10 ℃ · min^{-1} 升温至 260 ℃，保持 10 min。通过与脂肪酸甲酯混合标准品(10 mg · mL^{-1}，CDAB-O83811AMP，上海安谱实验科技股份有限公司)对比鉴别油酸和亚油酸。采用峰面积归一化法[19]计算油酸和亚油酸的相对含量。每组实验 3 次重复，每个重

复测定2次,结果取平均值。

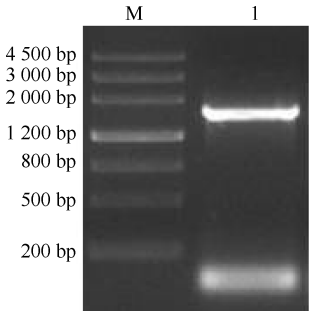
1.3 数据处理

采用EXCEL 2007和SPSS 17.0软件进行数据分析,采用Duncan's新复极差法进行多重比较。

2 结果和分析

2.1 基因克隆及序列分析

根据浙江红山茶全长转录组数据库中注释为*FAD2*基因的部分序列信息设计引物,克隆得到的*CcFAD2*基因(登录号KC342951)全长1 482 bp(图1),开放阅读框长度为1 149 bp,编码383个氨基酸,5′UTR(非翻译区)和3′UTR长度分别为141和189 bp(图2)。BLASTn比对结果显示:*CcFAD2*基因与油茶*CoFAD2*基因(登录号JQ739518)的相似性最高,达98%。*CcFAD2*基因编码的氨基酸序列在105~110、141~145和315~319位具有3个保守的组氨酸簇,分别是HECGHH、HRRHH和HVAHH。



M: DNA标记 DNA marker; 1: *CcFAD2*基因 *CcFAD2* gene.

图1 浙江红山茶*CcFAD2*基因的PCR扩增图谱

Fig. 1 PCR amplification pattern of *CcFAD2* gene from *Camellia chekiangoleosa* Hu

```
                                                GAAACTCGTACTCTCTCTCCTCAAAATCTCTATACATATAGAGAGAGAAAG
     AGAGATAGAAAGAGAGAGACAGAGAGAGAGGGGTGTAAAATCGCAGGAGGTGAAGGAACTCGAAGAACTTTTCTTTCAGGTTAGTGAACA
     ATGGGTGCAGGTGGCCGAATGTCTGTTCCTCCTGAGGGAAAGAAGTCAGACCGTGATGTCATCCGGCGAGTTCCTTACTCAAAACCTCCA
   1  M  G  A  G  G  R  M  S  V  P  P  E  G  K  K  S  D  R  D  V  I  R  R  V  P  Y  S  K  P  P
     TTCACAGTTGGCGAGATCAAGAAGGCCATACCACCCCATTGTTTTCGTCGATCTGTTCTCCACTCATTCTCCTACGTTGTTTATGACTTG
  31  F  T  V  G  E  I  K  K  A  I  P  P  H  C  F  R  R  S  V  L  H  S  F  S  Y  V  V  Y  D  L
     ATCATAGCCTTCCTGTTCTACTATCTCGCCACCAATTACATCCACCTCCTTCCTCAGCCTCTCTCGTACCTTGCCTGGCTGGTTTACTGG
  61  I  I  A  F  L  F  Y  Y  L  A  T  N  Y  I  H  L  L  P  Q  P  L  S  Y  L  A  W  L  V  Y  W
     ATCTGTCAAGGTTGTGTCCTAACCGGTGTTTGGGTCGTAGCCCATGAGTGTGGCCATCATGCCTTCAGTGACTACCAATGGCTTGATGAC
  91  I  C  Q  G  C  V  L  T  G  V  W  V  V  A  H  E  C  G  H  H  A  F  S  D  Y  Q  W  L  D  D
     ACAGTCGGTCTTGTCCTTCACTCTGCTCTCCTTGTTCCTTACTTCTCTTGGAAATATAGCCATCGCCGCCACCATTCCAACACGGCTTCT
 121  T  V  G  L  V  L  H  S  A  L  L  V  P  Y  F  S  W  K  Y  S  H  R  R  H  H  S  N  T  A  S
     CTAGAGCGTGATGAGGTGTTTGTTCCCAAACTTAAGTCCAGCATTGGATGGTATTCCAAATATCTTAACAACCCACCTGGCCGAATTCTC
 151  L  E  R  D  E  V  F  V  P  K  L  K  S  S  I  G  W  Y  S  K  Y  L  N  N  P  P  G  R  I  L
     ACAGTCATCATCACACTGACTCTAGGCTGGCCGCTATACCTAATGTTCAACGTTTCGGGCCGACATTATGATCGTTTTGCATGCCACTAT
 181  T  V  I  I  T  L  T  L  G  W  P  L  Y  L  M  F  N  V  S  G  R  H  Y  D  R  F  A  C  H  Y
     GACCCTTATGGCCCTATTTACTCAGATCGCGAGCGCCTTCAAATCTACCTCTCTGATGCTGGTGTTCTTGGAGTTAGTTATGTGCTTTAT
 211  D  P  Y  G  P  I  Y  S  D  R  E  R  L  Q  I  Y  L  S  D  A  G  V  L  G  V  S  Y  V  L  Y
     CGGTTTGCACTAGTAAAAGGACTAGCTTGGGTACTCTGTCTTTATGGCGGTCCTCTTCTCATCGTGAATGGGTTTCTTGTGCTGATCACG
 241  R  F  A  L  V  K  G  L  A  W  V  L  C  L  Y  G  G  P  L  L  I  V  N  G  F  L  V  L  I  T
     TGGTTGCAGCACACTCACCCTGCATTGCCACACTACGATTCATCTGAGTGGGACTGGTTGAGAGGAGCTCTAGCTACATGTGACCGAGAT
 271  W  L  Q  H  T  H  P  A  L  P  H  Y  D  S  S  E  W  D  W  L  R  G  A  L  A  T  C  D  R  D
     TATGGAATTCTAAACAAGGTATTCCATAATATCACTGATACTCATGTAGCCCACCATTTGTTCTCAACAATGCCACATTACCATGCAATG
 301  Y  G  I  L  N  K  V  F  H  N  I  T  D  T  H  V  A  H  H  L  F  S  T  M  P  H  Y  H  A  M
     GAAGCCACAAAAGCAATAAAGCCGATTTTGGGAGATTATTATCAGTGTGATGGGACTCCGGTTTTGAGGGCAATATGGAGGGAAGCAAAG
 331  E  A  T  K  A  I  K  P  I  L  G  D  Y  Y  Q  C  D  G  T  P  V  L  R  A  I  W  R  E  A  K
     GAGTGCATTTATGTTGAGAATGACGAAAGTGACCAAACCAAAGGTGTTTTCTGGTACAAAAACAAGCTTTGAATGGCGGAAGAAATTGCA
 361  E  C  I  Y  V  E  N  D  E  S  D  Q  T  K  G  V  F  W  Y  K  N  K  L
     GGCGGGGAAGTTTTGGTTTCTTGTTAGGGACTAAACTCCCATTTCCTGGTAAAAGTTAGGTTGTTTTTGTTGTTTTTGTACTGAATCTCT
     AATTTTAGATTAATTATTTTTGTTGTTCACTACATGCTTGGAACATTGCAAACTGGTGAAGTTTGAGAGAAAAAAAAAAAA
```

下划线分别示起始密码子ATG和终止密码子TGA The underlines show initiation codon ATG and termination codon TGA, respectively; 方框示保守的组氨酸簇 The boxes show conservative histidine clusters.

图2 浙江红山茶*CcFAD2*基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *CcFAD2* gene from *Camellia chekiangoleosa* Hu and its encoding amino acid sequence

2.2 蛋白质结构分析及亚细胞定位预测

浙江红山茶CcFAD2蛋白的理论相对分子质量为44 240,理论等电点为pI 8.43,无信号肽,具有4个跨膜结构域(图3),分别位于55~77、82~104、178~200和250~272位。二级结构预测结果显示:CcFAD2蛋白包含44.39%的α螺旋、11.49%的延伸链、3.92%的β折叠和40.21%的无规卷曲。三级结构预测结果(图4)显示:CcFAD2蛋白的C值为-2.19(C值在-5.00~2.00之间,C值越大,预测结果越可靠),具有32个配体结合位点。亚细胞定位预测结果显示:CcFAD2蛋白定位于内质网膜。

2.3 同源性比对及系统进化树分析

对浙江红山茶CcFAD2蛋白与其他8种油料植物FAD2蛋白的氨基酸序列进行同源性比对,结果

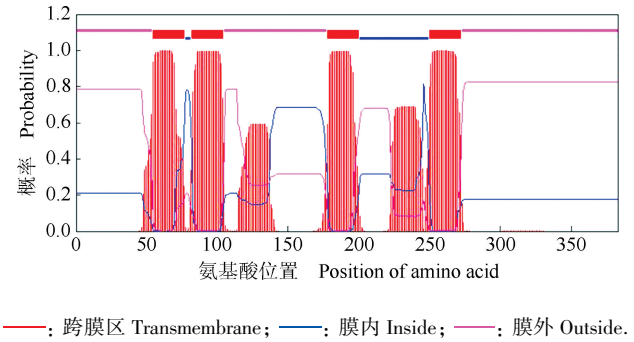


图 3　浙江红山茶 *CcFAD2* 基因编码氨基酸序列的跨膜结构域
Fig. 3　Transmembrane domain of amino acid sequence encoded by *CcFAD2* gene from *Camellia chekiangoleosa* Hu

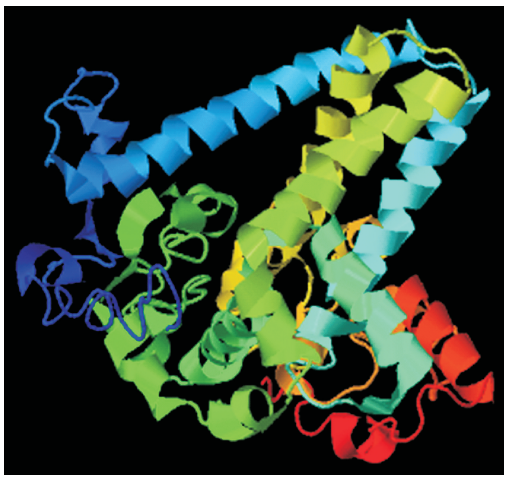
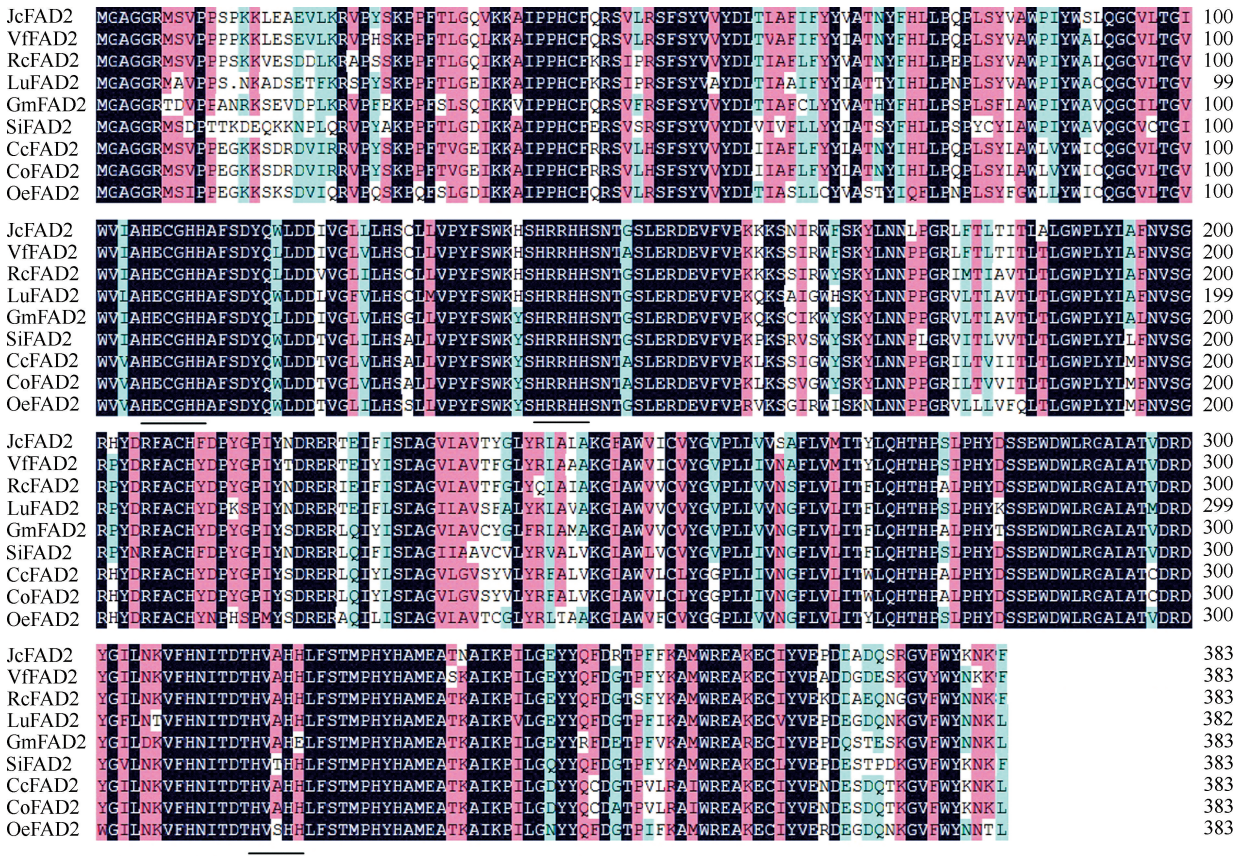


图 4　浙江红山茶 CcFAD2 蛋白的三级结构
Fig. 4　Tertiary structure of CcFAD2 protein from *Camellia chekiangoleosa* Hu

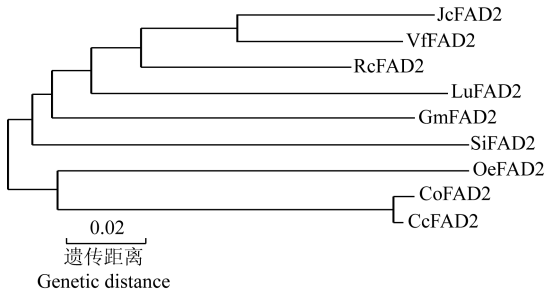
(图 5)显示：浙江红山茶 CcFAD2 蛋白与其他油料植物 FAD2 蛋白的氨基酸序列存在高度的保守性，均存在3 个保守的组氨酸簇。根据比对结果，排除缺口



Jc：麻疯树 *Jatropha curcas* Linn.；Vf：油桐 *Vernicia fordii*（Hemsl.）Airy Shaw；Rc：蓖麻 *Ricinus communis* Linn.；Lu：亚麻 *Linum usitatissimum* Linn.；Gm：大豆 *Glycine max*（Linn.）Merr.；Si：芝麻 *Sesamum indicum* Linn.；Cc：浙江红山茶 *Camellia chekiangoleosa* Hu；Co：油茶 *Camellia oleifera* Abel.；Oe：油橄榄 *Olea europaea* Linn. 下划线示保守的组氨酸簇 The underlines show conservative histidine clusters.

图 5　基于氨基酸序列浙江红山茶 CcFAD2 蛋白与其他 8 种油料植物 FAD2 蛋白的同源性比对
Fig. 5　Homologous alignment on CcFAD2 protein from *Camellia chekiangoleosa* Hu with FAD2 proteins from other eight oil plants based on amino acid sequence

位置,构建浙江红山茶 CcFAD2 蛋白与其他 8 种油料植物 FAD2 蛋白的系统进化树(图 6),结果显示:浙江红山茶 CcFAD2 蛋白与油茶 CoFAD2 蛋白(登录号 AFK31315)先聚为一亚组,再与油橄榄(*Olea europaea* Linn.)OeFAD2 蛋白(登录号 AAW63041)聚为一组,说明三者的遗传关系较近;蓖麻(*Ricinus communis* Linn.)RcFAD2 蛋白(登录号 NP001310648)、亚麻(*Linum usitatissimum* Linn.)LuFAD2 蛋白(登录号 AGJ01133)、大豆 GmFAD2 蛋白(登录号 BAD89862)和芝麻(*Sesamum indicum* Linn.)SiFAD2 蛋白(登录号 XP011080227)4 种草本油料植物与麻疯树(*Jatropha curcas* Linn.)JcFAD2 蛋白(登录号 AEW43690)和油桐〔*Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy Shaw〕VfFAD2 蛋白(登录号 AEE69021)聚为另一组。



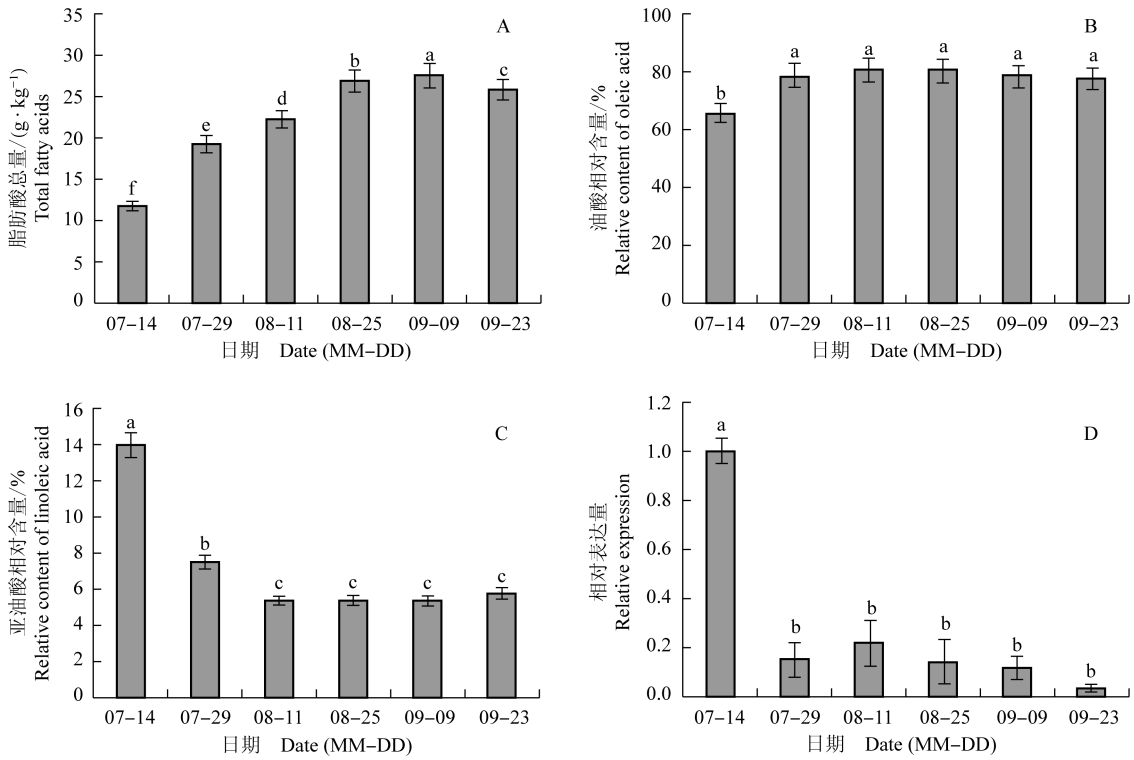
Jc:麻疯树 *Jatropha curcas* Linn.;Vf:油桐 *Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy Shaw;Rc:蓖麻 *Ricinus communis* Linn.;Lu:亚麻 *Linum usitatissimum* Linn.;Gm:大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr.;Si:芝麻 *Sesamum indicum* Linn.;Cc:浙江红山茶 *Camellia chekiangoleosa* Hu;Co:油茶 *Camellia oleifera* Abel.;Oe:油橄榄 *Olea europaea* Linn.

图 6 基于氨基酸序列浙江红山茶 CcFAD2 蛋白与其他 8 种油料植物 FAD2 蛋白的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of CcFAD2 protein from *Camellia chekiangoleosa* Hu with FAD2 proteins from other eight oil plants based on amino acid sequence

2.4 浙江红山茶籽仁中脂肪酸含量及 *CcFAD2* 基因表达的分析

浙江红山茶籽仁发育过程中脂肪酸含量及 *CcFAD2* 基因表达见图 7。结果显示:随着浙江红山茶籽仁的发育,脂肪酸总量先稳步上升,成熟后略有下降。在籽仁发育过程中,油酸和亚油酸的相对含量差异明显。7 月 14 日(籽仁形成初期)油酸相对含量最低,7 月 29 日(籽仁快速生长期)油酸相对含量升



同一指标中不同小写字母表示在不同时间差异显著($P<0.05$)Different lowercases of the same index indicate the significant ($P<0.05$) difference among different times.

图 7 浙江红山茶籽仁发育过程中脂肪酸含量及 *CcFAD2* 基因表达分析

Fig. 7 Analyses on fatty acid content and expression of *CcFAD2* gene during kernel development process of *Camellia chekiangoleosa* Hu

高，之后一直处于较高的水平。亚油酸相对含量在籽仁形成初期最高，达到 13.8%，之后显著降低，且趋于稳定。

实时荧光定量 PCR 结果显示：在浙江红山茶籽仁发育过程中，*CcFAD2* 基因均有表达。*CcFAD2* 基因的相对表达量在籽仁形成初期最高，显著高于其他时期，之后迅速降低，相对表达量维持在较低水平且差异不显著。

3　讨论和结论

浙江红山茶是中国南方地区集观赏和油用于一身的重要木本油料树种。茶油中含有多种脂肪酸，主要包括棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸等，其中，油酸和亚油酸占 80% 以上[3]，食用保健价值较高。油酸较亚油酸少 1 个不饱和键，不易氧化变质，且在烹饪中产生的油烟少，因此，提高油酸含量、降低亚油酸含量是浙江红山茶品质改良和良种选育的热点之一。

已有研究结果显示：*FAD2* 基因是控制油酸含量的主要基因[20-21]，且在高等植物中常以多拷贝的形式存在，构成了 *FAD2* 基因家族[22-23]。本研究克隆得到浙江红山茶 *CcFAD2* 基因，该基因与油茶 *CoFAD2* 基因（登录号 JQ739518）[14]的相似性最高（98%），符合同一属的分类定位，但与油茶 *FAD2* 基因家族另一成员（登录号 KJ995981）[13]的差异较大。林萍等[15]认为，油茶 2 个 *FAD2* 基因均具有 1 个脂肪酸去饱和酶结构域，属于脂酰-脂去饱和酶基因家族，二者编码的蛋白质均为跨膜蛋白，本研究中浙江红山茶 *CcFAD2* 基因与之结构类似，符合 *FAD2* 基因的典型特征[8,24-25]，也验证了本研究中 *CcFAD2* 序列的正确性。

浙江红山茶 CcFAD2 蛋白与其他 8 种油料植物 FAD2 蛋白的系统进化树分析结果显示：FAD2 蛋白的氨基酸序列在不同植物中较保守，浙江红山茶与同为木本油料植物的油茶和油橄榄聚为一组，而与草本油料植物间区别相对较大。浙江红山茶和油茶同属于山茶科山茶属，茶油组分相似，含量各异[4]，亲缘关系近，但与不同科属的油橄榄也聚为一组，推测前两者与油橄榄的 OeFAD2 蛋白在进化上分歧时间较短，可能存在平行进化的关系，最终形成相似的油脂品质[26]。亚细胞定位预测结果显示：CcFAD2 蛋白定位于内质网膜。油茶中 CoFAD2-1 蛋白也主要定位在内质网膜[27]，与二者序列相近、结构类似、功能一致相符。

多种植物种子脂肪酸累积模式显示：脂肪酸含量总体呈先上升后小幅度下降的变化趋势，推测随着种子成熟，种子含水量不断降低，脂肪酸合成逐渐停止，而种子内含物中其他成分（如蛋白质和部分单糖）的合成需要消耗部分油脂，最终导致种子含油量下降[28-30]。生产上可以根据该趋势确定采种时间，降低脂肪酸的损耗，提高种子出油率。本研究中，浙江红山茶籽仁中的脂肪酸总量随着籽仁发育进程逐步增加，成熟后略有下降，亚油酸相对含量在籽仁形成初期较高到籽仁趋于成熟时下降且趋于稳定，但作为主要成分的油酸则呈现先升高然后略有降低的变化趋势，该结果可以为确定浙江红山茶合适的采种时间提供依据。综合 *CcFAD2* 基因的相对表达量和脂肪酸含量，*CcFAD2* 基因的表达模式与亚油酸相对含量的变化规律基本吻合，说明浙江红山茶籽仁发育中后期油酸的合成速率远远高于油酸转化为亚油酸的速率，油茶的相关研究也得到了类似结果[31-32]，这从侧面验证了 *CcFAD2* 基因在浙江红山茶籽仁发育过程中的功能。本研究结果显示：浙江红山茶 *CcFAD2* 基因影响籽仁中油酸和亚油酸的比例，这为浙江红山茶品质改良和分子辅助育种提供了候选研究对象。此外，浙江红山茶是二倍体油茶树种，开花结实期短，脂肪酸组分优于油茶，将来可以作为油茶油脂改良基因工程育种的模式物种进一步深入研究 *CcFAD2* 基因的功能。

参考文献：

[1]　闵天禄. 山茶属山茶组植物的分类，分化和分布[J]. 云南植物研究，1998，20(2)：127-148.

[2]　庄瑞林. 中国油茶[M]. 北京：中国林业出版社，1988：112.

[3]　王开良，曹福亮，姚小华，等. 浙江红花油茶茶油中脂肪酸主要成分分析[J]. 南京林业大学学报（自然科学版），2011，35(2)：131-134.

[4]　陈　阳，杨水平，王　卫，等. 3 种油茶种仁含油率及脂肪酸组成的比较研究[J]. 西南大学学报（自然科学版），2015，37(10)：38-42.

[5]　沈　冰，吴雪辉，李媛媛，等. 三种红花茶油品质的研究[J]. 食品工业科技，2016，37(3)：97-100，104.

[6]　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.

[7]　王　苹，王春荣. 茶油对动物血脂和血小板功能的影响[J]. 营养学报，1993，15(4)：377-384.

[8] OKULEY J, LIGHTNER J, FELDMANN K, et al. Arabidopsis *FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis[J]. The Plant Cell, 1994, 6(1): 147-158.

[9] HITZ W D, CARLSON T J, RUSELL BOOTH J, Jr., et al. Cloning of a higher-plant plastid ω-6 fatty acid desaturase cDNA and its expression in a cyanobacterium[J]. Plant Physiology, 1994, 105(2): 635-641.

[10] BYFIELD G E, UPCHURCH R G. Effect of temperature on delta-9 stearoyl-ACP and microsomal omega-6 desaturase gene expression and fatty acid content in developing soybean seeds[J]. Crop Science, 2007, 47(4): 1698-1704.

[11] CHEN S, PENG Q, GAO J, et al. Fatty acid compsition and seed quality traits of the transgenic rapeseed W-4 (*Brassica napus* L.) with down-regulated expression of *fad2* gene[J]. Agricultural Science and Technology, 2015, 16(8): 1769-1774.

[12] 周文才, 肖相元, 沈敬理, 等. 浙江红花油茶种质资源述评及育种策略[J]. 南方林业科学, 2019, 47(6): 20-24.

[13] 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, 44(3): 70-75.

[14] 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.

[15] 林 萍, 周长富, 姚小华, 等. 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[J]. 林业科学研究, 2016, 29(5): 743-751.

[16] WANG Z W, JIANG C, WEN Q, et al. Deep sequencing of the *Camellia chekiangoleosa* transcriptome revealed candidate genes for anthocyanin biosynthesis[J]. Gene, 2014, 538(1): 1-7.

[17] JIANG C, WEN Q, CHEN Y, et al. Efficient extraction of RNA from various *Camellia* species rich in secondary metabolites for deep transcriptome sequencing and gene expression analysis[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(74): 16769-16773.

[18] ZHONG H, BEDGOOD D R, Jr., BISHOP A G, et al. Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils[J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 1544-1551.

[19] 张国武, 阙龙善, 赖笋芽, 等. 6 个油茶优良无性系种子脂肪酸组分与含量分析[J]. 江西科学, 2007, 25(1): 33-36.

[20] WEN S, LIU H, LI X, et al. Talen-mediated targeted mutagenesis of *fatty acid desaturase 2* (*FAD2*) in peanut (*Arachis hypogaea* L.) promotes the accumulation of oleic acid[J]. Plant Molecular Biology, 2018, 97(1): 177-185.

[21] PENG Q, HU Y, WEI R, et al. Simultaneous silencing of *FAD2* and *FAE1* genes affects both oleic acid and erucic acid contents in *Brassica napus* seeds[J]. Plant Cell Reports, 2010, 29(4): 317-325.

[22] 刘永红, 张丽静, 张洪荣, 等. Δ12-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.

[23] 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.

[24] DYER J M, MULLEN R T. Immunocytological localization of two plant fatty acid desaturases in the endoplasmic reticulum[J]. FEBS Letters, 2001, 494(1/2): 44-47.

[25] LOS D A, MURATA N. Structure and expression of fatty acid desaturases[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1394(1): 3-15.

[26] XIA E H, JIANG J J, HUANG H, et al. Transcriptome analysis of the oil-rich tea plant, *Camellia oleifera*, reveals candidate genes related to lipid metabolism[J]. PLOS ONE, 2014, 9(8): e104150.

[27] 陈潇潇, 罗红艳, 顾真琪, 等. 油茶 *CoFAD2-1* 基因的克隆、亚细胞定位及组织表达[J]. 四川农业大学学报, 2019, 37(4): 475-480.

[28] 戴晓峰. 油菜脂肪酸合成关键基因的克隆与脂肪酸积累模式研究[D]. 北京: 中国农业科学院油料作物研究所, 2006: 83.

[29] 李晓丹, 曹应龙, 胡亚平, 等. 花生种子发育过程中脂肪酸累积模式研究[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(2): 157-162.

[30] BAUD S, BOUTIN J-P, MIQUEL M, et al. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40(2): 151-160.

[31] 袁德义, 彭邵锋, 邹 锋, 等. 油茶种子脂肪酸与游离氨基酸的分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(1): 77-79.

[32] 宋志波. 油茶内参基因的筛选与油脂合成相关酶基因的表达特征分析[D]. 长沙: 中南林业科技大学林学院, 2014: 23.

(责任编辑: 张明霞)