

‘无籽’瓯柑 *CsLTP* 和 *CsLOX* 基因的克隆与表达分析

张敏¹, 刘志辉¹, 宋雪恩², 朱咪咪¹, 党婉誉¹, 颜福花³, 张迟^{1,4}

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省平湖市乍浦镇农技水利服务中心, 浙江 平湖 314200; 3. 浙江省丽水市林业科学研究院, 浙江 丽水 323000; 4. 浙江农林大学 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 采用同源序列法, 结合 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术, 克隆获得‘无籽’瓯柑 *Citrus suavisissima* ‘Seedless’ 脂转移酶基因 *CsLTP* 和脂氧合酶基因 *CsLOX* 的全长 cDNA 序列; *CsLTP* cDNA 全长 667 bp, 1 个开放阅读框, 编码 215 个氨基酸, 与脐橙 *C. sinensis*, 粗柠檬 *C. jambhiri* 的脂转移蛋白的相似性分别为 95% 和 60%; *CsLOX* cDNA 全长 2 915 bp, 1 个开放阅读框, 编码 895 个氨基酸, 与粗柠檬、美洲黑杨 *Populus deltoids* 的相似性分别为 99% 和 51%。荧光定量聚合酶链式反应(PCR)表明: *CsLTP* 和 *CsLOX* 的表达量均在‘无籽’瓯柑花粉粒形成期开始显著下降, 并显著低于普通瓯柑 *Citrus suavisissima*。‘无籽’瓯柑花粉发育过程中油脂的转运及氧化的异常, 可能成为‘无籽’瓯柑花粉败育的原因之一。图 6 参 33

关键词: 园艺学; ‘无籽’瓯柑; 花粉败育; *CsLTP*; *CsLOX*; 荧光定量 PCR

中图分类号: S603 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2014)06-0823-08

Cloning and expression analysis of *CsLTP* and *CsLOX* in seedless Ougan (*Citrus suavisissima* ‘Seedless’)

ZHANG Min¹, LIU Zhihui¹, SONG Xueen², ZHU Mimi¹, DANG Wanyu¹, YAN Fuhua³, ZHANG Chi^{1,4}

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Center of Agro-technical & Water Resources Service of Zhapu Town, Pinghu 314200, Zhejiang, China; 3. Lishui Academy of Forestry, Lishui 323000, Zhejiang, China; 4. The Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To gain new insight into the male sterile characters of seedless Ougan, homologous cloning was undertaken for clones of full length cDNAs of *CsLTP* (lipid transfer protein) and *CsLOX* (lipoxygenase) genes of seedless Ougan (*Citrus suavisissima* ‘Seedless’). Then, bioinformatic analyses were performed online to predict the characteristics of encoded proteins. The expression model of *CsLTP* and *CsLOX* with pollen development was analyzed through real time polymerase chain reaction (PCR), and statistic analysis was performed by Duncan's multiple comparison test. The cDNA of *CsLTP* was 667 bp in length encoding 215 amino acids, which was similar to LTPs of *Citrus sinensis* (95%) and *Citrus jambhiri* (60%). The cDNA of *CsLOX* was 2 915 bp in length encoding 895 amino acids, which was similar to LOXs of *C. jambhiri* (99%) and *Populus* (51%). Compared to seedy Ougan, the mRNA transcripts of *CsLTP* and *CsLOX* in seedless Ougan decreased noticeably ($P < 0.05$) after the pollen formation stage leading to aberrant lipid transportation and oxygenation in seedless

收稿日期: 2014-05-08; 修回日期: 2014-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31000897); 浙江省自然科学基金资助项目(Y3090494); 浙江农林大学科研发展基金资助项目(2007FR106)

作者简介: 张敏, 副教授, 博士, 从事经济林遗传育种研究。E-mail: mzhang@zafu.edu.cn。通信作者: 张迟, 博士, 从事园艺植物遗传育种与分子生物学研究。E-mail: zhangchi1978@zafu.edu.cn

Ougan. Thus, the turbulence of lipid metabolism was related to pollen abortion in seedless Ougan.[Ch, 6 fig. 33 ref.]

Key words: horticulture; seedless Ougan (*Citrus suavisissima* ‘Seedless’); pollen abortion; *CsLTP*; *CsLOX*; real-time PCR

瓯柑 *Citrus suavisissima* 是浙江南部地区的一个古老的地方栽培种, 具有祛热生津、清凉解毒等特殊的医药功效, 素有“端午瓯柑似羚羊”之说。‘无籽’瓯柑 *Citrus suavisissima* ‘Seedless’ 是瓯柑的无核突变体, 2004年2月通过浙江省林木良种审定委员会的良种认定并命名^[1]。前期的研究^[2-4]表明: 花粉败育是‘无籽’瓯柑无核的原因之一。植物雄性不育是指植物有性繁殖过程中不能产生正常的花药、花粉或雄配子的遗传现象。雄性不育可以分为细胞核雄性不育(NMS)及质核互作雄性不育(CMS)。关于植物 CMS 分子机制, 普遍认为与呼吸链和三磷酸腺苷(ATP)合成基因的嵌合基因以及核糖核酸(RNA)的编辑等有关^[5-7]。胡志勇等^[8]成功地从温州蜜柑 *Citrus unshui* 克隆到了3个线粒体基因 *atp6*, *cob* 和 *cox II* 的片段, 它们分别编码 F1FO-ATP 合成酶的第6亚基、细胞色素 b 的亚基和细胞色素 C 氧化酶复合体的第2亚基, 并通过实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time PCR)技术证明了这3个基因在小孢子发育后期一直到形成成熟的花粉粒的过程中线粒体基因的表达减弱, 即供给小孢子发育的能量可能在减少, 进而导致了花粉的败育, 由此推测温州蜜柑的雄性不育与呼吸作用及能量代谢的异常相关。Qiu 等^[9]在对‘无籽’椪柑 *Citrus reticulata* ‘Seedless’ 差异表达基因的分析研究中, 筛选到一些参与雄配子体发育的基因。本课题组从‘无籽’瓯柑和普通瓯柑的数字基因表达谱(digital gene expression, DGE)中筛选出2个脂类代谢相关的基因片段 *LTP*(lipid transfer proteins)和 *LOX*(lipoxygenase)(另文发表)。植物转脂蛋白(lipid transfer proteins, LTPs)是一类广泛存在于高等植物中的碱性小分子量蛋白质, 生理功能包括参与角质的形成、脂代谢、生物膜的形成、体细胞发育、花粉与雌蕊的相互作用等, 特别是在抗性信号转导和植物防御功能中的作用, 成为近年来关注的焦点^[10-11]。脂氧合酶(LOX)是一类广泛存在于动植物中的非血红素铁蛋白, 参与脂肪酸氧化途径中的 LOX 途径, 专一催化含有顺,顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸的加氧反应^[12]。为进一步明确‘无籽’瓯柑花粉败育与其脂质代谢的相关性, 本研究采用同源序列法, 结合 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术, 克隆获得‘无籽’瓯柑脂转移酶基因(*CsLTP*)和脂氧合酶基因(*CsLOX*)的全长 cDNA 序列。通过实时荧光定量 PCR(real-time PCR)技术, 对2个目标基因 mRNA 表达量在花粉发育的不同时期进行实时定量分析, 期望能够进一步解析‘无籽’瓯柑花粉败育的分子基础, 为揭示‘无籽’瓯柑无核机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自浙江省丽水市林业科学研究院百果园内的普通瓯柑和‘无籽’瓯柑。

1.2 ‘无籽’瓯柑 *CsLTP* 和 *CsLOX* 全长 cDNA 的克隆

取‘无籽’瓯柑的花蕾, 采用 Trizol Kits(Invitrogen)进行总 RNA 抽提。经 DNase I ($1 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$) (Promega)处理纯化后, 按照 SMARTTM cDNA Library Construction Kit(TaKaRa)操作, 分别反转录获得 3'-RACE 和 5'-RACE 的模板 cDNA。根据数字基因表达谱(DGE)测序分析的 BLASTn 结果, 用 Primer Premier 5.0 软件分别在2个基因内部设计基因特异引物(GSP), 并使用 3'-RACE 或 5'-RACE 的模板进行 3'-RACE 和 5'-RACE。PCR 扩增产物经分离、回收后, 连接 pMD18-T 测序载体, 转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* TG1, 调取阳性克隆, 由上海生工测序。

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件进行序列分析, 预测目标 cDNA 编码的蛋白质, 将氨基酸序列提交到美国国家生物技术信息中心(NCBI)进行 BLAST 比对, 并用 DNAMAN 和 ORF Finder 进行 ORF 分析序列的开放阅读框和保守域, 用 ClustalX 和 MEGA4^[13]软件对蛋白序列进行多重比对和系统进化分析。利用在线工具分析氨基酸序列的二级结构, 物理性质及功能域, 并对亚细胞定位进行预测。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

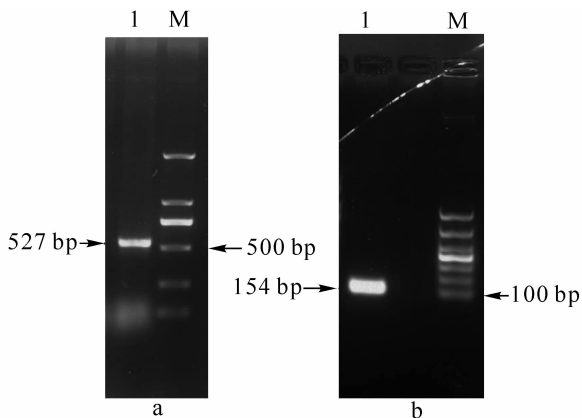
2013 年 4 月 9 日瓯柑花蕾可见时开始采集样品, 采样 1 次·d⁻¹, 根据花蕾大小差异将 ‘无籽’ 瓯柑和普通瓯柑各分为 5 个时期: I (花粉母细胞形成期)、II (四分体时期)、III (花粉粒形成期)、IV (花粉粒成熟期) 和 V (花朵开放期) 等 5 个时期的花蕾。其中, ‘无籽’ 瓯柑(N): N I, N II, N III, N IV, N V; 普通瓯柑(Y): Y I, Y II, Y III, Y IV, Y V。液氮冷冻, 于-80 °C 保存备用。

分别提取 ‘无籽’ 瓯柑和普通瓯柑各自不同时期花蕾的总 RNA, 采用 PrimerScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time, TaKaRa) 试剂盒反转录成 cDNA, 采用 CFX96 Real-Time System 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad), 反应程序为 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s; 57 °C, 30 s, 39 个循环; 65~95 °C, 隔 5 s 上升 0.5 °C 做融解曲线。重复 3 次·样品⁻¹, 取平均值。实时定量 PCR 引物分别为: *CsLTP_F* (3'-CACCATGCATCGGTTTCTT-5') 和 *CsLTP_R* (3'-AGTTTGGCGGTCAGGTGT-5'); *CsLOX_F* (3'-CTGAAATTCGAACTGTGGGA-5') 和 *CsLOX_R* (3'-CAATGTTGCATCTTGCAGTG-5')。

2 结果

2.1 ‘无籽’ 瓯柑 *CsLTP* 和 *CsLOX* 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

利用 LTP+98 (3'-ATGTGGCAGGTGAGTGGCT-5') 和 LTP-118 (3'-GAGCCACTCACCTGCCCACAT-5') 作为特异引物, 3'-RACE 和 5'-RACE 完成后, PCR 扩增产物在质量浓度为 1% 的琼脂糖胶上电泳检测, 结果 3'-RACE 产物约为 500 bp (图 1a), 5'-RACE 产物约为 150 bp (图 1b); 测序结果表明: 它们分别为 527 bp 和 154 bp。根据重叠序列将 3'-RACE 和 5'-RACE 的结果拼接, 经测序, *CsLTP* cDNA 全长 667 bp, 包含 1 个开放阅读框, 编码 215 个氨基酸, 分子量为 1.26 kD, 等电点 (pI) 为 9.42, 带负电荷的氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 3, 总的正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 总数为 12, 推测基因所编码的蛋白位置在细胞外。BLASTn 结果显示: 与脐橙 *Citrus sinensis* (AF369931) 和粗柠檬 *C. jambhiri* (AB437259) 的脂转移蛋白 LTP 相似性分别为 95% 和 60%, 序列提交 GenBank, 登录号为 KF772872, 命名为 *CsLTP*。利用 LOX-GSP3 (3'-ATAGCAACCAATCGGCAACTCAGCGTG-5') 和 LOX-GSP5 (3'-GCTTGTGCGAGCCAAAC CATTGA-5') 为特异引物, 3'-RACE 和 5'-RACE 完成后, PCR 扩增产物在质量浓度为 1% 的琼脂糖胶上电泳检测。结果显示: 3'-RACE 产物约为 1 000 bp (图 2a), 5'-RACE 产物约为 2 000 bp (图 2b)。测序结果表明: 它们分别为 1 115 bp 和 1 901 bp。根据重叠序列将 3'-RACE 和 5'-RACE 的结果拼接, 经测序, *CsLOX* cDNA 全长 2 915 bp, 包含 1 个开放阅读框, 编码 895 个氨基酸 (图 3b), 分子量为 10.176 6 kD, 等电点 (pI) 为 6.09, 带负电荷的氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 120 个, 总的正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 总数为 108 个, 推测该基因所编码的蛋白位置在细胞核内 (76.0%), 线粒体基质 (50.2%), 过氧化物酶体 (35.8%), 线粒体内膜上 (22.2%)。BLASTn 结果显示: 与粗柠檬 (AB039745), 美洲黑杨 *Populus deltoids* (DQ131179) 的脂氧合酶相似性分别为 99% 和 51%, 序列提交 GenBank, 登录号为

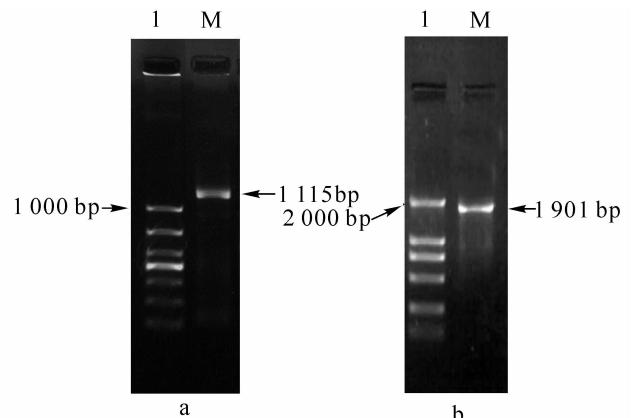


a: 3'-RACE产物 527 bp (DL2 000)

b: 5'-RACE 154 bp (DL1 000)

图 1 *CsLTP* 3'-RACE 和 5'-RACE

Figure 1 *CsLTP* 3'-RACE and 5'-RACE



a: 3'-RACE PCR产物 1 115 bp (DNA 分子量标记 DL1 000)

b: 5'-RACE PCR产物 1 901 bp (DNA 分子量标记 DL2 000)

图 2 *CsLOX* 3'-RACE 和 5'-RACE

Figure 2 *CsLOX* 3'-RACE and 5'-RACE

a

```

1 TATAATAAAGGACATTTTGTGTCGATTatgaaatctcaggagaatctcaaatggctgcoctcaagctgtttcagctttggtctgtgcatgttggctgactggt
      M K S Q E K S Q M A A L K L V S A L V L C M L V T G
111 ccoctgagtgctcaggccataacatgtggcaggtgagtgctcattggcaccatgcatgctgttctctgagatcggcggcoctatacctatgcoactgctcaacggc
      P L S A Q A I T C G Q V S G S L A P C I G F L R S G G P I P M P C C N G
219 gtcaggctctcaacgctgccgacagaccacacctgaccgcaaacctgcatgcaactgcttgaagcaagccagatcaatccctagcctcaacctaatatgctgct
      V R S L N A A A R T T P D R Q T A C N C L K Q A A R S I P S L N L N A A
329 ggtctccaggagcttggagtttagcattccttacaagatcagcaacctccactgactgctctaaagtcaggtagaACAGGAATCTGGGCCGTTGATTTCAGGTTTAACTT
      G L P G A C G V S I P Y K I S T S T D C S K V R *
439 GACGGAGTAGAATAAATGATAATAAAGGACATTTTGTGTCGATTATGAGTCTCTCTACACTTTGTACTGCGAGTCTGTTGCGCCCTGTTTCATGTTAATG
549 TTTATGTC TTGCTTTTC ATGTCATCGT CAGTTTGTG TTTATTCGTTTATTAATGAAATCTTGOCTGTGTTTCAGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

b

```

1 CAATAAAAACCTTTTGAGAAATGAGTTCAAGAAATGAATCAATAAATTTGCAAGTTCAGAAAATAGAAAAGCTTTTCTCTCAAGCGTCTCCTCTAGTCATTAATAACA
106 atgttttaaccocagtactggttcatcagactcagactcctatctagaaacctatgccaactttcgaagccatttcttcatgaaatggcaatgtttttcgccaaattcag
      M F N P V L V H Q T R S I R T I L P L S K P F L H G N G N V F R Q I Q
211 tcaagtctctcaatataaaaggggcccaaatgctgactgggtctgttctcctagtaacagtgctcaagctatggcagatcacagctgatacaacgggtttacggct
      S S P S F K K G P K I R L G S V P S N S V K A M A D T A V S N G V T A
316 gttgtcactgtcagaccactatcaatccgcttacggctggtgctcaagtcattgatgactgagaagattgttcagttaactcaactacaattggagctgtttagt
      V V T V R P P I N P L T A G G V I D D V E L F S K S L Q L K L V S
421 gccaaagatgaaataaacccacaattagtgtaagcaaaataaaggggtagtgtgaggtgtgaggtgcaatagaagcagaattccaagttccagtt
      A K D E N K P T I S G N A K I K G V V V K D C E V Q Y E A E F Q V P V
526 gattttggagaattggtgcaatattagtgtaaatgagcagcctctgagatgtattttaaagatagttcttgatggtttccaagtggtctgtgaccata
      D F G E I G A I L V V N E H A L E M Y L K D I V L D G L P S G L V T I
631 acatgtgaactcgtgggttcagccaaatactagcaagaccgagaattttcttactaacaagtcatacctgccgtcaaaaaccggatggattgcagaaatta
      T C E S W V Q P N T S K D P R I F F T N K S Y L P S K T P N G L Q K L V
736 agatagccgagctagttaatttaccgggcaatggagaaggggaacgcaaaaagctgataaatatagttatgatgtctacaatgatctggagactcctgac
      R Y A E L V N L R G N G E G E R Q K A D R I Y D Y D V Y N D L G D P D
841 gaagatgaagaattgaaagccagctactcgttgtaaacagcagcctctcctagacgtttagaactggcagccacattgtaaacctgacgaagcctcggag
      E D E E L K R P V L G G K Q H P Y P R R C R T G R P H C K T D E A S E
946 gaaagagtccaagcaaaagttgatcctattcgcctatgtcccaggatgaagagctcggcgattaaagcaaacagttgttataagggtgattgtt
      E R V P S K S L I P I S P Y V P R D E E S R R L K E I T F V I K G I V
1051 tcggacagttgctgttctgcttaatacaaaactgaaagccgaatttctgacaccgaggtttcccaaaactcacagaaaatagcaaaactctccggaagga
      S D S C V S L N T K L E S R I C R H R W V S Q T S Q K I D K L F R E G
1156 gttaaaaataaagatgcagaattttgaaatcgcactcctccgattgttgaagaaataaagacattggcagattttttttgagtttacgactcctgaaaca
      V K I K D A E F W K S L L P G F V E E I K D I G D F F L R F T S P E T
1261 ttaagagagacagatcttttggtttagggatgaggaattttcagcaaacctcctgctcacaaccgctatagcacaagttgatcgggaatggccctg
      F F L T P A G T L R P I A I E L T R P P M N G K P Q W K Q V F L Q W R
1366 aaaagcacactcagctcgtgaaatttaccgaccaccagatcagcaattaccacagaattgattgaaaaaagaattggaggaatgatttctgtgaagagctata
      K S T L D P E I Y G P P E S A I T T E L I E K E I G G M I S V E E A I
1471 aaacaaaagaagttgttcatctagattaccatgacctattttaccatattggaaaaagtgcagacaactcaaaagcacacactgtgatggatctcgcacaatt
      K Q K K L F I L D Y H D L F L P Y V E K V R Q L K S T T L Y G S R T I
1576 ttcttctaacaccagccggcacattgagaccaatagcctattgagctcactcggcctccaatgaaaggcaagccacaatgaaacaagtttttaccitcttgg
      F F L T P A G T L R P I A I E L T R P P M N G K P Q W K Q V F L Q W R
1681 cactcctagtgctgctgcttggagctagccaaagctcctgctcctgctcatgatgctggctatcaccagctgtcagccattggtttaatcactcattgttc
      H S T E C W L W K L A K A H V L A H D A G Y H Q L V S H W L N T H C C
1786 acagaaacctacgtaatagcaaccaatcggcaactcagcgtgatgcatccaactatagattgttgatcctcattttcgtacacaatggagatcaatggtttg
      T E P Y V I A T N R Q L S V M H P I Y R L L D P H F R Y T M E I N G L
1891 gctcgacaagctctgttaatgctgaggaatcattgcaaacctcattcctcaactggaagtaactctatggaattcagctcgttgcctatgacaagaatggcc
      A R Q A L V N A D G I I E S S F S P G K Y S M E F S S V A Y D K W R
1996 tttgaccatgaagcactccccaaagacctaattagccggggtggtgctgtgagatccaagtgctccacatggcttgaagctaacaaatgaagactatcctttt
      F D H E A L P K D L I S R G L A V E D P S A P H G L K L T I E D Y P F
2101 gccaatgagccttgatctcgggagccataaaacaatgggttaccgatattgttaatcactactaccctgataaaagcctgtgaaactgtgatgagagctc
      A N D G L D L W D A I K Q W V T D Y V N H Y Y P D K S L V E S D E E L
2206 caagcttggtagactgaaatcgaactgtgggacagctgacaagaacatgaacctgtgtgctccttgaacaccctaaagatttaacgaaatcatcaca
      Q A W W T E I R T V G H G D K K H E P W W P V L K T P K D L I E I T
2311 actattgttgggttaacatcgtgctcaccagcagctgttaactcggccaatacaactcaggagctatctcccaatagcccaaccactgcaagatgcaacatt
      T I V W V T S G H H A A V N F G Q Y T Y G G Y F P N R P T T A R C N I
2416 gccactgaagatccatctgatgaacaatggaattctcctgaaaaacctgaaatgcaactttgaaatccttccctccagattcaagctactaaagttatg
      A T E D P S D E Q W K F F L E K P E N A L L N T F P S Q I Q A T K V M
2521 gctattctgtgattttatcgactcattcctgtaggagatttagaaaagaatagagccagcagcagctgagatccgggttataatgacatctttaa
      A I L D V L S T H S P D E E Y L G K E I E P A W R E D P V I N A A F E
2626 aagtttagaggcaagtttaaggagctgaaagattattgatgcaaggaatgcagatccaagttgaggaatgaaatggagctgggatggtccatgatgctc
      K F R G K L M E L E G I I D A R N A D P K L R N R N G A G M V P Y E L
2731 ttgaagccattttcgaacctggtttacagaaaaggagttccgtacagcattctctatctagAGTTGAAAAATGTGTGCAATGCTCGAATGTGTATCAATAA
      L K P F S E P G V T G K G V P Y S I S I *
2836 AAACCTTTTGAGAAATGAGTTCAAGAAATGAATCAATAAATTTGCAAGTTCAGAAAATAGAAAAGCTTTTCTCTCAAGCGTCTCCTCTAGTCATTAATAACA

```

a: *CsLTP*; b: *CsLOX*; *表达终止密码子。

图3 ‘无籽’ 瓯柑 *CsLTP* 和 *CsLOX* 的核酸序列及推导的氨基酸序列

Figure 3 Nucleotide and deduced amino acids sequence of seedless Ougan gene *CsLTP* and *CsLOX*

KF772871, 命名为 *CsLOX*。

2.2 *CsLTP*, *CsLOX* 基因的推导氨基酸序列分析

根据 NCBI CDS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析氨基酸序列, *CsLTP* 包含 *nsLTP1* 保守功能域, 属于非特异性脂转运蛋白 1 型(*nsLTP1*)亚科, 属于 AAI_LTSS 超基因家族(图 4a), 即 α -淀粉酶抑制子(AAI)-脂转移(LT)-种子储藏(SS)蛋白家族。*CsLOX* 包含植物脂氧合酶相关蛋白结构域, 属于 *PLAT* 超基因家族(图 4b), 即多囊蛋白 1-脂氧合酶- α -毒素蛋白家族。

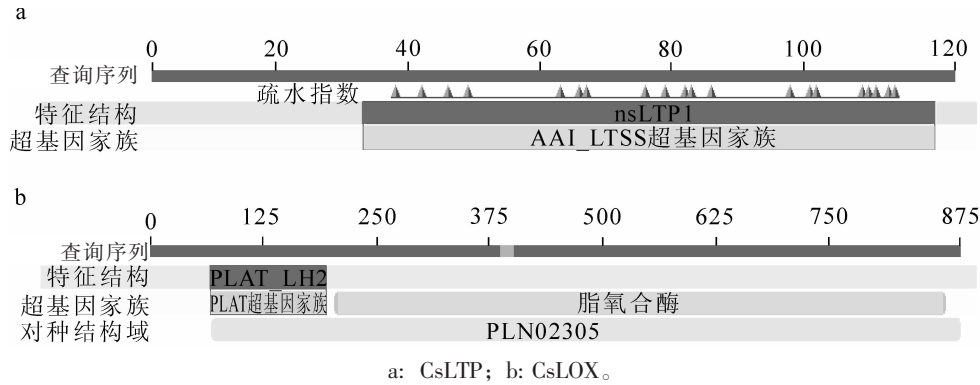


图 4 *CsLTP* 和 *CsLOX* 氨基酸序列保守功能域分析

Figure 4 Conserved domain analysis of *CsLTP* and *CsLOX* amino acid sequences

利用在线分析软件 <http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>, 选择 Hphob./Kyte& Doolittle 模式, 对 ‘无籽’ 瓯柑 *CsLTP* 和 *CsLOX* 基因的蛋白疏水性进行分析预测。*CsLTP* 基因蛋白的疏水指数为 -2.00~2.82, 约在第 18~21 位出现较强的疏水性, 在第 74~75 位出现较强的亲水性; *CsLOX* 基因蛋白的疏水指数从 -2.57 到 2.46, 约在第 150, 743, 817 位出现较强的疏水性, 在第 225, 250, 300, 398, 638, 726, 778 位出现较强亲水性。

利用在线同源建模分析软件 <http://swissmodel.expasy.org/> 对蛋白质三级结构预测, 得到了 *CsLTP* 和 *CsLOX* 的三级结构^[14-16]。*CsLTP* 蛋白经过几次折叠后主要以 α 短螺旋为主; *CsLOX* 蛋白主要以 α 螺旋为主, 包括长螺旋和短螺旋, 并伴有一些 β 折叠, 其间由一些转角等相互连接。

2.3 ‘无籽’ 瓯柑 *CsLTP* 和 *CsLOX* 的系统进化树分析

利用 BLASTP 对 *CsLTP* 和 *CsLOX* 预测蛋白的氨基酸序列进行同源性检索, 并比对同源性较高的物种氨基酸序列进行系统进化树分析(图 5)。结果表明: *CsLTP* 与龙眼 *Dimocarpus longan* 的亲缘关系较近(图 5a); 而 *CsLOX* 与蓖麻 *Ricinus communis* 的亲缘关系较近(图 5b)。

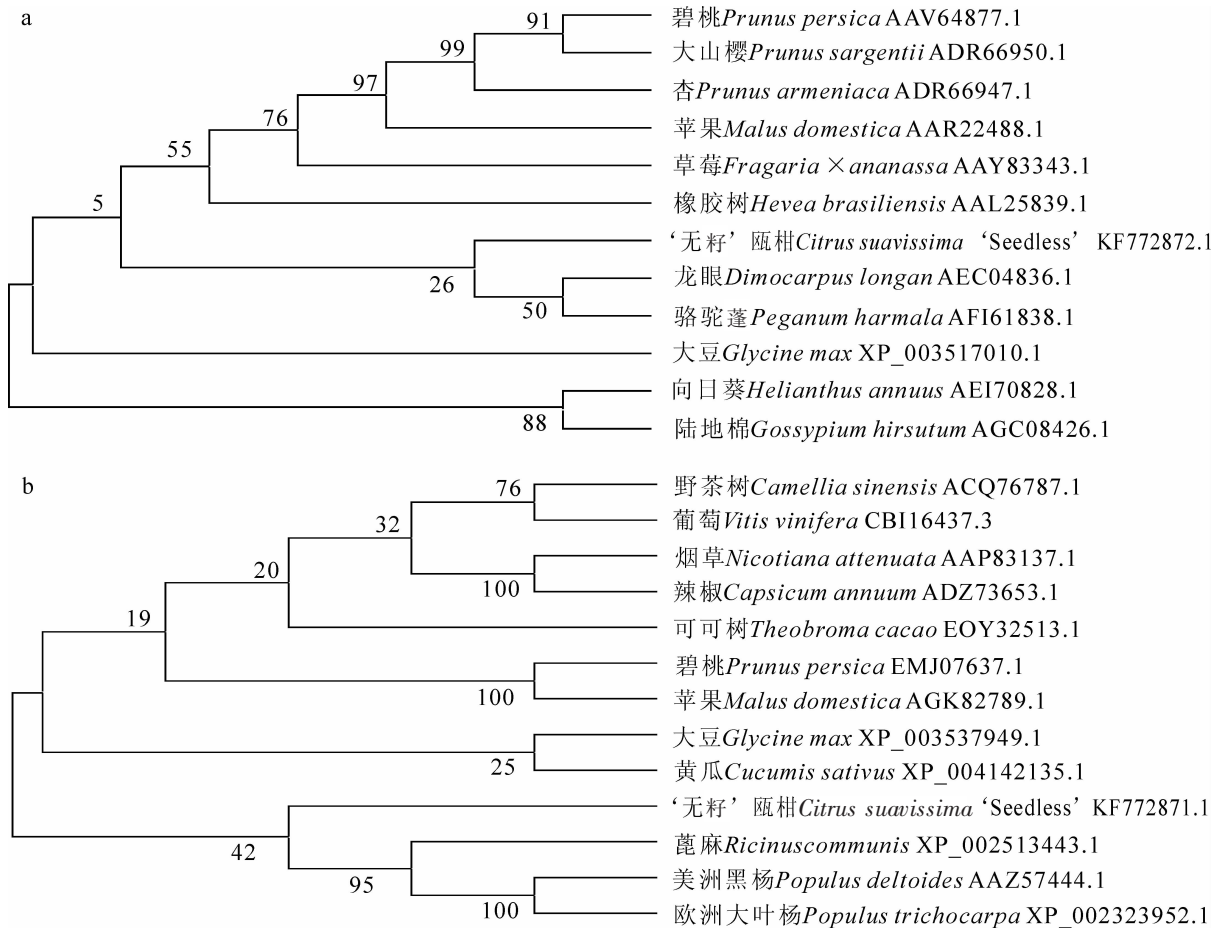
2.4 *CsLTP* 和 *CsLOX* 的荧光定量表达

根据花粉的发育过程, 分别采集 I (花粉母细胞形成期), II (四分体时期), III (花粉粒形成期), IV (花粉粒成熟期), V (花朵开放期) 等 5 个时期的花蕾, 通过荧光定量 PCR 技术分别检测 ‘无籽’ 瓯柑和普通瓯柑各自花粉发育的 5 个时期中 *CsLTP* 和 *CsLOX* 的表达水平, 以 *CsLTP* 和 *CsLOX* 的实时表达量与各自在普通瓯柑的第 I 时期的表达量的比值计算, 以 ACTIN(GU911361) 为内参。以 SPSS 14.0 软件进行 0.05 和 0.01 水平的统计分析。结果显示: *CsLTP*(图 6a) 和 *CsLOX*(图 6b) 在 ‘无籽’ 瓯柑和普通瓯柑中均有表达, 其中 *CsLTP* 的表达趋势在 2 个品种中相似, 即花粉母细胞形成期表达量最高, 而后随发育时期的进行显著下降, 但 ‘无籽’ 瓯柑中 *CsLTP* 表达量的下降比普通瓯柑延后 1 个时期, 并且从 III 时期开始, ‘无籽’ 瓯柑中 *CsLTP* 的表达量显著低于普通瓯柑; *CsLOX* 在 ‘无籽’ 瓯柑中的表达趋势与普通瓯柑相反, 即表达量从 II 时期(四分体时期)开始显著下降, III 时期(花粉粒形成期)达到最低值, 并极显著低于普通瓯柑, 其余 4 个时期均显著高于普通瓯柑(特别是花粉母细胞形成期)。

3 讨论

脂类物质对于动植物细胞结构和功能调节具有非常重要作用^[17]。本研究结合 ‘无籽’ 瓯柑与普通瓯柑的差异表达基因筛选, 克隆了与脂类代谢相关的脂转移酶基因 *CsLTP* 和脂氧合酶基因 *CsLOX*。甜橙

Citrus sinensis 基因组测序^[18]已经完成,对现有数据库(<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/index.php>)进行 Blastn 检索,发现 *CsLTP* 在甜橙的 6 号染色体可能存在同源序列, *CsLOX* 则在 3, 7, 9 号染色体可能存在拷贝。研究发现:植物转脂蛋白(LTP)与动物非特异性脂转移蛋白(nonspecific lipid-transfer protein, nsLTP)非常相似,能与磷脂和脂肪酸结合,进行膜间的脂类转运^[19]。LTP 在植物的生长发育以及抗逆等生命活动中具有广泛的生物学功能,近年来 LTP 在生殖发育中的重要作用也开始引起人们的广泛关注^[20-21],特别是在小孢子的各发育时期中油脂等营养物质的传递与积累,以及花粉壁等结构物质的形成等方面发挥着重要的作用^[22-28]。本研究中, *CsLTP* 从花粉粒形成期开始表达量显著下降,降低了生殖细胞对周围营养物质的吸收效率,无法为小孢子发育提供营养,因而花粉粒不能正常发育。



a: *CsLTP* 的系统进化树分析; b: *CsLOX* 的进化树分析。

图 5 ‘无籽’ 瓯柑 *CsLTP* 和 *CsLOX* 氨基酸序列的进化树

Figure 5 Phylogenetic analysis of *CsLTP* and *CsLOX* amino acid

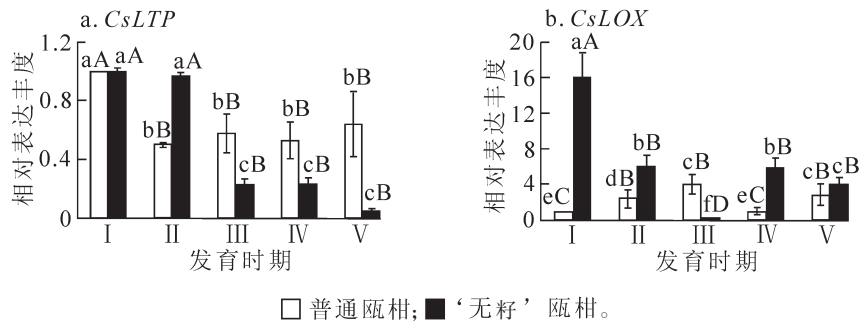


图 6 ‘无籽’ 瓯柑花粉不同发育时期的 *CsLTP* 和 *CsLOX* 的相对表达量分析

Figure 6 Expression alteration of *CsLTP* and *CsLOX* during the flower bud development

脂氧合酶是动植物体内不饱和脂肪酸代谢的关键酶^[29-30]之一,参与茉莉酸(JA)的生物合成,影响雄

蕊花丝的伸长、花药开裂以及花粉生活力, 甚至是雄蕊的形态发育^[31]。*LOX* 在小麦 *Triticum aestivum* 光敏雄性不育系 BS366 中的表达较低^[32], 引起花药开裂异常。何永明等^[33]发现水稻 *Oryza sativa* *OsLOX-RC1* 的表达水平在颖花开放时明显上调, 开放后又下降。本研究中, *CsLOX* 的表达在‘无籽’瓯柑花粉粒形成期急剧下降, 则可能引起花粉粒成熟进程异常, 进而导致花粉粒不能正常的发育。

前期研究^[3]表明: ‘无籽’瓯柑的花药自然散粉率极低, 在花粉粒成熟期, ‘无籽’瓯柑花粉粒内大多中空, 其绒毡层附近有大量脂类物质残存。本试验中, ‘无籽’瓯柑 *CsLTP* 和 *CsLOX* 的表达水平都在花粉粒形成期开始锐减, 绒毡层细胞内的营养物质无法被花粉粒充分利用, 严重影响了花粉粒的成熟进程, 最终导致花粉败育。

4 结论

从‘无籽’瓯柑中克隆到的脂转移酶基因 *CsLTP* 和脂氧合酶基因 *CsLOX* 序列分析表明: 它们具有植物转脂蛋白(LTPs)和脂氧合酶(LOXs)的特征结构域。两者在花粉发育不同时期转录本的丰度变化表明: ‘无籽’瓯柑花粉粒发育初期脂类物质转运效率的下降, 以及花粉粒成熟进程的中止, 可能成为绒毡层脂类营养物质滞留, 花粉发育关键时期营养不良, 并最终成为‘无籽’瓯柑花粉败育的原因之一。

参考文献:

- [1] 徐象华, 颜福花, 叶荣华, 等. 瓯柑研究进展[J]. 浙江林业科技, 2008, **28**(3): 75 – 77.
XU Xianghua, YAN Fuhua, YE Ronghua, *et al.* Advances in researches of *Citrus reticulata* ‘Suavissima’ [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2008, **28**(3): 75 – 77.
- [2] 曾燕如, 张炼炳, 斯金平, 等. ‘无籽’瓯柑无核原因的研究[J]. 浙江林学院学报, 2005, **22**(4): 359 – 362.
ZENG Yanru, ZHANG Lianbing, SI Jingping, *et al.* Preliminary study on seedlessness of seedless Ougan [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2005, **22**(4): 359 – 362.
- [3] 张迟, 张敏, 朱铨, 等. 瓯柑及其无籽突变体花粉发育的细胞学观察[J]. 果树学报, 2014, **31**(2): 265 – 269.
ZHANG Chi, ZHANG Min, ZHU Quan, *et al.* Cytological observation of pollen development in ‘Ougan’ (*Citrus suavissima* Hort. ex Tanaka) and its seedless mutant [J]. *J Fruit Sci*, 2014, **31**(2): 265 – 269.
- [4] HU Zhiyong, ZHANG Min, WEN Qigen, *et al.* Abnormal microspore development leads to pollen abortion in a seedless mutant of ‘Ougan’ mandarin (*Citrus suavissima* Hort. ex Tanaka) [J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 2007, **132**(6): 777 – 782.
- [5] GRAY M W, HANIC-JOYCE P J, COVELLO P S. Transcription, processing and editing in plant mitochondrial [J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1992, **43**(1): 145 – 175.
- [6] BONEN L, BROWN G G. Genetic plasticity and its consequences: perspectives on gene organization and expression in plant mitochondrial [J]. *Can J Bot*, 1993, **71**(5): 645 – 660.
- [7] FERNAND V, ERIC L, MOHAMMED S, *et al.* The mitochondrial respiratory chain ant ATP synthase complexes: composition, structure and mutational studies [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1999, **37**(9): 629 – 643.
- [8] 胡志勇, 全铸, 徐强, 等. 温州蜜柑线粒体基因的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2006, **33**(3): 485 – 490.
HU Zhiyong, TONG Zhu, XU Qiang, *et al.* Cloning and expression analysis of mitochondrial genes from satsuma mandarin (*Citrus unshui* Marc) [J]. *Acta Horti Sin*, 2006, **33**(3): 485 – 490.
- [9] QIU Wenming, ZHU Andan, WANG Yao, *et al.* Comparative transcript profiling of gene expression between seedless Ponkan mandarin and its seedy wild type during floral organ development by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray [J]. *BMC Genomics*, 2012, **13**(1): 397 – 413.
- [10] CARVALHO ADE O, GOMES V M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology: a concise review [J]. *Peptide*, 2007, **28**(5): 1144 – 1153.
- [11] MALDONADO A M, DOERNER P, DIXON R A, *et al.* A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2002, **419**(6905): 399 – 403.
- [12] BLEE E. Phytooxylipins and plant defense reactions [J]. *Prog Lipid Res*, 1998, **37**(1): 33 – 72.
- [13] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, **24**(8): 1596 – 1599.
- [14] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, *et al.* The SWISS-MODEL Workspace: a web-based environment for protein

- structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*, 2006, **22**(2): 195 – 201.
- [15] SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, **31**(13): 3381 – 3385.
- [16] GUEX N, PEITSCH M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling [J]. *Electrophoresis*, 1997, **18**(15): 2714 – 2723.
- [17] RAFFAELE S, LEGER A, ROBY D. Very long chain fatty acid and lipid signaling in the response of plants to pathogens [J]. *Plant Signal Behav*, 2009, **4**(2): 94 – 99.
- [18] XU Qiang, CHEN Lingling, RUAN Xiaolan, *et al.* The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*) [J]. *Nat Gen*, 2013, **45**(1): 59 – 66.
- [19] KADER J C. Lipid-transfer proteins in plants [J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, **47**(1): 627 – 654.
- [20] BLEIN J P, COUTOS-THÉVENOT P, MARION D, *et al.* From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, **7**(7): 293 – 296.
- [21] IMIN N, KERIM T, WEINMAN J J, *et al.* Low temperature treatment at the young microspore stage induces protein changes in rice anthers [J]. *Mol Cell Prot*, 2006, **5**(2): 274 – 292.
- [22] FOSTER G D, ROBINSON S W, BLUNDELL R P, *et al.* A *Brassica napus* mRNA encoding a protein homologous to phospholipid transfer proteins, is expressed specifically in the tapetum and developing microspores [J]. *Plant Sci*, 1992, **84**(1): 187 – 192.
- [23] ARIIZUMI T, AMAGAI M, SHIBATA D, *et al.* Comparative study of promoter activity of the three anther-specific genes encoding lipid transfer protein, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and polygalacturonase in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Rep*, 2002, **21**(1): 90 – 96.
- [24] BOTTON A, BEGHELDO M, RASORI A, *et al.* Differential expression of two lipid transfer protein genes in reproductive organs of peach (*Prunus persica* L. Batsch) [J]. *Plant Sci*, 2002, **163**(5): 993 – 1000.
- [25] BOUTROT F, MEYNARD D, GUIDERDONI E, *et al.* The *Triticum aestivum* non-specific lipid transfer protein (TaLtp) gene family: comparative promoter activity of six *TaLtp* genes in transgenic rice [J]. *Planta*, 2007, **225**(4): 843 – 862.
- [26] CHEN Yuning, LEI Shaolin, ZHOU Zhengfu, *et al.* Analysis of gene expression profile in pollen development of recessive genic male sterile *Brassica napus* L. line S45A [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, **28**(9): 1363 – 1372.
- [27] TIAN Aimei, CAO Jiashu, HUANG Li, *et al.* Characterization of a male sterile related gene *BcMF15* from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, **36**(2): 307 – 314.
- [28] 刘志勇, 叶雪凌, 李承彧, 等. 大白菜核雄性不育相关基因 *BrLTP1* 的克隆及特征分析 [J]. *园艺学报*, 2011, **38**(2): 343 – 352.
- LIU Zhiyong, YE Xueling, LI Chengyu, *et al.* Cloning and characterization of a genic male sterility-related gene *BrLTP1* in Chinese cabbage [J]. *Acta Horti Sin*, 2011, **38**(2): 343 – 352.
- [29] FEUSSNER I, WASTERNAK C. The lipoxygenase pathway [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2002, **53**: 275 – 297.
- [30] 李彩凤, 赵丽影, 陈业婷, 等. 高等植物脂氧合酶研究进展 [J]. *东北农业大学学报*, 2010, **41**(10): 143 – 149.
- LI Caifeng, ZHAO Liying, CHEN Yeting, *et al.* Research advances on higher plant lipoxygenase [J]. *J Northeast Agric Univ*, 2010, **41**(10): 143 – 149.
- [31] CALDELARI D, WANG Gao, FARMER E E, *et al.* *Arabidopsis lox3 lox4* double mutant are male sterile and defective in global proliferative arrest [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, **75**(1/2): 25 – 33.
- [32] 向群, 张立平, 赵昌平, 等. 外源茉莉酮酸甲酯通过调节相关基因表达诱导光温敏雄性不育小麦 BS366 离体花药开裂 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2010, **26**(11): 1028 – 1035.
- XIANG Qun, ZHANG Liping, ZHAO Changping, *et al.* Methyl jasmonic acid *in vitro* induces anther dehiscence of photothermo-sensitive male sterile wheat line BS366 through regulating related gene expression [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2010, **26**(11): 1028 – 1035.
- [33] 何永明, 林拥军, 曾晓春. 水稻颖花自然开放过程中茉莉酸 (JA) 生物合成的变化 [J]. *作物学报*, 2012, **38**(10): 1891 – 1899.
- HE Yongming, LIN Yongjun, ZENG Xiaochun. Dynamic changes of jasmonic acid biosynthesis in rice florets during natural anthesis [J]. *Acta Agron Sin*, 2012, **38**(10): 1891 – 1899.