

花生油酸脱氢酶基因 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 的时空表达特征

刘 华¹, 薛金嫚², 徐倩玉², 易 昕², 王维艳², 刘宏波²

(1. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 农业与食品科学学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 花生 *Arachis hypogaea* 油酸脱氢酶 *AhFAD2* 是调控花生种子中油酸与亚油酸比值(oleic acid/linoleic acid, O/L)的关键酶, 已确定存在 2 个编码 *AhFAD2* 的基因: *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B*, 但两者在花生中的时空表达特征尚不清楚。选取 2 个有代表性 O/L 的花生品种 ‘山花 15’ ‘Shanhua 15’ (O/L 为 1)和高油酸花生突变体(O/L 大于 20)为材料, 根据 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 基因 3'-UTR 核苷酸序列的差异, 设计了新型、简便的区分两者的特异性引物, 并利用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)技术, 对 2 个花生品种的 7 个不同组织(根, 茎, 叶, 花, 开花后 20, 40, 60 d 种子)中 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 的表达特征进行了分析。结果表明: *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 在 ‘山花 15’ 和高油酸花生突变体 7 个组织中都有表达; 其中, 在 2 个花生品种 3 个不同发育时期的种子中, *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 在开花后 40 d 的种子中表达量最高, 推测在开花至花后 40 d 这一阶段种子中 *FAD2* 的表达量可能对花生最终 O/L 起主要的调控作用。另外, ‘山花 15’ 种子中 *AhFAD2B* 的表达量显著高于 *AhFAD2A*, 而在高油酸花生突变体种子中则相反, 推测花生中 *AhFAD2B* 在催化油酸去饱和生成亚油酸的过程中比 *AhFAD2A* 可能起更重要的调控作用。图 3 表 3 参 25

关键词: 分子生物学; 花生; 油酸脱氢酶基因; qRT-PCR; 基因表达

中图分类号: S565.2; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2019)01-0014-07

Spatio-temporal expression of fatty acid desaturase genes *AhFAD2A* and *AhFAD2B* in peanuts

LIU Hua¹, XUE Jinman², XU Qianyu², YI Xin², WANG Weiyan², LIU Hongbo²

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. School of Agricultural and Food Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: The fatty acid desaturase 2 (*FAD2*) in peanut (*Arachis hypogaea*), a crucial enzyme for controlling the ratio of oleic acid to linoleic acid (O/L) in the seed, with presently two *FAD2*-encoding genes (*AhFAD2A* and *AhFAD2B*) has unknown spatial and temporal expression patterns. To determine the expression patterns of *AhFAD2A* and *AhFAD2B* in seven different tissues (root, stem, leaf, flower, and seeds at 20, 40, and 60 d after pollination) of two distinct cultivars, ‘Shanhua 15’ with an O/L of approximately 1.0 and a high-oleate peanut mutant, were analyzed. In doing so, real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using different pairs of specific primers, suitable for distinguishing *AhFAD2A* from *AhFAD2B*, which were designed based on the difference in the 3'-untranslated region (UTR) sequences of these two genes. Results showed that *AhFAD2A* and *AhFAD2B* were expressed in all the tissues tested. Among the three developmental stages of the peanut pods for the two cultivars, the highest expression of *AhFAD2A* and *AhFAD2B* occurred 40 d after pollination. In addition, the expression of *AhFAD2B* was shown to be much higher than that of *AhFAD2A* in the pods of ‘Shanhua 15’ than the high-oleate peanut mutant. Thus, the *AhFAD2B* may play a more

收稿日期: 2018-01-12; 修回日期: 2018-04-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(31301272)

作者简介: 刘华, 从事花生高油酸性状的选育研究。E-mail: liuhualhhlh@163.com。通信作者: 刘宏波, 副教授, 博士, 从事作物农艺与品质性状改良及相关基因功能研究。E-mail: hbliu@zafu.edu.cn

important regulatory role in the conversion of oleic acid to linoleic acid in peanut seed compared to *AhFAD2A*, and possibly the expression level of the *FAD2* genes at the 40 d stage may exert a large effect on the final ratio of O/L in peanut seed oil. [Ch, 3 fig. 3 tab. 25 ref.]

Key words: molecular biology; *Arachis hypogaea*; fatty acid desaturase; qRT-PCR; gene expression

花生 *Arachis hypogaea* 是世界上最主要的油料作物之一，种子含油量为 46%~60%，较其他油料作物含油量高^[1]。在花生油的脂肪酸组成中，油酸(oleic acid, C18:1)和亚油酸(linoleic acid, C18:2)约占总脂肪酸的 80%；且油酸的自氧化稳定性是亚油酸的 10 倍，所以高油酸的花生具有较长的储存期。因此，油酸和亚油酸的比值(O/L)是评定花生油品质的重要指标之一^[2-3]。油酸可调整人体血浆中高、低密度脂蛋白胆固醇的比例，对软化血管，保护人体健康有一定效用^[4]；另外，在粮油业中，以高 O/L 花生为原料可避免在加工过程中过度氢化，产生反式脂肪酸危害人体健康^[5]。所以，研究调控 O/L 的分子机制，适当提高 O/L 具有重要意义。近年来，利用基因工程手段提高花生中油酸的研究日益增多，对控制 O/L 的重要基因的研究也逐渐深入^[6]。花生中催化油酸转变为亚油酸的酶是一种存在于内质网膜上的 ω -6 去饱和酶 FAD2^[7]，且酶的活性与其基因表达水平呈正相关^[8]；转录水平的表达分析显示，*FAD2* 在高油酸花生品种中的表达量明显低于普通油酸花生中的表达量^[9]，且 *FAD2* 在 O/L 范围为 1.07~6.80 的花生中，均在花中表达量最高，荚果次之，根、茎、叶中表达量较低^[10-11]。*FAD2* 活性受 2 个序列相似性为 99% 的基因 *AhFAD2A* (OL_1OL_1) 与 *AhFAD2B* (OL_2OL_2) 调控^[12]。在 *AhFAD2A* 编码区的核苷酸序列中，若在距起始密码子 448 bp 处发生单碱基替换(G:C/A:T)，则会造成氨基酸序列出现错义突变，使天冬氨酸改变为天冬酰胺；而在 *AhFAD2B* 中，在 442 bp 处插入 A(A:T) 则会发生移码突变，使终止密码子提前^[13]。这 2 类突变可降低或消除油酸脱氢酶 FAD2 的活性^[14]。在酵母异源表达体系中研究发现，*AhFAD2B* 脱氢酶活性要比 *AhFAD2A* 高，前者催化生成亚油酸的量约是后者催化生成亚油酸量的 10 倍^[15]，但 *AhFAD2A* 与 *AhFAD2B* 在不同 O/L 值花生中单独的表达情况，以及 *AhFAD2B* 是否为调控花生 O/L 的主要基因，目前还不明确。为了进一步了解花生调控 O/L 的分子机制及遗传基础，一些研究者针对 FAD2 突变体花生品种的选育开发了位点特异性基因标记 AS-PCR(allele-specific polymerase chain reaction)^[16] 和酶切扩增多态序列标记 CAPS^[17] 等标记方法，但这些方法仅可筛选特定类型的突变体，并不能简便快捷地区分未发生突变的原始的 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B*，且仅用一种方法不能有效区分四倍体花生突变基因型 OL_1ol_1/OL_2OL_2 和 ol_1ol_1/OL_2OL_2 或者 OL_1OL_1/OL_2ol_2 和 OL_1OL_1/ol_2ol_2 。目前，新采用的利用 TaqMan 探针荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR) 标记鉴定基因型的方法^[18] 因价格高昂也无法普及。本研究根据 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 在 3'-UTR 核苷酸序列的差异设计了新型简便的特异性区分两者的引物，以高产、耐肥和抗倒伏花生新品种‘山花 15’ (O/L 为 1) 和高油酸花生突变体(O/L 大于 20) 为试验材料，利用 qRT-PCR 技术，对 2 个花生品种不同组织中 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 各自的表达进行相对定量分析，以探究 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 基因各自的时空表达特点，为花生油酸脱氢酶基因 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 对 O/L 调控机制的深入研究以及日后高油酸含量花生品种的研制提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以目前国内主推的农艺性状优良花生品种‘山花 15’ ‘Shanhua 15’ (O/L 为 1, $OL_1OL_1OL_2OL_2$) 以及高油酸花生突变体(O/L 大于 20, $ol_1ol_1ol_2ol_2$) 为试验材料，其中高油酸花生突变体的 *AhFAD2A* 编码区核苷酸序列 448 bp 处发生单碱基替换(G:C/A:T, D/N)，且 *AhFAD2B* 编码区 442 bp 处插入 A(A:T) 发生移码突变，使终止密码子提前。RNA 提取试剂盒 (杭州新景，货号 5111050) 分离各组织部位 (根、茎、叶、花、开花后 20 d 种子、开花后 40 d 种子、开花后 60 d 种子) 的总核糖核酸(RNA)，第 1 链 cDNA 合成采用 PrimeScript RT reagent Kit with cDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, Cat.RR047A)，定量 PCR 荧光染料为 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa, Cat.RR470A)。

1.2 四倍体花生 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 基因的序列分析

以 GenBank 中异源四倍体花生 *FAD2* 基因 (NCBI 登录号：DQ666829) 与 Peanut Base 中二倍体花生

(*A. duranensis*, *A. ipaensis*)基因组进行 BLAST 检索, 基于 5'-UTR 和 3'-UTR 设计通用引物 FAD2-F, FAD2-R, 分别以‘山花 15’和高油酸花生突变体基因组模板进行 PCR 扩增, 反应体系为: 10.0 μL 5 \times PrimerSTAR 缓冲液, 4.0 μL dNTP 混合物, 1.0 μL FAD2-F(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1.0 μL FAD2-R(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 0.5 μL PrimerSTAR HS DNA 聚合酶(0.5 \times 16.67 $\text{mkat}\cdot\text{L}^{-1}$), 20 ng 模板, 用双蒸水(ddH₂O)补齐至 50 μL ; 反应条件为: 1.98 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 2.98 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 3.58 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 4.72 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 min, 第 2~4 步骤循环 35 次, 5.72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。利用 Vector-NTI 软件分析比对 TA 克隆序列。

1.3 四倍体花生 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 基因特异性引物的设计

依据 3'-UTR 核苷酸序列不同, 设计区分 *AhFAD2A* 与 *AhFAD2B* 的特异性引物 FAD2A-F, FAD2A-R, FAD2B-F, FAD2B-R, 并同内参基因(β -*Actin*)^[19]一起用于荧光定量 PCR 分析。以上引物均利用 Vector-NTI 设计并由上海英潍捷基贸易有限公司合成。引物序列信息见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers designed for reference genes *AhFAD2A* and *AhFAD2B*

基因名称	引物序列(5'→3')	
	上游引物	下游引物
β - <i>Actin</i>	CAGGATTGCGCGGTGATGATG	TCTGTTGGCCTTCGGGTTGAG
FAD2 通用引物	ACCATCCAAAATCCAAA	CAAATCCACACACACATT
<i>AhFAD2A</i> 特异引物	TATGTGGAGCCAGATGATGGAG	CAAATCCACACACACATT <u>C</u> TTTATTA <u>A</u>
<i>AhFAD2B</i> 特异引物	TATGTGGAGCCAGATGATGGAG	CAAATCCACACACACATT <u>C</u> TTTATTT <u>T</u>

说明: “_”表示引物特异性位点

1.4 四倍体花生 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 基因组织特异性荧光定量 PCR

荧光定量 PCR 反应体系: 配置 25.0 μL 反应混合液, 包括 12.5 μL SYBR Premix Ex *Taq* II (TliR-NaseH Plus)(2 \times), 1.0 μL 上游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1.0 μL 下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 2.0 μL RT 反应液(cDNA 溶液), 8.5 μL 灭菌水; 使用 Bio-Rad CFX Connect 定量分析仪进行定量分析, 每个反应重复 3 次。反应条件为: 1.95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 2.95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 3.60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 第 2~3 步骤循环 39 次, 4.95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 5.65 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 6.95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。*AhFAD2A* 与 *AhFAD2B* 基因表达量以内参基因(β -*Actin*)作为标准, 以 *AhFAD2A* 在‘山花 15’茎中的表达量为 1, 运用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法进行相对定量分析。

1.5 花生不同组织油酸和亚油酸相对含量的测定

花生种子脂肪酸含量的分析方法参考 QUEHENBERGER 等^[20]和 VONGSVIVUT 等^[21]并稍作修改。花生根、茎和叶脂质提取方法: ①液氮研磨样本, 并加入提取液[V(氯仿):V(甲醇):V(甲酸)=10:10:1]过夜萃取; ②离心并吸取上层提取液; ③用[V(氯仿):V(甲醇):V(水)=5:5:1]洗涤沉淀, 再次萃取, 并与之前提取液合并; ④加入混合液(0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸, 1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钾), 混匀离心, 并吸取下层氯仿相; ⑤用氮吹仪浓缩氯仿相即得到脂质提取物。

运用 Agilent 7890B GC 气相色谱仪进行样品脂肪酸的分离, 色谱条件参考文献[22]。程序升温: 160 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1.5 min, 然后以 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min, 总运行时间为 10.5 min; 进样口温度为 260 $^{\circ}\text{C}$; 空气流量为 300.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 氢气燃气流量 30.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 尾吹气(氮气)流量 25.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 载气(氦气)流量 1.533 4 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, 分流比 30, 进样量为 1.0 μL 。

2 结果与分析

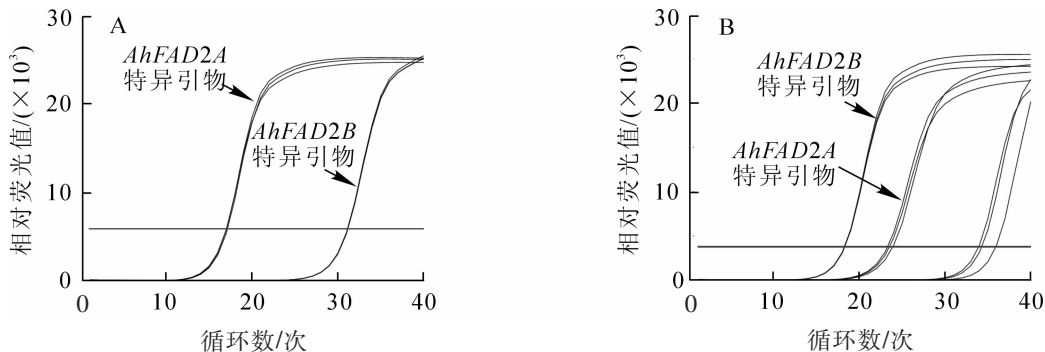
2.1 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 区分及特异性引物专一性检测

将在 GenBank 中已登录的异源四倍体花生 *FAD2* 编码区基因片段(NCBI 登录号: DQ666829)与 Peanut Base 中 2 种二倍体花生(*A. duranensis*, *A. ipaensis*)基因组进行 BLAST 检索, 共发现 3 个 *AhFAD2* 基因, 并可分为 2 种情况: 一类是含 1 140 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 379 个氨基酸组成的完整蛋白(*AhFAD2A* 和 *AhFAD2B*), 序列同源率为 99%; 另一类为 1 147 bp 的 ORF, 由于核苷酸序列中第 451 位碱基由 G 突变为 T(G451T), 形成 TAA 终止子且在 674~680 bp 有 7 bp 的插入导致移码, 使翻译提前终止, 不能编码完整的蛋白而成为假基因(表 2)。

表 2 二倍体花生中 *AhFAD2* 基因序列差异性分析Table 2 Differences of *AhFAD2* sequences in diploid peanuts

基因	花生种类	匹配位点	开放阅读框特征
<i>AhFAD2A</i>	<i>A. duranensis</i>	A09 从 114 692 128 bp 至 114 693 267 bp	1 140 bp, 编码 379 个氨基酸组成的完整蛋白
<i>AhFAD2B</i>	<i>A. ipaensis</i>	B09 从 142 678 637 bp 至 142 679 776 bp	1 140 bp, 编码 379 个氨基酸组成的完整蛋白
假基因		B09 从 141 478 288 bp 至 141 479 434 bp	1 147 bp, ORF 区 G(451)T 且 ins 674 bp(GACTCAG)680 bp, 翻译提前终止, 不能编码完整蛋白

由于以上同源基因序列是在原始的二倍体花生中获得, 而本研究材料‘山花 15’和高油酸花生突变体为人工选育的四倍体花生品种, 所以需先用通用引物扩增‘山花 15’和高油酸花生突变体基因组得到包含 5'-UTR 和 3'-UTR 的四倍体花生 *FAD2* 基因序列, 然后再设计特异性引物区分同源基因 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B*。所以在以上 3 个比对位点 5'-UTR 和 3'-UTR 设计通用引物 FAD2-F, FAD2-R, 以‘山花 15’和高油酸花生突变体基因组为模板, 用此引物扩增包含 5'-UTR 和 3'-UTR 的 *AhFAD2* 基因片段 1 700 bp 左右, 将扩增得到的目的片段进行 TA 克隆, 利用 Vector-NTI 软件分析比对 TA 克隆的序列进行分析, 也分为 3 类: *AhFAD2A*, *AhFAD2B* 和假基因, 与二倍体花生相同。依据 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 基因 3'-UTR 序列不同, 设计了特异性荧光定量 PCR 引物 FAD2A-F, FAD2A-R, FAD2B-F, FAD2B-R, 并检测了所设计引物的专一性。结果表明: *AhFAD2A* 与 *AhFAD2B* 特异引物在扩增其对应模板时, 扩增循环阈值(C_t)最小, 且在最佳范围内($15 \leq C_t \leq 20$), 表明引物专一性良好, 适用于 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 序列的鉴别(图 1)。



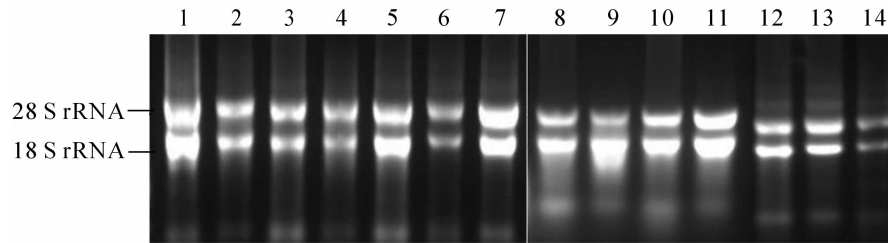
A: 以 *AhFAD2A* 与 *AhFAD2B* 特异引物扩增包含 3'-UTR *AhFAD2A* 基因片段质粒的荧光定量 PCR 扩增曲线; B: 以 *AhFAD2A* 与 *AhFAD2B* 特异引物扩增包含 3'-UTR *AhFAD2B* 基因片段质粒的荧光定量 PCR 扩增曲线; 纵坐标 RFU(relative fluorescence unit)代表荧光定量 PCR 反应后的信号强度; 各样本均进行 3 次生物学重复

图 1 *AhFAD2A* 与 *AhFAD2B* 特异引物专一性检测结果Figure 1 Primers specificity of *AhFAD2A* and *AhFAD2B* tested by qRT-PCR

2.2 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 基因的表达模式

花生各组织总 RNA 的提取如图 2 所示, 28S 和 18S 条带清晰, 其 $D(260)/D(280)$ 均约 1.85, 表明所提取的 RNA 的完整性和纯度均很好, 可反转录合成第 1 链 cDNA 进行荧光定量 PCR 反应。根据‘山花 15’和高油酸花生突变体的 7 个不同组织中荧光定量 PCR 中的 C_t 值, 计算 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 与内参基因的表达量, 以 *AhFAD2A* 在‘山花 15’茎中的表达量为 1, 运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量分析(表 3)。结果表明: *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 在‘山花 15’和高油酸花生突变体中均有表达, 两者在花和开花后 40 d 的种子中表达量显著高于在其他组织中的表达量; 其中, 在高油酸花生突变体 3 个不同发育时期种子中 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 表达量均显著低于在‘山花 15’种子中 2 个基因的表达量, 表明 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 协同调控花生 O/L; 同时, ‘山花 15’种子中 *AhFAD2B* 的表达量显著高于 *AhFAD2A*, 而在高油酸花生突变体种子中则相反, 表明 *AhFAD2B* 在催化油酸去饱和和生成亚油酸的过程中比 *AhFAD2A* 可能起更重要的调控作用。

‘山花 15’和高油酸花生突变体 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 在花后 20, 40, 60 d 的种子中表达量呈“低—高一低”模式, 推测在开花至花后 40 d 这一阶段的种子中 *FAD2* 的表达量可能对花生最终 O/L 起



1~7分别为‘山花15’的根、茎、叶、花、开花后20 d种子、开花后40 d种子和开花后60 d种子；8~14分别为高油酸花生突变体的根、茎、叶、花、开花后20 d种子、开花后40 d种子和开花后60 d种子

图2 ‘山花15’和高油酸花生突变体不同组织样本的总RNA电泳条带分析

Figure 2 Total RNA of different tissues in ‘Shanhua 15’ and high-oleate peanut mutants

表3 *AhFAD2A*与*AhFAD2B*在‘山花15’和高油酸突变体不同组织中表达量差异分析

Table 3 Multiple comparison of *AhFAD2A* and *AhFAD2B* expression in ‘Shanhua15’ and high-oleate peanut mutants

基因	部位	表达量均值	
		‘山花15’	高油酸花生突变体
<i>AhFAD2A</i>	根	0.85 ± 0.01 i	0.71 ± 0.09 h
	茎	1.00 ± 0.00 i	1.41 ± 0.08 h
	叶	78.98 ± 0.78 g	118.19 ± 1.16 d
	花	220.84 ± 1.74 e	3 522.23 ± 1.44 b
	开花后 20 d 种子	40.88 ± 0.37 g	23.59 ± 2.20 f
	开花后 40 d 种子	900.96 ± 4.51 c	301.18 ± 12.37 c
	开花后 60 d 种子	120.17 ± 0.61 f	18.96 ± 1.03 f
<i>AhFAD2B</i>	根	14.92 ± 0.17 h	1.81 ± 0.47 h
	茎	8.71 ± 0.19 h	1.63 ± 0.13 h
	叶	143.09 ± 1.39 f	39.98 ± 0.44 e
	花	32 001.30 ± 154.68 a	5 100.50 ± 10.71 a
	开花后 20 d 种子	113.65 ± 0.91 f	11.27 ± 0.58 f
	开花后 40 d 种子	1 968.69 ± 16.87 b	44.63 ± 0.34 e
	开花后 60 d 种子	293.68 ± 4.37 d	6.38 ± 0.40 g

说明：不同小写字母代表 0.05 水平下差异显著

主要的调控作用。

2.3 ‘山花15’和高油酸花生突变体各组织的油酸和亚油酸相对含量

测定‘山花15’和高油酸花生突变体根、茎、叶及成熟种子中油酸和亚油酸相对含量，可知根、茎和叶中油酸和亚油酸相对含量在品种间无显著差异，而在成熟种子中2个花生品种的油酸和亚油酸相对含量均差异显著(图3)，表明 *FAD2* 对花生种子中的 O/L 有重要影响。

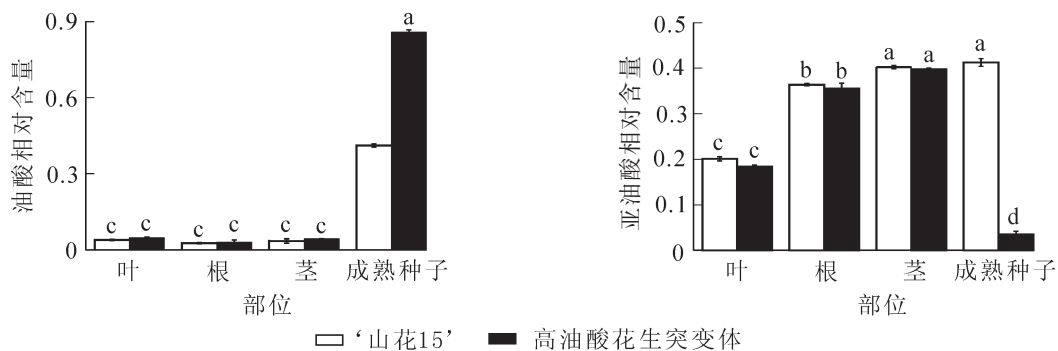


图3 ‘山花15’和高油酸花生突变体根、茎、叶和成熟种子中油酸与亚油酸相对含量

Figure 3 Oleic acid and linoleic acid content in roots, stems, leaves and pods of ‘Shanhua 15’ and high-oleate peanut mutants

3 讨论与结论

依据 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 基因 3'-UTR 序列不同而设计的特异性荧光定量 PCR 引物 (*FAD2A-F*, *FAD2A-R*, *FAD2B-F* 及 *FAD2B-R*), 经检测专一性良好, 可成为一种新型简便的鉴定方法。同时, 由于特异性引物区分位点在 3'-UTR, 因此, 该引物在筛选特定类型的 *AhFAD2* 突变体方面也有着广泛的应用前景。例如, 可与特定的 *AhFAD2* 开放阅读框突变位点组合, 设计与突变位点有关的特异上游引物, 用于突变体基因型的鉴定。

AhFAD2A 和 *AhFAD2B* 在 ‘山花 15’ 和高油酸花生突变体 7 个组织中均有表达, 但在根、茎和叶中表达量较低, 在花和种子中表达量很高。2 个不同 O/L 花生品种在根、茎和叶中油酸和亚油酸的相对含量并没有差异, 而在种子中差异显著。这可能是由于在根、茎和叶中, 质体酰基载体蛋白去饱和酶发挥主要作用, 而在种子中主要是内质网上的酰基-脂质去饱和酶起主导作用^[23], 所以 *FAD2* 对种子中的脂肪酸含量有重要影响。*AhFAD2B* 在 ‘山花 15’ 各组织中表达量均显著高于 *AhFAD2A*; 在高油酸花生突变体 3 个不同发育时期的种子中, *AhFAD2B* 的表达量显著低于 *AhFAD2A*, 但两者的表达量均下降, 且 *AhFAD2B* 表达量的下降幅度大。以往研究表明, *AhFAD2B* 基因较 *AhFAD2A* 相对保守, 且其活性对花生 O/L 影响更大^[9], 在酵母异源表达体系中, *AhFAD2B* 脱氢酶的活性要高于 *AhFAD2A*^[15]; 本研究结果与这些研究结论相符, 推测 ‘山花 15’ 和高油酸花生突变体中 *AhFAD2B* 脱氢酶在催化油酸去饱和和生成亚油酸的过程中比 *AhFAD2A* 可能起更重要的调控作用。花后 20, 40 和 60 d 种子中 *FAD2* 相对表达量有显著差异, 在 2 个花生品种间基因表达量也差异显著, *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 在开花后 40 d 的种子中表达量最高。陈四龙等^[24]指出: 花生油脂积累过程分为初始、快速和稳定积累 3 个阶段, 主要在前 2 个阶段有较集中的积累。迟晓元等^[25]研究显示: 花生果针下地 40 d 前油脂累积速率显著大于 40 d 之后, 呈现先快后慢的累积模式。本研究中 *FAD2* 表达量的变化趋势与种子发育过程中油脂的积累情况相符, 推测在开花后至 40 d 这一阶段 *FAD2* 在种子中的表达量可能对花生最终 O/L 起主要调控作用, 若对这一发育时期进行基因手段干预, 如改变这一时期 *FAD2* 的启动子, 可能使花生籽粒的油酸提高。

本研究所选用的 ‘山花 15’ 为目前国内主推的具有高产、耐肥和抗倒伏等农艺性状优良的花生新品种, 高油酸花生突变体也为具有目前世界范围内主流的高油酸性状突变类型的突变体品种, 且它们的 O/L 具有显著差异, 所以结果具有一定的代表性与应用价值。花生脂肪酸组成和油脂累积是一个协同作用且复杂的调控网络, 目前还未有对具有 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 单独纯合突变基因型的花生品种进行基因表达的研究, 所以 *FAD2* 基因对花生 O/L 的影响还需要更深入的探索。

4 参考文献

- [1] WANG Yun, ZHANG Xinguo, ZHAO Yongli, *et al.* Insights into the novel members of the *FAD2* gene family involved in high-oleate fluxes in peanut [J]. *Genome*, 2015, **58**(8): 375 – 383.
- [2] WANG M L, CHEN C Y, DAVIS J, *et al.* Assessment of oil content and fatty acid composition variability in different peanut subspecies and botanical varieties [J]. *Plant Genet Resour*, 2009, **8**(1): 71 – 73.
- [3] NAWADE B, BOSAMIA T C, THANKAPPAN R, *et al.* Insights into the Indian peanut genotypes for *AhFAD2* gene polymorphism regulating its oleic and linoleic acid fluxes [J]. *Front Plant Sci*, 2016, **7**: 1271. doi: 10.3389/fpls.2016.01277.
- [4] 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**(4): e0119454. doi: 10.1371/journal.pone.0119454.
- [5] 雷永. 花生高油酸的分子遗传机制及其高效遗传改良体系构建[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
LEI Yong. *Molecular Mechanism and Genetic Enhancement Technology for High Oleic Acid in Peanut (Arachis hypogaea L.)* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.
- [6] LOPEZ Y, NADAF H L, SMITH O D, *et al.* Genetic factors influencing high oleic acid content in Spanish market type peanut cultivars [J]. *Crop Sci*, 2000, **41**: 51 – 56.
- [7] CHI Xiaoyuan, YANG Qingli, PAN Lijuan, *et al.* Isolation and characterization of fatty acid desaturase genes from

- peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, **30**(8): 1393 – 1404.
- [8] YIN Dongmei, CUI Dangqun, JIA Bin. Construction of a high-efficient expression vector of Delta12 fatty acid desaturase in peanut and its prokaryotical expression [J]. *Genet Genom*, 2007, **34**(1): 81 – 88.
- [9] 周丽侠, 唐桂英, 陈高, 等. 花生 *AhFAD2* 基因的多态性及其与籽粒油酸/亚油酸比值间的相关性[J]. 作物学报, 2011, **37**(3): 415 – 423.
- ZHOU Lixia, TANG Guiying, CHEN Gao, *et al.* Correlation between *AhFAD2* polymorphism and oleic acid/linoleic acid ratio in peanut seeds [J]. *Acta Agron Sin*, 2011, **37**(3): 415 – 423.
- [10] YU Shanlin, CHEN Mingna, YANG Qingli, *et al.* Cloning, characterization and expression analysis of a stearyl-ACP desaturase gene from *Arachis hypogaea* L. [R]// IEEE. *Proceedings of the 2nd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics*, Tianjin, 2009: 1 – 6.
- [11] 殷冬梅, 胡晓峰, 张幸果, 等. 不同油酸亚油酸比值花生品种油酸脱氢酶基因的时空表达特征[J]. 中国油料作物学报, 2013, **35**(2): 137 – 141.
- YIN Dongmei, HU Xiaofeng, ZHANG Xingguo, *et al.* Temporal and spatial expression of oleate desaturase gene with different O/L values in peanut varieties [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2013, **35**(2): 137 – 141.
- [12] LOPEZ Y, NADAF H L, SMITH O D, *et al.* Isolation and characterization of the $\Delta 12$ -fatty acid desaturase in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and search for polymorphisms for the high oleate trait in Spanish market-type lines [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, **101**(7): 1131 – 1138.
- [13] BARKLEY N A, ISIEIB T G, WANG M L, *et al.* Genotypic effect of *AhFAD2* on fatty acid profiles in six segregating peanut (*Arachis hypogaea* L.) populations [J]. *Bmc Genet*, 2013, **14**(1): 62.
- [14] FANG Chaoqi, WANG Chuantang, WANG Piwu, *et al.* Identification of a novel mutation in *FAD2B* from a peanut EMS mutant with elevated oleate content [J]. *J Oleo Sci*, 2012, **61**(3): 143 – 148.
- [15] JUNG S, POWELL G, MOORE K, *et al.* The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) (II) Molecular basis and genetics of the trait [J]. *Mol Gen Genet*, 2000, **263**(5): 806 – 811.
- [16] CHEN Zhenbang, WANG Mingli, BARKLEY N A, *et al.* A simple allele-specific PCR assay for detecting *FAD2* Alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2010, **28**(3): 542 – 548.
- [17] CHU Y, RAMOS L, HOLBROOK C C, *et al.* Frequency of a loss-of-function mutation in oleoyl-PC desaturase (*AhFAD2A*) in the mini-core of the US peanut germplasm collection[J]. *Crop Sci*, 2007, **47**(6): 2372 – 2378.
- [18] NOELLEAB B, KELLYDCHENAULT C, WANG M L, *et al.* Development of a real-time PCR genotyping assay to identify high oleic acid peanuts (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Mol Breed*, 2010, **25**(3): 541 – 548.
- [19] CHI Xiaoyuan, HU Ruibo, YANG Qingli, *et al.* Validation of reference genes for gene expression studies in peanut by quantitative real-time RT-PCR [J]. *Mol Genet Genomics*, 2012, **287**(2): 167 – 176.
- [20] QUEHENBERGER O, ARMANDO A M, DENNIS E A. High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Biochim Et Biophysic Acta*, 2011, **1811**(11): 648 – 656.
- [21] VONGSVIVUT J, HERAUD P, ZHANG Wei, *et al.* Quantitative determination of fatty acid compositions in micro-encapsulated fish-oil supplements using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy [J]. *Food Chem*, 2012, **135**(2): 603 – 609.
- [22] 罗伟强. 气相色谱法测定葵花籽油的脂肪酸[J]. 食品工业科技, 2003, **24**(6): 79 – 80.
- LUO Weiqiang. Fatty acids of sunflower seed oil determined by gas chromatography [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2003, **24**(6): 79 – 80.
- [23] OHLROGGE J, BROWSE J. Lipid biosynthesis [J]. *Plant Cell*, 1995, **7**(7): 957 – 970.
- [24] 陈四龙, 李玉荣, 徐桂真, 等. 不同高油花生油分积累性的模拟研究[J]. 花生学报, 2016, **45**(2): 33 – 37.
- CHEN Silong, LI Yurong, XU Guizhen, *et al.* Simulation on oil accumulation characteristics in different high-oil peanut varieties [J]. *J Peanut Sci*, 2016, **45**(2): 33 – 37.
- [25] 迟晓元, 郝翠翠, 潘丽娟, 等. 不同花生品种脂肪酸组成及积累规律的研究[J]. 花生学报, 2016, **45**(3): 32 – 36.
- CHI Xiaoyuan, HAO Cuicui, PAN Liyuan, *et al.* Fatty acid accumulation pattern in different types of peanut [J]. *J Peanut Sci*, 2016, **45**(3): 32 – 36.