

DOI: 10.5846/stxb201806261402

谢小玉,何巧丽,侯爽,张小短,马仲炼.油菜 *FBA* 基因克隆、表达分析及其与抗旱性的关系.生态学报,2020,40(16):5708-5717.

Xie X Y, He Q L, Hou S, Zhang X D, Ma Z L. Cloning and expression analysis of *FBA* gene and its relationship with drought resistance in *Brassica napus* L. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(16): 5708-5717.

油菜 *FBA* 基因克隆、表达分析及其与抗旱性的关系

谢小玉*,何巧丽,侯爽,张小短,马仲炼

西南大学农学与生物科技学院,重庆 400715

摘要:为了解果糖-1,6-二磷酸醛缩酶(fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *FBA*)在油菜抗旱中的作用,揭示油菜干旱胁迫下 *FBA* 基因表达量、光合指标、产量等之间的关系,为油菜等作物抗旱性鉴定和抗旱性改良提供依据。以抗旱性强的甘蓝型油菜 94005 为材料,在初花期进行干旱胁迫处理,以正常浇水作为对照;测定叶片光合参数和 *FBA* 酶活性,通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析 *FBA* 基因的表达量;采用 RACE 方法对 *FBA* 基因进行全长克隆,并对测序结果进行生物信息学分析;复水后生长至成熟期测定产量,分析产量、光合指标、*FBA* 基因表达量等之间的关系。结果表明,随着干旱的加剧,油菜叶片的净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、蒸腾速率(T_r)、产量均下降,*FBA* 活性和 *FBA* 基因的表达量上升。在轻度、中度和重度干旱胁迫下,油菜叶片胞间 CO_2 浓度(C_i)显著下降,水分利用率(WUE)上升;极度胁迫下, C_i 上升,WUE 下降;油菜产量、净光合速率与 *FBA* 活性和 *FBA* 表达量呈显著负相关。*FBA* 基因全长序列 1440bp, ORF(开放阅读框)位于 60—1172 区域,编码 370 个氨基酸;蛋白分子量为 38.51 KDa,等电点 6.92;同源对比显示,甘蓝型油菜 *FBA* 基因与拟南芥 *FBA* 基因的一致性在 87%以上。二级结构预测结果表明 *FBA* 蛋白由 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链以及 β -转角组成,4 种二级结构元件所占比例分别为 43.85%、31.28%、17.60%、7.26%。因此,干旱胁迫下油菜的净光合速率下降、产量降低,随着胁迫的加剧,降低幅度增大。*FBA* 基因与干旱胁迫密切相关,干旱胁迫下,*FBA* 基因主要通过抑制光合、降低蒸腾、促进糖酵解和有氧呼吸等途径来提高植物对干旱胁迫的适应性。

关键词:甘蓝型油菜;干旱胁迫;光合;果糖-1,6-二磷酸醛缩酶(*FBA*);基因克隆;表达分析

Cloning and expression analysis of *FBA* gene and its relationship with drought resistance in *Brassica napus* L.

XIE Xiaoyu*, HE Qiaoli, HOU Shuang, ZHANG Xiaoduan, MA Zhonglian

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: This paper aims to understand the function of fructose-1, 6-bisphosphate aldolase (*FBA*) in drought resistance of rapeseed (*Brassica napus* L.), to reveal the relationship between gene expression and photosynthetic index and yield under drought stress, and to provide a reference for the identification and improvement of drought resistance. The high drought-tolerant rapeseed 94005 as experimental materials, were treated with drought stress during the flowering stage and with normal irrigation as the control group. We measured the photosynthetic parameters and *FBA* enzyme activities of the leaves and analyzed the expression of *FBA* through real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The RACE method was used to get the full-length clone of *FBA* gene. The sequencing results were analyzed with bioinformatics. After rehydration, the plants grew until maturity and rapeseed yield was measured, meanwhile the relationship was analyzed between gene expression, physiological parameters, yield and so on. The results showed that the rapeseed yield and net photosynthetic rate (P_n), stomatal conductance (G_s), and transpiration rate (T_r) of the leaves were significantly decreased, fructose-1,

基金项目:国家自然科学基金项目(31871583);公益性行业(农业)科研专项(201503127)

收稿日期:2018-06-26; 网络出版日期:2020-06-08

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xiexy8009@163.com

6-bisphosphate aldolase activity and gene expression were increased with the drought stress level increasing. The intercellular CO_2 concentration (C_i) was decreased and water use efficiency (WUE) was significantly increased under lightly, moderate, and severe stress, while the C_i was increased and WUE was decreased under extreme stress. The correlation analysis showed that the net photosynthetic rate and yield had a significantly negative correlation with *FBA* activity and the expression of *FBA*. The full length of *FBA* was 1440bp, and the ORF was located in 60bp—1172bp, encoding a protein of 370 amino acids with a predicted molecular weight of 38.51 kD and isoelectric point of 6.92. Homology comparison indicated that *FBA* of rapeseed had a consistency over 87% with *Arabidopsis FBA*. The secondary structure prediction showed that *FBA* protein consisted of α -helix, random coil, extending chain, and β -corner, as well as the proportion of four kinds of secondary structural elements was 43.85%, 31.28%, 17.60%, and 7.26%, respectively. The net photosynthetic rate and yield of rapeseed were decreased under drought stress, and the decrease was greater with the enhancement of stress. *FBA* gene was closely related to drought stress. *FBA* gene mainly improved plant adaptability to drought stress by inhibiting photosynthesis rate, reducing of transpiration rate, promoting effect of glycolysis, and aerobic respiration under drought stress.

Key Words: *Brassica napus* L.; drought stress; photosynthetic characteristics; fructose-1,6-bisphosphate aldolase (*FBA*); gene clone; gene expression analysis

季节性干旱是油菜生产的主要自然灾害之一,尤其春旱使我国长江中下游地区的油菜平均减产 20% 以上^[1]。研究表明,干旱胁迫下油菜的净光合速率(the net photosynthetic rate, P_n)降低^[2],随干旱胁迫时间的延长,下降幅度不断增加,下降幅度与油菜抗旱性有关^[3]。油菜产量与蕾苔期叶片净光合速率抗旱系数呈极显著正相关^[4]。要提高油菜的抗旱性,就需提高干旱胁迫下油菜的光合效率。果糖-1,6-二磷酸醛缩酶(fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *FBA*)既参与了糖酵解和糖异生过程,同时又参与了磷酸戊糖途径和卡尔文循环^[5-6],对细胞生命活动起着至关重要的作用。对油菜的研究发现 *FBA* 基因参与干旱胁迫应答。通过对 *FBA* 基因的克隆、表达分析及干旱胁迫下基因表达量与净光合速率、产量等之间的关系分析,对于揭示 *FBA* 基因在油菜抗旱中的作用及对油菜抗旱性鉴定和抗旱性改良具有重要意义。

前人研究表明,在自然界中存在两类 *FBA*,有不依赖金属离子的第 I 类酶和依赖金属离子的第 II 类酶^[7]。高等植物中的 *FBA* 均为 I 型,又存在 2 种亚型,即胞质型 *FBA* 和质体型 *FBA*^[8]。前者存在于细胞质基质中,参与糖酵解和糖异生途径,催化果糖-1,6-二磷酸的裂解^[9-10];后者分布于叶绿体中,参与卡尔文循环中 1,5-二磷酸核酮糖的再生^[11-12]。近几年研究表明,植物的果糖-1,6-二磷酸醛缩酶不仅参与了很多的生理和生化过程^[13-15],还参与了植物对高温^[16]、低温^[8]、干旱^[17]、盐^[10,18]、镉^[19]、硼^[20]等多种胁迫的响应和信号传导过程。Lu 等^[8]发现盐胁迫下拟南芥的 *FBA* 基因家族成员中的 *AtFBA3*、*AtFBA4*、*AtFBA6* 和 *AtFBA8* 表达量均上调;Fan 等^[10]研究表明海马齿的 *FBA* 基因在盐胁迫后强烈表达,超表达后可以明显提高植株的耐盐性;胡杨细胞质中的果糖-1,6-二磷酸醛缩酶通过促进糖酵解和有氧呼吸途径提高植物对盐胁迫的适应性^[21]。Larkindale 等^[22]研究表明 37℃ 的高温显著诱导拟南芥 *AtFBA6* 基因的大量积累。孙胜楠等^[23]研究表明,*FBA* 活性与基因表达均受高温诱导,诱导效应与温度升高幅度和高温持续时间有关。通过表型分析及基因芯片检测发现,在拟南芥低温致死的突变体中,*FBA* 基因的表达量发生了明显的上调^[24]。干旱胁迫下,拟南芥的 *AtFBA1*、6、8 表达量上调 8 倍以上^[25];陈娜^[26]等的研究也表明,*FBA* 基因可能参与花生对高盐和干旱胁迫的适应性调控。目前研究者们已克隆出了紫花苜蓿^[27]、番茄^[16]等多种植物的 *FBA* 基因序列,Uematsu 等^[12]通过将拟南芥的质体 *FBA* 基因在烟草中进行异源表达,使转基因烟草的光合速率增加,促进了转基因烟草的生长和生物量的积累。但至今未见关于油菜 *FBA* 基因研究的报道。

本研究通过对前期构建的基于干旱胁迫下甘蓝型油菜 SSH 文库^[28]的测序分析,发现 *FBA* 基因参与干旱胁迫应答。在此基础上,采用 RACE 方法对基因进行全长克隆、测序和生物信息学分析;利用实时荧光定量

PCR(RT-qPCR)测定 *FBA* 基因表达量,分析表达量与干旱胁迫下油菜光合指标、酶活性、产量等之间的关系,明确 *FBA* 基因与油菜抗旱性的关系,为油菜 *FBA* 基因功能研究以及利用 *FBA* 基因改良作物抗旱性提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试验处理

供试材料为经鉴定抗旱能力强的甘蓝型油菜 94005(由重庆市油菜工程研究中心提供)。挑选籽粒饱满、大小均一的油菜种子,用 15% 的次氯酸钠消毒 20 min,然后用无菌水清洗 5 次,播种于室内以蛭石和草炭(1:1)为基质的塑料营养钵中,在室温下培养至幼苗四叶一心时将其移栽到遮雨人工网室内的盆钵中(盆高 40 cm,直径 30 cm,盆中所用基质为草炭土、自然土壤和蛭石按 1:3:1 比例混合而成的混合物,基质提前用多菌灵和敌百虫杀菌灭虫,每盆装基质 15.0 kg,使其达 9 成满,施氮磷钾复合肥 30 g),每盆定植 2 株,期间进行正常的田间管理。

油菜生长至初花期,选择长势良好且生长一致的植株进行干旱处理,分为 5 组:正常供水(control, CK)、轻度干旱(lightly drought, LD)、中度干旱(moderate drought, MD)、重度干旱(severe drought, SD)和极度干旱(extreme drought, ED),其土壤相对含水量分别为 65%—75%、50%—55%、40%—45%、20%—30%、10%—15%。每个处理种植 8 盆,共 16 株。自然干旱至设定土壤相对含水量标准范围,每天 8:00 和 18:00 采用称重法补水控水,处理期间除盆内土壤含水量差异外其他管理一致,土壤相对含水量达到干旱胁迫条件时持续 7d 取样测定,之后复水使土壤含水量恢复到对照水平,并正常水分管理培养至成熟期测定产量。

1.2 试验方法

1.2.1 抑制消减杂交(Suppression subtractive hybridization, SSH)文库构建

对干旱胁迫的植株分别在第 1 天、第 3 天、第 5 天和第 7 天 9:00—9:30 采集对照和处理顶部完全展开的第 1 叶混合,液氮速冻,−80℃ 保存。进行 RNA 的提取及 mRNA 的纯化,抑制性消减杂交,SSH-cDNA 文库构建以及差异表达序列测序和生物信息学分析^[30]。

1.2.2 光合参数的测定

用美国 LI-COR 公司生产的 LI-6400 光合仪,在干旱胁迫的第 7 天(晴天)10:00 点左右,对对照和处理植株的顶部外部向阳完全展开的长势一致的第 2—3 片叶测定净光合速率(Net photosynthetic rate, P_n)、气孔导度(Stomatal conductance, G_s)、胞间 CO_2 浓度(Intercellular CO_2 concentration, C_i)、蒸腾速率(Transpiration rate, T_r),采用 LI-6400-02B 红蓝光光源,设定光强为 $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,温度为 25℃,大气 CO_2 浓度(C_a)为 $400 \mu\text{mol/mol}$,空气相对湿度为 50%—70%;计算水分利用率(Water use efficiency, WUE),水分利用率(WUE)=光合速率(P_n)/蒸腾速率(T_r)。采用轮回测定的方法,每个处理测定 3 株。

1.2.3 *FBA* 酶活性的测定

剪取测定完光合参数的叶片,−20℃ 保存,采用上海优选生物科技有限公司的植物果糖-1,6-二磷酸醛缩酶试剂盒(微量法)测定 *FBA* 的活性,所有操作步骤均按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 *FBA* 基因表达量的测定

剪取测定完光合参数的叶片,液氮速冻,−80℃ 保存,采用天根公司的 RNA prep pure 植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 RNA 的完整性,用紫外分光光度计测定纯度。使用 TAKARA 公司的 PrimerScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser 试剂盒进行 RNA 的纯化和反转录合成 cDNA,根据 SSH 文库中 *FBA* 基因的 EST(表达序列标签,Expressed sequence tag)序列,利用 Vector NTI 软件和 primer premier 5.0 软件设计引物,正向引物为 5'-TACCTGGCATCAAAGTCGACAA-3',反向引物 5'-TCG TAGTACTTCTTGCAACGCT-3'。以 *ACT7* 和 *UBC12* 为候选内参基因,通过基因表达稳定性的分析^[29],以 *ACT7* 为内参基因,正向引物 TGGGTTTGCTGGTGACGAT,反向引物 TGCCTAGGACGACCAACA ATACT。使用 BIO-

RAD 公司的 iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix 试剂盒进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 扩增。PCR 程序为: 95℃ 3min, 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 45 个循环; 72℃ 10 min。每个样品 4 个重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达量^[30]。

1.2.5 *FBA* 基因的全长克隆

采用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒获得基因的 3' 端序列。以 RACE-Ready cDNA 为模板, 在试剂盒提供的通用引物 UPM 及基因特异性引物 GSP 引导下, 用 Advantage 2 Polymerase Mix 催化合成相关基因的 cDNA 末端。引物序列为: FBA-1: AGGAAGGAGGAGTCTTACCTGGCATCA、FBA-2: TCGACAAGGGCACCCTTTCTCTACC, 第一轮 PCR 扩增, 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 68℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 25 循环; 72℃ 10 min; 再进行第二轮 PCR 扩增, 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 sec, 68℃ 30 sec, 72℃ 3 min, 25 循环; 72℃ 10 min; PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 按 TIANGEN 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行凝胶回收, 回收纯化后的 PCR 产物送上海生工测序。

1.2.6 测序结果的生物信息学分析

采用 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的 BLAST 工具对所测得的序列进行基因序列的相似性及同源性查找, 并利用这些序列进行基因同源性的比较, 用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线分析全长序列的开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 利用 DNAMAN 软件将基因的 ORF 序列翻译成氨基酸, 利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白的理化性质, 利用 PSORT II Prediction (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 进行亚细胞定位预测; 采用 PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>) 预测蛋白的二级结构, 运用 SWISS-MODEL 对氨基酸序列进行蛋白质三级结构预测分析, 用 Raswin 视图软件得到该蛋白质三维结构。用 Vector NTI Advance 11.5 程序进行序列比对分析, 用 MEGA5.2.2 软件构建进化树, 在 SOPMA 和 SWISS MODEL 网站上进行蛋白质结构分析。

2 结果与分析

2.1 SSH 分析发现 *FBA* 基因与抗旱有关

通过对干旱诱导的 SSH 文库中 646 个经 PCR 鉴定的阳性克隆测序, 获得 639 个单一的 EST, 经过聚类、拼接和去除冗余, 获得重叠群 (contigs) 89 条, 单拷贝序列 (singleton) 97 条。对测序获得的 186 条 unigene 进行 Blastn 和 Blastx 数据库的序列比对, 发现其中 166 条具有同源基因, 20 条没有匹配项。具有同源基因的 EST 中 154 条与已知功能的蛋白有同源性, 其中果糖-1, 6-二磷酸醛缩酶基因 11 条, 占具有同源性基因的 6.63%。表 1 列出了部分 ESTs。

2.2 *FBA* 基因的克隆与序列分析

2.2.1 *FBA* 基因的 RACE 克隆

在已获得的保守区基础上, 以 3' RACE 的 cDNA 为模板, 经 2 轮 PCR 之后扩增出大小约 900bp 的单一 DNA 片段。将第二轮 PCR 产物进行电泳并对目的条带进行切胶回收纯化测序, 测序结果提交 Genbank, 命名为 *BnFBA1*, 基因登录号为 MH316131。经过软件分析, 确认此片段大小为 975 bp, 与保守区序列有 368 bp 的重叠片段, 是油菜 *FBA* 的 mRNA 3' 端序列。

2.2.2 *FBA* 基因的序列分析

(1) 油菜 *BnFBA1* 基因编码产物的基本性质分析

用 DNAMAN V6 将测序结果与已知 *FBA* 序列进行拼接, 得到 *FBA* 全长序列 1440bp, 预测基因的 ORF 位于 60—1170 区域 (共 1107bp), 编码 369 个氨基酸。

经 ProtParam 分析, *FBA* 蛋白序列分子量为 38.51 KDa, 等电点 6.92, 酸性氨基酸残基 (Asp+Glu) 总数为 70 个, 碱性氨基酸残基 (Arg+Lys) 总数为 47 个, 原子总数为 5445, 分子式为 $C_{1705}H_{2738}N_{466}O_{526}S_{10}$, 半衰期为 30h, 稳定系数 29.51, 是稳定蛋白。较高含量的氨基酸有 Ala (丙氨酸, 10.6%), Leu (亮氨酸, 10.1%), 不含 Pyl (苯

丙氨酸) 和 Sec(丝氨酸)。亚细胞定位分析表明该蛋白是细胞质蛋白。

表 1 油菜叶片干旱胁迫下诱导表达的部分基因
Table 1 Part results of Blast alignment in rapeseed leaves under drought stress

克隆号 Clone No.	表达序列 标签数量 No. of expressed sequence tags (ESTs)	同源性 Homology	物种 Species	一致性 Identity/%	期望值 Expectation value (E-value)
CTE87		C3H4 type zinc finger protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	66	7×10^{-20}
contig37	6	zinc finger family protein	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	71	9×10^{-93}
contig39	14	NAC5	<i>Brassica napus</i>	91	9×10^{-81}
CTE68		F-box protein 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	70	2×10^{-61}
contig15	6	F-box family protein	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	67	6×10^{-96}
CTE80		homeobox-leucine zipper protein ATHB-7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	80	1×10^{-23}
contig20	7	probable calcium-binding protein CML20-like	<i>Cucumis sativus</i>	82	4×10^{-63}
contig1	11	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	92	3×10^{-110}
contig6	14	photosystem I reaction center subunit E	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82	4×10^{-21}
contig16	8	malate dehydrogenase	<i>Brassica oleracea</i>	100	8×10^{-125}
CTE9		peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	96	6×10^{-143}
CTE72		gamma carbonic anhydrase like 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99	4×10^{-64}
CTE75		cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	80	9×10^{-34}
contig68	4	chloroplast thylakoidal processing peptidase	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	88	4×10^{-61}
contig77	9	Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein	<i>Medicago truncatula</i>	94	3×10^{-43}
Contig89	7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase	<i>Brassica rapa subsp. chinensis</i>	100	3×10^{-105}
CTE89		chloroplast beta-carbonic anhydrase	<i>Brassica napus</i>	99	3×10^{-21}
contig42	15	ELIP	<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	94	1×10^{-61}

(2) 油菜 *BnFBA1* 蛋白高级结构的预测

BnFBA1 基因编码的蛋白的二级结构预测结果(图 1)表明,该基因编码的氨基酸序列由 43.85%的 α 螺旋(alpha helix)、31.28%的无规卷曲(random coil)、17.60% 的延伸链(extended strand)、7.26%的 β 转角(beta turn)构成。

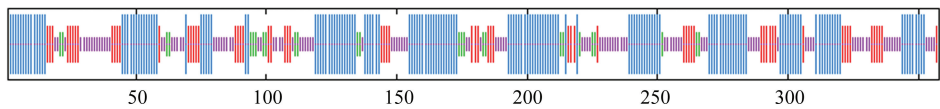


图 1 *BnFBA1* 蛋白二级结构预测

Fig.1 The predicted secondary structure of *BnFBA1* protein
蓝色; α 螺旋; 紫色;无规则卷曲; 红色;延伸链; 绿色; β 转角

BnFBA1 蛋白的三级结构预测(图 2)模型中清晰地看到 α 螺旋和 β 片层结构,与二级结构预测结果基本一致。

(3) 不同物种间 *BnFBA1* 基因编码蛋白质同源性分析

多重序列比对分析显示甘蓝型油菜 94005 的 *BnFBA1* 与拟南芥、花生、野生大豆、苜蓿等 7 种植物的细胞质 *FBA* 有 69.8%的总体同源性(图 3);从构建的系统进化树(图 4)可看出,甘蓝型油菜 94005 的细胞质 *FBA* 与拟南芥的细胞质 *FBA* 同源性最高。

2.3 *FBA* 的表达分析及其与抗旱性关系

2.3.1 干旱对油菜叶片 *FBA* 表达量的影响

所有提取的叶片总 RNA 通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后的结果表明 18S 与 28S 条带清晰、明亮,28S 条带比 18S 条带更亮,两者之比大于 1。经核酸蛋白检测仪检测,提取的总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值均在 2.0—2.2 之间,表明提取的总 RNA 完整、质量高、纯度好,达到了反转录和 RT-qPCR 的要求(图 5)。

实时荧光定量 PCR 结果(表 2)表明,在干旱胁迫下,*FBA* 基因的表达量随着干旱胁迫程度的增加而增加,其中轻度、中度、重度和极度干旱下上升幅度分别为 1.73%、3.97%、6.48%、7.23%。

2.3.2 *FBA* 的表达与抗旱性的关系

(1) 干旱胁迫下油菜产量、光合特性及 *FBA* 活性的变化

表 3 表明,随着干旱胁迫的加剧,油菜产量、叶片 P_n 、 G_s 以及 Tr 下降幅度加大。在轻度、中度、重度和极度干旱胁迫下,产量分别较对照降低 40.78%、45.55%、53.69%、62.90%, P_n 分别较对照降低 17.96%、45.42%、65.43%、82.71%, G_s 分别较对照降低 34.02%、65.98%、83.50%、84.87%, Tr 分别较对照降低 26.55%、47.57%、78.13%、80.54%。

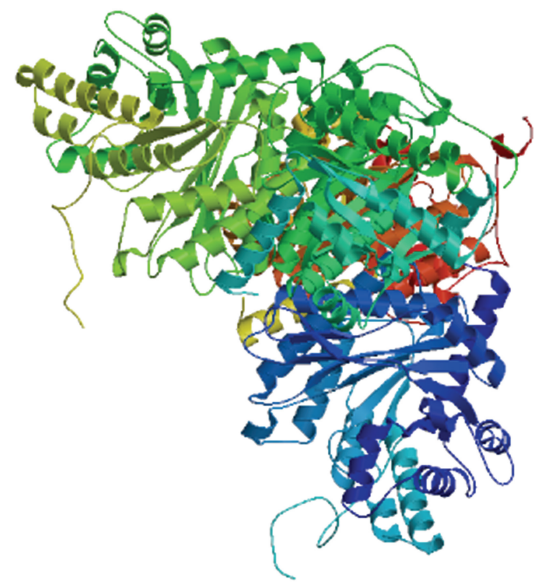


图 2 *BnFBA1* 蛋白三级结构预测模型
Fig.2 Predicted 3-D dimensional structure of *BnFBA1* protein

表 2 干旱胁迫下 *BnFBA1* 基因的表达情况

Table 2 The relative Expression value of <i>BnFBA1</i> under drought stress					
处理 Treatment	CK	LD	MD	SD	ED
<i>BnFBA1</i> 基因的表达量 Expression value of <i>BnFBA1</i>	24.686±0.371cC	25.114±0.206bBC	25.667±0.229bAB	26.286±0.143aA	26.471±0.229aA

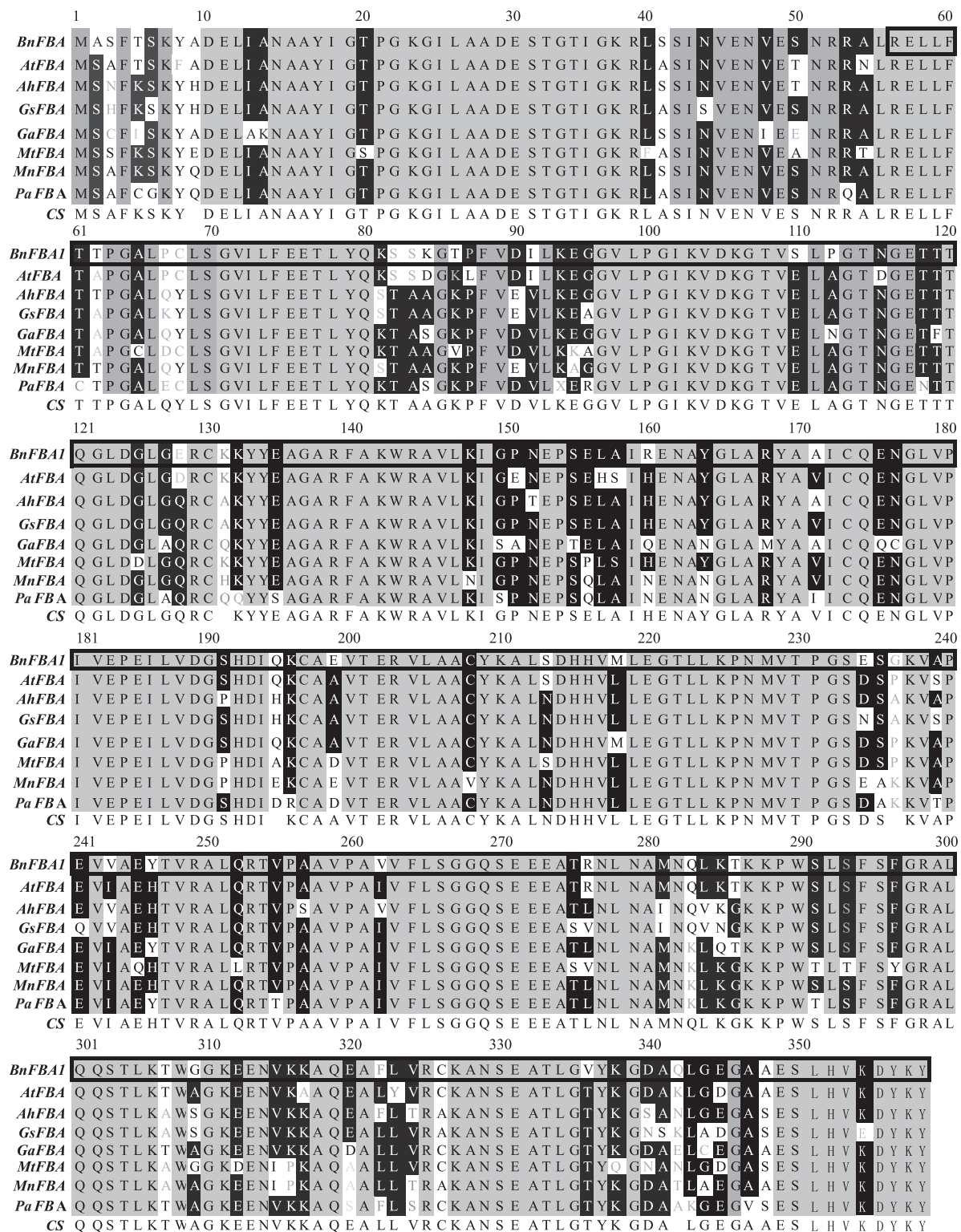
表中数据后不同大写/小写字母表示在 0.01/0.05 水平差异显著; CK: 正常供水 Control; LD: 轻度干旱 Lightly drought; MD: 中度干旱 Moderate drought; SD: 重度干旱 Severe drought; ED: 极度干旱 Extreme drought

FBA 活性随着干旱胁迫的增加而增加,轻度、中度、重度和极度干旱胁迫下,分别比对照高 18.45%、31.69%、32.35%、35.66%。而 C_i 随着干旱胁迫的加剧降低,到重度干旱下达到最低,而极度干旱下又上升; WUE 随着干旱胁迫的加剧不断上升,到重度干旱胁迫下达到最大,极度干旱胁迫下又下降。

表 3 干旱胁迫对油菜产量、光合特性及 *FBA* 活性的影响

Table 3 Effects of drought stress on yield, photosynthetic parameters and <i>FBA</i> activity of rapeseed					
处理 Treatment	CK	LD	MD	SD	ED
产量 Yield/(g/株)	13.02±1.23aA	7.71±0.58bB	7.09±0.72bB	6.03±0.69cB	4.83±0.48dC
$P_n/(\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1})$	8.194±1.056aA	6.722±1.639bB	4.472±0.431cC	2.833±0.411dD	1.417±0.153eE
$C_i/(\mu\text{mol/mol})$	306.482±23.6116aA	300.926±28.704bB	227.074±17.593 cC	193.519±22.222 dD	287.963±28.704 bB
$G_s/(\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1})$	95.4±13.44aA	62.95±12.46bB	32.46±4.92cC	15.743±3.61dD	14.43±2.62 dD
$Tr/(\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1})$	0.663±0.092aA	0.487±0.084bB	0.3476±0.034cC	0.145±0.032dD	0.129±0.021 dD
WUE/(g/kg)	0.31±0.049dD	0.353±0.058cC	0.498±0.033bB	0.563±0.047aA	0.365±0.057cC
<i>FBA</i> 活性 <i>FBA</i> activity/(U/L)	10.99±0.727bB	13.018±2.000abA	14.473±1.018aA	14.545±1.164 aA	14.909±2.218aA

表中数据后不同大写/小写字母表示在 0.01/0.05 水平差异显著; P_n : 净光合速率 Net photosynthetic rate; C_i : 胞间二氧化碳浓度 Interacellular CO_2 concentration; G_s : 气孔导度 Stomatal conductance; Tr : 蒸腾速率 Transpiration rate; WUE: 水分利用率 Water use efficiency; *FBA*: 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 Fructose-1,6-bisphosphate aldolase

图3 油菜 *BnFBA1* 与其他植物 *FBA* 多重比对Fig.3 Alignment of the amino acids of *BnFBA1* with other species

BnFBA1: 油菜果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因 *Brassica napus FBA*; *AtFBA*: 拟南芥果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因 *Arabidopsis thaliana FBA*; *AhFBA*: 花生果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因 *Arachis hypogaea FBA*; *GsFBA*: 野生大豆果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因 *Glycine soja FBA*; *GaFBA*: 乔木棉果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因 *Gossypium arborreum FBA*; *MtFBA*: 苜蓿果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因 *Medicago truncatula FBA*; *MnFBA*: 野桑果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因 *Morus notabilis FBA*; *PaFBA*: 油梨果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因 *Persea americana FBA*; *CS*: 共有序列 Consensus sequence。黑色框中为糖酵解结构域。灰色背景表示相似度 100% 的氨基酸序列, 黑色背景表示相似度 75% 的氨基酸序列, 白色背景表示相似度 50% 的氨基酸序列

(2) 干旱胁迫下 *FBA* 基因表达量、酶活性和油菜产量等指标的关系

用 SPSS 17.0 软件分析干旱胁迫处理下油菜 *FBA* 基因的表达量与酶活性、产量、光合参数的相关性(表 4)表明, *FBA* 表达量与 *FBA* 活性呈显著正相关, 与 *Pn*、*Gs*、*Tr* 呈极显著负相关, 与产量呈显著负相关。 *FBA* 活性与干旱胁迫下 *Pn* 呈显著负相关, 与产量、*Gs*、*Tr* 呈极显著负相关。

3 讨论

3.1 *FBA* 基因与油菜抗旱性密切相关

FBA 作为一类重要的糖代谢酶, 处于 6C 糖可逆地转化为 3C 糖的关键部位, 越来越多的证据表明这一家族在许多代谢和发育过程中扮演着重要的作用^[31]。近年来, *FBA* 相继在拟南芥^[8]、番茄^[16]、黄瓜^[31] 等不同的物种中展开了研究, 发现 *FBA* 基因除了受光照、温度、盐等非生物因素的胁迫外, 还参与了植物的干旱调控^[8,17]。本研究从干旱胁迫下的 SSH 文库分析发现 *FBA* 参与油菜对于干旱胁迫的应答; 干旱胁迫下, 油菜 *BnFBA1* 基因表达量和酶活性增加, 这与拟南芥的研究结果相同^[25]。这说明 *FBA* 是干旱胁迫响应基因。

干旱胁迫导致油菜叶片 *Gs*、*Tr*、*Pn* 和产量下降; 在轻度 (Lightly drought, LD)、中度 (Moderate drought, MD) 和重度 (Severe drought, SD) 胁迫下, *Ci* 下降、WUE 提高, 而在极度干旱 (Extreme drought, ED) 下, *Ci* 上升、WUE 下降, 可能是由于干旱胁迫下果糖-1,6-二磷酸醛缩酶参与糖酵解, 分解葡萄糖, 使细胞内糖分降低, 水势升高, 气孔关闭; 而在极度干旱 (ED) 下由于气孔关闭时间较长, *Ci* 升高, 细胞内 pH 值降低, 水势降低, WUE 下降, *Pn* 下降, 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶参与糖酵解并合成甘油来调节细胞内渗透压以提高油菜抗旱性。

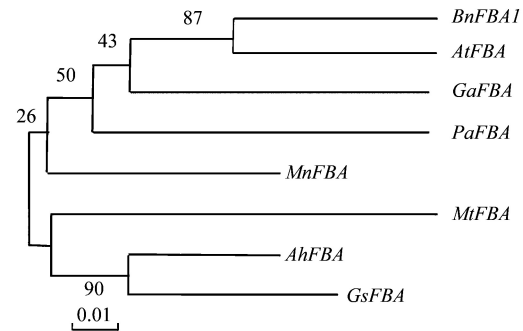


图 4 油菜 *BnFBA1* 的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic relationship of amino acid sequences between *BnFBA1* and other species

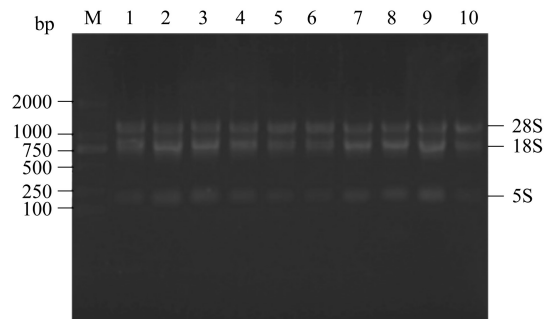


图 5 总 RNA 电泳图

Fig.5 Electrophoresis profile of total RNA

M 代表标记, 1/2/3/4/5 代表 CK/LD/MD/SD/ED/, 6/7/8/9/10 为重复; CK: 正常供水 Control; LD: 轻度干旱 Lightly drought; MD: 中度干旱 Moderate drought; SD: 重度干旱 Severe drought; ED: 极度干旱 Extreme drought

表 4 油菜产量、基因表达量、酶活性、净光合速率的相关性

Table 4 The relationship among gene expression, enzyme activity, *Pn*, yield

指标 Index	产量 Yield	<i>FBA</i> 表达量 <i>FBA</i> expression level	<i>FBA</i> 活性 <i>FBA</i> activity	净光合速率 <i>Pn</i>	气孔导度 <i>Gs</i>	蒸腾速率 <i>Tr</i>	水分利用率 WUE	胞间 CO ₂ 浓度 <i>Ci</i>
产量 Yield	1							
<i>FBA</i> 表达量 <i>FBA</i> expression level	-0.897 *	1						
<i>FBA</i> 活性 <i>FBA</i> activity	-0.967 **	0.920 *	1					
净光合速率 <i>Pn</i>	0.897 *	-0.995 **	-0.923 *	1				
气孔导度 <i>Gs</i>	0.945 *	-0.972 **	-0.981 **	0.966 **	1			
蒸腾速率 <i>Tr</i>	0.921 *	-0.995 **	-0.935 **	0.984 **	0.983 **	1		
水分利用率 WUE	-0.528	0.581	0.656	-0.525	-0.687	-0.623	1	
胞间 CO ₂ 浓度 <i>Ci</i>	0.471	-0.569	-0.614	0.513	0.66	0.604	-0.994 **	1

** : 在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关; * : 在 0.05 水平 (双侧) 上显著相关

3.2 克隆的油菜 *BnFBA1* 基因属于胞质型 *FBA*

干旱处理小麦 7d 后,包括果糖-1,6-二磷酸醛缩酶在内的一系列参与卡尔文循环的酶基因表达协同下调^[32]。而本研究表明,干旱胁迫下 *BnFBA1* 基因表达上调,*FBA* 基因表达量、*FBA* 酶活性与油菜叶片 *Pn*、产量呈显著负相关。对成功克隆的 *BnFBA1* 同源的氨基酸序列对比显示甘蓝型油菜 94005 的 *FBA* 与拟南芥、花生、大豆、苜蓿等 7 种植物的细胞质 *FBA* 有 69.8% 的总体同源性;与拟南芥的细胞质 *FBA* 同源性最高。这表明 *FBA* 在进化过程中保证了足够的遗传稳定性,克隆的 *BnFBA1* 基因属于胞质型 *FBA*,这与亚细胞定位预测结果一致。

3.3 需进一步研究的问题

前人研究表明,*FBA* 基因一方面改变植物糖类物质的代谢,另一方面可调节植物的生殖生长^[25],本研究中干旱胁迫下油菜产量降低是否是由于 *FBA* 促进生殖生长提前而导致产量下降,还需进一步研究。同时,后期实验进一步发掘更多的 *FBA* 基因,进一步分析蛋白二级、三级结构与抗旱性的关系,深入研究胞质型 *FBA* 调控糖代谢和生殖生长的过程及该基因家族在油菜干旱胁迫下的调节机制。

4 结论

从油菜中成功克隆获得 1 条 *FBA* 基因,该基因与油菜抗旱性密切相关,属于胞质型 *FBA*。

参考文献 (References):

- [1] 杨春杰,程勇,邹崇顺,张学昆,郑普英,李桂英,杨畅. 模拟干旱胁迫下不同甘蓝型油菜品种发芽能力的配合力与遗传效应分析. 作物学报, 2008, 34(10): 1744-1749.
- [2] 宋丰萍,蒙祖庆,次仁德吉,大次卓嘎. 干旱胁迫对油菜花期光合特性的影响. 西北农业学报, 2014, 23(8): 99-105.
- [3] 蒙祖庆,宋丰萍,刘振兴,张方凯. 干旱及复水对油菜苗期光合及叶绿素荧光特性的影响. 中国油料作物学报, 2012, 34(1): 40-47.
- [4] 白鹏,冉春燕,谢小玉. 干旱胁迫对油菜蕾薹期生理特性及农艺性状的影响. 中国农业科学, 2014, 47(18): 3566-3576.
- [5] 穆建强,梁文洁,张芳松,熊意,祝建波. 天山雪莲 *sikFBA1* 基因克隆定位及表达分析. 西北植物学报, 2016, 36(11): 2137-2145.
- [6] Stracquadanio G, Umeton R, Papini A, Liò P, Nicosia G. Analysis and optimization of C₃ photosynthetic carbon metabolism//Proceedings of 2010 IEEE International Conference on Bioinformatics and Bioengineering. Philadelphia, PA, USA: IEEE, 2010: 44-51.
- [7] Alefounder P R, Baldwin S A, Perham R N, and Short N J. Cloning, sequence analysis and over-expression of the gene for the Class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. Biochemical Journal, 1989, 257(2): 529-534.
- [8] Lu W, Tang X L, Huo Y Q, Xu R, Qi S D, Huang J G, Zheng C C, Wu C A. Identification and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. Gene, 2012, 503(1): 65-74.
- [9] Konishi H, Yamane H, Maeshima M, Komatsu S. Characterization of fructose-bisphosphate aldolase regulated by gibberellin in roots of rice seedling. Plant Molecular Biology, 2004, 56(6): 839-848.
- [10] Fan W, Zhang Z L, Zhang Y L. Cloning and molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene regulated by high-salinity and drought in *Sesuvium portulacastrum*. Plant Cell Reports, 2009, 28(6): 975-984.
- [11] Sonnewald U, Lerchl J, Zrenner R, Frommer W. Manipulation of sink-source relations in transgenic plants. Plant, Cell & Environment, 1994, 17(5): 649-658.
- [12] Uematsu K, Suzuki N, Iwamae T, Inui M, Yukawa H. Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(8): 3001-3009.
- [13] 曾艳玲. 油茶种仁糖醇解途径解析及醛缩酶基因家族功能研究,长沙:中南林业科技大学,2013
- [14] Zeng Y L, Tan X F, Zhang L, Jiang N, Cao H P. Identification and expression of fructose-1,6-bisphosphate aldolase genes and their relations to oil content in developing seeds of tea oil tree (*Camellia oleifera*). PLoS One, 2014, 9(9): e107422.
- [15] Zhang G X, Liu Y F, Ni Y, Meng Z J, Lu T, Li T L. Exogenous calcium alleviates low night temperature stress on the photosynthetic apparatus of tomato leaves. PLoS One, 2014, 9(5): e97322.
- [16] Cai B B, Li Q, Xu Y C, Yang L, Bi H G, Ai X Z. Genome-wide analysis of the fructose 1,6-bisphosphate aldolase (*FBA*) gene family and functional characterization of *FBA7* in tomato. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 108: 251-265.
- [17] Khanna S M, Taxak P C, Jain P K, Saini R, Srinivasan R. Glycolytic enzyme activities and gene expression in *Cicer arietinum* exposed to water-deficit stress. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 173(8): 2241-2253.

- [18] Murad A M, Molinari H B C, Magalhães B S, Franco A C, Takahashi F S C, de Oliveira N G, Franco O L, Quirino B F. Physiological and proteomic analyses of *Saccharum* spp. grown under salt stress. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98463.
- [19] Sarry J E, Kuhn L, Ducruix C, Lafaye A, Junot C, Hugouvieux V, Jourdain A, Bastien O, Fievet J B, Vaillien D, Amekraz B, Moulin C, Ezan E, Garin J, Bourguignon J. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics*, 2006, 6(7): 2180-2198.
- [20] Chen M, Mishra S, Heckathorn S A, Frantz J M, Krause C. Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* leaves in response to acute boron deficiency and toxicity reveals effects on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and protein synthesis. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(3/4): 235-242.
- [21] 胡月, 张帆, 申泽丹, 于瑞, 赵瑞, 沈昕, 陈少良. 胡杨果糖-1,6-二磷酸醛缩酶的定位及功能研究. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(6): 743-751.
- [22] Larkindale J, Vierling E. Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiology*, 2008, 146(2): 748-761.
- [23] 孙胜楠, 王强, 孙晨晨, 刘丰娇, 毕焕改, 艾希珍. 黄瓜幼苗光合作用对高温胁迫的响应与适应. *应用生态学报*, 2017, 28(5): 1603-1610.
- [24] Provart N J, Gil P, Chen W Q, Han B, Chang H S, Wang X, Zhu T. Gene expression phenotypes of *Arabidopsis* associated with sensitivity to low temperatures. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 893-906.
- [25] 卢玮. 拟南芥果糖-1,6-二磷酸醛缩酶家族分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
- [26] 陈娜, 潘丽娟, 迟晓元, 陈明娜, 王通, 王冕, 杨珍, 胡冬青, 王道远, 禹山林. 花生果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因 *AhFBA1* 的克隆与表达. *作物学报*, 2014, 40(5): 934-941.
- [27] 龙瑞才, 杨青川, 康俊梅, 王凭青, 秦智慧. 紫花苜蓿果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因全长克隆及分析. *西北植物学报*, 2010, 30(6): 1075-1082.
- [28] 谢小玉, 张兵, 张霞, 马仲炼, 李加纳. 干旱胁迫下油菜消减文库的构建及分析. *作物学报*, 2013, 39(4): 744-752.
- [29] 张喆, 白鹏, 肖通, 谢小玉. 甘蓝型油菜 *P5CSb* 和 *OAT* 基因在干旱胁迫下的表达分析. *西北农业学报*, 2013, 22(9): 65-73.
- [30] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45.
- [31] Du C X, Fan H F, Guo S R, Tezuka T, Li J. Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. *Phytochemistry*, 2010, 71(13): 1450-1459.
- [32] Xue G P, McIntyre L C, Glassop D, Shorter R. Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(3): 197-214.