

澳洲坚果光壳种 *MiSAD* 的克隆与表达

杨倩^{1,2,3}, 杨子平^{1,2,3*}, 邹明宏¹, 宋喜梅¹, 万继锋¹, 陈菁¹, 罗炼芳¹,
曾辉^{1*}

1. 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 广东湛江 524091; 2. 农业农村部热带果树生物学重点实验室, 广东湛江 524091; 3. 海南省热带作物营养重点实验室, 广东湛江 524091

摘要: 澳洲坚果果仁中含有丰富的不饱和脂肪酸 (unsaturated fatty acid, UFA), 其不饱和脂肪酸生物合成的分子机制还有待进一步解析。植物硬脂酰-酰基载体蛋白脱饱和酶 (SAD) 是脂肪酸生物合成途径中形成不饱和脂肪酸的关键酶。本研究以澳洲坚果 (*Macadamia integrifolia*) 光壳种为对象, 通过 PCR 技术克隆获得澳洲坚果硬脂酰-酰基载体蛋白脱饱和酶基因 (*MiSAD*), 并对结构功能和表达模式进行了初步分析。结果显示, 克隆获得 5923 bp 的 *MiSAD* 基因组 DNA 序列, 该基因由 3 个外显子 2 个内含子组成, 包含 1191 bp 的编码框, 与公布的粗壳种 *MiSAD* 序列高度一致; 编码 396 个氨基酸; *MiSAD* 分子量为 45.22 kDa, 等电点为 5.93, 属于酰基-ACP 脱饱和酶, 是位于叶绿体或质体基质中的水溶性酶; 高度保守的区域存在形成酶活位点的 2 个 E-X-X-H 二铁原子中心基序, N 端和 C 端氨基酸序列差异较大; 二级结构中以 α -螺旋和无规则卷曲为主; 三级结构预测中存在形成脂酰链结合部位的螺旋-转角-螺旋 (HTH); 与蒂罗花的同源性最高达 94.2%, 与其他物种的 SAD 同源性也都在 80% 以上; 分子进化树显示与荷花进化关系较近, 属于植物脂酰-ACP 脱饱和酶。荧光定量 PCR 数据显示 *MiSAD* 在根、茎、叶、花、果中均有表达, 其中叶片和果实中表达量较高, 果实中的 *MiSAD* 表达量在开花后第 100 天左右达到最高, 之后随着果实的成熟逐渐下降, 呈现正态分布趋势。该研究为深入研究 *MiSAD* 在澳洲坚果果仁中不饱和脂肪酸生物合成的作用机制奠定基础。

关键词: 澳洲坚果; 硬脂酰-酰基载体蛋白脱饱和酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S664.9 文献标识码: A

Cloning and Expressing Analysis of Stearoyl-acyl-carrier-protein Desaturase (*SAD*) from *Macadamia integrifolia*

YANG Qian^{1,2,3}, YANG Ziping^{1,2,3*}, ZOU Minghong¹, SONG Ximei¹, WAN Jifeng¹, CHEN Jing¹,
LUO Lianfang¹, ZENG Hui^{1*}

1. South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524091, China; 2. Key Laboratory of Tropical Fruit Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs Zhanjiang, Guangdong 524091, China; 3. Key Laboratory of Tropical Crops Nutrition of Hainan Province, Zhanjiang, Guangdong 524091, China

Abstract: Macadamia nuts contain abundant source of unsaturated fat acid (UFA), but the molecular mechanism of biosynthesis of UFA remains to be further analyzed. Stearoyl acyl-carrier-protein desaturase catalyses the insertion of a double bond into saturated fatty acid bound in saturated acyl chains bound to ACP in higher plant, which is the key enzyme in unsaturated fatty acid biological synthesis pathway. The *Macadamia integrifolia* plant as research object, the full-length gDNA and cDNA of *SAD* gene encoding stearoyl acyl-carrier-protein desaturase were isolated from *M. integrifolia* using PCR technique. The structure, function and expression pattern of *MiSAD* were preliminarily studied. The gDNA of *SAD* was 6947 bp and contained 3 exons and 2 introns. The open reading frame was 1191 bp and encoded

收稿日期 2022-05-10; 修回日期 2022-06-27

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 321QN300); 广东省自然科学基金项目 (No. 2021A151501242); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630062022002)。

作者简介 杨倩 (1985—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 作物资源与育种。*通信作者 (Corresponding author): 曾辉 (ZENG Hui), E-mail: zenghui@catas.cn; 杨子平 (YANG Ziping), E-mail: yangziping302@163.com。

396 amino acids which was highly consistent with the public *MtSAD* sequence, and *SAD* was a water soluble enzyme with a total predicted molecular mass of 45.22 kDa and isoelectric point (pI) 5.93 located in chloroplast or plasmids stroma. The amino acid sequences of *SAD* involved in active site showed highly conserved and significant difference in N-end and C-end. The highly conserved region contained 2 central motifs of E-X-X-H iron atoms which formed the active site of this enzyme. The α -helix and random curl were predominate in the secondary structure. The helix-turning-helix was found in the prediction of tertiary structure for formation of fatty acyl chain binding site. Derived amino acid sequence showed the highest homology 94.2% with *Teloepa speciosissima*, and the homology is above 80% in other species of *SAD*, close to *Nelumbo nucifera* in phylogentic tree. The *SAD* gene expression trends were basically identical by qRT-PCR. The *SAD* expression were found in root, stem, leaf, flower and macadamia nut, and the highest level was in nut. The expression of *SAD* gene increased about 90days after and reached the highest level at 100 days, then declined gradually in the following days during the macadamia nut maturation and presenting a normal distribution trend. This study would build a foundation for elucidating the molecular mechanism of *MiSAD* in biosynthesis of unsaturated fatty acid in macadamia.

Keywords: *Macadamia integrifolia*; stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase (*SAD*); gene cloning; expressing analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.02.004

澳洲坚果 (*M. integrifolia*), 又称夏威夷果, 原产于澳大利亚, 在热带和亚热带地区多有种植^[1], 中国目前已经成为澳洲坚果种植面积最大的国家。澳洲坚果属于山龙眼科澳洲坚果属, 主要有 4 个种, 即 *M. integrifolia* Maiden & Betche、*M. tetraphylla* L. A. S. Johnson、*M. ternifolia* F. Mueller 和 *M. janseni* C. L. Gross & P. H. Weston, 仅有光壳种 (*M. integrifolia*) 和粗壳种 (*M. tetraphylla*) 及其杂交种用于商业性栽培。澳洲坚果果仁不仅风味独特, 而且具有很高的营养价值, 含有丰富的脂肪酸、蛋白质、矿物质元素 (锰、铁、镁)、维生素 (B₆) 和微量元素^[2]。研究表明, 成熟的澳洲坚果中总油脂的含量最高可达 80.3%, 主要包含油酸、棕榈油酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、二十碳烯酸、肉豆蔻酸和二十一烷酸等, 其中油酸、棕榈油酸和二十碳烯酸是大含量脂肪酸, 可以占到总脂肪酸的 87.52%^[3], 澳洲坚果是重要的单不饱和脂肪酸来源植物, 也是新兴的木本油料作物, 但其遗传转化体系尚未建立, 关于澳洲坚果果仁中不饱和脂肪酸生物合成和积累的分子机制研究鲜有报道。

植物硬脂酰-酰基载体脱饱和酶 (stearoyl acyl-carrier-protein desaturase, *SAD*) 是质体中脂肪酸生物合成途径中的关键酶, 能够催化硬脂酰-ACP 在第 9 位至第 10 位碳原子之间脱饱和形成双键^[4], 是产生不饱和脂肪酸的关键步骤。因此, 植物 *SAD* 酶是产生油酸和多不饱和脂肪酸的前提, 大量研究表明, 植物 *SAD* 基因能够显著调控植物中饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的比例^[5-6]。LIN 等^[7]通过转录组测序技术发现澳洲坚果 *SAD*

基因家族存在 12 个成员, GUMMESON 等^[8]和 RODRÍGUEZ 等^[9]早期从澳洲坚果中分离到一个与不饱和脂肪酸生物合成相关的脱饱和酶基因, 酶活试验表明澳洲坚果 *SAD* 脱饱和酶能够催化硬脂酰-ACP (18:0-ACP) 和软脂酰-ACP (16:0-ACP) 转化成 C18:1-ACP 和 C16:1-ACP, 经过比对分析发现与 12 个成员之一的 *MiFAB2.12* 一致, 但还需进一步验证。因此, 本研究开展澳洲坚果光壳种 *SAD* 基因的克隆, 并分析其基因结构、理化性质、进化关系和表达特征, 为研究澳洲坚果 *SAD* 基因功能和脂肪酸生物合成 (积累) 分子机制奠定理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试材料为澳洲坚果光壳种 ‘南亚 1 号’, 种植于中国热带农业科学院南亚热带作物研究所的国家热带植物种质资源库——澳洲坚果种质资源圃 (中国广东省湛江市)。根取自 ‘南亚 1 号’ 种子萌发的实生幼苗的新鲜幼根; 茎、叶取自 “南亚 1 号” 果树上当年新生的嫩叶和嫩茎; 花取自 ‘南亚 1 号’ 果树花序上的全部小花混合。分别收集澳洲坚果开花后第 45、68、75、86、95、100、117、126、139、146、168、177、188、195、201 天的果仁。所有样品采集后, 尽快使用液氮速冻, 直接用于 DNA/RNA 提取或者保存于 -80℃ 备用。

Plant Total RNA Isolation Kit Plus 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。MonAmp™ 2× MonHI-FI Mix、All-in-One First-Strand Synthesis Master Mix、Taq SYBR Green qPCR Premix ROX I

(NOVA) 购自莫纳公司。PCR 产物纯化、凝胶回收试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。引物合成与 DNA 测序委托广州艾基生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 澳洲坚果叶片总 RNA 提取按照 Plant Total RNA Isolation Kit Plus 方法进行。反转录按照 All-in-One First-Strand Synthesis Master Mix 操作。反应体系为：All-in-One First-Strand Synthesis Master Mix 4 μL ，RNA 模板 50 ng~1 μg ，dsDNase μL ，Nuclease-free water 加至 20 μL 。反转录程序为：37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min，55 $^{\circ}\text{C}$ 30 min，85 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。

1.2.2 澳洲坚果 *SAD* 基因全长及 cDNA 序列克隆 根据澳洲坚果基因组 CDS 数据^[10]，设计扩增 *SAD* 编码框的引物(SAD-F: ACAGCAATGGCTCTCAAGCTTA; SAD-R: CCCTTCTACTCAGCTTCCATTCTG)。根据澳洲坚果基因组数据，设计扩增 *SAD* 基因组序列的引物(MiSAD-F51: CGAAAGAAAGAGTGAGTAGGC; MiSAD-R6997: ACAACAATGCCAAC GGAG)。PCR 反应体系为：上下游引物各 0.5 μL ，cDNA 模板 1.0 μL ，MonAmpTM 2 \times MonHI-FI Mix 10.0 μL ，ddH₂O 补足至 20.0 μL 。扩增 *SAD* 编码框的程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ ，预变性 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，35 个循环；扩增 *SAD* 基因组序列的程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ ，预变性 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min，35 个循环；终延伸 10 min。将 PCR 产物纯化，连接至 T 载体，连接体系为：T 载体 0.5 μL ，DNA Ligase 0.5 μL ，PCR 产物 4.0 μL ，2 \times Ligation buffer 5.0 μL ，ddH₂O 将体系补足至 10.0 μL 体系。室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 即可完成连接反应。随后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态，以含氨苄青霉素的抗性培养基进行筛选，对阳性克隆测序。

1.2.3 澳洲坚果 *SAD* 生物信息学分析 利用 Vector NTI 软件进行多序列比对，以确定扩增的序列为 *SAD* 的基因组序列和编码框。利用 DNAMAN 进行开放阅读框(ORF)分析；利用 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam>) 在线软件预测蛋白的基本物理化学性质；利用 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 在线软件预测蛋白的二级结构和三级结构；利用 Clustal X 软件多序列比对后，并利用 ESPript3.0 (https://esprict.ibcp.fr/ESPript/_cgi-bin/ESPript.)

在线软件对比对结果可视化；利用 SignalP 5.0 在线软件预测信号肽；利用 MEGA4 软件建立系统进化树。

1.2.4 澳洲坚果 *SAD* 基因表达模式分析 利用 Taq SYBR Green qPCR Premix ROX I (NOVA) 试剂进行盒荧光定量 PCR，罗氏(Roche) Light Cycler 480 II 实时荧光定量仪器采集荧光数据。实时荧光定量 PCR 反应体系为：SYBR Green qPCR Mix(2 \times)10.0 μL ；特异引物 1.0 μL ；cDNA 模板 1.0 μL ；ddH₂O 补足至 20.0 μL 。PCR 扩增程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s，45 个循环。在每个循环结束后进行荧光信号的采集，所有循环结束后进行溶解曲线分析(65~95 $^{\circ}\text{C}$)。采集数据，计算基因表达量。

2 结果与分析

2.1 澳洲坚果总 RNA 提取

吸光度检测结果显示，叶片总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 为 1.82；其凝胶电泳结果显示，28S 和 18S 条带清晰，28S 条带亮度约为 18S 的 2 倍，无弥散条带(图 1A)。结果表明提取的总 RNA 质量较好，纯度较高，可以用于下一步实验。

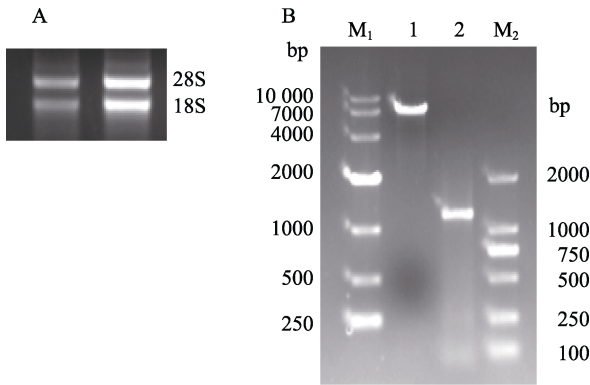
2.2 *MiSAD* 编码框序列的克隆

凝胶电泳结果显示，*MiSAD* 编码框序列引物扩增的 PCR 产物大小约在 1000 bp 左右(图 1B)，与 *SAD* 基因 CDS 序列大小接近。测序结果显示，扩增的序列为 1224 bp。经分析，扩增片段包含一个最长 1191 bp 的编码框，编码 396 个氨基酸，命名为 *MiSAD*。经测序后比对，与 NCBI 公布的粗壳种 *MtSAD*(登录号为 GU595455.1)及 LIN 等^[7]公布的 *MiFAB 2.12* 序列一致，没有缺失、插入及位点突变。

2.3 *MiSAD* 基因组序列的克隆

凝胶电泳结果显示，*MiSAD* 基因组序列引物扩增的 PCR 产物大小在 6000 bp 左右(图 1B)，分析发现 *MiSAD* 基因 gDNA 序列长度为 5923 bp，由 3 个外显子和 2 个内含子组成(图 2)。

比较发现，*MiSAD* 基因与拟南芥 *SSI2* 基因和亚麻芥 *SAD* 家族基因结构总体相似，都包含 3 个外显子 2 个内含子(图 2)。澳洲坚果的 *SAD* 基因外显子 1(Ex1) 含 126 bp，而拟南芥和亚麻芥的均为 141 bp，有细微差异。外显子 2 和外显子 3



A: RNA 纯化; B: *SAD* 基因克隆; M₁: D2000 DNA ladder; 1: *SAD* 基因 gDNA; 2: *SAD* 基因 cDNA; M₂: DL10 000 DNA marker。
A: Purification of RNA; B: PCR production of *MiSAD*; M₁: D2000 DNA ladder; 1: gDNA of *MiSAD*; 2: cDNA of *MiSAD*; M₂: DL10 000 DNA marker.

图 1 澳洲坚果总 RNA 和 *MiSAD* 基因 cDNA 和 gDNA 克隆

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA and the sequences of *SAD* cDNA and genomic DNA

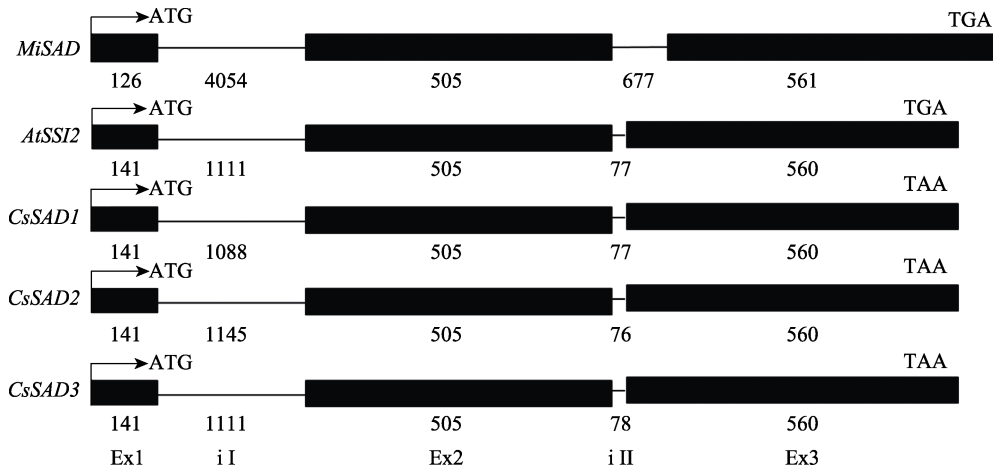
长度基本一致，并且序列相似度也较高，为植物 *SAD* 基因的保守区域。其次，澳洲坚果的 2 个内含子长度分别为 4054 bp 和 677 bp，明显大于拟南芥 *SSI2* 和亚麻芥 *SAD1*、*SAD2* 和 *SAD3* 基因的 1088~1145 bp 和 76~78 bp。

2.4 澳洲坚果 *SAD* 的理化性质与二、三级结构预测

蛋白理化分析结果显示，澳洲坚果 *SAD* 分子式为 C₂₀₂₄H₃₁₆₂N₅₄₆O₅₉₈S₁₆，总原子数 6346，预测的分子量约为 45.22 kDa，蛋白质等电点为 5.93，负电荷残基总数 (Asp+Glu) 为 56，正电残基总数 (Arg+Lys) 为 50 个，不稳定系数为 40.1，脂肪族氨基酸指数为 79.34，总平均亲水性系数为 -0.446，推测该蛋白为稳定的亲水性蛋白。

利用 NCBI 的保守结构域数据库预测澳洲坚果 *SAD* 蛋白的结构域和保守位点，发现具有 2 个保守功能结构域 (图 3)，一个是酰基-ACP 脱饱和酶家族；另一个是类铁蛋白家族。保守区中存在 6 个氨基酸的金属离子结合基序、多个酶活性位点及亚基结合位点。

利用在线工具 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 预测澳洲坚果 *SAD* 酶的蛋白二级结构，结果显示，该酶主要以 α -螺旋和无规则卷曲为主 (图 4)，并且在第 176~179 和第 262~265 的残基上存在 2 个 E-X-X-H 组氨酸富集区，为二铁离子提供结合位点，形成 *SAD* 酶的活性中心。



实心黑框代表外显子，线条代表内含子。
Closed box represent exons and open boxes introns.

图 2 *MiSAD* 基因的 gDNA 序列结构
Fig. 2 gDNA structure of *MiSAD*

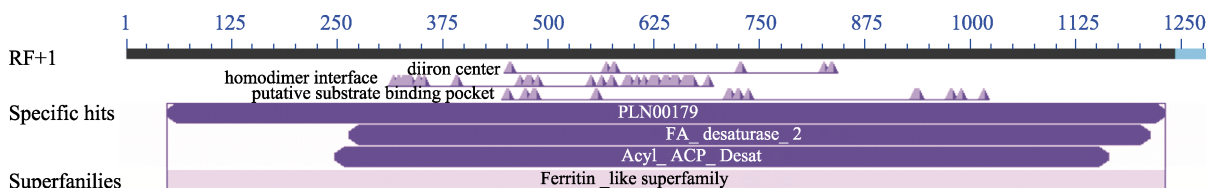


图 3 *MiSAD* 保守结构域分析

Fig. 3 Conserved domains analysis of *MiSAD*

三级结构预测中存在螺旋-转角-螺旋结构 (HTH), 与二级结构预测结果一致。SignalP 5.0

和 DeepLoc-1.0 在线预测结果显示, 澳洲坚果 SAD 序列不存在信号肽, 为非分泌的膜结合蛋白。

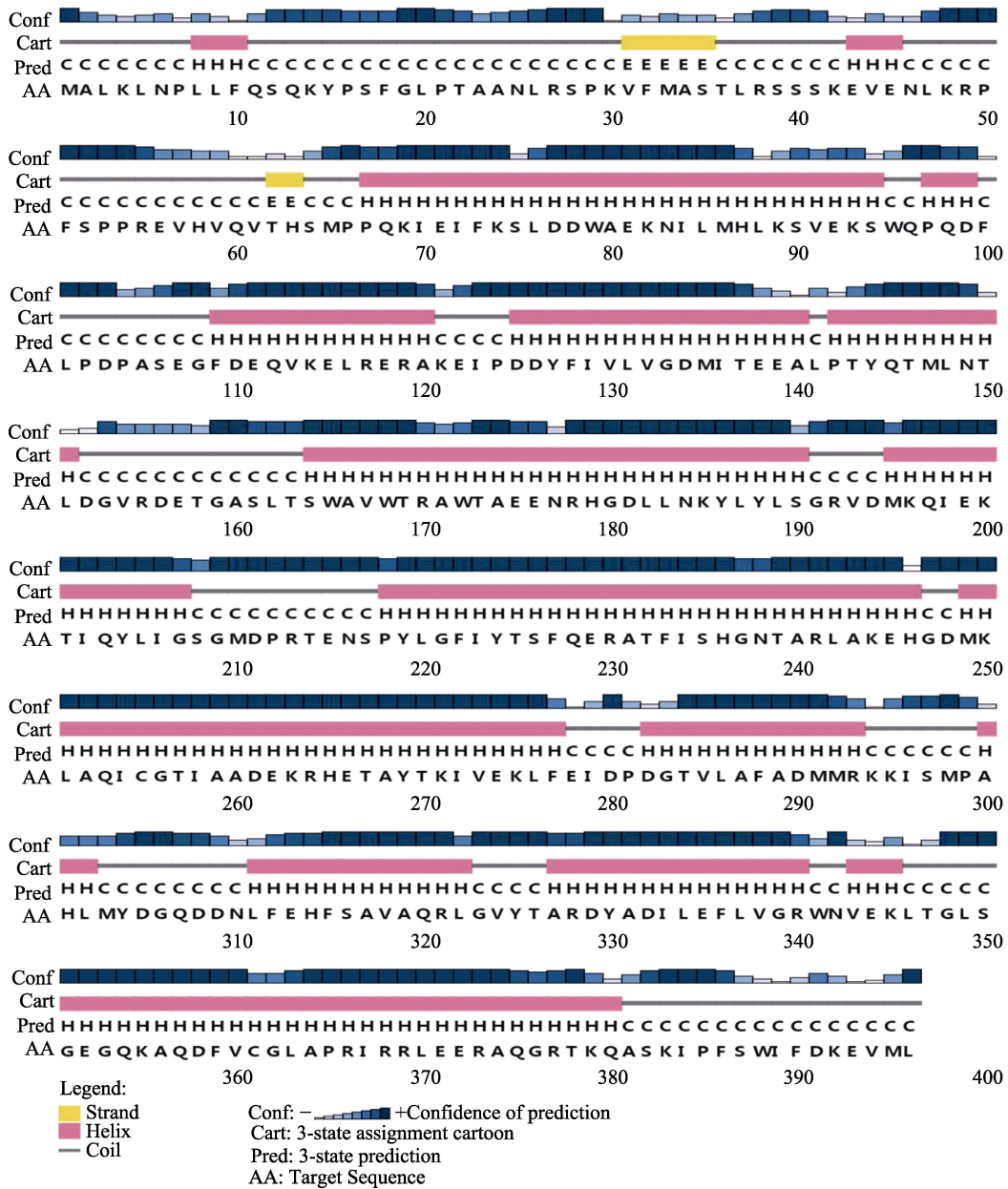


图 4 MiSAD 二级结构预测

Fig. 4 Prediction secondary structure of MiSAD protein

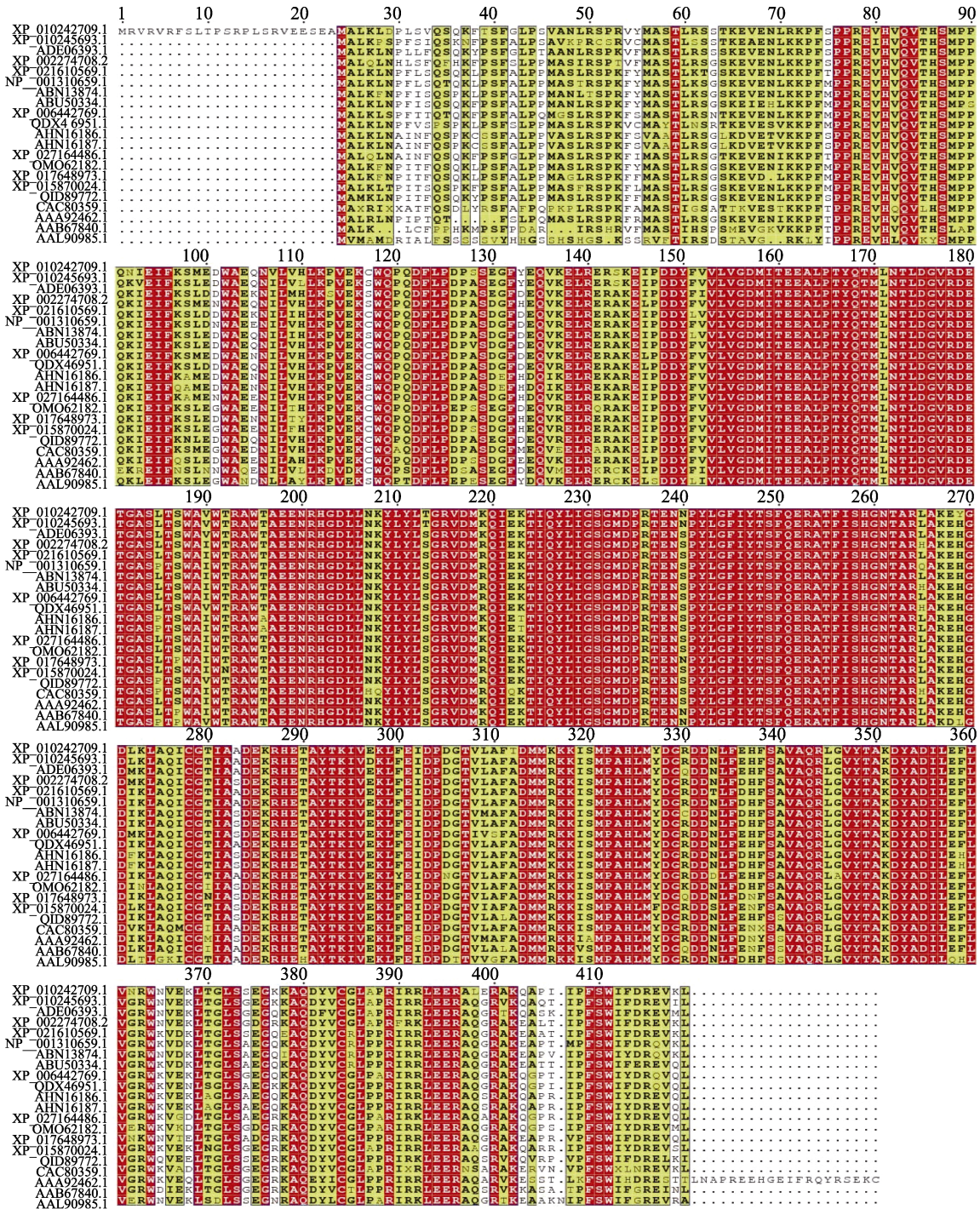
2.5 澳洲坚果 SAD 多序列比对分析和系统进化分析

在 NCBI 将推导的氨基酸序列进行 blastp 分析发现, 发现澳洲坚果 SAD 与其他很多物种的 SAD 具有较高的同源性, 其中与澳大利亚分布的同为山龙眼科的蒂罗花同源性最高达 94.2%, 与木薯同源性也较高为 89.9%, 葡萄 89.4%, 荷花 89.1%, 油茶 88.6%, 木油桐 88.9%, 其他物种的 SAD 同源性也均在 80% 以上。选取荷花

(XP_010242709.1, XP_010245693.1); 澳洲坚果 (ADE06393.1); 葡萄 (XP_002274708.2); 木薯 (XP_021610569.1); 乌桕 (ABN13874.1); 木油桐 (ABU50334.1); 克莱门柚 (XP_006442769.1); 山桐子 (QDX46951.1); 猫爪藤 (AHN16186.1, AHN16187.1); 咖啡 (XP_027164486.1); 黄麻 (OMO62182.1); 木本棉 (XP_017648973.1); 枣 (XP_015870024.1); 油茶 (QID89772.1); 向日葵 (CAC80359.1); 大豆 (AAA92462.1); 油橄

榄 (AAB67840.1); 蓖麻 (NP_001310659.1); 拟南芥 (AAL90985.1) 等 19 个物种的 21 个 SAD 的氨基酸序列, 进行多重比对发现, 澳洲坚果 SAD

与其他植物的 SAD 序列在功能结构域具有较高的保守性, 但在 N 端和 C 端的氨基酸残基上有较明显的差异 (图 5)。



相同氨基酸标为白色字母红色背景, 相似氨基酸标为黑色粗体字母黄色背景。

Same residues are written with white characters and boxed in red, the black bold characters and boxed in yellow are similar residues.

图 5 澳洲坚果 SAD 与其他植物 SAD 的蛋白序列比对

Fig. 5 Protein sequences alignment of SAD from *M. integrifolia* and other plants

对澳洲坚果在内的 32 个物种的 SAD 进行系统进化分析 (图 6), 发现在进化上这些 SAD 聚

成 2 支。第一支有 28 个 SAD, 分布在 15 个科的植物中, 与棉花、油桐、油茶、胡桃、木薯、蓖

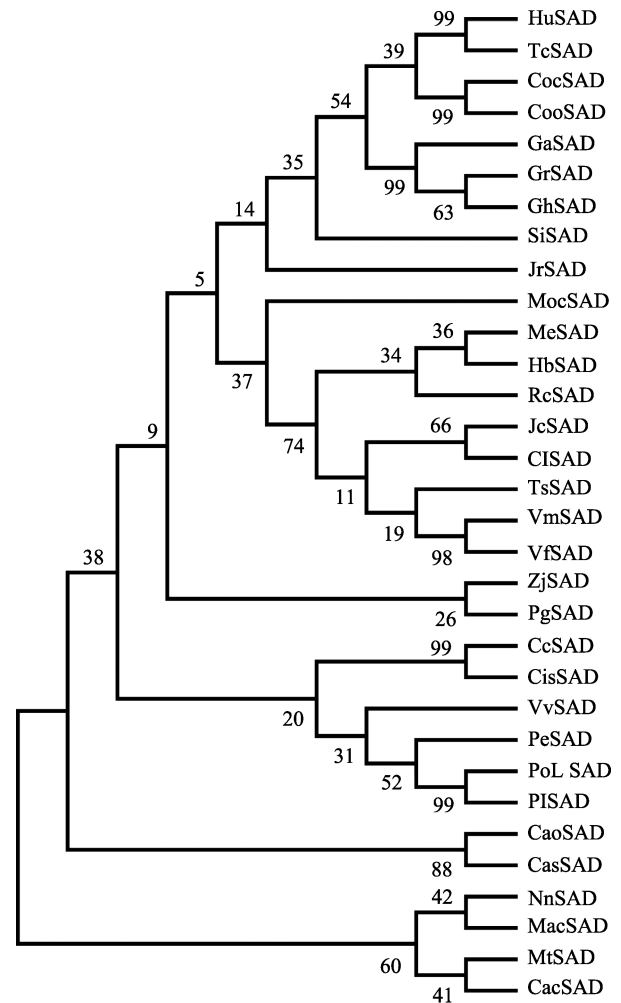
麻等物种中的 SAD 进化关系都比较远; 澳洲坚果 SAD 聚在第二支上, 与荷花、浙江红花油茶和博落回聚在一起, 分别属于 4 个科的植物, 尤其与荷花的进化关系最近。

2.6 *MiSAD* 基因的表达分析

采用实时荧光定量 PCR 分析了 *MiSAD* 基因在澳洲坚果不同组织和果仁发育不同阶段的表达水平。结果显示, *MiSAD* 基因在根、茎、叶、花和果仁中均有表达, 但是在叶片和果仁中表达量较高, 花和根中的表达量较低 (图 7A); *MiSAD* 基因的表达呈钟形分布, 在开花前 86 d 表达量非常低, 第 86 天后表达量显著增加, 至第 100 天左右表达量达到顶峰之后随着果实的成熟表达量又逐渐降低 (图 7B)。

3 讨论

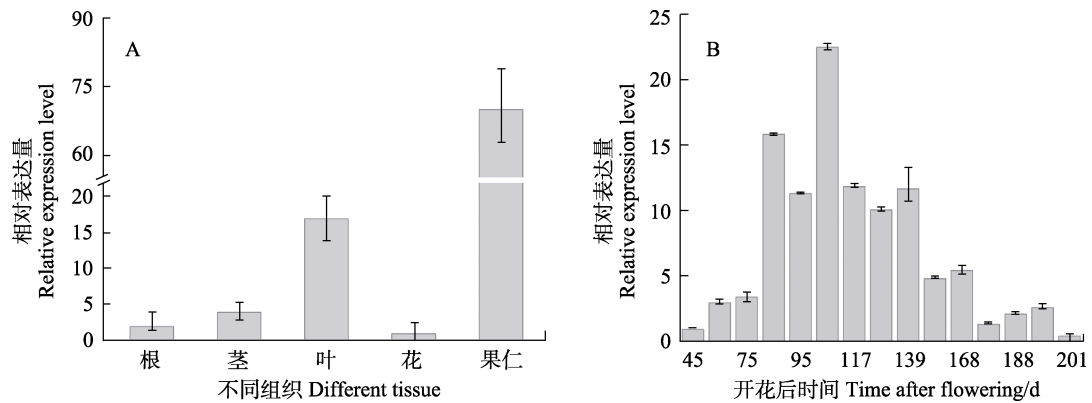
澳洲坚果是新兴的木本油料作物, 果仁中富含油酸和棕榈油酸等单不饱和脂肪酸^[11-12], 长期食用能够降低患心脑血管疾病的风险^[13]。植物脂肪酸的合成是在质体中进行, 以酰基载体蛋白 (ACP) 为载体, 乙酰-CoA 在乙酰-CoA 羧化酶的作用下合成丙二酰-CoA, 然后在脂肪酸合成酶的作用下经过多次连续聚合形成 18 碳的酰基载体复合物 (C18:0-ACP), 植物 $\Delta 9$ -SAD 可以催化 C18:0-ACP 脱饱和产生油酰-ACP (C18:1-ACP), 还可进一步脱饱和产生多不饱和脂肪酸。因此, 植物中 $\Delta 9$ -SAD 是不饱和脂肪酸生物合成的关键酶。植物硬脂酰脱饱和酶研究得最为广泛, 迄今为止, 已从多个植物中分离并克隆了 SAD 基因, 如向日葵^[14]、蓖麻^[15]、花生^[16]、拟南芥^[17]、油菜^[18]、玉米^[19]、棉花^[20]等。蓖麻中的 SAD 研究最为清楚, SAD 是以二聚体形式存在^[21], 以二铁原子活性中心为酶活位点, 结合和氧原子形成反应脂链上的 C 单键转化成双键^[22]。在本研究中, 发现 *MiSAD*、拟南芥 *SSI2* 和亚麻芥 SAD 基因的 gDNA 结构基本一致, 都是由 2 个内含子和 3 个外显子组成, 对应编码框相似度也较高, 主要是内含子长度差异较大。澳洲坚果 *MiSAD* 基因含有 1191 bp 的编码框, 编码 396 个氨基酸。拟南芥的 SAD 基因 (*AtSSI2/FAB2*) 长度约 3000 bp, 编码框为 1206 bp, 编码 401 个氨基酸。亚麻芥的 SAD 基因有 3 个家族成员组成^[9], 3 个基因的长度在 2371 ~ 2427 bp 之间, 与拟南芥 *SSI2* 相似性较高。同源比对发现, 澳洲坚果 *MiSAD* 和很多植物的



HuSAD: 哥伦比亚锦葵; TcSAD: 可可; CocSAD: 圆果黄麻; CooSAD: 长果黄麻; GaSAD: 亚洲棉; GrSAD: 雷蒙德氏棉; GhSAD: 陆地棉; SiSAD: 芝麻; JrSAD: 胡桃; MocSAD: 苦瓜; MeSAD: 木薯; HbSAD: 橡胶; RcSAD: 蓖麻; JcSAD: 麻疯树; CisSAD: 甜橙; TsSAD: 乌柏; VmSAD: 木油桐; VfSAD: 油桐; ZjSAD: 枣; PgSAD: 石榴; CcSAD: 克莱门柚; CisSAD: 油樟; VvSAD: 葡萄; PeSAD: 胡杨; PoLSAD: 凤丹; PiSAD: 芍药; CaoSAD: 油茶; CasSAD: 野茶树; MacSAD: 博落回; CacSAD: 浙江红花油茶; NnSAD: 荷花; MtSAD: 澳洲坚果。
HuSAD: *Herrania umbroica*; TcSAD: *Theobroma cacao*; CocSAD: *Corchorus capsularis*; CooSAD: *Corchorus olitorius*; GaSAD: *Gossypium arboreum*; GrSAD: *Gossypium raimondii*; mGhSAD: *Gossypium hirsutum*; SiSAD: *Sesamum indicum*; JrSAD: *Juglans regia*; MocSAD: *Momordica charantia*; MeSAD: *Manihot esculenta*; HbSAD: *Hevea brasiliensis*; RcSAD: *Ricinus communis*; JcSAD: *Jatropha curcas*; CisSAD: *Citrus sinensis*; TsSAD: *Triadica sebifera*; VmSAD: *Vernicia Montana*; VfSAD: *Vernicia fordii*; ZjSAD: *Ziziphus jujube*; PgSAD: *Punica granatum*; (cSAD: *Citrus clementine*; CiSAD: *Cinnamomum longipani culatum*; VvSAD: *Vitis vinifera*; PeSAD: *Populus euphratica*; PoLSAD: *Paeonia ostii* var. *lishizhenii*; PiSAD: *Paeonia lactiflora*; CaoSAD: *Camellia oleifera*; CasSAD: *Camellia sinensis*; MacSAD: *Macleaya cordata*; CacSAD: *Camellia chekiangoleosa*; NnSAD: *Nelumbo nucifera*; MtSAD: *M. tetraphylla*.

图 6 澳洲坚果 SAD 与其他 31 个物种 SAD 的系统进化分析

Fig. 6 Phylogenetic analysis of SAD from *M. integrifolia* and other 31 plants



A: *MiSAD* 在不同组织中表达; B: 果仁不同发育时期 *MiSAD* 表达。

A: Expression of *SAD* gene in different tissues by qRT-PCR; B: Expression of *SAD* gene in different development stage of macadamia nut.

图 7 *MiSAD* 基因表达分析

Fig. 7 Expressing analysis of *MiSAD* gene

SAD 同源性都在 80% 以上, 与同是山龙眼科的帝王花同源性最高可以达到 90% 以上; 进化上, 尤其与荷花亲缘关系最近, 这与 LIN 等^[7]的结果一致。对本研究中 *MiSAD* 基因与拟南芥家族基因进行聚类, 发现该基因与拟南芥中的 *SSI2* 的亲缘关系最近 (数据未提供), 推测 *MiSAD* 具有与拟南芥中 *SSI2* 共同的构象和功能。多序列比对显示澳洲坚果 *MiSAD* 基因与其他多个物种的 *SAD* 氨基酸序列功能区域的保守性较高, 但在 N 端和 C 端位点上差异较大。

植物 *SAD* 氨基酸序列非常保守, 只有微小的差异发生在多肽的两端。蓖麻 *SAD* 氨基酸序列 N-端 33 个氨基酸为信号肽序列, 含较多的疏水性氨基酸^[23], 成熟蛋白含 363 个氨基酸, 其分子量约 40 kDa。本研究克隆的澳洲坚果 *SAD* 氨基酸序列不包含信号肽, 保守区域存在 2 个二铁原子结合基序形成活性反应中心, 螺旋-转角-螺旋 (HTH) 结构可能折叠出蓖麻 *SAD* 晶体结构上的深沟, 由表面延伸到内部, 形成底物结合位点, 是形成 *SAD* 酶活性的重要区域。计算机模拟的澳洲坚果 3 维结构与蓖麻的结构非常相似, 表明 *MiSAD* 酶可能也以二聚体形式存在于澳洲坚果中, 对澳洲坚果果实的生长发育具有重要的作用。

植物 *SAD* 是个小家族基因, 存在多个家族成员, 不同成员之间的表达特征不尽相同。拟南芥 *SAD* 基因有 7 个家族成员^[24], 家族成员在不同组织中的表达差异较大。*SSI2* 在拟南芥的根、茎、叶和花中表达较高, 在角果的表达量最低; 但是在角果中 *SSI2* 相对于 *AtSAD1*、*AtSAD3* 和 *AtSAD5* 基因表达量最高。在木本油料植物可可树中,

TcSAD1 在各个组织中均有表达, *TcSAD3*、*TcSAD4* 在花中表达, 叶片中主要表达 *TcSAD1*、*TcSAD2*, 以前者为主, 根中 *TcSAD1* 的表达量最高, *TcSAD7* 主要在种子中表达^[25]。植物 *SAD* 酶决定不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸的比例, 是改善油品质的关键突破点。拟南芥的 *SSI2* 基因被突变后叶片中硬脂酸含量升高, 油酸含量下降^[26]。玉米中过表达 *ZmSAD1*, 硬脂酸含量由对照的 1.64% 降到处理组的 1.57%, 脂肪酸与不饱和脂肪酸比值由 20.61% 降低到 20.40%^[27]。采用 RNA 沉默技术抑制棉花中 *Δ9-SAD* 基因的表达后, 硬脂酸由平常的 2.3% 增加到 39.8%, 油酸含量有原来的 13.2% 降低到 3.8%^[28]。将澳洲坚果 *SAD* 基因转入到大肠杆菌后, 细菌内油酸的含量由原来的 1.2% 增加到 2.5%, 不饱和脂肪酸含量增加 2.2%^[8-9]。本研究克隆获得的 *MiSAD* 基因与 LIN 等^[7]分析的澳洲坚果 *SAD* 基因家族 12 个成员中的 *MiFAB2.12* 一致, 在根、茎、叶中均有表达, 且在果实中表达量最高, 表达趋势呈现钟形分布, 在花后 100 d 左右表达量达到最高, 之后略有下降, 与不饱和脂肪酸积累的趋势基本一致 (数据未提供), 推测是影响澳洲坚果中不饱和脂肪酸积累的重要基因。

植物 *SAD* 基因还通过调控脂肪酸从而和植物激素、信号传导相联系, 参与植物的衰老调控、化学防御等过程^[29]。突变拟南芥的 *SSI2* 基因 (*SAD*), 结果使水杨酸和茉莉酸介导的抗病性增强^[30-31]。在烟草中超表达拟南芥 *SAD* 基因后, 叶片中不饱和脂肪酸含量均有增加, 并且低温能诱导 *SAD* 基因的表达^[32]。鳄梨植株受真菌侵染、低温、机械伤害等逆境损害后, 果实中的 *SAD* 基因

表达上升,同时果实对真菌的抵抗力提高^[33]。在高度缺氧的拟南芥冠瘿瘤中发现,*SAD6* 基因通过提高不饱和脂肪酸含量,有助于拟南芥度过不利生长环境^[34],因此推测澳洲坚果 *MiSAD* 基因的表达可能也受多种因素调控,通过多种生物代谢通路,与澳洲坚果果树的生长发育、品质调控、抗逆防御相关,值得深入研究,但是澳洲坚果 *MiSAD* 基因是家族基因,还需尽可能克隆到更多的家族成员综合分析研究,为今后开展澳洲坚果分子育种和脂肪酸组分改良提供理论依据。

参考文献

- [1] MAST A R, WILLIS C L, JONES E H, DOWNS K M, WESTON P H. A smaller *Macadamia* from a more vagile tribe: inference of phylogenetic relationships, divergence times, and diaspore evolution in *Macadamia* and relatives[J]. *American Journal of Botany*, 2008, 95: 843-870.
- [2] HU W, FITZGERALD M, TOPP B, ALAM M, O'HARE T J. A review of biological functions, health benefits, and possible *de novo* biosynthetic pathway of palmitoleic acid in macadamia nuts[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 62: 103520.
- [3] 杨为海, 张明楷, 邹明宏, 曾辉, 张汉周, 陆超忠. 澳洲坚果不同种质果仁粗脂肪及脂肪酸成分的研究[J]. *热带作物学报*, 2012, 33: 1297-1302.
YANG W H, ZHANG M K, ZOU M H, ZENG H, ZHANG H Z, LU C Z. Crude fat and fatty acid composition of various macadamia germplasm kernel[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2012, 33(7): 1297-1302. (in Chinese)
- [4] OHLROGGE J, BROWSE J. Lipid biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 957-970.
- [5] LU S P, STURTEVANT D, AZIZ M, JIN C, LI Q, CHAPMAN K D, GUO L. Spatial analysis of lipid metabolites and expressed genes reveals tissue-specific heterogeneity of lipid metabolism in high- and low-oil *Brassica napus* L. seeds[J]. *Plant Journal*, 2018, 94: 915-932.
- [6] DAMUDE H G, ZHANG H, FARRALL L, RIPP K G, TOMB J F, HOLLERBACH D, YADAV N S. Identification of bifunctional delta12/omega3 fatty acid desaturases for improving the ratio of omega3 to omega6 fatty acids in microbes and plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103: 9446-9451.
- [7] LIN J S, ZHANG W P, ZHANG X T, MA X K, ZHANG S C, CHEN S, WANG Y B, JIA H F, LIAO Z Y, LIN J, ZHU M T, XU X M, CAI M X, ZENG H, WAN J F, YANG W H, MATSUMOTO T, HARDNER C, NOCK C J, MING R. Signatures of selection in recently domesticated macadamia[J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 2041-1723.
- [8] GUMMESON P O, LENMAN M, LEE M, SINGH S, STYMNEA S. Characterisation of acyl-ACP desaturases from *Macadamia integrifolia* Maiden & Betche and *Nerium oleander* L.[J]. *Plant Science*, 2000, 154(1): 53-60.
- [9] RODRÍGUEZ M F, SÁNCHEZ-GARCÍA A, SALAS J J, GARCÉS R, MARTÍNEZ-FORCE E. Characterization of soluble acyl-ACP desaturases from *Camelina sativa*, *Macadamia tetraphylla* and *Dolichandra unguis-cati*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 178: 35-42.
- [10] NOCK C J, BATEN A, MAULEON R, LANGDON K S, TOPP B, HARDNER C, FURTADO A, HENRY R J, KING G J. Chromosome-scale assembly and annotation of the macadamia genome (*Macadamia integrifolia* HAES 741)[J]. *Genes Genomes Genetics*. 2020,10(10): 3497-3504.
- [11] CARRILLO W, CARPIO C, MORALES D, VILCACUNDO E, ALVAREZ M. Fatty acids composition in macadamia seed oil (*Macadamia integrifolia*) from Ecuador[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2017, 10: 303-306.
- [12] O'HARE J T, TRIEU H H, TOPP B, RUSSELL D, PUN S, TORRISI C, LIU D. Assessing fatty acid profiles of macadamia nuts[J]. *American Society for Horticultural Science*, 2019, 54(4): 633-637.
- [13] WANG D D, HU F B. Dietary fat and risk of cardiovascular disease: recent controversies and advances[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2017, 37: 423-446.
- [14] 周菲. 向日葵油酸合成上游基因 *HaFAB2* 克隆与表达分析[J]. *东北农业大学学报*, 2020, 51(11): 23-31.
ZHOU F. Cloning and expression analysis of upstream gene *HaFAB2* for oleic acid synthesis in sunflower[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2020, 51(11): 23-31. (in Chinese)
- [15] KNUTZON D S, SCHERER D E, SCHRECKENGOST W E. Nucleotide sequence of a complementary DNA clone encoding stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor bean, *Ricinus communis*[J]. *Plant Physiology*, 1991, 96(1): 344-345.
- [16] 刘浩, 鲁清, 李海芬, 李少雄, 陈小平, 梁炫强, 洪彦彬. 花生硬脂酰-ACP 酸脱饱和基因 *FAB2* 表达的分子机制[J]. *作物学报*, 2019, 45(11): 1638-1648.
LIU H, LU Q, LI H F, LI S X, CHEN X P, LIANG X Q, HONG Y B. Molecular mechanism of stearoyl-ACP desaturase gene *FAB2* expression in peanut[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45(11): 1638-1648. (in Chinese)
- [17] CAO Y J, XIAN M, YANG J M, XU X, LIU W, LI L Z. Heterologous expression of stearoyl-acyl carrier protein de-

- saturase (S-ACP-DES) from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2010, 69(2): 209-214.
- [18] 贾艳丽, 吴磊, 卢长明. 甘蓝型油菜 $\Delta 9$ 硬脂酰 ACP 脱氢酶(*SAD*)基因的克隆与表达分析[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(2): 135-141.
JIA Y L, WU L, LU C M. Stearoyl-acyl carrier protein desaturase (*SAD*) gene cloning and expression in *Brassica napus*[J]. Chinese Journal of Oil Crop Science, 2014, 36(2): 135-141. (in Chinese)
- [19] 韩英佳. 玉米籽粒油份相关基因 *ZmCOP II*、*SAD* 的功能研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
HAN Y J. Studies on *ZmCOP II* and *SAD* related to oil content in maize kernel[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [20] 蔡曼, 李卫华, 王娟, 王旭文, 孔宪辉, 余渝, 刘丽. 陆地棉 *GhSAD2* 基因克隆与表达特征研究[J]. 西北植物学报, 2016, 36(9): 1713-1720.
CAI M, LI W H, WANG J, WANG X W, KONG X H, YU Y, LIU L. Molecular cloning and expression analysis of stearoyl-ACP desaturase gene (*GhSAD2*) in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2016, 36(9): 1713-1720. (in Chinese)
- [21] MCKEON T A, STUMPF P K. Purification and characterization of the stearoyl-acyl carrier protein desaturase and the Acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower[J]. Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(20): 1214-1217.
- [22] BROADWATER J A, AI JY, LOEHR T M, LOEHR S, FOX B G. Peroxidiferic intermediate of stearoyl-acyl carrier protein Δ^9 desaturase: oxidase reactivity during single turnover and implications for the mechanism of desaturation[J]. Biochemistry, 1998, 37: 14664-14671.
- [23] HAAS J A, FOX B G. Role of hydrophobic partitioning in substrate selectivity and turnover of the *Ricinus communis* stearoyl acyl carrier protein delta(9) desaturase[J]. Biochemistry, 1999, 38(39): 12833-12840.
- [24] KACHROO A, SHANKLIN J, WHITTLE E, LAPCHYK L, HILDEBRAND D, KACHROO P. The *Arabidopsis* stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63(2): 257-271.
- [25] ZHANG Y F, MAXIMOVA S N, GUILTINAN M J. Characterization of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene family from chocolate tree, *Theobroma cacao* L.[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 239.
- [26] KAEHROO A, LAPEHYK L, FUKUSHIGE H, HILDEBRAND D, KLESSIG D, KACHROO P. Plastidial fatty acid signaling modulates salicylic acid- and jasmonic acid-mediated defence pathways in the *Arabidopsis ssi2* mutant[J]. Plant Cell, 2003, 15(12): 2952-2965.
- [27] DU H W, HUANG M, HU J Y, LI J S. Modification of the fatty acid composition in *Arabidopsis* and maize seeds using a stearoyl-acyl carrier protein desaturase-1 (*ZmSAD1*) gene[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16: 137.
- [28] LIU Q, SINGH S P, GREEN A G. High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing[J]. Plant Physiology, 2002, 129(4): 1732-1743.
- [29] DAR A A, CHOUDHURY A R, KANCHARLA P K, ARUMUGAM N. The *FAD2* gene in plants: occurrence, regulation, and role[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1789.
- [30] SEKINE K T, NANDI A, ISHIHARA T, HASE S, IKEGAMI M, SHAH J, TAKAHASHI H. Enhanced resistance to *Cucumber mosaic virus* in the *Arabidopsis thaliana ssi2* mutant is mediated via an SA-independent mechanism[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2004, 17(6): 623-632.
- [31] CRAIG W, LENZI P, SCOTTI N, PALMA M D, SAGGESE P, CARBONE V, CURRAN N M, MAGEE A M, MEDGYESY P, KAVANAGH T A, DIX P J, GRILLO S, CARDI T. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance[J]. Transgenic Research, 2008, 17: 769-782.
- [32] KODAMA H, HORIGUEHI G, NISHIUCHI T, NISHIMURA M, IBA K. Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves[J]. Plant Physiology, 1995, 107(4): 1177-1185.
- [33] MADI L, WANG X J, KOBILER I, LICHTER A, PRUSKY D. Stress on avocado fruits regulates Δ^9 -stearoyl-ACP desaturase expression, fatty acid composition, antifungal diene level and resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* attack[J]. Physiological Molecular Plant Pathology, 2003, 62: 277-283.
- [34] KLINKENBERG J, FAIST H, SAUPE S, LAMBERTZ S, KRISCHKE M, STINGL N, FEKETE A, MUELLER M J, FEUSSNER I, HEDRICH R, DEEKEN R. Two fatty acid desaturases, stearoyl-acyl carrier protein Δ^9 -desaturase6 and fatty acid desaturase3, are involved in drought and hypoxia stress signaling in *Arabidopsis* crown galls[J]. Plant Physiology, 2014, 164(2): 570-583.