网络出版时间:2026-05-11 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.11.008

菜心天冬氨酸激酶基因*BrAK3*调控植株耐热性功能分析

庞强强,孙晓东,周曼,王亚强,施国宾,陈贻诵

(海南省农业科学院 蔬菜研究所,农业农村部 热带果蔬遗传资源评价利用重点实验室(部省共建),海南省蔬菜生物学重点实验室,海南省瓜菜育种工程技术研究中心,海南 海口 571100)

[摘 要] 【目的】基于高温胁迫处理后的菜心转录组数据,从中筛选并命名了一个可能与高温胁迫响应相关的候选基因,即天冬氨酸激酶基因*BrAK3*,对该基因编码蛋白的生物信息学进行了分析,探究其在耐热性调控中的功能,以期为菜心耐热分子育种提供理论依据与基因资源。【方法】采用全基因合成方法获得*BrAK3*全长序列,利用生物信息学工具分析其理化性质、信号肽、蛋白结构与顺式作用元件,利用MEGA 6.0构建系统发育树。以耐热的菜心自交系CX1-7和热敏的菜心自交系CX7-3为材料,构建*BrAK3*过表达植株和*BrAK3*沉默表达植株,采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)技术,分析高温(37 ℃)胁迫下*BrAK3*以及与高温胁迫相关基因(*BrHsfA2*、*BrHsp90*和*BrMn-SOD*)的表达模式以及相关生理指标的变化。【结果】*BrAK3*基因全长为681 bp,编码226个氨基酸,具有典型的天冬氨酸激酶保守结构域,蛋白二级结构以α-螺旋、无规则卷曲和延伸链结构为主,含有11个高温胁迫响应元件CAAT-box,与白菜、甘蓝型油菜、野生甘蓝和萝卜的同源性较高。转录表达分析结果显示,高温胁迫前,热敏材料CX7-3与耐热材料CX1-7的*BrAK3*基因表达水平均较低;高温胁迫6 h后,CX1-7中的*BrAK3*表达水平迅速上升,而CX7-3中的*BrAK3*无显著变化。随着高温胁迫处理时间的延长,CX1-7中的*BrAK3*表达水平持续上调,于12 h时达到峰值;而CX7-3始终维持较低水平。组织表达分析结果显示,与高温胁迫前相比,高温胁迫6 h后根和叶柄中的*BrAK3*表达量均无显著变化;CX1-7叶片中的*BrAK3*表达水平显著增加,CX7-3中的*BrAK3*表达水平仍处于低水平。高温胁迫下,*BrAK3*过表达植株中的*BrHsfA2*、*BrHsp90*和*BrMn-SOD*基因表达上调,植株表型变化不明显,叶绿素含量无显著变化,相对电导率降低,同时脯氨酸含量和SOD活性升高,耐热性增强;*BrAK3*沉默表达植株中的*BrHsfA2*、*BrHsp90*和*BrMn-SOD*表达均受到抑制,叶片颜色变浅且叶绿素含量下降,相对电导率升高,脯氨酸含量和SOD活性均降低,植株耐热性明显减弱。【结论】成功获得了菜心*BrAK3*基因,证实其表达受高温特异性诱导,并具有正向调控菜心耐热性的生物学功能。

[关键词] 菜心;*BrAK3*;耐热性;基因过表达;基因沉默表达

[中图分类号] S634.5 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)11-0073-11

Heat resistance analysis of the aspartate kinase gene *BrAK3* in Chinese flowering cabbage

PANG Qiangqiang, SUN Xiaodong, ZHOU Man, WANG Yaqiang, SHI Guobin, CHEN Yisong

(*Institute of Vegetable, Hainan Provincial Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Genetic Resources Evaluation and*

[收稿日期] 2025-10-23 [修回日期] 2025-12-10

[基金项目] 海南省科技专项-省属科研院所技术创新科研项目(SQKY2022-0011);海南省重点研发项目(ZDYF2024XDNY242,ZDYF2024KJTPY051);海南省农业科学院院本级科研项目(HAAS2025KJCX11,HAAS2024SJTCSCS22);国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-23-G55)

[作者简介] 庞强强(1987—),男,安徽宿州人,副研究员,硕士,主要从事菜心育种及分子生物研究。E-mail:qiangq113@163.com

[通信作者] 孙晓东(1983—),男,黑龙江双鸭山人,研究员,博士,主要从事叶菜栽培技术研究。E-mail:sxd1949@163.com

陈贻诵(1975—),男,海南文昌人,研究员,硕士生导师,主要从事蔬菜栽培与育种研究。E-mail:chenyisong@hnaas.org.cn

Utilization of Tropical Fruits and Vegetables(Co-construction by Ministry and Province), Hainan Province Key Laboratory of Vegetable Biology, Hainan Province Melon and Vegetable Breeding Engineering Technology Research Center, Haikou, Hainan 571100, *China*))

Abstract: 【Objective】 Chinese flowering cabbage, a cold-preferring vegetable with low heat tolerance, faces significant production challenges during summer and autumn due to high temperatures. Based on the transcriptome data obtained from Chinese flowering cabbage under heat stress, we screened and named a candidate gene *BrAK*3 that may be related to heat stress response. This study aimed to analyze its physicochemical properties, protein structure, phylogenetic relationships, and expression patterns of the protein encoded by *BrAK*3, and further explore its function in heat tolerance regulation, in order to provide a theoretical basis and genetic resources for the molecular breeding of heat-tolerant Chinese flowering cabbages. 【Method】 The full-length sequence of *BrAK*3 was obtained by whole gene synthesis. Its physicochemical properties, signal peptides, protein structure, and cis acting elements were analyzed using bioinformatic tools such as ExPASy ProtParam, ProtScale, SignalP-5.0, SOPMA, Swiss Model, and PlantCARE. A phylogenetic tree was constructed using MEGA 6.0. Using a heat-tolerant inbred line (CX1-7) and a heat-sensitive inbred line (CX7-3) of Chinese flowering cabbage as materials, overexpression vector pBarleyGate 101-*BrAK*3 and gene silencing vector pK7GWIWG2(Ⅰ)-*BrAK*3 were constructed. Real time fluorescence PCR (RT-qPCR) technology was used to analyze the expression patterns of BrAK3 and heat stress-related genes (*BrHsfA*2, *BrHsp*90, *BrMn-SOD*) under high-temperature stress (37 ℃), and the changes in relevant physiological indices. 【Result】 The full-length squence of the *BrAK*3 gene was 681 bp, encoding 226 amino acids that contained a typical aspartate kinase conserved domain. The secondary structure of the BrAK3 potein was predominantly composed of alpha helices, irregular coils, and extended chain structures, and it contained eleven CAAT box heat stress response elements. Phylogenetic analysis showed that BrAK3 had the highest homology with *Brassica rapa*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea* var. *Oleracea* and *Raphanus sativus*. Transcriptional expression analysis showed that before heat stress, the expression level of the *BrAK*3 gene were low in both the thermosensitive material CX7-3 and the heat-resistant material CX1-7. After 6 h of heat stress, the expression level of *BrAK*3 in CX1-7 rapidly increased, while there was no significant change in CX7-3. With prolonged stress, the *BrAK*3 expression in CX1-7 continued to rise, peaking at 12 h, whereas it remained consistently low in CX7-3. Tissue-specific expression analysis showed no significant changes in the expression level of *BrAK*3 in the root and petiole before and after 6 h of heat stress. The leaf expression of *BrAK*3 was significantly higher than that before stress, while in CX7-3, it remained at a low level. Functional analysis showed that the expression level of *BrAK*3 directly affected the heat tolerance of Chinese flowing cabbage. In the *BrAK*3-overexpressed plant, the expression of *BrHsfA*2, *BrHsp*90 and *BrMn-SOD* was upregulated. The phenotypic changes of the plants and chlorophyll content were not significant, the relative conductivity decreased, and the proline content and SOD activity increased. In contrast, in *BrAK*3-silenced plants, the expression of the *BrHsfA*2, *BrHsp*90 and *BrMn-SOD* genes was inhibited. The leaf color became lighter, the chlorophyll content decreased, the relative conductivity increased, the proline content and SOD activity decreased, and the plant's heat tolerance was significantly weakened. 【Conclusion】 This study successfully identified the *BrAK*3 gene in Chinese flowering cabbage, confirming that its expression is specifically induced by high temperature and that it has a biological function of positively regulating the heat tolerance of Chinese flowering cabbage.

Key words: Chinese flowering cabbage; *BrAK*3; heat resistance; gene overexpression; gene silencing expression

菜心(*Brassica rapa* ssp. *chinensis* var. *Utilis*)作为我国华南地区特色蔬菜,因其脆嫩口感和丰富营

养而广受欢迎。菜心对高温天气极为敏感，当环境温度超过 30 ℃时，植株会出现薹茎细弱、品质下降等热害症状[1]，严重时可导致绝收，严重制约夏秋季节的菜心生产。近年来，随着菜心产业的发展和气候变化的影响，关于菜心热害及耐热性的研究日益受到学界和产业界的重视。在热害表现方面，系统观察了高温胁迫对菜心外部形态特征和主要经济性状的影响[2-3]；在耐热性评价方面，初步建立了基于形态指标和生理生化指标的耐热性鉴定体系[4-5]。这些研究为深入解析菜心耐热机制和开展耐热育种奠定了基础。当前菜心耐热育种面临的主要瓶颈在于种质资源遗传多样性不足，特别是缺乏优异的耐热亲本材料。传统杂交育种方法因受限于现有种质库的遗传背景狭窄，在耐热性状改良方面进展缓慢。在此背景下，采用基因编辑、分子标记辅助选择等现代生物技术手段，突破常规育种的局限性，实现菜心耐热性的精准改良，已成为育种研究的重要突破口和迫切需求。因此，解析菜心耐热调控机制，挖掘耐热基因，可为今后培育耐热菜心品种奠定基础。

在植物中，天冬氨酸经新陈代谢产生赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸和异亮氨酸[6]，这些氨基酸对于人类都非常重要。在天冬氨酸代谢途径中，首先以天冬氨酸为底物，在天冬氨酸激酶（aspartate kinase，AK）催化下形成 β-天冬氨酰磷酸（β-aspartyl phosphate，ASA），随后在天冬氨酸半醛脱氢酶（aspartate-semialdehyde dehydrogenase，ASADH）催化下转变成 β-天冬氨酸半醛（β-aspartic semialdehyde，ASD），从而进入合成赖氨酸等必需氨基酸的代谢途径[7]。AK 控制整条代谢途径的代谢通路，是天冬氨酸代谢中的第一个关键酶[8]，通过调节 AK 活性可以改变植物体内必需氨基酸的含量[9]。AK 基因是多基因家族，在细菌中研究得比较清楚，在植物中研究较少，目前已在拟南芥中鉴定出 3 个 AK 基因家族成员，在玉米、大豆、棉花、红花等植物中也有分离 AK 基因的报道[10-15]，而在菜心中尚未见相关研究。现有的研究表明，AK 基因参与植物体的器官发育、非生物胁迫响应等过程[16-17]。本研究从高温胁迫处理菜心转录组数据[18]中筛选获得了一个差异表达基因，并将其命名为天冬氨酸激酶基因 *BrAK3*，对该基因进行克隆及序列分析，并研究其表达模式与高温胁迫的关联性，以期为阐明菜心的耐热分子机制提供理论依据，并为耐热菜心新品种选育提供候选基因资源。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验于海南省农业科学院蔬菜研究所蔬菜生物学重点实验室进行。供试菜心材料为苗期高温胁迫鉴定及田间自然高温鉴定均表现为耐热的自交系 CX1-7 和热敏的自交系 CX7-3[19]，由海南省农业科学院蔬菜研究所叶菜研究室提供。

1.2　试验方法

1.2.1　*BrAK3* 基因克隆及生物信息学分析　基于菜心高温胁迫转录组数据库[18]，筛选目标基因片段，并将其命名为 *BrAK3*，委托武汉天一辉远生物科技有限公司进行全基因合成，获得该基因的全长序列。利用 ORF Finder 在线工具（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）预测其氨基酸序列。采用 ExPASy 服务器中的 ProtParam（https://web.expasy.org/protparam/）分析编码蛋白的基本理化性质，通过 ProtScale（https://web.expasy.org/protscale/）评估其亲/疏水性。使用 SignalP-5.0（https://services.healthtech.dtu.dk/service.php SignalP-5.0）预测蛋白质信号肽。通过 NCBI-CDS（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）进行蛋白质保守结构域分析。采用 SOPMA 在线软件（https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.plpage=npsa_sopma.html）预测蛋白质二级结构，并基于 Swiss-Model 在线平台（https://swissmodel.expasy.org/）进行同源建模，获得其三级结构模型。将所得氨基酸序列在 NCBI 蛋白质数据库中进行 Blastp 同源比对，选取同源性高且注释明确的序列，利用 MEGA 6.0 软件，采用邻接法构建系统进化树，设置 Bootstrap 重复抽样次数为 1 000 次以评估树形可靠性。利用 PlantCARE 在线工具（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）进行顺式作用元件分析。

1.2.2　高温胁迫试验　采用 32 孔穴盘育苗的方式，将供试的菜心材料于自然条件下培养至 3 片或 4 片叶后，转入光照培养箱中预培养（光 12 h（25 ℃）/暗 12 h（18 ℃），光照 80%，相对湿度 70%）3 d。高温胁迫处理在光照培养箱中进行，高温处理温度为 37 ℃，设置两组试验，其中第一组试验为：将耐热自交系 CX1-7 和热敏自交系 CX7-3 于高温条件下分别处理 0，0.5，1，3，6，12，24 和 48 h，分别取第 3 片和

第4片叶,分析高温胁迫处理不同时间下菜心*BrAK3*基因表达水平的变化;第二组试验为:将耐热自交系CX1-7和热敏自交系CX7-3于高温条件下处理0和6 h,分别取菜心的根、叶柄和叶片,分析高温胁迫处理下*BrAK3*基因在菜心不同组织中表达水平的变化。所有处理均设3次重复,取样完成后立即用液氮冷冻,并置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.2.3 *BrAK3*基因过表达和沉默表达体系的构建 利用同源重组方法,分别将*BrAK3*基因的CDS全长序列替代pEarleyGate 101质粒、CDS非保守区段90 bp(CDS 592~681 bp)替代pK7GWIWG2(Ⅰ)质粒35S启动子后attR1和attR2之间的*ccdB*基因,得到*BrAK3*基因过表达载体pEarleyGate 101-*BrAK3*和沉默表达载体pK7GWIWG2(Ⅰ)-*BrAK3*。将以上两个载体分别转化农杆菌GV3101,然后在对应抗性的培养基上倒置培养48 h,分别挑取阳性菌落进行扩大培养。经摇菌、离心、重悬菌体后,加入终浓度为200 mol/L的乙酰丁香酮,室温静置3 h。用注射器吸取等量静置过后的菌液,注射至菜心叶片背面的主叶脉,于22 ℃黑暗培养12 h后进行正常光照培养,获得*BrAK3*过表达植株和*BrAK3*沉默表达植株。其中过表达体系构建所用试验材料为CX7-3,沉默体系构建所用试验材料为CX1-7。将获得的*BrAK3*过表达植株和*BrAK3*沉默表达植株及其空白对照植株分别于37 ℃高温处理0和6 h,拍照记录处理前后植株表型的变化,并收集菜心幼苗叶片,液氮速冻后于-80 ℃保存备用。

1.2.4 基因表达分析及生理生化指标测定 对1.2.2和1.2.3节获得的植株样品,设计引物(表1)进行*BrAK3*以及与高温胁迫相关基因(*BrHsfA2*、*BrHsp90*和*BrMn-SOD*)表达水平的检测。使用TRIzol试剂(Invitrogen)提取样品总RNA,并合成cDNA。以稀释3倍后的cDNA为模板进行RT-qPCR分析。PCR反应体系为:2×SYBR *Premix Ex Taq*™ 5 μL,正向引物(10 μmol/L)0.5 μL,反向引物(10 μmol/L)0.5 μL,稀释后cDNA 4 μL,灭菌蒸馏水10 μL。PCR扩增程序为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,共40个循环。以*BrCK*Ⅰ[20]作为内参基因,每个样品设置3次重复,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对表达量。

采用SPAD法测定叶绿素含量,用电导仪法测定相对电导率,用茚三酮比色法测定脯氨酸(Pro)含量,用氮蓝四唑法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性。

表1 供试引物及其序列

Table1 Primers and its sequence used in this study

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5′→3′)	引物用途 Primer purpose
BrAK3	*BrAK3*-F	GGCAGATGGGTTCAGATTCG	RT-qPCR
	BrAK3-R	AAGAGGCGTGCTCATACTCA	
BrHsfA2	*BrHsfA2*-F	GACCATTGCTCCAAGACACC	RT-qPCR
	BrHsfA2-R	GGAAGAGACGGTGACCTACG	
BrHsp90	*BrHsp90*-F	CTGCAACAGTCTCACCCTCT	RT-qPCR
	BrHsp90-R	CTGAGAGCAAGTGGTGGAAC	
BrMn-SOD	*BrMn-SOD*-F	AGATGAGTGCTGAAGGTGCT	RT-qPCR
	BrMn-SOD-R	CTGATTGGCGGTTGTGTCAA	
*BrCK*Ⅰ	*BrCK*Ⅰ-F	GTCTAACTTCCTCGCCACCT	内参基因 Reference gene
	*BrCK*Ⅰ-R	GATTCGACGACAAGCCAGAC	

1.3 数据统计及分析

采用SPSS 22.0软件进行所有数据的统计分析,采用Duncan's多重比较法对单因素试验数据进行差异显著性检验,使用Excel 2007软件进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 菜心*BrAK3*基因的克隆

基于前期菜心转录组数据中的c34240.graph_c3基因片段,采用全基因合成方法获得其完整开放阅读框全长为681 bp,编码一个由226个氨基酸组成的蛋白序列,包含起始密码子ATG与终止密码子TGA(图1)。通过拟南芥基因组数据库进行同源比对,发现该基因与拟南芥天冬氨酸激酶基因*AtAK3*相似度最高,结合转录组注释信息,将其命名为菜心天冬氨酸激酶基因*BrAK3*。

2.2 菜心BrAK3蛋白理化性质分析

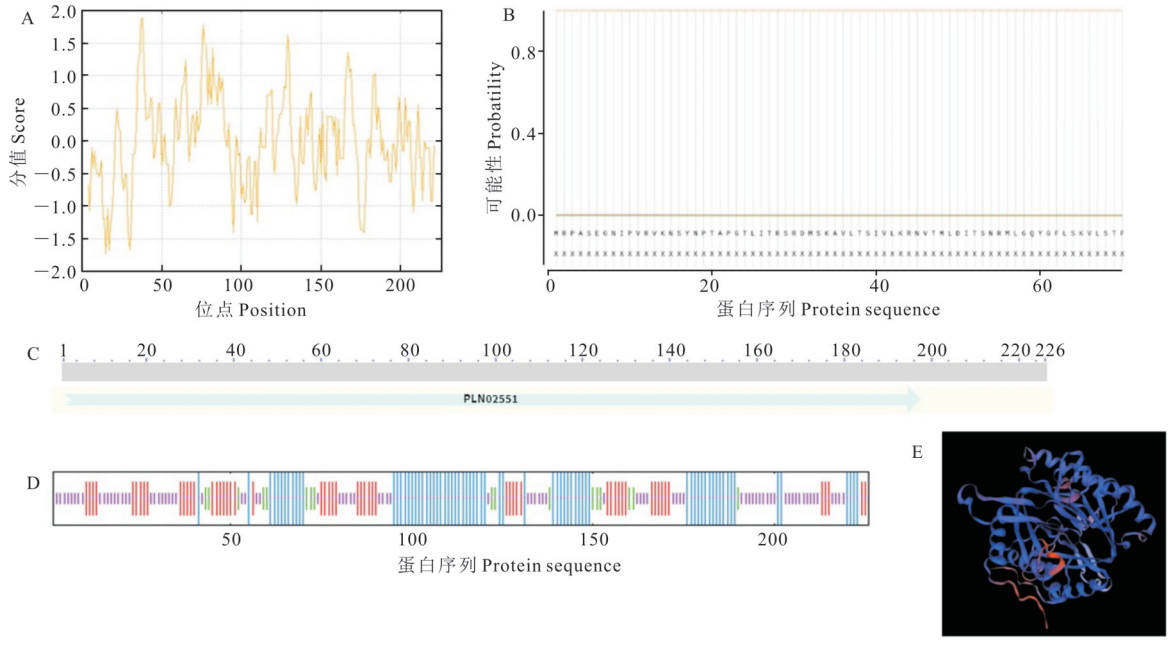
ProtParam分析结果显示,BrAK3蛋白分子式为$C_{1094}H_{1810}N_{308}O_{333}S_{10}$,原子总数为3 555,分子量为24.93 ku,理论等电点(pI)为9.05,为不稳定亲水性蛋白(图2-A)。结构预测显示,BrAK3不存在信号肽切割位点(图2-B),属于天冬氨酸激酶家族,且含

有一个典型的天冬氨酸激酶保守结构域（图 2-C），其二级结构由 31.86% 的 α-螺旋、36.28% 的无规则卷曲、24.34% 的延伸链和 7.52% 的 β-转角构成（图 2-D）。基于同源建模获得的三级结构模型与二级结构预测结果高度一致（图 2-E）。

1	ATG	CGG	CCA	GCT	AGC	GAA	GGG	AAC	ATT	CCT	GTA	AGG	GTT	AAG	AAC	TCT	TAC	AAT	CCC	ACT
1	M	R	P	A	S	E	G	N	I	P	V	R	V	K	N	S	Y	N	P	T
61	GCA	CCA	GGA	ACT	CTC	ATC	ACT	AGA	TCA	AGA	GAC	ATG	AGC	AAG	GCT	GTA	CTG	ACC	AGC	ATC
21	A	P	G	T	L	I	T	R	S	R	D	M	S	K	A	V	L	T	S	I
121	GTT	CTG	AAA	CGT	AAT	GTT	ACC	ATG	TTG	GAC	ATC	ACT	AGC	AAC	CGT	ATG	CTC	GGT	CAA	TAT
41	V	L	K	R	N	V	T	M	L	D	I	T	S	N	R	M	L	G	Q	Y
181	GGT	TTC	CTT	TCC	AAG	GTG	CTC	TCC	ACA	TTT	GAA	AAG	ATG	GGC	ATA	TCT	GTA	GAT	GTT	GTT
61	G	F	L	S	K	V	L	S	T	F	E	K	M	G	I	S	V	D	V	V
241	GCA	ACC	AGC	GAA	GTT	AGC	GTT	TCC	TTG	ACA	TTG	GAT	CCT	TCA	AAG	TTC	TGC	AGC	AAA	GAG
81	A	T	S	E	V	S	V	S	L	T	L	D	P	S	K	F	C	S	K	E
301	TTA	ATT	CAA	CAG	GAG	ATT	AAT	CAC	ATG	GTA	GAG	GAA	CTG	GAG	AAG	ATT	GCT	TCG	GTA	AAC
101	L	I	Q	Q	E	I	N	H	M	V	E	E	L	E	K	I	A	S	V	N
361	CTG	CTT	CAG	CAC	AGA	TCA	ATT	ATC	TCA	CTC	ATT	GGA	AAT	TTT	CAG	AGA	TCA	TCA	TCT	TTC
121	L	L	Q	H	R	S	I	I	S	L	I	G	N	F	Q	R	S	S	S	F
421	ATA	TTA	GAG	AAG	GGC	TTC	CGA	GTT	CTT	AGA	ACC	AAT	GGA	ATC	AAT	GTC	CAG	ATG	ATC	TCT
141	I	L	E	K	G	F	R	V	L	R	T	N	G	I	N	V	Q	M	I	S
481	CAG	GGT	GCA	TCT	AAG	GTA	AAC	ATC	TCG	CTG	ATA	GTG	AAT	GAT	GAT	GAG	GCA	GAG	CAT	TGT
161	Q	G	A	S	K	V	N	I	S	L	I	V	N	D	D	E	A	E	H	C
541	GTG	AAG	GCT	CTC	CAT	TCA	GCC	TTC	TTC	GAG	ACA	GGA	ACC	TCC	AAA	GCT	GTT	CCT	CAG	ATA
181	V	K	A	L	H	S	A	F	F	E	T	G	T	S	K	A	V	P	Q	I
601	GGG	CGT	CTA	GCT	ACT	ACA	CCT	CTG	CCT	TGT	CGT	GAA	AAC	CTC	TTG	GTG	CAA	CCT	GAC	CTG
201	G	R	L	A	T	T	P	L	P	C	R	E	N	L	L	V	Q	P	D	L
661	CGA	GAT	CTA	CAA	GTA	GTT	TGA													
221	R	D	L	Q	V	V	-													

图 1　菜心 *BrAK3* 的 ORF 序列及氨基酸序列

Fig. 1　ORF and amino acid sequences of *BrAK3* in Chinese flowering cabbage



A. 蛋白疏水性/亲水性预测结果；B. 蛋白信号肽预测结果；C. 蛋白结构域分析结果；D. 蛋白二级结构预测，其中红色为延伸链，绿色为 β-转角，紫色为无规则卷曲，蓝色为 α-螺旋；E. 蛋白三级结构预测。

A. Protein hydrophobicity/hydrophilicity prediction results; B. Protein signal peptide prediction results; C. Protein domain analysis results; D. Protein secondary structure prediction, where red represents extended strand, green represents β-turn, purple represents random coil, blue represents α-helix; E. Protein tertiary structure prediction.

图 2　菜心 BrAK3 蛋白的生物信息学分析

Fig. 2　Bioinformatic analysis of BrAK3 protein in Chinese flowering cabbage

2.3　菜心 *BrAK3* 基因系统进化分析

Blastp 同源性检索发现，BrAK3 与 22 种植物的 AK3 蛋白相似性较高，这些植物分别为白菜、甘蓝型油菜、萝卜、野生甘蓝、瑞典拟南芥、亚麻芥、堪察

加拟南芥、盐芥、拟南芥、荠菜、柳橙、薄壳山核桃、菜蓟、簸箕柳、可可、胡桃、向日葵、核桃、西班牙栓皮栎、茶树、大麻、大叶栎。系统进化分析结果(图3)显示,BrAK3和白菜、甘蓝型油菜、野生甘蓝、萝卜等十字花科作物处于同一分支,说明其亲缘关系较近。

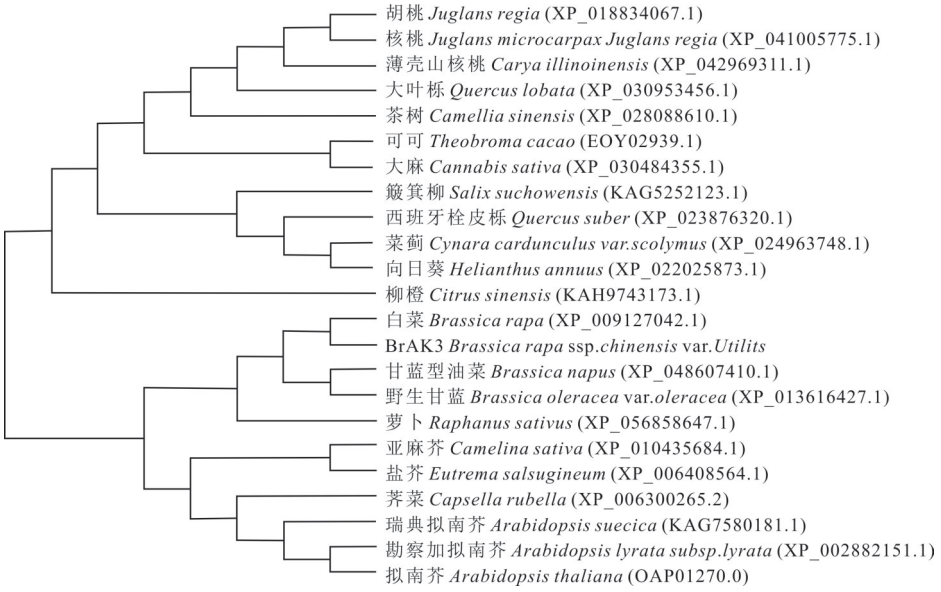


图3 菜心与其他科属植物AK3氨基酸序列的分子系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of AK3 amino acid sequence from Chinese flowering cabbage and other plants

2.4 菜心*BrAK3*基因顺式作用元件分析

对*BrAK3*基因的顺式作用元件进行分析,结果(图4)发现,其包含11个高温胁迫响应元件CAAT-box,同时含有光响应元件Box4、G-box、GATA-motif、GT1-motif和TCT-motif各1个、1个厌氧诱导响应元件ARE、1个醇溶蛋白代谢调控元件O_2-site及1个水杨酸响应元件TCA-element。该结果表明,*BrAK3*可能参与菜心对高温、光照、厌氧胁迫及水杨酸信号等多种生物学过程的响应与调控。

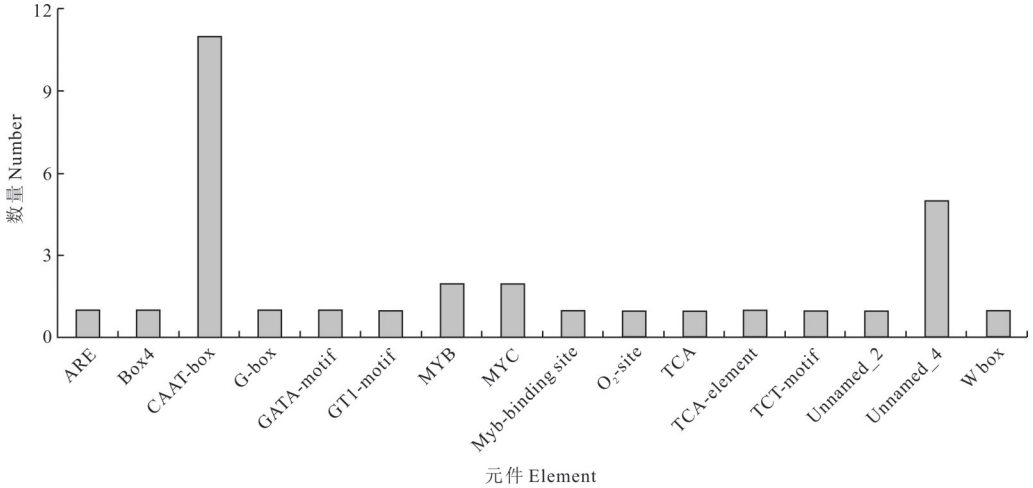


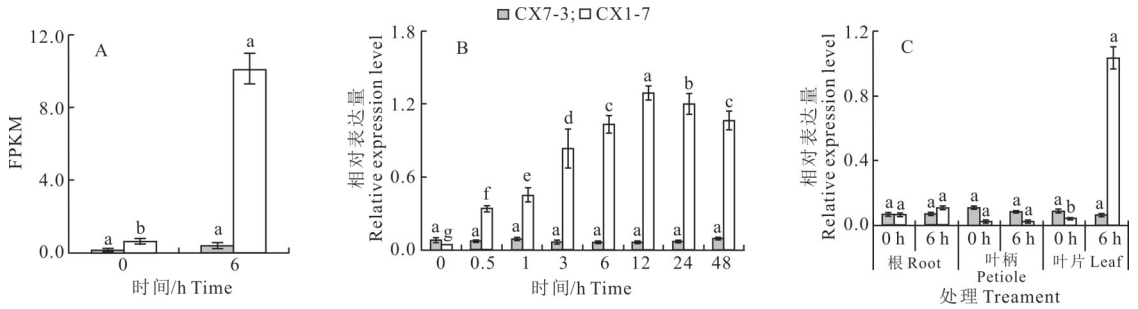
图4 菜心*BrAK3*基因顺式作用元件分析

Fig. 4 Analysis of cis-acting elements in the *BrAK3* gene of Chinese flowering cabbage

2.5 高温胁迫下菜心*BrAK3*基因的表达分析

从菜心高温胁迫转录组数据库中提取了*BrAK3*基因在高温胁迫前后的FPKM值,结果(图5-A)显示,在高温胁迫前(0 h),菜心*BrAK3*基因在热敏自交系CX7-3和耐热自交系CX1-7中的转录表达均处于较低水平。在高温胁迫6 h后,*BrAK3*基因在CX1-7中的转录表达水平迅速上升,是高温胁迫前的15.58倍;而在CX7-3中的转录表达水平仅增加为高温胁迫前的2.30倍;此时,*BrAK3*基因在CX1-7中的表达量是其在CX7-3中表达量的

222.02倍。RT-qPCR分析结果（图5-B）显示，随着高温胁迫处理时间的延长，耐热自交系CX1-7中*BrAK3*的表达量持续上调，并在12 h时达到峰值；而热敏自交系CX7-3中*BrAK3*的表达量始终维持在低水平，且无明显变化。组织特异性分析结果（图5-C）表明，*BrAK3*基因在不同组织的表达量存在差异，高温胁迫主要诱导*BrAK3*在CX1-7叶片中特异性高表达，而在两个自交系的根和叶柄中均未观察到*BrAK3*表达量的显著变化。上述结果说明，*BrAK3*受高温胁迫特异性诱导，且在耐热自交系中响应迅速而强烈，提示其可能是菜心高温胁迫响应的调控基因。



图柱上标不同小写字母表示同一植株不同处理间差异显著（$P<0.05$）。下同。

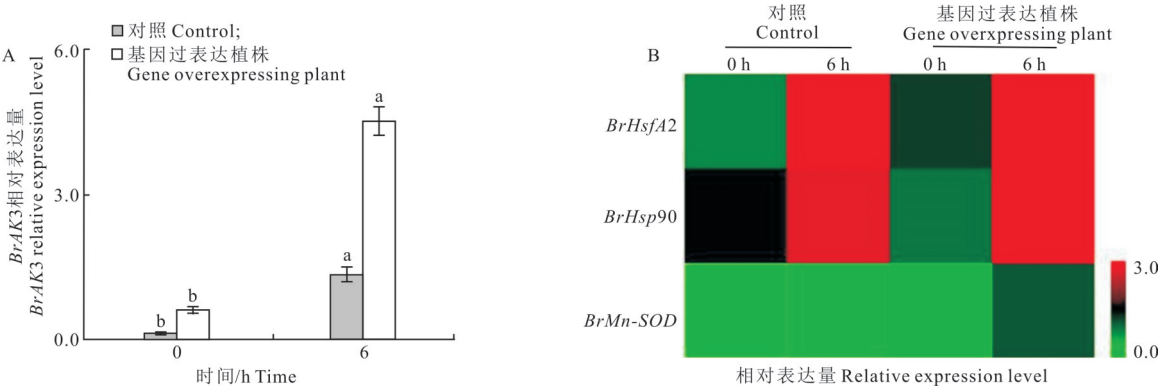
Different lowercase letters above the bars indicate significant differences among different treatments of the same plant（$P<0.05$）. The same below.

图5　高温胁迫处理下菜心*BrAK3*基因的表达水平分析

Fig. 5　Expression analysis of *BrAK3* gene under heat stress in Chinese flowering cabbage

2.6　菜心*BrAK3*基因过表达体系构建及耐热性分析

菜心*BrAK3*基因过表达体系构建及耐热性分析见图6～7和表2。*BrAK3*基因过表达阳性植株鉴定结果如图6-A所示。



A. 对照和基因过表达植株*BrAK3*相对表达量；B. *BrHsfA2*、*BrHsp90*和*BrMn-SOD*基因表达热图。

A. Relative expression levels of *BrAK3*; B. Heatmap of gene expression for *BrHsfA2*, *BrHsp90*, and *BrMn-SOD*.

图6　对照和*BrAK3*基因过表达菜心中相关基因的表达情况

Fig. 6　Expression of related genes in control and *BrAK3* gene overexpressing Chinese flowering cabbage plant



图7　高温胁迫前后对照和*BrAK3*基因过表达菜心植株表型的变化

Fig. 7　Phenotypic changes of control plants and *BrAK3* gene overexpressing Chinese flowering cabbage plants before and after heat stress

表2 对照和*BrAK3*基因过表达菜心植株生理生化指标的比较

Table 2 Comparison of physiological and biochemical indicators between control and *BrAK3* gene overexpressing Chinese flowering cabbage plant

处理 Treatment	叶绿素含量(SPAD) Chlorophyll content		相对电导率/% Relative electrical conductivity	
	0 h	6 h	0 h	6 h
对照 Control	23.83±0.59 a	19.83±0.45 b	15.83±1.45 b	36.07±6.45 a
基因过表达植株 Gene overexpressing plant	23.43±0.62 a	22.81±0.34 a	13.55±0.58 b	24.41±1.22 a
处理 Treatment	脯氨酸含量/(μg·mL^{-1}) Proline content		SOD活性/(U·g^{-1}) SOD activity	
	0 h	6 h	0 h	6 h
对照 Control	27.66±2.74 b	31.86±2.90 a	1.53±0.38 b	4.56±0.62 a
基因过表达植株 Gene overexpressing plant	25.26±3.88 b	144.32±3.15 a	1.72±0.63 b	9.78±0.38 a

注:同行数据后标不同小写字母表示同一植株不同处理时间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the peer data indicate significant differences between different treatment time for the same plant ($P<0.05$).

图6-A显示,高温胁迫6 h后,过表达植株中*BrAK3*表达水平显著高于对照,说明*BrAK3*基因过表达体系构建成功。由图6-B可知,高温胁迫6 h以后,过表达植株中多个耐热相关基因的表达被激活,包括热激转录因子基因*BrHsfA2*、分子伴侣基因*BrHsp90*以及活性氧清除酶基因*BrMn-SOD*,其表达量均显著高于对照。在高温胁迫6 h后,对照植株出现叶片褪绿等明显热害表型,而过表达植株表型保持相对正常(图7)。表2显示,过表达植株的叶绿素含量在高温胁迫前后未发生显著变化;与对照相比,过表达植株在高温胁迫6 h以后具有更低的相对电导率,同时伴随更高的Pro含量和SOD活性。

2.7 菜心*BrAK3*基因沉默表达体系构建及耐热性分析

为进一步验证*BrAK3*的功能,成功构建了*BrAK3*基因沉默表达体系,RT-qPCR分析结果显示,高温胁迫6 h后,基因沉默表达植株中*BrAK3*的表达量显著低于对照(图8-A);与对照植株相比,耐热标记基因*BrHsfA2*、*BrHsp90*和活性氧清除酶基因*BrMn-SOD*的表达均受到抑制(图8-B~D)。

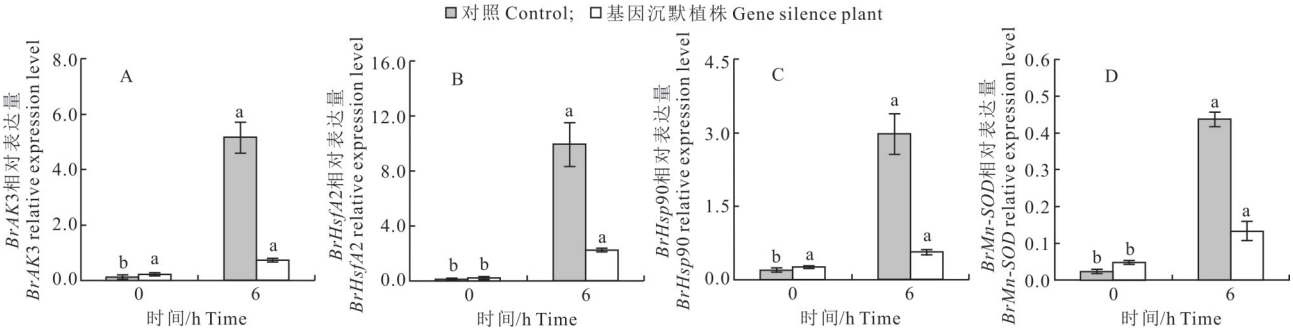


图8 对照和*BrAK3*基因沉默表达菜心植株中相关基因的表达情况

Fig. 8 Expression of related genes in control and *BrAK3* gene silence Chinese flowering cabbage plant

图9显示,在高温胁迫6 h后,基因沉默表达植株表现出明显的热敏感表型,表现为叶片褪绿、叶绿素含量下降,细胞膜损伤加剧,相对电导率升高;抗氧化防御能力减弱,Pro含量和SOD活性均下降。这些结果共同表明,抑制*BrAK3*表达会削弱菜心的热胁迫应答能力,从而降低其耐热性。

3 讨论与结论

本研究成功地从高温胁迫处理菜心转录数据库中获得了一个天冬氨酸激酶基因*BrAK3*,生物信息学分析表明,该基因编码的蛋白具有典型的天冬氨酸激酶结构域,属于亲水性蛋白,且不含信号肽,这暗示它可能主要在细胞内发挥功能,而非分泌到细胞外。系统进化分析显示,BrAK3与白菜中的同源蛋白亲缘关系最近,这与其同属于十字花科的分类地位相符,也表明该基因在进化上较为保守。

*BrAK3*的表达模式揭示了其与基因型依赖性耐热性的紧密关联。本研究发现,*BrAK3*的表达并非简单地由高温诱导,而是在耐热自交系与热敏自交系中呈现出截然不同的调控模式。在常温下,两个自交系中*BrAK3*的基础表达量均很低,表明该基

因并非组成型表达。然而高温胁迫下，*BrAK3* 在耐热自交系 CX1-7 中的表达被迅速且持续地诱导，并在 12 h 时达到峰值；相反，在热敏自交系 CX7-3 中，*BrAK3* 表达始终处于较低水平。这表明，*BrAK3* 的表达上调与菜心的耐热性呈正相关。*BrAK3* 基因启动子区含有 11 个高温胁迫响应元件 CAAT-box，而 CAAT-box 作用元件是一种广泛存在于植物基因的保守序列，在植物逆境响应中发挥着重要的作用[21]，这可能为 *BrAK3* 能够响应热胁迫奠定了基础，解释了其在耐热材料中能被特异性激活的原因。进一步的分析发现，*BrAK3* 基因具有组织表达特异性，其主要在叶片中表达，而在根和叶柄中表达水平较低，表明其主要在叶片中行使功能。

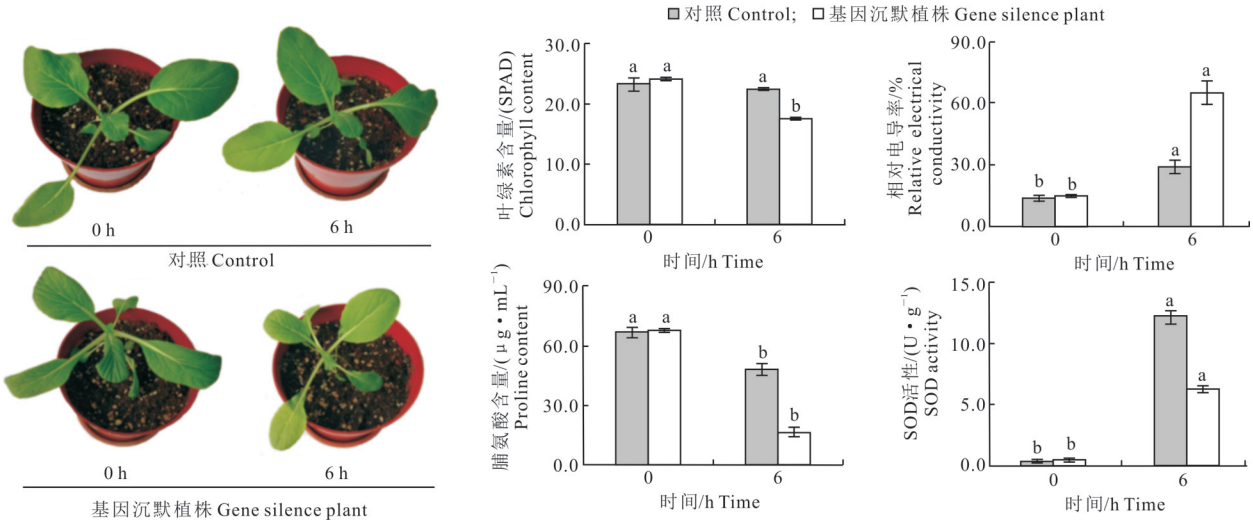


图 9　高温胁迫前后对照和 *BrAK3* 基因沉默表达菜心植株的表型及生理指标测定结果

Fig. 9　Phenotypic and physiological indicators of control and *BrAK3* gene silenced Chinese flowering cabbage plant before and after heat stress

在一些植物中可通过基因工程手段提高耐热型 AK 同工酶的表达水平，增强了转基因植物的耐热性。如有研究者将一个反馈不敏感的天冬氨酸激酶基因导入烟草，转基因植株耐热性增强，脯氨酸含量更高，细胞膜膜损伤更低[22]。改变 AK 活性不仅改变了植株氨基酸谱，还通过代谢重编程影响植株整体的生长和胁迫响应，其中包括耐热性[23]。高温胁迫会扰乱植物细胞的活性氧动态平衡，诱发氧化胁迫并导致细胞损伤。在这一过程中，植物体内会迅速积累热休克蛋白（heat shock protein，HSP），这些蛋白通过修复因氧化而失活的蛋白质的结构与功能，并协同增强抗氧化系统的效能，在植物耐热性形成中发挥着核心作用[24]。本研究中，*BrAK3* 过表达菜心植株的细胞膜热稳定性更好，氧化损伤程度减轻，相对电导率降低，同时伴随着 Pro 含量和 SOD 活性升高，*BrMn-SOD* 表达上调，植株清除活性氧（ROS）的能力增强，有效缓解了高温引起的氧化胁迫。转录因子 HsfA2 是启动下游保护基因（包括 *Hsp* 基因）表达的核心调控因子，正常情况下，Hsp90 通过与 HsfA2 相互作用，使其处于钝化的单体状态，抑制其转录活性。一旦遭遇热激，细胞内的蛋白质稳态面临挑战，这种相互作用被打破，使 HsfA2 得以激活，进而诱导热激蛋白的合成与积累，以增强植物的耐热性[25]。本研究中，高温胁迫下，*BrAK3* 被过表达后，*BrHsp90* 和 *BrHsfA2* 表达水平显著高于对照植株，说明过表达 *BrAK3* 导致 BrHsfA2 的活性被激活，同时 Hsp90 的合成受到影响，提高了细胞内活性氧清除效率，伤害程度减轻，证实了 *BrAK3* 在菜心耐热性方面起着正向调控作用，叶片表型正常，则是其整体耐热性提升的最终体现。反之，*BrAK3* 基因沉默植株的表现则从反面印证了其功能。*BrAK3* 基因沉默表达植株在高温胁迫后，不仅上述耐热相关基因的表达受到抑制，更出现了叶色变浅、叶绿素含量下降、相对电导率升高以及 Pro 含量与 SOD 活性降低等一系列典型的热敏感表型。这充分证明，*BrAK3* 基因的正常表达是菜心维持基础耐热性所必需的，当该基因功能被削弱时，植株的抗氧化系统和热激响应通路均无法有效启动，导致其更易遭受热损伤。

综上所述，*BrAK3* 是一个在菜心响应高温胁迫中发挥正向调控作用的基因，其可能位于高温信号通路的上游，通过调控 BrHsfA2 等核心转录因子，

进而影响下游热休克蛋白和抗氧化酶基因的表达,最终通过增强细胞的氧化胁迫耐受性和蛋白质稳态来提升植物的整体耐热性。然而,BrAK3蛋白本身是如何感知热信号的,其激酶活性是否通过磷酸化特定底物来传递信号,以及其与已知热信号通路(如HsfA1等)之间的具体互作关系,仍有待进一步研究。未来的工作将聚焦于解析*BrAK3*的具体生化功能及其在热信号网络中的精确位置,这为利用分子育种手段改良菜心及其他十字花科作物的耐热性提供了重要的基因资源和理论依据。

[参考文献]

[1] 李荣华,郭培国,张华,等. 高温胁迫对菜心农艺性状的影响[J]. 长江蔬菜,2011(22):39-43.
LI R H,GUO P G,ZHANG H,et al. Effects of heat stress on agronomic traits of flowering Chinese cabbages[J]. Journal of Changjiang Vegetables,2011(22):39-43.

[2] 刘畅. 高温涝渍对菜心农艺性状和生理特性影响的研究[D]. 广州:广州大学,2020.
LIU C. Effects of high temperature and waterlogging on agronomic and physiological traits in flowering Chinese cabbage[D]. Guangzhou: Guangzhou University,2020.

[3] 陈连珠,张雪彬,杨小锋. 根际高温对菜心生长及光合生理的影响[J]. 北方园艺,2020(14):50-55.
CHEN L Z,ZHANG X B,YANG X F. Effects of rhizosphere high temperature on growth and photosynthetic physiology of Chinese flowering cabbages[J]. Northern Horticulture,2020(14):50-55.

[4] 庞强强,周曼,孙晓东,等. 不同菜心品种萌发期和苗期耐热性分析及其鉴定指标筛选[J]. 西北农业学报,2020,29(2):295-305.
PANG Q Q,ZHOU M,SUN X D,et al. Comprehensive evaluation and indexes screening of heat tolerance at germination and seedling stages in different cultivars of Chinese flowering cabbage[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2020,29(2):295-305.

[5] 李光光,张财顺,郑岩松. 不同菜心品种耐热性鉴定指标的筛选[J]. 北方园艺,2012(18):1-5.
LI G G,ZHANG C S,ZHENG Y S. Screening of assessment indexes on heat tolerance in different Chinese flowering cabbage cultivars[J]. Northern Horticulture,2012(18):1-5.

[6] JANDER G,JOSHI V. Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants[J]. Molecular Plant,2010,3(1):54-65.

[7] KARSTEN W E,VILOA R E. Chemical and knetic mechanism of aspartate-β-semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coil*[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology,1991,1077(2):209-219.

[8] 杨宇亭,闵伟红. 天冬氨酸激酶代谢调控的研究进展[J]. 食品科学,2016,37(7):270-275.
YANG Y T,MIN W H. Review of research on metabolic regulation of aspartokinase[J]. Food Science,2016,37(7):270-275.

[9] 于妍,宋万坤,刘春燕,等. 植物天冬氨酸代谢途径关键酶基因研究进展[J]. 生物技术通报,2008,24(S1):7-11,17.
YU Y,SONG W K,LIU C Y,et al. Research development of key enzyme gene on aspartic acid metabolic pathway in plants[J]. Biotechnology Bulletin,2008,24(S1):7-11,17.

[10] VAN BOCHAUTE P,NOVOA A,BALLET S,et al. Regulatory mechanisms after short- and long-term perturbed lysine biosynthesis in the aspartate pathway: the need for isogenes in *Arabidopsis thaliana*[J]. Physiologia Plantarum,2013,149(4):449-460.

[11] MÜNTZ K,CHRISTOV V,SAALBACH G,et al. Genetic engineering for high methreonine grain legumes[J]. Nahrung,1998,42(3/4):125-127.

[12] GALILI G. The aspartate-family pathway of plants: Linking production of essential amino acids with energy and stress regulation[J]. Plant Signaling & Behavior,2011,6(2):192-195.

[13] STILLER I,DANCS G,HESSE H,et al. Improving the nutritive value of tubers: elevation of cysteine and glutathione contents in the potato cultivar White Lady by marker-free transformation[J]. Journal of Biotechnology,2007,128(2):335-343.

[14] 王艳芳,张娜,张玲,等. 红花天冬氨酸激酶基因片段的分离及表达分析[J]. 中草药,2015,46(20):3065-3070.
WANG Y F,ZHANG N,ZHANG L,et al. Isolation and expression analysis of aspartokinase gene fragment from *Carthamus tinctorius*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2015,46(20):3065-3070.

[15] 于妍,唐敬仙,姜威,等. 大豆AK基因的克隆与序列多样性分析[J]. 大豆科学,2016,35(4):574-580.
YU Y,TANG J X,JIANG W,et al. Molecular cloning and gene diversity analysis of gene AK in soybean[J]. Soybean Science,2016,35(4):574-580.

[16] YOSHIOKA Y,KUREI S,MACHIDA Y. Identification of a monofunctional aspartate kinase gene of *Arabidopsis thaliana* with spatially and temporally regulated expression[J]. Genes & Genetic Systems,2001,76(3):189-198.

[17] LIANG C G,ZHANG Q,XU G L,et al. High temperature during rice grain filling enhances aspartate metabolism in grains and results in accumulation of aspartate-family amino acids and protein components[J]. Rice Science,2013,20(5):343-348.

[18] 庞强强,孙晓东,周曼,等. 菜心叶片响应高温胁迫的转录组分析及转录因子筛选[J]. 分子植物育种,2024,22(8):2473-2487.
PANG Q Q,SUN X D,ZHOU M,et al. Transcriptome analysis of Chinese flowering cabbage leaves and transcription factor screening under heat stress[J]. Molecular Plant Breeding,2024,22(8):2473-2487.

[19] 庞强强,孙晓东,周曼,等. 一种菜心耐热性评价方法:CN113348992A[P]. 2021-09-07.
PANG Q Q,SUN X D,ZHOU M,et al. A method for evaluat-

ing the heat resistance of vegetable hearts: CN113348992A [P]. 2021-09-07.

[20] 庞强强，孙晓东，周曼，等. 菜心高温胁迫内参基因及其筛选方法和应用：CN115927296A[P]. 2023-04-07.
PANG Q Q, SUN X D, ZHOU M, et al. Heat stress internal reference genes and their screening methods and applications in Chinese flowering cabbage: CN115927296A[P]. 2023-04-07.

[21] SHRESTHA A, KHAN A, DEY N. *Cis-trans* engineering: advances and perspectives on customized transcriptional regulation in plants[J]. Molecular Plant, 2018, 11(7): 886-898.

[22] SONG D D, LIU J, LI X, et al. Improved stress tolerance and yield in transgenic tobacco plants constitutively expressing a feedback-insensitive aspartate kinase [J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(13): 1259-1267.

[23] GALILI G, AMIR R, FERNIE A R. The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67(1): 153-178.

[24] MITTLER R, FINKA A, GOLOUBINOFF P. How do plants feel the heat[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2012, 37(3): 118-125.

[25] LI J, SOROKA J, BUCHNER J. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Cell Research, 2012, 1823(3): 624-635.

（责任编辑：李小平）

（上接第 48 页）

[25] 王优信，延荣，蔺明月，等. 冀中北小麦品种抗旱性筛选研究[J]. 植物遗传资源学报，2021，22(1)：74-82.
WANG Y X, YAN R, LIN M Y, et al. Screening for drought-resistant wheat varieties in northern central area of Hebei Province [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(1): 74-82.

[26] 张德顺，战颖，姚鳗卿，等. 不同程度干旱胁迫对叶片颜色的影响[J]. 上海农业学报，2022，38(5)：27-31.
ZHANG D S, ZHAN Y, YAO M Q, et al. Effects of different degrees of drought stress on leaf color characters[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2022, 38(5): 27-31.

[27] 陈树钢，丁彦芬. 以电导法配合 Logistic 方程确定 5 种景天属植物耐旱性[J]. 江苏农业科学，2011，39(3)：213-216.
CHEN S G, DING Y F. Determination of drought tolerance of five *Sedum* species by conductance method combined with Logistic equation[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(3): 213-216.

[28] 徐田，毕玮，陈剑. 应用 Logistic 方程确定巨龙竹叶片低温半致死温度[J]. 竹子学报，2018，37(2)：75-78.
XU T, BI W, CHEN J. Application of logistic equation on determination of semilethal low temperature of *Dendrocalamus sinicus*[J]. Journal of Bamboo Research, 2018, 37(2): 75-78.

（责任编辑：马秋明）