DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.01167

花生 Δ^9 -硬脂酰-ACP 脱氢酶基因(SAD)的序列分析

东金玉 万勇善* 刘风珍*

山东农业大学农学院 / 作物生物学国家重点实验室 / 山东省作物生物学重点实验室, 山东泰安 271018

摘要: 利用同源克隆技术获得花生区组二倍体野生种 *A. duranensis* 和 *A. ipaensis* 的 Δ^9 -硬脂酰-ACP 脱氢酶基因 *SAD* (命名为 *gSAD-A* 和 *gSAD-B*)及 3 个栽培品种的 *SAD*, 每个栽培品种有 2 个 *SAD* (命名为 *gSAD-1* 和 *gSAD-2*)。同时获得丰花 2 号 *SAD* 的两条全长 cDNA (命名为 *FhrSAD-1* 和 *FhrSAD-2*)。丰花 2 号的 *FhgSAD-1* 和 *FhgSAD-2* 均含有 2 个内含子, 二者同源性 97.5%, 共有 69 个变异位点, 其中 62 个是 SNP 位点、6 个特异性酶切位点。*FhrSAD-1* 和 *FhrSAD-2* 间核苷酸序列同源性 98.6%, 其中编码区序列同源性 98.9%, 共有 12 个变异位点, 编码的 Ah-SAD2 氨基酸序列与 Ah-SAD1 相比在 N 端的 ¹⁷PSSSSSSSSSFSL³⁰ 丝氨酸聚集区少一个丝氨酸。*gSAD-1* 和 *gSAD-A* 同源性为 99.9%, 存在 4 个 SNP 位点; *gSAD-2* 和 *gSAD-B* 同源性为 100%。推测 *gSAD-1* 和 *gSAD-2* 分别来自花生栽培品种的 A、B 2 个染色体组。研究明确了花生不同染色体组 *SAD* 的序列特征, 为进一步探讨 *SAD* 的表达及其在控制花生籽仁脂肪酸组分中的作用提供了重要的参考。

关键词: 花生; 硬脂酰-ACP 脱氢酶(SAD); 序列分析

Sequence Analysis of Δ^9 -Stearoyl-ACP Desaturase Gene (SAD) in Peanut

DONG Jin-Yu, WAN Yong-Shan*, and LIU Feng-Zhen*

State Key Laboratory of Crop Biology / Shandong Key Laboratory of Crop Biology / Agronomy College of Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract: The peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars are an allotetraploid consisting of A and B genomes. Δ^9 -Stearoyl-ACP desaturase (SAD) is a key enzyme that catalyzes the conversion of stearoyl-ACP to oleoyl-ACP, and finally controls the content of oleic acid as well as the proportion of saturated to unsaturated fatty acids. By using the primers based on the peanut cDNA sequence of *SAD* (AF172728), genomic DNAs were amplified from the wild diploid species *A. duranensis* and *A. ipaensis*, and from the cultivated accessions of peanut Fenghua 2, Shanhua 7 and Puyangdatuoyang, respectively. Two isoforms of the genomic *SAD* were identified and named as *FhgSAD-1* and *FhgSAD-2* from the cultivated peanut accessions. In addition, two isoforms of *SAD* cDNA were isolated and named as *FhrSAD-1* and *FhrSAD-2* from Fenghua 2. Comparison of the genomic sequences with cDNAs revealed that there were two introns in the *SAD* genomic sequences. Sequences alignment showed that the similarity between *FhgSAD-1* and *FhgSAD-2* in nucleotide level was over 97.5%, with 69 different sites in total, including 62 SNP sites and six variation sites of endonuclease recognition. The cDNA sequence similarity between *FhrSAD-1* and *FhrSAD-2* was 98.6%, with 98.9% nucleotides identity in coding region. Deduced amino acid sequences revealed that only one difference occurred in serine gathering area of ¹⁷PSSSSSSSSSFSL³⁰. *gSAD-1* shared 99.9% nucleotide sequence homology with *gSAD-A*, while *gSAD-2* was the same as *gSAD-B*. According to the phylogenetic tree, it is assumed that *gSAD-1* and *gSAD-2* may come from the A and B genome, respectively. The results revealed the characteristics of *SAD* sequences from different genomes of peanut, and provided important basis for exploring gene expression regulation and fatty acid component improvement in peanut seeds.

Keywords: Peanut; Stearoyl-ACP desaturase (SAD); Sequence analysis

花生是我国重要的油料和经济作物之一, 总产居世界首位。花生籽仁贮藏油脂中 80%左右为不饱和脂肪酸, 饱和脂肪酸占 20%左右^[1-2]。植物不饱和脂肪酸组成很大程度上是受到脂肪酸脱氢酶种类和

本研究由山东省花生良种产业化工程项目和现代农业产业技术体系建设项目(CAIS-14)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 万勇善, E-mail: yswan@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8241540; 刘风珍, E-mail: liufz@sdau.edu.cn, Tel: 0538-8241540

第一作者联系方式: E-mail: dongjinyu86@163.com

Received(收稿日期): 2011-12-29; Accepted(接受日期): 2012-04-15; Published online(网络出版日期): 2012-05-11.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120511.1540.020.html>

数量的调控,而 Δ^9 -硬脂酰-ACP脱氢酶(stearoyl-ACP desaturase, SAD)催化硬脂酰-ACP脱饱和而在脂肪酸链的C9与C10间引入一个双键形成油酰-ACP的反应,是不饱和脂肪酸合成代谢的关键酶^[3-4]。因此,SAD直接决定了植物油脂中的不饱和脂肪酸的总量以及饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例^[5-6]。目前,在大豆^[7-8]、拟南芥^[9]等很多植物中已经克隆到SAD^[10-12],经研究证实在大多数高等植物中,SAD呈现组织特异性表达,且在发育的种子中的表达量比其他组织都高^[9,13-15]。Liu等^[16]通过RNA干涉使棉花的SAD沉默,硬脂酸含量从正常的20%上升到40%,同时还伴随棉籽油中其他3种主要脂肪酸棕榈酸、油酸和亚油酸的减少。Wendy等^[17]将土豆SAD转入烟草,发现叶片和种子的脂肪酸组分发生了变化,不饱和脂肪酸含量增加。Jung等(2000年)首先在GenBank中注册了花生SAD的全长cDNA序列(AF172728),关于栽培品种不同染色体组SAD序列特征的研究未见报道。

本研究目的是通过对花生3个栽培品种和2个野生种SAD的cDNA和基因组DNA序列结构分析,比较A、B染色体组的SAD核苷酸序列和编码的氨基酸序列差异,及花生与其他油料作物的系统发育关系,为进一步利用SAD改善油料作物中脂肪酸组分提供重要的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

花生属花生区组二倍体野生种 *A. duranensis* 和 *A. ipaensis* 及栽培品种濮阳大拖秧由中国农业科学院油料作物研究所姜慧芳研究员提供;栽培品种丰花2号、山花7号由山东农业大学选育。

TIANGel 胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;pEASY-T1 Vector, 大肠杆菌菌株 DH5 α , Trizol Reagent Kit, EasyScript First-Strand cDNA Synthesis Kit 购自北京全式金生物技术有限公司,其他试剂均为进口或国产分析纯。引物由上海生物工程有限公司合成,测序工作由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.2 DNA、RNA 提取及 cDNA 链的合成

分别取花生栽培品种和野生种幼嫩花生叶片,用CTAB法提取总DNA。丰花2号花生果针入土约35d后,取幼果,液氮速冻,-70℃保存,参照Trizol Reagent Kit说明书提取其总RNA。以2 μ L RNA为模板、

以Oligo(dT)为引物,按照EasyScript First-Strand cDNA Synthesis Kit描述的方法,合成cDNA第一链。

1.3 花生 SAD 的 PCR 扩增

采用报道的花生SAD的cDNA序列(GenBank登录号为AF172728)设计1对特异性引物,上游引物F: 5'-GCAACACGAAAAATGGCTCT-3';下游引物R: 5'-GGACACCACACCGAAAACAT-3'。以花生栽培品种丰花2号总RNA经反转录生成的cDNA第一链为模板,用引物F和R扩增SAD的cDNA序列。PCR程序为94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1.5 min, 35个循环; 72℃ 10 min。分别以3个栽培品种和2个野生种基因组DNA为模板,用引物F和R扩增SAD的DNA序列。扩增程序为94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 3 min, 35个循环; 72℃ 10 min。

1.4 PCR 产物的克隆测序和序列分析

PCR扩增产物经10 g L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳后,按照DNA胶回收试剂盒说明书回收,再与pEASY-T1克隆载体连接,转化至大肠杆菌DH5 α 中进行抗卡那霉素筛选。挑选白色单菌落,PCR检测鉴定后送北京六合华大基因科技有限公司测序,每个品种选6~10个克隆。采用Blast程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)分析序列的同源性,用DNAMAN软件进行序列翻译和多重比对。

1.5 生物信息学分析

利用ClustalX软件结合PHYMLIP软件,采用最大简约法,以来自栽培品种和野生种SAD的DNA序列构建分子进化树。采用BootStrap 1000检验分子系统树的置信度。利用软件ClustalW对包括花生在内的10种主要油料作物SAD编码的氨基酸序列进行聚类分析。用下列在线软件对氨基酸序列进行结构特征分析:蛋白等电点、分子量等分析软件(<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>),蛋白二级结构分析软件(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html),蛋白保守结构域分析软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>),跨膜结构分析软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>),亚细胞定位软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>),信号肽预测软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)。

2 结果与分析

2.1 花生 SAD 的克隆

用引物F和R对丰花2号cDNA进行PCR扩

增, 琼脂糖凝胶电泳检测获得约 1.5 kb 特异性条带, 与预期大小相符。从琼脂糖凝胶回收的 PCR 产物与 pEASY-T1 克隆载体连接, 重组子转化大肠杆菌 DH5 α , 经卡那霉素筛选、PCR 检测鉴定获得含有目的片段的阳性克隆, 测序结果表明, 存在 2 个 SAD 基因, 分别命名为 *FhrSAD-1* 和 *FhrSAD-2*。

以 3 个栽培品种和 2 个野生种的 DNA 为模板, 用引物 F 和 R 对进行 PCR 扩增, 获得约 3.5 kb 的片段, 与 pEASY-T1 载体连接后, 克隆测序。结果表明, 3 个栽培品种均得到 2 条不同的序列, 命名为 *gSAD-1* 和 *gSAD-2* (表 1); 2 个野生种分别得到一条序列, 由 *A. duranensis* 克隆的序列命名为 *gSAD-A*, 由 *A. ipaensis* 克隆的序列命名为 *gSAD-B*。

表 1 供试的 3 个花生栽培品种及其对应的序列名
Table 1 Peanut cultivar names and the corresponding DNA sequences

亚种名 Subspecies	品种类型 Variety type	品种名 Accession	DNA 序列名 DNA sequence name
疏枝亚种 <i>ssp. fastigiata</i>	珍珠豆型 <i>var. vulgaris</i>	丰花 2 号 Fenghua 2	<i>FhgSAD-1</i> , <i>FhgSAD-2</i>
	中间型 Irregular type	山花 7 号 Shanhua 7	<i>ShgSAD-1</i> , <i>ShgSAD-2</i>
密枝亚种 <i>ssp. hypogaea</i>	普通型 <i>var. hypogaea</i>	濮阳大拖秧 Puyangdatuoyang	<i>PygSAD-1</i> , <i>PygSAD-2</i>

2.2.2 DNA 序列分析 由丰花 2 号扩增得到的 2 条 DNA 序列 *FhgSAD-1* 和 *FhgSAD-2* 长度分别为 3 503 bp 和 3 510 bp, 同源性 97.5%。Splign 程序分析表明, *FhrSAD-1* 和 *FhrSAD-2* 分别与 *FhgSAD-1* 和 *FhgSAD-2* 外显子部分完全一致。*FhgSAD-1* 和 *FhgSAD-2* 均含有 2 个内含子, *FhgSAD-1* 内含子位于 168~1 689、2 195~2 695 bp 处, 大小分别为 1 522 bp 和 501 bp; *FhgSAD-2* 内含子位于 165~1 695、2 201~2 699 bp 处, 大小分别为 1 531 bp 和 499 bp。2 个序列所有内含子的剪切方式均符合 GT-AG 规则(图 1)。

FhgSAD-1 和 *FhgSAD-2* 内含子核苷酸序列差异分析表明, 2 个内含子分别存在 36 和 17 个差异位点, 其中 34 个和 14 个为 SNP (图 1)。全序列共有 69 个变异位点, 其中 62 个 SNP, 占 90.0%。

用 DNAMAN 软件对序列分析发现, *FhgSAD-1* 具有 *FhgSAD-2* 没有的 *Bsm* I、*Nde* I、*Apa* I 和 *Hind* III 4 种限制性酶的识别位点, 而 *FhgSAD-2* 具有 *FhgSAD-1* 没有的 *Age* I 和 *Bst*E II 两种限制性酶的识别位点(图 2)。

2.3 花生 SAD 核苷酸序列推导的氨基酸序列分析

由 *FhrSAD-1* 和 *FhrSAD-2* 推导出编码蛋白的氨

2.2 丰花 2 号 SAD 核苷酸序列分析

2.2.1 cDNA 序列分析 由丰花 2 号扩增得到的 cDNA 序列 *FhrSAD-1* 和 *FhrSAD-2* 同源性为 98.6%, 与发表序列同源性分别为 97.6%和 96.7%。克隆得到的两序列都具有开放阅读框, *FhrSAD-1* 全长 1 479 bp, 包含 1 221 bp 的编码区和 246 bp 的 3'UTR; *FhrSAD-2* 全长 1 480 bp, 包含 1 218 bp 的编码区和 250 bp 的 3'UTR; 起始密码子均位于 13 bp 处, 终止密码子分别位于 1 231 bp 和 1 228 bp 处; ATG 起始密码子附近符合 Kozak 规则(AXXATGG)(图 1)。*FhrSAD-1* 和 *FhrSAD-2* 的编码区核苷酸序列同源性 98.9%, 共有 12 个变异位点, 其中 11 个为 SNP 位点(图 1)。

基酸序列, 分别命名为 Ah-SAD1 和 Ah-SAD2。二者氨基酸序列同源性 99.8%, Ah-SAD1 全长 406 个氨基酸, Ah-SAD2 全长 405 个氨基酸, Ah-SAD2 在 N 端比 Ah-SAD1 少一个丝氨酸。将参考的该基因编码蛋白的氨基酸序列命名为 Ah-SAD3, Ah-SAD3 全长 409 个氨基酸。Ah-SAD1 和 Ah-SAD3 序列同源性 97.6%, 存在 9 个氨基酸差异(图 5)。

以 Ah-SAD1 和 Ah-SAD2 两条序列的生物信息学分析预测 Ah-SAD1 的理论分子量和等电点, MW=46.229 kD, pI 6.43; Ah-SAD2 的理论分子量和等电点为 MW=46.31 kD, pI 6.43。二级结构分析表明 Ah-SAD1 含 50.62%的 α 螺旋, 8.89%的延伸串, 5.43%的 β 转角, 35.06%的不规则卷曲; Ah-SAD2 含 50.74%的 α 螺旋, 9.16%的延伸串, 5.45%的 β 转角, 34.65%的不规则卷曲。Ah-SAD1 和 Ah-SAD2 蛋白不存在明显的跨膜结构特征, 为可溶性蛋白。Ah-SAD1 和 Ah-SAD2 定位于叶绿体的概率为 0.950。

通过 NCBI 的 protein blast 功能、CD-Search 工具及 Cn3D 4.1 软件进行蛋白质保守结构分析表明: Ah-SAD1 和 Ah-SAD2 编码的多肽的保守性基本一致, 都是以同型二聚体形式存在, 均含一个属于酰

<i>FhgSAD-1</i>	GCAACACGAAAAATGGCTCTGAGGCTGAACCCCTAACCCCTCACAGAAGCTCTTCTCTCTCCTTCTTCAT	70
<i>FhgSAD-2</i>		70
<i>FhgSAD-1</i>	CATCATCTTCTTCTTCTTCATCGTTCTCGCTTCCTCAAATGGCTAGCCTCAGATCTCCAAGGTTCGCGAT	140
<i>FhgSAD-2</i>	...	137
<i>FhgSAD-1</i>	GGCCTCCACCCCTCCGCACTGGTTCCAAGTCTGTTCTCTTTCTCTCTTCTCCCTTCCATTCCTC	210
<i>FhgSAD-2</i>		207
<i>FhgSAD-1</i>	CTCGATCTGCTTTTTCCCGATTTTTAATTTCTGAAATCAATGCCAAGCACGCTGAAAACACGCGCTGAT	280
<i>FhgSAD-2</i>		277
<i>FhgSAD-1</i>	TTTTCAATCACGTTTTTAATTTTGTCTATAATGCTGTTTATTCATTTAATTACTTCTGTTGAATACTG	350
<i>FhgSAD-2</i>		347
<i>FhgSAD-1</i>	TGTTATGTGTGCACCGTCCAAAAAGGTTTCAGCTACTGTTGAAGATGCTGATTCAATTTGTGGTACC	420
<i>FhgSAD-2</i>		417
<i>FhgSAD-1</i>	TTCTTTGAATCGGTGCTGTTTGGTTTCAGGGGATTGGGATTGGGAGTGGTTCGATCGCATTCAATTGATTCC	490
<i>FhgSAD-2</i>		487
<i>FhgSAD-1</i>	TCCCTCTTTCTTCTGTTATGTCAATTTTGTGTTTATTTTTTATTATTATTTGGGTAGAGTGATG	560
<i>FhgSAD-2</i>		556
<i>FhgSAD-1</i>	TAGCTGCATGTCTTTCTTTTGGGTTGTTGAGGCTTATACACTTATTAAGAAAGAAATCCATCATCAC	630
<i>FhgSAD-2</i>		626
<i>FhgSAD-1</i>	TATTAATAATCTCAACAACCTTATCTCTCTCACATAAGTCACAACCCCCCTTTTTCCGTTTTTGTACT	700
<i>FhgSAD-2</i>		696
<i>FhgSAD-1</i>	TGTCGCACACCTTCATTGTTGTTTGGTGGGTGAACAATGAACATGCGACTAAAAACAAATTTCAAGAAA	770
<i>FhgSAD-2</i>		766
<i>FhgSAD-1</i>	AAGGAATACTTGAGTTGAAGTGTAAACAAATTAATTTGATTCATTAGTTAACTATTTTGTGTGCA	840
<i>FhgSAD-2</i>		836
<i>FhgSAD-1</i>	CTTGTTTTTCCACACCCGTTTTCAATATTCTTGAACAAGTTTGTGGTTTTGTAGCCTATGTTTTG	910
<i>FhgSAD-2</i>		906
<i>FhgSAD-1</i>	GTCCCATAGTTTGAACCTCATTTACTTTCTGTTGAATTTTTTATTGAGATGCAGTCTTTCAATTCT	980
<i>FhgSAD-2</i>		976
<i>FhgSAD-1</i>	TCTCCCTTTTCAACATAAACTAACTTTTATTTATTTATATGTGGATTAGCTAAAGAGTATCCT	1050
<i>FhgSAD-2</i>		1046
<i>FhgSAD-1</i>	AATGAAAGTTGAAAGTTTTGGTCTTTCATGCATAGAAAACCTGAAAAATTTAATTTACATTTTCTATT	1120
<i>FhgSAD-2</i>		1116
<i>FhgSAD-1</i>	CGAACTTTTCTACTTGTGATGTCATTAAAGGGCATTGTTAGGCTTTCTCAGTCATGCATATGAACCTTA	1190
<i>FhgSAD-2</i>		1186
<i>FhgSAD-1</i>	ACAATCATGCATGTGTATCTTTTACTTT.....TCTATTCTCCTTCTGATTGGTACTCTGTTTT	1251
<i>FhgSAD-2</i>	ccgtatgtta	1256
<i>FhgSAD-1</i>	TTTCTCCTTGTGTTGATTTGATTTTGGATCTCTTGATCTTTCTGCGTAATATTGTATGATTTTGATCA	1321
<i>FhgSAD-2</i>		1326
<i>FhgSAD-1</i>	ATGCTGTGAACCGATGAGTGTGAATTATCATGCATAGGTGACTTGGGACTTTTTGAAGTTTTGGTAACT	1391
<i>FhgSAD-2</i>		1395
<i>FhgSAD-1</i>	ATGTTGATTATGTTGTATGAACTGCTTTTGGGCTTTTACTGTGTCAAAGGTATTTTGGTGGCTCTTGT	1461
<i>FhgSAD-2</i>		1465
<i>FhgSAD-1</i>	GTGGTGATTTGAGTAACCTAGGCATGTGTTGGTGCATGCTCTGCAACCTGTTCTTGCTATGATTATTC	1531
<i>FhgSAD-2</i>		1535
<i>FhgSAD-1</i>	TTTGTAATCTCTTAACATAATAGTGGATATGGCCTTTTTTTTCT..CTTATTTTGTGCGTCAATA	1599
<i>FhgSAD-2</i>		1605
<i>FhgSAD-1</i>	ATATGATCTTCGCAATTGATTTATTGATTAGCATGGTAGGATCATTGTAGAATTATTAATCCGACATT	1669
<i>FhgSAD-2</i>		1675
<i>FhgSAD-1</i>	CATGTGCTTTCTTTGTAGAGAGGTTGAAATCTCAAGAAGCCTTTACGCGCTCCCGAGAGGTACATG	1739
<i>FhgSAD-2</i>		1745
<i>FhgSAD-1</i>	TTCAAGTAACCCACTCCATGCCACCCGAGAAGATTGAGATTTCAAATCGTTAGAGGGTTGGCTGAGGA	1809
<i>FhgSAD-2</i>		1815
<i>FhgSAD-1</i>	GAACATTTTGACTCTCCTCAAACCTGTAGAGAAGTGTGGCAGCCACAGGACTATTTACCAGAACCTTCA	1879
<i>FhgSAD-2</i>		1885
<i>FhgSAD-1</i>	GAGGATGGATTTGAGGAGCAAGTGAGGGAAGTGTAGAGCAAGGGCAAAAGAGCTTCTGATGATTACTTTG	1949
<i>FhgSAD-2</i>		1955
<i>FhgSAD-1</i>	TGTCTGGTTCGAGACATGATCACTGAAGAAGCCCTTCTACTTACCAGACAATGCTTAATACTCTCGA	2019
<i>FhgSAD-2</i>		2025
<i>FhgSAD-1</i>	CGGGGTTTCGAGATGAAACAGGTGCCAGCCTTACTTCTGGGCAGTTTGACAAGGGCATGGACTGCGGAG	2089
<i>FhgSAD-2</i>		2095
<i>FhgSAD-1</i>	GAAAAATAGACATGGTGATCTTCTTAACAAGTATCTTTACTTGTCTGGCCGCGTTGACTTGAGGCAAAATG	2159
<i>FhgSAD-2</i>		2165
<i>FhgSAD-1</i>	AGAAGACAATTGAGTACTTGATTTGGCTCTGGAATGGTAAGATCTTATTGAATCTAGTAGTATGGTTATCT	2229
<i>FhgSAD-2</i>		2235
<i>FhgSAD-1</i>	TAAGTAGTATAGTAGATTTCTTTATGAATTTGCATAATCTTGACCTGCTGAAAAGCCATTGAGACACT	2299
<i>FhgSAD-2</i>		2305
<i>FhgSAD-1</i>	AATATATGTCACATTCTGGGTTCTTCAAATACACATATACATAGGCATCTCTAACTATTGAAGGCACAC	2369

图 1 丰花 2 号 2 条 SAD 核苷酸序列比对分析

Fig. 1 Alignment of two genomic nucleotide sequences of SAD from Fenghua 2

下画线标注外显子部分; “-”表示核苷酸缺失; 黑色阴影标注起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA; 灰色阴影标注 SNP 位点。Exon is underlined; “-” indicates nucleotide deletion; initiator codon ATG and the stop codon TAA are shaded by dark blocks, the sites of SNP are shaded by gray.

基 ACP 脱氢酶家族和属于类铁蛋白家族的保守结构域。位于 SAD 保守区的 4 个螺旋结构中埋藏着一个由 2 个铁原子组成的二铁中心, Fe 原子的 6 个配基即是四螺旋束的 6 个氨基酸的侧链或其基团: 其中一个铁原子的配基是 E239、H285, 另一个铁的配基是 E148、H189, 而 E186、E282 是 2 个铁原子的桥连配基。两铁原子之间通过一个氧原子相联, 形成非常对称的 Fe-O-Fe 二铁氧簇结构。SAD 每个亚基表面有 33 个多肽连接位点。推断的底物结合位点包括 14 个氨基酸的侧链或其基团(图 3 和图 5)。此二铁中心及四螺旋束的氨基酸侧链形成 SAD 活性中心。

2.4 3 个栽培品种和 2 个野生种间 SAD 核苷酸序列分析

以来自 3 个栽培品种的 *FhgSAD-1*、*FhgSAD-2*、*ShgSAD-1*、*ShgSAD-2*、*PygSAD-1*、*PygSAD-2* 以及

来自野生种的 *gSAD-A* 和 *gSAD-B* 构建的进化树表明, *FhgSAD-1*、*ShgSAD-1*、*PygSAD-1* 和 *gSAD-A* 聚为一组, *FhgSAD-2*、*ShgSAD-2*、*PygSAD-2* 和 *gSAD-B* 聚为一组(图 4)。序列比对分析显示, *FhgSAD-1* 和 *ShgSAD-1* 序列完全相同, *FhgSAD-2*、*ShgSAD-2*、*PygSAD-2* 和 *gSAD-B* 完全相同。而 *FhgSAD-1*、*PygSAD-1* 和 *gSAD-A* 共存在 4 个碱基差异, 均在内含子部分, 其中在第 2 319、第 2 622 个碱基处属于转换, 第 310 个碱基处属于颠换, 第 3 377 个碱基处属于缺失(表 2)。

2.5 花生与其他油料作物 SAD 编码的氨基酸序列分析

将 Ah-SAD1、Ah-SAD2、Ah-SAD3 与 NCBI 蛋白数据库中注册的其他油料作物 SAD 编码的氨基酸序列比对, 结果显示花生 Ah-SAD1 与大豆、麻风树、芝麻、油茶、向日葵、甘蓝型油菜、拟南芥、

(a)	<i>FhgSAD-1</i>	CGGTGCTGTTTGGTTACGGGATTGGGATTGGGAGTGGTTCGATCGCATTCTTGATTCC	490
	<i>FhgSAD-2</i>	CGGTGCTGTTTGGTTAGGGGATTGGGATTGGGAGAGGTTTCGATCGCGTTCTTGATTCC	487
(b)	<i>FhgSAD-1</i>	CTACTTGTGATGTCATTAAGGGCATTGTTAGGCTTCTCAGTCATGCATATGAACCTTA	1190
	<i>FhgSAD-2</i>	CTACTTGTGATGTCATTAAGGGCATTGTTAGGCTTCTCAGTCATGCATAGGAACCTTA	1186
(c)	<i>FhgSAD-1</i>	ATATAGGGCCCTGGTACTAAGTTCATATATAAATCATCACAATTACAATGGACAAGTT	2639
	<i>FhgSAD-2</i>	ATATAGGACCCCTGGTACTAAGTTCATATATAAATCATGACAATTACAATGGACAAGTT	2643
(d)	<i>FhgSAD-1</i>	CATTATGCATCATTATGCAATATCCTATTCTGAGAAAGTGTGAATAGTGAAGAAGCTT	3349
	<i>FhgSAD-2</i>	CATTATGCATCATTATGCAATATCCTATTCTGAGAAAGTGTGAATAGTGAAGAAGTTT	3353
(e)	<i>FhgSAD-1</i>	CTTGTTTTTCCACCACCGTTTCAATATTCTGAACAAGTTTGGTTTTGTTAGCC	900
	<i>FhgSAD-2</i>	CTTGTTTTTCCACCACCGTTTCAATATTCTGAACAAGTTTGGTTTTGTTAGCC	896
(f)	<i>FhgSAD-1</i>	GAAAATAGACATGGTGATCTTCTTAACAAGTATCTTTACTTGTCTGGCCGCTTGACTTG	2149
	<i>FhgSAD-2</i>	GAAAATAGACACGGTGACCTTCTTAACAAGTATCTTTACTTGTCTGGCCGCTTGACTTG	2155

图 2 *FhgSAD-1* 和 *FhgSAD-2* 部分核苷酸序列比对分析Fig. 2 Alignment of partial genomic nucleotide sequences of *FhgSAD-1* and *FhgSAD-2*

a: 黑色阴影所示序列是 *Bsm* I 可识别的核苷酸序列; 灰色阴影所示序列是 *Bsm* I 不能识别的核苷酸序列; b: 黑色阴影所示序列是 *Nde* I 可识别的核苷酸序列; 灰色阴影所示序列是 *Nde* I 不能识别的核苷酸序列; c: 黑色阴影所示序列是 *Apa* I 可识别的核苷酸序列; 灰色阴影所示序列是 *Apa* I 不能识别的核苷酸序列; d: 黑色阴影所示序列是 *Hind* III 可识别的核苷酸序列; 灰色阴影所示序列是 *Hind* III 不能识别的核苷酸序列; e: 黑色阴影所示序列是 *Age* I 可识别的核苷酸序列; 灰色阴影所示序列是 *Age* I 不能识别的核苷酸序列; f: 黑色阴影所示序列是 *Bst*E II 可识别的核苷酸序列; 灰色阴影所示序列是 *Bst*E II 不能识别的核苷酸序列。

a: endonuclease recognition site of *Bsm* I is shaded by dark blocks, the unrecognitive nucleotides by gray; b: endonuclease recognition site of *Nde* I is shaded by dark blocks, the unrecognitive nucleotides by gray; c: endonuclease recognition site of *Apa* I is shaded by dark blocks, the unrecognitive nucleotides by gray; d: endonuclease recognition site of *Hind* III is shaded by dark blocks, the unrecognitive nucleotides by gray; e: endonuclease recognition site of *Age* I is shaded by dark blocks, the unrecognitive nucleotides by gray; f: endonuclease recognition site of *Bst*E II is shaded by dark blocks, the unrecognitive nucleotides by gray.

图 3 花生 Ah-SAD 理论三维结构

Fig. 3 Theoretical three-dimensional structure of Ah-SAD

a: SAD 保守区的二铁中心; b: Fe 原子的 6 个配基; c: 亚基表面的多肽连接位点; d: 推断的底物结合位点。

a: diiron center on conserved domain of SAD; b: six bidentate ligand of Fe; c: polypeptide binding site; d: putative substrate binding pocket.

油橄榄和蓖麻间 SAD 氨基酸序列同源性依次为 88.0%、85.2%、83.0%、82.8%、80.7%、80.2%、77.0%、

图 4 花生栽培品种和野生种 SAD 分子进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of SAD genes from the cultivated peanut and wild diploid

75.8%和 63.6%。SAD 在不同物种间的同源性很高, 所有 SAD 的核心区段几乎完全相同, 仅在起始密码子和终止密码子附近有较大的差异(图 5)。聚类分析表明, 花生 SAD 与大豆的亲缘关系最近, 并与麻风树、油茶和芝麻聚为一类, 又与向日葵聚为一大类; 油菜、拟南芥聚为一类, 油橄榄和蓖麻聚为一类。这与各物种在经典分类学上的地位相一致(图 6)。

表 2 不同花生品种中 SAD 多态性位点
Table 2 Polymorphism sites of SAD in different peanut cultivars

碱基位置 Nucleotide site	<i>FhgSAD-1</i>	<i>ShgSAD-1</i>	<i>PygSAD-1</i>	<i>gSAD-A</i>
310	A	A	T	T
2319	G	G	A	A
2622	G	G	G	A
3377	T	T	—	—

3 讨论

SAD 是高等植物中脂肪酸合成代谢的关键酶，目前已从多种植物中分离获得 SAD 的 cDNA。其中油菜、芝麻、油茶、麻风树等大多数油料作物 SAD 基因的 ORF 长 1 173~1 197 bp，编码 390~398 个氨基酸^[10,18-19]。本研究获得的 2 个花生 SAD 基因全长分别为 3 503 bp、3 510 bp，均包括 3 个外显子和 2

Ah-SAD1	MALRLNPNSQKLFSPSSSSSSSSSSFLPQMASLRSPRFRMAST---LRTGSKEVEN 56
Ah-SAD3	MALRLNPNSQKLFSPSSSSSSSSSSFLPQMASLRSPRFRMAST---LRTGSKEVEN 56
Ah-SAD2	MALRLNPNSQKLFSPSSSSSSSSSSFLPQMASLRSPRFRMAST---LRTGSKEVEN 55
Gm	-----TFSLPQMASLRSPRFRMAST---LRSGSKEVEN 41
Si	MALKLNAINFQ-----SPKCPFALPPVASVRSPKFFMAST---LRSGSKEVET 46
Co	MAMKLNPTFQ-----YQKYPFALPPMASLRSPKFFMAST---LRSGSKEVEN 46
Jc	MALKLNPFISQ-----FHKLPTFALPPMANLRSPKFFMAST---LKSQSKEVEN 46
Ha	MAIRINTATFQ-----SDLYRSFAFPQPKPLRSPKFAMAST---IGSATTKVES 46
At	MALKFNPLVAS-----QPYKFPSTRPPTSSFRSPKFLCLASSPALSSSGPKEVES 51
Bn	MALKLNPLAS-----QPYNFPSSARPPISTFRSPKFLCLASSPALSS---KEVES 48
Oe	MALKLCFPPHK-----MPSFPDARIRSHRVFMAST---IHSPSMEVGK 40
Rc	MQASHCLSLSL-----SSHNFNTWTQHHLQPPQLRRLKP-----LAA 39
	* . : . : . :
Ah-SAD1	LKKPFTPPREVHVQVTHSMPPQKIEIFKSLEGWAEENILTLKPVEKWCWQPQDYLPEPSE 116
Ah-SAD3	LKKPFTPPREVHVQVTHSMPPQKIEIFKSLEGWAEENILTLKPVEKWCWQPQDYLPEPSE 116
Ah-SAD2	LKKPFTPPREVHVQVTHSMPPQKIEIFKSLEGWAEENILTLKPVEKWCWQPQDYLPEPSE 115
Gm	LKKPFTPPREVHVQVTHSMPPQKIEIFQSLDEWAEENILHLKPVEKWCWQPQDFLPDPSS 101
Si	VKRPFPNPREVHVQVTHSMPPQKIEIFKALEDWADNNILVHLKPVEKWCWQPQDFLPDPSS 106
Co	LRKPFSPPREVHVQVTHSMPPQKIEIFKNLEDWADQNILVHLRVEKWCWQPQDFLPDPAS 106
Jc	LKKPFMPPREVHVQVTHSMPPQKIEIFKSLDEWAEENILVHLKPVEKWCWQPQDFLPDPSS 106
Ha	TKKPFPPREVHVQVTHSMPPQKIEIFKSMEGWAEENILVHLKPVEKWCWQPQDFLPDPAS 106
At	LKKPFTPPREVHVQVTHSMPPQKIEIFKSMENWAEENLLIHLKDVESWQVQDFLPDPAS 111
Bn	LKKPFTPPKEVHVQVTHSMPPQKIEIFKSMEDWAEENLLQLKDVESWQVQDFLPDPAS 108
Oe	VKKPFTPPREVHVQVTHSLAPEKREIFNSLNNWAEENILVLLKDVDCWQPSDFLPDSAS 100
Rc	VAAPAPLK---HQTKTHSMPPQKIEIFKSLENWATQEVLPKLPVDCWQVQDFLPDPAL 97
	* * * * * : * * * : : * : : * * * * * : * * * * * : * * * * * :
Ah-SAD1	---DGFEQVRELRAKELPDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETASLTS 174
Ah-SAD3	---DGFEQVRELRAKELPDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETASLTS 174
Ah-SAD2	---DGFEQVRELRAKELPDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETASLTS 173
Gm	---DGFEQVKELRERAKELPDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETASLTS 159
Si	---EGFDDQVKELRERAKEIPDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETASPTS 164
Co	---EGFDEQVRELREAKEIPDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETASLTS 164
Jc	---DGFEQVRELREVRKEIPDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETASLTS 164
Ha	---DGFMEQVEELRAKELPDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETATLLL 164
At	---DGFEDQVRELREARDELDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETASPTS 169
Bn	---DGFEDQVRELREARELPDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETASPTS 166
Oe	---EGFDEQVRELKRCKEIPDDYFVVLVGDMIITEALPTYQTMNTLDGVRDETASLTP 158
Rc	PFDEFTDQVRALRDRTAELPDEYFVVLVGDMIITDALPTYQTMINTLDGVDKDETASNNP 157
	: * : * * * * : * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :
Ah-SAD1	WAVWTRAWTAENRHGDLLNKYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 234
Ah-SAD3	WAVWTRAWTAENRHGDLLNKYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 234
Ah-SAD2	WAVWTRAWTAENRHGDLLNKYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 233
Gm	WAIWTRAWTAENRHGDLLNKYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 219
Si	WAIWTRAWTAENRHGDLLNKYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 224
Co	WAVWTRAWTAENRHGDLLNKYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 224
Jc	WAIWTRAWTAENRHGDLLNKYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 224
Ha	GLVWTRAWTAENRHGDLLHQYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 224
At	WAIWTRAWTAENRHGDLLNKYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 229
Bn	WAIWTRAWTAENRHGDLLNKYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 226
Oe	WAIWTRAWTAENRHGDLLNKYLILSGRVDLRQIEKTIQYLIGSGMDPRTENSPYLGFIY 218
Rc	WALWTRSWTAENRHGDLLRSFLYLSGRVDLRQIEKTIQYLIGAGMDPRTENSPYLGFIY 217
	: * * : * * * * * : * * * * * : * * : * * * * * : * * : * * * * * :

Ah-SAD1	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGMKLAQICGMIASDEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	294
Ah-SAD3	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGMKLAQICGMIASDEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	294
Ah-SAD2	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGMKLAQICGMIASDEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	293
Gm	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGDIKLAQICGMIASDEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	279
Si	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGDIKLAQICGTIAADEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	284
Co	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGDIKLAQICGTIAADEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	284
Jc	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGDIKLAQICGTIAADEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	284
Ha	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGDVLAQMCGLIAADEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	284
At	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGDIKLAQICGTIAADEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	289
Bn	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGDIKLAQICGTIAADEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	286
Oe	TSFQERATFISHGNTARLAKEHGDIKLAQICGTIAADEKRHETAYTKIVEKLFEIDPDGT	278
Rc	TSFQERATFVSHGNTARLAKEGGDILARICGTIAADEKRHENAYARIVEKLLEVDPTGA	277
*****:***** *: ** *:*** **:*:*****,*:*****:*** ** :		
Ah-SAD1	VMAFADMMRKKIAMPAHLMYDGRDDNLFENYSAVAQRIGVYAKDYADILEFLVGRWKVA	354
Ah-SAD3	VMAFADMMRKKIAMPAHLMYDGRDDNLFENYSAVAQRIGVYAKDYADILEFLVARWKVA	354
Ah-SAD2	VMAFADMMRKKIAMPAHLMYDGRDDNLFENYSAVAQRIGVYAKDYADILEFLVGRWKVA	353
Gm	VMAFADMMRKKIAMPAHLMYDGRDDNLFENYSAVAQRIGVYAKDYADILEFLVGRWKVE	339
Si	VLAFADMMRKKISMPAHLMYDGRDDNLFDFHSSVAQRLGVYAKDYADILEHLVARWKVA	344
Co	VLALADMMRKKISMPAHLMYDGRDDNLFDFHSSVAQRLGVYAKDYADILEFLVGRWKVE	344
Jc	VLAFADMMRKKISMPAHLMYDGRDDNLFDFHSSVAQRLGVYAKDYADILEFLVGRWKVD	344
Ha	VLAFADMMRKKISMPAHLMYDGRDDNLFENYSAVAQRLGVYAKDYADILEFLVGRWKVA	344
At	VMAFADMMRKKISMPAHLMYDGRDDNLFDFHSSVAQRLGVYAKDYADILEFLVGRWKIQ	349
Bn	VMAFADMMRKKISMPAHLMYDGRDDNLFDFHSSVAQRLGVYAKDYADILEFLVGRWKIE	346
Oe	VLALADMMRKKVSMPAHLMYDGRDDNLFENYSAVAQRLGVYAKDYADILEFLVGRWDIE	338
Rc	MVAIADMMHKKITMPAHLMYDGRDDNLFDFHSSVAQRLGVYAKDYADILEFLVGRWRL	337
:;*:*****:***:*****:***:***:***:*****,*****:***:***:		
Ah-SAD1	DLTGLSGEGRAQDYVCGLPPIRIRLEERAQGRAKESPRLKFSWIYDREVQL	406
Ah-SAD3	DLTGLSGEGRAQDYVCGRCRPIRIRIRLEERAQGRAKESPRLKFSWIYDREVQL	409
Ah-SAD2	DLTGLSGEGRAQDYVCGLPPIRIRLEERAQGRAKESPRLKFSWIYDREVQL	405
Gm	QLTGLSGEGRAQDYVCGLPPIRIRLEERAQGRAKESSTLKFSWIHDRETT	391
Si	NLTGLSADGRKAQDYVCGLPPIRIRLEERAQGRAKQAPKIPFSWIHDREVQL	396
Co	ELTGLSAEGRAQDYVCGLPPIRIRLEERAQGRAKQVRPVPFSWIFDRELKI	396
Jc	KLTGLSAEGRAQDYVCGLPPIRIRLEERAQGRAKEGPTIPFSWIFDREVQL	396
Ha	DLTGLSGEGRAQDYVCGLPPIRIRLEERNSARAKESVNVFWSWIFDREVQL	396
At	DLTGLSGEGRAQDYVCGLPPIRIRLDERAQARAKLGQRQKPLPVPHFICLLKL	406
Bn	SLTGLSGEGRAQDYVCGLPPIRIRLDERAQARAKKGPKVPFWSWIFDREVQL	398
Oe	KLTGLSGEGRAQDYVCGLPPIRIRLEERAQGRAKESATPFWSWIFGREINL	390
Rc	KLEGMTGEGRAQDYVCGLPPIRIRKQERADERAKKMKPQSAKFSWIFNREVPL	391
. * * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
Ah-SAD1	-----	
Ah-SAD3	-----	
Ah-SAD2	-----	
Gm	LNAPREEHGEIFRQYRSEKC	411
Si	-----	
Co	-----	
Jc	-----	
Ha	-----	
At	V-----	407
Bn	-----	
Oe	-----	
Rc	-----	

图5 花生与主要油料作物 SAD 编码的氨基酸序列比较

Fig. 5 Alignment of SAD amino acid sequences of peanut and other major oil plants

Ah: 花生; Gm: 大豆; Si: 芝麻; Co: 油茶; Jc: 麻风树; Ha: 向日葵; At: 拟南芥; Bn: 甘蓝型油菜; Oe: 油橄榄; Rc: 蓖麻。 “—” 表示该处氨基酸残基缺失; 灰色阴影标注 Ah-SAD1 和 Ah-SAD3 的氨基酸差异; 黑色阴影标注 14 个底物结合位点; “*” 表示该处氨基酸完全相同。

Ah: *Arachis hypogae*; Gm: *Glycine max*; Si: *Sesamum indicum*; Co: *Camellia oleifera*; Jc: *Jatropha curcas*; At: *Arabidopsis thaliana*; Bn: *Brassica napus*; Ha: *Helianthus annuus*; Oe: *Olea europae*; Rc: *Ricinus communis*. “—” represents absences of amino acids residual, the difference amino acids between Ah-SAD1 and Ah-SAD3 are shaded by gray blocks; the sites of substrate binding pocket variations by dark. “*” indicates that the amino acids are identical.

图 6 花生与 9 种主要油料作物 SAD 氨基酸序列的聚类分析

Fig. 6 Clustering of Ah-SAD and other SAD of nine oil plants based on amino acid sequence

Ah: 花生; Gm: 大豆; Si: 芝麻; Co: 油茶; Jc: 麻风树; Ha: 向日葵; At: 拟南芥; Bn: 甘蓝型油菜; Oe: 油橄榄; Rc: 蓖麻。

Ah: *Arachis hypogaea*; Gm: *Glycine max*; Si: *Sesamum indicum*; Co: *Camellia oleifera*; Jc: *Jatropha curcas*; At: *Arabidopsis thaliana*;

Bn: *Brassica napus*; Ha: *Helianthus annuus*; Oe: *Olea europae*; Rc: *Ricinus communis*.

个内含子, 其编码区长 1 221 bp、1 218 bp, 分别编码 406 个、405 个氨基酸。通过与其他植物 SAD 氨基酸序列比对可以发现, 花生 SAD 氨基酸序列 N 端存在一段特有的 17 PSSSSSSSSSFSL 30 丝氨酸聚集区, 并且 Ah-SAD2 比 Ah-SAD1 少一个丝氨酸。董胜张等^[20]和 Sappington 等^[21]研究发现大多数昆虫的卵黄原蛋白(Vg)氨基酸序列中存在一段丝氨酸聚集域, 通常位于进化速率较高的区域, 可能是某些激酶(如磷酸化激酶)的底物。对于花生 SAD 非保守的丝氨酸聚集区的作用有待进一步研究。

Lindqvist 等^[22]用 X-射线晶体衍射分析描述了蓖麻 SAD 的晶体结构, 张党权等^[19]通过同源建模法获得油茶 SAD 的理论三维结构, 均为同型二聚体, 亚基含有 11 个 α -螺旋, 其中 9 个 α -螺旋形成一个反平行螺旋束, 该螺旋束上的 4 个 α -螺旋与 Fe^{2+} 共同形成 SAD 的活性中心。本研究获得的花生 SAD 存在同型二聚体亚基结合位点和底物作用位点, 具有植物 SAD 的空间结构特征。这为进一步从蛋白水平研究花生 SAD 的功能奠定了基础。

花生栽培种(*Arachis hypogaea* L.)是异源四倍体(AABB)。花生区组除了栽培种和 *A. monticola* 是四倍体外, 其他都是二倍体野生种^[23-24]。一般认为花生栽培种是由 2 个具有不同染色体组的二倍体野生种通过自然杂交形成的杂种再经一次性加倍事件进化形成^[25]。探寻花生栽培种的二倍体野生种亲本一直是有关学者的研究热点, Moretzsohn 等^[26]通过微卫星分析, Seijo 等^[27]利用 GISH 技术, Milla 等^[28]采用 AFLP 方法均推断, A 组野生种 *A. duranensis* 和 B 组野生种 *A. ipaensis* 为栽培种 A、B 2 个染色体组的供体。Fávero 等^[29]成功构建了由二倍体种 *A. duranensis* 和 *A. ipaensis* 组成的双二倍体, 并利用所获得

的双二倍体分别与栽培种几大植物学类型种质杂交, 得到了杂种后代植株, 进一步证明 *A. duranensis* 和 *A. ipaensis* 可能是栽培种的祖先。Jung 等^[30]通过对栽培种和野生种 Δ^{12} -脂肪酸脱氢酶基因序列的研究, 发现 *A. duranensis* 和 *A. ipaensis* 与栽培种的 2 个非等位基因 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 分别有相同的基因序列, 从而推断这 2 个野生种最有可能是花生栽培种的二倍体祖先种。本研究获得的 *gSAD-1* 和 *gSAD-2* 同源性 97.5%。利用栽培品种和野生种 SAD 的核酸序列构建的系统进化树表明, 来自 3 个栽培品种 *gSAD-1* 序列与野生种 *A. duranensis* (AA)的 *gSAD-A* 聚在一组, *gSAD-2* 序列与 *A. ipaensis* (BB)的 *SAD-B* 序列聚在一组。来源于 A 染色体组的 4 条 DNA 序列(*FhgSAD-1*、*ShgSAD-1*、*PygSAD-1* 和 *gSAD-A*)存在等位变异, 但碱基差异位点均出现在内含子区域, 并未导致编码氨基酸序列的改变。来自 B 染色体组的 SAD 非常保守, 3 个栽培品种 *gSAD-2* 序列与野生种 *A. ipaensis* (BB)的 *gSAD-B* 序列完全相同。推断栽培品种 *gSAD-1* 和 *gSAD-2* 分别来自花生 A、B 染色体组。

4 结论

利用同源克隆技术获得了花生区组 2 个二倍体野生种和 3 个栽培品种的 SAD, 每个栽培品种有 2 个 SAD。同时获得丰花 2 号 SAD 的 2 条全长 cDNA。丰花 2 号的 *FhgSAD-1* 和 *FhgSAD-2* 均含有 2 个内含子, 二者变异位点丰富。*FhrSAD-1* 和 *FhrSAD-2* 间核苷酸序列共有 12 个变异位点, 编码的 Ah-SAD2 氨基酸序列与 Ah-SAD1 相比在 N 端的 17 PSSSSSSSSSFSL 30 丝氨酸聚集区少一个丝氨酸。*gSAD-1* 和 *gSAD-A* 同源性为 99.9%, *gSAD-2* 和 *gSAD-B* 同源

性为100%。推测 *gSAD-1* 和 *gSAD-2* 分别来自花生栽培品种的 A、B 2 个染色体组。

References

- [1] Wan S-B(万书波). Peanut Quality (花生品质学). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2005. pp 2–10 (in Chinese)
- [2] Chu Y, Holbrook C C, Ozias-Akins P. Two alleles of *ahFAD2B* control the high oleic acid trait in cultivated peanut. *Crop Sci*, 2009, 49: 2029–2036
- [3] Yukawa Y, Takaiwa F, Shojik K, Masuda K, Yamada K. Structure and expression of two seed-specific cDNA encoding stearoyl-acyl carrier protein desaturase from sesame, *Sesamum indicum*. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37: 201–205
- [4] Li X-D(李晓丹), Cao Y-L(曹应龙), Hu Y(胡亚), Xiao L(肖玲), Wu Y-H(武玉花), Wu G(吴刚), Lu C-M(卢长明). Fatty acid accumulation pattern in developing seeds of peanut. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2009, 31(2): 157–162 (in Chinese with English abstract)
- [5] Wendy C, Paolo L, Nunzia S, Monica D P, Paola S, Virginia C, Noreen M C, Alan M M, Peter M, Tony A K, Philip J D, Stefania G, Teodoro C. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. *Transgenic Res*, 2008, 17: 769–782
- [6] Kachroo A, Shanklin J, Whittle E, Lapchik L, Hildebrand D, Kachroo P. The *Arabidopsis* stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. *Plant Mol Biol*, 2007, 63: 257–271
- [7] Byfield G E, Xue H, Upchurch R G. Two genes from soybean encoding soluble Δ^9 -stearoyl-ACP desaturase. *Crop Sci*, 2006, 46: 840–846
- [8] Ping Z, Joseph W B, Robert G U, Edward W, John S, Ralph E D. Mutations in a Δ^9 -stearoyl-ACP-desaturase gene are associated with enhanced stearic acid levels in soybean seeds. *Crop Sci*, 2008, 48: 2305–2313
- [9] Aardra K, John S, Edward W, Ludmila L, David H, Pradeep K. The *Arabidopsis* stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis. *Plant Mol Biol*, 2007, 63: 257–271
- [10] Luo T, Deng W Y, Zeng J, Zhang F I. Cloning and characterization of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene from *Cinnamomum longepaniculatum*. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, 27: 13–19
- [11] Florin S, Yael B, Arnon B, Ilan H, Ran H. Identification and molecular characterization of homeologous Δ^9 -stearoyl-acyl carrier protein desaturase3 genes from the allotetraploid peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Mol Biol Rep*, 2010, 29: 232–241
- [12] Whittle E, Cahoon E B, Subrahmanyam S, Shanklin J. A multi-functional acyl-acyl carrier protein desaturase from *Hedera helix* L. (English ivy) can synthesize 16- and 18-carbon monoene and diene products. *J Biol Chem*, 2005, 280: 28169–28176
- [13] Zaborowska Z, Starzycki M, Femiak I, Swiderski M, Legocki A B. Yellow lupine gene encoding stearoyl-ACP desaturase-organization, expression and potential application. *Acta Biochim Polonica*, 2002, 49: 29–42
- [14] Chen M N, Ren Z K, Chi X Y, Pan L J, Yu S L, Yang Q L. Isolation, characterization and expression analysis of stearoyl-ACP desaturase gene from *Kosteletzkya virginica*. *Bioinform Biomed Engin* (iCBBE), 2010, 4: 1–5
- [15] Shah F H, Rashid O, San C T. Temporal regulation of two isoforms of cDNA clones encoding delta 9-stearoyl-ACP desaturase from oil palm (*Elaeis guineensis*). *Plant Sci*, 2000, 152: 27–33
- [16] Liu Q, Singh S P, Green A G. High-steric and oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1–12
- [17] Wendy C, Paolo L, Nunzia S, Monica D P, Paola S, Virginia C, Noreen M C, Alan M M, Peter M, Tony A K, Philip J D, Stefania G, Teodoro C. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. *Transgenic Res*, 2008, 17: 769–782
- [18] Thompson G A, Scherer D E, Aken S F, Kenny J W, Young H L, Shintani D K, Kridl J C, Knauf V C. Primary structures of the precursor and mature forms of stearoyl-acyl carrier protein desaturase from safflower embryos and requirement of ferredoxin for enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 2578–2582
- [19] Zhang D-Q(张党权), Tan X-F(谭晓凤), Chen H-P(陈鸿鹏), Zeng Y-L(曾艳玲), Jiang Y(蒋瑶), Li W(李魏), Hu F-M(胡芳名). Full-length cDNA cloning and bioinformatic analysis of *Camellia oleifera* SAD. *Sci Silv Sin* (林业科学), 2008, 44(2): 155–159 (in Chinese with English abstract)
- [20] Dong S-Z(董胜张), Ye G-Y(叶恭银), Liu C-L(刘朝良). Research progress in molecular evolution of yolk proteins in insects. *Acta Entomol Sin* (昆虫学报), 2008, 51(11): 1196–1209 (in Chinese with English abstract)
- [21] Sappington T W, Raikhel A S. Molecular characteristics of insect vitellogenin and vitellogenin receptors. *Insect Biochem Mol Biol*, 1998, 28: 277–300
- [22] Lindqvist Y, Huang W, Schneider G, Shanklin J. Crystal structure of delta9-stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor

- seed and its relationship to other diiron proteins. *EMBO J*, 1996, 15: 4081–4092
- [23] Krapovickas A, Gregory W C. Taxonomia del género *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 1994, 8: 1–186
- [24] Valls J F M, Simpson C E: New species of *Arachis* from Brazil, Paraguay, and Bolivia. *Bonplandia*, 2005, 14: 35–64
- [25] Smartt J, Gregory W C, Gregory M P. The genomes of *Arachis hypogaea* L. cytogenetic studies of putative genome donor. *Euphytica*, 1978, 27: 665–675
- [26] Moretzsohn M C, Hopkins M S, Mitchell S E, Kresovich S, Valls J F M, Ferreira M E. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biol*, 2004, 4: 11
- [27] Seijo G, Lavia G I, Fernández A, Krapovickas A, Ducasse D A, Bertioli D J, Moscone E A. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. *Am J Bot*, 2007, 94: 1963–1971
- [28] Milla S R, Isleib T G, Stalker H T. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. *Genome*, 2005, 48: 1–11
- [29] Fávero A P, Simpson C E, Valls J F M, Vello N A. Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaënsis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. *Crop Sci*, 2006, 46: 1546–1552
- [30] Jung S, Tate P L, Horn R, Kochert G, Moore K, Abbott A G. The phylogenetic relationship of possible progenitors of the cultivated peanut. *J Hered*, 2003, 94: 334–340