

樟树柠檬酸合酶基因在干旱胁迫下的表达

雷蕾^{1,2*} 曾一帆³ 王荣涛⁴ 罗雅之¹ 刘以然¹ 陈武耀¹

(1.南昌工程学院水土保持学院, 江西南昌, 330000; 2.江西省樟树繁育与开发利用工程研究中心, 江西南昌, 330000;

3.华南农业大学研究生院, 广东广州, 510000; 4.南昌工程学院研究生院, 江西南昌, 330000)

摘 要:樟树(*Camphora officinarum* Nees ex Wall.)是我国南方的珍贵乡土树种,耐涝不耐旱。在全球变暖、干旱日益严重的环境下,找到樟树的干旱相关基因,有助于抗旱樟树新品种的培育。柠檬酸是重要的渗透调节剂之一,也是三羧酸循环的关键中间产物。柠檬酸合酶基因(*Citrate synthase*, *CS*)是合成柠檬酸的关键酶基因,是细胞内多种代谢途径的关键限速酶,在干旱环境下表达量升高。【目的】研究樟树的柠檬酸合酶基因(*CoCS*)在干旱胁迫下的表达模式,为樟树的抗旱性遗传改良和种质创制提供理论依据。

【方法】以樟树叶片 RNA 为原材料,通过 PCR、转化克隆菌、测序等技术克隆 *CoCS* 基因,得到完整序列,通过生物信息学手段,预测其结构与功能。同时,对樟树无性系设计为期 44 天的干旱处理试验,利用荧光定量 PCR 技术,分析其表达模式。【结果】克隆出三个 *CoCS* 基因(*CoCS1*、*CoCS2*、*CoCS3*),全长分别为 1594 bp、1542 bp 和 1503 bp,分别编码 508、473 和 471 个氨基酸,分子式分别为 $C_{2506}H_{3960}N_{690}O_{725}S_{17}$ 、 $C_{2375}H_{3752}N_{634}O_{676}S_{18}$ 和 $C_{2370}H_{3744}N_{632}O_{679}S_{17}$,分子量分别为 55900.22、52580.84 和 52500.64,均为稳定的亲水性蛋白。*CoCS1* 基因与澳洲坚果(*Macadamia integrifolia*)、蒂罗花(*Telopea speciosissima*)等的同源性最高(80 % 以上);*CoCS2* 基因与油棕(*Elaeis guineensis*)、无油樟(*Amborella trichopoda*)等的同源性最高(80 % 以上);*CoCS3* 基因与莲(*Nelumbo nucifera*)、白栎(*Quercus lobata*)等的同源性最高(80 % 以上)。构建进化树,*CoCS1* 单独为一支;*CoCS2* 与沉水樟(*Cinnamomum micranthum* f. *kanehirae*)聚为一支;*CoCS3* 与华盖木(*Magnolia sinica*)聚为一支。三个 *CoCS* 的蛋白质二级结构均由 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规则卷曲四种结构构成,三级结构均为椭球型。*CoCS1* 定位在乙醛酸循环体中,具有拟南芥过氧化物酶体(*AthCS_per_like*)结构域。而 *CoCS2* 和 *CoCS3* 定位在线粒体基质中,具有柠檬酸合酶 C 末端结构域(*Citrate_synt*)。三个 *CoCS* 基因都在一定程度上受干旱胁迫诱导表达,但表达模式有所差异。在受干旱胁迫的一周以内,以诱导 *CoCS3* 基因表达为主,在受干旱胁迫两周左右,主要诱导 *CoCS1* 基因表达,在受干旱胁迫 3 周左右,主要诱导 *CoCS2* 基因表达。【结论】樟树依靠 *CoCS3* 基因增加有氧呼吸的强度来应对早期干旱胁迫,依靠 *CoCS1* 基因通过乙醛酸循环补充能量代谢来应对中期干旱胁迫,依靠 *CoCS2* 基因维持细胞内渗透压以应对晚期干旱胁迫。三个 *CoCS* 基因都是典型的 *CS* 家族成员,且均与樟树的抗旱机制有关,可作为抗旱樟树种质创制的候选基因。

关键词:樟树; 干旱; 柠檬酸合酶; 基因克隆; 基因表达