

水曲柳丙二烯氧化物合成酶基因*FmAOS*序列与表达模式分析

刘春浩¹, 梁楠松^{1,2}, 于磊^{1,2}, 赵兴堂^{1,2}, 曹羊^{1,2}, 詹亚光^{1,2,*}

¹东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

²林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨150040

摘要:茉莉酸(jasmonic acid, JA)作为一种重要的信号分子参与了植物的生长发育过程, JA生物合成途径中的关键酶为丙二烯氧化物合成酶(allene oxide synthase, AOS)。本研究克隆了水曲柳(*Fraxinus mandschurica*) AOS基因, 命名为*FmAOS*。生物信息学分析表明该基因全长1 605 bp, 具有完整的开放阅读框, 编码534个氨基酸。*FmAOS*为两性不稳定性蛋白, 不存在信号肽, 具有跨膜能力, 亚细胞定位预测其存在于叶绿体中。三维建模分析表明该蛋白属于混和型。*FmAOS*表达模式分析表明, 其响应了寒冷、NaCl、干旱等非生物胁迫及脱落酸(ABA)、赤霉素(GA₃)等植物激素信号, 但表达模式各不相同, 说明*FmAOS*参与了植物的生长发育和逆境胁迫的平衡。本文为*FmAOS*功能的深入研究提供参考。

关键词:水曲柳; AOS; 生物信息学分析

植物在自身生长发育及逆境胁迫响应中形成了复杂的信号通路(Mwenda等2015)。茉莉酸(jasmonic acid, JA)作为广泛分布在植物界的脂质衍生的信号传导化合物(von Malek等2002), 在植物的生长发育过程中发挥了重要的作用, 如调控了植物的果实成熟、卷须卷曲、根生长、花粉萌发、衰老、机械传导以及气孔关闭等(Bae等2010; Castro等1999)。此外, 近期研究表明JA也作为一种防卫信号分子参与了植物防御反应(Turner等2002; Weber 2002), 例如叶片伤口诱导的JA的形成、JA参与植物虫害以及微生物病原体抗性反应(Lulai等2011; Wu等2008)。

JA通常是由植物细胞膜脂在脂酶作用下释放的底物亚麻酸经脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)、丙二烯氧化物合成酶(allene oxide synthase, AOS)等一系列酶促反应生成的, 即类十八烷途径(von Malek等2002; Schaller 2001; Laudert和Weiler 1998)。其中, AOS是JA合成途径中的关键基因(Liu等2014), 并且AOS基因启动子可以被创伤、JA等信号激活(Lian等2011; Laudert和Weiler 1998; Sivasankar等2000)。马铃薯(*Solanum tuberosum*)块茎组织伤口诱导表达了AOS, 并且提高了JA的含量(Lulai等2011); 大豆(*Glycine max*) AOS基因过表达的转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)增强了对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)以及微生物病原体的耐受性(Wu等2008; De Vos等2006); 小麦(*Triticum aestivum*) *TaAOS*基因过表达的转基因烟草增强了对

ZnCl₂胁迫的耐受性(Liu等2014); AOS催化合成的JA对于花药的正常发育也十分重要, 水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AOS突变体由于花药和花粉发育的缺陷导致严重的雄性不育, 但可以通过施加外源JA使其可育, 此外拟南芥AOS突变体在机械损伤后JA水平不变而野生型增高了100倍, 并且与野生型相比受伤口诱导的拟南芥营养贮藏蛋白基因(*AtVSP2*)和脂氧合酶基因(*AtLOX2*)的表达受阻, 表明AOS基因突变阻断了JA的合成, 导致花药、花粉发育缺陷和伤口信号转导不良(von Malek等2002; Bae等2010; Park等2002); 过表达AOS基因的拟南芥其JA水平没有提高, 而受到创伤后诱导了JA的积累, 表明AOS的过表达可能是控制高等植物防御动力学的一种方式, 并且创伤诱导增加的JA主要受AOS底物即叶绿体脂质释放的亚麻酸供应的调控, 拟南芥JA合成中膜脂供应的亚麻酸与AOS基因的表达相比可能更重要(von Malek等2002; Han等2013; Laudert等2000)。可见, AOS基因不仅参与调控JA的合成, 也与植物防御反应密切相关, 但是对AOS基因的研究目前集中在水稻、拟南芥等模式植物, 木本中少见报道。

水曲柳(*Fraxinus mandschurica*)为木犀科(Oleaceae)白蜡树属落叶乔木, 系中国东北地区“三

收稿 2017-08-29 修定 2018-03-04

资助 国家重点研发计划课题(2017YF D0600605-01)和国家自然科学基金(31270697)。

* 通讯作者(yaguangzhan@126.com)。

大硬阔” [硬指木质, 阔即阔叶, 分别是水曲柳、黄檗(*Phellodendron amurense* Rupr)、胡桃楸(*Juglans mandshurica*)]之一, 常用于家具与建筑等。水曲柳具有耐近-40°C低温、一定的耐盐和抗病虫的特性, 基因资源丰富(Liu等2017)。

本研究获得了水曲柳AOS基因, 命名为*FmAOS*, 并对其进行了生物信息学分析; 通过与拟南芥等模式植物的同源性分析预测了*FmAOS*基因的功能; 同时进行了在寒冷等不同的非生物胁迫以及不同激素信号调控下的基因表达分析, 为进一步研究水曲柳*FmAOS*的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

实验材料为取自东北林业大学实验林场的水曲柳(*Fraxinus mandshurica* Rupr.)种子和叶片, 水曲柳幼苗的培养基质为 $V_{\text{营养土}}:V_{\text{蛭石}}=3:1$, 置于恒温培养箱中培养并处以60%~80%湿度、(23±2)°C温度、16 h·d⁻¹日照长度, 使植物正常生长。取生长了20 d并且长势均一的水曲柳幼苗植株采用基质浇灌的方法处以200 mmol·L⁻¹ NaCl、20% (m/V)聚乙二醇6000 (PEG6000)干旱、4°C低温的非生物胁迫处理以及100 μmol·L⁻¹ 赤霉素(gibberellin, GA₃)、100 μmol·L⁻¹ 脱落酸(abscisic acid, ABA)的激素信号处理(试剂购自Sigma公司), 对照组不做处理, 并于处理后0、6、12、24、48和72 h分别取幼苗冷冻于液氮中, 保存于-80°C冰箱。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆

采用溴化十六烷基三甲铵(cetrimonium bromide, CTAB)法提取水曲柳叶片总RNA并应用反转录试剂盒反转录为cDNA (Zeng等2007)。应用BioEdit软件中的Local blast功能分析作者研究团队测序获得的水曲柳转录组数据库, 获得了水曲柳AOS基因序列, 并通过Primer 5.0软件设计两条引物*FmAOS*-F (5'-AATACCTCACAAGGAACAA-CATCA-3')和*FmAOS*-R (5'-ACTATGTACAATAGACTAAATCTTCACCC-3')。以水曲柳叶片反转录的cDNA为模板, 于20 μL反应体系进行特异性扩增(94°C预变性5 min; 94°C变性30 s、53°C退火45 s、72°C延伸1 min, 35个循环; 72°C延伸10 min), 并利用凝胶回收试剂盒进行纯化回收, 将纯化产物

连接于pMD18-T载体, 转化入JM109感受态细胞, 送生物公司测序(Liu等2017)。基因克隆所需试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司, 引物合成与测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2.2 *FmAOS*基因编码区序列的生物信息学分析

对*FmAOS*核苷酸序列应用DNAMAN软件分析去掉载体部分, 并推测其氨基酸序列。应用ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>; Walker 2002)、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Petersen等2011)、TMPred (https://embnet.vitalit.ch/software/TMPRED_form.html; Hofmann 1993)、WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>; Horton等2007)、SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html; Sen等2005)、Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>)以及NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)数据库中的Conserved Domain Search Service在线软件分别预测分析*FmAOS*蛋白的理化性质、信号肽、跨膜结构、亚细胞定位、二级结构、三级结构、保守结构域。对*FmAOS*氨基酸序列应用NCBI数据库中的Blast功能进行同源性分析, 并利用ClustalX进行多序列比对, 再采用MEGA 5.0软件中的neighbor-joining算法(近邻结合法), 自检1 000次, 构建进化树(Tamura等2007)。

1.2.3 *FmAOS*基因在逆境胁迫和激素信号下的表达分析

内参基因为水曲柳微管蛋白基因*Tu*, 引物如表1。PCR反应体系为20 μL: 10 μL Master Mix, 各1 μL的正反向引物(10 μmol·L⁻¹), 2 μL模板cDNA, ddH₂O补至总体积20 μL。参照SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa)说明书进行反应程序, 每个样品重复3次。应用2^{-ΔΔC_t}法(Ren等2015)计算目的基因的相对表达量。

2 实验结果

2.1 *FmAOS*基因编码区全长的鉴定

以水曲柳叶片cDNA为模板, 采用反转录PCR法进行扩增, 经测序及blastn比对, 确定了水曲柳AOS基因序列, 并命名为*FmAOS*, 基因编码区全长为1 605 bp。对*FmAOS*编码区全长应用DNAMAN软件分析, 推测*FmAOS*编码534个氨基酸, 如图1所示。

表1 实时荧光定量PCR采用的引物

Table 1 Primers for quantitative real-time PCR

名称	序列(5'→3')	用途
qFmAOS-F	CTTCGCCACTTGCTTCAACTCCT	定量引物
qFmAOS-R	CGGATCTCTTGTGCCAACTCTGTATG	定量引物
Tu-F	AGGACGCTGCCAACTTT	内参引物
Tu-R	TTGAGGGGAAGGGTAAATAGTG	内参引物

名称	序列(5'→3')	用途	
1	ATGGCTCATCTCTTTAGCTTCTCGTCTCGCAATTACAATTTCTTTGCAGAGGTC	841	GATGGCGTTTTCTCACTCAATTTCTCTCCCGCGTCTTGATAAAGAAAGACTACAAAAGA
1	M A S S S L A F S S S Q L Q F S L Q R S	281	D G V F H S I S L P P F L I K K D Y K R
61	CAAAAGCTACCTGCTCAAAACAATAAAACAGCACCCCTTTCCGACCAATCACAGCC	901	TTGTATGATTTCTTTACAAGAATCACTCTGTCTTGATGGAGTGAAAAATGGT
21	Q K L P A S K Q L K P A P L F R P I T A	301	L Y D F F Y K N S T P V L D G A E K L G
121	TCTGTCCAAAAGCCATCTTTCTACGCCATCAGCTCTCTCGGCATCGACGGT	961	CTATCAGGAGAAGGAGCTTGCACAATCAATCTCGCCACTTCTTCACTCTTTGGG
41	S V S K K P S F S T P S A P H S A S T V	321	L S R E E A C H N L I F A T C F N S F G
181	GTGCCACAAAACCGAGCAAGCTTCGATCCGAAAAATTCGGAGGACTACGGGCTCC	1021	GGGATGAAAATTTCTTCCCAACATGCTTAAATGGTGTGTCGAGTGGGCAAGCTC
61	V P P K P S K L P I R K I P E D Y G L P	341	G M K I F F P N M L K W V G R A G A K L
241	TTGATCGACCATGGAAGACAGACAGGACTCTTTACAACCAAGGACGGGACAGTAT	1081	CATACAGAGTTGGACAAGAAATCCGGTCGGCCATCAATCAACGGTGGCAAGTCA
81	L I G P W K D R Q D Y F Y N Q G R D E Y	361	H T E L A Q E I R S A I Q S T G G K V T
301	TTCAAGTCCGAATCAAAAACACAGTCTACAGTCTTAAAGACCAATATGCCACCGGT	1141	ATGGCTGCCATGGAACGATGCCGTGATGAAGTCGATATACGAATCCCTGCGAAT
101	F K S R I Q K H Q S T V F K T N M P P G	381	M A A M E R M P L M K S V V Y E S L R I
361	CCTTAATCTCTCACTCGAAGTACAGTCTTTCGCTGACGGCAAGGATTTTCGGT	1201	GAGCCGCGGTGCTCCAGTTCGGAGGCAACCGGACTTGTGATTAATCCAC
121	P L I S F N S K V T V L L D G K S F P V	401	E P P V P L Q F A R A K R D F V I E S H
421	CTTTTTCAGACTGATAAGTCGAAAAGAAAGATGTTTTCACCGGTACATACATCCCTC	1261	GACGACGTTTTCAATTAAGGAGGAGAAATGCTCTTCGGCTTCCACCAATTCGAC
141	L F D T D K V E K K D V F T G T Y M P S	421	D A A F Q I K E G E M L F G F Q P P A T
481	ACTGAACCTCACTGGTGTATAGAATCTCTCTTTCGATCCATCGGAACCGAAGC	1321	AAGATCCTATGATTTTCGATCGGGCGAGGATTTGTCGGGAAAGGTTTCATCGCG
161	T E L T G G Y R I L S Y L D P S E P N H	441	K D P M I F D R A D E F V P E R F I G D
541	GCCAAGCTGAAGAATATCATGTTCTTCTACTGTCTCTCAGGCGGATCAGGTAATCCCG	1381	GAAGTGAACACGTTTGAACACGTTCTCTGCTTAAACCGGACCGAATCAGAGCT
181	A K L K N I M F F L L S L R R D Q V I P	461	E G E K L L K H V L W S N G P E T E S P
601	GAGTTTACAGCAGCTACACAGAGCTGTTGATGATTAGAAAAGAAATAGCCACTAA	1441	ACCGTTAACAACAGCAGTGTCCGGAAAAGATTTCGTTGATGATTTTCGAGGCTG
201	E F H S S Y T E L F D D L E K E I A T K	481	T V N N K Q C A G K D F V V L I S R L M
661	GGAAAGCAAGTTTGGGAGGCAATGATCAAGCCGATTTACATTTCTGGTCCGATCT	1501	CTGGTGGAGCTGTTCCCTCCGTTACGACTCCATTGATATTGAAGTCGGCGTCCGTTA
221	G K A S F G E A N D Q A A F T F L A R S	501	L V E L F L R Y D S I D I E V G A S P L
721	TTATACGGCTAACCCAGTTGACCAAGCTTGGTTCGACGGACCAAGATTGTTAGC	1561	GGACCAAGGTTACTGTACGTCGTTAAAGAAAGCCAGTTTCTAG
241	L Y G A N P V D T K L G S D G P K I V S	521	G A K V T V T S L K K A S F *
781	AAGTGGTGTCTTCACTGCATCCAATTTCAATTTCTGGTCTACCAAGACTTCTTGAA		
261	K W V L F Q L H P I L I L G L P R L L E		

图1 *FmAOS*基因编码区序列及推测的氨基酸序列Fig.1 Coding region sequence of *FmAOS* and putative amino acid sequence

2.2 FmAOS蛋白质一级结构分析

2.2.1 氨基酸序列理化性质分析

利用ProtParam在线工具预测分析FmAOS蛋白的理化性质。结果表明, FmAOS蛋白相对分子质量为59 911.25; 不稳定系数为46.03, 为不稳定类蛋白; 等电点(pI)为9.15; 总平均疏水性为-0.216, 说明该蛋白为两性蛋白。

2.2.2 信号肽、跨膜结构及亚细胞定位预测分析

信号肽是指一段通常位于新合成多肽链N端的用于指导蛋白质进行跨膜转移及蛋白定位的氨基酸序列, 一般由16~26个氨基酸残基组成。经SignalP在线工具预测分析, 结果表明FmAOS蛋白可能不存在信号肽。

蛋白质上一段由约20个疏水性氨基酸残基组成的用以与膜结合的氨基酸片段被称为跨膜结构,

往往易形成 α -螺旋。对FmAOS蛋白采用TMPred在线工具进行跨膜结构预测, 结果表明FmAOS蛋白可能最多存在六个跨膜特征。i→o (从内到外)的跨膜结构域有3个, o→i (从外到内)的跨膜结构域有3个, 且两者的跨膜结构域基本重合。因此, FmAOS可能存在从内到外和从外到内的双向跨膜能力。

蛋白质在细胞内的定位与其功能的发挥密切相关。通过对蛋白质进行的信号肽和跨膜结构分析, 再结合采用WoLF PSORT在线工具对亚细胞定位的预测, 能够更高效地揭示蛋白功能(Song等2014)。亚细胞定位结果表明FmAOS蛋白在细胞核得分为1, 在叶绿体得分为12 (分值越高即预测准确性越高), 说明FmAOS可能主要存在于叶绿体中。

2.3 FmAOS蛋白质二三级结构预测

蛋白质二级结构是指多肽链主链借助氢键作用力形成的有规则重复的构象, 主要包括 α -螺旋(H结构)、 β -折叠(E结构)、 β -转角(T结构)、无规则卷曲(C结构)四种结构。根据H和E结构含量的不同, 将蛋白质分为了全 α 型(H>45%、E<5%)、全 β 型(H<5%、E>45%)、 α - β 型(H>30%、E>20%)以及混和型(其他情况) (Li等2016)。对FmAOS蛋白应用在线软件SOPMA分析其二级结构, 结果显示: H占29.59%, E占20.22%。综上可得, FmAOS蛋白属于混和型。

应用Swiss-Model在线工具处理FmAOS蛋白质氨基酸序列进行三维同源建模, 结果显示FmAOS蛋白三维结构由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规则卷曲四种典型结构组成, 属于混和型蛋白。

2.4 FmAOS同源进化分析及保守结构域预测

应用NCBI数据库中的Blast对FmAOS编码的氨基酸序列进行同源比对。比对结果表明水曲柳AOS蛋白与芝麻(*Sesamum indicum*)、马铃薯、美花烟草(*Nicotiana sylvestris*)等多种蛋白同源性较高, 一致性均在70%以上。

系统进化树描述了物种之间的进化关系, 构建系统进化树可以用来研究物种的进化史。采用MEGA 5.0软件中的neighbor-joining算法构建了同

源性较高的14个物种AOS蛋白系统进化树, 如图2所示。结果表明, 这些物种的同源蛋白大致可分为3类: 丹参(*Salvia miltiorrhiza*)、猴面花(*Erythranthe guttata*)、芝麻、水曲柳、旋蒴苣苔(*Dorcoeras hygrometricum*)、牵牛(*Ipomoea nil*)、美花烟草、马铃薯和辣椒(*Capsicum annuum*)聚为一类, 石榴(*Punica granatum*)、茶(*Camellia sinensis*)、川桑(*Morus notabilis*)和枣(*Ziziphus jujuba*)聚为一类, 拟南芥单独聚为一类。其中, 水曲柳与芝麻、丹参、猴面花的遗传距离较近, 说明在进化过程中的亲缘关系较近, 而与美花烟草、拟南芥等物种的亲缘关系较远。

保守结构域是一个蛋白质家族或进化过程中不变或相同的氨基酸序列所形成的特定三维结构, 常会形成功能元件, 与蛋白功能的发挥密切相关。应用NCBI数据库在线工具CD Search, 分析了FmAOS蛋白的底物、抑制剂、辅酶结合位点及催化残基, 结果表明FmAOS蛋白含有一个属于p450超家族的PLN02648保守结构域, 即allene oxide synthase保守结构域, 且覆盖了FmAOS蛋白89.70%的氨基酸, 是一种较大的保守结构域, 如图3所示。

2.5 FmAOS在非生物胁迫下的表达模式

水曲柳在寒冷(4°C)、NaCl、干旱(PEG6000)处理下, FmAOS表达量随着处理时间的延长发生了

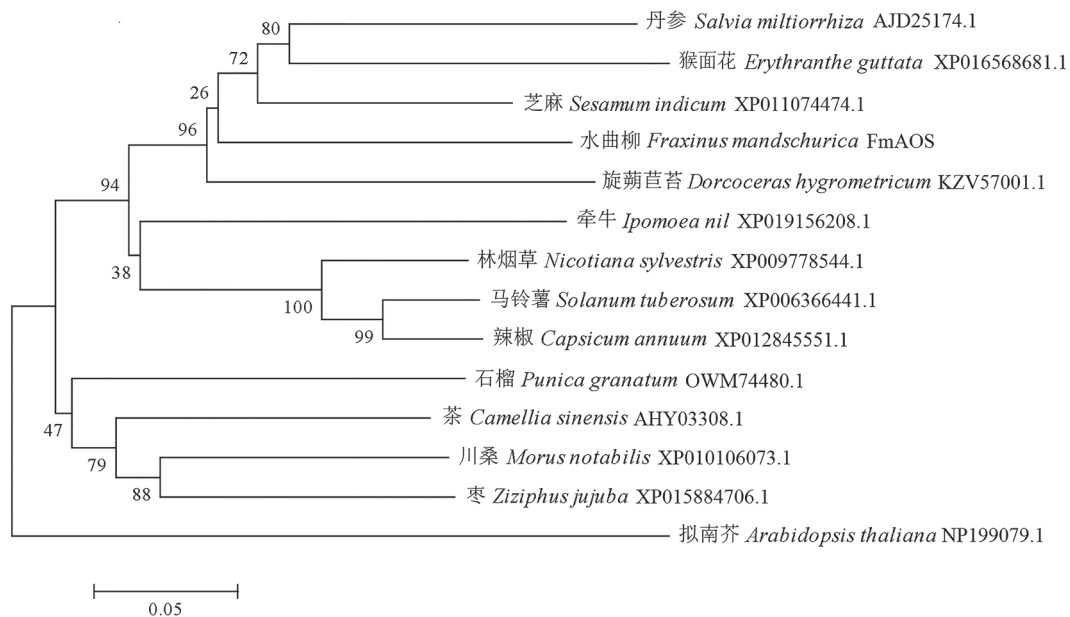
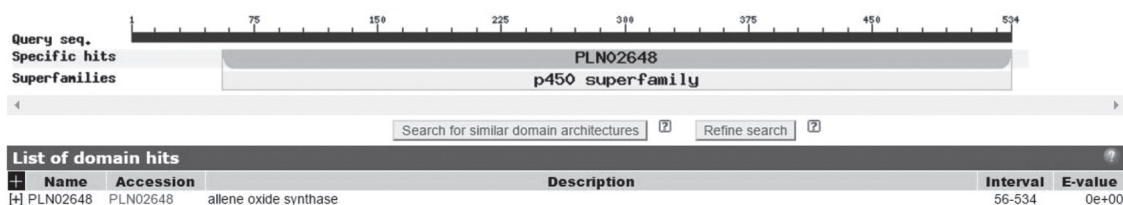
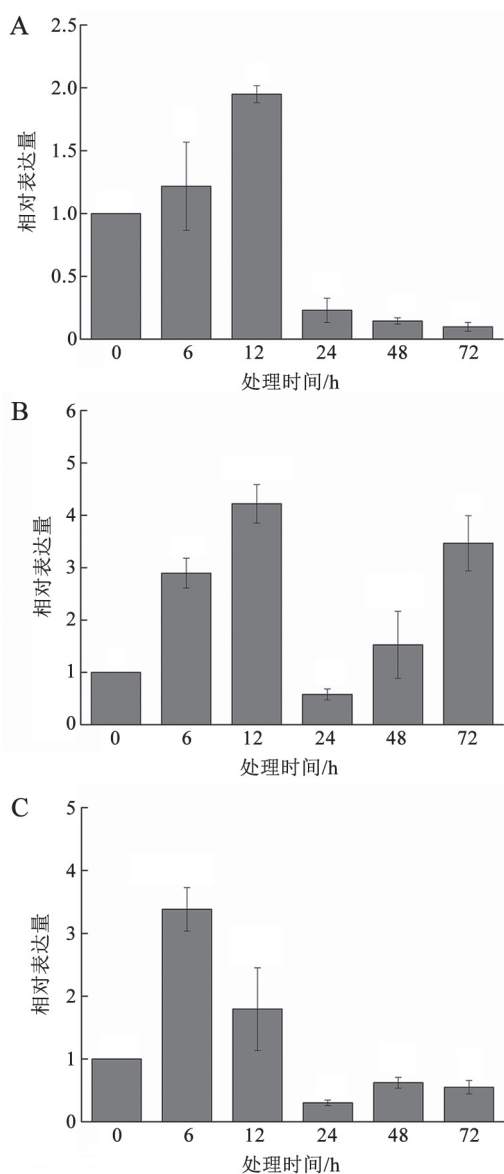


图2 根据AOS蛋白NCBI Blastp比对结果构建的系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of AOS proteins based on Blastp results from NCBI

图3 *FmAOS*蛋白结构域预测Fig.3 *FmAOS* protein domain prediction

Query seq.: 序列查询; Specific hits: 特异性匹配; Superfamilies: 超家族。

图4 *FmAOS*基因在非生物胁迫下的相对表达量Fig.4 Relative expression levels of *FmAOS* under abiotic stress treatmentsA、B、C分别为寒冷、NaCl、干旱处理下*FmAOS*基因相对表达量。

明显变化,如图4所示。在寒冷(4°C)处理后, *FmAOS* 基因表达呈现先上调后下调的趋势,其中,在12 h时上调表达达到峰值,表达量为对照的1.95倍,12 h后表达量急剧下降,并在72 h出现下调表达峰,为对照的0.10倍;在NaCl处理后, *FmAOS*基因呈现先上调后下调再上调的表达趋势,在12 h达到上调表达峰值,为对照的4.22倍;在干旱(PEG6000)处理后, *FmAOS*基因呈现先上调后下调的表达趋势,于6 h显著上调达到峰值,为对照的3.38倍,在24 h出现下调表达峰,为对照的0.30倍。结果表明, *FmAOS*明显响应了这三种非生物胁迫,并且其响应模式并不相同。

2.6 *FmAOS*在激素信号下的表达模式

水曲柳*FmAOS*在激素信号处理下,随处理时间的延长发生了明显的表达变化(图5)。其中,在ABA处理后, *FmAOS*的表达量先下降后上升再下降,并且处理组的*FmAOS*的表达量均低于对照组,在24 h显著下降达到峰值,为对照组的0.23倍;在GA₃处理后, *FmAOS*的表达呈现先上调后下调表达的趋势,其中,在12 h时显著上调达到峰值,为对照的4.02倍,而在12 h后,表达受到抑制,明显下调,并于48 h达到下调表达峰值,为对照的0.26倍。结果表明, *FmAOS*响应了ABA和GA₃的信号刺激。

3 讨论

AOS是JA合成途径中的限速酶, AOS基因的表达情况影响着植物体内受JA信号调控的一系列生物性状的表达(Cao等2014; Song等1993),如病虫害防御(Bruinsma等2009)、机械损伤后的信号转导(Glauser等2009)、植物生长发育(Reinbothe等2009)。本研究首次克隆获得了水曲柳*FmAOS*基因,该基因共1 605 bp,编码534个氨基酸,蛋白相对分子质量为59 911.25, pI为9.15。软件预测分析表

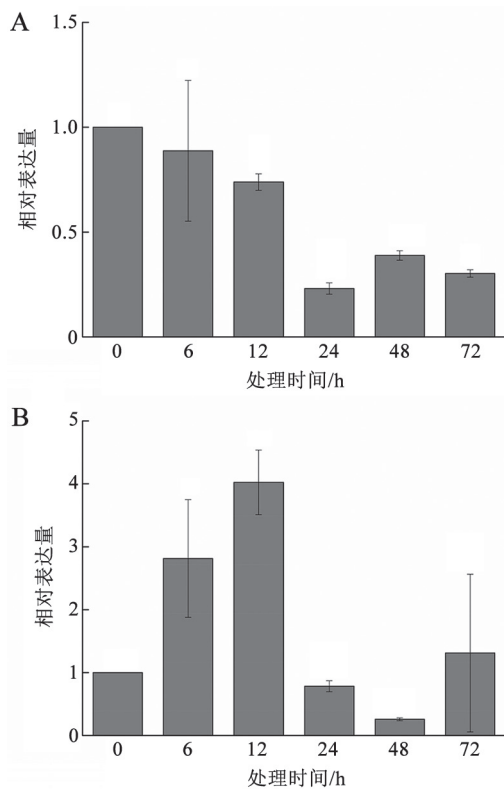


图5 *FmAOS*在植物激素信号下的相对表达量
Fig.5 Relative expression levels of *FmAOS* under hormone signal treatments

A、B分别为ABA、GA₃处理下*FmAOS*基因相对表达量。

明*FmAOS*蛋白存在跨膜结构域,为叶绿体蛋白,与其催化叶绿体脂质释放的亚麻酸底物的功能相吻合,预测结果较可信。信号肽预测分析水曲柳*FmAOS*可能不存在信号肽,而Li等(2008)报道的银胶菊(*Parthenium hysterophorus*)存在着明显的信号肽,推测可能是因为*AOS*蛋白存在着种属特异性。

温度、盐碱、干旱胁迫限制了野生植物和作物地理分布,是影响生产率的重要因素。不同植物由于分子机制的不同,对寒冷、盐碱和干旱的耐受性也不相同。研究抗逆基因及其响应机制在生产中也越来越具有实际意义。本研究对*FmAOS*在寒冷(4°C)、NaCl、干旱(PEG6000)胁迫下的表达模式进行了分析。在寒冷(4°C)条件下,*FmAOS*呈现先上调后下调的表达趋势;在NaCl处理下,*FmAOS*表达量为先上升后下降再上升的趋势;在干旱(PEG6000)胁迫下,*FmAOS*基因为先上调后下调的表达趋势。结果表明水曲柳*FmAOS*明显响应了这三种非生物胁迫,共同特征均是诱导初期的

快速应答,但其响应模式也各有所不同。而*AOS*是JA合成中的关键基因,JA信号通路则具有调控胁迫、激素等多种响应的生物学作用。因此,我们推测*FmAOS*基因响应寒冷、NaCl、干旱等非生物胁迫可能是通过激活JA信号通路来实现的,并且*FmAOS*在诱导初期快速表达的特征可能是其发挥功能的关键并与JA信号调控密切相关。

本研究也对*FmAOS*基因在激素信号下的表达进行了分析。ABA处理后,*FmAOS*基因表达量先下降后上升再下降,并且处理组的表达量均低于对照组,表明ABA信号抑制了水曲柳*FmAOS*基因的表达,与Laudert和Weiler (1998)、Maucher等(2000)分别在大麦(*Hordeum vulgare*)和拟南芥中的研究结果类似,表明*FmAOS*基因明显响应了ABA信号。而ABA信号却诱导了苹果(*Malus pumila*)中*AOS*基因的上调表达(Cao等2014),说明*AOS*在不同物种中的表达模式不同,存在物种特异性。GA₃诱导下,水曲柳*FmAOS*基因的表达量也发生了变化,表明*FmAOS*也响应了GA₃信号。并且ABA和GA₃作为植物生长调节剂调控了植物生长发育过程,因此,我们推测*FmAOS*可能也影响了水曲柳的生长发育。

此外,大量研究已表明*AOS*基因也响应了机械损伤胁迫及病虫害胁迫防御反应。如苹果的损伤诱导了*AOS*基因表达,但表达量的增加延滞于外源JA诱导,推测可能是由于JA信号转导途径长于伤诱导或者伤诱导的*AOS*基因的表达是通过JA含量的积累来实现的(Cao等2014)。有趣的是*AOS*受机械损伤诱导的表达模式在不同植物中也可能不同,机械损伤诱导了双子叶植物拟南芥中*AOS*基因的表达(Laudert和Weiler 1998),而单子叶植物大麦未受机械损伤诱导(Maucher等2000),故推测双子叶植物水曲柳*FmAOS*受机械损伤的诱导,具体有待进一步验证。*AOS*基因也参与了植物病虫害防御反应。过表达大豆*GmAOS*基因的转基因烟草在接种棉铃虫后受虫害相对面积降低,并且降低了棉铃虫的相对生长率,表明*GmAOS*基因增强了烟草的虫害抗性,参与了虫害防御反应(Wu等2008)。并且进化树分析表明水曲柳*FmAOS*与烟草中的同源蛋白聚为一类,据此推测水曲柳*FmAOS*基因可能也参与了病虫害反应,具体有待进一步研究。

综上所述, *FmAOS*同时响应了寒冷、盐、干旱等非生物胁迫及ABA、GA₃等植物激素信号。在水曲柳中, *FmAOS*可能作为生长发育及逆境胁迫响应的双重调控基因, 具体分子机制及调控网络有待进一步研究。

参考文献(References)

- Bae HK, Kang HG, Kim GJ, et al (2010). Transgenic rice plants carrying RNA interference constructs of *AOS* (*allene oxide synthase*) genes show severe male sterility. *Plant Breeding*, 129 (6): 647–651
- Bruinsma M, Posthumus MA, Mumm R, et al (2009). Jasmonic acid-induced volatiles of *Brassica oleracea* attract parasitoids: Effects of time and dose, and comparison with induction by herbivores. *J Exp Bot*, 60 (9): 2575–2587
- Cao Y, Bai S, Dai H (2014). Cloning and expression analysis of an allene oxide synthase gene *MdAOS* from *Malus domestica*. *Genom Appl Biol*, 33 (2): 273–281 (in Chinese with English abstract) [曹晏彬, 柏素花, 戴洪义. 苹果丙二烯氧化物合成酶*MdAOS*的克隆和表达分析. 基因组学与应用生物学, 33 (2): 273–281]
- Castro G, Kraus T, Abdala G (1999). Endogenous jasmonic acid and radial cell expansion in buds of potato tubers. *J Plant Physiol*, 155 (6): 706–710
- De Vos M, Van Zaanen W, Koornneef A, et al (2006). Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 142 (1): 352–363
- Glauser G, Dubugnon L, Mousavi SAR, et al (2009). Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 284 (50): 34506–34513
- Han TK, Zhou JJ, Xue YJ, et al (2013). Expression analysis of allene oxide synthase gene, *OsAOS1*, in rice. *Shandong Agr Sci*, 45 (5): 1–5 (in Chinese with English abstract) [韩同凯, 周晋军, 薛彦久等(2013). 水稻丙二烯氧化物合成酶基因*OsAOS1*的表达研究. 山东农业科学, 45 (5): 1–5]
- Hofmann K (1993). TMBASE-A database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 374 (1): 1–3
- Horton P, Park KJ, Obayashi T, et al (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucl Acids Res*, 35 (2): 585–587
- Laudert D, Schaller F, Weiler EW (2000). Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta*, 211 (1): 163–165
- Laudert D, Weiler EW (1998). Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J*, 15 (5): 675–684
- Li L, Chang Z, Pan Z, et al (2008). Modes of heme binding and substrate access for cytochrome P450 CYP74A revealed by crystal structures of allene oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (37): 13883–13888
- Li XY, Zhan YG, Lou XR, et al (2016). The Sequence and expression analysis of *BpUVR8* gene in birch. *Plant Physiol J*, 52 (5): 685–692 (in Chinese with English abstract) [李晓一, 詹亚光, 娄晓瑞等(2016). 白桦*BpUVR8*基因的序列与表达模式分析. 植物生理学报, 52 (5): 685–692]
- Lian QL, Han JH, Xin HB, et al (2011). Cloning and expression of *GhAOS* gene from *Gladiolus hybridus*. *J Beijing For Univ*, 33 (2): 77–83 (in Chinese with English abstract) [连青龙, 韩昊君, 辛海波等(2011). 唐菖蒲*GhAOS*基因的克隆与表达. 北京林业大学学报, 33 (2): 77–83]
- Liu CH, Liang NS, Yu L, et al (2017). Cloning, analysing and homologous expression of *TCP4* transcription factor under abiotic stress and hormone signal in *Fraxinus mandshurica* Rupr. *J Beijing For Univ*, 39 (6): 22–31 (in Chinese with English abstract) [刘春浩, 梁楠松, 于磊等(2017). 水曲柳*TCP4*转录因子克隆及胁迫和激素下的表达分析. 北京林业大学学报, 39 (6): 22–31]
- Liu HH, Wang YG, Wang SP, et al (2014). Improved zinc tolerance of tobacco by transgenic expression of an allene oxide synthase gene from hexaploid wheat. *Acta Physiol Plant*, 36 (9): 2433–2440
- Lulai E, Huckle L, Neubauer J, et al (2011). Coordinate expression of AOS genes and JA accumulation: JA is not required for initiation of closing layer in wound healing tubers. *J Plant Physiol*, 168 (9): 976–982
- Maucher H, Hause B, Feussner I, et al (2000). Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant J*, 21 (2): 199–213
- Mwenda CM, Matsuki A, Nishimura K, et al (2015). Spatial expression of the *Arabidopsis hydroperoxide lyase* gene is controlled differently from that of the *allene oxide synthase* gene. *J Plant Interact*, 10 (1): 1–10
- Park JH, Halitschke R, Kim HB, et al (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J*, 31 (1): 1–12
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, et al (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, 8 (10): 785–786
- Reinbothe C, Springer A, Samol I, et al (2009). Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J*, 276 (17): 4666–4681
- Ren XL, Zhan YG, Liang X, et al (2015). qRT-PCR analysis of gene expression of *AG* and *SOC1* during flower development of *Fraxinus mandshurica* Rupr. *Bull Bot Res*, 35 (4): 612–617 (in Chinese with English abstract) [任小

- 龙, 詹亚光, 梁雪等(2015). 水曲柳花发育过程中*AG*、*SOCI*基因表达的qRT-PCR分析. 植物研究, 35 (4): 612–617]
- Schaller F (2001). Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J Exp Bot*, 52 (354): 11–23
- Sen TZ, Jernigan RL, Garnier J, et al (2005). GOR V server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*, 21 (11): 2787–2788
- Sivasankar S, Sheldrick B, Rothstein SJ (2000). Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato. *Plant Physiol*, 122 (4): 1335–1342
- Song WC, Funk CD, Brash AR (1993). Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 (18): 8519–8523
- Song YF, Dong LH, Jin YR, et al (2014). Subcellular localization and expression analysis of *Nicotiana sylvestris* *KUP/HAK/KT* family K^+ transporter gene *NsHAK11*. *Sci Agr Sin*, 47 (6): 1058–1071 (in Chinese with English abstract) [宋毓峰, 董连红, 靳义荣等(2014). 林烟草*KUP/HAK/KT*钾转运体基因*NsHAK11*的亚细胞定位与表达. 中国农业科学, 47 (6): 1058–1071]
- Tamura K, Dudley J, Nei M, et al (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24 (8): 1596–1599
- Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002). The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, 14 (Suppl): S153–S164
- von Malek B, van der Graaff E, Schneitz K, et al (2002). The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the *ALLENE OXIDE SYNTHASE* gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta*, 216 (1): 187–192
- Walker JM (2002). *The Protein Protocols Handbook*. Totowa: Humana Press
- Weber H (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci*, 7 (5): 217–224
- Wu J, Wu Q, Wu Q, et al (2008). Constitutive overexpression of *AOS*-like gene from soybean enhanced tolerance to insect attack in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett*, 30 (9): 1693–1698
- Zeng FS, Nan N, Zhan YG (2007). Extraction of total RNA from mature leaves rich in polysaccharides and secondary metabolites of *Betula platyphylla* Suk. *Plant Physiol Commun*, 43 (5): 913–916 (in Chinese with English abstract) [曾凡锁, 南楠, 詹亚光(2007). 富含多糖和次生代谢产物的白桦成熟叶中总RNA的提取. 植物生理学通讯, 43 (5): 913–916]

Sequence and expression analyses of allene oxide synthase gene *FmAOS* in *Fraxinus mandschurica*

LIU Chun-Hao¹, LIANG Nan-Song^{1,2}, YU Lei^{1,2}, ZHAO Xing-Tang^{1,2}, CAO Yang^{1,2}, ZHAN Ya-Guang^{1,2,*}

¹College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

²State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Jasmonic acid (JA) is an important signal molecule participating in plant growth and development. Allene oxide synthase (AOS) is a key enzyme in JA biosynthesis. We cloned *AOS* gene in ash tree (*Fraxinus mandschurica*), and named it as *FmAOS*. Bioinformatic analysis showed that *FmAOS* is 1 605 bp, containing a complete open reading frame, encoding 534 amino acids. *FmAOS* protein is amphoteric and unstable, has no signal peptide but transmembrane ability, and exists in chloroplast by subcellular localization prediction. According three dimension modeling analysis, *FmAOS* is belong to mixed protein. Expression analysis showed *FmAOS* responds to abiotic stress such as cold, NaCl, drought and plant hormone signals like ABA and GA_3 , but the expression patterns are different, which means *FmAOS* is involved in the balance of growth/development and stress response. This paper can lay a foundation for the study of *FmAOS* gene function.

Key words: *Fraxinus mandschurica*; AOS; bioinformatic analysis

Received 2017-08-29 Accepted 2018-03-04

This work was supported by the National Key R&D Plan (2017YF D0600605-01), and the National Natural Science Foundation of China (31270697).

*Corresponding author (yaguangzhan@126.com).