

油桐乙醛脱氢酶基因 $ALDH2B4$ 和 $ALDH2B7$ 的克隆与表达分析

刘美兰, 华园榕, 龙洪旭, 吕佳斌, 谭晓凤*

中南林业科技大学, 经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室, 长沙410004

摘要: 本研究运用反转录PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)技术, 从油桐(*Vernicia fordii*)近成熟种子中克隆了油桐乙醛脱氢酶基因家族两个成员的全长编码序列(CDS), 命名为 $VfALDH2B4$ 和 $VfALDH2B7$, NCBI登记号分别为MF179125和MF179126, CDS长度分别为1 617和1 626 bp, 分别编码538和541个氨基酸。通过蛋白结构分析发现这两个蛋白均含有乙醛脱氢酶基因家族特有的保守结构域, 且两个蛋白都与麻疯树(*Jatropha curcas*)的 $ALDH2B4$ 和 $ALDH2B7$ 亲缘关系最近。实时荧光定量PCR分析表明, 这两个基因在油桐各组织器官中均有表达, 其中 $VfALDH2B4$ 在嫩叶的表达量最高, 是其他组织的21倍左右, 而 $VfALDH2B7$ 在花瓣的表达量最高, 是其他组织的62倍左右; 在油桐种子不同发育时期, 两个基因的表达也存在明显差异。此外, 两个基因表达还受高盐、干旱和脱落酸调控, 它们可能在油桐逆境胁迫应答和脱落酸信号途径中发挥作用。

关键词: 油桐; 乙醛脱氢酶; 系统进化; 表达分析; 非生物胁迫

油桐(*Vernicia fordii*)属大戟科(Euphorbiaceae)油桐属, 多年生落叶乔木, 为我国特有经济林木(黄艳2013)。世界上种植的油桐树主要有油桐(又称光桐、三年桐)和千年桐两种, 我国均产。油桐生长快, 结果早, 产量高。油桐栽培历史悠久且用途广泛, 桐油可用于涂料和油漆生产, 不仅是新型环保化工原料, 而且是重要的工业用油(Shockey等2006); 油桐树皮可制胶, 榨油后的桐饼和桐麸是肥效很高的优质肥料; 果壳可制活性炭; 炭灰可熬制土碱(张玲玲和彭俊华2011)。

近年来环境破坏严重, 非生物性胁迫使油桐严重减产。干旱、高盐等环境胁迫诱导活性氧的快速生成, 随后导致醛类在生物体内积累。醛类分子为高活性分子, 极易与不同细胞内亲核物质如核酸、蛋白质和膜脂发生化学反应, 对细胞有潜在毒性(Skibbe等2002)。乙醛脱氢酶(acetaldehyde dehydrogenase, ALDH)被认为是生物体内活性氧物质的解毒剂, 它使有毒的醛类氧化成对应的无毒羧酸, 维持醛类物质平衡。

ALDHs是一个超家族蛋白, 它依赖于 $NAD(P)^+$, 能氧化许多内源依赖性酶、脂肪族和芳香族醛, 生成羧酸(Kirch等2004)。ALDHs在人体和酵母中的功能备受关注, 它们作为生物源和外源性醛的一般解毒酶的作用已经非常明确, 但在植物方面的研究起步较晚。当前研究表明ALDHs参与植物中某些重要途径, 第一个在植物中发现的 $ALDH$ 基因 $rf2a$ 是从玉米(*Zea mays*)编码线粒体中分离出来的(Cui等1996), 该基因对恢复雄性育性方面发挥

作用, 同时可能参与花药发育(Liu等2001; Liu和Schnable 2002)。其后在其他植物中陆续发现 $ALDH$ 基因, 比如在拟南芥中发现了9个醛脱氢酶亚家族, 共14个基因, 其中3个基因与非生物逆境相关(Kirch 2005); 在葡萄(*Vitis vinifera*)中鉴定出23个非冗余的葡萄 $ALDH$ 家族成员, 归属于10个家族, 其中多数 $ALDH$ 基因响应环境胁迫和病原菌侵袭(Zhang 2012); 在苹果(*Malus pumila*)中共鉴定出39个苹果 $ALDH$ 基因, 归于10个家族, 其中7个基因响应高盐或干旱胁迫(Li 2013)。不同家族的醛脱氢酶基因对植物表现出不同的抗逆特性, $ALDH2$ 家族位于胞浆或线粒体中, 与乙醛的氧化脱毒相关(Tsuji等2003)。在拟南芥和部分重要经济作物中关于 $ALDH$ 基因的研究较多, 但有关油桐 $ALDH$ 基因的研究尚未报道。因此本研究以油桐为材料, 分离克隆了油桐 $ALDH2$ 家族的 $B4$ 和 $B7$ 两个成员, 并进行了初步的生物信息学和表达模式分析, 为进一步深入研究 $ALDH2B4$ 和 $ALDH2B7$ 基因在油桐中的功能提供参考。

材料与方法

1 材料和试剂

实验所用油桐[*Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy Shaw]栽植于湖南省永顺县青坪镇中南林业科技

收稿 2017-01-06 修定 2017-07-02

资助 湖南省科技计划项目(2016NK2147)。

* 通讯作者(E-mail: tanxiaofengcn@126.com)。

大学油桐实验基地。采集后取出种仁,自然干燥。筛选饱满的油桐种仁,用0.1% (*m/V*)的高锰酸钾溶液消毒30 min,无菌水洗净,埋入准备好的干净河沙中。待油桐长出嫩叶后,选取长势相近的幼苗进行处理。高盐胁迫处理方法为:每株油桐苗浇灌1 L 250 mmol·L⁻¹ NaCl溶液,浇等量清水作为对照。干旱胁迫处理方法为:每株油桐苗浇灌1 L 25% (*m/V*)聚乙二醇6000 (polyethylene glycol 6000, PEG6000)溶液,浇等量清水作为对照。将浓度为100和200 μmol·L⁻¹的脱落酸(abscisic acid, ABA)激素喷施油桐叶片,用清水按照同样方法喷施到油桐叶片上作为对照。待处理后的植株叶片表面水分被吸收干,即喷施处理溶液后20 min、3 h 20 min、6 h 20 min、12 h 20 min、24 h 20 min分别进行取样,取植株叶片液氮速冻,保存于-80°C冰箱。

植物RNA抽提试剂EZ-10 DNAaway RNA Mini-prep Kit购自生工公司, pEASY克隆载体、*EasyTaq* DNA聚合酶、大肠杆菌感受态*Trans5α*购自全式金公司,实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)和RT-PCR相关试剂购自TaKaRa公司, DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒购自博日公司,引物合成由华大基因完成,测序由铂尚生物技术有限公司完成,其他生化试剂均为进口及国产分析纯。

2 RNA抽提和cDNA第一链的合成

所有植物材料参照生工公司EZ-10 DNAaway RNA Mini-prep Kit试剂盒说明书提取总RNA, cDNA第一链的合成参照大连宝生物工程公司PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒说明书。

3 油桐ALDH2B4和ALDH2B7基因的克隆

从油桐种子转录组数据库中获得ALDH2B4和ALDH2B7基因的全长编码序列(coding sequence, CDS),其中ALDH2B4基因的开放阅读框为1 617 bp, ALDH2B7基因的开放阅读框为1 626 bp。利用Primer Premier 5.0软件设计两对特异引物A4F1、A4R1以及A7F1、A7R1并进行PCR扩增(表1)。PCR反应体系(20 μL):上下游引物各0.4 μL,模板cDNA 0.4 μL, Prime STAR HS (premix) 8.8 μL, 双蒸水(double-distilled water, ddH₂O) 10 μL。扩增条件:98°C 3 min; 98°C 10 s, 58°C 5 s, 72°C 90 s, 30个循环; 72°C 7 min; 4°C保温。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	碱基数
A4F1	ATGGCTGCTCGCAGGATA	18
A4R1	TTACAACCATGCCGGATT	18
A7F1	ATGGCTAGTAGGAGGATATCTT	22
A7R1	CTCATAGCCATGCTGGGT	19
A4-F1	GCTATGGTCCAACCTGCTGGT	20
A4-R1	GCAAGCTCCACTGCCTTATC	20
A7-F1	TCACCGGATCGACTGATACA	20
A7-R1	GCATGGCCCTGATTAAAGA	20
GAPDH-F	CTGCTAAGGCTGTTGGGAAG	20
GAPDH-R	TCCCTCTGACTCCTCTTGA	20

利用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测上述PCR产物,并回收纯化目的片段。将目的片段与pEASY克隆载体连接,转入大肠杆菌中,送至铂尚生物公司测序。

4 油桐ALDH2B4和ALDH2B7基因生物信息学分析

利用NCBI的BLAST功能搜索同源核苷酸序列及氨基酸序列,利用在线软件ProtParam分析和预测蛋白理化性质,利用DNAMAN软件对序列进行分析和比对,并使用ClustalX和MEGA 5.1软件构建系统进化树。

5 油桐ALDH2B4和ALDH2B7基因不同胁迫条件下的表达模式分析

根据油桐转录组数据库中获得目的基因全长设计实时定量PCR引物A4-F1、A4-R1和A7-F1、A7-R1(表1),扩增片段长度分别为202和176 bp,以油桐GAPDH作为内参基因。总反应体系(12 μL): 6.25 μL 2×SYBR Premix Ex Taq、4.25 μL去RNA酶水、各0.25 μL引物(10 μmol·L⁻¹)、1 μL cDNA模板。扩增程序:94°C预变性30 s; 94°C变性5 s, 55°C退火30 s, 72°C延伸30 s, 39个循环。各反应进行3次重复,采用2^{-ΔΔC_t}法(Livak和Schmittgen 2001),用Excel进行数据分析。

实验结果

1 目的基因的克隆与序列分析

以近成熟油桐种子为材料,利用RNA试剂盒提取油桐种子总RNA,总RNA的28S和18S两条带亮度高,且28S与18S的亮度比例接近2:1,无降解,无DNA残留(图1-A),可用于逆转录。根据逆转录

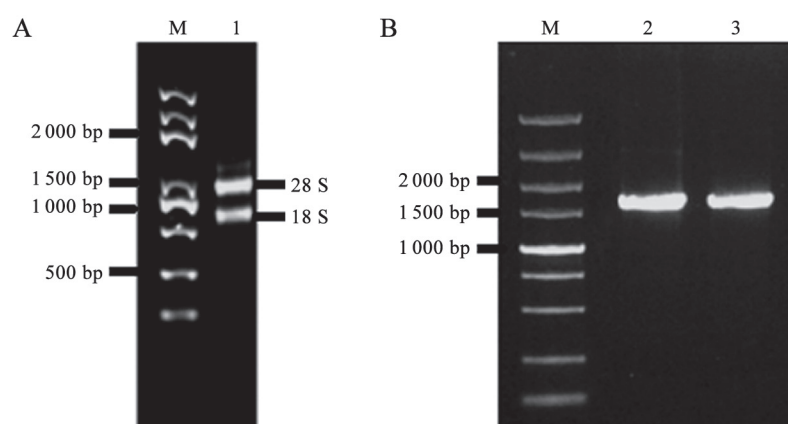
图1 油桐种子总RNA提取(A)与*VfALDH*基因CDS扩增结果(B)

Fig. 1 Electrophoretogram of total RNA (A) and PCR amplification results of CDS of *VfALDH* (B) in *V. fordii* seed

M: DNA marker; 1: 总RNA; 2: *VfALDH2B4* CDS; 3: *VfALDH2B7* CDS。

试剂盒步骤获得油桐种子cDNA, 以此为模板利用特异性引物(A4F1、A4R1、A7F1、A7R1)进行PCR扩增, 克隆至pEASY-Blunt Simple载体上, 挑取单菌落检测获得阳性克隆后进行测序(图1-B)。结果表明这两个基因序列与油桐转录组测序的序列完全一致, 最终确认为油桐*ALDH2B4*和*ALDH2B7*基因的全长CDS。*VfALDH2B4*基因编码区为1 617 bp, 编码538个氨基酸; *VfALDH2B7*基因编码区为1 626 bp, 编码541个氨基酸。

利用在线工具ProtParam分析*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*蛋白的理化性质, 结果表明: *VfALDH2B4*蛋白分子质量为58.79 kDa, 理论等电点为7.16, 负电荷残基(Asp+Glu)总数为57, 正电荷残基(Arg+Lys)为57, 分子式为 $C_{2646}H_{4136}N_{716}O_{771}S_{15}$, 不稳定系数为37.87, 是稳定蛋白; 亲水性平均系数为-0.105, 属于亲水蛋白。*VfALDH2B7*蛋白分子质量为59.01 kDa, 理论等电点为6.38, 负电荷残基(Asp+Glu)总数为59, 正电荷残基(Arg+Lys)为55, 分子式为 $C_{2647}H_{4123}N_{721}O_{782}S_{14}$, 不稳定系数为33.24, 是稳定蛋白; 亲水性平均系数为-0.110, 属于亲水蛋白。

2 油桐ALDH2B4和ALDH2B7蛋白的生物信息学分析

利用ClustalX和MEGA 5.1软件, 根据最新的邻接(neighbor-joining, NJ)法对*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*基因编码的氨基酸与其他植物中*ALDH2B4*和*ALDH2B7*基因编码的氨基酸构建系统进化树。从图2可看出25个ALDH2蛋白明显分为两个大枝,

分别为ALDH2B4和ALDH2B7两组蛋白, 油桐ALDH2B4和ALDH2B7与大戟科麻疯树(*Jatropha curcas*)的ALDH2B4和ALDH2B7分别聚合在一个小分枝上, 因此推测油桐ALDH2B4与麻疯树ALDH2B4亲缘关系最近, 而油桐ALDH2B7与麻疯树ALDH2B7亲缘关系最近。

通过对*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*的蛋白结构分析, 发现它们均捆绑PLN02466标签, 即醛脱氢酶家族两成员的高度保守序列分别位于27~538和1~541 aa。*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*蛋白的保守结构域相当一致, 均含有醛脱氢酶基因家族的3个保守结构域, 即谷氨酸激活位点、半胱氨酸激活位点、多个Rossmann卷曲GxGxxG辅酶结合位点(图3)。其中*VfALDH2B4*的谷氨酸和半胱氨酸激活位点分别位于304~311和332~343 aa; *VfALDH2B7*的谷氨酸和半胱氨酸激活位点分别位于307~314和335~346 aa。

3 油桐ALDH2B4和ALDH2B7基因表达特征分析

3.1 不同组织部位和种子发育时期的表达分析

采用qRT-PCR检测*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*两个基因在油桐不同组织部位的表达特征, 表明两个基因在各个组织中均有表达, 但表达规律有所不同。*VfALDH2B4*基因在嫩叶和老叶中的表达量相对较高, 其中在嫩叶中的表达量最高, 是花瓣中的21倍左右; 其次在幼根、老茎和茎中表达; 在花器官即柱头、雄蕊、子房、花萼和花瓣中的表达量相对较低(图4-A)。*VfALDH2B7*基因在花瓣和

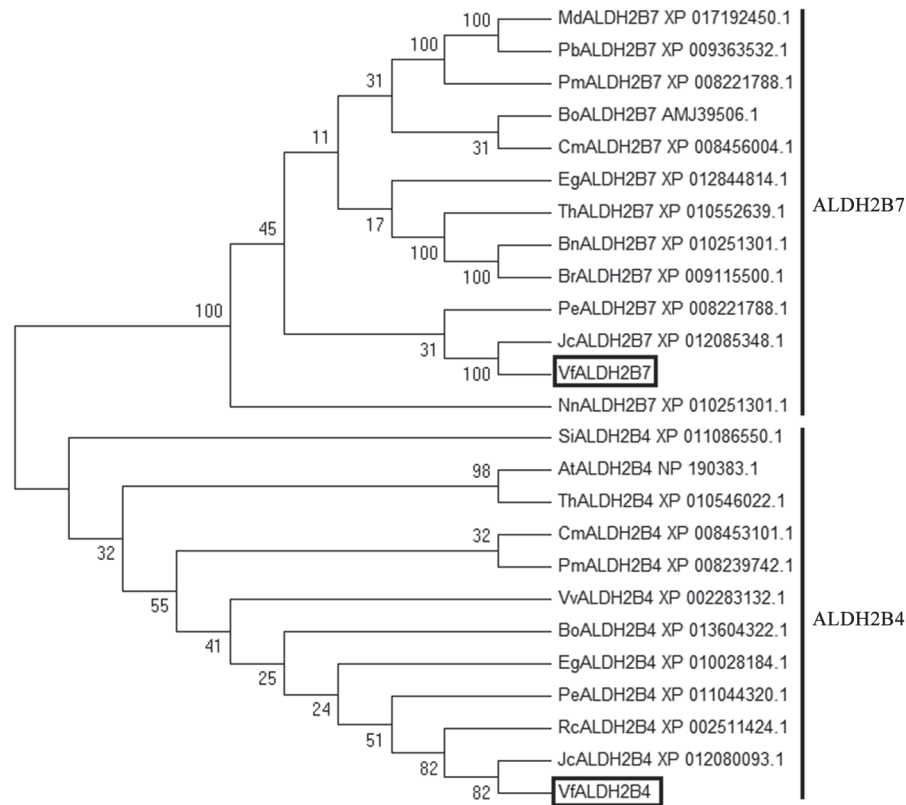


图2 不同物种ALDH2蛋白系统进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree of predicted ALDH2 and other homologous proteins from various species

模型为松柏修正, bootstrap值>500。本文克隆的两个油桐ALDH2基因编码蛋白以方框标示。At: 拟南芥; Bn: 欧洲油菜(*Brassica napus*); Bo: 胭脂树(*Bixa orellana*); Br: 芜菁(*Brassica rapa*); Cm: 甜瓜(*Cucumis melo*); Eg: 巨桉(*Eucalyptus grandis*); Jc: 麻疯树; Md: 苹果; Nn: 莲花(*Nelumbo nucifera*); Pb: 白梨(*Pyrus bretschneideri*); Pe: 胡杨(*Populus euphratica*); Pm: 梅花(*Prunus mume*); Rc: 蓖麻(*Ricinus communis*); Si: 芝麻(*Sesamum indicum*); Th: 醉蝶花(*Tarenaya hassleriana*); Vf: 油桐; Vv: 葡萄。

老茎中的表达量相对较高,尤其在花瓣中的表达量最高,是花萼中的62倍左右;其次在柱头、茎、幼根和嫩叶中表达;在子房、老叶、花萼中的表达量相对较低,以雄蕊中的表达量最低(图4-B)。

qRT-PCR检测*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*基因在种子发育过程中的表达量,发现它们均有表达,但表达量各不相同。*VfALDH2B4*基因的最大表达量出现在7月30日,随后在8月表达量呈下降趋势,在8月30日~9月15日骤然升高,并在9月15日达到第二高峰后急剧下降,在9月30日达到最小值后稳步升高,其中*VfALDH2B4*基因在7月30日的最大表达量为9月30日最低表达量的约103倍,整体变化趋势呈现“W”形曲线(图5-A)。*VfALDH2B7*基因的表达量在7月30日~8月15日呈下降趋势,随后表达量开始上升,并在9月15日达到最大值后逐渐下降。在此过程中,*VfALDH2B7*基因在9月15日的最大表达

量为8月15日最低表达量的约450倍(图5-B)。油桐种子发育主要分为3个时期,其中8月为油桐的油脂快速积累期,10月为油脂的累积完成期,*VfALDH2B7*基因在油桐种子发育时期的表达规律与这一现象部分相符,由此推测*VfALDH2B7*基因可能与油桐的油脂合成相关。

3.2 干旱、高盐处理下的表达分析

qRT-PCR分析油桐*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*在干旱、高盐处理后的表达模式,发现*VfALDH2B4*基因的表达量在干旱处理后20 min~12 h 20 min呈现上升趋势,并12 h 20 min时达到峰值,此时表达量为对照的约5倍左右,起到明显的促进作用,随后的12 h内表达量呈下降趋势;*VfALDH2B4*基因在高盐胁迫下的前6 h 20 min内受到抑制作用,且表达量逐渐下降,并在6 h 20 min时到达低谷,此时的表达量仅为对照的30%左右,之后开始升高,在24 h

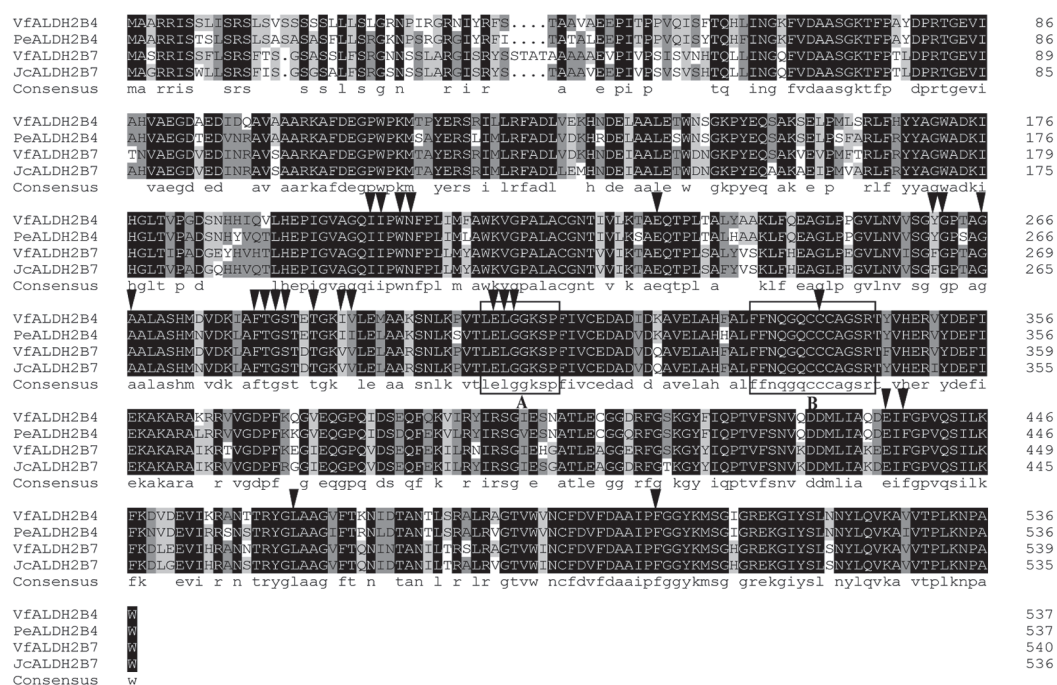


图3 油桐ALDH2B4和ALDH2B7氨基酸序列与其他物种的比对

Fig.3 Comparison of ALDH2B4 and ALDH2B7 amino acid sequences of *V. fordii* and other plants

A: 谷氨酸激活位点; B: 半胱氨酸激活位点; ▼: 辅酶结合位点。Jc: 麻疯树; Pe: 胡杨; Vf: 油桐; Consensus: 序列一致的氨基酸。

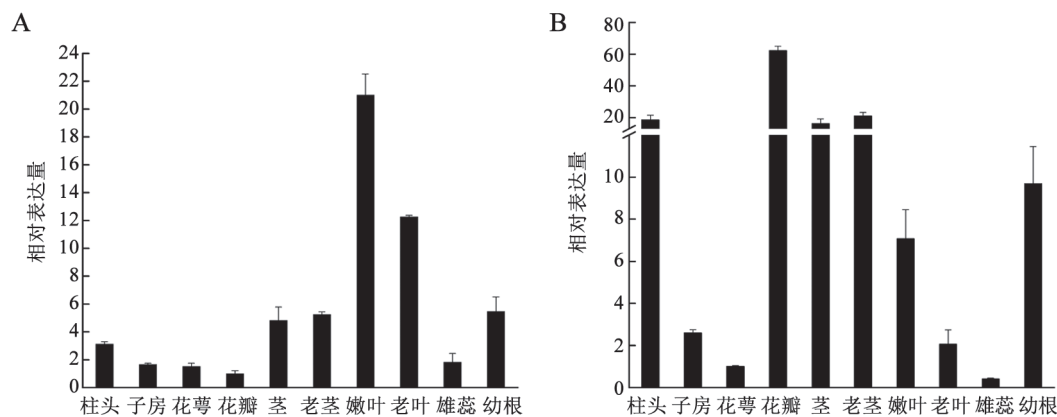


图4 *VfALDH2B4* (A)和*VfALDH2B7* (B)在油桐各组织部位中的表达情况

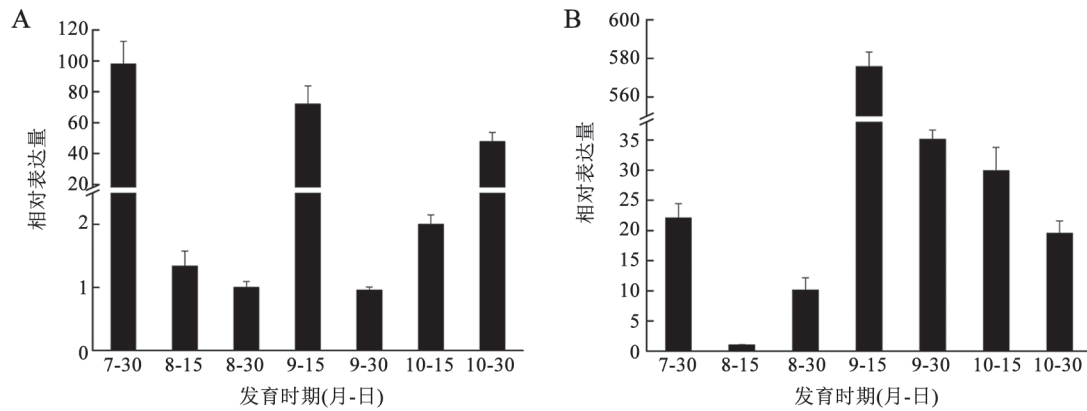
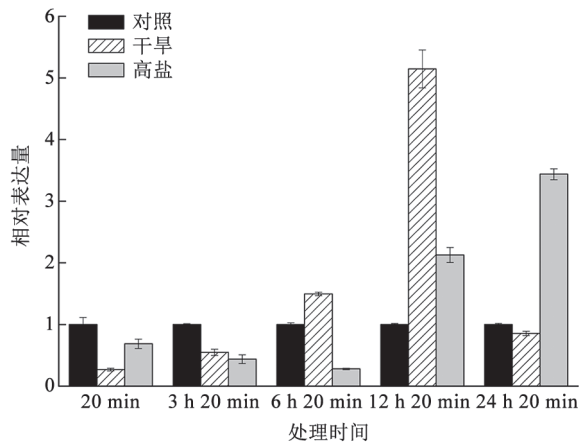
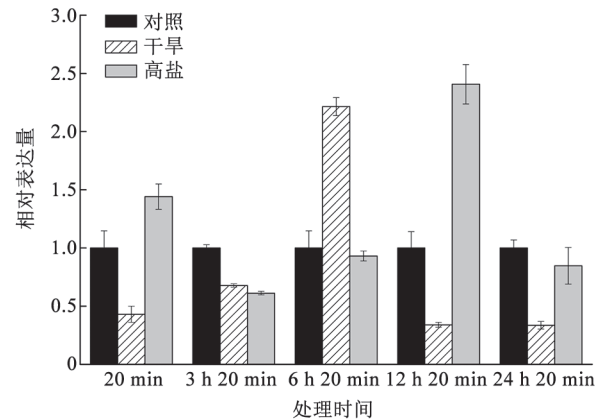
Fig.4 Expressions of *VfALDH2B4* (A) and *VfALDH2B7* (B) in different tissues of *V. fordii*

20 min时达到最大表达量, 此时表达量为对照的约3倍(图6)。在干旱处理下, *VfALDH2B7*表达量从20 min到6 h 20 min呈上升趋势, 并在6 h 20 min时达到最高峰, 表达量为对照的2倍左右, 之后呈现下降趋势并趋于稳定; 在高盐条件下, *VfALDH2B7*表达量从20 min到3 h 20 min开始下降并在3 h 20 min时为最低值, 表达量约为对照的2/3, 随后开始上升并在12 h 20 min时达到最大表达量, 此时表达量为

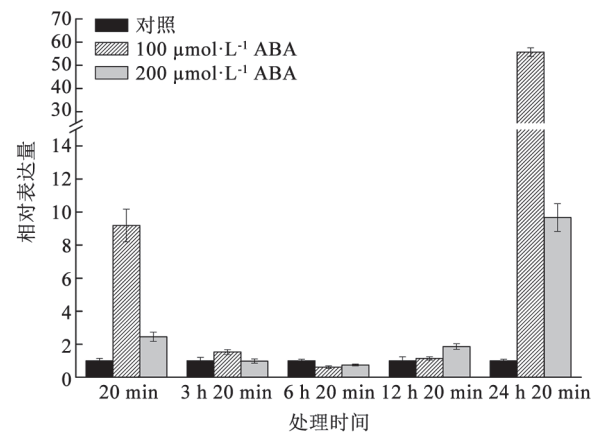
对照的约2倍, 之后表达量逐步降低且低于对照(图7)。总体来看, *VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*的表达受干旱胁迫和盐胁迫调控。

3.3 不同浓度ABA处理下的表达分析

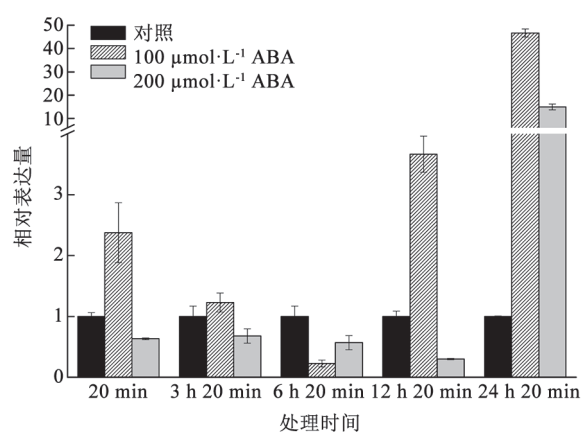
qRT-PCR分析在ABA诱导条件下*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*基因的表达模式, 发现两基因随着时间变化均呈下降-上升趋势。在两种ABA浓度处理条件下, *VfALDH2B4*的起始表达量明显高于对

图5 *VfALDH2B4* (A)和*VfALDH2B7* (B)在油桐种子不同发育时期的表达情况Fig.5 ExpressionS of *VfALDH2B4* (A) and *VfALDH2B7* (B) in different periods of *V. fordii* seeds图6 逆境下*VfALDH2B4*表达分析Fig.6 Expression profiles of *VfALDH2B4* under stresses图7 逆境下*VfALDH2B7*表达分析Fig.7 Expression profiles of *VfALDH2B7* under stresses

照, 在20 min~6 h 20 min表达量下降, 在6 h 20 min时为最低值, 随后的12 h 20 min~24 h 20 min, 表达量迅速升高, 在24 h 20 min时均达到峰值, 此时ABA浓度为100和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 表达量分别是对照的55和10倍, 整个过程呈“V”形变化趋势。在100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA浓度条件下, *VfALDH2B4*对ABA响应更为明显(图8)。 *VfALDH2B7*在100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA浓度条件下, 反应趋势呈相同的“V”形变化。处理后起始表达量就高于对照, 此时基因的表达呈促进作用, 随后促进作用开始减弱, 表达量在6 h 20 min时到达低谷并呈抑制作用, 在随后的12 h内, 表达量迅速升高并在24 h 20 min是达到最高值, 此时表达量为对照的约47倍。在200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理下, *VfALDH2B7*在前12 h 20 min受抑制作用, 在12 h 20 min时抑制作用较为明显, 表达量仅为对照

图8 ABA处理对*VfALDH2B4*表达的影响Fig.8 Effects of ABA treatments on expression of *VfALDH2B4*

的1/4, 随后表达量逐渐升高并在24 h 20 min时达到峰值, 此时的表达量约为对照的15倍(图9)。整

图9 ABA处理对*VfALDH2B7*表达的影响Fig.9 Effects of ABA treatments on expression of *VfALDH2B7*

体来看, 两种浓度的ABA都对*VfALDH2B4*基因的表达起到促进作用, 而*VfALDH2B7*基因的表达在ABA浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时呈现促进作用, 在ABA浓度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 情况下受抑制。

讨 论

本研究通过克隆得到CDS长度分别为1 617 bp的*VfALDH2B4*和1 626 bp的*VfALDH2B7*基因。对*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*进行氨基酸序列比对发现醛脱氢酶序列具有3个保守的模块: 谷氨酸活性位点(PROSITE PS00687)、Rossmann卷曲GxGxxG辅酶结合位点(通常能结合辅酶I)、催化硫基(PROSITE PS00070) (Perozich等1999)。对*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*基因的保守序列进行分析, 保守序列为LELGKSP (PROSITE PS00687)、FFNQGQCCCAGS (PROSITE PS00070), 以及多个 NAD^+ 结合位点, 属于高度保守的醛脱氢酶家族基因。对油桐ALDH2B4和ALDH2B7蛋白进行聚类分析表明它们分别与麻疯树的ALDH2B4和ALDH2B7亲缘关系最近, 油桐与麻疯树同属大戟科, 相较于上述其他物种, 它们的亲缘关系应该是最相近的, 因此可能油桐ALDH2B4和ALDH2B7蛋白的功能与麻疯树的ALDH2B4和ALDH2B7最相似。

本研究利用qRT-PCR技术, 检测了*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*基因在油桐组织和果实中的表达情况, 发现它们在油桐组织中分布广泛且表达规律不同。*VfALDH2B4*在油桐的根、茎、叶、花中均有表达, 在嫩叶中的表达量最高, 这与拟南芥

的ALDH2B4和水稻(*Oryza sativa*) *OsALDH2B4*具有相似的表达模式(Wei等2009; Gao和Han 2008), 都在细胞分裂旺盛的幼嫩组织中大量表达, 可能与ALDH2B4的功能有重要关系; 而油桐ALDH2B7的表达情况与ALDH2B4存在一定差异, *VfALDH2B7*在花瓣中的表达量最高, 其次在柱头、幼茎、幼根、嫩叶中表达, 在子房、老叶、花萼、雄蕊中的表达量最低, 这与拟南芥ALDH2B7和葡萄ALDH2B8的表达模式相似(Wei等2009; 徐晓召2013), 都在花芽或者花的某个组织中表达量最高, 可能与油桐ALDH2B7参与PDC-ALDH-ACS途径有关, 即丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, PDC)催化花器官中的丙酮酸形成乙醛, 乙醛再经ALDH、乙酰辅酶A合成酶(acetyl coenzyme A synthase, ACS)转化进入三羧酸等代谢途径。*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*基因在油桐种子不同发育时期的表达具有特异性, 其中*VfALDH2B4*基因的表达整体变化趋势呈现“W”形曲线, 与油桐果实生长和种仁油脂积累相关性不高; *VfALDH2B7*基因与之具有一定相关性, 其变化规律部分符合, 初步推测*VfALDH2B7*基因可能在果实生长和种仁油脂合成过程中参与调控。

非生物胁迫会造成植物膜脂过氧化, 产生大量醛类物质(Bartels 2001; Kotchoni和Bartels 2003)。醛脱氢酶基因在拟南芥中过量表达, 抗干旱和盐胁迫能力提高(Kotchoni等2006; Sunkar等2003), 说明醛脱氢酶在逆境生理方面可能起到重要作用。ABA调控着植物种子发育、休眠、萌发、气孔运动等生长发育过程(Cutler等2010), 同时在植物抵抗干旱、低温、高盐等非生物胁迫中发挥重要作用(Huang等2008)。分析*VfALDH2B4*和*VfALDH2B7*基因在干旱、盐及ABA处理下的表达模式, 发现油桐ALDH2B4和ALDH2B7与水稻*OsALDH2-4*和葡萄*VvALDH2B4*、*VvALDH2B8*相似, 它们在干旱及盐胁迫下都被诱导表达来参与缓解渗透胁迫产生的醛类物质, 同时, 在ABA诱导条件下, 都可能参与油桐ABA相关信号的传导(Gao和Han 2008; Zhang 2012)。

逆境胁迫影响油桐的正常生长发育, 因此提高油桐的抗逆性对于提高油桐产量至关重要。鉴定和研究油桐抗逆基因是从分子水平上揭示油桐

抗逆机理的一项基础研究。本研究首次在重要油料树种油桐中获得*ALDH2B4*和*ALDH2B7*基因,并开展了蛋白结构、系统进化、基因表达特征等分析,丰富了油桐*ALDH2*基因家族信息,并为进一步研究其在油桐抗逆方面的功能提供了参考。

参考文献

- Bartels D (2001). Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 6: 284–286
- Cui X, Wise RP, Schnable PS (1996). The *rf2* nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. *Science*, 272: 1334–1335
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 651–679
- Gao C, Han B (2009). Evolutionary and expression study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in rice (*Oryza sativa*). *Gene*, 431 (1–2): 86–94
- Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ (2008). The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J Exp Bot*, 59: 2991–3007
- Kirch HH, Bartels D, Wei Y, Schnable PS, Wood AJ (2004). The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 9: 371–377
- Kirch HH, Schlingensiepen S, Kotchoni S, Sunkar R, Bartels D (2005). Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 57 (3): 315–332
- Kotchoni SO, Bartels D (2003). Water stress induces the up-regulation of a specific set of genes in plants: aldehyde dehydrogenase as an example. *Bulg J Plant Physiol*, (S): 37–51
- Kotchoni SO, Kuhns C, Ditzer A, Kirch HH, Bartels D (2006). Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant Cell Environ*, 29: 1033–1048
- Li X, Guo R, Li J, Singer SD, Zhang Y, Yin X, Zheng Y, Fan C, Wang X (2013). Genome-wide identification and analysis of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Physiol Biochem*, 71: 268–282
- Liu F, Cui X, Horner HT, Weiner H, Schnable PS (2001). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell*, 13 (5): 1063–1078
- Liu F, Schnable PS (2002). Functional specialization of maize mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Plant Physiol*, 130: 1657–1674
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Perozich J, Nicholas H, Wang BC, Lindahl R, Hempel J (1999). Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci*, 8: 137–146
- Shockey JM, Gidda K, Chapital DC, Kuan JC, Dhanoa PK, Bland JM, Rothstein SJ, Mullen RT, Dyer JM (2006). Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell*, 18 (9): 2294–2313
- Skibbe DS, Liu F, Wen TJ, Yandeu MD, Cui X, Cao J, Simmons CR, Schnable PS (2002). Characterization of the aldehyde dehydrogenase gene families of *Zea mays* and *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 48: 751–764
- Sunkar R, Bartels D, Kirch HH (2003). Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant J*, 35: 452–464
- Tsuji H, Meguro N, Suzuki Y, Tsutsumi N, Hiari A, Nakazono M (2003). Induction of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by submergence facilitates oxidation of acetaldehyde during re-aeration in rice. *FEBS Lett*, 546: 369–373
- Wei Y, Lin M, Oliver DJ, Schnable PS (2009). The roles of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the pdh bypass of *Arabidopsis*. *BMC Biochem*, 10: 7
- Xu X (2013). Expression and functional analysis of grape aldehyde dehydrogenase gene *ALDH2B8* (Master's thesis). Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [徐晓召(2013). 葡萄醛脱氢酶基因*ALDH2B8*表达及功能研究(硕士论文). 杨凌: 西北农林科技大学]
- Yan H (2013). Studies on tissue culture of *Vernicia fordii* and establishment of regeneration system in *Vernicia fordii* (Master's thesis). Chongqing: Southwest University (in Chinese with English abstract) [黄艳(2013). 油桐组织快繁与离体再生体系的建立(硕士论文). 重庆: 西南大学]
- Zhang LL, Peng JH (2011). Values, development and utilization prospect of *Vernicia fordii* resources. *Nonwood For Res*, 29 (3): 130–135 (in Chinese with English abstract) [张玲玲, 彭俊华(2011). 油桐资源价值及其开发利用前景. *经济林研究*, 29 (3): 130–135]
- Zhang Y, Mao L, Wang H, Brocker C, Yin X, Vasiliou V, Fei Z, Wang X (2012). Genome-wide identification and analysis of grape aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily. *PLoS ONE*, 7: e32153

Cloning and expression analysis of *Vernicia fordii* aldehyde dehydrogenase genes $ALDH2B4$ and $ALDH2B7$

LIU Mei-Lan, HUA Yuan-Rong, LONG Hong-Xu, LÜ Jia-Bin, TAN Xiao-Feng*

Central South University of Forestry and Technology / Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Ministry of Education, Changsha 410004, China

Abstract: In this study, we reported the cloning and expression analysis of two aldehyde dehydrogenase (ALDH) family member genes in *Vernicia fordii*, named $VfALDH2B4$ and $VfALDH2B7$, respectively. The coding sequence (CDS) of $ALDH2B4$ gene is 1 617 bp, encoding 538 amino acids. The CDS of $ALDH2B7$ gene is 1 626 bp, encoding 541 amino acids. Protein structural analysis reveals that both proteins contain three conserved motifs in $ALDH$ gene family, and both proteins have the closest relationship with $JcALDH2B4$ and $JcALDH2B7$, respectively. At the same time, we found both $VfALDH2B4$ and $VfALDH2B7$ expressed in tissues and organs by real-time PCR. In different developmental stages of *V. fordii* seed, both genes were significantly different in the expression. In addition, the expressions of these two genes were regulated by high-concentration salt, drought and abscisic acid treatments, which indicates that $VfALDH2B4$ and $VfALDH2B7$ genes may participate in stress response and abscisic acid pathway of *V. fordii*.

Key words: *Vernicia fordii*; aldehyde dehydrogenase; phylogeny; expression analysis; abiotic stress

Received 2017-01-06 Accepted 2017-07-02

This work was supported by the Science and Technology Project of Hunan Province (Grant No. 2016NK2147).

*Corresponding author (E-mail: tanxiaofengcn@126.com).