

doi:10.11707/j.1001-7488.20131123

油茶果糖 - 1,6 - 二磷酸醛缩酶基因 (*CoFBA4*) 的分子特征与表达分析*

曾艳玲 谭晓风 蒋 瑶 刘 敏 王建勇 周俊琴

(中南林业科技大学 森林培养与保护教育部重点实验室 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室 长沙 410004)

关键词: 油茶; 果糖 - 1,6 - 二磷酸醛缩酶; 基因克隆; 基因表达; 亚细胞定位

中图分类号: S718.46 文献标识码: A 文章编号: 1001 - 7488 (2013) 11 - 0164 - 07

Molecular Characterization and Expression Analysis of Fructose-1,6-Diphosphate Aldolase Gene (*CoFBA4*) from *Camellia oleifera*

Zeng Yanling Tan Xiaofeng Jiang Yao Liu Min Wang Jianyong Zhou Junqin

(Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees of Ministry of Education Key Laboratory of Non-Wood Forest Products of State Forestry Administration Central South University of Forestry and Technology Changsha 410004)

Abstract: Fructose-1,6-diphosphate aldolase (FBA) in plants is not only one of the key regulatory enzyme in glycolysis pathway but also provide substrate source for two key components of oil synthesis. In this paper, a new *FBA* full-length cDNA of *Camellia oleifera* seed was isolated and cloned by RACE technology, and was named *CoFBA4* (GenBank number: JX914590). *CoFBA4* had an open reading frame with 1 185 base pairs encoding 394 amino acids. Sequence analysis showed that *CoFBA4* had nearest genetic distance with *FBA* of *Arabidopsis thaliana*, and belonged to subfamily A. *CoFBA4* contained glycosylation and fructose-1,6-diphosphate aldolase activity site, but had no transmembrane domain. *CoFBA4* belonged to hydrophilic protein. Subcellular localization analysis showed that *CoFBA4* acted out of cell. There was a positive relationship between expression abundance of *CoFBA4* gene and oil yield from different superior clones during the same maturity period.

Key words: *Camellia oleifera*; fructose-1,6-diphosphate aldolase; gene cloning; gene expression; subcellular localization

果糖 - 1,6 - 二磷酸醛缩酶 (fructose-1,6-diphosphate aldolase, FBA, EC4. 1. 2. 13), 简称醛缩酶, 是糖酵解代谢途径中第 4 步关键酶, 催化果糖 - 1,6 - 二磷酸 (Fru-1,6-BP) 可逆地裂解为磷酸二羟丙酮 (DHAP) 和 3 - 磷酸甘油醛 (G-3-P) (Rutter, 1964)。其中, DHAP 经甘油磷酸脱氢酶的催化, 还原生成 3 - 磷酸甘油, 然后在脂酰转移酶的作用下生成磷脂酸, 再经磷脂酸磷酸酶水解, 形成油脂合成必需的酯化甘油骨架 (Vigeolas *et al.*, 2007); G-3-P 则经过多步反应最终形成丙酮酸, 产生乙酰辅酶 A, 经乙酰辅酶 A 羧化酶作用形成脂肪酸合成的底物丙二酸单酰辅酶 A, 经过一系列聚合反应形成油脂合成的另一必需元素脂肪酸 (Thelen *et al.*, 2002)。

油茶 (*Camellia oleifera*) 是我国大力推广的优良食用油料树种, 但产油率低是制约油茶产业快速发

展的主要原因。为了从根本上提高油茶产油率, 近年来关于油茶油脂合成代谢途径调控基因的研究较多 (谭晓风等, 2008a; 2008b; 张党权等, 2008), 但是大部分都集中在脂肪酸方面, 对于调控甘油三磷酸的基因研究甚少。油茶果糖 - 1,6 - 二磷酸醛缩酶不仅影响脂肪酸的合成, 而且为油脂骨架的构建提供原料。因此, 本文根据本实验室构建的油茶种仁转录组数字化文库分析, 从油茶种仁中分离克隆了 *CoFBA4* 的全长 cDNA, 采用生物信息学方法对其进行了较为系统的分析, 并在此基础上开展了亚细胞定位研究及表达差异检测。

1 材料与方法

1.1 材料 油茶优良品种 ‘华硕’ (‘HS’) (谭晓风等, 2011) 采自湖南省长沙市望城县东城镇中南林

收稿日期: 2013 - 04 - 03; 修回日期: 2013 - 06 - 29。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070603); 中南林业科技大学青年基金重点项目 (QJ2011008A)。

* 谭晓风为通讯作者。

业科技大学油茶基地, ‘华鑫’ (‘HX’)、‘华金’ (‘HJ’)、‘衡东 65’ (‘HD65’)、‘衡东 17’ (‘HD17’)、‘茶陵 78’ (‘CL78’)、‘茶陵二仙 268’ (‘CLEX268’)、‘茶陵二仙 343’ (‘CLEX343’) 等品种采自株洲马家河油茶基地, 采样后迅速存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱备用。本生烟 (*Nicotiana benthamiana*)、载体 pEGAD 和农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3103 为湖南大学生物学院生物能源与材料研究中心惠赠, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 \square 为本实验室保藏。

1.2 酶与试剂 TransStart™ FastPfu DNA Polymerase 和 pEASY-Blunt Simple Cloning Kit 购自北京全式金生物技术有限公司, $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ 、质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司, RNA 提取和反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司, QuantiFast SYBR Green PCR Kit 购自 QIAGEN 公司。

1.3 方法 1) 总 RNA 提取与 cDNA 合成 取油茶近成熟种仁, 根据 RNA 提取和反转录试剂盒说明书提供的方法提取总 RNA, 电泳检测之后, 逆转录成 cDNA 第 1 链, 用 RNaseH 消化 cDNA 产物。

2) 全长 cDNA 克隆 根据本实验室构建的 ‘华硕’ 油茶转录组数据库得到的 *CoFBA4* 基因序列设计特异引物, 分别为 CoFBA4F: GTCCTCCTCCTGC CGATTCCGCACT; CoFBA4R: AATCGGCAGGAGGAGGACGATCCAG, 由北京华大生物技术有限公司合成。PCR 反应体系 ($50\text{ }\mu\text{L}$) 为 $5' \times \text{Trans Start Fast Pfu Buffer (Mg}^{2+} \text{ plus)}$ $10.0\text{ }\mu\text{L}$, $2.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs $5.0\text{ }\mu\text{L}$, cDNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$, Trans Start Fast Pfu DNA Polymerase $1.0\text{ }\mu\text{L}$, CoFBA4F ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, CoFBA4R ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$, 超纯水 $31.0\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min ; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温。采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 根据试剂盒说明进行回收连接, 转化大肠杆菌 DH5 \square 菌株, 抗生素筛选后提取阳性克隆质粒, 委托上海博尚生物技术有限公司测序。

3) 序列生物信息学分析 利用 NCBI 的 BLAST 功能 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 搜索同源的核苷酸序列及氨基酸序列; 利用 MEGA 4.0 (<http://www.bio-soft.net>) 程序的 UPGMA 算法构建 FBA 蛋白的系统进化树; 利用软件 AnthePro 5.0 (<http://www.bio-soft.net>) 进行蛋白跨膜结构预测, <http://cello.life.nctu.edu.tw> 在线进行亚细胞定位; <http://expasy.org/tools/protscale>.

html 在线分析蛋白亲疏水性; <https://www.predictprotein.org> 在线分析蛋白二级结构。

4) 不同无性系特异表达与出油率检测 取不同无性系油茶种仁提取 RNA, 逆转录为 cDNA, 采用实时荧光 PCR 技术确定 *CoFBA4* 基因的相对表达量, 每样做 3 个平行重复检测。PCR 引物分别为 qCoFBA4F: GAGATTCTTCTTGATGGGGAT; qCoFBA4R: CATAGTGAGCGTGTATTTGGC。PCR 反应体系为 $2 \times \text{QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix}$ $12.5\text{ }\mu\text{L}$, qCoFBA4F ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, qCoFBA4R ($10\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, cDNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$, 超纯水 $9.5\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , 共 40 个循环。油脂提取采用索氏提取法 (谢鹏等, 2010), 出油率 = (提取油茶种仁的油脂质量/油茶种仁干粉质量) $\times 100\%$ 。利用软件 SPSS Statistics 17.0 (<http://www.stathome.cn>) 进行统计学分析。

5) 表达载体构建 根据载体 pEGAD 多克隆位点设计 $5'$ 端添加 *EcoRI* 酶切位点的上游引物 CoFBA4ZF: $5'$ -CCGGAATTCATGGCGTGTTCGAG TT- $3'$; $5'$ 端添加 *Sam I* 酶切位点的下游引物 CoFBA4ZR: $5'$ -TCCCCGGGTTAGTAGGTATA GCC- $3'$ 。以阳性质粒为模板 PCR 扩增, 回收连接至 pEASY-Blunt 载体上, 经测序正确后采用 *EcoRI* 和 *Sam I* 双酶切连接至载体 pEGAD 多克隆位点, 构建包含 *CoFBA4* 和 eGFP 融合植物表达载体。

6) 亚细胞定位观察 将融合植物载体转化农杆菌, 挑取阳性克隆单菌落接种于 3 mL 含有利福平 (Rif, $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和卡那霉素 (Kan, $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 液体培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 $16 \sim 24\text{ h}$ 。取 1 mL 活化后菌液于 50 mL 同样的 LB 培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $200\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养至 OD_{600} 为 $0.8 \sim 1.0$ 。 $3\text{ }000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 20 min , 收集菌体细胞, 用终浓度为 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 、 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES (调节 pH 至 5.7)、 $200\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮的无菌水溶液重悬至 OD_{600} 为 1.0。室温放置 3 h 后, 用去掉针头的无菌 1 mL 针筒浸润生长 1 个月左右烟草植株中部完全伸长的 3 个叶片。接种后的烟草植株置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光/暗周期 ($16\text{ h}/8\text{ h}$) 培养 36 h , 将浸润部位剪成 $0.5 \sim 1.0\text{ cm}^2$ 小块, 叶背面朝上, 在激光共聚焦显微镜下观察 eGFP 的荧光信号, 分析 *CoFBA4* 蛋白的亚细胞定位。同时, 采用基因枪法将重组质粒转化洋葱 (*Allium cepa*) 表皮细胞, 观察 eGFP 的荧光信号 (Hiei *et al.*, 1994)。

2 结果与分析

2.1 *CoFBA4* 基因全长 cDNA 克隆 根据油茶种子转录组数据设计特异引物,结合 RACE 技术,获得 1 643 bp 左右的目的片段,测序结果表明,其中包含 193 bp 的 5' 端非编码区、265 bp 的 3' 非编码区和 1 个 1 185 bp 的完整开放阅读框,编码 394 个氨基酸,分子质量为 42 740.4 Da,等电点理论值为 7.55,即生理中性下该蛋白为碱性。带负电荷残基 (Asp + Glu) 数为

40,带正电荷残基 (Arg + Lys) 数 41,分子式为 $C_{1884}H_{2988}N_{524}O_{582}S_{14}$ 。估算的半寿期 (half-life) 分别为: 30 h (哺乳动物网状细胞,体外)、>20 h (酵母,体内)、>10 h (大肠杆菌,体内); 稳定指数 (II) 为 42.28,属于不稳定蛋白。含有果糖-1,6-二磷酸醛缩酶中的底物特异结合位点: R_{91}, K_{181}, K_{263} (图 1)。将该油茶果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因命名为 *CoFBA4*, GenBank 登录号为 JX914590。

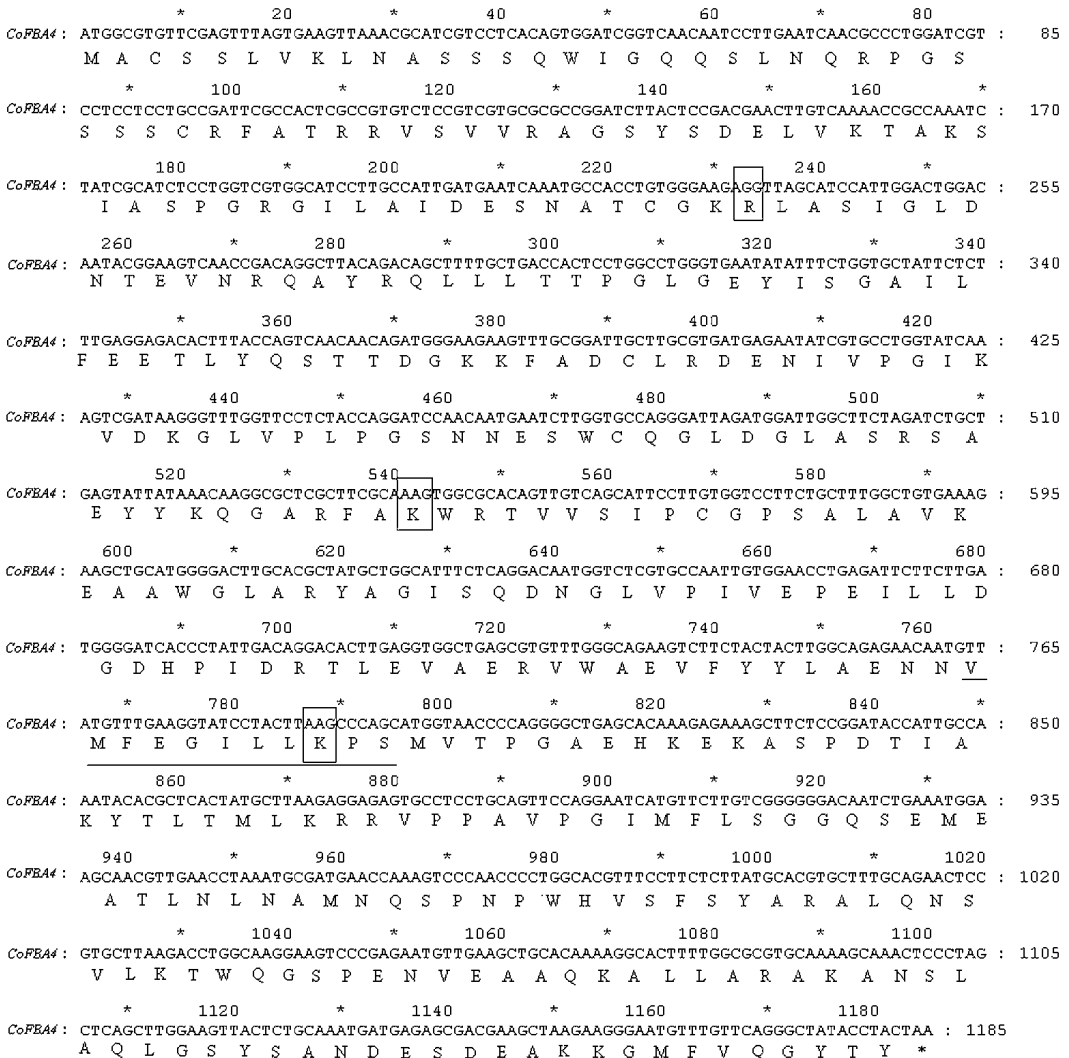


图 1 *CoFBA4* 基因编码区核酸序列及推导氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and predicted amino acid sequence of *CoFBA4*

方框区为底物特异结合位点,下划线部分为果糖二磷酸醛缩酶活性位点。

Specificity binding sites in box, fructose-1,6-diphosphate aldolase activity site with underline.

2.2 *CoFBA4* 系统进化树分析 自然界中存在 2 种机制的果糖-1,6-二磷酸醛缩酶: I 型和 II 型。高等真核生物中主要存在的是 I 型果糖-1,6-二磷酸醛缩酶,特别是动物和高等植物 (Schnarrenberger *et al.*, 1990)。根据进化树结果 (图 2),来源不同的 20 条 FBA 蛋白家族可分为 A,

B 2 个亚族。A 亚族支系庞大,既包含藻类也含有草本和林木类 FBA,一方面说明该亚族分化较早,另一方面本文所选 2 种藻类 [盐藻 (*Dunaliella salina*) 和衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)] 均属于 A 亚族原始分支,说明藻类 FBA 进化较慢,且 A 亚族植物 FBA 可能较 B 亚族的植物 FBA 构型或酶活

性等方面更接近 II 型醛缩酶; B 亚族较 A 亚族分化晚些,且主要包含植物类 FBA,说明该分支可能均为 I 型醛缩酶,与 A 亚族醛缩酶行使的功能有较大差异。*CoFBA4* 归为 A 亚族,与拟南芥 (*Arabidopsis*

thaliana) 遗传距离最近为 0.043,与葡萄遗传距离最远为 0.677,这说明 *CoFBA4* 可能是油茶果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因家族中分化早期的成员之一。

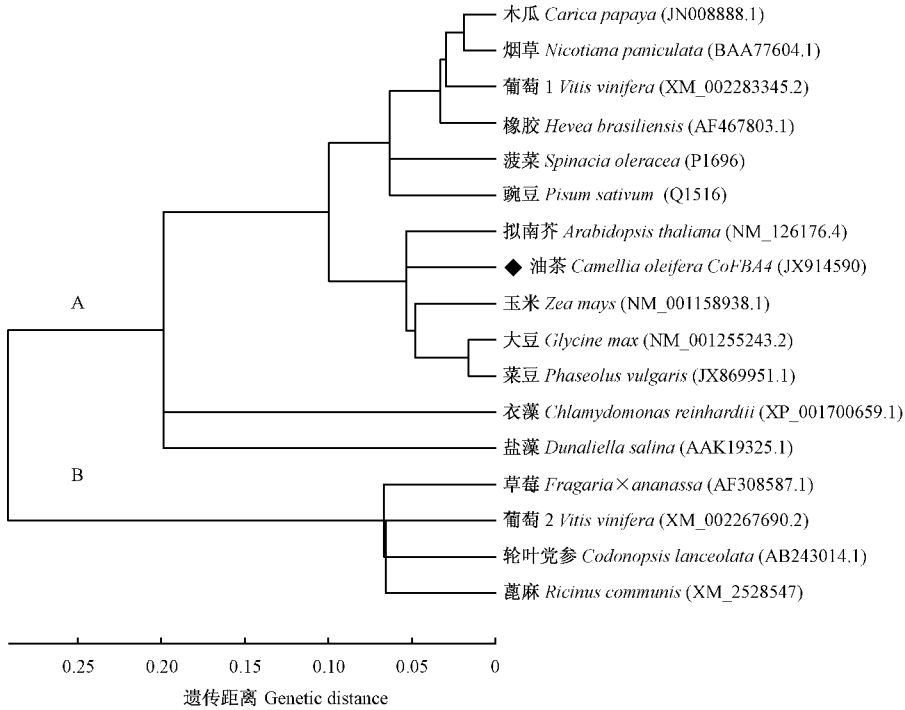


图 2 *CoFBA4* 基因编码蛋白的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of *CoFBA4* protein

2.3 *CoFBA4* 氨基酸序列分析及结构预测 采用生物信息学方法分析,*CoFBA4* 推测 5—10, 38, 42—44, 54—56, 61—69, 78—83, 85, 97, 100—102, 107—116, 139—141, 144—151, 161—163, 166, 183—201, 204—208, 213, 216—224, 228, 235, 239—240, 242—243, 245—248, 253—254, 257—266, 285—287, 297—305 (最大疏水值位于第 301 个残基, 赋值 1.800), 315—317, 330, 332—333, 338, 340, 356—359, 361—364, 367, 369, 371—372, 390 等区段的计 119 个残基具疏水性, 占全部残基总数的 30.20%, 由此可以推测油茶 *CoFBA4* 为亲水性的蛋白。

蛋白质二级结构预测结果显示, *CoFBA4* 蛋白

的二级结构中 α -螺旋(用 H 表示)占 43.65%, β -折叠(用 E 表示)占 12.18%, 无规则卷曲(用 L 表示)占 44.16%。包含了 1 个果糖二磷酸醛缩酶活性位点, 位于第 225—265 位氨基酸外, 还包括 N-糖基化位点 3 个 (10—13, 72—75, 155—158), cAMP 和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点 1 个 (37—40), 蛋白激酶磷酸化位点 3 个 (31—33, 36—38, 54—56), 酪蛋白激酶磷酸化位点 5 个 (46—49, 121—124, 153—156, 309—312, 375—378), 酪氨酸激酶磷酸化位点 1 个 (241—249), N-豆蔻酰化位点 5 个 (27—32, 83—88, 176—181, 347—352, 372—377), 酰胺化位点 2 个 (75—78, 124—127)。经分析, *CoFBA4* 蛋白不含跨膜区(图 3)。

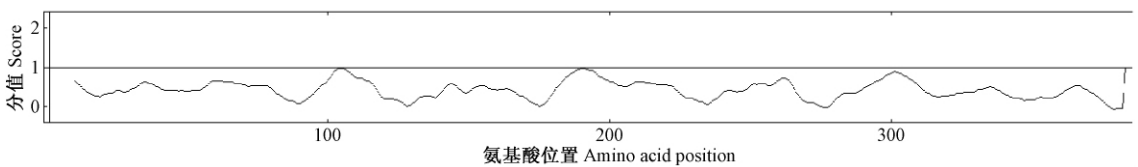


图 3 *CoFBA4* 基因编码蛋白的跨膜结构预测

Fig. 3 Transmembrane domains prediction of *CoFBA4* protein

分值大于 1.0 时说明该区域为跨膜结构, 分值小于 1.0 时说明该区域无跨膜结构。

Region with transmembrane structure if scores > 1.0, region without transmembrane structure if scores < 1.0.

2.4 不同无性系种仁出油率及*CoFBA4* 基因表达差异 以油茶 *GAPDH* 基因作为内参(王保明, 2012), 采用实时荧光定量 PCR 的方法对油茶不同无性系 10 月 18 日采收的种仁中 *CoFBA4* 基因进行相对表达丰度分析。结果(图 4)显示, 花期不同的无性系之间比较, 存在表达量低出油率高、表达量高出油率低的现象, 采用双变量相关性统计分析, 结果显示显著性为 0.488, 说明相关性不强。但是, 根据采摘时花期分为 3 组: 花后约 365 天采摘、花后约 350 天采摘以及花后约 335 天采摘。取组员最多的进行统计学分析(表 1), 结果显示 Pearson 相关性为 0.967, 显著性为 0.033, 不仅说明二者显著相关, 而且表现为花期接近的无性系种仁 *CoFBA4* 基因表达丰度与出油率基本呈正相关关系。

2.5 亚细胞定位观察 将 *CoFBA4* 推导氨基酸序列在线进行亚细胞定位预测, 结果显示排在前三位的为外膜、细胞外和周质, 可靠性分别为 2.100, 1.488 和 0.685。采用基因枪法将带有绿色荧光蛋白基因(*eGFP*)的目的融合表达载体转化至洋葱表皮细胞, 同时通过注射烟草法将融合表达载体转化烟草叶片, 获得高效瞬时表达; 在激光共聚焦显微镜下观察 *eGFP* 荧光信号, 从烟草亚细胞定位观察看, *CoFBA4* 可能定位于细胞膜或细胞膜与细胞壁

之间, 而结合洋葱表皮亚细胞定位, 发现 *CoFBA4* 融合蛋白主要在细胞壁与细胞膜之间的位置表达, 说明 *CoFBA4* 可能定位于细胞外(图 5), 这与 *CoFBA4* 亚细胞定位预测结果基本一致。

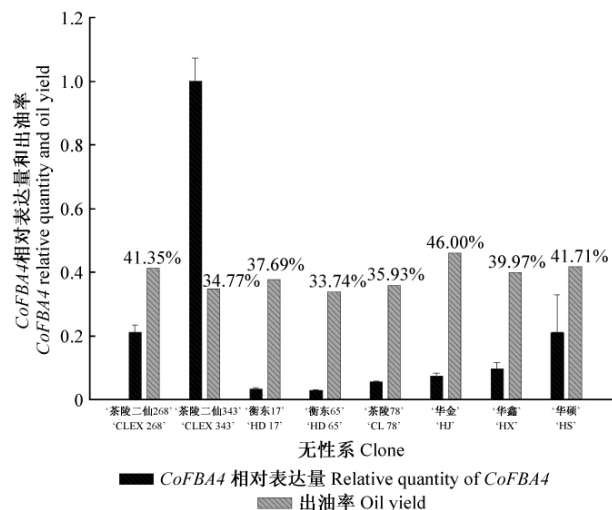


图 4 油茶无性系种仁 *CoFBA4* 基因表达丰度及出油率

Fig. 4 Expression abundance of *CoFBA4* gene and oil yield from different superior clones
出油率来自参考文献(谢鹏等, 2010)。
Oil yield of different superior clones came from reference (谢鹏等, 2010)

表 1 *CoFBA4* 相对表达量与出油率相关性

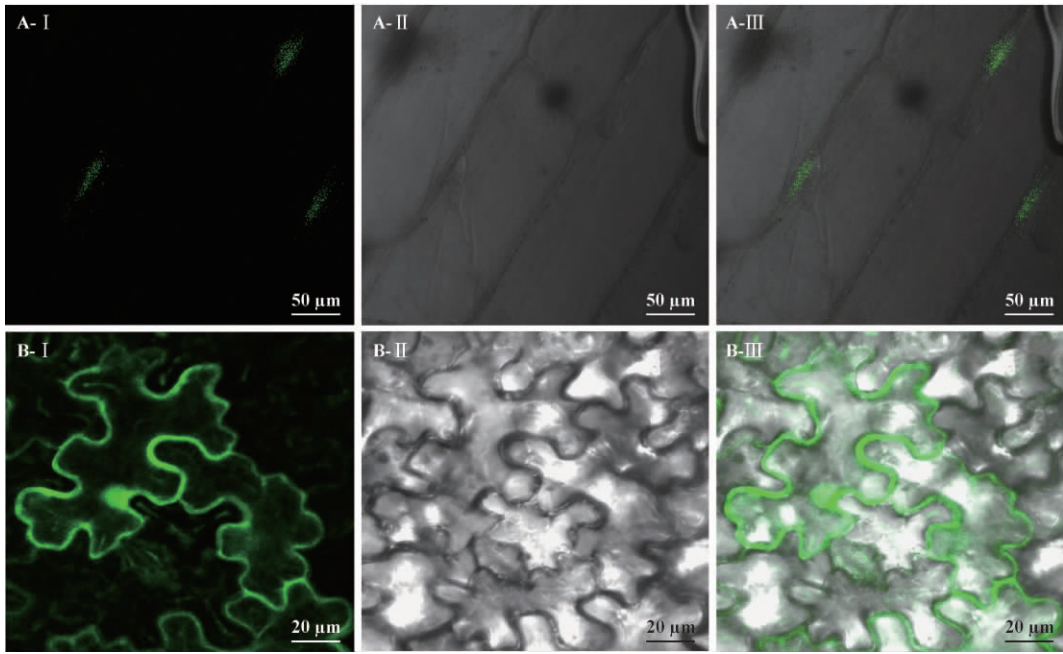
Tab. 1 Correlation between *CoFBA4* relative expression level and oil yield

油茶无性系 Superior clones	<i>CoFBA4</i> 相对表达量 Relative quantity of <i>CoFBA4</i>	出油率 Oil yield (%)	采摘期 Picking period	Pearson 相关性 Pearson correlation
'茶陵二仙 268' 'CLEX268'	0.211 20	41.35	花后约 350 天	0.967*
'华硕' 'HS'	0.211 32	41.71	About 350 days	
'衡东 17' 'HD17'	0.032 47	37.69	after blossom	
'华鑫' 'HX'	0.095 63	39.97		

3 结论与讨论

油茶常规育种周期长, 且常规杂交育种可能伴有遗传累赘。采用基因工程新方法改良油茶, 可实现单一性状或多个性状的定向改良, 大大缩短育种周期, 而且不会带有遗传累赘。20 世纪 90 年代, 我国开始启动油茶分子生物学方面的研究, 近年来更是研究的热点, 构建了油茶近成熟种子 EST 文库(谭晓风等, 2006)、油茶种仁转录组和表达谱数据库(林萍等, 2011; 陈英等, 2011), 挖掘出大量与油茶油脂合成相关基因。糖酵解途径是油脂合成代谢途径的上游代谢途径, 该途径各调控酶的作用不仅影响糖酵解的速率和产物而且影响油脂合成的效率, 譬如, Focks 等(1998)曾得到一个丙酮酸激酶基

因缺失的皱叶拟南芥突变体, 研究发现其 80% 的种子表现出随糖酵解活性降低而含油量下降的特性。果糖-1,6-二磷酸醛缩酶是糖酵解代谢途径中枢纽调控酶, 其酶促产物为油脂合成所需脂肪酸和甘油同时提供不可或缺的原料。在植物细胞中, 果糖-1,6-二磷酸醛缩酶至少存在 2 种异构形式, 它们有部分同源的基因编码, 但结构不同且分别定位于细胞质或叶绿体(Tsutsumi *et al.*, 1994)。本研究亚细胞定位结果显示 *CoFBA4* 定位于细胞外, 且系统进化分析将其归为支系庞大的 A 亚族, 这说明植物醛缩酶随着生物进化、基因家族成员的增加, 各自表达部位和行使功能也出现了更多分化。通常情况下, 人们认为分泌蛋白需要借助信号肽的疏水核心穿过内质网(ER)膜, 但 Hamman 等依据多肽转运

图 5 *CoFBA4* 基因亚细胞定位Fig. 5 Subcellular localization of *CoFBA4* gene

A: 洋葱表皮细胞; B: 烟草。I: 紫外激发的荧光信号; II: 可见光的信号; III: I 和 II 叠加。

A: Epidermal cells of onion; B: Tobacco. I: The fluorescence signal ultraviolet excitation; II: Signal light; III: I add II.

过程处于亲水环境的现象提出了亲水转位子孔道的转运模式,这种模式中由结合蛋白 BiP 调控 ER 膜的选择通透性(刘丹如等, 2006), N-糖基化修饰可以使蛋白质打上不同标记,改变多肽构象,在高尔基体上还可形成蛋白聚糖被分泌到细胞外形成细胞外基质或黏液层(周蕾等, 2011),这些可能是促成没有跨膜结构的 *CoFBA4* 定位于细胞外的原因,但具体是否如此还需进一步证明。

虽然目前人们对植物果糖-1,6-二磷酸醛缩酶基因家族的功能研究主要集中在激素调控、抗逆性等方面(吴耀荣等, 2006; Rajjou *et al.*, 2006; Konishi *et al.*, 2004; Osakabe *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2007),但有研究表明,在烟草体内过量表达拟南芥叶绿体醛缩酶,总生物量明显增加,尤其是在高 CO_2 浓度($1\ 375\ \text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$)时,转基因植株生物量达到野生型植株的 2.2 倍,这说明过量表达醛缩酶能促进 CO_2 的固定(Uematsu *et al.*, 2012),从而促进糖类代谢和脂类代谢。本研究结果也显示,相近花期的油茶种仁 *CoFBA4* 基因表达丰度与出油率基本呈显著正相关关系,理论上初步证明通过分子设计育种方法改良油茶果糖-1,6-二磷酸醛缩酶的表达可以提高油茶产量或单位面积出油率。

参 考 文 献

陈 英,江香梅,张 露,等. 2011. 基于油茶组 59 万条 EST 序列的

转录组学初步分析. 林业科学,47(2): 161-163.

林 萍,曹永庆,姚小华,等. 2011. 普通油茶种子 4 个发育时期的转录组分析. 分子植物育种,9(4): 498-505.

刘丹如,宋长征,张更林. 2006. 植物表达分泌蛋白的运输及定位. 生物技术通报,17(3): 425-428.

谭晓风,胡芳名,谢禄山,等. 2006. 油茶种子 EST 文库构建及主要表达基因的分析. 林业科学,42(1): 43-48.

谭晓风,陈鸿鹏,张党权,等. 2008a. 油茶 FAD2 基因全长 cDNA 的克隆和序列分析. 林业科学,44(3): 70-75.

谭晓风,王威浩,刘卓明,等. 2008b. 油茶 ACP 基因的全长 cDNA 克隆及序列分析. 中南林业科技大学学报,28(4): 8-14.

谭晓风,袁德义,袁 军,等. 2011. 大果油茶良种‘华硕’. 林业科学,47(12): 184.

王保明. 2012. 油茶 ACCase 基因的克隆及功能研究. 长沙: 中南林业科技大学博士学位论文.

吴耀荣,谢 旗. 2006. ABA 与植物胁迫抗性. 植物学通报,23(5): 511-518.

谢 鹏,谭晓风,王 渊,等. 2010. DTOPSIS 法在油茶优良无性系综合评价中的应用研究. 广东农业科学,(6): 10-11.

张党权,谭晓风,陈鸿鹏,等. 2008. 油茶 SAD 基因的全长 cDNA 克隆及生物信息学分析等. 林业科学,44(2): 155-159.

周 蕾,顾 建. 2011. N-糖基化位点鉴定方法和非经典 N-糖基化序列. 生命科学,23(6): 605-611.

Focks N, Benning C. 1998. Low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol*, 118(1): 91-101.

Hiei Y, Ohta S, Komari T, *et al.* 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, 6(2): 271-282.

- Jiang Y, Yang B, Harris N S, *et al.* 2007. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*, 58 (17) : 3591 – 3607.
- Konishi H, Yamane H, Maeshima M, *et al.* 2004. Characterization of fructose-bisphosphate aldolase regulated by gibberellin in roots of rice seedling. *Plant Molecular Reporter*, 56 (6) : 839 – 848.
- Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, *et al.* 2005. Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17 (4) : 1105 – 1119.
- Rajjou L, Belghazi M, Huguet R, *et al.* 2006. Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiol*, 141 (3) : 910 – 923.
- Rutter W J. 1964. Evolution of aldolase. *Federation Proceedings*, 23 : 1248 – 1257.
- Schnarrenberger C, Jacobshagen S, Muller B, *et al.* 1990. Evolution of isozymes of sugar phosphate metabolism in green algae. *Progress in Clinical and Biological Research*, 344 : 743 – 764.
- Thelen J J, Ohlrogge J B. 2002. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metabolic Engineering*, 4 (1) : 12 – 21.
- Tsutsumi K, Kagaya Y, Hidaka S, *et al.* 1994. Structural analysis of the chloroplastic and cytoplasmic aldolase-encoding genes implicated the occurrence of multiple loci in rice. *Gene*, 141 (2) : 215 – 220.
- Uematsu K, Suzuki N, Iwamae T, *et al.* 2012. Increased fructose 1, 6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, 63 (8) : 3001 – 3009.
- Vigeolas H, Waldeck P, Zank T, *et al.* 2007. Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotechnology Journal*, 5 (3) : 431 – 441.

(责任编辑 徐 红)