

谢佳彤, 孙丽丹, 陈晓曼, 等. 麻风树 *JcWR11* 基因克隆及功能分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38( 2 ): 334-342  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.02.006

## 麻风树 *JcWR11* 基因克隆及功能分析

谢佳彤, 孙丽丹, 陈晓曼, 方形彤, 张苗苗, 赵雨凡, 杨冉, 王琦媛, 杨同文, 唐跃辉

(周口师范学院生命科学与农学院, 河南 周口 466001)

**摘要:** WR11 是 AP2 类转录因子的成员, 在植物生长发育和脂肪酸合成途径中起着重要的调控作用。通过 RT-PCR 技术从麻风树中克隆了 1 个 AP2 家族基因, 将其命名为 *JcWR11*。*JcWR11* 基因开放阅读框全长 1 137 bp, 编码 378 个氨基酸。表达模式分析结果表明, 在麻风树种子胚中没有检测到 *JcWR11* 基因的表达, 然而该基因在麻风树种子胚乳中高表达。亚细胞定位结果表明, *JcWR11* 基因编码 1 个核定位蛋白质。表型分析结果表明, 提高 *JcWR11* 基因的表达量不影响转基因水稻的生长发育, 但是改变了转基因植株叶片、胚乳中脂肪酸组分的含量, 并且提高了转基因水稻叶片、胚乳中的含油量。qRT-PCR 结果表明, 脂肪酸合成相关基因在 *JcWR11* 转基因水稻中的相对表达量显著高于野生型。研究结果为将来研究 *JcWR11* 基因在麻风树种子胚乳发育及油脂代谢途径中的功能提供了理论依据和新的基因资源。

**关键词:** 麻风树; *JcWR11*; AP2 家族; 转基因水稻; 胚乳

**中图分类号:** S727.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)02-0334-09

## Cloning and functional analysis of *JcWR11* gene from physic nut

XIE Jia-tong, SUN Li-dan, CHEN Xiao-man, FANG Tong-tong, ZHANG Miao-miao, ZHAO Yu-fan, YANG Ran, WANG Qi-yuan, YANG Tong-wen, TANG Yue-hui

(College of Life Science and Agronomy, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

**Abstract:** WR11 is a member of AP2 transcription factors and plays an important regulatory role in plant growth and development and fatty acid synthesis. In this study, an AP2 family gene was cloned from physic nut by RT-PCR and named *JcWR11*. The open reading frame of *JcWR11* gene was 1 137 bp in length, encoding 378 amino acids. The results of expression pattern analysis showed that the expression of *JcWR11* gene was not detected in the embryo, but it was highly expressed in the endosperm. The subcellular localization results indicated that the *JcWR11* gene encoded a nuclear localization protein. Phenotypic analysis revealed that the increase of *JcWR11* gene expression did not affect the growth and development of transgenic rice, but changed the

fatty acid composition in the leaves and endosperm of transgenic plants and increased the oil content in the endosperm and leaves of transgenic rice. The results of qRT-PCR showed that the relative expression of fatty acid synthesis-related genes in *JcWR11* transgenic rice was significantly higher than that in wild-type rice. The results provide a theoretical basis and new genetic resources for further research on the function of *JcWR11* gene in the endosperm development and lipid metabolism pathway of physic nut.

收稿日期: 2021-11-05

基金项目: 2020 年度河南省自然科学基金青年项目(202300410520); 2020 年度河南省高等学校重点科研项目(21A180028); 2021 年度河南省周口师范学院大学生创新创业训练计划项目(S202110478032); 周口师范学院大学生科研创新基金项目(ZKNU2021073)

作者简介: 谢佳彤(2000-), 女, 河南信阳人, 本科, 主要从事麻风树基因功能研究。(E-mail) 2230439874@qq.com

通讯作者: 唐跃辉, (E-mail) yhtang2005@163.com

**Key words:** physic nut; *JcWR11*; AP2 family; transgenic rice; endosperm

油不仅是生产食物的原料,也是一种重要的工业原料,具有巨大的经济价值。在植物种子中,三酰甘油(TAGs)作为一种主要的储存化合物,能够为种子发育和幼苗生长提供碳源和能量<sup>[1]</sup>。TAGs是甘油和脂肪酸酯化的产物,通过基因工程的方法提高TAG代谢途径关键酶基因*GPAT*、*LPAT*、*DGAT*的表达量,能够增加植物种子的含油量<sup>[2-4]</sup>。近年来,控制脂肪酸合成途径中多种酶活性的转录因子已经引起研究者的广泛关注。

*WR11* 是 AP2 类转录因子家族成员,包含 2 个保守的 AP2/ERF 结构域,首次是从种子表皮有皱纹的拟南芥突变体中分离出来的,命名为 *WRINKLED1*<sup>[5]</sup>。此外,在种子发育过程中,*WR11* 突变体种子不能将葡萄糖、蔗糖转化为脂肪酸合成的前体,并且种子含油量降低了 80%<sup>[5]</sup>。相反,以 *WR11* 突变体为受体,过表达 *AtWR11* 基因不仅可以恢复突变体正常的种子外观,而且与野生型相比增加了种子的含油量<sup>[6]</sup>。在玉米中,过表达 *ZmWR11* 不影响转基因植株种子萌发、叶片发育和作物产量,然而会增加转基因植株种子的含油量<sup>[7]</sup>。在大豆中,提高 *GmWR11b* 基因的表达量增加了大豆种子的含油量<sup>[8]</sup>。此外,在拟南芥中过表达油菜 *BnWR11* 基因后,通过上调脂肪酸合成基因 *EAR* 的表达量增加了种子的含油量<sup>[9]</sup>。综上所述,尽管不同物种的 *WR11* 基因已经被克隆并进行了功能分析,然而这些物种的油脂主要积累在种子胚中,而目前与油脂在植物种子胚乳中积累相关的 *WR11* 基因是否拥有相似功能的研究较少。因此,挖掘与油脂在种子胚乳中积累相关的 *WR11* 基因并对其调控机制进行研究,对于胚乳油脂含量的提高具有重要理论意义。

麻风树,又名小桐子,是一种多用途的木本植物,具有抗旱、耐盐碱、耐贫瘠、胚乳含油量高等特点,已被广泛认为是最适宜用于生产生物柴油的能源植物之一<sup>[10]</sup>。在本研究中,笔者克隆了 1 个麻风树 AP2 家族转录因子基因,将其命名为 *JcWR11*,并在水稻中分析该基因的功能,以期为麻风树及其他作物高含油品种的培育提供新的基因资源和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

本试验所用的麻风树品种为 GZQX0401 自交系,水稻材料为粳稻中花 11(ZH11)。取麻风树授粉后 29 d、35 d、41 d、45 d 种子的胚、胚乳用于表达模式分析。本试验所用高保真酶、T4 DNA 连接酶、pMD18-T 载体、限制性内切酶等试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.2 基因克隆与植物表达载体的构建

按 *JcWR11* 基因序列设计特异性引物,以麻风树种子 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 技术克隆获得 *JcWR11* 基因序列,电泳回收后将用 RT-PCR 技术扩增得到的目的基因连接到 pMD18-T 载体上,转化、扩大培养、提取质粒后送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序,随后将测序正确的目的基因从 pMD18-T 载体切下来,最后通过 T4 DNA 连接酶将回收的目的基因连接到植物表达载体上,再次将构建好的植物表达载体送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序,确保目的基因正确连接到植物表达载体上后,将植物表达载体转入农杆菌 EHA105 中保存待用。

### 1.3 *JcWR11* 基因编码蛋白质的亚细胞定位分析

以麻风树种子 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 技术克隆获得 *JcWR11* 基因的全长编码序列(不含终止密码子),再将测序正确的序列连接到亚细胞定位载体 p-GFP 上,形成 *JcWR11-GFP* 融合表达载体。然后将空载体和 *JcWR11-GFP* 融合表达载体通过聚乙二醇(PEG)介导的方法转移到拟南芥原生质体细胞中,在荧光共聚焦显微镜下观察定位结果。

### 1.4 转 *JcWR11* 基因水稻的获得

本研究以 ZH11 愈伤组织为受体,通过农杆菌 EHA105 介导的转化法将构建好的 *JcWR11* 表达载体通过转基因方法转化到水稻中<sup>[11]</sup>,通过潮霉素筛选  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(*GUS*)染色初步确定转基因植株,最后通过 RT-PCR 技术检测 *JcWR11* 基因在野生型(WT)、转基因水稻植株[包括转 *JcWR11* 基因水稻 1 号株系(OE1)、转 *JcWR11* 基因水稻 2 号株系(OE2)、转 *JcWR11* 基因水稻 3 号株系(OE3)]中的表达情况,最终确定有效转基因植株,并挑选 3 株用于后续研究。

### 1.5 转 *JcWR11* 基因水稻的表型分析

野生型和转基因水稻种子萌发后,挑选生长一致的幼苗并将其转移到水稻营养液中继续生长,14 d 后进行表型分析,选取 30 株幼苗,统计其根长和株高。

### 1.6 野生型和转基因水稻种子脂肪酸、淀粉含量的测定

脂肪酸组分的测定参考前人的研究方法<sup>[12]</sup>,所选材料为成熟的野生型水稻、转 *JcWR11* 基因水稻纯合体种子和剑叶,首先称取 50 mg 种子,用三氯甲烷彻底清洗后放入 10 ml 玻璃瓶中,随后加入 1 ml 5% (体积分数)  $H_2SO_4$  甲醇溶液、300  $\mu$ l 甲苯,并补充 20  $\mu$ l 0.2% (质量体积比) 丁基羟基甲苯溶液,以  $C_{17:0}$  作为内标(40  $\mu$ l),然后将玻璃管在 90  $^{\circ}C$  加热 1.5 h。冷却至室温后,加入 1 ml 0.9% (质量体积比) NaCl 并混合均匀,随后加入 2 ml 己烷并混合均匀,并在室温下 4 000 r/min 离心 5 min,接着将上层溶液转移到新的玻璃管中,向新的玻璃管中加入 2 ml 己烷并混合均匀,在室温、4 000 r/min 条件下离心 5 min,然后将上层溶液转移到新玻璃管中,最后使用配备火焰离子化检测器(FID)的 Agilent 7890A GC 系统仪器在 HP-88 色谱柱(30.00 mm $\times$ 0.25 mm 内径,膜厚 0.20  $\mu$ m)上通过气相色谱(GC)分析脂肪酸甲酯提取物。用野生型、转基因水稻植株成熟的种子胚乳检测淀粉含量,具体操作方法参考淀粉总量试剂盒(莱尔生物医药科技有限公司,货号:K-

TSTA-100A)说明书。

### 1.7 野生型和转基因水稻植株含油量的测定

所用材料为成熟的野生型、转基因水稻胚乳和剑叶。首先将胚乳磨碎并于 80  $^{\circ}C$  烘干,将叶片去除叶绿素后于 80  $^{\circ}C$  烘干。将去除叶绿素后磨碎的叶片粉末在干燥器中冷却后称质量,再将磨碎的粉末放入 10 ml 离心管中,然后加入 2 ml 异丙醇且于 85  $^{\circ}C$  水浴 10 min,冷却至室温后,加入 3 ml 正己烷并静置 5 min,然后剧烈振荡,接着加入 2.5 ml 15%  $Na_2SO_4$  上下颠倒后,将上层溶液转入 1 个新的玻璃管中,下层再加入 5 ml 正己烷-异丙醇(体积比 7:2)再次萃取。最后将玻璃管中萃取得到的有机相用氮气吹干,烘干过夜后在干燥器内冷却,再次称玻璃管质量。种子、叶片含油率=(含油玻璃瓶质量-玻璃瓶质量)/种子质量 $\times$ 100%。

### 1.8 RNA 的提取及基因表达情况的检测

本研究所用材料中 RNA 的提取均采用赛默飞世尔科技(中国)有限公司的 RNA 提取试剂盒(货号:12183025),cDNA 链的合成采用 TaKaRa 公司的逆转录试剂盒(货号:6215A)。定量 PCR 采用 LightCycler480 II 实时荧光定量 PCR 仪和 TB Green<sup>®</sup> Fast qPCR Mix 试剂盒,具体操作方法参照试剂盒说明书。分别用 *OsUbiquitin*、*JcActin* 作为水稻、麻风树的内参基因,用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算基因的相对表达水平,本研究所需引物序列见表 1,所有试验均进行 3 次生物学重复。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Sequences of primers used in this study

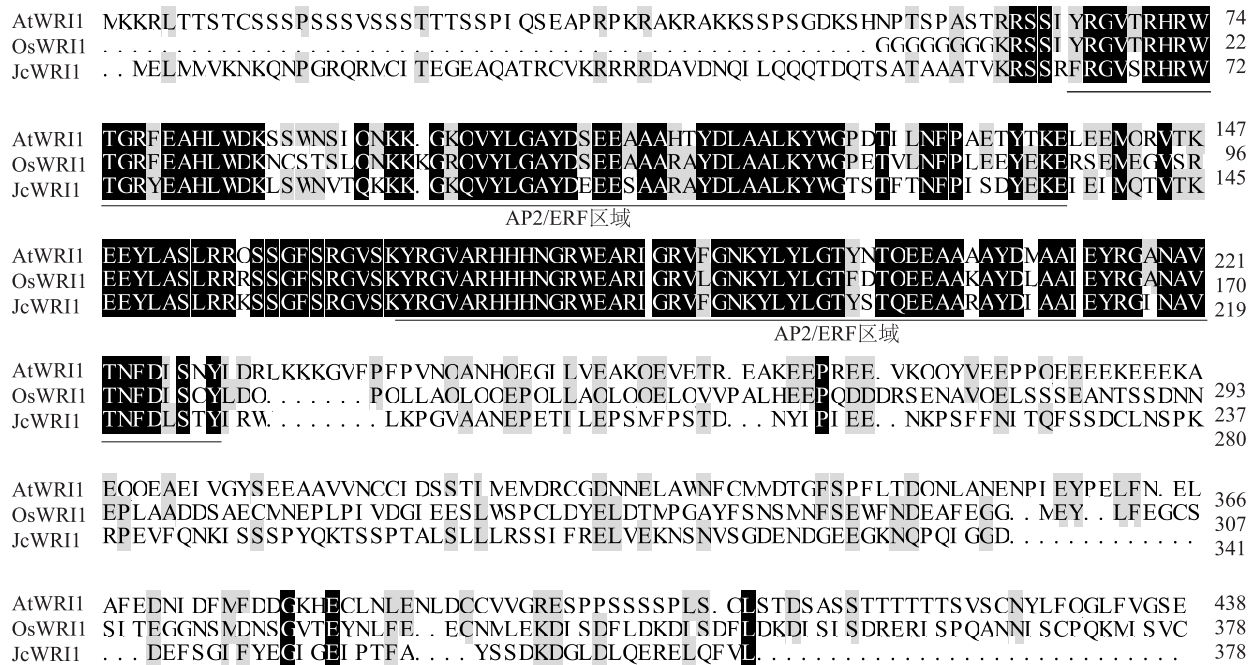
| 引物类别 | 编号                               | 正向引物序列(5'→3')           | 反向引物序列(5'→3')             |
|------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 定量引物 | <i>JcWR11</i>                    | GGAAGAACCAACCGCAGATAG   | ACACTTTGCTGTACCATGAAAACAC |
|      | <i>KASIII</i>                    | TGGCAAGGTGAAGGCAGGC     | GGATGAAATCTCGGAACGGTGT    |
|      | <i>PDH-E1<math>\beta</math></i>  | GCACACGATAGGGAAGTCCATTA | GTTCGCTCCTCCAGAGTTGC      |
|      | <i>PDH-E1<math>\alpha</math></i> | GGACCCCATACAGCCTTGAA    | GGCTTGCGTCAGCGAACTC       |
|      | <i>ENR1</i>                      | CGAAGTGGGGAACACAGCAG    | TTTATTCAAGAAACAAGCCGCA    |
|      | <i>PDH-E2</i>                    | TGGGATCAAGAACCAATGTC    | AGTGCCTCAGGGAAAAACAAT     |
|      | <i>ACP</i>                       | CGAGGAGGAGTTCCACATCAG   | CGCCCAAGGTAGAAAGTAGAGC    |
|      | <i>JcActin</i>                   | TAATGGTCCCTCTGGATGTG    | AGAAAAGAAAAGAAAAAGCAGC    |
|      | <i>OsRUB1</i>                    | TTCCATGCTGCTCTACCACAG   | AGGGTTCACAAGTCTGCCTATT    |
|      |                                  |                         |                           |
| 全长引物 | <i>JcWR11</i>                    | ATGGCGAAGAGATCGTCTCC    | TCAGTTGCACACACTGATCA      |

## 2 结果与分析

### 2.1 *JcWRI1* 基因的生物信息学分析

设计特异性引物,以麻风树种子 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 技术克隆出 *JcWRI1* 基因,随后进行测序并通过美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 网站的 BlastP 程序进行比对。比对结果表明,该基因开放阅读框全长 1 137 bp, 编码 378 个氨基酸 (GenBank 登录号: JCGZ\_09727)。多序列比对结果表明,

*JcWRI1* 基因编码的蛋白质含有 2 个保守的 AP2/ERF 结构域,且与拟南芥 AtWRI1 蛋白、水稻 OsWRI1 蛋白高度同源 (图 1)。此外,研究结果表明,在拟南芥中,第 1 个 AP2/ERF 结构域中的 VYL 基序对于维持 AtWRI1 在调控植物发育方面的功能是至关重要的<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,VYL 基序也存在于 *JcWRI1* 蛋白序列中 (图 1)。说明,VYL 基序在 WRI1 蛋白中是高度保守的。



字母底色为深色表示保守氨基酸;字母底色为浅色表示不保守氨基酸;划线部分表示 AP2/ERF 区域。

图 1 *JcWRI1* 蛋白的氨基酸序列分析

Fig.1 Amino acid sequence analysis of *JcWRI1* protein

### 2.2 *JcWRI1* 基因的表达模式分析

对麻风树不同组织及种子不同发育时期的转录组测序结果表明,*JcWRI1* 基因在根、茎和叶中没有检测到表达,仅在种子中检测到高表达。为了验证转录组测序结果的可靠性,通过 qRT-PCR 技术检测 *JcWRI1* 在麻风树种子不同发育时期的胚、胚乳中的表达。结果表明,在麻风树种子胚中没有检测到 *JcWRI1* 基因表达,仅在胚乳中检测到 *JcWRI1* 基因的表达,且在授粉后 35 d 的胚乳中相对表达量最高 (图 2)。说明,*JcWRI1* 基因也许在麻风树种子发育过程中起重要的调控作用。

### 2.3 *JcWRI1* 基因编码蛋白质的亚细胞定位分析

为了明确 *JcWRI1* 蛋白的特性,通过 RT-

PCR 克隆了 *JcWRI1* 开放阅读框序列 (不含终止子),测序后通过酶切连接的方法构建了 *JcWRI1-GFP* 融合表达载体。随后通过 PEG 介导的拟南芥原生质体转化的方法将空载体和 *JcWRI1-GFP* 融合表达载体分别转化到拟南芥原生质体细胞中。于 25 °C 过夜培养后,将拟南芥原生质体细胞置于荧光共聚焦显微镜下观察定位情况。结果表明,空载体转化的细胞中所有细胞器中都检测到了绿色荧光信号,然而在 *JcWRI1-GFP* 融合表达载体转化的细胞中,仅在细胞核中检测到了绿色荧光信号 (图 3)。本研究结果进一步表明,*JcWRI1* 基因编码 1 个核定位蛋白质。



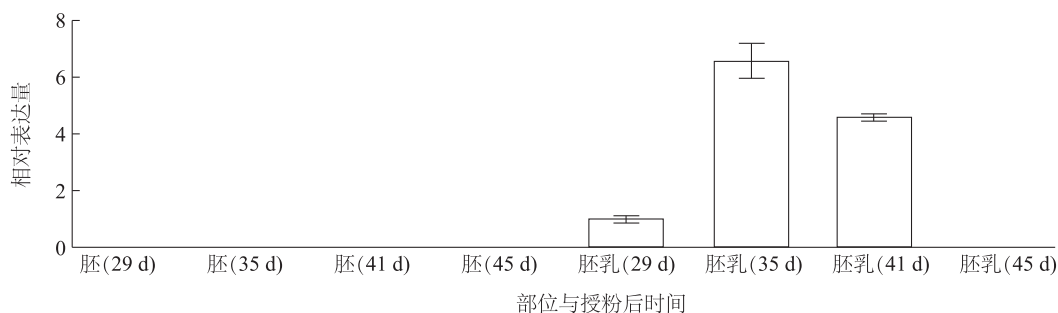
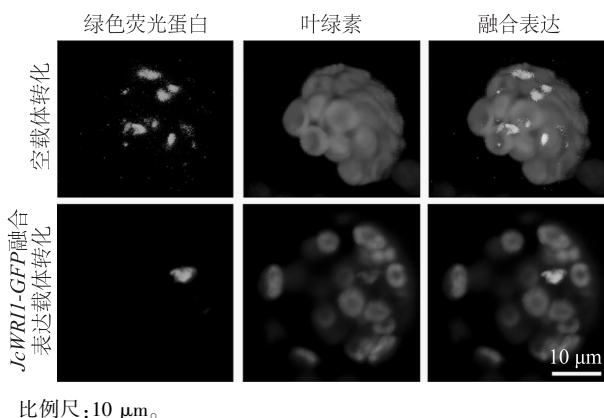


图2 qRT-PCR 分析 *JcWR11* 基因在麻风树授粉后 29 d、35 d、41 d、45 d 胚(Em)、胚乳(En)中的表达情况

Fig.2 The qRT-PCR analysis of *JcWR11* gene expression in the embryo (Em) and endosperm (En) of physic nut at 29 d, 35 d, 41 d, 45 d after pollination



比例尺:10 μm。

图3 *JcWR11* 基因编码蛋白质的亚细胞定位

Fig.3 Subcellular localization of protein encoded by *JcWR11* gene

## 2.4 转 *JcWR11* 基因水稻的表型分析

为了研究 *JcWR11* 基因的生物学功能,本研究构建了 *JcWR11* 基因过表达的转基因水稻植株,并选取 3 株转基因水稻(OE1、OE2、OE3)用于后续功能研究。RT-PCR 结果表明, *JcWR11* 基因在野生型水稻中没有表达,然而在转基因水稻中高表达。表型分析结果表明,过表达 *JcWR11* 基因不影响转基因水稻根、地上部分的生长发育。统计学分析结果表明,转 *JcWR11* 基因水稻根长、地上部分的高度与野生型植株相比没有明显差异(图 4)。为了分析提高 *JcWR11* 表达量是否会影响转基因水稻的生长发育情况,本研究进一步统计了成熟植株的高度,结果表明,野生型、转基因水稻(OE1、OE2、OE3 株系)的株高分别为 89.52 cm、88.80 cm、88.62 cm 和 88.90 cm,进一步表明过表达 *JcWR11* 基因不会影响转基因水稻的生长发育。

## 2.5 转 *JcWR11* 基因水稻胚乳脂肪酸成分分析

为了明确提高 *JcWR11* 基因表达量是否会影响

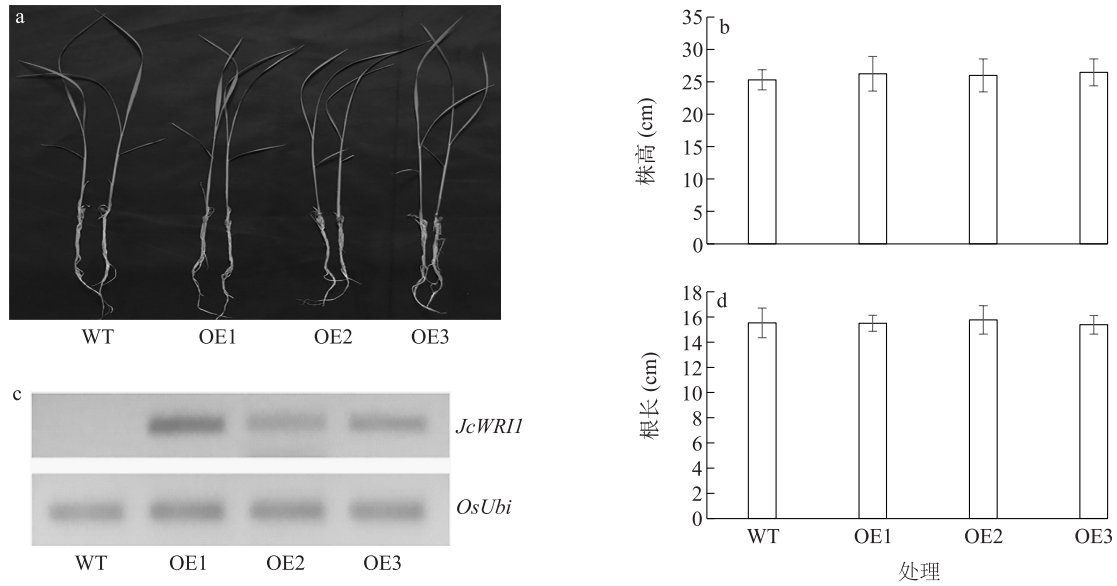
转基因水稻的脂肪酸成分,通过气相色谱的方法分析了野生型、转基因水稻胚乳的脂肪酸成分。由图 5 可以看出,水稻胚乳中主要含有  $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ 、 $C_{20:0}$  和  $C_{20:1}$ , 其中  $C_{16:0}$ 、 $C_{18:1}$  和  $C_{18:2}$  为主要脂肪酸成分,三者占比约为 90%。研究结果还显示,与野生型植株相比,转 *JcWR11* 基因植株中  $C_{14:0}$ 、 $C_{18:0}$  和  $C_{20:0}$  脂肪酸成分的含量显著低于野生型,然而  $C_{16:1}$  和  $C_{18:1}$  在转基因水稻中的含量显著高于野生型。综上所述,过表达 *JcWR11* 改变了转基因水稻胚乳中脂肪酸成分。

## 2.6 转 *JcWR11* 基因水稻叶片脂肪酸成分分析

为了验证过表达 *JcWR11* 基因是否会影响转基因水稻叶片脂肪酸组分,笔者进一步分析了野生型和转 *JcWR11* 基因水稻旗叶中脂肪酸组分。结果表明,  $C_{16:0}$ 、 $C_{18:2}$  和  $C_{18:3}$  为水稻旗叶的主要脂肪酸成分,三者占有组分比例为 89%;与野生型水稻相比,  $C_{16:1}$  在转基因水稻中的含量显著提高,然而  $C_{18:0}$  在转基因水稻中的含量却显著低于野生型(图 6)。

## 2.7 转 *JcWR11* 基因水稻叶片和胚乳中含油量分析

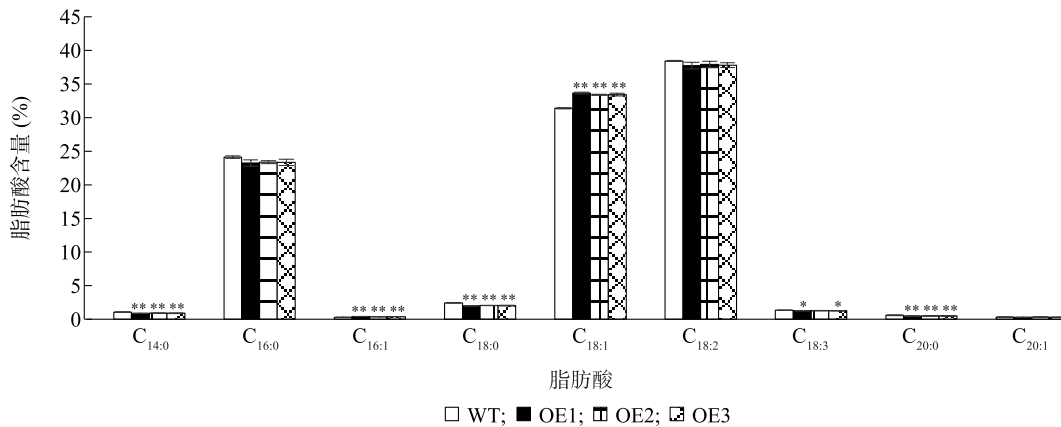
表达模式分析结果表明, *JcWR11* 基因主要在麻风树胚乳中表达(图 2)。此外前人研究发现,麻风树中的油主要积累在胚乳中,且含量高达 50%。因此,为了验证 *JcWR11* 基因在麻风树种子胚乳发育中的功能,首先检测了转 *JcWR11* 基因植株种子的千粒质量。图 7b 结果表明,与野生型水稻相比,转基因水稻种子千粒质量没有显著差异。随后,检测了野生型水稻和转 *JcWR11* 基因水稻种子胚乳中的含油量、淀粉含量,结果表明,与野生型水稻相比,过表达 *JcWR11* 基因显著增加了转基因水稻种子胚乳的含油量(图 7a),但是降低了转基因水稻种子胚乳中淀粉含量(图 7c)。



a.转 *JcWR11* 基因水稻和野生型植株表型分析;b.转 *JcWR11* 基因水稻和野生型株高;c.*JcWR11* 基因在野生型和转基因水稻中的表达;d.转 *JcWR11* 基因水稻和野生型根长。WT:野生型;OE1:转 *JcWR11* 基因水稻 1 号株系;OE2:转 *JcWR11* 基因水稻 2 号株系;OE3:转 *JcWR11* 基因水稻 3 号株系。

图 4 转 *JcWR11* 基因水稻植株的表型分析

Fig.4 Phenotype analysis of *JcWR11* transgenic rice plants



\*\* 表示转基因水稻与野生型相比差异显著 ( $P < 0.01$ )。WT:野生型;OE1:转 *JcWR11* 基因水稻 1 号株系;OE2:转 *JcWR11* 基因水稻 2 号株系;OE3:转 *JcWR11* 基因水稻 3 号株系。

图 5 野生型和转 *JcWR11* 基因水稻胚乳脂肪酸组分

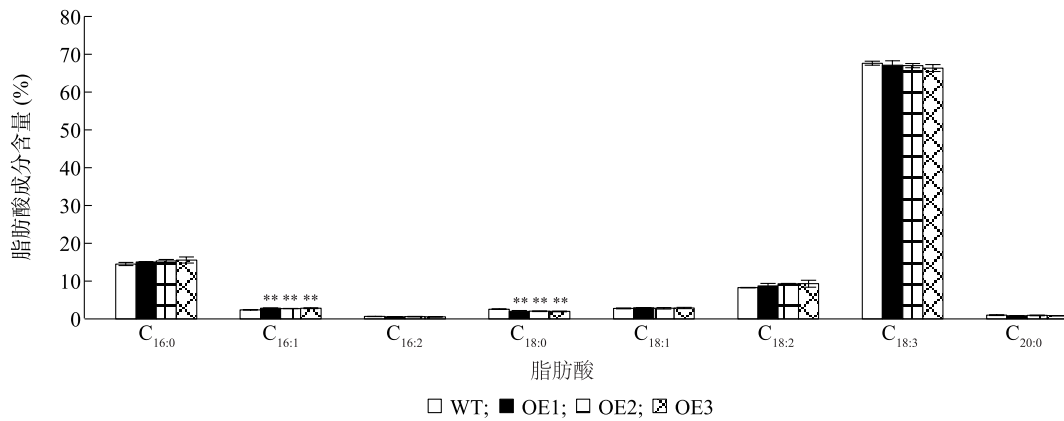
Fig.5 Fatty acid composition in endosperm of wild-type and *JcWR11* transgenic rice

进一步检测水稻叶片中含油量,结果表明,转 *JcWR11* 基因水稻叶片的含油量明显高于野生型水稻(图 7d)。

## 2.8 过表达 *JcWR11* 基因改变脂肪酸合成相关基因的表达

为了阐明 *JcWR11* 基因参与水稻胚乳含油量调控的分子机制,通过 qRT-PCR 技术进一步检测了脂

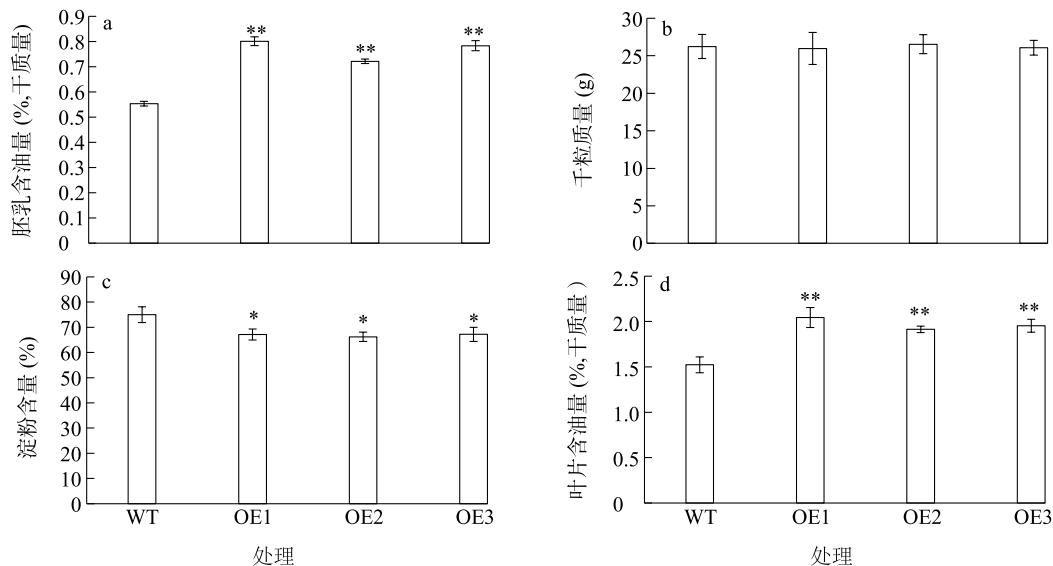
肪酸合成相关基因在野生型、转基因水稻中的表达情况。结果表明,与野生水稻相比,脂肪酸合成相关基因 (*KASIII*、*PDH-E1 β*、*ENR1*、*PDH-E2*、*ACP* 和 *PDH-E1α*) 在转 *JcWR11* 基因水稻中的相对表达量显著高于在野生型(图 8)。表明过表达 *JcWR11* 基因增加了转基因水稻胚乳含油量的部分原因可能是因为上调了脂肪酸合成相关基因的表达量。



\*\* 表示转基因水稻与 WT 相比差异显著 ( $P < 0.01$ )。WT: 野生型; OE1: 转 *JcWR11* 基因水稻 1 号株系; OE2: 转 *JcWR11* 基因水稻 2 号株系; OE3: 转 *JcWR11* 基因水稻 3 号株系。

图 6 野生型和转 *JcWR11* 基因水稻旗叶脂肪酸组分

Fig.6 Fatty acid composition in flag leaves of wild-type rice and *JcWR11* transgenic rice



a: 野生型和转基因水稻种子胚乳含油量; b: 千粒质量; c: 野生型和转基因植株种子胚乳淀粉含量; d: 野生型和转基因水稻叶片含油量。\*\* 表示转基因水稻与 WT 相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ), \* 表示转基因水稻与 WT 相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。WT: 野生型; OE1: 转 *JcWR11* 基因水稻 1 号株系; OE2: 转 *JcWR11* 基因水稻 2 号株系; OE3: 转 *JcWR11* 基因水稻 3 号株系。

图 7 野生型、转 *JcWR11* 基因水稻千粒质量及胚乳、叶片含油量

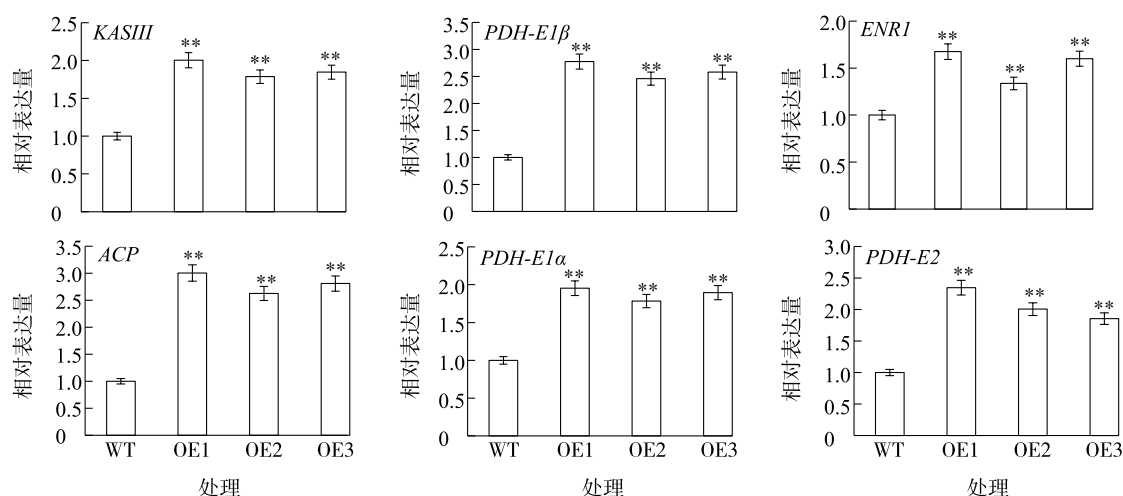
Fig.7 Thousand-grain weight and oil content in endosperm and leaves of wild-type rice and *JcWR11* transgenic rice

### 3 结论与讨论

AP2 家族是一类至少包含 1 个保守 AP2/ERF 结构域的转录因子, 该家族成员在植物生长发育及油脂合成中起重要的调控作用<sup>[14-15]</sup>。尽管一些物种的 AP2 转录因子已经被克隆和进行功能分析, 但是关于麻风树 AP2 家族成员的生物学功能研究未见报道。在本研究中, 克隆了油脂合成关键调控因子编码基因 *WR11* 在麻风树中的同源基因, 将其命

名为 *JcWR11*, 并分析了该基因的功能, 结果表明, 在水稻中过表达 *JcWR11* 基因增加了转基因植株叶片、胚乳中的含油量。

前人研究发现, 在玉米中过表达 *ZmWR11* 基因不影响转基因植株叶片的发育<sup>[7]</sup>。本研究也发现, 异位表达 *JcWR11* 基因对转基因植物叶片发育也没有明显影响, 且过表达 *JcWR11* 增加了转基因植株叶片的含油量。另外, 在拟南芥中异位表达 *AtWR11* 基因增加了转基因拟南芥叶片的含油量, 且 *WR11* 突



\*\*表示与WT相比差异显著( $P < 0.01$ )。WT:野生型;OE1;*JcWRI1*转基因水稻1号株系;OE2;*JcWRI1*转基因水稻2号株系;OE3;*JcWRI1*转基因水稻3号株系。

图8 qRT-PCR检测脂肪酸合成相关基因在野生型和转基因水稻中的表达量

Fig.8 The expression of fatty acid synthesis-related genes in wild-type rice and transgenic rice by qRT-PCR

变体对叶片发育没有影响<sup>[13]</sup>。以上结果表明,*JcWRI1*基因在调控叶片脂肪酸和三酰基甘油(TAG)合成中的功能是相对保守的。综上所述,*WRI1*的异位表达可以用来作为提高植物营养器官含油量的有效路径。与野生型相比,拟南芥*WRI1*突变体胚、胚乳中的含油量都明显降低<sup>[5,16-19]</sup>。本研究发现,提高*JcWRI1*基因的表达量增加了转基因植株胚乳中的含油量。可见,*WRI1*在种子油脂合成中的功能也是相对保守的。

尽管转*JcWRI1*基因水稻胚乳、叶片的含油量与野生型相比都显著增加,但是胚乳、叶片中的脂肪酸组分差异很大。本研究结果表明,在转基因水稻胚乳中,约30%的脂肪酸被用来合成 $C_{18:1}$ ,然而 $C_{18:3}$ 含量低于2%。形成鲜明对比的是,在叶片中,含量最高的脂肪酸组分是 $C_{18:3}$ (约为68%),然而 $C_{18:1}$ 含量仅为2.8%。本研究为进一步研究麻风树种子发育和作物高油品种的培育提供了新的基因资源和理论依据。

#### 参考文献:

[1] FEI W J, YANG S Q, HU J, et al. Research advances of WRINKLED1 (*WRI1*) in plants[J]. Functional Plant Biology, 2020, 47(3):185-194.

[2] SHOCKEY J, REGMI A, COTTON K, et al. Identification of *Arabidopsis* GPAT9 (At5g60620) as an essential gene involved in triacylglycerol biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2015, 170(1):

163-179.

[3] MISRA A, KHAN K, NIRANJAN A, et al. Heterologous expression of two GPATs from *Jatropha curcas* alters seed oil levels in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Science, 2017, 263(2):79-88.

[4] ZHENG P Z, ALLEN W B, ROESLER K, et al. A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize[J]. Nature Genetics, 2008, 40(3):367-372.

[5] FOCKS N, BENNING C. WRINKLED1: a novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism [J]. Plant Physiology, 1998, 118(1):91-101.

[6] BAUD S, WUILLÈME S, TO A, et al. Role of WRINKLED1 in the transcriptional regulation of glycolytic and fatty acid biosynthetic genes in *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2009, 60(6):933-947.

[7] SHEN B, ALLEN W B, ZHENG P Z, et al. Expression of *ZmLECI* and *ZmWRI1* increases seed oil production in maize [J]. Plant Physiology, 2010, 153(3):980-987.

[8] GUO W, CHEN L M, CHEN H F, et al. Overexpression of *GmWRI1b* in soybean stably improves plant architecture and associated yield parameters, and increases total seed oil production under field conditions[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(8):1639-1641.

[9] LIU J, WEI H, ZHAN G M, et al. Increasing seed mass and oil content in transgenic *Arabidopsis* by the overexpression of *wri1*-like gene from *Brassica napus* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(1):9-15.

[10] EWUNIE G A, MORKEN J, LEKANG O I, et al. Factors affecting the potential of *Jatropha curcas* for sustainable biodiesel production: a critical review[J]. Renewable and Sustainable Energy



- Reviews, 2020, 137(2):1-18.
- [11] AKHTER D, QIN R, NATH U K, et al. A rice gene, *OsPL*, encoding a MYB family transcription factor confers anthocyanin synthesis, heat stress response and hormonal signaling[J]. *Gene*, 2019, 699:62-72.
- [12] WEI Q, LI J, ZHANG L, et al. Cloning and characterization of a  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *Jatropha curcas* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(8):816-824.
- [13] LI D L, HE Y J, LI S H, et al. Genome-wide characterization and expression analysis of *AP2/ERF* genes in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 167(3):492-503.
- [14] MA W, KONG Q, VINCENT A, et al. *WRINKLED1*, A ubiquitous regulator in oil accumulating tissues from *Arabidopsis* embryos to oil palm mesocarp[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):1-13.
- [15] 王 玲, 刘晓伟, 江 纳, 等. 蔓花生 *AP2* 基因家族的生物信息学分析[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(14):65-77.
- [16] BAUD S, MENDOZA M S, TO A, et al. *WRINKLED1* specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 2007, 50(5):825-838.
- [17] BATES P D, STYMNE S, OHLROGGE J. Biochemical pathways in seed oil synthesis[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2013, 16(3):358-364.
- [18] BATES P D, FATIHI A, SNAPP A R, et al. Acyl editing and headgroup exchange are the major mechanisms that direct polyunsaturated fatty acid flux into triacylglycerols [J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(3):1530-1539.
- [19] BATES P D, BROWSE J. The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3:147.

(责任编辑:徐 艳)