

引用格式:

郭诗芬, 钟婷婷, 卢文斌, 刘忠松, 郭贤梦, 官春云, 肖钢. *BnaYUCCA10* 基因在不同油酸含量油菜中的表达[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(1): 22–26.

GUO S F, ZHONG T T, LU W B, LIU Z S, WU X M, GUAN C Y, XIAO G. Expression of *BnaYUCCA10* gene in *Brassica napus* with different oleic acid content[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(1): 22–26.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



BnaYUCCA10 基因在不同油酸含量油菜中的表达

郭诗芬¹, 钟婷婷¹, 卢文斌¹, 刘忠松¹, 郭贤梦^{1,2}, 官春云¹, 肖钢^{1,2*}

(1.湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128; 2.水稻油菜抗病育种湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为明晰油菜 *BnaYUCCA10* 基因与油酸含量之间的关系, 以 miRNA 测序得到的 *BnaYUCCA10* 基因为对象, 采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术研究 *BnaYUCCA10* 基因在 30 份不同油酸含量的甘蓝型油菜不同部位和生长时期的表达情况, 并对 *BnaYUCCA10* 基因是否参与油酸的代谢进行分析。结果表明: 营养生长期大部分油菜材料的 *BnaYUCCA10* 基因表达量随生育进程逐渐增加, 高油酸材料与非高油酸材料间无显著差异; 在开花 1 d 的花中的表达量高于花蕾和开花 5 d 的花中的表达量, 且在高油酸材料与非高油酸材料中的表达量差异显著; 在角果期的表达量随生育进程逐渐降低, 在高油酸材料与非高油酸材料中的表达量差异显著; *BnaYUCCA10* 基因在角果期及开花 5 d 的花中的表达量与油酸含量呈极显著正相关, 在高油酸材料中的表达量显著高于非高油酸材料的。推测 *BnaYUCCA10* 基因可能参与了种子中的油酸代谢, 可为油菜油酸调控机制的研究提供参考依据。

关 键 词: 甘蓝型油菜; 油酸代谢; 吡嗪-3-丙酮酸单氧合酶基因; 基因表达

中图分类号: S565.401

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)01-0022-05

Expression of *BnaYUCCA10* gene in *Brassica napus* with different oleic acid content

GUO Shifen¹, ZHONG Tingting¹, LU Wenbin¹, LIU Zhongsong¹, WU Xianmeng^{1,2}, GUAN Chunyun¹, XIAO Gang^{1,2*}

(1.College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128,China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory of Rice and Rapeseed Breeding for Disease Resistance, Changsha, Hunan 410128,China)

Abstract: In order to clarify the relationship between the *BnaYUCCA10* gene expression and the oleic acid content in *Brassica napus*, we used miRNA sequencing and real-time fluorescent quantitative PCR(RT-PCR) methods in this study to analyze the expression of *BnaYUCCA10* gene in 30 samples collected from different tissues and growth periods of *B. napus* with different oleic acid content. And whether the oleic acid is involved in the metabolism was also analyzed. The results showed that the expression level of *BnaYUCCA10* gene increased gradually with the growth process in most *B. napus* materials during the vegetative growth stage, and there was no significant difference between high oleic acid materials and non-high oleic acid materials. The expression level of 1 DAF flowers was higher than that of buds and 5 DAF flowers, and the expression level of high oleic acid materials and non-high oleic acid materials was significantly different. The expression level in silique stage decreased gradually with the growth process, and the expression level of high oleic acid materials and non-high oleic acid materials was significantly different. The expression level of the *BnaYUCCA10* gene in silique stage and 5 DAF flowers was significantly related to the oleic acid content. The expression

收稿日期: 2020-12-06

修回日期: 2021-12-30

基金项目: “十三五”国家重点研发项目(2016YFD0100500)

作者简介: 郭诗芬(1997—), 女, 湖南省常德市人, 硕士研究生, 主要从事油菜分子育种研究, 1925829593@qq.com; *通信作者, 肖钢, 博士, 副教授, 主要从事油菜遗传育种研究, sanjian123@yeah.net

level of the high oleic acid materials was significantly higher than that in non-high oleic acid materials. It was suggested that *BnaYUCCA10* gene might be involved in oleic acid metabolism in seeds, which could be of insight to the further research on the regulation mechanism of oleic acid in rapeseed.

Keywords: *Brassica napus*; oleic acid metabolism; *BnaYUCCA10* gene; gene expression

高油酸菜籽油具有营养价值高、稳定性强、保质期长等优点^[1-2]。目前对油菜油酸相关基因的研究大多集中于对脂肪酸去饱和酶(FADs)基因家族的研究^[3-5]，而对脂肪酸代谢调控途径中其他基因的研究较少。黄素单加氧酶(YUCCA)家族是植物生长素依赖色氨酸合成途径的关键限速酶^[6]，这些酶可催化丙酮酸丙酮酯直接转化为吲哚-3-乙酸(IAA)，而吲哚-3-丙酮酸单氧合酶基因(*BnaYUCCA10*)是生长素 IAA 生物合成途径中的限速酶基因。在发育中的油菜籽粒中，IAA 含量受该基因影响较大。目前，已在拟南芥^[7-8]、水稻^[9]、玉米^[10]和番茄^[11]中成功克隆了 *BnaYUCCA10* 同源基因，该基因在不同类型植物的生长和发育中具有相似的作用。笔者曾对 2 组不同油酸含量的甘蓝型近等基因系油菜进行 miRNA 测序，结果(待发表)表明，与生长素合成相关的靶基因 *BnaYUCCA10* 在该近等基因系中的表达差异显著。本研究中，以不同油酸含量的甘蓝型油菜为对象，分析 *BnaYUCCA10* 基因在不同油酸含量材料中的表达情况，并对 *BnaYUCCA10* 基因是否参与油酸的代谢进行分析，旨在发现新的与油酸代谢相关的基因，为研究甘蓝型油菜油酸代谢的分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以 30 份甘蓝型油菜为材料,使用安捷伦 7890B 气相色谱仪测定其油酸含量,结果见表 1。材料 1 ~ 20 号为甘蓝型高油酸材料, 21 ~ 30 号为甘蓝型非高油酸材料, 均由水稻油菜抗病育种湖南省重点实验室提供。

表 1 30 份甘蓝型油菜材料的油酸含量

Table 1 Fatty acid contents in 30 rape seeds %					
材料编号	油酸含量	材料编号	油酸含量	材料编号	油酸含量
1	84.041	11	80.883	21	51.022
2	85.163	12	84.759	22	56.399
3	83.232	13	85.688	23	59.455
4	85.215	14	85.291	24	65.937
5	85.620	15	85.724	25	63.174
6	86.683	16	86.537	26	62.396
7	78.785	17	88.210	27	64.298
8	85.505	18	86.421	28	66.246
9	81.265	19	86.969	29	62.061
10	85.460	20	85.367	30	66.017

1.2 方法

1.2.1 取样

试验于 2018 年 9 月至 2019 年 5 月在湖南农业大学科技园基地进行。2018 年 9 月 30 日播种, 2019 年 5 月 1 日收获, 按大田管理方式进行管理。每个小区面积 10 m², 种植密度 12 万株/hm²。3 次重复。在油菜的营养生长期、花期和角果期进行取样。营养生长期分别于油菜幼苗期、5~6 叶期和薹期取第 1 片新叶; 花期取花蕾中子房、开花 1 d 的子房和开花 5 d 的子房; 角果期取开花 15 d、开花 25 d 和开花 35 d 的种子。以上材料各取 5 株, 混合保存于-80 ℃冰箱内, 备用。

1.2.2 RNA 提取

采用 TransZol Up Plus RNA Kit(Trans Gene Biotech)提取总 RNA; 采用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 检测 RNA 质量与浓度。

1.2.3 *BnaYUCCA10* 基因的表达量分析

运用 Primer Premier 6.0 设计 RT-PCR 引物(表 2), 以 *BnaUBC9* 作为内参基因^[12], 参照 PFAFFL^[13]的方法, 使用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪测定 *BnaYUCCA10* 基因的表达量。3 次重复, 结果取平均值。

表 2 荧光定量引物序列

Table 2 Primer for RT-PCR

基因名称	基因 ID	序列 (5'-3')
<i>BnaYUCCA10</i>	GSBRNA2T00071462001	F CCGATGTTCCAACCTTCA
		R CCTCTACCCCTCCACTTGTT
<i>BnaUBC9</i>	AT4G27960	F TCCATCCGACAGCCCTTACTCT
		R ACACTTTGGTCCTAAAAGCCACC

1.2.4 数据处理

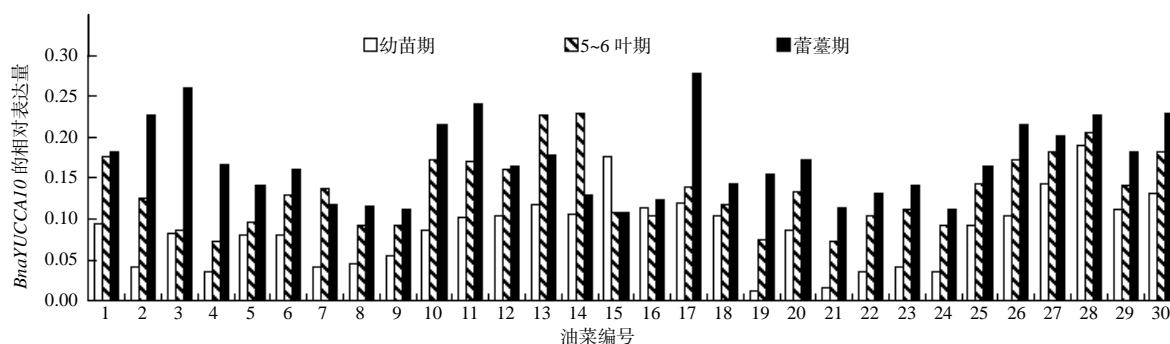
采用 SPSS 进行数据分析;运用 Excel 2010 绘图。

2 结果与分析

2.1 *BnaYUCCA10* 基因在营养生长期的表达

营养生长期 *BnaYUCCA10* 基因在 30 份甘蓝型

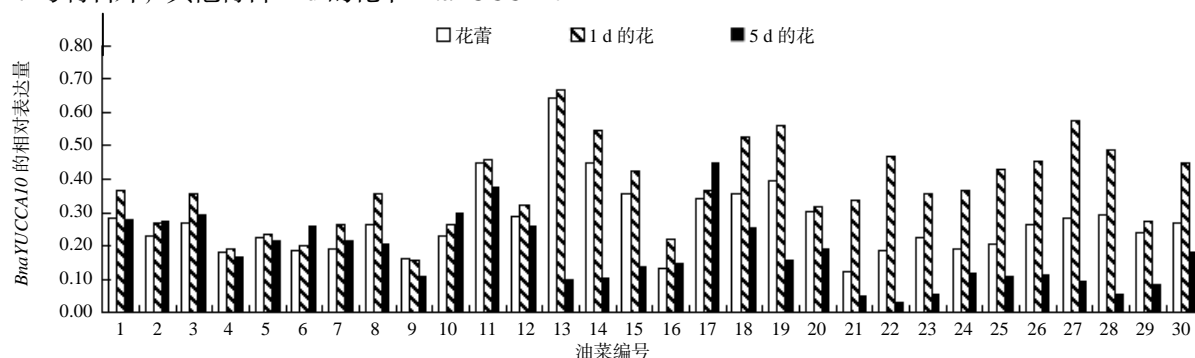
油菜中的表达情况见图 1。从图 1 可以看出,除 7、13、14、15、16 号材料外,其他材料幼苗期、5~6 叶期、薹薹期 *BnaYUCCA10* 的表达量呈逐渐增加的趋势;营养生长期高油酸材料和非高油酸材料的表达量无显著差异。

图 1 营养生长期 *BnaYUCCA10* 基因的相对表达量Fig.1 Expression level of the *BnaYUCCA10* gene during vegetative growth

2.2 *BnaYUCCA10* 基因在花期的表达

花期 *BnaYUCCA10* 基因在 30 份甘蓝型油菜中的表达情况见图 2。从图 2 可以看出,除 2、6、9、10、17 号材料外,其他材料 1 d 的花中 *BnaYUCCA10*

基因的表达量均高于花蕾和 5 d 的花中的表达量;花蕾和 5 d 的花中高油酸材料的 *BnaYUCCA10* 基因表达量高于非高油酸材料的表达量,1 d 的花中高油酸材料的表达量低于非高油酸材料的表达量。

图 2 开花期 *BnaYUCCA10* 基因的相对表达量Fig.2 Expression level of the *BnaYUCCA10* gene during the flowering period

2.3 *BnaYUCCA10* 基因在角果期的表达

BnaYUCCA10 基因在 30 份甘蓝型油菜角果期的表达情况见图 3。从图 3 可以看出,除 14、15 号材料外,其他材料 15 d 的种子、25 d 的种子、35 d 的种子 *BnaYUCCA10* 的表达量均呈现逐渐下降的

趋势;15 d 的种子中的 *BnaYUCCA10* 基因表达量是 25 d 的种子中的 1.1~2.4 倍,是 35 d 的种子中的 1.3~3.9 倍;角果期高油酸材料的 *BnaYUCCA10* 表达量高于非高油酸材料的表达量。

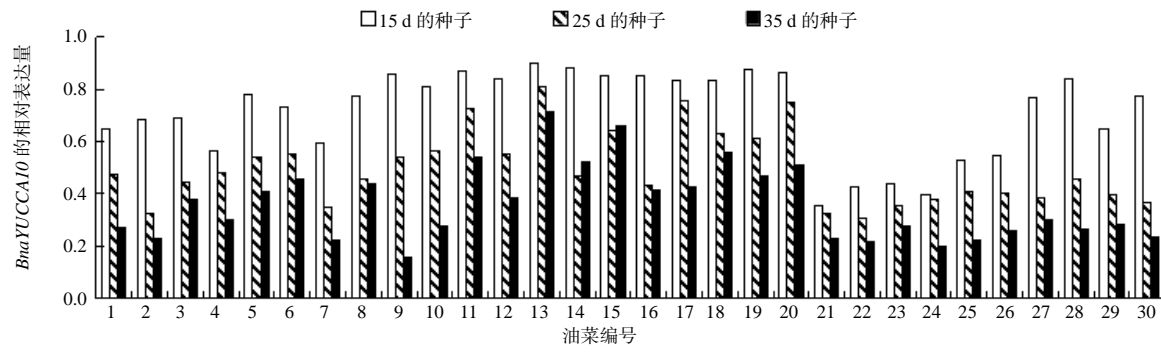


图 3 角果期 *BnaYUCCA10* 基因的相对表达量

Fig.3 Expression level of the *BnaYUCCA10* gene during the silique period

2.4 *BnaYUCCA10*基因表达水平与油酸含量之间的相关性分析

对 30 个油菜品系的 *BnaYUCCA10* 基因在整个生育时期的表达量与油酸含量进行线性及非线性相关性分析。结果(表 3)表明：营养生长期的叶片及花期的花蕾、1 d 的花中的表达量与油酸含量均无显著相关性；而角果期的种子及 5 d 的花中基因表达量与油酸含量间均呈极显著正相关。

表 3 *BnaYUCCA10* 基因表达量与种子油酸含量的相关性

Table 3 Correlation analysis between *BnaYUCCA10* gene expression and seed oleic acid content

时期	器官	相关系数	
		非线性	线性
营养生长期	幼苗期叶	0.138	0.091
	5~6 叶期叶	-0.103	-0.020
	蕾薹期叶	-0.034	0.055
花期	花蕾	0.325	0.345
	1 d 的花	-0.137	-0.191
	5 d 的花	0.534**	0.629**
角果期	15 d 的种子	0.640**	0.720**
	25 d 的种子	0.736**	0.633**
	35 d 的种子	0.726**	0.597**

“**”示差异极显著($P<0.01$)。

3 结论与讨论

前人研究结果表明，油菜发育早期一些基因的表达量可用于预测油菜的生长^[14]。王晓丹等^[15]分析了 *BnaHSP90* 和 *BnaATG3* 基因在油菜发育早期的表达与油菜抗病性的相关性。常涛等^[16]发现 *BnDGAT1* 和 *BnP DAT1* 基因的表达与油菜种子成熟后的含油量呈显著正相关。本研究中，生长素合成的关键基因 *BnaYUCCA10* 在高油酸材料中的表达量高于非高油酸材料的，且在 5 d 的花和角果期中的表达量与种子油酸含量呈极显著正相关，这与笔者前期进

行的 miRNA 测序结果一致，表明 *BnaYUCCA10* 基因的表达水平可用于预测油菜籽的油酸含量。

BnaFAD2 是影响油酸积累的关键基因。刘睿洋等^[17]克隆了油菜籽中 *BnaFAD2* 基因并分析了其功能和结构。熊兴华等^[18]采用基因枪法将 *BnFAD2* 基因导入甘蓝型油菜中，为高油酸油菜育种提供了基础材料。刘芳等^[19]同时干扰了油菜中的 *BnFAD2*、*BnFAD* 和 *BnFATB* 基因，使油酸含量从 66.76% 增至 82.98%。PENG 等^[4]同时沉默 *BnaFAD2* 和脂肪酸延伸酶 1 基因(*FAE1*)，获得了油酸含量大于 85% 的转基因品系。然而，仅抑制 *BnaFAD2* 基因很难获得油酸含量大于 85% 的油菜籽。本研究结果表明，*BnaYUCCA10* 基因的表达量在角果期与油酸含量呈极显著正相关，与主效基因 *BnaFAD2* 的作用相反，可以初步确定该基因与 *FAD2* 基因均为影响油酸含量的基因。*BnaYUCCA10* 基因作为潜在促进油酸合成的基因，将有助于高油酸油菜分子机理的研究。

YUCCA 基因家族编码的黄素单加氧酶是生长素合成过程中色氨酸依赖途径中的 1 个限速酶，在植物生长发育过程中发挥着重要的作用^[20]。杨芳慧等^[21]发现茶树 *CsYUCCA10* 的表达量随着花的生长发育呈增加趋势。李娜^[22]研究发现，*TaYUC* 基因在小麦中的表达具有时空特异性，在生殖器官(花和种子)中强烈表达。本研究结果发现，营养生长期大部分材料中 *BnaYUCCA10* 基因表达量随生育进程逐渐增加；花期 1 d 的花中 *BnaYUCCA10* 的表达量高于花蕾和 5 d 的花的表达量；角果期 *BnaYUCCA10* 基因的表达水平逐渐降低，表明 *BnaYUCCA10* 基因可能在油菜的生长发育过程中起到关键的调控作用，可为今后油菜生长发育调控及 *YUCCA* 基因的研究提供参考。

参考文献:

- [1] STAHL A, PFEIFER M, FRISCH M, et al. Recent genetic gains in nitrogen use efficiency in oilseed rape[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 963.
- [2] 张振乾, 胡庆一, 官春云. 高油酸油菜研究现状、存在的问题及发展建议[J]. *作物研究*, 2016, 30(4): 462-474.
- [3] 戴晓峰, 肖玲, 武玉花, 等. 植物脂肪酸去饱和酶及其编码基因研究进展[J]. *植物学通报*, 2007, 42(1): 105-113.
- [4] PENG Q, HU Y, WEI R, et al. Simultaneous silencing of *FAD2* and *FAE1* genes affects both oleic acid and erucic acid contents in *Brassica napus* seeds[J]. *Plant Cell Reports*, 2010, 29: 317-325.
- [5] SIVARAMAN I, ARUMUGAM N, SODHI Y S, et al. Development of high oleic and low linoleic acid transgenics in a zero erucic acid *Brassica juncea* L. (Indian mustard) line by antisense suppression of the *fad2* gene[J]. *Molecular Breeding*, 2004, 13: 365-375.
- [6] ZHAO Y, CHRISTENSEN S K, FANKHAUSER C, et al. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis[J]. *Science*, 2001, 291: 306-309.
- [7] MASHIGUCHI K, TANAKA K, SAKAI T, et al. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(45): 18512-18517.
- [8] WANG W, XU B, WANG H, et al. *YUCCA* genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(4): 1805-1819.
- [9] LEHMANN T, HOFFMANN M, HENTRICH M, et al. Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production?[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2010, 89(12): 895-905.
- [10] GALLAVOTTI A, BARAZESH S, MALCOMBER S, et al. *Sparse inflorescence1* encodes a monocot-specific *YUCCA*-like gene required for vegetative and reproductive development in maize[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(39): 15196-15201.
- [11] EXPÓSITO-RODRÍGUEZ M, BORGES A A, BORGES-PÉREZ A, et al. Gene structure and spatiotemporal expression profile of tomato genes encoding *YUCCA*-like flavin monooxygenases: the *ToFZY* gene family[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(7): 782-791.
- [12] 王晓丹, 胡庆一, 张振乾, 等. 不同肥密条件对甘蓝型油菜叶绿素含量及脂肪酸合成相关基因表达量影响的研究[J]. *华北农学报*, 2018, 33(1): 127-134.
- [13] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45.
- [14] 石柳柳. 甘蓝型油菜角果长和粒重主效 QTL *qSLWA9* 的克隆与功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [15] 王晓丹, 陈浩, 张振乾, 等. 2 个抗病相关基因与高油酸油菜病害关系分析[J]. *核农学报*, 2019, 33(5): 894-901.
- [16] 常涛, 王峰, 程潜, 等. *BnDGAT1* 和 *BnPDA1* 基因在不同含油量油菜发育进程中的表达[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(22): 7320-7325.
- [17] 刘睿洋, 刘芳, 官春云. 甘蓝型油菜 *BnFAD2* 基因的克隆、表达及功能分析[J]. *作物学报*, 2016, 42(7): 1000-1008.
- [18] 熊兴华, 官春云, 李梅, 等. 基因枪法向甘蓝型油菜转移反义 *FAD2* 基因的研究[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2003, 29(3): 188-191.
- [19] 刘芳, 刘睿洋, 官春云. *BnFAD2*、*BnFAD3* 和 *BnFATB* 基因的共干扰对油菜种子脂肪酸组分的影响[J]. *植物遗传资源学报*, 2017, 18(2): 290-297.
- [20] 张倩倩, 田守蔚, 张洁, 等. 西瓜 *YUCCA* 基因家族鉴定及在果实成熟过程中的表达分析[J]. *中国蔬菜*, 2019(3): 21-29.
- [21] 杨方慧, 夏丽飞, 蒋会兵, 等. 茶树生长素合成酶基因 *YUCCA10* 克隆与表达分析[J]. *西南农业学报*, 2019, 32(2): 253-258.
- [22] 李娜. 小麦 *TaYUC* 基因的克隆与初步功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳 正