

# *BnFAD2*、*BnFAD3* 和 *BnFATB* 基因的共干扰对油菜种子脂肪酸组分的影响

刘芳, 刘睿洋, 官春云

(湖南农业大学农学院/国家油料改良中心湖南分中心, 长沙 410128)

**摘要:** 甘蓝型油菜是一种重要的油料作物, 为了改良其种子脂肪酸组分, 提升其经济价值, 本研究分析了油菜种子发育时期脂肪酸合成积累模式及 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因的表达规律, 认为这 3 个基因在种子发育中后期 (授粉后 25 d 起) 的高效表达对油酸合成积累有着重要影响。通过 Napin 启动子诱导对油菜植株中 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因进行 RNAi 共干扰抑制, 以达到提升油酸含量的目的。试验结果表明, 转基因油菜种子中 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因的表达受到强烈抑制, 种子中油酸含量由 66.76% 提升至 82.98%, 且油脂合成的相关基因同步出现表达上调。

**关键词:** 油菜种子; 油酸; *BnFAD2*; *BnFAD3*; *BnFATB*

## Effect of Silencing of *BnFAD2*, *BnFAD3*, *BnFATB* Genes on Fatty Acid Component in Rapeseed (*Brassica napus*)

LIU Fang, LIU Rui-yang, GUAN Chun-yun

(College of Agronomy, Hunan Agricultural University/National Oilseed Crops Improvement Center in Hunan, Changsha 410128)

**Abstract:** *Brassica napus* L. is an important oil crop. In order to improve fatty acid components in rape seed and enhance its economic value, this study analyzed the synthesis and accumulation mode of fatty acid in seed developmental stages and the expression pattern of *BnFAD2*, *BnFAD3* and *BnFATB* genes. The results suggested that *BnFAD2*, *BnFAD3* and *BnFATB* genes played important roles in the synthesis and accumulation of oleic acid in mid-late period of seed development stage (25 days after pollination) with its efficient expression. Through Napin promoter induction, *BnFAD2*, *BnFAD3* and *BnFATB* genes were suppressed by RNA interference technology to enhance the oleic acid content. The results showed that the *BnFAD2*, *BnFAD3* and *BnFATB* genes' expression was strongly inhibited in transgenic oilseed and the oleic acid content increased from 66.76% to 82.98%. At the same time, the expression of related genes up-regulated synchronously.

**Key words:** rape seed; oleic acid; *BnFAD2*; *BnFAD3*; *BnFATB*

与“双低”(低芥酸、低硫苷)油菜籽油相比,高油酸、低亚麻酸的菜油在食用油营养健康和食品工业的应用上均具有较高的竞争力。一方面,高油酸油可降低血液中低密度脂蛋白胆固醇的含量,并且在阻止动脉硬化中较一般植物油更具有优越性;另一方面,由于亚麻酸具备多个双键致使其极易

被氧化从而导致植物油变质,而高油酸、低亚麻酸植物油具有更高的氧化稳定性,耐储存,不易产生难闻的气味<sup>[1-2]</sup>。因此,在“双低”的基础上,进一步改良油菜籽品质,培育出高油酸、低亚麻酸油菜品种成为油菜育种主要目标之一。

*FAD2*、*FAD3* 在种子不饱和脂肪酸的合成过程

收稿日期: 2016-05-06 修回日期: 2016-05-22 网络出版日期: 2017-02-17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170217.1431.042.html>

基金项目: 湖南省科技创新项目(CX2013A012); 国家重点基础研究发展规划项目(2015CB150200)

第一作者主要从事油菜分子育种方向研究。E-mail: liupanpan1988@sina.cn

通信作者: 官春云, 研究方向为作物栽培和育种。E-mail: guancy2011@yahoo.com.cn

中发挥着重要作用,二者常以同源或异源二聚体的形式附着于内质网中<sup>[3]</sup>。当油酸由质体进入内质网后,便由 FAD2、FAD3 酶催化进而形成以亚油酸、亚麻酸为主的多不饱和脂肪酸<sup>[4-5]</sup>。经<sup>14</sup>C 试验证实,C18:1-PC 和 C18:2-PC 分别是 FAD2、FAD3 脂肪酸去饱和酶唯一的作用底物<sup>[6]</sup>。通过传统育种技术及基因工程方法控制 FAD2、FAD3 基因的功能发挥可以有效改善植物油中油酸及亚麻酸的含量,如利用诱变育种技术,通过诱发 FAD2 基因突变,将大豆油的油酸含量从 28% 提高至 80%<sup>[7]</sup>;通过人工诱发 FAD3 基因突变,将亚麻子中的亚麻酸含量从 55% 下降到 2%,油酸含量从 15% 上升至 36%<sup>[8]</sup>。通过诱变育种获得的 FAD2、FAD3 油菜双突变体,油酸含量高达 89%。

脂酰基 ACP 硫脂酶(FAT)能够水解脂肪酸上的脂酰基 ACP,促使其由质体进入内质网中,从而参与 TAG 的组装。FAT 有 A、B 两种,其中 FATA 水解油酸酰(C18:1)-ACP,而 FATB 主要对棕榈酰(C16:0)-ACP、硬脂酰(C18:0)-ACP 发生水解作用,使得硬脂酰脱氢酶(SAD)未能对其进行催化合成油酸,进而过早的离开了质体,并整合入 TAG 中。由此可知,FATB 功能的发挥对油酸的合成积累有着一定的削弱作用,G. Bomaventure 等<sup>[9]</sup>和 P. Dörmann 等<sup>[10]</sup>在拟南芥中尝试进行 FATB 基因活性的抑制均有效提升了种子中油酸的含量。

提升植物油中油酸的含量,改善其抗氧化能力是育种家的目标。分子生物学技术因其可以缩短育种年限、提高育种效率,受到普遍欢迎。在棉花<sup>[11]</sup>和大豆<sup>[12]</sup>中,为了改善种子脂肪酸结构,分别构建了 FAD2、FAD3、FATB 基因的 T-DNA 插入突变体,经多轮杂交、自交,从而完成在同一植株中多基因的功能失活。目前,随着 CRISPR-Cas9 基因编辑系统的推广应用,未来也可以在甘蓝型油菜中对其进行基因结构变异。但 FAD2、FAD3、FATB 在植物生长发育过程发挥重要作用,抑制 3 个基因的功能,会导致植株个体营养体生长变缓、花蕾死亡、低结实率、低耐冷性等,使得这种高油酸油菜的产量及含油量下降,严重影响了甘蓝型油菜作为油料作物的经济地位。

为了解上述问题,本研究测定了甘蓝型油菜种子在发育各个时期棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸的积累规律及 *BnFAD2*、*BnFATB*、*BnFAD3* 的表达模式,结果显示油菜种子自授粉后 25 d 起进入了油酯合成期,且该时期 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB*

基因表达较为活跃。分析认为在此时期对 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因进行抑制,既可以提升油菜种子中油酸的含量,又能够保证植株正常发育。因此,本研究采用能够在种子发育中后期高效表达 Napin 启动子诱导对 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因进行 RNAi 共干扰抑制,结果显示种子中油酸含量由 66.76% 提升至 82.98%,且油酯合成的相关基因同步出现表达上调。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

甘蓝型油菜中双 9 号种植在大田,花期时去除已有的花和角果并套袋自交,分别取 10 d、15 d、20 d、25 d、30 d、35 d、40 d 的种子液氮速冻后保存在 -70 °C 以备气相色谱分析和 RNA 提取。

### 1.2 基因表达分析

采用 TRNzol (天根)试剂盒提取总 RNA 并合成 cDNA 第 1 链。以此 cDNA 为模板进行 RT-PCR,以 *Ubc21* 和 *ACT7* 为内参基因,每个样本做 3 个重复,在 Bio-Rad CFX 96 定量 PCR 仪上进行扩增,程序为 95 °C 30 s;95 °C 15 s,60 °C 30 s,40 个循环。

### 1.3 脂肪酸含量分析

将收集到的油菜种子置于冻干机中冻干,直至质量不再发生变化。再用研钵将种子磨碎,定量称取干种子粉末,并转入螺口玻璃顶空瓶中,向其中加入 1 mL 的甲酯化溶液(5% 的硫酸-甲醇溶液)及 20 μg 的十七烷酸甘油三酯标样(C17:0-TAG),加盖后 85 °C 水浴保温 1.5 h。甲酯化反应过后,向顶空瓶中加入 1.5 mL 0.9% NaCl (w/v)和 1 mL 的正己烷用于萃取甲酯化的脂肪酸。分离含有脂肪酸甲酯的正己烷溶液,在氮吹仪下低温吹干浓缩,最后溶于 50 μL 正己烷,进行气相色谱分析。

气相色谱仪(Agilent 6890)的设置程序为色谱柱温 180 ~ 210 °C,升温 20 °C/min;210 ~ 230 °C,升温 5 °C/min;240 °C 后运行 1 min。进样口温度 220 °C,氮气 25 mL/min,空气 400 mL/min,氢气 40 mL/min。

脂肪酸绝对含量及相对含量计算公式如下:

$$\begin{cases} y_i = w_i/w_s, x_i = a_i/a_s \\ y_i = kx_i + b \text{ (脂肪酸线性回归方程)} \\ w_i = y_i \times w_s \div m_i \end{cases}$$

$a_i$  是脂肪酸的峰面积;  $a_s$  是内标(十七酸甲酯)的峰面积;  $w_i$  是脂肪酸的绝对含量;  $w_s$  是内标的绝对含量;  $m_i$  是种子干粉样品的质量。每个时期的种

子样品做3次生物学重复,使用SPSS软件计算平均数和标准差。

#### 1.4 干扰载体的构建及转化

通过重组PCR技术将干扰片段 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 和干扰片段 *FADB* 融合,连接 pMD18-T 构建 pMD18-T-FADB 载体并测序,载体构建过程中所用引物见表1。

载体构建过程如图1,将 NapinA 启动子和 pFGC5941 载体经 EcoR I 和 Nco I 酶切处理后连

接,构建 pFGC5941. nap 载体。pFGC5941. nap 和 pMD18-T-FADB 质粒经 BamH I 和 Xba I 酶切处理后,将切下的 FADB-插入 pFGC5941. nap 构建 pFGC5941. nap. (FADB-) 载体,将此载体和 pMD18-T-FADB 使用 NcoI 和 SmaI 双酶切,然后将 FADB + 插入 pFGC5941. nap. (FADB-) 构建 PF-GC5941. nap (FADB ±) 干扰载体。将构建好的载体转入农杆菌 LBA4404 中,以双低油菜中双9号外植体为受体,进行基因转化<sup>[13]</sup>。

表1 载体构建中用到的引物

Table 1 Primer pairs used in vector construction

类别	基因名称	基因注释	引物名称	引物序列
Category	Gene name	Gene annotation	Primer name	Primer sequences
储存蛋白 Storage protein	<i>Napin</i>	Storage protein	Napin promoter	F:5'GGAATTCGAAGCTTTCTTCATCGGTGATTGAT3'
				R:5'CATGCCATGGCATGAGTAAAGAGTGAAGCGGATGAGT3'
去饱和酶 Desaturase	<i>FAD2</i>	Oleate desaturase	Recombie- <i>FAD2</i>	F:5'GGCGCGCGGATCCGAATTCCTCGCTCTTTCTC3'
				R:5'CCATGGTCTAGAATGTCTGACTTCTTCTTGG3'
	<i>FAD3</i>	Linoleate desaturase	Recombie- <i>FAD3</i>	F:5'ATTATCTTTGTAATGTGTTGACG3'
				R:5'TTATCAACGACAACCTGCCTACGAGCGTAGAGATCTGGATCTGTCTCGTA3'
硫酯酶 Thioesterase	<i>FATB</i>	Palmitoyl-ACP thioesterase	Recombie- <i>FATB</i>	F:5'CTCCTACGCAGGTTGTCTGTGATAA3'
				R:5'ATTTAAATGGATCCAACATGCTGGTTAACATCCAAGTCA3'

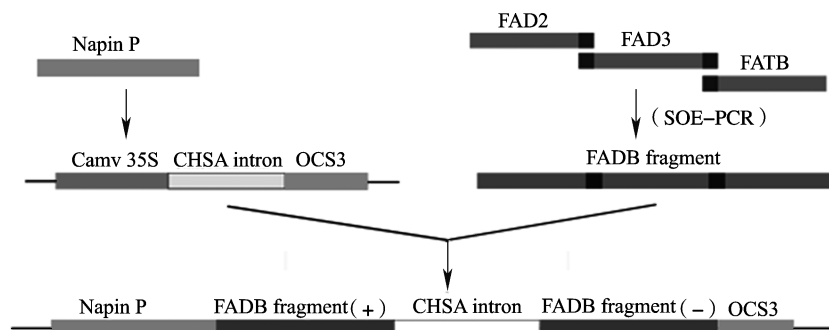


图1 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因干扰载体构建示意图

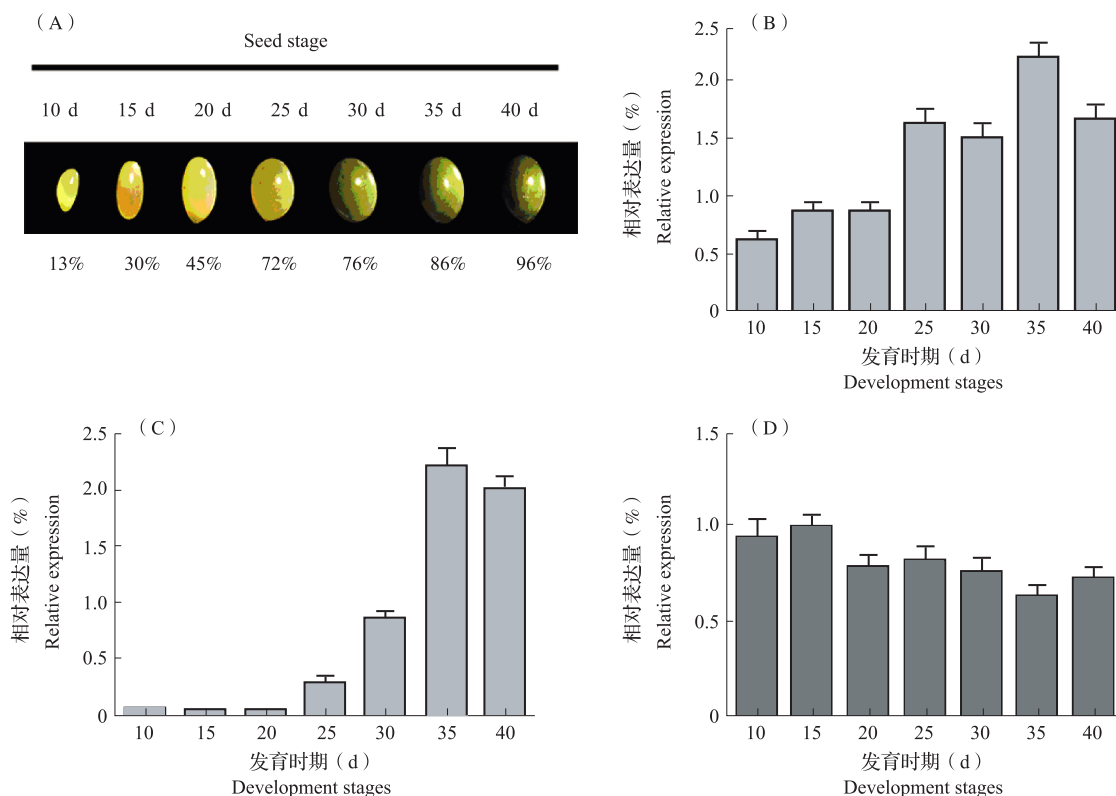
Fig. 1 Construction of *BnFAD2*, *BnFAD3* and *BnFATB* gene RNAi vector

## 2 结果与分析

### 2.1 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因的表达分析

油菜种子从授粉到成熟约为45d左右,在10~40d期间主要进行干物质合成与贮藏;在40~45d期间种子经自身脱水干燥进入完熟期。由于10~40d是脂肪酸合成的主要时期,故将其分为7个阶段(图2A)。在种子授粉后10~25d期间,种子个体、鲜重逐步增加,但始终保持着透明嫩绿的色泽。在授粉后25~40d期间,种子个体大小保持不变,鲜重增速变缓,种子由嫩绿色转变为深绿色,说明此时种子内部积累了大量的叶绿素。

选用 *UBC21* 和 *ACT7* 作为双内参校正基因,测定油菜种子成熟过程中 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因表达变化。由图2可知,在种子授粉后10~25d期间,*FAD2*、*FATB* 基因表达量较高,*FAD3* 基因基本处于不表达状态;在25~40d期间,*BnFAD2*、*BnFAD3* 基因表达量分别提增加了1.3倍和2.3倍,并始终保持高位表达态势;但 *FATB* 基因表现呈现下调趋势。综上所述,*BnFAD2*、*BnFAD3* 基因表达量伴随着种子发育程度的加深而不断增加,但 *BnFATB* 基因不同于前者,其表达量下调后逐步趋于稳定。这一规律与在棕榈中果皮中基因表达结果<sup>[10]</sup>十分相似。



(A): 油菜种子的不同发育时期; (B): 不同发育时期种子中 *FAD2* 表达情况; (C): 不同发育时期种子中 *FAD3* 表达情况; (D): 不同发育时期种子中 *FATB* 表达情况  
 (A): Different stage of *Brassica napus* L. seed, (B): *FAD2* expression in different stage of seed, (C): *FAD3* expression in different stage of seed, D: *FATB* expression in different stage of seed

图 2 *FAD2*、*FAD3*、*FATB* 在油菜种子中的表达分析

Fig. 2 Expression analysis of *FAD2*, *FAD3* and *FATB* in rape seed

## 2.2 脂肪酸积累模式分析

为了能够准确测定棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸在油菜种子成熟过程中的合成积累规律,降低气相色谱仪在试验过程中造成的误差。本研究以十七酸甲酯作为参照,采用气相色谱内标法构建了 5 种主要的脂肪酸回归方程及

其线性浓度范围。如表 2 所示,油菜种子中 5 种主要的脂肪酸甲酯标准品的线性方程,其线性相关性均较好 ( $r \geq 0.99$ ),回收率在 97.91% ~ 100.45% 之间,精密度试验效果好(标准偏差小于 2%),可用于油菜种子中衡量脂肪酸甲酯的测定。

表 2 脂肪酸甲酯的线性回归方程

Table 2 Fatty acid methylesters standard linear regression equations

标准品 Standard substance	线性回归方程 Equation of linear regression	R2 相关性 Correlation R2	线性范围 (mg/mL) Linearity range	标准差 (%) Standard deviation	回收率 (%) Recover
棕榈酸甲酯 Methyl palmitate	$y = 0.8467x - 0.0057$	0.9996	0.1 ~ 0.9	0.37	100.45
硬脂酸甲酯 Methyl stearate	$y = 0.9832x - 0.003$	0.9963	0.05 ~ 0.45	0.11	99.65
油酸甲酯 Methyl oleate	$y = 1.1585x + 0.0051$	0.998	0.016 ~ 0.144	0.11	99.67
亚油酸甲酯 Methyl linoleate	$y = 1.0856x - 0.0592$	0.9985	0.5 ~ 4.5	0.76	98.92
亚麻酸甲酯 Methyl linolenate	$y = 1.1399x + 0.0025$	0.9979	0.201 ~ 1.809	0.52	97.91

依据所得脂肪酸甲酯的线性回归方程,分析测定中双9号油菜种子发育时期5种主要脂肪酸的合成积累模式。由图3可知,油菜种子中5种主要脂肪酸含量的积累明显分为2个阶段。在10~25 d期间,5种主要脂肪酸的含量均处于较低的水平,其中含量最高的2种脂肪酸分别为亚油酸和亚麻酸,其次是棕榈酸,油酸含量最低。在25~40 d期间,5种主要脂肪酸高效积累,并随着种子成熟度的加深不断增加,且油酸积累速率远大于亚油酸的积累速

率,说明油酸已经作为贮备脂肪酸被大量组装至甘油三酯(TAG)中,油菜植株发育进入末期。

综上所述,油菜种子发育至25~40 d期间是脂肪酸合成的主要时期,*BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB*基因在该时期高效表达对油酸的积累合成有着重要影响。此时油菜植株发育已基本完成,抑制*BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB*基因表达,既可以改善油菜种子中脂肪酸组分的结构,又能够减少对油菜经济性状的消极影响。

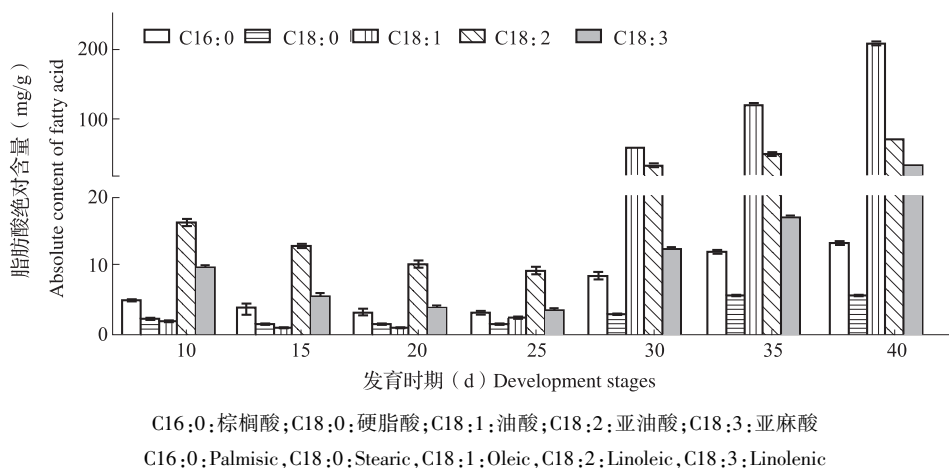


图3 发育中种子脂肪酸组分积累模式

Fig. 3 The accumulation pattern of FAME in developing seed

### 2.3 RNAi 技术干扰 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因结果分析

Napin 启动子是种子特异性启动子<sup>[14]</sup>,在种子发育初期几乎不表达,但在油酯合成主要时期(如油菜种子授粉后20~45 d、拟南芥种子授粉后7~13 d)高效表达<sup>[15-16]</sup>。为了抑制*BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB*基因在脂肪酸合成期的功能发挥,本研究选用Napin启动子,对发育种子中*BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB*基因进行RNAi干扰。RNAi-*FAD2*、*FAD3*、

*FATB*载体借助农杆菌转化法导入野生型油菜中。采用气象色谱法对其T3转基因油菜的种子进行脂肪酸含量分析(表3),结果显示油酸含量由66.76%提升至82.98%,棕榈酸、硬脂酸含量明显降低,说明*FATB*基因在油脂合成期的活性得到了有效控制;亚油酸、亚麻酸含量有所减少,但其波动幅度较大,可能是由于*BnFAD2*、*BnFAD3*基因在种子油脂合成期间表达量较高,RNAi干扰效率有限,未能有效抑制2个基因功能活性。

表3 6个T3转基因株系种子中脂肪酸组分分析

Table 3 Fatty acids composition of T3 seeds from six transgenic lines

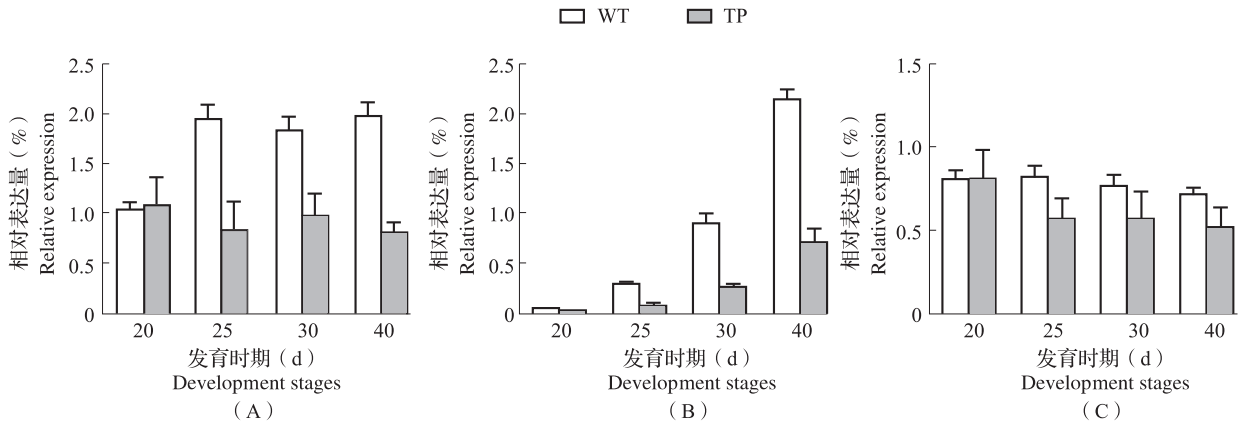
株系 Lines	棕榈酸(%) Palmitic acid	硬脂酸(%) Stearic acid	油酸(%) Oleic acid	亚油酸(%) Linoleic acid	亚麻酸(%) Linolenic acid	其他脂肪酸(%) Other acids
TB11-3	1.78 ± 0.19c	1.10 ± 0.21c	78.37 ± 1.16c	12.51 ± 0.64c	3.37 ± 0.56d	2.88 ± 0.46b
TB34-2	1.55 ± 0.12c	1.53 ± 0.12bc	74.50 ± 0.65d	14.93 ± 0.33b	4.59 ± 0.53bc	2.83 ± 0.84b
TB41-7	1.16 ± 0.11d	1.55 ± 0.51bc	74.66 ± 0.67d	13.09 ± 0.98c	5.41 ± 0.63b	2.92 ± 0.67b
TB51-11	1.09 ± 0.12d	1.18 ± 0.17c	81.19 ± 0.29b	8.05 ± 0.14de	4.60 ± 0.11bc	3.89 ± 0.45ab
TB54-8	2.06 ± 0.22b	1.88 ± 0.12b	79.34 ± 0.63c	8.59 ± 0.24d	4.44 ± 0.14c	4.44 ± 0.67a
TB55-17	1.83 ± 0.13bc	1.52 ± 0.18bc	82.98 ± 0.31a	7.55 ± 0.36e	3.17 ± 0.16d	3.93 ± 0.18a
WT	3.11 ± 0.15a	2.43 ± 0.48a	66.76 ± 0.95e	18.00 ± 0.35a	8.23 ± 0.96a	1.51 ± 0.43c

TB: Transgenic plants, WT: Control (zhongshuang 9). Each value is the mean of three replicates. Values are expressed as mean ± SD, <sup>a</sup>  $P < 0.05$  statistically significant difference

采用 qPCR 检测转基因油菜种子中 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因的表达变化(图 4)。油菜授粉后 20 d 时,转基因油菜中 Napin 启动子并未开始对 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因进行 RNAi 干扰抑制,因此,3 个基因在野生型油菜与转基因油菜种

子中表达变化一致。

在油菜种子发育至 25~40 d 时,转基因油菜与野生型油菜相比种子中 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因表达量大幅下调,其中 *BnFAD2*、*BnFAD3* 基因表达量下调幅度约为 60% (图 4)。



(A) *FAD2* 表达情况;(B) *FAD3* 表达情况;(C) *FATB* 表达情况

(A) The expression of *FAD2*, (B) The expression of *FAD3*, (C) The expression of *FATB*

图 4 转基因与非转基因油菜中 *FAD2*、*FAD3*、*FATB* 基因的表达

Fig. 4 Expression of *FAD2*, *FAD3* and *FATB* in wild-type and transgenic plants

#### 2.4 脂肪酸合成路径中相关基因的表达调控分析

为了分析在油脂合成期进行 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因 RNAi 干扰抑制对种子中脂肪酸合成通路的影响,本研究对参与脂肪酸合成及功能调控的主要基因进行表达量检测。

在转基因油菜种子中共有 10 个基因表达上调(图 5)。在质体脂肪酸合成路径中, *WRII* 的主要功能是调控脂肪酸合成酶基因表达,其表达量增加可以促进种子细胞油脂含量增加,因此, *WRII* 基因表达量的提升可能是在转基因油菜 T2 种子中含油量均高于野生型的主要原因。另外, *KASII*、*SAD*、*FATA* 基因作为该路径中的主要基因,其表达量均显著提升。在内质网合成途径中, *PDAT1*、*DGAT1*、*LIL*、*bZIP67*、*LEC1*、*ROD1* 基因表达量均有所上调,但 *LPCAT* 基因表达量下降。

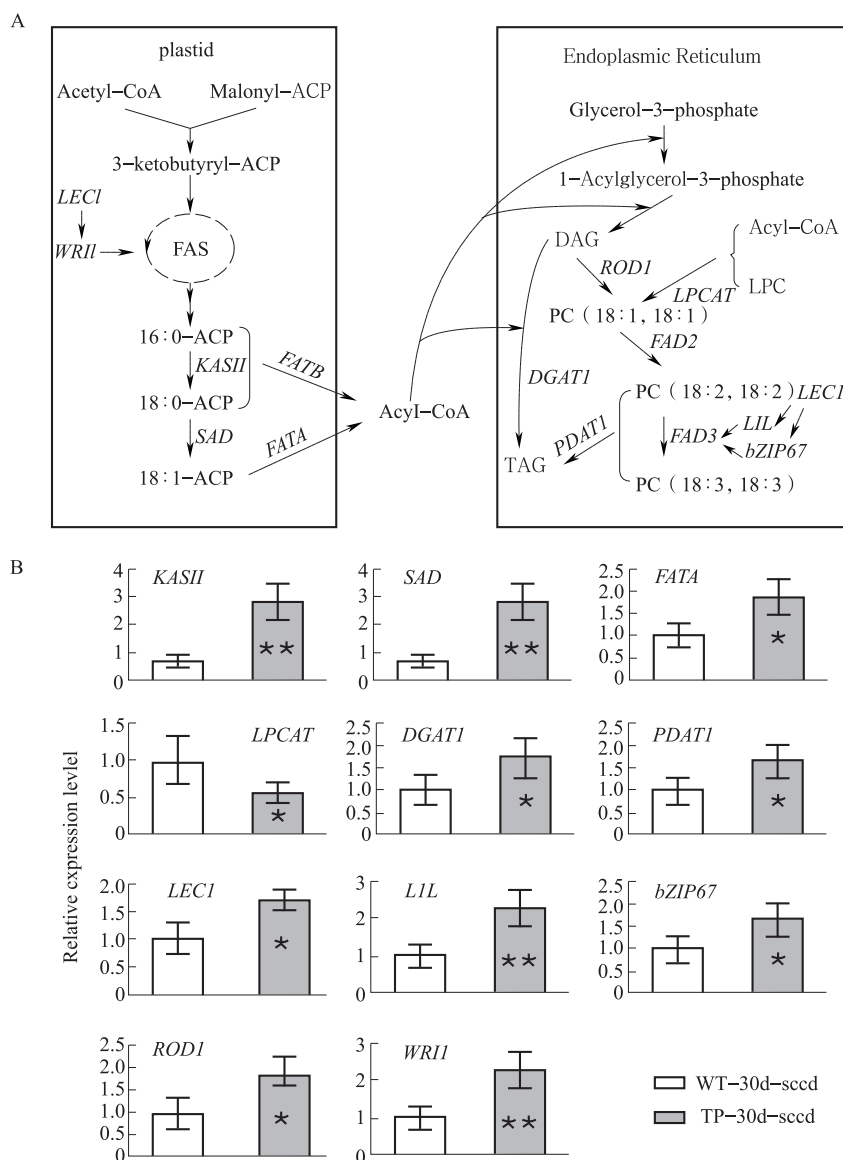
### 3 讨论

种子发育主要包含两个方面,一是种子的形态建成,包含胚的大小等变化;二是种子成熟,包括种子贮藏物质如油脂、糖类、蛋白质等物质的积累及种子脱水等<sup>[16-17]</sup>。

种子油脂形成的时间因植物的种类不同而存在差异,在一些谷物种子中,例如燕麦种子,其油脂积累发生在胚形态建成的早期阶段<sup>[18]</sup>,然而在一些油料

种子中,如向日葵<sup>[19-20]</sup>、拟南芥<sup>[16-17]</sup>和芝麻<sup>[21]</sup>,其油脂积累发生在胚胎形态建成的较晚阶段。在油菜种子中,其 5 种主要脂肪酸总量在开花后 10~25 d 期间呈递减趋势,而在 25~40 d 期间呈现指数型增加,结合种子发育形态分析,认为油菜种子在开花后 10~25 d 为种子形态建成期,而 25~40 d 为种子油脂合成期。

油菜种子在形态建成期,亚油酸、亚麻酸含量较高,这是由于亚油酸、亚麻酸是细胞膜系统的主要构成元件,参与内质网、质体外膜、核膜等细胞器膜的形成,如拟南芥叶片细胞中 PC-C18:2、PC-18:3 含量分别为 38.8% 和 32.1%<sup>[17]</sup>;同时亚麻酸是多种植物信号分子的前体物质,参与种子发育的调控。种子细胞基于自身膜质构建的需要,会将质体内油酸经内 *FAD6*、*FAD7*、*FAD8* 酶去饱和作用,以便大量合成亚油酸和亚麻酸。但此时的亚油酸、亚麻酸均是以 PG、MGDG、DGDG、SQDG 形式存在,不能直接参与到甘油三酯的合成<sup>[22]</sup>。在油菜种子油脂合成期,油酸由质体大量进入内质网,此时亚油酸、亚麻酸则借助于 *FAD2*、*FAD3* 酶高效合成;且棕榈酸、硬脂酸在该时期依赖于 *FATB* 酶的去酰基化作用,由原核质体途径进入真核内质网途径,共同参与甘油三酯的组装。甘油三酯作为能量和碳源的重要储存物质,其大量的积累代表着植物器官的发育接近尾声。因此,在油脂合成期改善种子脂肪酸结构对油菜品种改良有着重要意义。



(A) 质体和内质网中脂肪酸合成的主要步骤示意图; (B) 油脂合成相关基因的表达检测  
 FAS: 脂肪酸合成酶; CoA: 辅酶 A; ACP: 酰基载体蛋白; DAG: 甘油二酯; PC: 磷脂胆碱; LPC: 溶血磷脂胆碱; TAG: 甘油三酯; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$

(A) Diagram of the fatty acid biosynthetic pathway with major steps in the plastid and the endoplasmic reticulum, (B) Expression of representative fatty acid synthetic genes analyzed by qPCR using total RNA prepared from wild-type and transgenic plants  
 FAS: Fatty acid synthase, CoA: Coenzyme A, ACP: Acyl carrier protein, DAG: Diacylglycerol, PC: Phospholipid choline, LPC: lysophosphatidylcholine, TAG: triacylglycerol, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$

图 5 转基因油菜中脂肪酸合成路径中各基因表达情况

Fig. 5 Expression of different genes in the fatty acid biosynthesis pathway in transgenic plants

在棉花、大豆、油菜、拟南芥中, 分别单独对 *FAD2*、*FAD3*、*FATB* 基因进行 RNAi 干扰, 均可有效改善脂肪酸组分含量。为了同时完成对多个基因表达沉默, Q. Peng 等<sup>[13]</sup> 将 *FAD2* 和 *FAE1* 两个干扰片段融合后构入干扰载体中, 所得的转基因油菜具备高油酸、低芥酸两种性状。本研究借鉴类似的经验, 将 *FAD2*、*FAD3*、*FATB* 基因 RNAi 干扰片段融合后, 共同导入至甘蓝型油菜中, 期望抑制 C16 脂肪酸过

早的离开原核途径, 促进其向油酸的转化; 同时削弱真核途径对油酸的去饱和作用。在转基因油菜中, 棕榈酸、亚油酸、亚麻酸含量显著降低, 且 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因的表达量均小于对照, 这表明 RNAi 共干扰能够同时抑制 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因表达活力, 有利于提高种子中油酸所占的比重。

*LECI* 基因是调控植物种子脂肪酸合成的重要

转录因子,过表达 *LEC1* 基因可以提高种子中油脂的含量<sup>[15]</sup>。在本研究中,经 RNAi 干扰后的转基因油菜种子中, *BnFAD2*、*BnFAD3* 基因的表达量明显降低,致使其所合成的亚麻酸含量较少。这可能刺激种子细胞为增加亚麻酸的含量而提升 *LEC1* 基因的表达量。*LEC1* 基因的表达量增加可以进一步促进其下游调控基因 *WR11*、*L1L*、*bZIP67* 的表达上调<sup>[23-24]</sup>。*WR11* 是质体中调控脂肪酸合成的重要转录因子,其表达量的提高可以促进糖类物质向脂肪酸类物质的转化<sup>[25]</sup>;同样, *L1L* 基因表达量的提升有助于种子含油量的增加。*DGAT1* 基因是控制油脂合成-Kenney 途径的关键基因,当 *DGAT1* 和 *WR11* 基因同时表达上调时,种子的含油量和单不饱和脂肪酸的含量明显增加<sup>[26]</sup>。*PDAT1* 基因的表达量提升,可以促进 PC 中的脂肪酸酰基 DAG 中转移,加速 TAG 的合成<sup>[27]</sup>。

综上所述,油菜种子中脂肪酸的合成主要发生于油脂合成期(即开花后 25 ~ 40 d),在此期间单不饱和脂肪酸及多不饱和脂肪酸大量合成积累,种子最终的脂肪酸组分含量均是由这个时期所决定。*BnFAD2*、*BnFAD3* 基因在油脂合成期高效表达是造成多不饱和脂肪酸积累的主要原因。在种子油脂合成期,对 *BnFAD2*、*BnFAD3*、*BnFATB* 基因进行 RNAi 抑制后,可以显著提升种子中油酸的含量。

#### 参考文献

- Maher L, Burton W, Salisbury P, et al. High oleic, low linolenic (HOLL) specialty canola development in Australia [C]. The 12th International Rapeseed Congress, 2007; 22-24
- Carré P, Evrard J, Judde A, et al. Technological performances of low linolenic/high oleic rapeseed oils for food and non-food application [C]. The 12th International Rapeseed Congress, 2007; 152-159
- Lou Y, Schwender J, Shanklin J. FAD2 and FAD3 desaturases form heterodimers that facilitate metabolic channeling in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(26): 17996-18007
- Okuley J, Lightner J, Feldmann K, et al. *Arabidopsis FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis [J]. *Plant Cell Online*, 1994, 6(1): 147-158
- Aronel V, Lemieux B, Hwang I, et al. Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1992, 258(5086): 1353-1355
- Stymne S, Appelqvist L Å. The biosynthesis of linoleate from oleoyl-CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomes of developing safflower seeds [J]. *European J Biochem*, 1978, 90(2): 223-229
- Kinney A J, Knowlton S. Designer oils; the high oleic acid soybean [M]. *Genetic modification in the food industry*, 1998; 193-213
- Green A G. A mutant genotype of flax (*Linum usitatissimum* L.) containing very low levels of linolenic acid in its seed oil [J]. *Canadian J Plant Sci*, 1986, 66: 499-503
- Bonaventure G, Salas J J, Pollard M R, et al. Disruption of the *FATB* gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(4): 1020-1033
- Dörmann P, Voelker T A, Ohlrogge J B. Accumulation of palmitate in *Arabidopsis* mediated by the Acyl-Acyl carrier protein thioesterase *FATB1* [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123(2): 637-643
- Liu Q, Singh S, Green A. High-oleic and high-stearic cottonseed oils; nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing [J]. *J Am Coll Nutr*, 2002, 21(S3): 205-211
- Park H, Graef G, Xu Y, et al. Stacking of a stearyl-ACP thioesterase with a dual-silenced palmitoyl-ACP thioesterase and  $\Delta$  12 fatty acid desaturase in transgenic soybean [J]. *Plant Biotech J*, 2014, 12(8): 1035-1043
- 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 Rep*, 2010, 29(4): 317-325
- Song C, Qi P, Zhou X Y, et al. Analysis of seed-specificity of silencing *fad2* gene expression in transgenic rapeseed line W-4 (*Brassica napus* L.) [J]. *Agric Sci Technol*, 2014, 10(10): 608-610
- Tan H, Yang X, Zhang F, et al. Enhanced seed oil production in canola by conditional expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1 and LEC1-LIKE in developing seeds [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(3): 1577-1588
- Baud S, Boutin J P, Miquel M, et al. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40(2): 151-160
- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, et al. Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*; metabolic and developmental control of seed filling [J]. *The Arabidopsis Book*, 2008, 6: e0113
- Ekman Å, Hayden D M, Dehesh K, et al. Carbon partitioning between oil and carbohydrates in developing oat (*Avena sativa* L.) seeds [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(15): 4247-4257
- Mantese A I, Medan D, Hall A J. Achene structure, development and lipid accumulation in sunflower cultivars differing in oil content at maturity [J]. *Ann Bot*, 2006, 97(6): 999-1010
- Rondanini D, Savin R, Hall A J. Dynamics of fruit growth and oil quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to brief intervals of high temperature during grain filling [J]. *Field Crops Res*, 2003, 83(1): 79-90
- Chung C H, Yee Y J, Kim D H, et al. Changes of lipid, protein, RNA and fatty acid composition in developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds [J]. *Plant Sci*, 1995, 109(2): 237-243
- Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, et al. Acyl-lipid metabolism [J]. *The Arabidopsis book*, 2011, 11(8): e0133
- Mu J, Tan H, Zheng Q, et al. LEAFY COTYLEDON1 is a key regulator of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(2): 1042-1054
- Mendes A, Kelly A A, van Erp H, et al. bZIP67 regulates the omega-3 fatty acid content of *arabidopsis* seed oil by activating FATTY ACID DESATURASE3 [J/OL]. *Plant Cell*, 2013, 25(8): 3104-3116
- 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 Physiol*, 1998, 118(1): 91-101
- Vanhercke T, El Tahchy A, Shrestha P, et al. Synergistic effect of WR11 and DGAT1 coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(4): 364-369
- Fan J, Yan C, Zhang X, et al. Dual role for phospholipid; diacylglycerol acyltransferase; enhancing fatty acid synthesis and diverting fatty acids from membrane lipids to triacylglycerol in *Arabidopsis* leaves [J/OL]. *Plant Cell*, 2013, 25(9): 3506-3518