

种子特异表达二酰甘油酰基转移酶基因(*VgDGAT1*)提高亚麻荠种子油脂积累

苑丽霞^{1,2}, 毛雪¹, 高昌勇¹, 张莉¹, 薛金爱¹, 杨致荣¹, 李润植^{1,*}

¹山西农业大学分子农业与生物能源研究所, 山西太谷030801; ²晋中学院生物科学与技术学院, 山西晋中030600

摘要: 亚麻荠(*Camelina sativa*)是一种“低耗、高效、环保”的非粮型工业油料作物。为提高亚麻荠种子含油量, 将来源于一种菊科野生油料植物(*Vernonia galamensis*)高酶活性的二酰甘油酰基转移酶1 cDNA克隆(*VgDGAT1*)在发育种子中特异表达。*VgDGAT1*超表达导致转基因亚麻荠种子中DGAT酶活性提高了30多倍。*VgDGAT1*高表达的亚麻荠种子含油量从野生型的37%提高到46%~51%, 而且蛋白质积累未减少, 表明对DGAT酶基因进行遗传修饰可打破种子油和蛋白含量的负相关连锁。此外, *VgDGAT1*高表达也没有对种子重量和种子萌发等农艺性状造成不良影响。这种高油亚麻荠基因工程新种质可进一步用于商业化优良新品种的培育。

关键词: 亚麻荠; 二酰甘油酰基转移酶(DGAT); 种子特异表达; 种子油脂合成积累

Seed-Specific Over-Expression of a Diacylglycerol Acyltransferase 1 Gene (*VgDGAT1*) Increase Seed Oil Accumulation in *Camelina sativa*

YUAN Li-Xia^{1,2}, MAO Xue¹, GAO Chang-Yong¹, ZHANG Li¹, XUE Jin-Ai¹, YANG Zhi-Rong¹, LI Run-Zhi^{1,*}

¹Institute of Molecular Agriculture and Bioenergy, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; ²College of Biological Science and Technology, Jinzhong University, Jinzhong, Shanxi 030600, China

Abstract: *Camelina sativa* is an important non-food industrial oilseed with “low-input, high efficiency and environment-friendly”. To enhance seed oil content for meeting an increasing market demand, a cDNA clone (*Vg-DGAT1*) encoding type 1 diacylglycerol acyltransferase from *Vernonia galamensis* with the higher DGAT enzymatic activity was introduced into camelina by *Agrobacterium*-mediated floral dip infiltration. Seed-specific over-expression of *VgDGAT1* significantly enhanced the DGAT activity in the transgenic seeds by 30 folds more compared to the wild-type control, resulting in seed oil content increase from 37% (dry weight) in the wild-type seeds up to 46%–51% in the transgenics. However, seed protein level was not significant difference between the transgenic and the wild type, indicating that genetic modification on DGAT can break up the negative genetic linkage of oil and protein contents in seeds. Moreover, the seed-specific high expression of *Vg-DGAT1* did not adversely affect seed weight, seed germination and other agronomic traits. Such novel engineered camelina lines with higher seed oil content and no reduction of protein accumulation could be used for breeding new camelina varieties with multiple excellent agronomic traits for commercialization.

Key words: *Camelina sativa*; diacylglycerol acyltransferase (DGAT); seed-specific expression; seed oil synthesis and accumulation

亚麻荠(*Camelina sativa*)是一种十字花科的油料作物, 其种植历史可追溯到青铜器时代(公元前1500年~公元前400年)。在高产的油料作物油菜(*Brassica napus*)大面积引进种植前, 亚麻荠在欧洲东南部和亚洲西南部地区广为栽培许多世纪, 一直到20世纪中叶, 亚麻荠仍是欧洲一些国家和俄罗斯等地的重要油料作物(Eynck和Falk 2013)。近十几年来, 随着全球应对化石能源危机和研发绿色可持续生物能源的蓬勃发展, 亚麻荠以其独特

的栽培特性(生育期短, 水肥需求低, 适应多种逆境和高抗多种病虫害)、种子含油量高(34%~45%)、以及种子油脂超过90%为不饱和脂肪酸和适于炼制航空燃油、生物柴油和其他高值油脂工

收稿 2015-03-06 修定 2015-03-30

资助 国家自然科学基金(30971806、31201266和31401430)、国家“948”项目(2014-Z39)和山西省煤基重点科技攻关项目(FT-2014-01)。

* 通讯作者(E-mail: rli2001@hotmail.com; Tel: 0354-6288374)。

业产品等, 被重新发掘出来作为一种“低投入、高效率、环保型”的替代性非粮工业油料作物(Gehring等2006; Moser 2012; Séguin-Swartz等2009)。现今, 全世界许多国家已开始了亚麻荠新一轮的种植及研究热潮(Kagale等2014; Singh等2015; Vollmann和Eynck 2015)。亚麻荠已在美洲、欧洲和大洋洲开始大面积种植和用于生物燃油生产, 我国一些地区也不同规模地试种亚麻荠和开展亚麻荠油脂产品的研发(邓乾春等2009; 谢光辉等2012)。

随着全球食用和工业用、特别是生物燃油对植物油脂需求量日益剧增, 提高油料作物种子产量和种子含油量就成为油料作物遗传改良的主要目标。已有遗传研究显示, 与油菜和大豆等普通油料作物一样, 亚麻荠种子含油量和蛋白含量为负相关(Vollmann等2007), 提高种子含油量势必导致蛋白质含量降低。因此, 由于蛋白含量相应减少, 提高种子含油量所带来的附加值就会因榨油后种子副产品利用价值减低而部分抵消。显然, 通过常规育种方法培育高油和高蛋白的亚麻荠品种存在诸多困难。近年来兴起的代谢工程技术为打破这种负连锁和培育种子油脂和蛋白双高的油料作物新种质提供了新途径(吴永美等2011; 岳爱琴和李润植2009; Nguyen等2013; Vollmann和Eynck 2015)。

亚麻荠等油料作物种子所积累的油脂主要以三酰甘油(triacylglycerol, TAG)形式储存于细胞油体中。TAG的生物合成和积累过程涉及到一系列酶基因和调节基因, 以及质体和内质网等亚细胞结构。脂肪酸在质体内从头合成后转入细胞质, 并与CoA分子结合, 在内质网上进一步发生脱氢等修饰反应, 再在一系列酰基转移酶(acyltransferase)依次作用下, 结合于CoA分子的酰基(脂肪酸链)被分别转移到甘油(glycerol)分子的 $sn-1$ 、 $sn-2$ 和 $sn-3$ 位置从而生成TAG (Ohlrogge和Browse 1995)。最后一步酰基化反应, 即在二酰甘油(diacylglycerol, DAG)中再导入一个酰基链生成TAG是TAG生物合成途径的限速步骤(Wu等2012; Jako等2001; Zheng等2008)。诸多试验证明, 二酰甘油酰基转移酶(diacylglycerol acyltransferase, DGAT) (EC 2.3.1.20)和磷脂胆碱二酰甘油酰基转移酶(phospholipid: diacylglycerol acyltransferase, PDAT) (EC2.3.1.43)参

与生成TAG的最后一步酰基化反应(Li等2010a; Zhang等2009)。在动植物中, 至少发现有两类DGATs, 即DGAT1和DGAT2 (Burgal等2008; Shockey等2006; Li等2013)。尽管二者不具序列同源性, 但均能催化将结合于CoA的酰基转移到DAG分子的 $sn-3$ 位置生成TAG酶促反应。与DGAT不同, PDAT不依赖酰基-CoA, 而是催化将磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)分子中的酰基导入DAG分子的 $sn-3$ 位置生成TAG酶促反应(Dahlqvist等2000)。应用基因修饰技术对DGAT酶表达进行遗传操作, 在拟南芥、大豆和玉米等作物上已获得种子含油量提高的工程株系(Jako等2001; Lardizabal等2008; Oakes等2011)。

我们实验室前期从一种高油的野生菊科植物 *Vernonia galamensis* 发育种子中分离到编码DGAT1的cDNA克隆(*VgDGAT1*, GenBank登录号EF653277), 多种酶学试验证明*VgDGAT1*酶活性3倍多高于大豆等油料作物DGAT1活性(Yu等2006, 2008)。在大豆种子中特异共表达*VgDGAT1*和一种催化生成环氧化脂肪酸的环氧化酶基因(*SIEPX*), 不仅使大豆种子新合成了环氧化脂肪酸(积累量达总油脂的15%), 而且完全克服了单独表达*SIEPX*引起的种子油和蛋白含量减低以及其他负效应(Li等2010b, 2012), 显示了*VgDGAT1*在油料作物遗传改良及代谢工程上重要应用价值。本文在亚麻荠种子中特异超表达*VgDGAT1*基因, 以期培育种子含油明显提高而蛋白质含量不减和其他农艺性状优良的新种质。研究结果显示, 与空载体转基因亚麻荠和非转化的对照植株相比, 种子特异超表达*VgDGAT1*基因的纯合转基因系成熟种子含油量由37%提高到51%, 蛋白含量(28%)不减低和种子产量等农艺性状未显负效应。本研究的发现有助于全面认识亚麻荠等油料作物种子油脂等储藏物合成积累调控机制, 也为其他油料作物种子代谢工程提供借鉴。研究获得高油亚麻荠新种质可进一步用于商业化优良新品种的培育。

材料与方法

1 目的基因及种子特异表达载体构建

本文所用靶基因为从菊科斑鸠菊属一种植物 *Vernonia galamensis* L.的发育种子中分离到编码

DGAT1的cDNA克隆(*VgDGAT1*, GenBank登录号EF653276), 保存于本实验室。参见Li等(2010b)描述的种子特异表达载体构建方法, 构建本实验用于在亚麻荠[*Camelina sativa* (L.) Crantz]发育种子中超表达*VgDGAT1*的植物表达载体。先将种子特异表达盒(Phaseolin promoter-Cloning sites-Terminator)转移到pBluescript载体多克隆位点, 接着将*VgDGAT1*编码序列(1 571 bp)插入到种子特异表达启动子下游, 形成携带有种子特异表达盒和靶基因(Phaseolin promoter-*VgDGAT1*-Terminator)的中间质粒载体。最后, 将该表达盒从中间质粒载体上酶切下来, 再连接于表达载体pCAMBIA1301的多克隆位点, 生成*VgDGAT1*种子特异表达载体(图1), 仅载有种子特异表达盒、无*VgDGAT1*序列的pCAMBIA1301载体用作空载体对照。

2 亚麻荠种质材料及其遗传转化

本文选用的亚麻荠种质材料为‘SNC104’, 种子油和蛋白含量分别为37%和28% (种子干重)。亚麻荠遗传转化采用Lu和Kang (2008)描述的农杆菌介导花序浸染法(floral dip infiltration)进行。简要操作如下: 上述构建的种子特异表达*VgDGAT1*载体质粒用电击法导入根癌农杆菌GV3101菌株, 涂盘抗性选择培养(28 °C)。挑取抗性阳性单克隆

于含有Kan 50 mg·L⁻¹的5 mL YEP液体培养基(5 g·L⁻¹ yeast extract, 10 g·L⁻¹ peptone, 5 g·L⁻¹ NaCl, pH 6.8)过夜震荡培养(28 °C)。将过夜培养的菌液转入500 mL相同培养基中震荡培养24~48 h, 离心(4 000×g) 10 min收集菌体, 并重新悬浮于渗透培养基(含有1/2MS盐离子, 50 g·L⁻¹蔗糖和0.05% (V/V) Silwet L77E表面活性剂)。

将生长于花盆内的早花期亚麻荠花序浸入新悬浮的农杆菌渗透培养基, 于85 kPa压力下抽真空5 min。菌液浸渗的亚麻荠植株用塑料袋覆盖24 h, 然后移植于苗床, 在温室正常条件下生长至成熟。

3 转基因植株的分子鉴定

将从转基因处理的亚麻荠植株收获的T₁代种子, 表面消毒后播种于含潮霉素的MS培养基上。能萌发且正常生长的抗性阳性幼苗再移植于营养苗床, 在温室下生长至成熟。取T₁代植株幼叶提取基因组DNA, 用常规Southern blot方法鉴定*VgDGAT1*是否整合到亚麻荠基因组。选取仅检测出一条*VgDGAT1*片段的T₁代转基因植株收获T₂代种子用于后续试验和检测。

采用常规Northern blot方法检测*VgDGAT1*基因是否种子特异高效表达(详见Li等2010b的描述)。取T₂代不同发育时期的种子, 以及取T₂代种

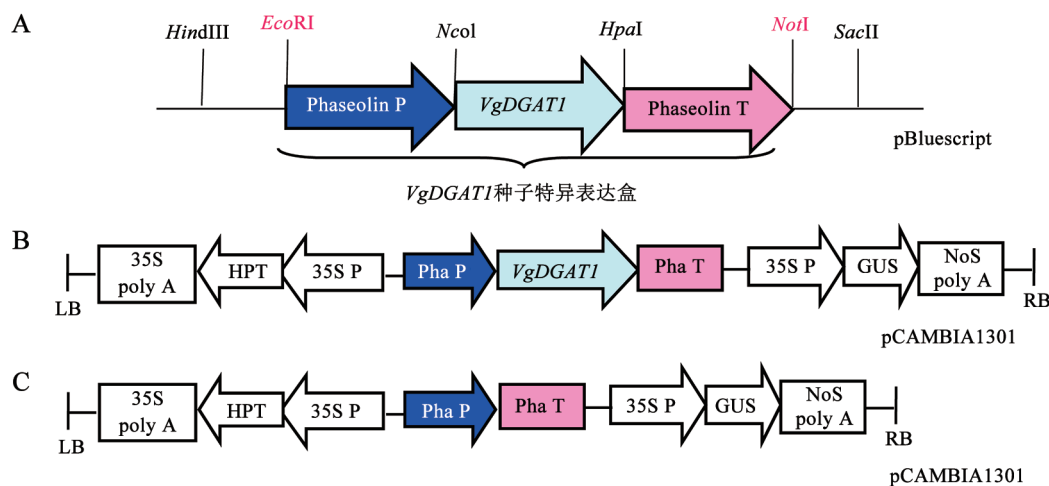


图1 *VgDGAT1*基因种子特异表达载体pCAMBIA1301的构建

Fig.1 Schematic representation of seed-specific expression construct of *VgDGAT1* in pCAMBIA1301

A: 载有*VgDGAT1*种子特异表达盒的中间载体pBluescript; B: 将*VgDGAT1*种子特异表达盒插入双元载体pCAMBIA1301的多克隆位点形成*VgDGAT1*种子特异表达的植物表达载体; C: 仅含有种子特异表达盒的启动子和终止子、无*VgDGAT1*基因编码序列的pCAMBIA1301载体, 用作空载体对照。Pha P: 菜豆蛋白启动子; Pha T: 菜豆蛋白终止子; *VgDGAT1*: *Vernonia galamensis* DGAT1酶基因编码序列; 35S: 花椰菜花叶病毒35S启动子; HPT: 潮霉素抗性基因; GUS: β-葡萄糖苷酶; 35S poly A: 35S poly A信号; Nos poly A: 胭脂碱合酶poly A信号。

子萌发长成的幼苗茎和叶片作为对照, 提取总RNA样品, 电泳分离、转膜和用生物素标记的*Vg-DGATI*探针进行杂交, 以及自显影。检测样品RNA blot带的有无及强弱来分析*VgDGATI*转基因是否种子特异表达和表达水平, 确定发育种子*Vg-DGATI*峰值表达时期。

T₂和T₃代转基因种子*VgDGATI*表达水平的大量样品检测采用荧光定量Real-time PCR方法(Xue等2013)。正向和反向引物分别为: 5'-CAAGCCTGATGCTGGAATCG-3'和5'-TGCTTGAAGATGGCGTCAGA-3'。

Real-time PCR应用SYBR Green I试剂盒和iCycler iQ定量PCR仪(Bio-Rad)。每个96孔PCR板上同一RNA样品重复3次, 各RNA样品分别进行3次独立的实验。PCR反应程序为: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环; 最后72 °C延伸5 min。18S RNA用作内参对照。依Livak和Schmittgen (2001)描述的方法计算各样品中*VgDGATI*的相对表达量。即 $\Delta CT = CT_{\text{目标基因}} - CT_{\text{内参基因}}$, 目标基因的CT相对于内参基因的CT为 $2^{-\Delta CT}$, 转基因植株基因表达的变化表示为对照的 $2^{-\Delta \Delta CT}$ 记为1时目标基因 $2^{-\Delta CT}$ 的相对值(即 $2^{-\Delta \Delta CT}$), 各基因表达量用均值±标准误表示。

4 微体蛋白提取与DGAT酶活性的测定

前期预实验显示发育种子中DGAT酶活性峰值出现在发育时期3。因此, 本文用于DGAT酶活性分析的样品均取自发育时期3的种子。依据Yu等(2008)描述的方法进行微体蛋白分离和DGAT酶活性分析。主要步骤包括: 取足量的发育种子样品(500~800 mg), 置于液氮中研磨成粉末状, 加入提取缓冲液(100 mmol·L⁻¹ HEPES-KOH, pH 7.4, 0.32 mol·L⁻¹蔗糖, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 1 mmol·L⁻¹二硫苏糖醇), 冰上继续研磨。将研磨所得细胞混液过滤后离心(10 000×g, 20 min), 取上清液超高速离心(105 000×g, 1 h), 获得粗蛋白样品。用提取液重新悬浮微体蛋白, 测蛋白浓度和将各样品蛋白浓度标定一致便于后续分析。

DGAT酶活性测试所用放射性底物均从Sigma试剂公司定制, 包括1-[¹⁴C]18:1-CoA (56 mCi·mmol⁻¹)、1-[¹⁴C]18:2-CoA (56 mCi·mmol⁻¹)、1-[¹⁴C]18:3-CoA (56 mCi·mmol⁻¹)和18C DAG (*sn-1, 2 di18:1, sn-1, 2*

di18:2, sn-1, 2 di18:3) (56 mCi·mmol⁻¹)。非放射性标记的CoAs、ATP、CoASH以及TAG标样等酶活性测试化学药品也购自Sigma。酶活性测试反应体系(500 μL): 微体蛋白(富集DGAT) 100~200 μg, 90 mmol·L⁻¹ HEPES-NaOH, 0.5 mmol·L⁻¹ ATP, 0.5 mmol·L⁻¹ CoASH, 1 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 200 μm ¹⁴C labeled *sn-1, 2 di18:1* (溶于0.02% Tween 20, *V/V*, 10 nCi·nmol⁻¹), 18或40 μm ¹⁴C-labeled acyl-CoA (10 nCi·nmol⁻¹)。反应体系在pH 7.4, 30 °C水浴震荡(100 r·min⁻¹)反应30~60 min。加入二氯甲烷:异丙醇(1:2)终止反应。分层后取有机相用硅胶G板进行TLC层析, 分离和纯化放射性标记TAGs。层析介质为已烷:二乙醚:乙酸(70:30:1, *V/V/V*)。用放射性TCL扫描仪查看TCL板上放射性条带, 并将其带刮下来, 用液体闪烁计数器检测各样品的放射性TAG条带的放射强度, 并计算样品所含DGAT酶活性[pmol·min⁻¹·mg⁻¹(蛋白)]。

5 种子含油量、蛋白含量和脂肪酸成分的测定

亚麻荠种子含油量(%干重)和蛋白含量(%干重)用近红外反射光谱种子成分分析仪(Perten DA7200 NIR seed analyzer)测定。大量样品测定前, 系统标准曲线用一组已知含油量和蛋白含量的亚麻荠品种标样(经多种化学分析方法验证)作精细校正。每个品系取样重复6次, 每个样品测试3次, 计算平均值和标准误。

种子脂肪酸成分测定依据薛金爱等(2013)描述的方法进行。取25~30 mg种子研磨成粉末, 加入三甲基氢氧化物或2.5% (*V/V*)硫酸甲醇溶液, 转移至玻璃试管中进行甲酯化反应, 同时加入十七烷酸甘油三酯(17:0)作为内标, 加入1 mL含有0.01% (*W/V*)丁化羟基甲苯(BHT)防止脂肪酸氧化, 混匀后离心分层。取上层[含脂肪酸甲酯(FAME)的己烷层]用于Hewlett-Packard 5890A气相色谱仪(0.25 mm i.d.×0.33 μm×10 m FFAP柱, 火焰离子化检测器)检测各种脂肪酸, 并计算脂肪酸含量。

上述所有测试数据均用SAS统计分析包相应软件进行统计学分析, 差异显著性用*t*-test检验。

实验结果

1 转基因亚麻荠植株的分子鉴定

采用农杆菌介导花序浸染法对亚麻荠进行选

传转化,从转化植株上收获种子,在含有潮霉素的1/2MS培养基上能萌发的种子,再栽植于育苗营养土中,共获得193株潮霉素抗性T₁代亚麻荠植株。取T₁代植株的叶片分别提取核基因组DNA,用Southern blot和PCR分别鉴定*VgDGATI*基因的整合。从仅有一条杂交片段的T₁株系上收获T₂代种子。T₂代种子在含有抗生素培养基上萌发和移栽于苗床,生长至成熟并收获T₃代种子。

为检测*VgDGATI*基因是否按设计仅在发育种子中表达,分别取T₁代植株茎、叶片组织和不同发育时期的T₂代种子样品,用Northern blot和RT-PCR检测*VgDGATI*基因表达情况。依据亚麻荠种子大

小、色泽和鲜重以及花后天数(DAF)将种子分为5个不同发育时期取样(发育时期1至发育时期5)(图2)。发育时期2及以前为种子发育早期阶段(幼期),发育时期3和4为种子快速生长阶段(中期),从发育时期5起,种子开始脱水、颜色变黄,至成熟(成熟期)。Northern blot(图3)显示,非转基因植株叶片,转基因T₁代茎和叶片组织均未检测到*VgDGATI*表达。然而,转基因T₂代种子中*VgDGATI*高表达,以发育时期3表达量最大。这表明*VgDGATI*仅在发育种子中特异表达。

接着,我们取发育时期3的种子RNA样品,用Real-time PCR分别检测T₃代转基因系(61个*VgDGATI*



种子发育时期	1	2	3	4	5
种子鲜重/mg	0.52±0.41	1.41±0.53	2.62±0.39	2.35±0.43	2.15±0.26
花后天数(DAG)	5	12	19	25	31
种子					
角果					

图2 亚麻荠种子和角果5个发育时期的形态及种子鲜重

Fig.2 Five development stages of camelina seeds and siliques and seed fresh weight

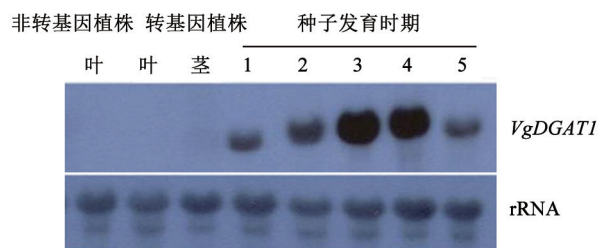


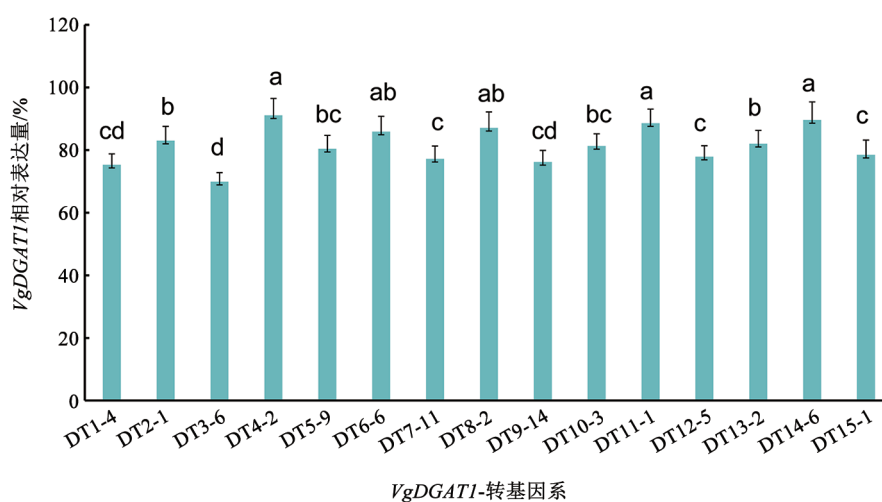
图3 转基因亚麻荠种子及茎叶组织中*VgDGATI*表达的Northern blot分析

Fig.3 Northern blot on development seeds and other tissues of *VgDGATI* transgenic camelina

转基因纯合系)种子中*VgDGATI*的表达。由图4可见,*VgDGATI*在所检测的各转基因系种子中均高表达。统计分析显示在不同转基因系种子中表达量高低有显著差异($P<0.05$),但未达极显著水平($P<0.01$)。

2 转基因发育种子中DGAT活性检测

如引言中所述,与膜结合的DGAT催化酰基-CoA分子中的酰基转移到DAG分子的sn-3位置而形成TAG。为鉴定导入并在种子特异表达的*VgDGATI*所编码的蛋白是否正确行使功能,我们分析T₃代转基因系发育种子的DGAT活性。我们前

图4 转基因亚麻荠纯系种子中*VgDGAT1* mRNA的表达Fig.4 Expression of *VgDGAT1* mRNA in the transgenic camelina seeds

用SYBR Green I试剂盒进行实时定量PCR检测*VgDGAT1* mRNA, 以18S RNA为内参基因。RNA样品为随机选取的转基因纯合系。各柱形上不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 图5、7、9同。

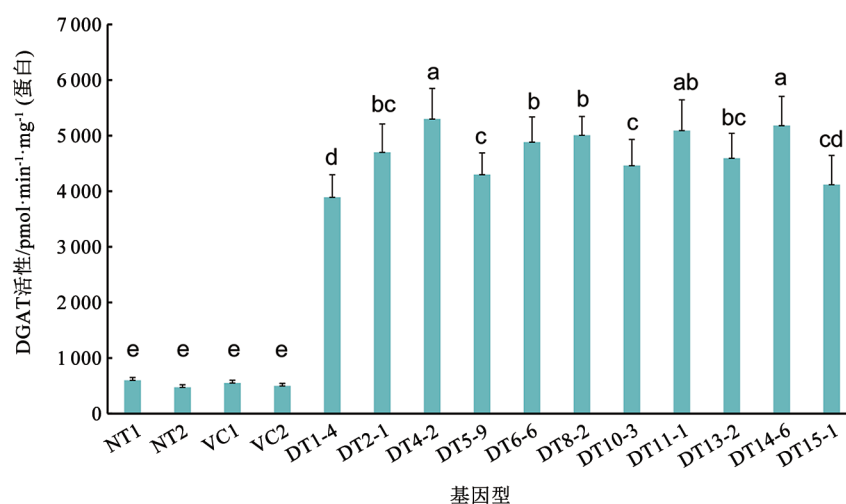
图5 *VgDGAT1*转基因亚麻荠发育种子中DGAT活性检测

Fig.5 DGAT activity in microsomal fractions prepared from pooled developing seeds (stage 4) of the transgenic camelina lines

NT: 非转基因种子; VC: 空载体对照的种子; DT: *VgDGAT1*转基因T₃种子。图7、9同。

期试验证实发育种子中DGAT活性从发育时期3开始急剧升高, 在发育时期4达峰值(Li等2010b)。因此, 本文用于种子DGAT活性检测的样品均取样于发育时期4的种子, 以便比较不同样品间的差异。用发育种子样品制备分离微体蛋白、富集DGAT酶蛋白。反应底物18C的DAG和18:1酰基-CoA分别用¹⁴C放射性标记。将富集的DGAT酶蛋白和放射性底物加入反应体系, 通过反应生成放射性TAG的多少和速率来检测

DGAT活性。与非转基因(NT)和空载体对照(VC)的亚麻荠种子相比, *VgDGAT1*转基因系种子的DGAT活性提高了至少30多倍(图5), 各转基因系种子的DGAT活性也有显著差异($P < 0.05$)。我们进一步将各T₃代转基因种子的*VgDGAT1* mRNA表达量与其DGAT活性作相关分析(图6), 发现二者呈正相关($R^2 = 0.7922$), 表明在转基因亚麻荠种子中, *VgDGAT1*基因不仅能高效表达, 且编码的蛋白具有正确的DGAT活性。

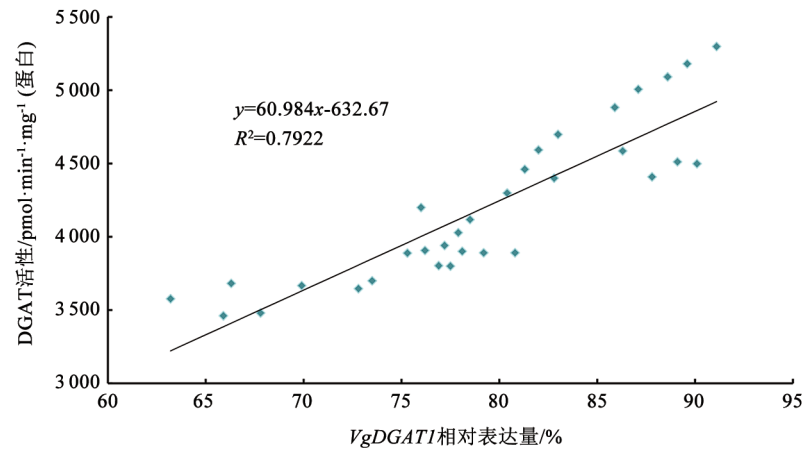


图6 T₃代转基因亚麻荠发育种子中*VgDGAT1*表达与DGAT活性相关性分析

Fig.6 The relation between *VgDGAT1* expression and DGAT activity for T₃ transgenic camelina seeds

3 *VgDGAT*超表达促进亚麻荠种子油脂积累但不损伤蛋白积累

为检测*VgDGAT1*基因超表达及DGAT活性显著提高是否引起亚麻荠种子油脂和蛋白质合成积累发生明显变化,我们分别测试T₃代转基因系成熟种子的含油量和蛋白含量。如图7所示,*VgDGAT1*转基因系种子含油量由非转基因(NT)的37%提高到46%~51%,比非转基因(NT)和空载体对照(VC)的亚麻荠种子含油量增加了9%~14%。然而,与非转基因(NT)和空载体对照(VC)的亚麻荠种子蛋白含量(28%)相比,*VgDGAT1*转基因种子的蛋白含量(27.5%~29.6%) (图7)则没有显著变化,尽管部分转

基因系蛋白含量有轻微上升。显然, DGAT活性的提高加快了TAG合成,进而拉动油脂合成途径上游合成更多的脂肪酸,使得油脂积累增多。但这种油脂积累上升并没有以消耗蛋白质积累为代价。

为检测这种转基因高油表型是否能稳定遗传,我们对温室生长收获的T₃代转基因系及其衍生的T₄代转基因种子的含油量作对比(图8),统计分析揭示T₃代种子含油量与相应T₄代种子含油量高度正相关($R^2=0.8538$)。可见这种转基因高油表型是能够稳定遗传的。进一步需在大田条件下进行多年多点试验来评估这种高油性状表达的稳定性。

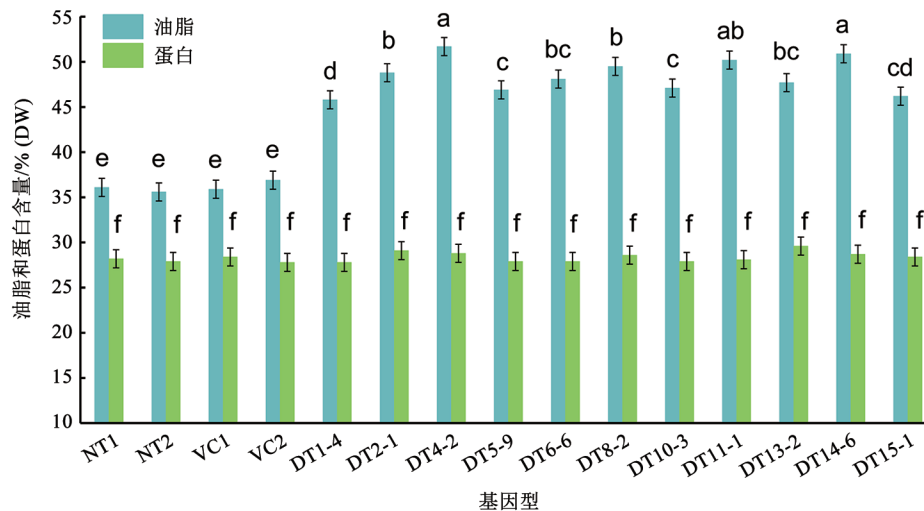


图7 *VgDGAT1*转基因亚麻荠T₃代种子中油脂和蛋白含量

Fig.7 Oil and protein contents of T₃ *VgDGAT1*-transgenic camelina seeds

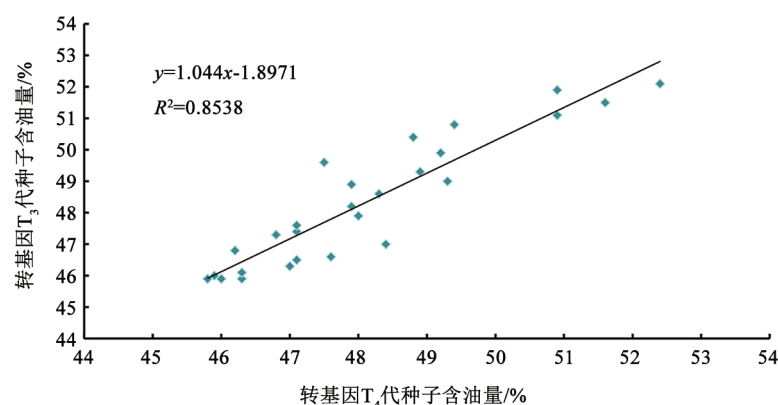
图8 *VgDGAT1*转基因亚麻荠T₃和T₄代种子高油表型的遗传分析

Fig.8 Heritability of the high oil trait from T₃ transgenic seeds (generation) to the average values for the corresponding T₄ seeds (progeny) of camelina

4 *VgDGAT*超表达对亚麻荠种子重量和种子萌发的影响

为深入分析*VgDGAT1*种子特异超表达是否对亚麻荠产量等农艺性状产生负影响, 本文定量检测T₃代转基因成熟种子的百粒重和种子萌发特性等表型。对百粒重而言(图9), 所测转基因系(102~110 mg)都不低于非转基因和空载体对照的种子(98~99 mg), 其中约72%转基因系种子百粒重高于对照种子平均5.7 mg以上($P < 0.05$), 尽管统计分析未达极显著水平($P < 0.01$)。种子萌发率(图10)和种子活力测试发现, 转基因系种子与对照种子没有明显差异。这些数据显示*VgDGAT1*种子特异超表达未对种子萌发等性状构成负影响, 而且还导致

种子百粒重小幅度提高。进一步需在大田条件下检验转基因表达是否对其他农艺性状产生影响。

讨 论

亚麻荠是重新发掘的可广泛用于生产优质生物燃油和富营养保健品以及其他高值油脂化工产品的“低耗、高效、环保”非粮型油料作物。培育种子油脂和蛋白含量双高及其他农艺性状优良的种质/品种将极大增加基于亚麻荠种子的燃油业和油脂工业的商业开发利用经济价值和社会效益。本文首次报道应用基因工程对二酰甘油酰基转移酶(DGAT1)进行遗传修饰, 获得了种子含油量显著提高、而蛋白积累不减、且其他农艺性状未现负

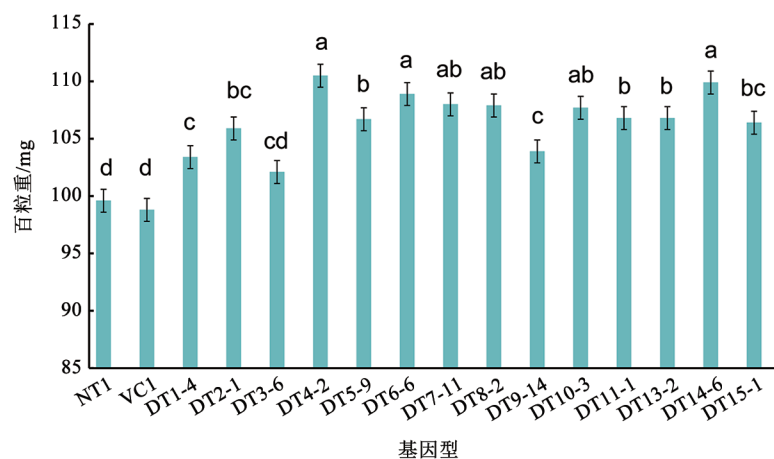
图9 对照和*VgDGAT1*转基因亚麻荠T₃代种子的百粒重

Fig.9 100-seed weight of the control and T₃ *VgDGAT1*-transgenic camelina

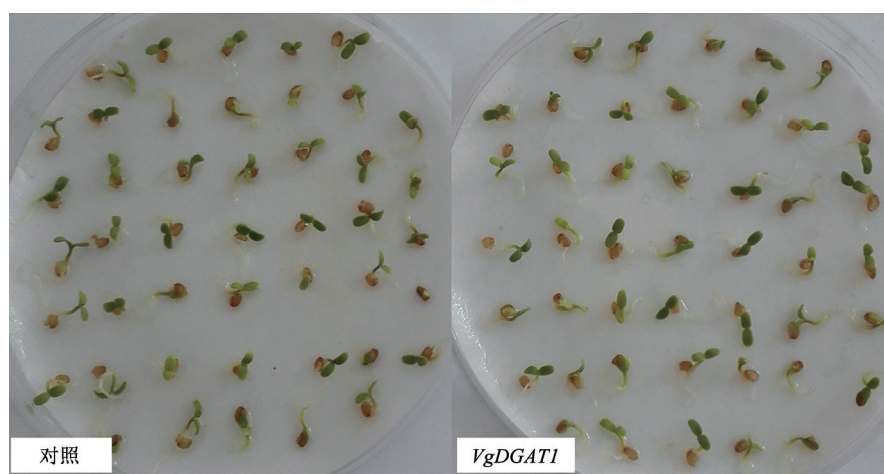


图10 对照和*VgDGAT1*转基因亚麻荠种子的萌发

Fig.10 Germination of the control and *VgDGAT1*-transgenic camelina seeds

效应的亚麻荠转基因新种质。

如前文所述, DGAT是控制种子TAG生物合成和油脂积累的关键限速酶之一。反义抑制油菜(*Brassica napus*) DGAT基因表达, 引起转基因油菜种子含油量显著减少, 且种子发育不正常(Lock等2009), 显示DGAT在种子油脂合成积累中起重要作用。Jako等(2001)发现, 种子特异表达(*napin*启动子驱动)拟南芥*AtDGAT1*, 导致拟南芥种子含油量由野生型的27%上升到32%~37%, 平均提高了7.5%。转基因拟南芥种子千粒重由野生型的19.6 mg增加到20.3~25.8 mg, 平均上升约3.8 mg。Lardizabal等(2008)从一种真菌*Umbelopsis ramanniana*分离到*UrDGAT2A*基因, 对其密码子作适于植物表达优化编辑后导入大豆, 种子特异表达(大豆7S-a启动子)优化的*UrDGAT2A*基因提高了种子油脂的合成积累。*UrDGAT2A*高表达的纯合转基因大豆品系经多年多点大田试验, 大豆种子含油量比非转基因对照平均提高了1.5%, 蛋白质含量减少与对照相比未达显著水平($P < 0.05$), 转基因种子产量与非转基因对照相比也没有明显差异。将该*UrDGAT2A*基因在玉米种子胚中特异表达(由大麦胚增强型启动子*Per1*驱动), 使玉米籽粒含油量比非转基因对照(含油量为4%)提高了0.2%~0.6% (Oaks等2011)。同样的*Per1*启动子驱动另一个真菌*Neurospora crassa*的DGAT2基因(*NcDGAT2*)在玉米籽粒中超表达, 导致玉米籽粒含油量上升0.5%~0.9%。尽管这种*NcDGAT2*转基因玉米品系种子产量与对

照相比没有显著差异, 但其种子萌发及幼苗生长表现出轻度生理障碍(Oaks等2011)。有趣的是, 在玉米种子胚中特异表达(种胚特异的16 kDa油质蛋白启动子驱动)玉米本身DGAT1-2的高油等位基因ASKC281B1, 较大幅度促进玉米籽粒中油脂积累, 含油量比野生型提高了0.9%~1.3%, 同时引起油酸含量上升18%和亚油酸减低13.7% (Zheng等2008)。可见, 超表达DGAT提高种子油脂积累的幅度以及对其他农艺性状的影响大小在不同植物上的效应会有差异, 这可能与DGAT的来源、使用的种子特异启动子和受体植物种类不同有关。

我们实验室从一种野生菊科油料植物*Vernonia galamensis*发育种子中分离到编码DGAT1的cDNA克隆(*VgDGAT1*), 前期一系列试验证明*VgDGAT1*是迄今检测的活性较高的一个DGAT (Yu等2006, 2008; Li等2010b, 2012)。本文应用种子特异启动子(菜豆蛋白phaseolin启动子)驱动*VgDGAT1*在亚麻荠发育种子中超表达。对转基因亚麻荠株系表型分析显示, *VgDGAT1*基因纯合转基因系成熟种子含油量由非转基因的37%提高到46%~51% (图7), 蛋白含量(28%)与对照相比没有减低(图7), 而且部分转基因系种子蛋白含量有所升高, 尽管未达显著水平。此外, 72%的*VgDGAT1*转基因亚麻荠种子百粒重也平均提高了5.7 mg (图9) ($P < 0.05$), 尽管未达极显著水平($P < 0.01$)。高油转基因亚麻荠种子活力和萌发率(图10)以及株高和生育期等其他农艺性状(数据未发表)与非转基因品系和对

照品系没有差异。温室条件下, T₃代转基因种子含油量与相应T₄代转基因种子含油量呈正相关($R^2=0.8538$) (图8), 说明这种转基因高油表型是可稳定遗传的。这与上述种子特异表达DGAT导致种子高油表型遗传一致, 进一步还需在大田条件下验证本文获得的转基因高油亚麻荠表型及其稳定性。

统计分析表明, 不仅*VgDGATI* mRNA表达量和转基因种子DGAT活性(图6)为正相关($R^2=0.7922$), 而且DGAT活性与种子含油量也呈正相关($R^2=0.74$) (数据未发表)。与此结果相似的是, Oakes等(2011)在玉米种子超表达真菌*DGAT2*和Jako等(2001)在拟南芥种子超表达*AtDGATI*的研究也发现转基因表达水平、DGAT活性和种子含油量之间存在中等水平的线性相关性。这些例证显示发育种子具有某种可塑性使种子增加油脂积累成为可能。种子特异超表达DGAT, 使DGAT活性显著增强, 势必消耗更多的DGA和酰基-CoA分子和扩充TAG库容量。这种代谢变化很可能产生某种生理信号反过来上调油脂合成途径上游步骤, 促使更多的光合产物用于油脂合成。种子油脂的高积累进而也促进种子重量的增加。另外, 为检测用于油脂合成增加所需的额外碳源是否来自于其他储藏化合物合成的减少, 我们测试了*Vg-DGATI*超表达的亚麻荠成熟种子多糖类储藏物积累情况, 与对照植株相比, 这类储藏物平均减少了约4.9% (数据未发表)。与之相似的是, Lardizabal等(2008)对*UrDGAT2A*基因超表达的大豆种子检测发现寡聚糖类化合物相应降低。在DGAT超表达的发育种子中, 这种多糖类化合物减少所节省的碳源很可能部分地用于种子油脂合成, 从而使种子油脂含量提高。种子油脂合成的提高可能没有明显影响到用于蛋白质合成的碳源供给, 因而蛋白质合成积累与在非转基因对照种子中一样, 未受干扰。未来需设计精细试验鉴定超表达DGAT的发育种子中来自光合作用的碳源是如何分配到油脂和蛋白质以及其他储藏物合成途径的机制。

总之, 种子特异超表达*VgDGATI*基因显著提高了亚麻荠发育种子DGAT活性, 不仅较大幅度提高了种子油脂合成积累, 而且打破了种子油脂含量与蛋白含量负连锁, 未对蛋白质合成积累和种子重

量等农艺性状造成负影响。研究结果为全面解析亚麻荠等油料作物种子油脂等储藏物合成积累调控机制和进一步建立油料作物种子油脂遗传改良的代谢工程策略提供了理论及技术参考。

参考文献

- 邓乾春, 黄凤洪, 黄庆德, 谢笔钧, 钮琰星, 万楚筠, 刘昌盛(2009). 一种高利用价值油料作物—亚麻荠的研究进展. 中国油料作物学报, 31 (4): 551~559
- 吴永美, 毛雪, 王书建, 薛金爱, 贾小云, 王计平, 杨致荣, 李润植(2011). 植物 ω -7脂肪酸的系统代谢工程. 植物学报, 46 (5): 575~585
- 谢光辉, 秦烁, 薛帅, 梁振兴(2012). 亚麻荠作为生物柴油原料树种的研究现状与前景分析. 中国农业大学学报, 17 (6): 239~246
- 薛金爱, 毛雪, 吴永美, 杨致荣, 贾小云, 张莉, 王计平, 岳爱琴, 孙希平, 李润植(2013). 酿酒酵母脂酰- Δ^9 脱氢酶亚细胞定位表达及其对烟草脂肪酸合成的影响. 生物工程学报, 29 (5): 630~645
- 岳爱琴, 李润植(2009). 新型可再生工业用油脂的代谢工程. 中国生物化学与分子生物学报, 25 (6): 501~509
- Burgal J, Shockey J, Lu C, Dyer J, Larson T, Graham I, Browse J (2008). Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. Plant Biotechnol J, 6: 819~831
- Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sandager L, Ronne H, Stymne S (2000). Phospholipid: diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. Proc Natl Acad Sci USA, 97 (12): 6487~6492
- Eynck C, Falk KC (2013). Camelina (*Camelina sativa*). In: Singh BP (ed). Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics. London: Center for Agriculture and Bioscience International, 369~391
- Gehringer A, Friedt W, Luhs W, Snowdon, RJ (2006). Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*). Genome, 49 (12): 1555~1563
- Jako C, Kumar A, Wei Y, Zou J, Barton DL, Giblin EM, Covello PS, Taylor D (2001). Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. Plant Physiol, 126 (2): 861~874
- Kagale S, Koh C, Nixon J, Bollina V, Clarke WE, Tuteja R, Spillane C, Robinson SJ, Links MG, Clarke C et al (2014). The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure. Nat Commun, 5: 3706
- Lardizabal K, Effertz R, Levering C, Mai J, Pedroso MC, Jury T, Aasen E, Gruys K, Bennett K (2008). Expression of *Umbelopsis ramanniana DGAT2A* in seed increases oil in soybean. Plant Physiol, 148 (1): 89~96
- Li R, Hatanaka T, Yu K, Wu Y, Fukushinge H, Hildebrand DF (2013). Soybean oil biosynthesis: roles of diacylglycerol acyltransferase. Funct Integr Genomics, 13 (1): 99~117
- Li R, Yu K, Hatanaka H, Hildebrand DF (2010a). *DGAT1*, *DGAT2*

- and *PDAT* expression in seed and other tissues of epoxy and hydroxyl fatty acid accumulation plant. *Lipids*, 45 (2): 145~157
- Li R, Yu K, Hatanaka T, Hildebrand DF (2010b). *Vernonia* DGATs increase accumulation of epoxy fatty acids in oil. *Plant Biotechnol J*, 8 (2): 184~195
- Li R, Yu K, Wu Y, Tateno M, Hatanaka T, Hildebrand DF (2012). *Vernonia* DGATs can complement the disrupted oil and protein metabolism in epoxygenase-expressing soybean seeds. *Metab Eng*, 14 (1): 29~38
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25: 402~408
- Lock YY, Snyder CL, Zhu W, Siloto RMP, Weselake RJ, Sha S (2009). Antisense suppression of type 1 diacylglycerol acyltransferase adversely affects plant development in *Brassica napus*. *Physiol Plant*, 137: 61~71
- Lu C, Kang J (2008). Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep*, 27: 273~278
- Moser BR (2012). Biodiesel from alternative oilseed feedstocks: camelina and field pennycress. *Biofuels*, 3: 193~209
- Nguyen HT, Silva JE, Podicheti R, Macrander J, Yang W, Nazarens TJ, Nam J-W, Jaworski JG, Lu C, Scheffler BE et al (2013). Camelina seed transcriptome: a tool for meal and oil improvement and translational research. *Plant Biotechnol J*, 11 (6): 759~769
- Oakes J, Brackenridge D, Colletti R, Daley M, Hawkins DJ, Xiong H, Mai J, Screen SE, Val D, Lardizabal K et al (2011). Expression of fungal *diacylglycerol acyltransferase2* genes to increase kernel oil in maize. *Plant Physiol*, 155 (3): 1146~1157
- Ohlrogge JB, Browse J (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 957~970
- Séguin-Swartz G, Eynck C, Gugel R, Strelkov S, Olivier C, Li J, Klein-Gebbinck H, Borhan H, Caldwell C, Falk K (2009). Diseases of *Camelina sativa* (false flax). *Can J Plant Pathol*, 31: 375~386
- Shockey JM, Gidda SK, 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: 2294~2313
- Singh R, Bollina V, Higgins EE, Clarke WE, Eynck C, Sidebottom C, Gugel R, Snowdon R, Parkin IA (2015). Single-nucleotide polymorphism identification and genotyping in *Camelina sativa*. *Mol Breeding*, 35: 35
- Vollmann J, Eynck C (2015). Camelina as a sustainable oilseed crop: Contributions of plant breeding and genetic engineering. *Biotech J*, doi: 10.1002/biot.201400200
- Vollmann J, Moritz T, Kargl C, Baumgartner S, Wagentristl H (2007). Agronomic evaluation of camelina genotypes selected for seed quality characteristics. *Ind Crop Prod*, 26 (3): 270~277
- Wu Y, Li R, Hildebrand DH (2012). Biosynthesis and metabolic engineering of palmitoleate production, an important contributor to human health and sustainable industry. *Prog Lipid Res*, 51 (4): 340~349
- Xue JA, Mao X, Yang ZR, Wu YM, Jia XY, Zhang L, Yue AQ, Wang JP, Li RZ (2013). Expression of yeast acyl-CoA- $\Delta 9$ desaturase leads to accumulation of unusual monounsaturated fatty acids in soybean seeds. *Biotech Lett*, 35 (6): 951~959
- Yu K, Li R, Hatanaka T, Hildebrand DF (2008). Cloning and functional analysis of two type 1 diacylglycerol acyltransferases from *Vernonia galamensis*. *Phytochemistry*, 69: 1119~1127
- Yu K, McCracken Jr CT, Li R, Hildebrand DF (2006). Diacylglycerol acyltransferase from *Vernonia* and *Stokesia* prefer substrates with vernolic acid. *Lipids*, 41: 557~566
- Zhang M, Fan J, Taylor DC, Ohlrogge JB (2009). *DGAT1* and *PDAT1* acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell*, 21: 3885~3901
- Zheng P, Allen WB, Roesler K, Williams ME, Zhang S, Li J, Glassman K, Ranch J, Nubel D, Solawetz W et al (2008). A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize. *Nat Genet*, 40 (3): 367~372