

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201612013

引文格式: 余进德, 熊宏, 宋健, 等. 麻疯树种子发育过程中 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 基因的表达模式研究 [J]. 广西植物, 2017, 37(9): 1096–1100

YU JD, XIONG H, SONG J, et al. Expression patterns of *JcOle14.3* and *JcOle16.6* in different developmental stages of *Jatropha curcas* seeds [J]. *Guihaia*, 2017, 37(9):1096–1100

## 麻疯树种子发育过程中 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 基因的表达模式研究

余进德, 熊宏, 宋健, 陈海涛, 刘小焯, 丁勇\*

(西南林业大学 生命科学学院, 昆明 650224)

**摘要:** 油质蛋白基因对种子中油体的形成至关重要, 该研究通过实时荧光定量 PCR, 对麻疯树的两个油质蛋白基因 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 在种子不同发育时期的表达模式进行了分析。结果表明: 两个基因在种子发育初期 (10~30 d) 表达量逐渐升高, 但表达水平均较低; 40 d 时表达量急剧增加并达到最高, 而种子发育后期 (50~55 d) 两个基因表达水平均逐渐降低。由此可初步推测, *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 基因的表达量可能与种子油脂积累量存在正相关。该研究结果为麻疯树油体形成机理和油质蛋白的深入研究提供了理论基础。

**关键词:** 麻疯树, 种子, 油质蛋白, 荧光定量, 表达分析

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)09-1096-05

## Expression patterns of *JcOle14.3* and *JcOle16.6* in different developmental stages of *Jatropha curcas* seeds

YU Jin-De, XIONG Hong, SONG Jian, CHEN Hai-Tao, LIU Xiao-Zhu, DING Yong\*

(College of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

**Abstract:** The oleosin gene is very important to the formation of oil body in seeds, present study analyzed the expression patterns of oleosin genes *JcOle14.3* and *JcOle16.6* in different development stages of *Jatropha curcas* seeds by quantity RT-PCR, and the results showed that the expression levels of *JcOle14.3* and *JcOle16.6* were increased gradually at the early development stage (10–30 d) of seeds, but the levels were low. However, on the 40th day after pollinated, the expression levels of these two genes increased dramatically and arrived the highest, and the levels were reduced at the late development stage (50–55 d) of seeds. The results could be presumed that the expression levels of *JcOle14.3* and *JcOle16.6* may have the positively correlation with the lipid accumulation in the seeds.

**Key words:** *Jatropha curcas*, seeds, oleosin, quantity RT-PCR, expression analysis

收稿日期: 2017-02-16 修回日期: 2017-03-26

基金项目: 云南省生物学优势特色重点学科建设项目 (50097505); 云南省高校林下生物资源保护及利用科技创新团队项目 (51400605) [Supported by the Key Discipline Construction Project of Biology in Yunnan Province, China (50097505); Science and Technology Innovation Team for Forest Biological Resources Protection and Utilization of Yunnan Province Colleges and Universities (51400605)].

作者简介: 余进德 (1983–), 男, 云南宣威人, 博士, 讲师, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究, (E-mail) yusundt@163.com。

\*通信作者: 丁勇, 高级实验师, 硕士研究生导师, 研究方向为分子生物学, (E-mail) dingyong@swfu.edu.cn。

麻疯树 (*Jatropha curcas*) 为大戟科 (Euphorbiaceae) 麻疯树属 (*Jatropha*) 多年生落叶灌木或小乔木 (刘志军等, 2005), 主要分布于中美、南美、东南亚、印度和非洲 (Choodhury, 2001), 在我国产于广东、广西、云南、四川、贵州、台湾、福建和海南等地 (张明生等, 2005)。麻疯树植物油脂含量很高, 并主要以油体的形式储存于种子中, 其含油率高达 40%~60% (王岩等, 2007), 是目前最具潜力的生物柴油原料 (王涛, 2005; Wu et al, 2009)。

植物油脂作为理想的生物柴油之一, 广泛存在于植物的根、茎、叶、花和种子中, 但主要以油体的形式存在于种子中 (Huang, 1992, 1996), 并可作为种子的萌发和幼苗的生长提供能量储备 (Wanner et al, 1981)。油体由中性脂肪、磷脂和蛋白质组成。从结构上看, 油体内部主要为液态的三酰甘油酯中性脂肪, 外层则被磷脂单分子层及附着于其上的油体结合蛋白所包被, 而油体结合蛋白包括油质蛋白 (oleosin)、油体钙蛋白 (caleosin)、油体固醇蛋白-A (steroleosin-A) 和油体固醇蛋白-B (steroleosin-B) (Tzen et al, 1990, 1997; 丁勇等, 2012), 其中 oleosin 最早被发现, 且含量最丰富, 占 90% 左右。研究表明, 作为最主要的油体相关蛋白, oleosin 可能对油体的形成、稳定及油脂代谢等过程均起着重要的生物学作用 (Tzen & Huang, 1992; Chen et al, 1999; Millichip et al, 1996; Naested et al, 2000)。截至目前, oleosin 基因已从麻疯树、芝麻 (*Sesamum indicum*) (Chen et al, 1999; Lin et al, 2002)、油菜 (*Brassica campestris*) (Murphy et al, 1989; Keddie et al, 1992; 丁勇等, 2008, 2010)、水稻 (*Oryza sativa*) (Frandsen et al, 1996) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (Naested et al, 2000) 等植物中分离克隆。Wu et al (1999) 研究发现, oleosin 基因以为为数不多的基因家族形式存在, 其中在裸子植物中仅发现一种 oleosin 基因, 在被子植物中有两种不同的 oleosin 蛋白异构体, 并且存在于同一油体上 (Tzen et al, 1998), 而在麻疯树中, 本课题组已克隆了两个 oleosin 基因: *JcOle14.3* (GenBank: JX073623) 和 *JcOle16.6* (GenBank: JX073622) (宋健等, 2016; 熊宏等, 2016), 表明麻疯树中 oleosin 基因亦以基因家族的形式存在, 该文在此基础上对这两个基因进行了深入研究。

当油体在植物种子中开始形成时, oleosin 基因

随即转录并翻译成油质蛋白, 这些油质蛋白镶嵌于油体表面, 并且具有电荷斥力和空间位阻效应, 从而维持了油体结构的稳定性 (Tzen & Huang, 1992)。Murphy et al (1989) 研究表明, 油菜种子在发育早期 (花后前 6 周), oleosin 的 mRNA 表达量较低, 而在花后 6~12 周, 即油体的大量形成与稳定时期, mRNA 表达量迅速增高并维持在较高水平。同样的结果显示, 在芝麻种子的发育过程中, oleosin 基因亦有相似的表达模式 (Lin et al, 2002)。然而, 麻疯树种子作为最具潜力的生物柴油来源, 其发育过程中 oleosin 基因 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 的表达特性尚未见报道。该文拟从麻疯树种子的不同发育时期研究 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 基因的表达模式, 进而阐明 oleosin 基因在麻疯树种子中的表达特性, 为麻疯树油体形成机理以及 oleosin 蛋白的深入研究提供理论基础, 同时为利用麻疯树进行生物柴油的生产提供重要的实践指导意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

麻疯树种子采自于云南省西双版纳热带植物研究所。在麻疯树花序未开放时去除雄花并进行套袋, 当雌花开放时进行人工授粉, 授粉当天记为种子发育 0 d, 授粉后对不同发育阶段 (10、20、30、40、50 和 55 d) 的种子进行取样; 选取 9 株植株, 并以每 3 株植株上的种子混合为 1 个样品, 3 次重复, 每个发育阶段的取样方法与上相同。样品用液氮速冻后保存于 -80 °C 低温冰箱备用。

### 1.2 方法

1.2.1 样品 RNA 的提取及反转录 种子样品总 RNA 提取参照丁勇等 (2012) 的方法进行, cDNA 的合成按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明合成。

1.2.2 基因表达分析 利用荧光定量 PCR 对麻疯树种子不同发育阶段的 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 基因进行表达模式分析, 每个样品 3 次重复。荧光定量 PCR 采用 SYBR Green master mix (Fermentas) 法进行。 *JcOle14.3* 引物为 *JcOle14.3*-qF (5'-GGATCTCT-TCTAGTTCTCT-3'), *JcOle14.3*-qR (5'-TGAATAT-GACCAGCAATG-3'); *JcOle16.6* 引物为 *JcOle16.6*-qF

(5'-AGCCACACGTTCAAG-3'), *JcOle16.6*-qR (5'-TCTGAGCTGATGGACCTT-3'); 内参基因 18S (GenBank: AY823528.1) 引物为 18S-qF (5'-ACATAGTA-AGGATTGACAGA-3'), 18S-qR (5'-TAACGGAATTA-ACCAGACA-3')。PCR 反应程序为 95 °C 解链 15 s, 60 °C 同时复性延伸 30 s, 40 个循环。基因相对表达量的计算方法采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法。

## 2 结果与分析

### 2.1 *JcOle14.3* 基因表达模式分析

以麻疯树种子发育第 10 天作为对照, 对麻疯树 *JcOle14.3* 基因在种子不同发育阶段的相对表达量进行了荧光定量 PCR 分析, 结果显示 (图 1), *JcOle14.3* 基因在整个种子发育过程中均有表达, 在种子发育初期 (10~30 d), 表达量有逐渐升高的趋势, 但表达较低, 而在发育 40 d 时, *JcOle14.3* 表达量急剧增加并达到最高, 是种子发育 10 d 的 90 多倍, 而在发育后期 (50~55 d) 表达量开始下降。

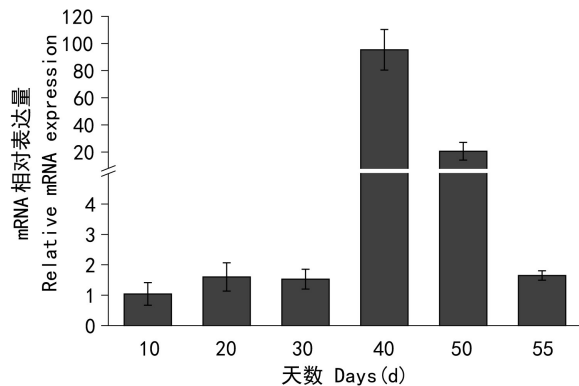


图 1 *JcOle14.3* 基因在种子不同发育时期的表达水平  
Fig. 1 Expression level of *JcOle14.3* in different developmental stages of seeds

### 2.2 *JcOle16.6* 基因表达模式分析

以同样的方法对麻疯树 *JcOle16.6* 基因在种子不同发育阶段的表达模式进行了分析。图 2 结果显示, *JcOle16.6* 表达情况与 *JcOle14.3* 相似, 在种子发育 40 d 前, *JcOle16.6* 表达量逐渐升高, 在授粉后 40 d 表达量急剧增加并达到最高, 为种子发育 10 d 的 110 多倍, 而发育 40 d 后表达量亦开始下降。

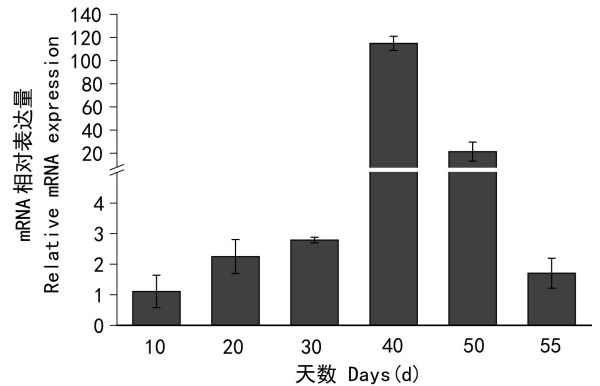


图 2 *JcOle16.6* 基因在种子不同发育时期的表达水平  
Fig. 2 Expression level of *JcOle16.6* in different developmental stages of seeds

## 3 讨论

麻疯树种子是最具潜力的生物柴油 (王涛, 2005; Wu et al, 2009), 而种子中的油体是开发生物柴油的前提, 故油体的形成至关重要。本研究在种子发育过程中, oleosin 基因 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 的表达情况对油体的形成、稳定和大小均起到重要作用。本研究表明, *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 在种子发育阶段的表达呈先升高后降低的趋势, 在发育初期 (10~30 d), 两个基因的表达量均较低, 而第 40 天表达量迅速增加并达到最高, 40 d 后两个基因的表达量又逐渐降低。本研究推测麻疯树种子发育初期因油体形成量较少, 故 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 表达量虽然逐渐增加, 但表达量较低。发育至 40 d 时, 种子中的油体大量形成并得以逐渐稳定, 两个基因的表达量也急剧增加并达到最大值。40 d 后, 即种子成熟后期, 油体形成量逐渐减低, 表达量亦随之降低。文锦芬等 (2014) 的研究表明, 在麻疯树果实发育过程中, 与油脂合成相关的酰基辅酶 A 结合蛋白基因 (*JcACBP*) 的表达也表现先升高后降低的趋势, 但该基因的表达在发育后期才略有下降, 而本研究 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 基因的表达在种子发育后期具有明显的下降趋势。造成以上结果不同的原因可能是由于麻疯树的生境及其种子成熟期存在差异所致。如文锦芬等 (2014) 实验材料来自云南昆明, *JcACBP* 的表达在种子发育 50 d 时达

到最高,而本研究的实验材料采自云南西双版纳热带植物研究所,种子发育 40 d 时 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 就达到最大值。此外,油菜和芝麻中的 oleosin 基因在种子成熟后期也保持较高的表达水平 (Murphy et al, 1989; Lin et al, 2002), 这可能是由于不同物种的油脂积累模式不同,从而 oleosin 基因的表达模式不同所导致。

以往研究表明,麻疯树 *JcACBP* 基因的表达量与油脂含量变化趋势基本一致 (文锦芬等, 2014), 而本研究结果显示 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 的表达模式与 *JcACBP* 相似,暗示 *JcOle14.3* 和 *JcOle16.6* 的表达量与麻疯树油脂合成亦存在正相关性。

## 参考文献:

CHEN JC, TSAI CC, TZEN JT, 1999. Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seed [J]. *Plant Cell Physiol*, 40 (10): 1079-1086.

CHOODHURY A, 2001. An overview of the status and conservation of the red panda *Ailurus fulgens* in the India, with reference to its global status [J]. *Oryx*, 35(3): 250-259.

DENG ZJ, CHENG HY, SONG SQ, 2005. Studies on *Jatropha curcas* seed [J]. *Acta Bot Yunnan*, 27(6): 605-612. [邓志军, 程红焱, 宋松泉, 2005. 麻疯树种子的研究进展 [J]. 云南植物研究, 27(6): 605-612.]

DING Y, FAN HB, ZHANG GL, et al, 2012. Study on methods of total RNA isolation from seeds of *Jatropha curcas* L. [J]. *J Centy S Univ For Technol*, 32(3): 158-161. [丁勇, 范红波, 张高磊, 等, 2012. 麻疯树种子总 RNA 提取方法研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 32(3): 158-161.]

DING Y, XU CL, GAN L, 2008. Progress in plant oil bodies and their proteins [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 27(4): 558-563. [丁勇, 徐春雷, 甘莉, 2008. 植物油体及其相关蛋白的研究进展 [J]. 华中农业大学学报, 27(4): 558-563.]

DING Y, CHANG W, LIU XZ, 2010. Molecular cloning, expression vector construction and prokaryotic expression of *BnClo1* gene from *Brassica napus* [J]. *Sci Agric Sin*, 43 (2): 252-258. [丁勇, 常玮, 刘小焯, 2010. 甘蓝型油菜 *BnClo1* 基因克隆、表达载体的构建及原核表达 [J]. 中国农业科学, 43(2): 252-258.]

FRANSEN GI, MULLER UF, NIELSEN M, et al, 1996. Novel plant  $Ca^{2+}$ -binding protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress [J]. *J Biol Chem*, 271(1): 343-348.

HUANG AH, 1992. Oil bodies and oleosins in seeds [J]. *Ann Rev Plant*, 43(1): 177-200.

HUANG AH, 1996. Oleosin and oil bodies in seeds and other organs [J]. *J Plant Physiol*, 110(4): 1055-1061.

KEDDIE JS, HUBNER G, SLOCOMBE SP, et al, 1992. Cloning and characterization of an oleosin gene from *Brassica napus* [J]. *Plant Mol Biol*, 19(3): 443-453.

LIN LJ, TAI SS, PENG CC, et al, 2002. Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies [J]. *J Plant Physiol*, 128(4): 1200-1211.

MILLICHIP M, TATHAM A, JACKSON F, et al, 1996. Purification and characterization of on bodies (oleosomes) and oil-body boundary proteins (oleosins) from the developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. *Biochem J*, 314(1): 333-337.

MURPHY DJ, CUMMINS I, KANG AS, 1989. Synthesis of the major oil-body membrane protein in developing rapeseed embryos [J]. *Biochem J*, 258(1): 285-293.

NAESTED H, FRANSEN GI, JAUH GY, et al, 2000. Caleosins:  $Ca^{2+}$ -binding proteins associated with lipid bodies [J]. *Plant Mol Biol*, 44(4): 463-476.

SONG J, XIONG H, YU JD, et al, 2016. Cloning and sequence analysis of oleosin gene *JcOle14.3* in *Jatropha curcas* L. [J]. *J Centr S Univ For Technol*, 36(6): 15-22. [宋健, 熊宏, 余进德, 等, 2016. 麻疯树油质蛋白 *JcOle14.3* 基因克隆及序列分析 [J]. 中南林业科技大学学报, 36(6): 15-22.]

TZEN JT, LAI YK, CHAN KL, et al, 1990. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species [J]. *J Plant Physiol*, 94(3): 1282-1289.

TZEN JT, PENG CC, CHENG DJ, et al, 1997. A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination [J]. *J Biochem*, 121(4): 762-768.

TZEN JT, HUANG AH, 1992. Surface structure and properties of plant seed oil bodies [J]. *J Cell Biol*, 117(2): 327-335.

TZEN JT, CHUANG RL, CHEN JC, et al, 1998. Coexistence of both oleosin isoforms on the surface of seed oil bodies and their individual stabilization to the organelles [J]. *Biochem J*, 1998, 123(2): 318-323.

WANG Y, LONG CL, CHENG ZY, 2007. Utilization of *Jatropha Curcas* L., an "Energy Plant" for biodiesel [J]. *J Anhui Agr Sci*, 35(24): 426-427. [王岩, 龙春林, 程冶英, 2007. 能源植物小桐子的利用与研究进展 [J]. 安徽农业科学, 35(24): 426-427.]

WANG T, 2005. A survey of the woody plant resources for biomass fuel oil in china [J]. *Sci Technol Rev*, 5(23): 12-14. [王涛, 2005. 中国主要生物质燃料油木本能源植物资源概况与展望 [J]. 科技导报, 5(23): 12-14.]

- WANNER G, FORMANEK H, THEIMER RR, 1981. The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells ultrastructural evidence [J]. *Planta*, 151(2):109-123.
- WEN JF, GONG M, CHEN K, et al, 2014. Cloning and expression analysis of a new Acyl-CoA \_ binding protein (*JcACBP*) identified from *Jatropha curcas* L. [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 34(11):2159-2164. [文锦芬, 龚明, 陈凯, 等, 2014. 小桐子 *JcACBP* 基因克隆和序列分析 [J]. *西北植物学报*, 34(11):2159-2164.]
- WU WG, HUANG JK, DENG XZ, 2009. Potential land for plantation of *Jatropha curcas* as feedstocks for biodiesel in China [J]. *Sci Chin Earth Sci*, 53(1):120-127.
- WU LS, HONG GH, HOU RF, et al, 1999. Classification of the

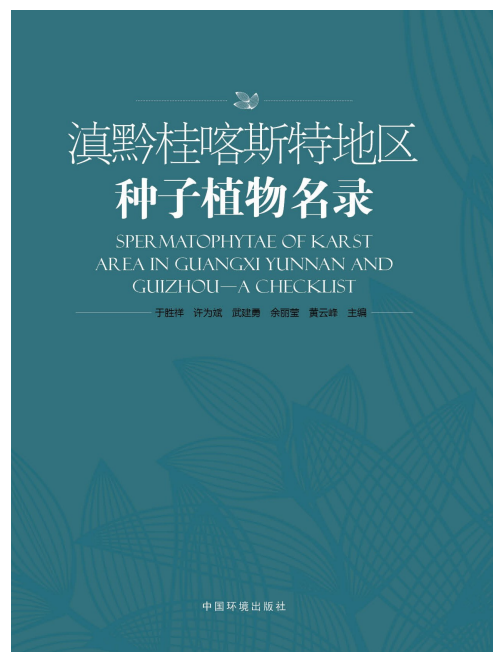
- single oleosin isoform and characterization of seed oil bodies in gymnosperms [J]. *Plant Cell Physiol*, 3(40):326-334.
- XIONG H, CHEN HT, SONG J, et al, 2016. Cloning and sequence analysis of oleosin gene *JcOle16.6* in *Jatropha curcas* L. [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 44(6):84-89. [熊宏, 陈海涛, 宋健, 等, 2016. 麻风树油质蛋白 *JcOle16.6* 基因克隆及序列分析 [J]. *江苏农业科学*, 44(6):84-89.]
- ZHANG MS, FAN WG, YIN J, et al, 2005. Biological characteristic, resource distribution, exploitation and utilization of *Jatropha curcas* [J], *Guizhou Agric Sci*, 33(6):97-98. [张明生, 樊卫国, 尹杰, 等, 2005. 麻风树资源概况及其开发利用 [J]. *贵州农业科学*, 33(6):97-98.]

## 《滇黔桂喀斯特地区种子植物名录》正式出版发行

中国科学院植物研究所、广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所、环境保护部南京环境科学研究所等6家单位联合编著的《滇黔桂喀斯特地区种子植物名录》日前由中国环境出版社正式出版发行。

《滇黔桂喀斯特地区种子植物名录》共602页,收录了滇黔桂喀斯特地区野生及常见外来栽培的种子植物226科、1737属、8795种(含种下等级,下同)。本土植物209科、1621属、8553种,其中常见栽培植物64种,外来植物(含入侵种)178种。裸子植物按郑万钧、傅立国1977年《中国植物志》系统编排,共计9科、22属、70种;被子植物按哈钦松1926、1934年系统编排,共计217科、1715属、8725种。属、种按拉丁字母顺序排列,书后附有科、属名索引,便于查阅和检索。

本书可供植物区系学、植物地理学、植物分类学、植物生态学、植物资源学、植物多样性



保护、农业、林业、园林园艺、医药卫生等相关专业师生、科研院所研究人员以及海关、环境保护部门等政府决策者参考使用。