

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.24063

CSTR: 32231.14.PSJ.2095-0837.24063

惠生娟, 葛丽萍, 王子瑜, 张玉胜, 苏云婷, 孙岩, 李润植. 续随子 MYB 基因家族的鉴定及 EIMYB114 在油脂合成中的功能分析[J]. 植物科学学报, 2025, 43 (1): 92-101

Hui SJ, Ge LP, Wang ZY, Zhang YS, Su YT, Sun Y, Li RZ. Identification of MYB gene family and functional analysis of EIMYB114 in lipid synthesis of *Euphorbia lathyris* L.[J]. *Plant Science Journal*, 2025, 43 (1): 92-101

续随子 MYB 基因家族的鉴定及 EIMYB114 在油脂合成中的功能分析

惠生娟^{1,3}, 葛丽萍^{1*}, 王子瑜¹, 张玉胜¹, 苏云婷^{1,2}, 孙岩^{1,2}, 李润植^{2,3}

(1. 山西农业大学林学院, 山西太谷 030801; 2. 山西省特用作物遗传和代谢工程研究中心, 山西太谷 030801;

3. 山西农业大学分子农业与生物能源研究所, 山西太谷 030801)

摘要: MYB 转录因子广泛参与植物的代谢和种子发育等生命过程。为探究其在续随子 (*Euphorbia lathyris* L.) 油脂合成及积累过程中的调控作用, 本研究对续随子 MYB 转录因子进行了全基因组鉴定, 分析了其基因结构、编码蛋白理化性质、启动子顺式元件以及时空表达谱, 并克隆了 EIMYB114 基因的编码序列, 将其转入烟草 (*Nicotiana tabacum* L.), 进一步鉴定该基因的生物学功能。结果显示: (1) 全基因组鉴定获得 199 个续随子 MYB 基因, 命名为 EIMYB1~EIMYB199, 编码蛋白均具有 SANT 结构域; (2) EIMYB114 编码的蛋白定位于细胞核; (3) 荧光定量 qRT-PCR 分析结果表明, EIMYB114 基因在种子发育后期的表达量最高; (4) 与转空载对照相比, 异源表达 EIMYB114 基因的烟草株系, 其叶片总油脂含量分别提高了 3.7% 和 4.2%, 种子总脂含量分别提高了 11.0% 和 10.7%, 表明过表达 EIMYB114 基因可提高植物组织的总油脂积累。研究为深入解析 MYB 介导的续随子油脂生物合成调控网络奠定了基础。

关键词: 续随子; MYB 转录因子; EIMYB114; 油脂合成与调控; 基因克隆

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837 (2025) 01-0092-10

Identification of MYB gene family and functional analysis of EIMYB114 in lipid synthesis of *Euphorbia lathyris* L.

Hui Shengjuan^{1,3}, Ge Liping^{1*}, Wang Ziyu¹, Zhang Yusheng¹, Su Yunting^{1,2},
Sun Yan^{1,2}, Li Runzhi^{2,3}

(1. College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China; 2. Shanxi Engineering Research Center for Genetics and Metabolism of Special Crops, Taigu, Shanxi 030801, China; 3. Institute of Molecular Agriculture and Bioenergy, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Abstract: MYB transcription factors play pivotal roles in plant metabolism and seed development. This study conducted a comprehensive investigation into the regulatory functions of these transcription factors in lipid synthesis and accumulation in *Euphorbia lathyris* L.. The analysis included genome-wide identification of MYB transcription factors, characterization of gene structures, physicochemical properties of encoded proteins, distribution of promoter *cis*-acting elements, and spatiotemporal expression patterns. The EIMYB114 coding sequence was cloned and genetically transformed into tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to characterize its biological function. Genome-wide identification revealed 199 MYB genes in *E. lathyris*, designated EIMYB1 to

收稿日期: 2024-04-16, 接受日期: 2024-05-22。

基金项目: 山西省自然科学基金项目 (201901D111223); 国家重点研发计划项目 (2023YFF0805800); 2022 年山西省研究生教育创新项目 (2022Y325)。

作者简介: 惠生娟 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物资源保护与利用 (E-mail: 18791565696@163.com)。

* 通信作者 (Author for correspondence. E-mail: 2052631809@qq.com)。

EIMYB199, all encoding proteins with SANT domains. The protein encoded by *EIMYB114* was localized to the nucleus. Quantitative fluorescence qRT-PCR analysis showed that *EIMYB114* expression peaked during the late stage of seed development. Overexpression of *EIMYB114* in transgenic tobacco lines led to a 3.7% and 4.2% increase in total oil content in leaves and an 11.0% and 10.7% increase in total lipid content in seeds compared to the empty vector control. These findings suggest that *EIMYB114* enhances carbon flux within the heterologous host toward lipid synthesis pathways, thereby promoting lipid accumulation in plant tissues. This study provides foundational insights into the MYB-mediated regulatory networks governing oil biosynthesis in *E. lathyris*.

Key words: *Euphorbia lathyris*; MYB transcription factor; *EIMYB114*; Lipid synthesis and regulation; Gene cloning

续随子 (*Euphorbia lathyris* L.) 种子中油分含量为 45% 左右, 包括油酸 (C18:1)、棕榈酸 (C16:0)、亚油酸 (C18:2)、 α -亚麻酸 (C18:3) 等, 其中油酸的含量高达 83% 左右^[1]。李昌珠等^[2]研究发现, 可将理想柴油替代品的分子式表示为 $C_{19}H_{36}O_2$ 。续随子种子油的脂肪酸成分以 C16 和 C18 为主, 与理想柴油替代品的分子组成相似, 是生产生物柴油的理想原料。生物柴油作为一种新型可再生的绿色能源, 可用于取代一般石化基柴油^[3]。

近年来, 植物油脂合成过程中的许多酶和基因已被鉴定, 而调控油脂代谢的转录因子报道较少。在植物转录因子家族中, 参与油脂代谢调控的主要有 AP2、B3、NF-Y、Dof、MYB、MYC 类基因家族。作为植物中最大的转录因子家族之一, MYB 转录因子在种子油脂合成过程中发挥重要作用^[4,5]。如, AtMYB96 通过激活拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 种子中 *DGAT1* 和 *PDAT1* 的表达来调节三酰甘油的积累^[6], AtMYB76 显著促进拟南芥种子和叶片中脂肪族芥子油苷的形成^[7], 而 MYB123 通过抑制油脂合成通路上多个基因的表达来抑制种子油脂的积累^[8,9]。Luo 等^[10]在乌拉尔图小麦 (*Triticum urartu* Tum.) 中发现了 R2R3-MYB 家族中的 *TuODORANT1* 基因, 将其在普通小麦 (*T. aestivum* L.) 中过表达, 能使成熟籽粒的总 SSP (种子贮藏蛋白) 水平下降。拟南芥 AtMYB96 被认为是调控脂肪酸链延伸的关键因子, 通过结合 *AtFAE1* 基因的特定启动子而促进长链脂肪酸的合成^[11]。拟南芥 *AtMYB5* 基因功能缺失突变体 *myb5-1* 的种子脂肪酸含量显著高于野生型^[12]。

上述研究表明, MYB 转录因子的表达与植物油脂合成等生物学过程密切相关, 但目前关于续

随子 MYB 转录因子的鉴定及功能分析鲜有报道。本研究通过对续随子 MYB 转录因子家族进行全基因组鉴定、生物信息学及表达特性分析, 并通过烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 遗传转化, 分析 MYB 转录因子在续随子油脂合成过程中的调控功能, 以期借助基因手段提高续随子油脂品质及产量提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料续随子来源于山西农业大学林学院产学研实训基地, 分别采集根、茎、叶样品。花取自续随子盛花期, 种子取自 3 个不同发育时期 (S1: 花后 15 d, S2: 花后 30 d, S3: 花后 45 d), 样品采集后立即置于液氮速冻, 然后存于 -80 °C 冰箱, 用于提取总 RNA。

本研究所用大肠杆菌 DH5 α 感受态、根癌农杆菌 GV-3101、植物过表达载体 pCambia1303 和 pCambia1300 均来源于山西农业大学农学院李润植实验室。引物合成及 DNA 测序均由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.2 研究方法

1.2.1 续随子 MYB 基因家族鉴定及生物信息学分析

为获得续随子 MYB 基因信息, 首先在 pfam 数据库下载 MYB 基因家族结构域的隐马尔科夫模型文件, 使用 hmmer 软件对续随子蛋白数据库进行比对搜索。同时, 利用 AtMYB 蛋白序列作为检索序列, 以续随子基因组数据为基础, 进行 BLAST 比对。对两种方法获得的结果进行筛选, 通过 NCBI-CDD 分析 EIMYB 蛋白的保守结构域, 剔除无 SANT 结构域的蛋白序列。根据文献^[13]报

道的方法对 MYB 转录因子进行分类；在 ExPasy 网站 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 中分析预测基因编码蛋白的分子量、等电点、氨基酸数目等理化性质；利用 TBtools 预测基因在染色体上的位置，并进行启动子分析；利用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 在线工具预测蛋白的亚细胞定位。

1.2.2 qRT-PCR 分析

根据续随子种子油脂含量的变化趋势，从转录组数据（未发表）筛选出发育种子中表达呈上升趋势的基因，获得 6 个 MYB 转录因子。从续随子基因组数据（未发表）中获取 MYB 基因的 CDS 序列，根据其在染色体上的分布位置分别命名为 *EIMYB33*、*EIMYB63*、*EIMYB100*、*EIMYB111*、*EIMYB114* 和 *EIMYB188*。使用 NCBI 网站设计 qRT-PCR 引物、内参基因 *ElActin*^[14] 引物和定量引物（表 1）。按照 Trizol（杭州新景生物公司）试剂盒说明书提取续随子不同组织（根、茎、叶、花、S1、S2、S3 时期种子）的总 RNA，反转录成 cDNA，保存于 -20 °C 冰箱，用于后续的 qRT-PCR 分析和基因克隆。用染料法荧光定量预混试剂盒（AQ601，TransGen Biotech，中国）进行 qRT-PCR 检测，反应体系为 10 μL，包含：模板 0.5 μL，2 × *PerfectStart*[®]Green qPCR SuperMix

5 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 0.2 μL，Nuclease-free Water 4.1 μL。反应程序为：94 °C 30 s；再 94 °C 5 s，58 °C 15 s，72 °C 10 s，共 40 个循环。每个样品 3 次生物学重复，采用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因的相对表达水平。差异显著性分析采用 SPSS 26 软件，用邓肯检验分析组间差异性。

1.2.3 续随子 *EIMYB114* 基因表达载体的构建

根据续随子基因组数据，得到 *EIMYB114* 的完整 CDS 序列，以 *Kpn* I 和 *Xba* I 为酶切位点，通过 Primer Primer 5.0 软件设计引物 *EIMYB114*-1303-F 和 *EIMYB114*-1303-R（表 1），用高保真酶扩增目的基因，将其连接到 pCambia1303 载体上，转化 DH5α 大肠杆菌感受态后，在含卡那霉素的 LB 固体培养基上进行筛选，过夜培养后，挑取若干个单克隆摇菌 12 h，以菌液为模板进行 PCR 鉴定，阳性单菌落提取质粒，并通过双酶切进行验证。

1.2.4 续随子 *EIMYB114* 的亚细胞定位

通过亚克隆构建 pCambia1300-*EIMYB114* 植物表达载体，设计含有 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切位点的引物（表 1）。将重组质粒 35S::*EIMYB114*-GFP 转入农杆菌中，将含有重组表达载体的侵染液注射到 6 周龄的本氏烟草（*N. benthamiana* Domin）

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	用途 Application
ElAction-F	ATGTATGTCGCCATTCAAGCCGTTTC	内参
ElAction-R	TCATCAGAGCATCAGTAAGGTCACG	
EIMYB33-F	TGCATGCTAGATGGGGGAAC	实时荧光定量 PCR
EIMYB33-R	TGTCGCAGTTTTTCGGGTACT	
EIMYB63-F	ATTCGAGTTCCAGCGCTACG	
EIMYB63-R	GATCCATCCGAGTTCGCACA	
EIMYB100-F	CACCGCAAGGACCGATAACT	
EIMYB100-R	ATATGCCGATACCAGGGGGT	
EIMYB111-F	GGACGAGATGTCGCAATGGA	
EIMYB111-R	TAACACGTGGCTTTGGACGA	
EIMYB114-F	TCGAGGAATGTGGTGGTGAC	
EIMYB114-R	AGGGTTGCTCTCCACACTTG	
EIMYB188-F	AACGTTACTCCTCAAGCCCG	
EIMYB188-R	CTGAGGAGGCAATTGAGCCA	
EIMYB114-1303-F	ATGACCGCTTGCTGGACTCG	基因克隆
EIMYB114-1303-R	TCACATTGGGGGGAAGTTATAGTT	
EIMYB114-1300-F	ATGACCGCTTGCTGGACTCG	
EIMYB114-1300-R	CATTGGGGGGAAGTTATAGTTTG	

健康叶片中, 注射后标记位置, 暗培养 48 h, 培养条件为温度 25 ℃、空气湿度 70%。暗培养后的烟草, 用打孔器选择标记部位且长势良好、无破损的叶片, 用 DAPI 试剂处理。在激光共聚焦显微镜下, 观察荧光信号的位置。

1.2.5 烟草遗传转化及表达分析

将构建的 pCAMBIA1303-EIMYB114 质粒转入根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞, 挑取单克隆, 用引物 EIMYB114-1303-F 和 EIMYB114-1303-R 进行 PCR 鉴定, 检测是否为阳性, 具体步骤参考高慧玲^[15]的方法。通过叶盘法获得转基因烟草植株后, 提取叶片 DNA 和 RNA, 进行 PCR 验证, 进一步筛选出阳性植株。

分别提取烟草野生型和转基因阳性植株叶片的 RNA, 反转录成 cDNA, 以 *Actin* 为内参基因, 其他步骤同 1.2.2, 检测 *EIMYB114* 基因在烟草中的表达水平。

1.2.6 烟草叶片和种子总油脂的提取和测定

采用氯仿-甲醇法, 提取转 *EIMYB114* 基因烟草植株叶片和种子中的总油脂, 具体步骤参考罗涛等^[16]的方法。

2 结果与分析

2.1 续随子 EIMYB 家族鉴定

经筛选, 本研究从续随子中共鉴定出 199 个 EIMYB 蛋白编码基因。分析续随子 EIMYB 家族各

成员的染色体定位信息, 发现这些基因不均匀地分布于 1~10 号染色体上 (图 1)。其中, 2 号染色体上分布数量最多, 为 45 个, 1 号染色体上分布有 39 个, 其他 8 条染色体上各有 10~16 个。根据基因在染色体上的位置, 将其分别命名为 *EIMYB1*~*EIMYB199*。

2.2 EIMYB 家族的分类及理化性质分析

根据拟南芥 MYB 转录因子的分类依据和 MYB 结构域的数目, 本研究将续随子 MYB 转录因子分为 4 种类型: MYB-related、R2R3-MYB、3R-MYB、4R-MYB。理化性质分析结果表明 (表 2), 续随子 199 个 EIMYB 家族蛋白的相对分子质量在 8.229~219.856 kD, 氨基酸数目在 71~2 026 aa, 等电点在 4.25~9.98。其中, 116 个为酸性蛋白, 83 个为碱性蛋白。稳定蛋白有 8 个 (不稳定指数 $II < 40$), 其余均为不稳定蛋白 ($II > 40$)。平均疏水指数均小于 0, 为亲水性蛋白。MYB-related 类型的蛋白相对分子质量、氨基酸数目、不稳定指数、亲水性系数最大。亚细胞定位预测结果表明, 续随子 MYB 蛋白均位于细胞核。

2.3 启动子顺式作用元件分析

对 *EIMYB* 家族基因上游 2 000 bp 的启动子序列进行顺式作用元件在线分析, 预测基因的潜在功能, 结果见表 3。续随子 *EIMYB* 基因启动子包含的功能元件有基本元件 CAAT-box 和 TATA-box, 厌氧诱导必需元件 443 个, 光响应元件 2 090 个,

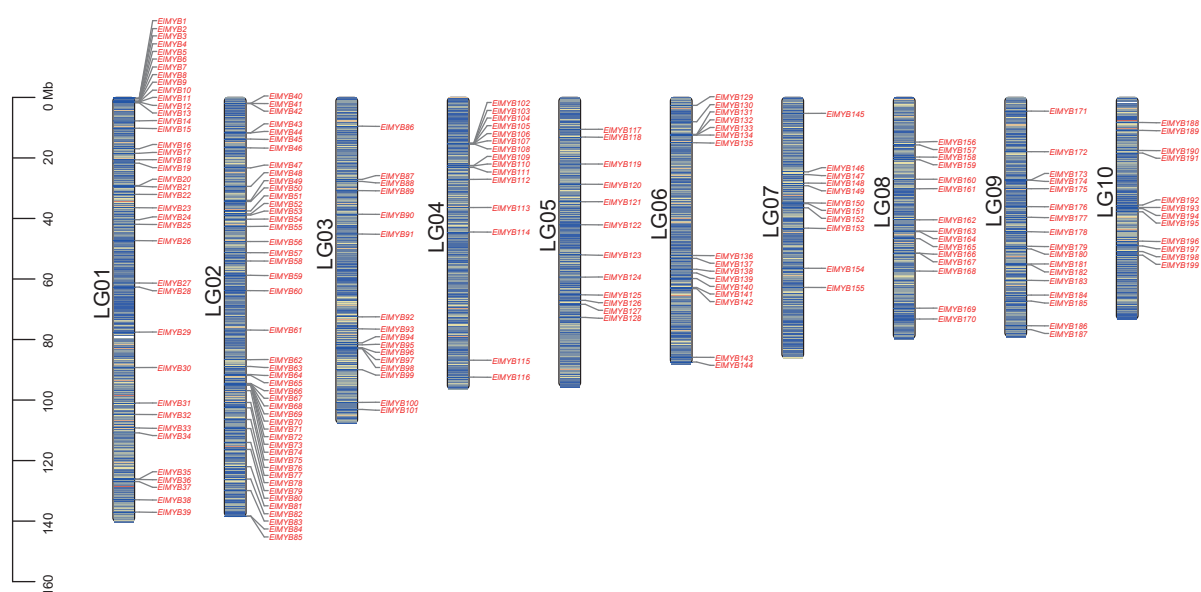


图 1 续随子 *EIMYB* 基因的染色体定位

Fig. 1 Chromosomal localization of *EIMYB* genes in *Euphorbia lathyris*

表 2 续随子 EIMYB 家族蛋白的基本理化性质
Table 2 Basic information of EIMYB family proteins

蛋白类型 Protein type	数量 Quantity	分子量 Molecular weight / kD	氨基酸数 Number of amino acids	等电点 Theoretical pI	不稳定指数 Instability index / (I)	亲水性系数 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
MYB-related	78	8.23~219.86	72~2 026	4.25~9.93	32.06~89.20	-1.316~-0.137	细胞核
R2R3-MYB	115	12.34~177.75	105~1 619	4.62~9.98	35.43~81.68	-1.220~-0.319	细胞核
3R-MYB	5	39.08~119.47	330~1 081	5.26~9.00	43.07~60.47	-0.642~-1.220	细胞核
4R-MYB	1	118.07	1 043	6.94	55.65	-0.828	细胞核
合计	199	8.23~219.86	72~2 026	4.25~9.98	32.06~89.20	-1.316~-0.137	细胞核

表 3 续随子 EIMYB 基因上游启动子顺式作用元件
Table 3 Cis-acting elements in the upstream promoter of EIMYB genes of Euphorbia lathyris

顺式作用元件 Cis-acting element	核心序列 Core sequence	功能 Function
WRE3	CCACCT	损伤诱导元件
LTR	CCGAAA	低温响应元件
MYB	CAACAG	MYB 结合位点
Myc	TCTCTTA	MYC 结合位点
MRE	AACCTAA	与光反应有关的 MYB 结合位点
WUN-motif	TTATTACAT	创伤反应元件
STRE	AGGGG	热休克、营养饥饿和低 pH 诱导响应元件
GATA-motif	GATAGGA	光响应元件
CAAT-box	CAAT	启动子和增强子区域的共同顺式作用元件
TC-rich repeats	GTTTTCTTAC	参与防御和应激反应的顺式作用元件
GT1-motif	GGTTAA	光响应元件
Box 4	ATTAAT	参与光反应的保守 DNA 模块的一部分
MYB-like sequence	TAACCA	MYB 结合位点
ABRE	ACGTG	脱落酸响应元件
ABRE3a	TACGTG	脱落酸响应元件
AAGAA-motif	GAAAGAA	脱落酸响应元件
ABRE4	CACGTA	脱落酸响应元件
TATA-box	TATAAATA	启动子基本元件
P-box	CCTTTTG	赤霉素响应元件
Myb-binding site	CAACAG	MYB 结合位点
ARE	AAACCA	厌氧响应元件
G-box	TACGTG	光响应相关的顺式作用元件
TCA-element	CCATCTTTTT	水杨酸反应涉及的顺式作用元件
3-AF3 bind site	CACTATCTAAC	光应答
A-box	CCGTCC	α-淀粉酶启动子保守序列
ABRE2	CCACGTGG	脱落酸响应元件
AT1-motif	AATTATTTTTTATT	光应答
AE-box	AGAAACTT	光响应模块
ATCT-motif	AATCTAATCC	部分光反应元件
as-1	TGACG	压力响应元件
CAT-box	GCCACT	与分生组织表达相关的顺式作用元件
TCA	TCATCTTCAT	水杨酸响应元件
TGA-box	TGACGTAA	部分生长素响应元件
MBS	CAACTG	与干旱诱导有关的 MYB 结合位点

低温响应元件 140 个, 胁迫相关响应元件 464 个, 激素应答元件 963 个, 应激元件 91 个, 同时还有许多 MYB 结合位点、MBS (与干旱诱导有关的 MYB 结合位点) 和 MYC 结合位点。此外, 还有许多功能未知的顺式作用元件。

2.4 EIMYB 蛋白的基序分析

利用 MEME 软件对续随子 EIMYB 家族蛋白的保守结构域进行分析, 共鉴定出 10 个保守基序 (附图 1¹⁾)。每个 MYB 转录因子家族成员均具有 1 个 MYB 家族典型的保守基序 Motif 1, 具有两个 MYB 结构域的 R2R3-MYB 转录因子几乎都包含 Motif 1~Motif 3; 大部分 MYB-related 类蛋白包含 Motif 1 和 Motif 3; 3R-MYB 和 4R-MYB 均含有 Motif 1~Motif 3、Motif 5 和 Motif 9, 但在 4R-MYB 转录因子中 Motif 9 重复出现, 每个 Motif 在不同基因上的相对位置是一致的。

2.5 EIMYB 基因的组织特异性表达

根据转录组数据, 选取种子发育时期表达量呈上升趋势的 6 个基因, 通过 qRT-PCR 检测其在根、茎、叶、花、S1、S2、S3 时期种子中的表达量。结果发现, EIMYB33 和 EIMYB63 在不同组织及种子不同发育时期的表达量都较低, EIMYB111、EIMYB100、EIMYB114 和 EIMYB188 在花和叶中

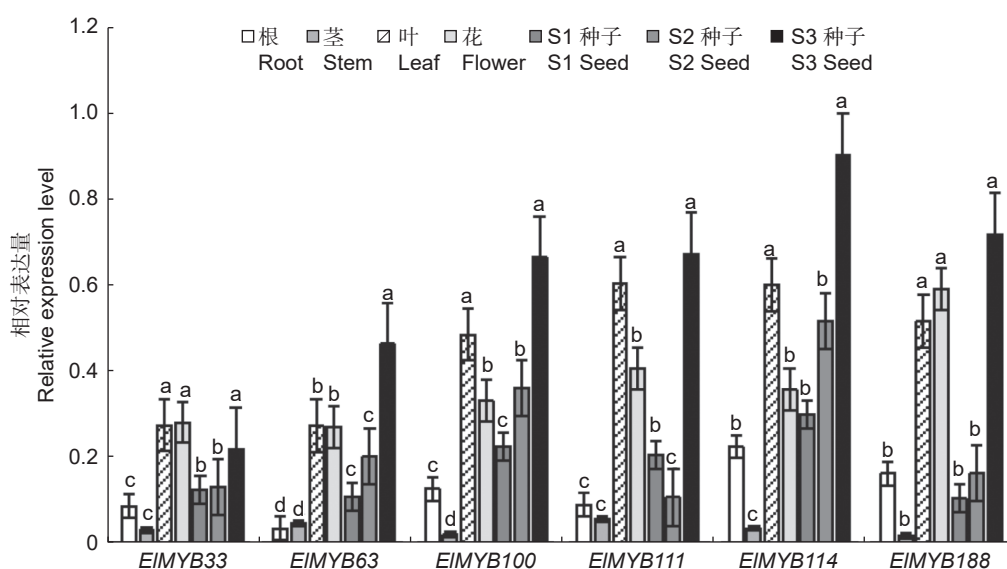
的表达量较高, EIMYB114 基因在 S3 时期种子中的表达量最高, 除了 EIMYB111 基因的表达量在种子发育时期呈先降后升趋势外, 其余 5 个基因的表达量均呈上升趋势 (图 2), 与转录组数据基本一致。因此, 本研究选择在种子发育后期表达量最高的 EIMYB114 基因进行后续实验。

2.6 续随子 EIMYB114 基因克隆和烟草遗传转化

EIMYB114 基因在续随子种子油脂储藏期的表达量最高。本研究以续随子种子发育时期的 cDNA 混样为模板, 使用高保真酶扩增该基因, 构建了植物表达载体 pCambia1303-EIMYB114, 转化根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞后, 通过叶盘法将其转入烟草, 筛选阳性转基因植株, 炼苗后移土培养。利用荧光定量 qRT-PCR, 检测 EIMYB114 基因在两株转基因烟草叶片中的表达量, 发现其在 OE2 株系中的表达量最高 (图 3)。

2.7 EIMYB114 的亚细胞定位分析

将携带 pCambia1300-EIMYB114 重组质粒的农杆菌液注入健康的烟草叶片中, 暗培养 48 h 后, 用 DAPI 对侵染部位进行染色处理, 在激光共聚焦显微镜下观察荧光信号的位置, 发现 EIMYB114 蛋白在细胞核中表达 (图 4), 与预测的亚细胞定位结果相一致。



不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著, 下同。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level. Same below.

图 2 EIMYB 基因在续随子不同组织中的相对表达量

Fig. 2 Relative expression level of EIMYB genes in different tissues of *Euphorbia lathyris*

1) 如需查阅附图内容请登录《植物科学学报》网站 (<http://www.plantscience.cn>) 查看本期文章。

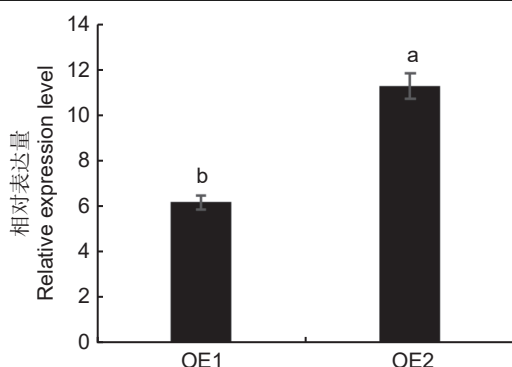
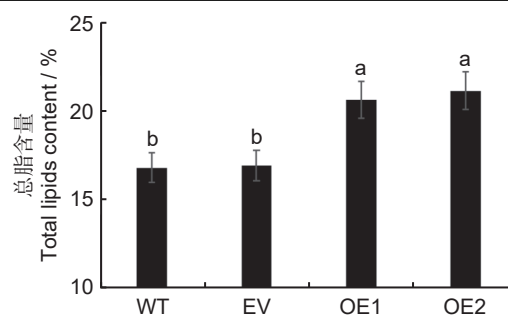


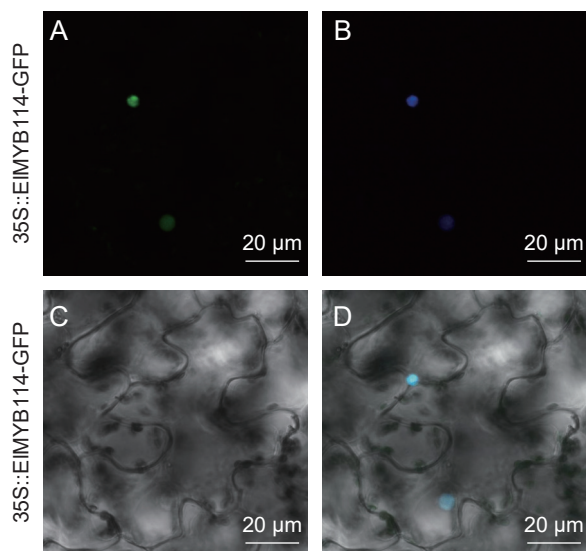
图 3 转基因株系烟草叶片中 *EIMYB114* 基因的表达量
Fig. 3 Expression of *EIMYB114* gene in tobacco leaves of transgenic plants



WT: 野生型; EV: pCAMBIA1303 空载转烟草; OE1、OE2: 转基因株系。下同。
WT: Wild type; EV: pCAMBIA1303 no-load; OE1, OE2: Transgenic strain. Same below.

图 5 不同基因型烟草叶片总油脂含量

Fig. 5 Total lipid content in tobacco leaves



A: GFP; B: DAPI 暗场; C: 明场; D: 叠加场。
A: GFP; B: DAPI dark field for green fluorescence; C: Bright field; D: Observed in combination.

图 4 *EIMYB114* 的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of *EIMYB114*

2.8 过表达 *EIMYB114* 基因促进烟草叶片和种子总油脂的积累

检测烟草野生型和两个转基因株系 OE1、OE2 叶片及种子的总脂含量。结果表明, 野生型与转空载对照植株的叶片总脂没有差异; 与转空载对照相比, 两个转基因株系叶片的脂肪酸含量分别提高了 3.7% 和 4.2%, 差异显著 (图 5)。

测定烟草野生型和转基因株系种子的总脂, 结果显示, 野生型烟草种子的总脂含量为 39.8%, 而两个转基因株系的种子总脂含量分别为 50.8% 和 50.5%, 与野生型相比, 分别提升了 11.0% 和 10.7%, 差异显著 (图 6)。

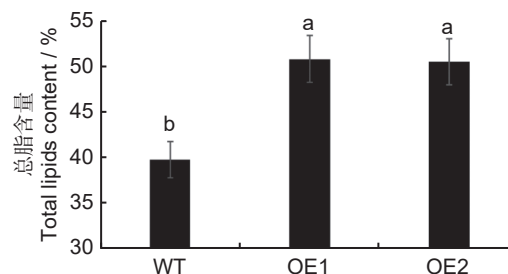


图 6 烟草种子总油脂含量

Fig. 6 Total lipid content in tobacco seeds

3 讨论

续随子是生产生物柴油的理想原料之一。MYB 转录因子目前已在许多植物中被鉴定出来, 包括玉米 (*Zea mays* L.)^[17]、大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.)^[18]、蓖麻 (*Ricinus communis* L.)^[19] 等。研究表明, MYB 转录因子在种子油脂快速积累过程中发挥重要调节作用。

在植物 MYB 转录因子家族中, 基因重复事件可以促进基因家族的扩张^[20]。Cao 等^[21]发现, 大戟科 MYB 基因家族在进化过程中发生了片段重复或全基因组重复事件, 导致了基因组数目增加, 且不同物种中数目变化不一致。本研究从续随子的基因组数据中共鉴定出 199 个 MYB 转录因子, 包含 78 个 MYB-related、115 个 R2R3-MYB、5 个 3R-MYB、1 个 4R-MYB, 这与报道的大戟科其他物种 MYB 转录因子的数量相差较大, 如油桐 (*Vernicia fordii* (Hemsl.) Airy Shaw) 中 MYB 转录因子家族成员至少有 149 个^[22], 巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell.

Arg.) MYB 家族成员有 141 个^[23]。本研究发现, 续随子 1~10 号染色体上均分布着关系紧密的基因簇, 推测可能出现过基因串联复制事件, 从而导致基因家族成员数目扩大, 正如紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.)^[24] 中发生的一样。续随子 EIMYB-114 基因启动子区域存在许多激素响应元件, 表明激素可能作为重要调控信号参与续随子的发育和基因诱导过程^[25]。MYB 转录因子与 MYB 元件结合, 对调控植物逆境胁迫响应起重要作用^[26]。譬如, 和续随子 EIMYB114 同属 S10 亚族的拟南芥 MYB39 转录因子参与盐驯化机制^[27]。因此, 推测续随子 EIMYB114 基因可能也参与逆境胁迫响应过程。研究表明, 基因的表达模式通常可为其功能研究提供重要参考^[28]。牛听风等^[29] 发现不同发育时期的续随子种子油含量呈动态变化模式, 花后 22~43 d 是油脂积累的关键时期。本研究基于续随子转录组数据, 选择与种子油脂积累趋势基本一致且表达显著上调的 6 个基因 (EIMYB33、EIMYB63、EIMYB100、EIMYB111、EIMYB114、EIMYB188), 进行 qRT-PCR 分析, 结果发现 EIMYB114 基因在续随子的各个组织中均有表达, 且在种子发育后期的表达量显著高于其他基因。这表明, 在种子油脂储藏期, EIMYB114 可能会通过调控相关基因的表达来控制油脂的合成与积累。

前人研究证实, 具有两个重复结构域的 R2R3-MYB 型转录因子不仅能够直接或间接地参与脂肪酸链的伸长, 还可以提高植物的抗逆性和促进种子中油脂的积累, 如 MYB89^[5]、MYB96、MYB92 等^[30-33]。将外源基因转入受体细胞并实现稳定表达和遗传的转基因技术是鉴定基因功能的有效方法^[34]。本研究发现, 续随子 EIMYB114 属于 R2R3-MYB 型转录因子, 通过烟草遗传转化方法鉴定 EIMYB114 基因的功能, 发现两个转基因株系叶片的总油脂含量分别提高了 3.7% 和 4.2%, 且其种子中油脂含量也显著提高 (分别增加了 11.0% 和 10.7%), 表明过表达 EIMYB114 基因对烟草种子的油脂含量有较大影响, 研究结果为利用 MYB 基因提高续随子种子油的含量奠定了基础。

本研究发现, 过表达 EIMYB114 基因的烟草株系中, 种子中总脂含量较叶片的变化更大, 总脂含量在两种组织中积累模式的差异可能是不同

器官间的生理和代谢差异所导致, 但与大豆^[35]、亚麻荠 (*Camelina sativa* (L.) Crantz)^[36] 等植物相比, 续随子种子中的总油脂含量增加不多。推测油脂合成可能存在复杂的调控机制, 许多 MYB 转录因子通过直接或间接调控油脂合成过程中的关键酶或基因的表达, 从而促进种子脂肪酸的合成。如, MYB89 通过调控 WRI1、L1L 和脂肪酸合成关键基因来调控种子脂肪酸的累积^[5], 而共表达 MYB96A 和 DGAT1C 基因可显著提高亚麻荠的种子油含量^[36]。

综上所述, 本研究鉴定获得了 199 个续随子 MYB 基因, 推测其中 EIMYB114 基因对种子的物质代谢过程起重要调控作用。研究结果显示, EIMYB114 蛋白定位于细胞核, 在烟草中过表达 EIMYB114 基因, 转基因株系叶片和种子中的总油脂含量均高于野生型, 表明 EIMYB114 基因的表达可促进种子总油脂的积累。

参考文献:

- [1] 危文亮, 金梦阳, 马冲, 冯顺山. 续随子油脂脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2007, 32 (5): 70-71.
Wei WL, Jin MY, Ma C, Feng SS. Fatty acid composition analysis of *Euphorbia lathyris* L. seed oil[J]. *China Oils and Fats*, 2007, 32 (5): 70-71.
- [2] 李昌珠, 吴红, 肖志红, 李力. 工业油料植物资源高值化利用研究进展[J]. 湖南林业科技, 2014, 41 (6): 106-111.
Li CZ, Wu H, Xiao ZH, Li L. Research progress of industrial oil plant resources in high-valued application[J]. *Hunan Forestry Science & Technology*, 2014, 41 (6): 106-111.
- [3] 林正芳, 王伟. 我国生物柴油产业发展现状及战略选择[J]. 化学工业, 2013, 31 (9): 20-22.
Lin ZF, Wang W. The development status and strategic choices of biodiesel industry in China[J]. *Chemical Industry*, 2013, 31 (9): 20-22.
- [4] Singh R, Low ETL, Ooi LCL, Ong-Abdullah M, Nookiah R, et al. The oil palm VIRESCENS gene controls fruit colour and encodes a R2R3-MYB[J]. *Nat Commun*, 2014, 5 (1): 4106.
- [5] Li D, Jin CY, Duan SW, Zhu YN, Qi SH, et al. MYB89 transcription factor represses seed oil accumulation[J]. *Plant Physiol*, 2017, 173 (2): 1211-1225.
- [6] Lee HG, Kim H, Suh MC, Kim HU, Seo PJ. The MYB96 transcription factor regulates triacylglycerol accumulation by activating DGAT1 and PDAT1 expression in *Arabidopsis* seeds[J]. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59 (7):

- 1432–1442.
- [7] Duan SW, Jin CY, Li D, Gao CH, Qi SH, *et al.* MYB76 inhibits seed fatty acid accumulation in *Arabidopsis*[J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 226.
- [8] Chen MX, Wang Z, Zhu YN, Li ZL, Hussain N, *et al.* The effect of *TRANSPARENT TESTA2* on seed fatty acid biosynthesis and tolerance to environmental stresses during young seedling establishment in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2012, 160 (2): 1023–1036.
- [9] Wang Z, Chen MX, Chen TL, Xuan LJ, Li ZL, *et al.* *TRANSPARENT TESTA2* regulates embryonic fatty acid biosynthesis by targeting *FUSCA3* during the early developmental stage of *Arabidopsis* seeds[J]. *Plant J*, 2014, 77 (5): 757–769.
- [10] Luo GB, Shen LS, Song YH, Yu K, Ji JJ, *et al.* The MYB family transcription factor *TuODORANT1* from *Triticum urartu* and the homolog *TaODORANT1* from *Triticum aestivum* inhibit seed storage protein synthesis in wheat[J]. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19 (9): 1863–1877.
- [11] Lee HG, Park BY, Kim HU, Seo PJ. MYB96 stimulates C18 fatty acid elongation in *Arabidopsis* seeds[J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2015, 9 (3): 161–166.
- [12] Cheng TH, Zhao P, Ren YR, Zou J, Sun MX. AtMIF1 increases seed oil content by attenuating GL2 inhibition[J]. *New Phytol*, 2021, 229 (4): 2152–2162.
- [13] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15 (10): 573–581.
- [14] 李春霞. 续随子三个候选内参基因的克隆及液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的表达分析 [D]. 南京: 南京师范大学, 2013: 1–56.
- [15] 高慧玲. 亚麻荠 *CsDGAT3* 基因的克隆及功能分析 [D]. 晋中: 山西农业大学, 2020: 16–18.
- [16] 罗涛, 王计平, 高慧玲, 崔红利, 李润植. 亚麻荠 *FUS3* 转录因子的鉴定及功能分析 [J]. *西北植物学报*, 2022, 42 (12): 2003–2012.
- Luo T, Wang JP, Gao HL, Cui HL, Li RZ. Identification and functional analysis of *FUS3* transcription factor in *Camelina sativa* (L.) Crantz[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 42 (12): 2003–2012.
- [17] Chen YH, Cao YY, Wang LJ, Li LM, Yang J, Zou MX. Identification of *MYB* transcription factor genes and their expression during abiotic stresses in maize[J]. *Biol Plant*, 2018, 62 (2): 222–230.
- [18] He YX, Dong YS, Yang XD, Guo DQ, Qian XY, *et al.* Functional activation of a novel R2R3-MYB protein gene, *GmMYB68*, confers salt-alkali resistance in soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Genome*, 2020, 63 (1): 13–26.
- [19] Liu YY, Wang XY, Li ZJ, Tu J, Lu YN, *et al.* Regulation of capsule spine formation in castor[J]. *Plant Physiol*, 2023, 192 (2): 1028–1045.
- [20] Manzoor MA, Li GH, Abdullah M, Wang H, Han WL, *et al.* Genome-wide investigation and comparative analysis of MATE gene family in Rosaceae species and their regulatory role in abiotic stress responses in Chinese pear (*Pyrus bretschneideri*) [J]. *Physiol Plant*, 2021, 173 (3): 1163–1178.
- [21] Cao YP, Fan TT, Wang LH, Zhang L, Li YL. Large-scale analysis of putative Euphorbiaceae R2R3-MYB transcription factors identifies a MYB involved in seed oil biosynthesis[J]. *BMC Plant Biol*, 2023, 23 (1): 145.
- [22] 冉舵. 油桐 MYB 转录因子家族的鉴定与功能特征研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019: 11.
- [23] 林贤桂. 巴西橡胶树 MYB 基因家族的克隆鉴定 [D]. 海口: 海南大学, 2018: 33.
- [24] 任明辉, 张雨蓬, 许涛, 朱慧森, 岑慧芳. 紫花苜蓿 R2R3-MYB 亚家族鉴定与干旱胁迫下的表达分析 [J]. *草地学报*, 2023, 31 (4): 972–983.
- Ren MH, Zhang YP, Xu T, Zhu HS, Cen HF. Identification and expression analyses of R2R3-MYB subfamily in alfalfa under drought stress[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31 (4): 972–983.
- [25] 郭晋艳, 郑晓瑜, 邹翠霞, 李秋莉. 植物非生物胁迫诱导启动子顺式元件及转录因子研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2011 (4): 16–20, 30.
- Guo JY, Zheng XY, Zou CX, Li QL. Research progress of cis-elements of abiotic stress inducible promoters and associated transcription factors[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011 (4): 16–20, 30.
- [26] 陈俊, 王宗阳. 植物 MYB 类转录因子研究进展 [J]. *植物生理与分子生物学报*, 2002, 28 (2): 81–88.
- Chen J, Wang ZY. Progress in the study of plant MYB transcription factors[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2002, 28 (2): 81–88.
- [27] 王繁华. MAPK6 调控 MYB39 和 ERF109 转录因子参与拟南芥盐驯化的机制研究 [D]. 济南: 山东师范大学, 2020: 1–90.
- [28] Li JB, Luan YS, Liu Z. Overexpression of *SpWRKY1* promotes resistance to *Phytophthora nicotianae* and tolerance to salt and drought stress in transgenic tobacco[J]. *Physiol Plant*, 2015, 155 (3): 248–266.
- [29] 牛听风, 葛丽萍, 苏云婷, 王壮琳, 李润植. 续随子转录因子 EIWR1 的鉴定及功能分析 [J]. *植物科学学报*, 2023, 41 (4): 458–466.

- Niu TF, Ge LP, Su YT, Wang ZL, Li RZ. Identification and functional analysis of *Euphorbia lathyris* L. transcription factor EIWR1[J]. *Plant Science Journal*, 2023, 41 (4): 458–466.
- [30] 宋雷, 范成明, 陈宇红, 张新永, 胡赞民. 植物油脂合成的分子调控机制 [J]. 分子植物育种, 2016, 14 (8): 2178–2187.
- Song L, Fan CM, Chen YH, Zhang XY, Hu ZM. The molecular regulation mechanism of the plant lipid biosynthesis[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14 (8): 2178–2187.
- [31] Raffaele S, Vaillau F, Léger A, Joubès J, Miersch O, *et al.* A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2008, 20 (3): 752–767.
- [32] Seo PJ, Lee SB, Suh MC, Park MJ, Go YS, Park CM. The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2011, 23 (3): 1138–1152.
- [33] To A, Joubès J, Thueux J, Kazaz S, Lepiniec L, Baud S. AtMYB92 enhances fatty acid synthesis and suberin deposition in leaves of *Nicotiana benthamiana*[J]. *Plant J*, 2020, 103 (2): 660–676.
- [34] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 4–7.
- [35] Liu YF, Li QT, Lu X, Song QX, Lam SM, *et al.* Soybean *GmMYB73* promotes lipid accumulation in transgenic plants[J]. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 73.
- [36] Kim RJ, Kim HU, Suh MC. Development of camelina enhanced with drought stress resistance and seed oil production by co-overexpression of MYB96A and DGAT1C[J]. *Ind Crops Prod*, 2019, 138: 111475.

(责任编辑: 李惠英)