

# 木本油料作物星油藤 *LAV* 亚家族成员鉴定及再生相关基因 *PvoLEC2* 的功能初探

邓诗玲<sup>1,2</sup>, 莫金辉<sup>1,2</sup>, 俞璟菁<sup>2</sup>, 陈英达<sup>2,3</sup>, 马世涛<sup>1,2</sup>, 卢源东<sup>1,2</sup>, 王 翊<sup>1,2\*</sup>

1. 国家林草局中南速生材繁育重点实验室, 广西南宁 530000; 2. 广西大学林学院, 广西南宁 530000; 3. 广西高校亚热带人工林培育与利用重点实验室, 广西南宁 530000

**摘 要:** *LEC2* 是植物 B3 超家族中 *LAV* 亚家族的重要成员, 在胚胎发育以及分生组织维持等过程中起着重要的调控作用。为了探究 *LEC2* 基因在星油藤细胞再生过程中的作用, 本研究通过系统进化等生物信息学分析和分子生物学技术克隆星油藤 *PvoLEC2* 的基因组序列 (*gPvoLEC2*), 利用本氏烟草验证 *gPvoLEC2* 促进植物再生的功能, 并且对星油藤毛状根中的 *gPvoLEC2* 的功能进行研究。系统进化和基因结构分析表明, 星油藤等大戟科植物与拟南芥、水稻、杨树的 *LAV* 亚家族中 *LEC2-ABI3* 亚群比较保守。表达分析显示, *PvoLEC2* 仅在星油藤种子发育晚期 (50~65 DAP) 微弱表达, 且 B3 结构域的基序及关键氨基酸位点保守。过表达 *gPvoLEC2* 导致转基因本氏烟草植株矮化、主茎难以长高、叶片发育畸形, 同时 *gPvoLEC2* 转基因本氏烟草器官离体培养的再生能力明显高于野生型, 但低于阳性对照——*ZmWUS2* & *STM* 转基因本氏烟草, 而在星油藤毛状根中过表达 *gPvoLEC2* 导致其缩短、增粗。本研究结果表明星油藤 *PvoLEC2* 的基因组序列是一段具有促进植物再生的功能序列, 但同时也会导致植物发育畸形。

**关键词:** 星油藤; *PvoLEC2*; *LAV* 亚家族; 植物再生; 本氏烟草

中图分类号: S565.9 文献标志码: A

## Identification of Members of the *LAV* Subfamily in Woody Oil Crops *Plukenetia volubilis* L. and the Function of Regeneration-related Gene *PvoLEC2*

DENG Shiling<sup>1,2</sup>, MO Jinhui<sup>1,2</sup>, YU Jingjing<sup>2</sup>, CHEN Yingda<sup>2,3</sup>, MA Shitao<sup>1,2</sup>, LU Yuandong<sup>1,2</sup>, WANG Yi<sup>1,2\*</sup>

1. Key Laboratory of Fast-growing Timber Breeding in Central and South China, National Forestry and Grassland Administration, Nanning, Guangxi 530000, China; 2. College of Forestry, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530000, China; 3. Key Laboratory of Cultivation and Utilisation of Subtropical Plantation Forests in Guangxi Colleges and Universities, Nanning, Guangxi 530000, China

**Abstract:** *LEC2* is an important member of the *LAV* subfamily in the plant B3 superfamily and plays a significant regulatory role in embryo development and meristem maintenance. To explore the function of the *PvoLEC2* in the cell regeneration of *Plukenetia volubilis*, the genomic sequence of *PvoLEC2* (*gPvoLEC2*) was cloned through phylogenetic analysis and molecular biology techniques. The function of *gPvoLEC2* in promoting plant regeneration was verified in *Nicotiana benthamiana*, and the function of *gPvoLEC2* was studied in *P. volubilis* hairy roots. Phylogenetic and gene structure analysis indicated that the *LEC2-ABI3* subfamily of Euphorbiaceae plants such as *P. volubilis*, and *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus spp.* were relatively conserved. Expression analysis showed that *PvoLEC2* was only weakly expressed in the late stage of *P. volubilis* seed development (50–65 DAP), and the motifs and key amino acid sites of the B3 domain were conserved. Overexpression of *gPvoLEC2* led to dwarfing of transgenic *N. benthamiana*.

收稿日期 2025-01-07; 接受日期 2025-02-12

基金项目 国家自然科学基金地区科学基金项目 (No. 32360398); 广西自然科学基金项目 (No. 202200354)。

作者简介 邓诗玲 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 林木遗传育种。\*通信作者 (Corresponding author): 王 翊 (WANG Yi), E-mail: wangyi1984@gxu.edu.cn。

plants, difficulty in the growth of the main stem, and abnormal leaf development. At the same time, the regeneration ability of *gPvoLEC2* transgenic *N. benthamiana* organs in vitro was significantly higher than that of the wild type, but lower than that of the positive control-*ZmWUS2* & *STM* transgenic *N. benthamiana*. Overexpression of *gPvoLEC2* in *P. volubilis* hairy roots led to their shortening and thickening. The results indicate that the genomic sequence of *PvoLEC2* is a functional sequence that promotes plant regeneration, but it also causes abnormal development.

**Keywords:** *Plukenetia volubilis* L.; *PvoLEC2*; LAV subfamily; plant regeneration; *Nicotiana benthamiana*

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.06.006

星油藤 (*Plukenetia volubilis* L.) 是大戟科 (Euphorbiaceae) 多年生木质藤本植物, 又名美藤果、南美油藤、印奇果等, 原产于南美洲的热带雨林, 是一种热带油料作物, 与油用牡丹 (*Paeonia suffruticosa*)、元宝枫 (*Acer truncatum* Bunge) 并称为三大新兴木本油料作物<sup>[1]</sup>。冷榨的星油藤油有丰富的亚麻酸、亚油酸、维生素 E 及多种微量元素, 是一种优秀的新资源食品<sup>[2-3]</sup>, 在食用和药用方面均有广阔的应用前景<sup>[2, 4]</sup>。同时, 星油藤的种植周期短于油茶树 (*Camellia oleifera* Abel)、油橄榄树 (*Olea europaea* L.) 等木本油料植物, 在种植当年就可收获果实<sup>[2, 5]</sup>。但由于星油藤细胞再生比较困难, 限制了该物种的遗传改良。提高星油藤再生效率将有助于利用基因组编辑技术创造高产、多抗、环境友好的新品种, 从而保证我国星油藤产业的可持续发展。

LAV [LEAFY COTYLEDON2 (*LEC2*)-ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (*ABI3*)-VAL (VP1/ABI3-LIKE)] 亚家族属于 B3 超家族, 由 *LEC2*-*ABI3* 亚群和 *VAL* 亚群组成。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 LAV 亚家族包含 6 个基因, *LEC2*-*ABI3* 亚群的 *LEAFY COTYLEDON2* (*LEC2*)、*ABSCISIC ACID INSENSITIVE3* (*ABI3*)、*FUSCA3* (*FUS3*) 以及 *VAL* 亚群的 *VAL1*、*VAL2*、*VAL3*。*LEC2*-*ABI3* 亚群的基因在种子发育过程中起重要作用, 这些基因在种子中高水平表达, 而在其他植物器官中的表达量较低。*ABI3* 在种子发育过程中调控脱落酸响应基因, 参与种子萌发过程。*LEC2* 和 *FUS3* 基因能够促进种子胚胎发育, *FUS3* 参与种子成熟以及种子储存蛋白表达等过程, *LEC2* 通过调控生长素生物合成相关基因诱导体细胞胚发生<sup>[6]</sup>。研究表明, *FUS3* 或 *LEC2* 的过表达会使营养器官 (或组织) 出现胚性特征<sup>[7-8]</sup>, 如转基因拟南芥真叶具有子叶特征, 无表皮毛等。与 *LEC2*-*ABI3* 亚群不同, *VAL* 亚群的基因在植物生长发育过程中, 在多个植物器官中表达, 抑制细胞再生。当前对 *VAL* 亚群的 3 个成员中研究较

多的是 *VAL1* 和 *VAL2*<sup>[9]</sup>。*val1val2* 双突变体植株在根和茎上长出胚性愈伤组织, 检测发现 *FUS3* 和 *LEC2* 在 *val1val2* 双突变体中显著上调表达, 这表明 *VAL1*、*VAL2* 是植物组织再生的负调控因子<sup>[10]</sup>。

*LEC2* 基因是 LAV 亚家族中被充分研究的基因之一, 最初是在模式植物拟南芥中过表达 *LEC2* 基因发现其能够促进体细胞向胚性细胞转变, 诱导体细胞胚胎发生<sup>[8]</sup>。研究表明 *LEC2* 过表达诱导体细胞胚胎产生的原因可能是 *LEC2* 基因能够诱导 *IPA-YUC* 生长素合成途径中 *YUC1*、*YUC4* 和 *YUC10* 等关键调控因子的表达<sup>[6]</sup>。同时, 过表达 *LEC2* 还可以有效提高种子含油量, 在拟南芥中过表达蓖麻 (*Ricinus communis* L.) *RcLEC2* 基因, 能激活油体蛋白相关基因的表达, 种子含油量增加约 2.7 倍<sup>[11]</sup>。近年来发现木本植物的 *LEC2* 也具有促进体细胞胚胎发生的功能, 在可可 (*Theobroma cacao* L.) 子叶中过表达 *TcLEC2* 可以显著增加体细胞胚胎发生的频率<sup>[12]</sup>, 在木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 中过表达 *MeLEC2*, 转基因木薯成熟叶的叶肉细胞可通过体细胞胚途径诱导出再生芽<sup>[13]</sup>。

在破解玉米 (*Zea mays* L.)、高粱 (*Sorghum bicolor* L.)、小麦 (*Triticum aestivum* L.) 等作物遗传转化障碍的过程中发现, 具有再生功能的发育调节基因通常来源于 WUSCHEL-RELATED HOMEBOX (WOX)、APETALA2/ETHYLENE-RESPONSIVE FACTOR (AP2/ERF) 等基因家族, 很少关注 LAV 亚家族。前期研究表明, 星油藤的遗传转化可诱导出转基因愈伤, 但难以从这些转基因愈伤中诱导出再生芽或体细胞胚胎。本研究从星油藤、蓖麻等大戟科植物中鉴定 LAV 亚家族, 分析该基因家族成员在大戟科植物与拟南芥、水稻 (*Oryza sativa* L.) 等模式物种间的保守性, 同时利用本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 验证 *PvoLEC2* 的基因组序列 (*gPvoLEC2*) 的再生功能, 并且在星油藤的毛状根中对 *gPvoLEC2* 的功能进

行初步研究,为提高星油藤的再生能力以及遗传改良提供优质的候选基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 本氏烟草种子经 75%乙醇和 1%次氯酸钠溶液消毒后播种于 MS 固体培养基上,生长 30 d 后,叶片可用于转化实验。星油藤种子由云南普洱市宁洱哈尼族彝族自治县农户提供。星油藤种子去壳后经 75%乙醇和 2.5%次氯酸钠溶液消毒后播种于 WPM 培养基,培养 7~10 d 时可用于转基因星油藤毛状根诱导实验。发根农杆菌 K599 菌株由北京林业大学孟冬教授惠赠,根癌农杆菌 GV3101 菌株由本实验室保存。

1.1.2 数据来源 星油藤、蓖麻、橡胶树[*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.]、小桐子 (*Jatropha curcas* L.)、木薯等大戟科物种全基因数据、转录组数据均来自 EupDB 数据库 (<http://eupdb.liu-lab.com/>);拟南芥 LAV 亚家族序列来自拟南芥数据库 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>);水稻、杨树 (*Populus* spp.)、玉米 LAV 亚家族序列及数据来源于 NCBI 数据库。

### 1.2 方法

1.2.1 LAV 基因家族的鉴定及系统进化分析 从 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 数据库中分别下载拟南芥 LAV 家族各成员的氨基酸序列,在 Geneious prime 2021 本地 BLAST 插件的星油藤、蓖麻、小桐子等物种本地数据库中进行序列比对 (参数为  $E < 1e^{-10}$ ),获得与拟南芥相似度较高的 LAV 序列信息,作为候选基因。从 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 数据库中下载含有 B3 基因家族的特征结构域 PF00847 的隐马尔科夫模型,使用 HMMER 3.0 (<http://hmm.janelia.org>) 在线软件建立 HMM 模型进行同源序列的鉴定。利用 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 和 ExPASy Proteomics Server (<https://prosite.expasy.org/scan-prosite/>) 在线软件确认候选序列具有完整的 B3 特征结构域的 LAV 亚家族基因。使用 Mega 11.0 软件,采用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 生成系统进化树,Bootstrap 重复 1000 次。

1.2.2 表达分析 利用大戟科植物 EupDB 公共数据库中星油藤不同组织器官的 RNA-seq 数据,对星油藤 LAV 亚家族基因在不同组织器官[根

(root)、茎 (stem)、叶 (leaf)、雌花序 (female inflorescence)、雄花序 (male inflorescence)、果 (fruit) 和种子 (seed)] 的表达进行分析。提取基因在各组织器官表达的 FPKM 值,利用 GraphPad Prism 8.0<sup>[14]</sup> 软件绘制表达热图。

1.2.3 基因克隆及过表达载体的构建 设计特异性引物 (*gPvoLEC2*-F: ttttctgattaacagggtaccATG-GAGAACCCTTTTTCACCTTTTGT, *gPvoLEC2*-R: tcttcattctcatatggatccCTAAGCGCTGCACAAGTCT-TCC;小写字母为 Infusion 同源臂),利用 In-fusion 技术将 *gPvoLEC2* 克隆至 pW502 载体获得 *UBI10pro::gPvoLEC2* 的过表达载体 (图 1)。

1.2.4 本氏烟草遗传转化及离体诱导 分别挑取携带目的基因 *UBI10pro::gPvoLEC2* (简称 *gPvoLEC2*)、*NOSpro::ZmWUS2* & *CmYLCVpro::STM* (简称 *ZmWUS2* & *STM*, 图 1) 的根癌农杆菌 GV3101 单菌落接种于含 50 mg/L 卡那霉素 (kanamycin) 和 20 mg/L 利福平 (rifampicin) 的 LB 液体培养基中,在 28 °C、220 r/min 的条件下振荡培养至 OD=0.6~1.0。将菌液转移至 50 mL 离心管,4000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用含 100 μmol/L 乙酰丁香酮的 1/2MS 液体培养基 (pH 5.8) 重悬农杆菌至 OD=0.3~0.4。本氏烟草的侵染流程参照 JANSING 等<sup>[15]</sup> 的方法实施。

收集 T<sub>0</sub> 代 *gPvoLEC2*、*ZmWUS2* & *STM* 转基因烟草植株种子 (T<sub>1</sub> 代),经 75%乙醇和 1%次氯酸钠溶液消毒后播种于 MS 固体培养基上。待转基因本氏烟草幼苗生长至 12 d,将其切分为 3 种外植体 (子叶、下胚轴和根),并以相同生长条件下的野生型本氏烟草作为对照。将 3 种外植体分别放入芽诱导培养基 (含 1 mg/L 6-BA、0.1 mg/L NAA、200 mg/L 头孢噻肟钠、100 mg/L 特美汀的 MS 固体培养基) 中诱导,培养 25 d 时统计再生芽诱导情况。

1.2.5 星油藤转基因毛状根诱导 利用携带目的基因 *35S::DsRed2* (简称 *DsRed2*, 图 1)、*35S::gPvoLEC2* 的发根农杆菌 K599 侵染星油藤幼苗,参考俞璟菁等<sup>[16]</sup> 的方法诱导转基因毛状根,并稍作修改。星油藤幼苗裹菌后放入含 2 mg/L 6-BA、0.2 mg/L IBA、400 mg/L 头孢噻肟钠、100 mg/L 特美汀的 WPM 固体培养基,在 26 °C 暗培养 5 d 后,转入 26 °C、16 h 光照/8 h 黑暗的光周期条件下培养诱导转基因星油藤毛状根。

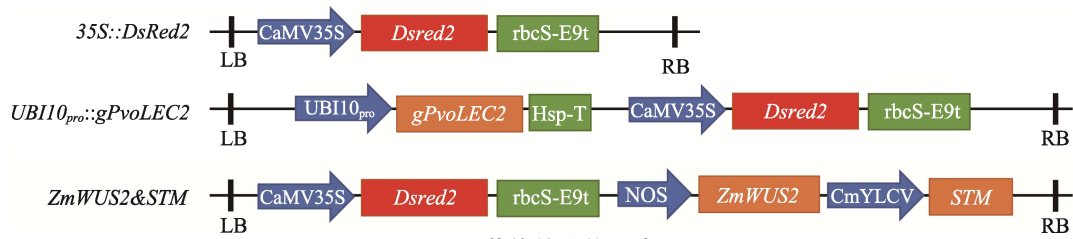


图 1 载体的结构示意图  
Fig. 1 Schematic diagram of structure of vector

2 结果与分析

2.1 大戟科物种 LAV 基因家族基因结构及系统进化分析

系统进化显示，星油藤 LEC2-ABI3 亚群中 *LEC2* (*PvoB3-69*)、*ABI3* (*PvoB3-03*)、*FUS3*

(*PvoB3-18*) 与蓖麻、小桐子、橡胶树等大戟科物种的 LEC2-ABI3 亚群的基因均为单拷贝 (图 2)。玉米 *LEC2* 和 *ABI3* 均有 2 个成员，不存在 *FUS3*，但在水稻中存在 *OsFUS3a* 和 *OsFUS3b* 两个成员。VAL 亚群变化较大，供试的 5 种大戟科

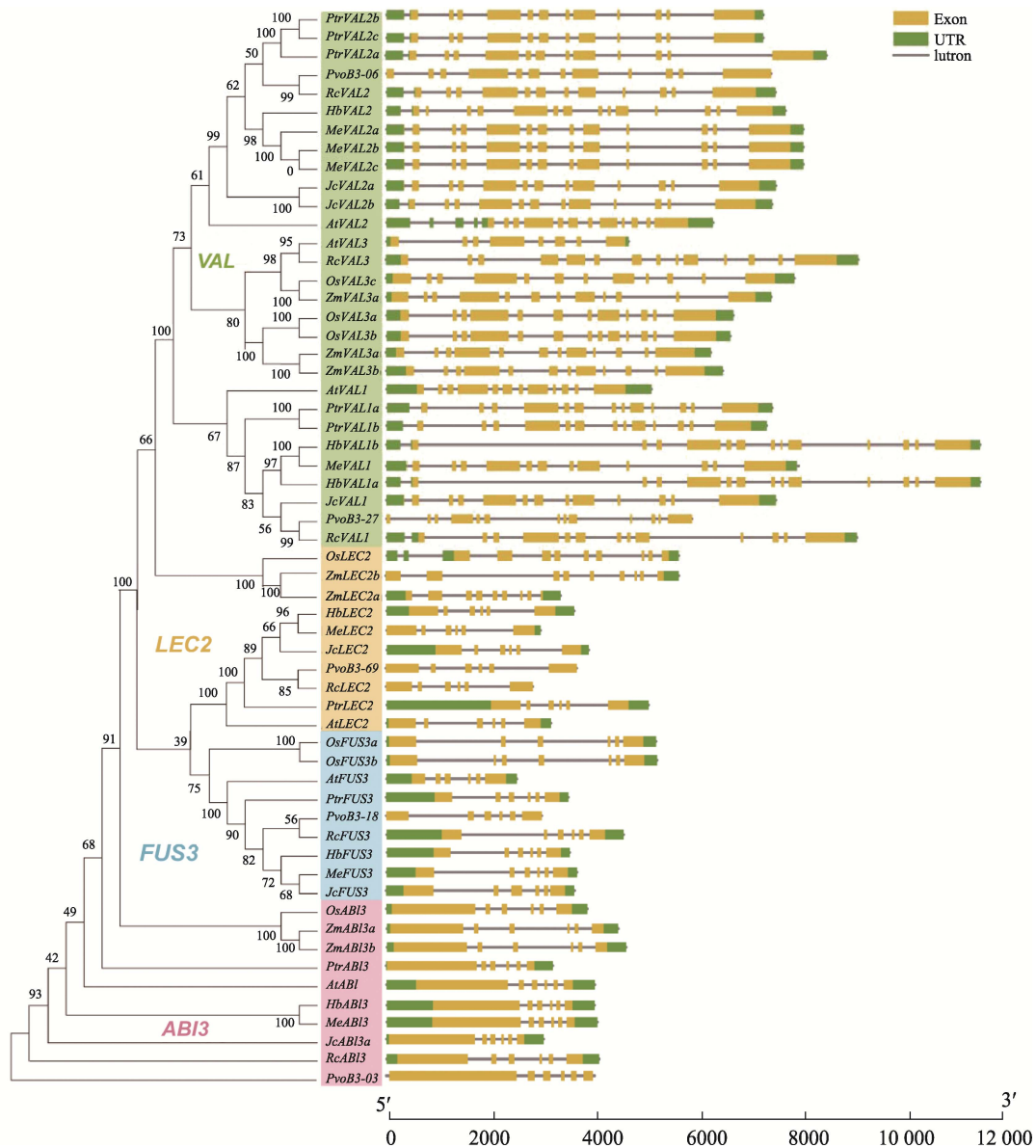


图 2 大戟科物种 LAV 基因家族基因结构及系统进化分析  
Fig. 2 Gene structure and phylogenetic analysis of LAV family in Euphorbiaceae

物种中的 *VAL3* 数量较少, 仅有蓖麻中有 1 个 *RcVAL3*; 但存在多个 *VAL1* 和 *VAL2* 成员, 如橡胶树、木薯。星油藤 *VAL* 亚群中仅含有 *PvoB3-06* (*VAL2*) 和 *PvoB3-27* (*VAL1*) 2 个成员。从基因结构 (图 2) 来看, *LEC2-ABI3* 亚群比较保守, 星油藤等大戟科植物以及拟南芥、杨树等木本植物均有 6 个外显子, 但玉米 *ZmLEC2a*、*ZmLEC2b* 以及水稻 *OsLEC2* 均含有 9 个外显子。*VAL* 亚群变异幅度较大, *VAL1* 和 *VAL2* 两个进化支含有 12~13 个外显子。在 *VAL3* 进化枝中, 拟南芥 *VAL3* 含有 8 个外显子, 水稻和玉米的 *VAL3* 成员含有 12 个外显子, 而蓖麻的 *RcVAL3* 有 14 个外显子。由此可知, 星油藤 *LAV* 亚家族中 *LEC2-ABI3* 亚群的数量和基因结构与其他双子叶植物相同, 功能可能比较保守。

## 2.2 星油藤 *LAV* 亚家族表达分析

为了研究星油藤 *LAV* 亚家族成员的表达特异性, 对鉴定得到的 *LAV* 亚家族基因在根、茎、茎尖、叶、雌花序、雄花序和种子等不同组织器官中的表达特征进行分析。结果 (图 3) 表明, *PvoABI3*、*PvoFUS3* 在开花后 50~65 d 的种子内特异性表达, 且 *PvoABI3* 的表达量很高, *PvoLEC2* 在各个组织部位的表达量均较低。*PvoVAL1* 在果中特异性表达, 在种子中也有少量低丰度的表达; *PvoVAL2* 在根系以及雄花中表达, 其中在根中的表达量较高, 在茎和果中也有低丰度表达。研究表明, 拟南芥 *LEC2* 在球形胚等胚胎发育早期表达, 调控胚胎的形态建成。本研究选取星油藤果实发育早期的样品提取 RNA, 仍未检测到 *PvoLEC2* 表达, 推测该基因可能在星油藤胚胎发育更早期表达。因此, 克隆该基因的基因组序列

*gPvoLEC2* 用于后期功能研究。*gPvoLEC2* 基因全长序列为 2896 bp, 基因结构如图 2 中 *PvoB3-69* 所示, 包含 6 个外显子, 5 个内含子 (GenBank accession: PP454233)。

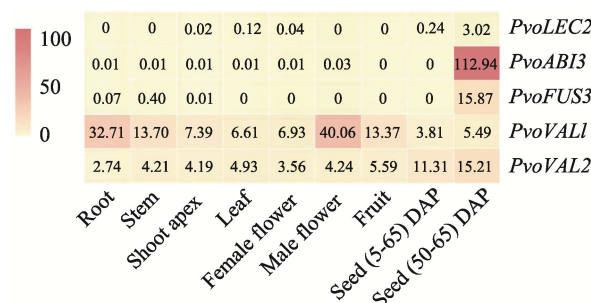


图 3 星油藤 *LAV* 亚家族基因在不同器官中的表达模式

Fig. 3 Expression profiles of *LAV* subfamily genes in different organs of *P. volubilis*

## 2.3 星油藤 *PvoLEC2* 及其同源基因多重序列比对分析

以拟南芥 *RAV1* 的 B3 结构域为模板, 对星油藤 *PvoLEC2* 与橡胶、木薯、蓖麻、小桐子等物种的同源蛋白 B3 结构域进行多重序列比对, 发现该结构域由 7 个  $\beta$ -折叠和 2 个  $\alpha$ -螺旋组成 (图 4)。 $\beta$ -折叠内部的疏水链核心氨基酸 Leu267、Ile282、Leu284、Val307、Trp318、Leu320、Phe322、Leu335、Leu354、Leu356、Leu366、Phe368 在星油藤 *PvoLEC2* 与其他物种同源蛋白 B3 结构域中是保守的,  $\alpha$ -螺旋核心氨基酸 Thr339、Phe342 在星油藤 *PvoLEC2* 与其他物种同源蛋白 B3 结构域中也是保守的。这表明不同物种 *LEC2* 同源蛋白的 B3 结构域的功能可能相同。

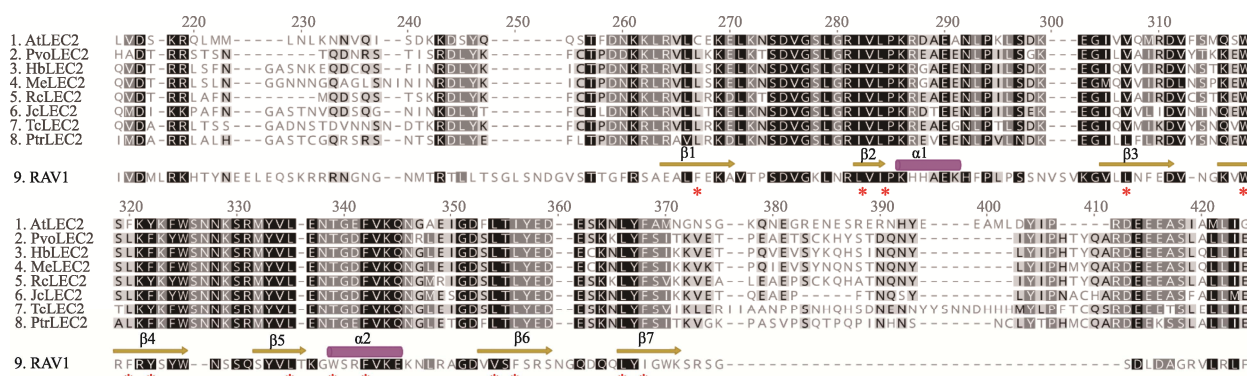


图 4 *PvoLEC2* 及其同源基因 B3 结构域氨基酸序列多重比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment of homologous of *PvoLEC2* proteins with sequences of other species

## 2.4 过表达 *gPvoLEC2* 促进转基因本氏烟草再生

为了探究过表达 *gPvoLEC2* 是否具有促进再

生的功能, 对 10 d 的 *gPvoLEC2* 转基因无菌苗进行器官离体培养, 以先前已经证明具有再生能力

的 *ZmWUS2* & *STM* 转基因本氏烟草作为阳性对照。离体培养 25 d 后发现（表 1，图 5），WT 的 72 片子叶中 8 片子叶能够诱导出再生芽，诱导率为 11.1%。*gPvoLEC2* 的 126 片子叶中 66 片子叶能够诱导出再生芽，诱导率为 52.4%，且诱导出的再生芽多集中在叶基部。*ZmWUS2* & *STM* 的 84 片子叶中 78 片子叶能够诱导出再生芽，诱导率为 92.9%，再生芽诱导率远高于野生型本氏烟草和 *gPvoLEC2* 转基因本氏烟草子叶。*ZmWUS2* & *STM* 转基因烟草子叶上诱导出的转基因芽更为密集，子叶的各个部位均能诱导出再生芽，并且多集中在子叶的近轴面。

对胚轴的再生情况统计显示，*gPvoLEC2* 的 63 个胚轴中 31 个胚轴能够诱导出再生芽，诱导率为 49.2%；WT 的 36 个胚轴中 5 个胚轴能够诱导出再生芽，诱导率为 13.9%；*ZmWUS2* & *STM* 的 42 个胚轴中 21 个胚轴能够诱导出再生芽，诱导率为 50.0%。野生型本氏烟草胚轴膨大不明显，再生芽的诱导数也极少，*gPvoLEC2* 转基因本氏烟草和 *ZmWUS2* & *STM* 转基因烟草胚轴的转基因芽诱导率相当，且远高于野生型本氏烟草胚轴的再生芽诱导率。*gPvoLEC2* 转基因本氏烟草胚轴和 *ZmWUS2* & *STM* 转基因烟草胚轴诱导的再生芽主要集中在两端的切口处。

对主根的再生情况进行统计发现，野生型本氏烟草根愈伤增殖速度最慢，36 条根中 2 条根能够诱导出再生芽，诱导率为 5.6%，再生芽诱导效率最低。*gPvoLEC2* 转基因本氏烟草根愈伤增殖速度最快，63 条根中 10 条根能够诱导出再生芽，诱导率为 15.9%，再生芽诱导率高于 *ZmWUS2* & *STM* 和 WT。*ZmWUS2* & *STM* 的 42 条根中 3 条根能够诱导出再生芽，诱导率为 7.1%。以上结果表明，相较于野生型本氏烟草，*gPvoLEC2* 转基因

表 1 转基因本氏烟草和野生型本氏烟草  
器官再生芽诱导效率

| Tab. 1 Organ regeneration bud induction efficiency of transgenic and wild-type <i>N. benthamiana</i> |                               |                                             |                                                                           |                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 基因型<br>Genotype                                                                                      | 外植体<br>类型<br>Type of explants | 外植体<br>总数<br>Total<br>number of<br>explants | 诱导出再生芽<br>的外植体数<br>Number of<br>explants induced<br>to regenerate<br>buds | 再生芽<br>诱导率<br>Regeneration<br>bud<br>induction<br>rate/% |
| WT                                                                                                   | 子叶                            | 72                                          | 8                                                                         | 11.1                                                     |
|                                                                                                      | 胚轴                            | 36                                          | 5                                                                         | 13.9                                                     |
|                                                                                                      | 主根                            | 36                                          | 2                                                                         | 5.6                                                      |
| <i>gPvoLEC2</i>                                                                                      | 子叶                            | 126                                         | 66                                                                        | 52.4                                                     |
|                                                                                                      | 胚轴                            | 63                                          | 31                                                                        | 49.2                                                     |
|                                                                                                      | 主根                            | 63                                          | 10                                                                        | 15.9                                                     |
| <i>ZmWUS2</i> &<br><i>STM</i>                                                                        | 子叶                            | 84                                          | 78                                                                        | 92.9                                                     |
|                                                                                                      | 胚轴                            | 42                                          | 21                                                                        | 50.0                                                     |
|                                                                                                      | 主根                            | 42                                          | 3                                                                         | 7.1                                                      |

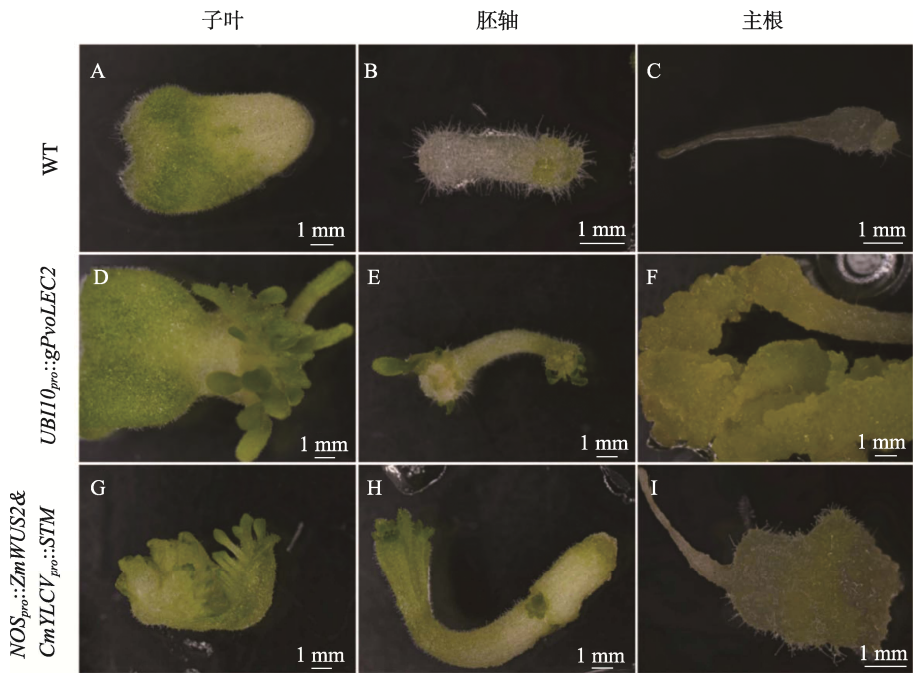


图 5 过表达 *gPvoLEC2* 促进本氏烟草再生

Fig. 5 Ectopic expression of *gPvoLEC2* promoting regeneration of *N. benthamiana*

本氏烟草子叶、胚轴以及主根的再生芽诱导能力均有所提升,即 *gPvoLEC2* 具有促进植物再生的功能。

## 2.5 过表达 *gPvoLEC2* 导致转基因本氏烟草发育畸形

为探究过表达 *gPvoLEC2* 以及 *ZmWUS2* & *STM* 对本氏烟草生长发育的影响,将 *ZmWUS2* & *STM* 和 *gPvoLEC2* 转基因本氏烟草的种子播种至土壤中,38 d 后对  $T_1$  代植株进行表型分析。结果发现,*gPvoLEC2* 转基因本氏烟草体型与野生型存在较大差别,地上部分主茎缩短,很难

伸长,植株明显矮化。*gPvoLEC2* 转基因本氏烟草  $T_1$  代植株叶片圆肥,形态不规则,部分畸形且叶脉偏心、不突出,革质化。 $T_1$  代 *ZmWUS2* & *STM* 转基因本氏烟草呈侏儒状,体型大小趋近于 WT 幼年期,茎不伸长,叶片簇生,叶小而密,植株地上部分高度通常为 3~5 cm,并且随着培养时间的延长也无明显生长趋势,叶片极小且密,叶片无明显卷曲(图 6)。以上结果表明,过表达 *gPvoLEC2*、*ZmWUS2* & *STM* 都会导致转基因本氏烟草发育畸形,但表型变异并不一致。

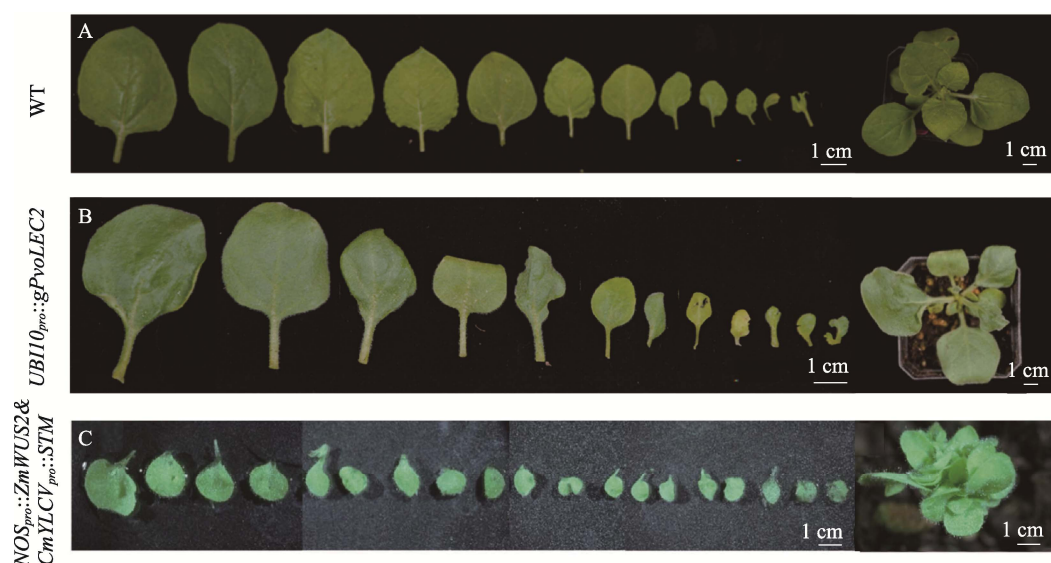


图 6 *gPvoLEC2* 和 *ZmWUS2* & *STM* 转基因本氏烟草  $T_1$  代植株表型分析

Fig. 6 Phenotypic analysis of  $T_1$  generation *gPvoLEC2* and *ZmWUS2* & *STM* transgenic *N. benthamiana*

## 2.6 过表达 *gPvoLEC2* 影响星油藤毛状根发育

为探究过表达 *gPvoLEC2* 对星油藤生长发育的影响,使用携带目的基因 *DsRed2*、*gPvoLEC2*、*ZmWUS2* & *STM* 的发根农杆菌 K599 诱导星油藤转基因毛状根。最终成功诱导出 *DsRed2* 和 *gPvoLEC2* 的星油藤转基因毛状根,未能诱导出 *ZmWUS2* & *STM* 的星油藤转基因毛状根。由图 7 可知,*gPvoLEC2* 转基因星油藤毛状根与 *DsRed2* 转基因毛状根存在较为明显的区别,相较于 3 条独立的 *DsRed2* 转基因星油藤毛状根,3 条独立的 *gPvoLEC2* 转基因星油藤毛状根均出现了较为明显的膨大和缩短,部分毛状根出现卷曲。随着培养时间的延长,*gPvoLEC2* 转基因毛状根很缓慢的伸长,与 *DsRed2* 转基因毛状根的细长表型呈现出明显的区别。可见,过表达 *gPvoLEC2* 抑制星油藤毛状根伸长,这与过表达抑制本氏烟草茎伸长

的表型类似,但是否促进毛状根再生还有待研究。

## 3 讨论

### 3.1 LAV 亚家族基因具的保守性

对拟南芥、水稻、杨树、玉米以及星油藤、蓖麻、橡胶树、小桐子、木薯等大戟科物种 LAV 基因家族的基因进行基因结构和系统进化分析,结果显示星油藤等大戟科植物的 *LEC2*-*ABI3* 亚群比较保守。前期研究表明 *ABI3* 的基因结构在陆生植物进化过程中相当保守,几乎所有陆生植物 *ABI3* 基因的内含子相位都是一致的,*FUS3* 和 *LEC2* 在进化的过程中也具有较高的保守性<sup>[17]</sup>,与本研究结果一致。虽然已报道 *LEC2*-*ABI3* 亚群的 *ABI3*、*FUS3*、*LEC2* 与胚胎发育有关,但 *ABI3* 参与调控植物激素 ABA 信号传导<sup>[18]</sup>,是种子萌发的关键负调控基因<sup>[19-20]</sup>。*FUS3* 基因是调控油脂

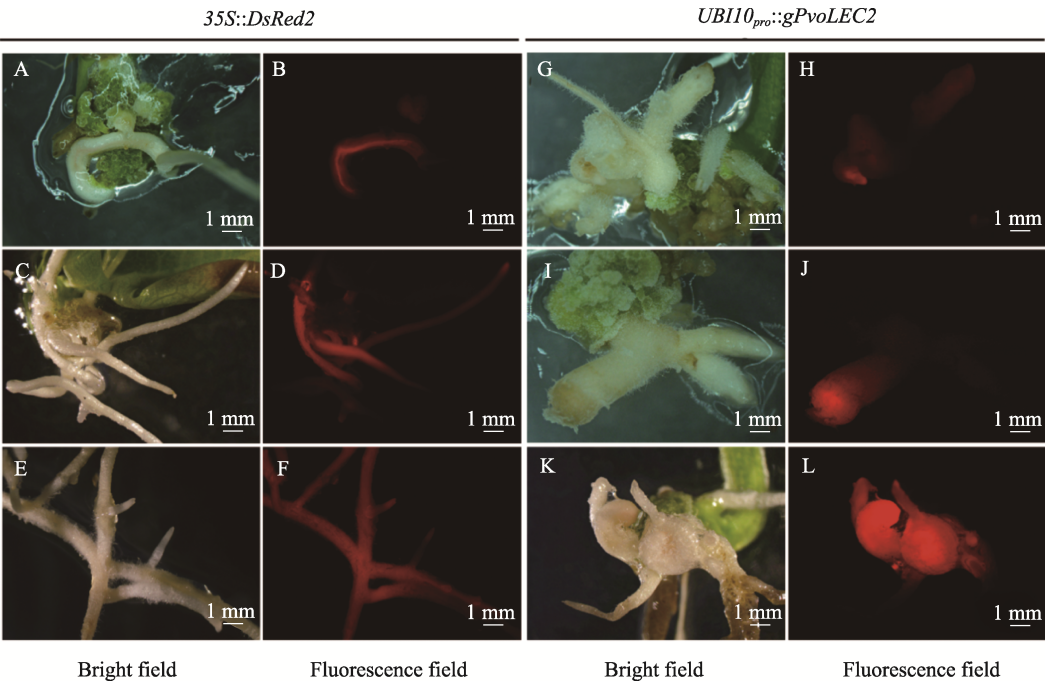


图 7 *DsRed2* 和 *gPvoLEC2* 转基因星油藤毛状根表型观察

Fig. 7 Ectopic expression *DsRed2* and *gPvoLEC2* affects *P. volubilis* hairy root development

合成的植物特异性转录因子之一，在拟南芥中 *FUS3* 基因在油脂积累方面发挥重要调控作用<sup>[21]</sup>。*LEC2* 在多个物种中的同源基因均能促进体细胞向胚性细胞转变、诱导体细胞胚胎发生，如萝卜（*Raphanus sativus* L.）<sup>[22]</sup>、可可、木薯等。因此，本研究推测 *LEC2* 在星油藤中的同源基因 *PvoLEC2* 可能也具有促进再生的功能。

### 3.2 利用模式植物快速筛查具有再生功能的发育调节基因

本研究通过本氏烟草验证了星油藤 *gPvoLEC2* 的再生功能，对于挖掘林木中与再生相关的发育调节基因提供了新思路。近年来利用 *BABY BOOM*（*BBM*）和 *WUSCHEL*（*WUS*）等促进细胞再生功能的发育调节基因显著提高了玉米、高粱等作物的遗传转化效率<sup>[23]</sup>，这些作物在以往的研究中是难以转化的。这些研究案例具备 2 个特点：一是使用的发育调节基因大多是已知功能的同源基因，如 *BBM* 和 *WUS*；二是被转化的物种具备基本的遗传转化条件。但是，在林木中使用发育调节基因促进遗传转化难以获得成功，可能是已知功能的发育调节基因在林木中并不一定可行。如植物细胞全能性的关键调控因子 *BBM* 基因，在甘蓝型油菜（*Brassica napus*）中过表达 *BnBBM* 可诱导体细胞胚胎的发生<sup>[24]</sup>，在拟南芥和毛白杨

（*Populus tomentosa* Carrière）中过表达 *BnBBM* 均能诱导体细胞胚胎的形成<sup>[24-25]</sup>，在再生困难的辣椒中过表达 *BnBBM* 也能有效地促进再生<sup>[25]</sup>，但林木中目前仅有苹果的遗传转化借助 *MdBBM* 取得了成功<sup>[26]</sup>。另外，林木中普遍缺乏基本的遗传转化体系，直接使用发育调节基因破解林木遗传转化障碍需要逐一尝试，工作量过大且难以成功。

据报道，常用的发育调节基因有 *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE*（*SERK*）、*LEC2*、*BBM*、*WUS*、*SHOOT-MERISTEMLESS*（*STM*）等<sup>[8, 23, 27-29]</sup>。星油藤中这些发育调节基因的功能还无法确定，并且遗传转化步骤繁杂，转化周期长，将这些发育调节基因不经筛选直接应用的可行性较差。考虑到本氏烟草在基础生物学中的诸多优势，使用具备再生功能的 *ZmWUS2* & *STM* 转基因烟草作为阳性对照，验证 *gPvoLEC2* 的再生功能，结果表明 *gPvoLEC2* 转基因本氏烟草的子叶、胚轴和主根离体培养的再生芽诱导率相较于野生型本氏烟草均有所提高。

### 3.3 *gPvoLEC2* 抑制植物生长发育

在本氏烟草和星油藤的毛状根中过表达 *gPvoLEC2* 均导致植物（器官）发育异常，转基因本氏烟草茎缩短、明显矮化、叶片畸形，转基因星油藤毛状根缩短、增粗，二者表型类似。此前

有研究显示在烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中过表达 *LEC2* 基因, 转基因植株表现出胚轴缩短, 子叶缩小甚至畸形的现象<sup>[30-31]</sup>。在拟南芥中过表达大豆 *GmLEC2* 基因也表现出相似的表型, 植株矮化, 莲座叶变小<sup>[32]</sup>。在可可中过表达 *TcLEC2* 基因, 虽然能够提高体细胞胚胎诱导的效率, 但这些体细胞胚胎生长发育会受到影响, 难以发育成完整植株<sup>[12]</sup>。在可可中过表达 *TcBBM* 可以诱导体细胞胚胎的发生, 但是持续的过表达 *TcBBM* 影响可了的正常生长发育, 诱导出的体细胞胚胎也无法发育成完整植株<sup>[33]</sup>。在苹果 (*Malus pumila* Mill) 中过表达 *MdBBM* 也产生了多效性影响, 一方面 *MdBBM* 显著提高了苹果的遗传转化效率, 另一方面转基因苹果幼苗难以生根, 根系的形态产生变化, 生长发育受到影响<sup>[26]</sup>。为获得正常发育的植株, 在玉米中过表达 *BBM* 和 *WUS2*, 有效地促进了再生的同时对启动子进行更换, 获得了健康可育的植株<sup>[34]</sup>。还有研究表明, 可以通过雌二醇诱导的系统来控制发育调节基因的表达, 获得完整的转基因植株后关闭发育调节基因的表达, 从而避免发育调节基因负面效应, 该策略在不同的物种中得到了有效的应用<sup>[26, 35]</sup>。因此, 如何削减 *gPvoLEC2* 负面效应是该基因在星油藤基因工程的应用过程中需要攻克的难点。

#### 4 结论

本研究通过系统进化、氨基酸序列多重比对, 结合本氏烟草功能验证, 从星油藤 LAV 亚家族中鉴定了 1 个促进细胞再生的发育调节基因 *gPvoLEC2*, 这表明在缺乏基本遗传转化的林木中, 利用本氏烟草验证发育调节基因的再生功能行之有效。在后续研究中, 探讨 *PvoLEC2* 的编码区序列以及 LAV 亚家族其他成员在星油藤再生过程中的作用也非常必要。

#### 参考文献

- [1] 尹丹丹, 李珊珊, 吴倩, 冯成庸, 李冰, 王倩玉, 王亮生, 徐文忠. 我国 6 种主要木本油料作物的研究进展[J]. 植物学报, 2018, 53(1): 110-125.  
YIN D D, LI S S, WU Q, FENG C Y, LI B, WANG Q Y, WANG L S, XU W Z. Research progress of 6 main woody oil crops in China[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2018, 53(1): 110-125. (in Chinese)
- [2] 谢蓝华, 陈佳, 张晓琴, 张嘉怡, 杜冰, 陈军. 对新资源食品——美藤果油的一些研究[J]. 云南科技管理, 2015, 28(1): 81-83.  
XIE L H, CHEN J, ZHANG X Q, ZHANG J Y, DU B, CHEN J. Some studies on *Plukenetia volubilis* oil, a new resource food[J]. Yunnan Science and Technology Management, 2015, 28(1): 81-83. (in Chinese)
- [3] 中华人民共和国卫生部公告[J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2013(1): 1-3.  
Announcement of Ministry of Health of the People's Republic of China[J]. Announcement of Ministry of Health of the People's Republic of China, 2013(1): 1-3. (in Chinese)
- [4] 董玉玲, 陈茂盛, 王秀兰, 牛龙见, 付乾堂, 徐增富. 木本油料作物美藤果组织培养植株再生体系的建立[J]. 分子植物育种, 2016, 14(2): 462-470.  
DONG Y L, CHEN M S, WANG X L, NIU L J, FU Q T, XU Z F. Establishment of in vitro regeneration system of woody oil crop *Plukenetia volubilis*[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(2): 462-470. (in Chinese)
- [5] 张嘉怡, 杜冰, 谢蓝华, 陈军, 陈佳, 杨公明. 绿色新资源食品: 美藤果油[J]. 中国油脂, 2013, 38(7): 1-4.  
ZHANG J Y, DU B, XIE L H, CHEN J, CHEN J, YANG G M. A new resource green food: *Sacha inchi* oil[J]. China Oils and Fats, 2013, 38(7): 1-4. (in Chinese)
- [6] WÓJCIKOWSKA B, JASKÓŁA K, GAŚSIOREK P, MEUS M, NOWAK K, GAJ M D. *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* promotes embryogenic induction in somatic tissues of *Arabidopsis*, via *YUCCA*-mediated auxin biosynthesis[J]. Planta, 2013, 238(3): 425-440.
- [7] TSUCHIYA Y, NAMBARA E, NAITO S, MCCOURT P. The *FUS3* transcription factor functions through the epidermal regulator *TTG1* during embryogenesis in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2004, 37: 73-81.
- [8] STONE S L, KWONG L W, YEE K M, PELLETIER J, LEPINIEC L, FISCHER R L, GOLDBERG R B, HARADA J J. *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(20): 11806-11811.
- [9] 马瑞景, 张晴雯, 龚霞, 许亚飞, 袁文雅. 拟南芥 B3 结构域蛋白质 VALs 互作转录因子的筛选[J]. 湖北大学学报 (自然科学版), 2020, 42(6): 597-602.  
MA R J, ZHANG Q W, GONG X, XU Y F, YUAN W Y. Screening of transcription factors interacting with VALs containing B3 domain in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Hubei University (Natural Science), 2020, 42(6): 597-602. (in Chinese)
- [10] SWAMINATHAN K, PETERSON K, JACK T. The plant

- B3 superfamily[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(12): 647-655.
- [11] KIM H U, JUNG S J, LEE K R, KIM E H, LEE S M, ROH K H, KIM J B. Ectopic overexpression of castor bean *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* in *Arabidopsis* triggers the expression of genes that encode regulators of seed maturation and oil body proteins in vegetative tissues[J]. FEBS Open Bio, 2013, 4: 25-32.
- [12] ZHANG Y F, CLEMENS A, MAXIMOVA S N, GUILTINAN M J. The *Theobroma cacao* B3 domain transcription factor *TcLEC2* plays a dual role in control of embryo development and maturation[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 106.
- [13] BRAND A, QUIMBAYA M, TOHME J, AGUIRRE P C. *Arabidopsis LEC1* and *LEC2* orthologous genes are key regulators of somatic embryogenesis in cassava[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 673.
- [14] CAI Y, SUN M, CORKE H. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the *Amaranthaceae*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(4): 1971-1978.
- [15] JANSING J, SACK M, AUGUSTINE S M, FISCHER R, BORTESI L. CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking  $\beta$ -1,2-xylose and core  $\alpha$ -1,3-fucose[J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(2): 350-361.
- [16] YU J J, DENG S L, HUANG H, MO J H, XU Z F, WANG Y. Exploring the potential applications of the noninvasive reporter gene RUBY in plant genetic transformation[J]. Forests, 2023, 14(3): 637.
- [17] 唐通. 植物中油脂调节基因 *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*, *FUSCA3* 和 *LEAFY COTYLEDON2* 的鉴定、系统进化和结构特征分析[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2019.
- TANG T. Identification, evolution analysis and structure characterization of oil-regulating genes *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*, *FUSCA3* and *LEAFY COTYLEDON2* in plants[D]. Xianyang: Northwest A & F University, 2019. (in Chinese)
- [18] LOPEZ-MOLINA L, MONGRAND S, MCLACHLIN D T, CHAIT B T, CHUA N H. ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination[J]. The Plant Journal, 2002, 32(3): 317-328.
- [19] LIU X D, ZHANG H, ZHAO Y, FENG Z Y, LI Q, YANG H Q, LUAN S, LI J M, HE Z H. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(38): 15485-15490.
- [20] HORSTMAN A, LI M F, HEIDMANN I, WEEMEN M, CHEN B J, MUINO J M, ANGENENT G C, BOUTILIER K. The *BABY BOOM* transcription factor activates the *LEC1-ABI3-FUS3-LEC2* network to induce somatic embryogenesis[J]. Plant Physiology, 2017, 175(2): 848-857.
- [21] ROSCOE T T, GUILLEMINOT J, BESSOULE J J, BERGER F, DEVIC M. Complementation of seed maturation phenotypes by ectopic expression of *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3*, *FUSCA3* and *LEAFY COTYLEDON2* in *Arabidopsis*[J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(6): 1215-1228.
- [22] 王川艺. 萝卜体细胞胚胎发生相关转录因子的鉴定及 *RsLEC2* 基因的功能验证[D]. 重庆: 重庆三峡学院, 2024.
- WANG C Y. Identification of transcription factors associated with somatic embryogenesis and functional verification of *RsLEC2* gene in *Raphanus sativus*[D]. Chongqing: Chongqing Three Gorges University, 2024. (in Chinese)
- [23] LOWE K, WU E, WANG N, WANG N, HOERSTER G, HASTINGS C, CHO M J, SCELONGE C, LENDERTS B, CHAMBERLIN M, CUSHATT J, WANG L J, RYAN L, KHAN T, YIU J C, HUA W, YU M, BANH J, BAO Z M, BRINK K, IGO E, RUDRAPPA B, SHAMSEER P M, BRUCE W, NEWMAN L, SHEN B, ZHENG P Z, BIDNEY D, FALCO C, REGISTER J, ZHAO Z Y, XU D P, JONES T, KAMM W G. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation[J]. The Plant Cell, 2016, 28(9): 1998-2015.
- [24] BOUTILIER K, OFFRINGA R, SHARMA V K, KIEFT H, OUELLET T, ZHANG L M, HATTORI J, LIU C M, LAMMEREN A A M, MIKI B L A, CUSTERS J B M, CAMPAGNE M M L. Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth[J]. The Plant Cell, 2002, 14(8): 1737-1749.
- [25] DENG W, LUO K M, LI Z G, YANG Y W. A novel method for induction of plant regeneration via somatic embryogenesis[J]. Plant Science, 2009, 177: 43-48.
- [26] 肖旭. 苹果 *Baby Boom* 基因在遗传转化和体细胞胚胎发生中的功能鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- XIAO X. Functional identification of apple *Baby Boom* in genetic transformation and somatic embryogenesis[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [27] HECHT V R, VIELLE-CALZADA J P, HARTOG M V, HARTOG M V, SCHMIDT E D L, BOUTILIER K, GROSSNIKLAUS U, VRIES S C. The *Arabidopsis somatic embryogenesis receptor Kinase 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture[J]. Plant Physiology, 2001, 127(3): 1015-1024.

- 803-816.
- [28] PÉREZ-PASCUAL D, JIMÉNEZ-GUILLEN D, VILLANUEVA-ALONZO H, SOUZA-PERERA R, GODOY-HERNÁNDEZ G, ZÚÑIGA-AGUILAR J J. Ectopic expression of the *Coffea canephora* *SERK1* homolog-induced differential transcription of genes involved in auxin metabolism and in the developmental control of embryogenesis[J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 163(4): 530-551.
- [29] LONG J A, MOAN E I, MEDFORD J I, BARTON M K. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 1996, 379(6560): 66-69.
- [30] LI K, WANG J, LIU C L, LI C S, QIU J J, ZHAO C Z, XIA H, MA C L, WANG X J, LI P C. Expression of *AtLEC2* and *AtIPTs* promotes embryogenic callus formation and shoot regeneration in tobacco[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 314.
- [31] 郭凤丹. *LEC* 基因促进植物体细胞胚形成及机理的研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2012.
- GUO F D. Study on the promotion and mechanism of *LEC* gene in plant somatic embryo formation[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2012. (in Chinese)
- [32] 马彦龙. 大豆 *GmLEC2* 基因的克隆及再生功能的初步分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- MA Y L. Cloning and regenerative function preliminary analysis of *GmLEC2* gene in soybean[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [33] FLOREZ S L, ERWIN R L, MAXIMOVA S N, GUILTINAN M J, CURTIS W R. Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous *BABY BOOM* transcription factor[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 121.
- [34] LOWE K, ROTA L M, HOERSTER G, HASTINGS C, WANG N, CHAMBERLIN M, WU E, JONES T, GORDON-KAMM W. Rapid genotype “independent” *Zea mays* L. (maize) transformation via direct somatic embryogenesis[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-plant*, 2018, 54(3): 240-252.
- [35] LUTZ K A, MARTIN C, KHAIRZADA S, MALIGA P. Steroid-inducible *BABY BOOM* system for development of fertile *Arabidopsis thaliana* plants after prolonged tissue culture[J]. *Plant Cell Report*, 2015, 34(10): 1849-1856.