

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.06.006

麻疯树 *JcBRL3* 基因的克隆及在花发育过程中的功能分析

陈雨倩¹, 雷世康², 徐刚^{1*}

(1. 贵州大学贵州省森林资源与环境研究中心/贵州省高原山地林木培育重点实验室/林学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 西南大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要: [目的] 探究 *BRL3* 基因在麻疯树花发育中的功能。[方法] 利用 RACE PCR 技术成功从麻疯树花蕾中获得了 *JcBRL3* 基因的 cDNA 全长序列; 利用原核表达体系对 *JcBRL3* 基因进行诱导表达, 利用 LC-MS/MS 对其表达产物进行质谱鉴定, 利用生物信息学方法对其蛋白质结构和基本理化性质进行分析; 利用实时荧光定量 PCR 方法分析了 *JcBRL3* 基因在麻疯树雌雄花发育的 9 个关键时期的相对表达量; 利用叶盘法将 *JcBRL3* 基因转化至烟草中超表达, 分析超表达 *JcBRL3* 对烟草花的形态结构影响。[结果] *JcBRL3* 基因的开放阅读框长 3 618 bp, 编码 1 205 个氨基酸。原核表达产物质谱鉴定表明: 该基因编码 1 个 *JcBRL3* 蛋白 (A0A067KCE7)。蛋白质结构分析表明: *JcBRL3* 含有多个富含亮氨酸重复序列, 是跨膜蛋白, 并且具有保守重复序列 LxxLxLxxN/CxL。荧光定量 PCR 分析发现: 在雌花中 *JcBRL3* 的表达于单核胚囊期达到最高水平, 在雄花中 *JcBRL3* 的表达于花粉粒成熟期达到最高水平且其显著高于其它任何时期。转基因烟草的花形态结构分析表明: 转 *JcBRL3* 基因烟草柱头位置低于花药, 花粉粒畸形率较低。[结论] *JcBRL3* 蛋白为富含亮氨酸重复序列类受体激酶蛋白, 是一个膜蛋白, *JcBRL3* 基因可能参与了麻疯树雌花单核胚囊期和雄花花粉粒成熟的发育并促进了花丝伸长。

关键词: 麻疯树; 花发育; *JcBRL3*; 功能分析

中图分类号: S718.46

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)06-0046-10

油菜素内酯 (BR) 是一类甾醇类植物激素, 在很低的浓度下即可表现出很强的生理生化效应^[1], 能参与调控植物生长发育和逆境胁迫等许多重要的生理过程^[2]。BRI1 (brassinosteroid insensitive 1) 作为 BR 的受体, 在 BR 信号转导中起重要作用。BRI1 属于富含亮氨酸重复类受体激酶 (LRR-RLK), 其结构主要由胞外区、跨膜区和胞内激酶区 3 部分组成^[3], 其中, 胞外区包括 1 个亮氨酸拉链基序, 1 个 N 端信号肽, 25 个富含亮氨酸重复单位 (LRR) 以及在第 21 和第 22 个 LRR 之间有一个由 70 个氨基酸组成的 ID (island domain) 结

构^[4-5], 该结构是 BR 的识别区域^[6]; 而 BRI1-like3 (BRI1-like receptor genes 3) 作为 BRI1 蛋白家族成员, 也参与了 BR 信号识别转导过程^[7-8]。

研究发现, BRI1 在植物花发育上有着重要的作用, Nie 等在番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 中过表达了 *SIBRI1* 基因, 结果发现番茄花变大且花瓣和花柱变长^[9]; Singh 等发现, 小麦 (*Triticum aestivum* L.) *TaBRI1* 基因在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 中过表达会导致转基因拟南芥提前开花^[10]; 雷世康等发现, 麻疯树 (*Jatropha curcas* L.) 油菜素内酯受体基因 *JcBRI1* 介导的 BR 途径可能对麻疯

收稿日期: 2021-02-04 修回日期: 2021-09-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31760198); 贵州省生态学一流学科 (GNYL[2017]007)

作者简介: 陈雨倩, 硕士研究生在读。Email: chenyuqiangzu@126.com

* 通讯作者: 徐刚, 博士, 教授。主要研究方向: 林木分子生物学。Email: xg335300@aliyun.com

树雌花发育有一定的促进作用^[11]。然而,目前关于 *BRL3* 参与花发育方面的研究还未见报道。

麻疯树果实含油率高达 60%,是最具潜力的生物柴油原料树种^[12]。然而,由于麻疯树结实少、种子产量低等原因严重阻碍了其大规模种植和发展,而雌雄花比例低(约为 1/30~1/10)是导致麻疯树结实少的重要原因之一^[13]。本研究从麻疯树花蕾转录组数据中筛选到了一个性别差异表达的油菜素内酯受体蛋白基因 *BRI1-like3* (*BRL3*),利用 RACE PCR 技术获得了 *JcBRL3* 基因的全长 cDNA;通过 LC-MS/MS 技术鉴定了 *JcBRL3* 的原核表达产物(蛋白质);通过在线软件对 *JcBRL3* 蛋白的结构进行了生物信息学分析;通过 qRT-PCR 技术分析了该基因在麻疯树花发育过程中的表达模式,并通过该基因的转基因烟草对其功能进行了初步验证。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究材料为贵州省黔西南州贞丰县采集而来麻疯树花蕾,收集完花蕾样品后将其放进非冻型组织 RNA 保护液中。将不同时期的麻疯树花蕾在 4℃ 平衡 48 h 后分成 9 类,分别为性别未分化时期、雌花大孢子母细胞时期、雌花大孢子母细胞分裂期、雌花单核胚囊期、雌花胚囊成熟期、雄花小

孢子母细胞时期、雄花四分体时期、雄花单核花粉粒时期以及雄花花粉粒成熟期^[11],随后放入-80℃超低温冰箱中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取及 *JcBRL3* 基因全长 cDNA 克隆 麻疯树总 RNA 的提取参照 Plant RNA Kit (OMEGA) 说明书进行。采用 SMARTer[®] RACE 5'/3' Kit (Clontech) 试剂盒进行 5'/3' RACE 扩增,引物见表 1。PCR 产物用 NuceloSpin Gel and PCR Clean-Up Kit (TaKaRa) 胶回收纯化后与 pUC19 载体连接,利用 In-Fusion[®] HD Cloning Kit (TaKaRa) 进行转化,筛选阳性克隆于生工生物工程股份有限公司(上海)测序验证。将测序成功的 5'cDNA 片段、3'cDNA 片段和已知中间片段通过 DNAMAN 软件拼接,从而获得 *JcBRL3* 基因全长 cDNA 序列。

1.2.2 原核表达载体构建及诱导表达 使用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Nde* I 对目的基因 ORF 与原核表达载体 pET-30a (+) 进行双酶切,经胶回收纯化连接后转化到 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞中。提取阳性菌株质粒进行测序验证,将测序正确的重组载体(pET-30a-*JcBRL3*)分别转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞中。挑取单克隆接种于含卡那霉素(50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 LB 液体培养基中过夜培养,其中, *E. coli*

表 1 本研究所用引物及其序列

Table 1 Primers sequences and ways of use in this study

引物 Primers	引物序列 Sequence (5'→3')	引物用途 Usage
3'GSP	GATTACGCCAAGCTTGGCTTCTTCCAGTAATGATGAAGTTGC	全长克隆
5'GSP	GATTACGCCAAGCTTCAGTATTTGTGAGGTTGAGGGCAGTAA	全长克隆
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	全长克隆
JcBRL3-F	GGAATTCATATGCAGTAATGATGAAGTTGCGGGGTTA	原核表达载体构建
JcBRL3-R	CCCAAGCTTAGAGAGATTGTTGTTAGAGACATCA	原核表达载体构建
QJcBRL3-F	GCTTGACTTGAACAGCAACGACCTT	荧光定量PCR
QJcBRL3-R	TCCTGACACAACGCCTGGAACAAT	荧光定量PCR
JcActin-F	TCCCTGGTATTGCTGACCGTAT	荧光定量PCR (内参基因)
JcActin-R	TGGACAATGGATGGACCAGACT	荧光定量PCR (内参基因)
JcTubulin-F	CTCTGCAACTATGAGTGGTGTAAACG	荧光定量PCR (内参基因)
JcTubulin-R	CACGAGAAGTAAGTGGGGCAAA	荧光定量PCR (内参基因)
GMJcBRL3-F	CAGTGGTCTCACAAATGAAGAAACAATGGAGAAT	过表达载体构建
GMJcBRL3-R	CAGTGGTCTCATAATCATGAACTTTGAGATTCTT	过表达载体构建
JcBRL3st-F	TGCCTGACCTCATCGCTGCTT	转基因烟草检测
JcBRL3st-R	CCTGACACAACGCCTGGAACAA	转基因烟草检测

Rosetta (DE3) 中需再加入氯霉素 ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。次日以 1:100 的体积比接种到 LB 液体培养基中 (抗生素与之前相同), 待 OD_{600} 为 0.5~0.8 时, 向液体培养基中加入 IPTG (终浓度为 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 分别置于 15°C 和 37°C 下进行培养, 培养时间均为 16 h, 诱导 JcBRL3 重组蛋白的表达, 再用 SDS-PAGE 电泳对重组蛋白的表达进行检测。

1.2.3 蛋白质质谱分析及鉴定 将 SDS-PAGE 凝胶的目的条带切下装入离心管中, 经脱水脱色后使用胰蛋白酶于 37°C 水浴过夜酶解, 之后提出肽段制成冻干粉。取 $5 \mu\text{L}$ 含 0.1%TFA 的溶液将干粉重新溶解, 再按 1:1 的比例与 α -氰基-4-羟基肉桂酸饱和溶液混合 (含 50%ACN 和 1%TFA), 制成上样液, 取 $1 \mu\text{L}$ 样品进行质谱点靶鉴定^[11]。质谱数据分析和蛋白鉴定采用 Mascot 2.1 (Matrix Science) 软件进行。

1.2.4 JcBRL3 蛋白结构分析 利用在线工具分别对麻疯树 JcBRL3 蛋白的信号肽 (SignalP 4.1 Server)、跨膜结构 (TMHMMServerV.2.0)、磷酸化位点 (NetPhos3.1Server)、二级结构 (GOR4)、三级结构 (SWISS-MODEL) 以及保守结构域 (NCBI-CDD) 进行预测和分析。利用 Uniprot 数据库检索 JcBRL3 蛋白, 通过 Clustal X 软件对与 JcBRL3 蛋白含相同结构域的同源蛋白进行多重比对分析。通过 MEGA 6.0 软件的邻接法 (Neighbor-Joining), Poissoncorrection 模型, Bootstrap 检验为 1 000 来构建系统发育树。

1.2.5 JcBRL3 在花发育过程中的表达分析 按照 Plant RNA Kit (OMEGA) 试剂盒说明书分别提取麻疯树花蕾 9 个关键发育时期的 RNA, 对 RNA 浓度和质量进行检测后, 取等量 RNA 反转录形成 cDNA。所用荧光定量 PCR 引物见表 1。以麻疯树花蕾未分化时期为对照组, 以 β -Actin 和 Tubulin 为内参基因, 每个样品设置 3 个技术重复与 3 个生物重复, 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算, 再利用 SPSS20.0 软件对数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

1.2.6 JcBRL3 基因过表达载体的构建 通过 Golden Gate assembly 技术构建 JcBRL3 基因 ORF 与载体 pBWA (V) KS-ccDB 的植物过表达载体。通过冻融法将 pBWA (V) KS-BRL3 质粒转化到根癌农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 涂板于含卡那霉素 ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和利福平 ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的

YEP 固体培养上, 挑取阳性菌落测序验证。将测序正确的农杆菌菌液划线培养, 挑取单菌落接种于 YEP 液体培养基中过夜培养, 第 2 天取 1 mL 菌液加入到 50 mL YEP 液体培养基中, 当 OD_{600} 培养到 0.4~0.7 时, 将菌液转移到离心管中, 离心收集菌体。

1.2.7 叶盘法转化烟草及转基因烟草的分子检测 用 MS 重悬液重悬农杆菌, 再通过叶盘转化法将目的基因转入烟草 K326, 之后置于培养基中培养到烟草幼苗形成, 再对其进行移植。分别提取野生型烟草和转基因烟草的 DNA 与 RNA, 进行 PCR 与 RT-PCR 检测, 判断目的基因是否整合至烟草抗性植株基因组中以及能否在烟草体内转录成功, 检测所用引物见表 1。

1.2.8 烟草花粉粒电镜扫描观察 采集 2 株野生型及 3 株转基因烟草处于散粉期的花药, 每株 3 个 (共 15 个), 经戊二醛和锇酸双重固定、脱水干燥、对花粉粒喷金处理后于扫描电镜 (SU8100) 下观察拍照并计算花粉粒畸形率。

2 结果与分析

2.1 麻疯树 JcBRL3 基因 cDNA 全长序列的克隆

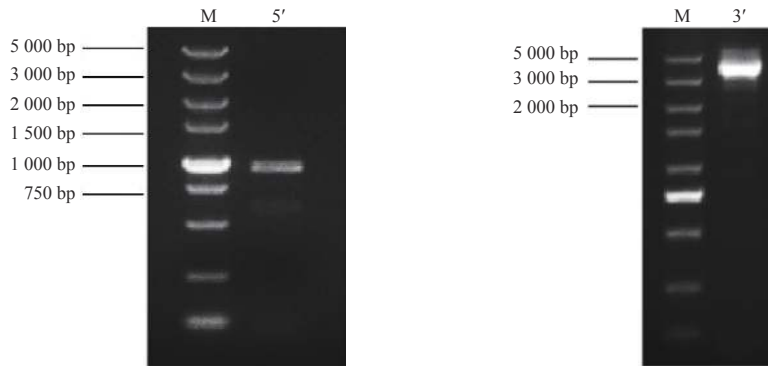
利用 RACE PCR 技术获得 JcBRL3 基因的 5'RACE 和 3'RACE 片段 (图 1), 经拼接得到 cDNA 全长 4 755 bp, 该基因的开放阅读框 (ORF) 为 3 618 bp, 编码 1 205 个氨基酸, 分子量为 130.71 kDa, 等电点 (pI) 为 6.06 (GenBank 登录号: MG879232)

2.2 原核表达载体构建及诱导表达分析

将构建好的原核表达载体 pET-30a (+) - JcBRL3 转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 与 *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞中, 在 15°C 与 37°C 温度下诱导 16 h 后, 离心收集菌体进行 SDS-PAGE 分析。结果表明: JcBRL3 蛋白大约在 80 kDa 左右出现目的条带, 与预测的蛋白理论分子量几乎一致, 说明 JcBRL3 基因在 *E. coli* BL21 (DE3) 与 *E. coli* Rosetta (DE3) 中均可成功表达, 且在相同的诱导时间, 15°C 与 37°C 不同的诱导温度下, JcBRL3 蛋白有同样的表达情况 (图 2)。

2.3 麻疯树 JcBRL3 蛋白质质谱鉴定

质谱鉴定结果表明: JcBRL3 在原核表达系统得到表达, 共有 16 条特异的肽段与 JcBRL3 蛋白 (A0A067KCE7) 氨基酸序列相匹配 (表 2), 序

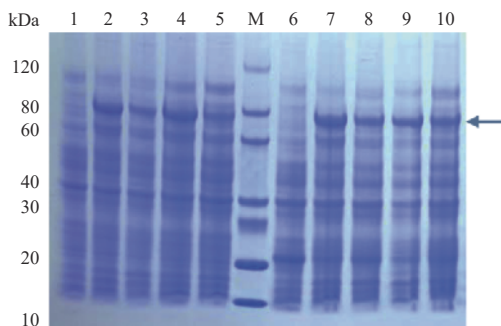


注: 5': *JcBRL3* 基因的 5' RACE PCR 扩增条带; 3': *JcBRL3* 基因 cDNA 的 3' RACE PCR 扩增条带

Notes: 5': The 5' RACE PCR amplified band of *JcBRL3* gene; 3': The 3' RACE PCR amplified band of *JcBRL3* gene

图1 麻疯树 *JcBRL3* 基因 RACE PCR 电泳检测

Fig. 1 The *JcBRL3* gene of *Jatropha curcas* RACE PCR electrophoresis detection



注: M: 蛋白 Marker; 1: 阴性对照, Rosetta; 2、3、4、5 表示重组载体转化 BL21 (DE3), 经 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 于 15°C 、 37°C 、 15°C 、 37°C 下诱导 16 h 的表达产物; 6: 阴性对照 BL21 (DE3); 7、8、9、10 表示重组载体转化 Rosetta (DE3), 经 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 于 15°C 、 37°C 、 15°C 、 37°C 下诱导 16 h 的表达产物。

Notes: M: Protein Marker; 1: negative control, Rosetta; 2, 3, 4, 5: the recombinant vector transformed BL21(DE3), the expression product induced by $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG at 15°C , 37°C , 15°C , 37°C for 16 h; 6: negative control, BL21(DE3); 7, 8, 9, 10: the recombinant vector transformed Rosetta (DE3), the expression product was induced by $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG at 15°C , 37°C , 15°C , 37°C for 16 h.

图2 pET-30a-*JcBRL3* 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 SDS-PAGE detection of pET-30a-*JcBRL3*

列覆盖率达到了 100%, 蛋白分子量为 84.7 kDa, 蛋白得分为 615, 这表明 *JcBRL3* 基因的表达产物就是 *JcBRL3* 蛋白 (A0A067KCE7)。

2.4 麻疯树 *JcBRL3* 蛋白结构分析

信号肽预测结果表明: *JcBRL3* 蛋白存在信号肽结构, 切割位点位于第 24 位与第 25 位氨基酸之间 (图 3A)。跨膜结构预测结果表明: *JcBRL3* 属于跨膜蛋白, 具有 1 个跨膜区, 位于第 813 至第 835 氨基酸处, 推测该蛋白可能定位至细胞膜上, 作为膜受体蛋白参与信号转导 (图 3B)。磷酸化

位点分析表明: *JcBRL3* 蛋白有 101 个丝氨酸 (Ser)、9 个酪氨酸 (Tyr) 和 21 个苏氨酸 (Thr) 磷酸化位点 (图 4A)。Uniport 数据库分析表明: *JcBRL3* 蛋白结构域位于 898~1 175 位氨基酸之间, 为丝氨酸/苏氨酸 (Serine/Threonine Kinase) 活性位点蛋白激酶家族成员。蛋白二级结构分析发现: *JcBRL3* 蛋白二级结构主要为无规则卷曲和 α 螺旋, α 螺旋占比 25.06%, 无规则卷曲占比 56.27%, 延伸链占比 18.67%。(图 4B)。蛋白三维结构分析发现: *JcBRL3* 蛋白的三维结构呈弯曲螺旋管状, 是个同源二聚体, 以同源二聚体的形式行使功能 (图 4C)。

氨基酸序列分析表明: *JcBRL3* 蛋白含有多个富含亮氨酸重复序列 (LRR), 并且具有保守重复序列: LxxLxLxxN/CxL, 属于富含亮氨酸重复序列类受体蛋白激酶 (LRR-RLK) (图 5)。对其功能域氨基酸序列多重比对分析发现: *JcBRL3* 蛋白与蓖麻 (*Ricinus communis* L.) 和亚洲棉 (*Gossypium arboreum* L.) 的 BRI1 蛋白相似性分别达 94.6% 和 93.5%, 与油桐 (*Vernicia fordii*) 的一个 LRR-RLK 相似性高达 96.8%, 表明 *JcBRL3* 蛋白可能与它们具有相似的结构 (图 6)。此外, 系统发育树结果显示: *JcBRL3* 与油桐的一个 LRR-RLK 蛋白聚集在同一个分支上, 表明二者具有较高的同源性 (图 7)。

2.5 麻疯树 *JcBRL3* 基因在花发育过程中的表达分析

通过 qRT-PCR 技术检测了 *JcBRL3* 基因在麻疯树 9 个关键花发育时期的相对表达量。结果显示: *JcBRL3* 基因的表达量在雌花中呈现先上升后下降的趋势, 其中, 在大孢子母细胞时期表达水平

表 2 16 条匹配肽段
Table 2 16 matched peptide segments

编号 Number	肽段 Sequence	分子量 Molecular weight/Da		误差 Error(\pm Da)	起始序列 Start sequence	终止序列 Terminator sequence
		估算值 Estimated value	观测值 Observed value			
		1	NEGGTSCR			
2	GAGGLVEFEGIR	1 204.632 1	1 204.646 0	0.013 9	621	632
3	FCTSSNPSALQK	1 339.631 1	1 339.645 9	0.014 8	419	430
4	FSGNLETIPLSCK	1 465.735 6	1 465.740 8	0.005 2	187	199
5	FSGNLETIPLSCKR	1 621.836 7	1 621.854 5	0.017 8	187	200
6	LENFPMVHSCPTTR	1 688.788 3	1 688.806 9	0.018 6	636	649
7	LLLASNYLSGNVPSGLGSK	2 122.085 0	2 122.083 3	-0.001 7	431	450
8	LENFPMVHSCPTTRISYSGK	2 196.057 6	2 196.113 3	0.055 7	636	654
9	MHHHHHHSSNDEVAGLLAFK	2 320.078 9	2 320.085 2	0.006 3	1	20
10	SFLVSCNHLAHVNLSHNSIPGGIFR	2 776.410 2	2 776.460 4	0.050 2	122	146
11	YENNSGLCGVPLAPCGSGHRPASYTR	2 907.326 2	2 907.354 0	0.027 8	765	791
12	RLSVLDLSYNLFSGEIPSSFVANSPPSLK	3 137.651 9	3 137.711 9	0.060 0	200	228
13	LSVLDLSYNLFSGEIPSSFVANSPPSLK	2 981.550 8	2 981.562 3	0.011 5	201	228
14	GNLFSAGDLSATSVCALETLDLSSNNISDPLPGK	3 463.689 7	3 463.699 2	0.009 5	88	121
15	QLYLAYNQFLGDIPPELSQACGTQLQELDLSGNR	3 723.832 3	3 723.931 6	0.099 3	304	336
16	HLDLSHNNFSGTFFSLDFGHCGNLTFLNVSQNR	3 735.735 8	3 735.828 4	0.092 6	229	261

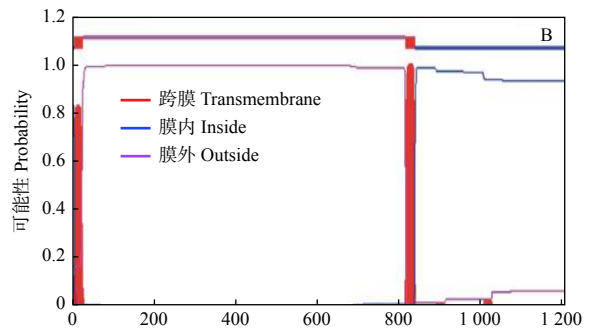
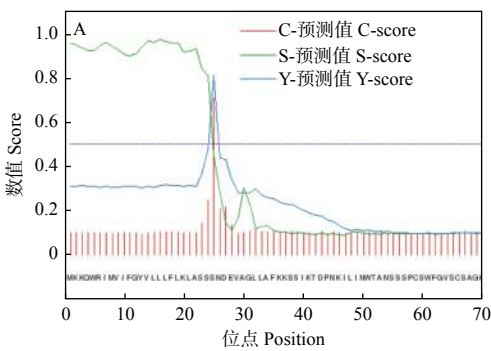


图 3 JcBRL3 蛋白信号肽 (A) 和跨膜结构 (B) 预测

Fig. 3 Signal peptide (A) and transmembrane structure (B) prediction of JcBRL3 protein

最低，在单核胚囊期时表达量达到最高；*JcBRL3* 基因的表达量在雄花中则呈现先上升，后下降，最后再上升的趋势，其中在小孢子母细胞时期表达量最低，在花粉粒成熟期表达量达到最大且高于其它任何时期（图 8）。这些分析结果表明 *JcBRL3* 基因很可能参与了麻疯树的雌花单核胚囊期发育和雄花花粉粒的成熟过程。

2.6 转基因植株的获得及转基因烟草的分子检测结果

采用叶盘法侵染 K326 烟草，经卡那霉素筛选、共培养、选择培养、继代培养及生根培养等过

程，成功获得了一批转基因烟草。以转基因烟草基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，结果显示：野生型烟草未检测到目的条带，9 株转基因植株能成功检测到目的条带，推断麻疯树 *JcBRL3* 基因已成功导入 K326 烟草基因组中（图 9A）。提取了转基因烟草的总 RNA 合成 cDNA 第一链，通过 RT-PCR 扩增表明，*JcBRL3* 基因在转基因烟草中成功表达（图 9B）。

2.7 转基因烟草花和花粉粒的形态学分析

为了进一步研究 *JcBRL3* 基因在花发育的作

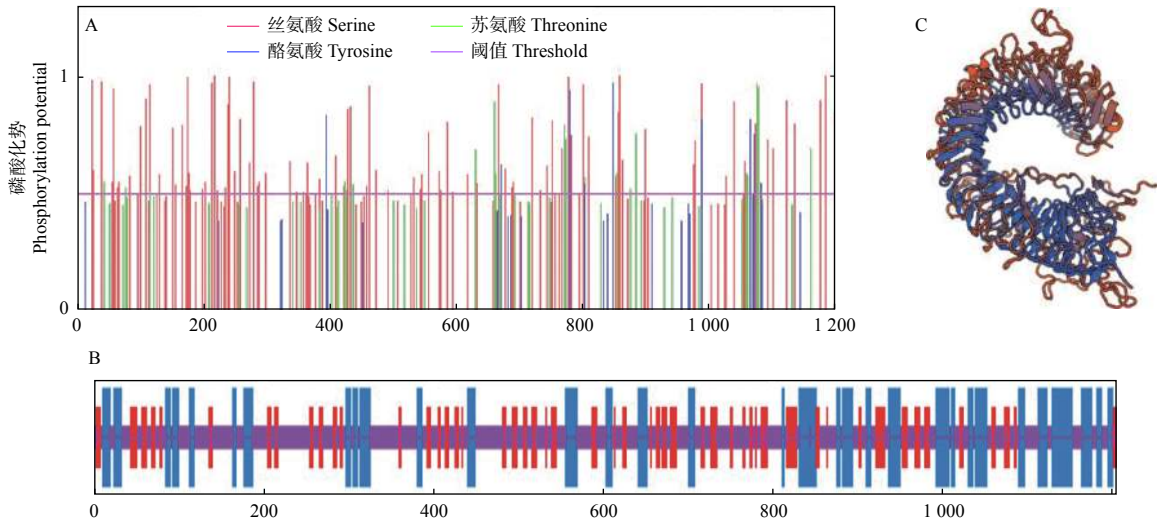


图 4 *JcBRL3* 蛋白磷酸化位点 (A)、二级结构 (B) 和三级结构预测图 (C)

Fig. 4 Prediction of phosphorylation site (A), secondary structure (B) and tertiary structure (C) of *JcBRL3* protein

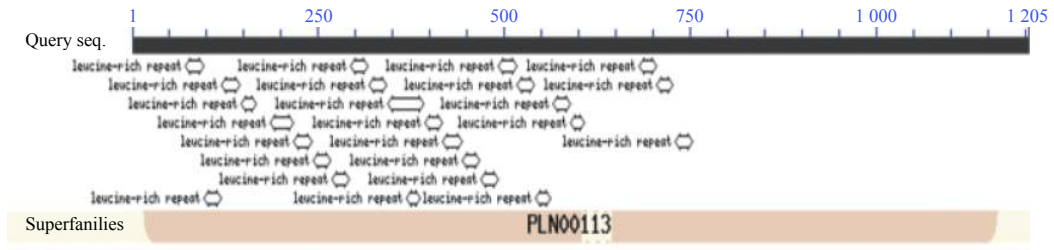


图 5 *JcBRL3* 蛋白保守结构域

Fig. 5 Conserved domain of *JcBRL3* protein

用, 对 2 株野生型和 3 株转基因烟草的花和花粉进行形态结构分析。经观察发现: 2 株野生型 K326 烟草柱头的位置均高于花药, 而 3 株转基因烟草的柱头的位置均低于花药 (图 10A、B)。扫描电镜观察发现: 2 株野生型烟草花粉部分凹陷空瘪, 平均畸形率为 25.4% (图 10C、D), 而 3 株转基因烟草花粉粒基本较为饱满, 凹陷空瘪较少, 平均畸形率仅为 7.1% (图 10E、F)。推测 *JcBRL3* 基因可能参与了麻疯树雄花发育。

3 讨论

BR 是一种高活性的植物激素, 广泛存在于各种植物中。BR 能调控植物细胞伸长和分裂、维管组织分化、种子萌发和成熟、叶片的形态建成和衰老、生殖发育等一系列植物生长发育过程, 还具有增强植物抵抗低温、高温、高盐等非生物逆境的能力^[14-15]。在 BR 信号传导过程中, 首先细胞膜表面受体 BRI1 和辅助受体 BAK1 (BRI1-associated receptor kinase 1) 互作形成具有活性的复合物识别

BR 信号; 之后 BR 信号途径通过一系列磷酸化和去磷酸化作用, 使 BZR1 (brassinazole-resistent 1) 和 BES1 (BRI1-EMS-SUPOPRESSOR 1) 等转录因子被激活, 从而调控 BR 应答相关基因的表达^[16]。而 BRL3 受体作为 BRI1 受体蛋白家族成员, 也参与了 BR 的信号转导^[17]。

本研究从麻疯树花发育的转录组中筛选到一个性别差异表达的油菜素内酯受体蛋白基因 *BRL3*, 其开放阅读框长 3 618 bp, 编码 1 205 个氨基酸。对其原核表达产物质谱鉴定及蛋白结构分析表明: *JcBRL3* 蛋白包含 1 个胞内功能域、1 个跨膜区以及 1 个胞外富亮氨酸重复序列结构, 且胞内区具有丝氨酸/苏氨酸活性位点, 这与 LRR-RLK 的结构一致^[18], 初步判定 *JcBRL3* 蛋白是一个 LRR-RLK 类受体激酶。在三维结构上 *JcBRL3* 与拟南芥 BRI1-like1 高度相似; 在功能域上 *JcBRL3* 蛋白与亚洲棉 BRI1 蛋白、蓖麻 BRI1 蛋白及油桐的一个 LRR-RLK 序列相似性极高, 这些结果表明 *JcBRL3* 蛋白很可能属于 BRI1 家族蛋白。

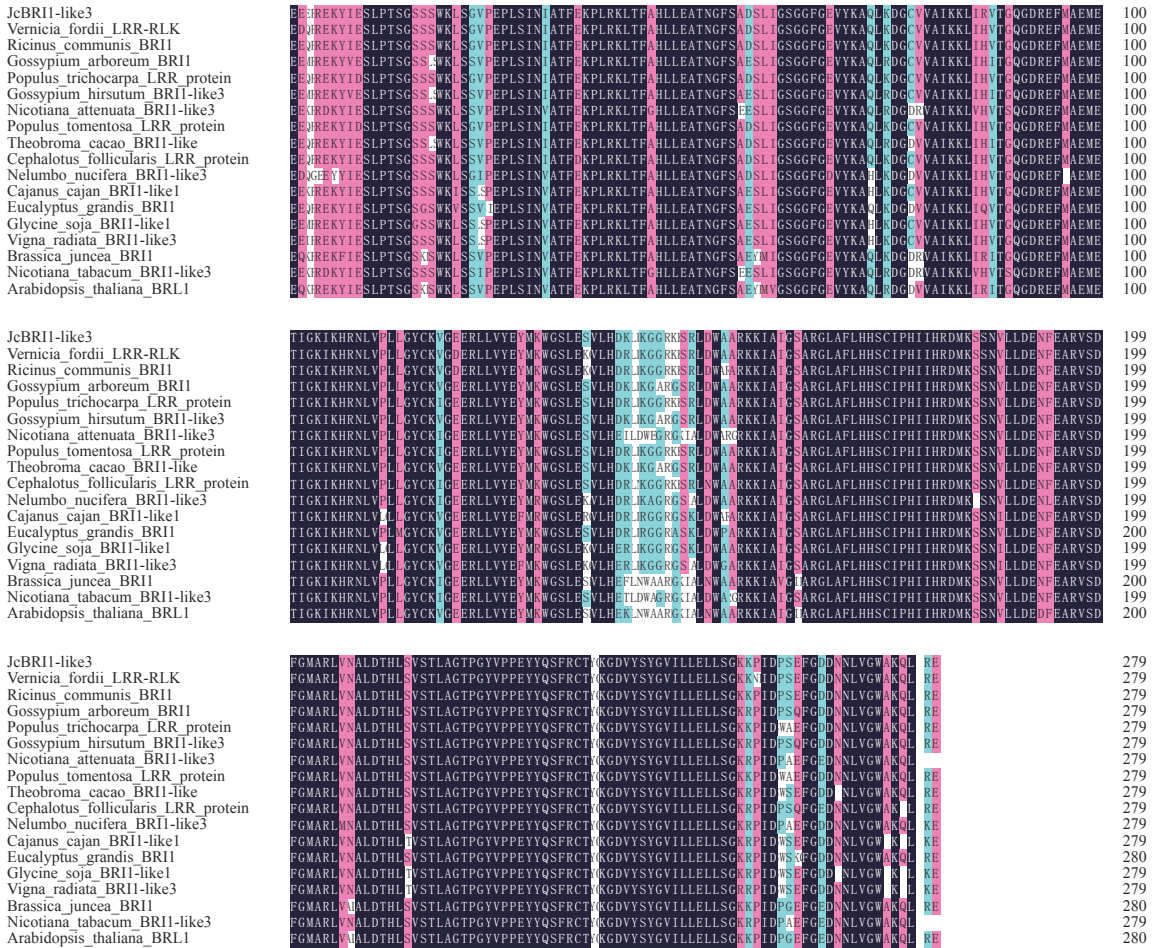


图 6 麻疯树 JcBRL3 蛋白结构域与其他植物的多序列比对结果

Fig. 6 Multiple sequence alignment of the JcBRL3 protein domain of *Jatropha curcas* and other plants

注/Notes: *Jatropha curcas* BR11-like3: 麻疯树; *Vernicia fordii* LRR-RLK: 油桐; *Ricinus communis* BR11: 蓖麻; *Gossypium arboreum* BR11: 亚洲棉; *Populus trichocarpa* LRR Protein: 毛果杨; *Gossypium hirsutum* BR11-like3: 陆地棉; *Nicotiana attenuata* BR11-like3: 渐狭烟草; *Populus tomentosa* LRR Protein: 毛白杨; *Theobroma cacao* BR11-like: 可可树; *Cephalotus follicularis* LRR Protein: 土瓶草; *Nelumbo nucifera* BR11-like3: 莲; *Cajanus cajan* BR11-like1: 木豆; *Eucalyptus grandis* BR11: 巨桉; *Glycine soja* BR11-like1: 野大豆; *Vigna radiata* BR11-like3: 绿豆; *Brassica juncea* BR11: 芥菜; *Nicotiana tabacum* BR11-like3: 烟草; *Arabidopsis thaliana* BRL1: 拟南芥

目前, 对于 *BRL3* 基因的研究还十分有限, 且大都集中于韧皮部形成、维管分化及抗旱性方面^[19-20], 其参与生殖发育调控的研究尚未涉及。本研究通过对 *JcBRL3* 基因在麻疯树花发育过程中的表达模式分析发现, *JcBRL3* 的表达水平在麻疯树雄花花粉粒成熟期达到最高, 表明其可能参与了雄花花粉粒成熟的过程; 将 *JcBRL3* 基因导入烟草中过量表达发现, 野生型烟草柱头位置高于花药, 而转基因烟草柱头位置低于花药, 且其花粉粒较饱满畸形率低, 推测这种差异可能是 *JcBRL3* 基因参与烟草雌蕊发育导致的。虽然目前的研究尚未直接表明 *BRL3* 能调控雄蕊发育, 但大量研究证明 *BR* 在植物雄性器官发育方面有不可替代的作用。 *BR*

能促进番茄^[21]、扁桃 (*Prunus dulcis* L.)^[22]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[23] 及拟南芥^[24] 等植物的花粉萌发, 而 *BR* 信号传导或生物合成缺陷会导致花粉发育缺陷和雄蕊缩短^[25]。 *BR* 缺陷与不敏感株系如: *cpd*、*dwf4* 和 *bri1* 皆表现为雄性不育^[26-27], 而导致这类植株雄性不育的主要原因是花丝变短^[28]、花粉数量减少以及绒粘层和小孢子发育异常^[25]。此外, 研究发现, 在拟南芥中 *BR* 可以通过控制 *MS1*、*MS2*、*MYB103*、*TDF1* 和 *SPL/NZZ* 基因的表达来调控雄蕊的发育, 这种调控能够完成的关键在于这些基因的启动子上含有 *BES1* 转录因子的结合位点^[25]。已有研究证明 *BRL3* 基因的表达能修复 *bri1* 突变体的表型缺陷^[7], 并发现 *BES1* 转录因子能与

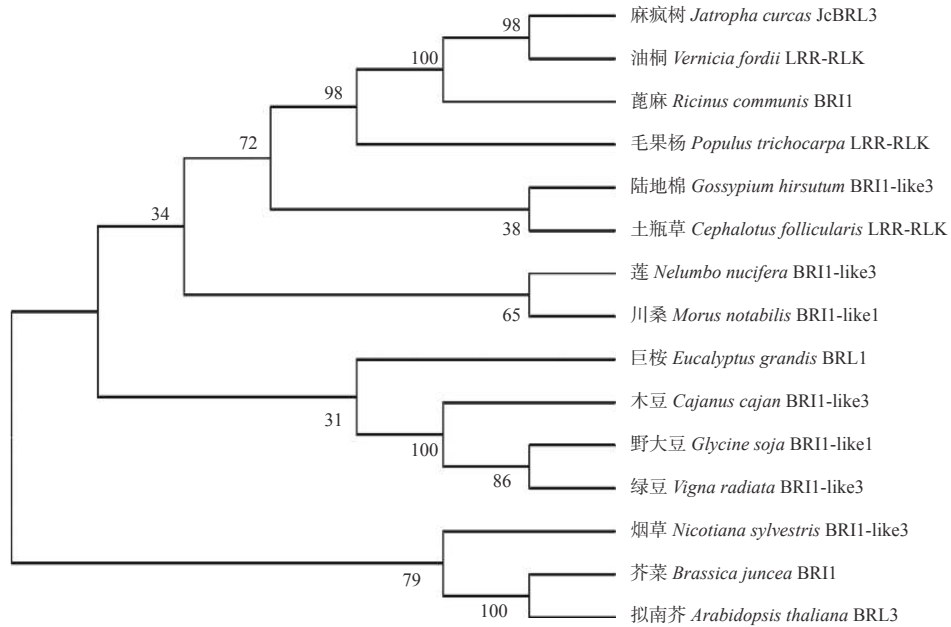


图 7 麻疯树 *JcBRL3* 蛋白系统进化树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree analysis of *Jatropa curcas* *JcBRL3* protein

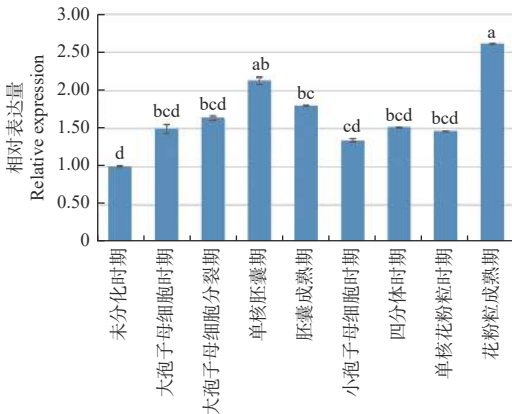


图 8 *JcBRL3* 基因不同发育时期的表达量

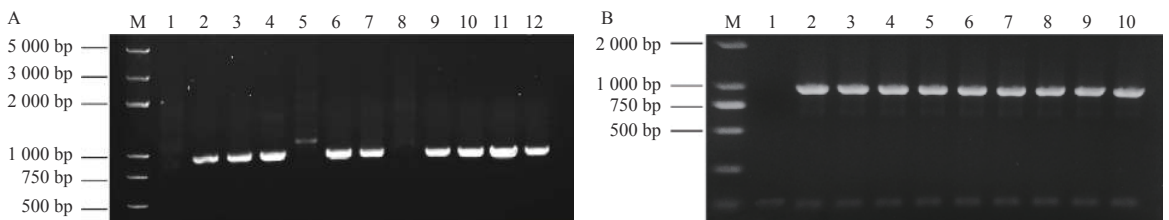
Fig. 8 The expression level of *JcBRL3* gene at different development stages

BRL3 启动子上的 BRRE 相结合从而调控 *BRL3*^[19], 这暗示 *BRL3* 的表达很可能通过调控雄蕊发育来修

复 *bril* 突变体的雄性不育。因此, 推测在烟草、拟南芥和麻疯树中极可能存在相同的 BR 调控途径, *JcBRL3* 基因的过量表达导致烟草花丝伸长、花粉粒畸形率降低是很明显的 BR 增强表型, 这种 BR 增强型很可能是由 BES1 转录因子的调控导致的, 而这种推测是否属实还需进一步研究证明。

4 结论

本研究通过 RACE PCR 技术成功从麻疯树花蕾中获得了 *JcBRL3* 基因的 cDNA 全长序列, 该基因开放阅读框长 3 618 bp, 编码 1 205 个氨基酸; 原核表达产物为 *JcBRL3* 蛋白, 预测属于跨膜蛋白, 含有多个 LLR; qRT-PCR 分析表明, 其可能参与了麻疯树雌花单核胚囊期和雄花花粉粒成熟的发育过程; 此外, 其转基因烟草花药位置高于柱

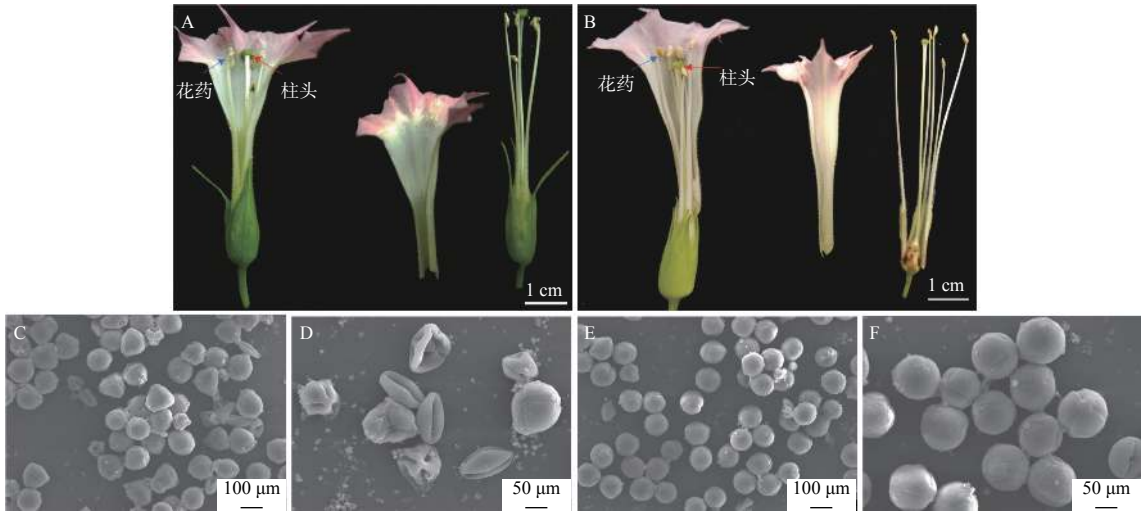


注: A: 1: 野生型烟草; 2~12: 转基因烟草。B: 1: 野生型烟草; 2~10: 转基因烟草。

Notes: A: 1: wild type tobacco; 2~12: Transgenic tobacco. B: 1 wild type tobacco; 2~10: Transgenic tobacco.

图 9 转基因烟草 PCR (A) 与 RT-PCR 检测 (B)

Fig. 9 PCR (A) and RT-PCR (B) detection of genetically modified tobacco



注: A: 野生型烟草花; B: 转基因烟草花; C、D: 野生型烟草花粉粒电镜图; E、F: 转基因烟草花粉粒电镜图。

Notes: A: Wild-type tobacco flower; B: Transgenic tobacco flower; C, D: Wild-type tobacco pollen grain electron micrograph; E, F: Transgenic tobacco pollen grain electron micrograph.

图 10 野生型烟草 K326 和转基因烟草花及花粉粒的形态分析

Fig. 10 Morphological analysis of flowers and pollen grains of wild-type tobacco K326 and transgenic tobacco

头, 花粉粒也较为饱满, 进一步表明 *JcBRL3* 可能参与了麻疯树雄花发育。而关于 *JcBRL3* 和其介导的 BR 信号是如何参与调控麻疯树花发育的还需进一步的研究来揭示。

参考文献:

- [1] Vert G, Jaillais Y. Brassinosteroid signaling and BRI1 dynamics went underground[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, 33: 92-100.
- [2] 郑洁, 王磊. 油菜素内酯在植物生长发育中的作用机制研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2014, 16(1): 52-58.
- [3] Li J, Wen J, Lease K A, et al. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling[J]. *Cell*, 2002, 110(2): 213-22.
- [4] Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction[J]. *Cell*, 1997, 90(5): 929-938.
- [5] Vert G, Nemhauser J L, Geldner N, et al. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants[J]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*, 2005, 21(1): 177-201.
- [6] He Z, Wang Z Y, Li J, et al. Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1[J]. *Science*, 2000, 288(5475): 2360-2363.
- [7] Cañodelgado A, Yin Y, Yu C, et al. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2004, 131(21): 5341-5351.
- [8] Zhou A, Wang H, Walker J C, et al. BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis* brassinosteroid signaling[J]. *Plant Journal*, 2004, 40(3): 399-409.
- [9] Nie S, Huang S, Wang S, et al. Enhancing brassinosteroid signaling via overexpression of tomato (*Solanum lycopersicum*) SIBR11 improves major agronomic traits[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1386.
- [10] Singh A, Breja P, Khurana J P, et al. Wheat *Brassinosteroid-Insensitive1 (TaBRI1)* interacts with members of *TaSERK* gene family and cause early flowering and seed yield enhancement in *Arabidopsis*[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0153273.
- [11] 雷世康, 徐刚. 麻疯树 *BRI1* 基因的鉴定及其在不同发育时期花蕾中的表达分析[J]. *林业科学研究*, 2019, 32(5): 121-129.
- [12] Wu W G, Huang J K, Deng X Z. Potential land for plantation of *Jatropha curcas* as feedstocks for biodiesel in China[J]. *Science China-Earth Sciences*, 2009, 53(1): 120-127.
- [13] 郭承刚, 王朝文, 李建富, 等. 麻疯树物候期和花的发育动态观察[J]. *现代农业科技*, 2007(1): 12-13.
- [14] 李元元, 曹清河. 油菜素内酯参与调控植物生长发育与抗逆性的机制及其育种应用研究[J]. *中国农业科技导报*, 2015, 17(2): 25-32.
- [15] Planas-Riverola A, Gupta A, Betegón-Putze I, et al. Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress[J]. *Development*, 2019, 146(5): dev151894.
- [16] 王喆, 王璐, 宋旭明, 等. 植物油菜素内酯信号通路与植物免疫相关研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2019, 47(4): 26-29.
- [17] Lozano-Elena F, Cao-Delgado A I. Emerging roles of vascular brassinosteroid receptors of the BRI1-like family[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2019, 51: 105-113.
- [18] Shiu S H, Blecker A B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling[J]. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2001, 2001(113): re22.
- [19] Salazar-Henao J E, Lehner R, Betegón-Putze I, et al. BES1 regulates the localization of the brassinosteroid receptor BRL3 within the provascular tissue of the *Arabidopsis* primary root[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(17): 4951-4961.
- [20] Fàbregas N, Lozano-Elena F, Blasco-Escámez D, et al. Overexpression of the vascular brassinosteroid receptor BRL3 confers drought resistance without penalizing plant growth[J]. *Nature communica-*

- tions, 2018, 9(1): 4680.
- [21] Singh I, Shono M. Physiological and molecular effects of 24-Epi-brassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato[J]. *Plant Growth Regulation*, 2005, 47(2-3): 111-119.
- [22] Sotomayor C, Castro J, Velasco, Nicolás, *et al.* Influence of seven growth regulators on fruit set, pollen germination and pollen tube growth of almonds[J]. *Journal of Agricultural Science & Technology B*, 2012(9): 1051-1056.
- [23] Thussagunpanit J, Jutamanee K, Chai-arree W, *et al.* Increasing photosynthetic efficiency and pollen germination with 24-Epi-brassinolide in rice (*Oryza sativa* L.) under heat stress[J]. *Thai Journal of Botany* 4, 2012: 1135-143.
- [24] Vogler F, Schmalzl C, Enghart M, *et al.* Brassinosteroids promote *Arabidopsis* pollen germination and growth[J]. *Plant Reproduction*, 2014, 27(3): 153-167.
- [25] Ye Q, Zhu W, Li L, *et al.* Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(13): 6100-6105.
- [26] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, *et al.* Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem[J]. *Plant Journal*, 2002, 32(4): 495-508.
- [27] Hewitt F R, Hough T, O' Neill P, *et al.* Effect of brassinolide and other growth regulators on the germination and growth of pollen tubes of *Prunus avium* using a multiple hangingdrop assay[J]. *Plant Physiology*, 1985, 1: 201-211.
- [28] Kim T W, Hwang J Y, Kim Y S, *et al.* *Arabidopsis* CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(8): 2397-2412.

Cloning and Functional Analysis of *JcBRL3* Gene from *Jatropha curcas* During Flower Development

CHEN Yu-qian¹, LEI Shi-kang², XU Gang¹

(1. Institute for Forest Resources and Environment of Guizhou/Key Laboratory of Forest Cultivation in Plateau Mountain of Guizhou Province/College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: [Objective] To explore the function of *BRL3* gene in flower development of *Jatropha curcas*. [Method] The full-length cDNA sequence of *JcBRL3* gene was obtained by RACE PCR. The prokaryotic expression system was used to induce the expression of *JcBRL3* gene. The expression products were identified by mass spectrometry using LC-MS/MS. The structure and basic physicochemical properties of the protein were analyzed by bioinformatics. The relative expression levels of *JcBRL3* gene during the key stages of flower development of *Jatropha curcas* were analyzed by qRT-PCR. The overexpression *JcBRL3* gene was transformed into tobacco by leaf plate method to analyze the influence of overexpression of *JcBRL3* gene on the morphology and structure of tobacco flowers. [Result] The length of the open reading frame of *JcBRL3* gene was 3 618 bp and encoded 1 205 amino acids. The results of mass spectrometry showed that the expression of this gene encoded a *JcBRL3* protein. Protein structure analysis showed that *JcBRL3* protein was a transmembrane protein with multiple leucine-rich repeats and conserved repeats: LxxLxLxxN/CxL. qRT-PCR analysis showed that the expression of *JcBRL3* in female flowers reached the highest level at mononuclear embryo sac stage, and in male flowers reached the highest level at pollen grain maturation stage, which was significantly higher than at any other stage. The morphological structure analysis of transgenic tobacco flower showed that the stigma position of transgenic tobacco was lower than that of anther, and the malformation rate of pollen grains was lower. [Conclusion] *JcBRL3* protein is a LRR-RLK, which is a membrane protein. *JcBRL3* gene may participate in the development process of female flower mononuclear embryo sac stage and pollen grain maturation of male flower and promote filament elongation in *Jatropha curcas*.

Keywords: *Jatropha curcas*; flower development; *JcBRL3*; functional analysis