

Artificial miRNA 调控甘蓝型油菜芥酸的研究

王志伟^{1,2} 张自阳¹ 林丽婷³ 张金文² 刘明久^{1,*} 乔岩²

¹河南科技学院/现代生物育种河南省协同创新中心,河南 新乡 453003;

²甘肃农业大学农学院,甘肃 兰州 730070;³河南师大附中双语国际学校,河南 新乡 453003)

摘要:芥酸是重要的工业原料,主要来源是甘蓝型油菜种子,为调节甘蓝型油菜种子内芥酸含量,针对甘蓝型油菜芥酸合成过程中的关键酶基因 *Bnfad2* 设计特异性 amiRNA,并构建种子特异表达载体,转化高芥酸甘蓝型油菜品种 MY15 和低芥酸甘蓝型油菜品种 LEA01,并对转化植株 T₀ 种子脂肪酸进行分析。结果表明,转化的高芥酸甘蓝型油菜芥酸的增加最高达到 5.12%,最低 2.11%;而转化的低芥酸品种,最高仅为 0.45%,最低只有 0.16%,而且所有转化低芥酸材料的芥酸含量都小于 1%;同时转化种子内油酸的含量得到了明显的提高,最低为 4.99%,最高达到了 10.71%,亚油酸降低的幅度十分明显,最大降幅达到 17%。表明 amiRNA 技术可以通过影响脂肪酸合成过程中特定基因的表达,有效改变种子内脂肪酸的组成,从而改变其营养结构,提高营养价值,进一步提高油菜种子的附加值。本研究为运用 amiRNA 技术调节油菜脂肪酸组成和改变其营养结构提供了一定理论依据。

关键词:甘蓝型油菜;芥酸;脂肪酸;amiRNA;调控

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2019.01.0024

芥酸(erucic acid, C22:1^{Δ13})属超长链脂肪酸,是以光合产物蔗糖为主要碳源,通过碳链的延长和去饱和作用形成的^[1]。芥酸是制备聚乙烯膜、山嵛醇、山嵛酸、尼龙、感光材料、乳化剂、香精、润滑油等的原材料,在机械、化工、冶金、油漆、纺织、橡胶、医药等行业被广泛应用,是一种重要的工业原料^[2-3]。目前,工业芥酸主要来源于高芥酸甘蓝型油菜,因此提高油菜中芥酸的含量具有重要意义。同时,油菜也是植物油的重要来源,其菜籽油食用量占国内食用植物油的 57.2%^[4],且菜籽油中的芥酸含量对于人类的健康具有重要影响。研究表明,菜籽油中的芥酸可能影响菜籽油在人体内的消化,引起心肌损伤,使肾上腺组织的胆固醇水平上升,且容易使脂肪在心脏组织中积累,如果长期食用芥酸含量高的菜籽油,会增加食用者患心血管类疾病的几率,因此我国对用于食用油的菜籽中芥酸含量的要求是低于 1%,而工业上对芥酸含量的要求是 60%,甚至更高^[5-6]。通过杂交选育等传统育种方法,我国先后育出了多个芥酸含量低于 1%的食

用油菜品种,而育出的高芥酸品种含油量仅 40%左右,芥酸含量约为 50%,但传统育种方法局限性较大,芥酸含油量很难再提高^[7-8]。因此,利用生物技术的手段提高芥酸含量已成为油菜高芥酸育种的重要方向^[9-10]。

油酸(oleic acid, C18:1)作为超长链脂肪酸和多不饱和脂肪酸合成的底物,其代谢途径有 2 条,一是在原来碳链的基础上在脂肪酸延长酶 1(fatty acid elongation 1, FAE1)作用下继续延长,继而合成 C20:1、C22:1 等超长链脂肪酸;二是在脂肪酸去饱和酶(fatty acid desaturase2, FAD2)作用下继续去饱和,从而合成 C18:2、C18:3 等多不饱和脂肪酸。因此提高芥酸的含量一方面可通过提高 *fae1* 基因的表达量,以合成更多的芥酸,另一方面可沉默 *fad2* 基因的表达,减少油酸的去饱和作用,为芥酸的合成提供更多的底物^[11]。

人工 miRNA(artificial miRNA, amiRNA)是以生物体内的 miRNA 为模板,设计一段 miRNA 及 miRNA*

收稿日期:2018-03-09 接受日期:2018-08-10

基金项目:河南省基础前沿项目(162300410142)

作者简介:王志伟,男,实验师,主要从事作物生理及分子生物学研究。E-mail:wangzhiwei519@126.com

* 通讯作者:刘明久,男,教授,主要从事作物育种及高产理论研究。E-mail:liumingjiu@hist.edu.cn

序列替换原来前体序列中的 miRNA :miRNA *,从而使生成的前体序列经过剪切作用能够有目的地对特定靶基因进行沉默。相比传统沉默基因方式,amiRNA 具有高特异性、高效性、高遗传稳定性、高生物安全性等特点,已被广泛运用于植物的代谢功能、基因功能等相关研究^[12-13]。

芥酸的调节研究多是利用传统的反义抑制、RNAi 等手段沉默基因的表达^[14],而 amiRNA 在甘蓝型油菜芥酸调控中的研究尚未见报道。本研究利用 amiRNA 技术,针对甘蓝型油菜 *fad2* 的基因序列设计特异的 amiRNA,并利用特异性启动子 *Napin*,研究 amiRNA 对油菜芥酸合成相关基因和芥酸含量的调控,以期为 amiRNA 在甘蓝型油菜中的应用和培育理想芥酸含量的油菜品种奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

遗传转化油菜品种是由甘肃农业大学农学院油菜育种实验室提供的高芥酸甘蓝型油菜品种 MY15(油酸 14.38%、亚油酸 11.69%、芥酸 47.26%)和低芥酸甘蓝型油菜品种 LEA01(油酸 67.36%、亚油酸 18.04%、芥酸 0.72%)。本试验所用菌株均由甘肃农

业大学植物基因组学实验室保存,大肠杆菌(*E. coli*) *DH5 α* 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 LBA4404、*pCEPSPS*[由 *pCAMBIA1300* 载体改造而来,载体内的潮霉素(*Hyg*)抗性被草甘膦(*EPSPs*)抗性替代]、*pCENN*(在 *pCEPSPS* 的多克隆位点利用 *EcoR* I 和 *Kpn* I 酶切和 T4 连接酶添加 *Napin* 启动子,然后用 *Sal* I 和 *Hind* III 酶切连接 *Nos* 终止子得到),*pRS300* amiRNA 克隆载体。

DNA 聚合酶(*AP111-01*)、克隆载体(*CT101-01*)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(*GF201-01*)、氨基青霉素(*GG101-01*)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(*GF101-01*)、卡那霉素(*Kanamycin*, *Kna*, *GG201-01*)、T4 连接酶(*FL101-01*)、*Xba* I(*JX101-01*)、*EcoRI*(*JE201-01*)、*Kpn* I(*JE201-01*)、*Hind* III(*JH101-01*)、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(*TIANGEN*, *DP209*),均购自北京自全式金公司。

1.2 试验方法

1.2.1 人工 miRNA 片段的克隆 将 *Bnfad2* (*AY577313*)的序列提交至 amiRNA 设计网站 *WMD3*,利用 *pRS300* 为模板设计针对 *BnFAD2* 的专用 amiRNA 引物(表 1),利用设计出的引物进行重叠 PCR 克隆 amiRNAD2,各轮反应的引物、模板以及产生的片段大小详见表 2,最终获得的 f 片段即为目标片段。

表 1 *FAD2* 的 amiRNA 引物
Table 1 The amiRNA primers of *FAD2*

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequece(5'-3')
pRS300 A	CTGCAAGCGGATTAAGTTGGGTAAC
pRS300 B	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG
amiRNAD2 I	GATGTTAATAACGATGAACGCCCTCTCTCTTTTGTATTCC
amiRNAD2 II	GAGGGCGTTCATCGTTATTAACATCAAAGAGAATCAATGA
amiRNAD2 III	GAGGACGTTTCATCGTAATTAACATTCACAGGTCGTGATATG
amiRNAD2 IV	GAAGTTAATTACGATGAACGTCCTCTACATATATATTCCT

表 2 重叠 PCR 各轮反应产物及其引物与模板
Table 2 The production of overlapping PCR and the primer and template

PCR 反应产物 PCR production	5'引物 5' primer	3'引物 3' primer	模板 Template	产物长度 Production length/bp
a	pRS300A	amiRNAD2 IV	pRS300	272
b	amiRNAD2 III	amiRNAD2 II	pRS 300	171
c	amiRNAD2 I	amiRNAD2 B	pRS 300	298
d	pRS300A	amiRNAD2 II	a+b	481
e	pRS300B	amiRNAD2 III	b+c	481
f	pRS300A	pRS300B	d+e	701

1.2.2 表达载体 pCENND 的构建 将重叠 PCR 获得的目标片段经琼脂糖凝胶电泳回收后,连接到 PMD-19T 载体,利用片段内含的 *Kpn* I 和 *Xba* I 的酶切位点进行酶切验证并回收,然后将回收目标片段利用 T4 连接酶连接到 pCENND 载体,组成表达载体 pCENND2,表达载体经 *EcoR* I / *Kpn* I 和 *Xba* I / *Hind* III 酶切验证无误后,转入农杆菌进行转化。油菜的转化参照 Kopertekh 等^[15] 和邹智^[16] 的方法,并略作改进。

1.2.3 转化阳性株鉴定及种子脂肪酸含量分析 切取无菌培养的油菜幼苗上胚轴和下胚轴作为浸染的外植体,预培养 2 d 后进行农杆菌的浸染,经过愈伤诱导、发芽、植株发育和生根,从而发育成完整植物。在此过程中,在培养基中添加草甘膦,对愈伤组织的幼芽、幼芽发育植株及植株生根过程进行阳性植株的初步筛选。转化株经过草甘膦筛选后,取幼苗叶片提取转化苗叶片 DNA 作为模板,利用抗除草剂基因 *EPSPs* 设计特异性引物(表 3),并进行定量 PCR,然后进行阳性株的鉴定。

表 3 转化阳性植株检测 PCR 引物

Table 3 The detect PCR primer for transgenic positive strain

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
EPSPs F	ACAGGCGATCGGTCTCTTTA
EPSPs R	CTTTGCTGATGTGCTGGAAA

将经过鉴定的阳性株移栽至花盆,开花后 45 d,待种子接近成熟时取新鲜的油菜种子,提取种子总 RNA,同时利用近红外光谱法^[17] 测定种子油酸、亚油酸、芥酸的含量。*BnFAD2* 基因的定量分析,以 *BnEF1* 基因作为内参基因,以未转化的品种中 *fad2* 基因的表达为参照,进行相对定量分析。定量分析所用的引物详见表 4。

表 4 甘蓝型油菜转化植株定量引物

Table 4 The quantification primer for transgenic *Brassica napus*

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
BnEF-1F	ATGCTCTTCTTGCTTTCACCCCT
BnEF-1R	CTCTTTGGCTCGTTGATCTGG
FAD2-F	GCCACCACTTACTTCCTCT
FAD2-R	TAAGGGACGAGGAGGAAGGA

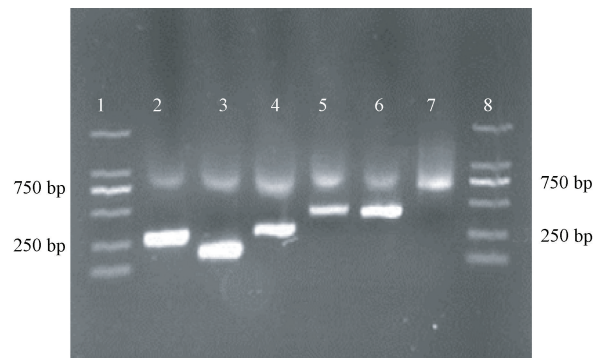
1.3 数据分析

利用 SPSS17.0 软件对未转化植株和转化植株相关数据进行多重比较分析,检测差异显著性。

2 结果与分析

2.1 amiRNA 片段的克隆

利用 WMD3 设计 *BnFAD2* 基因 amiRNA 的特异性引物,以 *pRS300* 为模板,经过 3 轮的重叠 PCR,每轮利用琼脂糖凝胶电泳回收,最后可以克隆出 amiRNAD2 片段,即 PCR 中的片段 f。由图 1 可知,片段 a 略大于 250 bp,片段 b 介于 150~200 bp 之间,片段 c 接近 300 bp,片段 d 和 e 为相同大小的片段,接近于 500 bp,而片段 f 接近 750 bp。以上结果与每个片段的理论长度基本相符,即片段 a 理论长度为 272 bp,片段 b 理论长度为 171 bp,片段 c 理论长度为 298 bp,片段 d 理论长度为 481 bp,片段 e 理论长度为 481 bp,片段 f 理论长度为 701 bp,说明克隆的片段是有效的。



注:1:DL 2 000 marker, 2:片段 a, 3:片段 b, 4:片段 c, 5:片段 d, 6:片段 e, 7:片段 f, 8:DL 2 000 marker。

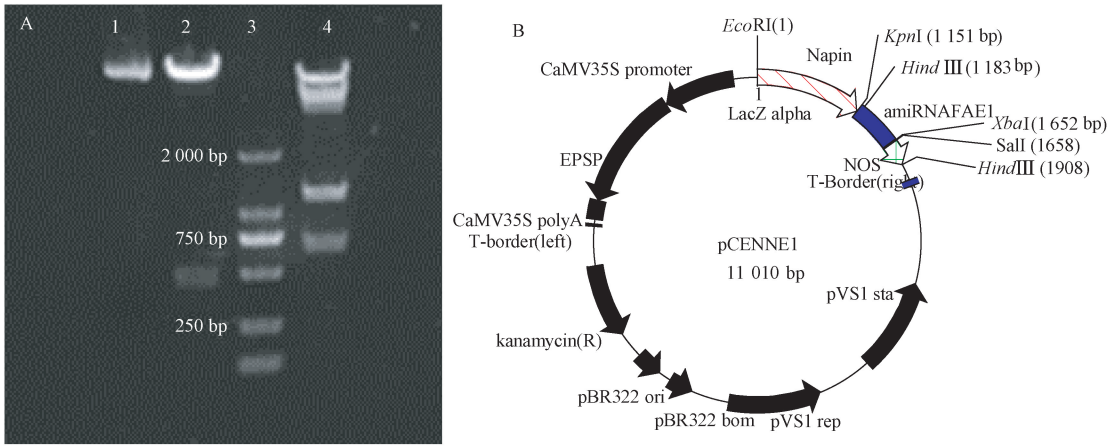
Note: 1:DL2000 marker. 2:Fragment a. 3:Fragment b. 4:Fragment c. 5:Fragment d. 6:Fragment e. 7:Fragment f. 8:DL 2 000 marker.

图 1 amiRNAD2 克隆

Fig.1 amiRNAD2 clone

2.2 表达载体的酶切验证

经 *Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切之后,2 泳道产生 1 条略小于 500 bp 的片段,4 泳道为 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切后的电泳图,酶切后产生 2 条片段,1 条约 1 100 bp,另 1 条约 750 bp,较大的条带为酶切后的 *Napin* 启动子,较小的片段为 amiRNAD2+NOS 片段(图 2-A)。因为在 amiRNAD2 的 5' 端和 NOS 的 3' 端各存在一个 *Hind* III 的酶切位点(图 2-B),所以在酶切时 amiRNAE1+NOS 片段作为一个整体片段被切下,因此其实际大小应该为 2 个片段之和,即 732 bp。



注:A: pCENND 双酶切电泳图, 1:pCENND 质粒, 2:*Kpn* I 和 *Xba* I 双酶切, 3: DL 2 000 marker, 4: *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切; B:pCENND 质粒图。

Note: A: Lectrophoresis of double digest pCENND vector. 1:pCENND vector. 2:*Kpn* I and *Xba* I double digest. 3:DL 2 000 marker. 4: *EcoR* I and *Hind* III double digest. B: Graph of pCENND vector.

图 2 pCENND 双酶切验证

Fig.2 The verify of pCENND by double digest

2.3 阳性植株的鉴定

以经过草甘膦筛选的阳性植株叶片 DNA 为模板, 以 *EPSPs* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增, 由图 3 可知, 阳性植株可扩增 1 条大小约 200 bp 的条带, 而未转化的植株则没有任何条带, 说明表达载体成功转入阳性植株。



注: 1:DL 2 000 marker; 2:未转化株 MY15; 3:未转化株 LEA01; 4~6:MY15 转化株; 7~9:LEA01 转化株。

Note: 1:DL 2 000 marker. 2:No transgenic MY15. 3:No transgenic LEA01. 4~6:MY15 positive transgenic. 7~9: LEA01 positive transgenic.

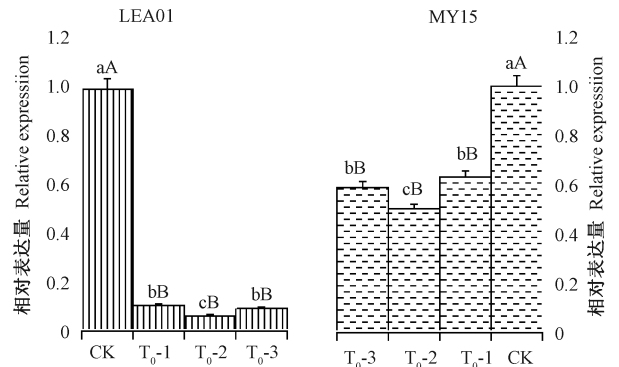
图 3 转化油菜阳性株检测

Fig.3 The detection of positive transformed rapeseed

2.4 转化植株 *fad2* 基因表达和脂肪酸组成分析

pCENND2 经过农杆菌浸染, 分别转入了 2 个受体材料 MY15 和 LEA01 中, 并获得了阳性株, 共移栽 8 株转化株, 成活 6 株, MY15 和 LEA01 分别各成活 3 株, 提取转化株的 T_0 种子和未转化种子的总 RNA, 反转录后对 *FAD2* 基因的表达进行相对定量。结果表明, 低芥酸品种 LEA01 转化株 *FAD2* 基因的表达量极

显著低于未转化的植株, 且转化株 T_0-2 的 *fad2* 基因的表达量显著低于转化株 T_0-1 和 T_0-3 ; 高芥酸品种 MY15 的转化株种子 *fad2* 表达量相对于未转化的植株显著降低, 且转化株 T_0-2 的 *fad2* 基因的表达量显著低于转化株 T_0-1 和 T_0-3 (图 4)。



注: T_0-1 、 T_0-2 和 T_0-3 均指转化阳性株的 T_0 种子。

不同大小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平差异显著。下同。

Note: T_0-1 , T_0-2 and T_0-3 indicate transgenic *Brassica napus* seeds. Different capital and small letters indicate significance difference at 0.01 and 0.05 level, respectively. The same as following.

图 4 甘蓝型油菜转化植株种子 *fad2* 基因表达
Fig.4 The *fad2* gene expression in transgenic *Brassica napus* seeds

由表 5 可知, 高芥酸品种 MY15 和低芥酸品种 LEA01 转化株种子油酸含量均明显增加, 其中 MY15 转化株油酸含量极显著高于 CK, 而 LEA01 转化株显

著高于 CK。与 CK 相比,高芥酸品种 MY15 和低芥酸品种 LEA01 转化株种子亚油酸含量均极显著降低,最大降幅约为 17%。转化株芥酸含量均明显高于 CK,高芥酸品种 MY15 转化株芥酸含量均极显著高于 CK,

最高可增加 5.12%,最少也增加了 3.11%;而低芥酸 LEA01 转化株芥酸增加的幅度较低,最高只增加了 0.45%,最低仅增加了 0.16%,且所有材料的芥酸含量均低于 1%,仅转化株 T₀-1 和 T₀-3 显著高于 CK。

表 5 甘蓝型油菜转化植株种子脂肪酸含量分析

Table 5 Analysis of fatty acids content of transgenic *Brassica napus* seed

/%

植株 Plant	MY15			LEA01		
	油酸含量 Oleic acid content	亚油酸含量 Linoleic acid content	芥酸含量 Erucic acid content	油酸含量 Oleic acid content	亚油酸含量 Linoleic acid content	芥酸含量 Erucic acid content
CK	14.38cB	11.69aA	47.26bB	66.96bA	17.71aA	0.53bA
T ₀ -1	23.81aA	1.28bB	50.37aA	70.85aA	1.68bB	0.85aA
T ₀ -2	19.37bA	0.98bB	52.38aA	71.42aA	0.83cB	0.69bA
T ₀ -3	25.19aA	1.03bB	51.96aA	70.93aA	1.07bB	0.98aA

3 讨论

目前调控芥酸的合成主要通过以下 3 个途径:一是使芥酸合成的关键酶基因 *BnFAE1* 过表达,增加芥酸含量,或者沉默该基因表达,降低芥酸含量,如 Katavic 等^[18] 利用拟南芥的 *FAE1* 基因转化油菜,芥酸含量提高了 8%~10%;淮东欣^[19] 通过在甘蓝型油菜中超表达 *BnFAE1* 基因,得到了芥酸含量高达 63% 的转化植株。二是在油菜中引入外源 *LPAAT* 基因,并且将该基因与 *BnFAE1* 结合,从而增加芥酸合成量及其与甘油 sn-2 位的结合以提高种子中的芥酸含量,如陈柳等^[20] 利用 *LPAAT* 和 *KCS* 基因共转化甘蓝型油菜,低芥酸油菜品种的芥酸含量提高到 10.5%,高芥酸油菜品种芥酸含量提高了 5%,达到 62.8%;Kanras 等^[21] 利用 Ld-LPAAT+Bn-fae1 转化甘蓝型油菜,得到了芥酸含量高达 72% 的转化植株,其后代的芥酸含量也稳定在 54% 左右。三是调控亚油酸合成的关键酶基因 *Bnfad2*,沉默该基因可以为芥酸合成提供更多的底物,或者过表达该基因,调控脂肪酸的组成,本研究通过 amiRNA 沉默 *fad2* 基因的表达,使芥酸含量显著提高;Jadhav 等^[22] 通过利用基因沉默技术 RNAi 的方式沉默 *fad2* 基因,成功地将甘蓝型油菜转化植株芥酸含量提高了 5%~19%;Mietkiewska 等^[23] 利用 Hairpin-RNA 技术沉默 *fad2* 基因,所获得的甘蓝型油菜转化植株后代种子中芥酸含量提高了 16%;Loo^[24] 通过诱变的方式使 *fad2* 基因的表达受到抑制,也成功地提高了转化株种子芥酸含量。但是通过利用这种方式提高芥酸的含量有很大的限制性,其原因在于沉默 *fad2* 基因虽然能

够为芥酸合成提供更多的底物,但 *FAE1* 基因的表达没有显著提高,造成芥酸的合成能力受到限制,因此高芥酸品种芥酸含量的提高明显高于低芥酸品种,其原因就是因为不同芥酸含量的油菜品种 *FAE1* 基因的表达不同。芥酸的调控是一个复杂的过程,需要各个方面的配合,按照作物生产上的“源·库·流”理论,油酸只是芥酸合成的“源”,要想芥酸含量达到预期目标,还需要“流”能够畅通,即合成芥酸的能力需提高,而甘油结合芥酸的能力为芥酸的“库”,既提高甘油结合芥酸的量,才能有效提高芥酸的含量^[25]。研究表明,通过调节 *fad2* 基因的表达只能单方面提高芥酸含量,要想使芥酸含量达到 80% 以上的理想水平,还需要结合 *FAE1* 和 *LPAAT* 基因的过表达,共同组成多元表达载体^[26]。

植物基因调控转化与外源基因的拷贝数目、基因整合的染色体位置、遗传稳定性等因素密切相关^[6],但本研究利用 amiRNA 技术避免了以上几个因素的影响,amiRNA 与传统的基因沉默方法相比,具有特异性高、沉默效果好、遗传稳定性较高等优点^[6]。其原因在于,首先在 amiRNA 载体构建的过程中,整个 pre-miRNA 序列改变的只有大约 21 nt 的 miRNA 和 miRNA* 序列,其余的序列则相当于植物的内源序列,且在植物体内不编码蛋白,从而降低了转基因植物的生物安全性问题,其结构与植物内源的 miRNA 具有高度的相似性,该特性决定了 amiRNA 具有良好的遗传稳定性^[27-29]。

与前人研究相比,本研究具有独特的优越性,同时由于 miRNA 和 miRNA* 的设计只针对 *Bnfad2* 基因,既保证了沉默效果,又降低了脱靶的可能性。

amiRNAD2 沉默 *fad2* 基因的沉默效果及转化植株种子内脂肪酸含量的变化都说明了 amiRNA 技术能够有效沉默 *fad2* 基因的表达,从而减少油酸的继续去饱和生成多不饱和脂肪酸,从而使种子内积累更多的油酸,这也为油菜种子内脂肪酸成分的调节提供了一条有效的途径。在今后的研究中可以继续利用 amiRNA 技术对基因的沉默效果有针对性地改变种子脂肪酸合成过程中特定基因的表达,从而有效改变种子内脂肪酸的组成,改变其营养结构,提高营养价值,进一步提高油菜种子的附加值。

amiRNAD2 对转化品种种子内 *fad2* 基因的沉默效果显著,但在不同芥酸含量的甘蓝型油菜品种转化株内, *fad2* 基因的表达虽然都下降,但是不同芥酸含量的油菜品种内 *fad2* 基因下降的幅度是不同的。高芥酸品种降低的相对较小,而低芥酸品种的降低反而较大,这是因为高芥酸品种内 *fad2* 基因的表达量低于低芥酸品种,所以基因沉默的时候其相对变化反而小。同时,不同转化株内 *fad2* 基因的表达量是不同的,其表达差异甚至达到了显著水平,这种差异可能是因为在转化过程中,外源基因序列在转入受体材料过程中,插入基因位置的不同而造成。

4 结论

本研究结果表明,amiRNA 技术能够很好地沉默 *fad2* 基因,使得 *fad2* 基因的表达量在高芥酸甘蓝型油菜品种中只有未转化之前表达量的 6.67%~10.00%,其芥酸含量增加了 2.11%~5.12%,在低芥酸甘蓝型油菜品种中 *fad2* 基因的表达量降低了 30%~50%,芥酸含量增加了 0.16%~0.45%;同时不论高芥酸品种还是低芥酸品种,脂肪酸的组成都发生了很大的变化,油酸增加 4.99%~10.17%,亚油酸降低 10.71%~16.88%,很好地调节了油菜种子内脂肪酸的组成。综上所述,利用 amiRNA 技术可有效调控甘蓝型油菜脂肪酸的组成,提高转化株种子芥酸和油酸的含量,降低亚油酸的含量,改善菜籽油的品质,提高菜籽的经济价值。

参考文献:

- [1] Sakhno L O. Fatty acid composition variability of rapeseed oil: classical breeding and biotechnology [J]. Cytology and Genetics, 2016, 44(6): 389-397
- [2] Rahman M N, Habib K, Nasreen L, Rahman M H. Effects of dietary coconut oil on erucic acid rich rapeseed oil-induced changes of blood serum lipids in rats[J]. Current Nutrition & Food Science, 2014, 10(4): 302-307
- [3] 吴关庭, 郎春秀, 陈锦清. 工业用高芥酸油菜育种与应用[J]. 核农学报, 2007, 21(4): 374-377
- [4] 殷艳, 陈兆波, 余健, 王汉中, 冯中朝. 我国油菜生产潜力分析[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(3): 16-21
- [5] Gillingham L G, Gustafson J A, Han S Y, Jones D S, Jones P J. High-oleic rapeseed (canola) and flaxseed oils modulate serum lipids and inflammatory biomarkers in hypercholesterolaemic subjects [J]. British Journal of Nutrition, 2011, 105(3): 417-427
- [6] Gueguen V, Macherel D, Jaquinod M, Douce R, Bourguignon J. Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(7): 5016-5025
- [7] 袁代斌, 蒲定福, 蒙大庆, 李芝凡, 胥岚, 郭子荣. 工业专用高芥酸油菜新品种绵油 13 号的选育[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(3): 85-87
- [8] 殷艳, 王汉中. 我国油菜生产现状及发展趋势[J]. 农业展望, 2011, 7(1): 43-45
- [9] 刘志文, 单连民, 韩旭, 毛玮. 现代生物技术在油菜遗传改良上的应用和进展[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(6): 900-906
- [10] 徐爱遐, 黄镇, 马朝芝, 肖恩时, 张修森, 涂金星, 傅延栋. 芥菜型油菜 *FAE1* 基因序列特征及其与芥酸含量关系的初步分析[J]. 作物学报, 2010, 36(5): 794-800
- [11] Shamsi I H, Shamsi B H, Jiang L. Biochemistry of fatty acids[J]. Technological Innovations in Major World Oil Crops, 2012, 2(5): 123-150
- [12] Duan C G, Wang C H, Fang R X, Guo H S. Artificial microRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants [J]. Journal of Virology, 2008, 82(22): 1108-1114
- [13] Ossowski S, Schwab R, Weigel D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs [J]. Plant Journal, 2010, 53(4): 674-690
- [14] 周万平, 郎春秀, 熊鲜艳, 陈锦清, 吴关庭. 油菜籽芥酸含量遗传调控研究进展[J]. 核农学报, 2010, 24(3): 537-541
- [15] Kopertekh L, Broer I, Schiemann J. A developmentally regulated cre-lox system to generate marker-free transgenic *Brassica napus* Plants[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 847(1): 335-350
- [16] 邹智. 油菜安全高效转化体系研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008
- [17] 杨翠玲, 陈文杰, 赵兴忠, 田建华, 李殿荣. 近红外光谱法同时分析油菜 9 种品质参数的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(3): 61-67
- [18] Katavic V, Friesen W, Barton D L, Gossen K K, Giblin E M, Luciw T, An J, Zou J, Mackenzie S L, Keller W A. Utility of the *Arabidopsis FAE1* and yeast *SLC1-1* genes for improvements in erucic acid and oil content in rapeseed [J]. Biochemical Society Transactions, 2000, 28(6): 935-946
- [19] 淮东欣. 调控超长链脂肪酸合成关键基因对植物种子中脂肪酸组成的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015
- [20] 陈柳, 毛善婧, 陆莉, 储成才, SONNTAG Karin, 王幼平. 导入 *LPAAT* 和 *KCS* 基因对油菜种子芥酸含量的影响[J]. 作物学报, 2006, 32(8): 1174-1178
- [21] Kanrar S, Venkateswari J, Dureja P, Kirti P B, Chopra V L.

- Modification of erucic acid content in Indian mustard (*Brassica juncea*) by up-regulation and down-regulation of the *Brassica juncea* Fatty acid1 (BjFAE1) gene[J]. Plant Cell Reports, 2006, 25(2): 148–155
- [22] Jadhav A, Katavic V, Marillia E F, Michael G E, Barton D L, Kumar A, Sonntag C, Babic V, Keller W A, Taylor D C. Increased levels of erucic acid in *Brassica carinata* by co-suppression and antisense repression of the endogenous *FAD2* gene [J]. Metabolic Engineering, 2005, 7(3): 215–220
- [23] Mietkiewska E, Hoffman T L, Brost J M, Giblin E M, Barton D L, Francis T, Zhang Y, Taylor D C. Hairpin-RNA mediated silencing of endogenous *FAD2* gene combined with heterologous expression of *Crambe abyssinica* *FAE* gene causes an increase in the level of erucic acid in transgenic *Brassica carinata* seeds[J]. Molecular Breeding, 2008, 22(4): 619–627
- [24] Loo E N V. Modification of erucic acid levels by mutagenizing *FAD2* gene in *crambe abyssinica*[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(5): 794–800
- [25] Jadhav A, Katavic V, Marillia E F. Increased levels of erucic acid in *Brassica carinata* by co-suppression and antisense repression of the endogenous *FAD2* gene [J]. Metabolic engineering, 2005, 7(3): 215–220
- [26] Brough C, Coventry J M, Christie W. Towards the genetic engineering of triacylglycerols of defined fatty acid composition; major changes in erucic acid content at the sn-2 position affected by the introduction of a 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Limnanthes douglasii* into oil seed rape [J]. Molecular Breeding, 1996, 2(2): 133–142
- [27] Mickiewicz A, Rybarczyk A, Sarzynska J, Figlerowicz M, Blazewicz J. AmiRNA designer-new method of artificial miRNA design [J]. Acta Biochimica Polonica, 2016, 63(1):71–77
- [28] Niu Q W, Lin S S, Reyes J L, Chen K C, Wu H W, Yeh S D, Chua N H. Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance [J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(11):1420–1428
- [29] 林艺华, 郑涛, 高三基, 陈振东. 人工 miRNA 技术及其在植物抗病育种中的应用[J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 47–52

Study of Artificial miRNA Regulate Erucic Acid in *Brassica napus*

WANG Zhiwei^{1,2} ZHANG Ziyang¹ LIN Liting³ ZHANG Jinwen² LIU Mingjiu^{1,*} QIAO Yan²

(¹ Collaborative Innovation Center of Modern Biological Breeding Henan Province/Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003; ² Agronomy College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070; ³The International Bilingual Academy of AMS of Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453003)

Abstract: Erucic acid is an important industrial raw material, which is acquired majorly from *Brassica napus* seeds. To regulate the content of erucic acid in *Brassica napus* seeds, the specific amiRNA is designed according to the key enzyme gene *Bnfad2* in the erucic acid synthesis of *Brassica napus* L. The expression vector is constructed to transform the high erucic acid *Brassica napus* cultivar MY15 and low erucic acid *Brassica napus* cultivar LEA01, and the fatty acid of the transformed plant T₀ generation seeds is analyzed. The erucic acid content in transformed erucic canola is up to 5.12% and the lowest is 2.11%; while in the transformed low erucic acid variety, the highest is 0.45%, the lowest is only 0.16%, and the erucic acid content in low acid material is less than 1%; Meanwhile, the content of oleic acid in the transformed seeds is significantly improved, and the lowest is 4.99%, the highest up to 10.71%. The reduction of linoleic acid is quite obvious, and the maximum drop is 17%. The results show that the amiRNA technology can effectively change the composition of fatty acids in the seeds, change their nutritional structure and further increase the added value of rape seeds by influencing the expression of specific genes in process of fatty acid synthesis. In summary, the effect of amiRNA technology is obviously on reduce the expression of *FAD2* gene and improve the content of erucic acid in *Brassica napus*. The technology has great meaning when it's widely used in *Brassica napus* to adjust the fatty acids composition, change nutrition structure and raise economic value.

Keywords: *Brassica napus*, erucic acid, fatty acids, amiRNA, regulate