

引用格式:

谢小玉, 侯爽, 冉春燕. 干旱诱导的甘蓝型油菜 SSH 文库及抗旱相关基因表达的分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(2): 157–164.

XIE X Y, HOU S, RAN C Y. Analysis of expression of drought associated genes and SSH library of *Brassica napus* under drought stress[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(2): 157–164.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



干旱诱导的甘蓝型油菜 SSH 文库及 抗旱相关基因表达的分析

谢小玉, 侯爽, 冉春燕

(西南大学农学与生物科技学院, 重庆 北碚 400715)

摘 要: 从前期构建的干旱诱导的甘蓝型油菜 SSH 文库中随机挑取了 646 个阳性克隆, 对其进行测序及生物信息学分析。结果表明: 通过测序, 获得 639 条高质量 EST 序列, 186 条单一序列(重叠群 89 条, 单拷贝序列 97 条); 比对分析发现, 166 条单一序列有同源序列; 乙醛酸和二羧酸代谢、碳代谢、光合中的碳固定、氨基酸的生物合成、氮代谢等在植物抵抗干旱胁迫中发挥着重要的作用; MYB、NAC5、锌指蛋白等转录因子以及苹果酸脱氢酶、核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶、磷酸核酮糖激酶等与光合相关的基因以及 P5CS 基因、F-box 蛋白等参与油菜干旱胁迫应答; 单一序列涉及的功能中所占比例较大的是蛋白绑定和催化活性。以抗旱性较强的甘蓝型油菜 Holiday 为材料, 在开花初期进行干旱处理, 在处理的第 1、3、5、7 天(土壤含水量分别为 60%、40%、30%、20%)进行叶片取样, 采用实时荧光定量 PCR, 分析基因表达量, 发现随机选取的文库中的 3 个基因(P5CSb、BnSOS2 和 CAM)在干旱胁迫下表达水平均上调, 推测这 3 个基因在抵御干旱胁迫中发挥了重要作用。

关 键 词: 甘蓝型油菜; 干旱胁迫; cDNA 文库分析; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S565.4; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2020)02-0157-08

Analysis of expression of drought associated genes and SSH library of *Brassica napus* under drought stress

XIE Xiaoyu, HOU Shuang, RAN Chunyan

(College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing, Beibei 400715, China)

Abstract: 646 positive clones were randomly selected from the library of suppression subtractive hybridization (SSH) constructed at early stage. These clones were subject to sequencing and bioinformatics analysis. The results show that 639 high quality EST were got by sequencing, 186 unigenes was obtained, of which 89 contigs and 97 singletons were contained. Blast alignment with Nr database showed that 166 unigenes were of high similarity. KOBAS suggested that that glyoxylate and dicarboxylate metabolism, carbon metabolism, carbon fixation in photosynthetic organisms, biosynthesis of amino acids, nitrogen metabolism et al. played a key role in drought-resistant of rapeseed according to P-value. In the drought stress response, the genes of MYB family transcription factor, NAC5, zinc finger protein and other genes related to photosynthesis including malate dehydrogenase, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, fructose 1,6-bisphosphate aldolase, phosphoribulokinase, carbonic anhydrase, aconitase like protein and delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase A, F-box protein etc were involved. The analysis of unigenes showed that a large share of function could be attributed to binding and catalytic activity. The high drought-tolerant rapeseed Holiday as experimental materials, were treated with drought stress during the flowering stage and with normal irrigation as the

收稿日期: 2019-06-30

修回日期: 2019-08-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271673); 公益性行业(农业)科研专项(201503127)

作者简介: 谢小玉(1968—), 女, 陕西勉县人, 博士, 副教授, 主要从事植物生理与分子生物学研究, xiexy8009@163.com

control group. We collected the samples at the 1st, 3rd, 5th and 7th day of drought stress(the soil water content was 60%, 40%, 30% and 20% respectively) and analyzed their expression values of *P5CSb*, *BnSOS2* and *CAM* genes from screening the library by quantitative real time PCR reaction, their expression level were found up-regulated under drought stress in the leaves. This result suggested those genes may play an important role in the resistance of rape to drought stress.

Keywords: *Brassica napus*; drought stress; analysis of cDNA library; quantitative real time PCR reaction

干旱是限制作物产量提高的重要非生物因子。季节性干旱是油菜生产的主要自然灾害之一,严重影响油菜的生长和产量。据报道,春旱可使中国油菜减产20%以上^[1],因此,了解油菜抗旱机制,培育抗旱品种非常重要。

研究表明,抗旱性是多基因控制的性状。ZHONG等^[2]研究表明,油菜*BnNAC2*和*BnNAC5*参与植物对盐、干旱和ABA的胁迫应答。万乔^[3]从甘蓝型油菜中克隆到干旱胁迫相关基因*BnBip*,且研究表明该基因的表达受干旱胁迫诱导,超量表达可提高植物对干旱胁迫的耐受力。

抑制消减杂交(SSH)常被用于差异表达基因的分离和cDNA文库的构建。在抗病基因的筛选和研究上,前人利用SSH技术构建了环形泰勒虫^[4]、普通野生稻^[5]、黄瓜^[6]、青稞^[7]等作物的抑制消减文库,筛选出与抗病相关的基因;在非生物胁迫方面,利用SSH技术,筛选出了与山葡萄抗寒性相关的抗冻蛋白(AFPs)、热休克蛋白(Hsps)、防御素样蛋白、细胞色素P450加单氧酶等多个相关的ESTs^[8];在抗旱基因的研究上,前人利用SSH技术构建了獐茅^[9]、柠条^[10]、大豆^[11]、棉花^[12]、蚕豆^[13]等作物的抑制消减文库,筛选出与抗旱相关的基因。

本研究以抗旱甘蓝型油菜Holiday为材料,通过对SSH技术构建的油菜干旱诱导的cDNA文库的测定分析,筛选在干旱胁迫下油菜的差异表达基因及参与抗旱的代谢途径,从该文库中随机筛选抗旱相关基因进行实时荧光定量PCR表达分析,旨在为揭示油菜抗旱的分子机制和克隆油菜抗旱基因提供依据。

1 材料与方法

1.1 SSH 文库分析

从前期成功构建的SSH文库^[14]中,以巢式PCR引物Primer 1和Primer 2R进行菌液PCR扩增,对阳性克隆进行进一步筛选,挑选有清晰单一条带的646个片段,较长的阳性克隆对应菌液送宝生物工

程(大连)有限公司测序;应用VecScreen去除构建文库时所用的载体及巢式引物接头序列,摒弃低质量的序列;利用Blast程序在GenBank中寻找同源序列,分析基因功能;采用KOBAS程序进行基因功能归类和代谢途径分析,寻找与抗旱密切相关的代谢途径;运用Blast2GO对功能蛋白进行注释和分类。

1.2 抗旱相关基因的表达分析

以抗旱性强的甘蓝型油菜Holiday为材料,种子用15%次氯酸钠消毒20 min,用无菌水清洗4~6次后播种于口径为30 cm花盆中,每盆装沙壤土12 kg,出苗后每盆留苗3株,常规管理。开花初期(整个植株4%~5%的花开放),对油菜进行干旱处理,在处理的第1、3、5、7天(土壤含水量分别为60%、40%、30%、20%)剪取对照(未经干旱处理)和各干旱处理顶部完全展开的第2叶,液氮速冻,-80℃保存。采用First Strand cDNA Synthesis Kit(TAKARA)合成cDNA,按照试剂盒说明书,测定其纯度和浓度。随机选取文库中筛选到的3个与干旱胁迫相关的*P5CSb*、*BnSOS2*和*CAM*基因,通过引物设计和内参基因筛选^[15-16],进行实时荧光定量PCR分析。

1.3 数据处理

参照PFAFFL^[17]的方法计算目的基因相对表达量;采用Microsoft Excel 2007和SAS统计软件分析数据和作图。

2 结果与分析

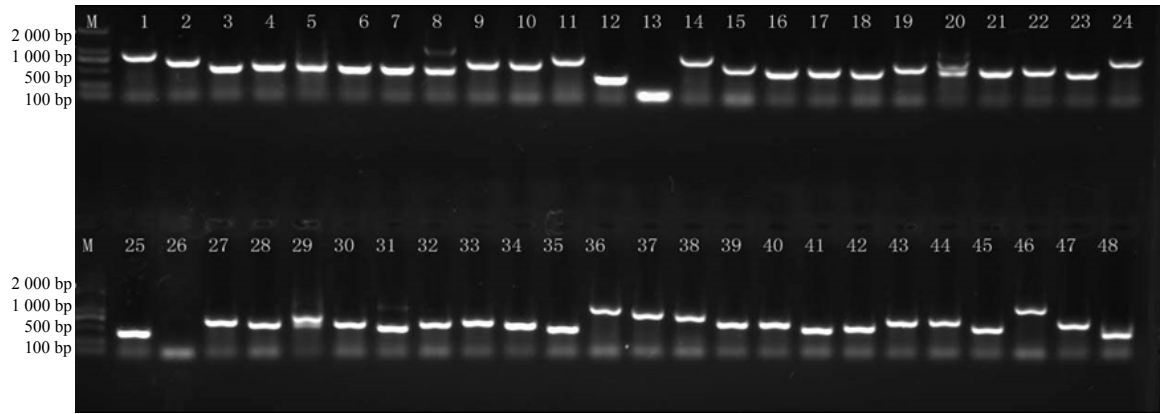
2.1 SSH 文库检测结果

对成功构建的SSH文库随机挑选850个单菌落进行阳性克隆筛选,726个含有插入片段,其中48个单菌落电泳结果如图1所示。13、26、8、20、29号是空质粒或非特异性克隆,阳性克隆率约为89.6%,克隆片段长250~1 000 bp,平均长度545 bp。

2.2 测序结果分析

通过对 646 个经 PCR 鉴定的阳性克隆测序, 获得 639 个单一的表达序列标签数量 (expressed sequence tag, EST), 经过聚类、拼接和去除冗余, 获得重叠群 (contigs) 89 条, 单拷贝序列 (singleton)

97 条。序列长度介于 101 ~ 800 bp, 其中 EST 长度 101 ~ 300 bp 的有 11 条, 301 ~ 400 bp 的有 28 条, 401 ~ 500 bp 的有 37 条, 501 ~ 600 bp 的有 34 条, 601 ~ 800 bp 的有 76 条。平均长度为 531 bp。



M 2 000 bp DNA ; 1 ~ 48 阳性克隆 PCR 结果。

图 1 SSH 文库阳性克隆片段检测结果

Fig.1 Positive fragments analysis of SSH cDNA library

2.2.1 EST 序列分析

对测序获得的 186 条单一序列进行 Blastn 和 Blastx 数据库的序列比对, 发现其中 166 条具有同源基因, 其主要来源于拟南芥、甘蓝型油菜、白菜、黄瓜、大豆、蒺藜苜蓿、草莓等物种; 其余 20 条没有匹配项。具有同源基因的 EST 中, 154 条与已知功能的蛋白有同源性, 6 条与假想蛋白有同源性, 4 条

与推定蛋白有同源性, 2 条与未命名蛋白有同源性 (表 1)。其中 MYB、NAC5、锌指蛋白等转录因子以及苹果酸脱氢酶、核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶、磷酸核酮糖激酶等与光合相关基因以及 P5CS 基因、F-box 蛋白等参与油菜干旱胁迫应答。表 1 列出了部分 ESTs 及其功能。

表 1 油菜叶片干旱胁迫下部分诱导表达的基因

Table 1 Part result of blast alignment in rapeseed leaves under drought stress						
功能	克隆号	EST 数量	同源性	物种	一致性/%	E 值
	EST-126		global transcription factor group E4	拟南芥	89	1E-102
	contig28	3	ethylene-responsive transcription factor 4	拟南芥	74	3E-40
	contig35	3	myb family transcription factor	深山南芥亚种	72	3E-30
	contig81	2	transcription factor	深山南芥亚种	78	2E-58
	CTE87		C3H4 type zinc finger protein	拟南芥	66	7E-20
	contig37	6	zinc finger family protein	深山南芥亚种	71	9E-93
	contig39	14	NAC5	甘蓝型油菜	91	9E-81
	CTE68		F-box protein 2	拟南芥	70	2E-61
	contig15	6	F-box family protein	深山南芥亚种	67	6E-96
	CTE80		homeobox-leucine zipper protein ATHB-7	拟南芥	80	1E-23
	contig20	7	probable calcium-binding protein CML20-like	黄瓜	82	4E-63
	contig46	5	protein phosphatase 2C	拟南芥	94	2E-80
	contig86	2	phosphoribulokinase	拟南芥	83	5E-17
	contig27	4	phosphoribulokinase/uridine kinase domain protein	拟南芥	98	1E-127
	CTE2		somatic embryogenesis receptor-like kinase-like protein	拟南芥	97	2E-94
	CTE7		serine/threonine-protein kinase ATPK19/ATPK2	白菜	96	2E-58
	CTE94		mitogen-activated protein kinase 17	拟南芥	99	2E-68

表 1(续)

功能	克隆号	EST 数量	同源性	物种	一致性/%	E 值
	contig1	11	fructose-bisphosphate aldolase 1	拟南芥	92	3E-110
	contig4	16	fructose-bisphosphate aldolase	拟南芥	92	7E-81
	contig6	14	photosystem I reaction center subunit E	拟南芥	82	4E-21
	contig16	8	malate dehydrogenase	甘蓝	100	8E-125
	CTE9		peroxisomal NAD-malate dehydrogenase 2	拟南芥	96	6E-143
	CTE72		gamma carbonic anhydrase like 1	拟南芥	99	4E-64
	CTE75		cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	拟南芥	80	9E-34
	contig68	4	chloroplast thylakoidal processing peptidase	深山南芥亚种	88	4E-61
	contig77	9	Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein	蒺藜苜蓿	94	3E-43
	Contig89	7	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	不结球白菜亚种	100	3E-105
	CTE89		chloroplast beta-carbonic anhydrase	甘蓝型油菜	99	3E-21
	contig42	15	ELIP	白菜亚种	94	1E-61
	CTE43		cytochrome P450	拟南芥	78	2E-33
	CTE95		NADPH-cytochrome P450 reductase 1	拟南芥	87	2E-130
	contig8	8	L-ascorbate oxidase	拟南芥	81	4E-100
	contig14	16	arogenate dehydratase 2	拟南芥	94	5E-148
	contig80	2	peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	拟南芥	91	3E-65
	CTE52		alternative oxidase 1	拟南芥	93	3E-120
	CTE76		peroxisomal membrane protein 11D	拟南芥	78	3E-57
	contig49	5	disease resistance protein RPP8	深山南芥亚种	62	6E-28
	contig69	5	stress responsive protein	甘蓝变种	88	6E-83
	CTE36		dehydrin	山萵菜属	82	3E-35
	contig56	8	dehydrin protein	芥菜	89	1E-20
	contig73	4	chitinase 1	白菜亚种	96	3E-74
	CTE14		chitinase	白菜亚种	96	2E-54
	contig88	2	delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase A	甘蓝型油菜	99	5E-112
	CTE61		universal stress protein family protein	深山南芥亚种	78	2E-31
	contig13	11	JA-responsive protein 1	拟南芥	84	5E-41
	contig26	2	epithiospecifier protein	甘蓝	99	1E-59
	contig34	4	AGC kinase family protein	拟南芥	88	3E-72
	EST-245		glutathione S-transferase TAU 10	拟南芥	73	4E-102
	CTE27		sec-independent protein translocase protein	拟南芥	86	1E-49
	CTE28		phosphate transporter 4;5	拟南芥	90	7E-115
	CTE53		glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1	拟南芥	96	3E-149
	CTE57		mitochondrial phosphate translocator	拟南芥	96	5E-66
	CTE59		TRAF-like family protein	拟南芥	66	2E-32
	contig44	3	serine trans hydroxymethyl transferase 1	拟南芥	98	6E-156
	contig3	11	histidine-containing phosphotransfer protein 3	拟南芥	92	6E-79
	contig53	3	TRAF-like protein	拟南芥	57	4E-12
	contig2	19	PREDICTED: solute carrier family 25 member 44-like	黄瓜	68	4E-66
	CTE35		Multidrug resistance protein ABC transporter family	蒺藜苜蓿	96	1E-143
	contig64	9	selenium-binding protein, partial	条叶盐芥	94	7E-88
	contig9	8	glycine-rich protein	拟南芥	93	1E-28
	contig23	7	glycine-rich protein	深山南芥亚种	88	3E-91
	contig85	2	glycine-rich protein	拟南芥	69	5.00E-06
	contig21	3	exocyst subunit exo70 family protein H7	拟南芥	84	6E-83

表 1(续)

功能	克隆号	EST 数量	同源性	物种	一致性/%	E 值
	contig48	2	ubiquitin carrier protein, partial	螺旋狸藻属	95	5E-29
	contig7	9	purple acid phosphatase 2-like	大豆	83	2E-24
	contig59	9	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	拟南芥	52	3E-34
	CTE66		pseudouridine synthase family protein	拟南芥	90	4E-104
	contig5	17	beta-glucosidase 3	拟南芥	85	1E-95
	contig11	2	beta-amylase 1	拟南芥	92	5E-29
	contig65	2	alpha-galactosidase 1	拟南芥	86	1E-89
	contig66	7	omega-3 fatty acid desaturase	甘蓝型油菜	95	2E-67
	contig10	16	aconitase like protein	拟南芥	91	2E-108
	contig83	4	cysteine protease	卷心菜变种	98	5E-159
	contig63	4	serine protease	拟南芥	78	2E-99
	CTE4		tyrosine transaminase like protein	拟南芥	69	1E-88
	contig19	7	protein disulfide isomerase	甘蓝	99	3E-100
	CTE55		glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-3	拟南芥	94	3E-144
	contig51	5	IAA-amino acid hydrolase 3	白菜	93	1E-73
	CTE90		IAA-amino acid hydrolase 6	白菜	99	2E-136
	CTE7		serine/threonine-protein kinase ATPK19/ATPK2	白菜	96	2E-58
	contig62	5	arginine-tRNA protein transferase 2	拟南芥	72	7E-68
	CTE39		DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 38	拟南芥	91	2E-134
	CTE70		tRNA synthetase class II (D, K and N) family protein	拟南芥	74	3E-40
	contig22	5	DNA repair protein Rad4 family	深山南芥亚种	66	4E-34
	contig17	13	WD40 domain-containing protein	拟南芥	62	2E-101
	contig25	14	Anticodon-binding domain-containing protein	拟南芥	85	9E-89
	contig31	7	PREDICTED: 40S ribosomal protein S15a-1-like	瓦斯卡草莓亚种	84	3E-30

“Ⅰ”表示信号传导与转录调控；“Ⅱ”表示光合作用；“Ⅲ”表示编码保护、防御和胁迫耐受蛋白；“Ⅳ”表示跨膜运输；“Ⅴ”表示参与结构和功能代谢；“Ⅵ”表示能量代谢；“Ⅶ”表示蛋白质代谢；“Ⅷ”表示核酸代谢。

2.2.2 KEGG 代谢途径分析和基因功能分类

以拟南芥为参考物种，利用 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，京都基因和基因组百科全书)的序列注释分析系统(KOBAS)程序进行代谢途径分析。结果表明，186 条单一序列中 160 条序列得到匹配，26 条序列无匹配信号。57 条 EST 定位到 70 条代谢途径中，表明这 70 条途径与植物的抗旱性有关。 $P<0.5$ 的 48 条代谢途径中，乙醛酸和二羧酸代谢、碳代谢、光合碳固定、泛素-蛋白酶体途径、氨基酸合成代谢、氮代谢、甾基氨基酸代谢、糖酵解、柠檬酸循环、精氨酸和脯氨酸代谢、植物激素信号转导及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢等 12 个途径都有 3 条及 3 条以上 EST 定位其中。 $P<0.1$ 的代谢途径如表 2 所示。

表 2 KOBAS 分析的干旱诱导代谢途径

Table 2 Representative drought-induced metabolic pathway identified by KOBAS

序号	KEGG 代谢途径	单一序列数	百分比/%	P 值
1	乙醛酸和二羧酸代谢	7	3.76	0.000 1
2	碳代谢	11	5.91	0.001 2
3	光合器官中的碳固定	6	3.23	0.001 3
4	泛素-蛋白酶体途径	7	3.76	0.001 8
5	氨基酸生物合成	10	5.38	0.010 6
6	氮代谢	3	1.61	0.042 7
7	甾基氨基酸代谢	3	1.61	0.059 7
8	糖酵解	3	1.61	0.077 9
9	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	3	1.61	0.079 4
10	柠檬酸循环	3	1.61	0.082 5
11	α -亚麻酸代谢	2	1.08	0.099 8

根据 P 值推测乙醛酸和二羧酸代谢、碳代谢、光合器官中的碳固定、泛素-蛋白酶体途径、氨基酸生物合成、氮代谢可能在油菜干旱胁迫应答中发挥着重要的作用。

2.2.3 GO 基因注释和功能分类

通过对 186 条单一序列进行 GO 功能注释、分类,结果表明,111 条 EST 共同在细胞组分、分子功能、生物学过程中执行着功能,141 条 EST 在生物学过程中发挥作用,133 条 EST 在分子功能中发挥作用,144 条 EST 在细胞组分中发挥作用。而细

胞组分、分子功能及生物学过程的注释中分布的亚类各不相同(表 3),这些单一序列涉及到细胞组分中所占比例较大的是细胞(cell)和细胞器(organelle),分子功能中所占比例较大的是蛋白绑定(Binding)和催化活性(catalytic activity),生物学过程中所占比例较大的是细胞过程(cellular process)和代谢过程(metabolic process),表明甘蓝型油菜在干旱胁迫下细胞及细胞器有关的组分和元件响应积极,绑定结合和催化活性功能加强,新陈代谢加速,防御机制加强。

表 3 GO 基因注释的功能分类的主要亚类及其比例

Table 3 Main sub-category and percentage of GO annotated gene classification of EST					
细胞组分		分子功能		生物学过程	
亚类	比例/%	亚类	比例/%	亚类	比例/%
细胞	32.38	蛋白绑定	44.23	细胞过程	15.54
细胞器	26.90	催化活性	41.35	代谢过程	14.32
细胞膜	16.67	转运活性	4.33	单一有机体过程	12.30
胞外区组分	6.90	核酸结合转录因子活性	3.85	对刺激的反应	11.62
大分子	5.72	电子载体活性	1.92	生物学调控	7.84
共质体	5.24	分子结构活性	1.92	定位	6.48
细胞连接	5.24	分子转导活性	1.44	组织细胞组成或生物发生	6.35

2.3 3 个抗旱基因表达分析

2.3.1 总 RNA 质量检测及内参基因的引物筛选

对样品的总 RNA 及 mRNA 质量检测结果显示,抽取的 RNA 品质和纯度符合反转录和

RT-qPCR 的要求。通过对 *ACT7* 和 *UBC21* 候选内参基因的稳定性分析,选择 *ACT7* 作为 RT-qPCR 分析中的内参基因^[15]。其中目的基因和内参基因的实时荧光定量 PCR 引物如表 4。

表 4 目的基因和候选内参基因的 RT-qPCR 引物

Table 4 The primers of candidate reference genes and target gene			
基因名称	正向引物(5'—3')	反向引物(5'—3')	GenBank 登录号
<i>P5CSb</i>	CAGAAGCCACAGACTGAACCTTG	AAACTGCTATCAGTCACCAGCA	AF314812
<i>BnSOS2</i>	CCAGAGGTACTTAATGGCCAAG	GTGGCCTTGACTGAACAATGTA	AY310413
<i>CAM</i>	ACTTGGGACTGTGATGAGGTCT	CCATCAGGTTTAGGAACCTCAGG	AF150059
<i>ACT7</i>	TGGGTTTGCTGGTGACGAT	TGCCTAGGACGACCAACAATACT	

2.3.2 3 个抗旱基因表达量分析

对 3 个抗旱基因的相对表达量(表 5)进行分析。结果表明:在干旱胁迫 1~5 d,油菜叶片中 *CAM* 和 *BnSOS2* 基因表达量均升高,而 *P5CSb* 在干旱胁迫后先轻微下降,第 5 天开始其表达量超过处理前。在干旱胁迫的前期(第 1~5 天),基因表达量从大到小依次为 *CAM*、*BnSOS2*、*P5CSb*,干旱胁迫的后期(第 7 天),基因表达量从大到小依次为 *CAM*、*P5CSb*、*BnSOS2*;在整个干旱胁迫期间,

表 5 干旱胁迫下 3 个抗旱基因的表达量

Table 5 Expression values of three drought-related genes in leaf under drought stress			
干旱处理 天数/d	基因表达量		
	<i>BnSOS2</i>	<i>CAM</i>	<i>P5CSb</i>
0	(1.03±0.051)cC	(1.16±0.063)dD	(0.82±0.063)cC
1	(1.06±0.059)cC	(1.74±0.105)dD	(0.54±0.014)dC
3	(3.52±0.067)bB	(5.10±0.404)bB	(0.62±0.054)cdC
5	(8.49±0.441)aA	(16.30±1.045)aA	(1.20±0.006)bB
7	(0.81±0.149)dD	(2.71±0.176)cC	(1.85±0.094)aA

同列不同大小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平差异显著。

BnSOS2 和 *CAM* 基因表达量先增加后降低。总体而言, *CAM*、*BnSOS2* 和 *P5CSb* 基因在干旱胁迫后均出现了上调表达, 推测这些基因在油菜抵抗干旱胁迫中发挥了重要作用。

3 结论与讨论

当植物受到干旱胁迫时, 植物能在分子水平上作出适应性调节, 从而增强其对胁迫的耐受性。本研究结果表明, 乙醛酸和二羧酸代谢、碳代谢、光合器官中的碳固定、泛素-蛋白酶体途径、氨基酸生物合成、氮代谢等可能在油菜干旱胁迫应答中发挥着重要作用。SINGH 等^[18]的研究结果表明, 转基因植物中 *AtNAC19*、*AtNAC55* 和 *RD26* 等过量表达均能提高转基因拟南芥的抗旱能力; 锌指蛋白在转录调节、病原菌防御及胁迫反应等关键过程中发挥重要作用^[19]。本研究中, *MYB(contig35)*、*NAC(contig39)*、*锌指蛋白(contig37)*等转录因子及泛素类蛋白基因、抗脱水素基因、渗透调节相关基因(甘氨酸蛋白等)、抗氧化胁迫基因及光合作用相关基因参与油菜干旱胁迫应答, 与前人的研究结果一致。

干旱对光合碳同化过程中重要酶类的活性产生影响。研究表明, 在轻度和中度干旱胁迫下, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)的活性以及 1,5-二磷酸核酮糖(RuBP)的含量和活性基本保持稳定; 在严重干旱时, 二者降低; 不抗旱的植物种类或品种降低幅度更大^[20]。葡萄在干旱胁迫下, 磷酸核酮糖激酶等会发挥关键性的作用, 以抵御干旱胁迫^[21]。与光合碳同化过程有关的其他一些酶, 如蔗糖磷酸合成酶(SPS)、果糖-1,6-二磷酸酯酶、NADP-苹果酸酶(NADP-ME)和 NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH)、碳酸酐酶(CA)以及 5-磷酸核酮糖激酶等的活性在干旱胁迫下都受到不同程度的抑制^[22]。本研究结果表明, 干旱胁迫下与油菜光合相关的苹果酸脱氢酶 (*contig16*、*CTE9*)、核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(*contig89*)、果糖-1,6-二磷酸酯缩酶(*contig1*、*contig4*)、磷酸核酮糖激酶(*contig86*、*contig27*)等参与光合碳固定过程, 为油菜抵抗干旱储备能量。

*P5CS*基因作为谷氨酸途径的限速酶, 对谷氨酸含量的积累特别关键; 周精华等^[23]的研究结果表明, *P5CS*基因受干旱胁迫的诱导。*BnSOS2*基因编码丝氨

酸/苏氨酸类蛋白激酶, 作为抗盐相关基因研究得较多^[24], 而作为干旱胁迫基因研究得较少。本研究中发现, *BnSOS2*基因在受到干旱胁迫时表达量增加, 说明*BnSOS2*参与了干旱胁迫的信号转导。*CAM*(钙调蛋白)是 Ca^{2+} 的受体, 与 Ca^{2+} 结合后, 具有了催化活性的*CAM*基因^[25], 可以激活许多下游靶细胞, 调节靶蛋白的活性, 响应干旱胁迫。本研究中, *P5CS*、*BnSOS2*、*CAM*基因在干旱胁迫下均呈现不同程度的上调, 表明这3个基因均参与了干旱胁迫的应答。

参考文献:

- [1] 项俊, 陈兆波, 王沛, 等. CaCl_2 对干旱胁迫下甘蓝型油菜抗旱性相关的生理生化指标变化影响[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(5): 607-611.
XIANG J, CHEN Z B, WANG P, et al. The effect of CaCl_2 treatment on the change of drought related physiological and biochemical indexes of *Brassica napus*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2007, 26(5): 607-611.
- [2] ZHONG H, GUO Q Q, CHEN L, et al. Two *Brassica napus* genes encoding NAC transcription factors are involved in response to high-salinity stress[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(11): 1991-2003.
- [3] 万乔. 甘蓝型油菜抗旱相关基因*BnBip*的克隆与功能鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
WAN Q. Cloning and functional characterization of drought tolerance related gene *BnBip* in rapeseed (*Brassica napus* L.)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.
- [4] 赵洪喜, 刘军龙, 李有全, 等. 环形泰勒虫感染细胞抑制性消减文库的构建及ESTs分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(22): 4551-4563.
ZHAO H X, LIU J L, LI Y Q, et al. Construction and ESTs analysis of SSH library from host cells infected by *Theileria annulata*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(22): 4551-4563.
- [5] 蒋春苗, 程在全, 孙正文, 等. 白叶枯病菌胁迫下云南普通野生稻SSH文库的构建及抗病相关基因分析[J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 43(11): 972-980.
JIANG C M, CHENG Z Q, SUN Z W, et al. Construction of SSH library and resistance gene analyses of Yunnan *Oryza rufipogon* Griff. under *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* stress[J]. SCIENTIA SINICA Vitae, 2013, 43(11): 972-980.
- [6] 孙道阳, 牛立新, 张延龙, 等. 黄瓜花叶病毒诱导的岷江百合SSH文库的构建及分析[C]//中国园艺学会. 中国观赏园艺研究进展. 成都: 中国林业出版社, 2017: 733-738.
SUN D Y, NIU L X, ZHANG Y L, et al. Construction and analysis of suppression subtractive hybridization library of *Lilium regale* infected with cucumber mosaic virus[C]// Chinese Society for Horticultural Science. Advances in Ornamental Horticulture of China. ChengDu: China

- Forestry Publishing House, 2017: 733–738.
- [7] 徐齐君, 王玉林, 原红军, 等. 西藏青稞品种甘农大7号白粉菌诱导早期应答基因SSH文库的构建及分析[J]. 大麦与谷类科学, 2017, 34(5): 8–12, 17.
XU Q J, WANG Y L, YUAN H J, et al. Construction and analysis of SSH library of the Tibetan hull-less barley (*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* HK. f.) variety Gannong Da 7 in response to *Erysiphe graminis*[J]. Barley and Cereal Sciences, 2017, 34(5): 8–12, 17.
- [8] 米宝琴, 毛娟, 申鹏, 等. 山葡萄‘通化-3’抗寒相关基因SSH文库的构建及分析[J]. 果树学报, 2015, 32(4): 546–554.
MI B Q, MAO J, SHEN P, et al. Construction and analyses of SSH libraries of cold resistance related genes in *Vitis amurensis* accession ‘Tonghua-3’[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(4): 546–554.
- [9] 张改英. 干旱胁迫下獐茅SSH文库的构建及耐旱相关基因的筛选[D]. 大连: 大连理工大学, 2014.
ZHANG G Y. Identification of drought stress response genes from *Aeluropus litoralis* by suppression subtractive hybridization[D]. Dalian: Dalian university of technology, 2014.
- [10] 杨杞, 张涛, 王颖, 等. 干旱胁迫下柠条锦鸡儿叶片SSH文库构建及*CkWRKY1*基因克隆[J]. 林业科学, 2013, 49(7): 62–68.
YANG Q, ZHANG T, WANG Y, et al. Construction of a suppression subtractive hybridization library of *Caragana korshinskii* under drought stress and cloning of *CkWRKY1* gene[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2013, 49(7): 62–68.
- [11] CLEMENT M, LAMBERT A, HEROUART D, et al. Identification of new up-regulated genes under drought stress in soybean nodules[J]. Gene, 2008, 426(1/2): 15–22.
- [12] 王德龙, 叶武威, 王俊娟, 等. 干旱胁迫下棉花SSH文库构建及其抗旱相关基因分析[J]. 作物学报, 2010, 36(12): 2035–2044.
WANG D L, YE W W, WANG J J, et al. Construction of SSH library and its analyses of cotton drought associated genes under drought stress[J]. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(12): 2035–2044.
- [13] AMMAR M H, KHAN A M, MIGDADI H M, et al. *Faba* bean drought responsive gene identification and validation[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2017, 24(1): 80–89.
- [14] 谢小玉, 张兵, 张霞, 等. 干旱胁迫下油菜消减文库的构建及分析[J]. 作物学报, 2013, 39(4): 744–752.
XIE X Y, ZHANG B, ZHANG X, et al. Construction and analysis of SSH library in rapeseed(*Brassica napus* L.) under drought stress[J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(4): 744–752.
- [15] 张喆, 白鹏, 肖通, 等. 甘蓝型油菜*P5CSb*和*OAT*基因在干旱胁迫下的表达分析[J]. 西北农业学报, 2013, 22(9): 65–73.
ZHANG Z, BAI P, XIAO T, et al. Expression analysis of *P5CSb* and *OAT* gene under drought stress in *Brassica napus*[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2013, 22(9): 65–73.
- [16] 张玉芳, 赵丽娟, 曾幼玲. 基因表达研究中内参基因的选择与应用[J]. 植物生理学报, 2014, 50(8): 1119–1125.
ZHANG Y F, ZHAO L J, ZENG Y L. Selection and application of reference genes for gene expression studies[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(8): 1119–1125.
- [17] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): e45.
- [18] SINGH K B, FOLEY R C, OÑATE-SÁNCHEZ L. Transcription factors in plant defense and stress responses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(5): 430–436.
- [19] 贾双伟, 高英, 赵开军. 芥菜锌指蛋白转录因子基因*Bj26*的克隆与鉴定[J]. 作物学报, 2014, 40(7): 1174–1181.
JIA S W, GAO Y, ZHAO K J. Cloning and characterization of *Brassica juncea* zinc finger protein transcription factor gene *Bj26*[J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(7): 1174–1181.
- [20] BOTA J, MRDRANO H, FLEXAS J. Photosynthesis limited by Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress[J]. New Phytol, 2004, 162(3): 671–681.
- [21] CHAVES M M, FLEXAS J, PINHEIRO C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell[J]. Annals of Botany, 2009, 103(4): 551–560.
- [22] OULA G, SUSANNE V C, JANN C. The effect of drought on plant water use efficiency of nine NAD-ME and nine NADP-ME Australian C4 grasses[J]. Functional Plant Biology, 2002, 29(11): 1337–1348.
- [23] 周精华, 邢虎成, 揭雨成, 等. 苎麻Δ¹-吡咯啉-5-羧酸合成酶(*P5CS*)基因的克隆和表达分析[J]. 作物学报, 2012, 38(3): 549–555.
ZHOU J H, XING H C, JIE Y C, et al. Molecular cloning and expression analysis of Δ¹-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) gene in ramie[J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(3): 549–555.
- [24] LIU J P, ISHITANI M, HALFTER U, et al. The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(7): 3730–3734.
- [25] BOUCLE N, YELLIN A, SNEDDEN W A, et al. Plant-specific calmodulin-binding proteins[J]. Annual Review of Plant Biology, 2005, 56(1): 435–466.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳 正