

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.02052

不同施氮水平下甘蓝型油菜发育种子中基因表达谱差异分析

闫贵欣 陈碧云 许 鲲 高桂珍 吕培军 伍晓明* 李 锋 李 俊

中国农业科学院油料作物研究所 / 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北武汉 430062

摘 要: 氮肥是油菜生长发育需要的重要营养元素之一, 增施氮肥可提高油菜籽产量和蛋白质含量, 但降低种子含油量。筛选氮肥不敏感油菜基因型、发掘氮肥响应基因及调控网络研究尚不多见。本研究以油菜中双 11 和德国品种 Parter 为材料, 设置 4 个氮水平(施用尿素 0、90、180 和 270 kg hm⁻²), 随机区组试验, 利用 Agilent 油菜基因芯片在全基因组水平分析施氮(180 kg hm⁻²)和未施氮(对照)处理授粉 25 d 种子的基因表达谱。结果显示, 随着施氮量的增加, 种子含油量降低, 而蛋白质含量增加, 且在 2 个品种中的变化程度不同, Parter 含油量的下降水平比中双 11 显著。处理与对照相比, 中双 11 和 Parter 分别有 827 个和 3 676 个差异表达基因, 明显存在基因型的差异; 2 个品种中共同的差异表达基因有 278 个, 其中上调表达的 151 个, 下调表达的 80 个, 差异表达在 10 倍以上的基因有 4 个。根据基因功能注释, 2 个品种中的差异表达基因分子功能主要为催化、结合和转录调节活性, 参与细胞、代谢和应激等生物过程, 约 50% 的差异基因未得到功能注释。选择 8 个差异表达基因进行实时荧光定量 PCR 分析, 结果显示 2 种方法的检测结果吻合率为 94%, 表明检测结果具有一定的生物重复性。本结果为进一步筛选油菜氮肥敏感基因型、开展氮应答机制研究提供了有用信息。

关键词: 基因芯片; 氮肥; 含油量和蛋白含量; 差异表达基因; 实时荧光定量 PCR

Differential Gene Expression Profiles in Developing Seeds of *Brassica napus* L. under Different Nitrogen Application Levels

YAN Gui-Xin, CHEN Bi-Yun, XU Kun, GAO Gui-Zhen, LÜ Pei-Jun, WU Xiao-Ming*, LI Feng, and LI Jun

Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China

Abstract: Nitrogen is one of the major fertilizers to *Brassica napus* L., it has concluded that increasing nitrogen application would raise seed yield, enhance protein abundance but decrease oil content. Up-to-date, little is known on screening nitrogen-tolerant *B. napus* and identifying nitrogen-response genes and their networks. In the paper, we designed four nitrogen application levels (0, 90, 180, and 270 kg ha⁻¹) using *Brassica napus* accessions Zhongshuang 11 and Parter (from Germany) with randomized block design. The results indicated that the seed protein content increased whereas oil content decreased with increasing nitrogen levels. There existed variance in protein and oil contents between Zhongshuang 11 and Parter. The oil content decline was obviously higher in Parter than in Zhongshuang 11. The comparison of 25 days after pollination (DAP) seeds by Agilent oil-seed microarrays at the whole-genome level between 180 kg ha⁻¹ nitrogen fertilizer treatment and CK showed that Zhongshuang 11 contained 827 differentially expressed genes, Parter comprised 3 676 differentially expressed genes, and two varieties jointly shared 278 differentially expressed genes, including 151 genes up-regulated and 80 genes down-regulated, and four genes with at least 10-fold difference expression. The functional classification of differentially expressed genes indicated that they mainly had binding, catalytic activities and transcriptional regulation activities. Most of them were involved in cellular, metabolic, and stimulative processes. The genes (about 50%) without function annotation should be studied further. Additionally, the expression of eight differentially expressed genes was validated by Quantitative RT-PCR. The results from the two methods were 94% consistent, which indicated that the microarray results were biologically reproducible. Our results shed light on exploring mechanism of nitrogen response and nitrogen-tolerance genotype identification in *B. napus*.

Keywords: Microarray; Nitrogen fertilizer; Oil and protein content; Differentially expressed genes; Quantitative RT-PCR

本研究由国家自然科学基金青年项目(31100911), 湖北省自然科学基金项目(2011CDB353)和国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2011CB109300)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 伍晓明, E-mail: wuxm@oilcrops.cn, Tel: 027-86812906

第一作者联系方式: E-mail: ygx_928@126.com

Received(收稿日期): 2012-03-16; Accepted(接受日期): 2012-06-10; Published online(网络出版日期): 2012-09-10.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120910.1324.005.html>

油菜是世界第二大油料作物, 也是中国重要的油料作物, 菜籽油占国产食用植物油的近 57%^[1], 菜籽油生产对保障食用油安全至关重要。由于油脂是油菜生产的最终目标产物, 产油量较种子产量更能反映实际生产成效。决定油菜产油量高低的 2 个最重要构成因子是种子含油量和单位面积种子产量, 这 2 个因子的变化直接影响产油量。

氮肥是保障油菜生长发育的最重要营养元素^[2]。研究表明, 增施氮肥能显著提升种子产量, 但同时又会降低种子含油量并增加菜籽粗蛋白含量^[3-5], 因此, 增施氮肥尽管能显著提升种子产量, 但不一定能相应地提升产油量。施氮后, 菜籽含油量降低, 而籽粒蛋白质含量增加^[6-7], 可能是种子内油脂和蛋白质合成过程中对碳源的竞争造成了两者之间的负相关^[8-9]。油脂和蛋白质的合成是一个极其复杂的生物合成过程, 涉及上百个基因及其编码的酶类^[10], 推测施氮后与油脂合成与转运相关基因可能受到抑制, 而与蛋白质合成与转运相关基因受到诱导, 从而导致含油量下降, 而蛋白质含量上升。考虑到油菜品种资源的遗传多样性, 有必要确定是否存在施氮后含油量下降不显著的品种, 如果存在这样的品种资源, 今后就能培育出施氮后, 产油量显著提升的高产高油品种, 同时通过对其油脂和蛋白质的合成基因网络研究, 明确控制碳源分流的关键基因或基因网络, 指导油菜分子育种。

基因表达谱芯片(gene expression profiling)是目前高通量研究基因表达的有效手段^[11], 它可以同时分析多组不同来源 mRNA 的差异, 快速获得大量基因在 mRNA 水平上的表达信息。通过比较分析基因表达谱的差异, 可以从全基因组表达水平研究基因之间的网络关系, 并发现重要功能基因^[12-16]。本文的研究目的在于利用基因芯片技术分析施氮和未施氮条件下油菜发育种子中基因表达谱的差异, 寻找对氮肥响应的基因或基因网络, 揭示氮肥对油菜种子中蛋白质和油脂合成的调控机制。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于中国农业科学院油料作物研究所试验地进行, 未施肥的耕层土壤(0~20 cm)每千克土碱解氮含量为 184.3 mg, 试验中磷肥为过磷酸钙(含 P_2O_5 16%), 钾肥为氯化钾(含 K_2O 60%), 各处理均基施磷肥 90 kg hm^{-2} , 钾肥 180 kg hm^{-2} ; 氮肥为尿素(含

N 46%), 施于苗期, 试验设 4 个氮肥梯度, 分别为 0(A)、90(B)、180(C)和 270 kg hm^{-2} (D), 每个处理(小区)面积 4.8 m^2 , 种植密度每平方米 15 株, 各处理重复 3 次, 随机区组排列。

1.2 植物材料

选用甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)德国品种 Parter 和中国品种中双 11, 盛花期每个小区选取 10 个单株, 自交授粉前一天, 将主花序上已经开过花和已结的荚果去掉后套袋, 令第 2 天对主花序上开放的 4~5 朵花自花授粉, 并作标记, 授粉当天记为第 0 天(day after pollination, DAP), 5 d 后去袋子。取开花后 25DAP 的种子, 将每次取材随机分成 3 份, 作为 3 次重复, 于液氮中速冻后保存在 $-70^{\circ}C$ 冰箱, 以保证 RNA 长度的完整, 备作 RNA 提取。

将收获是自交种子自然晾干, 采用 Foss NIR-Systems 5000 近红外分析仪分析测定自交油菜籽的含油量和蛋白质含量。

1.3 种子 RNA 的提取

取 100 mg 种子于碾钵, 加液氮碾磨, 用 1.5 mL 预冷的提取 buffer (8 mol L^{-1} LiCl, 2% β -巯基乙醇)悬浮粉末并混匀, $4^{\circ}C$ 过夜后离心 4 s, 取上清并于 16 000 $\times g$, $4^{\circ}C$ 离心 30 min, 弃上清液, 70%乙醇洗沉淀, 短暂风干。用 1 mL 溶解缓冲液(0.5% SDS, 100 mmol L^{-1} NaCl, 25 mmol L^{-1} EDTA, 10 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 7.6, 2% β -巯基乙醇)溶解沉淀。用 pH 4.6 的水饱和酚抽提 1 次, 酚: 氯仿: 异戊醇=25: 24: 1 和氯仿: 异戊醇=24: 1 各抽提 1 次, 每次抽提均以 16 000 $\times g$, $4^{\circ}C$ 离心 15 min。抽提完再用 0.1 倍体积的 3 mmol L^{-1} 醋酸钠和 1.5 倍体积的无水乙醇沉淀 RNA ($-20^{\circ}C$, 15 min), 然后 16 000 $\times g$, $4^{\circ}C$ 离心 15 min, 弃上清液, 用 70%乙醇洗沉淀, 最后将 RNA 溶解在 DEPC 处理过的水中^[17-18]。

取 2 μL RNA 作 BECKMAN DU650 核酸/蛋白质分析仪检测, 得到 RNA 的浓度和 OD_{260}/OD_{280} 比值 ($OD_{260}/OD_{280} \approx 1.8$ 的 RNA 质量符合要求); 用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的 28S 和 18S rRNA 比例, 以评估总 RNA 的完整性。

1.4 基因芯片实验与数据分析

25DAP 是油菜种子油脂和蛋白合成的关键时期^[17], 选择该时期 2 个品种处理(施尿素 180 kg hm^{-2}) 和对照(未施氮肥)的材料做基因芯片分析。

采用 Agilent 油菜 4 \times 44k DNA 芯片(由上海伯豪生物技术有限公司-生物芯片上海国家工程研究中

心提供), 共含 20 332 个基因。芯片实验的整个过程, 包括总 RNA 纯化质检和定量(LAB-ON-A-CHIP 系统)、cDNA 探针制备、芯片杂交、洗涤、扫描、图像分析和数据处理, 均在上海伯豪生物技术有限公司进行。

比较分析 2 张芯片的杂交数据, 以 2 个品种对照组为参照, 处理中种子基因表达变化的 Signal log₂ Ratio 值确定基因的上下调关系, 挑选 Fold Change 大于等于 2 的基因为差异基因。

1.5 差异表达基因的功能预测

利用 COG 库(cluster of genes)和 COGNITOR 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>), 预测差异表达基因的功能。

1.6 实时荧光定量 PCR (Quantitative RT-PCR) 验证基因芯片结果

使用 TOYOBO 公司的 ReverTra Ace-α 试剂盒合成第一链 cDNA, 反应体系中含 1×ReverTra buffer、2 μL dNTPs、1 U RNase 抑制剂、1 U ReverTra Ace 反转录酶、2 μL 总 RNA, 用 DEPC 处理过的水补充体积至 20 μL。反应程序为 30℃ 5 min, 42℃ 30 min, 99℃ 5 min。将得到的 cDNA 稀释 10 倍后分装, 用于 PCR 扩增。

在已注释的差异表达基因中, 挑选差异表达程度不同的 8 个基因, 以油菜 *β-actin* 基因为内参对照,

使用 TOYOBO 公司的 2×Real-time PCR Master Mix, 进行实时荧光定量 PCR 的检测, 以验证基因芯片的分析结果。荧光定量 PCR 的反应体系 20 μL, 含 10 μL 2×Real-time PCR Master Mix、400 nmol L⁻¹ 正向和反向引物、1 μL cDNA, 每个反应 3 次重复。PCR 扩增反应程序为: 94℃ 预变性 2 min; 随后进行 40 个循环, 包括 94℃ 变性 20 s, 56℃ 退火 30 s; 随后 55~95℃ 熔解曲线, 每 0.5℃ 读板 1 次, 来检测扩增产物的特异性; 最后 16℃ 保存。对每个基因, 进行 3 次平行实验。委托上海生工公司合成定量 PCR 引物(表 1), 使用 Bio-Rad iQ5 荧光定量 PCR 仪及 2^{-ΔΔCt} 法分析数据^[19]。

2 结果与分析

2.1 不同氮肥条件下的种子含油量与蛋白质含量

随着施氮量的增加, 2 个品种种子含油量均降低, 而蛋白质含量均提高。方差分析表明, 不同施氮量下含油量和蛋白含量差异均达极显著水平(*P*<0.001)(表 2)。由表 2 所示, 中双 11 在不同的施氮水平下, B、C 与 A 处理的含油量无显著差异, 但 D 与 A 处理间含油量差异极显著; C、D (两者之间无显著差异)与 A 处理的蛋白含量差异达极显著水平。Parter 在不同的施氮水平下, C、D (两者之间无显著差异)与 A、B 处理(两者之间无显著差异)的含油量差异达极显著

表 1 本研究中所用到的引物及其扩增产物
Table 1 List of primer sequences and amplicon sizes

基因名 Gene name	基因详细名称 Gene annotation	引物序列 Primer sequence (5'-3')	PCR 产物长度 Amplicon size (bp)	登录号 Accession number
<i>Up1</i>	Unknown	F: GTGTTTGAGGCATCCCGAGT	113	CD819016
<i>Up2</i>		R: TCCAAGGTCGAAATAACGCC		
<i>D1</i>	Unknown	F: TTCACGTCAGGAGAAGTTAGGT	118	EV172367
		R: CAGGTACATGCATGAGGGTATT		
<i>D1</i>	Unknown	F: TCCACAAAGACATCAAAGCTG	114	CD826382
		R: GTCTTCCTTCTTGATATTGTCC		
<i>DGAT2</i>	Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase	F: CATGACCTGATGAACCGCAAAG R: ACGGCTACCAAAAGGATACAAAA	111 ^[17]	AF155224
<i>PEPC</i>	Phosphoenolpyruvate carboxylase	F: GGTTGGGTTTATTGGTTTGTATG R: ATTCCCTTGCTCGGTTTGTGA	134 ^[17]	AJ223497
<i>FAE1</i>	Fatty acid elongase 1	F: GTCAGGCTTTAAGTGTAACAGTGCA R: TTATTAGGACCGACCGTTTGG	159 ^[17]	AF009563
<i>ACCase</i>	Homomeric acetyl CoA carboxylas	F: AGGACTTGCCAATCTTCTAAAC R: AGCTTCTTTCACCGTAGGACAC	157 ^[17]	X77382
<i>β-actin</i>	Housekeep genes	F: CTGGAATTGCTGACCGTATGAG R: ATCTGTTGGAAAGTGCTGAGGG	145 ^[17]	AF111812

F: 正向引物; R: 反向引物。 F: forward primer; R: reverse primer.

表 2 氮肥对油菜含油量和蛋白质含量的影响
Table 2 Effect of nitrogen on seed oil and protein contents of rapeseed (%)

氮肥处理 Treatment (kg hm ⁻²)	中双 11 Zhongshuang 11		Parter	
	含油量 Oil content	蛋白含量 Seed protein	含油量 Oil content	蛋白含量 Seed protein
0 (A, control)	45.89 aA	21.65 bC	43.45 aA	20.88 cC
90 (B)	45.19 abAB	22.98 bBC	42.48 aA	22.51 bB
180 (C)	43.85 bcAB	25.23 aAB	38.92 bB	26.02 aA
270 (D)	43.18 cB	26.97 aA	38.82 bB	26.73 aA

小写字母代表 0.05 显著水平, 大写字母代表 0.01 显著水平。

Values within a column followed by different letters are significantly different at 0.05 probability level (small letter) and at 0.01 probability level (capital letter).

水平。B、C、D 与 A 处理蛋白含量达极显著水平。

选择处理 A 和处理 C 的材料作基因芯片的分析。处理 C 跟处理 A 比较, 中双 11 的含油量显著差异, Parter 的含油量差异达极显著水平, 2 个品种的蛋白含量均达极显著差异, 因此, 通过基因芯片分析可以获得不同表型的差异表达基因。

2.2 油菜总 RNA 的质量评估

经琼脂糖凝胶电泳检测, 所提取的 RNA 的完整性较好(图 1), 通过核酸/蛋白质分析仪粗测 RNA 的浓度, 各送样 10 μg 到公司, 经公司质控评估, RNA 样品符合作基因芯片的要求。

2.3 不同氮水平下油菜种子中的基因差异表达分析

Agilent 表达谱芯片用重复探针点(10 次重复)信号的 CV 值来计算芯片的稳定性, 其质控标准是 CV 值小于 15%。本次 4 张基因芯片结果的 CV 值均在 5%~7%之间, 基因的检出率在 81%~84%之间, 说明

分析结果是合格可用的。

比较分析施氮肥跟未施氮肥的基因芯片数据(图 2), 中双 11 的差异表达基因有 827 个, 表达上调的基因 481 个, 表达下调的基因 346 个。其中差异表达倍数在 2.0~3.0 之间的有 524 个, 占差异基因总数的 64%, 3.0~5.0 倍的差异基因有 189 个, 占总数的 23%, 差异表达倍数大于 20 的基因有 12 个。而 Parter 差异表达的转录本 3 676 条, 其中表达上调的 1 830 条, 表达下调的 1 846 条, 差异表达倍数在 2.0~3.0 范围的基因有 2 026 个, 占差异基因总数的 55%, 3.0~5.0 之间的差异基因有 892 个, 占总数的 24%, 差异表达倍数大于 50 的基因有 54 个。

比较发现 Parter 中的差异基因数远远高于中双 11; 2 个品种中约 80%差异基因的差异倍数分布在 2.0~5.0 之间, 随着差异倍数的增大差异基因数目相应降低; 2 个品种中共同的差异表达基因比较少, 仅有 278 个, 其中共同上调的 151 个, 下调的 80 个。

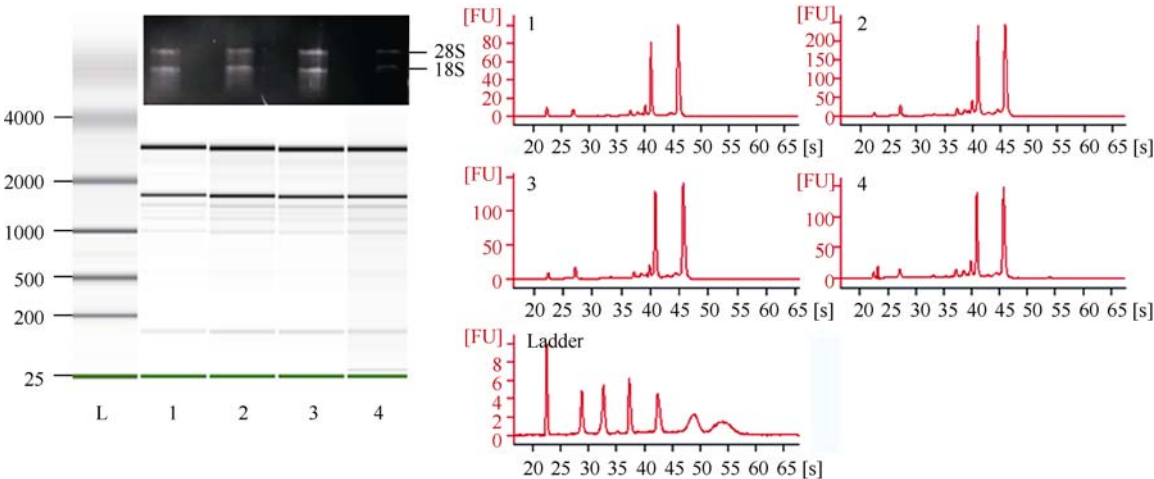


图 1 中双 11 和 Parter 种子总 RNA 的电泳图
Fig. 1 Electrophoretic gel image of the total RNA from seeds of Zhongshuang 11 and Parter

1: 中双 11 (对照); 2: 中双 11 (处理); 3: Parter (对照); 4: Parter (处理); L: ladder.
1: Zhongshuang 11 (control); 2: Zhongshuang 11 (treatment); 3: Parter (control); 4: Parter (treatment); L: ladder.

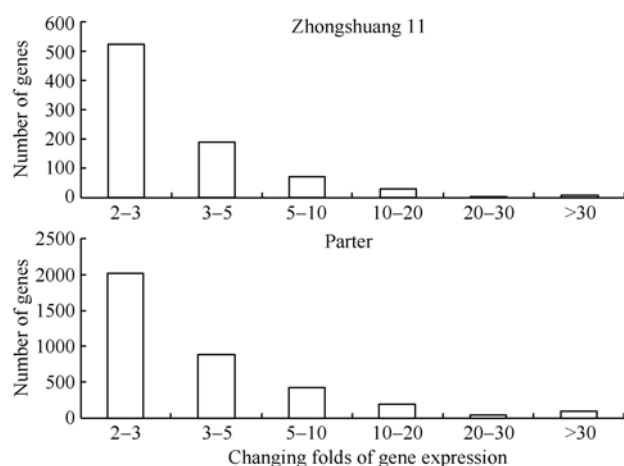


图 2 中双 11 与 Parter 具不同倍数的差异表达基因的分布
Fig. 2 Distribution of differentially expressed genes with different folds of expression levels in Zhongshuang 11 and Parter

相对于整体的差异表达基因, 表达趋势一致的基因在数量上较少, 而且 2 个品种基因表达的上调或下调显著程度存在差异。

2.4 差异表达基因的功能预测

在对基因芯片所有基因整体分析基础上, 采用 GO 注释系统对差异表达倍数在 2 倍或 2 倍以上基因进行功能注释。表 3 表明, 以分子功能分类, 注释了 379 个差异基因, 92% 的差异基因具有催化活性 (catalytic activity)、结合 (binding) 和转录调节活性 (transcription regulation activity), 其他基因分别具有转运蛋白活性 (transporter activity)、电子载体活动 (electron carrier activity) 和酶调 (enzyme regulator activity) 等活性。以基因参与的生物过程分类, 中双 11 中注释了 676 个差异基因, 70% 的差异基因被分在代谢过程 (metabolic process)、细胞过程 (cellular process)、应激过程 (response to stimulus) 和生物调节 (biological regulation) 过程, 其他基因分别参与了生物过程的调控 (regulation of biological process)、多个生物过程 (multi-organism process)、多细胞生物过程 (multicellular organismal process)、定位 (localization)、发育过程 (developmental process)、生殖 (reproduction)、解剖构造的形成 (anatomical structure formation) 和免疫系统 (immune system process) 等生物过程。以细胞组分分类, 中双 11 中有 474 个差异基因得到注释, 94% 的差异基因被归于 2 类, 细胞 (cell) 和细胞器 (organelle), 其他基因参与大分子复合体 (macromolecular complex)、胞外区域 (extracellular region) 和包膜 (envelope) 等的形成。

由表 3 可知, 以分子功能分类, Parter 中有 1 240

个差异基因得到注释, 85% 的差异基因具有催化、结合和转录调节活性。以基因参与的生物过程分类, Parter 中有 2 229 个差异基因得到注释, 65% 的差异基因参与细胞、代谢、应激和生物调节 4 个过程。以细胞组分分类, Parter 中有 1 334 个差异基因得到注释, 89% 的差异基因被归于 2 类, 细胞 (cell) 和细胞器 (organelle), 11% 的基因定位在高分子复合体、胞外区域、细胞外壁等部位。

比较发现, 2 组差异基因在不同功能分类中的主要功能是吻合的, 主要具有催化活性、结合和转录调节活性等分子功能, 参与细胞、代谢、应激和生物调节 4 个生物过程, 参与细胞和细胞器的形成。同时我们分析了中双 11 和 Parter 两组差异基因中共同的差异基因, 发现 2 个品种共同的差异基因和 2 个品种差异表达的基因在不同功能分类中的主要功能也是吻合的 (表 3)。

GO 分类可以从整体水平分析基因表达差异, 阐明施肥导致不同品种种子发育过程中产生差异的主要功能类别。但是, 为了更明确地了解在氮肥诱导下差异基因的具体功能, 我们逐一分析了 2 个品种共同的差异表达基因。结果发现约 50% 的基因功能未知, 它们在油菜油脂和蛋白的形成过程中的作用以及对氮肥的应答功能还需进一步研究。表 4 中列出了 2 个品种中部分共同的差异表达基因, 主要是一些与碳代谢相关的酶类和信号调控相关的基因。如碳代谢 (carbon metabolism) 相关基因, 包括葡萄糖-6-磷酸转运体、 β -葡萄糖苷酶、 α/β 水解酶家族、6-磷酸果糖激酶、蛋白激酶、糖基水解酶等, 信号及调控 (signal and regulator) 相关基因, 包括乙烯应答转录因子、乙烯应答元件结合因子、钙依赖性蛋白激酶、吲哚乙酸氨基化合成酶、可变剪接调控蛋白、丝裂原活化蛋白激酶等; 转录 (transcription) 相关基因, 包括锌指蛋白家族、WRKY DNA 结合蛋白, myb 家族转录因子、病程相关蛋白、抗病蛋白 (disease resistance protein RPM1)、富含亮氨酸重复序列的蛋白、TRAF-like 家族蛋白等。

为了更明确地了解 2 个品种共同差异显著基因的具体功能, 我们逐一分析 2 个品种中共同上调或下调在 10 倍以上的基因, 其中上调的基因只有 3 个, 其功能都为假定的, 一个为假定的镁离子螯合酶 (putative magnesium-chelatase subunit chlI), 与膜及运输 (membrane and transport) 有关系; 一个为假定的水溶性叶绿素结合蛋白 (water-soluble chlorophyll-binding protein, WSCP); 另外 1 个是假定未知功能

表 3 差异表达基因的 GO 功能分类
Table 3 Statistics of differentially expressed genes assigned to GO functional categories

本体与基因本体术语 Ontology and GO term	中双 11 Zhongshuang 11		Parter		共有 Share	
	数目 No.	百分比 Percentage (%)	数目 No.	百分比 Percentage (%)	数目 No.	百分比 Percentage (%)
分子功能 Molecular function	379	100	1240	100	107	100
催化活性 Catalytic activity	179	48	522	42	50	47
结合 Binding	142	38	440	35	39	36
转录调节活性 Transcription regulator activity	24	6	102	8	7	7
转运活性 Transporter activity	15	4	79	6	5	5
电子载体活性 Electron carrier activity	7	2	39	3	0	0
酶调活性 Enzyme regulator activity	6	2	24	2	6	6
分子传感器活性 Molecular transducer activity	1	0	15	1	0	0
营养库活性 Nutrient reservoir activity	2	0	7	1	0	0
结构分子活性 Structural molecular activity	2	0	6	0	0	0
抗氧化活性 Antioxidant activity	1	0	6	0	0	0
生物学过程 Biological process	676	100	2229	100	189	100
细胞过程 Cellular process	155	23	498	22	40	21
代谢过程 Metabolic process	156	23	465	21	41	22
应激反应 Response to stimulus	72	11	246	11	30	16
生物调节 Biological regulation	52	8	199	9	14	7
生物过程调节 Regulation of biological process	97	15	188	9	12	6
发育过程 Developmental process	24	4	100	4	5	3
定位 Localization	19	3	98	4	6	3
定位建成 Establishment of localization	15	2	91	4	5	3
多细胞生物过程 Multicellular organismal process	22	3	85	4	3	2
多生物过程 Multi-organism process	23	3	71	3	12	6
繁殖 Reproduction	12	2	57	3	5	3
繁殖过程 Reproductive process	11	2	55	2	4	2
免疫系统过程 Immune system process	8	1	27	1	6	3
生长 Growth	0	0	18	1	0	0
死亡 Death	0	0	16	1	3	2
解剖结构形成 Anatomical structure formation	10	1	15	1	3	2
细胞组分 Cellular component	474	100	1334	100	127	100
细胞 Cell	221	47	755	57	73	58
细胞器 Organelle	221	47	429	32	28	22
大分子复合体 Macromolecular complex	16	3	53	4	13	10
包膜 Envelope	7	1	43	3	5	4
胞外区 Extracellular region	8	2	41	3	8	6
括膜腔 Membrane-enclosed lumen	1	0	13	1	0	0

蛋白(putative uncharacterized protein)。而下调 10 倍以上的基因仅有 1 个，是含有胰蛋白酶抑制剂结构域的蛋白(trypsin inhibitor domain containing protein)。

2.5 差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

为了验证芯片数据的可靠性，挑选 8 个差异表达程度不同的基因(表 5)，进行实时荧光定量 PCR 的检

测。检测结果表明(图 3)，中双 11 的处理与对照比较，尽管 8 个候选基因的差异表达倍数和芯片分析结果存在一定差异，例如，*DI* 在基因芯片的结果中是显著下调的，但是经荧光定量检测下调不明显，但是其上调或下调的趋势却是一致的。

在 Parter 中(图 3)，*FAE1*、*DGAT2*、*ACCase*、

表 4 2 个品种共同差异表达基因的功能注释(仅部分)
Table 4 Function annotation of partial common differentially expressed genes in the two rapeseed varieties

下调基因 Down-regulated gene	
DNA 结合蛋白 Putative DNA-binding protein	β-葡萄糖苷酶 Beta-glucosidase
α/β 水解酶家族 Alpha/beta-hydrolases family protein	GDSL 脂肪酶 GDSL esterase/lipase
富含半胱氨酸受体 Cysteine-rich receptor-like protein kinase 28	嘌呤核甘二磷酸解离抑制因子 RAB GDP-dissociation inhibitor
Myb 家族转录因子 Myb family transcription factor	衰老相关蛋白 Senescence-associated protein
丝裂原活化蛋白激酶 Mitogen-activated protein kinases	丝裂原活化蛋白激酶 Map 4 kinase alpha1
磷酸激酶 Phosphoinositide-3-kinase	肽基脯氨酰顺反异构酶
磷酸甘油酸激酶 2-phosphoglycerate kinase	Peptidyl-prolyl <i>cis</i> -trans isomerase CYP19-3
含 α/β 水解酶结构域的蛋白	识别起点的蛋白复合体 Origin recognition complex protein 5
Alpha/beta-hydrolase domain-containing protein	吲哚乙酸氨基化合成酶
转运抑制剂应答因子 Transport inhibitor response	Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.17
WRKY DNA 结合蛋白 WRKY DNA-binding protein	晚期胚胎富集蛋白 Dehydrin LEA
	葡萄糖-6-磷酸转运体
	Glucose-6-phosphate/phosphate translocator
上调基因 Up-regulated gene	
酯酶 Esterase/lipase	蛋白激酶家族蛋白 Protein kinase family protein
有机阳离子/肉毒碱转运体 Organic cation/carnitine transporter 2	病程相关蛋白 Pathogenesis-related protein
钙依赖性蛋白激酶 Calcium-dependent protein kinase	锌指蛋白家族 Zinc finger (C ₂ H ₂ type) family protein
果胶酯酶 Pectinesterase 6	β-葡萄糖苷酶 Beta glucosidase
6-磷酸果糖激酶 6-phosphofructokinase	渗透相似蛋白 Osmotin-like protein OSM34
乙烯应答转录因子 Ethylene-responsive transcription factor	含 LOB 结构域的蛋白 LOB domain-containing protein
海藻糖-6-磷酸合成酶 Putative alpha, alpha-trehalose-phosphate synthase	类甲基转移酶蛋白 Methyltransferase-like protein
COBRA 类似蛋白 COBRA-like protein	线粒体基质载体蛋白家族
D-阿拉伯糖-1,4-内酯氧化酶	Mitochondrial substrate carrier family protein
D-arabinono-1,4-lactone oxidase-like protein	抗病蛋白 Disease resistance protein RPM1
假定蛋白 Hypothetical protein	β-1,3-葡聚糖酶 Beta-1,3-glucanase
过氧化物酶 Peroxidase	乙烯应答元件结合因子
	Ethylene-responsive transcription factor ERF012
GDSL 脂肪酶 GDSL esterase/lipase	GDSL 脂肪酶 GDSL esterase/lipase
锌指蛋白 Zinc finger protein CONSTANS-LIKE	重构关键酶木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶
糖基水解酶家族 Glycosyl hydrolase family 17 protein	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein
TRAF-like 家族蛋白 TRAF-like family protein	可变剪接调控蛋白 Polypyrimidine tract-binding protein
β-酮酯酰-CoA 合酶 β-Ketoacyl-CoA synthase	富含亮氨酸重复序列的蛋白
	Leucine-rich repeat-containing protein
	水溶性叶绿素结合蛋白
	Water-soluble chlorophyll-binding protein

FAD2、*PEPC*、*Up1* 和 *Up* 在 2 种检测手段中的表达变化趋势是一致的,但是 *D1* 在芯片的分析结果中是下调的,但荧光定量 PCR 的检测却是上调的。综合 8 个基因在 2 个品种中的检测结果,2 种检测手段的吻合率达 94%,说明绝大部分芯片数据具有生物学意义上的可重复性,结果是可信的。

3 讨论

本研究采用基因芯片技术构建了 2 个油菜品种在施氮和未施氮处理下基因表达谱数据库。为了验证数据的准确性和可靠性,运用实时荧光定量方法

验证差异表达基因,发现 2 种检测手段的吻合率达 94%,表明本研究及其数据的可靠性和准确性;但是基因 *D1* 的检测结果出现偏差这可能源自不同生物学实验手段本身的局限性,或不同实验室所掌握的技术水平参差不齐^[20-21]。

不同氮肥条件下,2 份油菜品种种子含油量与蛋白质含量的测定结果显示,品种间确实存在对氮素的敏感性差异,中国高含油量品种中双 11 对氮素的敏感性较德国品种 Parter 低,表明今后有可能从多样性丰富的油菜品种资源中筛选出对氮素的敏感性更低的优异种质。

表 5 挑选的 8 个基因在基因芯片中的差异表达

Table 5 Differential expression of eight selected genes assessed by microarray

基因名称 Gene name	探针编号 Probe set ID	中双 11 C/A Zhongshuang 11 C/A	Parter C/A
<i>ACCase</i>	A_46_P009521	1.12	-1.40
<i>PEPC</i>	A_46_P183394	1.03	2.01
<i>DGAT2</i>	A_46_P374545	-1.19	-1.34
<i>FAE1</i>	A_46_P008926	-1.04	-6.91
<i>FAD2</i>	A_46_P008841	1.11	-1.22
<i>Up1</i>	A_46_P192524	3.19	178.25
<i>Up2</i>	A_46_P036011	154.14	4.32
<i>D1</i>	A_46_P199019	-27.56	-5.83

表达变化倍数为负值时表示下调表达。A: 对照(0 kg hm⁻² 氮肥); C: 处理(180 kg hm⁻² 氮肥); C/A: 处理相对对照的基因表达量。

Ratios with a negative sign indicate down-regulated expression. A: control (0 kg hm⁻² nitrogen application); C: treatment (180 kg hm⁻² nitrogen application); C/A: the relative gene expressions in treatment compared to control.

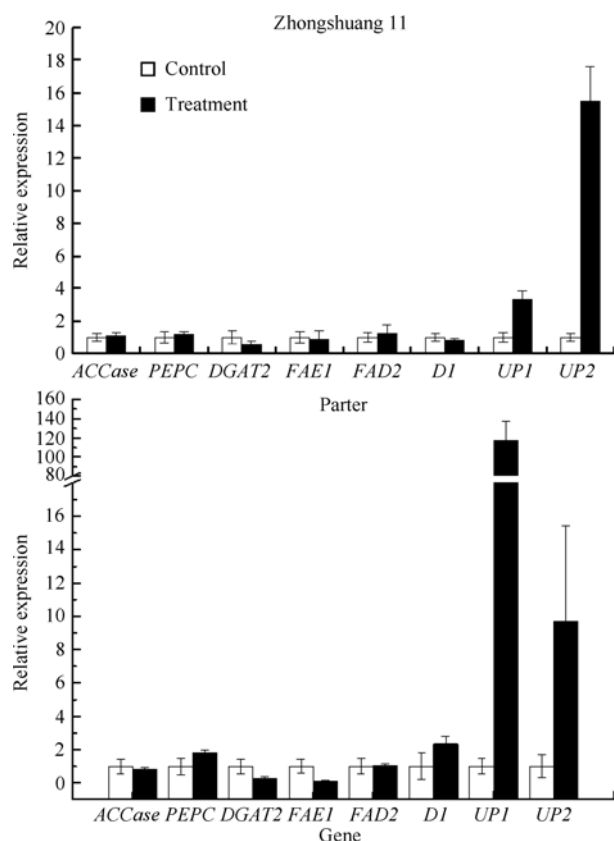


图 3 差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

Fig. 3 Differentially expressed genes validated by real-time PCR

从全基因组表达水平看, 本研究得到的一个极有趣结果, 即存在氮素敏感性差异的中双 11 和 Parter 在基因表达谱上存在极为显著的差异, Parter 中的差异表达基因数量是中双 11 的 4 倍, 并且

Parter 中差异表达大于 20 倍的基因比例(3.7%)远远大于高油品种中双 11 中的比例(1.4%), 其上调和下调基因的显著性均远远大于中双 11。这种差异是否是导致施氮后含油量和蛋白质含量变异程度不同的原因, 有待进一步研究。今后应进一步研究确定这些差异基因所属的代谢途径或基因网络。

通过分析 2 个品种有 278 个共同的差异基因, 还发现一些有潜在研究价值的重要基因, 例如水溶性叶绿素结合蛋白(water-soluble chlorophyll-binding protein, WSCP)基因, 该基因在中双 11 中的表达水平上调了约 15 倍, 在 Parter 中表达水平约上调了 10 倍, 此基因与植物蛋白合成和光合能力等代谢相关^[22], 推测该基因的上调表达可能促进了 2 个品种中蛋白的合成。我们还发现了类似 S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖的甲基转移酶蛋白(S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase-like protein), 在中双 11 中的表达水平提高了约 50 倍, 而在 Parter 中仅提高 2 倍, 该酶参与 S-腺苷甲硫氨酸的转甲基作用, 40 多种代谢反应与 S-腺苷-L-甲硫氨酸转甲基作用有关, 如核酸、蛋白质和脂质。DNA 甲基化(DNA methylation)是一种主要的表观遗传修饰形式, 在高等植物中普遍存在, 它在基因组防御、调控基因表达等方面有重要作用^[23], 该基因的差异表达暗示施氮后可能存在一系列基因的甲基化表观调控。另外, 转运抑制应答因子(transport inhibitor response 1, TIR1)在 2 个品种中的表达水平均下调。有研究表明 TIR1 是生长素受体之一^[24-25], 调控植物发育和防卫反应^[26], 抑制该基因的表达, 从而抑制生长素的反应, 并影响与植物生长素相关的一系列生命活动。氮素作为信号分子使得信号传导分子的表达发生了变化, 进一步说明氮素对油菜籽蛋白和油脂含量的影响是多个代谢与调控过程综合作用的结果, 这些基因共同作用可能造成 2 个品种处理中蛋白质含量提高而含油量下降。

4 结论

随施氮量的增加中双 11 和 Parter 的含油量均降低, 而蛋白质含量提高。中双 11 和 Parter 分别有 827 个和 3 676 个差异表达基因, 明显存在基因型的差异; 2 个品种共同的差异基因有 278 个, 其中上调表达的 151 个, 下调表达的 80 个。其功能主要是具催化活性、结合和转录调节活性等分子功能, 参与细胞、代谢、应激和生物调节等生物过程, 还发现大量未知功能

的差异基因。基因芯片是发现功能基因的可靠、有效手段。

References

- [1] USDA. Foreign Agricultural Service Oilseeds: World Markets and Trade Monthly Circular. [2010-05-11] <http://www.fas.usda.gov/oilseeds/circular/Current.asp>
- [2] Liu H-L(刘后利). Practical Cultivation of Rapeseed (实用油菜栽培学). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1987 (in Chinese)
- [3] Li Z-Y(李志玉), Guo Q-Y(郭庆元), Liao X(廖星), Qin Y-P(秦亚平). Effects of different amount of nitrogen on yield, quality and economics of Zhongshuang No.9. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2007, 29(2): 78–82 (in Chinese with English abstract)
- [4] Liu C-Z(刘昌智), Cai C-B(蔡常被), Chen Z-X(陈仲西), Tu Y-C(涂运昌), Li Z-Y(李致云). Effects of nitrogen, phosphorus and potassium on yield protein and oil content of oilseed. *Oil Crop China* (中国油料), 1982, (3): 25–29 (in Chinese)
- [5] Zhao H-J(赵合句), Li P-W(李培武), Li G-M(李光明), Lu S-G(陆师国). Effects of fertilizer dressing on biochemical qualities in quality rape (*Brassica napus*). *Acta Agron Sin* (作物学报), 1991, 7(4): 255–259 (in Chinese with English abstract)
- [6] Zhou N-N(周年年). The Research on the Nitrogen's Effect on Rapeseed Yield and Quality and Relevant Analysis. MS Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2005 (in Chinese with English abstract)
- [7] Zhao J-X(赵继献), Cheng G-P(程国平), Ren T-B(任廷波), Gao Z-H(高志宏). Effect of different nitrogen rates on yield and quality parameters of high grade yellow seed hybrid rape. *Plant Nutr Fert Sci* (植物营养与肥料学报), 2007, 13(5): 882–889 (in Chinese with English abstract)
- [8] Wilcox J R. Increasing seed protein in soybean with eight cycles of recurrent selection. *Crop Sci*, 1998, 38: 1536–40
- [9] Chung J, Babka H L, Graef G L, Staswick P E, Lee D J, Cregan P B, Shoemaker R C, Specht J E. The seed protein, oil and yield QTL on soybean linkage group I. *Crop Sci*, 2003, 43: 1053–1067
- [10] Beisson F, Koo A J, Ruuska S, Schwender J, Pollard M, Thelen J J, Paddock T, Salas J J, Savage L, Milcamps A, Mhaske V B, Cho Y, Ohlrogge J B. *Arabidopsis* genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant Physiol*, 2003, 132: 681–697
- [11] Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K. Toxicity of free proline revealed in a *Arabidopsis* T-DNA-Tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 541–548
- [12] Lorkowski S, Cullen P M. Analysing Gene Expression: a Handbook of Methods Possibilities and Pitfalls. New York: John Wiley and Sons, Inc. 2003
- [13] Schena M, Shalon D, Davis R W, Brown P O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, 270: 467–470
- [14] Scheible W R, Fry B, Kochevenko A, Schindelasch D, Zimmerli L, Somerville S, Loria R, Somerville C R. An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *Plant Cell*, 2003, 15: 1781–1794
- [15] Fu S-X(付三雄), Qi C-K(戚存扣). Identification of genes differentially expressed in seeds of *Brassica napus* planted in Nanjing and Lhasa by *Arabidopsis* microarray. *Chin Bull Bot* (植物学报), 2009, 44(2): 178–184 (in Chinese with English abstract)
- [16] Trick M, Cheung F, Drou N, Fraser F, Lobenhofer E K, Hurban P, Magusin A, Town C D, Bancroft I. A newly-developed community microarray resource for transcriptome profiling in *Brassica* species enables the confirmation of *Brassica*-specific expressed sequences. *BMC Plant Biol*, 2009, 9: 50–59
- [17] Hu Y, Wu G, Cao Y, Wu Y, Xiao L, Li X, Lu C. Breeding response of transcript profiling in developing seeds of *Brassica napus*. *BMC Mol Biol*, 2009, 10: 49–65
- [18] Vicent C M, Delseny M. Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Anal Biochem*, 1999, 268: 412–413
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- [20] Udall J A, Fligel L E, Cheung F, Woodward A W, Hovav R, Rapp R A, Swanson J M, Lee J J, Gingle A R, Nettleton D, Town C D, Chen Z J, Wendel J F. Spotted cotton oligonucleotide microarrays for gene expression analysis. *BMC Genomics*, 2007, 8: 1471–2164
- [21] Li L-Y(李龙云), Yu W-W(于雯雯), Zhai H-H(翟红红), Huang S-L(黄双领), Li X-L(李兴丽), Zhang H-W(张红卫), Zhang J-F(张金发), Yu S-X(喻树迅). Identification of fiber length-related genes using cotton oligonucleotide microarrays. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2011, 37(1): 95–104 (in Chinese with English abstract)
- [22] Desclos M, Dubousslet L, Etienne P, Caherec F L, Satoh H, Bonnefoy J, Ourry A, Avic J C. A Proteomic Profiling approach to reveal a novel role of *Brassica napus* drought 22 kD/Water-Soluble chlorophyll-binding protein in young Leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1830–1844
- [23] Cheng X, Blumenthal R M. S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions, Singapore: World Scientific, 1999. pp 5–8
- [24] Spartz A K, Gray W M. Plant hormone receptors: new perceptions. *Gene Dev*, 2008, 22: 2139–2148
- [25] Kepinski S, Leyser O. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 2005, 435: 446–451
- [26] Wang D, Pajerowska-Mukhtar K, Culler A H, Dong X. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol*, 2007, 17: 1784–1790