

基于角果皮转录组研究夜间低温对油菜种子含油量的影响

米 超^{1,2}, 王晋雄^{1*}

(1. 西藏自治区农牧科学院农业研究所, 西藏 拉萨 850032; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘 要:为探究油菜角果皮对夜间低温的响应情况, 结合主要气象因子分析不同海拔油菜种子含油量变化趋势, 通过不同海拔及夜间低温处理试验, 对不同处理间材料进行含油量及脂肪酸含量检测, 进一步对各处理的角果皮进行转录组分析。结果表明, 随着海拔升高, 强敏感型材料DH0815种子含油量和芥酸含量显著升高, 弱敏感型材料DH0729则差异不显著; 夜间温度越低, DH0815含油量及芥酸含量差异越大, 因此, 夜间温度是影响油菜DH0815种子含油量及芥酸含量的主要因素; 结合生育期数据, 得出20/18℃(CK)和20/13℃(LNT)为研究夜间低温对油菜种子含油量的相对处理条件; 转录组结果显示, 夜间低温促进了油菜角果皮蔗糖合成及转运和相关转录因子基因(*SIP*、*ATPase 11*、*SUT*、*SWEET*、*SPP*、*CINV1*、*SUC1*、*ABI4*、*WRKY51*、*NAC104*、*DOF3*、*ARF8*)上调表达, 保证了种子油脂合成的底物含量和能量水平, 促进了角果皮蔗糖向种子转运效率, 同时, 在LNT处理下, DH0815种子中油脂合成相关基因(*SAD*、*HAD*、*KAS II*、*FAD2*、*FAD3*、*KAR*、*ECR*)的表达量显著上调, 该验证结果与转录组结果相吻合。夜间温度是影响油菜种子含油量和芥酸含量的主要因素, 夜间低温使得油菜角果皮蔗糖合成及转运和相关转录因子基因上调表达, 蔗糖转运和合成能力增强, 促进了油脂合成底物的增加和能量水平的提高, 进而促进油菜种子油脂合成。

关键词:油菜; 夜间低温; 角果皮; 转录组; 含油量; 基因表达

中图分类号: S565.4

文献标志码: A

Effects of Night Low Temperature on Oil Content of *Brassica Napus* L. Seeds Based on Transcriptome of Silique Wall

MI Chao^{1,2}, WANG Jinxiang^{1*}

(1. Institute of Agricultural Research, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850032, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Yunnan Kunming 650201, China)

Abstract: In order to investigate the response of rape silique wall to low temperature at night, the change trend of oil content of rape seed at different elevations was analyzed combined with main meteorological factors. The oil content and fatty acid content of different treated materials were detected through different altitude and low nighttime temperature treatment, and the transcriptome analysis was further performed on the silique wall of individual treated. With the increase of altitude, the oil content and erucic acid content of strongly sensitive material DH0815 increased, and the difference was significant, while the difference of weak sensitive material DH0729 was not significant. The lower the night temperature, the greater the difference of oil content and erucic acid content of DH0815. Therefore, the night temperature is the main factor affecting the oil content and erucic acid content in DH0815 seeds. Combined with the growth period data, 20/18℃(CK) and 20/13℃(LNT) were obtained as the relative treatment conditions for studying the oil content of seeds at low nighttime temperature. Transcriptomic results showed that night low temperature promoted sucrose synthesis and transport, up-regulated expression of related transcription factor genes (*SIP*, *ATPase 11*, *SUT*, *SWEET*, *SPP*, *CINV1*, *SUC1*, *ABI4*, *WRKY51*, *NAC104*, *DOF3*, *ARF8*), ensured the substrate content and energy level of seed oil synthesis, and promoted the transport efficiency of sucrose from silique wall. At the same time, the expression level of lipid synthesis-related genes (*SAD*, *HAD*, *KAS II*, *FAD2*, *FAD3*, *KAR*, *ECR*) in DH0815 seeds were significantly up-regulated under LNT treatment, which was consistent with the transcriptomic results. Night low temperature is the main factor affecting the oil content and erucic acid content of rape seeds. Low nighttime temperature can enhance the sucrose synthesis and transport, the up-regulated expression of related transcription factor genes, enhance the sucrose transport and synthesis ability of silique wall, promote the increase of lipid synthesis substrate and energy level, and promote the oil synthesis of seeds.

Key Words: *Brassica napus* L.; night low temperature; silique wall; transcriptome; oil accumulation; genes expression

收稿日期: 2024-01-30

基金项目: 西藏自治区农牧科学院农业研究所统筹项目(NYSTC202403); 国家农业产业技术体系项目(CARS-12)。

作者简介: 米超(1988-), 男, 助理研究员, 主要从事高海拔油菜育种及分子生物学研究, E-mail: michao@taas.org; *为通信作者: 王晋雄(1982-), 男, 副研究员, 主要从事高海拔油菜育种和推广, E-mail: wjxwang9619@163.com。

油菜是我国第一大栽培油料作物,同时也是食用油的主要来源之一。为适应国内外市场食用油需求,现阶段高含油量育种依然是油菜育种和栽培研究的主要目标之一。油菜种子发育过程中物质通量(碳水化合物、ATP等)的动态变化是提高种子含油量和产量的关键。对发育中的种子的代谢物谱分析得出,角果壁转化的种子中高浓度的代谢产物诱导了与脂肪酸(FA)合成和糖代谢相关的基因集,最终导致种子含油量的提高。角果皮同化物积累和转运受到温度调控,夜间温度越低,呼吸作用越弱,同化物消耗越少,积累越多,同时被转运到种子的同化物越多,转运能力越强,更多的同化物转运到种子用于优质合成^[1]。因此,生产中可适当密植、改善结角层内部光照、优化水肥条件等,以发挥角果光合作用,延长角果皮高光合期限,减缓光合衰退期限,调节角果皮的光合机能,提高同化物的积累与转运,促进产量及含油量的提高。

我国油菜种植区主要分为冬油菜及春油菜种植区,其中以长江流域冬油菜种植区面积最大^[2]。基于多个气象站1962—2015年气象数据分析长江流域冬油菜产量与气象数据的关系,得到冬油菜生育期内平均气温为16℃~17℃,昼夜温差7℃~8℃^[3]。测定了昼夜高温(29/20℃)、常温(20/18℃)和昼夜低度(20/16℃)处理下油菜种子含油量,夜间高温处理(29/20℃)比常温(20/18℃)处理含油量降低了18.30%,而低温处理(20/16℃)比常温处理含油量升高了7.70%^[4],在20/16℃处理下种子含油量增加,但并未阐述夜间温度影响油菜含油量变化的机制。云南省属于冬油菜区,位于云贵高原,属于热带亚热带季风气候区,环境气候因子复杂且多变^[5]。该地区的冬油菜抽薹期到成熟期时,白天平均温度为18℃~25℃、夜间平均温度为13℃~19℃,昼夜温差在5℃~12℃,海拔梯度差异较大的地区昼夜温差更大,此为含油量积累最有利的环境因素。白菜型油菜随着海拔的升高,农艺性状趋于变差,角果性状得到改善,同时高海拔促进了籽粒含油量增加,油酸及亚油酸积累^[6]。海拔变化对甘蓝型油菜含油量的影响更大,农艺性状变差,含油量趋于优质,芥酸及硫苷趋于劣质^[7,8]。种子含油量和芥酸含量随海拔升高而升高,其中DH0815含油量和芥酸含量随海拔升高程度最明显,而DH0729变化幅度最小,同一地方不同海拔的环境因子变化主要为夜间温度变化,同时也说明

了DH0815为温度强敏感型品系,DH0729为温度弱敏感型品系^[9]。

油脂积累受遗传因素和环境因子共同调控,温度为主要的环境因子。前人研究主要以夜间高温为主,而夜间低温与含油量和脂肪酸含量的关系的相关研究鲜有报道。本试验以20℃为白天温度,以18℃和13℃为夜间温度处理,分析夜间温度对油菜种子含油量及脂肪酸含量的影响,进而对角果皮进行转录组分析,挖掘与蔗糖合成及转运、呼吸、油脂合成相关基因的差异表达水平,以期揭示夜间低温影响油菜种子含油量积累的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以温度强敏感型甘蓝型油菜品系DH0815及弱敏感型油菜品系DH0729为试材,均来源于云南农业大学。

1.2 试验方法

1.2.1 海拔试验

试验点设置在云南农业大学校内试验基地(海拔1 890 m)和云南省农科院园艺所团结乡试验基地(海拔2 180 m),DH0815和DH0729种植面积为4×6 m²,设置3次重复,统计试验地油菜生育期内的主要气象因子(表1)。以当地土壤为主底肥添加适量农家肥,并按照375 kg/hm²磷酸二铵、600 kg/hm²尿素施加肥料,田间管理与当地油菜种植管理模式一致。待成熟后,检测种子脂肪酸含量及含油量,同时记录油菜发育期内的气象数据。

表1 不同海拔种植区生育期内主要气象因子

| 海拔 | 纬度 | 白天平均 | 夜间平均 | 极端 | 极端 | 降雨 | 总日照 | 蒸发量 |
|-------|-------|------|------|------|------|-----|-------|-----|
| /m | ° | 温度/℃ | 温度/℃ | 高温/℃ | 低温/℃ | /mm | 时长/h | /mm |
| 1 890 | 25.10 | 15 | 10.9 | 21.5 | 1.6 | 150 | 1 025 | 598 |
| 2 180 | 25.11 | 13 | 5.1 | 16.7 | 0.2 | 167 | 1 027 | 581 |

1.2.2 夜间低温处理

DH0815和DH0729分别种植在花盆(50 cm×50 cm)中,土壤为农大油菜育种试验地土壤,将土壤碾碎过筛,参考海拔试验进行施加尿素及磷酸二铵为底肥并置于油菜育种试验地。待出苗后间苗,3~4叶期定苗,每盆3株,两份油菜各种植30盆,后期管理与海拔试验一致。待抽薹时选择生长一致的植株在中国科学院昆明植物所精密日光温度控制室进行夜间温度处理(±0.5℃),白天自然光照。根据油菜较适宜的生长温度(18℃~25℃)及昼夜温差的实际情况,白天(14 h)温度均设为20℃,夜

间(10 h)温度分别设为 18 ℃和 13 ℃。适时取材和收获。

1.2.3 含油量和脂肪酸含量检测

含油量和脂肪酸含量检测参考 Mi 等的方法^[10]。

1.2.4 甘蓝型油菜角果皮转录组分析

转录组分析参考 Mi 等的方法^[10]。

1.2.5 甘蓝型油菜角果皮和种子中相关基因 qRT-PCR 分析

根据 NCBI 中甘蓝型油菜基因组(ncbi_GCF_000686985.2)对应的基因 CDS 序列设计 qRT-PCR 引物(表 2),并送上海生工合成引物序列,用于基因定量。以浓度一致的 DH0815 和 DH0729 角果皮和种子 27DAF、35 DAF 和 43DAF 的 cDNA 为模板, BnActin 为内参,进行荧光定量 RT-PCR。定量 RT-PCR 采用同机分管扩增内参基因和目的基因。参考诺唯赞 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 进行荧光定量 PCR,采用两步法,扩增程序为 95 ℃

2 min; 95 ℃5 s, 60 ℃35 s, 40 个循环; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃15 s。每个样品 3 次重复。采用 2^{-ΔΔCt}方法计算 qRT-PCR 结果。

1.3 数据分析

采用 Microsoft 2016 统计数据, GraphPad 9.0 作图,显著性分析采用 SPSS 26.0。

2 结果与分析

2.1 不同海拔对油菜种子含油量及脂肪酸组成的影响

将 DH0729 和 DH0815 种植在海拔不同的试验基地。结果表明,种子含油量和脂肪酸含量发生了变化,气象因素除温度与蒸发量变化外,其他因素变化较小(表 1)。随着海拔升高, DH0729 和 DH0815 种子含油量均升高(表 3),但 DH0815 的种子含油量显著($p\leq0.05$)升高,增加了 4% 以上,而 DH0729 的变化不显著,其变异系数分别为 6.81 和

表 2 qRT-PCR 引物

| 基因 | 正向引物(5' to 3') | 反向引物(3' to 5') |
|--------------|-------------------------|-------------------------|
| BnACTIN7 | CCCTGGAATTGCTGACCGTA | TGGAAAGTGCTGAGGGATGC |
| LOC106357816 | GCGGAAGATCAACGGAACG | GTCGGATTCTCCCCCTTTCAA |
| LOC106421663 | CGCGTGTAGCCGCTTAGATA | AGTGTCTAACGTGACGGAGT |
| LOC106435356 | GAAAACGAGAACTTTGCTTGATG | AGAAGAGGATTACAGCGGCG |
| LOC106426279 | TGGGTGAAATTTATGCAGGTCA | GGTGAGGTTCTGTGGAAGG |
| LOC106357816 | ACGAACAATCCAAGTTTATCGGC | ACGTCCATAAAGAAGCGCCA |
| LOC106372205 | GGACTCGAAACTAGCGCAGA | AACAGATTGTCATCTCGGCCA |
| LOC106375927 | TCATACGCAACAAGCGACC | GCTACAGCTGAAACACCAGG |
| LOC106387251 | ATACCCGTCAAGCCTTTGGG | TCCGAGGAGAGGAAAGGCAT |
| LOC106396280 | TTCGGGGACTGTTGCTAATC | GTCCTTTGAGCCAGGAGCC |
| LOC106434448 | GTACACATCCCGCATCACAT | CGATTCTTCAGGGGCTAACCTAT |
| LOC106439274 | CTCCACTAAGAAGTGGGCCG | TGGGTGCAATCTCTGCCTCT |
| LOC106439448 | CAACAAAGACAGTTGAAGGTCAC | TCGCATCTCCTTATACAGCCAC |

表 3 不同海拔对油菜种子含油量和脂肪酸含量的影响

| 品系 | 海拔/m | 软脂酸/% | 硬脂酸/% | 油酸/% | 亚油酸/% | 亚麻酸/% | 花生烯 | 芥酸% | 含油量/% |
|--------|-------|-------------|------------|------------|------------|------------|-----------|-------------|-------------|
| | | C16:0 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 | 酸/% C20:1 | C22:1 | |
| DH0729 | 1 890 | 3.93±0.23 | 0.90±0.02 | 60.39±1.68 | 21.59±1.34 | 7.66±0.48 | 1.92±0.82 | 3.61±1.68 | 38.22±0.05 |
| | 2 180 | 3.44±0.28 | 0.90±0.16 | 60.71±1.66 | 21.42±1.19 | 7.72±0.52 | 2.78±0.54 | 3.75±0.32 | 38.83±0.65 |
| | CV/% | 9.40 | 0.00 | 0.37 | 0.56 | 0.55 | 2.27 | 2.69 | 1.12 |
| DH0815 | 1 890 | 2.89±0.27** | 2.02±0.20* | 47.13±2.44 | 22.19±1.29 | 10.18±1.58 | 8.27±1.54 | 3.97±0.97 | 40.82±0.42 |
| | 2 180 | 0.66±0.56 | 0.86±0.19 | 48.90±1.98 | 23.97±1.98 | 10.26±1.36 | 8.54±2.01 | 8.50±1.23** | 44.95±0.35* |
| | CV/% | 89.49 | 56.96 | 0.34 | 0.67 | 0.55 | 25.88 | 51.37 | 6.81 |

注: *和**表示在基于 T 检验不同海拔的 $p\leq0.05$ 和 $p\leq0.01$ 时具有显著性, CV/%=标准差/平均值×100%。下同。

1.12;随着海拔升高,DH0815的种子芥酸、花生烯酸含量极显著升高,变异系数分别为51.37和25.88,而DH0729的变化不显著,变异系数分别为2.69和2.27,而其他不饱和脂肪酸变异系数不大。1 890 m和2 180 m海拔变化主要为温度的变化,白天两海拔温度变化不大,即夜间温度差异是油菜种子含油量变化的主要原因。

2.2 夜间温度对油菜种子含油量和脂肪酸含量的影响

夜间温度变化对DH0729和DH0815种子含油量及脂肪酸含量产生了影响(图1)。随着夜间温度的降低,DH0729(图1a)和DH0815(图1b)含油量和脂肪酸含量对夜间温度的反应不尽相同;DH0729中8种脂肪酸含量(除亚油酸外)变异均小于DH0815,DH0729中C22:0和C20:1(花生烯酸)含量变化较大(CV分别为11.78和9.35),C18:1含量变异最小(CV为1.35);而DH0815中饱和脂肪酸(软脂酸、硬脂酸、花生酸不显著升高趋势),不饱和脂肪酸含量中油酸随夜间温度的降低而降低,亚油酸、亚麻酸和芥酸则相反,但明显芥酸含量变化最大,CV为27.12;油菜种子5种脂肪酸(软脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸和芥酸)总量的90%以上,DH0815种子芥酸由8.02%升高至15.21%,而DH0729中分别有2%和0.5%的变化。随着夜间温度的降低,DH0729和DH0815含油量变化趋势呈上升趋势(表4)。13℃和10℃夜间温度处理DH0815种子含油量显著高于其他处理,而10℃夜间温度处理WTSL种子含油量显著高于18℃、16℃和13℃处理,DH0815含油量变异系数明显大于WTSL,CV分别为4.08和8.90。

综上所述,夜间温度对油菜(DH0729和DH0815)含油量和脂肪酸含量变化有影响,夜间温度越低,DH0815含油量和芥酸含量差异越大,夜间温度是影响油菜DH0815种子含油量和芥酸含量的主要因素。

| 表4 夜间温度对油菜种子含油量的影响 | | | | |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 品系 | 20/18℃ | 20/16℃ | 20/13℃ | 20/10℃ |
| DH0729 | 33.99±1.02 b | 34.00±0.98 b | 35.44±1.12 a | 37.00±0.88 a |
| DH0815 | 38.93±0.83 d | 41.00±1.05 c | 44.36±0.56 b | 46.05±0.28 a |

注:不同小写字母表示不同夜间温度下含油量具有差异显著性。

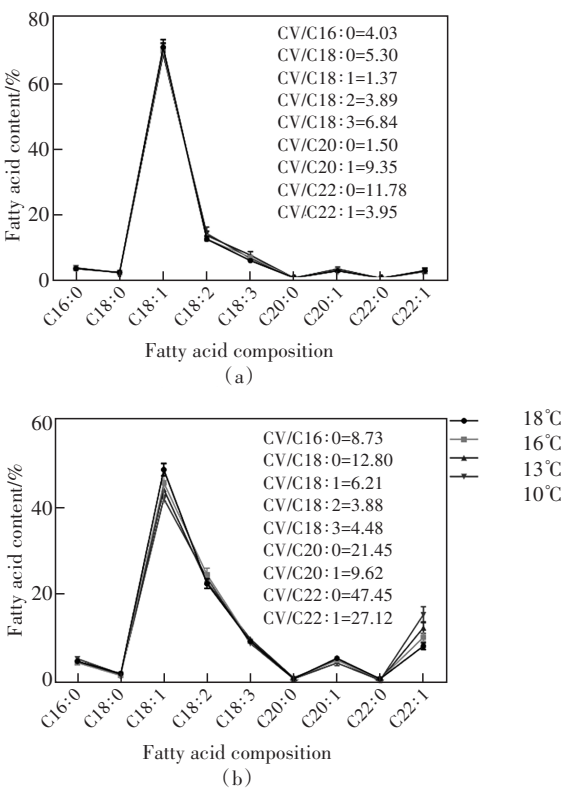
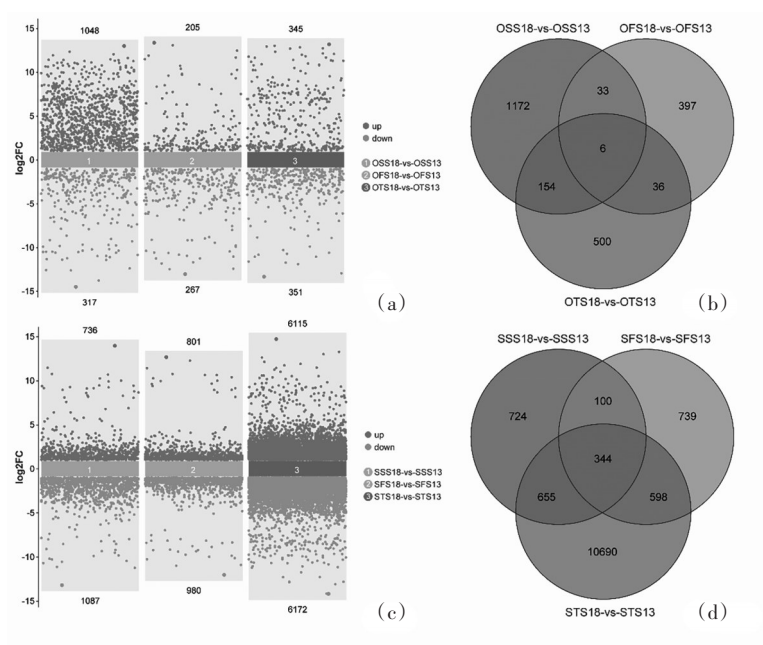


图1 夜间温度对油菜种子脂肪酸含量的影响

2.3 夜间低温下的油菜角果皮差异基因分析

LNT与CK相比,OSS18 vs OSS13中共有1 365个DEGs(1 048个上调及317个下调DEGs)(图2),OFS18 vs OFS13中共有472个DEGs(205个上调及267个下调DEGs),OTS18 vs OTS13中共有696个DEGs(345个上调及351个下调DEGs),SSS18 vs SSS13中共有1 814个DEGs(736个上调和1 078个下调DEGs),SFS18 vs SFS13中共有1 781个DEGs(801个上调和980个下调DEGs),STS18 vs STS13中共有12 287个DEGs(6 115个上调和6 172个下调DEGs)。通过夜间低温下DH0729角果皮差异表达基因的韦恩图比较(图2),SSS18 vs SSS13与SFS18 vs SFS13有444个共有差异基因,分别有1 379和1 337个特有差异基因;SFS18 vs SFS13与STS18 vs STS13有942个共有基因,分别有839和11 345个特有差异基因;SSS18 vs SSS13与STS18 vs STS13有999个共有基因,分别有824和11 288个特有差异基因。这些潜在的基因与维持角果皮的生长发育和种子油脂合成有关系。



注：(a)和(c)：LNT和CK处理油菜DH0815和DH0729角果皮差异基因数目；(b)和(d)：LNT和CK处理油菜DH0815和DH0729角果皮不同发育时期样品间及比较组差异基因韦恩图。

图2 夜间低温下油菜角果皮差异基因分析

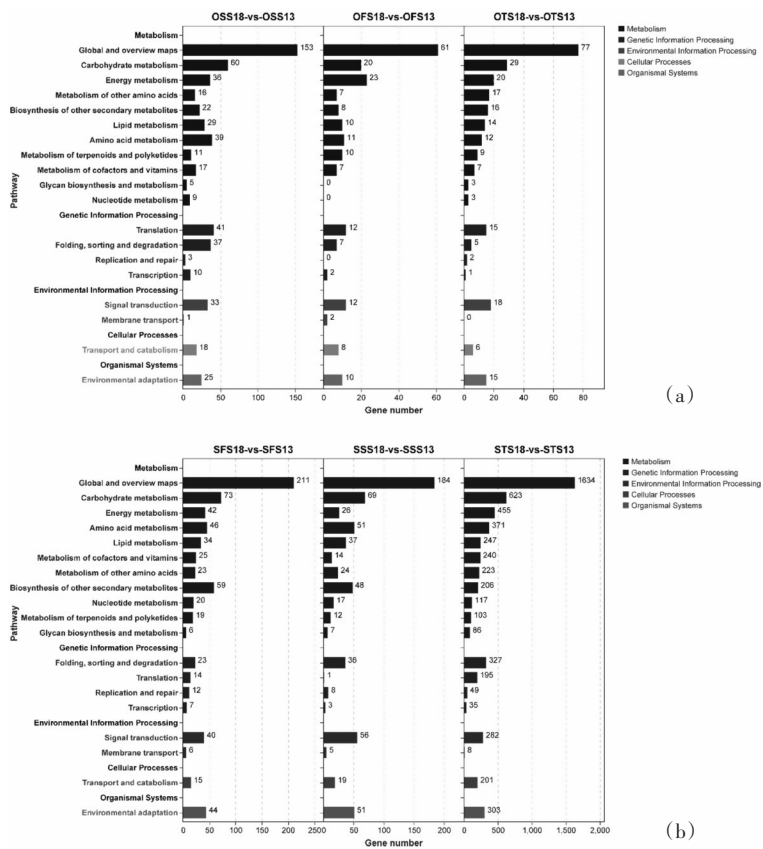


图3 夜间低温下油菜DH0729和DH0815角果皮差异基因KEGG注释

2.4 夜间低温下油菜角果皮差异基因KEGG注释

LNT和CK相比,DH0729和DH0815揭示油菜种子含油量和芥酸含量的变化,因此对夜间低温下油菜角果皮转录组数据进行比较,阐述油菜在LNT

和CK下油脂合成底物含量的差异。OSS18 vs OSS13、OFS18 vs OFS13和OTS18 vs OTS13比较组(图3a)KEGG富集terms主要富集在全局和概述图谱(分别有153个、61个和77个DEGs)、碳水化合物

代谢(60个、20个和29个DEGs)、能量代谢(36个、23个和20个DEGs)、氨基酸代谢(39个、11个和12个DEGs)、脂质代谢(29个、10个和14个DEGs)、辅因子和维生素代谢(17个、7个和7个DEGs)、其他氨基酸代谢(16个、7个和17个DEGs)、其他次生物代谢(22个、8个和16个DEGs)、核酸代谢(9个、0个和3个DEGs)、萜类及酮类化合物代谢(11个、10个和9个DEGs)、聚糖生物合成及代谢(5个、0个和3个DEGs)、折叠、排序和降解(37个、7个和5个DEGs)、翻译(41个、12个和15个DEGs)、剪切与修复(3个、0个和2个DEGs)、转录(10个、2个和1个DEGs)、信号转导(33个、12个和18个DEGs)、膜转运(1个、2个和0个DEGs)、转运与分解代谢(18个、8个和6个DEGs)、环境适应性(25个、10个和15个DEGs)等19个terms。SSS18 vs SSS13, SFS18 vs SFS13, STS 18 vs STS13 差异基因的KEGG注释也与之类似(图3b),存在上下调差异基因数目的差异。

2.5 夜间低温下油菜角果皮中呼吸作用相关差异基因的表达分析

角果皮光合产物是甘蓝型油菜种子优质积累的底物来源。本研究分析了夜间低温下角果皮中与呼吸作用相关(TCA循环、糖酵解、氧化磷酸化、戊糖磷酸途径)的基因表达情况,结果显示,OSS18

vs OSS13、OFS18 vs OFS13、OTS18 vs OTS13、SSS18 vs SSS13、SFS18 vs SFS13和STS18 vs STS13比较组分别有163、141、140、157、145和282个DEGs(表5)。因此筛选与TCA循环、糖酵解、氧化磷酸化、戊糖磷酸途径相关差异基因,同时了解这些差异基因在不同昼夜温度下的表达状况是揭示油菜角果皮底物合成过程的基础。LNT与CK相比,DEGs与氧化磷酸化、糖酵解相关的差异基因表达如表6所示。18个DEGs与糖酵解相关,主要为果糖-1,6-二磷酸酶、醛脱氢酶家族3、果糖-双磷酸酯酶2、丙酮酸激酶、ATP依赖型6-磷酸果酶的编码基因,其中LOC106446362(二磷酸果糖醛缩酶1)和LOC106421663(果糖-1,6-二磷酸酶)参与糖酵解中的6-磷酸果糖转化为3-磷酸甘油醛的两步反应,二磷酸果糖醛缩酶参与的1,6-二磷酸果糖转化为3-磷酸甘油醛是一个可逆反应,酶活性及基因表达量的高低决定了反应正向进行程度,在35 DAF和43 DAF的DH0729角果皮中显著上调表达(尤其43 DAF上调2倍以上),而在DH0815中差异不显著;22个DEGs参与氧化磷酸化过程的DEGs共有17个ATPase和5个可溶性焦磷酸化酶(SIP, soluble inorganic pyrophosphatase),其中LOC106369006为编码ATPase 11的基因,氧化磷酸化过程中将呼吸链释放能量通过ATPase将ADP合

表5 夜间低温油菜角果皮呼吸相关差异表达基因

| KEGG terms | OSS18 vs OSS13 | | OFS18 vs OFS13 | | OTS18 vs OTS13 | | SSS18 vs SSS13 | | SFS18 vs SFS13 | | STS18 vs STS13 | |
|----------------------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | up | down | up | down | up | down | up | down | up | down | up | down |
| Citrate cycle (TCA cycle) | 22 | 21 | 18 | 18 | 19 | 17 | 22 | 22 | 17 | 17 | 14 | 16 |
| Glycolysis/Gluconeogenesis | 22 | 21 | 17 | 20 | 17 | 18 | 20 | 19 | 18 | 21 | 65 | 57 |
| Oxidative phosphorylation | 24 | 17 | 17 | 17 | 17 | 18 | 18 | 20 | 20 | 18 | 29 | 17 |
| Pentose phosphate pathway | 18 | 18 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 19 | 17 | 17 | 53 | 31 |
| Total | 86 | 77 | 69 | 72 | 70 | 70 | 77 | 80 | 72 | 73 | 161 | 121 |

表6 夜间低温下角果皮中与蔗糖转运、氧化磷酸化和糖酵解途径相关差异基因表达

| 基因 | DH0815 | | | DH0729 | | |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 27 DAF | 35 DAF | 43 DAF | 27 DAF | 35 DAF | 43 DAF |
| LOC106397369 | -0.77 | -0.76 | 0.91 | 0.59 | 0.68 | 1.58 |
| LOC106432297 | -0.99 | -0.55 | -0.50 | 0.21 | 0.88 | 1.13 |
| LOC106369006 | -0.03 | -0.21 | 2.05 | -0.34 | 0.70 | -1.96 |
| LOC106357816 | 0.74 | 1.23 | 4.51 | 0.00 | -0.81 | 2.39 |
| LOC106446362 | 0.62 | 0.56 | 4.37 | 0.69 | -0.20 | 0.71 |
| LOC106421663 | 0.15 | 0.54 | 2.59 | 0.46 | 0.44 | 0.65 |

成ATP,为油菜生长发育过程提供能量及物质基础(氨基酸、蛋白质、核酸等)。氧化磷酸化是植物呼吸作用的重要环节,呼吸作用的底物即为糖类(蔗糖等),呼吸底物被氧化降解成还原型辅酶NADH或者FADH,进入电子传递链进一步氧化同时释放能量,通过氧化磷酸化生成ATP,为油菜生长发育提供能量;*LOC106357816*为编码可溶性焦磷酸化酶2的基因,可溶性焦磷酸化酶参与ADP的降解。LNT下,*LOC106369006*和*LOC106357816*在35 DAF和43 DAF的WTSL角果皮中显著上调表达(尤其43 DAF差异倍数2倍以上),而在STSL中差异不显著。结果表明,糖酵解、ATP降解相关基因在DH0729的35 DAF和43 DAF角果皮中是上调表达,而在35 DAF和43 DAF的DH0815角果皮中是下调表达,这说明LNT处理不利于DH0815角果皮的糖酵解、ATP降解,从而贮存更多的底物和能量,为种子中油脂合成提供物质基础和能量。

2.6 夜间低温下油菜角果皮中蔗糖转运相关差异基因的表达分析

油菜角果皮光合产物是种子油脂合成的物质来源,蔗糖是角果皮光合作用的产物,被储存在细胞中合成淀粉或者转移至种子用于油脂合成,油菜角果皮中的光合产物在角果形成初期用于角果形态建成,中后期则主要用于被转运到种子中合成油脂。本试验分析了LNT下油菜角果皮中与糖代谢相关代谢通路的差异基因,其中碳代谢、植物内源激素信号转导及淀粉与蔗糖代谢等代谢过程富集到的差异基因较多,筛选了与蔗糖转运相关的差异基因,分别为*SUT*(*LOC106395514*、*LOC106400782*、*LOC106369332*、*LOC106415203*、*LOC106440357*、*LOC111214171*、*LOC106362619*、*LOC106432297*)、*SWEET*家族基因(*SWEET1*、*LOC106347359*、*LOC106348315*、*LOC106349243*、*LOC106384025*、*LOC106384033*、*LOC106401315*、*LOC106419028*、*LOC106424615*、*LOC106425885*、*LOC111198786*、*LOC111198801*、*LOC111208255*)、1个差异基因为*SPP*(*LOC106390094*)、1个*CINV1*(*LOC106397369*),这些DEGs主要参与角果皮细胞中光合产物(糖类)通过筛管将蔗糖转运到种子用于油脂合成。结果显示,LNT处理下,STSL中35 DAF和43 DAF蔗糖合成相关基因*CINV1*(*LOC106397369*)和蔗糖转运相关基因*SUC1*(*LOC106432297*)显著上调表达(尤其在43 DAF差异倍数在1.9以上),而在LNT下的DH0729中下调或差

异不显著。说明对于DH0815,LNT处理有利于蔗糖合成及转运,使种子中用于油脂及脂肪酸合成的物质基础较高,从而有利于种子中油脂合成。

2.7 夜间低温下油菜角果皮中糖代谢转录因子基因的表达分析

为了解不同夜间温度下甘蓝型油菜复杂的信号通路,对不同发育时期角果皮TFs的表达谱进行了分析。结果显示,LNT与CK相比,DH0815角果皮中*ABI4*(*LOC111208556*)、*WRKY51*(*LOC106379059*)基因在27 DAF和43 DAF上调表达(表7),35 DAF差异不显著,而DH0729在27 DAF、35 DAF和43 DAF下调或者差异不显著;*NAC104*(*LOC106357642*)、*DOF3*(*LOC106435356*)、*ARF8*(*LOC106426279*)基因在27 DAF、35 DAF和43 DAF的DH0815角果皮中上调表达,而DH0729下调表达或者差异不显著。表明在LNT下,DH0815中与糖类合成调控转录因子基因上调表达,调控与糖代谢相关基因上调表达促进糖类积累,为种子油脂合成提供更多的底物。

| 表7 夜间低温下糖类合成转录因子调控 | | | | | | |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 基因 | DH0729 | | | DH0815 | | |
| | 27 DAF | 35 DAF | 43 DAF | 27 DAF | 35 DAF | 43 DAF |
| <i>LOC111208556</i> | 0.74 | -0.73 | -0.24 | 0.90 | -0.56 | 2.40 |
| <i>LOC106379059</i> | 0.00 | -0.78 | -2.30 | 1.57 | -1.93 | 1.31 |
| <i>LOC106357642</i> | -0.53 | -0.41 | 0.16 | 4.17 | 0.76 | 4.44 |
| <i>LOC106435356</i> | 0.96 | 0.81 | 1.10 | 3.06 | 1.30 | 2.41 |
| <i>LOC106426279</i> | 0.20 | -0.18 | 0.49 | 2.00 | 0.23 | 1.38 |

2.8 种子中油脂合成相关基因相对表达量分析

本研究对DH0815和DH0729不同夜间温度处理下的种子中与油脂积累相关基因[*SAD*(*LOC106372205*)、*HAD*(*LOC106375927*)、*KAS*(*LOC106387251*)、*FAD2*(*LOC106434448*)、*FAD3*(*LOC106439274*)、*KAR*(*LOC106439448*)、*ECR*(*LOC106396280*)]的相对表达量进行分析,结果显示,夜间低温处理下,STSL种子中*SAD*、*HAD*、*KAS*Ⅱ、*FAD2*、*FAD3*、*KAR*、*ECR*在27 DAF、35 DAF和43 DAF的相对表达量均显著升高,而在DH0729中则表现为下降或者无显著性差异(表8)。说明夜间低温使得DH0815种子中与油脂合成相关基因表达量显著升高,从而促进了油脂合成,含油量升高,而WTSL则差异不显著或上调水平不如STSL。

表8 夜间低温下对油菜种子中与油脂合成相关基因表达量变化

| 基因 | OSE18 vs. OSE13 | OFE18 vs. OFE13 | OTE18 vs. OTE13 | SSE18 vs. SSE13 | SFE18 vs. SFE13 | STE18 vs. STE13 |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <i>SAD (LOC106372205)</i> | 2.14±0.12 | 1.64±0.32 | 1.61±0.20 | 0.72±0.10 | 1.04±0.15 | 0.79±0.09 |
| <i>HAD (LOC106375927)</i> | 1.79±0.15 | 1.07±0.21 | 1.87±0.37 | 1.47±0.18 | 0.33±0.02 | 0.73±0.11 |
| <i>KAS II (LOC106387251)</i> | 2.40±0.20 | 1.14±0.09 | 1.28±0.45 | 0.64±0.21 | 0.68±0.09 | 0.80±0.16 |
| <i>FAD2 (LOC106434448)</i> | 2.14±0.35 | 3.68±0.58 | 1.85±0.79 | 0.82±0.13 | 0.78±0.13 | 1.02±0.21 |
| <i>FAD3 (LOC106439274)</i> | 0.68±0.08 | 5.93±0.88 | 1.61±0.50 | 0.88±0.09 | 0.59±0.12 | 1.02±0.09 |
| <i>KAR (LOC106439448)</i> | 1.32±0.05 | 8.91±0.95 | 2.67±0.65 | 0.87±0.10 | 0.80±0.15 | 0.42±0.05 |
| <i>ECR (LOC106396280)</i> | 1.77±0.17 | 3.70±0.42 | 2.50±0.55 | 0.93±0.11 | 0.73±0.12 | 0.80±0.08 |

2.9 角果皮转录组数据的qRT-PCR验证

LNT处理油菜DH0815角果皮呼吸作用明显减弱,相关基因显著下调表达,而DH0729中相关基因差异不显著或下调程度不如DH0815。同时DH0815角果皮与蔗糖转运相关基因上调表达,使得光合产物能更多的被转运至种子进行油脂生物合成。检测DH0815角果皮呼吸作用相关差异基因显著下调表达,蔗糖合成及转运相关差异基因显著上调,说明夜间低温处理使得STSL角果皮中呼吸消耗减少,更多的光合同化物被转运至种子用于油脂合成,有利于提高种子含油量。采用qRT-PCR验证了呼吸作用及蔗糖转运相关基因表达量,同时验证了转录组数据与qRT-PCR结果的相关性一致(图4)。*LOC106357816*、*LOC106446362*和*LOC106421663*参与角果皮糖酵解和氧化磷酸化。与CK相比,LNT处理下27 DAF、35 DAF和43 DAF的DH0815角果皮中基因相对表达量显著下调,在DH0729角果皮中则差异不显著;说明LNT处理DH0815呼吸相关差异基因显著下调,呼吸作用减弱,糖类消耗减少,同时蔗糖合成及转运相关基因上调,提高了光合同化物转运能力,而在DH0729中呼吸相关基因不显著下调,蔗糖合成及转运下调或无差异。综上,DH0815角果皮中呼吸消耗明显

较弱及蔗糖转运能力的加强使得LNT下其种子含油量增加。

3 讨论与结论

3.1 讨论

糖类(蔗糖)是油脂合成的前体和必需底物,油菜角果皮中丰富的糖类有利于提高种子含油量。角果皮光合能力的强弱决定了种子油脂积累的多少,同时也决定了产量的高低。角果皮呼吸消耗的强弱决定了油菜种子油脂底物的多少,夜间呼吸消耗越多则转运到种子中用于油脂合成的底物越少,反之则越多,有利于油脂积累和产量提高。夜间低温下油菜DH0815角果皮中糖酵解作用增强,呼吸作用减弱,糖类物质积累增加,角果皮中的糖类物质是油菜种子油脂合成的物质来源,即增加了油脂合成的“源”。综合夜间低温下DH0815种子含油量显著升高,说明夜间低温下角果皮中增加的“源”被转运到种子“库”中,促进了种子含油量升高。

拟南芥中ABI4蛋白参与了淀粉代谢相关酶基因表达的调控,从而影响了淀粉的积累,如淀粉合成相关基因APL3和SBE2、淀粉降解类基因SEX1和BMY8/BAM3^[11]。水稻中突变体与野生型相比,NAC23过表达植株的源器官中6-磷酸-海藻糖含

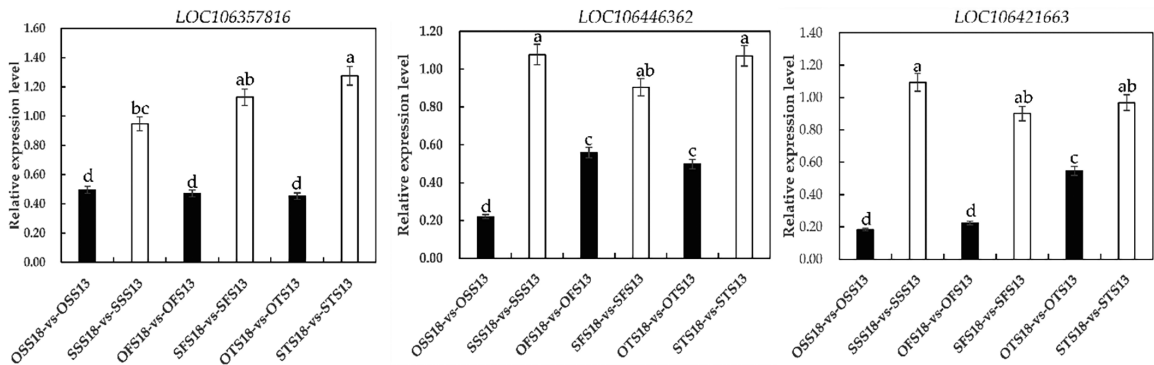


图4 qRT-PCR验证糖酵解和氧化磷酸化相关基因表达量

量上升,提高了光合速率和光合产物从源向库的转运速率^[12]。研究发现NAC68通过抑制中性转化酶活性,进而提高西瓜果肉中糖类积累,丰富了NAC转录因子调控西瓜果肉糖代谢的分子机制^[13-14]。低温下,SUT4基因在大豆种子表达量较高拟南芥中,SUC1和SUC2表达受到低温的上调^[15]。桑树中发现SWEETs基因的表达上调,在应对温度响应方面起着重要作用^[16]。ABI4是调控淀粉合成关键酶基因的表达,淀粉作为储藏物质在角果皮中将光合产物储存,后续降解成蔗糖通过角果柄导管和筛管运输到种子中进行油脂合成^[17-18];WRKY51激活了与蔗糖合成相关的基因表达,促进蔗糖合成^[19];NAC104通过抑制蔗糖酶活性,进而提高糖的积累;DOF3表达水平下降,淀粉粒较小、排列松散、形状不规则,淀粉合成相关基因和蔗糖合酶基因表达量显著下降^[20];ARF8通过参与生长素的合成,将影响蔗糖磷酸合成酶活性,从而影响蔗糖含量^[21]。本研究显示,LNT下,DH0815角果皮中与蔗糖合成及转运相关差异基因(*LOC106397369*、*LOC106432297*)上调表达,尤其是在35 DAF和43 DAF(含油量增长的快速增长期及稳定期),ABI4(*LOC111208556*)、WRKY51(*LOC106379059*)转录因子基因在27 DAF和43 DAF上调表达,35 DAF差异不显著,而27 DAF、35 DAF和43 DAF的DH0729角果皮中下调或者差异不显著;NAC104(*LOC106357642*)、DOF3(*LOC106435356*)、ARF8(*LOC106426279*)转录因子基因在27 DAF、35 DAF和43 DAF的DH0815角果皮中上调表达,在DH0729下调或者差异不显著。LNT下DH0815角果皮中与蔗糖合成的基因及转录因子基因上调表达,促进了糖类积累,提高了种子油脂合成物质基础和能量水平。

已知的调控甘蓝型油菜脂肪酸合成及积累过程的基因有2 000多个,并且多个基因高度保守,种子发育时期检测与脂肪酸合成及积累相关基因表达量(*SnRK*、*DGAT*、*G6PDH*、*PDH*、*PPase*、*LPAAT4*、*LPAAT5*、*ACC*、*FAD2*、*FAD3*、*SAD*、*FAE*、*LPTG*、*IPMS*、*IPMI*、*FATA*、*FATB*)及关键酶活性在研究油菜种子油脂积累过程具有指导意义,这些基因在油菜种子油脂合成中发挥着底物合成、酰基转移、异构化、脱饱和、碳链延伸等作用^[23-25],WR11^[26]、MYB76^[27]等转录因子调控脂肪酸合成起始过程发挥重要作用,因此这些基因和转录因子表达水平、

酶活性可反映油脂积累状况。本试验中,夜间低温处理下,DH0815种子中与油脂合成相关的7个基因均显著上调表达,DH0729中则差异不显著或上调水平不如DH0815。综合角果皮转录组结果,DH0815角果皮中呼吸作用减弱,蔗糖转运能力增强,种子中油脂合成相关基因(*SAD*、*HAD*、*KAS II*、*FAD2*、*FAD3*、*KAR*、*ECR*)显著上调表达,为种子中油脂合成提供物质基础和能量水平,使得DH0815种子含油量升高。

3.2 结论

通过海拔试验得到DH0815是温度强敏感型品系,DH0729为温度弱敏感型品系;不同夜间温度下油菜(DH0815和DH0729)含油量和脂肪酸含量发生变化,夜间温度越低,STSL含油量和芥酸含量差异越大,夜间温度是影响油菜DH0815种子含油量及芥酸含量的主要因素。以此设计了20/18℃(CK)和20/13℃(LNT)试验处理,分析油菜角果皮转录组数据,夜间低温减弱油菜角果皮呼吸作用,使得糖类含量提高,促进了种子含油量的升高。夜间低温促进了油菜角果皮蔗糖合成及转运和相关转录因子基因上调表达,保证了种子油脂合成的底物水平。DH0815角果皮蔗糖合成及转运相关基因[*SUC1*(*LOC106432297*)、*CINV1*(*LOC106397369*)]和转录因子基因[*ABI4*(*LOC111208556*)、*WRKY51*(*LOC106379059*)、*NAC104*(*LOC106357642*)、*DOF3*(*LOC106435356*)、*ARF8*(*LOC106426279*)]上调表达,促进了角果皮蔗糖向种子转运。同时DH0815种子中油脂合成相关基因(*SAD*、*HAD*、*KAS II*、*FAD2*、*FAD3*、*KAR*、*ECR*)表达量显著上调,有利于STSL种子油脂积累,种子含油量增加。

参考文献:

- [1] LI N, D SONG, W PENG, et al. Maternal Control of Seed Weight in Rapeseed (*Brassica napus* L.): the Causal Link between the Size of Pod (Mother, Source) and Seed (off Spring, Sink) [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(4): 332-344.
- [2] 康文霞. 生理生化指标及气象因子与甘蓝型油菜含油量的相关性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [3] 丛日环, 张智, 鲁剑巍. 长江流域不同种植区气候因子对冬油菜产量的影响[J]. *中国油料作物学报*, 2019, 41(6): 894-903.
- [4] 李志兰. 拟南芥与油菜GDSL类脂肪酶基因的in silico分析及对种子油脂积累影响的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [5] 田正书, 赵凯琴, 李根泽, 等. 云南省主要油菜产区施肥现状调查与分析[J]. *西南农业学报*, 2019, 32(7): 1586-1593.
- [7] 曹小东, 刘自刚, 米文博, 等. 甘蓝型冬油菜北移种植的适应性分析[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(20): 4164-4176.

- [8] YAN X Y, LI J N, FU F Y, et al. Co-location of Seed Oil Content, Seed Hull Content and Seed Coat Color QTL in Three Different Environments in *Brassica napus* L.[J]. *Euphytica*, 2009, 170(3): 355-364.
- [9] 付三雄, 李成磊, 尼玛卓玛, 等. 气象因子对油菜种子中油分积累的影响[J]. *植物学报*, 2014, 49(1): 41-48.
- [10] MI C, SUN C, YUAN Y, et al. Effects of Low Nighttime Temperature on Fatty Acid Content in Developing Seeds from *Brassica napus* L. [J]. based on RNA-Seq and metabolome. *Plants (Basel)*. 2023, 12(2): 325.
- [11] 杨加虎, 汪骞, 张传利, 等. 不同高海拔对甘蓝型油菜种子含油量及其农艺性状的影响[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2021, 36(5): 762-767.
- [12] JULIA J W, ALESSIA P, BEREND S, et al. ABI4: Versatile Activator and Repressor [J]. *Trends in Plant Science*, 2013, 18(3): 125-132.
- [13] GAO M, LI X, LUI H, et al. ASIL1 is Required for Proper Timing of Seed Filling in Arabidopsis [J]. *Plant signaling & behavior*, 2011, 6(12): 1886-1888.
- [14] MOGHADDAS S H, HAMZEH-MIVEHROUD M, SILVA ANA P, et al. Expression, purification and DNA-binding Properties of Zinc Finger Domains of DOF Proteins from Arabidopsis Thaliana [J]. *BioImpacts: BI*, DOI: 10.15171/bi.2018.19.
- [15] GE S X, SON E W, YAO R, et al. iDEP: an Integrated Web Application for Differential Expression and Pathway Analysis of RNA-seq data [J]. *BMC bioinformatics*, 2018, 19(1): 534.
- [16] 黄焕焕. 蔗糖/ABA 响应因子 ZmEREB156 和 ZmEREB17 调控玉米胚乳淀粉合成的机理研究 [D]. 成都: 四川农业大学, 2016.
- [17] WANG J, WANG Y, ZHANG J, et al. The NAC Transcription Factor CINAC68 Positively Regulates Sugar Content and Seed Development in Watermelon by Repressing ClINV and ClGH3.6 [J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 214.
- [18] PAPI M, SABATINI S, ALTAMURA M M, et al. Inactivation of the phloem-specific D of zinc finger gene DAG1 Affects Response to Light and Integrity of the Test of Arabidopsis Seeds [J]. *Plant physiology*, DOI: 10.1104/pp.010488.
- [19] KANG X, HUANG S, FENG Y, et al. SWEET Transporters and Their Potential Roles in Response to Abiotic and Biotic Stresses in Mulberry [J]. *Beverage Plant Research*, 2023, 3: 6.
- [20] LOU G, ALAM BHAT M, TAN X, et al. Research Progress on the Relationship between Rice Protein Content and Cooking and Eating Quality and its Influencing Factors [J], *Seed Biology*, 2023, 6(2): 1.
- [21] 唐婧泉, 王南, 高界, 等. 甘蓝型油菜 SnRK 基因家族生物信息学分析及其与种子含油量的关系 [J]. *作物学报*, 2021, 47(3): 416-426.
- [22] 张飞, 高秀清, 张靖洁, 等. 种子特异表达异源 DGAT1 基因提高大豆种子含油量和营养品质 [J]. *生物工程学报*, 2018, 34(9): 1478-1490.
- [23] 郭彦丽. 甘蓝型油菜种子含油量遗传及油脂合成相关基因功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [24] 孔祥东. 油菜荚果转录组测序分析及油分相关候选基因的鉴别 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [25] WOODFIELD H K, FENYK S, WALLINGTON E, et al. Increase in Lysophosphatidate Acyltransferase Activity in Oilseed Rape (*Brassica napus*) Increases Seed Triacylglycerol Content Despite its Low Intrinsic Flux Control Coefficient [J]. *New Phytologist*, 2019, 224(2): 700-711.
- [26] YE Y, NIKOVICS K, TO A, et al. Docking of Acetyl-CoA Carboxylase to the Plastid Envelope Membrane Attenuates Fatty Acid Production in Plants [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 6191.
- [27] LIU F, XIA Y, WU L, et al. Enhanced Seed Oil Content by Overexpressing Genes Related to Triacylglyceride Synthesis [J]. *Gene*, 2015, 557(2): 163-171.