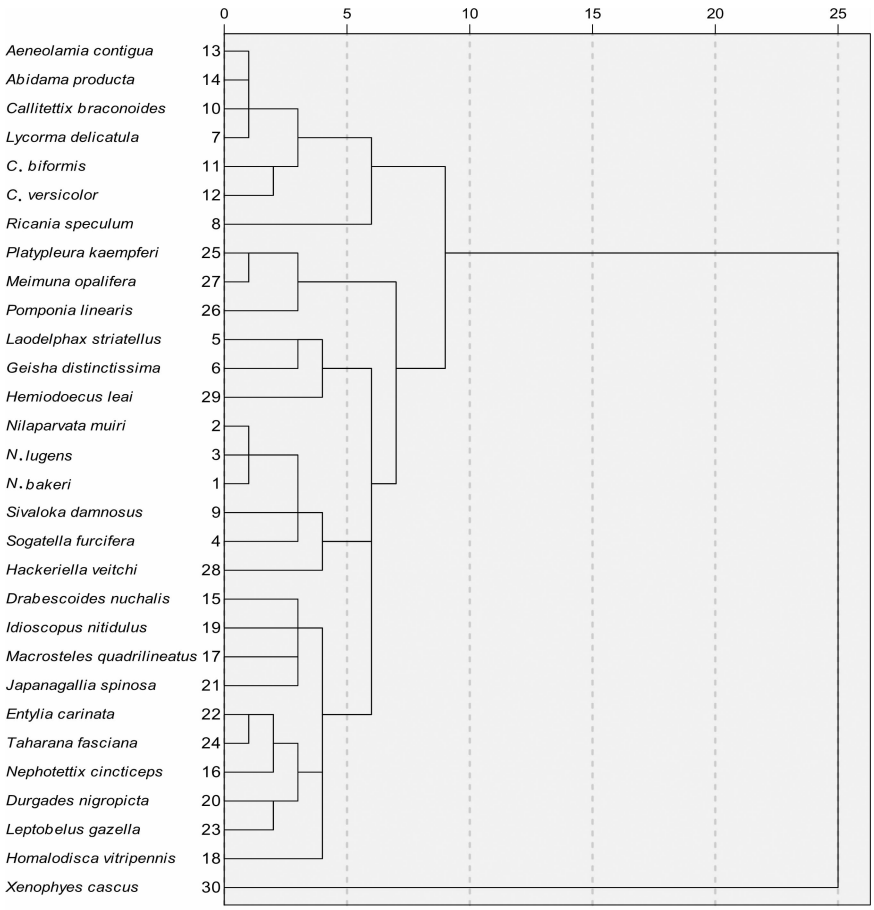


图1　基于线粒体 *COI* 基因密码子偏好性的聚类分析

使用偏好的比较[J]. 作物学报,2005,31(5):596 – 602.

[8]晁岳恩,吴政卿,杨会民,等. 11 种植物 *psbA* 基因的密码子偏好性及聚类分析[J]. 核农学报,2011,25(5):927 – 932.

[9]梁爱萍. 关于停止使用"同翅目 Homoptera"目名的建议[J]. 应用昆虫学报,2005,42(3):332 – 337.

[10]Campbell B C,Steffen – Campbell J D,Gill R J. Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera:Sternorrhyncha:Aleyrodidae) inferred from 18S rDNA sequences[J]. Insect Molecular Biology,1994,3(2):73 – 88.

[11]Ouvrard D,Campbell B C,Bourgoin T,et al. 18S rRNA secondary structure and phylogenetic position of Peloridiidae (Insecta, Hemiptera)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2000,16(3):403 – 417.

[12]Xie Q,Tian Y,Zheng L,et al. 18S rRNA hyper – elongation and the phylogeny of Euhemiptera (Insecta: Hemiptera)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2008,47(2):463 – 471.

[13]Song N,Liang A P,Bu C P. A molecular phylogeny of Hemiptera inferred from mitochondrial genome sequences[J]. PLoS One,2012,7(11):e48778.

[14]Song N,Liang A P,Ma C. The complete mitochondrial genome sequence of the planthopper,*Sivaloka damnosus*[J]. Journal of Insect Science,2010,10(1):76.

[15]Cui Y,Xie Q,Hua J M,et al. Phylogenomics of hemiptera (Insecta: Paraneoptera) based on mitochondrial genomes[J]. Systematic Entomology,2013,38(1):233 – 245.

[16]Fuglsang A. The effective number of codons for individual amino acids:some codons are more optimal than others[J]. Gene,2003,320(3):185 – 190.

[17]Behura S K,Severson D W. Comparative analysis of codon usage bias and codon context patterns between dipteran and hymenopteran sequenced genomes[J]. PLoS One,2012,7(8):e43111.

[18]Sharp P M,Li W H. The codon adaptation index:a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications[J]. Nucleic Acids Research,1987,15(3):1281 – 1295.

[19]刘汉梅,赵　耀,顾　勇,等. 几种植物 *waxy* 基因的密码子用法特性分析[J]. 核农学报,2010,24(3):476 – 481.

[20]刘汉梅,何　瑞,赵　耀,等. 玉米密码子用法分析[J]. 核农学报,2008,22(2):141 – 147.

[21]Clary D O,Wolstenholme D R. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code[J]. Journal of Molecular Evolution,1985,22(3):252 – 271.

[22]Crozier R H,Crozier Y C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*:complete sequence and genome organization[J]. Genetics,1993,133(1):97 – 117.

[23]Wang J J,Li H,Dai R H. Complete mitochondrial genome of *Taharana fasciana* (Insecta, Hemiptera: Cicadellidae) and comparison with other Cicadellidae insects[J]. Genetica,2017,145(6):593 – 602.

[24]Wang J J,Dai R H,Li H,et al. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Japanagallia spinosa* and *Durgades nigropicta* (Hemiptera: Cicadellidae: Megophthalminae)[J]. Biochemical Systematics and Ecology,2017,74:33 – 41.

李　霄,陈　婷,鲍玲莉,等. 甘蓝型油菜 *BnNPR1* 的序列及其环境信号响应分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(14):19 - 24.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2018.14.005

甘蓝型油菜 *BnNPR1* 的序列及其环境信号响应分析

李　霄, 陈　婷, 鲍玲莉, 谭小力, 张志燕, 王　政
(江苏大学生命科学研究院,江苏镇江 212013)

摘要:为了研究油菜 *NPR1*(nonexpressor of pathogenesis - related genes 1)基因对各种环境胁迫信号及植物防卫激素信号的表达响应,以甘蓝型油菜品种宁油 12 为材料,采用同源克隆法克隆了甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.) *NPR1* 基因 *BnNPR1* 的 cDNA 序列。序列分析表明,*BnNPR1* 编码的蛋白序列由 579 个氨基酸残基组成,含有 1 个锚定蛋白重复序列结构和 1 个 BTB/POZ 结构域,与 AtNPR1 的序列相似性达到 73%。烟草叶片瞬时表达分析显示,*BnNPR1* 编码 1 个细胞核定位蛋白;实时荧光定量 PCR 分析显示,*BnNPR1* 在根、茎和叶组织器官中特异性表达,其中在根中表达量极为显著,并且对 4 ℃低温、PEG 溶液以及水杨酸和甲基茉莉酸等的处理呈显著上调表达,而对 $K_2Cr_2O_7$ 和 NaCl 溶液处理则呈显著下调表达。这些结果表明,*BnNPR1* 是低温、重金属、干旱、高盐以及水杨酸(SA)和茉莉酸(JA)等防卫信号分子的响应基因,本研究结果将为进一步分析 *BnNPR1* 在油菜抗逆中的功能及其机制提供线索。

关键词:甘蓝型油菜;*BnNPR1*;环境信号;表达响应;基因克隆;序列分析
中图分类号: S565.401　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 - 1302(2018)14 - 0019 - 05

NPR1(nonexpressor of pathogenesis - related genes 1)是一个调控植物防卫反应的关键基因,在植物抗逆胁迫的生理活动中具有重要的作用。*NPR1* 最早从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆获得,研究发现,这个基因不仅在拟南芥系统获得性抗性(systemic acquired resistance,SAR)[1]和诱导系统抗性(induced systemic resistance,ISR)[2]中起核心调控作用,而且也在植物基础抗性(basic resistance)[3]中起作用。例如,在拟南芥中,研究者发现植物重要防卫信号分子水杨酸(SA)强烈诱导 *NPR1* 的表达[4-5],并且 *NPR1* 在细胞核中能够与转录因子结合而促进防卫基因的表达[6];Spoel 等分析发现 *NPR1* 在调控 SA 和茉莉酸(JA)信号途径的交联中起重要作用[2];在水稻(*Oryzae sativa*)中,SA 介导的 *NPR1* 抑制脱落酸(ABA)诱导基因的表达[7],以上表明 *NPR1* 在植物防卫反应中的重要地位与作用。

近年来,对 *NPR1* 在植物抗胁迫方面的研究也越来越多[8-11]。在拟南芥中,研究者发现 *npr1* 功能缺失突变体与野生型相比在低温和高盐处理条件下均不同程度延迟了植物的生长发育[12-14];Zhang 等在烟草中过量表达异源 *MhNPR1*(*Malus hupehensis* Pamp. Rehd.)而增强了烟草对盐和干旱胁迫的抗性[8,15];Quilis 等研究分析表明,在水稻中组成型表达 *AtNPR1* 使其对盐和干旱胁迫具有更高的敏感性[16]。目前,有关于 *NPR1* 在抗逆功能中的研究主要集中在拟南芥、烟草以及水稻中,而在油菜中还未被研究或未见报道。

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是我国最重要的油料作物之一,在生长过程中经常受到各种外界环境胁迫的影响,严重影响油菜的生产。本研究以甘蓝型油菜品种宁油 12 为研究材料,分离获得油菜 *NPR1* 基因(*BnNPR1*),然后探究其蛋白的亚细胞定位及组织特异性表达,并且调查 *BnNPR1* 在各种环境胁迫处理条件下的表达响应情况,以期为进一步研究其抗逆功能提供线索。

1　材料与方法

1.1　植物材料和菌种

本试验所用到的植物材料分别为甘蓝型油菜品种宁油 12 和本式烟草(*Nicotiana tabacum* cv. Xanthinc),均在光照培养箱中培养,培养条件为:25 ℃条件光照培养 16 h,20 ℃条件下暗培养 8 h,相对湿度 60% ~90%,光照度为 44 μmol/(m^2 · s)。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5α、农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV3101 均为笔者所在实验室保存菌种。

1.2　主要试剂

用于 RNA 提取的 Trizol 试剂盒购于 Invitrogen 公司,DEPC 水购自北京索莱宝科技有限公司,反转录试剂盒 HiScript Q RT(SuperMix for qPCR +gDNA wiper)和荧光定量 PCR 试剂盒 AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix 均购于南京诺唯赞生物科技有限公司;水杨酸购于华东化玻有限公司(CAS No:616 - 76 - 2);甲基茉莉酸(methyl jasmonate,MeJA)购自 Sigma - aldrich 公司(cat No. 39,270 - 7);脱落酸(abscisic acid,ABA)购于 Sigma - aldrich 公司(Cat. No. A4906);乙烯前体 ACC(1 - aminocyclopropane carboxylic acid,ACC)购于 Adamas Reagent 公司(CAS No:22059 - 21 - 8)。

1.3　模拟生物激素和环境胁迫的化学处理[17]

选用 4 叶 1 心期长势良好的油菜幼苗,将幼苗从土壤中取出后用水洗干净,然后将其转移至 1/2 MS 培养基中进行培养,在黑暗条件下 20 ℃培养 48 h,以去除外界环境等因素对试验

收稿日期:2017 - 01 - 22
基金项目:国家自然科学基金(编号:31071672);江苏大学高级专业人才科研启动基金(编号:09JDG061)。
作者简介:李　霄(1991—),女,山东潍坊人,硕士,主要从事油菜功能基因组学方面的研究。E - mail:18252585951@163.com。
通信作者:王　政,博士,副研究员,主要从事油菜功能基因组学方面的研究。E - mail:wangzheng4466@163.com。

结果的影响,然后对其进行模拟不同环境条件下的胁迫处理。

1.3.1　生物激素处理　将上述预处理后幼苗的叶片剪下,选取大小基本相同且等量的叶片,在离体叶片上分别喷洒足量 1 mmol/L SA(水杨酸)、0.1 mmol/L MeJA(甲基茉莉酸)、0.05 mmol/L ABA(脱落酸)和 0.1 mmol/L ACC(乙烯前体),封闭黑暗保湿处理 0、3、6、9、12 h,对照则用灭菌双蒸水喷洒作相同处理,然后分别将用激素处理的叶片相应的对照叶片做好标记,取出装袋后迅速置于液氮中冻存,并于 -70 ℃ 冰箱保存。上述每种处理均进行 3 次生物学重复。

1.3.2　环境胁迫处理　低温胁迫处理:取上述预处理油菜的根部置于另一 100 mL 1/2MS 培养基,在黑暗条件下将其置于 4 ℃冰箱中模拟低温进行胁迫处理。重金属(铬)胁迫处理:将预处理油菜的根部置于配制好的 500 μmol/L 的 $K_2Cr_2O_7$ 溶液中在黑暗条件下 20 ℃培养;干旱胁迫处理:将预处理油菜的根部置于浓度为 15% 的 PEG-4000(PEG,聚乙二醇)溶液中模拟干旱,黑暗下 20 ℃培养。盐胁迫处理:将预处理油菜的根部置于浓度为 400 mmol/L 的 NaCl 溶液中模拟盐胁迫,20 ℃黑暗培养。

1.4　植物叶片总 RNA 提取及 cDNA 扩增

采用液氮研磨法对植物叶片(不超过 1 g)进行研磨制备,然后按照 Trizol 试剂盒说明书上的步骤对叶片总 RNA 进行提取。提取得到的总 RNA 溶于 20 μL DEPC 水中,从中取出 0.2 μL 溶于 5 μL DEPC 水并用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,RNA 浓度使用 OneDrop OD-1000+分光光度计测定。RNA 的逆转录用 4×gDNA wiper Mix 迅速彻底去除基因组污染,然后按 HiScript® 两步法 RT-PCR/qPCR 系列试剂盒进行反转录合成 cDNA,最后得到总体积 10 μL 的 cDNA 溶液,置于 -70 ℃冰箱中保存备用。

1.5　*BnNPR1* 的序列克隆及生物信息学分析

根据已经报道的 NCBI 上公布的甘蓝(*Brassica oleracea*)*NPR1*(*BoNPR1*,Gene ID:106376036)的序列设计引物进行克隆,PCR 引物序列为:F:5′-CTTGTCTCTTGGAGTTTTCAC-3′ 和 R:5′-GAATGAGCCAACAATAGACAG-3′。扩增条件为:94 ℃ 10 min;然后 94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,36 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增得到的目的片段使用 GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收后连接到 pMD18-T Vector 上,转化大肠杆菌。PCR 鉴定平板上的单菌落,将鉴定得到的阳性菌株提取质粒后送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序成功后命名为 pMD18T-*BnNPR1*。使用 ProtParam 工具(http://web.expasy.org/protparam/)分析上述扩增得到的 BnNPR1 蛋白的理化性质,如等电点、相对分子量等;Plant-mPLoc(http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/)[18] 用于预测蛋白质的亚细胞定位锚定序列;GeneDoc 和 MEGA 软件用于多序列比对分析;利用 NCBI 数据库中 CDD 数据库对目的蛋白的保守结构域进行在线分析预测。

1.6　农杆菌介导的烟草叶片瞬时转化

1.6.1　pK7FWG2.0-*BnNPR1* 亚细胞定位载体的构建　从甘蓝型油菜宁油 12 的叶片中提取 RNA,以反转录得到的 cDNA 作为模板,设计 PCR 引物 F:5′-CACCATGGAGACCATTGCCGGATT-3′ 和 R:5′-CCGACGCCGGTGAGAGGGTT-3′,将扩增完成后的目的条带进行胶回收(去除终止子)并测定其浓度。依据 Gate-way 试剂盒的操作说明(在上游的 5′ 端加入 CACC 目的是提高与入门载体的连接效率),以 1∶3 的比例将回收的目的片段与 pENTR/D-TOPO 载体反应,得到入门中间克隆载体,转化大肠杆菌后用 LB 培养基(50 mg/L 卡那霉素)进行抗性筛选,挑取单克隆摇菌后进行 PCR 鉴定,阳性克隆对应菌液送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序,并留存剩余菌液。取测序正确的菌液提取质粒,然后按照 Gate-way LR 试剂盒的说明书通过 LR 置换反应将 *BnNPR1* 从 pENTR 中间载体转移至最终的植物表达载体 pK7FWG2.0-eGFP 上,LR 反应完成后转化大肠杆菌,PCR 鉴定单菌落,将得到的阳性克隆命名为 pK7FWG2.0-*BnNPR1*-eGFP。将该阳性克隆扩大培养后提取的质粒转化至农杆菌 GV3101 中。菌种置于 -70 ℃ 冰箱保存备用。

1.6.2　烟草叶片的瞬时转化　将含有 pK7FWG2.0-*BnNPR1*-eGFP 重组质粒的农杆菌 GV3101 活化,然后在摇床(28 ℃,200 r/min)中分别培养含有重组质粒、P19(一种抑制基因沉默的蛋白质)和 PCX-IND-DsRed 携带红色荧光蛋白的核定位(marker 基因构成的载体)的农杆菌,培养至 $D_{600\ nm}$ 的值为 0.6 时,5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,加入 15~20 mL 的甲基丙烯酸甲酯(MMA)溶液悬浮 1 次,第 2 次悬浮后用分光光度计调节其 $D_{600\ nm}$ 值为 1.2 时,按照 1∶1∶1 的体积比混合 3 种农杆菌菌液,28 ℃暗室放置诱导 3 h。选取生长 4 周大且长势良好的烟草植株,在靠近烟草叶片叶脉部位下表皮扎孔,然后用去掉针头的 1 mL 无菌医用注射器吸取菌液,紧贴烟草叶片下表皮将菌液缓慢注入叶片,直至菌液将整片叶片都充满为止。黑暗条件下将烟草置于不透光的密封箱内,保湿培养 24 h,然后转入光照培养箱中培养 5 d 后观察。试验进行 3 次重复。

1.6.3　亚细胞定位观察　取上述注射 5 d 后的烟草叶片,用荧光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5)观察并检测荧光信号。分别用激发光波长为 488 nm(发射波长为 510~540 nm)检测 eGFP 发出的绿色荧光,用激发光波长为 543 nm(发射波长为 580~584 nm)检测核定位 marker 发出的红色荧光。观察时以空载体 pK7FWG2.0-eGFP、PCX-IND-DsRed 和 P19 的混合菌液为对照。

1.7　实时荧光定量 PCR

选择使用内参基因 *B. napus TIP41*(*BnTIP41*,油菜数据库登录号:Bra011516),设计引物为:F:5′-TGAAGAGCAGATTGATTTGGCT-3′;R:5′-ACACTCCATTGTCAGCCAGTT-3′;根据目的基因 BnNPR1 设计引物序列为:F:5′-TCCAACATACACAAGGCGCT-3′ 和 R:5′-CATCGCAATACGCAACAGCA-3′。荧光定量反应体系根据 AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix 试剂盒的说明书配制。依据说明书该试剂一般采用两步法程序进行反应,即退火/延伸设置为 60 ℃,反应 40 个循环;在每个循环的 60 ℃收集荧光信号,通过每一个循环荧光信号的变化得到扩增产物的熔解曲线,以反应的 C_T 值落在 20~28 之间的定量最为准确。每组试验均要进行 3 个生物学重复,同时每个生物学重复至少需要进行 3 次技术重复。数据处理参考 Wang 等[19] 的 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算方法,将数据输出后得到的 *BnTIP41* 和 *BnNPR1* 的 C_T 值转化为基因的相对表达量。

2　结果与分析

2.1　甘蓝型油菜 *BnNPR1* 基因的克隆与序列分析

根据甘蓝 *NPR1*(*Brassica oleracea NPR1*,*BoNPR1*)的核苷酸序列 CDS 区的外侧设计上下游引物,以油菜品种宁油 12 的总 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得单一的 1 892 bp 的扩增片段。该序列最终的 ORF 框长 1 740 bp,终止密码子 TAG,编码含有 579 个氨基酸残基的蛋白质(图 1)。与其他植物 NPR1 氨基酸序列进行同源性比较发现,其所编码的蛋白与双子叶植物拟南芥、辣椒、烟草和单子叶植物葡萄、玉米、水稻等 6 个物种的 NPR1 在氨基酸水平上有较强的保守性,与 AtNPR1 的一致性达到 73%(图 2),进而,NCBI 的 CDD(conserved domain database)Search 搜索比较发现,与其他植物的 NPR1 类似,其蛋白序列含有 NPR1_like_C superfamily 保守功能域(图 3),同时还具有 BTB domain 和 Ankryin repeat domain 蛋白相互作用功能位点。这些分析表明,本试验克隆得到的是 *NPR1* 在甘蓝型油菜中的同源基因即 *Brassica napus NPR1*(*BnNPR1*)。

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110       120
1       CTTGTCTCTTGGAGTTTTCACTTCTCACCATCTCTCTGTTTCGAGAACTTCCTCACCATTGATGGAGACCATTGCCGGATTTGATGATTTCTATGAGATCAGCAGCACTAGCTTCCTCGCCGCACCGGC
1                                                                     M  E  T  I  A  G  F  D  D  F  Y  E  I  S  S  T  S  F  L  A  A  P  A

               139       149       159       169       179       189       199       209       219       229       239       249
130     GCCAACCGATAACTCCGGATCATCCACCGTCTACCCGACGGAGCTTCTCACCAGACCCGAGGTCTCGGCGTTTCAACTCCTCTCCACCAGCCTCGAGTCCGTCTTCGACTCGCCGGAAGCGTTCTACAG
44        P  T  D  N  S  G  S  S  T  V  Y  P  T  E  L  L  T  R  P  E  V  S  A  F  Q  L  L  S  T  S  L  E  S  V  F  D  S  P  E  A  F  Y  S

               268       278       288       298       308       318       328       338       348       358       368       378
259     CGACGCCAAGCTTGTCCTCTCCGACGACAAGGAAGTATCCTTCCACCGCTGCATTCTCTCCGCGAGAAGCCTCTTCTTCAAGGCCGCGTTGGCAGCCGCCGAGAAGGTGCAGAAGTCCACCCCCCGTGAA
87        D  A  K  L  V  L  S  D  D  K  E  V  S  F  H  R  C  I  L  S  A  R  S  L  F  F  K  A  A  L  A  A  A  E  K  V  Q  K  S  T  P  V  K

               397       407       417       427       437       447       457       467       477       487       497       507
388     GCTCGAGCTGAAGACGCTCGCGGCGGAGTACGACGTCGGGTTCGATTCCGTGGTGGCTGTTCTGGCGTACGTTTACAGCGGCAGAGTGAGGCCCCCGCCGAAGGGTGTTTCTGAATGCGCAGACGAGAG
130       L  E  L  K  T  L  A  A  E  Y  D  V  G  F  D  S  V  V  A  V  L  A  Y  V  Y  S  G  R  V  R  P  P  P  K  G  V  S  E  C  A  D  E  S

               526       536       546       556       566       576       586       596       606       616       626       636
517     TTGCTGCCACGTGGCGTGCCGTCCGGCTGTGGATTTCATGGTGGAGGTTCTCTACTTGGCTTTCGTCTTCCAGATTCAGGAACTGGTTACTATGTATCAGAGGCATTTACTGGATGTTGTAGACAAAGT
173       C  C  H  V  A  C  R  P  A  V  D  F  M  V  E  V  L  Y  L  A  F  V  F  Q  I  Q  E  L  V  T  M  Y  Q  R  H  L  L  D  V  V  D  K  V

               655       665       675       685       695       705       715       725       735       745       755       765
646     TATGATAGAGGACACTTTGGTCGTCCTCAAGCTCGCTAACATCTGTGGCAAAGCGTGCAAGAAGCTATTTGATAAGTGCAGAGAGATCATTGTCAAGTCTAACGTGGATGTTGTTACTCTAAAGAAGTC
216       M  I  E  D  T  L  V  V  L  K  L  A  N  I  C  G  K  A  C  K  K  L  F  D  K  C  R  E  I  I  V  K  S  N  V  D  V  V  T  L  K  K  S

               784       794       804       814       824       834       844       854       864       874       884       894
775     ACTGCCTGAGAACATTGCCAAGCAAGTAATCGATATCCGTAAAGAGCTCGGCTTGGAGGTTGCTGAACCAGAGAAACATGTCTCCAACATACACAAGGCGCTTGAGTCAGACGATCTTGACCTTGTCGT
259       L  P  E  N  I  A  K  Q  V  I  D  I  R  K  E  L  G  L  E  V  A  E  P  E  K  H  V  S  N  I  H  K  A  L  E  S  D  D  L  D  L  V  V

               913       923       933       943       953       963       973       983       993      1003      1013      1023
904     TATGCTTTTGAAAGAGGGCCACACGAATCTAGACGAAGCGTATGCTCTCCATTTTGCTGTTGCGTATTGCGATGAGAAGACCGCGAGGAATCTCCTGGAACTGGGGCTTGCGGATGTCAACCGGAGAAA
302       M  L  L  K  E  G  H  T  N  L  D  E  A  Y  A  L  H  F  A  V  A  Y  C  D  E  K  T  A  R  N  L  L  E  L  G  L  A  D  V  N  R  R  N

              1042      1052      1062      1072      1082      1092      1102      1112      1122      1132      1142      1152
1033    CCCGAGAGGGTACACGGTGCTTCACGTCGCTGCGATGAGGAAAGAGCCGACATTGATAGCATTGTTGTTGACGAAAGGGGCTAATGCATTAGAAACGTCTTTGGACGGGAGAACTGCTCTGTTGATCGC
345       P  R  G  Y  T  V  L  H  V  A  A  M  R  K  E  P  T  L  I  A  L  L  L  T  K  G  A  N  A  L  E  T  S  L  D  G  R  T  A  L  L  I  A

              1171      1181      1191      1201      1211      1221      1231      1241      1251      1261      1271      1281
1162    GAAACAAGTCACTAAGGCGGCTGAGTGTTGTATTCTGGAGAAAGGGAAGTTAGCTGCCAAAGGCGGAGTATGTGTAGAGATACTCAAGCAACCAGACAACAAACGAGAACCATTTCCTGAAGATGTTTT
388       K  Q  V  T  K  A  A  E  C  C  I  L  E  K  G  K  L  A  A  K  G  G  V  C  V  E  I  L  K  Q  P  D  N  K  R  E  P  F  P  E  D  V  F

              1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400      1410
1291    TCCCTCCCTTGCAGTGGCTGCTGATGAATTCAAGATAAGGTTGATTGATCTTGAAAACAGAGGTATTCAAATGGCTAGATGTCTCTATCCAATGGAAGCACAAGTTGCAATGGATTTCGCCCGAATGAA
431       P  S  L  A  V  A  A  D  E  F  K  I  R  L  I  D  L  E  N  R  G  I  Q  M  A  R  C  L  Y  P  M  E  A  Q  V  A  M  D  F  A  R  M  K

              1429      1439      1449      1459      1469      1479      1489      1499      1509      1519      1529      1539
1420    GGGAACACGCGAGTTTGTCGTGACGACAGCAACTGACCTACACATGGAACCTTTCAAGTTCGTAGAAATGCATCAGAGTAGACTAACAGCGCTTTCTAAAACTGTGGAATTCGGGAAACGCTTCTTCCC
474       G  T  R  E  F  V  V  T  T  A  T  D  L  H  M  E  P  F  K  F  V  E  M  H  Q  S  R  L  T  A  L  S  K  T  V  E  F  G  K  R  F  F  P

              1558      1568      1578      1588      1598      1608      1618      1628      1638      1648      1658      1668
1549    ACGCTGTTCGAAAGTGCTCGATGATATTGTGGACTCTGAGGACTTGACTATACTGGCTCTCGTAGAAGAAGACACTCCTGAGCAACGACAACAAAAGAGGCAGAGGTTCATGGAGATACAGGAGATTGT
517       R  C  S  K  V  L  D  D  I  V  D  S  E  D  L  T  I  L  A  L  V  E  E  D  T  P  E  Q  R  Q  Q  K  R  Q  R  F  M  E  I  Q  E  I  V

              1687      1697      1707      1717      1727      1737      1747      1757      1767      1777      1787      1797
1678    GCAAATGGCGTTTAGTAAAGACAAGGAGGATCTTGGAAAGTCGTCTCTCTCAGCTTCCTCTTCTTCCACATCCAAATTAACTGGTAAAAAGAGGTCAATTGCTAAACCCTCTCACCGGCGTCGGTGACA
560       Q  M  A  F  S  K  D  K  E  D  L  G  K  S  S  L  S  A  S  S  S  S  T  S  K  L  T  G  K  K  R  S  I  A  K  P  S  H  R  R  R  *

              1816      1826      1836      1846      1856      1866      1876      1886
1807    CTATTTGTTCGGGGTAATATTTGATGTACCATATATATATCTGAGTTGTCATGTGTTTAGTGTCTCTGTCTATTGTTGGCTCATTC
603
```

灰色阴影标记为扩增序列所用的上下游引物，黑色表示起始密码子和终止密码子

图1　*BnNPR1* 的核苷酸和氨基酸序列

2.2　BnNPR1 的亚细胞定位

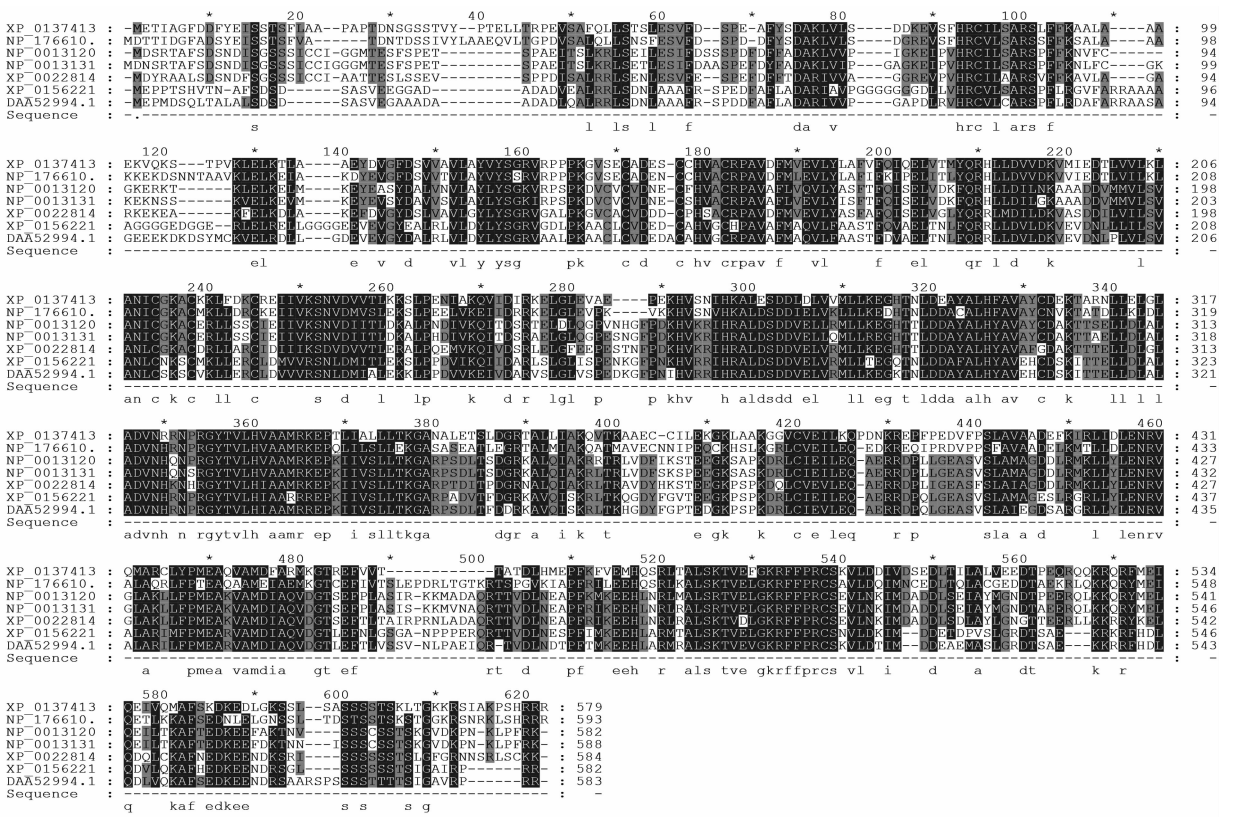
蛋白质在细胞中不同位置的定位与其相应的生物功能相关。为了研究 BnNPR1 蛋白的亚细胞定位,笔者构建了植物表达载体 pK7FWG2.0 – *BnNPR1* – eGFP,并且利用农杆菌介导的烟草瞬时表达系统进行探测。结果(图 4)显示,转化载体的烟草叶片的细胞在绿色荧光激发下细胞核显示为绿色,与细胞核核定位标记基因的 RFP 显示的红色重叠后显黄色,表明 BnNPR1 定位于细胞核中。

2.3　组织表达分析

为了研究 *BnNPR1* 在油菜中各组织特异性表达情况,以油菜 *BnNPR1* 基因的全长 cDNA 为模板设计特异性引物,以 *BnTIP41* 为内参基因,利用荧光定量 PCR 技术对 *BnNPR1* 在油菜的根、茎、叶、花、角果等组织器官中的相对表达情况进行分析。结果表明,*BnNPR1* 在根、茎、叶、花、角果中都有表达,其中在根中相对表达量最高,而在角果中表达量最少(图 5)。

2.4　*BnNPR1* 在各种植物激素胁迫下的表达分析

已有的许多研究报道显示,水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)、脱落酸(ABA)、乙烯(ET)等激素在调控植物防卫反应及抗逆胁迫中具有重要作用。为了研究 *BnNPR1* 是否与这些激素途径相关或可能参与其中的途径,笔者用上述植物激素或其类似物处理甘蓝型油菜宁油 12 后,QRT – PCR 分析结果显示,SA、JA 和 ABA 均可显著激活 *BnNPR1* 的表达,但激活程度不



黑色背景为相同序列，灰色背景为同源的氨基酸序列；甘蓝型油菜（XP_013741384.1）、拟南芥NP_176610.1)、辣椒（NP_001312028.1）、烟草（NP_001313196.1）、葡萄（XP_002281475.1）、水稻（XP_015622114.1）、玉米（DAA52994.1）

图2　BnNPR1 与其他物种的氨基酸序列比对及其序列分析

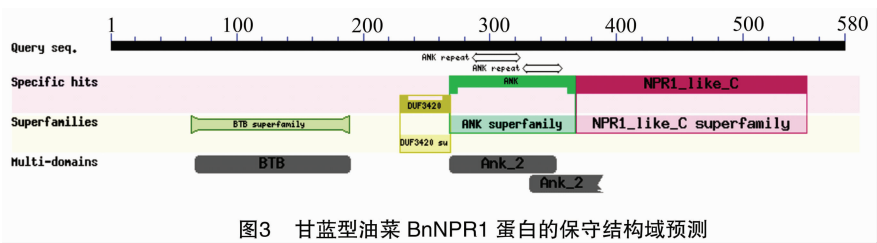
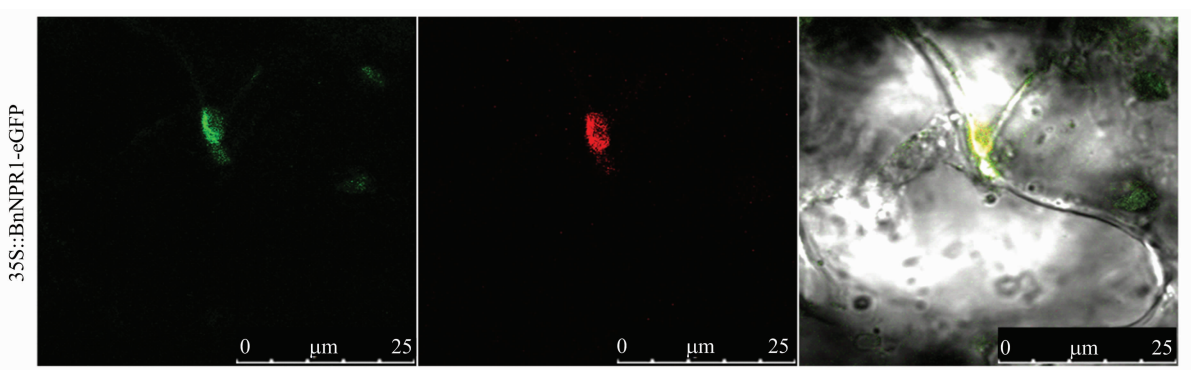


图3　甘蓝型油菜 BnNPR1 蛋白的保守结构域预测



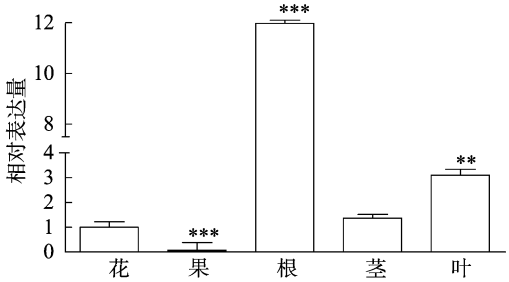
烟草中瞬时表达 *BnNPR1* 后亚细胞定位；从左到右：基因绿色荧光、核 marker 基因红色荧光和合并后的图像

图4　BnNPR1 的亚细胞定位

同，而 ET 对其表达影响不明显。SA 处理后 *BnNPR1* 的表达量极显著提高，特别是在 6 h 时表达上调到未处理时的近 20 倍；在 JA 和 ABA 处理后，*BnNPR1* 也有上调表达；而在 ET 处理后，*BnNPR1* 的表达量未发生明显变化（图 6）。这些结果表明，*BnNPR1* 是激素 SA、JA 和 ABA 的响应因子，*BnNPR1* 可能在调控植物防卫反应及各种环境胁迫中，主要参与到 SA 和 JA 相关的信号网络中。

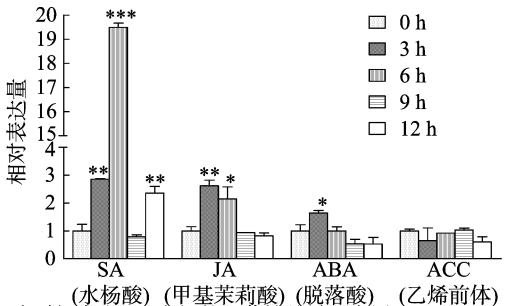
2.5　*BnNPR1* 在各种环境因子胁迫下的表达分析

在模拟低温、重金属、干旱、高盐这 4 种环境因子胁迫处理条件下，调查甘蓝型油菜 *BnNPR1* 基因的表达情况。结果如图 7 所示，在低温处理 1 h 时 *BnNPR1* 的表达量显著上调；在 PEG 溶液处理 3 h 时 *BnNPR1* 的表达也上调明显。与此同



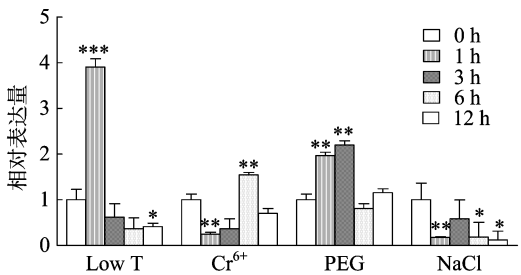
每个组织和对照之间的表达差异程度用*(P<0.05) **(P<0.01)***(P<0.001)表示

图5　*BnNPR1* 组织器官表达分析



每个时间点和 0 h 之间的显著性差异程度用***(P<0.001)、**(P<0.01)和*(P<0.05)表示

图6　*BnNPR1* 对各种激素处理的表达响应



Low T—4℃低温；Cr^{6+}—重金属镉离子；PEG—聚乙二醇(模拟干旱)；NaCl—盐；每个时间点和 0 h 之间的显著性差异程度用***(P<0.001)、**(P<0.01)和* (P<0.05)表示

图7　*BnNPR1* 对各种环境胁迫因子的表达响应

时，在 $K_2Cr_2O_7$ 溶液和低温处理的条件下，*BnNPR1* 的表达量也出现较明显的变化。由这些结果可知，*BnNPR1* 是低温、重金属、干旱、高盐等各种环境胁迫因子的响应基因。

3　讨论与结论

油菜是重要的油料作物，在食品、冶金、机械等多种行业应用广泛，经济价值高[20]。不良的环境条件会对植物生长产生不好的影响，甚至严重时会威胁到油菜的正常生产。目前，有关 *NPR1* 的研究主要集中在拟南芥、烟草以及水稻中，而关于 *NPR1* 在甘蓝型油菜中还未有研究或未见报道。本研究从甘蓝型油菜中克隆了 *BnNPR1*，并系统地研究了其在各种防卫信号分子和环境因子胁迫下的表达响应，结果显示，*BnNPR1* 是 SA 和 JA 以及低温、重金属、干旱、高盐等各种环境胁迫及激素胁迫因子的响应基因。

迄今为止，多种植物的 *NPR1* 同源基因已被克隆，并且展开了这个基因的植物抗逆功能的研究。在拟南芥(*Arabidopsis*)中，*AtNPR1* 参与增强由 SA 介导的 flg22 诱导的 MPK3 和 MPK6 的激活[21]，本研究 SA 处理条件下，*BnNPR1* 的表达量极显著升高，特别是在 6 h 时表达量上调到未处理时的近 20 倍，表明 *NPR1* 在 SA 途径中发挥重要作用；在烟草(*Nicotiana attenuata*)中，其 *NPR1* 通过影响早期酶的合成途径参与 JA 生物合成的诱导[22]，本调查结果也发现在 JA 的处理下，*BnNPR1* 的表达量响应显著，说明 *NPR1* 可能在油菜中也参与 JA 信号途径。这些研究结果共同指出 *NPR1* 在 SA 和 JA 等防卫信号途径中起作用。

当植物受到外界环境胁迫时，其生物胁迫与非生物胁迫中的防卫反应信号调控机制是复杂的。Jayakannan 等在拟南芥中发现，依赖于水杨酸途径的 *NPR1* 缺失突变体在盐胁迫下表现为敏感的，表明 *NPR1* 依赖的 SA 信号途径对盐是非常重要的[10]。Liu 等在拟南芥中发现 ET/SA 双突变体比 ET 敏感单突变体(ein2)和 SA 敏感单突变体(npr1)对低温处理更加敏感，表明除了 SA 途径，ET 信号途径也在低温胁迫中起作用[12]。本研究对甘蓝型油菜的调查结果显示，*BnNPR1* 是盐和低温胁迫的响应因子。另外，本研究首次发现 *BnNPR1* 也是重金属环境胁迫的响应基因。本研究的数据将为进一步研究 *BnNPR1* 在油菜抗逆中的功能及其机制提供线索。

参考文献：

[1] Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, et al. The *Arabidopsis NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats[J]. Cell, 1997, 88(1): 57 – 63.

[2] Spoel S H, Koornneef A, Claessens S M, et al. NPR1 modulates cross – talk between salicylate – and jasmonate – dependent defense pathways through a novel function in the cytosol[J]. Plant Cell, 2003, 15(3): 760 – 770.

[3] Cao H, Bowling S A, Gordon A S, et al. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance[J]. Plant Cell, 1994, 6(11): 1583 – 1592.

[4] Yu D, Chen C, Chen Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression[J]. Plant Cell, 2001, 13(7): 1527 – 1540.

[5] Ryals J, Weymann K, Lawton K, et al. The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B[J]. Plant Cell, 1997, 9(3): 425 – 439.

[6] Mou Z, Fan W, Dong X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate *NPR1* function through redox changes[J]. Cell, 2003, 113(7): 935 – 944.

[7] Sugano S, Jiang C J, Miyazawa S I, et al. Role of *OsNPR1* in rice defense program as revealed by genome – wide expression analysis[J]. Plant Molecular Biology, 2010, 74(6): 549 – 562.

[8] Zhang J Y, Qu S C, Qiao Y S, et al. Overexpression of the *Malus hupehensis MhNPR1* gene increased tolerance to salt and osmotic stress in transgenic tobacco[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(3): 1553 – 1561.

[9] Jayakannan M, Bose J, Babourina O, et al. Salicylic acid in plant salinity stress signalling and tolerance[J]. Plant Growth Regulation, 2015, 76(1): 25 – 40.

[10] Jayakannan M, Bose J, Babourina O, et al. The *NPR1* – dependent salicylic acid signalling pathway is pivotal for enhanced salt and oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(7): 1865 – 1875.

虞　杭,张得芳,樊光辉,等. 枸杞转录组 SSR 分布特征分析及其与基因组 SSR 分布特征的比较[J]. 江苏农业科学,2018,46(14):24 - 27.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2018.14.006

枸杞转录组 SSR 分布特征分析及其与基因组 SSR 分布特征的比较

虞　杭[1], 张得芳[1,2], 樊光辉[1,2], 王占林[1,2]
(1. 青海大学,青海西宁 810016; 2. 青海省农林科学院/青海高原林木遗传育种实验室,青海西宁 810016)

摘要:通过 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台,利用 RNA - Seq 技术对青杞 1 号品种整体转录活动进行检测,并对得到的序列采用生物信息学手段进行拼接后查找 SSR,然后与基因组 SSR 进行比较。结果显示,转录组共获得 5 411 个重复单元长度为 2 ~ 6 碱基的微卫星重复序列,2 碱基重复的微卫星最为丰富,共 2 666 个,占 49.27%,其中 AG/CT 基序的重复数量最多;3 碱基重复类型有 2 609 个,占重复序列总数的 48.22%;4 碱基重复 118 个,5 碱基重复 10 个,6 碱基重复 8 个,分别占重复序列总数的 2.18%、0.18%、0.15%。而基因组共获得 14 733 个重复单元为 2 ~ 6 碱基的微卫星重复序列,3 碱基重复的微卫星最为丰富,共 9 799 个,占 66.51%,其中 GTT/CAA 基序的数量最多。青杞 1 号转录组 SSR 与基因 SSR 在重复序列分布上存在显著差异。

关键词:枸杞;RNA - Seq 技术;转录组;微卫星;遗传图谱
中图分类号: S567.1^{+}9　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 - 1302(2018)14 - 0024 - 04

枸杞(*Lycium barbarum*)属于茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium* L.)落叶灌木,是重要的药用资源,其果、叶、根等均能被利用,在中药配方中有重要地位[1-2]。枸杞的营养含量非常丰富,富含蛋白质、维生素和多种氨基酸,还有类胡萝卜素以及钙、铁、锌、硒等对人体有益的元素,有很高的药用价值和保健效果。枸杞不仅有美容养生和抗衰老的功效,还具有抗癌、降血糖、降血脂以及护眼等功能[3-7]。

转录组是指某个物种或细胞在某一条件下所有转录产物的集合。RNA - Seq 技术能够在单核苷酸水平对特定物种的整体转录活动进行检测,以提供最全面的转录组信息[8-12]。同样,RNA - Seq 技术的应用也非常普遍,利用此技术鉴定油

收稿日期:2017 - 05 - 19
基金项目:青海省科技计划(编号:2014 - NS - 522);青海省自然科学基金青年科学基金(编号:2015 - ZJ - 926Q);青海省重大科技专项(编号:2015 - NK - A2);青海高原林木遗传育种实验室(编号:2017 - ZJ - Y29)。
作者简介:虞　杭(1994—),男,浙江义乌人,硕士研究生,主要从事森林培育方面的研究。E - mail:513859965@qq.com。
通信作者:王占林,研究员,主要从事森林培育和林木育种方面的研究。E - mail:1735105720@qq.com。

[11] Rengasamy P. World salinization with emphasis on Australia[J]. Journal of Experimental Botany,2006,57(5):1017 - 1023.
[12] Liu J Y, Zhu Y, Huang L L, et al. Combined effect of ethylene - and salicylic acid - signaling insensitive mutation on *Arabidopsis* response to low temperature[J]. Biologia Plantarum,2016,60(3):523 - 531.
[13] Xia J C, Zhao H, Liu W Z, et al. Role of cytokinin and salicylic acid in plant growth at low temperatures[J]. Plant Growth Regulation,2008,57(3):211 - 221.
[14] Hao L, Zhao Y, Jin D D, et al. Salicylic acid - altering *Arabidopsis* mutants response to salt stress[J]. Plant and Soil,2012,354(7):81 - 95.
[15] Zhang J Y, Qu S C, Du X L, et al. Overexpression of the *Malus hupehensis MhTGA2* gene, a novel bZIP transcription factor for increased tolerance to salt and osmotic stress in transgenic tobacco[J]. International Journal of Plant Sciences,2012,59(5):441 - 453.
[16] Quilis J, Peñas G, Messeguer J, et al. The *Arabidopsis AtNPR1* inversely modulates defense responses against fungal, bacterial, or viral pathogens while conferring hypersensitivity to abiotic stresses in transgenic rice[J]. Molecular Plant - Microbe Interactions,2008,21(9):1215 - 1231.
[17] 陈　宇. 油菜在多种逆境条件下 qRT - PCR 内参基因的稳定性评估及抗逆相关基因的表达分析[D]. 镇江:江苏大学,2014.
[18] Chou K C, Shen H B. Plant - mPLoc: a top - down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization[J]. PLoS One,2010,5(6):e11335.
[19] Wang Z, Chen Y, Fang H, et al. Selection of reference genes for quantitative reverse - transcription polymerase chain reaction normalization in *Brassica napus* under various stress conditions[J]. Molecular Genetics and Genomics,2014,289(5):1023 - 1035.
[20] 汪　雷,刘　瑶,丁一娟,等. 油菜菌核病研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,43(10):85 - 93.
[21] Kallenbach M, Alagna F, Baldwin I T, et al. Nicotiana attenuata *SIPK*, *WIPK*, *NPR1*, and fatty acid - amino acid conjugates participate in the induction of jasmonic acid biosynthesis by affecting early enzymatic steps in the pathway[J]. Plant Signaling & Behavior,2010,152(1):96 - 106.
[22] Yi S Y, Min S R, Kwon S Y. *NPR1* is instrumental in priming for the enhanced flg22 - induced MPK3 and MPK6 activation[J]. Plant Pathology Journal,2015,31(2):192 - 194.