

# 利用转录组及 iTRAQ 技术筛选高油酸油菜抗病相关基因

张振乾<sup>1,2</sup>, 肖 钢<sup>1</sup>, 官春云<sup>1</sup>, 邬贤梦<sup>1</sup>, 熊兴华<sup>1</sup>, 李云昌<sup>2</sup>, 胡 琼<sup>2</sup>, 陈社员<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学 农学院, 南方粮油作物协同创新中心, 湖南 长沙 410128; 2. 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:**高油酸油菜和低油酸油菜对菌核病的抗性存在显著差异,为了弄清其分子机理,以一组高油酸油菜近等基因系自交授粉后 20~35 d 的种子为材料,分别进行转录组和同位素相对标记与绝对定量技术分析。分析了与抗病相关的氧化磷酸化、植物激素信号转导通路和植物病原体互作 3 个分类,将注释的基因和蛋白进行关联,并对其中可能与抗病相关的基因进行定量 PCR 验证。结合前人研究发现,基因表达或蛋白表达发生显著变化的基因 gi|260505503 (多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白)、gi|226346102 (HSR203J 类蛋白)、gi|470103214 (钙调蛋白类)与抗病相关;而 gi|297843222 (结合蛋白)、gi|18397961 (2-铁,2-硫-铁氧化还原类蛋白)、gi|196052306 (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚基)、gi|18423437 (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(辅酶)1 $\alpha$ -复形 5)和 gi|297794581 (激酶家族蛋白)等基因差异显著。

**关键词:**菌核病;高油酸油菜;转录组;同位素相对标记与绝对定量技术;定量 PCR

**中图分类号:**S565.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)05-0016-09

**doi:**10.7668/hbxb.2015.05.003

## The Study of High Oleic Acid Rapeseed Disease Resistance Related Genes by Transcriptome and iTRAQ Analysis

ZHANG Zhen-qian<sup>1,2</sup>, XIAO Gang<sup>1</sup>, GUAN Chun-yun<sup>1</sup>, WU Xian-meng<sup>1</sup>,  
XIONG Xing-hua<sup>1</sup>, LI Yun-chang<sup>2</sup>, HU Qiong<sup>2</sup>, CHEN She-yuan<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops in China, Changsha 410128, China; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** There are obvious differences between high oleic acid rapeseed and low oleic acid rapeseed on *sclerotinia sclerotiorum* resistance. In order to find out the molecule mechanism, the high oleic acid rapeseed inbred line seeds 20-35 d after pollination were used as material for transcriptome analysis and iTRAQ analysis respectively in this study. The classifications associated with disease resistance were oxidative phosphorylation, plant hormone signal transduction and plant-pathogen interaction were discussed, and the relationship between differential genes and the corresponding protein were investigated too. Then real-time quantitative PCR (qPCR) analysis was used to verify the expression levels of differentially expressed genes which may be associated with disease resistance. Combined with previous study, the genes related with disease resistance were: gi|260505503 (polygalacturonase inhibitory protein), gi|226346102 (HSR203J-like protein) and gi|470103214 (caltractin-like). And the genes of gi|297843222 (binding protein), gi|18397961 (2Fe-2S ferredoxin-like protein), gi|196052306 (NADH dehydrogenase subunit), gi|18423437 (NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 $\alpha$  subcomplex 5) and gi|297794581 (kinase family protein) have obvious difference.

**收稿日期:**2015-08-07

**基金项目:**“973”项目(2015CB150206);国家自然科学基金项目(31201240;31000722);“863”项目(2012AA101107-3);湖南省科技重大专项(2014FJ1006);农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室开放课题(2014008);湖南农业大学作物学开放基金项目(ZWKF201302)

**作者简介:**张振乾(1977-),男,河南南阳人,博士,副教授,主要从事油菜育种研究。

**通讯作者:**李云昌(1955-),男,湖北崇阳人,博士,教授,主要从事油菜育种研究。

官春云(1938-),男,湖北荆州人,教授,主要从事油菜育种、栽培研究。

**Key words:** *Sclerotinia sclerotiorum*; High oleic acid rapeseed; Transcriptome; Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ); Real-time quantitative PCR (qPCR)

油菜菌核病是中国油菜三大病害(油菜菌核病、病毒病和霜霉病)之首,常年株发病率高达 10%~30%,严重的达 80% 以上;病株一般减产 10%~70%,对油菜产量影响较大。高油酸油菜菜籽中油酸含量高,因而其菜籽油有较好的营养保健功能<sup>[1]</sup>,是一种可以与橄榄油、茶油相媲美的新型优质食用油,近年来相关的研究较多<sup>[2-6]</sup>。

但高油酸油菜的农艺性状稍差<sup>[7]</sup>,使其大规模推广受到一定影响,因而高油酸油菜的抗病能力提高将是其育种研究中一个急需解决的问题。转录组是目前最有效的规模化鉴定功能基因的高通量技术<sup>[8-10]</sup>,同位素标记相对和绝对定量(Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术可同时对 2~8 个样品进行相对定量研究,具有很好的精确性和重复性,是目前在比较蛋白质组学上应用效果较好的标记技术之一<sup>[11]</sup>。蛋白质组与转录组从 2 个不同的层面反映了基因表达的情况,将基于 mRNA 水平和蛋白质水平的表达结果,根据不同的关联类型分别讨论<sup>[12]</sup>,可实现数据互补,得到生物体更加完整的表达信息。表达变化趋势相同的蛋白质和 mRNA 信息,进一步印证和解释了生物体的某些重要机制<sup>[13-14]</sup>,而表达变化趋势相反的蛋白质和 mRNA 信息,也解释了从单一技术无法解释的现象<sup>[15-16]</sup>。目前已有不少基于转录组及 iTRAQ 分析的研究报道<sup>[17-18]</sup>。

湖南农业大学油料所对一组高油酸油菜近等基因系(油酸含量分别为 81.4% 和 56.2%)材料进行农艺性状观察中发现,二者之间菌核病抗性存在显著差异。为了研究高油酸油菜菌核病抗性的分子机理,在本研究中以近等基因系材料自交授粉后 20~35 d 的种子为材料,分别进行转录组和 iTRAQ 分析及后续的分析,以期从中筛选与菌核病相关的基因及蛋白,为高油酸油菜育种提供参考,加快其研究进程。

# 1 材料和方法

## 1.1 试验材料

高油酸油菜近等基因系材料(高油酸品系油酸含量 81.4%,低油酸油菜品系油酸含量 56.2%)由湖南农业大学油料所通过正反交培育得到,且通过自交筛选 4 年,性状稳定。该材料于 2012 年 9 月 28 日至 2013 年 5 月 4 日种植于湖南农业大学耘园油

菜基地,每个材料小区面积 6 m<sup>2</sup>,播种密度 10 株/行,共 5 行,3 个重复。每个小区 20 株油菜自交套袋,取授粉后 20~35 d 部分种子混合保存于 -80 ℃ 备用,其余 30 株油菜不套袋。

## 1.2 试验方法

1.2.1 病害情况观察 2013 年 5 月 1 日观察发现,自交套袋的高油酸油菜植株菌核病发病率为 38.4% (20 株/小区),而未自交套袋的高油酸油菜植株菌核病发病率为 21.1% (30 株/小区);自交套袋的低油酸油菜植株发病率为 11.7% (20 株/小区),未自交套袋的低油酸油菜植株 2.2% (30 株/小区)。调查结果显示,自交套袋对菌核病抗性有一定影响,油酸含量不同的油菜间菌核病株有明显差异;同时,菌核病染病数较高也可能与 2013 年 4 月雨水较多有一定关系。

1.2.2 转录组分析 以授粉后 20~35 d 油菜种子为材料,采用 TRIzol 法提取 RNA,并检测其质量,高油酸材料和低油酸材料的 OD<sub>260/280</sub> 分别为 1.90 和 1.94,OD<sub>260/230</sub> 为 1.89 和 1.8, RIN 为 8.0 和 8.2, 28S/18S 为 1.4 及 1.5,符合测序要求。使用 DNase I 消化 DNA 后,用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集 mRNA;加入打断试剂在 Thermomixer 中适温将 mRNA 打断成短片段,以打断后的 mRNA 为模板合成一链 cDNA,然后配制二链合成反应体系合成双链 cDNA,并使用试剂盒纯化回收、黏性末端修复、cDNA 的 3'末端加上碱基“A”并连接接头,然后进行片段大小选择,最后进行 PCR 扩增;构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 质检合格后,使用 Illumina HiSeq™ 2000 进行测序。将所得的 uni 转录物序列与 NR、Swiss-Prot 等蛋白数据库进行 Blastx 本地批量比对,获取最佳注释(E-value < = 1e-05)。

1.2.3 iTRAQ 分析 以授粉后 20~35 d 油菜种子为材料,采用 TCA/丙酮法提取蛋白,利用 Bradford 定量方法测定浓度,12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,每个样品精确取出 100 μg 蛋白,按蛋白:酶 = 20:1 的比例加入 Trypsin,37 ℃ 酶解 4 h;按上述比例再补加 Trypsin 一次,37 ℃ 继续酶解 8 h。胰蛋白酶消化后,用真空离心泵抽干肽段。用 0.5 mol/L TE-AB 复溶肽段,按照手册进行 iTRAQ 标记。采用岛津 LC-20AB 液相系统、分离柱为 4.6 mm × 250 mm 型号的 UltremexSCX 柱对样品进行液相分离,基于

Triple TOF 5600 的 LC-ESI-MSMS 分析。蛋白丰度差异倍数达到 1.5 倍以上,且经统计检验其  $P$ -value 值小于 0.05 时,视为差异蛋白。参考白菜、拟南芥及甘蓝数据库,进行肽段及蛋白质的鉴定。

1.2.4 数据处理 以低油酸材料为对照,设置 cut-off 条件筛选出差异表达的关联基因和蛋白质,蛋白差异表达倍数大于 1.5,  $P$ -value  $\leq 0.05$ ; 基因差异表达倍数  $\geq 2$ ,  $P$ -value  $\leq 0.001$ 。参考本实验室油菜菌核病方面的研究<sup>[19-20]</sup>,与抗病相关的基因主要在氧化磷酸化、植物激素信号转导通路和植物病原体互作 3 个类别,故在本试验中对这 3 个类别的基因及蛋白进行分析。

1.2.5 定量 PCR 验证 选用转录组分析和 iTRAQ 分析相同的材料,采用植物 RNA 提取试剂盒 (Omega, USA) 进行总 RNA 提取。cDNA 合成采用 Prime Script™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Clone tech, USA)。引物根据基因的 DNA 序列采用 Primer 5.0 软件设计。反应采用两步循环法在 CFX96™ Real-Time System (BIO-RAD, USA) 中进行<sup>[4]</sup>, *UBC21* (Ubiquitin-conjugating enzyme 21) 作为内参基因,序列为: 5'-CCTCTGCAGCCTCCTCAAGT-3' (F), and 5'-CATATCTCCCCTGTCTTGAAATGC-3' (R)。相关基因的评价采用比较循环阈值法<sup>[21]</sup>。数据分析采用方差分析和事后检定法,  $P < 0.05$  为显著性差异。引物序列如表 1 所示。

表 2 转录组分析得到的与抗病有关的基因

Tab. 2 The differential genes involved in disease-resistant by transcriptome analysis						
代谢途径 Pathway	注释的差异基因 DEGs genes with pathway annotation (2 043)	注释的所有基因 All genes with pathway annotation (24 345)	代谢途径 ID Pathway ID	分类 1 Level 1	分类 2 Level 2	
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	44 (2.15%)	424 (1.74%)	ko00190	代谢	能量代谢	
植物激素信号转导通路 Plant hormone signal transduction	84 (4.11%)	1 194 (4.90%)	ko04075	环境信息处理	信号传导	
植物病原体互作 Plant-pathogen interaction	94 (4.60%)	967 (3.97%)	ko04626	生物体系统	环境适应	

2.2 iTRAQ 分析得到的与抗病相关的蛋白  
在 iTRAQ 分析中,2 个材料间蛋白差异表达在

表 1 定量 PCR 引物序列	
Tab. 1 Primer sequences used in qPCR	
基因编号 GI number	引物序列(5'-3') Sequence
gi 297843222	F: TTGTTACACGAAAGCCATTA R: GATTCCGAGAAGAAAGATAG
gi 18397961	F: CTCTAATCGTTCCGACATCC R: GCGGATGTGCGAACGATTAG
gi 196052306	F: AAAGGGTCCTGATGTAAGTGG R: GTAGCCACTGGAGCCATTCT
gi 226346102	F: TCTTCCACGACTTCTGCTCC R: GGAGCAGAAAGTCGTGGAAGA
gi 260505503	F: CCTCCTCAAATGACAAGAAT R: GGAGGGCATTCTTGTCATTT
gi 470103214	F: GTTTCCAAATGGCGACCCTA R: TCAATAGTGCCTGAGCCATC
gi 18423437	F: TTGGCTAAAGTGAAGCAGAC R: CGTCCGATTGCCCGTAGAAA
gi 297794581	F: CTAAGCGTCAACAACAACAG R: GCTCTACTTGTTCGTCATC

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组分析得到的与抗病相关的基因

高油酸材料与低油酸材料表达差异在 2 倍以上的基因按照其功能分为 119 类,其中与抗病相关的有 3 个分类:氧化磷酸化、植物激素信号转导通路和植物病原体互作,如表 2 所示。

1.5 倍以上的蛋白有 3 568 个,其中与抗病相关的如在表 3 所示。

表 3 iTRAQ 分析得到的与抗病相关的蛋白

Tab. 3 The differential proteins involved in disease-resistant by iTRAQ		
代谢途径 Pathway	注释的差异蛋白 Different proteins with pathway annotation (3 568)	代谢途径 ID Pathway ID
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	103 (2.89%)	ko00190
植物激素信号转导通路 Plant hormone signal transduction	45 (1.26%)	ko04075
植物病原体互作 Plant-pathogen interaction	62 (1.74%)	ko04626

### 2.3 抗病相关的基因与蛋白间的关联分析

2.3.1 和蛋白关联的基因 将转录组和 iTRAQ 的结果进行分析,有 1 460 个基因及其对应的蛋白均有表达差异,其中与抗病相关的 3 个类别如表 4 所示。

由表 4 可知,氧化磷酸化、植物病原体互作和植物激素信号转导通路 3 个分类的关联基因分别为 53,21,19 个,结果如表 5~7 所示。

表 4 和蛋白表达有关联的基因

Tab. 4 The genes correlation with proteins

代谢路径	注释的差异基因	代谢路径 ID
Pathway	Different gene with pathway annotation ( 1 460 )	Pathway ID
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	53 ( 3. 70% )	ko00190
植物病原体互作 Plant-pathogen interaction	21 ( 1. 51% )	ko04626
植物激素信号转导通路 Plant hormone signal transduction	19 ( 1. 37% )	ko04075

由表 5 可知,在 53 个差异基因中,有 19 个功能未知或为预测功能。二氢新蝶呤醛缩酶( Dihydrone-opterin aldolase)可催化产生维生素的前提物质 6-羟甲基-7, 8-二氢新蝶呤( 6-hydroxymethyl-7, 8-dihydropterin),对抗病、抗寄生虫有潜在效果<sup>[22-23]</sup>。抗病相关的基因为 gi|40557572(7,8-二氢新蝶呤醛缩酶突变体 FolB1-delLS)。

表 5 氧化磷酸化类关联基因

Tab. 5 The genes correlation with proteins in Oxidative phosphorylation

基因编号	基因 Nr ID	基因 Nr 注释
Gene ID	Nr-ID	Nr-annotation
CL1395. Contig5_All	gi 15232644	细胞色素 C 氧化酶亚基
CL1556. Contig2_All	gi 21554378	细胞色素 C 氧化酶亚基( 推定的)
CL1595. Contig2_All	gi 297818298	细胞色素 c1 AT3g27240/K17E12_6
CL1959. Contig2_All	gi 15239782	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶( 辅酶)铁-硫蛋白 7
CL2135. Contig3_All	gi 297832628	催化/辅酶结合蛋白
CL2314. Contig2_All	gi 15231675	泛醇-细胞色素 C 还原酶亚基 9
CL2660. Contig1_All	gi 297805184	假定蛋白 ARALYDRAFT_915762
CL2759. Contig2_All	gi 15219265	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶( 辅酶)铁-硫蛋白 8
CL2867. Contig1_All	gi 297844990	假定蛋白 ARALYDRAFT_472256
CL2961. Contig1_All	gi 15242306	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶( 辅酶)黄素蛋白 1
CL2986. Contig3_All	gi 298364396	叶绿体生物素羧化酶
CL3166. Contig2_All	gi 297830496	假定蛋白 ARALYDRAFT_479342
CL3305. Contig2_All	gi 15240627	泛醇-细胞色素 C 还原酶铁-硫亚基
CL3853. Contig2_All	gi 119720766	氢转运 ATP 合成酶
CL429. Contig1_All	gi 297820706	假定蛋白
CL4356. Contig1_All	gi 312190391	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶( 辅酶)氧化还原酶 B18
CL4386. Contig1_All	gi 297824483	假定蛋白 ARALYDRAFT_903878
CL441. Contig3_All	gi 297798092	假定蛋白 ARALYDRAFT_912546
CL5103. Contig1_All	gi 1480014	推定的 ATP 合成酶 δ 亚基
CL5164. Contig5_All	gi 23397307	未知蛋白
CL5350. Contig2_All	gi 15223288	无机焦磷酸酶
CL5492. Contig1_All	gi 1336803	液泡膜 H( + )-ATP 酶亚基
CL6185. Contig1_All	gi 297834026	复合 1 家族蛋白
CL6524. Contig3_All	gi 62319210	液泡焦磷酸酶类蛋白
CL7151. Contig2_All	gi 15242465	水溶无机焦磷酸酶 1
CL7377. Contig1_All	gi 18403216	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶
CL7648. Contig1_All	gi 312282069	未命名蛋白产物
CL766. Contig1_All	gi 359474909	推定的 V 型 ATP 酶 16 kDa 蛋白脂质亚基 c1/c3/c5
CL7855. Contig3_All	gi 15227257	ATP 合成酶 γ 亚基
CL8613. Contig1_All	gi 42563394	非典型蛋白
CL8936. Contig1_All	gi 40557572	7,8-二氢新蝶呤醛缩酶突变体 FolB1-delLS
CL902. Contig2_All	gi 227204477	假定的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶( 辅酶) 24 kDa 亚基 AT4G02580
CL9089. Contig1_All	gi 297791889	推定的蛋白 ARALYDRAFT_494832
CL986. Contig2_All	gi 119720786	氢转移 ATP 合成酶
CL9954. Contig1_All	gi 15242103	H( + )ATP 酶 3
UnigeneI0487_All	gi 12655995	酰基转移蛋白
UnigeneI0629_All	gi 383930460	atpB 基因产物( 线粒体)
UnigeneI1448_All	gi 15229475	V 型质子 ATP 酶亚基 d2

续表 5:

基因编号 Gene ID	基因 Nr ID Nr-ID	基因 Nr 注释 Nr-annotation
Unigene12437_All	gi 383930459	<i>atpA</i> 基因产物(线粒体)
Unigene13463_All	gi 18423437	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(辅酶)1 $\alpha$ -复形 5
Unigene147_All	gi 297832954	泛醌氧化还原酶家族蛋白
Unigene19627_All	gi 383930462	<i>atpF</i> 基因产物(线粒体)
Unigene2496_All	gi 112253918	细胞色素 C 氧化酶亚基 2
Unigene26976_All	gi 196052306	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚基 1
Unigene4524_All	gi 383930459	<i>atpA</i> 基因产物(线粒体)
Unigene7829_All	gi 414591131	推定蛋白 ZEAMMB73_792172
Unigene7902_All	gi 297798716	推定蛋白 ARALYDRAFT_913201
Unigene8726_All	gi 297798734	ATP 合成酶家族蛋白
Unigene9291_All	gi 297802490	推定蛋白 ARALYDRAFT_912916
Unigene958_All	gi 118197450	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(辅酶)氧化还原酶相关类蛋白
Unigene9598_All	gi 297836738	推定蛋白 ARALYDRAFT_480836
Unigene9794_All	gi 297803260	推定蛋白 ARALYDRAFT_913700
Unigene9810_All	gi 112253900	ATP 酶亚基 1

由表 6 可知,在 21 个差异基因中,有 7 个功能未知或为预测功能。多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白(Polygalacturonase inhibitory protein, PGIPs)是广泛存在的植物细胞壁蛋白,直接抵御重要的致病因子——真菌多聚半乳糖醛酸酶(PG)<sup>[24-25]</sup>。SGT1 蛋白调节很多植物抗性蛋白和发育过程中产生的激素对疾病的防御。Azevedo 等<sup>[26]</sup>发现,*SGT1* 基因沉默会导致抗性蛋白表达量下降。AtSGT1b 在疾病防

御和泛素介导的蛋白水解中有一定作用<sup>[27]</sup>。富亮氨酸重复序列受体类蛋白激酶(Leucine-rich repeat sequence receptor-like kinase, LRR-RLK)在植物受体类蛋白激酶家族中是一个较大的亚家族,有防御反应的功能<sup>[28]</sup>。*nls1-1D* 和 *nls1-2D* 的突变均是 CC-NB-LRR 类 R 蛋白 *NLS1* 的 NB 结构域上单个氨基酸的替换。随着 NLS1 这一 R 蛋白的序列改变,*nls1* 突变体内积累了高水平的水杨酸,组成性诱导了抗

表 6 植物病原体互作类关联基因

Tab.6 The genes correlation with proteins in plant-pathogen interaction

基因编号 Gene ID	基因 Nr ID Nr-ID	基因 Nr 注释 Nr-annotation
CL1506. Contig1_All	gi 40974915	茄啮半乳糖基转移酶类蛋白
CL2253. Contig1_All	gi 6560758	F3M18. 23
CL2710. Contig1_All	gi 15220142	甘油激酶
CL7550. Contig1_All	gi 310781310	丝裂原活化蛋白激酶 4
CL9467. Contig1_All	gi 297843222	结合蛋白
Unigene10981_All	gi 186522588	E3 泛素蛋白连接酶 KEG
CL5503. Contig1_All	gi 297799586	推定蛋白 ARALYDRAFT_492441
CL4879. Contig2_All	gi 312282123	未命名蛋白产物
CL479. Contig2_All	gi 75332066	可能钙结合蛋白 CML13
CL4746. Contig1_All	gi 167594027	LRR 类抗病蛋白
CL4282. Contig1_All	gi 297800188	亮氨酸重复家族蛋白
CL4030. Contig1_All	gi 18397961	2-铁,2-硫-铁氧化还原类蛋白
CL3578. Contig2_All	gi 260505503	多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白
CL3578. Contig1_All	gi 260505503	多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白
CL3468. Contig3_All	gi 22330985	ras 群体相关 LRR9 蛋白
CL3075. Contig1_All	gi 71492979	钙依赖蛋白激酶 5
CL3067. Contig3_All	gi 297804102	线粒体延伸因子 tub
CL2765. Contig1_All	gi 297850212	推定蛋白 ARALYDRAFT_889234
Unigene12324_All	gi 470103214	假定钙调蛋白类
Unigene4336_All	gi 42567264	FGGY 家族糖类激酶蛋白
Unigene8339_All	gi 9369365	F10A5. 16

病基因的 表达,同时提高 了对水稻白叶枯病菌 (Xoo) 的抗性<sup>[29]</sup>。植物细胞内 Ras 群体相关富含亮氨酸重复序列型类受体蛋白 (Ras-group-related leucine-rich repeat proteins, PIRLs) 是植物特有的与抗病相关的一类亮氨酸重复序列蛋白<sup>[30]</sup>。GDPKs 在植物抗真菌的防卫应答和抗非生物的伤害应答中也起重要作用<sup>[31]</sup>,付力文<sup>[32]</sup>发现,水稻钙依赖性蛋白激酶 osepck10 和 osepck20 过量表达能提高植物抗病防卫反应。因此,抗病相关的基因为:gi|40974915 (茄 烷半乳糖基转移酶类蛋白,SGT1-like protein); gi|297800188 (亮氨酸重复家族蛋白,Leucine-rich repeat family protein)、gi|167594027 (LRR 类抗病蛋白,LRR-like disease resistance protein)、gi|71492979 (钙依赖激酶,Calcium dependent kinase)、gi|260505503 (多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白, Polygalacturonase inhibitoryprotein)、gi|470103214 (钙调蛋白类, cal-

tractin-like) 和 gi|22330985 (ras 群体相关 LRR9 蛋白,Ras group-related LRR 9 protein)。

由表 7 可知,在 19 个差异基因中,有 8 个功能未知或为预测功能。在大豆花叶病毒侵染大豆诱发产生的过敏性坏死斑过程中,胼胝质通过对胞间连丝颈部的修饰作用进而限制了病毒在胞间的转运,使病毒不能进行长距离运输<sup>[33]</sup>。胼胝质对筛板的修饰是大豆限制 SMV 在维管束中进行长距离运输的主要因素<sup>[34]</sup>。大豆被大豆花叶病毒侵染后,抗病性越强的品种就会在侵染点处越早地积累胼胝质,胼胝质的沉积与大豆抗病毒侵染密切相关<sup>[35]</sup>。因此,抗病相关的基因为:gi|18409239 (胞间连丝胼胝质结合蛋白,Plasmodesmata callose-binding protein) 和 gi|22330985 (Ras 群体相关 LRR9 蛋白,Ras group-related LRR 9 protein)。

表 7 植物激素信号转导通路类关联基因

Tab.7 The genes correlation with proteins in plant hormone signal transduction

基因编号 Gene ID	基因 Nr ID Nr-ID	基因 Nr 注释 Nr-annotation
CL10070. Contig2_All	gi 297819478	假定蛋白 ARALYDRAFT_485224
CL2253. Contig1_All	gi 6560758	F3M18. 23
CL262. Contig1_All	gi 297798794	假定蛋白 ARALYDRAFT_491566
CL2776. Contig2_All	gi 297794581	激酶家族蛋白
CL3468. Contig3_All	gi 22330985	Ras 群体相关 LRR9 蛋白
CL3901. Contig2_All	gi 18409239	胞间连丝胼胝质结合蛋白 4 4
CL4382. Contig2_All	gi 15223025	VH1 互作激酶
CL488. Contig2_All	gi 15231445	U 盒域包涵蛋白 13
CL5435. Contig1_All	gi 75163673	可能的蛋白磷酸酶 2C 58
CL5956. Contig3_All	gi 297820300	假定蛋白 ARALYDRAFT_485970
CL6165. Contig2_All	gi 240256160	葡聚糖内 1,3-β 葡萄糖苷酶 7
CL640. Contig2_All	gi 392311801	A 链,复合 Ja-Ile 拟南芥 Gh3. 11 (Jar1) 晶体结构
CL6683. Contig1_All	gi 297792681	假定蛋白 ARALYDRAFT_918384
CL7410. Contig1_All	gi 15229263	两因素反应调节子 ARR22
CL8234. Contig1_All	gi 89257688	链霉菌酶/脱水酶家族蛋白
Unigene1097_All	gi 297814650	假定蛋白 ARALYDRAFT_904630
Unigene4980_All	gi 297835794	糖基水解酶家族蛋白 17
Unigene6926_All	gi 326519078	预测蛋白
Unigene8706_All	gi 297838277	糖基水解酶家族蛋白 17

2.3.2 蛋白表达差异不显著,mRNA 表达变化显著

将关联基因按照其差异变化进行分析,发现有一部分基因的表达变化在 2 倍以上,但其对应的蛋白差异变化不显著(1.5 倍以下,结果未列出),结果如表 8。

在上述差异基因中,gi|297805184 (假定蛋白,Hypothetical protein)、gi|383930460 (atpB 基因产物,atpB gene product)、gi|383930459 (atpA 基因产物,atpA gene product)、gi|392311801 (A 链,复合 Ja-Ile 拟南芥 Gh3. 11 (Jar1) 晶体结构;Chain A, Crystal

Structure Of Arabidopsis Thaliana Gh3. 11 (Jar1) In Complex With Ja-Ile)、gi|112253900 (ATP 酶亚基,ATPase subunit)、gi|15227257 (ATP 合成酶 γ 亚基,ATP synthase subunit gamma) 等基因明显与抗病关系不大。因此,gi|297843222 (结合蛋白,Binding protein)、gi|18397961 (2-铁,2-硫-铁氧化还原类蛋白,2Fe-2S ferredoxin-like protein) 和 gi|196052306 (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚基 1,NADH dehydrogenase subunit) 等差异基因功能有待进一步研究。

2.3.3 蛋白表达差异显著,mRNA 表达无显著差异的基因或蛋白 将关联基因按照其差异变化进行分析,发现有一部分蛋白的表达变化在 1.5 倍以上,但其对应的基因差异变化不显著(2 倍以下),结果如表 9 所示。

表 8 蛋白表达差异不显著,mRNA 表达变化显著的基因

Tab.8 The differential genes with obviously change in mRNA express and little in protein				
代谢途径 Pathway	注释的差异基因 Different gene with pathway annotation (139)	基因编号 Gene ID	基因 Nr ID Nr-ID	基因 Nr 注释 Nr-annotation
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	6 (4.32%)	CL2660. Contig1_All	gi 297805184	假设蛋白 ARALYDRAFT_915762
		CL7855. Contig3_All	gi 15227257	ATP 合成酶 $\gamma$ 亚基 ATP
		Unigene10629_All	gi 383930460	<i>atpB</i> 基因产物(线粒体)
		Unigene26976_All	gi 196052306	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚基 1
		Unigene4524_All	gi 383930459	<i>atpA</i> 基因产物(线粒体)
植物病原体互作 Plant-pathogen interaction	2 (1.44%)	Unigene9810_All	gi 112253900	ATP 酶亚基 1
		CL4030. Contig1_All	gi 18397961	2-铁,2-硫-铁氧化还原类蛋白
		CL9467. Contig1_All	gi 297843222	结合蛋白
植物激素信号转导通路 Plant hormone signal transduction	1 (0.72%)	CL640. Contig2_All	gi 392311801	A 链,复合 Ja-Ile 拟南芥 Gh3.11 (Jar1)晶体结构

表 9 蛋白表达差异显著,mRNA 表达差异不显著的基因

Tab.9 The differential genes with obviously change in protein express and little in mRNA				
代谢途径 Pathway	注释的差异基因 Different gene with pathway annotation (176)	基因编号 Gene ID	基因 Nr ID Nr-ID	基因 Nr 注释 Nr-annotation
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	2 (1.14%)	CL902. Contig2_All	gi 227204477	AT4G02580
		Unigene13463_All	gi 18423437	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(辅酶)1 $\alpha$ -复形 5
植物病原体互作 Plant-pathogen interaction	4 (2.27%)	CL2710. Contig1_All	gi 15220142	甘油激酶
		CL3578. Contig1_All	gi 260505503	多聚半乳糖醛酶抑制蛋白
		CL3578. Contig2_All	gi 260505503	多聚半乳糖醛酶抑制蛋白
		Unigene12324_All	gi 470103214	假定钙调蛋白类
植物激素信号转导通路 Plant hormone signal transduction	3 (1.70%)	CL2776. Contig2_All	gi 297794581	激酶家族蛋白
		CL8234. Contig1_All	gi 89257688	链霉菌酶/脱水酶家族蛋白
		Unigene9230_All	gi 226346102	HSR203J 类蛋白

在上述差异基因中,gi|260505503(多聚半乳糖醛酶抑制蛋白,Polygalacturonase inhibitory protein)和 gi|470103214(钙调蛋白类,Caltractin-like)与抗病相关。*HSR203J* 是烟草中的一个防卫基因,当烟草叶片接种烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)后,*HSR203J* 基因迅速在局部表达。进一步研究发现,该基因启动子的调控与发育阶段和组织特异性无关,同时对环境刺激或外源植物信号分子没有反应,该启动子是一个严格由病原物和病原物激发子诱导的启动子<sup>[36]</sup>。Belbahri 等<sup>[37]</sup> 将 HSR203J 启动子与来自青枯菌的 *popA* 基因相连,转入烟草植株,发现诱导表达的 *popA* 基因定位在感病部位,且转基因植株对烟草疫霉具有高度抗性。周鑫<sup>[38]</sup> 采用 HSR203J 启动子控制抗病基因 *CfHNNII* 的表达,烟草疫霉的侵染诱导了 *CfHNNII* 的强烈表达,病菌侵染还诱发过敏性反应的标志基因 *HSR203J* 和 *PR* 的表达,对烟草疫霉病菌侵染的抗

性提高。gi|18423437(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(辅酶)1 $\alpha$ -复形 5,NADH dehydrogenase(ubiquinone)1alpha subcomplex 5)和 gi|297794581(激酶家族蛋白,Kinase family protein)的功能有待于进一步研究。

2.4 定量 PCR 验证结果

根据上述分析结果,将 gi|297843222、gi|18397961、gi|196052306、gi|226346102、gi|260505503、gi|470103214、gi|18423437和 gi|297794581 等差异基因进行转录水平的验证,结果如图 1 所示。

由图 1 可知,定量 PCR 结果与转录组测序结果一致。gi|297843222(结合蛋白,Binding protein)为上调表达,gi|18397961(2-铁,2-硫-铁氧化还原类蛋白,2Fe-2S ferredoxin-like protein)和 gi|196052306(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚基 1,NADH dehydrogenase subunit)为下调表达,其余基因差异较小。

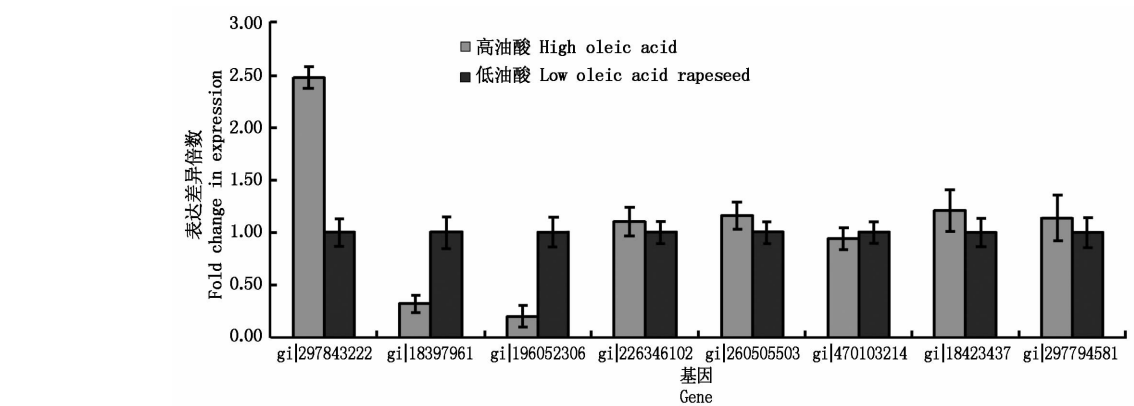


图 1 相关基因的定量 PCR 验证

Fig.1 Real-time PCR analysis of the transcript levels of relative genes

### 3 结论与讨论

#### 3.1 结论

通过对高油酸油菜近等基因系材料进行转录组分析及 iTRAQ 分析,发现在转录组分析中 2 组材料共有 24 345 个基因被注释,其中差异在 2 倍以上的基因有 2 043 个,按照其功能分为 119 类,与抗病相关的氧化磷酸化、植物激素信号转导通路和植物病原体互作分类中差异基因分别为 44, 84, 94 个。iTRAQ 分析中差异表达在 1.5 倍以上的蛋白有 3 568 个,其中氧化磷酸化、植物激素信号转导通路和植物病原体互作分类中差异蛋白分别为 103, 45, 62 个。

将转录组分析结果与 iTRAQ 分析结果进行关联分析,发现在基因表达和蛋白表达中均有差异的基因有 1 460 个,其中在氧化磷酸化、植物激素信号转导通路和植物病原体互作分类中分别为 53, 19, 21 个。蛋白表达差异不显著,mRNA 表达变化在 2 倍以上的有 139 个基因,氧化磷酸化、植物激素信号转导通路和植物病原体互作分类中分别为 6, 1, 2 个;而蛋白表达差异显著,mRNA 表达差异不显著的有 176 个基因,氧化磷酸化、植物激素信号转导通路和植物病原体互作分类中分别为 2, 3, 4 个。

#### 3.2 讨论

本研究基因表达或蛋白表达发生显著变化的基因中,gi|260505503(多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白, Polygalacturonase inhibitory protein)、gi|226346102(HSR203J 类蛋白, HSR203J-like protein)和 gi|470103214(钙调蛋白类, Caltractin-like)前人研究发现与抗病相关;而 gi|297843222(结合蛋白, Binding protein), gi|18397961(2-铁, 2-硫-铁氧化还原类蛋白, 2Fe-2S ferredoxin-like protein)、gi|196052306(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚基, NADH dehydrogenase subunit)、gi|18423437(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(辅酶)1 $\alpha$ -复形 5, NADH dehydrogenase

(ubiquinone) 1alpha subcomplex 5)和 gi|297794581(激酶家族蛋白, Kinase family protein)等差异基因功能需进一步研究。

#### 参考文献:

[1] 张振乾,肖 钢,谭太龙,等.高油酸油菜研究进展及其前景展望[J].作物杂志,2009(5):1-6.

[2] Jung J H, Kim H, Go Y S, et al. Identification of functional *BrFAD2-1* gene encoding microsomal delta-12 fatty acid desaturase from *Brassica rapa* and development of *Brassica napus* containing high oleic acid contents[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(10):1881-1892.

[3] 肖 钢,张宏军,彭 琪,等.甘蓝型油菜油酸脱氢酶基因(*fad2*)多个拷贝的发现及分析[J].作物学报, 2008, 34(9):1563-1568.

[4] Zhang Z Q, Xiao G, Liu R Y, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins between Xiangyou 15 variety and the mutant M15[J]. Frontiers of Biology, 2014, 9(3):234-243.

[5] Suresha G S, Santha I M. Molecular cloning and in silico analysis of novel oleate desaturase gene homologues from *Brassica juncea* through sub-genomic library approach[J]. Plant Omics, 2013, 6(1):55-64.

[6] Karine V, Maarten D B, Nele H, et al. Ozone effects on yield quality of spring oilseed rape and broccoli[J]. Atmospheric Environment, 2012, 47:76-83.

[7] 官 梅,李 杻.高油酸油菜品系农艺性状研究[J].中国油料作物学报,2008,30(1):25-28.

[8] Liu F L, Wang W J, Sun X T, et al. RNA-Seq revealed complex response to heat stress on transcriptomic level in *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta)[J]. Journal of Applied Phycology, 2014, 26(3):1585-1596.

[9] Li Y, Wang N, Zhao F T, et al. Changes in the transcriptomic profiles of maize Roots in response to iron-deficiency stress[J]. Plant Molecular Biology, 2014, 85(4/5):349-363.

[10] Salgado L R, Koop D M, Pinheiro D G, et al. De novo transcriptome analysis of *Hevea brasiliensis* tissues by RNA-seq and screening for molecular markers[J]. BMC Genomics, 2014, 15:236.



- [11] Wu W W, Wang G, Baek S J, *et al.* Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAI and iTRAQ, using 2D gel-or LC-MALDI TOF/TOF[J]. *Proteome Res*, 2006, 5(3): 651 – 658.
- [12] Wang J P, Mei H, Zheng C, *et al.* The metabolic regulation of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis* revealed by transcriptomics and proteomics[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(5): 1363 – 1376.
- [13] Lan P, Li W F, Schmidt W. Complementary proteome and transcriptome profiling in phosphate-deficient *Arabidopsis* Roots reveals multiple levels of gene regulation[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11(11): 1156 – 1166.
- [14] Dyhrman S T, Jenkins B D, Rynearson T A, *et al.* The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a diverse Phosphorus stress response[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): 0033768.
- [15] Gonzalez L, El K W, Ju C, *et al.* Integrated transcriptomic and proteomic profiling of white spruce stems during the transition from active growth to dormancy[J]. *Plant Cell and Environment*, 2012, 35(4): 682 – 701.
- [16] Kuss C, Gan C S, Gunalan K, *et al.* Quantitative proteomics reveals new insights into erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2012, 11(2): 010645.
- [17] Robbins M L, Roy A, Wang P H, *et al.* Comparative proteomics analysis by DIGE and iTRAQ provides insight into the regulation of phenylpropanoids in maize[J]. *Journal of Proteomics*, 2013, 93(SI): 254 – 275.
- [18] Clark M E, He Z L, Redding A M, *et al.* Transcriptomic and proteomic analyses of *Desulfovibrio vulgaris* biofilms: Carbon and energy flow contribute to the distinct biofilm growth state[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 138.
- [19] 张秋萍. 甘蓝型油菜与菌核菌互作的转录组学研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [20] Wen L, Tan T L, Shu J B, *et al.* Using proteomic analysis to find the proteins involved in resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in adult *Brassica napus*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 137(3): 505 – 523.
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  Method[J]. *Methods (San Diego, Calif.)*, 2001, 25(4): 402 – 408.
- [22] Bauer S, Schott A K, Illarionova V, *et al.* Biosynthesis of tetrahydrofolate in plants: Crystal structure of 7, 8-dihydroneopterin aldolase from *Arabidopsis thaliana* reveals a novel adolase class[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 339(4): 967 – 979.
- [23] Lopez P, A Lacks S. A bifunctional protein in the folate biosynthetic pathway of *Streptococcus pneumoniae* with dihydroneopterin aldolase and hydroxymethyldihydropyrophosphokinase activities[J]. *J Bacteriol*, 1993, 175(8): 2214 – 2220.
- [24] De Lorenzo G, Ferrari S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(4): 295 – 299.
- [25] Deo A, Shastri N V. Purification and characterization of polygalacturonase-inhibitory proteins from *Psidium guajava* Linn. (guava) fruit[J]. *Plant Science*, 2003, 164(2): 147 – 156.
- [26] Azevedo C, Betsuyaku S, Peart J A, *et al.* Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity[J]. *EMBO Journal*, 2006, 25(9): 2007 – 2016.
- [27] Tör M, Gordon P, Cuzick A, *et al.* *Arabidopsis* SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes[J]. *American Society of Plant Biologists*, 2002, 14(5): 993 – 1003.
- [28] Gomez-Gomez L, Boller T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(6): 1003 – 1011.
- [29] Tang J Y, Zhu X D, Wang Y Q, *et al.* Semi-dominant mutations in the CC-NB-LRR-type R gene, NLS1, lead to constitutive activation of defense responses in rice[J]. *Plant Journal*, 2011, 66(6): 996 – 1007.
- [30] Forsthoeftel N R, Dao T P, Vernon D M. PIRL1 and PIRL9, encoding members of a novel plant-specific family of leucine-rich repeat proteins, are essential for differentiation of microspores into pollen[J]. *Planta*, 2010, 232(5): 1101 – 1114.
- [31] Chico J M, Raices M, Tellez-Inon M T, *et al.* A calcium-dependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants[J]. *Plant Physiology*, 2002, 128(1): 256 – 270.
- [32] 付力文. 水稻钙依赖性蛋白激酶 *oscpk10* 和 *oscpk20* 在植物抗病防卫反应中的功能研究[D]. 北京: 北京大学, 2013.
- [33] 赵永山. 胍胍质对胞间连丝的修饰在大豆抗病毒侵染过程中的作用[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- [34] 姚贵滨. 大豆抵抗 SMV 长距离运输机制的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2011.
- [35] 吴思思, 李文龙, 肖东强, 等. 大豆不同花叶病毒抗性品种胍胍质荧光标记初探[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(1): 132 – 140.
- [36] Pontier D, Godiard L, Marco Y, *et al.* Hsr203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions[J]. *Plant Journal*, 1994, 5(4): 507 – 521.
- [37] Belbahri L, Boucher C, Thierry C, *et al.* A local accumulation of the *Ralstonia solanacearum* PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant-pathogen interaction incompatible[J]. *The Plant Journal*, 2001, 28(4): 419 – 430.
- [38] 周鑫. 番茄叶霉菌基因 *CfHNNII* 诱导植物非寄主抗病性的功能分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.