

甘蓝型油菜 *BnAR* 基因家族全基因组鉴定 与响应低温胁迫的表达分析

郭志婷, 秦梦凡, 李浩东, 赵飞雪, 李心茹,
杜媛媛, 包顺君, 李鸿洋, 徐佳丽, 黄镇

(西北农林科技大学农学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为了解甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 中 *BnAR* 基因的基本信息、进化关系及其在低温胁迫下的表达模式, 对甘蓝型油菜 *BnAR* 基因家族成员进行全基因组鉴定, 并探究低温胁迫下家族成员的表达情况。结果表明: 甘蓝型油菜参考基因组中共鉴定出 14 个 *BnAR* 基因家族成员, 分布在 8 条染色体上, 将其命名为 *BnAR-1* ~ *BnAR-14*, 可分为 ADC 和 DapDC 两个亚家族; 启动子顺式作用元件分析发现, *BnAR* 基因家族成员的启动子区含有多种与激素和胁迫响应相关的元件; 甘蓝型油菜组内共线性分析发现 11 对基因具有共线性关系, *Ka/Ks* 分析发现所有同源基因的比值均小于 0.5, 说明 *BnAR* 基因家族在进化过程中受到严格的纯化选择; 转录组数据分析表明, 14 个 *BnAR* 基因均响应低温胁迫, 其中 *BnAR-4*、*BnAR-5*、*BnAR-11* 和 *BnAR-13* 受低温胁迫程度最为强烈, 荧光定量 PCR 验证结果与转录组数据高度一致, 因此可将这 4 个基因作为候选基因进行后续的功能验证。

关键词: 甘蓝型油菜; *BnAR* 基因家族; 生物信息学; 表达模式; 低温胁迫

中图分类号: S565.4 **文献标志码:** A

Genome-wide identification of *BnAR* gene family and expression analysis under low temperature stress in *Brassica napus* L.

GUO Zhiting, QIN Mengfan, LI Haodong, ZHAO Feixue, LI Xinru,
DU Yuanyuan, BAO Shunjun, LI Hongyang, XU Jiali, HUANG Zhen

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: To understand the basic information, evolutionary relationship and the function of *BnAR* genes under cold stress in *Brassica napus* L., the *BnAR* gene family of *B.napus* were identified in this study, and the expression of family members under low temperature conditions were explored. The results showed that 14 *BnAR* genes were identified in *B.napus*. They were distributed on eight chromosomes and renamed as *BnAR-1* to *BnAR-14*, dividing into ADC and DapDC subgroups. Promoter cis-element analysis showed that the promoter region of *BnAR* genes contained various elements related to hormone and stress response. Intra-group collinearity analysis of *B.napus* showed that 11 pairs of genes had collinearity relationship, and *Ka/Ks* analysis showed that the ratio of all homologous gene pairs were less than 0.5, indicating that the *BnAR* gene family was subjected to strict purification selection in the evolutionary process. Transcriptome data analysis indicated that all 14 *BnAR* genes responded to low temperature stress, among which four genes, *BnAR-4*, *BnAR-5*, *BnAR-11* and *BnAR-13* were strongly subjected to low temperature stress. The results of qRT-PCR were highly consistent with the transcriptome data, so these four genes could be used as candidate genes for subsequent functional verification.

Keywords: *Brassica napus* L.; *BnAR* gene family; bioinformatics; expression pattern; low temperature stress

吡哆醛-5'-磷酸 (PLP, pyridoxal-5'-phosphate) 依赖酶在自然界中普遍存在,并催化各种重要的代谢反应。就其结构而言,可分为 4 个家族,即以天冬氨酸转氨酶为原型酶的 α 家族、以色氨酸合成酶为原型酶的 β 家族、d-丙氨酸转氨酶家族、丙氨酸消旋酶 (AR, alanine racemase) 家族^[1],分别对应 4 种不同的折叠类型,即 I 型、II 型、IV 型、III 型^[2]。

根据系统发育关系,丙氨酸消旋酶 (AR) 基因家族可分为 3 个不同的亚家族,分别为精氨酸脱羧酶 (ADC, arginine decarboxylase)、鸟氨酸脱羧酶 (ODC, ornithine decarboxylase) 和二氨基庚二酸脱羧酶 (DapDC, diamino pimelate decarboxylase)^[3]。AR 基因家族有两个保守结构域,分别是位于 N 端的 Orn_Arg_Dec_N (PF02784) 和位于 C 端的 Orn_DAP_Arg_Dec (PF00278);ADC 和 ODC 是腐胺生物合成途径中的关键限速酶^[4],腐胺是脂肪族多胺的前体,参与许多生物的生长发育过程^[5]。在动物和酵母中,腐胺以鸟氨酸为前体,通过 ODC 催化形成^[6];在植物中,腐胺不仅能以鸟氨酸为前体合成腐胺,还可以以精氨酸为前体,通过 ADC 催化形成胍丁胺,通过多步催化形成腐胺^[7]。然而在拟南芥基因组中尚未发现 ODC 基因,因此认为拟南芥中 ADC 通路是合成腐胺的唯一途径^[8]。

目前,研究者们已在多种植物中克隆 ADC 基因并进行了功能验证。研究表明,拟南芥中有两个拷贝 *AtADC1* 和 *AtADC2*^[9],过表达 *AtADC1* 通过提高腐胺含量从而增强拟南芥的耐冷性^[10],过表达 *AtADC2* 通过诱导气孔关闭、降低水分散失而增强拟南芥的耐旱性^[11]。桃树 (*Prunus persica*) *PpADC* 主要在茎、叶、花和果实中表达,并响应脱水、盐、低温和重金属胁迫^[12];枳 (*Poncirus trifoliata*) 中 *PtADC* 基因通过清除活性氧和促进根系生长响应干旱胁迫^[13];颠茄 (*Atropa belladonna*) 中 *AbADC2* 基因响应低温胁迫^[14];水稻 (*Oryza sativa*) 中 *OsADC1* 和 *OsADC2* 基因在根、茎、叶和花序中均有表达,且受盐、干旱和低温胁迫诱导^[15];杜梨 (*Pyrus betulifolia*) 中 *PbADC* 基因响应低温、脱水、盐和 H_2O_2 的胁迫应答^[16]。*DapDC* 基因存在于细菌和植物中,是催化赖氨酸生物合成的最后一步^[3],而目前关于 *DapDC* 在植物中的功能研究较少。

甘蓝型油菜 (*B. napus*) 由白菜 (*B. rapa*) 和甘蓝 (*B. oleracea*) 自然杂交而成^[17],是我国重要的油料作物和工业原料^[18]。近年来低温天气频发,对甘蓝型油菜的产量造成了重大影响。AR 基因在多种植物中被鉴定出参与低温胁迫,但在甘蓝型油菜中对

AR 基因家族的研究尚未见报道。因此,本研究利用生物信息学的方法鉴定甘蓝型油菜 *BnAR* 基因家族成员,对其基因结构及进化关系进行分析,同时探究 *BnAR* 基因在低温胁迫下的表达模式,以期为进一步了解 *BnAR* 基因家族的进化特征和 *BnAR* 基因的功能解析提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为本课题组 (西北农林科技大学油菜种质资源课题组) 前期培育鉴定的耐寒品系 'GZ 恢' (GZH, 冬性) 与敏寒品系 '10B' (B10, 半冬性)。

1.2 试验方法

1.2.1 基因检索及理化性质预测 从公共数据库 Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/index.html>) 中下载甘蓝型油菜、拟南芥、甘蓝和白菜的基因组数据、GFF 文件、CDS 文件和蛋白质文件,从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 中下载 AR 基因的隐马尔可夫模型 PF00278 和 PF02784。使用两种方法检索家族成员:一是使用 4 个拟南芥 AR 蛋白质序列作为检索查询,导入蛋白质序列文件和物种的蛋白质序列文件,用软件 TBtools^[19] 进行本地 blast;二是利用隐马尔可夫模型作为索引,使用 HMMER3.0 软件 (<http://hmmer.org/>) 进行 hmmersearch 搜索, e 值设为 1×10^{-5} 。将两种方法筛选得到的序列合并后去除重复,使用 Pfam 和 NCBI 网站的 Batch CD-Search 鉴定家族成员是否具有保守结构域,将没有保守结构域的基因删除,从而获得 4 个物种的家族成员,用网站 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测候选 AR 蛋白的理化性质。

1.2.2 多序列比对和系统进化分析 使用 MEGA 7.0 软件^[20] 对筛选出的所有蛋白氨基酸序列进行比对,使用 Neighbor-Joining 生成 AR 基因的系统发育树,使用 bootstrap method 检验方法,重复 1000 次,使用 Jones-Taylor-Thornton Model 置换模型。使用在线网站 Evolview (<https://www.evolgenius.info/evolview/>) 进行绘制和优化系统发育树。

1.2.3 Ka/Ks 分析 使用 TBtools 中 Simple Ka/Ks Calculator 计算同源基因对的同义替换率 (Ks)、非同义替换率 (Ka) 以及非同义替换率和同义替换率的比值 (Ka/Ks),分析基因进化类型。 $Ka/Ks > 1$ 代表基因受正向选择, $Ka/Ks = 1$ 代表基因为中性进化, $Ka/Ks < 1$ 代表基因受纯化选择^[21]。

1.2.4 物种间、物种内共线性分析 使用 TBtools 中 Advanced Circos 对甘蓝型油菜 *BnAR* 基因进行种内

共线性分析,使用 Tbttools 中 MCSanX 分析甘蓝型油菜与甘蓝和白菜之间的种间共线性关系。

1.2.5 染色体定位、保守基序及基因结构分析 从4个物种下载的 gff3 文件中获得 *AR* 基因的染色体定位数据,使用 Tbttools 中 Gene Location Visualize from GTF/GFF 绘制其分布。使用在线网站 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 进行 *AR* 蛋白保守基序的预测,设置 motif 数量为 10,大小为 5~200 个氨基酸。外显子-内含子结构信息从注释文件 gff3 中获得,基序、外显子和内含子的分布使用软件 Tbttools 中的 Visualize Gene Structure (Basic) 进行可视化。

1.2.6 启动子顺式作用元件分析 使用 Tbttools 中的 Sequence Extract 提取 *AR* 基因家族成员起始密码子上游 2 000 bp 的序列作为启动子序列,提交至 PlantCare (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 网站进行顺式作用元件的预测,使用 Tbttools 对不同顺式作用元件进行分类和可视化。

1.2.7 甘蓝型油菜 *BnAR* 基因在低温胁迫下的表达分析 使用甘蓝型油菜‘GZ 恢’和‘10B’于苗期^[22]和花期^[23]低温胁迫处理的转录组数据,以 $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$ 算法转化转录组数据并计算基因表达水平,使用 Tbttools 软件对 *BnAR* 基因表达结果进行可视化。

选取籽粒饱满的油菜种子播种于营养土中,培养至 6~7 叶期时,选取生长状态一致的植株进行苗期(L)低温处理,于光照强度为 5 klx、相对湿度为 60% 的人工气候室中,5℃ 连续处理 2 h 后取样(5℃ 2 h,记为 L-T1),继续降温至 0℃ 处理 2 h 后取样(5℃ 2 h + 0℃ 2 h,记为 L-T2),继续降温至 -5℃ 处理 2 h 后取样(5℃ 2 h + 0℃ 2 h + -5℃ 2 h,记为 L-T3)。待种子生长至 3~5 朵花开时,选取生长状态一致的植株进行花期(F)低温处理,同样于光照强度为 5 klx、相对湿度为 60% 的人工气候室中,12℃/14 h,2℃/10 h 连续处理 2 d(记为 F-T2)和 3 d(记为 F-T3)时取样,取样均取叶片,以每 3 株混样作为 1 个重复,重复 3 次。使用天根生化科技有限公司(北京)的 E.Z.N.A.TM Plant RNA Kit 提取试剂盒进行 RNA 的提取,使用全式金生物技术有限公司(北京)的 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 进行 gDNA 的去除及 cDNA 的合成,荧光定量反应体系按照康润诚业生物科技有限公司(北京)的 2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix 试剂说明书配制,以油菜 *BnActin2* 作为内参基因,相对定量计算公式使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$,引物序列见表 1。

1.2.8 数据统计及分析 试验数据使用 Excel 2010 进行汇总整理,使用 SPSS 25.0 和 GraphPad 8.4 进行数据统计分析及作图。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence in qRT-PCR

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	正向引物序列(5'-3') Forward primer	反向引物序列(5'-3') Reverse primer
<i>BnActin2</i>	<i>BnActin2</i>	TGTTCCCTGGAAITGCTGACCGTA	TGCCACCACCTTGATCTTCATGCT
<i>BnaA03g53010D</i>	<i>BnAR-4</i>	ACACCACCGACGTGTTTCATC	GATGAGGGAGAGTGTGGAG
<i>BnaA08g10990D</i>	<i>BnAR-5</i>	GAGCATCGAGCAGTTGGCTT	TCGCCGCCTATGAACTTATC
<i>BnaC03g65810D</i>	<i>BnAR-11</i>	CACCTCGATTCTGATCTGTGG	TCGCCGCCTATGAACTTATC
<i>BnaC07g45200D</i>	<i>BnAR-13</i>	GCTCCTACTTCTCCGCCAA	GATAACCGGAGCTGTAATCCC

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜 *BnAR* 基因家族的鉴定及系统发育分析

为了解甘蓝型油菜 *BnAR* 基因家族的进化关系,在甘蓝型油菜、拟南芥及其亲缘关系较近的甘蓝和白菜 4 种植物中鉴定 *AR* 基因家族的成员,利用同源性搜索和保守结构域相结合的方法在 4 种植物中共鉴定到 30 个 *AR* 基因,其中甘蓝型油菜中 14 个、拟南芥中 4 个、甘蓝和白菜中均为 6 个。所有 *AR* 基因根据其物种和染色体位置重新命名,如表 2 所示,甘蓝型油菜 *AR* 基因分别命名 *BnAR-1*~*BnAR-14*,拟南芥分别命名为 *AtAR-1*~*AtAR-4*,甘蓝分别

命名为 *BoAR-1*~*BoAR-6*,白菜分别命名为 *BrAR-1*~*BrAR-6*。对 30 个 *AR* 基因编码蛋白的理化性质进行分析,包括蛋白质长度、分子量(MW)、理论等电点(pI)、脂肪族系数(AI)、不稳定性指数(II)和亲水性总平均值(GRAVY)。30 个 *AR* 蛋白的长度为 185(*BnAR-6*)~711(*AtAR-3*)个氨基酸,MW 范围为 20356.28(*BnAR-6*)~77219.45(*AtAR-3*)kD,pI 值介于 4.89(*BnAR-8*)~7.13(*BoAR-2*),除 *BoAR-2* 基因为碱性外,其余蛋白均为酸性。AI 范围为 89.00(*AtAR-1*)~101.27(*BoAR-2*),II 的范围为 35.64(*BnAR-14*)~48.99(*BnAR-9*),GRAVY 值的范围为 -0.167(*BnAR-12*)~0.093(*BnAR-10*),只有两个 *AR* 蛋白的 GRAVY 值大于 0,其余均小于 0,说

明大多 AR 蛋白是疏水性的。

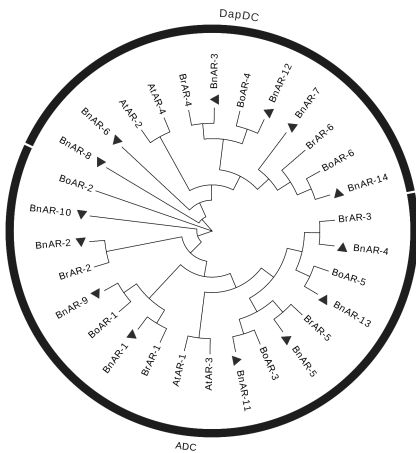
为分析 AR 基因之间的进化关系,使用 Neighbor-Joining 对 30 个 AR 基因构建系统发育树(图 1)。前人研究表明拟南芥基因组中未发现 ODC 基因^[8],

本研究在甘蓝型油菜、甘蓝和白菜基因组中也均未发现 ODC 基因,与前人研究结果一致。30 个 AR 基因被划分为两个亚家族,即 ADC 和 DapDC,分别有 18 个和 12 个成员。

表 2 AR 基因编码蛋白的理化性质

Table 2 Physicochemical properties of protein encoded by AR genes

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	亚家族 Subfamily	氨基酸数 Number of amino acid	分子量 Molecular weight/kD	理论等电点 Theoretical isoelectric point	脂肪系数 Aliphatic index	不稳定系数 Instability index	亲水性总平均值 Grand average of hydropathicity
AT2G16500	AtAR-1	ADC	702	76175.46	5.38	89.00	39.35	-0.075
AT3G14390	AtAR-2	DapDC	32484	53557.34	6.51	94.24	39.24	-0.160
AT4G34710	AtAR-3	ADC	711	77219.45	5.12	91.45	46.92	-0.077
AT5G11880	AtAR-4	DapDC	489	54164.05	6.21	95.07	35.65	-0.137
BnaA01g02460D	BnAR-1	ADC	648	71098.07	5.62	92.48	46.84	-0.124
BnaA01g02450D	BnAR-2	ADC	665	72284.00	5.25	89.67	46.48	-0.111
BnaA03g03620D	BnAR-3	DapDC	493	54322.00	6.25	94.12	40.77	-0.160
BnaA03g53010D	BnAR-4	ADC	688	75305.35	5.03	91.05	45.22	-0.090
BnaA08g10990D	BnAR-5	ADC	666	72399.38	5.17	93.50	47.04	-0.045
BnaA10g20750D	BnAR-6	DapDC	185	20356.28	5.19	90.59	42.21	-0.079
BnaA10g20730D	BnAR-7	DapDC	485	53475.13	6.10	94.85	36.14	-0.151
BnaAnng39810D	BnAR-8	DapDC	198	21802.80	4.89	92.53	47.14	-0.090
BnaC01g03720D	BnAR-9	ADC	649	71041.90	5.50	93.08	48.99	-0.123
BnaC01g03710D	BnAR-10	ADC	385	41663.77	5.81	96.68	41.38	0.093
BnaC03g65810D	BnAR-11	ADC	661	71759.50	5.13	92.15	46.53	-0.053
BnaC03g05110D	BnAR-12	DapDC	493	54422.14	6.15	93.91	43.32	-0.167
BnaC07g45200D	BnAR-13	ADC	684	74709.85	5.06	91.45	45.53	-0.063
BnaC09g44740D	BnAR-14	DapDC	486	53638.50	6.65	94.29	35.64	-0.161
Bo1g007050	BoAR-1	ADC	649	71027.87	5.50	92.93	48.99	-0.123
Bo1g007010	BoAR-2	ADC	354	38504.50	7.13	101.27	44.64	0.053
Bo3g167590	BoAR-3	ADC	687	74502.67	5.14	92.77	45.46	0.056
Bo3g007320	BoAR-4	DapDC	533	58499.75	6.47	93.64	42.64	-0.156
Bo7g117010	BoAR-5	ADC	687	74980.02	4.96	90.20	46.36	-0.065
Bo9g169810	BoAR-6	DapDC	486	53634.38	6.34	94.07	35.98	-0.150
Bra0111554	BrAR-1	ADC	648	70879.77	5.48	93.98	47.33	-0.105
Bra0111555	BrAR-2	ADC	670	72948.70	5.25	89.13	48.60	-0.125
Bra017672	BrAR-3	ADC	688	75319.38	5.03	91.05	45.56	-0.090
Bra006124	BrAR-4	DapDC	493	54245.96	6.25	94.32	40.11	-0.147
Bra034648	BrAR-5	ADC	665	72231.10	5.18	92.92	46.08	-0.063
Bra008931	BrAR-6	DapDC	486	53646.43	6.48	94.47	35.92	-0.159



注:图中三角形代表 BnARs 成员。

Note: The triangle represents BnARs members

图 1 甘蓝型油菜、拟南芥、甘蓝和白菜 AR 基因家族系统进化树分析

Fig.1 Phylogenetic tree analysis of AR gene families in *B. napus*, *Arabidopsis*, *B. oleracea* and *B. rapa*.

2.2 甘蓝型油菜 BnAR 基因家族 Ka/Ks 分析

为分析 AR 基因的进化类型,对 AR 同源基因对的 K_a 、 K_s 以及 K_a/K_s 进行计算, K_a/K_s 可判断是否有选择压力作用于基因^[21]。如表 3 所示,所有同源基因对的 K_a/K_s 值均小于 0.5,说明 AR 基因家族的进化过程中一直存在纯化选择,导致 AR 基因的功能分化受到严重抑制。

2.3 甘蓝型油菜 BnAR 基因家族物种间、物种内共线性分析

共线性分析可反映物种间的亲缘关系,处于共线性区域的基因越多,物种间的亲缘关系就越近。基因复制事件的发生是导致基因家族扩张的重要因素^[24]。如图 2 所示,对甘蓝型油菜 BnAR 基因的种内关系进行分析,发现 11 对基因具有共线性关系,且部分 BnAR 基因与多个基因存在共线性关系,如 BnAR-13 分别与 BnAR-4、BnAR-5 和 BnAR-10

表3 *AR* 基因 *Ka/Ks* 分析
Table 3 *Ka/Ks* analysis of *AR* genes

基因名称 Gene name	亚家族 Subfamily	基因名称 Gene name	亚家族 Subfamily	<i>Ka</i>	<i>Ks</i>	<i>Ka/Ks</i>
<i>BnAR-1</i>	ADC	<i>BnAR-7</i>	DapDC	0.800031316	1.800582839	0.444317972
<i>BnAR-3</i>	DapDC	<i>BnAR-12</i>	DapDC	0.019332705	0.240393324	0.080421141
<i>BnAR-7</i>	DapDC	<i>BnAR-3</i>	DapDC	0.03080357	0.286149864	0.107648381
<i>BnAR-12</i>	DapDC	<i>BnAR-3</i>	DapDC	0.019332705	0.240393324	0.080421141
<i>BnAR-13</i>	ADC	<i>BnAR-1</i>	ADC	0.125802272	0.74168151	0.169617646
<i>BnAR-4</i>	ADC	<i>BnAR-13</i>	ADC	0.012575531	0.164016901	0.076672166
<i>BnAR-11</i>	ADC	<i>BnAR-9</i>	ADC	0.115950039	0.692689012	0.167391192
<i>BnAR-5</i>	ADC	<i>BnAR-13</i>	ADC	0.081294579	0.724947492	0.112138575
<i>BnAR-9</i>	ADC	<i>BnAR-1</i>	ADC	0.022999514	0.082913388	0.27739204
<i>BnAR-1</i>	ADC	<i>BnAR-13</i>	ADC	0.125802272	0.74168151	0.169617646
<i>AtAR-1</i>	ADC	<i>AtAR-3</i>	ADC	0.094419472	0.736146767	0.128261749
<i>BoAR-2</i>	ADC	<i>BoAR-3</i>	ADC	0.163784757	0.795146454	0.205980617
<i>BoAR-4</i>	DapDC	<i>BoAR-6</i>	DapDC	0.034469372	0.353055545	0.097631583
<i>BoAR-2</i>	ADC	<i>BoAR-3</i>	ADC	0.085466517	0.66518371	0.128485584
<i>BrAR-2</i>	ADC	<i>BrAR-3</i>	ADC	0.10666996	0.679754411	0.156924262
<i>BrAR-3</i>	ADC	<i>BrAR-5</i>	ADC	0.0784638	0.664867578	0.118014178
<i>BrAR-4</i>	DapDC	<i>BrAR-6</i>	DapDC	0.029773731	0.265520903	0.112133283
<i>BrAR-5</i>	ADC	<i>BrAR-2</i>	ADC	0.109813678	0.622123652	0.176514231
<i>BrAR-6</i>	DapDC	<i>BrAR-4</i>	DapDC	0.029773731	0.265520903	0.112133283

存在共线性,结合进化分析结果,这4个基因属于ADC亚家族,*BnAR-3*分别与*BnAR-6*和*BnAR-12*存在共线性,这3个基因属于DapDC亚家族,说明具有共线性关系的基因可能是染色体片段复制的结果,且属于同一亚家族,具有相似功能。

为进一步研究*AR*基因在不同物种之间的进化关系,对甘蓝型油菜、甘蓝和白菜的*AR*基因进行种间共线性分析发现,甘蓝型油菜与甘蓝间有26个同源基因对,甘蓝型油菜与白菜间有22个同源基因对,说明来自甘蓝的*AR*基因更倾向于在甘蓝型油菜中保留(图3)。

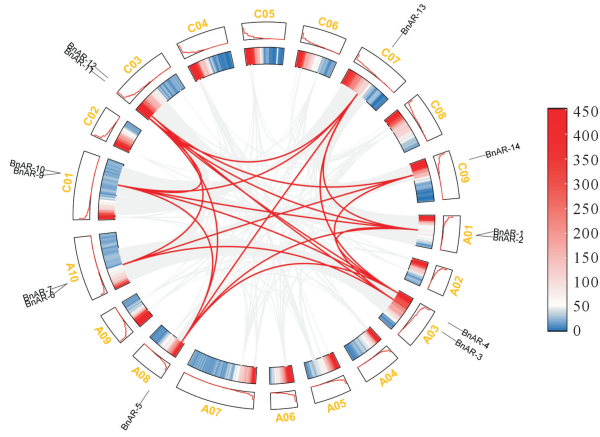
2.4 甘蓝型油菜 *BnAR* 基因家族染色体定位

根据基因组注释,染色体定位结果显示,甘蓝型油菜的14个*BnAR*基因分布在8条染色体上,其中8个基因位于A亚基因组,6个位于C亚基因组(图4),由于基因组组装不完整,*BnAR-8*未能准确定位到染色体上。*BnAR*基因大部分位于染色体末端,很少位于中心区域,分析发现14个*BnAR*基因中3个基因对(*BnAR-1*和*BnAR-2*、*BnAR-6*和*BnAR-7*、*BnAR-9*和*BnAR-10*)属于串联复制,其中2个基因对属于ADC亚家族,1个基因对属于DapDC亚家族。研究表明,基因家族的扩张主要是由全基因组复制、片段重复和串联复制引起^[25],这些串联复制基因可能在甘蓝型油菜的物种进化过程中发挥了重要作用。

2.5 甘蓝型油菜 *BnAR* 蛋白保守基序和 *BnAR* 基因结构分析

为了解*BnAR*基因的结构多样性并预测其功能,对14个*BnAR*蛋白的保守基序和*BnAR*基因结构进行了分析。如表4所示,通过MEME结构域分析,将预测到的10个不同的基序分别命名为motifs1~motifs10,这些基序在同一亚家族中高度相似且排列顺序相同,表明所有蛋白质都具有高度保守性,但不同亚家族间存在一定差异。所有家族蛋白包含3个共同的motif,分别为motif2、motif3和motif4。motif3对应于*BnAR*家族蛋白的底物结合位点,表明这些成员均属于该家族。大多数ADC亚家族蛋白包含10个motif,而DapDC亚家族包含的motif相对较少,motif5、motif6和motif9几乎是ADC亚家族蛋白所特有的。以上结果表明,*BnAR*蛋白在同一亚家族中的相似保守基序具有相似的功能,亚家族特异性基序可能在特定功能中起关键作用。

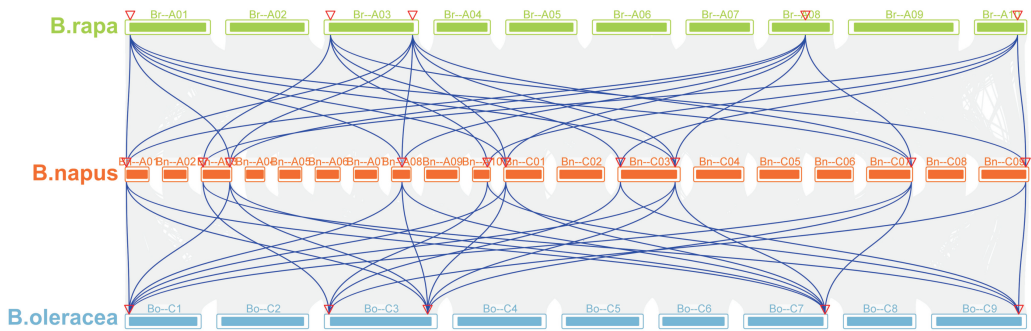
基因功能多样性由基因结构多样性引起^[26]。基因结构分析表明,两个亚家族的外显子和内含子数量不一致,而同一亚家族的数量相对保守。如图5所示,大多数ADC基因含0~2个内含子,而DapDC基因含4~7个内含子。内含子的数量与*AR*基因的进化有关,具有多个内含子的DapDC基因可能在进化过程中受到更大的选择压力^[27]。



注:红线表示共线性的 *BnAR* 基因对;黄色方块表示染色体,长度表示染色体大小,其内两个方块表示基因密度,分别以线性和热图形式呈现。

Note: The red lines indicate collinear *BnAR* gene pairs, the yellow squares represent the chromosomes, the length represents the size of the chromosomes, and the two squares inside represent the gene density, as linear and heat maps, respectively.

图 2 甘蓝型油菜 *BnAR* 基因组内共线性分析
Fig.2 Collinearity analysis of *BnAR* genes

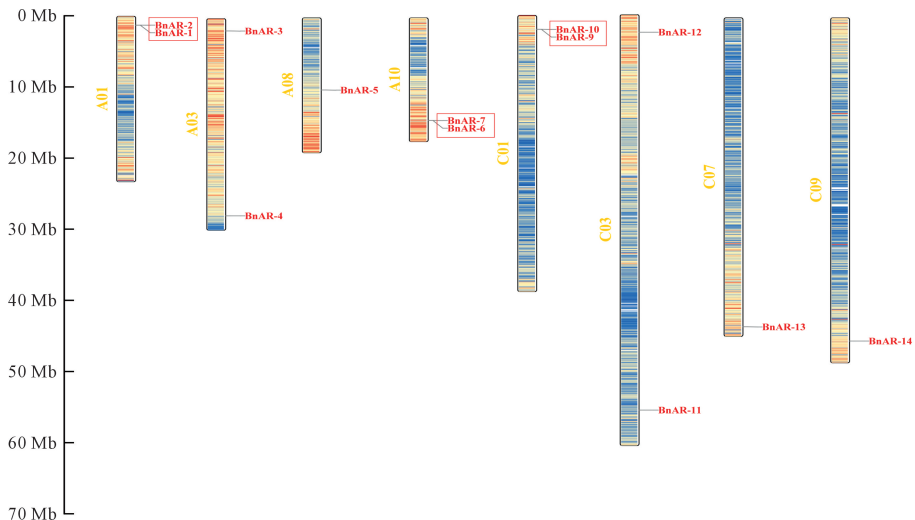


注:染色体编号在每条染色体的顶部,紫色线表示共线性的 *AR* 基因对,红色三角形表示基因所在的位置。

Note: The chromosome number is marked on the top of each chromosome, the purple line represents the collinear *AR* gene pair, and the red triangle represents the location of the gene.

图 3 甘蓝型油菜与甘蓝和白菜 *AR* 基因的组间共线性分析

Fig.3 Collinearity analysis of *AR* genes between *B.napus* and *B.oleracea* and *B.napus* and *B.rapa*



注:红框中的基因是串联复制基因。

Note: Genes in the red box are tandem duplication genes.

图 4 *BnAR* 基因染色体定位图

Fig.4 Chromosomal distribution of *BnAR* genes

表 4 *BnAR* 蛋白的保守基序
Table 4 Conserved motifs of *BnAR* protein

Motif	序列(5'-3') Sequence
motif 1	IVRFPDVLKNRLECLQSAFDYAVKSQGYGSHYZGVYPVKCNQDRFSVEDJ
motif 2	ALLGRKLAJNTVIVILEQERELBLVIELSRKMNVRPVIGLRA
motif 3	MKVIDVGGGLGIDYDGSKSGEGDGSVVYTL EEYAEAVVSSY
motif 4	GAPYFVABSSGNISIRPHGSBTLPHQJD
motif 5	RVSQSDGPHSAFVTRA VPGQSSADVLRAVQHEPELMFQTLKHRAEEVMHT
motif 6	CEWVLKAIGASDPVQTYNINLSVFTSIPDLWGIDQL
motif 7	KLRTKQSGHYGSTSGEKGFGLTSTQIVRV
motif 8	HFHJGSTIPSTSJLSDGVSEAAZLYCEJVRLGAE
motif 9	REDYEDLYAAVMRGDQESCLLYVDKLRQRCVEGFKDGVLSIEQLASVDGL
motif 10	FPIVPIHKLDQRPGARGVLSDLTCDSDGKIVKFIGESSLPLHEJDSGGC

2.6 甘蓝型油菜 *BnAR* 基因家族启动子顺式作用元件分析

基因启动子区域的顺式作用元件对于基因表达的时间、空间和细胞类型特异性至关重要^[28]。为更好了解 *BnAR* 基因的潜在调控作用,利用 PlantCARE 数据库对 *BnAR* 基因起始密码子上游 2 000 bp 区域的顺式作用元件进行预测。如图 6 所示,除转录核心元件 TATA-box 和 CAAT-box 外,共检测到 34 种顺式元件,将其分为非生物胁迫响应、激素响应和生长发育相关顺式元件共三大类。非生物胁迫响应元件包含四种顺式元件,分别为干旱胁迫(MBS)、厌氧诱导(ARE)、低温胁迫(LTR)和防御与胁迫响应元件;激素响应元件包括脱落酸响应元件(ABRE)、茉莉酸甲酯响应元件(CGTCA-motif 和 TGACG-motif)、水杨酸响应元件(TCA-element)、赤霉素响应元件(GARE-motif 和 P-box)和生长素响应元件(TGA-element 和 AuxRR-core),表明它们可能参与植物激素信号通路,即生长发育相关顺式元件包括昼夜节律控制、分生组织表达、细胞周期调节和根特异性元件。除 *BnAR-8* 外,其余 13 个基因均含有光响应元件,如 TCT-motif、GT1-motif、G-Box、GATA-motif、Box 4、AE-box、MRE 等,说明植物生长发育及相关功能受光影响最大。以上结果表明,*BnAR* 基因家族不仅参与植物的光合作用、生长发育,还在植物的抗逆性反应中发挥重要作用。此外,不同的 *AR* 基因启动子区域存在不同的顺式作用元件,ADC 亚家族较 DapDC 亚家族包含更多的元件,这意味着 ADC 亚家族的基因扩增可能与环境适应有关。

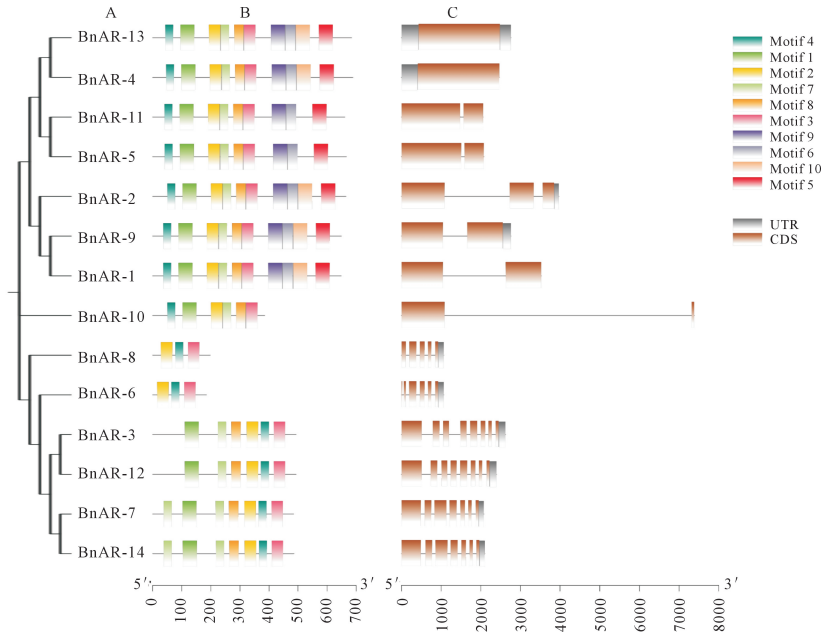
2.7 甘蓝型油菜 *BnAR* 基因在低温胁迫下的表达模式分析

在甘蓝型油菜耐寒种质‘GZ 恢’(GZH)和敏寒

种质‘10B’(B10)的苗期低温转录组中,根据转录组数据,将其标准化处理后发现,14 个 *BnAR* 基因均不同程度地响应低温胁迫,其中 ADC 亚家族中 *BnAR-13*、*BnAR-4*、*BnAR-11*、*BnAR-5*、*BnAR-2* 和 *BnAR-10*、DapDC 亚家族中 *BnAR-7* 和 *BnAR-14* 在‘10B’中上调表达较为明显(图 7)。

BnAR 基因在两种油菜材料花期低温胁迫下的转录组分析结果如图 8 所示,低温处理后,在‘GZ 恢’中,ADC 亚家族的 *BnAR-13*、*BnAR-4*、*BnAR-11*、*BnAR-5* 和 DapDC 亚家族的 *BnAR-8* 不同程度上调表达;在‘10B’中,除 ADC 亚家族的 *BnAR-11*、*BnAR-5* 和 DapDC 亚家族的 *BnAR-6* 上调表达外,其余基因均下调表达。综合苗期低温胁迫转录组数据,*BnAR-13*、*BnAR-4*、*BnAR-11* 和 *BnAR-5* 共 4 个基因在苗期和花期的耐寒和敏寒材料中均相应低温胁迫。

根据转录组数据筛选出的 *BnAR-4*、*BnAR-5*、*BnAR-11* 和 *BnAR-13* 这 4 个基因,利用 qRT-PCR 对其在两种材料不同低温胁迫下的表达水平进行检测。如图 9 所示,4 个基因均不同程度地响应低温胁迫,苗期低温处理后,*BnAR-4* 和 *BnAR-13* 在两种材料中均上调表达;花期低温处理后,其在‘GZ 恢’中表达量先升高后降低,在‘10B’中呈现下调趋势。*BnAR-5* 和 *BnAR-11* 在两种材料的不同处理时期均上调表达,其中 *BnAR-5* 在‘10B’中表达量升高倍数高于‘GZ 恢’,在‘10B’中花期低温处理 2 d 后升高倍数最大;*BnAR-11* 表达量于花期两种材料中随低温处理时间的增加而持续升高。综上可知,荧光定量 PCR 验证结果与转录组数据表现出较高的一致性,因此 *BnAR-4*、*BnAR-5*、*BnAR-11* 和 *BnAR-13* 这 4 个基因可作为候选基因进行后续的功能验证。



注: (A) *BnAR* 基因家族成员的系统发育树; (B) 不同颜色表示的 10 个保守基序; (C) *BnAR* 基因 UTR 和 CDS 分布, 黑线表示内含子。

Note: (A) Phylogenetic tree of *BnAR* gene family members; (B) The 10 conserved motifs are represented in different colors; (C) Distribution of UTRs and CDSs of *BnAR* genes, the black lines represent introns.

图 5 *BnAR* 蛋白保守基序与 *BnAR* 基因结构分析

Fig.5 *BnAR* protein conserved motif and *BnAR* gene structure analysis

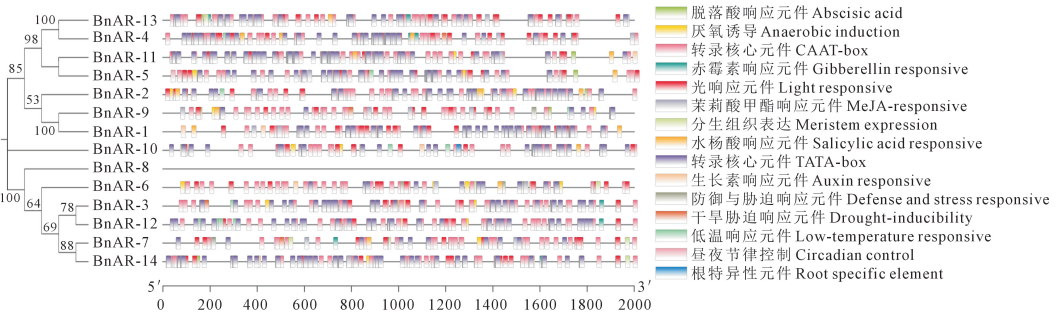
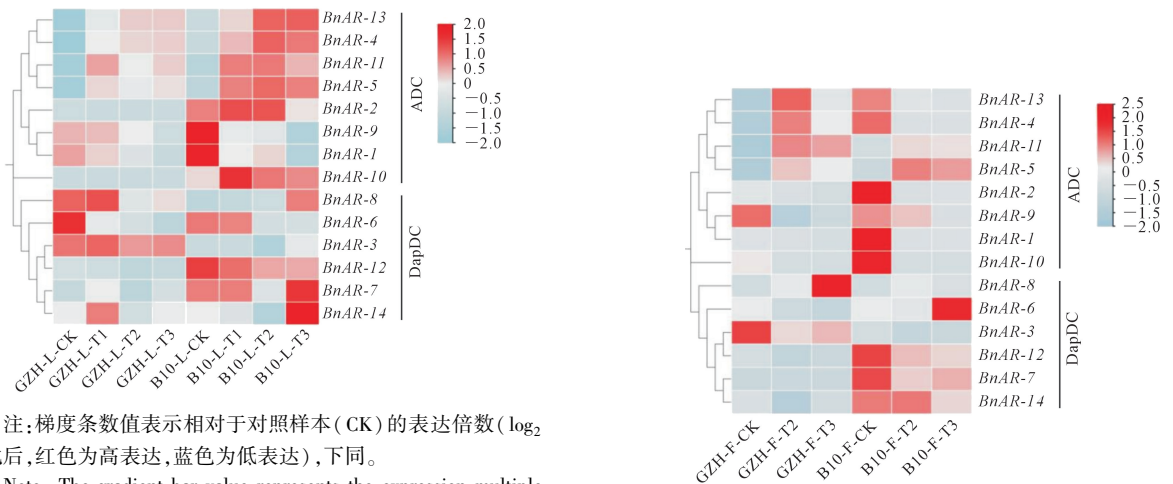


图 6 *BnAR* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig.6 Identified cis-elements in the promoters of *BnAR* gene



注: 梯度条数值表示相对于对照样本 (CK) 的表达倍数 (\log_2 转化后, 红色为高表达, 蓝色为低表达), 下同。

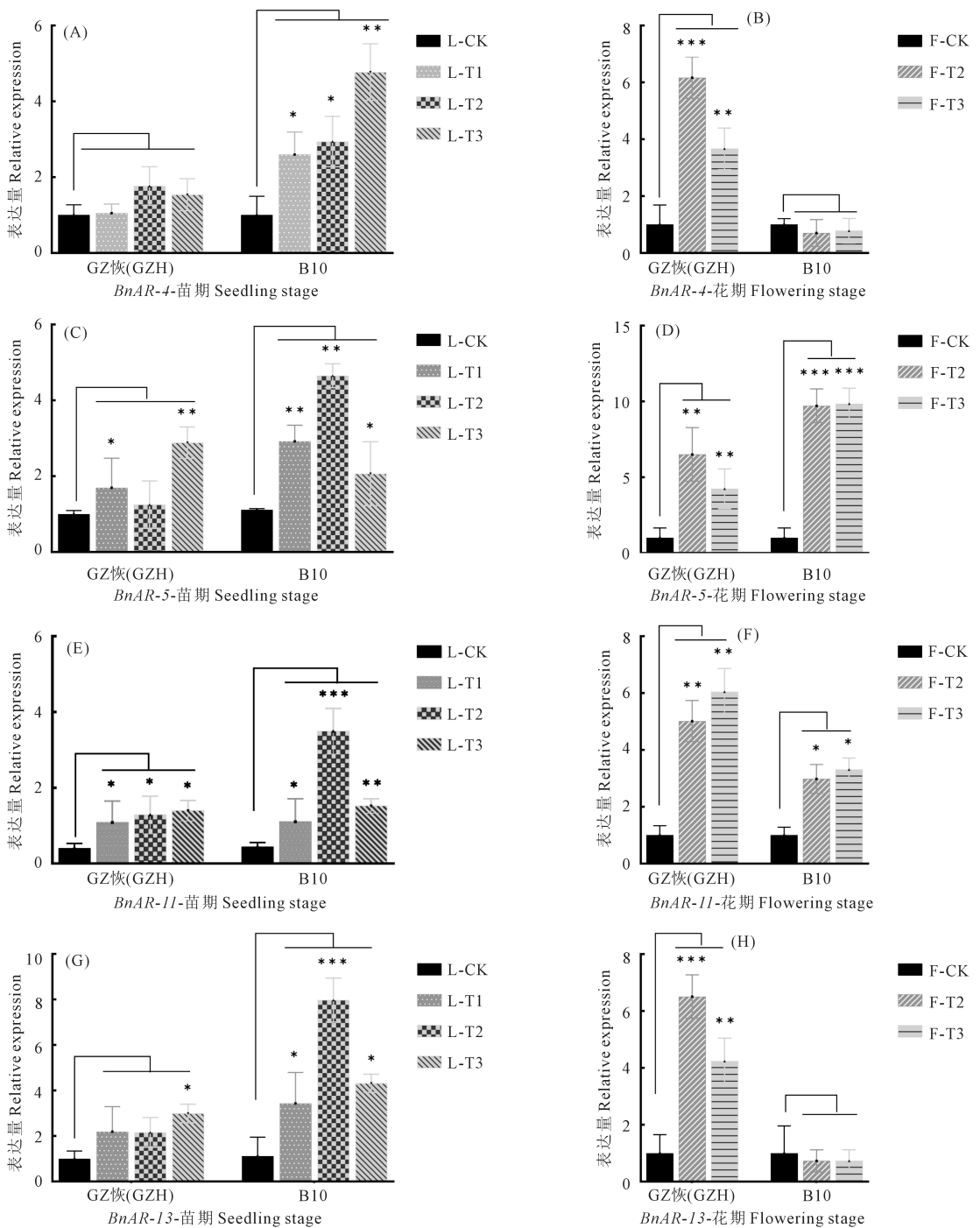
Note: The gradient bar value represents the expression multiple relative to the control sample (CK) (after \log_2 conversion, red is high expression, blue is low expression). The same below.

图 7 甘蓝型油菜 *BnAR* 基因苗期低温胁迫下表达模式

Fig.7 Expression patterns of *BnAR* genes in *B.napus* under low temperature stress at seedling stage

图 8 甘蓝型油菜 *BnAR* 基因花期低温胁迫下表达模式

Fig.8 Expression patterns of *BnAR* genes in *B.napus* under low temperature stress at flowering stage



注: *、**、*** 分别表示处理间差异在 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 水平差异显著。

Note: *, **, and *** indicate significant differences between treatments at $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$ level, respectively.

图 9 低温胁迫下 *BnAR* 基因的表达量

Fig. 9 Expression of *BnAR* genes under low temperature stress

3 讨论

腐胺作为多种化合物的前体,是植物中重要的代谢产物,腐胺在多数植物中可通过 ODC 和 ADC 两种途径催化形成^[7]。丙氨酸消旋酶(*AR*)基因家族包括精氨酸脱羧酶(*ADC*)、鸟氨酸脱羧酶(*ODC*)

和二氨基庚二酸脱羧酶(*DapDC*)3个亚家族。本研究通过 blast 和 hmmersearch 搜索两种方法在甘蓝型油菜中鉴定到 14 个家族成员,分为 *ADC* 和 *DapDC* 两个亚家族,未鉴定到 *ODC* 基因,与拟南芥中一致^[8],表明 *ODC* 基因在这些植物进化过程中发生了丢失。片段复制和串联复制在植物进化过程中对

基因家族扩张起着重要作用^[29]。*BnAR* 同源基因对的 *Ka/Ks* 值均小于 0.5, 说明大多数 *BnAR* 基因经历了广泛的纯化选择。串联重复基因是指在基因组中存在多个相同或类似的 DNA 序列, 这些序列可能在基因组中连续地排列在一起, 形成串联重复序列^[30], 本研究中甘蓝型油菜 *AR* 基因家族中有 3 个串联基因重复对, 可能是家族分化和扩张的重要驱动力。

保守基序和基因结构分析显示, 同一亚家族含有一致或相似的保守基序、内含子和外显子数量, 内含子可以调控基因表达, 影响基因功能^[31]。内含子较少的基因比内含子较多的基因更容易参与盐胁迫和干旱胁迫响应^[32], 其中 *ADC* 亚家族包含 0~2 个内含子, 而 *DapDC* 成员含有 4~7 个内含子。已有研究表明, 拟南芥中过表达 *ADC* 基因可以增强其耐寒性^[10] 和耐旱性^[11], 桃树^[12]、水稻^[15]、杜梨^[16] 中 *ADC* 基因同样响应低温、干旱和盐胁迫, 这可能与 *ADC* 基因中内含子的含量有关。对 *BnAR* 基因启动子的顺式作用元件进行分析, 发现多种与光照、激素和逆境胁迫如低温胁迫相关的元件, 表明 *BnAR* 基因可能参与植物的生长发育及胁迫响应。

甘蓝型油菜低温胁迫转录组数据分析表明, 所有 *BnAR* 基因均不同程度地响应低温胁迫, 说明该家族成员可能在油菜的低温应答中起关键作用, 其中 *BnAR-4*、*BnAR-5*、*BnAR-11* 和 *BnAR-13* 这 4 个基因在两种材料的不同处理条件下均响应低温胁迫, 且 4 个基因均属于 *ADC* 亚家族, 拟南芥同源基因均为 *AtADC2*。已有研究表明, *AtADC2* 在种子萌发、根和叶中强烈表达^[33], 且响应低温^[10]、干旱^[11] 及盐胁迫^[34] 等非生物胁迫, qRT-PCR 验证结果与转录组数据高度一致。通过查看 4 个基因的全生育期表达图发现, 除 *BnAR-13* 在叶中表达量较高外, *BnAR-4*、*BnAR-5*、*BnAR-11* 均在花中的表达量较高, 且 *BnAR-5* 启动子中含有低温胁迫响应元件, 后续可将这 4 个基因作为候选基因, 通过基因克隆、基因编辑、转化拟南芥与甘蓝型油菜等, 分别在苗期和花期验证基因在低温胁迫下的功能, 为甘蓝型油菜抗寒基因的挖掘提供一定帮助。

4 结 论

参考基因组中鉴定到 14 个甘蓝型油菜 *AR* 基因家族成员, 非均一地分布在 9 条染色体上, 系统进化分析将其分为两个亚家族, 同亚家族成员含有一致或相似的保守基序和基因结构; 共线性分析发现 11 对基因具有共线性关系, 启动子区鉴定到与低

温、干旱等胁迫相关的顺式作用元件。转录组和 qRT-PCR 分析发现, 低温胁迫下 *BnAR* 基因均不同程度地上调表达, 其中 *BnAR-4*、*BnAR-5*、*BnAR-11* 和 *BnAR-13* 这 4 个基因可作为候选基因进行后续的功能分析。

参 考 文 献:

- [1] MEHTA P K, CHRISTEN P. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes [J]. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 2000, 74: 129-184.
- [2] GRISHIN N V, PHILLIPS M A, GOLDSMITH E J. Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases [J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 1995, 4(7): 1291-1304.
- [3] KIDRON H, REPO S S A, JOHNSON M S, et al. Functional classification of amino acid decarboxylases from the alanine racemase structural family by phylogenetic studies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(1): 79-89.
- [4] KUSANO T, BERBERICH T, TATEDA C, et al. Polyamines: essential factors for growth and survival [J]. *Planta*, 2008, 228(3): 367-381.
- [5] KUSANO T, YAMAGUCHI K, BERBERICH T, et al. Advances in polyamine research in 2007 [J]. *Journal of Plant Research*, 2007, 120(3): 345-350.
- [6] COLEMAN C S, HU G R, PEGG A E. Putrescine biosynthesis in mammalian tissues [J]. *The Biochemical Journal*, 2004, 379(Pt 3): 849-855.
- [7] DEL RIO B, LINARES D M, LADERO V, et al. Putrescine production via the agmatine deiminase pathway increases the growth of *Lactococcus lactis* and causes the alkalization of the culture medium [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 897-905.
- [8] HANFREY C, SOMMER S, MAYER M J, et al. *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2001, 27(6): 551-560.
- [9] SOYKA S, HEYER A G. *Arabidopsis* knockout mutation of *ADC2* gene reveals inducibility by osmotic stress [J]. *FEBS Letters*, 1999, 458(2): 219-223.
- [10] CUEVAS J C, LÓPEZ-COBOLLO R, ALCÁZAR R, et al. Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature [J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(2): 1094-1105.
- [11] ALCÁZAR R, PLANAS J, SAXENA T, et al. Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous arginine decarboxylase 2 gene [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(7): 547-552.
- [12] LIU J H, BAN Y S E, WEN X P, et al. Molecular cloning and expression analysis of an arginine decarboxylase gene from peach (*Prunus persica*) [J]. *Gene*, 2009, 429(1/2): 10-17.
- [13] WANG J, SUN P P, CHEN C L, et al. An arginine decarboxylase gene *PtADC* from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(8): 2899-2914.
- [14] 王中平, 秦白富, 强玮, 等. 颠茄精氨酸脱羧酶基因的克隆与表

- 达分析[J]. 中草药, 2016, 47(15): 2734-2740.
- WANG Z P, QIN B F, QIANG W, et al. Cloning and expression analysis on arginine decarboxylase genes in *Atropa belladonna* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(15): 2734-2740.
- [15] THOMAS S, KRISHNA G K, YADAV P, et al. Cloning and abiotic stress responsive expression analysis of arginine decarboxylase genes in contrasting rice genotypes[J]. India Journal of Genetics and Plant Breeding, 2019, 79(2): 411-419.
- [16] 靳丛, 郭巧会, 陈国栋, 等. 杜梨精氨酸脱羧酶基因 *PbADC* 的克隆与表达分析[J]. 核农学报, 2021, 35(2): 306-313.
- JIN C, GUO Q H, CHEN G D, et al. Cloning and expression analysis of *PbADC* in *Pyrus betulifolia*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(2): 306-313.
- [17] CHALHOUB B, DENOEUDE F, LIU S Y, et al. Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome[J]. Science, 2014, 345(6199): 950-953.
- [18] 王汉中, 殷艳. 我国油料产业形势分析与对策建议[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(3): 414-421.
- WANG H Z, YIN Y. Analysis of the situation and development countermeasures of China's oil industry[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2014, 36(3): 414-421.
- [19] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [20] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [21] WANG D P, ZHANG S, HE F H, et al. How do variable substitution rates influence Ka and Ks calculations? [J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2009, 7(3): 116-127.
- [22] QIN M F, LI H D, ZHAO N, et al. Integrated genomics, QTL mapping, and co-expression analyses identifying candidates of low-temperature tolerance in *Brassica napus* L[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 187, Part B: 115437.
- [23] 李浩东. 甘蓝型油菜花期低温生理响应及候选基因分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- LI H D. Physiological response to the low temperature during flowering stage and analyses of candidate genes in *Brassica napus* L [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2022.
- [24] MAGADUM S, BANERJEE U, MURUGAN P, et al. Gene duplication as a major force in evolution[J]. Journal of Genetics, 2013, 92(1): 155-161.
- [25] ZHANG W, YU H Y, LV Y X, et al. Gene family expansion of pine-wood nematode to detoxify its host defence chemicals[J]. Molecular Ecology, 2020, 29(5): 940-955.
- [26] ABRAHAM Z, MARTINEZ M, CARBONERO P, et al. Structural and functional diversity within the cystatin gene family of *Hordeum vulgare* [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(15): 4245-4255.
- [27] MIN X J, POWELL B, BRAESSLER J, et al. Genome-wide cataloging and analysis of alternatively spliced genes in cereal crops [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 721.
- [28] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327.
- [29] MUN J H, KWON S J, YANG T J, et al. Genome-wide comparative analysis of the *Brassica rapa* gene space reveals genome shrinkage and differential loss of duplicated genes after whole genome triplication [J]. Genome Biology, 2009, 10(10): R111.
- [30] 林琿, 黄建都, 陈继兵, 等. 茄子组蛋白基因家族全基因组鉴定及其低温胁迫下的表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(9): 1996-2008.
- LIN H, HUANG J D, CHEN J B, et al. Genome-wide identification and expression analysis under low-temperature stress of histone gene family in eggplant (*Solanum melongena*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2024, 32(9): 1996-2008.
- [31] LIN Y, SMITH G R. An intron-containing meiosis-induced recombination gene, *rec15*, of *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Molecular Microbiology, 1995, 17(3): 439-448.
- [32] LIU H, LYU H M, ZHU K K, et al. The emergence and evolution of intron-poor and intronless genes in intron-rich plant gene families[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2021, 105(4): 1072-1082.
- [33] HUMMEL I, BOURDAIS G, GOUESBET G, et al. Differential gene expression of *arginine decarboxylase ADC1* and *ADC2* in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development [J]. New Phytologist, 2004, 163(3): 519-531.
- [34] 郭彩明, 陈宗明, 陈春丽. 精氨酸脱羧酶基因 *AtADC2* 通过调节超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性增强拟南芥耐盐性[J]. 植物生理学报, 2015, (7): 1067-1074.
- GUO C M, CHEN Z M, CHEN C L. *AtADC2* enhances salt tolerance through regulating activities of superoxide dismutase and catalase in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology Communications, 2015, (7): 1067-1074.