

王 祺, 蒲媛媛, 赵玉红, 等. 强冬性甘蓝型冬油菜抽薹相关基因 *SVP* 和 *SOCI* 的克隆与表达分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(5): 1088-1097.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.05.003

强冬性甘蓝型冬油菜抽薹相关基因 *SVP* 和 *SOCI* 的克隆与表达分析

王 祺, 蒲媛媛, 赵玉红, 孙柏林, 金姣姣, 王万鹏, 牛早霞, 刘丽君, 马 骊, 武军艳, 方 彦, 李学才, 孙万仓

(甘肃农业大学农学院/甘肃省油菜工程技术研究中心/甘肃省干旱生境作物学重点实验室/甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 甘蓝型冬油菜(*Brassica napus* L.)的冬前抽薹对北方冬油菜生产是极为不利的。*SVP* (Short vegetative phase) 和 *SOCI* (Suppressor of overexpression of constans 1) 是与甘蓝型冬油菜抽薹及生长相关的同源基因, 为揭示甘蓝型冬油菜抽薹机制, 以甘肃农业大学育成的强冬性甘蓝型冬油菜 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 为试验材料, 对 *SVP* 和 *SOCI* 克隆和表达情况进行分析。核酸序列分析结果表明, 强冬性甘蓝型冬油菜 *SVP* 和 *SOCI* 基因的开放阅读框(ORF)长度分别为 726 bp 和 642 bp, 分别编码 241 个和 213 个氨基酸; 2 个基因在进化过程中高度保守, 属于 *MADS-box* 家族成员, 编码的蛋白质均为 α -螺旋和卷曲环组成的亲水蛋白质, 通过对不同抗寒性材料 *SVP* 和 *SOCI* 氨基酸序列比较, 分别发现了 4 个和 9 个氨基酸位点突变。荧光定量(qPCR)分析结果表明, *SVP* 基因在未抽薹植株叶中高表达, 在抽薹未现蕾及抽薹现蕾植株叶中低表达; *SOCI* 基因相对表达量的变化趋势与 *SVP* 基因相反, 抽薹现蕾及成熟植株中的 *SOCI* 基因相对表达量较未抽薹植株高。由此推测 *SVP* 和 *SOCI* 基因可能参与甘蓝型冬油菜抽薹及成花的调控, 研究结果可为今后选育强冬性甘蓝型冬油菜晚抽薹抗寒品种提供理论依据。

关键词: 甘蓝型冬油菜; 抽薹; *SVP* 基因; *SOCI* 基因; 基因表达

中图分类号: S332; Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)05-1088-10

Cloning and expression analysis on bolting related genes *SVP* and *SOCI* in strong winteriness *Brassica napus* L.

WANG Qi, PU Yuan-yuan, ZHAO Yu-hong, SUN Bai-lin, JIN Jiao-jiao, WANG Wan-peng, NIU Zao-xia, LIU Li-jun, MA Li, WU Jun-yan, FANG Yan, LI Xue-cai, SUN Wan-cang

(College of Agronomy, Gansu Agricultural University/Rapeseed Engineering Research Center of Gansu Province/Key Laboratory of Arid Land Crop Science in Gansu Province/Gansu Key Laboratory of Crop Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, China)

收稿日期: 2020-03-16

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-12); 国家“973”计划项目(2015CB150206); 科技部项目(2016YFD0101300); 甘肃省重大专项(17ZD2NA016-4); 甘肃省现代农业产业技术体系项目(GARS-TSZ-1); 国家自然科学基金项目(31860388、31960435)

作者简介: 王 祺(1994-), 男, 甘肃金塔人, 硕士研究生, 研究方向为农艺与种业。(E-mail) 962655876@qq.com

通讯作者: 孙万仓, (E-mail) 18293121851@163.com

Abstract: The pre-winter bolting of *Brassica napus* L. is extremely disadvantageous to the production of winter rape in North China. *SVP* (Short vegetative phase) and *SOCI* (Suppressor of overexpression of constans 1) are the homologous genes related to bolting and growth in *Brassica napus* L.. In order to reveal the bolting mechanism of winter rape (*Brassica napus* L.), strong winteriness *Brassica napus* L. strains 16VHNTS158, 16VHNPZ269-1 and 16VHTS309-10 bred by Gansu Agricultural University

were used as experimental materials to analyse the cloning and expression of *SVP* and *SOCI*. The results of nucleotide sequence analysis showed that the open reading frames (ORF) of *SVP* and *SOCI* genes in winter type *Brassica napus* L. were 726 bp and 642 bp in length, encoding 241 and 213 amino acids respectively. The two genes belonging to *MADS-box* family are highly conserved in evolution, which encode hydrophilic proteins composed of α -helix and loop. By comparing the amino acid sequences of *SVP* and *SOCI* in different cold-resistant materials, four and nine amino acid site mutations were found respectively. The results of quantitative real-time PCR (qRT-PCR) showed that *SVP* gene was highly expressed in the leaves of unbolting plants, but lowly expressed in the leaves of bolting plants and budding plants. The relative expression changes of *SOCI* gene were opposite to *SVP* gene. The relative expression of *SOCI* gene in budding plants and mature plants were higher than in unbolting plants. It is suggested that *SVP* and *SOCI* gene may be involved in the regulation of bolting and flower formation in *Brassica napus* L., the results of this study can provide theoretical basis for the breeding of cold-resistant and late bolting varieties of strong winteriness *Brassica napus* L. in the future.

Key words: *Brassica napus* L.; bolting; *SVP* gene; *SOCI* gene; gene expression

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是中国重要的油料作物,其播种面积占油菜播种面积的90%左右^[1],但抗寒性差,在35°N左右地区难以越冬^[2]。甘蓝型油菜的生长发育特性不同于白菜型油菜,先抽薹、后现蕾,这种生长特性对抵御北方地区的严酷自然环境极为不利,极易遭受冻害的影响^[3]。甘蓝型冬油菜抽薹早晚与其抗寒性密切相关,蒲媛媛等^[4]的研究结果表明,抗寒性强的甘蓝型冬油菜在春播条件下不抽薹,春化率低,绝大部分植株只进行营养生长;而抗寒性弱的材料,春化率较高,会出现抽薹、抽薹现蕾以及开花等处于不同生长发育阶段的植株。因此,研究甘蓝型冬油菜晚抽薹的分子调控机制,对甘蓝型冬油菜的抗寒育种具有重要意义。*SVP*和*SOCI*都是*MADS-box*家族成员,*SVP*是重要的开花抑制基因,参与花分生组织的形成,并调节开花途径中关键基因*SOCI*的表达,从而调控开花^[5]。Hartmann等^[6]研究发现,*SVP*基因在拟南芥早花突变体的营养组织和花原基中表达,对抽薹开花具有抑制作用。Tang等^[7]发现,在拟南芥中过表达*LoSVP*基因的转基因植株较对照延迟6 d开花,说明*LoSVP*基因对抑制拟南芥开花具有重要作用。王世祥等^[8]发现,随着苹果花芽的不断分化,*SVP*表达量逐渐下调,表明*SVP*基因可能抑制苹果成花诱导。大麦*SVP*基因异位表达引起成花阻遏^[9];水稻中*SVP*基因在营养生长阶段稳定表达,而在生殖生长阶段表达量有不同程度的减少^[10]。*SOCI*基因不仅调控开花时间和参与花器官形态建成^[11-12],也是光周期、春化途径、自主途径、赤霉素途径等开花路径的主要调控信号整合因子^[13]。Heuer等^[14]在玉米中克隆到*SOCI*的同源基因*ZmMADS1*,并证明该基因与开花相关。Shitsukawa等^[15]在小麦

中克隆到*WSOCI*,发现在拟南芥中过表达*WSOCI*基因提前了转基因植株的开花时间。Zhong等^[16]在大豆中克隆到拟南芥*SOCI*同源基因*GmGAL1*,发现其主要作用是作为开花途径的关键调节因子,与拟南芥中*SOCI*同源基因功能相似。*SVP*和*SOCI*对强冬性甘蓝型冬油菜生长发育的影响尚未见报道。本研究以甘肃农业大学育成的强冬性甘蓝型冬油菜16VHNTS158、16VHNPZ269-1和16VHTS309-10为试验材料,研究*SVP*和*SOCI*对甘蓝型冬油菜生长发育的影响,探究*SVP*和*SOCI*基因在甘蓝型冬油菜抽薹、现蕾以及成花过程中的作用,为强冬性甘蓝型冬油菜晚抽薹抗寒品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以甘肃农业大学选育的16VHNTS158、16VHNPZ269-1和16VHTS309-10等3个不同抗寒性的强冬性甘蓝型冬油菜品系为参试材料(表1)。试验于2018年在甘肃省永登县上川镇甘肃省油菜工程中心试验基地进行,试验点位于36°03'N、103°40'E,海拔2 150 m,最大冻土深度113 cm,最冷月平均气温-8.1℃,最冷月平均最低气温-14.6℃,极端最低气温-28.0℃^[17]。2018年3月21日播种,行距20 cm,株距8~10 cm,小区面积4 m²,3次重复,于8月24日对3个冬油菜品系的植株生长发育状态进行调查取样分析。

取样:3个冬油菜品系小区内的植株处于未抽薹、抽薹未现蕾、抽薹现蕾及结角成熟4种生长发育状态。(1)对处于不同发育阶段的植株叶片进行取样,包含未抽薹植株叶片、抽薹未现蕾植株叶片、抽

薹现蕾植株叶片以及结角成熟植株叶片。(2)对植株的不同组织器官进行取样,对同一植株的叶、薹、花 3 个组织部位分别进行取样。取样后用液氮速冻,用于 RNA 提取和基因克隆等试验。

表 1 试验材料的抗寒特性

Table 1 Cold resistance characteristics of test materials

品系	抗寒性强弱排序	半致死温度(℃)	春化率(%)
16VHTS309-10	1	-7.0	25.00
16VHNTS158	2	-6.1	38.71
16VHNPZ269-1	3	-5.7	43.98

1.2 甘蓝型冬油菜叶、薹及花的总 RNA 提取与反转录

根据植物总 RNA 提取试剂盒 DP419[天根生化科技(北京)有限公司产品]提取步骤分别提取甘蓝型冬油菜叶、花薹及花的总 RNA,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性并用 NanoPhotometer Pearl 测定浓度。用 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 反转录试剂盒(大连 TaKaRa 公司)进行反转录,得到 cDNA,置于-20℃冰箱保存备用。

1.3 SVP 和 SOCI 基因的克隆

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中得到与甘蓝型油菜相似性为 100%,位于 A09 染色体上的 SVP 和位于 C04 染色体上的 SOCI 的 CDS(编码序列),利用 Primer Premier 5.0 设计 SVP 和 SOCI 基因的克隆引物(表 2)。以 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 未抽薹植株叶片的 cDNA 为模板,采用聚合酶链式反应(PCR)进行体外扩增,扩增程序为:98℃预变性 2 min;98℃变性 10 s;SVP 基因退火温度为 55℃,退火 15 s;SOC1 基因退火温度为 58℃,退火 15 s;72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 5 min,4℃保存。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,用 DNA 凝胶回收试剂盒(AxyPrep DNA Gel Extraction Kit)对目的片段进行切胶回收,与 pMD™19-T 克隆载体进行连接,转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,37℃培养 12 h,筛选蓝白斑并进行菌液 PCR 验证,最终挑选 3 个阳性克隆菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 基因的生物信息学分析

应用 DANMAN 软件对克隆基因进行多重序列对比和氨基酸同源性分析,用 NCBI 的 ORF finder

分析氨基酸序列,利用 ProtParam 在线软件分析氨基酸理化性质,包括氨基酸数目、理论等电点、相对分子质量^[18],利用 ProtScale 在线软件分析蛋白质的亲水性和疏水性^[19],利用 NCBI (Conserved Domain Search) 分析蛋白质保守结构域,利用 TMpred 在线软件分析蛋白质跨膜区特性,利用 SignalP 4.0 Server 预测蛋白质信号肽,利用 SOPMA 在线工具进行蛋白质二级结构预测,利用 SWISS-MODEL 预测蛋白质三级结构,利用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树^[20]。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
SVP-F	ATGGCGAGAGAAAAGATTTCAGATCAGG	基因克隆
SVP-R	CTAACCACCATACGGTAAGCCGAG	
SOCI-F	ATGGTGAGGGGAAACTCAGA	基因克隆
SOCI-R	TCACCTTCTTGAAGAACAAGGTAACCC	
SVP-F1	TGCGACGCTGATGTTGCTCTC	实时荧光定量 PCR
SVP-R1	GCCTCTCTAACACTTCCCTCATGC	
SOCI-F1	CAGCATTTCAAACATGAAGCAGC	实时荧光定量 PCR
SOCI-R1	TGCCTTCTCCCAAGAGTTTACG	
Actin-F	TCCATCCATCGTCCACAG	实时荧光定量 PCR
Actin-R	GCATCATCACAAGCATCCTT	

1.5 基因的表达分析

试验采用实时荧光定量法(qPCR),分析 SVP 和 SOCI 在不同发育阶段下甘蓝型冬油菜植株叶片、花薹及花中的相对表达量,基因相对表达量参照 Pfaffl 法^[21]进行计算。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物(表 2)。根据 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa,大连)进行 qPCR 试验,以 Actin 为内参基因^[22],反应条件为:95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s,60℃退火 30 s,共 40 个循环。熔解程序:95℃15 s,60℃30 s,95℃15 s。扩增效率计算:将 cDNA 稀释为 50.000 ng/μl、25.000 ng/μl、12.500 ng/μl、6.250 ng/μl 和 3.125 ng/μl 的质量浓度后作为模板进行扩增,利用 Excel 2016 绘制标准曲线后,进一步计算得到扩增效率。

1.6 数据分析

采用 Excel 2016、Origin 2018 和 SPSS 22.0 统计分析软件进行数据分析与作图。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型冬油菜 *SVP* 基因和 *SOC1* 基因的克隆

以 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 叶片的 cDNA 为模板,设计特异性引物并通过 PCR 分别获得大小约为 720 bp 的 *SVP* 和 640 bp 的 *SOC1*(图 1)。切胶回收后连接至 pMD™ 19-T 载体,转化大肠杆菌后进行蓝白斑筛选,菌液经 PCR 鉴定后挑选阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

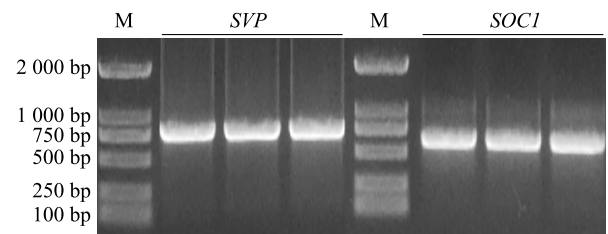


图 1 PCR 扩增产物电泳结果
Fig.1 Electrophoresis results of PCR amplification products

2.2 甘蓝型冬油菜 *SVP* 蛋白和 *SOC1* 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 *SVP* 蛋白和 *SOC1* 蛋白的理化特性

2.2.1.1 *SVP* 蛋白的理化特性 通过 NCBI 查询 *SVP* 的开放阅读框,发现该基因序列中含有大小为 726 bp 的完整开放阅读框,编码 241 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAG。分别对从 16VHNTS158、16VHNPZ269-1、16VHTS309-10 克隆到的 *SVP* 基因所编码的蛋白质进行了理化性质分析,如表 3 所示,*SVP* 蛋白属于不稳定蛋白质。对克隆到的 3 个 *SVP* 基因所编码的蛋白质进行亲水性、信号肽、保守结构域、跨膜区、蛋白质二级结构及三级结构预测,发现 3 个蛋白质的分析结果一致,因此,接下来主要以 16VHNTS158 中克隆到的 *SVP* 基因所编码的蛋白质进行分析。*SVP* 蛋白具有 13 个亲水区 and 7 个疏水区,具有保守的 MADS 结构域和 K-box 结构域,该蛋白质氨基酸序列中不存在信号肽切割位点,但含有 2 个跨膜区域,蛋白质二级结构和三级结构预测结果显示, *SVP* 蛋白主要由 α -螺旋和卷曲环组成。

2.2.1.2 *SOC1* 蛋白的理化特性 通过 NCBI 查询 *SOC1* 的开放阅读框,发现该基因序列中含有大小为 642 bp 的完整开放阅读框,编码 213 个氨基酸,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA。分别对

从 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 克隆到的 *SOC1* 基因编码的蛋白质进行理化性质分析,如表 4 所示,*SOC1* 蛋白属于不稳定蛋白质。对克隆到的 3 个 *SOC1* 基因所编码的蛋白质进行亲水性、保守结构域、信号肽、跨膜区、蛋白质二级结构及三级结构预测,发现 3 个蛋白质的分析结果一致,因此,接下来主要以 16VHNTS158 中克隆到的 *SOC1* 基因所编码的蛋白质进行分析。*SOC1* 蛋白有 13 个亲水区和 7 个疏水区,具有保守的 MADS 结构域和 K-box 结构域,该蛋白质不存在信号肽切割位点,无跨膜区。蛋白质二级结构及三级结构预测结果表明, *SOC1* 蛋白主要由 α -螺旋和卷曲环组成。

表 3 *SVP* 蛋白理化性质分析

Table 3 Physicochemical properties analysis on *SVP* proteins

品系	亲水性 平均值	等电点	相对分子 质量	不稳定 指数
16VHNTS158	-0.722	5.57	27 311	59.62
16VHNPZ269-1	-0.722	5.57	27 311	59.62
16VHTS309-10	-0.654	6.04	27 110	55.84

不稳定系数小于 40 时,预测蛋白质稳定,反之则不稳定。

表 4 *SOC1* 蛋白理化性质分析

Table 4 Physicochemical properties analysis on *SOC1* proteins

品系	亲水性 平均值	等电点	相对分子 质量	不稳定 指数
16VHNTS158	-0.810	9.18	24 392	46.39
16VHNPZ269-1	-0.794	9.18	24 349	49.22
16VHTS309-10	-0.794	9.18	24 349	49.22

不稳定系数小于 40 时,预测蛋白质稳定,反之则不稳定。

2.2.2 *SVP* 蛋白和 *SOC1* 蛋白氨基酸序列比对

2.2.2.1 *SVP* 蛋白氨基酸序列比对 通过 DNAMAN 软件对克隆到的 *SVP* 基因所编码的蛋白质氨基酸序列比对发现,16VHNTS158 和 16VHNPZ269-1 的蛋白质氨基酸序列相似性为 100.00%,与 16VHTS309-10 的相似性为 98.34%,比较 16VHNTS158 和 16VHNPZ269-1 与 16VHTS309-10 的 *SVP* 蛋白氨基酸序列发现,存在 4 个氨基酸位点突变。将克隆到的 *SVP* 基因所编码的蛋白质氨基酸序列与 NCBI 数据库中甘蓝型油菜和拟南芥的 *SVP* 蛋白氨基酸序列进行多序列比对发现,16VHNTS158、16VHNPZ269-1、16VHTS309-10 与甘蓝型油菜的相似性分别为 99.59%、99.59%、97.93%,与拟南芥的相似性分别为 92.12%、

92.12%、91.29%(图2)。

16VHNTS158	MAREKICIRKIDNATARCVTFSKRRRGIFKKAEELSVLCD	40
16VHNPZ269-1	MAREKICIRKIDNATARCVTFSKRRRGIFKKAEELSVLCD	40
16VHTS309-10	MAREKICIRKIDNATARCVTFSKRRRGIFKKAEELSVLCD	40
<i>Brassica napus</i>	MAREKICIRKIDNATARCVTFSKRRRGIFKKAEELSVLCD	40
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MAREKICIRKIDNATARCVTFSKRRRGIFKKAEELSVLCD	40
16VHNTS158	ADVALIIFSSSTCKLFEFCSSSMFEVIERHNLCKNLEKLD	80
16VHNPZ269-1	ADVALIIFSSSTCKLFEFCSSSMFEVIERHNLCKNLEKLD	80
16VHTS309-10	ADVALIIFSSSTCKLFEFCSSSMFEVIERHNLCKNLEKLD	80
<i>Brassica napus</i>	ADVALIIFSSSTCKLFEFCSSSMFEVIERHNLCKNLEKLD	80
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ADVALIIFSSSTCKLFEFCSSSMFEVIERHNLCKNLEKLD	80
16VHNTS158	CPSIFICIVFNSEHALISKEITAKSHRIRCMRGFFICGIN	120
16VHNPZ269-1	CPSIFICIVFNSEHALISKEITAKSHRIRCMRGFFICGIN	120
16VHTS309-10	CPSIFICIVFNSEHALISKEITAKSHRIRCMRGFFICGIN	120
<i>Brassica napus</i>	CPSIFICIVFNSEHALISKEITAKSHRIRCMRGFFICGIN	120
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CPSIFICIVFNSEHALISKEITAKSHRIRCMRGFFICGIN	120
16VHNTS158	IEEIQCLEKALFSGITRVITKSEKIMNEISYLCKGVC	160
16VHNPZ269-1	IEEIQCLEKALFSGITRVITKSEKIMNEISYLCKGVC	160
16VHTS309-10	IEEIQCLEKALFSGITRVITKSEKIMNEISYLCKGVC	160
<i>Brassica napus</i>	IEEIQCLEKALFSGITRVITKSEKIMNEISYLCKGVC	160
<i>Arabidopsis thaliana</i>	IEEIQCLEKALFSGITRVITKSEKIMNEISYLCKGVC	160
16VHNTS158	MDENKRLRCOCTCLTEENRIGCCITNNVHERYCGGESEN	200
16VHNPZ269-1	MDENKRLRCOCTCLTEENRIGCCITNNVHERYCGGESEN	200
16VHTS309-10	MDENKRLRCOCTCLTEENRIGCCITNNVHERYCGGESEN	200
<i>Brassica napus</i>	MDENKRLRCOCTCLTEENRIGCCITNNVHERYCGGESEN	200
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MDENKRLRCOCTCLTEENRIGCCITNNVHERYCGGESEN	199
16VHNTS158	IAVYEEGSSSEITNAGNSTGAFVDSSESDISLRIGI FYG	240
16VHNPZ269-1	IAVYEEGSSSEITNAGNSTGAFVDSSESDISLRIGI FYG	240
16VHTS309-10	IAVYEEGSSSEITNAGNSTGAFVDSSESDISLRIGI FYG	240
<i>Brassica napus</i>	IAVYEEGSSSEITNAGNSTGAFVDSSESDISLRIGI FYG	240
<i>Arabidopsis thaliana</i>	IAVYEEGSSSEITNAGNSTGAFVDSSESDISLRIGI FYG	239

图2 16VHNTS158、16VHNPZ269-1和16VHTS309-10 SVP蛋白氨基酸序列与甘蓝型油菜和拟南芥 SVP蛋白氨基酸序列比对

Fig.2 Amino acid sequences alignment of 16VHNTS158, 16VHNPZ269-1 and 16VHTS309-10 SVP proteins with amino acid sequences of SVP proteins in *Brassica napus* L. and *Arabidopsis thaliana*

2.2.2.2 SOC1 蛋白氨基酸序列比对 采用 DNAMAN 软件对克隆到的 *SOC1* 基因所编码的蛋白质氨基酸序列比对发现,16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 的相似性为 100.00%,与 16VHNTS158 的相似性为 95.77%,比较 16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 与 16VHNTS158 的 SOC1 蛋白质氨基酸序列发现,存在 9 个氨基酸位点突变。将克隆到的 *SOC1* 基因所编码的蛋白质氨基酸序列与 NCBI 数据库中甘蓝型油菜和拟南芥的 SOC1 蛋白氨基酸序列进行多序列比对发现,16VHNTS158、16VHNPZ269-1、16VHTS309-10 与甘蓝型油菜的相似性分别为 96.24%、99.53%、99.53%,与拟南芥的相似性分别为 91.12%、94.39%、94.39%(图3)。

2.2.3 SVP 蛋白和 SOC1 蛋白系统进化树分析

2.2.3.1 SVP 蛋白系统进化树 将 SVP 基因在 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 中所编码的 SVP 蛋白氨基酸序列与甘蓝型油菜、甘蓝等 8 个物种的 SVP 蛋白同源氨基酸序列构建系统进化树

(图4),DNAMAN 软件分析结果显示,16VHNTS158、16VHNPZ269-1 与甘蓝型油菜 SVP 基因编码的蛋白质氨基酸序列的相似性均为 99.59%,与甘蓝、萝卜的相似性达到 98.76%、97.93%,与烟草属的相似性为 54.36%。16VHTS309-10 与甘蓝型油菜、甘蓝、萝卜的 SVP 蛋白氨基酸序列的相似性分别达到 97.93%、98.76%、96.27%,与烟草属的相似性为 54.36%。由此推测 SVP 基因在 16VHNTS158、16VHNPZ269-1、16VHTS309-10、甘蓝型油菜、甘蓝等十字花科植物中的功能相似,与烟草属植物的功能差异较大。

2.2.3.2 SOC1 蛋白系统进化树 将克隆的 *SOC1* 基因所编码的蛋白质与其他 8 个不同物种的 SOC1 蛋白构建系统进化树(图5)。DNAMAN 比对发现,16VHNTS158 与甘蓝型油菜 SOC1 蛋白的相似性达到 96.24%,与萝卜、芥菜、亚麻荠的相似性分别为 95.77%、94.84%、92.02%,与烟草的相似性为 63.93%。16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 与甘蓝型油菜 SOC1 蛋白氨基酸序列的相似性均为

99.53%,与萝卜、芥菜、甘蓝的相似性分别为99.06%、98.59%、94.37%,与烟草的相似性为64.38%。由此推测 *SOC1* 基因在十字花科植物(甘

蓝型油菜、芥菜、萝卜等)中功能相似,而在烟草属植物中的功能差异较大。

16VHNTS158	MVRGKTCMKRIENATSRQVTFSKRRNGLIKKAFELSVLCD	40
16VHNPZ269-1	MVRGKTCMKRIENATSRQVTFSKRRNGLIKKAFELSVLCD	40
16VHTS309-10	MVRGKTCMKRIENATSRQVTFSKRRNGLIKKAFELSVLCD	40
<i>Brassica napus</i>	MVRGKTCMKRIENATSRQVTFSKRRNGLIKKAFELSVLCD	40
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MVRGKTCMKRIENATSRQVTFSKRRNGLIKKAFELSVLCD	40
16VHNTS158	AEVSLIIFSEFGKIYEFASSNMCDTVDRYLRLHTKDRVSSK	80
16VHNPZ269-1	AEVSLIIFSEFGKIYEFASSNMCDTVDRYLRLHTKDRVSSK	80
16VHTS309-10	AEVSLIIFSEFGKIYEFASSNMCDTVDRYLRLHTKDRVSSK	80
<i>Brassica napus</i>	AEVSLIIFSEFGKIYEFASSNMCDTVDRYLRLHTKDRVSSK	80
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEVSLIIFSEFGKIYEFASSNMCDTVDRYLRLHTKDRVSSK	80
16VHNTS158	FVSEFNVCHEKFEAANMMKKIECI FASKRKLIICFGIGTCS	120
16VHNPZ269-1	FVSEFNVCHEKFEAANMMKKIECI FASKRKLIICFGIGTCS	120
16VHTS309-10	FVSEFNVCHEKFEAANMMKKIECI FASKRKLIICFGIGTCS	120
<i>Brassica napus</i>	FVSEFNVCHEKFEAANMMKKIECI FASKRKLIICFGIGTCS	120
<i>Arabidopsis thaliana</i>	FVSEFNVCHEKFEAANMMKKIECI FASKRKLIICFGIGTCS	120
16VHNTS158	IEELCOIECCLEKSVKCV RARKTCVFEKCEIOLKCKEKAL	160
16VHNPZ269-1	IEELCOIECCLEKSVKCV RARKTCVFEKCEIOLKCKEKAL	160
16VHTS309-10	IEELCOIECCLEKSVKCV RARKTCVFEKCEIOLKCKEKAL	160
<i>Brassica napus</i>	IEELCOIECCLEKSVKCV RARKTCVFEKCEIOLKCKEKAL	160
<i>Arabidopsis thaliana</i>	IEELCOIECCLEKSVKCV RARKTCVFEKCEIOLKCKEKAL	160
16VHNTS158	AAFNEKTA FKWGSFETFEWSNKNQESGRGDED.SSPSSEV	199
16VHNPZ269-1	AAFNEKTA FKWGSFETFEWSNKNQESGRGDED.SSPSSEV	199
16VHTS309-10	AAFNEKTA FKWGSFETFEWSNKNQESGRGDED.SSPSSEV	199
<i>Brassica napus</i>	AAFNEKTA FKWGSFETFEWSNKNQESGRGDED.SSPSSEV	199
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAFNEKTA FKWGSFETFEWSNKNQESGRGDED.SSPSSEV	200
16VHNTS158	ETCLFTIGLPCSSR	212
16VHNPZ269-1	ETCLFTIGLPCSSR	212
16VHTS309-10	ETCLFTIGLPCSSR	212
<i>Brassica napus</i>	ETCLFTIGLPCSSR	212
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ETCLFTIGLPCSSR	213

图3 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 *SOC1* 蛋白氨基酸序列与甘蓝型油菜及拟南芥 *SOC1* 蛋白氨基酸序列对比

Fig.3 Amino acid sequences alignment of 16VHNTS158, 16VHNPZ269-1 and 16VHTS309-10 *SOC1* proteins with amino acid sequences of *SOC1* proteins in *Brassica napus* L. and *Arabidopsis thaliana*

2.3 *SVP* 基因和 *SOC1* 基因在甘蓝型冬油菜中的表达分析

由图 6A 可知,在不同发育阶段,*SVP* 基因的相对表达量在 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 中差异显著 ($P < 0.05$),*SVP* 在未抽薹植株叶中高表达,在抽薹未现蕾、抽薹现蕾及成熟植株叶中相对表达量显著降低,其中抽薹未现蕾的植株叶中 *SVP* 的相对表达量分别下调了 83%、80% 和 65%,与未抽薹植株相比差异显著 ($P < 0.05$)。16VHNTS158 和 16VHNPZ269-1 叶中 *SVP* 相对表达量表现为未抽薹>抽薹未现蕾>抽薹现蕾,但材料间有差异,16VHTS309-10 中表现为未抽薹>抽薹现蕾>抽薹未现蕾。由图 6B 可知,不同组织中 *SVP* 基因的相对表达量不同,16VHTS309-10 成熟植株的蕾与花中的相对表达量高于叶片。总体来说,未抽薹

植株中 *SVP* 基因相对表达量显著高于抽薹未现蕾及抽薹现蕾植株,3 个参试材料中,16VHTS309-10 与其他 2 个材料有一定差异,可能与其感温性及抗寒性有关。这些结果表明 *SVP* 基因可能在甘蓝型冬油菜抽薹及春化中发挥作用。

由图 7 可知,16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 叶中 *SOC1* 基因的相对表达量与 *SVP* 不同,抽薹未现蕾植株及抽薹现蕾植株相对表达量高于未抽薹植株,差异显著 ($P < 0.05$)。由图 7A 可知,16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 抽薹未现蕾植株叶中 *SOC1* 的相对表达量较未抽薹植株分别上调了 119%、192% 和 165%,差异显著 ($P < 0.05$),抽薹现蕾植株叶中则分别上调了 139%、198% 和 131%。图 7B 则说明,*SOC1* 在 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 成熟植株的不同组织部位中相对表

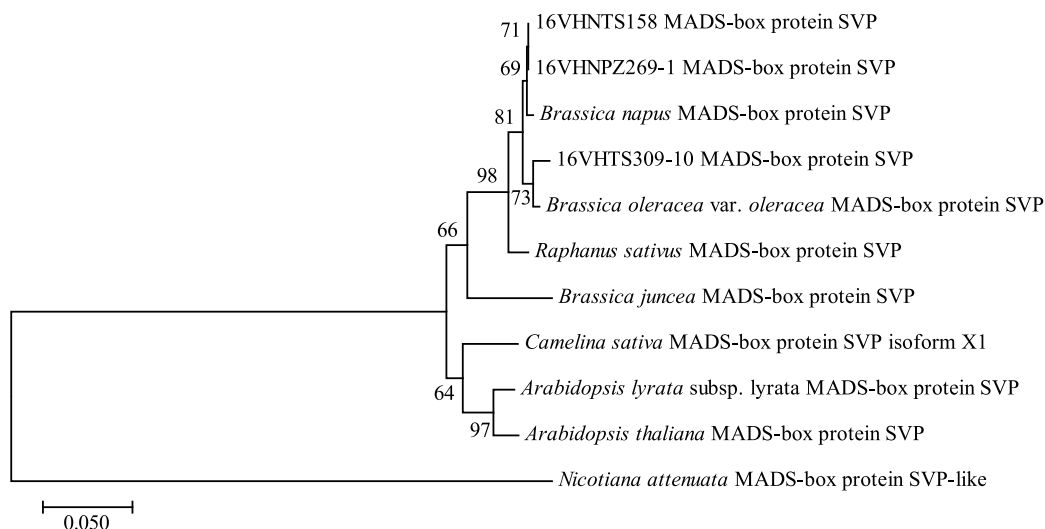


图 4 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 及其他物种 SVP 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of amino acid sequences of SVP proteins in 16VHNTS158, 16VHNPZ269-1, 16VHTS309-10 and other species

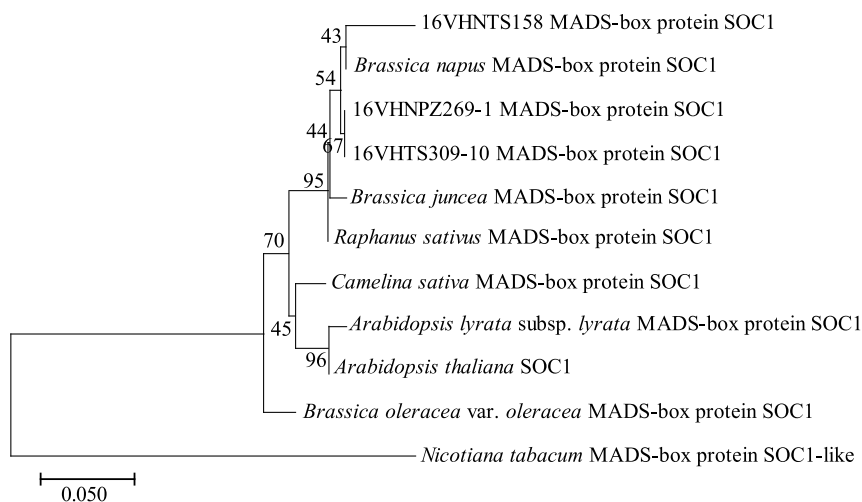


图 5 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 及其他物种 SOC1 蛋白氨基酸序列的系统进化树

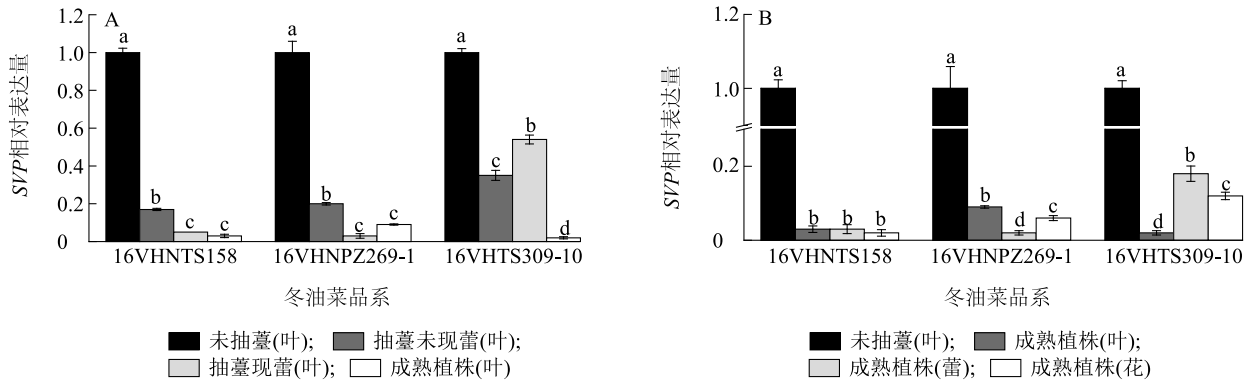
Fig.5 Phylogenetic tree of amino acid sequences of SOC1 proteins in 16VHNTS158, 16VHNPZ269-1, 16VHTS309-10 and other species

达量有显著差异,在叶片中最高,花蕾中次之,花中最少。这些结果显示,*SOC1* 基因可能参与调控甘蓝型冬油菜的抽薹及开花过程。

3 讨论

本研究发现,16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 3 个强冬性甘蓝型冬油菜未抽薹植株 *SVP* 基因表达量显著高于抽薹未现蕾及抽薹现蕾植株,而在成熟植株中几乎检测不到 *SVP* 基因的表达。Michaels 等^[23] 发现,拟南芥 *svp* 突变体开花早,而 *SVP* 过表达株系开花晚。冬小麦 *SVP* 基因在

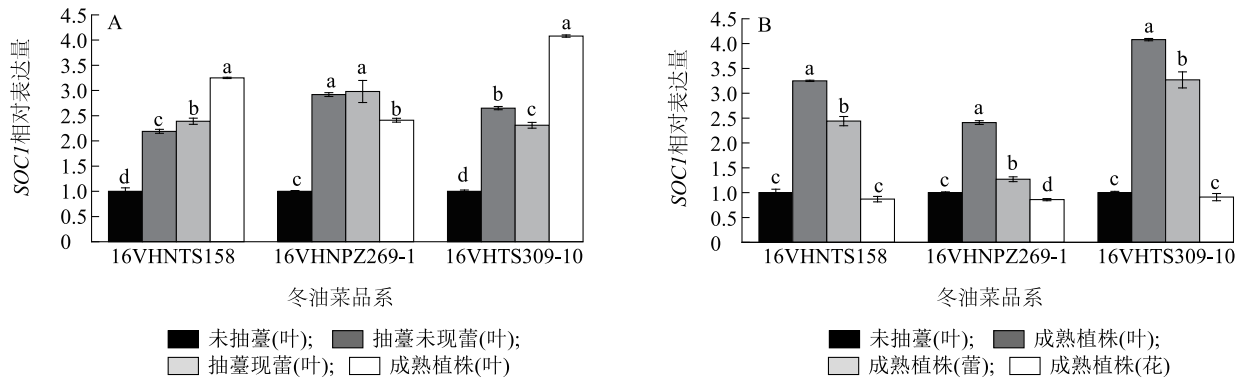
营养阶段上调表达,春化过程中 *SVP* 基因表达量受到抑制,证明其可能抑制开花^[24]。Lee 等^[25-26] 对拟南芥的研究发现,*SVP* 过表达植株中 *FT*、*TFS*、*SOC1* 的表达量减少,但在 *SVP* 功能缺失突变体中又上调表达,说明 *SVP* 对 *FT*、*TFS*、*SOC1* 有抑制作用,且抑制部位是在分生组织中。*SVP* 是开花转变的中心调控者,直接抑制芽顶端和叶中 *SOC1* 的表达^[27]。本研究中,*SVP* 在抽薹现蕾及成熟植株叶片中的表达量减少时,*SOC1* 则开始上调表达,说明 *SVP* 的表达在一定程度上可能抑制了 *SOC1* 的表达。Lee^[28] 研究发现,*SOC1/AGL20* 在哥伦比亚野生型拟南芥的



A:16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 不同发育阶段下 *SVP* 的相对表达量;B:16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 不同组织部位 *SVP* 的相对表达量。同一组织部位/发育阶段的不同品系间标有不同小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

图 6 *SVP* 在 3 个甘蓝型冬油菜品系中的相对表达量

Fig.6 Relative expression of *SVP* in three winter brassica napus lines



A:16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 不同发育阶段下 *SOC1* 的相对表达量;B:16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 不同组织部位 *SOC1* 的相对表达量。同一组织部位/发育阶段的不同品系间标有不同小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

图 7 *SOC1* 在 3 个甘蓝型冬油菜品系中的相对表达量

Fig.7 Relative expression of *SOC1* in three winter *Brassica napus* L. lines

叶片、叶芽、花序、茎以及根中均有表达,并且其表达量随植株生长而不断提高,在成熟植株叶片中的表达量最高。在水稻生长期的各个组织部位也检测到 *OsSOC1* 基因的表达,在成熟植株叶片中表达量最高^[29]。由此推测, *SVP* 基因在调控甘蓝型冬油菜从营养生长到生殖生长的过程中发挥着作用,而且其调控方向与 *SOC1* 基因相反。

控制作物性状的相关基因的突变是作物性状变异的根源,寻找与主要农艺性状相关联的 SNP,能够为农作物重要农艺性状相关基因定位及分子标记辅助育种奠定基础^[30]。本研究发现,2 个抗寒性较弱的材料 16VHNTS158 和 16VHNPZ269-1 的 *SVP* 基因序列完全一致,但与强抗寒性材料 16VHTS309-10 相比,存在 4 个氨基酸位点突变。反观 *SOC1*, 比对

3 个不同抗寒性材料序列发现, 16VHNTS158 和 16VHNPZ269-1 之间存在 9 个氨基酸位点突变,而 16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 的基因序列却一致。因此,这些位点的突变是否改变了甘蓝型冬油菜的抗寒性还有待我们进一步研究。

春化率可以反映甘蓝型冬油菜的抗寒性^[4],抗寒性强的品种春化率低,春化所需温度低、时间长,而抗寒性弱的品种春化率高,所需温度相对较高、时间短,更容易通过春化开花^[31-33]。Waalén 等^[34]对油菜抗寒性的研究发现,油菜达到春化饱和所需的时间越长,其保持耐寒性的时间越长,当油菜由营养生长进入生殖生长,耐寒性也随之减弱。孙万仓等^[35]研究发现,白菜型冬油菜的抗寒性与其冬性呈正相关,且冬性越强,春化所需的低温时间也越长。甘蓝型冬油

菜生长发育过程中,抽薹的植株不确定是否已经开始春化阶段,但未抽薹的植株肯定是未开始春化阶段发育的植株。本研究,16VHNTS158、16VHNPZ269-1和16VHTS309-10 3个品系春播后,未抽薹植株叶中 *SVP* 相对表达量均最高,抽薹现蕾的植株叶片中 *SVP* 的相对表达量显著降低。研究还发现,16VHTS309-10 抽薹未现蕾、抽薹现蕾植株叶片以及成熟阶段蕾和花中的 *SVP* 相对表达量较 16VHNTS158 和 16VHNPZ269-1 高,可能与其抗寒性强于其他 2 个品系有关。由此推测 *SVP* 基因可能与抑制甘蓝型冬油菜的抽薹有关。

4 结论

本研究从甘蓝型冬油菜 16VHNTS158、16VHNPZ269-1 和 16VHTS309-10 中克隆到 *SVP* 和 *SOC1* 基因,基因相对表达量分析结果表明,在强冬性甘蓝型冬油菜中,*SVP* 基因在未抽薹植株中的表达量高于抽薹未现蕾及抽薹现蕾植株,*SOC1* 基因在抽薹未现蕾及抽薹现蕾植株中的表达量高于未抽薹植株。由此推测 *SVP* 可能对未抽薹特性具有调控作用,*SOC1* 在调控甘蓝型冬油菜抽薹中的作用与 *SVP* 相反,具有负向调控作用。比较不同抗寒性材料 *SVP* 和 *SOC1* 核苷酸序列,分别发现了 4 个和 9 个氨基酸位点突变,而这些位点的突变是否改变了甘蓝型冬油菜的抗寒性还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 周可金,童存泉,牛运生,等.2007年油菜籽发展的现状、效益与前景分析[J].安徽农学通报,2007,13(19):171-172.
- [2] 孙万仓,武军艳,方彦,等.北方旱寒区北移冬油菜生长发育特性[J].作物学报,2010,36(12):2124-2134.
- [3] 孙万仓,武军艳,曾军,等.8个白菜型冬油菜品种抗寒性的初步评价[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2007,33(8):151-155.
- [4] 蒲媛媛,赵玉红,武军艳,等.北方强冬性甘蓝型冬油菜品种(系)抗寒性评价[J].中国农业科学,2019,52(19):3291-3308.
- [5] 刘世男,林新春.植物 *SVP* 基因的研究进展[J].生物技术通报,2014,6(2):9-13.
- [6] HARTMANN U, HÖHMANN S, NETTESHEIM K, et al. Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*[J]. Plant Journal, 2000, 21(4):351-360.
- [7] TANG X, LIANG M, HAN J, et al. Ectopic expression of LoSVP, a MADS-domain transcription factor from lily, leads to delayed flowering in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Reports, 2020, 39(2):289-298.
- [8] 王世祥,左希亚,邢利博,等.苹果成花抑制蛋白 *SVP* 基因的克隆、表达及启动子活性分析[J].园艺学报,2019,46(8):1445-1457.
- [9] TREVASKIS B, TADEGE M, HEMMING M N, et al. Short vegetative phase-like *MADS-Box* genes inhibit floral meristem identity in barley[J]. Plant Physiology, 2006, 143(1):225-235.
- [10] LEE S, CHOI S C, AN G. Rice *SVP*-group *MADS*-box proteins, OsMADS22 and OsMADS55, are negative regulators of brassinosteroid responses[J]. The Plant Journal, 2008, 54(1):93-105.
- [11] LEE JUNGEUN, LEE ILHA. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator[J]. Journal of Experimental Botany, 2010,61(9):2247-2254.
- [12] MELZER S, LENS F, GENNEN J, et al. Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*[J]. Nature Genetics, 2008, 40(12):1489-1492.
- [13] LIU C, XI W, SHEN L, et al. Regulation of floral patterning by flowering time genes[J]. Developmental Cell, 2009, 16(5):720-722.
- [14] HEUER S. The maize mads box gene *ZmMADS3* affects node number and spikelet development and is co-expressed with *ZmMADS1* during flower development, in egg cells, and early embryogenesis[J]. Plant Physiology, 2001,127(1):33-45.
- [15] SHITSUKAWA N, IKARI C, MITSUYA t, et al. Wheat *SOC1* functions independently of *WAP1/VRN1*, an integrator of vernalization and photoperiod flowering promotion pathways[J]. Physiologia Plantarum, 2007, 130(4):627-636.
- [16] ZHONG X, DAI X, XV J, et al. Cloning and expression analysis of *GmGALI*, *SOC1* homolog gene in soybean[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(6):6967-6974.
- [17] 武军艳.脱落酸(ABA)与北方白菜型冬油菜抗寒性的关系及 *NCED* 基因的克隆表达分析[D].兰州:甘肃农业大学,2016.
- [18] 马骊,袁金海,孙万仓,等.白菜型冬油菜类甜蛋白的筛选、克隆及其在低温胁迫下的表达[J].作物学报,2017,43(4):620-628.
- [19] THIELLEMENT H. Book review: proteomics protocols handbook[J].Proteomics, 2005, 5(13):3546-3546.
- [20] 鲁丹丹,李保全,安素妨,等.甘蓝型油菜 *BnDMC1.A01* 基因的分离及序列分析[J].中国油料作物学报,2018,40(6):745-754.
- [21] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9):e45.
- [22] 杜春芳.甘蓝型油菜低温诱导的转录组和蛋白组分析[D].武汉:华中农业大学,2016.
- [23] MICHAELS S D, DITTA G, GUSTAFSON-BROWN C, et al. *AGL24* acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization[J]. The Plant Journal, 2003, 33

- (5):867-874.
- [24] KANE N A, AGHARBAOUI Z, DIALLO A O, et al. *TaVRT2* represses transcription of the wheat vernalization gene *TaVRT1* [J]. *The Plant Journal*, 2007, 51(4):670-680.
- [25] LEE J H, YOO S J, PARK S H, et al. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis* [J]. *Genes & Development*, 2007, 21(4):397-402.
- [26] JANG S, TORTI S, COUPLAND G. Genetic and spatial interactions between *FT*, *Tsf* and *SVP* during the early stages of floral induction in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2009, 60(4):614-625.
- [27] GREGIS V, SESSA A, DORCA-FORNELL C, et al. The *Arabidopsis* floral meristem identity genes *API*, *AGL24* and *SVP* directly repress class B and C floral homeotic genes [J]. *The Plant Journal*, 2009, 60(4):626-637.
- [28] LEE H. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis* [J]. *Genes & Development*, 2000, 14(18):2366-2376.
- [29] LEE S, KIM J, HAN J J, et al. Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative suppressor of overexpression of co 1/AGAMOUS-like 20 (*SOC1/AGL20*) ortholog in rice [J]. *The Plant Journal*, 2004, 38(5):754-764.
- [30] 陈吉宝. 普通菜豆 *P5CS* 基因的克隆、功能验证及单核苷酸多态性[D]. 北京:中国农业科学院, 2008.
- [31] 陈满霞, 蒋玉蓉, 於金生. 小麦春化作用研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(24):6-12.
- [32] 冯 岳, 褚 蔚, 隋新霞, 等. 小麦冬春性人工低温春化鉴定的研究[J]. *山东农业科学*, 2018, 50(1):9-15.
- [33] 栗延茹, 于锡宏, 蒋欣梅, 等. 春化有效积温对结球甘蓝春化相关物质的影响[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(11):122-124.
- [34] WAALLEN W M, STAVANG J A, OLSEN J E, et al. The relationship between vernalization saturation and the maintenance of freezing tolerance in winter rapeseed [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2014, 106(1):164-173.
- [35] 孙万仓, 侯献飞, 杨 刚, 等. 一种利用高温诱导鉴定白菜型冬油菜抗寒性的方法:CN104982173A[P]. 2015-10-21.

(责任编辑:陈海霞)