

甘蓝型油菜湿害相关基因 *BnLDH-1* 的克隆和表达分析

吴金海¹, 周玉堂², 谢伶俐¹, 张学昆³, 许本波^{1*}

(1. 长江大学 生命科学学院, 湖北 荆州 434025; 2. 孝感市农业科学院, 湖北 孝感 432000;
3. 中国农业科学院 油料作物研究所, 湖北 武汉 432600)

摘要:采用 RACE 技术从中双 9 号中克隆了甘蓝型油菜 *BnLDH-1* 基因全长 cDNA 序列和基因组序列。*BnLDH-1* 基因的 DNA 序列为 1 432 bp, 包含 1 个内含子;cDNA 序列全长 1 319 bp, 含有 1 个 1 053 bp 的 ORF, 其编码蛋白含 350 个氨基酸。经预测发现, *BnLDH-1* 蛋白存在 LDH-1 保守结构域。qRT-PCR 结果表明, 湿害诱导 *BnLDH-1* 表达, 但在不同耐湿性甘蓝型油菜品种中, *BnLDH-1* 的诱导表达水平不同。相关分析表明, 湿害胁迫后 48 h 的 *BnLDH-1* 表达量与 12 份测试的甘蓝型油菜材料的耐湿指数呈显著负相关, 其相关系数为 0.73。

关键词: 甘蓝型油菜; 克隆; 表达; 乳酸脱氢酶; 耐湿

中图分类号: S565.4; Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2016)03-0053-06

Cloning and Expressional Characterization of Wet Damage Related Gene *BnLDH-1* from *Brassica napus* L.

WU Jinhai¹, ZHOU Yutang², XIE Lingli¹, ZHANG Xuekun³, XU Benbo^{1*}

(1. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. Xiaogan Academy of Agricultural Sciences, Xiaogan 432000, China; 3. Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 432600, China)

Abstract: The *BnLDH-1* gene cDNA and genomic sequences were cloned by the RACE from Zhongshuang No. 9. The genomic sequence of *BnLDH-1* was 1 432 bp and contained one intron. The 1 319 bp *BnLDH-1* cDNA had a 1 053 bp ORF which encoded a polypeptide of 350 amino acids. The predicted results indicated that the *BnLDH-1* protein contained conserved LDH-1 domain. qRT-PCR results indicated that *BnLDH-1* transcription levels were induced by waterlogging, and the *BnLDH-1* transcription level had significant difference among the *Brassica napus* L. with different waterlogging tolerance after waterlogging treatment. Correlation analysis indicated that *BnLDH-1* transcription levels were significantly negatively correlated with waterlogging tolerance indices of 12 *Brassica napus* L. at 48 h after waterlogging treatment, and the correlation coefficient was 0.73.

Key words: *Brassica napus* L.; cloning; expression; lactate dehydrogenase; waterlogging tolerance

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是我国乃至世界上最重要的油料作物,其生产常受到湿害的胁迫。湿害造成土壤和大气中 CO₂ 和 O₂ 交换困难,土壤缺氧,从而给植物生长带来危害,造成植物落叶、生

长受抑制,甚至造成植株死亡^[1],可导致油菜减产 17.0% ~ 42.4%^[2]。

湿害过程中,由于 O₂ 在土壤中的溶解度和扩散系数降低而造成植物 O₂ 胁迫^[3]。蛋白质 2 维电泳

收稿日期:2015-10-28

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2011AA10A104)

作者简介:吴金海(1978-),男,湖北襄阳人,在读硕士研究生,研究方向:植物生物技术。E-mail:1312813987@qq.com

* 通讯作者:许本波(1977-),男,湖北安陆人,副教授,博士,主要从事植物生物技术研究。

E-mail:benboxu@yangtzeu.edu.cn

分析结果表明,湿害造成玉米根部 20 多种蛋白质的差异表达,这些蛋白质参与糖的无氧和有氧代谢^[4-5]。在 O₂ 胁迫条件下,植物启动无氧代谢途径有利于提高植物对环境的适应能力,维持植物生长发育^[6-7]。湿害过程中,一系列酶,包括乙醛脱氢酶(FDH, EC1.2.1.2)、乙醇脱氢酶(ADH, EC1.1.1.1)、乳酸脱氢酶(LDH, EC1.1.1.27) 和丙酮酸脱羧酶(PDC, EC4.1.1.1)被诱导表达^[7-8]。研究表明,植物的耐湿性与植物湿害过程中腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)含量、ADH 和 PDC 的诱导表达水平密切相关^[9-10]。相同量的糖分子在无氧条件下分解产生的 ATP 量低于有氧条件,因此,植物必须加速进行糖酵解和糖代谢^[11]。根据 Davis-Roberts pH 假说,植物对 O₂ 胁迫的第一反应是产生大量的乳酸,降低细胞中 pH 值,激活 PDC 和 ADH 的转录,并抑制 LDH 的转录,启动乙醇代谢途径^[12]。为研究 LDH 在甘蓝型油菜耐湿中的作用,从甘蓝型油菜中双 9 号中克隆出 *BnLDH-1*,利用 qRT-PCR 研究了 *BnLDH-1* 在不同耐湿性甘蓝型油菜中的表达特征及与甘蓝型油菜耐湿性指数的关系。

1 材料和方法

1.1 试验材料

根据田间淹水试验结果,从 4 000 个材料中选取 12 个具有不同耐湿能力的甘蓝型油菜品种系作为试验材料,包括中双 9 号、H305、秦油 8 号、955、H04、H1020、PH36、沪油 17、GH01、中双 6 号、2021 和中双 11 号。

1.2 甘蓝型油菜耐湿指数的计算

对于 12 份甘蓝型油菜材料,分别取 100 粒发芽种子,在 20 ℃ 条件下浸泡 24 h,然后取出种子,用双蒸水冲洗 2 次^[13],对照发芽种子不作 20 ℃ 条件下浸泡 24 h 处理。将种子平铺于 9 cm 培养皿中,第 7 天,记录平均萌发率、成苗率、幼苗根长,并计算耐湿指数。耐湿指数 = (处理成苗率 × 处理幼苗根长)/(对照成苗率 × 对照幼苗根长)^[14]。在甘蓝型油菜成熟期,计算单株的籽粒产量。

1.3 甘蓝型油菜 *BnLDH-1* 基因的全长 cDNA 扩增及序列分析

利用 CTAB 法提取甘蓝型油菜的 DNA^[15] 和 RNA^[16],利用 RNase-free DNase I (TaKaRa) 除去 RNA 中混有的微量 DNA。按照 SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen) 说明书完成 cDNA 的合成。对来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (NM_117832)、玉米(*Zea mays*) (AY109690) 等物种

的 LDH 基因的核苷酸序列进行多重比对,设计甘蓝型油菜 *BnLDH-1* 基因的 3' 和 5'RACE 一扩和巢式 PCR 扩增引物(表 1)。其中,引物 FBnLDH-31 和 FBnLDH-32 与试剂盒 3'RACE 引物配对用于 3' cDNA 末端扩增,引物 RBnLDH-51 和 RBnLDH-52 与试剂盒 5'RACE 引物配对用于 5'cDNA 末端扩增,按照 GeneRacer 试剂盒 (Invitrogen, USA) 说明书分别进行甘蓝型油菜 *BnLDH-1* 的 3' 及 5'RACE 扩增。扩增体系为 50 μL: 10 × PCR Buffer 5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 3 μL、10 mmol/L dNTP 1 μL、试剂盒引物 1 μL、RACE 引物 1 μL、cDNA 1 μL、Taq 酶(5 U/μL)0.5 μL、ddH₂O 37.5 μL。PCR 反应程序为:94 ℃ 2 min; 94 ℃ 1 min, 52 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。

根据 5' 和 3' 末端测序结果,设计 1 对引物 FBnLDH/RBnLDH(表 1)用于扩增甘蓝型油菜 *BnLDH-1* 全长 cDNA 及对应的基因组序列。PCR 产物经过电泳、凝胶回收后连接到 pMD18-T 载体,交由北京三博生物有限工程测序。利用软件 Vector NTI Advance 9.0 对测定序列进行分析,查找开放阅读框(ORF),翻译成蛋白质,并进行蛋白质参数计算。利用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分析核酸、蛋白质的同源性。在 EXPASY 网站 (<http://www.expasy.org> and <http://www.softberry.com/berry.phtml>) 进行蛋白质结构和性质分析。

表 1 PCR 引物名称及序列

引物名称	序列(5'-3')
FBnLDH-31	CTCGACGTCAATGCTCAGGATGT
FBnLDH-32	CACTTCTGGCCATTGGCTACTC
RBnLDH-51	GAGTAGCCAATGGCCAAGAACAGTG
RBnLDH-52	TGAGCATTGACGTCGAGATGATCTG
FBnLDH	CTCCTCTATAATAAGTACACTTCTC
RBnLDH	CTCCTCTATAATAAGTACACTTCTC
QFLDH	ATTGTGTAATGGCGAACAAACGG
QRLDH	GAAGGTACGGATATGCCCTCTGA
FACT	ATGACGGAGACCTGGTGCA
RACT	TGTGCCTAGGACGACCAACA

1.4 甘蓝型油菜中 *BnLDH-1* 表达谱分析

将 12 份材料种植于中国农业科学院油料作物研究所试验地,在花期进行淹水处理至地面积水 10 cm,取淹水处理 0、24、48 h 的根系材料保存于 -80 ℃,提取 RNA,并反转录成 cDNA。根据拟南芥 *actin* 基因序列设计甘蓝型油菜 *actin* 基因扩增引物 FACT/RACT(表 2),以 *actin* 基因为内参基因,根据 SYBR® PrimeScript® RT-PCR 试剂盒(TaKaRa)说明书,采

用 *BnLDH-1* 基因 qRT-PCR 引物 QFLDH/QRLDH 检测 12 份甘蓝型油菜材料 *BnLDH-1* 基因转录水平。qRT-PCR 在荧光定量 PCR 仪 (iQ5, Bio-Rad, USA) 中进行, 反应体系按照 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex *Taq* 试剂盒的操作说明配制, 总共 25 μ L: 2 \times One Step SYBR[®] RT-PCR Buffer III 12.5 μ L、TaKaRa Ex *Taq* HS(5 U/ μ L)0.5 μ L、PrimeScript RT Enzyme Mix II 0.5 μ L、QFLDH(10 μ mmol/L)0.5 μ L、QRLDH(10 μ mmol/L)0.5 μ L、RNA 2.0 μ L、无 RNA 酶的 H₂O 8.5 μ L, 反应程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 56 °C 30 s, 72 °C 45 s, 40 个循环。每个反应重复 3 次, 并且以标准差小于 0.25 为选择标准, 数据分析采用 iQ5 PCR 仪器附带的数据分析系统 (iQ5 Optical System Software, Version 2.1) 进行。

2 结果与分析

2.1 *BnLDH-1* 全长 cDNA 序列的克隆及序列分析

分别以 cDNA 和基因组 DNA 为模板, 利用引物 FBnLDH/RBnLDH 分别成功地扩增出 1 条约 1.3 kb 的亮带和 1 条约 1.4 kb 的亮带, 将该基因命名为 *BnLDH-1*。经测序发现, 其基因组 DNA 全长为 1 432 bp, 其遵循标准的内含子剪接方式; GT…AG, 只包含 1 个内含子。其 cDNA 全长为 1 319 bp, 5'UTR 长度为 92 bp, ORF 长度为 1 053 bp, 3'UTR 长度为 174 bp; 另外, 在 polyA 上游 20 bp 的序列 ATAA-A 与已知的大多数的植物的加尾信号序列 AATA-AA 在序列特征和位置上相似, 因此它可能充当 *BnLDH-1* 基因的加尾信号(图 1)。

```

1 GAAAATTCTTCTCTATAATAAGTACACTCTCACTCACACGGAGAAGAAGAATAAACAAACATCAAACAACTAATTGTG
1 M A N N G S G S S L G P G G L D L T N T F F K P I L N S D
91 TAATCGCGAACACCGATCCGTTCATCTTAGGCCGGCGGGCTAGATCTAACCAATACCTTTCAACCGATCCTTAACCTCGACC
30 P P I P S N R C T K V S V I G V G N V G M A I A Q T I L T Q
181 CTCTATCCCCCTCAACCGCTGTACCAAGGTCTCGTCATCGCGCTCGGGAACGTCGGCATGCCATCGCTCAGACCATCCCTACTCAAG
60 D I A D E I A L V D S K P E K L R G E M L D L Q H A A A F L
270 ACATCGCCGACGAGATCGCCCTCGTGACTCCAAGCCGAAAGCTCGCAGGGCAGATGCTCGATCTCCAGCACGCCGCCGCTTCCCTCC
90 P R T R I T A S V D Y A V T A G S D L C I V T A G A R Q N P
361 CCCGACCAGAACATACCGCCCTCGTGACTACGCTGTACCGCCGATCCGATCTGCATCGTACCGCCGGCGTAGGCAGAACCCGG
120 G E S R L N L L Q R N V A L F R H I I P P L A K S S P D A I
451 GAGAGTCTAGGCTCAATCTGCTCCAGAGGAACGTCGCTCTCTCCGCCACATCATCCCTCGCTCGTAAGCTGCTCCCGATGCGATCT
150 L L I V S N P V D V L T Y V A W K L S G F P V N R V L G S G
541 TGCTCATCGCTCTAACCTGTCGATGCTTGACCTACGTCGCTTGGAAAGCTCTGCTGGTTTCCGGTGAATCGGGTCTTGGATCGGGTA
160 T N L D S S R F R F L I A D H I D V N A Q D V Q
631 CTAATCTCGACTCGTCTCGGTTCTTGATCGCAGATCATCGACGTCATGCTCAGGATGTCAGGTCAGTTCCGACCAAAGT
721 TACGGTTTTGTATAATAGATAGGTCAAGTTACGGTTTTGTATAATAGATCCGATGATAATGGTGCCTTGTGTT
204 A F I V G E H G D S S V A L W S S I S V G G I P V L S F L
811 TTAGGCATTCTACGTCGGAGAGCATGGAGACAGCTGGCTGGCGTTATGGTCGAGCATAGCGCTGGGAGGCATCCCTGCTTAAGCTTCC
233 • E K Q Q I A Y E K Q T L E D I H Q T V V G S A Y E V I S L K
901 GGAGAAGAACAGATCGCTACGAGAAACAAACCTTGAGGACATTACCGACAGTCGCTTGGAAAGTCGCTTGAAGTCGCTTGAAGTCATTAGTCTCAA
263 • G Y T S W A I G Y S V A N L A Y T I L R D Q R K I H P V T V
991 GGGTTATCTCTGGCCATTGGCTACTCTGTTGCCAACCTGGCTACACCATCCCTCGTACCGCTAACGCGTAAGATCCACCCGGTACCGGT
293 • L A R G F Y G V E G G D A F L S L P A L L L G R N G V V A V T
1081 TCTTGCTCGTCTCTATGGTGTGAAGGTGCTGATGGCTTCTCAGTCTCCCGCTCGCTTGACGTAACGGTGTGGCTGTGAC
323 • N V H M T D E E S E K L Q K S A K T I L E M Q S Q L G L
1171 TAATGTGATCATGACTGAGGAGTCGAGAGCTGCGAGAAATCTGCAAGACTATATTGGAGATGCAAGAGCCAGTTAGGACTTTGAAC
121 TTATCTCTTCTATTGCTTCACTTGTGAACCTTTGTTGGTTATGAAATTATCATATAATCATCTCCATGGATGTTAGTGTGGA
1351 TCTTGATATCTACATATGTTATAAATGCTTGTCTTGACCAAAAAAGAATACATAATGCTGTATGAAAG
```

ATG 和 TAA 用下划线和粗体表示, 内含子用灰字体表示, N35—Q347 的保守域用灰背景表示, 加尾信号 ATTAA 用下划线表示

图 1 *BnLDH-1* 的核酸序列及其编码氨基酸序列

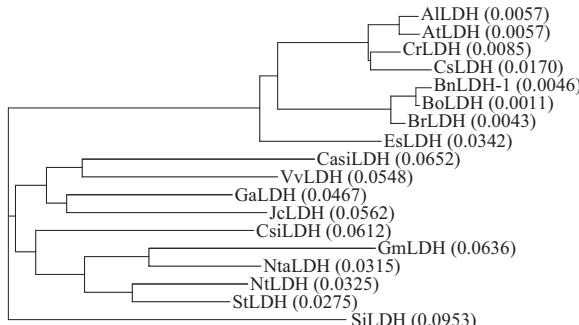
经 NCBI Blastn 分析表明, *BnLDH-1* 和来自十字花科的白菜 (*Brassica rapa*)、甘蓝 (*Brassica oleracea*)、山嵛菜 (*Eutrema salsugineum*) 和琴叶拟南芥 (*Arabidopsis lyrata*) 的 LDH 基因的同源性最高, 分别为 94.0%、78.2%、78.4% 和 74.3%, 和其他一些植物的 LDH 基因的同源性也比较高。

对 *BnLDH-1* 的开放读码框进行翻译, 得到 1 个由 350 个氨基酸组成的 37.52 ku 的多肽链, 其等电点为 5.82。Blastp 结果表明, *BnLDH-1* 蛋白序列与许多已知的植物 LDH 蛋白具有很高的相似性, 与

甘蓝的 LDH 蛋白相似性最高, 其与甘蓝、拟南芥和山嵛菜 LDH 蛋白的一致性/相似性分别为 99.7% / 98.6%、94.3% / 90.7% 和 96.3% / 91.5%, 说明在十字花科 LDH 蛋白进化过程中, 该蛋白序列非常保守。

多重比对和聚类分析结果表明, *BnLDH-1* 蛋白和来自十字花科植物甘蓝和白菜的 LDH 蛋白聚成 1 个亚类(图 2)。其中, *BnLDH-1* 与甘蓝 LDH 的遗传距离最近, 它们与同属十字花科的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、琴叶拟南芥、山嵛菜、芥菜 (*Capsella rubella*) 以及芥蓝 (*Camelina sativa*) 的 LDH

遗传距离也比较近,形成 1 个大类(图 2)。



各 LDH 蛋白的 GenBank 序列号分别为 ALLDH: XP_002870113.1, AtLDH: AAM64829.1, CrLDH: XP_006284020.1, CsLDH: XP_010434693.1, BoLDH: XP_013595446.1, BrLDH: XP_009144619.1, EsLDH: XP_006414250.1, CasiLDH: ADM88555.1, VvLDH: XP_002274162.3, GaLDH: EPSS59698.1, JcLDH: XP_012069951.1, CsiLDH: XP_006477218.1, GmLDH: XP_003549909.1, NtaLDH: AIL30517.1, NtLDH: XP_009602609.1, StLDH: XP_006355475.1, SiLDH: XP_004951206.1

图 2 BnLDH-1 蛋白系统发育树

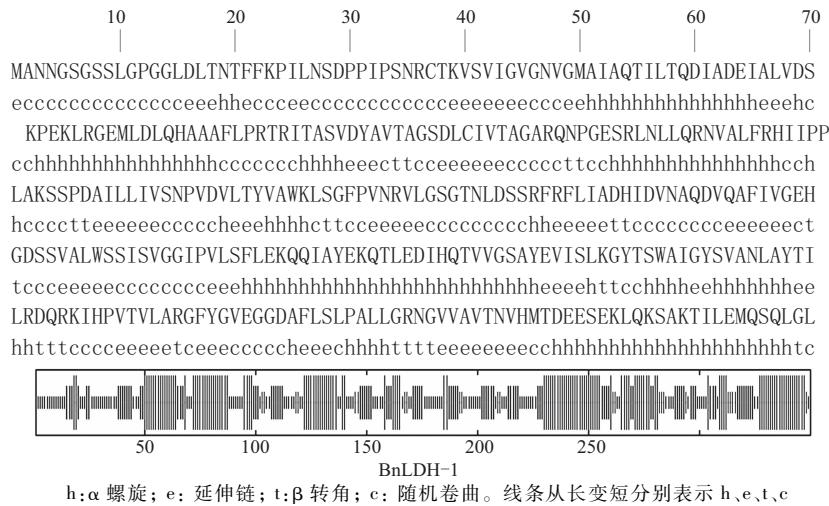


图 3 BnLDH-1 蛋白的二级结构预测

2.2 12 个甘蓝型油菜材料的耐湿指数

由表 2 可知,12 份甘蓝型油菜材料的耐湿指数存在极显著差异,中双 9 号最大,为 82.3,其次为 H1020, GH01 最小,为 13.2, PH36 次之;籽粒产量损失与之相反,即耐湿指数越大的材料,湿害处理后其产量损失越小,表明这些材料适合用于甘蓝型油菜耐湿性分析。

2.3 BnLDH-1 在甘蓝型油菜中的表达特征

由图 4 可知,在湿害处理过程中,12 份甘蓝型油菜材料的 BnLDH-1 表达量存在明显差异,但变化趋势基本相同。在 0~24 h 的胁迫过程中,各材料的 BnLDH-1 表达量缓慢升高,但在 24~48 h,BnLDH-1 表达量迅速升高。在 PH36 和 GH01 这些耐湿指数比较低的材料中,BnLDH-1 表达量的增加幅度明显高于高耐湿指数材料(如中双 11 号

NCBI 保守域搜索结果表明,BnLDH-1 蛋白的 N₁₁ 到 Q₃₄₇ 区域存在 LDH-1 保守结构域。SignalP 3.0 预测表明,BnLDH-1 蛋白没有信号肽;TargetP 预测表明,BnLDH-1 蛋白位于叶绿体、线粒体的可能性很小;PSORT 预测表明,BnLDH-1 蛋白可能定位在细胞质中,结合 BnLDH-1 蛋白功能分析,BnLDH-1 蛋白应该位于细胞质中;而 TMpred 预测表明,BnLDH-1 蛋白具有 5 个强的跨膜结构。

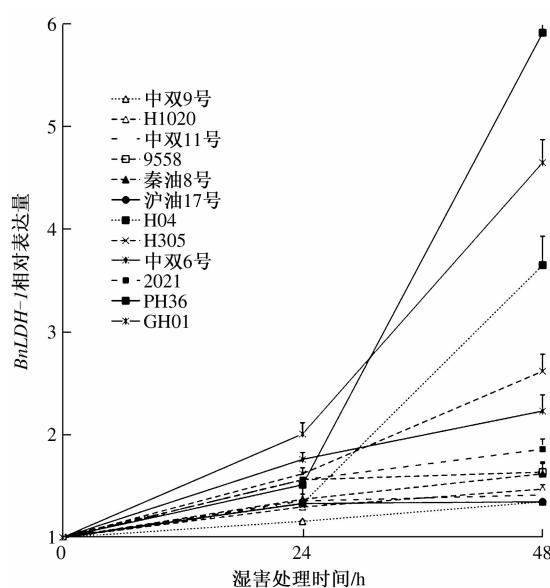
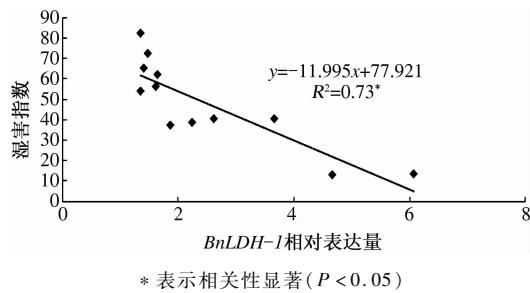
利用 SOPMA 软件预测 BnLDH-1 二级结构(图 3)发现,该蛋白的二级结构含有 36.57% 的 α 螺旋、25.14% 的延伸链、6.57% 的 β 转角和 31.71% 的随机卷曲。BnLDH-1 蛋白的中部有 4 个大型的 α 融合,同时在其尾部(C-末端)也有类似的 2 个大型 α 融合。在其头部(N-末端)均有大量随机卷曲,且不存在 α 融合;同时在其中部 α 融合与尾部 α 融合之间存在转角与延伸链交错的结构。

和中双 9 号)(图 4)。相关分析表明,耐湿指数与湿害胁迫处理 48 h 的 BnLDH-1 表达量呈显著负相关,其相关系数为 0.73(图 5)。

表 2 12 个不同耐湿材料的耐湿指数和产量损失

品系	耐湿指数	产量损失/(g/株)
中双 9 号	82.3 ± 2.00 ^A	8.4 ± 0.53 ^F
H1020	72.4 ± 2.52 ^B	8.9 ± 0.56 ^E
中双 11 号	65.3 ± 1.68 ^C	9.5 ± 0.23 ^D
9558	62.3 ± 0.26 ^C	9.4 ± 0.32 ^D
秦油 8 号	56.2 ± 0.68 ^D	10.7 ± 0.30 ^C
沪油 17	53.9 ± 1.27 ^D	10.1 ± 1.36 ^C
H04	40.7 ± 1.22 ^E	11.3 ± 0.40 ^B
H305	40.4 ± 0.61 ^E	12.7 ± 0.52 ^B
中双 6 号	38.6 ± 0.35 ^E	12.2 ± 0.12 ^B
2021	37.3 ± 0.75 ^E	12.0 ± 0.32 ^B
PH36	13.6 ± 0.64 ^F	13.7 ± 0.65 ^A
GH01	13.2 ± 0.65 ^F	13.3 ± 0.40 ^A

注:同列数据后不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

图4 不同湿害胁迫时间下 *BnLDH-1* 相对表达量变化图5 耐湿指数与湿害胁迫 48 h 后 *BnLDH-1* 表达量的线性关系

3 结论与讨论

水对植物生长具有重要作用,但缺水(干旱)或水分过多(湿害)都严重危害植物的生长发育。湿害通常造成氧胁迫,氧胁迫是植物遭受的一种最重要的非生物胁迫^[17-18]。目前,已经分离和鉴定了一些植物抗氧胁迫相关基因,并初步阐明了其抗逆机制^[19]。在玉米的抗氧胁迫研究中发现,胁迫导致20多种蛋白质的合成^[20],这些蛋白质包括蔗糖合成酶、1,6-二磷酸果糖醛缩酶、PDC、LDH和ADH等^[21-22]。ADH突变体不能合成ADH或者产生乙醇,但能产生LDH并造成pH值下降,因此该突变体对湿害胁迫非常敏感^[3,23-24]。本研究发现,耐湿指数与湿害胁迫48 h时 *BnLDH-1* 表达量呈显著负相关。这可能是由于 *BnLDH-1* 表达量迅速升高可以降低pH值,从而迅速启动无氧代谢途径,在一定程度上满足植物生长发育的能量需求^[12],但过多的乳酸对植物细胞有害,因而造成耐湿性降低。根据相关报道,湿害过程中,通气组织的形成,侧根的发育,对提高植物的耐湿性具有重要作用^[25-26],其

根本是提高植物的O₂吸收和转运能力。虽然不能利用抑制 *BnLDH-1* 基因表达提高植物耐湿性,但由于耐湿指数和湿害胁迫48 h时 *BnLDH-1* 的表达量呈显著负相关,因此可以利用湿害胁迫48 h时 *BnLDH-1* 表达量的高低进行耐湿材料的快速筛选。

参考文献:

- [1] Cornelius B, Chen P, Chen Y, et al. Identification of QTLs underlying water-logging tolerance in soybean [J]. Molecular Breeding, 2005, 16(2): 103-112.
- [2] 程伦国, 刘德福, 郭显平, 等. 油菜排渍指标试验研究 [J]. 湖北农业科学, 2003, 42(1): 37-39.
- [3] Sairam R K, Kumutha D, Ezhilmathi K, et al. Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants [J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(3): 401-412.
- [4] Sachs M M, Freeling M, Okimoto R. The anaerobic proteins of maize [J]. Cell, 1980, 20(3): 761-767.
- [5] Dennis E S, Dolferus R, Ellis M, et al. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2000, 51(342): 89-97.
- [6] Good A G, Muench D G. Long-term anaerobic metabolism in root-tissue-metabolic products of pyruvate metabolism [J]. Plant Physiology, 1993, 101(4): 1163-1168.
- [7] Kennedy R A, Rumpho M E, Fox T C. Anaerobic metabolism in plants [J]. Plant Physiology, 1992, 100(1): 1-6.
- [8] Ricard B, Couee I, Raymond P, et al. Plant-metabolism under hypoxia and anoxia [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1994, 32(1): 1-10.
- [9] Drew M C. Oxygen deficiency and root metabolism; Injury and acclimation under hypoxia and anoxia [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1997, 48(1): 223-250.
- [10] Waters I, Morrell S, Greenway H, et al. Effects of anoxia on wheat seedlings [J]. Journal of Experimental Botany, 1991, 42(244): 1437-1447.
- [11] Dolferus R, Klok E J, Ismond K, et al. Molecular basis of the anaerobic response in plants [J]. Iubmb Life, 2001, 51(2): 79-82.
- [12] Agarwal S, Grover A. Molecular biology, biotechnology and genomics of flooding-associated low O₂ stress response in plants [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2006, 25(1): 1-21.
- [13] Ueno K, Takahashi H. Varietal variation and physiological basis for inhibition of wheat seed germination after excessive water treatment [J]. Euphytica, 1997, 94(2): 169-173.
- [14] Zhang X, Cheng J, Wang H, et al. Genetic difference of waterlogging tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007, 29(2): 204-208.

(下转第 66 页)

参考文献:

- [1] 中国社会科学院农村发展研究所,国家统计局农村社会经济调查司. 农村绿皮书:中国农村经济形势分析与预测(2014~2015) [M]. 北京:社会科学文献出版社,2015;36.
- [2] 张毅. 我国油菜生产及油料需求分析[J]. 农业技术与装备,2009(7):14-16.
- [3] 王汉中. 我国油菜产业发展的历史回顾与展望[J]. 中国油料作物学报,2010,32(2):300-302.
- [4] 李云昌,胡琼,杨德圣,等. 选育高含油量双低油菜品种的理论与实践[J]. 中国油料作物学报,2006,28(1):92-96.
- [5] 韩继祥. 甘蓝型油菜含油量的遗传研究[J]. 中国油料,1990(2):1-6.
- [6] 徐正华,曾宇,颜梅,等. 主要栽培因子对甘蓝型油菜各枝序角果含油量的影响[J]. 中国农学通报,2012,28(21):150-154.
- [7] 金以龙,熊明军,曹艳茹,等. 油菜不同种植密度及氮肥水平试验[J]. 现代农业科技,2014(17):20-21,23.
- [8] 李志玉,胡琼,廖星,等. 优质油菜中油杂8号施用氮磷硼肥的产量和品质效应[J]. 中国油料作物学报,
- [9] 乔志伟,李金岚,李俊霖,等. 鸡粪菌剂对复垦土壤上油菜产量和品质的影响[J]. 山西农业科学,2010,38(12):40-43,46.
- [10] 谭太龙,徐一兰,张宏军,等. 栽培因子对油菜含油量的影响[J]. 作物研究,2009,23(2):97-100.
- [11] 乔志伟,李金岚,李俊霖,等. 鸡粪菌剂对复垦土壤上油菜产量和品质的影响[J]. 山西农业科学,2010,38(12):40-43,46.
- [12] 周铭,贺铁桥,李军辉,等. 油菜硼肥不同施用量田间试验研究[J]. 现代农业科技,2014(15):20,22.
- [13] 徐素琴,王润屹,程旺大,等. 油菜苔肥施用时期对高油品种产量及含油量的影响[J]. 农业与技术,2004,24(1):57-60.
- [14] 李元,洪坚平,李桃,等. 多酶金缓释尿素对土壤氮素形态和含量及油菜产量的影响[J]. 山西农业科学,2014,42(1):39-42,53.
- [15] 唐雪辉,贺建文,白桂萍. 不同施氮量和密度对稻田免耕直播油菜产量的影响[J]. 天津农业科学,2012,18(5):92-94.
- [16] 邓力超,薛灿辉,周安兴,等. 收割期对油菜产量和含油量的影响[J]. 湖南农业科学,2010(1):26-27.

(上接第 57 页)

- [15] Saghai-Marof M A, Soliman K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81(24):8014-8018.
- [16] Jaakola L, Pirttila A M, Halonen M, et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit [J]. Molecular Biotechnology, 2001, 19(2): 201-203.
- [17] Chugh V, Gupta A K, Grewal M S, et al. Response of antioxidative and ethanolic fermentation enzymes in maize seedlings of tolerant and sensitive genotypes under short term waterlogging [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2012, 50(8):577-582.
- [18] Araki H, Hossain M A, Takahashi T. Waterlogging and hypoxia have permanent effects on wheat root growth and respiration [J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2012, 198(4):264-275.
- [19] Singh A P. A review of microbial decay types found in wooden objects of cultural heritage recovered from buried and waterlogged environments [J]. Journal of Cultural Heritage, 2012, 13(3):S16-S20.
- [20] Sachs M M, Freeling M, Okimoto R. The anaerobic proteins of maize [J]. Cell, 1980, 20(3):761-767.
- [21] Chung H J, Ferl R J. Arabidopsis alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment [J]. Plant Physiology, 1999, 121(2):429-436.
- [22] Zeng Y, Wu Y, Avigne W T, et al. Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival [J]. Plant Physiology, 1999, 121(2):599-608.
- [23] Roberts J K M, Callis J, Jardetzky O, et al. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1984, 81(19):6029-6033.
- [24] Roberts J K M, Callis J, Wemmer D, et al. Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root-tips and its role in survival under hypoxia [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1984, 81(11):3379-3383.
- [25] Shabala S. Physiological and cellular aspects of phytotoxicity tolerance in plants: The role of membrane transporters and implications for crop breeding for waterlogging tolerance [J]. New Phytologist, 2011, 190(2):289-298.
- [26] Colmer T D, Voesenek L A C J. Flooding tolerance: Suites of plant traits in variable environments [J]. Functional Plant Biology, 2009, 36(8):665-681.