

高温胁迫下油菜籽粒成熟期基因差异表达分析^①

李超^{1,2,3}, 荐红举^{2,3}, 刘列钊^{2,3}, 李加纳^{2,3}

1. 贵州省油料研究所, 贵阳 550006; 2. 西南大学农学与生物科技学院, 重庆 400716;
3. 重庆市油菜工程技术研究中心, 重庆 400716

摘要: 利用数字化基因表达谱技术, 对花后不同时期及不同环境温度条件下差异表达基因进行统计分析. 将 3 份甘蓝型油菜于开花后 20 d 移入到 40 °C 高温和低温 2 个环境, 分别处理 12 d 和 25 d 后取角果种子提取 RNA, 对花后不同时期及不同环境温度条件下差异表达基因进行统计分析. 结果再以低温条件为对照, 在高温下花后 32 d 共检测出 968 个差异表达基因, 其中上调表达基因为 501 个, 下调表达基因为 467 个; 在花后 45 d 检测到 1 064 个差异表达基因, 其中上调表达基因为 274 个, 下调表达基因为 790 个. 结果表明, 随着角果成熟, 绝大多数基因的表达量减少, 少数表达量显著上升的基因值得关注, 它们可能与角果储藏物质的合成和角果成熟有关; 在籽粒充实的高峰期(花后 32 d), 高温胁迫下上调表达的基因较多, 其中可能有一部分基因与环境应答有关. 本研究结果与前人的结果在一定程度相似, 表明本研究所采用的研究方法是可行的, 获得的与环境胁迫相关基因为后续研究奠定了基础.

关键词: 甘蓝型油菜; 高温胁迫; 籽粒成熟期; 数字化基因表达谱; 基因差异表达

中图分类号: S565.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)11-0019-07

在油菜有关差异表达基因研究方面, Zhao 等^[1]以绝对抗菌核病和敏感菌核病材料为研究对象, 分析了 2 种基因型材料的基因表达差异, 结果在检测出的 1 547 个基因中, 有 686 个基因存在表达差异, 并表现为上调表达, 这些基因的功能涉及病原蛋白、氧化蛋白、激酶蛋白、分子转运、细胞的稳定与生长以及非生命体的胁迫蛋白等. Zhu 等^[2]以 NIL-9 和 NIL-1 这 2 个近等基因系为材料, 研究花后 25 d 2 个近等基因系在不同温度条件下含油量有关基因表达差异, 结果显示在花后 25 d, 基因型、环境以及基因型与环境的互作对基因表达具有重要影响, 分别检测到 4 982, 1 911 和 839 个差异表达序列, 尤其是在相同温度胁迫处理下, NIL-9 的含油量比 NIL-1 要高. Li 等^[3]用 15 000 个 EST 对氯化锂处理后的油菜进行 cDNA 微阵列分析, 结果在棕色油菜品系中有 89 个基因、在黄籽油菜中有 95 个基因存在表达差异, 约 1 083 个基因表达量发生了 2 倍的变化. 付三雄等^[4]将甘蓝型油菜高油品系 H105 在 2 个海拔环境差异大的南京和拉萨同时种植, 他利用拟南芥表达谱基因芯片检测了不同环境下开花后 30 d 种子的基因表达. 结果发现, 以南京种植的 H105 为对照, 有 421 个差异表达的基因, 其中 229 个基因是表达下调, 192 个基因表达上调, 这些基因主要涉及代谢、运输、结合、转录、结构、发育和信号转导等功能, 还有一些其它功能未知的基因. 同时, 在其他研究中, 高温或干旱胁迫也会引起植物体内基因表达和酶、蛋白质、激素含量等变化^[5-7]. 本试验利用 2 种环境温度, 研究甘蓝型油菜花后不同时期基因差异表达的变异, 为定位及克隆与胁迫反应相关的基因提供理论依据.

① 收稿日期: 2014-06-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31260337); 国家联合基金资助项目(U1302266); 国际科技合作 948 资助项目(2013-Z66); 贵州省国际科技合作资助项目(黔科合外 G 字[2012]7027 号); 贵州省农科院创新基金资助项目(黔农科合[创新基金]2010007 号).

作者简介: 李超(1977-), 男, 贵州道真人, 副研究员, 博士, 主要从事油菜育种研究.

通信作者: 李加纳, 教授.

1 实验材料与方法

1.1 实验材料与处理

本研究使用的材料为 LCD1, LCD9 和 LCD10. 其中, LCD1 为含油量环境钝感材料, LCD9 和 LCD10 为含油量环境敏感材料. 材料均由贵州省油料研究所提供. 每个材料各种植 10 钵, 开花后 20 d 将 3 份材料分别放到室外低温和高温环境, 每个材料每个环境各 5 钵, 高温温度控制在 40 °C 以上; 室外低温的温度最高为 37 °C, 最低为 13 °C, 平均温度为 22.3 °C; 在 2 种环境下都处理 12 d 和 25 d. 取花后 32 d(处理 32 d), 45 d(处理 25 d) 的角果置于小试管中, 迅速放入液氮罐, 转移到 -80 °C 冰箱保存待用. 用天根“RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒”(目录号: DP432) 提取花蕾种子的 RNA, 纯化后放到 -80 °C 冰箱保存待用. 将 3 个材料的 RNA 等量混合, 形成温室高温环境及对照和低温及对照 4 个样品进行表达谱测序分析.

1.2 数字基因表达谱分析

本研究基因测序委托深圳华大基因分析.

1.2.1 主要仪器设备、试剂和耗材

分析中使用的主要仪器为 Illumina Cluster Station 和 Illumina HiSeq™ 2000 系统, 试剂为 Illumina Gene Expression Sample Prep Kit, 耗材为 Solexa 测序芯片.

1.2.2 分析方法

首先提取供试材料总 RNA 各 6 μg , 然后用磁珠进行吸附纯化 mRNA, 并通过反转录合成双链 cDNA. 通过 NlaIII 内切酶标签 5' 末端, 然后连接 Illumina 接头 1, 让其产生带有接头 1 的 Tag. 通过磁珠沉淀后在 Tag 3' 末端连接 Illumina 接头 2, 获得两端连有不同接头序列的 21 bp 标签库. 通过 PCR 线性扩增后(15 个循环), 然后用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化碱基条带, 解链后的单链分子加到 Illumina 测序芯片, 经过原位扩增成一个单分子簇的测序模板, 加入 4 种不同荧光标记颜色的 4 种核苷酸, 最后合成测序.

1.2.3 数据处理过程

经过去除 3' adaptor 序列, 去除空载 reads, 去除低质量 Tag, 去除长度过小过大的 Tag, 留长度为 21 nt 的 Tag, 去除拷贝数为 1 的 Tag, 最后获得 Clean Tag.

1.3 基因注释

本研究参考序列为白菜基因组, 然后通过检测 mRNA 上的所有“CATG”位点, 生成“CATG+17nt”碱基的参考标签数据库, 然后将 4 个样品的测序全部 Clean Tag 与参考标签数据库进行比对, 对其中唯一比对到一个基因的标签进行功能注释, 统计每个基因对应的原始 Clean Tag 数, 最后对原始 Clean Tag 数做标准化分析处理, 获得标准化的基因表达量. 最后利用 GO 功能显著性富集分析方法, 把所有差异表达基因向 Gene Ontology 数据库(<http://www.geneontology.org/>)的各 term 映射, 分析每个 term 的基因数目, 并与整个基因组背景相比, 找出在差异表达基因中显著富集的 GO 条目, 获取该基因的 GO 功能注释.

2 结果与分析

2.1 测序质量评估

分析 4 个样品总标签 Total Tags 和 Distinct Tag number 中 Clean Tag 的各自分布, 花后 32 d 处理和对照样品分别为 96.64%, 96.61% 和 49.57%, 50.17%; 花后 45 d 处理和对照样品分别为 97.70%, 97.70% 和 50.71%, 52.59%. 从图 1 分析 Clean Tags 拷贝数分布, 结果拷贝数大于 100 的高表达 Tags 在处理和对照中都超过 61%, 而拷贝数小于 5 的低表达 Tags 在种类上非常丰富, 为 54%~56%. 说明占 mRNA 总量 50% 的是种类不到 3% 的少数 mRNA, 标签种类拷贝数分布符合 mRNA 的不均一性, 说明样品制备和测序质量良好, 符合下一步数据分析.

2.2 高温胁迫下甘蓝型油菜籽粒成熟期的基因差异表达谱分析

在 $\text{FDR} < 0.001$, 且 $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1$ 时, 以自然条件为对照, 在高温下花后 32 d 检测到 968 个差异表达基因, 其中上调表达基因为 501 个, 下调表达基因为 467 个; 在高温下花后 45 d 检测到差异基因共 1 064 个, 其中上调基因 274 个, 下调基因 790 个(图 2).

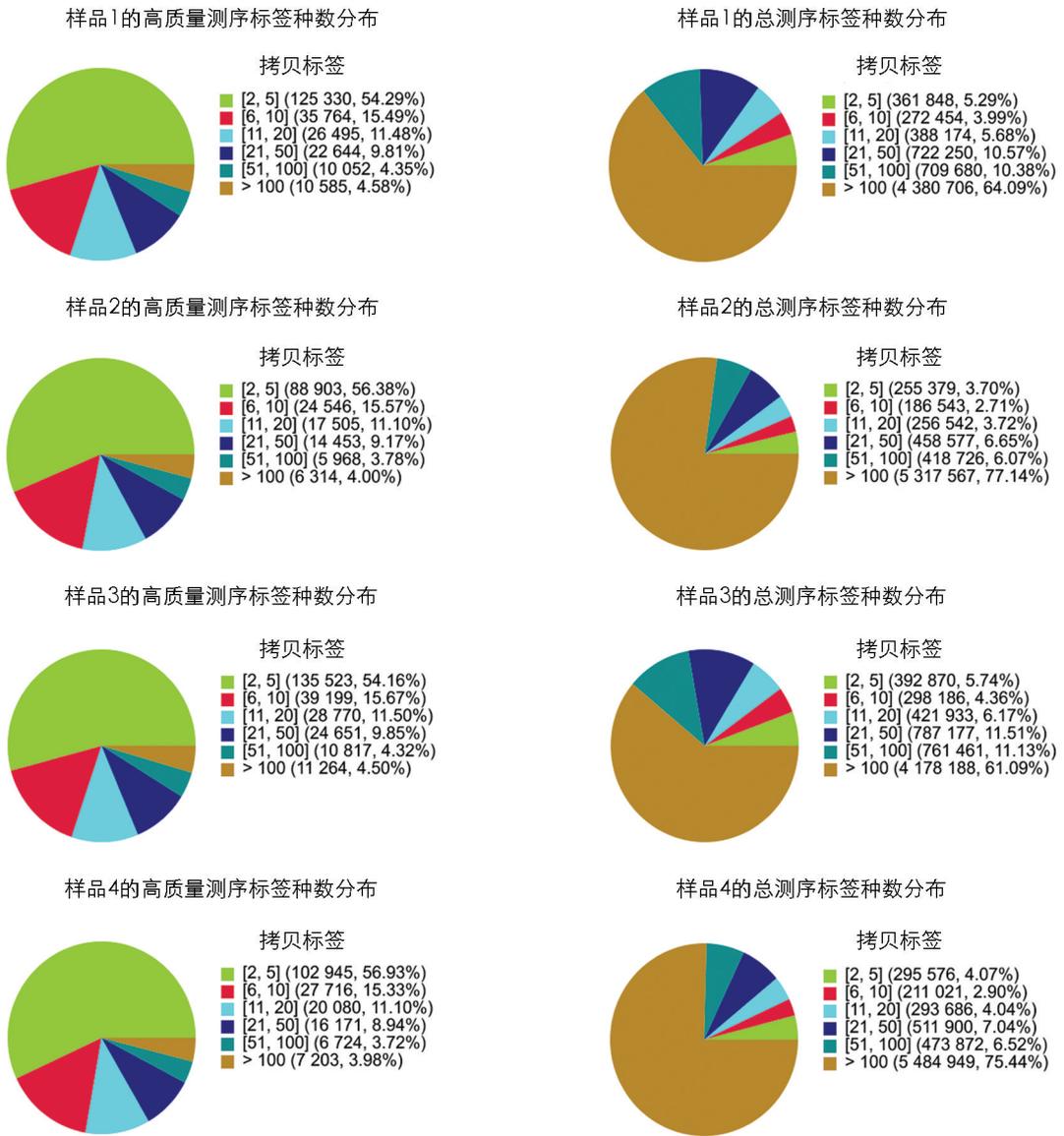


图 1 测序样品 Clean Tag 拷贝数分布统计

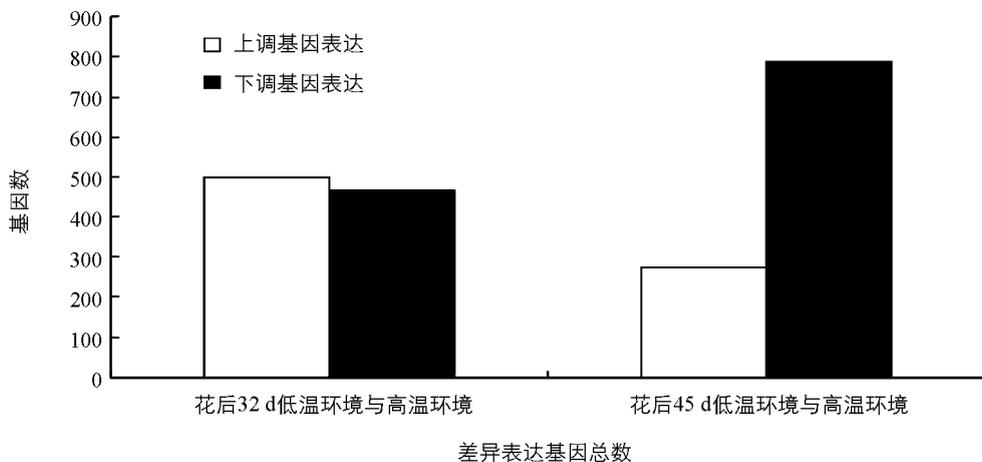


图 2 不同环境条件间差异表达基因的总量

2.3 差异基因功能注释

对差异表达基因进行 GO 功能注释,可以确定差异表达基因及基因产物所在的细胞位置、分子功能以及参与的生物过程.

分析在高温下花后 32 d(对照为低温花后 32 d)的差异表达基因,结果显示,与细胞组分相关的差异表达基因总数为 595 个,基因产物主要分布在细胞周缘、外包结构、维管束和贮藏泡 4 个细胞位置.在注释到的 605 个差异表达基因的分子功能方面,主要包括核苷三磷酸酶活性、肌动活性和微管肌动活性,其中肌动活性和微管肌动活性的 19 个差异表达基因都是表达下调,只有核苷三磷酸酶活性的 53 个差异表达基因中有 7 个基因是表达上调,其余 46 个基因也是表达下调.在注释到的 594 个差异表达基因的生物过程方面,主要为脂的定向积累和微管细胞的生物过程.从细胞组分、分子功能和生物可以看出,在高温下花后 32d 与低温下花后 32 d 相比,差异表达基因产物主要与微管的生物代谢及合成相关.

以低温花后 32 d 为对照,在高温花后 32 d 的种子差异表达基因代谢网络中,一共注释了 555 个差异表达的基因,当 $p < 0.01$ 时,共注释到 47 个差异表达基因,其中有 28 个基因与淀粉和糖代谢途径相关,其中有 15 个基因是上调表达的,13 个基因是下调表达的;有 23 个基因与苯丙素的生物合成途径相关,其中 17 个基因是上调表达,6 个基因是下调表达.在 47 个差异表达基因中,筛选出表达量在 10 倍以上的 6 个基因进行分析,结果这 6 个基因都是上调表达,基因 Bra032343, Bra039705 和 Bra016676 的分子功能都与水解酶活性和阳离子结合相关,其代谢过程都为初级代谢产物的过程,基因的蛋白质产物都与芥子酶(myrosinase)相关,基因 Bra039705 的蛋白质还包括葡萄糖苷酶(thioglucoside glucohydrolase);基因 Bra004012 的分子功能包括与阳离子结合、葡萄糖苷酶活性等,其代谢过程为抗逆反应、气孔运动和刺激应答,基因的蛋白质产物为芥子酶(myrosinase);基因 Bra033504 的分子功能与氧化还原酶活性相关,其代谢过程为保持细胞内的稳定状态,基因的蛋白质产物为谷氧还蛋白家族的成员;基因 Bra010076 的分子功能为酶抑制剂活性,其蛋白质产物也为抑制相关蛋白.由此可以看出,基因 Bra032343, Bra039705 和 Bra016676 都与芥酸和硫苷的代谢相关,推测这 3 个基因可能主要参与芥酸和硫苷的生物合成与代谢;而基因 Bra004012 可能是与抗逆有关的主要基因.

高温花后 45 d 的差异表达基因(对照为低温花后 45 d),结果显示,与细胞组分相关的差异表达基因总数为 753 个,基因产物主要分布于细胞质、质体、细胞周缘和外包结构等位置;在注释到的 736 个差异表达基因的分子功能方面,主要为催化活性、氧化还原酶活性和四吡咯结合(tetrapyrrole binding);在注释到的 755 个差异表达基因的生物过程方面主要包括刺激应答、胁迫反应和一些小分子的代谢,其次还包括有糖类代谢过程(carbohydrate metabolic process)、羧酸的代谢过程(carboxylic acid metabolic process)、细胞甲酮类代谢(cellular ketone metabolic process)和脂类代谢(lipid metabolic process)等.

以低温花后 45 d 为对照,在高温下花后 45 d 的代谢网络中,一共注释了 1 198 个差异表达的基因,当 $p < 0.01$ 时,共注释到 310 个差异表达基因,其中 59 个基因是表达上调,251 个基因是表达下调的.在 310 个差异表达基因中 80.3% 的基因(249 个)都与新陈代谢途径相关,47.7% 的基因(148 个)与次生代谢物的合成相关,11.9% 的基因(37 个)与淀粉和糖代谢途径相关,10.9% 的基因(34 个)与苯丙素的生物合成途径相关,其他差异表达基因中,包括了糖酵解(glycolysis/gluconeogenesis)、类黄酮的生物合成(flavonoid biosynthesis)途径等.在淀粉和糖代谢途径中,37 个差异表达基因中只有 11 个基因是表达上调,其余 26 个基因是表达下调.

3 讨论

3.1 差异表达基因分析

在功能基因组学应用于作物研究方面,数字基因表达谱正在发挥着越来越重要的作用.当植物在高温、干旱等逆境环境下,数字表达谱能快速检测植物基因差异表达,还可以研究基因在不同组织或细胞、不同

发育阶段中基因的改变进而阐明基因的功能。

本文研究甘蓝型油菜在温室高温环境和低温环境下, 不同开花时间基因的差异表达。在花后 32 d, 从代谢途径显著性富集分析, 高温下检测到的 47 个差异表达基因中, 28 个基因都是表达上调, 19 个基因是表达下调。在 10 倍表达量以上的 6 个上调表达基因中, Bra004012、Bra010076 和 Bra033504 可能都是与抗逆相关的基因, 而基因 Bra032343、Bra039705 和 Bra016676 都与芥酸和硫苷的代谢相关, 这表明花后 32 d 的幼嫩种子, 受环境影响没有极端的表现, 种子中基因的表达还处于正常的新陈代谢与生物合成时期, 对于受环境影响的差异表达基因不显著; 到了花后 45 d, 温室与低温相比, 在 1 711 个差异表达基因中, 只有 120 个基因是表达上调, 1 591 个基因都是表达下调, 结果说明, 随着角果成熟, 绝大多数基因的表达量减少, 少数表达量显著上升的基因值得关注, 它们可能与角果储藏物质的合成和角果成熟有关; 在籽粒充实的高峰期(花后 32 d), 高温胁迫下上调表达的基因较多, 其中可能有一部分基因与环境应答有关。这可以从高温下, 花后 45 d 种子中差异表达基因的代谢情况得到证实, 结果发现这时期有 68.9% 的基因都参与新陈代谢, 有 35.94% 的基因参与了次生代谢物的生物合成, 这证明了花后 45 d 是次生代谢物主要代谢时期。

本研究结果显示, 花后不同时期, 并没有检测到因为环境变化而产生的众多差异表达基因, 为了消除敏感基因型材料受环境的影响而产生更多的差异基因, 供试材料选择了环境钝感基因型类别, 在环境之间, 只有因为环境的极端变化才能产生更多差异表达的基因, 但试验结果显示, 不同环境之间含油量差异较大, 这说明高温对油脂合成产生了影响, 这种含油量的差异是来自后期物质的积累, 与前期的代谢相关性不大, 所以表现出花后 45 d 的差异表达基因多于花后 32 d 的差异表达基因。

3.2 在差异表达基因中与光合作用有关的主要酶

从本研究所得到的胁迫诱导基因编码产物可以看出, 高温下, 受到高温胁迫的影响, 机体内产生特异蛋白以维持细胞正常的生长和发育需要, 如 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶小亚基(基因 Bra025431)、光系统 II 10 K 蛋白等在机体维持正常的光合作用过程中发挥重要作用^[8-9]; 由于 rubisco 含量和活化程度都是影响光合速率的限制因子, 本研究结果也表明, 在高温下, 花后 32 d 该基因的表达量是花后 45 d 的 8.1 倍; 在低温下, 花后 32 d 该基因的表达量是花后 45 d 的 4.9 倍, 表明花后 32 d 物质的有效积累远远少于花后 45 d, 这证实了 rubisco 含量和活化程度与光合速率的关系。本研究结果与前人的结果在一定程度相似, 认为生物体在受到外界的胁迫反应可能存在着某些共同的机制^[10], 胁迫反应中光合相关基因 Bra025431(1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶(rubisco)小亚基、光系统 II 10 K 蛋白)等表达频次较高, 其他基因种类较多, 但出现频率较低。

热激蛋白(如 HSP70)在温室胁迫条件下对蛋白质的折叠和复性、变性中有重要的作用^[11]; 铁蛋白的存在可使细胞免受各种胁迫所造成的氧化损伤^[12]; 3-磷酸甘油酸脱氢酶是糖酵解和糖异生作用的关键酶^[13]。由此可知这些已知功能基因很多表现为直接或间接对细胞遭受逆境胁迫起保护作用, 如基因 Bra004012 等, 有的是使植物细胞免受各种胁迫所造成的伤害, 有的是在各种胁迫反应信号转导或基因表达中起调节作用。

本研究温室处理是花后进行 40 °C 以上的高温, 这种高温胁迫对差异表达基因的影响已在多种作物中研究过, 并一直是研究热点。大多数的研究工作集中在高温对作物正常生理性状的影响, L. R. Gibson 和 R. E. Mullen 的实验证明生殖期高温会引起大豆种子中多种矿物质浓度的变化, 可能会影响大豆的营养品质^[14]。很多关于胁迫的研究报道中都说明油脂的合成和蛋白质的合成是此消彼长的关系, 可能是高温影响了两者之间的代谢关系从而改变了彼此的积累量。蛋白质含量上升还有一个可能的原因是在高温胁迫下热激蛋白含量增加, 本研究中, 虽然没有测定蛋白质的含量变化, 但是可以肯定的是, 高温下的含油量显著下降。高温对植物的伤害有很多个方面, 其中最主要的是对细胞内酶系统的破坏, 造成细胞正常的代谢受

阻, 从而影响组织细胞的生长发育; 其次是植物对高温也会发生相应的变化来适应或者降低高温胁迫造成的伤害, 如开启、关闭或者改变某些基因的表达来适应或者抵抗高温胁迫. 在这个过程中最主要的变化就是正常的蛋白合成受阻, 细胞内大量合成热激蛋白(heat-shock proteins HSPs)

为了更加全面地研究油菜在多种不同环境下胁迫诱导基因表达情况, 可以建立多个处理环境、多种不同基因型材料和其他组织的 RNA 表达情况, 以及采用更加先进的分析技术进行筛选, 完善环境胁迫诱导的基因表达谱. 此外, 本文只对部分上调基因做了分析研究, 很多上调和下调表达基因都还需要进一步分析, 最终获得完整的差异表达基因信息.

4 结 论

对花后不同处理时间及不同环境下差异表达基因进行统计分析, 结果以自然条件为对照, 在高温下花后 32 d 检测到 968 个差异表达基因, 其中上调表达基因为 501 个, 下调表达基因为 467 个; 在高温下花后 45 d 检测到 1 064 个差异表达基因, 其中上调表达基因为 274 个, 下调表达基因为 790 个. 结果表明, 随着角果成熟, 绝大多数基因的表达量减少, 少数表达量显著上升的基因值得关注, 它们可能与角果储藏物质的合成和角果成熟有关; 在籽粒充实的高峰期(花后 32 d), 高温胁迫下上调表达的基因较多, 其中可能有一部分基因与环境应答有关. 本研究结果与前人的结果在一定程度相似, 在高温下检测到与胁迫反应中光合相关的基因 Bra025431(1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶小亚基、光系统 II 10 K 蛋白)等表达频次较高, 获得的与环境胁迫相关基因为后续研究奠定了重要基础.

参考文献:

- [1] ZHAO J W, WANG J L, AN L L, et al. Analysis of Gene Expression Profiles in Response to *Sclerotinia Sclerotiorum* in *Brassica napus* [J]. *Planta*, 2007, 227(1): 13–24.
- [2] ZHU Y N, CAO Z Y, XU F, et al. Analysis of Gene Expression Profiles of Two Near-Isogenic Lines Differing at a QTL Region Affecting Oil Content at High Temperatures During Seed Maturation in Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 124(3): 515–531.
- [3] LI X, GAO P, GJETVAJ B, et al. Analysis of the Metabolome and Transcriptome of *Brassica Carinata* Seedlings After Lithium Chloride Exposure [J]. *Plant Science*, 2009, 177(1): 68–80.
- [4] 付三雄, 戚存扣. 不同海拔地区(南京和拉萨)种植的甘蓝型油菜的种子基因差异表达 [J]. *植物学报*, 2009, 44(2): 178–184.
- [5] 王丹丹, 唐章林, 荆蓉蓉, 等. 甘蓝型油菜遗传图谱构建及苗期耐旱相关性状的 QTL 定位 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2014, 36(7): 8–16.
- [6] 易小林, 李名扬, 池 浩, 等. 水杨酸缓解干旱、高温及双重胁迫对紫御谷内源激素及渗透调节物质的影响 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2014, 36(2): 62–67.
- [7] 田学军, 郭亚力, 李春燕, 等. 锰胁迫对甘蓝型油菜 *Brassica napus* L. 种子活力和幼苗抗氧化系统的影响 [J]. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 2012, 37(2): 77–81.
- [8] 万华方, 姚 庆, 梁 颖, 等. 稻瘟菌激发子对油菜光合作用及菌核病抗性的影响 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2013, 35(11): 37–42.
- [9] CAMPALANS A, MESSEGUER R, GODAY A, et al. Plant Responses to Drought, from ABA Signal Transduction Events to the Action of the Induced Proteins [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1999, 37(5): 327–340.
- [10] TEZARA W, MITCHELL V J, DRISCOLL S D, et al. Water Stress Inhibits Plant Photosynthesis by Decreasing Coupling Factor and ATP [J]. *Nature*, 1999, 401: 914–917.
- [11] BAJIAJ S, TARGOLLI J, LIU L F, et al. Transgenic Approaches to Increase Dehydration-Stress Tolerance in Plants [J]. *Molecular Breeding*, 1999, 5(6): 493–503.

- [12] SEKI M, NARUSAKA M, ISHIDA J, et al. Monitoring the Expression Profiles of 7000 Arabidopsis Genes Under Drought, Cold and High-Salinity Stresses Using a Full-Length cDNA Microarray [J]. *The Plant Journal*, 2002, 31(3): 279–292.
- [13] SEKI M, KAMEI A, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, et al. Molecular Responses to Drought, Salinity and Frost: Common and Different Paths for Plant Protection [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(2): 194–199.
- [14] GIBSON L R, MULLEN R E. Mineral Concentrations in Soybean Seed Produced under High Day and Night Temperature [J]. *Plant Science*, 2001, 81(4): 595–600.

Analysis of Differential Gene Expression Profiles of *Brassica napus* at Seed Maturation Under Heat Stress

LI Chao^{1,2,3}, JIAN Hong-ju^{2,3}, LIU Lie-zhao^{2,3}, LI Jia-na^{2,3}

1. Guizhou Province Institute of Oil Crops, Guiyang 550006, China;

2. School of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

3. Chongqing Engineering Research Center for Rapeseed, Chongqing 400716, China

Abstract: Digital gene expression profile was used to investigate the global gene expression profiles of *Brassica napus* in different development stages and under different temperature conditions. Three *B. napus* germplasms were transplanted into two environments (40 °C greenhouse and natural conditions) on the 20th day after flowering for 12 days and 25 days, respectively. RNA from the pod seeds was extracted for statistic analyses of the differential expression genes after flowering in different periods and different ambient temperature conditions. With natural conditions as the check, in the treatment of 32 days after flowering a total of 968 differential expression genes were detected in the greenhouse environment, of which 501 were up-regulated and 467 down-regulated; and in the treatment of 45 days after flowering a total of 1 064 differential expression genes were detected in the greenhouse environment, of which 274 were up-regulated and 790 down-regulated, thus suggesting that the expression of most genes decreased with the maturation of the siliques. However, the expression of a few genes significantly increased, a phenomenon worth careful consideration, for they might be involved with the synthesis of the reserve materials and the maturation of the siliques. The expression of a considerable number of genes were up-regulated under heat stress at maximum seed filling (32 days after flowering), which might be related to the response of these genes to environment. The results of this study were similar to previous results in some extent, indicating that the research methods used in this study are feasible, and the elucidation of the genes related to environmental stress has laid an important foundation for further research.

Key words: *Brassica napus*; heat stress; grain maturation stage; digital gene expression profile; differentially expressed gene

