

陆地棉矮化突变体 Ari1327 茎尖的转录组分析

安文燕^{1,2}, 孙君灵², 龚文芳², 何守朴², 潘兆娥², 杜雄明^{1,2}

(¹华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430072; ²中国农业科学院棉花研究所/棉花生物学国家重点实验室, 河南安阳 455000)

摘要: 为了从分子水平上研究陆地棉矮秆突变体 Ari1327 的矮化机理, 本研究以矮秆突变体 Ari1327、野生型 Ari971 和高秆突变体 Ari3697 的茎尖为材料, 建立 3 个 cDNA 文库, 用 Illumina HiSeqTM2000 系统对 3 个材料的茎尖 cDNA 进行转录组测序。3 个文库测序共得 4.9 G 数据量, 拼接得到 Unigene 70877 个。通过矮化突变体 Ari1327 与野生型 Ari971 和高秆突变体 Ari3697 两个文库的差异筛选, 得到 13919 个与矮化相关的差异表达基因, 其中 5406 个表现上调, 8513 个表现下调。GO 功能和 KEGG 通路富集发现, 差异基因在植物激素信号转导途径显著富集。通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证, 推测 Ari1327 的矮化可能与赤霉素和生长素 2 种激素的信号转导及互作有关。转录组测序得到的大量差异基因, 为深入研究棉花的矮化机理具有重要参考价值, 同时为棉花的矮化育种工作奠定了基础。

关键词: 棉花 (*Gossypium hirsutum* L.); 矮化; 转录组

Transcriptome Analysis of Stem Apex of an Upland Cotton Dwarf Mutant Ari1327

AN Wen-yan^{1,2}, SUN Jun-ling², GONG Wen-fang², HE Shou-pu², PAN Zhao-e², DU Xiong-ming^{1,2}

(¹ College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430072;

² State Key Laboratory of Cotton Biology/Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang Henan 455000)

Abstract: To study the dwarf mechanism of Ari1327 on molecular level, three stem apex cDNA libraries of Ari1327, Ari971, and tall-culm mutant Ari3697 were constructed and sequenced using Illumina HiSeqTM2000 system, respectively. 4.9 G available transcriptome data were obtained, with 70877 Unigenes were spliced. After comparing the transcriptome data of Ari1327 with data of Ari971 and Ari3697, we uncovered 13919 differentially expressed genes, of which 5406 up-regulated while 8513 down-regulated in Ari1327. Gene Ontology functional enrichment and KEGG pathway analysis revealed that the differentially expressed genes enriched in plant hormone signal transduction pathway. After qRT-PCR, we speculated that the signal transduction and interaction of IAA and GA might contribute to dwarfism of Ari1327. We believed that the abundant differentially expressed genes detected by transcriptome sequencing would be beneficial for revealing the mechanism underlying cotton dwarfism which laid the foundation for breeding cotton dwarf gene type.

Key words: cotton (*Gossypium hirsutum* L.); dwarf; transcriptome

棉花是我国重要的经济作物, 矮化植株具有抗倒伏能力强、适宜密植以及机械化管理的特点, 对于减少劳动强度、提高肥料利用率和提高产量具有重要意义^[1]。根据矮化突变体对外源植物激素的反应, 可将其分为激素缺陷型和激素不敏感型两类。激素缺陷型矮化突变体的激素生物合成途径被抑制

或阻断, 使植物体内源活性激素缺乏或痕量存在, 外施相应的活性激素后, 突变体可恢复至野生型的株高; 激素不敏感型矮化突变体内源活性激素水平变化不大, 甚至比野生型的高, 这类矮化突变体在外施相应的激素后不能恢复到野生型的株高^[2]。自 1918 年 S. C. Harland^[3] 发现第一个海岛棉矮化突变

收稿日期: 2014-01-22 修回日期: 2014-04-11 网络出版日期: 2014-08-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140807.1021.016.html>

基金项目: 国家“973”计划 (2010CB12600)

第一作者主要从事棉花矮化突变体研究。E-mail: anwy.07.neu@163.com

通信作者: 杜雄明, 主要从事棉花种质资源研究工作。E-mail: dxm630723@163.com

体以来,对棉花矮化突变体的研究进展缓慢,且主要集中于遗传规律和生理方面。陈旭升等^[4]报道了一个超矮秆棉花突变体,该突变体的矮化伴随子叶与真叶的极度卷缩,外源 GA₃ 处理可使其正常开花结铃。刘爱玉等^[5]对矮秆陆地棉品种陆矮 1 号的研究发现,该突变体苗期生长正常,现蕾后株高增长速度显著低于正常株高品种,主茎顶芽激素 GA₃ 和 IAA 含量偏低,而抑制生长的 ABA 含量高。张超等^[6]对陆地棉极端矮化品种 AS98 的研究发现,外源 GA₃ 的处理能使其节间长度伸长,株高恢复至野生型。相对于水稻和小麦等作物,棉花的矮化研究还处于初级阶段,对其矮化的分子机理研究还很少。

王新坤等^[7-8]报道了一个陆地棉矮秆突变体 Ari1327,其平均株高为 69 cm,属于半矮秆棉花突变体;遗传、形态及生理的初步研究表明,其矮化是由于节间长度缩短引起的,而节间长度的缩短是由节间细胞伸长受到抑制引起的。通过外施植物激素,初步证明 Ari1327 的矮化与赤霉素、生长素都相关。通过 QTL 定位研究表明,株高与纤维品质在遗传上关系不大,可同步改良,突出了 Ari1327 在棉花矮化育种中的重要性。

转录组测序技术(RNA sequencing)可以在没有完整基因组序列的前提下,研究所有的 mRNA 转录本丰度信息,发掘新的转录本和可变剪接体,可以得到定量更准确、分析更可靠、重复性更高及检测范围更广的结果,该技术目前已经被广泛应用^[9]。目前为止,国内外还未见对棉花矮化突变体的转录组测序的报道。前人研究的棉花矮化突变体主要来自于自然突变^[3,10-11]和杂交重组^[4,6,12],且主要为矮化与叶片皱缩同时表现,不利于在育种中的实际应用。Ari1327 是优异种质 Ari971 通过⁶⁰Co γ 射线诱变得到的矮化突变体,遗传背景清楚,是研究棉花矮化突变体的极好材料^[7]。本研究利用转录组测序技术,建立了矮秆突变体 Ari1327、野生型 Ari971 和高秆突变体 Ari3697 等 3 个 cDNA 文库,以期从分子水平上探索 Ari1327 的矮化机理,为 Ari1327 在棉花矮化育种中的应用提供理论依据。同时,测序所得的大量数据也为后续分子机理研究提供了丰富的资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以陆地棉种质材料 Ari971(A9,野生型)及其矮秆突变体 Ari1327(A1)和高秆突变体 Ari3697(A3)5 叶期的茎尖为研究材料,种子由国家棉花种质资源中期库提供。3 个材料用土培法种植于人工气候

室;灭菌的营养土与普通黄土 1:3 的比例均匀混合,装于花盆中,每个样 10 盆,每盆留 5 棵苗,3 个重复。人工气候室参数设置为:光照强度大于 3000 lx,昼夜温度 28℃/22℃,光照时间 14 h/10 h,CO₂ 浓度 > 350 PPM,空气湿度 60%~80%。每 3 d 浇水 1 次。5 片真叶时,采用混合取样法,分别取 3 个品种的茎尖,立即投入液氮中,之后存放于 -70℃ 超低温冰箱中备用。

1.2 RNA 的提取及文库构建

1.2.1 总 RNA 的提取 采用 RNA prep pure 植物总 RNA 提取试剂盒(天根)分别提取 3 个材料茎尖的总 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的纯度及完整性,用 Agilent 2100 RNA 6000 Nano Kit(安捷伦)仪器进一步检测 RNA 的浓度以及 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值,纯度及完整性良好的总 RNA(OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.2 之间)用于文库构建。

1.2.2 RNA 文库的构建 提取样品的总 RNA 后,用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集总 RNA 中的 mRNA,保留 200 nt 以上的 RNA,采用二价阳离子高温加热的方法将 mRNA 打断,以 mRNA 短片段为模板,用六碱基随机引物反转录合成双链 cDNA。经过纯化、末端修复、加碱基 A、加测序接头的步骤后,进行 PCR 扩增,完成测序文库的制备。构建好的文库用 Illumina HiSeq™2000 平台进行测序。

1.3 数据分析

1.3.1 原始数据处理 测序得到的原始图像数据经 Base calling 转化为原始序列数据。通过质量预处理步骤:首先以滑动窗口法去除低质量片段,质量阈值 20(错误率 1%),窗口大小 5 bp,长度阈值 35 bp;然后切除读段中含 N 部分序列,长度阈值 35 bp,得到有效数据。

1.3.2 序列组装 将 3 个样本的有效 Reads 使用 Trinity^[13] 软件 Paired-end 方法进行 De novo 拼接并去重,得到 156848 个长度大于 200 bp 的转录本,取每个 Loci(comp * _c * _) 下最长的转录本作为 Unigene,最终得到 70877 个 Unigene。

1.3.3 基因注释 通过 Blastx 将 Unigene 序列与数据库 NR(Non-redundant Protein Sequence Database in GenBank)、Swiss-Prot(Swiss-Prot Protein Sequence Database, http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guide-line.html)、TrEMBL(Translation of The European Molecular Biology Laboratory, <http://www.uniprot.org/uniprot/>)、CDD(The Conserved Domain Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)

ml)、Pfam (A Data base of Protein Families, <http://pfam.sanger.ac.uk/>) 和 KOG (Cluster of Orthologous Groups for Eukaryotic Complete Genomes, <http://genome.jgi.doe.gov/Tutorial/tutorial/kog.html>) 比对, 取相似度 >30% 且 $e < 10^{-5}$ 的注释, 合并基因得到所有的注释详细信息。

对得到的基因进行 KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) 分析, 利用 KAAS (KEGG Automatic Annotation Server, <http://www.genome.jp/tools/kaas/>) 软件预测得到对应的 KO 号, 然后利用 KO 号对应到 KEGG 通路上, 分析基因与 KEGG 中酶注释的关系文件以及映射到通路上的信息。

根据注释信息, 进行 GO (Gene Ontology) 功能在线注释 (<http://www.geneontology.org/>), 得到每个 Unigene 的 GO 信息后, 用 WEGO 软件做 GO 功能分类统计。

1.3.4 基因表达差异分析 Unigene 表达量的计算用 RPKM (reads per kb per million fragments) 法。根据基因的表达量 (RPKM 值) 计算该基因在不同样本间的差异表达倍数, 差异倍数用 Log_2 (样本 1 RPKM/样本 2 RPKM) 表示。差异表达基因定义为 $P \leq 0.05$ 且差异倍数在 2 倍以上的基因。得到的差异基因进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析。

1.3.5 确定矮秆相关基因的比对方案 将矮秆突变体 Ari1327、野生型 Ari971 和高秆突变体 Ari3697 测序得到的 Unigene 进行表达量 RPKM 的计算, 根据基因表达差异分析的标准, 分别得到 Ari1327 相对于 Ari971 差异表达的 Unigene 和 Ari1327 相对于 Ari3697 差异表达的 Unigene, 将这 2 部分差异表达 Unigene 取交集, 获得 Ari1327 相对于 Ari971 和 Ari3697 都差异表达的 Unigene, 本研究将这些在矮秆突变体中特异表达的 Unigene 作为与矮化相关的 Unigene。

表 1 测序原始数据与有效数据概况

Table 1 Data set summary of sequencing of raw data and valid data

样品 Samples	原始数据 Raw data		有效数据 Valid data			有效数据比例 (%) Valid ratio(reads)
	读段 Reads	总长度 (bp) Base	读段 Reads	总长度 (bp) Base	平均长度 (bp) Average length	
A1	19386166	1958002766	17142420	1632109999	95.21	88.43
A3	19442786	1963721386	16728306	1583094013	94.64	86.04
A9	21990400	2221030400	18712824	1775620884	94.89	85.10

A1: Ari1327, 矮秆突变体; A3: Ari3697, 高秆突变体; A9: Ari971, 野生型, 下同

A1: Ari1327, dwarf mutant, A3: Ari3697, tall-culm mutant, A9: Ari971, wild type, the same as below

2.2 De novo 拼接

由于棉花 A_1D_1 异源四倍体的基因组测序信息尚未公布, 目前只有雷蒙德氏棉 D 基因组的测序信息^[14]。因此本研究采用 Reads 组装软件 Trinity 进

1.4 荧光定量 PCR 分析

Ari1327、Ari3697 和 Ari971 茎尖的总 RNA 用 PrimerScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) 反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链。用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒 (TaKaRa) 在 ABI 7500 FAST 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 上用 SYBR green 荧光染料法进行 qRT-PCR。反应体系: SYBR[®] Premix Ex Taq 10 μL , 正向引物 0.4 μL , 反向引物 0.4 μL , ROX Reference Dye II 0.4 μL , 模板 2 μL , 灭菌蒸馏水 6.8 μL , 总体积 20 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 34 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延 30 s, 40 个循环。每个试验设 3 个重复, 以 *Ghactin* 基因为内参, 用相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行结果分析。用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计引物, *Ghactin* (F: ATCCTCCGTCCTTGACCTTG, R: TGTCCGTCAGGCAACTCAT); *GhAUX₁* (F: CCCTCCTAATCCGAAACCGA, R: AGCCTCCCTTCTTCCTACCA); *GhDELLA* (F: GTTGTGAAGGAACGCATCGG, R: CCGACACCGCCTTGAATTTG); *GhARR-A* (F: CTCGGAAGCAGCCATAACCA, R: TTTGTTTCCATTTCCCATCCC); *GhSAUR* (F: GCTCCGCTTCCTTCAACAAC, R: ACCCAAGGGACATCTTGCTG); *GhGH₃* (F: TCCCAAACCGAGTACCTTCG, R: CGCCATTAGCGATACGTTGG); *GhAUX/IAA* (F: CCT CCTGC-CAAAGCACAAATAG, R: TGTAATCCCAGGACCCTCAC), 委托 Invitrogen 公司合成引物。

2 结果与分析

2.1 测序质量统计

通过对 3 个文库的测序, 得到原始数据和过滤之后的有效数据 (表 1), 后续的分析都基于有效数据。经过预处理, 最终得到了有效 RNA 测序数据 5.2×10^7 条, 数据量 4.9 G, 平均长度 94.91 bp, 每个样本的数据量在 2 G 左右, 可以满足后续的分析需求。

行从头拼接, 最终得到 70877 个 Unigene。

对组装得到的 70877 个 Unigene 进行长度分布特征分析 (图 1), 结果显示: Unigene 的长度主要分布在 200 ~ 400 bp, 占有 Unigene 的 51.6%; 长度

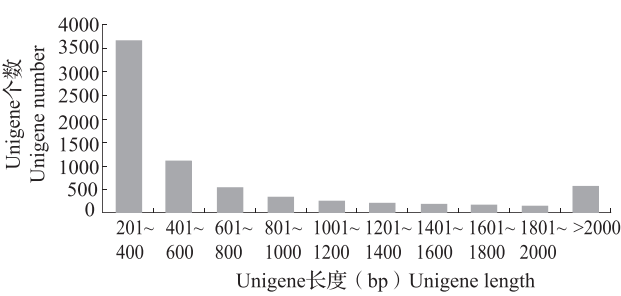


图1 Unigene 的长度分布
Fig.1 Distribution of Unigene length

表 2 Unigene 功能注释结果

Table 2 Annotation results of unigene

比对上的基因 Annotated unigene	非冗余蛋白 序列数据库 NR	蛋白序列 数据库 Swiss-Prot	欧洲分子生 物学实验室 TrEMBL	保守结构域 数据库 CDD	蛋白质家 族数据库 Pfam	真核生物全基因 组直系同源簇 KOG	基因功 能分析 GO	基因和基因组 日本百科全书 KEGG
个数 Number	30607	17163	31361	15044	27478	9253	23707	9811
比例(%) Rate	43.18	24.22	44.25	21.23	38.77	13.06	33.45	13.84

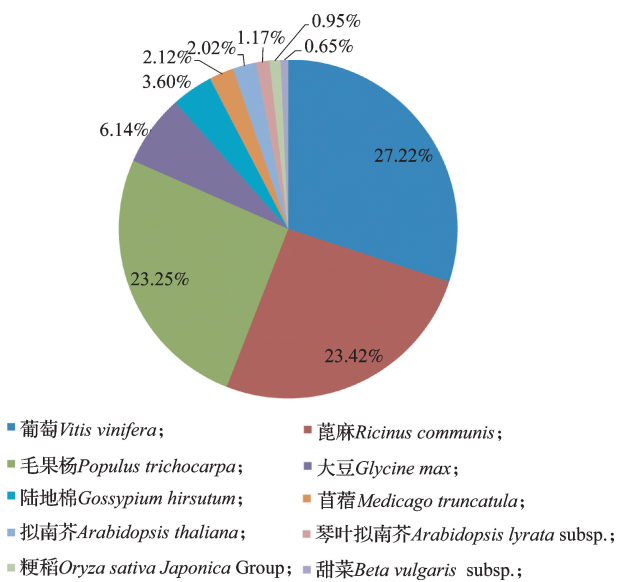


图2 NR 数据库中注释上数目最多的物种分布
Fig.2 Distribution of the most abundant species
blast on NR database

2.4 矮秆突变体 Ari1327 与野生型 Ari971 的转录组比较分析

对 Ari1327 和 Ari971 的茎尖转录组数据进行差异比较分析(图3),共得到 27745 个差异表达基因,其中红色散点代表 14230 个上调基因(Ari1327 相对于 Ari971),绿色散点代表 13515 个下调基因。进一步结合 Ari3697 的转录组测序数据,利用矮秆基因

大于 1000 bp 的 Unigene 有 14620 个,比例达到 20.6%。这 70877 个 Unigene 的平均长度为 727 bp,表明进一步的拼接结果比较理想。

2.3 Unigene 注释

将 3 个样本的 Unigene 与公共数据库 NR、Swiss-Prot、TrEMBL、CDD、Pfam 和 KOG 等进行 Blast 比对,比对结果如表 2 所示。与 NR、TrEMBL 和 Pfam 等 3 个数据库比对上的 Unigene 数目最多。其中,在 NR 注释中,90.54% 的 Unigene 注释上最多的前 5 个物种分别为葡萄、蓖麻、毛果杨、大豆和陆地棉(图 2)。

确定的比对方案,得到与矮秆相关的差异基因共 13919 个,其中上调基因 5406 个,下调基因 8513 个(图 4),后续关于基因功能和富集通路的分析都基于这些基因。

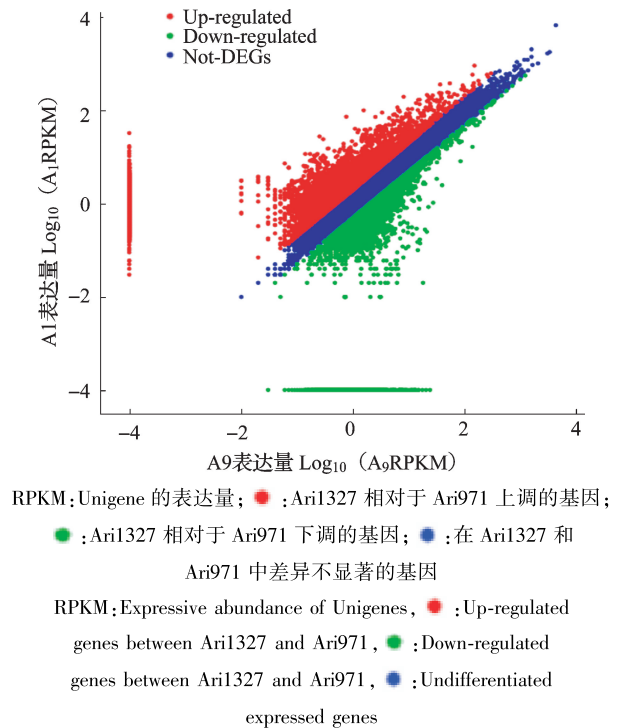
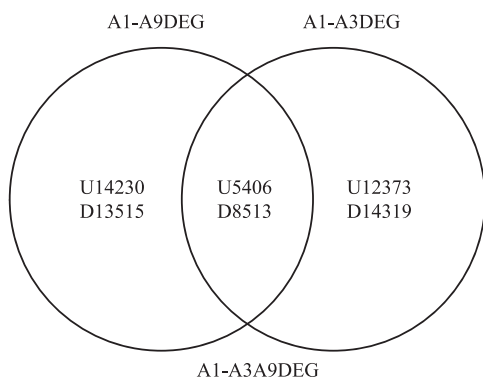


图3 Ari1327 和 Ari971 茎尖中基因的差异表达
Fig.3 Differentially expressed genes(DEGs) of
Ari1327 and Ari971



DEG: 差异表达基因; A1-A9DEG: Ari1327 相对于 Ari971 差异表达的基因; A1-A3DEG: Ari1327 相对于 Ari3697 差异表达的基因; A1-A3A9: Ari1327 相对于 Ari971 和 Ari3697 都差异表达的基因, 即与矮秆相关的基因; U: 上调的差异基因; D: 下调的差异基因
DEG: Differentially expressed gene, A1-A9DEG: Differentially expressed genes between Ari1327 and Ari971, A1-A3DEG: Differentially expressed genes between Ari1327 and Ari3697, A1-A3A9: Differentially expressed genes of Ari1327 compared with both Ari971 and Ari3697, Unigenes correlated with dwarfism, U: Up-regulated genes, D: Down-regulated genes

图 4 与矮秆相关的 Unigene 维恩图

Fig. 4 Venn diagram of Unigenes correlated with dwarfism

对 13919 个可能与矮秆相关的差异表达基因进行 GO 功能注释(图 5)。细胞组分、分子功能和生物学过程 3 大功能分类分别包含了 12、11 和 22 个功能分类。在细胞组分分组中, 差异表达基因在细

胞和细胞组分类型中所占比例最高, 都为 42.6%; 在分子功能分组中, 结合和催化活性类型中差异表达基因最多, 分别占 71.9% 和 59.4%; 在生物学过程分组中, 细胞过程和代谢过程所占比例分别为 64.4% 和 65%。差异表达基因主要富集在生物学过程分类中, 推测该分类中的基因对株高有显著性影响。

对 13919 个与矮秆相关的差异基因进行 Pathway 富集分析, 这些基因主要富集在 64 个通路上, 表 3 列出了富集的差异基因数目最多的前 10 个途径。其中, 富集在植物与病原体互作、植物激素信号转导、淀粉和蔗糖的代谢这 3 个途径上的基因最多。

植物激素信号转导途径上的基因参与植物激素信号的传递, 表明 Ari1327 的矮化与植物激素密切相关, 这与王新坤等^[8]之前对其生理研究的结果一致。表 4 列举了参与赤霉素、生长素等激素信号转导过程的一些基因。王新坤等^[8]通过外施激素试验表明 Ari1327 的矮化可能与 GA、IAA 相关, 但这 2 种激素具体的调控机制还不清楚, 需要进一步试验的验证。

qRT-PCR 结果显示, *AUX1* (生长素输入载体)、*DELLA* (抑制 GA 反应基因表达) 和 *ARR-A* (细胞分裂素快速诱导基因) 在 Ari1327 中的表达量高于 Ari971; *SAUR*、*GH3* 和 *AUX/IAA* 等 3 个生长素早期响应因子, 在矮秆突变体 Ari1327 中的表达量均低于野生型 Ari971 (图 6)。

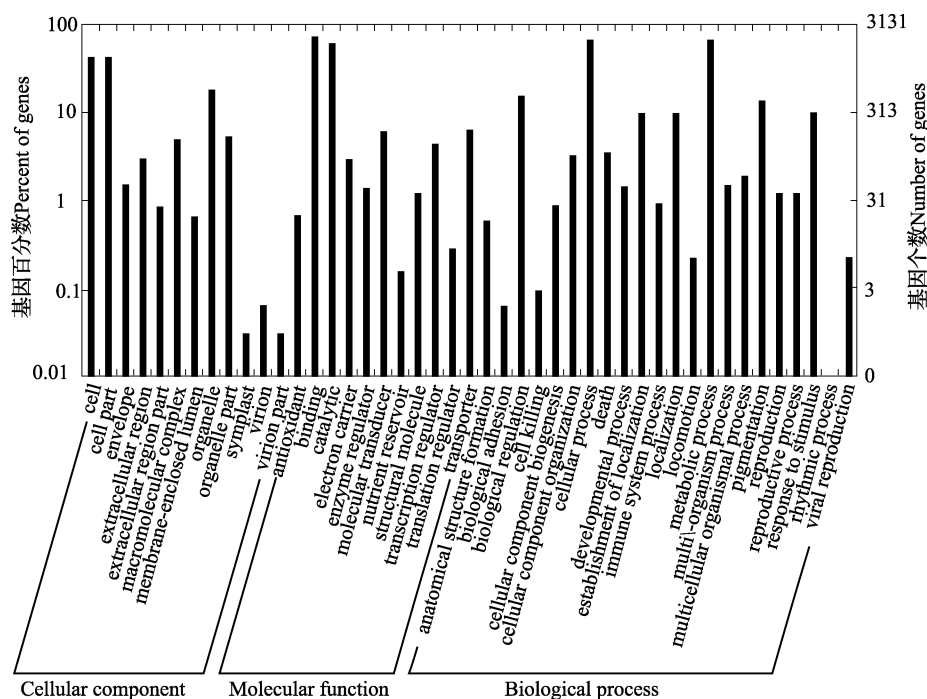


图 5 矮秆相关差异表达基因 GO 分类图

Fig. 5 GO annotation of DEGs related to dwarfism

表 3 矮秆相关基因 KEGG 富集分析

Table 3 KEGG enrichment of genes correlated with dwarfism

通路编号	差异表达基因数	通路
KO code	DEG number	Pathway
ko04626	52	植物与病原体互作 Plant-pathogen interaction
ko04075	46	植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction
ko00500	35	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism
ko00940	24	苯丙烷类生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis
ko04912	22	促性腺激素释放素信号途径 GnRH signaling pathway
ko04976	22	胆汁脂质分泌 Bile secretion
ko04724	21	谷氨酸突触 Glutamatergic synapse
ko04910	21	胰岛素信号途径 Insulin signaling pathway
ko02010	20	ABC 转运子 ABC transporters
ko05145	19	弓形体病 Toxoplasmosis

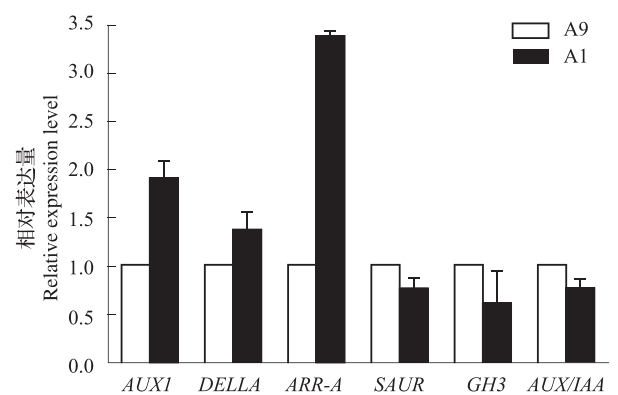


图 6 荧光实时定量 PCR 检测
Fig. 6 Gene detected by qRT-PCR

表 4 植物信号转导途径上差异表达的基因

Table 4 Differentially expressed genes in pathway of plant hormone signal transduction

基因序号	表达量 RPKM		Log ₂ A1/A9	名称	数据库注释
Gene ID	A1	A9		Name	Database annotation
comp112867_c0_seq1	3. 59	0. 45	2. 9959869	ARR-A	ARR-A 家族反应调节组分 Two-component response regulator ARR-A family
comp44158_c0_seq2	0. 81	0. 25	1. 6959938	DELLA	DELLA 蛋白 DELLA protein
comp21197_c0_seq1	2. 25	0. 73	1. 6239566	MYC2	转录因子 MYC2transcription factor MYC2
comp32099_c0_seq1	11. 01	5. 2	1. 0822309	JAZ	茉莉酮酸 ZIM 结构域蛋白 Jasmonate ZIM domain-containing protein
comp166574_c0_seq1	1. 02	0. 39	1. 3870231	BAK1	油菜素内酯敏感的受体激酶 1Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1
comp156025_c0_seq1	0. 66	0	/	AUX1/LAX	生长素输入载体 Auxin influx carrier
comp5697_c0_seq1	2. 5	0. 86	1. 5395195	TGA	转录因子 TGA Transcription factor TGA
comp45906_c0_seq5	1. 88	5. 04	-1. 422691	ETR/ERS	乙烯受体 Ethylene receptor
comp19854_c0_seq1	0. 59	2. 56	-2. 117357	EIN3	乙烯敏感蛋白 3Ethylene-insensitive protein 3
comp11245_c0_seq1	2. 26	5. 18	-1. 196629	SAUR	生长素诱导蛋白 Auxin-induced protein
comp90264_c0_seq1	1. 65	4. 37	-1. 405167	GH3	生长素应答因子 GH3 家族 Auxin responsive GH3 gene family

3 讨论

高通量测序得到的数据通过一定的比对方案,得到大量可能与矮秆相关的基因。通过 KEGG 通路富集分析发现,显著富集在植物激素信号转导上的基因有 46 个,证明 Ari1327 的矮化与植物激素密切相关,这与王新坤等^[8]的研究结果一致,也与其他关于棉花矮化突变体的研究相符。王新坤等^[8]通过对 Ari1327 外施激素、测定内源激素,证明 Ari1327 不是单一的激素敏感型或不敏感型矮化突变体,GA 和 IAA 对其矮化都起到重要调控作用。陈旭升等^[4]研究发现,陆地棉极矮突变体超矮 1 号是赤霉素敏感型矮化突变体。陆地棉极端矮化突变体 AS98 也属于赤霉素敏感型矮化突变体,其内源

赤霉素合成受影响,在连续施用一定浓度的赤霉素后,株高恢复至野生型^[6]。这一研究结果也与在小麦和水稻等作物上发现的矮秆突变体一致,大多数矮化突变体都因为激素合成途径或应答调节过程的基因突变,导致茎的生长发育受限^[15]。植物激素调节植物生长的过程中,各种激素之间并不是孤立地起作用,而是多种激素相互作用共同调节的^[16]。DELLA 蛋白是赤霉素诱导植物生长的负调控因子,位于细胞核,抑制赤霉素反应基因的表达^[17]。在赤霉素存在的情况下,DELLA 蛋白通过将赤霉素结合到其受体上(水稻种的 GID1,拟南芥中的 GID1a、GID1b 和 GID1c),接着与 SCF E3 泛素酶复合体互作,通过泛素化途径使 DELLA 蛋白降解,从而解除 DELLA 蛋白对赤霉素反应基因的抑制^[18]。

本研究通过转录组表达水平检测发现,矮秆突变体 Ari1327 体内编码 DELLA 蛋白的基因与野生型相比,上调表达。Ari1327 体内 DELLA 蛋白的积累,可能是由于 DELLA 蛋白受体结合结构域发生变化,使其不能通过赤霉素介导的泛素化途径降解而造成的。由于不能解除 DELLA 蛋白的阻遏作用,所以下游的赤霉素响应基因表达受到抑制,GA 不能发挥其促进植株生长的作用,造成 Ari1327 的矮化。DELLA 蛋白的稳定性和赤霉素介导的 DELLA 蛋白的降解也受其他几种激素的影响,如生长素和乙烯等,证明 DELLA 蛋白可能是作为一种调节各种生长信号路径的集合子^[19]。

GH3 基因编码生长素结合酶,GH3 蛋白具有吡啶乙酸氨基酸化的合成酶功能,通过减少游离生长素水平,对生长素起到反馈调节的作用^[20]。AUX/IAA 蛋白是一种转录抑制子,在生长素信号转导途径中发挥极其重要的作用,AUX/IAA 基因突变体表现出与生长素直接相关的发育表型的改变。水稻 OsIAA1 能与 OsARF1 相互作用,转基因植株表现为株高降低、株型松散^[21]。SAUR 编码一种钙调素结合蛋白,组成了生长素反应基因的最大家族,但由于其半衰期很短,所以目前对其功能研究还很少^[22]。研究证明在拟南芥中表达稳定的 SAUR19-SAUR24 融合蛋白,得到与生长素相关的表型,表现为下胚轴和叶子的伸长以及热反应的改变^[23]。本研究发现在矮秆突变体 Ari1327 中,GH3、AUX/IAA 和 SAUR 这 3 个生长素早期反应基因表达量均低于野生型,这可能导致 Ari1327 体内生长素含量与野生型的显著差别;由于这 3 类基因家族成员较多,在转录组测序结果中,有的基因还在矮秆突变体中上调。因此,具体的调控机制还需要进一步的克隆、转化等研究来证明。但可以初步确定 Ari1327 的突变不仅仅与赤霉素有关,而且与生长素等激素调控基因也有关。

本研究通过新一代高通量测序技术对棉花矮秆突变体 Ari1327 及其野生型和高秆突变体的茎尖进行了转录组测序,得到大量的差异表达基因,尤其是富集在植物激素信号转导途径上的基因,为后续深入研究调控 Ari1327 矮化的基因提供了良好的分子基础。由于植物激素转导途径以及激素之间的相互作用机制很复杂,目前还未完全研究清楚,且棉花的分子基础研究有限,本研究结果还未能明确 Ari1327 的矮化机理,但测序得到的数据为下一步工作的开展提供了丰

富资源。

参考文献

- [1] 王坤波,刘正德. 试论棉花矮化育种[J]. 中国棉花,1996,23(9):2-3
- [2] 虞慧芳,曹家树,王永勤. 植物矮化突变体的激素调控[J]. 生命科学,2002,14(2):85-88
- [3] Harland S C. On the genetics of crinkled dwarf rogues in Sea Island cotton[J]. West Ind Bull,1918,16(1):82
- [4] 陈旭升,狄佳春,许乃银,等. 陆地棉超矮秆突变性状质量遗传规律分析[J]. 遗传,2007,29(4):471-474
- [5] 刘爱玉,易九红,陈金湘,等. 矮秆陆地棉品种陆矮 1 号的生长发育特性研究[J]. 植物遗传资源学报,2009,9(4):536-539
- [6] 张超,孙君灵,贾银华,等. 外源激素对一个新的棉花极端矮化突变体 AS98 植株生长和酶活性的影响[J]. 中国农业科学,2010,43(7):1370-1378
- [7] 王新坤,潘兆娥,孙君灵,等. 陆地棉超矮秆突变体株高和纤维品质的 QTL 定位及相关性研究[J]. 核农学报,2011,25(3):448-455
- [8] 王新坤,孙君灵,潘兆娥,等. 陆地棉矮化突变体 Ari1327 的矮化机理研究[J]. 棉花学报,2012,24(4):293-302
- [9] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nat Rev Genet,2009,10(1):57-63
- [10] 刘爱玉,陈金湘,李瑞莲,等. 矮秆陆地棉陆矮 1 号主茎顶芽几种激素含量研究[J]. 棉花学报,2009,21(3):248-251
- [11] McMichael S C. Occurrence of the dwarf-red character in Upland cotton[J]. Jour Agr Res,1942,64(8):477-481
- [12] 何鉴星,孙传渭,姜茹琴,等. 棉花矮化突变体的遗传分析[J]. 遗传学报,1996,23(5):397-402
- [13] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nat Biotechnol,2011,29(7):644-652
- [14] Wang K, Wang Z, Li F, et al. The draft genome of a diploid cotton *Gossypium raimondii*[J]. Nat Genet,2012,44(10):1098-1103
- [15] 廖娇,黄春辉,辜青青,等. 植物矮化相关基因研究进展[J]. 生物技术通讯,2011,22(4):593-597
- [16] 叶梅荣,朱昌华,甘立军,等. 激素间相互作用对植物茎伸长生长的调控综述[J]. 中国农学通报,2007,23(4):228-231
- [17] Alvey L, Harberd N P. DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? [J]. Physiol Plant Arum,2005,123(2):153-160
- [18] Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, et al. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors [J]. Plant J, 2006,46(5):880-889
- [19] Achard P, Vriezen W H, Van Der Straeten D, et al. Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function [J]. Plant Cell, 2003,15(12):2816-2825
- [20] Staswick P E, Serban B, Rowe M, et al. Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid[J]. Plant Cell,2005,17(2):616-627
- [21] Song Y, You J, Xiong L. Characterization of *OsIAA1* gene, a member of rice Aux/IAA family involved in auxin and brassinosteroid hormone responses and plant morphogenesis[J]. Plant Mol Biol, 2009,70(3):297-309
- [22] Kant S, Bi Y M, Zhu T, et al. SAUR39, a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice[J]. Plant Physiol,2009,151(2):691-701
- [23] Spartz A K, Lee S H, Wenger J P, et al. The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion[J]. Plant J,2012,70(6):978-990