

王江英, 朱朋波, 汤雪燕, 等. 外源赤霉素诱导矮生山茶恨天高植株生长的转录组分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(1): 47-56.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.01.007

外源赤霉素诱导矮生山茶恨天高植株生长的转录组分析

王江英¹, 朱朋波¹, 汤雪燕¹, 孙明伟¹, 葛金涛¹, 赵统利¹, 李纪元², 惠林冲¹, 邵小斌¹
(1. 连云港市农业科学院花卉研究中心, 江苏 连云港 222000; 2. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所/浙江省林木育种技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311400)

摘要: 对 0 mg/L、800 mg/L 赤霉素处理的矮生山茶恨天高叶片、茎段和茎尖进行了 Illumina HiSeq 高通量转录组测序, 共获得 476 635 个 Unigenes, 其中 181 115 (38.00%) 个 Unigenes 获得了注释; 差异基因分析发现了 43 624 个差异基因, 其中包括 43 295 个特异的和 329 个共同的差异基因; GO 和 KEGG 富集分析结果显示, 恨天高叶片增大、茎段伸长及茎尖生长与糖代谢、苯丙烷生物合成代谢相关; 茎尖生长还与植物激素信号传导和二萜生物合成有关。通过赤霉素处理后恨天高叶片、茎段、茎尖转录组分析发现, 茎尖组织中参与赤霉素生物合成的 *KAO*、*GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 基因表达量发生变化, 赤霉素信号传导过程中 DELLA 蛋白调控以及赤霉素和生长素、细胞分裂素等其他激素间的互作促进恨天高植株生长。

关键词: 矮生恨天高; 赤霉素; 转录组; 差异表达基因

中图分类号: S685.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)01-0047-10

Transcriptome profiling of plant height growth in *Camellia reticulata* Hentiangao induced by exogenous gibberellin

WANG Jiang-ying¹, ZHU Peng-bo¹, TANG Xue-yan¹, SUN Ming-wei¹, GE Jin-tao¹, ZHAO Tong-li¹, LI Ji-yuan², HUI Lin-chong¹, SHAO Xiao-bin¹

(1. Lianyungang Academy of Agricultural Sciences, Flower Research Center, Lianyungang 222000, China; 2. Research Institute of Subtropical Forestry of Chinese Academy of Forestry/Zhejiang Provincial Key Laboratory of Tree Breeding, Hangzhou 311400, China)

Abstract: Illumina HiSeq high-throughput sequencing was performed on the leaves, stem segments and shoot tips of *Camellia reticulata* Hentiangao treated with mg/L 0 and 800 mg/L gibberellin, respectively. A total of 476 635 unigenes were obtained, and 181 115 (38.00%) of them were annotated. In addition, 43 624 differentially expressed genes (DEGs), including 43 295 unique and 329 common, were identified. GO and KEGG enrichment analysis results showed that leaf enlargement, stem elongation and shoot tip growth were related to glucose metabolism and phenylpropanoid biosynthesis. Furthermore, many DEGs in shoot tip growth were involved in plant hormone signal transduction and diterpenoid biosynthesis. According to the transcriptome analysis, three factors were found to promote the growth of Hentiangao. The first was the expression changes of *KAO*, *GA20ox*, *GA3ox* and *GA2ox* genes involved in gibberellin biosynthesis in shoot tips. The second was the regulation of DELLA protein in gibberellin signal transduction. The third was the interaction of gibberellin with auxin, cytokinin and other hormones.

Key words: *Camellia reticulata* Hentiangao; gibberellin; transcriptome; differentially expressed genes

收稿日期: 2019-08-07

基金项目: 连云港市财政专项 (QNJJ1802)

作者简介: 王江英 (1984-), 女, 江苏泰州人, 博士, 助理研究员, 主要从事花卉分子育种研究。 (E-mail) wangjiangying3401@163.com

通讯作者: 邵小斌, (E-mail) 13851270566@163.com; 汤雪燕, (E-mail) 3202txy@163.com

赤霉素 (Gibberellins, GAs), 二萜类植物激素, 主要促进植株的营养生长, 包括节间的延长、根的伸长和叶的扩展^[1-3]。在赤霉素合成途径中, 萜烯合成酶 *TPSs*、细胞色素 P450s 和 GA 氧化酶 (*GAoxs*) 将前体牻牛儿苗酸牻牛儿苗焦磷酸 GGDP 催化成活性赤霉素, 其中贝壳杉烯酸氧化酶 (*KAO*) 属于细胞色素 P450, 催化

赤霉素合成前期阶段。GA 氧化酶包括 *GA2ox*、*GA20ox* 和 *GA3ox*, 是赤霉素合成和代谢后期阶段的主要调控点, 将非活性赤霉素催化成活性赤霉素^[4-7]。前期研究发现, 多种植物的 *KAO* 突变能诱导植株矮化, 如水稻 *d35* 突变体^[8]。梨矮化砧木中 *KAO* 表达量低于乔化和半矮化的品种^[9]。相对于早期合成酶, 后期生物合成酶易受植物生长发育和环境因素调节, 这些酶在生物活性赤霉素水平的调控中起着关键作用。*GA20ox* 和 *GA3ox* 过量表达后提高活性赤霉素的含量, 加快植物生长, 节间伸长, *GA20ox* 和 *GA3ox* 功能缺失会引起植株矮化^[10-11]。*GA2ox* 的作用则是降低活性赤霉素的水平^[11-12]。

赤霉素信号传导途径中, *DELLA* 蛋白作为植物生长抑制剂可被活性赤霉素抵消^[13], 赤霉素信号启动 *DELLA* 蛋白的降解, 调控赤霉素反应基因的表达, 从而促进植物的生长, 所以 *DELLA* 蛋白对植物的生长发育起负反馈调节^[14-16]。目前 *DELLA* 基因在拟南芥^[17]、葡萄^[18]、草莓^[19]和甘蓝型油菜^[20]等植物中陆续被克隆及分析, 为植物矮化性状研究提供依据。

恨天高 (*Camellia reticulata* Hentiangao) 是云南山茶最珍贵的品种之一, 其株形矮小, 生长缓慢, 花瓣平展, 完全重瓣, 形态优美, 叶浓花艳, 具有极高的观赏价值^[21]。随着城市的快速发展, 矮生和盆栽木本花卉植物在园林绿化、居室美化等方面有着重要作用。通过转录组分析挖掘高效调控恨天高株高的关键基因, 为培育微型山茶新品种奠定基础。

本研究以云南山茶矮生品种恨天高为材料, 利用转录组测序分析恨天高植株矮生与赤霉素合成代谢和信号传导间的关系, 以期获得调控植物株高的重要基因, 并揭示其矮生机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以立地条件相同且生长年龄相近的恨天高山茶 (*Camellia reticulata* Hentiangao) 为材料, 利用不同质量浓度梯度 [0 mg/L (CK)、200 mg/L (T1)、400 mg/L (T2)、800 mg/L (T3) 和 1 000 mg/L (T4)] 的赤霉素 (GA_3) 进行茎尖涂抹。75 d 后采集各质量浓度处理后的叶片、茎段及茎尖组织进行液氮速冻, -80 °C 保存备用。

1.2 茎尖和叶片总 RNA 提取

参照北京艾德莱生物科技有限公司 RN53-

EASYspin Plus 植物试剂盒说明书提取样品总 RNA。利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 分光光度计检测 RNA 完整度、浓度、 $A_{260/280}$ 、 $A_{260/230}$ 及核酸峰度是否正常, 之后再经 Agilent bioanalyzer 2100 进行 RNA 质量检测。

1.3 赤霉素诱导恨天高植株生长的质量浓度筛选

分别利用 0 mg/L、200 mg/L、400 mg/L、800 mg/L 和 1 000 mg/L 的 GA_3 涂抹 5 年生恨天高植株茎尖, 每 2 d 涂 1 次, 每个质量浓度处理 3 株, 每株分别处理 5 个茎尖, 30 d 和 75 d 后分别测量茎尖生长值。

1.4 文库构建和转录组测序

恨天高叶片、茎段和茎尖总 RNA 质量分别检测合格后, 利用 NEBNext® Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module 进行 mRNA 捕获, 利用 NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina 和 Beckman Agencourt AMPure XP beads 分别进行文库构建和文库纯化, 利用 TruSeq PE Cluster Kit V4 完成 cBOT 自动成簇, 最后通过 TruSeq SBS Kit v4-HS 进行 HiSeq 测序。以上文库构建和转录组测序均由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.5 生物信息学分析

对测序结果原始图像数据利用软件 Bcl2fastq (v2.17.1.14) 进行图像碱基识别, 初步质量分析后得到原始测序数据。测序数据质量评估采用 FastQC (v0.10.1) 进行分析, 使用 Cutadapt (version 1.9.1) 对测序原始数据去除接头以及低质量序列等, 得到后续信息分析用的高质量有效序列。采用 Trinity 对样品数据从头组装, 组装结果通过序列聚类进行进一步序列拼接和去冗余处理, 得到长的非冗余 Unigenes, 利用 TransDecoder 软件进行 ORF 分析^[22]。

Unigenes 表达计算使用 RSEM 软件, 该软件使用 FPKM (Fragment per kilo bases per million reads) 方法计算基因表达量。利用 EdgeR 软件进行基因差异表达分析, 以变化 2 倍以上、 $Pvalue \leq 0.05$ 且错误发现率 (FDR) < 0.01 为差异表达基因筛选标准。最后基于差异表达基因进行 GO 功能注释、KEGG 代谢通路分析和 COG 功能注释。

1.6 实时荧光定量 PCR 验证

利用实时荧光定量 PCR 验证转录组测序的准确性, 挑选 5 个差异表达基因设计引物, 以山茶 *18S* RNA 为内标基因 (所用引物见表 1), 生物学试验重复 3 次。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法求得差异基因的表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

基因	基因号	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>DELLA</i>	TRINITY_DN160422_c1_g1_i1	AGTGGCAAACCTCGGTTATCC	AGTGTGCCATCCTAGCATTAG
<i>KAO</i>	TRINITY_DN176135_c1_g1_i1	CCTGGAAATGAGCTTGCGAA	TGTGGTAAGTACATCACACG
<i>GA20ox</i>	TRINITY_DN159432_c2_g2_i1	TAGGAACAGGACCTCATTGCG	AAGGTGTGCCTATGTTGACGAC
<i>GA3ox</i>	TRINITY_DN161062_c1_g1_i1	AACGTTGGTGACCTCTTCCAC	ACTAACCAGCTTCGGTACAG
<i>GA2ox</i>	TRINITY_DN145066_c2_g1_i1	TTGGAGGACCACCATTGACT	TATCAGCAAGCCTAGACTTG
<i>18S RNA</i>		GACTCAACACGGGGAACTTACC	CAGACAAATCGCTCCACCAAC

2 结果与分析

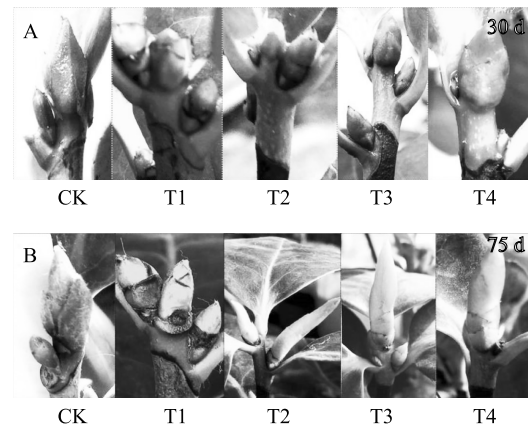
2.1 外施赤霉素促进恨天高茎尖伸长

选择立地条件相同、生长状态良好且一致的三年生根天高(*Camellia reticulata* Hentiangao)幼苗为材料(图 1A),利用不同质量浓度梯度的 GA_3 进行茎尖涂抹(图 1B)。研究结果发现, GA_3 处理 30 d 后,对照组和试验组茎尖长度差异显著($P<0.05$)(图 1C),其中 CK 的茎尖长度最短,T1、T2、T4 处理分别是 CK 的 1.23 倍、1.58 倍和 1.92 倍,T3 为 CK 的 2.53 倍(图 2A); GA_3 处理 75 d 后,对照组和试验组茎尖长度差异显著($P<0.05$)(图 1D),其中 CK 茎尖长度依旧最短,其次是 T1 处理和 T2 处理,为 CK 的 1.59 倍和 1.93 倍,而 T4 处理和 T3 处理分别为 CK 的 2.27 倍和 3.61 倍(图 2B)。比较发现,对照组和试验组在 2 次测量的 45 d 间隔期,CK 的茎尖少许伸长,试验组除了 T1 处理长势变化不明显外,T2、T3、T4 处理长势旺,尤其 T3 处理(图 2C)。由此可以推测,外源 GA_3 能诱导恨天高山茶的植株生长,并且随着外施质量浓度的增高(0 mg/L、200 mg/L、400 mg/L),茎尖生长值也随之增加,当质量浓度达 800 mg/L 时,茎尖生长最快,然而质量浓度达 1 000 mg/L 时,茎尖增加幅度却有所下降,从而表明 800 mg/L 是诱导恨天高山茶植株生长的较佳质量浓度。

2.2 转录组序列组装及 Unigene 注释分析

利用最佳赤霉素诱导质量浓度 800 mg/L 处理恨天高茎尖组织,0 mg/L 的 GA_3 处理作对照,75 d 后采集叶片、茎段、茎尖进行转录组测序,其中叶片和茎段分别取 2 组样品进行测试,茎尖只取 1 组样品进行测试。

使用软件 Cutadapt 对测序原始数据去除接头以

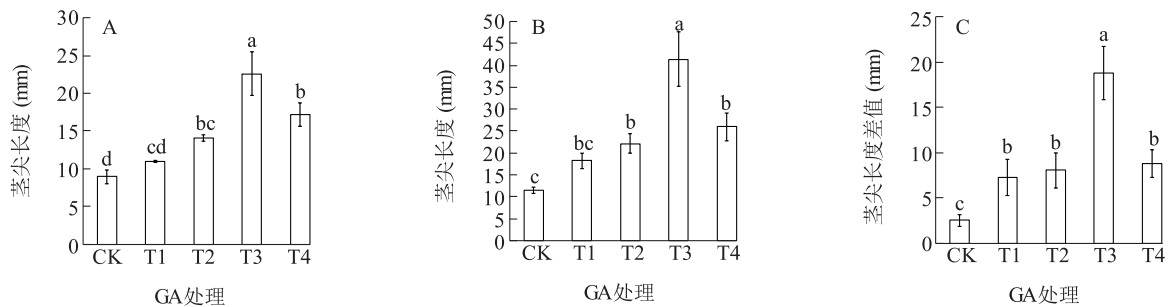


A: 赤霉素茎尖涂抹处理 30 d 的茎尖;B: 赤霉素茎尖涂抹处理 75 d 的茎尖。CK: GA_3 质量浓度为 0 mg/L;T1: GA_3 质量浓度为 200 mg/L;T2: GA_3 质量浓度为 400 mg/L;T3: GA_3 质量浓度为 800 mg/L;T4: GA_3 质量浓度为 1 000 mg/L。

图 1 外源赤霉素处理的恨天高茎尖

Fig.1 Shoot tips of *Camellia reticulata* Hentiangao treated with exogenous gibberellin

及低质量序列,获得后续信息分析用的过滤数据。恨天高 3 种组织及对照共 8 个文库产生了 411 464 870 条序列,约 60.96 Gb 转录组数据,Unigene 平均长度为 147.38~148.61 bp, G + C 碱基含量为 44.58%~46.84%(表 2)。由表 3 可以看出,转录组数据经组装产生了 43 073 816 个重叠群,476 635 个 Unigenes,平均长度为 497.69 bp。在所有 Unigenes 序列中,序列长度小于 500 bp 的占 71.60%。Unigene 注释分析显示有 181 115 条 Unigenes 获得注释,占 Unigenes 总数的 38.00%,其中获得注释较多的数据库分别是 Nr 注释 172 121 条(36.11%),COG 注释 74 120 条(15.55%),Swissport 注释 106 818 条(22.41%)和 KEGG 注释 25 837 条(5.42%)(图 3)。



A: 外源赤霉素处理后 30 d 的茎尖长度; B: 外源赤霉素处理后 75 d 的茎尖长度; C: 外源赤霉素处理后 75 d 茎尖长度与外源赤霉素处理后 30 d 茎尖长度差值; CK、T1、T2、T3、T4 见图 1 注。

图 2 恨天高茎尖长度 (A、B) 和差值 (C)

Fig.2 The length (A and B) and difference (C) of shoot tips in *C. reticulata* Hentiangao

表 2 8 个 cDNA 文库的过滤数据

Table 2 Clean data information of eight cDNA libraries

样品	平均长度 (bp)	总序列数	总碱基数 (bp)	Q30 含量 (%)	G+C 含量 (%)
L1	148.36	48 279 292	7 162 609 060	91.64	45.68
L2	148.61	47 968 180	7 128 743 011	91.59	45.21
SS1	148.17	51 623 634	7 649 092 427	91.71	46.84
SS2	148.59	47 126 320	7 002 301 993	91.96	44.58
ST1	148.20	51 542 308	7 638 504 542	91.80	45.65
CK1	148.31	48 833 656	7 242 368 757	92.07	45.71
CK2	147.38	6 069 186	9 294 935 564	92.13	45.44
CK3	147.98	53 022 294	7 846 027 311	91.78	45.07

L1: 800 mg/L 外源赤霉素处理后叶片样品 1; L2: 800 mg/L 外源赤霉素处理后叶片样品 2; SS1: 800 mg/L 外源赤霉素处理后茎段样品 1; SS2: 800 mg/L 外源赤霉素处理后茎段样品 2; ST1: 800 mg/L 外源赤霉素处理后茎尖样品; CK1: 对照叶片样品; CK2: 对照茎段样品; CK3: 对照茎尖样品。

表 3 恨天高转录组序列组装分析

Table 3 Assembly and analysis of the *C. reticulata* Hentiangao transcriptome sequences

序列类型	重叠群	Unigene	长度 (bp)	数量/比例
最短 Unigene 长度 (bp)	25	201	<200	0/0
最长 Unigene 长度 (bp)	16 513	13 960	200~500	341 277/0.716 0
Unigene 平均长度 (bp)	41.49	497.69	500~1 000	93 487/0.196 1
N50 长度 (bp)	45	573	1 000~1500	23 690/0.049 7
(A+T) %	55.75	61.47		9 632/0.020 2
(C+G) %	44.25	38.53		8 548/0.017 9
Unigene 总数	43 073 816	476 635		476 635/1.000 0
总碱基数量 (bp)	1 786 987 110	237 216 033		

2.3 差异表达基因筛选及分析

将 Clean data 比对到 Unigene 上, 利用 bowtie2 软件进行短 reads 比对, 结果显示, 唯一比对到参考基因的 reads 数量在 $2.5 \times 10^7 \sim 3.6 \times 10^7$, 用于基因表达分析。在叶片、茎段和茎尖 3 种组织中, 发现了特异的和共同的差异表达基因, 共发现 43 624 个差异表达基因, 包括 43 295 个特异差异表达基因和 329 个共同差异表达基因 (图 4A)。

CK1 (对照叶片样品) 与 L1 (800 mg/L 外源赤霉素处理后叶片样品 1) 比较中发现 27 424 个差异表达基因, 其中上调表达基因 16 495 个, 下调表达基因 10 929 个; CK1 与 L2 (800 mg/L 外源赤霉素处理后叶片样品 2) 比较中发现 23 450 个差异表达基因, 其中上调表达基因 12 956 个, 下调表达基因 10 494 个; CK2 (对照茎段样品) 与 SS1 (800 mg/L 外源赤霉素处理后茎段样品 1) 比较中发现 20 773 个差异表达

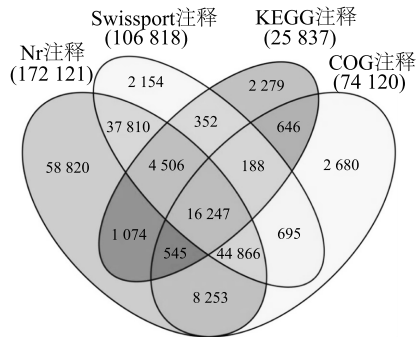


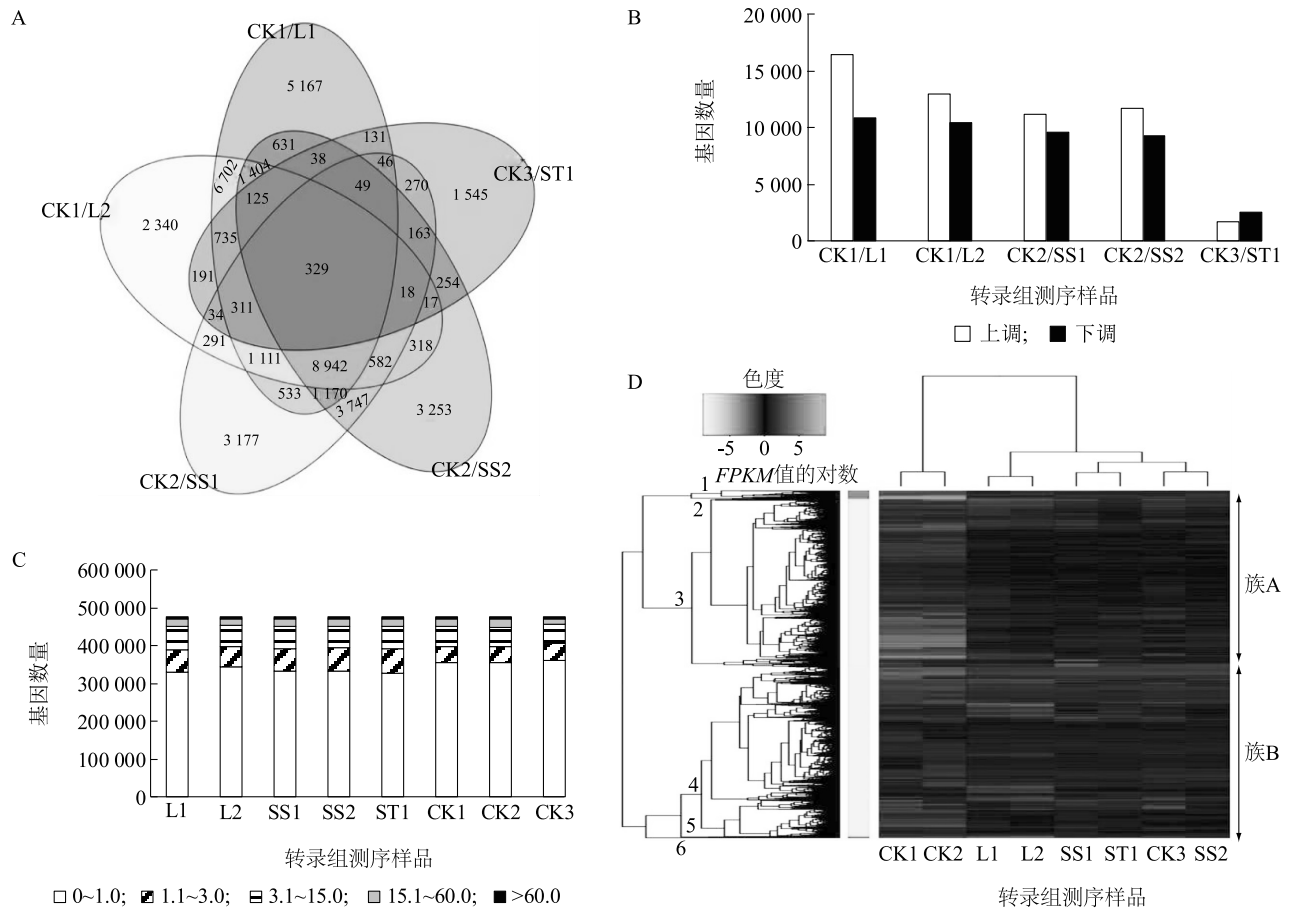
图3 Unigene 各数据库注释结果 Venn 图

Fig.3 Venn diagram of unigenes annotated in each database

基因,其中上调表达基因11 168个,下调表达基因9 605个;CK2 与 SS2(800 mg/L外源赤霉素处理后茎段样品 2)比较中发现21 040个差异表达基因,其

中上调表达基因11 706个,下调表达基因9 334个;CK3(对照茎尖样品)与 ST1(800 mg/L外源赤霉素处理后茎尖样品)比较中发现4 256个差异表达基因,其中上调表达基因1 734个,下调表达基因2 522个(图 4B)。在 5 组比较中,CK3 与 ST1 比较获得的上调和下调基因数量均最低,可能是由于茎尖组织相对于叶片和茎段而言,与植株伸长生长更为密切,获得的差异表达基因控制植株生长的作用更大。

根据 FPKM 值将 8 个文库中的基因表达水平分为极高、高、中、低和极低 5 类(图 4C),其中差异表达基因中占比例最大的是极低表达基因,FPKM 为 0~1,占比例最小的是极高表达基因,FPKM>60。另外,在叶片、茎段和茎尖等组织中检测到共同差异表达基因 329 个,通过层次聚类分析将其划分成 A、B 2 个簇(图 4D)。



A: 差异基因维恩图分析; B: 文库中差异表达基因的数量; C: 差异表达基因的 FPKM 值分布; D: 差异表达基因的聚类分析。L1、L2、SS1、SS2、ST1、CK1、CK2、CK3 见表 2 注。

图4 差异表达基因的表达谱分析

Fig.4 Expression profiling of differentially expressed genes

2.4 差异基因 GO 富集分析

通过 GO 富集分析对差异表达基因进行生物学功能研究,在错误发现率 $FDR < 0.01$ 时,43 个 GO 条目富集在 CK1/L1,42 个 GO 条目富集在 CK1/L2,39 个 GO 条目富集在 CK2/SS1,39 个 GO 条目富集在 CK2/SS2,37 个 GO 条目富集在 CK3/ST1。基于所有 GO 富集分析,确定 37 个共同 GO 类别和 8 个差异 GO 类别,在 37 个共同 GO 条目中,催化活性、结合、代谢过程、细胞过程、细胞组分和细胞器是富集基因最多的 GO 类别。在 8 个差异 GO 类别中,CK3/ST1 无分子功能调节剂富集;鸟苷酸交换因子活性显著富集在 CK1/L1 和 CK1/L2;CK2/SS1 和 CK2/SS2 无细胞外基质部分和细胞外区域部分富集;CK3/ST1 无类核和细胞外基质富集;转运状态显著富集在 CK1/L1;CK3/ST1 无生物附着富集。由此可以看出,在外源赤霉素处理下叶片、茎段和茎尖组织中的 GO 类别存在差异,诱导植株生长。

2.5 差异基因 KEGG 富集分析

KEGG 富集分析结果显示,分别有 30、30、18、14 和 27 条代谢途径富集在 CK1/L1、CK1/L2、CK2/SS1、CK2/SS2 和 CK3/ST1,显著富集的则为 5、4、5、4 和 5 条代谢途径(图 5)。苯丙烷生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化过程是共同显著富集的代谢途径(图 5),倍半萜和三萜生物合成富集在 CK1/L1、CK1/L2 和 CK2/SS2(图 5A,图 5B,图 5D),细胞色素 P450 对外源化合物代谢的影响、药物代谢-细胞色素 P450 只富集在 CK1/L1(图 5A),糖酵解/糖异生只富集在 CK1/L2(图 5B),光合-天线蛋白、油菜素内酯生物合成只富集在 CK2/SS1(图 5C),玉米素生物合成只富集在 CK2/SS1 和 CK2/SS2(图 5C、图 5D),CK3/ST1 显著富集植物激素信号转导、二萜生物合成和类胡萝卜素生物合成(图 5E)。由此可以看出,CK3/ST1 中所富集的植物激素信号转导和二萜生物合成两条途径与恨天高植株生长关系较为密切,其他途径则间接调控植株生长。

KEGG 富集研究结果显示,CK3/ST1 所富集的植物激素信号转导途径中色氨酸代谢 *CH3*、*SAUR* 下调表达,玉米素生物合成 *AHP* 上调表达、*A-ARR* 下调表达,二萜生物合成途径 *DELLA* 下调表达,油菜素内酯合成 *TCH4* 上调表达、*BSK* 和 *CYCD3* 下调表达(图 6A)。表明,植株生长受多种激素互作的影响,本研究中可以认为二萜生物合成途径对植株生长首先起作用。KEGG 富集结果显示,二萜生物

赤霉素生物合成途径中 *KAO* 上调表达、*GA20ox* 和 *GA3ox* 下调表达、*GA2ox* 既有上调也有下调表达(CK1/L1 上调,CK3/ST1 下调)(图 6B)。说明,二萜生物合成途径中 *DELLA*、*KAO*、*GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 调控恨天高植株生长。

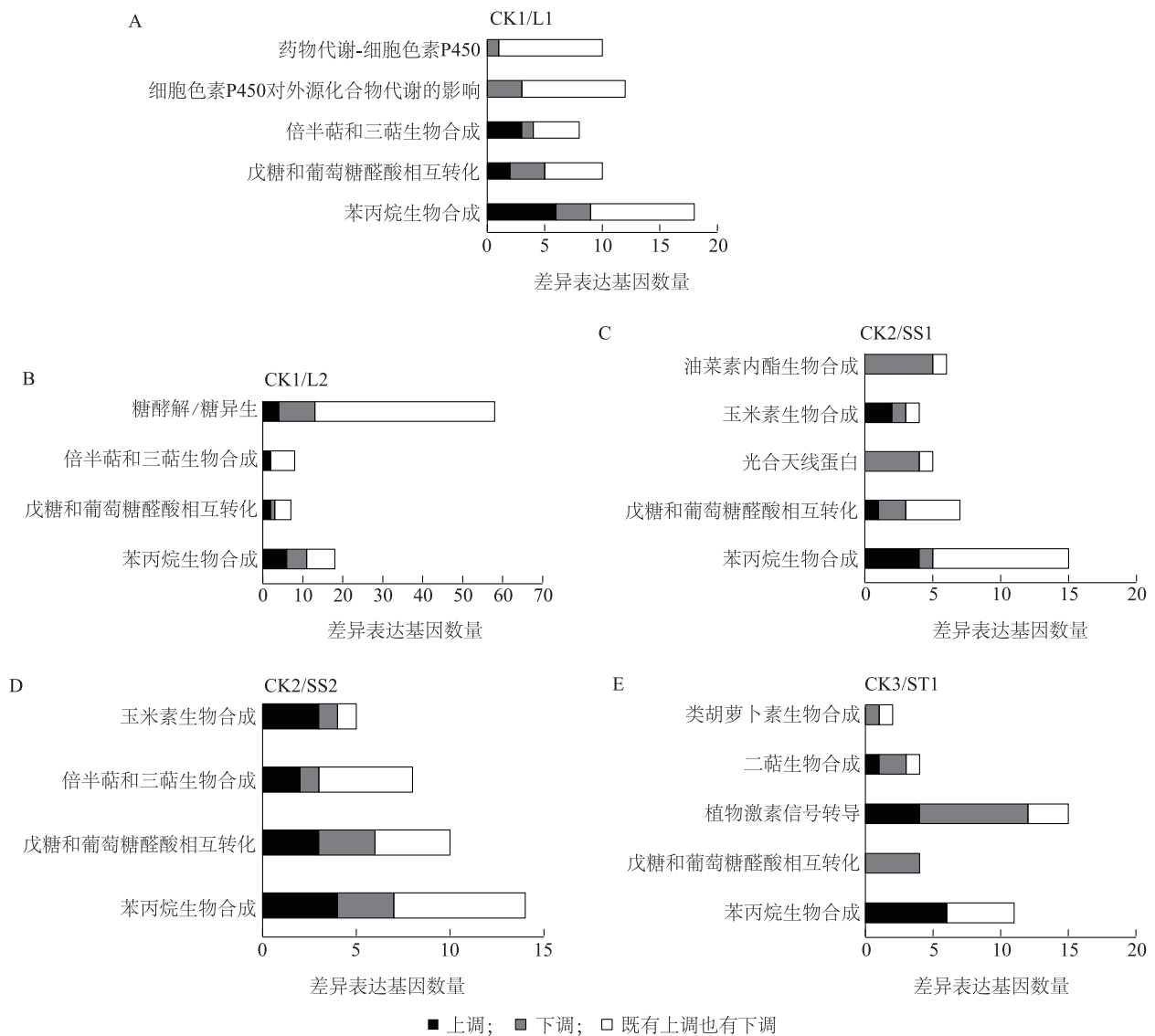
2.6 转录组的实时荧光定量 PCR 验证

挑选 5 个差异表达基因,利用实时荧光定量 PCR 进行对照组和试验组(800 mg/L GA_3 处理 75 d)茎尖基因的表达式测定。结果显示,实时荧光定量 PCR (qPCR)与转录组测序(RNA-Seq)的结果在基因表达式变化幅度上具有一定差异,但基因的表达趋势是一致的(图 7)。利用 SPSS Pearson 对 qPCR 和 RNA-Seq 进行双变量相关性分析,结果显示 5 个差异表达基因的 qPCR 和 RNA-Seq 在 $P < 0.01$ 水平(双侧)上显著相关,相关系数为 0.978(表 4)。由此可以说明,转录组测序获得的基因差异表达结果可靠。

3 讨论

恨天高作为天然矮生资源,是山茶矮化育种的优良亲本材料。本研究采用 Illumina HiSeq 高通量技术对 0 mg/L 和 800 mg/L GA_3 处理 75 d 的叶片、茎段和茎尖组织进行测序,组装得到的 181 115 条 Unigenes 获得了注释。通过实时荧光定量 PCR 检验,qPCR 和 RNA-Seq 结果显著相关,因此,本研究转录组测序结果是可靠的。

GO 富集分析发现,大量差异表达基因在催化活性、结合、代谢过程、细胞过程、细胞组分和细胞器等类别中显著富集,在差异条目中,叶片、茎段和茎尖所富集的类别存在差异,可能是外源赤霉素对不同组织的诱导作用存在差异,也可能是组织本身存在差异所造成。KEGG 通路分析发现,叶片、茎段和茎尖显著富集的代谢途径不完全相同,其中苯丙烷生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化过程是共同显著富集的代谢途径。苯丙烷生物合成是植物最重要的次生代谢途径之一^[23],而戊糖和葡萄糖醛酸相互转化也是糖代谢的重要环节,参与植物多种发育过程^[24],表明在外源赤霉素诱导过程中,苯丙烷生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化途径中差异基因对恨天高植株生长具有重要作用。然而,相比于其他 4 组,CK3/ST1 显著富集的植物激素信号转导、二萜生物合成和类胡萝卜素生物合成途径中差异表达基因直接参与调控恨天高植株生长。



L1、L2、SS1、SS2、ST1、CK1、CK2、CK3 见表 2 注。

图 5 差异基因的 KEGG 分析

Fig.5 KEGG analysis of differentially expressed genes (DEGs)

表 4 5 个差异表达基因的荧光定量 PCR 与转录组测序结果的相关性
Table 4 Correlation between fluorescence quantitative PCR results and transcriptome sequencing results of five DEGs

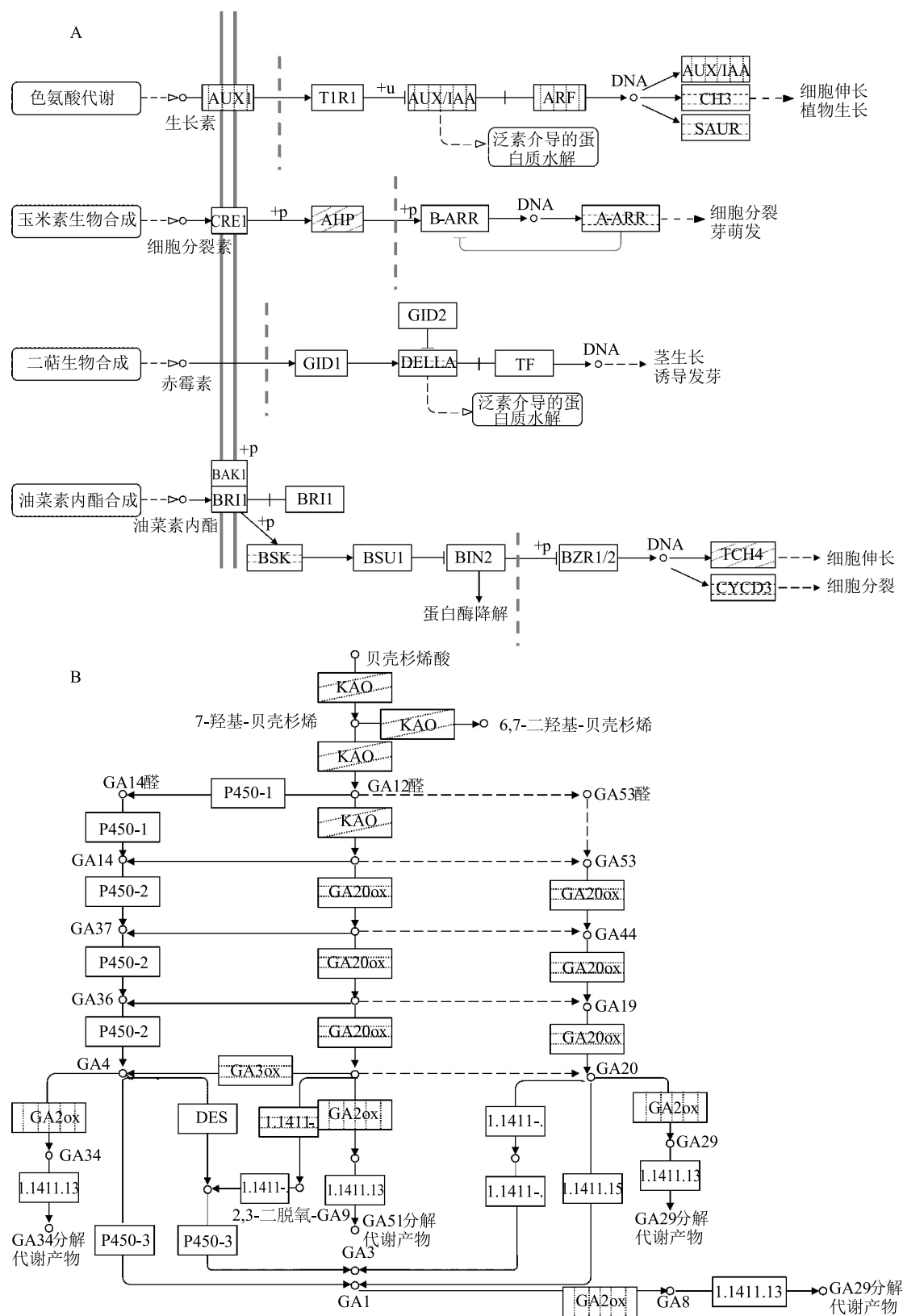
变量		实时荧光定量 PCR	转录组测序
实时荧光定量 PCR	Pearson 相关性	1.000	0.978 **
	显著性(双侧)		0.004
转录组测序	Pearson 相关性	0.978 **	1.000
	显著性(双侧)	0.004	

** 表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关。

本研究中,茎尖组织中外源赤霉素诱导的差异表达基因包括赤霉素信号传导途径中的 *DELLA*,赤霉素

生物合成途径中的 *KAO*、*GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 等基因,*DELLA*、*GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 下调表达,*KAO* 上调表达。研究表明,*DELLA* 蛋白在赤霉素信号传导途径中起中心开关的作用,对赤霉素诱导的反应非常灵敏,赤霉素处理 5~10 min 后蛋白水平显著下降^[25-26],本研究中外源赤霉素的诱导信号传递给 *DELLA* 蛋白,*DELLA* 蛋白呈下调表达,从而诱导下游赤霉素代谢基因如 *KAO* 的上调表达。

高等植物赤霉素水平通过正反馈和负反馈来实现调节体内激素的平衡。当体内活性赤霉素水平低时,拟南芥 *GA20ox1*、*GA20ox2*、*GA20ox3* 和 *GA3ox1*



左虚线:上调;横虚线:下调;竖虚线:既有上调也有下调。

图6 植物激素信号转导(A)和二萜生物合成(B)

Fig.6 Plant hormone signal transduction (A) and diterpenoid biosynthesis (B)

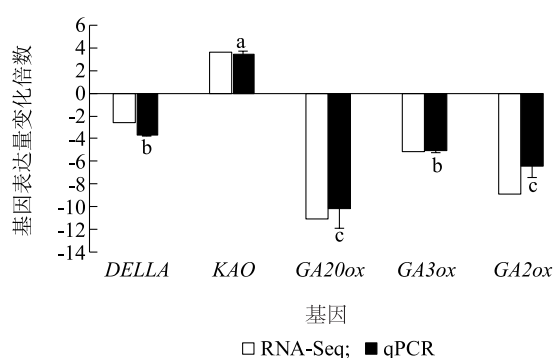


图7 差异表达基因的实时荧光定量 PCR 验证

Fig.7 Verification of DEGs by real-time fluorescence quantitative PCR

的表达量均显著提高,外施 GA_3 后,其表达量又显著降低^[27-28]。本研究中,外施赤霉素后恨天高茎尖中 $GA20ox$ 、 $GA3ox$ 也呈下调表达。当活性赤霉素水平增加时,拟南芥 $GA2ox$ 表达量上调^[29],在植物中过量表达 $GA2ox$ 能诱导植株矮化,本研究中通过差异基因表达水平测定发现,茎尖中 $GA2ox$ 下调表达,叶片中 $GA2ox$ 呈上调表达,可能由于茎尖在外源赤霉素的诱导下,快速生长,积累较多的活性赤霉素,当活性赤霉素由茎尖传输到叶片时,则诱导叶片中的 $GA2ox$ 上调表达,以抑制植株进一步生长,起到反馈调节作用。

另外,我们挑选了 $DELLA$ 、 $GA20ox$ 、 $GA3ox$ 、 $GA2ox$ 和 KAO 5 个差异表达基因进行了实时荧光定量 PCR 验证,在茎尖组织中,实时荧光定量 PCR (qPCR) 与转录组测序 (RNA-Seq) 结果一致, $DELLA$ 、 $GA20ox$ 、 $GA3ox$ 、 $GA2ox$ 呈下调表达, KAO 上调表达。由此可以推测,800 mg/L 外源赤霉素茎尖涂抹处理后,赤霉素质量浓度升高, $DELLA$ 蛋白接受信号呈下调表达,诱导下游 KAO 上调表达, $GA20ox$ 、 $GA3ox$ 、 $GA2ox$ 呈下调表达,多个基因相互作用,促进植株生长,当体内赤霉素质量浓度积累到一定程度时, $GA2ox$ 则反馈调节抑制植株继续生长。外源赤霉素诱导植株生长的机理,以本文为基础,后续还需要进一步深入研究。

本研究利用高通量转录组测序技术建立矮生山茶恨天高赤霉素诱导前后叶片、茎段和茎尖转录组数据库,分析比较 3 种组织在外源赤霉素处理后生物反应途径的差异,发现相对于叶片和茎段,茎尖对植株生长影响较大,进一步筛选出茎尖组织中的差异表达基因,为研究恨天高矮生机制以及培育矮生

山茶品种提供基础。

参考文献:

- [1] RICHARDS D E, KING K E, AIT-ALI T, et al. How gibberellin regulates plant growth and development; a molecular genetic analysis of gibberellin signaling [J]. Annual Review of Plant Biology, 2001, 52: 67-88.
- [2] 张旭红,孙美玉,李靖锐,等. 东方百合‘索邦’ $GA20ox$ 的克隆及表达分析[J]. 园艺学报, 2019, 46(1): 74-86.
- [3] YAMAGUCHI S. Gibberellin metabolism and its regulation [J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 225-251.
- [4] DAVIDSON S E, ELLIOTT R C, HELLIWELL C A, et al. The pea gene *NA* encodes ent-kaurenoic acid oxidase [J]. Plant Physiology, 2003, 131(1): 335-344.
- [5] LANGE T, HEDDEN P, GRAEBE J E. Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91(18): 8522-8566.
- [6] APPLEFORD N E J, LENTON J R. Gibberellins and leaf expansion in near-isogenic wheat lines containing *Rht1* and *Rht3* dwarfing alleles [J]. Planta, 1991, 183(2): 229-236.
- [7] COLES J P, PHILLIPS A L, CROKER S J, et al. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes [J]. The Plant Journal, 1999, 17(5): 547-563.
- [8] SAKAMOTO T, MIURA K, ITOH H, et al. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice [J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1642-1653.
- [9] 欧春青,姜淑苓,王 斐,等. 梨贝壳杉烯酸氧化酶基因 *PcKAO1* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(5): 849-858.
- [10] WANG J Y, WU B, LI J Y, et al. Overexpression and silent expression of *CrGA20ox1* from *Camellia reticulata* ‘Hentiangao’ and its effect on morphological alterations in transgenic tobacco plants [J]. Plant Breeding, 2018, 9(3): 1-9.
- [11] HUANG Y, WANG X, GE S, et al. Divergence and adaptive evolution of the gibberellin oxidase genes in plants [J]. BMC Evolutionary Biology, 2015, 15: 207-221.
- [12] THOMAS S G, PHILLIPS A L, HEDDEN P. Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(8): 4698-4703.
- [13] 李巧峡,张 丽,王 玉,等. 赤霉素调控植物开花及器官发育的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(4): 746-758.
- [14] WILLIGE B C, GHOSH S, NILL C, et al. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2007, 19(4): 1209-1220.

- [15] DILL A, THOMAS S G, HU J, et al. The Arabidopsis F-Box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(6): 1392-1405.
- [16] SUN T P. Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development [J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(2): 567-570.
- [17] CHEN J H, CHENG T L, WANG P K, et al. Genome-wide bioinformatics analysis of DELLA-family proteins from plants [J]. *Plant Omics*, 2013, 6(3): 201-207.
- [18] 张文颖,王晨,朱旭东. 葡萄全基因组 DELLA 蛋白基因家族鉴定及其应答外源赤霉素调控葡萄果实发育的特征[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(16): 3130-3146.
- [19] LI W J, ZHANG J X, SUN H Y. FveRGA1, encoding a DELLA protein, negatively regulates runner production in *Fragaria vesca* [J]. *Planta*, 2018, 247(4): 941-951.
- [20] 贾永鹏,李开祥,咎领兄,等. 甘蓝型油菜全基因组 DELLA 蛋白基因家族的鉴定和表达分析[J]. *中国油料作物学报*, 2019, 41(3): 360-368.
- [21] 管开云. 中国茶花图鉴[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2014: 53-54.
- [22] 张恩亮,马玲玲,杨如同,等. IBA 诱导楸树嫩枝扦插不定根发育的转录组分析[J]. *林业科学*, 2018, 54(5): 48-61.
- [23] WANG Y, WEATHERS P J. Sugar proportionately affect artemisinin production [J]. *Plant Cell Report*, 2007, 26(7): 1073-1081.
- [24] HU Y L, GAI Y, YIN L, et al. Crystal structures of a *Populus tomentosa* 4-coumarate: CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(9): 3093-3104.
- [25] ITOH H, UEGUCHI-TANAKA M, SATO Y, et al. The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(1): 57-70.
- [26] TYLER L, THOMAS S G, HU J, et al. DELLA proteins and gibberellin regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 1008-1019.
- [27] MITCHUM M G, YAMAGUCHI S, HANADA A, et al. Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development [J]. *The Plant Journal*, 2006, 45(5): 804-818.
- [28] RIEU I, RUIZ-RIVERO O, FERNANDEZ-GARCIA N, et al. The gibberellin biosynthetic genes *At GA20ox1* and *At GA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the *Arabidopsis* life cycle [J]. *The Plant Journal*, 2008, 53(3): 488-504.
- [29] RIEU I, THOMAS S, POWERS S J, et al. Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(9): 2420-2436.

(责任编辑:陈海霞)