

李 军, 吴霁蓂, 高广春, 等. 番红花多柱头突变体 Cs5 的转录组分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(6): 1630-1632.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2021.06.034

番红花多柱头突变体 Cs5 的转录组分析

李 军¹, 吴霁蓂², 高广春², 朱志明³, 李 白⁴, 蒋 琦², 周鸿宇²

(1. 嘉兴职业技术学院现代农业学院, 浙江 嘉兴 314036; 2. 嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001; 3. 嘉兴市秀洲区天禾藏红花专业合作社, 浙江 嘉兴 314000; 4. 嘉兴市农业科学研究院, 浙江 嘉兴 314016)

关键词: 番红花; 柱头; 突变体; 转录组

中图分类号: S567.23*9

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2021)06-1630-03

Transcriptome analysis of saffron mutant Cs5 with multiple stigmas

LI Jun¹, WU Ji-ming², GAO Guang-chun², ZHU Zhi-ming³, LI Bai⁴, JIANG Qi², ZHOU Hong-yu²

(1. School of Modern Agriculture, Jiaxing Vocational & Technical College, Jiaxing 314036, China; 2. School of Medicine Science, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China; 3. Jiaxing Xiuzhou Tianhe Saffron Professional Cooperative, Jiaxing 314000, China; 4. Jiaxing Academy of Agricultural Sciences, Jiaxing 314016, China)

Key words: saffron; stigma; mutant; transcriptome

番红花(*Crocus sativus* L.)为鸢尾科番红花属球茎类药用植物,以其干燥柱头入药,具有活血化瘀、解郁安神、凉血解毒等功效,同时也应用于食品、化妆品行业染料及香料的制作^[1-2]。番红花在浙江、江苏、上海、四川等地广泛栽培,但全国种植面积不到 667 hm²,占市场需求量的 20%左右,大部分还是依赖进口,因此番红花的需求量非常大。然而,由于番红花为三倍体雄性不育植物,仅靠球茎进行营养繁殖,而且每一朵花只有 3 个柱头,所以产量极低^[3-4]。因此,培育高产优质的番红花品种将有效缓解国内外番红花市场的供求矛盾,具有重要的基础理论研究价值和产业应用前景。

野生型番红花的花为顶生;花被片 6 个,淡紫色,长 4~6 cm;雄蕊 3 个,雌蕊三心皮合生,子房下位,花柱细长,黄色柱头 3 个,伸出花被筒外后下垂,深红色,顶端略膨大。本研究

在番红花生产过程中发现了多柱头突变体 Cs5,其雌蕊上端花柱和柱头数量均为 5 个,形态与野生型无异,花柱聚合后比野生型粗壮(图 1)。柱头数量的增多有助于提高番红花花丝的产量及花农收入,是番红花新品种培育的主要方向。通过转录组学和代谢组学,结合共表达网络分析番红花柱头发育的调控基因 *AGL6*,发现其可能通过影响花器官的发育进而影响柱头的生物量,最终影响次生代谢物的产量^[2,5-6]。番红花柱头数量是影响产量的一个重要指标,调控其生长发育的结构基因的挖掘和调控机制的研究有助于解决番红花资源短缺问题,然而目前相关研究报道较少。

目前,RNA-Seq 分析测试技术在植物特异突变、特定发育时期以及不同组织器官基因差异表达等方面的研究中广泛应用^[7-9]。本研究拟对番红花多柱头突变体 Cs5 柱头及其野生型柱头进行转录组测序和生物信息学比较分析,筛选差异表达基因,分析基因功能以及相关的代谢通路,以期为研究影响番红花柱头数量的相关调控基因及相关信号通路提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番红花多柱头突变体 Cs5 样本为浙江省嘉兴市农业科

收稿日期:2021-04-12

基金项目:国家自然科学基金项目(81703667);嘉兴市公益性研究计划项目(2020AY10023);浙江省大学生科技创新计划项目(2020R417016);嘉兴市科技特派员专项项目(2021K117);嘉兴学院大学生创新创业能力个性化培养项目

作者简介:李 军(1981-),男,山东泰安人,博士,副研究员,主要从事植物分子生物学研究。(E-mail)lijunx1@163.com

通讯作者:高广春,(E-mail)gaogcjx@163.com

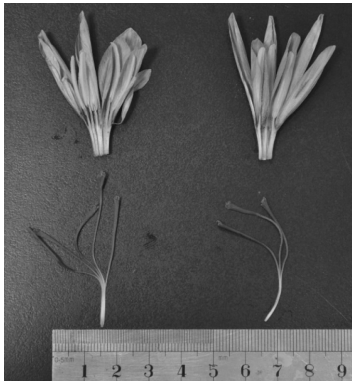


图1 番红花多柱头突变体 Cs5(左侧)与野生型(右侧)柱头表型比较

Fig.1 Comparison of stigma phenotypes between saffron mutant Cs5 (left) and wild type (right)

学研究院番红花种植基地里的自然突变体,其雄蕊、花柱和柱头的数量均为5个,均比野生型多2个。于盛花期分别采集番红花多柱头突变体 Cs5 和野生型番红花的柱头,每10个1组,设3次重复,于-80℃超低温冰箱中冻存,用于后续试验。

取各处理组的样品各0.1g,液氮研磨,采用 PureLink Plant RNAreagent Kit 试剂盒(Invitrogen 公司产品)提取柱头的总RNA,在 Illumina HiSeq2500 仪器(上海美吉生物医药科技有限公司产品)上进行 RNA-Seq 测序。

1.2 差异表达基因分析和功能注释

采用 Trinity 软件将各处理组的有效数据组装成对应的转录本序列,用 Blast 软件将各样品测序得到的所测读段与 Unigene 库进行比对,利用 DESeq 软件以错误发现率($FDR \leq 0.05$ 且 $\log_2 \text{Fold Change} \geq 1$ 为条件筛选差异表达基因(DEGs)。使用 Blast 软件将 DEGs 与 NR、SWISS、GO、COG、KEGG 数据库信息进行比对,获得相应的注释信息。

1.3 差异表达基因的验证及表达模式分析

分别选取10个差异表达基因,利用实时荧光定量 PCR 验证测序数据的可靠性,以及差异表达基因在花瓣、叶片、球茎、雄蕊、柱头等不同组织中的表达模式。实时荧光定量 PCR:总反应体积 20 μl ,反应条件为 95℃ 预变性 2 min;95℃ 10 s,58℃ 20 s,72℃ 30 s,循环数为 40 个,72℃ 延伸 30 s。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达差异。

差异表达基因实时荧光定量 PCR 验证和表达模式分析的数据用 GraphPad Prism5.0 软件进行统计处理,采用 One-way ANOVA 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 基因组组装分析

利用 Illumina HiSeq2500 仪器进行无参转录组测序,番红花多柱头突变体 Cs5 产生了 60 063 054 条序列数,野生型

产生了 54 706 306 条序列数,各处理组的 G、C 基本随机分布,无明显偏差。质量控制分析后,突变体保留 54 984 766 条序列,野生型保留 49 715 722 条序列。采用 Trinity 软件对数据进行组装,对得到的 52 317 条 Unigenes 分别进行功能注释,其中 NR 数据库 29 392 条,GO 数据库 20 510 条,COG 数据库 21 126 条,KEGG 数据库 12 875 条,SWISS 数据库 20 510 条,其中 NR 数据库注释比最高,达 56.18%。

2.2 差异表达基因分析

对番红花多柱头突变体 Cs5 和野生型番红花的转录组数据进行差异分析,共筛选出 917 个差异表达基因,其中番红花多柱头突变体 Cs5 中有 412 个(约占 44.93%)基因表达上调,505 个(约占 55.07%)基因表达下调。显著差异表达基因中包括 MADS 家族转录因子基因 15 个(包含 9 个已鉴定的番红花 MADS 类转录因子基因),MYB 家族转录因子基因 19 个,BHLH 家族转录因子基因 7 个,WRKY 家族转录因子基因 5 个,SEUSS 家族转录因子基因 6 个,TF1 转录因子基因 1 个,与植物激素相关的转录因子基因 23 个,这些转录因子基因大多与植物花发育相关。

2.3 实时荧光定量 PCR 验证差异表达基因

为了进一步验证测序结果的可靠性,从 917 个差异表达基因中随机选择 10 个差异表达基因(包含 3 个上调表达基因,7 个下调表达基因)进行实时荧光定量 PCR 验证,与转录组数据比较后发现,这 10 个基因的表达情况与测序结果一致,说明本次转录组测序结果真实可信。

2.4 DEGs 的 GO 功能注释分析

对番红花多柱头突变体 DEGs 进行 GO 功能注释分析,有 316 个基因被注释到 41 个分类条目上,包括 145 个上调基因和 171 个下调基因。这些基因功能分为生物过程、细胞组分和分子功能 3 大类,分别包含 141、103、72 个条目。对这 3 类条目的二级分类结果进行统计分析,发现 DEGs 在生物过程条目中主要分布在细胞过程和代谢过程,在细胞组分条目中主要包括共质体和细胞膜等,在分子功能条目中主要包括结合活性和催化活性。

2.5 DEGs 的 KEGG 功能注释分析

通过与 KEGG 数据库比对,对所有 DEGs 进行功能注释和富集分析。结果显示,917 个差异表达基因被富集在 179 个代谢通路中,以校正 P 值 <0.05 为条件筛选出 20 个显著富集的代谢通路,包括次生代谢产物生物合成、植物激素信号转导、RNA 转运、淀粉和蔗糖代谢等。植物激素信号转导中富集了 5 个差异表达基因,涉及生长素、赤霉素、脱落酸的代谢通路,植物激素在植物生长发育的不同时期和不同组织器官中均发挥重要的作用,番红花多柱头突变体 Cs5 的性状很有可能与激素表达、信号转导密切相关。

2.6 DEGs 表达模式分析

从 917 个差异表达基因中随机选取 10 个差异表达基因,通过实时荧光定量 PCR 技术分析其在番红花不同组织

器官里的表达情况。本研究结果表明, *DN34196*、*DN30594*、*DN41391*、*DN24459* 和 *DN39219* 共 5 个差异表达基因在番红花柱头中的表达量与其在雄蕊、花瓣、叶片和球茎中的表达量有极显著差异 ($P < 0.01$); *DN26020* 在番红花柱头中的表达量与其在雄蕊和花瓣中的表达量无显著差异, 与其在叶片和球茎中的表达量存在极显著差异 ($P < 0.01$); *DN17686* 和 *DN31280* 在柱头中的表达量与其在叶片中的表达量无显著差异, 与其在雄蕊、花瓣和球茎中的表达量存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

3 讨论

番红花作为经济价值极高的药用植物, 药用部位的产量一直是科研人员关注的焦点^[10-11]。本研究通过转录组测序技术对番红花多柱头突变体 *Cs5* 柱头和野生型番红花柱头进行转录组分析, 从中发现可能与柱头发育相关的转录因子包括 MADS 家族、MYB 家族、BHLH 家族、WRKY 家族、SEUSS 家族以及与植物激素相关的转录因子。另外, 番红花突变体中 MADS-box 基因包含 A Class (*API*)、B Class (*PI/AP3*)、C Class (*AG*)、D Class (*AGL*) 和 E Class (*SEP*), 说明番红花花发育过程也涉及到 5 类基因在不同时间和空间的精确表达^[6]。

植物自身激素水平在雌蕊发育过程中扮演着重要角色, 本研究发现一批与生长素、赤霉素、细胞分裂素和脱落酸的合成、失活及信号转导途径调控相关的转录因子, 通过这些转录因子的调控可以维持植物包括雌蕊在内的花器官的正常发育^[12-13]。番红花柱头的发育质量和数量直接影响其经济价值, 多柱头突变体的发现一方面可以为通过组培快繁技术快速扩繁突变体数量, 提高番红花产量的研究提供试验材料, 另一方面本研究获得的转录组分析数据使得解析多柱头突变体形成机制, 以及通过生物技术调控、创制更多突变体成为了可能。随着基因组、转录组和蛋白质组学技术的发展以及分子生物学技术的不断提高, 相信将来在番红花柱头生长发育调控网络上的一些蛋白质生物学功能和基因间互作关系的研究会有更大突破。

参考文献:

[1] SHAHI T, ASSADPOUR E, JAFARI S M. Main chemical com-

pounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 58: 69-78.

- [2] 陈祥慧, 谭何新, 张 磊. 西红花中类胡萝卜素生物合成途径研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(19): 4702-4709.
- [3] 朱 娇, 张永春, 周 琳, 等. 不同光周期对西红花开花和花丝品质的效应比较[J]. 西北植物学报, 2021, 41(3): 431-438.
- [4] DOUGLAS M H, SMALLFIELD B M, WALLACE A R, et al. Saffron (*Crocus sativus* L.): The effect of mother corm size on progeny multiplication, flower and stigma production [J]. Scientia Horticulturae, 2014, 166: 50-58.
- [5] NING K, HAN Y Y, CHEN Z J, et al. Genome-wide analysis of MADS-box family genes during flower development in lettuce[J]. Plant Cell and Environment, 2019, 42(6): 1868-1881.
- [6] SHEN X, ZHAO Z, WANG J, et al. Genome wide analysis of MADS-box gene family in *Brassica oleracea* reveals conservation and variation in flower development [J]. BMC Plant Biology, 2019, 19: 106.
- [7] LI J, YE C, CHANG C. Comparative transcriptomics analysis revealing flower trichome development during flower development in two *Lonicera japonica* Thunb. cultivars using RNA-seq [J]. BMC Plant Biology, 2020, 20: 341.
- [8] DENG M H, ZHAO K, LV J H, et al. Flower transcriptome dynamics during nectary development in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Genetics and Molecular Biology, 2020, 43(2): e20180267.
- [9] HUANG S, LIU Z, LI C, et al. Transcriptome analysis of a female-sterile mutant (fsm) in Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 546.
- [10] 王 桢, 张永春, 杨柳燕, 等. 西红花组织培养研究进展[J]. 中国农学通报, 2019, 35(12): 100-106.
- [11] 陈 莹, 张怡婷, 开国银, 等. 西红花等级标准与抗肿瘤药效的研究进展[J]. 植物生理学报, 2021, 57(7): 1385-1392.
- [12] CUCINOTTA M, CAVALLERI A, WILLIAM C J, et al. Auxin and Flower development: a blossoming field [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2020, 13: a039974.
- [13] ARROM L, MUNNÉ-BOSHCH S. Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium* [J]. Planta, 2012, 236(2): 343-354.

(责任编辑: 王 妮)