

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.01.033

甘蓝型油菜矮化突变体的茎秆发育转录组分析

牛显飞, 蒋学飞, 解艳芳, 刘双双, 王茂林

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”是从高秆油菜“3529”理化诱变群体中分离的矮化突变体, 它的株高只有高秆亲本的1/3, 是一个优良的甘蓝型油菜矮化资源. 本文应用RNA-Seq测序技术分析了“NDF-1”茎开始伸长的抽薹期和花期转录组, 为深入了解油菜茎秆发育机理提供基因组层面的参考. 抽薹期和花期的测序数据通过筛选得到了4.55亿条质量合格的clean reads. 经过对高质量序列的组装注释, 筛选得到“NDF-1”和“3529”间的2147条差异表达基因(DEGs). 选择其中的20个差异表达基因进行了荧光定量PCR验证. 通过GO和KEGG分析, 发现“NDF-1”的矮化与赤霉素、生长素和油菜素内酯相关, 细胞伸长异常和细胞壁的不正常形成也影响“NDF-1”的茎秆发育. 从差异基因中筛选出与植物矮化性状相关的基因, 为利用矮化基因改善性状和矮化机理的研究和提供了更多信息.

关键词: 甘蓝型油菜; 矮化; 茎秆伸长; 转录组

中图分类号: Q811.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)01-0201-06

Transcriptome analysis on stem development of a *Brassica napus* L. dwarf mutant

NIU Xian-Fei, JIANG Xue-Fei, XIE Yan-Fang, LIU Shuang-Shuang, WANG Mao-Lin

(Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065)

Abstract: “NDF-1” is a *Brassica napus* L. dwarf mutant, which was derived from physical and chemical mutagenesis of a high stemmed line “3529”, possesses a stable dwarf phenotype of approximately one third the height of high stalk parent “3529”. It is an excellent resource dwarf *Brassica napus* L. RNA-Seq based transcriptome analysis on stem elongation of the dwarf mutant from Bolting Stage (BS) and Florescence Stage (FS), which was conducted to provide a reference for the genome level in order to understand the mechanism of rapeseed stem development. A total of 455 million clean reads were obtained from two different stages include Bolting Stage (BS) and Florescence Stage (FS). Then 2,147 differentially expressed genes (DEGs) were found which detected between “NDF-1” and “3529” after assembled them. Furthermore, twenty differentially expressed genes were selected for RT-PCR validation. With the GO and KEGG pathway analysis, “NDF-1” stems elongation most regulated by the gibberellin, auxin and brassinosteroids, cell wall formation or cells Elongation is not normal but also play an important role in “NDF-1” dwarf. Screening genes associated with plant dwarfing traits from DEGs, which provide a reference for further use of these genes on traits improvement and dwarfing mechanism research.

Keywords: *Brassica napus* L.; Dwarfism; Stem elongation; Transcriptome

收稿日期: 2017-02-27

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD010020002); 国家科技支撑计划(2013BAD01B03); “十三五”四川省作物育种攻关项目(16ZC2860)

作者简介: 牛显飞(1991-), 男, 河南新乡人, 硕士, 研究方向为生物化学与分子生物学. E-mail: 1157951794@qq.com

通讯作者: 王茂林. E-mail: mlwang@scu.edu.cn

1 引言

矮秆小麦和水稻的应用是“第一次绿色革命”成功的关键因素之一,此后,矮化基因在提高作物的抗倒伏能力和产量中的作用越来越受到重视^[1]. 多种作物研究表明矮化性状与增加作物产量、高结实率、早熟和高分蘖能力有密切关系. 除了粮食作物,矮化性状在其他植物上也被认为是一种重要的农艺性状,它的特性在农学、园艺上均已发挥了重要的作用. 作为一种经济作物,甘蓝型油菜在世界农作物中占据重要的地位. 甘蓝型油菜矮化突变体“NDF-1”是从双高系“3529”中分离出来的,以前的研究证明,“NDF-1”的矮化性状是由一个加性效应的主基因 *ndf1* 调控的^[1-3].

随着高通量测序技术的发展,转录组测序技术被广泛的应用于生命科学的研究. 甘蓝型油菜的基因组在 2014 年已经被公布^[4],这为研究甘蓝型油菜的遗传发育机制奠定了分子基础. 与其他植物相比,甘蓝型油菜具有一个更加复杂的遗传背景. 高通量测序技术在生命科学中的应用极大地提高了基因发掘的效率^[5]. 通过对甘蓝型油菜进行转录组测序,可以更加深入的理解“NDF-1”的矮化机理.

在本研究中,对两个不同发育时期的油菜品种进行了转录组测序. 我们利用转录组测序技术分析“NDF-1”矮化相关基因的表达信息,以期在基因组层面对甘蓝型油菜“NDF-1”矮化机理进行全面解析,为茎秆发育相关基因的挖掘与应用提供参考.

2 材料与方法

2.1 材料

甘蓝型油菜高秆野生型“3529”、矮化突变体“NDF-1”由四川大学生命科学学院油菜课题组提供,两种材料均种植于四川大学试验地. 分别取“3529”、“NDF-1”生长最旺盛的抽薹期和刚刚进入初花期的茎秆材料,取样后直接放入液氮, -80℃ 保存备用^[6].

2.2 方法

2.2.1 甘蓝型油菜 RNA 提取和质量检测 所有样品的 RNA 提取均使用植物总 RNA 提取试剂盒(购自美国 OMEGA 公司). 所有样品的总 RNA 提取完成后,使用 Nanodrop 2000 进行质量和浓度检测,琼脂糖凝胶电泳进行完整性检测^[7].

2.2.2 cDNA 文库构建、测序 检测甘蓝型油菜高秆野生型“3529”,矮化突变体“NDF-1”茎秆的

RNA 质量后,采用 Illumina Hiseq 测序平台 2000 完成甘蓝型油菜(物种)的转录组测序,构建 Illumina PE 文库(200bp)进行 2×151bp 测序. 测序得到的原始数据称为 raw reads,对原始的测序数据(raw reads)进行过滤,过滤标准:1)去除 reads 中的接头序列,去除由于接头自连等原因导致没有插入片段的 reads;2)将序列末端(3'端)低质量(质量值小于 20)的碱基修剪掉,如剩余序列中仍然有质量值小于 10 则将整条序列剔除,否则保留;3)去除含 N 比率超过 10%的 reads;4)舍弃去 adapter 及质量修剪后长度小于 20bp 的序列. 从而得到高质量的测序数据(clean reads). 将质控后得到的高质量测序序列与指定的甘蓝型油菜参考基因组比对,参考基因组来自于: <http://www.genoscope.cns.fr/brassicacnapus/data/>使用软件: TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>)进行比对^[8].

在本实验中,一共对 8 个样本进行测序,抽薹期“NDF-1”的样本为 BS-NDF-1_1 和 BS-NDF-1_2, BS-NDF-1_2 是 BS-NDF-1_1 的生物学重复. 花期“NDF-1”的样本为 FS-NDF-1_1 和 FS-NDF-1_2, FS-NDF-1_2 是 FS-NDF-1_1 的生物学重复. “3529”的样本与“NDF-1”命名的规则相同.

2.2.3 差异基因表达分析 通过定位到基因组区域的高质量序列(clean reads)的数量计算基因的表达水平. 使用软件 Cufflinks (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>)进行分析^[9]. 差异筛选的标准是“ $FDR \leq 0.05$, $\| \log_2FC \| \geq 1$ ”(FDR: 对 p-value 的校验结果, p-value: 基因/转录本在样本中差异显著性检验结果). 对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 分析.

2.2.4 qRT-PCR 实验验证分析 以 β -actin (GeneBank AF111812)作为内参基因进行 qRT-PCR 实验验证分析. 荧光定量 PCR 仪为美国 Bio-Rad CFX96, 荧光定量试剂盒使用 TransStart Tip Green qPCR Super Mix(全式金公司), qRT-PCR 引物通过引物设计软件 Primer 5.0 完成,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行相对定量分析.

3 结果与分析

3.1 RNA-Seq 测序结果及分析

在本研究中,建立 8 个测序文库用于 Illumina 2000 平台测序. 每一个测序文库包含 5×10^7 到 6×10^7 的 reads,去除接头的序列,少量低质量的序列,通过处理后可以得到的 clean reads 数据,8 个样品

一共可以得到 4.55 亿条 clean reads 序列. 每个样品池的 Q20 不低于 98.00%, GC 含量接近 48%, 这表

明样品池的测序饱和度和覆盖度都是非常好的, 可以进行下一步的实验分析(表 1).

表 1 甘蓝型油菜茎秆测序结果的数据统计
Tab. 1 RNA-Seq dates from stem tissues of *B. napus*.

Category	Total reads	Clean reads	Q20(%)	GC(%)	Mapped tags
BS-NDF-1_1	60823562	58961368	98.00	47.47	45991370(78.00)
BS-NDF-1_2	60337528	58703730	98.16	47.69	46523286(79.25)
BS-3529_1	55796632	54094510	98.02	47.33	41766331(77.21)
BS-3529_2	51028112	48602252	97.83	47.55	37321259(76.79)
FS-NDF-1_1	59125558	57331416	98.63	47.92	46259335(80.69)
FS-NDF-1_2	55453174	53974628	98.71	47.86	43757925(81.07)
FS-3529_1	51602924	50069336	98.65	48.01	42677359(79.83)
FS-3529_2	60942750	59171804	98.66	47.9	45710461(79.95)

3.2 差异表达基因筛选

我们采用“ $FDR \leq 0.05$, $\| \log_2FC \| \geq 1$ ”的标准来进行差异基因的筛选, 在两个不同的时期中, 抽薹期筛选出 3220 个差异表达基因(1509 个上调, 1711 个下调); 花期筛选出 2793 差异表达基因(1373

个上调, 1420 个下调). 在两个时期共有的差异基因数目为 2147(1022 个上调的, 1125 个下调).

3.3 两个时期共有差异表达基因 GO 注释分析

差异表达基因主要被分为三个 GO 类别: 生物过程、细胞组分和分子功能(图 1).

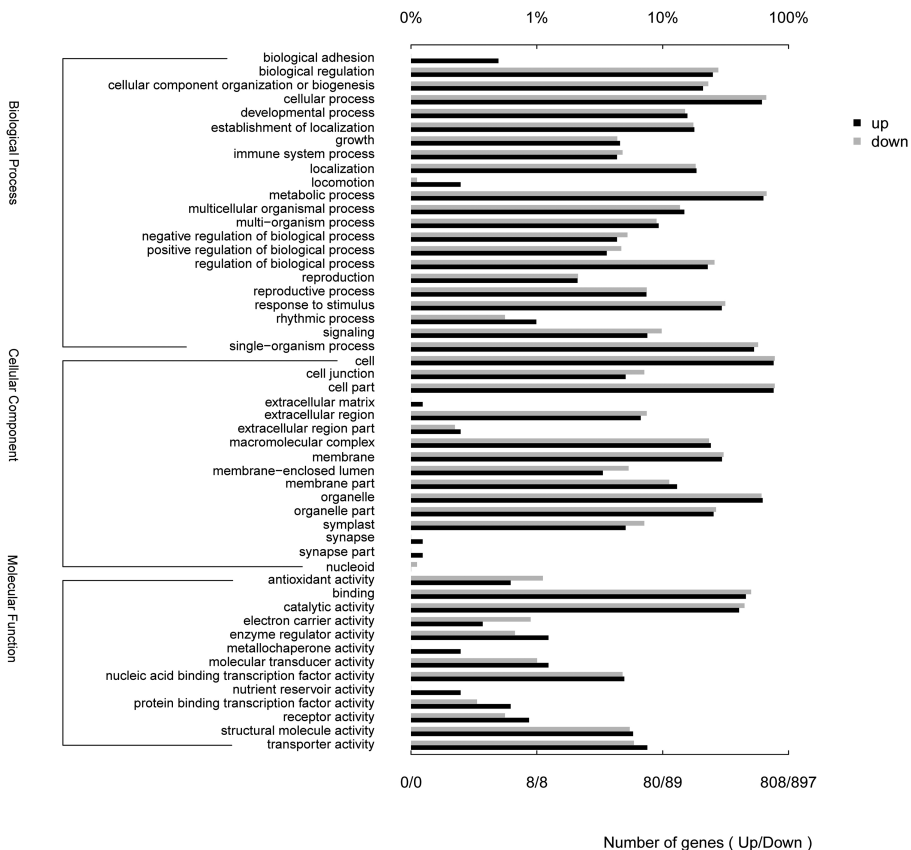


图 1 两个时期“NDF-1”和“3529”之间的差异表达基因的 GO 功能分类

上边的 X 轴表示某种功能差异表达基因占全部差异表达基因的比例, 下边的 X 轴表示某种功能的差异表达基因的数目. 黑色表示表达量上调的基因, 灰色表示表达量下调的基因. 一个基因可以具有不同的功能.

Fig. 1 GO classification of DEGs between ‘NDF-1’ and ‘3529’ in two stages

The top X-axis indicates percentage of genes in this term of total annotation genes; the down X-axis indicates the number of unigenes in a category. Black means up regulate gene and grey means down regulate gene. One unigene may assign with more than one go term.

在 GO 功能的显著性富集中,许多参与到茎秆发育中相关的差异表达基因都有明显的变化. 差异表达基因参与到“纤维素合酶活性 (GO: 0016759)、肌动蛋白解聚作用 (GO: 0030042)、葡萄糖跨膜转运体活动 (GO: 0005355)、己糖跨膜转运体活动 (GO: 0015149)、生长素生物合成过程的调节 (GO: 0010600)、微管解聚的调节 (GO:

0031114)、纺锤体微管”大部分是下调的.

3.4 KEGG pathway 分析

利用 KEGG pathway 分析能更好的了解基因在生命活动中的功能. 通过分析会发现,在抽薹期和花期中,差异基因分别被分为 310 和 240 种. 通过 p 值分别筛选出 20 条最为显著的通路(图 2). 其中,ribosome 是差异最为显著的通路.

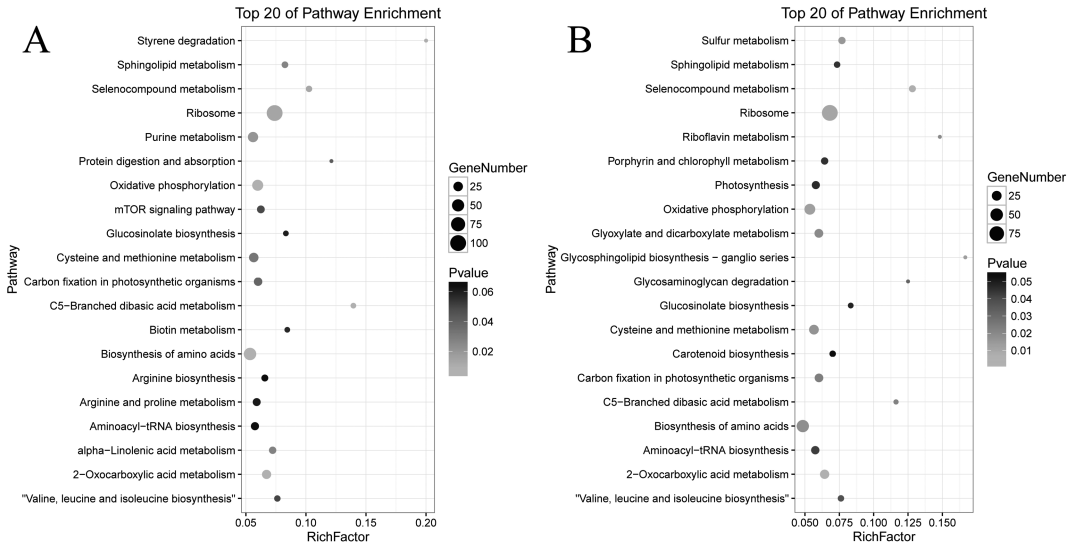


图 2 “NDF-1”和“3529”之间抽薹期(A)花期(B)的差异表达支路(TOP 20)

Fig. 2 Different expressed pathways in ‘NDF-1’ compared with ‘3529’ in (A) BS and (B) FS, respectively (TOP 20)

在 KEGG 代谢通路中,植物激素信号转导的通路与植株的矮化有着密切的联系. 在赤霉素的信号转导中,抽薹期时,*GID1* 和 *DELLA* 的表达量出现了上调,但是在通路下游的 *TF* 的表达量没有出现变化,赤霉素上游的合成在抽薹期时没有变化,但是在花期时却出现了上调. 在生长素信号转导途径中,*TIR1* 在抽薹期和花期展现了不同的变化,其中,抽薹期的表达量出现了上调,花期的表达量却是没有变化的. *TIR1* 参与生长素的蛋白降解和生长素下游应答基因的转录. 生长素信号转导的下游应答基因没有规律性的变化. 在油菜素内酯信号转导途径中,下游的 *CYCD3* 参与细胞的分裂. *CYCD3* 在抽薹期和花期表现出不同的表达趋势.

3.5 “NDF-1”高度相关的差异表达基因

“NDF-1”的赤霉素信号转导有了很多变化, *GID1* 和 *DELLA* 在抽薹期时时上调的,但是它上游的 *GA4*、*GA9*、*GA20* 的合成却没有出现变化,在花期的 *GA4*、*GA9*、*GA20* 的合成表达量是上调的. 在“NDF-1”中,油菜素内酯在两个时期中的合成都

是上调的,信号转导途径中的 *BAK1* 的表达量也都是上调的. 生长素的信号转导途径中 *GH3s* 的表达量可以作为生长素浓度的一个指示. 生长素极性运输蛋白 *PIN3* 的表达量是上升的,但是由 *GH3s* 的表达量可以看出生长素的浓度是上调的.

COBRA 参与纤维素微纤丝的定向生长而能影响植物高度. 在“NDF-1”中,*COBRA* 的表达量是降低的,而且,一些纤维素合成酶基因的表达量也是下调的,例如 *CESA3*、*CESA6* 和 *CESA8*. 细胞壁松弛素可以松弛细胞壁的网络结构,利于细胞的伸长. 在“NDF-1”中 *Expansin-A5* 和 *Expansin-A13* 的表达量都出现了下调.

3.6 QRT-PCR 验证

通过 qRT-PCR 确定 20 个基因的表达量来对转录组测序的结果进行验证(表 2). 这些基因与生长素信号通路、赤霉素信号通路、油菜素内酯信号通路、多胺合成、纤维素合成和胞壁松弛素等有关. 结果表明转录组的测序结果与 qRT-PCR 的验证是一致的.

表 2 差异表达基因的 QRT-PCR 结果

Tab. 2 QRT-PCR results of DEGs

时期种类相对表达量	BS_3529	BS_NDF-1	FS_3529	FS_NDF-1
BnaA05g32040D/ β -ACTIN	0.985	5.874	1.945	4.522
BnaC07g05450D/ β -ACTIN	2.967	0.0085	13.742	0.936
BnaA03g52520D/ β -ACTIN	2.245	0.504	13.235	1.456
BnaC09g03980D/ β -ACTIN	12.057	0	59.852	0.548
BnaC09g04940D/ β -ACTIN	0.592	2.673	0.005	1.035
BnaC05g37330D/ β -ACTIN	0.502	2.382	0.104	0.967
BnaC06g24400D/ β -ACTIN	3.746	0.836	1.154	1.955
BnaC05g47100D/ β -ACTIN	1	0.015	3.157	0.009
BnaC02g08800D/ β -ACTIN	0.847	0.765	0.364	1.448
BnaC05g48280D/ β -ACTIN	1	0.848	1.046	0.306
BnaA02g10450D/ β -ACTIN	0.256	1.554	0.742	1.667
BnaAnng36830D/ β -ACTIN	1	2.386	0.278	1.566
BnaAnng38530D/ β -ACTIN	0.528	0.405	0.559	11.526
BnaC09g06600D/ β -ACTIN	1.083	1	1.306	3.687
BnaC05g48610D/ β -ACTIN	0.643	0.867	1.487	0.343
BnaC06g23710D/ β -ACTIN	0	2.558	0.008	1.105
BnaC02g00990D/ β -ACTIN	0.996	2.965	1.485	11.247
BnaC09g04330D/ β -ACTIN	10.364	1	0.755	0.906
BnaC02g04540D/ β -ACTIN	0.095	1.286	11.667	0.507
BnaC09g07170D/ β -ACTIN	0.805	0.415	1	0.256

通过 qRT-PCR 确定 20 个基因的表达量来对转录组测序的结果进行验证(表 2)。

4 讨论和结论

矮化是一个非常重要的农艺性状,在作物的产量发挥重要的作用,倒伏会严重影响作物的产量^[10]。很多因素都会导致植株的矮化。生长素、赤霉素、油菜素内酯是植物矮化的主要的调控激素。矮化通常是由一些与这些激素合成或信号通路相关的基因突变导致的^[11]。

GO 功能的显著性富集一些与茎秆发育相关的分支中,纤维素合成酶的基因表达量都是下调的,说明纤维素的合成是减少的^[12]。“NDF-1”中的 COBRA(*BnaC07g32390D*) 基因的表达量下调对纤维素的合成有很大的影响,这会让细胞壁的合成出现紊乱^[13]。抽薹期的 GID1(*BnaA05g32040D*) 和 DELLA 的基因的表达量都是上调的,但是上游的赤霉素合成在抽薹期是没有变化的。这说明赤霉素信号通路的变化对“NDF-1”矮化产生了影响^[14]。在抽薹期和花期的油菜素内酯的合成都是上调的,合成量上升的油菜素内酯会影响其他信号通路^[15-16]。在“NDF-1”中表达量上升的 PIN3

(*BnaC06g24400D*)是生长素外运的一条通道,但是为了能够使 PINs 家族蛋白实现这个功能,首先需要去磷酸化^[17-18]。在“NDF-1”中编码 PP2A 蛋白 A 亚基 α 基(*BnaC07g10740D*)和 B 亚基的 η 基(*BnaC09g03980D*)的表达量降低了很多,PP2A 蛋白合成量减少不能有效的实现去磷酸化的功能^[19, 20]。生长素合成的相关基因的表达量是下调的,花期的 GH3s(*BnaCnng28110D*)的表达量都是上调的,说明花期时生长素浓度是升高的,表明生长素发生了积累^[21]。

对“NDF-1”的转录组测序结果表明编码 PP2A 蛋白基因的在野生型和“NDF-1”中的表达量进行分析表明,编码该蛋白的表达量出现的显著地减少,这会影响到油菜素内酯的信号转导,也会影响生长素的主动运输。这表明编码 PP2A 蛋白基因的差异表达可能是导致“NDF-1”矮小表型的因素之一,关于 PP2A 对甘蓝型油菜的影响需要更多更加深入的研究。

参考文献:

- [1] Kim S G, Lee S, Kim Y S, *et al.* Activation tagging of an Arabidopsis SHI-RELATED SE-

- QUENCE gene produces abnormal anther dehiscence and floral development[J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 74: 337.
- [2] Liu S S, Chen J, Li S C, *et al.* Comparative transcriptome analysis of genes involved in GA-GID1-DELLA regulatory module in symbiotic and asymbiotic seed germination of *anectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. (Orchidaceae) [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 30190.
- [3] Wang R, Liu M, Yuan M, *et al.* The brassinosteroid-activated BRI1 receptor kinase is switched off by dephosphorylation mediated by cytoplasm-localized PP2A B subunits[J]. *Mol Plant*, 2015, 9: 148.
- [4] Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, *et al.* Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic Brassica napus oilseed genome [J]. *Science*, 2014, 345: 950.
- [5] Zhang J, Ren A, Chen H, *et al.* Transcriptome analysis and its application in identifying genes associated with fruiting body development in Basidiomycete *Hypsizygus marmoreus*[J]. *PloS One*, 2015, 10: e0123025.
- [6] 吴燕, 颜朗, 李雪丹, 等. 甘薯耐旱和耐盐基因的挖掘和表达分析[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 5.
- [7] Freiman Z E, Doron-Faigenboim A, Dasmohapatra R, *et al.* High-throughput sequencing analysis of common fig (*Ficus carica* L.) transcriptome during fruit ripening [J]. *Tree Genet Genomes*, 2014, 10: 923.
- [8] Li X, Nair A, Wang S, *et al.* Quality control of RNA-seq experiments [J]. *Bioinformatics*, 2015, 28: 2184.
- [9] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate—a practical and powerful approach to multiple testing[J]. *J R Stat Soc*, 1995, 57: 289.
- [10] Chen S, Yuan H M, Liu G F, *et al.* Genome-wide analysis of a TaLEA-introduced transgenic *Populus simonii* × *Populus nigra* dwarf mutant[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 13: 2744.
- [11] Bo Z, Lin J, Peng W, *et al.* Dwarfism in Brassica napus L. induced by the over-expression of a gibberellin 2-oxidase gene from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Breed*, 2012, 29: 115.
- [12] Song D, Shen J, Li L. Characterization of cellulose synthase complexes in *Populus* xylem differentiation [J]. *New Phytol*, 2010, 187: 777.
- [13] Roudier F, Fernandez AG, Fujita M, *et al.* COBRA, an Arabidopsis extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation [J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 1749.
- [14] Ueguchitanaka M, Nakajima M, Motoyuki A, *et al.* Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 183.
- [15] Collins C, Maruthi N M, Jahn C E. CYCD3 D-type cyclins regulate cambial cell proliferation and secondary growth in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66: 351.
- [16] Clouse SD, Mcmorris TC. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111: 671.
- [17] Petrásek J, Friml J. Auxin transport routes in plant development [J]. *Development*, 2009, 136: 2675.
- [18] Song C, Zhang D, Zhang J, *et al.* Expression analysis of key auxin synthesis, transport, and metabolism genes in different young dwarfing apple trees [J]. *Acta Physiol Plant*, 2016, 38: 1.
- [19] Wang R, Liu M, Yuan M, *et al.* The brassinosteroid-activated BRI1 receptor kinase is switched off by dephosphorylation mediated by cytoplasm-localized PP2A B subunits[J]. *Mol Plant*, 2015, 9: 148.
- [20] Kataya A R, Heidari B, Lillo C. Protein phosphatase 2A regulatory subunits affecting plant innate immunity, energy metabolism, and flowering time—joint functions among B γ subfamily members[J]. *Plant Signal Behav*, 2015, 10: e1026024.
- [21] Hagen G, Martin G, Li Y, *et al.* Auxin-induced expression of the soybean GH3 promoter in transgenic tobacco plants[J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 567.