

DOI:10.12171/j.1000-1522.20200376

白桦木质部原生质体初生细胞壁再生过程转录组分析

郑 杰 于 颖 贺卓熙 路明远 孙 宇 尹天龙 王 超

(东北林业大学林学院, 林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:【目的】木质部细胞壁的组成及特性是决定材性的重要因素, 研究木质部细胞壁形成的分子调控机制对于木材改良具有重要意义。本研究探究了白桦木质部原生质体初生壁再生过程的分子调控机制, 并鉴定出重要调控基因, 旨在为林木材性性状研究提供数据和材料。【方法】分别以培养 0 h 和 2 h 的白桦木质部原生质体为材料, 通过荧光增白剂染色观察初生壁再生过程。利用转录组分析技术研究初生壁再生前后的差异表达基因及其参与的调控途径, 将检测到的差异表达基因在 GO、KEGG、PlantTFDB 数据库中进行比对分析。【结果】荧光显微镜观察结果显示: 原生质体分离后不具有细胞壁, 培养 2 h 再生初生细胞壁。以 $|\log_2(FC)| \geq 1$ (FC 为差异倍数) 且 $q < 0.05$ 为标准筛选差异基因, 结果显示: 相较于刚分离的原生质体, 培养 2 h 的原生质体中检测到 4 396 个上调表达的基因, 4 056 个下调表达基因, 总计 8 452 个差异表达基因。其中 GO 数据库共注释到 10 个显著上调条目, KEGG 数据库注释到 10 个显著差异代谢通路, PlantTFDB 数据库共注释到 16 个家族的 360 个差异表达转录因子。GO 注释结果表明, DNA 复制、细胞周期相关基因上调表达。KEGG 注释结果表明, 谷胱甘肽、 α -亚麻酸等与抗逆代谢相关的基因下调表达, 果胶脂酶相关基因上调表达。PlantTFDB 注释结果表明, bHLH、NAC、MYB、bZIP 等与细胞壁合成密切相关的转录因子均差异表达。【结论】培养 2 h 的木质部原生质体处于细胞壁再生及分裂准备状态, DNA 复制、细胞周期、多糖合成代谢等相关基因在白桦木质部原生质体培养及初生细胞壁形成过程中起调控作用。

关键词: 白桦; 原生质体; 初生细胞壁再生; 转录组

中图分类号: S718.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2022)08-0012-11

引文格式: 郑杰, 于颖, 贺卓熙, 等. 白桦木质部原生质体初生细胞壁再生过程转录组分析 [J]. 北京林业大学学报, 2022, 44(8): 12-22. Zheng Jie, Yu Ying, He Zhuoxi, et al. Transcriptome analysis of regeneration process of primary cell wall in xylem protoplast of *Betula platyphylla* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2022, 44(8): 12-22.

Transcriptome analysis of regeneration process of primary cell wall in xylem protoplast of *Betula platyphylla*

Zheng Jie Yu Ying He Zhuoxi Lu Mingyuan Sun Yu Yin Tianlong Wang Chao

(College of Forestry, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] The properties of wood are determined by the composition and characteristics of xylem cell wall. It is important for wood improvement to study the molecular regulation mechanism of xylem cell wall formation. In this study, the molecular regulatory mechanisms in the process of regeneration of primary wall in the protoplast of birch (*Betula platyphylla*) xylem were analyzed and the important regulatory genes were identified, aiming to provide data and materials for the study of wood properties. [Method] The protoplasts of birch xylem cultured for 0 h and 2 h were used as materials, respectively, and the regeneration process of primary cell wall was observed by staining with calcofluor white. The

收稿日期: 2020-11-29 修回日期: 2021-02-08

基金项目: 东北林业大学大学生创新项目(201910225011)。

第一作者: 郑杰。主要研究方向: 林木重要性状形成的分子机制。Email: jiezheng@nefu.edu.cn 地址: 150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路 26 号东北林业大学林学院。

责任作者: 王超, 教授。主要研究方向: 林木重要性状形成的分子机制。Email: wangchao@nefu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

differentially expressed genes (DEGs) and differential metabolic pathways participating before and after the regeneration of the primary wall were compared by transcriptomic analysis. The detected DEGs were aligned with GO, KEGG and PlantTFDB. [Result] Observation by fluorescence microscopy showed that protoplasts had no cell walls after enzymatic digestion and the primary cell walls had been regenerated after 2 h culture. The DEGs were screened using $|\log_2(\text{FC})| \geq 1$ (fold change, FC) and $q < 0.05$ as the parameters. The results showed that compared with the protoplasts without cell wall, 4 396 up-regulated genes and 4 056 down-regulated genes were detected in the protoplasts cultured for 2 h, with a total number of 8 452 DEGs. In the GO database, there were 10 significantly up-regulated terms. KEGG analysis noted 10 significantly different metabolic pathways. Total of 360 differentially expressed transcription factors from 16 families was annotated in PlantTFDB database. The GO database annotation results showed that DNA replication and cell cycle related genes were up-regulated in the cell wall regeneration lines compared with that in control. The results of KEGG database annotation showed that genes involved in glutathione, α -linolenic acid and other stress-related metabolism genes were down-regulated, and pectinester related genes were up-regulated. PlantTFDB annotation results showed that bHLH, NAC, MYB, bZIP and other transcription factors closely related to cell wall biosynthesis were differentially expressed. [Conclusion] Above results show that xylem protoplasts are in a state of cell wall regeneration and division preparation at 2 h culture. DNA replication, cell cycle, polysaccharide biosynthesis and other related genes play a regulatory role in xylem protoplast culture and primary cell wall formation of *B. platyphylla*.

Key words: *Betula platyphylla*; protoplast; regeneration of primary cell wall; transcriptome

白桦(*Betula platyphylla*)是我国东北林区重要的树种,在森林生态、城市园林、经济用材等方面有着重要的作用^[1-3]。因此,培育白桦良种在林业生态文明建设中具有重要的战略意义。白桦的木材性状对于其用材价值有着重要的影响^[4-5],所以,筛选鉴定其木材形成调控重要基因,探究木材性状形成的分子基础,对于白桦的育种工作有着巨大的理论和应用价值。树干形成层向内分化形成具有生活力的木质部细胞,担负着木材形成的重要使命^[6-7]。木质部细胞失去生活力后残留的细胞壁则是构成木材的主要成分。因此,探究白桦木质部细胞细胞壁的形成过程具有重要的科学意义。

原生质体是通过机械法或酶解法除去细胞壁后留下的无壁且具有生活力的原生质团^[8]。由于没有细胞壁的阻隔,原生质体容易摄取外源遗传物质,是进行遗传操作的优良受体^[9],可通过诱导细胞融合的方法形成杂种细胞,是筛选突变体、获得遗传资源的优良材料。植物原生质体培养则是将其置于特定条件下,通过改变激素等条件引导其生长发育的方向,使原生质体适用于遗传转化、瞬时表达、细胞融合等特定的实验目的^[10]。木质部原生质体细胞壁再生过程一定程度上可以模拟细胞壁的生物合成过程。

高通量测序技术(high-throughput sequencing)是一项具有革命性的技术,具有大通量、高分辨、高灵敏等特点,因此被广泛用于生物转录组测序(RNA-

sequencing)工作中^[11-13]。Chang 等^[14]利用转录组方法首次鉴定了维管束鞘细胞细胞壁发育相关的转运蛋白基因。Tian 等^[15]在研究乳酸菌酸胁迫时,利用转录组测序鉴定到与细胞壁合成相关基因的显著变化。Sharma 等^[16]利用转录组学方法分析了水稻原生质体分离以及再生细胞壁过程中悬浮细胞系内基因表达差异情况,鉴定了大量与细胞壁合成相关的基因^[16]。可见,原生质体细胞壁培养过程中,细胞壁合成相关基因代谢旺盛,是分析细胞壁合成相关转录、翻译、修饰等过程的理想材料。

本研究聚焦于白桦木质部细胞细胞壁再生过程,利用酶解法破坏白桦木质部细胞的细胞壁,获得具有生活力的木质部原生质体(0 h),并通过液体浅层培养的方法观察到原生质体细胞壁再生以及部分原生质体第一次分裂(2 h)。通过这种方式,我们模拟了白桦木质部细胞合成细胞壁的过程。在此基础上,提取了刚刚分离的原生质体(0 h)以及原生质体细胞壁再生时(2 h)的总 RNA,利用高通量平台获得了其转录组测序数据,并采用生物信息学方法对细胞壁再生前后的转录组进行基因表达差异分析。最后,对差异基因进行了 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)和 GO(gene ontology)功能注释,分析了原生质体培养及初生细胞壁再生过程中的分子调控机制,并筛选到一批可能与木质部细胞细胞壁合成相关的基因,为下一步的白桦材性改良工作提供了一定的依据。

1 材料与方法

1.1 白桦植物材料

选取生长于东北林业大学白桦种子园室外的5年生野生型白桦苗木,在5—7月之间取材。选取其顶端第5茎节以下的茎用于木质部原生质体的分离。

1.2 方法

1.2.1 原生质体分离

配置 W5 溶液(2×10^{-3} mol/L MES, 0.15 mol/L NaCl, 0.17 mol/L CaCl_2 , 5×10^{-3} mol/L KCl)及酶解液(15 g/L Cellulase R10, 4 g/L Macerozyme, 0.02 mol/L MES, 0.4 mol/L 甘露醇, 0.2 mol/L KCl, 0.1 mol/L CaCl_2 , 0.1% BSA),其中 W5 溶液进行高压蒸汽灭菌后使用。

取白桦茎段喷洒 75% 乙醇进行表面消毒,于超净工作台中剥去表皮后剪成适宜长度的茎段,浸泡于酶解液中(每个 50 mL 离心管大约 5 根茎段,茎段长度 10 cm)。避光置于 22~24 °C 酶解 3 h。酶解完成后轻晃离心管,使得原生质体充分释放到酶解液中,观察到酶解液变浑浊。于超净台中用镊子取出酶解过的茎段,用等体积的 W5 溶液(4 °C 预冷)稀释酶解液后,使用 200 目无菌细胞筛过滤。将滤液于 150 r/min 离心 2 min,去除上清液,并使用 W5 溶液对原生质体进行 2 次重悬洗涤。利用显微镜(OLYMPUS BX43)对原生质体完整性进行镜检。使用血球计数板进行计数统计。

1.2.2 原生质体培养

使用 MS 培养基(20 g/L 蔗糖, pH 为 5.8~6.2, 0.8 mg/L NAA、1.7 mg/L 6-BA)对原生质体进行细胞壁再生培养。

1.2.3 原生质体细胞壁染色观察

在 0、0.5、1、2、4 h 时,用 1% 的荧光增白剂(含 0.7 mol/L 的甘露醇)对上述原生质体进行染色,染色液和样品体积比为 1:1,染色时间为 10 min,将血球计数板置于荧光显微镜下对其进行观察。

1.2.4 原生质体取样及总 RNA 提取

选取培养 0 h 的原生质体作为对照组记为 C,共计 3 个重复,分别记为 C1、C2、C3。取培养 2 h 时的原生质体作为实验组,记为 T,共计 3 个重复,分别记为 T1、T2、T3。使用 LAKERA 植物 RNA 提取试剂盒提取原生质体 RNA,1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。并用核酸测定仪测定 RNA 浓度。

1.2.5 文库制备和测序

总 RNA 样品检测符合标准后,选用带有 Oligo(dT)的磁珠纯化富集总 RNA,使用试剂盒去除

rRNA。向纯化后的 mRNA 中加入 Fragmentation Buffer,使其裂解为小片段,利用随机引物进行逆转录。对逆转录产物进行末端修复、加 A 碱基、加测序接头等操作,回收片段后进行 PCR 扩增,完成文库构建。文库构建完成后,先使用 Qubit3.0 初步定量,然后对文库的 insert size 进行检测,最后使用 Bio-Rad CFX 96 荧光定量 PCR 仪准确定量文库有效浓度(文库有效浓度 > 10 nmol/L),以保证文库质量。选取合格的文库,使用 Illumina 平台,按照 PE150 策略进行高通量测序。建库及测序工作由安诺优达(ANORODA, Beijing)公司完成。

1.2.6 样本聚类分析方法

使用斯皮尔曼相关性系数计算样本相关性,样本之间距离使用欧式距离,采用最长距离法对样本进行聚类分析。

1.2.7 基因表达量分析及差异基因分析注释及富集分析

将原始下机数据(raw reads)去除低质量序列和接头污染后获得高质量序列(clean reads)信息。使用 HISAT2 软件将 clean reads 与参考基因组(*Betula pendula_coge.kehu.v1*)进行比对,并进行表达量估计。在 RNA-seq 分析中,通过定位到基因组区域或外显子区域的测序序列(reads)的数量来估计基因的表达水平。引入 FPKM(fragments per kilobase per million mapped fragments)概念来定量表达水平,即每百万个测序片段中来自某一基因每千碱基长度的测序片段数^[17]。使用 DESeq2 软件^[18]进行基因差异表达分析, $|\log_2(\text{FC})| \geq 1$ (FC 为差异倍数)且 $q < 0.05$ 的基因被标记为差异基因。将差异表达基因与 NCBI、Uniport、GO 和 KEGG 数据库进行比对,得到差异表达基因的注释。将注释到的差异基因进行超几何检验(使用工具 fisher.test p.adjust),找出差异基因显著富集的 GO 条目和 KEGG 代谢通路。

2 结果与分析

2.1 原生质体分离

对白桦木质部进行原生质体分离,用 W5 溶液重悬原生质体,荧光增白剂染色后于荧光显微镜下观察,细胞壁酶解完全,处于无壁状态,生理状态良好,鲜见破损,适用于后续分析(图 1a)。使用血球计数板进行计数统计,使得原生质体最终密度为 10^6 个/mL。

2.2 原生质体细胞壁再生

对获得的原生质体用 MS 培养基进行细胞壁再生培养,使用荧光增白剂染色后于荧光显微镜下对细胞壁进行观察。如图 1 所示:右侧为荧光显微镜明

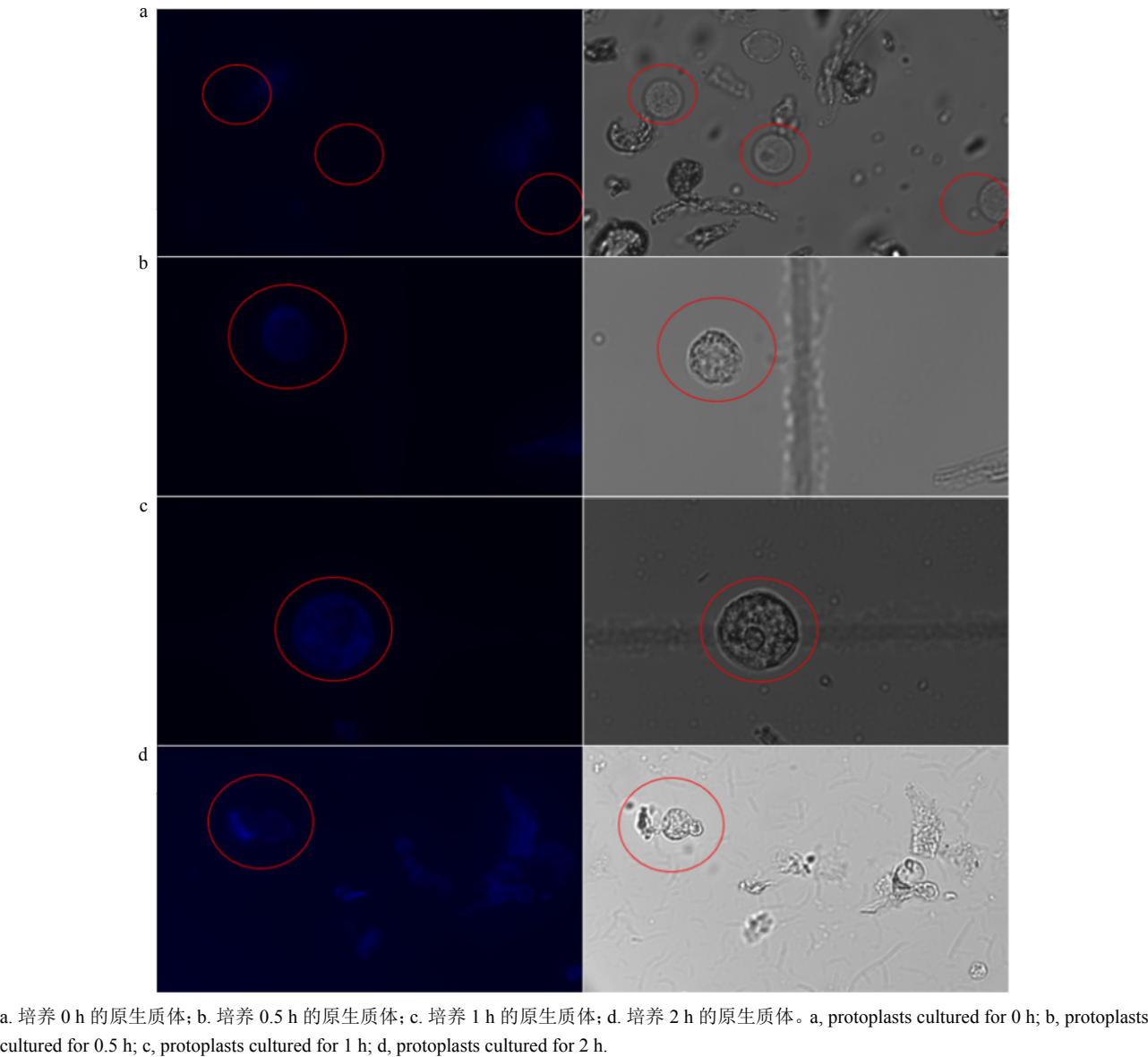


图 1 白桦原生质体细胞壁再生荧光显微镜观察结果

Fig. 1 Fluorescence microscope observation of cell wall regeneration in protoplasts of birch

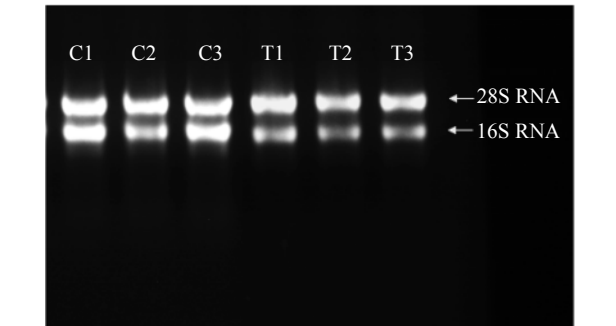
场，左侧为对应的荧光显微镜暗场。荧光增白剂将细胞壁里的纤维素染色，在蓝光激发下发荧光。0 h 时(图 1a)，明场下观察到原生质体，暗场无荧光，原生质体未染色，证明原生质体细胞壁酶解完全。0.5 h 时(图 1b)，明场下观察到原生质体，暗场中四周细胞染色不均一，证明原生质体处于再生过程中，部分细胞壁再生。1 h 时(图 1c)，明场观察到原生质体，暗场中细胞四周均被染色，显示细胞壁再生。2 h 时(图 1d)，观察到细胞出芽。

2.3 原生质体总 RNA 提取

用植物 RNA 提取试剂盒提取白桦木质部原生质体 RNA，并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 2 所示。

2.4 转录组数据组装及测序质量评估

使用 Illumina 平台，按照 PE150 策略对 RNA 进



C1 ~ C3. 培养 0 h 时的原生质体; T1 ~ T3. 培养 2 h 时的原生质体。
C1 - C3, protoplast cultured for 0 h; T1 - T3, protoplast cultured for 2 h.

图 2 白桦木质部原生质体 RNA 提取结果

Fig. 2 RNA extraction results from protoplasts of birch xylem

行高通量测序。对 raw reads 进行过滤后得到 clean reads，使用 clean reads 与参考基因组 *Betula_pendula_*

coge.kehu.v1 比对, 结果如表 1。对照组和实验组的聚类分析如图 3 所示, 结果显示样本聚类正常, 重复性良好。

表 1 Clean reads 与参考基因组比对结果

Tab. 1 Clean reads and the sequence alignment results with reference genome

组别 Group	过滤后序列总数 Total clean reads	比对成功率 Mapping rate/%	基因总数 Total gene number	Q30/%
C1	44 905 836	92.04	19 835	93.36
C2	41 241 930	92.26	19 764	93.44
C3	45 786 950	92.28	19 885	93.22
T1	47 178 646	91.37	20 442	93.53
T2	44 340 702	91.13	20 310	93.22
T3	41 809 660	91.02	20 281	93.32

注: Q30为过滤后碱基质量值, 表示碱基错误率小于0.001的测序碱基占测序总数的比例。Notes: Q30 is the base quality value after filtering, indicating the proportion of sequenced bases with a base error rate less than 0.001 in the total number of sequenced bases.

2.5 原生质体细胞壁再生基因表达差异分析

2.5.1 差异表达分析统计结果

如图 4 所示: 相较于刚分离的原生质体, 培养 2 h 的原生质体中检测到 4 396 个上调表达的基因, 4 056 个下调表达基因, 总计 8 452 个差异表达基因。

2.5.2 差异表达基因的 GO 注释结果及富集分析

差异表达基因的 GO 注释结果如图 5 所示。显

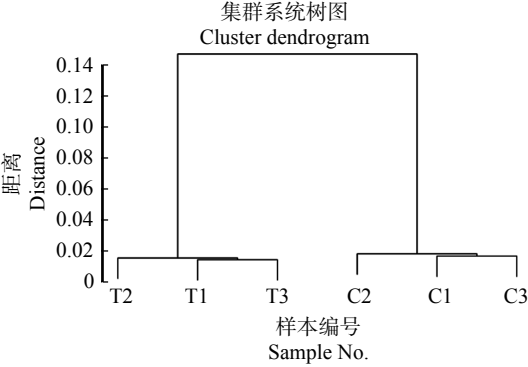


图 3 对照组和实验组的聚类分析结果

Fig. 3 Cluster analysis results of control group and experimental group

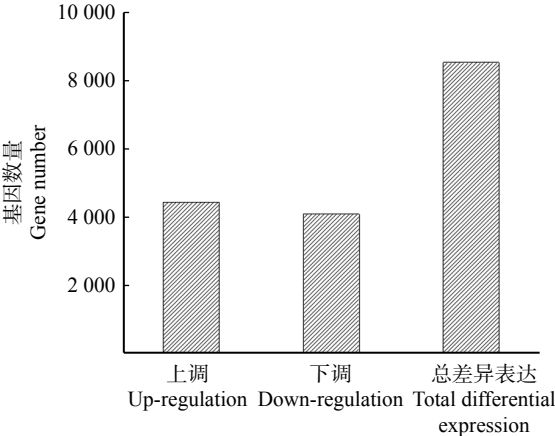


图 4 培养 2 h 相对 0 h 原生质体内差异表达基因数量柱状图

Fig. 4 Histogram of the number of DEGs in 2 h versus 0 h protoplasm

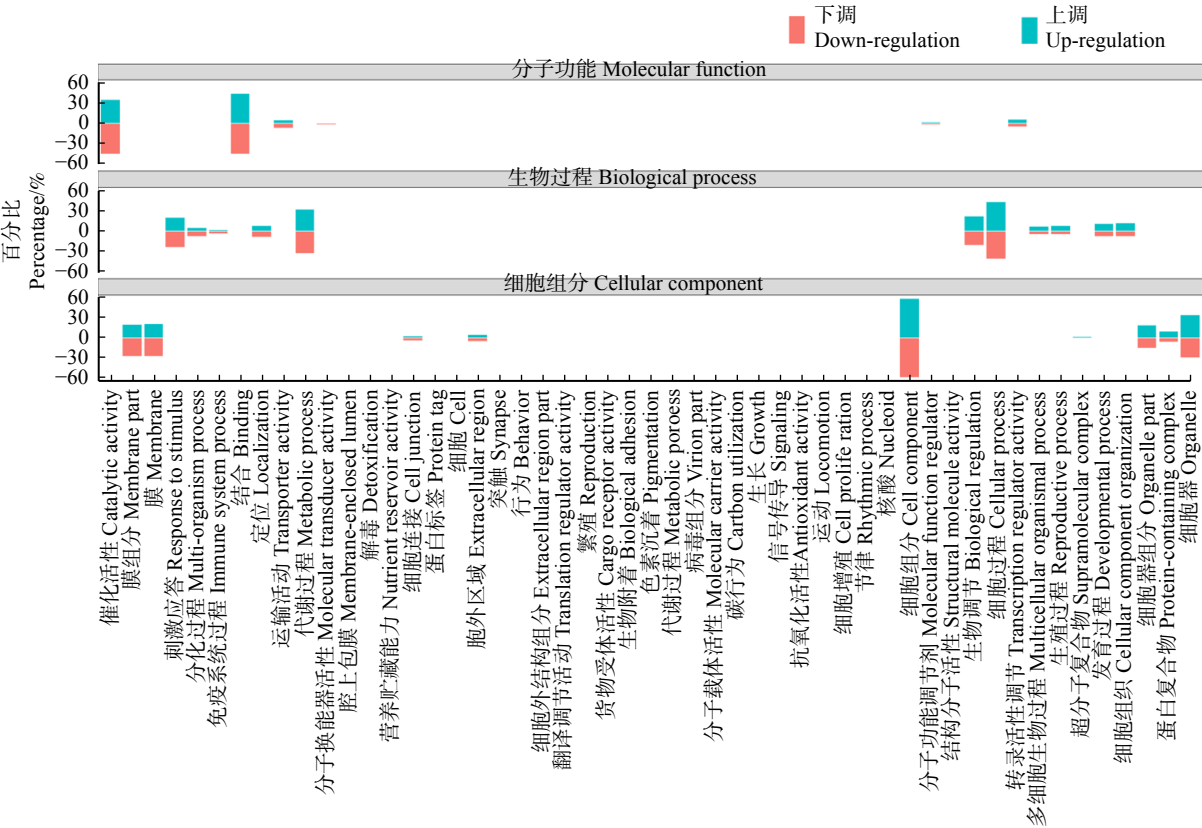


图 5 培养 2 h 相对 0 h 原生质体内差异表达基因 GO 注释结果柱状图

Fig. 5 GO annotation of differentially expressed genes in protoplasts after 2 h culture compared with just isolated protoplasts

著上调(基因上调占比大于 20%)的条目为:膜、细胞器组分、细胞器、代谢过程、细胞过程、生物调节、新陈代谢、刺激应答、催化活性、结合过程。同时,在这些条目中也检测到了相近程度的下调。这些差异表达可能与原生质体细胞壁再生及分裂过程相关。

GO 富集分析结果如图 6 所示:在细胞组分、生物过程以及分子功能 3 个大类中均有 DNA 复制相

关条目的差异基因富集。其中,在细胞组分大类中,细胞膜锚定组分检测到显著富集。在生物过程大类中,细胞周期和细胞周期进程 2 个条目下差异基因富集显著。在分子功能大类中,ADP 结合、DNA 复制起点结合 2 个条目下差异基因显著富集。

2.5.3 差异表达基因 KEGG 注释结果及富集分析

差异表达基因 KEGG 注释结果如表 2 所示:注释到的 KEGG 富集通路共 10 个。其中和植物抗逆

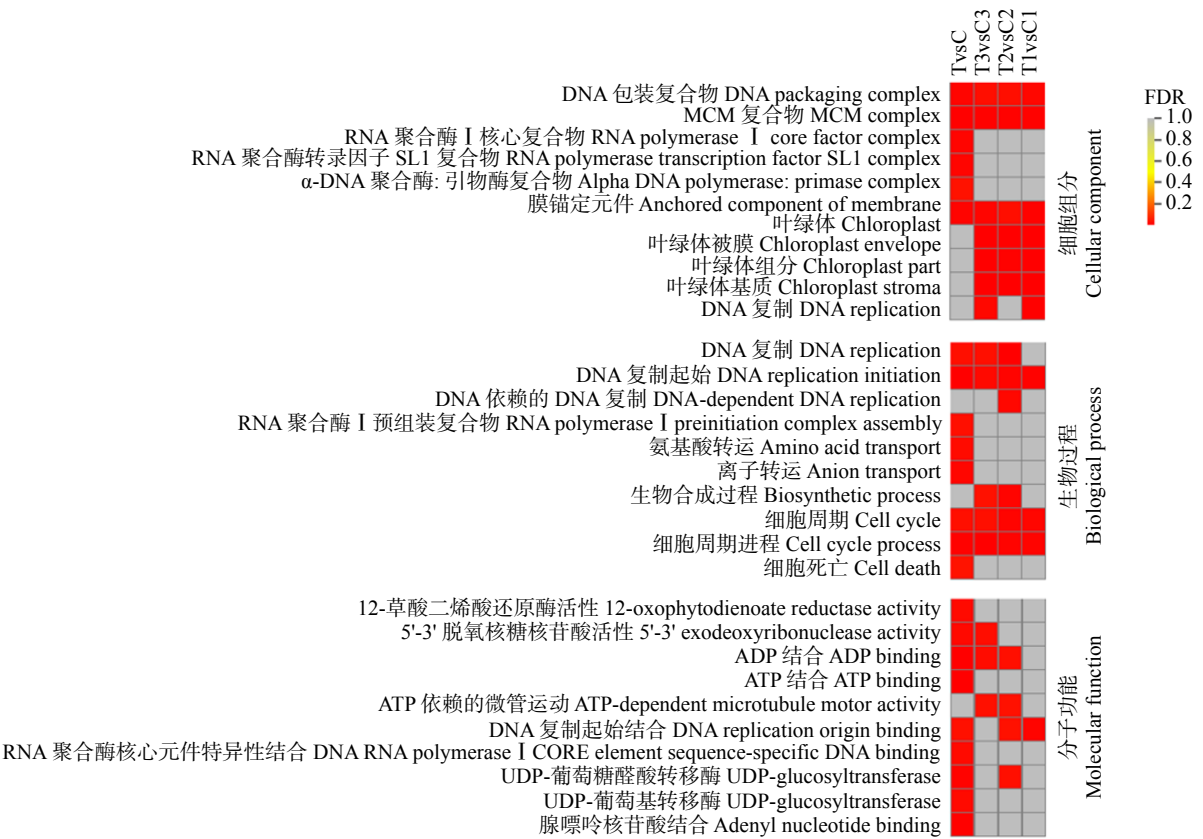


图 6 GO 注释结果富集热图
Fig. 6 GO annotation results enrich heat map

表 2 KEGG 通路注释结果及富集分析统计表

Tab. 2 Results of KEGG notions and the significantly enriched KEGG pathway statistics					
通路名称 Pathway name	Map编号 Map No.	p 值 p value	q 值 q value	上调数 Number of up-regulation	下调数 Number of down-regulation
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	map00480	0.000 002 450	0.000 238	8	30
α-亚麻酸代谢 Alpha-Linolenic acid metabolism	map00592	0.000 029 600	0.001 353	6	17
DNA复制 DNA replication	map03030	0.000 332 000	0.011 156	18	1
光合作用天线蛋白 Photosynthesis-antenna proteins	map00196	0.001 147 000	0.026 197	7	0
黄酮代谢 Flavonoid biosynthesis	map00941	0.001 623 000	0.027 359	9	5
戊糖及葡萄糖醛互变异构体 Pentose and glucuronate interconversions	map00040	0.001 997 000	0.027 359	14	8
光合作用 Photosynthesis	map00195	0.001 945 000	0.027 359	13	0
卟啉和叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism	map00860	0.001 666 000	0.027 359	14	3
牛磺酸及亚牛磺酸代谢 Taurine and hypotaurine metabolism	map00430	0.002 319 000	0.028 882	2	5
黄酮及黄酮合成 Flavone and flavanol biosynthesis	map00944	0.004 234 000	0.04 8 340	6	1

和应激相关的谷胱甘肽代谢(map00480)通路和 α -亚麻酸代谢(map00592)通路基因均有明显的下调表达。此外,光合作用相关代谢通路(map00195、map00860)基因有显著的上调表达。戊糖及葡萄糖糖醛互变异构体代谢途径(map00040)相关基因显著上调表达。

2.5.4 差异转录因子 PlantTFDB 注释结果统计

如图 7 所示:共获得差异表达转录因子 360 个,按照家族对其进行分组计数,其中差异基因按照差异表达数量降序分布于 bHLH、NAC、HSF、S1、C2H2、WRKY、C3H、ERF、B3、FAR1、MYB、bZIP 等家族中。

2.6 白桦木质部原生质体细胞壁再生过程相关差异表达基因统计

白桦木质部原生质体细胞壁再生过程中,相关基因的表达差异会导致代谢的差异。植物细胞壁主要成分有纤维素、半纤维素、果胶以及木质素,其中纤维素、半纤维和果胶的单体是糖类,木质素的单体是苯丙烷基团。而核酸代谢则与磷酸戊糖途径密切

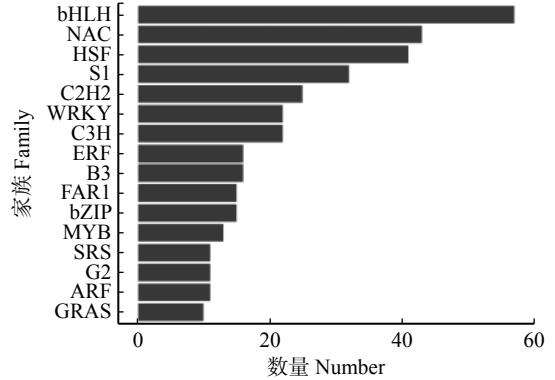


图 7 差异转录因子家族分布柱状图

Fig. 7 Histogram of differential transcription factor family distribution

相关。因此,我们从鉴定到的差异表达基因中进行筛选,结合 GO 和 KEGG 注释结果,统计出与糖代谢以及苯丙烷基代谢相关的差异基因。

2.6.1 细胞壁再生过程中核酸代谢差异表达基因

由 KEGG 富集结果可知,细胞壁再生过程中 DNA 复制旺盛。糖酵解途径和磷酸戊糖途径中相关酶的变化可影响核酸的代谢,其差异表达情况如表 3

表 3 原生质体细胞壁再生过程中相关差异基因统计

Tab. 3 DEGs in the process of cell wall regeneration

细胞壁发育相关代谢过程 Metabolic processes associated with cell wall development	差异表达基因编码的酶 Enzyme cluster of DEGs encoding	差异基因总数(上调数+下调数) Total DEGs number (up-regulation number + down-regulation number)
葡萄糖及葡萄糖酰代谢 Glucose and glucosyl metabolic	UDP葡萄糖糖醛酸转移酶 UDP-glucosyl transferase (UDPGT)	37(13 + 24)
	UDP葡萄糖转移酶 UDP-glucose transferase (UDPG)	3(3 + 0)
	果糖二磷酸酶 Fructose diphosphatase (FBP)	1(1 + 0)
	果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase (ALDO)	1(1 + 0)
	羧基转移酶家族 Glycosyl transferase family	12(0 + 12)
	糖基羟化酶家族 Glycosyl hydrolases family	9(9 + 0)
	内质网二糖结合 Di-glucose binding within endoplasmic reticulum	5(2 + 3)
	3- β 葡萄糖苷酶 3-beta-glucosidase	3(3 + 0)
	1,3-葡聚糖合成酶 1,3-beta-glucan synthase	1(1 + 0)
	6-磷酸葡萄糖羟化酶 6-phosphogluconate dehydrogenase	1(0 + 1)
木糖代谢 Xylose metabolic	6-磷酸葡萄糖异构酶 Glucosamine-6-phosphate isomerases	1(1 + 0)
	3-磷酸甘油醛脱氢酶 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1(1 + 0)
半乳糖代谢 Galactose metabolic	β -1,4-木糖基转移酶 Beta-1,4-xylosyltransferase	1(1 + 0)
	β -1,2-木糖基转移酶 Beta-1,2-xylosyltransferase	1(1 + 0)
	细胞壁相关受体激酶半乳糖醛酸结合 Wall-associated receptor kinase galacturonan-binding	10(4 + 6)
	半乳糖基转移酶 Galactosyltransferase	5(3 + 2)
	聚半乳糖醛酸酶 Polygalacturonase	5(2 + 3)
磷酸戊糖代谢 Pentose phosphate metabolic	聚半乳糖醛酸酶抑制剂 Polygalacturonase inhibitor	3(0 + 3)
	糖基水解酶 Glycosyl hydrolases	2(0 + 2)
果胶代谢 Pectic metabolism	核糖激酶 Ribokinase (RbsK)	3(3 + 0)
	6-磷酸葡萄糖脱氢酶 Phosphogluconic dehydrogenase (G6PD)	2(2 + 0)
苯丙素生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	果胶酯酶 Pectinester	6(0 + 6)
	果胶裂解酶 Pectate lyase	7(7 + 0)
	月桂醇脱氢酶 Cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD)	2(0 + 2)
	过氧化物酶 Peroxidase (POD)	6(6 + 0)

所示。在葡萄糖及葡萄糖酰代谢途径中, 鉴定到 1 个果糖-1,6-二磷酸酶(FBP, hexosediphosphatase)基因上调表达和 1 个果糖二磷酸醛缩酶(ALDO, fructose-bisphosphate aldolase)基因上调表达。磷酸戊糖途径中, 有 2 个葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD, 6-phosphate dehydrogenase)以及 3 个核糖激酶(RbsK, ribokinase)基因显著上调表达。

2.6.2 细胞壁再生过程中多糖代谢差异表达基因

从所有差异表达基因中筛选与葡萄糖、木糖、半乳糖以及果胶代谢相关的基因, 其结果如表 3 所示。鉴定到 1 个 FBP 基因上调表达, 3 个 UDP-葡萄糖转移酶(UDPG, UDP-glucose transferase)基因上调表达, 24 个消耗 UDP-葡萄糖的 UDP-葡萄糖醛酸转移酶(UDPGT, UDP-glucosyl transferase)基因表达量下调, 13 个 UDPGT 基因上调, KEGG 富集结果显示为 UDPGT 总体下调。在果胶代谢途径中, 检测到与果胶分解代谢紧密相关的 6 个果胶酯酶(PE, pectinesterase)基因下调表达以及 7 个果胶裂解酶基因的上调表达。

2.6.3 细胞壁再生过程中木质素代谢差异表达基因

在苯丙烷代谢途径中, 催化 3 种木质素前体合成的肉桂醇脱氢酶(CAD, cinnamyl-alcohol dehydrogenase)基因表达量出现明显下调, 而催化木质素合成的过氧化物酶(POD, peroxidase)基因有 6 个显著上调。

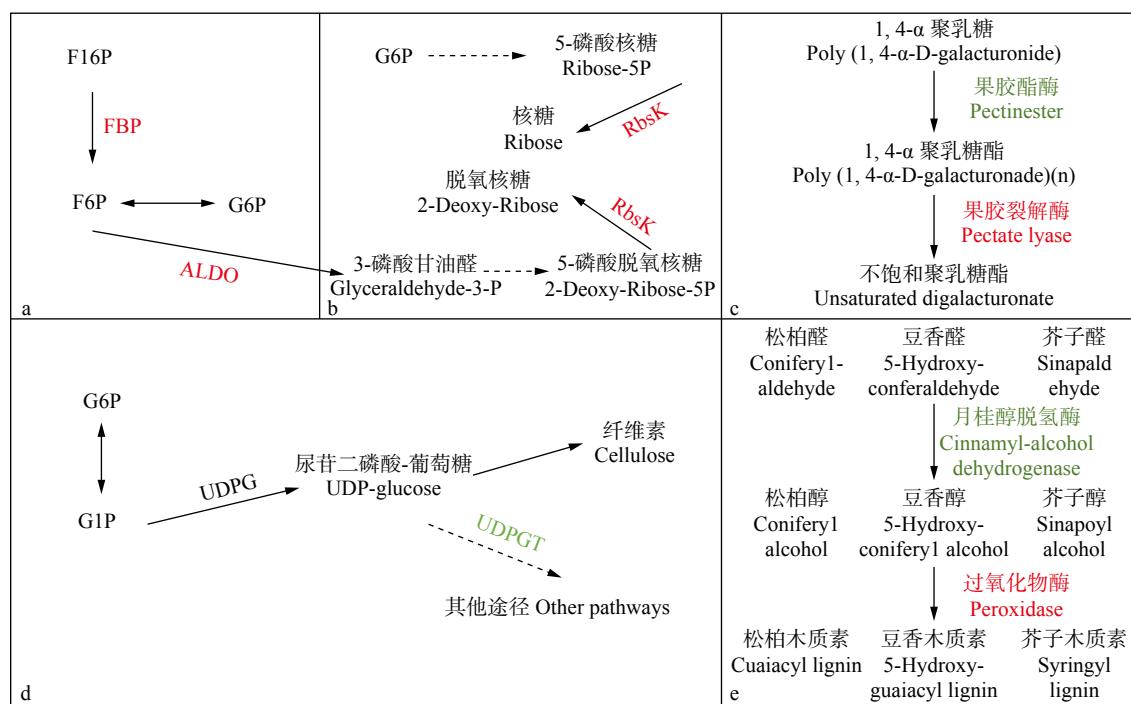
3 讨 论

在杨树木质部原生质体的研究中, 木质部原生质体在分离 48 h 内, 依然保持木质部细胞发育的状态^[19]。因此这一阶段内, 木质部原生质体细胞壁再生过程中表达的基因, 在很大程度上反应了木质部发育相关基因的表达调控情况, 这一特点是其他组织原生质体所不具备的, 因此, 分析木质部原生质体细胞壁再生过程的基因表达情况对于筛选鉴定木质部发育相关基因具有重要意义。本研究聚焦于白桦木质部原生质体细胞壁合成的分子调控及相关基因筛选, 首先对白桦木质部原生质体分离及培养技术进行了探索, 得到了活力较高的白桦木质部原生质体, 并在培养过程中利用荧光增白剂染色观察到了木质部原生质体细胞壁再生(1 h)和部分原生质体的第一次分裂(2 h)。由此推断, 培养 2 h 的白桦木质部原生质体处于细胞壁合成以及核酸复制旺盛的状态。

本研究利用 Illumina 平台高通量测序技术对刚酶解细胞壁的原生质体(0 h)和酶解后培养 2 h 的原生质体进行了转录组测序。GO 注释结果显示,

差异表达基因在 DNA 复制、细胞周期相关的条目下显著富集。结合荧光显微观察结果及相关转录组文献, 说明此时少部分原生质体处于分裂期, 大部分原生质体处于核酸合成旺盛的分裂准备期。KEGG 共注释到 10 个显著富集的代谢通路, 其中谷胱甘肽代谢(map00480)和 α -亚麻酸代谢(map00592)基因均有明显的下调表达, 这 2 个代谢通路与植物抗逆和应激密切相关^[20-25]。出现此结果的原因可能是, 在原生体分离过程中, 细胞受到了一定程度的渗透和氧化胁迫^[26], 引起抗逆性相关基因的高表达; 而在培养时, 由于培养环境较为适宜, 条件改善, 抗逆性相关的基因下调。其次, 光合作用相关代谢通路(map00195、map00860)基因有显著的上调表达。在严格避光条件下, 木质部细胞无叶绿体发育, 这些差异表达基因的出现, 可能是因为培养条件非严格避光, 一定程度上促进了细胞中叶绿体的发育^[27-28]。

在差异基因表达分析过程中, 多糖合成代谢、木质素合成等细胞壁合成相关基因表达量发生了变化。果糖-1,6-磷酸酶(FBP)催化果糖-1,6-二磷酸向果糖-6-磷酸转化, 进而促进了糖酵解途径中磷酸己糖(G6P、F6P)的积累^[29], 本研究中 FBP 基因的上调表达(图 8a), 说明该基因在细胞壁合成过程的己糖积累中起作用。另一方面, 磷酸戊糖途径中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和核糖激酶使得糖酵解途径中积累的磷酸己糖向磷酸戊糖途径中输入^[30], 本研究中鉴定的这 2 个酶基因上调表达(图 8b), 进一步说明其促进了细胞壁合成中糖的积累。在纤维素合成途径中, 尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(UDPGT)是催化 UDP-葡萄糖发生醛缩转移反应、消耗 UDP-葡萄糖的酶家族^[31]。其显著下调表达有利于 UDP-葡萄糖的积累, 一定程度上有利于纤维素的合成, 由此可以分析出本研究鉴定的下调表达的 UDPGT 基因(图 8d)在调控原生质体细胞壁纤维素合成中具有重要作用。在戊糖及葡萄糖互变异构体代谢途径中(图 8c), 本研究鉴定到 6 个果胶酯酶基因的显著下调表达和 7 个果胶裂解酶基因的上调表达。2007 年, 林河通等^[32]在研究龙眼(*Dimocarpus longan*)果实采摘后果肉自溶过程中果肉细胞壁成分变化及相关酶活差异时发现, 果胶酯酶的活性与细胞壁中果胶成分的降解量显著正相关。因此, 果胶酯酶基因的下调表达可能抑制了果胶的分解代谢, 一定程度上促进了果胶的积累, 进而影响了初生壁的合成。CAD 基因编码的肉桂醛脱氢酶将苯丙素中的醛基还原为羟基, POD 则进一步将苯丙素转化为木质素单体^[33]。本研究鉴定到 2 个 CAD 基因下调表达, 6 个 POD 基因



F16P. 果糖-1,6-二磷酸 1,6-fructose diphosphate; F6P. 果糖-6-磷酸 fructose 6-phosphate; G6P. 葡萄糖-6-磷酸 glucose 6-phosphate; G1P. 磷酸葡萄糖 glucose 1-phosphate; 红色文本代表基因的上调; 绿色文本代表基因的下调; 实线单箭头代表不可逆反应; 实线双箭头代表可逆反应; 虚线单箭头代表多步反应。Red text refers to gene up-regulation, the green text refers to gene down-regulation, the solid single arrow represents an irreversible reaction, the solid double arrow represents the reversible reaction, the dotted single arrow represents the multistep reaction.

图8 糖酵解(a)、磷酸戊糖(b)、戊糖及葡萄糖互变异构体(c)、纤维素合成(d)和苯丙烷代谢(e)途径差异示意图

Fig. 8 Schematic diagram of differences in glycolysis (a), pentose phosphate (b), pentose and glucuronate interconversions (c), cellulose synthesis (d) and phenylpropanoid metabolism pathway (e)

上调表达。苯丙烷代谢途径中的 *CAD* 基因的下调表达使得木质素前体的合成减少。从动力学角度来看,相较于过氧化物的分解反应,醛到羟基的反应为慢反应,因此肉桂醇脱氢酶为限速反应。即使催化醛体向木质素转化的 *POD* 基因表达量上升,木质素的合成依然受到了抑制,这可能是因为培养 2 h 内的细胞壁再生过程主要合成初生壁,次生壁合成受到了抑制。

转录因子差异分析中,共注释到 360 个差异显著的转录因子,主要分布于 bHLH、NAC、HSF、S1、C2H2、WRKY、C3H、ERF、B3、FAR1、MYB、bZIP 等家族中。已有研究显示, bHLH^[34]、NAC^[35-38]、MYB^[39-42]、bZIP^[43-46] 等家族的转录因子与细胞壁的再生有关。转录因子的表达调控是一个复杂的过程,涉及多种代谢途径,同一家族的转录因子在同一代谢途径中也存在不同的调控作用。离体原生质体培养过程存在着分裂、脱分化、响应环境刺激及细胞壁再生等多种生物学过程,转录因子在其中扮演重要角色。本研究根据 DEG 分析,初步筛选出在木质部原生质体细胞壁再生过程中差异表达的转录因子,为进一步研究木质部发育及细胞壁合成的转录调控机制及鉴定关键转录因子奠定基础。

4 结 论

本研究分离到得到活力较高的白桦木质部原生质体,组织培养过程中利用荧光增白剂染色观察到了木质部原生质体初生细胞壁再生(2 h)。相较于刚分离的原生质体,培养 2 h 的原生质体检测到上调表达的基因 4 396 个,下调表达基因 4 056 个,总计差异表达基因数量 8 452 个。GO 注释结果显示,差异表达基因在 DNA 复制、细胞周期相关的条目下显著富集。KEGG 共注释到 10 个显著富集的代谢通路,其中谷胱甘肽代谢(map00480)和 α-亚麻酸代谢(map00592)基因均有明显的下调表达,光合作用相关代谢通路(map00195、map00860)相关基因有显著的上调表达。此外,本研究共注释到 360 个差异显著的转录因子,主要分布于 bHLH、NAC、HSF、S1、C2H2、WRKY、C3H、ERF、B3、FAR1、MYB、bZIP 等家族中。本研究筛选到与糖代谢以及苯丙烷代谢相关的基因,其中在糖酵解和磷酸戊糖途径中, *FBP* 及 *RbsK* 基因上调表达, 24 个 *UDPGT* 基因显著下调;在戊糖及葡萄糖互变异构体代谢途径中, *PE* 基因显著下调;苯丙烷代谢途径中, *CAD* 基因下调表达, *POD* 基因上调表达。本研究为进一步研究

白桦木质部细胞壁合成的分子调控机制及鉴定重要调控基因奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Hong Z M, Xing Y J, Yan G Y, et al. Response of fine root morphology and anatomical structure of *Betula platyphylla* and *Populus davidiana* natural secondary forest to nitrogen deposition in Changbai Mountains[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(2): 608–620.
- [2] 张毅, 牟长城, 郑瞳, 等. 小兴安岭天然白桦林生态系统碳储量[J]. *北京林业大学学报*, 2015, 37(4): 38–47.
Zhang Y, Mou C C, Zheng T, et al. Ecosystem carbon storage of natural secondary birch forests in Xiaoxing'an Mountains of China[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2015, 37(4): 38–47.
- [3] Rastogi S, Pandey M M, Rawat A K S. Medicinal plants of the genus *Betula*: traditional uses and a phytochemical-pharmacological review[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 159: 62–83.
- [4] 李艳霞, 张含国, 邓继峰, 等. 长白落叶松木芯基本密度与材性指标相关及建筑材优良家系选择研究[J]. *北京林业大学学报*, 2012, 34(5): 6–14.
Li Y X, Zhang H G, Deng J F, et al. Correlations among wood density, wood physical mechanics index and growth trait, and selection of elite families for production of building products in *Larix olgensis*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2012, 34(5): 6–14.
- [5] 张冬梅, 鲍甫成, 张志毅. 杨树木材性状遗传学研究进展[J]. *世界林业研究*, 2002, 15(6): 21–25.
Zhang D M, Bao F C, Zhang Z Y. Advances in wood trait genetics of poplar[J]. *World Forestry Research*, 2002, 15(6): 21–25.
- [6] 王传贵, 江泽慧, 费本华, 等. 化学成分对木材细胞壁纵向弹性模量和硬度的影响[J]. *北京林业大学学报*, 2012, 34(3): 107–110.
Wang C G, Jiang Z H, Fei B H, et al. Effects of chemical components on longitudinal MOE and hardness of wood cell wall[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2012, 34(3): 107–110.
- [7] 张雨, 赵明洁, 张蔚. 植物次生细胞壁生物合成的转录调控网络[J]. *植物学报*, 2020, 55(3): 351–368.
Zhang Y, Zhao M J, Zhang W. Transcriptional regulation of plant secondary cell wall biosynthesis[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2020, 55(3): 351–368.
- [8] Cocking E C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuole[J]. *Nature*, 1960(187): 927–929.
- [9] 彭邵锋, 陆佳, 陈永忠, 等. 木本植物原生质体培养体系研究进展[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(1): 1–6.
Peng S F, Lu J, Chen Y Z, et al. Progress in the protoplast culture system of woody plants[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(1): 1–6.
- [10] Eeckhaut T, Lakshmanan P S, Deryckere D, et al. Progress in plant protoplast research[J]. *Planta*, 2013, 238(6): 991–1003.
- [11] Claudio L G, Graziano P, Ernesto P. High-throughput sequencing to detect DNA-RNA changes. [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2181: 193–212.
- [12] Xue J L, Shi K, Chen C, et al. Evaluation of response of dynamics change in bioaugmentation process in diesel-polluted seawater via high-throughput sequencing: degradation characteristic, community structure, functional genes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 403: 123579.
- [13] Inaba T, Aoyagi T, Hori T, et al. Clarifying prokaryotic and eukaryotic biofilm microbiomes in anaerobic membrane bioreactor by non-destructive microscopy and high-throughput sequencing[J]. *Chemosphere*, 2020, 254: 126810.
- [14] Chang Y M, Liu W Y, Arthur C, et al. Characterizing regulatory and functional differentiation between maize mesophyll and bundle sheath cells by transcriptomic analysis[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(1): 165–177.
- [15] Tian K, Li Y, Wang B, et al. The genome and transcriptome of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* F44 and G423: insights into adaptation to the acidic environment[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(2): 1044–1058.
- [16] Sharma R, Tan F, Jung K H, et al. Transcriptional dynamics during cell wall removal and regeneration reveals key genes involved in cell wall development in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 77(4–5): 391–406.
- [17] Trapnell C, Pachter L, Salzberg S L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(9): 1105–1111.
- [18] Wang L, Feng Z, Wang X, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 26(1): 136–138.
- [19] Lin Y C, Li W, Chen H, et al. Simple improved-throughput xylem protoplast system for studying wood formation[J]. *Nature protocols*, 2014, 9(9): 2194–2205.
- [20] 刘杏苟, 宋斯雨, 高贤贤, 等. 亚硝基谷胱甘肽还原酶 GSNOR1 正调控植物对疫霉菌的抗性[J]. *西北农业学报*, 2020, 29(10): 1–15.
Liu X S, Song S Y, Gao X X, et al. Nitroso glutathione reductase GSNOR1 for positive regulation of plant resistance against phytophthora[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2020, 29(10): 1–15.
- [21] 宋文, 单春会, 宁明, 等. 谷胱甘肽-S-转移酶在植物响应胁迫方面的研究进展[J]. *食品工业*, 2020, 41(7): 239–244.
Song W, Shan C H, Ning M, et al. Advances in research of glutathione-S-transferase in response to cold stress in plants[J]. *The Food Industry*, 2020, 41(7): 239–244.
- [22] 毕艳, 郑伟, 周涛, 等. 太子参谷胱甘肽-S-转移酶基因家族生物信息学及表达分析[J]. *广西植物*, 2020, 11(3): 1–11.
Bi Y, Zheng W, Zhou T, et al. Bioinformatics and expression analysis of glutathione-S-transferase gene family in *Pseudostellaria*[J]. *Guihaia*, 2020, 11(3): 1–11.
- [23] 于蕊. 紫斑牡丹种子 α -亚麻酸合成相关基因克隆与功能验证[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
Yu R. Cloning and functional verification of genes related to α -linolenic acid synthesis of *Paeonia rockii* seed[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2018.
- [24] 覃楠楠. 外源水杨酸对干旱胁迫下分枝结薯期甘薯植株生理指

- 标的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- Qin N N. Effects of exogenous salicylic acid on physiological indexes of sweet potato plants at branching-tubering under drought stress[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [25] 周苹, 柴颖, 黄祥辉, 等. 元麦叶肉原生质体细胞壁再生过程中的扫描电镜观察及过氧化物酶活性[J]. 实验生物学报, 1986, 19(2): 12–20.
- Zhou P, Chai Y, Huang X H, et al. Scanning electron microscope observation and peroxidase activity in protoplast cell wall regeneration of rice wheat mesophyte[J]. Journal of Experimental Biology, 1986, 19(2): 12–20.
- [26] 刘梅, 李祖然, 张光群, 等. 野生小花南芥体内 AsA-GSH 循环对土壤 Cd、Pb 胁迫的响应[J]. 农业资源与环境学报, 2020, 11(3): 1–13.
- Liu M, Li Z R, Zhang G Q, et al. Response of ascorbate-glutathione cycle in wild *Arabidopsis* L. to soil Cd and Pb stress[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2020, 11(3): 1–13.
- [27] 邵青. 裸藻光响应下叶绿体发育相关的初步研究[D]. 深圳: 深圳大学, 2018.
- Shao Q. A preliminary study on chloroplast development in euglenophyta under light response[D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2018.
- [28] 王成孜. 光照强度对超级稻和常规稻苗期光合特性影响的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- Wang C Z. Effects of light intensity on photosynthetic characteristics of super rice and conventional rice at seedling stage[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.
- [29] Marcus F, Rittenhouse J, Gontero B, et al. Function, structure and evolution of fructose-1,6-bisphosphatase[J]. Archivos de biología y medicina experimentales, 1987, 20(3–4): 371–378.
- [30] Kornberg A, Horecker B L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase[J]. Method Enzymol, 1956, 1: 323.
- [31] Rajaonarison J F, Lacarelle B, De S G, et al. In vitro glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine by human liver: role of UDP-glucuronosyltransferase 2 form[J]. Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals, 1991, 19(4): 809–815.
- [32] 林河通, 赵云峰, 席芳. 龙眼果实采后果肉自溶过程中细胞壁组分及其降解酶活性的变化[J]. 植物生理与分子生物学报, 2007, 33(2): 137–145.
- Lin H T, Zhao Y F, Xi F. Changes in cell wall components and cell wall-degrading enzyme activities of postharvest longan fruit during aril breakdown[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2007, 33(2): 137–145.
- [33] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54(1): 519–546.
- [34] 李欣, 李影, 曲子越, 等. bHLH 转录因子在茉莉酸信号诱导植物次生产物合成中的作用及分子机制[J]. 植物生理学报, 2017, 53(1): 1–8.
- Li X, Li Y, Qu Z Y, et al. The molecular mechanism and the function of bHLH regulating jasmonic acid mediated secondary metabolic synthesis[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(1): 1–8.
- [35] 刘佳欣. *BpNAC012* 基因调控木质部发育基因表达谱分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018.
- Liu J X. Expression profile analysis of *BpNAC012* gene regulating xylem development[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2018.
- [36] Ohnsson C, Jin X, Xue W, et al. The plant hormone auxin directs timing of xylem development by inhibition of secondary cell wall deposition through repression of secondary wall NAC-domain transcription factors[J]. Physiologia Plantarum, 2019, 165(4): 673–689.
- [37] Laubscher M, Brown K, Tonfack L B, et al. Temporal analysis of *Arabidopsis* genes activated by *Eucalyptus grandis* NAC transcription factors associated with xylem fibre and vessel development[J]. Scientific Report, 2018, 8(1): 10983.
- [38] Yamaguchi M, Ohtani M, Mitsuda N, et al. VND-INTERACTING2, a NAC domain transcription factor, negatively regulates xylem vessel formation in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2010, 22(4): 1249–63.
- [39] 张明亮. 水稻 MYB 转录因子调控细胞壁合成分子机理及秸秆酶解产糖因子研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- Zhang M L. Molecular mechanism of MYB transcription factor regulating cell wall synthesis in rice and study on enzymatic hydrolysis of straw to produce sugar factor[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016.
- [40] Jiao B, Zhao X, Liu W X, et al. The R2R3 MYB transcription factor MYB189 negatively regulates secondary cell wall biosynthesis in *Populus*[J]. Tree Physiology, 2019, 39(7): 1187–1200.
- [41] Morse A M, Whetten R W, Dubos C, et al. Post-translational modification of an R2R3-MYB transcription factor by a MAP kinase during xylem development[J]. New Phytologist, 2009, 183(4): 1001–1013.
- [42] Patzlaff A, McInnis S, Courtenay A, et al. Characterisation of a pine MYB that regulates lignification[J]. Plant Journal, 2003, 36(6): 743–754.
- [43] 王莲萍, 王博, 王瑞, 等. 白桦 2 个 bZIP 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(9): 2811–2817.
- Wang L P, Wang B, Wang R, et al. Cloning and expression analyses of two bZIP genes from *Betula platyphylla*[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(9): 2811–2817.
- [44] Wang H, Yang J H, Chen F, et al. Transcriptome analysis of secondary cell wall development in *Medicago truncatula*[J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 23.
- [45] Li W Y, Yu D, Yu J J, et al. Functional analysis of maize silk-specific ZmbZIP25 promoter[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(3): 822.
- [46] Schumann S T, Ringli C, Heierli D, et al. In vitro binding of the tomato bZIP transcriptional activator VSF-1 to a regulatory element that controls xylem-specific gene expression[J]. Plant Journal, 1996, 9(3): 283–296.

(责任编辑 范娟 赵田芸
责任编辑 卢孟柱)