

欧美山杨杂种插穗不定根 2 个发育时期基因表达谱分析

闫绍鹏¹ 尚艳茹¹ 冷淑娇¹ 杨瑞华² 王秋玉¹

(1 东北林业大学生命科学学院 2 黑龙江省农业科学院园艺分院)

摘要:以欧美杂种山杨嫩枝插穗为实验材料,进行扦插不定根生成过程中插穗形态和解剖学观察,通过 Solexa 高通量测序对扦插后 6 和 12 d 插穗不定根生成部位进行转录水平上的检测分析。插穗解剖观察发现扦插后 6 d 为根原基的诱导期,12 d 为不定根的伸生长长期,对插穗不定根 2 个时期高通量测序获得差异表达基因 2 328 个。对筛选出的显著差异表达基因进行功能注释、分类和 KEGG 及 pathway 分析,确定 2 个山杨样本中差异表达基因参与的生化代谢和信号转导途径。

关键词:杂种山杨; 基因表达谱; 扦插; 差异表达

中图分类号:S718.43 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2015)10-0009-05

YAN Shao-peng¹; SHANG Yan-ru¹; LENG Shu-jiao¹; YANG Rui-hua²; WANG Qiu-yu¹. **Gene expression profile of aspen hybrid cuttings in two developing stages of the adventitious root.**

Journal of Beijing Forestry University(2015)37(10) 9-13 [Ch,13 ref.]

1 College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang, 150040, P. R. China;

2 Horticultural Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang, 150069, P. R. China.

We used *Populus tremula* × *P. tremuloides* softwood cuttings as experimental material, and observed morphological and anatomical changes of the cuttings during the rooting process of adventitious roots. Solexa high-throughput sequencing was performed for the parts of cuttings where adventitious roots generated 6 days and 12 days after cutting (DAC) at transcriptional level. Anatomical observation showed that the induction stage of the adventitious root primordia was 6 days after cutting and the elongation stage of adventitious roots was 12 days after cutting. A total of 2 328 differentially expressed genes were obtained by the Solexa high-throughput sequencing. The significantly differential expression genes were classified after their functions annotation, and then the KEGG passway analysis was carried out. On this basis, the biochemical metabolic and signal transduction pathways of these differentially expressed genes were determined.

Key words hybrid aspen; gene expression profile; cutting; differential expression

欧美山杨杂种 (*Populus tremula* × *P. tremuloides*) 是 2001 年从芬兰林业科学研究院引进的优良无性系,并由东北林业大学林木遗传育种学科利用微体繁殖技术进行大量繁殖,用于田间无性系测定。该树种具有树形高大、生长速度快、耐寒冷、环境适应性强等优点,在适宜立地条件下,能够

快速的恢复森林生态环境,成为寒温带广泛推广的优良造林树种。欧美山杨杂种秋季叶色红艳,可作为观赏价值较高的园林绿化树种,该树种还具有材质洁白、柔软、细腻等优点,在林产工业中逐渐成为了造纸、胶合板生产的优良原料^[1]。

插穗不定根的形成是无性系扦插繁殖成活的关键

收稿日期: 2013-12-25 修回日期: 2015-06-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(J1210053)、中央高校基本科研业务费专项(2572014CA22)。

第一作者: 闫绍鹏,博士,高级工程师。主要研究方向:林木遗传学。Email: ysp_4@126.com 地址:150040 黑龙江省哈尔滨市香坊区和兴路 26 号东北林业大学生命科学学院。

责任作者: 王秋玉,博士,教授。主要研究方向:林木遗传学。Email: wqyll@sina.com.cn 地址:同上。

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

键因素。前人的研究成果主要集中在提高插穗成活率的处理措施^[2]和扦插过程中插穗在解剖学、植物生理学、生物化学等方面的变化进行研究^[3]。近年来,随着植物功能基因组学和高通量测序技术的快速发展,不定根发生发育的研究逐渐深入到基因^[4]、蛋白表达调控水平^[5]。插穗不定根发生分子调控机制和不定根发生相关的重要基因成为研究的热点^[6]。

本研究利用 Solexa (Illumina) 高通量测序技术对欧美山杨杂种嫩枝插穗不定根发育的 2 个时期(诱导期和伸长期)进行基因表达谱分析,探讨了影响插穗不定根发育的相关基因表达情况及其功能,为杨树分子育种提供相应的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以东北林业大学林木遗传育种学科实验基地山杨杂种采穗圃 13 号无性系母株为材料,于 2011 年 3 月中旬选取生长状况良好,粗细适中的 1 年生枝条在温室中进行扦插繁殖,插穗长度 3~4 cm,保留部分叶片,沙土作为扦插基质,扦插前用 100 mg/L NAA 溶液处理插穗基部 30 min。扦插后,室温 25 °C,湿度 70% 培养,保持充足光照。

1.2 扦插过程中插穗形态和解剖学观察

扦插后每天观察插穗外部形态变化,0、6、9、12 d 切取插穗基部的茎段 1 cm,FAA 固定。用石蜡切片法研究嫩枝插穗不定根发生过程中的解剖学变化。

1.3 欧美山杨杂种插穗基部 RNA 的提取及检测

在扦插后 6 d (6DAC, days after cutting) 和 12 d (12DAC) 分别取插穗基部(生根部位)作为实验材料。取材后迅速用液氮冷冻,带回实验室 -80 °C 保存用于 RNA 提取和测序分析。对 2 个时期的欧美杂种山杨插穗提取总 RNA,利用 Agilent 2100 生物分析仪测量杂种山杨的总 RNA 质量,取浓度 $\geq 3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$,总量 $\geq 60 \mu\text{g}$, $\text{OD}_{260/280}$ 为 1.8~2.2, RIN ≥ 8 的 RNA 样品送往华大基因测序分析。

1.4 Illumina/Solexa 测序数据的处理

测序得到的原始序列去除 3' 接头(adaptor)序列、空载读长(reads)、低质量标签(Tag)及长度过小和过大的 Tag 等数据,得到高质量读长(clean reads),作为后续分析的基础。对测序结果进行饱和度和分析,检验随着测序量的增加,检测到的基因是否随之上升。使用 SOAPaligner /soap2 软件^[7]将 clean reads 分别比对到毛果杨(*Populus trichocarpa*)参考基因组和参考基因序列,最多允许 1 个碱基错配。对其中成功比对的唯一基因标签(Unambiguous Tags)进行基因功能注释,统计与其对应的原始高质量标签(Clean Tag)数,然后对原始 Clean Tag 数目做数据标准化处理,使用 RPKM (Reads per kb per million reads) 法计算基因表达量^[8]。基因表达量符合 $\text{FDR} (\text{False Discovery Rate}) \leq 0.001$ 且 $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1$ 的基因被定义为差异表达的基因, $\text{FDR} (\text{False Discovery Rate}) \leq 0.001$ 且 $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 2$ 的基因被定义为显著差异表达的基因。对所有差异表达基因进行了 GO (Gene Ontology) 功能分类,利用 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库定位分析代谢途径(pathway)。

2 结果与分析

2.1 欧美杂种山杨扦插生根过程中解剖学观察

对扦插后 0、6、9、12 d 的插穗基部材料进行解剖学观察(图 1)。扦插 0 d 的插穗基部横切面具有完整的髓、木质部、形成层、韧皮部、皮层、表层结构;扦插后 6 d,插穗韧皮部部分薄壁细胞开始快速分裂,数量显著增多,向皮层方向生长,这一时期并未看到根原基的形成,为根原基的诱导期,在外部形态上表现为插穗下切口处组织变得松散、开裂;扦插后 9 d,薄壁细胞继续分裂,分生能力增强,开始出现分层,基本形成根原基,分生后的细胞染色较深。早期分生的细胞紧密排列,保护其后面的分生细胞向前分裂生长。插穗上出现不同生长进度的根原基,发育较快的已经冲断韧皮纤维,但尚未突破表皮,外部形态上表现为插穗上乳白色突起,此过程为不定根

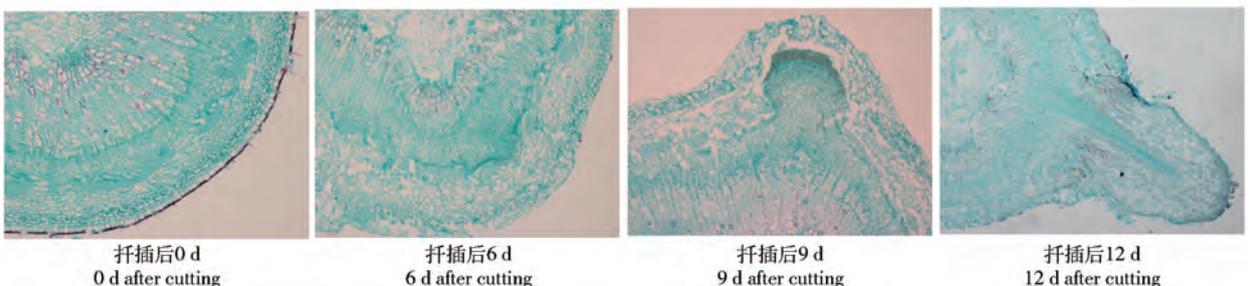
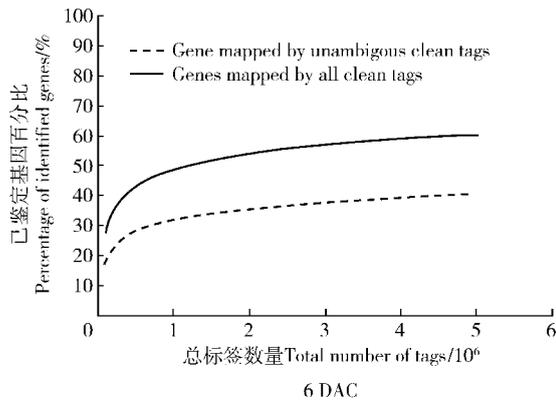


图 1 欧美山杨插穗扦插生根过程中的形态解剖学特征

发育的起始时期;扦插后 12 d, 根原基细胞突破表皮并不断进行伸长生长, 最终形成具有根冠、分生区和伸长区结构的完整不定根, 此阶段为不定根的伸长生长时期。在外部形态上, 不定根已经形成, 进行伸长生长。根据生根过程的解剖及外部形态观察, 选择扦插后 6 和 12 d 2 个样本进行基因表达谱分析。这 2 个时期包含了插穗不定根的诱导、起始和伸长生长过程, 在根生长相关基因转录表达中具有较强的代表性。

2.2 测序饱和度分析

获得样品测序数据量多少的衡量标准称为测序



饱和度。随着 Tag 数量的持续增加, 能够检测到的基因数目也相应上升, 当达到一定测序数据量时, 能够检测到的基因数目增长缓慢至停止, 说明此时检测到的基因数目已经趋于饱和。6DAC 和 12DAC 样品的测序饱和度见图 2, 当各样品测序量达到 2×10^6 Tags 以上时, 标签种类增加的趋势变缓, 当 2 个样本测序量达到 3×10^6 Tags 以上时, 已鉴定的基因数不再增加, 说明测序量已基本覆盖细胞中表达的全部基因, 即欧美山杨杂种插穗不定根发育的 2 个时期样品测序已达饱和。

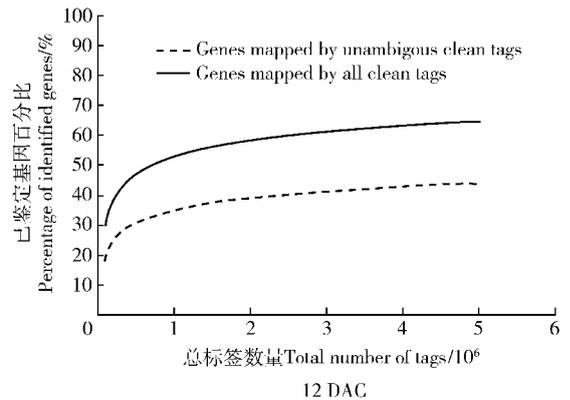


图 2 测序饱和度分析

Fig. 2 Sequencing saturation analysis

2.3 显著性差异表达基因的筛选及功能分析

将所有 Clean Tags 与参考基因标签库进行比对注释, 然后进行 2 组样品的基因对比, 筛选差异表达基因。经过比对分析发现 95% 的转录样本在 2 组样品中表达水平相似, 基因表达差异都在 5 倍以内。只有 5% 的基因表达差异倍数在 5 倍以上。

选择差异倍数在 2 倍以上的表达显著差异基因, 去掉未知和预测功能基因, 利用 GO 分析将功能确定的转录本分为 12 类(表 1)。从表 1 可见, 在扦插后的 2 个时期 6 DAC 与 12 DAC 发现有 322 个显著差异表达基因, 其中上调表达 80 个, 下调表达 242 个。在这 12 类功能中, 富集度程度最高的是新陈代谢 (24.53%), 其次是离子吸收和细胞运输 (19.57%) 和氧化还原 (11.8%)。杂种山杨插穗不定根在伸长期发生了更复杂的分子事件, 促使大量与不定根伸长相关基因的表达。

对 2 个样品库(6DAC vs 12DAC)中 5 倍以上显著差异表达基因进行功能分析, 主要功能为肌动蛋白解聚因子 (actin depolymerizing factor)^[9]、生长素输出载体 (auxin efflux carrier component)^[10]、ABC 转运蛋白 (ABC transporter family protein)^[11]、GH3 家族蛋白 (GH3 family protein)^[12] 等基因为上调表

达。 β -1,3 葡聚糖苷酶 (beta-1,3 glucanase), 细胞色素 P450 (cytochrome P450) 等基因为下调表达, 这些基因在以前的研究中发现与不定根发育相关。这些基因在扦插生根过程中的具体功能还需今后深入研究。

2.4 Pathway 分析

为确定差异表达基因参与的生化代谢途径, 阐明插穗不定根发生、发育过程中主要发生的分子事件, 对插穗不定根 2 个发育时期差异表达基因进行 Pathway 功能富集分析。

通过对 6DAC 和 12DAC 样品差异表达基因的 pathway 显著性富集分析, 得到了插穗不定根发生发育过程中差异表达基因数目较多的 10 个途径(表 2)。在插穗不定根形成的诱导期(6DAC)和伸长期(12DAC)差异表达基因主要集中在新陈代谢、剪接体、核糖体、蔗糖代谢、糖酵解、泛素介导的蛋白酶解等代谢途径。其中最显著富集的路径是新陈代谢途径, 共有 379 个基因与此相关, 占显著差异表达基因总数的 16.93%, 这与扦插生根过程插穗需要大量营养物质的合成和分解相吻合。其次是剪接体途径, 共涉及 98 个基因, 占显著差异表达基因总数的 4.38%; 第 3 为核糖体蛋白, 共涉及到 72 个基因, 占

表1 6DAC vs 12DAC 差异表达基因的功能分类

Tab.1 Functional classification of differentially expressed genes in 6 days after cutting (DAC) vs 12 DAC

序号 No.	功能分类 Functional category	上调基因 Up-regulate gene		下调基因 Down-regulate gene		合计 Total	
		数目/个 Numbers	百分比/% Percent	数目/个 Numbers	百分比/% Percent	数目/个 Numbers	百分比/% Percent
		1	新陈代谢 Metabolism	23	7.14	56	17.39
2	离子吸收和细胞运输 Ion uptake and cellular transport	15	4.66	48	14.91	63	19.57
3	氧化还原 Axidoreduction	12	3.73	26	8.07	38	11.80
4	细胞骨架和染色质结构 Cyteskeleton and chromatin structure	7	2.17	27	8.38	34	10.55
5	转录调控 Transcription regulation	4	1.24	23	7.14	27	8.38
6	生长素相关 Auxin related	6	1.86	18	5.57	24	7.43
7	蛋白结合作用 Protein binding function	1	0.31	15	4.66	16	4.97
8	防御 Defense	4	1.24	10	3.11	14	4.35
9	信号通路 Signal pathway	3	0.93	10	3.11	13	4.04
10	细胞壁代谢 Cell wall metabolism	4	1.24	2	0.62	6	1.86
11	光合作用 Photosynthesis	0	0	4	1.24	4	1.24
12	细胞增殖 Cell proliferation	1	0.31	3	0.93	4	1.24
13	合计 Total	80	24.83	244	75.15	322	100

表2 6DAC vs 12DAC 差异表达基因 Pathway 分析

Tab.2 Pathway enrichment analysis of differential expressed genes between 6DAC and 12DAC

序号 No.	途径名 Pathway	差异表达基因 Differential expressed genes		总注释基因 Total gene		P 值 P value
		数目/个 Numbers	百分比/% Percent	数目/个 Numbers	百分比/% Percent	
		1	新陈代谢 Metabolic pathways	379	16.93	
2	剪接体 Spliceosome	98	4.38	715	3.36	0.003711
3	核糖体 Ribosome	72	3.22	438	2.06	8.41×10^{-5}
4	蔗糖代谢 Sucrose metabolism	66	2.95	534	2.53	0.043031
5	糖酵解 Glycolysis	49	2.19	266	1.25	6.88×10^{-5}
6	泛素调控的蛋白酶解 Ubiquitin mediated proteolysis	43	1.96	307	1.45	0.031487
7	嘌呤代谢 Purine metabolism	41	1.83	367	1.72	0.054554
8	柠檬烯和 α -蒎烯降解 Limonene and pinene degradation	32	1.43	408	1.92	0.042428
9	氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	30	1.36	215	1.04	0.066006
10	细胞周期 Cell cycle	30	1.35	491	2.40	0.049789
11	其他 Others	1132	51.03	12477	58.63	
12	合计 Total	2328	100	21281	100	

显著差异表达基因总数的 3.22% ;这两个途径均与基因的转录和蛋白质的合成有关。最后依次为蔗糖代谢、以及糖酵解过程,分别涉及 66 和 49 个基因,占显著差异表达基因总数的 2.95% 和 2.19% ,这两个途径是重要的糖代谢途径,产生大量 ATP 和 NADPH,为细胞的物质合成以及细胞分裂延伸提供能量。

3 结论与讨论

插穗不定根发育是扦插过程的一个重要阶段。利用 Solexa 高通量测序技术对扦插生根过程的 2 个时期进行研究,获得与不定根发育相关的基因,分析基因的表达以及在生根过程中所参与的生物代谢过程,揭示插穗不定根生成的分子机制。

对杂种山杨插穗不定根诱导和伸长期材料的高通量测序文库进行比对分析,筛选出差异表达基因并对其进行功能分类,主要包括新陈代谢、离子吸收和细胞运输、氧化还原、细胞骨架和染色体结构、转录调控、生长素相关等功能类别。研究表明,杂种山杨不定根发育过程中差异表达基因主要集中在新陈代谢、剪接体、糖类代谢、核糖体、泛素介导的蛋白质的降解、糖酵解、细胞周期等代谢途径。

高通量测序技术具有海量数据、可靠性高、实验操作简单等优点,如今已经广泛应用于生命科学各个研究领域^[13]。但是测序获得的海量数据的分析为研究人员在专业性和生物信息学分析方面的能力提出了更高的要求。本研究首次对欧美山杨杂种插穗不定根发育过程中基因表达的变化进行了全面检测,对不定根发育过程中的诱导期和伸长期涉及到的基因进行了功能分析,为今后杨树基因工程育种提供理论依据。

参 考 文 献

[1] 闫绍鹏. 欧美山杨杂种无性系低温胁迫下几种生理指标的遗传变异[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2004.

YAN S P. Genetic variation among the hybrid clones of *Populus tremula* × *P. tremloides* in several physiological characteristics under low temperature stress [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2004.

[2] ROSIER C L, FRAMPTON J, GOLDFARB B, et al. Growth stage, auxin type, and concentration, influence rooting of Virginia pine stem cuttings[J]. Hortscience, 2004, 39(6): 1397-1402.

[3] SYROS T, YUPSANIS T, ZAFIRIADIS H, et al. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L [J]. Journal of Plant Physiology, 2004, 16(1): 69-77.

[4] 冷淑娇. 欧美山杨插穗不定根发育的诱导期和伸长期数字表达谱分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.

LENG S J. Analysis of the digital gene expression profiling of *Populus tremula* × *P. tremloides* cuttings development during adventitious roots induction and adventitious roots elongation[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2012.

[5] BRINKER M, ZYL L, LIU W B, et al. Microarray analyses of gene expression during adventitious root development in *Pinus contorta*[J]. Plant Physiology, 2004, 135: 1526-1539.

[6] RIGAL A, YORDANOV Y S, PERRONE I, et al. The AINTEGUMENTA LIKE1 homeotic transcription factor PtAIL1 controls the formation of adventitious root primordia in poplar[J]. Plant Physiol, 2012, 160: 1996-2006.

[7] LI R Q, YU C, LI Y R, et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment[J]. Bioinformatics, 2009, 25(15): 1966-1967.

[8] MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nature Methods, 2008, 5(7): 621-628.

[9] THOMAS P, SCHIEFELBEIN J. Cloning and characterization of an actin depolymerizing factor gene from grape (*Vitis inifera* L.) expressed during rooting in stem cuttings [J]. Plant Science, 2002, 162: 283-288.

[10] SWARUP R, FRIML J, MARCHANT A, et al. Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex[J]. Genes Dev, 2001, 15: 2648-2653.

[11] WU G S, DANIEL R L, EDGAR P. Spalding, mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development[J]. The Plant Cell, 2007, 19(6): 1826-1837.

[12] DING X H, CAO Y L, HUANG L L, et al. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice[J]. The Plant Cell January, 2008, 20(1): 228-240.

[13] 闫绍鹏, 杨瑞华, 冷淑娇, 等. 高通量测序技术及其在农业科学研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2012, 28(30): 171-176.

YAN S P, YANG R H, LENG S J, et al. High-fluxed DNA sequencing technology and its application in agricultural science research [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(30): 171-176.

(责任编辑 赵 勃
责任编辑委 赵秀海)