

农业生物技术

利用 RNA-Seq 技术鉴定拟南芥不定芽再生相关的转录因子

王兴春^{1,2}, 陈钊³, 樊娟¹, 何苗苗¹, 韩渊怀^{2,4}, 杨致荣³

1 山西农业大学生命科学学院, 山西 太谷 030801

2 山西农业大学农业生物工程研究所, 山西 太谷 030801

3 山西农业大学文理学院, 山西 太谷 030801

4 农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室, 山西 太原 030031

王兴春, 陈钊, 樊娟, 等. 利用 RNA-Seq 技术鉴定拟南芥不定芽再生相关的转录因子. 生物工程学报, 2015, 31(4): 552–565.

Wang XC, Chen Z, Fan J, et al. Identifying transcription factors involved in *Arabidopsis* adventitious shoot regeneration by RNA-Seq technology. Chin J Biotech, 2015, 31(4): 552–565.

摘 要: 转录调控是不定芽再生过程的主要调控方式之一, 但具体机制尚需进一步研究。为此, 利用基于 Illumina HiSeq™ 2000 测序平台的 RNA-Seq 技术分析了不定芽再生缺陷突变体 *bel-3* 和野生型 WS 在愈伤形成和不定芽再生过程以及野生型 WS 从脱分化向再分化转变过程差异表达的转录因子 (Transcription factor, TF) 编码基因。结果表明: 与野生型 WS 相比, *bel-3* 在脱分化过程差异表达的 TF 编码基因有 155 个, 其中表达量上调的 97 个, 表达量下调的 58 个; 在再分化过程差异表达的 TF 编码基因有 68 个, 其中表达量上调的 40 个, 表达量下调的 28 个; 而在野生型 WS 从脱分化向再分化转变的过程, 总共检测到 231 个差异表达的 TF 编码基因, 包括 160 个表达量上调的基因和 71 个表达量下调的基因。其中, MYB-related (*v-myb* 禽成髓细胞瘤病毒癌基因) 家族的不定芽相关转录因子基因 *ART1* 在 *bel-3* 突变体脱分化阶段的表达量提高了 3 217 倍, 是表达量上调最大的 TF 编码基因。进一步研究发现, 该基因过量表达导致愈伤形成和不定芽再生缺陷, 并抑制了幼苗特别是主根的生长发育, 表明该基因是愈伤形成和不定芽再生过程的一个负调控因子。本研究不仅加深了人们对不定芽再生转录调控机制的认识, 而且为今后不定芽再生相关转录因子的研究提供了大量候选基因信息。

关键词: 不定芽再生, 愈伤组织形成, RNA-Seq, 转录因子, 转录调控, 拟南芥

Received: November 4, 2014; **Accepted:** December 11, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31100235), Natural Science Foundation of Shanxi (No. 2013011028-1), Shanxi Scholarship Council of China (No. 2010050).

Corresponding author: Xingchun Wang. Tel: +86-354-6287191-307; E-mail: wxingchun@163.com

Zhirong Yang. Tel: +86-354-6288341; E-mail: zryangsx@163.com

国家自然科学基金 (No. 31100235), 山西省自然科学基金 (No. 2013011028-1), 山西省回国留学人员科研资助项目 (No. 2010050) 资助。

网络出版时间: 2015-02-03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20150203.1622.003.html>

Identifying transcription factors involved in *Arabidopsis* adventitious shoot regeneration by RNA-Seq technology

Xingchun Wang^{1,2}, Zhao Chen³, Juan Fan¹, Miaomiao He¹, Yuanhuai Han^{2,4},
and Zhirong Yang³

1 College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

2 Institute of Agricultural Bioengineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

3 College of Arts and Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

4 Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Taiyuan 030031, Shanxi, China

Abstract: Transcriptional regulation is one of the major regulations in plant adventitious shoot regeneration, but the exact mechanism remains unclear. In our study, the RNA-seq technology based on the Illumina HiSeq™2000 sequencing platform was used to identify differentially expressed transcription factor (TF) encoding genes during callus formation stage and adventitious shoot regeneration stage between wild type and adventitious shoot formation defective mutant *bel-3* and during the transition from dedifferentiation to redifferentiation stage in wildtype WS. Results show that 155 TFs were differentially expressed between *bel-3* mutant and wild type during callus formation, of which 97 genes were up-regulated, and 58 genes were down-regulated; and that 68 genes were differentially expressed during redifferentiation stage, with 40 genes up-regulated and 28 genes down-regulated; whereas at the transition stage from dedifferentiation to redifferentiation in WS wild type explants, a total of 231 differentially expressed TF genes were identified, including 160 up-regulated genes and 71 down-regulated genes. Among these TF genes, the adventitious shoot related transcription factor 1 (*ART1*) gene encoding a MYB-related (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) TF, was up-regulated 3 217 folds, and was the highest up-regulated gene during *bel-3* callus formation. Over expression of the *ART1* gene caused defects in callus formation and shoot regeneration and inhibited seedling growth, indicating that the *ART1* gene is a negative regulator of callus formation and shoot regeneration. This work not only enriches our knowledge about the transcriptional regulation mechanism of adventitious shoot regeneration, but also provides valuable information on candidate TF genes associated with adventitious shoot regeneration for future research.

Keywords: adventitious shoot regeneration, callus formation, RNA-Seq, transcription factor, transcriptional regulation, *Arabidopsis thaliana*

作为植物再生完整植株的主要方式之一，不定芽再生不仅广泛应用于植物快速繁殖，而且是利用生物技术进行作物遗传改良的前提和基础^[1]。植物激素尤其是细胞分裂素和生长素是影响不定芽再生的最主要因素。经典的拟南芥两步不定芽再生法即是通过调控这两种激素的比例来实现的：第一步，将拟南芥外植体在含有高浓度 2,4-D 的愈伤诱导培养基 (Callus

induction medium, CIM) 上进行预培养。经过预培养，即可在外植体中柱鞘部位形成愈伤组织^[2]；第二步，将愈伤组织再转移到含有高浓度细胞分裂素的不定芽诱导培养基 (Shoot induction medium, SIM) 继续培养，即可分化出不定芽^[3]。因此，人们曾经乐观地认为只要合理调控细胞分裂素和生长素的比例，所有植物的组织或器官都能经过不定芽再生出完整植

株。但时至今日,有些植物的离体再生仍非常困难,这极大地限制了基因功能的研究和重要农艺性状基因的应用。长期以来,人们普遍认为愈伤组织的形成是体细胞重编程从而回到一种未分化状态的过程。但 Sugimoto 等^[4]的研究表明,各种器官形成的愈伤组织基因表达模式与根顶端分生组织的基因表达模式类似;而且愈伤组织和侧根的起始受到相同基因的调控,影响拟南芥侧根发育的基因同样也会影响植物离体器官发生。该研究从根本上改变了人们认为愈伤组织是未分化的细胞这一传统观念,使人们对不定芽再生机制有了更清晰的认识。

上述细胞分裂素和生长素调控不定芽再生的过程实质上是相关基因被激活或抑制的过程,在这一过程中转录因子起着极其重要的作用^[5]。LBD (Lateral organ boundaries domain) 家族的 *LBD16*、*LBD17*、*LBD18* 和 *LBD29* 位于生长素信号下游,在 CIM 培养基上被迅速诱导表达^[6]。这 4 个基因中的任何一个过量表达都会促进愈伤组织的形成;相反,功能缺失后导致愈伤形成能力受阻,表明 LBDs 转录因子是愈伤形成所必需的^[6]。类似的,细胞分裂素早期响应的关键因子 B 型 ARR 在不定芽再生过程也起着关键的作用,而 B 型 ARR 是一类 MYB 转录因子^[7-8]。APETALA2 (AP2) 家族的 *ESR1* (Enhancer of shoot regeneration 1) 是细胞分裂素信号下游的调控因子,过量表达 *ESR1* 及其同源基因 *ESR2* 可以促进不定芽的再生^[9-11]。对 *ESR1* 和 *ESR2* 功能缺失突变体 *esr1* 和 *esr2* 的分析表明,单突变体不定芽再生能力都明显下降,而且 *esr1 esr2* 双突变体不定芽再生能力比任何一个单突变体都差,暗示了这两个基因存在功能冗余^[11]。AP2 家族的另一成员 *RAP2.6L* 的表达量在不定芽分

化过程中显著增加,而该基因的突变则影响了芽分生组织特异基因的表达从而导致不定芽分化频率降低^[12]。*LFY* (Leafy) 转录因子是一个调控植物从营养生长向生殖生长转变的关键因子^[13]。当 *LFY* 基因过量表达时,拟南芥根外植体可以直接再生出花器官,表明花发育相关基因在花器官离体再生过程也同样起着重要的作用^[14]。尽管如此,人们对不定芽再生过程仍缺乏系统深入的认识。高通量测序技术的出现,使得大规模系统分离和鉴定不定芽再生相关转录因子成为可能^[15-17]。

最近,我们在拟南芥中发现了一个编码糖苷水解酶 13 家族的 *BE1* (Branching enzyme 1) 基因,该基因的 EMS 点突变体 *be1-3* 愈伤形成和不定芽再生严重受阻^[18]。为了阐明不定芽再生过程的转录调控机制,我们利用 RNA-Seq 技术检测了 *be1-3* 突变体与野生型在愈伤形成和不定芽再生两个阶段以及野生型从脱分化向再分化转变过程差异表达的基因,从中发现一大批相关的转录因子,并对其中一个负调控因子 *ART1* (Adventitious shoot related transcription factor 1) 基因进行了深入研究。这些基因可作为不定芽再生转录调控机制研究的候选基因,其分离和鉴定将有助于全面解析不定芽再生调控网络。

1 材料与方法

1.1 植物材料和培养条件

RNA-Seq 所用的拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 材料为 Wassilewskija (WS) 野生型和 *be1-3* 突变体^[18-19]。雌激素诱导的条件性过量表达转基因种子来自欧洲拟南芥种质中心 (European Arabidopsis Stock Centre, NASC) 的

TRANSPLANTA 种质^[20]。除非特别说明,拟南芥种子均播种于 1/2 MS 培养基:2.3 g/L MS 基本盐 (Murashige and Skoog Basal Medium w/Vitamins, PhytoTechnology Laboratories, 货号 M519)、2%蔗糖和 0.8%的琼脂粉, pH 值 5.8。拟南芥幼苗和外植体生长温度均为 22 °C。采用 T8 LED 灯管照明,灯管红、蓝、橙和白光灯珠的比例 6:2:1:1。光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗交替,光照强度为 80–120 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。

1.2 愈伤组织和不定芽的诱导

愈伤组织和不定芽的诱导参照王兴春等^[17-18]的方法进行:用剪刀剪取 20–30 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 弱光下培养的拟南芥下胚轴,置于 CIM 培养基诱导愈伤,7 d 后再转移到 SIM 培养基诱导不定芽。CIM 和 SIM 的配方详见王兴春等^[17-18]的报道。

1.3 总 RNA 的提取和 RNA-Seq 高通量测序及测序数据分析

RNA-Seq 实验材料为在 CIM 培养 7 d 的 WS (命名为 WS-CIM7) 和 *bel-3* (命名为 *bel*-CIM7) 以及在 SIM 培养 2 d 的 WS (命名为 WS-SIM2) 和 *bel-3* (命名为 *bel*-SIM2)。为了提高实验结果的准确性并节约测序费用,我们进行了 3 次生物学重复。3 次重复的样品分别提取 RNA,然后等量混合用于 RNA-Seq 测序,测序反应仅进行 1 次。首先称取 100 mg 外植体材料,将其放入装有液氮的研钵中,快速研磨成粉末;然后利用康为世纪公司含 DNase I 的植物 RNA 提取试剂盒 (货号 CW0559) 提取总 RNA,提取步骤按照试剂盒说明书进行。RNA-Seq 高通量测序利用 Illumina HiSeq™ 2000 测序仪进行。测序产生的图像数据首先经碱基识别 (Base calling) 转为原始碱基序列数据,然后去除含有接头的

序列和低质量的序列,产生的数据称之为有效读段 (Clean reads)。对有效读段进行测序质量评估、比对统计、测序饱和度分析和在参考基因上的分布分析,全部分析合格的即可用于基因的差异表达分析。基因表达量的计算采用 RPKM 法进行^[21],根据两个样本间基因的 RPKM 值来筛选差异表达的基因。差异表达基因的筛选参照 Audic 等^[22]的方法进行,将错误发现率 (False discovery rate, FDR) 0.001 且差异倍数不低于 2 倍即 $|\log_2| \geq 1$ 的视为差异表达基因。

1.4 不定芽再生相关转录因子的筛选和分类

为了筛选差异表达的转录因子,我们将所有差异表达的基因映射到 Gene ontology (<http://www.geneontology.org/>) 数据库进行基因注释 (Gene annotation),然后根据其参与的生物过程 (Biological process) 进行分类,GO term 为 0001071 具有核酸结合转录因子活性的即为不定芽再生相关的转录因子。所筛选到的转录因子根据 PlantTFDB 3.0^[23]进行分类。

1.5 雌激素诱导基因过量表达

愈伤形成阶段雌激素诱导及观察方法:在 CIM 培养基中添加 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 17 β -雌二醇 (货号 E-8875, Sigma-Aldrich),培养 7 d。然后,利用 Olympus BX51 显微镜观察拍照。不定芽再生阶段雌激素诱导方法:弱光培养的拟南芥下胚轴在无 17 β -雌二醇的 CIM 培养基上培养 7 d,然后再转移到含有 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 17 β -雌二醇的 SIM 培养基继续培养。拟南芥幼苗的雌激素诱导方法:将拟南芥种子播种在含有不同浓度 17 β -雌二醇的 1/2 MS 培养基,4 °C 低温春化 2 d,取出后置于拟南芥培养间培养。

2 结果与分析

2.1 RNA-Seq 测序结果评估

为了解析 *bel-3* 突变体在愈伤形成和不定芽再生两个阶段以及野生型 WS 从脱分化向再分化转变过程差异表达的 TF 编码基因,我们选取了在 CIM 培养 7 d 的 WS (WS-CIM7) 和 *bel-3* (*bel*-CIM7) 以及在 SIM 培养 2 d 的 WS (WS-SIM2) 和 *bel-3* (*bel*-SIM2) 进行 RNA-Seq 分析。经测序 WS-CIM7、*bel*-CIM7、WS-SIM2 和 *bel*-SIM2 4 个样品分别得到 10 184 656、10 898 770、9 399 484 和 9 788 169 条有效读段 (表 1 和表 2, 以及王兴春等^[17]的数据, NCBI Sequence Read Archive accession No. 分别为 SRR1144842、SRR1144843、SRR1144844、和 SRR1144845), 其有效读段分别占 99.59%、99.55%、99.55% 和 99.56%。然后, 将 WS-CIM7、*bel*-CIM7、WS-SIM2 和 *bel*-SIM2 样品的有效读段分别与拟南芥基因数据库进行比对分析, 结果表明匹配读段 (Total mapped reads) 分别占 92.96%、92.90%、93.13% 和 93.02% (表 1 和表 2, 以及王兴春等^[17]的数据)。测序饱和度分析表明, 这 4 个样品检测到的基因数在测序量较小时均随着测序量的增加而增加; 当测序量达到 4 M 时, 其增长趋于平缓; 而当测序量达到 8 M 时, 检测到的基因数趋于饱和 (图 1A 和 1B, 以及王兴春等^[17])。而这 4 个样品的测序量均在 9 M 以上, 因此可以认为测序基本覆盖细胞中表达的全部基因, 具有代表性。随后, 我们又分析了有效读段在拟南芥参考基因上的分布情况, 由图 1C 和 1D 以及王兴春等^[17]的数据可知这 4 个样品的有效读段分布均匀性较好, 表明 mRNA 是随机打断的。综上所述, 这 4 个样品测序质量较高, 可用于下一步差异表达基因的研究。

2.2 愈伤形成过程差异表达的 TF 编码基因

对 CIM 培养基上培养 7 d 的 WS 和 *bel-3* 外植体的 RNA-Seq 数据进行差异比较分析, 共筛选出 1 860 个差异表达的基因, 其中 TF 编码基因为 155 个, 约占总差异表达基因的 8.3% (表 3)。这 155 个 TF 编码基因中, *bel-3* 外植体中表达量上调的有 97 个, 表达量下调的有 58 个。进一步研究发现, 这 155 个转录因子属于 26 个家族, 主要涉及激素信号转导、胁迫响应和根毛或侧根的发生以及生长发育的调控等过程^[24-26]。值得一提的是, *BE1* 基因的突变导致 *ESR2* (AT1G24590) 基因的表达量下降了 5.05 倍。该基因在不定芽再生过程起着重要的作用^[11], 但对脱分化的影响还需要进一步研究。

表 1 样品 *bel*-CIM7 测序读段与拟南芥参考基因的比对统计结果

Table 1 Alignment statistics of *bel*-CIM7 sequencing reads to reference genes in *Arabidopsis thaliana*

Map to gene	Reads number	Percentage (%)
Total mapped	10 898 770	100.00
Perfect match	10 125 443	92.90
≤2 bp mismatch	6 301 969	57.82
Unique match	3 823 474	35.08
Multi-position match	6 507 183	59.71
Total unmapped	3 618 260	33.20

表 2 样品 *bel*-SIM2 测序读段与拟南芥参考基因的比对统计结果

Table 2 Alignment statistics of *bel*-SIM2 sequencing reads to reference genes in *Arabidopsis thaliana*

Map to gene	Reads number	Percentage (%)
Total mapped	9 788 169	100.00
Perfect match	9 104 737	93.02
≤2 bp mismatch	5 636 215	57.58
Unique match	3 468 522	35.44
Multi-position match	5 821 034	59.47
Total unmapped	3 283 703	33.55

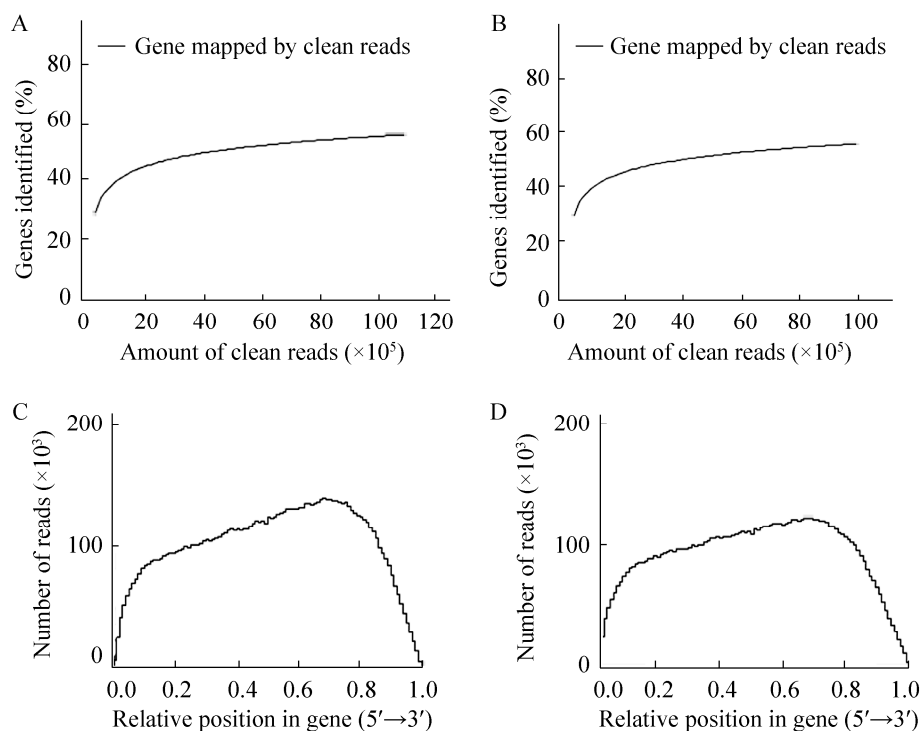


图1 RNA-Seq 测序质量评估

Fig. 1 RNA-Seq quality assessment. (A, B) Sequencing saturation analysis of *bel*-CIM7 (A) and *bel*-SIM2 (B). (C, D) Sequencing randomness analysis of *bel*-CIM7 (C) and *bel*-SIM2 (D).

2.3 不定芽再生早期差异表达的 TF 编码基因

为了解析不定芽再生早期的转录调控机制,我们比较了野生型 WS 拟南芥外植体从脱分化(样品 WS-CIM7)向再分化(样品 WS-SIM2)转变过程差异表达的基因。如表 4 所示,共检测到 231 个差异表达的 TF 编码基因,其中表达量下调的为 71 个,表达量上调的有 160 个。值得注意的是, *ESR1* 和 *RAP2.6L* 基因的表达量分别上调了 7.59 倍和 2.25 倍,而这两个基因已经被证明是不定芽再生过程的关键基因^[9,12]。除此之外, NAC 家族的 *CUC1* (*Cup shaped cotyledon 1*) 和 *CUC2* 的表达量也大幅上调,分别上调了 8.94 倍和 5.09 倍,这一结果与 Che 等^[12]的研究是一致的。

为了深入了解不定芽再生早期的转录调控机制并解析 *bel-3* 突变体不定芽再生障碍的原因,我们进一步比较了在 SIM 培养基上培养 2 d 的 *bel-3* (*bel*-SIM2) 和 WS (*WS*-SIM2) 外植体中差异表达的基因。共检测到 832 个差异表达基因,其中 68 个基因编码转录因子,占 8.17% (表 5)。这些转录因子涉及 20 个家族,其中数目最多的为 NAC 家族、ERF 家族和 WRKY 家族,分别为 13 个、9 个和 8 个 (表 5)。

2.4 过量表达 *ART1* 基因抑制了不定芽再生

由于拟南芥 *bel-3* 突变体中柱鞘发育异常,从而导致外植体愈伤组织形成受阻^[18]。我们推测, *bel-3* 外植体愈伤形成缺陷的表型可能与基因的转录调控有关。为了证实这一推测,并验

表 3 愈伤形成过程 *be1-3* 与 WS 野生型相比差异表达的 TF 编码基因Table 3 Differential expressed TF encoding genes between *be1-3* and WS wild type at callus formation stage

Family	Differential expressed/total TF genes	Down-regulated genes	Up-regulated genes
AP2	2/22	AT5G17430	AT4G37750
ARF	1/22		AT2G33860
B3	9/66	AT3G61970 AT1G26680 AT4G01580 AT3G11580 AT3G18960 AT1G49475 AT5G58280 AT2G24700	AT4G31615
bHLH	13/145	AT4G01460 AT3G21330 AT1G71200 AT4G37850 AT4G36930	AT3G20640 AT3G07340 AT4G30980 AT3G56770 AT5G65320 AT5G43650 AT1G10585 AT4G33880
bZIP	1/74	AT3G58120	
C2H2	13/100	AT1G03840 AT3G45260 AT1G75710 AT3G20880	AT3G19580 AT1G08290 AT2G28200 AT5G25160 AT5G03510 AT1G10480 AT1G26590 AT1G27730 AT1G68360
C3H	1/50	AT5G44260	
DBB	1/11		AT2G31380
Dof	3/36		AT3G50410 AT2G46590 AT1G51700
EIL	1/6		AT5G21120
ERF	25/123	AT5G05410 AT1G24590 AT5G61590 AT1G22190	AT4G36900 AT2G46310 AT5G07580 AT5G53290 AT5G61890 AT5G47230 AT5G52020 AT3G11020 AT5G51190 AT3G61630 AT3G16770 AT3G50260 AT5G61600 AT1G12610 AT4G34410 AT5G47220 AT1G77640 AT1G44830 AT2G44840 AT2G38340 AT1G33760
G2-like	3/42	AT1G68670 AT1G25550	AT1G14600
GATA	4/30	AT2G45050 AT3G50870 AT2G18380	AT5G26930
GRAS	2/34	AT1G14920 AT3G03450	
HD-ZIP	4/49	AT4G17460 AT2G18550	AT3G61890 AT4G17710
HSF	2/24	AT3G51910	AT2G41690
MYC	3/42	AT4G11880	AT1G71692 AT4G22950
M-type	2/66	AT1G18750	AT1G17310
MYB	13/144	AT3G24310 AT5G57620 AT2G47190 AT1G14350 AT5G10280 AT1G06180 AT5G60890	AT2G31180 AT5G67300 AT5G12870 AT4G13480 AT4G37780 AT1G08810
MYB_ related	5/66	AT1G71030 AT5G37260 AT2G46410	AT5G58900 AT3G10590
NAC	19/113	AT5G39820 AT1G69490 AT1G26870 AT5G39610 AT3G29035	AT4G01540 AT1G52880 AT3G12977 AT5G18270 AT1G12260 AT2G18060 AT3G44290 AT5G62380 AT1G28470 AT1G02220 AT1G52890 AT5G64060 AT3G01600 AT5G14490
TALE	4/22	AT1G75430	AT5G11060 AT1G62990 AT5G41410
TCP	1/24		AT3G27010
Trihelix	2/28		AT5G03680 AT5G28300
WOX	3/16		AT1G20700 AT1G46480 AT5G05770
WRKY	10/72	AT5G64810 AT5G22570 AT2G40750 AT3G56400	AT2G25000 AT1G80840 AT1G69810 AT2G30250 AT4G23810 AT4G22070
Others	8	AT3G24500 AT3G62100	AT1G15580 AT3G44550 AT2G43060 AT4G32280 AT2G27380 AT2G24340

表 4 野生型拟南芥外植体从脱分化向再分化转变过程差异表达的 TF 编码基因

Table 4 Differential expressed TF encoding genes in wild type between dedifferentiation and redifferentiation stages

Family	Differential expressed/total TF genes	Down-regulated genes	Up-regulated genes
AP2	5/22	AT5G10510 AT1G51190 AT5G17430 AT5G10510	AT4G37750
ARF	1/22	AT3G61830	
B3	4/66	AT5G58280	AT2G46870 AT4G31650 AT1G01030
bHLH	24/145	AT5G65320 AT4G37850 AT5G56960 AT2G43140 AT5G15160 AT1G74500 AT3G25710	AT1G68810 AT4G29100 AT3G20640 AT2G46510 AT2G24260 AT4G30980 AT1G27660 AT1G32640 AT3G07340 AT1G62975 AT2G22760 AT5G58010 AT1G66470 AT1G27740 AT5G43650 AT2G40200 AT4G21340
bZIP	6/74		AT2G36270 AT1G77920 AT1G49720 AT5G24800 AT1G06850 AT1G13600
C2H2	13/100	AT3G20880 AT3G57670	AT5G10970 AT2G29660 AT2G28200 AT5G03510 AT2G37430 AT5G59820 AT2G02070 AT1G27730 AT5G57520 AT5G67450 AT3G53600
C3H	2/50		AT2G40140 AT3G55980
CO-like	3/17	AT5G57660	AT5G48250 AT5G24930
DBB	2/11	AT2G21320	AT4G39070
Dof	5/36	AT3G47500 AT4G00940	AT2G28510 AT1G51700 AT5G60850
ERF	35/123	AT5G18560 AT4G11140 AT1G24590 AT4G23750 AT5G07310 AT3G23240 AT1G75490 AT1G36060 AT3G61630	AT3G16770 AT5G13330 AT4G17500 AT2G23340 AT4G32800 AT4G17490 AT4G25490 AT3G50260 AT5G47230 AT5G51190 AT1G77640 AT5G47220 AT4G25470 AT3G60490 AT1G12610 AT4G34410 AT5G61600 AT4G25480 AT1G12980 AT1G19210 AT5G25810 AT5G19790 AT5G21960 AT1G74930 AT4G28140 AT2G44840
G2-like	6/42	AT5G42630	AT2G40970 AT1G49560 AT1G14600 AT2G40260 AT5G59570
GATA	3/30	AT3G50870 AT2G18380	AT2G45050
GRAS	3/34	AT3G54220	AT5G59450 AT3G03450
HD-ZIP	13/49	AT4G21750 AT4G17460 AT5G66700 AT4G04890 AT1G17920 AT2G01430	AT4G37790 AT4G40060 AT3G61150 AT3G61890 AT1G69780 AT3G01220 AT1G26960
HSF	3/24	AT3G51910	AT5G03720 AT3G22830
MIKC	3/42	AT3G02310 AT2G45660	AT4G24540
M-type	1/66	AT1G17310	
MYB	32/144	AT3G62610 AT1G14350 AT1G14350 AT1G48000 AT2G02820 AT3G47600 AT4G34990	AT5G57620 AT2G31180 AT2G36890 AT5G10280 AT5G16600 AT5G60890 AT3G12720 AT2G38090 AT1G22640 AT1G57560 AT5G05790 AT3G49690 AT1G34670 AT5G23000 AT3G02940 AT4G05100 AT3G24310 AT1G17950 AT2G16720 AT1G73410 AT1G66230 AT3G61250 AT5G12870 AT3G30210 AT5G14340

续表 4

MYB_ related	5/66	AT3G09600 AT1G71030	AT5G37260 AT5G58900 AT3G10590
NAC	23/113	AT3G15510 AT1G52880 AT1G26870 AT5G39610 AT1G54330 AT5G14000	AT1G01010 AT4G29230 AT5G13180 AT3G12977 AT1G77450 AT4G28500 AT1G28470 AT5G53950 AT1G62700 AT2G43000 AT5G64530 AT4G10350 AT3G15170 AT1G12260 AT1G71930 AT5G62380 AT1G02250 AT2G42200
SBP	1/17		AT5G11060 AT2G16400 AT1G62990 AT5G02030 AT4G32980 AT5G23280
TALE	5/22		AT5G03680
TCP	1/24		AT1G46480
Trihelix	1/28		AT3G56400 AT2G25000 AT2G38470 AT4G23810 AT4G18170 AT1G80840 AT5G24110 AT5G41570 AT1G69600 AT1G75240
WOX	2/16	AT3G11260	
WRKY	8/72		
ZF-HD	2/17		
others	19	AT4G27310 AT5G54470 AT4G15248 AT2G46990 AT3G15540 AT3G62100 AT3G24500 AT5G22500 AT1G20065 AT4G23800 AT2G07677 AT5G24120	AT2G36740 AT1G51950 AT4G28490 AT1G04240 AT1G04250 AT5G25890 AT3G44550

证所筛选转录因子的真实性,我们从表 3 中选取了一个 MYB-related 家族的 AT3G10590 基因进行了深入研究。该基因在 *bel-3* 突变体和野生型外植体中的转录本数分别为 13 和 0, RPKM 值分别为 3.217 和 0.001, 表达量上升了 3 217 倍, 是所有基因中上调倍数最大的一个, 故将其命名为 *ART1* (*Adventitious shoot related transcription factor 1*) 基因。此外, 我们从 NASC 获得了 *ART1* 基因的两个雌激素诱导过量表达的转基因株系 TPT_3.10590.1F 和 TPT_3.10590.1I。由于 TPT_3.10590.1F 和 TPT_3.10590.1I 在所有的实验中表型类似, 只是 TPT_3.10590.1I 的表型比 TPT_3.10590.1F 的更强, 因此在本文仅给出 TPT_3.10590.1I 的结果, 并将其命名为 *ART1OE* (*ART1 overexpression*)。

为阐明 *ART1* 在不定芽再生过程的作用, 分别将 *ART1OE* 和 Col-0 野生型的下胚轴培养在 0 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 雌二醇的 CIM 培养基上。培养 7 d

后, 无论是在 0 还是 10 $\mu\text{mol/L}$ 雌二醇 CIM 培养基上培养的 Col-0 野生型下胚轴顶端和中柱都已经膨大形成愈伤组织, 且二者无明显差异 (图 2A 和 2B), 表明雌二醇对愈伤的形成无显著影响。与野生型类似, 无雌二醇 CIM 上培养的 *ART1OE* 外植体顶端因形成大量愈伤而膨大成球状 (图 2C), 而雌二醇培养基上培养的外植体顶端仅稍微变粗 (图 2D)。类似的, *ART1OE* 外植体中柱鞘部位在无雌二醇时膨大形成了突起 (图 2E), 而在雌二醇培养基上的则无明显变化 (图 2F)。然后, 将无雌二醇 CIM 培养的外植体分别转到 0 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 雌二醇的 SIM 培养基继续培养。14 d 后, 无论是否有雌二醇, 野生型外植体都可以分化出绿芽 (图 2G 和 2H), 但 *ART1OE* 仅在无雌二醇的培养基上能分化出绿芽, 在雌二醇培养基上培养时仅有少数绿点 (图 2I 和 2J)。这表明, *ART1* 基因是愈伤形成和不定芽再生过程的一个负调控因子。

表 5 不定芽再生早期 *be1-3* 中差异表达的 TF 编码基因
Table 5 Differential expressed TF encoding genes in *be1-3* at the early stage of adventitious shoot formation

Family	Differential expressed/total TF genes	Down-regulated genes	Up-regulated genes
AP2	1/22	AT3G20840	
ARF	1/22		AT2G33860
B3	5/66	AT1G26680 AT1G01030 AT3G61970	AT4G31615
bHLH	2/145	AT3G18960	
bZIP	1/74	AT1G74500 AT1G66470	
C2H2	3/100	AT3G58120	
CO-like	1/17	AT1G75710	AT5G22890 AT3G46080
Dof	1/17	AT1G25440	
ERF	2/36	AT1G28310	AT4G00940
	9/123	AT1G77640 AT4G27950	AT3G11020 AT2G46310 AT1G12980 AT5G18560
			AT3G61630 AT2G38340 AT1G74930
G2-like	1/42	AT1G14600	
GATA	1/30	AT2G45050	
GRAS	1/34	AT3G03450	
HD-ZIP	4/49	AT4G17460	AT5G52170 AT2G46680 AT4G17710
MIKC	2/42	AT4G11880	AT5G20240
MYB	6/144	AT1G49010 AT3G12820 AT5G10280	AT1G34670 AT1G48000 AT4G37780
MYB_ related	1/66	AT3G16350	
NAC	13/113	AT1G33280 AT4G10350 AT5G39820	AT3G04060 AT2G18060 AT5G64060 AT1G02250
		AT1G26870	AT3G01600 AT3G15510 AT1G02230 AT1G02220
			AT5G14490
TALE	1/22	AT4G32980	
WRKY	8/72		AT2G40750 AT5G13080 AT5G64810 AT2G30250
			AT5G22570 AT1G66600 AT5G01900 AT2G21900
ZF-HD	1/17	AT2G18350	
Others	4		AT3G15540 AT3G44550 AT2G21650 AT3G24500

2.5 过量表达 *ART1* 基因抑制了幼苗的生长发育

上述结果是在离体条件下获得的，为解析 *ART1* 基因在幼苗生长和发育中作用，将 *ART1OE* 播种在不同浓度的 17 β-雌二醇培养基上。结果表明，在无诱导剂的培养基上，*ART1OE* 幼苗生长发育完全正常（图 3A），然而在雌激素

培养基上，幼苗生长发育缓慢，根系变短（图 3B–3F）。而且诱导剂的浓度越高，这种表型也越严重（图 3B–3F）。在 10 μmol/L 17 β-雌二醇培养基上，*ART1OE* 的主根不能伸长，而且长出大量毛状根系（图 3E 和 3F）。这表明，*ART1* 基因在植物生长发育和离体器官再生过程都起着重要的作用。

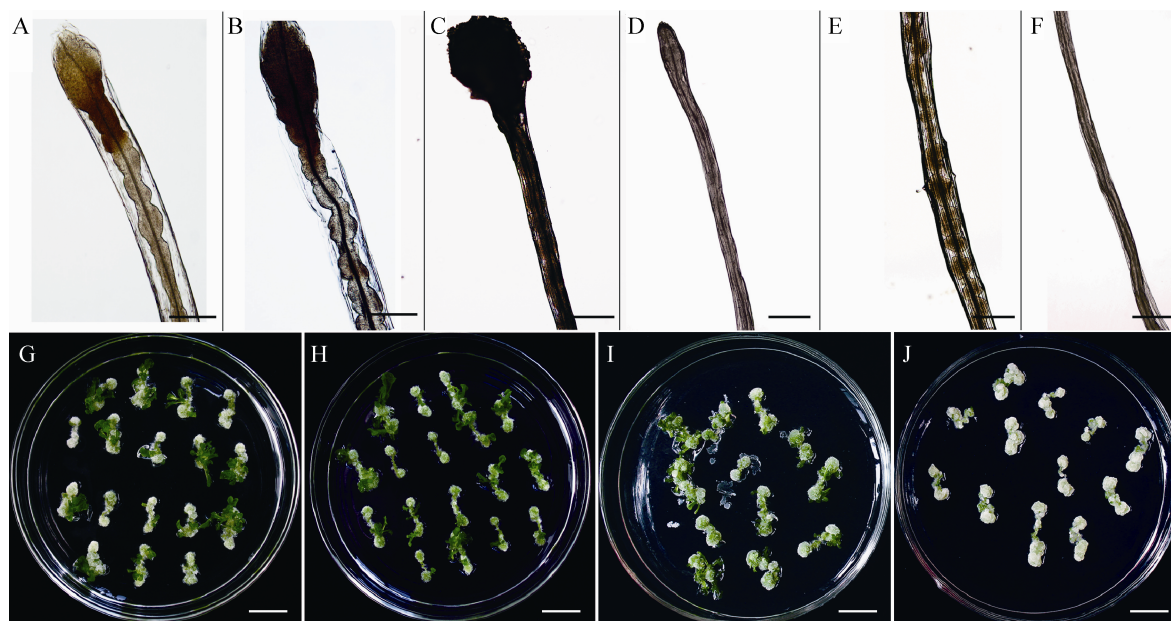


图2 过量表达 *ART1* 基因抑制了不定芽再生

Fig. 2 Overexpression of *ART1* inhibits adventitious shoot regeneration. (A–F) Hypocotyl segments of wildtype (A and B) and *ART1OE* (C–F) cultured for 7 d on CIM containing 0 (A, C and E) or 10 (B, D and F) $\mu\text{mol/L}$ estradiol. The top (A–D) or the middle (E and F) hypocotyl segments were photographed with a Olympus BX51 microscopy. (G–J) Hypocotyl segments of wildtype (G and H) and *ART1OE* (I–J) were cultured for 14 d on SIM containing 0 (G and I) or 10 (H and J) $\mu\text{mol/L}$ estradiol. Bar= 0.2 mm (A–F) or 1 cm (G–J).

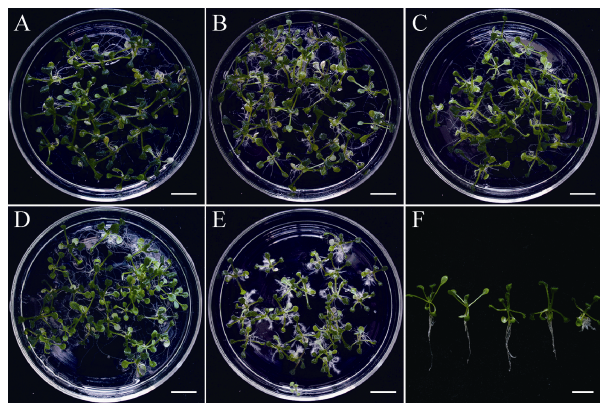


图3 过量表达 *ART1* 基因抑制了幼苗生长发育

Fig. 3 Overexpression of *ART1* retards seedling growth and development. (A–E) Twelve-day-old *ART1OE* seedlings germinated and grown on MS medium containing 0 (A), 0.01 (B), 0.1 (C), 1 (D) and 10 (E) $\mu\text{mol/L}$ estradiol. (F) An enlarged view of *ART1OE* seedlings in panel A–E. Bar=1 cm.

3 讨论

本研究利用 RNA-Seq 高通量测序技术检测了脱分化和再分化过程以及从脱分化向再分化转变过程差异表达的 TF 编码基因, 获得了不定芽再生过程转录调控的重要信息。拟南芥基因组中共有 1 716 个 TF 编码基因, 分属于 58 个转录因子家族^[23]。在拟南芥不定芽再生过程, 共检测到 341 个差异表达的 TF 编码基因 (表 3–5), 占拟南芥总 TF 编码基因的 19.87%。这 341 个转录因子分属于 29 个家族, 其中 ERF 家族是差异表达的 TF 编码基因最多的家族, 其次是 MYB 家族和 NAC 家族, 这 3 个家族差异表达的基因数分别为 50、40 和 38 个, 分别占差异表达转录因子的 14.67%、11.73%和 11.14% (表 3–5)。

ERF 家族是拟南芥中的一个转录因子大家族,有 123 个成员,占拟南芥转录因子总数的 7.17%;而在本研究中差异表达的 ERF 占总差异表达 TF 编码基因的 14.67%,富集了 2.05 倍。ERF 的富集可能与该家族广泛参与了激素信号转导、胁迫响应和生长发育调控等有关^[27]。这暗示了与其他家族的转录因子相比,ERF 家族的转录因子在不定芽再生过程可能起着更为重要的作用。进一步分析发现,*bel-3* 外植体在愈伤形成和不定芽再生两个阶段表达模式一致(均上调或下调)的 TF 编码基因有 26 个,表达模式不一致的 TF 编码基因有 5 个(表 3 和表 5)。这 26 个表达模式一致的基因可能在这两个过程都起作用,是不定芽再生转录调控的关键 TF 编码基因。

在本研究中,我们发现了一些已知的与不定芽再生有关的 TF 编码基因,这些基因包括 *ESR1*、*ESR2* 和 *RAP2.6L* 等^[9,11-12]。其中,在野生型拟南芥外植体从脱分化向再分化转变时 *ESR1* 基因的表达量上调了 7.59 倍;而在 *bel-3* 外植体脱分化阶段 *ESR2* 基因的表达量下调了 5.05 倍,这与其功能是相适应的。这表明本实验反映了拟南芥不定芽再生过程基因差异表达的真实情况,结果是可信的。在脱分化过程,与野生型相比 *bel-3* 突变体中一系列与根系发育相关的基因差异表达(表 3),而根系尤其是侧根的开发与愈伤的形成有着密切的关系^[4],深入研究这些基因的功能有望全面揭示愈伤形成和根系发育的关系。Fan 等^[6]的研究表明,*LBD16*、*LBD17*、*LBD18* 和 *LBD19* 等 4 个基因在愈伤形成过程起着重要的调控作用,但在本实验中未检测到这 4 个基因的差异表达。这可能是因为 *BEI* 基因是一个碳水化合物代谢相关的基因,位于愈伤形成调控网络的下游,因此其突变不会影响到上

游 *LBDs* 基因的表达。不过,相对于已有的数据,本研究挖掘了更为丰富的拟南芥不定芽再生相关的转录因子信息,为今后深入研究不定芽再生转录调控机制提供了重要的参考。

拟南芥 *BEI* 基因通过碳水化合物代谢调控了植物生长发育和离体器官再生^[18-19],但在愈伤形成和不定芽再生两个阶段均未发现直接参与碳水化合物代谢的转录因子。其原因可能有 3 个:1) *BEI* 基因编码一个糖苷水解酶,位于碳水化合物代谢的下游,其变化对这两个过程中其他碳水化合物代谢影响很小;2) CIM 和 SIM 培养基均添加了大量外源碳水化合物,这也可能在一定程度上影响了由于 *BEI* 缺失导致的相关基因表达的程度;3) 已发现的转录因子中,大部分功能未知。在愈伤形成过程,*bel-3* 外植体中表达量上调的 TF 编码基因有 97 个,下调的 TF 编码基因有 58 个(表 3)。*bel-3* 外植体愈伤形成缺陷的表型可能就是因为这些基因表达变化导致的。进一步实验表明,表达量上调倍数最大的 *ART1* 基因是愈伤形成的一个负调控因子,其过量表达导致愈伤形成和不定芽再生严重受阻。但这并不意味着 *ART1* 基因过量表达是导致 *bel-3* 突变体愈伤形成缺陷的唯一原因。要证明这一推测,可以构建 *bel-3 art1* 的双突变体,进一步分析 *bel-3 art1* 愈伤形成情况。若双突变体再生能力与野生型相同,则表明 *ART1* 基因过量表达是导致 *bel-3* 突变体愈伤形成缺陷的主要原因,否则表明 *bel-3* 不定芽再生缺陷是多种原因造成的。此外,*BEI* 基因突变导致 *ART1* 基因表达量大幅上调,表明 *BEI* 基因负调控 *ART1* 基因的表达。但这种调控不是直接的,可能是由于 *BEI* 基因的代谢产物(例如碳水化合物)抑制了 *ART1* 基因的表达。

REFERENCES

- [1] Guan CM, Zhang XS. Advances in the molecular mechanism of *in vitro* plant organogenesis. *Chin Bull Bot*, 2006, 23(5): 595–602 (in Chinese).
关春梅, 张宪省. 植物离体器官发生控制机理研究进展. *植物学通报*, 2006, 23(5): 595–602.
- [2] Atta R, Laurens L, Boucheron-Dubuisson E, et al. Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown *in vitro*. *Plant J*, 2009, 57(4): 626–644.
- [3] Valvekens D, Montagu MV, Van Lijsebettens M. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(15): 5536–5540.
- [4] Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM. *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell*, 2010, 18(3): 463–471.
- [5] Long TA, Benfey PN. Transcription factors and hormones: new insights into plant cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(6): 710–714.
- [6] Fan M, Xu C, Xu K, et al. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Res*, 2012, 22(7): 1169–1180.
- [7] Sakai H, Honma T, Aoyama T, et al. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 2001, 294(5546): 1519–1521.
- [8] Hill K, Mathews DE, Kim HJ, et al. Functional characterization of type-B response regulators in the *Arabidopsis* cytokinin response. *Plant Physiol*, 2013, 162(1): 212–224.
- [9] Banno H, Ikeda Y, Niu QW, et al. Overexpression of *Arabidopsis* *ESR1* induces initiation of shoot regeneration. *Plant Cell*, 2001, 13(12): 2609–2618.
- [10] Ikeda Y, Banno H, Niu QW, et al. The *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 2* gene in *Arabidopsis* regulates *CUP-SHAPED COTYLEDON 1* at the transcriptional level and controls cotyledon development. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(11): 1443–1456.
- [11] Matsuo N, Makino M, Banno H. *Arabidopsis* *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION (ESR)1* and *ESR2* regulate *in vitro* shoot regeneration and their expressions are differentially regulated. *Plant Sci*, 2011, 181(1): 39–46.
- [12] Che P, Lall S, Nettleton D, et al. Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiol*, 2006, 141(2): 620–637.
- [13] Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, et al. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 1992, 69(5): 843–859.
- [14] Wagner D, Wellmer F, Dilks K, et al. Floral induction in tissue culture: a system for the analysis of *LEAFY*-dependent gene regulation. *Plant J*, 2004, 39(2): 273–282.
- [15] Gliwicka M, Nowak K, Balazadeh S, et al. Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69261.
- [16] Wang XC, Yang ZR, Wang M, et al. High-throughput sequencing technology and its application. *China Biotechnol*, 2012, 32(1): 109–114 (in Chinese).
王兴春, 杨致荣, 王敏, 等. 高通量测序技术及其应用. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(1): 109–114.
- [17] Wang XC, Yang ZR, Zhang SW, et al. Digital gene expression profiling analysis of the early adventitious shoot formation in *Arabidopsis thaliana*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(2): 189–202 (in Chinese).
王兴春, 杨致荣, 张树伟, 等. 拟南芥不定芽发生早期的数字基因表达谱分析. *生物工程学报*, 2013, 29(2): 189–202.
- [18] Wang XC, Yang ZR, Wang M, et al. The *BRANCHING ENZYME1* gene, encoding a

- glycoside hydrolase family 13 protein, is required for *in vitro* plant regeneration in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2014, 117(2): 279–291.
- [19] Wang XC, Xue L, Sun JQ, et al. The *Arabidopsis BE1* gene, encoding a putative glycoside hydrolase localized in plastids, plays crucial roles during embryogenesis and carbohydrate metabolism. *J Integr Plant Biol*, 2010, 52(3): 273–288.
- [20] Coego A, Brizuela E, Castillejo P, et al. The TRANSPLANTA collection of *Arabidopsis* lines: a resource for functional analysis of transcription factors based on their conditional overexpression. *Plant J*, 2014, 77(6): 944–953.
- [21] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 2008, 5(7): 621–628.
- [22] Audic S, Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*, 1997, 7(10): 986–995.
- [23] Jin J, Zhang H, Kong L, et al. PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Database issue): D1182–1187.
- [24] Yi K, Menand B, Bell E, et al. A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nat Genet*, 2010, 42(3): 264–267.
- [25] Karas B, Amyot L, Johansen C, et al. Conservation of lotus and *Arabidopsis* basic helix-loop-helix proteins reveals new players in root hair development. *Plant Physiol*, 2009, 151(3): 1175–1185.
- [26] Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, et al. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(49): 18822–18827.
- [27] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 2006, 140(2): 411–432.

(本文责编 陈宏宇)