

研究报告 Original Paper

基于RNA-seq的水稻根尖和侧根区愈伤组织诱导中生长素相关基因差异表达分析

黄伊子, 郭芾, 韩凝, 边红武*

浙江大学生命科学院遗传与再生生物学研究所, 杭州310058

摘要: 本研究以愈伤诱导培养基(CIM)诱导24 h的水稻(*Oryza sativa*)主根为材料, 利用高通量转录组测序(RNA-seq)技术进行主根根尖和侧根区的基因差异表达分析。通过对生长素信号相关基因家族进行聚类 and 差异表达分析后发现: 生长素受体基因*OsTIR/AFBs*及其同源基因在根尖和侧根区组织的愈伤诱导过程中均无明显的差异表达; 系统进化关系接近的*OsIAA20*、*OsIAA9*等10个*OsIAA*基因在根尖和侧根区均增强表达; 而另一组进化关系相邻的*OsIAA11*和*OsIAA13*基因在根尖和侧根区表现出相反的差异表达模式。相比而言, *OsARFs*家族基因在根尖和侧根区中对生长素诱导的表达变化具有明显的差异性。本研究分析了在根尖和侧根区组织生长素信号相关家族基因差异表达的异同, 拟为根愈伤组织诱导中生长素响应的组织特异性研究提供新参考。

关键词: 愈伤组织; RNA-seq; 生长素; 根; 水稻

植物拥有强大的再生能力。利用一定比例的生长素和细胞分裂素培养基可以诱导体细胞去分化形成愈伤组织获得再生能力。生长素诱导是植物体细胞脱分化形成愈伤组织的主要方式, 即依赖生长素信号转导途径开启一系列生长素响应基因的激活。但不同组织诱导愈伤组织的能力差异很大。生长素响应的组织特异性, 即不同类型的细胞如何对相同的生长素信号做出不同的响应, 是当今生长素信号研究领域需要阐明的一个关键问题(Wagner和Weijers 2016)。

迄今为止, 比较清晰的生长素信号转导途径是*TIR1/AFBs* (*Transport Inhibitor Response 1/Auxin Signaling F-Box Proteins*)介导的核受体途径, 主要由生长素受体*TIR1/AFBs*、负调控因子*Aux/IAAs*和生长素激活或抑制因子*ARFs* (*Auxin Response Factors*)组成(Kitomi等2012; Reed 2001; Roosjen等2018; Wagner和Weijers 2016)。当细胞内存在高浓度生长素时, 生长素迅速与其受体*TIR1/AFBs*结合形成泛素相关的蛋白降解酶复合体SCF^{*TIR1/AFB*}, 同时*TIR1/AFB*蛋白的Leucine-Rich-Repeat基序与*Aux/IAA*的结构域II结合, 使*Aux/IAA*脱离与下游*ARF*转录因子形成的异源二聚体, 并将*Aux/IAA*蛋白通过泛素化途径运送到蛋白酶体降解(Tan等

2007), 从而使*ARF*转录因子激活或者抑制下游生长素响应基因的表达(Roosjen等2018)。因此, 生长素响应的组织特异性至少受*TIR1/AFBs*、*Aux/IAAs*和*ARFs*三者的表达及其蛋白相互作用的调控。

植物组织内有活性的生长素的总量由一系列生长素合成、代谢和运输过程所决定。内源生长素主要的合成途径是*YUCCA/YUC*参与的色氨酸依赖途径, 该通路中色氨酸被转化为吲哚-3-丙酮酸(indole-3-pyruvate, IPA), 而后被*YUC*催化形成生长素(Zhao 2010)。植物体内的生长素多以氨基酸化的形式存在, 氨基酸化的生长素无活性, 且外源生长素可能增强植物体内的氨基酸化。*GH3*具有植物生长素氨基酸化合成酶活性, 是生长素早期响应基因, 调控植物体内的生长素动态平衡(Nakazawa等2001; Takase等2004)。生长素在根尖分生组织和茎尖分生组织合成后通过脉管系统的非极性运输, 或细胞间细胞质膜载体的极性运输到植物其他部位(Kramer和Bennett 2006), 极性运输在胚胎发生、器官形成、维管组织形成、侧根起始等植

收稿 2019-11-12 修定 2020-06-05

资助 国家自然科学基金(31771776)、浙江省自然科学基金(LGN18C130001)和中国博士后科学基金(508000-X91806)。

* 通讯作者(hwbian@zju.edu.cn)

物的生长发育各个过程中发挥重要作用(Petrásek和Friml 2009; Robert和Friml 2009)。生长素的极性运输由输入载体*AUX/LAX*基因和输出载体*PIN* (*PIN-FORMED Protein*)基因介导(Křecek等2009; Lee等2020; Péret等2012; Swarup和Bhosale 2019)。

我们前期的研究利用水稻生长素响应显性突变体*Osiaa11* (一种无侧根突变体)开展实验(Zhu等2012),发现其主根在愈伤诱导培养基(callus inducing medium, CIM)培养条件下,侧根区不能形成愈伤组织,但根尖愈伤组织的形成并不受影响(Guo等2018)。可见生长素抑制因子*Osiaa11*显性突变所干扰的生长素信号通路可完全阻碍水稻侧根来源的愈伤组织形成,却不影响根尖愈伤组织诱导,说明水稻根尖部位的愈伤组织形成的生长素信号通路与侧根区是不同的。为了揭示水稻根尖和侧根区组织对外源生长素响应的基因表达差异,本研究以CIM诱导24 h的水稻主根为材料,运用转录组测序(RNA-seq)技术对根尖和侧根区差异表达基因进行了检测、富集和分类,并针对生长素的信号转导通路、合成、代谢和运输基因家族进行了差异表达特点分析,为不同组织来源的愈伤组织形成机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用材料为粳稻(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)野生型‘日本晴’。

1.2 水稻主根的获得及其愈伤组织诱导

成熟的水稻种子去壳后经体积分数为2%的次氯酸钠消毒杀菌15 min、双蒸水清洗后37℃浸泡12 h,然后转移至1/2MS (Murashige and Skoog)培养基上培养3 d (28℃、16 h光照/8 h黑暗培养条件)。待主根萌发至3~4 cm且侧根未萌发时,将处理组(CIM)主根转移至愈伤诱导培养基上,即含有 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)的N6培养基;将对照组(CK)主根转移至无激素N6培养基上。28℃、16 h光照/8 h黑暗培养条件下,24 h后剪断分离主根根尖(root tip, RT; 2~3 mm处)和侧根区(lateral root region, LRR),并分别提取总RNA。对照组和处理组分别

设置3个生物学重复。

1.3 转录组cDNA文库构建和测序

通过琼脂糖凝胶电泳、NanoDrop、Qubit和Agilent 2100方法分别对RNA降解程度、纯度、浓度和完整性进行检测之后,将检测合格的总RNA用于转录组cDNA文库构建。用带有oligo(dT)的磁珠,通过互补配对与mRNA的poly(A)尾结合的方式富集mRNA。随后,将mRNA打断成短片段,以mRNA为模板合成第一链cDNA,然后加入DNA polymerase I合成第二链cDNA。第二链cDNA经过纯化、末端修复、加poly(A)尾并连接测序接头后,用AMPure XP beads进行片段大小选择,再进行PCR富集得到最终的cDNA文库,最后使用Illumina HiSeq进行高通量测序(北京诺禾致源生物信息科技有限公司)。

1.4 RNA-seq数据分析

获得原始测序序列后,以NCBI数据库中的‘日本晴’基因组(https://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Oryza_sativa_Japonica_Group/)为参考进行比对分析,过滤得到clean reads。经计算获得衡量基因转录丰度的FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped);根据比较处理组和对照组基因表达水平分析的read count数据进行标准化处理和概率检验后,利用DESeq (Anders和Huber 2010)处理获得fold change (FC),以 $|\log_2\text{FC}(\text{CIM}/\text{CK})| \geq 1$ (式中CIM为处理组read count, CK为对照组read count)和 $P < 0.05$ (式中 P 为根据每个样品3个生物学重复计算获得的统计学差异显著性)为阈值筛选差异表达基因。对差异表达基因进行注释和Gene Ontology (GO)富集分析后选取了富集最显著的30个GO条目。对差异表达基因进行Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)富集分析,选取富集最显著的前20个KEGG通路。

1.5 构建系统进化树

从水稻基因组注释数据库(http://rice.plantbiology.msu.edu/pub/data/Eukaryotic_Projects/o_sativa/annotation_dbs/)下载蛋白序列进行比对,选择近邻法(neighbor-joining)、bootstrap检验1 000次重复,用MEGA 5软件绘制系统进化树。

2 实验结果

2.1 差异表达基因的功能注释与分类

为检测愈伤组织诱导初期基因的差异表达情况,我们分别将在CIM上诱导24 h的水稻根尖和侧根区的基因表达量与其对应的对照组(即不含2,4-D的N6培养基上培养24 h的根尖和侧根区)基因表达量进行了对比,以 $P<0.05$ 且差异倍数不低于2倍($|\log_2FC(CIM/CK)|\geq 1$)为阈值筛选差异表达基因。根尖筛选出6 571个差异表达基因(上调基因数加下调基因数,下同),其中3 237 (2 589+648)个基因上调表达,3 334 (2 133+1 201)个基因下调表达(图1-A);侧根区有7 721个基因差异表达,其中3 167 (648+2 519)和4 554 (1 201+3 353)个基因分别上调和下调表达(图1-B);648个基因在根尖和侧根区共同上调表达,1 201个基因共同下调表达。

对根尖和侧根区差异表达的基因分别进行GO功能注释和富集分析,差异表达基因被划分到3种GO类别中:生物学过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecule function);三个GO分类下又有不同的GO条目。我们根据显著性 $P<0.05$ 选取了显著富集前30的GO条目,发现根尖和侧根区前30条全部显著富集(表1)。根尖中差异表达基因显著富集的前30个GO条目包括:10个生物学过程GO条目(酰胺的生物学合成、酰胺的代谢等)、14个细胞组分GO条目和6个分子功能GO条目。侧根区差异表达基因显著富集的前30个GO条目包括:14个生物学过程GO条目(氧化

还原过程、氧化应激反应等)、5个细胞组分GO条目和11个分子功能GO条目(氧化还原酶活性、过氧化物酶活性、作用于过氧化氢作为受体的氧化还原酶活性、抗氧化活动、作用于配对供体的氧化还原酶活性等)。由此可知,CIM诱导24 h后根尖和侧根区差异表达基因均在氧化还原反应相关的多个GO条目显著富集,暗示高浓度的生长素导致根尖和侧根区细胞内的氧化还原状态发生了显著变化。

2.2 差异表达基因的KEGG分析

对根尖和侧根区中差异表达基因进行KEGG分析,根据显著分析的 P 值(KEGG富集分析统计学显著水平)选取了前20个KEGG通路。根尖上调表达的基因中富集最显著的是植物激素信号转导通路,其次是过氧化物酶体等通路;根尖下调表达的基因富集的通路有DNA复制、柠檬酸循环等(表2)。侧根区上调表达基因富集的KEGG通路有:DNA复制、错配修复、同源重组等DNA复制相关的通路,RNA相关的RNA运输、RNA聚合酶、RNA降解等通路,以及植物激素信号转导、油菜素类固醇生物合成等激素调控相关的通路;侧根区下调表达的基因显著富集在光合作用等通路(表3)。以上数据结果显示,CIM诱导24 h后根尖和侧根区上调表达的基因均富集在植物激素信号转导通路,表明高浓度生长素诱导的愈伤组织形成初期,水稻根细胞中植物激素对基因表达产生了明显的调控作用。

2.3 生长素信号通路相关基因的差异表达分析

根据以上KEGG分析结果,我们对参与生长素信号通路的主要基因家族进行差异表达分析,包括*OsTIR1/AFB2*家族、*OsIAAs*家族、*OsARFs*家族,并绘制了差异表达热图(图2)。

本次RNA-seq检测到了生长素受体*OsTIR1/AFB2*及其3个预测同源基因的转录本,主根根尖在CIM上诱导24 h后,*OsAFB2*和*LOC_Os02g52230*下调表达(分别为1.3倍和1.48倍),*LOC_Os11g31620*上调表达1.48倍,*OsTIR1*则未差异表达;而侧根区中,这5个同源基因都未差异表达(图2-A)。说明高浓度的外源2,4-D处理对水稻根组织中生长素受体基因表达的影响不明显。

*OsIAA*家族31个成员中,有10个*OsIAAs*在根尖

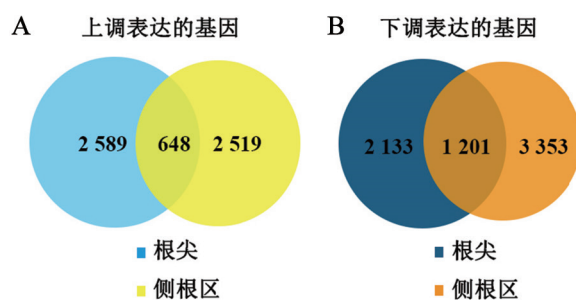


图1 根尖和侧根区差异表达基因的交集分析

Fig.1 Intersection analysis of differentially expressed genes between root tip and lateral root region

A: 根尖和侧根区上调表达基因数; B: 根尖和侧根区下调表达基因数。

表1 根尖和侧根区差异表达基因显著富集的前30个GO条目

Table 1 Top 30 enriched GO terms of differentially expressed genes in root tip and lateral root region

根尖		侧根区	
GO条目	P值	GO条目	P值
结构性分子的活性	1.69×10 ⁻¹²	核糖体	1.18×10 ⁻²⁴
核糖体的结构组成	1.69×10 ⁻¹²	核糖体的结构组成	1.18×10 ⁻²⁴
核糖体	1.69×10 ⁻¹²	核糖核蛋白复合体	1.18×10 ⁻²⁴
细胞质部分	1.71×10 ⁻¹¹	翻译	5.48×10 ⁻¹⁸
细胞组分	3.01×10 ⁻⁹	肽的生物合成过程	3.79×10 ⁻¹⁵
核糖核蛋白复合体	3.25×10 ⁻⁹	酰胺的生物合成过程	8.22×10 ⁻¹⁵
非膜结构的细胞器	3.25×10 ⁻⁹	肽的代谢过程	1.80×10 ⁻¹⁴
细胞质	3.25×10 ⁻⁹	细胞的酰胺代谢过程	1.94×10 ⁻¹⁴
大分子复合体	6.11×10 ⁻⁹	结构性分子的活性	1.47×10 ⁻¹²
细胞内非膜结构的细胞器	1.29×10 ⁻⁸	亚铁血红素结合	4.59×10 ⁻¹²
微管运动活性	3.11×10 ⁻⁸	氧化还原过程	8.93×10 ⁻¹⁰
微管运动	3.13×10 ⁻⁷	四吡咯	9.66×10 ⁻¹⁰
膜	5.15×10 ⁻⁷	非膜结构的细胞器	1.84×10 ⁻⁹
肽的代谢过程	6.12×10 ⁻⁷	水解O-糖基化合物的水解酶活性	1.45×10 ⁻⁸
细胞酰胺的代谢过程	9.00×10 ⁻⁷	细胞内非膜结构的细胞器	2.97×10 ⁻⁸
蛋白质复合体的绑定	1.31×10 ⁻⁶	有机氮化合物生物合成过程	2.97×10 ⁻⁸
肽的生物合成过程	2.77×10 ⁻⁶	生物学过程	2.14×10 ⁻⁷
有机氮化合物代谢过程	2.87×10 ⁻⁶	作用于糖基键的水解酶活性	2.56×10 ⁻⁷
翻译	3.05×10 ⁻⁶	氧化还原酶活性	3.23×10 ⁻⁷
酰胺的生物合成过程	3.05×10 ⁻⁶	过氧化物酶活性	6.17×10 ⁻⁷
生物学过程	3.38×10 ⁻⁶	细胞氮化合物的生物合成过程	1.70×10 ⁻⁶
单有机体过程	3.63×10 ⁻⁶	过氧化氢作为受体的氧化还原酶活性	1.70×10 ⁻⁶
膜部分	4.07×10 ⁻⁶	细胞质	3.08×10 ⁻⁶
细胞	6.10×10 ⁻⁶	抗氧化活性	8.07×10 ⁻⁶
细胞部分	6.10×10 ⁻⁶	有机氮化合物的代谢过程	5.70×10 ⁻⁵
定位	9.70×10 ⁻⁶	氧化应激反应	8.09×10 ⁻⁵
细胞内部	1.10×10 ⁻⁵	与分子氧结合或还原的氧化还原酶活性	8.31×10 ⁻⁵
细胞内的细胞器	1.95×10 ⁻⁵	代谢过程	8.31×10 ⁻⁵
微管蛋白结合	1.99×10 ⁻⁵	细胞大分子的生物合成过程	1.27×10 ⁻⁴
微管结合	2.80×10 ⁻⁵	大分子的生物合成过程	1.38×10 ⁻⁴

和侧根区共同上调表达(图2-B), 包括*OsIAA19*、*OsIAA24*、*OsIAA1*、*OsIAA15*、*OsIAA26*、*OsIAA10*、*OsIAA4*、*OsIAA8*、*OsIAA9*和*OsIAA20*。这些上调基因集中分布在系统进化树的相近分枝, 其中位于同一分枝的*OsIAA9*和*OsIAA20*表达上调最显著, 分别达到21倍和31倍。有趣的是, *OsIAA13*和*OsIAA11*在根尖和侧根区的差异表达模式相反, 表现为在侧根区均上调表达, 而在根尖中均下调表达。此外, 侧根中也有2个显著下调表达的*OsIAA*基因——*OsIAA16*和*OsIAA18*, 但它们在根尖中分别表现为未差异表达和上调表达。说明CIM处理

可显著增加水稻根组织中10个*OsIAAs*的表达水平, 在根尖和侧根区具有共性; 然而*OsIAA13*和*OsIAA11*表现出根尖和侧根区表达调控模式相反的特征, 暗示它们可能具有组织特异性的调控功能。

*OsARF*基因家族中, *OsARF15*、*OsARF14*、*OsARF19*和*OsARF10*等4个基因在根尖和侧根区共同上调表达, 此外, 根尖中还有*OsARF23*、*OsARF4*、*OsARF2*、*OsARF11*、*OsARF5*和*OsARF21*等6个基因上调表达以及*OsARF7*、*OsARF1*、*OsARF25*和*OsARF8*等4个基因下调表达, 侧根区只有*OsARF12*、*OsARF22*和*OsARF1*等3

表2 根尖差异表达基因显著富集的前20个KEGG通路

Table 2 Top 20 enriched KEGG pathways of differentially expressed genes in root tip

根尖上调基因KEGG通路	基因数	根尖下调基因KEGG通路	基因数
植物激素信号转导	73	核糖体	219
谷胱甘肽代谢	38	吞噬体	46
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	24	氨基糖和核苷酸糖代谢	50
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	21	类固醇生物合成	18
氨基酸的生物合成	76	糖酵解和糖异生	56
酪氨酸代谢	20	N-多糖的生物合成	21
次生代谢产物的生物合成	232	淀粉和蔗糖的代谢	64
过氧化物酶体	32	DNA复制	28
硫代谢	17	氧化磷酸化	62
半胱氨酸和蛋氨酸代谢	33	柠檬酸循环	26
β-丙氨酸新陈代谢	16	糖基磷脂酰肌醇锚的生物合成	13
ABC转运蛋白	7	半乳糖代谢	26
柠檬烯和蒎烯降解	9	内吞作用	43
脂肪酸降解	18	氰基酸代谢	17
色氨酸代谢	11	果糖和甘露糖的代谢	23
丙烷、哌啶、吡啶生物碱合成	9	磷脂酰肌醇信号系统	19
牛磺酸与次牛磺酸代谢	9	类苯基丙烷生物合成	48
2-氧代羧酸的代谢	19	嘧啶代谢	43
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成	8	磷酸肌醇代谢	19
异喹啉生物碱生物合成	10	碱基的切除修复	18

表3 侧根区差异表达基因显著富集的前20个KEGG通路

Table 3 Top 20 enriched KEGG pathways of differentially expressed genes in lateral root region

侧根区上调基因KEGG通路	基因数	侧根区下调基因KEGG通路	基因数
核糖体	228	类苯基丙烷的生物合成	70
核糖体在真核生物中的生物发生	40	次生代谢产物的生物合成	222
RNA运输	51	苯丙氨酸的代谢	47
嘧啶代谢	37	淀粉和蔗糖的代谢	57
DNA复制	23	光合作用	37
嘌呤代谢	41	代谢途径	379
错配修复	16	光合作用-天线蛋白	14
同源重组	18	氰基氨基酸代谢	22
碱基的切除修复	15	柠檬烯和蒎烯降解	11
ABC转运蛋白	6	丙烷、哌啶、吡啶生物碱合成	9
核苷酸的切除修复	19	脂肪酸伸长	11
RNA聚合酶	13	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	19
植物激素信号转导	39	不饱和脂肪酸的生物合成	15
RNA降解	22	亚麻酸代谢	13
剪接体	39	β-丙氨酸新陈代谢	13
油菜素类固醇生物合成	4	角质、软木脂和蜡的生物合成	8
泛素介导的蛋白水解作用	23	半乳糖代谢	18
玉米素的生物合成	4	乙醛酸和二羧酸代谢	19
生物素代谢	5	卟啉和叶绿素代谢	13
赖氨酸的生物合成	4	其他多糖降解	7

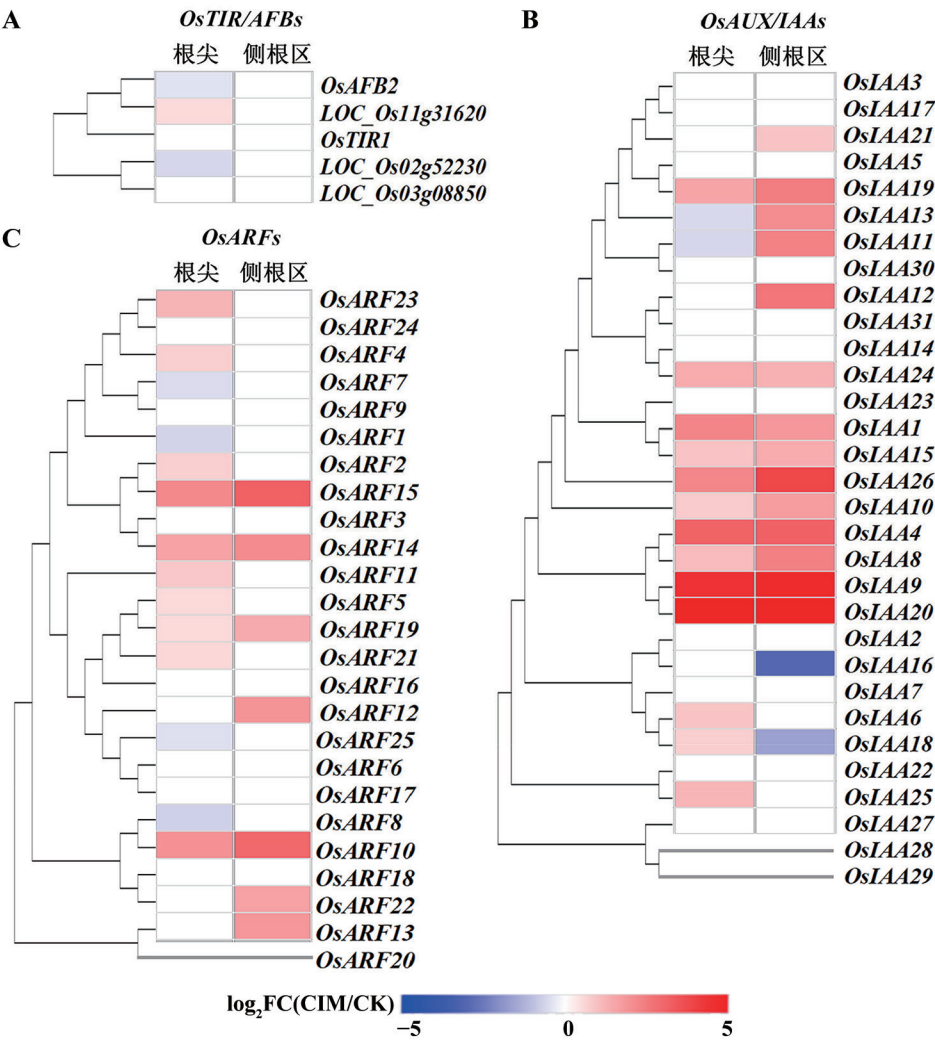


图2 生长素信号通路基因差异表达热图
Fig.2 Heatmap of differentially expressed genes involved in auxin signaling pathway
A: *OsTIR/AFBs*差异表达热图; B: *OsAUX/IAAs*差异表达热图; C: *OsARFs*差异表达热图。

个基因上调表达(图2-C)。可见, *OsARFs*家族成员在根尖和侧根区的差异表达模式相似性较低, 除4个*OsARFs*在根尖和侧根区差异表达模式相同外, 其他差异表达基因及其表达模式均不相同。

2.4 生长素生物合成和代谢相关基因表达分析

为进一步探究生长素对根尖和侧根区愈伤组织诱导的影响, 我们对生长素合成基因家族*OsYUCCA*和生长素代谢相关基因家族*OsGH3*进行了差异表达分析, 并绘制了基因差异表达热图(图3)。

水稻主根在CIM上诱导24 h后, RNA-seq共检测到9个*OsYUCCA*基因的转录本和10个*OsGH3*基

因的转录本, 其中*OsYUCCA1*在根尖和侧根区共同上调表达, 分别提高了5.2倍和3.5倍; 此外, 侧根区还有*OsYUCCA6*、*OsYUCCA9*、*OsYUCCA10*表达上调和*OsYUCCA4*表达下调; 根尖中只有*OsYUCCA9*下调表达(图3-A)。结果显示*OsYUCCA9*在根尖和侧根区具有相反的差异表达模式。

在*OsGH3*基因家族中, *OsGH3.8*、*OsGH3.2*、*OsGH3.1*、*OsGH3.4*在根尖和侧根区共同显著上调表达(图3-B), 以上4个*OsGH3s*在系统进化树中分布于同一分枝, 其中进化关系最近的*OsGH3.1*和*OsGH3.4*表达增强最显著, 在根尖中分别上调了

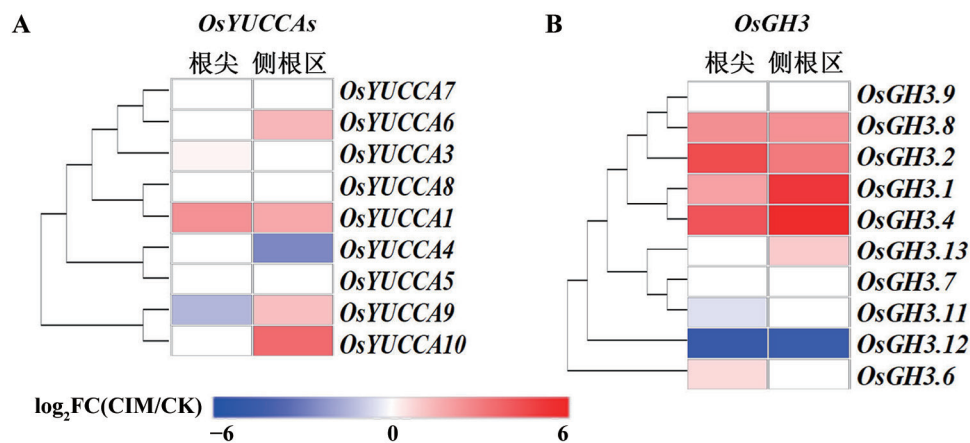


图3 *OsYUCCAs*和*OsGH3s*差异表达热图
Fig.3 Heatmap of differentially expressed *OsYUCCAs* and *OsGH3s*
A: *OsYUCCAs*差异表达热图; B: *OsGH3s*差异表达热图。

34倍和52倍,在侧根区上调了18.4倍和4倍;而*OsGH3.12*在根尖和侧根区表达均明显下调,分别降低了28倍和23倍(图3-B)。整体上,根尖和侧根区的*OsGH3*基因家族对外源生长素具有相似的差异表达模式。

以上数据分析表明,主根根尖和侧根区在CIM诱导24 h后,生长素合成相关*OsYUCCAs*基因家族在根尖和侧根区的差异表达模式相差较大,而生长素代谢相关*OsGH3s*基因家族的差异表达模式相似。

2.5 生长素运输载体基因表达分析

为了探究生长素输入和输出对根尖和侧根区愈伤组织诱导的影响,我们对生长素输入载体*OsAUX/LAX*基因家族和生长素输出载体*OsPIN- FORMED*基因家族进行了差异表达分析。如图4-A所示,在CIM上诱导24 h后,生长素输入载体基因*OsAUX2*在根尖和侧根区表达均上调,分别增加2.1倍和2.5倍;不同的是,根尖无*OsAUXs*下调表达,但侧根区*OsAUX5*和*OsAUX3*分别下调了4倍和3倍。

如图4-B所示,生长素输出基因*OsPIN*家族中,*OsPIN1A*、*OsPIN8*和*OsPIN3A*等3个基因在根尖和侧根区均上调表达,其中*OsPIN8*和*OsPIN3A*表达增幅较大,*OsPIN8*在根尖和侧根区分别上调了20倍和45倍,*OsPIN3A*在根尖和侧根区分别上调了60倍和15倍;*OsPIN2*在根尖和侧根区共同下调表达,

分别下调了1.6倍和2.8倍。此外,侧根区还有*OsPIN1C/B/D*和*OsPIN9*共4个*OsPIN*基因上调表达,*OsPIN5A*下调表达;根尖中还有1个*OsPIN5C*上调表达。

可见,水稻根尖和侧根区在CIM上诱导24 h后,生长素输入载体基因*OsAUX2*在根尖和侧根区共同上调表达,差异表达下调的基因仅在侧根区,表明生长素输入载体基因在根尖和侧根区具有不同的差异表达模式。生长素输出载体家族中*OsPIN1A*、*OsPIN8*、*OsPIN3A*在根尖和侧根区显著共同上调表达,*OsPIN2*共同下调表达,在侧根区差异表达的基因数多于根尖。

3 讨论

本研究利用RNA-Seq技术检测到CIM诱导24 h后的水稻主根根尖和侧根区分别有6 571和7 721个基因差异表达。经GO分析发现,侧根区的氧化还原过程、氧化应激反应、氧化还原酶活性等GO条目均显著富集。KEGG分析也发现,根尖上调基因在过氧化物酶体和氧化磷酸化通路显著富集,表明高浓度的生长素诱导根尖细胞的氧化还原状态发生改变。有研究表明,拟南芥分生组织细胞的氧化还原状态可调控干细胞命运(Zeng等2017),但这一过程如何影响愈伤组织形成还需要进一步的研究。

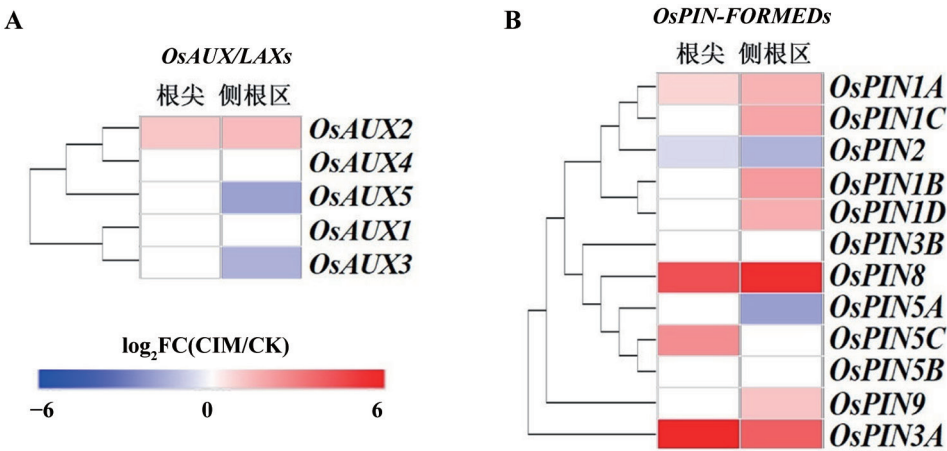


图4 *OsAUX/LAXs*和*OsPIN-FORMEDs*差异表达热图
Fig.4 Heatmap of differentially expressed *OsAUX/LAXs* and *OsPIN-FORMEDs*
A: *OsAUX/LAXs*差异表达热图; B: *OsPIN-FORMEDs*差异表达热图。

KEGG分析发现, 根尖和侧根区的差异表达基因均在植物激素信号转导通路显著富集。我们通过对生长素的信号通路、合成、代谢和运输的基因家族进行差异表达分析, 发现根尖和侧根区这些基因家族的差异表达存在明显的相似性和差异性。其中, 根尖和侧根区的生长素受体基因*OsTIR/AFBs*及其同源基因对CIM培养均无明显的差异表达, 说明生长素受体基因对高浓度的外源2,4-D处理不敏感, 并且在根尖和侧根区具有相似的差异表达模式。

*Aux/IAAs*是一类快速响应生长素诱导的基因家族(Reed 2001)。我们发现*OsIAA20*和*OsIAA9*等10个*OsIAA*基因在CIM处理的根尖和侧根区共同增强表达, 并且这些*OsIAA*基因的系统进化关系接近, 可能在根来源愈伤组织诱导中具有相似的调控作用, 但它们是否存在功能冗余的问题还需要相关突变体验证。引起我们注意是, 进化关系相邻的*OsIAA11*和*OsIAA13*基因表现出在根尖和侧根区独特的差异表达模式, 即*OsIAA11*和*OsIAA13*在侧根中均被激活表达, 而在根尖则被抑制表达。研究表明*OsIAA11*和*OsIAA13*是控制水稻侧根形成的关键调控基因, *OsIAA11*和*OsIAA13*蛋白结构域II的突变导致与之结合的*ARF*蛋白的功能被持续抑制, 进而抑制了下游的生长素信号通路, 最终导致侧根生发缺陷(Kitomi等2012; Zhu等2012)。Osiaa11

突变体的侧根区不能形成愈伤组织, 但根尖可以, 说明水稻不同组织形成愈伤组织是受不同生长素信号途径调控的(Guo等2018)。那么*OsIAA11*和*OsIAA13*又是与哪些*ARFs*相互作用的呢? 我们进一步分析了*ARFs*在侧根和主根中的表达情况。

*ARF*转录因子和*Aux/IAA*蛋白之间的相互作用是生长素调控的核心(Guilfoyle和Hagen 2007)。水稻基因组中有31个*OsAux/IAAs*基因, 以及25个*OsARFs*基因(Jain等2006; Wang等2007)。*OsARF*基因家族的分析结果显示*OsARF14*、*OsARF15*、*OsARF10*和*OsARF19*等4个基因表达水平在根尖和侧根区均增强, 我们推测这四个*OsARFs*可能是调控下游基因促进根愈伤组织形成中共同作用的基因; 除以上4个*OsARFs*增强表达外, 侧根区还有*OsARF12*、*OsARF13*和*OsARF22*基因的表达增强, 而这3个基因表达量在根尖中均未变化; 此外, 根尖中出现多个下调表达的*OsARF*, 侧根区却无下调表达的*OsARF*。可见, *OsARFs*基因在不同根细胞中对生长素诱导的表达变化具有明显的差异性。在拟南芥侧根和侧根愈伤组织形成中*IAA14*介导*ARF7*和*ARF19*蛋白调控了Lateral Organ Boundaries Domain (LBD)/Asymmetric Leaves2-Like蛋白家族的一些成员, 如LBD16、LBD17、LBD18和LBD29, 进而促进了生长素诱导的愈伤组织形成(Fan等2012; Liu等2018)。在水稻中尚未发现因

*OsARF*基因突变引起的无侧根突变体。因此, 我们仍无法确定与*OsIAA11*和*OsIAA13*相互结合的*OsARFs*成员。然而, 正是不同的*ARFs-Aux/IAA*表达模式及其组合方式极大地拓展了生长素响应的多样性和复杂性。根尖和侧根区分别有10个和7个*OsARF*同时上调表达, 推测在根尖和侧根区的愈伤组织形成过程中多个*OsARF*共同作用且存在功能冗余, 接下来的实验可通过构建*OsARF*单突变体和多突变体, 以及蛋白互作实验确认水稻根愈伤组织形成中起作用的*OsARFs*和*ARFs-Aux/IAA*的互作组合, 扩展控制植物生长发育的生长素信号调控网络的研究。

生长素在细胞间的浓度梯度对于生长素的调控作用至关重要, 而生长素的分布和浓度由生长素的合成、降解、运输等控制(Vanneste和Friml 2009)。生长素合成相关*OsYUCCAs*基因家族和运输相关*OsPINs*、*OsAUXs*基因家族在根尖和侧根区的差异表达模式相差较大, 体现了水稻根尖和侧根区生长素响应的组织特异性, 而生长素代谢相关*OsGH3s*基因家族的差异表达模式相似, 表明根尖和侧根区愈伤组织形成过程中生长素响应也具有相似性。其中*OsAUX2*和*OsGH3.8*、*OsGH3.2*、*OsGH3.1*、*OsGH3.4*在根尖和侧根区共同显著上调表达, 因此, *OsAUX2*和以上4个*OsGH3*在愈伤组织形成中可能是关键的生长素输入载体和生长素活性调控基因, 后续可通过构建相应的转基因株系进一步进行功能验证。

侧根区愈伤组织由快速分裂的类根原基细胞团组成(Hu等2017; Hu和Xu 2016), 而根尖主要由根尖分生组织及静止中心细胞组成(Dinnyeny和Benfey 2008)。侧根区和根尖愈伤组织的细胞来源不同可能是其生长素相关基因表达调控差异性的原因。目前, 侧根原基起源的愈伤组织形成的发育过程和遗传途径已取得很大进展(Liu等2014, 2018; Sugimoto等2010), 而根尖愈伤组织的形成机制还需要更多的研究和探索。开展水稻不同体细胞脱分化过程中生长素信号转导途径基因家族的组织特异性研究, 将为阐明生长素响应的组织特异性提供新的认识。

参考文献(References)

- Anders S, Huber W (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*, 11 (10): R106
- Dinnyeny JR, Benfey PN (2008). Plant stem cell niches: standing the test of time. *Cell*, 132 (4): 553–557
- Fan M, Xu C, Xu K, et al (2012). LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Res*, 22 (7): 1169–1180
- Guilfoyle TJ, Hagen G (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol*, 10 (5): 453–460
- Guo F, Zhang H, Liu W, et al (2018). Callus initiation from root explants employs different strategies in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 59 (9): 1782–1789
- Hu B, Zhang G, Liu W, et al (2017). Divergent regeneration-competent cells adopt a common mechanism for callus initiation in angiosperms. *Regeneration*, 4 (3): 132–139
- Hu X, Xu L (2016). Transcription factors *WOX11/12* directly activate *WOX5/7* to promote root primordia initiation and organogenesis. *Plant Physiol*, 172 (4): 2363–2373
- Jain M, Kaur N, Garg R, et al (2006). Structure and expression analysis of early auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct Integr Genomics*, 6 (1): 47–59
- Kitomi Y, Inahashi H, Takehisa H, et al (2012). OsIAA13-mediated auxin signaling is involved in lateral root initiation in rice. *Plant Sci*, 190: 116–122
- Kramer EM, Bennett MJ (2006). Auxin transport: a field in flux. *Trends Plant Sci*, 11 (8): 382–386
- Křeček P, Skůpa P, Libus J, et al (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol*, 10 (12): 249
- Lee HJ, Kim HS, Park JM, et al (2020). PIN-mediated polar auxin transport facilitates root-obstacle avoidance. *New Phytol*, 225 (3): 1285–1296
- Liu J, Sheng L, Xu Y, et al (2014). *WOX11* and *12* are involved in the first-step cell fate transition during de novo root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26 (3): 1081–1093
- Liu W, Yu J, Ge Y, et al (2018). Pivotal role of *LBD16* in root and root-like organ initiation. *Cell Mol Life Sci*, 75 (18): 3329–3338
- Nakazawa M, Yabe N, Ichikawa T, et al (2001). *DFL1*, an auxin-responsive *GH3* gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant J*, 25 (2): 213–221
- Péret B, Swarup K, Ferguson A, et al (2012). *AUX/LAX* genes

- encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 24 (7): 2874–2885
- Petrásek J, Friml J (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136 (16): 2675–2688
- Reed JW (2001). Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 6 (9): 420–425
- Robert HS, Friml J (2009). Auxin and other signals on the move in plants. *Nat Chem Biol*, 5 (5): 325–332
- Roosjen M, Paque S, Weijers D (2018). Auxin response factors: output control in auxin biology. *J Exp Bot*, 69 (2): 179–188
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM (2010). *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell*, 18 (3): 463–471
- Swarup R, Bhosale R (2019). Developmental roles of AUX1/LAX auxin influx carriers in plants. *Front Plant Sci*, 10: 1306
- Takase T, Nakazawa M, Ishikawa A, et al (2004). *yd1-D*, an auxin-responsive *GH3* mutant that is involved in hypocotyl and root elongation. *Plant J*, 37 (4): 471–483
- Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, et al (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*, 446 (7136): 640–645
- Vanneste S, Friml J (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136 (6): 1005–1016
- Wagner D, Weijers D (2016). Editorial overview: growth and development: signals and communication in plant pluripotency, differentiation and growth. *Curr Opin Plant Biol*, 29: v-ix
- Wang D, Pei K, Fu Y, et al (2007). Genome-wide analysis of the *auxin response factors (ARF)* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Gene*, 394 (1–2): 13–24
- Zeng J, Dong Z, Wu H, et al (2017). Redox regulation of plant stem cell fate. *EMBO J*, 36 (19): 2844–2855
- Zhao Y (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 49–64
- Zhu ZX, Liu Y, Liu SJ, et al (2012). A gain-of-function mutation in *OsIAA11* affects lateral root development in rice. *Mol Plant*, 5 (1): 154–161

RNA-seq-based differential expression analysis of auxin-related genes during callus induction derived from root tip and lateral root region in rice (*Oryza sativa*)

HUANG Yizi, GUO Fu, HAN Ning, BIAN Hongwu*

Institution of Genetics and Regenerative Biology, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: In this study, we used high-throughput transcriptome sequencing (RNA-seq) to analyze differentially expressed genes in root tip (RT) and lateral root region (LRR) when rice (*Oryza sativa*) primary roots were induced on callus induction medium (CIM) for 24 hours. Through phylogenetic relationship and differential expression analyses of gene families involved in auxin signaling pathway, we found that the expressions of auxin receptor *OsTIR1/AFBs* family genes did not apparently change during callus induction in RT and LRR. The expressions of 10 *OsIAA* genes with close phylogenetic clades, including *OsIAA20* and *OsIAA9*, were enhanced dramatically in RT and LRR. However, a clade of *OsIAA11* and *OsIAA13* with adjacent evolutionary relationship showed an opposite differential expression pattern between RT and LRR. In contrast, the differential expressions of *OsARF* family genes were apparently different between RT and LRR. This study analyzed similarities and differences of the differentially regulated expression of auxin-related genes between RT and LRR, providing valuable data for further investigating the tissue specificity of auxin response in the root-derived callus induction.

Key words: callus; RNA-seq; auxin; root; rice

Received 2019-11-12 Accepted 2020-06-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31771776), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LGN18C130001), and the National Science Foundation for Post-doctoral Scientists of China (508000-X91806).

*Corresponding author (hwbian@zju.edu.cn).