

烤烟品种 K326 及其耐低温抗早花变异系基因表达谱分析

杨 静^{1,2}, 陈 杰³, 陈建军², 邓世媛², 邱妙文⁴, 赵伟才⁴, 王 维^{2*}

(1. 黔东南州烟草公司镇远县分公司, 贵州 镇远 557700; 2. 华南农业大学农学院, 广州 510642; 3. 黔东南州烟草公司, 贵州 凯里 556000; 4. 广东省烟草南雄科学研究所, 广东 南雄 512400)

摘要: 为了解烤烟早花与抗早花的形成及调控机制, 本研究利用安捷伦烟草全基因组芯片分析了烤烟品种 K326 及其抗早花品系华烟 06 茎尖端花芽分化过程中基因的表达。结果表明, K326 与华烟 06 距离各自花芽分化相同时间的茎尖端未花芽分化时的差异探针数最多, 有 5295 个; K326 分化当天各品种(品系)之间相比较差异探针数量最少, 有 2116 个。与分子功能相关的差异基因主要与催化性能、转运性能、结合性能和转录调节性能有关; 与细胞组成相关的差异基因主要是与细胞、细胞组分、细胞器相关的基因; 与生物学过程相关的差异基因种类最多最复杂, 涉及到植株抗逆性、生长、发育等方面, 这对进一步研究与从中搜寻与烟草开花相关的基因奠定了基础。

关键词: 烤烟; 早花; 抗早花; 基因芯片; 表达谱

中图分类号: S572.03

文章编号: 1007-5119(2015)02-0093-06

DOI: 10.13496/j.issn.1007-5119.2015.02.017

Gene Expression Profile Analysis of Flue-cured Tobacco K326 and the Premature Flowering Resistance Varieties

YANG Jing^{1,2}, CHEN Jie³, CHEN Jianjun², DENG Shiyuan², QIU Miaowen⁴, ZHAO Weicai⁴, WANG Wei^{2*}

(1. Zhenyuan County Tobacco Company of Guizhou Province, Zhenyuan, Guizhou 557700, China; 2. College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Qiandongnan Tobacco Company of Guizhou Province, Kaili, Guizhou 556000, China; 4. Nanxiong Institute of Tobacco Science, Guangdong Provincial Tobacco Company, Nanxiong, Guangdong 512400, China)

Abstract: To study the regulation and formation mechanism of premature flowering and premature flowering resistance of flue-cured tobacco, we used the Agilent Tobacco Oligo Microarray to deduce the expression profiling of flue-cured tobacco K326 and its premature flowering resistance variety Huayan06 under the flower bud differentiation process. The result showed that the same days from their flower bud differentiation the number of differential probes were the maximum amount of the comparative item between K326 and Huayan06. The number of the probe was 5295. On the day of K326 flower bud differentiation, the number of differential probe was the minimum amount. The number of the probe was 2116. The molecular function mainly included catalytic activity, transporter activity, binding and transcription regulator activity. The cellular component mainly included cell, cell part and organelle. The biological process was the most complex, involved plant resistance, growth, development, etc. It would establish a basis for the further study and search for genes associated with tobacco flowering.

Keywords: flue-cured tobacco; premature flowering; premature flowering resistance; gene chip; expression profile

烟草早花指植株未能达到正常生长应具有的高度和叶数就现蕾开花。国内外烤烟均存在烟草早花问题^[1-2], 严重影响着烟叶的生产。近百年来, 人们在开花生理生化方面进行了大量的探索^[3], 直到 1990 年, Yanofsky 等^[4]成功地分离了花器官发育控

制基因 *AGAMOUS*, 植物发育生物学的机理研究由以生理生化为主转变到以分子生物学及生理遗传学为主。拟南芥开花基因的研究开启了植物开花基因研究的大门, 水稻、谷物、果树中与开花相关的基因的研究也已取得了很大的进展, 与开花相关的

基金项目: 国家烟草专卖局重点科技项目“耐低温抗早花烤烟新品种选育及遗传生理机理研究”(110200902043); 广东省烟草专卖局(公司)科技项目“耐低温抗早花烤烟新品种选育”(200816); 国家自然科学基金项目“抗早花烟草成花生理信号物质运转及其抵御低温的生理机理研究”(31101108)

作者简介: 杨 静, 女, 硕士研究生, 研究方向为烟草遗传育种。E-mail: yangjinggzchina@163.com。*通信作者, E-mail: wangwei@scau.edu.cn

收稿日期: 2014-07-08

修回日期: 2015-03-09

基因相继被克隆^[5-6]。植物生长发育是一个十分复杂的过程,涉及到众多基因的表达和调控,利用基因芯片技术,可以快速高效地检测目的材料中成千上万个基因的表达情况^[7]。朱素琴等^[8]利用 Affymetrix 水稻表达谱芯片,分析了高盐低温胁迫下水稻转录因子基因的表达谱。宋雯雯等^[9]利用基因芯片技术,研究在不同干旱胁迫时间下强抗旱品种晋豆 23 幼苗根部基因的表达情况。许州达等^[10]在分析了小麦与水稻基因的同源性后,利用水稻的基因芯片检测了小麦耐旱的相关基因的表达。曾黎琼等^[11]通过 GenBank 搜索已发布的花序发育基因序列,设计特异性的引物,采用 PCR 法扩增,获得了相应的基因片段后利用这些基因片段制备基因芯片,然后用此芯片与已标记的非洲菊 cDNA 杂交,用以分析同一基因在非洲菊不同发育时期的表达情况和同一基因在不同肥料条件下的表达情况。本研究利用上海伯豪生物技术有限公司 Agilent 烟草全基因组表达谱芯片,对烟草早花与抗旱花基因的表达进行分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料及种植

本试验选用烤烟 (*Nicotiana tabacum* L.) 品种 K326 及其变异系华烟 06 作为试验材料。K326 易出现早花,华烟 06 则表现出明显的抗旱花优势。为了使低温胁迫效果显著,早花与抗旱花的差异表现更明显,试验比常规生产提前 20 d 播种(2011 年 11 月 15 日),提早移栽(2012 年 2 月 5 日),并于移栽后第 20 天开始对 K326 和华烟 06 茎尖端进行花芽分化观察,每 3 d 采一次样,采样时间为 8:00,分别取 3 个茎尖端作为重复,记录样品采集时间及花芽分化情况,采集至观测到华烟 06 花芽分化,并记录现蕾时间。所采样品用液氮固定后-80 °C 保存备用,用于芯片检测的样品采集时间及材料标记如图 1。

1.2 RNA 的抽提和纯化

采用 TRIZOL Reagent (Cat#15596-018, Life

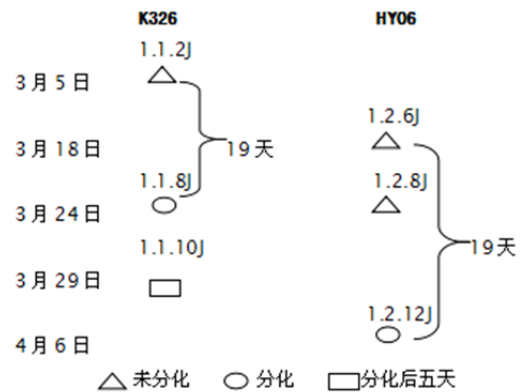


图 1 基因芯片材料选择设计

Fig. 1 The gene chip material sampling design

technologies, Carlsbad, CA, US) 抽提所得 total RNA 质检合格后使用 RNeasy mini kit (Cat#74106, QIAGEN, GmBH, Germany)和 RNase-Free DNase Set (Cat#79254, QIAGEN, GmBH, Germany)纯化。试验样品 RNA 采用试剂盒 Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-Color (Cat#5190-2305, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)和标准操作流程对样品 total RNA 中的 mRNA 进行放大和标记,用 RNeasy mini kit (Cat#74106, QIAGEN, GmBH, Germany) 纯化标记后的 cRNA。

1.3 芯片杂交扫描

按照 Agilent 表达谱芯片配套提供的杂交标准流程和配套试剂盒, Gene Expression Hybridization Kit (Cat#5188-5242, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)杂交,并在洗缸 staining dishes (Cat#121, Thermo Shandon, Waltham, MA, US)中洗片。完成杂交的芯片采用 Agilent Microarray Scanner (Cat#G2565CA, Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)进行扫描。

1.4 基因芯片数据分析

扫描数据采用 Gene Spring Software 11.0 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)进行归一化处理,所用的算法为 Quantile。归一化的数据根据试验设计两两比较,计算倍数差异 Fold Change (FC) = SignalA / SignalB, 算法为 2 (归一化 A-归一化 B)。登陆上海伯豪生物服务在线网站

(<http://www.shanghaiabiotech.com>), 利用在线 SAS 系统进行数据分析。通过 GO (Gene Ontology) 分析对两倍以上差异表达基因进行功能注释和富集分析。

1.5 荧光定量 PCR 验证

利用烟草 Actin 基因 (AB158612) 为内参, 从基因芯片分析结果中随机挑选出 5 个与开花相关的基因, 进行实时荧光定量 PCR, 荧光定量 PCR 所用材料与基因芯片的材料及处理方式完全一样。3 次重复, 反应条件为 95 °C, 10 min; 接着进行 40 个循环: 95 °C, 15 秒; 60 °C, 30 s。算法为 $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

2 结 果

2.1 芯片数据验证

试验中 K326 于 4 月 11 日现蕾, 华烟 06 于 4 月 24 日现蕾, 二者现蕾时间相差 13 d。为了验证芯片分析结果, 随机挑选了 5 个与开花有关并具有代表性的差异基因 (CCR2, ELF4, AGL20, CBF1, COL9) 进行荧光定量 PCR 验证, 结果表示芯片表达谱信息具有较高的可靠性。

2.2 芯片扫描结果中差异探针数的基本特征

按照两倍以上 ($FC > 2$ 或 $FC < 0.5$) 差异为有效差异的标准筛选差异探针, 将基因表达情况分别进行纵向比较和横向比较。纵向比较为 K326 和华烟 06 各自花芽分化过程中茎尖端基因表达情况的比较; 横向比较包括: K326 和华烟 06 距离各自花芽分化 19 d 时茎尖端基因表达情况的比较; K326 花芽分化当天, K326 与华烟 06 的比较; 花芽分化时 K326 茎尖端基因表达情况与华烟 06 的比较 (表 1)。

表 1 差异探针分析

Table 1 Analysis of differential probes

比较项	差异探针数/个	上调数量/个	下调数量/个	具有功能注释基因/个	注释探针所占比例/%
1.1.2Jvs1.1.8J	4620	1762	2858	2037	51.5
1.1.8Jvs1.1.10J	3080	1348	1732	1325	49.7
1.2.6Jvs1.2.8J	3311	1920	1391	1464	50
1.1.2Jvs1.2.6J	5295	2198	3097	2235	49.6
1.1.8Jvs1.2.8J	2116	1255	861	928	50.5
1.1.8Jvs1.2.12J	3652	1891	1761	1577	50.5

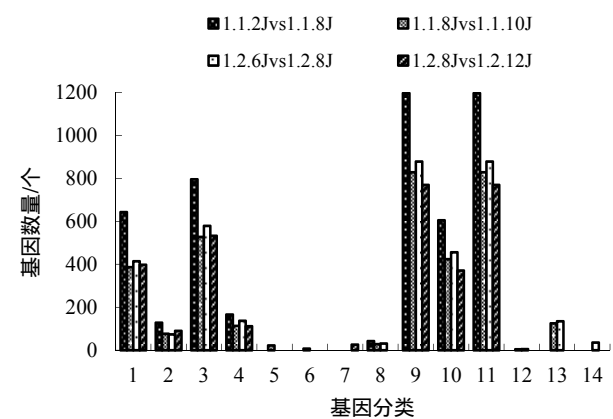
其中 K326 与华烟 06 距离各自花芽分化相同时间的茎尖端未花芽分化时的差异探针数最多, 有 5295 个; K326 分化当天各品种 (品系) 之间相比较差异探针数量最少, 有 2116 个。

2.3 纵向比较中差异基因的功能分类及富集分析

华烟 06 中与分子功能相关的差异表达基因可分为 13 类, 而 K326 只有 12 类, 其中少了蛋白标签 (protein tag); 华烟 06 中与细胞组分相关的差异基因有 9 类, K326 有 10 类, 多了与共质体 (symplast) 相关的基因 (表 2)。

K326 花芽分化过程中, 未分化与分化相比, 分子功能中显著富集的差异基因主要与催化性能、转运性能、结合性能和转录调节性能有关, 这与华烟 06 一致; K326 花芽分化与分化后 5 d 相比, 除了与催化性能、转运性能、结合性能和转录调节性能有关的基因在茎尖端显著富集之外, 与酶调节活性、营养贮存活性有关的基因也显著富集; 与细胞组成相关的显著富集的基因有胞外区、细胞、细胞器及细胞组分相关的基因等 (图 2)。

K326 和华烟 06 花芽分化过程中与生物学过程相关的基因分类共有 24 种, 通过极显著富集筛选出 16 种, 其中包括发育过程、刺激应答、生殖过程等 (表 3)。



注: 1.catalytic activity; 2.transporter activity; 3.binding; 4.transcription regulator activity; 5.enzyme regulator activity; 6.nutrient reservoir activity; 7.molecular transducer activity; 8.extracellular region; 9.cell; 10.organelle; 11.cell part; 12.extracellular region part; 13.organelle part; 14.membrane-enclosed lumen

图 2 与分子功能及细胞组成相关的显著富集基因

Fig. 2 Molecular function related and cellular component related significantly enriched genes

表2 差异表达基因的GO功能分类

Table 2 GO functional category of differential expressed genes

本体	基因本体术语	K326		华烟 06	
		1.1.8Jvs1.1.10J	1.1.2Jvs1.1.8J	1.2.6Jvs1.2.8J	1.2.8Jvs1.2.12J
分子功能	catalytic activity	643	387	414	398
	structural molecule activity	27	22	23	24
	transporter activity	128	77	74	90
	binding	796	528	597	533
	electron carrier activity	24	14	15	18
	antioxidant activity	5	3	5	4
	enzyme regulator activity	28	22	20	19
	transcription regulator activity	166	113	137	112
	translation regulator activity	11	7	3	5
	nutrient reservoir activity	4	7	3	4
	molecular transducer activity	27	21	25	26
	metallochaperone activity	1	1	1	1
	protein tag	-	-	1	1
细胞组分	cell	1197	829	879	770
	membrane-enclosed lumen	46	22	36	31
	envelope	38	36	38	28
	macromolecular complex	103	79	81	62
	organelle	605	424	456	371
	extracellular region part	3	4	5	3
	organelle part	171	125	135	108
	cell part	1197	829	879	770
	symplast	1	1	-	-
生物过程	reproduction	100	53	65	64
	immune system process	32	29	31	24
	metabolic process	625	394	444	392
	cellular process	769	489	550	480
	anatomical structure formation	20	25	21	18
	death	29	25	25	27
	reproductive process	98	52	64	63
	biological adhesion	3	-	-	-
	multicellular organismal process	157	98	115	108
	developmental process	167	100	121	109
	growth	29	22	17	17
	locomotion	1	-	-	-
	pigmentation	2	1	-	1
	rhythmic process	5	6	7	6
	response to stimulus	279	212	220	229
	localization	171	116	107	122
	establishment of localization	167	111	101	119
	multi-organism process	67	42	45	44
	biological regulation	333	224	252	214
	positive regulation of biological process	26	26	16	20
	negative regulation of biological process	32	19	18	12
regulation of biological process	287	192	217	186	

注：“-”表示该类基因没有差异或差异在两倍以下。表3同。

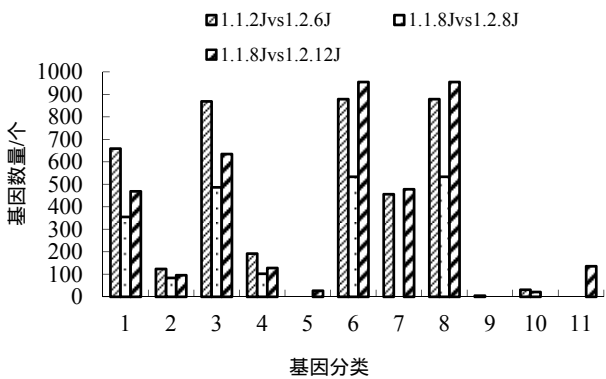
表3 与生物学过程相关的极显著富集基因

Table 3 Biological process related highly significantly enriched genes

基因分类	K326		华烟 06	
	1.1.2Jvs1.1.8J	1.1.8Jvs1.1.10J	1.2.6Jvs1.2.8J	1.2.8Jvs1.2.12J
positive regulation of biological process	26	26	-	20
establishment of localization	167	111	-	119
death	29	25	25	27
cellular process	769	489	550	480
multicellular organismal process	157	98	115	108
developmental process	167	100	121	109
response to stimulus	279	212	220	229
localization	171	116	107	122
biological regulation	333	224	252	214
regulation of biological process	287	192	217	186
reproductive process	98	-	64	63
multi-organism process	67	-	-	44
reproduction	100	-	65	64
growth	-	22	-	-
anatomical structure formation	-	25	-	-
immune system process	-	29	31	24

2.4 横向比较中差异基因的功能分类与富集分析

K326 和华烟 06 距离各自花芽分化天数相同、花芽未分化的茎尖端基因表达情况相比，与分子功能相关的显著富集的基因主要与催化性能、转运性能、结合性能和转录调节性能相关，K326 分化当天与华烟 06 相比，与催化性能、转运性能、结合性能和转录调节性能相关的差异基因显著富集，K326、华烟 06 花芽分化时的差异表达基因中，与催化性能、转运活性、结合性能、转录调节性能、分子转导活性有关的基因显著富集；K326 和华烟 06 距离各自花芽分化相同天数的差异表达基因中，与细胞组成相关的显著富集的基因主要与细胞、细胞器、细胞组分、胞外区组分、胞外区相关，K326 分化当天，与胞外区、细胞、细胞组分相关的基因显著富集（图 3）。



注：1.catalytic activity; 2.transporter activity; 3.binding; 4.transcription regulator activity; 5.molecular transducer activity; 6.cell; 7.organelle; 8.cell part; 9.extracellular region part; 10.extracellular region; 11.organelle part

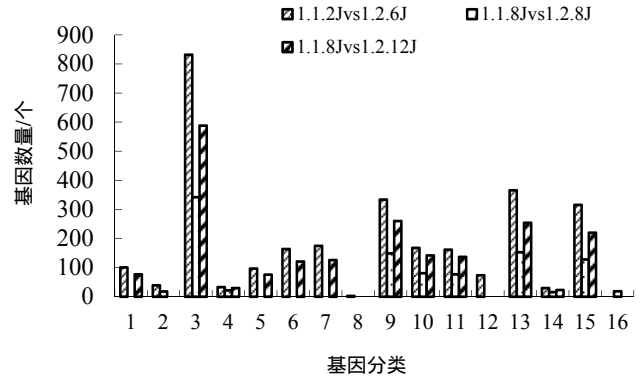
图 3 横向比较中与分子功能及细胞组成相关的显著富集基因

Fig. 3 Molecular function related and cellular component related significantly enriched genes by horizontal comparison

K326 分化当天差异表达基因最少，其中对死亡、刺激反应、定位、生物调节及生物调节进程相关、生物进程正向调节相关的差异基因都有极显著富集（图 4）。

3 讨论

试验结果表明，在低温诱导下，K326 移栽后 65 d 即开始现蕾，而华烟 06 则表现出了明显的抗



注：1.reproduction; 2.immune system process; 3.cellular process; 4.Death; 5.reproductive process; 6.multicellular organismal process; 7.developmental process; 8.Pigmentation; 9.response to stimulus; 10.Localization; 11.estabishment of localization; 12.multi-organism process; 13.biological regulation; 14.positive regulation of biological process; 15.regulation of biological process; 16.anatomical structure formation.

图 4 横向比较中与生物学过程相关的极显著富集基因

Fig. 4 Biological process related highly significantly enriched genes by horizontal comparison

早花特性，移栽后 60 d 才开始花芽分化。植物对环境刺激高度敏感，Lee 等^[12]的研究结果表明，即便是短时期的触碰和黑暗处理也会导致植物基因芯片检测结果存在较大差异。从本试验的比较结果看，K326 与华烟 06 花芽均未分化且距离各自花芽分化时间相同点相比的差异探针数最多，达到 5295 个，而 K326 分化当天，二者之间相比差异探针数量最少，差异探针数为 2116 个，这说明基因表达差异不仅与植株的生长发育时期及遗传因素有关，更多的表达可能与气温及日照长短有关。

各品种（品系）生长发育过程中，分子功能、细胞组成、生物学过程相关的差异基因数量虽有一定差异，但分布比例是一致的，这说明 K326 与华烟 06 生长发育过程中基因总体的调控机制是相似的，这说明调控不同烤烟品种（品系）生长的基本机理相近，是否具有耐低温抗早花特性取决于少量特殊基因的表达。

为了进一步了解花芽分化过程中基因的表达变化及调控机制，有必要对差异基因进行显著和极显著富集分析，以确定差异表达基因行使的主要生物功能及其对植株花芽形成所具有的影响^[13]。虽然 K326 花芽分化当天的差异基因数量最少，但通过显著富集分析，与营养储蓄相关的差异基因显著富

集,这可能与植株的生长发育状态有密切关系。从与细胞组成相关的差异基因的显著富集分析看,K326花芽分化与分化后5 d相比的差异基因的分类要多于其未分化与分化时相比的差异基因分类;而华烟06花芽未分化1与花芽未分化2相比,与细胞组成相关的差异基因种类要比未分化2与分化时相比的多,调控细胞生长的基因的表达有待进一步研究。

4 结 论

本试验通过比较分析,初步了解了K326及其抗旱花品系花芽分化过程中基因的调控及表达机制。与分子功能相关的差异基因主要与催化性能、转运性能、结合性能和转录调节性能有关;与细胞组成相关显著富集的差异基因主要是与细胞、细胞组分、细胞器相关的基因;与生物学过程相关的差异基因种类最多最复杂,涉及到植株抗逆性、生长、发育等方面,这可为进一步研究并从中搜寻与烟草开花相关的基因提供参考依据。

参考文献

- [1] Steinberg R A. Premature blossoming: effects of vernalization, seedling age and environment on subsequent growth and flowering of transplanted tobacco [J]. *Plant Physiology*, 1952, 27(4): 745-753.
- [2] 张国,朱列书,王奎武,等. 烟草早花研究进展[J]. *作物研究*, 2005 (5): 383-385.
- [3] 种康,雍伟东,谭克辉. 高等植物春化作用研究进展[J]. *植物学通报*, 1999, 16 (5): 481-487.
- [4] Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, et al. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, 1990, 346: 35-39.
- [5] Horvath D P. Common mechanisms regulate flowering and dormancy[J]. *Plant Science*, 2009, 177(6): 523-531.
- [6] Matsuda N, Ikeda K, Kurosaka M, et al. Early flowering phenotype in transgenic pears (*Pyrus communis* L.) expressing the *CiFT* gene[J]. *Japan. Soc. Hort. Sci.*, 2009, 78 (4): 410-416.
- [7] 许志茹,李玉花. 基因芯片技术在植物研究中的应用[J]. *生物技术*, 2004, 14 (6): 70-72.
- [8] 朱素琴,季本华,陈名蔚. 高盐低温胁迫下水稻转录因子基因表达谱分析[J]. *科技通报*, 2010, 26 (6): 844-852.
- [9] 宋雯雯,李文滨,韩雪. 干旱胁迫下大豆幼苗根系基因的表达谱分析[J]. *中国农业科学*, 2010, 43 (22): 4579-4586.
- [10] 许州达,景瑞莲,甘强,等. 用水稻基因芯片筛选小麦耐旱相关基因[J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(5): 821-827.
- [11] 曾黎琼,张伟,段玉云,等. 利用基因芯片分析非洲菊花序发育相关基因的表达[J]. *西南农业学报*, 2009, 22 (3): 759-763.
- [12] Lee D, Polisensky D H, Braam J. Genome-wide identification of touch and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes[J]. *New Phytologist*, 2005, 165(2): 429-444.
- [13] 刘明,王米渠,丁维俊,等. 表达谱芯片数据的基因功能富集分析[J]. *生物医学工程学杂志*, 2010, 27(5): 1166-1168, 1196.