

红蓝光调控茉莉开花的转录组分析

陈笛, 郭永春, 陈雪津, 王鹏杰, 陈桂信, 叶乃兴

福建农林大学 园艺学院 茶学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002

陈笛, 郭永春, 陈雪津, 等. 红蓝光调控茉莉开花的转录组分析. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1869–1886.

Chen D, Guo YC, Chen XJ, et al. Transcriptome analysis of flowering regulated by red and blue light in *Jasminum sambac*. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1869–1886.

摘要: 茉莉花是多年生常绿灌木植物, 因其香气芬芳怡人, 常被作为天然香料的原材料。本研究通过红光和蓝光分别处理茉莉植株, 以白光模拟日光作为对照, 观察茉莉植株开花早晚情况, 结果表明, 红光处理可促使茉莉花提前开花且增加花蕾数量, 而蓝光延迟茉莉开花但花蕾数量减少, 且各组之间花蕾数量差异显著。采用 Illumina HiSeq/Miseq 2000 高通量测序技术对红光组、蓝光组及白光组的顶芽部分进行转录组测序, 共得到 2 452 457 条单基因簇 (Unigene), 其中 1 760 723 个 Unigenes 注释到 GO、COG、KEGG、KOG、NR、Pfam、Swiss-Prot、NOG 数据库。差异表达基因分析显示, 对照组 vs 红光组共获得 894 个 DEGs, 对照组 vs 蓝光组共获得 2 690 个 DEGs, 红光组 vs 蓝光组共获得 3 828 个 DEGs, 共有的 DEGs 有 72 个。KEGG 富集分析显示对照组 vs 红光组与对照组 vs 蓝光组共有的显著富集通路包括次生代谢物生物合成、苯丙素生物合成、吲哚生物碱生物合成、光合作用、植物激素信号传导和植物-病原体相互作用等, 并从中筛选出 24 条差异表达基因, 采用荧光定量 PCR 技术检测其表达水平, 进行相关性分析, 结果表明与转录组数据显著相关。通过对转录组数据进一步分析, 发掘出大量调控开花相关的激素 (IAA、ETH、GA、CTK、ABA、SA、JA) 信号转导基因、开花途径相关调控基因 (PHY、CRY1、FPA、AGL 和 SOC1) 以及转录因子 (bHLH、MYB、WKRY) 家族基因, 有助于阐明不同光质调控茉莉开花的差异表达机理。

关键词: 茉莉花, 光质, 转录组测序, 开花调控

Transcriptome analysis of flowering regulated by red and blue light in *Jasminum sambac*

Di Chen, Yongchun Guo, Xuejin Chen, Pengjie Wang, Guixin Chen, and Naixing Ye

Key Laboratory of Tea Science at Universities in Fujian, College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: *Jasminum sambac* is a perennial evergreen shrub plant. With fragrant and aroma, and often used as a raw material for natural spices. In this study, we used white light as the control group, red-light and blue-light as the treatment to study

Received: December 24, 2019; **Accepted:** June 2, 2020

Supported by: Project of Science and Technology in Fuzhou City (No. 2017-N-30), Fujian Provincial Natural Science Foundation (No. 2016J01110).

Corresponding authors: Naixing Ye. Tel: +86+591-83789281. E-mail: ynxtea@126.com

福州市科技计划 (No. 2017-N-30), 福建省自然科学基金 (No. 2016J01110) 资助。

网络出版时间: 2020-07-03

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200703.0932.001.html>

effects of different light on jasmine flowering. Red-light promoted jasmine flowering in advance and increased the number of flower buds, whereas blue-light delayed jasmine flowering and decreased the number of flower buds. There was significant difference on the number of flower buds among the three groups. The top buds' transcriptomes of different light were sequenced by the Illumina Hiseq/Miseq 2000 high-throughput sequencing technology. In total 2 452 457 Unigenes were generated by transcriptome sequencing, of which 1 760 723 Unigenes were annotated into GO, COG, KEGG, KOG, NR, Pfam, Swiss-Prot, NOG databases. There were 894 DEGs in the control group vs red-light group, 2 690 DEGs in the control group vs blue-light group, and 3 828 DEGs in the red-light group vs blue-light group. KEGG Enrichment analysis reveals that the significant enrichment pathways had 6 pathways, including secondary metabolite biosynthesis, phenylpropanoid biosynthesis, indole alkaloid biosynthesis, photosynthesis, plant hormone signaling, and plants-pathogen interactions, and 24 related DEGs were detected by RT-qPCR, the result of which was significantly correlated with the transcriptome data. Through further analysis of transcriptome data, a large number of flowering-related hormones (IAA, ETH, GA, CTK, ABA, SA, JA) signal transduction genes and flowering pathway-related regulatory genes (PHY, CRY1, FPA, AGL and SOC1) and transcription factor (bHLH, MYB, WKRY) family genes were found. The study will help elucidate the differential expression mechanism of different light regulation of jasmine flowering.

Keywords: *Jasminum sambac* (L.)Ait., light quality, transcriptome sequencing, flowering regulation

茉莉花 (*Jasminum sambac* (L.)Ait.), 属木樨科 (Oleaceae) 素馨属的多年生常绿灌木, 是一种天然的香料及观赏植物, 其根、茎、叶、花均具有药用功能, 在亚热带地区广泛栽培, 我国江苏省、浙江省、福建省、广东省等地有较多栽培^[1]。光对植物的生长发育及形态建成是一个重要的环境因素, 而光质作为重要的光环境因素, 近年来受到人们日益密切的关注, 有研究表明光质可调控植物开花, 其中红光 (600–660 nm) 可诱导长日照植物开花, 抑制短日照植物开花, 而蓝光与其具有相反的作用^[2]。Lin 等^[3]的研究发现, 红光和蓝光影响植物开花主要是通过调控 *PHY* 和 *CRY* 基因的表达, 其中红光影响 *PHY* 基因的表达进而抑制开花, 而蓝光调控 *CRY* 基因的表达来促进开花。目前, 光质对植物的研究主要用于培育部分花卉, 如郁金香^[4]、菊花^[5]等, 且多是对生理生化指标的测试, 如光质对叶绿素含量、氧化酶活性、可溶性糖含量及生长速率等的调控^[6], 鲜有从转录水平进行深入研究。

随着组学技术的快速发展及其在揭示细胞生理活动规律和代谢机理的研究中广泛应用, 转录组测序技术能全面快速地获取研究对象在某一状态下基因转录信息, 从中挖掘重要功能基因, 揭

示不同生物学性状的分子机制, 且相对于传统的芯片杂交平台, 转录组测序可提供更精确的数字化信号, 更高的检测通量及更广泛的检测范围^[7], 尤其适用于还未有基因组信息的物种。目前, 转录组测序技术已被广泛应用于茶树^[8]、芒^[9]、慈竹笋^[10]等植物的研究中。

目前, 关于茉莉花方面的研究主要集中在香气成分及相关合成基因的研究^[11–13], 而通过光质调控茉莉开花的研究尚未见报道。本研究选取双瓣茉莉花, 运用 Illumina Hiseq/Miseq 2000 高通量测序技术, 探究了以 LED 为光源的红光和蓝光对茉莉开花时间调控的影响, 利用测序得到的大量 Unigene 进行比较分析不同光质处理后茉莉花的转录差异, 筛选出开花调控相关的差异表达基因, 研究旨在初步揭示光质调控茉莉开花的分子机制, 并为茉莉开花时间的调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试材与取样

以长势一致且已过花期的 3 年生茉莉盆栽植株 (盆 15 cm×20 cm, 株高 25 cm) 为试验材料, 并置于昼温 (32±2)°C、夜温 (22±2)°C 及相对湿度 (75±5)% 的植物培养箱中培养。本试验的对照组

(CK) 为白色 LED 灯, 处理组为纯红光 (Red) 和纯蓝光 (Blue), 波长分别为 660 nm 和 460 nm, 光照强度均为 $18 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光照周期为 12 h/d, 每个处理 3 个重复 (1 盆为一个处理, 每盆 10 株左右)。在处理过程中, 观察茉莉开花情况, 以现蕾时间 (处理后第 7 天) 最早的一组作为取样时间点, 对 3 组分别取顶芽部位作为样品, 液氮速冻后 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 用于后期转录组测序分析。

1.2 茉莉开花数量统计

观察并记录茉莉花经不同光质处理后茉莉花的始花期 (第一朵花蕾出现) 和花蕾数量, 以及终花期 (整株花蕾不再增加) 及花蕾数量, 并通过 SPSS 软件在 $P < 0.05$ 显著水平下采用 LSD 方法进行方差分析。

1.3 文库构建及转录组测序

参照 Plant RNA Purification Reagent 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司) 中方法提取样品总 RNA, 用于后续 cDNA 文库的构建和转录组测序; 提取的 RNA 利用 Nanodrop2000 进行浓度和纯度 (OD_{260}/OD_{280} 比值) 的检测, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 最后用 Agilent 2100 测定其 RIN 值。

cDNA 文库的构建和转录组测序均委托上海元莘生物医药科技有限公司完成。利用带有 Oligo (dT) 的磁珠从总 RNA 中分离出 mRNA, 用片段化缓冲液将其完全随机断裂成 200 bp 左右的片段序列; 随后以此为模板, 进行反转录实验, 合成一链 cDNA, 随后进行二链合成, 形成稳定的双链结构; 加入 End Repair Mix 将结构为粘性末端的双链 cDNA 补成平末端, 随后在 3' 末端加上一个 A 碱基, 用于连接 Y 字形的接头; 最后采用 TruseqTM RNA sample prep Kit 试剂盒 (美国 Illumina 公司) 进行 PCR 扩增富集得到 cDNA 文库, 并用 Certified Low Range Ultra Agarose 试剂盒 (美国 BIO-RAD 伯乐) 回收目的条带; 文库建成后, 采用 TBS380 Picogreen (美国 Invitrogen 公

司) 进行定量, 按数据比例混合参照 cBot Truseq PE Cluster Kit v3-cBot-HS 试剂盒 (美国 Illumina 公司) 进行桥式 PCR 扩增生成 clusters, 最后进行 Illumina Hiseq/Miseq 测序。

1.4 测序数据分析

将 Illumina 测序得到的原始图像数据经过 Base Calling 转化为序列数据 (原始数据), 对原始数据进行质量控制, 利用在线软件 SeqPrep 和 Sickle 进行数据过滤: 将获得的读长 (Reads) 中接头序列剔除, 以及 5' 端含有非 AGCT 的碱基和 N 比例达到 10% 的 reads, 测序质量值低于 Q20 的 reads 末端需要被修剪, 去除长度小于 25 bp 的小片段, 最终得到高质量的测序数据 (Clean data)。使用 Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>) 对所有 clean data 进行从头组装获得单一序列的转录本 (Transcript) 或基因簇 (Unigene), 随后通过 Blastx 比对工具将这些单基因簇 Unigene 与蛋白质直系同源簇数据库 (COG)、基因本体数据库 (GO)、京都基因和基因组百科全书 (KEGG)、蛋白质序列数据库 (Swiss-Prot) 以及 NCBI 非冗余蛋白库 (NR) 等蛋白数据库比对 ($E \text{ 值} \leq 1e-5$) 并进行功能注释, 并基于负二项分布模型使用 edgeR (<http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/edgeR.html>) 进行差异表达分析^[14-15], 以差异倍数 $\log_2|\text{FC}| \geq 1$ 且 $P\text{-value} < 0.01$ 为筛选标准, 对差异表达基因的功能、类别、代谢通路富集情况等注释。

1.5 实时荧光定量 PCR 验证

筛选出受光质影响的代谢通路差异表达基因序列设计荧光定量 PCR 引物 (表 1), 以同期茉莉花不同光质处理的叶片 cDNA 为模板, Actin 为内参, 按照 Transstart[®] Tip Green qPCR superMix 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 的操作说明进行 RT-qPCR 反应, 验证转录组测序的可靠性, 每个处理设置 3 个生物学重复, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量分析。反应体系为 10 μL : 1 μL 茉莉花

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 The primer sequence of qPCR

KEGG pathway	Gene name of Red	Primer sequence (5'-3')	Gene name of Blue	Primer sequence (5'-3')
Biosynthesis of secondary metabolites	Fructose-bisphosphate aldolase 5 (XP_011095600.1)	F:CGTTTGACCGATTGACCTT R:TGTCCCCTTGACGTTGTTCT	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 8 (XP_011086168.1)	F:CGAGAATGGGGTTTCTTTCA R:ACCGGAACGCAAGATATCAC
	Caffeoyl CoA-O-methyl-transferase (ALR35193.1)	F:GTCGTTTGGATCGAACTGGT R:CCTTGTGAGTTGCTTCGTGA	Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 5 (XP_012847891.1)	F:ACGACGAGAAGGAGTGGAAA R:GGCGTAAAACGCGACATATT
	Beta-glucosidase (XP_011077708.1)	F:TAAAGTTGGGGGAGTGATCG R:CCTACAGGGAGCATGCAAAT	GDSL esterase/lipase (XP_022158415.1)	F:GTGTTGCCACCAAGAAAAGT R:CGGTGAACGGAAAATCAACT
Phenylpropanoid biosynthesis	Plastocyanin (XP_004136366.1)	F:TGCGTTGTTGAACAGAGTCC R:TCATGATTTGAGGTCCACGA	Plastocyanin (XP_004136366.1)	F:CTTGCCATATAGCCCTGAA R:ACTCCATTTGTTGGGATCG
	L484_012234 (XP_010095663.1)	F:GGTGACGCTGATCAAAGGAT R:ACCAATGGGCACTTCTTCAC	Gibberellin receptor 1 (XP_016477390.1)	F:GCCCTACAAGCAAATTGGAG R:CCCACGATGAAGAGAGCATT
Indole alkaloid biosynthesis	Heat shock protein 83 (XP_015068083.1)	F:CTCTGGATCCCGACGATAAA R:CGATCCTTTCACCACTTCT	Calmodulin-like protein 8 (XP_012854007.1)	F:AATGGGCCGAAGGATACAGT R:CAGAGCCCTGATCTTGTGTA
	Fructose-bisphosphate aldolase 5 (XP_011095600.1)	F:AAGGCATTGCTGGTTAGCAC R:TTCACCGGCCTTAAACTCAC	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 8 (XP_011086168.1)	F:ACTCGTCGAACACCACATTG R:CCCCAAAATAACCGTGAAA
Photosynthesis	Caffeoyl CoA-O-methyl-transferase (ALR35193.1)	F:GGTTGGACTTTGACGTTAGCA R:TGATGTCGTCGATTCCTTT	Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 5 (XP_012847891.1)	F:CCAGCATGGCTACTGGATTT R:ATCTTTGGCTGCAGGTTGAG
	Beta-glucosidase (XP_011077708.1)	F:CCACAAGCAGCAGTTTTGAA R:TTCAGCTCGACGAAGAAGGT	GDSL esterase/lipase (XP_022158415.1)	F:TGTGTACATGGCAGGGGATA R:CCGGTAAATACGCTCTCCAA
Plant hormone signal transduction	Plastocyanin (XP_004136366.1)	F:ATCCCTTGCCTGAGAAGAGA R:AGGTTGACATCAGCCAAACC	Plastocyanin (XP_004136366.1)	F:ACCGGGTCACAACACTTTTC R:TTGGAAAGTATGGCCTTTGC
	L484_012234 (XP_010095663.1)	F:TGTCAAGCACTTCTCCGTTG R:TGAGTGCCAAATCGTCAGAG	Gibberellin receptor 1 (XP_016477390.1)	F:GGCCTTTAGCTGTTTGACA R:TCCTCAGCATCAGCTTCTT
Plant-pathogen interaction	Heat shock protein 83 (XP_015068083.1)	F:TTGGGTAACAAGGGAGCAAG R:CCATGGTGATGAGAGCTGAA	Calmodulin-like protein 8 (XP_012854007.1)	F:ACGCTTTCGGTGTGTTCTT R:TTGAGGATTCTCGTGTGTGC

叶片 cDNA, 0.2 μ L Forward Primer, 0.2 μ L Reverse Primer, 5 μ L Transstart[®] Tip Green qPCR SuperMix, 补 3.6 μ L ddH₂O 至 10 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s (第二步至第三步重复 40 个循环)。

2 结果与分析

2.1 LED 对茉莉开花的影响

与对照组相比较, 红光处理下茉莉的始花期比对照组提前了 5 d, 而蓝光组延迟了 3 d, 且红光组相比对照组开花持续时间无显著差异, 但蓝

光组花期持续了 9 d; 茉莉植株经不同光质处理后, 花蕾数量变化不同, 其中红光组的花蕾数量相较于对照组有所增加, 而蓝光组相较于对照组, 花蕾数量减少, 且各组之间花蕾数量差异显著 (表 2)。

2.2 茉莉花转录组测序结果质量评估及 Unigene 功能初步分析

根据测序产生的原始序列文件, 过滤掉低质量的序列后进行统计分析。通过 Trinity 初步从头组装, 获得 2 883 742 个转录本, 总长度达到 1 328 373 387 bp, 最长序列为 30 951 bp, 最短序

表 2 不同光质对茉莉开花时间及花蕾数量的影响

Table 2 The effects of different light quality on jasmine flowering

Treatments	The early buds period (d)	The number of buds	The final buds period (d)	The number of buds
CK	12	123±5.1b	19	270±7.6b
Red	7	138±3.8a	14	292±6.7a
Blue	15	112±3.5c	24	214±6.4c

Note: the different letters in figures are significantly different at $P<0.05$.

列为 201 bp, 平均长 460.64 bp, N50 长 489 bp; 进一步组装得到 2 452 457 个单基因簇 Unigene, 总长度为 1 011 078 933 bp, 最长序列为 30 951 bp, 最短序列为 201 bp, 平均长 412.27 bp, N50 长 425 bp。对组装获得的转录本和单基因簇长度分布进行分析, 结果如表 3 所示, 所占比例最大的是 100–400 bp, 分别占 66.026% (1 904 022 条) 和 68.164% (1 671 695 条), 其次为 401–1 000 bp, 分别占 27.268% (786 349 条) 和 27.868% (683 448 条)。长度大于 4 000 bp 的分别占 0.168% (4 858 条) 和 0.058% (1 425 条)。

将获得的 2 452 457 条 Unigene 序列通过 NCBI 中 Blastx 比对, 最终结果显示 (表 4), 总共 1 760 723 条的 Unigene (71.8%) 获得注释信息, 其中非冗余蛋白质数据库 NR 比对上 227 123 条, 蛋白质数据库 Swiss-Prot 比对上 237 536 条, 蛋白质数据库 Pfam 比对上 25 582 条, STRING 数据库比对上 254 422 条, COG 数据库比对上 127 517 条, KOG 数据库比对上 284 775 条, NOG 数据库比对上 155 211 条, GO 数据库比对上 214 933 条, KEGG 数据库比对上 233 624 条。

表 3 茉莉花转录组中转录本和单基因簇的序列大小

Table 3 Sequence size (bp) of transcript and Unigene in jasmine transcriptome

Length range (bp)	Transcript		Unigene	
	Number	Percentage (%)	Number	Percentage (%)
1–400	1 904 022	66.026	1 671 695	68.164
401–1 000	786 349	27.268	683 448	27.868
1 000–2 000	139 164	4.826	79 791	3.254
2 000–4 000	49 349	1.711	16 098	0.656
≥4000	4 858	0.168	1 425	0.058

表 4 茉莉花转录组 Unigene 的功能注释统计结果

Table 4 Statistics of annotation results of Unigene functional annotation in jasmine transcriptome

Annotation database	Number	Percent (%)
NR	227 123	9.26
Swiss-Prot	237 536	9.69
STRING	254 422	10.37
Pfam	25 582	1.04
COG	127 517	5.20
KOG	284 775	11.61
NOG	155 211	6.33
GO	214 933	8.76
KEGG	233 624	9.53

2.3 茉莉花转录组差异表达基因分析

以 P -Value<0.05 为筛选标准,且通过 NR 注释后的差异基因分析表明,CK vs Red 产生的差异表达基因有 894 个,上调基因 (Up-regulated genes) 数量为 727,下调基因 (Down-regulated genes) 数量为 167 个;CK vs Blue 产生的差异表达基因有 2 619 个,上调基因 (Up-regulated genes) 数量为 1 072,下调基因 (Down-regulated genes) 数量为 1 681 个;Red vs Blue 产生了 3 828 个差异基因,其中 2 541 个上调基因,1 287 个下调基因 (图 1),且两两比较后,3 组之间共有 72 个差异表达基因 (图 2)。

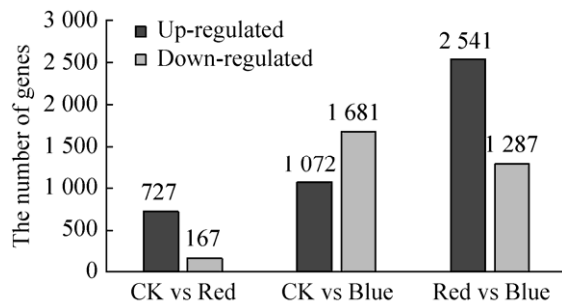


图 1 茉莉花转录组两两比较之间差异表达基因分析统计

Fig. 1 The pattern of significantly differential expressed genes between each group in jasmine transcriptome.

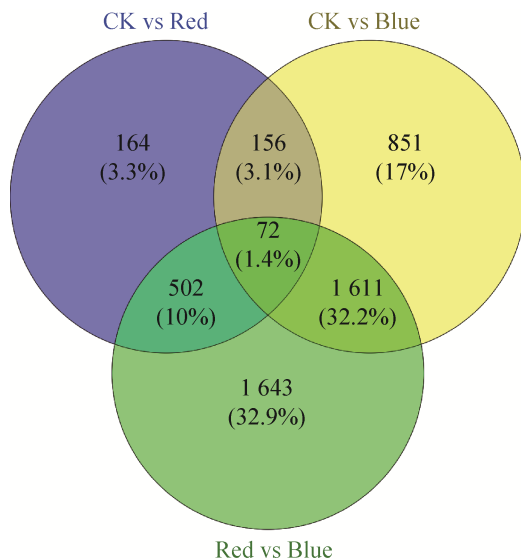


图 2 茉莉花各组样本间差异表达基因 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of significantly differential expressed genes between each group in jasmine.

2.4 茉莉花转录组差异表达基因的 GO 注释分析

为探究不同组间的基因功能差异,对上述差异表达基因进行 GO 富集分析,通过 $FDR < 0.001$ 筛选出极显著的 GO 条目。结果显示 (图 3、图 4),CK vs Red 有 635 个 DEGs 注释到 GO 数据库的生物过程、细胞组分及分子功能 3 大类型,其中 526 个上调基因,109 个下调基因,其特有的显著性富集通路有 71 条,主要涉及碳固定 (Carbon fixation)、光呼吸 (Photorespiration)、过氧化物酶体部分 (Peroxisomal part)、信使核糖核蛋白复合物 (Messenger ribonucleoprotein complex)、天冬氨酰酯酶活性 (Aspartyl esterase activity)、脱氧核糖核苷酸结合 (Deoxyribonucleotide binding) 等过程;CK vs Blue 有 1 554 个差异基因注释到 GO 数据库的生物过程和分子功能,其中 690 个上调基因,864 个下调基因,其特有的显著性富集通路有 65 条,主要涉及花发育的负调节 (Negative regulation of flower development)、生长素生物合成过程 (Auxin biosynthetic process)、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶活性 (Cyclin-dependent protein kinase activity)、类固醇羟化酶活性 (Steroid hydroxylase activity) 等过程;Red vs Blue 有 2 422 个差异基因注释到 GO 数据库的生物过程、细胞组分及分子功能,其中 1 501 个上调基因、921 个下调基因,其特有的显著性富集通路有 157 条,主要含有初级代谢过程 (Primary metabolic process)、细胞蛋白质代谢过程 (Cellular protein metabolic process)、蛋白质的复合物 (Protein-containing complex)、叶绿体外膜 (Chloroplast outer membrane)、光系统 I 反应中心 (Photosystem I reaction center)、PSII 相关的光捕获复合物 II (PSII associated light-harvesting complex II)、花青素 3'-O- β -葡萄糖基转移酶活性 (Anthocyanin 3'-O-beta-glucosyltransferase activity)、花色素还原酶活性 (Anthocyanidin reductase activity)。

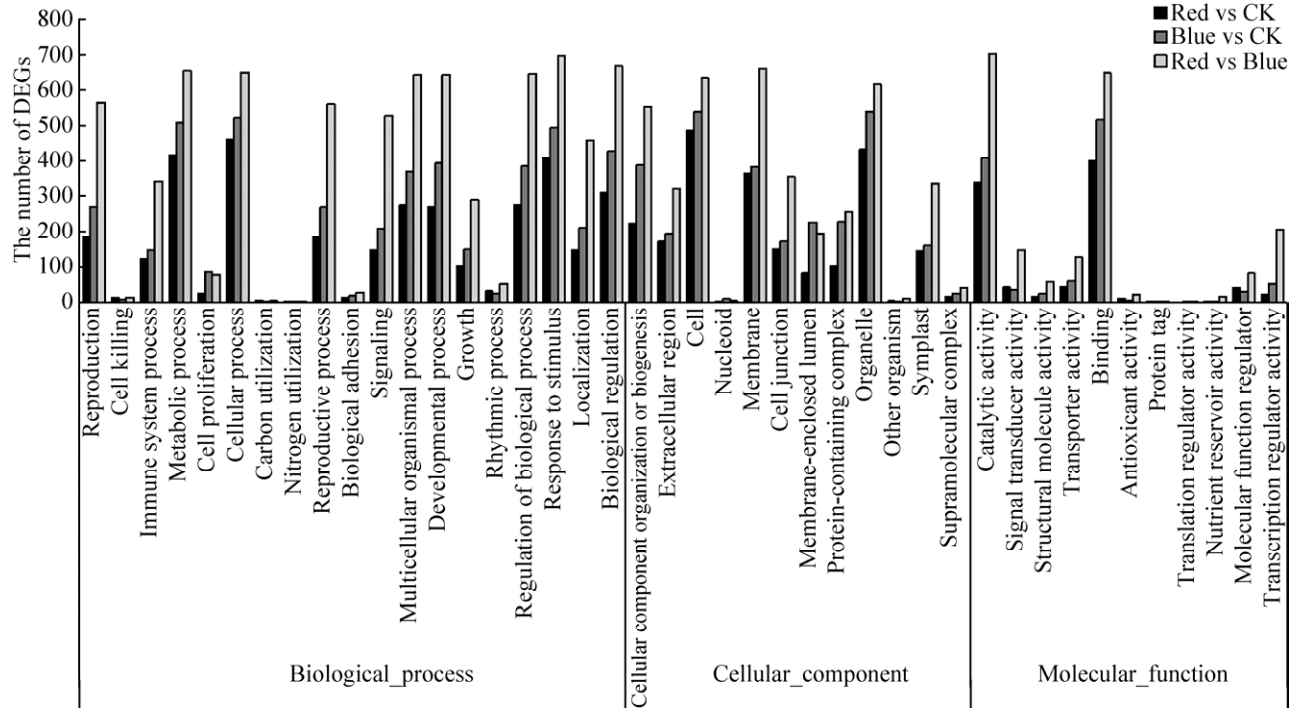


图3 茉莉花转录组中上调表达 DEGs 的 GO 二级节点注释

Fig. 3 The GO annotation of up-regulated DEGs in jasmine transcriptome.

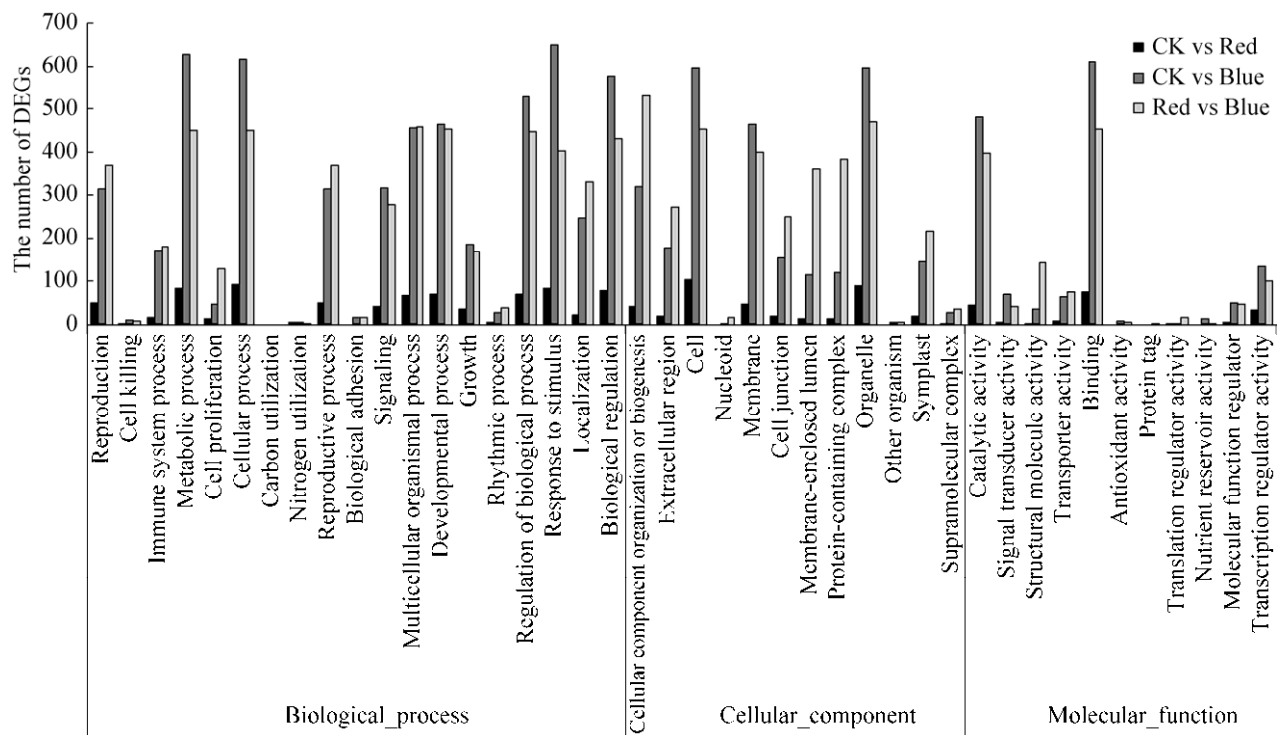


图4 茉莉花转录组中下调表达 DEGs 的 GO 二级节点注释

Fig. 4 The GO annotation of down regulated DEGs in jasmine transcriptome.

2.5 茉莉花转录组差异表达基因的 KEGG 富集分析

为了明确茉莉花经过不同光质处理后的差异表达代谢通路,根据上述注释结果进行 KEGG 富集分析。结果显示,CK vs Red 有 258 个差异基因注释到 KEGG 途径 166 条具体分支通路,显著富集通路 24 条,主要包括光合生物中的碳固定(Carbon fixation in photosynthetic organisms)、植物激素信号转导 (Plant hormone signal transduction)、苯丙烷类生物合成 (Phenylpropanoid biosynthesis) 等; CK vs Blue 有 606 个差异基因注释到 312 条具体代谢途径,显著富集的代谢通路有 32 条,主要涉及植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)、次生代谢物的生物合成 (Biosynthesis of secondary metabolites)、单萜类生物合成 (Monoterpenoid biosynthesis)、苯丙烷类生物合成 (Phenylpropanoid biosynthesis)等; Red VS Blue 共有 1 048 个差异基因注释到 329 条代谢通路,显著富集的代谢通路 36 条,主要涉及核糖体 (Ribosome)、植物激素信号转导 (Plant hormone

signal transduction)、苯丙烷类生物合成 (Phenylpropanoid biosynthesis)、光合作用-天线蛋白质 (Photosynthesis-antenna proteins)、光合作用(Photosynthesis) 等。两两比较后分别排名前 5 的显著 KEGG 富集通路见表 5。

2.6 光质调控茉莉花中相关通路差异表达基因分析及荧光定量 q-PCR 验证

根据通路图展现的信息进一步挑选了受光质影响较大的代谢通路,主要涉及次生代谢物生物合成 (Biosynthesis of secondary metabolites)、苯丙素生物合成 (Phenylpropanoid biosynthesis)、吲哚生物碱生物合成 (Indole alkaloid biosynthesis)、光合作用 (Photosynthesis)、植物激素信号传导 (Plant hormone signal transduction) 和植物-病原体相互作用 (Plant-pathogen interaction),分别从红光组和蓝光组中筛选出 12 条差异表达基因,采用荧光定量 qPCR 对 24 个基因的表达模式进行验证,在 $P < 0.01$ 水平进行显著性检验。结果表明, qPCR 的相对表达量结果与转录组的结果呈极显著相关 ($R^2=0.763^{**}$, $P=0.003$),表明本次转录组测序数据及结果可靠 (图 5)。

表 5 茉莉花转录组中显著 KEGG 富集通路

Table 5 The significant KEGG enrichment pathway in jasmine transcriptome

	KEGG ID	Annotation description	P-value	FDR	Gene number
CK vs Red	ko00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms	1.50E-11	1.28E-09	19
	ko01110	Biosynthesis of secondary metabolites	1.54E-11	1.28E-09	54
	ko04626	Plant-pathogen interaction	1.24E-09	6.87E-08	23
	ko01100	Metabolic pathways	3.21E-09	1.33E-07	88
	ko01200	Carbon metabolism	3.98E-08	1.32E-06	27
CK vs Blue	ko04075	Plant hormone signal transduction	4.46E-17	6.96E-15	52
	ko03030	DNA replication	6.14E-10	4.79E-08	27
	ko04016	MAPK signaling pathway-plant	8.87E-10	5.53E-08	33
	ko03010	Ribosome	1.84E-08	8.20E-07	30
	ko01110	Biosynthesis of secondary metabolites	2.26E-08	8.81E-07	110
Red vs Blue	ko03010	Ribosome	2.41E-43	7.97E-41	135
	ko04075	Plant hormone signal transduction	4.12E-23	6.81E-21	77
	ko04016	MAPK signaling pathway-plant	1.56E-19	1.72E-17	50
	ko03030	DNA replication	2.19E-12	1.21E-10	38
	ko04626	Plant-pathogen interaction	7.50E-12	3.10E-10	39

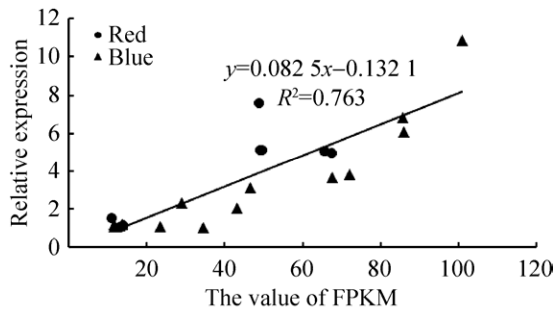


图 5 实时荧光定量 PCR 及转录组表达水平的相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis of RT-qPCR and RNA-seq.

2.7 光质调控茉莉开花相关基因的分析

光质主要通过不同光受体感应并进行信号转

导, 从而影响植物生长发育, 本研究中为找到不同光质调控茉莉开花的相关差异基因, 比较分析 CK vs Red、CK vs Blue 及 Red vs Blue 的转录组表达模式。结果显示, 从该转录组数据中共找到与光周期途径相关的基因包括红光受体基因 PHY、蓝光受体基因 CRY1 及 LHY 和 ELF3, 自主途径相关基因 FPA, 春化途径相关基因 VIN、VRN、ELF4, 开花整合因子 AGL 和 SOC1, 与成花诱导相关的 bHLH、MYB 及 WRKY 转录因子家族成员 (表 6), 以及 IAA、ETH、GA、CTK、ABA、SA 及 JA 相关植物激素信号转导基因 (表 7)。

表 6 茉莉花转录组中开花调控相关基因的表达模式

Table 6 The expression pattern of DEGs related to flowering regulation in jasmine transcriptome

Regulated flowering pathway	Gene	CK vs Red		CK vs Blue		Red vs Blue	
		Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated
Photoperiod pathway	PHY	7	7	3	11	11	3
	CRY	3	0	1	2	2	1
	LHY	1	0	0	1	1	0
	ELF3	0	1	0	1	1	0
Autonomous approach	FPA	3	0	1	2	3	0
Transcription factor	bHLH	40	14	24	19	40	18
	MYB	12	9	10	10	24	12
	WRKY	33	7	15	19	34	5
Vernalization pathway	VRN	0	4	3	1	0	4
	VIN	3	0	1	0	0	3
	ELF4	2	0	0	2	2	0
Flower integration factor	SOC1	4	1	3	2	2	3
	AGL	3	2	2	3	3	2

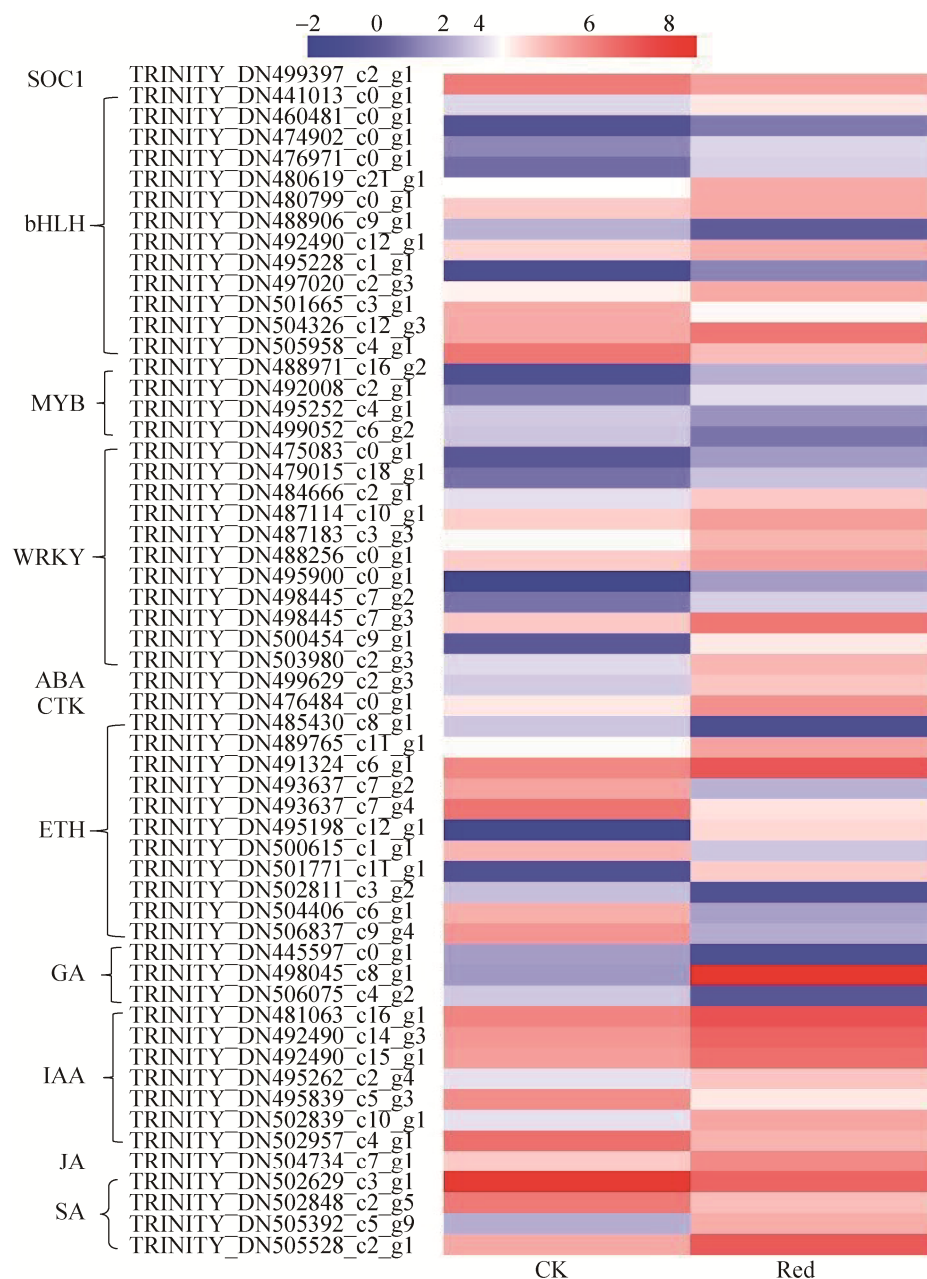
表 7 茉莉花转录组中植物激素信号转导相关基因的表达模式

Table 7 The expression pattern of DEGs about plant hormone signal transduction pathway in jasmine transcriptome

Plant hormone signal transduction pathway	CK vs Red		CK vs Blue		Red vs Blue	
	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated	Up-regulated	Down-regulated
IAA	49	27	17	56	56	21
ETH	57	20	31	41	54	22
ABA	10	6	5	12	13	4
GA	6	9	5	9	10	5
CTK	6	9	5	9	10	5
JA	10	2	3	7	10	2
SA	2	0	0	2	2	0
	11	17	7	22	16	12

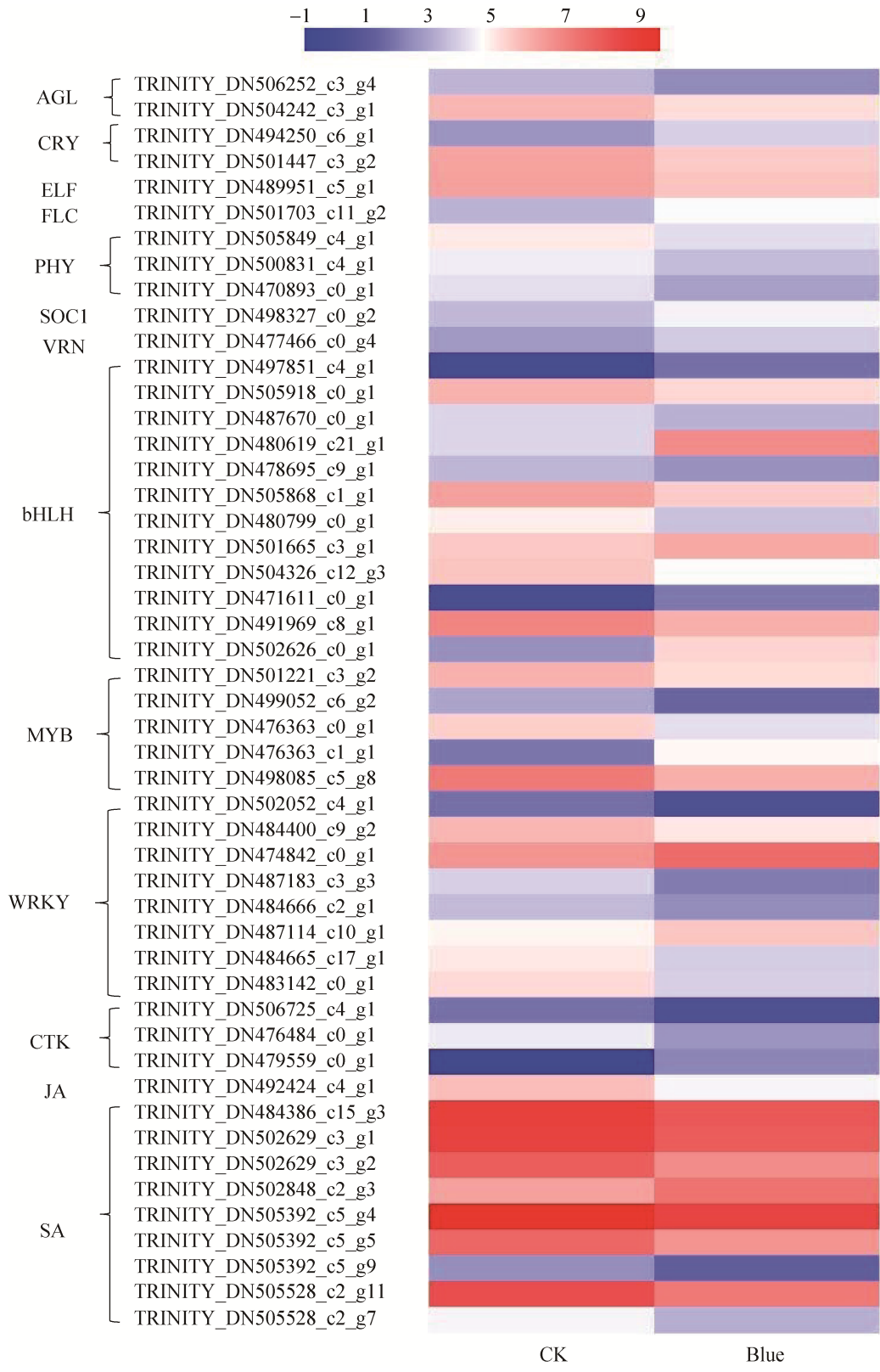
进一步分析表明,植物激素信号转导相关基因数量最多,共有 234 个,其中 ETH 数量最多,占总基因 33.76%,其次为 IAA,占总基因 32.9%,在 CK vs Red、CK vs Blue 及 Red vs Blue 中差异表达基因数量分别有 28 个、78 个、101 个;开花调控相关基因在 CK vs Red 中基因数量最多,其次为对照组 vs 蓝光组,但在 CK vs Red 中无差异表达,CK vs Blue 中仅 8 个基因差异表达,但下调表达基因数量多,Red vs Blue 中 9 个基因差异表达,上调表达基因数量多;与成花

整合因子相关基因 SOC1 和 AGL 各含有 5 个,差异表达基因下调数量多;bHLH、MYB 及 WRKY 转录因子家族成员基因在 CK vs Red 中共找到 115 个,差异表达的基因有 28 个;在 CK vs Blue 中共找到 107 个 bHLH、MYB 及 WRKY 转录因子家族成员基因,差异表达的基因有 25 个;Red vs Blue 中 133 个 bHLH、MYB 及 WRKY 转录因子家族成员基因,差异表达的基因有 50 个。CK vs Red、CK vs Blue 及 Red vs Blue 差异表达基因模式如图 6 所示。



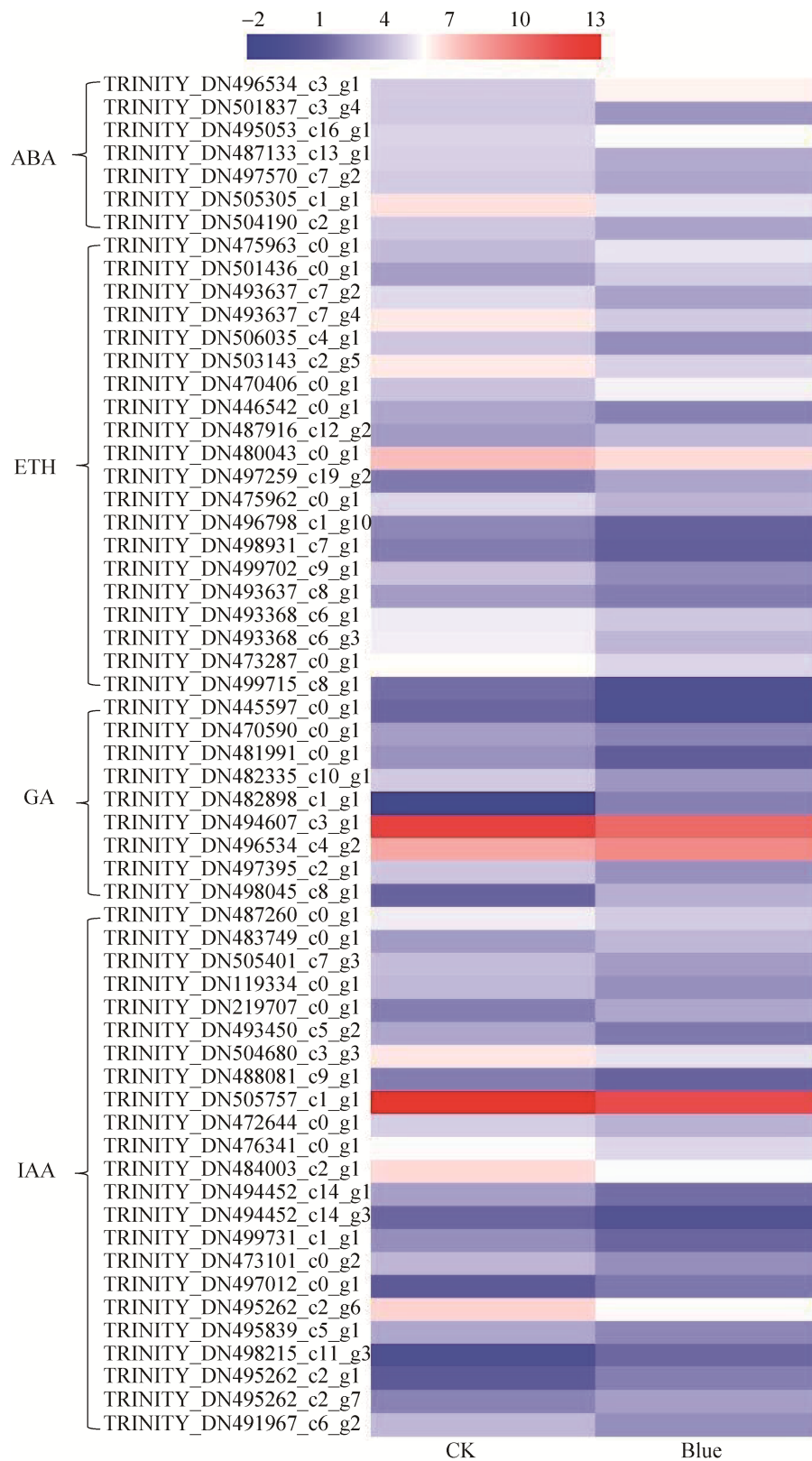
待续

续图 6



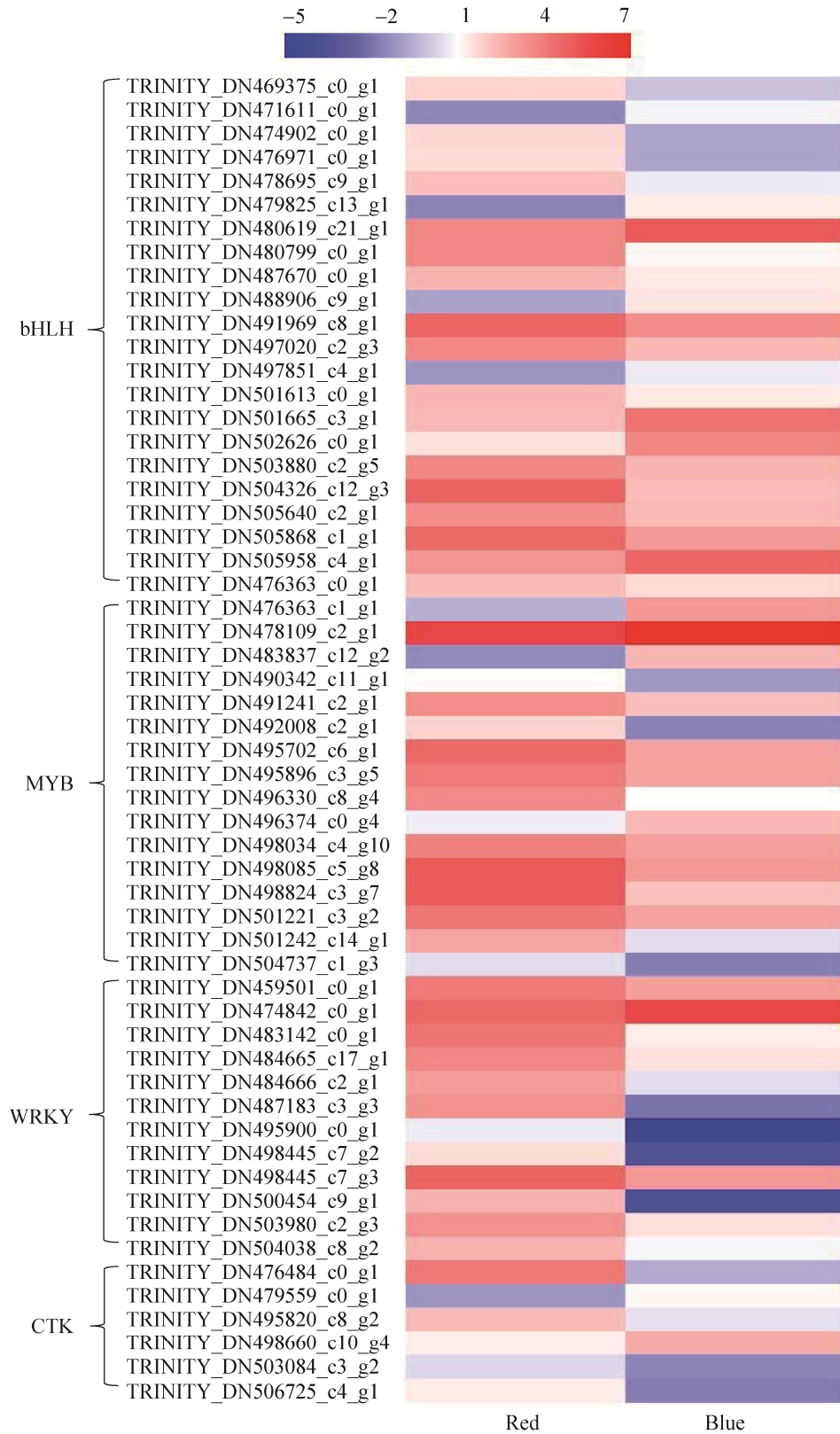
待续

续图 6



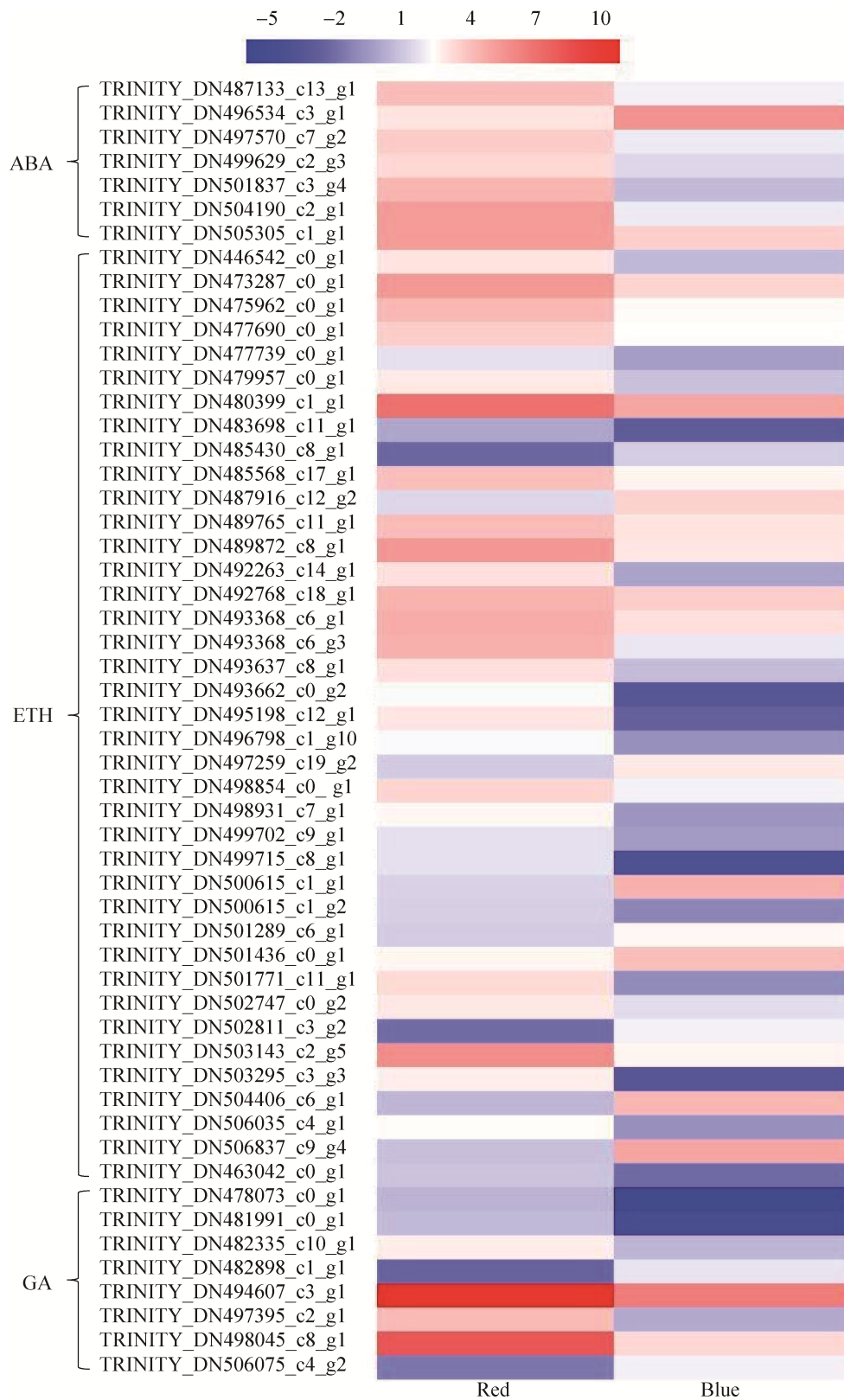
待续

续图 6



待续

续图 6



待续

续图 6

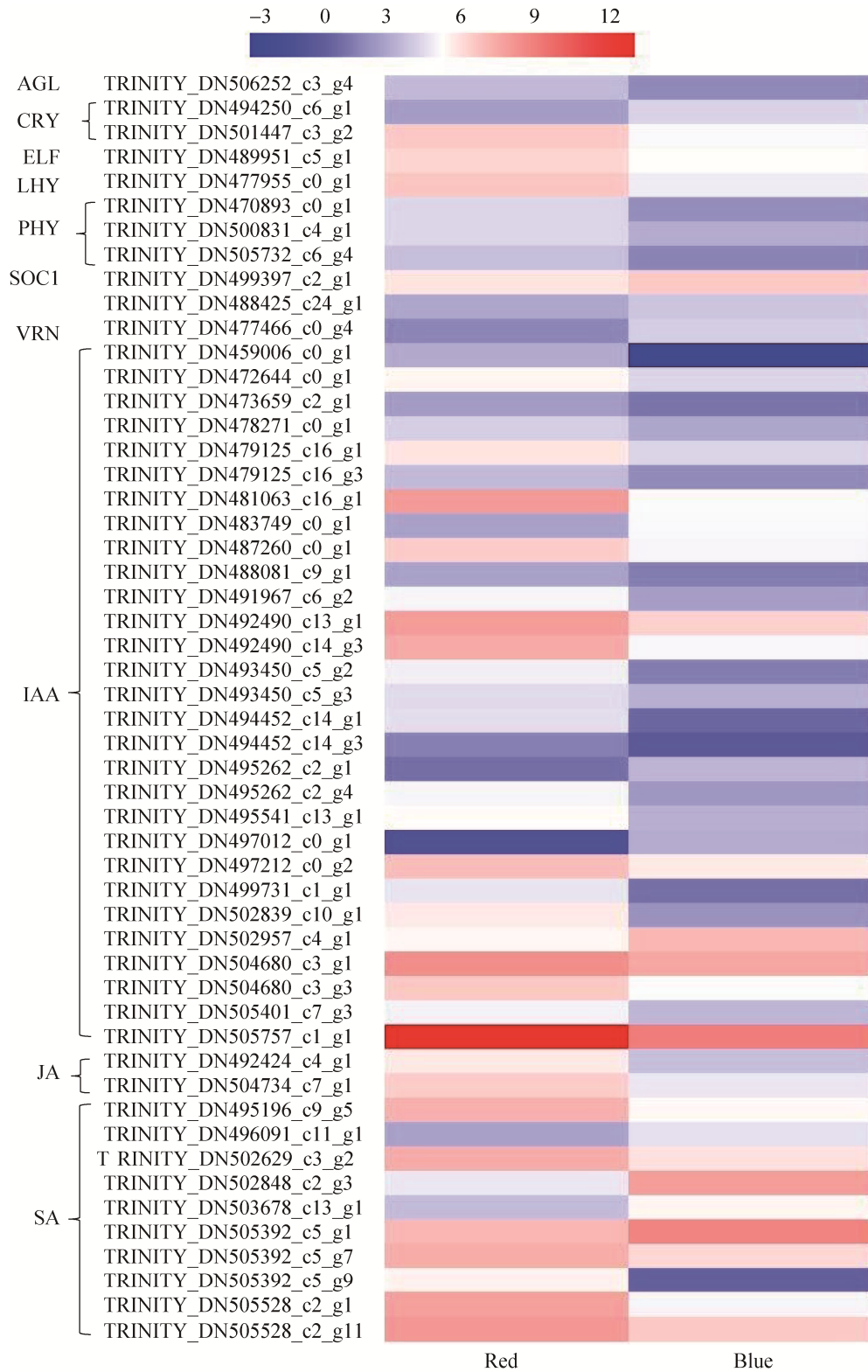


图 6 茉莉花转录组中调控开花相关差异表达基因热图

Fig. 6 The heatmap of flowering-related differential expressed genes in jasmine transcriptome.

3 讨论

转录组技术已在园艺植物中广泛应用研究。刘之慧等^[16]通过对草莓组培苗进行红蓝光处理,其转录组结果发现糖酵解/糖异生代谢通路、吡啶和叶绿素代谢通路、光合作用、植物激素信号转导通路为主要受影响通路,其差异表达基因数量随着蓝光比率的下降而减少,且下调基因数量增多,说明蓝光对草莓组培苗的生长发育影响较大。本研究发现茉莉花在不同光质下,其光合作用、植物激素信号转导途径及苯丙烷生物合成通路相关基因差异极显著,在红光处理下的差异基因数量低于蓝光组,但蓝光中下调基因数量居多,推测蓝光对茉莉花开花有较大影响;但研究表明茉莉花在红光下花期提前,而在蓝光花期相对对照组延迟,而有研究结果表明蓝光可诱导短日照植物开花,抑制长日照植物开花,而红光的作用与之相反^[17-18]。

本研究从该转录组中共找到 14 个光敏色素 PHY 基因,包括 PHYA、PHYB、PHYC 及 PHYE, 3 个隐花色素基因 CRY1, 1 个 LHY 基因,其中差异表达的基因有 3 个 PHY 基因及 2 个 CRY1 基因,均在蓝光中下调表达,在红光中上调表达,而光敏色素基因 PHY 基因为光周期途径上游调控基因,隐花色素基因 CRY 为其下游调控基因,不同光质通过调节 CRY 和 PHY 基因的表达进而调控茉莉花开花早晚。植物开花受多种途径调控,其通过影响植物开花时间基因 FT 调控下游开花整合因子,进而调控开花, SOC1 和 AGL 为成花整合因子,属于 MADS-box 基因,可被蓝光诱导表达促进拟南芥开花^[19]。本研究中总共鉴定到 5 个 SOC1 同源基因和 5 个 AGL 同源基因,在不同光质作用下表现出不同的表达模式,在红光中上调表达基因数量多且高表达,而在蓝光中相对较低,且 5 个 AGL 同源基因中未发现与 SOC1 功能相似的 AGL24 基因,由此说明不同的植物中调控植物

开花的 AGL 基因可能会有所不同^[15]。

植物激素信号转导作为光质影响的主要通路之一,在植物成花诱导中也发挥着重要作用,如乙烯可促进雌花发育^[20],而 GA 促进雄蕊的发育, IAA 可通过诱导乙烯的合成从而促进雌花发育, JA 可通过不同途径影响植株雌花的发育^[21], ABA 因植物种类不同而起到促进雌花或雄花的发育^[17], CTK 可促进植物开花结实^[22]。本研究中红光不仅诱导茉莉花提前开花,且增加始花期花蕾数量,通过转录组数据分析发现,与植物激素信号转导相关的差异表达基因中数量最多的为 ETH(33.76%),其次为 IAA(32.9%)、SA(12.39%)、GA(7.69%)、ABA(7.26%)、CTK(5.13%),表明光质调控茉莉开花是多种植物激素协同作用,其中 ETH 可能起主导作用。GA 途径作为植物开花途径中重要调控途径之一,在红光中高表达,而在蓝光中下调表达基因较多,茉莉花花芽中检测到的 GA 信号转导相关基因,在蓝光中下调表达数量居多。有研究表明红光可通过光敏色素诱导 GA 合成相关酶基因的表达进而提高赤霉素含量,而在 PHYA 和 PHYB 突变体中该酶基因不表达或表达量无显著变化^[23]; PHYA 在远红光处理下正调节 ABA 信号,而 PHYB 负调控 ABA 的积累,因此光质可能通过不同光受体调节植物激素进而调控植物花芽分化^[24]。

转录因子在植物生长发育各阶段均可发挥作用,大部分研究表明转录因子在逆境胁迫中发挥重要作用,而较少研究证明其在植物开花诱导中发挥着作用^[25]。bHLH 家族成员光敏色素互作因子 PIFs 可与光信号直接作用,如 PIF3 可直接激活乙烯信号转导途径中 EIN3 转录因子^[26], PIF4 可以激活植物开花时间基因 FT^[27]。WRKY 家族中的 WRKY25 通过调节开花整合因子 API 调控植物开花^[28],而 WRKY20 可能通过调控开花相关基因 FT、SOC1、CO 等从而提早开花^[29]。本研究中筛选出 bHLH、MYB 及 WRKY 三大类转录因

子家族基因, 其中 bHLH 转录因子最多, 包括 PIF1、PIF3 及 PIF7, 其次为 WRKY 转录因子, 主要有 WRKY40 和 WRKY70, MYB 转录因子数量较少, 主要有 MYB2、MYB44 及 MYB52, 在红光中多为上调表达, 而在蓝光中均为下调表达, 由此说明不同的植物中调控植物开花的相关转录因子可能会有所不同。本研究通过不同光质作用于茉莉花, 经转录组测序数据分析, 推测光质调控茉莉开花与植物激素、转录因子及开花途径相关基因的表达有关, 为茉莉开花时间的研究提供了一定的理论基础, 而光质调控茉莉开花时间的机制还有待进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Wei XJ. Applied research of jasmine//Greater Mekong River National Medicine Development Forum and Mekong Subregion Traditional Medicine Exchange Conference. Kunming: Yunnan Association of Science and Technology, 2011 (in Chinese).
韦香杰. 茉莉花的应用研究//大湄公河民族医药发展论坛暨第四届湄公河次区域传统医药交流会论文集. 昆明: 云南省科协, 2011.
- [2] Lai ZC, Xu SS, Lai GT, et al. Effects of different light qualities and light intensities on *in vitro* flowering in cockscomb (*Celosia cristata*). Horticult Seed, 2013, (6): 16–19, 70 (in Chinese).
赖志宸, 许珊珊, 赖恭梯, 等. 不同光质和光强对鸡冠花试管开花的影响. 园艺与种苗, 2013, (6): 16–19, 70.
- [3] Lin CT. Photoreceptors and regulation of flowering time. Plant Physiol, 2000, 123(1): 39–50.
- [4] Shen HX, Shen M, Cheng JH, et al. Effect of supplemental lighting with different light quality on growth and bloom of tulip. J Beijing Univ Agric, 2007, 22(1): 16–18 (in Chinese).
沈红香, 沈漫, 程继鸿, 等. 不同光质补光处理对郁金香生长和开花的影响. 北京农学院学报, 2007, 22(1): 16–18.
- [5] Xu H. Effect of blue light on *Dendranthema* growth and flowering. J Binzhou Edu Coll, 2000, 6(3): 79–80 (in Chinese).
许卉. 蓝光对菊花生长和开花的影响. 滨州教育学报, 2000, 6(3): 79–80.
- [6] Rabara RC, Behrman G, Timbol T, et al. Effect of spectral quality of monochromatic led lights on the growth of artichoke seedlings. Front Plant Sci, 2017, 8: 190.
- [7] Sangwan RS, Tripathi S, Singh J, et al. *De novo* sequencing and assembly of *Centella Asiatica* leaf transcriptome for mapping of structural, functional and regulatory genes with special reference to secondary metabolism. Gene, 2013, 525(1): 58–76.
- [8] Guo YQ, Chang XJ, Zhu C, et al. *De novo* transcriptome combined with spectrophotometry and gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) reveals differentially expressed genes during accumulation of secondary metabolites in purple-leaf tea (*Camellia sinensis cv Hongyafoshou*). J Horticult Sci Biotechnol, 2018, 94(3): 349–367.
- [9] Zhang X, Wang JH, Yu M, et al. Transcriptome analysis of bioenergy plant *Miscanthus sinensis* Anderss by RNA-Seq. Chin J Biotech, 2015, 31(10): 1437–1448 (in Chinese).
张贤, 王建红, 喻曼, 等. 基于 RNA-seq 的能源植物芒转录组分析. 生物工程学报, 2015, 31(10): 1437–1448.
- [10] Chen YP, Cao Y, Hu SL, et al. Transcriptome analysis and gene function annotation of *Bambusa emeiensis* shoots based on high-throughput sequencing technology. Chin J Biotech, 2016, 32(11): 1610–1623 (in Chinese).
陈宇鹏, 曹颖, 胡尚连, 等. 基于高通量测序的慈竹笋转录组分析与基因功能注释. 生物工程学报, 2016, 32(11): 1610–1623.
- [11] Sun J, Lin Y, Yu Y, et al. Cloning, molecular characterization, and expression of *JsGGPPS* gene from *Jasminum sambac*. Fujian J Agric Sci, 2016, 31(4): 350–355 (in Chinese).
孙君, 林滢, 俞滢, 等. 茉莉花 *JsGGPPS* 基因的克隆及生物信息学与表达分析. 福建农业学报, 2016, 31(4): 350–355.
- [12] Yu Y, Lyu SH, Chen D, et al. Volatiles emitted at different flowering stages of *Jasminum sambac* and expression of genes related to α -farnesene biosynthesis. Molecules, 2017, 22(4): 546.
- [13] Chen D, Chen XJ, Guo YC, et al. Cloning and expression analysis of *JsNEL/LINS* from *Jasminum sambac*. Acta Botan Boreali-Occidental Sin, 2019,

- 39(8): 1344–1352 (in Chinese).
陈笛, 陈雪津, 郭永春, 等. 茉莉花芳樟醇生物合成关键基因的克隆与表达分析. 西北植物学报, 2019, 39(8): 1344–1352.
- [14] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Biogeosciences*, 2010, 26: 139–140.
- [15] Tang HB, Wang XY, Bowers JE, et al. Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps. *Genome Res*, 2008, 18: 1944–1954.
- [16] Liu ZH, Cai WT, Dong QH. Transcriptome analysis of the seedlings treated with different ratio of red and blue light in strawberry. *J Beijing Univ Agric*, 2017, 32(4): 28–35 (in Chinese).
刘之慧, 蔡雯婷, 董清华. 红蓝光处理草莓组培苗的转录组测序与分析. 北京农学院学报, 2017, 32(4): 28–35.
- [17] Song JL. RNA-seq-transcriptome analysis of sex differentiation in cucumber seedling under different light quality[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
宋佳丽. 光质调控黄瓜花性分化的转录组分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [18] Hu SC. Effects of different light quality on the growth and development of *viola tricolor*. *J Xichang College: Natl Sci Ed*, 2014, 28(2): 1–4 (in Chinese).
胡世诚. 不同光质对三色堇生长发育的影响. 西昌学院学报: 自然科学版, 2014, 28(2): 1–4.
- [19] Macalister CA, Ohashi-Ito K, Bergmann DC. Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, 2007, 445(7127): 537–540.
- [20] Yang XX, Qu SP, Yang GX, et al. Effect of ethephon, ethylene inhibitor on *Cucurbita maxima* sex expression. *Northern Hortic*, 2015(18): 30–34 (in Chinese).
杨晓霞, 屈淑平, 杨贵先, 等. 乙烯利与乙烯抑制剂对印度南瓜(*Cucurbita maxima*)性别表现的影响. 北方园艺, 2015(18): 30–34.
- [21] Song SS, Qi TC, Huang H, et al. Regulation of stamen development by coordinated actions of jasmonate, auxin, and gibberellin in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2013, 6(4): 1065–1073.
- [22] D'Aloia M, Bonhomme D, Bouché F, et al. Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the *FT* paralogue *TSF*. *Plant J*, 2011, 65(6): 972–979.
- [23] Ait-Ali T, Frances S, Weller JL, et al. Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3-beta-hydroxylase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol*, 1999, 121(3): 783–791.
- [24] Jiang L, Zhou X, Wang ZR, et al. Relationship between the formation of male or female strobili and the levels of Ga S, ABA, CTK s in masson pine. *J Nanjing For Univ : Natl Sci Ed*, 1998, 22(3): 61–63 (in Chinese).
江玲, 周燮, 王章荣, 等. 马尾松雌雄球花的形成与赤霉素和脱落酸及细胞分裂素的关系. 南京林业大学学报: 自然科学版, 1998, 22(3): 61–63.
- [25] Jiang WB, Yu DQ. *Arabidopsis WRKY2* transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid. *BMC Plant Biol*, 2009, 9: 96.
- [26] Zhong SW, Shi H, Chang X, et al. A molecular framework of light-controlled phytohormone action in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2012, 22(16): 1530–1535.
- [27] Kumar SV, Lucyshyn D, Jaeger KE, et al. Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, 2012, 484(7393): 242–245.
- [28] Wang FX, Li SJ, Yi DQ. Overexpression of *WRKY25* causes early flowering in *Arabidopsis* under long-day conditions. *Plant Divers Resour*, 2011, 33(6): 653–659 (in Chinese).
王芳秀, 黎舒佳, 余迪求. *WRKY25* 过量表达导致拟南芥在长光照下开花提前. 植物分类与资源学报, 2011, 33(6): 653–659.
- [29] Luo X, Sun XL, Liu BH, et al. Ectopic expression of a *WRKY* homolog from glycine soja alters flowering time in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e73295.

(本文责编 陈宏宇)