

祁蒙,贾敏,刘夏燕. 黑暗胁迫下拟南芥叶片衰老突变体的筛选及鉴定[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):38-43.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.010

# 黑暗胁迫下拟南芥叶片衰老突变体的筛选及鉴定

祁蒙,贾敏,刘夏燕

(西北农林科技大学生命科学学院,陕西杨凌 712100)

**摘要:**叶片衰老作为叶片发育的最后阶段,是营养物质从叶片到其他器官的重新配置过程,对植物的适应环境至关重要。衰老突变体及衰老相关基因的鉴定,对在分子水平上理解叶片衰老具有重要意义。本研究以拟南芥野生型为植物材料,通过 EMS 诱变技术构建突变体库,并建立了合理的黑暗胁迫体系诱导叶片衰老。利用该系统筛选到 1 个衰老表型加剧的衰老异常突变体 *accelerated senescence in dark1-1(asd1-1)*。通过黑暗胁迫条件下对该突变体的叶绿素含量分析及叶片总蛋白含量的测定,确定了该突变体确实为叶片衰老加剧突变体,为寻找新的叶片衰老调控基因及揭示植物衰老途径的分子机制提供依据。

**关键词:**叶片衰老;黑暗胁迫;拟南芥;突变体筛选

**中图分类号:** Q945.48 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0038-05

植物衰老是一个年龄依赖的在细胞、组织、器官和生物体水平上的程序性死亡过程,是生长发育的最后一个阶段<sup>[1-2]</sup>。叶片衰老作为植物衰老的主要形式,是叶片细胞对年龄信息及一系列内外环境的总体响应。影响叶片衰老的环境因子包括生物因素及非生物因素,生物因素包括病菌入侵或邻近植物遮蔽等,非生物因素包括干旱、营养限制、黑暗处理、极端温度及氧化胁迫等<sup>[3-4]</sup>。而外界因素的影响,会导致衰老的提前发生<sup>[5-6]</sup>,例如,黑暗是最有效也是最简便的诱发衰老的信号,使植物产生快速、一致的衰老表型<sup>[7]</sup>。在衰老过程中,伴随着叶片形态上的显著变化如叶色逐渐黄化,细胞内也发生一系列的生理生化反应<sup>[8-9]</sup>。首先,生长及环境因素等信号分子激活调控衰老相关基因表达的转录因子<sup>[10-11]</sup>,从而启动相关基因的表达。随后,细胞内的各组分开始进入有序的降解过程,其中叶绿体的降解最早发生;伴随着叶绿体的降解就是叶绿素和蛋白质的降解,典型的叶绿体蛋白如核酮糖二磷酸羧化酶及叶绿素结合蛋白(CAB)等都有很大程度的减少;其他组分如膜脂、核酸等也被一定程度的降解,降解后的小分子营养物质被转移到新生器官或种子中循环利用<sup>[12-13]</sup>。叶片衰老是植物进化选择的产物,能够帮助植物更好地适应环境并保证后代的繁衍<sup>[14]</sup>,但另一方面,叶片衰老降低了作物产量和生物量的积累,限制了水果、蔬菜以及观赏植物的寿命,使植物更容易受到病原体侵害<sup>[15-16]</sup>。因而,对叶片衰老的研究一方面可以更深入地阐明衰老过程的分子机理;另一方面,对提高作物产量及果蔬储藏具有重要经济意义。

目前研究衰老机制主要从遗传筛选和分子手段两方面入手。遗传手段包括筛选和鉴定衰老异常突变体。拟南芥作为

模式植物,具有全基因组已经测序、生长周期短、叶片生长发育阶段易于区分等特点,成为研究叶片衰老的最适材料<sup>[1,4]</sup>。拟南芥突变体的获得主要有物理诱变、化学诱变、T-DNA 插入诱变等<sup>[17]</sup>。化学诱变法作为经典的诱变方法,其产生的突变体为基因功能研究提供了丰富资源。甲基磺酸乙酯(EMS)是一种较为常用的化学诱变剂,能诱发植物产生高密度的系列等位基因点突变,并且诱变频率高、副作用(致死或不育等)较小、操作简单<sup>[18]</sup>,因而被广泛用于拟南芥的诱变处理。对经过诱变处理后的植物,通常多利用植物表型鉴定、生理生化、遗传学等方法进行筛选。

本研究先对野生型拟南芥进行时间梯度的黑暗胁迫诱导,获得一个合理的诱导衰老体系:将拟南芥种子在添加 1% 蔗糖的 MS 培养基上持续光照生长 7 d,之后移栽至不添加外源糖的 MS 培养基上,并进行梯度黑暗胁迫处理,植物叶片随处理时间延长呈现出明显的衰老表型;接着,将自噬基因突变体在碳素缺乏条件下,经过黑暗诱导后呈现的早衰表型来确定试验体系的可行性和有效性;最后,以 EMS 诱变获得的 M2 代分离群体为研究对象,进行上述黑暗胁迫体系的诱导,从而筛选出可能的叶片衰老提前或者衰老延缓的突变体,成功获得了 1 个衰老提前的突变体 *asd1-1*,进一步对该衰老异常突变体进行了鉴定和研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型为 Columbia(Col-0)生态型。植物经典自噬基因突变体 *atg5-1*、*atg7-3* 由笔者所在实验室购于拟南芥资源中心(*Arabidopsis biological resource center*, ABRC)。突变体 *asd1-1* 为野生型拟南芥通过 EMS 诱变筛选得到。

1.1.2 主要试剂 拟南芥培养基质购自 Pindstrup Substrate Peat Moss;蔗糖和 EMS 购自美国 Amresco 公司,琼脂(BACTO)购自美国 BD 公司。

1.1.3 溶液 种子漂洗液(50%市售 84 消毒液,0.1%

收稿日期:2017-03-24

基金项目:陕西省自然科学基金(编号:2015JM3081)。

作者简介:祁蒙(1991—),女,陕西商洛人,硕士,主要从事植物分子遗传学研究。E-mail:191575587@qq.com。

通信作者:刘夏燕,博士,副教授,硕士生导师,主要从事植物分子遗传学研究。E-mail:xiayanliu@gmail.com。

Triton X-100); MS 全素固体培养基[5 mmol/L 硝酸钾, 2 mmol/L 硫酸镁, 2.5 mmol/L 磷酸二氢钾, 2 mmol/L 硝酸钙, 0.05 mmol/L Fe-EDTA, 0.1% 微量元素混合液(V/V), 0.02% EMS, 1% 蔗糖, 1% 琼脂; KOH 调 pH 值为 5.8, 121 ℃ 高压灭菌 20 min]。

## 1.2 方法

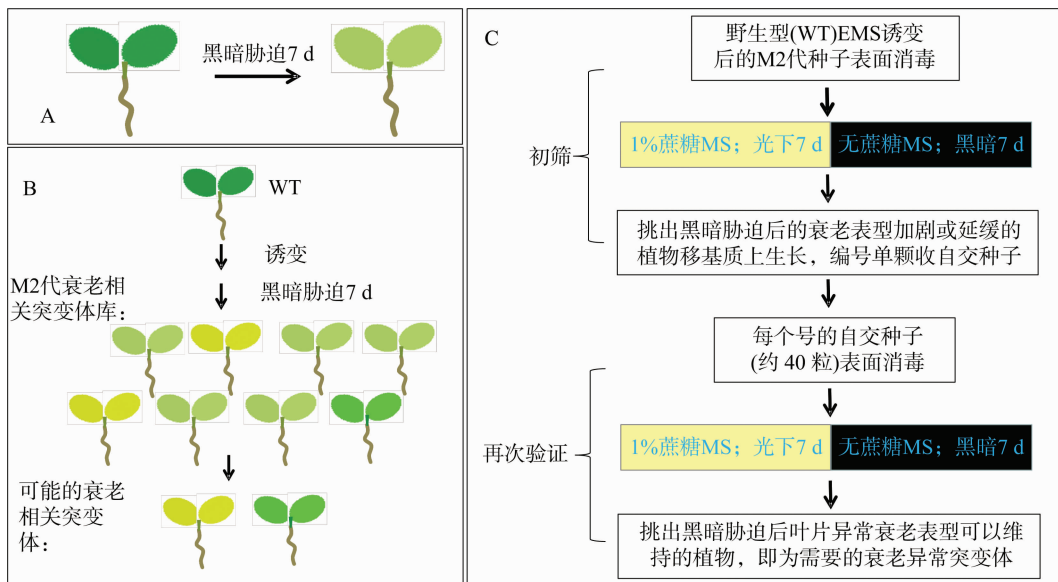
**1.2.1 EMS 诱变** 以拟南芥野生型(Col)为材料, 利用甲基磺酸乙酯(EMS)化学诱变技术, 构建诱变群体, 参照 Wilson 等的方法<sup>[19]</sup>略作改动。称取 0.4 g(约 2 万粒)的野生型种子, 于 50 mL 离心管中用双蒸水浸泡 6~8 h 使种子预吸胀。之后吸出水, 加入用磷酸缓冲液配制的 0.4% 的 EMS(V/V), 浸泡 14 h 过夜。处理后的种子, 吸出 EMS, 用蒸馏水反复冲洗数次, 每次 5 min, 即为 M1 种子。将 M1 种子种植于培养基上, 混合收获种子并分组, 共得到 30 个 M2 诱变群体。将获得的 M2 代群体作为筛选对象, 通过缺失碳源及黑暗胁迫处理, 观察植物表型, 筛选可能的叶片衰老相关突变体。

**1.2.2 种子表面消毒** 每次用千分之一天平称取 0.05 g(约 3 000 粒)种子, 分装于 1.5 mL 的离心管中, 加入 1 mL 新配置的种子漂洗液, 颠倒数次后, 于超净台中将漂洗液吸去, 用已灭菌的双蒸水反复洗数遍至不再有漂洗液残留, 最后将种子重新悬浮于无菌水中, 置于 4 ℃ 低温黑暗处理 2~3 d。

**1.2.3 MS 固体培养基培养** 配制含有 1% 蔗糖的 MS 培养基并于 121 ℃ 高压灭菌。将灭菌后的培养基以每个培养板约

40 mL 的量均匀平铺于 12 cm×12 cm 的方形培养板上, 待培养基凝结以备用。用巴氏滴管吸取种子, 单粒均匀点播在含有 1% 蔗糖的 MS 固体培养基表面。待培养基表面无多余水分后, 用封口膜密封培养板。将培养板放入培养间, 放置在温度 22 ℃ 和光强约 100 μmol/(m<sup>2</sup>·s) 的持续光照下竖直培养。

**1.2.4 黑暗胁迫体系诱导叶片衰老及衰老异常突变体的筛选** 将在含有 1% 蔗糖的 MS 培养基上光下生长的拟南芥植株, 移到不添加外源糖的 MS 培养基上并完全黑暗处理的体系称为黑暗胁迫。在含 1% 蔗糖的 MS 培养基上生长 7 d 的 M2 代植物, 于超净台中用镊子小心挑起并移到不添加蔗糖的 MS 培养基上, 封口膜密封后, 用锡纸包裹培养板使植物完全黑暗并竖直放入培养箱中培养。在黑暗胁迫处理 7 d 后, 取出黑暗处理过的 M2 代植株观察拍照。叶片衰老相关突变体的筛选模式如图 1 所示, 此时的 M2 群体中叶片衰老程度不一。将黑暗胁迫 7 d 的野生型(WT)植株(图 1-A)中子叶明显黄化、衰老加剧或子叶较绿、衰老延缓的植物挑出(图 1-B), 移栽到植物基质泥炭土中, 放入光照培养间正常培养, 单株编号并记录植株表型后收种子。以野生型拟南芥作对照, 将第 1 轮筛选得到的叶片衰老表型异常植株经过黑暗胁迫处理再次验证叶片衰老表型, 能够维持第 1 轮得到的叶片衰老加剧或延缓的植物即为可能的衰老异常突变体。具体筛选过程如图 1-C 所示。



A—野生型在黑暗处理 7 d 以后的衰老模式, 图中深绿代表正常野生型, 黄绿色代表黑暗处理以后的野生;

B—衰老异常突变体的筛选模式, 图中黄色和翠绿色分别代表衰老提前突变体和衰老延缓突变体;

C—衰老异常突变体的筛选流程; WT 为野生型拟南芥

图1 叶片衰老异常突变体的筛选示意图

**1.2.5 突变体的衰老表型分析** 观察突变体幼苗的发育状况、叶色的差异、植株整体表型及在黑暗胁迫处理中植物的衰老情况并拍照。

**1.2.6 T-DNA 插入突变体的鉴定** 进行突变体 T-DNA 插入鉴定的引物如表 1 所示。T-DNA 插入的纯合体植株基因组 DNA 用自身基因 R 引物或 F 引物与 T-DNA 序列上的 LB 引物可以扩增出特异条带, 而自身 F+R 不能扩增出目的条带。野生型或无插入的植株只有 F+R 可以扩增出目的条

带。进一步对突变体的 T-DNA 插入位置进行确定, 以纯合突变体植株的基因组 DNA 为模板, 用 T-DNA 序列的左端引物 LB 与基因组 F 或 R 引物扩增, 将所得的扩增产物回收后测序并比对分析 T-DNA 插入位置。

**1.2.7 叶绿素的提取及含量测定** 取新鲜植物叶片(约 20 mg)置于标记好的 1.5 mL 离心管中, 精确称质量并记录组织鲜质量后迅速投入液氮中冻存。将植物组织充分研磨至粉末状, 加入 1 mL 的 95% 乙醇; 避光放入 4 ℃ 环境中颠倒混匀

表 1 ATG5 及 ATG7 T-DNA 插入突变体鉴定引物

突变体名称 (编号)	引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>atg5-1</i> (SAIL_129_B07)	SAIL_LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACC- AATCTCGATACAC
	ATG5F2	GGATATCCTTGCAACATACTG
	ATG5R2	TTGTATAGGCATCAAGATCAC
<i>atg7-3</i> (SAIL_11_H07)	SAIL_LB3	TAGCATCTGAATTTTCATAACC- AATCTC
	ATG7F1	GAGCATTACCGTCTCTTAAC
	ATG7R2	CATGGCGCATTACCATGTAG

孵育,孵育时间为 5~24 h;孵育完成后,使用高速低温离心机以 14 000 r/min 在 4℃ 下离心 10 min;转移上清液到新的离心管中,之后对样本的吸光度进行测定。将分光光度计设定 3 个波长(664、649、470 nm),每个样本重复测 3 遍后记录平均吸光度  $D_{664\text{ nm}}$ 、 $D_{649\text{ nm}}$ 、 $D_{470\text{ nm}}$ 。用 95% 乙醇调零后,即可进行样本吸光度的测定,若样本的吸光度高于 1,可以按 1:10 的比例进行稀释。通过计算公式可以得到总叶绿素含量及叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素、叶黄素的量。

1.2.8 拟南芥叶片总蛋白提取及 SDS-PAGE 分离 取拟南芥叶片组织(约 50 mg)置于 1.5 mL 离心管中,用千分之一天平精确称量后放入液氮中瞬时冷冻。将叶片充分研磨至粉末状,按 1 mg 组织加 10  $\mu\text{L}$  缓冲液量加入 2 $\times$  蛋白提取缓冲液,颠倒混匀后放入 65℃ 干浴 2 h。2 h 后,室温以 14 000 r/min 离心 10 min,转移上清液(即为所需的蛋白样品)到新的离心管中,蛋白样品可于 -80℃ 保存。等量的蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离后,通过考马斯 R-250 染色液染胶,充分染色后,加入脱色液室温脱色至凝胶空白处蓝色完全脱去,拍照分析条带。

2 结果与分析

2.1 黑暗胁迫体系诱导野生型拟南芥叶片衰老

利用黑暗胁迫梯度处理体系,首先构建了以拟南芥野生型为处理对象的植物叶片衰老模式,以此寻找叶片出现显著衰老表型的时间点,同时鉴定该黑暗处理体系的有效性。将生长于 MS 培养基上的 7 d 的野生型拟南芥,转移到不添加蔗糖的 MS 培养基上,经过黑暗胁迫(C-)不同天数处理诱导植物衰老;而对照组植株转移到含有 1% 蔗糖的 MS 培养基上,继续光下生长。黑暗胁迫处理的时间梯度依次为 0、0.5、1、2、3、4、5、7、9 d。取出对应时间点的植物观察表型,与光下对照相比,在黑暗胁迫诱导 5 d 后植物叶片颜色开始变黄,7 d 后叶片黄化加剧,衰老表型明显(图 2)。在处理 9 d 后,植物叶片基本完全变黄。通过对野生型诱导衰老,确定了最为明显的植物叶片衰老表型开始于处理 7 d 左右,同时也说明了构建的黑暗胁迫体系确实能诱导植物产生快速一致的叶片衰老表型。

2.2 经典自噬基因突变体的 T-DNA 插入鉴定及黑暗胁迫诱导叶片衰老

Thompson 等将在碳源充足的短日照条件下生长的自噬基因突变体 *atg5-1* 和 *atg7-1*,转移到黑暗中生长一段时间后又回到短日照下生长 1 周,诱导 *atg5-1* 和 *atg7-1* 产生了

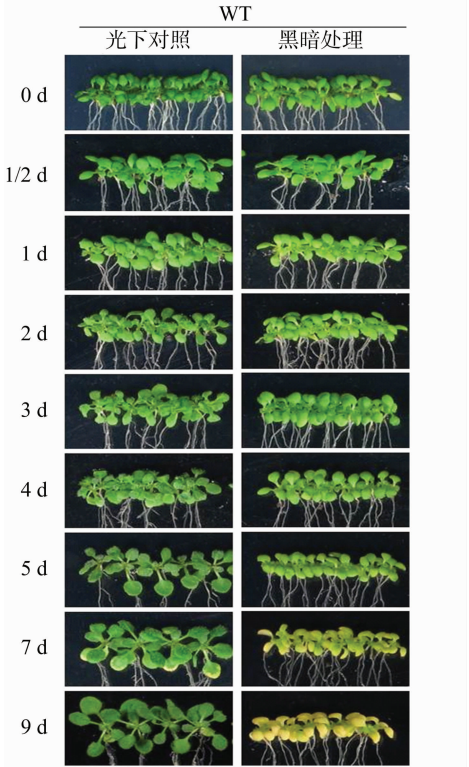


图2 黑暗胁迫诱导野生型拟南芥的叶片衰老表型

生长减慢和衰老加速的表型,从而证明了其构建的碳源缺乏体系的有效性<sup>[20]</sup>。因此,先通过从 ABRC 网站上购买,分别获得了 *ATG5* 基因和 *ATG7* 基因的 T-DNA 插入功能缺失突变体 *atg5-1* 和 *atg7-3*,再通过设计引物进行 PCR 鉴定其 T-DNA 插入位点(图 3),获得其 T-DNA 插入功能缺失纯合突变体。

进一步将突变体 *atg5-1* 和 *atg7-3* 作为处理对象来检测该黑暗胁迫体系在鉴定自噬异常突变体叶片衰老表型中的有效性,处理时间为 7 d,处理方法同上。在黑暗胁迫体系处理 7 d 后,取出植物观察表型,可以看到,经过处理的野生型植物叶片已经开始变黄,这与之之前结果一致。然而相比于野生型,处理后的自噬基因突变体 *atg5-1* 和 *atg7-3* 均表现出更为明显的叶片黄化衰老表型(图 3),这与已经报道的经典自噬基因突变体在营养胁迫下产生的超敏感表型一致。同时,观察光下正常生长的对照组植物,发现突变体与野生型植物叶片颜色并无差异,表明在黑暗胁迫后产生的叶片衰老表型并非由植物本身叶色差异造成。通过已知的自噬突变体在黑暗胁迫诱导下产生的衰老加剧表型,说明构建的黑暗胁迫体系确实可以作为筛选或鉴定衰老异常突变体的有效手段。

2.3 衰老异常突变体的筛选与表型鉴定

通过 EMS 诱变及黑暗胁迫处理体系,在 M2 代筛到了 3 个可能的衰老相关突变体。其中筛到 1 个在黑暗胁迫处理以后植物叶片颜色明显黄化、衰老加剧的突变体 *asd1-1*,在后续作为研究对象。将野生型和 *asd1-1* 突变体经过黑暗胁迫梯度处理体系诱导,培养时间梯度为 0.5、1、2、3、4、5、7、9 d,将到达处理时间点的植物取出观察衰老表型,本研究展示了 0、1、3、5、7、9 d 这 6 个时间点的植物表型图(图 4)。从图中可以看出,随时间的延长,黑暗胁迫处理以后的植物叶片逐渐



变黄衰老。而对比野生型与 *asd1-1* 突变体可以发现, *asd1-1* 突变体衰老更快, 在处理 5 d 后, 野生型与 *asd1-1* 突变体已呈现出叶色黄化差异, 而在处理 7 d 后, 叶色差异更为明显; 到处理 9 d 后, 虽然二者都衰老严重, 但 *asd1-1* 突

变体的叶片已经开始腐烂。而处理 0 d 的植物叶片颜色并无差异, 表明在黑暗胁迫后产生的叶片衰老加剧表型并非由植物本身叶色差异造成, 而可能是 *ASD1* 基因在调控叶片衰老中的功能引起。

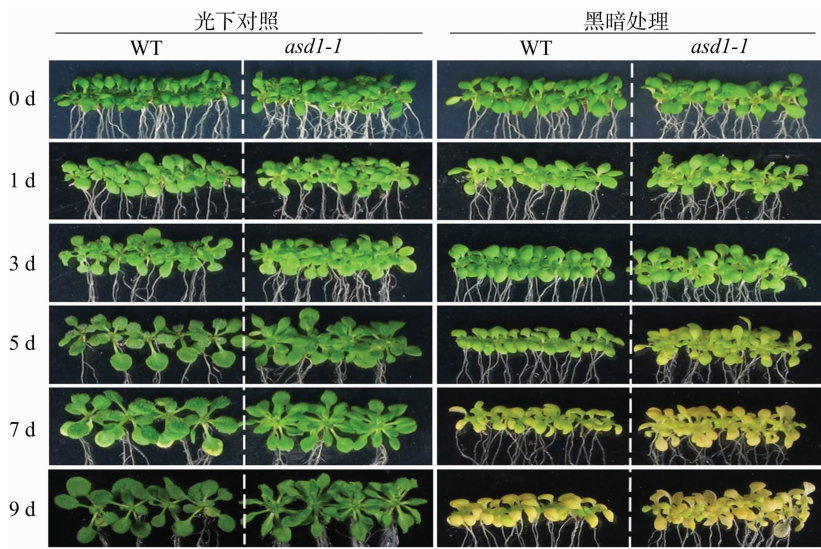
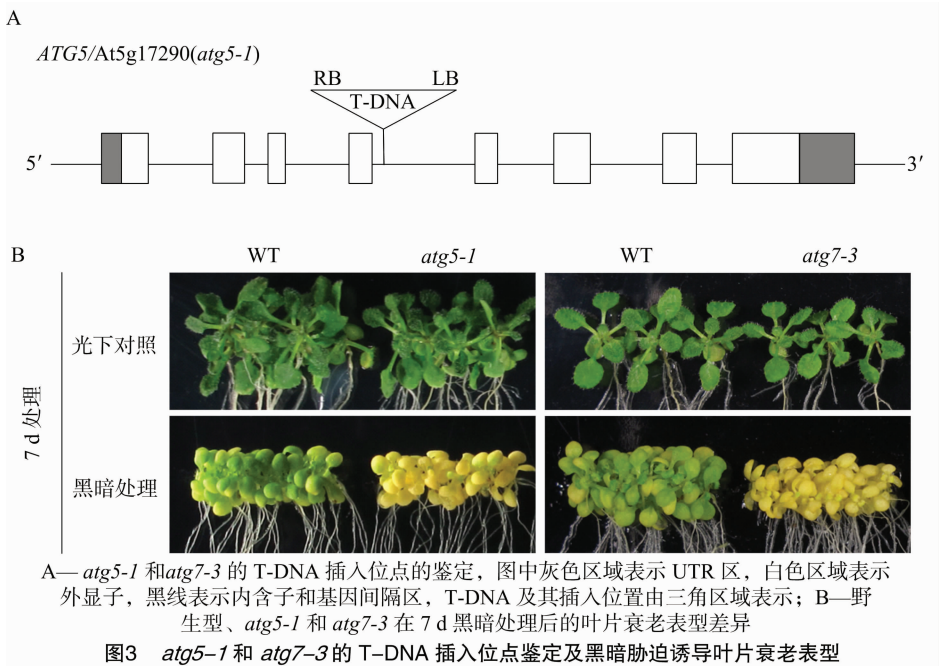


图4 野生型与 *asd1-1* 的黑暗胁迫诱导叶片衰老表型比较

2.4 衰老叶片中的叶绿素含量测定

现已建立的表征衰老的标记有叶绿素含量、光合效率、基因表达以及蛋白水平的变化等。其中测定叶绿素含量是最为方便和简单的定量叶片衰老的方法<sup>[21-22]</sup>。通过测量叶片的叶绿素含量, 发现光下对照中的野生型与 *asd1-1* 突变体的叶绿素含量在同一时间点差异并不明显; 而在黑暗胁迫处理中的 2 种基因型植物叶绿素含量都随着处理时间延长呈下降趋势, 但 *asd1-1* 突变体叶绿素下降速率要高于野生型 (图 5)。

2.5 衰老叶片中蛋白的降解

将野生型拟南芥与 *asd1-1* 突变体在梯度黑暗处理 0.5、

1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 d 后, 通过提取衰老叶片的总蛋白及 SDS-PAGE 电泳检测叶片总蛋白的降解情况 (图 6)。观察考马斯亮蓝染色的蛋白胶, 可以看到在黑暗胁迫诱导的衰老叶片中, 蛋白积累明显降低, 而对比于野生型, *asd1-1* 突变体中蛋白的降解更为明显, 尤其在处理 3 d 以后, *asd1-1* 突变体中蛋白积累, 特别是叶绿体蛋白 Rubisco 大亚基 (50 ku) 的含量明显下降。这也间接反映了 *asd1-1* 突变体在黑暗胁迫诱导下衰老加剧。

3 结论与讨论

植物叶片衰老是植物自身发育阶段整合外界环境而表现

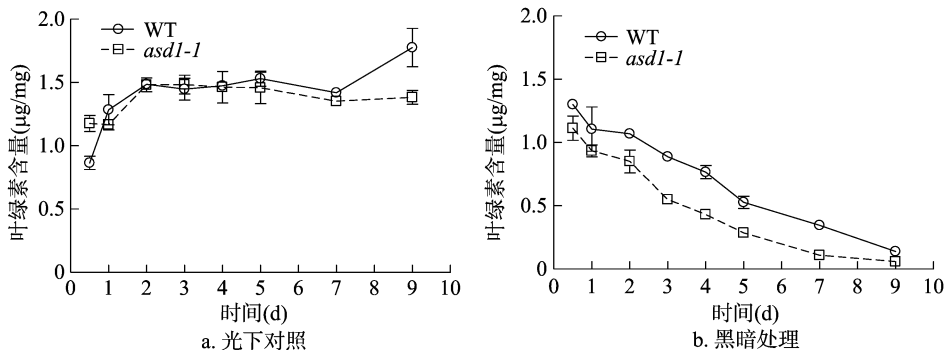
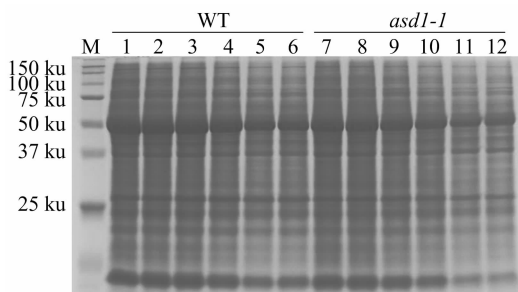


图5 野生型拟南芥与 *asd1-1* 衰老叶片中的叶绿素含量测定



M—蛋白分子量标准；1~6—野生型拟南芥分别黑暗处理 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 d；7~12—*asd1-1* 突变体分别黑暗处理 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 d

图6 野生型拟南芥和 *asd1-1* 突变体在黑暗胁迫处理后的叶片总蛋白降解差异

出的一种自然响应的衰退过程。外界环境（如黑暗诱导、营养限制等）可以促使整个叶片趋于同步化的衰老<sup>[23]</sup>。前人的研究中常将单个叶片避光黑暗或者采用营养限制（如缺氮、缺磷等）来促使植物衰老，将营养缺乏和黑暗结合起来处理植物幼苗的方法则是一种更为有效的新方法。本研究中，在不提供外源蔗糖的情况下，完全黑暗处理阻止植物进行光合作用，从而抑制内源糖类的产生，形成完全的碳素缺乏。而梯度黑暗胁迫处理的目的在于观测植物表型及细胞内物质变化的动态过程，为后期试验提供合理的植物处理时间点。这种黑暗胁迫体系不仅可以实现植物在幼苗期形成快速一致的衰老，并且植物培养基成分易于控制，避免了因外在因素导致的衰老差异。在本研究中建立的黑暗胁迫体系，不仅可以作为筛选植物衰老相关突变体的有效手段，对于已有突变体材料进行衰老相关表型的鉴定也是一种快速而简便的方法。

利用 EMS 技术构建突变体库，从中筛选突变体是一种经典的正向遗传学方法，该方法有可能筛选到从 T-DNA 插入突变体库中无法发现的新基因<sup>[24]</sup>。在本试验中，通过对野生型拟南芥进行 EMS 诱变，筛选到 1 个衰老表型加剧的突变体 *asd1-1*，进一步对该突变体通过黑暗胁迫体系诱导叶片衰老进行表型验证，同时检测衰老叶片中叶绿体基质蛋白的降解情况，发现突变体叶片衰老表型和叶绿体蛋白降解都与野生型存在差异，明确了 *asd1-1* 为 1 个叶片衰老相关突变体，这为后续研究 *ASD1* 基因在调控叶片衰老中的功能奠定了基础。

#### 参考文献：

[1] Lim P O, Kim H J, Nam H G. Leaf senescence[J]. Annual Review

of Plant Biology, 2007, 58: 115-136.

[2] Buchanan - Wollaston V. The molecular biology of leaf senescence [J]. Journal of Experimental Botany, 1997, 48(2): 181-199.

[3] Senescence T H. Ageing and death of the whole plant [J]. New Phytologist, 2013, 197(3): 696-711.

[4] Lim P O, Woo H R, Nam H G. Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(6): 272-278.

[5] Bleecker A B, Patterson S E. Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1997, 9(7): 1169-1179.

[6] Smart C M. Gene expression during leaf senescence [J]. New Phytologist, 1994, 126(3): 419-448.

[7] Nooden L D, Guimard J J. Regulation of assimilation and senescence by the fruit in monocarpic plants [J]. Physiologia Plantarum, 1989, 77(2): 267-274.

[8] Zhang H S, Zhou C J. Signal transduction in leaf senescence [J]. Plant Molecular Biology, 2013, 82(6): 539-545.

[9] Lee R H, Wang C H, Huang L T, et al. Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes [J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(358): 1117-1121.

[10] Balazadeh S, Riano - Pachon D M, Mueller - Roeber B. Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Biology, 2008, 10(1): 63-75.

[11] Guo H, Ecker J R. The ethylene signaling pathway: new insights [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7(1): 40-49.

[12] Robinson W D, Carson I, Ying S, et al. Eliminating the purple acid phosphatase AtPAP26 in *Arabidopsis thaliana* delays leaf senescence and impairs phosphorus remobilization [J]. New Phytologist, 2012, 196(4): 1024-1029.

[13] Pottier M, Masclaux - Daubresse C, Yoshimoto K A. Autophagy as a possible mechanism for micronutrient remobilization from leaves to seeds [J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5(2): 11.

[14] Buchanan - Wollaston V, Earl S, Harrison E, et al. The molecular analysis of leaf senescence—A genomics approach [J]. Plant Biotechnology Journal, 2003, 1(1): 3-22.

[15] Lim P O, Nam H G. 2 - The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis* [J]. Current Topics in Developmental Biology, 2005, 67: 49-83.

[16] Navabpour S, Morris K, Allen R, et al. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(391): 2285-2292.

[17] 李国保. 一个拟南芥晚花突变体的鉴定[D]. 太原: 山西大学,

陶仕珍,田 斌,孙正海,等. 绣球藤叶片转录组分析及 SSR 引物开发[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):43-46.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.011

# 绣球藤叶片转录组分析及 SSR 引物开发

陶仕珍<sup>1</sup>, 田 斌<sup>2</sup>, 孙正海<sup>2</sup>, 张 睿<sup>2</sup>

(1. 云南林业职业技术学院, 云南昆明 650224; 2. 西南林业大学, 云南昆明 650224)

**摘要:**转录组是特定组织或细胞在某一发育阶段或功能状态下转录出来的所有转录本的集合,转录组研究能够从整体水平上探讨基因功能及基因结构,揭示特定生物学过程的分子机制。利用 Illumina 测序平台对绣球藤叶片的转录组进行测序,共得到原始 reads 92 042 086 个;对其测序组装总共获得 202 340 个 unigene,长度分布于 201 ~ 19 415 bp 之间,平均长度为 642 bp;数据库中的序列同源性比较表明,95 586 个 unigene 与其他生物的已知基因具有不同程度的同源性;绣球藤转录组中的 unigene 根据基因本体论(gene ontology,简称 GO)功能大致可分为细胞组分、分子功能和生物学过程三大类和 38 个亚类;将 unigene 与蛋白质直系同源数据库(cluster of orthologous groups,简称 COG)数据库进行比对,根据其功能大致可分为 26 类;KEGG 数据库作为参考,依据代谢途径可将 unigene 定位到 5 个代谢途径分支;KEGG 通路分析显示,参与翻译的 unigenes 最多有 550 条,并得到 10 255 个简单重复序列(simple sequence repeat,简称 SSR)位点,能为今后对铁线莲属植物资源的研究和有效利用奠定基础。

**关键词:**绣球藤;转录组;基因功能与结构;SSR 引物开发;测序

**中图分类号:** Q753 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0043-04

转录组是指特定生物体在某种状态下所有基因转录产物的总和。目前,以 Illumina、454 和 ABI 为代表的第 2 代测序技术的迅速发展及随之产生的诸如 SOAP-denov 等新的分析方法使人们能更全面快速地了解真核生物复杂的转录组<sup>[1-2]</sup>,更为全基因组测序尚未完成(无参考基因组)的生物提供了组学研究的新途径<sup>[3]</sup>。

通过转录组测序分析能有效挖掘植物不同组织、不同生长发育时期及在不同环境下的基因表达差异<sup>[4]</sup>。另外,转录组测序对新基因的深度发掘、基因家族鉴定、代谢途径确定等科学问题提供了新的解决途径<sup>[5]</sup>。近年来,由于转录组测序成本的降低,通过转录组数据开发适用于动植物育种、濒危物种保护、群体遗传学等领域的分子标记也已获得了很好的效果<sup>[6]</sup>。

铁线莲属(*Clematis*)是毛茛科(Ranunculaceae Jussieu)的

一个世界性分布的大属,共约有 350 余种<sup>[7]</sup>。我国是铁线莲属物种多样性最高的国家之一,约有 147 种,其中 93 种为我国特有<sup>[8]</sup>。这个属的植物多为大型攀援草本,并且有很多物种如转子莲(*C. patens*)、毛茛铁线莲(*C. ranunculoides*)、长瓣铁线莲(*C. macropetala*)等花大而艳丽,具有很高的园艺价值。此外这个属的部分植物如绣球藤(*C. montana*)、威灵仙(*C. chinensis*)、小木通(*C. armandii*)等还有很高的药用价值。本研究所涉及的物种绣球藤是铁线莲属绣球藤组分布较广泛的一个物种,自然分布于我国西南以及喜马拉雅地区,具有良好的药用价值和观赏价值<sup>[9]</sup>。

本研究拟利用 Illumina 测序平台对绣球藤叶片的转录组进行测序,对其测序组装得到的 unigene 进行分类统计、功能注释以及代谢通路分析,并得到一批简单重复序列(simple sequence repeat,简称 SSR)位点,为今后对铁线莲属植物资源的深入研究和有效利用奠定基础。

## 1 研究方法

### 1.1 总 RNA 的提取和测序

用十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethylammonium bromide,简称 CTAB)法<sup>[10]</sup>提取采自云南省昆明市的绣球藤

收稿日期:2016-07-21

基金项目:云南省教育厅科学研究基金(编号:2013Z047、2013J020)。

作者简介:陶仕珍(1970—),女,云南曲靖人,硕士,副教授,主要从事森林植物教学与研究工作。E-mail:1239257922@qq.com。

通信作者:孙正海,博士,副教授,主要从事园林植物和药用植物栽培育种研究。E-mail:sunzhenghai1978@163.com。

2007.

[18] 崔清志,刘晓虹,陈惠明. EMS 诱变技术研究进展[J]. 湖南农业科学,2013(5):7-9,13.

[19] Wilson A K, Picke F B, Turner J C, et al. A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1990, 222(2):377-383.

[20] Thompson A R, Doelling J H, Suttangkakul A, et al. Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways [J]. Plant Physiology, 2005, 138(4):2097-2110.

[21] Oh S A, Park J H, Lee G I, et al. Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal, 1997, 12(3):527-535.

[22] Woo H R, Chung K M, Park J H, et al. ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2001, 13(8):1779-90.

[23] Andersson A, Keskitalo J, Sjödin A, et al. A transcriptional timetable of autumn senescence [J]. Genome Biology, 2004, 5(4):R24.

[24] 李超群,王文静,葛晓春. 拟南芥抗盐突变体的筛选[J]. 复旦学报(自然科学版), 2016, 55(1):97-103, 111.