

分子植物育种
Molecular Plant Breeding
ISSN 1672-416X, CN 46-1068/S

《分子植物育种》网络首发论文

题目： 大麦条纹叶片突变体的表型鉴定及转录组分析
作者： 李云，曹东，宗渊，张怀刚，刘宝龙
网络首发日期： 2020-04-24
引用格式： 李云，曹东，宗渊，张怀刚，刘宝龙. 大麦条纹叶片突变体的表型鉴定及转录组分析. 分子植物育种.
<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20200424.1546.006.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

研究报告

Research Report

大麦条纹叶片突变体的表型鉴定及转录组分析

李云^{1,2,3} 曹东^{1,2,3} 宗渊^{1,2,3} 张怀刚^{1,2,3*} 刘宝龙^{1,2,3*}

1 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁, 810008; 2 中国科学院西北高原生物研究所, 中国科学院种子创新研究院, 中国科学院高原生物适应与进化重点实验室, 西宁, 810008; 3 中国科学院大学, 北京, 100049

*共同通信作者, hgzhang@nwipb.cas.cn; blliu@nwipb.cas.cn

摘要 叶色是与作物的光合速率及产量紧密相关的重要性状, 利用叶色突变体研究叶绿体的发育过程及调控网络, 有助于揭示叶色形成的机制。在农杆菌介导的大麦幼胚遗传转化过程中, 获得一个具有条纹叶片的突变体(*msal*), 该突变株具有条纹白化的叶片、茎秆, 叶鞘、幼穗及幼种, 其叶绿素和类胡萝卜素含量均下降。叶绿体超微结构观察显示条纹叶片突变体细胞的叶绿体数量变少, 呈狭长型, 结构不完整。转录组分析表明在突变体中有 1 004 个差异基因, 其中 388 个表达量下调, 609 个表达量上调。GO 富集分析显示细胞组份“叶绿体”的富集频率最高, 为 23.0%, P 值为 5.74e-07, 表明“叶绿体”在转录水平上发生了改变。62 个与叶绿体发育相关的差异基因在突变体中表达量均为上调, 而与类胡萝卜素合成相关的差异基因表达量下调。我们推测该突变体抑制了类胡萝卜素的合成, 影响了叶绿体发育, 而作为补偿机制激活了叶绿体相关发育基因的表达。

关键词 大麦, 条纹白化叶片, 叶绿体, 转录组

Phenotype and Transcriptome Analyses of Striated Mutation from Barley

Li Yun^{1,2,3} Cao Dong^{1,2,3} Zong Yuan^{1,2,3} Zhang Huaigang^{1,2,3*} Liu Baolong^{1,2,3*}

1 Qinghai Province Key Laboratory of Crop Molecular Breeding, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810008; 2 Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota (AEPB), Innovation Academy for Seed Design, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Qinghai Xining, 810008; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049

* Co-corresponding authors, hgzhang@nwipb.cas.cn; blliu@nwipb.cas.cn

Abstract Leaf color is a vital trait associated closely with the photosynthetic rate and crop productivity of barley. Chloroplast development and its regulatory networks had been studied by using leaf color mutations for revealing the mechanism of leaf color formation. Here, a novel barley mutation (*msal*), which had striated albino leaves, stalks, sheathes, immature spikes and immature seeds, was obtained from the plants regenerated from an *Agrobacterium*-mediated transformation of barley. The chlorophyll and carotenoid contents was drastically reduced in *msal*. Ultrastructural observations revealed that the cells from albino parts of *msal* contained limited chloroplasts, and these chloroplasts exhibited spindly shapes and incomplete membrane systems. A transcriptome analysis identified 1 004 differentially expressed genes, including 388 downregulated and 609 upregulated in *msal*. A GO analysis showed the cluster frequency of the enriched cellular component “chloroplast” was the highest at 23.0% with a P-value of 5.74e-07, which indicated that “chloroplast” was changed at the transcriptome level. A further analysis showed that all 62 differentially expressed unigenes involved with chloroplast development were upregulated, while three differentially expressed unigenes involved with carotenoid biosynthesis were downregulated. Thus, this mutation appeared to inhibit the carotenoid biosynthetic pathway and activate the chloroplast developmental pathway.

Keywords Barley, Striated albino leave, Chloroplast, Transcriptome

作为植物细胞中重要的细胞器，叶绿体是光合作用和很多重要化合物(碳水化合物、氨基酸、脂肪酸及萜类化合物)生物合成的场所(Rolland et al., 2008)。叶绿体是由胚胎形成过程中产生的原质体发育而来。在叶绿体分化时类囊体形成并堆叠成基粒，从而提供光合作用中的光反应平台(Pogson et al., 2015; Rast et al., 2015)。形成结构完成且具有光合作用功能的叶绿体是个高度复杂的过程，需要一系列蛋白质的参与，而编码这些蛋白质的基因一部分来自核基因组(~3 000 基因)，一部分来自叶绿体基因组(~150 基因)。同时双向的信号调控协调了核基因组和叶绿体基因组的基因表达(Kleine et al., 2009; Pesaresi et al., 2007)，保证了叶绿体的形态建成及功能形成。在叶绿体发育的早期，由于缺乏光化学猝灭所需的下游元件，新形成的叶绿

体膜容易受到光氧化损伤(Horton et al., 1996), 而类胡萝卜素可以保护叶绿体膜免受氧自由基的损害(Li et al., 2009)。对拟南芥白绿斑纹突变体的研究显示突变 IMMUTANS 对于类胡萝卜素的合成十分重要, 和质体醌池的氧化状态紧密相关, 导致了叶绿体的发育缺陷(Wu et al., 1999)。

叶绿素是高等植物光合系统中必不可少的组份, 其生物合成是一个复杂并且极其协调的生物过程, 从前体物质谷氨酰-tRNA^{Glu} 到最终产物叶绿素 a 和叶绿素 b, 二十多种酶参与了叶绿素的合成过程(Bollivar, 2006)。其中原叶绿素酸酯氧化还原酶催化原叶绿素酸酯形成了叶绿素酸酯, 属于叶绿体形成过程中的第一个依赖光的反应, 引起了类囊体的堆叠(Tatsuru et al., 2003)。同时 POR 的功能与原质体转化为成熟叶绿体的生物过程紧密相关(Solymosi et al., 2007)。

叶色突变体是研究叶绿体发育与光合系统建成的良好材料(Ge et al., 2017)。在过去的研究中利用转录组测序的方法揭示了一系列叶色突变体的叶绿体发育及叶绿素合成的调控机制(Ge et al., 2017; Kim et al., 2015; Li et al., 2016; 2017; Luo et al., 2017; Shi et al., 2017)。在本研究中, 条纹叶片突变体中叶绿体结构变异, 数量变少, 叶片叶绿素和类胡萝卜素含量下降, 进而导致株高和穗粒数下降。转录组分析显示突变体抑制了类胡萝卜素的合成, 而激发了叶绿体发育相关基因的表达, 这可能是一种补偿机制。

1 结果与分析

1.1 叶色突变体的表型分析

在农杆菌介导的大麦幼胚遗传转化过程中, 获得一株具有条纹叶片突变的植株(*msal*), 该突变株具有条纹白化的叶片、茎秆, 叶鞘、幼穗及幼种(图 1), 可正常结实。该突变体的自交子代出现了表型分离, 分为正常绿色叶片植株和条纹叶片植株, 其中部分条纹叶片植株由于白化面积过大而逐渐死亡。

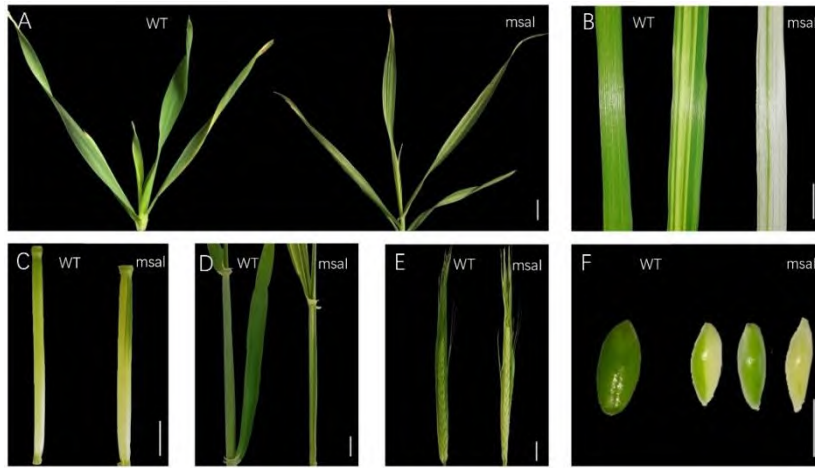


图 1 大麦野生型与突变体的表型

注: A: 幼苗; B~F: 叶片, 茎, 叶鞘, 幼穗, 幼种; WT: 野生型; *msal*: 条纹叶片突变体; A, C, D and E, bar = 1 cm; B and F, bar = 0.5 cm

Figure 1 Phenotypes of wild type and mutant barley

Note: (A) Seedlings of wild type and mutants; (B–F) leaves, stalks, sheaths, immature spikes and immature seeds of wild type and mutants; WT, wild type; *msal*, mutation with striated albino leaves (A, C, D and E, bar = 1 cm; B and F, bar = 0.5 cm)

与野生型相比, 突变体的色素含量均下降, 其中叶绿素 a 和叶绿素 b 含量差异水平显著, 总叶绿素和类胡萝卜素含量差异水平极显著, 而叶绿素 a/b 比值与野生型没有差异(表 1)。农艺性状鉴定显示突变体的株高和千粒重均为极显著下降, 而穗长和穗粒数没有差异(表 2)。这些结果说明突变体中色素含量的降低, 影响了植株的生长, 导致株高和千粒重的下降。

表 1 野生型和突变体的色素含量检测

Table 1 The chlorophyll and carotenoid content of wild type barley and *msal*

	叶绿素 a (mg/g)	叶绿素 b (mg/g)	叶绿素 a+b (mg/g)	叶绿素 a/b	类胡萝卜素(mg/g)
	Chl a (mg/g)	Chl b (mg/g)	Chl a+b (mg/g)	Chl a/b	Car (mg/g)
野生型	1.61±0.11	0.51±0.10	2.12±0.37	3.21±0.33	0.59±0.11
WT					

突变体	0.93±0.15a	0.26±0.06a	1.20±0.16b	3.60±0.46	0.33±0.04b
<i>msal</i>					

注: a: 显著水平($P \leq 0.05$); b: 显著水平($P \leq 0.01$)

Note: a: Significant difference ($P \leq 0.05$); b: Significant difference ($P \leq 0.01$)

表 2 野生型和突变体的农艺性状鉴定

Table 2 The agricultural traits of wild type barley and *msal*

	株高(cm)	穗长(cm)	穗粒数	千粒重(g)
	Plant height (cm)	Panicle length (cm)	Grains per spike	Thousand seed weight (g)
野生型	77.70±4.0	13.6±1.49	25.8±2.45	32.66±0.8
WT				
突变体	66.20±3.3b	13.5±1.07	24.2±2.89	30.13±0.8b
<i>msal</i>				

注: b:显著水平($P \leq 0.01$)

Note: b: Significant difference ($P \leq 0.01$)

1.2 叶绿体超微结构观察

利用电镜观察叶绿体的超微结构, 鉴定野生型和突变体的细胞形态学差异。野生型叶绿体数量较多, 呈扁球型, 结构完整, 具有丰富的基粒及基质类囊体(图 2A~图 2C)。然而, 突变体白化部位的叶绿体数量变少, 呈梭型, 叶绿体膜结构不完整。类囊体疏松分散于叶绿体中, 没有堆叠形成基粒(图 2D~图 2F)。我们推测在突变体中, 原质体分化时类囊体没有堆叠形成基粒, 最终形成了结构缺陷的叶绿体。

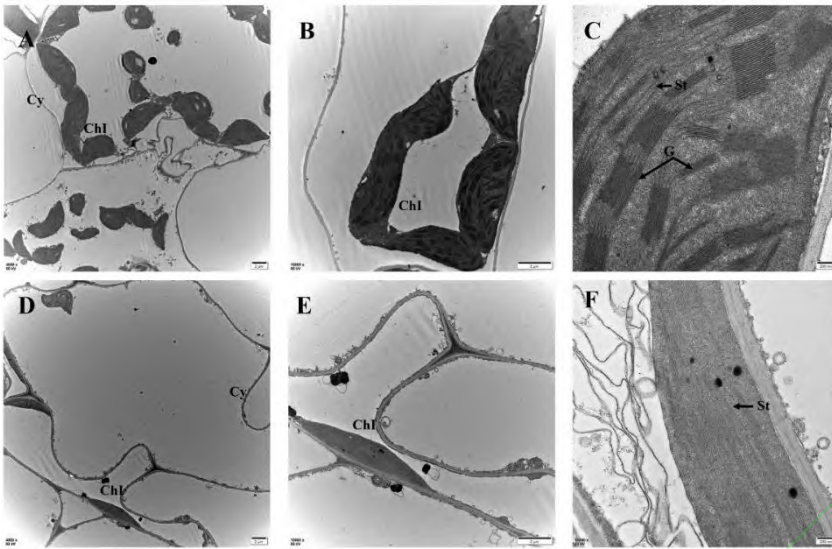


图2 野生型和突变体的叶绿体超微结构

注: A~C: 野生型; D~F: 突变体; Chl: 叶绿体; Cy: 细胞壁; G: 基粒; St: 基质类囊体(A, B, D和E, bar = 2 μ m; C和 F, bar = 200 nm)

Figure 2 Chloroplast ultrastructures of wild type barley and *msal*

Note: A~C: Chloroplast ultrastructures of wild type; D~F: Chloroplast ultrastructures of albino parts of *msal*; Chl: Chloroplast; Cy, Cytoderm; G: Grana; St: Stroma thylakoids (A, B, D and E, bar = 2 μ m; C and F, bar = 200 nm)

1.3 转录组测序、序列组装和功能注释

为了揭示突变体缺陷叶绿体的分子机制，我们分析了野生型和突变体的转录组差异基因。原始数据过滤后，四个文库分别得到了 67 060 668, 63 543 686, 51 313 638 和 51 526 426 clean reads, GC 含量为 53.02% ~ 60.8%, 并且 Q20 均高于 94.5% (表 3)。使用 Trinity 软件将 clean reads 组装为 82 991 unigenes, 这些 unigenes 长度均超过 300 bp, 且平均长度为 1 269 bp, N50 的长度为 2 028 bp。通过与各个数据库(Nr, Nt, Swissprot, KEGG, KOG, Interpro 和 GO)的比对, 共 70 419 unigenes 被注释, 占有 unigenes 的 84.85%。同时 45.96% 的 unigenes 注释到大麦(*Hordeum vulgare* subsp. *Vulgare*)基因组上, 35.21% 注释到山羊草(*Aegilops tauschii*)基因组上, 7.06% 注释到乌拉尔图小麦(*Triticum urartu*)基因组上, 2.26% 注释到普通小麦(*Triticum aestivum*)基因组上。这些结果表明测序数据是高质量的, 可以用于下一步的分析。

表 3 野生型和突变体的转录组测序数据

Table 3 Summary of transcriptome sequencing data in wild type barley and *msal*

	野生型 1	野生型 2	突变体 1	突变体 2
	WT1	WT2	<i>msal1</i>	<i>msal2</i>
Total Raw Reads	67063398	63546268	51315820	51545458
原始数据				
Total Clean Reads	67060668	63543686	51313638	51526426
优化数据				
Data size	10059100200	9531552900	7697045700	7728963900
数据大小				
GC percentage	60.8	60.115	57.31	53.02
GC 含量				
Q20 percentage	95.52	95.43	94.915	95.165
Q20 值				

1.4 野生型和突变体的差异基因分析

根据 FPKM 值，在野生型和突变体中共有 1 004 差异基因，其中在突变体中有 388 个表达量上调的基因，609 个表达量下调的基因(图 3)。将差异基因进行 GO 功能分析，共有 391 个差异基因分布在生物过程、细胞组份和分子功能等三个层面上。在生物过程层面，261 个差异基因主要富集在“细胞过程”、“代谢过程”、“细胞组份构成”和“生物调控”等。在细胞组份层面，287 个差异基因主要富集在“细胞”、“细胞器”、“膜”和“大分子复合物”等。在分子功能层面，328 个差异基因主要富集在“结合”，“催化活性”和“运输活性”(图 4)。进一步的分析显示差异基因极显著富集在“蛋白质折叠”、“叶绿体”、“叶绿体基质”、“铁离子跨膜转运活性”和“葡萄糖 6-磷酸脱氢酶活性”等。其中“叶绿体”的富集频率最高，达到 23.0%，P-value 为 5.74e-07(表 4)。这个结果表明与叶绿体相关的基因在转录水平发生了改变，这和叶绿体结构缺陷的表型是一致的。

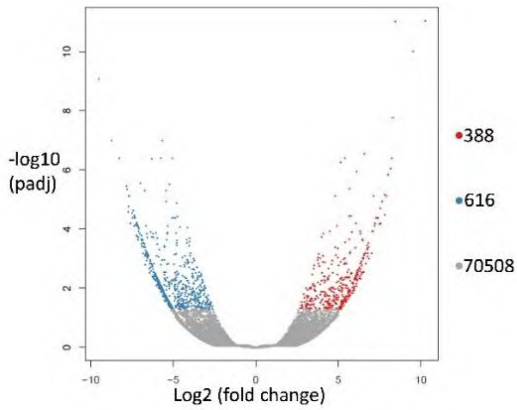


图3野生型和突变体的差异基因火山图

注: 红点为突变体表达量下调基因; 蓝点为突变体表达量上调基因; 灰点为表达量无差异基因

Figure 3 Volcano plot of gene expression levels between wild type and *msal*

Note: Red points indicate down regulated unigenes in *msal*; blue points indicate upregulated unigenes in *msal*; gray points indicate no difference in expression between *msal* and wild type

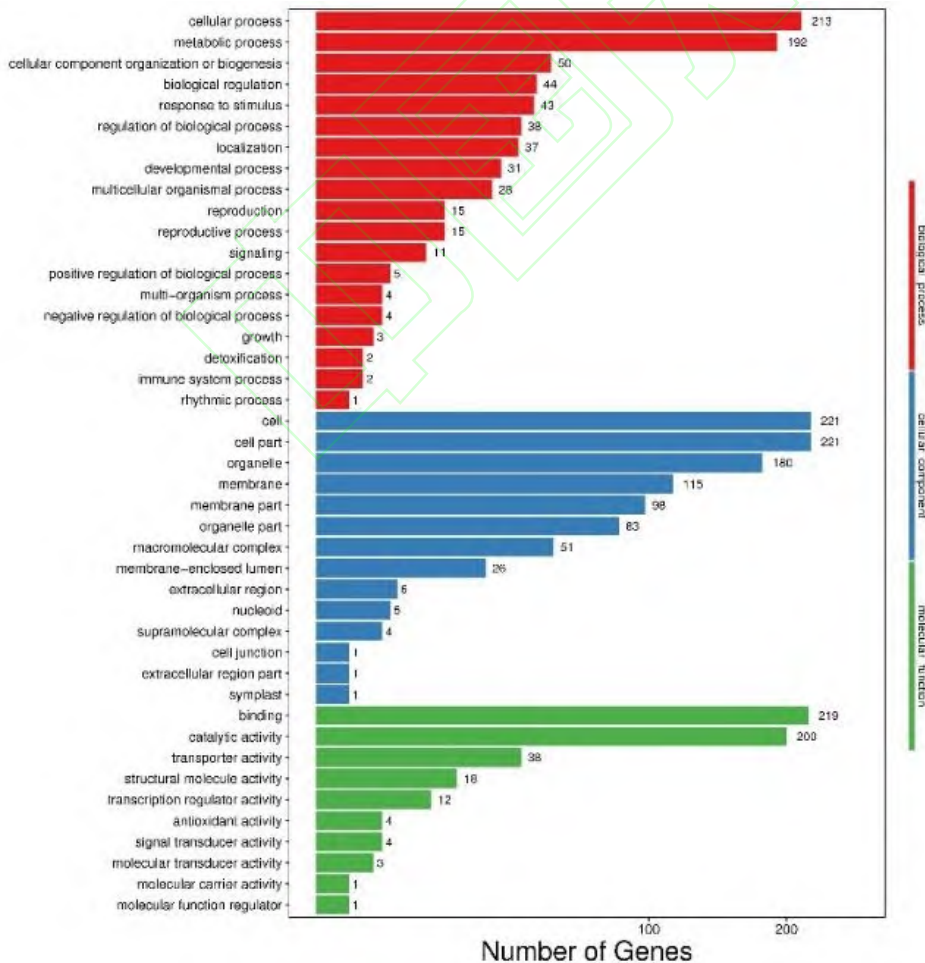


图 4 野生型和突变体的差异基因 GO 功能分析

注: 红色为生物过程; 蓝色为细胞组份; 绿色为分子功能

Figure 4 GO functional analysis of DEGs between wild type and *msal*

Note: Red indicate biological process; Blue indicate cellular component; Green indicate molecular function.

表 4 差异基因显著富集的 GO 项

Table 4 Summary of GO terms with significantly enriched DEGs

层面	GO 条目	富集频率	P-value 值
Ontology	GO term	Cluster frequency	Corrected P-value
Biological process	Protein refolding	16 out of 261 genes, 6.1%	0.00130
生物过程	蛋白质折叠		
Cellular component	Chloroplast	66out of 287 genes, 23.0%	5.74e-07
细胞组份	叶绿体		
	chloroplast stroma	24 out of 287 genes, 8.4%	0.00275
	叶绿体基质		
Molecular function	iron ion transmembrane transporter activity	8 out of 328 genes, 2.4%	8.63e-06
分子功能	铁离子跨膜转运活性		
	glucose-6-phosphate dehydrogenase activity	4 out of 328 genes, 1.2%	0.00533
	葡萄糖 6-磷酸脱氢酶活性		

1.5 与叶绿体相关的差异基因分析

根据 GO 功能和 KEGG 通路分析, 有功能的叶绿体形成通常涉及了四个方面: 叶绿体发育, 叶绿素合成, 类胡萝卜素合成和光合系统, 共有 74 个差异基因。其中 62 个与叶绿体发育相关的差异基因, 在突变体中的表达量为上调, 主要涉及了 RNA 的转录, 内含子的剪切和蛋白质的翻译等, 这些过程都影响叶绿

体的发育。类胡萝卜素合成途径有 3 个差异基因，在突变体中表达量下调，其中八氢番茄红素合成酶是类胡萝卜素合成途径中的关键酶。这说明在突变体中激活了叶绿体发育相关途径而抑制了类胡萝卜素合成途径的相关基因。叶绿素合成途径有 3 个差异基因，其中 **POR** 基因在突变体中表达量下调。光合系统通路中 6 个差异基因，其中 **CP43** 叶绿素脱辅基蛋白基因和反应中心蛋白 **M** 基因在突变体中表达量下调(表 5)。

表 5 与叶绿体发育，叶绿素合成，类胡萝卜素合成及光合系统相关的差异基因

Table 5 DEGs related to chloroplast development, chlorophyll biosynthesis, carotenoid biosynthesis and photosystem between wild type barley and *msal*

Function	Unigenes	log2FoldChange	Expression in	Annotation
功能		(<i>msal</i> /wild type)	<i>msal</i>	注释
		log2Fold 差异	表达差异	
Chlorophyll biosynthesis	CL1437.Contig2_All	-8.169	Down	protochlorophyllide reductase A, chloroplastic
	CL4646.Contig1_All	3.102	Up	protoporphyrinogen oxidase, chloroplastic
叶绿素合成	CL10323.Contig1_All	3.538	Up	glutamate--tRNA ligase, chloroplastic
Carotenoid biosynthesis	CL8224.Contig3_All	-6.843	Down	phytoene synthase, chloroplastic
	Unigene18155_All	-6.031	Down	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase NCED3, chloroplastic
胡萝卜素合成	Unigene14519_All	-6.074	Down	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase NCED5, chloroplastic
Photosystem	Unigene15985_All	-2.766	Down	photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein
光合系统	Unigene15727_All	-3.956	Down	photosystem II reaction center protein M
	CL1903.Contig2_All	4.225	Up	photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 2

	CL1903.Contig3_All	4.141	Up	photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 2
	CL1194.Contig11_All	5.974	Up	photosystem II oxygen-evolving enhancer protein 3
	CL4939.Contig1_All	2.879	Up	Ferredoxin-3, chloroplastic
Chloroplast	Unigene15498_All	3.364	Up	DNA gyrase subunit A
Development	CL8916.Contig1_All	2.941	Up	Ribosome-recycling factor
叶绿体发育	CL9233.Contig2_All	4.184	Up	DNA-templated transcription
	CL8233.Contig2_All	3.697	Up	pentatricopeptide repeat-containing protein
	Unigene3843_All	4.064	Up	FAD binding domain
	CL7765.Contig1_All	3.435	Up	Ribonuclease E/G family
	Unigene7142_All	3.496	Up	Transcription termination factor MTERF6
	CL2139.Contig4_All	3.908	Up	ruBisCO large subunit-binding protein subunit beta
	Unigene9447_All	3.258	Up	CRM-domain containing factor CFM3
	Unigene2438_All	6.762	Up	SAM-dependent methyltransferases
	CL2806.Contig2_All	4.835	Up	plastidial pyruvate kinase
	CL8233.Contig1_All	3.856	Up	pentatricopeptide repeat-containing protein
	CL3006.Contig2_All	3.207	Up	50S ribosomal protein L4
	CL3950.Contig1_All	3.530	Up	Trigger factor-like protein TIG
	CL10294.Contig2_All	5.442	Up	Fructokinase-like 1
	CL627.Contig1_All	3.846	Up	UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase

CL5753.Contig2_All	3.426	Up	ruBisCO large subunit-binding protein subunit beta
CL5090.Contig3_All	3.313	Up	Isochorismate synthase 2
CL4646.Contig1_All	3.102	Up	Protoporphyrinogen oxidase
Unigene28408_All	8.739	Up	translocase subunit SECA1
Unigene751_All	2.631	Up	30S ribosomal protein S20
CL3006.Contig1_All	3.098	Up	50S ribosomal protein L4
CL2460.Contig5_All	6.174	Up	dynamamin-related protein 3B-like
CL474.Contig5_All	5.295	Up	Pentatricopeptide repeat-containing protein
<hr/>			
CL10146.Contig6_All	6.417	Up	GTP-binding protein
CL751.Contig1_All	2.844	Up	Cystathionine beta-synthase and related enzymes
Unigene4549_All	2.969	Up	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit-related protein
CL10309.Contig2_All	4.456	Up	Superoxide dismutase [Fe]
CL1142.Contig5_All	6.901	Up	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit S
CL5211.Contig1_All	3.031	Up	pyridoxal reductase,
CL5097.Contig2_All	5.875	Up	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
Unigene19023_All	4.703	Up	ribosomal protein L23
Unigene21338_All	2.741	Up	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase
CL9522.Contig1_All	5.155	Up	oxygenase large subunit N-methyltransferase
CL4523.Contig11_All	6.583	Up	RNA polymerase beta subunit

Unigene1263_All	3.391	Up	shikimate kinase
CL9956.Contig4_All	3.365	Up	SpoU rRNA Methylase family
CL3168.Contig1_All	3.804	Up	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase
CL3296.Contig1_All	2.931	Up	20 kDa chaperonin
Unigene28433_All	3.626	Up	Omega-amidase
Unigene11770_All	3.251	Up	fructokinase-like 2
CL9844.Contig1_All	2.835	Up	30S ribosomal protein
CL5392.Contig2_All	3.314	Up	DJ-1 homolog C isoform X1
CL7782.Contig2_All	4.525	Up	L-ascorbate peroxidase 5
Unigene5821_All	4.706	Up	glycine--tRNA ligase
CL5392.Contig1_All	3.244	Up	DJ-1 homolog C isoform X1
CL8633.Contig1_All	2.763	Up	30S ribosomal protein S31
Unigene681_All	2.787	Up	50S ribosomal protein
Unigene3582_All	2.862	Up	RNA polymerase I subunit 1
Unigene2682_All	5.381	Up	predicted protein
Unigene2258_All	5.417	Up	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase
Unigene11543_All	2.717	Up	30S ribosomal protein S9
Unigene16107_All	2.852	Up	predicted protein
CL9060.Contig1_All	4.223	Up	Bacterial trigger factor protein
CL4927.Contig1_All	3.714	Up	envelope ADP,ATP carrier protein
CL5927.Contig2_All	6.133	Up	3-isopropylmalate dehydrogenase
CL2535.Contig4_All	3.036	Up	20 kDa chaperonin

Unigene248_All	5.222	Up	pentatricopeptide repeat-containing protein
Unigene9165_All	3.544	Up	50S ribosomal protein
CL2833.Contig1_All	3.743	Up	predicted protein
Unigene23097_All	4.783	Up	valine--tRNA ligase
CL9956.Contig2_All	3.410	Up	RNA Methylase, SpoU family

2 讨论

在农杆菌介导的大麦幼胚遗传转化过程中，获得一个具有条纹叶片的突变体。该突变体生长缓慢，可正常结实。与野生型相比，突变体的叶绿素和类胡萝卜素含量显著下降，株高和千粒重下降。叶绿体超微结构观察显示突变体白色部位的叶绿体数量变少，结构缺陷。这些结果表明叶片色素含量下降和叶绿体形态变异与条纹突变体的形成有关。由于部分突变体白化面积过大而死亡，很难统计子代正常株和突变株的分离比率，进而分析其遗传规律。

RNA-Seq 提供了样品转录水平的整体信息，是我们能够更好地理解复杂的生物学过程和基因调控的变化(Wang et al., 2009)。在我们研究中，野生型和突变体共有 1 004 个差异基因，其中在突变体中有 388 个表达量下调基因，609 个表达量上调基因。差异基因富集频率最高的 GO 条目是“叶绿体”，富集频率达 23.0%，P-value 为 5.74e-07，表明与叶绿体相关的基因在转录水平发生了改变，与叶绿体结构缺陷的表型是一致的。突变体中 62 个与叶绿体发育相关的基因表达量是上调的，这与叶绿体数目下降是矛盾的。然而类胡萝卜素合成途径中的 3 个表达量下调基因可以解释叶绿体数目的下降。类胡萝卜素具有光保护和抗氧化的功能，在叶绿体发育早期发挥着重要作用。其中，八氢番茄红素合成酶作为类胡萝卜素合成途径中的限速酶，直接影响着类胡萝卜素的含量(Cunningham and Gantt, 1998; Shumskaya and Wurtzel, 2013)。在文心兰中八氢番茄红素合成酶的表达量下降，引起了叶绿素合成途径中基因表达量的改变(Liu et al., 2014)。我们推测被抑制的类胡萝卜素合成通路导致类胡萝卜素含量下降。缺乏类胡萝卜素的保护，光氧化影响了叶绿体的发育(Horton et al., 1996)。而作为补偿机制，和叶绿体发育相关的基因表达量上调。大麦条纹叶片突变体的遗传

机制有待进一步进行研究。

3 材料与方法

3.1 实验材料

大麦野生型和突变体种子温室，在植株三叶期采集野生型叶片和突变体叶片的白色部分，用于叶绿体超微结构观察及转录组分析。在六叶期分析野生型和突变体叶片的色素含量。

3.2 色素含量测定

将 0.1 g 新鲜叶片切成小块，加入 10 mL 提取液(50%乙醇和 50%丙酮)，静置提取至叶片变为白色，设三次生物学重复。测定提取液在 663 nm, 646 nm 和 470 nm 的吸光值，根据以下公式计算色素含量： $\text{Chl a (mg/g)} = (12.21 \times A_{663} - 2.81 \times A_{646}) / 10$, $\text{Chl b (mg/g)} = (20.13 \times A_{646} - 5.03 \times A_{663}) / 10$, $\text{Car (mg/g)} = (1000 \times A_{470} - 3.27 \times \text{Chl a} - 104 \times \text{Chl b}) / 2290$ 。

3.3 叶绿体超微结构观察

将叶片切成 1 mm × 1 mm 小块，并在 4% 的戊二醛中室温固定 24 h，磷酸盐缓冲液清洗后，在 1% 饿酸中再固定 3 h。磷酸盐缓冲液清洗后在 30%，50%，70%，80%，90%，95% 和 100% 乙醇中逐级脱水，包埋于环氧树脂中，33 °C 浸透 25 h，60 °C 聚合 48 h。包埋块在超薄切片机上切片，切片用双氧柚和柠檬酸铅染色后，在日立 H-7650 型电镜上观察并拍照。

3.4 转录组分析

采集突变体叶片的白色部分及野生型叶片，分为两次生物学重复用于建库测序。利用天根 RNA 提取试剂盒提取样品总 RNA，检测合格的 RNA 通过磁珠法富集真核生物的 mRNA，然后使用六碱基随机引物构建 cDNA 文库，并利用 HiSeq 2000 系统进行测序(北京诺禾致源生物信息科技有限公司)。

原始数据去除模糊碱基，接头和 ploy-Ns 等低质量片段后，得到优化数据。利用 Trinity 将优化数据进行序列组装(Grabherr et al., 2011)。通过与数据库进行序列比对，将这些序列进行功能注释。一共有 7 个数据库用于序列比对：NCBI nonredundant protein sequences (Nr), NCBI nonredundant nucleotide sequences (Nt),

Swissprot, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Clusters of Orthologous Groups of proteins (KOG), Protein sequence analysis & classification (Interpro)和 Gene Ontology (GO)。

利用 FPKM (the fragments per kb per million reads values)值计算功能基因的表达量。利用 IDEG6 软件分析野生型和突变体的差异基因，将阈值设为 $P\text{-value} \leq 0.001$ 和 $|\log_2\text{Ratio}| \geq 1$ 。利用超几何分布检测分析差异基因显著富集的 GO 项目及 KEGG 通路。

作者贡献

刘宝龙和张怀刚是本研究的实验设计者；李云是本研究的执行人，完成论文初稿的写作；曹东和宗渊参与实验结果的分析。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由青海省科技项目(2018-NK-133, 2018-ZJ-T08)和中国科学院西部之光项目共同资助。

参考文献

- Bollivar D.W., 2006, Recent advances in chlorophyll biosynthesis, *Photosynthesis Research*, 90(2): 173-194
- Cunningham F.X., and Gantt E., 1998, Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 557-583
- Ge C., Wang L., Ye W., Wu L., Cui Y., Chen P., Pan J., Zhang D., Hu J., Zeng D., Dong G., Qian Q., Guo L., and Xue D., 2017, Single-point mutation of an histidine-aspartic domain-containing gene involving in chloroplast ribosome biogenesis leads to white fine stripe leaf in rice, *Sci. Rep.*, 7(1): 3298
- Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., and Regev A., 2011, Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome, *Nat Biotechnol.*, 29(7): 644-652
- Horton A.V., Ruban A., and Walters R.G., 1996, Regulation of light harvesting in green plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1): 655-684

- Kim C.K., Seol Y.J., Shin Y., Lim H.M., Lee G.S., Kim A.R., Lee T.H., Lee J.H., Park D.S., Yoo S., Kim Y.H., and Kim Y.K., 2015, Whole-genome resequencing and transcriptomic analysis to identify genes involved in leaf-color diversity in ornamental rice plants, *PLoS One*, 10(4): e0124071
- Kleine T., Maier U.G., and Leister D., 2009, DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 60(1): 115-138
- Li C.F., Xu Y.X., Ma J.Q., Jin J.Q., Huang D.J., Yao M.Z., Ma C.L., and Chen L., 2016, Biochemical and transcriptomic analyses reveal different metabolite biosynthesis profiles among three color and developmental stages in 'Anji Baicha' (*Camellia sinensis*), *BMC Plant Biol.*, 16(1): 195
- Li X., Kanakala S., He Y., Zhong X., Yu S., Li R., Sun L., and Ma J., 2017, Physiological characterization and comparative transcriptome analysis of white and green leaves of *Ananas comosus* var. *bracteatus*, *PLoS One*, 12(1): e0169838
- Li Z., Wakao S., Fischer B.B., and Niyogi K.K., 2009, Sensing and responding to excess light, *Annual Review of Plant Biology*, 60(1): 239-260
- Liu J.X., Chiou C.Y., Shen C.H., Chen P.J., Liu Y.C., Jian C.D., Shen X.L., Shen F.Q., and Yeh K.W., 2014, RNA interference-based gene silencing of phytoene synthase impairs growth, carotenoids, and plastid phenotype in *Oncidium* hybrid orchid, *SpringerPlus*, 3: 348
- Luo J., Duan J., Huo D., Shi Q., Niu L., and Zhang Y., 2017, Transcriptomic analysis reveals transcription factors related to leaf anthocyanin biosynthesis in *Paeonia qiui*, *Molecules*, 22(12): 2186
- Pesaresi P., Schneider A., Kleine T., and Leister D., 2007, Interorganellar communication, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10(6): 600-606
- Pogson B.J., Ganguly D., and Albrecht-Borth V., 2015, Insights into chloroplast biogenesis and development, *Biochim Biophys Acta*, 1847(9): 1017-1024
- Rast A., Heinz S., and Nickelsen J., 2015, Biogenesis of thylakoid membranes, *Biochim Biophys Acta*, 1847(9): 821-830
- Rolland N., Ferro M., Seigneurinberny D., Garin J., Block M., and Joyard J., 2008, The chloroplast envelope proteome and lipidome,

Plant Cell Monographs, Springer, Berlin, Germany, pp.1-48

Shi K., Gu J., Guo H., Zhao L., Xie Y., Xiong H., Li J., Zhao S., Song X., and Liu L., 2017, Transcriptome and proteomic analyses reveal multiple differences associated with chloroplast development in the spaceflight-induced wheat albino mutant mta, *PLoS One*, 12(5): e0177992

Shumskaya M., and Wurtzel E.T., 2013, The carotenoid biosynthetic pathway: Thinking in all dimensions, *Plant Science*, 208: 58-63

Solymsi K., Smeller L., Ryberg M., Sundqvist C., Fidy J., and Boddi B., 2007, Molecular rearrangement in POR macrodomains as a reason for the blue shift of chlorophyllide fluorescence observed after phototransformation, *Biochim Biophys Acta*, 1768(6): 1650-1658

Tatsuru M., Naoki F., Naoki O., Ken'ichi T., and Yoshiharu Y., 2003, Functional analysis of isoforms of NADPH_ protochlorophyllide oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol*, 44(10): 963-974

Wang Z., Gerstein M., and Snyder M., 2009, RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Nat. Rev. Genet.*, 10(1): 57-63

Wu D., Wright D.A., Wetzel C., Voytas D.F., and Rodermel S., 1999, The IMMUTANS variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis, *The Plant Cell*, 11(1): 43-55