

GA₃ 和 IAA 组合调控华重楼种子萌发机理初探

陈瑶^{1,2}, 周寒梅¹, 何兵^{1,*}, 李维¹

(¹四川师范大学生命科学院, 成都 610101; ²成都文理学院现代农业学院, 成都 610401)

摘要: 运用高通量转录组测序技术分析华重楼种子萌发前后激素信号转导途径和合成通路中的差异表达基因, 旨在初步揭示 GA₃ 和 IAA 组合处理华重楼种子萌发的调控机理。结果表明: 600 mg · L⁻¹ GA₃ + 40 mg · L⁻¹ IAA 可使华重楼种子萌发率在 8 个月时达到 87.33%。结合转录组测序结果, 将差异表达基因与 KEGG 数据进行比较发现: 外源施加 GA₃ 和 IAA 可使 GA 分解代谢基因 *GA₂ox* 下调表达, GA 合成基因 *GA₂₀ox* 上调表达, GA 信号转导通路中 *GID₁* 下调表达, PIF₄ 上调表达, 推测在外源施加的 GA₃ 和内源 GA 增加的共同作用下 GA 信号转导增强。外源施加 IAA 可使 IAA 合成通路中 *YUCCA* 和 *ALDH* 上调表达, IAA 信号转导通路中生长素的受体蛋白基因 *AUX1*、*AUX/IAA*、*SAUR* 等上调表达, 推测在外源施加 IAA 和内源 IAA 增加的共同作用下 IAA 信号转导增强。GA₃ 和 IAA 组合促进种子萌发的调控机理可能与 GA、IAA 合成代谢和信号转导相关。

关键词: 华重楼; 种子; GA₃; IAA; 转录组测序; 激素信号转导通路; 激素合成途径

中图分类号: S 567

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 02-0321-13

Preliminary Study on the Regulation Mechanism of GA₃ and IAA Combination in *Paris polyphylla* var. *chinensis* Seed Germination

CHEN Yao^{1,2}, ZHOU Hanmei¹, HE Bing^{1,*}, and LI Wei¹

(¹College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China; ²College of Modern Agriculture, Chengdu College of Arts and Sciences, Chengdu 610401, China)

Abstract: The experiment used transcriptome sequencing to analyze differentially expressed genes (DEGs) in hormone synthesis and hormone signal transduction pathways. The mechanism of the combination of GA₃ and IAA on the germination of seeds of *Paris polyphylla* var. *chinensis* was preliminarily revealed. The results found that the germination rate of seeds of *P. polyphylla* var. *chinensis* reached 87.33% after 8 months of treatment with 600 mg · L⁻¹ GA₃ + 40 mg · L⁻¹ IAA. Comparing the DEGs from transcriptome sequencing with the KEGG database. We found that treating *P. polyphylla* var. *chinensis* seeds with exogenous GA₃ and IAA of could down-regulated the *GA₂ox* and up-regulate the *GA₂₀ox*. In the GA signal transduction pathway, the *GID1* was down-regulated and the PIF₄ was up-regulated. It was speculated that the GA signal transduction was enhanced by the combined increase action of the exogenous GA₃ and the endogenous GA. In the IAA synthesis pathway, the exogenous IAA up-regulated the *YUCCA* and *ALDH*. In the IAA signal transduction pathway, the auxin influx carrier

收稿日期: 2019 - 11 - 15; **修回日期:** 2020 - 01 - 07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31271332); 四川省教育厅重点项目 (15ZA0038)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yummy3000@163.com)

gene *AUX1*, *AUX/IAA*, and *SAUR* et al were up-regulated. It was speculated that the IAA signal transduction was enhanced by the combined increase of the exogenous IAA and the endogenous IAA. Thus, the seed germination promoted by the combination of GA₃ and IAA was associated with the GA and IAA synthesis and the signal transduction.

Keywords: *Paris polyphylla* var. *chinensis*; seed; GA₃; IAA; transcriptome sequencing; hormone signal transduction pathway; hormone synthesis pathway

华重楼 (*Paris polyphylla* var. *chinensis*) 是百合科重楼属植物, 其干燥根茎是名贵中药材, 从中提取的主要活性物质为甾体皂苷 (国家药典委员会, 2015), 具有抗肿瘤 (Huang et al., 2007; Wu et al., 2013)、抗菌 (Qin et al., 2012)、抗氧化 (张宁, 2016)、止血 (李洪梅 等, 2017) 等作用。且是云南白药、季德胜蛇药片、宫血宁等 65 种中成药的重要原料 (武珊珊 等, 2004; 杨天梅 等, 2017; 张翔宇 等, 2017)。近年来华重楼野生资源遭到无规律大量采挖而急剧减少, 中国 80% 的野生重楼已被开发利用 (黄希 等, 2016)。因此必须加大重楼人工种植面积。华重楼结籽量大, 种子多, 但由于其为两年生, 自然条件下需 15 个月才能萌发且萌发率低, 植株生长缓慢 (李运昌, 1982)。为加大重楼药材种植力度, 必须打破重楼属植物的休眠, 提高萌发率。

激素对种子休眠与萌发有重要的调节作用, 植物生长调节剂处理种子后, 可改变种子内部的激素信号水平 (李振华, 2017)。GA₃ 可促进华重楼种子萌发, 萌发过程中 GA₃、IAA 含量增加 (宋发军 等, 2016)。本研究中以华重楼种子为材料, 研究 GA₃ 和 IAA 组合对其萌发的影响, 并采用 Illumina HisSeq 2500 分析华重楼种子萌发过程中的差异表达基因, 旨在初步揭示 GA₃ 和 IAA 组合调控华重楼种子萌发的机理, 为其萌发的分子研究提供有价值的基因信息资源, 也将为规范华重楼育苗方法和大规模人工栽培提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 华重楼种子萌发试验

2016 年 10 月将采自四川省峨眉山的新鲜华重楼种子去除红色外种皮, 选取饱满、健康、大小均匀一致的种子 3 000 粒, 分 30 份, 每份 100 粒。分别放入不同浓度 GA₃ 和 IAA 组合的 10 种浸种液 (表 2) 中, 常温下浸种 24 h。将浸种后稍晾干的种子分别放入层积盒进行层积, 每个处理 3 盒, 重复 3 次。将经高温高压灭菌后的蛭石、壤土、河沙按 1:1:4 的比例配制变温层积基质, 在高 15 cm、长 35 cm、宽 13 cm 的育种盒底层铺 8 cm 厚的基质, 供试种子平铺于基质上, 再覆 4~5 cm 厚的基质, 放入人工气候箱进行变温 (5 °C 60 d, 20 °C 60 d, 5 °C 60 d, 20 °C 60 d, 共 240 d) 层积, 期间用相应浸种液保持基质湿度为 70%~75%。每隔 30 d 分别从层积盒中随机取样观察种子形态变化, 并制作石蜡切片观察其种胚结构变化。在层积过程中漂去霉烂的种子, 再用 50% 多菌灵 500 倍液浸种 20 min, 并用经高温高压灭菌的基质替换原有基质重新层积。胚根突破种子 0.1~0.5 cm 视为萌发, 以上胚轴突出种子 0.1 cm 为休眠解除, 若有霉烂种子视为未萌发。

1.2 高通量转录组测序

变温层积 240 d 后, 从对照中随机取未萌发的种子 (休眠种子), 从处理 5 (表 2) 中随机选取已萌发种子 (休眠解除种子), 进行转录组测序和实时荧光定量聚合酶链式反应 (Quantitative

Real-time Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR)。

将样品送至北京百迈克生物技术有限公司进行转录组测序。基于边合成边测序 (Sequencing By Synthesis, SBS) 技术, 使用 Illumina HiSeq 2500 测序平台对两个样品进行测序, 要求每个样品测序产出不少于 8 Gb Clean Data, Q30 碱基百分比达到 80%。使用 BLAST 软件将获得的 Unigene 序列与 NR (Deng et al., 2006)、Swiss-Prot (Apweiler et al., 2004)、GO (Ashburner et al., 2000)、COG (Tatusov et al., 2000)、KOG (Koonin et al., 2004)、KEGG (Kanehisa et al., 2004) 数据库比对, 并用 KOBAS 2.0 得到 Unigene 在 KEGG 中的 KEGG Orthology 结果, 最后用 HMMER 软件与 Pfam (Finn et al., 2014) 数据库比对, 获得 Unigene 的注释信息。利用 FPKM 值表示对应 Unigene 的表达丰度。FPKM = 比对到某一转录本上的片段数 / (比对到转录本上的片段总数 × 转录本长度), 比对到转录本上的片段总数以 10⁶ 为单位, 转录本长度以 10³ 个碱基为单位。使用 DESeq、EBSeq 进行差异表达基因 (Differentially Expressed Genes, DEGs) 分析, 以 FDR < 0.01, log₂FC ≥ 2 为筛选标准, 获得未萌发种子和萌发种子之间的 DEGs。

1.3 转录组数据的 qRT-PCR 验证与差异表达基因的定量分析

随机选取 GH3、A-ARR、TKTA 基因, 以 GAPDH 为内参基因 (徐文娟, 2013), 用 Beacon Designer 7.9 软件设计 qRT-PCR 引物 (表 1), 按照 HSYBR 一步法荧光定量 PCR 方法进行 qRT-PCR, 以验证转录数据的可靠性。

表 1 用于 qRT-PCR 的基因特异性引物
Table 1 The gene-specific primers used for qRT-PCR

转录本编号 Transcript ID	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer
c144644.graph_c0	GAPDH-F	TTGTAGGTGGCAGACTT
c144644.graph_c0	GAPDH-R	CTACTCCCGATGTTCC
c84123.graph_c0	GH3-F	GAGATACATTGCCTTGC
c84123.graph_c0	GH3-R	CCTCTACAGCCTCCTAA
c101588.graph_c0	A-ARR-F	AATCCTCGGCTCCAATG
c101588.graph_c0	A-ARR-R	TTCCTGTAGTCATAATGTCATCT
c108348.graph_c0	TKTA-F	GTTGTGCTATGGAAGGA
c108348.graph_c0	TKTA-R	TGTTGTGATTATCGTCGTA
c106163.graph_c1	AUX1-F	TTACTTCACCTCCTAATCCAA
c106163.graph_c1	AUX1-R	TCAATCCAACAGCATCCT
c93265.graph_c0	IAA-F	AGATGGGCTAAGTGAGA
c93265.graph_c0	IAA-R	CCGTCCTGTGCTTCATAA
c107750.graph_c0	PIF ₄ -F	CGTATGCCCGTTATCTTAG
c107750.graph_c0	PIF ₄ -R	TACCTGATTGTTGATTCTGTT

反应体系为: 10 μL 2× HSYBR One step qRT-PCR 缓冲液, 上、下游引物各 0.4 μL, 0.2 μL 超级转录酶混合液, 1 μL ROX 染料, 1.0 ng RNA 模板, 补水至总体积 20 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 15 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 40 个循环。利用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因表达水平。从 GA、IAA 合成途径和信号转导途径中随机选取 AUX1、IAA、PIF₄ 基因 (表 1), 用 qRT-PCR 进行基因定量表达分析。

1.4 数据处理

将种子萌发试验数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 用 Statistical Product and Service Solutions (SPSS) 软件进行 Tukey HSD 测试, 以确定平均值之间的差异显著性 ($P < 0.05$), 用 Excel 制图表。

2 结果与分析

2.1 GA₃ 和 IAA 组合处理对华重楼种子萌发和上胚轴休眠解除的影响

如表 2 所示: 与对照相比, 除处理 3 外, 其他处理对种子萌发都有显著影响。处理 1、2、4、5、6 都显著提高种子萌发率, 其中处理 5 比对照提高了 49.72%, 而处理 7、8、9 则显著抑制种子萌发, 且抑制程度随 IAA 浓度增大而增加, 故高浓度 GA₃ 和 IAA 组合不利于华重楼种子萌发。上胚轴休眠解除率在处理 2、4、5、6 条件下较对照都显著提高。尤其在处理 5 条件下是对照的 2.2 倍。以上结果表明, 处理 5 (600 mg · L⁻¹ GA₃ + 40 mg · L⁻¹ IAA) 最有利于华重楼种子萌发和上胚轴休眠解除。

表 2 GA₃ 和 IAA 组合对华重楼种子萌发的影响
Table 2 Effects of GA₃ and IAA treatment on seed germination of *P. polyphylla* var. *chinensis*

处理组 Treatment	GA ₃ / (mg · L ⁻¹)	IAA/ (mg · L ⁻¹)	萌发率/% Germination rate	上胚轴休眠解除率/% Release rate of epicotyl dormancy
对照 Control	0	0	58.33 ± 1.70 e	17.33 ± 1.25 def
1	300	20	68.00 ± 1.63 cd	22.67 ± 2.05 cd
2	300	40	72.67 ± 2.05 bc	27.00 ± 1.63 c
3	300	80	64.67 ± 2.05 de	18.67 ± 1.70 de
4	600	20	82.67 ± 1.25 a	34.67 ± 1.25 ab
5	600	40	87.33 ± 2.49 a	38.33 ± 1.70 a
6	600	80	75.67 ± 2.62 b	28.67 ± 1.89 bc
7	1 200	20	30.33 ± 1.70 f	19.67 ± 2.05 de
8	1 200	40	25.33 ± 1.70 f	15.33 ± 1.25 ef
9	1 200	80	15.67 ± 2.05 g	11.67 ± 2.49 f

注: 不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。

Note: Different lowercase letters indicates a significant level of $P < 0.05$.

2.2 GA₃ (600 mg · L⁻¹) 和 IAA (40 mg · L⁻¹) 处理下华重楼种子萌发过程及形态变化

华重楼的新鲜种子为圆形或椭圆形, 呈米白色 (图 1A, 0 d), 球形胚, 靠近珠孔 (图 1B, 0 d)。0 ~ 30 d 期间多数种子形态上没有明显变化 (图 1A, 30 d), 而球形胚可分化出胚柄并与珠孔端胚乳细胞连接, 胚明显长大 (图 1B, 30 d)。

处理 60 d 时, 未萌发种子的胚发育成鱼雷胚, 初步分化出胚根和子叶 (图 1B, 60 d), 部分种子珠孔端有突起甚至胚根已经长出 0.1 cm 左右 (图 1A, 60 d)。

处理 120 d 时, 约 50% 的种子胚根已经突破珠孔处于萌发状态 (图 1A, 120 d), 子叶和胚根进一步分化 (图 1B, 120 d)。

处理 180 d 时萌发种子的胚根长多数为 0.5 cm 左右 (图 1A, 180 d), 此时子叶和胚根有明显分化 (图 1B, 180 d)。处理 240 d 时上胚轴休眠解除并伸出珠孔 (图 1A, 240 d)。

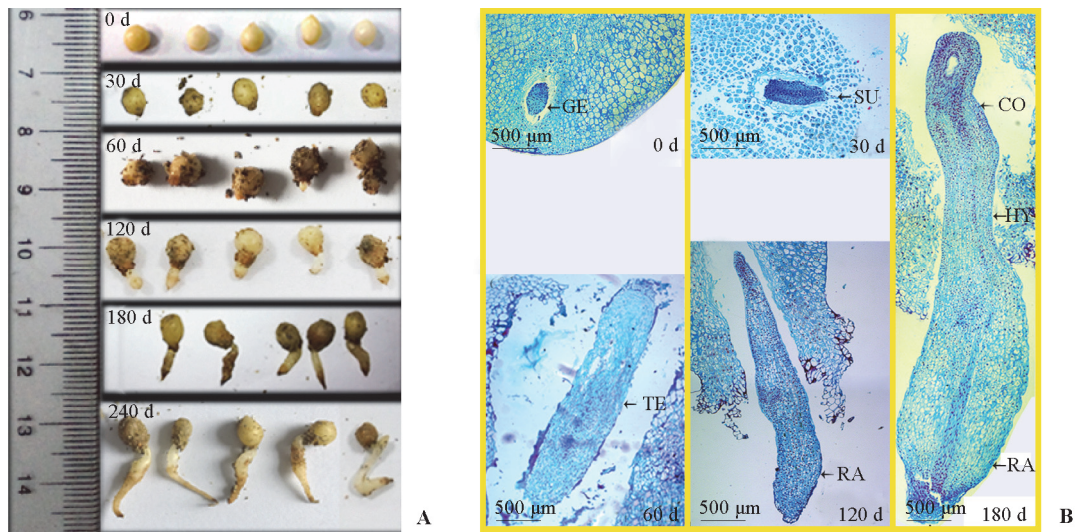


图 1 华重楼种子萌发时的形态 (A) 及显微结构 (B) 变化

GE: 球形胚; SU: 胚柄; TE: 鱼雷胚; RA: 胚根; EP: 上胚轴; CO: 子叶。

Fig. 1 Morphological changes (A) and microstructural changes (B) during seed germination of *P. polyphylla* var. *chinensis*

GE: Globular embryo; SU: Suspensor; TE: Torpedo embryo; RA: Radicle; EP: Epicotyl; CO: Cotyledon.

2.3 差异表达基因分析

在本研究条件下, 华重楼种子休眠解除过程中有 6 427 个 DEG, 休眠种子与萌发种子相比, 有 3 907 个上调基因, 2 520 个下调基因 (图 2)。

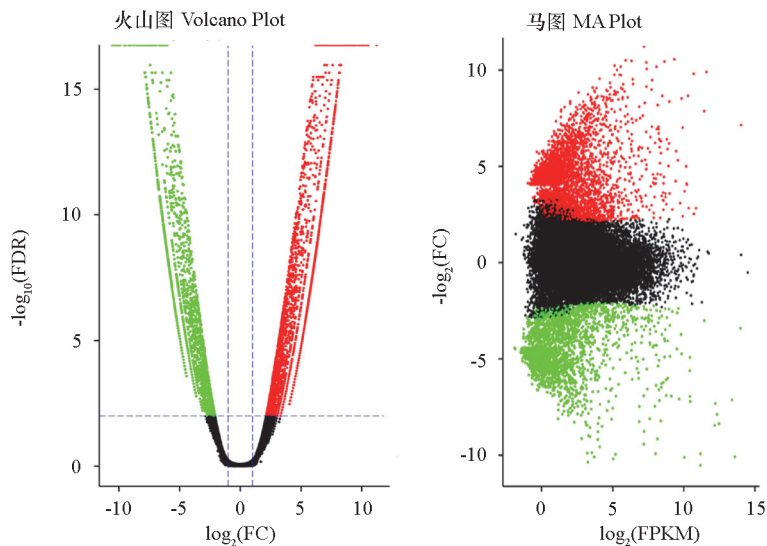


图 2 差异表达基因的火山图和马图

绿色表示基因表达量下调, 红色表示基因表达量上调, 黑色表示无显著性表达差异; DEGs 筛选标准为 $FDR < 0.01$, $\log_2 FC \geq 2$ 。

Fig. 2 Volcano and MA plot of differentially expressed genes

Up-regulated genes were shown in red, down-regulated genes were shown in green, and no significant expression differences genes were shown in black; $FDR < 0.01$ and $\log_2 FC \geq 2$ was the screening criteria of differential expression gene.

有 73.49% DEG 在七大数据库中有注释信息，1 804 个被注释到 KEGG 数据库（表 3），且被分为 50 个通路类型，118 条通路（图 3）。其中有 45 个与植物激素信号转导通路相关。

表 3 DEGs 在七大数据库中的注释结果

Table 3 Annotated results of the DEGs

数据库名称 Database	注释基因数 Number of annotated gene	所占百分比/% Percentage
COG	1 728	26.89
GO	2 635	41.00
KEGG	1 804	28.07
KOG	2 519	39.19
Pfam	3 610	56.17
Swiss-Prot	2 929	45.57
NR	4 484	69.77

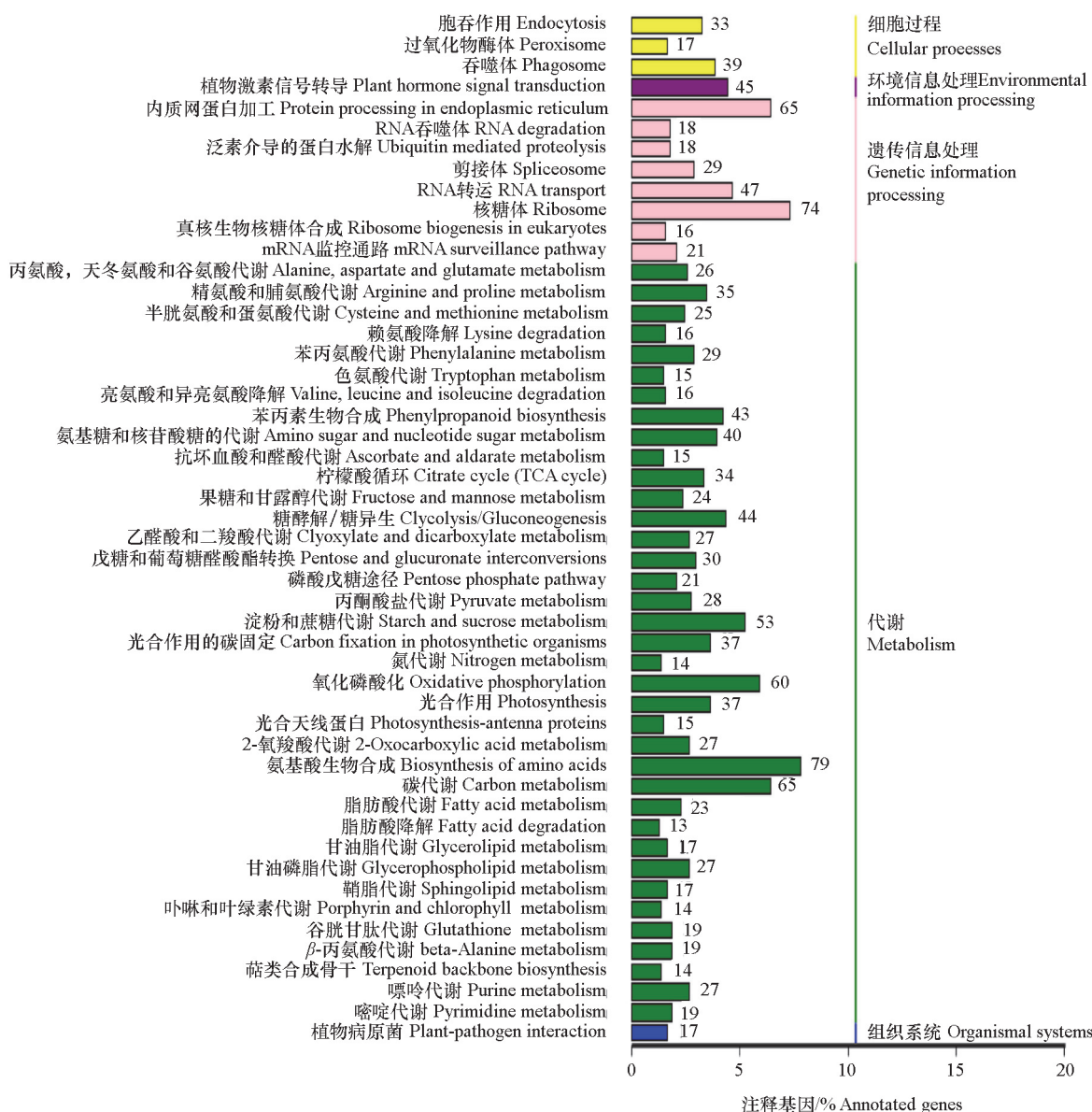


图 3 差异表达基因的在 KEGG 中的注释分类图

Fig. 3 Differentially expressed genes annotation classification in KEGG

2.4 qRT-PCR 验证转录组数据

在转录组测序结果（表 4）中 A-ARR 的基因上调表达，在 qRT-PCR 分析（图 4）中同样上调表达；在转录组测序结果中 GH3、TKTA 的基因下调表达，在 qRT-PCR 分析中同样下调表达。由此证明转录组试验数据准确可靠，可继续进行华重楼种子萌发过程中与激素信号转导和合成相关差异表达基因分析。

表 4 转录组测序中差异表达基因的结果

Table 4 The results of differential gene analysis in transcriptome sequencing

编码蛋白 Encoding protein	Unigene 编号 Unigene ID	FPKM		错误发现率 False discovery rate	差异倍数 log ₂ FC	调控 Regulation
		未萌发种子 Ungerminated seeds	萌发种子 Germinated seeds			
GH3	c84123_graph_c0	21.15	1.14	2.14E-11	- 4.61	下调 Down
A-ARR	c101588_graph_c0	0	8.94	1.69E-07	5.69	上调 Up
TKTA	c108348_graph_c0	27.48	0.60	4.44E-16	- 5.86	下调 Down

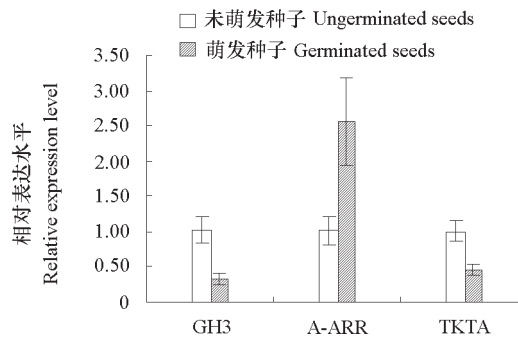


图 4 华重楼种子萌发过程中 3 个差异表达基因的 qRT-PCR 验证分析

Fig. 4 qRT-PCR analysis of three selected differentially gene during seed germination process of *P. polyphylla* var. *chinensis*

2.5 GA 和 IAA 合成通路中差异表达基因分析

CYP₇₀₁、*GA_{20ox}* 和 *GA_{2ox}* 是 GA 合成的关键基因（Brady & Mccourt, 2003; Fleet et al., 2003）。只有 GA₁、GA₃、GA₄ 和 GA₇ 有生理活性（Eriksson et al., 2006）。依据 KEGG 数据库的 pathway 预测的 GA 合成通路和转录组测序结果（表 5）发现：*CYP₇₀₁* 的 2 个编码基因明显下调；*GA_{20ox}* 的编码基因明显上调，差异倍数 2.50；*GA_{2ox}* 能使有活性的 GA₁ 转变为无活性的 GA₈，导致有活性的

表 5 GA 合成通路中的差异表达基因

Table 5 Differentially expressed gene analysis in the GA synthesis pathway

编码蛋白 Encoding protein	Unigene 编号 Unigene ID	FPKM		错误发现率 False discovery rate	差异倍数 log ₂ FC	调控 Regulation
		未萌发种子 Ungerminated seeds	萌发种子 Germinated seeds			
<i>CYP₇₀₁</i>	c78907_graph_c0	3.01	0.22	0.000756777	- 3.50	下调 Down
	c85990_graph_c0	2.17	0.27	0.006290936	- 2.94	下调 Down
<i>GA_{20ox}</i>	c97855_graph_c0	0.77	6.40	0.00535699	2.50	上调 Up
<i>GA_{2ox}</i>	c112923_graph_c0	22.77	3.38	7.72E-06	- 3.15	下调 Down

注：差异表达基因筛选标准为 FDR < 0.01, log₂FC ≥ 2。下同。

Note: FDR < 0.01 and log₂FC ≥ 2 was the screening criteria of differential expression gene. The same below.

GA 分解, GA₂ox 的编码基因明显下调, 差异倍数 - 3.15。这有利于合成有生理活性的 GA, 由此推测有活性的 GA 合成水平提高。但 GA 合成过程中, 3 个关键酶的基因表达量都较低 (表 5), 由此推测外源施加的 GA₃ 在华重楼种子萌发过程中起主要作用。

YUCCA、ALDH 是催化吲哚丙酮酸形成 IAA 的关键酶。依据 KEGG 数据库中 pathway 预测的 IAA 合成通路和转录组测序结果 (表 6) 发现: YUCCA 的编码基因明显上调表达, 差异倍数为 4.30; ALDH 的 7 个编码基因中, 仅 c102733.graph_c0、c33727.graph_c0 明显下调表达, 另外 5 个基因明显上调表达, 推测 ALDH 呈上调表达趋势。基于 IAA 合成途径中关键酶 YUCCA 和 ALDH 上调表达, 推测 IAA 的合成水平提高。IAA 合成过程中, 两个关键酶的基因表达水平都较低 (表 6), 由此推测外源施加的 IAA 在种子萌发过程中起主要作用。

表 6 IAA 合成通路中的差异表达基因
 Table 6 Differential gene analysis in the IAA synthesis pathway

编码蛋白 Encoding protein	Unigene 编号 Unigene ID	FPKM		错误发现率 False discovery rate	差异倍数 log ₂ FC	调控 Regulation
		未萌发种子 Ungerminated seeds	萌发种子 Germinated seeds			
YUCCA	c32476.graph_c0	0	2.67	0.001025713	4.30	上调 Up
ALDH	c105442.graph_c0	0	3.49	1.82E-09	6.30	上调 Up
	c110700.graph_c0	0.26	10.59	5.02E-09	4.67	上调 Up
	c41909.graph_c0	0	2.54	0.000774287	4.35	上调 Up
	c78259.graph_c0	0	3.10	0.00034432	4.50	上调 Up
	c80324.graph_c0	0	1.75	0.001366824	4.24	上调 Up
	c102733.graph_c0	20.03	2.46	5.14E-07	- 3.44	下调 Down
	c33727.graph_c0	2.29	0.03	5.80E-09	- 5.43	下调 Down

2.6 GA 和 IAA 信号转导通路中差异表达基因分析

PIF₄ 能结合到参与下胚轴伸长基因的启动子 *G-box* 元件上从而激活转录, 促进下胚轴伸长 (Lincoln & Eduardo, 2015)。DELLA 蛋白是 GA 信号转导途径的负调控因子, 通过与 PIF 结合抑制 PIF 激活下游转录因子, 从而抑制植物生长发育 (Lincoln & Eduardo, 2015)。GA 可促进核内 DELLA 蛋白的降解从而消除 DELLA 蛋白的抑制作用, 促进植物生长发育 (Wang & Deng, 2014)。根据 KEGG 数据库中 pathway 预测的 GA 信号通路和转录组测序结果 (表 7), GA 信号通路下游 PIF₄ 的编码基因 (c107750.graph_c0) 明显上调表达, 差异倍数为 3.02; GA 的受体 GID₁ 蛋白的编码基因 (c106625.graph_c0) 明显下调表达, 经 qRT-PCR 试验发现 PIF₄ 表达水平增高 (图 5)。故适宜浓度的 GA₃ 能通过促进 GA 信号通路增强来促进华重楼种子萌发。

表 7 GA 信号转导通路中的差异表达基因
 Table 7 Differential gene analysis in the GA signal transduction pathway

编码蛋白 Encoding protein	Unigene 编号 Unigene ID	FPKM		错误发现率 False discovery rate	差异倍数 log ₂ FC	调控 Regulation
		未萌发种子 Ungerminated seeds	萌发种子 Germinated seeds			
PIF ₄	c107750.graph_c0	1.29	14.87	7.53E-05	3.02	上调 Up
GID ₁	c106625.graph_c0	164.22	41.78	0.00186777	- 2.40	下调 Down

生长素是植物生长和发育的关键因素, 能促进细胞伸长, 在种子萌发过程中起重要的调节作用 (René & Scheres, 2008)。AUX1 能将生长素携带进入细胞 (郑柄松, 2011)。依据 KEGG 数据库中 pathway 预测的生长素信号通路和转录组测序结果 (表 8) 发现: AUX1 的 3 个编码基因明显上

调; ARF 的 4 个编码基因, 除 c100879.graph_c0 明显下调表达外, 其他 3 个基因都明显上调表达, 推测 ARF 呈上调表达趋势。生长素诱导的 AUX/IAA、SAUR 的编码基因全部上调表达 (表 8)。经 qRT-PCR 试验发现, AUX1、IAA 表达水平增高 (图 5)。由此推测适宜浓度的 IAA 通过促进 IAA 信号通路增强来促进华重楼种子萌发。

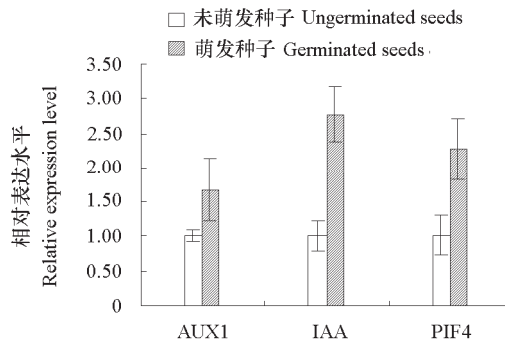


图 5 华重楼种子萌发过程中对选择的 3 个差异表达基因的 qRT-PCR 定量表达分析

Fig. 5 qRT-PCR analysis of three selected differentially expressed gene during seed germination process of *P. polyphylla* var. *chinensis*

表 8 生长素信号转导通路中的差异表达基因

Table 8 Differentially expressed gene analysis in the auxin signal transduction pathway

编码蛋白 Encoding protein	Unigene 编号 Unigene ID	FPKM		错误发现率 False discovery rate	差异倍数 log ₂ FC	调控 Regulation
		未萌发种子 Ungerminated seeds	萌发种子 Germinated seeds			
AUX1	c100098.graph_c0	0.15	13.54	1.55E-12	5.78	上调 Up
	c106163.graph_c0	0.95	32.53	1.17E-09	4.56	上调 Up
	c106163.graph_c1	3.63	31.17	0.000375911	2.66	上调 Up
AUX/ IAA	c100217.graph_c0	0.00	3.18	0.00034432	4.50	上调 Up
	c101806.graph_c0	0.28	20.79	3.46E-12	5.53	上调 Up
	c101953.graph_c0	10.24	82.04	0.0008429	2.56	上调 Up
	c76275.graph_c0	0.00	7.20	1.28E-08	6.04	上调 Up
	c82488.graph_c0	0.00	10.92	1.96E-07	5.67	上调 Up
	c84645.graph_c0	0.07	3.56	0.000118717	4.15	上调 Up
	c93265.graph_c0	30.23	200.21	0.007543812	2.29	上调 Up
ARF	c98810.graph_c0	0.28	7.27	0.000515738	3.61	上调 Up
	c101160.graph_c0	2.25	14.25	0.005961428	2.22	上调 Up
	c83085.graph_c0	12.52	76.27	0.008426625	2.16	上调 Up
	c84314.graph_c0	0.91	7.38	0.004750392	2.48	上调 Up
SAUR	c100879.graph_c0	7.37	1.61	0.000721811	-2.57	下调 Down
	c114008.graph_c0	0.18	14.71	3.00E-10	5.42	上调 Up
GH3	c45327.graph_c0	0	33.00	2.11E-15	7.93	上调 Up
	c53212.graph_c0	0.03	1.94	1.83E-05	4.45	上调 Up
	c84123.graph_c0	21.15	1.14	2.14E-11	-4.61	下调 Down

3 讨论

外源施加 GA₃ 和 IAA 能影响激素信号转导和植物内源激素水平, 内源激素水平又影响植物激素的应答、反应途径, 形成复杂的信号转导网络, 共同调节植物生长发育 (任小芸 等, 2016)。通过

转录组测序和 KEGG 预测的 pathway 分析华重楼种子萌发过程植物激素合成和信号转导通路中的 DEGs, 可初步探究 GA₃ 和 IAA 组合调控种子萌发的机制。

GA 是种子萌发的激活因子, 主要通过降解 DELLA 蛋白, 从而激活 GA 下游信号来拮抗 ABA 对种子萌发的抑制 (Dill et al., 2001; Hirano et al., 2008; Sun, 2010)。GA_{20ox} 和 GA_{3ox} 是调控合成有活性 GA 的关键酶 (Yamaguchi et al., 1998)。外源 GA 可以调节植物内源 GA 活性 (Wu et al., 2009; Yang et al., 2010)。GA 和 IAA 处理烟草种子, 种子吸胀阶段, GA 合成基因 *GA_{2ox2}*、*GA_{3ox12}* 显著差异表达 (李振华, 2017)。陈静 (2015)、姚兆群 (2016) 分别在花生种子、列当种子休眠解除过程中发现 GA_{20ox} 上调表达。但于倩 (2016) 在研究黄芪种子萌发过程中发现 *GA_{2ox}* 上调表达, *GA_{20ox}* 下调表达。本研究中发现 *GA_{2ox}* 下调, *GA_{20ox}* 上调, 这与外源 GA₃ 和 IAA 有关。Reid 等 (2011) 也认为 IAA 会影响 GA 相关基因的表达。位于 GA 信号通路下游的 PIF₄ 能结合到参与下胚轴伸长基因的启动子 G-box 元件上激活转录, 促进下胚轴伸长 (Lincoln & Eduardo, 2015)。李振华 (2017) 进行烟草萌发试验时发现, IAA 可使 GID₁ 受体蛋白的编码基因下调表达, GA₃ 仅使 PIF₃、PIF₄ 的编码基因差异表达。本研究中发现 GA₃ 和 IAA 组合处理种子后, GID₁ 受体蛋白的编码基因明显下调表达, GA 信号通路下游 PIF₄ 的编码基因明显上调表达, 推测在外源施加 GA₃ 和内源 GA 共同作用下, GA 信号转导通路增强, 促进华重楼种子萌发。

Leivar 等 (2012) 发现 IAA₂、IAA₄、IAA₁₉、IAA₂₉、YUC₈ 等含有 G-box 的生长素响应基因是 PIFs 的直接靶基因。Sun 等 (2012) 认为 PIF₄ 能直接调节 YUCCA 的表达, 从而促进 IAA 的合成, 进而影响生长素介导的植物生长。IAA 的积累可促进 AUX/IAA 蛋白的降解从而消除对 ARF 转录因子的抑制作用, ARF 可进一步激活 SAUR₁₉ 基因家族的表达来促进胚轴伸长 (Guilfoyle & Hagen, 2001; Franklin et al., 2011; Proveniers & Zanten, 2013)。生长素通过快速调节 AUX/IAA 的转录水平调节植物的生长发育 (Mockaitis & Estelle, 2008)。本研究中对 IAA 合成途径分析时发现, YUCCA 和 ALDH 的编码基因表达上调, 表明 IAA 合成水平升高。推测在外源施加的 IAA 和内源 IAA 共同作用下, IAA 信号转导通路增强, 促进华重楼种子萌发。陈静 (2015) 在研究花生种子萌发过程中生长素合成时, 也发现了相似的结果。

综上所述, 适宜浓度 GA₃ 和 IAA 组合作为浸种液和变温层积过程中的保湿液, 层积 240 d 可有效解除华重楼种子的休眠, 使华重楼种子萌发率提高。GA₃ 和 IAA 组合促进种子萌发的调控机理可能与 GA、IAA 合成代谢和信号转导相关。

References

- Apweiler R, Bairoch A, Wu C H, Wu C H, Barker W C, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger G, Huang Hong-zhan, Lopez R, Magrane M, Martin M J, Natale D A, Donovan C O, Redaschi N, Yeh L S L. 2004. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 32 (Database issue): D115 - D119.
- Ashburner M, Ball C A, Blake J A, Botstein D, Butler H, Cherry J M, Davis A P, Dolinski K, Dwight S S, Eppig J T, Harris M A, Hill D P, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese J C, Richardson J E, Ringwald M, Rubin G M, Sherlock G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* Italic, 25 (1): 25 - 29.
- Brady S M, McCourt P. 2003. Hormone cross-talk in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22 (1): 25 - 31.
- Chen Jing. 2015. Analysis on transcriptome of genes involved in peanut seed dormancy release (*Arachis hypogaea* L.) [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 陈 静. 2015. 花生种子休眠解除过程中相关基因转录组学研究 [博士论文]. 南京: 南京农业大学.

- Chinese Pharmacopoeia Commission. 2015. Chinese pharmacopoeia. Beijing: China Medical Science Press. (in Chinese)
- 国家药典委员会. 2015. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社.
- Deng Y Y, Li J Q, Wu S F, Zhu Y P, Chen Y W, He F C. 2006. Integrated nr database in protein annotation system and its localization. *Computer Engineering*, 32 (5): 71 - 72.
- Dill A, Jung H S, Sun T P. 2001. The DELLA motif is essential for gibberellin induced degradation of RGA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (24): 14162 - 14167.
- Eriksson S, Böhlenius H, Moritz T, Nilsson O. 2006. GA₄ is the active gibberellin in the regulation of leafy transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell*, 18 (9): 2172 - 2181.
- Finn R D, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt R Y, Eddy S R, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer E L L, Tate J, Punta M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research*, 42 (D1): 222 - 230.
- Fleet C M, Yanmaguchis S, Handa A, Kawaide H, David C J, Kamiya Y, Sun T P. 2003. Over expression of *AtCPS* and *AtKS* in *Arabidopsis* confers increased *ent*-kaurene production but no increase in bioactive gibberellins. *Plant physiology*, 132 (2): 830 - 839.
- Franklin K A, Sang H L, Patel D, Kumar S V, Spartz A K, Gu C, Ye S Q, Yu P, Breen G, Cohen J D, Wigge P A, Gray W M. 2011. Phytochrome Interacting factor4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (50): 20231 - 20235.
- Guilfoyle T J, Hagen G. 2001. Auxin response factors. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 (3): 281 - 291.
- Hirano K, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M. 2008. GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends in Plant Science*, 13 (4): 192 - 199.
- Huang Xi, Liang Shewang, Cai Huming, Zhou Wen, He Zhongjun. 2016. Effects of combination of orange and blue LED on photosynthetic characteristics and fluorescence parameter of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 32 (22): 98 - 103. (in Chinese)
- 黄 希, 梁社往, 蔡虎铭, 周 文, 何忠俊. 2016. 不同 LED 橙蓝光质配比对滇重楼叶片光合特性和叶绿素荧光参数的影响. *中国农学通报*, 32 (22): 98 - 103.
- Huang Y, Cui L J, Zhan W H, Dou Y H, Wang Y L, Wang Q, Zhao D. 2007. Separation and identification of steroidal compounds with cytotoxic activity against human gastric cancer cell lines *in vitro*, from the rhizomes of *Paris polyphylla* var. *chinensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43 (6): 672 - 677.
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. 2004. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*, 32 (Database issue): D277 - D280.
- Koonin E V, Fedorova ND, Jackson J, Jacobs A R, Krylov D M, Makarova K S, Mazumde R, Mekhedov S L, Nikolskaya A N, Rao B S, Rogozin I B, Smirnov S, Sorokin A V, Sverdlov A V, Vasudevan S, Wolf Y, Yin J J, Natale D A. 2004. A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes. *Genome Biology*, 5 (2): R7.
- Leivar P, Monte E, Cohn M M, Quail P H. 2012. Phytochrome signaling in green *Arabidopsis* seedlings: impact assessment of a mutually negative phyB-PIF feedback loop. *Molecular plant*, 5 (3): 734 - 749.
- Li Hongmei, Sun Jianhui, Kang Liping, Huo Hairu, Li Xiaoqin, Huang Yuanyuan, Chen Min, Huang Luqi. 2017. Pharmacodynamics study on *Paris vietnamensis*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 42 (18): 3465 - 3468. (in Chinese)
- 李洪梅, 孙建辉, 康利平, 霍海如, 李小芹, 黄圆圆, 陈 敏, 黄璐琦. 2017. 重楼同属植物南重楼的药理研究. *中国中药杂志*, 42 (18): 3465 - 3468.
- Li Yunchang. 1982. Studies on the introduction cultivation of genus *Paris* L. a preliminary report on sexual propagation of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Acta Botanica Yunnanica*, 4 (4): 429 - 431. (in Chinese)
- 李运昌. 1982. 重楼属植物引种栽培的研究 I 滇重楼有性繁殖试验初报. *云南植物研究*, 4 (4): 429 - 431.

- Li Zhenhua. 2017. Mechanism on exogenous auxin and gibberellin signal induced seed dormancy and germination in tobacco [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 李振华. 2017. 外源生长素和赤霉素信号调控烟草种子休眠与萌发的机理中国农业大学[博士学位]. 北京: 中国农业大学.
- Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger. 2015. Plant physiology. Song Chunpeng, Wang Xuelu, Zhou Yun, trans. Beijing: Science Press: 483 - 484. (in Chinese)
- Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger. 2015. 植物生理学. 宋纯鹏, 王学路, 周云, 译. 北京: 科学出版社: 483 - 484.
- Mockaitis K, Estelle M. 2008. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 24 (24): 55 - 80.
- Proveniers M C G, Zanten M V. 2013. High temperature acclimation through PIF4 signaling. *Trends in Plant Science*, 18 (2): 59 - 64.
- Qin X J, Sun D J, Ni W, Chen C X, Hua Y, He L, Liu H Y. 2012. Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Steroids*, 77 (12): 1242.
- Reid J B, Davidson S E, Ross J J. 2011. Auxin acts independently of DELLA proteins in regulating gibberellin levels. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (3): 406 - 408.
- Ren Xiaoyun, Wu Meiqin, Chen Jianmin, Zhang Dongping, Gao Yong. 2016. The molecular mechanisms of phytochrome interacting factors (PIFs) in phytohormone signaling transduction. *Plant Physiology Communications*, 52 (10): 1466 - 1473. (in Chinese)
- 任小芸, 吴美琴, 陈建民, 张冬平, 高勇. 2016. 光敏色素作用因子 PIFs 参与植物激素信号转导的分子机制. *植物生理学报*, 52 (10): 1466 - 1473.
- René B R, Scheres B. 2008. Auxin: the looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 59 (1): 443 - 465.
- Song Fajun, Luo Zhong, Huang Zhen, Meng Yan-yan, Zhang Peng. 2016. Physiological and biochemical factors in germination process of *Paris polyphylla* var. *chinensis* seeds. *Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 35 (3): 30 - 35. (in Chinese)
- 宋发军, 罗忠, 黄珍, 孟艳艳, 张鹏. 2016. 赤霉素处理对重楼种子萌发相关生理指标的影响. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 35 (3): 30 - 35.
- Sun J, Qi L, Li Y, Chu J F, Li C Y. 2012. PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating *Arabidopsis* hypocotyl growth. *PLoS Genetics*, 8 (3): e1002594.
- Sun T P. 2010. Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiology*, 154 (2): 567 - 570.
- Tatusov R L, Galperin M Y, Natale D A, Koonin E V. 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 28 (1): 33 - 36.
- Wang Y, Deng D. 2014. Molecular basis and evolutionary pattern of GA-GID1-DELLA regulatory module. *Molecular Genetics & Genomics*, 289 (1): 1 - 9.
- Wu J M, Li Y R, Wang A Q, Yang L, Yang L T, Gan C H. 2009. The real-time quantitative fluorescent PCR analysis of GA₂₀ oxidase gene GA₃ induced in sugarcane. *Molecular Plant Breeding*, 7 (5): 922 - 927.
- Wu Shanshan, Gao Wenyuan, Duan Hongquan, Jia Wei. 2003. Advances in studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Rhizoma paridis*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 35 (3): 344 - 347. (in Chinese)
- 武珊珊, 高文远, 段宏泉, 贾伟. 2004. 重楼化学成分和药理作用研究进展. *中草药*, 35 (3): 344 - 347.
- Wu X, Wang L, Wang G C, Wang H, Dai Y, Yang X X, Ye W C, Li Y L. 2013. Triterpenoid saponins from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Carbohydrate Research*, 368 (5): 1 - 7.
- Xu Wenjuan. 2013. Research on seed development and dormancy breaking mechanism of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* (Fr) Hand [M. D. Dissertation]. Peking Union Medical College. (in Chinese)
- 徐文娟. 2013. 滇重楼种子发育与种子休眠解除机理研究[硕士论文]. 北京: 北京协和医学院.
- Yamaguchi S, Smith M W, Brown R G, Kamiya, Sun T. 1998. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 beta-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell*, 10 (12): 2115 - 2126.

- Yang Tianmei, Jin Hang, Yang Mequan, Zhao Yanli, Wang Yuanzhong, ZhangJinyu. 2017. Effects of different processing methods on four steroidal saponin content of *Paris polyphylla* var. *yunannensis*. Journal of Chinese Medicinal Materials, 40 (12): 2832 - 2835. (in Chinese)
- 杨天梅, 金 航, 杨美权, 赵艳丽, 王元忠, 张金渝. 2017. 不同加工方法对滇重楼中 4 种重楼皂苷成分含量的影响. 中药材, 40 (12): 2832 - 2835.
- Yang Y H, Zhang Y D, Zhu Z, Zhao L, Chen T, Zhao Q Y, Wang C L. 2010. Effects of gibberellic acid 3 and abscisic acid on growth, physiological characteristics and gene expression of GA₂₀ox2 and GA₃ox2 in differen rice cultivars. Chinese Journal of Rice Science, 24 (4): 433 - 437.
- Yao Zhaoqun. 2016. Study on the role of strigolactones in resistance of muskmelon to broomrape and broomrape seed germination[Ph. D. Dissertation]. Shihezi: Shihezi University. (in Chinese)
- 姚兆群. 2016. 独脚金内酯在甜瓜抗列当机理和对列当种子萌发调控的研究[博士学位论文]. 新疆: 石河子大学.
- Yu Qian. 2016. Integrating transcriptomics to analyse the process of astragalus seed germination and endogenous hormones[M. D. Dissertation] . Hohhot: Inner Mongolia University. (in Chinese)
- 于 倩. 2016. 基于转录组对黄芪种子萌发过程及其内源激素分析[硕士论文]. 呼和浩特: 内蒙古大学.
- Zhang Ning. 2016. The study on the extraction technology of *Paris polyphylla* and *Verbena* and protective effects on rats with alcoholic liver injury [M. D. Dissertation]. Changchun: Jilin University. (in Chinese)
- 张 宁. 2016. 重楼与马鞭草提取工艺研究及对酒精性肝损伤大鼠的保护作用[硕士论文]. 长春: 吉林大学.
- Zhang Xiangyu, Hong Lin, Zha Qin, Wang Caiyun, Yan Xianjin, Ji Yun. 2017. Investigation on *Paris* resources in Bijie area. Guizhou Agricultural Sciences, 45 (2): 134 - 137. (in Chinese)
- 张翔宇, 洪 林, 查 钦, 王彩云, 严显进, 吉 云. 2017. 毕节地区野生重楼资源调查. 贵州农业科学, 45 (2): 134 - 137.
- Zheng Bingsong. 2011. Plant physiology. Zhejiang: Zhejiang University Press: 99. (in Chinese)
- 郑柄松. 2011. 植物生理学. 浙江: 浙江大学出版社: 99.