

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.24071

CSTR: 32231.14.PSJ.2095-0837.24071

罗双双, 张宗琼, 农保选, 夏秀忠, 梁树辉, 廖祖宇, 冯锐, 陈灿, 郭辉, 梁云涛, 曾宇, 邱永福, 李丹婷, 杨行海. 过表达 *OsTTG1* 影响拟南芥的表皮毛、花青素及开花期[J]. 植物科学学报, 2025, 43 (1): 82~91

Luo SS, Zhang ZQ, Nong BX, Xia XZ, Liang SH, Liao ZY, Zeng Y, Feng R, Chen C, Guo H, Liang YT, Qiu YF, Li DT, Yang XH. Overexpression of *OsTTG1* affects the epidermal trichome, anthocyanins, and flowering stage in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. [J]. *Plant Science Journal*, 2025, 43 (1): 82~91

过表达 *OsTTG1* 影响拟南芥的表皮毛、花青素及开花期

罗双双^{1,2#}, 张宗琼^{2#}, 农保选^{2,3}, 夏秀忠², 梁树辉², 廖祖宇², 冯锐²,
陈灿², 郭辉², 梁云涛², 曾宇², 邱永福^{1,3}, 李丹婷^{2,3*}, 杨行海^{2,3*}

(1. 广西大学农学院, 南宁 530004; 2. 广西农业科学院水稻研究所/广西水稻遗传育种重点实验室, 南宁 530007;
3. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004)

摘要: *OsTTG1* 编码 WD40 结构域重复蛋白, 在水稻 (*Oryza sativa* L.) 中与花青素积累有关, 但是是否影响其他性状尚不清楚。本研究中, 我们在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 突变体 *ttg1* 中过表达 *OsTTG1* 基因, 结果显示, *OsTTG1*-OE 株系的叶片和茎秆上均有花青素积累, 种子呈棕褐色, 叶片、茎秆、花萼等部位均出现表皮毛。突变体 *ttg1* 的开花时间比 Col-0 和 *OsTTG1*-OE 株系早了大约 3~5 d, 而 Col-0 和 *OsTTG1*-OE 的开花时间没有明显差异。利用 RNA-seq 技术分析 *OsTTG1*-OE 与 *ttg1* 在不同时期的差异表达基因 (DEGs), 发现这些 DEGs 包括可能与花青素合成相关的基因 (*MKK9*、*CYP75B1*、*TT8*、*GSTF12*、*DFR*、*F3H*、*CHS*、*LDOX* 等)、可能与表皮毛形成相关的基因 (*SPL15*、*TCL1*、*ETC2*、*SPL4*、*SPL13A*、*ETC3*、*GIS* 等) 以及可能与开花相关的基因 (*FLC*、*FT*、*AGL19*、*HDA05*、*LHY* 等)。研究结果可为了解 *OsTTG1* 在水稻中的功能提供基础和借鉴。

关键词: *OsTTG1*; 拟南芥; 过表达; 表皮毛; 花青素; 开花期

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837 (2025) 01-0082-10

Overexpression of *OsTTG1* affects the epidermal trichome, anthocyanins, and flowering stage in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Luo Shuangshuang^{1,2#}, Zhang Zongqiong^{2#}, Nong Baoxuan^{2,3}, Xia Xiuzhong², Liang Shuhui²,
Liao Zuyu², Feng Rui², Chen Can², Guo Hui², Liang Yuntao², Zeng Yu², Qiu Yongfu^{1,3},
Li Danting^{2,3*}, Yang Xinghai^{2,3*}

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Rice Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Guangxi Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding, Nanning 530007, China; 3. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning 530004, China)

Abstract: The *OsTTG1* gene encodes a WD40 domain repeat protein, with its knockout in *Oryza sativa* L. known to affect anthocyanin accumulation. However, whether this gene affects other traits remains unclear. In this study, *OsTTG1* was overexpressed in the *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *ttg1* mutant. Results showed that overexpression of *OsTTG1* (*OsTTG1*-OE) restored anthocyanin accumulation in leaves and stalks,

收稿日期: 2024-03-25, 接受日期: 2024-05-16。

基金项目: 广西重点研发计划项目 (桂科 AB21238009); 国家自然科学基金项目 (32060476, 32260487, 32360519); 广西重大科技创新基地项目 (2022-36-Z01-ZZ07)。

作者简介: 罗双双 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水稻遗传育种 (E-mail: 3095646725@qq.com); 张宗琼 (1978-), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向为水稻遗传育种 (E-mail: zhangzongqiong@gxaas.net)。

#共同作者。

*通信作者 (Authors for correspondence. E-mail: lidanting@gxaas.net; yangxinghai888@gxaas.net)。

produced dark brown seeds, and promoted epidermal hair development on leaves, stalks, and calyces. In contrast, the *ttg1* mutant exhibited flowering 3–5 d earlier than both the Col-0 and *OsTTG1*-OE strains, while no significant differences in flowering time were observed between Col-0 and *OsTTG1*-OE. RNA-seq analysis of differentially expressed genes (DEGs) between *OsTTG1*-OE and *ttg1* at various developmental stages revealed key gene clusters potentially associated with anthocyanin synthesis (*MKK9*, *CYP75B1*, *TT8*, *GSTF12*, *DFR*, *F3H*, *CHS*, and *LDOX*), epidermal hair formation (*SPL15*, *TCL1*, *ETC2*, *SPL4*, *SPL13A*, *ETC3*, and *G/S*), and flowering regulation (*FLC*, *FT*, *AGL19*, *HDA5*, and *LHY*). These findings provide an important theoretical basis and reference for understanding the function of *OsTTG1* in *O. sativa*.

Key words: *OsTTG1*; *Arabidopsis thaliana*; Overexpression; Epidermal trichome; Anthocyanins; Flowering stage

TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1) 是一种串连肽重复蛋白^[1], 含有7个WD40结构域。**TTG1**基因对植物生长发育具有重要意义, 能够参与调控多种生命活动, 譬如: 调节花青素的积累^[2]、表皮毛和根毛的密度^[3], 影响种子大小、种皮颜色以及种皮粘液的合成^[4], 调控开花时间^[5]等。

花青素作为类黄酮化合物^[6], 具有较强的抗氧化^[7]和抗炎^[8]作用。植物中花青素的积累, 使植物具有吸引传粉者^[9]、免受紫外线或病虫侵害^[10]等多种生物学功能。**TTG1**在花青素合成过程中极为重要, 突变体 *ttg1* 中花青素的积累受阻^[11]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中, 花青素转录激活有两种调控方式, 一种是不依赖 **bHLH** 转录因子的 **MYB** 转录因子和 **WD40** 蛋白形成的二元复合体协同调控, 如: **TTG1**-**GL3**/**TT8**-**TT2** 复合物通过激活 *DFR*、*ANS*、*BAN*、*TT9* 和 *TT12* 的表达来调控花青素的生物合成^[12-14]; 另一种是 **MYB** 转录因子、**bHLH** 转录因子以及 **WD40** 蛋白形成三元复合体来协同调控, 如: **TTG1**-**TT8**/**GL3**-**PAP1**/**PAP2**/**MYB113**/**MYB114** 复合物通过激活 *DFR*、*ANS*、*BAN*、*UF3GT* 的表达来调控花青素的生物合成^[15-17]。

表皮毛是植物地上部分表面的附属物, 具有减少水分蒸发及病虫侵害的作用^[18]。研究表明, **R2R3-MYB**型转录因子 (**MYB23**、**MYB82**、**GL3**)、**MYC1**编码的**bHLH**型转录因子^[19]、**WD40**类重复蛋白 (**TTG1**、**TT8**、**GL3**、**EGL3**)^[20, 21]、**C2H2**锌指蛋白家族基因 (**G/S**、**G/S2**、**G/S3**、**ZFP5**、**ZFP6**、**ZFP8**) 等能够正调控拟南芥表皮毛的发育^[22-24]; 而 **R3-MYB**转录因子 (**ETC1**、**ETC2**、**ETC3**、**TCL1**、**TCL2**、**TRY**、**CPC**等)

能够负调控其发育^[25]。突变体 *ttg1* 具有无表皮毛的特征^[11], 说明 **TTG1**在表皮毛发育过程中起着关键作用。**TTG1**能够与 **R2R3-MYB** 转录因子中的 **GL1**、**MYB23** 以及 **bHLH** 转录因子中的 **GL3**、**EGL3** 相互作用, 形成 **MBW**, 激活下游基因 **GL2** 的表达, 从而促进表皮毛的生长发育^[26]。**TTG1** 也能够与 **SPL** 转录因子中的 **SPL4** 或 **SPL5** 相互作用, 从而影响 **MBW** 复合物的转录活性, 导致毛状体起始受到抑制^[27]。

开花是植物从营养期向生殖期过渡的重要性状。研究发现, *ttg1* 突变体比野生型早开花, **TTG1**过表达植株则比野生型晚开花^[5], 表明 **TTG1**能够调控植物的开花时间。**FLC**是编码 **MADS-box** 转录因子的开花抑制基因^[28], **TTG1** 位于 **FLC** 的上游, **Paffendorf** 等^[5]发现 **TTG1**可以激活 **FLC** 的表达, 调节开花时间。**FT**是一种成花素基因^[29], 通常在叶片中表达, 转移到茎尖分生组织, 进而诱导开花^[14]。**FLC** 通过与 **FT**的启动子区域相结合, 可以抑制 **FT**的表达, 促使植物形成晚花表型。

TTG1除了能够影响拟南芥的花青素生物合成、表皮毛生长以及开花期外, 还能影响其种皮粘液的产生以及根毛密度等^[11]。**TTG1**对种皮粘液的调控也是依靠形成 **MBW** 复合物来进行, **MBW** 复合物可以激活 **TTG2** 和 **GL2** 的表达, 进而激活粘液生物合成基因 **MUM4** 的表达, 导致种皮粘液的产生^[30]。**TTG1**除了可以直接调节粘液生物合成基因的表达, 还可以通过调节种子中脂肪酸的积累来间接调节种皮粘液的产生^[31]。**TTG1**参与形成的 **MBW** 复合物能够调节植物激素乙烯 (ET) 的形成^[32], 进而影响植物根毛密度。

前期研究中, 我们从水稻 (*Oryza sativa* L.) 中图位克隆了 *OsTTG1* 基因, 并利用 CRISPR/Cas9 技术研究了其功能, 发现 *OsTTG1* 可以调控水稻叶片、叶鞘和种皮等组织部位的花青素生物合成^[7]。本研究利用转基因技术在拟南芥突变体 *ttg1* 中过表达 *OsTTG1* 基因, 研究结果旨在探究该基因的其他生物学功能, 并为其开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥突变体 *ttg1* 购自 Arashare (中国拟南芥突变体服务中心)。野生型 Col-0 和 *OsTTG1* 过表达株系 *OsTTG1-OE* 由本实验保存。

1.2 材料种植和表型观察

取适量拟南芥种子放入 1.5 mL 的离心管中, 向离心管加入 0.1% 的琼脂糖溶液, 并将其放入 4 ℃ 冰箱中保存 3~4 d^[33]。将春化处理过的种子均匀地播撒于基质中, 在温度为 18 ℃~20 ℃、湿度为 60%~70% 的培养箱中培养。

分别取拟南芥 Col-0、*ttg1*、*OsTTG1-OE* 的种子、植株从根基部开始往上 1 cm 左右的茎段、以及叶片和花序等材料, 放置到体视显微镜下观察, 并拍照保存。使用佳能 EOS R5 相机对莲座期、开花期、结荚期的拟南芥进行拍照。不同基因型的拟南芥在相同条件、相同设置下进行观察及拍照。

1.3 *OsTTG1* 基因的克隆与载体的构建

通过 PCR 方法克隆目的基因, 用琼脂糖凝胶电泳确定目的条带的位置, 按照胶回收试剂盒说明书, 进行目的片段的回收。PCR 引物为 CAM-FLAG-45 810 (F: 5'-TTGGAGAGGACACGCTC GAGATGGAGCAGCCAAAGCCG-3'; R: 5'-GT CATCCTTGTAGTCGAATTGACCCCTGAGAA GCTGGACCTTGT-3')。用 *Eco*R I 和 *Xho* I 对质粒 CAM-flag 进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物, 回收载体大片段对应的条带。将目的 DNA 片段与线性化载体进行连接, 形成重组克隆载体。将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 使用单菌落 PCR 进行阳性克隆鉴定。利用 Plasmid Mini Kit I 试剂盒提取测序正确的质粒, 采用

冻融法直接转化农杆菌 GV3101, 使用单菌落 PCR 进行阳性克隆鉴定。单菌落 PCR 检测的引物均为 P (F: 5'-AGAAGACGTTCCAACCACG-3'; R: 5'-CGGTAAGGATCTGAGCTACAC-3')。

1.4 拟南芥转基因及转化植株的筛选

将含阳性重组质粒的农杆菌接种于含有抗生素的 LB 液体培养基中, 获得转化液。采用花序侵染法转化拟南芥^[34], 收集 T_0 代种子。将 T_0 代种子播种于含有抗生素的 MS 培养基中, 筛选具有抗性的拟南芥植株。选取生长健壮的植株移栽至育苗基质中进行培养。待种子成熟后, 按单株收集 T_1 代种子, 连续培养具有抗性的拟南芥, 获得纯合的 T_3 代种子, 用于后续实验以及表型鉴定。

1.5 转基因植株 PCR 鉴定及 RT-PCR 分析

提取拟南芥野生型和转基因阳性植株的 DNA。分别以转基因、野生型植株的 DNA、 H_2O 和农杆菌菌液为模板, 进行 PCR 鉴定, 引物为 45810 (F: 5'-CTTCACCTGCGAGCTGC-3'; R: 5'-CTTG TCGTGCAGCGATGAG-3')。

对拟南芥野生型、突变体 *ttg1* 和 *OsTTG1-OE* 株系进行 RT-PCR 分析。总 RNA 提取按照 RNeasy Plant Mini kit 说明书进行。使用 TaKaRa 试剂盒进行反转录, 获得 cDNA。以 *ACTIN2* 为内参, 利用 RT-PCR 检测 *AtTTG1* 和 *OsTTG1* 在不同基因型中的表达情况。引物分别为: *ACTIN2* (F: 5'-ACTTGCTGGACGTGACCTTACTGAT-3'; R: 5'-GTTGTCTCGTGGATTCCAGCAGCCT-3'); *TTG1* (F: 5'-CAACATATGATGGATAATTCAAGC TCCAGATTG-3'; R: 5'-CAACTTAAGTCAAACCTC TAAGGAGCTGCATTTG-3') 以及 *OsTTG1* (F: 5'-TTACTCTGAACCTCCCGACCCG-3'; R: 5'-GT TGGATTTCGCTTCGCTTGCT-3')。

1.6 RNA-seq 分析

为进一步挖掘引起 *OsTTG1-OE* 表型变化的基因, 选取莲座期、抽薹期和结荚期 3 个关键时期, 对 *ttg1* 和 *OsTTG1-OE* 植株的地上部分进行取样, 每个时期、每种基因型取 4 个重复, 共 24 个样品, 进行转录组测序。

提取 24 个样品的总 RNA, 利用 Nanodrop 2000 对 RNA 的浓度和纯度进行检测, 用琼脂糖凝

胶电泳检测 RNA 的完整性, 使用 Agilent 2100 测定 RIN 值。将检测合格的样品进行文库构建, 确保文库质量合格, 然后选择 Illumina 平台, 进行上机测序。

1.7 生物信息学分析流程

使用 TopHat 2 软件将得到的 Clean data 与指定的参考基因组进行序列比对, 获得 Mapped data。参考基因组版本为 TAIR10, 来源于网站 http://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Info/Index, 同时对测序的结果进行质量评估。使用 DESeq 2 软件进行差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs) 分析, 筛选阈值为: $|\log_2 FC| \geq 1$, 且 $p\text{adjust} < 0.05$ 。结合 GraphPad Prism 5.0 软件和在线网站 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 等进行作图分析。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建和遗传转化拟南芥

用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切质粒 CAM-flag, 回收载体大片段。将目的 DNA 片段与线性化载体连接, 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 获得了阳性克隆。

利用试剂盒提取测序正确的重组质粒, 采用冻融法直接转化农杆菌 GV3101。经抗性平板筛选, 菌落 PCR 进行阳性克隆鉴定, 发现可扩增出明亮单一的条带, 且与预期片段大小相符, 可用于遗传转化实验。

将含阳性重组质粒的农杆菌接种于含抗生素的 LB 液体培养基中, 制备转化液。采用花序侵染法侵染拟南芥突变体 *ttg1*, 获得了 T_0 代转基因植株种子。将 T_0 代种子进行抗性筛选, 直到获得转基因纯合体株系。PCR 检测验证了 *OsTTG1* 在转

基因植株中的表达 (图 1: A), 获得 *OsTTG1*-OE 拟南芥。利用 RT-PCR 检测 *OsTTG1* 在野生型、突变体以及过表达植株中的表达量, 发现 *OsTTG1* 在过表达植株中稳定高表达 (图 1: B)。

2.2 拟南芥种子及植株表型分析

随机选取拟南芥 3 种基因型的成熟种子, 在体式显微镜下观察种子形态。发现 Col-0 和 *OsTTG1*-OE 的种皮呈棕褐色, *OsTTG1*-OE 的种皮颜色比野生型稍浅。突变体 *ttg1* 的种皮为浅黄色。取不同基因型的拟南芥种子各 10 粒, 在体视显微镜下测量种子长度。结果显示, 突变体 *ttg1* 的种子平均长度为 0.46 mm, 野生型为 0.52 mm, *OsTTG1*-OE 为 0.53 mm, 说明过表达 *OsTTG1* 后, 拟南芥的种子大小受到影响 (图 2: A、B)。

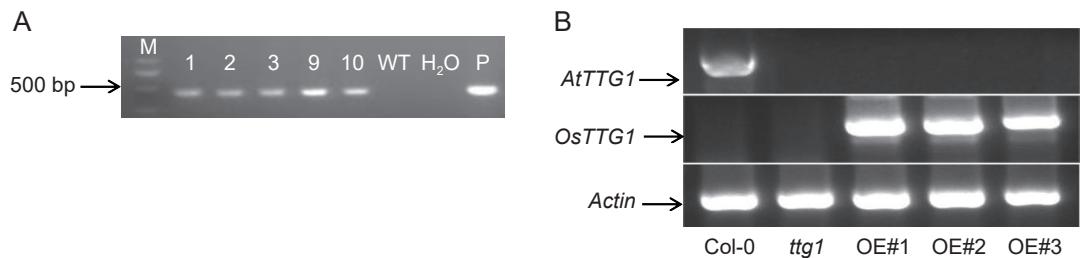
选取苗龄 10 d 的拟南芥植株第 1 片真叶, 在体视显微镜下观察表皮毛的密度, 统计不同基因型拟南芥叶片上的表皮毛。结果显示, 野生型拟南芥第 1 片真叶上表皮毛在 35 根左右, *OsTTG1*-OE 在 32 根左右, 突变体 *ttg1* 则几乎没有表皮毛 (图 2: C)。野生型和 *OsTTG1*-OE 植株的叶片、茎秆及花序上均有表皮毛, 突变体 *ttg1* 则没有。此外, 突变体 *ttg1* 几乎没有花青素的积累, 过表达 *OsTTG1* 拟南芥株系则在叶片、茎等部位均有花青素的积累 (图 2: D)。

对不同基因型拟南芥的开花期进行观察, 发现突变体 *ttg1* 的开花时间比 Col-0 和 *OsTTG1* 转基因株系提前 3~5 d。Col-0 和 *OsTTG1*-OE 的开花时间没有明显差异 (图 3), 说明 *OsTTG1* 也能够影响拟南芥的开花时间。

2.3 RNA-seq 分析结果

2.3.1 转录组测序分析

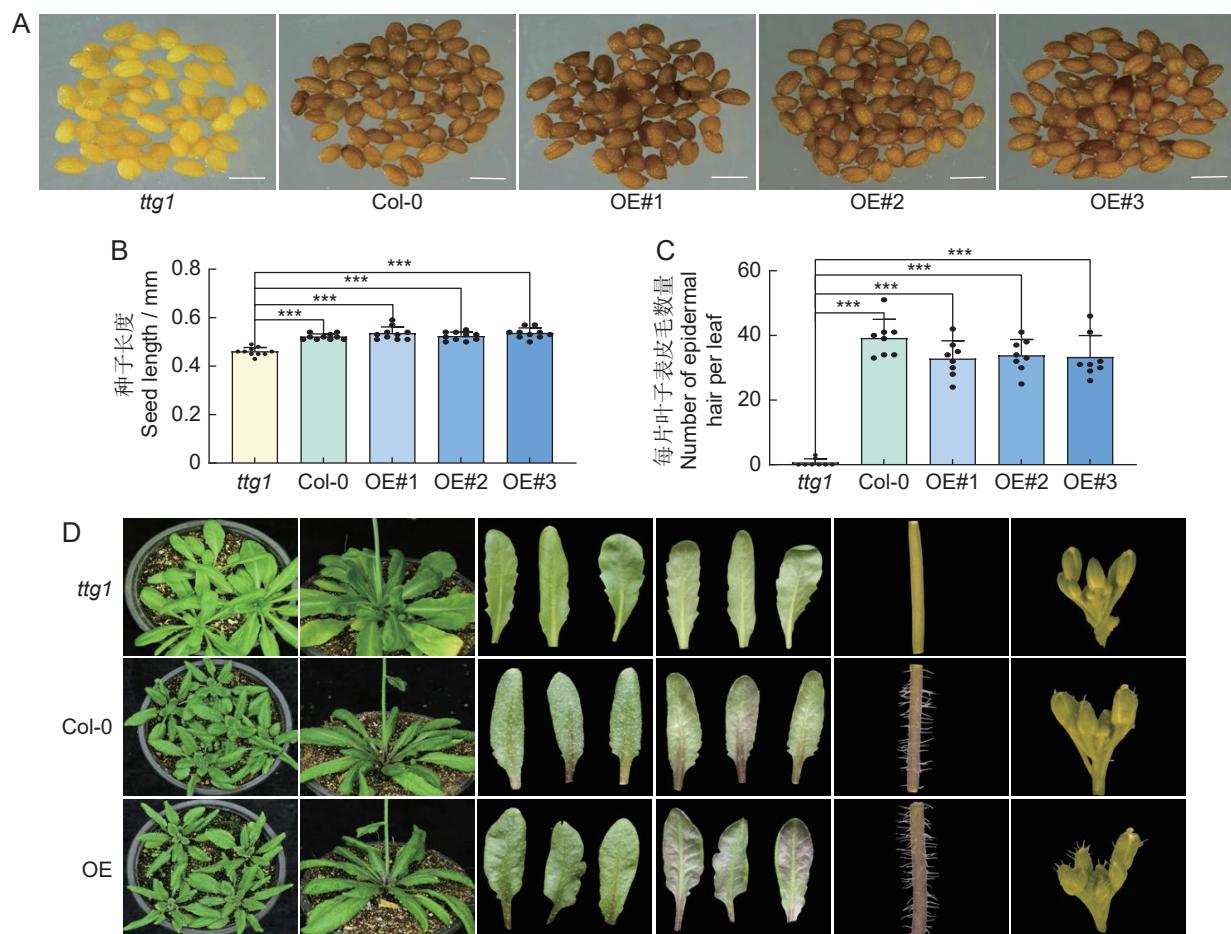
对拟南芥突变体 *ttg1* 和 *OsTTG1*-OE 株系共



A: WT, 野生型拟南芥; P, 菌液; M: 2 000 bp marker。B: 对照及转基因拟南芥中 *OsTTG1* 的表达情况。

A: WT, Wild-type; P, Bacterial solution; M: 2 000 bp marker. B: Expression of *OsTTG1* in CK and transgenic *Arabidopsis thaliana* seedlings.

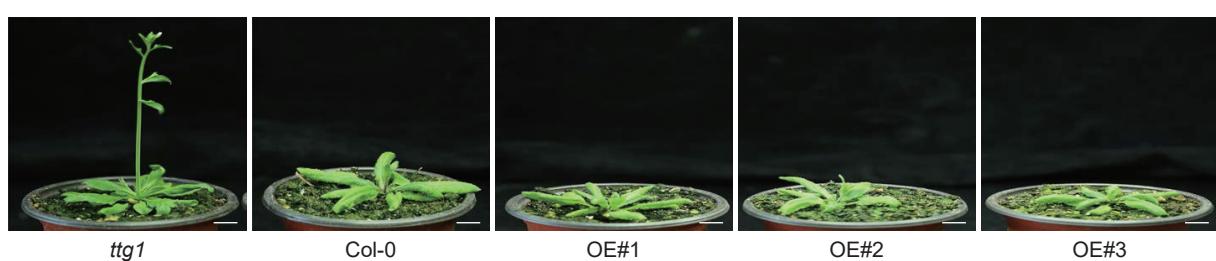
图 1 *OsTTG1* 在拟南芥中的表达情况
Fig. 1 *OsTTG1* expression in *Arabidopsis thaliana*



标尺为 0.5 mm。***, $P < 0.001$ 。

Scale is 0.5 mm.

图 2 拟南芥 Col-0、突变体 ttg1、OsTTG1-OE 的种子及植株表型
Fig. 2 Seed and plant phenotypes in *Arabidopsis thaliana* Col-0, mutant *ttg1*, and *OsTTG1-OE*



标尺为 1 cm。

Scale is 1 cm.

图 3 3 种基因型拟南芥株系的开花期比较
Fig. 3 Comparison of flowering period of three genotyped strains of *Arabidopsis thaliana*

24 个样品进行 RNA-seq 分析, 共获得 167.02 Gb 的 Clean data, 各样品的 Clean data 均在 6.01 Gb 以上, Q30 在 93.51% 以上, GC 值均在 46.01% 以上。将各样品的 Clean reads 与参考基因组进行序列比对, 发现匹配率在 94.44%~96.47%。

2.3.2 差异表达基因统计分析

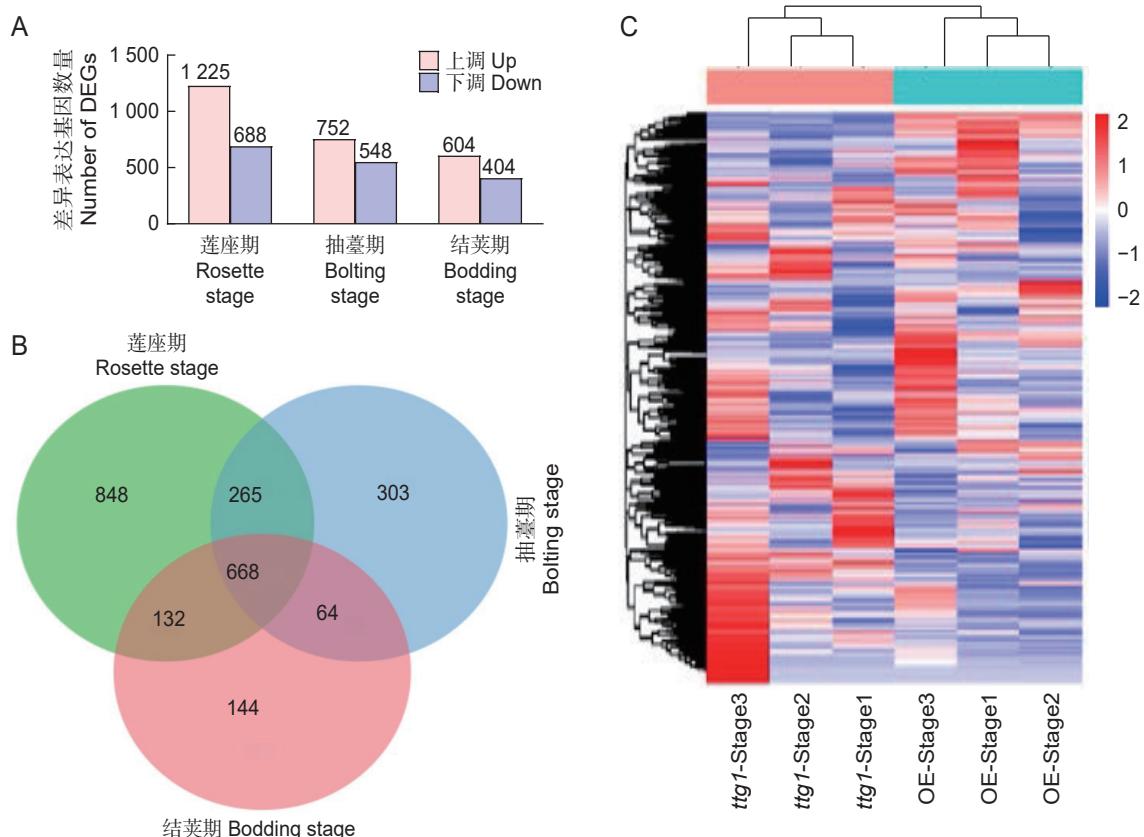
经统计, 3 个时期共得到 2424 个 DEGs。在莲座期突变体 *ttg1* 和 *OsTTG1-OE* 中筛选到 1913 个 DEGs, 其中上调基因 1225 个, 包括可能与花青素积累有关的基因 (*MKK9*、*CYP75B1*、*GSTF12*、*DFRA*、*LDOX*)、可能与表皮毛形成

有关的基因 (*ETC2*、*SPL4*、*SPL3A*)，以及可能与调控开花有关的基因 (*FLC*、*HDA5*) 等；下调基因 688 个，包括可能与表皮毛形成有关的基因 (*SPL15*、*TCL1*、*ETC3*)、可能与调控开花有关的基因 (*FT*、*AGL19*、*LHY*) 等。在抽薹期筛选到的 DEGs 为 1 300 个，其中上调基因 752 个，包括可能与花青素积累有关的基因 (*CYP75B1*、*TT8*、*GSTF12*、*F3H*、*CHS*、*DFRA*、*LDOX*)、可能与表皮毛形成相关的基因 (*ETC2*、*SPL3A*、*GIS*) 等；下调基因 548 个，其中包括可能与表皮毛形成有关的基因 *ETC3*。在结荚期筛选到差异表达基因 1 008 个，其中上调基因 604 个，包括可能与花青素积累有关的基因 *DFRA*、*LDOX*，可能与表皮毛形成相关的基因 *ETC2*、*SPL3A*；下调基因 404 个，包括可能与表皮毛形成相关的基因 *ETC3* (图 4: A)。对获得的 DEGs 进行分析，发现 3 个时期共有的 DEGs 为 668 个 (图 4: B)。

对 3 个时期的 DEGs 进行层次聚类分析，发现多数在莲座期下调的基因，在抽薹期也下调，但在结荚期则上调；而在莲座期上调的基因，在其他两个时期则大多为下调 (图 4: C)。

2.3.3 差异表达基因 GO (Gene ontology, GO) 富集分析

对所有 DEGs 进行基因本体富集分析，发现在分子功能 (Molecular function, MF) 相关条目中，催化活性 (GO: 0003824)、转录调节剂活性 (GO: 0140110)、复合蛋白 (GO: 0005488) 等条目有较多的 DEGs 富集。在细胞组分 (Cellular component, CC) 相关条目中，膜部分 (GO: 0044425)、细胞部分 (GO: 0044464)、细胞器 (GO: 0043226) 等条目有较多的 DEGs 富集。在生物进程 (Biological processes, BP) 相关条目中，生物调节 (GO: 0065007)、代谢过程 (GO: 0008152) 等条目有较多 DEGs 富集 (图 5)。在



A: 上调基因与下调基因统计；B: DEGs 的韦恩图；C: DEGs 的表达水平聚类热图。Stage1: 莲座期；Stage2: 抽薹期；Stage3: 结荚期，下同。

A: Statistical analysis of up-regulated and down-regulated genes; B: Venn diagram of DEGs; C: Heatmap of DEG expression levels. Stage 1: Rosette stage; Stage 2: Bolting stage; Stage 3: Boddng stage, same below.

图 4 突变体 *ttg1* 与 *OsTTG1-OE* 株系 3 个时期的差异表达基因

Fig. 4 DEGs across three periods in *Arabidopsis thaliana* mutant *ttg1* and *OsTTG1-OE*

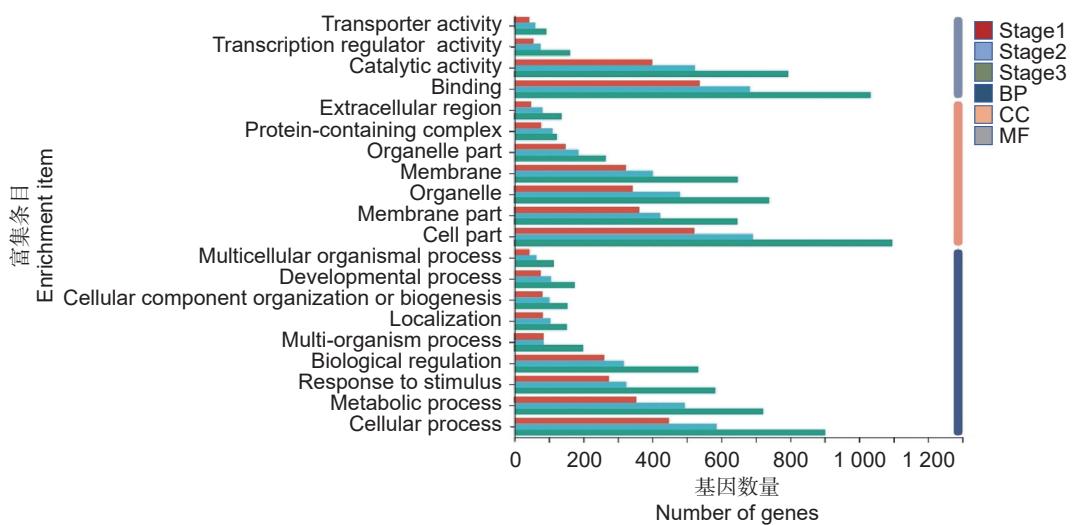


图 5 差异表达基因的 GO 富集分析
Fig. 5 Gene ontology enrichment analysis of DEGs

3 个时期中, DEGs 在催化活性、转录调节剂活性、代谢过程等相关条目均有较多富集。

3 讨论

花青素是高等植物中的次生代谢产物, 在抗逆、防御病虫害、育花、育种等方面发挥着重要作用^[35]。花青素是在 PAL、CHS、F3H、CHI、DFR、LDOX、UGT 等多种酶的催化下, 在多种转录因子的调控下合成的^[36]。在拟南芥中, 当 WD40 的 TTG1 和 bHLH 的 TT8、GL3 或者 EGL3 与 R2R3-MYB 相互作用时, 花青素的合成被激活。TTG1 参与形成的 MBW 复合物能够直接与 DFR、F3H、TT8、TTG2 和 ANS 等基因的启动子结合, 调控基因的表达。本研究中, 水稻 *OsTTG1* 可以修复拟南芥突变体 *ttg1* 无花青素积累的表型缺陷。表明 *OsTTG1* 具有影响植株花青素积累的作用。RNA-seq 分析发现了 4 个与花青素合成有关的酶, 其中 DFR 是花青素合成途径中的关键酶, TTG1 会影响 DFR 的功能, 诱导 DFR 的表达, 拟南芥突变体 *ttg1* 中 DFR 的催化受阻, 花青素合成受到影晌^[37]。在拟南芥突变体 *ttg1* 中过表达 *OsTTG1* 后, 发现 3 个时期的转基因植株中 DFR 的表达水平均比突变体 *ttg1* 高, 说明 *OsTTG1* 可能也像 TTG1 一样能够诱导 DFR 的表达, 影响花青素的积累。TT8 属于 bHLH 转录因子, 其能够与 TT2 (MYB)、TTG1 (WD40) 蛋白形成稳定的三元复合物, 调控花青素合成途径中后期结构基因的表达, 还能

够通过正负反馈调节自身的表达, 进而促进花青素的合成^[38]。本研究中 *TT8* 基因的表达上调, 说明 *OsTTG1* 或许也能与 *TT8* 及 *TT2* 形成复合物, 调控花青素的合成。

表皮毛是拟南芥的一个重要性状, 而突变体 *ttg1* 的表皮毛生长发育受阻, 整个植株几乎没有表皮毛。本研究中, 在拟南芥突变体 *ttg1* 中过表达 *OsTTG1*, 可以修复突变体 *ttg1* 无表皮毛的表型缺陷, 表明 *OsTTG1* 具有影响表皮毛形成的作用。RNA-seq 分析发现, 在抽薹期时, 转基因植株中 *G/S* 的表达量显著高于突变体植株。*G/S* 能够正调控拟南芥表皮毛的发育^[22]。这说明 *OsTTG1* 可能通过调控 *G/S* 的表达来影响拟南芥表皮毛的形成。*TCL1* 在拟南芥表皮毛形成过程中起着负调控的作用, *AtTCL1* 过表达拟南芥植株的表皮毛形成被抑制^[33]。我们发现, 在莲座期时, 转基因植株中 *G/S* 的表达量显著低于突变体植株, 这说明 *OsTTG1* 可能对 *TCL1* 基因的表达量有影响, 进而影响了莲座期表皮毛的形成。*ETC2* 和 *TCL1* 一样, 都是影响表皮毛形成的 R3-MYB 型负调控因子, 但本研究发现, 转基因植株中 *ETC2* 在 3 个时期的表达均显著上调。有研究指出, MBW 对表皮毛的生长发育有正向调控作用, 使 R3-MYB 型负调控因子 TRY、CPC 受到激活, 使得 MYB 正向调控因子被取代, 最后形成无活性的 GY/CPC-GL3/EGL3-TTG1 复合物^[39]。我们猜测, 在 *OsTTG1* 的影响下, MBW 也能激活 *ETC2* 的表达, 最终形成无活性的

ETC2-GL3-EGL3-TTG1 复合物, 因此, *ETC2* 的上调表达并没有抑制表皮毛的形成。

开花期是决定植物分布和季节适应性的重要农艺性状之一。本研究在拟南芥突变体 *ttg1* 中过表达 *OsTTG1* 基因, 发现多个开花相关的基因只在莲座期表达量有差异, 而在开花期的突变体 *ttg1* 和 *OsTTG1*-OE 植株中没有差异, 说明 *OsTTG1* 可能会直接影响开花期, 或者像 *TTG1* 一样可以调控下游生物合成相关的基因^[17]。*FLC* 是一个开花抑制基因, 该基因表达上调会促使植株形成晚花表型^[40], *FLC* 的上调表达能够使拟南芥开花延迟。*FT* 是拟南芥中的一种成花素, 在花的形成过程中起着重要的作用。*FT*^[29] 和 *AGL19*^[41] 基因的过表达均会导致拟南芥提前开花。本研究发现在莲座期时, 转基因植株中 *FLC* 的表达量显著高于突变体植株, 而 *FT* 和 *AGL19* 的表达量则显著下调。与开花相关的基因的表达量只在莲座期有差异, 说明这些基因在植株抽薹前就能发挥功能。这 3 个基因的表达可能均受 *OsTTG1* 的影响, 进而影响 *OsTTG1*-OE 植株的开花时间。有研究表明, *TTG1* 过表达植株比野生型开花晚^[5]。然而, 本研究发现 *OsTTG1*-OE 植株的开花时间与野生型并没有明显差异。同时, 我们发现在转基因植株中 *HDA5* 的表达量显著高于突变体植株。前人报道认为 *HDA5* 是一个正调控开花的基因, *hda5* 突变体比野生型晚开花^[42], 与我们的研究结果刚好相反。因此, 我们猜测 *OsTTG1* 可能会影响 *HDA5* 的表达, 进而影响植株的开花时间。

在拟南芥突变体 *ttg1* 背景下, 过表达 *OsTTG1* 株系的表型得到恢复, 表明 *OsTTG1* 影响花青素生物合成、表皮毛形成及开花时间等性状。此外, *TTG1* 对植株的根毛密度^[43]、根长^[44]、种皮黏液质^[45] 等也具有一定的影响。本研究中, RNA-seq 分析发现的 DEGs 中也包括与氮素吸收利用、耐盐、抗病等相关的基因, 因此, *OsTTG1* 是否对上述性状也有影响还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Airola CA, Hearn TJ, Brockington SF, Webb AAR, Glover BJ. TTG1 proteins regulate circadian activity as well as epidermal cell fate and pigmentation[J]. *Nat Plants*, 2019, 5 (11): 1145–1153.
- [2] Broun P. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8 (3): 272–279.
- [3] Tominaga-Wada R, Ishida T, Wada T. New insights into the mechanism of development of *Arabidopsis* root hairs and trichomes[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2011, 286: 67–106.
- [4] Oppenheimer DG, Herman PL, Sivakumaran S, Esch J, Marks MD. A *myb* gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules[J]. *Cell*, 1991, 67 (3): 483–493.
- [5] Paffendorf BAM, Qassrawi R, Meys AM, Trimborn L, Schrader A. TRANSPARENT TESTA GLABRA 1 participates in flowering time regulation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8303.
- [6] Wang JY, Zhang CH, Li YS. Genome-wide identification and expression profiles of 13 key structural gene families involved in the biosynthesis of rice flavonoid scaffolds[J]. *Genes*, 2022, 13 (3): 410.
- [7] Yang XH, Wang JR, Xia XZ, Zhang ZQ, He J, et al. *OsTTG1*, a WD40 repeat gene, regulates anthocyanin biosynthesis in rice[J]. *Plant J*, 2021, 107 (1): 198–214.
- [8] Du SL, Wang ZW, Chen Y, Tan Y, Li X, et al. Coleoptile purple line regulated by A-P gene system is a valuable marker trait for seed purity identification in hybrid rice[J]. *Rice Sci*, 2022, 29 (5): 451–461.
- [9] Miller R, Owens SJ, Rørslett B. Plants and colour: flowers and pollination[J]. *Opt Laser Technol*, 2011, 43 (2): 282–294.
- [10] Dixon RA, Achnne L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, Wang LJ. The phenylpropanoid pathway and plant defence: a genomics perspective[J]. *Mol Plant Pathol*, 2002, 3 (5): 371–390.
- [11] Koornneef M. The complex syndrome of *ttg* mutants[J]. *Arabidopsis Inf Serv*, 1981, 18: 45–51.
- [12] Gonzalez A, Zhao MZ, Leavitt JM, Lloyd AM. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/MYB transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings[J]. *Plant J*, 2008, 53 (5): 814–827.
- [13] Petroni K, Tonelli C. Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs[J]. *Plant Sci*, 2011, 181 (3): 219–229.
- [14] Zhang BP, Schrader A. TRANSPARENT TESTA GLABRA 1-dependent regulation of flavonoid biosynthesis[J]. *Plants (Basel)*, 2017, 6 (4): 65.
- [15] Wei ZL, Cheng YL, Zhou CC, Li D, Gao X, et al. Genome-wide identification of direct targets of the TTG1-bHLH-MYB complex in regulating trichome formation and flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (20): 5014.

- [16] Xu WJ, Grain D, Bobet S, Le Gourrierec J, Thévenin J, et al. Complexity and robustness of the flavonoid transcriptional regulatory network revealed by comprehensive analyses of MYB-bHLH-WDR complexes and their targets in *Arabidopsis* seed[J]. *New Phytol.*, 2014, 202 (1): 132–144.
- [17] Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L. TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J.*, 2004, 39 (3): 366–380.
- [18] 柳蕾, 孙健, 吴殿星, 舒小丽. 水稻光叶性状及表皮毛发育研究进展 [J]. *核农学报*, 2015, 29 (11): 2110–2116.
Liu L, Sun J, Wu DX, Shu XL. Advances in studying on glabrous rice and the development of trichomes[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29 (11): 2110–2116.
- [19] Kirik V, Lee MM, Wester K, Herrmann U, Zheng ZG, et al. Functional diversification of *MYB23* and *GL1* genes in trichome morphogenesis and initiation[J]. *Development*, 2005, 132 (7): 1477–1485.
- [20] Zhang F, Gonzalez A, Zhao MZ, Payne CT, Lloyd A. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2003, 130 (20): 4859–4869.
- [21] Payne CT, Zhang F, Lloyd AM. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*[J]. *Genetics*, 2000, 156 (3): 1349–1362.
- [22] An LJ, Zhou ZJ, Su S, Yan A, Gan YB. *GLABROUS INFLORESCENCE STEMS (GIS)* is required for trichome branching through gibberellic acid signaling in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Physiol.*, 2012, 53 (2): 457–469.
- [23] Gan YB, Liu C, Yu H, Broun P. Integration of cytokinin and gibberellin signalling by *Arabidopsis* transcription factors *GIS*, *ZFP8* and *GIS2* in the regulation of epidermal cell fate[J]. *Development*, 2007, 134 (11): 2073–2081.
- [24] Zhou ZJ, An LJ, Sun LL, Gan YB. *ZFP5* encodes a functionally equivalent *GIS* protein to control trichome initiation[J]. *Plant Signal Behav.*, 2012, 7 (1): 28–30.
- [25] 刘艳霞, 王娟, 兰海燕. 基因调控网络调节植物表皮毛发育的研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15 (4): 1362–1370.
Liu YX, Wang J, Lan HY. Advance in gene regulatory network of plant trichome development controlling[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15 (4): 1362–1370.
- [26] Masucci JD, Rerie WG, Foreman DR, Zhang M, Galway ME, et al. The homeobox gene *GLABRA 2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Development*, 1996, 122 (4): 1253–1260.
- [27] Ioannidi E, Rigas S, Tsitsekian D, Daras G, Alatzas A, et al. Trichome patterning control involves *TTG1* interaction with SPL transcription factors[J]. *Plant Mol Biol*, 2016, 92 (6): 675–687.
- [28] Hellwell CA, Wood CC, Robertson M, James Peacock W, Dennis ES. The *Arabidopsis* *FLC* protein interacts directly *in vivo* with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex[J]. *Plant J.*, 2006, 46 (2): 183–192.
- [29] Zheng R, Meng XB, Hu QL, Yang B, Cui GC, et al. *OsFTL12*, a member of *FT*-like family, modulates the heading date and plant architecture by florigen repression complex in rice[J]. *Plant Biotechnol J.*, 2023, 21 (7): 1343–1360.
- [30] Western TL, Young DS, Dean GH, Tan WL, Samuels AL, Haughn GW. *MUCILAGE-MODIFIED4* encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by *APETALA2*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*, and *GLABRA2* in the *Arabidopsis* seed coat[J]. *Plant Physiol.*, 2004, 134 (1): 296–306.
- [31] Shi L, Katainic V, Yu YY, Kunst L, Haughn G. *Arabidopsis glabra2* mutant seeds deficient in mucilage biosynthesis produce more oil[J]. *Plant J.*, 2012, 69 (1): 37–46.
- [32] Qiu YP, Tao R, Feng Y, Xiao ZN, Zhang D, et al. *EIN3* and *RSL4* interfere with an MYB-bHLH-WD40 complex to mediate ethylene-induced ectopic root hair formation in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118 (51): e2110004118.
- [33] Tian HN, Wang XL, Guo HY, Cheng YX, Hou CJ, et al. *NTL8* regulates trichome formation in *Arabidopsis* by directly activating *R3 MYB* genes *TRY* and *TCL1*[J]. *Plant Physiol.*, 2017, 174 (4): 2363–2375.
- [34] Zhang XR, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method[J]. *Nat Protoc.*, 2006, 1 (2): 641–646.
- [35] Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10 (5): 236–242.
- [36] 贾赵东, 马佩勇, 边小峰, 杨清, 郭小丁, 谢一芝. 植物花青素合成代谢途径及其分子调控 [J]. *西北植物学报*, 2014, 34 (7): 1496–1506.
Jia ZD, Ma PY, Bian XF, Yang Q, Guo XD, Xie YZ. Biosynthesis metabolic pathway and molecular regulation of plants anthocyanin[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2014, 34 (7): 1496–1506.
- [37] 马旭. miR159-MYB65-DFR 参与番茄花青素合成调控分析 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2023: 12–15.

- [38] Baudry A, Caboche M, Lepiniec L. TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J.*, 2006, 46 (5): 768–779.
- [39] 曹敏, 张璐, 高新梅, 张良邦, 李文强, 郭万里. 植物表皮毛发育分子调控机制的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2013, 41 (10): 4231–4235.
- Cao M, Zhang L, Gao XM, Zhang GB, Li WQ, Guo WL. Research progress of molecular regulation mechanism in the development of plant trichomes[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41 (10): 4231–4235.
- [40] Takahashi Y, Teshima KM, Yokoi S, Innan H, Shimamoto K. Variations in Hd1 Proteins, *Hd3a* promoters, and *Ehd1* expression levels contribute to diversity of flowering time in cultivated rice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (11): 4555–4560.
- [41] Krogan NT, Hogan K, Long JA. APETALA2 negatively regulates multiple floral organ identity genes in *Arabidopsis* by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19[J]. *Development*, 2012, 139 (22): 4180–4190.
- [42] Luo M, Tai R, Yu CW, Yang SG, Chen CY, et al. Regulation of flowering time by the histone deacetylase HDA5 in *Arabidopsis*[J]. *Plant J.*, 2015, 82 (6): 925–936.
- [43] Grierson C, Nielsen E, Ketelaarc T, Schiefelbein J. Root hairs[J]. *Arabidopsis Book*, 2014 (12): e0172.
- [44] 周卫丰, 史春阳, 葛永胜, 丁艳, 胡训霞, 等. 水稻耐低磷根系形态重塑基因挖掘及功能分析 [J]. 扬州大学学报 (农业与生命科学版), 2022, 43 (3): 1–11.
- Zhou WF, Shi CY, Ge YS, Ding Y, Hu XX, et al. Gene mining and functional analysis of root morphological remodeling tolerant to low phosphorus in rice[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2022, 43 (3): 1–11.
- [45] 曹婧, 徐栋生, 黄代红, 袁军文, 赵娟, 等. 抱茎独行菜种皮粘液质相关基因 *TTG1* 的克隆、表达分析及功能鉴定 [J]. 植物科学学报, 2014, 32 (4): 371–382.
- Cao J, Xu DS, Huang DH, Yuan JW, Zhao J, et al. Cloning, characterization, and functional analysis of seed coat mucilage-related gene *TTG1* from *Lepidium perfoliatum*[J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32 (4): 371–382.

(责任编辑: 李惠英)