

## 玉米光合突变体 $bsd2$ (*bundle sheath defective II*)的转录组分析

江芳<sup>1\*</sup>, 丁泽红<sup>2\*</sup>, 董雷<sup>3</sup>, 李平华<sup>4,\*\*</sup>

<sup>1</sup>海南大学农学院, 海口570228; <sup>2</sup>中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口571101; <sup>3</sup>河南农业大学农学院, 郑州450002; <sup>4</sup>山东农业大学农学院, 山东泰安271018

**摘要:** 玉米是典型的C<sub>4</sub>植物, 具有独特的花环结构和二氧化碳浓缩机制, 因而具有较高的光合效率。*BSD2* (*bundle sheath defective II*)基因主要在花环结构的维管束鞘细胞表达, 其缺失会造成维管束鞘细胞中的叶绿体发育异常, 从而影响叶片的光合作用。本研究对高光和低光下的野生型和 $bsd2$ 突变体不同发育阶段的叶片进行RNA-seq测序。结果表明, *BSD2*基因缺失对叶片非光合部位影响较小; 对叶片光合部位影响较大。其中, 光合作用、淀粉和糖代谢、四吡咯生物合成等相关基因在 $bsd2$ 突变体中显著下调, 而蛋白质合成与折叠、RNA加工与转录调节相关的基因显著上调。

**关键词:** 玉米; C<sub>4</sub>光合; 维管束鞘细胞缺失突变体II ( $bsd2$ ); RNA-seq

植物通过光合作用产生生长发育所必需的碳水化合物。植物根据其光合作用的类型不同可分为C<sub>3</sub>植物、C<sub>4</sub>植物及CAM植物, 其中C<sub>4</sub>植物(如玉米)比C<sub>3</sub>植物具有更高的光合效率。玉米叶片具有两种形态和功能不同的光合细胞, 分别是维管束鞘细胞和叶肉细胞(Esau 1943; Russell和Evert 1985), 这两种细胞形成了玉米型C<sub>4</sub>植物特有的花环结构(kranz structure) (Brown 1975)。存在于这两种类型细胞中的光合酶也存在较大差异: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)特异性定位于叶肉细胞, 而进行卡尔文循环所必需的Rubisco则特异性定位于维管束鞘细胞。C<sub>4</sub>植物中CO<sub>2</sub>首先被叶肉细胞中的PEPC固定, 形成四碳糖草酰乙酸, 再以苹果酸的形式运送至相邻的维管束鞘细胞内并完成脱羧反应, 生成CO<sub>2</sub>, 进而被Rubisco重新固定进入卡尔文循环(Crespo等1979; Williams和Kennedy 1978), 从而形成碳水化合物来满足植物生长发育的需要。正是这种独特的二氧化碳浓缩机制使得C<sub>4</sub>植物不受大气中O<sub>2</sub>浓度的干扰保持较高的光合效率(Hatch 1978)。

植物体内丰富的光合酶Rubisco是植物光合作用过程中固定CO<sub>2</sub>的关键酶, 同时具有催化羧化反应和氧化反应的功能, 催化光合作用还是光呼吸取决于CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>浓度的比值, 在玉米中, Rubisco主要定位于维管束鞘细胞中的叶绿体间质内(Nishioka等1996; 杨梅等2007), 因此维管束鞘细胞内CO<sub>2</sub>的浓度影响Rubisco发挥功能。玉米 $bsd2$ 突变体植株的维管束鞘细胞在结构和功能上发生了变化, 维管束鞘细胞中的叶绿体结构异常, 而叶肉细胞中的叶绿体正常(Brutnell等1999), 因而 $bsd2$ 突变体是研究

玉米光合类型细胞分化的好材料(Hall等1998)。前人研究表明 $bsd2$ 玉米突变体中缺乏Rubisco蛋白的积累, 推测*BSD2*基因是通过调控Rubisco大亚基的组装而影响光合。

关于突变体 $bsd2$ 的早期研究只局限在解剖结构的观察及各种光合酶定位的检测(Brutnell等1999; Roth等1996), 而且已有证据表明光照在C<sub>4</sub>叶片细胞分化的过程中发挥重要作用, 甚至能够影响光合碳同化途径(姜雯宇等2013)。而在黑暗条件下生长的玉米叶片中RuBPCase定位在所有的光合细胞中, 催化C<sub>3</sub>光合途径(Nelson和Langdale 1992)从而影响玉米的C<sub>4</sub>光合, 因此本实验设置了不同的光照强度。依赖于RNA测序技术(RNA-Seq)的转录组学的快速发展为我们研究 $bsd2$ 突变体及玉米光合功能的分化提供了契机和新的生物学视角(Wang等2009)。为了进一步了解*BSD2*基因的功能, 了解C<sub>4</sub>光合发育, 本实验对不同光强(高光480  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 低光80  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )下生长的野生型和 $bsd2$ 突变体不同叶片部位进行了转录组分析。寻找突变体在不同光强下及不同部位与野生型存在差异表达的基因及受影响的主要生物学途径, 为进一步研究玉米*BSD2*基因的功能提供了线索。

## 材料与方法

### 1 材料种植及取样

随机选取60粒玉米(*Zea mays* L.) *BSD2*+/-自

收稿 2016-04-08 修定 2016-07-12

资助 国家自然科学基金(31271393)。

\* 并列第一作者。

\*\* 通讯作者(E-mail: pinghuali@sdau.edu.cn)。

交的种子, 播种于塑料小方盒(7 cm×7 cm×8 cm)保证2粒种子/盒, 之后放置于培养室培养, 光照强度设为高光(high light, HL)  $480 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和低光(low light, LL)  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 光照时间8:00~20:00, 温度28°C; 黑夜时间20:00~次日8:00, 温度20°C)。种植5 d后, 对幼苗进行形态观察; 同时提取叶片基因组DNA, 利用Mutator特异性引物(Mu1: 5' GCCTCCATTTTCGTCGAATCCC 3'; Mu2: 5' GCCTCTATTTTCGTCGAATCCG 3')及BSD2基因特异性引物(BSD2-F: 5' GGCCGTTGTTTCTCTTCT-

TATC 3'; BSD2-R: 5' TTGGTCTTGATGCACAGG 3')对黄化苗及绿苗进行PCR鉴定, 确定其基因型。

为了进一步研究玉米BSD2基因的功能, 我们根据基因型(PCR鉴定)的结果, 选择 $bsd2$ 突变体和野生型的叶片进行RNA-Seq实验。种植8 d后, 幼苗处于二叶一心期, 然后于10:00选取幼苗第二叶暴露于光下部分(+4 cm, 从叶尖向下量4 cm, 切取0.5 cm)及未见光叶片部分(-1 cm, 第一叶叶枕部位向下, 切取0.5 cm) (图1-A指示位置), 立即用液氮冻存, 待RNA提取建库。

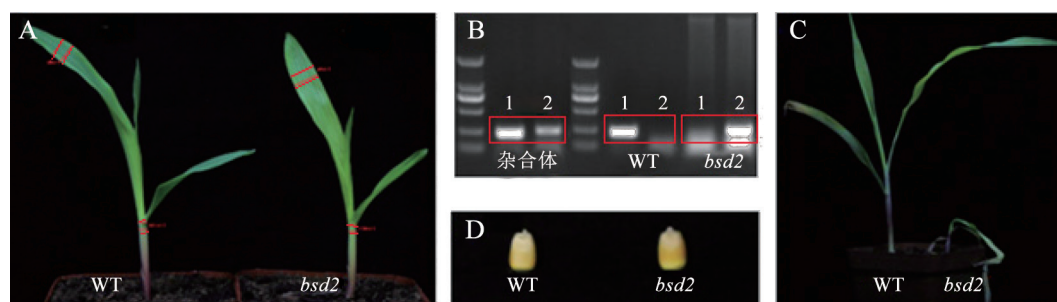


图1 野生型(WT)与突变体( $bsd2$ )玉米的表型差异及基因型鉴定

Fig.1 The phenotype observation and genotyping of wild type (WT) and mutant ( $bsd2$ )

A: 幼苗时期的表型差异, 红色区段所指部位为RNA-seq取样部位; B: PCR的方法鉴定植株的基因型, 1: 引物(BSD2-F+BSD2-R), 2: 引物(BSD2-R+Mu1+Mu2), 1和2均有条带的是杂合体, 只有1有条带的是野生型WT, 只有2有条带的是突变体 $bsd2$ ; C: 播种后13 d突变体 $bsd2$ 幼苗死亡; D: 野生型和突变体种子比较。

## 2 叶绿素荧光参数的测定

为了明确BSD2基因对植株光合作用的影响, 种植10 d后, 用fluorescence monitoring system (FMS-2; Hansatech)仪器测量野生型和突变体植株的叶绿素荧光参数, 包括 $F_v/F_m$  (暗适应下PSII的最大光化学效率)、 $\Phi_{PSII}$  (PSII实际光化学效率)、 $q_p$  (光化学淬灭系数)、ETR (电子传递速率)等。

## 3 RNA的提取及RNA-Seq文库的构建

采用TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)法提取叶片总RNA。为了尽量消除个体间的差异, 每个样品为5株相同基因型植株混合取样, 共3次生物学重复。提取总RNA后, 用Nanodrop测量其浓度, 并用凝胶电泳检测其质量。RNA-Seq文库构建参照Wang等(2011)的构建方法。文库用Illumina HiSeq 2500进行单端测序(北京贝瑞和康生物科技有限公司)。

## 4 RNA-Seq数据的整合与分析

使用FASTX-toolkit (<http://hannonlab.cshl.edu/>

[http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastx\\_toolkit/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastx_toolkit/))去除每个测序reads的接头, 用FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)检测测序的质量。干净Reads比对到Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)网站上B73基因组(AGPv3版本)。FPKM>1的基因被认为是表达的基因。差异表达基因利用EdgeR (Robinson等2010)软件根据野生型和突变体的比较(FDR<0.01)确定。功能富集分析参照Li等(2010)进行。

## 5 荧光定量PCR

为了验证RNA-Seq的结果, 本实验以建库所用RNA为模板, 选取了12个与光合作用相关的基因进行qRT-PCR分析, 考察它们在不同样本中的表达量变化。用玉米中的18S rRNA基因作为RT-PCR的内参基因, 因为它含量丰富且任何情况下稳定存在, 受外界调控影响较小(Suresh等2012), 共3次生物学重复, 4次技术重复, 基因表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算所得。

## 实验结果

### 1 *BSD2*基因突变玉米幼苗缺绿致死

种植7 d后,与野生型相比,突变体在植株大小上差异不明显,但表现出明显的黄化(图1-A)。对60株幼苗进行形态观察发现,黄化苗11株,绿苗39株,表现出1:3的分离比例。

进一步用Mu引物及基因特异性引物可以清楚的辨别出杂合体、野生型及纯合的突变体(图1-B)。PCR鉴定结果表明,所有黄化苗均为Mu转座子插入纯合子;而且,绿苗中杂合体与野生型比例接近2:1。由此,确定黄化表型由*BSD2*基因功能缺失造成,而且符合隐性基因控制的遗传比例。

值得一提的是,在种植后13 d,突变体植株会死亡而野生型生长正常(图1-C),然而突变体和野生型的种子在大小上是没有差异的(图1-D)。

### 2 突变体玉米的光合作用和荧光参数显著下降

播种后10 d测量植株的光合作用指标发现,突变体玉米较野生型的净光合速率显著降低,胞间CO<sub>2</sub>浓度明显升高(数据未列出),说明突变体的光合作用受到了抑制,胞间的CO<sub>2</sub>也没能得到充分的

利用而被剩余。 $F_v/F_m$ 是反映光合系统潜在的光化学效率的指标,一般情况下在0.80~0.85之间,但是突变体中 $F_v/F_m$ 显著降低(表1); $F_v'/F_m'$ 是植物光适应下PSII反应中心的最大光化学效率,显然突变体的光合作用遭到了破坏,不能正常进行; $\Phi_{PSII}$ 指用于光化学反应的光能所占的比例,突变体显著降低表明PSII反应中心的光能捕获效率较低。一系列光合参数的变化表明突变体的光合作用受到了严重的影响。

### 3 RNA-Seq及差异表达基因功能富集分析

为了更好的从转录组水平上研究玉米维管束鞘细胞在植株光合过程中的不可或缺性以及*BSD2*突变对基因表达和各种代谢通路的影响,我们对野生型及突变体植株叶片的不同部位取样进行RNA-Seq测序。一共构建了24个RNA-Seq文库,3个生物学重复。在移除接头和过滤掉低质量的reads后,共获得了241 M的干净reads,其中大约75% (180 M)被比对到玉米B 73 (AGPv3)基因组上。

测序后共得到24 874个基因在玉米叶片表达。统计分析发现,在两个不同发育时期(-1 cm和+4 cm)和2种不同光强处理下,野生型和突变体之间

表1 野生型(WT)与突变体(*bsd2*)玉米植株的各项荧光参数比较

Table 1 The comparison of fluorescence parameters between wild type (WT) and mutant (*bsd2*)

植物材料	$\Phi_{PSII}$	ETR	$q_p$	$F_v/F_m$	$F_v'/F_m'$
野生型	0.63±0.04	1.73±0.11	0.96±0.01	0.82±0.01	0.65±0.04
突变体	0.22±0.04*	0.62±0.14*	0.68±0.09	0.60±0.05*	0.32±0.04*

\*表示差异显著( $P<0.05$ )。

差异表达的基因共有12 163个。不同光强下不同部位的野生型和突变体的差异表达基因个数如图2所示: +4 cm低光(3 765)>+4 cm高光(1 921)>-1 cm高光(621)>-1 cm低光(112)。不管是高光还是低光, +4 cm中的差异基因都要显著的多于-1 cm,说明光对*BSD2*功能有重要影响。只有叶片暴露于光下(+4 cm部位),野生型和突变体基因表达才有明显差异。另外,我们还发现:在+4 cm,低光比高光能诱导更多的差异基因;然而在-1 cm,高光比低光能诱导更多的差异基因。可见,不同组织部位对不同光强的响应差别很大。就样本唯一的差异表达基因个数而言,+4 cm低光最多,高达2 385个;而-1 cm低光最少,仅31个。

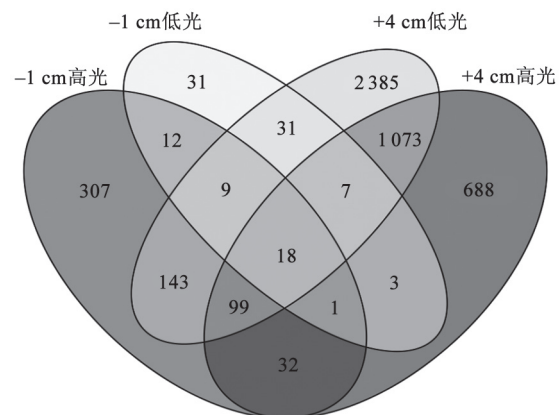


图2 不同光强下不同叶片部位差异表达基因的数目  
Fig.2 The number of differential expressed genes in different parts under different light intensity

此外,在4种条件下均差异显著的基因共18个,其中就包括 $BSD2$ 基因本身,说明另外17个基因不受光强和发育时期的限制在突变体和野生型植株中差异表达,可能与 $BSD2$ 基因关系密切(表2)。

经过统计发现(表3),除了-1 cm高光部位,突变体中均为下调基因多于上调基因,而且+4 cm部位的差异表达基因数目远远多于-1 cm部位的差异表达基因数目。

表2 野生型和突变体植株中显著差异表达的基因

Table 2 The differential expressed genes in wild type (WT) and mutant ( $bsd2$ )

基因	主要基因注释	log <sub>2</sub> (突变体表达量/野生型表达量)			
		-1 cm高光	-1 cm低光	+4 cm高光	+4 cm低光
GRMZM2G062788	BSD2	-4.93	-4.13	-5.62	-5.08
GRMZM2G094742	AO1同源基因	-1.61	-1.53	-0.95	-1.65
GRMZM2G076989	酸性磷酸酶	-4.30	-6.24	-2.81	-5.08
GRMZM2G396477	ARM超基因家族	-2.74	-4.53	-1.98	-2.78
GRMZM2G392791	$\alpha/\beta$ -水解酶超基因家族	-1.86	-3.03	-1.95	-1.75
GRMZM2G071987	NAD(P)-结合家族	-1.92	-2.25	-1.33	-2.09
GRMZM2G079957	AUX/IAA转录因子	-3.51	-3.62	-3.86	-4.26
GRMZM2G131254	RAB1同源基因	-2.01	-3.32	-1.63	-1.76
GRMZM2G508789	未知	-2.10	-2.44	-1.63	-1.67
GRMZM2G518271	未知	-4.67	-6.02	-3.26	-4.31
GRMZM5G801886	未知	-3.57	-3.23	-3.32	-4.62
GRMZM5G861100	未知	-0.64	-1.47	-0.96	-1.19
GRMZM2G016088	未知	-2.03	-2.85	-1.34	-1.37
GRMZM2G044354	未知	-1.16	-2.61	-0.76	-1.51
GRMZM2G119249	未知	-0.80	-2.11	-0.95	-1.82
GRMZM2G167728	未知	-1.07	-2.19	-1.48	-1.81
GRMZM2G703783	未知	-1.21	-2.95	-1.94	-3.14
GRMZM2G415310	未知	0.98	1.56	0.91	0.6

log<sub>2</sub> (fold change)为log<sub>2</sub> (突变体表达量/野生型表达量), 负值表示下调, 正值表示上调。下表同此。

表3 不同条件下差异表达基因的上调或下调数目

Table 3 The upregulated or downregulated number of differential expressed genes with different treatments

不同组分	高光	低光	高光和低光
-1 cm下调	176	77	33
-1 cm上调	445	35	5
+4 cm下调	1244	2007	739
+4 cm上调	677	1758	449

为了进一步了解 $BSD2$ 突变后玉米叶片转录组的变化,我们将差异表达基因根据不同组织(-1 cm、+4 cm)、不同光照处理(高光、低光)分为上调或下调,再对它们分别做基因功能富集分析。在-1 cm部位,高光上调/下调的基因有445/176个,低光上调/下调的基因有35/77个,在高光和低光两种条件下(高光和低光)都上调/下调的基因有5/33个;在+4 cm部位,高光上调/下调的基因有677/1244个,

低光上调/下调的基因有1758/2007个,在高光和低光两种条件下都上调/下调的基因有449/739个(表3)。不难发现,除了-1 cm高光,在其他条件下(如+4 cm低光、+4 cm高光、-1 cm低光)下调的基因都要显著的多于上调的基因。

由于在-1 cm只发现较少的上调或下调的差异表达基因,如预期的那样,仅有少数的代谢通路被富集。相比之下,在+4 cm发现了较多的被富集的代谢通路,如主要碳水化合物代谢与合成、光合相关途径(包括卡尔文循环、碳浓缩机制、光反应和光呼吸)、硫同化、四吡咯生物合成与运输等途径均在高光、低光下调的基因中显著富集;而次要碳水化合物(棉子糖家族)代谢、蛋白质折叠与合成、RNA加工以及非生物胁迫等途径均在高光、低光上调的基因中显著富集(图3)。此外,我们还发现一些代谢通路只在某个数据子集中被富集,如纤维素合成和细胞壁蛋白合成途径只在+4 cm下调低光富集。



图3 差异表达基因功能富集热图

Fig.3 The functional enrichment heat map of differentially expressed genes

灰色表示被富集的功能途径,灰色越深代表被富集的越显著。

#### 4 光合作用等被抑制的代谢路径

*bsd2*突变体幼苗光合作用受到明显抑制,因此,我们非常关心光合作用相关基因的转录变化。由表4可见, -1 cm区域光合基因表达在突变体和野生型中没有明显变化,而在+4 cm区域,无论是生长在高光还是低光条件下,突变体光合相关基因(包括光反应及卡尔文循环相关基因)的表达均明显下降。以+4 cm高光为例,在突变体中,光系统I中光捕获复合物基因(*LHCA1-3*、*LHC5*)和多肽亚基基因(*PSAD*、*PSAE*、*PSAF*、*PSAG*、*PSAH*、*PSAK*、*PSAL*等),光系统II中光捕获复合物基因(*LHCB1.5*、*LHCB6*)和多肽亚基基因(*OHP*、*PSBY*等)的表达量显著减少;卡尔文循环相关基因,包括二磷酸果糖酶基因(*aldolase*)、1,6-二磷酸果糖酶基因(*FBPase*)、磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPA*)、磷酸甘油酸激酶基因(*phosphoglycerate kinase*)、磷酸核酮糖激酶基因(*PRK*)、磷酸核酮糖差向异构酶基因(*RPE*)和景

天庚酮糖-1,7-二磷酸酯酶基因(*SBPase*)的表达都显著降低。此外, Rubisco活化酶基因(*RCA* (rubisco activase))的表达量下降了大约3倍,相应的,2个Rubisco小亚基的表达量分别下降了3.5倍和4.2倍。此外,  $C_4$ 光合相关基因,比如丙酮酸磷酸双激酶基因 *PPDK*和苹果酸脱氢酶基因 *NADP-ME*的表达量也分别下降了4.3倍和3.3倍。在+4 cm叶片区域,共有70个光合相关基因在高光及低光下表现相同的表达趋势,占有差异表达的光合基因的32.1%。

四吡咯在植物光合作用和光呼吸过程中扮演着非常重要的角色(Ryouichi和Ayumi 2007)。四吡咯生物合成与光捕获关系密切,它们均与叶绿素生物合成相关。与叶片光合能力降低相一致,在+4 cm高光中,四吡咯生物合成基因的表达量也显著降低,包括镁螯合酶基因 *GUN5*、镁原卟啉IX甲基转移酶基因 *CHLM* (参与叶绿素生物合成)、原叶绿素酸酯还原酶基因 *PORA*以及 *GUN4* (作为调节因子参与叶绿素合成和细胞内信号转导)。

淀粉和糖合成代谢与光合作用紧密相关。我们总共发现了11个与淀粉和糖合成相关的基因。与光合作用类似,它们的表达量在-1 cm中变化不大,但在+4 cm (不论高光或低光)中都显著地降低了。这些基因包括ADP-葡萄糖焦磷酸化酶基因 *ADG1-2*、淀粉分支酶基因 *SBE2.2*、淀粉合成酶基因 *SSI-4*、淀粉转运子基因 *AAC3*和蔗糖磷酸水解酶基因 *SPPI*和蔗糖磷酸合成酶基因 *SPS4F*等。

#### 5 BSD2功能缺失对转录因子表达的影响

我们共发现了56个差异表达的转录因子(表5)。其中,较多的转录因子是MYB家族成员(11个),其次是bZIP (6个)、bHLH (5个)、C2C2 (Zn) CO-like (5个)和G2-like (5个)。与野生型相比,大多数转录因子的表达量在 *bsd2*突变体中显著下降,包括调控叶绿体发育的 *GLK1*、受蔗糖诱导的负调控因子 *GBF6*和光敏色素相互作用因子 *PIL6*。我们还发现,许多参与激素代谢的转录因子的表达量也显著下降,如参与水杨酸代谢的MYB家族成员 *MYB59*,参与脱落酸代谢的HB家族成员 *HB6*,参与生长素代谢的Aux/IAA家族成员 *IAA2*、*SHY2*, ARF家族成员 *ARF16*、*ARF19*等。此外,我们也发现了一些上调表达的转录因子,如受硝酸盐诱导的参与碳代谢的C2C2(Zn) CO-like类转录因子 *GNC*和参与光调控的bZIP类转录因子 *HY5*等。

表4 光合相关基因的表达变化

Table 4 Expression changes of genes that related to the photosynthesis

基因	主要基因注释	log <sub>2</sub> (突变体表达量/野生型表达量)			
		-1 cm高光	-1 cm低光	+4 cm高光	+4 cm低光
GRMZM2G046284	aldolase	-0.427	-0.128	-2.315	-1.278
GRMZM2G155253	aldolase	-1.143	0.150	-3.637	-2.315
GRMZM2G306732	FBPase	-0.324	-0.039	-2.353	-1.620
GRMZM2G337113	GAPA	-0.381	-0.193	-1.573	-0.737
GRMZM2G162529	PRK	-0.259	0.186	-2.400	-1.700
GRMZM2G026807	RPE	-0.242	0.003	-2.349	-1.706
GRMZM2G162200	RCA	-0.002	-0.047	-1.630	-1.309
GRMZM2G098520	RBCS1A	-0.115	0.205	-1.795	-1.491
GRMZM2G113033	RBCS1A	-0.699	0.007	-2.078	-1.455
GRMZM5G814089	SBPase	-0.259	0.107	-2.251	-0.955
GRMZM2G085019	NADP-ME	-0.179	0.148	-1.743	-1.210
GRMZM2G097457	PPDK	-0.095	0.225	-2.107	-1.589
GRMZM2G010884	LHCA3	-0.336	0.189	-1.652	-0.399
GRMZM2G036880	LHCA1	-0.715	-0.318	-3.932	-2.097
GRMZM2G038519	LHCA2	-0.425	-0.098	-1.229	-0.475
GRMZM2G072280	LHCA2	0.212	-0.270	-1.395	-0.944
GRMZM2G103101	LHCA5	-0.546	-0.080	-1.750	-1.343
GRMZM2G012397	PSAK	-0.310	0.052	-1.955	-0.262
GRMZM2G013342	PSAD	-0.388	0.122	-1.926	-1.123
GRMZM2G016066	PSAE	-0.552	-0.481	-1.947	-1.099
GRMZM2G016622	PSAE	-0.361	0.005	-2.131	-1.886
GRMZM2G017290	PSAF	-0.139	0.034	-1.829	-0.954
GRMZM2G094224	PSAL	-0.628	0.017	-1.788	-0.799
GRMZM2G329047	PSAG	-0.642	0.045	-2.599	-0.483
GRMZM2G377855	PSAG	-0.772	-0.210	-1.528	-0.858
GRMZM2G451224	PSAH	-0.181	-0.054	-1.048	-0.783
GRMZM2G092427	LHCB6	-0.905	-0.279	-1.348	-0.509
GRMZM2G155216	LHCB1.5	-1.410	-0.115	-2.775	-1.290
GRMZM2G012324	OHP	-0.298	0.000	-2.242	-1.038
GRMZM2G134130	PSBY	-1.839	-0.122	-1.481	-0.249
GRMZM2G308944	PSBY	-0.554	-0.396	-1.134	-0.507

## 6 荧光定量PCR验证RNA-Seq结果

为了进一步验证RNA-Seq结果的可靠性,我们对12个不同的基因进行了qRT-PCR定量分析。突变体和野生型的相对表达结果显示与RNA-Seq结果的高度相似性。 $-1$  cm部位的 $R^2=0.8634$ ,  $+4$  cm部位的 $R^2=0.860$ 。

## 讨 论

玉米突变体 $bsd2$ 植株花环结构维管束鞘细胞叶绿体结构异常而叶肉细胞中的叶绿体正常(Brutnell等1999),因而 $bsd2$ 突变体是研究玉米光合细胞分化的好材料(Hall等1998)。

从形态上看,野生型和 $bsd2$ 的种子大小不存在差异。由于玉米籽粒中的贮存营养可供植株早期的萌发与生长,所以二者在幼苗时期的长势基本一致。但在叶片见光进行光合作用时( $+4$  cm叶片区域),野生型的 $F_v/F_m$ 接近植物在非胁迫条件下生长的平均值 $0.832\pm 0.004$  (Björkman和Demmig 1987; 肖华贵等2013),而 $bsd2$ 的 $F_v/F_m$ 只有野生型的73.1%,并且PSII反应中心的光能捕获效率明显降低。与之相对应,光合光反应及卡尔文循环有关基因,包括 $LHC5$ 、 $FBPase$ 、 $PRK$ 等在突变体的表达均明显下降。前人western blot研究表明 $bsd2$ 玉米突变体中缺乏Rubisco蛋白的积累,推测 $BSD2$ 基因

表5 野生型及突变体转录因子表达比较

Table 5 Expression comparison of transcription factors between wild type (WT) and mutant (*bsd2*)

基因	转录因子类别	log <sub>2</sub> (突变体表达量/野生型表达量)			
		-1 cm高光	-1 cm低光	+4 cm高光	+4 cm低光
GRMZM2G029323	AP2/EREBP	0.746	-0.058	-0.909	-0.754
GRMZM2G169820	ARF	-0.263	0.077	-1.585	-1.273
GRMZM2G386674	AS2	1.198	-0.312	-2.851	-1.672
GRMZM2G079957	Aux/IAA	-3.508	-3.869	-3.624	-4.266
GRMZM2G042895	bHLH	-0.986	-1.084	-4.051	-3.953
GRMZM2G445575	bZIP	-0.526	-0.166	-2.874	-2.014
GRMZM2G144346	C2C2(Zn) CO-like	-0.817	-0.008	-3.159	-0.320
GRMZM2G089448	C2H2	-0.503	0.528	-2.270	-1.932
GRMZM2G107491	C3H	-0.109	0.293	-1.218	-0.780
AC234155.1_FG002	G2-like	0.196	0.492	-2.366	-1.682
GRMZM2G179325	GRAS	-1.319	-1.211	-0.704	-1.697
GRMZM2G041127	HB	-0.257	0.082	-2.898	-3.179
GRMZM2G105348	HSF	0.484	0.498	1.889	3.054
GRMZM2G150260	MYB	-1.719	1.110	-4.049	-1.957
AC203535.4_FG002	NAC	-0.140	0.811	-2.433	-0.915
GRMZM2G142751	TCP	-0.270	-0.192	-2.067	-1.520
GRMZM2G375307	Trihelix	0.335	0.036	-1.694	-1.652
GRMZM2G414844	zf-HD	2.291	-0.334	1.971	0.954

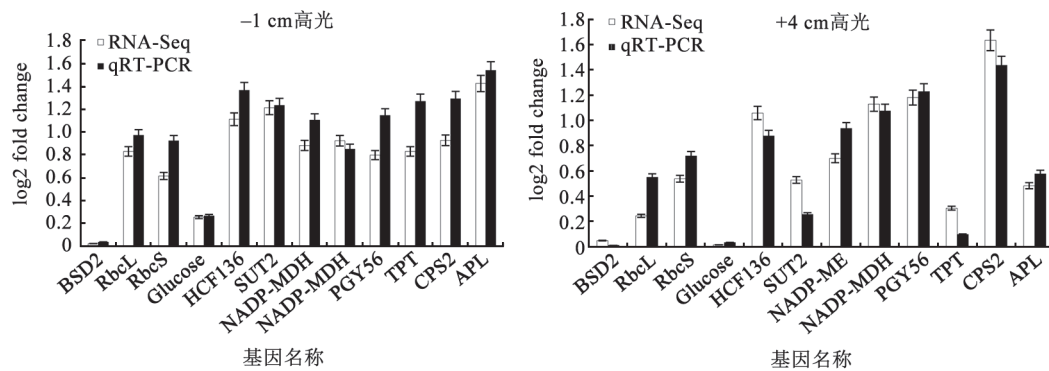


图4 RNA-Seq与qRT-PCR结果比较

Fig.4 The comparison of results between RNA-Seq and qRT-PCR

log<sub>2</sub> fold change代表log<sub>2</sub> (突变体表达量/野生型表达量)。

是通过调控Rubisco的组装而影响光合。我们也发现, Rubisco活化酶(RCA)的表达量下降了大约3倍, rubisco小亚基的表达量平均下降3.8倍, 与前人结论一致。此外, 我们还发现突变体中四吡咯合成受阻。四吡咯生物合成与叶绿素生物合成密切相关, 直接影响到植物叶片的光捕获能力(Lee等2011)。四吡咯生物合成关键基因, 如*GUN5*、*CHLM*、*PORA*等在突变体中的表达明显降低可能是突变体叶片黄化, 光合能力降低的重要原因。无论是高光和还是低光处理突变体幼苗, 光合及四吡

咯合成途径基因表达变化趋势一致, 证明*BSD2*基因的缺失的确影响了光合及叶绿素的生物合成。

有趣的是, 在玉米叶片尚未见光的源库转换区-1 cm区域(Li等2010), 基因转录受*BSD2*缺失影响较小。与野生型相比, 高光下只有621个基因在此处差异表达, 低光下只有112个基因在此处差异表达, 在高光及低光下均差异表达的受*BSD2*缺失影响的基因仅有38个, 说明光对*BSD2*发挥功能起重要影响。

转录因子对基因表达起重要的调控作用。我

们发现一系列影响叶绿素合成及糖代谢的转录因子如GLK1、GBF6在突变体中的表达量明显降低,与光合卡尔文循环活性降低相一致。而参与碳氮均衡的转录因子GNC及参与光调控的bZIP类转录因子HY5表达量上升,证明突变体体内的光信号及碳氮均衡受到了影响。对这些受BSD2突变影响的转录因子进行进一步的研究将有助于揭示C<sub>4</sub>光合的转录调控。

本研究从转录水平上揭示了BSD2基因的功能及其在玉米C<sub>4</sub>光合作用中的重要性,为深入研究C<sub>4</sub>光合提供了基础,从而为研究C<sub>3</sub>植物的C<sub>4</sub>改造提供了理论基础。

### 参考文献

- Björkman O, Demmig B (1987). Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170 (4): 489–504
- Brown WV (1975). Variations in anatomy, associations and origins of kranz tissue. *Amre J Bot*, 62 (4): 395–402
- Brutnell TP, Sawers RJH, Mant A, Langdale JA (1999). BUNDLE SHEATH DEFECTIVE2, a novel protein required for post-translational regulation of the *rbcl* gene of maize. *Plant Cell*, 11 (5): 849–864
- Crespo HM, Freaux M, Cresswell CF, Tew J (1979). The occurrence of both C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> photosynthetic characteristics in a single *Zea mays* plant. *Planta*, 147 (3): 257–263
- Esau K (1943). Ontogeny of the vascular bundle in *Zea mays*. *Hilgardia*, 15: 327–368
- Hall LN, Roth R, Brutnell TP, Langdale JA (1998). Cellular differentiation in the maize leaf is disrupted by bundle sheath defective mutations. *Soc Expr Biol Med*, 51: 27–31
- Hatch MD (1978). Regulation of enzymes in C<sub>4</sub> photosynthesis. *Curr Top Cell Reg*, 14: 1–27
- Jiang WY, Li Z, Zhang HL, Zhang FZ, Guo IL, Zhu YS (2013). Effect of light density on kranz structure of leaves in different position of maize seedling. *J Henan Agr Sci*, 42 (2): 34–37 (in Chinese with English abstract) [姜雯宇, 李智, 张红亮, 张福珍, 郭丽丽, 朱延姝(2013). 光强对玉米幼苗不同叶位叶片花环结构的影响. *河南农业科学*, 42 (2): 34–37]
- Lee M, Kim JH, Lee SH, Lee SH, Park CB (2011). Biomimetic artificial photosynthesis by light-harvesting synthetic wood. *Chem Sus Chem*, 4 (5): 581–586
- Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, Kebrom TH, Provart N, Patel R, Brutnell TP, et al (2010). The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nat Genet*, 42 (12): 1060–1067
- Nelson AT, Langdale JA (1992). Developmental genetics of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 43 (4): 25–47
- Nishioka D, Miyake H, Taniguchi T (1996). Suppression of granal development and accumulation of rubisco in different bundle sheath chloroplast of the C<sub>4</sub> succulent plant *portulaca grandiflora*. *Anna Bot*, 77 (6): 629–637
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010). edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26 (1): 139–140
- Roth R, Lisa NH, Brutnell TP, Langdale JA (1996). *Bundle sheath defective2*, a mutation that disrupts the coordinated development of bundle sheath and mesophyll cells in the maize leaf. *Plant Cell*, 8 (5): 915–927
- Russell SH, Evert RF (1985). Leaf vasculature in *Zea mays*. *Planta*, 164 (4): 448–458
- Ryouichi T, Ayumi T (2007). Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Revi Plant Biol*, 58 (1): 321–346
- Suresh VK, Tellabati M, Nelli RK, White GA, Perez BB, Sebastian S, Slomka MJ, Brown IH, Stephen PD, Kin CC, et al (2012). *18S rRNA* is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells. *Vir J*, 9 (1): 230
- Wang JL, Long JJ, Hotchkiss T, Berry JO (1993). C<sub>4</sub> photosynthetic gene expression in light- and dark-grown amaranth cotyledons. *Plant Physiol*, 102 (4): 1085–1093
- Wang L, Si Y, Dedow LK, Shao Y, Liu P, Brutnell TP (2011). A low-cost library construction protocol and data analysis pipeline for Illumina-based strand-specific multiplex RNA-seq. *PLoS ONE*, 6 (10): e26426
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10 (1): 57–63
- Williams LE, Kennedy RA (1978). Photosynthetic carbon metabolism during leaf ontogeny in *Zea mays*: enzyme studies. *Planta*, 142 (3): 269–274
- Xiao HG, Yang HW, Rao Y, Yang B, Zhu Y (2013). Photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence kinetic parameters analyses of chlorophyll-reduced mutant in *Brassica napus* L. *Acta Agro Sin*, 39 (3): 520–529 (in Chinese with English abstract) [肖华贵, 杨焕文, 饶勇, 杨斌, 朱英(2013). 甘蓝型油菜黄化突变体的光合特性及叶绿素荧光参数分析. *作物学报*, 39 (3): 520–529]
- Yang M, Li HL, Xie J, Luo HY (2007). Ribulise-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). *Plant Physiol Com*, 43 (2): 363–368 (in Chinese with English abstract) [杨梅, 李海蓝, 谢晋, 罗红艺(2007). 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco). *植物生理学报*, 43 (2): 363–368]



## Transcriptome analysis on the maize photosynthetic mutant *bsd2* (*bundle sheath defective II*)

JIANG Fang<sup>1\*</sup>, DING Ze-Hong<sup>2\*</sup>, DONG Lei<sup>3</sup>, LI Ping-Hua<sup>4,\*\*</sup>

<sup>1</sup>College of Agronomic Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China; <sup>2</sup>Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China; <sup>3</sup>College of Agronomic Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; <sup>4</sup>College of Agronomic Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

**Abstract:** As a typical C<sub>4</sub> plant, maize (*Zea mays*) has specifically anatomical structure—‘Kranz structure’ and unique CO<sub>2</sub> concentration mechanism. Then it has high photosynthetic efficiency. Nucleus-encoded *BSD2* gene expresses mainly in the bundle sheath cells of C<sub>4</sub>-Kranz structure and its deficiency perturbs the chloroplast biosynthesis. In this study, we utilized RNA-Seq technology to monitor the transcriptome changes in different leaf sections between wild type and *bsd2* mutant under different light intensity. The results indicated that the deficiency of *BSD2* gene had little effect on the leaf sections that had not exposed to the light. However, for the leaf sections that exposed to the light, the transcriptome was dramatically influenced by the mutation of *BSD2*, with genes that involved in photosynthesis, starch and sugar metabolism and tetrapyrrole biosynthesis were significantly repressed and the genes related to the protein metabolism and RNA processing were significantly induced. Our research revealed the important function of *BSD2* gene on the photosynthesis at the transcriptome level, which provides valuable information for understanding the mechanism of C<sub>4</sub> photosynthesis.

**Key words:** *Zea mays*; C<sub>4</sub> photosynthesis; bundle sheath cell; *bundle sheath defective II* mutant (*bsd2*); RNA sequencing (RNA-Seq)

---

Received 2016-04-08 Accepted 2016-07-12

This work was supported by the National Science Foundation of China (Grant No. 31271393).

\*Co-first author.

\*\*Corresponding author (E-mail: pinghuali@sdau.edu.cn).