

基于转录组和蛋白互作网络分析光信号在花药发育过程中的功能和可能机制

阮林伟, 付莹, 王梦涵, 李梦雨, 马红, 常芳*

复旦大学生命科学院, 植物科学研究所, 上海200438

摘要: 花药是被子植物重要的雄性生殖器官, 其正常发育对植物的有性生殖和作物产量至关重要。花药的发育受到外在环境因子和内在信号的共同调控。光是植物生长和发育的重要环境因子之一, 影响着植物生长的各个方面, 然而对于光是否参与以及如何参与花药发育的调控过程, 却鲜有报道。本文研究发现: 光相关基因有752个(96.66%)在野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 4~7期花药中表达, 其中246个高表达, 33个极高表达; 655个在6~7期绒毡层、633个在8~10期绒毡层高表达, 推测这些基因可能在花药发育中发挥功能。进一步分析光相关基因在花药发育重要转录因子突变体*dyt1-3*、*bhlh010* *bhlh089* *bhlh091*、*ams*中的表达变化, 挖掘到一批受这些转录因子调控的光信号基因, 暗示这些光相关基因作为DYT1-bHLHs-AMS转录网络的下游元件发挥功能; 通过酵母双杂交实验筛选到与bHLH010、bHLH089、bHLH091、DYT1有相互作用的光系统以及光信号转导途径相关的蛋白, 绘制了这些蛋白的相互作用网络。本文的研究为深入揭示光信号基因在花药发育中发挥的作用和调控网络提供新的认识和参考。

关键词: 花药发育; 光信号; 转录组; 蛋白互作网络; DYT1

开花植物的雄性生殖器官雄蕊由花药和花丝两部分组成, 花药通常包含4个药室, 每个药室内都可以完成花粉粒的发育。雄性生殖发育包括花分生组织中雄蕊的起始和生殖细胞以及包括绒毡层在内的体细胞层的形成, 随后减数分裂细胞和绒毡层细胞进行发育以支撑花粉的发育, 同时配子体的基因在花粉发育中发挥着重要的作用(Chang等2011)。每个药室从外到内依次由表皮、药室内壁、中间层和绒毡层组成, 其中表皮来自L1层细胞, 药室内壁、中间层和绒毡层细胞来自L2层细胞(Scott等2004; Ma 2005)。绒毡层细胞是花药壁细胞中最内的一层细胞, 与花粉囊中花粉母细胞直接相邻, 绒毡层细胞为小孢子提供营养、分泌胼胝质酶, 分解围绕着进行减数分裂的四分体胼胝质壁释放出的单倍体小孢子, 并为花粉外壁的生物合成提供前体(Wu和Cheung 2000; Parish和Li 2010), 因此在花药发育过程中发挥着重要的作用。

目前已有研究表明, 在雄蕊花药发育过程中发挥重要作用的基因有DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (*DYT1*)、ABORTED MICROSPORES (*AMS*)、BASIC HELIX LOOP HELIX PROTEIN 010 (*bHLH010*)、BASIC HELIX LOOP HELIX PROTEIN 089 (*bHLH089*)、BASIC HELIX LOOP HELIX PROTEIN

(*bHLH091*)等。*DYT1*编码bHLH家族的转录因子, 在花药的第5期和第6期的绒毡层中有较高的表达, *dyt1*突变体中花药的绒毡层空泡化, 绒毡层降解异常且不断膨胀, 在减数分裂细胞进行胞质分裂前被降解; *dyt1*植株果荚短小, 不能形成花粉和种子(Zhang等2006)。此外受DYT1调控的下游基因主要参与包括脂质代谢、细胞壁形成和次级代谢等花粉发育的生物学过程(Feng等2012)。*AMS*编码MYC亚家族的bHLH转录因子, 在*ams*突变体中, 小孢子在未进行有丝分裂前进入降解过程, 绒毡层细胞异常膨大、液泡化, 最终小孢子和绒毡层降解, 花丝变短, 不能形成花粉粒, 植株表现出雄性不育(Sorensen等2010)。对*ams*突变体的花苞进行转录组分析, 发现有很多个与绒毡层功能和花粉壁形成相关的基因的表达量发生了变化(Xu等2010)。*bHLH010*、*bHLH089*和*bHLH091*是序列相似性较高且在绒毡层中有较高表达的bHLH家族转录因子, 能和DYT1互作形成复合体, 帮助DYT1入核, 促

收稿 2018-10-24 修订 2019-01-30

资助 国家自然科学基金(31470282)。

致谢 复旦大学生命科学院遗传工程国家重点实验室质谱平台对课题提供设备和技术支持。

* 通讯作者(fangchang@fudan.edu.cn)。

进其在花药发育中的功能(Cui等2016)。*bHLH010*、*bHLH089*、*bHLH091*这三个基因的单突植物育性正常,但是双突会造成绒毡层发育异常、四分体胼胝质降解延迟以及花粉败育,暗示这三个基因存在功能冗余,且与*DYT1*功能类似,调控绒毡层的发育(Zhu等2015)。

光是植物生长和发育重要的影响因子之一,植物通过感受不同波长和方向的光,经过复杂的响应和传递,调节种子萌发、光形态建成、叶绿体发育、庇荫反应、生物节律、气孔开闭到开花和衰老的各个生物学过程(Jiao等2007; Heijde和Ulm 2012)。植物的开花过程受到多种调控途径的协同作用,众多调控途径之一就是光周期途径(Andrés和Coupland 2012)。蓝光受体CRYPTOCHROME 2 (CRY2)通过磷酸化和泛素化最终被降解,在调控植物光周期方面起着重要的作用(Yu等2007)。CRYPTOCHROME-INTERACTING BASIC-HELIX-LOOP-HELIX 1 (CIB1)、CIB2、CIB4、CIB5是一类bHLH的同源蛋白,可结合开花途径中关键因子FT启动子的E-box原件,激活其转录,而CRY2通过与CIBs蛋白互作,促进FLOWERING LOCUS T (FT)的表达,进而调节植物的开花过程(Liu等2008)。定位在核内的EMPFINDLICHER IM DUNKEL-ROTEN LICHT 1 (EID1)蛋白在幼苗的光形态建成、开花等过程中发挥功能(Koops等2011)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)隐花色素CRY2参与了开花的光周期途径(Guo等1998),与CONSTANS (CO)、FT、GIGANTEA (GI)一样,也通过光周期途径控制植物开花(Koornneef等1998)。有报道CRYPTOCHROME 1 (CRY1)通过抑制PHYTOCHROME B (PHYB)的表达促进植物开花((Exner等2010; Franklin和Quail 2010), CRY1和CRY2是功能冗余的蓝光受体。目前在水稻(*Oryza sativa*)和小麦(*Triticum aestivum*)中均有光敏核不育型的报导,且对于光敏核不育的水稻和小麦的调控机理和遗传机制有了较多的说明,已经知道在该过程发挥作用的PHOTO-PERIOD-SENSITIVE GENIC MALE-STERILE (PMS1)和PMS2两个基因控制植物的雄性育性(Liu等2001),然而,在拟南芥中有关光周期相关的报导却不甚多见。

为了揭示光合及光信号转导途径在花药发育过程中的功能和可能的作用机制,本文通过转录组数据分析及蛋白网络的构建,明确了在拟南芥花药4~7期高表达的光合及光信号转导途径相关基因,挖掘到一批在转录因子突变体中(*bhlh010 bhlh089 bhlh091*、*dyl1-3*、*ams*)表达发生变化的基因,并通过互作网络阐明了其与花药关键转录因子间的相互作用。这些结果暗示了光信号在花药发育过程中可能的重要作用,并为深入研究花药发育和光信号之间的关系提供了重要参考。

1 材料与方法

1.1 转录组数据

本文所用拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]材料均为哥伦比亚生态型(Columbia-0, Col-0)背景。野生型、*bhlh010 bhlh089 bhlh091*三突变体以及*dyl1-3*突变体的4~7期花药转录组数据均来自于实验室前期发表文章(Feng等2012; Zhu等2015),*ams*转录组数据来源于已发表文章(Ma等2012),绒毡层的转录组数据来源于Li等(2017)。

1.2 拟南芥光系统、光信号转导相关GO类别与基因的筛选

在欧洲生物信息学中心(European Bioinformatics Institute)的QuickGO网站(<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>)上筛选得到的与“light”相关的拟南芥生物学过程(biological process)所有GO,并下载其GO类别与基因。

1.3 转录组数据分析

利用DAVID网站(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行GO富集分析,并利用Draw Venn Diagram网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)进行不同基因列表的比较分析。

1.4 蛋白网络绘制工具

利用Cytoscape 3.6.1软件(<https://cytoscape.org/>)将酵母核系统筛库所得蛋白互作关系绘制成网络图。

1.5 酵母核系统筛库

本文酵母核系统筛库操作流程按照TaKaRa公司的Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (cat. No. 630489)进行操作。以*bHLH010*、*bHLH089*、

bHLH091及DYT1为诱饵蛋白进行自激活检验与毒性检验, 载体不存在自激活, 且对酵母没有毒性后, 用以上4个诱饵蛋白筛选拟南芥花药cDNA文库, 将含有诱饵蛋白的Y2H Gold酵母分别与含有拟南芥花药cDNA文库的Y187酵母进行共培养, 挑选共培养成功的菌落涂在SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/AbA固体平板上, 培养3~5 d后将蓝色菌落点在SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA平板上, 继续培养2~3 d直至长出菌落, 用通用引物PCR扩增出目的片段, 将产物送测序鉴定筛选到的靶Prey基因。

2 实验结果

2.1 光合及光信号转导相关基因在花药中的表达情况

根据QuickGO网站信息, 模式生物拟南芥中“光(light)”相关基因共有778个, 为了明确这些基因在花药发育过程中是否发挥功能, 我们首先关注了它们在花药中的表达情况。通过检索本实验室前期拟南芥哥伦比亚生态型背景野生型4~7期花药转录组数据, 将这些光基因的RPKM (reads per kilo bases per million reads)数据绘制成频数分布直方图(如图1-A), 以观察光相关基因在野生型4~7期花药

中的表达情况: 有26个(3.34%)光相关基因不表达 [$\log_2(\text{RPKM}+1)=0$], 有473个(60.80%)光相关基因有表达 [$0 < \log_2(\text{RPKM}+1) < 5$], 246个(31.62%)光相关基因高表达 [$5 < \log_2(\text{RPKM}+1) < 8$], 33个(4.24%)光相关基因 [$8 < \log_2(\text{RPKM}+1) < 12$]极高表达。光相关基因在野生型花药转录组中有如此高比例的表达情况, 暗示光在花药发育过程中可能发挥重要功能。

为了研究在花药发育中有高表达的光基因参与了哪些生物学过程, 通过DAVID网站对279个高表达的光基因 [$\log_2(\text{RPKM}+1) > 5$]进行富集分析, 按照FDR从大到小的顺序取前20个通路(FDR < 0.05), 如图1-B, 这个通路主要富集于“响应光刺激通路(response to light stimulus)”、“红光和远红光转导通路(red, far-red light phototransduction)”、“光形态建成通路(photomorphogenesis)”、“调节昼夜节律过程(circadian rhythm)”等20个生物学途径; 同时发现, “响应光刺激通路(response to light stimulus)”富集程度最高, “光周期和开花过程(photoperiodism, flowering)”、“长光周期和开花过程(long-day photoperiodism, flowering)”这两个途径的富集程度也较高。以上功能富集情况进一步暗示光信号途径在花药发育过程中可能发挥重要作用。

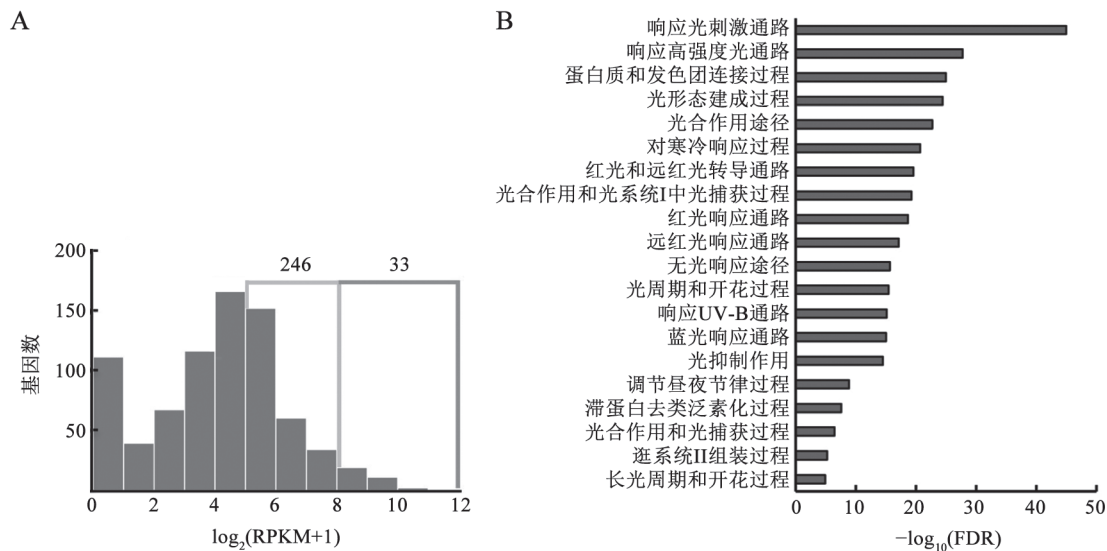


图1 光相关基因在花药4~7期表达及富集分析

Fig.1 Expression and enrichment analysis of light-related genes in stages 4-7 anthers

A: 778个光相关基因在野生型植株4~7期花药转录组中表达水平。横坐标 $\log_2(\text{RPKM}+1)$ 表示表达水平, 纵坐标表示在每一个表达区间内分布的基因数。B: 778个光相关基因的功能聚类分析。横坐标 $-\log_{10}(\text{FDR})$ 表示相关过程的富集程度。

2.2 光合及光信号转导相关基因在花药绒毡层的表达情况

众所周知,在花药的5层细胞中,外侧的4层体细胞组成了花药壁结构,最内层细胞为生殖细胞。作为紧邻生殖细胞的一层体细胞,绒毡层为花粉母细胞及花粉的发育提供必要的营养物质及外壁合成物质,其发育是否正常对雄性育性至关重要。为了分析光相关基因是否在花药绒毡层发挥作用,我们首先分析了这些基因在绒毡层的表达情况。

我们将778个光相关基因与杨仲南老师课题组发表的野生型花药6~7期绒毡层和8~10期绒毡层的转录组数据(Li等2017)比对分析后发现(如图2-A):在6~7期绒毡层中高表达的光相关基因有655个(命名为a+c组),占总光基因数的84.2%;在8~10期绒毡层中表达的光相关基因有633个(命名为b+c

组),占总光基因数的81.4%;在两个时期的绒毡层均有表达的有596个(命名为c组),占光基因数的76.6%。由此可见,大部分光相关基因均在绒毡层中表达,暗示光相关基因可能参与绒毡层的发育和调控过程。

为了进一步获知这些基因在绒毡层中的具体表达情况,我们将上述花药6~7及8~10期花药绒毡层表达基因根据RPKM数据绘制成频数分布直方图。我们发现:在6~7期花药绒毡层中有2个(0.31%)光相关基因不表达[$\log_2(\text{RPKM}+1)=0$], 508个(77.56%)光相关基因有表达[$0 < \log_2(\text{RPKM}+1) < 5$], 126个(19.23%)光相关基因高表达[$5 < \log_2(\text{RPKM}+1) < 8$], 19个(2.90%)光相关基因极高表达[$8 < \log_2(\text{RPKM}+1)$] (图2-B); 在8~10期的绒毡层中有2个(0.32%)光表达基因不表达[$\log_2(\text{RPKM}+1)=0$], 493个(77.88%)光相关基因表达[$0 < \log_2(\text{RPKM}+1) < 5$],

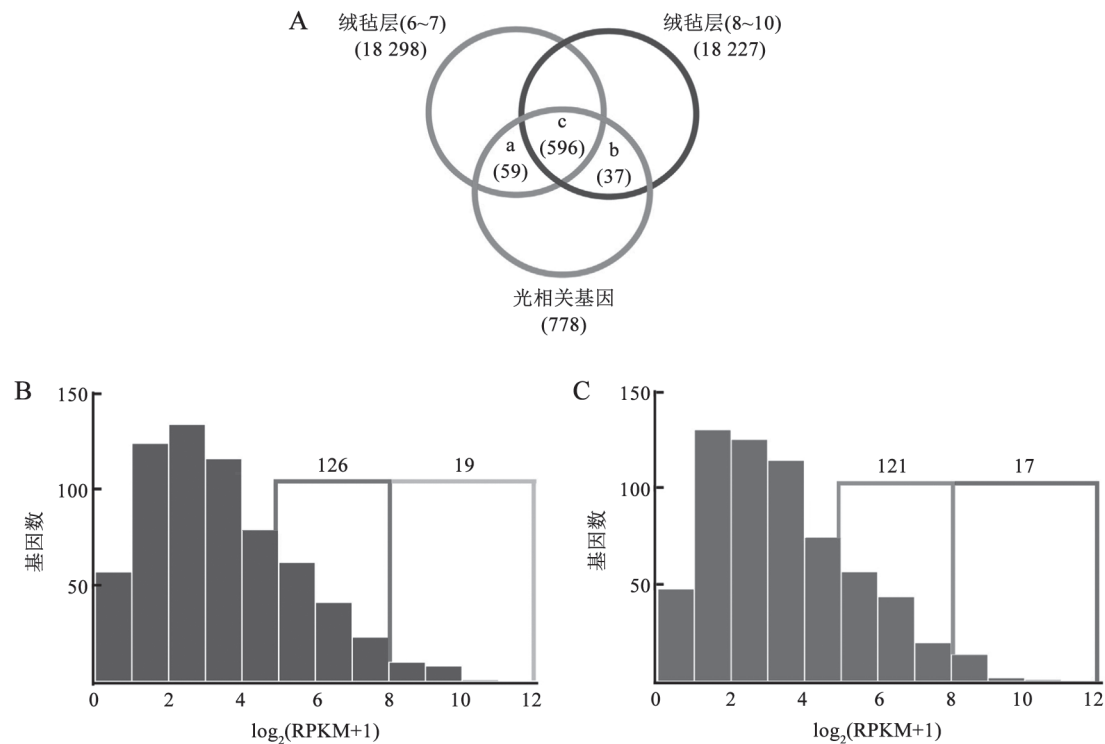


图2 光相关基因在花药6~7期及8~10期绒毡层中的表达分析

Fig.2 Expression analysis of light-related genes in tapetum of stages 6-7 and 8-10 anthers

A: 维恩图显示6~7期、8~10期绒毡层表达基因与778个光相关基因之间的比较分析。a表示只在6~7期绒毡层中有表达的59个光基因, b表示只在8~10期绒毡层中有表达的37个光基因, c表示在6~7期和8~10期绒毡层中均有表达的596个光基因。B: 光基因在6~7期绒毡层转录组中的表达情况, 对应A中a+c。C: 光基因在8~10期绒毡层转录组中的表达情况, 对应A中b+c。

121个(19.1%)光相关基因高表达[$5 < \log_2(\text{RPKM}+1) < 8$], 17个(2.69%)光相关基因极高表达[$8 < \log_2(\text{RPKM}+1)$] (图2-C)。上述结果再次说明, 超过99%的光相关基因在绒毡层表达或高表达[$5 > \log_2(\text{RPKM}+1)$], 并且高表达的基因数在两个时期均超过20%, 进一步暗示了光相关基因在绒毡层发育过程中可能存在重要功能。

我们进一步分析了在6~7和8~10期绒毡层极高表达的23个光相关基因表达量的变化, 包括6~7期绒毡层中极高表达的19个光基因和8~10期绒毡层中有极高表达的17个基因。如图3的热图所示, *ATTIL*、*COR15A*、*ROC1*、*LHCA4*、*LHCB1.5*、*LHCB4.1*、*LHCB3*、*SAC52*、*SAG24*等基因在6~7和8~10期的绒毡层中均高水平表达, 说明该基因在绒毡层整个

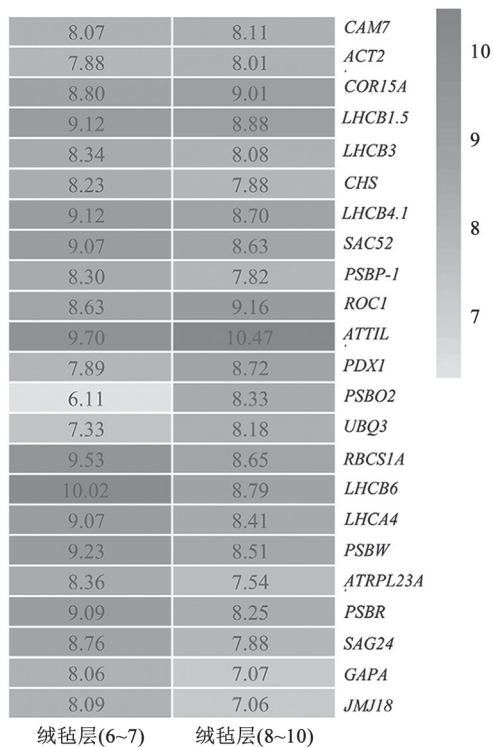


图3 热图显示极高表达的光相关基因在6~7期和8~10期绒毡层中表达情况

Fig.3 Heat map shows the expression of extremely-highly-tapetum-expressed light-related genes in stages 6-7 and 8-10 tapetal cells

在6~7和8~10期绒毡层中有极高表达[$8 < \log_2(\text{RPKM}+1)$]的23个光相关基因的表达量变化情况, 数字表示该基因的 $\log_2(\text{RPKM}+1)$ 值。

发育过程中都发挥至关重要的作用; *LHCB6*、*JMJ18*、*GAPA*在6~7期绒毡层呈现更高的表达水平, 暗示其在早期绒毡层发育中发挥更重要的作用; 而*PSBO2*、*UBQ3*则在8~10期绒毡层呈现更高的表达水平, 说明其在晚期绒毡层发育中发挥更重要的作用。

2.3 光相关基因在DYT1相关绒毡层转录调控网络突变体中表达发生变化

迄今的研究已揭示了*DYT1-bHLH010/bHLH089/bHLH091-AMS*转录调控网络在调控绒毡层的功能、维持正常雄性育性方面发挥重要作用, 那么上述光相关基因是否参与到这一转录调控网络中呢? 为此, 我们通过转录组数据深入分析了光基因在*dyl*、*bhlh010 bhlh089 bhlh091*、*ams*突变体花药中的表达变化情况, 结果表明: 22个光相关基因在*dyl-3*突变体中、45个在*bhlh010 bhlh089 bhlh091*三突变体中、32个在*ams*突变体中显著差异表达。将这三个突变体中差异表达的光基因进一步比较分析, 结果如图4和表1所示: 仅在*bhlh010 bhlh089 bhlh091*中差异表达的光基因有41个(命名为A组), 仅在*dyl*中差异表达的光基因有15个(命名为B组), 仅在*ams*中差异表达的光基因有26个(命名为C组), 在*bhlh010 bhlh089 bhlh091*和*dyl*中都差异表达的光基因有2个(命名为D组), 在*bhlh010 bhlh089 bhlh091*和*ams*中都差异表达的光基因有1个(命名为E组), 在*dyl*和*ams*中都差异表达的光基因有4个(命名为F组), 在*bhlh010 bhlh089 bhlh091*、*dyl*和*ams*中都差异表达的基因有1个(命名为G组)。其中, D组中基因包括在响应无光中发挥功能的*DARK INDUCIBLE 9 (DIN9)*和在开花调节中有功能的*CYCLING DOF FACTOR 5 (CDF5)*; E组中基因包括对红光或远红光起作用的*GIBBERELLIN 2-OXIDASE 4 (GA2OX4)*; F组中包括响应光刺激的*LIGHT SENSITIVE HYPOCOTYLS 6 (LSH6)*, 参与光形态发生正向调节的*B-BOX DOMAIN PROTEIN 20 (BZS1)*, 响应红光和参与庇荫的*CYTOCHROME P450 FAMILY 83 SUBFAMILY B POLYPEPTIDE 1 (CYP83B1)*以及响应高强度光的*FE SUPEROXIDE DISMUTASE 1 (ATFSD1)*; G组中有调节光周期和开花的*SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 21 (SAG21)*, 且该基

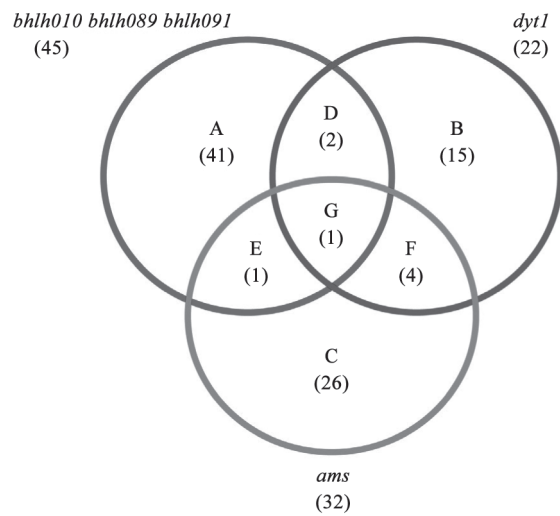


图4 光相关基因在*dyt1*、*bhlh010 bhlh089 bhlh091*和*ams*突变体花药中的差异表达分析

Fig.4 Comparison of differentially expressed light-related genes in *dyt1*, *bhlh010 bhlh089 bhlh091* and *ams* mutant anthers

A组为仅在*bhlh010 bhlh089 bhlh091*中差异表达的41个光基因, B组为仅在*dyt1*中差异表达的15个光基因, C组为仅在*ams*中差异表达的26个光基因, D组为在*bhlh010 bhlh089 bhlh091*和*dyt1*中都差异表达的2个光基因, E组为在*bhlh010 bhlh089 bhlh091*和*ams*中都差异表达的1个光基因, F组为在*dyt1*和*ams*中都差异表达的4个光基因, G为在*bhlh010 bhlh089 bhlh091*、*dyt1*和*ams*中都差异表达的1个光基因。表1同。

因是3种转录因子中表达都发生变化的光相关基因, 这将是研究光和生殖发育的一个重要的突破口。以上这些基因参与植物光周期的很多过程, 在三

种转录因子的突变体中, 光相关基因的表达量均发生了变化, 说明DYT1-bHLH010/089/091-AMS转录网络调控这些基因的功能, 或者这些基因参与到DYT1-bHLH010/089/091-AMS绒毡层转录网络调控绒毡层功能。

2.4 多种光相关蛋白与bHLH010、bHLH089、bHLH091、DYT1蛋白有相互作用

有趣的是, 我们不仅发现光相关基因在花药及绒毡层的高水平表达, 部分光相关基因参与到DYT1-bHLH010/089/091-AMS绒毡层转录网络, 同时在我们以*bHLH010*、*bHLH089*、*bHLH091*和*DYT1*的编码序列全长作为诱饵蛋白筛选到的相互作用蛋白中, 也发现了和诱饵蛋白有相互作用的光相关蛋白。其中, 6种光信号蛋白和DYT1相互作用, 10种光信号蛋白和bHLH010相互作用, 5种光信号蛋白和bHLH089, 25种光信号蛋白和bHLH091相互作用。将这几组筛选到的光系统相关蛋白进行对比, 我们发现LHCB3 (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-BINDING PROTEIN 3)与四种转录因子均有相互作用。*LHCB3*编码捕光叶绿素B结合蛋白3, 是光系统II的主要捕光复合物叶绿素a/b-蛋白质的组成部分, 在光合作用以及捕光过程中发挥着重要的作用。当然, LHCB3和DYT1、bHLH010、bHLH089、bHLH091相互作用的具体功能和调控机制尚待进一步研究, 但这也为光调控生殖发育过程提供了一个新的思路。

表1 三种突变体中差异表达的光基因汇总

Table 1 Summary of light-related genes differentially expressed in three mutants

组类别	差异表达的光基因
A	<i>MDC12.16</i> , <i>ATGA2OX2</i> , <i>AtGRDP2</i> , <i>RHL41</i> , <i>APRR9</i> , <i>DREB2A</i> , <i>AT-HSFA7A</i> , <i>ELIP1</i> , <i>T29H11.90</i> , <i>LSH8</i> , <i>ASN1</i> , <i>ACBP3</i> , <i>BLH1</i> , <i>OM66</i> , <i>SARD1</i> , <i>GBF2</i> , <i>J8</i> , <i>NF-YB2</i> , <i>T3A4.5</i> , <i>ATBCB</i> , <i>F15E12.7</i> , <i>VQ12</i> , <i>ABI2</i> , <i>STZ</i> , <i>TCH3</i> , <i>ERD7</i> , <i>GPT2</i> , <i>HLS1</i> , <i>YAP169</i> , <i>PIL6</i> , <i>LEA14</i> , <i>ATERF6</i> , <i>MT1A</i> , <i>ATAF2</i> , <i>ATCOL5</i> , <i>SIB1</i> , <i>ZF14</i> , <i>CBP60G</i> , <i>AtGolS1</i> , <i>TEM1</i> 和 <i>PR5</i>
B	<i>RUP1</i> , <i>F15I1.13</i> , <i>ATHSP101</i> , <i>HSP70T-2</i> , <i>BAG6</i> , <i>CYP707A1</i> , <i>PAL1</i> , <i>ANAC051</i> , <i>F16P2.12</i> , <i>F24A6.100</i> , <i>ATHSFA2</i> , <i>SR45a</i> , <i>AT-HSP17.6A</i> , <i>COPI</i> 和 <i>Hop3</i>
C	<i>FLS3</i> , <i>DDB1B</i> , <i>ATPDIL1-2</i> , <i>WEI8</i> , <i>PRR7</i> , <i>AT3G24870.1</i> , <i>ATMYB4</i> , <i>DegP7</i> , <i>CS19</i> , <i>RAP2.4</i> , <i>CO</i> , <i>GATA9</i> , <i>ATEXPA1</i> , <i>PCC1</i> , <i>HUA2</i> , <i>FT</i> , <i>AHL22</i> , <i>CSA1</i> , <i>K11J9.5</i> , <i>ACDO1</i> , <i>LHCB4.2</i> , <i>MMP</i> , <i>ATEXPA3</i> , <i>HAC1</i> , <i>ATHB-1</i> 和 <i>CAT3</i>
D	<i>DIN9</i> 和 <i>CDF5</i>
E	<i>GA2OX4</i>
F	<i>LSH6</i> , <i>BBX20</i> , <i>CYP83B1</i> 和 <i>FSD1</i>
G	<i>SAG21</i>

2.5 光相关蛋白与bHLH010、bHLH089、bHLH091、DYT1构建成蛋白互作网络

将酵母核系统筛库得到的所有蛋白进行Quick GO术语合并,发现筛库得到的光相关蛋白参与了光合作用、蛋白质-发色团以及响应光刺激这三种生物学途径。将筛库的结果用Cytoscape软件画图,结合光相关基因参与的各种途径,得到如图5所示的结果。

与bHLH010、bHLH089、bHLH091、DYT1蛋白互作的光相关蛋白一共有28个,这些光相关

蛋白主要参与响应光刺激、蓝光响应、红光和远红光信号通路和信号转导、蛋白质-发色团连接、光合作用、光系统中的捕光过程、光形态发生、响应高强度和低强度光、对响应光刺激的保护、光反应过程、光系统II复合物的组装等过程。图5-A表示光相关基因在蛋白质-发色团连接过程中蛋白互作网络,图中与bHLH091相互作用的光相关蛋白较多,且主要是LHC蛋白家族的成员,该家族成员在光系统II的光捕获和电子传递中有重要的功能(Chen等2018),图5-A中的光相关蛋白可能

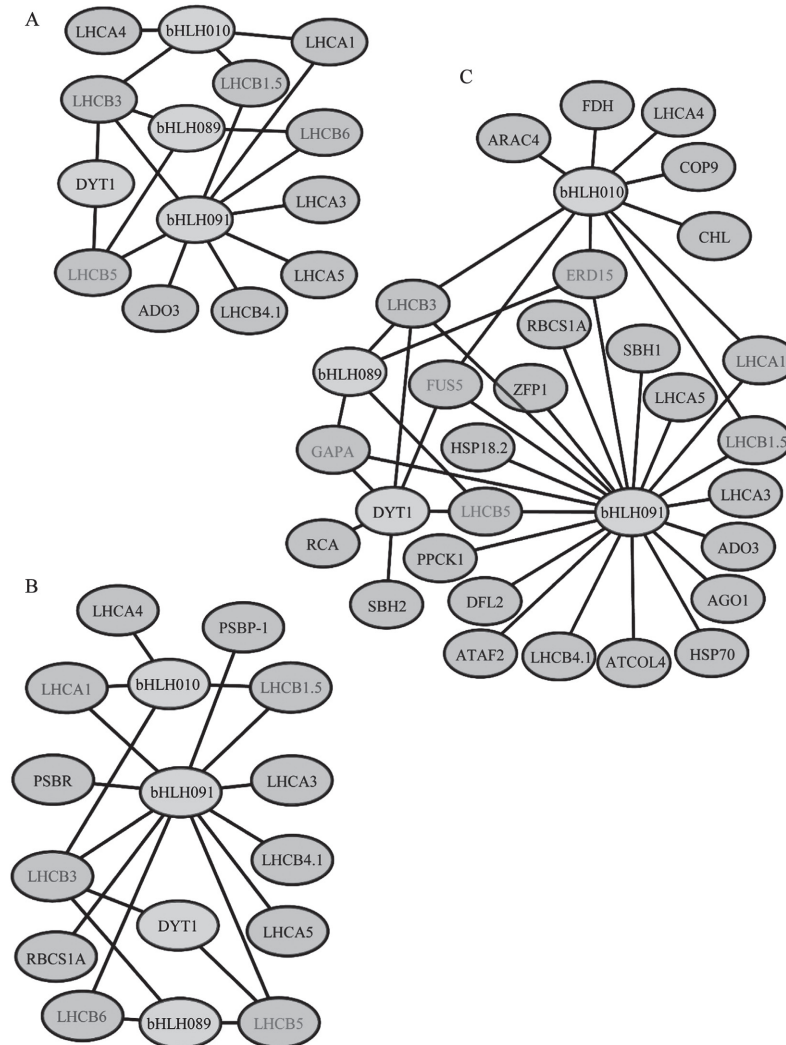


图5 光相关蛋白与bHLH010、bHLH089、bHLH091、DYT1互作网络

Fig.5 Interaction networks between light-related proteins and bHLH010, bHLH089, bHLH091 and DYT1

A: 与蛋白质-发色团连接过程相关的光相关蛋白互作网络; B: 与光合作用相关的光相关蛋白互作网络; C: 与光刺激响应途径相关的蛋白互作网络。

使光捕获以及电子传递通路与bHLH091所参与的生殖发育途径有所关联。在光相关基因在光合作用过程中的蛋白互作网络(图5-B)和光相关基因在响应光刺激途径中蛋白互作网络(图5-C)中,相较于与bHLH010、bHLH089、DYT1相互作用的光基因蛋白数量,与bHLH091互作的蛋白数目更多。

3 讨论

光是植物进行光合作用的能源,也是调控植物生长发育的重要环境信号,如调控开花时间(Andrés和Coupland 2012)、调控植物庇荫反应(Jiao等2007)、调控下胚轴伸长、调控幼苗出土(Somers等2000)等过程,但迄今光信号是否调控雄性育性尚缺乏深入报道。拟南芥的生殖发育是一个复杂的调控过程,需要不同的基因在不同的发育时期共同发挥作用,如在绒毡层发挥作用的*AMS*、*DYT1*、*bHLH010*、*bHLH089*、*bHLH091*等编码重要转录因子的基因。本课题研究发现279个光相关基因在拟南芥野生型4~7期的花药中有较高的mRNA表达水平[$\log_2(\text{RPKM}+1) > 5$],暗示这些基因可能在花药发育中有潜在的功能;同时发现247和36个光相关基因在花药6~7期及8~10期绒毡层高表达[$5 < \log_2(\text{RPKM}+1) < 8$]和极高表达[$8 < \log_2(\text{RPKM}+1)$],并且花药绒毡层发育重要转录因子转录组数据显示,有1个基因(*SAG21*)在*DYT1-bHLH010/bHLH089/bHLH091-AMS*转录网络相关突变体中表达发生两倍以上变化,表明*SAG21*在花药绒毡层发育过程中发挥重要作用并且位于*DYT1-bHLH010/bHLH089/bHLH091-AMS*转录网络的下游。进一步通过分析实验室酵母双杂交方法筛选到和DYT1、bHLH010、bHLH089、bHLH091相互作用的蛋白,绘制蛋白相互作用网络,我们共发现了31个光相关蛋白和至少一个上述转录因子有相互作用,其中包括光合作用相关基因*LHCB3*、*LHCB4.1*、*LHCB5*、*LHCB6*、*LHCA4*等,还包括光信号转导途径基因*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 9 (COP9)*、*FUSCA 5 (FUS5)*、*CONSTANS-LIKE 4 (ATCOL4)*等。目前已经有研究证明CONSTANS-LIKE 3 (COL3)/BBX4与B-BOX32 (BBX32)能共同激活*FLOWERING LOCUS (FT)*基因的表达,促进植物开花,调控

拟南芥的生殖生长过程(Tripathi等2016)。COL4是与COL3同家族的成员,被报道在非生物逆境方面发挥着重要的作用(Min等2015)。在我们的结果中,COL4与bHLH091在酵母系统中相互作用,我们推测一方面COL4可能接到了光信号途径在花药绒毡层发育过程中发挥功能,另一方面可能和bHLH091共同介导和生殖过程中的环境相应,这也和之前我们发现bHLH091可能参与环境响应的推测相吻合(Zhu等2015)。此外,ADO3曾被证明与COP1通过共同影响CO的表达水平和降解过程来调控植物的开花周期(Lee等2018),而我们研究发现ADO3与bHLH091在酵母中互作,暗示COP1-CO可能在花药绒毡层发挥功能或者bHLH091可能同时参与开花时间的调控。相信进一步的依赖于突变体的遗传及分子生物学证据将回答这一问题。

此外,我们对和四种转录因子有互作的光相关蛋白进行聚类分析,功能富集到与蓝光响应相关的生物学过程。已有研究表明蓝光信号能通过降低植物体内的高氮含量导致植物的开花时间延迟(Yuan等2016)。LHCB3蛋白是光系统II外周捕光复合物的的重要组成部分,光系统II外周捕光复合物由包括LHCB1-6在内的6种蛋白组成(Luciński和Jackowski 2006),且当LHCB3蛋白含量降低后,LHCB1、LHCB2的含量会显著增加,以弥补LHCB3功能缺失造成的影响(Adamic等2015)。我们的研究发现LHCB3与DYT1、bHLH010、bHLH089、bHLH091四个转录因子均存在相互作用,并且其他多个LHCB蛋白也与其中一到多个转录因子成员相互作用,暗示四个转录因子可能通过LHCB3及其功能冗余的LHCB1、LHCB2互作来共调花药的发育过程。

目前在小麦和水稻中的研究中有一些关于光敏核不育基因的功能报道,水稻光敏核不育相关的遗传机制和调控机理也已被研究和阐释,如对在雄性生殖过程中有着重要功能的基因*PSM1*和*PSM3*进行了精准的细胞内定位。然而在模式生物拟南芥中,虽然对于生殖发育和光信号转导过程均有大量深入的基因功能以及分子机制的研究进展,却很少有人将这两种不同的方向联系起来进行研究。本文结合了酵母双杂交文库与拟南芥花

药转录组数据分析的结果, 筛选到了大批可能参与介导拟南芥生殖发育和光相关信号转导通路交叉互作的候选蛋白, 为后续的深入探索提供了理论基础和研究线索。相信后续更深入的研究将能进一步解开光合及光信号调控雄性生殖发育的分子机制, 并将明确拟南芥代表的双子叶植物与水稻代表的单子叶植物在生殖发育过程的光响应机制的保守和分化。

参考文献(References)

- Adamiec M, Gibasiewicz K, Luciński R, et al (2015). Excitation energy transfer and charge separation are affected in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein Lhcb3. *J Photochem Photobiol B*, 153: 423–428
- Andrés F, Coupland G (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat Rev Genet*, 13 (9): 627
- Chang F, Wang Y, Wang S, et al (2011). Molecular control of microsporogenesis in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol*, 14 (1): 66–73
- Chen YE, Ma J, Wu N, et al (2018). The roles of *Arabidopsis* proteins of Lhcb4, Lhcb5 and Lhcb6 in oxidative stress under natural light conditions. *Plant Physiol Biochem*, 130: 267–276
- Cui J, You C, Zhu E, et al (2016). Feedback Regulation of DYT1 by interactions with downstream bHLH factors promotes DYT1 nuclear localization and anther development. *Plant Cell*, 28 (5): 1078–1093
- Exner V, Alexandre C, Rosenfeldt G, et al (2010). A gain-of-function mutation of *Arabidopsis* CRYPTOCHROME1 promotes flowering. *Plant Physiol*, 154 (4): 1633–1645
- Feng B, Lu D, Ma X, et al (2012). Regulation of the *Arabidopsis* anther transcriptome by DYT1 for pollen development. *Plant J*, 72 (4): 612–624
- Franklin KA, Quail PH (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot*, 61 (1): 11–24
- Guo H, Yang H, Mockler TC, et al (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science*, 279 (5355): 1360–1363
- Heijde M, Ulm R (2012). UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci*, 17 (4): 230–237
- Jiao Y, Lau OS, Deng XW (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet*, 8 (3): 217–230
- Koops P, Pelsers S, Ignatz M, et al (2011). EDL3 is an F-box protein involved in the regulation of abscisic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 62 (15): 5547–5560
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, de Vries HB, et al (1998). Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics*, 148 (2): 885–892
- Lee BD, Cha JY, Kim MR, et al (2018). Photoperiod sensing system for timing of flowering in plants. *BMB Rep*, 51 (4): 163–164
- Li DD, Xue JS, Zhu J, et al (2017). Gene regulatory network for tapetum development in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 8: 1559
- Liu H, Yu X, Li K, et al (2008). Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. *Science*, 322 (5907): 1535–1539
- Liu N, Shan Y, Wang FP, et al (2001). Identification of an 85-kb DNA fragment containing *pms1*, a locus for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. *Mol Genet Genomics*, 266 (2): 271–275
- Luciński R, Jackowski G (2006). The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of photosystem II. *Acta Biochim Pol*, 53 (4): 693–708
- Ma H (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 393–434
- Ma X, Feng B, Ma H, et al (2012). AMS-dependent and independent regulation of anther transcriptome and comparison with those affected by other *Arabidopsis* anther genes. *BMC Plant Biol*, 12: 23
- Min JH, Chung JS, Lee KH, et al (2015). The CONSTANS-like 4 transcription factor, AtCOL4, positively regulates abiotic stress tolerance through an abscisic acid-dependent manner in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 57 (3): 313–324
- Parish RW, Li SF (2010). Death of a tapetum: a programme of developmental altruism. *Plant Sci*, 178 (2): 73–89
- Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG, et al (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell*, 16: S46–S60
- Somers DE, Schultz TF, Milnamow M, et al (2000). *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell*, 101 (3): 319–329
- Sorensen AM, Kröber S, Unte US, et al (2010). The *Arabidopsis* *ABORTED MICROSPORES (AMS)* gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J*, 33 (2): 413–423
- Tripathi P, Carvallo M, Hamilton EE, et al (2016). *Arabidopsis* B-BOX32 interacts with CONSTANS-LIKE3 to regulate flowering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114 (1): 172–177
- Wu HM, Cheung AY (2000). Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Mol Biol*, 44 (3): 267–281
- Xu J, Yang C, Yuan Z, et al (2010). The *ABORTED MICROSPORES* regulatory network is required for postmeiotic male reproductive development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 22 (1): 91–107
- Yu X, Klejnot J, Zhao X, et al (2007). *Arabidopsis* cryptochrome

- chrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *Plant Cell*, 19 (10): 3146–3156
- Yuan S, Zhang ZW, Zheng C, et al (2016). *Arabidopsis* cryptochrome 1 functions in nitrogen regulation of flowering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (27): 7661–7666
- Zhang W, Sun Y, Timofejeva L, et al (2006). Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by *DYS-FUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1)* encoding a putative bHLH transcription factor. *Development*, 133 (16): 3085–3095
- Zhu E, You C, Wang S, et al (2015). The DYT1 - interacting proteins bHLH010, bHLH089 and bHLH091 are redundantly required for *Arabidopsis* anther development and transcriptome. *Plant J*, 83 (6): 976–990

Investigation on the function and possible mechanism of light signal in anther development based on transcriptome and protein interaction network analyses

RUAN Lin-Wei, FU Ying, WANG Meng-Han, LI Meng-Yu, MA Hong, CHANG Fang*

Institute of Plant Biology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China

Abstract: Anther is the male reproductive organ of angiosperms, and its normal development is crucial to plant sexual reproduction and crop yield. Anther development is regulated by both intrinsic and external environmental signals. Light is one of the most important environmental factors and affects almost all aspects of the plant growth and development. However, there are few reports on whether light participates and how to participate in the regulation of anther development. Here in this study, 752 (96.66%) of light-related genes were found to be expressed in stages 4–7 anthers of *Arabidopsis thaliana*, of which 246 were highly expressed and 33 were extremely highly expressed; 655 were expressed in stages 4–7 tapetum and 633 in stages 8–10 tapetum, suggesting that these genes might play important roles in anther development. The expression of light-related genes in *dyt1-3*, *bhlh010* *bhlh089* *bhlh091* and *ams* mutant anthers was further analyzed, and a number of light-related genes regulated by these transcription factors were identified, suggesting that these genes play a role as downstream components of the DYT1-bHLHs-AMS transcriptional network. In addition, proteins related to the photosystems and light signal transduction pathway that interact with bHLH010, bHLH089, bHLH091 and DYT1 were screened with yeast two-hybrid experiment, and the interaction network of these proteins was drawn. This study provides a new understanding and important reference for further revealing the function of light signaling genes and their regulatory mechanism in anther development.

Key words: anther development; light signal; transcriptome; protein interaction network; DYT1

Received 2018-10-24 Accepted 2019-01-30

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31470282).

*Corresponding author (fangchang@fudan.edu.cn).