

# 基于 *AP2* 和 *AG* 基因对斑果藤花瓣缺失机制的初步探究

## 中文摘要

斑果藤属 (*Stixis* Lour.) 是木犀草科 (Resedaceae) 多年生木质藤本, 为东南亚特有属, 大多分布在我国云南。斑果藤属的近缘类群节蒴木科和木犀草科均有花瓣, 但是该属植物花瓣缺失, 使得斑果藤属成为花发育研究的理想材料。

本研究首先对斑果藤 (*Stixis suaveolens*) 和节蒴木 (*Borthwickia trifoliata*) 幼嫩花进行体视解剖对比观察, 结果发现斑果藤在本该着生花瓣的位置无花瓣, 而是有一定的空隙, 为了进一步确定该位置是否产生花瓣原基, 本研究采用石蜡切片技术对斑果藤幼嫩花芽进行观察, 结果显示斑果藤花萼与雄蕊间的空隙处只有薄壁细胞, 无分生组织, 无维管束延伸, 不具备分化、继续发育的能力, 由此判断, 斑果藤花缺失的原因是花瓣原基不存在。其次, 我们对斑果藤不同发育时期的花及叶进行转录组测序, 得到了花发育相关基因的转录本序列。结果发现, ABC 三类花基因均有表达。为确定花发育基因的表达模式, 我们采用半定量 RT-PCR 技术对 *AP2*、*AP3*、*PI* 和 *AG* 基因进行 PCR 扩增, 结果表明, *AP2* 基因在花萼中表达, *AP3*、*PI* 基因在雄蕊中表达, 这与花发育模型相一致; 但是 *AG* 基因在萼片和雄蕊中均有表达, 暗示其表达范围可能发生外扩, 这可能是斑果藤花瓣缺失的重要原因。为了进一步从基因结构上探究花瓣缺失的机制, 我们从斑果藤中克隆了 A 类功能基因 *AP2* 和 C 类功能基因 *AG*, 并对其编码区序列进行了生物信息学分析, *AP2* 基因多序列比对结果显示, 两个保守元件中 YRG 元件高度保守, RAYD 元件在 263、277 位氨基酸发生突变, 推测与 *AG* 基因间的相互作用有关; *AG* 基因的多序列比对结果显示, MADS-box 保守结构域在 141、154 位氨基酸突变, K-box 保守结构域 195、245、256 位氨基酸发生突变, 推测其可能与 *AG* 基因表达范围异常有关。为了验证 *AG* 基因对斑果藤花发育的影响, 我们构建了拟南芥 *AG* 基因表达载体 pCambia 2301-*AG*。

本研究基于斑果藤转录组数据, 对 *AP2* 和 *AG* 基因进行表达范围分析、编码区生物信息学分析和载体构建, 初步探究了斑果藤属花瓣缺失的原因, 为进一步探究斑果藤花

瓣缺失的机制奠定了基础，也为被子植物花发育的研究提供了数据。

**关键词：**斑果藤 花发育 *AP2* 基因 *AG* 基因

# **A Preliminary Study on the Mechanism of Petal Deletion in *Stixis suaveolens* -- Based on *AP2* and *AG* Genes**

## **ABSTRACT**

*Stixis* Lour. is perennial woody vine in Resedaceae, it is unique in Southeast Asia, mostly distributed in Yunnan in our country. The related groups of genus Borthwickiaceae and Resedaceae of *Stixis* both have petals, but the absence of petals in this genus makes the *S. suaveolens* an ideal material for the study of flower development.

In this study, the stereopic anatomical comparison of young flowers of *S. suaveolens* and *B. trifoliata* was carried out, and the results showed that *S. suaveolens* had no petals where the petals should have been. In order to further determine whether there is petal primordium in this position, this study used paraffin sectioning technology to observe the young flower buds of *S. suaveolens*. The results showed that there were only parenchyma cells in the gap between calyx and stamen, without meristem, no vascular bundle extension, and no ability to differentiate and continue development. Therefore, it can be concluded that, the absence of petal primordia was the reason for the absence of petal primordia. Secondly, we sequenced the transcriptome of flowers and leaves in different developmental stages of *S. suaveolens*, and obtained the transcriptome sequences of genes related to flower development. The results showed that all three types of ABC flower genes were expressed. To determine the expression pattern of flower development genes, we amplified *AP2*, *AP3*, *PI* and *AG* genes by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that *AP2* genes were expressed in calyx, and *AP3* and *PI* genes were expressed in stamens, which was consistent with the flower development model. However, *AG* gene was expressed in both sepals and stamens, suggesting that the expression range of *AG* gene might be expanded, which may be an important cause of petal deletion in *S. suaveolens*. In order to further explore the mechanism of petal deletion in terms of gene structure, we cloned class A functional gene

*AP2* and class C functional gene *AG* from *Stixis suaveolens*, and conducted bioinformatics analysis of their coding region sequences. The results of multiple sequence comparison of *AP2* gene showed that YRG element of the two conserved elements was highly conserved. The mutation of RAYD element at amino acid position 263 and 277 was speculated to be related to the interaction between *AG* gene. Multiple sequence alignment of *AG* gene showed that MADS-box conserved domain was mutated at positions 141 and 154, and K-box conserved domain was mutated at positions 195, 245 and 256, which might be related to the abnormal expression range of *AG* gene. In order to verify the effect of *AG* gene on the flower development of *S. suaveolens*, we constructed Arabidopsis *AG* overexpression vector pCambia2301-*AG*.

**KEYWORDS:** *S. suaveolens*; Flower development; *AP2* gene; *AG* gene

# 目 录

中文摘要 .....	I
ABSTRACT .....	III
第一章 前言 .....	7
1.1. 斑果藤属简介 .....	7
1.2. 被子植物花的起源及多样性 .....	8
1.2.1. 被子植物花的来源 .....	8
1.2.2. 花发育模型的提出与发展 .....	8
1.2.3. 花瓣的多样性 .....	10
1.2.4. 花瓣的起源与缺失 .....	11
1.2.5. B类C类基因与花瓣缺失 .....	14
1.3. 研究目的与意义 .....	15
1.4. 研究内容 .....	16
第二章 材料与amp;方法 .....	17
2.1. 实验材料 .....	17
2.2. 实验试剂 .....	17
2.2.1. 酶与试剂 .....	17
2.2.2. 培养基及其它试剂配制 .....	17
2.3. 实验方法 .....	19
2.3.1. 石蜡切片 .....	19
2.3.2. 转录组分析 .....	19
2.3.3. RT-PCR .....	21
2.3.4. <i>AP2</i> 和 <i>AG</i> 基因的克隆及生物信息学分析 .....	24
2.3.5. <i>AG</i> 基因表达载体的构建 .....	27
第三章 结果与分析 .....	33
3.1. 体视显微镜与石蜡切片 .....	33
3.1.1. 体视显微镜 .....	33
3.1.2. 石蜡切片 .....	33
3.2. 转录组分析 .....	34
3.2.1. 转录本拼接 .....	34
3.2.2. 数据库注释结果 .....	36
3.2.3. 差异基因分析 .....	41

3.3. RT-PCR.....	46
3.3.1. RNA 提取质量.....	46
3.3.2. 各基因表达范围的检测.....	47
3.4. <i>AP2</i> 和 <i>AG</i> 基因的克隆与生物信息学分析.....	48
3.4.1. <i>AP2</i> 基因.....	48
3.4.2. <i>AG</i> 基因.....	55
3.5. pCAMBIA2301- <i>AG</i> 表达载体的构建.....	63
3.5.1. 双酶切.....	63
3.5.2. 转化大肠杆菌.....	64
3.5.3. 菌落 PCR.....	64
第四章 讨论.....	67
第五章 结论与展望.....	69
参考文献.....	71
在学期间的研究成果.....	77
致 谢.....	79

## 第一章 前言

### 1.1. 斑果藤属简介

斑果藤属(*Stixis* Lour.)隶属于木犀草科(Resedaceae),是核心十字花目(core Brassicales) GRFT分支的一员。斑果藤属为木质藤本,稀灌木;单叶,革质,互生,边缘无锯齿;花淡黄色,较小,多数,总状花序;苞片小,早落;萼片6枚,2轮,萼片基部合生成筒状;无花瓣;雄蕊多数;花柱单枚或3-4浅裂;种子1粒,稀2粒,大型,种皮薄<sup>[1-2]</sup>。

斑果藤属共有8种,为亚洲特有属,产锡金至马来西亚,分布中心在印度中南半岛。我国产4种,大多分布在云南,其中斑果藤(*Stixis suaveolens* (Roxb.) Pierre)还分布于广西壮族自治区、西藏自治区、海南省和广东省<sup>[1-3]</sup>。

斑果藤于1790年发表,归入山柑科中(Capparaceae)<sup>[4]</sup>。在2003年,Kers等人依据斑果藤族(Stixeeae)与山柑科植物的子房及花柱的形态差异将其从山柑科中移除<sup>[5]</sup>;2008年,Dowled和Reveal将斑果藤族提升为一个科——斑果藤科(Stixaceae)<sup>[6]</sup>;然而APG III并没有正式接受斑果藤科<sup>[7]</sup>;在此基础上,2012年苏俊霞等人通过对602个类群的研究,将斑果藤属从山柑科中排除,并对其进行了分子系统学研究,获得十字花目12科39属57种的四个cpDNA片段(*matK*、*ndhF*、*rbcL*、*trnL-F*),并与形态学结果进行比较,最终将斑果藤族归于GRFT分支中<sup>[8-9]</sup>。2014年,斑果藤科得到了木质部解剖学证据的支持<sup>[10]</sup>;2015年,赵慧玲等的分子研究和表皮微型态研究也支持这个观点<sup>[11]</sup>。但在2016年,APG IV并不支持斑果藤科的成立,将该类群中的4属合并入木犀草科<sup>[12]</sup>;同年,祁夏莉等人在茎的基础上进行解剖学观察,其研究结果同样也支持斑果藤科的成立<sup>[13]</sup>;2019年,孙媛媛对斑果藤属营养器官的解剖学研究结果支持将斑果藤族提升为斑果藤科<sup>[14]</sup>;2021年,林昱宏对斑果藤属花发育的研究结果支持斑果藤属从木犀草科分离,但具体位置有待探讨。综上所述,斑果藤属的系统学位置还存在着争议<sup>[15]</sup>。

## 1.2. 被子植物花的起源及多样性

### 1.2.1. 被子植物花的来源

被子植物大约有 25,000 种，是世界上进化程度最高，物种最丰富、分布最广泛的类群。花是被子植物特有的重要生殖器官，具有极高的观赏价值，同时也是重要的食用资源。花的存在，使得被子植物不需要水分就可以完成受精过程；此外，种皮将种子包裹起来，可以更好地保护种子，大大提高了生殖效率和对环境的适应能力，使其得以广泛分布，形成了多样化的地球生态系统。

被子植物花结构丰富多样，容易发生变异，是开展花发育机制研究的良好材料。典型的被子植物花由 4 部分组成，即花萼、花瓣、雄蕊和雌蕊。其中花瓣最为显眼，其在形态、结构、颜色和大小等方面都表现出丰富的差异，是花形态多样性的重要体现。对于花的来源，人们有许多不同的假设。最先是Goethe提出的变态枝条假说，该假说认为花相当于一个缩短变态的枝条<sup>[16-17]</sup>。这为后来其他学说的发展奠定了理论基础。之后，学者们根据形态特征和系统学分析提出了“真花学说”、“假花学说”、“顶枝学说”等。尽管目前对被子植物花结构的多样性的来源还缺乏足够的研究，但在某些问题上，人们已取得了一致的看法。他们一致认为花是一个缩短变态的枝条，而各个花器官则是叶性器官；花被片的起源可能要晚于雄蕊和心皮，甚至可能是由心皮和雄蕊发育来的，即两者向顶聚合过程中其基部的营养叶发育成了花被片。因而，对于花瓣的起源，存在着两种不同的假设：萼片源和雄蕊源<sup>[18-19]</sup>。

### 1.2.2. 花发育模型的提出与发展

1991 年，Coen 首次提出花发育“ABC 模型”（图 2）<sup>[20-23]</sup>。在金鱼草中，ABC 类基因分别为 *SQUA*；*DEF*、*GLO*；*PLE*。随着花发育研究的不断深入，科学家们发现除了 ABC 类基因外，还有一些基因参与调控花发育，并将其命名为 D 类基因和 E 类基因，之后，他们修正并完善了花发育的“ABC”模型，提出了“ABCDE”模型（图 1），该模型能够解释大部分双子叶植物花发育现象。拟南芥的 D 功能基因有 *STK(AGL11)*、*SHP1*、*SHP2* 等，E 功能基因有 *SEP1(AGL2)*、*SEP2(AGL4)*、*SEP3(AGL9)*、*SEP4(AGL3)*。Ferrario 对矮牵牛中 E 类基因突变体进行了研究，发现 E 类基因对于 B、C、D 类基因的正常表达具有非常重要的作用<sup>[24]</sup>。



ABCDE 基因家族成员 (*AP2* 基因除外) 均属于 MIKC 型 MADS-box 基因, 其编码的蛋白从 N 端到 C 端依次是 MADS (M) 结构域、I 结构域、K 结构域和 C 结构域<sup>[25]</sup>。M 结构域含有约 60 个氨基酸, 是一个高度保守, 含有大量碱性氨基酸的功能区域, 对二聚体的形成至关重要。I 区是 C 区与 MADS-box 区相连所必须的一段短肽, 由 28 个氨基酸组成, 它可以调控与 DNA 的结合, 从而影响蛋白质对 DNA 的识别。K 区是一个相对保守的区域, 它可以形成一个超级螺旋, 在二聚体的解离中起到重要作用, K 结构域存在于大部分植物的 MADS-box 蛋白。C 区是高度变异的区域, 含有每个基因家族的特定序列, 对转录活化起作用, 涉及到基因特定功能<sup>[26-27]</sup>。

研究表明, 遗传信息从 DNA 传递到蛋白质, 大多数生物蛋白都是通过形成蛋白复合体或相互间的作用来行使功能的。在花器官的发育过程中, ABCDE 各类基因也是通过形成蛋白多聚体来实现相互作用。通过酵母三杂及凝胶阻滞试验, 有学者发现金鱼草 A 类基因和 B 类基因的多聚体复合物比二聚体更容易与 DNA 结合<sup>[28]</sup>。为了明确 MADS 基因家族蛋白在植物开花过程中的作用机制, Theissen 在 2001 年提出了花发育的四重奏模型<sup>[29]</sup>(Theissen G,2001) (图 1-1), 该模型指出, 四聚体 *API/API-SEP/SEP*、*AP3/PI-SEP/API*、*AP3/PI-SEP/AG*、*AG/AG-SEP/SEP* 分别控制第一轮 (花萼)、第二轮 (花瓣)、第三轮 (雄蕊) 和第四轮 (心皮) 花器官的发生和分化<sup>[31]</sup> (Thomas Jack,2004)。每个四聚体内部的组合方式是各轮花器官发生特异性分化的关键。花发育的四重奏模型不仅进一步完善了花发育的 ABCDE 模型, 而且还从蛋白质水平上阐明了植物开花的调控机理<sup>[30]</sup>。

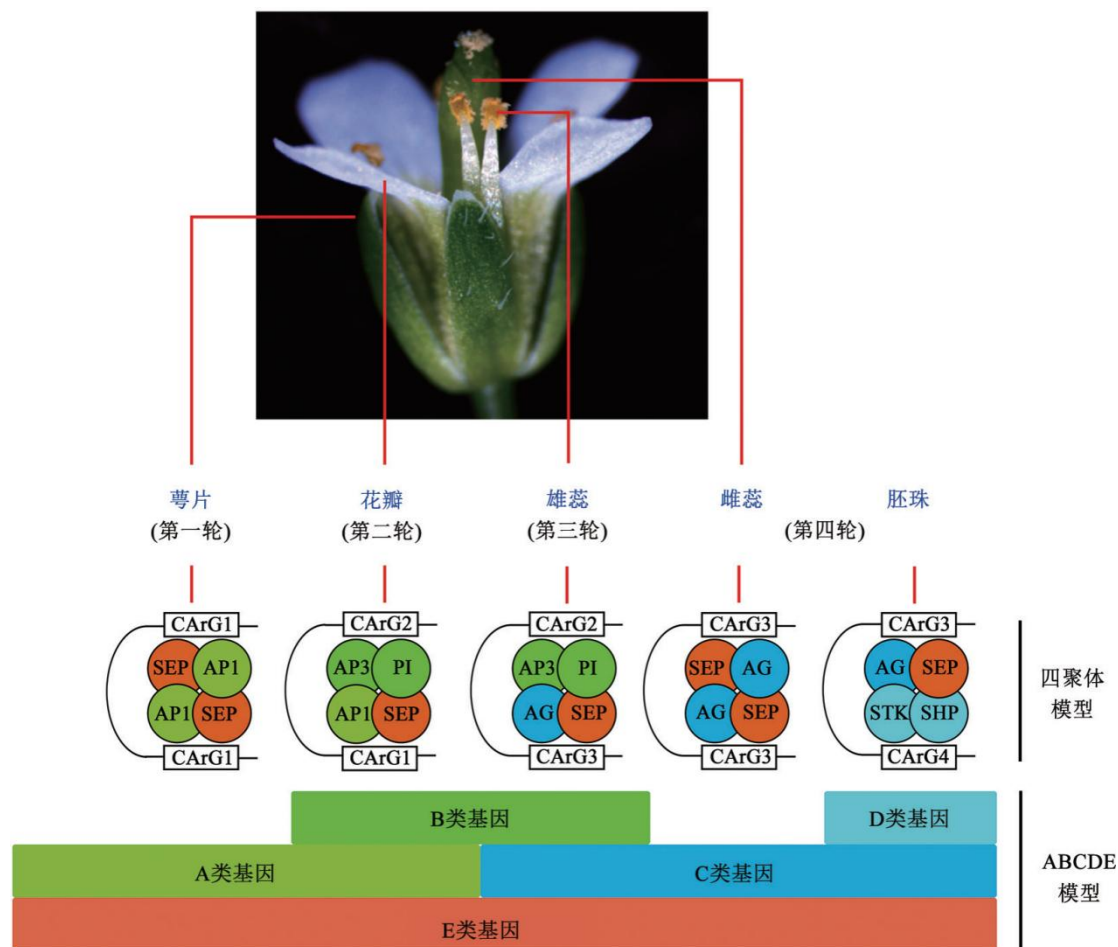


Fig.1-1 The ABCDE model and the quartet model of floral organ identity determination in *Arabidopsis thaliana*

### 1.2.3. 花瓣的多样性

在花瓣的界定上，经典的形态学将其界定为一种色彩艳丽、对昆虫具有较强吸引力的叶性生殖器官。但是，在自然状态下，许多被子植物的其它花器官都存在着不同程度的瓣化现象。这使得对花瓣的定义仅仅局限于形态和功能不再合适，推动了研究者们对花瓣的深层次研究。非花瓣器官瓣化可分为以下几种：1) 花瓣状雄蕊，如姜科 (*Zingiberaceae*)、蔷薇属 (*Rosa* L.) 和芍药属 (*Paeonia* L.) 植物；2) 花瓣状萼片，如八仙花 (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.)、紫茉莉 (*Mirabilis jalapa* L.)、毛茛科 (*Ranunculaceae*) 的铁线莲属 (*Clematis* L.) 和驴蹄草属 (*Caltha* L.) 等；3) 花瓣状苞片，如山茱萸 (*Cornus officinalis* Siebold & Zucc.)、海芋 (*Alocasia odora* (Roxburgh) K. Koch)、三角梅 (*Bougainvillea spectabilis* Willd.) 和蕺菜 (*Houttuynia cordata* Thunb.)

等；4) 花瓣状叶片，如凤梨属 (*Ananas* Mill.) 植物<sup>[32]</sup>。以上所述的瓣状器官在外形上和真实的花瓣非常类似，都起到了吸引传粉昆虫的作用，但是在形态学本质上却有很大区别。综上所述，以往学者们仅仅从形态和功能来界定花瓣显然是不恰当的。

#### 1.2.4. 花瓣的起源与缺失

花瓣对于被子植物吸引传粉者至关重要，但是自然界仍旧存在大量无花瓣的被子植物。张睿对被子植物无花瓣类群进行了统计，将不同分支的花瓣有无现象在系统发育树上进行标注<sup>[33]</sup> (图 1-2)，结果显示无花瓣现象在被子植物中普遍存在，花瓣缺失在不同分支上多次独立发生，被子植物最近共同祖先都是有花瓣的。由此可见，无花瓣现象是由于被子植物的花瓣多次丢失导致的<sup>[34]</sup>。

花瓣缺失对于植物具有重要的生物学意义。在一些风媒传粉的植物中，如杨柳科 (*Salicaceae*)、胡桃科 (*Juglandaceae*) 以及壳斗科 (*Fagaceae*)，它们的花均无花被片，花瓣缺失一方面降低了生殖成本即植物开花期间的能量消耗，而且减小了传粉过程来自于花瓣的阻力，更有利于花粉的散播，大大提高了繁殖效率；另一方面，花瓣缺失可以在一定程度上减少以花瓣为介质传播的某些病菌的侵染。还有一些以水媒传粉的植物，如，金鱼藻属 (*Ceratophyllum* L.) 植物，它的传粉以水为媒介，整个过程无需花瓣来吸引昆虫。另外，还有一些植物出现了雄蕊或心皮的瓣化，这些花瓣状结构代替花瓣来吸引昆虫，使花瓣不再是被子植物生殖过程中的必需结构，因此花瓣缺失对这类植物并无影响；如毛茛科的铁线莲 (*Clematis florida* Thunb.) 和白头翁 (*Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel) 等植物。这类植物花瓣缺失除了降低生殖成本外，由于原本长花瓣的位置上长出了雄蕊，既增加了花粉产量，也大大提高了繁殖效率<sup>[35]</sup>。

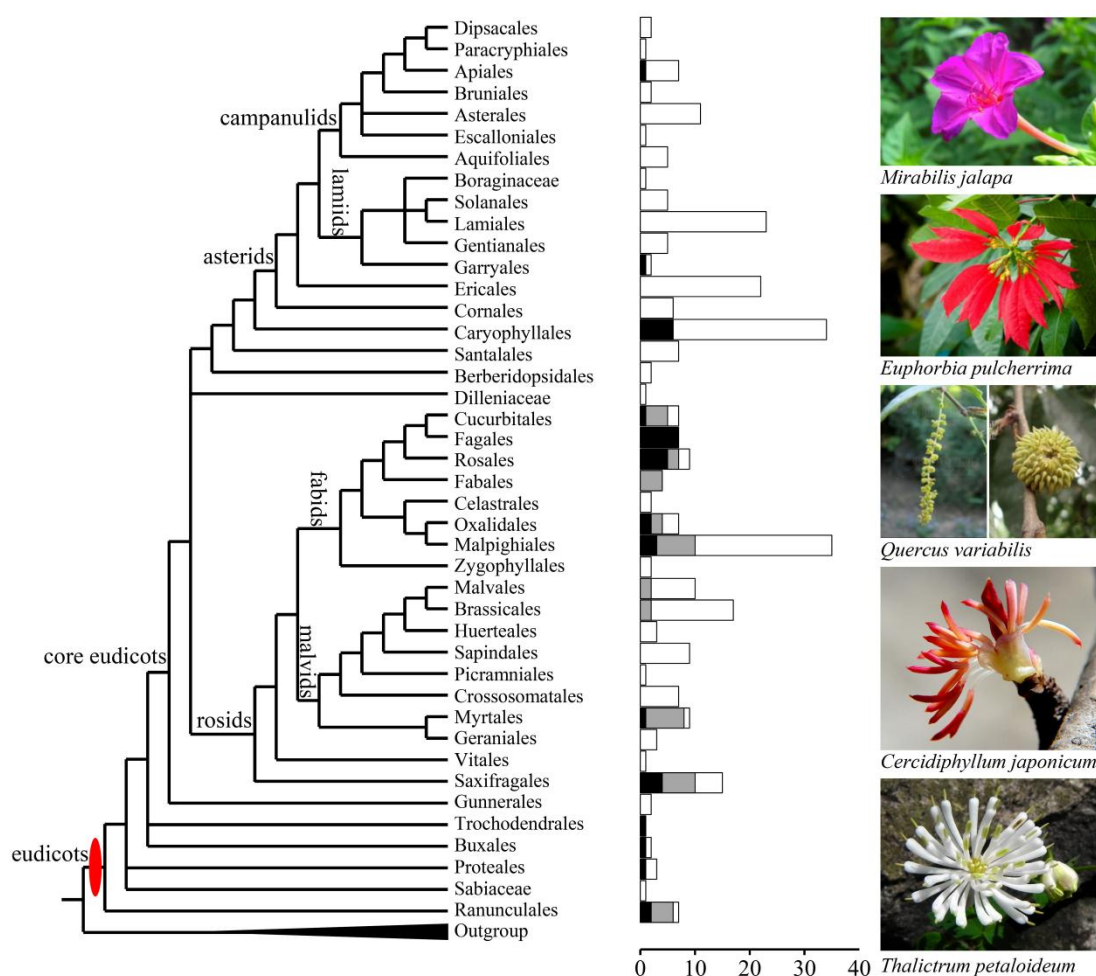


图 1-2 被子植物无花瓣类群分布及其典型代表 (张睿, 2013)

Figure 1-2 Representative apetalous taxa within angiosperms (Zhang Rui, 2013)

左图是基于 APGIII 分类系统 (APGIII, 2009) 展现的部分被子植物系统学关系。红色标记代表某些类群的共同祖先是具有花瓣的。白色框代表有花瓣的科, 黑色框代表无花瓣的科, 灰色框代表部分类群无花瓣的科。

无花瓣现象在被子植物中普遍存在, 这些类群的花瓣是如何丢失的? 要解决上述问题, 首先需要了解花瓣的发生与起源。目前, 被多数学者所接受的花瓣起源学说有苞片源学说和雄蕊源学说。即被子植物的花瓣是由苞片或者雄蕊多次进化来的<sup>[18,32,36-39]</sup>。苞片源的花瓣是一类具有叶绿素、原基形态为新月形、顶端平滑、有 3 个维管束、能够保护内部花器官等特点的花瓣<sup>[40]</sup>, 这种花瓣常见于木兰目 (Magnoliales)、八角目 (Illiciales) 和石竹目 (Caryophyllales) 等类群。其中石竹目祖先只有一轮花被片, 被认为与萼片同源<sup>[41]</sup>。雄蕊源的花瓣形态与雄蕊相似, 是一类不具有叶绿素、原基形态为半球形、顶端

圆钝、发育延迟、具有单维管束的花器官<sup>[40]</sup>；例如，毛茛科植物的花瓣是最早且最典型的雄蕊源花器官<sup>[42-43]</sup>。

基于花瓣的起源与发生，人们对花瓣缺失现象的解释有两种：1)花瓣原基未分化或在早期停止发育，如十字花科 (Brassicaceae) 的独行菜属 (*Lepidium* L.)，豆科 (Fabaceae) 的短盖属 (*Brachystegia* Harms ) 和 *Crudia* 属等植物<sup>[44-46]</sup>；2)花瓣原基不存在，这种情况在植物界比较普遍，如毛茛科等类群<sup>[47]</sup>。最初，学者们单纯地认为花瓣原基根本没有形成。如果这种观点成立，原本长花瓣的位置应该是有空隙的；但一些无花瓣物种的形态发生学研究结果显示，许多植物花的萼片原基与雄蕊原基是紧挨着发生的。因此，另一些学者认为，花瓣原基并非不存在，而是发生了向其它花器官的同源转化<sup>[34,48]</sup>。该观点也得到了一些研究的支持，如 Smith-Huerta NL 发现了柳叶菜科 (Onagraceae) 的具双层萼片的突变体山字草 (*Clarkia tembloriensis* Vasek) <sup>[49]</sup>；Ronse 和 Arango-Ocampo 等人发现博落回具有花瓣向雄蕊转化的现象<sup>[34,50]</sup>。

随着植物分子生物学的研究体系不断完善，人们对花发育的研究也逐渐深入到分子水平，研究对象主要集中在一系列模式植物。段晓珊对拟南芥无花瓣突变体的研究结果表明，花瓣缺失的因素主要有三个方面，即花瓣身份决定基因的失活；萼片身份决定基因的表达范围向内扩展；和雄蕊身份决定基因的向外扩展<sup>[47]</sup>。非模式物种的花发育研究主要集中在毛茛科，2013 年张睿对毛茛科植物的研究发现，*AP3-3* 基因的失活与该科多个分支的花瓣丢失有关<sup>[51]</sup>。段晓珊等人在张睿的基础上进行了深入的研究，发现 B 类基因 *AP3-3* 的失活是由于 *AG1* 表达范围的扩大所致<sup>[47]</sup>。

综上所述，花瓣正常发育需要满足两个条件，任一条件的缺失，都会引起花瓣形态的改变，甚至导致花瓣原基无法形成，最终造成花瓣的丢失<sup>[54-56]</sup>。具体如下：

第一，B 类基因在第二轮花器官中持续表达<sup>[36,52-53]</sup>。B 类基因的突变或者沉默，可使植物的花瓣转化为萼片，雄蕊转化为心皮，最终造成花瓣丢失。被子植物多个分支上出现无花瓣类群可能是 B 类基因的多次沉默而致<sup>[57]</sup>。另外，B 类基因如果不能连续地表达或者其表达量很少，也会引起花瓣发育不完全。在花发育不同时期利用微扰分析 (perturbation assays) 和转录谱 (transcript profiling) 基因组定位等技术对拟南芥的 B 类基因沉默，可使花瓣到萼片发生不同程度的转变<sup>[58-59]</sup>。

第二，C 类基因在第二轮花器官不表达。在自然条件下，C 类基因表达范围应局限在雄蕊、心皮、胚珠三轮花器官。但是，当 C 类基因在第二轮花器官发生异位表达，则

会抑制 A 类基因在该轮的表达，进而导致花瓣向雄蕊同源转化。上述结论也在拟南芥、金鱼草、矮牵牛以及水稻 (*Oryza sativa* L.) 等植物中得到了验证，C 类基因的异位表达引起了花瓣/浆片向雄蕊的转化<sup>[60-62]</sup>。

### 1.2.5. B类C类基因与花瓣缺失

B 类基因 *AP3-3* 基因通常在无花瓣类群中不表达，因此，一些学者们猜测 *AP3-3* 基因的不表达可能与花瓣缺失有关。但是在少数毛茛科无花瓣类群中，如：白根葵属 (*Glaucidium* Siebold & Zucc.)、铁破锣属 (*Beesia* Balf. f. & W. W. Sm.)、无瓣毛茛属 (*Trautvetteria* Fisch. & C.A. Mey.) 和铁线莲属 (*Clematis* L.)，*AP3-3* 同源基因不仅存在，而且也表达，甚至具有功能，这表明 *AP3-3* 的失活不是花瓣丢失的先决条件<sup>[47]</sup>。为了探讨花瓣缺失的真正原因，学者们从 C 类基因 *AG* 的表达范围入手进行了一系列研究<sup>[60-63]</sup>，他们认为 *AG1* 同源基因表达域的外扩可能是重要原因。此外，也有研究发现，*AG1* 同源基因均能抑制 B 类基因 *AP3-3* 的表达，表明两个基因之间存在一定的调控关系<sup>[63-65]</sup>。一旦 *AG1* 的表达域扩展到花瓣，*AP3-3* 就会被抑制，进而该基因在放松选择下进化，从而解释了无花瓣类群中 *AP3-3* 基因不同程度突变的原因。

既然 *AG* 基因表达域的外扩可能是导致花瓣缺失的重要原因，那么又是什么原因导致 *AG* 基因的外扩呢？为了解决此问题，学者们开展了一系列研究，发现 C 类基因表达域的向外扩张可由多种机制引起，其中顺式调控区的变化被认为是最可能的原因之一<sup>[66-70]</sup>。除此之外，有些学者发现 *AG* 基因的启动子区和内含子区的突变可能与 *AG* 基因表达外扩相关。例如，1997 年，Leslie 单独将 *AG* 基因的启动子融合 GUS 转入拟南芥，结果发现该基因时空表达紊乱，而后又在启动子后连上 *AG* 基因的前两个内含子后再次转入拟南芥，结果发现该基因表达恢复正常，因此推测 *AG* 基因的第二个内含子对基因的表达调控起着关键作用<sup>[71]</sup>。此外，学者们在拟南芥、黄瓜、烟草中发现 *AG* 基因的第二内含子对该基因的表达至关重要<sup>[69,71-74]</sup>。除此之外，段晓珊 2020 年将有花瓣的扁果草和无花瓣的拟扁果草的基因组序列进行比对，发现两者 *AG1* 基因的编码序列高度同源 (99.0%)，但是启动子 (80%) 和内含子区域 (92%) 同源性较低。其中，WUSCHEL (WUS) 和 APETALA2 (AP2) 的结合位点存在于扁果草 *AG1* 中，但在拟扁果草 *AG1* 的相应区域中不存在，因此推测 *AG* 基因第二内含子的差异很可能是拟扁果草 *AG1* 同源基因表达外扩的原因。随后，段晓珊等人将 *AG* 基因的第二内含子融合 GUS 转入拟

南芥，通过 GUS 染色技术验证内含子对下游基因的调控作用。结果显示在扁果草的雄蕊和心皮中均检测到了 GUS 信号，拟扁果草除了雄蕊和心皮，在花萼中也检测到了 GUS 信号。上述结果说明 *AG* 基因第二内含子的突变可能增强了拟扁果草 *AG* 基因的表达，进而使其表达范围外扩最终导致花瓣丢失<sup>[47]</sup>。

上游基因是如何调控 *AG* 基因的？都有哪些关键的靶位点？有研究者针对上述问题对近年来拟南芥的相关研究进行了综述，详细的调控网络见图 33。从图 1-3 中，我们可以看出，*AP2* 基因在蛋白水平上抑制 *AG* 基因的活性，并且负责将 *AG* 基因的表达范围限制在花器官的第三、四、五轮<sup>[75]</sup>。*LFY* 基因是 *AP2* 基因的上游直接调控者。在花发育前期，*LFY* 基因与 *WUS* 基因共同激活 *AG* 基因的表达<sup>[76-78]</sup>。而且它们在 *AG* 基因的第二个内含子有不同的结合位点<sup>[77]</sup>，只有同时结合到 *AG* 基因上才会激活 *AG*<sup>[79]</sup>。*LUG* 蛋白与 *SEU* 蛋白二者形成蛋白复合体，作用于 *AG* 基因相应的靶位点，从而抑制 *AG* 基因的表达。*BLR* 则是直接结合到 *AG* 基因的第二个内含子转录位点抑制其表达。综上所述，*AG* 基因第二个内含子能很好地调控下游基因的时空特异性表达。

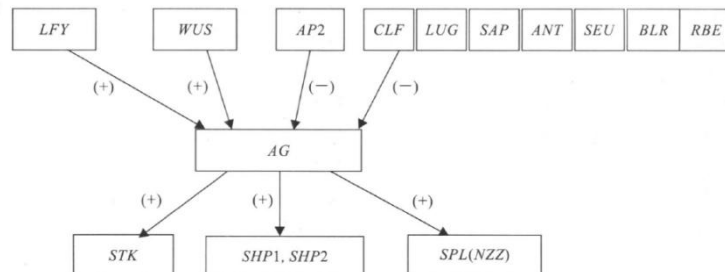


图 1-3 *AG* 基因与其上下游基因的调控关系

(+ ) . 激活作用； (- ) . 抑制作用

Figure1- 3 Relationship between *AG* gene and other related genes

(+ ) indicates activate; (- ) indicates repress

### 1.3. 研究目的与意义

在被子植物的花中，花瓣通常是最醒目的花器官，可吸引传粉者帮助传粉。但是花瓣的缺失在整个被子植物中出现了上百次，这可能是由于对不同环境的适应导致的平行演化。对花瓣缺失的研究已经很深入，但是研究对象主要局限在模式物种，其它被子植

物花发育的分子机制大多不清楚。斑果藤是核心十字花目 *GRFT* 分支斑果藤属植物, 该属植物花瓣缺失, 但其近缘类群节蒴木 (*Borthwickia trifoliata* W. W. Smith) 和木犀草科 (*Resedaceae*) 都具有花瓣, 这使得斑果藤成为研究花瓣缺失的理想材料。

通过揭示斑果藤花瓣缺失的遗传与分子机制, 可为被子植物无花瓣类群的研究增加数据, 也可为斑果藤及其近缘类群分类地位的确定提供一定的证据。此外, 斑果藤所在的核心十字花目中有大量经济作物。菌核病是危害这类作物的真菌病之一。菌核病可通过凋落的花瓣对植株进行侵染, 因此无花瓣的品种对菌核病具有较强的抗性。厘清天然无花瓣物种斑果藤花瓣缺失的分子机制, 有助于指导核心十字花目中的作物育种。

#### 1.4. 研究内容

(1) 运用石蜡切片技术对斑果藤早期花芽形态进行解剖观察, 初步判断斑果藤属植物花瓣缺失的可能类型。

(2) 通过转录组分析筛选花发育相关的差异基因, 并获取其转录本序列。

(3) ABC 类花发育基因做半定量 RT-PCR 检测各基因的表达范围及粗略表达量。

(4) 克隆斑果藤中 *AP2* 和 *AG* 基因的编码区序列, 利用各种生信分析软件对 *AP2* 基因及 *AG* 基因编码区序列进行深入剖析, 与被子植物相近物种进行比对分析。

(5) 构建 *AG* 基因表达载体。



## 第二章 材料与amp;方法

### 2.1. 实验材料

本实验所用的供试材料为斑果藤。用于分子实验的材料于2022年6月28日采自云南省西双版纳州勐腊县勐仑镇中科院西双版纳热带植物园。采集斑果藤的花蕾，开放的花及幼嫩茎叶，经液氮速冻，干冰运输，到达实验室后在-80℃冰箱（海尔，DW-86L626）保存。用于石蜡切片的材料为实验室浸泡在FAA中保存的斑果藤花蕾。

### 2.2. 实验试剂

#### 2.2.1. 酶与试剂

酶：2×Taq Master Mix（诺唯赞）、载体pCAMBIA1300双切酶（XbaI、KpnI）、同源重组酶（5×CE II Buffer、Exnase II）（诺唯赞）。

试剂：乙醇、二甲苯、Tris-base、EDTA-Na<sub>2</sub>、KCl、β-巯基乙醇、70%的酒精、胰蛋白胨、酵母粉提取物、NaCl、蔗糖、琼脂粉，硫酸卡那霉素（30μg/mL），利福平（30μg/mL）。

试剂盒：RNA提取试剂盒；反转录试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒（FastPure Plasmid Mini Kit），EB染液，loading buffer，2000marker。

#### 2.2.2. 培养基及其它试剂配制

LB液体（1L）：

表 2-1 LB液体培养基配方

Table 2-1 LB liquid medium formula

成分	质量
胰蛋白胨	10g
酵母提取物	5g
NaCl	10g

LB 固体 (1L) :

表 2-2 LB固体培养基配方

Table 2-2 LB solid medium formula

成分	质量
胰蛋白胨	10g
酵母提取物	5g
NaCl	10g
琼脂	15g

YEB 固体 (1L) :

表 2-3 YEB固体培养基配方

Table 2-3 YEB solid medium formula

成分	质量
胰蛋白胨	10g
酵母提取物	5g
NaCl	10g
琼脂	15g
蔗糖	15g

YEB 液体 (1L) :

表 2-4 YEB液体培养基配方

Table 2-4 YEB liquid medium formula

成分	质量
胰蛋白胨	10g
酵母提取物	5g
NaCl	10g
蔗糖	15g

MS 培养基配制:

表 2-5 MS培养基配方 (1L)

Table 2-5 MS medium preparation(1L)

组分	质量
蔗糖	30g
琼脂	8g
M519	4.3g

TBE 溶液的配制：称取 Tris 108g，硼酸 55g，40mL0.5M EDTA 溶解在 600mL 的去离子水中；pH 调至 8.3，加去离子水定容至 1L 后室温避光保存，使用时稀释 10 倍。

琼脂糖凝胶：首先稀释 10 倍 TBE，根据样多少分别称取 0.3g /0.6g/0.9g AGAROSE，取 30mL/60mL/90mL TBE 加热 2min，加入 0.3 $\mu$ L/0.6 $\mu$ L/0.9 $\mu$ L EB 染料，最后倒入制胶板，静置 30min 待冷却。

30ug/mL Kan：称取 0.3mgKan 溶于 10mL 蒸馏水中；50ug/mL Rif：称取 0.5mgRif 溶于 10mL 蒸馏水中。

## 2.3. 实验方法

### 2.3.1. 石蜡切片

将固定在 FAA 溶液中的斑果藤早期花蕾取出置于盛有 70%酒精溶液的玻璃皿中，清洗并处理材料（由于斑果藤花蕾表面有厚重的绒毛，使外界溶液难以渗透，因此将材料上端切掉，露出开口，保留材料中下部），室温下采取乙醇梯度系列脱水，每次 10min；在乙醇和二甲苯（乙醇：二甲苯=3:1/1:1）中透明，每次 10min；最后，二甲苯中透明 30min，于 40 $^{\circ}$ C 烘箱中渗蜡。使用 Leica EG1150H 石蜡自动包埋机包埋，石蜡凝固变硬后修成梯形方块，Leica RM2235 切片机切片，厚度为 8~10 $\mu$ m。

### 2.3.2. 转录组分析

#### 2.3.2.1. 构建 cDNA 文库及 Illumina 测序

首先，按照试剂盒的说明，从三个样品中提取它们的总 RNA，三个生物学重复，然后用 RNA-Seq 技术对全部提出的 RNA 中含有 poly A 结构的 mRNA 进行分离，然后

用 Oligo(dT)磁球对全部 RNA 中含有 polyA 结构的 mRNA 进行分离，再用离子断裂的方法将这些 mRNA 断裂成 300bp 长的碎片，再用六个碱基点的随机引物和反转录酶对这些碎片进行反向转录，得到 cDNA 的第一条链，以第一条 cDNA 作为模板扩增第二条 cDNA 链。在建立了一个数据库后，通过 PCR 对数据库的片段进行了富集，然后按照片段的大小来筛选数据库，数据库大小为 450 bp 之后，使用 Agilent 2100 生物分析仪对该文库进行质量和浓度检测，然后按照文库的有效浓度和该文库所需要的数据量，按照一定比例，将包含不同指数序列的文库的混合（每个样品和不同指数最终基于指数来区别各个样品的下机数据）。将所得到的混合质谱均稀释到 2nM，再进行碱化处理，得到单股质谱。本项目拟在在前期工作的基础上，利用 Illumina HiSeq 高通量测序技术，通过 RNA 提取、纯化和数据库构建，并利用二代测序技术对所有生物样本进行二代测序。测序完成后，对数据进行处理和分析的过程见图 2-1。

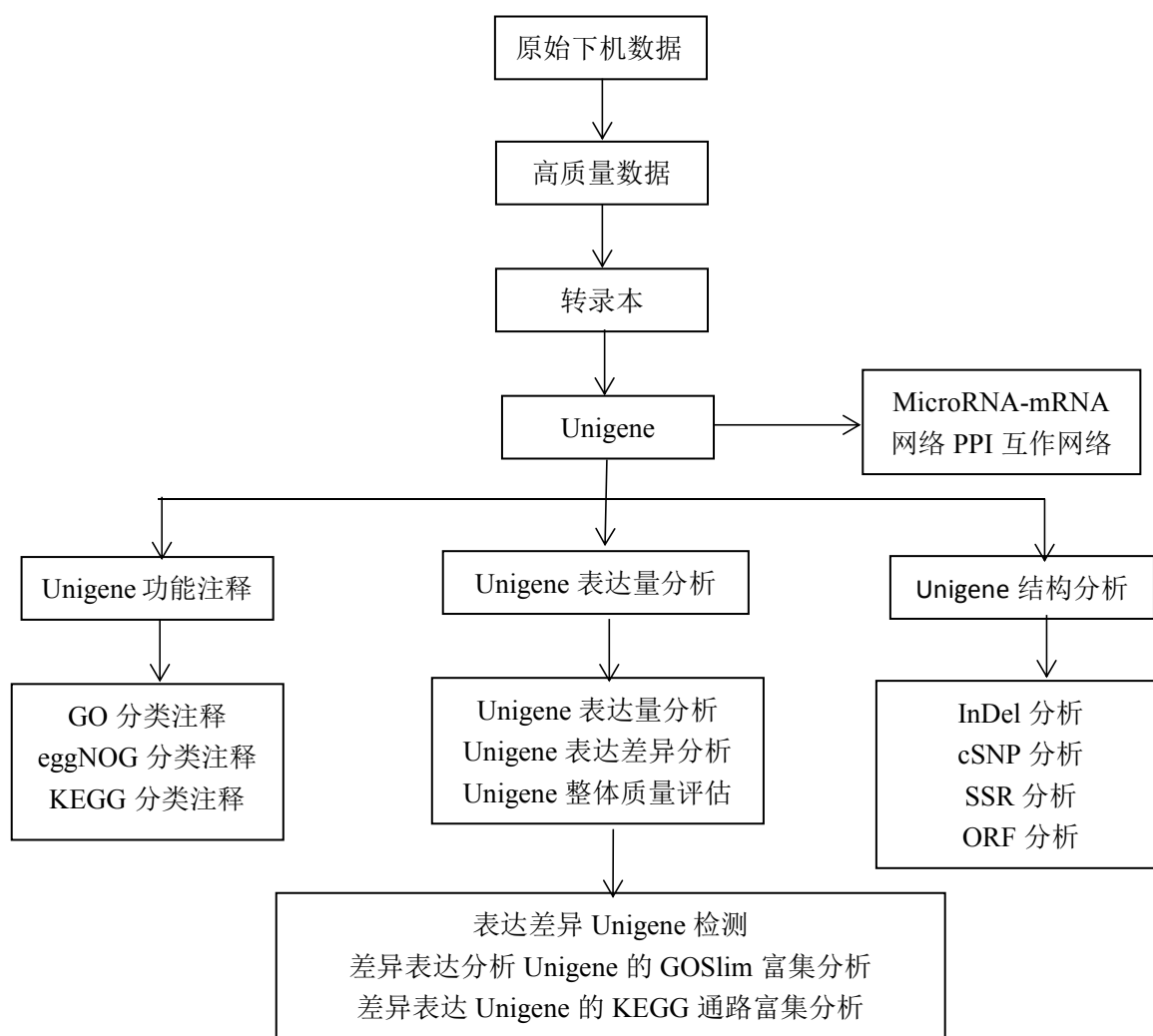


图 2-1 数据处理流程图

Figure2-1 Data processing flowchart

### 2.3.2.2. 下机数据的过滤、整理及转录本拼接

通过对样本下机器产生的 FASTAQ 原始数据的统计，删除部分接头和低质量片段，筛选得到 clean reads。具体操作如下：首先，除去一些 3'端接头和低于 Q20 的片段，然后将剩余的片段连在一起测序，然后再次将该序列打断成长度一致的片段，并进行延伸，最后将这些片段重新整合。

其中，过滤后质量为 20 以上的碱基（Q20）所占百分比 97%-98%之间，过滤后不碱基为 30 以上的百分比（Q30）为 92%-95%之间，而过滤后模糊碱基所占比例在 0.0003%-0.0004%之间。所有的 clean data 都是在 Trinity 的基础上重新组合和拼接的。

### 2.3.2.3. 数据库比对

将拼接好的转录本与 NR、GO、KEGG、NOG、SwissProt、Pfam 数据库进行比对分析。

### 2.3.2.4. 花发育基因的差异表达

在 Swissprot 数据库注释到的差异基因中，搜索斑果藤花发育相关基因，然后从斑果藤 Unigene 数据库中调取相关序列，输入 NCBI 数据库进行比对，确认基因类型，数据库未注释到的基因找近缘物种进行比对分析。

## 2.3.3. RT-PCR

### 2.3.3.1. 实验材料

见 2.1 实验材料。

### 2.3.3.2. 实验试剂

见 2.2 实验试剂。

### 2.3.3.3. 引物序列

表 2-6 引物序列

Table 2-6 Primer sequence

名称	引物序列 (5'→3')	用途
<i>AP2-F</i>	TCCAGTTCGGGTTATCAGAG	RT-PCR 验证
<i>AP2-R</i>	CCCATCTTCCACATTTATGC	RT-PCR 验证
<i>AP3-F</i>	GAGAGTGCTTGAACGAACTG	RT-PCR 验证
<i>AP3-R</i>	TGGTGGTGTCTATCTGGTTG	RT-PCR 验证
<i>PI-F</i>	GAGATTGTGGGATGCTAAGC	RT-PCR 验证
<i>PI-R</i>	CCTATGCTCTTCCCTCCTGTATC	RT-PCR 验证
<i>AG-F</i>	AGGTTGCTCTCGTAGTCTTCTC	RT-PCR 验证
<i>AG-R</i>	GGAAATCAGTTGACGCAGC	RT-PCR 验证

#### 2.3.3.4. 实验方法

##### (1) RNA 的提取

从-80℃冰箱取出实验材料后称重，加入液氮研磨成粉末。根据全式金 RNA 提取试剂盒说明方法进行操作，将得到的 RNA 存于-80℃冰箱短暂保存。

##### (2) 反转录

在无酶离心管中配制以下混合液

表 2-7 RNA模板变性混合液

Table 2-7 RNA template denaturation mixture

试剂	萼片	雄蕊
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	4μL	1μL
Total RNA	4μL	7μL

表 2-8 基因组DNA的去除

Table 2-8 Removal of genomic DNA

组分	体积
上一步混合液	8μL
5×gDNA wiper Mix	2μL

表 2-9 配置第一链cDNA合成反应液

Table 2-9 Preparation of the first strand of cDNA synthesis reaction solution

上一步混合液	10μL
10×RT Mix	2μL
HiScript III Enzyme Mix	2μL
Oligo(dT) <sub>20</sub> VN	1μL
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	5μL

用 mini 离心机（奥盛，Mini-6K）点离混匀

表 2-10 合成第一链cDNA反应程序

Table 2-10 Synthetic first strand cDNA reaction procedure

温度	时间
25℃ <sup>a</sup>	5min
37℃ <sup>b</sup>	45min
85℃	5sec

放置于-20℃冰箱短暂保存

### （3） RT-PCR 反应

10μl 体系

表 2-11 半定量RT-PCR反应液配制

Table 2- 11 Preparation of semi-quantitative RT-PCR reaction solution

组分	体积
Mix 酶	5μL
ddH <sub>2</sub> O	3.7μL
Primer1-F	0.4μL
Primer2-R	0.4μL
cDNA	0.5μL

表 2-12 半定量RT-PCR反应程序

Table 2-12 Semi-quantitative RT-PCR reaction procedure

温度	时间	
95℃	3min	
95℃	15sec	} 35 cycles
55.5℃	15sec	
72℃	1min	
72℃	5min	

### 2.3.4. AP2 和 AG 基因的克隆及生物信息学分析

#### 2.3.4.1. 实验材料

见 2.1 实验材料。

#### 2.3.4.2. 实验试剂

见 2.2 实验试剂

#### 2.3.4.3. 引物序列

表 2-13 引物序列

Table 2-13 Primer sequence

名称	引物序列 (5'→3')	用途
AG-F	CCAAATCGACTCTAGTCTAGAACGGAGTTCCAGAATCAGTTCAG	目的基因扩增
AG-R	GCCCTTGCTCACCATGGTACCTTATGTGTATATATTTATATGTGTG TGTGTGTG	目的基因扩增
AP2-F	ATGTTGATCTAAACGACTCACC	目的基因扩增
AP2-R	TTACCTTGCTGCTTCAATTCAGTG	目的基因扩增

#### 2.3.4.4. 实验方法



表 2-14 生信分析工具

Table 2-14 Bioinformatics analysis tools

生信分析	软件或网站
CDS 区预测	DNAMAN8
二级结构预测	<a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html</a>
三级结构预测	ExPaSy
功能结构域	NCBI
蛋白基序预测	<a href="https://meme-suite.org/meme/tools/meme">https://meme-suite.org/meme/tools/meme</a>
磷酸化分析	NetPhos
亚细胞定位	<a href="https://wolfsort.hgc.jp/">https://wolfsort.hgc.jp/</a>
跨膜区预测	<a href="https://www.novopro.cn/tools/tmhmm.html">https://www.novopro.cn/tools/tmhmm.html</a>
系统发育树	MEGA5

(1) PCR 反应

a. 分别将提取的斑果藤雄蕊和萼片的 cDNA 作为 PCR 扩增反应的模板，根据下表配制 PCR 扩增反应的反应液。反应体系为 20 $\mu$ L。

表 2-15 基因克隆反应体系

Table 2-15 Gene cloning reaction system

组分	体积
2 $\times$ Taq Master Mix	10 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	7.4 $\mu$ L
AP2/AG-F	0.8 $\mu$ L
AP2/AG-R	0.8 $\mu$ L
cDNA(stamens/sepal)	1 $\mu$ L

表 2-16 AG/AP2 基因克隆反应程序

Table 2-16 Gene cloning reaction procedure

温度	时间
95℃	3min (预变性)
95℃	15sec
60.6℃	15sec
72℃	1min
72℃	5min (彻底延伸)

} 35cycles

## (2) 胶回收

将琼脂糖凝胶电泳跑出的DNA条带于紫外灯下快速切下，按照全式金公司提供的胶回收试剂盒说明步骤操作，将回收到的DNA存放在-20℃冰箱短暂保存。

## (3) 测序

将 PCR 反应产物移至测序公司进行测序。

## (4) CDS 区预测

使用 DNAMAN8 软件对已克隆到的斑果藤花 AP2 和 AG 基因序列进行 CDS 区预测。首先，将转录组数据提供的转录本序列输入文本框，正反共有 6 种翻译方式，从而得到 6 条 frame。一般情况下，从起始密码子所翻译的氨基酸开始到后面第一个 gap 位点的最长的连续序列，一般即为该基因的编码区序列，即 CDS 区。

## (5) 二级结构预测

## (6) 三级结构预测

## (7) 功能结构域预测

## (8) 蛋白基序(motif)预测

设置预测 motif 数目为 10，其余参数保持默认值。

- (9) 磷酸化分析
- (10) 蛋白的亚细胞定位分析
- (11) 蛋白质跨膜区预测
- (12) 基因进化树

将目标基因序列输入在线工具 NCBI 去 blast 近缘同源基因, 将这些基因序列下载下来, 使用软件 MEGA5 分别构建各基因的系统发育树。

### 2.3.5. AG 基因表达载体的构建

#### 2.3.5.1. 实验材料

见 2.1 实验材料。

#### 2.3.5.2. 实验试剂

见 2.2 实验试剂。

#### 2.3.5.3. 实验菌株与载体

表 2-17 实验菌株与载体

Table 2-17 Experimental strains and vectors

功能	名称
大肠杆菌菌株	DH5 $\alpha$
农杆菌菌株	GV3101
表达载体	Pcambia2301 载体

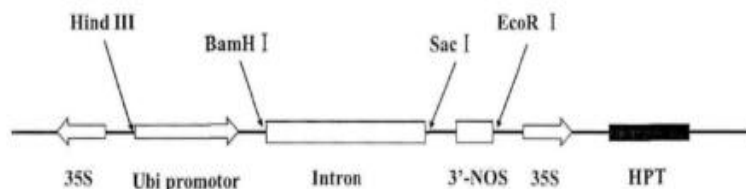


图 2-2 pCAMBIA2301 质粒 T-DNA

Figure 2-2 pCAMBIA2301 plasmid T-DNA

### 2.3.5.4. 实验方法

#### (1) 载体质粒的提取 (FastPure Plasmid Mini Kit)

根据诺唯赞公司提供的小量质粒抽提试剂盒说明书提取菌液质粒，将得到的质粒纯化后置于-20℃冰箱短暂保存。

#### (2) 双酶切

首先将pCAMBIA2301质粒活化，提取环状质粒后进行酶切，通过分析载体图谱，选择XbaI和KpnI，反应体系如下：

表 2-18 pCAMBIA2301 双酶切体系

Table 2-18 pCAMBIA2301 double enzyme digestion system

反应体系	体积
Buffer	2μL
pCAMBIA2301	1μL
XbaI	1μL
KpnI	1μL
ddH <sub>2</sub> O	5μL

PCR程序：37℃，2h结束后，加入 5ul 10X Loading Buffer使酶失活

反应结束得到的PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳检测其是否酶切成功，并胶回收对质粒进行纯化。进行浓度测定，浓度达标后，可用于后续实验。

#### (3) 同源重组连接

将酶切后且浓度达标的质粒，利用同源重组的方法与目的基因进行连接。

表 2-19 连接体系

Table 2-19 Connection system

组分	体积
线性化载体	8μL
目的基因	3μL
5×CE II Buffer	4μL
Exnase II	2μL
ddH <sub>2</sub> O	3μL

移液枪反复吹打混匀，使用迷你离心机短暂离心将反应液收集至管底；于 PCR 仪上 37℃反应 30min，立即转化大肠杆菌或放入 4℃冰箱短暂保存。

(4) 转化大肠杆菌

将大肠杆菌 DH5α感受态细胞从-80℃冰箱取出，置于冰上自然融化，根据诺唯赞公司提供的操作说明将同源重组片段转入大肠杆菌感受态，并加入不含抗性的液体培养基培养 1h 后涂布到卡那抗性的固体培养基上，倒置在 37℃培养箱中培养 18-20 小时。

(5) 菌落 PCR

挑取重组反应转化平板培养基上若干个大而圆润的单菌落，按照以下程序进行菌落 PCR。若有略大于目的基因片段长度的条带出现，单一且明亮，说明重组产物连接成功。

表 2-20 菌落PCR体系

Table 2-20 Colony PCR system

组分	体积
2×Taq Master Mix	5μL
ddH <sub>2</sub> O	2μL
AP2-F	0.5μL
AP2-R	0.5μL
cDNA	2μL

反应程序：

表 2-21 菌落PCR反应程序

Table 2-21 Colony PCR reaction procedure

温度	时间
95℃	3min (预变性)
95℃	15sec } 35cycles
60.6℃	
72℃	
72℃	5min (彻底延伸)

**(6) 摇菌液**

选取数个在 LB 固体培养基上长出的单菌落挑到 10mL LB 液体培养基上（卡那 10uL），在 28℃ 200r 中摇 24h 左右，待菌液 OD<sub>600</sub> 值在 OD<sub>600</sub>=1.8-2.0 之间，即可进行后续实验。

**(7) 提质粒**

步骤与 2.2.6.1 相同

**(8) 转化农杆菌**

将农杆菌感受态细胞从-80℃冰箱拿出，立即插进冰上，待其自然融化，然后按照说明书步骤进行操作。

**(9) 摇菌液**

一摇：将在固体 YEB 上长出的单菌落挑到 10mLYEB（含抗生素各 10uL）液体中，在 28℃ 200r 中摇 24h，测 OD<sub>600</sub> 值，使 OD<sub>600</sub>=1.8-2.0 之间。

二摇：在 OD<sub>600</sub>=1.8-2.0 之间的菌液里取 50uL 加入到 50mLYEB（含抗生素各 50uL）液体中，28℃ 150r 中摇 24h，测 OD<sub>600</sub> 值，使 OD<sub>600</sub>=1.8-2.0 之间，进行菌液 RCR。

**(10) 菌液 PCR**

① 破壁复苏：取 OD<sub>600</sub>=1.8-2.0 之间菌液于一灭菌的离心管中，短暂离心，弃掉上清液，加入无菌水，振荡混匀，高低温反复冻融（-20℃ 5min→沸水 10min→-20℃ 5min→沸水 10min）

② 菌液 PCR

表 2-22 菌液PCR体系

Table 2-22 Bacterial liquid PCR system

组分	体积
2×Taq Master Mix	5μL
ddH <sub>2</sub> O	3.7μL
AP2-F	0.4μL
AP2-R	0.4μL
cDNA	0.5μL

反应程序:

表 2-23 菌液PCR反应程序

Table 2-23 Bacterial solution PCR reaction procedure

温度	时间
95℃	3min (预变性)
95℃	15sec
60.6℃	15sec
72℃	1min
72℃	5min (彻底延伸)

} 35cycles





### 第三章 结果与分析

#### 3.1. 体视显微镜与石蜡切片

##### 3.1.1. 体视显微镜



图 3-1 斑果藤与节蒴木幼嫩花形态

Figure 3-1 Young flowers morphology of *Stixis suaveolens* *Borthwickia trifoliata*

1 斑果藤花横切；2 斑果藤花纵切；3 节蒴木花横切；4 节蒴木花纵切

1 Cross-section of *Stixis suaveolens* flower; 2 Longitudinal section of *Stixis suaveolens* flower; 3 Cross-section of *Borthwickia trifoliata*; 4 Longitudinal section of *Borthwickia trifoliata*

图注：S 花萼，G 雌蕊，St 雄蕊；P 花瓣

##### 3.1.2. 石蜡切片

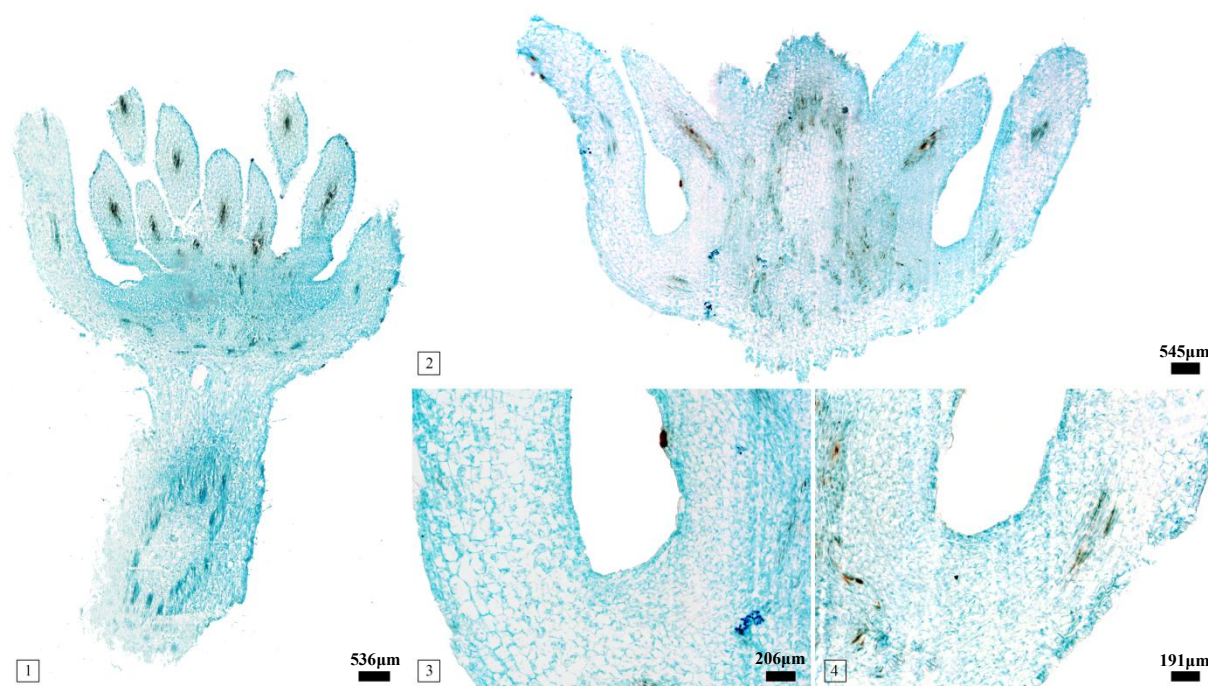


图 3-2 斑果藤幼嫩花芽纵切

Figure 3-2 Longitudinal cutting of young flower buds of *S. suaveolens*

1 示斑果藤较早时期花纵切整体观；2 示斑果藤稍晚时期花纵切；3 斑果藤花芽纵切（左局部放大）；  
4 斑果藤花芽纵切（右局部放大）

1 Early period flower bud longitudinal cutting of *S. suaveolens*; 2 Later period flower bud longitudinal cutting of *S. suaveolens*; 3 flower bud longitudinal cutting of *S. suaveolens*(enlarge); 4 flower bud longitudinal cutting of *S. suaveolens*(enlarge)

图注：S 花萼，G 雌蕊，St 雄蕊；Vb 维管束

## 3.2. 转录组分析

### 3.2.1. 转录本拼接

#### 3.1.1.1 结果及评估

使用 Trinity 软件对所有 clean data 进行从头组装共得到 42248 条 Unigene 基因，平均长度 1437bp。

表 3-1 组装质量统计表

Table 3-1 Statistical tables of assembly quality

基因数量 Genes Num	GC 含量 GC percentag	N50 数量 N50 number	N50 含量 N50 length	最长长度 Max length	平均长度 Average length	全部碱基数 Total assembled bases
42248	41.68	8764	2306	17312	1437.25	60720999

表 3-2 数据统计结果

Table 3-2 Statistical results

样品 samples	高质量序列 Clean Data(bp)	Q20(%)	Q30(%)	N(%)	
	CK1	7413673800	97.98	94.47	0.00039
花蕾	CK2	7028263200	97.88	94.2	0.000394
	CK3	7252811100	97.8	94.05	0.000389
	T1	7122113400	97.68	93.77	0.000393
开放的花	T2	7537725600	97.47	93.29	0.000393
	T3	6486383700	97.61	93.58	0.000396
	M1	7087060500	97.36	92.83	0.00037
幼嫩茎叶	M2	6896691900	97.61	93.68	0.000389
	M3	6192655500	97.38	93.25	0.000388

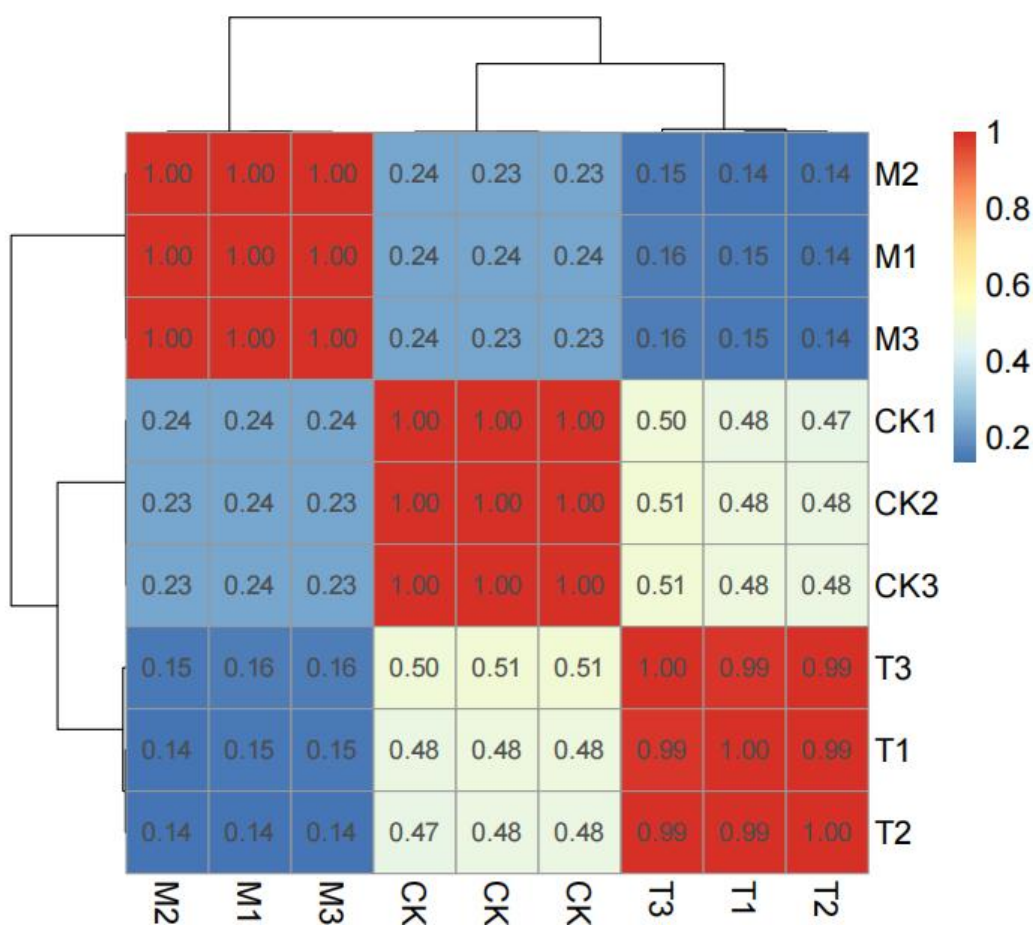


图 3-3 试验样品基因表达水平相关性检验

Figure 3-3 Correlation test of gene expression level in test samples

### 3.2.2. 数据库注释结果

与各大数据库进行比对, 比对结果如下表。在所有的 42248 条 Unigene 序列中, 14696 个被匹配到了 NR 数据库, 占比 34.79%; 在 GO 数据库中, 有 5629 个序列被注释, 占比 13.32%; 在 KEGG 数据库中, 注释到了 9571 个序列, 占比 22.65%; 对 Pfam 的注释有 16700 个, 占比 39.53%; 13269 个与 NOG 相关的条目被注释, 占比 31.41%; 注释至 Swissprot 的 22346 条序列, 占比 52.89%; 3582 个对上述数据库进行了注释, 占 8.48%。

表 3-3 各数据库注释到的基因数

Table 3-3 Number of genes annotated in each database

Total Unigenes	NR	GO	KEGG	NOG	Swissprot	Pfam	All dasebase
42248	14696	5629	9571	13269	22346	16700	3582

### 3.2.2.1. GO 数据库

通过与 GO 数据库进行比对，将 5629 条 Unigene 大致分为三大类，分别为：生物学过程、细胞组分和分子功能，共包括 43 个分支。结果如表 3-4。

表 3-4 Unigene 的GO 分类注释统计

Table 3-4 Unigene GO classification statistics

功能类别	Unigene 数量	功能
cellular process	3211	
metabolic process	2744	
single-organism process	1911	
localization	818	
biological regulation	774	
cellular component organization or biogenesis	766	
response to stimulus	497	
signaling	189	生物学过程
reproduction	159	Biological process
reproductive process	158	
multi-organism process	97	
developmental process	51	
growth	47	
detoxification	22	
biological phase	10	
multicellular organismal process	7	
cell	3013	
cell part	3000	
organelle	2002	

---

macromolecular complex	1238	
organelle part	1021	细胞组分
membrane	798	(Cellular component)
membrane part	451	
membrane-enclosed lumen	234	
supramolecular fiber	61	
virion	14	
virion part	14	
nucleoid	10	
extracellular region	7	
extracellular region part	4	
extracellular matrix	2	
catalytic activity	2289	
binding	2112	
structural molecule activity	565	
transporter activity	247	
molecular function regulator	44	
electron carrier activity	34	分子功能
antioxidant activity	34	Molecular function
nucleic acid binding	22	
transcription factor activity	22	
signal transducer activity	16	
transcription factor activity, protein binding	12	
nutrient reservoir activity	2	

---

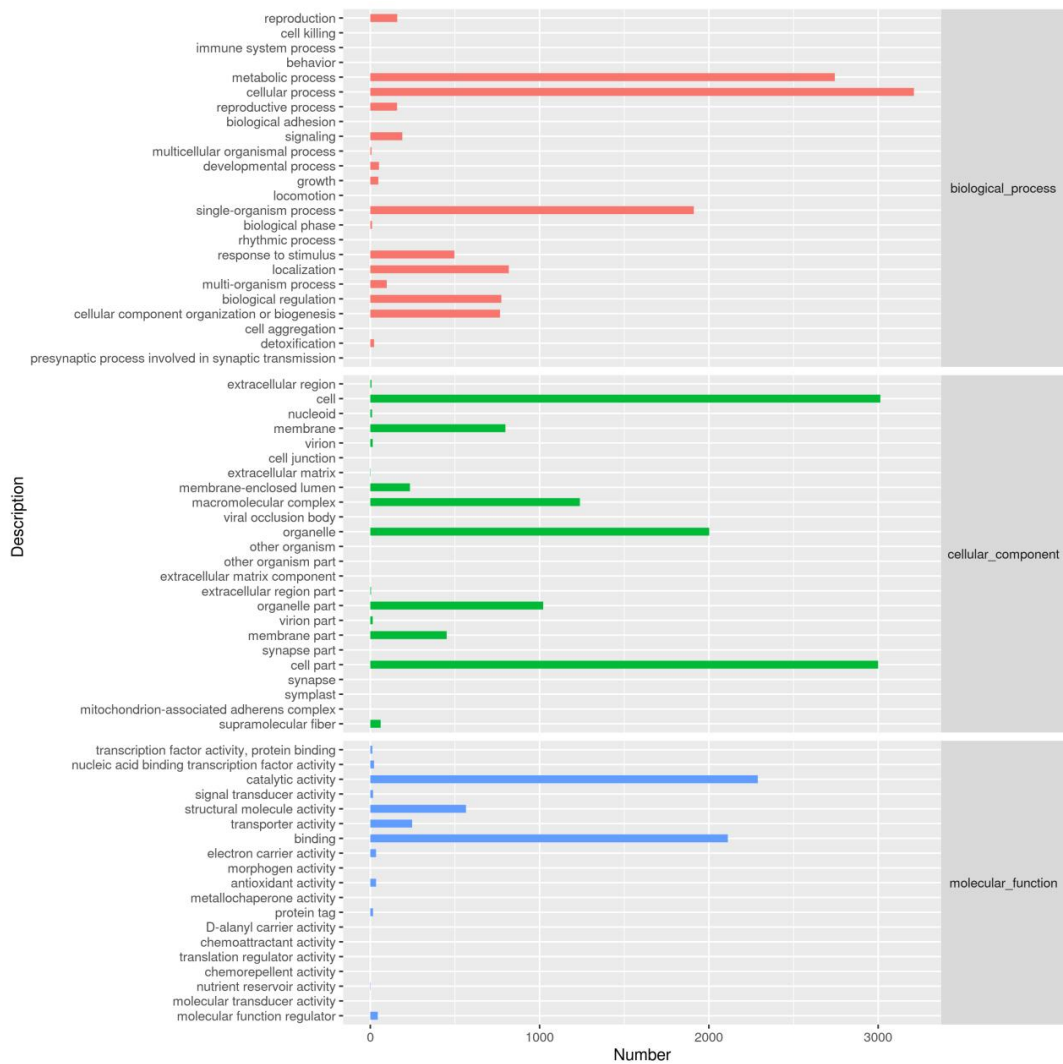


图 3-4 Unigene 的 GO 分类注释

Figure3-4 Unigene GO classification notes

### 3. 2. 2. 2. KEGG 数据库

根据 KEGG 数据库，把转录组中 9571 条 Unigenes 分为 114 类。其中，富集到核糖体（Ribosome）相关的基因数量最多，涉及 746 个基因；其次是酵母 MAPK 激酶途径（MAPK signaling pathway - yeast）相关的基因有 413 个；然后是内质网蛋白质加工（Protein processing in endoplasmic reticulum）相关基因有 326 个。结果见表 3-5 及图 3-3。

表 3-5 Unigene的KEGG代谢途径分类（Unigene中注释基因数大于 2%的途径）

Table 3-5 Unigene classification of KEGG metabolic pathways (pathways with than 2%)

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/496011205015011011>