

研究报告 Original Papers

TOR介导的糖激活SAM活性的拟南芥自然变异位点鉴定

秦萍^{1,2,#}, 李平^{1,#}, 孙爱清², 杨静², 滕胜^{2,*}¹上海大学生命科学学院, 上海200444²中国科学院上海植物生理生态研究所分子植物科学卓越创新中心光合与环境实验室, 上海200032

摘要: 在黑暗条件下, 糖能激活拟南芥的茎顶端分生组织(SAM)发育成叶状器官, 该现象已成为植物糖敏感性的重要指标之一。本研究发现, 通过RNAi降低雷帕霉素靶标(TOR)的表达, 能降低拟南芥幼苗的糖敏感性, 表明TOR参与了糖对SAM的激活。本研究还通过对265个拟南芥自然生态型的鉴定, 筛选到了一个糖敏感性较低的生态型CS76205; 进一步分析发现, Col-0和CS76205的F₁代的糖敏感性处于Col-0和CS76205之间, 偏向CS76205; Col-0×CS76205 F₂群体的糖敏感性呈正态分布, 通过二代测序对CS76205生态型和F₂代的两个极端表型混合池进行全基因组重测序, 在3号染色体定位到一个糖激活SAM活性相关的区域, 位于2.520 Mb和3.715 Mb之间, 利用生物信息学的手段对该关联区域进行注释, 筛选出9个关键的候选基因。这为进一步克隆该位点基因、揭示该基因功能及其和TOR之间的关系奠定基础。

关键词: 糖信号; 茎顶端分生组织(SAM); 雷帕霉素靶标(TOR); 集群分离分析法(BSA)

糖类是植物利用太阳能进行光合作用的产物, 它不仅为植物的生长发育提供了能量, 还可以作为信号因子对植物的生长发育、基因表达等进行调控(Moore等2003; Smeekens等2010)。

目前已经发现多个糖营养介导的植物生长发育的调控体系(Smeekens等2010)。包括己糖激酶(hexokinase, HKK)、海藻糖-6-磷酸(trehalose 6-phosphate, T6P)、雷帕霉素靶蛋白激酶(target of rapamycin, TOR)、蔗糖非酵解型相关蛋白激酶1(snfl-related protein kinase1, SnRK1)和C/S1 bZIP转录因子等。其中HKK、T6P和TOR激酶主要是促进植物生长的, 而SnRK1和C/S1 bZIP转录因子一般都是抑制植物生长的。

拟南芥己糖激酶1(hexokinase1, HKK1)是一种磷酸化葡萄糖的酶, 也可作为信号感受体响应葡萄糖, HKK1作为葡萄糖传感器和信号转导器并不是通过其激酶活性起作用的(Moore等2003)。T6P是植物海藻糖代谢过程中的中间产物, 也是重要的信号分子; T6P影响植物的生长和花发生, 还影响小麦籽粒的发育, 严重缺乏T6P会导致胚胎死亡(Gomez等2010; Martinez -Barajas等2011)。当糖供应充足时, T6P积累, 抑制SnRK1活性, 阻断逆境响应基因的表达, 诱导营养充足时生长过程所需

基因的表达, 从而增加碳营养的可利用率(Baena-Gonzalez和Sheen 2008; Gomez等2010)。SnRK1是一种保守的蛋白激酶复合物, 主要调节植物体内的能量平衡(Margalha等2016)。当糖和能量缺乏时, SnRK1会被激活, 从而引起巨大的代谢和转录变化(Baena-Gonzalez等2007; Hardie 2007; Baena-Gonzalez和Sheen 2008), 抑制植物的生长, 保证其在营养缺乏的逆境条件下亦能存活。SnRK1不仅能对胁迫作出有效的反应, 还能影响植物的整体生长和营养物质的再活化(Lastdrager等2014; Tsai和Gazzarrini 2014)。有研究指出在糖供应不足条件下, 转录因子C/S1 bZIP调控相关基因的表达, 其中bZIP11属于S1 bZIP, 当其受到强烈诱导表达后可抑制植物生长, 但是此过程与营养利用无关(Hanson等2008)。

TOR (target of rapamycin)蛋白激酶存在于几乎所有真核生物中。植物中TOR复合体主要包括一个TOR蛋白和两个RAPTOR蛋白(AtRAPTOR1a & b)以及两个LST8蛋白(AtLST8-1&2)。在植物的

收稿 2019-04-20 修定 2019-05-14

资助 国家自然科学基金(31370284)。

并列第一作者。

* 通讯作者(steng@sibs.ac.cn)。

大多数组织中都能观察到TOR的表达,但主要在分生组织的增殖细胞中表达。TOR信号通路与植物的生长发育、代谢等都密切相关, TOR通过调节转录、翻译等来调控植物的生长、发育、开花等生命活动(Li等2017)。TOR的过量表达有利于积累更多的生物量,产生更多的种子并且更能抗胁迫(Roldan等1999)。反之,通过组成型或诱导型RNA干扰(RNA interference, RNAi)下调TOR,导致植物器官生长缓慢和早衰以及严重的转录和代谢紊乱,从而影响糖和氨基酸的积累(Roldan等1999)。在拟南芥中, LST8-1的突变导致营养生长被抑制以及花发育异常(Moreau等2012)。拟南芥*AtRaptor1b*突变体表现出开花延迟,花序分枝数目增加;若*RAPTOR*基因的2个拷贝都缺失则胚后,分生驱动的植物生长不能得到维持(Anderson等2005; Mahfouz等2006)。但是目前对于TOR复合体的分子功能的研究并不是特别的清楚,仅鉴定出了极少数的目标基因(Robaglia等2012)。

植物茎顶端分生组织(shoot apical meristem, SAM)是叶、茎、侧枝、花序等地上部分所有组织和器官的源泉,是植物株型形成的基础。茎顶端分生组织及衍生的分生组织、横向和腋生分生组织以及花分生组织直接影响作物的产量性状(Wang等2008; Wang和Li 2008)。

过去研究者们对于SAM功能的研究主要集中在植物发育方面(Barton 2010)。植物的生长发育离不开对糖等营养物质的利用,在植物细胞的分裂和分化过程中,包括分生组织的维持和器官的形成所需要的大量碳水化合物和植物的营养水平密切相关(Francis和Halford 2006)。研究发现分生组织细胞的分化依赖于碳源,可代谢糖在激活拟南芥分生细胞周期特别是在G1转至S和G2转至M期中起很关键的作用(Riou-Khamlichi等2000; Skylar等2011),还发现SAM生长能被外源添加的蔗糖激活(Wu等2005)。

SAM的激活是植物种子萌发和幼苗生长发育的基础。一般而言, SAM的激活需要光的参与,但在黑暗条件下,对SAM补给可代谢糖(蔗糖、葡萄糖或果糖)也能促使茎顶端分生组织发育成叶状器官,因此,在黑暗条件下,糖依赖的植物发育表型

已成为植物糖敏感性的重要指标之一(Roldan等1999)。最近有研究表明糖对SAM的激活需要BR信号的参与(Peng等2018)。

本研究发现糖对SAM的激活依赖于TOR; SAM激活对糖的敏感性在拟南芥的生态型中存在广泛的自然变异;利用筛选的糖弱敏感生态型CS76205与Col-0杂交,构建F₂群体,采用BSA-seq方法定位到一个参与糖激活SAM活性的新位点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究采用的*est1*是以拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]生态型Col-0为背景,具有雌二醇(Estradiol, est)诱导的TOR-RNAi (RNA Interference)的转基因材料(Xiong和Sheen 2012)。本研究还对Col-0和CS76205等265个生态型进行糖敏感性筛选。以糖弱敏感的生态型CS76205作为亲本,与Col-0杂交构建的F₁代和F₂代。观察F₁代和F₂代的顶端分生组织对蔗糖的敏感性表型。从F₂代中分别挑选2个极端表型各20株用于BSA-seq分析。

1.2 拟南芥的培养

采用5%的次氯酸钠溶液以对拟南芥种子进行表面消毒10 min,然后将种子用无菌水在超净台中清洗4~5次。再将种子放在4°C冰箱黑暗条件下吸胀3 d。经此灭菌的种子铺到1/2MS培养基(含1%蔗糖, pH=5.8)的方形培养皿上,用封口膜将方皿封口,在黑暗条件下垂直培养14 d;然后在体视镜下观察拟南芥的SAM的生长状况并拍照记录。培养箱的培养条件设置为22°C。在研究与TOR活性相关的实验中,在1/2MS培养基中再添加0.5 μmol·L⁻¹ est,以不添加est为对照,其他培养条件不变。

1.3 拟南芥茎顶端分生组织表型观察

将拟南芥幼苗放置在体视镜下,拍照记录幼苗顶端分生组织的生长状况。

1.4 基因组提取

取植物新鲜组织约100 mg,加入液氮充分碾磨。用植物基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN BIOTECH, 目录号: DP305)提取基因组。具体步骤如下:将研磨好的粉末迅速转移到预先装有700 μL 65°C预热缓冲液GPI的离心管中(实验前在预热的

GP1中加入巯基乙醇,使其终浓度为0.1%),迅速颠倒混匀后,将离心管放在65°C水浴20 min,水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次。加入700 μL 氯仿,充分混匀,13 400 $\times g$ 离心5 min。小心地将上一步所得上层水相转入一个新的离心管中,加入700 μL 缓冲液GP2,充分混匀。将混匀的液体转入吸附柱CB3中,13 400 $\times g$ 离心30 s,弃掉废液。向吸附柱CB3中加入500 μL 缓冲液GD(使用前请先检查是否已加入无水乙醇),13 400 $\times g$ 离心30 s,倒掉废液,将吸附柱CB3放入收集管中。向吸附柱CB3中加入600 μL 漂洗液PW(使用前请先检查是否已加入无水乙醇),13 400 $\times g$ 离心30 s,倒掉废液,将吸附柱CB3放入收集管中,此步骤重复一次。将吸附柱CB3放回收集管中,13 400 $\times g$ 离心2 min,倒掉废液。将吸附柱CB3置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。将吸附柱CB3转入一个干净的离心管中,向吸附膜的中间部位悬空滴加50~200 μL 洗脱缓冲液TE,室温放置2~5 min,13 400 $\times g$ 离心2 min,将溶液收集到离心管中。

1.5 BSA法混池构建和基因分型

从1级和4级(分级标准见结果2.1节)的 F_2 群体中分别选取20株单株,提取这些单株和亲本CS-76205的基因组。将20个1级的 F_2 单株和20个4级的 F_2 单株的DNA分别等量混合构建成对蔗糖不敏感的混合池和对蔗糖敏感的混合池。对2个混合池的DNA和CS76205的DNA进行测序。测序所得的原始序列经过滤处理,去掉低质量的序列,得到高质量的序列;然后先利用BWA软件(Li和Durbin 2009),将测序数据比对到已发表的拟南芥Col-0参考基因组序列上,利用SAMtools软件(Li等2009),将比对后所得数据中的重复序列删除;利用GATK软件(McKenna等2010)的Haplotype算法分析每个样品和参考基因组之间的基因型差异;再用Break-Dancer软件(Chen等2009)对样品的结构变异(structural variation, SV)进行检测。

1.6 关联区域定位与候选基因预测

将不同样品的分析结果进行合并和整合,得到样品之间的差异数据,并利用SnpEff软件(Cingolani等2012)对这些数据进行功能注释并根据变异点对蛋白编码的影响程度进行划分。根据基因

分型结果,筛选出亲本间纯合差异的多态性位点。选择亲本基因组作为参照,参考Takagi等(2013)的方法计算2个混合池在每个位点上的(SNP或/和InDel)Index值。混池的Index差值关联的区域即是目标性状关联的候选区域。为了消除假阳性的位点,利用标记在基因组上的位置,采用滑窗的方法,将Index值进行拟合,消除类似随机扩增导致的差异位点。选择窗口大小1 Mb、步长5 kb对 $\Delta\text{SNP-index}$ 在各个染色体上的分布进行作图,选取99.9%的置信水平作为筛选的阈值,置信水平以上的窗口作为候选区间。根据候选区间内功能注释、变异位点的影响以及基因的表达模式筛选跟拟南芥茎顶端分生组织生长发育相关的基因。

2 实验结果

2.1 TOR参与糖激活SAM活性

拟南芥幼苗在黑暗条件下的生长状况可以作为植物生长发育响应糖敏感性的指标(Baier等2004; Li等2007; Zheng等2015)。根据已有的文献报道(Peng等2018),结合我们的实际情况,我们将1%蔗糖条件下黑暗培养的拟南芥幼苗茎顶端分生组织的发育状况分成4级。1级是子叶未张或微张,未见叶原基;2级是子叶伸长,叶原基可见;3级是子叶张开,第一真叶张开,未出现明显的节间;4级是第一真叶伸长,第二真叶开始显露,节间不明显(图1-A)。已有研究发现,在含有1%甘露醇培养基上生长的拟南芥经黑暗培养后,幼苗只长到子叶张开就不再变化,表明葡萄糖诱导的拟南芥暗生长的表型不是因为渗透作用(Peng等2018)。我们将雌二醇(est)诱导TOR-RNAi株系*est1*和野生型Col-0分别培养在含有0和0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ est的1/2MS、1%蔗糖的培养基中。结果显示,在没有外源est添加的情况下,Col-0和*est1*茎顶端分生组织发育衡量级数主要分布于3级(图1-B);在添加0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ est对*est1*中的TOR进行RNA干扰的条件下,Col-0的SAM发育仍主要分布于3级,而*est1*的SAM发育受到明显的抑制,整体只处于1级(图1-B),表明TOR参与糖激活SAM活性。

2.2 糖弱敏感生态型CS76205的筛选

为了筛选出对糖敏感有差异的生态型,将

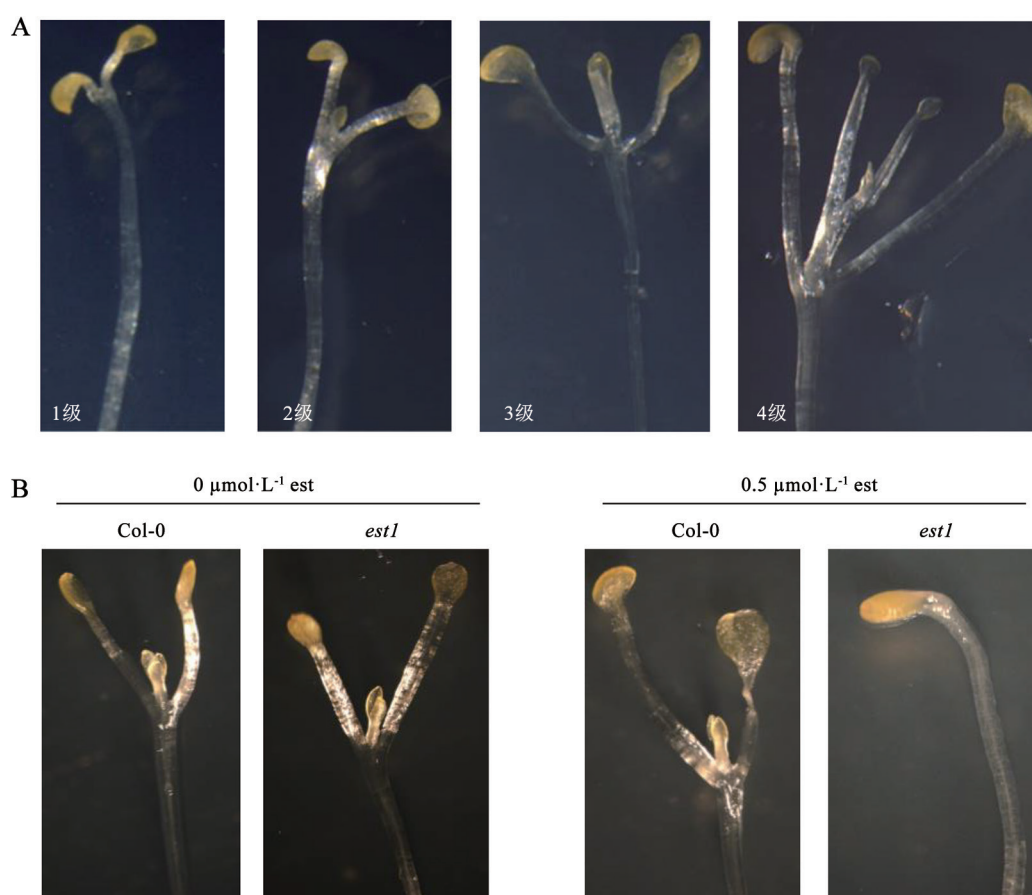


图1 TOR参与糖激活SAM活性

Fig.1 TOR participates in the activation of sugar-activated SAM

A: 拟南芥的SAM对糖响应的不同生长阶段的分级, 分别为1级、2级、3级和4级。B: Col-0和*est1*在含有0和0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ est的1/2MS培养基上暗培养14 d。

Col-0和CS76205等其他共265个生态型在1/2MS培养基上进行黑暗培养。结果发现, 包括Col-0在内的大多数自然群体都能正常地形成叶原基, 并进而形成真叶, 但是CS76205的生态型则表现出子叶伸长和叶原基可见; 通过分级统计, 我们发现Col-0的SAM发育到3级, 而CS76205的SAM发育到2级, 表明CS76205比Col-0对蔗糖不敏感(图2), 表明拟南芥的SAM对蔗糖的敏感性存在自然变异。

2.3 拟南芥SAM的遗传分析

将Col-0和CS76205生态型进行杂交得到F₁代, 给予相同培养条件, 通过多重比较Col-0、CS76205和F₁各自的平均级数, 发现F₁代的平均级数介于2级和3级之间, F₁表型偏向亲本CS76205, 二者之间无显著差异, 这表明CS76205对应的性状为显性性状(图3-

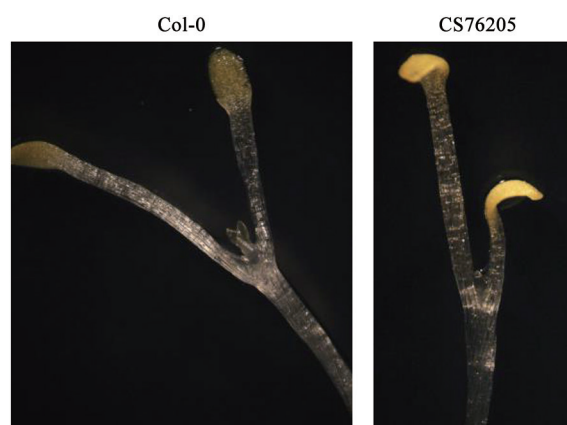


图2 蔗糖弱敏感生态型CS76205的筛选

Fig.2 The screen of sugar less sensitive ecotype CS76205 在培养基中暗生长14 d后拍照观察, Col-0属于3级, CS76205属于2级。

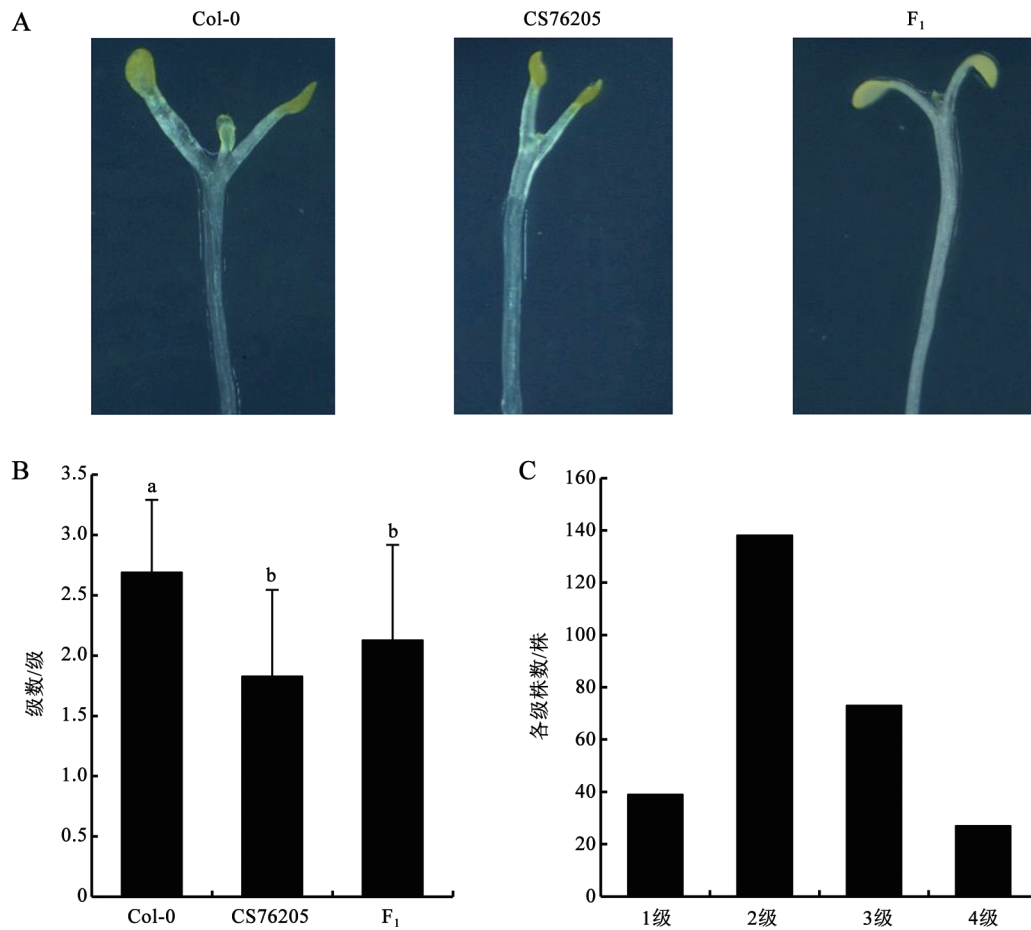


图3 拟南芥SAM发育的遗传分析

Fig.3 The genetic analysis of SAM in Arabidopsis

A: 拟南芥SAM发育表型; B: 表型统计, 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$); C: F₂表型各级统计。

A和B)。将F₁自交产生的F₂根据分级标准进行统计, 发现277株F₂代植株中各级分布为1级:2级:3级:4级=39:138:73:27, 说明CS76205×Col-0的F₂代群体中SAM的生长偏向于1级和4级的较少, 而偏向于2级的最多, 偏向于3级的次之(图3-C), 表明拟南芥SAM对蔗糖的响应是由多个基因控制的数量性状。挑选极端表型1级和4级的F₂对应单株进行BSA测序。

2.4 基于F₂极端表型混池测序的QTL分析

从1级和4级的F₂株系中分别选取20株单株构建混合池, 对2个混合池和亲本之一CS76205进行全基因组测序。将原始数据中的低质量数据过滤掉以后共获得33.65 G的高质量数据, 平均每个样品11.22 G高质量数据, 碱基质量Q30比例达到92.23%,

GC含量为38.31% (表1)。这些说明所有样本的数据量足够, 测序质量合格, GC分布正常, 测序数据与亲本基因组比对结果正常, 可用于后续的变异检测及性状的基因定位。

表1 各样品测序数据质控统计表

Table 1 The quality of sequencing data of every sample

样品编号	Clean Reads	Clean Base	GC/%	Q30/%
Group_3	73 984 298	11 040 929 361	38.31	93.64
Group_1	77 620 578	11 574 772 362	38.62	93.44
PAR_3	74 112 302	11 031 206 425	38.01	89.62

Clean Reads: 原始数据过滤后剩余的高质量Reads数; Clean Base: 高质量测序数据总碱基数; GC: Clean Data中的GC碱基占所有碱基的比例; Q30: Clean Data中质量值大于或等于30的碱基所占百分比。

通过生物信息学分析, 平均每个样品检测到753 169个SNPs和138 781个InDels, SNPs明显比InDels多。比较变异发生的位置, 发现无论是InDel变异还是SNP变异, 位于基因非编码区的多态性位点比编码区多。基于基因分型的结果, 筛选2个亲本间纯合差异的标记, 最终挑选出638 300个SNPs和127 025个InDels, 用于定位候选基因。

对于经过滤和筛选所得到的样本间SNP和InDel位点, 分别计算2个混池中每个位点的(SNP或

/和InDel) index值, 用于SAM响应蔗糖的相关基因的定位。定位结果显示, 在拟南芥3号染色体上的一个区域出现了一个超过临界值水平的显著峰; 按照距离划窗(窗口大小1 Mb、步长5 kb), 亲本和混池过滤深度10X, 定位到这个候选区间位于3号染色体上的2.520~3.715 Mb, 区间大小约1.19 Mb (图4-A、B和C), 说明这个区域包含调控茎顶端分生组织响应蔗糖生长的相关基因。

将关联区域内的基因, 与变异位点进行结合,

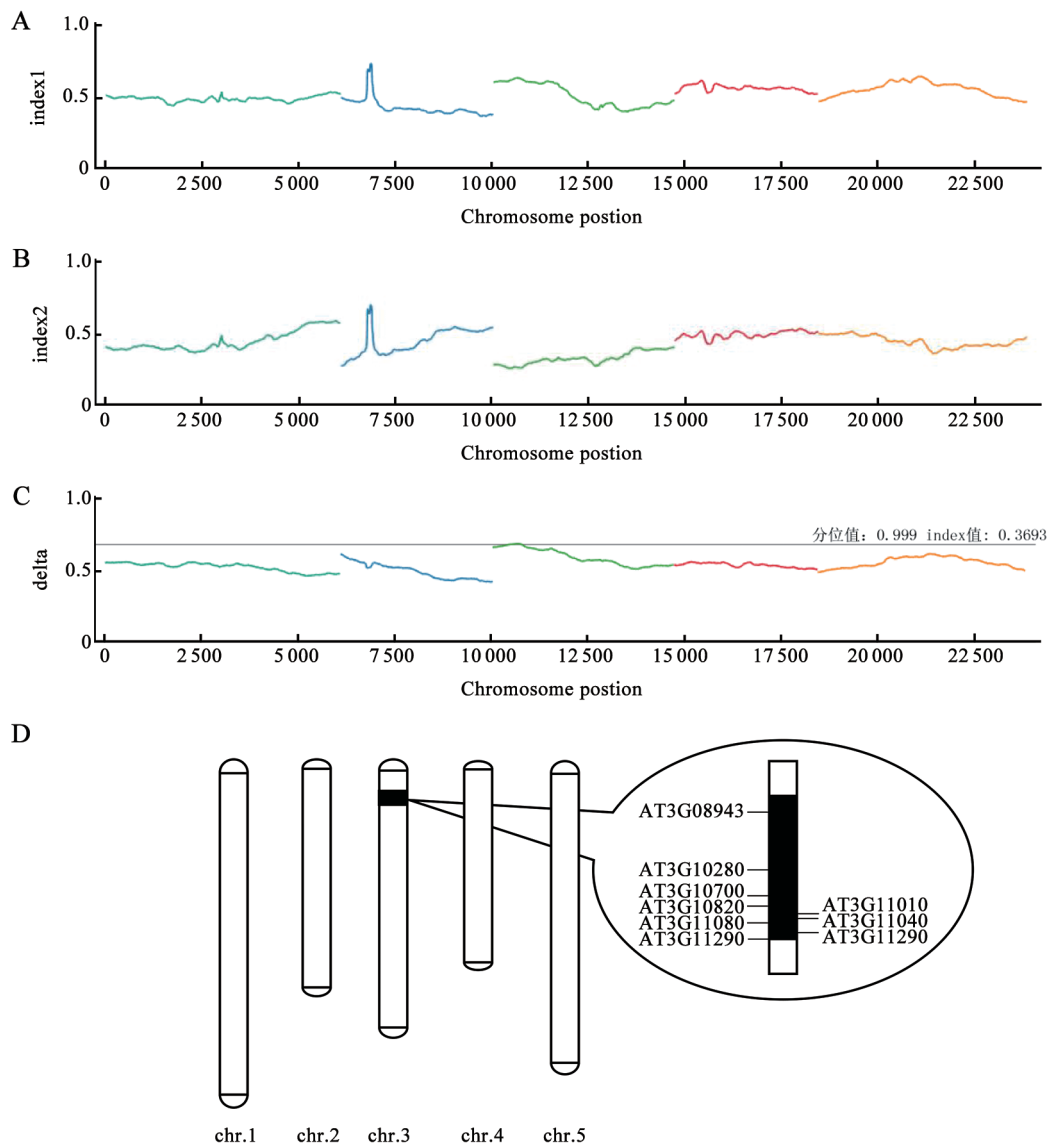


图4 变异位点的Index和候选基因在染色体上的分布图

Fig.4 The distribution of genotype frequency

关联区域定位在Chr.3上2.520~3.715 Mb。A: index1 (突变型); B: index2 (野生型); C: delta; D: 候选基因在染色体上的大概分布。

并利用Blast软件将基因序列与GO (Harris等2004)、NR、UniProt (UniProt Consortium 2015)、EggNOG (Jensen等2008)、EGG (Kanehisa和Goto 2000)等功能数据库比对, 确定发生突变的基因的功能。在候选区域内, 统计注释到数据库的基因个数共422个。

2.5 主效QTL候选基因的预测

根据SnpEff软件的注释结果, 筛选到变异位点对蛋白编码具有高功能影响(提前终止或产生移码)的基因16个, 根据Arabidopsis eFP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca>)数据库中的表达模式, 其中7个基因在SAM中不表达, 因此我们获得了9个候选基因, 分别是AT3G08943、AT3G10280、AT3G10-

700、AT3G10820、AT3G11010、AT3G11040、AT3G11080、AT3G11290和AT3G11520 (图4-D和表2)。

AT3G08943属于ARM (armadillo)重复超家族。AT3G10280编码的3-酮脂酰-CoA合酶(3-ketoacyl-CoA synthase, KCS)作为跨膜多酶复合体脂肪酸碳链延长酶的组成之一, 是脂肪酸碳链延长反应第一步中的关键酶, 与其他酶共同起作用, 形成超长链脂肪酸(Bach和Faure 2010; Haslam和Kunst 2013)。植物中发现了2种类型的KCS, 分别与植物的FAE1 (fatty acid elongation1)基因和酵母的ELO基因同源, 拟南芥中发现的FAE1类型的KCS可分为FAE1-like、KCS1-like等4个亚组(Dunn等2004; Costaglioli

表2 关联区间内的候选基因预测分析

Table 2 Prediction analysis of candidate genes within the association interval

候选基因	名称	位置/bp	变异位点/bp	变异类型	变异结果	注释
AT3G08943	—	2 718 88~2 722 624	2 720 585	InDel	移码突变产生提前终止	ARM重复超家族蛋白
AT3G10280	KCS14	3 180 064~3 181 611	3 180 185	InDel	移码突变产生提前终止	编码KCS14蛋白, 属于3-酮脂酰-CoA合酶的成员之一参与超长链脂肪酸合成
AT3G10700	GALAK	3 346 509~3 351 170	3 347 678	SNP	E→*	编码一种GHMP激酶家族蛋白, 该蛋白作为半乳糖醛酸-1-磷酸激酶, 催化半乳糖醛酸-1-磷酸生成, 半乳糖醛酸-1-磷酸是重要的细胞壁基本构成元素UDP-半乳糖醛酸的前体, 该转录本在植株所有组织中均有表达
AT3G10820	—	3 387 078~3 391 003	3 388 426/ 3 389 628	SNP	W→*	转录延长因子(TFIS)蛋白家族
AT3G11010	RLP34	3 450 496~3 453 985	3 452 177/ 3 452 180/ 3 452 766/ 3 452 770/ 3 452 767 (SNP)	InDel/SNP	移码突变产生提前终止 /Y→*	类受体蛋白34 (receptor-like protein 34, RLP34)
AT3G11040	ENGASE85B	3 459 939~3 463 264	3 463 484	InDel	移码突变产生提前终止	编码胞质β-内源性-N-乙酰氨基葡萄糖(ENGase)。ENGases M-glycan裂解M-glycan核结构的2个GlcNAc残基之间的O-糖苷键, 生成与天冬酰胺连接的单GlcNAc蛋白
AT3G11080	RLP35	3 470 304~3 473 685	3 471 689/ 3 471 691/ 3 472 848/ 3 472 853	InDel	移码突变产生提前终止	类受体蛋白35 (RLP35)
AT3G11290	—	3 535 561~3 537 904	3 536 587/ 3 536 591	InDel	移码突变产生提前终止	Myb/SANT类DNA结合域蛋白
AT3G11520	CYCB1;3	3 625 286~3 627 273	3 625 649	InDel	移码突变产生提前终止	编码B型细胞周期蛋白

等2005), 其中KCS14属于KCS1-like亚组, 其结构较复杂并具有2个跨膜结构域(Joubes等2008)。

*AT3G10700*编码的GALAK属于GHMP (galactokinase, homoserine, mevalonate, phosphomevalonate)激酶家族, 编码半乳糖醛酸-1-磷酸激酶, 催化半乳糖醛酸-1-磷酸的生成。GALAK具有特异的保守结构, 其中碳末端是 α - β 折叠和4个螺旋组合的结合域, 氮末端是一个由甘氨酸和丝氨酸富集的参与ATP结合的保守片段(Timson 2007)。与半乳糖激酶不同, *GALAK*基因在所有组织中都表达(Yang等2009)。

*AT3G10820*编码的蛋白属于转录延长因子(TFIIS)家族。TFIIS作用于RNA聚合酶II, 促进其转录活性, 并识别转录停顿或终止位点使RNA聚合酶II越过这些点, 使转录延长能够顺利进行(Mortensen等2011)。

*AT3G11010*编码的RPL34和*AT3G11080*编码的RPL35作为重要的细胞表面受体, 参与细胞内外的信号的转导, 对植物的生长发育起重要的调节作用(Wu等2016)。RPL34在烟草中的同源基因有*NTRLP20*、*NTRLP21*、*NTRLP46*、*NTRLP63*。研究表明, 在拟南芥受到白粉病菌(*E. orontii*)感染时, RPL35的表达量会升高(Wu等2016)。

*AT3G11040*编码的ENGASE85B是一种糖化酶, 主要定位在细胞质, 对蛋白质进行糖基化修饰, 合成一种含有N-乙酰葡萄糖胺的天冬酰胺(Kimura等2011)。*AT3G11290*编码一个Myb家族转录因子, 在植物的各组织中均有表达, 但尚未有相关功能研究的报道。

*AT3G11520*编码的CYCB1;3是一种B型细胞周期蛋白, 与细胞周期依赖蛋白激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)结合形成具有激酶活性的复合物(De Veylder等1997), 该复合物是植物所特有的, 参与调控有丝分裂G2/M期。

3 讨论

糖营养可以调控分生组织活性, 从而影响植物的生长、发育和产量, 但其作用机制尚未完全明确。高度保守的TOR蛋白复合体在植物的生长发育中起着非常重要的调控作用。TOR激酶复合

体的靶基因在营养感受信号机制中的多个不同的信号分支中也起着非常重要的作用, 调控细胞的生长和增殖, 影响分生组织活性。在我们的实验条件下, 发现在含1%蔗糖的1/2MS培养基中添加 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雌二醇后, Col-0的SAM对糖的敏感性变化不大, 但对于*est1*而言, 因TOR被抑制而表现出对蔗糖响应的不敏感, 表明糖激活SAM的活性需要TOR的参与。植物的发育依赖于分生组织将营养和能量与环境信号的整合利用, 有研究表明, 葡萄糖激发的TOR信号激活拟南芥的根尖分生组织, 促进根的生长; 但在SAM中, TOR信号的激发除了需要葡萄糖外, 还需要生长素(Li等2017)。在无光的条件下, 采用垂直培养, 让拟南芥的SAM与糖直接接触, 可以克服TOR的激发对生长素的需求。

植物的生长, 特别是茎器官的伸长, 是由几种促进生长的激素相互依赖的作用所驱动的, 除了生长素, 还有油菜素内酯(brassinosteroid, BR)和赤霉素(Chaiwanon等2016)。BR在糖诱导植物生长的过程中起关键作用(Zhang等2015)。研究发现, 碳利用通过TOR抑制自噬调控BR转录因子BZR1 (brassinazole-resistant1), 而且TOR的下游因子核糖体S6蛋白激酶2 (ribosomal protein S6 kinase beta-2, S6K2)可以直接磷酸化BIN2 (brassinosteroid insensitive 2) (Zhang等2016; Xiong等2017), 表明TOR可能参与BR信号途径, 但是TOR和BR之间的直接关系尚未可知。RLPs参与植物激素的信号传导, RLP41和RLP44分别调控拟南芥叶片对脱落酸的敏感性(Wang等2008)和BR信号途径(Wolf等2014), 而关于候选基因*RPL34*的相关功能尚未可知。

相较于TOR信号下游的研究而言, 其上游的研究还比较少。ROPs (rho-like small GTPases)家族是植物中特有的蛋白家族(Li等2001)。研究表明, 光和生长素都能激活ROP2, ROP2能与TOR互作且CA-ROP2 (a constitutively active form of ROP2)能促进TOR活性的增强(Li等2001; Jeon等2008)。在没有光的条件下, 过表达CA-ROP2能激活茎顶端分生组织的TOR激酶和有丝分裂, 表明ROP2是TOR上游一个很重要的调节子(Li等2017)。

SAM的生长发育是一个非常复杂的过程, 为了维持其正常的结构和生长, 需要各种信号途径

构成的网络参与精细调控, 比如CLV-WUS负反馈调节环参与维持SAM的大小(Schoof等2000)。而关于TOR是如何参与糖对SAM产生影响的这方面的报道还比较少。我们筛选到一个SAM发育相对较缓慢的糖弱敏感的拟南芥生态型CS76205, 与Col-0杂交, 通过对CS76205与Col-0杂交后代的遗传分析, F₂代中出现了分布在1级和4级株系, 这是由超亲遗传效应引起的, 说明SAM对蔗糖的响应是由多个基因控制的数量性状, 还可能受到环境因素的影响。从F₂代中挑选极端表型, 利用BSA测序分析定位到一个位于拟南芥3号染色体上关联区域。经过分析筛选, 在这个候选区域内共预测到9个候选基因, 这是我们下一步研究的基础。接下来, 我们将对BSA测序分析后所得的候选基因的功能做进一步研究。观察各个候选基因的突变体材料对糖的响应状况, 从而确定响应糖的主效基因, 再通过分子生物学等实验方法去研究该基因的功能, 以期对阐明TOR介导糖激活SAM活性的分子机制做一些贡献。

参考文献(References)

- Anderson GH, Veit B, Hanson MR (2005). The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol*, 3: 12
- Bach L, Faure JD (2010). Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *C R Biol*, 333 (4): 361–370
- Baena-Gonzalez E, Rolland F, Thevelein JM, et al (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448 (7156): 938–942
- Baena-Gonzalez E, Sheen J (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci*, 13 (9): 474–482
- Baier M, Hemmann G, Holman R, et al (2004). Characterization of mutants in *Arabidopsis* showing increased sugar-specific gene expression, growth, and developmental responses. *Plant Physiol*, 134 (1): 81–91
- Barton MK (2010). Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Dev Biol*, 341 (1): 95–113
- Chaiwanon J, Wang W, Zhu JY, et al (2016). Information Integration and Communication in Plant Growth Regulation. *Cell*, 164 (6): 1257–1268
- Chen K, Wallis JW, McLellan MD, et al (2009). BreakDancer: an algorithm for high resolution mapping of genomic structural variation. *Nat Methods*, 6 (9): 677–681
- Cingolani P, Platts A, Coon M, et al (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3. *Fly*, 6 (2): 80–92
- Costaglioli P, Joubes J, Garcia C (2005). Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Biochim Biophys Acta*, 1734 (3): 247–258
- De Veylder L, Segers G, Glab N, et al (1997). The *Arabidopsis* Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Lett*, 412 (3): 446–452
- Dunn TM, Lynch DV, Michaelson LV, et al (2004). A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*, 93 (5): 483–497
- Francis D, Halford NG (2006). Nutrient sensing in plant meristems. *Plant Mol Biol*, 60: 981–993
- Gomez LD, Gilday A, Feil R, et al (2010). *AtTPS1*-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. *Plant J*, 64 (1): 1–13
- Hanson J, Hanssen M, Wiese A, et al (2008). The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*. *Plant J*, 53 (6): 935–949
- Hardie DG (2007). AMPK and SNF1: snuffing out stress. *Cell Metab*, 6 (5): 339–340
- Harris MA, Clark J, Ireland A, et al (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*, 32: D258–D261
- Haslam TM, Kunst L (2013). Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Sci*, 210: 93–107
- Jensen LJ, Julien P, Kuhn M, et al (2008). eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes. *Nucleic Acids Res*, 36: 250–254
- Jeon BW, Hwang JU, Hwang Y, et al (2008). The *Arabidopsis* small G protein ROP2 is activated by light in guard cells and inhibits light-induced stomatal opening. *Plant Cell*, 20 (1): 75–87
- Joubes J, Raffaele S, Bourdenx B, et al (2008). The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Mol Biol*, 67 (5): 547–566
- Kanehisa M, Goto S (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28 (1): 27–30
- Kimura Y, Takeoka Y, Inoue M, et al (2011). Double-knockout of putative endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase) genes in *Arabidopsis thaliana*: loss of ENGase activity induced accumulation of high-mannose type free N-gly-

- cans bearing *N,N'*-acetylchitobiosyl unit. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75 (5): 1019–1021
- Lastdrager J, Hanson J, Smeeckens S (2014). Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot*, 65 (3): 799–807
- Li H, Durbin R (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25 (14): 1754–1760
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25 (16): 2078–2079
- Li H, Shen JJ, Zheng ZL, et al (2001). The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 126 (2): 670–684
- Li X, Cai W, Liu Y, et al (2017). Differential TOR activation and cell proliferation in *Arabidopsis* root and shoot apices. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114 (10): 2765–2770
- Li Y, Smith C, Corke F (2007). Signaling from an altered cell wall to the nucleus mediates sugar-responsive growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 19 (8): 2500–2515
- Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ (2006). *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell*, 18 (2): 477–490
- Margalha L, Valerio C, Baena-Gonzalez E (2016). Plant SnRK1 Kinases: Structure, Regulation, and Function. In: Cordero MD, Viollet B (eds). *AMP-activated Protein Kinase*. Switzerland: Springer, 403–438
- Martinez-Barajas E, Delatte T, Schluepmann H, et al (2011). Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose 6-phosphate accumulation pregrain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. *Plant Physiol*, 156 (1): 373–381
- Mortensen SA, Sonderkaer M, et al (2011). Reduced expression of the *DOG1* gene in *Arabidopsis* mutant seeds lacking the transcript elongation factor TFIIS. *FEBS Lett*, 585 (12): 1929–1933
- McKenna A, Hanna M, Banks E, et al (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*, 20 (9): 1297–1303
- Moore B, Zhou L, Rolland F, et al (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300 (5617): 332–336
- Moreau M, Azzopardi M, Clement G, et al (2012). Mutations in the *Arabidopsis* homolog of *LST8/GβL*, a partner of the Target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell*, 24 (2): 463–481
- Peng Y, Chen L, Li S, et al (2018). BRI1 and BAK1 interact with G proteins and regulate sugar-responsive growth and development in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 9 (1): 1522
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JM, et al (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol*, 20 (13): 4513–4521
- Robaglia C, Thomas M, Meyer C (2012). Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Curr Opin Plant Biol*, 15 (3): 301–307
- Roldan M, Gomez-Mena C, Ruiz-Garcia L, et al (1999). Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *Plant J*, 20 (5): 581–590
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, et al (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUS-CHEL* genes. *Cell*, 100 (6): 635–644
- Skylar A, Sung F, Hong F, et al (2011). Metabolic sugar signal promotes *Arabidopsis* meristematic proliferation via G2. *Dev Biol*, 351 (1): 82–89
- Smeeckens S, Ma J, Hanson J, et al (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol*, 13 (3): 274–279
- Takagi H, Abe A, Yoshida K, et al (2013). QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J*, 74 (1): 174–183
- Timson D (2007). GHMP kinases—structures, mechanisms and potential for therapeutically relevant inhibition. *Curr Enzym Inhib*, 3 (1): 77–94
- Tsai AY, Gazzarrini S (2014). Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Front Plant Sci*, 5: 1–11
- UniProt Consortium (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*, 43: 204–212
- Wang G, Ellendorff U, Kemp B, et al (2008). A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 147 (2): 503–517
- Wang Y, Li J (2008). Molecular basis of plant architecture. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 253–279
- Wolf S, Ladwig F, Sticht C, et al (2014). A receptor-like protein mediates the response to pectin modification by activating brassinosteroid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 (42): 15261–15266
- Wu J, Liu Z, Zhang Z, et al (2016). Transcriptional regulation of receptor-like protein genes by environmental stresses and hormones and their overexpression activities in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 67 (11): 3339–3351
- Wu X, Dabi T, Weigel D (2005). Requirement of homeobox

- gene *STIMPY/WOX9* for *Arabidopsis* meristem growth and maintenance. *Curr Biol*, 15 (5): 436–440
- Xiong F, Zhang R, Meng Z, et al (2017). Brassinosteroid Insensitive 2 (BIN2) acts as a downstream effector of the Target of Rapamycin (TOR) signaling pathway to regulate photoautotrophic growth in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 213 (1): 233–249
- Xiong Y, Sheen J (2012). Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J Biol Chem*, 287 (4): 2836–2842
- Yang T, Bar-Peled L, Gebhart L, et al (2009). Identification of galacturonic acid-1-phosphate kinase, a new member of the GHMP kinase superfamily in plants, and comparison with galactose-1-phosphate kinase. *J Biol Chem*, 284 (32): 21526–21535
- Zhang Y, Liu Z, Wang J, et al (2015). Brassinosteroid is required for sugar promotion of hypocotyl elongation in *Arabidopsis* in darkness. *Planta*, 242 (4): 881–893
- Zhang Z, Zhu JY, Roh J, et al (2016). TOR signaling promotes accumulation of BZR1 to balance growth with carbon availability in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 26 (14): 1854–1860
- Zheng L, Shang L, Chen X, et al (2015). *TANG1*, encoding a Symplekin_C domain-contained protein, influences sugar responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 168 (3): 1000–1012

Identification of natural-variation-locus involved in TOR mediated sugar activating shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*

QIN Ping^{1,2,#}, LI Ping^{1,#}, SUN Ai-Qing², YANG Jing², TENG Sheng^{2,*}

¹School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China

²Laboratory of Photosynthesis and Environmental Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: In the dark, sugar activates the shoot apical meristem (SAM) of *Arabidopsis thaliana* to develop leaf-like organs, which has become one of the important indicators of sugar sensitivity in plant. Our study found that the RNAi of target of rapamycin (TOR) decreased the sugar sensitivity, indicating that TOR is involved in the sugar-responsive SAM activation. We obtained a sugar less sensitive ecotype, CS76205, from 265 *Arabidopsis* natural ecotypes. Further analysis showed that the degree of sugar sensitivity of F₁ of Col-0 × CS76205 was intermediate between Col-0 and CS76205 and biased towards CS76205. The sugar sensitivity of Col-0 × CS76205 F₂ population was normal distribution. Whole-genome resequencing and subsequent Bulk Segregant Analysis (BSA)-seq analysis suggested that the sugar-induced SAM activity was mapped on chromosome 3 through a next-generation sequencing of CS76205 and the two extreme phenotype pools of F₂ generation. The associated region, located between 2.520 Mb and 3.715 Mb, was annotated with bioinformatics to filter out nine key candidate genes. Our study will contribute to lay the foundation for further cloning of the locus gene, revealing the function of the gene and its relationship with TOR.

Key words: sugar signal; target of rapamycin (TOR); shoot apical meristem (SAM); bulk segregant analysis (BSA)

Received 2019-04-20 Accepted 2019-05-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31370284).

#Co-first author.

*Corresponding author (steng@sibs.ac.cn).