

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 20620130153802

UDC____

廈門大學

博士学位论文

菊花心江蕨无性系构建及其不定芽诱导和固碳机制
的研究

Study on Tissue Culture and Mechanisms of Adventitious
Branches Induction and Inorganic Carbon Acquisition in
Gracilaria lichenoides

王文磊

指导教师姓名: 方柏山 教授

林祥志 研究员

专业名称: 生物化工

论文提交日期: 2016年4月

论文答辩时间: 2016年5月

学位授予日期: 2016年6月

答辩委员会主席:

评阅人:

2016年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	I
Abstract	IV
第一章 绪论	1
1.1 大型海藻无性繁殖系.....	1
1.2 大型海藻组织培养研究现状.....	2
1.2.1 callus 形成率低	2
1.2.2 不能控制 callus 的生长与分化	2
1.2.3 不定芽 (ABs) 更容易诱导	3
1.3 海藻无性系发育机制的研究.....	3
1.3.1 内源激素.....	3
1.3.1 miRNA.....	6
1.4 高通量测序概述.....	7
1.4.1 第二代高通量测序技术简介.....	7
1.4.2 转录组测序.....	8
1.4.3 小 RNA 测序.....	9
1.5 非损伤微测技术.....	9
1.6 菊花心江蓐简介.....	10
1.7 本研究的目的是和内容.....	11
1.7.1 研究目的.....	11
1.7.2 研究内容.....	11
第二章 菊花心江蓐不定芽 (ABs) 诱导的影响因素及其无性系构建的研究	12
2.1 材料与方法.....	12
2.1.1 藻体采集与处理.....	12
2.1.2 菊花心江蓐的切块培养.....	12
2.1.3 ABs 离体培养.....	13

2.2.结果与分析.....	13
2.2.1 菊花心江蓐无性系构建.....	13
2.2.2 温度对菊花心江蓐 ABs 诱导的影响	14
2.2.3 外源植物激素对 ABs 诱导的影响	15
2.2.4 低温条件下 (20℃) 不同光质对 ABs 诱导的影响	17
2.3 讨论.....	18
2.4 小结.....	19
第三章 菊花心江蓐 ABs 形成以及被抑制时的转录组测序分析.....	21
3.1 材料与方法.....	21
3.1.1 藻体采集与处理.....	21
3.1.2 菊花心江蓐 RNA 提取与质量分析	21
3.1.3 cDNA 文库构建和测序	23
3.1.4 转录组数据处理与分析.....	24
3.1.5 SSR 分析	27
3.1.6 SNP 的查找和分析	27
3.1.7 差异表达基因 qRT-PCR 验证	28
3.2 结果与分析.....	29
3.2.1 RNA 质量分析	29
3.2.2 测序数据组装与分析.....	30
3.2.3 转录组数据功能注释.....	31
3.3 讨论.....	42
3.3.1 生长素 (auxin) 极性运输和信号传导途径.....	43
3.3.2 细胞分裂素 (CTK) 合成途径.....	44
3.3.3 脱落酸 (ABA) 信号传导途径	45
3.3.4 乙烯 (ET) 信号传导途径.....	45
3.3.5 油菜素内酯 (BRs) 合成途径.....	46
3.3.6 水杨酸 (SA) 信号传导途径	46
3.3.7 抗氧化系统.....	47

3.3.8 磷脂酰肌醇信号传导途径.....	48
3.4 小结.....	51
第四章 菊花心江蒿 ABs 形成以及被抑制时的小 RNA 测序分析....	52
4.1 材料与方法.....	52
4.1.1 藻体采集与组织培养.....	52
4.1.2 总 RNA 提取与质量分析	52
4.1.3 小 RNA 分离、文库构建及测序	52
4.1.4 测序数据处理.....	52
4.1.5 差异表达 miRNA 定量验证.....	53
4.2 结果与分析.....	56
4.2.1 菊花心江蒿内源小 RNA 分析	56
4.2.2 菊花心江蒿新 miRNA 预测.....	61
4.2.3 miRNA 差异表达分析.....	65
4.2.4 菊花心江蒿已知 miRNA 和新 miRNA 的靶基因预测及功能注释	66
4.2.5 miRNA 与 mRNA 关联分析	66
4.2.6 菊花心江蒿差异表达 miRNA 的 qRT-PCR 验证	68
4.3 讨论.....	69
4.3.1 生长素 (auxin) 信号传导途径.....	69
4.3.2 细胞分裂素 (CTK) 信号传导途径.....	70
4.3.3 脱落酸 (ABA) 信号传导途径	70
4.3.4 磷脂酶 D (PLD)	71
4.3.5 其他信号传导途径.....	71
4.4 小结.....	71
第五章 菊花心江蒿 ABs 形成以及被抑制时的 IAA 流速变化分析 .73	73
5.1 材料与方法.....	73
5.1.1 藻体采集与组织培养.....	73
5.1.2 IAA、Ca ²⁺ 、H ₂ O ₂ 流速和流向测定	73
5.2 结果分析.....	75

5.2.1 IAA 流速分析	75
5.2.2 Ca ²⁺ 流速分析	76
5.2.3 H ₂ O ₂ 流速分析	76
5.2.4 IAA 含量分析	77
5.3 讨论.....	77
5.4 小结.....	80
第六章 菊花心江蓐固碳机制的初步研究	81
6.1 材料与方法.....	82
6.1.1 实验仪器与试剂.....	82
6.1.2 温度对菊花心江蓐固碳能力的影响.....	82
6.1.3 光照对菊花心江蓐固碳能力的影响.....	83
6.1.4 不同抑制剂对菊花心江蓐固碳能力的影响.....	83
6.2 结果与分析.....	84
6.2.1 温度对菊花心江蓐等大型海藻提升海水 pH 速率的影响.....	84
6.2.2 温度对菊花心江蓐等大型海藻吸收海水中 DIC 及 PGR 的影响....	86
6.2.3 温度对菊花心江蓐等大型海藻释放 DOC 的影响	87
6.2.4 光照对菊花心江蓐等大型海藻固碳效率的影响.....	89
6.2.5 不同抑制剂对菊花心江蓐固碳能力的影响.....	90
6.3 讨论.....	94
6.4 小结.....	96
第七章 结论与展望	97
7.1 全文结论.....	97
7.2 本文创新点.....	98
7.3 展望.....	99
参考文献	100
博士期间发表、待发表论文	119
致谢.....	120

Contents

Abstract in chinese.....	I
Abstract.....	IV
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Clone of seaweed	1
1.2 Current research status of seaweed tissue culture.....	2
1.2.1 Low rate of callus induction	2
1.2.2 The dedifferentiation and redifferentiation of callus are not controled	2
1.2.3 The formation of ABs are easier than callus	3
1.3 The sduty on mechanisms of seaweed tissue culture.....	3
1.3.1 Endogenous plant hormones	3
1.3.1 miRNA.....	6
1.4 Overview of high-throughput sequencing	7
1.4.1 Introduction of second sequencing technology.....	7
1.4.2 Transcriptomes sequencing.....	8
1.4.3 small RNA sequencing.....	9
1.5 Introduction of non-invasive micro-test technology.....	9
1.6 Introduction of <i>G. lichenoides</i>	10
1.7 The purpose and contents of these studies	11
1.7.1 The purpose of the study	11
1.7.2 The contents of the study	11
Chapter 2 Clone construction of <i>G. lichenoides</i>	12
2.1 Materials and methods	12
2.1.1 Acquisition and culture of thallus	12
2.1.2 Tissue culture of <i>G. lichenoides</i>	12

2.1.3 Culture of ABs in vitro.....	13
2.2 Results.....	13
2.2.1 Clone construction of <i>G. lichenoides</i>	13
2.2.2 The impact of temperature on ABs formation	14
2.2.3 The impact of exogenous plant hormones on ABs formation.....	15
2.2.4 The impact of light quality on ABs formation under low temperature.	17
2.3 Discussion	18
2.4 Summary.....	19
Chapter 3 Transcriptomes sequencing of <i>G. lichenoides</i> during ABs	
formation and supression.....	21
3.1 Materials and methods	21
3.1.1 Materials and methods	21
3.1.2 Extraction and quality analyses of RNA.....	21
3.1.3 Cloning and sequencing of cDNA library.....	23
3.1.4 Analyses of transcriptome datas.....	24
3.1.5 SSR analyses	27
3.1.6 SNP analyses.....	27
3.1.7 Validation of different expression mRNA by qRT-PCR	28
3.2 Results.....	29
3.2.1 Quality analyses of RNA	29
3.2.2 Assemble and analyses of original reads	30
3.2.3 Annotation of transcripts.....	31
3.3 Discussion	42
3.3.1 Auxin polar transcription and signal transduction	43
3.3.2 Synthesis pathway of CTK	44
3.3.3 ABA signal transduction.....	45
3.3.4 ET signal transduction	45
3.3.5 Synthesis pathway of BRs	46

3.3.6 SA signal transduction	46
3.3.7 Antioxidant system.....	47
3.3.8 PI signal transduction.....	48
3.4 Summary	51
Chapter 4 Small RNA sequencing of <i>G. lichenoides</i> during ABs formation and supression	52
4.1 Materials and methods	52
4.1.1 Acquisition and culture of thallus	52
4.1.2 Extraction and quality analyses of RNA.....	52
4.1.3 Cloning and sequencing of small RNA	52
4.1.4 Analyses of sequencing datas.....	52
4.1.5 Validation of different expression miRNA by qRT-PCR	53
4.2 Results.....	56
4.2.1 Analyses of small RNA.....	56
4.2.2 Prediction of novel miRNA	61
4.2.3 Analyses of differently expressed miRNA	65
4.2.4 Prediction of target mRNA of conserved and novel miRNAs	66
4.2.5 Cross-talk analyses between miRNA and mRNA	66
4.2.6 Validation of different expression miRNA by qRT-PCR	68
4.3 Discussion	69
4.3.1 Auxin signal transduction	69
4.3.2 CTK signal transduction	70
4.3.3 ABA signal transduction	70
4.3.4 PLD	71
4.3.5 Others signal transduction.....	71
4.4 Summary	71
Chapter 5 Analyses of IAA fluxes during ABs formation	73
5.1 Materials and methods	73

5.1.1 Acquisition and culture of thallus	73
5.1.2 The determination of IAA、Ca ²⁺ 、H ₂ O ₂ fluxes.....	73
5.2 Results.....	75
5.2.1 Analyses of IAA fluxes	75
5.2.2 Analyses of Ca ²⁺ fluxes.....	76
5.2.3 Analyses of H ₂ O ₂ fluxes.....	76
5.2.4 Analyses of IAA contents.....	77
5.3 Discussion	77
5.4 Summary	80
Chapter 6 The study on mechanisms of carbon acquisition in	
<i>G. lichenoides</i>	81
6.1 Materials and methods	82
6.1.1 Experimental instruments and reagents	82
6.1.2 The impact of temperature on carbon acquisition of <i>G. lichenoides</i>	82
6.1.3 The impact of light intensity on carbon acquisition of <i>G. lichenoides</i> ...	83
6.1.4 The impact of different inhibitors on carbon acquisition of <i>G. lichenoides</i>	83
6.2 Results.....	84
6.2.1 The impact of temperature on seaweed to increase seawater pH	84
6.2.2 The impact of temperature on seaweed to absorb DIC	86
6.2.3 The impact of temperature on seaweed to release DOC	87
6.2.4 The impact of light intensity on <i>G. lichenoides</i> to acquire carbon.....	89
6.2.5 The impact of different inhibitors on <i>G. lichenoides</i> to acquire carbon.....	90
6.3 Discussion	94
6.4 Summary	96
Chapter 7 Conclusions and Prospects.....	97
7.1 Conclusions.....	97

7.2 Innovations.....	98
7.3 Prospects	99
References	100
Appendix.....	119
Acknowledgements	120

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

大型海藻组织培养 (seaweed tissue culture, STC) 技术可以解决大型海藻栽培中的诸多问题, 主要包括高品质藻种的保存、大规模育苗生产以及基因工程研究等。然而, STC 还面临着很多困难, 例如: 愈伤组织 (callus) 诱导与再分化困难、且形成率低; 对于很多藻种, 切块培养后会快速极性再生不定芽

(adventitious branches, ABs) 而非 callus; 同时, 这一过程会因藻种的不同而对外源植物激素的敏感性有所不同。研究表明, 转录因子、MicroRNA (miRNA) 和内源植物激素等因素在细胞脱分化与再分化、植物极性建成以及抗逆机制等生物过程中扮演着重要角色。而正是由于 STC 缺乏这方面的分子知识, 才使得 STC 技术落后, 并不像高等植物那样成熟而广泛地应用到实际生产中。此外, 菊花心江蓠可以快速吸收海水中的氮和磷, 且耐高温, 因此它可以作为热带海域防治海水富营养化以及缓解海水变暖和海水酸化的优良藻种。然而, 由于我国大陆菊花心江蓠引自我国台湾, 种质保存和种苗来源面临一定困难, 因此本文对该江蓠无性系构建方法进行了探讨; 同时, 由于菊花心江蓠组织培养表现为再生 ABs, 所以我们还以该江蓠为例对 STC 过程中 ABs 的发生机制进行了研究, 我们首次利用高通量测序技术对菊花心江蓠 ABs 形成以及被抑制过程中 mRNA 和 miRNA 表达水平的变化进行了测定。由于 ABs 只在外植体生物学顶端形成, 而且生长素极性运输 (PAT) 和钙离子 (Ca^{2+}) 等信号分子/离子在植物极性建成方面起着不可替代的作用, 所以我们还利用非损伤微测技术 (NMT) 对 ABs 形成以及被抑制期间藻体内的这些信号分子/离子进行了实时动态检测。此外, 本文还对菊花心江蓠的固碳能力和固碳机制进行了初步研究。具体结果如下:

1. 通过转录组测序技术成功拼接组装获得 14 070 个转录本 (unigene)。通过差异表达分析我们成功的筛选出调控 ABs 形成的重要代谢通路, 主要包括植物激素信号传导途径 (plant hormone signal transduction)、ABCB1 家族基因、磷脂酰肌醇 (PI) 信号传导途径、抗氧化系统等。另外, 还成功的检测到 3 287 个简单重复序列 (SSR); 同时, 我们分别从野生藻体 (CK)、诱导出不定芽藻体 (EWAB) 和未诱导出不定芽藻体 (NPA) 转录本中检测出 12 552、4 198 以及 5 145 条单核苷酸多态性 (SNP), 这为以后研究江蓠属海藻基因突变和基因标记 (marker) 筛选提供了一定理论参考。通过转录组测序并没有注释到完整的经典

的生长素 (auxin) 等其他植物激素信号传导途径, 这可能是造成 STC 过程中外植体对外源激素不敏感的原因; 同时, 我们还发现菊花心江蕨 ABs 的直接形成是一个非常复杂的生理过程, 受多种因素的共同调控, 例如生长素 (auxin) 和乙烯 (ET) 之间存在协同作用; 而 auxin 和脱落酸 (ABA) 或者油菜素内酯 (BRs) 之间存在拮抗作用; 此外, ABA、水杨酸 (SA) 和抗氧化系统之间也存在着协同作用。更多的结论还需进一步实验验证。

2. 通过 RNA-seq 技术首次成功地构建了菊花心江蕨小 RNA 文库, 并对其中的 miRNA 进行了靶基因预测及其功能注释。在 CK、EWAB、NPA 样品中分别筛选到了 133、149、139 个 miRNAs, 这极大的丰富了江蕨中已知 miRNA 的数量, 并成功的预测到了 30 个新的 miRNAs, 这为以后深入研究大型海藻无性系发育机制、有效解决大型海藻种质保存和种苗培育等难题提供了一定理论基础。我们还分析了 miRNA 在不同样品间的表达模式并对差异表达的 miRNA 进行了靶基因预测及其功能富集。这些差异表达 miRNA 的靶基因涉及多个生物过程, 主要包括 auxin、ABA 等植物激素信号传导途径、ABC 转运子、抗氧化系统以及磷脂酶 D 等, 说明 miRNA 在菊花心江蕨 ABs 的再生过程中起着非常重要的调控作用。

3. 利用 NMT 技术首次成功地直接测定了菊花心江蕨体内 IAA、Ca²⁺和 H₂O₂ 流速的实时动态变化。研究发现, 生长素 PAT 确实存在于大型海藻体内, 且 PAT 抑制剂 NPA 可能是通过结合 ABCB1 转运子来抑制生长素的外流, 进而抑制 ABs 的极性再生; 菊花心江蕨藻体在切块培养后, 外植体生物学基部会向顶端持续输送 IAA 以保证 ABs 形成对 IAA 的正常需求。如果这一运输过程被 NPA 阻止, 那么 ABs 也不会被诱导出; 同时, 外植体内 IAA 含量在 NPA 处理后会急剧增加, 因此, IAA 的过度积累也会超过 ABs 形成对 IAA 的正常需求反而抑制其再生; 我们还发现 Ca²⁺和 H₂O₂ 信号离子/分子调控了菊花心江蕨 ABs 的再生过程, 而且它们和 PAT 以及 auxin 信号传导之间存在着复杂的网络调控关系。本文研究为澄清 STC 过程中 ABs 的发生机制提供了新的视野和帮助。

4. 利用总有机碳 (TOC) 分析技术测定了菊花心江蕨的光合固碳能力和固碳机制。研究发现, 菊花心江蕨光合固碳的最适温度为 30℃, 而且该江蕨在 35℃ 高温条件下固碳效率仍维持在较高水平, 具有耐高温的特点, 为不同海域不同气

候条件下海藻养殖种类的选择提供了科学依据，同时也为应对海水温度逐年升高、有效利用大型海藻进行固碳、储碳进而缓解海水变暖加剧现象提供了可靠的藻种选择；菊花心江蓐存在两种利用 HCO_3^- 的方式，分别为 1) 胞外碳酸酐酶调节途径间接吸收 HCO_3^- ；2) 通过细胞膜上的阴离子载体蛋白直接吸收 HCO_3^- ；通过转录组测序以及对 PEPc mRNA 在不同条件下表达水平的测定，我们推测 PEPc 型类 C4 途径可能存在于菊花心江蓐藻体内，这对于研究江蓐等大型海藻固碳机制以及准确有效的评估大型海藻的固碳和储碳能力提供了有效的科学依据。

关键词：海藻组织培养；不定芽；高通量测序；生长素极性运输；固碳机制；菊花心江蓐

Abstract

Seaweed Tissue culture (STC) could solve the problems associated with *Gracilaria* cultivation, including the consistent supply of high-quality seed stock, strain improvement, and genetic engineering. However, STC lags behind that of higher plants because of the paucity of genomic information. The main morphological response to wounding of seaweed explants *in vitro* is the direct production of adventitious branches (ABs) within a short period, although there are many reports describing callus induction and regeneration. In the present study, we used the Illumina sequencing platform to examine the transcriptional and miRNA profiles of samples of *G. lichenoides* exposed to different treatments, including a control (CK), explants with adventitious branches (EWAB), and explants treated with N-1-naphthylphthalamic acid (NPA), a PAT inhibitor. In addition, auxin, calcium (Ca^{2+}) and hydrogen peroxide (H_2O_2) fluxes all play key roles during plant growth and development. In this study, we therefore measured indole-3-acetic acid, Ca^{2+} and H_2O_2 fluxes of *Gracilaria lichenoides* explants during adventitious branch (ABs) formation for the first time using non-invasive micro-test technology. Further, *G. lichenoides* could effectively absorb inorganic nitrogen and inorganic phosphate, and could suffer from high temperature, which have been identified as a robust and effective alternative for resolve eutrophication of seawater. Meanwhile, it can acquire exogenous inorganic carbon (Ci) to drive photosynthesis for growth and development from the ocean, which would alleviate ocean acidification and high temperature. However, the relationship with environmental factors and the mechanisms of inorganic carbon acquisition in *G. lichenoides* are still unclear. In the present study, we tried to elucidate that relationship and mechanisms. All results are as following:

1. Herein, the CK, EWAB and NPA *G. lichenoides* transcriptomes were analyzed using the Illumina sequencing platform in first time. BLAST analysis resulted in the assignment of 13 724 (97.5 %), 3 740 (26.6 %), 9 934 (70.6 %), 10 611 (75.4 %), 9 490 (67.4 %), and 7 773 (55.2 %) unigenes were annotated to the NR, NT, Swiss-Prot,

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库