

郭震华,马文东,蔡丽君,等. 基于转录组测序的寒地水稻孕穗期低温响应分析[J]. 江苏农业科学,2025,53(4):193-200.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.04.023

基于转录组测序的寒地水稻孕穗期低温响应分析

郭震华¹, 马文东¹, 蔡丽君², 蔡永盛¹, 胡月婷¹, 韩 笑¹, 田崇兵¹, 张希瑞¹, 王 翠¹

(1. 黑龙江省农业科学院水稻研究所,黑龙江佳木斯 154026; 2. 黑龙江省农业科学院佳木斯分院,黑龙江佳木斯 154007)

摘要:水稻作为世界重要的粮食作物,极易受到低温侵袭,并伴随着水稻机体内一系列复杂的代谢变化及分子水平调控,以适应低温逆境。为了明确寒地水稻孕穗期低温胁迫应答的关键调控通路及基因,采集龙粳 11(LG11)在孕穗期低温处理下 0、2、4 d 的幼穗,用于孕穗期低温胁迫的转录组动态分析。结果共鉴定得到 14 236 个差异表达基因(DEG),其中,低温处理前 2 d 共得到 11 724 个 DEG,在低温处理 4 d 后共识别了 11 057 个 DEG。GO 功能富集分析, LG11 低温处理共包含 144 个显著富集的生物进程 GO 类别,其中富集 DEGs 数量最多的集中在光合作用、叶绿体重定位、红外光应答等光合作用相关类别。KEGG 富集分析共显著富集到 37 个 KEGG 通路,其中与光合作用相关的光合作用-天线蛋白等 KEGG 通路显著富集下降,进一步明确龙粳 11 光合作用在孕穗期低温下显著受抑制。这些结果为后续水稻孕穗期低温胁迫应答中转录组水平上的分子调控提供了理论指导。

关键词:水稻;孕穗期;低温;转录组测序

中图分类号:S511.01

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2025)04-0193-07

作为世界上重要的粮食作物之一,水稻养活了全球近半数人口^[1]。水稻源自亚热带或热带地区,易受低温冷害侵袭。目前每年约 1 500 万 hm² 水稻受低温威胁^[2]。而伴随着长时间的自然进化和人为驯化,水稻逐渐形成了对低温逆境适应和抵御的复杂调控机制^[3]。当遭遇低温冷害时,水稻体内通过改变细胞膜结构、调整物质转运代谢、加速保护性物质及活性氧(ROS)的清除等一系列复杂的代谢变化,适应低温逆境^[4-6]。伴随着各种生理变化的同时,水稻体内相关耐冷调节基因的表达也会相应改变,其中涉及到众多复杂的信号传递转导途径,最终形成了水稻体内耐冷分子调控机制的重要组成部分。

众多研究表明,水稻耐冷性是一个复杂的数量

性状,受多基因调控^[7-8],目前与水稻耐冷相关基因已有超过 70 个被报道(www.ricedata.cn),且多为转录因子(TF)。OsWRKY71 在遭受低温胁迫时显著上调,过表达该基因可显著提高幼苗的存活率及光合能力等,表明该基因在水稻低温胁迫应答中发挥了积极的作用^[9]。OsWRKY76 作为另一个 WRKY 家族转录因子,其过表达会显著降低水稻对稻瘟病的抗性,但提高了低温抗性^[10]。有报道称,作为 OsWRKY63 的直接靶基因,OsWRKY76 通过与 OsbHLH148 间产生互作,共同诱导 OsDREB1B 的表达,进而增强了水稻的低温抗性^[11]。

近年来,伴随着第二代高通量测序技术的不断更新进步,转录组测序技术已在各类植物的低温胁迫应答研究中得到了成功的应用,尤其是在水稻、大豆、玉米等多种作物中,在低温抗性机制及基因表达调控中起到了重要的作用^[12-16]。白李唯丹等通过对东乡野生稻苗期低温下的转录组测序分析,共检测到 10 200 个差异表达基因,其中 37 个基因是耐冷调控相关的家族基因^[17]。高红秀等以水稻中花 11 为研究材料,经低温处理后,通过 RNA-Seq 技术分析植物激素调控水稻幼苗对低温胁迫的应答模式,其中植物激素信号转导中低温应答的差异表达基因有 31 个,分别有 25 个上调表达基因和 6 个下调表达基因;主要参与了茉莉酸和脱落酸信号途径^[18]。

收稿日期:2024-01-24

基金项目:黑龙江省农业科学院农业科技基础创新项目杰出青年项目(编号:CX23JQ02);黑龙江省省属科研业务费项目(编号:CZKYF2021-2-C002,CZKYF2021-2-C007);黑龙江省博士后面上资助项目(编号:LBH-Z21027);国家水稻产业体系建设专项(编号:CARS-01)。

作者简介:郭震华(1985—),男,内蒙古集宁人,博士,副研究员,主要从事水稻分子育种研究,E-mail:hljsdsgzh@163.com;共同第一作者:蔡丽君(1988—),女,云南昆明人,博士,助理研究员,主要从事作物高产研究,E-mail:lijun_cai@yeah.net。

通信作者:马文东,硕士,研究员,主要从事水稻育种研究。E-mail:wendongma@163.com。

黑龙江省作为我国粳稻种植面积最大的省份,地处我国最北部,低温冷害频发,冷害是黑龙江省水稻安全生产的重要限制因子之一。为了深入了解当地水稻品种的孕穗期低温应答机制,并进一步发掘孕穗期低温应答关键代谢调控通路及相关基因,本研究以黑龙江省水稻品种龙粳 11(LG11)为研究材料,借助美国 Illumina 公司的 HiSeq 2500 平台,对孕穗期低温处理后的水稻幼穗开展转录组差异分析,在 DEG 分析的基础上,继续进行 GO 和 KEGG 富集分析,进一步揭示水稻对孕穗期低温应答响应机制,并结合荧光定量 PCR 筛选验证耐冷候选基因,以期后续水稻孕穗期耐冷分子育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究选取由黑龙江省农业科学院水稻研究所育成的水稻品种龙粳 11(LG11)作为研究材料。该品种曾为黑龙江省第三积温带的主栽品种,具有高产优质等众多优良性状,但对温度十分敏感,低温造成严重的空壳。

1.2 材料种植及低温处理

本研究采用盆栽试验,试验在黑龙江省农业科学院水稻研究所田间试验场(130°52'E,46°87'N)进行。挑选健康饱满的 LG11 稻粒,置于 1% NaClO 溶液 15 min,蒸馏水连续冲洗 2~3 次。将消毒过的稻粒移入培养箱催芽,温度为 30℃。试验材料于 2018 年 4 月 20 日播种。待幼苗长至 3 叶 1 心期移栽至盆栽桶中,盆栽桶直径 34 cm,高 35 cm。盆栽土壤 pH 值为 6.56,有机质含量为 36.56 g/kg,速效氮、速效磷及速效钾含量分别为 106.65、85.58、93.8 mg/kg。每盆栽桶环形均匀种植 LG11 幼苗 15 株,为保证供试材料处于同一生长期,盆栽桶中所有材料去除分蘖,只留主茎,共种植 36 盆。当 LG11 的剑叶叶枕距离倒二叶的叶枕在 -4~0 cm 时,即认为其进入孕穗期^[19],并对该单株进行挂牌标记。对进入到孕穗期的 LG11,取 18 盆转移到光照培养箱(HPG-280,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)培养,生长条件设置为温度 12℃,光照—黑暗周期为 8 h—16 h,相对湿度为 80%;其余生长条件与处理组一致。当处理 4 d 后,返回到正常环境生长直到成熟。孕穗期低温抗性通过幼穗结实率判定。水肥管理同黑龙江省农业科学院水

稻研究所田间常规管理。

1.3 样品采集

在 12℃下处理 0、2、4 d 后,分别从 LG11 幼穗的上 1/3 部分取下和收集长度在 3.5~4.5 mm 的新鲜颖花约 0.5 g,立即用液氮冷冻,并储存在 -80℃的超低温冰箱中,每个处理重复 3 次。

1.4 RNA 测序

将低温保存样品通过干冰包裹送至北京百迈客生物科技有限公司,委托其进行 RNA 抽提、质控及建库。利用 Nanodrop 8000 分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司)测定 RNA 的纯度和浓度,并用 RNA 6000 Nano LabChip(美国安捷伦科技公司)检测 RNA 的完整性和浓度。通过 Illumina HiSeq 2500 平台进行转录组测序(RNA-Seq),产生双末端(2×150 bp)reads。

1.5 数据质控

将 LG11 原始的下机数据以 FASTQ 文件格式进行储存。进一步过滤含有接头序列和低质量数据,在此基础上通过对高质量 LG11 文库序列的 GC 含量、Q20 和 Q30 等进行计算,进一步获得高质量序列(clean data)用于后续分析。本研究参考基因组为 *Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* (*Oryza_sativa_IRGSP-1.0*),利用 HISAT2 v2.1.0 软件将 clean data 比对到参考基因组上,通过 FPKM 值判定转录本数或基因表达水平。

1.6 差异表达基因筛选

利用 DEGseq2 软件进行差异基因分析,显著差异的阈值为 $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$, $P < 0.05$ ^[20]。其中 Fold Change(FC)代表基因表达量变化倍数, $|FC| \geq 2$ 表示该基因在 2 个比较组之间存在显著差异, P 是基因差异表达概率, $P < 0.05$,即表示该基因是差异表达基因。

1.7 差异表达基因功能富集分析

基因本体(GO, <http://www.geneontology.org/page/download-go-annotatios>)和 KEGG(京都基因与基因组百科全书, <http://www.genome.jp/kegg>)分别用于 GO 和 KEGG 功能注释。用 Goseq 进行 GO 富集分析,阈值为校正 P 值 < 0.01 。用 KOBAS(v2.0)进行 KEGG 富集分析,富集因子越大, Q 值 < 0.01 ,对应通路的富集程度越高。

1.8 qRT-PCR 验证分析

为了验证 RNA-Seq 结果的准确性,选取测序结果中差异表达倍数较高的 6 个基因,开展 qRT-

PCR 验证分析。使用 Trizol 试剂提取 LG11 的 12 ℃ 低温处理 0、2、4 d 后的幼穗颖花的总 RNA。进一步根据 TaKaRa 反转录试剂盒说明书将样品 RNA 反转录成 cDNA。通过 Primer Premier 5.0 软件设计 qRT-PCR 引物,并通过英潍捷基(上海)贸易有限公司引物合成,内参为 *Actin1*。qRT-PCR 反应在 SYBR Select Master Mix 仪器上运行,供试样本中每个基因均分别设 3 次生物学和 3 次技术重复,通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因相对表达量变化。

1.9 数据处理

WPS office 用于数据分析;SPSS 22.0 软件用于显著性检验($\alpha = 0.05$);GraphPad Prism 9.0 用于作图。

2 结果与分析

2.1 孕穗期低温处理不同时间段 LG11 的结实率

孕穗期低温对水稻最直接的影响体现在结实率的变化上。本研究对 LG11 在 12 ℃ 低温处理下 0、2、4 d 后的结实率进行了调查分析,结果如图 1 所示。在正常生长条件下(处理 0 d),LG11 的结实率为 92.36%,该结果与之前报道结果^[21]较为一致,表明 LG11 在正常温度环境中可正常结实。当低温处理 2 d 后,LG11 的结实率迅速降低至 39.26%,极显著低于对照。而当低温继续,至处理 4 d 后,LG11 的结实率较对照仍呈现极显著下降趋势,仅为 8.14%,几乎不结实。因此,孕穗期低温导致 LG11 的结实率极显著降低,表明 LG11 的孕穗期耐冷性弱。

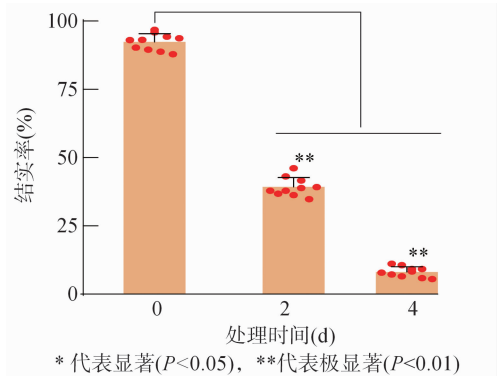


图1 孕穗期低温处理不同时间段 LG11 的结实率

2.2 转录组测序结果质控分析

由表 1 可知,本研究通过对 LG11 在低温处理 0、2、4 d 后的颖花进行 RNA-Seq 分析,构建了 9 个文库,通过筛选掉低质量数据,共得到 540.27 Mb 的

clean reads,其中 GC 含量在 53.40% ~ 56.58% 之间,Q30 均 $\geq 91.10\%$,比对到参考基因组的片段在 34 915 829 ~ 60 514 688 bp 之间,比对到参考基因组上的比例在 79.55% ~ 82.84% 之间。以上结果表明,LG11 的 RNA-Seq 的测序质量较高,可用于后续分析。

表 1 转录组测序数据统计

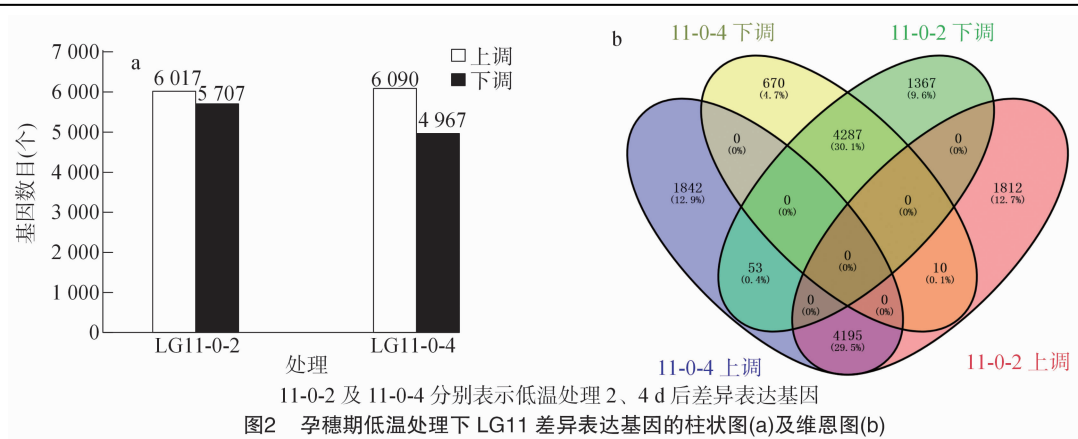
样品	可用碱基数 (bp)	GC 含量 (%)	Q30 (%)	比对片段 (bp)	比对到参考基因组 (%)
LG11-0-1	53 942 024	56.58	91.10	43 361 427	80.39
LG11-0-2	68 461 348	56.40	91.52	55 243 173	80.69
LG11-0-3	62 525 964	55.92	91.26	50 368 723	80.56
LG11-2-1	43 221 480	54.77	91.39	34 915 829	80.78
LG11-2-2	74 234 502	55.35	91.86	60 514 688	81.52
LG11-2-3	62 994 916	55.02	91.29	50 799 160	80.64
LG11-4-1	61 814 654	53.92	91.86	49 175 101	79.55
LG11-4-2	59 057 624	53.98	91.92	48 432 689	82.01
LG11-4-3	54 019 710	53.40	92.20	44 750 148	82.84

2.3 低温胁迫下转录组差异表达基因分析

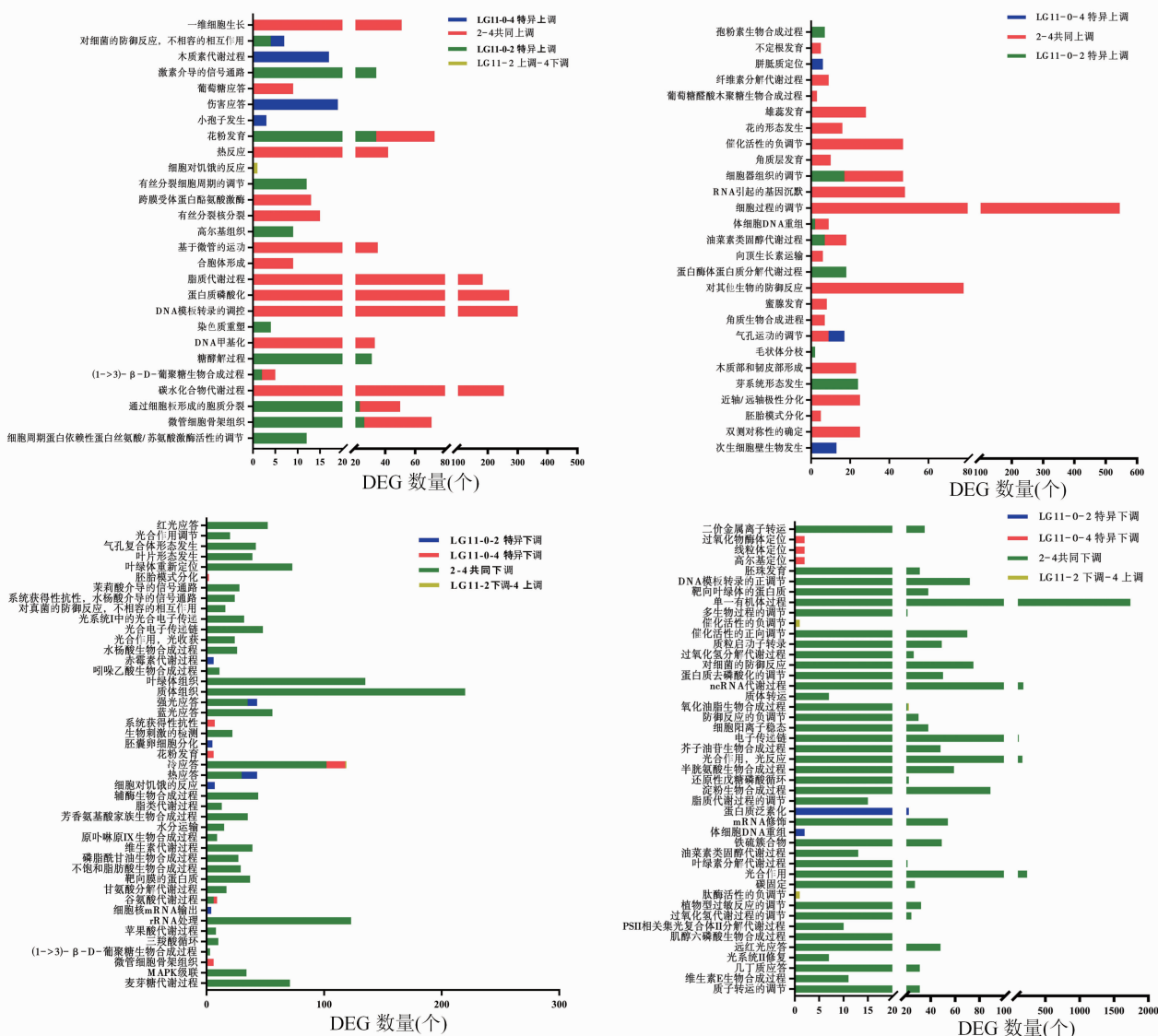
以 $|\log_2 FC| \geq 1$ 、 $P < 0.05$ 为阈值,分别对 12 ℃ 低温处理 2、4 d 的 LG11 进行 DEG 的筛选。由图 2-a 可知,低温胁迫下,将 LG11 不同处理时间下的 DEG 通过维恩图分析,共得到 14 236 个 DEG,其中,低温处理前 2 d 共得到 11 724 个 DEG,包含了 6 017 个上调及 5 707 个下调表达基因;而在低温处理 4 d 后,LG11 中共识别了 11 057 个 DEG,包含了 6 090 个上调及 4 967 个下调表达的 DEG。进一步的维恩图分析结果(图 2-b)表明,LG11 中分别有 4 287 个下调和 4 195 个上调的 DEG 是低温处理 2、4 d 后共有的,分别占全部 DEG 的 30.1% 和 29.5%;分别有 1 812 个和 1 842 个 DEG 是在低温处理 2、4 d 后特异上调表达;另有 1 367 个和 670 个 DEG 是在低温处理 2、4 d 后特异下调表达。可见,LG11 在 12 ℃ 低温胁迫 2、4 d 后,多数基因均呈现差异表达,表明 LG11 对低温敏感,基因受低温胁迫持续应答。

2.4 DEG 的 GO 功能富集分析

本研究以 $KS(Kolmogorov-Smirnov) < 0.001$ 为筛选阈值,对维恩图中(图 2-b)各部分 DEG 进行 GO 功能富集分析,重点对生物功能类别(BP)展开分析。首先对上调基因展开分析(图 3-a、图 3-b),LG11 低温处理 2、4 d 后共得到 54 个生物进程 GO 类别。其中,37 个生物进程 GO 类别是在低温



(LG11-0-4-特异上调)时特异富集得到的,而仅有1个生物进程GO类别细胞对饥饿应答在低温处理2 d时上调而在处理4 d后下调。54个上调的生



物进程 GO 类别中,低温处理 2、4 d 时在 LG11 中共同富集到(2-4 共同上调)的细胞过程的调节 GO 类别包含的基因最多(545 个 DEG),之后依次是 DNA 模板转录的调控(300 个 DEG;2-4 共同上调)、蛋白磷酸化(272 个 DEG;2-4 共同上调)。在下调基因中,维恩图各部分 DEG 同样以 $KS < 0.001$ 为阈值共显著富集到 90 个生物进程 GO 类别(图 3-c、图 3-d)。同样的,低温处理 2、4 d 时 LG11 中共同富集(2-4 共同下调)到的生物进程 GO 类别最多,为 74 个。其中单一有机体过程包含基因数最多(1 738 个 DEG),然后依次是光合作用、质体组织、ncRNA 代谢进程等,分别含有 233、220、178 个 DEG。

2.5 DEG 的 KEGG 功能富集分析

在对 DEG 进行 GO 功能富集分析的同时,进一步对其进行 KEGG 的富集分析,用于发掘 DEG 参与的主要代谢调控及基因转导途径,并对关键基因功能及遗传调控进行深入分析。以 q 值 < 0.001 为筛选阈值,维恩图各部分 DEG 分别进行 KEGG 富集分

析,共得到 37 个显著富集的 KEGG 通路(图 4)。维恩图各部分 DEG 显著富集最多的 KEGG 通路是在低温处理 2、4 d 后 LG11 中共同下调的 DEG 部分(2-4 共同下调),共富集到 19 个 KEGG 通路中。在低温处理 2、4 d 后 LG11 中共同下调的 DEG(2-4 共同下调)中显著富集的碳代谢 KEGG 通路,含有的差异基因最多,为 71 个,之后依次是低温处理 2、4 d 后 LG11 中共同下调的 DEG(2-4 共同下调)显著富集的氨基酸生物合成 KEGG 通路(52 个 DEG),在低温处理 2、4 d 后 LG11 中共同上调的 DEG 中(2-4 共同上调)显著富集到的植物激素信号转导通路(42 个 DEG),低温处理 2、4 d 后共同下调的 DEG(2-4 共同下调)中显著富集到的光合有机物的碳固定通路(40 个 DEG)及光合作用(36 个 DEG)。而在低温处理 2 d 后特异上调的 DEG 中,酮体的合成和降解通路含有的 DEG 最少,仅为 3 个,之后依次是在低温处理 4 d 后特异上调的 DEG 中,黄酮和黄酮醇生物合成(4 个 DEG)及角质、木质及蜡质生物合成(5 个 DEG)KEGG 通路。

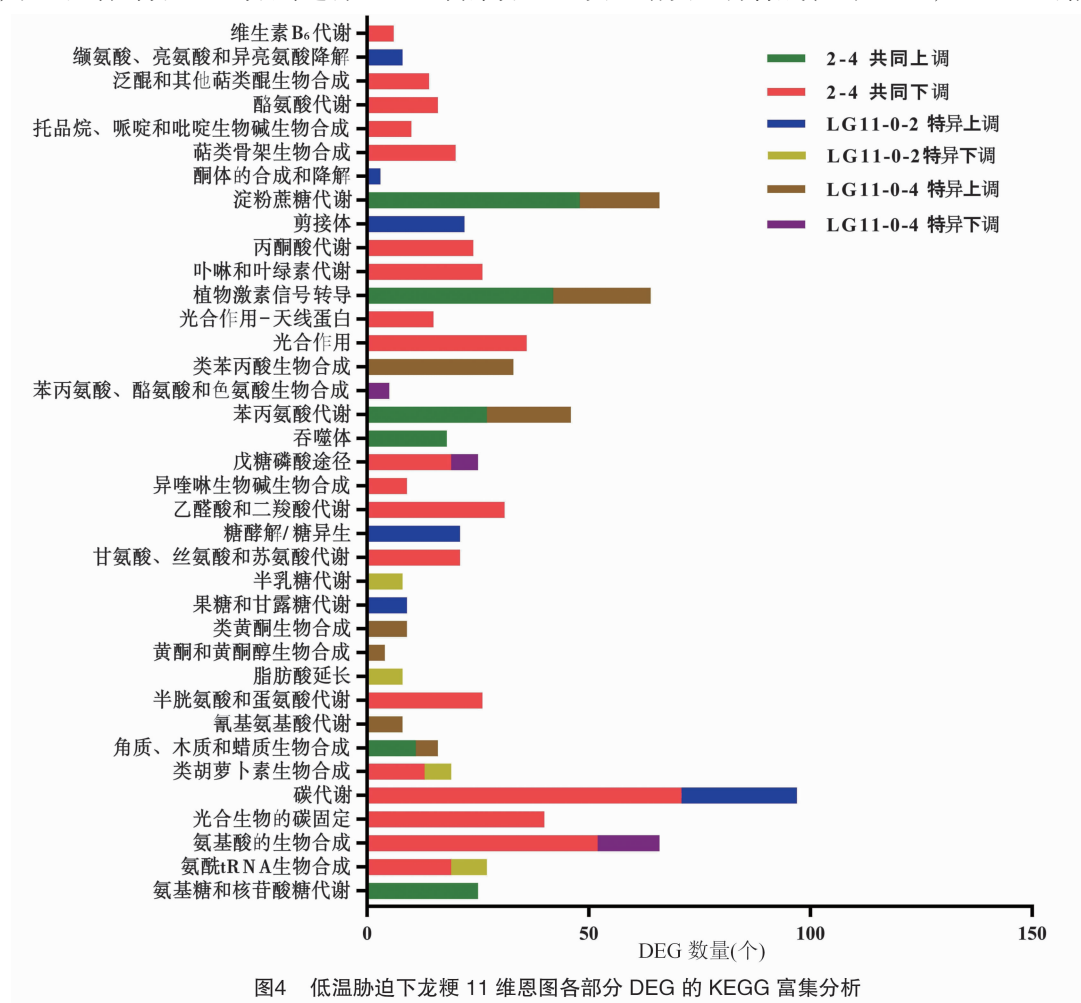


图4 低温胁迫下龙梗 11 维恩图各部分 DEG 的 KEGG 富集分析

2.6 DEG 的 qRT-PCR 验证分析

基于 LG11 在低温胁迫下基因的表达模式变化,从测序结果中随机选择 6 个 DEG 进行 qRT-PCR 分析,用于验证转录组测序结果的准确性,引

物序列见表 2。由图 5 可以看出,6 个基因的表达模式变化均与转录组测序中各基因的结果一致,表明转录组测序结果的准确性及可靠性。

表 2 qRT-PCR 验证所用引物列表

基因编号	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>Os01g0867300</i>	CTTCTGTTTATCGGCAGTAGC	CCTCCCTACACATATGATGCT
<i>Os03g0318600</i>	GATACGGCTGTATTAGTTGGGA	CCACCTCTACATCAAAGCAAAC
<i>Os02g0766700</i>	TGAAGACCTGGTTACCTGTAAC	ATCGAGTGAATATCTCAGGCAG
<i>Os09g0111100</i>	AACAAGCGGTGCTAGGATCG	CTACAGCAGCCACGTCTAGT
<i>Os11g0184900</i>	CACGCGTCCGCTTCCATT	ACTCCTTCTCCCTCCCATC
<i>Os05g0138300</i>	CCTGTTCTTGTGTGCTTGGT	GTGATGGCGTAGATGGCGTA
<i>Actin1</i>	CCTTCAACACCCTGCTATG	CAATGCCAGGGAACATACTG

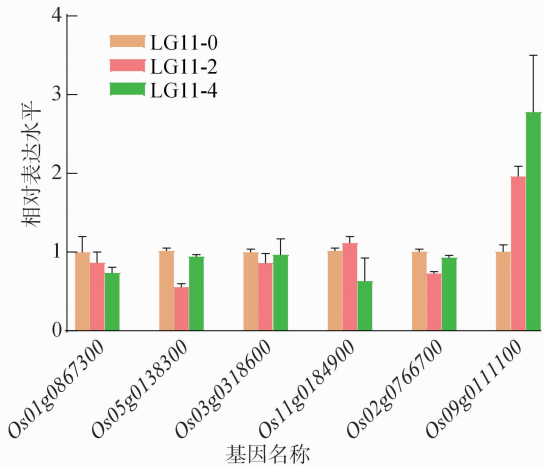


图5 低温胁迫下 LG11 中部分基因表达量的 qRT-PCR 验证分析

3 讨论与结论

作为我国北方第一水稻大省,黑龙江也是我国重要的水稻商品粮基地(水稻产量的 70% 作为商品)。然而,由于黑龙江位于我国最北部地区,低温尤其是在孕穗期低温严重制约了水稻的安全生产。LG11 处黑龙江省第三积温带,具有良好的农艺和产量性状,但孕穗期耐冷性极差^[22]。因此,本研究以 LG11 为研究对象,通过对其进行孕穗期低温胁迫下的转录组测序研究,以进一步全面的研究寒地水稻孕穗期低温胁迫下的代谢调节及应答机制。本研究中 LG11 低温处理前 2 d 和前 4 d 分别得到 11 724 和 11 057 个 DEG,表明 LG11 中众多基因在不同低温处理时间段都呈现出高度差异表达,说明 LG11 低温敏感,持续受低温胁迫,此项结果也同样与本研究中的 LG11 的低温结实率结果呈现出一定

的正相关,再次印证了 LG11 的孕穗期低温高度敏感性。

通过对 DEG 进行 GO 功能富集分析发现,在维恩图各部分中共得到 144 个显著富集的生物进程 GO 类别,其中下调 GO 类别为 90 个,明显多于上调的 GO 类别(54 个),再次表明 LG11 受低温影响更加强烈。而这些下调 GO 类别中,富集基因数最多的多与光合作用相关,如光合作用(GO:0015979)、叶绿体重新定位(GO:0009902)、红光应答(GO:0010114)及远红光应答(GO:0010218)等。此外,KEGG 通路富集分析共得到 37 个显著富集到的 KEGG 通路。其中下降 KEGG 通路为 19 条。而这其中与光合作用相关的光合作用(ko00195)及光合作用-天线蛋白(ko00196)同样显著富集下降。因此,结合 GO 功能富集及 KEGG 通路显著富集分析,进一步明确 LG11 孕穗期低温下光合作用受到明显抑制。

光合作用是通过吸收光能转化为植物体的化学能,是植物体内有机物合成的起点。众多报道称,植物光合作用显著受到低温抑制^[23-24]。低温胁迫下,叶绿体的亚显微结构遭到破坏,阻碍其电子传递,导致光合作用受到抑制,进而降低光合速率^[25]。低温胁迫不仅影响了类囊体膜介导的光反应,抑制类囊体膜上 PS II 光能的传递及转换效率,减弱了 CO₂ 的同化能力,还会降低叶绿体基质中光合作用暗反应的活性^[26-27]。对相关 GO 类别和 KEGG 通路所包含基因研究发现,低温对光合作用涉及到多个方面的调控,如 *Os10g0496900*(*OsPORB*, 原叶绿素酸酯氧化还原酶 B)、*Os09g0346500*(*OsCAB1R*,

捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因)、*Os03g0563300* (*OsCHLI*, 镁离子螯合酶 I 亚基编码基因)^[28-30] 等。作为 C3 碳反应中重要的羧化酶,核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的亚基编码基因 *OsRBCS2*、*OsRBCS3*、*OsRBCS4* 及 *OsRBCS5* 等均在 LG11 中下调表达。以上结果再一次表明,孕穗期低温对 LG11 的光合作用相关功能形成严重的抑制。

进一步通过对 GO 功能富集分析发现, LG11 的维恩图中各部分 DEG 中显著富集到的生物进程的 GO 类别中,低温应答 (GO:0009409) 类别富集到的次数最多,表明孕穗期低温胁迫严重影响了寒地水稻正常生长发育。对此 GO 类别中的 DEG 进一步研究发现,孕穗期低温胁迫下, *OsMAP1*、*OsMPK2*、*OsMPK6* 等丝裂原活化蛋白激酶的编码基因均在 LG11 中下调表达。而丝裂原活化蛋白激酶在平衡低温等非生物胁迫产生过多积累的活性氧起到重要的调控作用,因此在寒地水稻孕穗期低温应答中,丝裂原活化蛋白激酶的相关编码基因起到正向调控的作用,需进一步研究。

通过 qRT-PCR 分析验证了一些 DEG 的表达模式或水平,初步证实这些基因在水稻在低温应答中发挥了积极作用,可以作为调控低温抗性的候选基因。然而,为了解这些基因如何对低温应答作出贡献,并识别真正的低温应答基因,须要对这些基因进行进一步的验证和功能分析。

参考文献:

- [1] Zhao J L, Zhang S H, Yang T F, et al. Global transcriptional profiling of a cold-tolerant rice variety under moderate cold stress reveals different cold stress response mechanisms [J]. *Physiologia Plantarum*, 2015, 154(3): 381-394.
- [2] 刘静妍, 闫双勇, 张融雪, 等. 水稻耐低温研究重要进展[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(27): 1-5.
- [3] 郭慧, 李树杏, 孙平勇, 等. 水稻苗期耐冷性差异的转录组分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(6): 1731-1739.
- [4] Thomashow M F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1999, 50: 571-599.
- [5] Shi Y L, An L Z, Zhang M X, et al. Regulation of the plasma membrane during exposure to low temperatures in suspension-cultured cells from a cryophyte (*Chorispora bungeana*) [J]. *Protoplasma*, 2008, 232(3/4): 173-181.
- [6] Wang X C, Zhao Q Y, Ma C L, et al. Global transcriptome profiles of *Camellia sinensis* during cold acclimation[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 415.
- [7] 徐玉碧, 申宗坦. 粳稻间苗期耐冷性的遗传研究[J]. *中国农业科学*, 1989, 22(5): 14-18.
- [8] 覃宝祥, 刘立龙, 韩飞怡, 等. 普通野生稻染色体片段代换系的孕穗期耐冷性研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(6): 1283-1289.
- [9] Kim C Y, Vo K T X, Nguyen C D, et al. Functional analysis of a cold-responsive rice WRKY gene, *OsWRKY71* [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2016, 10(1): 13-23.
- [10] Yokotani N, Sato Y, Tanabe S, et al. *WRKY76* is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(16): 5085-5097.
- [11] 张明星. *OsWRKY63* 调控水稻耐冷性的分子机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022: 73-104.
- [12] 韦云飞, 白璐嘉, 宋晓叶, 等. 基于水稻幼穗盐胁迫响应转录组的 MYB 基因分析及耐盐基因挖掘[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(2): 360-369.
- [13] 刘慧, 薛承进, 赵兰馨, 等. 贵州平塘黑糯稻半矮秆突变体 *bgsd-2* 苗期与抽穗期转录组比较分析[J]. *种子*, 2023, 42(1): 7-12, 44.
- [14] 李阿立, 冯雅楠, 李萍, 等. 大豆叶片响应 CO₂ 浓度升高、干旱及其交互作用的转录组分析[J]. *作物学报*, 2022, 48(5): 1103-1118.
- [15] 王继勇, 余庭跃, 张采波. 玉米转录组学研究进展[J]. *华北农学报*, 2014, 29(增刊1): 10-15.
- [16] 蒋滔, 张晓梅, 杨梅, 等. 玉米灰斑病原菌胁迫下玉米转录组测序的 SNP 和 InDel 分析[J]. *种子*, 2023, 42(2): 1-8.
- [17] 白李唯丹, 戴亮芳, 陈雅玲, 等. 东乡野生稻苗期响应低温胁迫的转录组分析[J]. *热带亚热带植物学报*, 2021, 29(6): 616-625.
- [18] 高红秀, 朱琳, 刘天奇, 等. 水稻植物激素响应低温胁迫反应的转录组分析[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(13): 4188-4197.
- [19] Sato Y, Masuta Y, Saito K, et al. Enhanced chilling tolerance at the booting stage in rice by transgenic overexpression of the ascorbate peroxidase gene, *OsAPXa* [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(3): 399-406.
- [20] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [21] 刘乃生, 宋成艳, 王桂玲, 等. 三江平原水稻品种孕穗期耐冷性评价[J]. *黑龙江农业科学*, 2012(10): 1-7, 42.
- [22] Guo Z H, Cai L J, Chen Z Q, et al. Identification of candidate genes controlling chilling tolerance of rice in the cold region at the booting stage by BSA-Seq and RNA-Seq [J]. *Royal Society Open Science*, 2020, 7: 201081.
- [23] 陈青君, 张福漫, 王永健, 等. 黄瓜对低温弱光反应的生理特征研究[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(1): 77-81.
- [24] 任旭琴, 陈伯清. 低温下辣椒幼苗光合特性的初步研究[J]. *江苏农业科学*, 2006, 34(6): 243-244.
- [25] Qiu C P, Ethier G, Pepin S, et al. Persistent negative temperature response of mesophyll conductance in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves under both high and low vapour pressure deficits: a role for abscisic acid? [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2017, 40(9): 1-12.

贾 慧,赵玉龙,郭晓阳,等. 多花黄精 *PcWRKY1* 基因的克隆及响应高温胁迫功能分析[J]. 江苏农业科学,2025,53(4):200–208.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2025.04.024

多花黄精 *PcWRKY1* 基因的克隆 及响应高温胁迫功能分析

贾 慧¹,赵玉龙²,郭晓阳²,杨铁钢²,郭红霞²,苏秀红¹,腊贵晓²

(1. 河南中医药大学药学院,河南郑州 450002; 2. 河南省农业科学院中药材研究所,河南郑州 450002)

摘要:探究 WRKY 转录因子家族在多花黄精 (*Polygonatum cyrtoneura* Hua) 适应高温胁迫中的作用,基于前期转录组分析鉴定到受高温影响显著下调的基因 *PcWRKY1*,克隆了 *PcWRKY1* 基因,并利用生物信息学、RT-qPCR 和玉米原生质体瞬时转化体系等技术对其编码蛋白的基本特性、组织表达特异性、高温胁迫下表达模式及功能进行了分析。结果显示:*PcWRKY1* 基因 CDS 序列全长共 1 560 bp,编码 519 个氨基酸;*PcWRKY1* 蛋白没有跨膜结构,分子量为 56.93 ku,等电点为 7.2,具有 2 个 WRKY 保守结构域,属于 Group I a 类群;RT-qPCR 分析结果显示,*PcWRKY1* 基因在多花黄精不同组织中均有表达,且在种子中表达量最高,其转录水平受高温胁迫的抑制;玉米原生质体中 *PcWRKY1* 定位于细胞核中,且高温处理不影响其位点;在玉米原生质体中瞬时过表达 *PcWRKY1*,与无高温胁迫相比,抑制了过氧化氢酶 (CAT) 活性的增加,提高了高温胁迫诱导的丙二醛 (MDA) 含量的增加,说明过表达 *PcWRKY1* 降低了原生质体在高温胁迫下的耐性。综上所述,*PcWRKY1* 可能在多花黄精响应高温胁迫中起负调控作用。

关键词:多花黄精;WRKY 转录因子;高温胁迫;生物信息学分析;功能分析

中图分类号:S188;S567.23⁺9.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2025)04–0200–09

多花黄精 (*Polygonatum cyrtoneura* Hua) 为百合科 (Liliaceae) 黄精属 (*Polygonatum*) 多年生草本植物,其根茎常被用作药物和食物,具有降低血糖、抗癌、调节免疫力及抑菌等功效,是《中华人民共和国药典》收录的 3 种药用黄精之一^[1–2]。近年来,随着对多花黄精的药用价值和营养保健等功能的逐步挖掘,其原料的需求量也日益增加,致使价格不断上

涨,供不应求。但掠夺式的采挖方式导致自然资源枯竭,野生产能急剧下降,远不能满足市场需求,因此,越来越多的人开始选择人工种植多花黄精^[3]。

随着温室气体浓度的逐年上升,全球气候日益变暖,极端高温的发生更为频繁、强度更强、持续时间更久^[4]。气温升高已成为限制植物生长和产量的主要非生物胁迫之一。当植物遭受高温胁迫时,常常会对其生理、生化和发育造成严重的影响。例如高温使蛋白质变性、聚集和降解,同时抑制蛋白质的合成,加速活性氧 (ROS) 的产生和叶绿素降解,增加膜的流动性和渗透性,引起细胞器的功能紊乱,加速细胞衰老,引起植物光合作用器官的提前衰老等^[5–9]。而多花黄精作为中性需光植物,喜阴凉和湿润的环境,但极端高温灾害事件的频发,给多花黄精种植带来极大阻碍。大田栽培过程

收稿日期:2024–10–29

基金项目:国家重点研发计划(编号:2022YFD1601808);国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS–21);河南省现代农业产业技术体系建设专项(编号:HARS–22–11–G2)。

作者简介:贾 慧(1999–),女,河南荥阳人,硕士研究生,主要从事中药资源学研究。E-mail:2396554366@qq.com。

通信作者:腊贵晓,博士,副研究员,主要从事中药材生态栽培、育种等研究。E-mail:zju–1@163.com。

1940–1959.

[26]李 平,刘鸿先,王以柔,等. 低温对杂交水稻及其亲本三系始穗期旗叶光合作用的影响[J]. 植物学报,1990,32(6):456–464.

[27]李 平,陈贻竹,李晓萍,等. 籼稻的抗冷性与亲本的关系[J]. 植物学报,1995,37(7):544–551.

[28]Li Z Y,Mo W P,Jia L Q,et al. Rice FLUORESCENT1 is involved in the regulation of chlorophyll[J]. Plant & Cell Physiology,2019,

60(10):2307–2318.

[29]Sugiyama N,Izawa T,Oikawa T,et al. Light regulation of circadian clock-controlled gene expression in rice[J]. The Plant Journal,2001,26(6):607–615.

[30]Zhang H,Liu L L,Cai M H,et al. A point mutation of magnesium chelatase *OsCHL1* gene dampens the interaction between CHL1 and CHL2 subunits in rice[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2015,33(6):1975–1987.