



### 东乡野生稻苗期响应低温胁迫的转录组分析

白李唯丹, 戴亮芳, 陈雅玲, 张帆涛, 谢建坤, 罗向东

引用本文:

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.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4387>

### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### 冰菜盐胁迫下的转录组分析

Transcriptome Analysis of *Mesembryanthemum crystallinum* under Salt Stress

*热带亚热带植物学报*. 2019, 27(3): 279–284 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3972>

#### 香蕉果实冷胁迫相关MaWRKY11转录因子的特性、互作蛋白筛选与鉴定

Characterization and Interacting-protein Identification of MaWRKY11 Transcription Factor Related to Cold Stress from Banana Fruits

*热带亚热带植物学报*. 2015(5): 543–552 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2015.05.009>

#### 毛竹APX家族基因鉴定和表达分析

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*

*热带亚热带植物学报*. 2020, 28(3): 255–264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

#### 不同水分条件下杜鹃花转录因子的转录组分析

Transcriptome Analysis of Transcription Factors of *Rhododendron pulchurum* 'Baifeng4' under Different Water Conditions

*热带亚热带植物学报*. 2018, 26(5): 515–522 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3910>

#### 橄榄CaICE1基因的克隆和表达分析

Cloning and Expression Analysis of the CaICE1 Gene in *Canarium album*

*热带亚热带植物学报*. 2018, 26(6): 571–579 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3877>

向下翻页, 浏览PDF全文

# 东乡野生稻苗期响应低温胁迫的转录组分析

白李唯丹, 戴亮芳, 陈雅玲, 张帆涛, 谢建坤, 罗向东\*

(江西师范大学 生命科学学院, 南昌 330022)

**摘要:** 为了解东乡野生稻(*Oryza rufipogon*)对低温胁迫的响应机制, 对苗期的 RNA-seq 转录表达谱进行了研究。结果表明, 与对照相比, 共检测到 10 200 个差异表达基因(DEGs), 其中 5 201 个上调表达, 4 999 个下调表达, 其中有 426 个 DEGs 位于已报道的水稻耐冷 QTL 区间, 且 37 个为耐冷调控相关的家族基因。GO 功能分类和 KEGG 代谢路径分析表明, 核酸结合转录因子活性、氨基酸生物合成以及光合作用代谢等均参与响应低温胁迫过程。实时荧光定量分析表明, ABA 响应蛋白基因、MYB 转录因子和 40S 核糖体蛋白 SA 基因等 12 个可能与低温胁迫响应相关的 DEGs 表达模式与 RNA-seq 的一致。可见, 植物激素传导途径和转录因子相关调控基因在东乡野生稻苗期响应低温胁迫过程中起重要作用。

**关键词:** 东乡野生稻; 低温胁迫; 转录组学; 耐冷基因

doi: 10.11926/jtsb.4387

## Transcriptome Analysis of Response to Low Temperature Stress in Dongxiang Wild Rice at Seedling Stage

BAI Liweidan, DAI Liangfang, CHEN Yaling, ZHANG Fantao, XIE Jiankun, LUO Xiangdong\*

(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

**Abstract:** In order to study the response mechanism of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) to low temperature stress, its RNA-Seq transcriptional expression profile at seedling stage was studied. The results showed that a total of 10 200 differentially expressed genes (DEGs) under low temperature stress were detected compared with control under normal temperature, among which 5 201 DEGs were up-regulated and 4 999 were down-regulated. There were 426 DEGs located in the reported QTL interval of cold tolerance in rice, and 37 of them were family genes related to cold tolerance regulation. GO functional classification and KEGG metabolic pathway analysis of DEGs indicated that nucleic acid binding transcription factor activity, amino acid biosynthesis and photosynthetic metabolism were involved in the response to low temperature stress. The expression patterns of 12 DEGs, including ABA response protein gene, MYB transcription factor and 40S ribosomal protein SA gene, might be related to low temperature stress response by real-time fluorescence quantitative PCR analysis were consistent with those of RNA-Seq. So, it was suggested that plant hormone transduction pathways and transcription factor-related regulatory genes could play an important role in response to low temperature stress in Dongxiang wild rice seedling stage.

**Key words:** Dongxiang wild rice; Low temperature stress; Transcriptome; Cold tolerance gene

水稻(*Oryza sativa*)是最重要的粮食作物, 其产量约占世界粮食总产量的 1/3<sup>[1]</sup>。然而, 随着全球气

候变暖, 极端天气发生日趋频繁, 低温冷害已成为限制水稻安全生产的主要因子<sup>[2]</sup>。据统计, 全

收稿日期: 2021-01-22

接受日期: 2021-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660384, 32060074); 江西省自然科学基金重点项目(20202ACB205001); 江西省主要学科学术和技术带头人培养计划项目(20204BCJ22024)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31660384, 32060074), the Key Project of Natural Science of Jiangxi (Grant No. 20202ACB205001), and the Project for Major Academic and Technical Leader Training of Jiangxi (Grant No. 20204BCJ22024).

作者简介: 白李唯丹(1995-), 女, 硕士, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: bailiweidan@163.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: xdluolf@163.com

世界每年约有  $1.50 \times 10^7 \text{ hm}^2$  的水稻在不同生长期遭受寒害或冷害, 轻者导致秧苗黄化, 生长迟钝; 重者出现烂秧、烂芽或死苗, 甚至颗粒无收<sup>[3]</sup>。我国每年因低温冷害导致水稻减产  $5.0 \times 10^9 \sim 1.00 \times 10^{10} \text{ kg}$ <sup>[2]</sup>。因此, 研究水稻耐冷机制, 挖掘水稻遗传潜能, 培育水稻耐冷新品种具有重要的理论和实践意义。

东乡野生稻(*O. rufipogon*)是全球分布最北的普通野生稻, 蕴藏着强耐冷、抗旱和高产等优异基因。强耐冷性是其最显著的特点, 苗期和抽穗期的耐冷性均强于粳稻, 地下茎能耐受 $-12.8^\circ\text{C}$ 而安全越冬<sup>[4-5]</sup>。因此研究和利用东乡野生稻的强耐冷性受到广泛关注。前人在东乡野生稻的耐冷性鉴定评价、数量性状基因位点(quantitative trait locus, QTL)分析和差异表达谱等方面已做了大量工作<sup>[5-7]</sup>, 然而, 东乡野生稻的耐冷性遗传机理非常复杂, 不同研究群体和不同鉴定方法所检测的耐冷 QTL 数目、染色体区域和效应大小有较大差异, 可比性较低, 东乡野生稻耐冷的分子调控机制仍然难以琢磨<sup>[8-9]</sup>。因此, 进一步全面深入探讨东乡野生稻耐冷基因的调控网路及分子机制, 具有重要的理论价值和现实意义。

转录水平的调控是生物体很重要的一种调控方式, 与基因组学相比具有针对性强、研究范围小的优点且被认为是一种在转录水平上更精准的分析方法, 鉴于此, 本研究在前期研究的基础上<sup>[10]</sup>, 利用转录组学测序技术(RNA-Seq)分析其东乡野生稻低温胁迫下和常温培养条件下的基因表达谱特征, 获取差异表达基因信息数据。采用 qRT-PCR 方法分析、验证差异表达基因的表达特性。将转录组的基因表达谱数据与报道的水稻耐冷相关的 QTL 结果进行联合分析, 为挖掘东乡野生稻耐冷相关基因、阐明东乡野生稻响应低温胁迫的应答机制提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为中国江西省东乡县的东乡野生稻(*Oryza rufipogon*)。将种子置于  $50^\circ\text{C}$  烘箱中干燥 3 d, 挑选 50 粒成熟饱满的种子用 3% NaClO 消毒 15 min, 清洗 3 遍, 于  $28^\circ\text{C}$  浸种 3 d 催芽, 将露白种子均匀播种于垫有滤纸的  $90 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$  培养皿中, 待胚

芽长至 8~12 mm 后置于  $28^\circ\text{C}$ 、 $44.9 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ 、光照 14 h/d 的光照培养箱中培养, 加入 MS 营养液, 每隔 5 d 更换 1 次。待苗长至 3 叶 1 心, 除去弱苗, 记录每皿中成苗数。将幼苗分成两组, 一组为对照(DY1、DY2 和 DY3)置于  $28^\circ\text{C}$  下正常培养; 另一组为处理组(DYL1、DYL2 和 DYL3)置于  $8^\circ\text{C}$  冷胁迫处理 72 h, 每组均 3 次生物学重复。处理结束后, 取叶片于液氮中冻存, 置于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中保存备用。

### 1.2 方法

**RNA 提取、文库构建** 采用 Thermo Fisher Scientific 公司的 Trizol 试剂盒, 参照 Qiao 等<sup>[9]</sup>的方法提取东乡野生稻幼苗的 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的完整性和纯净度, 委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成 RNA 的质控, 建库合格后上机(Illumina HiSeq)进行测序工作。

**测序数据分析** 测序片段经 CASAVA 碱基识别转化为 Fastq 格式序列数据(Reads), 其中包含测序片段的序列信息和其对应的测序质量信息。对原始数据进行过滤, 去除接头、含 N、低质量 Reads 后得到 Clean reads, 然后计算  $Q_{20}$ 、 $Q_{30}$  和 GC 含量。从基因组网站下载基因模型注释文件和参考基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), 构建参考基因组的索引, 将 Clean reads 与参照基因组比对。采用 String Tie 拼接出转录本后, 利用 Feature Counts 计算映射到每个基因的读数, 然后根据基因的长度计算每个基因的 FPKM 和映射到该基因的读数, 利用 DESeq2 分析两组处理间的差异表达。本试验以  $P < 0.05$  以及  $|\log_2 \text{FoldChange}| > 1$  作为差异表达基因的筛选阈值。通过 clusterProfiler R 软件实现差异表达基因的 GO 富集分析和 KEGG 通路差异表达基因的统计富集。

**差异表达基因的 qRT-PCR 验证** 参照 Luo 等<sup>[11]</sup>的方法, 用 Trizol 试剂提取 RNA 后, 按照反转录试剂盒 First-Strand Synthesis of cDNA Kit (普洛麦格生物技术有限公司)说明书进行 cDNA 第一链的合成, 根据 CDS (编码序列)设计后续 qRT-PCR 的特异引物, 所有引物由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成(附表), 按照 SYBR Premix Ex Taq II (2×)(TaKaRa 北京生物技术有限公司)说明书, 在荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)检测 12 个差异表达基因的表达情况, 以 *Cyclophilin* 作为内参基因。PCR 反应体系总体积

为 20  $\mu\text{L}$ , 其中 *Taq* 聚合酶 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , 模板 2  $\mu\text{L}$ , 灭菌水 7.2  $\mu\text{L}$ , 每个样品均 3 次重复。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环, 相对表达量以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  计算。

## 2 结果和分析

### 2.1 转录组测序结果和质控分析

对东乡野生稻幼苗提取 RNA 后进行转录组测序, 获得样品原始数据序列 Reads; 舍弃低质量数据, 经序列拼接, 最后获得 Clean reads 为 47 041 126~51 358 394, 占总数的 93%~97%, 错误率仅为 0.03,  $Q_{20}$  均高于 95%,  $Q_{30}$  均高于 89%, GC 含量约为 52% (表 1), 表明东乡野生稻幼苗叶片的转录测序质量良好。

表 1 转录组测序数据质量检测

Table 1 Quality test of transcriptome sequencing data

样品 Sample	Reads	Clean reads	%	错误率 Error rate	$Q_{20}$	$Q_{30}$	GC /%
DY1	52 974 854	49 271 326	93.01	0.03	96.93	92.14	52.33
DY2	53 600 074	50 934 142	95.03	0.03	96.73	91.70	53.71
DY3	52 998 110	51 358 394	96.91	0.03	95.42	89.23	53.10
DYL1	49 411 866	47 044 094	95.21	0.03	96.60	91.46	50.79
DYL2	51 774 334	48 569 268	93.81	0.03	96.99	92.23	52.06
DYL3	48 860 690	47 041 126	96.28	0.03	96.97	92.18	51.29

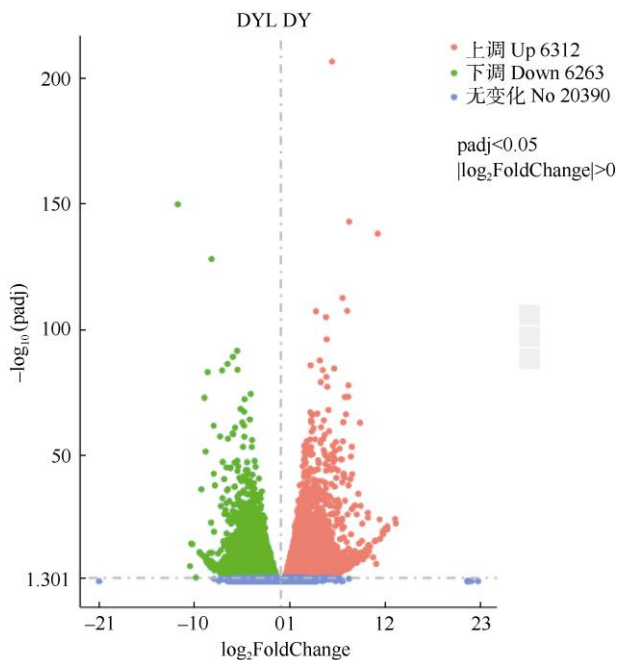


图 1 基因表达火山图

Fig. 1 Volcano map of gene expression

### 2.2 差异表达基因的表达谱分析

低温胁迫下对低温敏感的基因会发生表达变化, 表达差异程度可以反映其在低温胁迫过程中的活跃度。对差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)数量进行统计学分析表明(图 1), 与 DY 相比, DYL 中  $P < 0.05$ 、相对表达水平绝对值  $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ , 即表达差异  $|\log_2\text{FC}|$  大于 2 倍的 DEGs 有 10 200 个, 上调表达的有 5 201 个, 占 50.99%, 下调表达的有 4 999 个, 占 49.01%。这些基因表达差异幅度较大,  $|\log_2\text{FC}|$  主要集中在 10 以内, 占比 90.18%;  $|\log_2\text{FC}| > 10$  的 DEGs 有 24 个, 其中 21 个上调表达, 3 个下调表达, 分布在 1 号染色体上的有 2 个, 3 号染色体有 6 个, 4 号染色体有 2 个, 5 号染色体有 4 个, 11 号染色体有 5 个, 第 2、6、8、10、12 号染色体各 1 个。

从表 2 可以看出, 表达上调的基因主要与激素信号转导因子(脱落酸 ABA、乙烯 ETH、漆酶 LAC)、膜蛋白等相关, 下调的基因与乙醛脱氢、甲基转移、稻谷粒长相关。

### 2.3 差异表达基因与耐冷 QTL 区间的联合分析

为进一步分析与耐冷相关的差异基因, 将  $|\log_2\text{FC}| > 1$  的 DEGs 与已知耐冷 QTL 进行联合匹配分析, 结果表明, 共有 426 个 DEGs 可以 map 到 2 个以上研究者报道的 QTL 区间, 其中 1 号染色体上有 61 个, 3 号染色体有 36 个, 4 号染色体有 50 个, 5 号染色体有 156 个, 6 号染色体有 21 个, 7 号染色体有 69 个, 8 号染色体有 33 个。

研究表明 WRKY、AP2/ERF、MYB、bZIP、HSF 等家族基因在调控水稻的生长发育和耐逆性中起着重要作用<sup>[12-15]</sup>。本研究结果表明, 位于耐冷 QTL 区间内的 426 个 DEGs 中, 有 37 个为耐冷调控相关的家族基因(表 3)。在经过低温胁迫后, WRKY、

表 2  $|\log_2FC|>10$  的显著差异表达基因Table 2 Significant differentially expressed genes with  $|\log_2FC|>10$ 

ID	$\log_2FC$	<i>P</i>	功能 Function
Os01g0644200	10.835 239 29	4.84E-18	-
Os01g0947000	10.987 543 65	1.40E-08	-
Os03g0168100	12.274 984 26	2.86E-24	胚胎晚期丰富蛋白 16 Late embryogenesis abundant protein 16
Os03g0226200	11.797 337 13	1.81E-21	血红蛋白 2 Hemoglobin 2
Os03g0233900	11.769 414 38	5.39E-21	血红蛋白 1 Hemoglobin 1
Os03g0745000	10.640 932 18	2.39E-11	热应激转录因子 A2A Heat stress transcription factor A2A
Os04g0121800	10.025 555 32	7.30E-30	-
Os04g0610600	11.446 361 50	3.92E-19	晚期胚胎发生丰富的蛋白质 18 Late embryogenesis abundant protein 18
Os05g0206000	12.062 298 27	1.53E-23	c 末端编码的肽 14 C-Ternally encoded peptide 14
Os05g0206100	11.372 033 56	4.08E-27	c 末端编码的肽 11 C-Ternally encoded peptide 11
Os05g0381400	13.255 753 71	1.80E-25	质膜蛋白 1 Plasma membrane protein 1
Os05g0542500	11.161 144 95	8.37E-143	胚胎晚期丰富蛋白 3-1 Late embryogenesis abundant protein 3-1
Os06g0681200	13.166 729 70	2.77E-27	早期结瘤样蛋白 18 Early nodulin like protein 18
Os08g0529000	10.105 014 22	1.59E-16	PIN 蛋白 5B PIN protein 5B
Os10g0133166	10.281 571 60	6.49E-16	-
Os11g0168500	10.037 036 68	7.75E-28	乙烯响应因子 118 Ethylene response factor 118
Os11g0181200	10.161 641 03	7.14E-14	-
Os11g0451700	11.789 483 03	2.23E-22	脱水蛋白 6 Dehydrin 6
Os11g0454000	10.886 422 27	2.41E-18	ABA 响应基因 16C Responsive to ABA gene 16C
Os11g0533400	12.281 814 90	4.61E-23	-
Os12g0257600	10.018 601 49	4.69E-15	漆酶 28 Laccase 28
Os02g0646500	-10.458 935 46	1.41E-07	乙醛脱氢酶 Aldehyde dehydrogenase
Os03g0843800	-11.87 6989 10	9.90E-155	对臭氧层无害 1 Harmless to ozone layer 1
Os03g0417700	-10.209 978 51	7.08E-17	稻谷粒长 Grain length

AP2/ERF、PP2C、bZIP、HSP70、HSF 家族基因和低温调节蛋白基因的 DEGs 都上调表达, 而 ABC 转运蛋白家族基因则下调表达, 其余家族基因均有上调和下调表达的基因(表 3); 还有 89 个包括 AOX、petidase-S8、p450 等与植物耐逆性相关的其他家族基因。此外, 还检测到 1 个  $|\log_2FC|>10$  且功能尚未报道的 DEG (Os04g0121800)。

## 2.4 差异表达基因 GO 功能分类分析

GO 分析表明(表 4),  $|\log_2FC|>1$  的 DEGs 富集到 896 条 GO 注释中, 其中生物过程(biological process, BP)占 48.19%, 细胞组分(cellular component, CC)占 12.72%, 分子功能(molecular function, MF)占 39.07%, 说明大多数差异表达基因与一些生物学功能显著相关。BP 中主要富集在有机氮化合物生物合成过程(GO: 1901566, 251 个)、碳水化合物代谢过程(GO: 0005975, 217 个)、小分子代谢过程(GO: 0044281, 194 个)和细胞酰胺代谢过程(GO: 0043603, 188 个)等 4 个方面; 在 CC 中主要富集在细胞质(GO: 0005737, 272

个)、胞质部分(GO: 0044444, 228 个)和无膜细胞器(GO: 0043228, 168 个)等 3 个方面; 在 MF 中主要富集在跨膜转运体活动(GO: 0022857, 197 个)、核酸结合转录因子活性(GO: 0001071, 190 个)等 2 个方面。这表明在低温胁迫下, 东乡野生稻进行着十分复杂的新陈代谢, 涉及有机氮化合物生物合成、细胞质、胞质部分和碳水化合物代谢等生物学功能方面的基因较为活跃。

## 2.5 差异表达基因的 KEGG 代谢路径分析

为探索低温胁迫下东乡野生稻代谢途径的变化, 揭示 DEGs 的生物学功能, 对 DEGs 进行 KEGG 代谢途径富集分析表明(图 3), DEGs 共富集到 113 条信号通路上, 主要富集在核糖体(ribosome, dosa03010)、真核生物的核糖体生物发生(ribosome biogenesis in eukaryotes, dosa03008)、氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids, dosa01230)、光合作用(photosynthesis, dosa00195)等通路上, 其中核糖体通路富集的 DEGs 最多。前 3 条通路都与蛋白质

表 3 耐冷 QTL 区间内的家族基因

Table 3 Family genes located in the QTL loci of cold tolerance

家族 Family	ID	log <sub>2</sub> FC	P	功能 Function
WRKY	Os05g0583000	3.836 580 966	1.66E-13	WRKY 基因 8 WRKY GENE 8
	Os05g0474800	3.537 004 773	2.55E-07	WRKY 基因 70 WRKY GENE 70
	Os05g0565900	4.483 967 975	6.11E-09	WRKY 基因 49 WRKY GENE 49
MYB_DNA-binding	Os05g0543600	2.697 716 138	0.000 581 547	MYB 基因 OsMYB86-L2
	Os04g0583900	5.825 651 135	1.78E-39	晚期下胚轴伸长 Late elongated hypocotyl
	Os05g0553400	-2.945 141 429	1.85E-17	R2R3-MYB 转录因子 R2R3-MYB transcription factor OsMYB55
	Os08g0450900	2.958 708 225	0.001 813 088	-
	Os05g0442400	-3.170 777 002	2.88E-09	MYB DNA 结合域包含蛋白 1 MYB-like DNA-binding domain containing protein 1
AP2/ERF	Os01g0868000	2.694 991 640	3.14E-10	乙烯响应因子 99 Ethylene response factor 99
	Os05g0420300	4.723 051 012	3.41E-05	乙烯响应因子 131 Ethylene response factor 131
	Os05g0420300	4.723 051 012	3.41E-05	乙烯响应因子 131 Ethylene response factor 131
PP2C	Os03g0268600	4.370 127 993	4.16E-50	蛋白磷酸酶 2C30, 蛋白磷酸酶 48 Protein phosphatase 2C30, protein phosphatase 48
	Os04g0584300	2.855 149 847	1.92E-08	蛋白磷酸酶 2C 43 Protein phosphatase 2C 43
	Os05g0457200	3.392 170 580	4.41E-23	蛋白磷酸酶 2C 49 Protein phosphatase 2C 49
	Os05g0572700	3.990 222 093	3.40E-11	-
bZIP	Os01g0867300	2.780 010 306	8.98E-53	b-ZIP 转录因子 12 b-ZIP Transcription factor 12
ABC 转运蛋白 ABC transporter	Os03g0281900	-2.660 992 860	7.25E-05	ABC 转运蛋白 G 家族成员 5 ABC Transporter G family member 5
锌指蛋白 Zinc finger protein	Os01g0839100	4.390 115 156	4.74E-19	锌指蛋白 179 Zinc finger protein 179
	Os05g0579300	-4.103 085 431	1.15E-17	锌指同源域类同源盒转录因子 6 Zinc finger homeodomain class homeobox transcription factor 6
蛋白激酶 Protein kinase	Os01g0852100	-2.874 289 272	2.72E-09	受体细胞质激酶 48 Receptor-like cytoplasmic kinase 48
	Os01g0832900	2.282 067 202	7.21E-05	丝氨酸/苏氨酸激酶 1 Serine/threonine kinase 1
	Os05g0545400	3.162 769 983	1.02E-17	蛋白激酶 Protein kinase
	Os05g0550800	3.026 412 308	6.90E-09	蛋白激酶 Protein kinase
	Os07g0628700	-4.989 943 614	5.95E-47	蛋白激酶 Protein kinase
	Os07g0618400	2.650 915 963	3.09E-23	蛋白激酶 Protein kinase
	Os07g0574100	5.428 104 608	0.002 547 104	蛋白激酶 Protein kinase
	Os07g0628900	-3.198 008 619	1.86E-18	蛋白激酶 Protein kinase
	Os07g0637000	-2.773 645 455	6.70E-15	钙调神经磷酸酶类蛋白相互作用蛋白激酶 21 Calcineurin B-like protein-interacting protein kinase 21
	Os08g0441100	3.247 812 226	7.05E-22	钙调神经磷酸酶类蛋白相互作用蛋白激酶 6 Calcineurin B-like protein-interacting protein kinase 6
	Os03g0292700	-3.141 755 016	1.02E-11	蛋白激酶 Protein kinase
HSP70	Os07g0616600	3.017 334 808	7.16E-40	40S 核糖体蛋白 40S Ribosomal protein
	Os01g0840100	3.779 780 365	1.43E-16	-
	Os03g0276500	2.544 860 540	1.25E-11	热激蛋白 Heat shock protein
	Os03g0277300	3.800 204 963	1.37E-07	热激蛋白 70KD Heat shock protein 70KD
	Os05g0460000	3.600 751 735	1.10E-22	胞质热休克蛋白 70-1 Cytosolic heat shock protein 70-1
HSF	Os04g0568700	2.725 132 836	1.00E-11	热应激转录因子 B2As Heat stress transcription factor B2As
低温调节蛋白 Cold regulated protein	Os05g0468800	5.220 028 896	4.55E-47	低温调节蛋白 Cold regulated protein

的合成相关, 且大部分 DEGs 都上调。核糖体通路中 167 个 DEGs 上调; 真核生物中核糖体生物发生通路中有 58 个 DEGs 上调; 氨基酸的生物合成通路中有 78 个 DEGs 上调。这表明低温胁迫下, 东乡野生稻蛋白质的合成大幅提高, 在响应低温时可能发挥着重要作用。

## 2.6 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

为了挖掘与验证东乡野生稻响应低温胁迫信号网络相关基因, 本文随机选取了包括 ABA 响应

蛋白基因、MYB 转录因子和 40S 核糖体蛋白基因 SA 等可能参与响应低温胁迫的 12 个 DEGs, 对其转录水平的表达量进行 qRT-PCR 验证(图 4), 绝大部分基因的 qRT-PCR 表达水平表现出与转录组 RNA-Seq 相同的变化趋势, 其中 9 个 DEGs 的 qRT-PCR 和 RNA-Seq 表达水平为上调, 分别是 Os01g0951200 (尿苷-磷酸合成酶基因)、Os04g0497000 (NADPH 氧化还原酶基因)、Os07g0616600 (40S 核糖体蛋白基因 SA)、Os12g0478200 (ABA 响应蛋白基因)、Os06g0714500 (假定 spastin 蛋白基因)、Os12g0145700 (丙

表 4 差异表达基因的 GO 注释

Table 4 Differentially expressed genes by GO annotation

分类 Category	描述 Description	P	DEG
BP	有机氮化合物生物合成过程 Organonitrogen compound biosynthetic process	8.96E-08	251
	酰胺生物合成的过程 Amide biosynthetic process	9.50E-08	182
	翻译 Translation	1.63E-07	176
	肽生物合成的过程 Peptide biosynthetic process	1.69E-07	178
	细胞内酰胺代谢过程 Cellular amide metabolic process	3.58E-07	188
	肽代谢过程 Peptide metabolic process	4.54E-07	182
	核糖体生物合成 Ribosome biogenesis	4.77E-05	31
	核糖核蛋白复杂生物起源 Ribonucleoprotein complex biogenesis	7.77E-05	33
	辅因子代谢过程 Cofactor metabolic process	0.000 235 203	67
	DNA 构象变化 DNA Conformation change	0.000 766 017	20
CC	细胞内的核糖核蛋白复合体 Intracellular ribonucleoprotein complex	2.89E-11	150
	核糖核蛋白复合体 Ribonucleoprotein complex	2.89E-11	150
	核糖体 Ribosome	6.74E-10	131
	细胞质 Cytoplasm	4.85E-07	272
	无膜细胞器 Non-membrane-bounded organelle	2.63E-06	168
	细胞内的无膜细胞器 Intracellular non-membrane-bounded organelle	2.63E-06	168
	胞质部分 Cytoplasmic part	8.93E-06	228
	前核糖体 Preribosome	0.000 299 383	10
	线粒体部分 Mitochondrial part	0.023 432 438	24
	线粒体 Mitochondrion	0.036 135 733	27
MF	核糖体的结构成分 Structural constituent of ribosome	1.99E-10	133
	结构分子活性 Structural molecule activity	6.30E-09	138
	转移酶活性 Transferase activity	0.003 133 481	9
	氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity	0.004 534 735	27
	二氧酶活性 Dioxigenase activity	0.007 227 765	27
	氧化还原活性 Oxidoreductase activity	0.007 974 971	30
	醛-裂解酶活性 Aldehyde-lyase activity	0.010 597 346	9
	裂解酶活性 Lyase activity	0.010 680 818	70
	O-酰基转移酶活性 O-Acyltransferase activity	0.012 027 626	13
	RNA 结合 RNA binding	0.012 260 637	129

酮酸激酶基因)、Os01g0783500 (结构域蛋白基因)、Os12g0147800 (植物磺胺激素基因)和 Os12g0564100 (MYB 转录因子)。有 3 个 DEGs 的 qRT-PCR 和 RNA-Seq 表达水平都下调, 分别是 Os03g0843800 (硫醇甲基转移酶基因)、Os07g0619400 (结构域蛋白基因)和 Os11g0147800 (特异性茎蛋白基因 *TSJT1*)。从图 5 可见, DEGs 的 qRT-PCR 和 RNA-Seq 表达差异倍数不同但表达趋势相同, 这表明 qRT-PCR 验证结果和转录组测序结果一致。这些基因在低温胁迫下发生表达变化, 预示其在东乡野生稻耐低温胁迫中可能发挥着重要作用。

### 3 结论和讨论

转录组测序技术能够全面且高效分析植物组

织或细胞在物种、品种、发育阶段和环境下, 全部转录产物的类别、结构及表达水平的变化, 揭示特定生物学过程的分子调控机制<sup>[15]</sup>。目前植物的耐冷研究中, 许多研究者利用该技术鉴定并成功揭示了包括拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻、小麦 (*Triticum aestivum*) 等几十种重要作物的耐冷关键基因和复杂的低温胁迫响应机制<sup>[18]</sup>, 为作物的分子育种奠定了重要基础。

本研究采用 RNA-seq 技术对东乡野生稻苗期叶片在常温与低温诱导下的全转录组测序, 比较了两者的完整差异基因表达谱。结果表明, 与常温相比, 东乡野生稻苗期叶片经低温诱导后, 上调表达的 DEGs 有 5 201 个, 比下调表达的多 1.98%; GO 功能分类和 KEGG Pathway 通路分析表明, DEGs 主要富集在核糖体结合转录因子活性、氨基酸的生

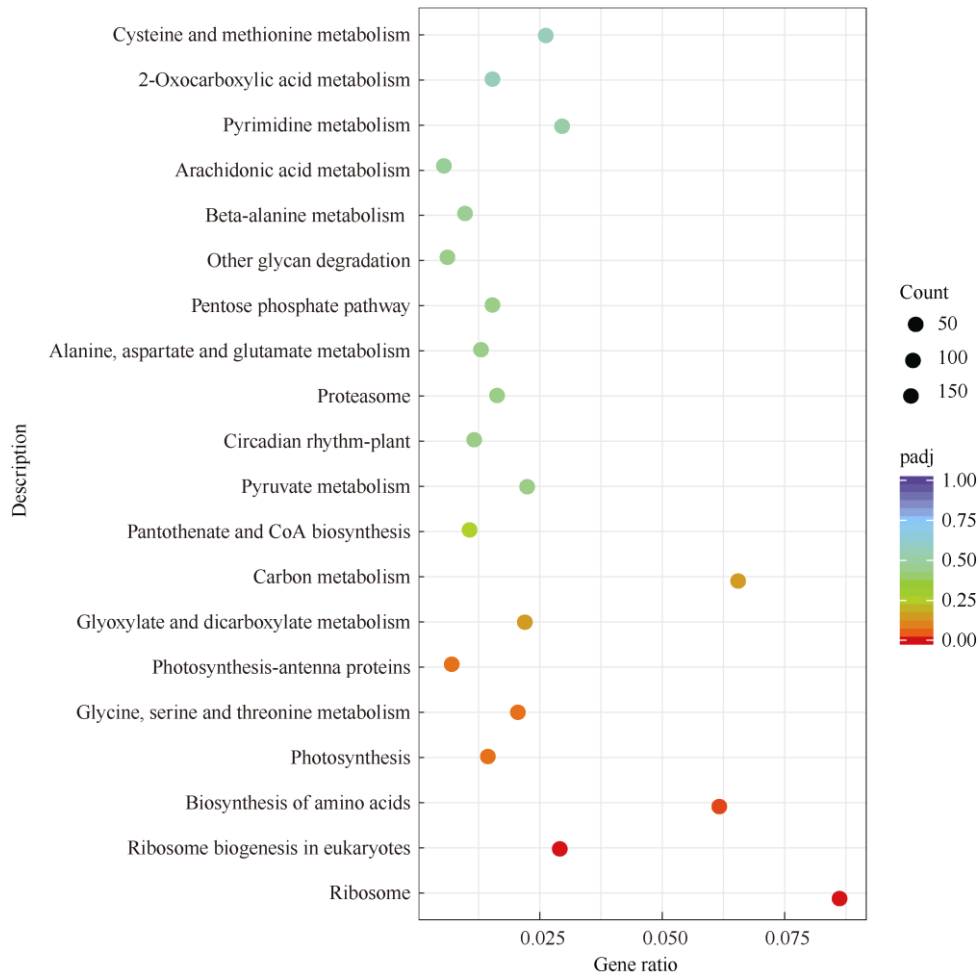


图 2 DEGs 的 KEGG 通路富集散点图

Fig. 2 Scatter diagram of pathway enrichment analysis of DEGs

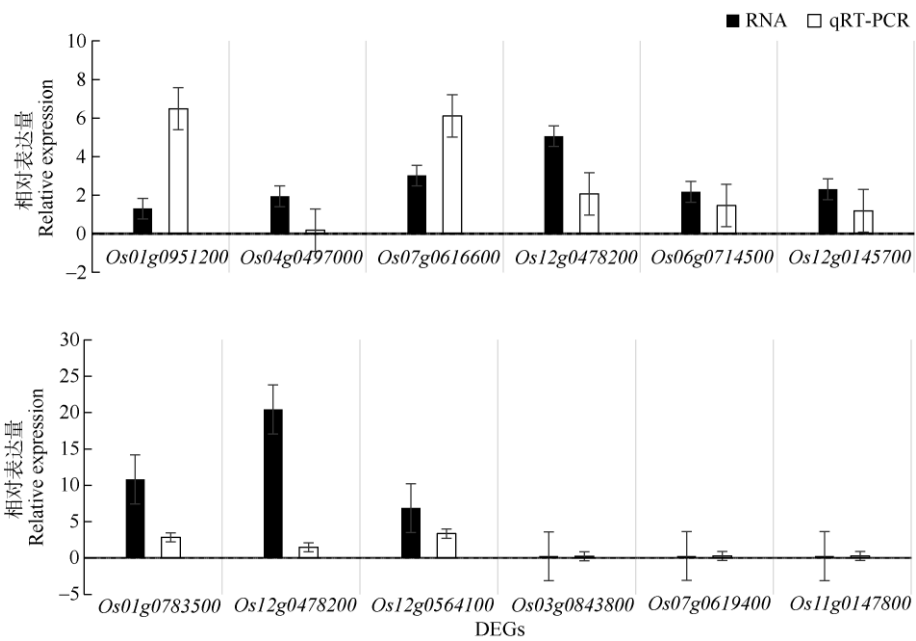


图 3 部分 DEGs 的 RNA-Seq 和 qRT-PCR 的表达模式比较

Fig. 3 Comparison of expression levels of some DEGs by RNA-Seq and qRT-PCR



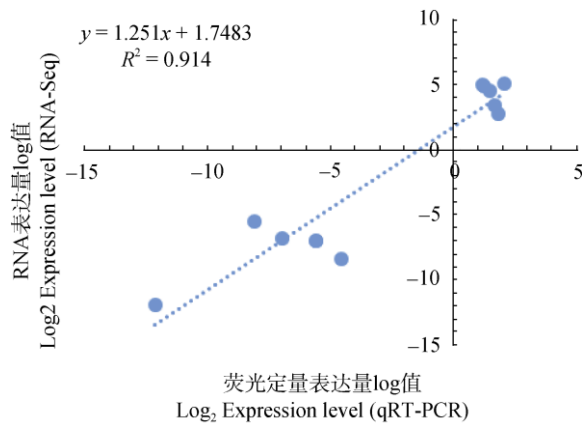


图 4 DEGs 基因的 RNA-Seq 和 qRT-PCR 表达相关性

Fig. 4 Relationship of expression level of DEGs between RNA-Seq and qRT-PCR

物合成和光合作用等代谢过程中, 这表明东乡野生稻在面临低温时植物体内时刻发生着复杂的新陈代谢变化, 通过改变次级代谢物合成、环境应激来响应低温胁迫, 这与前人<sup>[19-21]</sup>对水稻苗期耐冷品种的转录组研究结果类似。

众多研究表明, 植物激素信号转导途径(生长素 IAA、脱落酸 ABA、乙烯 ETH 等激素)对水稻苗期低温耐受性调控起重要作用<sup>[22-23]</sup>。很多研究表明, IAA 反应因子(ARF)、ABA 激活蛋白激酶、ETH 信号转导因子在水稻中过度表达可以提高低温耐受力<sup>[24-25]</sup>。低温胁迫下, 水稻内源 ABA 升高, 其受体 PYP/PYL/RCAR 蛋白与 ABA 结合并与蛋白激酶 PP2C 互动, 抑制蛋白激酶 SnRK2 与 PP2C 结合, SnRK2 便能磷酸化转录因子, 磷酸化后的转录因子激活 ABA 响应基因, 进而提高对低温的耐受性<sup>[26]</sup>。本研究检测到了 3 个 ETH 信号转导因子(AP2/ERF 家族基因)以及 16 个与 ABA 相关的基因(蛋白激酶 Pkinase 家族基因 11 个、蛋白磷酸酶 PP2C 家族基因 4 个上调表达、ABA 响应蛋白 1 个)和 1 个 IAA 反应因子(ARF 家族基因 Os06g0702600), 这些基因位于前人耐冷 QTL 区间内, 并且在遭受低温胁迫后大量诱导表达, 促使体内生理生化发生改变, 帮助水稻抵抗寒冷, 除此之外, 我们还检测到 2 个 ETH 信号转导因子(ERF1 和 OsERF09), 前人也有研究报道。ABA 响应蛋白(Os12g0478200)在 qRT-PCR 验证后表明, qRT-PCR 和转录组测序 RNA-seq 的表达水平一致, 暗示着这些植物激素信号传导的相关基因可能在东乡野生稻响应低温胁迫的过程中发挥着重要的作用。

有研究也表明, 转录因子及其相关的调控基因对植物的耐寒性至关重要, 它可以调控酶、蛋白和代谢物<sup>[27-30]</sup>。目前已有 8 类转录因子家族(锌指 b-ZIP、MYB、AP2/ERF、BHLH、NAC、Bzip、WRKY 和 HSF)的转录因子基因被识别, 低温诱导的最大转录因子家族组属于锌指家族<sup>[12-15]</sup>。锌指蛋白基因表达增强可提高作物对低温的耐受能力<sup>[31-32]</sup>, 水稻锌指蛋白基因 *ZFP177* 转入烟草均可增强转基因植株耐受低温胁迫的能力<sup>[33]</sup>, 许多 WRKY 家族转录因子影响着水稻的低温耐受性, 过表达 WRKY 转录因子的转基因水稻株系对冷胁迫的抗性显著增强<sup>[34-35]</sup>, MYB 转录因子参与了植物的低温响应调控过程, 但是, 不同的 MYB 成员所起的作用并不相同。本研究检测到 1 个 b-ZIP、5 个 MYB\_DNA-binding、3 个 WRKY 和 1 个 HSF 家族基因及 3 个锌指蛋白基因, 且这些基因都位于耐冷 QTL 区间内, 此外, 还检测到 5 个 b-ZIP 转录因子和 16 个 WRKY 家族基因, 也与前人研究结果一致。这些转录因子相关的调控基因不仅位于耐冷 QTL 区间内而且属于耐冷调控相关的家族, 极有可能参与了应答低温胁迫的信号刺激。qRT-PCR 验证表明 MYB 转录因子(Os01g0867300)在冷胁迫后上调表达, 与转录组结果一致。这表明转录因子相关的调控基因极有可能参与了应答低温环境的信号刺激, 被诱导表达, 进而提高水稻的抗逆能力。

水稻在遇到低温胁迫时会发生一系列生理生化和分子机制的变化, 以响应、适应环境温度的变化, 来增强自身的耐冷性, 维持并稳定生长。本研究以水稻耐冷品种东乡野生稻为材料, 对低温胁迫下叶片的转录组进行测序, 获得了较为完善的转录本信息。GO 和 KEGG 分析表明, 核酸结合转录因子、氨基酸生物合成和光合作用代谢等均参与响应低温胁迫过程。同时, 也检测到植物激素信号传导基因和转录因子。此外, ABA 响应蛋白和 MYB 转录因子的 qRT-PCR 表达谱和转录组测序的表达变化一致, 是否可以推测在东乡野生稻苗期遭受低温信号刺激时, 植物激素信号传导途径相关基因与转录因子相关调控基因被上调诱导表达, 从而提高了东乡野生稻的抗寒能力, 在其响应低温胁迫的过程中起着关键作用。

## 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]. *Physiol Plant*, 2015, 154(3): 381–394. doi: 10.1111/ppl.12291.
- [2] LIU J Y, YAN S Y, ZHANG R X, et al. Low temperature tolerance of rice: A review [J]. *Chin Sci Bull*, 2020, 36(27): 1–5.  
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] LIU C T, WANG W, MAO B G, et al. Cold stress tolerance in rice: Physiological changes, molecular mechanism, and future prospects [J]. *Hereditas*, 2018, 40(3): 171–185. doi: 10.16288/j.ycz.18-007.  
刘次桃, 王威, 毛毕刚, 等. 水稻耐低温逆境研究: 分子生理机制及育种展望 [J]. *遗传*, 2018, 40(3): 171–185. doi: 10.16288/j.ycz.18-007.
- [4] QIU Z H, HU B L, XIAO Y Q, et al. Research advances on important stress tolerant traits and its molecular mechanisms in Dongxiang wild rice [J]. *China Rice*, 2017, 23(5): 12–18. doi: 10.3969/j.issn.1006-8082.2017.05.003.  
邱在辉, 胡标林, 肖叶青, 等. 东乡野生稻重要耐逆性状及其分子机制研究进展 [J]. *中国稻米*, 2017, 23(5): 12–18. doi: 10.3969/j.issn.1006-8082.2017.05.003.
- [5] MAO D H, YU L, CHEN D Z, et al. Multiple cold resistance loci confer the high cold tolerance adaptation of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) to its high-latitude habitat [J]. *Theor Appl Genet*, 2015, 128(7): 1359–1371. doi: 10.1007/s00122-015-2511-3.
- [6] ZHAO J, QIN J J, SONG Q, et al. Combining QTL mapping and expression profile analysis to identify candidate genes of cold tolerance from Dongxiang common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) [J]. *J Inter Agric*, 2016, 15(9): 1933–1943. doi: 10.1016/S2095-3119(15)61214-X.
- [7] LUO X D, DAI L F, CAO J F, et al. Identification and molecular cytology analysis of cold tolerance introgression lines derived from *Oryza sativa* L. mating with *O. rufipogon* Griff. [J]. *Euphytica*, 2012, 187(3): 461–469. doi: 10.1007/s10681-012-0769-y.
- [8] SHEN C X, LI D, HE R H, et al. Comparative transcriptome analysis of RNA-seq data for cold-tolerant and cold-sensitive rice genotypes under cold stress [J]. *Plant Biol*, 2014, 57(6): 337–348. doi: 10.1007/s12374-014-0183-1.
- [9] XIAO N, HUANG W N, LI A H, et al. Fine mapping of the *qLOP2* and *qPSR2-1* loci associated with chilling stress tolerance of wild rice seedlings [J]. *Theor Appl Genet*, 2015, 128(1): 173–185. doi: 10.1007/s00122-014-2420-x.
- [10] SHI D H, WANG J Y, BAI Y, et al. Transcriptome analysis of Chinese *Ficus tikoua* [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2020, 28(4): 317–328. doi: 10.11926/jtsb.4164.  
石登红, 王继玥, 白禹, 等. 地果的转录组学分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2020, 28(4): 317–328. doi: 10.11926/jtsb.4164.
- [11] LUO X D, LIU J, ZHAO J, et al. Rapid mapping of candidate genes for cold tolerance in *Oryza rufipogon* Griff. by QTL-seq of seedlings [J]. *J Integr Agric*, 2018, 17(2): 265–275. doi: 10.1016/S2095-3119(17)61712-X.
- [12] JOO J, LEE Y H, SONG S I. OsbZIP42 is a positive regulator of ABA signaling and confers drought tolerance to rice [J]. *Planta*, 2019, 249(5): 1521–1533. doi: 10.1007/s00425-019-03104-7.
- [13] HARTMANN L, PEDROTTI L, WEISTE C, et al. Crosstalk between two *bZIP* signaling pathways orchestrates salt-induced metabolic reprogramming in *Arabidopsis* roots [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(8): 2244–2260. doi: 10.1105/tpc.15.00163.
- [14] SUN X L, LI Y, CAI H, et al. The *Arabidopsis AtbZIP1* transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses [J]. *J Plant Res*, 2012, 125(3): 429–438. doi: 10.1007/s10265-011-0448-4.
- [15] PAN Y L, HU X, LI C Y, et al. *SlbZIP38*, a Tomato bZIP family gene downregulated by abscisic acid, is a negative regulator of drought and salt stress tolerance [J]. *Genes*, 2017, 8(12): 402. doi: 10.3390/genes8120402.
- [16] JIA C L, ZHANG Y, ZHU L, et al. Application progress of transcriptome sequencing technology in biological sequencing [J]. *Mol Plant Breed*, 2015, 13(10): 2388–2394. doi: 10.13271/j.mpb.013.002388.  
贾昌路, 张瑶, 朱玲, 等. 转录组测序技术在生物测序中的应用研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(10): 2388–2394. doi: 10.13271/j.mpb.013.002388.
- [17] JIANG K Y, ZHOU M B. Recent advances in bamboo molecular biology [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2014, 22(6): 632–642. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2014.06.012.  
姜可以, 周明兵. 竹子分子生物学研究进展 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2014, 22(6): 632–642. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2014.06.012.
- [18] ZHANG J, TANG L, RAN Q F, et al. Advances in RNA sequencing in response to low temperature stress in plants [J]. *Mol Plant Breed*, 2020, 18(6): 1849–1866. doi: 10.13271/j.mpb.018.001849.  
张健, 唐露, 冉启凡, 等. 植物响应低温胁迫转录组测序研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(6): 1849–1866. doi: 10.13271/j.mpb.018.001849.
- [19] ZHU L, YUAN M, GAO H X, et al. Transcriptomic analysis of rice seedling responsive to low temperature [J]. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2018, 33(5): 40–51.  
朱琳, 袁梦, 高红秀, 等. 水稻苗期低温应答转录组分析 [J]. *华北农学报*, 2018, 33(5): 40–51.

- [20] GUO H, LI S X, SUN P Y, et al. Transcriptomes analysis of the cold tolerance difference of rice seedlings [J]. *Mol Plant Breed*, 2020, 18(6): 1731–1739. doi: 10.13271/j.mpb.018.001731.
- 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. doi: 10.13271/j.mpb.018.001731.
- [21] ZHANG T, ZHAO X Q, WANG W S, et al. Comparative transcriptome profiling of chilling stress responsiveness in two contrasting rice genotypes [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43274. doi: 10.1371/journal.pone.0043274.
- [22] LIU F. Effects of low temperature on physiological traits and transcriptome of *Casuarina cunninghamiana* Miq. clones [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2015: 5–7.
- 刘芬. 低温胁迫对细枝木麻黄无性系生理指标和转录组的影响 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2015: 5–7.
- [23] JAIN M, KHURANA J P. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice [J]. *FEBS J*, 2009, 276(11): 3148–3162. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07033.x.
- [24] ZHAO Y D, DAI X H, BLACKWELL H E, et al. SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemical genetics [J]. *Science*, 2003, 301(5636): 1107–1110. doi: 10.1126/science.1084161.
- [25] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants [J]. *Cell*, 2016, 167(2): 313–324. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.029.
- [26] ZHANG L, LI X Y, LI D K, et al. CARK1 mediates ABA signaling by phosphorylation of ABA receptors [J]. *Cell Discov*, 2018, 4(1): 30. doi: 10.1038/s41421-018-0029-y.
- [27] SAH S K, REDDY K R, LI J X. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 571. doi: 10.3389/fpls.2016.00571.
- [28] LIU Q Q, ZHENG L, HE F, et al. Transcriptional and physiological analyses identify a regulatory role for hydrogen peroxide in the lignin biosynthesis of copper-stressed rice roots [J]. *Plant Soil*, 2015, 387(1/2): 323–336. doi: 10.1007/s11104-014-2290-7.
- [29] WANG L N. The WRKY family gene and its response to cold stress in grape [D]. Wuhan: Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, 2014: 10–18.
- 王莉娜. WRKY 基因家族的鉴定及其在葡萄冷胁迫中的功能分析 [D]. 武汉: 中国科学院研究生院, 2014: 10–18.
- [30] JOO J, LEE Y H, SONG S I. OsbZIP42 is a positive regulator of ABA signaling and confers drought tolerance to rice [J]. *Planta*, 2019, 249(5): 1521–1533. doi: 10.1007/s00425-019-03104-7.
- [31] HARTMANN L, PEDROTTI L, WEISTE C, et al. Crosstalk between two bZIP signaling pathways orchestrates salt-induced metabolic reprogramming in *Arabidopsis* roots [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(8): 2244–2260. doi: 10.1105/tpc.15.00163.
- [32] SUN X L, LI Y, CAI H, et al. The *Arabidopsis AtbZIP1* transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses [J]. *J Plant Res*, 2012, 125(3): 429–438. doi: 10.1007/s10265-011-0448-4.
- [33] PAN Y L, HU X, LI C Y, et al. *SibZIP38*, a tomato bZIP family gene downregulated by abscisic acid, is a negative regulator of drought and salt stress tolerance [J]. *Genes*, 2017, 8(12): 402. doi: 10.3390/genes8120402.
- [34] HUANG J, WANG M M, JIANG Y, et al. Expression analysis of rice A20/AN1-type zinc finger genes and characterization of *ZFP177* that contributes to temperature stress tolerance [J]. *Gene*, 2008, 420(2): 135–144. doi: 10.1016/j.gene.2008.05.019.
- [35] RAMAMOORTHY R, JIANG S Y, KUMAR N, et al. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(6): 865–879. doi: 10.1093/pcp/pcn061.