

干旱胁迫下玉米苗期的转录组分析

胡玉锋^{1,2,3}, 金峰学², 程云清¹, 单晓辉⁴, 李毅丹^{2,3}, 姜志磊^{2,3*}, 郝文媛^{2*}

(1. 吉林师范大学生命科学学院, 吉林 四平 136000; 2. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 3. 吉林省农业生物技术重点实验室, 长春 130033; 4. 吉林大学植物科学学院, 长春 130062)

摘要: 干旱是影响玉米产量的重要因素。为了探究玉米的抗旱机制, 本研究以干旱胁迫前后的 B73 玉米为实验材料, 取地上部分采用 IlluminaHiSeq 2000 平台对其进行转录组测序。对测序数据进行基因差异表达分析, 共鉴定出差异表达基因 1 111 个, 其中上调表达基因 963 个, 下调表达基因 148 个。对差异表达基因进行了 GO 和 KEGG 功能富集分析, 结果表明在干旱胁迫下差异基因主要富集在细胞壁合成、糖基化过程相关的代谢途径中, 说明这两个代谢途径与玉米抗旱性密切相关。

关键词: 玉米; 转录组; 干旱; 细胞壁; 糖基转移酶

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)06-0048-05

Transcriptome Analysis of Maize Seedlings under Drought Stress

HU Yufeng^{1,2,3}, JIN Fengxue², CHENG Yunqing¹, SHAN Xiaohui⁴, LI Yidan^{2,3}, JIANG Zhilei^{2,3*}, HAO Wenyan^{2*}

(1. School of Life Science, Jilin Normal University, Siping 136000; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 3. Jilin Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Changchun 130033; 4. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Drought is an important factor affecting maize yield. In order to explore the drought resistance mechanism of maize seedlings, this study used IlluminaHiSeq 2000 to sequence the transcriptome of B73 maize seedlings under the well watering and drought stress conditions. The filtered data was screened for gene differential expression, and the screened differentially expressed genes were analyzed by GO and KEGG. The results showed that differential genes were mainly enriched in cell wall synthesis and glycosylation pathways under the drought stress, which indicated that these two pathways might be closely related to drought resistance in maize seedlings.

Key words: Maize; Transcriptome; Drought; Cell wall; Glycosyltransferase

干旱是全球发生频率最高、影响范围最广、每年造成经济损失巨大的自然灾害^[1]。在全球气候变暖和人类活动的影响下, 频繁发生的干旱已然成为全球性的环境与资源问题^[2]。中国平均每年受旱面积为 2 733 万 hm^2 , 发生干旱地区的作物产量也会受到严重的影响, 因干旱减产量与总产量之比达到了 4.7%^[3]。吉林省作为我国重要的商品粮生产基地, 2000 年以来旱情日益加剧, 受旱面

积大幅增加, 受灾区域由西部半干旱地区急剧向中部延伸^[4]。

玉米作为我国主要的粮食作物, 其产量对我国的粮食安全有重要的影响。我国玉米的产区主要分布在东三省、淮海平原以及西南山地^[5]。由于不同年份间降雨差异较大, 玉米在生产周期中很容易受到干旱灾害的影响。每年因降雨不足而引发的干旱都会导致玉米减产, 造成巨大的经济损失。因此有必要在玉米中发掘抗旱相关基因, 培育耐旱玉米品种。玉米转录组分析有助于探索玉米内与耐旱响应相关的基因, 对玉米种质创新以及新品种选育等研究具有重要的促进作用^[6]。

随着时代的发展, Roche 公司的 454 技术、Illumina 公司的 Solexa 技术以及 ABI 公司的 SOLiD 技术共同催生了最新一代的转录组测序技术—RNA-Seq^[7]。RNA-Seq 对全 cDNA 文库以及 EST

收稿日期: 2020-12-16

基金项目: 吉林省农业科技创新工程(CXGC2018ZY025); 吉林省国际科技合作项目(20200801070GH); 吉林省已完成绩效评估创新中心科研项目(20200602049ZP)

作者简介: 胡玉锋(1994-), 男, 在读硕士, 从事玉米抗旱研究。

通讯作者: 姜志磊, 男, 硕士, 副研究员, E-mail: jiang1891@aliyun.com

郝文媛, 女, 博士, 研究员, E-mail: wenyan_h@163.com

(expressed sequence tag)文库进行测序,是目前主流的转录组测序技术^[8]。其相比于初代测序有通量高、分辨率高、灵敏度高、限制性小等优点^[9-10]。转录水平调控是生物基因表达的主要调控方式之一,是生物研究的重要组成部分^[11]。利用转录组测序分析,可以在转录水平上收集处于干旱环境中玉米相关基因的表达信息。尽管对玉米耐旱基因的挖掘及其耐受性分子机制的研究已经开展很久了,但取得的成果并不完美。本研究以 B73 玉米为材料,借助新一代的 IlluminaHiSeq 2000 测序平台对其进行差异转录组分析,以研究玉米干旱胁迫下基因表达的变化,挖掘耐旱基因及代谢通路,为培育耐旱玉米提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 玉米苗期干旱胁迫

本研究以玉米自交系 B73 为实验材料。首先,选取大小一致的种子在 26 °C 暗培养条件下,于湿润的脱脂棉上进行诱导发芽。选择发芽情况基本一致的种子移栽于装填了 200 g 耕种层土壤(装盆前充分混匀烘干)的培养钵中。移栽后土壤含水量维持在饱和含水量 65% 左右。在 28 °C/22 °C (16 h 昼/8 h 夜),光照强度为 600 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,相对湿度 60% 的条件下,培养至三叶一心期后,进行模拟干旱胁迫。其中,干旱胁迫组(BD₁、BD₂、BD₃)停止供水,而对照组(BK₁、BK₂、BK₃)继续保持正常培养条件。干旱胁迫处理后第五天,干旱胁迫组土壤含水量降至低于 10% 时进行取材。胁迫组和对照组均选择生长状态基本一致的单株,取全部地上部分材料,液氮保存,用于 RNA 提取和后续分析。

1.2 转录组测序

样品由上海鹿明生物科技有限公司进行 RNA 提取和测序分析。简要步骤如下:提取样品总 RNA 后,用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集真核生物 mRNA (若为原核生物,则用试剂盒去除 rRNA 后进入下一步),加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段,以 mRNA 为模板,用六碱基随机引物(random hexamers)合成第一条 cDNA 链,然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第二条 cDNA 链,在经过 QiaQuick PCR 试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱之后做末端修复并连接测序接头,然后用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择,最后进行 PCR 扩增,使用建好的测序文库进行测序。利用比对到参考基因组和参考基因

的 unique reads 统计基因表达量,然后对表达的基因进行 Reads 统计。

1.3 差异基因获得

统计基因表达量的原始数据 reads_counts 分布情况,并对原始数据进行过滤得到 clean read。利用 R 语言 DESeq2 程序包对过滤后的数据进行处理分析。以 baseMean>10, $|\log_2 \text{fold changes}| \geq 1$ 和 padj<0.1 为筛选条件来获得差异基因。

1.4 差异表达基因的注释及分析

差异基因利用 DAVID^[11]进行 GO 富集分析和 KEGG 富集分析。

2 结果与分析

2.1 转录组测序质量分析

高通量测序后,首先对测序数据进行过滤,保证各个材料所得的基因长度及分布规律基本一致。6 个材料的 GC 含量平均为 52.5%,各材料碱基的质量值大于 Q30 的超过 90%,证明本次测序所得数据准确性良好。利用胁迫组与对照组所有测到基因的表达数据进行主成分分析,第一主成分占总变异的 71%,胁迫组与对照组可清晰区分,表明胁迫组与对照组基因表达存在差异,本次转录组测序结果可用于后续分析。

2.2 差异表达基因的筛选

对于干旱组与对照组的转录组数据进行比较分析,共获得差异表达基因 1 111 个,其中上调表达基因共 963 个,下调表达基因共 148 个。以 6 个样品间检测到的 1 111 个差异基因为基础,统计基因显著性差异表达情况,其中差异基因上调表达倍数最高的 5 个基因依次为: GRMZM2G002260、GRMZM2G451187、GRMZM2G037781、GRMZM2G168304 和 GRMZM2G143373。下调表达倍数最高的 3 个基因分别为: GRMZM2G347027、GRMZM2G413482 和 GRMZM2G396169。

2.3 干旱胁迫后差异表达基因 GO 分析以及 KEGG 富集分析

利用 DAVID^[12]进行差异基因 GO 富集分析(表 1)和 KEGG 富集分析。根据差异基因对应的生物过程、分子功能和细胞组分的不同,分别进行 GO 富集分析,并依据 *P* 值列出前 10 个富集分类。依据生物过程共有 5 个 GO 富集分类达到了极显著水平:纤维素生物合成过程(cellulose biosynthetic process)、细胞壁组织(cell wall organization)、脂肪酸生物合成过程(fatty acid biosynthetic process)等;依据分子功能共有 5 个 GO 富集分类达到

表 1 差异基因 GO 分析

分类	富集分类	基因数目	P 值
生物过程	GO:0030244:纤维素生物合成过程	14	0.000 0
	GO:0071555:细胞壁组织	20	0.000 0
	GO:0006633:脂肪酸生物合成过程	15	0.000 0
	GO:0006869:脂质转运	7	0.000 8
	GO:0007017:基于微管的过程	6	0.008 9
	GO:0005975:碳水化合物代谢过程	23	0.013 2
	GO:0007018:基于微管的运动	6	0.017 2
	GO:0008652:细胞氨基酸的生物合成过程	5	0.021 3
	GO:0042744:过氧化氢分解过程	10	0.048 5
	GO:0016760:纤维素合酶(形成 UDP)活性	13	0.000 0
分子功能	GO:0016757:转移酶活性,转移糖基	14	0.000 0
	GO:0016788:水解酶活性,作用于酯键	13	0.002 6
	GO:0004553:水解酶活性,水解 O-糖基化合物	17	0.007 6
	GO:0005200:细胞骨架的结构成分	5	0.009 9
	GO:0016746:转移酶活性,转移酰基	6	0.011 4
	GO:0016491:氧化还原酶活性	26	0.012 2
	GO:0008725:DNA-3-甲基腺嘌呤糖基化酶活性	3	0.020 9
	GO:0003777:微管运动活动	6	0.021 7
	GO:0005506:铁离子结合	21	0.038 0
	GO:0016021:膜的组成部分	240	0.000 0
细胞组成	GO:0005874:微管	10	0.000 7
	GO:0005886:质膜	17	0.002 9
	GO:0005576:细胞外区域	22	0.020 0

极显著水平:纤维素合成酶(UDP 形成)活性(cel-lulose synthase(UDP-forming) activity)、转移酶活性(Transferase activity)、转移糖基基团(transferring glycosyl groups)等;依据细胞组成共有 3 个 GO 富

集分类达到极显著水平:细胞膜的组成成分(inte-gral component of membrane)、微管(microtubule)、质膜(plasma membrane)。

依据生物过程获得的最显著富集 GO 分类为

表 2 纤维素生物合成途径中的差异表达基因

Gene ID	Gene 注释	log2FC	padj
GRMZM2G122277	推定的纤维素合成酶样家族蛋白	3.367 6	0.000 1
GRMZM2G025231	纤维素合成酶 7	3.297 2	0.002 8
GRMZM2G424832	纤维素合成酶 4	2.532 5	0.017 8
GRMZM2G110145	可能的混合连接葡聚糖合酶 6	4.469 4	0.022 1
GRMZM2G028353	纤维素合成酶 A 催化亚基 5(UDP 形成)	2.687 0	0.025 2
GRMZM2G177631	纤维素合成酶 8	2.071 0	0.027 6
GRMZM2G113432	纤维素合成酶样蛋白 D3	2.347 6	0.030 3
GRMZM5G886952	推定的蛋白激酶	1.992 3	0.038 9
GRMZM5G870176	推定的纤维素合成酶样家族蛋白	1.303 5	0.038 9
GRMZM2G002523	纤维素合成酶 A 催化亚基 9(UDP 形成)	4.825 7	0.040 6
GRMZM2G103972	推定的混合连接葡聚糖合酶 1	2.222 3	0.062 8
GRMZM2G082580	可能的纤维素合成酶 A 催化亚基 6(UDP 形成)	2.201 2	0.084 3
GRMZM2G018241	纤维素合成酶 9	3.411 8	0.087 1
GRMZM2G112336	纤维素合成酶 1	1.817 4	0.087 8

纤维素生物合成过程(GO:0030244),包含14个基因(表2)。这些基因与依据分子功能获得的极显著富集的GO分类纤维素合成酶(UDP形成)活性(GO:0016760)的13个基因相重合,并且在细胞壁组织(GO:0071555)富集中也包含一部分相重合的

基因。这些基因均为上调表达,主要参与植物细胞壁的合成与分解^[13-14]。依据分子功能获得的极显著富集GO分类糖基转移酶类(GO:0016757)包括了14个基因,这些基因大多与糖基转移酶和半乳糖醛转移酶相关(表3)。

表3 糖基转移功能相关的差异基因

Gene ID	Gene 注释	log2FC	padj
GRMZM2G129302	糖基转移酶5	3.593 211	0.000 602
GRMZM5G869788	糖基转移酶家族61蛋白	1.075 276	0.000 731
GRMZM2G074896	糖基转移酶	5.873 471	0.001 569
GRMZM2G142709	假定的半乳糖醛酸转移酶样9	1.373 985	0.001 083
GRMZM2G300692	假定的半乳糖醛酸转移酶样7	1.321 183	0.004 456
GRMZM2G115762	糖基转移酶5	2.175 725	0.006 163
GRMZM2G098793	糖基转移酶	1.680 098	0.006 593
GRMZM2G176576	糖基转移酶	1.183 936	0.038 061
GRMZM2G057930	转移酶	2.486 295	0.048 621
GRMZM2G130800	糖基转移酶家族61蛋白	1.123 258	0.062 751
GRMZM5G875864	糖基转移酶家族61蛋白	1.465 975	0.069 467
GRMZM2G468661	可能的半乳糖醛酸转移酶样3	3.249 477	0.082 998
GRMZM2G410916	糖基转移酶家族61蛋白	1.069 41	0.094 232
GRMZM2G149024	糖基转移酶	1.468 535	0.096 488

图1中列出了KEGG富集的10个通路。其中4个KEGG通路达到了极显著水平,分别为次生代谢产物的生物合成途径(biosynthesis of secondary metabolites, zma01110)、代谢途径(metabolic pathways, zma01100)、苯丙烷类生物合成途径(phenylpropanoid biosynthesis, zma00940)、类固醇生物合成途径(steroid biosynthesis, zma00100)。

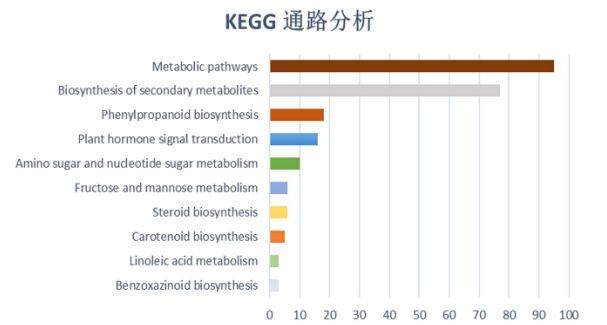


图1 KEGG代谢通路分析

3 讨论

干旱是植物生长发育过程中容易受到的胁迫之一,当植物处于干旱环境中时,植物本身的耐旱响应会调节许多基因的表达。本研究以B73玉米为材料,通过转录组测序对差异表达基因进行分析,发现与玉米苗期耐旱相关的基因主要富集

在细胞壁代谢、脂质的合成与转运、氨基酸的合成、糖基转移酶代谢等重要代谢途径。这与其他抗旱转录组研究具有相似之处,刘春妮等^[15]研究表明玉米干旱胁迫的差异基因主要参与细胞壁合成、碳水化合物及多糖代谢等生物学过程;张然等^[16]研究表明青海野生草地早熟禾干旱胁迫的差异基因显著富集在淀粉和蔗糖代谢通路;李铂等^[17]研究表明半夏干旱胁迫下差异表达基因主要集中在核糖体、碳代谢、淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导和氨基酸生物合成等过程。宋广树等^[18-19]研究表明,水稻品种特优12在盐碱胁迫下,差异表达基因主要参与了氧化还原反应、渗透逆境响应、逆境胁迫响应、氧化胁迫响应、次生代谢途径、刺激响应、盐胁迫响应、化学刺激响应、非生物刺激响应等途径,水稻品种长白9号在盐碱胁迫下,渗透调节蛋白和酶类表现出上调趋势。

细胞壁是植物重要的细胞结构组成,在植物的形态建成、器官发育、信号转导、机械支撑、运输水分和养料、保护植株免受病虫害等方面起作用^[20]。细胞壁可分为初生壁与次生壁,其构成包括:纤维素、半纤维素、果胶质等结构多糖、木质素及少量蛋白质^[21]。本研究发现,玉米在干旱胁迫应答中5个纤维素合成酶相关基因、3个纤维素酶A催化亚基、3个纤维素合成酶样家族蛋白、2

个混合链接葡萄糖酶相关基因表达均出现了上调。分析其原因可能是由于纤维素作为合成细胞壁主要成分,其相关基因大量上调表达,会导致细胞壁不断增厚。而细胞壁的增厚,会影响保卫细胞的功能并弱化玉米的蒸腾作用,从而使玉米保存更多的水分。这可能是玉米苗期应对干旱的一个响应机制。

植物生长发育过程中,次级代谢过程发挥着重要的作用,而糖基化是次级代谢过程中不可代替的一部分^[22]。本研究发现,玉米幼苗在干旱胁迫下,大量的差异基因富集在植物转移酶代谢的通路中,特别是一些与糖基转移酶相关的基因表达变化明显。已有研究表明植物受到胁迫时糖基转移酶可以催化各类植物激素发生糖基化,从而改变这些激素的特性,在短时间内适应逆境胁迫。例如拟南芥中的糖基转移酶家族1中的某些功能酶能够糖基化吲哚丁酸,并且影响植株对盐、旱的抗性^[23]。还有研究发现生长素、脱落酸与细胞分裂素均可以在糖基转移酶的作用下发生糖基化^[24-27]。结合本研究所获得的结果,推测玉米苗期在遭受干旱胁迫的情况下,可能通过糖基化影响植物激素的生理特性,进而影响植株耐旱响应。

4 结 论

玉米的耐旱调控较为复杂,本研究通过停止供水模拟干旱胁迫,并对玉米材料进行转录组测序与分析,发现玉米大量基因出现了差异表达,这些差异基因主要集中在细胞壁合成、糖基化过程相关的代谢途径中。

参考文献:

- [1] 韩兰英. 气候变暖背景下中国农业干旱灾害致灾因子、风险性特征及其影响机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
- [2] 李茂松, 李 森, 李育慧. 中国近 50 年旱灾灾情分析[J]. 中国农业气象, 2003(1): 8-11.
- [3] 李 洁, 宁大同, 程红光, 等. 基于 3S 技术的干旱灾害评估研究进展[J]. 中国农业气象, 2005(1): 50-53.
- [4] 闫伟平, 边少锋, 张丽华, 等. 半干旱区抗旱丰产玉米品种的评价及筛选[J]. 东北农业科学, 2017, 42(3): 1-5.
- [5] 陈淑梅, 安玉富. 我国玉米种植业发展现状及方向探讨[J]. 中国农业信息, 2012(19): 97.
- [6] 许 波, 张伟强, 冯晓曦, 等. 转录组测序技术在玉米中的应用研究进展[J]. 玉米科学, 2014, 22(1): 67-72.
- [7] 崔 凯, 吴伟伟, 刁其玉. 转录组测序技术的研究和应用进展[J]. 生物技术通报, 2019, 35(7): 1-9.
- [8] 张春兰, 秦孜娟, 王桂芝, 等. 转录组与 RNA-Seq 技术[J]. 生物技术通报, 2012(12): 51-56.
- [9] Wilhelm B T, Marguerat S, Watt S, et al. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution[J]. Nature, 2008, 453: 1239-1243.
- [10] 梁 焯, 陈双燕, 刘公社. 新一代测序技术在植物转录组研究中的应用[J]. 遗传, 2011, 33(12): 1317-1326.
- [11] 张椿雨, 龙 艳, 冯 吉, 等. 植物基因在转录水平上的调控及其生物学意义[J]. 遗传, 2007(7): 793-799.
- [12] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists[J]. Nucleic acids research, 2009, 37(1): 1-13.
- [13] Holland N, Holland D, Helent jaris T, et al. A Comparative Analysis of the Plant Cellulose Synthase (CesA) Gene Family[J]. Plant Physiology, 2000, 123(4): 1313-1323.
- [14] Jobling S A. Membrane pore architecture of the CslF6 protein controls (1-3, 1-4)- β -glucan structure[J]. Science Advances, 2015, 1(5): e1500069.
- [15] 刘春妮, 宋明桂, 陈思远, 等. 干旱耐受型和敏感型玉米应答干旱的比较转录组学分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020(4): 1-11.
- [16] 张 然, 马 祥, 朱瑞婷, 等. 青海野生草地早熟禾响应干旱胁迫的代谢通路及转录调控分析[J]. 草地学报, 2020, 28(6): 1508-1518.
- [17] 李 铂, 彭 亮, 王 楠, 等. 聚乙二醇模拟干旱胁迫下半夏茎段转录组分析[J]. 中草药, 2020, 51(21): 5579-5589.
- [18] 宋广树, 朱秀侠, 孙 蕾, 等. 水稻品种特优 12 在苏打盐碱处理下数字表达谱分析[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(6): 9-12.
- [19] 宋广树, 朱秀侠, 孙 蕾, 等. 水稻品种长白 9 号的耐盐碱机理分析[J]. 东北农业科学, 2016, 41(2): 5-8.
- [20] 张保才, 周奕华. 植物细胞壁形成机制的新进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(6): 544-556.
- [21] Burton R A, Gidley M J, Fincher G B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls[J]. Nature Chemical Biology, 2010, 6(10): 724-732.
- [22] 李 攀. 拟南芥和玉米糖基转移酶基因参与非生物胁迫耐性的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [23] Szerszen J B, Szczylowski K, Bandurski R S. A gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid[J]. Science, 1994, 265(5179): 1699-1701.
- [24] Hou B K, Lim E K, Higgins G S, et al. N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*[J]. The Journal of biological chemistry, 2004, 279(46): 47822-47832.
- [25] Song C K, Gu L, Liu J Y, et al. Functional Characterization and Substrate Promiscuity of UGT71 Glycosyltransferases from Strawberry (*Fragaria × ananassa*) [J]. Plant and cell physiology, 2015, 56(12): 2478-2493.
- [26] Wang J, Ma X M, Mikiko K, et al. N-glucosyltransferase UGT76C2 is involved in cytokinin homeostasis and cytokinin response in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant and cell physiology, 2011, 52(12): 2200-2213.
- [27] Ting D, Hwang I. Contribution of ABA UDP-glucosyltransferases in coordination of ABA biosynthesis and catabolism for ABA homeostasis[J]. Plant signaling and behavior, 2014, 9(7): e28888.

(责任编辑: 刘洪霞)