

热胁迫下大岩桐花的转录组分析

罗正健 李晓燕

杭州医学院 基础医学与法医学院

DOI:10.12238/as.v5i3.2154

[摘要] 试验以常温培养(WT)和高温胁迫(mut)的大岩桐花蕾为材料进行转录组学测序分析,WT组和mut组共有1885个差异表达基因,在胁迫响应、多生物过程以及温度响应等方面存在显著差异;与通路相关的差异表达基因主要富集在植物信号转导和内质网蛋白加工等方面;转录因子预测分析发现AP2/ERF类、bHLH、MYB-related、C2H2和NAC等转录因子在大岩桐响应高温胁迫时表达量较高,这些转录因子与植物激素信息转导和内质网蛋白加工有关的基因成为大岩桐响应高温胁迫的重要候选基因。

[关键词] 大岩桐; 高温胁迫; 转录组; 花发育

中图分类号: S792.37 文献标识码: A

Transcriptome Analysis of Gloxinia Flowers in Response to Heat Stress

Zhengjian Luo Xiaoyan Li

School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine

[Abstract] The flower buds of gloxinia cultured at room temperature and high temperature were used for transcriptome analysis. The results showed that there were 1885 different expression genes between mut group and WT group involved in stress response, multi-organism process and response to temperature stimulus; the differentially expressed genes related to pathways are mainly concentrated in plant signal transduction and endoplasmic reticulum protein processing. Transcription factor prediction analysis showed that AP2/ERF, bHLH, MYB-related, C2H2 and NAC were highly expressed in response to heat stress. These transcription factors and genes related to plant hormone signal transduction and endoplasmic reticulum protein processing can be used as candidate genes in response to heat stress.

[Key words] gloxinia; heat stress; transcriptome; floral transition

成花转变是植物生长发育中一个非常重要的生理过程,开花期间发生的许多生理过程,如授粉、花粉萌发和受精等对温度高度敏感^[1]。近些年由于全球气候变暖,暖冬和高温天气出现的频率相对增多。温度升高,无论是短暂的还是持续的,都会对开花植物产生不利影响,然而极端热浪并不是造成这些不利影响的唯一原因,即使是轻微的温度波动也会影响植物生长。有研究表明,植物生长季最低温度每升高1°C,水稻产量就会下降10%;同样白天温度高于21°C,夜间温度高于16°C,每升高1°C,普通小麦的产量就会下降5%;而每天温度高于30°C,玉米产量就会下降1%^[2]。随着“温室效应”的日益严重,全球气候变化加剧,越来越多的开花植物因为高温气候的影响面临生长季的改变,因此在这样的气候背景下研究开花植物的抗逆胁迫,尤其是热胁迫分子响应机制显得尤为重要。

了解植物应对非生物胁迫的分子机制,并利用这一点筛选在不利环境条件下适应并保持高产的作物,一直是分子育种家

努力的目标。近些年兴起的转录组学分析为了解植物适应环境胁迫而做出的细胞和分子响应提供了全面的知识。转录因子、蛋白激酶和磷酸酶等具有不同功能和调节功能的基因表达在非生物胁迫条件下会发生改变^[3]。调节基因表达和信号转导的小肽、植物激素和非编码RNA在响应非生物胁迫反应机制时扮演重要角色和关键成分^[4,5]。如何利用现有的转录组学数据以及新因子的发现来选育更多抵御非生物胁迫的优良品种是目前面临的一大挑战。

大岩桐是苦苣苔科多年生植物,花朵大而美丽,园艺品种较多,是装饰室内的理想盆花,具有较大的市场经济价值。大岩桐喜爱温暖湿润的环境,但对光照和温度敏感,因此以大岩桐花为材料,构建热胁迫下大岩桐花转录组数据库,筛选花发育过程中响应热胁迫相关的基因,为作物和花卉育种提供重要策略。

1 材料与方法

1.1 材料。实验转录组分析数据以栽培重瓣大岩桐为材料,

选取健壮幼苗统一移入珍珠岩和蛭石混合的基质土中栽培(24℃, 长日照, 16h光照/8h黑暗, 湿度≥80%)。待长至成苗, 取部分成苗进行高温培养, 实验组光照时温度设置为38℃高温, 黑暗时温度降为28℃; 对照组光照和黑暗温度均设置为24℃; 每组处理设置3个生物学重复, 培养至大岩桐现蕾, 取花蕾, 液氮冷冻, 储存备用。

1.2 RNA提取。大岩桐富含多糖和多酚, RNA提取相对困难, 因此大岩桐RNA的提取采用总RNA提取试剂盒(Solarbio, 货号: R1200)。RNA提取完成之后, 超微量分光光度计(Thermo Scientific, 型号: NanoDrop 2000)检测RNA提取质量和浓度。

1.3 转录组数据分析。为了揭示高温胁迫对大岩桐转录组学变化的影响, 我们共收集了六组样品, 三组野生型(WT1, WT2, WT3)作为对照组; 三组高温胁迫组(mut1, mut2, mut3)作为试验组。总RNA经过质量检测合格后, 委托北京百迈客生物科技有限公司进行转录组测序分析。

2 结果与分析

2.1 转录组组装结果与质量评估。经过严格的测序质量控制, 测序共得到50.44Gb Clean Data, 并且每个样品Q30碱基百分比都高于93.94%, 说明测序结果较好, 可以进行下一步的数据分析。测序采用de novo组装和聚类去除冗余, 一共组装得到53,876条Unigene, 并且Unigene的N50为2531, 说明组装完整性较高。

2.2 差异基因的表达分析。在差异基因表达分析过程中, 我们设置FDR=0.01和FC=2为筛选条件, 对DEGs进行详细的对比分析。通过对WT1&WT2&WT3_vs_mut1&mut2&mut3进行差异基因筛选, 一共获得1885个差异表达基因(DEGs), 其中表达量上调的基因有1317个, 占69.87%; 下调的基因有568个, 占30.13%; 对差异表达的基因制作火山图分析(图1)。总的来说, 在开花期间, 高温胁迫的状态下, 上调的Unigene多于下调的Unigene, 以利于植物更好的应对逆境胁迫。

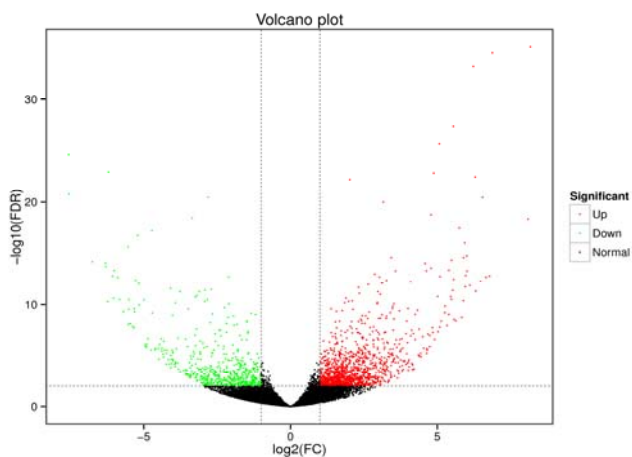


图1 差异基因表达的火山图

2.3 差异表达基因的GO分析。对WT组和mut组之间的差异表达基因进行GO功能分析, 共有19541个Unigene(占有注释Unigene的81.76%)被归类为53个GO条目, 分为三大类: 生化过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecu-

lar function)。

在生物过程方面, 与胁迫响应有关的基因(response to stress)富集程度最高, 此外多生物过程(multi-organism process)、蛋白折叠(protein folding)、温度响应蛋白(response to heat)以及温度刺激响应蛋白(response to temperature stimulus)也得到了显著富集; 在细胞组分方面, 富集显著的是核蛋白(nucleus); 在分子功能方面, 铁离子结合蛋白(iron ion binding)、结合蛋白(protein binding)以及序列特异性DNA结合蛋白(sequence-specific DNA binding)被大量富集(图2)。

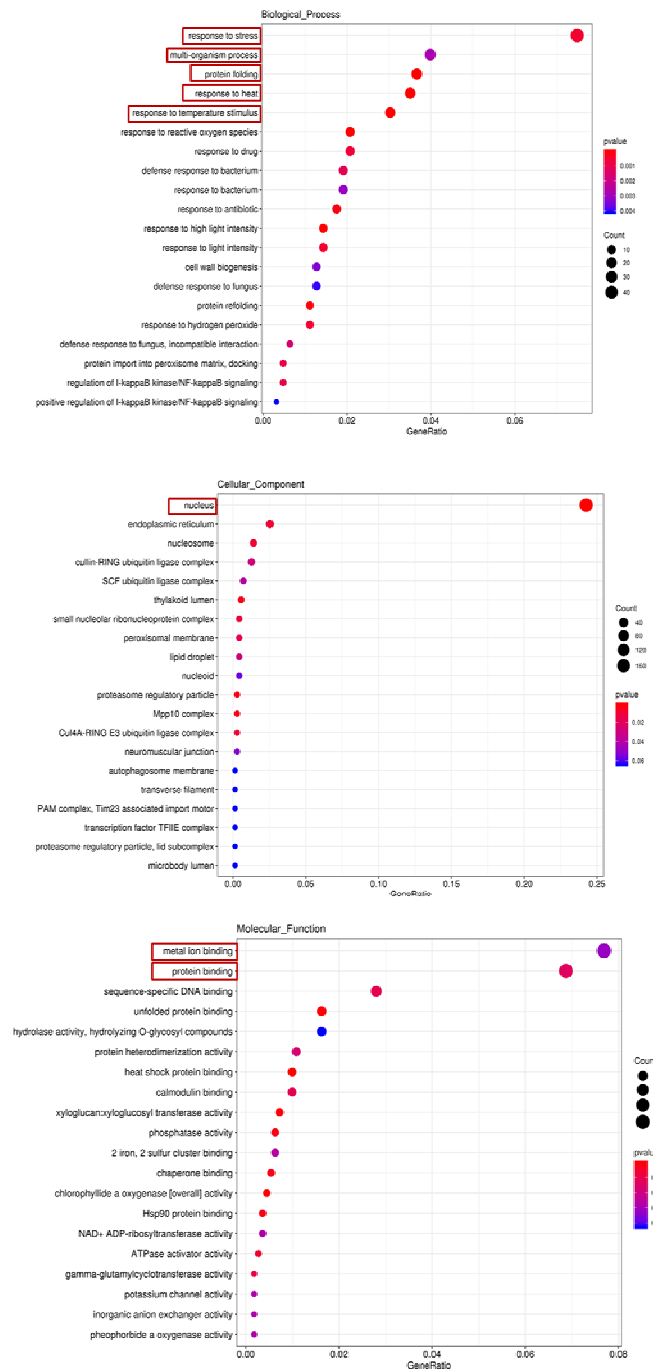


图2 GO富集

2.4 差异表达基因的KEGG富集分析

为了探索高温胁迫下大岩桐的代谢调控网络途径, 将对照组WT 和诱变组mut相比, 与通路相关的601个差异表达基因进行KEGG富集分析, 结果显示两组数据基因差异表达主要富集在植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction) (53个差异表达基因) 和内质网蛋白加工(Protein processing in endoplasmic reticulum) (48个差异表达基因), 说明大岩桐在响应热胁迫时, 植物激素、蛋白质合成方面发生了较大变化(图3)。

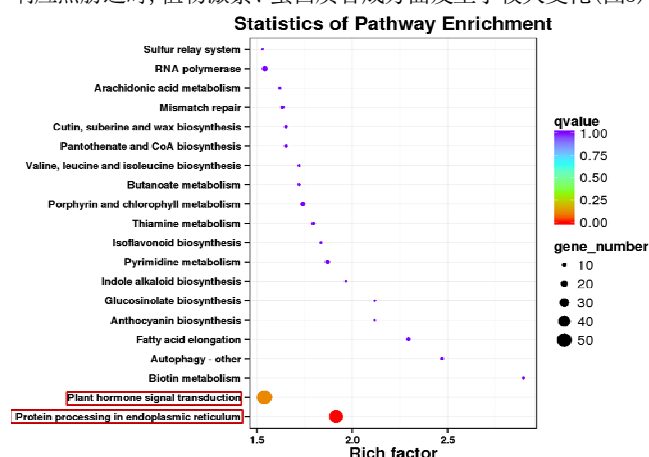


图3 差异表达基因的KEGG富集分析

2.5 热胁迫响应候选基因分析

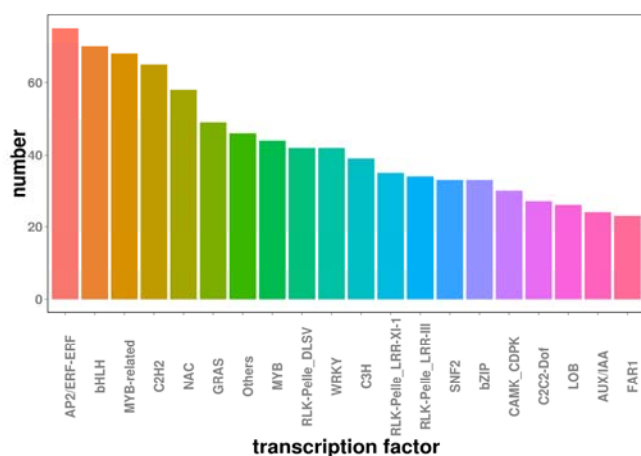


图4 转录因子家族分类

根据基因功能注释对mut组中差异表达的601个基因进行分析, 筛选耐热候选基因, 其中表达量相对较高的基因有: 53个基因与植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)有关; 51个基因与植物-病原相互作用(Plant-pathogen interaction)有关; 48个基因与内质网中的蛋白质加工(Protein processing in endoplasmic reticulum)有关; 28个基因与碳代谢(Carbon metabolism)相关; 23个基因与淀粉和蔗糖代谢(Starch and sucrose metabolism)有关; 22个基因与植物的MAPK信号通路(MAPK signaling pathway-plant)有关; 另外还有一些基因与RNA转运和剪接体(RNA transport和Spliceosome)有关; 这些基因在大岩桐响应热胁迫的过程中发挥显著的调节

作用。

转录因子在大岩桐的热胁迫响应过程中发挥重要作用。测序发现, 在差异表达的基因中, 表达量较高的转录因子家族有AP2/ERF类、bHLH、MYB-related、C2H2和NAC等(图4), 这些转录因子在植物的生长发育以及应对生物胁迫和非生物胁迫的过程中起重要调控作用。

3 讨论

花期是外源和内源因子的综合作用, 在分子水平上通过信号通路整合来控制花发育主要调节因子在组织中的表达^[6]。温度对花期以及花发育的影响机制目前仍是一个研究热点, 但高温对开花关键基因的影响有待进一步研究^[7,8]。植物感知非生物和生物胁迫之后会在体内启动复杂的信号通路, 并利用这些信号通路来应对胁迫。通过转录组数据发现, 热胁迫差异表达最多的基因集中在植物激素信号转导和植物-病原相互作用。在分子水平上, 每种激素都有多个中间信号产物, 并且它们在不同的信号水平上具有相互影响的能力, 从而促进了级联反应。植物激素改变会影响内质网中的蛋白质的表达变化, 所以转录组数据中, 差异表达基因在内质网蛋白质加工、碳代谢、淀粉和蔗糖代谢以及RNA转运和剪接体方面存在较大差异。

在针对热胁迫下大岩桐花的转录组数据分析中, 转录因子的表达变化差异较大, 主要集中在植物生长发育、抗病抗逆等方面^[9-11]。在大岩桐应对热胁迫的外界刺激时, AP2/ERF类、bHLH、MYB-related、C2H2和NAC转录因子表达量明显升高。其中AP2/ERF (APETALA2/ethylene responsive element binding factors) 是存在于植物中的一大类转录因子, 该家族的转录因子在许多植物生理过程中起着重要的调节作用, 比如植物形态发生、响应各种胁迫的反应机制、激素信号转导和代谢产物调节等。MYB转录因子广泛分布于高等植物中, 是转录因子家族中含量最丰富、功能最强的转录因子, 同时在植物抗逆性反应中发挥着最重要的作用。C2H2转录因子参与转录调控和染色质重塑, 作为去甲基酶或甲基转移酶, C2H2参与FLC的组蛋白修饰。在植物顶端分生组织或叶片中的C2H2已证明与开花诱导有关。NAC是植物特有的转录因子, 已有研究表明NAC与植物发育、非生物和生物胁迫响应有关。以NAC为中心的网络揭示了衰老、细胞程序性死亡、生物胁迫和非生物胁迫等相关途径之间的相互作用。

植物已经进化出显著的发育可塑性, 能够根据环境变化调整生长和发育。在不断变化的环境中, 这种发育可塑性对植物的适应性尤为重要。例如, 包括日长(光周期)和温度在内的各种环境因素会影响开花时间, 这是成功繁殖的关键因素。在植物生长季, 日照长度时间的变化波动不大; 相比之下, 气温每天都在波动, 因此植物进化出了复杂的信号网络, 能够感知和监测温度变化从而调整开花时间。不同的植物利用不同的机制来响应开花时的温度变化, 环境温度是控制开花时间的关键决定因素之一。尽管人们越来越担心全球气温升高对植物生长发育的潜在影响, 但开花对环境温度的响应机制仍然相对未知。

[基金项目]

浙江省大学生创新创业训练计划(00004CS202013023039);
浙江省教育厅科研项目(00004C4Y201941297)。

[参考文献]

- [1]郭丽,朱飞雪,王存纲,等.温度与汞胁迫对大岩桐花粉萌发及花粉管生长的影响[J].分子植物育种,2022,20(2):511-517.
- [2] Santiago J P, Sharkey T D. Pollen development at high temperature and role of carbon and nitrogen metabolites[J]. Plant Cell Environ. 2019,42(10):2759-2775.
- [3]宋姣敏,徐小萍,陈裕坤,等.热胁迫下水仙花叶片的转录组分析[J].热带作物学报,2019,40(10):1991-2000.
- [4]彭真.高温影响番茄花粉发育的细胞学研究及花药差异表达分析[D].浙江大学,2012.
- [5]于晓英,卢向阳,陈永华,等.瓜叶菊热胁迫下的基因差异表达[J].农业生物技术学报,2007(03):459-463.
- [6] Jiao Y, Hu Q, Zhu Y, et al. Comparative transcriptomic analysis of the flower induction and development of the Lei bamboo (*Phyllostachys violascens*)[J]. BMC Bioinformatics. 2019,20(Suppl25):87.
- [7]Quint M,Delker C, Franklin K A, et al. Molecular and

genetic control of plant thermomorphogenesis[J].Nat Plants. 2016,2:15190.

[8]Zhang G,Tang R,Niu S,et al.Heat-stress-induced sprouting and differential gene expression in growing potato tubers:Comparative transcriptomics with that induced by postharvest sprouting[J].Hortic Res.2021,8(1):226.

[9]Gross T,Becker A.Transcription Factor Action Orchestrates the Complex Expression Pattern of CRABS CLAW in Arabidopsis[J].Genes (Basel).2021,12(11).

[10]Moyroud E, Kusters E,Monniaux M,et al.LEAFY blossoms[J].Trends Plant Sci.2010,15(6):346-352.

[11] Yamaguchi N. LEAFY, a Pioneer Transcription Factor in Plants: A Mini-Review[J]. Front Plant Sci.2021,12:701406.

作者简介:

罗正健(2000--),男,汉族,广西北流人,在读本科,研究方向:分子生物学。

通讯作者:

李晓燕(1982--),女,汉族,山东淄博人,博士研究生,讲师,从事花卉响应逆境胁迫的分子生物学机制研究。

中国知网数据库简介:

CNKI介绍

国家知识基础设施(National Knowledge Infrastructure, NKI)的概念由世界银行《1998年度世界发展报告》提出。1999年3月,以全面打通知识生产、传播、扩散与利用各环节信息通道,打造支持全国各行业知识创新、学习和应用的交流合作平台为总目标,王明亮提出建设中国知识基础设施工程(China National Knowledge Infrastructure, CNKI),并被列为清华大学重点项目。

CNKI 1.0

CNKI 1.0是在建成《中国知识资源总库》基础工程后,从文献信息服务转向知识服务的一个重要转型。CNKI1.0目标是面向特定行业领域知识需求进行系统化和定制化知识组织,构建基于内容内在关联的“知网节”、并进行基于知识发现的知识元及其关联关系挖掘,代表了中国知网服务知识创新与知识学习、支持科学决策的产业战略发展方向。

CNKI 2.0

在CNKI1.0基本建成以后,中国知网充分总结近五年行业知识服务的经验教训,以全面应用大数据与人工智能技术打造知识创新服务业为新起点,CNKI工程跨入了2.0时代。CNKI 2.0目标是将CNKI 1.0基于公共知识整合提供的知识服务,深化到与各行业机构知识创新的过程与结果相结合,通过更为精准、系统、完备的显性管理,以及嵌入工作与学习具体过程的隐性知识管理,提供面向问题的知识服务和激发群体智慧的协同研究平台。其重要标志是建成“世界知识大数据(WKBD)”、建成各单位充分利用“世界知识大数据”进行内外脑协同创新、协同学习的知识基础设施(NKI)、启动“百行知识创新服务工程”、全方位服务中国世界一流科技期刊建设及共建“双一流数字图书馆”。