

小麦幼穗在减数分裂期响应低温胁迫的转录组分析

马新^{1,2}, 王娟², 姚丹妤², 万小能², 吕凯迪², 杨柏松², 王含², 杨淑颖²,
郝淑女^{1,2}, 张慧慧², 陈彦竹¹, 王彩¹, 马守才¹, 孙果忠²

(1. 西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100; 2. 中国农业科学院作物科学研究所作物分子育种国家工程中心, 北京 100081)

摘要:由春季低温引发的倒春寒灾害在中国频繁发生,解析小麦幼穗应答低温胁迫的基因调控机制对抗倒春寒遗传改良具有重要意义。在人工控制环境条件下,通过转录组测序技术分析了小麦幼穗在减数分裂期进行低温胁迫处理的基因表达特征。结果表明,在减数分裂期,低温胁迫可引起花药组织超微结构的损伤,导致籽粒结实率显著下降。幼穗在低温胁迫过程中的差异表达基因主要涉及激素信号转导、光合作用、昼夜节律-植物、糖代谢、DNA复制等反应通路。编码肌动蛋白解聚因子(ADF)、胚胎发育晚期丰富蛋白(LEA)、CCCH 锌指蛋白等的基因在低温处理各个时间节点均极显著上调表达,可能参与调控小麦幼穗对低温胁迫的抗性反应。

关键词: 小麦; 减数分裂期; 低温; 转录组

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)11-1451-11

Transcriptome Analysis of Wheat Young Spikes in Response to Low Temperature Stress at Meiosis Stage

MA Xin^{1,2}, WANG Juan², YAO Danyu², WAN Xiaoneng², LÜ Kaidi², YANG Baisong²,
WANG Han², YANG Shuying², HAO Shunü^{1,2}, ZHANG Huihui², CHEN Yanzhu¹,
WANG Cai¹, MA Shoucai¹, SUN Guozhong²

(1. College of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. National Engineering Research Center for Crop Molecular Breeding, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The late spring cold disaster caused by low temperature in spring occurs frequently in China. It is of great significance to analyze the gene regulation mechanism of wheat in response to low temperature to resist the genetic improvement. In this study, the gene expression characteristics of wheat young spikes subjected to low temperature during meiosis was analyzed using transcriptome technology under artificially controlled environmental conditions. The results indicate that low temperature during meiosis stage can cause damage to the ultrastructure of anther tissue, leading to a significant decrease in seed setting rate. The differentially expressed genes (DEGs) in young spikes under low temperature mainly involve pathways such as hormone signal transduction, photosynthesis, circadian rhythm-plants, sugar metabolism, DNA replication, etc. The encoding genes of actin depolymerization factor (ADF), late embryonic development abundant protein (LEA), CCCH zinc finger protein, etc. were significantly upregulated at all time points of low temperature treatment, which may be involved in regulating the resistance response of wheat spikes to low temperature.

收稿日期: 2024-10-25

修回日期: 2025-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32201806); 中国农业科学院创新工程项目 (CAAS-ZDRW202002); 国家重点研发计划项目 (2021YFD12006); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-03); 科技创新 2030-重大项目 (2023ZD0402402)

第一作者 E-mail: max782916350@163.com (马新); wj_1714661899@163.com (王娟); yaodanyu@caas.cn (姚丹妤)

通讯作者 E-mail: sunguozhong@caas.cn (孙果忠); mashoucai@nwsuaf.edu.cn (马守才)

Keywords: *Triticum aestivum* L.; Meiosis stage; Low temperature; Transcriptome

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是世界上种植区域最广的粮食作物^[1]。近年来,春季气候波动异常,小麦拔节孕穗期遭受倒春寒的灾害频发^[2-3],导致小麦产量降低和品质劣化^[4-5],严重时可造成绝收^[6]。2018年,中国黄淮南片麦区发生大面积的倒春寒灾害,抗寒性弱的强筋小麦品种减产十分严重,较抗寒品种每公顷减产达 3 000 kg^[7]。明确小麦在生殖发育阶段耐低温的分子机理,挖掘关键耐寒基因,对小麦抗倒春寒遗传改良具有重要的意义。

遭受低温胁迫后,植物会启动一系列的基因应答反应。当温度下降时,位于细胞膜上的信号受体(如钙离子通道蛋白)识别外界低温信号后产生 Ca^{2+} 、活性氧(reactive oxygen species, ROS)等第二信使,这些第二信使可同时介导细胞内的多种信号转导途径^[8]。为了保护和维持正常代谢和生长发育,植物会启动一系列低温反应保护机制,激活大量耐低温胁迫的相关基因,以减弱低温造成的伤害^[9]。C-端重复结合因子(C-repeat binding factor, CBF)信号转导通路是植物响应低温应答的主要途径^[10],CBF 转录因子是 APETA-LA2/乙烯反应元件结合蛋白(AP2/EREBP)家族的成员^[11],可通过特异识别下游靶基因启动子区域中的 C-重复/脱水反应元件(CRT/DRE),激活次级低温胁迫响应基因(COR)的表达^[12]。ICE 基因正向调控 CBF 转录因子的表达来增强植物抗寒性^[13]。在春大麦中过表达冬小麦 *TaCBF14* 和 *TaCBF15* 基因,可导致下游 *HvCOR14b* 基因表达上调,转基因株系的低温耐受性显著提高^[14]。多种激素在植物应对低温胁迫中发挥着重要作用。脱落酸(abscisic acid, ABA)不仅能够通过调节植物气孔的开合而控制植物的含水量,而且能够调控某些低温胁迫响应基因的表达^[15]。CBF 转录因子通过促进 ABA 的生物合成,进而诱导 COR 基因的表达^[16]。罕见低温诱导 1A 基因(*RC1A*)可通过控制乙烯(ethene, ET)的生物合成调节拟南芥耐冻性^[17]。茉莉酸(jasmonic acid, JA)可与 ABA、ET 等激素相互作用来抵御低温胁迫^[18],抑制 JA 的生物合成会导致植物对低温胁迫更加敏感^[19]。赤霉素(gibberellin, GA)合成受抑制的拟南芥突变体经低温胁迫后,冷反应相关基因 CBF 和 *COR15* 的表达水平升高,植株对低温胁迫

的耐受性增强^[20]。

转录组测序(RNA-Seq)技术是挖掘植物抗逆基因的重要手段之一。Du 等^[21]利用 RNA-Seq 鉴定了一个在 PEG 诱导的脱水胁迫应答中起重要作用的关键基因 *TaERF87*,挖掘了受 *TaERF87* 调控的脯氨酸生物合成相关基因 *TaP5CS1* 和 *TaP5CR1*。Liu 等^[22]利用 RNA-Seq 技术发现,水稻氮高效基因 *OsTCP19* 作为转录因子抑制分蘖促进基因 *DLT* 的表达,进而实现对水稻分蘖发育的调控。小麦在减数分裂期遭遇低温胁迫后结实率会显著降低。Zhang 等^[23]对处于花药分化期的小麦进行低温胁迫,发现小穗粒数、千粒重和单株产量明显下降。王娟等^[24]发现小麦品种中麦 8444 在减数分裂期遭受低温胁迫,可造成茎、叶等器官冻伤,最终株高、穗长和结实率显著降低。为了进一步阐明小麦幼穗在减数分裂期应答低温的分子机制,本研究以小麦品种中麦 8444 为试验材料,在减数分裂期进行低温胁迫处理,对低温处理不同时间节点的幼穗进行转录组测序,以期解析小麦幼穗在减数分裂期应答低温胁迫的基因调控网络,并鉴定耐低温胁迫的关键基因。

1 材料与方法

1.1 试验材料

春性小麦品种中麦 8444 为试验材料,其生育期短,矮秆,株高 40 cm 左右。

1.2 样品处理和采集

将小麦种子腹沟朝下置于含双层湿润滤纸的培养皿中,在室温下吸涨 12 h。为保证种子萌发一致,将其转移至 4 °C 条件下培养 48 h,然后挑选露白一致的种子均匀播种于高 12 cm、直径 14.5 cm 的花盆中,播种深度为 1 cm。所用栽培土为营养土(购自 Pindstrup 公司)。播种后置于光照培养箱(DPRX-450A,上海乔越仪器公司)中培养,生长环境为 22 °C 光照 16 h,15 °C 黑暗 8 h,相对湿度 80%,光强的光合光子通量密度(photo-synthetic photon flux density,PPFD)450 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。待生长至三叶期,参照 Zadoks 等^[25]方法记录播种以后的植株关键生长发育阶段,参照 Waddington 等^[26]方法记录幼穗发育进程。当小麦植株生长至减数分裂期(GS17, S8)时,此期旗叶与倒数第二叶距离为 2~3 cm,利用低温人

工气候培养箱进行低温胁迫处理。低温处理前(22)对小麦幼穗进行第一次取样,命名为 S1;培养箱温度从 22 °C 开始降温,每小时降 4 °C,历时约 6 h 降至 -2 °C,进行第二次取样,命名为 S2; -2 °C 处理 24 h 后进行第三次取样,命名为 S3; -2 °C 处理 48 h 后进行第四次取样,命名为 S4;低温处理结束后,每小时升 4 °C,历时约 6 h 升至 22 °C,进行第 5 次取样,命名为 S5。剥取幼穗时在冰上操作,将幼穗装入冻存管,迅速放入液氮速冻,然后 -80 °C 保存。每个时间点的样品做 3 次生物学重复,取样部位如图 1 所示。

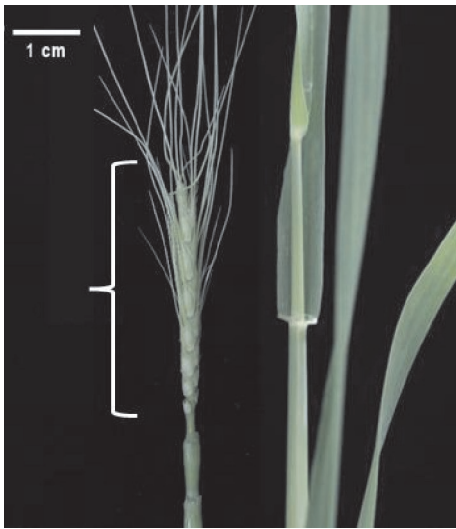


图 1 用于转录组分析的植株发育时期及幼穗取样

Fig. 1 Sampling stages of plant development and young spikes for transcriptome analysis

1.3 低温胁迫过程中的花药超微结构观察

幼穗取样后,用镊子夹取中部小穗的花药迅速置于装有 2.5% 戊二醛固定液的离心管中,抽真空,使花药尽快下沉,室温固定 24 h 以上,然后 4 °C 保存。用缓冲液将固定液冲洗完全,在 1% 锇酸固定 2 h 后,依次用 30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 100% 的酒精梯度脱水。脱水后,以无水丙酮置换酒精,并用包埋剂包埋。包埋的样品经过超薄切片和醋酸铀/柠檬酸铅染色后,利用 H-7500 透射电子显微镜(日本日立公司)观察花药组织的超微结构。

1.4 低温胁迫后性状调查

低温胁迫后,植株恢复至正常环境条件下继续生长。成熟期调查株高、主茎穗长度、小穗数、小花数和穗粒数。用 SPSSAU(<https://spssau.com/index.html>)进行差异显著性分析(*t*-检验)。以结实

率(seed-setting rate, SSR)^[24]来评价低温胁迫的影响, $SSR = \text{穗粒数} / \text{小花数} \times 100\%$ 。

1.5 总 RNA 提取和转录组测序

使用 RNeasy Pure Plant Kit(天根生化科技有限公司,北京)提取幼穗的总 RNA。RNA 样品委托北京诺禾致源科技股份有限公司进行转录组测序。将纯化后的总 RNA 利用 Agilent2100 精确检测 RNA 的质量和完整性,质控合格后进行 Illumina 1500 测序,产生 150 bp 配对末端读长(paired reads)。为了保证数据分析的质量,去除原始 reads 中的接头、低质量 reads 以及无法确定碱基信息的 reads。从国际小麦基因组测序联盟网站(<http://www.wheatgenome.org/>)下载中国春基因组 V1.0 版本和基因注释文件。使用 HISAT2 V2.0.5 进行参考基因组比对,计算每个基因的表达量 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments)^[27]。测序数据提交国家生物信息中心(<https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa>, CRA021808)。

1.6 差异表达基因分析

样本测序数据用 DESeq2(1.20.0)进行基因差异表达分析^[28]。差异表达基因(differential expression gene, DEGs)选择依据为校正后的 $P < 0.05$ 和 $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 1$ 。按照错误发现率 $FDR < 0.05$ 的标准,通过 ClusterProfiler (3.4.4) 软件进行 DEGs 的功能注释分析(gene ontology, GO)^[29]。使用 GSEA 分析工具(<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)进行 DEGs 的基因通路富集分析(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)。

1.7 qRT-PCR 检测差异表达基因

为验证转录组测序结果的准确性,随机挑选 6 个差异表达基因 TraesCS5B01G491500、TraesCS5A01G468300、TraesCS5A01G478500、TraesCS3A01G107200、TraesCS3B01G125600、TraesCS2D01G084400,以 Actin 基因为内参,根据 ORF 序列设计引物,并由上海生物工程有限公司合成(表 1)。使用 EasyScript[®] All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒(购自北京全式金生物公司)合成第一链 cDNA。反应体系:cDNA 模板 1 μL , $2 \times$ PerfectStart[®] Green qPCR SuperMix 5 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上游引物 0.3 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下游引物 0.3 μL 。各样品设置 3 次生物学重复。

用 CFX96 Real-time PCR 系统(Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)。反应程序:94 °C 预变性 30 s;94 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计

算基因相对表达量^[30],用 SPSSAU(https://spssau.com/)分析 qRT-PCR 的 $|\log_2(\text{FoldChange})|$ 和转录组测序的 $|\log_2(\text{FoldChange})|$ 之间的相关性。

表 1 本研究所用的 qRT-PCR 引物
Table 1 Primers for qRT-PCR used in this study

基因 ID Gene ID	基因注释 Gene annotation	引物序列 Primer sequence(5'-3')	
		正向 Forward	反向 Reverse
<i>Actin</i>	肌动蛋白 Actin	ATGGAAGCTGCTGGAATCCAT	CCTTGCTCATAACGGTCAGCAATAC
TraesCS5B01G491500	肌动蛋白解聚因子 Actin depolymerizing factor	CTCATCACCTCCAGCCATCAGCT	CCCAGACACAGAGTTCGCCATTG
TraesCS5A01G468300	包含 NAC 结构域的蛋白质 NAC domain-containing proteinve	GACGACATCCAGAGCATGTACA	AAGAGGGAGGAGTAGAGCAG
TraesCS5A01G478500	肌动蛋白解聚因子 Actin depolymerizing factor	AGCACACGGATTTCTCCTCG	CACCTTCACGCACTCCTCAT
TraesCS3A01G107200	包含锌指 CCCH 结构域的蛋白质 Zinc finger CCCH domain-containing protein	TCAATGACGTCCCTCGCTTCG	GTTTTCAGTGGCTCCAGGTTGG
TraesCS3B01G125600	包含锌指 CCCH 结构域的蛋白质 Zinc finger CCCH domain-containing protein	CGGCTCTTGCGGCTCTTGGC	TGGTGGGGGAGACTGTAGAGG
TraesCS2D01G084400	蛋白磷酸酶 2C Protein phosphatase 2C	CTGCAGCTCCACCACCATC	CTTGACCGGGGCCTTAGC

2 结果与分析

2.1 低温胁迫对株高和籽粒结实率的影响

中麦 8444 先在减数分裂期低温胁迫处理 48 h 后,再升温至正常环境下继续生长到成熟。结果(表 2)表明,与正常生长条件下的对照相比,低温胁迫处理均导致小麦的株高、穗长、小穗数、穗粒数和结实率降低。其中,株高、穗粒数、结实率的变化达到极显著水平(表 2)。

2.2 低温胁迫对花药组织超微结构的影响

利用透射电镜观察小麦幼穗在 S1 和 S5 处理时间节点的花药组织超微结构。结果表明,减数分裂期低温处理可导致小麦幼穗花药的超微结构发生变化。S5 的花粉母细胞(PMC)

皱缩,逐渐脱离绒毡层(T);药室内壁细胞(E)和绒毡层(T)细胞靠近,中层细胞(ML)变窄(图 2a、图 2b)。S5 的绒毡层细胞(T)的细胞核(N)较 S1 发生皱缩(图 2c、图 2d)。部分 S5 的表皮细胞(EP)中出现了大量不溶性物质(图 2e、图 2f)。

2.3 不同低温处理时间的 DEGs 比较

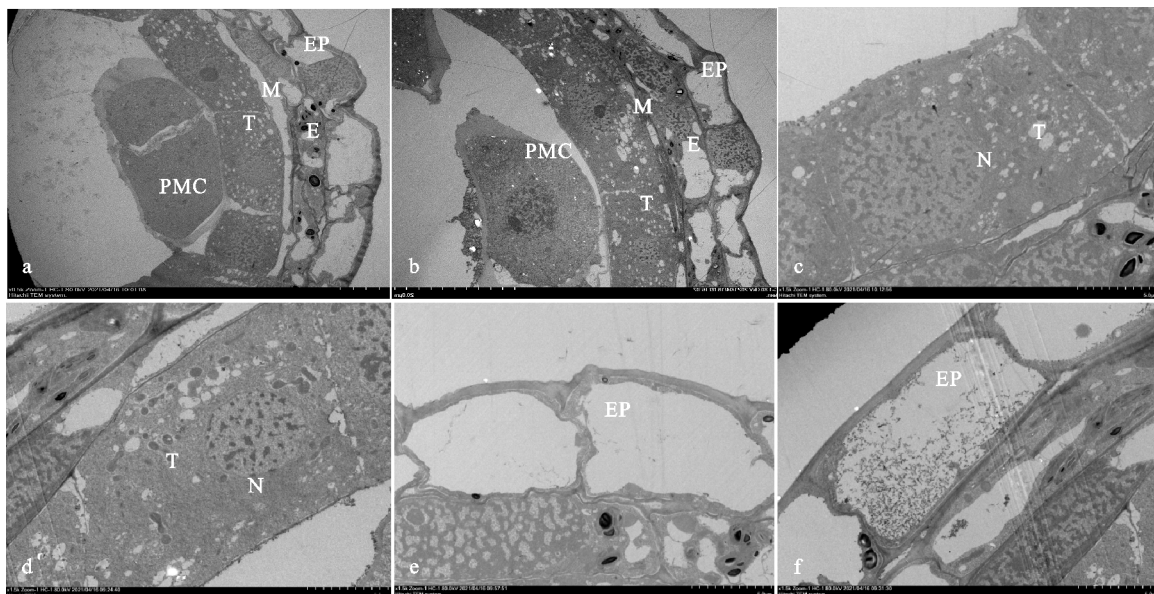
对小麦幼穗不同低温处理时间节点的 DEGs 进行统计,结果(图 3)表明,随着低温胁迫处理时间的延长,DEGs 数量逐渐增多;低温处理 48 h 时 DEGs 最多(S4 vs S1);恢复到常温后,DEGs 急剧减少(S5 vs S1)。与 S1 相比,在低温处理的 S2、S3、S4、S5 中共同上调表达和下调表达的小麦幼穗 DEGs 数量分别为 199 和 51 个(图 3)。

表 2 低温对中麦 8444 株高和结实的影响

Table 2 Effect of low temperature on plant height and seed setting of Zhongmai 8444

处理 Treatment	株高 Plant height/cm	穗长 Spike length/cm	小穗数 Number of spikelets	穗粒数 Number of grains per spike	结实率 Seed setting rate/%
对照 Control	43.60 ± 1.90	6.68 ± 0.48	11.83 ± 0.98	24.83 ± 3.34	70.63 ± 6.90
低温 Low temperature	31.58 ± 5.91 **	6.27 ± 0.33	9.83 ± 1.47	18.33 ± 2.58 **	56.57 ± 4.50 **

** : $P < 0.01$.

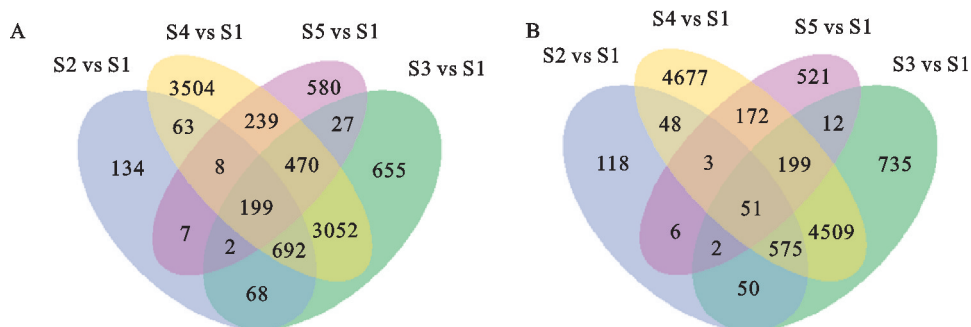


a: S1 的花药, ×500; b: S5 的花药, ×500; c: S1 的绒毡层细胞, ×1500; d: S5 的绒毡层细胞, ×1500; e: S1 的花药表皮细胞, ×1500; f: S5 的花药表皮细胞, ×1500。

a: Anther of S1, ×500; b: Anther of S5, ×500; c: Tapetum cell of S1, ×1500; d: Tapetum cell of S5, ×1500; e: Anther epidermic cell of S1, ×1500; f: Anther epidermic cell of S5, ×1500.

图 2 S1 和 S5 时间节点取样的小麦花药组织超微结构

Fig. 2 Ultrastructure of anther tissues from wheat samples at S1 and S5 timepoints



A 和 B: 幼穗中上调或下调的 DEGs 分布。

A and B: Distribution of up-regulated and down regulated DEGs in young spikes.

图 3 幼穗不同低温处理时间节点间的 DEGs 维恩图

Fig. 3 Analysis of DEGs in wheat young ears at different timepoints under low temperature treatment

2.4 DEGs 的 GO 功能富集分析

对小麦幼穗低温处理不同时间节点的 DEGs 进行 GO 功能注释分析, 根据校正后 $P < 0.05$ 筛选出最显著的生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 的条目 (图 4)。

在 BP 中, 低温处理 0 h (S2 vs S1)、24 h (S3 vs S1) 和 48 h (S4 vs S1) 均可引起激素的响应。随着低温处理时间延长, 在 24 h (S3 vs S1) 和 48 h (S4 vs S1) 均富集到对水响应、酸性化学物质、非生物刺激响应、无机物质和富氧成分的条目。

处理 48 h (S4 vs S1) 时, 有 45 个表达下调的 DEGs 富集在光合作用功能, 表明光合作用在低温胁迫下会受到影响。当恢复常温 (S5 vs S1) 后, DNA 代谢过程被富集, 有 42 个表达下调的 DEGs。

在 CC 中, 低温处理 24 h (S3 vs S1) 和 48 h (S4 vs S1) 中 DEGs 富集在光合作用功能、类囊体膜上的下调表达基因分别有 66 和 104 个, 表明低温胁迫影响光合作用。当恢复常温 (S5 vs S1) 后, 在细胞壁、质外体、胞外区等组分中有 38 个表达上调的 DEGs 被富集, 说明细胞壁、质外体、胞外

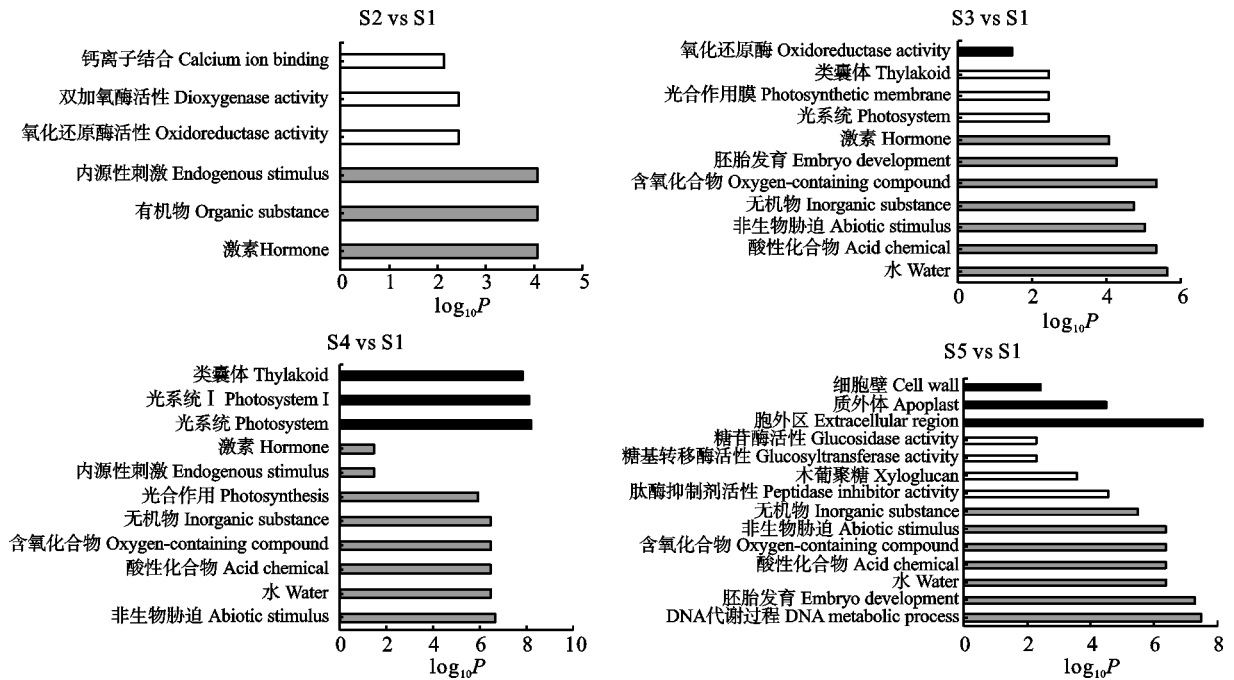


图 4 小麦幼穗低温处理不同时间节点 DEGs 的 GO 功能分类

Fig. 4 GO terms of DEGs under different timepoints of low temperature treatment

区等组分可能在植株脱离低温胁迫后优先恢复生长。

在 MF 中,低温处理 0 h(S2 vs S1)显著富集氧化还原酶、钙离子结合条目;低温处理 24 h(S3 vs S1)富集氧化还原酶。恢复常温(S5 vs S1)后,肽酶抑制剂、木葡聚糖、低聚木糖葡萄糖基转移酶、葡萄糖基转移酶、葡萄糖苷酶被富集,33 个参与上述酶代谢的 DEGs 表现上调,表明与细胞壁合成相关的代谢途径优先恢复。

2.5 DEGs 的 KEGG 通路富集分析

对小麦幼穗低温处理不同时间节点的 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析。在 S2、S3、S4、S5 时间节点均富集到植物激素信号转导,富集的 DEGs 数量分别为 10、38、57 和 13 个,说明植物激素信号转导通路基因参与幼穗低温诱导、耐受和恢复的全过程。在 S2、S3、S4 时间节点均富集到光合作用-天线蛋白,富集的 DEGs 数量分别为 6、12 和 11 个,这些 DEGs 均下调表达,表明在低温胁迫下光合作用受到抑制。在 S3、S4 时间节点均富集到昼夜节律-植物,富集的 DEGs 数量分别为 12 和 17 个,表明低温胁迫影响植物的昼夜节律活动。在 S5 时间节点富集到淀粉和糖代谢、DNA 复制,富集的 DEGs 均为 10 个,且主要呈现下调表达,表明淀粉和糖代谢、DNA 复制活动在

恢复常温后受到抑制(图 5)。

2.6 激素信号转导相关基因的表达模式

激素是植物生长发育的重要调节因子。KEGG 通路分析表明,激素信号转导通路与低温胁迫关系密切。以低温胁迫处理 24 h(S3 vs S1)的 21 个显著上调表达的激素信号转导通路基因为对象,进行表达模式分析。结果表明,多数基因的表达水平随着低温处理时间延长而逐渐升高,恢复常温后表达水平降低。这些基因编码包括蛋白磷酸酶、蛋白激酶、植物激素响应蛋白、植物激素信号受体蛋白、BZIP 转录因子、激素转运蛋白等组分(表 3)。上述结果表明,JA、GA、ABA、ET 等激素均影响幼穗对低温胁迫的应答反应。

2.7 在低温胁迫过程中表达差异显著的基因

依据低温胁迫处理 24 h(S3 vs S1)节点的校正后 P 值大小,筛选出 19 个 DEGs。这些 DEGs 的表达水平大多数呈现随着低温处理时间的延长而逐渐升高,恢复常温后逐渐降低的表达模式。这些基因编码小麦肌动蛋白解聚因子(ADF)、胚胎发育晚期丰富蛋白(LEA)、CCCH 锌指蛋白、NAC 家族转录因子等组分(表 4),表明 ADF、LEA、NAC 等基因上调表达可能会提高幼穗对低温的耐受性。

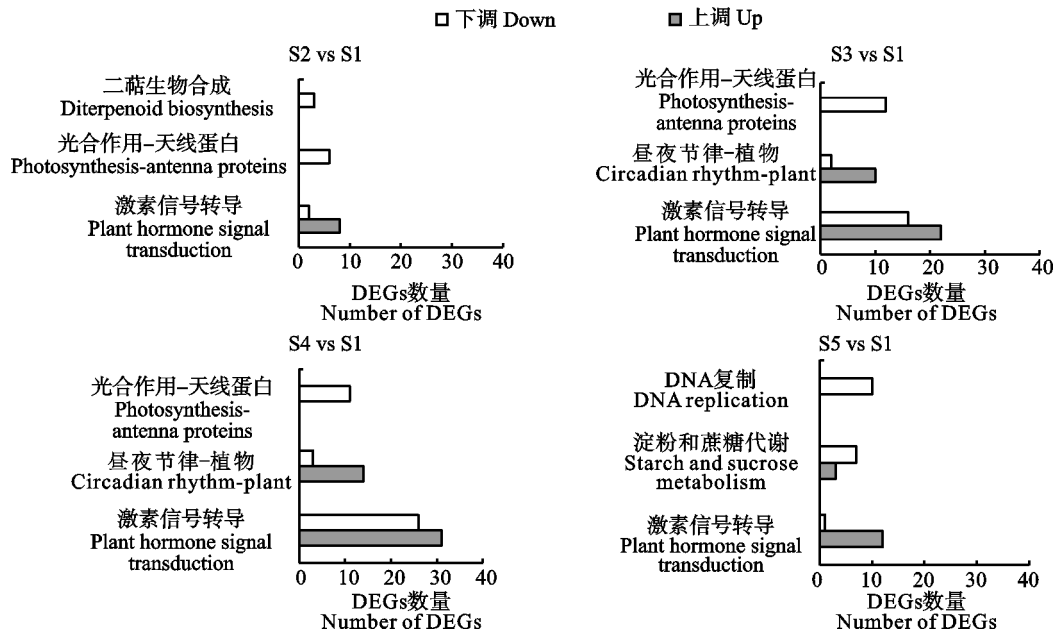


图 5 DEGs 的 KEGG 富集通路

Fig. 5 KEGG enrichment pathway of DEGs

表 3 低温处理 24 h 显著富集的激素信号转导通路的基因

Table 3 Genes of hormone signal transduction pathway significantly enriched under 24-hour low temperature treatment

基因 ID Gene ID	基因注释 Gene annotation	log ₂ (FoldChange)			
		S2 vs S1	S3 vs S1	S4 vs S1	S5 vs S1
TraesCS3A01G362200		1.08	2.74	3.57	0.76
TraesCS5A01G183600	蛋白磷酸酶 2C Protein phosphatase 2C	1.97	3.93	4.75	1.93
TraesCS4B01G210100		1.58	5.57	5.75	3.44
Novel. 12191	含组氨酸的磷酸转移蛋白 2 Histidine-containing phosphotransfer protein 2	0.69	1.04	1.20	-0.19
TraesCS2D01G577000	激酶家族蛋白 Kinase family protein	0.88	1.11	1.15	-0.24
TraesCS4B01G297100	茉莉酸 ZIM 结构域蛋白	2.53	3.59	3.24	1.59
TraesCS4B01G297000	Jasmonate ZIM domain protein	1.05	1.49	2.06	1.18
TraesCS3B01G399200	冠菌素不敏感蛋白 1	0.56	1.21	1.70	0.38
TraesCS4A01G091200	Coronatine-insensitive protein 1	0.86	1.02	1.39	0.10
TraesCS5A01G058700	生长素反应蛋白	0.98	2.54	2.11	0.23
Novel. 10994	Auxin-responsive protein	0.64	1.45	0.9	-0.04
TraesCS4B01G111100	生长素流入转运蛋白 Auxin influx transporter	1.33	1.32	2.52	0.27
TraesCS6A01G226200	生长素响应家族蛋白 Auxin-responsive family protein	0.97	2.08	2.12	1.56
TraesCS2D01G191800	GH3 生长素响应蛋白 GH3 auxin-responsive protein	1.17	2.17	2.58	0.14
TraesCS1D01G254500	赤霉素受体 Gibberellin receptor	0.41	1.12	1.06	1.02
TraesCS2B01G105300	脱落酸受体 Abscisic acid receptor	1.18	1.51	1.44	-0.37
TraesCS2D01G099400	乙烯不敏感蛋白 3 Ethylene insensitive 3	1.11	1.54	1.88	0.44
TraesCS7B01G075600	bZIP 转录因子家族蛋白 bZIP transcription factor family protein	-0.19	1.02	1.57	0.77
TraesCS6D01G312800	bZIP 转录因子 bZIP transcription factor	-0.03	1.03	2.15	1.25
TraesCS3A01G298800	调节蛋白 Npr1 Regulatory protein Npr1	0.23	1.10	1.50	-0.07
TraesCS2D01G374300	响应调节因子 Response regulator	0.32	1.93	1.96	1.26

表 4 低温胁迫过程中表达差异显著的基因

Table 4 Genes with significant differential expression under low temperature stress

基因 ID Gene ID	基因注释 Gene annotation	log ₂ (FoldChange)			
		S2 vs S1	S3 vs S1	S4 vs S1	S5 vs S1
TraesCS5B01G491500		1.60	6.43	7.36	2.82
TraesCS5A01G478500	肌动蛋白解聚因子 Actin depolymerizing factor	1.33	5.16	5.94	1.70
TraesCS5D01G491900		1.77	5.35	5.99	1.66
TraesCS3B01G205100		2.74	6.33	7.84	5.01
TraesCS3D01G180900	晚期胚胎发生丰富蛋白 Late embryogenesis abundant protein	2.63	5.73	7.27	4.16
TraesCS4B01G332700		2.28	5.48	7.06	3.73
TraesCS4D01G329400		3.76	7.38	9.05	5.54
TraesCS3A01G107200		3.18	4.90	6.27	1.82
TraesCS3B01G125600	含锌指 CCCH 结构域的蛋白质 Zinc finger CCCH domain-containing protein	2.83	5.01	6.33	1.48
TraesCS3D01G109300		2.61	4.74	6.37	2.1
TraesCS5A01G468300	含 NAC 结构域的假定蛋白 NAC domain-containing protein, putative	1.46	5.64	6.48	3.18
TraesCS5D01G481200		1.54	5.98	6.88	2.89
TraesCS5B01G218200	早期光诱导蛋白 Early light-induced protein	2.06	5.22	4.48	-1.09
TraesCS2B01G077100	含重金属相关结构域的蛋白 Heavy metal-associated domain containing protein, expressed	1.84	3.74	4.74	1.70
TraesCS1D01G288700	真核翻译起始因子 3 亚基 A Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	4.45	5.03	6.99	2.98
TraesCS5A01G320300	伪响应调节因子 Pseudo response regulator	3.06	2.92	4.51	-1.23
TraesCS1B01G299300	QWRF 基序蛋白 (DUF566) QWRF motif protein (DUF566)	4.93	5.53	7.16	3.22
TraesCS2D01G084400	蛋白磷酸酶 2C Protein phosphatase 2C	1.04	4.36	4.86	1.45
TraesCS7B01G170400	伴侣蛋白 dnaJ Chaperone protein dnaJ	3.67	4.61	6.04	1.05

2.8 qRT-PCR 分析

为了验证 RNA-Seq 数据的准确性,从表 3 和表 4 的 DEGs 中随机选取 6 个 DEGs 进行 qRT-PCR 验证。转录本数据经 NCBI Blast 确定引物特异性,以 *Actin* 为对照,计算基因相对表达水平。结果表明,6

个 DEGs 在 S2、S3、S4、S5 时间节点的相对表达量较 S1 主要呈现极显著差异(图 6A)。由 qRT-PCR 所得到的 log₂ (FoldChange) 和 RNA-Seq 的 log₂ (FoldChange) 相关系数 (R^2) > 0.8, 二者间呈显著正相关(图 6B),表明 RNA-Seq 数据准确可靠。

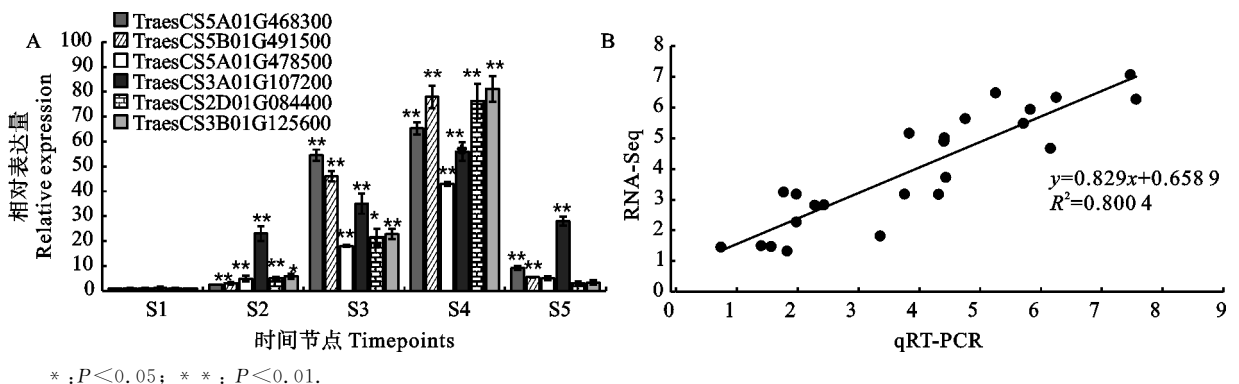


图 6 6 个 DEG 基因的表达水平(A)及其 qRT-PCR 和 RNA-Seq 的相关性分析(B)

Fig. 6 Expression levels of six genes(A)and the correlation analysis of between RT-qPCR and RNA-Seq(B)

3 讨论

3.1 减数分裂期遭遇低温小麦结实率的变化

生产上倒春寒对小麦生长发育会产生严重影响。通常小麦孕穗前遭受低温冻害主要引起穗数和穗粒数降低^[6]。低温导致无效小穗和不育小花数增加,造成穗粒数减少^[24]。严重的倒春寒会引起小麦茎秆损伤、不抽穗或畸形穗及有效穗数降低^[31]。本研究发现,在人工可控环境条件下小麦减数分裂期遭受低温胁迫后花药组织超微结构发生损伤,籽粒结实率降低。在小麦进入生殖发育期时,低温对细胞膜结构、细胞器的破坏以及胞内渗透压的改变会造成茎、穗等组织细胞的损伤,从而导致株高、穗长显著下降。

3.2 减数分裂期小麦幼穗响应低温胁迫的基因表达特征

本研究中,在低温诱导、胁迫直至恢复常温过程中小麦幼穗激素信号响应、合成和转导等相关基因的表达发生变化。研究表明,激素参与植物对低温胁迫的反应。冷驯化正调控因子 OPEN STOMATA1(OST1)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[32],也是脱落酸(ABA)信号传递的关键成分,能够调节气孔孔径^[33]。OST1 能够被冷胁迫激活,并通过 ICE1-CBF-COR 通路提高植株对低温的耐冻性^[34-35]。IAA(生长素)是重要的植物激素。Kyohei 等^[36]发现在植物激素响应蛋白作用下,低温胁迫会抑制生长素的细胞内运输。JA(茉莉酸)是植物界中普遍存在的一类氧化脂类化合物,是调节多种植物过程的重要信号分子,能够激发植物抗寒基因的表达,增强植株抗寒性^[37]。

本研究中编码 ADF 的 TraesCS5A01G478500、TraesCS5B01G491500 和 TraesCS5D01G491900 是分布于 A、B 和 D 基因组的 3 个同源基因,低温胁迫后显著上调表达。肌动蛋白的细胞骨架可以影响细胞对非生物应激的反应和信号转导^[38],ADF 通过解聚肌动蛋白来调节 F-肌动蛋白和 G-肌动蛋白之间的比例,以重塑肌动蛋白的细胞骨架^[39]。研究表明,ADF 可增强植物的低温耐受性。在拟南芥中过表达 *TaADF16* 基因,能够提高植株 ROS 清除能力和细胞渗透调控能力,进而提高拟南芥的抗冻性^[40]。在水稻中过表达南极发草(*D. antarctica*)的 *DaADF3* 基因也能够显著提高转基因水稻植株的耐寒性^[41]。

细胞中 LEA 蛋白可通过与 DNA 或 RNA 结

合,形成一个紧密的氢键网络来稳定细胞结构^[42],以减少非生物胁迫引起的损伤^[43]。本研究中,LEA 基因在低温胁迫后的幼穗中显著上调表达。Guo 等^[44]发现玉米低温胁迫后 LEA 基因转录本显著上调。在大肠杆菌和酵母中异源表达 *CsLEA1* 基因,可显著提高两种微生物的低温耐受性^[45]。

CCCH 锌指蛋白作为转录因子可通过调控下游低温耐受性相关基因的表达水平来提高植株对低温胁迫的耐受性。本研究中,编码 CCCH 锌指蛋白的 TraesCS3A01G107200、TraesCS3B01G1-25600、TraesCS3D01G109300 是分布于 A、B 和 D 基因组的 3 个同源基因,低温胁迫后均显著上调表达。Lin 等^[46]在拟南芥中过表达 CCCH 锌指蛋白调控的下游基因 *AtTZF1*,可显著提高植株的耐寒性。锌指蛋白合成基因 *SCOF-1* 受到低温胁迫后能够诱导 *COR* 基因表达,过表达 *SCOF-1* 基因可增强拟南芥的耐寒性^[47]。

本研究表明,在减数分裂期的低温胁迫可引起小麦花药组织超微结构的损伤,使籽粒结实率显著下降。利用转录组测序技术分析发现,幼穗遭受低温胁迫过程中的 DEGs 主要涉及激素信号转导、光合作用、昼夜节律-植物、糖代谢、DNA 复制等生物反应。编码植物激素、ADF、LEA、CCCH 锌指蛋白等相关功能的基因在低温处理各个时间节点均显著上调表达,其可能参与调控小麦幼穗抵御低温胁迫的反应。本实验室正在利用 VIGS 和转基因技术进行这些基因的功能验证,以期阐明小麦减数分裂期对低温的耐受性提供理论依据。

参考文献:

- [1] 蒋赞,张丽丽,薛平,等.我国小麦产业发展情况及国际经验借鉴[J].中国农业科技导报,2021,23(7):1.
JIANG Y, ZHANG L L, XUE P, et al. Development status of wheat industry in China and international experience for reference [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2021, 23(7):1.
- [2] 陈翔,林涛,林非非,等.黄淮海区小麦倒春寒危害机理及防控措施研究进展[J].麦类作物学报,2020,40(2):243.
CHEN X, LIN T, LIN F F, et al. Research progress on damage mechanism and prevention and control measures of late spring coldness of wheat in Huang-Huai Region [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2020, 40(2):243.
- [3] ZHENG B Y, CHAPMAN S, CHRISTOPHER J, et al. Frost trends and their estimated impact on yield in the Australian wheatbelt [J]. *Procedia Environmental Sciences*, 2015, 29:171.

- [4]陈翔,于敏,蔡洪梅,等.小麦倒春寒研究现状与进展[J].应用生态学报,2021,32(8):2999.
CHEN X, YU M, CAI H M, *et al.* Current status and research advances of late spring coldness in wheat [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2021, 32(8): 2999.
- [5]秦毛毛,刘艳喜,张琨,等.倒春寒对优质强筋小麦品种郑麦366品质的影响[J].河南农业科学,2021,50(3):42.
QIN M M, LIU Y X, ZHANG K, *et al.* Effect of late spring coldness on quality of high-quality strong gluten wheat Zhengmai 366 [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2021, 50(3): 42.
- [6]高艳,唐建卫,殷贵鸿,等.倒春寒发生时期和次数对冬小麦产量性状的影响[J].麦类作物学报,2015,35(5):687.
GAO Y, TANG J W, YIN G H, *et al.* Effect of different periods and frequency of late spring coldness on winter wheat yield related traits [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2015, 35(5): 687.
- [7]欧行奇,王玉玲.黄淮南片麦区小麦耐倒春寒育种研究初探[J].麦类作物学报,2019,39(5):560.
OU X Q, WANG Y L. Preliminary study on wheat breeding for late spring coldness tolerance in south of Huanghuai Region [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2019, 39(5): 560.
- [8]CHEN K, LI G J, BRESSAN R A, *et al.* Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(1): 25.
- [9]ORVAR B L, SANGWAN V, OMANN F, *et al.* Early steps in cold sensing by plant cells; The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity [J]. *The Plant Journal*, 2000, 23(6): 785.
- [10]STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP₂ domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(3): 1035.
- [11]ALLAGULOVE C R, GIMALOV F R, SHAKIROVA F M, *et al.* The plant dehydrins: Structure and putative functions [J]. *Biochemistry Biokhimiia*, 2003, 68(9): 945.
- [12]SHI Y T, DING Y L, YANG S H. Molecular regulation of CBF signaling in cold acclimation [J]. *Trends in Plant Science*, 2018, 23(7): 623.
- [13]陈露,杨立明,罗玉明.植物ICE蛋白基因家族的系统进化分析[J].江苏农业科学,2016,44(2):42.
CHEN L, YANG L M, LUO Y M. Phylogenetic analysis of the ICE protein gene family in plants [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44(2): 42.
- [14]SOLTÉSZ A, SMEDLEY M, VASHEGYI I, *et al.* Transgenic barley lines prove the involvement of *TaCBF14* and *TaCBF15* in the cold acclimation process and in frost tolerance [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(7): 1849.
- [15]JEON J, KIM J. Cold stress signaling networks in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Plant Biology*, 2013, 56(2): 69.
- [16]WANG X L, WU D Z, YANG Q, *et al.* Identification of mild freezing shock response pathways in barley based on transcriptome profiling [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 106.
- [17]CATALÁ R, LÓPEZ-COBOLLO R, MAR C M, *et al.* The *Arabidopsis* 14-3-3 protein rare cold inducible 1a links low-temperature response and ethylene biosynthesis to regulate freezing tolerance and cold acclimation [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(8): 3326.
- [18]HU Y R, JIANG Y J, HAN X, *et al.* Jasmonate regulates leaf senescence and tolerance to cold stress; Crosstalk with other phytohormones [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(6): 1361.
- [19]HU Y R, JIANG L Q, WANG F, *et al.* Jasmonate regulates the inducer of CBF expression-C-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(8): 2907.
- [20]RICHTER R, BASTAKIS E, SCHWECHHEIMER C. Cross-repressive interactions between *SOCl* and the GATAs GNC and GNL/CGA1 in the control of greening, cold tolerance, and flowering time in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(4): 1992.
- [21]DU L Y, HUANG X L, DING L, *et al.* *TaERF87* and *TaAKSl* synergistically regulate *TaP5CS1/TaP5CR1*-mediated proline biosynthesis to enhance drought tolerance in wheat [J]. *New Phytologist*, 2023, 237(1): 232.
- [22]LIU Y Q, WANG H R, JIANG Z M, *et al.* Genomic basis of geographical adaptation to soil nitrogen in rice [J]. *Nature*, 2021, 590(7847): 600.
- [23]ZHANG Y, LIU L Z, CHEN X, *et al.* Effects of low-temperature stress during the anther differentiation period on winter wheat photosynthetic performance and spike-setting characteristics [J]. *Plants*, 2022, 11(3): 389.
- [24]王娟,刘翼,姚丹妤,等.小麦生殖发育阶段对低温的敏感性鉴定[J].作物学报,2022,48(7):1721.
WANG J, LIU Y, YAO D Y, *et al.* Identification on sensitivity of wheat to low temperature at reproductive stages [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(7): 1721.
- [25]ZADOKS J C, CHANG T T, KONZAK C F. A decimal code for the growth stages of cereals [J]. *Weed Research*, 1974, 14(6): 415.
- [26]WADDINGTON S R, CARTWRIGHT P M, WALL P C. A quantitative scale of spike initial and pistil development in barley and wheat [J]. *Annals of Botany*, 1983, 51(1): 119.
- [27]KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357.
- [28]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.
- [29]YU G C, WANG L G, HAN Y Y, *et al.* ClusterProfiler: An

- R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *Omics*, 2012, 16(5): 284.
- [30] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402.
- [31] 薛辉, 余慷, 马晓玲, 等. 黄淮海区小麦品种耐倒春寒相关性状的评价及关联分析[J]. 麦类作物学报, 2018, 38(10): 1174.
- XUE H, YU K, MA X L, *et al.* Evaluation and association analysis of related traits of wheat varieties resistant to late spring cold in Huanghuai wheat region [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2018, 38(10): 1174.
- [32] FREDERIKS T M, CHRISTOPHER J T, SUTHERLAND M W, *et al.* Post-head-emergence frost in wheat and barley: Defining the problem, assessing the damage, and identifying resistance [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(12): 3487.
- [33] LIU C T, SCHLÄPPI M R, MAO B G, *et al.* The *bZIP73* transcription factor controls rice cold tolerance at the reproductive stage [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17: 1834.
- [34] AJAB Z, XIN W, LIU J L, *et al.* Overexpression of antisense phosphatase 2C affords cold resistance in hybrid *Populus davidiana* × *Populus bolleana* [J]. *Genes & Genomics*, 2021, 43(10): 1209.
- [35] MUSTILLI A C, MERLOT S, VAVASSEUR A, *et al.* *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production [J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(12): 3089.
- [36] DING Y L, JIA Y X, SHI Y T, *et al.* OST1-mediated BTF3L phosphorylation positively regulates CBFs during plant cold responses [J]. *EMBO Journal*, 2018, 37(8): e98228.
- [37] ZHENG Y, LUO L D, WEI J J, *et al.* The glutamate receptors *AtGLRI. 2* and *AtGLRI. 3* increase cold tolerance by regulating jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 506(4): 895.
- [38] DU J, WANG X, DONG C H, *et al.* Computational study of the binding mechanism of actin-depolymerizing factor 1 with actin in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159053.
- [39] PORTER K, DAY B. From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(4): 299.
- [40] ALLARD A, BOUZID M, BETZ T, *et al.* Actin modulates shape and mechanics of tubular membranes [J]. *Science Advances*, 2020, 6(17): eaaz3050.
- [41] XU K, ZHAO Y, ZHAO S H, *et al.* Genome-wide identification and low temperature responsive pattern of actin depolymerizing factor (ADF) gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 618984.
- [42] BYUN M Y, CUI L H, LEE A, *et al.* Abiotic stress-induced actin-depolymerizing factor 3 from *Deschampsia antarctica* enhanced cold tolerance when constitutively expressed in rice [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 734500.
- [43] WOLKERS W F, MCCREADY S, BRANDT W F, *et al.* Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses *in vitro* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2001, 1544(1-2): 196.
- [44] GUO Q Q, LI X, NIU L, *et al.* Transcription-associated metabolomic adjustments in maize occur during combined drought and cold stress [J]. *Plant Physiology*, 2021, 186(1): 677.
- [45] GAO T, MO Y X, HUANG H Y, *et al.* Heterologous expression of *Camellia sinensis* late embryogenesis abundant protein gene 1 (*CsLEA1*) confers cold stress tolerance in *Escherichia coli* and yeast [J]. *Horticultural Plant Journal*, 2021, 7(1): 89.
- [46] LIN P C, POMERANZ M C, JIKUMARU Y, *et al.* The *Arabidopsis* tandem zinc finger protein AtTZF1 affects ABA- and GA-mediated growth, stress and gene expression responses [J]. *The Plant Journal*, 2011, 65(2): 253.
- [47] KIM J C, LEE S H, CHEONG Y H, *et al.* A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants [J]. *The Plant Journal*, 2001, 25(3): 247.