作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2023, 49(7): 1808–1817 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2023.21050

外源 6-BA 调控孕穗期低温后小麦幼穗发育的转录组分析

李凌雨 周琦锐 李 洋 张安民 王贝贝 马尚宇 樊永惠 黄正来* 张文静*

安徽农业大学农学院, 安徽合肥 230036

摘 要: 小麦孕穗期对低温非常敏感, 低温胁迫后外源喷施 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA), 能够缓解低温胁迫对小麦造成的伤害, 通过转录组测序技术分析 6-BA 提高小麦抗寒性的分子机制。选用低温敏感型品种皖麦 52 和低温迟钝型品种烟农 19 为试验材料, 在孕穗期低温胁迫后喷施 20 mg L^{-1} 的 6-BA 溶液, 以喷施等量蒸馏水处理为对照。观察幼穗形态, 并测定幼穗可溶性糖含量和淀粉含量。再通过转录组测序筛选并分析差异表达基因, 探究差异表达基因的功能及可能参与的调控通路, 采用 qRT-PCR 方法对测序结果进行验证。外源 6-BA 处理 10 d 后, 与对照相比小麦幼穗形态发育良好, 可溶性糖、淀粉含量均升高。转录组结果表明, 在皖麦 52 和烟农 19 中分别鉴定出 22,770 个和 9866 个差异基因, 其中有 661 个基因在两个品种中均上调, 从中筛选出 *ARF5*、*AGPL1*、*1-SST*、*SWEET15* 等基因, 这些基因与调节植物激素水平、淀粉合成、糖代谢等有关。对筛选出的差异基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 注释表明皖麦 52 和烟农 19 差异基因的功能都主要富集于细胞结构稳定性、代谢、催化活性等。KEGG 富集分析表示信号转导、内源激素水平的调节、碳代谢、膜结构和功能的改变等途径发生显著变化。选择部分候选基因对其表达模式进行 qRT-PCR 分析, 结果说明 RNA-seq 数据准确。综上所述, 6-BA 可以通过调节小麦内部抗氧化物质代谢、激素信号转导、碳水化合物代谢、渗透调节等途径缓解低温损伤, 研究结果可为探索减轻春季低温对小麦伤害的栽培措施提供理论基础。

关键词: 小麦; 6-BA; 低温; 幼穗; 转录组分析

Transcriptome analysis of exogenous 6-BA in regulating young spike development of wheat after low temperature at booting stage

LI Ling-Yu, ZHOU Qi-Rui, LI Yang, ZHANG An-Min, WANG Bei-Bei, MA Shang-Yu, FAN Yong-Hui, HUANG Zheng-Lai*, and ZHANG Wen-Jing*

College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

Abstract: In recent years, due to the frequent occurrence of extreme weather, low temperatures (LT) became one of the main disasters restricting wheat production. LT has negative effects on wheat growth and yield formation, especially at booting stage. Exogenous spraying of 6-benzylamino adenine (6-BA) after LT at booting stage can alleviate the damage caused by LT in wheat, but the related molecular regulation mechanism is still unclear. In this study, transcriptome sequencing technology was used to analyze the molecular mechanism of 6-BA improving cold tolerance in wheat. The LT sensitive variety Wanmai 52 and insensitive variety Yannong 19 were selected as the experimental materials. The experiment was carried out in combination of potted and field planting. Two wheat cultivars were planted in plastic pots at a planting density of ten plants per pot. At booting stage, the pots were moved into an artificial climate chamber for low temperature treatment. At the end of the treatment, 20 mg L^{-1} 6-BA solution was sprayed, and an equal volume of distilled water was sprayed as the control. The morphology of young spike, and the

本研究由国家自然科学基金项目(31801285), 安徽省重点研究与开发计划项目(202204c06020040)和安徽省科技重大专项(202003a06020014)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31801285), the Anhui Key Research and Development Plan (202204c06020040), and the Major Science and Technology Project of Anhui Province (202003a06020014).

* 通信作者(Corresponding authors): 张文静, E-mail: zhangwenjing79@126.com; 黄正来, E-mail: xdnyyjs@163.com

第一作者联系方式: E-mail: 171650776@qq.com

Received (收稿日期): 2022-07-17; Accepted (接受日期): 2022-11-25; Published online (网络出版日期): 2022-12-01.

URL: https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.1809.S.20221201.1038.002.html

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

content of soluble sugar and starch in young spikes were determined. Some candidate differentially expressed genes (DEGs) were screened and their relative expression patterns were analyzed by qRT-PCR, and the results were verified by qRT-PCR. After 10 days, compared with the control, the morphological development of young spike was better, fuller and longer. The contents of soluble sugar and starch in young spikes increased after 6-BA treatment. The results showed that 22,770 DEGs were identified in Wanmai 52 and 9866 in Yannong 19, respectively, and 661 genes were up-regulated in the two cultivars. *ARF5*, *AGPL1*, *1-SST*, *SWEET15*, and other genes were screened out, which were related to the regulation of plant hormone level, starch synthesis, and sugar metabolism. GO and KEGG enrichment analysis were performed on the selected differential genes. GO annotation revealed that the functions of the differential genes of the two varieties were mainly concentrated in cell structure stability, metabolism, and catalytic activity. KEGG enrichment analysis demonstrated that signal transduction, regulation of endogenous hormone levels, carbon metabolism, the changes of membrane structure and function had significant changes. In conclusion, 6-BA could alleviate cold damage by regulating the metabolism of antioxidant substances, hormone signal transduction, carbohydrate metabolism, osmotic adjustment, and other ways in wheat. The results provide a theoretical basis for exploring the cultivation measures to reduce the damage of low temperature on wheat in spring.

Keywords: wheat; 6-BA; low temperatures; young spikes; transcriptome

由于极端天气的频繁发生, 低温胁迫已成为制约小麦(*Triticum aestivum* L.)生产的主要灾害之一。低温会造成小麦的产量下降, 其中以孕穗期低温对小麦产量的影响最为直接, 此时小麦正处于关键生育时期, 对低温非常敏感[1], 幼穗是否能够发育良好直接决定了小麦最终产量的高低[2]。目前已有研究表明, 孕穗期低温胁迫后外源喷施 6-BA 能有效缓解低温对小麦的伤害[3], 但其相关的分子调控机制仍不明确。因此探究 6-BA 调控孕穗期低温后小麦幼穗发育的分子机制, 可为探索减轻春季低温对小麦伤害的栽培措施提供理论基础。

低温胁迫下, 植物内部会发生多种响应途径以适应环境和自我保护, 如渗透调节物质的积累、抗氧化系统的调节、内源激素水平的调节等[4]。低温胁迫会影响小麦正常生长发育, 施用外源植物生长调节剂能在一定程度上提高植物抗寒性, 而 6-BA 作为一种在植物生理反应中具有多种功能的细胞分裂素, 在调控小麦等多种植物的抗逆性方面都发挥着关键作用[5-7]。目前有研究表明, 6-BA 能显著改善低温引起的植株生长不良和叶绿素含量的下降, 调节小麦内源激素水平变化, 提高抗氧化酶活性, 促进籽粒灌浆, 提高小麦产量[8-10]。另有研究表明, 使用 6-BA 还可显著提高碳水化合物含量(蔗糖、己糖和淀粉)[11-12]。Wang 等[13]通过转录组分析发现, 使用 6-BA 后白菜叶片中有大量差异基因富集于抗氧化物质合成、植物激素信号转导和呼吸代谢等过程。干旱胁迫下外源硫化氢(H_2S)能够提高小麦抗旱性, Li 等[14]研究发现, H_2S 减轻干旱伤害可能与运输系统、植物激素信号转导、蛋白质加工、脂肪酸和氨基酸代谢等途径有关。

目前针对 6-BA 影响小麦抗寒性的研究主要集中于叶片生理活性和产量的变化, 通过转录组测序探究其分子调控机制的研究仍比较匮乏。本研究选用低温敏感性不同的小麦品种, 于孕穗期低温处理后喷施 6-BA, 通过对小麦幼穗进行转录组测序, 明确外源 6-BA 缓解低温对小麦幼穗伤害的调控途径及重要调控基因。

1　材料与方法

1.1　试验材料

本试验选用的小麦品种为对低温敏感型小麦品种皖麦 52 (安徽省宿州市种子公司选育)和迟钝型小麦品种烟农 19 (山东省烟台市)农业科学院小麦研究所选育)。

1.2　试验设计

本试验于 2020 年 11 月至 2021 年 6 月于安徽省合肥市安徽农业大学试验基地农萃园进行(31.52°N、117.17°E)。试验点属亚热带季风湿润气候区, 年平均降水量约 900~1000 mm, 年平均气温约 15~16℃。试验地土壤有机质含量为 15.16 g kg^{-1}, 全氮含量为 0.86 g kg^{-1}, 速效氮、速效磷、速效钾含量分别为 149.61、22.31 和 101.67 mg kg^{-1}。采用盆栽的栽培方式, 每个盆高 30 cm, 直径 30 cm, 盆底开 6 个排水孔。每盆装 9 kg 筛过的土壤(取自田间 0~20 cm 的耕作层), 将盆埋入试验田, 盆内土壤与地面齐平, 每盆添加有机肥(微生物菌剂, 有机质含量≥80%) 45 g, 复合肥 7 g (N∶P∶K=15∶15∶15), 尿素 4.57 g (含氮量 46%), 拔节期追施尿素 2.28 g。于 2020 年 11 月 5 日进行播种, 先覆沙土 0.6 kg, 播种后再覆沙土 0.9 kg, 齐苗后, 间苗至每盆 10 株。其他田间管理措施均按高产栽培要求进行。

于小麦孕穗期(2021 年 3 月 18 日)将盆栽移入人工气候室进行低温处理。人工气候室 18:00—06:00 温度设定为–2℃, 06:00—18:00 温度设置为 5℃, 气候室相对湿度设置为 70%, 连续处理 24 h。处理结

束后将盆栽移回大田，于次日上午 10:00，根据前期试验选择喷施浓度为 20 mg L^{-1} 的 6-BA 溶液至叶片正反两面均有一层小水珠欲滴落为止，以喷施等量蒸馏水的同品种小麦作为对照，24 h 后取样。样品经液氮速冻后，用于总 RNA 提取和转录组测序。

1.3 可溶性糖及淀粉含量测定

外源 6-BA 处理 10 d 后取小麦幼穗，105℃杀青 0.5 h，80℃烘干至恒重后粉碎并过 100 目筛，称取 0.1 g 样品至 10 mL 离心管，加入 8 mL 配制的 80% 乙醇溶液 80℃水浴 30 min，冷却后离心，重复 3 次，合并上清液用于测定可溶性糖，残渣用于测定淀粉，采用蒽酮比色法测定可溶性糖和淀粉含量[15]。

1.4 RNA-seq 测序及差异表达基因筛选

转录组测序由上海欧易生物医学科技有限公司完成，构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 质检合格后，使用 Illumina HiSeq 测序仪进行测序。原始数据使用 Trimmomatic[16]软件进行质控并去除接头，得到高质量的 clean reads。利用 HISAT2[17]将 clean reads 与参考基因组进行比对。使用 Cufflinks 软件计算每千个碱基的转录每百万映射读取的 fragments (FPKM 值)，以对转录本或基因的表达水平进行定量[18-19]。使用 DESeq (2012) R 软件检测差异表达基因，将 P-value < 0.05 且差异倍数 Fold Change > 2 作为筛选标准。

1.5 差异基因注释和功能富集分析

对样品间筛选出的差异基因进行 GO 富集分析，结合 GO 注释结果对差异基因功能进行描述，并用超几何分布检验方法计算每个 GO 条目中差异基因富集的显著性。利用 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库对差异基因进行 Pathway 分析，并用超几何分布检验的方法计算每个 Pathway 条目中差异基因富集的显著性，以判定差异基因主要影响的生物学功能或者通路。

1.6 差异基因的 qRT-PCR 验证

以小麦 *GAPDH* 基因作为内参基因，选择差异基因 *ARF5*、*AGPL1*、*SWEET15* 为待验证基因，主要功能涉及生长素、淀粉合成和糖转运。特异性引物序列见表 1。用 SYBR Green 染料进行 qRT-PCR，重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算，得出样本间表达量差异倍数关系。

1.7 数据处理

幼穗生理数据采用 SPSS 22.0 软件进行方差分析，用 Origin 2017 进行作图。韦恩图、聚类热图由在线软件制作(https://cloud.oebiotech.com/task/)。

2 结果与分析

2.1 幼穗形态

如图 1 所示，外源喷施 6-BA 溶液 10 d 后，烟农 19 和皖麦 52 幼穗形态都出现了明显的变化。与对照相比，6-BA 处理后的小麦幼穗生长状态更好，穗形更加饱满，穗长也优于对照。

2.2 幼穗可溶性糖含量和淀粉含量

与对照相比，外源 6-BA 处理 10 d 后小麦幼穗



图 1 外源 6-BA 处理后幼穗表型变化

Fig. 1 Phenotypic changes of young spike after exogenous 6-BA treatment

Wanmai 52 CK 为皖麦 52 低温处理后喷施清水; Wanmai 52 6-BA 为皖麦 52 低温处理后喷施 6-BA 溶液; Yannong 19 CK 为烟农 19 低温处理后喷施清水; Yannong 19 6-BA 为烟农 19 低温处理后喷施 6-BA 溶液。

Wanmai 52 CK is Wanmai 52 sprayed with water after low temperature treatment; Wanmai 52 6-BA is Wanmai 52 sprayed with 6-BA solution after low temperature treatment; Yannong 19 CK is Yannong 19 sprayed with water after low temperature treatment; Yannong 19 CK is Yannong 19 sprayed with 6-BA solution after low temperature treatment.

表 1 实时荧光定量 PCR 所用的引物

Table 1 Primers for qRT-PCR used in this study

基因名称 Gene name	正向引物 Forward sequence (5′–3′)	反向引物 Reverse sequence (5′–3′)	基因 ID Gene ID
GAPDH	CCACTAACTGCCTTGCTCCT	CCAGTGCTGCTTGGAATGA	
ARF5	TCGACAGAGTATGGGTTGGAA	CGGAAACATCGGCTGAAG	TraesCS6A02G111900
AGPL1	ACATCACGCAGAAACCTACCA	AACGGATTCCAACGACACTG	TraesCS5D02G484500
SWEET15	TATCAGTTGGTTTGTGTGTTCGA	GTCGGGAGTGGTGAAAGGA	TraesCS7B02G050500

中可溶性糖含量显著上升, 皖麦 52 与对照相比上升 5.34%, 烟农 19 与对照相比上升 9.55% (图 2)。与对照相比, 低温胁迫后喷施 6-BA 小麦的淀粉含量也随之上升, 皖麦 52 与对照相比上升 7.17%, 烟农 19 与对照相比上升 10.50%。低温胁迫下植株为了增强对胁迫的适应性保护自身, 需要消耗更多的糖及其他能量载体, 喷施 6-BA 后糖及淀粉含量增加有利于增强植株对低温胁迫的抵抗能力。

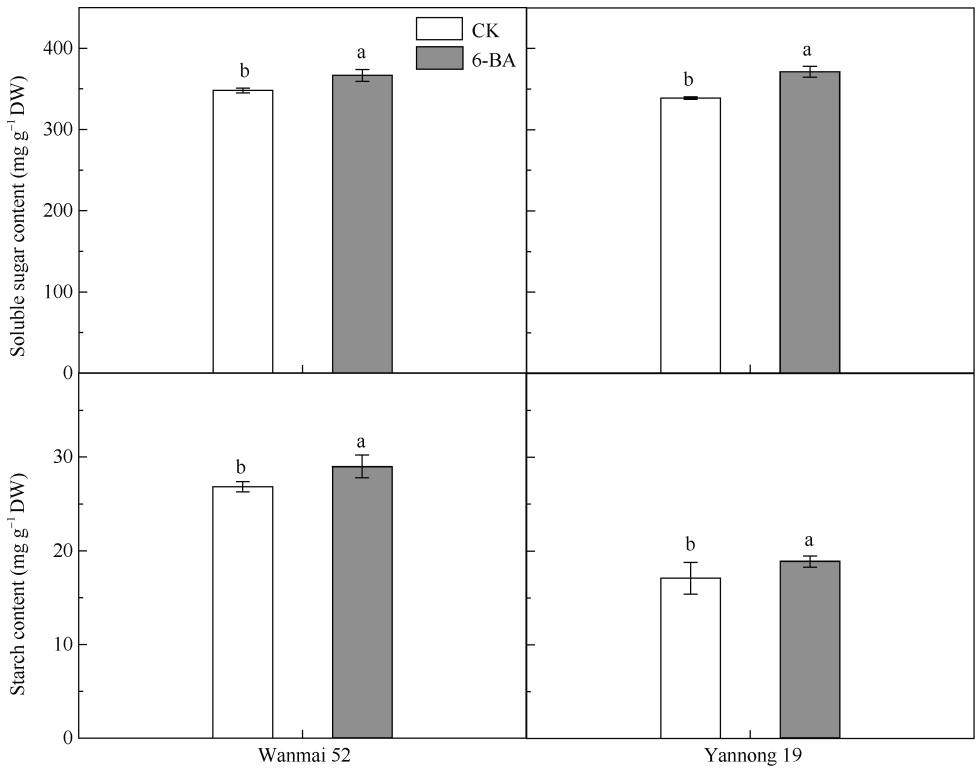


图 2　幼穗可溶性糖含量及淀粉含量
Fig. 2　Soluble sugar and starch content in young spikes

2.3　转录组数据分析

测序共获得 79.75G 的 Clean Data。Q30 的碱基分布均超过 94.90%。每个样本中 reads 与小麦参考基因组的比对率为 94.52%~97.10%。样品间相关性检验表明, 重复样品间的相关系数均超过 0.99, 生物重复一致性极高。

皖麦 52 共检测出差异基因 22,770 个, 其中有 8080 个基因表达上调, 14,690 个基因表达下调; 烟农 19 检测出差异基因 9866 个, 其中有 4991 个基因表达上调, 4875 个基因表达下调。根据韦恩分析可知, 有 661 个差异基因在两小麦品种中均上调, 1220 个差异基因均下调。

2.4　差异表达基因的 GO 注释与富集

对识别出的差异基因进行 GO 功能注释, 将其分为 3 个主要功能类别:分子功能、细胞组分和生物过程。在两类基因型小麦品种中, GO 富集在生物过程、细胞成分和分子功能中的项数均为 23、20 和 21。将两个品种差异基因富集最多的 20 个 GO 条目进行整合, 发现两个品种表现出了相似的富集趋势, 差异基因富集最多的 20 个 GO 条目中有 17 条都相同(表 2), 除了对刺激和转录因子结合活性的反应, 其他过程可能在小麦响应外源 6-BA 缓解低温胁迫伤害的过程中发挥关键作用。其中大量差异基因被

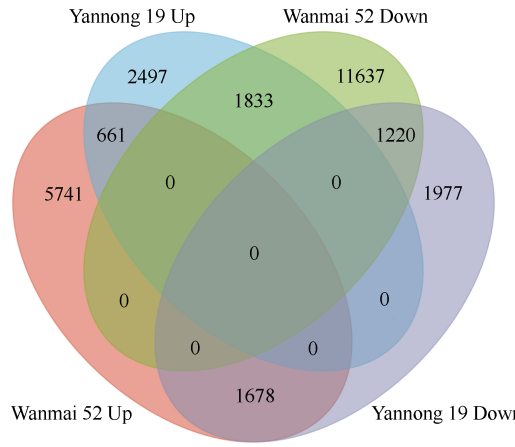


图 3　差异表达基因的韦恩图
Fig. 3　Venn plots of differently expressed genes (DEGs)

表 2 低温胁迫后喷施外源 6-BA 差异表达基因的 GO 注释

Table 2 GO annotation of DEGs after spraying 6-BA under low temperature stress

GO 号 GO ID	GO 功能 GO function	皖麦 52 基因数目及其所占百分比 Gene number and ratio in Wanmai 52	烟农 19 基因数目及其所占百分比 Gene number and ratio in Yannong 19	GO 类别 GO category
GO:0016021	膜的有机成分 Integral component of membrane	3990 (23.22%)	1367 (18.73%)	C
GO:0005524	ATP 结合 ATP binding	2195 (12.77%)	764 (10.47%)	M
GO:0005515	蛋白质结合 Protein binding	2092 (12.17%)	920 (12.61%)	M
GO:0016020	细胞膜 Membrane	1609 (9.36%)	566 (7.76%)	C
GO:0055114	氧化还原过程 Oxidation reduction process	1604 (9.33%)	708 (9.70%)	B
GO:0005634	细胞核 Nucleus	1576 (9.17%)	1076 (14.74%)	C
GO:0004672	蛋白激酶活性 Protein kinase activity	1503 (8.75%)	428 (5.86%)	M
GO:0006468	蛋白磷酸化 Protein phosphorylation	1500 (8.73%)	427 (5.85%)	B
GO:0003677	DNA 结合 DNA binding	1410 (8.20%)	1034 (14.17%)	M
GO:0006355	调控转录, DNA 模板化 Regulation of transcription, DNA templating	1083 (6.30%)	410 (5.62%)	B
GO:0003824	催化活性 Catalytic activity	1005 (5.85%)	372 (5.10%)	M
GO:0046872	金属离子结合 Metal ion binding	953 (5.55%)	432 (5.92%)	M
GO:0016491	氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity	901 (5.24%)	385 (5.28%)	M
GO:0055085	跨膜转运 Transmembrane transport	799 (4.65%)	266 (3.64%)	B
GO:0003700	DNA 结合转录因子活性 DNA-binding transcription factor activity	648 (3.77%)	232 (3.18%)	M
GO:0020037	血红素结合 Heme binding	617 (3.59%)	301 (4.12%)	M
GO:0005975	碳水化合物代谢过程 Carbohydrate metabolic process	535 (3.11%)	256 (3.51%)	B

B、C、M 分别代表生物学过程、细胞组分、分子功能。

B: biological process; C: cellular component; M: molecular function.

富集于细胞组分分类, 包括膜的有机成分(GO:0016021)、细胞膜(GO:0016020)和细胞核(GO:0005634), 另有大量基因参与跨膜转运(GO:0055085), 说明低温处理后喷施 6-BA 小麦内部细胞膜透性可能发生变化。

2.5 差异表达基因的 KEGG 富集

根据 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)数据库开展通路富集分析。结果表明, 皖麦 52 的差异基因被成功富集到 199 条 KEGG 通路上, 其中有 80 个通路显著富集。烟农 19 的差异基因被成功共富集 187 条 KEGG 通路上, 其中有 56 个通路显著富集。

通过 KEGG 分析发现, 两个品种在差异基因富集前 20 的通路中有 10 条相同的生理代谢途径(图 4)。值的注意的是, 低温胁迫下喷施 6-BA 后, 低温敏感型和迟钝型品种中都显著富集了谷胱甘肽代谢、细胞色素 P450、苯丙烷类生物合成、苯丙氨酸代谢等有关抗氧化的代谢途径。另外还在淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导、精氨酸和脯氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢途径显著富集。表明低温胁迫后喷施外源 6-BA, 抗氧化代谢、糖代谢、植物激素调节及渗透调节等可能增加植物抗寒性、缓解低温造成的伤害。

淀粉和蔗糖代谢途径(ko00500)和激素信号转导途径(ko04075)在两基因型小麦品种中都排在差异基因富集前 20 的通路中。皖麦 52 中激素信号转导途径含有 87 条相关上调基因, 烟农 19 中含有 96 条相关上调基因。其中相同的差异基因有两条 TraesCS4A02G207600、TraesCS4D02G014900, 都与生长素信号转导有关, 间接影响细胞增大和植物生长(图 5)。淀粉和蔗糖代谢途径在皖麦 52 中含有 89 条相关上调基因, 烟农 19 中含有 77 条相关上调基因。其中两个品种的共有差异基因有 4 条, TraesCS5D02G484500、TraesCS7D02G451800、TraesCS2D02G381000、TraesCS6B02G031300, 主要涉及淀粉、果糖和葡萄糖的合成(图 6)。

2.6 qRT-PCR 验证

为了验证转录组表达数据的可靠性, 选择 3 个

在低温处理后喷施 6-BA 差异表达的基因，用 qRT-PCR 进行验证(图 7)。结果表明选取的目的基因表达趋势与转录组测序结果一致，均表现为上调。证明转录组数据是真实可靠的。

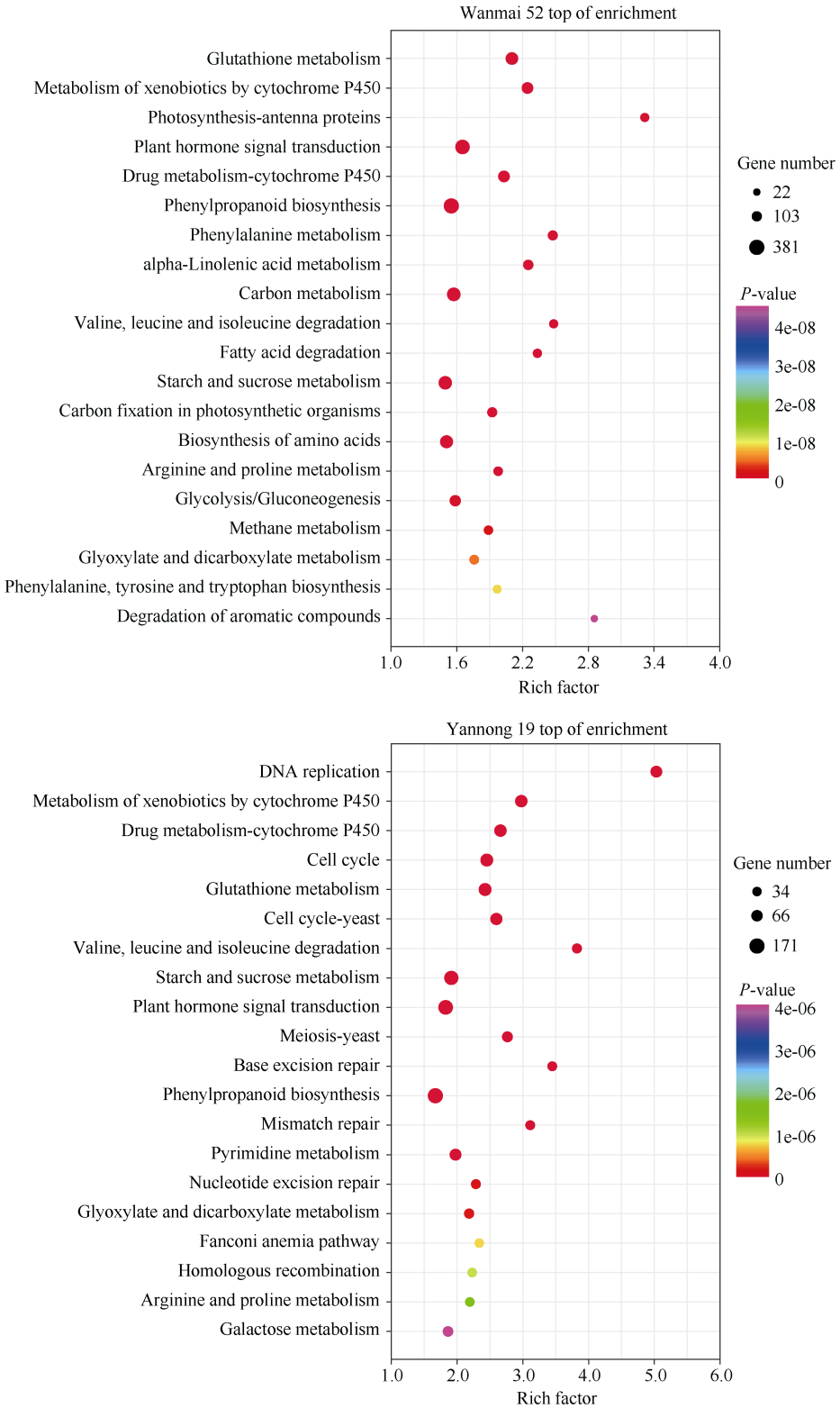


图 4　KEGG 通路富集散点图

Fig. 4　Scatter diagram of KEGG pathway enrichment

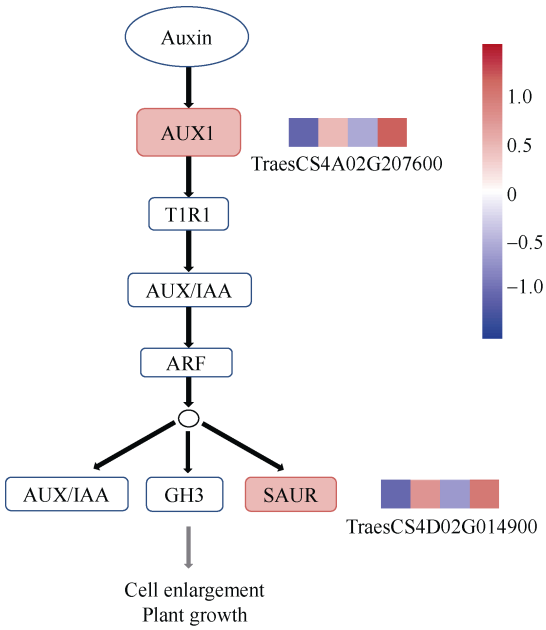


图 5 IAA 信号通路基因表达模式分析

Fig. 5 Analysis of gene expression pattern in IAA signaling pathway

红蓝色块代表相应的 FPKM 数值，数值越大，颜色越红；从左到右样本依次为皖麦 52 CK、皖麦 52 6-BA、烟农 19 CK、烟农 19 6-BA。

The color lump represents the corresponding FPKM value, and the higher the value, the redder the color. The samples from left to right are Wanmai 52 CK, Wanmai 52 6-BA, Yannong 19 CK, and Yannong 19 6-BA.

3 讨论

3.1 差异表达基因分析

孕穗期低温会严重影响植株正常生长发育并降低小麦产量，前人研究表明，低温胁迫后喷施 6-BA 能缓解低温对小麦产量造成的不利影响[3]。低温胁迫下小麦对 6-BA 的响应是通过复杂的调控网络进行的，而转录组分析则能够明晰这些调控机制。本研究对获得的差异表达基因进行统计分析，结果表明两基因型小麦品种的处理与对照之间均存在大量的差异基因，正是这些上调或下调基因导致处理与对照之间的差异表现。对两组 RNA-seq 数据进行进一步的韦恩分析，确定了相关的候选基因，外源 6-BA 处理后这些基因在低温敏感性不同的两种小麦中均显著上调。*PMEI8* 和 *CCR1* 在上调基因中反复出现且高度显著，这两个基因在维持细胞壁完整和对非生物胁迫的响应中均起着重要作用[20-23]。*ARF5* 的表达在本试验中差异性显著，生长素反应因子(ARF)是一类转录因子，可作为介导生长素基因表达的关键调节因子[24]。因此外源 6-BA 可能通过激活 *ARF5* 转录，启动了生长素信号转导，从而促进低温胁迫后小麦的生长发育，这可能是外源 6-BA 处理后小麦幼穗的穗形穗长优于对照的原因之一。同时韦恩分析显示，两类小麦中与碳水化合物代谢相关的基因 *AGPL1*、*1-SST*、*SWEET15* 等也在上调基因当中。*AGPL1* 在小麦籽粒淀粉合成中扮演重要角色，其表达量与腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(AGPase)的活性呈显著正相关，而 AGPase 的活性又与籽粒内淀粉积累速率呈显著正相关[25-26]，有研究表明，禾本科作物的 *AGPL1* 基因过表达可显著提高植株的 AGPase 活性与淀粉含量，从而增加粒重

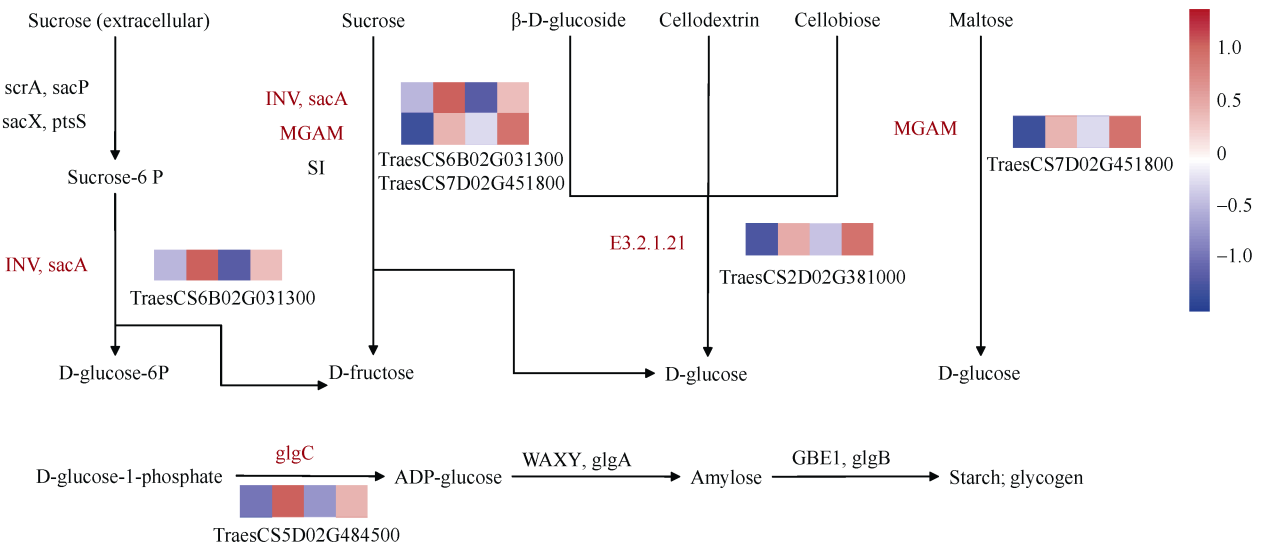


图 6 糖类物质积累相关基因表达模式分析

Fig. 6 Analysis of the expression pattern of carbohydrate accumulation related genes

色块所知内容同图 5。The contents of the colors are the same as those given in Fig. 5.

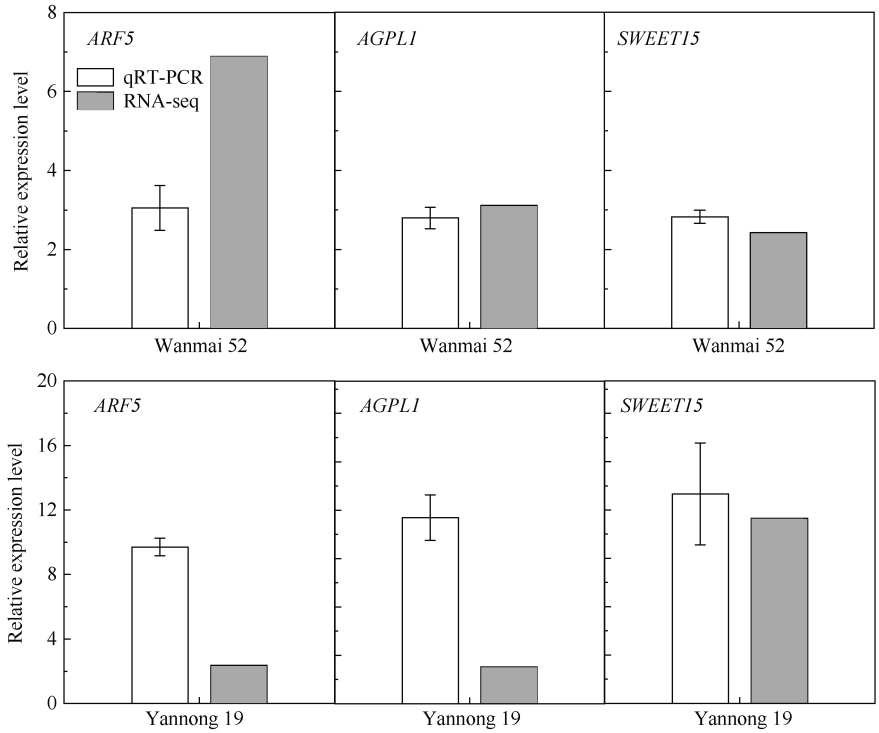


图 7　差异表达基因 qRT-PCR 验证
Fig. 7　Verification of the differentially expressed genes by qRT-PCR

与产量[27-28]。通过测定小麦幼穗的淀粉含量可知，喷施 6-BA 后两基因型小麦品种的淀粉含量均显著上升，而 *AGPL1* 的显著上调很有可能就是引起幼穗中淀粉含量上升的原因。*1-SST* 基因可诱导果聚糖合成，果聚糖的积累可提高植物的抗寒性，并且通过稳定植物膜系统使其免受低温胁迫的伤害[29-30]。已有研究证明 *SWEET15* 在低温胁迫下被诱导表达，起到渗透调节的作用[31]。同时，Chen 等[32]证明 *SWEET15* 和 *SWEET12*、*SWEET11* 的三重突变体种子表现为严重的缺陷，包括粒重降低、淀粉和脂质含量下降以及种皮褶皱。

通过 GO 富集可知两类基因型小麦品种差异基因的功能都主要富集于细胞膜透性、结合作用、氧化还原过程、碳水化合物代谢、催化活性，这些可能是小麦响应外源 6-BA 调控植株抗寒性、缓解低温伤害的关键功能基因。KEGG 分析表明，两个品种的差异表达基因均主要参与抗氧化代谢、植物激素信号转导、淀粉和蔗糖代谢、渗透调节等途径。Zhao 等[33]对低温胁迫后的小麦植株进行转录组分析，明确了渗透调节、碳水化合物代谢和激素信号转导等途径对低温胁迫的响应，结合本试验说明 6-BA 在低温胁迫下可能会通过加强小麦体内的生理生化反应来提高小麦的抗寒性。两小麦品种在 6-BA 的作用下基本采用相似的响应途径来缓解低温胁迫造成的损伤，这些途径主要与抗氧化、渗透调节、植物激素调节和碳水化合物代谢有关。

3.2　外源 6-BA 对幼穗形态、可溶性糖和淀粉含量及相关途径的影响

研究发现喷施 6-BA 后小麦幼穗的生长发育状态更好，穗形饱满，穗长增加(图 1)，幼穗可溶性糖含量和淀粉含量均有提高。幼穗和小花的发育与植株内部能否提供充足的碳水化合物直接相关，幼穗中可溶性糖能为小花的发育提供能量，在小花分化发育期增加穗可溶性糖含量，有利于促进小花发育为籽粒[34]。同时，有研究表明。淀粉总是向生长发育迅速的器官积累，而淀粉含量低的小穗在逆境中易停止发育转向退化[35]。因此，幼穗中可溶性糖和淀粉含量的增加能促进小花发育和籽粒形成，而外源 6-BA 处理后幼穗中可溶性糖和淀粉含量的增加可能是 6-BA 能缓解低温对小麦产量影响的原因。通过 KEGG 富集可知，低温敏感性不同的两类小麦的差异基因均显著富集于 IAA 信号转导通路和淀粉和蔗糖代谢途径。生长素作为一类内源激素在植物的整个生命周期中都起重要作用，植物能够快速感知和响应生长素水平的变化。*AUX1* 属于 AUX1/LAX 家族，主要负责生长素向细胞内的输入[36]。生长素

上调小 RNA (SAUR)家族是对生长素反应最迅速和最强烈的一类基因, 在植物体内起着较为关键的作用[37]。KEGG 富集结果表明两类小麦的上调差异基因都富集于 IAA 信号通路的 *AUX1* 和 *SAUR*。说明 6-BA 可能通过加强小麦内部的 IAA 信号转导来调节小麦遭遇低温后的生长发育, 这也可能是喷施 6-BA 后小麦幼穗穗形更饱满, 穗长更长的原因。淀粉和蔗糖代谢途径(ko00500)涉及许多复杂的通路, 本研究中, 两类小麦有四个相同的上调差异基因富集到淀粉和蔗糖代谢途径, TraesCS5D02G484500、TraesCS7D02G451800 、 TraesCS2D02G381000 、TraesCS6B02G031300, 分别涉及果糖、葡萄糖和淀粉的合成。这些基因表达上调, 促进糖类物质的合成, 而植物在低温胁迫下为了增强对低温的适应性, 需要消耗更多的糖和其他能量载体来产生脂质、氨基酸等, 进一步促进细胞膜流动性和结构重排[38-39], 因此糖类物质的增加有利于增强植物对低温的适应性。外源 6-BA 可能通过调控淀粉和蔗糖代谢途径来促进小麦内部糖类物质的合成以提高小麦抗寒性、促进小花发育和籽粒形成。

本研究发现孕穗期低温胁迫后喷施 6-BA 溶液, 低温敏感型和迟钝型小麦幼穗的穗形都更饱满、穗长更长, 且幼穗可溶性糖含量和淀粉含量均有所增加。结合转录组分析发现, 外源 6-BA 处理后, 两类小麦的上调差异基因均显著富集于植物激素信号转导途径和淀粉和蔗糖代谢途径, 具体涉及 IAA 信号转导和果糖、葡萄糖及淀粉的合成。表明低温胁迫后 6-BA 通过调控与 IAA 信号转导和糖类物质合成相关的基因的表达, 来调节低温后小麦的生长发育、促进可溶性糖和淀粉的合成。

4 结论

通过对低温胁迫下外源 6-BA 处理后小麦的幼穗表型分析表明, 6-BA 可以缓解低温胁迫造成的负面效应。转录组分析发现, 6-BA 处理可诱导细胞膜透性、氧化还原及碳水化合物代谢等相关基因的表达, 通过调节小麦抗氧化物质代谢、渗透调节、激素信号转导和碳水化合物代谢等途径来缓解低温损伤、增强小麦抗寒性, qRT-PCR 结果表明转录组测序结果准确可信。

References

[1] Ji H T, Xiao L J, Xia Y M, Song H, Liu B, Tang L, Cao W X, Zhu Y, Liu L L. Effects of jointing and booting low temperature stresses on grain yield and yield components in wheat. *Agric For Meteorol*, 2017, 243: 33–42.

[2] Shahandashti S S K, Amiri R M, Zeinali H, Ramezanpour S S. Change in membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in chickpea. *Mol Biol Rep*, 2013, 40: 893–903.

[3] Zhang W J, Huang Z L, Xu K F, Liu L, Zeng Y L, Ma S Y, Fan Y H. The effect of plant growth regulators on recovery of wheat physiological and yield-related characteristics at booting stage following chilling stress. *Acta Physiol Plant*, 2019, 41: 133.

[4] Zhang B, Jia D, Gao Z Q, Dong Q, He L H. Physiological responses to low temperature in spring and winter wheat varieties. *J Sci Food Agric*, 2016, 96: 1967–1973.

[5] Wang X Y, Liu D M, Wei M M, Man J G. Spraying 6-BA could alleviate the harmful impacts of waterlogging on dry matter accumulation and grain yield of wheat. *PeerJ*, 2020, 8: e8193.

[6] Li H, Wang J Q, Liu Q. Photosynthesis product allocation and yield in sweet potato with spraying exogenous hormones under drought stress. *J Plant Physiol*, 2020, 253: 153265.

[7] Yang D Q, Li Y, Shi Y H, Cui Z Y, Luo Y L, Zheng M J, Chen J, Li Y X, Yin Y P, Wang Z L. Exogenous cytokinins increase grain yield of winter wheat cultivars by improving stay-green characteristics under heat stress. *PLoS One*, 2016, 11: e0155437.

[8] Chen J L, Wu X X, Yao X F, Zhu Z W, Xu S, Zha D S. Exogenous 6-benzylaminopurine confers tolerance to low temperature by amelioration of oxidative damage in eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings. *Braz J Bot*, 2016, 39: 409–416.

[9] 杨东清, 李玉玲, 倪英丽, 尹燕枰, 杨卫兵, 崔正勇, 张永太, 马仁元, 王振林. 外源ABA和6-BA对不同持绿型小麦籽粒灌浆进程及蛋白质含量影响. 作物学报, 2014, 40: 301–312.
Yang D Q, Li Y L, Ni Y L, Yin Y P, Yang W B, Cui Z Y, Zhang Y T, Ma R Y, Wang Z L. Effects of exogenous ABA and 6-BA on protein content and grain filling process in different types of stay-green wheat. *Acta Agron Sin*, 2014, 40: 301–312 (in Chinese with English abstract)

[10] 杨东清, 王振林, 尹燕枰, 倪英丽, 杨卫兵, 蔡铁, 彭佃亮, 徐彩龙, 崔正勇, 刘铁宁, 徐海成. 外源 ABA 和 6-BA 对不同持绿型小麦旗叶衰老的影响及其生理机制. 作物学报, 2013, 39: 1096–1104.
Yang D Q, Wang Z L, Yin Y P, Ni Y L, Yang W B, Cai T, Peng D L, Xu C L, Cui Z Y, Liu T N, Xu H C. Effects of exogenous ABA and 6-BA on flag leaf senescence in different types of stay-green wheat and relevant physiological mechanisms. *Acta Agron Sin*, 2013, 39: 1096–1104 (in Chinese with English abstract)

[11] Li H, Li M, Wei X L, Zhang X, Xue R L, Zhao Y D, Zhao H J. Transcriptome analysis of drought-responsive genes regulated by hydrogen sulfide in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Mol Genet Genom*, 2017, 292: 1091–1110.

[12] Li G G, Liang Z M, Li Y J, Liao Y C, Liu Y. Exogenous spermidine regulates starch synthesis and the antioxidant system to promote wheat grain filling under drought stress. *Acta Physiol Plant*, 2020, 42: 1–14.

[13] Wang C M, Yang Y Y, Chen N H, Zeng Z X, Ji S J, Shan W, Kuang J F, Lu W J, Su X G, Chen J Y, Zhao Y T. Physiological and transcription analyses reveal regulatory pathways of 6-benzylaminopurine delaying leaf senescence and maintaining quality in postharvest Chinese flowering cabbage. *Food Res Int*,

2022, 157: 111455.

[14] Diao J, Liu H J, Hu F W, Li L, Wang X L, Gai C L, Yu X Q, Fan Y, Xu L, Ye H B. Transcriptome analysis of immune response in fat greenling (*Hexagrammos otakii*) against *Vibrio harveyi* infection. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 84: 937–947.

[15] Mandal D, Tudu S, Mitra S R, De G C. Effect of common packing materials on keeping quality of sugarcane jaggery during monsoon season. *Sugar Tech*, 2006, 8: 137–142

[16] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30: 2114–2120.

[17] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Meth*, 2015, 12: 356–360.

[18] Roberts A, Trapnell C, Donaghey J, Rinn J L, Pachter L. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. *Genome Biol*, 2011, 12: 1–14.

[19] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, Van B M J, Salzberg S L, Wold B J, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 511–515.

[20] Sorek N, Szemenyei H, Sorek H, Landers A, Knight H, Bauer S, Wemmer D E, Somerville C R. Identification of MEDIATOR16 as the *Arabidopsis* COBRA suppressor MONGOOSE1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 16048–16053.

[21] Hong P N, Jeong H Y, Kim H, Kim Y C, Lee C. Molecular and biochemical characterization of rice pectin methylesterase inhibitors (OsPMEIs). *Plant Physiol Bioch*, 2016, 101: 105–112.

[22] Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Umemura K, Umezawa T, Shimamoto K. Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 230–235.

[23] So H A, Chung E S, Cho C W, Kim K Y, Lee J H. Molecular cloning and characterization of soybean cinnamoyl CoA reductase induced by abiotic stresses. *J Plant Pathol*, 2010, 26: 380–385.

[24] Liu Z N, Miao L M, Huo R X, Song X Y, Johnson C, Kong L J, Sundaresan V, Yu X L. ARF2-ARF4 and ARF5 are essential for female and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59: 179–189.

[25] Kang G Z, Liu G Q, Peng X Q, Wei L T, Wang C Y, Zhu Y J, Ma Y, Jiang Y M, Guo T C. Increasing the starch content and grain weight of common wheat by overexpression of the cytosolic AGPase large subunit gene. *Plant Physiol Bioch*, 2013, 73: 93–98.

[26] Wang Z B, Li W H, Qi J C, Shi P C, Yin Y G. Starch accumulation, activities of key enzyme and gene expression in starch synthesis of wheat endosperm with different starch contents. *J Food Sci Tech Mys*, 2014, 51: 419–429.

[27] Jiang L L, Yu X M, Qi X, Yu Q, Deng S, Bai B, Li N, Zhang A, Zhu C F, Liu B, Pang J S. Multigene engineering of starch biosynthesis in maize endosperm increases the total starch content and the proportion of amylose. *Transgenic Res*, 2013, 22: 1133–1142.

[28] Shaik S S, Carciofi M, Martens H J, Hebelstrup K H, Blennow A. Starch bioengineering affects cereal grain germination and seedling establishment. *J Exp Bot*, 2014, 65: 2257–2270.

[29] Van D E W, El-Esawe S K. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: a dual function in abiotic and biotic stress responses. *Environ Exp Bot*, 2014, 108: 4–13.

[30] Kawakami A, Yoshida M. Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose: fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. *Biosci Biotech Bioch*, 2002, 66: 2297–2305.

[31] Seo P J, Park J M, Kang S K, Kim S G, Park C M. An *Arabidopsis* senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. *Planta*, 2011, 233: 189–200.

[32] Chen L Q, Lin I W, Qu X Q, Sosso D, McFarlane H E, Londono A, Samuels A L, Frommer W B. A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *Plant Cell*, 2015, 27: 607–619.

[33] Zhao Y, Zhou M, Xu K, Li J H, Li S S, Zhang S H, Yang X J. Integrated transcriptomics and metabolomics analyses provide insights into cold stress response in wheat. *Crop J*, 2019, 7: 857–866.

[34] Fang S, Gao K, Hu W, Snider J L, Wang S S, Chen B L, Zhou Z G. Chemical priming of seed alters cotton floral bud differentiation by inducing changes in hormones, metabolites and gene expression. *Plant Physiol Bioch*, 2018, 130: 633–640.

[35] Jian L C. Accumulation and mobilization of starch during the differentiation of the shoot apex and their correlation to the development of the spikelets in wheat. *J Integr Plant Biol*, 1964, 12: 309–316.

[36] Carrier D J, Bakar N T A, Swarup R, Callaghan R, Napier R M, Bennett M J, Kerr I D. The binding of auxin to the *Arabidopsis* auxin influx transporter AUX1. *Plant Physiol*, 2008, 148: 529–535.

[37] Wu J, Liu S Y, He Y J, Guan X Y, Zhu X F, Cheng L, Wang J, Lu G. Genome-wide analysis of SAUR gene family in *Solanaceae* species. *Gene*, 2012, 509: 38–50.

[38] Maruyama K, Urano K, Yoshiwara K, Morishita Y, Sakurai N, Suzuki H, Kojima M, Sakakibara H, Shibata D, Saito K. Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts. *Plant Physiol*, 2014, 164: 1759–1771.

[39] Wu Z G, Jiang W, Chen S L, Mantri N, Tao Z M, Jiang C X. Insights from the cold transcriptome and metabolome of *Dendrobium officinale*: global reprogramming of metabolic and gene regulation networks during cold acclimation. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1653.