

王亚丽, 陈煜东, 王益军. 高世代回交玉米矮秆种质的转录组分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(2): 280-288.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.02.002

高世代回交玉米矮秆种质的转录组分析

王亚丽^{1,2}, 陈煜东^{1,2}, 王益军^{1,2}

(1.江苏省作物遗传生理重点实验室/植物功能基因组学教育部重点实验室/江苏省作物基因组学和分子育种重点实验室/扬州大学农学院, 江苏 扬州 225009; 2.江苏省粮食作物现代产业技术协同创新中心/扬州大学, 江苏 扬州 225009)

摘要: 株高影响株型建成, 与抗倒性、收获指数以及最终产量相关。对矮秆材料的研究有助于丰富对株高调控机理的认识。在前期研究中, 对玉米矮秆材料 D11 的农艺与生理特征进行了分析。本研究基于高世代回交群体, 通过转录组测序, 对矮秆材料 D11 的基因表达调控进行解析。与株高正常植株相比, 矮秆材料中共检测到 2 537 个差异表达的基因, 其中 1 120 个基因表达上调、1 417 个基因表达下调。功能注释、GO 富集、通路富集的结果表明, 差异表达基因参与细胞延伸、细胞骨架功能、微管组织、叶绿体功能、植物激素合成代谢等。差异表达基因最显著富集的通路为糖酵解。共表达分析结果表明, 编码果糖-1,6-双磷酸酶的基因与多个差异表达基因存在功能关联。该研究结果揭示了玉米矮秆材料中的基因表达调控, 为后续玉米株高调控节点的发掘提供了参考。

关键词: 矮秆; 高世代回交群体; 转录组测序; 共表达; 玉米

中图分类号: S513.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)02-0280-09

Transcriptome analysis on the advanced backcross population of maize dwarf germplasm

WANG Ya-li^{1,2}, CHEN Yu-dong^{1,2}, WANG Yi-jun^{1,2}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology/Key Laboratory of Plant Functional Genomics of the Ministry of Education/Jiangsu Key Laboratory of Crop Genomics and Molecular Breeding/College of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Jiangsu Co-Innovation Center for Modern Production Technology of Grain Crops/Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Plant height affects plant type and is related to lodging resistance, harvest index and final yield. The research on dwarf plants helps to improve the understanding of plant height regulation mechanism. In previous studies, the agronomic and physiological characteristics of maize dwarf material D11 were analyzed. In this study, based on the advanced backcross population, the gene expression regulation of D11 was analyzed by transcriptome sequencing. A total of 2 537 differentially expressed genes (DEGs) were identified, including 1 120 up-regulated and 1 417 down-regulated DEGs. Functional annotation, GO enrichment and pathway enrichment analysis results indicated that DEGs were involved in cell expansion, cytoskeletal function, microtubule organization, chloroplast function, phytohormone homeostasis. The pathway most

significantly enriched by DEGs was related to glycolysis. The gene encoding fructose-1, 6-bisphosphatase was functionally related to several DEGs. The results of this study reveal the gene expression regulation in maize dwarf materials, and provide a reference for the subsequent exploration of maize plant height regulatory modes.

Key words: dwarf plant; advanced backcross population; transcriptome sequencing; co-expression; maize

收稿日期: 2020-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571671); 扬州大学高端人才支持计划项目(18HTYZU12); 扬州大学青蓝工程项目(QLYZU201809); 扬州大学科技创新培育基金项目(2019CXJ097); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

作者简介: 王亚丽(1995-), 女, 河南济源人, 硕士研究生, 研究方向为玉米遗传育种。(E-mail) wylyzu@163.com

通讯作者: 王益军, (E-mail) wyj@yzu.edu.cn

株高是重要的农艺性状,影响抗倒性、光合效率、收获指数和最终产量。“绿色革命”期间,产量的提高主要得益于株型与农艺措施的改良。改良的高产品种具有半矮秆性状、较高的氮肥同化效率、优良的抗倒性^[1]。控制高产品种半矮秆性状的基因已被克隆。水稻的半矮秆基因 *semidwarf1* (*sd1*) 编码负责赤霉素合成的酶 *GA 20-oxidase2* (*GA20ox2*)^[2-3]。小麦株高降低是由于 *Reduced height* (*Rht*) 基因的变异所导致,*Rht* 编码 DELLA 蛋白,参与赤霉素信号转导^[4]。“绿色革命”期间,半矮秆性状主要是由于赤霉素合成、信号转导通路的改变所导致。除了赤霉素,其他植物激素,例如生长素、油菜素内酯、独脚金内酯等植物激素也与株高调控相关。生长素转运异常导致玉米和高粱植株矮化^[5]。玉米严重矮化表型是由于编码油菜素内酯合成酶 *brassinosteroid C-6 oxidase* 基因的突变所导致^[6]。油菜素内酯信号通路的改变同样能导致玉米植株矮化^[7]。植物激素独脚金内酯诱导豌豆幼茎伸长^[8]。除了植物激素,表观调控因子也影响株高。通过全基因组关联分析,调控玉米株高的表观因子被发掘^[9]。

玉米株高是由微效多基因控制的性状^[10]。通过连锁分析、全基因组关联分析,已有大量调控玉米株高的 QTL/靶点被发掘^[10-11]。其中,一些玉米株高 QTL 已被图位克隆,例如 *qPH3.1*、*qph1*^[12-13]。QTL 克隆是发掘玉米株高调控靶点的重要方法。通过玉米矮秆突变体研究,亦能为株高调控机制的解析提供重要参考。在前期研究中,实验室鉴定到 1 份玉米矮秆材料 Dwarf11 (D11),矮秆材料 D11 的农艺性状、生理特征已被初步分析^[14]。基于高通量测序的转录组技术,被用来研究植物调控网络。转录组技术可用于 SNP 发掘、可变剪辑预测、融合转录本鉴定、基因表达分析等^[15]。本研究采用转录组测序技术,结合荧光定量 PCR 验证、基因功能注释、通路富集分析、共表达网络构建等,对高世代回交 D11 矮秆群体的基因表达调控进行了分析,所得结果有助于解析矮秆基因 *D11* 介导的调控网络,也为后续玉米株高调控靶点的解析提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

矮秆材料 D11 与玉米自交系 Mo17 杂交,获得

F₁ 代。通过连续 5 个世代的回交,获得高世代回交群体 BC₅。在高世代回交群体 BC₅ 中,与株高正常植株相比,矮秆材料株高显著降低。本研究采用高世代回交群体 BC₅ 中的株高正常植株与矮秆植株作为试验材料。

1.2 RNA 提取、文库构建与高通量测序

在高世代回交群体 BC₅ 中,取三叶期幼茎,采用 RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 试剂盒进行 RNA 提取。提取 RNA 的质量与浓度用 NanoDrop 2000 spectrophotometer、Agilent 2100 Bioanalyzer 进行测定。mRNA 通过带有 oligo(dT) 的磁珠进行吸附。吸附的 mRNA 片段,反转录成 cDNA。cDNA 末端修复,加腺嘌呤,连接接头。连接产物进一步纯化,用于 PCR 扩增。回收 400~500 bp 大小的产物,采用 RNA Seq Library Preparation Kit 进行文库构建。测序前,文库质量采用 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 进行 qPCR 检测。合格的文库基于 125 bp 成对模式,在 Illumina HiSeq2500 platform 进行高通量测序。

1.3 差异表达基因发掘

对转录组测序获得的原始序列,首先进行质量控制。接头序列、低质量 reads(含有超过 50% 低质量碱基的 reads、未知碱基数超过 5% 的 reads、测序质量低于 10 的低质量碱基)被剔除。采用 SOAPaligner/soap2,过滤后的 reads 比对到玉米参考基因组^[16]。比对结果质量控制后,采用 Cufflinks 进行转录本组装^[17]。通过计算每 1×10⁶ reads 中来自于某基因每 1 000 碱基长度的 reads 数 (RPKM),对基因表达量进行度量。本研究中,表达变化 ≥ 2、发现错误率 (FDR) ≤ 0.05 的基因为差异表达基因。

1.4 差异表达基因生物信息学分析

差异表达基因功能注释通过 BLAST 进行。玉米基因功能注释使用 maizeGDB 数据库 (<https://www.maizegdb.org/>)。水稻、拟南芥中差异表达基因的同源基因通过 BLASTP 获得,所用数据库分别为 RGAP (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 与 Araport (<https://www.araport.org/>)。Gene ontology (GO) 富集分析:首先基于 Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org/>) 数据库,将差异表达基因比对到 GO term^[18]。确定每个 GO term 的差异表达基因数,超几何分布检验用来发掘显著富集的 GO term。通过 Bonferroni 校正,获得校

正 P 值。校正 P 值小于 0.05 为差异表达基因显著富集的 GO term。通路富集分析采用 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 进行^[19]。校正 P 值小于 0.05 为差异表达基因显著富集的通路。

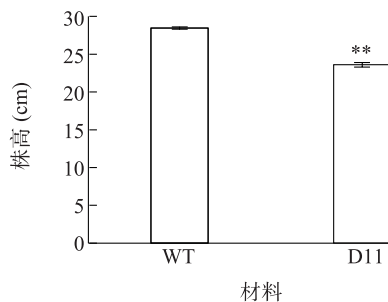
1.5 荧光定量 PCR 分析

RNA 样品用 RNase-free DNase I (QIAGEN) 处理,采用 M-MLV reverse transcriptase (Promega) 反转录,获得 cDNA。采用 SYBR qPCR master mix (TaKaRa),在 7500 Real-Time PCR System (ABI) 上进行荧光定量 PCR。每个样品重复 3 次。 $18S$ rRNA 基因作为内参基因。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析基因的相对表达量^[20]。

2 结果与分析

2.1 高世代群体矮秆材料表型及基因表达分析

玉米矮秆材料 D11 与自交系 Mo17 杂交。通过连续 5 个世代的回交,获得高世代回交群体 BC₅。在高世代回交群体 BC₅ 中,与株高正常植株相比,矮秆材料株高极显著降低(图 1)。



** 表示极显著差异。

图 1 高世代回交群体中株高正常植株与矮秆植株株高

Fig.1 Plant height of wild-type (WT) and D11 dwarf plants from advanced backcross population

为了发掘矮秆材料中差异表达基因,取高世代回交群体中株高正常植株与矮秆植株,进行转录组测序。通过对原始测序数据质量控制、过滤,Clean reads 比对到玉米参考基因组,对株高正常植株与矮秆植株中的基因表达进行分析。结果表明,在株高正常植株中检测到超过 30 000 个基因的表达。在矮秆植株中检测到近 30 000 个基因的表达(图 2)。

2.2 转录组测序发掘差异表达基因

为了发掘矮秆材料中差异表达基因,比对的 reads 通过计算 RPKM 值对基因的表达量进行度量。通过比较株高正常植株和矮秆植株的基因表达量,

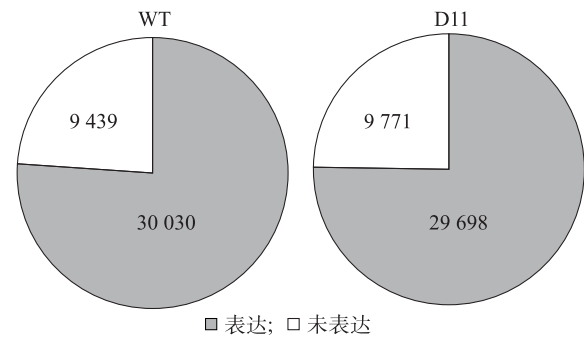


图 2 高世代回交群体中株高正常植株与矮秆植株的转录组分析

Fig.2 Transcriptome analysis of the wild-type (WT) and D11 dwarf plants from advanced backcross population

进行差异表达基因发掘。本研究中,基因表达变化 ≥ 2 、发现错误率 ≤ 0.05 的基因被认为是差异表达基因。根据上述设定的阈值,共发掘到 2 537 个差异表达基因。与株高正常植株相比,其中 1 120 个基因在矮秆材料中表达量上升、1 417 个基因在矮秆材料中表达量下降。

2.3 转录组测序揭示的差异表达基因的验证

基于转录组测序揭示的差异表达基因,设计引物(表 1),进行荧光定量 PCR 分析,对差异表达基因进行验证。

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,对基因的表达量进行相对定量。差异表达基因荧光定量 PCR 与转录组测序表达量的决定系数(R^2)为 0.72(图 3)。结果表明,转录组测序获得的差异表达基因可靠,由转录组测序获得的差异表达基因可用于后续分析。

2.4 差异表达基因功能

对转录组测序揭示的差异表达基因,首先在 maizeGDB 数据库中进行功能注释。此外,发掘水稻、拟南芥中差异表达基因的同源基因。玉米数据库中没有功能注释的差异表达基因,通过其水稻、拟南芥中的同源基因进行功能注释。功能注释的结果表明,差异表达基因参与多个生物学过程。基于矮秆材料表型,本研究集中分析可能与矮秆表型相关的差异表达基因。与株高正常植株相比,矮秆材料中与细胞伸长相关的 *ARF GTPase* 家族成员基因差异表达,与微管组织、细胞骨架、木质素合成、维管束组织发育相关的基因差异表达。矮秆材料叶片变宽、微卷,通过转录组测序,检测到与叶片发育相关的差异表达基因。例如,生长调节因子、MYB 转录

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

基因 ID	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
GRMZM2G031983	CTACCGTCTTCATGACCCAAC	ATAGCTGCTTTGCCCTTGGA
GRMZM2G100060	AATGTAAAGAAAGCTGCCAT	AGACAAAACATATTCCCAT
GRMZM5G838196	ACGACTGCCTTCTTCCCTC	CGACCTCCTCTCTGTGCTTG
GRMZM2G063756	AGATCATGCTCGCCAACCTC	GAAGCATCAGCCGAACGTCT
GRMZM6G910544	CTCAACTTCGCGGGCTCCTC	TTCTGGGCAGGCTTCTTGCT
GRMZM2G145518	GGCCCATCCAGCTCTCCT	TACCAGAGCGCGTCTCGAA
GRMZM2G132506	ACGTGCGGCTGACCAAGTCC	ACGAACCTTGGCGCTACGTCCA
GRMZM2G155216	TCGTGACCCGCTCTACCCC	GCCGTTCTTGAGCTCCTTACCT
GRMZM2G172723	TCCTTCATCAGCGCAAGCC	CCCCTCCTCTACCCGAGCAGA
GRMZM2G045243	GCCGCGCTACCTCATCGC	ACGACCTCGCAGCCGACGAC
AC210173.4_FG005	CGTTCCGCGCGCCTTC	AGGTCCATCCAGCTCAGCCAC
GRMZM2G167497	CTCGTCGCGCAGACCCCAA	ACCTCCGACTGCACGTTCCC
GRMZM5G831399	TAGTTCTAGACCTAAGCCAA	CATAAAGGAGTAGTCCCC
GRMZM2G031615	CCCTCTCAAGGACGCTCACC	ACTTGCTACTCTTTGGAGCGTCT
GRMZM2G039586	CCTTTTCCCTTTGTGATCAGC	AGTCGCAGTTGATGATCCTCC
GRMZM2G056120	CCATAAGTTCTGAAGAGCCTA	GGCCGTTACATTCAACACC
GRMZM2G103101	TCAATCCACTAGGACTCGAAA	CATTGCCAACCTCCCGTTC
GRMZM2G112336	CTTCAATAGCAGCAAAGCTC	TGCCATCAAATCTCTGTGGA
GRMZM2G129261	TATGCCTGACCCGACGCTGA	GGAACCCCTTGTGACACCC
GRMZM2G077333	ACAAGGCCGTCATCCAACCC	CGCCATCCGCCCCACGAA
GRMZM2G358180	CCCTTAGCCCCGTGTT	CGCCAAGTACACAAATGGAAC
GRMZM2G479243	TACTTGGTCAATCTTCGTGCT	ATGTTAATACGTGCATCCCA
GRMZM2G001653	AGGATCACCTGCATGACGTTTCCC	ATCCAGCCGATGAGCCCGAA
GRMZM2G115773	AGTGTCCAAGCCGTACTACCG	ACAGCGCCACGAAGATTCCC
GRMZM2G149347	ACGCCACCTCCTCTGTACC	CCCGCCGTTGAGCTTCTCC
GRMZM2G064193	GCCGCCTACGCCGATTCTT	TTGGAGCCCGCACTCTCACC
GRMZM2G017957	TCCTGTTCTCTGCCCCACT	CAAAATGGAACCGTGAATCCTTG
GRMZM2G059845	GATTGCTACGAACTGGCCTT	TTCCCCGTCCAATGGCTT
GRMZM2G323024	AAAGTCTGCCAGCCCTCACC	CGTCACTCATCCCAACCTGCT
GRMZM2G323504	ACCACCCCTACGTCAACCC	CTTGCCCTCTCCACGAACCCAG
AC233866.1_FG006	ATGATTCCCACTAAGCCCAT	GTCTTCTTCTCCACGCTCT
GRMZM5G856777	TTCGTACCAGAAAAGCCCAT	ATAAATGCCACCGAAGCCTA
GRMZM2G351977	TACCTGACCGGCGAGTTCCC	TCACCTCCAGCTCGCGGTT
GRMZM5G809195	AGCCAAGCATTTCTCTCACAC	CTCCGCGTCGATCATCTCCA
GRMZM2G026223	ACAAGACAGCACATCAGGACA	AGTCTTTCTTCCCTGATGCAA
GRMZM2G113432	CCCTACCAAGCGTGTC	AAAACATCAAGCCTAGGGAG
GRMZM2G437460	TCCTGCACCTCATAACCACT	CTGCACCTCATTTCCAACAGA
GRMZM2G159393	CGAGCAGCAACGATTCTTTC	AGAGCCCAGATTGACCCTT
GRMZM2G043453	TCTCAAGAACTGAAGACGA	AGAAATTACAGCATCCGAAG
GRMZM2G048313	CGCCACCGCCCTGAGCA	CAACCGCGACCTGAGCCTGA
GRMZM2G045977	CCCCACCAGCGTCTCTCTC	ATCACAGCACGCACACGACA

续表 1 Continued 1

基因 ID	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
GRMZM2G038519	AGCCCGGAAGCGTCAACACC	AGGCGTCCGTTCTTGATCTCCT
GRMZM5G872368	CGTCCTTCTGCGATGACCCC	ACAAGGCTGTACACTCCATGCTC
GRMZM5G811731	CGTCCTTCTGCGATGACCCC	ACAAGGCTGTACACTCCATGCTC
GRMZM2G062885	TCAAACGCCGCAGTGTACAG	CCGTCGCCATCAGCTTCCTCC
GRMZM2G029506	CATATGCCATTGCTCAGGT	CCATCATGCCATAGTAGGTG
GRMZM2G162233	GCTGCCCTGCGACAATACACC	CCACCTTCGCTGAACCGGAT
GRMZM5G862540	GAGAAGTCCACCGTCCCTGT	ATGAGCACTCTGTCAGGCTT
GRMZM2G080107	AGGCCAACAAGGAGCTGAACGAC	ACTTCTCCTTCCCCTCGCACT
GRMZM2G028302	GAAAAAGGAGGCTGGTCGCA	TGCATCAGACCAGGAACCAAC
GRMZM2G328988	ATCCAGAATATGTGCTCTCG	AAGTAATCTCTCTAGCTCGT
GRMZM2G028980	GACAGTTCAGCATTTCTCG	TCGGAAGGTAATCTCCCAA
GRMZM2G096709	TTAGCAACGCTCTGCTTGA	CCACGATGCATGTGACGTTT
GRMZM2G043813	CTCTTCTTCCGTCGGACTCG	GTAGAAGAAGCTGCACCCGT
GRMZM2G022679	CCTCCAGCGCCGCGTTC	CTCCGCCATCGCCTCCAGCA
GRMZM5G839411	TTGAAGAAACGGTTCCCTG	GCGTGAAACAGCTTCCACC
GRMZM2G111609	ATCCACATCACTCGCAGCAA	TCGTCTCCTAGGCTTCCGAT
GRMZM2G046885	TCTCCCAGTTCCGCAGCTC	CTTCACCTCTCATCTGCCTG
GRMZM5G877647	CCACACGTTCCACAGGAGCTT	CGTGGTTCTGGTTGATCTCGCT
GRMZM2G117454	ACAGTGCGCCCGAGAACAAC	AGGCAGTTCACCACGGTCCC
GRMZM2G043338	GCATCATGATCAAGCGTCCC	TTCTTCTGAAGCGACCACC
GRMZM2G139066	AAAGGCTCATATCCACGTT	TTCCACGCATGATCGCAGA
GRMZM2G036340	ACCGGATCGCCACCATGTTCC	GCCCTCGGACCACATGCACT
GRMZM2G074645	CCCTTTGCTTCCATGGCTCT	GTTCCGCATATCATCTTGCCTAA
GRMZM2G119359	CGCTATGGCAGCAAGTACCTCC	AAGCCCTGGAGTTCCCT
GRMZM2G320549	GAGTACGCCTCCACCAGCAT	CCAGCTCATCTACATCTGATTCC
GRMZM2G025685	CTTCGTCAGGCAGCTCAACACC	CGGCTGCGACGACTTCTCTCC
GRMZM2G003379	AGCTGCCTTCTCCATGACC	ACTTCCCACCTGTGCAACGA
GRMZM5G805026	CCTCACCGAGCACCAGGACA	GTTGCCACCGCTGCCTT
GRMZM2G099101	ACTTGACTCTAGCCACAAACCC	AGAAAAGCCTCAACCGACT
GRMZM2G138750	AGCAGACCAGCTCGAACCTCC	TACAGCCGACGCTCTCGTT
GRMZM2G173630	GCAGCTTCGCCCCTCGTCCT	ACCACGCCCTTGCTCAGCTT
GRMZM2G180060	CGCTCCCTCGTCCCTC	AGCAAAGTCCAGGCACGAGT
GRMZM2G064775	TTCCCCGTCCGCAATAGCAG	TCGTGCTACCCCTTTCCCC
GRMZM2G446201	CAACTGATCAACAGTGCCGC	GAGTGAGACGTCGTGGAAGC
GRMZM2G059964	CTGGTCTGTCTCAAGCTCAA	AGAAGGAACAGTTGGAGCCC
AC233943.1_FG002	CCTTACGCTTCCGTGGCTAA	CTGTCTCCCCCTTCTTGTG
GRMZM2G034876	CCTCCCCGTTCTCTCTCGT	CGTCCGCCAGAGATCTTATTCGG
GRMZM2G067743	CTCTCCAGCTCCACCTCGACT	AAGCTCCTTGGAGTGCCTGTA
GRMZM2G180246	GCCATCCTCGACAACCAGAA	GTTTCATCATCTGCCCGGACT

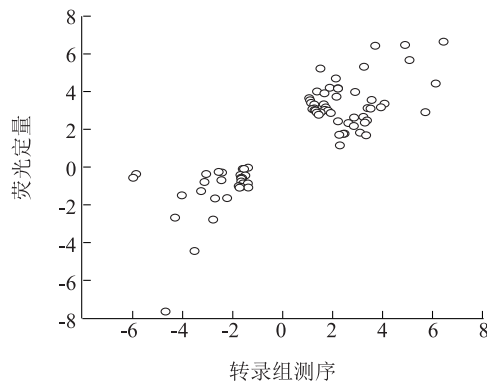


图3 差异表达基因荧光定量 PCR 分析

Fig.3 qRT-PCR analysis of differentially expressed genes

因子等。此外,矮秆材料叶缘白化。在矮秆材料中,与叶绿素合成、叶绿体功能相关的基因差异表达,例

如编码参与叶绿素合成 Mg-螯合酶基因、编码叶绿素 a/b 结合蛋白的基因、调控叶绿素降解的 NAC 转录因子基因等。差异表达基因还参与生长素、油菜素内酯、细胞分裂素等植物激素的合成与信号转导过程(表 2)。

本研究所用矮秆材料对外源赤霉素施用敏感。转录组测序的结果表明,与株高正常植株相比,矮秆材料中与赤霉素合成代谢、信号通路相关的基因差异表达。与赤霉素合成相关的 4 个基因差异表达,包括上调的 *GA20ox5* 基因,下调的 *Dwarf1*、*dwarf3*、*KO1* 基因。与赤霉素代谢相关的 2 个 *GA2ox* 基因均下调表达。与赤霉素信号转导相关的 6 个基因,包括赤霉素受体基因、F-box 蛋白基因等,其中 2 个基因表达上调、4 个基因表达下调。与赤霉素通路调控相关的 5 个基因,在矮秆材料中均下调表达(表 3)。

表 2 差异表达基因功能注释

Table 2 Functional annotation of differentially expressed genes

生物学过程	基因 ID
细胞延伸	Zm00001d008295、Zm00001d043994
细胞骨架功能	Zm00001d012063
微管组织	Zm00001d051789、Zm00001d002817、Zm00001d032464、Zm00001d051308、Zm00001d034239、Zm00001d005570、Zm00001d050216、Zm00001d008815、Zm00001d003669、Zm00001d010862、Zm00001d005102、Zm00001d020685
木质素合成积累	Zm00001d036050、Zm00001d036986、Zm00001d032468、Zm00001d023950、Zm00001d039584
维管束组织发育	Zm00001d014971、Zm00001d027645、Zm00001d038741
叶绿素合成	Zm00001d013013、Zm00001d026603、Zm00001d046354
叶绿体形成和发育	Zm00001d047128、Zm00001d039096、Zm00001d033181、Zm00001d037108
叶绿体功能	Zm00001d018362、Zm00001d002089、Zm00001d026439、Zm00001d009589、Zm00001d011285、Zm00001d039040、Zm00001d042697、Zm00001d018157、Zm00001d006663、Zm00001d048998、Zm00001d041819、Zm00001d029745、Zm00001d018030、Zm00001d049883、Zm00001d005996、Zm00001d042178、Zm00001d031484、Zm00001d017364、Zm00001d052595、Zm00001d034919
生长素合成	Zm00001d025005、Zm00001d046913、Zm00001d002025
生长素代谢	Zm00001d034519、Zm00001d033037
生长素转运	Zm00001d039840、Zm00001d037492、Zm00001d043660、Zm00001d044812、Zm00001d015569、Zm00001d004546、Zm00001d028401
生长素响应	Zm00001d049141、Zm00001d039513、Zm00001d043515、Zm00001d043922、Zm00001d043431、Zm00001d021337、Zm00001d005802、Zm00001d053819、Zm00001d041056
油菜素内酯合成	Zm00001d052971、Zm00001d030824、Zm00001d048335

2.5 差异表达基因 GO 与通路富集分析

基于 Gene Ontology Consortium resource 数据库,对差异表达基因进行 GO 分析。设定了较严格的阈值(校正 P 值 <0.05)用来发掘差异表达基因显著富集的 GO term。在生物学过程中,差异表达基因富集在碳水化合物合成代谢、光合作用等过程。在分子功能方面,差异表达基因最显著富集的 GO term

与结构组分相关。为了进一步分析差异表达基因参与的生物学通路,采用 KEGG 数据库,对差异表达基因进行 KEGG 通路分析。与 GO 富集分析类似,校正 P 值 <0.05 作为显著富集 KEGG 通路筛选的标准。KEGG 通路富集的结果表明,差异表达基因最显著富集的通路 with 糖酵解相关。差异表达基因可能参与糖的合成与代谢。此外,差异表达基因显著富

集的通路与 RNA 转运、氨基酸合成、光合作用等过程相关(表 4)。

2.6 差异表达基因共表达分析

共表达分析有助于发掘基因调控网络的关键节点,为后续基因调控网络的深入解析提供参考。本研究对转录组测序揭示的差异表达基因进行了共表达分析。结果表明,Class I-like SAM-binding 甲基转移酶基因(ID: GRMZM2G064759)下调表达。在基因共表达网络中,该基因与 10 个差异表达基因互作,包括 DUF947 结构域蛋白基因(ID: GRMZM2G051197)、寡肽转运类蛋白基因(ID: GRMZM2G434935)等。果糖-1,6-双磷酸酶编码蛋白基因(ID: GRMZM2G306732)上调表达,是共表达调控网络的关键调节因子。该基因与多个差异表达基因功能相关,包括编码纤维素-1,7-双磷酸酶的 *shbp1* 基因、编码磷酸核酮糖激酶基因(ID: GRMZM2G026024)等。基因共表达分析的结果表明,转录组测序揭示的差异表达基因可能存在一定的功能关联。

表 3 差异表达的赤霉素通路基因

Table 3 Differentially expressed genes involved in gibberellic acid (GA) pathway

生物学过程	功能注释	基因 ID	上调或者下调
赤霉素合成	GA20 氧化酶 5	Zm00001d012212	上调
	D1	Zm00001d039634	下调
	D3	Zm00001d045563	下调
赤霉素代谢	内根-贝壳杉烯氧化酶 1	Zm00001d046344	下调
	GA2 氧化酶 3	Zm00001d043411	下调
	GA2 β 加双氧酶	Zm00001d037724	下调
赤霉素信号	赤霉素受体	Zm00001d005909	上调
	赤霉素受体	Zm00001d050493	上调
	羧酸酯酶 15	Zm00001d018853	下调
赤霉素介导的调控	GID1 类赤霉素受体	Zm00001d038165	下调
	F-box 蛋白	Zm00001d014091	下调
	羧酸酯酶 17	Zm00001d047883	下调
	SHI 相关蛋白	Zm00001d014762	下调
	赤霉素调控蛋白	Zm00001d053208	下调
	赤霉素调控蛋白 1	Zm00001d033369	下调
	赤霉素调控蛋白 14	Zm00001d003380	下调
	赤霉素调控蛋白 10	Zm00001d013222	下调

表 4 差异表达基因通路富集分析

Table 4 Pathway enrichment analysis of differentially expressed genes

通路 ID	通路术语	选择中的数目	整个基因组中的数目	校正 <i>P</i> 值
ko00010	糖酵解/糖质新生	48	369	—
ko03013	RNA 转运	538	6 633	2.07×10^{-17}
ko02010	ABC 转运子	14	230	6.90×10^{-7}
ko00730	维生素 B ₁ 代谢	2	12	1.11×10^{-6}
ko00020	柠檬酸盐循环	16	131	5.43×10^{-5}
ko03018	RNA 降解	26	436	0.000 11
ko00630	乙醛酸和二羧酸盐代谢	20	139	0.000 21
ko03015	mRNA 监视通路	487	5 829	0.000 74
ko00061	脂肪酸合成	8	65	0.000 87
ko00650	丁酸代谢	5	66	0.001 87
ko00640	丙酸代谢	12	64	0.002 36
ko01110	次生代谢物合成	260	2 708	0.002 37
ko00196	光合作用-天线蛋白	6	31	0.004 20
ko00290	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸合成	2	48	0.006 10
ko00510	N-聚糖合成	3	75	0.006 72
ko00950	异喹啉类生物碱合成	5	43	0.010 14
ko04144	内噬作用	118	2 208	0.014 84
ko00230	嘌呤代谢	64	861	0.021 61
ko00260	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	16	160	0.021 68

续表 4 Continued 4

通路 ID	通路术语	选择中的数目	整个基因组中的数目	校正 <i>P</i> 值
ko00904	双萜合成	9	96	0.022 63
ko00941	类黄酮合成	16	239	0.026 58
ko00030	磷酸戊糖通路	21	201	0.026 72
ko00920	硫代谢	1	49	0.030 29
ko00531	黏多糖降解	6	44	0.035 54
ko00410	β -丙氨酸代谢	8	71	0.038 71
ko00052	半乳糖代谢	24	271	0.046 02

-表示最显著富集的 pathway。

3 讨论

本研究所用矮秆材料是田间自然突变所产生,表现为植株矮化。在前期研究中,对该矮秆材料的农艺、生理特征进行了分析。结果表明,外源赤霉素施用可以使该矮秆材料的株高变高,表明该矮秆材料属于赤霉素敏感型矮秆种质^[14]。本研究基于高世代回交种质,通过转录组测序,对矮秆材料的基因表达调控进行了解析。采用高世代回交种质,有利于降低遗传背景对基因表达的影响,提高转录组测序结果的可靠性。在高世代回交群体中,与株高正常植株相比,矮秆材料中共检测到2 537个基因差异表达,其中1 120个基因上调表达、1 417个基因下调表达。差异表达基因功能注释、GO 富集、通路富集的结果表明,差异表达基因参与多个生物学过程,包括细胞延伸、微管组成、木质素合成、叶绿素合成、叶绿体功能、植物激素合成与信号转导等。供试矮秆材料的矮化可能与细胞延伸的缺陷相关。叶绿素合成、叶绿体功能的异常,可能与矮秆材料的叶缘白化相关。木质素合成的变化与矮秆材料茎秆质地的改变相关^[14]。不同生物学过程存在一定的关联性。例如,植物激素赤霉素、生长素、油菜素内酯、细胞分裂素、独脚金内酯等互作,协同调控了多个生物学过程^[21-25]。此外,已有证据表明,植物激素赤霉素影响叶绿体的产生^[26]。本研究转录组测序结果表明,供试矮秆材料中存在着复杂的正向、反向、交叉基因调控网络,进而影响矮秆材料的表型。

通过比较不同矮秆材料的转录组数据,可以发掘共有的、特异的差异表达基因,为矮秆基因介导的调控网络的解析提供科学依据。通过检索数据库,未能获得 d1、d3、d5、br2、na2、bv1、D8、D9 等玉米矮秆材料的转录组数据。通过将本研究获得的转录组

数据与数据库中玉米矮秆材料的转录组数据进行比较分析,有助于发掘本研究矮秆材料中特异的差异表达基因,特异差异表达基因的发掘可以为供试矮秆材料基因调控网络的解析提供重要参考。

参考文献:

- [1] KHUSH G S. Green revolution: the way forward[J]. Nature Reviews Genetics, 2001, 2(10): 815-822.
- [2] MONNA L, KITAZAWA N, YOSHINO R, et al. Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*; rice 'green revolution gene' encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis[J]. DNA Research, 2002, 9(1): 11-17.
- [3] SPIELMEYER W, ELLIS M H, CHANDLER P M. Semidwarf (*sd-1*), 'green revolution' rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(13): 9043-9048.
- [4] PENG J, RICHARDS D E, HARTLEY N M, et al. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators[J]. Nature, 1999, 400(6741): 256-261.
- [5] MULTANI D S, BRIGGS S P, CHAMBERLIN M A, et al. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants[J]. Science, 2003, 302(5642): 81-84.
- [6] MAKAREVITCH I, THOMPSON A, MUEHLBAUER G J, et al. *Brd1* gene in maize encodes a brassinosteroid C-6 oxidase[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30798.
- [7] KIR G, YE H, NELISSEN H, et al. RNA interference knockdown of Brassinosteroid Insensitive1 in maize reveals novel functions for brassinosteroid signaling in controlling plant architecture[J]. Plant Physiology, 2015, 169(1): 826-839.
- [8] DE SAINT GERMAIN A, LIGEROT Y, DUN EA, et al. Strigolactones stimulate internode elongation independently of gibberellins[J]. Plant Physiology, 2013, 163(2): 1012-1025.
- [9] WENG J, XIE C, HAO Z, et al. Genome-wide association study identifies candidate genes that affect plant height in Chinese elite maize (*Zea mays* L.) inbred lines[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29229.
- [10] PEIFFER J A, ROMAY M C, GORE M A, et al. The genetic archi-

- ture of maize height[J]. *Genetics*, 2014, 196(4): 1337-1356.
- [11] 李清超, 李永祥, 杨钊钊, 等. 基于多重相关 RIL 群体的玉米株高和穗位高 QTL 定位[J]. *作物学报*, 2013, 39(9): 1521-1529.
- [12] TENG F, ZHAI L, LIU R, et al. *ZmGA3ox2*, a candidate gene for a major QTL, *qPH3.1*, for plant height in maize[J]. *The Plant Journal*, 2013, 73(3): 405-416.
- [13] XING A, GAO Y, YE L, et al. A rare SNP mutation in *Brachytic2* moderately reduces plant height and increases yield potential in maize[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(13): 3791-3802.
- [14] WANG Y, LU W, CHEN Y, et al. Revealing physiological and genetic properties of a dominant maize dwarf *Dwarf11* (*D11*) by integrative analysis[J]. *Molecular Breeding*, 2016, 36(3): 31.
- [15] CONESA A, MADRIGAL P, TARAZONA S, et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis[J]. *Genome Biology*, 2016, 17: 13.
- [16] LI R, YU C, LI Y, et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(15): 1966-1967.
- [17] ROBERTS A, PIMENTEL H, TRAPNELL C, et al. Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-Seq[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(17): 2325-2329.
- [18] GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Creating the gene ontology resource: design and implementation[J]. *Genome Research*, 2001, 11(8): 1425-1433.
- [19] KANEHISA M, GOTO S, SATO Y, et al. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(Database issue): D109-D114.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] 王江英, 朱朋波, 汤雪燕, 等. 外源赤霉素诱导矮生山茶根天高植株生长的转录组分析[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(1): 47-56.
- [22] 员盎然, 孙小娟, 马小雯, 等. GA3 与 ABA 对黑穗醋栗二次萌芽总酚含量及代谢酶活性的影响[J]. *南方农业学报*, 2019, 50(6): 1263-1270.
- [23] 刘达淮, 刘诗琴, 易鹏程, 等. 淹水胁迫下外源激素对甜瓜幼苗根系生理特性的影响[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(9): 182-185.
- [24] 曹 帅, 杜仲阳, 刘 鹏, 等. 碱胁迫对大豆光合特性及内源激素含量的影响[J]. *江苏农业学报*, 2020, 36(2): 284-291.
- [25] VANSTRAELEN M, BENKOVÁ E. Hormonal interactions in the regulation of plant development[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2012, 28: 463-487.
- [26] JIANG X, LI H, WANG T, et al. Gibberellin indirectly promotes chloroplast biogenesis as a means to maintain the chloroplast population of expanded cells[J]. *The Plant Journal*, 2012, 72(5): 768-780.

(责任编辑: 陈海霞)