

陆红臣, 刘陈玮, 王 凡, 等. 基于转录组测序的蚕豆春化响应相关基因挖掘[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(12): 2418-2429.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.12.014

## 基于转录组测序的蚕豆春化响应相关基因挖掘

陆红臣, 刘陈玮, 王 凡, 卞晓春, 徐仁超, 吴春芳  
(江苏沿江地区农业科学研究所, 江苏 南通 226012)

**摘要:** 为揭示蚕豆春化作用的分子机制, 本研究以通鲜 2 号为材料, 通过对春化处理前(CK)、春化处理 1 d (V1d)、春化处理 10 d (V10d)、春化处理 30 d (V30d) 的蚕豆茎顶端组织转录组测序, 将转录组数据进行两两对比, 进行差异表达基因鉴定、功能富集及代谢途径分析, 并对 8 个春化响应基因的表达特征进行 PCR 验证。结果表明, 不同比较组中共鉴定差异表达基因(DEG) 7 553 个, DEG 主要参与刺激响应、代谢过程、生物调节、结合等生物学功能。春化处理中共筛选、鉴定到 34 个蚕豆春化响应相关差异基因, 涉及春化途径、光周期途径、赤霉素途径等多个途径。实时荧光定量 PCR 检测结果与转录组测序结果相一致。本研究结果为蚕豆春化响应及花期调控提供了重要的候选基因, 同时也为进一步探究蚕豆春化分子机制提供了基础。

**关键词:** 蚕豆; 春化; 转录组; 基因挖掘

**中图分类号:** S529 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)12-2418-12

## Mining of genes related to vernalization response in faba bean based on transcriptome sequencing

LU Hongchen, LIU Chenwei, WANG Fan, BIAN Xiaochun, XU Renchao, WU Chunfang  
(*Jiangsu Yanjiang Institute of Agricultural Sciences, Nantong 226012, China*)

**Abstract:** In order to reveal the molecular mechanism of vernalization in faba bean, Tongxian 2 was used as the material, transcriptome sequencing was performed on the top of faba bean stem treated with different vernalization time (0 d, 1 d, 10 d, 30 d, which were abbreviated as CK, V1d, V10d and V30d respectively), and the transcriptome data were compared in pairs in this study. Differentially expressed genes were identified, functional enrichment and metabolic pathway analysis were performed, and the expression characteristics of eight vernalization response genes were verified by PCR. The results showed that 7 553 differentially expressed genes (DEGs) were identified in different comparison groups. DEGs were mainly involved in biological functions such as stimulus response, metabolic process, biological regulation and binding. A total of 34 differentially expressed genes related to vernalization response of faba bean were screened and identified in vernalization treatments, involving vernalization pathway, photoperiod pathway, gibberellin pathway and other pathways. The results of real-time fluorescence quantitative PCR were consistent with the results of transcriptome sequencing. The results of this study provide important candidate genes for vernalization response and flowering regulation of faba bean, and also provide a basis for further exploration of the molecular mechanism of vernalization of faba bean.

**收稿日期:** 2025-01-16

**基金项目:** 江苏省种业揭榜挂帅项目[JBSG(2021)058]; 江苏现代农业产业技术体系建设项目[JATS(2023)158]; 江苏沿江地区农业科学研究所博士基金项目[YJBS(2023)003]

**作者简介:** 陆红臣(1993-), 男, 河南周口人, 博士, 助理研究员, 主要从事蚕豆春化基因挖掘及育种研究。(E-mail) 20230017@jaas.ac.cn

**通讯作者:** 吴春芳, (E-mail) jsyias@163.com

provide a basis for further exploration of the molecular mechanism of vernalization of faba bean.

**Key words:** faba bean; vernalization; transcriptome; gene mining

春化作用是小麦、油菜等越冬作物由营养生长向生殖生长转变的重要过程之一, 在植物的花期调控中起着重要作用, 且春化过程具有多步骤性, 由多

种途径控制,与作物栽培、作物驯化、杂交育种等有密切联系<sup>[1-3]</sup>。春化植物主要分为种子春化型植物和绿体春化型植物。春化作用会引起植物体内碳水化合物代谢、核酸代谢、酶代谢、内源激素代谢等诸多生理过程的变化<sup>[4-5]</sup>。一段时间的低温春化可以推进小麦、大麦、蚕豆等作物的开花进程并提高产量<sup>[6-7]</sup>,开展蚕豆春化分子机制研究对于蚕豆栽培和育种具有重要意义。

拟南芥、小麦、油菜等植物对低温春化响应的生理特点大体相似,但不同植物对春化作用响应的分子机制却有较大差别。拟南芥的春化途径主要依赖 *FRI* 和 *FLC* 2 个关键基因<sup>[8]</sup>。拟南芥春化前,*FRI* 蛋白通过与 mRNA 结合蛋白的相互作用,不但可以提升 *FLC* 转录水平,还直接形成复合体结合到 *FT*、*FD*、*SOC1* 等基因位点并抑制其转录,进而减弱光周期信号和其他调控途径对这些基因的激活作用<sup>[9]</sup>。*FLC* 属于 MADS-box 转录因子,*FLC* 基因的高表达会抑制下游 *FT*、*FD* 和 *SOC1* 等开花基因的表达,导致拟南芥和粮食作物开花推迟<sup>[10]</sup>。拟南芥经历低温春化后,*VAL1* 等转录因子基因会抑制 *FLC* 的表达,促使拟南芥抽薹开花提前<sup>[11]</sup>。此外,*VRN1*、*VRN2*、*VIN3* 和 *VRN5* 等基因能稳定抑制 *FLC* 基因的表达水平和组蛋白修饰。在正常温度条件下,拟南芥 *VRN1* 基因表达水平较低,但经历持续低温后,其表达量会骤然升高;*VRN2* 则在恢复温暖条件后 *FLC* 抑制的稳定性维持中起重要作用<sup>[12-13]</sup>。目前,芸薹属作物中已克隆出多个 *FLC* 同源基因,如 *FRI*、*SOC1*、*VIN3*、*FT* 等,且这些基因被证明与芸薹属作物的春化作用相关<sup>[14]</sup>。小麦的春化途径主要受 *VRN* 基因调控,且小麦 *VRN1* 与拟南芥中的 *API* 基因同源,说明小麦春化途径可能发生了独立进化<sup>[15]</sup>。此外,*TaRF2b* 可以识别小麦 *TaVRN1* 近端启动子区域,并激活 *TaVRN1* 的转录,进而促使小麦提前开花<sup>[16]</sup>,E3 连接酶 *TaE3V-B1* 通过泛素化春化基因 *TaVRN1* 编码的蛋白质并调节小麦发育进程<sup>[17]</sup>。

蚕豆 (*Vicia faba* L.) 属于豆科一年生或二年生草本植物,是重要的经济作物。中国蚕豆种植面积和产量均居世界首位<sup>[18]</sup>。作为一种二倍体植物,蚕豆基因组庞大且复杂,约为 13 Gb,是豆类作物中最大的基因组之一<sup>[19]</sup>。蚕豆作为长三角及其周边地区主要越冬作物之一,不仅是重要的植物蛋白来源,还可以作为绿肥,是理想的轮茬作物<sup>[18-20]</sup>。设施生

产中,花期较早的蚕豆一般具有更高的产量<sup>[21]</sup>。目前,十字花科植物和麦类植物春化作用的分子机制已有较多的报道<sup>[13-15]</sup>,但关于蚕豆春化作用的分子机制研究还比较缺乏。本研究利用生物信息学及比较转录组学等方法,筛选鉴定蚕豆春化响应基因,并对关键基因的表达特征进行分析,为阐明蚕豆春化作用分子机制及培育早花品种提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究以江苏沿江地区农业科学研究所选育的蚕豆品种通鲜 2 号为材料开展试验。在 25 °C 恒温人工气候箱(光周期 16 h/d)中,利用 32 孔穴盘培养蚕豆幼苗至第 3 张叶片完全展开,然后将蚕豆幼苗转移到 4 °C 人工气候箱中进行春化处理(光周期 16 h/d),分别在春化处理前(CK)、春化处理 1 d(V1d)、春化处理 10 d(V10d)及春化处理 30 d(V30d)采集蚕豆茎顶端组织样本,液氮处理后,保存于-80 °C 冰箱中备用。每处理 3 个重复。

### 1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取、建库、测序及数据处理 使用 Trizol 试剂盒(美国 Life Technologies 公司产品)提取样本总 RNA,利用安捷伦 2100 生物分析仪(美国安捷伦科技公司产品)评估总 RNA 质量,并使用无 RNase(核糖核酸酶)琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。鉴定合格的总 RNA 样品利用 Hieff NGS ultima dual-mode mRNA library prep kit 试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司产品]构建 cDNA 文库。利用 Illumina Novaseq6000 测序平台(美国 Illumina 公司产品)进行转录组双端测序。测序工作委托广州基迪奥生物科技有限公司完成。测序数据利用 Fastp 0.18.0 软件进行过滤,然后再利用 Bowtie2 v2.2.8 软件将序列映射到核糖体 RNA (rRNA) 数据库,利用 HISAT2 v2.1.0 软件将测序得到的序列比对到蚕豆参考基因组 Vfaba.Tiffany.v1 (<https://projects.au.dk/fabagenome/genomics-data>)。

1.2.2 差异表达基因分析 利用 DESeq2 软件对 4 个不同春化时间处理的数据进行两两比对,以 *FDR* (False discovery rate, 错误发现率) < 0.05 和  $|\log_2 FC| \geq 2$  (*FC* 为差异倍数) 为标准,进行差异表达基因的鉴定。

1.2.3 基因本体 (GO) 功能注释和 KEGG 富集分析

利用 BLAST2 GO 软件对基因进行注释,将差异基因向 GO 数据库 (<http://www.geneontology.org/>) 的条目进行映射,并计算每个条目的差异基因数,应用超几何检验,找出差异基因中显著富集的 GO 条目。代谢通路(Pathway)显著性富集分析以 KEGG Pathway 为单位,应用超几何检验,找出差异表达基因中显著富集的代谢通路。利用 TBtools 软件,基于转录组数据和基因的  $\log_2$  FPKM 值 (FPKM 为每百万映射片段中每千碱基外显子模型的片段数) 绘制蚕豆春化相关基因的表达热图。

1.2.4 蚕豆春化响应关键基因蛋白质互作网络构建 利用 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 在线工具对蚕豆春化关键基因编码的蛋白质进行蛋白质互作网络(PPI)分析,并利用 Cytoscape 软件对分析结果进行修饰<sup>[22]</sup>。

1.2.5 关键基因的表达水平定量分析 为验证转录组分析的可靠性,对 8 个蚕豆春化和开花相关基因的表达模式进行实时荧光定量 PCR 分析。首先使用第一链 cDNA 合成试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,再利用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物(表 1)。以 *ELF1A* 基因为内参基因,利用 SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒(武汉全式金生物公司产品)和 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞公司产品)进行实时定量 PCR 分析。PCR 程序为:95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环;从 65 °C 到 95 °C,以 0.1 °C/s 绘制熔解曲线。对每个基因进行 3 次定量 PCR 分析,使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各基因的相对表达量<sup>[23]</sup>。

1.2.6 数据分析 使用 Student *t* 检验法进行处理间相对表达量差异显著性分析,使用 GraphPad Prism 8 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 蚕豆春化的转录组分析

不同春化处理时间(春化处理前及春化处理 1 d、10 d、30 d)蚕豆茎顶端转录组测序结果如表 2 所示。从表中可以看出,不同春化处理时间,蚕豆茎顶端测序数据均在 5 604 266 400 bp 及以上,过滤后得到的有效数据均在 5 229 713 289 bp 及以上。不同样品原始测序数据碱基质量值达到 Q20(测序碱基质量值达到 20 以上的碱基数目占原始数据的百分比)以上的

比例为 96.98%~99.10%,碱基质量值达到 Q30(测序碱基质量值达到 30 以上的碱基数目占原始数据的百分比)以上的比例为 92.31%~97.33%,有效数据中碱基 G+C 含量为 41.83%~43.07%(表 2)。不同处理表达量的主成分分析结果显示,同一处理 3 个重复大致聚集在一起(图 1),说明测序得到的数据重复性好,可用于进一步的分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

Table 1 Primers for real-time fluorescent quantitative PCR

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>VjCOL5</i> -F	CGCGTTTCTATGCATCGATTGT
<i>VjCOL5</i> -R	CGAGTGGATTGCAGAGTGGATG
<i>VjCDF3</i> -F	CCGAAAACGAACAAAGTGATGTAG
<i>VjCDF3</i> -R	CCTGCACCAACTGGAACATTCC
<i>VjVRN1</i> -F	GCACGAGAATGAAGCGTTAAATAGAG
<i>VjVRN1</i> -R	CCAAATTCTACCATCCACGAGCT
<i>VjFT1</i> -F	GCAATCAAGAATCCAAGGGCT
<i>VjFT1</i> -R	CGGCATCAGAGGGAGGGTCTC
<i>VjSEP</i> -F	ATGGGTAGAGGAAAGGTAGAATTAAGA
<i>VjSEP</i> -R	CCTGTGCCACTGCAGAATTCA
<i>VjAP3</i> -F	CACTCCTGGACTTTCTACAAAGAAG
<i>VjAP3</i> -R	CACCTATTCTATGCCTGATCTGTC
<i>VjSOCI</i> -F	ATGGTGAGAGGGAAGACGCA
<i>VjSOCI</i> -R	AAGAGCAACTTGAGCATCACAC
<i>VjSVP</i> -F	AGCTCTTTGAGTATGCTAGTTCAAG
<i>VjSVP</i> -R	CTCCATTCATTTGCCCTCAGTTCAC
<i>ELF1A</i> -F	GTGAAGCCCGGTATGCTTGT
<i>ELF1A</i> -R	CCTGAGATCCTTGACTGCAACATT

### 2.2 差异表达基因筛选

不同春化处理时间蚕豆茎顶端转录本共得到 7 553 个差异表达基因。春化处理前(CK)与春化处理 1 d(V1d)比较组的差异表达基因有 3 610 个,与 CK 相比,V1d 处理差异上调基因 1 073 个,差异下调基因 2 537 个。CK 与春化处理 10 d(V10d)比较组的差异表达基因有 3 356 个,与 CK 相比,V10d 处理差异上调基因 2 163 个,差异下调基因 1 193 个。CK 与春化处理 30 d(V30d)比较组的差异表达基因有 2 588 个,与 CK 相比,V30d 处理差异上调基因 1 385 个,差异下调基因 1 203 个。春化处理 1 d 与春化处理 10 d 比较组的差异表达基因有 3 561 个,与 V1d 处理相比,V10d 处理差异上调基因 2 999 个,差异下调基因 562 个。春化处理 10 d 与春化处理 30 d 的

差异表达基因有 161 个,与春化处理 10 d 相比, V30d 处理差异上调基因 19 个,差异下调基因 142 个(图 2A)。CK 与春化处理 1 d 比较组的差异表达基因数量最多且多数基因表达量下调,而随着低温

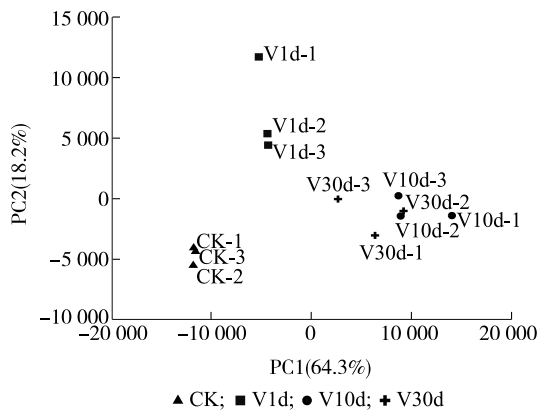
处理时间延长至 10 d,春化处理样本中差异上调基因显著增多,说明 1~10 d 的低温处理能显著影响蚕豆基因组表达水平,这可能是低温春化处理影响蚕豆发育过程的关键机制。

表 2 不同处理转录组测序结果

Table 2 Transcriptome sequencing results of different treatments

样品	数据		Q20		Q30		G+C	
	原始数据(bp)	有效数据(bp)	数量	占比(%)	数量	占比(%)	数量	占比(%)
CK-1	8 693 398 200	8 202 676 812	8 457 312 665	97.28	8 107 268 462	93.26	3 523 774 241	42.96
CK-2	5 830 889 700	5 509 229 893	5 666 007 157	97.17	5 410 401 116	92.79	2 366 847 195	42.96
CK-3	6 127 996 500	5 770 555 541	5 942 680 014	96.98	5 656 877 658	92.31	2 485 372 355	43.07
V1d-1	7 083 578 700	6 629 397 052	6 897 204 151	97.37	6 618 140 835	93.43	2 835 843 234	42.78
V1d-2	7 304 370 900	6 867 357 266	7 128 351 524	97.59	6 858 370 144	93.89	2 938 145 095	42.78
V1d-3	6 072 932 400	5 733 120 770	5 889 926 061	96.99	5 612 248 555	92.41	2 461 503 114	42.93
V10d-1	6 764 749 500	6 415 010 023	6 604 669 931	97.63	6 365 687 290	94.10	2 697 133 016	42.04
V10d-2	7 102 407 600	6 739 451 896	6 911 469 632	97.31	6 622 290 236	93.24	2 863 610 146	42.49
V10d-3	7 948 723 800	7 487 124 231	7 735 079 458	97.31	7 418 398 300	93.33	3 179 069 463	42.46
V30d-1	8 526 760 500	8 450 864 710	8 450 445 456	99.10	8 299 034 156	97.33	3 537 104 068	41.85
V30d-2	5 604 266 400	5 229 713 289	5 464 037 473	97.50	5 246 122 810	93.61	2 187 369 485	41.83
V30d-3	7 065 613 500	6 630 060 176	6 871 904 548	97.26	6 584 378 357	93.19	2 808 739 898	42.36

CK-1~CK-3:春化处理前样本;V1d-1~V1d-3:春化处理 1 d 样本;V10d-1~V10d-3:春化处理 10 d 样本;V30d-1~V30d-3:春化处理 30 d 样本;Q20:测序碱基质量值达到 20 以上的碱基数目占原始数据的百分比;Q30:测序碱基质量值达到 30 以上的碱基数目占原始数据的百分比。



CK-1~CK-3、V1d-1~V1d-3、V10d-1~V10d-3、V30d-1~V30d-3 见表 2 注。

图 1 不同处理表达量的主成分分析

Fig.1 Principal component analysis of expression levels under different treatments

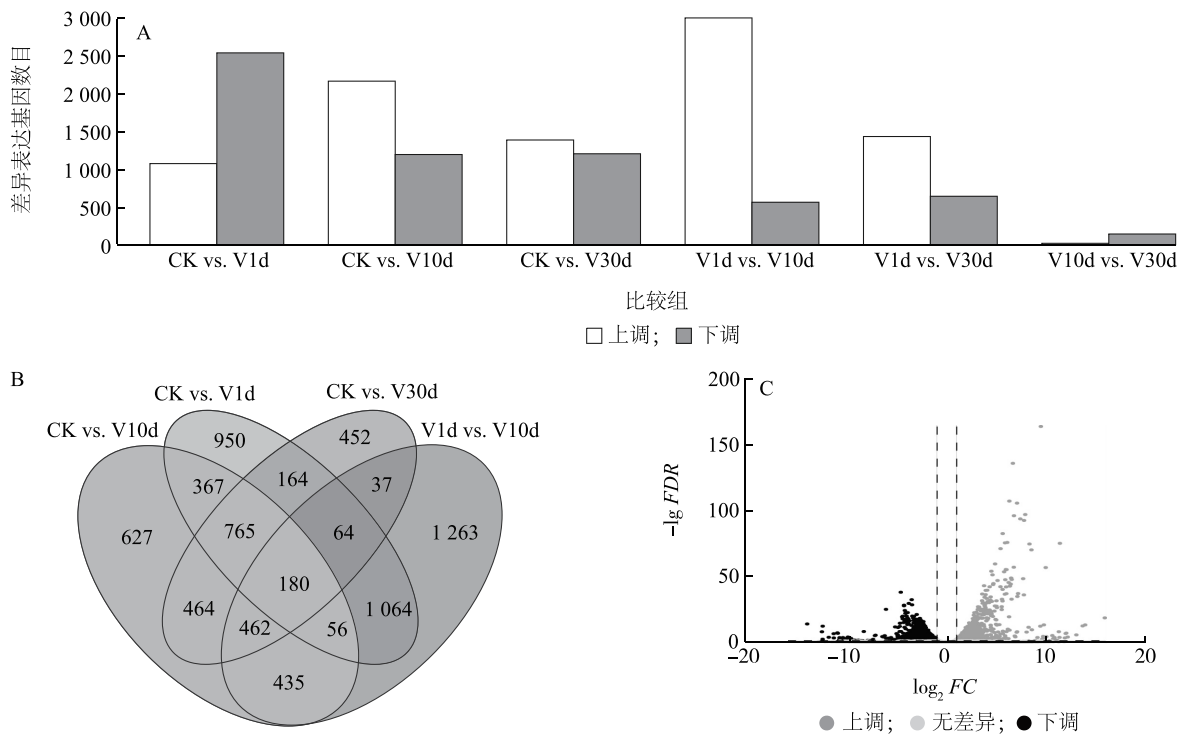
不同春化时间处理差异表达基因维恩图如图 2B 所示。从图中可以看出,CK 与 V1d 处理特有的差异表达基因 950 个,CK 与 V10d 处理特有的差异表达基因 627 个,CK 与 V30d 处理特有的差异表达基因 452 个,说明随着春化时间的不断延长,蚕豆每个阶段对春化的差异性响应也有相应的变化。整个

春化过程中均差异表达的基因有 945 个。

不同春化时间处理差异表达基因火山图如图 2C 所示。从图中可以看出,整个春化过程中,蚕豆中差异上调基因的数目要多于差异下调基因,大部分差异表达基因的差异倍数(FC)为 2~32。

### 2.3 差异表达基因 GO 功能富集分析和 KEGG 富集分析

对不同比较组鉴定到的差异基因进行 GO 功能富集分析,结果如表 3 所示。从表中可以看出,不同春化时间处理差异基因主要富集在刺激响应、代谢过程、生物调节、细胞学过程等生物学过程,结合、催化活性、转运活性等分子功能,及细胞结构实体、含蛋白质复合体等细胞组分等方面。春化 10 d 处理富集在生长、发育过程、细胞学过程、结合、催化活性等功能,且表达量上调的差异表达基因数量分别为 978 个、415 个、1 119 个、902 个、859 个,与春化处理 1 d 相比,富集在上述功能的上调基因数量明显增多;春化 10 d 处理富集在代谢过程、定位、信号转导、细胞学过程、结合、催化活性等功能,且表达量下调的差异表达基因分别为 136 个、12 个、35 个、620 个、551 个、576 个,与春化 1 d 处理相比,富集在这



A:不同春化时间处理蚕豆茎顶端转录组差异表达基因数量;B:春化时间处理比较组差异表达基因韦恩图;C:不同处理差异表达基因火山图。CK:未春化处理;V1d:春化1d处理;V10d:春化10d处理;V30d:春化30d处理;FC:差异倍数;FDR:误差发现率。

图2 不同春化时间处理蚕豆转录组差异表达基因

Fig.2 Differentially expressed genes (DEGs) in the transcriptome of faba bean treated with different vernalization durations

些功能的下调基因数量明显减少。春化30d处理富集在代谢过程、生物调节、细胞学过程、结合、催化活性等功能,且表达量上调的差异表达基因数量分别为644个、276个、733个、581个、558个,其中后3种的数量较春化10d处理时有所下降。春化10d处理富集在生长、发育过程、细胞学过程等生物学过程的差异上调基因多于春化1d处理和春化30d处理,说明春化10d处理对蚕豆植株的生长发育产生了重要的影响。

鉴于春化10d处理对蚕豆生长发育的重要影响,本研究对该阶段的差异表达基因进行KEGG富集分析。结果表明,富集在代谢途径和次生代谢产物的生物合成中的差异基因数量较多,分别有402个和261个,其次是淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、MAPK信号通路-植物、磷脂酰肌醇信号系统等代谢途径(图3)。因此,本研究认为上述代谢途径在蚕豆春化响应过程中发挥了重要作用。

## 2.4 关键差异基因分析

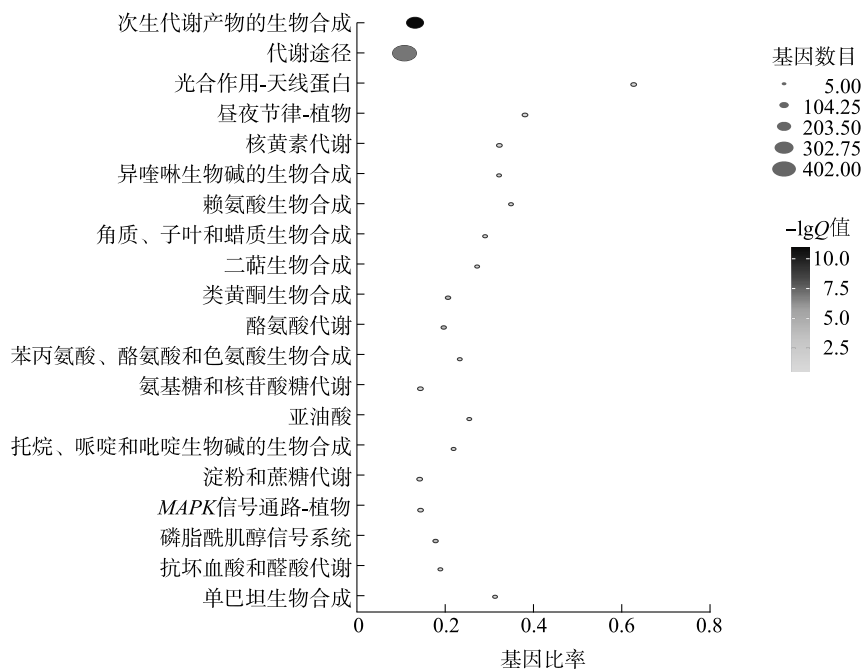
蚕豆春化处理后,有较多基因表达量出现显著变化。从蚕豆3个春化处理中共筛选到34个开花途径

相关显著差异基因,其中MADS家族成员6个,分属5个亚家族;SVP基因2个,上调和下调基因各1个,SEP、AP3、AGL6、SOC1基因各1个,除SEP(Vfaba.Tiffanny.R1.lg151400)外均出现不同程度的上调表达;其他重要开花调控相关基因28个。其中,春化途径相关基因VRN1 2个,均上调表达;VIN3基因1个,下调表达;光周期途径调控相关基因PIF(Phytochrome interacting factor)2个,均上调表达;CO(CONSTANS)基因共7个,其中4个上调表达,3个下调表达;赤霉素途径调控差异基因3个,1个上调表达,2个下调表达;自主途径相关差异基因HDA基因2个,均上调表达;开花相关整合因子FT基因1个,上调表达(表4)。基于其他作物中春化响应及开花相关同源基因的报道,选择转录组数据中差异表达的20个基因在不同春化时间处理后的相对表达量数据绘制热图(图4),从图中可以看出,7个基因的相对表达量在春化1d处理后即出现明显下调,13个表达量上调的基因中有4个基因在春化1d处理时,相对表达量变化不大,春化10~30d处理相对表达量明显上调,另外9个基因在春化1d处理时,相对表达量就出现明显上调。

表 3 差异表达基因的 GO (基因本体) 功能富集

Table 3 GO (Gene ontology) functional enrichment of differentially expressed genes

所属类别	基因功能	差异表达基因数量					
		春化 0 d 与春化 1 d 比较组		春化 0 d 与春化 10 d 比较组		春化 0 d 与春化 30 d 比较组	
		上调	下调	上调	下调	上调	下调
生物学过程	节律过程	7	7	14	6	11	5
	刺激响应	218	434	404	182	264	215
	代谢过程	532	1 125	353	136	644	586
	生长	15	27	978	597	26	11
	多生物学过程	23	68	159	36	48	39
	定位	147	273	34	12	237	125
	信号转导	68	126	81	35	95	42
	生物调节	205	464	180	67	276	190
	发育过程	72	197	415	167	112	78
	细胞学过程	567	1 221	1 119	620	733	606
分子功能	转录调节因子活性	62	125	107	38	68	51
	分子传递活性	15	16	37	3	23	5
	转运活性	87	119	209	66	140	65
	分子功能调节器	16	59	26	29	21	28
	抗氧化活性	16	12	19	17	10	17
	翻译调节因子活性	5	20	5	5	6	2
	结合	477	1 087	902	551	581	522
	催化活性	474	1 038	859	576	558	559
细胞组分	结构分子活性	18	38	37	29	27	14
	病毒粒子组分	5	8	9	4	8	4
	细胞结构实体	436	907	851	470	570	476
	含蛋白质复合体	110	259	231	150	167	140



MAPK:丝裂原活化蛋白激酶。

图 3 春化 10 d 处理差异表达基因 KEGG 富集前 20 的代谢途径

Fig.3 KEGG pathways analysis of top 20 enriched differentially expressed genes after vernalization treatment for ten days

表 4 开花途径相关差异基因

Table 4 Different genes related to flowering pathway

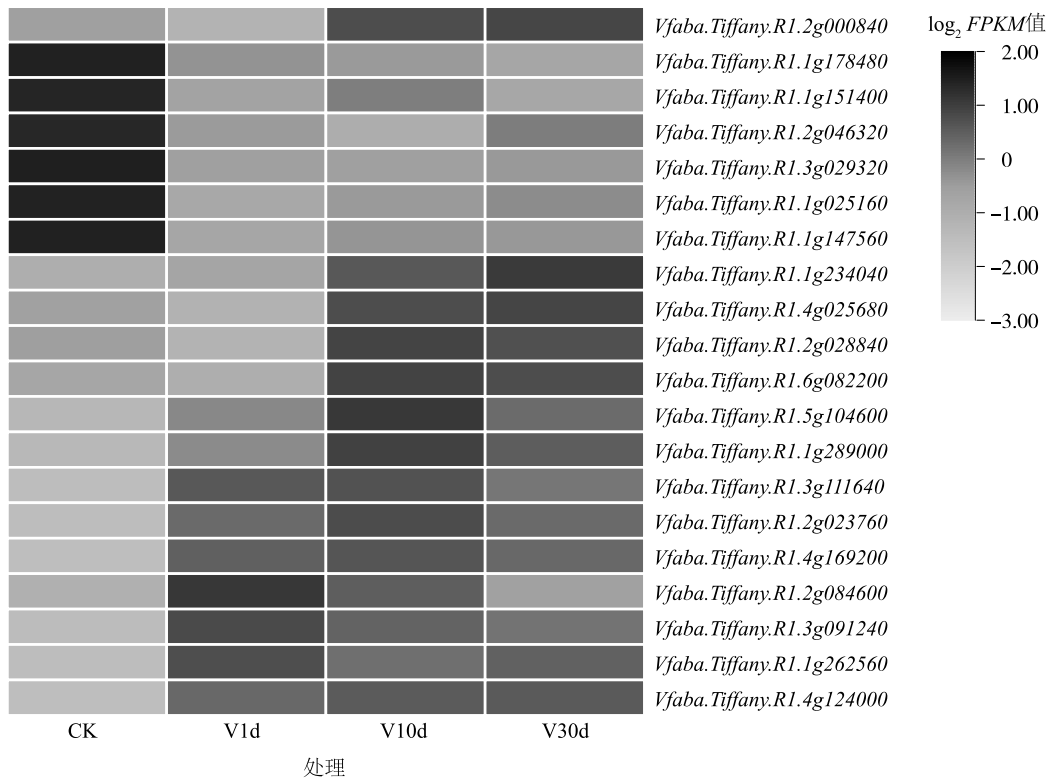
蚕豆基因编号	拟南芥基因 ID	蚕豆基因名称	注释	GO 条目	上调/下调
Vfaba.Tiffany.R1.1g262560	AT5G62430	<i>VjCDF1</i>	CYCLING DOF FACTOR 1	GO:0003677	上调
Vfaba.Tiffany.R1.Ung006640	AT5G62430	<i>VjCDF1</i>	CYCLING DOF FACTOR 1	GO:0003677	上调
Vfaba.Tiffany.R1.5g077440	AT5G39660	<i>VjCDF2</i>	CYCLING DOF FACTOR 2	GO:0003677	上调
Vfaba.Tiffany.R1.2g023760	AT3G47500	<i>VjCDF3</i>	CYCLING DOF FACTOR 3	GO:0003677	上调
Vfaba.Tiffany.R1.4g017920	AT3G47500	<i>VjCDF3</i>	CYCLING DOF FACTOR 3	GO:0003677	下调
Vfaba.Tiffany.R1.6g063920	AT3G47500	<i>VjCDF3</i>	CYCLING DOF FACTOR 3	GO:0003677	上调
Vfaba.Tiffany.R1.1g025160	AT5G15850	<i>VjCOL1</i>	CONSTANS-LIKE 1	GO:0005515	下调
Vfaba.Tiffany.R1.1g038040	AT3G21880	<i>VjCOL12</i>	CONSTANS-LIKE 12	GO:0003674	上调
Vfaba.Tiffany.R1.1g011440	AT3G02380	<i>VjCOL2</i>	CONSTANS-LIKE 2	GO:0003674	上调
Vfaba.Tiffany.R1.2g144680	AT5G24930	<i>VjCOL4</i>	CONSTANS-LIKE 4	GO:0005515	下调
Vfaba.Tiffany.R1.4g169200	AT5G57660	<i>VjCOL5</i>	CONSTANS-LIKE 5	GO:0004252	上调
Vfaba.Tiffany.R1.1g174960	AT3G07650	<i>VjCOL9</i>	CONSTANS-LIKE 9	GO:0005515	下调
Vfaba.Tiffany.R1.2g084600	AT3G07650	<i>VjCOL9</i>	CONSTANS-LIKE 9	GO:0005515	上调
Vfaba.Tiffany.R1.4g124000	AT2G03220	<i>VjFT1</i>	FUCOSYLTRANSFERASE 1	GO:0008107	上调
Vfaba.Tiffany.R1.1g072720	AT4G25420	<i>VjGA200X1</i>	GIBBERELLIN 20 OXIDASE 1	GO:0016491	上调
Vfaba.Tiffany.R1.2g046320	AT4G21200	<i>VjGA20X8</i>	GIBBERELLIN 2-OXIDASE 8	GO:0003674	下调
Vfaba.Tiffany.R1.5g093200	AT3G63010	<i>VjGID1B</i>	GA INSENSITIVE DWARF1B	GO:0016787	下调
Vfaba.Tiffany.R1.1g234040	AT4G38130	<i>VjHDA19</i>	HISTONE DEACETYLASE 19	GO:0003674	上调
Vfaba.Tiffany.R1.3g176120	AT5G26040	<i>VjHDA2</i>	HISTONE DEACETYLASE 2	GO:0003674	上调
Vfaba.Tiffany.R1.5g104600	AT2G20180	<i>VjPIF1</i>	PHY-INTERACTING FACTOR 1	GO:0046983	上调
Vfaba.Tiffany.R1.2g028840	AT2G43010	<i>VjPIF4</i>	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4	GO:0046983	上调
Vfaba.Tiffany.R1.2g090960	AT3G60030	<i>VjSPL12</i>	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 12	GO:0003674	上调
Vfaba.Tiffany.R1.3g023920	AT3G57920	<i>VjSPL15</i>	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 15	GO:0003677	下调
Vfaba.Tiffany.R1.5g033680	AT5G18830	<i>VjSPL8</i>	SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 7	GO:0003674	下调
Vfaba.Tiffany.R1.3g091240	AT1G25560	<i>VjTEM1</i>	ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR 1	GO:0003677	上调
Vfaba.Tiffany.R1.1g178480	AT5G57380	<i>VjVIN3</i>	VERNALIZATION INSENSITIVE 3	GO:0003674	下调
Vfaba.Tiffany.R1.2g000840	AT3G18990	<i>VjVRN1</i>	REDUCED VERNALIZATION RESPONSE 1	GO:0003677	上调
Vfaba.Tiffany.R1.3g029320	AT3G18990	<i>VjVRN1</i>	REDUCED VERNALIZATION RESPONSE 1	GO:0003677	上调
Vfaba.Tiffany.R1.4g025680	AT2G45660	<i>VjSOC1</i>	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1	GO:0005575	上调
Vfaba.Tiffany.R1.1g151400	AT1G24260	<i>VjSEP</i>	SEPALLATA3	GO:0005634	下调
Vfaba.Tiffany.R1.1g289000	AT3G54340	<i>VjAP3</i>	APETALA 3	GO:0005575	上调
Vfaba.Tiffany.R1.1g147560	AT2G22540	<i>VjSVP</i>	SHORT VEGETATIVE PHASE	GO:0005575	上调
Vfaba.Tiffany.R1.6g082200	AT2G22540	<i>VjSVP</i>	SHORT VEGETATIVE PHASE	GO:0005575	下调
Vfaba.Tiffany.R1.3g111640	AT2G45650	<i>VjAGL6</i>	AGAMOUS-LIKE 6	GO:0005575	上调

GO:基因本体。

## 2.5 关键差异基因表达模式

根据蚕豆各组织的转录组数据<sup>[24]</sup>,可能参与蚕豆春化响应或花期调控的基因在根、茎叶、花、种子、

种皮等组织中的表达模式如图 5 所示。从图中可以看出, *Vfaba. Tiffany. R1. 2g144680*、*Vfaba. Tiffany. R1. 4g169200*、*Vfaba. Tiffany. R1. 1g234040* 等 3 个基因在



CK、V1d、V10d、V30d 见图 2 注。

图 4 蚕豆春化相关基因的表达模式

Fig.4 Expression pattern of vernalization related genes in faba bean

多个组织中高表达, *Vfaba.Tiffany.R1.6g063920*、*Vfaba.Tiffany.R1.2g084600*、*Vfaba.Tiffany.R1.5g093200*、*Vfaba.Tiffany.R1.1g151400*、*Vfaba.Tiffany.R1.1g289000* 等 5 个基因在花中高表达。部分 MADS 家族成员仅在个别组织中有较高的表达水平 (*Vfaba.Tiffany.R1.1g147560* 在茎叶中高表达, *Vfaba.Tiffany.R1.1g151400*、*Vfaba.Tiffany.R1.1g289000*、*Vfaba.Tiffany.R1.4g025680* 在花中高表达, *Vfaba.Tiffany.R1.3g111640* 和 *Vfaba.Tiffany.R1.6g082200* 在种皮中高表达), 在其他组织中表达量都较低。

## 2.6 关键差异基因的蛋白质-蛋白质互作 (PPI) 网络

利用 Cytoscape 软件及 SRING 数据库构建的关键差异基因的蛋白质-蛋白质互作 (PPI) 网络如图 6 所示。从图中可以看出, *SOCI*、*VRN1*、*SVP*、*VIN3* 蛋白与其他蛋白间的连接数分别为 36、22、18、18, 是 PPI 网络中的核心蛋白, 而 *COL12*、*CDF3*、*SPL8*、*HDA2* 蛋白与其他蛋白的连接数据相对较低。 *SOCI* 是调控植物开花的重要基因, *VRN1* 是调控植物春化过程的重要基因, 因此, PPI 网络中的核心蛋白编

码基因可能是蚕豆春化响应的关键基因。

## 2.7 春化处理对关键基因相对表达量的影响

春化处理后, *VfSOC1*、*VfVRN1*、*VfSVP*、*VfCOL5*、*VfSEP*、*VfFT1*、*VfAP3*、*VfCDF3* 等 8 个春化响应关键基因的相对表达量变化特征如图 7 所示。从图中可以看出, 春化 1 d 处理下 8 个基因的相对表达量与春化前 (CK) 相比均无显著差异; 春化 10 d 处理 *VfSOC1* 基因的相对表达量显著高于 CK, *VfSVP* 基因的相对表达量极显著高于 CK, 而其他 6 个基因与 CK 无显著差异; 春化 30 d 处理 *VfVRN1*、*VfCOL5*、*VfSEP*、*VfFT1*、*VfAP3*、*VfSVP*、*VfCDF3* 等 7 个基因的相对表达量均极显著高于 CK, 而 *VfSOC1* 基因的相对表达量极显著低于 CK。上述特征表明, PPI 网络中的 7 个基因 (*VfSOC1*、*VfVRN1*、*VfSVP*、*VfCOL5*、*VfSEP*、*VfAP3*、*VfCDF3*) 均对春化处理有所响应, 这些基因可能是蚕豆春化响应的关键基因。

## 3 讨论与结论

春化作用是大部分越冬植物由营养生长向生殖生长必需的生理过程, 春化相关基因调控植物的开

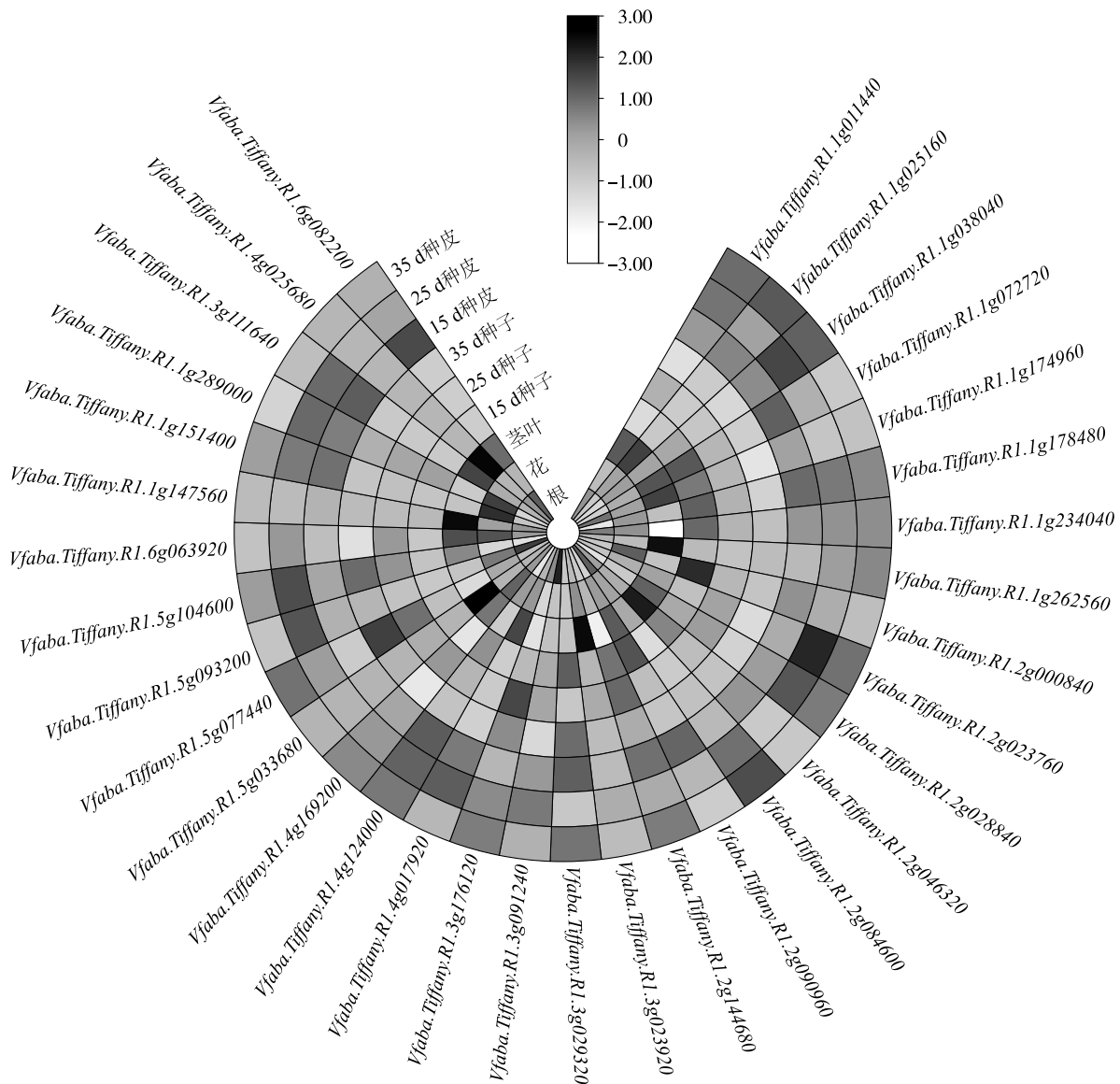
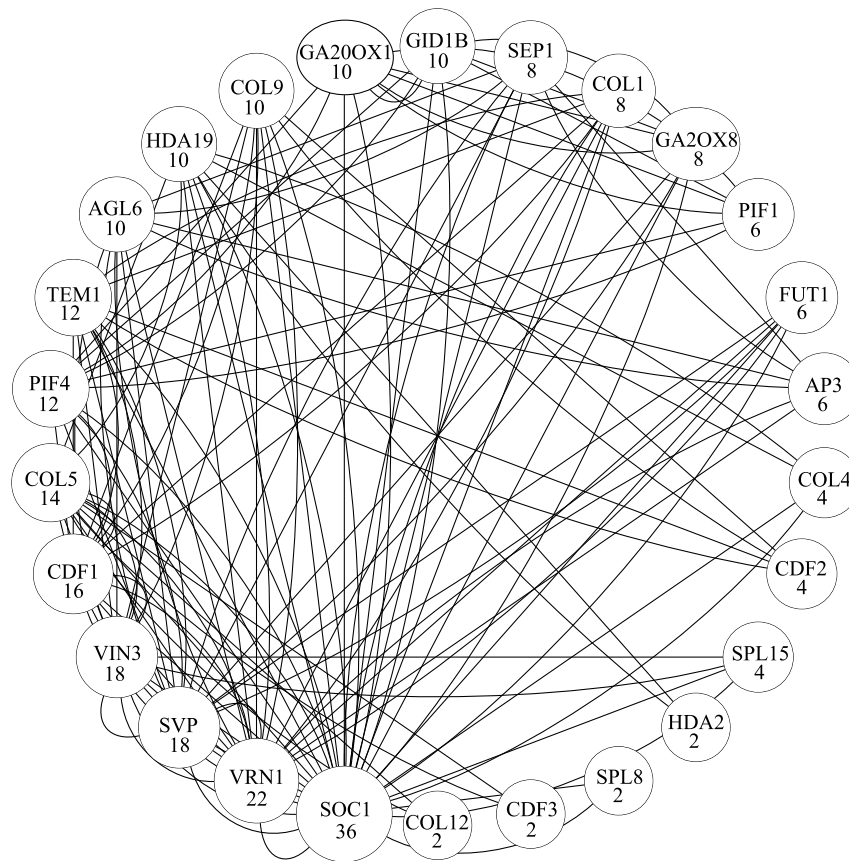


图5 蚕豆春化响应基因的组织表达模式

Fig.5 Tissue expression patterns of genes responsive to vernalization in faba bean

花过程。目前,关于拟南芥、油菜、白菜等十字花科植物和小麦、大麦等禾本科作物春化过程的分子机制已有较多研究<sup>[11, 25-26]</sup>,大量春化响应相关基因被鉴定并克隆,但关于蚕豆春化响应基因的报道还比较少。本研究通过对不同春化时长的蚕豆茎顶端进行转录组测序,将数据比对到 Tiffany 参考基因组<sup>[19]</sup>,通过处理间比对分析,共鉴定到 7 553 个差异表达基因,其中包含 *bHLH*、*ERF*、*MYB* 等多个基因家族中的成员。经过筛选比较,共鉴定到 34 个春化响应基因,大部分为其他植物中已报道的春化基因的同源基因<sup>[3, 27]</sup>。

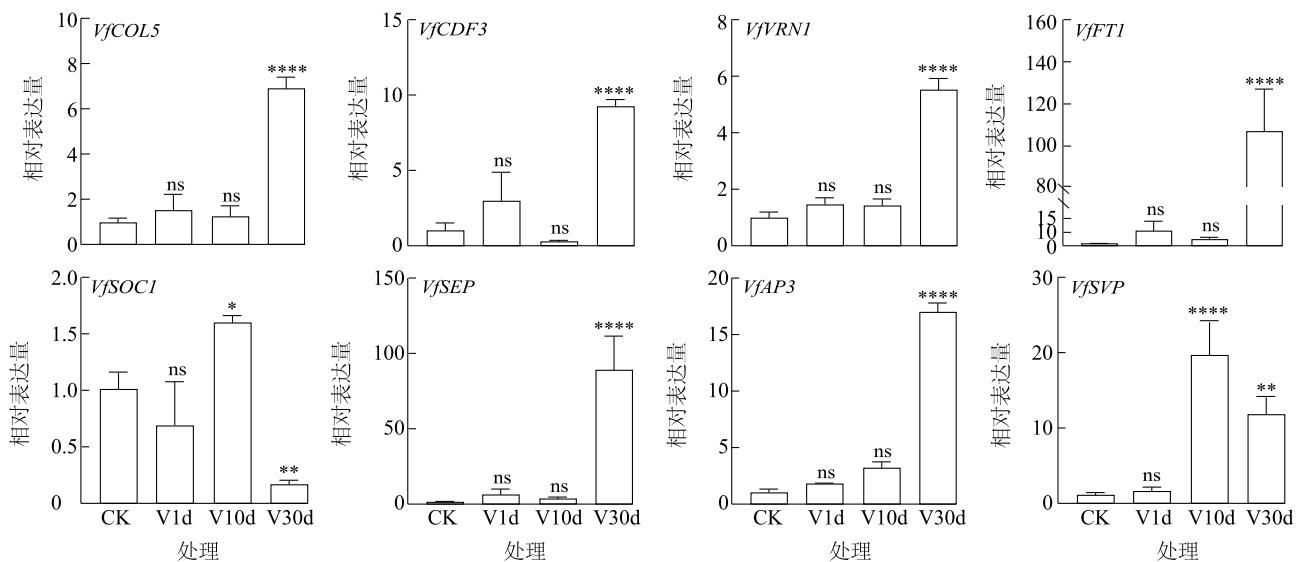
*FLC* 基因在拟南芥等植物春化途径中占据重要地位,*FLC* 调控植物开花的研究已有较多报道<sup>[8, 28]</sup>。*FLC* 基因的高表达会抑制下游 *FT*、*SOC1* 等开花基因的转录,而一段时间的低温处理可以抑制 *FLC* 的转录水平,从而导致植物开花提前<sup>[10]</sup>。本研究在蚕豆转录组数据中没有发现差异表达的 *FLC* 基因,蚕豆转录本中亦没有发现 *FLC* 的同源基因,这与花生和苜蓿等植物类似<sup>[29-30]</sup>。*VRN* 基因能独立介导拟南芥的春化作用,且其在拟南芥茎尖、叶片、花等组织中均有较高表达水平<sup>[31]</sup>,但蚕豆 *VRN1* 基因(*Vfaba.Tiffany.R1.2g000840*)仅在种子中相对高表达,说



圆圈内蛋白质名称下的数字表示与其他蛋白质的连接数(度)。

图6 蚕豆春化响应基因 PPI 网络构建

Fig.6 PPI network of vernalization-responsive genes in faba bean



CK、V1d、V10d、V30d 见图2注。ns:处理与对照(CK)无显著差异; \*、\*\*、\*\*\*\* 分别表示处理与CK在0.05、0.01、0.0001水平上差异显著。

图7 不同春化处理时间对8个春化响应关键基因相对表达量的影响

Fig.7 Response characteristics of relative expression levels of eight key vernalization-responsive genes to vernalization treatment time

明 *VRN* 基因在蚕豆进化过程中可能发生了功能分化。冬小麦春化作用主要受 *VRN* 基因调控,其中 *VRN1* 基因受表观遗传调控,*VRN3* 是拟南芥 *FT* 的同源基因<sup>[25,32-33]</sup>。本研究结果显示,春化处理后,蚕豆 *VRN1* 基因和 *FT1* 基因表达量均上调。因此,本研究认为,蚕豆春化作用可能主要受 *VRN* 基因独立调控,而该过程是否受表观遗传调控还有待进一步探究。

*CO* 是植物光周期途径中的关键基因,它可以激活 *FT* 的表达,进而上调 *SOC1* 的表达水平,促进植物开花<sup>[34-35]</sup>。生物钟协调了赤霉素、细胞分裂素等多种激素信号通路,和 *PIF4* 共同控制植物生长调节<sup>[36]</sup>。本研究从蚕豆转录组中共鉴定到 7 个差异表达的 *CO* 基因和 2 个 *PIF* 基因,其中有 4 个 *CO* 基因春化后上调表达,*COL5* 基因上调最为显著,2 个 *PIF* 基因春化后均上调表达,说明蚕豆中春化途径会耦合光周期途径调节植物开花。*SOC1* 作为被子植物开花通路的核心整合子,受 *FLC* 负向调控,同时也受赤霉素、温度等多个调控途径中基因直接调控,与植物花器官形态建成联系密切<sup>[10,34]</sup>。拟南芥中过表达蚕豆 *SOC1* 基因可以促进开花,说明该基因在蚕豆中是重要的开花调节因子<sup>[37]</sup>。本研究结果表明,春化处理后,1 个蚕豆 *SOC1* 基因表达量上调,推测该基因是蚕豆响应春化的候选基因。同时,*SOC1-SPL* 模块作为一个分子链接可以整合光周期和赤霉素(GA)信号,促进拟南芥开花<sup>[38]</sup>。本研究共鉴定到 3 个 *SPL* 基因春化后均上调表达,而且 PPI 网络中 *SOC1* 与其他蛋白连接数最多,说明 *SOC1* 可能是蚕豆春化作用重要的响应因子。此外,过表达 *AGL6* 可以促进拟南芥开花提前<sup>[39]</sup>。本研究鉴定到 1 个 *AGL6* 的同源基因春化后表达量上调,推测其可能参与蚕豆春化响应。*SVP* 基因是温度途径中关键调节因子。一般认为,*SVP* 是拟南芥、梅花、西伯利亚杏等植物的开花负调控因子,其表达量降低可导致植物开花提前<sup>[40-41]</sup>,且 *SVP* 基因还介导赤霉素途径、自主途径等过程调节拟南芥开花<sup>[42]</sup>。本研究鉴定到的 2 个 *SVP* 基因春化后 1 个上调表达,1 个下调表达。这 2 个基因在蚕豆春化响应和花期调控上具体有什么功能还有待进一步探究。

本研究通过转录组数据和生物信息学分析,初步筛选出蚕豆春化响应的候选基因,但这些基因确切的调节机制尚不明确,后续研究中可以通过构建

候选基因的过表达载体,利用转基因技术明确其在蚕豆春化响应中的具体作用,这样才能更准确地阐明蚕豆特有的春化分子机制,为蚕豆分子育种提供依据。

## 参考文献:

- [1] BOUCHÉ F, LOBET G, TOCQUIN P, et al. FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): 1167-1171.
- [2] IRISH V F. The flowering of *Arabidopsis* flower development [J]. *The Plant Journal*, 2010, 61(6): 1014-1028.
- [3] SUNG S, AMASINO R M. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3 [J]. *Nature*, 2004, 427(6970): 159-164.
- [4] 王凡, 卞晓春, 刘陈玮, 等. 植物春化作用分子机理研究进展 [J]. *现代园艺*, 2022(15): 43-45, 48.
- [5] 刘生财, 蒋欣梅, 于锡宏. 植物春化作用机理研究进展 [J]. *亚热带农业研究*, 2010, 6(1): 29-33.
- [6] CAO Y Y, BIAN X C, CHEN M X, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis in vernalization-treated faba bean (*Vicia faba* L.) [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187436.
- [7] TREVASKIS B, HEMMING M N, DENNIS E S, et al. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals [J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(8): 352-357.
- [8] ZHU P, LISTER C, DEAN C. Cold-induced *Arabidopsis* FRIGIDA nuclear condensates for *FLC* repression [J]. *Nature*, 2021, 599(7886): 657-661.
- [9] ZENG X L, LV X C, LIU R, et al. Molecular basis of CONSTANS oligomerization in *FLOWERING LOCUS T* activation [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(3): 731-740.
- [10] SHARMA N, GEUTEN K, GIRI B S, et al. The molecular mechanism of vernalization in *Arabidopsis* and cereals: role of Flowering Locus C and its homologs [J]. *Physiologia Plantarum*, 2020, 170(3): 373-383.
- [11] QUESTA J I, SONG J, GERALDO N, et al. *Arabidopsis* transcriptional repressor VAL1 triggers Polycomb silencing at *FLC* during vernalization [J]. *Science*, 2016, 353(6298): 485-488.
- [12] COSTA S, DEAN C. Storing memories: the distinct phases of Polycomb-mediated silencing of *Arabidopsis FLC* [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(4): 1187-1196.
- [13] WHITTAKER C, DEAN C. The *FLC* locus: a platform for discoveries in epigenetics and adaptation [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2017, 33: 555-575.
- [14] LI X R, ZHANG S F, BAI J J, et al. Tuning growth cycles of *Brassica* crops via natural antisense transcripts of *BrFLC* [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(3): 905-914.
- [15] DIXON L E, KARSAI I, KISS T, et al. *VERNALIZATION1* controls developmental responses of winter wheat under high ambient temperatures [J]. *Development*, 2019, 146(3): dev172684.

- [16] XU S J, DONG Q, DENG M, et al. The vernalization-induced long non-coding RNA *VAS* functions with the transcription factor TaRF2b to promote *TaVRN1* expression for flowering in hexaploid wheat[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(9):1525-1538.
- [17] LI T, NAGARAJAN R, LIU S J, et al. The E3 ligase TaE3V-B1 ubiquitinates proteins encoded by the vernalization gene *TaVRN1* and regulates developmental processes in wheat[J]. *Plant Physiology*, 2024, 197(1):kiae606.
- [18] O'SULLIVAN D M, ANGRA D. Advances in faba bean genetics and genomics[J]. *Frontiers in Genetics*, 2016, 7:150.
- [19] JAYAKODI M, GOLICZ A A, KREPLAK J, et al. The giant diploid faba genome unlocks variation in a global protein crop[J]. *Nature*, 2023, 615(7953):652-659.
- [20] JENSEN E S, PEOPLES M B, HAUGGAARD-NIELSEN H. Faba bean in cropping systems[J]. *Field Crops Research*, 2010, 115(3):203-216.
- [21] 赵薇,王爱花,陆慢,等.不同春化处理对蚕豆开花结实时间和产量的影响[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(16):102-105.
- [22] SZKLARCZYK D, KIRSCH R, KOUTROULI M, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1):638-646.
- [23] 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):402-408.
- [24] ZHAO N, ZHOU E Q, MIAO Y M, et al. High-quality faba bean reference transcripts generated using PacBio and Illumina RNA-seq data[J]. *Scientific Data*, 2024, 11(1):359.
- [25] DANYLUK J, KANE N A, BRETON G, et al. TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(4):1849-1860.
- [26] GENDALL A R, LEVY Y Y, WILSON A, et al. The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 2001, 107(4):525-535.
- [27] RICHTER R, BASTAKIS E, SCHWECHHEIMER C. Cross-repressive interactions between *SOC1* 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):1992-2004.
- [28] YUAN W Y, LUO X, LI Z C, et al. A *Cis* cold memory element and a trans epigenome reader mediate Polycomb silencing of *FLC* by vernalization in *Arabidopsis*[J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(12):1527-1534.
- [29] DONG X M, DENG H, MA W X, et al. Genome-wide identification of the MADS-box transcription factor family in autotetraploid cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) and expression analysis under abiotic stress[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1):603.
- [30] MOU Y F, YUAN C L, SUN Q X, et al. MIKC-type MADS-box transcription factor gene family in peanut: genome-wide characterization and expression analysis under abiotic stress[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:980933.
- [31] LEVY Y Y, MESNAGE S, MYLNE J S, et al. Multiple roles of *Arabidopsis VRN1* in vernalization and flowering time control[J]. *Science*, 2002, 297(5579):243-246.
- [32] LIU Y, LIU P, GAO L, et al. Epigenomic identification of vernalization cis-regulatory elements in winter wheat[J]. *Genome Biology*, 2024, 25(1):200.
- [33] YAN L, FU D, LI C, et al. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(51):19581-19586.
- [34] LEE J, LEE I. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(9):2247-2254.
- [35] NIWA Y, ITO S, NAKAMICHI N, et al. Genetic linkages of the circadian clock-associated genes, *TOC1*, *CCA1* and *LHY* in the photoperiodic control of flowering time in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2007, 48(7):925-937.
- [36] NOMOTO Y, KUBOZONO S, YAMASHINO T, et al. Circadian clock- and PIF4-controlled plant growth: a coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2012, 53(11):1950-1964.
- [37] YUAN X, WANG Q, YAN B, et al. Single-molecule real-time and Illumina-based RNA sequencing data identified vernalization-responsive candidate genes in Faba bean (*Vicia faba* L.)[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12:656137.
- [38] JUNG J H, JU Y, SEO P J, et al. The *SOC1-SPL* module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2012, 69(4):577-588.
- [39] KOO S C, BRACKO O, PARK M S, et al. Control of lateral organ development and flowering time by the *Arabidopsis thaliana* MADS-box Gene *AGAMOUS-LIKE6*[J]. *The Plant Journal*, 2010, 62(5):807-816.
- [40] 陈晨,徐宛玉,朱高浦,等.西伯利亚杏开花相关基因的转录组测序分析[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(22):7422-7430.
- [41] 李玉舒,杨炜茹,程堂仁,等.梅花2个SVP基因的克隆与表达分析[J]. *西北植物学报*, 2019, 39(7):1163-1171.
- [42] LEE J H, YOO S J, PARK S H, et al. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*[J]. *Genes & Development*, 2007, 21(4):397-402.

(责任编辑:石春林)