

引用格式:

周佳, 彭艳, 陈信波. 高温胁迫下不同耐热性水稻品种的差异表达基因分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(5): 536–542.

ZHOU J, PENG Y, CHEN X B. Analysis of differentially expressed genes in rice varieties with different heat tolerance under high temperature stress[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(5): 536–542.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



高温胁迫下不同耐热性水稻品种的差异表达基因分析

周佳^{1,2}, 彭艳², 陈信波^{1,2*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要: 以耐热水稻品种 996 和热敏感水稻品种 4628 为材料, 提取 2 个水稻品种在 40 °C 高温处理 0、10、20、60 min 和 2 h 的 5~6 期幼穗中的 RNA 进行微阵列分析。结果表明: 高温胁迫下 2 个不同耐热性品种的差异表达基因显著富集在苯丙烷生物合成、热休克蛋白、四肽重复以及一些与非生物胁迫相关的过程; 耐热型水稻品种 996 的差异表达基因还显著富集于细胞色素 P450, 而热敏感水稻品种 4628 的差异表达基因显著富集到五肽重复; 对高温胁迫下具有品种特异性表达的基因进行分析, 推测可能是细胞色素 P450 家族基因的差异表达提高了耐热水稻 996 的耐热能力, *PPR* 基因的存在影响了热敏感水稻 4628 的抗逆性。

关键词: 水稻; 高温胁迫; 耐热; 热敏感; 差异表达基因

中图分类号: S511; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)05-0536-07

Analysis of differentially expressed genes in rice varieties with different heat tolerance under high temperature stress

ZHOU Jia^{1,2}, PENG Yan², CHEN Xinbo^{1,2*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: In this study, using heat tolerance line 996 and heat sensitive line 4628 as materials, we performed microarray analysis on the RNA extracted from the 5-6 stage young panicles of the two rice varieties treated with 40 °C for 0 min, 10 min, 20 min, 60 min and 2 h. The results showed that the differentially expressed genes of the two varieties were significantly enriched in phenylpropane biosynthesis, heat shock protein, tetratricopeptide repeat, and processes related to abiotic stress. In addition, heat tolerance line 996 differentially expressed genes were also significantly enriched in cytochrome P450. The heat sensitive rice 4628 differentially expressed genes were significantly enriched to pentatricopeptide repeat. With the results from this study, we could conclude that heat tolerance rice 996 may improve its own heat tolerance due to the differential expression of cytochrome P450 family genes, and heat sensitive rice 4628 may be due to the existence of *PPR* gene to affect its own stress resistance. The differentially expressed genes in the heat tolerance line 996 and heat sensitive line 4628 provided information for further heat resistant gene identification and clarification of the heat resistant mechanism.

Keywords: rice; high temperature stress; heat tolerance; heat sensitive; differentially expressed genes

高温(超过 35 °C 以上)是影响水稻产量和质量的重要因素, 对水稻生殖生长影响显著^[1]。据国际

收稿日期: 2021-12-01

修回日期: 2022-09-27

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2015JJ-3081); 湖南省研究生科研创新项目(CX2015B241)

作者简介: 周佳(1996—), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究, 1010964041@qq.com; *通信作者, 陈信波, 博士, 教授, 主要从事植物分子生物学研究, xinbochen@live.cn

2.2 高温胁迫下 2 个水稻品种 DEGs 的功能富集分析

2.2.1 DEGs 的 GO 富集分析

从图 2 可以看出, 高温胁迫下, 耐热品种 996 的 DEGs 主要富集到 22 个 GO terms, 包括 6 个生物过程(biological process, BP), 4 个细胞组分(cellular component, CC)及 12 个分子功能(molecular function, MF)。GO 富集分析表明, 这 6 个生物过程为热响应、次生代谢产物生物合成、碳水化合物

代谢、几丁质分解代谢、毒素分解代谢、草酸代谢; 在细胞组分中, 质外体、胞外区、膜和细胞壁的 DEGs 最为显著; 分子功能中, 富集基因较多的为血红素结合、转录因子活性的序列特异性 DNA 结合、铁离子结合, 各有 104、94、77 个差异表达基因。高温胁迫下, 热敏感品种 4628 的 DEGs 主要富集到 5 个 GO terms, 包括 2 个生物过程和 3 个细胞组分, 没有显著富集分子功能。

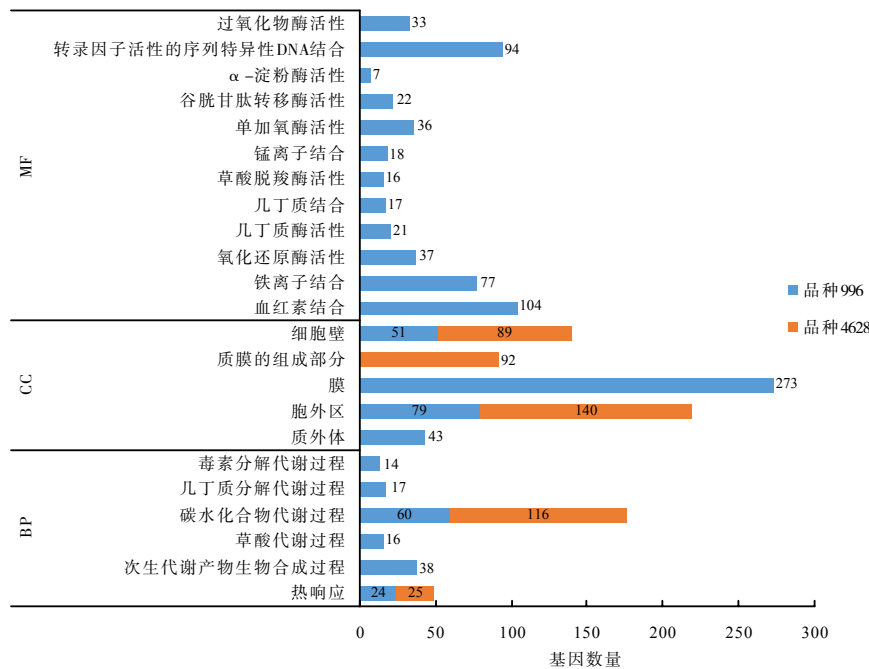


图 2 高温胁迫下耐热型、热敏感型水稻 DEGs 的 GO terms

Fig.2 Enrichment GO terms within heat-resistant and heat-sensitive rice DEGs under high temperature stress

2.2.2 DEGs 的 KEGG 通路富集分析

从表 1 可以看出, 耐热品种 996 的 DEGs 主要

表 1 高温胁迫下 2 个不同耐热性水稻品种 DEGs 富集的 KEGG 通路

Table 1 The enriched KEGG pathways of DEGs in rice varieties with different heat tolerance under heat stress

品种	通路术语	基因数	错误发现率
4628	次生代谢物的生物合成	302	0.000 0
	代谢途径	504	0.000 6
	苯丙烷生物合成	56	0.005 6
	糖酵解/糖异生	54	0.006 3
	淀粉和蔗糖代谢	49	0.028 7
	碳代谢	90	0.028 8
	半乳糖代谢	27	0.028 8
996	内质网中的蛋白质加工	62	0.000 0
	二萜生物合成	12	0.004 5
	苯丙烷生物合成	29	0.008 3
	谷胱甘肽代谢	19	0.042 7

富集在 4 条 KEGG 通路, 富集基因最多的是内质网中的蛋白质加工, 为 62 个。热敏感品种 4628 的 DEGs 主要富集在 7 条 KEGG 通路, 其中代谢途径富集的基因最多, 为 504 个。2 个品种的 DEGs 都显著富集到苯丙烷生物合成。

2.2.3 DEGs 的 INTERPRO 蛋白结构域分析

为了识别品种 996 与品种 4628 DEGs 蛋白结构域的特征, 采用 DAVID 在线工具进行 INTERPRO 蛋白结构域的富集分析。结果(图 3)表明, 品种 996 DEGs 主要富集到 20 个蛋白质结构域。富集基因排在前 5 的蛋白结构域有细胞色素 P450、细胞色素 P450 的 E 类 I 组、细胞色素 P450 的保守位点、糖苷水解酶超家族、糖苷水解酶的催化结构域, 分别为 69、64、62、62、56 个。品种 4628 DEGs 主要

富集到类 HSP20 分子伴侣、 α -晶体蛋白/Hsp20 结构域、五肽重复、糖苷水解酶超家族、糖苷水解酶的催化结构域等 5 个蛋白质结构域。

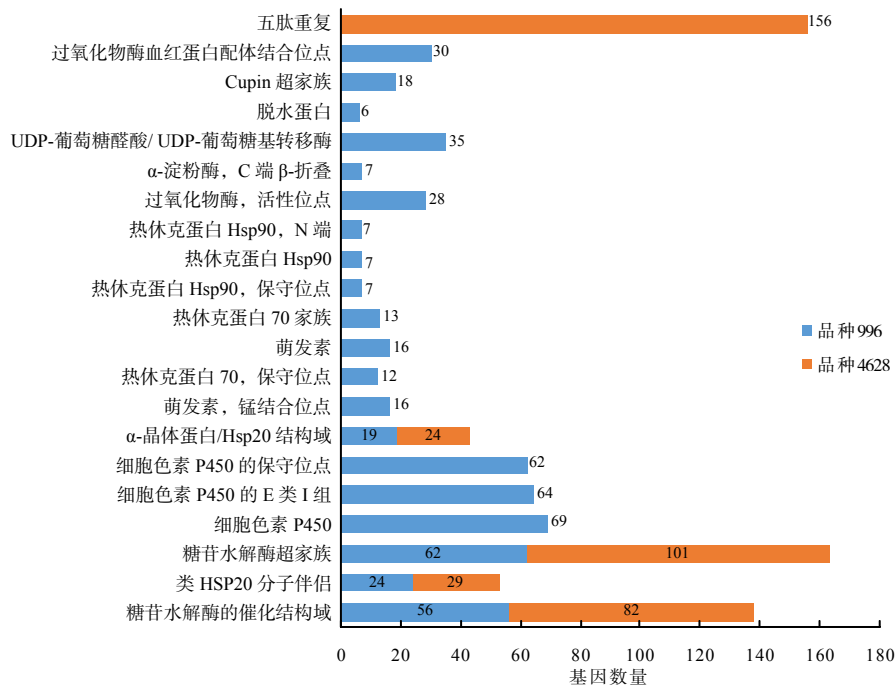


图 3 高温胁迫下 2 个水稻品种 DEGs 的 INTERPRO 蛋白结构域富集分析结果

Fig.3 Enrichment analysis result of the INTERPRO protein domain of heat-resistant and heat-sensitive rice DEGs under high temperature stress

2.3 高温胁迫下 2 个水稻品种中差异表达一致基因的功能富集分析

选取 2 个品种在高温处理差异表达一致的基因 (314 个) 进行富集分析。GO 富集分析结果 (图 4) 表明, 2 个品种差异表达一致的基因主要富集到 5 个基本生物学过程, 没有显著富集的细胞组分和分子功能。在 KEGG 富集分析中发现, 高温胁迫下 2 个

品种差异表达一致的基因主要富集在 1 条通路, 即内质网中的蛋白质加工。INTERPRO 蛋白结构域富集分析结果 (图 4) 表明, 2 个品种差异表达一致的基因富集到 8 个蛋白质结构域, 主要为热休克蛋白和四肽重复相关的蛋白结构域。

2.4 高温胁迫下 2 个水稻品种中差异表达相反的基因功能富集分析

选取了 2 个品种在高温处理差异表达相反的基因 (在品种 4628 表达上调而在品种 996 表达下调的 429 个; 在品种 996 表达上调而在品种 4628 表达下调的 149 个) 进行富集分析。GO 富集分析结果 (图 5) 表明, 在品种 4628 表达上调而在品种 996 表达下调的基因主要富集到 6 个 GO terms, 包括 1 个生物过程、1 个细胞组分及 4 个分子功能; 在品种 996 表达上调而在品种 4628 表达下调的基因没有显著富集到生物过程、细胞组分及分子功能。在本 GO 富集分析中, 所富集到的基因在草酸盐代谢过程、草酸脱羧酶活性部分和锰离子结合部分完全一致, 均为 *GLPs* 基因。

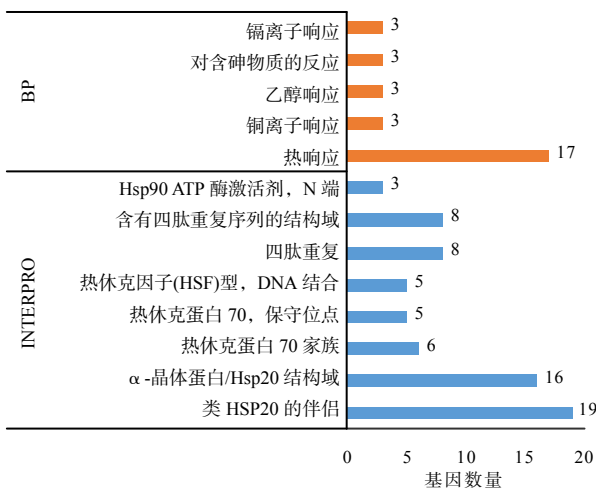


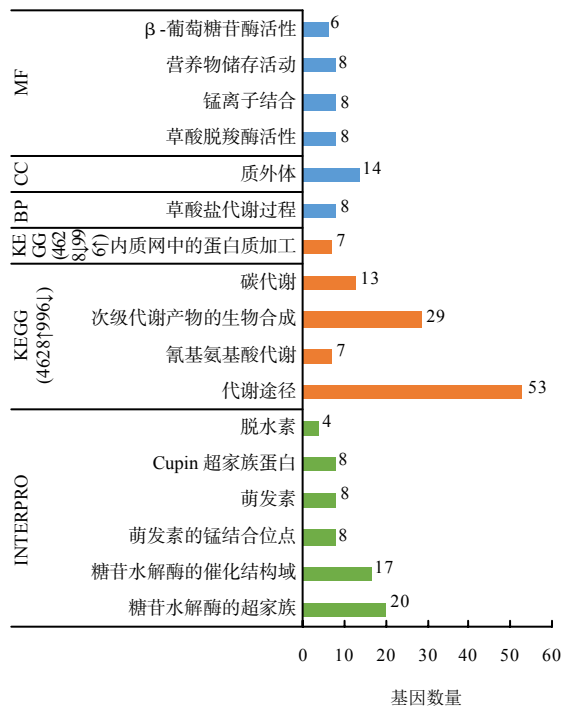
图 4 高温胁迫下 2 个水稻品种差异表达一致基因的功能富集分析结果

Fig.4 The functional enrichment analysis result of differentially expressed consistent genes in heat-resistant and heat-sensitive rice under high temperature stress

在 KEGG 通路富集分析 (图 5) 中发现, 在品种 4628 表达上调而在品种 996 表达下调的基因主要富

集在 4 条 KEGG 通路,富集基因最多的是代谢途径,为 53 个。对在品种 4628 表达下调而在品种 996 表达上调的基因进行富集分析后,发现只有 1 条 KEGG 通路,即内质网中的蛋白质加工。

INTERPRO 蛋白结构域分析结果(图 5)表明,在品种 4628 表达上调而在品种 996 表达下调的基因主要富集到 6 个蛋白质结构域,前 2 位显著富集的蛋白结构域为糖苷水解酶的超家族和糖苷水解酶的催化结构域,这 2 个蛋白结构域富集的基因数量较多,分别为 20 和 17。在品种 996 表达上调而在品种 4628 表达下调的基因没有显著富集到 INTERPRO 蛋白结构域。在本 INTERPRO 蛋白结构域富集分析中,萌发素的锰结合位点、萌发素以及 Cupin 超家族蛋白所富集的基因一致,均为 *GLps* 基因。



“↑”和“↓”分别表示高温胁迫下基因表达上调和下调。

图 5 高温胁迫下 2 个水稻品种差异表达相反基因的功能富集分析结果

Fig.5 The functional enrichment analysis result of differentially expressed opposite genes in heat-resistant and heat-sensitive rice under high temperature stress

2.5 高温胁迫下具有品种特异性表达的基因

对 2 个品种 DEGs 的功能进行富集分析发现,耐热型水稻 996 DEGs 蛋白结构域富集到细胞色素 P450、细胞色素 P450 的 E 类 I 组、细胞色素 P450 保守位点的基因基本一致,包括 LOC_Os09g28390

(*OsABA8ox3*)、LOC_Os02g36150(*CYP71Z6*)、LOC_Os02g36190(*CYP71Z7*)、LOC_Os02g36070(*CYP76M8*)、LOC_Os04g48170(*CYP87A3*)、LOC_Os05g40384(*CYP714D1*)等。其中 *OsABA8ox3* 在高温胁迫下表达上调,*CYP71Z6*、*CYP71Z7*、*CYP76M8*、*CYP87A3*、*CYP714D1* 在高温胁迫下表达下调。热敏感水稻 4628 DEGs 显著富集在五肽重复,包括 LOC_Os09g24680(*PPRI*)、LOC_Os12g17080(*OGR1*)等。其中 *PPRI* 在高温胁迫下表达上调,*OGR1* 在高温胁迫下表达下调。品种 4628 显著富集于草酸盐代谢过程、草酸脱羧酶活性、锰离子结合、萌发素的相关基因在高温胁迫下特异上调,这些基因包括 LOC_Os08g08980(*GER1*)、LOC_Os08g08960(*GER3*)、LOC_Os01g18170(*GER4*)、LOC_Os08g35760(*GER5*)、LOC_Os08g09000(*GER6*)、LOC_Os03g58980(*GER7*)等。

3 结论与讨论

本研究中,通过对高温胁迫下 2 个水稻品种的转录组数据进行分析,发现耐热水稻品种 996 与热敏感水稻品种 4628 的 DEGs 均显著富集在一些基本的或者与胁迫密切相关的生物学过程、代谢途径以及蛋白结构域。苯丙烷代谢有多个分支,可产生包括木质素、类黄酮、木脂素、类苯丙酸酯、羟基肉桂酸酰胺和单宁的前体在内的代谢物^[6]。维管植物需要木质素为细胞壁提供机械支持,使得植物能够长得更高^[7]。研究^[8-9]发现,木质素有助于植物对各种非生物胁迫的响应;类黄酮可减少由非生物胁迫引起的 ROS 积累造成的氧化损伤^[10]。热休克蛋白(HSP)通常起分子伴侣的作用,根据其相对分子质量大小和序列同源性可分为 Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60 和小热休克蛋白 sHsp(如 Hsp40、Hsp20)。Hsp90 可能对非生物胁迫具有直接的保护能力,并在信号转导中发挥作用^[11-14]。Hsp70 蛋白可增强植物对热和其他非生物胁迫的耐受性^[15]。研究^[16]表明,线粒体 Hsp70 可通过调控 ROS 含量来抑制水稻原生质体中的细胞编程性死亡。植物中含量最多的一类热休克蛋白为小热休克蛋白(sHsp),它能防止热诱导的蛋白质聚集,防止蛋白的变性以及不可逆的沉淀,促进变性蛋白正确的重折叠^[17]。热休克蛋白表达的诱导是对非生物胁迫的最佳反应之一^[18-20]。四肽重复与水稻抗性有关^[21],且与伴

蛋白有特定的相互作用。有研究^[22]报道, *OsGLP* 基因的重复和 *OsGLP* 基因的启动子区 TFBs (transcription factor binding sites) 的后续变异可能是 *OsGLP* 基因及其启动子对水稻生物和非生物胁迫耐受性的新功能化的结果。

耐热型水稻 996 的 DEGs 显著富集在细胞色素 P450。 *OsABA8ox3* 基因在控制水稻脱落酸水平和非生物胁迫中起重要作用^[23]。本研究中, *OsABA8ox3* 在高温胁迫下表达上调, 说明其可能是提高水稻耐高温性的关键基因。 *CYP87A3* 蛋白可能是生长素对生长反应的负调控因子, 应用生长素可快速诱导 *CYP87A3* 的表达^[24]。本研究中, *CYP87A3* 在高温胁迫下表达下调, 说明其可能不利于水稻开花。 *CYP71Z6* 催化 ent-异贝壳杉烯的 C2-羟基化, *CYP71Z7* 催化 ent-卡萨二烯的 C2-羟基化^[25]。 *CYP76M8* 是一种多功能/混杂羟化酶, 可催化 ent-卡萨-12,15-二烯的 C11 位羟基化^[26]。 *CYP714D1* (也称 *EUI*) 编码细胞色素 P450 单加氧酶, 该酶作为赤霉素失活酶, 催化非 13-羟基化 GA 的 16 α 、17-环氧化^[27]。本研究中, *CYP71Z6*、*CYP71Z7*、*CYP76M8* 和 *CYP714D1* 在高温胁迫下表达下调, 说明它们可能在胁迫反应中起负调控作用。 *OsCYPs* 的启动子区域包含多种顺式作用元件, 其中非生物胁迫响应元件包括 ABRE(脱落酸响应元件)、TGACG-motif (MeJA 响应元件)、ERE(乙烯响应元件)、LTR(低温响应元件)、TATC/GARE(赤霉素响应元件)、TCA-Element(水杨酸响应元件)、MBS(干旱诱导响应元件)、TGA-Element(生长素响应元件)和 AuxRR-Core(生长素响应元件)等^[28]。推测耐热水稻 996 可能是因为细胞色素 P450 家族基因的差异表达提高了其耐热能力。

热敏感水稻 4628 的 DEGs 显著富集于五肽重复(PPR)。PPR 蛋白在植物发育过程以及非生物胁迫反应中发挥重要作用, 且 PPR 基因可能在水稻对环境胁迫的反应中发挥作用^[29]。 *PPR1* 保护 RNA 转录物免受核糖核酸酶降解^[30]。本研究中, *PPR1* 在高温胁迫下表达上调, 说明其可能在水稻非生物胁迫下发挥重要作用。水稻 *OGR1* 编码一种含有 DYW 基序的五肽重复蛋白^[31], 对线粒体中的 RNA 编辑至关重要。推测可能是 PPR 基因在水稻耐热性上发挥了特定作用, 可见 2 个品种的不同耐热性是由不

同基因的差异表达导致的。

参考文献:

- [1] 杨军, 章毅之, 贺浩华, 等. 水稻高温热害的研究现状与进展[J]. 应用生态学报, 2020, 31(8): 2817-2830.
- [2] PENG S B, HUANG J L, SHEEHY J E, et al. Rice yields decline with higher night temperature from global warming[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(27): 9971-9975.
- [3] 彭艳, 刘跃武, 刘伯涵, 等. 高温干旱胁迫下水稻花器官中敏感基因的筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(1): 13-21.
- [4] YAO D P, WU J, LUO Q H, et al. Influence of high natural field temperature during grain filling stage on the morphological structure and physicochemical properties of rice (*Oryza sativa* L.) starch[J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125817.
- [5] ZHANG C Q, ZHOU L H, ZHU Z B, et al. Characterization of grain quality and starch fine structure of two Japonica rice (*Oryza sativa*) cultivars with good sensory properties at different temperatures during the filling stage[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(20): 4048-4057.
- [6] GRAY J, CAPARRÓS-RUIZ D, GROTEWOLD E. Grass phenylpropanoids: regulate before using![J]. Plant Science, 2012, 184: 112-120.
- [7] ZHAO Q. Lignification: flexibility, biosynthesis and regulation[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(8): 713-721.
- [8] MOURA J C M S, BONINE C A V, DE OLIVEIRA FERNANDES VIANA J, et al. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2010, 52(4): 360-376.
- [9] CESARINO I. Structural features and regulation of lignin deposited upon biotic and abiotic stresses[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 209-214.
- [10] NAKABAYASHI R, SAITO K. Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2015, 24: 10-16.
- [11] YAMADA K, FUKAO Y, HAYASHI M, et al. Cytosolic HSP90 regulates the heat shock response that is responsible for heat acclimation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(52): 37794-37804.
- [12] SONG H M, ZHAO R M, FAN P X, et al. Overexpression of AtHsp90.2, AtHsp90.5 and AtHsp90.7 in *Arabidopsis thaliana* enhances plant sensitivity to salt and drought stresses[J]. Planta, 2009, 229(4): 955-964.

- [13] NISHIZAWA-YOKOI A, TAINAKA H, YOSHIDA E, et al. The 26S proteasome function and Hsp90 activity involved in the regulation of HsfA2 expression in response to oxidative stress[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(3): 486–496.
- [14] XU J Y, XUE C C, XUE D, et al. Overexpression of GmHsp90s, a heat shock protein 90 (Hsp90) gene family cloning from soybean, decrease damage of abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69810.
- [15] MONTERO-BARRIENTOS M, HERMOSA R, CARDOZA R E, et al. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases *Arabidopsis* resistance to heat and other abiotic stresses[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(8): 659–665.
- [16] QI Y C, WANG H J, ZOU Y, et al. Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice[J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(1): 231–239.
- [17] 周丽, 何非, 潘秋红, 等. 热休克蛋白在植物逆境反应中的作用[J]. *热带生物学报*, 2011, 2(4): 297–301.
- [18] JIANG L Y, HU W J, QIAN Y X, et al. Genome-wide identification, classification and expression analysis of the Hsf and Hsp70 gene families in maize[J]. *Gene*, 2021, 770: 145348.
- [19] SUN X B, ZHU J F, LI X, et al. AsHSP26. 8a, a creeping bentgrass small heat shock protein integrates different signaling pathways to modulate plant abiotic stress response[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 184.
- [20] UL HAQ S, KHAN A, ALI M, et al. Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(21): 5321.
- [21] YANG C, YU Y Q, HUANG J K, et al. Binding of the *Magnaporthe oryzae* chitinase MoChia1 by a rice tetratricopeptide repeat protein allows free chitin to trigger immune responses[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(1): 172–188.
- [22] DAS A, PRAMANIK K, SHARMA R, et al. In-silico study of biotic and abiotic stress-related transcription factor binding sites in the promoter regions of rice germin-like protein genes[J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0211887.
- [23] CAI S L, JIANG G B, YE N H, et al. A key ABA catabolic gene, OsABA8ox3, is involved in drought stress resistance in rice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116646.
- [24] CHABAN C, WALLER F, FURUYA M, et al. Auxin responsiveness of a novel cytochrome P450 in rice coleoptiles[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(4): 2000–2009.
- [25] WU Y S, HILLWIG M L, WANG Q, et al. Parsing a multifunctional biosynthetic gene cluster from rice: biochemical characterization of CYP71Z6 & 7[J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(21): 3446–3451.
- [26] YE Z F, YAMAZAKI K, MINODA H, et al. In planta functions of cytochrome P450 monooxygenase genes in the phytocassane biosynthetic gene cluster on rice chromosome 2[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2018, 82(6): 1021–1030.
- [27] ZHU Y Y, NOMURA T, XU Y H, et al. *ELONGATED UPPERMOST INTERNODE* encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(2): 442–456.
- [28] WASEEM M, HUANG F Y, WANG Q Y, et al. Identification, methylation profiling, and expression analysis of stress-responsive cytochrome P450 genes in rice under abiotic and phytohormones stresses[J]. *GM Crops & Food*, 2021, 12(1): 551–563.
- [29] CHEN G L, ZOU Y, HU J H, et al. Genome-wide analysis of the rice PPR gene family and their expression profiles under different stress treatments[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 720.
- [30] HICKS J L, LASSADI I, CARPENTER E F, et al. An essential pentatricopeptide repeat protein in the api complexan remnant chloroplast[J]. *Cellular Microbiology*, 2019, 21(12): e13108.
- [31] KIM S R, YANG J I, MOON S, et al. Rice OGR1 encodes a pentatricopeptide repeat-DYW protein and is essential for RNA editing in mitochondria[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2009, 59(5): 738–749.

责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳正