

干旱胁迫及复水处理对白菜型油菜生理指标和DNA甲基化水平的影响

古再丽努尔·穆萨¹, 马 骊², 张亚宏³, 刘丽君¹, 杨 刚¹, 王旺田²,
蒲媛媛¹, 孙万仓¹, 方 彦^{1,2}, 范婷婷¹, 武军艳¹

(¹甘肃农业大学农学院, 兰州 730070; ²甘肃省部共建干旱生境作物学国家重点实验室, 兰州 730070;

³天水市农业科学研究所, 甘肃天水 741001)

摘要: 为了解析干旱处理对白菜型油菜生理指标及DNA甲基化水平的影响, 本研究对白菜型油菜陇油7号进行正常供水(对照)、干旱胁迫、干旱后复水3个处理, 分析不同处理后油菜生理指标及DNA甲基化水平的变化。结果表明, 与正常供水相比, 当白菜型油菜受到干旱胁迫时, 丙二醛含量、超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性、过氧化氢酶活性均有所增加, 增加幅度分别为167.27%、254.85%、103.24%、164.64%, 渗透调节物质脯氨酸、可溶性蛋白增加量分别为: 3.21 μg/g、0.048 μg/mg, 叶片相对含水量显著下降, 下降幅度为53.64%。复水后各项生理指标得到部分恢复; 与正常供水相比, 干旱后油菜甲基化率呈上升趋势, 干旱后复水组甲基化率高于干旱和对照, 甲基化率达到20.56%。GO富集结果显示, 差异甲基化基因在生物学过程、核及分子功能等条目中富集。KEGG功能富集分析表明, 差异甲基化基因主要在泛素介导的蛋白水解、胞吞作用、ABC转运蛋白、光合生物中的碳固定等代谢相关通路中富集。甲基化率和生理指标之间存在一定的相关性, 结合GO和KEGG的富集结果, 发现有7个差异甲基化基因编码过氧化物酶。本研究结果将为调控油菜耐旱性机制的研究和耐旱新品种选育提供依据。

关键词: 白菜型油菜; 干旱胁迫; 复水; DNA甲基化; 全基因组重亚硫酸盐测序

Effects of Drought Stress and Rewatering Treatments on Physiological Indicators and DNA Methylation Levels in *B.rapa*

MUSA Guzailinuer¹, MA Li², ZHANG Yahong³, LIU Lijun¹, YANG Gang¹, WANG Wangtian²,
PU Yuanyuan¹, SUN Wancang¹, FANG Yan^{1,2}, FAN Tingting¹, WU Junyan¹

(¹Agronomy College of Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070; ²State Key Laboratory of Aridland Crop Science of Gansu Province and Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Lanzhou 730070; ³Tianshui Institute of Agricultural Sciences, Tianshui 741001, Gansu)

Abstract: To analyze the effects of drought treatments on physiological indexes and DNA methylation levels of *Brassica Rapa*, this study subjected oilseed rape Longyou 7 to three treatments, namely, normal water supply, drought stress, and rehydration after drought, followed by analyzing the physiological indexes and DNA methylation after treatments. In comparison to those under normal water supply treatment, the oilseed rape under drought stress exhibited 167.27%, 254.85%, 103.24%, and 164.64% of increase on malondialdehyde content, SOD, POD and CAT activities, respectively. Osmoregulatory substances Pro and SP were elevated up to 3.21 μg/g

收稿日期: 2024-01-12 网络出版日期: 2024-10-21

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240112001>

第一作者研究方向为作物遗传育种, E-mail: 327610533@qq.com

通信作者: 武军艳, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: wujuny@gsau.edu.cn

基金项目: 甘肃省高校产业支撑计划项目(2023CYZC-51); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-12); 国家重点研发计划专项(2022YFD1100500); 甘肃省科技计划项目(21JR7RA825)

Foundation projects: Gansu Province University Industry Support Plan Project (2023CYZC-51); Ministry of Finance and the Ministry of Agriculture and Rural Affairs National Modern Agricultural Industry Technology System Construction Special Fund (CARS-12); National Key R & D Program (2022YFD1100500); Science and Technology Project of Gansu Province (21JR7RA825)

and 0.048 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively; the relative water content of leaves decreased significantly by 53.64%. The physiological indexes decreased partially after rewatering. Compared with normal water supply treatment, the methylation level showed an increasing trend after drought, while the methylation rate after rewatering was even higher than that of drought and control, with the methylation rate reaching 20.56%. Through GO enrichment analysis, differentially methylated genes (DMGs) were enriched in biological processes, nucleus, and molecular functions. KEGG functional enrichment analysis showed that DMGs were mainly involved in the ubiquitin mediated protein hydrolysis, cytotoxicity, ABC transporter proteins, carbon fixation in photosynthetic organisms, and other metabolism-related pathways. A correlation between methylation rate and physiological indicators was observed, and through integration of both GO and KEGG enrichment results, seven DMGs were revealed encoding peroxidases. The results of this study will provide a basis for unrevealing the regulatory mechanism to drought stress in rapeseed and breeding for drought tolerant new varieties.

Key words: *Brassica rapa*; drought stress; rewatering; DNA methylation; WGBS

在全球气候变暖的背景下,干旱已成为导致全球作物产量和品质下降的重要环境因子^[1]。据国家统计局数据显示(<http://data.stats.gov.cn/>),2010年以来,我国农作物受自然灾害年平均面积达2576万公顷,其中旱灾面积达1112万公顷。作为甘肃省的第一大油料作物,油菜常年种植面积280万亩左右,其中冬油菜主要分布在甘肃省中部干旱、半干旱地区。为了不与主粮争地,油菜主要种植在山旱地,该区域是典型的雨养农业,冬春季干旱少雨,油菜在整个生育期最易受到干旱的影响^[2-3]。2021年,受旱情的影响,甘肃省油菜的秋播面积有所减少。因此,北方冬油菜在生长过程中,除了需要抵御低温外,还需应对干旱胁迫。

植物在受到干旱胁迫时,通过积累可溶性蛋白、脯氨酸等渗透调节物质,使渗透调节能力增强,同时产生多种抗氧化酶,有效消除过量的活性氧,减轻干旱胁迫对植物的影响,如超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化物酶(POD, peroxidase)和过氧化氢酶(CAT, catalase)等^[4-5]。

DNA甲基化作为植物适应的一种机制,参与基因组进化、基因表达调控、生长发育等生物过程及逆境胁迫(包括盐、干旱和重金属胁迫)响应等过程^[6-8]。甲基化调控涉及的机制非常复杂,在植物细胞中non-CG(CHH、CHG、H分别代表碱基A、C、T)甲基化存在的比例很高^[9-10],在启动子、基因内或基因间等区域中具有不同的功能^[11]。全基因组重亚硫酸盐测序(WGBS, whole genome bisulfite sequencing)具有高精度、高覆盖度等特点,常用于甲基化图谱研究。Sun等^[12]采用WGBS技术构建了西瓜的全基因组DNA甲基化谱;苏畅^[13]和Zilberman等^[14]利用该

测序技术分别构建了白桦和拟南芥基因组的DNA甲基化图谱。Wang等^[15]分析评估了两个水稻品种在干旱胁迫和随后恢复条件下的DNA甲基化变化模式。Li等^[16]构建了桑葚基因组的甲基化图谱,说明了桑葚甲基化状态对干旱胁迫的响应机制。

本研究以北方冬油菜主栽品种陇油7号(原编号18R-1)为试验材料,对其进行干旱胁迫及复水处理后测定各项生理生化指标,并通过WGBS技术对其叶组织进行全基因组DNA甲基化分析,比较不同处理下的生理生化指标变化及甲基化变化情况,研究结果将为调控油菜耐旱性机制的研究和耐旱新品种选育提供重要依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

材料为课题组前期试验(数据未发表)筛选获得的强耐旱品种陇油7号(原编号18R-1),其由甘肃农业大学育成。

1.2 试验方法

采用盆栽自然干旱胁迫试验。首先对种子进行发芽,再选取发芽正常、胚根长势一致且健康的种子,移栽至盆中,置于培养箱(25 $^{\circ}\text{C}/18$ $^{\circ}\text{C}$,光周期16 h/8 h)。幼苗正常生长至3~4叶期时,设置对照(正常浇水)、干旱处理7 d、干旱处理7 d后复水4 d三个处理,每个处理设置3组重复,每个重复3株。为消除生长发育过程的影响,3个处理都在同一时间点取样,采样后迅速放入-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.1 测定指标与方法 9份样品取样后立即采用烘干法^[17]测定叶片相对含水量;丙二醛(MDA,

malondialdehyde)、脯氨酸、可溶性蛋白、超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶的测定按照李合生等^[18]和张平等^[19]的方法进行。

1.2.2 WGBS 测序分析 对9份样品使用DNA提取试剂盒(QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit Qiagen, Dusseldorf, Germany)提取总DNA,进行片段打断、亚硫酸盐转化等处理构建文库,对质检合格后的文库进行HiSeq测序。测序由杭州联川生物技术有限公司完成。

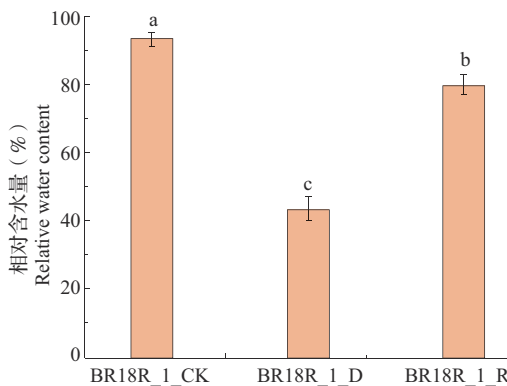
1.3 数据分析

使用Fast QC (<https://www.lc-bio.com>)验证测序数据的序列质量,通过质控的Reads与油菜的参考基因组序列(<http://brassicadb.cn/>)进行比对,评估甲基化水平;使用R包MethylKit分析差异甲基化区域,默认参数为1000 bp Windows, 500 bp Overlap, $P < 0.05$ 。随后对差异表达基因进行GO功能注释和KEGG富集分析;采用Excel 2022、Origin、SPSS statistics 25.0等软件进行基础分析与绘图、显著性分析等, $P < 0.05$ 表示处理间差异显著。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫及复水对油菜叶片生理生化指标的影响

2.1.1 干旱胁迫及复水对叶片含水量的影响 干旱胁迫7 d后,叶片相对含水量为43.49%,低于对照组,且达到了显著水平,下降幅度为53.64%;复水处理4 d后叶片相对含水量较干旱胁迫7 d的水平显著增高,表现出一定的恢复作用,但仍显著低于对照组(图1)。可见干旱胁迫对油菜生长造成的影响



不同小写字母表示不同处理之间存在显著差异($P < 0.05$); BR18R_1_CK: 对照组; BR18R_1_D: 干旱胁迫; BR18R_1_R: 干旱处理后复水; 下同
Different lowercase letters indicate that there are significant differences between different treatments ($P < 0.05$); BR18R_1_CK: Control group; BR18R_1_D: Drought stress; BR18R_1_R: Rehydration after drought treatment; The same as below

图1 干旱胁迫及复水对叶片相对含水量的影响

Fig. 1 Effects of drought stress and rewatering treatments on leaf relative water content

在复水处理后仍无法完全恢复。

2.1.2 干旱胁迫及复水对叶片MDA含量的影响

油菜叶片在干旱胁迫处理7 d后,与对照组相比,MDA含量显著增加(图2),增加幅度为167.27%,说明干旱胁迫使油菜膜的脂质过氧化程度加剧,造成油菜叶片的膜损伤和植物细胞的衰老。经复水后,MDA含量的增加幅度呈下降趋势,较干旱胁迫处理显著下降,下降幅度为88.66%,但仍显著高于对照组。

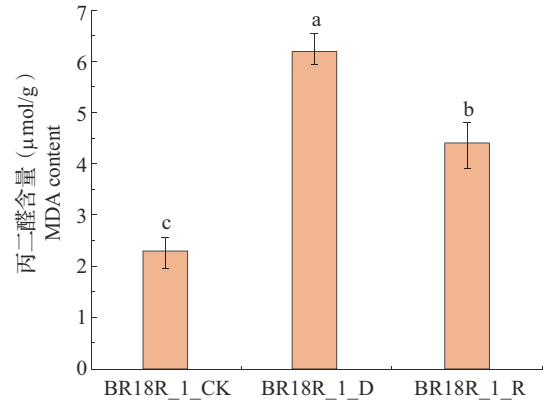


图2 干旱胁迫及复水对叶片丙二醛含量的影响

Fig. 2 Effects of drought stress and rewatering treatments on leaf MDA content

2.1.3 干旱胁迫及复水对叶片渗透调节物质含量的影响 干旱胁迫处理下的脯氨酸、可溶性蛋白含量呈上升趋势(图3),增加量分别为3.21 μg/g、0.048 μg/mg,与对照组差异达到显著水平。经复水4 d后,脯氨酸和可溶性蛋白含量显著下降,但仍显著高于对照组。说明复水后干旱得到缓解,但是油菜的生理生化水平并没有完全恢复。

2.1.4 干旱胁迫及复水对叶片抗氧化酶活性的影响 当受到干旱胁迫时,SOD活性增加,与对照组的差异达到显著水平,增幅为254.85%(图4A),POD活性与对照组相比显著增加(图4B),增幅达到了103.24%,CAT活性增加(图4C),增幅为164.64%,均显著高于对照组。复水7 d后SOD、POD、CAT活性均下降,较干旱处理下降幅度分别为102.71%、41.73%、60.77%,但仍显著高于对照组。说明SOD、POD、CAT三种酶的活性在干旱复水条件下的变化幅度均较大。

2.2 全基因组甲基化测序质控分析与样本相关性分析

为探究干旱、复水与对照的DNA甲基化模式差异,对9组样品进行测序,共得到1097413769个原始数据(Raw reads),902580654个有效测序数据(Clean reads),平均为12.82 Gb, Clean reads在Raw

reads 中的占比超过了 70%, GC 含量在 23.79%~25.32% 之间, Q20 平均为 94.23%, Q30 平均为 85.14%, 处理组和对照组的亚硫酸氢盐转化率均 >99%, 说明 WGBS 测序数据精确可靠, 可进行后续

分析(表1)。将有效测序数据比对到油菜参考基因组序列上, 共得到 902580654 个有效数据, 比对到参考基因组的唯一位置上的比率在 35.50%~37.15%, C 覆盖率平均值在 22.89%~25.32%(表2)。

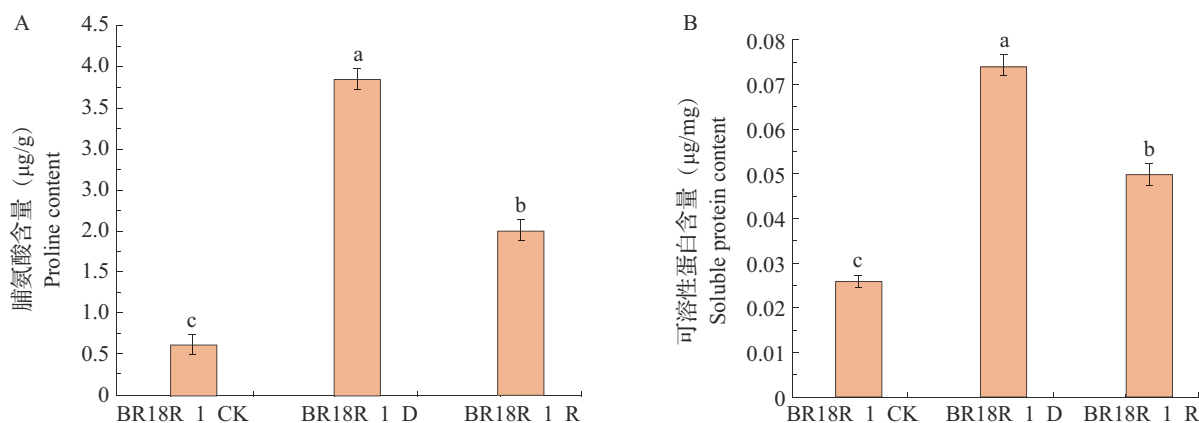


图3 干旱胁迫及复水对叶片渗透调节物质含量的影响

Fig 3 Effects of drought stress and rewatering treatments on leaf osmoregulation substances content

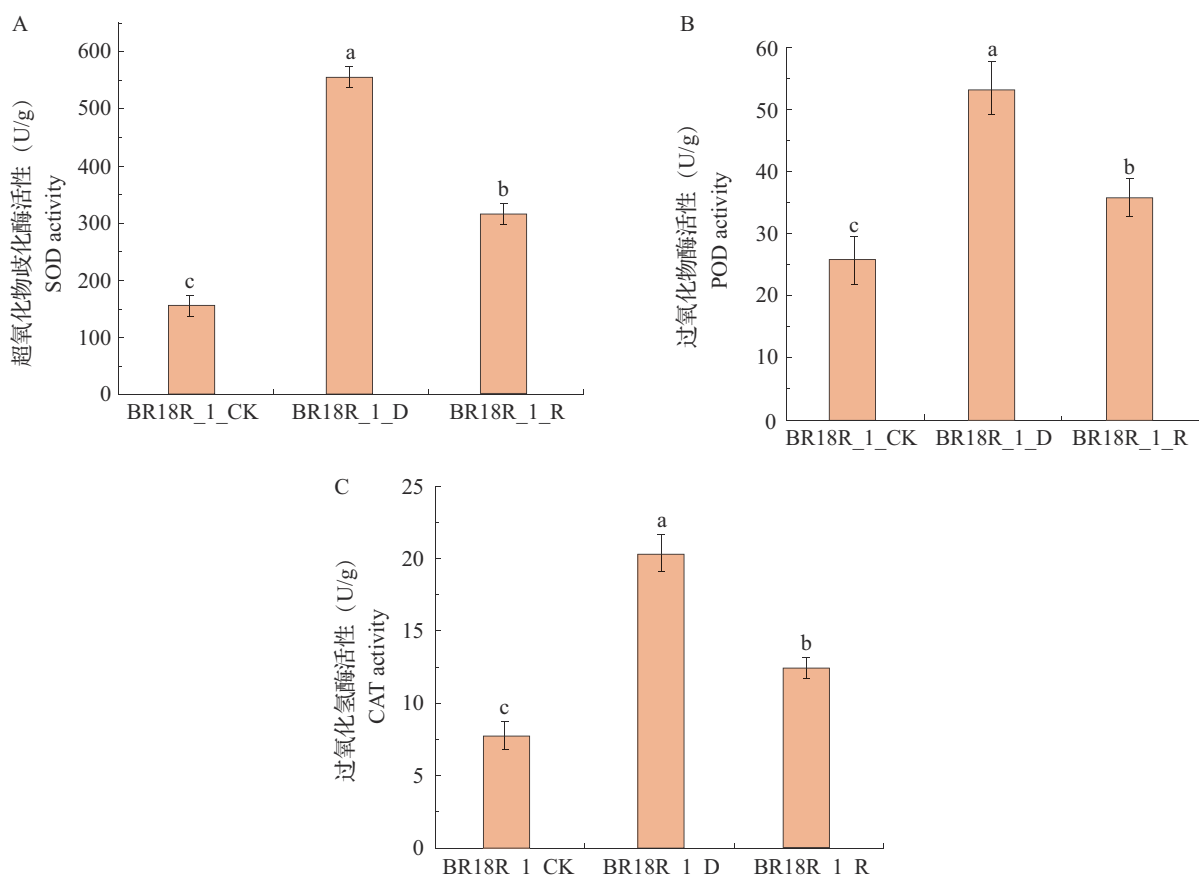


图4 干旱胁迫及复水对超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性的影响

Fig. 4 Effects of drought stress and rewatering treatments on SOD, POD, CAT activities

表1 测序数据质控统计

Table 1 Reads quality of all samples

样品 Sample	原始数据 Raw reads	有效数据 Clean reads	碱基(Gb) Base	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)	亚硫酸氢盐转化率(%) BS conversion rate
BR18R_1_CK1	112946807	98317642	12.46	94.20	84.98	24.19	99.768
BR18R_1_CK2	106744736	98896062	12.64	93.94	84.77	24.03	99.776
BR18R_1_CK3	108980006	100239398	12.88	94.31	85.44	24.52	99.778
BR18R_1_D1	123214322	98765230	12.62	94.26	85.25	25.32	99.784
BR18R_1_D2	113411472	103874514	13.29	94.49	85.64	24.54	99.786
BR18R_1_D3	118638258	101388646	12.94	94.14	84.93	24.67	99.790
BR18R_1_R1	150234644	99135772	12.72	94.32	85.36	24.19	99.794
BR18R_1_R2	134982930	102820838	13.11	94.24	84.92	23.79	99.797
BR18R_1_R3	128260594	99142552	12.72	94.17	84.99	24.25	99.801

1,2,3 分别代表3个生物学重复;下同

1, 2, and 3 respectively represent three biological replicates; The same as below

表2 Clean reads 比对到参考基因组结果统计

Table 2 Statistics result of clean data map to reference genome results

样品 Sample	总片段数 Total read pairs	唯一位置 比对片段数 Unique mapped reads	唯一位置 比对率(%) Unique reads mapping rate	重复片段比率 (%) Duplication rate	C覆盖的 平均数(%) Mean of C coverage	≥5×C覆盖 率(%) ≥5×C coverage	≥10×C 覆盖率(%) ≥10×C coverage	≥15×C 覆盖率(%) ≥15×C coverage
BR18R_1_CK1	98317642	36395012	37.02	7.14	22.89	6.96	2.55	1.37
BR18R_1_CK2	98896062	36738918	37.15	27.16	22.98	7.12	2.65	1.44
BR18R_1_CK3	100239398	36979881	36.89	7.17	23.14	7.24	2.71	1.48
BR18R_1_D1	98765230	35059528	35.50	6.02	24.91	8.47	2.65	1.32
BR18R_1_D2	103874514	37812209	36.40	6.28	25.32	9.2	2.95	1.47
BR18R_1_D3	101388646	36460258	35.96	6.11	25.10	8.82	2.80	1.39
BR18R_1_R1	99135772	35977022	36.29	5.53	24.94	8.71	2.92	1.55
BR18R_1_R2	102820838	37546167	36.52	5.72	25.07	9.01	3.06	1.62
BR18R_1_R3	99142552	36019234	36.33	5.51	24.91	8.69	2.93	1.55

对9个样本间的表达模式进行了皮尔逊相关性分析,9组样品相关系数均达到0.99以上,说明组内重复性较好,结果可靠(图5)。

2.3 染色体上CG、CHG和CHH平均甲基化水平统计与各处理C碱基中CG、CHG、CHH的分布情况

根据基因组比对分析结果,对测序深度≥5×的胞嘧啶(C)位点进行甲基化水平分析,分别统计了甲基化的CG、CHG和CHH在各染色体上出现的次数。统计发现9个样品有1431766857个胞嘧啶发生了DNA甲基化(表3)。对照组、干旱处理组、干旱后复水组的胞嘧啶(C)位点平均甲基化率(mC%)分别为17.18%、18.47%、20.56%,干旱胁迫后甲基化水平高于对照组,复水后胞嘧啶(C)位点甲基化水平高于干旱处理组和对照组。3个处理的CG平均

甲基化率达到了55.71%,CHG平均甲基化率达到了23.44%,CHH平均甲基化率最低且明显低于前两种类型,约为9.75%(表3)。

分析3组处理不同序列的甲基化比例,结果显示,mCG在染色体上出现频率最多(均值达到42.94%),其次为mCHH(均值达到39.01%),最少的为mCHG(均值达到18.04%)。其中,对照的CG类型甲基化平均占比为44.34%,高于干旱处理组(42.97%)和干旱后复水组(41.50%)。由此可见,与对照组相比,干旱和复水条件下的CG位点发生的甲基化水平呈下降趋势。干旱后复水组较干旱处理组与对照组的CHG位点甲基化水平呈现上升趋势。干旱处理组和干旱后复水组较对照组CHH位点的甲基化水平平均呈现上升趋势(图6)。

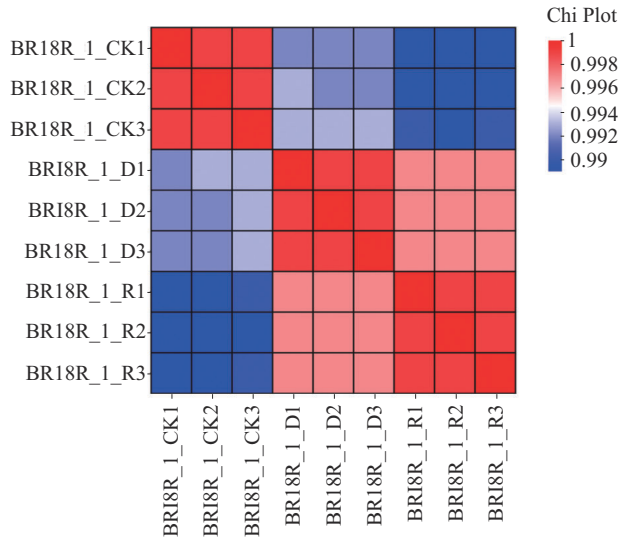


图5 样品间的 Pearson 相关性
Fig.5 Pearson correlation between samples

表3 3种序列类型甲基化C的数量及比例

Table 3 The amount and proportion of methylated C in the three sequence types

甲基化水平 Methylation level	BR18R_1_CK	BR18R_1_D	BR18R_1_R
总C Total C	2555799507	2715414441	2739005230
C 甲基化总数 Total mC number	409453608	477622134	544691115
CG 甲基化数 mCG number	181665285	194902729	210096513
CHG 甲基化数 mCHG number	73681289	81409784	92151519
CHH 甲基化数 mCHH number	154357034	177211621	204063083
CG 甲基化率(%) mCG rate	56.26	54.11	56.76
CHG 甲基化率(%) mCHG rate	22.96	22.48	24.89
CHH 甲基化率(%) mCHH rate	9.14	9.53	10.58
C 甲基化率(%) mC rate	17.18	18.47	20.56

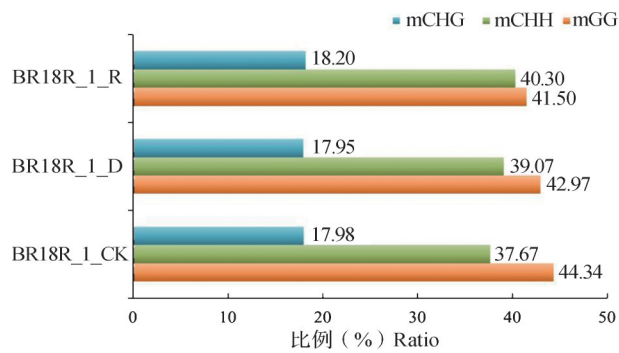


图6 不同处理中不同类型mC分布比例
Fig.6 Distribution ratio of different types of mC in different treatments

2.4 油菜全基因组差异甲基化区域统计

2.4.1 DNA 甲基化组的差异甲基化区域分析 根据差异甲基化区域在基因组上的位置,以及基因组的注释信息对差异甲基化区域分布进行注释,结果

如表4所示,其中位于基因间的差异甲基化区域数量占比最大,约为78%,这表明大部分的差异甲基化发生在基因间区。与对照组相比,干旱处理组发生高甲基化差异甲基化区域318207个,低甲基化差异甲基化区域225492个。与对照组相比,干旱后复水组发生高甲基化差异甲基化区域377930个,低甲基化差异甲基化区域213857个。与干旱后复水组相比,干旱处理组发生高甲基化差异甲基化区域329276个,低甲基化差异甲基化区域178786个。因此可看出干旱后复水组高甲基化差异甲基化区域较多,干旱处理组低甲基化差异甲基化区域较少,这表明一些差异甲基化区域因处理条件的不同而发生动态变化,干旱处理导致甲基化水平降低(表4)。3组比较组分别检测出543699个、591787个和508602个差异甲基化区域,将这些差异甲基化区域比对到油菜参考基因组,发现分别有19003个、19150个和16259个差异甲基化基因被覆盖。

表4 差异甲基化区域的分布分析

Table 4 Distribution analysis of DMR(differentially methylated regions)

对照组 Comparison group	基因组功能区 Genomic functional region	差异甲基化区域数 Number of DMRs	百分比(%) Percent	高甲基化差异 甲基化区域数 Number of hyper- methylated DMRs	低甲基化差异 甲基化区域数 Number of hypo- methylated DMRs
BR18R_1_D VS BR18R_1_CK	启动子	42852	2.61	23516	19336
	外显子	20162	1.23	10299	9863
	内含子	11316	0.69	5735	5581
	基因间	469369	28.56	278657	190712
BR18R_1_R VS BR18R_1_CK	启动子	45708	2.78	27613	18095
	外显子	21548	1.31	12064	9484
	内含子	12233	0.74	6774	5459
	基因间	512298	31.17	331479	180819
BR18R_1_R VS BR18R_1_D	启动子	118374	7.20	74960	43414
	外显子	57325	3.49	34430	22895
	内含子	36403	2.21	21486	14917
	基因间	295960	18.01	198400	97560

对照组为前者相对于后者

The comparison group is the former relative to the latter

2.4.2 差异甲基化基因的GO富集分析 GO富集结果(图7)显示,3组比较组中差异甲基化基因显著富集情况有部分相同,涉及生物学过程、细胞组分、分子功能3大类。生物学过程有25个条目,其中在生物学过程(Biologicat.process)富集的基因最多,其次分别为转录和DNA模板调控(Regulation of transcription, DNA-templated)、氧化还原过程(Oxidation-reduction process)、蛋白磷酸化(Protein phosphorylation)。细胞组分有15个条目,其中富集基因最多的是核(Nucleus),其次分别为质膜的组成成分(Integral component of membrane)、细胞质(Cytoplasm)、线粒体(Mitochondrion)、细胞质膜(Plasma membrane)。分子功能有10个条目,其中富集基因最多的是分子功能(Molecular_function),其次分别为ATP结合(ATP binding)、锌离子结合(Zinc ion binding)。将干旱处理组和干旱后复水组与对照组比对中发现,蛋白质去磷酸化(Protein dephosphorylation)显著富集,干旱后复水组与干旱处理组比对发现甲基化(Methylation)显著富集。研究表明,以上类型的通路在油菜响应干旱胁迫和复水过程中起着关键作用。

2.4.3 差异甲基化基因的KEGG通路富集分析 干旱处理组与对照组比对发现差异甲基化基因显著富集在二苯乙烯类,二芳基庚烷类和姜辣素的生物合成(Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis)、甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)、泛素介导的蛋白质降解(Ubiquitin mediated proteolysis)、胞吞作用(Endocytosis)等4个通路中,共涉及到1445个基因(图8A)。

干旱后复水组与对照组比对发现差异甲基化基因显著富集在氨基糖和核苷酸糖代谢(Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、吞噬体(Phagosome)、真核生物中的核糖体生物发生(Ribosome biogenesis in eukaryotes)、光合生物中的碳固定(Carbon fixation in photosynthetic organisms)等4个通路中,共涉及到1068个基因(图8B)。

干旱后复水组与干旱处理组比对发现差异甲基化基因显著富集在芥子油苷生物合成(Glucosinolate biosynthesis)、ABC转运蛋白(ABC transporters)、二萜类生物合成(Diterpenoid biosynthesis)、光合生物中的碳固定(Carbon fixation in photosynthetic organisms)等4个通路中,涉及到461个基因(图8C)。

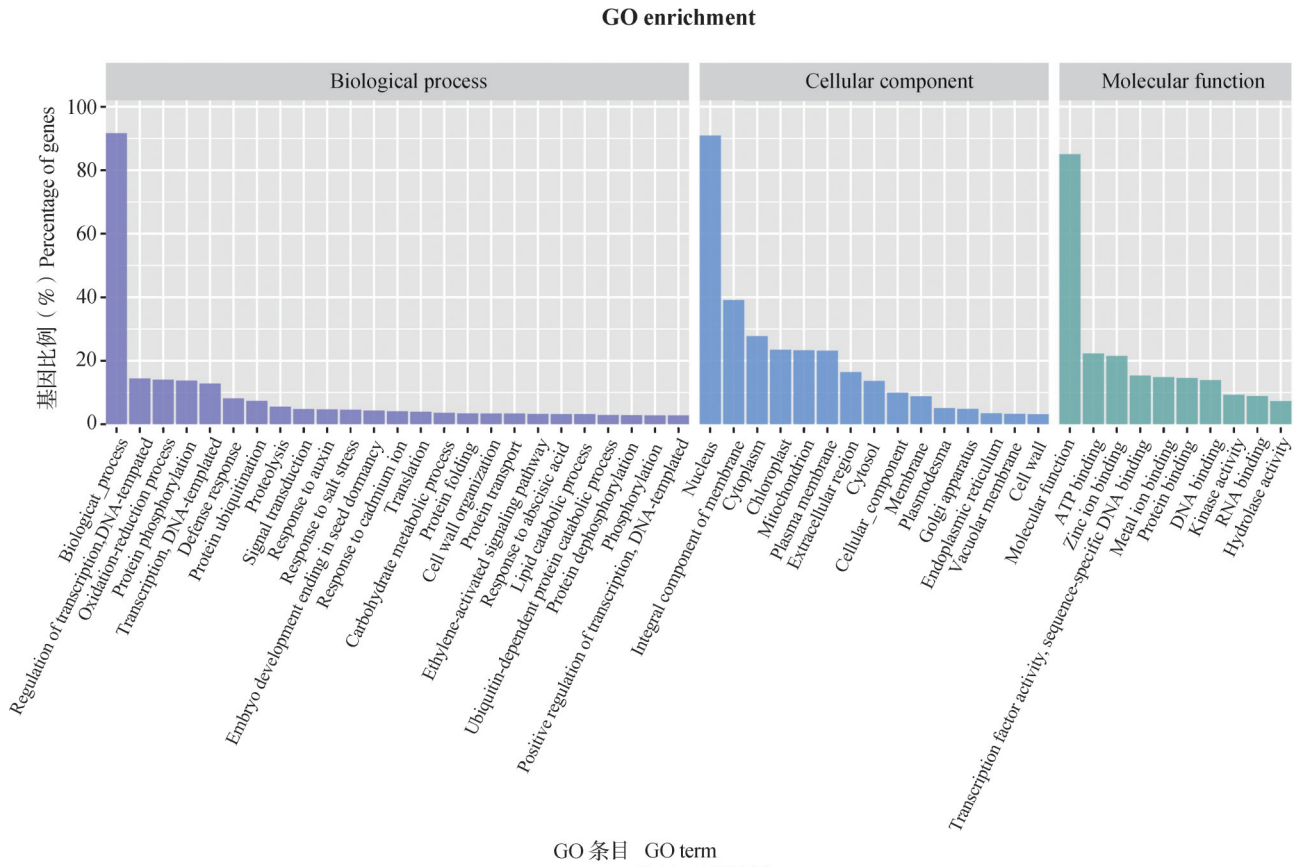
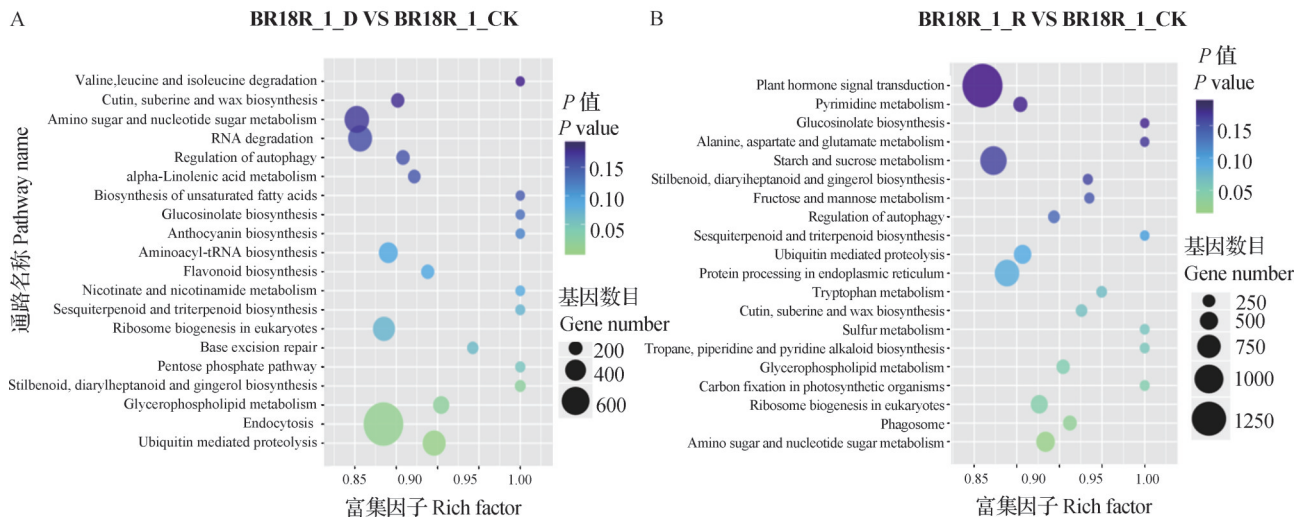


图7 差异甲基化基因的GO功能注释

Fig. 7 GO functional annotation of Differently methylated genes



(图8)

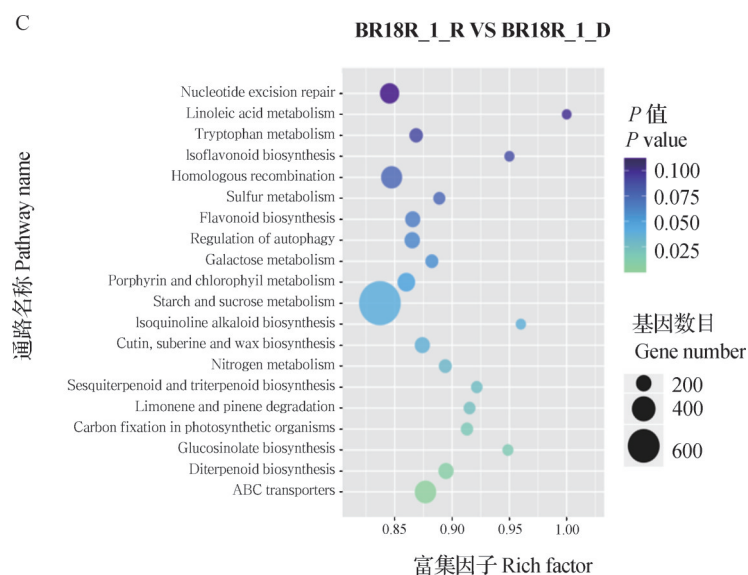
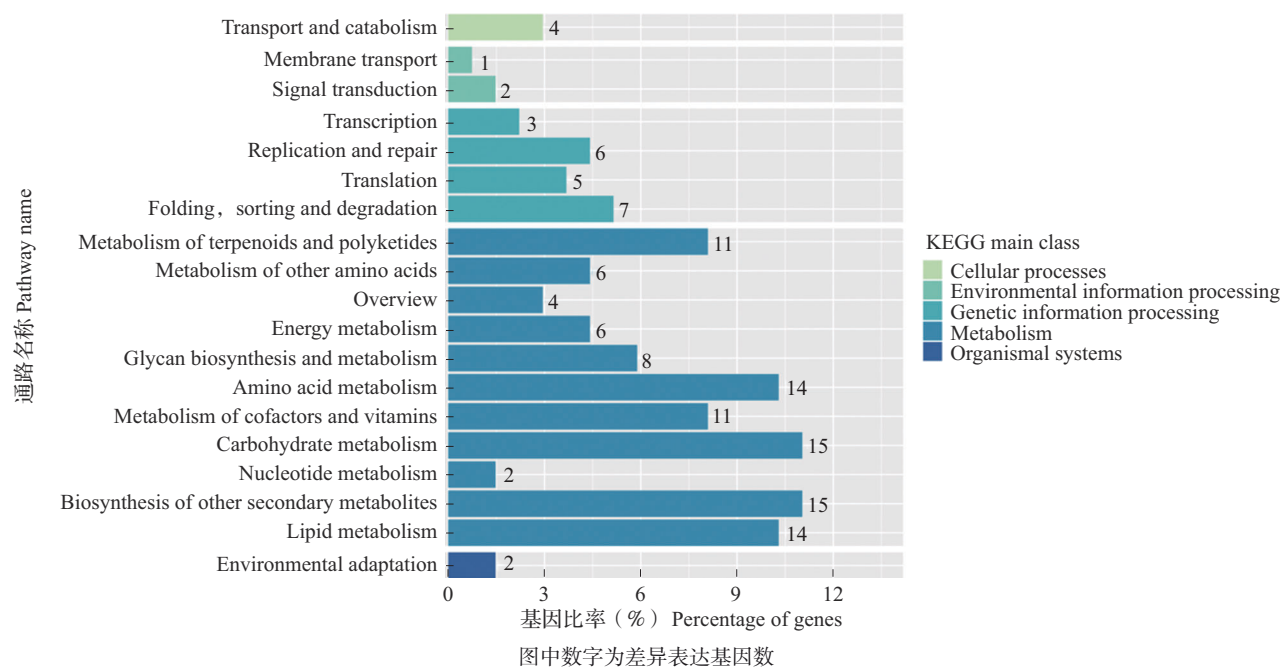


图8 3种处理下KEGG富集图

Fig. 8 KEGG enrichment diagram under three treatments

统计KEGG富集得到的通路及涉及到的差异甲基化基因(图9)。结果显示,3种处理下的通路富集情况大致相似,包括有机体系统(Organismal systems)、代谢(Metabolism)、遗传信息处理(Genetic information processing)、环境信息处理(Environmental information processing)、细胞过程(Cellular processes)等一级通路5大类,其中,主要通路为代谢过程,其次为遗传信息处理过程。将5类一级通路分为19类二级通路,代谢(Metabolism)分类下的通路及基因占比较大,其中其

他次级代谢产物的生物合成(Biosynthesis of other secondary metabolites)、碳水化合物代谢(Carbohydrate metabolism),均包含15个差异表达基因,氨基酸代谢(Amino acid metabolism)、脂质代谢(Lipid metabolism),均包含14个差异表达基因,萜类化合物和聚酮化合物的代谢(Metabolism of terpenoids and polyketides)和辅助因子和维生素的代谢(Metabolism of cofactors and vitamins),分别包含11个差异表达基因。以上富集结果表明各个通路相互协调响应干旱胁迫。



The numbers in the figure represent the number of differentially expressed genes

图9 KEGG富集通路统计

Fig. 9 Statistics of KEGG enrichment pathways

2.4.4 3种处理下的甲基化率与生理指标间的相关性分析 由图10可看出,过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶活性与甲基化率呈显著正相关,相关系数

分别为0.492、0.624、0.551;丙二醛、脯氨酸、可溶性蛋白含量与甲基化率呈正相关,但未达到显著水平;相对含水量与甲基化率呈负相关,相关系数为-0.111。

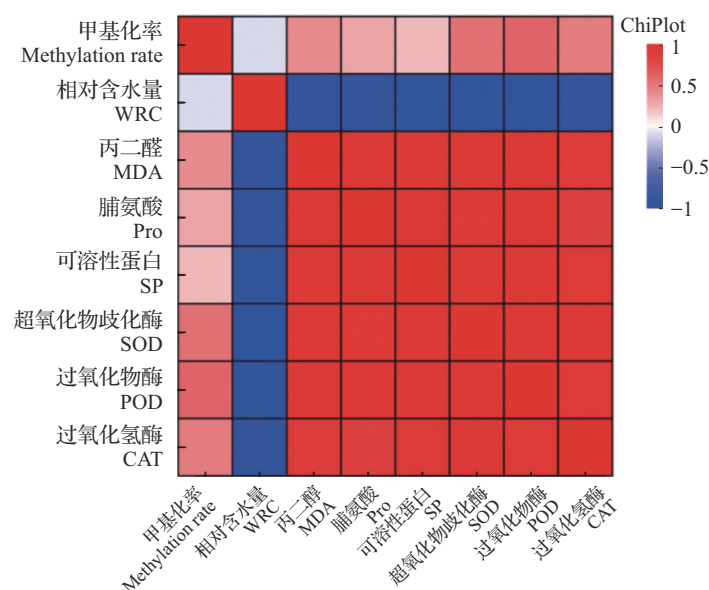


图10 3种处理下的甲基化率与生理指标间的相关性

Fig.10 The correlation between methylation rate and physiological indexes under three treatments

2.4.5 差异甲基化基因筛选 结合GO和KEGG的富集和BlastX比对的结果对筛选得到的基因进行功能注释分析,最终筛选得到14个在植物抗逆过程中发挥重要作用的基因,其中7个差异甲基化基因编码过氧化物酶(表5)。在干旱处理组和对照组比中共筛选到6个差异甲基化基因,其中2个基因表达下调,其余4个基因表达上调。干旱

后复水组和对照组比中筛选到6个基因,其中有1个基因表达下调,其余5个基因表达上调。干旱后复水组和干旱处理组比中筛选到2个基因,其中1个基因表达下调,另1个基因表达上调(图11)。其中编码水解酶超家族 α/β 水解酶的差异甲基化基因在干旱处理组和干旱后复水组中表达水平均比对照组高。

表5 差异甲基化基因功能预测

Table 5 Function prediction of differentially methylated genes

比对照组 Comparison group	比对照组基因ID Gene ID	功能 Gene function	参考文献 Reference
BR18R_1_R VS BR18R_1_D	BraA06g027600.3C	辣根过氧化物酶与过氧化氢解毒、生长素分解代谢和木质素生物合成以及逆境反应有关	[20-22]
	BraA07g024450.3C	过氧化物酶体生成因子11 (PEX11), 直接或间接参与调节细胞中过氧化物酶体数量	[23]
BR18R_1_D VS BR18R_1_CK	BraA09g007140.3C	B3 DNA结合域, 在植物发育过程中发挥重要作用的转录因子家族, 辅助AUX/IAA家族基因的转录被植物激素生长素迅速诱导生长素响应因子	[24-25]
	BraA07g037580.3C	水解酶超家族 α/β 水解酶, 参与调节植物对各种非生物胁迫的反应和适应	[25-26]
	BraA09g009710.3C	钙依赖蛋白激酶CDPK, 在植物信号传导及逆境胁迫响应过程中起重要作用	[26]
	BraA07g002430.3C	在拟南芥中发现BHLH-At BPE-like结构域, 来自拟南芥的几种bHLH转录因子, 如油菜素甾醇(BRs)是一种植物类固醇激素, 在植物生长发育以及胁迫响应等多个方面发挥着重要作用	[27-29]

表 5 (续)

比较组 Comparison group	比较组基因 ID Gene ID	功能 Gene function	参考文献 Reference
BR18R_1_D VS BR18R_1_CK	BraA07g025400.3C	脂氧合酶,参与调节生长发育、胁迫应答等过程	[30-31]
	BraA01g012680.3C	辣根过氧化物酶与过氧化氢解毒、生长素分解代谢和木质素生物合成以及应激反应有关	[20-21]
BR18R_1_R VS BR18R_1_CK	BraA02g008980.3C	B3 DNA 结合域,在植物发育过程中发挥重要作用的转录因子家族,辅助 AUX/IAA 家族基因的转录被植物激素生长素迅速诱导	[23]
	BraA10g020020.3C	草酸氧化酶,在植物信号传导和与植物生物胁迫、非生物胁迫的防御中发挥作用	[32-34]
	BraA07g029080.3C	草酸氧化酶,在植物信号传导和与植物生物胁迫、非生物胁迫的防御中发挥作用	[32-34]
	BraA06g011250.3C	ABC 转运蛋白 G 家族成员,参与植物气孔调节、次生代谢产物的运输和环境胁迫响应等过程	[35-36]
	BraA07g037580.3C	水解酶超家族 α/β 水解酶,参与调节植物对各种非生物胁迫的反应和适应	[24-25]
	BraA07g036960.3C	草酸氧化酶,在植物信号传导和与植物生物胁迫、非生物胁迫的防御中发挥作用	[32-34]

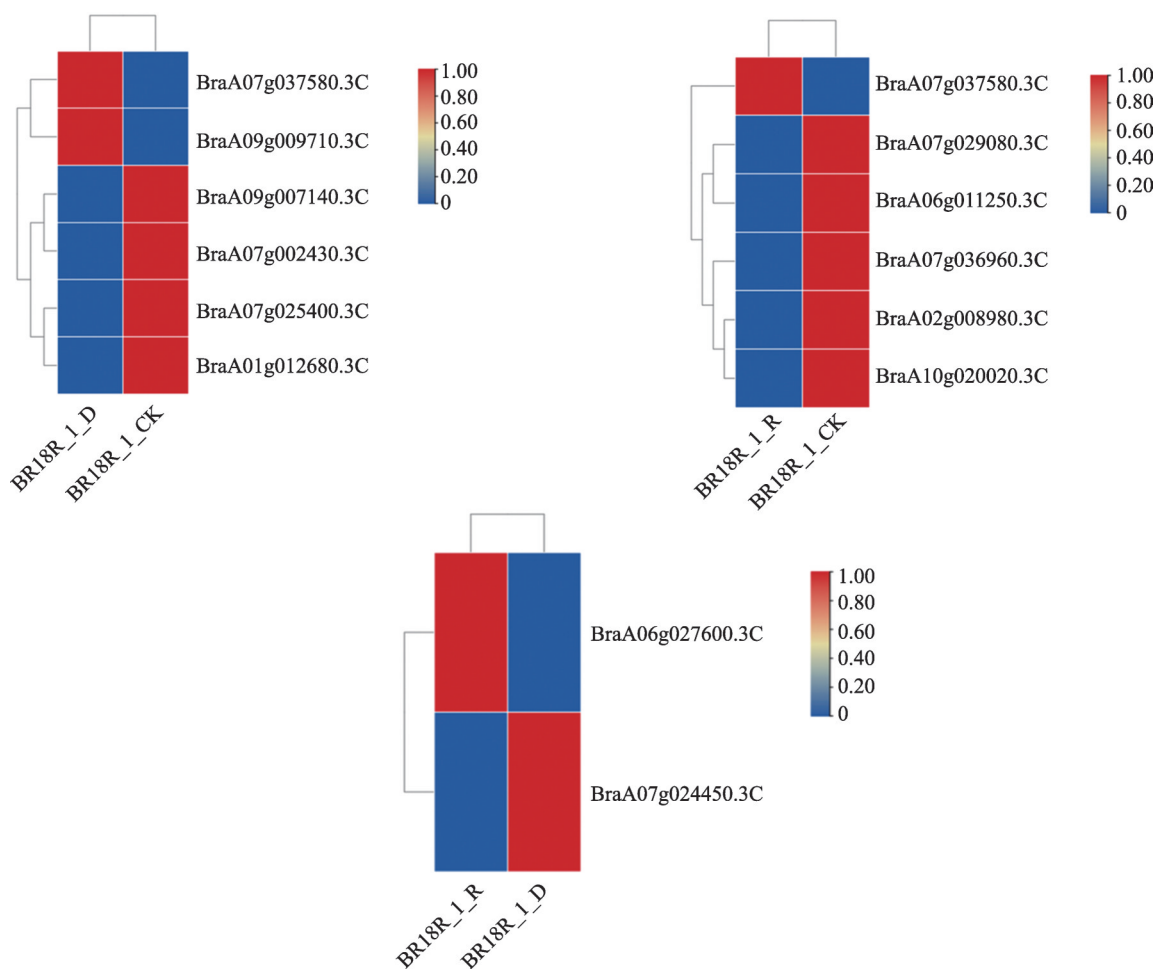


图 11 差异甲基化基因表达热图

Fig. 11 Differentially methylated gene expression heat map

3 讨论

植物在干旱胁迫复水过程中存在补偿效应^[37], 因此对干旱胁迫的耐受程度和胁迫解除后的恢复生长的能力体现了植物的抗旱性。刘素军^[38]对马铃薯进行干旱复水处理, 叶片相对含水量显著下降, 抗氧化酶活性及渗透调节物质含量均显著增加, 复水后叶片相对含水量迅速增加, 其余生理指标基本恢复到正常水平。周白云等^[39]研究发现干旱复水能使酸枣响应干旱胁迫的能力增强, 并且植物在复水后, 能够产生补偿机制, 减少植物因干旱遭受的伤害。本研究测定干旱复水条件下油菜的生理生化指标, 结果显示干旱胁迫后叶片相对含水量明显下降, 复水处理后叶片相对含水量有所恢复; 干旱胁迫下叶片内渗透调节物质及抗氧化酶活性均有所增加, 复水处理后有所恢复, 但与正常水平对比有明显差距, 这与刘素军^[38], 周白云等^[39]研究结果基本一致。因此, 植物通过提高渗透调节能力、减轻细胞损伤、减缓活性氧积累、诱导抗氧化系统等多种途径响应干旱胁迫。干旱胁迫对油菜造成的伤害在胁迫解除后可得到轻微缓解, 表现出一定耐旱性, 但不能完全恢复到正常状态。

植物通过调节DNA甲基化水平的动态变化, 在响应环境胁迫时能够有效控制特定基因的表达^[40-41], 从而增强其对环境胁迫的抵抗力, 保证其正常的生长发育^[42-43]。本研究利用WGBS技术对白菜型油菜在干旱和复水处理下的叶组织进行DNA甲基化分析, 统计发现CG的平均甲基化水平最高, 其次为CHG类型, CHH类型的甲基化率较前两种类型最低。可看出干旱处理的油菜甲基化水平在一定程度上有所上升, 复水处理后甲基化率高于干旱处理和对照, 这表明一些甲基化变化会随着处理条件改变而改变, 当胁迫解除时, 甲基化水平可能会提高, 说明植物在遭受某种胁迫时可以通过甲基化动态调整其基因表达模式以适应不断变化的环境条件。油菜基因组在CG和CHG位点下表现出相对较高的甲基化水平, 这种甲基化的改变可能是一种重要的表观遗传调控机制, 使油菜能够适应干旱及其他环境胁迫。

对3种处理下的甲基化率和生理指标进行相关性分析, 发现甲基化率和植物生理指标之间存在一定的关联性, 其中过氧化物酶活性和甲基化率呈显著相关。结合GO和KEGG的富集结果, 对筛选得到的基因进行功能注释分析, 得到7个编码过氧化

物酶的差异甲基化基因, 结果表明甲基化状态与植物生理功能和抗逆性之间存在密切关系; 还注释到B3DNA、BHLH转录因子和水解酶超家族 α/β 水解酶等转录因子, 结构域及水解酶, 这与前人研究结果一致^[20-34]。然而, 研究结果表明只是在DNA甲基化水平上呈现出差异性, 接下来还需将全基因组甲基化测序结果与转录和代谢组学数据进行联合分析, 筛选在多组学中都表现出差异的基因并对其进行功能验证, 以便于更全面了解基因的功能。

参考文献

- [1] 姚玉璧, 杨金虎, 肖国举, 赵鸿, 雷俊, 牛海洋, 张秀云. 气候变暖对马铃薯生长发育及产量影响研究进展与展望. 生态环境学报, 2017, 26(3): 538-554
Yao Y B, Yang J H, Xiao G J, Zhao H, Lei J, Niu H Y, Zhang X Y. Research progress and prospect of the effects of climate warming on potato growth and yield. Ecology and Environmental Sciences, 2017, 26(3): 538-554
- [2] 靳丰蔚, 董云, 王毅, 刘婷婷, 徐一涌. 甘肃省油菜种业发展现状与对策. 甘肃农业科技, 2022, 53(5): 15-19
Jin F W, Dong Y, Wang Y, Liu T T, Xu Y Y. Development status and countermeasures of rape seed industry in Gansu province. Gansu Agricultural Science and Technology, 2022, 53(5): 15-19
- [3] 朱维卓. 甘蓝型油菜苗期耐旱基因型差异及耐旱基因挖掘. 杭州: 浙江大学, 2022
Zhu W Z. Drought-tolerant genotype differences and drought-tolerant gene mining of *Brassica napus* at seedling stage. Hangzhou: Zhejiang University, 2022
- [4] Fang Y J, Xiong L Z. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(4): 673-689
- [5] Du H M, Wang Z L, Yu W J, Huang B R. Metabolic responses of hybrid bermudagrass to short-term and Long-term drought stress. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2012, 137(6): 411-420
- [6] Bossdorf O, Richards C L, Pigliucci M. Epigenetics for ecologists. Ecology Letters, 2008, 11: 106-115
- [7] Jablonka E, Raz G. Transgenerational epigenetic inheritance: Prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. Quarterly Review of Biology, 2009, 84: 131-176
- [8] 李青芝, 李成伟, 杨同文. DNA甲基化介导的植物逆境应答和胁迫记忆. 植物生理学报, 2014, 50(6): 725-734
Li Q Z, Li C W, Yang T W. DNA methylation-mediated plant stress response and stress memory. Plant Physiology Journal, 2014, 50(6): 725-734
- [9] Adam J B, Robert J S. Gene body DNA methylation in plants. Current Opinion in Plant Biology, 2017, 36: 103-110

- [10] Mirouze M, Paszkowski J. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14 (3):267-274
- [11] Chinnusamy V, Zhu J K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12 (2):133-139
- [12] Sun Y, Fan M, He Y. DNA methylation analysis of the *Citrullus lanatus* response to *Cucumber Greenmottle Mosaic Virus* infection by whole-genome bisulfite sequencing. *Genes*, 2019, 10(5):344
- [13] 苏畅. 基于白桦全基因组重亚硫酸盐测序 (bisulfite-sequencing) 的甲基化图谱分析. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015
- Su C. Methylation map analysis based on bisulfite-sequencing of the whole genome of *Betula platyphylla*. Harbin: Northeast Forestry University, 2015
- [14] Zilberman D, Gehring M, Tran R K, Ballinger T, Henikoff S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, 2007, 39(1):61-69
- [15] Wang W S, Pan Y J, Zhao X Q, Dwivedi D, Zhu L H, Ali J, Fu B Y, Li Z K. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62 (6):1951-1960
- [16] Li R X, Hu F, Li B, Zhang Y P, Chen M, Fan T, Wang T C. Whole genome bisulfite sequencing methylome analysis of mulberry (*Morus alba*) reveals epigenome modifications in response to drought stress. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1) : 8013
- [17] 谭占明, 张朋朋, 吴翠云, 高秋玲, 王建宇, 邓海燕. 干旱胁迫对两个杏品种的生长和生理指标的影响. *北方园艺*, 2020 (8):50-54
- Tan Z M, Zhang P P, Wu C Y, Gao Q L, Wang J Y, Deng H Y. Effects of drought stress on growth and physiological indicators of two *Apricot* varieties. *Northern Horticulture*, 2020 (8):50-54
- [18] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000:164-261
- Li H S, Sun Q, Zhao S J. Principle and technology of plant physiological and biochemical experiment. Beijing: Higher Education Press, 2000:164-261
- [19] 张平, 张慧, 刘俊娜, 环秀菊, 王倩朝, 李莉, 刘永江, 覃鹏. 干旱及复水处理对抗旱性不同小麦品种/系苗期生理生化指标的影响. *西北农业学报*, 2020, 29(12):1795-1802
- Zhang P, Zhang H, Liu J N, Huan X J, Wang Q C, Li L, Liu Y J, Qin P. Effects of drought and re-watering treatment on physiological and biochemical indexes of different drought-resistant wheat varieties/lines at seedling stage. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2020, 29 (12) : 1795-1802
- [20] 郭晓红. 柽柳过氧化物酶基因的序列分析及功能验证. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009
- Guo X H. Sequence analysis and functional verification of peroxidase gene in *Tamarix chinensis*. Harbin: Northeast Forestry University, 2009
- [21] 龙国辉, 武鹏雨, 付嘉智, 鹿宏丽, 张锐. 过氧化物酶调控木质素合成研究进展. *现代农业科技*, 2021 (23): 47-49, 54
- Luo G H, Wu P Y, Fu J Z, Lu H L, Zhang R. Research progress on peroxidase regulating lignin synthesis. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2021 (23): 47-49, 54
- [22] Deori N M, Nagotu S. Peroxisome biogenesis and inter-organelle communication: An indispensable role for Pex11 and Pex30 family proteins in yeast. *Current Genetics*, 2022, 68 (5-6):537-550
- [23] 蒋存钰, 申彦华, 王义. 生长素响应因子 ARF 研究进展. *分子植物育种*, 2022, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221215.1726.015.html>
- Jiang C Y, Shen Y H, Wang Y. Research progress of auxin response factor ARF. *Molecular Plant Breeding*, 2022, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221215.1726.015.html>
- [24] Dimitriou P S, Denesyuk A I, Nakayama T, Johnson M S, Denessiouk K. Distinctive structural motifs co-ordinate the catalytic nucleophile and the residues of the oxyanion hole in the alpha/beta-hydrolase fold enzymes. *Protein Science*, 2019, 28(2):344-364
- [25] Mindrebo J T, Nartey C M, Seto Y, Burkart M D, Noel J P. Unveiling the functional diversity of the alpha/beta hydrolase superfamily in the plant kingdom. *Current Opinion in Structural Biology*, 2016, 41:233-246
- [26] 陈果, 郝晓燕, 高升旗, 胡文冉, 赵准, 黄全生. 玉米钙依赖蛋白激酶全基因组鉴定及抗旱表达分析. *新疆农业科学*, 2023, 60(4):857-864
- Chen G, Hao X Y, Gao S Q, Hu W R, Zhao Z, Huang Q S. Genome-wide identification of maize calcium-dependent protein kinase and drought resistance expression analysis. *Xinjiang Agricultural Science*, 2023, 60(4):857-864
- [27] Anwar A, Liu Y, Dong R, Bai L, Yu X, Li Y. The physiological and molecular mechanism of brassinosteroid in response to stress: A review. *Biological Research*, 2018, 51(1):46
- [28] Nolan T M, Vukašinović N, Liu D, Russinova E, Yin Y. Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. *Plant Cell*, 2020, 32(2):295-318
- [29] 李根, 张然, 王雨藤. 油菜素甾醇调控植物生长发育及非生物胁迫的研究进展. *分子植物育种*, 2022, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20220129.1459.010.html>
- Li G, Zhang R, Wang Y T. Research progress on the regulation of plant growth and development and abiotic stress by brassinosteroids. *Molecular Plant Breeding*, 2022, <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20220129.1459.010.html>
- [30] 张乾翔. 谷子脂氧合酶基因家族响应干旱及盐胁迫的研究. 太原: 山西农业大学, 2022
- Zhang Q X. Study on the response of millet lipoxygenase gene family to drought and salt stress. Taiyuan: Shanxi Agricultural

- University, 2022
- [31] Babenko L M, Shcherbatiuk M M, Skaterna T D, Kosakivska I V. Lipoxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2017, 89 (1):5-21
- [32] Davidson M R, Reeves A P, Manosalva M P. Germins: A diverse protein family important for crop improvement. *Plant Science*, 2009, 177(6):499-510
- [33] 许青松, 赵佳, 魏运民, 韩蓉蓉, 刘卢生, 蒋曹德, 王永雄. 紫花苜蓿 *MsOXO* 基因的克隆及表达分析. *浙江农业学报*, 2019, 31 (1): 11-19
- Xu Q S, Zhao J, Wei Y M, Han R R, Liu L S, Jiang C D, Wang Y X. Cloning and expression analysis of *MsOXO* gene in alfalfa. *Zhejiang Agricultural Journal*, 2019, 31 (1): 11-19
- [34] 覃运琼. 草酸氧化酶在水稻不同亚细胞中的定向表达及其对草酸代谢影响研究. 广州: 华南农业大学, 2019
- Qin Y Q. The directional expression of oxalate oxidase in different subcellular cells of rice and its effect on oxalate metabolism. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019
- [35] Rea P A. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology*, 2007, 58: 347-375
- [36] 朱璐, 许杰, 张大兵. 拟南芥 ABC 转运类蛋白家族的分子进化、表达模式和蛋白功能网络预测分析. *植物生理学报*, 2012, 48(12): 1151-1166
- Zhu L, Xu J, Zhang D B. Molecular evolution, expression pattern and protein function network prediction of *Arabidopsis* ABC transporter family. *Plant Physiology*, 2012, 48 (12): 1151-1166
- [37] Dong S, Jiang Y, Dong Y, Wang L, Liu L. A study on soybean responses to drought stress and rehydration. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, 26(8):2006-2017
- [38] 刘素军. 马铃薯对不同生育时期水分胁迫及复水的生理和分子响应机制. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017
- Liu S J. Physiological and molecular response mechanism of potato to water stress and rehydration at different growth stages. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017
- [39] 周自云, 梁宗锁, 李硕, 来威峰. 干旱-复水对酸枣相对含水量、保护酶及光合特征的影响. *中国生态农业学报*, 2011, 19 (1):93-97
- Zhou Z Y, Liang Z S, Li S, Lai W F. Effect of water stress and re-watering on relative water content, protective enzyme and photosynthetic characteristics of wild jujube. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2011, 19(1):93-97
- [40] Liu J L, Dong X X, Zhao Z K, Sun H R, Yu L X. Analysis of sunflower DNA methylation in response to salt and alkali stresses based on methylation-sensitive amplified polymorphisms. *Current Plant Biology*, 2023, 34:100282
- [41] Patten M M. Epigenetics: Imprinting evolution in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 2016, 2(10):1-2
- [42] Bartels A, Han Q, Nair P, Stacey L, Gaynier H, Mosley M, Huang Q Q, Pearson J K, Hsieh T F, An Y Q C, Xiao W Y. Dynamic DNA methylation in plant growth and development. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7):2144
- [43] Nie W F. DNA methylation: from model plants to vegetable crops. *Biochemical Society Transactions*, 2021, 49 (3): 1479-1487