

锂离子束辐照小麦诱发DNA损伤 与特异基因调控网络解析

杜国锋^{1,2}, 谢永盾², 郭会君², 熊宏春², 古佳玉²,
赵林姝², 赵世荣², 丁玉萍², 隋丽³, 刘录祥²

(¹青岛农业大学农学院, 山东青岛 266109; ²中国农业科学院作物科学研究所 / 国家农作物基因资源与基因改良
重大科学工程 / 国家农作物航天诱变技术改良中心, 北京 100081; ³中国原子能科学研究院, 北京 102413)

摘要: 锂(⁷Li)离子束作为一种新型诱变剂在作物诱变育种中发挥着越来越重要的作用。本研究利用彗星电泳技术探索了⁷Li离子束辐照小麦诱导的DNA损伤特点,并结合转录组分析初步解析了特异基因表达调控网络。结果表明,与传统诱变因素伽马(γ)射线相比,⁷Li离子束辐照引起的小麦幼苗生长抑制程度低,幼苗叶脉失绿至开裂。对辐照诱导的差异表达基因进行GO和KEGG功能分析显示,⁷Li离子束辐照诱导的差异表达基因主要富集在细胞壁合成与代谢和甘油酯类代谢通路,而 γ 射线辐照诱导的差异表达基因主要富集在光合作用代谢通路中,推测细胞壁合成与代谢和甘油酯类代谢途径与响应⁷Li离子束辐照引起的损伤密切相关,而光合作用代谢途径与响应 γ 射线辐照引起的损伤密切相关。两种辐射诱导的差异表达基因的转录因子分析结果显示,⁷Li离子束辐照诱导的MYB、WRKY、bHLH和NAC等转录因子家族可能在响应⁷Li离子束辐照过程中具有重要作用,⁷Li离子束辐照特异诱导Whirly家族转录因子调控DNA损伤修复,而 γ 射线辐照诱导E2F/DP家族转录因子调控DNA损伤修复。

关键词: 小麦; 锂(⁷Li)离子束; 伽马射线(γ); DNA损伤; 转录组

Analysis of DNA Damage and Specific Gene Regulatory Network Induced by Lithium Ion Beam Irradiation in Wheat (*Triticum aestivum* L.)

DU Guofeng^{1,2}, XIE Yongdun², GUO Huijun², XIONG Hongchun², GU Jiayu²,
ZHAO Linshu², ZHAO Shirong², DING Yuping², SUI Li³, LIU Luxiang²

(¹College of Agriculture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/National Center of Space Mutagenesis for Crop Improvement, Beijing 100081; ³China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413)

Abstract: As a new mutagen, lithium (⁷Li) ion beam plays an increasingly important role in crop mutation breeding. In this study, the characteristics of wheat DNA damage induced by ⁷Li ion beam irradiation treatment were explored by comet assay, and the transcriptional re-programming was preliminarily analyzed by transcriptome analysis. The wheat seedlings showed lower growth inhibition of wheat seedlings caused by ⁷Li ion beam irradiation, but seedlings leaf vein chlorosis to cracking, if compared with those treated by the conventional mutagenic gamma ray (γ). Based on GO and KEGG functional analysis of differentially expressed genes (DEGs) induced by irradiation, DEGs induced by ⁷Li ion beam irradiation were mainly enriched in cell wall synthesis and metabolism and glycerolipid metabolic pathways, while DEGs induced by γ ray irradiation

收稿日期: 2023-03-29 修回日期: 2023-04-12 网络出版日期: 2023-04-28

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230329001>

第一作者研究方向为小麦诱发突变与生物技术育种研究, E-mail: duguofeng0305@163.com

通信作者: 刘录祥, 主要从事小麦诱发突变与生物技术育种研究, E-mail: liuluxiang@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1200705)

Foundation project: National Key Research and Development Program of China(2022YFD1200705)

were mainly enriched in photosynthetic metabolic pathways. That suggested that cell wall synthesis and metabolism and glycerolipid metabolic pathways are likely modulated by ^7Li ion beam irradiation, while photosynthetic metabolic pathways are likely modified by γ ray irradiation. Gained from the results of transcription factor analysis of two radiation-induced DEGs, several transcription factor families, such as MYB, WRKY, bHLH and NAC, might specifically respond to ^7Li ion beam irradiation. The results of this study implied that ^7Li ion beam irradiation specifically modify the transcriptional re-programming of Whirly family transcription factors to regulate DNA damage repair, while the conventional γ ray irradiation likely induced the E2F / DP family transcription factors to regulate DNA damage repair.

Key words: wheat; lithium(^7Li) ion beam; gamma ray (γ); DNA damage; transcriptome

作物诱发突变技术是利用X射线、 γ 射线、航天诱变和EMS等诱变因素诱发植物遗传物质产生突变,以创制新种质、选育新品种的有效技术^[1-2],在小麦(*Triticum aestivum* L.)^[3]、水稻(*Oryza sativa* L.)^[4]、大豆(*Glycine max*(L.) Merr.)^[5]等作物上已经得到了广泛的应用,取得了重要进展,其中 γ 射线是最广泛的诱变剂。近年来,高能重离子作为新型诱变剂引起了人们的关注。重离子束属于高线性能量转移(LET, linear energy transfer)辐射^[6],与X、 γ 射线等低线性能量转移辐射相比,能将大部分能量沉积在生物体内,使生物体产生损伤,具有突变率高、相对生物学效应高、损伤不易修复等特点^[7-9]。重离子束辐照能产生尖锐的Bragg峰,峰值处生物体受到的损伤较强,其他区域受到的影响相对较小,即重离子束辐照区域是局部的,所以能获得更多存活率较高的突变体^[10]。利用全基因组测序技术对 γ 射线和碳离子束诱变创制的水稻 M_5 代突变株系进行鉴定,发现碳离子比 γ 射线能诱发更多复杂的结构变异^[11]。10 Gy的碳离子束辐照水稻种子后,对水稻株高、根长和鲜重有刺激作用,但高于10 Gy剂量就会显著抑制地上部分生长^[12]。研究表明,利用25 Gy及以上剂量的 ^7Li 离子束辐照小麦种子后,小麦幼苗的苗高会显著降低^[13-14],并出现弯曲生长^[15]。离子束辐照还能对植物DNA造成直接和间接影响,诱导植物DNA发生单链断裂或双链断裂^[16]。 ^7Li 离子束辐照能在植物DNA周围产生活性氧(ROS, reactive oxygen species),进而引起植物产生更加复杂的DNA损伤^[17]。林敏等^[18]研究发现, ^7Li 离子束辐照后对DNA分子中的氢键能造成破坏;Stoilov等^[19]研究结果表明, ^7Li 离子束辐照会导致DNA链发生断裂。虽然已经有多项 ^7Li 离子束辐照诱发的DNA损伤效应研究,但DNA损伤修复的调控机制仍然不清楚。

本研究利用彗星电泳实验和转录组测序技术

分析 ^7Li 离子束与 γ 射线辐照诱发小麦DNA损伤和特异基因调控网络的差异。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究选用北京市审定的小麦品种航麦501(HM501)为材料,使用 ^7Li 离子束辐照2021年收获的HM501的干种子,根据以前的研究结果^[15],选择合适的辐照剂量,分别为0、30、50和75 Gy,每个处理的种子数为200粒,进行3次生物学重复。辐照后的小麦种子放置冰箱中低温保存。同时使用 γ 射线辐照2021年收获的HM501的干种子,根据以前的研究结果^[20],选择合适的辐照剂量,分别为0、100、150和200 Gy,每个处理的种子数为200粒,进行3次生物学重复。辐照后的小麦种子放置冰箱中低温保存。其中0 Gy ^7Li 离子束和 γ 射线辐照的小麦种子均为未辐照种子,在后续试验中设为同一个对照组。

1.2 试验方法

1.2.1 生长条件和生物损伤的分析 将经过 ^7Li 离子束和 γ 射线辐照的HM501种子用2% NaClO浸泡10 min消毒,后用蒸馏水清洗4~5次,将消毒后的种子放置培养皿中,加入少量蒸馏水浸泡1 d至露白。将露白的种子置于网状尼龙线的金属架上,保持种子表面与水接触,放置在200~300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 光照和21 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中生长7 d后,记录幼苗表型,分别测量20株幼苗的苗高和根长计算平均值,每个处理设置3次生物学重复。

1.2.2 彗星电泳实验 将生长7 d的小麦幼苗用刀片切碎后浸入5 mL新鲜制备的酶溶液中(包括1.5%(w/v)纤维素酶RS、0.75%(w/v)离析酶R10、0.6 mol/L甘露醇、10 mmol/L MES(pH=5.5)、10 mmol/L CaCl_2 、0.1% BSA、5 mmol/L β -巯基乙醇和50 mg/mL羧苄青霉素),酶解3 h制备原生质体。

使用彗星测定试剂盒 (Trevigen, 美国) 制作载玻片, 用 1:10000 稀释的 SYBR Green I 染色剂 (Sigma) 对载玻片进行染色后, 使用荧光显微镜对小麦 DNA 进行拍照。使用 CASP 彗星分析软件 (<http://www.casp.of.pl/>) 定量评估每个彗尾尾部 DNA 百分含量 (Tail DNA%), 每次处理分析 3 张图片, 每张图片包含 20 个彗星细胞。

1.2.3 转录组测序和分析 分别取对照、 ^7Li 离子束和 γ 射线辐照的种子生长 7 d 后的小麦幼苗地上部分, 用于 RNA 提取和 cDNA 文库构建, 命名为 CK、 $^7\text{Li}30$ 、 $^7\text{Li}50$ 、 $^7\text{Li}75$ 、 $\gamma 100$ 、 $\gamma 150$ 和 $\gamma 200$, 每个样品均设 3 次生物学重复。RNA 提取、cDNA 文库的构建、文库质控和测序由北京百迈客生物技术有限公司完成。测序的原始数据经过滤得到 Clean data, 利用 HISAT2^[21] 与小麦参考基因组 IWGSC RefSeq v2.1 (<http://www.wheatgenome.org>) 进行序列比对, 利用 StringTie^[22] 对与参考基因组对比上的读长 (Read) 进行组装和定量。以 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript Per Million Fragments mapped) 作为检

测基因表达水平的指标。采用 DEGseq2^[23] 软件分析样本间差异, 以 Fold Change ≥ 2 且 FDR < 0.01 为筛选标准。

1.2.4 数据分析 使用 GO (<http://www.geneontology.org/>) 和 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) 对差异表达基因进行富集分析; 采用 K-means 聚类共表达分析和转录因子分析方法对差异表达基因进行数据分析, 所有转录组数据分析均在百迈客转录组分析平台 (www.biocloud.net) 完成。

1.2.5 差异表达基因的 RT-qPCR 验证 随机选取 8 个差异表达基因进行荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证, 检验 RNA-seq 数据的可靠性, 引物序列见表 1。使用 All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 反转录试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司, 中国北京) 合成 cDNA。用 Green qPCR SuperMix 荧光定量试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司, 中国北京) 进行 RT-qPCR 实验。本研究选择 *Actin* 作为内参基因进行表达量归一化处理。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer of RT-qPCR

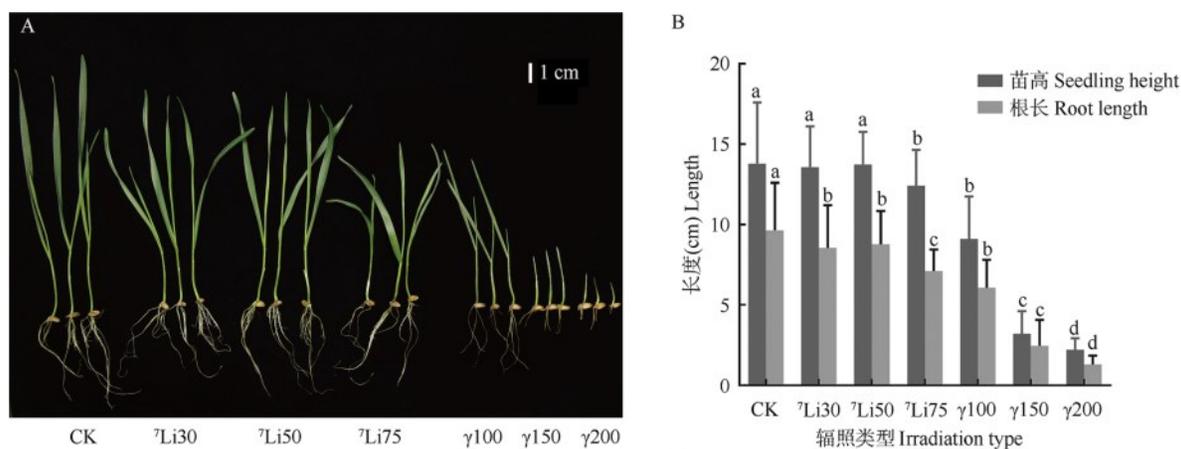
引物名称 Primer name	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
TraesCS1A03G0253000	GGGCACTGGGCTAGAGACTGC	CTGATTGCATTTGCTGCACAGG
TraesCS4D03G0025500	ATCACGCCGCAGTGCCCAA	CAGTTGTTGGCCGCCGACCCG
TraesCS4A03G0749800	ATCACGCCGCAGTGCCCCAG	GCAGTTGTTGGCCGCCGACCCT
TraesCS2B03G0698400	GTTGCTATTAAACCTCTGGAG	GATCTGAATTTTGTACCCCA
TraesCS2A03G0395300	AGTTCCAGTTCAGTACTCG	TGTAGAGGTGCTGTGGCAGC
TraesCS2B03G0852800	TCTGAGGAGCTGCTCGAACGT	ACAGCAGCTATATGGTCCGA
TraesCS2D03G1091000	ACATGTCGCACGAGCTCGAG	GCGCTCTCTTGCTCCTGCGCTG
TraesCS2B03G0179300	TGATCCGCTCCAAGTGGGTA	TGAAGCTGACGCATTGCACT
Actin	ATGGAAGCTGCTGGAATCCAT	CCTTGCTCATA CGGTCAGCAATAC

2 结果与分析

2.1 ^7Li 离子束与 γ 射线辐照对苗高和根长的抑制作用

幼苗生长 7 d 后, ^7Li 离子束辐照的幼苗在不同剂量下均出现叶脉失绿至开裂, 且出现部分卷叶 (图 1A), 但 30 Gy 和 50 Gy 辐照后的小麦的苗高没有显著变化, 根长分别下降了 11.41% 和 9.02%, 75 Gy 辐照后的小麦苗高和根长分别下降了 10.14%

和 26.42% (图 1B)。 γ 射线辐照的 HM501 幼苗出现了显著的生长抑制效应 (图 1A), 与对照相比, 100 Gy 辐照后的小麦苗高和根长分别下降了 34.06% 和 37.20%, 150 Gy 辐照后的小麦苗高和根长分别下降了 76.81% 和 74.61%, 200 Gy 辐照后的小麦苗高和根长分别下降了 89.23% 和 86.74% (图 1B)。结果表明, ^7Li 离子束辐照后对小麦幼苗的生长抑制效应较 γ 射线低。



A: ⁷Li 离子束与 γ 射线辐照后的小麦种子生长 7 d 后的幼苗照片; B: ⁷Li 离子束与 γ 射线辐照后的小麦种子生长 7 d 后幼苗苗高和根长; CK 为对照, ⁷Li30、⁷Li50 和 ⁷Li75 分别为 30、50 和 75 Gy ⁷Li 离子束辐照后的小麦材料, γ100、γ150 和 γ200 分别为 100、150 和 200 Gy γ 射线辐照后的小麦材料, 下同; 不同小写字母表示在不同处理间在 $P < 0.05$ 水平差异显著, 下同

A: The seedling photographs of 7-day-seedlings germinated from ⁷Li ion beam and γ ray irradiated wheat seeds; B: The seedling height and root length of 7-day-seedlings germinated from ⁷Li ion beam and γ ray irradiated wheat seeds; CK was the control, ⁷Li30, ⁷Li50 and ⁷Li75 were wheat materials irradiated by 30, 50 and 75 Gy ⁷Li ion beams, respectively, γ100, γ150 and γ200 were wheat materials irradiated by 100, 150 and 200 Gy γ rays, respectively, the same as below; Different lowercase letters indicate significant differences between different treatment at $P < 0.05$ level, the same as below

图 1 ⁷Li 离子束与 γ 射线辐照后小麦幼苗的损伤效应

Fig.1 The damage effects of ⁷Li ion beam and γ ray on wheat seedlings

2.2 ⁷Li 离子束与 γ 射线辐照诱导的 DNA 损伤

彗星电泳结果显示, 不同剂量的 ⁷Li 离子束和 γ 射线照射后, 小麦的 DNA 均发生了不同程度的损伤 (图 2)。为了阐明两种辐照诱发的小麦 DNA 损伤程度, 对尾部 DNA 百分含量进行分析 (图 3)。⁷Li 离子束辐照后, 尾部 DNA 百分含量随着剂量增加而显著上升, 均值从 3.17% (对照组) 上升到 26.39% (50 Gy 辐照), 75 Gy ⁷Li 离子束辐照引起的尾部 DNA 百分含量与 50 Gy ⁷Li 离子束辐照维持在相似水平 (图 3)。 γ 射线辐照后, 尾部 DNA 百分含量随剂量增加而显著上升, 均值从 3.17% (对照组) 升至 36.95% (150 Gy 辐照), 200 Gy γ 射线辐照引起的尾部 DNA 百分含量与 150 Gy γ 射线辐照维持在相似水平 (图 3)。

2.3 ⁷Li 离子束与 γ 射线辐照诱导的差异表达基因分析

为了解析 ⁷Li 离子束与 γ 射线辐照的分子特征

和响应机制的异同, 对辐照后的幼苗进行了转录组数据分析。测序数据经过质量控制后, 共获得 230.13 Gb 的 Clean data, 各样品 Clean data 均达到 10.96 Gb, Q30 碱基百分比在 94.21% 以上。将 Clean reads 与参考基因组序列进行对比, 各样品的比对效率在 92.64%~95.44%, 生物学重复相关性均在 0.821 以上 (图 4), 表明本研究的转录组测序质量和样品重复性良好。以 $\text{Fold Change} \geq 2$ 且 $\text{FDR} < 0.01$ 为筛选标准, 鉴定不同样品间的差异表达基因。如图 5 所示, 与对照相比, 30 Gy、50 Gy 和 75 Gy ⁷Li 离子束辐照后, 分别鉴定出 8819、6436 和 2502 个差异表达基因, 其中包含 632 个共同的差异表达基因 (图 5B); 100 Gy、150 Gy 和 200 Gy γ 射线辐照后, 分别鉴定出 9819、25215 和 26795 个差异表达基因, 其中包含 6684 个共同的差异表达基因 (图 5C)。共有 272 个差异表达基因受两种辐照共同诱导 (图 5D)。

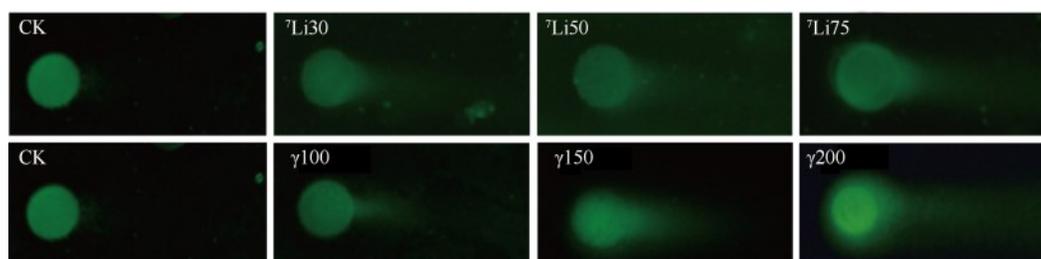


图 2 不同剂量 ⁷Li 离子束与 γ 射线辐照后小麦幼苗细胞核彗星电泳实验图片

Fig.2 Comet assay images of nuclei of wheat seedling from different doses of ⁷Li ion beam and γ ray irradiated seed

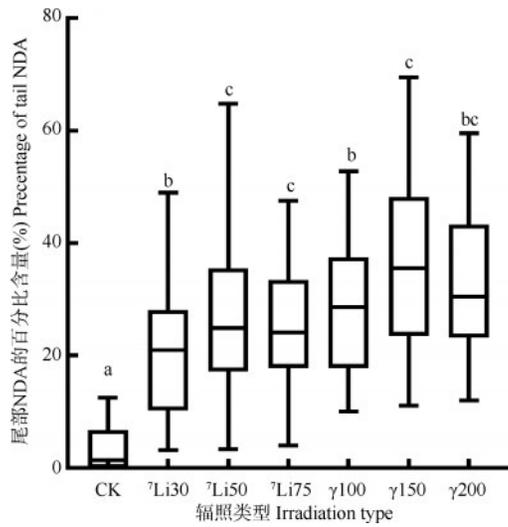
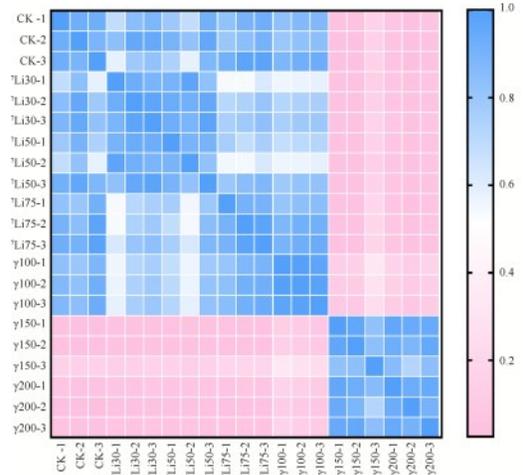
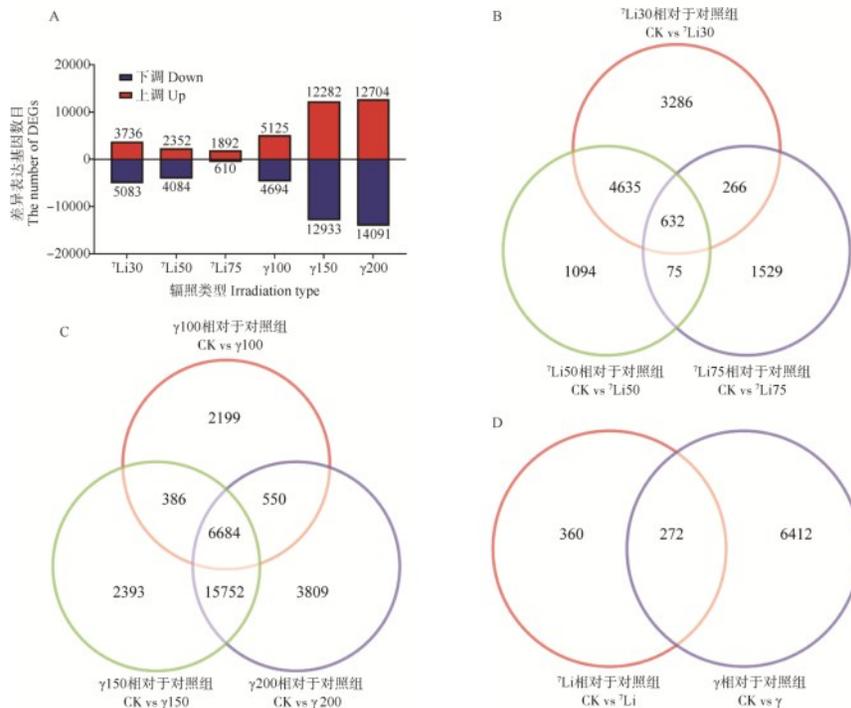


图3 ⁷Li离子束与γ射线辐照后小麦幼苗DNA的彗星电泳分析结果
 Fig.3 Results of the comet assay analysis on wheat seedling from ⁷Li ion beam and γ ray irradiated seed



1, 2, 3 表示不同处理的 3 次生物学重复
 1, 2, 3 are three biological replicates in different treatments
 图4 样品间表达量相关性热图
 Fig.4 Correlation heatmap between samples



A: ⁷Li离子束与γ射线辐照后诱导的上调和下调差异表达基因的数量; B: 不同剂量的⁷Li离子束辐照后诱导的差异表达基因的韦恩图; C: 不同剂量的γ射线辐照后诱导的差异表达基因的韦恩图; D: ⁷Li离子束与γ射线辐照后诱导的差异表达基因的韦恩图; 韦恩图中数字代表不同比较组中差异表达基因的个数, 重叠部分中的数字代表不同比较组中共同差异表达基因的个数
 A: A summary of the numbers of up- and down-regulated DEGs under ⁷Li ion beam and γ ray irradiation treatment; B: Venn map of differentially expressed genes under different doses of ⁷Li ion beam irradiation treatment; C: Venn map of differentially expressed genes under different doses of γ ray irradiation treatment; D: Venn map of differentially expressed genes between ⁷Li ion beam and γ ray irradiation treatment; The numbers in the Venn map represent the number of differentially expressed genes in different comparison groups, and the numbers in the overlapping part represent the number of common differentially expressed genes in different comparison groups

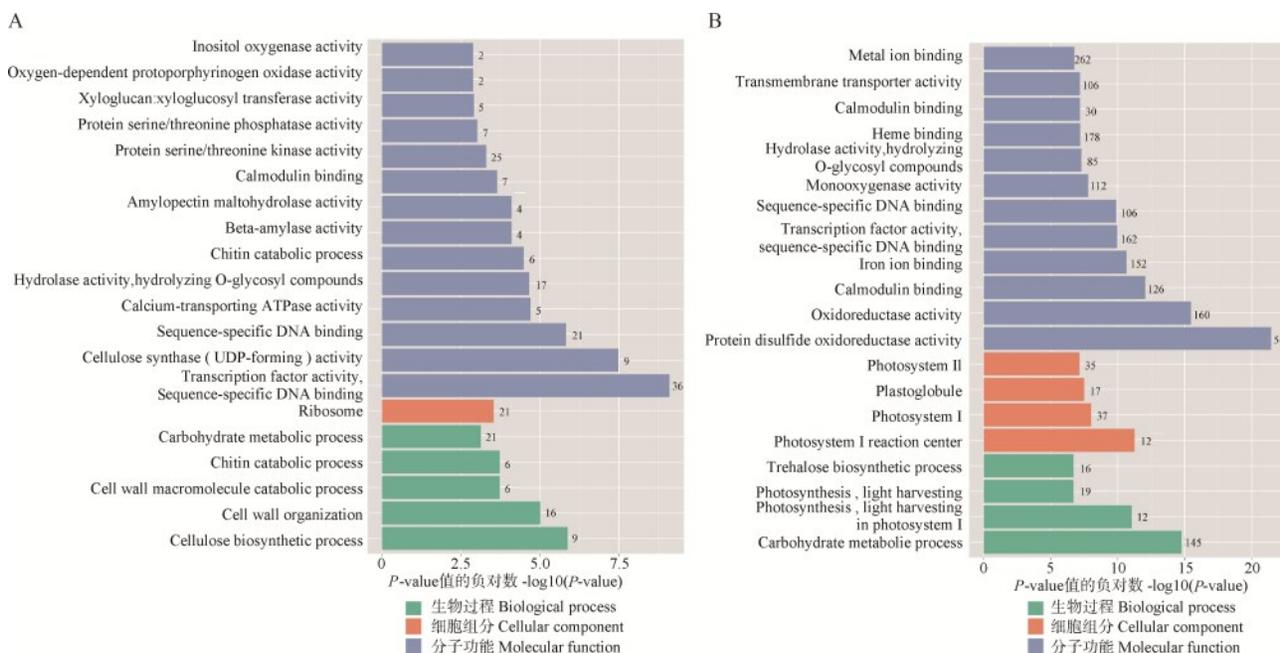
图5 ⁷Li离子束与γ射线辐照后诱导的差异表达基因
 Fig.5 Summary of the DEGs under ⁷Li ion beam and γ ray irradiation treatment

2.4 差异表达基因功能分析

为了进一步解析差异表达基因的功能,进行了GO和KEGG富集分析。GO分析结果显示,⁷Li离子束和 γ 射线分别富集注释出64和333个条目。⁷Li离子束和 γ 射线辐照后,GO富集的前20个条目具有显著差异(图6)。⁷Li离子束辐射诱导的生物过程(BP, biological process)相关的差异表达基因富集较为显著的3个GO条目分别是纤维素生物合成过程(Cellulose biosynthetic process)、细胞壁组织(Cell wall organization)和细胞壁大分子分解代谢过程(Cell wall macromolecule catabolic process);细胞组分(CC, cellular component)相关的差异表达基因富集较为显著的GO条目是核糖体(Ribosome);分子功能(MF, molecular function)相关的差异表达基因富集较为显著的3个GO条目分别是转录因子活性(Transcription factor activity)、序列特异性DNA结合(Sequence-specific DNA binding)和纤维素合成酶(UDP形成)活性(Cellulose synthase (UDP-forming) activity)(图6A)。 γ 射线辐射诱导的生物过程相关的差异表达基因富集较为显著的3个GO条目分别是碳水化合物代谢过程(Carbohydrate metabolic process)、光系统I中的光捕获(Photosynthesis, light harvesting in photosystem I)和光合系统的光捕获(Photosynthesis, light harvesting);细胞组分相关的差

异表达基因富集较为显著的3个GO条目分别是光系统I反应中心(Photosystem I reaction center)、光系统I(Photosystem I)和质体球(Plastoglobule);分子功能相关的差异表达基因富集较为显著的3个GO条目分别是:蛋白质二硫化物氧化还原酶活性(Protein disulfide oxidoreductase activity)、氧化还原酶(Oxidoreductase activity)和钙离子结合(Calcium ion binding)(图6B)。

KEGG通路富集结果表明,⁷Li离子束和 γ 射线辐照后,分别诱导5条和26条信号通路,均涉及淀粉和蔗糖代谢(Starch and sucrose metabolism)通路(图7)。⁷Li离子束辐照后,特异诱导甘油脂类代谢(Glycerolipid metabolism)、氨基糖和核苷酸糖代谢(Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、柠檬烯和蒎烯降解(Limonene and pinene degradation)和植物-病原菌互作(Plant-pathogen interaction)4条通路(图7A)。 γ 射线辐照后,特异诱导光合作用-天线蛋白(Photosynthesis- antenna proteins)、光合生物碳固定(Carbon fixation in photosynthetic organisms)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(Alanine, aspartate and glutamate metabolism)、维生素B6代谢(Vitamin B6 metabolism)、硫代谢(Sulfur metabolism)和磷脂酰肌醇信号系统(Phosphatidylinositol signaling system)等25条通路(图7B)。结果



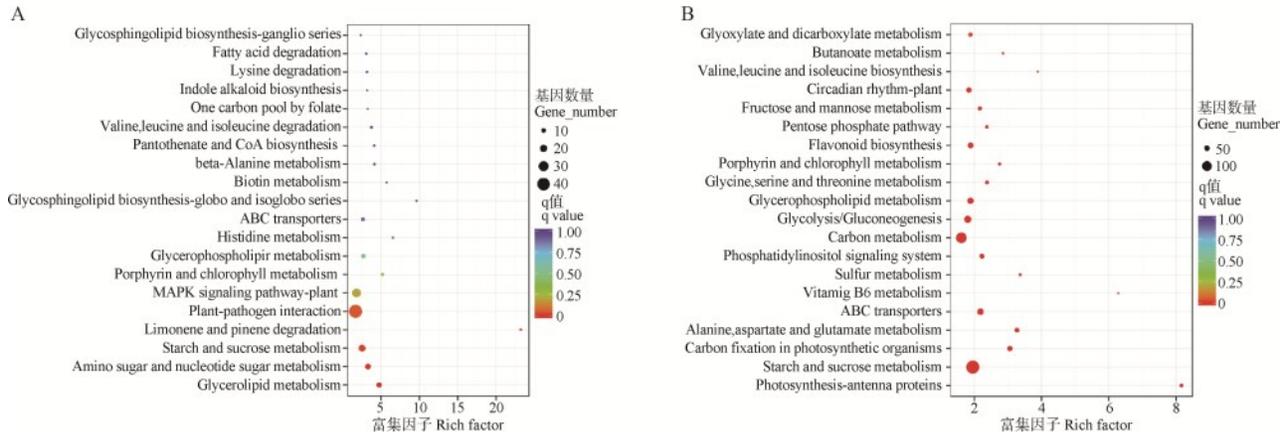
A: ⁷Li离子束辐照后的差异表达基因GO分析; B: γ 射线辐照后的差异表达基因GO分析; 图中数字代表该GO条目中差异表达基因个数

A: GO enrichment analysis of the DEGs under ⁷Li ion beam irradiation treatment; B: GO enrichment of the DEGs under γ ray irradiation

treatment; The numbers in the figure represent the number of DEGs in this term

图6 差异表达基因的GO富集

Fig.6 GO enrichment analysis of the DEGs



A: ⁷Li 离子束辐照后的差异表达基因 KEGG 分析; B: γ 射线辐照后的差异表达基因 KEGG 分析

A: KEGG enrichment analysis of the DEGs under ⁷Li ion beam irradiation treatment;

B: KEGG enrichment analysis of the DEGs under γ ray irradiation treatment

图 7 差异表达基因的 KEGG 富集

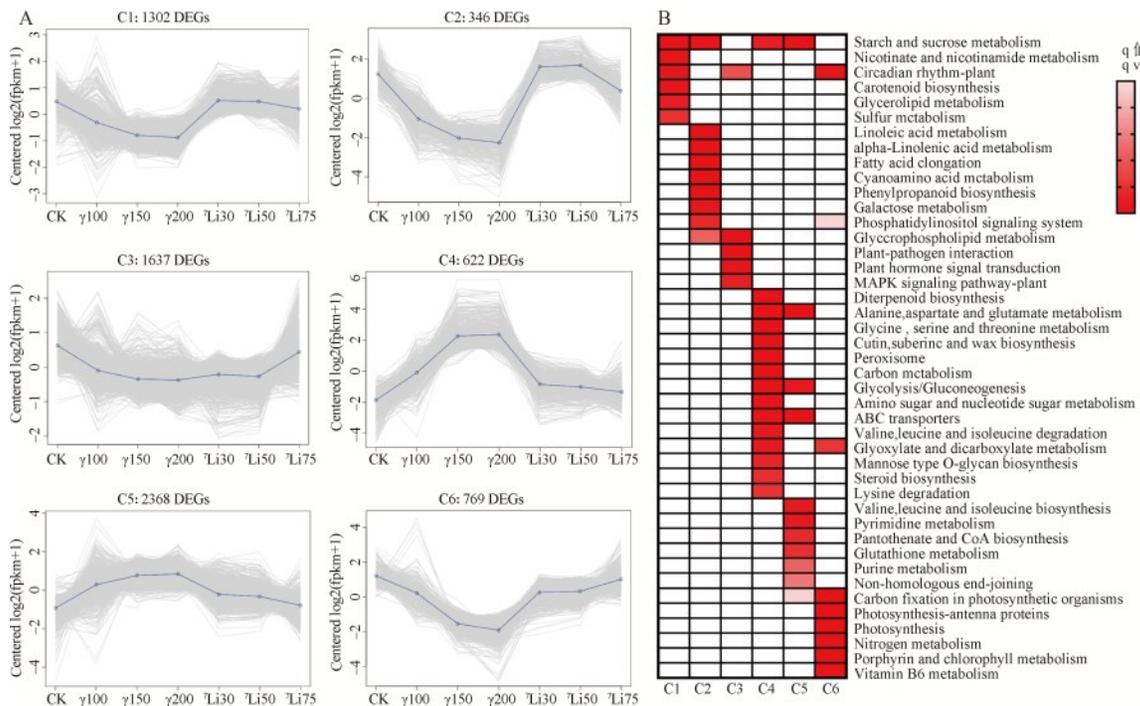
Fig.7 KEGG enrichment analysis of the DEGs

表明,⁷Li 离子束和 γ 射线辐照诱导的基因表达网络具有显著差异。

2.5 ⁷Li 离子束与 γ 射线辐照诱导的基因表达模式差异

将 ⁷Li 离子束与 γ 射线辐照诱导的差异表达基因进行 K-means 聚类共表达分析(图 8A), 结果表明, 可以将其中 7044 个基因分类为 6 种聚类模式。

与对照组相比, 聚类模式 C1、C2 和 C6 中的基因在 ⁷Li 离子束辐照后表达水平与对照相当或略有降低, 而 γ 射线辐照后表达量显著下调; 聚类模式 C4 和 C5 中的基因在 ⁷Li 离子束辐照后的表达水平与对照相当或略有升高, 而 γ 射线辐照后表达量显著上调; 聚类模式 C3 中的基因在 ⁷Li 离子束和 γ 射线辐照后表达量都低于对照组, 且两种辐照后的表达水



A: 差异表达基因的 6 个聚类 (C1 ~ C6), 名称后数字代表该聚类包含差异表达基因数目; B: 不同聚类的差异表达基因的 KEGG 富集通路

A: The six clusters (C1 to C6) for DEGs, the number after the name represents the number of differentially expressed genes in the cluster;

B: Enrichment pathways of the DEGs in different clusters, referring to the KEGG database

图 8 ⁷Li 离子束与 γ 射线诱导的差异表达基因的聚类分析

Fig.8 Clustering analysis of DEGs under ⁷Li ion beam and γ ray irradiation treatment

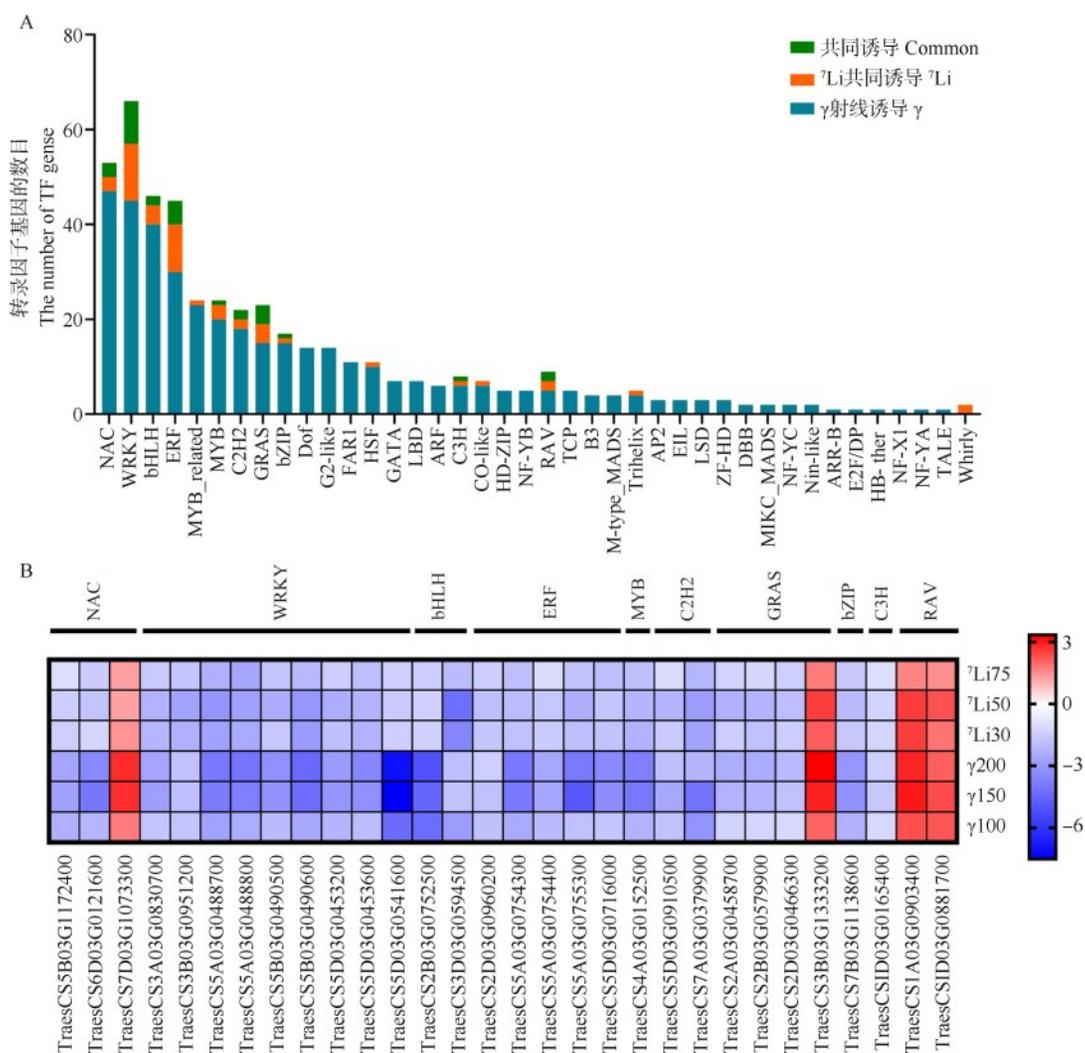
平相似(图8A)。

将上述6个聚类模式包含的基因进行KEGG分析,结果表明,聚类模式C1、C2和C6包含的基因主要涉及淀粉和蔗糖代谢(Starch and sucrose metabolism)、昼夜节律-植物(Circadian rhythm-plant)、光合生物固碳(Carbon fixation in photosynthetic organisms)、磷脂酰肌醇信号系统(Phosphatidylinositol signaling system)、光合作用-天线蛋白(Photosynthesis - antenna proteins)和光合作用(Photosynthesis)等通路。聚类模式C4和C5包含的基因则主要涉及二萜生物合成(Diterpenoid biosynthesis)、丙氨酸,天冬氨酸和谷氨酸代谢(Alanine, aspartate and glutamate metabolism)、糖酵解/糖异生(Glycolysis/Gluconeogenesis)、ABC转运蛋白(ABC transporters)和过氧化物酶体(Peroxisome)

等通路。而聚类模式C3包含的基因主要涉及昼夜节律-植物(Circadian rhythm - plant)、甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)、植物病原相互作用(Plant-pathogen interaction)、植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)、MAPK信号通路-植物(MAPK signaling pathway-plant)(图8B)。结果表明,在光合作用相关途径中, ^7Li 离子束辐照对小麦幼苗的抑制作用较 γ 射线低。

2.6 ^7Li 离子束与 γ 射线辐照诱导的差异转录因子分析

^7Li 离子束辐照诱导15个转录因子(TF)家族中的48个TF编码基因, γ 射线辐照诱导39个TF家族中的392个TF编码基因(图9A)。两种辐照条件均能诱导10个TF家族中的30个TF编码基因,包括



A: ^7Li 离子束和 γ 射线诱导的差异表达基因中TF编码基因的数量和分类;B:共同诱导的TF编码基因的表达量热图

A: Number and classification of TF genes among the ^7Li ion and γ ray beam irradiation induced DEGs;

B: Heat map constructed based on \log_2 (fold change) of common TFs

图9 ^7Li 离子束和 γ 射线诱导的差异表达基因中TF编码基因的分布

Fig.9 Distributions of TF genes among the ^7Li ion and γ ray beam irradiation induced DEGs

NAC(3个)、WRKY(9个)、bHLH(2个)、GRAS(4个)、RAV(2个)、ERF(5个)、C2H2(2个)、MYB(1个)、bZIP(1个)和C3H(1个)。其中,除1个NAC家族TF编码基因、1个GRAS家族TF编码基因和2个RAV家族TF编码基因在⁷Li离子束和 γ 射线辐照后表达水平上调外,其他TF编码基因都在⁷Li离子束和 γ 射线辐照后表达水平下调(图9B)。⁷Li离子束辐照特异诱导的Whirly TF家族中的2个基因,主要功能为DNA损伤修复^[24]。 γ 射线辐照特异诱导Dof(14个)、G2-like(14个)、FAR1(11个)、GATA(7个)、LBD(7个)、ARF(6个)、HD-ZIP(5个)、NF-YB(5个)和E2F/DP(1个)等24个TF家族中的108个基因,其中E2F/DP家族的基因功能主要为DNA损伤修复^[25](图9A)。结果表明,⁷Li离子束能特异诱导Whirly转录因子调控DNA损伤修复。

2.7 差异表达基因验证

为了验证转录组数据的可靠性,随机选取RNA-seq结果中8个具有不同表达水平基因进行RT-qPCR的验证。结果表明,RNA-seq与RT-qPCR基因表达趋势一致(图10),证明了转录组数据的可靠性。

3 讨论

高能重离子束与传统诱变剂 γ 射线辐照诱导具有不同的突变谱^[17]。利用⁴He、¹²C、⁴⁰Ar等重离子束对植物进行辐照研究发现,重离子辐照植物能产生显著的生物效应^[26]。近年来,⁷Li离子束作为一种新型诱变剂进行诱变效应研究发现,其对植物生长发育有抑制效应^[14]。本研究结果显示,⁷Li离子束辐照后,小麦幼苗叶片呈现叶脉失绿至开裂,出现卷叶,仅在75 Gy出现抑制效应。然而, γ 射线辐照小麦后幼苗的苗高和根长均受到显著抑制,且随着辐射剂量增加抑制越显著。结果表明,⁷Li离子束辐照对小麦幼苗生长的抑制效应程度比 γ 射线低,但幼苗均出现叶脉失绿至开裂。⁷Li离子束作为新型诱变剂可能诱发与 γ 射线不同的突变效应。

电离辐射可以直接和间接影响植物细胞活性^[27],通过植物细胞内水分解产生活性氧攻击DNA^[28],导致DNA损伤^[29]。DNA损伤可以影响M₁代幼苗的生长发育,甚至诱发死亡或不育现象,同时也是使遗传物质产生突变的关键因素^[30]。本研究表明,⁷Li离子束与 γ 射线辐照均对小麦DNA造成

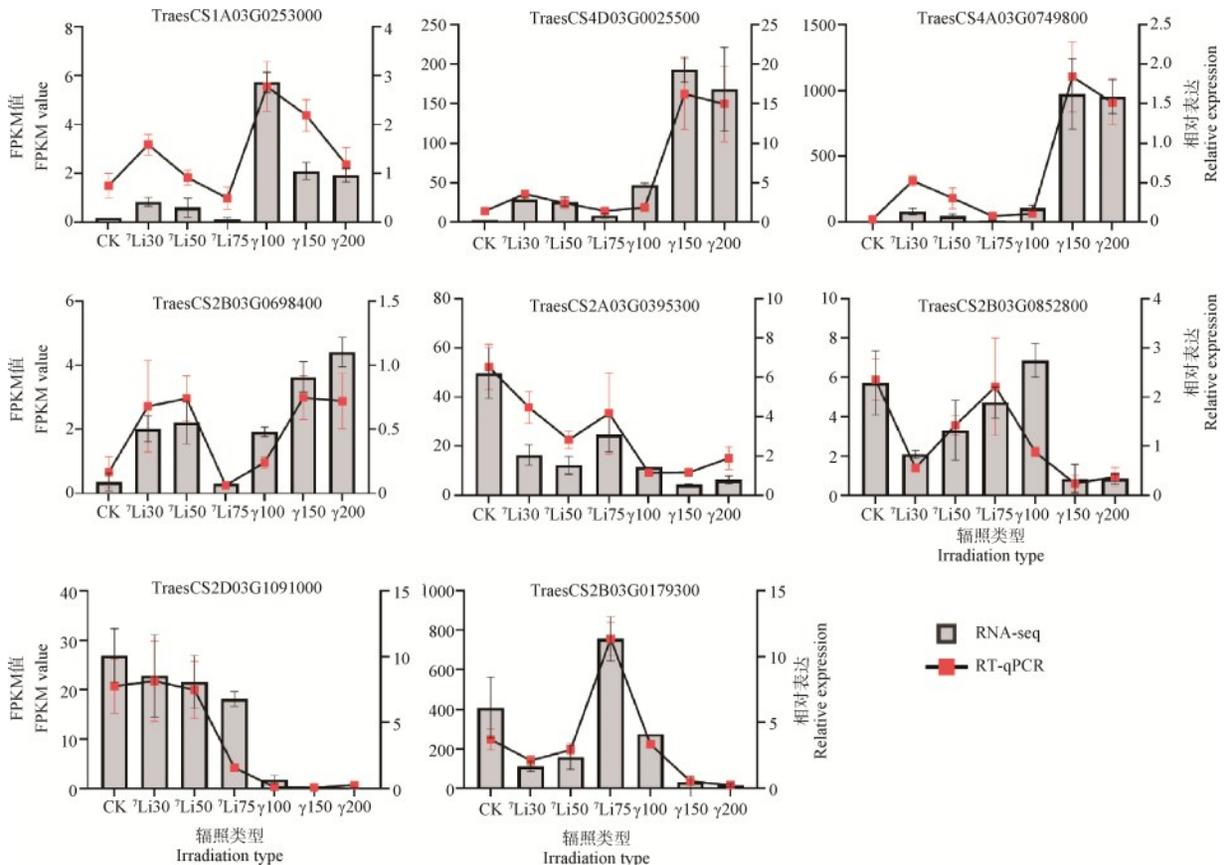


图10 转录组测序数据的RT-qPCR验证

Fig.10 RNA sequencing data accuracy was verified by RT-qPCR

了显著损伤,但 ^7Li 离子束辐照造成的损伤程度比 γ 射线低。然而, Yuichiro 等^[31]研究发现,碳离子束辐照烟草细胞后,造成的DNA损伤程度比 γ 射线更大。结果说明,DNA损伤程度可能与离子束种类相关。

近年来,转录组数据分析成为解析植物响应胁迫的基因调控网络的有效方法^[32]。通过转录组数据分析表明, ^7Li 离子束辐照诱导的差异表达基因数量远少于 γ 射线。差异表达基因的GO分析结果表明, ^7Li 离子束辐照后,差异表达基因显著富集在细胞壁等生物大分子的分解与合成,如纤维素生物合成过程、细胞壁组织、细胞壁大分子分解代谢过程和纤维素合成酶(UDP形成)活性等。细胞壁是组成植物细胞的重要部分,对植物的器官发育和形态建成等方面起作用^[33]。Zhang 等^[34]发现细胞壁细胞发育不良会导致水稻叶片卷曲,说明 ^7Li 离子束辐照可能调控小麦细胞壁的合成和分解,以此使小麦应对 ^7Li 离子束引起的损伤,并使小麦幼苗叶脉失绿至开裂,导致叶片卷曲。 γ 射线辐照后,差异表达基因显著富集在光合作用代谢过程,如碳水化合物代谢过程、光合系统的光捕获和光系统I反应中心等。光合作用是植物响应外界环境变化的重要途径之一,也是绿色植物的基本物质和能量的来源^[35],只有进行光合作用植物才能生长发育^[36-37]。说明 γ 射线辐照可能影响小麦的光合作用代谢,并以此抑制小麦的苗高和根长,这与小麦幼苗形态学差异一致。KEGG分析结果表明, ^7Li 离子束辐照诱导的差异表达基因显著富集在甘油脂类代谢等通路。甘油脂类作为植物中含量最丰富的脂质之一,在植物生长、发育和逆境胁迫反应过程中发挥着重要作用^[38]。原静静等^[39]发现党参在干旱胁迫下,体内脂类代谢物发生显著变化。Li 等^[40]发现拟南芥的鞘脂代谢相关基因参与响应氧化胁迫过程。说明小麦可能通过调控甘油脂类代谢通路以应对 ^7Li 离子束引起的损伤。 γ 射线辐照诱导的差异表达基因显著富集在光合作用-天线蛋白等通路,说明 γ 射线辐照可能通过改变光合作用代谢通路抑制小麦生长。结果说明, ^7Li 离子束辐照能调控与 γ 射线不同的代谢途径响应辐照引起的损伤。

在受到非生物胁迫时植物会激活复杂的生物反应调节,而这些反应需要许多重要的调节因子参与,如转录因子^[41]。转录因子是信号转导中的关键部分,与顺式元件相互作用,与特定下游基因的启动子结合调控基因的表达,在植物的发育、进化和相应环境胁迫^[42-43]反应中发挥着重要作用。研究表

明,MYB^[44]、WRKY^[45]、bHLH^[46]和NAC^[47]是植物对非生物胁迫应答的重要转录因子。在向日葵(*Helianthus annuus* L.)叶片和根中的MYB转录因子基因表达下调响应盐胁迫^[48],在遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens* L.)中也发现了WRKY转录因子基因表达下调以响应盐胁迫^[49],表明这类转录因子可以作为负向调控因子参与植物对非生物胁迫的响应。Hwang 等^[50]发现 γ 射线和碳离子辐照水稻后,MYB、WRKY、bHLH和NAC等转录因子的表达受到显著抑制。本研究中, ^7Li 离子束辐照诱导的MYB、WRKY、bHLH和NAC等转录因子中大部分表达水平呈下降趋势,说明 ^7Li 离子束辐照能诱导这类转录因子基因表达下调以响应辐照引起的小麦损伤。本研究鉴定出几种电离辐射特异转录因子,如ARR-B和HSF;在质子束辐照后的豇豆(*Vigna unguiculata* (L.) Walp)中也发现这类转录因子^[51]。Dof转录因子具有调节植物新陈代谢、组织分化和生长发育的功能^[52-53],且Dof过表达会导致生长缺陷^[54],在本研究中Dof被 γ 射线辐照特异诱导,因此推测 γ 射线辐照对小麦幼苗的抑制效应可能与Dof家族转录因子的高表达密切相关。此外,E2F/DP^[55]和Whirly^[24]是调控植物DNA复制和修复的重要转录因子,Maréchal 等^[56]发现Whirly蛋白能维持拟南芥质体基因组的稳定,Wang 等^[24]发现Whirly能维持叶绿体基因组的完整性。本研究结果显示, ^7Li 离子束辐照特异诱导了2个Whirly转录因子,以此来修复 ^7Li 离子束辐照造成的DNA损伤,而 γ 射线特异诱导了1个E2F/DP的转录因子调控DNA损伤修复。以上结果表明,MYB、WRKY、bHLH和NAC等转录因子在响应 ^7Li 离子束辐照中具有重要作用,且 ^7Li 离子束和 γ 射线辐照诱导了不同转录因子参与DNA损伤修复。

4 结论

本研究解析了 ^7Li 离子束辐照小麦的特异生物学效应。彗星电泳数据结合转录组数据分析结果表明,与 γ 射线相比, ^7Li 离子束辐照引起的小麦幼苗生长抑制程度低; ^7Li 离子束辐照能特异诱导细胞壁合成与代谢和甘油脂类代谢等通路来响应 ^7Li 离子束辐照引起的损伤;此外 ^7Li 离子束辐照特异诱导了Whirly转录因子调控DNA损伤修复,说明 ^7Li 离子束是一种区别于 γ 射线的新型诱变剂。本研究结果为今后利用 ^7Li 离子束进行诱变育种提供了重要参考。

参考文献

- [1] 赵林姝, 刘录祥. 农作物辐射诱变育种研究进展. 激光生物学报, 2017, 26(6): 481-489
Zhao L S, Liu L X. Research progresses in irradiation-induced mutation breeding in crops. Acta Laser Biology Sinica, 2017, 26(6): 481-489
- [2] 杨震, 彭选明, 彭伟正. 作物诱变育种研究进展. 激光生物学报, 2016, 25(4): 302-308
Yang Z, Peng X M, Peng W Z. Progress of study on crop mutation breeding. Acta Laser Biology Sinica, 2016, 25(4): 302-308
- [3] Singh B, Datta P S. Gamma irradiation to improve plant vigour, grain development, and yield attributes of wheat. Radiation Physics and Chemistry, 2009, 79(2): 139-143
- [4] Belfield E J, Gan X C, Mithani A, Brown C, Jiang C F, Franklin K, Alvey E, Wibowo A, Jung M, Bailey K, Kalwani S, Ragoussis J, Mott R, Harberd N P. Genome-wide analysis of mutations in mutant lineages selected following fast-neutron irradiation mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Genome Research, 2012, 22(7): 1306-1315
- [5] Lemay M A, Torkamaneh D, Rigai G, Boyle B, Stec A O, Stupar R M, Belzile F. Screening populations for copy number variation using genotyping-by-sequencing: A proof of concept using soybean fast neutron mutants. BMC Genomics, 2019, 20(1): 1-16
- [6] 刘瑞媛, 金文杰, 曲颖, 周利斌, 董喜存, 李文建. 重离子束辐射诱变技术在植物育种中的应用. 广西科学, 2020, 27(1): 20-26
Liu R Y, Jin W J, Qu Y, Zhou L B, Dong X C, Li W J. Application of heavy ion beam irradiation mutagenesis technology in plant breeding. Guangxi Sciences, 2020, 27(1): 20-26
- [7] Atsushi T, Naoya S, Yoshihiro H. Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. Journal of Radiation Research, 2010, 51(3): 223-233
- [8] Yang G L, Luo W L, Zhang J, Yan X C, Du Y, Zhou L B, Li W J, Wang H, Chen Z Q, Guo T. Genome-wide comparisons of mutations induced by carbon-ion beam and gamma-rays irradiation in rice via resequencing multiple mutants. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1514
- [9] Thilo E, Michael S. Cluster effects within the local effect model. Radiation Research, 2007, 167(3): 319-329
- [10] 卢明. 低能重离子¹⁴C和⁷Li及⁶⁰Co- γ 射线对水稻的生物学效应研究. 长沙: 湖南农业大学, 2005
Lu M. Biological effects of low energy ion¹⁴C, ⁷Li and ⁶⁰Co- γ ray on rice. Changsha: Hunan Agricultural University, 2005
- [11] Li F, Shimizu A, Nishio T, Tsutsumi N, Kato H. Comparison and characterization of mutations induced by gamma-ray and carbon-ion irradiation in rice (*Oryza sativa* L.) using whole-genome resequencing. G3: Genes, Genomes, Genetics, 2019, 9(11): 3743-3751
- [12] Ling A P K, Ung Y C, Hussein S, Harun A R, Tanaka A, Yoshihiro H. Morphological and biochemical responses of *Oryza sativa* L. (cultivar MR219) to ion beam irradiation. Journal of Zhejiang University-Science B, 2013, 14(12): 1132-1143
- [13] 辛庆国, 刘录祥, 郭会君, 赵林姝, 于元杰, 赵葵, 隋丽, 孔福全, 赵世荣. ⁷Li离子束注入小麦干种子诱发M₁代变异的SSR分析. 麦类作物学报, 2007(4): 560-564
Xin Q G, Liu L X, Guo H J, Zhao L S, Yu Y J, Zhao K, Sui L, Kong F Q, Zhao S R. SSR analysis of M₁ variation of dry seeds implanted by ⁷Li ion beam in wheat. Journal of Triticeae Crops, 2007(4): 560-564
- [14] Li B, Zhao L S, Zhang S, Cai H Y, Xu L, An B Z, Wang R, Liu G, He Y G, Jiao C H, Liu L X, Xu Y H. The mutational, epigenetic, and transcriptional effects between mixed high-energy particle field (CR) and ⁷Li-Ion beams (LR) radiation in wheat M₁ seedlings. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 878420-878420
- [15] Xiong H C, Guo H J, Xie Y D, Gu J Y, Zhao L S, Zhao S R, Ding Y P, Kong F Q, Sui L, Liu L X. Comparative transcriptome analysis of two common wheat varieties induced by ⁷Li-ion beam irradiation reveals mutation hotspot regions and associated pathways. Radiation Physics and Chemistry, 2020, 170(C): 108650-108650
- [16] Hagiwara Y, Oike T, Niimi A, Yamauchi M, Sato H, Limsirichaikul S, Held K D, Nakano T, Shibata A. Clustered DNA double-strand break formation and the repair pathway following heavy-ion irradiation. Journal of Radiation Research, 2018, 60(1): 69-79
- [17] Shu Q Y, Forster B P, Nakagawa H. Plant mutation breeding and biotechnology. Wallingford, UK: Centre Agriculture Bioscience International Publishing, 2012: 301-326
- [18] 林敏, 杨俊诚, 刘录祥, 郑兴耘, 郑企成, 白希祥, 赵文荣. ⁷Li离子束对DNA分子中氢键的损伤效应. 农业生物技术学报, 1996(1): 93-94, 100
Lin M, Yang J C, Liu L X, Zheng X Y, Zheng Q C, Bai X X, Zhao W R. Damage effect of ⁷Li beam on hydrogen bonds in DNA molecule. Journal of Agricultural Biotechnology, 1996(1): 93-94, 100
- [19] Stoilov L, Georgieva M, Manova V, Liu L X, Gecheff K. Karyotype reconstruction modulates the sensitivity of barley genome to radiation-induced DNA and chromosomal damage. Mutagenesis, 2013, 28(2): 153-160
- [20] 韩冰, 古佳玉, 赵林姝, 郭会君, 谢永盾, 赵世荣, 孙云云, 宋希云, 刘录祥. 不同小麦基因型对 γ 射线辐照敏感性的分子解析. 植物遗传资源学报, 2014, 15(6): 1342-1347
Han B, Gu J Y, Zhao L S, Guo H J, Xie Y D, Zhao S R, Sun Y Y, Song X Y, Liu L X. Molecular characterization of radiation sensitivity of different wheat genotypes irradiated by γ rays. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(6): 1342-1347

- [21] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360
- [22] Pertea M, Pertea G M, Antonescu C M, Chang T C, Mendell J T, Salzberg S L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 290-295
- [23] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014, 15(12):550
- [24] Wang W J, Li K, Yang Z, Hou Q C, Zhao W W, Sun Q W. RNase H1C collaborates with ssDNA binding proteins WHY1/3 and recombinase RecA1 to fulfill the DNA damage repair in *Arabidopsis* chloroplasts. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(12): 6771-6787
- [25] Radziejewski A, Vlieghe K, Lammens T, Berckmans B, Maes S, Jansen M A K, Knappe C, Albert A, Seidlitz H K, Bahnweg G, Inzé D, De V L. Atypical E2F activity coordinates PHR1 photolyase gene transcription with endoreduplication onset. *The EMBO Journal*, 2011, 30(2): 355-363
- [26] 曲颖, 李文建, 周利斌, 王转子, 董喜存, 余丽霞, 刘青芳, 何金玉. 重离子辐射植物的诱变效应研究及应用. *原子核物理评论*, 2007(4): 294-298
Qu Y, Li W J, Zhou L B, Wang Z Z, Dong X C, Yu L X, Liu Q F, He J Y. Research and application of mutagenic effect in plants irradiated by heavy ion beams. *Nuclear Physics Review*, 2007(4): 294-298
- [27] Lee Y M, Jo Y D, Lee H J, Kim Y S, Kim D S, Kim J B, Kang S Y, Kim S H. DNA damage and oxidative stress induced by proton beam in *Cymbidium hybrid*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2015, 56(2): 240-260
- [28] Lin W, Ruonan M, Yue Y, Zhen J. Antioxidant response of *Arabidopsis thaliana* seedlings to oxidative stress induced by carbon ion beams irradiation. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2018, 195: 1-8
- [29] Badia B, Pierre C, Darel H, Michael A. H, Léon S. Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons. *Science*, 2000, 287(5458): 1658-1660
- [30] 赵健. 重离子束辐射对拟南芥DNA双链断裂修复缺陷突变体 *AtLig4^{-/-}* 的诱变效应研究. 兰州: 兰州理工大学, 2022
Zhao J. The mutagenic effects of heavy ion beam irradiation on DNA double-strand break repair deficient mutant *AtLig4^{-/-}* in *Arabidopsis thaliana*. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2022
- [31] Yuichiro Y, Shinya Y, Yoshihiro H, Naoya S, Issay N, Atsushi T, Masayoshi I. Initial yields of DNA double-strand breaks and DNA fragmentation patterns depend on linear energy transfer in tobacco BY-2 protoplasts irradiated with helium, carbon and neon ions. *Radiation Research*, 2007, 167(1): 94-101
- [32] Koenig D, Jiménez-Gómez J M, Kimura S, Fulop D, Chitwood D H, Headland L R, Kumar R, Covington M F, Devisetty U K, Tat A V, Tohge T, Bolger A, Schneeberger K, Ossowski S, Lanz C, Xiong G Y, Taylor-Teeple M, Brady S M, Pauly M, Weigel D, Usadel B, Fernie A R, Peng J, Sinha N R, Maloof J N. Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(28): 2655-2662
- [33] 张保才, 周奕华. 植物细胞壁形成机制的新进展. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45(6): 544-556
Zhang B C, Zhou Y H. Plant cell wall formation and regulation. *Scientia Sinica (Vita)*, 2015, 45(6): 544-556
- [34] Zhang G H, Xu Q, Zhu X D, Qian Q, Xue H W. SHALLOT-LIKE1 is a KANADI transcription factor that modulates rice leaf rolling by regulating leaf abaxial cell development. *The Plant Cell*, 2009, 21(3): 719-735
- [35] 张立新, 彭连伟, 林荣呈, 卢从明, 匡廷云. 光合作用研究进展与前景. *中国基础科学*, 2016, 18(1): 13-20
Zhang L X, Peng L W, Lin R C, Lu C M, Kuang T Y. Advances and prospects of photosynthesis research. *China Basic Science*, 2016, 18(1): 13-20
- [36] Mei C, Sasmita M, Scott A H, Jonathan M F, Charles K. Proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* leaves in response to acute boron deficiency and toxicity reveals effects on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and protein synthesis. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(3-4): 235-242
- [37] Donald T K, George F K, Abha U, Roman M M. UV-B response of cucumber seedlings grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Physiologia Plantarum*, 1993, 88(2): 350-358
- [38] 陈文玲, 张晴晴, 唐韶华, 龚伟, 洪月云. 甘油-3-磷酸酰基转移酶在植物脂质代谢、生长及逆境反应中的作用. *植物生理学报*, 2018, 54(5): 725-735
Chen W L, Zhang Q Q, Tang S H, Gong W, Hong Y Y. Glycerol-3-phosphate acyltransferase in lipid metabolism, growth and response to stresses in plants. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(5): 725-735
- [39] 原静静, 孙晓琛, 栗锦鹏, 杜毅, 王惠珍. 基于LC-MS的干旱胁迫下党参代谢组学分析. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(23): 145-152
Yuan J J, Sun X C, Li J P, Du T, Wang H Z. Metabolomics analysis of *codonopsis pilosula* under drought stress based on LC-MS. *Chinese Journal of Experimental Traditional*, 2021, 27(23): 145-152
- [40] Li J, Yin J, Rong C, Li K E, Wu J X, Huang L Q, Zeng H Y, Sahu S K, Yao N. Orosomucoid proteins interact with the small subunit of serine palmitoyltransferase and contribute to sphingolipid homeostasis and stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2016, 28(12): 3038-3051
- [41] 李君霞, 樊永强, 代书桃, 秦娜, 宋迎辉, 朱灿灿, 王春义, 翁鸿燕. bHLH转录因子在植物抗非生物胁迫基因工程中的

- 应用进展. 江苏农业科学, 2022, 50(12):1-9
- Li J X, Fan Y Q, Dai S T, Qin N, Song Y H, Zhu C C, Wang C Y, Weng H Y. Application progress of bHLH transcription factor in genetic engineering of plants against abiotic stress. Jiangsu Agricultural Sciences, 2022, 50 (12): 1-9
- [42] 张丹, 马玉花. NAC转录因子在植物响应非生物胁迫中的作用. 生物技术通报, 2019, 35(12): 144-151
- Zhang D, Ma Y H. The role of NAC transcription factor in plant response to abiotic stress. Biotechnology Bulletin, 2019, 35 (12): 144-151
- [43] 邱文怡, 王诗雨, 李晓芳, 徐恒, 张华, 朱英, 王良超. MYB转录因子参与植物非生物胁迫响应与植物激素应答的研究进展. 浙江农业学报, 2020, 32(7): 1317-1328
- Qiu W Y, Wang S Y, Li X F, Xu H, Zhang H, Zhu Y, Wang L C. Functions of plant MYB transcription factors in response to abiotic stress and plant hormones. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2020, 32 (7): 1317-1328
- [44] Xia H, Liu X L, Lin Z Y, Zhang X F, Wu M J, Wang Tong, Deng H H, Wang J, Lin L J, Deng Q X, Lv X L, Xu K F, Liang D. Genome-wide identification of MYB transcription factors and screening of members involved in stress response in *Actinidia*. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(4): 2323-2323
- [45] Wu Y Q, Zhang S S, Huang X, Lyu L F, Li W L, Wu W L. Genome-wide identification of WRKY gene family members in black raspberry and their response to abiotic stresses. Scientia Horticulturae, 2022, 304(2022): 111338
- [46] Wang L Z, Xiang L J, Hong J, Xie Z H, Li B B. Genome-wide analysis of bHLH transcription factor family reveals their involvement in biotic and abiotic stress responses in wheat (*Triticum aestivum* L.). 3 Biotech, 2019, 9(6): 236
- [47] Sadhana S, Hiroyuki K, Kaushal K. B, Anshu A. The biotechnological importance of the plant-specific NAC transcription factor family in crop improvement. Journal of Plant Research, 2021, 134(3): 1-21
- [48] Li J J, Liu H, Yang C, Wang J, Yan G J, Si P, Bai Q J, Lu Z Y, Zhou W J, Xu L. Genome-wide identification of MYB genes and expression analysis under different biotic and abiotic stresses in *Helianthus annuus* L.. Industrial Crops & Products, 2020, 143(C): 111924-111924
- [49] Wei W, Zhang Y X, Han L, Guan Z Q, Chai T Y. A novel WRKY transcriptional factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco. Plant Cell Reports, 2008, 27(4): 795-803
- [50] Hwang J E, Hwang S G, Kim S H, Lee K J, Jang C S, Kim J B, Kim S H, Ha B K, Ahn J W, Kang S Y, Kim D S. Transcriptome profiling in response to different types of ionizing radiation and identification of multiple radio marker genes in rice. Physiologia Plantarum, 2014, 150(4): 604-619
- [51] Kang R, Seo E, Park A, Kim W J, Kang B H, Lee J H, Kim S H, Kang S Y, Ha B K. A comparison of the transcriptomes of cowpeas in response to two different ionizing radiations. Plants, 2021, 10(3): 567-567
- [52] Mélanie N, Rana M A, Sergio O, Richard D. T. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. Plant Science, 2013, 209: 32-45
- [53] 任永康, 牛瑜琦, 逯成芳, 唐朝晖. 小麦Dof转录因子家族全基因组鉴定和表达分析. 河南农业科学, 2020, 49(9): 11-19
- Ren Y K, Niu Y Q, Lu C F, Tang Z H. Genome-wide identification and expression of wheat Dof transcription factors. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2020, 49 (9): 11-19
- [54] Kang H G, Singh K B. Characterization of salicylic acid-responsive, arabidopsis Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2000, 21(4): 329-339
- [55] Víctor A S C, 12, Samantha R R, Jorge M V R. Non-canonical functions of the E2F/DP pathway with emphasis in plants. Phyton (Buenos Aires), 2021, 90(2): 307-330
- [56] Maréchal A, Parent J, Véronneau-Lafortune F, Joyeux A, Lang B F, Brisson N. Whirly proteins maintain plastid genome stability in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(34): 14693-14698