DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04152

DNA 甲基化参与调控马铃薯响应干旱胁迫的关键基因挖掘

李鹏程^{1,2,**} 毕真真^{1,2,**} 孙超^{1,2} 秦天元^{1,2} 梁文君^{1,2}
王一好^{1,2} 许德蓉^{1,2} 刘玉汇^{1,2} 张俊莲^{1,2} 白江平^{1,2,*}

¹ 甘肃省干旱生境作物学重点实验室 / 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃兰州 730070; ² 甘肃农业大学农学院, 甘肃兰州 730070

摘要: 植物受到干旱胁迫时, 会通过 DNA 甲基化做出快速反应以帮助其应对胁迫。为探究在干旱胁迫下, DNA 甲基化是如何影响基因转录表达, 本研究对甘露醇模拟干旱和 5-azadC (去甲基化) 处理下, 抗旱性不同的 2 个马铃薯品种(抗旱型, 青薯 9 号; 干旱敏感型, 大西洋)进行转录组学分析, 以 Fold-change > 2 和校正后 $P < 0.01$ 进行差异表达基因(DEG)的筛选。GO 富集分析发现, 2 种处理都共同显著富集到氧化应激和碳水化合物代谢过程相关的 GO term。说明不同耐旱性马铃薯在响应干旱胁迫时, 与这些 GO term 相关的基因也受 DNA 去甲基化调控。对既响应干旱又响应 DNA 去甲基化的 1345 个 DEG 进行 KEGG 功能富集发现, 与植物抗旱相关的通路有植物 MAPK 信号途径、植物激素信号转导途径、植物谷胱甘肽代谢通路、糖酵解与糖异生和磷酸肌醇代谢通路。说明这些通路相关基因在大西洋和青薯 9 号 2 个抗旱性不同的马铃薯品种中, 响应干旱的敏感性受 DNA 甲基化调控。接着对 DEG 上游 1500 bp 启动子区域进行顺式作用原件和甲基化 CpG 岛分析发现, 干旱胁迫下参与植物谷胱甘肽代谢的 GST 基因通过 DNA 去甲基化来降低启动子区 ABRE 和 CAAT-box 作用元件的甲基化水平, 进而激活该基因的表达以应对干旱胁迫。因此, 利用比较转录组学分析干旱和 DNA 去甲基化处理下的差异基因, 可挖掘到 DNA 甲基化参与调控马铃薯响应干旱胁迫的相关基因, 为研究马铃薯干旱胁迫响应的表观遗传学机理提供新的研究思路。

关键词: 马铃薯; 干旱胁迫; DNA 甲基化; 转录组; 谷胱甘肽 S 转移酶

Key genes mining of DNA methylation involved in regulating drought stress response in potato

LI Peng-Cheng^{1,2,**}, BI Zhen-Zhen^{1,2,**}, SUN Chao^{1,2}, QIN Tian-Yuan^{1,2}, LIANG Wen-Jun^{1,2}, WANG Yi-Hao^{1,2}, XU De-Rong^{1,2}, LIU Yu-Hui^{1,2}, ZHANG Jun-Lian^{1,2}, and BAI Jiang-Ping^{1,2,*}

¹ Gansu Provincial Key Laboratory of Aridland Crop Science / Gansu Key Laboratory of Crop Improvement & Germplasm Enhancement, Lanzhou 730070, Gansu, China; ² College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: When plants are subjected to water stress, they will make a rapid response to drought stress through DNA methylation. In order to study how DNA methylation affects the transcriptional expression of genes under drought stress in potato, comparative transcriptomic analysis was carried out on two potato varieties with different drought resistances, which were planted under mannitol simulated drought and 5-azadC treatments. The differentially expressed genes (DEGs) were identified by Fold-change > 2 and corrected $P < 0.01$. Then DEGs were subjected to GO enrichment analysis. The results showed that these DEGs were enriched in the oxidative stress and carbohydrate metabolism, suggesting these GO term-related genes were also regulated by DNA

本研究由国家自然科学基金项目(31660432, 31960442), 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-09-P14), 甘肃省马铃薯产业体系(GARS-03-P1), 甘肃农业大学引进人才专项科研项目(2017RCZX-01)和甘肃省科技厅项目(18JR3RA170)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31660432, 31960442), the China Agriculture Research System (CARS-09-P14), the Gansu Potato Industry System (GARS-03-P1), the Gansu Agricultural University Special Talent Research Project (2017RCZX-01), and the Gansu Science and Technology Fund (18JR3RA170).

* 通信作者(Corresponding author): 白江平, E-mail: baijp@gsau.edu.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 李鹏程, E-mail: 526040572@qq.com; 毕真真, E-mail: bizhen925@sina.com

Received (收稿日期): 2020-07-11; Accepted (接受日期): 2020-10-14; Published online (网络出版日期): 2020-11-06.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20201105.1124.004.html>

demethylation, responded to drought stress in different drought-tolerant potatoes. The common 1345 DEGs both responding to drought stress and DNA demethylation were functionally enriched by KEGG pathway. The results showed that plant MAPK signal pathway, plant hormone signal transduction pathway, plant glutathione metabolism pathway, glycolysis and glutathione metabolism pathway and inositol phosphate metabolism pathway were related to plant drought resistance. It was suggested that the sensitivity of these pathway-related genes responding to drought stress were regulated by DNA methylation in Atlantic and Qingshu 9. The cis-acting elements and methylated CpG islands were analyzed in the 1500 bp promoter region of DEGs. The results showed that the methylation level of ABRE and CAAT-box acting elements in the promoter region of GST gene involved in plant glutathione metabolism were reduced through DNA demethylation under drought stress. Then the expression was activated in response to drought stress. Therefore, DEGs under drought and DNA demethylation treatments could be analyzed using comparative transcriptomic, and then the genes related to DNA methylation involved in regulating drought stress response in potato could be found. These results provide a new idea for further studying the epigenetic mechanism of drought stress response in potato.

Keywords: potato; drought stress; DNA methylation; transcriptome; glutathione S transferase

干旱胁迫通常发生在土壤水分不足以维持植物正常的生命活动且蒸发量大的区域^[1]。水分缺乏是限制植物生长发育的关键因素,影响植物的伸长和膨大生长^[2-3]以及土壤养分供应的不平衡等^[4]。马铃薯作为四大主粮作物之一,也是水分敏感作物。中国的马铃薯主要种植在西北干旱和半干旱地区,因此干旱严重影响了马铃薯的植株生长、块茎大小和商品属性^[5]。

近年来,除了阐明响应干旱胁迫的信号转导机制外,越来越多的研究表明,表观遗传调控在植物干旱胁迫响应中具有重要的作用^[6-7]。DNA 甲基化是发现最早、研究最深入的表观遗传修饰中的一种。DNA 甲基化的修饰往往与基因的转录相关,即 DNA 甲基化程度越高,基因的转录水平越低^[8-9]。干旱胁迫会引起植物体内 DNA 甲基化水平的改变,激活胁迫相关基因的表达、转座子的活性以及调控启动子区域的开关,以增强植物适应及抵御胁迫的能力^[10]。Fei 等^[11]研究表明,2 个不同耐旱性的小麦品种中的胞质甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPC)^[12]启动子中不同类型和水平的 DNA 甲基化动态变化与干旱胁迫反应中基因表达之间存在显著关系。Liang 等^[13]研究表明,转录因子可能通过 DNA 甲基化调控从而在毛果杨干旱胁迫反应中发挥重要作用。对耐旱(Bachar)和干旱敏感(F177)蚕豆基因型的全基因组 DNA 甲基化多态性进行分析,确定了 6 个与干旱胁迫相关的差异甲基化区域,且发现干旱胁迫下 Bachar 的抗旱相关基因的表达水平高于 F177。这表明全基因组 DNA 甲基化变化可能是蚕豆对响应干旱胁迫的重要调控机制^[14]。本试验前期通过 5-azadC 处理不同干旱敏感的马铃薯品种发现,干旱胁迫下 DNA 去甲基化参与调控马铃薯试管苗表型性状及生理生化的响应^[15]。而有关 DNA 甲基化如何影响干旱胁迫下马铃薯相关基因的变化尚不清楚。

通过转录组测序比较不同物种中不同基因型的

转录表达是探索非生物胁迫下抗性基因、阐明代谢途径以及解析响应胁迫的耐受性机制的最合适技术之一^[16-17]。因此,本研究通过比较转录组学分析以探讨耐旱型品种青薯 9 号和干旱敏感型品种大西洋在干旱胁迫和 DNA 甲基化抑制剂处理下相关基因的表达特性,以期获得受 DNA 甲基化调控响应干旱胁迫的相关基因,从而为更好地阐明 DNA 甲基化参与调控马铃薯响应干旱胁迫的分子机制,扩展对马铃薯耐旱机制的认识,为马铃薯抗旱分子育种的新方法提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理方法

马铃薯耐旱品种为青薯 9 号(Qingshu 9),干旱敏感品种为大西洋(Atlantic),均由甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室提供。使用纸桥法将 2 个品种的马铃薯组培苗茎段接种到 MS 液体培养基(不含琼脂),每个茎段带有 1 个腋芽,生长环境条件为温度 $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$,光强 $25.0\sim 37.5\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光照 16 h d^{-1} 。培养 24 d 后,用 200 mmol L^{-1} 甘露醇和 $60\mu\text{mol L}^{-1}$ DNA 甲基化抑制剂(5-azadC)处理马铃薯试管苗,分别取处理 2、6、12 和 24 h 以及未进行处理(对照,0 h)试管苗的茎叶,迅速使用液氮冷冻,存储在 -80°C 超低温冰箱备用。每个处理 3 个生物学重复。5-azadC (5-aza-2'-deoxycytidine)购于 Sigma 公司。

1.2 茎叶总 RNA 提取、文库构建及转录组测序

使用植物总 RNA 提取 TRIzol 试剂(Invitgen, 美国)分别提取 54 个样品{2 个品种 $\times$ [对照+(2 种处理 $\times$ 4 个时间点)] $\times$ 3 次生物学重复}的总 RNA,用 Turbo DNase I (Ambion, 美国)处理 30 min 后使用 RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, 德国)进行纯化;然后使用 TruSeq RNA sample Prep V2 kit (Illumina, 美国)构建转录组测序 cDNA 文库,并利用 Agilent 2200 TapeSta-

tion (Agilent, 美国)系统检测 cDNA 文库质量; 最后使用 Illumina HiSeqX10 测序仪上进行双端测序。

1.3 转录组数据分析

首先使用 FASTQC 对下机数据进行质控并计算 Q20、Q30 和 GC 含量。然后从 ENSEMBL 植物数据库中下载了马铃薯参考基因组序列(SolTub 3.0)和注释文件(gtf), 利用 HISAT2 将测序 reads 比对到马铃薯参考基因组中, 获得 sam 文件; 利用 Samtools 工具将 sam 文件转换为 bam 文件并排序, 使用 Cufflinks 对排序后的 bam 文件进行转录本的组装和定量; 使用 HTseq-count 计算各样本转录本的 counts 数, 利用 Python 脚本计算参考基因组各基因的长度, 使用 R 包 Dseq2 计算各基因的 TPM (Transcripts Per Million, 每百万条 reads 的转录本)和样本间的差异表达分析。将校正后的 $P < 0.01$ 和变化倍数大于 2 定义为差异表达基因(DEG), 通过比较青薯 9 号和大西洋在同一处理同一时间点的表达水平来确定差异表达基因。采用在线工具 g:Profiler^[18] (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler_beta/gost)进行 GO 和 KEGG 功能富集分析, 以 $P < 0.05$ 作为显著富集 GO term 和 KEGG

pathway 的筛选条件。

1.4 启动子区甲基化 CpG 岛预测和顺式作用元件分析

先使用 perl 脚本批量提取所分析基因上游 1500 bp 启动子序列, 然后利用在线软件 MethPrimer^[19] (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/MethPrimer.cgi>)对差异富集基因 5'调控区进行 CpG 岛预测, 预测参数设置为: CpG 岛长度>100 bp, CPG 检测含量/CpG 期望含量 (Obs/Exp)>0.60, GC 含量>50%。使用 Plant Care^[20] (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测基因启动子的顺式作用元件。

1.5 实时荧光定量 PCR 验证

随机选择 22 个差异基因, 使用 Primer Express 3.0.1 设计引物(表 1), 进行实时荧光定量 PCR 分析。采用 cDNA 合成试剂盒 9 (TaKaRa, 日本)将各样品 3 次生物学重复的 RNA 反转录为 cDNA, 以 *Actin* 为内参, 利用 QuantStudio5 实时荧光定量 PCR 系统 (ABI, 美国)进行荧光定量检测。每个样品 3 次生物学重复, 按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法计算相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用的引物

Table 1 Primers of real-time quantitative PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'–3')	反向引物 Reverse primer (5'–3')
<i>Actin</i>	AGGAGCATCCTGTCTCTCTAA	CACCATCACCAGAGTCCAACA
PGSC0003DMG400001333	CTCAATTGCACCTACTAAGCAC	GTGATATTCTTGCATGCAGAGG
PGSC0003DMG400005108	GTTGTGTTCTTGTTTATAGGCT	GTGGCATATTTCATGGGCATAAG
PGSC0003DMG400005112	TCGAATCTTGTCACCTGGTA	CCTGGTGGATCATAATTGCAAG
PGSC0003DMG400005116	CACAATGAAGCTCGTAGACAAG	CACATACTCTACCTGCTTGACA
PGSC0003DMG400017231	CACGAATTCCAAGAAAAGCAGT	CCCCAAATCTTCAAACACAAC
PGSC0003DMG400023921	CAACAAATGTGCTAGTGGGAAA	TGTTTCTGAAGGAGCATAGTT
PGSC0003DMG400002176	GCAGTCAAGTCAAGAAATATCTACC	TGAACACGTACAAGTAAGTGGA
PGSC0003DMG400004977	GATTGATGATGTGAAGAGTGCC	TGTCATAATGAAGGCCTTGAGT
PGSC0003DMG400011012	AATTTTGTGTGTGGAGGGATG	TATTCATTTGAGAGTAGCCGCA
PGSC0003DMG400016722	AACTAACAGGAACCACACTG	GTTGTGTCCCATTTTAGGGA
PGSC0003DMG400020253	GCTGGAAGGTTTCATGAAAGATG	GGAATGGATATTCTCAATGGCG
PGSC0003DMG400024232	GAGCAGGATTAGCCGTTTATAG	AGGTGCAATTACTCCGTAGAAA
PGSC0003DMG400006270	ATGCAATTGCTGGTGCTTATAG	AGCCTGATAGCAAGTAACAGTT
PGSC0003DMG400030038	ATGAAGTTTAGGGGTGACTCAG	TACACAACTTCCCCTATGTGA
PGSC0003DMG400030624	TGCTGAAAGTTCATATCCTGGT	GAAGTGTCTTGATGCATAGCAG
PGSC0003DMG403001316	GATGCTGTGAATCACCCAAATT	GATGGTGAACGTATACAACACG
PGSC0003DMG401000287	CTTCATTTGACTGGCCTCATTC	TCATCAAAAAGCACAAACCAAGAG
PGSC0003DMG401023603	TTAACTGATGAACCGACTTGGA	CAATTGTGAGACCAATCGAGAC
PGSC0003DMG400013765	TAAGTGCCAGAAGATTGGTCAT	TACATCTCTTGCTCCTCAATCG
PGSC0003DMG400019274	CTGGGCTTTATAGGTATCGTGT	ATATGAAGTTGAATTGAGGCGC
PGSC0003DMG400020139	AGCAACAAAAGACCTTCATCAC	CATGCTCACTTTAACGTAGCTC
PGSC0003DMG400026261	GGATTGAATTCGAGACGTCTG	TCGTTGTAGAAATCATCGCAAC

2 结果与分析

2.1 不同马铃薯品种干旱和 DNA 甲基化处理下差异表达基因的鉴定与分析

在数据过滤和质量评估后, 54个样品产生了大约2547百万的 reads 数, 平均每个样本约产生7.1 G 碱基, GC 含量均在44.17%~46.83%范围之间。应用 RNA-seq 分析比对软件 HISAT2将各样本所有的 reads 与马铃薯参考基因组序列进行比对, 比对率为 75.56%~94.64% (表2)。

为了分析不同耐旱型马铃薯品种在甘露醇和 5-Azadc 处理期间转录水平的差异, 使用 R 包 Dseq2 对大西洋和青薯 9 号在同一时间样本的 TPM 值计算了所有差异基因的表达。以 $\text{Flod-change} > 2$ 和校正后 $P < 0.01$ 作为差异表达基因 (DEG) 的筛选标准。结果表明, 在对照 (0 h) 下, A vs. Q 中筛选到 1030 个 DEG, 其中有 515 个上调和 515 个下调表达基因。干旱处理下, 在 A vs. Q 2 h 中筛选到 568 个 DEG, 其中有 384 个上调表达基因, 184 个下调表达基因, 在 A vs. Q 6 h 中筛选到 994 个 DEG, 其中有 560 个上调表达

基因, 434 个下调表达基因, 在 A vs. Q 12 h 中筛选到 519 个 DEG, 其中有 321 个上调表达基因, 198 个下调表达基因, 在 A vs. Q 24 h 中筛选到 1251 个 DEG, 其中有 471 个上调表达基因, 780 个下调表达基因。DNA 去甲基化处理下, 在 A vs. Q 2 h 中筛选到 1603 个 DEG, 其中有 1033 个上调表达基因, 570 个下调表达基因。在 A vs. Q 6 h 中筛选到 501 个 DEG, 其中有 641 个上调表达基因, 434 个下调表达基因。在 A vs. Q 12 h 中筛选到 1153 个 DEG, 其中有 576 个上调表达基因, 577 个下调表达基因。在 A vs. Q 24 h 中筛选到 981 个 DEG 其中有 465 个上调表达基因, 516 个下调表达基因(表 3)。

为了进一步分析马铃薯不同品种在不同处理下特定和共同差异表达基因变化。利用 R 语言分别绘制了干旱和 DNA 去甲基化处理下的 Upset 图(图 1-A, B)。与对照相比, 干旱处理下, A vs. Q 在 2、6、12 和 24 h 时差异表达基因总数为 1790, 在 2、6、12 和 24 h 中特异表达的差异基因为 170、432、175 和 507 个, 在 4 个时间点共同表达的基因有 17 个; DNA 去甲基化处理下, A vs. Q 在 2、6、12 和 24 h 中差异

表 2 测序 reads 数比对到参考基因组的基本统计
Table 2 Basic summary of sequence and sequencing reads mapping to the reference genome

样品 ID Sample ID	总 reads 数 Total reads	总碱基数 Total bases (G)	GC 含量 GC content (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	比对率 Mapped reads (%)
AtC_0h	132,318,050	19.85	44.33	99.93	96.45	82.13
AtA_2h	149,098,932	22.36	44.33	99.95	96.58	89.28
AtA_6h	157,099,124	23.56	44.50	99.94	96.40	84.40
AtA_12h	137,418,600	20.61	44.67	99.94	96.42	91.26
AtA_24h	146,797,368	22.02	45.67	99.95	96.59	91.93
AtM_2h	137,686,150	20.65	46.83	99.95	96.76	94.64
AtM_6h	147,166,226	22.07	45.67	99.91	96.45	79.18
AtM_12h	132,018,290	19.80	44.17	99.91	96.20	78.02
AtM_24h	143,830,794	21.57	44.83	99.94	96.43	87.10
QsC_0h	137,904,066	20.69	44.67	99.90	96.41	82.46
QsA_2h	133,480,780	20.02	45.67	99.93	96.68	92.56
QsA_6h	143,833,564	21.58	45.00	99.94	96.47	92.32
QsA_12h	150,781,586	22.62	44.67	99.93	96.41	84.35
QsA_24h	134,038,164	20.11	44.17	99.92	96.42	75.56
QsM_2h	145,819,266	21.87	44.83	99.92	96.43	81.50
QsM_6h	136,496,172	20.47	44.33	99.92	96.30	89.37
QsM_12h	130,599,502	19.59	44.50	99.93	96.40	85.07
QsM_24h	150,207,156	22.53	44.33	99.94	96.42	90.72

C: 对照处理; A: DNA 甲基化抑制剂处理; M: 干旱处理; At: 大西洋; Qs: 青薯 9 号。
C: control treatment; A: 5-azadC treatment; M: mannitol treatment; At: Atlantic; Qs: Qingshu 9.

表 3 干旱、DNA 去甲基化处理下不同品系间差异表达基因数量
Table 3 Number of DEGs among different varieties under drought and DNA demethylation

处理 Treatment	比较组合 Comparison	差异基因数 Number of DEGs	上调差异基因数 Up-regulated DEGs	下调差异基因数 Down-regulated DEGs
对照 Control 干旱 Drought	A vs. Q_0h	1030	515	515
	A vs. Q_2h	568	384	184
	A vs. Q_6h	994	560	434
	A vs. Q_12h	519	321	198
	A vs. Q_24h	1251	471	780
DNA 去甲基化 Demethylation	A vs. Q_2h	1603	1033	570
	A vs. Q_6h	1142	501	641
	A vs. Q_12h	1153	576	577
	A vs. Q_24h	981	465	516

图 1 马铃薯干旱胁迫和 DNA 去甲基化处理下差异基因表达谱
Fig. 1 Expression profile of regulated genes under drought stress and DNA demethylation in potato
A 和 B 是 UpSet 图, 分别表示干旱和 DNA 去甲基化处理下 AvsQ 各时间点比较得到的集合的重叠和 DEG 的数量。C 是韦恩图。
A and B are UpSet diagrams, showing the overlap of sets and the number of DEG obtained by comparison of AvsQ at each time point under drought and DNA demethylation, respectively. C is the venn diagram.

表达基因总数为 2617, 在 2、6、12 和 24 h 中特异表达的差异基因为 890、435、345 和 291 个, 在这 4 个时间点共同表达的基因有 29 个。同时绘制了对照、干旱和 DNA 甲基化抑制剂处理下 A vs. Q 差异

表达基因的韦恩图(图 1-C), 干旱和 DNA 甲基化抑制剂处理下共同表达的基因有 1354 个, 表明这 1354 个基因可能受 DNA 甲基化调控参与马铃薯干旱响应, 可作为后续基因挖掘的重点部分。

2.2 不同马铃薯品种干旱和 DNA 甲基化处理下差异表达基因 GO 分析

甘露醇处理下, 对 A vs. Q 在 2、6、12 和 24 h 中共 1790 个差异表达基因进行 GO 功能富集分析发现, 这些差异基因主要富集包括生物过程、分子功能、细胞组分三大分类下的 42 个 GO term (图 2-A)。生物学过程共富集到 15 个 GO term, 主要是苯丙烷类分解代谢过程(GO:0046274 和 GO:0009698)、木质素代谢过程(GO:0009808)、氧化还原过程(GO:0055114)、蛋白质磷酸化(GO:0006468)、植物型细胞壁组织或生物发生(GO:0071669)和碳水化合物代谢过程(GO:0005975)。分子功能共富集到 22 个 GO term, 与催化活性(GO:0003824)、氧化还原酶活性(GO:0016491 和 GO:0016682)、碳水化合物结合(GO:0030246)、水解 O-糖基化合物的水解酶活性(GO:0004553 和 GO:0016798)、天冬氨酸胺酶活性(GO:0070001 和 GO:0004190)、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性(GO:0004674)、木糖基转移酶活性(GO:0016762)、蛋白激酶活性(GO:0004672)、内肽酶抑制剂活性(GO:0004866)、钙调素结合(GO:0005516)和磷酸转移酶活性(GO:0016773)相关。细胞组分共富集到 5 个 GO term, 主要是质外体(GO:0005576)、细胞膜(GO:0005576 和 GO:0030312)和细胞壁(GO:0005618)。同样地, 对 DNA 甲基化抑制剂处理下, A vs. Q 在 2、6、12 和 24 h 共 2617 个差异表达基因进行 GO 功能富集分析(图 2-B)发现, 这些差异基因也显著富集到生物过程、分子功能、细胞组分下的 39 个 GO term。其中富集到生物学过程的共 16 个, 主要包括氧化还原过程(GO:0055114)、碳水化合物代谢过程(GO:0005975)、糖代谢过程(GO:0010411、GO:0006073、GO:0044042、GO:0010410、GO:0044264、GO:0010383 和 GO:0005976)和蛋白水解(GO:0045861)过程。分子功能共富集到 18 个 GO term, 与催化活性(GO:0003824)、加氧酶活性(GO:0004497)、氧化还原酶活性(GO:0016491)、血红素结合(GO:0020037)、木糖基转移酶活性(GO:0016762)、辅酶因子结合(GO:0048037)、水解 O-糖基化合物的水解酶活性(GO:0004553)和内肽酶抑制剂活性(GO:0004866)相关。细胞组分共富集到 5 个 GO term, 主要是质外体(GO:0005576)、细胞壁(GO:0005618)和细胞膜(GO:0005576 和 GO:0030312)。

同时比较干旱处理和去甲基化处理下所富集的 GO term 发现, 2 种处理都共同显著富集到催化活性

(GO:0003824)、氧化还原酶活性(GO:0016491 和 GO:0016682)、木糖基转移酶活性(GO:0016762)、内肽酶抑制剂活性(GO:0004866)、碳水化合物代谢过程、质外体(GO:0005576)、细胞壁(GO:0005618)和细胞膜(GO:0005576 和 GO:0030312)。

2.3 两种处理下共同差异表达基因表达聚类分析

聚类分析主要是把表达模式一致的差异表达基因归为一类。以干旱和 DNA 甲基化抑制剂处理下 A vs. Q 共同差异表达的 1354 个基因的表达量为目标, 对各样本进行表达层次聚类分析。由图 3 可知, A vs. Q 在干旱和 DNA 甲基化抑制剂处理下的表达模式基本一致。表达趋势主要分为: 2 种处理下持续下调表达基因, 说明与马铃薯响应干旱胁迫相关的负向调节基因受到 DNA 去甲基化的负调控; 以及 2 种处理下持续上调表达基因, 说明与马铃薯响应干旱胁迫相关的正向调节基因受到 DNA 去甲基化的正调控。

2.4 两种处理下共同差异表达基因 KEGG 功能富集分析

为了进一步分析 DNA 甲基化参与调控马铃薯干旱胁迫响应的相关基因的生物学功能, 利用 KEGG 数据库对 2 个马铃薯品种在甘露醇和 DNA 甲基化抑制剂处理下共同差异表达的基因进行通路分析发现, 1345 个差异表达基因显著富集到 12 个 KEGG pathways (图 4-A), 其中与植物抗旱相关的通路有 5 个, 分别是植物 MAPK 信号通路(KO04016, 富集到 DEG 有 11 个)、谷胱甘肽代谢(KO00480, 富集到 DEG 有 8 个)、糖酵解/糖异生(KO00010, 富集到 DEG 有 8 个)、磷酸肌醇代谢(KO00562, 富集到 DEG 有 5 个)、植物激素信号转导通路(KO04075, 富集到 DEG 有 14 个)。通过 pathview 绘制富集通路的基因在干旱和去甲基化处理下的表达模式和调控网络发现, 大西洋和青薯 9 号在响应干旱处理和 DNA 去甲基化处理下, 谷胱甘肽代谢(图 4-B)和磷酸肌醇代谢(图 4-C)通路中差异基因多为上调表达基因, 且 2 种处理下各时间点表达趋势类似。而 MAPK 信号(图 4-D)、糖酵解/糖异生代谢(图 4-E)和植物激素信号转导(图 4-F)通路中差异基因多为下调表达基因。这些基因的功能注释信息如表 4 所示。

2.5 两种处理下共同差异表达基因启动子分析

对 KEGG 富集到与植物抗旱相关的 5 个通路中的 39 个基因, 进行启动子区 CpG 岛预测和顺式作用元件分析。首先, 从马铃薯基因组序列中提取 39 个基因 1500 bp 的启动子序列。使用在线软件

图 2 差异基因的 GO 功能富集分析

Fig. 2 GO functional enrichment analysis of differential expressed genes

图 3 两种处理下共同差异基因层次聚类分析

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis of common differential genes under two treatments

MethPrimer 预测这些基因的启动子区域的 CpG 岛发现, 只有 1 个与植物谷胱甘肽代谢通路相关的基因 (*PGSC0003DMG400004977*) 含有 CpG 岛, 位于该基因启动子序列的 -736~ -866 之间, 大小为 131 bp (图 5)。同时, 使用在线数据库 Plant Care 对该基因启动子序列进行顺式作用元件分析发现, 在 *PGSC0003DMG400004977* 基因的 CpG 岛区域有 ABRE、CAAT-box、A-box 元件, 其中 ABRE 和 CAAT-box 与植物响应干旱胁迫相关。表明, 马铃薯在响应干旱胁迫时, 谷胱甘肽转移酶基因启动子区的 ABRE 和 CAAT-box 作用元件通过 DNA 去甲基化激活该基因的表达以应对逆境胁迫。

2.6 qRT-PCR 验证

从 KEGG 显著富集到的 5 条干旱相关通路的基因中随机挑选 22 个基因进行实时荧光定量 PCR 验证。利用反转录 cDNA 试剂盒将转录组测序时保存的 RNA 样品进行反转录, 使用 qRT-PCR 检测这些基因在不同处理下在大西洋和青薯 9 号中的相对表达量。结果表明, qRT-PCR 结果和转录组测序结果变化趋势基本一致 (图 6)。说明转录组测序数据的可靠性,

并进一步验证了这些基因对干旱和 DNA 甲基化抑制剂的响应。

3 讨论

植物对干旱胁迫反应的分子机制包括转录前表观遗传调控和转录后激素、转录因子、胁迫反应基因等信号分子的参与。研究发现, 植物通过基因组 DNA 甲基化和去甲基化的动态变化来迅速适应外部干旱环境, 表明 DNA 甲基化调控在植物响应干旱胁迫中起重要作用^[21]。本研究利用甘露醇和 DNA 甲基化抑制剂分别处理 2 种耐旱性不同的马铃薯试管苗, 通过比较 RNA-seq 分析 2 个品种转录本在相同处理和不同处理下 5 个时间点的基因表达变化, 在分子水平探究 DNA 甲基化如何参与调控马铃薯对干旱胁迫的响应。

植物通过升高或降低 DNA 在特定位点发生特定类型的甲基化水平, 来打开或关闭一系列与逆境响应相关的基因, 进而启动胁迫应答通路, 提高响应逆境相关酶活性, 从而防御逆境胁迫对植物功能基因表达造成的影响, 保护植物自身的生长发育^[15]。植物对干旱胁迫的耐受性是由复杂的多组分信号通路触发, 以恢复细胞动态平衡并促进植物生存^[22]。信号转导的一般途径包括由应激特异性受体 (如 G 蛋白偶联受体、蛋白激酶受体或磷酸肌醇) 检测和接受信号, 然后由第二信使扩增信号, 导致参与调控响应干旱胁迫功能基因的激活或表达调节蛋白活性的激活与抑制^[23]。Molina 等^[24]对鹰嘴豆根部在干旱处理下的转录组测序结果发现, 蛋白激酶基因和 Ca^{2+} 应答基因在感知水分胁迫信号中发挥重要作用。本研究也发现, 马铃薯在干旱胁迫下, 蛋白激酶 (*PGSC0003DMG400006639*)、 Ca^{2+} 结合蛋白 (*PGSC0003DMG400001333* 和 *PGSC0003DMG400001204*)、肌醇加氧酶 (*PGSC0003DMG401000287* 和 *PGSC0003DMG400004872*) 相关基因响应了干旱胁迫, 同时这些基因也响应了 DNA 去甲基化处理, 且 2 种处理下的表达模式基本一致, 说明马铃薯在响应干旱胁迫时蛋白激酶、 Ca^{2+} 结合蛋白、肌醇加氧酶相关基因的表达受到 DNA 甲基化的调控。

植物激素是一类小的内源性信号分子, 如生长素 (IAA)、赤霉素 (GA)、细胞分裂素 (CK)、脱落酸 (ABA)、乙烯 (ET)、茉莉酸 (JA) 和水杨酸 (SA)。植物激素是一种介质, 不仅作用于内源性发育过程, 而且还向多种激素反应途径提供环境刺激, 以适应不

图 4 两种处理下共同差异表达基因 KEGG 功能富集分析

Fig. 4 KEGG functional enrichment analysis of common differential genes under two treatments

表 4 共同富集 KEGG 与干旱相关通路基因功能注释

Table 4 Functional annotation of drought-related co-enrichment KEGG pathway genes

KEGG 通路 ID	基因 ID	对应拟南芥基因 ID	基因功能
KEGG ID	Gene ID	Gene in <i>A. thaliana</i>	Gene function
KO04016	PGSC0003DMG400000193	AT3G61510	1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2
KO04016	PGSC0003DMG400006639	AT3G25250	类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 OXI1 serine/threonine-protein kinase OXI1-like
KO04016	PGSC0003DMG400001333	AT5G39670	Ca ²⁺ 结合蛋白 Ca ²⁺ binding protein
KO04016	PGSC0003DMG400001529	AT3G12500	酸性 27-kD 内切酶 Acidic 27-kD endochitinase
KO04016	PGSC0003DMG400005108	AT3G19690	致病相关蛋白 1 pathogenesis-related protein 1-like
KO04016	PGSC0003DMG400005112	AT4G33720	碱性 PR-1 蛋白 Basic PR-1 protein
KO04016	PGSC0003DMG400005116	AT2G14580	PR1 蛋白 PR1 protein
KO04016	PGSC0003DMG400017231	AT3G23240	转录因子 TSRF1 Transcription factor TSRF1
KO04016	PGSC0003DMG400001204	AT5G49480	Ca ²⁺ 结合蛋白 1 Ca ²⁺ -binding protein 1
KO04016	PGSC0003DMG400005110	AT3G19690	PR1 蛋白 PR1 protein
KO04016	PGSC0003DMG400023921	AT2G14610	细胞质小热休克蛋白 I 类 Cytoplasmic small heat shock protein class I
KO00480	PGSC0003DMG400031091	AT1G17180	谷胱甘肽 S 转移酶 Glutathione S-transferase
KO00480	PGSC0003DMG400024232	AT1G23820	亚精胺合成酶 1 Spermidine synthase 1
KO00480	PGSC0003DMG400011012	AT2G29490	谷胱甘肽 S 转移酶 Glutathione S-transferase
KO00480	PGSC0003DMG400016722	AT3G03190	谷胱甘肽 S 转移酶 Glutathione S-transferase
KO00480	PGSC0003DMG400004977	AT5G41210	谷胱甘肽 S 转移酶 Glutathione S-transferase
KO00480	PGSC0003DMG400002169	AT3G09270	谷胱甘肽 S 转移酶 Glutathione S-transferase
KO00480	PGSC0003DMG400002176	AT3G09270	谷胱甘肽 S 转移酶 Glutathione S-transferase
KO00480	PGSC0003DMG400020253	AT3G27060	核糖核苷二磷酸还原酶小链 Ribonucleoside-diphosphate reductase small chain
KO00010	PGSC0003DMG400009472	AT1G22170	磷酸甘油酸变位酶 Phosphoglycerate mutase
KO00010	PGSC0003DMG400006270	AT4G33070	丙酮酸脱羧酶 Pyruvate decarboxylase
KO00010	PGSC0003DMG400030038	AT1G09870	多肌醇多磷酸磷酸酶 1 Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1
KO00010	PGSC0003DMG400030624	AT4G37840	己糖激酶 Hexokinase
KO00010	PGSC0003DMG400018084	AT3G47800	醛糖-1-表异构酶 Aldose-1-epimerase
KO00010	PGSC0003DMG403001316	AT5G15140	非细胞自主蛋白途径 2 Non-cell-autonomous protein pathway 2
KO00010	PGSC0003DMG400012308	AT5G57330	醛糖 1-表异构酶 Aldose 1-epimerase

(续表 4)

KEGG 通路 ID	基因 ID	对应拟南芥基因 ID	基因功能
KEGG ID	Gene ID	Gene in <i>A. thaliana</i>	Gene function
KO00010	<i>PGSC0003DMG400004800</i>	<i>AT4G17260</i>	L-乳酸脱氢酶 B L-lactate dehydrogenase B
KO00562	<i>PGSC0003DMG400022715</i>	<i>AT2G26870</i>	磷酸酯酶家族蛋白 Phosphoesterase family protein
KO00562	<i>PGSC0003DMG401000287</i>	<i>AT4G26260</i>	肌醇加氧酶 Myo-inositol oxygenase
KO00562	<i>PGSC0003DMG400004872</i>	<i>AT1G14520</i>	肌醇加氧酶 Myo-inositol oxygenase
KO00562	<i>PGSC0003DMG400030038</i>	<i>AT1G09870</i>	多肌醇多磷酸酯酶 1 Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1
KO00562	<i>PGSC0003DMG401023603</i>	<i>AT3G02870</i>	肌醇单磷酸酯酶 1 Inositol monophosphatase 1
KO04075	<i>PGSC0003DMG400019274</i>	<i>AT5G54510</i>	吲哚-3-乙酰胺合成酶 GH3.6 Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6
KO04075	<i>PGSC0003DMG400005108</i>	<i>AT3G19690</i>	致病相关蛋白 1 pathogenesis-related protein 1-like
KO04075	<i>PGSC0003DMG400005112</i>	<i>AT4G33720</i>	碱性 PR-1 蛋白 Basic PR-1 protein
KO04075	<i>PGSC0003DMG400021210</i>	<i>AT5G45110</i>	NIM1 1
KO04075	<i>PGSC0003DMG400020139</i>	<i>AT5G43700</i>	生长素诱导蛋白 22B Auxin-induced protein 22B
KO04075	<i>PGSC0003DMG400005116</i>	<i>AT2G14580</i>	PR1 蛋白 PR1 protein
KO04075	<i>PGSC0003DMG400017231</i>	<i>AT3G23240</i>	转录因子 TSRF1 Transcription factor TSRF1
KO04075	<i>PGSC0003DMG400005110</i>	<i>AT3G19690</i>	PR1 蛋白 PR1 protein
KO04075	<i>PGSC0003DMG400021676</i>	<i>AT4G03400</i>	吲哚-3-乙酰胺合成酶 GH3.5 Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5
KO04075	<i>PGSC0003DMG400025856</i>	<i>AT2G14960</i>	生长素和乙烯响应性 GH3 Auxin and ethylene responsive GH3
KO04075	<i>PGSC0003DMG400023921</i>	<i>AT2G14610</i>	细胞质小热休克蛋白 I 类 Cytoplasmic small heat shock protein class I
KO04075	<i>PGSC0003DMG400026261</i>	<i>AT5G47220</i>	ATERF-2/ATERF2/ERF2
KO04075	<i>PGSC0003DMG400024978</i>	<i>AT2G14960</i>	吲哚-3-乙酰胺合成酶 GH3.3 Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.3
KO04075	<i>PGSC0003DMG400013765</i>	<i>AT4G32280</i>	ATP 结合蛋白 ATP binding protein

图 5 谷胱甘肽 S 转移酶基因启动子分析
Fig. 5 Analysis of glutathione S-transferase gene promoter

图 6 干旱和 5-azadC 处理下差异表达基因的 qRT-PCR 验证
Fig. 6 qRT-PCR validation of differentially expressed genes under drought and 5-azadC treatment

利条件^[25-26]。Jain 和 Khurana^[27]发现, 水稻生长素反应相关基因在生殖发育和非生物胁迫过程中受到不同程度的调控。本研究也得到了类似的结果, 在“植物激素信号转导”中富集到 14 个基因, 其中 5 个是生长素信号转导基因, 编码“生长素响应蛋白”和“GH3 生长素响应基因”。因此, 我们推测生长素可能在马铃薯响应干旱胁迫中起重要作用。本研究还鉴定到与 ABA、ET 和 SA 调控相关的基因。共有 9 个差异表达基因, 分别编码 ERF2 转录因子(PGSC0003DMG400026261)、PR1 蛋白(PGSC0003DMG400005108、PGSC0003DMG400005112、PGSC0003DMG400005116 和 PGSC0003DMG400005110)和热休克蛋白(PGSC0003DMG400023921); 同时 PR1 蛋白和热休克蛋白也被富集到植物 MAPK 信号转导通路。这些基因在 2 种处理下的表达模式基本一致, 这是因为在马铃薯响应干旱胁迫时, DNA 甲基化参与了这些基因的表达调控。此外, 本研究还发现了参与植物糖酵解和糖异生途径的相关基因, 如磷酸甘油酸变位酶(PGSC0003DMG400009472)、丙酮酸脱羧酶(PGSC0003DMG400006270)、己糖激酶(PGSC0003DMG400030624), 在马铃薯响应干旱胁迫时受 DNA 甲基化的调控。

植物谷胱甘肽代谢中有 3 种重要的酶, 分别是谷胱甘肽还原酶(GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(GP)和谷胱甘肽 S 转移酶(GST)。这 3 种酶活性的变化与植物应对逆境胁迫密切相关^[28]。其中 GST 是在动植物中编码的多功能蛋白的一个基因家族。同时 GST 也在参与干旱、盐、重金属等氧化应激的反应中发挥重要功能。过量的 ROS 诱导 GST 水平升高, 使得 GST 对外源物质的解毒和应激代谢中发挥关键作

用^[29]。Xu 等^[30]获得了高表达番茄谷胱甘肽 S-转移酶的转基因拟南芥, 命名为 *LeGSTU2*, 该转基因拟南芥具有较强的耐盐性和抗旱性, 同时也发现转基因植株中脯氨酸、丙二醛含量以及抗氧化酶活性的变化与植物抗逆性相关。与野生型相比, 干旱处理过的拟南芥, *AtGSTF14* 启动子区重复序列的 DNA 甲基化水平显著降低, 同时 *AtGSTF14* 基因表达水平显著升高^[31]。本研究也得到类似结果, 对抗旱性不同的马铃薯品种共同响应干旱和 DNA 去甲基化处理下的差异表达基因进行功能富集, 结果显示, 有 8 个 DEG 显著富集到植物谷胱甘肽代谢通路, 其中有 6 个属于谷胱甘肽 S 转移酶基因。同时差异基因启动子区分析表明, 在谷胱甘肽 S 转移酶基因(PGSC0003DMG400004977)的 CpG 岛区域有与植物响应干旱胁迫相关的 ABRE 和 CAAT-box 作用元件。推测马铃薯在响应干旱胁迫时, 可能通过 DNA 去甲基化来降低该基因启动子区的 ABRE 和 CAAT-box 作用元件的甲基化水平, 进而激活该基因的表达以应对干旱胁迫(图 7)。

图 7 干旱胁迫下马铃薯 *GST* (PGSC0003DMG400004977) 基因 DNA 去甲基化调控模式

Fig. 7 Regulatory pattern of DNA demethylation of potato *GST* (PGSC0003DMG400004977) gene under drought stress

以上结果表明, 利用比较转录学分析干旱和 DNA 去甲基化处理下差异表达基因, 可挖掘到通过 DNA 甲基化参与调控马铃薯响应干旱胁迫的相关基因, 为研究马铃薯干旱胁迫响应的表观遗传学机理提供新的研究思路。同时, 本研究中有 DNA 甲基化具体调控马铃薯响应干旱胁迫的机制尚不清楚, 后续研究可通过检测差异表达基因启动子区 DNA 甲基化水平来进一步解析其蕴含的生物学意义。

4 结论

本研究对甘露醇和 5-azadC 处理下抗旱性不同的 2 个马铃薯品种进行比较转录组分析发现, 1345 个 DEG 既响应干旱又响应 DNA 去甲基化。这些基

因功能富集结果显示,与植物抗旱相关的通路有植物 MAPK 信号通路、谷胱甘肽代谢、糖酵解/糖异生、磷酸肌醇代谢和植物激素信号转导通路。差异基因启动子分析表明,干旱胁迫下 GST 基因通过 DNA 去甲基化来降低启动子区 ABRE 和 CAAT-box 作用元件的甲基化水平,进而激活该基因的表达以应对干旱胁迫。本研究结果将为进一步解析马铃薯响应干旱胁迫的表现遗传学调控机理提供理论依据。

References

- [1] 余林辉,蔡晓腾,徐萍,向成斌.植物抗旱节水:从实验室到田间.中国科学:生命科学,2017,47:145-154.
Yu L H, Cai X T, Xu P, Xiang C B. Drought resistant and water-saving plants: from laboratory to field. *Sci Sin (Vita)*, 2017, 47: 145-154 (in Chinese with English abstract).
- [2] Fang Y, Xiong L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 673-689.
- [3] 刘玉冰,李新荣,李蒙蒙,刘丹,张雯莉.中国干旱半干旱区荒漠植物叶片(或同化枝)表皮微形态特征.植物生态学报,2016,40:1189-1207.
Liu Y B, Li X R, Li M M, Liu D, Zhang W L. Leaf (or assimilation branch) epidermal micromorphology of desert plant in arid and semi-arid areas of China. *Chin J Plant Ecol*, 2016, 40: 1189-1207 (in Chinese with English abstract).
- [4] 朱健康,倪建平.植物非生物胁迫信号转导及应答.中国稻米,2016,22(6):52-60.
Zhu J K, Ni J P. Abiotic stress signaling and responses in plants. *China Rice*, 2016, 22(6): 52-60 (in Chinese with English abstract).
- [5] 余斌,杨宏羽,王丽,刘玉汇,白江平,王蒂,张俊莲.引进马铃薯种质资源在干旱半干旱区的表型性状遗传多样性分析及综合评价.作物学报,2018,44:63-74.
Yu B, Yang H Y, Wang L, Liu Y H, Bai J P, Wang D, Zhang J L. Genetic diversity analysis and comprehensive assessment of phenotypic traits in introduced potato germplasm resources in arid and semi-arid area. *Acta Agron Sin*, 2018, 44: 63-74 (in Chinese with English abstract).
- [6] Banerjee A, Roychoudhury A. Epigenetic regulation during salinity and drought stress in plants: histone modifications and DNA methylation. *Plant Gene*, 2017, 11: 199-204.
- [7] Pikaard C S, Mittelsten S O. Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6: a019315.
- [8] Vanyushin B F, Ashapkin V V. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809: 360-368.
- [9] Gallusci P, Hodgman C, Teyssier E, Seymour G B. DNA methylation and chromatin regulation during fleshy fruit development and ripening. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 807.
- [10] 赵云雷,叶武威,王俊娟,樊保香,宋丽艳. DNA 甲基化与植物抗逆性研究进展.西北植物学报,2009,29:1479-1489.
Zhao Y L, Ye W W, Wang J J, Fan B X, Song L Y. Review of DNA methylation and plant stress-tolerance. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2009, 29: 1479-1489 (in Chinese with English abstract).
- [11] Fei Y, Xue Y, Du P, Yang S, Deng X. Expression analysis and promoter methylation under osmotic and salinity stress of *TaGAPC1* in wheat (*Triticum aestivum* L). *Protoplasma*, 2017, 254: 987-996.
- [12] McLoughlin F, Arisz S A, Dekker H L, Kramer G, de Koster C G, Haring M A, Munnik T, Testerink C. Identification of novel candidate phosphatidic acid-binding proteins involved in the salt-stress response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Biochem J*, 2013, 450: 573-581.
- [13] Liang D, Zhang Z, Wu H, Huang C, Shuai P, Ye C Y, Tang S, Wang Y, Yang L, Wang J. Single-base-resolution methylomes of *Populus trichocarpa* reveal the association between DNA methylation and drought stress. *BMC Genet*, 2014, 15: S9.
- [14] Abid G, Mingeot D, Muhovski Y, Mergeai G, Aouida M, Abdelkarim S, Aroua I, El Ayed M, M'hamedi M, Sassi K. Analysis of DNA methylation patterns associated with drought stress response in faba bean (*Vicia faba* L.) using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Environ Exp Bot*, 2017, 142: 34-44.
- [15] 李鹏程,毕真真,梁文君,孙超,张俊莲,白江平. DNA 甲基化参与调控马铃薯干旱胁迫响应.作物学报,2019,45:1595-1603
Li P C, Bi Z Z, Liang W J, Sun C, Zhang J L, Bai J P. DNA methylation involved in regulating drought stress response of potato. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 1595-1603 (in Chinese with English abstract).
- [16] Garg R, Shankar R, Thakkar B, Kudapa H, Krishnamurthy L, Mantri N, Varshney R K, Bhatia S, Jain M. Transcriptome analyses reveal genotype- and developmental stage-specific molecular responses to drought and salinity stresses in chickpea. *Sci Rep*, 2016, 6: 19228.
- [17] Zhou Y, Yang P, Cui F, Zhang F, Luo X, Xie J. Transcriptome analysis of salt stress responsiveness in the seedlings of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *PLoS One*, 2016, 11: e0146242.
- [18] Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, Vilo J. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: W191-W198.
- [19] Li L C, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 2002, 18: 1427-1431.
- [20] Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 325-327.
- [21] 李艳,钱伟强.植物中 DNA 甲基化及去甲基化研究进展.生命科学,2017,29:302-309.
Li Y, Qian W Q. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in plants. *Chin Bull Life Sci*, 2017, 29: 302-309 (in Chinese with English abstract).
- [22] Golladack D, Li C, Mohan H, Probst N. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 151.

- [23] 王凯悦, 陈芳泉, 黄五星. 植物干旱胁迫响应机制研究进展. 中国农业科技导报, 2019, 21(2): 19–25.
Wang K Y, Chen F Q, Huang W X. Research advance on drought stress response mechanism in plants. *J Agric Sci Technol*, 2019, 21(2): 19–25 (in Chinese with English abstract).
- [24] Molina C, Rotter B, Horres R, Udupa S M, Besser B, Bellarmino L, Baum M, Matsumura H, Terauchi R, Kahl G, Winter P. SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC Genomics*, 2008, 9: 553.
- [25] Ha C V, Leyva-Gonzalez M A, Osakabe Y, Tran U T, Nishiyama R, Watanabe Y, Tanaka M, Seki M, Yamaguchi S, Dong N V, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Herrera-Estrella L, Tran L S. Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 851–856.
- [26] Verma V, Ravindran P, Kumar P P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol*, 2016, 16: 86.
- [27] Jain M, Khurana J P. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *FEBS J*, 2009, 276: 3148–3162.
- [28] 陈坤明, 宫海军, 王锁民. 植物谷胱甘肽代谢与环境胁迫. 西北植物学报, 2004, 24: 1119–1130.
Chen K M, Gong H J, Wang S M. Glutathione metabolism and environmental stresses in plants. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2004, 24: 1119–1130 (in Chinese with English abstract).
- [29] Li Z, Yu J, Peng Y, Huang B. Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and gamma-aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Physiol Plant*, 2017, 159: 42–58.
- [30] Xu J, Xing X J, Tian Y S, Peng R H, Xue Y, Zhao W, Yao Q H. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing tomato glutathione S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress. *PLoS One*, 2015, 10: e0136960.
- [31] 孟大伟, 王悦, 李沛璇, 赵宇威, 周瑶, 韩玉, 郎晨婧, 金太成, 杨丽萍. 干旱诱导 *AtGSTF14* 基因 DNA 去甲基化. 分子植物育种, 2020, 18: 6108–6113.
Meng D W, Wang Y, Li P X, Zhao Y W, Zhou Y, Han Y, Lang C J, Jin T C, Yang L P. Drought-introduced DNA demethylation of *AtGSTF14* gene. *Mol Plant Breed*, 2020, 18: 6108–6113 (in Chinese with English abstract).