DOI: 10. 11686/cyxb2025485 http://cyxb. magtech. com. cn
李欣钰, 王学敏, 李明娜, 等. 扁穗冰草全长转录组测序及不同生长时期叶片的转录组分析. 草业学报, 2026, 35(12): 165－182.
LI Xin-yu, WANG Xue-min, LI Ming-na, *et al*. Full-length transcriptome sequencing and comparative transcriptome analysis of leaves across different growth stages in *Agropyron cristatum*. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(12): 165－182.

扁穗冰草全长转录组测序及不同生长时期叶片的转录组分析

李欣钰[1,2], 王学敏[2], 李明娜[2*], 朱梦妹[1], 李如月[2], 徐嫣然[2], 丁旺[3], 张夏香[1*]
(1. 南京农业大学草业学院, 江苏 南京 210095; 2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 3. 歌拉斯(北京)科技发展有限公司, 北京 101399)

摘要: 扁穗冰草是一种具有重要生态与经济价值的多年生草本植物, 因其较强的抗旱和耐寒能力, 广泛分布于我国东北、西北及内蒙古等干旱半干旱地区。本研究结合第三代全长转录组测序与第二代转录组测序技术, 对不同生长天数(20、28和42 d)的扁穗冰草叶片进行了转录组分析。通过三代全长转录组测序, 共获得了61. 17 GB的数据量, 包含23889644条环形一致性序列(CCS), 从中筛选出23862353条全长非嵌合序列(FLNC), 在NCBI非冗余蛋白数据库(NR)、NCBI核酸序列数据库(NT)、基因本体数据库(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)和真核生物直系同源基因簇数据库(KOG)5大数据库进行基因功能注释后, 共有95580个转录本在所有数据库中均被成功注释。表型观测结果显示, 随着生长进程推进, 扁穗冰草的株高、分蘖数和叶片生物量均显著增加, 尤其是在28至42 d期间, 生物量积累达到较高水平。基于二代测序数据的分析表明, 在L_28与L_20比较组中鉴定出22380个差异基因, L_42与L_20比较组中鉴定出23789个, 而L_42与L_28比较组中鉴定出7208个。KEGG富集分析显示, 这些差异基因主要参与谷胱甘肽代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、光合作用及植物激素信号转导等重要通路。进一步分析发现, 光合作用相关基因及激素(如生长素、细胞分裂素)信号转导基因的表达水平在扁穗冰草不同生长阶段呈显著变化。此外, bHLH、AP2/ERF等转录因子家族也广泛参与扁穗冰草叶片生长调控。综上所述, 本研究系统解析了扁穗冰草叶片在不同生长阶段中的转录组动态, 为深入探究其生物学特性、特有表型形成的分子机制提供了参考和数据支持。

关键词: 扁穗冰草; 二代转录组测序; 三代全长转录组; 转录因子; 光合作用; 植物激素

Full-length transcriptome sequencing and comparative transcriptome analysis of leaves across different growth stages in *Agropyron cristatum*

LI Xin-yu[1,2], WANG Xue-min[2], LI Ming-na[2*], ZHU Meng-mei[1], LI Ru-yue[2], XU Yan-ran[2], DING Wang[3], ZHANG Xia-xiang[1*]

1. *College of Agro-grassland Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095, *China*; 2. *Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100193, *China*; 3. *Agros (Beijing) Technology Development Company limited, Beijing* 101399, *China*

Abstract: *Agropyron cristatum* is a perennial grass species with important ecological and economic value, known for its strong drought and cold tolerance, and is widely distributed in arid and semi-arid areas of China, including the

收稿日期: 2025-11-27; 改回日期: 2026-03-23
基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFD1200303)资助。
作者简介: 李欣钰(2002－), 男, 山西长治人, 在读硕士。E-mail: 2024820051@stu. njau. edu. cn
*通信作者 Corresponding author. E-mail: limingna@caas. cn, xiaxiang. zhang@njau. edu. cn

Northeast, Northwest, and Inner Mongolia. This study integrated third-generation full-length transcriptome sequencing and second-generation transcriptome sequencing to analyze the transcriptomes of *A. cristatum* leaves at different growth stages (20, 28, and 42 days; L_20, L_28 and L_42, respectively). The third-generation sequencing obtained 61.17 GB of data, comprising 23889644 circular consensus sequences (CCS), among which 23862353 full-length non-chimeric (FLNC) sequences were obtained. After functional annotation in five major databases NCBI non-redundant protein (NR), NCBI nucleotide sequences (NT), gene ontology (GO), Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG), and euKaryotic Ortholog groups (KOG), a total of 95580 transcripts were successfully annotated in all databases. Phenotypic observations revealed that plant height, tiller number, and leaf biomass of *A. cristatum* increased significantly during growth, with biomass accumulation reaching a high level particularly between 28 and 42 days. Analysis based on second-generation sequencing identified a total of 22380 differentially expressed genes (DEGs) between L_28 and L_20, 23789 DEGs were identified between L_42 and L_20, and 7208 DEGs were identified between L_42 and L_28. KEGG enrichment analysis showed that these DEGs were mainly involved in pathways such as glutathione metabolism, arginine and proline metabolism, photosynthesis, and plant hormone signal transduction. Further analysis indicated that the expression levels of photosynthesis-related genes and hormone (such as auxin, cytokinin) signaling transduction genes changed significantly across different growth stages. In addition, transcription factor families such as bHLH and AP2/ERF were widely involved in the regulation of leaf growth in *A. cristatum*. In summary, this study systematically elucidated the transcriptomic dynamics in *A. cristatum* leaves at different growth stages, providing valuable insights and data support for further research into the underlying molecular mechanisms of its biological characteristics and its specific phenotypic traits.

Key words: *Agropyron cristatum*; second-generation transcriptome sequencing; third-generation full-length transcriptome; transcription factors; photosynthesis; plant hormones

扁穗冰草(*Agropyron cristatum*)是禾本科小麦族(Triticeae)多年生草本植物,具有栽培简便、根系发达、生长迅速、生物量高和产草量大等特点,饲用价值突出,因此在我国东北、西北以及内蒙古自治区等地被广泛栽培利用[1-2]。此外,扁穗冰草还表现出显著的生态适应性,抗逆性强,能在-40 ℃的严寒环境下安全越冬,并具备优异的抗旱能力,在年降水量230~380 mm的地区仍能良好生长[3],是北方干旱地区水土保持和生态绿化的优良植物[4]。扁穗冰草作为一种抗逆性强、管理成本低且具有高产潜力的作物,在应对气候变化和全球粮食安全挑战的背景下,受到越来越多的关注。解析扁穗冰草生长发育及牧草产量相关性状的遗传基础,有助于深入理解其生长特性与适应机制,并为提升其农学价值提供理论依据,进而推动品种改良,对提高扁穗冰草作为饲料作物的生产效率与种植可持续性具有重要意义。

叶片是植物进行光合作用的主要器官,其发育过程受光照条件的严格调控。作为植物生长发育的核心生理过程,光合作用直接影响生物量的积累、能量代谢以及对环境的适应能力[5]。在叶片发育的不同阶段,光合机构的组装、光能捕获效率以及碳同化能力均呈动态变化,这一过程受到多层级基因调控网络的精密调控[6]。在转录层面,核心转录因子(如GLK、HY5)能够直接结合光合基因启动子区域以激活其表达[7]。在转录后调控方面,主要涉及microRNA(如miR156通过靶向SPL影响发育阶段转换)[8],及RNA结合蛋白可对mRNA进行加工与稳定性控制。在表观遗传层面,DNA甲基化和组蛋白修饰则通过改变染色质状态来影响基因的表达[9]。此外,叶绿体至细胞核的反向信号通路,进一步协调了细胞核基因表达与叶绿体功能状态,从而确保叶片在不同发育阶段均能精确实现光合作用的高效运行[10]。

扁穗冰草作为典型的C_3植物,其光合效率与分蘖能力及生物量积累密切相关,然而其内在的分子机制仍有待系统解析。在植物生长发育过程中,植物激素发挥着关键调控作用[11]。植物激素是指在植物体内合成的微量天然有机化合物[12],作为内源信号调节因子,它们通过复杂的调控网络协调植物的生长发育进程及其对环境适应

的响应[13]。在植物发育过程中，生长素（auxin，IAA）、赤霉素（gibberellin，GA）、细胞分裂素（cytokinin，CTK）和油菜素内酯（brassinosteroids，BR）等激素通过相互作用，共同调控细胞分裂、分蘖发生以及生物量的积累[14]。IAA作为首个被鉴定的植物激素，在细胞伸长、叶片形态建成和极性运输等过程中发挥重要功能。IAA和CTK共同参与调控植物顶端优势，其中IAA通过生长素/吲哚-3-乙酸蛋白（auxin/indole-3-acetic acid protein，Aux/IAA）和生长素响应因子（auxin response factors，ARF）模块抑制侧芽生长，而CTK通过B型反应调节因子（type-B authentic response regulator，B-ARR）激活侧芽生长[15]。此外，IAA与BR通过协同信号转导共同促进细胞伸长与分化[16]。GA通过降解DELLA蛋白，解除其对BR信号核心转录因子BZR1（brassinazole-resistant 1）的抑制，从而激活BZR1的转录活性，促进植物生长[17]。

随着测序技术不断发展，转录组测序技术已被广泛用于医学、生物学及农学等领域。通过对不同时期或不同处理下的植物样品进行转录组测序，可以检测植物基因表达动态，识别出差异表达基因，进而鉴定出可能参与调控植物生长发育及胁迫响应的关键候选基因。例如，樊璐等[18]以蒙古冰草（*Agropyron mongolicum*）为研究对象，结合二代和三代转录组测序技术筛选抗旱相关基因，发现干旱处理后*ERF053*、*ERF055*、*NAC100*、*bZIP23*、*ERF5*和*NAM-B1*等基因的表达量显著上升，表明这些基因可能在抗旱调控中发挥关键作用。王贺萍等[19]同样以蒙古冰草为材料，利用PacBio三代测序技术挖掘参与木质素合成的羟化酶基因，共获得7个可能参与木质素单体合成的羟化酶转录本，包括4个*F5H*、1个*C3H*及2个*C4H*。扁穗冰草基因组较大且杂合度高，目前尚未获得高质量的参考基因组，且采用二代及三代转录组测序技术筛选在其生长发育过程中的关键基因也少见报道。本研究以不同生长天数（20、28和42 d）的扁穗冰草为材料，采用三代全长转录组测序技术构建其高质量的全长转录本参考序列数据库，并以此为基础开展二代比较转录组分析，筛选不同生长天数扁穗冰草叶片的差异表达基因，并进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析，解析扁穗冰草叶片在生长过程中的转录组动态变化规律，以期为今后深入探究扁穗冰草生物学特性及其特有表型形成的分子机制提供数据基础与基因资源。

1　材料与方法

1.1　试验材料

本试验于2024年11月在南京农业大学草类植物逆境生理与生物学实验室进行，供试材料为扁穗冰草，由歌拉斯（北京）科技发展有限公司提供。

1.2　试验方法

1.2.1　种子萌发及植株培养　选取籽粒饱满、大小均匀的扁穗冰草种子，用5%次氯酸钠溶液消毒5 min，经蒸馏水冲洗5次后，将种子置于铺有3层润湿滤纸的培养皿中，放入植物生长箱（ZRX-1100G，宁波科晟，宁波，中国）进行萌发，培养箱温度设为（24±1）℃，光周期为16 h光照/8 h黑暗，培养期间定期喷洒蒸馏水以保持滤纸湿润。种子萌发5 d后，将幼苗转移至人工气候室（XBQH-1，旭邦，山东济南，中国）继续水培。气候室环境设置为昼/夜温度25 ℃/20 ℃，空气相对湿度70%，光照强度500 μmol·m^{-2}·s^{-1}。幼苗培养采用水培方式，使用42 cm×30 cm×12 cm的周转箱，幼苗分蘖节处用海绵包裹固定于水培板孔中，使根系充分浸入霍格兰营养液，营养液每周更换一次。

1.2.2　形态指标测定　选取30株长势良好且均匀一致的扁穗冰草植株进行编号，分别于第20、28和42天追踪并记录其形态指标。使用直尺测量株高，通过目测计数分蘖数。此外，每个时间点采集4株长势良好且均匀一致的植株，取叶片用分析天平（BSA224S，赛多利斯，北京，中国）测定鲜重，设3组生物学重复，鲜重测定完成后，将每组叶片分别装入信封，置入80 ℃烘箱中烘干至恒重后，使用分析天平测定干重。

1.3　转录组取样与测序

1.3.1　转录组样品采集　选取长势良好且均匀一致的扁穗冰草植株，分别于第20、28及42天采集整株植株，用于三代全长转录组测序，同时采集扁穗冰草植株全株叶片用于二代比较转录组分析，每组设3个生物学重复。样品经纯净水冲洗擦干后，装入冻存管立即置于液氮中速冻，并保存于－80 ℃冰箱备用。

1.3.2 总RNA提取与检测　将扁穗冰草样本委托北京诺禾致源科技股份有限公司进行总RNA提取及质量检测，使用琼脂糖凝胶电泳评估RNA完整性及污染情况，通过Nanodrop微量分光光度计(MICRO DROP，宝予德，北京，中国)检测RNA的纯度(OD_{260}/OD_{280})，采用Qubit荧光计(Qubit3.0，Invitrogen，卡尔斯巴德市，加利福尼亚州，美国)对RNA浓度进行精确定量，利用Agilent 2100生物分析仪(G2939A，Agilent Technologies，圣克拉拉市，加利福尼亚州，美国)精确评估RNA的完整性。

1.3.3 三代全长转录组测序与数据分析　使用PacBio Revio测序平台对不同时间点扁穗冰草整株植株RNA样本混合而成的总样本进行三代全长转录组测序。全长转录组文库构建流程如下：使用Oligo(dT)磁珠(Iso-Seq Express Oligo Kit，Pacific Biosciences，门洛帕克市，加利福尼亚州，美国)富集含有polyA尾的mRNA；利用SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit(Clontech，Takara Bio USA，圣何塞市，加利福尼亚州，美国)将mRNA反转录为cDNA；通过PCR扩增富集cDNA，并优化循环数以确定最佳扩增条件；利用磁珠进行片段筛选后进行大规模PCR，以获得足量cDNA；对全长cDNA进行损伤修复、末端修复，并连接SMRT哑铃型接头以构建全长转录组文库；使用核酸外切酶消化去除未成功连接接头的cDNA序列；最后结合引物与DNA聚合酶，形成最终的SMRT bell文库进行上机测序。

采用PacBio官方软件SMRTlink处理原始测序数据，首先通过环型一致性序列(circular consensus sequence，CCS)分析获得高质量读数；然后根据CCS是否包含5′-引物、3′-引物、poly-A尾，将其分类为全长非嵌合序列(full-length non chimera，FLNC)和非全长非嵌合序列(non-full-length，nFL)；使用hierarchical n*log(n)算法对同一转录本的FLNC序列进行聚类，得到一致性序列；最后通过抛光步骤对一致性序列进行精校，获得高质量的全长转录本序列用于后续分析。

为进一步提升数据准确性，利用同一样本的二代Illumina测序数据，通过LoRDEC[20]对上述全长转录本进行校正，最后使用CD-HIT软件[21]对校正后的序列进行去冗余处理，最终获得一套高质量的非冗余转录本序列，即全长转录本序列，作为后续分析的参考序列。

1.3.4 二代转录组测序与差异表达分析　取生长20、28和42 d的叶片RNA质检合格样品，构建cDNA文库，并于Illumina NovaSeq平台进行测序。使用fastp软件[22]对原始数据进行质控过滤，去除含接头、含未知碱基比例高于10%、均为A碱基以及质量值Q≤20的碱基数占整条读长50%以上的低质量序列，获得高质量清洁序列用于后续分析。将各样本的高质量清洁序列比对至由三代测序获得的全长转录本参考序列上，采用RSEM软件[23]进行基因表达量定量。差异表达基因(differentially expressed genes，DEGs)的筛选标准为：$|\log_2(\text{Fold Change})|>1$，且FDR(false discovery rate)<0.05。

1.4 RT-qPCR验证

为验证转录组测序结果的可靠性，选取6个DEGs利用RT-qPCR技术进行表达量验证。使用NCBI Primer-BLAST工具设计基因特异性引物(表1)，并以扁穗冰草*β-Actin*[24]作为内参进行标准化。将高质量RNA样本使用UnionScript First-strand cDNA Synthesis Mix(北京金沙生物科技有限公司，北京，中国)反转录为cDNA，使用Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物技术有限责任公司，南京，中国)在ABI 7300实时PCR系统(Applied Biosystems，福斯特城，加利福尼亚州，美国)上进行RT-qPCR分析。不同时间点样品设置3个生物学重复，以及3个技术重复，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法[25]计算各基因的相对表达量。

1.5 数据处理

采用Microsoft Excel 2020对数据进行整理分析，运用SPSS 27.0对数据进行单因素ANOVA分析，用Duncan多重比较法进行差异显著性检验($P<0.05$)。使用SigmaPlot 15.0制图。在诺禾致源公司云平台(https://css.novogene.com/)进行差异基因KEGG通路富集分析并绘图。

2 结果与分析

2.1 不同生长天数扁穗冰草地上部形态指标

在20 d时，扁穗冰草平均株高为20.8 cm(范围18.2～24.3 cm)，平均分蘖数为1.9(范围1～2)，平均地上部

鲜重和干重分别为 0.1257 g·株$^{-1}$和 0.0188 g·株$^{-1}$。在 28 d 时，平均株高达 24.7 cm（范围 23.3～28.3 cm），平均分蘖数为 3.2（范围 3～4），平均地上部鲜重和干重分别增至 0.4616 和 0.0853 g·株$^{-1}$（图 1）。42 d 时，株高与分蘖数进一步上升，平均株高达 34.9 cm（范围 31.7～39.9 cm），平均分蘖数为 7.2（范围 5～10），叶片生物量亦显著增加，平均地上部鲜重和干重分别达到 2.3657 和 0.7317 g·株$^{-1}$。综上，扁穗冰草在 28 至 42 d 期间表现出较强的生长潜力与分蘖能力，株高、分蘖数及叶片生物量均显著增长。

表 1　实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1　Primer sequences for RT-qPCR

引物 Primer	正向 Forward（5′－3′）	反向 Reverse（5′－3′）
β-Actin	GAGCGTGGTTACTCATTCA	TGCCGTACAGATCCTTCC
COG1	TGTCAATCCAGCTCACCACC	CCACACCTTGCCATTACCCT
FtsH11	TCCCTAGTCCTGATGTGCGA	TCAGCCCCATTAAAGCCAGG
γ-ECS	TGCCCACTTTGAACGATT	CTTGGCTAACTGGAGAACAT
CPI1	GAAGTGGGTCCTTTCCAGGG	CACCGTCTTGATTCGGGGAT
DHAR	CACTTGTGACCCCTCCTG	TTCGCCCCGCCGATGTAG
GR	CAACTGGTAGCCGAGCAA	ACTTCAGCACCCAACCCT

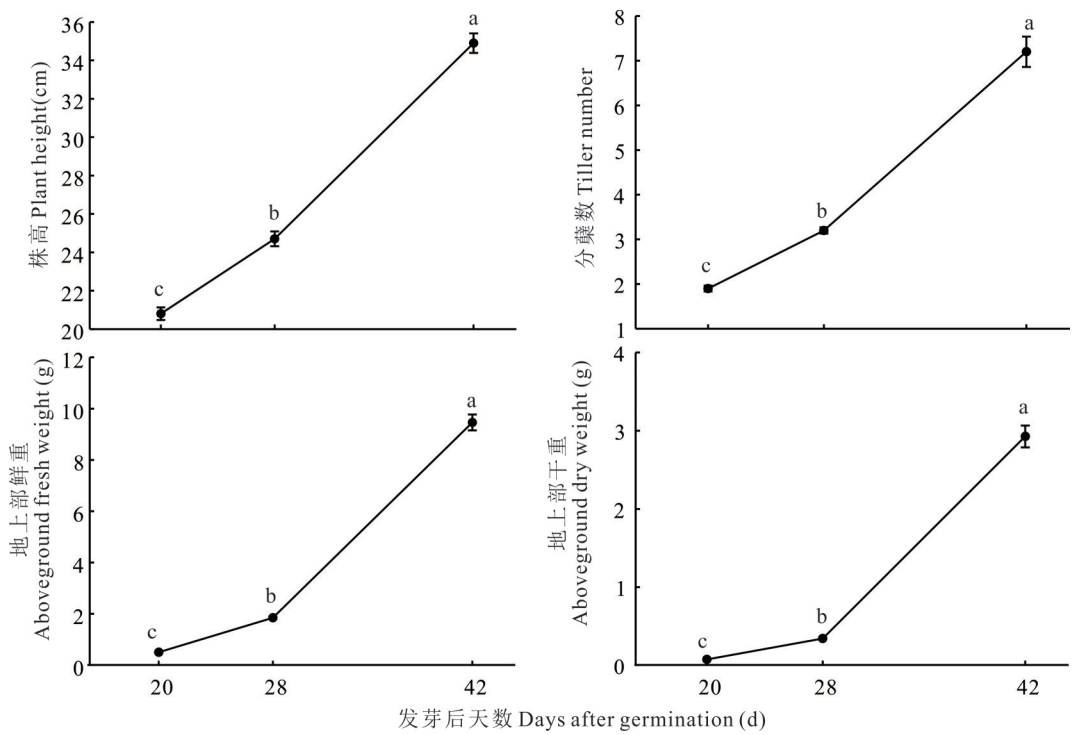

图 1　不同生长天数扁穗冰草地上部形态指标

Fig. 1　Morphological indicators of the aboveground part of *A. cristatum* during different growth stages

图中所示地上部鲜重、地上部干重为 4 株扁穗冰草植株的生物量。不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。The aboveground fresh weight and aboveground dry weight represent the biomass of four crested wheatgrass plants. Different lowercase letters indicate significant difference at the 0.05 level.

2.2　三代全长转录组测序分析

通过 PacBio Revio 高通量测序技术，对生长 20、28 和 42 d 扁穗冰草叶片及根系的混合样品进行全长转录组测序，获得了 61.17 GB 的数据量。通过 ZMW 孔筛选得到 23889644 条 CCS 序列，平均序列长度为 1433.6 bp，其中包括 FLNC 序列 23862353 条，序列的平均长度为 1325.8 bp。对 FLNC 序列聚类去冗余后，获得 1828762 条共

有(consensus)序列,经Arrow软件校正获得校正一致(polished consensus)序列。同时,使用LoRDEC软件以二代数据对PacBio三代数据进行校正,再通过CD-HIT软件按95%相似性聚类去冗余,最终获得397407条非冗余序列,平均长度为1539 bp,N50为1616 bp。

2.3 全长转录组功能注释

为获得全面的全长转录本功能信息,采用NCBI非冗余蛋白数据库(NCBI non-redundant protein sequences,NR)、瑞士生物信息学研究所蛋白质数据库(Swiss institute of bioinformatics protein,SwissProt)、NCBI核酸序列数据库(NCBI nucleotide sequence,NT)、基因本体数据库(gene ontology,GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)、真核生物直系同源基因簇数据库(eukaryotic orthologous groups,KOG)、蛋白质家族数据库(protein family,Pfam)对使用CD-HIT软件去冗余之后的序列进行功能注释(图2A)。结果显示,在所有序列中,364629条转录本在NR、NT、GO、KEGG、KOG数据库中被注释,注释率达91.75%,在NR、NT、KEGG、KOG、GO的注释量分别占注释序列总数的82.26%、76.09%、78.02%、47.13%、45.90%。此外,95580条转录本在上述5个数据库中同时获得了注释(图2B)。NR数据库注释发现,转录本注释到大麦(*Hordeum vulgare*)、节节麦(*Aegilops tauschii*)的数量较多,其次是野生二倍体小麦(*Triticum urartu*)、六倍体小麦(*Triticum aestivum*)(图2C)。KEGG通路注释分析发现,注释通路主要涵盖了细胞代谢、环境信息处理、遗传信息处理、代谢4大类,主要涉及碳水化合物代谢、脂质代谢、核苷酸代谢、氨基酸代谢、能量代谢等通路,遗传信息处理主要涉及转录、翻译、蛋白质折叠、分类及其降解等通路,环境信息处理主要涉及信号转导、膜转运、信号分子和相互作用等通路(图2D)。

2.4 二代转录组测序结果分析

2.4.1 参考序列比对分析 为系统解析扁穗冰草叶片在不同生长阶段的转录组动态变化规律,本研究对生长20、28和42 d的扁穗冰草叶片样本进行转录组测序,每个样本设置3个重复,结果如表2所示。其中"Total reads"表示经过质量控制后的测序序列总数,"Total mapped reads"则指能够映射到参考序列上的测序序列总数。各样本的参考序列映射比例较高(76.01%~86.32%),表明测序数据质量较好、准确性较高,可满足后续生物信息学分析的要求。

2.4.2 差异表达基因分析 基于$|\log_2(\text{Fold Change})|>1$且FDR<0.05的筛选阈值,火山图分析显示,在L_28 vs L_20中共鉴定到22380个差异表达基因,其中5695个上调,16685个下调;在L_42 vs L_20中共鉴定到23789个差异表达基因,包括7371个上调和16418个下调;而在L_42 vs L_28中则发现7208个差异表达基因,其中上调3361个,下调3847个(图3A)。通过对3个比较组中的差异表达基因进行维恩图分析,发现有160个基因在所有比较组中共同差异表达(图3B)。同时,各比较组特有的差异基因数量迥异,L_42 vs L_20组最多(14361个),其次是L_28 vs L_20(13281个),而L_42 vs L_28最少(2509个)。

2.4.3 差异表达基因KEGG通路富集分析 为解析扁穗冰草叶片在不同生长阶段的调控通路差异,进一步对各比较组的差异表达基因进行了KEGG通路富集分析。结果表明,在L_28 vs L_20中,差异基因主要富集于核糖体、谷胱甘肽代谢、真核生物核糖体的生物合成、光合作用、光合生物的碳固定、α-亚麻酸代谢等通路(图4A)。在L_42 vs L_28中,差异基因主要富集于植物激素信号转导、精氨酸和脯氨酸代谢、α-亚麻酸代谢、光合作用、光合生物的碳固定、苯丙烷类生物合成等通路(图4B)。在L_42 vs L_20中,差异基因主要富集于核糖体、谷胱甘肽代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、亚油酸代谢、β-丙氨酸代谢、α-亚麻酸代谢等通路(图4C)。总体而言,扁穗冰草在3个不同生长阶段的差异表达基因共同显著富集的通路包括光合作用、α-亚麻酸代谢、谷胱甘肽代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、核糖体等途径。

2.4.4 光合作用 本研究中,有130个差异基因富集到光合作用通路。光系统Ⅱ(PSⅡ)包含63个差异基因,光系统Ⅰ(PSⅠ)包含16个差异基因,光合电子传递过程包含38个差异基因,以及13个F型ATP合酶(图5)。其中,PSⅡ中分别有23和27个差异基因在28和42 d上调,主要为编码放氧复合体外周蛋白(如PsbO、PsbP、PsbQ等)的基因;PSⅠ中有10个差异基因在28 d上调,2个差异基因在20 d上调,4个差异基因在42 d上调,差异基因

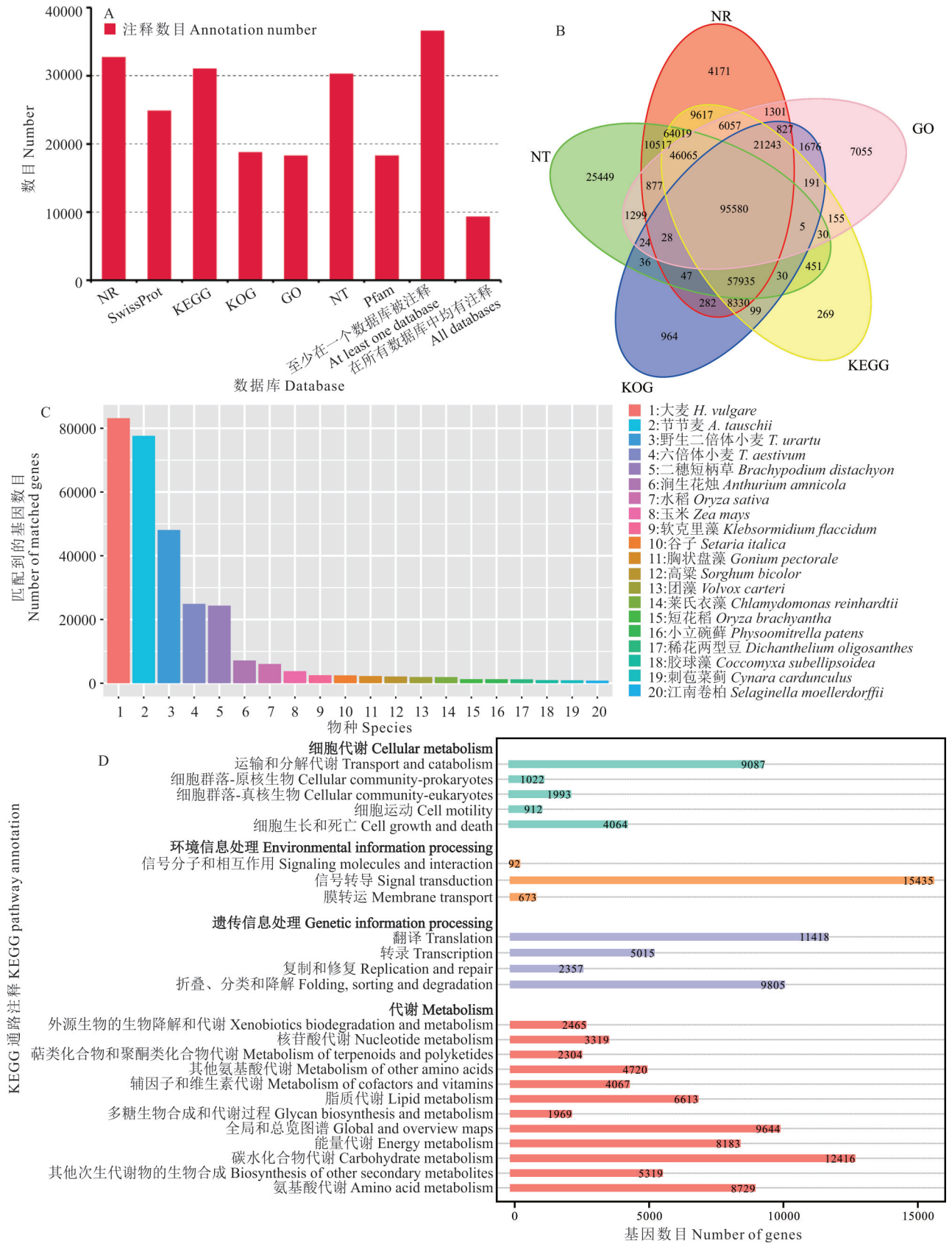

图 2　扁穗冰草三代全长转录组结果分析

Fig. 2　Analysis of full-length transcriptome of *A. cristatum*

A：七大数据库注释结果统计 Statistics of annotation results from seven major databases；B：五大数据库注释维恩图 Venn diagram of annotation from five major databases；C：NR 数据库注释统计 Statistics of NR database annotation；D：KEGG 通路注释柱形图 Bar chart of KEGG pathway annotations.

主要包括外周蛋白(PsaF、PsaH、PsaL),负责电子传递、天线结合与结构稳定等,协同保障光能高效转化;光合电子传递过程中有22个差异基因在28 d上调,主要为编码铁氧还蛋白-$NADP^+$还原酶(ferredoxin-$NADP^+$ reductase, FNR)的基因,在20或42 d表达量较高的基因主要为编码铁氧还蛋白3(ferredoxin 3, FD3)和铁氧还蛋白依赖型叶绿体蛋白2(ferredoxin-dependent chloroplast protein 2, FDC2)的基因等。

2.4.5 植物激素信号转导 本研究共鉴定到215个差异基因富集于植物激素信号转导通路(图6),涉及IAA、CTK、GA、BR、脱落酸(abscisic acid, ABA)、乙烯(ethylene, ETH)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)和水杨酸(salicylic acid, SA)共8类植物激素。其中IAA信号转导通路的差异基因数量最多(60个),其次为JA(43个)、SA(30个)、ABA(26个)、CTK(23个)、ETH(19个),而BR与GA通路各含7个差异基因。进一步分析显示,IAA通路包括生长素输入载体基因*AUX1*(7个)、生长素原初响应基因*AUX/IAA*(40个)、生长素响应因子*ARF*(8个)、生长素早期响应基因*GH3*(4个)和生长素快速响应基因*SAUR*(8个);CTK通路涵盖组氨酸激酶受体*CRE1*(4个)、A型响应调节因子*A-ARR*(10个)和B型响应调节因子*B-ARR*(9个);ABA通路包括脱落酸受体家族基因*PYR/PYL*(5个)、蛋白磷酸酶基因*PP2C*(4个)和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因*SNRK2*(17个);ETH通路包含乙烯受体基因*ETR*(2个)、组成型三重反应蛋白1基因*CTR1*(5个)、乙烯不敏感蛋白基因*EIN2*(1个)、*EIN3*(6个)、丝裂原激活蛋白激酶*MPK6*(2个)、EIN3结合F-Box蛋白1/2基因*EBF1/2*(1个)及乙烯反应性转录因子*ERF1/2*(2个);JA通路涵盖茉莉酸—氨基合成酶基因*JAR1*(3个)和茉莉酸ZIM结构域蛋白基因*JAZ*(40个);SA通路包括水杨酸调节蛋白基因*NPR*(5个)、TGACG序列特异性结合蛋白基因*TGA*(18个)和病程相关蛋白1基因*PR-1*(7个)。以上结果表明,多种植物激素信号途径在扁穗冰草生长过程中被广泛激活,并协同调控其叶片生长。

2.4.6 转录因子分析 差异表达基因中的转录因子分析显示(图7),不同生长阶段比较组中存在明显变化。在L_28 vs L_20中,共鉴定到966个差异表达转录因子,包括321个上调和645个下调转录因子,主要分布于

表2 各样本总读取数与总映射数比对情况

Table 2 Comparison of total reads and total mapped reads for each sample

样品 Sample	总读取数 Total reads	总映射数(比例) Total mapped reads (Proportion)
L_20-1	132019604	100351816 (76.01%)
L_20-2	123286334	101352978 (82.21%)
L_20-3	152294434	121825554 (79.99%)
L_28-1	125714796	108520384 (86.32%)
L_28-2	134285710	111815444 (83.27%)
L_28-3	152896860	131835092 (86.22%)
L_42-1	124362884	100460702 (80.78%)
L_42-2	184840476	151365264 (81.89%)
L_42-3	133727556	112686780 (84.27%)

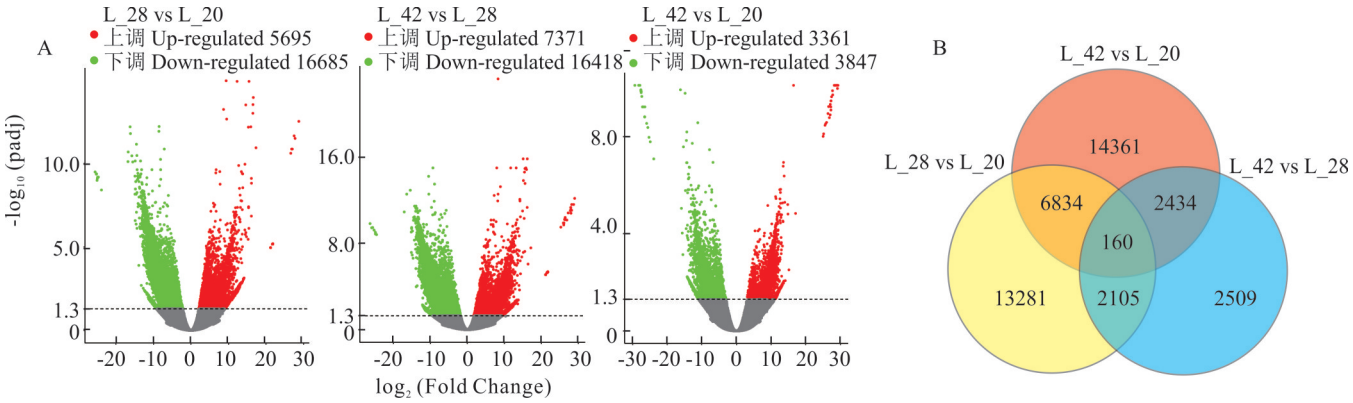

图3 不同生长阶段扁穗冰草叶片的差异表达基因分析

Fig. 3 Analysis of differentially expressed genes in *A. cristatum* leaves at different growth stages

A: 差异表达基因火山图 Volcano plot of differentially expressed genes; B: 差异表达基因维恩图 Venn diagram of differentially expressed genes.

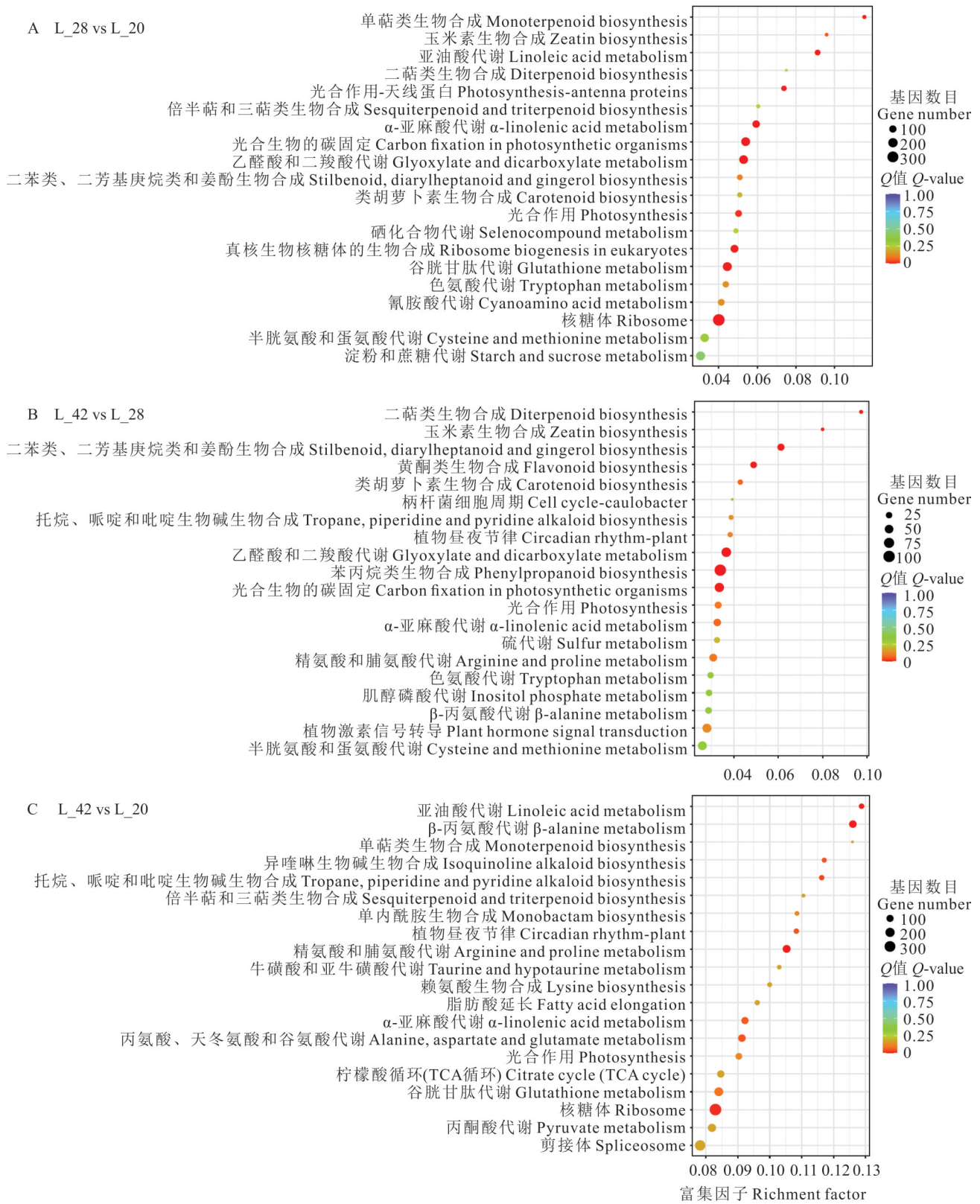

图 4　不同生长阶段扁穗冰草叶片差异表达基因的 KEGG 富集通路分析

Fig. 4　KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes in *A. cristatum* leaves at different growth stages

bHLH 家族(48 个上调,20 个下调)、AP2/ERF-ERF 家族(19 个上调,40 个下调)、NAC 家族(13 个上调,31 个下调)等。在 L_42 vs L_20 中,共发现 1021 个差异表达转录因子,其中 301 个上调,720 个下调,以 AP2/ERF-ERF 家族(6 个上调,67 个下调)、NAC 家族(7 个上调,41 个下调)、bHLH 家族(18 个上调,27 个下调)和 MYB-related

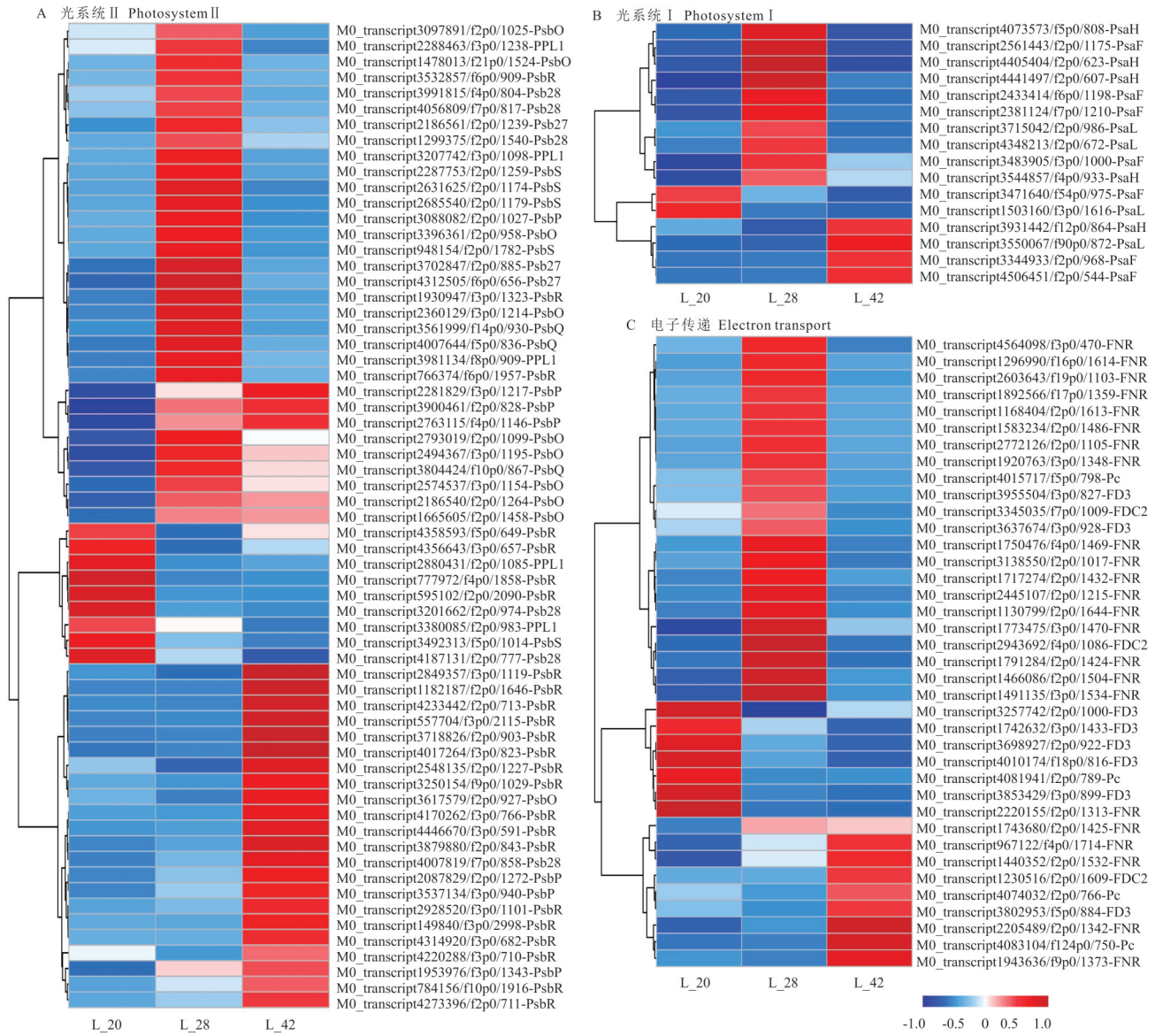

图5 富集在光合作用通路上的差异表达基因热图

Fig. 5 Heatmap of differentially expressed genes enriched in the photosynthesis pathway

PsbO：光系统Ⅱ放氧增强蛋白1 Photosystem Ⅱ oxygen-evolving enhancer protein 1；PsbP：光系统Ⅱ放氧增强蛋白2 Photosystem Ⅱ oxygen-evolving enhancer protein 2；PsbR：光系统Ⅱ 10 kDa蛋白 Photosystem Ⅱ 10 kDa protein；Psb28：光系统Ⅱ 28 kDa蛋白 Photosystem Ⅱ 28 kDa protein；PsbB：光系统Ⅱ CP47叶绿素脱辅基蛋白 Photosystem Ⅱ CP47 chlorophyll apoprotein；PsbQ：光系统Ⅱ放氧增强蛋白3 Photosystem Ⅱ oxygen-evolving enhancer protein 3；PPL1：PsbP类蛋白1 PsbP-like protein 1；PsbW：光系统Ⅱ 6 kDa蛋白 Photosystem Ⅱ 6 kDa protein；PsbY：光系统Ⅱ 4.8 kDa蛋白 Photosystem Ⅱ 4.8 kDa protein；Psb27：光系统Ⅱ 27 kDa蛋白 Photosystem Ⅱ 27 kDa protein；PsbS：光系统Ⅱ S亚基 Photosystem Ⅱ subunit S；PsaH：光系统Ⅰ H亚基 photosystem I subunit H；PsaF：光系统Ⅰ F亚基 Photosystem Ⅰ subunit F；PsaA：光系统Ⅰ P700叶绿素a脱辅基蛋白A1 Photosystem Ⅰ P700 chlorophyll a apoprotein A1；PsaL：光系统Ⅰ L亚基 Photosystem Ⅰ subunit L；PsaN：光系统Ⅰ N亚基 Photosystem Ⅰ subunit N；PsaO：光系统Ⅰ O亚基 Photosystem Ⅰ subunit O；PsaG：光系统Ⅰ G亚基 Photosystem Ⅰ subunit G；PsaD：光系统Ⅰ D亚基 Photosystem Ⅰ subunit D；PsaB：光系统Ⅰ P700叶绿素a脱辅基蛋白A2 Photosystem Ⅰ P700 chlorophyll a apoprotein A2；FNR：铁氧还蛋白-NADP$^+$还原酶 Ferredoxin-NADP$^+$ reductase；Pc：质体蓝素 Plastocyanin；FD3：铁氧还蛋白3 Ferredoxin 3；FDC2：铁氧还蛋白依赖型叶绿体蛋白2 Ferredoxin-dependent chloroplast protein 2.

家族(12个上调，32个下调)为主。在L_42 vs L_28中，共有364个转录因子存在差异表达，其中127个上调，237个下调，主要集中于AP2/ERF-ERF(7个上调，17个下调)、bHLH(4个上调，20个下调)、NAC(4个上调，18个下调)等家族。此外，3个比较组中共有的差异表达转录因子为13个，包括*MYB4*、*WRKY19*、*WRKY1*、*ARR2*、*IAA19*等。

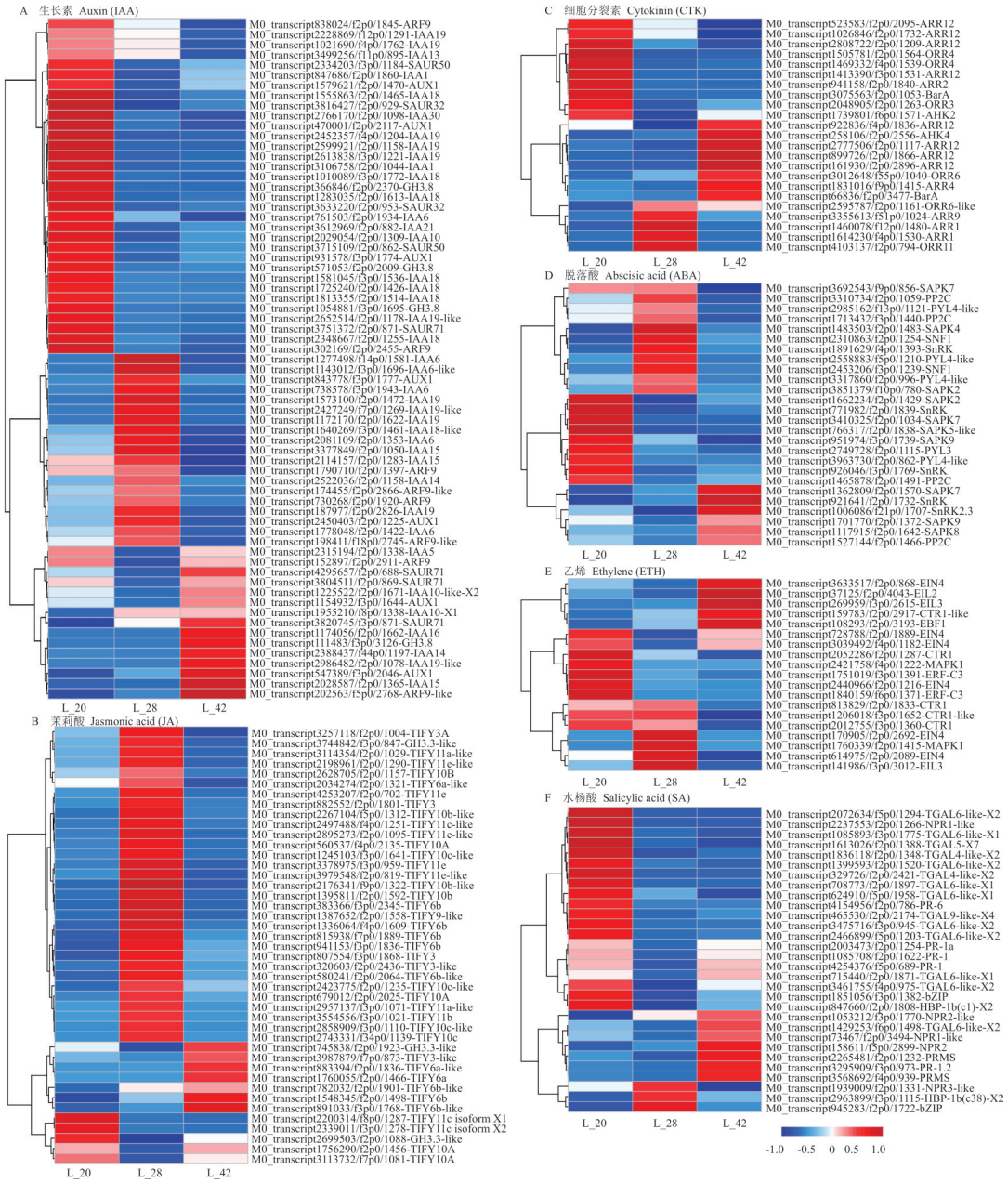

图 6　富集在植物激素信号转导通路上的差异表达基因热图

Fig. 6　Heatmap of differentially expressed genes enriched in plant hormone signal transduction pathway

ARF：生长素响应因子 Auxin response factor；AUX：生长素输入载体蛋白 Auxin transporter；GH3.8：GH3 早期响应蛋白 3.8 Gretchen hagen protein 3.8；IAA：生长素/吲哚-3-乙酸蛋白 Auxin/indole-3-acetic acid protein；SAUR：SAUR 早期响应蛋白 Small auxin up-regulated protein；GH3.3-like：GH3.3 类似蛋白 GH3.3-like protein；TIFY：茉莉酸 TIFY 结构域蛋白 Jasmonic acid TIFY domain protein；ARR：拟南芥反应调节蛋白 *Arabidopsis* response regulator；AHK：拟南芥组氨酸激酶 *Arabidopsis* histidine kinase；BcrA：B 类细胞分裂素响应调节蛋白 A B-type cytokinin response regulator A；CRR：细胞分裂素响应调节蛋白 Cytokinin response regulator；ORR：水稻反应调节蛋白 *O. sativa* response regulator；PP2C：蛋白磷酸酶 2C Protein phosphatase 2C；PYL：PYR/PYL 类蛋白 PYR/PYL-like protein；SAPK：SnRK2 类蛋白激酶 SnRK2-type protein kinase；SNF：蔗糖非发酵蛋白 Sucrose non-fermenting protein；SnRK：蔗糖非发酵相关蛋白激酶 Sucrose non-fermenting-related protein kinase；EBF：EIN3 结合 F-box 蛋白 EIN3-binding F-box protein；EIN：乙烯不敏感蛋白 Ethylene insensitive protein；EIL3：乙烯不敏感样蛋白 Ethylene insensitive 3-like protein；CTR：组成型三重反应 Constitutive triple response；ERF-C：乙烯响应因子 C Ethylene response factor C；MAPK：MAPK 级联相关蛋白激酶 MAPK cascade-related protein kinase；bZIP：碱性亮氨酸拉链蛋白 Basic leucine zipper protein；HBP-1b(c1)-X2：HBP-1b(c1)蛋白 X2 亚型 HBP-1b(c1) protein isoform X2；HBP-1b(c38)-X2：HBP-1b(c38)蛋白 X2 亚型 HBP-1b(c38) protein isoform X2；NPR：非表达致病相关基因 Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1-like；TGAL5-X：TGAL5 蛋白 X 亚型 TGAL5 protein isoform X；TGAL6-like-X：TGAL6 类蛋白 X 亚型 TGAL6-like protein isoform X；TGAL4-like-X：TGAL4 类蛋白 X 亚型 TGAL4-like protein isoform X；TGAL8-like-X：TGAL8 类蛋白 X 亚型 TGAL8-like protein isoform X；TGAL9-like-X：TGAL9 类蛋白 X 亚型 TGAL9-like protein isoform X；PR：病程相关蛋白 Pathogenesis-related protein；PRMS：病程相关蛋白调节因子 Pathogenesis-related protein modulator.

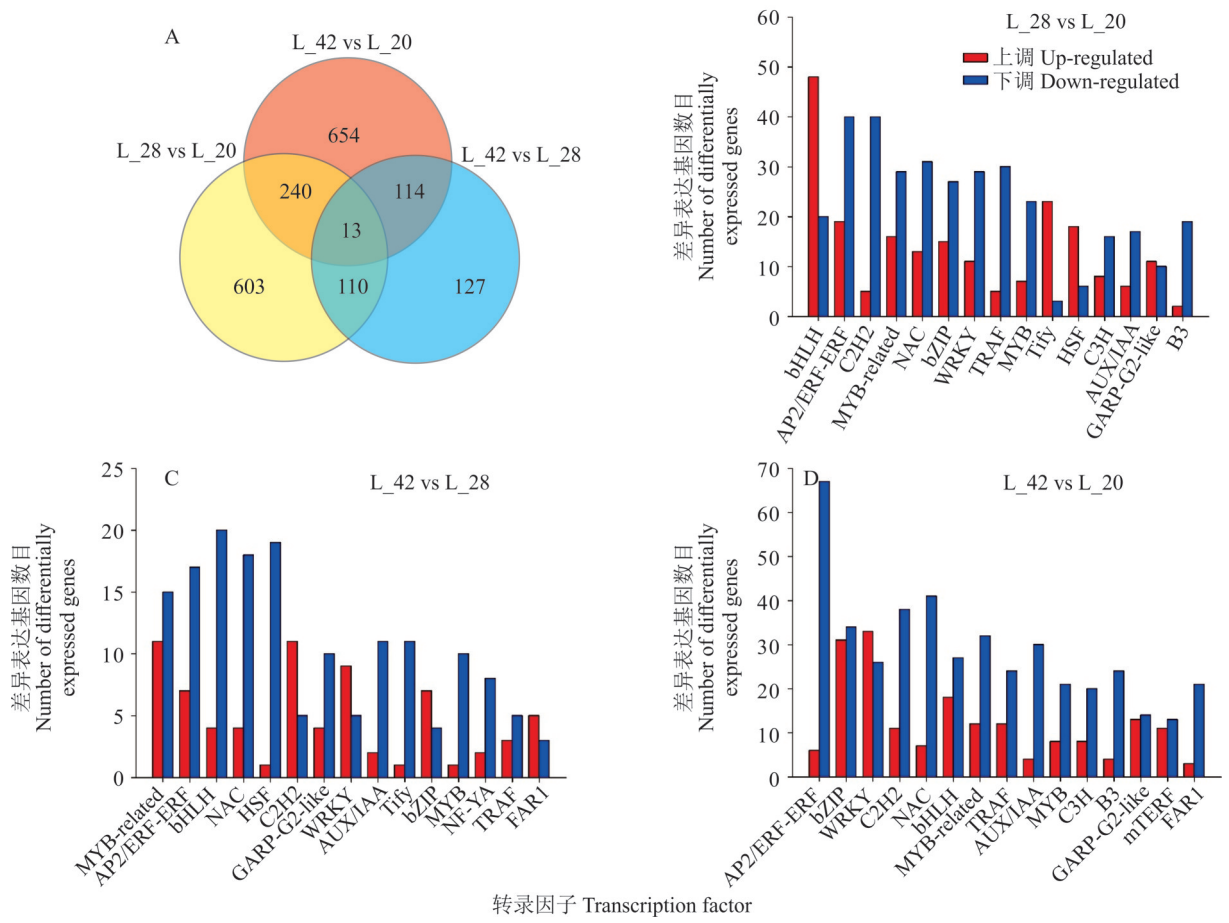

图7 差异表达基因中的转录因子分析

Fig. 7 Analysis of transcription factors among differentially expressed genes

A：差异表达转录因子维恩图 Venn diagram of differentially expressed transcription factors；B～D：差异表达转录因子柱状图 Bar chart of differentially expressed transcription factors；AUX/IAA：生长素/吲哚-3-乙酸蛋白家族 Auxin/indole-3-acetic acid protein family；AP2/ERF-ERF：AP2/乙烯响应因子家族 AP2/ethylene response factor family；B3：B3结构域蛋白家族 B3 domain-containing protein family；bHLH：碱性螺旋-环-螺旋转录因子家族 Basic helix-loop-helix transcription factor family；bZIP：碱性亮氨酸拉链转录因子家族 Basic leucine zipper transcription factor family；C2H2：C2H2型锌指蛋白家族 C2H2 zinc finger protein family；C3H：C3H型锌指蛋白家族 C3H zinc finger protein family；FAR1：FAR1转录因子家族 FAR1 transcription factor family；GARP-G2-like：GARP-G2样蛋白家族 GARP-G2-like protein family；HSF：热激转录因子家族 Heat shock factor family；mTERF：线粒体转录终止因子家族 Mitochondrial transcription termination factor family；MYB：MYB转录因子家族 MYB transcription factor family；MYB-related：MYB相关转录因子家族 MYB-related transcription factor family；NAC：NAC转录因子家族 NAC transcription factor family；NF-YA：核因子YA亚基家族 Nuclear factor Y subunit A family；Tify：TIFY转录因子家族 TIFY transcription factor family；TRAF：TRAF结构域蛋白家族 TRAF domain-containing protein family；WRKY：WRKY转录因子家族 WRKY transcription factor family.

植物bHLH家族参与各种信号转导及合成代谢途径，二代比较转录组数据显示，共有99个bHLH家族基因为差异表达基因（图8A），其中在28 d上调数目最多（49个），在42 d下调数目最多（72个）。在20 d表达水平较高的bHLH家族成员主要包括*bHLH35*、*bHLH30*以及PIF家族（*PIF3*、*PIF1-like*）；而编码铁调控bHLH转录因子2（iron-related transcription factor 2，*IRO2*）与OBP3应答基因2（OBP3-responsive gene 2，*ORG2*）的多个基因在28或42 d表现出高表达趋势，表明这两类基因可能在生长后期的生物量快速积累及分蘖发育过程中发挥关键作用。B3家族在植物生长发育及次生代谢调控中发挥着重要作用。转录组分析显示，共有42个*B3*家族基因在扁穗冰草不同生长天数的叶片中差异表达（图8B），其中在20 d上调数目最多，为29个，在42 d下调数目最多，为33个（图8B），大多数差异表达B3家族成员在20 d表达量最高，表明B3家族可能在扁穗冰草生长早期发挥关键调控作用。NF-YA家族共有28个基因差异表达（图8C），其中在20 d上调数目最多（23个），在42 d下调数目最多（22个），表明该家族也可能在扁穗冰草生长早期发挥重要调控作用。

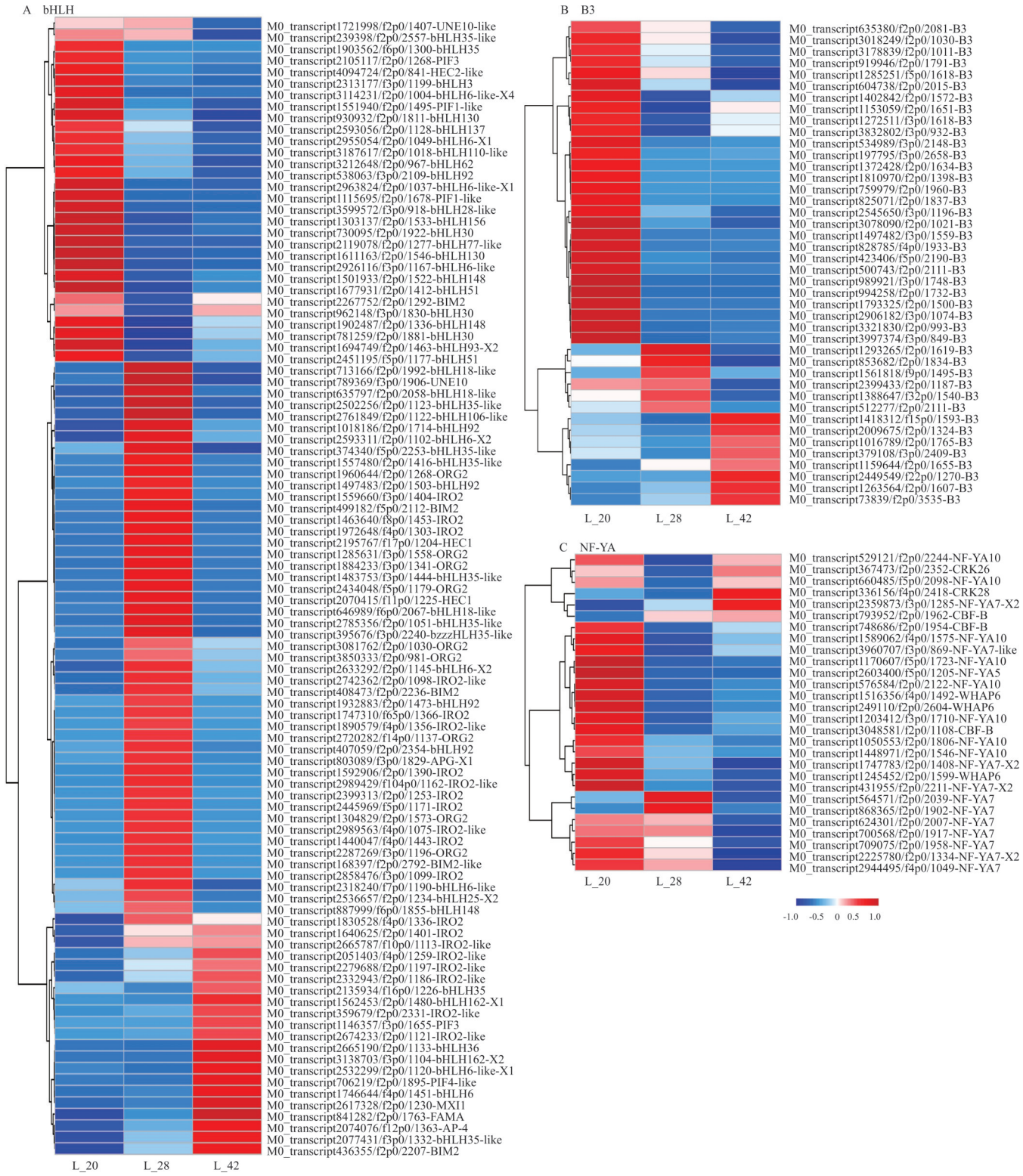

图 8　差异表达的 bHLH、B3 及 NF-YA 家族转录因子热图

Fig. 8　Heatmap of differentially expressed bHLH, B3 and NF-YA family transcription factors

bHLH：碱性螺旋-环-螺旋转录因子 Basic helix-loop-helix transcription factor；B3：B3 结构域蛋白 B3 domain protein；AP-4：转录因子 AP-4 Transcription factor AP-4；APG：PGL1 拮抗因子 Antagonist of PGL1；BIM：BIM 蛋白 BES1-interacting MYC-like protein；bzzz-bHLH35-like：碱性螺旋-环-螺旋转录因子 35 类似物（bzzz 型）Basic helix-loop-helix transcription factor 35-like（bzzz type）；FAMA：FAMA 转录因子 FAMA transcription factor；HEC：螺旋-环-螺旋蛋白 Helix-loop-helix protein；IRO：铁调控转录因子 Iron-related transcription factor；MXI：MAX 相互作用蛋白 MAX-interacting protein；ORG：器官大小调节蛋白 Organ size regulator；PIF：光敏色素互作因子 Phytochrome-interacting factor；UNE：胚珠发育异常蛋白 Unfertilized embryo sac；NF-YA：核因子 YA 亚基 Nuclear factor YA subunit；CBF-B：C 重复结合因子 B C-repeat binding factor B；WHAP6：CCAAT 盒转录因子复合物 CCAAT-box transcription factor complex.

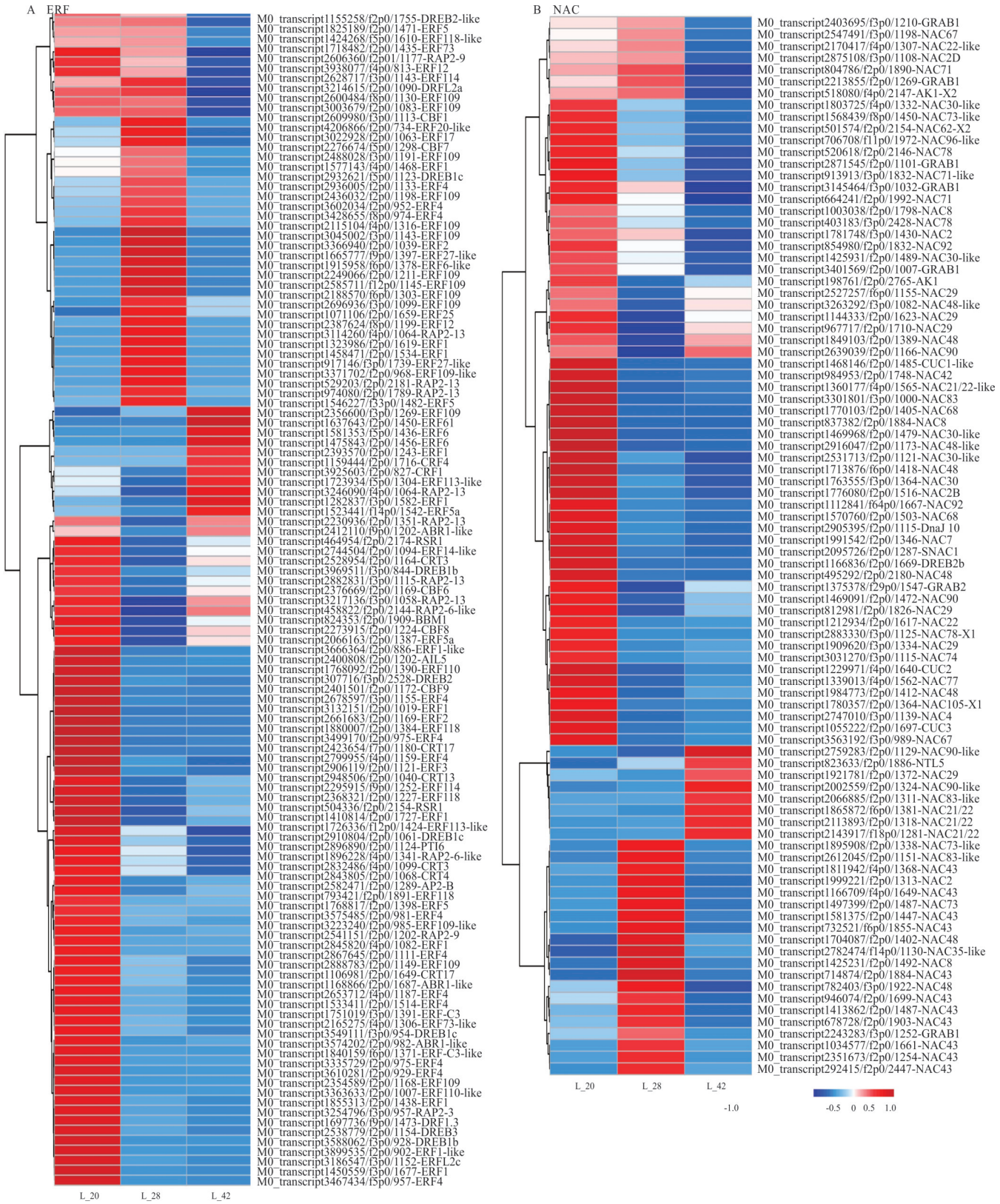

图9 差异表达的ERF及NAC家族转录因子热图

Fig. 9 Heatmap of differentially expressed ERF and NAC family transcription factors

ERF：乙烯响应因子 Ethylene response factor；AIL5：AINTEGUMENTA样蛋白5 AINTEGUMENTA-like protein 5；ABR1-like：ABA响应蛋白1类似物 ABA-responsive protein 1-like；AP2-B：AP2结构域蛋白B AP2 domain protein B；BBM1：体胚发生相关蛋白1 Baby boom-related protein 1；CBF：C重复结合因子 C-repeat binding factor；CRF：细胞分裂素响应因子 Cytokinin response factor；DRF：脱水响应因子 Dehydration-responsive factor；DRFL：脱水响应因子样蛋白 Dehydration-responsive factor-like protein；PTI：Pto互作蛋白 Pto-interacting protein；RAP：AP2相关蛋白 Related to AP2 protein；RSR：水稻淀粉调节因子 Rice starch regulator.

AP2/ERF-ERF 转录因子调控植物生长发育、激素（如 ETH、JA）信号传导等过程，转录组分析显示，有 119 个 AP2/ERF-ERF 转录因子呈差异表达，其中在 20 d 上调数目最多，为 79 个，在 28 d 下调数目最多，为 78 个（图 9A），大多数差异表达 AP2/ERF-ERF 家族成员在 20 或 28 d 表达量较高，主要包括 *ERF1*、*ERF4*、*ERF109* 以及 DREB 亚家族成员（*DREB1b*、*DREB1c*、*DREB2*）等。NAC 转录因子参与调控植物细胞次生壁发育、侧根生长及叶片衰老等进程，转录组分析显示，共有 90 个 NAC 家族基因在扁穗冰草不同生长天数的叶片中差异表达（图 9B），其中在 20 d 上调数目最多，为 61 个，以 *NAC71*、*NAC78*、*NAC29* 等成员为主，在 28 d 下调数目最多，为 77 个，而 *NAC21/22*、*NAC90* 等则在 42 d 表达量较高，NAC 家族在扁穗冰草叶片发育进程中呈时间特异性表达模式，不同成员分别在不同生长阶段发挥关键调控作用。

2.5　候选基因的筛选与验证

为了验证 RNA-Seq 数据的可靠性，随机选取了 6 个差异表达基因（*COG1*、*FtsH11*、*γ-ECS*、*CPI1*、*DHAR* 及 *GR*），利用 RT-qPCR 技术检测其在扁穗冰草不同生长阶段叶片中的相对表达水平。结果显示，这些基因的表达量变化趋势与 RNA-Seq 结果高度一致（图 10），从而证实了本研究 RNA-Seq 数据的可靠性。

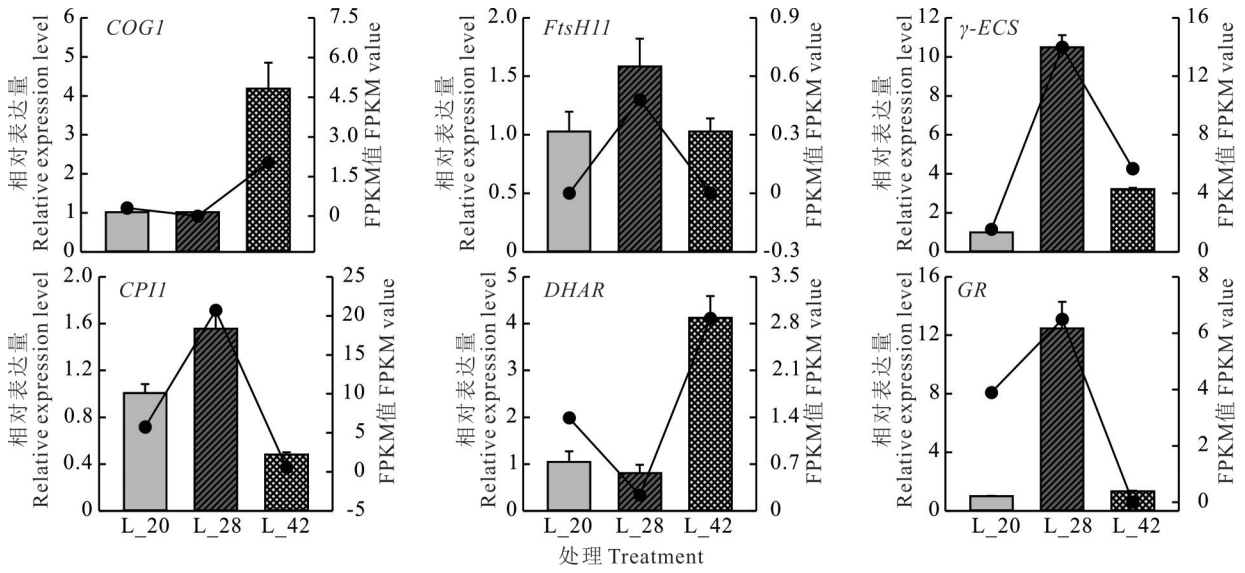

图 10　实时荧光定量 PCR 验证转录组测序结果

Fig. 10　Validation of the transcriptomic data with RT-qPCR

FPKM：每百万个映射读数中每千碱基转录本的片段数 Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads.

3　讨论

近年来，高通量转录组测序技术被广泛应用于生物体内的基因表达模式研究，特别是在识别差异表达基因和探索分子调控机制方面具有重要作用，是解析基因表达与分子机制的关键工具[26]。本研究基于高通量转录组测序技术，对扁穗冰草不同生长时期（20、28 和 42 d）的叶片和根系进行全长转录组测序，获得了高质量的转录本数据，并融合二代数据校正，成功构建了扁穗冰草高质量的转录组数据集；进一步通过二代转录组测序技术，比较了扁穗冰草不同生长时期叶片的关键差异表达基因及其可能的生物学功能，为其遗传改良与生态适应性研究提供了理论与数据支持。

本研究中，通过分析 L_28 vs L_20、L_42 vs L_20 和 L_42 vs L_28 这 3 个比较组的转录组数据，揭示了不同转录因子家族在扁穗冰草叶片生长过程中的动态调控特征。bHLHs 是植物中第二大类转录因子[27]，在植物生长发育中扮演着关键调控角色，不仅参与多种生理代谢过程，还通过调控细胞分化和组织形成来影响植物的形态建成和发育进程[28]。例如，过量表达 *OsbHLH59. 1* 的水稻植株株高较野生型显著增加[29]，在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）中过量表达 *AtbHLH146* 发现，该基因在心皮、花萼、花药及花粉管中大量表达，此外，过表达植株表现出

矮小、叶小、下胚轴缩短以及下表皮细胞显著缩小等表型[30]。本研究中,大部分bHLH家族成员随扁穗冰草生长先上调后下调,表明其在细胞增殖和器官建成初期可能具有关键作用。AP2/ERF转录因子在植物的生长发育、叶片衰老过程中具有重要作用[31-32],在杨树(*Populus tremula*×*Populus alba*)中过量表达*PtaERF194*显著抑制了叶片的发育[33],而水稻中过量表达*OsERF101*通过激活JA介导的信号通路促进叶片衰老[34]。在本研究中,大多数差异表达的AP2/ERF-ERF转录水平随着扁穗冰草生长呈下调趋势,表明该家族参与扁穗冰草早期发育调控。NAC家族在调控植物生长发育、生物及非生物胁迫响应及次生代谢产物合成等过程中起着关键作用,在本研究中其大多数家族成员转录水平随扁穗冰草生长时间延长持续下调,这与已报道的NAC转录因子调控叶片衰老的功能一致[35]。

光系统Ⅱ(PSⅡ)和光系统Ⅰ(PSⅠ)作为光合电子传递链的核心组分,其蛋白亚基的表达水平直接影响光能转换效率[36]。本研究发现,在扁穗冰草生长至28 d时,PSⅡ多个亚基表达量较20 d明显上升,而到42 d时部分基因表达量出现回落。类似趋势在PSⅠ亚基中也被观察到,表明在28 d时扁穗冰草叶片光合器官发育活跃,PSⅡ和PSⅠ亚基合成增强,光合效率达到高峰。细胞色素b6f复合体作为连接光反应与碳同化过程的关键桥梁[37],在本研究中也同样表现出阶段性表达特征。此外,多个参与电子传递的基因,如铁氧还蛋白(*PetF*)和铁氧还蛋白-NADP$^+$还原酶(*PetH*),在28 d明显上调,而在42 d部分下调,表明扁穗冰草可能通过维持较高的电子传递效率以延长光合活性。

植物激素是一类在植物体内合成的微量天然有机化合物,在植物生长发育过程中发挥关键调控作用[12]。其中,生长素和细胞分裂素通过拮抗作用共同调控茎尖分生组织的活性[15]。生长素通过极性运输建立浓度梯度,并直接调控细胞周期相关基因的表达[38]。研究表明,SQUAMOSA启动子结合蛋白样基因7(squamosa promoter binding protein like gene 7,*SPL7*)能够直接结合*OsAUX1*启动子,并通过调控*OsTB1*的表达来调节生长素信号传导,进而调节水稻分蘖[39]。本研究发现,在生长20 d的扁穗冰草叶片中,生长素响应因子(*ARF*)及生长素转运蛋白(*AUX/LAX*)家族基因呈高表达模式,可能与叶原基和分蘖原基的启动密切相关。此外,细胞分裂素信号通路中的ARR-A/B型响应调节因子在生长42 d的扁穗冰草叶片中较28 d明显上调。B型响应调节因子*ARR12*的表达水平与分蘖数呈显著正相关,拟南芥中某些B型ARR(如*ARR1*和*ARR12*)可通过直接激活*WUSCHEL*表达促进芽再生[40]。

4 结论

本研究通过对扁穗冰草进行PacBio第三代全长转录组测序,获得了61.17 GB数据及23889644条CCS。经LoRDEC校正和CD-HIT去冗余,最终获得397407条非冗余序列。注释结果显示,共有364629条转录本在NR、NT、GO、KEGG、KOG数据库中获得注释,其中95580条被上述全部5个数据库同时注释。扁穗冰草在20~42 d的生长过程中,株高、分蘖数和叶片生物量显著增加,尤其是在28~42 d期间,生物量积累达到较高水平。在L_28 vs L_20、L_42 vs L_20和L_42 vs L_28中分别获得22380、23789和7208个差异表达基因;KEGG富集分析中,不同天数叶片的差异基因主要富集在谷胱甘肽代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、核糖体、α-亚麻酸代谢等通路中。光合作用相关基因及激素(如生长素、细胞分裂素等)信号转导基因的表达水平随扁穗冰草不同生长阶段明显变化,bHLH、AP2/ERF和NAC等转录因子家族广泛参与生长调控,可能是调控扁穗冰草叶片生长的关键基因。以上结论可为今后研究扁穗冰草的生物学特性提供参考,为提升扁穗冰草的基础理论研究水平提供数据支撑。

参考文献 References:

[1] Zhou X L, Yang L C, Li G Q, *et al*. Polymorphism analysis of *Agropyron cristatum* (L.) Gaertn and endemic species based on cpDNAtrnT-trnL sequences. Qinghai Prataculture, 2019, 28(3): 2-6.
周学丽, 杨路存, 李桂全, 等. 扁穗冰草不同地理种群cpDNAtrnT-trnL多态性分析. 青海草业, 2019, 28(3): 2-6.

[2] Gao H J, Liu Z D, Sun R. Study on the production performance of newstrain of *Agropyron cristatum* (L.). Feed Review, 2019(5):

52－54.
高海娟，刘泽东，孙蕊．扁穗冰草新品系生产性能研究．饲料博览，2019(5)：52－54.
[3] Gao H J, Yun J F, Luo X Y, *et al*. A study on anatomy of vegetative organs of *Agropyron cristatum*. Pratacultural Science, 2012, 29(3): 429－433.
高海娟，云锦凤，罗新义，等．扁穗冰草营养器官的解剖学研究．草业科学，2012，29(3)：429－433.
[4] Xu C B, Mi F G, Wang Y, *et al*. Factors influencing plant regeneration systems in mature embryo culture of *Agropyron*. Acta Prataculturae Sinica, 2009, 18(1): 80－85.
徐春波，米福贵，王勇，等．影响冰草成熟胚组织培养再生体系频率的因素．草业学报，2009，18(1)：80－85.
[5] Fischer W W, Hemp J, Johnson E J. Evolution of oxygenic photosynthesis. Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 2016, 44: 647－683.
[6] Eberhard S, Finazzi G, Wollman F A. The dynamics of photosynthesis. Annual Review of Genetics, 2008, 42: 463－515.
[7] Waters M T, Moylan E C, Langdale J A. GLK transcription factors regulate chloroplast development in a cell-autonomous manner. The Plant Journal, 2008, 56(3): 432－444.
[8] Wu G, Park Y M, Conway R S, *et al*. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. Cell, 2009, 138(4): 750－759.
[9] Allis C D, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(8): 487－500.
[10] Chan K X, Phua S Y, Crisp P, *et al*. Learning the languages of the chloroplast: Retrograde signaling and beyond. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67: 25－53.
[11] Huang Y, Zhao Y C, Cui L L, *et al*. Research progress on effects of plant hormones and other regulatory factors on rice root growth and development. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2025, 40(1): 99－111.
黄熠，赵永超，崔丽丽，等．植物激素等调控因子对水稻根系生长发育的影响研究进展．福建农业学报，2025，40(1)：99－111.
[12] Waadt R, Seller C A, Hsu P K, *et al*. Plant hormone regulation of abiotic stress responses. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23(10): 680－694.
[13] Vanstraelen M, Benková E. Hormonal interactions in the regulation of plant development. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2012, 28: 463－487.
[14] Zhao B Q, Liu Q Y, Wang B S, *et al*. Roles of phytohormones and their signaling pathways in leaf development and stress responses. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(12): 3566－3584.
[15] Müller D, Leyser O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching. Annals of Botany, 2011, 107(7): 1203－1212.
[16] Woodward A W, Bartel B. Auxin: Regulation, action, and interaction. Annals of Botany, 2005, 95(5): 707－735.
[17] Li Q F, Wang C M, Jiang L, *et al*. An interaction between BZR1 and DELLAs mediates direct signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis*. Science Signaling, 2012, 5(244): ra72.
[18] Fan L, Tang J, Ma L, *et al*. Screening genes related to drought resistance in *Agropyron mongolicum* Keng based on transcriptome. Acta Agrestia Sinica, 2024, 32(11): 3344－3357.
樊璐，唐俊，马琳，等．基于转录组测序筛选蒙古冰草抗旱相关基因．草地学报，2024，32(11)：3344－3357.
[19] Wang H P, Zhao H B, Du J Y, *et al*. Full length transcriptome analysis of *Agropyron mongolicum* and identification of hydroxylase genes involved in lignin synthesis and drought response. Journal of Grassland and Forage Science, 2024(1): 10－22.
王贺萍，赵竑博，杜锦瑜，等．蒙古冰草全长转录组分析及参与木质素合成和干旱响应的羟化酶基因鉴定．草学，2024(1)：10－22.
[20] Salmela L, Rivals E. LoRDEC: Accurate and efficient long read error correction. Bioinformatics, 2014, 30(24): 3506－3514.
[21] Fu L M, Niu B F, Zhu Z W, *et al*. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. Bioinformatics, 2012, 28(23): 3150－3152.
[22] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, *et al*. fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884－i890.
[23] Li B, Dewey C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 323.
[24] Shan C J, Liang Z S. Jasmonic acid regulates ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. Plant Science, 2010, 178(2): 130－139.

[25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[26] Zhu Q N, Zhang K Y, Chen W X, *et al*. Transcriptomic and metabolomic analyses reveal key factors regulating chilling stress-induced softening disorder in papaya fruit. Postharvest Biology and Technology, 2023, 205: 112534.

[27] Zhang X F, Ma Y H, Fan B B, *et al*. Analysis of bHLH transcription factor family based on RNA-Seq in *Agropyron mongolicum*. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(4): 1154-1163.
张学峰, 马艳红, 范菠菠,等. 基于RNA-Seq的蒙古冰草bHLH转录因子家族分析. 分子植物育种, 2023, 21(4): 1154-1163.

[28] Chen X, Luo S Q, Duan C F, *et al*. Research advance on the transcription factors in higher plants. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2008, 14(9): 48-52, 65.
陈霞, 罗世巧, 段翠芳, 等. 高等植物转录因子研究进展. 安徽农学通报, 2008, 14(9): 48-52, 65.

[29] Ning M, Li Q Y, Wang Y, *et al*. Alternative splicing drives the functional diversification of a bHLH transcription factor in the control of growth and drought tolerance in rice. Science Bulletin, 2025, 70(2): 153-156.

[30] Jia Y T. Function analysis of transcription factor bHLH146 in *Arabidopsis thaliana*. Changchun: Jilin University, 2022.
贾雨彤. 拟南芥转录因子bHLH146的功能研究. 长春: 吉林大学, 2022.

[31] Gou Y L, Zhang L, Guo H, *et al*. Research progress on the AP2/ERF transcription factor in plants. Pratacultural Science, 2020, 37(6): 1150-1159.
苟艳丽, 张乐, 郭欢, 等. 植物AP2/ERF类转录因子研究进展. 草业科学, 2020, 37(6): 1150-1159.

[32] Guo Y F, Ren G D, Zhang K W, *et al*. Leaf senescence: Progression, regulation, and application. Molecular Horticulture, 2021, 1: 5.

[33] Wang S J, Zhou L D, Hu J, *et al*. Functional analysis of ERF transcription factors in regulating leaf morphological construction of poplar. Plant Physiology Journal, 2023, 59(6): 1157-1168.
王升级, 周猎鼎, 胡佳, 等. ERF转录因子调控杨树叶片形态构建的功能分析. 植物生理学报, 2023, 59(6): 1157-1168.

[34] Lim C, Kang K, Shim Y, *et al*. Rice ETHYLENE RESPONSE FACTOR 101 promotes leaf senescence through jasmonic acid-mediated regulation of *OsNAP* and *OsMYC2*. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 1096.

[35] Yu J Y, Gong C R. Advances in biological functions of plant NAC transcription factors. Henan Science, 2024, 42(11): 1589-1601.
于婧瑶, 巩琛锐. 植物NAC转录因子的生物学功能研究进展. 河南科学, 2024, 42(11): 1589-1601.

[36] Kılıç M, Gollan P J, Lepistö A, *et al*. Gene expression and organization of thylakoid protein complexes in the PSII-less mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Direct, 2022, 6(6): e409.

[37] Tikhonov A N. The cytochrome b6f complex: Biophysical aspects of its functioning in chloroplasts//Harris J R, Boekema E J. Membrane protein complexes: Structure and function. Singapore: Springer Singapore, 2018: 287-328.

[38] Wang Q Q, Marconi M, Guan C M, *et al*. Polar auxin transport modulates early leaf flattening. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(50): e2215569119.

[39] Jia L Q, Dai Y D, Peng Z W, *et al*. The auxin transporter *OsAUX1* regulates tillering in rice (*Oryza sativa*). Journal of Integrative Agriculture, 2024, 23(5): 1454-1467.

[40] Liu Z H, Dai X H, Li J, *et al*. The type-B cytokinin response regulator ARR1 inhibits shoot regeneration in an ARR12-dependent manner in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 2020, 32(7): 2271-2291.