

刘璐,刘芸伯,佟佳欣,等.低温胁迫下牛皮杜鹃 MAPK 级联参与 ABA 信号转导的基因表达分析[J].江苏农业科学,2020,48(17):59-65.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.010

# 低温胁迫下牛皮杜鹃 MAPK 级联参与 ABA 信号转导的基因表达分析

刘璐,刘芸伯,佟佳欣,闫彤,徐洪伟,周晓馥

(吉林师范大学/吉林省植物资源科学与绿色生产重点实验室,吉林四平 136000)

**摘要:**为了探究牛皮杜鹃在低温胁迫下 MAPK 级联途径参与 ABA 信号转导的分子机制,通过转录组测序的方法对 4 ℃ 低温处理组和 25 ℃ 正常对照组牛皮杜鹃进行研究。结果表明,转录组测序共得到 6.40 Gb clean data,低温组筛选出 12 261 个差异表达基因,其中上调基因和下调基因的数量分别为 6 811 个和 5 450 个。对关键基因进行 KEGG 注释发现,共有 228 个差异表达基因富集到 MAPK 信号通路-植物通路,其中 ABA 信号转导通路中大部分差异表达基因发生上调,说明该信号通路在低温胁迫下被激活。推测牛皮杜鹃在低温胁迫下可激活 MAPK 级联途径中相关基因的表达来参与 ABA 信号转导过程,进而应对低温环境所带来的不利影响。

**关键词:**牛皮杜鹃;低温胁迫;MAPK 级联途径;ABA 信号转导;基因表达分析

**中图分类号:**S685.210.1

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2020)17-0059-06

牛皮杜鹃(*Rhododendron chrysanthum* Pall.) 别称牛皮茶,杜鹃花科杜鹃属,是世界上最珍贵的种质资源之一,由于具有重要的观赏及药用价值<sup>[1]</sup>,因此极具开发潜力。

低温作为一种主要的逆境胁迫,严重影响植物的地理分布和品质<sup>[2]</sup>。脱落酸(ABA)既是一种植物激素也是一种信号传导物质,在植物逆境研究方面具有重要意义<sup>[3]</sup>。有研究证实,低浓度的 ABA 处理冬小麦幼苗会促使其生长,而高浓度的 ABA 则会抑制幼苗的光合作用效率,引起生物量积累下降<sup>[4]</sup>。MAPK(mitogen activated protein kinase)级联途径包括 MAPKKK-MAPKK-MAPK 3 个组分,这 3 个组分既可独自发挥作用也可彼此协作发挥作用,使植物及时作出相应的反应以抵御逆境胁迫带来的危害,该途径也被认为是植物细胞将胞外刺激转换成胞内反应的主要途径之一<sup>[5-7]</sup>。大量研究表明,MAPK 级联途径的 3 个组分均可直接或间接地参与 ABA 信号转导过程,ABA 信号也可调控 MAPK 级联途径中相关组分基因的表达<sup>[8]</sup>,但是对两者相

互作用的分子机制却鲜有研究。

近年来,转录组测序技术应用广泛,它可不依赖参考基因组,这为牛皮杜鹃等无内参的非模式生物的转录组研究提供了新方法<sup>[9]</sup>。本研究以牛皮杜鹃为试验材料,应用转录组测序的方法研究在 4 ℃ 低温胁迫下牛皮杜鹃 MAPK 级联途径参与 ABA 信号转导过程的基因表达情况,旨在从分子水平上探究二者相互作用的分子机制,为植物抗逆境胁迫研究提供理论基础和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

牛皮杜鹃采自长白山,用 1/4 MS 培养基置于吉林师范大学吉林省植物资源科学与绿色生产重点实验室模拟高山植物智能人工气候室中正常培养[光—暗周期 14 h—10 h;昼温 25 ℃,夜温 18 ℃;光子通量密度 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ],选取 8 个月大的牛皮杜鹃组培苗为试验材料。

### 1.2 方法

1.2.1 样品处理 2018 年 9 月 20 日选择 8 个月大长势一致且良好的牛皮杜鹃随机分成 2 组,每组 12 棵。随机选择其中 1 组置于智能人工培养箱[光—暗周期 14 h—10 h;昼温 25 ℃,夜温 18 ℃;光子通量密度 50  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ]中,记为对照组;另外 1 组移至 4 ℃ 低温环境下,记为低温组。24 h 后取出

收稿日期:2020-03-31

基金项目:国家自然科学基金(编号:31070224)。

作者简介:刘璐(1992—),女,吉林长春人,硕士研究生,主要从事植物遗传学研究。E-mail:muxianger2018@163.com。

通信作者:周晓馥,博士,教授,博士生导师,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:zhouxiaofu@jlnu.edu.cn。

2 组牛皮杜鹃于液氮中速冻后置于低温冰箱中保存备用,每组 3 次重复。

1.2.2 转录组测序数据分析 mRNA 文库构建委托华大基因完成。对得到的原始数据进行过滤,去除不符合要求的 reads,以保证结果的可靠性。使用 RPKM 值衡量基因的表达量,用以差异基因表达量的确定和分析,并筛选差异表达基因及功能注释。

1.2.3 统计分析 使用 SPSS 16.0 进行单向 ANOVA,运用 LSD 检验差异性。采用 Sigmaplot 12.5 进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 RNA 质量检测

经华大基因检测,对试验组和对照组样品总 RNA 进行质量评价,符合建库标准。

2.2 数据组装和质量分析

通过高通量测序获得原始数据,统计原始数据测序量。使用 BUSCO 数据库对组装的转录本进行产量评估。结果显示,Q30 均在 95% 以上,GC 含量接近 50%,N50 值在 1 k 左右,说明测序数据可以用于组装(表 1)。

表 1 转录组测序质量分析

处理	≥Q30 (%)	GC 含量 (%)	N50	Complete BUSCOs
对照组	95.04	44.84	1 605.33	80.33
试验组	95.04	44.90	1 621.33	81.87

对过滤后符合要求的数据进行预处理,得到 clean reads 数。如表 2 所示,2 组中的 clean reads 均占原始 raw reads 的 85 % 以上,说明数据组装和测序精确度较好。

表 2 转录组数据组装和质量分析

处理	raw reads 数	clean reads 数	总 unigene 数	比对上基因的 clean reads 比例 (%)	比对上基因唯一位置的 clean reads 比例 (%)
对照组	50 076 667	42 800 000	34 650	87.26	34.07
试验组	49 533 333	42 493 333	34 123	86.92	34.10

2.3 差异表达基因的筛选与注释

2.3.1 差异表达基因的筛选 为了研究低温胁迫下 ABA 调控 MAPK 信号在牛皮杜鹃中的作用,对低温处理组和对照组牛皮杜鹃进行转录组分析。将差异表达量大于 2 倍的基因视为差异表达基因。在此标准下,低温组共筛选出 12 261 个差异表达基因,包括 6 811 个上调基因和 5 450 个下调基因。

2.3.2 差异表达基因的 KEGG 富集分析 根据 KEGG 数据库,低温组筛选出的差异表达基因中有 7 031 个基因被注释在细胞过程、环境进化过程、遗传进化过程、新陈代谢和有机系统这五大类代谢通路的 19 个小类中(图 1)。其中,在 2 组牛皮杜鹃的差异基因 KEGG 分类中,448 个差异基因参与了信号转导这一途径。

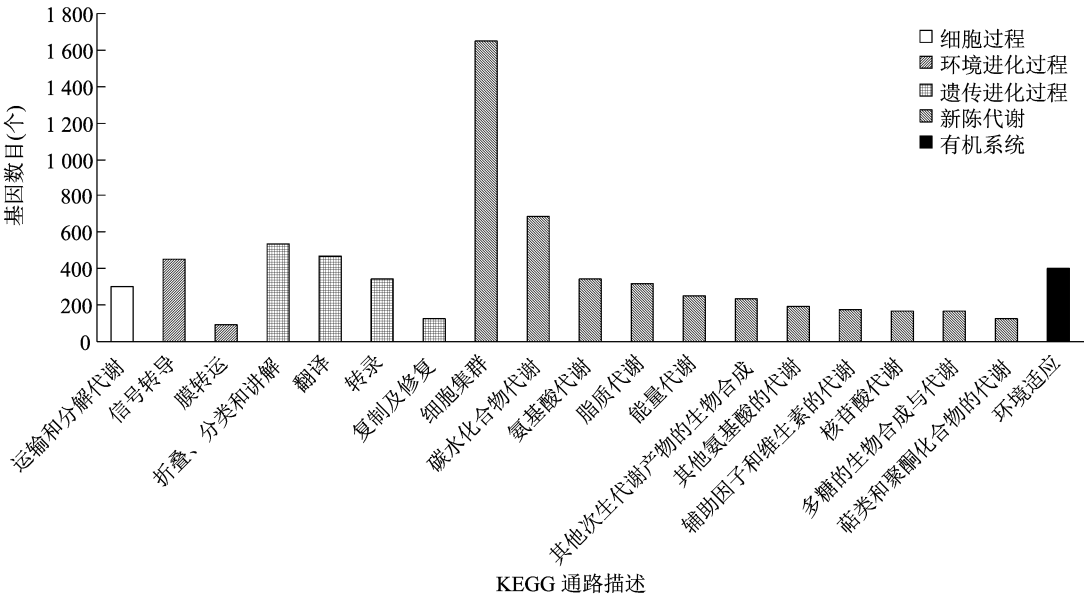


图1 低温胁迫下牛皮杜鹃差异表达基因 KEGG 分类统计

在信号转导途径中,有 228 个差异表达基因富集到 MAPK 信号通路-植物通路,对这部分差异基因进一步富集分析,以 Qvalue 最小的前 20 个 GO Term 作图(图 2)。分别为 MAPK 信号通路-植物、

植物-病原互作、植物激素信号转导、氨基糖和核苷酸糖代谢、蛋白酶体、色氨酸代谢、磷脂酰肌醇信号系统、乙醛酸和二羧酸代谢、过氧化物酶体等。

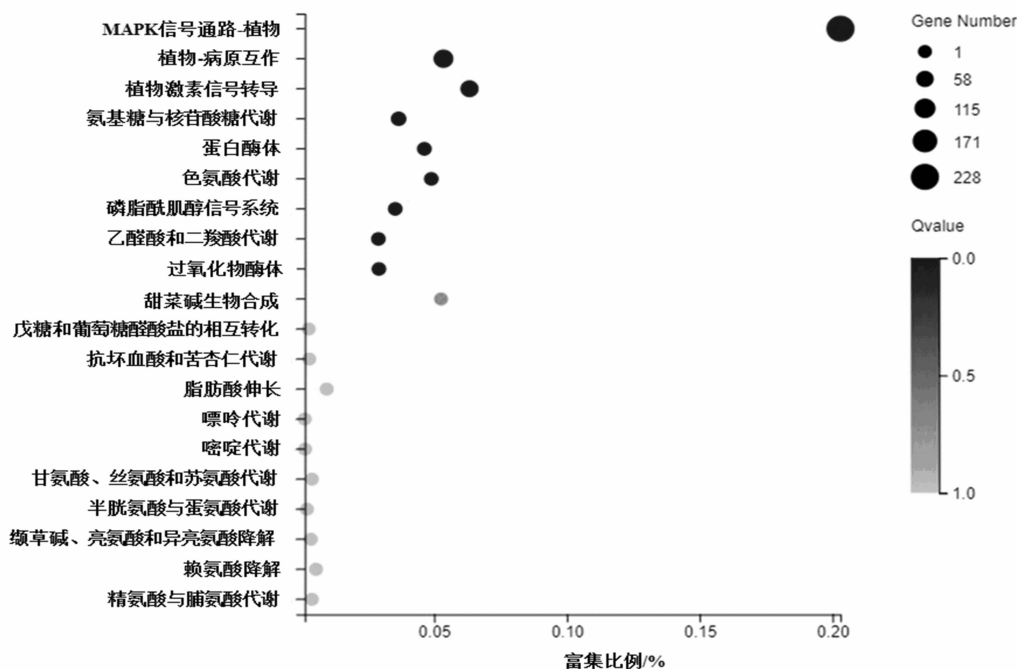


图2 参与 MAPK 信号通路-植物通路的差异基因 KEGG 富集气泡图

由图 3 可见,牛皮杜鹃 PYR/PYL - PP2C - SnRK2 信号通路在响应低温胁迫的过程中,差异基因的表达量发生显著改变,且大部分的差异基因表达量发生上调(表 3),由图 4 可知,低温胁迫下

SnRK2 促使下游 AREB/ABF 家族中的差异基因表达量发生显著变化,推测在低温胁迫下牛皮杜鹃激活了 ABA 信号转导途径中相关基因的表达,促进气孔关闭、种子休眠。

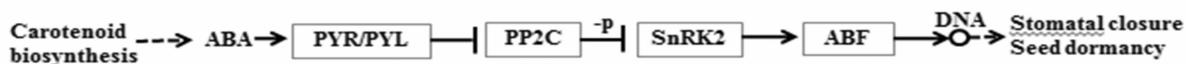


图3 低温胁迫下牛皮杜鹃激活 ABA 信号转导途径

## 2.4 低温胁迫下 MAPK 级联途径参与 ABA 信号转导的关键基因表达分析

### 2.4.1 低温胁迫对牛皮杜鹃 MAPK 级联信号途径中关键基因的影响

结合图 2 分析结果,最终确定从 MAPK 信号通路-植物、植物-病原互作、植物激素信号转导、氨基糖和核苷酸糖代谢、蛋白酶体、色氨酸代谢、磷脂酰肌醇信号系统、乙醛酸和二羧酸代谢、过氧化物酶体这几个代谢途径寻找低温胁迫下 MAPK 级联途径参与 ABA 信号转导途径中发生差异表达的关键基因。

MAPK 信号通路-植物和植物激素信号转导是低温胁迫下牛皮杜鹃信号转导途径中 2 个最重要的途径,参与多种植物代谢活动。对这富集在 2 条代谢通路的差异基因进行统计分析,结果显示,在这 2

条代谢通路中,上调基因的数量都大于下调基因的数量,说明牛皮杜鹃这 2 条代谢途径中的大部分关键基因的表达受低温胁迫影响显著。

结合表 3 与图 5 结果,在 MAPK 级联信号途径中,低温胁迫激活了 MAPK17/18,然后以逐级磷酸化的方式激活 MKK3、MPK1/2 以及下游胁迫适应基因,其中 MAPK17/18、MKK3 和 MPK1/2 基因表达量发生上调,胁迫适应基因表达量发生下调。结果表明,牛皮杜鹃 MAPK 级联信号途径中的关键基因受到低温胁迫的显著影响。

### 2.4.2 低温胁迫下牛皮杜鹃 MAPK 级联途径参与 ABA 信号转导调控

ABA 作为一种主要的逆境激素,在植物面临低温、干旱、高盐等非生物胁迫时,其含量在短时间内会明显上升,通过激活多条途径

表 3 低温胁迫下 PYR/PYL – PP2C – SnRK2 信号通路中差异表达基因调控

基因家族	Gene ID	KO 编号	通路名称	通路描述	表达量	
					对照组	低温组
PYR/PYL	CL1421. Contig2_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导、复制及修复	40.6	15.28
		ko03030	DNA 复制			
PP2C	CL3256. Contig1_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	1.11	0.29
		ko04075	植物激素信号转导			
	CL6341. Contig5_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	0.13	1.2
		ko04075	植物激素信号转导			
	CL8040. Contig1_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	1.52	0.54
		ko04075	植物激素信号转导			
	CL817. Contig1_All	ko04075	植物激素信号转导	信号转导	1.58	0.34
		ko04016	MAPK 信号通路 – 植物			
	CL817. Contig2_All	ko04075	植物激素信号转导	信号转导	7.75	0.89
		ko04016	MAPK 信号通路 – 植物			
	Unigene1544_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	2.73	0.50
		ko04075	植物激素信号转导			
SnRK2	Unigene2608_All	ko04626	植物 – 病原互作	信号转导 环境适应	0.07	0.42
		ko04016	MAPK 信号通路 – 植物			
	Unigene28916_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	折叠、分类和降解 信号转导	0.60	1.81
		ko04075	植物激素信号转导			
	Unigene3007_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	0.03	0.19
		ko04075	植物激素信号转导			
	Unigene3782_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	0.16	1.24
		ko04075	植物激素信号转导			
SnRK2	Unigene5497_All	ko04075	植物激素信号转导	信号转导	12.63	5.59
		ko04016	MAPK 信号通路 – 植物			
	Unigene988_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	9.66	3.76
		ko04075	植物激素信号转导			
	CL1703. Contig9_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	0.05	0.80
		ko04075	植物激素信号转导			
	CL3979. Contig2_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	6.71	2.71
		ko04075	植物激素信号转导			
SnRK2	Unigene2463_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	0.41	1.57
		ko04075	植物激素信号转导			
	Unigene2682_All	ko04075	植物激素信号转导	信号转导	0.39	0.94
		ko04016	MAPK 信号通路 – 植物			
	Unigene34310_All	ko04075	植物激素信号转导	信号转导	0.01	0.73
		ko04016	MAPK 信号通路 – 植物			
SnRK2	Unigene5673_All	ko04016	MAPK 信号通路 – 植物	信号转导	0.01	0.54
		ko04075	植物激素信号转导			

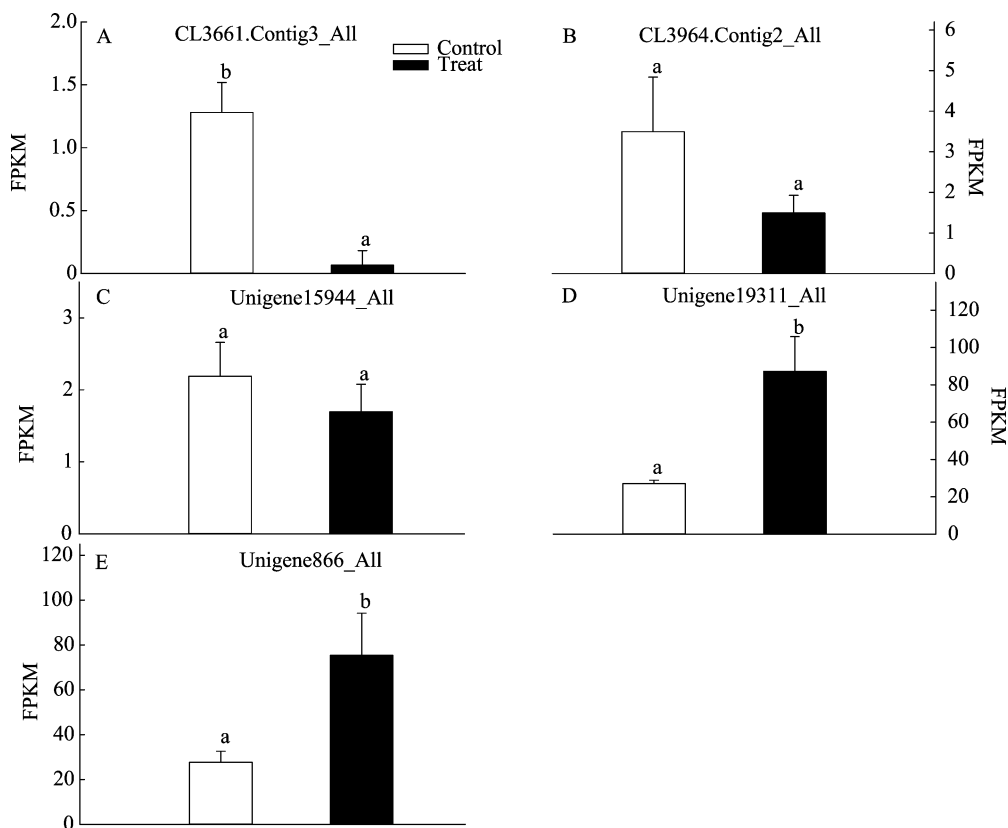


图4 低温胁迫下 AREB/ABF 家族中的差异基因表达量

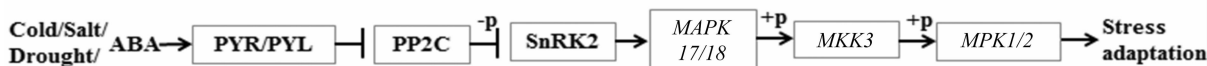


图5 低温胁迫下 ABA 调控植物 MAPK 信号通路的胁迫适应过程

中相关基因的表达来维持自身生理状态的稳定。在本研究中,如图 3 所示,在外界环境信号刺激下,通过启动类胡萝卜素生物合成过程来开启 ABA 合成系统,通过去磷酸化作用使得 PP2Cs 抑制 SnRK2s 活性,但受低温胁迫的影响导致 ABA 含量升高,解除了这种抑制作用,使得 SnRK2 得到释放,最终 SnRK2 促使下游 AREB/ABF 转录因子磷酸化,诱导 ABA 响应基因的表达。

而在低温胁迫下 ABA 的 PYR/PYL - PP2C - SnRK2 信号通路中的大部分基因的表达量都发生上调,推测牛皮杜鹃在低温胁迫下可以通过激活脱落酸合成相关基因,合成大量的脱落酸,促进气孔关闭,种子休眠,通过改变 ABA 信号转导途径中相关基因的表达量,增强牛皮杜鹃抵抗低温的能力。

### 3 讨论

#### 3.1 低温胁迫对牛皮杜鹃 MAPK 级联途径的影响

对拟南芥和其他植物的研究中发现,MAPK 级

联是植物响应逆境胁迫的一条重要代谢途径<sup>[10]</sup>。在研究非生物胁迫对玉米的抗氧化防御机制的影响时发现,在低温处理下,MAPK 级联途径受到抑制后,玉米中抗氧化酶活性均不同程度减弱,对低温信号反应迟钝<sup>[11]</sup>。在本研究中,MAPK 级联途径各组在响应低温胁迫的过程中,先激活了 MAPK17/18,然后以逐级磷酸化的方式依次激活 MKK3、MPK1/2 以及下游胁迫适应基因,其中 MAPK17/18、MKK3 和 MPK1/2 基因表达量发生上调,胁迫适应基因表达量发生下调。这些结果说明牛皮杜鹃 MAPK 级联信号途径中的关键基因受到低温胁迫的显著影响,并通过调节 MAPK 级联途径中相关基因的表达量来应对低温环境对其造成的不良影响。

#### 3.2 低温胁迫对牛皮杜鹃 MAPK 级联途径参与 ABA 信号转导的影响

大量研究表明,植物在面临低温等非生物逆境胁迫时,会引起植物自身 ABA 的累积效应<sup>[12-13]</sup>,而 MAPK 级联作为参与 ABA 信号转导的主要途径之

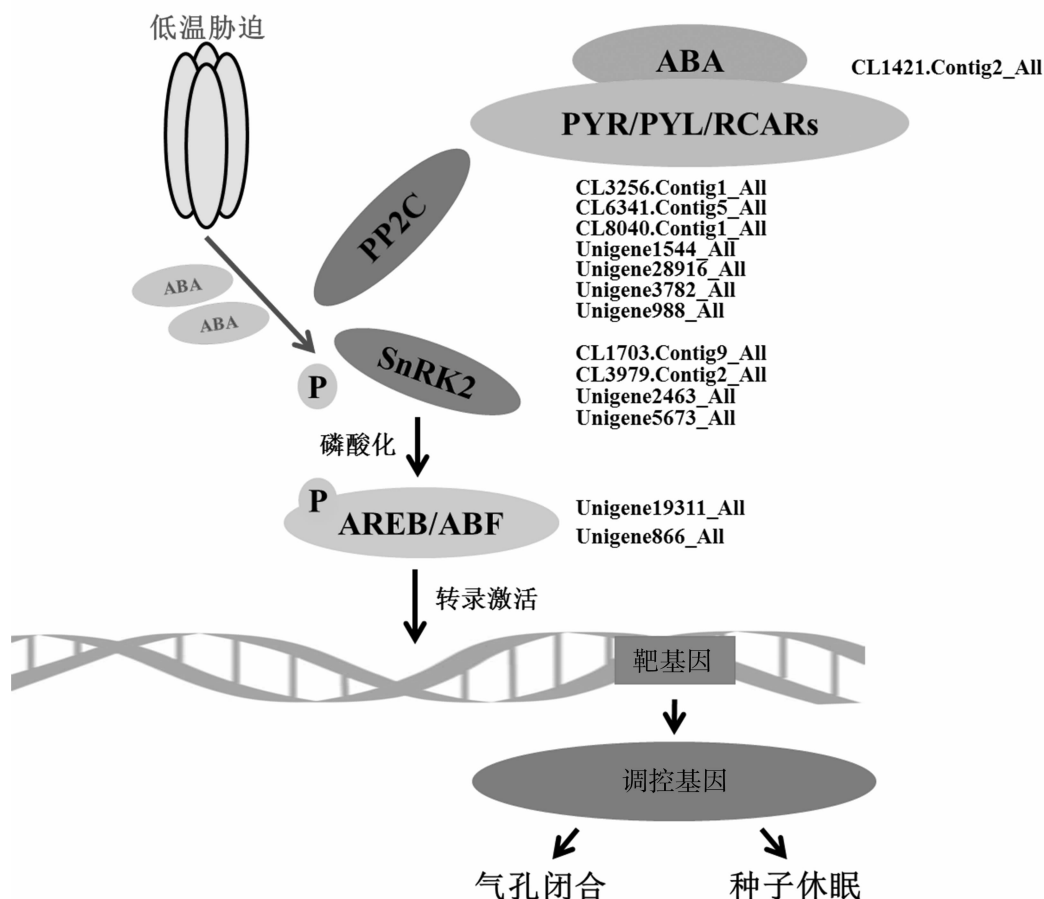


图6 低温胁迫下牛皮杜鹃 MAPK 级联途径参与 ABA 信号转导模式

一,更是控制着细胞的诸多生命活动<sup>[14]</sup>。PP2C 在非胁迫条件下可通过去磷酸化使 SnRK2 失去活性,进而使得 ABA 信号传递终止<sup>[15]</sup>。而一旦接受外界或植物自身信号刺激并激活 ABA 合成相关基因诱导合成 ABA 之后,ABA 与受体蛋白结合并在与 PP2C 互动时便可抑制 PP2C 活性以达到释放 SnRK2 的目的,使得 SnRK2 恢复活性继而磷酸化下游的 AREB/ABF,将上游信号向下传递<sup>[16]</sup>。在本研究中,低温胁迫下 ABA 的 PYR/PYL - PP2C - SnRK2 信号通路中的大部分基因的表达量都发生上调,推测低温胁迫可以通过激活 MAPK 级联途径,进而影响 ABA 信号转导途径中相关基因的表达量的变化,使其在 ABA 信号转导途径中发挥作用。

#### 4 结论

综上所述,本研究通过转录组测序的方法对低温胁迫下牛皮杜鹃 MAPK 级联途径参与 ABA 信号转导过程中的关键基因进行分析,推测低温胁迫可以激活 MAPK 级联途径中 3 个蛋白激酶家族中的关键基因,并调控了 ABA 信号转导途径中相关基因的

表达,从而激活 ABA 调控 MAPK 信号过程来应对低温胁迫环境。

#### 参考文献:

- [1] Zhou X, Chen S L, Wu H, et al. Biochemical and proteomics analyses of antioxidant enzymes reveal the potential stress tolerance in *Rhododendron chrysanthum* Pall [J]. *Biology Direct*, 2017, 12 (1):10.
- [2] 肖玉洁,李泽明,易鹏飞,等. 转录因子参与植物低温胁迫响应调控机理的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(12):1-9.
- [3] 丁海东,朱晓红,刘慧,等. ABA 信号转导途径中的 MAPKS [J]. *植物生理学报*, 2011, 47(12):1137-1144.
- [4] 张晓晶,李晨晨,刘志宏,等. 不同浓度 ABA 处理对冬小麦生理指标的影响[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(9):103-105.
- [5] Knetsch M, Wang M, Snaar - Jagalska B E, et al. Absciscic acid induces mitogen - activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(6):1061-1067.
- [6] Takahashi Y, Soyano T, Kosetsu K, et al. HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2010, 51(10):1766-1776.
- [7] Zhang M, Su J, Zhang Y, et al. Conveying endogenous and exogenous

张蕊,李艺,高巨,等.周楸腋芽离体培养快繁技术研究[J].江苏农业科学,2020,48(17):65-69.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.011

# 周楸腋芽离体培养快繁技术研究

张蕊<sup>1</sup>,李艺<sup>1</sup>,高巨<sup>1</sup>,孙凌玲<sup>1</sup>,张磊<sup>2</sup>

(1.周口职业技术学院农牧工程学院,河南周口 466000; 2.河南花博士花卉有限公司,河南周口 466000)

**摘要:**为研究周楸组织培养快繁技术,以周楸 2 号为材料,对带腋芽茎段离体培养不同阶段培养基中萘乙酸(NAA)、6-苄基腺嘌呤(6-BA)浓度分别设计 4 个水平,通过研究 NAA 和 6-BA 主效应及交互作用对腋芽诱导率、无菌苗增殖系数和 NAA 对无菌苗生根率的影响,以期明确周楸腋芽离体培养时最适激素条件。研究表明,周楸 2 号带腋芽茎段离体培养诱导培养基适宜的激素水平为 NAA 0.010~0.015 mg/L,6-BA 0.6~1.2 mg/L;增殖培养基适宜的激素水平为 NAA 0.15~0.20 mg/L,6-BA 0.8~1.6 mg/L;生根培养基适宜的激素水平为 NAA 1.0~1.5 mg/L。

**关键词:**周楸 2 号;腋芽;离体培养;NAA;6-BA;组织培养

**中图分类号:** S723.1<sup>+</sup>32.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0065-05

楸树(*Catalpa bungei* C. A. Mey.)为紫葳科落叶乔木<sup>[1]</sup>,其材质优良、生长快、寿命长、适应能力强,是常用的植树造林树木之一;同时楸树枝叶繁茂、花开锦簇,景观效果独具特色,因此楸树亦被广泛应用于沿路、沿河、沿水和园林绿化。随着社会环保意识的增强和环境保护措施的不断落实,在大规模乡村和城市绿化中,政府大力倡导以选用优良本土树种为主,楸树为河南省周口市城乡绿化首选天然分布树种之一,目前,楸树产业迎来巨大发展

空间和机遇。

近年来,楸树组织培养技术研究得了人们的重视,楸树组织培养(组培)育苗克服了传统育苗生产中存在的常见问题(种子量少<sup>[2]</sup>、育苗周期长、苗木生长性状一致性差、苗木数量和质量难以满足生产要求、嫁接苗由于插穗和砧木对水分需求不一致易导致“小脚”病、埋根影响母树生长<sup>[3]</sup>、扦插生根率低<sup>[4]</sup>等)。近年来有关楸树组织培养(组培)育苗的报道较多,范国强等对金丝楸幼嫩茎段进行离体培养,初次探讨金丝楸组培不同阶段适合的培养基和激素组合<sup>[5]</sup>。李艳敏等以金丝楸为试材,采用改变继代培养方式、将增殖和壮苗培养相结合、添加对活性炭等措施,使金丝楸组培工厂化生产顺利进行<sup>[6]</sup>。王爱芝对花楸的幼胚等 5 种不同外植体进行研究,指出适合花楸茎段和片叶的诱导与增殖培养条件<sup>[7]</sup>。韩创举对豫楸一号扦插、嫁接、组织培

收稿日期:2020-05-04

基金项目:河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(编号:202102110170);周口职业技术学院院级重点科技攻关课题(编号:Zzy1810)。

作者简介:张蕊(1978—),女,河南扶沟人,硕士,副教授,主要从事植物生理生化、园林植物栽培及应用技术的教学和研究。  
E-mail:522652203@qq.com。

signals;MAPK cascades in plant growth and defense[J]. Current Opinion in Plant Biology,2018,45:1-10.

[8]段志坤,秦晓惠,朱晓红,等.解析植物冷信号转导途径:植物如何感知低温[J].植物学报,2018,53(2):149-153.

[9]唐仕云,杨丽涛,李杨瑞.低温胁迫下不同甘蔗品种的转录组比较分析[J].生物技术通报,2018,34(12):116-124.

[10]Fujita Y, Fujita M, Satoh R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell,2005,17(12):3470-3488.

[11]Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, et al. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell

Physiology,2009,50(12):2123-2132.

[12]洪岚,刘旭,李玲.植物 AREB/ABF 转录因子及其参与的 ABA 信号转导[J].植物生理学报,2011,47(3):211-217.

[13]丁红映,王明,谢洁,等.植物低温胁迫响应及研究方法进展[J].江苏农业科学,2019,47(14):31-36.

[14]魏强,李静,刘艺,等. MAPK 信号转导通路在人参多糖诱导白血病 K562 细胞凋亡中的作用[J].中草药,2013,44(2):193-198.

[15]李悦鹏,谢晓兰,于雷,等. MAPK 级联途径激酶结构特点及其信号转导途径在园艺作物逆境中的作用[J].植物生理学报,2018,54(8):1305-1315.

[16]伍静辉,谢楚萍,田长恩,等.脱落酸调控种子休眠和萌发的分子机制[J].植物学报,2018,53(4):542-555.