

陈 盖,温可馨,司 冰. 盐胁迫下园林植物彩叶树响应菌根共生的比较转录组分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(22):19-28.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.22.003

盐胁迫下园林植物彩叶树响应菌根共生的比较转录组分析

陈 盖¹,温可馨²,司 冰²

(1.唐山工业职业技术学院,河北唐山 063299; 2.渭南职业技术学院,陕西渭南 714026)

摘要:土壤盐分是典型的非生物胁迫因素之一,严重影响着植物的生长发育。为了解盐胁迫下鸡爪槭(*Acer palmatum*)对接种丛枝菌根真菌的应答分子机制,对接种丛枝菌根处理(AM)、盐胁迫处理(SS)、盐胁迫接种丛枝菌根处理(AS)及对照处理(CK)进行转录组测序分析。结果表明,基于转录组测序技术(RNA-Seq)测序共获得4 672个新基因;将SS与AS处理进行比较时,鉴定出455个差异表达基因(DEGs),其中286个基因上调表达,169个基因下调表达。对获得的DEGs进行功能注释及富集分析,GO(gene ontology)分析结果表明,盐胁迫下接种丛枝菌根真菌涉及蛋白质生物合成相关过程、ATP生物合成过程、蛋白质谷胱甘肽化、细胞分化调控、氮同化相关过程、呼吸电子传递链以及类胡萝卜素代谢等生物过程。KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)富集分析结果表明,主要涉及苯丙烷、黄酮类、二芳基庚烷类及姜酚的次生代谢通路。综合GO、KEGG富集分析结果可知,这些基因主要参与植物细胞内部环境的改善、氮代谢相关过程和宿主光保护机制。实时荧光定量PCR(qRT-PCR)验证表明,挑选的6个DEGs表达趋势与测序结果高度一致,说明测序结果准确可靠。本研究丰富了丛枝菌根真菌对盐胁迫的改善机制,可为后续研究功能分析的耐盐候选基因提供理论依据。

关键词:丛枝菌根真菌;彩叶树;鸡爪槭;差异基因(DEGs);盐胁迫;转录组

中图分类号:S687.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)22-0019-10

土壤是植物生长发育的重要载体,然而全球范围内超过7%的土地受到不同程度盐胁迫的影响^[1]。盐胁迫是对作物生长发育及产量形成最不利的环境胁迫因子之一,其潜在的分子机制与多种

生物途径和过程有关,包括渗透调节、离子泵、氧化途径以及营养障碍等代谢过程的改变^[2];分子水平上,盐胁迫可限制细胞分裂、DNA扩增,甚至诱导产生基因毒性^[3]。此前的研究发现,植物体具有多种信号转导通路协助植物适应盐胁迫,例如盐胁迫敏感系统(SOS)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联、磷脂酰肌醇(PI)和脱落酸(ABA)介导的信号转导通路^[4]。此外,为应对盐胁迫,分子信号传导可以

收稿日期:2021-12-15

基金项目:陕西省教育厅专项科学研究计划(编号:20JK0639)。

作者简介:陈 盖(1990—),男,河北唐山人,硕士,讲师,研究方向为园林生物技术。E-mail:7153267620@qq.com。

[21] Pesch M, Hülskamp M. One, two, three... models for trichome patterning in *Arabidopsis*? [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(5): 587-592.

[22] 居利香,雷 欣,赵成志,等. 辣椒MYB基因家族的鉴定及与辣味关系分析[J]. 园艺学报,2020,47(5):875-892.

[23] Dubos C, Le Gourrierec J, Baudry A, et al. MYB12 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 2008, 55(6): 940-953.

[24] Raffaele S, Vaillau F, Leger A, et al. A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2008, 20(3): 752-767.

[25] Stracke R, Ishihara H, Huep G, et al. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol

accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling [J]. The Plant Journal, 2007, 50(4): 660-677.

[26] Gonzalez A, Zhao M Z, Leavitt J M, et al. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings [J]. The Plant Journal, 2008, 53(5): 814-827.

[27] Yao G F, Ming M L, Allan A C, et al. Map-based cloning of the pear gene *MYB114* identifies an interaction with other transcription factors to coordinately regulate fruit anthocyanin biosynthesis [J]. The Plant Journal, 2017, 92(3): 437-451.

[28] Nozawa M, Kawahara Y, Nei M. Genomic drift and copy number variation of sensory receptor genes in humans [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(51): 20421-20426.

激活其他转录因子(TF),TF 可增强和激活基因调控信号,从而重新调节细胞离子、渗透和活性氧(ROS)的稳态^[5]。

丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌是一种重要的土壤有益微生物,它可与 80% 以上的陆生植物形成互惠互利的共生关系,这种共生关系可促进植物生长并改变植物的形态、生理和营养水平^[6],从而提高对多种非生物胁迫因素的抵抗力,包括养分贫瘠、高温、寒冷、干旱和盐胁迫^[7]。在盐胁迫条件下,接种 AM 真菌的植物可以增强对离子稳态、渗透平衡和抗氧化酶活性的调节^[8],同时也可提高光合活性以改善养分活化、营养获取和植物的水分吸收^[7]。然而,以往对盐胁迫环境改善机制的研究主要集中于形态学和生理学特征,很少对接 AM 真菌的植物在基因组范围内的基因表达进行探索,这限制了 AM 真菌在植物抗盐性方面的应用认知^[9],因此,须要对盐胁迫条件下 AM 真菌改善机制进行进一步的分子水平分析。

彩叶树是指在整个生长季节,全部或部分叶色与自然绿色有明显区别的木本植物类群,基本特征是具备一致的变色期、较长的观赏期和整齐的落叶期^[10]。目前,紫叶稠李、金叶女贞、鸡爪槭、五角枫、金叶红瑞木等 10 余种彩叶树种广泛引种栽植于我国各省市道路、街道两侧及公园中,是园林绿化的重要组成^[11]。然而在实地栽种中,在各个地区均呈现出植株生长势弱、适应性差、病虫害严重等现象。许多彩叶树在盐渍土壤中生长不良,表现出叶片焦枯、叶色灰暗等现象^[12]。在前人的研究中,接种 AM 真菌可有效调节 100 mmol/L 盐胁迫下彩叶树的渗透胁迫、氧化损伤和离子应力,从而促进植株的生长发育^[13],这些结果为进一步研究彩叶树接种 AM 真菌的耐盐性分子机制奠定了基础。本研究中,借助 Illumina HiSeq™ 2500 测序平台分析彩叶树鸡爪槭(*Acer palmatum*)叶片组织中的全基因转录变化,以探索 AM 真菌诱导耐盐性的分子机制。研究结果可为更全面地了解 AM 真菌在耐盐性中的作用提供理论支持,并启动有效的基因工程策略。

1 材料和方法

1.1 供试时间与供试材料

试验于 2021 年 5—8 月于渭南职业技术学院试验场大棚中进行。供试彩叶树品种为鸡爪槭,购自杨凌益恒园林绿化有限公司。种子采用表面灭菌

后在培养皿中的 3 层湿滤纸上,在 26 ℃ 环境下黑暗处理催芽 4 d。

供试培养基质为体积比为 2 : 1 的土壤与珍珠岩(直径 < 3 mm),高压蒸汽灭菌(121 ℃, 1 × 10⁵ kPa, 4 h)后,冷却备用。土壤理化性质:pH 值为 7.11,有机质含量为 18.32 g/kg,全氮含量为 0.95 g/kg,碱解氮含量为 78.26 mg/kg,速效磷含量为 21.03 mg/kg,速效钾含量为 110.64 mg/kg。供试 NaCl 为优级纯,购自上海玉博生物科技有限公司。

供试 AM 真菌为根内根孢囊霉(*Rhizophagus intraradices*),购自北京市农林科学院植物营养与资源环境研究所,直接用作接种菌剂,接种菌剂由土壤和孢子构成,孢子数 > 100 个/g 基质。

1.2 试验设计

试验采用完全随机设计,设置 4 个处理:CK(不接种丛枝菌根真菌,不设置盐胁迫处理)、AM(接种丛枝菌根真菌,不设置盐胁迫处理)、SS(不接种丛枝菌根真菌,设置盐胁迫)、AS(接种丛枝菌根真菌,设置盐胁迫)。每个处理重复 3 次。

盆栽器具为桶形,盆高为 17 cm,半径为 8 cm,每盆培养基质 5 kg。将催芽的种子每盆 1 粒转移至盆栽土中,加入 200 mL 育苗专用营养液,并保持 60% 土壤持水量。接种 AM 真菌的处理须将 20 g AM 真菌菌剂与灭菌的培养基质混合,不接种处理即采用经高温灭菌处理的菌剂等量加入。培养 30 d 后在盐胁迫处理中加入 100 mL 浓度为 100 mmol/L 的 NaCl 溶液,对照中加入等量蒸馏水。胁迫处理后 30 d 收获植株,共培养 60 d。

1.3 样品采集及测定分析

1.3.1 生物量、菌丝定殖率、丛枝侵染率及泡囊丰富度测定 培养结束后,将植株全部取出,小心清洗以获得完整根系,将根系切成 1 cm 的小段,采用台盼蓝染色,光学显微镜下用网格交叉记数法计算菌丝定殖率、丛枝定殖率及泡囊丰富度,具体方法参照 Kormanik 等描述的步骤^[14]进行。生物量为鲜质量,采用电子天平称量记录。

1.3.2 转录组测定

1.3.2.1 RNA 提取、cDNA 文库构建和高通量测序 使用 RNA prep Pure Plant Kit[天根生化科技(北京)有限公司]分离 12(4 × 3)张叶片样品的总 RNA。文库构建和 RNA - Seq 分析由 Biomarker Biotechnology Corporation(中国,北京)进行。首先,

使用 NEBNext® poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module[纽英伦生物技术(北京)有限公司]从总 RNA 中富集提取 poly(A) mRNA,将 poly(A) mRNA 片段化。这些中断的片段被用作第一链和第二链 cDNA 合成的模板。然后对得到的 cDNA 进行末端修复、磷酸化和连接到测序接头;通过 PCR 扩增合适的产物以构建 cDNA 文库。最后,使用 Illumina HiSeq™ 2500 对 12 个纯化的文库进行高通量测序。

1.3.2.2 高通量测序 RNA-Seq 读取映射和功能注释 进行 RNA-Seq 分析后,通过修剪接头并去除低质量的原始序列以获得高质量的读数序列。使用 HISAT2 软件将读数映射到鸡爪槭参考基因组(GCA_001876935.1, *Acer palmatum* 2017)。使用 StringTie 软件对映射的读数进行组装和定量分析,作为每千个碱基的转录每百万个片段映射(FPKM)值。来自参考基因组的原始基因的非翻译区(UTR),在连续映射读取的基础下,扩展到上游和下游以合成和优化基因结构^[15]。此外,通过比较基因组的原始注释信息,进行一一对比找到以前未注释的转录区域(即过滤长度大于 50 个氨基酸的短多肽产物和单个外显子区域后的新基因)。对于新基因,对潜在的新转录本进行功能注释,即将测序得到的转录本与公开可用的蛋白质数据库(Nr、Swiss-Prot、GO、COGs、KOG、Pfam、egg-NOG 和 KEGG)进行比对,使用 BLASTx 算法获取对比值。

1.3.2.3 差异表达基因(DEGs)分析 每个基因的表达水平由每千个碱基外显子每百万个片段映射

值决定。使用 DESeq 软件进行成对比较中的差异表达基因分析。通过计算所有基因的错误发现率(FDR)和倍数变化对数($\log_2 C$)。结合 GO 注释结果进行功能描述,接着对 DEGs 进行 KEGG Pathway 富集分析,结合 KEGG 注释结果获取差异基因相关的生化代谢途径及生物信号转导途径。当转录本符合 $FDR \leq 0.01$ 和 $\log_2 C$ 的绝对值 ≥ 1 时,认为该转录本存在功能富集。转录组测序委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.3.3 实时定量 PCR 验证差异基因准确性 将保存于 -80°C 的叶片样品快速研磨,采用转基因 II 一体化引物试剂盒 TransScript II All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(北京全式金生物技术股份有限公司)提取样本总 RNA,并将总 RNA 转化为单链 cRNA。采用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物(表 1)。使用 TransStart Top Green qPCR SuperMix(北京全式金生物技术股份有限公司)进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR),并在 Bio-Rad CFX96 实时 PCR 检测系统(Bio-Rad, USA)上 1 式 3 份进行 PCR 定量复孔检测。

每个反应包含 $10\ \mu\text{L}$ $2 \times$ TransStart Top Green qPCR SuperMix、 $2.0\ \mu\text{L}$ cDNA 样本、 $0.4\ \mu\text{L}$ 基因特异性引物、 $7.6\ \mu\text{L}$ ddH₂O,最终体积为 $20\ \mu\text{L}$ 。利用比较的方法计算每个样本的 mRNA 与内参基因 *Acer PMI* 的相对表达量,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示^[16]。最后,通过 qRT-PCR 和 RNA-Seq 分析比较 SS、AS 处理中基因表达的变化趋势,以评估测序结果是否可靠。基因验证委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

表 1 qRT-PCR 引物序列信息

基因 ID	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
Gene23660	GAAAGGATGGGCTACGCTGC	ATCAAGCTGAACAGAGGAACC
Gene26140	CCCAGTAGATGTCCCAAAAG	CTCACAAGGGATCGTAAGAGC
Gene20188	TGCCCGAAGGTAACATTGAG	TGGATATGAAATGCCTAGCCTG
New_Gene4379	ATTTAGGGGCATGGACGACG	CAGAACAACCGAGAGATGGGA
Gene20176	GATGGCTTTGTTGAAGGACTCG	TCGTCTTACCACCTTTGCT
New_Gene23129	TGGTCGGTTCCTCATGCTT	CTTCCAGACCCCAAGAACG
<i>Acer PMI</i>	ACAACATCCAGAAGGATCG	ACTGACGGTCTTGTGCTTC

1.4 数据处理与统计分析

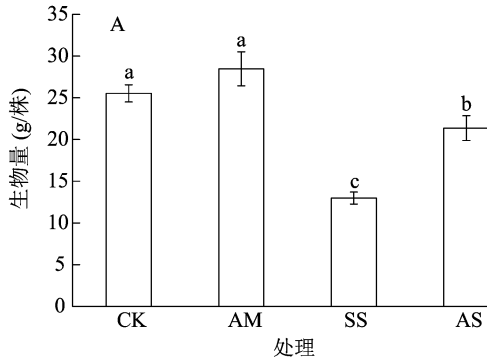
采用 Excel 2013 进行初步数据整理,采用 SPSS 23.0 软件中的单因素方差分析进行统计检测分析($\alpha = 0.05$),所有图形均采用 Origin 8、R 语言软件绘制。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下菌根共生对彩叶树生物量累积及根系侵染强度的影响

由图 1-A 可知,在生物量中,以 AM 处理生物

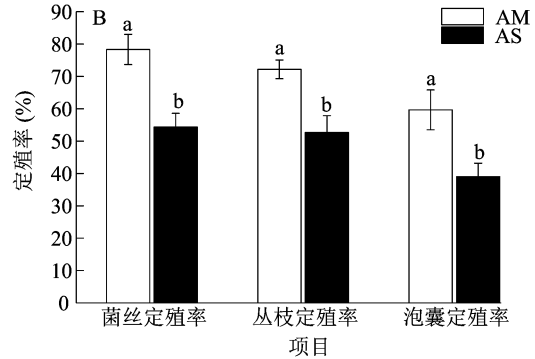
量累积最高,SS处理生物量累积最低,各处理表现为AM > CK > AS > SS,其中AM与CK处理无显著差异,二者皆显著大于SS和AS处理,且SS处理显著小于AS处理;与SS处理相比,CK、AM、AS处理分别显著提高104.31%、119.17%、64.51%。由图1-B可知,在没有接种AM真菌的处理中没有定殖情况,因此未列出;接种丛枝菌根真菌情况下,整体



柱上不同小写英文字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)

图1 盐胁迫下菌根共生对彩叶树生物量累积及根系侵染强度的影响

表现为菌丝定殖率大于丛枝定殖率,且以泡囊定殖率最低。在AM处理中,菌丝、丛枝及泡囊的定殖率分别为78.33%、72.16%、59.67%,盐处理(AS)下,菌丝、丛枝及泡囊的定殖率分别为54.33%、52.67%及39.05%;且在任一定殖率指标中,皆以AM处理显著大于AS处理。



2.2 盐胁迫及菌根共生下彩叶树转录本的原始数据分析

为了全面了解AM真菌对盐胁迫下彩叶树叶片转录组的影响,基于高通量RNA-Seq建立了12个cDNA文库。去除低质量读段、不确定碱基、过短序列以及可能污染的序列后,总共获得了高质量序列数20 600 209 ~ 29 151 214,高质量碱基数6 159 570 306 ~ 8 818 959 652,其中Q30 > 93.58%,鸟嘌呤和胞嘧啶(GC)所占的比例为47.58% ~ 48.71%。此外,注释比例表明映射到鸡爪槭基因组(GCA_001876935.1, *Acer palmatum* 2017)的读数比例皆较高,为81.54% ~ 83.81% (表2)。上述结果表明该RNA-Seq测序的12组cDNA文库可用作进一步分析的测序数据。

2.3 盐胁迫及菌根共生下彩叶树原始转录本的功能注释及分类

根据RNA-Seq测序结果,基于与参比基因组(GCA_001876935.1, *Acer palmatum* 2017)进行对比总共鉴定出6 019个原始转录本,且都均匀分布在染色体上。功能注释见图2,在上述数据库中总共注释得到4 672个新基因。可注释到COG、GO、KEGG、KOG、Pfam、Swiss-Prot、egg-NOG及Nr的新基因数分别为626、1 751、1 181、1 920、1 660、2 190、3 057及4 644个,分别占总的新基因数的13.40%、37.48%、25.28%、41.10%、35.53%、46.88%、65.43%

表2 盐胁迫下菌根共生下彩叶树转录本的原始数据分析

样本名	过滤序列数 (个)	过滤碱基数 (个)	GC含量 (%)	Q30 (%)	可注释比例 (%)
CK1	24 078 922	7 218 253 660	48.69	93.58	81.67
CK2	20 600 209	6 159 570 306	48.40	93.84	83.02
CK3	23 819 921	7 122 154 880	48.43	93.97	82.09
AM1	29 151 214	8 818 959 652	48.50	93.86	81.91
AM2	23 668 718	7 088 165 762	48.71	93.88	83.26
AM3	27 224 266	8 149 477 994	48.19	93.73	82.75
SS1	26 062 151	7 801 640 136	48.52	94.15	83.81
SS2	23 836 228	7 131 915 478	47.93	94.38	82.15
SS3	24 848 127	7 439 308 186	47.98	94.47	81.83
AS1	23 847 943	7 141 683 710	48.47	93.99	82.69
AS2	25 777 631	7 718 628 700	47.68	94.28	81.54
AS3	28 635 814	8 571 491 466	47.58	94.31	83.72

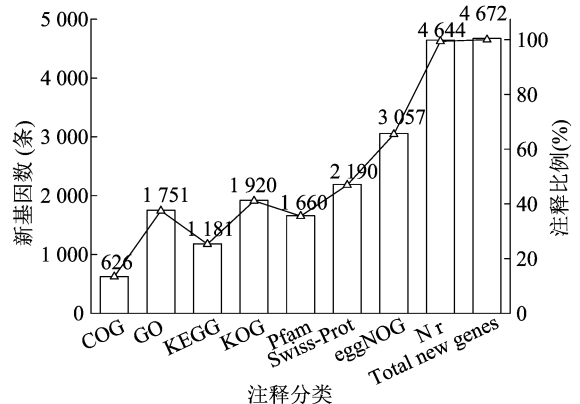


图2 盐胁迫下菌根共生下彩叶树转录本的功能注释及分类

及 99.40%。

2.4 盐胁迫及菌根共生下彩叶树转录本的差异基因 (DEGs) 分析

由图 3 - A 可知,当进行盐胁迫处理且无论接种丛枝菌根与否的对比组中(AM/SS、CK/SS),差异基因的下调数量整体上是上调数量的 2 倍。对于接种 AM 真菌处理中,在没有和有盐胁迫对比下(CK/AM、SS/AS),上调的 DEGs 数量则几乎是下调的 DEGs 数量的 2 倍。这些结果表明,鸡爪槭中更多的 DEGs 响应于盐胁迫而发生下调,而更多的 DEGs 响应于接种 AM 真菌而上调。有趣的是,本研究发现 41 个基因在比较 CK/SS 处理时下调,但在比较 SS/AS 处理时却上调。此外,在比较 SS/AS 处理时,有 286 个基因上调,但在比较 CK/SS 处理时,这些基因的表达水平没有差异。因此,可以推断具有

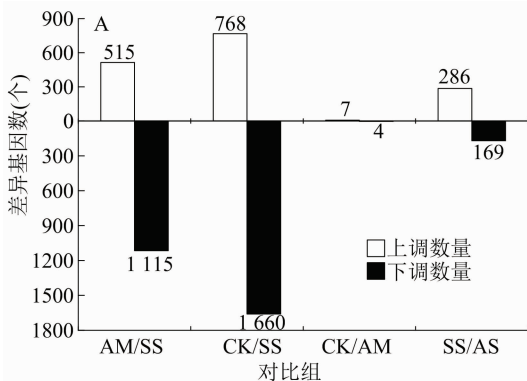


图3 盐胁迫及菌根共生下彩叶树转录本的差异基因分析

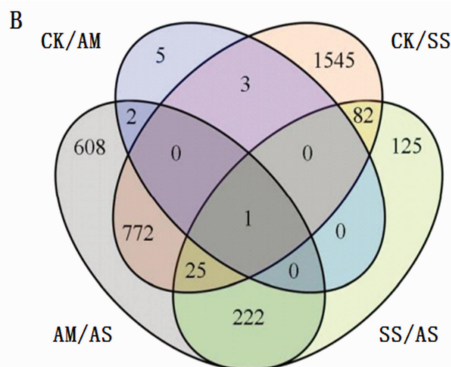
2.5 盐胁迫及菌根共生下彩叶树差异基因 (DEGs) 的功能注释

2.5.1 盐胁迫及菌根共生下彩叶树 DEGs 的 GO 功能注释与分类

为了解释 AM 真菌在盐度胁迫中的改善机制,研究了在 SS/AS 比较中的 455 个 DEGs 的特征。对于 GO 分析,455 个 DEGs 中有 247 个被分配到至少 1 个 GO 分类中,其主要涉及生物过程、分子功能和细胞成分(图 4);DEGs 显著富集(KS 值 ≤ 0.05) 在 32 个过程中产生富集(表 3)。这些富集的 GO term 在盐度胁迫的适应性反应中的生物过程高度相关,包括蛋白质生物合成相关过程(GO:0006383、GO:0006452、GO:0006449、GO:0045901、GO:0045905、GO:0006414 和 GO:0006415)、ATP 生物合成过程(GO:0006754)、蛋白质谷胱甘肽化(GO:0010731)、细胞分化调控(GO:0045595)、氮同化相关过程(GO:0010167、GO:0009309、GO:0009084)、呼吸电子传递链(GO:0022904)以及类胡

这些表达特征的 DEGs 可能是盐胁迫条件下响应菌根共生的关键基因。

为了进一步探索来自 4 个不同比较处理的 DEGs 之间的关系,构建了不同比较处理间 DEGs 的 Venn 图。由图 3 - B 可知,仅在接种与不接种 AM 真菌条件下(CK/SS、AM/AS),共有 798 个 DEGs,其中未接种的植物特有 1 630 个 DEGs。这些结果表明,在接种和未接种 AM 真菌的植物对盐胁迫的分子反应存在明显差异。此外,为了识别盐胁迫下 AM 真菌特异性调控的 DEGs,SS/AS 与 CK/AM 仅共有 1 个共同 DEGs,这表明大多数 DEGs 在 SS 和 AS 处理的比较可能与 AM 真菌调节的盐胁迫有关。因此 SS/AS 中的这些 DEGs(455 个)可用于后续基因功能表征以分析由 AM 真菌诱导耐盐性的可能分子机制。



萝卜素代谢过程(GO:0043288)。

2.5.2 盐胁迫及菌根共生下彩叶树 DEGs 的 KEGG 功能注释与富集分析

基于京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析中,455 个 DEGs 中有 98 个被分配了 KEGG ID 并被分类为 58 个途径(图 5)。在图 6 中突出显示了前 20 条富集途径(基于 q 值),其中,DEGs 显著(q 值 ≤ 0.05) 富集在与次级代谢物生物合成相关的 3 条途径中,包括苯丙烷、黄酮类、二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜酚的通路代谢(图 5、图 6),这些通路可能与耐盐性有关。

2.6 盐胁迫及菌根共生下彩叶树 DEGs 的 qRT-PCR 验证

为了验证 RNA-Seq 数据的可靠性,在 SS/AS 的 455 个 DEGs 中随机挑选了 6 个 DEGs 进行 qRT-PCR 分析。通过 qRT-PCR 分析发现, *Gene23660*、*Gene26140*、*New_Gene4379*、*Gene20176*、*Gene20188*、*New_Gene23129* 的 \log_2 FC 值分别为 9.66、3.26、3.39、

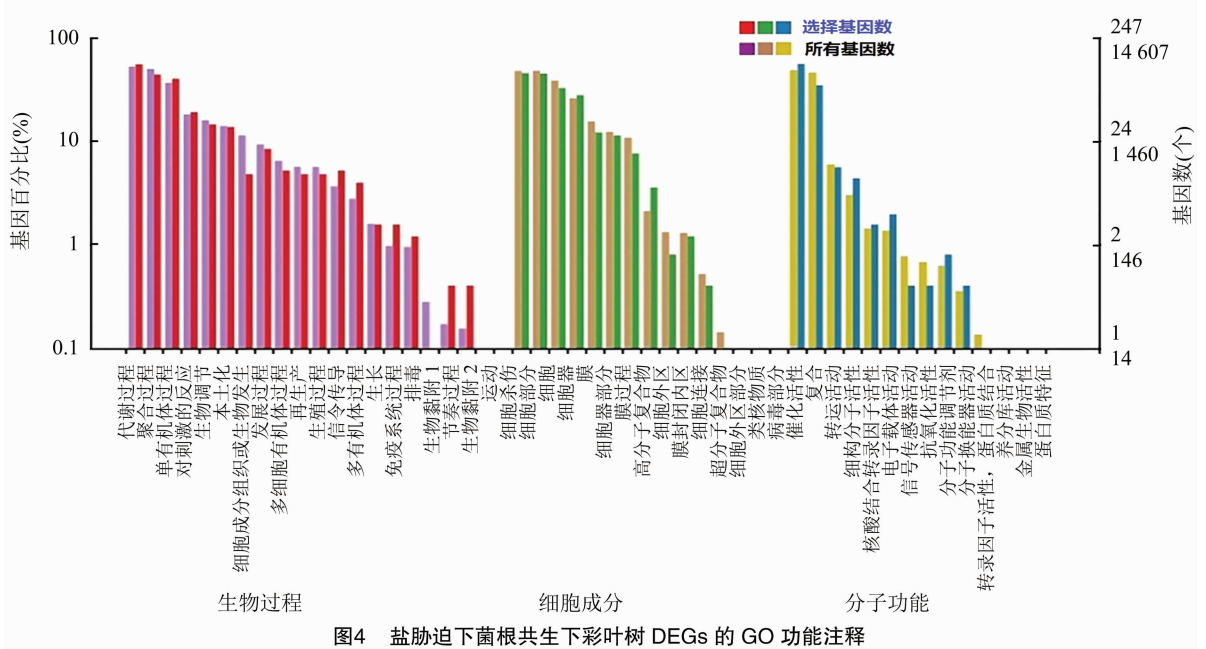


图4 盐胁迫下菌根共生下彩叶树 DEGs 的 GO 功能注释

表3 盐胁迫下菌根共生下彩叶树 DEGs 的 GO 分类

GO ID	GO 富集描述	注释数	注释显著数	富集系数
GO:0015713	磷酸甘油酸转运	5	2	0.009 40
GO:0006383	RNA 聚合酶Ⅲ启动子的转录 RNA	4	1	0.011 95
GO:0009399	固氮	3	1	0.012 99
GO:0045901	RNA 翻译延伸的正向调控因子	9	1	0.016 44
GO:0045905	RNA 翻译终止的正向调控因子	9	1	0.016 44
GO:0006452	RNA 翻译移码	9	1	0.016 44
GO:0006449	翻译终止的最终调控	9	1	0.016 44
GO:0009084	谷氨酰胺家族氨基酸的生物合成过程	25	3	0.017 10
GO:0009145	嘌呤核苷三磷酸的生物合成	58	1	0.020 28
GO:0009206	嘌呤核糖核苷三磷酸的生物合成	58	1	0.020 28
GO:0022904	呼吸电子传递链	30	1	0.021 26
GO:0006754	ATP 生物合成过程	53	1	0.024 70
GO:0043241	蛋白质复合物分解	41	2	0.024 76
GO:0032984	大分子复合物的分解	41	2	0.024 76
GO:0048571	长日光周期	8	1	0.025 02
GO:0048574	日照光周期与开花期	8	1	0.025 02
GO:0009696	水杨酸代谢过程	30	2	0.025 76
GO:0051336	水解酶活性调节	41	1	0.028 53
GO:0006414	水平延伸	101	2	0.030 62
GO:0006415	翻译终止	18	1	0.030 65
GO:0000103	硫酸盐同化	12	1	0.031 67
GO:0045595	调控细胞分化	46	1	0.031 67
GO:0071900	蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性的调控	31	1	0.034 33
GO:0022411	细胞成分分解	42	2	0.034 55
GO:0098656	阴离子跨膜转运	51	2	0.035 50
GO:0043288	类胡萝卜素代谢过程	9	1	0.035 84
GO:0043624	细胞蛋白复合物的分解	40	2	0.040 58
GO:0010167	对硝酸盐的反应	19	1	0.043 76
GO:0046189	含酚化合物生物合成过程	31	2	0.044 14
GO:0010731	蛋白质谷胱甘肽化	7	1	0.043 73
GO:0043244	蛋白质复合物分解的调节	20	1	0.049 81

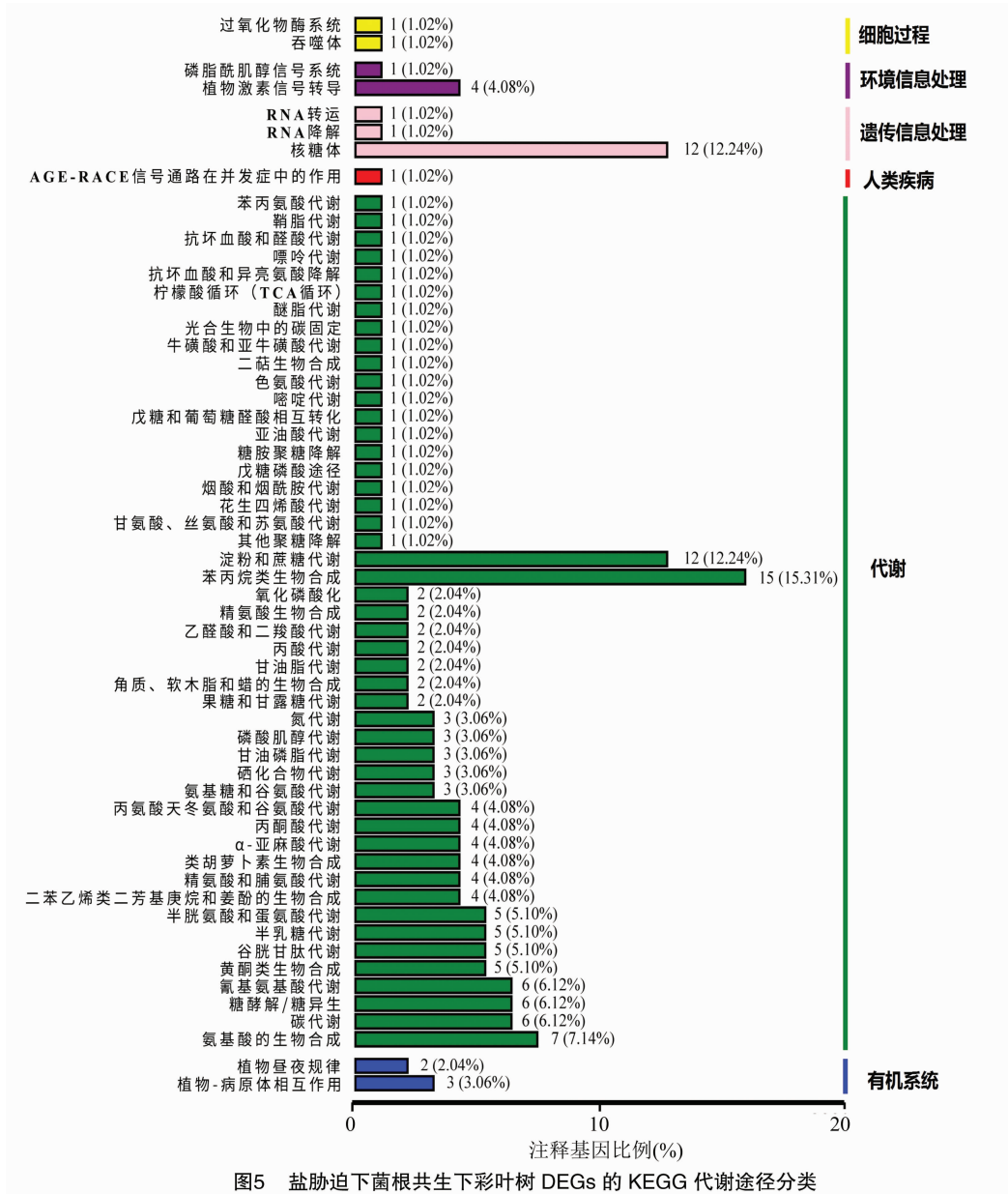


图5 盐胁迫下菌根共生下彩叶树 DEGs 的 KEGG 代谢途径分类

2.71、4.64、2.54(图7),这6个基因的表达趋势与转录本的RNA-Seq分析结果高度一致。这些结果表明DEGs分析是准确可靠的。

3 讨论与结论

丛枝菌根真菌在土壤中广泛存在,是重要的功能性微生物组成部分^[7]。关于AM真菌改善盐胁迫的研究已经在烟草、黄瓜、玉米以及小麦等多种植物中得到证实^[17-19]。为了更好地了解AM真菌对植物耐盐性的潜在分子机制,在盐胁迫下给彩叶树鸡爪槭接种AM真菌,并进行比较转录组分析,建立了12个测序文库,确定了6019个潜在基因,注释

得到4672个新基因。此外,在盐胁迫条件下由AM真菌诱导的455个差异基因显著富集在几个GO和KEGG通路中,这些通路涉及耐盐机制,包括植物细胞内部环境的改善、氮代谢相关过程以及可能的光保护机制。这些途径进一步证实AM真菌可调控离子渗透和氧化应激的影响,并改善盐度胁迫下的氮代谢和光保护机制。

3.1 盐胁迫下菌根共生涉及的细胞改善作用

首先,在盐胁迫条件下,抗氧化酶的分泌与非酶化合物的合成在清除过量ROS以维持氧化平衡和减少非生物胁迫对细胞中的影响方面起着重要作用,如过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽过氧化物酶

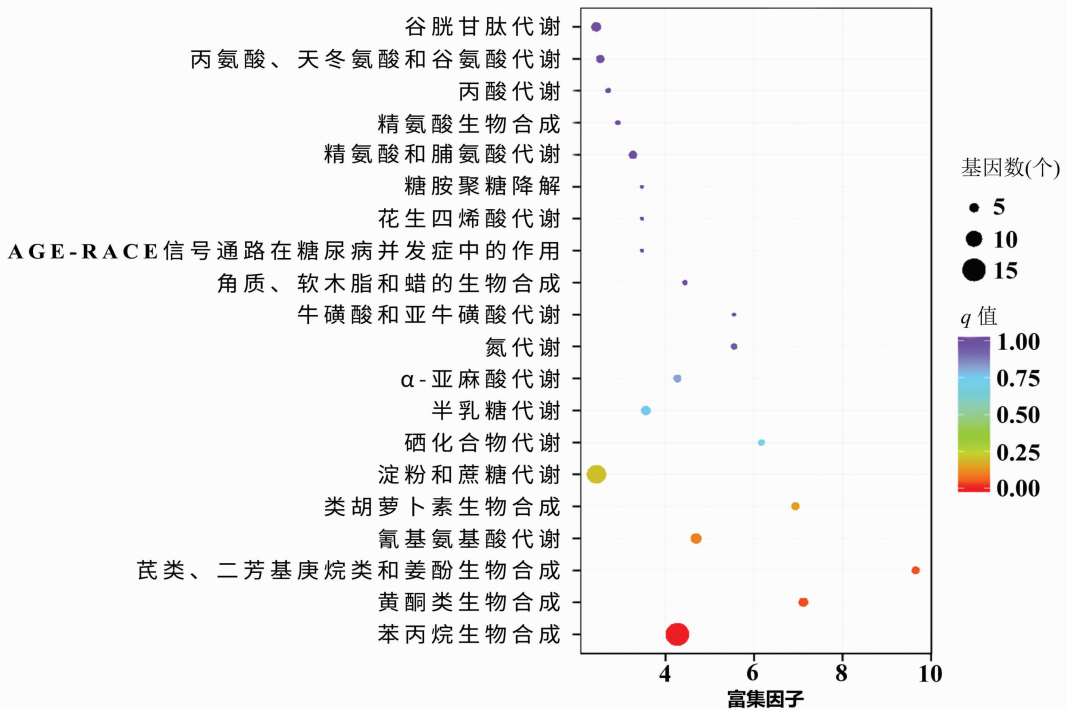


图6 盐胁迫下菌根共生下彩叶树 DEGs 的 KEGG 通路富集散点图

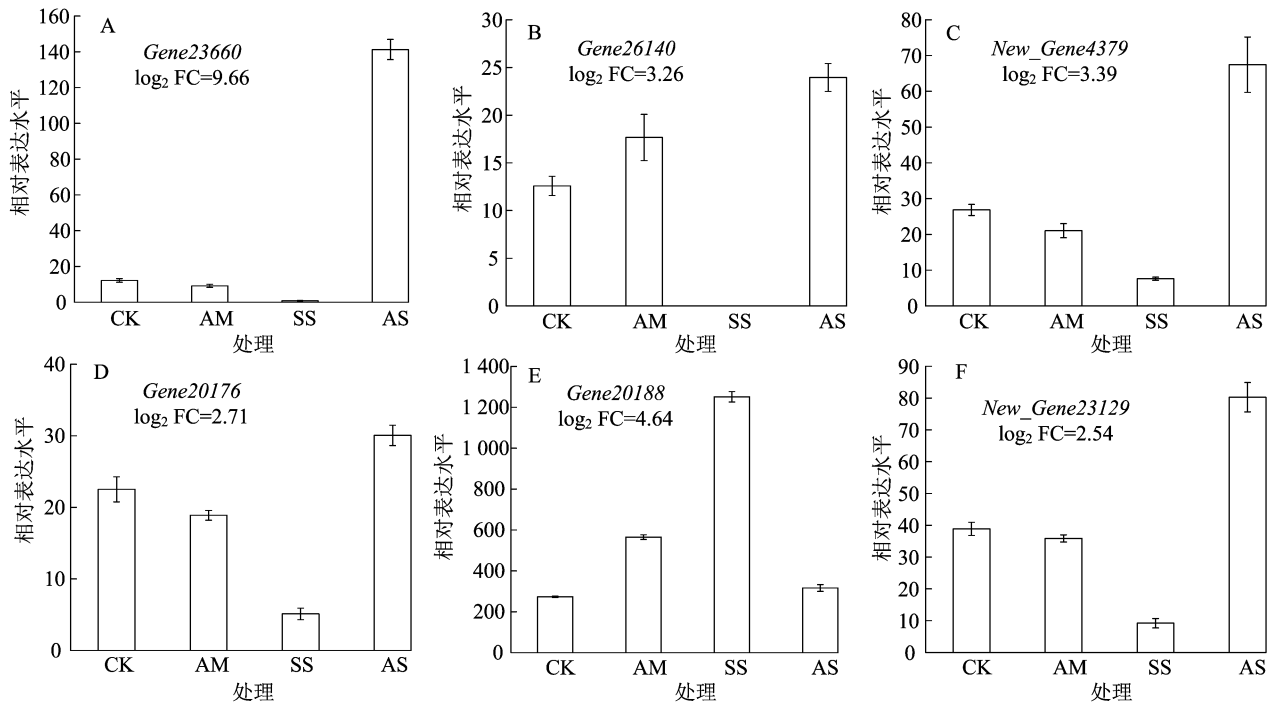


图7 通过转录组分析鉴定的 DEGs 的 qRT-PCR 验证

(GPX)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)、腺苷高半胱氨酸酶(AHCY)、谷胱甘 S- 转移酶(GST)、抗坏血酸(AsA)、谷胱甘肽(GSH)和硫氧还蛋白(TRX)等^[18,20-22]。本研究发现,许多编码 POD、GST、MDHAR、AHCY 和 TRX 的 DEGs 发生上调表

达并参与了多种抗氧化系统,包括抗坏血酸-GSH 循环和过氧还蛋白/硫氧还蛋白(PrxR/Trx)途径。

前人研究表明,AM 真菌可通过调节脯氨酸代谢酶活性从而改变叶脯氨酸代谢,这对调控宿主渗透压至关重要^[23]。本研究发现,2 个编码 K^+ 通道

的基因上调 *AKT* 基因的表达,这些基因参与 K^+ 在叶部中的易位^[2,24]。敏感系统信号通路通过调节质膜和液泡中的 Na^+ 转运在离子稳态中发挥重要作用,这涉及胞质 Ca^{2+} 信号运输、质膜和液泡 Na^+/H^+ 逆向调节以及 $H^+ - ATPase$ 建立的 H^+ 梯度驱动过程等^[25]。本研究中,参与 SOS 途径的相关基因发生上调,包括编码 Ca^{2+} 结合蛋白(SOS3)和 CBL 基因家族相互作用蛋白激酶(SOS2)的 DEGs。此外,CK/SS 比较中发现编码 V 型 H^+ 转运三磷酸腺苷(ATP)酶的基因表达水平增加,编码质膜 ATP 酶的基因在 SS/AS 中也发生上调,这对于在液泡膜和质膜上建立电化学 H^+ 梯度至关重要。这表明接种 AM 真菌通过在更全面、更平衡的渗透调控网络中调整过量 Na^+ 传输来促进离子稳态。此外,过量的 Na^+ 通常会导致盐度胁迫下糖生植物中 K^+ 缺乏,因此,*AKT* 基因的上调表达也可能在植物细胞中保持较高的 K^+/Na^+ 发挥作用,从而适应盐胁迫^[26]。

3.2 盐胁迫下菌根共生对氮代谢相关过程的调控作用

氮(N)是限制植物生长和发育的常量营养素,研究表明氮吸收、运输、还原和同化以及氨基酸代谢等代谢过程都受到盐度胁迫的影响^[27]。就植物对盐渍土的适应而言,增强 N 代谢可能是 AM 真菌改善宿主发育的重要功能之一^[17]。谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸脱氢酶(GDH)和谷氨酸合成酶(GOGAT)是参与 N 同化的关键酶^[28]。在本研究中,编码 GS 和 GDH 的 DEGs 在盐度胁迫下发生下调表达;接种 AM 真菌后,编码 GS、GDH 和 GOGAT 以及 NRT1/PTR 家族中编码蛋白质的 DEGs 表达发生上调。这表明彩叶树鸡爪槭的耐盐性增强可能与接种 AM 真菌提高 N 代谢效率有关。一些研究表明,AM 真菌还会导致编码与次级代谢相关的酶的基因表达水平增加,例如酚类化合物、黄酮类化合物和木质素的代谢,这些次级代谢涉及抗氧化、防御系统和耐盐调控^[29]。本研究发现,455 个已鉴定的 DEGs 在参与次级代谢产物生物合成的苯丙烷、黄酮类、二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜酚的等生物途径中存在显著富集,这与前人的研究结果^[29] 基本一致。这些结果表明,接种 AM 真菌可激活氮素相关次级代谢基因从而可能在增强耐盐性中起重要作用。

3.3 盐胁迫下菌根共生可能涉及的光保护机制

光合作用是受盐胁迫影响的主要过程之一,可

能会导致过多的光消耗,从而导致光抑制甚至光损伤^[30]。然而,植物已经进化出多种机制来保护自己免受光损伤,包括通过平衡光能的吸收和利用以及细胞环境的修复来避免光抑制^[2]。本研究中,结合转录组数据结果,在盐胁迫下彩叶树鸡爪槭可能通过下调编码光捕获叶绿素 a、叶绿素 b 结合蛋白(LHC II)基因的表达水平从而降低光抑制,叶绿素是植物体中最丰富的光收集器^[31]。因为 LHC II 从 PS II 迁移到 PS I 的状态转变是由编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因(*STN7*)的表达水平上调启动的,从而平衡光系统之间的激发能量分布^[29]。

本研究中,另一个显著的变化是参与类胡萝卜素代谢过程(GO:0043288)的 DEGs 水平发生了改变,类胡萝卜素具有 ROS 清除、光保护和膜稳定性功能,类胡萝卜素代谢 DEGs 上调可有助于提高耐盐性^[32]。光反应中,多余的光能可以从叶绿体输出并通过线粒体呼吸链消散^[33],这涉及替代呼吸途径能量守恒电子传递(ETC)途径的重要旁路,该途径涉及 II 型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)脱氢酶(NDs)和抗氧化物替代氧化酶(AOX)^[27-28],从而在光保护中起着关键作用。本研究中,在盐胁迫下编码 AOX 的基因被下调,同时随着接种 AM 真菌编码 NDB2(一种 II 型 NDs)的基因被上调。这些结果表明,接种 AM 真菌的彩叶树鸡爪槭采用多种策略来保护自己免受光损伤从而克服盐胁迫。

综上,本研究中,基于彩叶树鸡爪槭基因组分析总共鉴定出 6 019 个原始转录本,通过注释到 COG、GO、KEGG、KOGPfam、Swiss - Prot、egg - NOG 及 Nr 的新基因数共得到 4 672 个新基因,并在盐胁迫处理(SS)和盐胁迫下 AM 真菌接种处理(AS)的比较转录中鉴定了 455 个差异基因。进一步研究表明,在 455 个 DEGs 中,一些被鉴定为耐盐基因,因为它们参与植物细胞内部环境的改善、氮代谢相关过程和可能的光保护机制。本研究为后续研究功能分析的耐盐候选基因提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651 - 681.
- [2] 李明,冷冰莹,张晗菡,等. 盐胁迫下调控玉米胞内 Na^+/K^+ 比稳定的主要机制与措施[J]. 山东农业科学, 2021, 53(6): 133 - 138.
- [3] 刘云芬,彭 华,王薇薇,等. 植物耐盐性生理与分子机制研究进展[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 30 - 36.

- [4] Hussain S, Hussain S, Ali B, et al. Recent progress in understanding salinity tolerance in plants; story of Na^+/K^+ balance and beyond [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 160: 239 – 256.
- [5] Vaseva I I, Mishev K, Depaepe T, et al. The diverse salt – stress response of *Arabidopsis ctr1 – I* and *ein2 – I* ethylene signaling mutants is linked to altered root auxin homeostasis [J]. *Plants*, 2021, 10(3): 452.
- [6] 曹本福, 姜海霞, 刘 丽, 等. 丛枝菌根菌丝网络在植物互作中的作用机制研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2021, 32(9): 3385 – 3396.
- [7] Pedranzani H, Rodríguez – Rivera M, Gutiérrez M, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates physiology and performance of *Digitaria eriantha* plants subjected to abiotic stresses by modulating antioxidant and jasmonate levels [J]. *Mycorrhiza*, 2016, 26(2): 141 – 152.
- [8] Hashem A, Alqarawi A A, Radhakrishnan R, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi regulate the oxidative system, hormones and ionic equilibrium to trigger salt stress tolerance in *Cucumis sativus* L. [J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2018, 25(6): 1102 – 1114.
- [9] 陈保冬, 于 萌, 郝志鹏, 等. 丛枝菌根真菌应用技术研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2019, 30(3): 1035 – 1046.
- [10] 王 琪, 于晓南. 3 种彩叶树对低温的生理响应及抗寒性评价 [J]. *北京林业大学学报*, 2013, 35(5): 104 – 109.
- [11] 杨 锦, 史绍林, 季晓慧, 等. 低温胁迫对八种彩叶树生理指标的影响 [J]. *北方园艺*, 2018(5): 106 – 110.
- [12] 黄 妍, 周 强, 杨静慧, 等. 土壤盐碱程度对不同种类彩叶植物生长的影响 [J]. *天津农学院学报*, 2019, 26(2): 35 – 38, 56.
- [13] 张爱娜, 郑仰雄, 黄东兵. 丛枝菌根真菌对大女叶贞耐盐性的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(19): 129 – 133.
- [14] Kormanik P P, Bryan W C, Schultz R C. Procedures and equipment for staining large numbers of plant root samples for endomycorrhizal assay [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1980, 26(4): 536 – 538.
- [15] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA – seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 – 408.
- [17] 曹本福, 姜海霞, 陆引罡, 等. 烟草与丛枝菌根真菌的共生效应研究进展 [J]. *中国土壤与肥料*, 2021(1): 327 – 338.
- [18] 孔亚丽, 朱春权, 曹小闯, 等. 土壤微生物介导植物抗盐性机理的研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2021, 54(10): 2073 – 2083.
- [19] 孙思淼, 常 伟, 宋福强. 丛枝菌根真菌提高盐胁迫植物抗氧化机制的研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2020, 31(10): 3589 – 3596.
- [20] Das P, Nutan K K, Singla – Pareek S L, et al. Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles [J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2015, 2: 70.
- [21] Zhang H, Han B, Wang T, et al. Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics [J]. *Journal of Proteome Research*, 2012, 11(1): 49 – 67.
- [22] 赵 嫚, 陈仕勇, 李亚萍, 等. 外源 GABA 对盐胁迫下金花菜种子萌发及幼苗抗氧化能力的影响 [J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(2): 310 – 316.
- [23] Wu H H, Zou Y N, Rahman M M, et al. Mycorrhizas alter sucrose and proline metabolism in trifoliolate orange exposed to drought stress [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42389.
- [24] 王 哲, 柴里昂, 樊怀福, 等. 植物响应盐胁迫蛋白质组学研究进展 [J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(6): 1021 – 1028.
- [25] Yang Y Q, Guo Y. Unraveling salt stress signaling in plants [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2018, 60(9): 796 – 804.
- [26] 李晓院, 解莉楠. 盐胁迫下植物 Na^+ 调节机制的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2019, 35(7): 148 – 155.
- [27] Gu C S, Xu S, Wang Z Q, et al. *De novo* sequencing, assembly, and analysis of *Iris lactea* var. *chinensis* roots' transcriptome in response to salt stress [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 125: 1 – 12.
- [28] Costa M A, Collins R E, Anterola A M, et al. An in silico assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(6): 1097 – 1112.
- [29] Li C C, Liu S H, Yao X H, et al. *PnF3H*, a flavanone 3 – hydroxylase from the Antarctic moss *Pohlia nutans*, confers tolerance to salt stress and ABA treatment in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Growth Regulation*, 2017, 83(3): 489 – 500.
- [30] 束 胜, 郭世荣, 孙 锦, 等. 盐胁迫下植物光合作用的研究进展 [J]. *中国蔬菜*, 2012(18): 53 – 61.
- [31] Turan S. Light acclimation in plants: photoinhibition and photoprotection [J]. *Adv Bio Research*, 2012(3): 90 – 94.
- [32] Jin C, Ji J, Zhao Q, et al. Characterization of lycopene β – cyclase gene from *Lycium chinense* conferring salt tolerance by increasing carotenoids synthesis and oxidative stress resistance in tobacco [J]. *Molecular Breeding*, 2015, 35(12): 228.
- [33] Noguchi K, Yoshida K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves [J]. *Mitochondrion*, 2008, 8(1): 87 – 99.