

王新亮,彭 玲,王 健,等. 盐碱胁迫下平邑甜茶的转录组分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(22):29–37.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.22.004

盐碱胁迫下平邑甜茶的转录组分析

王新亮^{1,2}, 彭 玲², 王 健¹, 贾晶晶¹, 唐立平¹

(1. 滨州学院学报编辑部, 山东滨州 256603; 2. 滨州学院山东省黄河三角洲生态环境重点实验室, 山东滨州 256603)

摘要: 为了解平邑甜茶对盐碱胁迫的响应机制, 利用 RNA-seq 技术检测了盐碱胁迫下其幼苗的基因表达水平。结果显示, 每个样品平均产出 6.48 Gb 数据, 43.82×10^6 个原始数据; 纯净数据为 $42.71 \times 10^6 \sim 43.44 \times 10^6$ 个, 表达的基因数为 41 008, 其中已知的基因为 38 465 个, 预测的新基因为 2 543 个。基因表达量聚类分析显示, 根和叶中的基因分别聚类成 12 个基因簇, 并对根中基因簇 1、7、9、10、11 以及叶中基因簇 4、7、8、10 进行了 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析结果显示, 生物过程中的基因主要富集于细胞过程和代谢过程中, 细胞组分中的基因主要富集于膜、膜部分、细胞和细胞器中, 分子功能中的基因主要富集于结合和催化活性中; KEGG 富集分析显示, 根和叶中富集基因较多的途径有内质网内蛋白质加工、碳代谢、氨基酸的生物合成、核糖体、RNA 转运、植物激素信号转导等。进一步分析表明, 叶绿素 a/b 结合蛋白、查尔酮合成酶、查尔酮-黄酮异构酶、热休克蛋白、转录因子、细胞色素 P450 蛋白和未知蛋白等编码基因参与了平邑甜茶对盐碱胁迫的响应, 并发挥了重要的调节作用。本研究有助于进一步了解平邑甜茶对混合耐盐碱胁迫响应的分子机制, 为今后苹果砧木抗盐碱分子育种提供参考。

关键词: 平邑甜茶; 盐碱胁迫; 转录组; 基因表达; 胁迫响应

中图分类号: S661.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)22-0029-09

土壤盐碱化是影响植物生长的重要环境因子。据统计, 全球约有 95 000 万 hm^2 的盐碱地, 占世界总陆地面积的 7% 以上^[1], 预计至 2050 年将会有 50% 以上的耕地发生盐碱化^[2]。我国盐碱地总面积约有 9 900 万 hm^2 ^[3], 主要分布在东北松嫩平原、东部滨海沿岸、西北内陆干旱区等^[4]。作为我国重要农业生产基地的黄河三角洲, 地势平坦, 具备农业生产的优越条件, 但由于地理位置和气候等原因, 盐碱土分布非常广泛, 面积约占土地总面积的 50%^[5]。盐碱胁迫不是简单的盐胁迫与碱胁迫叠加, 而是有一定的协同效应, 对植物的危害更为复杂和严重^[6]。盐碱胁迫对植物的伤害是一个复杂的生理生化过程, 主要包括渗透胁迫、离子毒害、高 pH 伤害和活性氧胁迫等^[7]。多年来, 人们从土壤改良、栽培技术、培育耐盐碱品种等方面对提高盐碱地利用率和植物耐盐碱性进行了大量研究^[8-10], 而果树耐盐碱研究起步较晚。近年来, 盐碱胁迫响应机理和选育耐盐碱砧木已经成为果树耐盐碱研究的热点。

苹果 (*Malus × domestica* Borkh.) 是世界产量和消费量最大的 4 种水果之一^[11], 2018 年全球产量约为 8 600 万 t, 其中我国的苹果产量最高, 约为 3 900 万 t^[12], 但土壤盐碱化严重制约着我国苹果产业的发展。优良的砧木能够促进果树生长, 提高果实产量和品质^[13]。因此, 研究砧木对盐碱胁迫响应和耐受的分子机制对苹果产业的发展具有重要意义^[14]。一直以来, 人们对植物耐盐碱机理的研究大多集中在盐胁迫或碱胁迫方面, 而对盐碱胁迫的研究较少。此外, 报道侧重于对草本植物的影响, 对苹果砧木的研究较少^[15]。平邑甜茶 (*Malus hupehensis* Rehd.) 是我国广泛使用的苹果砧木之一, 具有无融合生殖特性^[16], 非常适合于分子研究。本研究利用 RNA-seq 技术分析了盐碱胁迫下平邑甜茶幼苗的转录本, 获得了大量差异表达基因, 通过基因表达模式聚类分析和功能注释, 分析了平邑甜茶在盐碱胁迫过程中显著上调或下调的基因, 及其响应盐碱胁迫的分子机制, 为今后苹果砧木抗盐碱分子育种提供参考。

收稿日期: 2021-11-08

基金项目: 滨州学院博士学位人员及具有硕士学位的高级职称人员科研启动费项目 (编号: 2019Y36)。

作者简介: 王新亮 (1983—), 男, 山东宁津人, 博士, 高级工程师, 主要从事果树抗逆及氮素吸收利用研究。E-mail: wiln1@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验在滨州学院黄河三角洲生态环境重点实

实验室苗圃进行。种子和细沙分别用 0.2% KMnO_4 浸泡 30 min,再用自来水冲洗干净。种子与细沙混匀后在 4 ℃ 温度下层积至露白。种子播种在塑料盆基质(沙子、蛭石和土壤的体积比为 3:2:1)中。幼苗在室外自然光和温度条件下生长,使用 1/2 霍格兰营养液(pH 值 = 6.8 ± 0.2)浇灌。

1.2 盐碱胁迫处理

幼苗长到 6~8 张真叶时被分为处理组和对照组。处理组幼苗用含有 200 mmol/L 混合盐(NaCl 、 Na_2SO_4 、 NaHCO_3 摩尔比为 2:1:1, pH 值 = 8)的 1/2 霍格兰溶液处理;对照组用 1/2 霍格兰溶液浇灌。分别在处理 0、1、3、6 d 采集处理组和对照组的新根和叶片(新根样品编号:R000、R001、R003、R006;叶片样品编号:L000、L001、L003、L006)。样品用液氮处理后储存在 -80 ℃ 冰箱。

1.3 RNA 提取、转录组测序与分析

采用 Trizol 法提取样品总 RNA。RNA 质量用 NanoDrop One 超微量紫外分光光度计(Thermo Fisher Scientific 公司,美国)和 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies 公司,美国)测定。mRNA 用带有 Oligo(dT)的磁珠从总 RNA 中富集,通过打断 buffer 得到 mRNA 短片段,用随机引物合成 cDNA 第 1 条链,接着形成双链 DNA,然后通过热变性使产物形成单链,最后环化得到单链环状 DNA 文库。采用 BGISEQ-500 平台(华大基因,深圳,中国)进行测序。

原始数据(raw data)经过滤低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的片段得到纯净数据(clean data)。纯净数据与参考基因组序列(*Malus × domestica* GDDH13 Whole Genome v1., https://www.rosaceae.org/species/malus/malus_x_domestica/genome_GDDH13_v1.1)^[17-18], 并使用 RSEM(RNA-Seq by expectation maximization)计算每个样本的基因表达水平^[19], 以 FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) 计算基因表达量。使用软件 Mfuzz 对基因进行时间序列分析^[20]。各样品间的 Pearson's 相关系数通过 R 软件的 cor 函数计算。

1.4 基因表达水平分析及功能注释

差异倍数(fold change) ≥ 2 或 ≤ -2 并且 Q 值(校正 P -value) ≤ 0.001 的基因被定义为差异表达基因^[21]。利用基因本体论(gene ontology, GO)数据库(<http://www.geneontology.org/>)和京都基因与基

因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), 对差异表达基因进行富集分析, Q 值 ≤ 0.05 为显著富集。利用 NCBI Nr 数据库 blast 功能检索差异表达基因的同源蛋白。

2 结果与分析

2.1 测序结果

本研究 23 个样品,每个样品平均产出 6.48 Gb 数据, 43.82×10^6 个原始数据;样品产生的纯净数据为 $42.71 \times 10^6 \sim 43.44 \times 10^6$ 个。各样品所得数据与基因组的平均比对率为 80.01%, 与基因的平均比对率为 76.54%;共 41 008 个基因被检测到表达,其中 38 465 个为已知基因,2 543 个为预测的新基因。通过计算样品之间所有基因表达量的 Pearson's 相关系数(图 1),发现每个样品的各个生物重复之间,只有 L001_1 和 L001_2 之间的相关系数小于 0.8,表明其余生物学重复样品之间的相关性较好。

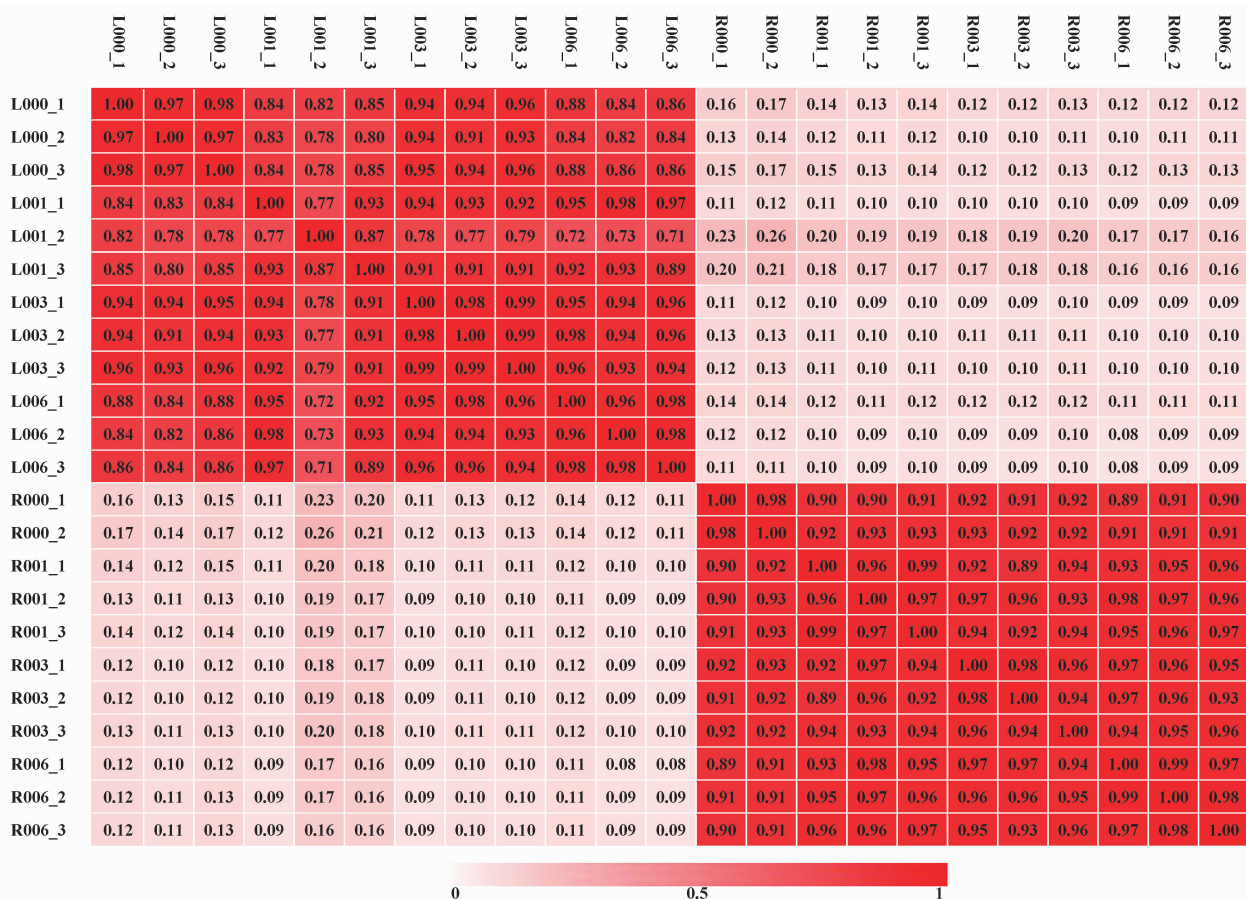
2.2 基因表达模式聚类分析

根据基因的表达量信息,表达模式一致的基因被聚到同一个基因簇中,根和叶中的基因分别聚类成 12 个基因簇(图 2)。其中,根中基因簇 1、10 以及叶中基因簇 8、10 表达上调;根中基因簇 7、9、11 以及叶中基因簇 4、7 表达下调。

2.3 基因功能注释

对根中基因簇 1、7、9、10、11 以及叶中基因簇 4、7、8、10 中的基因进行了 GO 和 KEGG 富集分析。结果显示,GO 富集分析包含生物过程、细胞组分和分子功能 3 类,根和叶中基因富集情况基本一致:生物过程中的细胞过程和代谢过程富集数量最多,细胞组分中的膜、膜部分、细胞和细胞器富集数量最多,分子功能中的结合和催化活性富集数量最多(图 3)。KEGG 富集分析显示根中基因簇 1、7、9、10、11 显著富集的途径分别为 2、3、2、17、2 个(表 1);叶中基因簇 4、7、8、10 显著富集的途径分别为 5、4、4、25 个(表 2)。

利用 NCBI Nr 数据库 blast 功能检索了上述 9 个基因簇的基因的同源蛋白,并将根和叶中表达变化显著(差异倍数 ≥ 2 或 ≤ -2)且表达量高的前 10 个基因分别列于表 3、表 4,根中基因簇 11 中只有 3 个基因,至少有一个样品的 FPKM ≥ 1 。结果表明,这些基因编码叶绿素 a/b 结合蛋白(LHC II)、查尔酮合成酶、查尔酮-黄酮异构酶、热休克蛋白、转录



相关系数越高 (颜色越深), 相关性越好

图1 各样品之间相关性分析热图

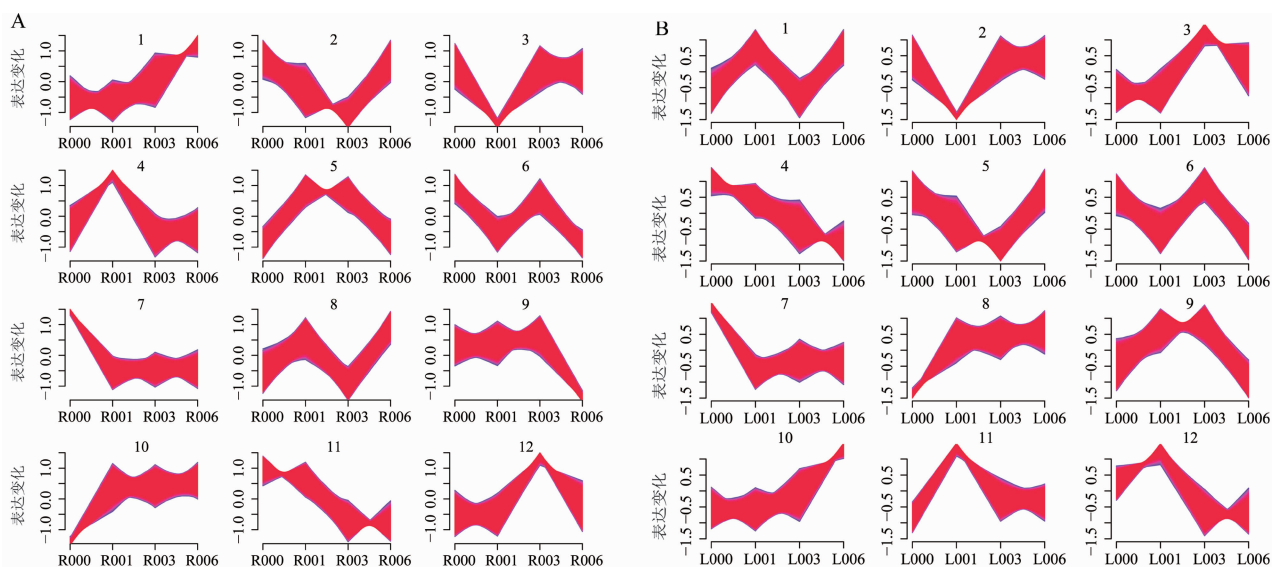


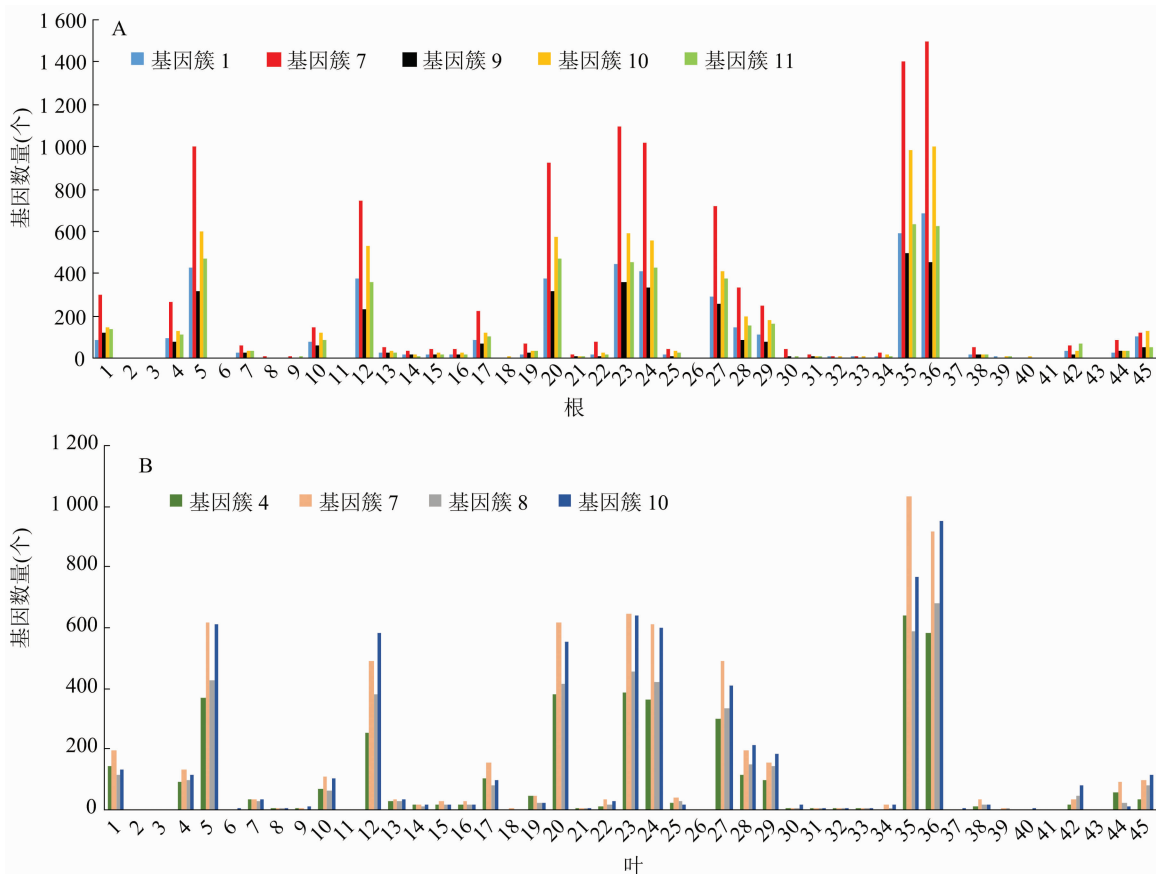
图2 根 (A) 和叶 (B) 中基因表达模式聚类分析

因子、细胞色素 P450 蛋白等。

3 结论与讨论

本研究利用 BGISEQ-500 平台对盐碱胁迫不

同时间的平邑甜茶根和叶进行了转录组测序, 共有 41 008 个基因被检测到表达, 其中已知的基因有 38 465 个, 预测的新基因有 2 543 个。基因表达聚类分析显示, 根和叶中的基因分别聚类成 12 个基因



属于分子功能。1—生

1~19 属于生物过程, 20~33 属于细胞组分, 34~45 属于分子功能。1—生物调节; 2—碳利用; 3—细胞增殖; 4—细胞组分组织或合成; 5—细胞过程; 6—脱毒; 7—发育过程; 8—生长; 9—免疫响应过程; 10—定位; 11—运动; 12—代谢过程; 13—多细胞生物过程; 14—多组织过程; 15—生殖; 16—生殖过程; 17—刺激响应; 18—节律过程; 19—信号; 20—细胞; 21—细胞连接; 22—胞外区; 23—膜; 24—膜部分; 25—膜内腔; 26—拟核; 27—细胞器; 28—细胞器部分; 29—含蛋白的复合体; 30—超分子复合体; 31—共质体; 32—病毒粒子; 33—病毒粒子部分; 34—抗氧化活性; 35—结合; 36—催化活性; 37—分子载体活性; 38—分子功能调节器; 39—分子传感器活性; 40—营养库活性; 41—蛋白质标签; 42—结构分子活性; 43—毒素活性; 44—转录调节活性; 45—转运体活性

表1 根中基因的 KEGG 途径富集分析

基因簇	途径编号	途径名称	基因数	<i>Q</i> 值	基因簇	途径编号	途径名称	基因数	<i>Q</i> 值
1	ko00190	氧化磷酸化	33	0.040 057	10	ko00630	乙醛酸和二羧酸代谢	38	0.001 329
	ko01200	碳代谢	67	0.040 057		ko00260	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	31	0.002 111
7	ko00196	光合作用天线蛋白	18	1.69×10^{-5}	ko00030	磷酸戊糖途径	27	0.004 138	
	ko00750	维生素 B6 代谢	17	0.029 780	ko00620	丙酮酸代谢	40	0.007 565	
9	ko04141	内质网内蛋白质加工	176	0.029 780	ko03015	mRNA 监控途径	67	0.008 102	
	ko04075	植物激素信号转导	93	1.04×10^{-6}	ko00510	<i>N</i> -聚糖生物合成	24	0.019 588	
	ko04136	自噬	17	0.002 255	ko00900	萜类骨架的生物合成	20	0.020 058	
10	ko01200	碳代谢	121	7.40×10^{-11}	ko00220	精氨酸生物合成	21	0.029 518	
	ko01230	氨基酸的生物合成	117	2.02×10^{-10}	ko00400	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸 的生物合成	21	0.030 235	
	ko00020	三羧酸循环	33	0.000 194	ko00790	叶酸生物合成	13	0.045 802	
	ko03008	真核生物的核糖体生物合成	59	0.000 252	11	ko03010	核糖体	115	5.36×10^{-8}
	ko00010	糖酵解/糖异生	54	0.000 264		ko03013	RNA 转运	103	0.000 995
	ko00250	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	29	0.000 397					
	ko01210	2-氧代羧酸代谢	36	0.000 397					

表 2 叶中基因的 KEGG 途径富集分析

基因簇	途径编号	途径名称	基因数	Q 值	基因簇	途径编号	途径名称	基因数	Q 值
4	ko00591	亚油酸代谢	15	0.041 109	10	ko00400	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成	28	1.34×10^{-5}
	ko00592	α -亚麻酸代谢	23	0.041 109		ko00630	乙醛酸和二羧酸代谢	39	6.04×10^{-5}
	ko03015	mRNA 监控途径	50	0.041 109	10	ko00520	氨基糖和核苷酸糖代谢	58	0.001 581
	ko03040	剪接体	79	0.047 198		ko00260	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	29	0.001 749
	ko04075	植物激素信号转导	84	0.047 198	10	ko00020	三羧酸循环	27	0.002 322
7	ko04141	内质网内蛋白质加工	161	4.71×10^{-10}		ko00620	丙酮酸代谢	38	0.004 271
	ko00196	光合作用天线蛋白	15	1.03×10^{-5}	10	ko00270	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	43	0.006 300
	ko03008	真核生物的核糖体生物合成	63	0.000 918		ko00010	糖酵解/糖异生	43	0.012 715
	ko03018	RNA 降解	74	0.009 744	10	ko04145	吞噬体	33	0.012 813
8	ko00860	卟啉和叶绿素代谢	25	0.001 490		ko00130	泛醌和其他萜类醌生物合成	19	0.013 179
	ko01200	碳代谢	73	0.003 739	10	ko00750	维生素 B ₆ 代谢	11	0.013 179
	ko00710	光合生物中的碳固定	31	0.015 861		ko00945	芪类、二苯基庚酮和姜酚生物合成	20	0.021 639
	ko00740	核黄素代谢	13	0.033 698	10	ko00780	生物素代谢	10	0.025 629
10	ko01200	碳代谢	124	4.62×10^{-15}		ko00730	硫胺素代谢	10	0.045 621
	ko01230	氨基酸的生物合成	116	8.65×10^{-13}	10	ko00860	卟啉和叶绿素代谢	21	0.045 621
	ko03010	核糖体	127	3.26×10^{-8}		ko00051	果糖和甘露糖代谢	25	0.049 458
	ko00710	光合生物中的碳固定	49	8.37×10^{-8}	10	ko00360	苯丙氨酸代谢	26	0.049 458
	ko00190	氧化磷酸化	53	1.67×10^{-7}		ko00906	类胡萝卜素生物合成	18	0.049 458
	ko00941	类黄酮生物合成	49	7.28×10^{-7}					
	ko00030	磷酸戊糖途径	32	5.90×10^{-6}					

簇,其中,根中基因簇 1、10 和叶中基因簇 8、10 基因的表达被上调;根中基因簇 7、9、11 以及叶中基因簇 4、7 基因的表达被下调。表明这些基因可能在平邑甜茶受盐碱胁迫过程中持续起作用。为了解这些基因的功能,对它们进行了 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析结果显示,分子功能中的结合和催化活性富集基因的数量最多,此外,细胞组分中的膜、膜部分、细胞和细胞器以及生物过程中的细胞过程和代谢过程富集基因的数量也较多。这与葡萄和白刺在盐胁迫后富集基因数量最多的是结合和催化活性的研究结果^[22-23]一致。这些结果表明结合和催化活性是植物对盐碱胁迫的主要响应过程;膜、膜部分、细胞、细胞器、细胞过程和代谢过程同样也在植物响应盐碱胁迫中发挥重要作用。KEGG 富集分析显示,根和叶中富集基因较多的途径有内质网内蛋白质加工、碳代谢、氨基酸的生物合成、核糖体、RNA 转运、植物激素信号转导等。在受到盐、碱胁迫时,高粱和榆叶梅的碳代谢途径富集的基因数量较多^[24-25],表明植物可能需要大量能量来应对盐、碱胁迫,并且胁迫可能通过改变植物碳代谢相关基因的表达来影响植物生长^[25]。

盐胁迫能引起果树叶片净光合速率下降^[26]。

叶绿素 a/b 结合蛋白(LHC II)能够促进光合作用正常进行,平邑甜茶叶片中叶绿素 a/b 结合蛋白(LHC II)编码基因(MD09G1292900、MD17G1281900)的表达量在受到盐碱胁迫后显著降低。另外,活性氧还会在植物体内大量积累,为清除这些活性氧,植物会启动如过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化物氢酶等酶类保护体系和类黄酮(黄酮类化合物)、谷胱甘肽、抗坏血酸等非酶类保护体系^[1]。平邑甜茶根中过氧化物酶编码基因 MD11G1061100 的表达被显著上调,而 MD13G1053000 的表达被显著下调。查尔酮合成酶是类黄酮合成途径中的关键酶之一^[27],查尔酮-黄酮异构酶也在类黄酮合成途径中起重要作用^[28],类黄酮在抗氧化方面具有重要作用。本研究中平邑甜茶叶片中查尔酮合成酶编码基因(MD04G1003300、MD04G1003400)和查尔酮-黄酮异构酶编码基因(MD01G1167300、MD07G1233400)的表达均显著上调。这些结果表明平邑甜茶在受到盐碱胁迫后光合作用减弱,并通过酶类和非酶类保护体系清除体内的活性氧。

热休克蛋白对植物热应激损伤的恢复及提高植物耐热性具有重要作用^[29],它能稳定染色质、蛋白质和膜,并通过再折叠促进蛋白质在胁迫期间或

表 3 根中基因簇中表达量高且表达变化显著(差异倍数≥2 或≤-2)的部分基因

基因编号	基因簇	FPKM				基因注释
		0 d	1 d	3 d	6 d	
MD05G1255500	1	222.00	694.89	878.65	2 223.08	锌转运蛋白 10
MD14G1158400	1	293.64	682.82	745.25	1 550.54	金属转运蛋白
MD04G1141100	1	142.67	492.64	514.21	1 390.47	咖啡酸 3-O-甲基转移酶
MD05G1221300	1	21.09	43.95	104.94	395.36	阿魏酰辅酶 A-羟化酶
MD15G1313900	1	4.95	19.19	50.92	248.34	阿魏酰辅酶 A-羟化酶
MD01G1068100	1	23.26	73.32	79.43	178.81	铁还原酶
MD02G1028800	1	44.15	91.81	136.71	165.56	铜蓝蛋白
MD10G1283900	1	5.43	11.72	17.20	66.53	亚精氨芥子酰辅酶 A 酰基转移酶
MD14G1086500	1	16.76	34.48	58.04	65.43	ORG2 转录因子
MD09G1036600	1	11.10	26.32	32.47	61.70	WAT1 相关蛋白
MD07G1196500	7	1 497.72	76.35	330.02	257.96	70 ku 热休克同源蛋白
MD15G1383700	7	1 003.73	292.16	285.18	332.48	天冬氨酰蛋白酶
MD01G1126500	7	950.20	46.66	140.69	126.35	70 ku 热休克同源蛋白
MD01G1144400	7	631.04	58.22	72.62	32.06	16.9 ku 热休克蛋白
MD15G1255700	7	449.90	192.92	180.77	203.74	脱落酸 8'-羟化酶
MD13G1023200	7	431.01	143.77	165.66	148.76	乳胶蛋白
MD11G1133200	7	407.04	139.45	134.09	118.01	类成束阿拉伯半乳糖蛋白
MD04G1020100	7	346.32	98.89	167.69	113.35	葡聚糖内糖基转移酶/水解酶
MD09G1102600	7	277.88	72.69	59.59	54.71	葡聚糖内糖基转移酶/水解酶蛋白 9 前体
MD01G1208700	7	252.45	9.76	30.46	25.94	热休克蛋白
MD14G1126800	9	165.27	142.99	134.04	71.84	蛋氨酸 γ-裂解酶
MD13G1053000	9	72.36	55.70	63.74	29.77	过氧化物酶
MD16G1198100	9	51.33	41.92	37.53	17.44	富含亮氨酸的重复延伸蛋白
MD14G1226200	9	48.75	50.72	49.11	20.88	未知蛋白
MD02G1030600	9	46.49	34.61	43.30	16.18	未知蛋白
MD07G1201800	9	26.92	28.33	24.91	12.57	甘油-3-磷酸酰基转移酶
MD16G1102100	9	26.50	21.80	19.92	7.56	未知蛋白
MD03G1282300	9	24.99	21.67	19.58	11.17	晚期分泌途径蛋白
MD15G1037200	9	24.62	21.01	29.813	12.35	锌指蛋白
MD13G1169600	9	24.04	19.45	34.516	11.72	开花促进因子蛋白
MD15G1132000	10	361.38	890.39	1 317.70	1 406.22	3,5-二羟基联苯合酶
MD01G1089800	10	201.23	466.88	563.29	656.50	联苯-O-甲基转移酶
MD09G1077400	10	140.12	467.65	530.25	631.34	钠偶联中性氨基酸转运蛋白
MD11G1061100	10	113.47	300.75	323.11	382.55	过氧化物酶
MD11G1220400	10	93.18	227.37	334.97	376.41	细胞色素 P450
MD01G1090900	10	94.10	313.13	369.35	361.15	LHY 类似蛋白
MD02G1028700	10	106.45	252.44	385.08	352.39	铜蓝蛋白
MD15G1351700	10	69.42	355.48	326.46	296.54	WAT1 相关蛋白
MD12G1119200	10	99.86	254.57	283.56	215.92	水通道蛋白
MD06G1212900	10	79.90	198.99	170.57	190.96	富脯氨酸蛋白 HaeⅢ 亚族
MD11G1269300	11	2.64	1.28	0.00	0.88	kunitz-型弹性蛋白酶抑制剂
MD06G1083400	11	1.90	1.20	0.72	0.00	
MD13G1199700	11	1.58	0.74	0.23	0.28	热激转录因子

表 4 叶中基因簇中表达量高且表达变化显著(差异倍数≥2 或≤-2)的部分基因

基因编号	基因簇	FPKM				基因注释
		0 d	1 d	3 d	6 d	
MD08G1092000	4	312.55	150.66	112.30	70.73	MYB 转录因子
MD15G1155500	4	187.97	94.23	84.34	42.90	温度诱导脂质运载蛋白
MD15G1189900	4	91.57	42.37	28.98	16.04	未知蛋白
MD08G1127700	4	58.00	25.98	15.00	9.79	未知蛋白
MD05G1122600	4	51.42	25.71	13.75	11.67	水通道蛋白
MD04G1167700	4	48.55	23.21	10.56	9.64	WRKY 转录因子
MD05G1073200	4	36.49	15.90	11.06	5.75	CCG 结合蛋白
MD00G1140000	4	35.70	17.34	9.72	4.10	氨基酸通透酶
MD14G1246200	4	35.12	16.57	10.67	5.25	GEM 蛋白
MD09G1207400	4	21.04	9.18	6.47	2.86	水通道蛋白
MD17G1281900	7	5 713.45	2 079.16	2 703.94	1 472.28	叶绿素 a/b 结合蛋白(LHC II)
MD01G1144400	7	1 764.06	30.29	268.06	118.00	16.9 ku 热休克蛋白
MD01G1041900	7	1 544.42	657.30	536.35	550.57	锌指蛋白 ZAT10
MD09G1292900	7	1 531.42	362.84	744.93	401.79	叶绿素 a/b 结合蛋白(LHC II)
MD08G1086500	7	1 237.53	490.41	427.26	421.92	锌指蛋白 ZAT10
MD07G1222900	7	1 147.34	384.09	391.08	331.03	锌指 CCCH 结构域蛋白
MD15G1404800	7	1 087.64	460.74	353.93	408.04	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶
MD01G1154000	7	1 043.19	480.87	400.30	362.57	锌指 CCCH 结构域蛋白
MD13G1108500	7	921.07	18.46	157.48	72.99	小热休克蛋白
MD01G1073600	7	869.92	189.51	333.83	183.83	BAG 家族分子伴侣调节蛋白
MD10G1062300	8	995.54	2 639.17	3 526.86	4791.57	依赖辅酶 NADP 的 6-磷酸山梨醇脱氢酶
MD15G1407600	8	252.14	552.30	545.99	596.91	UDP-葡萄糖:根皮素 2'-O-葡萄糖基转移酶
MD13G1052600	8	77.38	303.96	306.76	442.68	S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶酶原
MD11G1221200	8	64.89	260.89	237.33	396.41	脂肪酸脱氢酶
MD02G1243100	8	125.93	318.13	255.72	358.04	苹果酸脱氢酶
MD17G1243400	8	146.73	353.19	298.17	339.90	COL 结构域类转录因子
MD03G1205300	8	44.62	149.95	110.45	238.98	脂肪酸脱氢酶
MD15G1049500	8	59.64	159.03	140.25	238.02	YlmG 蛋白
MD09G1146800	8	45.55	118.12	164.92	189.87	八氢番茄红素合酶
MD17G1066000	8	69.06	290.58	254.62	178.66	WAS/WASL 相互作用蛋白家族成员
MD04G1003300	10	143.79	12.89	320.91	970.78	查尔酮合成酶
MD16G1057400	10	124.05	273.84	315.59	547.56	S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶酶原
MD04G1003400	10	92.29	8.13	207.35	404.72	查尔酮合成酶
MD01G1167300	10	36.79	5.42	77.46	129.02	查尔酮-黄酮异构酶
MD13G1081900	10	17.25	5.56	59.79	90.14	五肽重复蛋白
MD10G1038100	10	12.09	28.42	32.80	50.94	未知蛋白
MD15G1216500	10	5.68	18.23	15.40	43.86	生长素结合蛋白
MD08G1049300	10	7.82	20.27	25.02	40.10	未知蛋白
MD07G1233400	10	7.82	1.46	18.38	36.40	查尔酮-黄酮异构酶
MD15G1407300	10	6.57	13.55	15.49	29.35	UDP 糖基转移酶

胁迫后的修复^[30]。热休克蛋白的表达受温度或盐度等环境条件的影响^[31]。NaHCO₃ 胁迫条件下,柞柳根中热休克蛋白编码基因的表达有的被上调,有

的被下调^[30]。在本研究中,5 个热休克蛋白编码基因(MD01G1126500、MD01G1144400、MD01G1208700、MD07G1196500、MD13G1108500)的表达被显著下

调。热休克响应由 2 个重要成员——热休克蛋白和热激转录因子组成。热激转录因子在热胁迫防御响应调节中起关键作用^[32],通过识别高度保守的热休克元件并与‘nGAAnnTCCn’基序特异结合调节热休克蛋白编码基因的表达,来控制植物对不同环境胁迫的反应^[33-34]。平邑甜茶一个热激转录因子编码基因(MD13G1199700)的表达被下调,表明热休克响应可能在平邑甜茶响应盐碱胁迫过程中也发挥重要作用。

转录因子在调节植物对盐碱物胁迫响应过程中发挥着重要作用^[35-37]。除热激转录因子,本研究还发现 MYB 转录因子(MD08G1092000)、WRKY 转录因子(MD04G1167700)、锌指 CCCH 结构域蛋白(MD01G1154000、MD07G1222900)、锌指蛋白 ZAT10(MD01G1041900、MD08G1086500)、锌指蛋白(MD15G1037200)的表达被显著下调;ORG2 转录因子(MD14G1086500)、COL 结构域类转录因子(MD17G1243400)的表达被显著上调。MYB 家族是植物体重要的转录因子家族之一^[38]。在干旱和盐胁迫下,向日葵 55 个 MYB 基因中有 9 个的表达被下调,4 个被上调^[39]。超表达 *AtMYB111* 的拟南芥耐盐性强于野生型,而 *AtMYB111* 缺失显著降低了拟南芥耐盐性^[40]。锌指蛋白是一个庞大的转录因子家族,它由 CCCH、C₂H₂、C₂HC、C₂HC₅、C₃HC₄、C₄、C₄HC₃、C₆和 C₈(C 和 H 分别代表半胱氨酸和组氨酸)9 大类组成^[41],在植物耐非生物胁迫方面具有重要作用^[42]。本研究中的 6 个锌指蛋白的编码基因(MD01G1154000 和 MD07G1222900 属于 CCCH 类,MD01G1041900、MD08G1086500、MD04G1167700 和 MD15G1037200 属于 C₂H₂ 类)的表达均被显著下调,可以推测这些转录因子与平邑甜茶抗盐碱调控密切相关。

细胞色素 P450 是一个酶蛋白大家族^[43]。它们参与细胞分裂素、生长素、赤霉素等植物内源激素的生物合成以及许多次生代谢^[44-45]。Khanom 等研究发现,人参中 *PgCYP736A12* 在 NaCl 处理后转录水平上调,该基因参与除草剂的代谢^[46]。本研究 1 个细胞色素 P450 编码基因 MD11G1220400 的表达受盐碱胁迫诱导而持续升高,表明细胞色素 P450 可能在平邑甜茶盐碱响应的机制中发挥重要作用。丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶和 TMK1 受体蛋白激酶等的表达也受盐碱胁迫的诱导,说明这几类蛋白激酶在平邑甜茶盐碱胁迫响应中也可能发挥一定作用。

研究中还发现一些未知蛋白可能与盐碱胁迫相关,如 MD14G1226200、MD02G1030600、MD15G1189900 和 MD08G1127700 等,它们的具体功能有待进一步验证。

参考文献:

- [1] 毛 恋,芦建国,江海燕. 植物响应盐碱胁迫的机制[J]. 分子植物育种,2020,18(10):3441-3448.
- [2] Wang W X, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance[J]. *Planta*, 2003, 218(1): 1-14.
- [3] 朱建峰,崔振荣,吴春红,等. 我国盐碱地绿化研究进展与展望[J]. 世界林业研究,2018,31(4):70-75.
- [4] 费小钰. 盐碱胁迫对转 *Lc-CDPK* 基因水稻生理生化特性的影响[D]. 长春:吉林农业大学,2017.
- [5] 关元秀,刘高焕,刘庆生,等. 黄河三角洲盐碱地遥感调查研究[J]. 遥感学报,2001,5(1):46-52,86.
- [6] 李子英,丛日春,杨庆山,等. 盐碱胁迫对柳树幼苗生长和渗透调节物质含量的影响[J]. 生态学报,2017,37(24):8511-8517.
- [7] 王俭珍,刘 倩,高娅妮,等. 植物对盐碱胁迫的响应机制研究进展[J]. 生态学报,2017,37(16):5565-5577.
- [8] 张 强,赵文娟,陈卫峰,等. 盐碱地修复与保育研究进展[J]. 天津农业科学,2018,24(4):65-70.
- [9] 何瑞成,吴景贵. 有机物料对原生盐碱地土壤生物学性质的影响[J]. 土壤学报,2018,55(3):774-782.
- [10] 孙明法,严国红,王爱民,等. 水稻耐盐育种研究进展[J]. 大麦与谷类科学,2017,34(4):1-9.
- [11] Musacchi S, Serra S. Apple fruit quality: overview on pre-harvest factors[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 234:409-430.
- [12] 2018 年中国苹果产量[DB/OL]. (2020-11-05)[2021-11-08]. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- [13] Sabatino L, Iapichino G, D'Anna F, et al. Hybrids and allied species as potential rootstocks for eggplant: effect of grafting on vigour, yield and overall fruit quality traits[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 228:81-90.
- [14] Wang Y X, Hu Y, Zhu Y F, et al. Transcriptional and physiological analyses of short-term iron deficiency response in apple seedlings provide insight into the regulation involved in photosynthesis[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1):461-472.
- [15] Jia X M, Wang H, Svetla S, et al. Comparative physiological responses and adaptive strategies of apple *Malus halliana* to salt, alkali and saline-alkali stress[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 245:154-162.
- [16] Liu D D, Dong Q L, Sun C, et al. Functional characterization of an apple apomixis-related MhFIE gene in reproduction development[J]. *Plant Science*, 2012, 185/186:105-111.
- [17] Daccord N, Celton J M, Linsmith G, et al. High-quality *de novo* assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development[J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(7):1099-1106.
- [18] Jung S, Lee T, Cheng C H, et al. 15 years of GDR: new data and

- functionality in the Genome Database for Rosaceae [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 47 (D1): D1137 – D1145.
- [19] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA – Seq data with or without a reference genome [J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323.
- [20] Kumar L, Futschik M E. Mfuzz: a software package for soft clustering of microarray data [J]. Bioinformatics, 2007, 2 (1): 5 – 7.
- [21] Wang L K, Feng Z X, Wang X, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA – seq data [J]. Bioinformatics, 2009, 26 (1): 136 – 138.
- [22] Das P, Majumder A L. Transcriptome analysis of grapevine under salinity and identification of key genes responsible for salt tolerance [J]. Functional & Integrative Genomics, 2019, 19 (1): 61 – 73.
- [23] Li H Y, Tang X Q, Zhu J F, et al. *De novo* transcriptome characterization, gene expression profiling and ionic responses of *Nitraria sibirica* Pall. under salt stress [J]. Forests, 2017, 8 (6): 211.
- [24] 董明, 再吐尼古丽·库尔班, 吕 芃, 等. 高粱苗期耐盐性转录组分析和基因挖掘 [J]. 中国农业科学, 2019, 52 (22): 3987 – 4001.
- [25] 刘 佳, 田 云, 邓家林. 胁迫下榆叶梅差异基因表达分析 [J]. 核农学报, 2020, 34 (7): 1397 – 1408.
- [26] 高光林, 姜卫兵, 俞开锦, 等. 盐胁迫对果树光合生理的影响 [J]. 果树学报, 2003, 20 (6): 493 – 497.
- [27] 章 妮, 暴 涵, 崔博亮, 等. 毛竹查尔酮合成酶基因家族全基因组分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20 (3): 817 – 825.
- [28] Yuan H, Wu J Q, Wang X Q, et al. Computational identification of amino – acid mutations that further improve the activity of a chalcone – flavonone isomerase from *Glycine max* [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 248.
- [29] Hu W H, Hu G C, Han B. Genome – wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice [J]. Plant Science, 2009, 176 (4): 583 – 590.
- [30] Wang C, Gao C Q, Wang L Q, et al. Comprehensive transcriptional profiling of NaHCO₃ – stressed *Tamarix hispida* roots reveals networks of responsive genes [J]. Plant Molecular Biology, 2014, 84 (1/2): 145 – 157.
- [31] Hwang E W, Kim K A, Park S C, et al. Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions [J]. Journal of Biosciences, 2005, 30 (5): 657 – 667.
- [32] Chandel G, Dubey M, Meena R. Differential expression of heat shock proteins and heat stress transcription factor genes in rice exposed to different levels of heat stress [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2013, 22 (3): 277 – 285.
- [33] Miller G, Mittler R. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? [J]. Annals of Botany, 2006, 98 (2): 279 – 288.
- [34] 张 楠, 王映红, 王志敏, 等. 植物热激转录因子家族的研究进展 [J]. 生物工程学报, 2021, 37 (4): 1155 – 1167.
- [35] 刘奕嫩, 于 洋, 方 军. 盐胁迫及植物耐盐碱分子机制研究 [J]. 土壤与作物, 2018, 7 (2): 201 – 211.
- [36] Guan L, Haider M S, Khan N, et al. Transcriptome sequence analysis elaborates a complex defensive mechanism of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in response to salt stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19 (12): 4019.
- [37] An J P, Yao J F, Xu R R, et al. An apple NAC transcription factor enhances salt stress tolerance by modulating the ethylene response [J]. Physiologia Plantarum, 2018, 164 (3): 279 – 289.
- [38] Wu B, Hu Y N, Huo P J, et al. Transcriptome analysis of hexaploid hulless oat in response to salinity stress [J]. PLoS One, 2017, 12 (2): e0171451.
- [39] Li J J, Liu H, Yang C, et al. Genome – wide identification of MYB genes and expression analysis under different biotic and abiotic stresses in *Helianthus annuus* L. [J]. Industrial Crops and Products, 2020, 143: 111924.
- [40] Li B Z, Fan R N, Guo S Y, et al. The *Arabidopsis* MYB transcription factor, MYB111 modulates salt responses by regulating flavonoid biosynthesis [J]. Environmental and Experimental Botany, 2019, 166: 103807.
- [41] Berg J M, Shi Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc [J]. Science, 1996, 271 (5252): 1081 – 1085.
- [42] 向建华, 李灵之, 陈信波. 植物非生物逆境相关锌指蛋白基因的研究进展 [J]. 核农学报, 2012, 26 (4): 666 – 672, 716.
- [43] Siminszky B, Corbin F T, Ward E R, et al. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96 (4): 1750 – 1755.
- [44] Li D M, Wang Y, Han K L. Recent density functional theory model calculations of drug metabolism by cytochrome P450 [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2012, 256 (11/12): 1137 – 1150.
- [45] Xu J, Wang X Y, Guo W Z. The cytochrome P450 superfamily: key players in plant development and defense [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14 (9): 1673 – 1686.
- [46] Khanom S, Jang J, Lee O R. Overexpression of ginseng cytochrome P450 CYP736A12 alters plant growth and confers phenylurea herbicide tolerance in *Arabidopsis* [J]. Journal of Ginseng Research, 2019, 43 (4): 645 – 653.