

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230142

# 无瓣海桑根响应盐胁迫的转录组分析

梁锐涛, 韩维栋, 杨少瑕, 陈蓓蓓\*

(广东海洋大学滨海农业学院, 广东 湛江, 524088)

**摘要:** [目的] 初步探究无瓣海桑的耐盐分子机制, 筛选出无瓣海桑抗盐候选基因, 为后续功能验证实验及林木抗盐性遗传育种奠定分子基础。[方法] 以 1 年生无瓣海桑幼苗为材料, 用  $500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 分别处理 0 d (对照组) 和 10 d (处理组), 取不同条件下的根部组织进行转录组测序, 并结合三代全长转录组数据进行后续生物信息学分析。[结果] (1) 与对照组相比, NaCl 处理 10 d 后, 无瓣海桑幼苗根系中共有 14401 个差异表达基因, 其中, 7153 个上调, 7248 个下调。(2) GO 分析发现, 共有 11068 个差异基因在 47 个 GO 条目得到注释。(3) 在 KEGG 富集分析中, 共有 6189 个差异基因富集到 134 条通路, 其中, 共有 14 条通路显著富集 ( $P$  值  $< 0.01$ ,  $Q$  值  $< 0.05$ )。 (4) 通过进一步对差异基因进行功能注释分析, 共筛选出抗盐候选基因 89 个, 其中, 抗氧化基因 24 个, 渗透调节物质基因 22 个, 植物激素基因 19 个, 蛋白激酶基因 10 个, 转录因子基因 14 个。[结论] 活性氧清除、渗透调节、植物激素、蛋白激酶及转录因子相关基因参与调控无瓣海桑盐逆境适应过程。

**关键词:** 无瓣海桑; 盐胁迫; 转录组; 差异表达基因

**中图分类号:** S728.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2023)01-0068-11

土壤盐渍化现象几乎遍布所有的气候区域以及地理环境, 是影响农业和林业生产的主要问题。土壤盐渍化使植物受到渗透胁迫、离子毒害、膜透性改变及生理代谢紊乱等危害<sup>[1]</sup>, 严重制约了植物的生长, 是在植物生产与栽培上一个非常严峻的问题。因此, 通过对植物抗盐的分子调控机制进行探析, 挖掘耐盐相关基因, 并应用于新种质创制和新品种选育, 对于缓解土壤盐渍化问题具有重要的现实意义。

长期生长在滨海区域潮间带的红树林, 由于其特殊的、有别于陆地和淡水植物的生长环境, 演化出了一套特殊的盐逆境适应机制。植物的耐盐机制涉及渗透物质积累、蛋白积累、抗氧化酶的诱导、植物激素的诱导和光合作用路径的变化 5 个方面<sup>[2]</sup>。对于红树植物, 不同的红树物种具体的耐盐机制有所不同。无瓣海桑 (*Sonneratia apetala* Buch.-

Ham.) 是海桑科海桑属红树乔木, 具有生长快、耐淹浸、耐贫瘠、耐寒强等特点, 是滨海滩涂的先锋造林树种, 在维持海岸带生态平衡方面起着重要作用<sup>[3]</sup>。先前有关其耐盐特性的研究主要集中在形态、生理生态层面, 如廖岩等<sup>[4]</sup>研究了不同盐度处理 3 个月下无瓣海桑根、茎、叶中的蛋白质、可溶性糖、丙二醛含量、抗氧化酶活性的变化情况, 并探讨了它们的相互关系, 为耐盐树种的选育提供了参考。然而, 目前鲜见关于无瓣海桑耐盐分子机制方面的研究报道。

转录组测序是转录组学研究的核心技术, 被广泛应用于新基因的挖掘等<sup>[5]</sup>。目前, 最新的测序技术已经发展到了第三代。三代测序技术具有单分子、超长读长、无需 PCR 扩增等优点, 已在基因组学、转录组学、表观遗传学等领域上得到了应用<sup>[6]</sup>。在转录组学上, 三代全长转录组测序 (Iso-

收稿日期: 2022-03-29 修回日期: 2022-05-31

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31901330); 湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目 (2020A01007); 广东海洋大学科研启动费资助项目 (R19047)

\* 通讯作者: 陈蓓蓓 (1988-), 女, 博士, 主要从事林木抗性遗传育种研究。E-mail: beibeichenk@outlook.com

Seq) 的应用, 可弥补二代测序技术读段较短、无法覆盖整个转录本的缺点, 从而做到从全长转录本水平上研究转录组<sup>[7]</sup>。但三代测序技术存在碱基错误率高、成本高等缺点, 目前应用并不广泛<sup>[8]</sup>。二代测序有通量高、成本低的特点, 且发展至今已取得了较好的工作基础, 因此, 二代和三代测序结合使用成为很多研究者的策略<sup>[9]</sup>。如梅瑜等<sup>[10]</sup>利用基于 SMRT 技术原理的 PacBio 平台三代测序技术, 对甘葛藤 (*Pueraria thomsonii* Benth) 进行全长转录组测序及分析, 从转录数据中鉴定了黄酮类生物合成基因、转录因子、R 基因和 SSR 标记, 为甘葛藤的选育和利用提供了基础。然而, 对于红树植物, 当前研究仅限于对白骨壤 (*Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.)<sup>[11]</sup>、秋茄 (*Kandelia candel* (Linn.) Druce / *Kandelia obovata*)<sup>[12]</sup>、角果木 (*Ceriops tagal* (perr.) C. B. Rob)<sup>[13]</sup>、竹节树 (*Carallia brachiata* (Lour.) Merr.)<sup>[14]</sup> 和老鼠簕 (*Acanthus ilicifolius* L.)<sup>[15]</sup> 等个别物种开展了转录组学相关研究。特别是, 至今对无瓣海桑仅开展了以三代全长转录组数据集为基础的盐胁迫应答转录因子挖掘工作<sup>[16]</sup>。因此, 本研究利用二代与三代结合的高通量测序技术, 对盐胁迫处理前后的无瓣海桑根系进行转录组测序分析, 从中鉴定并初步筛选出无瓣海桑根系响应盐胁迫的候选基因, 可为深入研究无瓣海桑的耐盐基因组学、分子生物学和进一步揭示红树植物的耐盐机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与处理

本实验原材料采自于广东省湛江市特呈岛红树林自然保护区 (21°09' ~ 21°10' N, 110°25' ~ 110°27' E)。2019 年 10 月采集无瓣海桑的种子, 播种于人工配制的营养土中。1 a 后, 选取长势一致的无瓣海桑幼苗, 分别设置对照组 (RCK) 和处理组 (RT)。处理组用 500 mmol·L<sup>-1</sup> 的 NaCl 溶液每 3 d 进行 1 次盐胁迫处理, 对照组使用等量清水。对照组 (RCK\_a、RCK\_b、RCK\_c) 和处理组 (RT\_a、RT\_b、RT\_c) 均进行了 3 次生物学重复。10 d 后分别取对照组和处理组根部组织液氮速冻, 于 -80 °C 冰箱保存。

### 1.2 方法

1.2.1 测序文库构建及测序 提取 6 个样本的 RNA, 质检合格后构建三代全长转录组测序文库

和二代 RNA-seq 测序文库, 并进行测序及分析。二代测序文库构建方法如下: (1) 用 mRNA 富集法或 rRNA 去除法对 total RNA 进行处理; (2) 用打断 buffer 把获得的 RNA 片段化, 随机的 N6 引物进行反转录, 合成 cDNA 二链形成双链 DNA, 再将其末端补平并 5' 端磷酸化; (3) 连接一个 3' 端有凸出“T”的鼓泡状的接头; (4) 通过特异的引物进行 PCR 扩增得到 PCR 产物, 将其热变性成单链, 再用一段桥式引物将单链 DNA 环化得到单链环状 DNA 文库; (5) 利用 BGISEQ-500 平台测序。

PacBio 测序文库构建方法如下: 取 6 个样本的 RNA, 等量混合, 使用 SMARTer™ PCR cDNA Synthesis 试剂盒将混合的 RNA 样品反转录合成第一链 cDNA, 经 PCR 扩增合成第二链 cDNA, 然后对双链 DNA 经过 2 次 PCR 扩增后的片段进行损伤修复、末端修复, 并连接 SMRT 适配体后构建全长转录组测序文库, 利用 PacBio 平台进行测序。

文库构建及测序工作由华大基因公司完成。

1.2.2 测序数据组装和基因定量 为保证数据质量, 需对测序得到的原始数据进行过滤、参考基因比对等前期处理。本研究使用华大自主研发的过滤软件 SOAPnuke<sup>[17]</sup> 对 6 个样本进行过滤, 去除包含接头污染、未知碱基 N 含量大于 10%、低质量的 reads。使用 Bowtie2<sup>[18]</sup> 将 clean reads 比对到三代全长转录组数据库; 利用 RSEM 计算各个样品的基因表达水平<sup>[19]</sup>。样本间的相关性分析通过皮尔逊相关系数 (Pearson correlation coefficient) 进行。

1.2.3 差异基因的选择与功能注释分析 本研究基于负二项分布原理的 Deseq2 模型分析方法<sup>[20]</sup>, 对 2 组样本进行差异检测分析, 并以差异倍数 (fold change, FC)  $\geq 2$  或  $\leq 0.5$ ,  $P$ -value  $< 0.01$ ,  $Q$ -value  $< 0.05$  作为筛选差异基因的标准, 并将该筛选得到的差异基因用于后续的 GO 和 KEGG Pathway 富集分析, 前者通过 agriGO 网站 (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>) 进行, 后者借助基因数据库网站 (<https://www.kegg.jp/>)<sup>[21]</sup> 完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序质量分析

通过 SOAPnuke 软件对原始数据进行过滤

后,如表1所示,有效读序百分率均在98%以上, Q20(碱基量 $\geq 20\%$ )均大于96%且 Q30(碱基量 $\geq 30\%$ )均 $> 91\%$ , 比对率均在87%以上。6个样品转录本 reads 覆盖度的峰值在

90~100; 空白对照 RCK 组和盐处理 RT 组的三次生物学重复间的相关系数极高( $> 0.98$ , 图1)。以上数据均说明6个样品的测序质量较高, 测序数据可靠, 可用于后续的差异表达分析。

表1 高通量转录组测序数据统计表

Table 1 Statistical of high-throughput transcriptome sequencing data

样本编号 Sample ID	总原始读数 Total Raw Reads /M	总有效读数 Total Clean Reads /M	比对率 Mapping ratio/%	Q20/%	Q30/%	有效读序百分率 Clean Reads Ratio/%
RCK_a	43.82	43.07	87.49	96.89	91.97	98.28
RCK_b	43.82	43.26	87.89	96.92	92.03	98.71
RCK_c	43.82	43.23	87.94	96.89	91.97	98.66
RT_a	43.82	43.35	88.08	97.53	93.21	98.93
RT_b	43.82	43.23	87.62	97.78	93.88	98.65
RT_c	43.82	43.25	87.62	97.77	93.85	98.71

注: RCK, 空白对照组, RT, 盐胁迫处理10 d的处理组, a、b、c表示3个生物学重复; Q20、Q30分别表示质量值 $\geq 20$ 、30的碱基数占总碱基数的比例。

Notes: RCK represents blank control group, RT represents samples treated with salt for 10 days, and a, b, c represent the three biological repetitions; Q20, Q30, the proportion of bases with value  $\geq 20, 30$ .

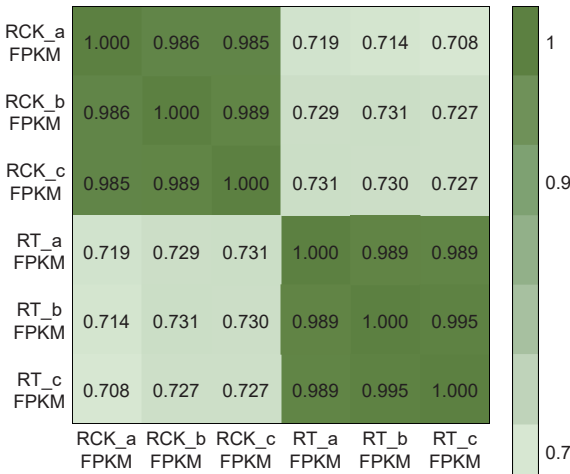
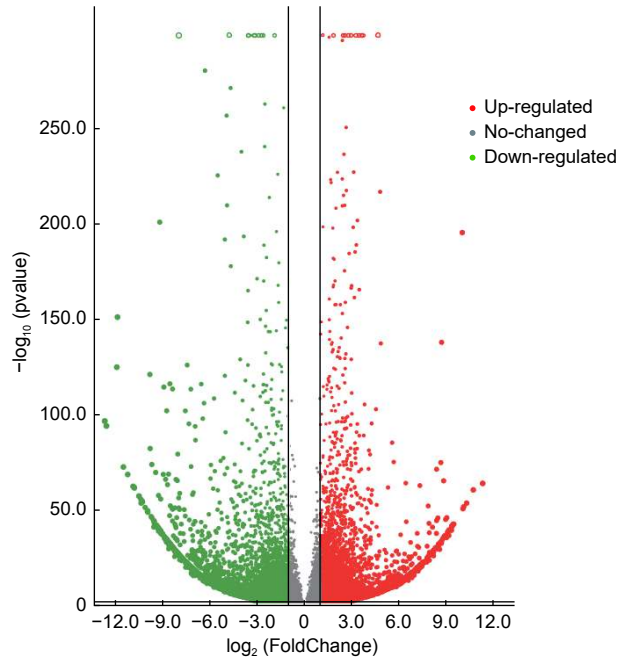


图1 6个样本表达量相关性热图

Fig. 1 Correlation heat map of six samples based on gene expression levels

## 2.2 样本差异基因表达情况

无瓣海桑根系在 $500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NaCl胁迫10 d后,共检测到20 289个基因表达量发生了改变(图2)。2组样本间共有14 401个基因差异表达,其中,7 153个差异基因上调表达, $\log_2\text{FC}$ 最大值为11.32(isoform\_13 051);7 248个差异基因下调表达, $\log_2\text{FC}$ 最低值为-12.69(isoform\_11 580)。结果表明,下调表达的差异基因数量多于上调的数量。



注: 红色点代表上调表达基因, 绿色点代表下调表达基因, 灰色点代表非显著差异表达基因

Notes: Red dots represent up-regulated genes, green dots represent down-regulated genes, and gray dots represent non-significant genes

图2 组间差异基因火山图

Fig. 2 Volcanic map of differential expression genes among different groups

## 2.3 差异基因的GO分类和显著性富集分析

将差异基因比对到 Gene Ontology (GO) 数据

库, 共有 11 068 个差异基因注释到 47 条 GO 条目, 注释率为 76.9%, 涉及 3 大主要功能分类: 生物过程、细胞组分和分子功能, 占比分别为 25.02%, 43.76%, 31.21%, 由此可知, 大多数差异基因的功能与细胞组分具有较大的相关性。根据 GO 功能注释分类结果 (图 3), 这些差异基因

在参与生物过程中, 主要集中在细胞过程和代谢过程; 在细胞组分中, 主要集中在细胞、膜、膜部分; 在分子功能中, 主要集中在连接、催化活性。表明在高盐胁迫下, 上述的亚类中涉及到的基因可能在无瓣海桑根系中响应强烈。

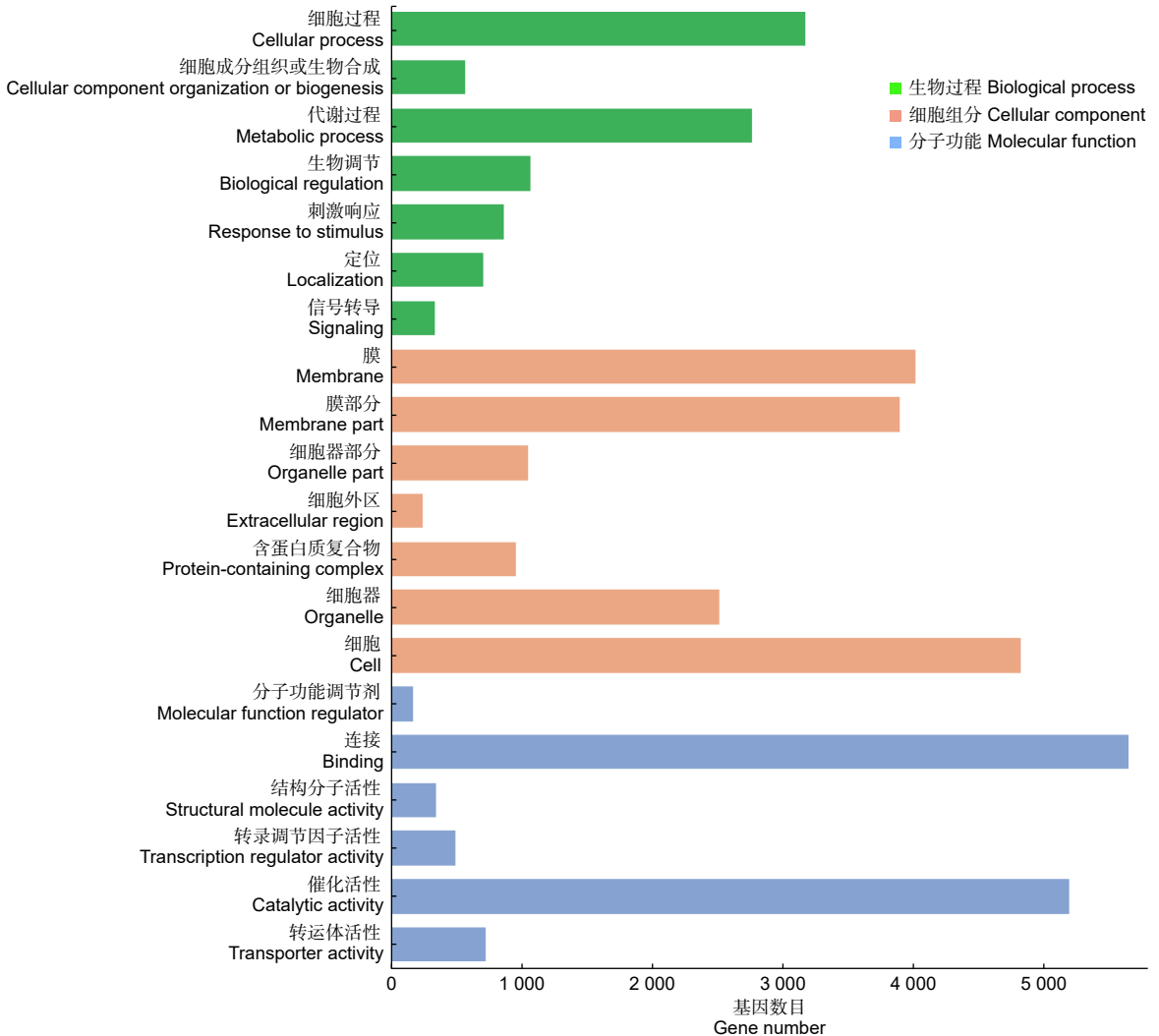


图 3 差异基因富集数目最多的 20 个 GO 条目

Fig. 3 the 20 most abundant GO terms for differentially expressed genes

## 2.4 差异基因的 KEGG 富集分析

在 KEGG 分析结果中, 共有 6 189 个差异基因富集到 134 条通路, 以  $Q\text{-value} < 0.05$  作为显著富集标准, 共有 14 条显著富集的通路 (图 4), 其中, 富集差异基因数量最多的是植物激素信号转导 (ko04075), 涉及 512 个基因, 最显著富集的植物-病原体相互作用 (ko04626) 涉及 367 个基因。富集分析结果表明, 无瓣海桑根系基因主要通

过 14 条显著通路参与盐胁迫的响应, 并且其中涉及的基因可能对无瓣海桑根系耐盐性的调控发挥作用, 关注这些显著通路, 有助于对无瓣海桑根系耐盐候选基因的筛选。

## 2.5 响应盐胁迫的差异表达基因功能分析

通过进一步对差异基因进行功能注释分析, 本研究共筛选出 89 个无瓣海桑根系抗盐候选功能基因, 涉及 12 条 KEGG 通路 (表 2, 图 5)。

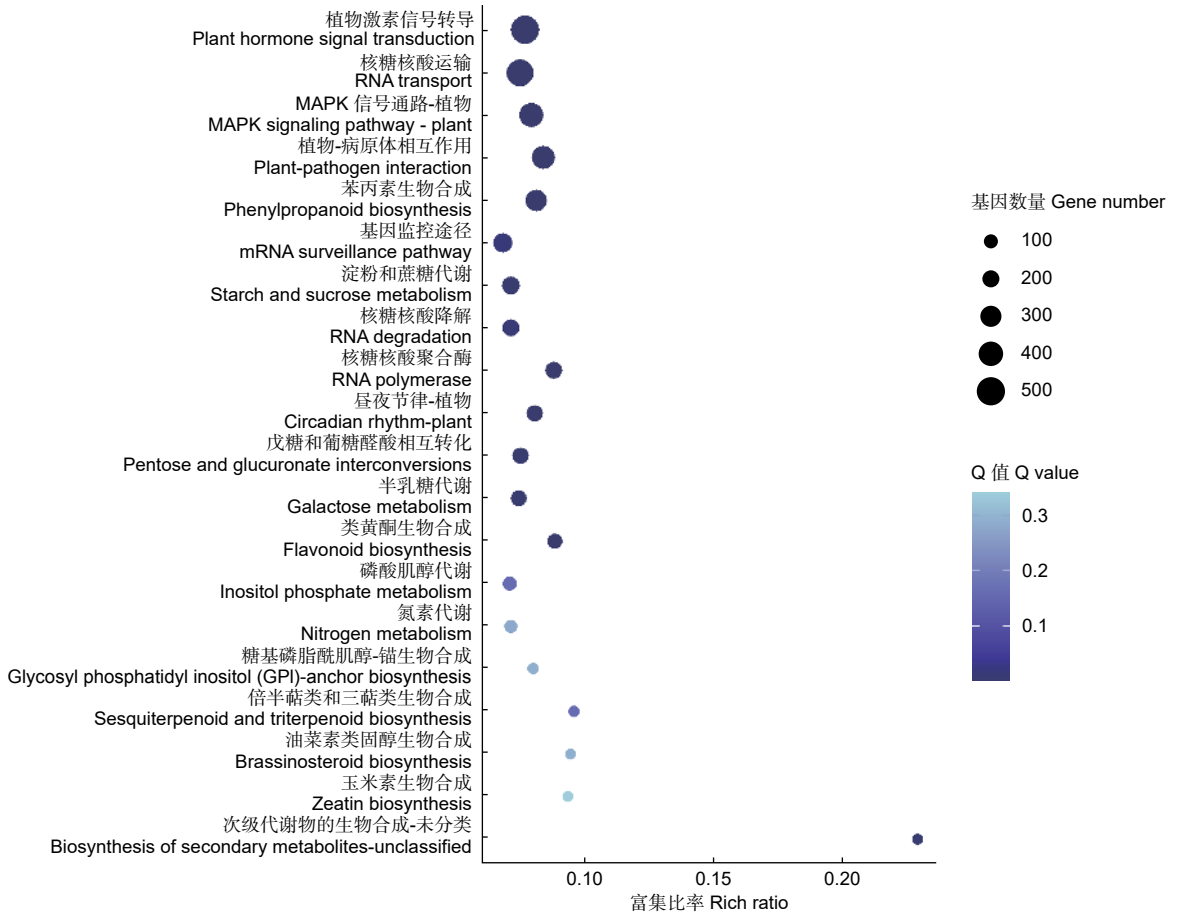


图 4 差异基因最显著富集的 20 个 KEGG 通路

Fig. 4 the first 20 significant enriched KEGG pathways for differentially expressed genes

**2.5.1 抗氧化基因的差异表达** 正常情况下,植物体内存在着活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生和清除的动态平衡,但外界的不良环境会打破这个平衡,导致 ROS 的积累,产生毒害<sup>[22]</sup>。植物体内存在 2 种 ROS 清除机制——酶促清除和非酶促清除,前者主要涉及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等,后者主要涉及抗坏血酸、类黄酮物质等<sup>[23]</sup>。本研究发现 6 类共 24 个活性氧清除基因(图 6),其中,上调表达基因数量最多的是过氧化物酶基因,总数为 7,表达量差异变化最大的为铜锌家族超氧化物歧化酶基因,差异倍数达到 6.46。这些上调表达的基因有利于无瓣海桑在盐胁迫前期,合成多种抗氧化酶类物质,提高体内抗氧化和 ROS 清除的能力,增强耐受性。

**2.5.2 渗透调节物质基因的差异表达** 植物在对盐胁迫的适应过程中,细胞会积累一定量的可溶性有机物质,作为渗透调节物质参与渗透调节,以适

应外界的低水势<sup>[2]</sup>。在本研究中,发现 10 种共 22 个编码生成有机渗透调节物质的基因(图 6),涉及水苏糖、棉子糖、蔗糖、海藻糖、脯氨酸、甜菜碱、热激蛋白等渗透调节物质。在这些基因中,部分基因存在上调表达,表明在盐胁迫下,无瓣海桑可通过合成一些渗透调节物质,以调节盐渍环境下植物细胞内的渗透势。

**2.5.3 植物激素基因的差异表达** 植物体内的多种激素在其生长发育、代谢等生理过程中发挥着重要的调控作用<sup>[24]</sup>。本研究发现 7 种共 19 个涉及 2 种植物激素(IAA 与 ABA)的基因(图 6),其中,IAA 途径相关的有生长素应答因子(auxin response factor, ARF)、生长素应答 GH3 家族基因(auxin responsive GH3 gene family, GH3)、SAUR 家族蛋白(SAUR family protein, SAUR)和生长素响应蛋白(auxin-responsive protein IAA, IAA)共 11 个基因;涉及 ABA 途径的有脱落酸应答元件结合因子(ABA responsive element binding

表 2 无瓣海桑根系部分抗盐候选功能基因

Table 2 List of partial salt-resistance candidate genes in root of *S. apetala*

	基因ID	log <sub>2</sub> FC	KEGG功能注释	参与通路
活性氧清除	isoform_61079	6.46	超氧化物歧化酶, 铜锌家族 superoxide dismutase, Cu-Zn family	过氧化物酶体 Peroxisome
	isoform_173361	1.47	超氧化物歧化酶, 铁锰家族 superoxide dismutase, Fe-Mn family	
	isoform_287367	6.10	过氧化物酶	苯丙素生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis
	isoform_57012	-4.69	peroxidase	
	isoform_25838	3.16	过氧化氢酶 catalase	MAPK信号通路-植物 MAPK signaling pathway-plant
	isoform_58072	-1.83	谷胱甘肽过氧化物酶 Glutathione peroxidase	谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism
isoform_67198	5.39	黄酮醇合成酶 flavonol synthase	类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthesis	
渗透调节	isoform_17235	7.54	海藻糖-6-磷酸磷酸酶 trehalose 6-phosphate phosphatase	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism
	isoform_134633	-4.24	海藻糖-6-磷酸合成酶/磷酸酶 trehalose 6-phosphate synthase/phosphatase	
	isoform_9570	3.75	水苏糖合成酶 stachyose synthetase	谷胱甘肽代谢 Galactose metabolism
	isoform_49176	7.98	棉子糖合成酶 raffinose synthase	
	isoform_16906	5.82	δ-1-吡咯啉-5-羧酸合成酶	氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids
	isoform_31419	-1.20	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	
	isoform_272673	5.53	甜菜碱醛脱氢酶 betaine-aldehyde dehydrogenase	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism
	isoform_228012	2.21	脯氨酸脱氢酶	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism
isoform_8893	-2.72	proline dehydrogenase		
植物激素	isoform_6363	8.35	生长素应答因子 auxin response factor	植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction
	isoform_119200	6.23	生长素应答GH3基因家族 auxin responsive GH3 gene family	
	isoform_126871	3.48	生长素响应蛋白 auxin-responsive protein IAA	
	isoform_278367	4.36	SAUR家族蛋白	
	isoform_50365	-7.94	SAUR family protein	
	isoform_48396	6.73	脱落酸受体PYR/PYL家族	
	isoform_49285	-6.23	abscisic acid receptor PYR/PYL family	
	isoform_221018	-2.92	蛋白磷酸酶2C protein phosphatase 2C	
isoform_267229	4.96	脱落酸应答元件结合因子		
isoform_43536	-2.46	ABA responsive element binding factor		
蛋白激酶	isoform_216952	4.44	促分裂原活化蛋白激酶激酶1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase1	MAPK信号通路-植物 MAPK signaling pathway-plant
	isoform_182097	4.28	促分裂原活化蛋白激酶4 mitogen-activated protein kinase4	
	isoform_140969	1.38	促分裂原活化蛋白激酶6 mitogen-activated protein kinase 6	
	isoform_161961	-7.52	钙依赖性蛋白激酶 calcium-dependent protein kinase	植物-病原体相互作用 Plant-pathogen interaction

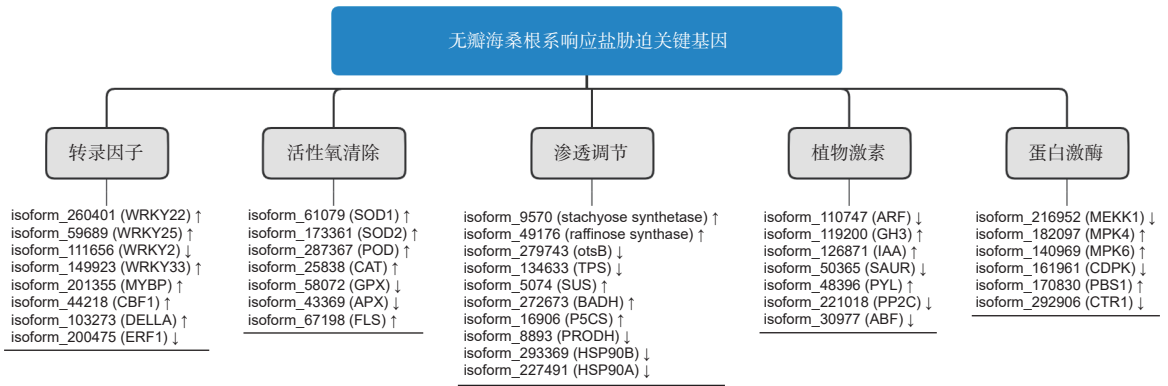


图 5 无瓣海桑根系响应盐胁迫关键基因

Fig. 5 Key genes in response to salt stress in root of *S. apetala*

factor, *ABF*)、脱落酸受体 *PYR/PYL* 家族 (abscisic acid receptor *PYR/PYL* family, *PYL*) 和蛋白磷酸酶 2C (protein phosphatase 2C, *PP2C*) 共 8 个基因。*IAA* 相关基因除 *GH3* 基因均上调表达外, 其他同时存在上下调表达, 而 *ABA* 相关基因大部分下调表达。上述结果表明, 植物激素能够在无瓣海桑的信号转导途径中发挥作用, 不同激素共同调控盐胁迫响应过程。

**2.5.4 植物蛋白激酶基因的差异表达** 蛋白激酶可调控植物的生长, 在逆境中起到调控感受胁迫信号、启动各种非生物逆境响应的的作用<sup>[25]</sup>。本研究发现 6 种共 10 个蛋白激酶相关基因 (图 6), 其中, 2 种促分裂原活化蛋白激酶基因 (mitogen-activated protein kinases, *MAPK*) *MPK4*、*MPK6* 和 2 种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因 *PBS1*、*CTR1* 均上调表达, 1 种促分裂原活化蛋白激酶基因 (mitogen activated protein kinase, *MEK*) *MEKK1* 和 1 种钙依赖性蛋白激酶基因 (calcium-dependent protein kinase, *CDPK*) 中均有 2 个上调表达, 1 个下调表达。可见这些蛋白激酶在无瓣海桑根系响应高盐胁迫时, 发挥着尤为重要的调控作用。

## 2.6 响应盐胁迫的转录因子分析

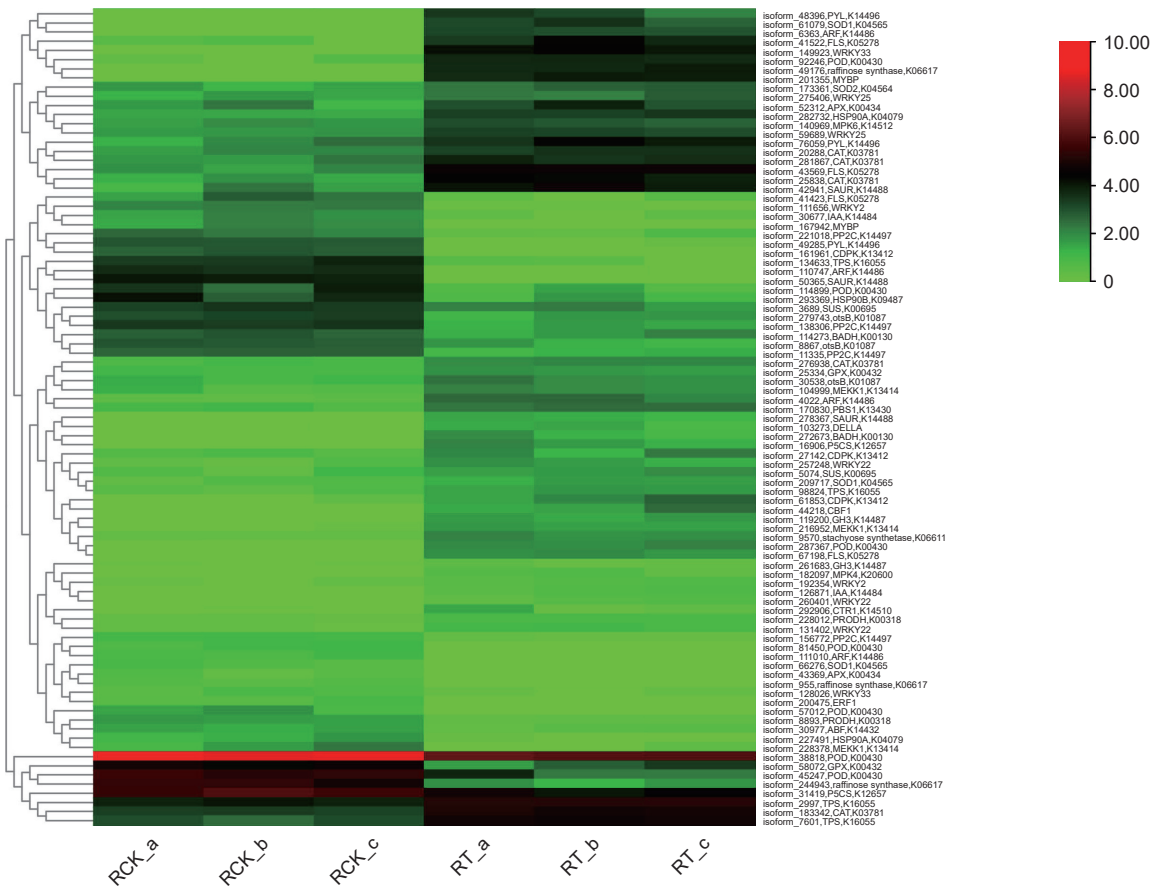
转录因子是一类功能蛋白质, 具有调控基因表达的作用。当植物受到逆境胁迫时, 转录因子通过与相应的顺式作用元件相互作用, 调控并减轻逆境胁迫带来的伤害, 以适应各种逆境<sup>[26]</sup>。本研究发现 8 种共 14 个差异表达的转录因子 (图 6), 涉及 5 个家族, 分别为 *WRKY* 家族、*MYB* 家族、*GRAS* 家族、*bHLH* 家族和 *EREBP* 家族, 其中, *WRKY* 家族发现的成员数量最多, 暗示 *WRKY* 家

族在无瓣海桑响应盐胁迫中起着重要的调控作用。

## 3 讨论

植物对盐胁迫的响应是一个多基因参与的复杂过程, 从微观上的基因响应到宏观上生理的变化, 经历了一系列的信号传递与调节过程, 最终适应盐逆境<sup>[27]</sup>。通过转录组测序技术对植物盐胁迫下的转录调控机制进行研究分析, 能够快速准确地初步筛选出其中的耐盐相关基因, 为进一步利用分子生物学手段深入探究其耐盐机制奠定数据基础。然而, 对于红树植物, 当前研究对无瓣海桑仅限于利用转录组学技术开展了盐胁迫相关转录因子的挖掘<sup>[16]</sup>, 而对转录因子以外的其他可能参与调控盐逆境适应过程的基因并未关注。本研究联合二代和三代转录组测序技术, 获得了无瓣海桑对照组及 500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐胁迫处理 10 d 后的根系转录组数据, 在此基础上进行生物信息学分析, 最终筛选出 89 个无瓣海桑根抗盐候选基因, 其中一些基因对盐胁迫的响应起着十分重要的作用。

在植物的 ROS 酶促清除机制中, *SOD*、过氧化物酶 (*POD*)、*CAT* 是常见的酶。研究表明, *NaCl* 胁迫后耐盐性强的 *A34* 株系葡萄根系中的 *SOD*、*CAT*、*POD* 活性表现出快速升高并在较高水平后小幅度降低的趋势, 这有利于维持活性氧代谢的平衡, 缓解细胞膜脂过氧化<sup>[28]</sup>。鲁琳等<sup>[29]</sup>通过高通量测序技术对盐胁迫下花烟草 (*Nicotiana glauca* Link et Otto) 的活性氧清除基因进行挖掘, 发现编码 *SOD*、*POD*、*CAT* 的基因均发生了显著的上调表达, 同时存在下调表达的基因。本研究也发现了类似的结果, 在 *SOD* 中, *SOD1* 2 个上调, 1 个下调, *SOD2* 1 个上调表达; *CAT* 5 个基



注: 基因的表达量用  $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$  值表示; 色块的颜色越红代表基因表达量越高, 颜色越绿, 表达量越低; 右侧为抗盐候选基因, 底部为盐处理 0 d 和 10 d 6 个样本。SOD1: 超氧化物歧化酶, 铜锌家族超氧化物歧化酶, 铜锌家族; SOD2: 超氧化物歧化酶, 铁锰家族; POD: 过氧化物酶; CAT: 过氧化氢酶; GPX: 谷胱甘肽过氧化物酶; APX: L-抗坏血酸过氧化物酶; FLS: 黄酮醇合成酶; stachyose synthetase: 水苏糖合成酶; otsB: 海藻糖-6-磷酸磷酸酶; TPS: 海藻糖-6-磷酸合成酶/磷酸酶; SUS: 蔗糖合酶; raffinose synthase: 棉子糖合成酶; BADH: 甜菜碱醛脱氢酶; P5CS:  $\delta$ -1-吡咯啉-5-羧酸合成酶; PRODH: 脯氨酸脱氢酶; HSP90B: 热休克蛋白 90kDa; HSP90A: 分子伴侣 HtpG; ARF: 生长素应答因子; GH3: 生长素应答 GH3 基因家族; SAUR: SAUR 家族蛋白; IAA: 生长素响应蛋白; ABF: 脱落酸应答元件结合因子; PYL: 脱落酸受体 PYR/PYL 家族; PP2C: 蛋白磷酸酶 2C; MEKK1: 促分裂原活化蛋白激酶 1; MPK4: 促分裂原活化蛋白激酶 4; MPK6: 促分裂原活化蛋白激酶 6; CDPK: 钙依赖性蛋白激酶; PBS1: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PBS1; CTR1: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 CTR1; CBF1: 转录调节因子 CBF1; ERF1: 乙烯响应转录因子 1

Notes:  $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$  was indicated on a color scale from magenta (high) to green (low); Gene names are on the right side of the figure, and the six samples under 0-and 10-d of salt stress were at the bottom. SOD1, superoxide dismutase 1; SOD2, superoxide dismutase 2; POD, peroxidase; CAT, catalase; GPX, glutathione peroxidase; APX, L-ascorbate peroxidase; FLS, flavonol synthase; otsB, trehalose 6-phosphate phosphatase; TPS, trehalose 6-phosphate synthase/phosphatase; SUS, sucrose synthase; BADH, betaine-aldehyde dehydrogenase; P5CS,  $\delta$ -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase; PRODH, proline dehydrogenase; HSP90B, heat shock protein 90kDa beta; HSP90A, molecular chaperone HtpG; ARF, auxin response factor; GH3, auxin responsive GH3 gene family; SAUR, SAUR family protein; IAA, auxin-responsive protein IAA; ABF, ABA responsive element binding factor; PYL, abscisic acid receptor PYR/PYL family; PP2C, protein phosphatase 2C; MEKK1, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1; MPK4, mitogen-activated protein kinase 4; MPK6, mitogen-activated protein kinase 6; CDPK, calcium-dependent protein kinase; PBS1, serine/threonine-protein kinase PBS1; CTR1, serine/threonine-protein kinase CTR1; CBF1, transcriptional regulator CBF1; ERF1, ethylene-responsive transcription factor 1

图 6 89 个无瓣海桑根系抗盐候选基因表达量聚类热图

Fig. 6 Cluster heat map of the 89 salt-resistance candidate genes in roots of *S. apetala*

因全部上调表达; 在 *POD* 中, 存在较多下调表达的基因。上述结果推测可能是由于植物体内的抗氧化机制存在着正负 2 种调控方式, 且不同抗氧化酶在不同植物中的调控方式可能有所不同; 对于无瓣

海桑来说, *CAT* 可能是以正向调控为主导, 而 *POD* 可能主要是以负向调控为主。

在逆境下, 植物可通过调节海藻糖的含量, 稳定蛋白质的结构与功能, 提高在逆境中的生存能



力<sup>[30]</sup>。李辉等<sup>[31]</sup>克隆了海藻糖合成关键酶基因海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因 (trehalose-6-phosphate phosphatase, *TPP*), 并研究其在非生物胁迫下的作用, 结果表明该基因表达显著上调。研究表明, 高盐胁迫主要促进了龙须菜 (*Asparagus schoberioides* Kunth) 海藻糖-6-磷酸合成酶/磷酸酶 1 基因 (trehalose 6-phosphate synthase/phosphatase 1, *TPS1*)、海藻糖-6-磷酸合成酶/磷酸酶 2 基因 (trehalose 6-phosphate synthase/phosphatase 2, *TPS2*) 和海藻糖-6-磷酸合成酶/磷酸酶 4 基因 (trehalose 6-phosphate synthase/phosphatase 4, *TPS4*) 的表达, 而渗透胁迫抑制了 *TPS1*、*TPS2* 和海藻糖-6-磷酸合成酶/磷酸酶 3 基因 (trehalose 6-phosphate synthase/phosphatase 3, *TPS3*) 的表达<sup>[32]</sup>。本研究发现 2 种共 7 个合成海藻糖的关键基因: 海藻糖-6-磷酸磷酸酶基因 (*otsB*) 和海藻糖-6-磷酸合成酶基因 (*TPS*)。在这些基因中, 3 个表现出下调表达, 可能是由于盐胁迫产生的渗透胁迫抑制了这些基因的表达。

脯氨酸是植物中常见的有机渗透调节物质, 而脯氨酸的积累是植物应对盐胁迫的普遍反应。在大多数植物物种中,  $\delta$ -1-吡咯啉-5-羧酸合成酶 (*P5CS*) 催化谷氨酸生物合成脯氨酸的第一步<sup>[33]</sup>。在 Funck 等<sup>[34]</sup>的研究中, 发现在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) NaCl 处理的 *p5cs2* 突变体中, 几乎没有  $\text{Na}^+$  的积累, 植株既没有褪绿, 也没有光合作用减弱, 可见 *P5CS2* 介导的脯氨酸合成在调节叶片  $\text{Na}^+$  积累和抗盐胁迫方面具有重要调控功能。本研究中发现 2 个 *P5CS* 基因, 1 个上调, 1 个下调, 表明 *P5CS* 基因在渗透调节中发挥了作用。

脱落酸在盐、干旱、低温等非生物胁迫下会在植物体内被诱导产生, 同时启动相关的信号途径, 以响应非生物胁迫<sup>[35]</sup>。ABA 信号途径由 ABA 受体、PP2C、SnRK2 和 ABF 转录因子四部分组成<sup>[36]</sup>。研究表明, 盐处理抑制了拟南芥中 *PP2C31* 基因的表达, 且在不同时期盐处理下 *PP2C31* 基因出现了不同程度的下调表达, 说明 *PP2C31* 蛋白在拟南芥响应盐胁迫中起负调控作用<sup>[37]</sup>。本研究发现 4 个 *PP2C* 基因均下调表达, 推测 *PP2C* 蛋白负调控无瓣海桑的盐胁迫响应。

丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径在盐、高温、病原菌等逆境的应答中起着重要作用, 它通过 MAPKKK $\rightarrow$ MAPKK $\rightarrow$ MAPK 逐级传递放大胁迫信号, 由下游的 MAPK 激活调控相应基因的表达, 引起植物对逆境的应答<sup>[38]</sup>。在野生大麦 (*Hordeum spontaneum* L.) 中, MEKK1-MKK2-MPK4/6<sup>[39]</sup> 联级系统参与了盐胁迫的响应。拟南芥的 MAPK 联级系统中多个 MAPK 基因在多种非生物胁迫的响应中起着重要作用<sup>[40]</sup>。汪芳珍等<sup>[41]</sup>通过对沙芥根进行 6 h 50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的盐处理实验, 结果表明, 共有 11 个 MAPK/MAPKK/MAPKKK 蛋白激酶基因的表达显著上调。本研究中发现 *MEKK1*、*MPK4*、*MPK6* 基因大都上调表达, 推测这些基因在无瓣海桑的 MAPK 联级途径响应盐胁迫中起着重要的作用, 但无瓣海桑具体响应盐胁迫的 MAPK 联级系统中的基因及机制, 还有待进一步研究。

植物体转录因子在盐胁迫调控下游机制中发挥着重要作用。参与植物盐胁迫响应的转录因子家族有 WRKY、MYB、bHLH、NAC 等<sup>[42]</sup>。在盐胁迫的响应中, WRKY 家族转录因子存在着正负 2 种调控机制。在拟南芥中, RtWRKY23 可提高自身过氧化物酶水平, 以增强盐胁迫耐受性<sup>[43]</sup>。转基因烟草中过表达的 *CaWRKY27* 抑制了抗氧化酶合成途径相关基因的表达, 在响应盐胁迫中起负调控作用<sup>[44]</sup>。本研究发现 *WRKY22*、*WRKY25* 均呈上调表达, 说明这些转录因子可能正向调控无瓣海桑的耐盐性。此外, *WRKY2*、*WRKY33* 呈现上下调表达, 这表明了 WRKY 家族转录因子参与无瓣海桑耐盐机制方式的复杂性。

## 4 结论

本研究通过二代 RNA-seq 和三代全长转录组测序技术的联合使用对无瓣海桑响应盐逆境的转录调控机制进行了解析, 获得了盐逆境下无瓣海桑根系的差异表达基因及功能注释信息, 并鉴定出一批与活性氧清除、渗透调节、植物激素、蛋白激酶、转录因子等相关的潜在耐盐候选基因, 研究结果对揭示红树植物的抗盐机制、耐盐型红树新型品种选育及沿海生态环境保护具有重要意义。

## 参考文献:

[1] 胡涛, 张鸽香, 郑福超, 等. 植物盐胁迫响应的研究进展[J]. 分

- 子植物育种, 2018, 16 (9): 3006-3015.
- [2] 牛 恋. 植物耐盐生理机制及抗盐性[J]. 河北农机, 2018 (2): 56.
- [3] 欧阳少明. 无瓣海桑的造林技术和管理措施[J]. 农业科技与信息, 2016 (15): 139-139.
- [4] 廖 岩, 赵 肖, 陈桂珠. 盐胁迫对无瓣海桑幼苗根茎叶膜保护系统的影响[J]. 海洋环境科学, 2009, 28 (2): 154-158.
- [5] 高慧娟, 吕昕培, 王润娟, 等. 转录组测序在林草植物抗逆性研究中的应用[J]. 草业学报, 2019, 28 (12): 184-196.
- [6] 赵陆滢, 曹绍玉, 龙云树, 等. 全长转录组测序在植物中的应用研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20 (6): 1390-1398.
- [7] 李玉梅, 李书娴, 李向上, 等. 第三代测序技术在转录组学研究中的应用[J]. 生命科学仪器, 2018, 16 (C1): 114-121, 113.
- [8] 周卫星, 石海鹤. 高通量测序中序列拼接算法的研究进展[J]. 计算机科学, 2019, 46 (5): 36-43.
- [9] 马东娜, 张兴坦, 魏柳锋, 等. 基因组二代测序数据与三代测序数据的混合校正和组装[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37 (4): 1547-1555.
- [10] 梅 瑜, 李向荣, 蔡时可, 等. 药食同源植物甘葛藤的全长转录组分析[J]. 华北农学报, 2021, 36 (5): 10-17.
- [11] 郝赛琦. 红树植物白骨壤根系结构与转录组特征研究[D]. 厦门大学, 2017: 11-57.
- [12] SU W, YE C, ZHANG Y, *et al.* Identification of putative key genes for coastal environments and cold adaptation in mangrove *Kandelia obovata* through transcriptome analysis[J]. Science of the Total Environment, 2019, 681: 191-201.
- [13] YANG Y, YANG S, LI J, *et al.* De novo assembly of the transcriptomes of two yellow mangroves, *Ceriops tagal* and *C. zippeliana*, and one of their terrestrial relatives, *Pellacalyx yunnanensis*[J]. Marine Genomics, 2015, 23: 33-36.
- [14] GOU W, WU H, ZHANG Z, *et al.* Comparative analysis of transcriptomes in *Rhizophoraceae* provides insights into the origin and adaptive evolution of mangrove plants in intertidal environments[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 795.
- [15] YANG Y, YANG S, LI J, *et al.* Transcriptome analysis of the Holly mangrove *Acanthus ilicifolius* and its terrestrial relative, *Acanthus leucostachyus*, provides insights into adaptation to intertidal zones[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 605.
- [16] 刘婷婷, 莫玉剑, 欧成川, 等. 盐胁迫下无瓣海桑差异表达转录因子的转录组信息分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20 (10): 3210-3222.
- [17] CHEN Y, CHEN Y, SHI C, *et al.* SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data[J]. GigaScience, 2018, 7(1): gix120.
- [18] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. Nature Methods, 2012, 9(4): 357-359.
- [19] VUONG H, TRUONG T, TRAN T, *et al.* A revisit of RSEM generative model and its EM algorithm for quantifying transcript abundances[J]. bioRxiv, 2018: 503672.
- [20] 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.
- [21] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 36(suppl\_1): D480-D484.
- [22] 吴 寒. 活性氧在植物体内的作用及其清除体制[J]. 广东蚕业, 2018, 52 (3): 18.
- [23] 郭明欣, 刘佳佳, 侯琳琳, 等. 植物体内活性氧的产生及清除机制研究进展[J]. 科技视界, 2021 (8): 104-106.
- [24] 黎 家, 李传友. 新中国成立70年来植物激素研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49 (10): 1227-1281.
- [25] 朱婷婷, 王彦霞, 裴丽丽, 等. 植物蛋白激酶与作物非生物胁迫抗性的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18 (4): 763-770.
- [26] WANG Y, XU W, CHEN Z, *et al.* Gene structure, expression pattern and interaction of Nuclear Factor-Y family in castor bean (*Ricinus communis*)[J]. Planta, 2018, 247(3): 559-572.
- [27] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167(2): 313-324.
- [28] 付晴晴, 李商锐, 刘小瑞, 等. NaCl胁迫对不同耐盐性葡萄根系活性氧代谢的影响[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2017 (3): 12-15.
- [29] 鲁 琳, 杨尚谕, 刘维东, 等. 基于转录组测序花烟草响应盐胁迫活性氧清除相关基因的挖掘[J]. 生物技术通报, 2020, 36 (12): 42-53.
- [30] KOSAR F, AKRAM N A, SADIQ M, *et al.* Trehalose: a key organic osmolyte effectively involved in plant abiotic stress tolerance[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2019, 38(2): 606-618.
- [31] 李 辉, 李德芳, 邓 勇, 等. 红麻海藻糖生物合成关键酶基因 *HcTPPJ* 的克隆及响应逆境的表达分析[J]. 作物学报, 2020, 46 (12): 1914-1922.
- [32] 张莹莹, 吕 燕, 宣雯燕, 等. 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS)对逆境胁迫的响应[J]. 海洋与湖沼, 2021, 52 (3): 777-785.
- [33] ZHANG H, DONG J, ZHAO X, *et al.* Research progress in membrane lipid metabolism and molecular mechanism in peanut cold tolerance[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 838.
- [34] FUNCK D, BAUMGARTEN L, STIFT M, *et al.* Differential contribution of P5CS isoforms to stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 1483.
- [35] GONG Z, XIONG L, SHI H, *et al.* Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency[J]. Science China Life Sciences, 2020, 63(5): 635-674.
- [36] 刘海洋, 陈玉珍. ABA受体结构及功能与ABA信号通路研究进展[J]. 中国农学通报, 2019, 35 (21): 75-81.
- [37] 张 弛, 蔚静玲, 储谟立, 等. 拟南芥蛋白磷酸酶PP2C31的盐胁迫

- 响应功能研究[J]. 中国科技论文, 2018, 13 ( 18 ): 2070-2075.
- [38] ZHANG M, SU J, ZHANG Y, *et al.* Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018(45): 1-10.
- [39] ABULFARAJ A A. Stepwise signal transduction cascades under salt stress in leaves of wild barley (*Hordeum spontaneum*)[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2020, 34(1): 860-872.
- [40] KUMAR K, RAINA S K, SULTAN S M. *Arabidopsis* MAPK signaling pathways and their cross talks in abiotic stress response[J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 29(4): 700-714.
- [41] 汪芳珍, 杨成行, 何子华, 等. 盐处理下旱生植物沙芥蛋白激酶相关基因的差异表达分析[J]. *草业学报*, 2021, 30 ( 10 ): 116-124.
- [42] 潘凌云, 马家冀, 李建民, 等. 植物盐胁迫应答转录因子的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38 ( 1 ): 50-65.
- [43] DU C, MA B, WU Z, *et al.* *Reaumuria trigyna* transcription factor RtWRKY23 enhances salt stress tolerance and delays flowering in plants[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 239: 38-51.
- [44] LIN J, DANG F, CHEN Y, *et al.* CaWRKY27 negatively regulates salt and osmotic stress responses in pepper[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 145(C.): 43-51.

## Transcriptome Analysis of *Sonneratia apetala* Root in Response to Salt Stress

LIANG Rui-tao, HAN Wei-dong, YANG Shao-xia, CHEN Bei-bei

(College of Coastal Agricultural Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China)

**Abstract:** [Objective] To lay a molecular basis for functional verification experiment and genetic breeding of tree salinity tolerance, the genetic mechanisms was explored, and salt-related genes were identified for *Sonneratia apetala* Buch.-Ham. [Method] In this study, the root tissues were collected from a 1-year-old *S. apetala* treated with 500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 0 (control group) and 10 d (treatment group). Then transcriptome sequencing and bioinformatics analysis was performed based on the three-generation full-length transcriptome dataset of *S. apetala*. [Result] (1) Compared with the control group, 14401 genes were differentially expressed after salt treatment, of which 7153 were up-regulated and 7248 were down-regulated. (2) GO analysis found that a total of 11068 differential genes were annotated in 47 GO items. (3) For KEGG enrichment analysis, a total of 6189 differential expression genes were enriched to 134 pathways, of which 14 were significantly enriched (*P*-value <0.01, *Q*-value <0.05). (4) Further functional annotation analysis of the differentially expressed genes revealed a total of 89 genes was potential salt-related candidate genes. Among these, 24, 22, 19, 10 and 14 genes encoded enzymes or functional proteins referred to antioxidation, osmotic adjustment substances, plant hormones, protein kinase and transcription factors, respectively. [Conclusion] Genes relating to active oxygen scavenging, osmotic regulation, plant hormones, protein kinases and transcription factors participate in the regulation of salt stress adaptation in *S. apetala*.

**Keywords:** *Sonneratia apetala*; salt stress; transcriptome; differentially expressed genes (DEGs)

(责任编辑: 张 研)