

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.01.001

盐胁迫下比拉底白刺差异表达基因的 转录组分析

田林^{1,2}, 尹丹丹², 成铁龙³, 夏新莉^{1*}, 尹伟伦^{1*}

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 中国林业科学研究院林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091;

3. 南京林业大学生物与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: [目的] 为了挖掘比拉底白刺耐盐相关基因, 对其盐胁迫下差异表达基因进行筛选分析。[方法] 以比拉底白刺幼苗为材料, 用 200 mmol·L⁻¹ NaCl 对幼苗处理 7 d, 并对胁迫处理和对照植株叶片进行转录组测序及生物信息学分析。[结果] 有效序列组装共得到应答盐胁迫的 168 463 条 unigenes 和 196 个差异表达基因。通过差异基因 GO 和 KEGG 功能聚类, 分别获得 64 个 GO 功能小类和 25 条 KEGG 通路。进一步基因相互作用网络分析发现, 转录调控、氧化还原以及抗逆相关基因在比拉底白刺应答盐胁迫中发挥重要作用, 其中, 筛选到 3 个重要的节点基因, 分别是热激同源蛋白基因、L 型凝集素类受体激酶基因和 Win 类蛋白基因。[结论] 本研究获得了盐胁迫下比拉底白刺的差异表达基因及功能注释信息, 有助于理解其耐盐的分子机制, 为后续开发耐盐分子标记及通过基因编辑改良植物耐盐特性提供了科学依据。

关键词: 比拉底白刺; 盐胁迫; 转录组; 差异表达基因; 功能分析

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)01-0001-10

土壤高盐是限制植物生长发育、地理分布的主要环境胁迫因子之一^[1]。世界上有超过 6% 的土地被盐化, 超过 20% 的灌溉土地遭受盐害^[2-4]。盐生植物作为可以在盐化土壤中正常生存的一类植物, 被广泛地用于盐碱地的生态改良和植被保护。因此, 研究盐生植物的耐盐机制、发掘和选育耐盐植物对充分利用盐化土地、改善生态环境具有重要的生态和经济意义。

蒺藜科 (Zygophyllaceae) 白刺属 (*Nitraria*) 植物广泛生长在亚洲、非洲和欧洲盐碱地, 因其较强的耐盐性, 被应用于盐碱地的植被改善和生态环境改良。有关白刺耐盐的特性和生理生化机制研究已有一定的进展, 研究报道白刺属可以耐受高达 500 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 胁迫条件^[5-6], NaCl 胁迫可以显著增加 Na⁺ 浓度, 降低 K⁺ 浓度^[7]。有研究发现, 在盐胁迫下, 唐古特白刺 (*N. tangutorum*) 可

能通过将 Na⁺ 积聚在液泡内进行隔离, 并对其它矿物质营养离子进行选择性吸收, 进而控制 Na⁺/K⁺ 比值, 以提高白刺耐盐性^[8]。唐古特白刺幼苗经高盐处理 7 d 时, 叶绿素含量随盐胁迫浓度升高而呈现先升后降的变化, 当 NaCl 浓度达 300 mmol·L⁻¹ 时, 叶绿素含量最高^[9]; 盐胁迫也提高了游离脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖等渗透调节物质的含量^[10-12]。低浓度 NaCl 处理可以提高叶片中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 等抗氧化酶活性, 进而提高植物对盐分胁迫的适应性^[13]。

关于白刺耐盐的分子机制研究可以归结为两个方面: 一方面, 在 500 mmol·L⁻¹ NaCl 高盐胁迫时, 唐古特白刺幼苗体内涉及到的光合过程、氧化还原、逆境、防御、能量代谢、糖代谢、氨基酸代谢、信号转导、蛋白质合成、蛋白质折叠和装配、

收稿日期: 2019-01-08 修回日期: 2019-11-06

基金项目: 唐古特白刺 SOS 信号通路在耐受高盐胁迫中的作用及其表观遗传分析

* 通讯作者: 夏新莉: xiaxl@bjfu.edu.cn; 尹伟伦: yinwl@bjfu.edu.cn

转录、膜运输、激素合成等途径的蛋白质表达发生了显著改变^[4]；另一方面，200 mmol·L⁻¹ NaCl 中等盐胁迫诱导了比拉底白刺 (*N. billardieri*) 幼苗叶片内多条代谢途径的蛋白质表达水平的改变，其中涉及到的有碳水化合物代谢、光合过程、氨基酸代谢、蛋白质降解、蛋白质折叠和组装、蛋白质合成、氧化还原、次级代谢、信号转导、细胞周期、细胞骨架、细胞防御、能量代谢、膜与运输、转录调控等^[4]。上述2个白刺研究均是通过蛋白质组学的方法，不同强度盐胁迫导致了一些相同类别蛋白质的表达及变化趋势，同时也呈现出一些细微的差别。

上述研究工作为了解白刺耐盐的生理生化与分子机制奠定了一定的基础，而基因作为植物应答环境胁迫的早期响应分子，对调控植株应对胁迫生存条件并适应胁迫环境起到关键作用。为了寻找白刺应答盐胁迫的基因并解析其分子机制，本研究以比拉底白刺幼苗为材料，运用转录组测序技术挖掘200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫下比拉底白刺幼苗叶片内的差异表达基因，并运用生物信息学方法分析差异表达基因的生物学功能及其参与的代谢途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

比拉底白刺幼苗的培养参照 Tian 等^[14] 方法，并稍作调整。将经温水浸种 24 h 后的比拉底白刺种子播种于装有纯净河沙的塑料盆（高 14 cm，直径 12 cm，底部有孔），5 个塑料盆放在一个塑料桶里（高 15 cm，直径 80 cm）；然后放置在温室中培养，在 (27±2) °C 下光照 (400~800 μmol·m⁻²·s⁻¹) 培养 14 h 和在 (25±1) °C 黑暗培养 10 h，温室的相对湿度维持在 60%~80%。待幼苗生长至 2 个月时，选取长势整齐的幼苗分为两组，第一组用 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理，第二组为对照，每组 3 个重复。7 d 时分别取样，放置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2 叶片总 RNA 样品的提取

取比拉底白刺幼苗叶片放于已灭过菌的研钵中，添加适量液氮快速研磨，然后取 0.3 g 磨好的样品全部装入 1 mL EP 管中；加入 1 mL Trizol 试剂，摇匀后静置 10 min；加入 0.3 mL 氯仿，摇匀后静置 10 min，然后离心 15 min (4 °C, 12 000 g)；

吸取上清液。再加入等体积异丙醇，静置 4 h 后离心 15 min (4 °C, 12 000 g)；去上清液，并用 75% 酒精洗涤，然后同样在高速冷冻离心机上离心 5 min (4 °C, 12 000 g)；用 75% 乙醇重复洗涤后，在冰上晾干；用无 RNAase 的水溶解后，分别用 1% RNA 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 仪检测 RNA 样品的质量和浓度。

1.3 RNA-seq 测序

总 RNA 经 DNase I 消化后，通过富集含有 polyA 尾巴的 mRNA、mRNA 打断成 200 nt 的小片段、反转录成第一条链 cDNA、合成第二链 cDNA 等步骤，用 QIA quick PCR extraction kit 进行纯化，然后进行末端修复加 polyA。经回收纯化、PCR 富集获得 cDNA 文库。文库构建完成后，使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System 分别对文库的插入片段长度和有效浓度进行检测，样品合格后在 Illumina 测序平台 (Illumina HiSeq™ 2000) 进行高通量测序。将得到的序列原始文件 Raw Reads 进行过滤、比对、*de novo* 组装、Unigene 功能注释、基因定量、差异基因筛选。其中，差异表达基因的筛选条件是 FDR (False Discovery Rate) < 0.001 且基因表达差异倍数 (fold change) 大于 2 倍，选取这些基因作为应答盐胁迫的差异基因，用于后续分析。

1.4 差异基因的功能注释与富集分析

1.4.1 GO 功能注释 利用 Blast2GO 软件将比对到 Gene Ontology 数据库中的所有差异基因进行 GO 功能注释和分类^[15]，网站是 <http://www.geneontology.org/>，获得转录本的 GO 功能注释信息。

1.4.2 GO 显著性富集分析 差异表达基因比对 Gene Ontology 数据库后，进行映射，得到目的 GO 条目 (term)。以这些 GO term 为单位，通过超几何检验 (phyper)，得到检验 *p* 值，Bonferroni 校正后，对于 corrected *p*-value < 0.05 的 GO term 定义为在差异表达基因中显著富集的 GO term。

1.4.3 KEGG 显著性富集分析 将差异表达基因应用 KEGG 数据库预测其参与的代谢途径。以 corrected *p*-value ≤ 0.05 为标准，筛选在差异表达基因中显著富集的代谢途径。

1.4.4 基因互作网络构建 利用分子相互作用分析软件 (STRING) 和相互作用蛋白数据库 (DIP) 进行蛋白质相互作用网络预测，运用 Cytoscape 程序

构建蛋白质相互作用网络^[16]。

1.5 实时荧光定量 PCR

以分别提取的对照组及盐胁迫处理 7d 时的幼苗叶片 RNA 为模板, 使用 Takara 公司的 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒反转录合成 cDNA 第一链作为实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应的模板。从转录组数据中随机选

择 7 个差异表达基因, 利用 Primer 5.0 设计 qRT-PCR 引物, 如表 1。以 18S rRNA 作为内参, 引物为 5'-GCTGGATTGCTGGTGGTAT-3' 和 5'-TTCCTGGGTCTGTGCCTGT-3' (表 1)。使用 SYBR® Premix Ex TaqTM 荧光定量试剂盒进行荧光定量检测。每个样品进行 3 次重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primers for qRT-PCR

Gene ID	Forward primer	Reverse primer
comp83443_c0_seq9	GACCAAGACAACAGCGAGC	CCATACCGACTAGGCAAACA
comp75099_c0_seq1	CCGCCTTTCGTTGACACC	GAAACAATGCTCGGCAAGAT
comp71196_c0_seq2	GCTGTTACATTGCTTACTCATCG	AACCTGAGGCACTTGGGATA
comp71223_c0_seq1	CCAACCCAGATACCCATAACC	TTGAGGACAAAATGAAGGAGC
comp82053_c0_seq5	CATTACGAGTGAAGGAGGTGAT	GTGAATACATTGTCTCTCTGCGA
comp82392_c1_seq3	TCATGCCTTACGTATGCTTC	CTTCTGGGACACTGACCGACT
comp86989_c0_seq2	AGTTGCCATTCTCAAGTCCTAA	TCCCCAAATCACGTCTTCTAG
18S rRNA	GCTGGATTGCTGGTGGTAT	TTCCTGGGTCTGTGCCTGT

2 结果

2.1 盐胁迫下拉底白刺叶片转录组分析

以盐胁迫处理及对照组白刺叶片为材料, 分别提取 RNA 后建立 cDNA 文库, 用 Illumina HiseqTM 2000 测序。通过 *de novo* 拼接、组装后共获得 168 463 条 unigenes。对测序获得的所有 unigenes 分别与 COG、GO、KEGG、KOG、Pfam、Swiss-Prot、

NR 七大功能数据库进行比对和功能注释, 注释率分别为 21.5%、41.2%、14.2%、37.2%、42.4%、40.4%、59.7% (表 2)。结果共注释到 101 016 条 unigenes, 占有 unigenes 的 60.0%, 剩余 67 447 条 (40.0%) unigenes 未得到注释。在注释到的所有 unigenes 里, 长度在 300~1 000 bp 的有 24 329 条, 占 24.1%; 长度 $\geq 1 000$ bp 的有 76 687 条, 占 75.9% (表 2)。

表 2 Unigene 在多个数据库中注释结果统计
Table 2 Statistics of annotation results in the databases

长度Length/bp	COG	GO	KEGG	KOG	Pfam	Swissprot	NR
300 \leq 长度Length < 1 000	5 145	14 525	4 636	13 050	11 091	13 814	24 024
长度Length $\geq 1 000$	31 004	54 981	19 301	49 713	60 316	54 180	76 567
合计All Annotated	36 149	69 506	23 937	62 763	71 407	67 994	100 591

2.2 盐胁迫下拉底白刺叶片差异表达基因

对盐胁迫处理及未处理对照的比拉底白刺幼苗叶片 RNA-seq 测序后得到的所有基因进行差异表达筛选, 以 \log_2 fold change (基因差异表达倍数) 的绝对值 > 1 且错配率 $FDR < 0.001$ 为差异表达基因 (DEG) 的筛选标准, 盐胁迫 7 d 时, 共筛选得到

差异表达基因 196 个, 其中, 79 条 DEGs 在盐胁迫响应中上调表达, 下调表达 DEGs 有 117 条。基因表达差异变化绝大部分集中在 3 倍左右, 其中, comp73009_c0_seq1 差异变化为 -7.10, 下调变化最大, 该 unigene 注释为 5'-甲基硫腺苷/s-腺苷同型半胱氨酸核苷酶 (5'-methylthioadenosine/S-adenosyl-

homocysteinenucleosidase); comp79737_c1_seq2 和 comp82550_c1_seq4 差异变化分别为 5.29 和 5.21, 上调变化最高, 然而前者尚未得到注释, 功能未知, 后者注释为赤霉素调节蛋白 (Gibberellin-regulated protein)。推测以上显著差异 unigenes 可能参与比拉底白刺的耐盐过程, 需要进一步研究。

2.3 盐胁迫下白刺差异表达基因的 GO 分析

Gene Ontology (GO) 分析能够比较全面地描述差异表达基因的主要生物学功能, 是一个国际标准化了的基因功能分类系统。对盐胁迫处理 7 d 的比拉底白刺叶片 DEGs 进行 GO 分析, 划分为 64 个功能组 (图 1), GO 数据库中的结构根据功

能组的不同又进一步分为三类描述: 生物学过程、分子功能和细胞组分。图 1 显示了比拉底白刺盐胁迫后差异基因表达谱的总体情况。生物学过程主要集中在代谢过程、单体过程、细胞过程和刺激反应。在分子功能中, 注释为结合和催化活性的差异基因最多, 其次为转运活性和抗氧化活性。在细胞组分大类中, 差异基因被注释到最多的亚类依次为细胞、细胞组分、细胞器、膜、细胞器组分和膜部分 (图 1)。以上注释较多的过程涉及到的基因可能参与了比拉底白刺的盐胁迫响应过程, 进一步挖掘这些差异表达基因有助于研究其抗逆机制和品质改良。

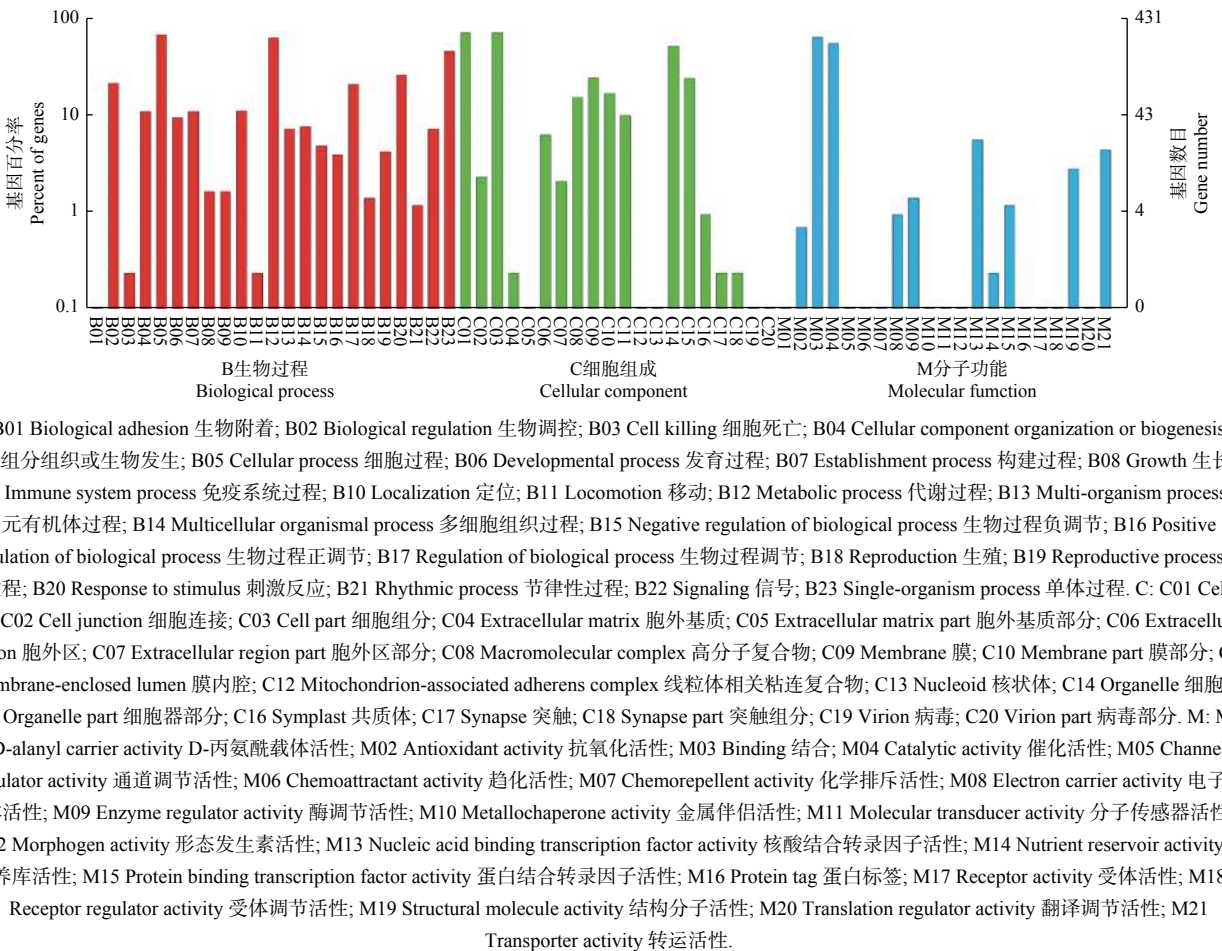


图 1 盐胁迫下比拉底白刺叶片差异表达基因的 GO 功能聚类注释图

Fig. 1 Gene Ontology classification annotation of differentially expressed genes in the leaves of *N. billardieri* under salt stress

通过进一步对比拉底白刺叶片 DEGs 的 GO 富集分析 (校正后 p -value<0.05) 发现: 在生物学过程中 DEGs 富集最显著的 GO term 分别是细胞壁高分子分解代谢过程、几丁质分解代谢过程、多糖分解代谢过程、氨基糖代谢过程、防御反应。在细胞

组分中, 富集最显著的 GO term 分别是液泡、叶绿体类囊体膜、细胞外区域、质外体、细胞壁。在分子功能中的 DEGs 富集最显著的 GO term 分别是几丁质结合、几丁质酶活性、氧化还原酶活性、醌结合、血红素结合。

2.4 盐胁迫下白刺差异表达基因的 KEGG 分析

在生物体中, 基于通路分析有助于进一步了解基因的生物学功能和上下游基因的相互作用, 深入理解基因与功能的关系。本文使用 KEGG 功能富集分析盐胁迫处理 7 d 时比拉底白刺幼苗叶片的差异表达基因可能涉及的代谢通路, 发现比拉底白刺响应盐胁迫的 DEGs 涉及到 25 条 KEGG 代谢通路 (图 2), 其中, 碳水化合物代谢过程的差异基因最多, 占 14%, 其次为运输和分解代谢, 占

9%; 蛋白质折叠、分类、降解和其它次级代谢产物的生物合成均占 7%, 免疫应答系统占 6%, 氨基酸代谢和信号转导分别占 5% 和 4%。与盐胁迫应答相关的环境适应占 2% (图 2)。KEGG 分析可以从功能的角度聚焦到通路及基因, 也可以从基因的角度锁定功能和互作关系, 直观地显示了比拉底白刺在盐胁迫下差异表达基因的代谢过程和信号通路, 有助于更好地研究比拉底白刺响应盐胁迫的分子机制。

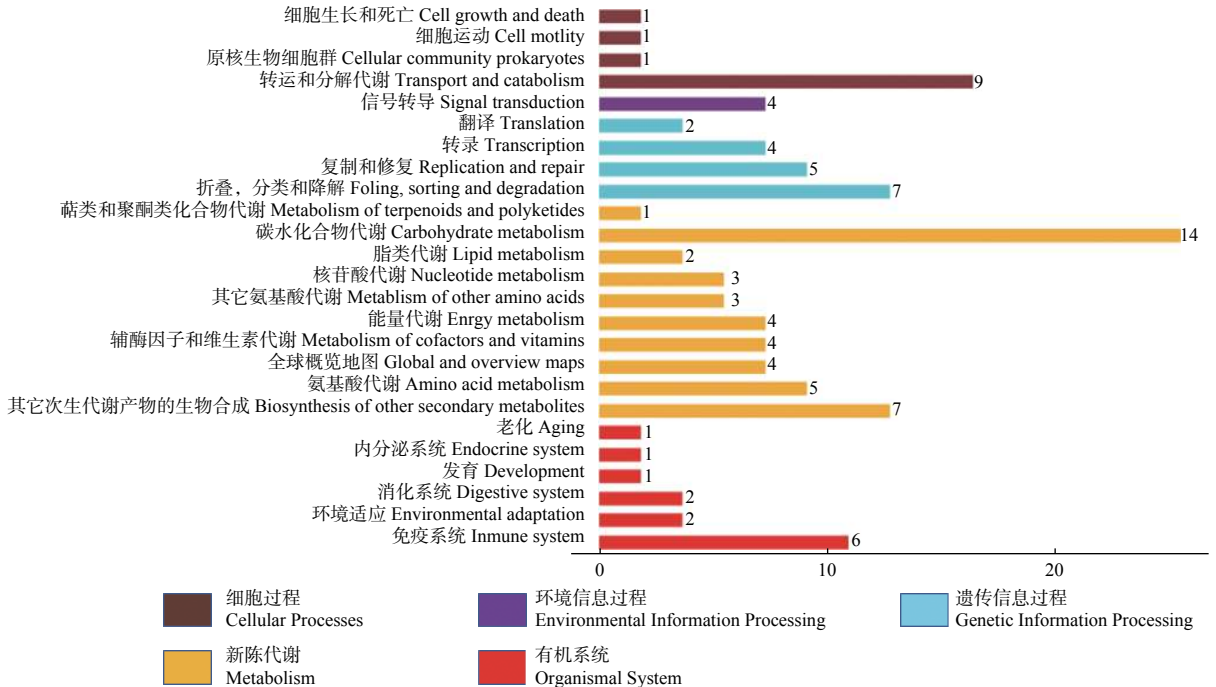


图 2 盐胁迫下比拉底白刺叶片差异表达基因的 KEGG 通路分析

Fig. 2 KEGG pathway analysis of differentially expressed genes in the leaves of *N. billardieri* under salt stress

以校正后 p -value <0.05 为筛选阈值, 盐胁迫 7 d 比拉底白刺叶片差异表达基因的 KEGG 富集分析发现, 有 9 条代谢途径产生显著变化 (图 3), 分别是苯丙烷类生物合成、氨基糖和核苷酸糖代谢、托烷, 嘧啶和吡啶生物碱的生物合成、抗原加工和呈现、内质网中的蛋白质加工、核苷酸切除修复、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、内吞作用、嘌呤代谢 (图 3)。以上 9 条代谢通路有助于获得比拉底白刺在抵御盐胁迫时的代谢信息, 以便更清楚地理解其在盐胁迫应答中的过程。

2.5 盐胁迫下白刺差异表达基因的互作网络

为了研究比拉底白刺幼苗是如何通过基因之间的相互作用来传递盐胁迫信号, 通过 String 数据库和搜索软件构建了盐应答基因在细胞内的互作网络

(图 4、表 3)。在基因作用网络中检测到一组相互作用的基因簇, 共包含 32 个基因 (图 4)。组成相互作用网络的这些基因主要与信号转导、氧化还原平衡、蛋白质合成、蛋白质折叠和组装、蛋白质降解、转录调控、次级代谢、细胞拯救/防御等途径相关。转录调控和氧化还原平衡在基因相互作用网络中占据着重要位置, 它们可能在比拉底白刺幼苗响应盐胁迫反应中起重要作用。此外, 基因 comp71223_c0_seq1、基因 comp83599_c0_seq4 和基因 comp71691_c0_seq2, 作为节点, 占据了网络的中心位置。

2.6 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

为了验证 RNA-Seq 数据的准确性, 随机选择 7 个差异表达基因, 取对照和盐胁迫 7 d 的比拉底

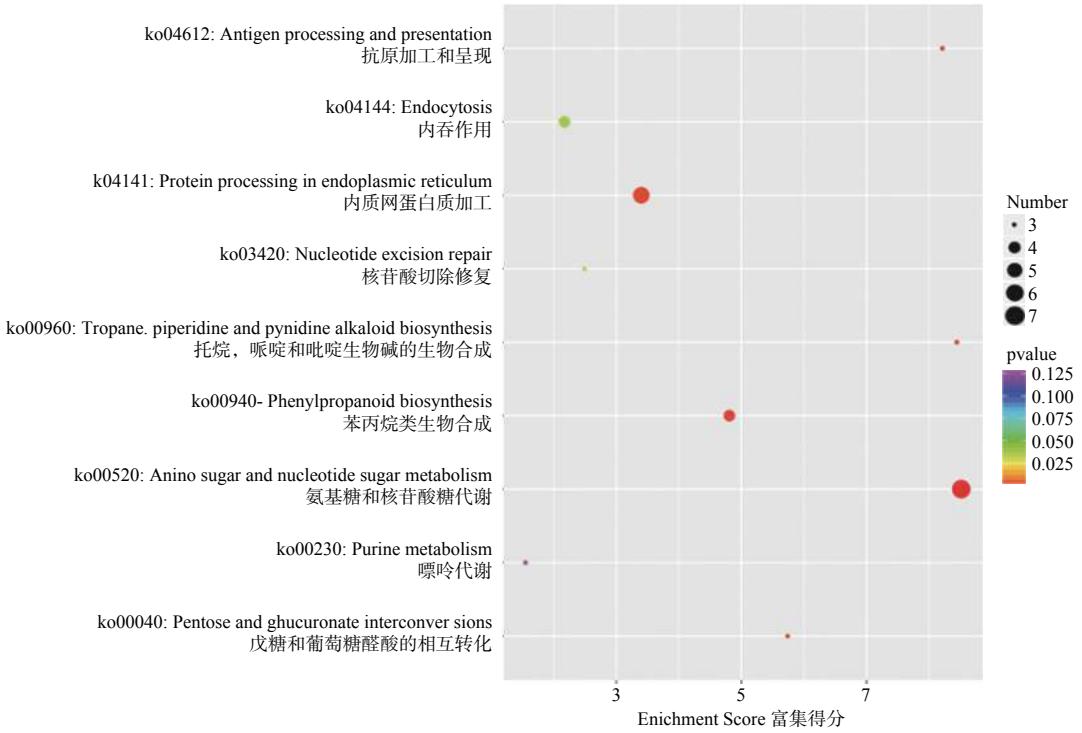


图 3 盐胁迫下比拉底白刺叶片差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig. 3 KEGG Enrichment Analysis of differentially expressed genes in the leaves of *N. billardieri* under salt stress

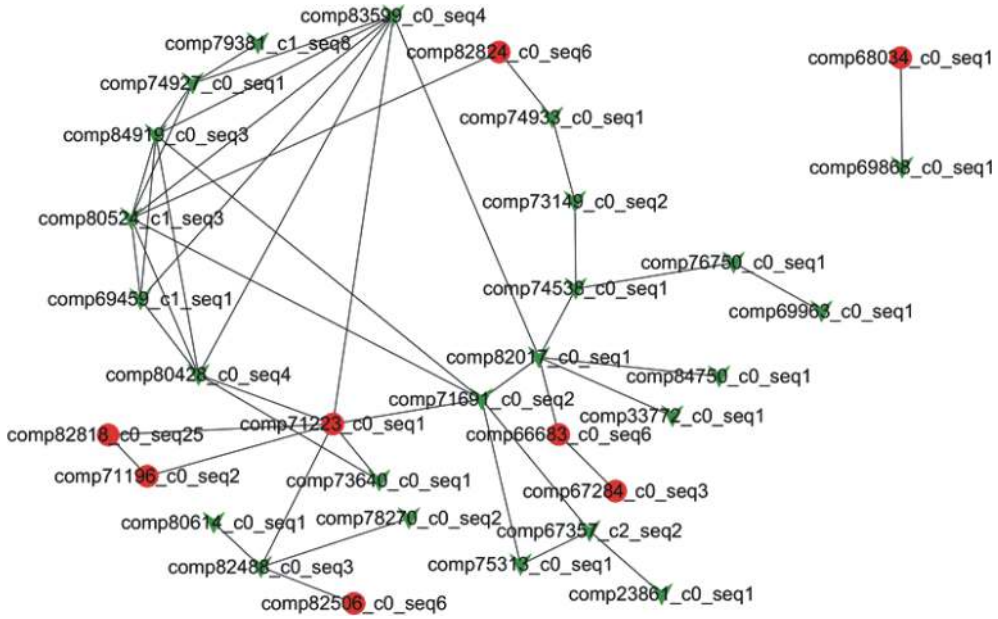


图 4 盐胁迫诱导的差异表达基因相互作用网络.

Fig. 4 The interaction network of differentially expressed genes induced by salt stress.

白刺叶片进行 qRT-PCR 实验。结果显示：这 7 个基因在 qRT-PCR 的结果与转录组分析的趋势一致（图 5），而在表达变幅倍数上有些许差异，可能是由于两类实验的检测灵敏度及数据分析方法不同造成的。盐胁迫处理前后，7 个差异基因的表达特征与测序结果呈现相同的变化趋势，验证了转录组

测序结果的可靠性。

3 讨论

本研究进行了多次预实验，通过观察盐胁迫下植株的表型发现，盐生植物比拉底白刺在 7 d 时开始出现叶片轻微卷曲的现象，之后开始逐渐萎焉，

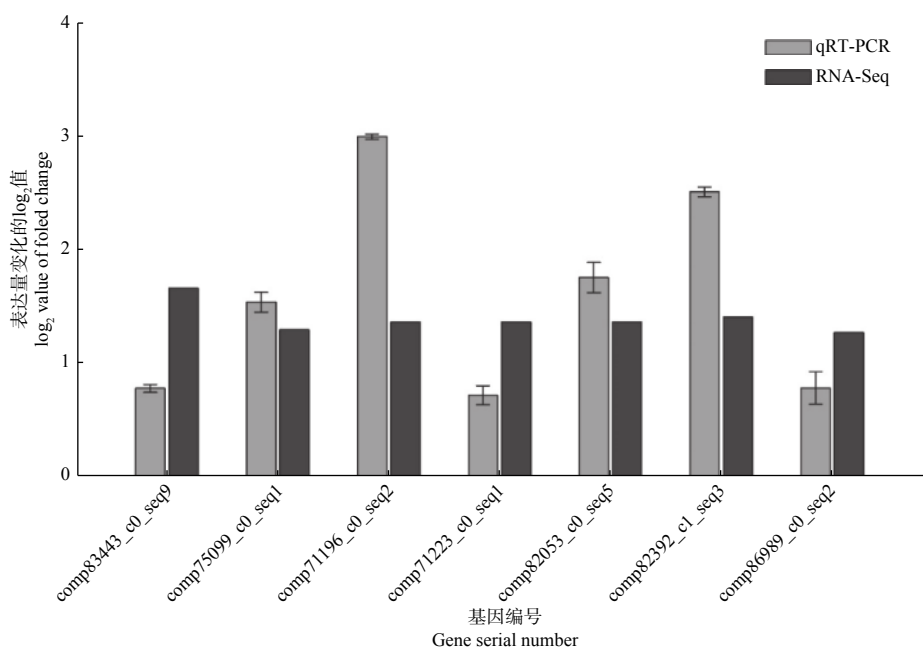
到 9 d 时萎蔫症状较明显。相对于非盐生植物, 盐生植物能够耐受一定强度的盐胁迫环境一段时间, 在一定盐浓度范围的土壤环境下正常生长^[17-18]。为

了研究比拉底白刺应答盐胁迫的分子机制, 本实验选择在其表型性状刚开始出现时进行取样和转录组测序分析, 以便更好地理解盐生植物特有的耐盐机制。

表 3 盐胁迫诱导的基因相互作用网络中差异表达基因的名称及注释

Table 3 The name and annotation of differentially expressed genes responding to salt stress in gene interaction network analysis

基因 gene	基因注释 gene annotation	基因 gene	基因注释 gene annotation
comp71223_c0_seq1	Heat shock cognate 70 kDa protein	comp82824_c0_seq6	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
comp82506_c0_seq6	Protein LNK4	comp74538_c0_seq1	Glycerophosphodiester phosphodiesterase GDE1
comp71691_c0_seq2	Win-like protein	comp73640_c0_seq1	Galactinol synthase 2
comp80524_c1_seq3	Flavanone 3-dioxygenase	comp67284_c0_seq3	Putative branched-chain-amino-acid aminotransferase
comp69868_c0_seq1	Cysteine proteinase 15A	comp79381_c1_seq8	Bidirectional sugar transporter SWEET1a
comp80428_c0_seq4	Calreticulin-1	comp71196_c0_seq2	Ferredoxin
comp74933_c0_seq1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog	comp68034_c0_seq1	Non-specific lipid-transfer protein 1
comp84919_c0_seq3	Probable WRKY transcription factor 41	comp69459_c1_seq1	NAC transcription factor NAM-B2
comp83599_c0_seq4	L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1	comp73149_c0_seq2	Monoacylglycerol lipase
comp75313_c0_seq1	Peroxidase 4	comp74927_c0_seq1	Ammonium transporter 1 member 2
comp82017_c0_seq1	DNA damage-repair/toleration protein DRT100	comp80614_c0_seq1	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase NCED2, chloroplastic
comp84750_c0_seq1	Pectinesterase 1	comp69963_c0_seq1	Wound-induced protein 1
comp82818_c0_seq25	Carboxyl-terminal-processing peptidase 3, chloroplastic	comp23861_c0_seq1	Wound-induced proteinase inhibitor 1
comp82488_c0_seq3	Chlorophyllide a oxygenase, chloroplastic	comp66683_c0_seq6	Tropinone reductase homolog At2g30670
comp76750_c0_seq1	--	comp33772_c0_seq1	G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase
comp67357_c2_seq2	Protein NP24	comp78270_c0_seq2	Acetamidase



注: qRT-PCR 结果中的误差线表示平均值的标准差 (n=3)

Note: Error bars in qRT-PCR detection results represent the standard error of the mean (n=3).

图 5 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig. 5 Verification of differentially expressed genes using qRT-PCR

植物盐胁迫是一个由多个基因参与表达调控的作用网络,转录组提供了基因的多样性、表达水平差异以及时空变化,利用转录组测序技术的实用性和高效性可以促进植物响应非生物逆境胁迫的分子机制研究^[19-20]。本研究采用 Illumina Hiseq™ 2000 高通量测序技术对盐胁迫 7 d 与未做处理的比拉底白刺幼苗叶片进行了转录组分析,共获得了 168 463 条 unigenes,与七大数据库的注释率达 60.0%,注释结果较好,大部分基因功能得到注释,与泡泡刺 (*N. sphaerocarpa*) 的注释率 (62.1%) 接近^[21]。剩余 67 447 条 (40.0%) unigenes 未得到注释,可能是比拉底白刺中的新基因。

植物中各类转录因子对于调控各种诱导型基因的表达以及植物生长发育、适应环境等起主要作用^[22]。该研究筛选出的差异基因中涉及到了 WRKY 转录因子 (comp85183_c0_seq4、comp85183_c0_seq10、comp74597_c0_seq1)、乙烯响应转录因子 (comp82253_c0_seq3)、NAC 转录因子 (comp69459_c1_seq1)、GATA 转录因子 (comp74878_c0_seq4)、发病机制相关转录因子 (comp83152_c0_seq5),这些 unigenes 在盐胁迫下均有显著响应,其中,WRKY 转录因子具有高度保守的 WRKY 结构域,研究表明能够参与损伤、衰老、发育、抗病等抗逆反应^[23]。乙烯响应转录因子 (ERF) 家族属于 AP2/ERF 超转录因子家族,具有保守的一个 AP2/ERF 结构域,在植物生长发育、环境应答反应 (干旱、低温、高盐、病虫害等胁迫) 中具有重要作用^[24]。本研究发现的几个转录因子需要进一步挖掘其功能,以期探究比拉底白刺的耐盐机理作出贡献。

通过盐胁迫诱导的差异表达基因 GO 分析结果可见,盐胁迫主要引起了比拉底白刺叶片内与代谢过程、环境刺激应答、防御反应等有关的生物学过程变化,以及与催化活性、结合活性、转运活性和抗氧化活性有关的分子功能的变化,这与比拉底白刺在蛋白质水平上对盐胁迫的应答模式有些类似^[14]。初步表明,比拉底白刺在受到低盐胁迫时,可能通过合成或者降解一些蛋白酶类,改变蛋白质结构和含量,以抵抗低盐逆境。

从比拉底白刺幼苗叶片差异表达基因参与的代谢途径可见,盐胁迫主要引起了白刺幼苗叶片内与

碳水化合物、氨基酸代谢相关的基因表达发生变化,同时也诱导了与蛋白质折叠、分类和降解相关的基因表达发生改变,这可能与盐胁迫导致了幼苗叶片内一些蛋白质代谢变化相关^[4, 14]。比拉底白刺幼苗叶片在受到低盐逆境胁迫时,氨基酸和核苷酸糖代谢途径有显著富集,可能其光合作用也受到一定影响,碳水化合物代谢活跃,推测其可能通过减少物质合成,控制能量代谢来抵抗低盐环境^[25]。由盐胁迫引起的植株叶片表型的轻微变化可能是由于差异表达基因所参与的代谢途径的改变引起的,正是由于植株体内代谢途径的改变引起了诸如光合作用、质膜渗透力等生理现象的变化,进而导致表型的变化^[4, 14]。

将比拉底白刺幼苗叶片响应盐应答差异基因在细胞内构建互作网络,作为网络中的“hubs”(连接到许多其他的蛋白质)和“bottlenecks”(在一个网络的子网络的关键连接器),如基因 comp71223_c0_seq1 注释为热激同源蛋白 (Heat shock cognate 70 kDa protein),基因 comp83599_c0_seq4 注释为 L 型凝集素域受体激酶 (L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1),和基因 comp71691_c0_seq2 注释为 Win 类蛋白 (Win-like protein),它们占据了网络的中心位置,可能在白刺幼苗叶片对盐胁迫处理的响应过程中发挥重要作用。因此,通过基因相互作用网络分析可以初步了解这些基因在比拉底白刺响应盐胁迫过程中起的作用,互作关系有待进一步研究。

4 结论

本研究通过对盐胁迫 7 d 与未处理的比拉底白刺叶片进行转录组测序及相关生物信息学分析,共获得 168 463 条 unigenes,筛选到 196 条差异表达基因。通过 GO 功能和 KEGG 通路分析,理清了差异表达基因富集的分子功能与代谢通路。此外,进一步构建了差异基因互作网络,得到了重要的节点基因。综上所述,本研究为挖掘和找寻重要耐盐候选基因提供了参考,同时为研究比拉底白刺响应盐胁迫的分子机制,以及为下一步培育比拉底白刺耐盐新品种奠定了基础。

参考文献:

[1] Stepien P, Johnson G. N. Contrasting responses of photosynthesis to

- salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *Thellungiella*: Role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(2): 1154-1165.
- [2] Zhu J K. Plant salt tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(2): 66-71.
- [3] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59(1): 651-681.
- [4] Cheng T L, Chen J H, Zhang J B, *et al.* Physiological and proteomic analyses of leaves from the halophyte Tangut *Nitraria* reveals diverse response pathways critical for high salinity tolerance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 30.
- [5] 杨升, 张华新, 刘涛. 16个树种盐胁迫下的生长表现和生理特性[J]. *浙江农林大学学报*, 2012, 29(5): 744-754.
- [6] 张雪, 贺康宁, 史常青, 等. 盐胁迫对怪柳和白刺幼苗生长与生理特性的影响[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2017, 45(1): 105-111.
- [7] 闫永庆, 袁晓婷, 刘威, 等. 盐胁迫及外源Ca²⁺对白刺离子吸收、运输的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2014, 45(3): 71-78.
- [8] 杨秀艳, 张华新, 张丽, 等. NaCl胁迫对唐古特白刺幼苗生长及离子吸收、运输与分配的影响[J]. *林业科学*, 2013, 49(9): 7-9.
- [9] 闫永庆, 高彦博, 刘威, 等. 外源Ca²⁺对盐胁迫下唐古特白刺光合作用影响[J]. *东北农业大学学报*, 2016, 47(4): 57-64.
- [10] 范小峰, 杨颖丽, 程转霞. NaCl胁迫下唐古特白刺愈伤组织生理生化变化研究[J]. *干旱地区农业研究*, 2009, 27(3): 3-5.
- [11] 倪建伟, 武香, 张华新, 等. 3种白刺耐盐性的对比分析[J]. *林业科学研究*, 2012, 25(1): 48-53.
- [12] 左凤月, 郝秀芬, 陈占峰, 等. 小果白刺和泡果白刺的耐盐性[J]. *天津农学院学报*, 2013(2): 11-14.
- [13] 鲁艳, 雷加强, 曾凡江, 等. NaCl胁迫对大果白刺幼苗生长和抗逆生理特性的影响[J]. *应用生态学报*, 2014, 25(3): 711-717.
- [14] Tian L, Zhu L M, Cheng T L, *et al.* Physiological and protein responses in leaves of *Nitraria billardieri* seedlings to moderate salt stress[J]. *Journal of Plant Interactions*, 2018, 13: 522-531.
- [15] Conesa A, Gotz S. Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics[J]. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 2008: 1-12.
- [16] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, *et al.* STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: 808-815.
- [17] Ding M, Hou P, Shen X, *et al.* Salt-induced expression of genes related to Na⁺/K⁺ and ROS homeostasis in leaves of salt-resistant and salt-sensitive poplar species[J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 73: 251-269.
- [18] Liu Q, Tang J, Wang W, *et al.* Transcriptome analysis reveals complex response of the medicinal/ ornamental halophyte *Iris halophila* Pall. to high environmental salinity[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 165: 250-260.
- [19] 孙瑞芬, 张艳芳, 郭树春, 等. 基于RNA-Seq技术的盐胁迫向日葵转录组信息分析[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(12): 2736-2742.
- [20] Agarwal P K, Gupta K, Lopato S, *et al.* Dehydration responsive element binding transcription factors and their applications for the engineering of stress tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68: 2135-2148.
- [21] 马婧, 邓楠, 褚建民, 等. 泡泡刺高通量转录组鉴定及其黄酮类代谢途径初步分析[J]. *林业科学研究*, 2016, 29(1): 61-66.
- [22] 赵航, 贾富强, 张富春, 等. 盐胁迫下盐穗木差异表达基因的转录组信息分析[J]. *生物信息学*, 2014, 12(2): 90-98.
- [23] Shi W Y, Du Y T, Ma J, *et al.* The WRKY transcription factor GmWRKY12 confers drought and salt tolerance in soybean[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19: 4087.
- [24] 张计育, 王庆菊, 郭忠仁. 植物AP2/ERF类转录因子研究进展[J]. *遗传*, 2012, 34(7): 835-847.
- [25] Qin D D, Wu H Y, Peng H R, *et al.* Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome Array[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 432.

Transcriptome Analysis of Differentially Expressed Genes of *Nitraria billardieri* Under Salt Stress

TIAN Lin^{1,2}, YIN Dan-dan², CHENG Tie-long³, XIA Xin-li¹, YIN Wei-lun¹

(1. College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] To find the salinity tolerance genes of *Nitraria billardieri*, the differentially expressed genes (DEGs) under salt stress were selected and analyzed. [Method] The seedlings of *N. billardieri* were subjected to salt stress treatments with 200 mmol·L⁻¹ NaCl for 7 days. High-throughput RNA-seq technology was used to generate the transcriptome of salt-treated leaves and the control, and the related bioinformatics analysis was performed. [Result] A total of 168 463 unigenes and 196 DEGs responding to salt stress were obtained with clean reads assembled. 64 subclasses and 25 KEGG pathways were enriched in the GO and KEGG annotation, respectively. Further gene interaction network analysis revealed that the genes related to transcriptional regulation, redox and stress tolerance play important roles in the response to salt stress of *N. billardieri*. Three key node genes were screened out: heat shock cognate 70 kDa protein gene, L-type lectin-domain containing receptor kinase IV.1 gene and Win-like protein gene. [Conclusion] In this study, the DEGs of *N. billardieri* under salt stress and the functional annotations were obtained. It will be helpful to understand the molecular mechanism of salt tolerance of *N. billardieri*. It also provide scientific basis for the subsequent development of salt-tolerance molecular markers and the improvement of salt-tolerance characteristics in plants through gene editing.

Keywords: *Nitraria billardieri*; salt stress; transcriptome; differentially expressed genes; functional analysis

(责任编辑: 张 研)