

DOI: 10.5846/stxb201712122233

李彦杰, 刘仁华, 周大祥, 杨俊年, 蒋梦芸, 吴巍, 郭世浩, 高鑫. 三峡库区消落带野生狗牙根对水淹适生性的转录组分析. 生态学报, 2018, 38(23): - .

Li Y J, Liu R H, Zhou D X, Yang J N, Jiang M Y, Wu W, Guo S H, Gao X. Transcriptome analysis of the adaptability of wild *Cynodon dactylon* in the Fluctuating Belt of Three Gorges Reservoir during flooding. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(23): - .

三峡库区消落带野生狗牙根对水淹适生性的转录组分析

李彦杰^{1,2,*}, 刘仁华², 周大祥², 杨俊年¹, 蒋梦芸², 吴巍², 郭世浩², 高鑫²

1 重庆三峡学院教师教育学院, 万州 404100

2 重庆三峡学院生物与食品工程学院, 万州 404100

摘要:为探究狗牙根对水淹环境的适生性机制, 取长势一致的狗牙根分为未水淹对照组(A1)和30 cm 沉水处理组(A2), A2 水淹 15 d 后两组同时采样, 提取样本总 RNA 作转录组测序。A1 和 A2 测序数据经 de novo 组装分别获得 128031 和 83363 条高质量 Unigene; A1 和 A2 对比发现 28844 条差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 其中 11858 条 DEGs 上调表达, 16986 条 DEGs 下调表达; 功能注释显示, 这些 DEGs 主要集中在转录、翻译、碳水化合物代谢和环境适应等途径; 信号通路富集显示, 包括植物对病原体的防御、物质代谢、光合作用、形态发育和抗氧化等过程的 103 个信号通路与狗牙根对水淹生境的适生性有关; 随机挑选 4 个 DEGs 作 qRT-PCR 分析, 荧光定量结果与测序数据基本一致, 说明基于转录组分析 DEGs 的表达情况较为可靠。该工作或可为进一步挖掘与狗牙根水淹适生性相关的调控基因和功能基因提供基础。

关键词:三峡库区; 消落带; 狗牙根; 水淹; 转录组分析

Transcriptome analysis of the adaptability of wild *Cynodon dactylon* in the Fluctuating Belt of Three Gorges Reservoir during flooding

LI Yanjie^{1,2,*}, LIU Renhua², ZHOU Daxiang², YANG Junnian¹, JIANG Mengyun², WU Wei², GUO Shihao², GAO Xin²

1 College of Teacher Education, Chongqing Three Gorges University, Wanzhou 404100, China

2 College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Wanzhou 404100, China

Abstract: To explore the adaptive mechanism of *Cynodon dactylon* under flooding, *Cynodon dactylon* plants with similar growth were divided into a non-flooded control group (A1) and a treatment group (A2). The latter consisted of a submersion depth of 30 cm. After submergence of A2 for fifteen days, sampling of the two groups was carried out simultaneously. Thereafter, the total RNA of the samples was extracted for transcriptome sequencing. The de novo sequencing data of A1 and A2 revealed 128031 and 83363 high-quality unigenes, respectively. 28844 differentially expressed genes (DEGs) were found between A1 and A2, of which 11858 DEGs were up-regulated and 16986 were down-regulated. Functional annotation showed that these DEGs were mainly concentrated in the transcription, translation, carbohydrate metabolism, and environmental adaptation. The results of signal pathway enrichment showed that 103 signaling pathways, including plant defense responses against pathogens, metabolism, photosynthesis, individual fitness development, and antioxidant activity, were related to the adaptability of *Cynodon dactylon* to flooding. DEGs were randomly

基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(KJ1401001); 重庆市教委科学技术研究项目(KJ1501011); 重庆市自然科学基金(cstc2016jcyjA2135); 重庆市自然科学基金(cstc2016jcyjA2132); 渝东北特色生物资源开发利用工程中心资助

收稿日期: 2017-12-12; 网络出版日期: 2018-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: 37805572@qq.com

selected for real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR), and the results of quantitative analysis of fluorescence were the same as that of sequencing, which indicated that the expression of DEGs was more reliable. It might provide a basis for further excavation of regulatory genes and functional genes, which are associated with the adaptability of *Cynodon dactylon* in flooding.

Key Words: the Three Gorges Reservoir; fluctuating belt; *Cynodon dactylon*; flooding; transcriptome analysis

自三峡大坝 175 m 蓄水以来,从大坝到其上游重庆江津地区的长江两岸形成了与天然河流涨落季节相反的干湿交替区域—三峡库区消落带^[1-2]。环境的改变破坏了三峡库区消落带原有陆生植被生态系统多样性,并随之带了如水土流失和农业面源污染加重等诸多问题^[3-4]。三峡库区消落带生态环境治理的关键是恢复或重建消落带植被生态系统。国内学者从消落带植被调查和适生植物筛选入手,发现消落带野生香根草(*Vetiveria zizanioides* L.)、空心莲子草(*Alternanthera Philoxeroides* (Mart.) Griseb.) 和狗牙根(*Cynodon dactylon* (Linn.) Pers.) 等植物在三峡库区消落带反复地出露与淹没交替过程中能保持较高存活率,并指出上述适生植物可通过形态学发育及生理、生化指标等变化以响应水淹信号,并在一定程度上对水淹环境表现出适生性^[5-9]。

狗牙根是三峡库区消落带原生植物,具有发达的根茎和匍匐枝,可固土护坡以防治水土流失。已有研究表明,狗牙根具有很强的环境适应性,可在水淹等非生物胁迫中维持较长存活时间,其主要适生性机制可能与其在胁迫环境中的气生组织发育、提升细胞还原力及解毒能力等有关^[10-12]。水淹结束后,狗牙根也可耐受高氧环境而迅速恢复生长,因此在三峡库区消落带治理实践中应用广泛^[13-14]。目前关于狗牙根对水淹生境的适生性研究多集中在生理、生化水平,而对其通过哪些信号通路响应水淹胁迫,并进一步对哪些基因的表达做出调整以适应水淹胁迫等研究未见报导。本研究以三峡库区消落带野生狗牙根为材料做水淹处理,通过转录组测序分析,研究狗牙根在水淹生境下的转录水平变化及差异表达基因,以期加深对狗牙根在水淹生境下适生性的理解,并为植物的耐淹研究和三峡库区消落带治理提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

实验用野生狗牙根来自重庆市万州区谭绍村的三峡库区自然消落带。选取长势良好、均匀一致的当年生分蘖苗随机分为未水淹对照组(A1)和 30 cm 沉水处理组(A2)。准备内径为 42 cm,高度为 22 cm 的塑料桶,桶底打孔,垫塑料纱窗后以谭绍村自然消落带湿润沙土装填土层厚度至 15 cm,分别将两组样品移栽至桶内。处理组于 2017 年 5 月在谭绍村自然消落带江边(107°87' E, 30°35' N)作 30 cm 沉水处理。处理组水淹 15 d 后可观察到狗牙根的形态学变化,同时取两组狗牙根幼嫩茎,冲洗后用液氮冷冻,并立即转移至实验室作后续处理。

1.2 试验方法

1.2.1 测序样品的制备及测序

以 Trizol 法(RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue, Takara)提取样品的总 RNA, Nanodrop 分光光度计检测样品总 RNA OD_{260/280} 在 1.8—2.2 之间,电泳检测样品总 RNA 无明显降解且 28 S 条带亮度高于 18 S 条带 1.5 倍以上。用 Oligo(dT)磁珠富集 mRNA,加入打断试剂在 Thermomixer 中将 mRNA 打断成短片段,将打断的 mRNA 反转录为双链 cDNA,末端修复后加 A 及测序接头,然后进行片段大小选择,构建文库,基于 Illumina HiSeq 4000 平台测序。

1.2.2 转录组数据分析

测序所得原始读序(Raw Reads)经过滤后得到纯净读序(Clean Reads),使用 Trinity 软件通过序列重叠得

到重叠群(Contigs),并进一步组装成转录本(Transcripts),再使用 Tgicl 软件进行聚类去冗余得到 Unigene。

使用 Blast 分别对 Unigene 作核酸序列数据库(nucleotide sequence database, Nt)、非冗余蛋白库(non-redundant protein sequence database, Nr)、蛋白质直系同源簇(cluster of orthologous groups of proteins, COG)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)和瑞士蛋白质序列数据库(Swiss protein sequence database, Swiss-Prot)注释,使用 Blast2GO 软件及 Nr 注释结果作 GO(gene ontology)注释,使用 InterProScan5 软件作 InterPro 注释。按照 Nr、Swiss-Prot、KEGG 和 COG 数据库优先顺序,选择 Unigene 的最佳比对片段作为该 Unigene 的编码序列(coding sequence, CDS),未能注释的 Unigene 使用 ESTScan 工具作进一步预测。使用 Bowtie2 软件将 clean reads 比对到 Unigene,然后基于期望最大算法(RNA-Seq expression estimation by Expectation-Maximization, RSEM)计算各个样品的基因表达水平。基于泊松分布法(PoissionDis)作差异表达基因分析,筛选标准为对比组样品间表达倍数(fold change)≥2 和错误发现率(false discover rate, FDR)<0.001;对差异表达基因作 GO 和 Pathway 功能分类及富集分析,功能和通路显著富集筛选标准均为 FDR≤0.01。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析

随机挑选 4 个差异表达基因,通过 PrimerQuest Tool 在线程序设计扩增引物,并设置扩增长度为 80—250 bp(表 1)。以 GAPDH 基因作内参,按照 Ultra SYBR Mix Kit(康为世纪公司)提供的操作流程作实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)扩增。扩增平台为 CFX connect Q-PCR 仪(Bio-Rad,美国),扩增反应程序为:95℃保持 10 min;95℃保持 15 s,60℃保持 1 min,设置 40 次循环。

表 1 实时定量 PCR 选用基因及其引物
Table 1 Genes and its primers for qRT-PCR

基因编号 Gene ID	正向引物 Forward primer (5'-3')	正向引物 Forward primer (5'-3')
GAPDH	TGTCCATGCCATGACTGCAA	CCAGTGCTGCTTGAATGATG
Unigene76585	AACATCGACTTCCAGGCCAA	TTGGAGATTGCTCGGGACTC
Unigene78381	AGGATCTGTAGTCTGCGTGC	GGCGCTGAAAAGAGCTAGGA
CL10569.Contig1	CCTGGGTATGGAGGAGGCTA	ACATACGTGGTTGCACCTCT
CL1401.Contig1	ACCAAGGAGTACGACGGGAG	CTTTGTTTGCCCGGTTTGGG

2 结果与分析

2.1 测序结果的评估及组装

A1 和 A2 组的 Total Raw Reads 分别为 90.69 Mb 和 89.06 Mb,过滤后 A1 和 A2 的 Clean Reads 分别为 73.89 Mb和 73.55 Mb。A1 和 A2 的 Clean Reads 经 Trinity 组装分别产生 200570 和 124076 条转录本。A1 和 A2 的转录本经 Tgicl 聚类去冗余分别得到 128031 和 83363 条 Unigene,总 Unigene 数目为 147256。

2.2 Unigene 的功能注释

分别基于 Nr、Nt、Swiss-prot、KEGG、COG、Interpro 和 GO 数据库作总 Unigene 注释,结果如表 2。7 个数据库可解释的 Unigene 数目为 107263,占总 Unigene 数目的 72.84%。Unigene 可注释到不同物种的数量由高到底依次为小米(*Setaria italica*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、玉米(*Zea mays*)和疫霉菌(*Phytophthora nicotianae*)。

按照 Nr、Swiss-Prot、KEGG、COG 的优先次序,得到 94879 条 Unigene 的 CDS。未注释的 Unigene 经 ESTScan 预测得到 8135 条 Unigene 参考注释。

2.3 差异表达基因分析

如表 3 所示,与未水淹对照组(A1)相比,水淹处理组(A2)共发现有 28844 条差异表达基因(differentially expressed genes, DEG),其中 11858 条 DEG 上调表达,16986 条 DEG 下调表达,上调表达变化倍数为 1.18—

14.03, 下调表达变化倍数为 1.45—11.52。DEG 在 Nr、Nt、Swiss-prot、KEGG、COG、Interpro 和 GO 数据库注释数目分别为 22160、25901、21413、22478、16063、18188 和 16439。

表 2 Unigene 功能注释

Table 2 Function annotation of Unigene

项目 Item	非冗余 蛋白库 Nr	核酸序列 数据库 Nt	瑞士蛋白质 序列数据库 Swissprot	京都基因 与基因组 百科全书 KEGG	蛋白质直系 同源簇 COG	蛋白质家族、 结构域和功能 位点数据库 Interpro	基因本体 数据库 GO	合计 Overall
数目 Number	96671	91666	62881	70943	42658	57486	52669	107263
占比 Percentage/%	65.65	62.25	42.70	48.18	28.97	39.04	35.77	72.84

Nr: 非冗余蛋白库 non-redundant protein sequence database; Nt: 核酸序列数据库 nucleotide sequence database; Swiss-Prot: 瑞士蛋白质序列数据库 Swiss protein sequence database; KEGG: 京都基因与基因组百科全书 Kyoto encyclopedia of genes and genomes; COG: 蛋白质直系同源簇 cluster of orthologous groups of proteins; InterPro: 蛋白质家族、结构域和功能位点数据库 integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites; GO: 基因本体数据库 gene ontology database

表 3 狗牙根响应水淹生境差异表达基因的数量及差异范围

Table 3 Numbers and range of differentially expressed genes (DEGs) of *Cynodon dactylon* under waterlogging

表达趋势 Expression trend	数目 Number	差异倍数范围 Range of difference multiple	差异倍数均值 Mean of difference multiple
上调表达 Up-regulation	11 858	1.18—14.03	6.76
下调表达 Down-regulation	16 986	1.45—11.52	5.47

2.4 差异表达基因 GO 功能分析

GO 分析可将 DEGs 分为生物过程 (biological process)、细胞组分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 三大功能类。由图 1 可知, 生物过程中的细胞过程、代谢过程、单生物过程、生物调节、刺激反应和定位等是水淹生境下 DEGs 富集较多的种类; 细胞组分中的细胞、细胞组分、细胞器、生物膜、细胞器组分和高分子配合物等是 DEGs 富集最多的种类; 分子功能中的催化活性、结合剂活性、转运活性、结构分子活性、核酸结合转录因子活性、电子传递体活性和抗氧化活性等是 DEGs 富集最多的种类。通过 GO 分析可知, 水淹生境下, 狗牙根的代谢过程、调节过程、细胞及组分和抗氧化等途径中的 DEGs 可能共同参与狗牙根对水淹胁迫的适生性响应。

2.5 差异表达基因 Pathway 功能分析

KEGG 数据库将 DEGs 分为细胞过程 (cellular processes)、环境信息处理 (environmental information processing)、遗传信息处理 (genetic information processing)、代谢 (metabolism) 和生物体系统 (organismal systems)。这些通路中的转录、翻译、碳水化合物的代谢和环境适应等可能在狗牙根对水淹生境的适生性过程中发挥重要作用 (图 2)。

KEGG 通路富集共检出 103 个信号通路参与狗牙根对水淹胁迫的响应。按照富集程度从大到小, 前 10 个显著富集的信号通路如表 4, 其中 Q 值表示富集程度, 它是统计推断所得 P 值经过 FDR 校正后的值, 其值越小表示富集越显著。富集结果显示, 狗牙根对水淹生境的响应及适生性由众多信号通路共同参与, 其作用方式可能包括活化抗病因子、调整物质代谢、上调光合效率、提升获氧能力和提高还原力等。

2.6 实时荧光定量 PCR 验证

为了评估转录组测序结果的可靠性, 随机挑选 Unigene76585、Unigene78381、CL10569.Contig1 和 CL1401.Contig1 等 4 个 DEGs 作 qRT-PCR 扩增。基因相对表达量 $F = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta\Delta Ct = (\text{待测样品的目的基因的 Ct 值} - \text{待测样本的管家基因的 Ct 值}) - (\text{对照样品的目的基因的 Ct 值} - \text{对照样本的管家基因的 Ct 值})$, 管家基因为 GAPDH。以 $\log_2$ -ratio 表示基于转录组和 qRT-PCR 检测的基因表达量变化, 其中 $\log_2$ -ratio = $\log_2[\text{处理组表达量} / \text{对照组表达量}]$, 设置 3 次重复。相关性分析结果显示, 两种检测方法的皮尔逊相关系数为 0.8490, $P <$

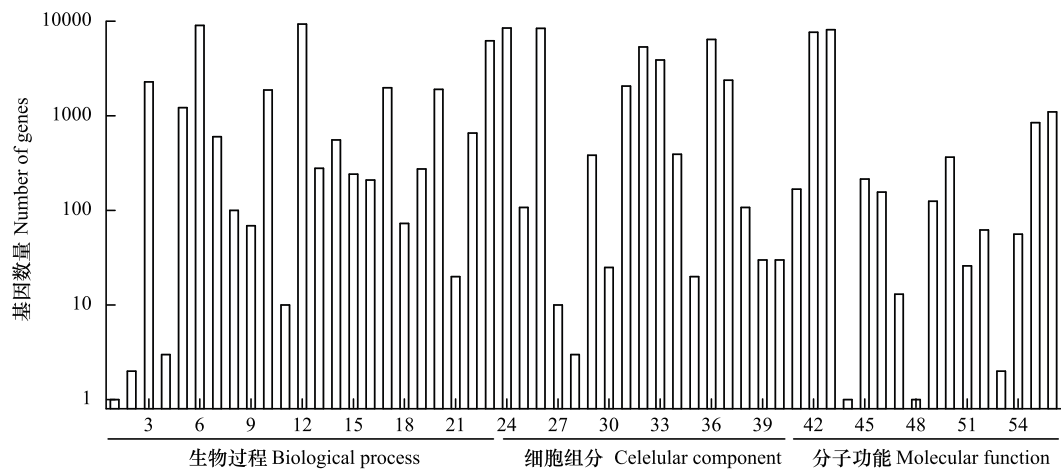


图 1 DEGs 的 GO 功能分类

Fig.1 GO functional classification of DEGs

1:生物粘附 biological adhesion;2:生物相 biological phase;3:生物调控 biological regulation;4:细胞杀伤 cell killing;5:细胞组分的组织和生物合成 cellular component organization or biogenesis;6:细胞过程 cellular process;7:发育过程 developmental process;8:发育 growth;9:免疫系统过程 immune system process;10:定位 localization;11:移动 locomotion;12:代谢过程 metabolic process;13:多机体过程 multi-organism process;14:多细胞组织过程 multicellular organismal process;15:生物过程的负调控 negative regulation of biological process;16:生物过程的正调控 positive regulation of biological process;17:生物过程调控 regulation of biological process;18:再生 reproduction;19:再生过程 reproductive process;20:刺激应答 response to stimulus;21:节律过程 rhythmic process;22:信号 signaling;23:单一的生物过程 single-organism process;24:细胞 cell;25:细胞连接 cell junction;26:细胞部件 cell part;27:细胞外外液 extracellular matrix;28:细胞外外液组分 extracellular matrix part;29:细胞间区域 extracellular region;30:细胞间区域组分 extracellular region part;31:高分子配合物 macromolecular complex;32:膜 membrane;33:膜组分 membrane part;34:膜结合腔体 membrane-enclosed lumen;35:核状体 nucleoid;36:细胞器 organelle;37:细胞器组分 organelle part;38:共质体 symplast;39:病毒体 virion;40:病毒体组分 virion part;41:抗氧化活性 antioxidant activity;42:结合剂活性 binding;43:催化活性 catalytic activity;44:通道调节因子活性 channel regulator activity;45:电荷载体活性 electron carrier activity;46:酶调节活性 enzyme regulator activity;47:鸟嘌呤核苷酸交换因子活性 guanyl-nucleotide exchange factor activity;48:金属伴侣活性 metallochaperone activity;49:分子感应器活性 molecular transducer activity;50:核苷酸结合转录因子活性 nucleic acid binding transcription factor activity;51:营养受体活性 nutrient reservoir activity;52:蛋白结合转录因子活性 protein binding transcription factor activity;53:蛋白标签 protein tag;54:受体活性 receptor activity;55:结构分子活性 structural molecule activity;56:转运因子活性 transporter activity

0.01,表明基于转录组分析 DEGs 的表达结果较为可靠(图 3)。

表 4 前 10 个显著富集的信号通路

Table 4 Top 10 signaling pathways of significant enrichment

通路 Pathway	差异表达基因数目(占比/%) Number of DEGs (percentage/%)	Q 值 Q-value	通路编号 Pathway ID
植物-病原体互作 Plant-pathogen interaction	2272 (9.85)	7.433673E-96	ko04626
RNA 运输 RNA transport	3067 (13.3)	6.049174E-59	ko03013
mRNA 监视 mRNA surveillance pathway	2601 (11.28)	1.197697E-53	ko03015
光合作用 Photosynthesis	106 (0.46)	1.081199E-09	ko00195
光合天线蛋白 Photosynthesis-antenna proteins	44 (0.19)	1.158267E-09	ko00196
植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	721 (3.13)	7.461203E-09	ko04075
卟啉和叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism	170 (0.74)	2.952624E-08	ko00860
光合作用碳固定 Carbon fixation in photosynthetic organisms	336 (1.46)	1.914865E-07	ko00710
核糖体 Ribosome	993 (4.31)	1.623489E-06	ko03010
花青素生物合成 Anthocyanin biosynthesis	40 (0.17)	6.075180E-06	ko00942

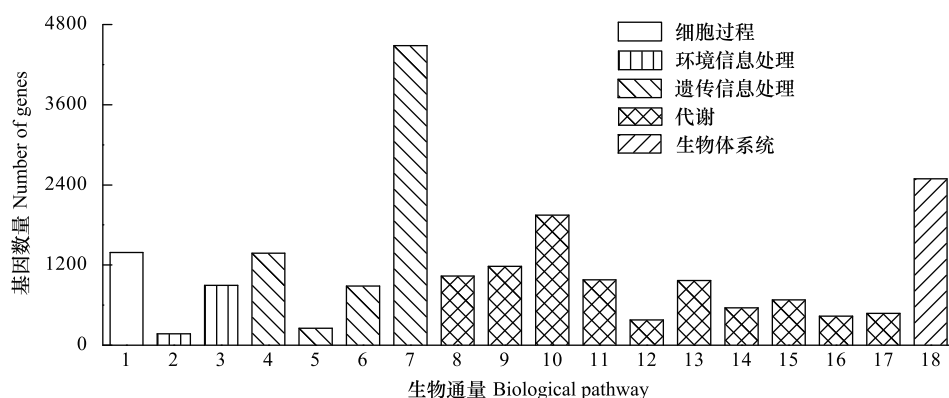


图2 DEGs的KEGG功能分类

Fig.2 KEGG functional classification of DEGs

1:转运和代谢 Transport and catabolism;2:膜转运 Membrane transport;3:信号转导 Signal transduction;4:折叠、分选和降解 Folding, sorting and degradation;5:复制和修复 Replication and repair;6:转录 Transcription;7:翻译 Translation;8:氨基酸代谢 Amino acid metabolism;9:其他次生代谢产物的生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites;10:碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism;11:能量代谢 Energy metabolism;12:多聚糖生物合成与代谢 Glycan biosynthesis and metabolism;13:脂质代谢 Lipid metabolism;14:辅助因子和维生素代谢 Metabolism of cofactors and vitamins;15:其他氨基酸代谢 Metabolism of other amino acids;16:萜类和酮类化合物的代谢 Metabolism of terpenoids and polyketides;17:核苷酸代谢 Nucleotide metabolism;18:环境适应 Environmental adaptation

3 结论与讨论

在水淹、干旱和盐碱等非生物胁迫生境下,植物可通过调整转录和翻译水平而在一定程度上表现出对环境的适应性。光线不足、缺氧或厌氧是深水淹胁迫中影响植物生长的两种主要因素。光线不足使得植物的光合作用受阻,从而限制了植物生长所需能量和物质的累积。氧气不足使得植物由有氧呼吸转变为无氧呼吸,除了抑制呼吸链而降低能量产生外,其也可产生乙醇等不完全氧化产物从而诱发细胞毒性^[15-17]。植物对水淹的响应较为复杂,通常涉及多个信号通路—既包括对光合作用、物质代谢和抗氧化等过程的适生性调整,也包括不定根及其他通气组织等形态的适生性发育^[18-21]。

本研究以筛选的三峡库区消落带适生狗牙根作水淹处理,通过转录组测序分析发现狗牙根在水淹环境下共有 28844 条差异表达基因(DEGs),其中 11858 条上调表达,16986 条下调表达。GO 功能分析显示,水淹胁迫下狗牙根 DEGs 主要富集在生物调节、细胞成分组织或组分合成、核酸结合转录因子活性等方面,这些 DEGs 共同参与了植物对水淹的响应和适生性发育,从而维持植物个体存活。进一步 KEGG 富集分析显示,狗牙根对水淹生境响应的 DEGs 来自 103 个信号通路,其中参与众多信号通路的乙烯、氧气和脱落酸(abscisic acid, ABA)等分子可能通过对碳水化合物代谢和适生性发育等过程中多个基因转录和翻译水平的调整而实现植物对水淹生境的快速响应^[22-23]。RNA 的成熟和从细胞核向细胞质转运是蛋白质翻译的基础,KEGG 富集显示,RNA 转运(RNA transport)通路中外显子拼接复合体(exon junction complex, EJC)和核转运复合物(nuclear export complex, NEC)等途径多个组分下调,即水淹生境降低了 RNA 的成熟及向细胞质转运。RNA 监视通路(RNA surveillance pathway)是检测和降解异常 mRNA 的控制途径,KEGG 富集显示,该通路中多个参与 mRNA 降解的组分水平上调。核糖体(Ribosome)信号通路涉及翻译的起始识别、延伸和终止等过程,富

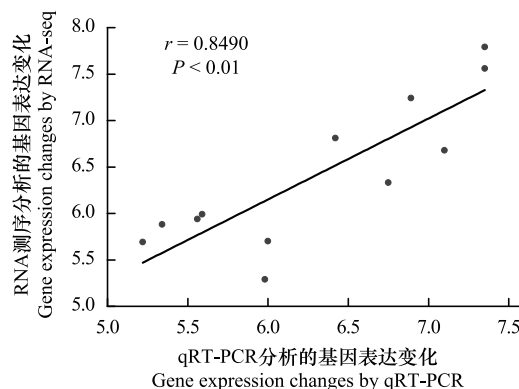


图3 转录组测序结果的实时定量 PCR 验证

Fig.3 Verification of RNA-seq by Real-time qRT-PCR

集显示,该通路中的延伸因子 ET-Tu 等组分水平下调倍数较大。由上述 3 种信号富集结果可知,狗牙根对水淹的响应和适生性总体表现为通过调整细胞核 RNA 转录、mRNA 转运、细胞质 mRNA 降解和翻译等途径中多个因子的水平从而下调细胞蛋白质合成,这与干旱、水淹等非生物胁迫中多种植物细胞内蛋白质水平调节类似^[24-27]。

提高从环境中获取氧气的能力,也是水淹生境下植物的适生性机制之一。KEGG 富集显示,植物细胞对水淹生境的适生性与植物激素信号转导(plant hormone signal transduction)通路有关,该通路中的胁迫响应信号、通气组织形成与关闭和组织发育等途径中多个组分上调。水淹生境下,通气组织的形成有利于提高植物从环境的获氧能力而维持存活,但同时也使得细胞间结构变得松散而可能导致个体死亡^[28-29]。富集显示,植物-病原互作(plant-pathogen interaction)信号通路中活性氧类(reactive oxygen species, ROS)和一氧化氮(nitric oxide, NO)的分子水平变化可能均与细胞壁的加固有关,这是因为植物在水淹等非生物胁迫下产生的 ROS 通过氧化交联作用加固细胞壁,或通过下调 NO 信号途径中 NO 水平而诱导气孔关闭以加固细胞壁^[30-33]。此外,植物在水淹生境可能发生生长性损伤,富集结果也显示,植物-病原物互作途径中多个抗病信号分子水平上调,推测这可能与狗牙根在水淹生境下受水体及水下土壤的微生物侵染而诱发对病原体的防御反应有关。

完全水淹生境下,光线不足使得光合作用受限,同时某些代谢氧化产物的累积也可能对光合器官产生毒性。富集发现,水淹生境下狗牙根通过上调光合作用(photosynthesis)、光合作用-天线蛋白(photosynthesis-antenna proteins)、卟啉与叶绿素代谢(porphyrin and chlorophyll metabolism)等 3 个信号通路中的抗氧化组分而保护光合器官。同时,水淹生境下狗牙根也上调了参与上述信号通路中的光合作用进程、光呼吸调控以及与天线蛋白、叶绿素合成有关的酶水平,这可能与提高光合效率及加速碳水化合物化合物的累积有关^[34-36]。核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, RuBisCO)在叶绿体中固定 CO₂ 而生成糖类,植物在水淹等非生物胁迫后通常会导致细胞内 RuBisCO 活性下降而引起胁迫伤害^[37]。本实验富集结果显示,较浅水淹生境下狗牙根通过上调光合生物碳固定(carbon fixation in photosynthetic organisms)信号通路中 RuBisCO 水平而提高物质累积。植物细胞中的酶和非酶抗氧化组分也参与对非生物胁迫的氧化应激适应性,其中非酶抗氧化组分如花青素、黄酮和类黄酮类等次生代谢产物可参与多种非生物胁迫环境中细胞氧化产物的清除^[38-39]。富集结果显示,水淹生境下,狗牙根细胞花青素的合成(Anthocyanin biosynthesis)信号通路中多个合成酶的表达水平上调,提高了细胞内的天竺葵素类、矢车菊素类、芍药花苷配基类花青素和丙二酰基紫苏宁花色苷等水平,从而增加了狗牙根在水淹生境的氧化耐受性。

植物对水淹的响应和适生性是一个包含多个信号通路中的众多基因共同参与、相互协调的复杂过程。本研究对前期筛选的三峡库区消落带野生狗牙根在水淹生境下的转录组信息作了初步挖掘分析,为后续筛选狗牙根耐水淹关键调控基因和功能基因提供参考。此外,转录组数据中还存在大量的未注释序列,对其进一步的分析挖掘将有助于加深植物对水淹响应和适生性的理解。

参考文献(References):

- [1] Liu X R, Jin M H, Li D L, Zhang L. Strength deterioration of a Shaly sandstone under dry-wet cycles: a case study from the Three Gorges Reservoir in China. *Bulletin of Engineering Geology and the Environment*, 2017, doi: 10.1007/s10064-017-1107-3.
- [2] 吕发友, 鲍玉海, 贺秀斌, 张淑娟, 唐强, 王铭烽, 曹植菁. 三峡水库消落带淹水-落干交替下紫色土力学特性变化模拟. *水土保持学报*, 2017, 31(3): 79-84.
- [3] 张广纳, 邵景安, 王金亮, 倪九派, 谢德体. 三峡库区重庆段农村面源污染时空格局演变特征. *自然资源学报*, 2015, 30(7): 1197-1209.
- [4] 马骏, 李昌晓, 魏虹, 马朋, 杨予静, 任庆水, 张雯. 三峡库区生态脆弱性评价. *生态学报*, 2015, 35(21): 7117-7129.
- [5] Wang Q, Yuan X Z, Liu H, Zhang Y M, Cheng Z L, Li B. Effect of long-term winter flooding on the vascular flora in the drawdown area of the Three Georges Reservoir, China. *Polish Journal of Ecology*, 2012, 60(1): 95-106.
- [6] 湛芸, 何丙辉, 陈彩霞, 刘志鹏, 彭石磊. 三峡库区陡坡根-土复合体抗冲性能. *生态学报*, 2016, 36(16): 5173-5181.
- [7] 饶丽, 朱振亚. 三峡库区消落带环境整治与生态修复调查研究. *环境影响评价*, 2016, 38(3): 77-80.
- [8] 赵洋, 饶良懿, 周紫璇. 中国水库消落带生物治理研究综述. *环境科学与技术*, 2016, 39(12): 71-79.
- [9] 朱妮妮, 郭泉水, 秦爱丽, 裴顺祥, 马凡强, 朱莉, 简尊吉. 三峡水库奉节以东秭归和巫山段消落带植物群落动态特征. *生态学报*, 2015, 35(23): 7852-7867.

- [10] 陈锦平, 曾成城, 魏虹, 刘媛, 王振夏, 贾中民. 不同水淹下狗牙根——牛鞭草混作对植株生物量的影响. 生态学报, 2017, 37(4): 1111-1118.
- [11] 韩文娇, 白林利, 李昌晓. 水淹胁迫对狗牙根光合、生长及营养元素含量的影响. 草业学报, 2016, 25(5): 49-59.
- [12] 张志永, 程丽, 李春辉, 胡红青, 万成炎. 三峡水库淹没水深对消落带植物牛鞭草和狗牙根生长及抗氧化酶活性的影响. 水生态学杂志, 2016, 37(3): 49-55.
- [13] 李兆佳, 熊高明, 邓龙强, 谢宗强, 樊大勇. 狗牙根与牛鞭草在三峡库区消落带水淹结束后的抗氧化酶活力. 生态学报, 2013, 33(11): 3362-3369.
- [14] 裴顺祥, 洪明, 郭泉水, 秦爱丽, 朱莉, 朱妮妮. 三峡库区消落带水淹结束后狗牙根的光合生理生态特性. 生态学杂志, 2014, 33(12): 3222-3229.
- [15] Ismail A M, Ella E S, Vergara G V, Mackill D J. Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (*Oryza sativa*). Annals of Botany, 2009, 103(2): 197-209.
- [16] Loreti E, Van Veen H, Perata P. Plant responses to flooding stress. Current Opinion in Plant Biology, 2016, 33: 64-71.
- [17] Voisenek L A C J, Sasidharan R, Visser E J W, Bailey-Serres J. Flooding stress signaling through perturbations in oxygen, ethylene, nitric oxide and light. New Phytologist, 2016, 209(1): 39-43.
- [18] Dos Santos Junior U M, De Carvalho Gonçalves J F, Strasser R J, Fearnside P M. Flooding of tropical forests in central Amazonia: what do the effects on the photosynthetic apparatus of trees tell us about species suitability for reforestation in extreme environments created by hydroelectric dams? Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(8): 166.
- [19] Shimamura S, Yoshioka T, Yamamoto R, Hiraga S, Nakamura T, Shimada S, Komatsu S. Role of abscisic acid in flood-induced secondary aerenchyma formation in soybean (*Glycine max*) hypocotyls. Plant Production Science, 2014, 17(2): 131-137.
- [20] Vidoz M L, Mignolli F, Aispuru H T, Mroginski L A. Rapid formation of adventitious roots and partial ethylene sensitivity result in faster adaptation to flooding in the *aerial roots* (*aer*) mutant of tomato. Scientia Horticulturae, 2016, 201: 130-139.
- [21] Yordanova R Y, Popova L P. Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. Acta Physiologiae Plantarum, 2007, 29(6): 535-541.
- [22] Voisenek L A C J, Sasidharan R. Ethylene-and oxygen signalling-drive plant survival during flooding. Plant Biology, 2013, 15(3): 426-435.
- [23] Yin X J, Komatsu S. Quantitative proteomics of nuclear phosphoproteins in the root tip of soybean during the initial stages of flooding stress. Journal of Proteomics, 2015, 119: 183-195.
- [24] Goetz A E, Wilkinson M. Erratum to: stress and the nonsense-mediated RNA decay pathway. Cellular and Molecular Life Sciences, 2017, 74(21): 4047-4047.
- [25] Bensenor L B, Vazquez M S, Boccaccio G L. Common themes in RNA subcellular transport, stress granule formation and abnormal protein aggregation. Current Chemical Biology, 2011, 5(2): 77-89.
- [26] Chinnusamy V, Gong Z, Zhu J K. Nuclear RNA export and its importance in abiotic stress responses of plants // Reddy A S N, Golovkin M, eds. Nuclear pre-mRNA Processing in Plants. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008: 235-255.
- [27] Park Y R, Choi M J, Park S J, Kang H. Three zinc-finger RNA-binding proteins in *cabbage* (*Brassica rapa*) play diverse roles in seed germination and plant growth under normal and abiotic stress conditions. Physiologia Plantarum, 2017, 159(1): 93-106.
- [28] Daneva A, Gao Z, Van Durme M, Nowack M K. Functions and regulation of programmed cell death in plant development. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2016, 32: 441-468.
- [29] Pramanik M, Shelley I J, Adhikary D, Islam M O. Carbohydrate reserve and aerenchyma formation enhance submergence tolerance in rice. Progressive Agriculture, 2016, 27(3): 256-264.
- [30] Le Gall H, Philippe F, Domon J M, Gillet F, Pelloux J, Rayon C. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. Plants, 2015, 4(1): 112-166.
- [31] Houston K, Tucker M R, Chowdhury J, Shirley N, Little A. The plant cell wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 984.
- [32] Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Riberio D. Nitric oxide, stomatal closure and abiotic stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2007, 146(4S): S257.
- [33] Ploschuk R A, Grimoldi A A, Ploschuk E L, Striker G G. Growth during recovery evidences the waterlogging tolerance of forage grasses. Crop & Pasture Science, 2017, 68(6): 574-582.
- [34] Kirst H, Gabilly S T, Niyogi K K, Lemaux P G, Melis A. Photosynthetic antenna engineering to improve crop yields. Planta, 2017, 245(5): 1009-1020.
- [35] Long S P, Marshall-Colon A, Zhu X G. Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. Cell, 2015, 161(1): 56-66.
- [36] Walker B J, Vanlooche A, Bernacchi C J, Ort D R. The costs of photorespiration to food production now and in the future. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67: 107-129.
- [37] Li X N, Cai J, Liu F L, Dai T B, Cao W X, Jiang D. Physiological, proteomic and transcriptional responses of wheat to combination of drought or waterlogging with late spring low temperature. Functional Plant Biology, 2014, 41(7): 690-703.
- [38] Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Michael A J, Tohge T, Yamazaki M, Saito K. Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. Plant Journal, 2014, 77(3): 367-379.
- [39] Martinez V, Mestre T C, Rubio F, Girones-Vilaplana A, Moreno D A, Mittler R, Rivero R M. Accumulation of flavonols over hydroxycinnamic acids favors oxidative damage protection under abiotic stress. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 838.