

DOI: 10.5846/stxb202012103153

刘鹏, 毕江涛, 李文兵, 惠治兵, 肖国举, 孙权, 王静. 生物有机肥对盐碱地水稻叶片的影响转录组分析. 生态学报, 2022, 42(6): 2342-2356.

Liu P, Bi J T, Li W B, Hui Z B, Xiao G J, Sun Q, Wang J. Transcriptome analysis of the effect of bio-organic fertilizer on rice leaves. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(6): 2342-2356.

# 生物有机肥对盐碱地水稻叶片的影响转录组分析

刘 鹏<sup>1</sup>, 毕江涛<sup>2,\*</sup>, 李文兵<sup>1</sup>, 惠治兵<sup>1</sup>, 肖国举<sup>2</sup>, 孙 权<sup>1</sup>, 王 静<sup>2</sup>

1 宁夏大学农学院, 银川 750021

2 宁夏大学生态环境学院, 银川 750021

**摘要:**改良修复盐碱地对保障粮食安全和守护耕地红线具有重要意义, 种植水稻配施生物有机肥是修复改良盐碱地的一项有效措施。基于生物有机肥肥料效应, 测定水稻灌浆期农艺性状, 开展叶片转录组测序, 通过基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库分析差异基因的生物学功能和代谢通路, 以期揭示生物有机肥对盐碱地水稻的潜在促生机制。试验共设置 4 个处理, 生物有机肥+化肥 (T1)、生物有机肥灭活+化肥 (T2)、化肥 (T3) 和空白对照 (T4), 结果表明, 施用生物有机肥能够显著提高水稻叶面积和叶绿素、植株分蘖数和干物质量 ( $P < 0.05$ ); T2vsT1、T3vsT1、T4vsT1、T4vsT3 差异基因数量分别为 6593、4796、6976 和 1866 条, 生物有机肥配施化肥引起差异基因表达数量最高, 其次为灭活生物有机肥, 单施化肥最小; GO 分析显示, 生物有机肥主要影响水稻叶片肽和酰胺的生物合成与代谢、翻译过程、细胞器及细胞器膜等, 化肥对水稻叶片生物学过程影响的差异基因无显著富集 ( $P > 0.05$ ); KEGG 分析表明, 施用生物有机肥差异显著基因主要富集在核糖体和能量代谢相关途径, 核糖体相关基因差异表达较多, 可能存在水稻响应生物有机肥的重要调节基因, 能量代谢途径涉及光合作用和光合作用-天线蛋白, 光合作用-天线蛋白代谢通路相关基因显著上调, T4vsT1 光合作用及光合作用-天线蛋白上调基因数量大于 T3vsT1, T3vsT1 大于 T4vsT3, 表明施用生物有机肥能够提高叶片捕光能力, 增强光合作用, 并且生物有机肥配施化肥效果优于单施生物有机肥或化肥, T2vsT1、T3vsT1、T4vsT1 处理比较表明植物激素信号传导中类胡萝卜素合成基因上调, 水稻抗逆性增强, 植物-病原体相互作用代谢通路基因在 T3vsT1 和 T4vsT1 中上调数量大于下调数量, 表明生物有机肥及生物有机肥配施化肥对提高水稻抗病性具有一定的促进作用; 耐盐基因转录因子分析显示, 微生物引起水稻叶片响应盐胁迫的转录因子有 111 条, 生物有机肥 93 条, 生物有机肥配施化肥 97 条, 化肥 40 条, 表明施用生物有机肥能有效促进植物响应盐胁迫基因表达, 增强水稻耐盐性。因此, 盐碱地施用生物有机肥能够显著影响水稻核糖体和光合作用基因上调表达, 抗逆基因上调趋势明显, 这对揭示生物有机肥促进盐碱地水稻生长潜在机制具有一定的理论价值。

**关键词:**生物有机肥; 盐碱地; 水稻; 转录组; 差异基因表达; 转录调控

## Transcriptome analysis of the effect of bio-organic fertilizer on rice leaves

LIU Peng<sup>1</sup>, BI Jiangtao<sup>2,\*</sup>, LI Wenbing<sup>1</sup>, HUI Zhibing<sup>1</sup>, XIAO Guoju<sup>2</sup>, SUN Quan<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>

1 School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

2 School of Ecology and Environment, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

**Abstract:** Reclamation and restoration of saline-alkali land is of great significance for ensuring food security and protecting the red line of arable land. Planting rice and applying bio-organic fertilizer is an effective measure to remediate and improve saline-alkali land. Based on fertilizer effect of the bio-organic fertilizer, this research is conducted with measuring agronomic traits of rice at the filling stage and analyzing leaf transcriptome sequencing and the biological functions and metabolic pathways of differential genes through Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

**基金项目:**国家重点研发计划项目 (2016YFC0501302-2); 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2018ZDKJ0312)

**收稿日期:**2020-12-10; **网络出版日期:**2021-11-26

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: bi\_jt@nxu.edu.cn

databases in order to reveal the potential growth-promoting mechanism of the bio-organic fertilizer on rice grown in saline-alkaline soil. A total of four treatments were set up in the experiment, bio-organic fertilizer+chemical fertilizer (T1), bio-organic fertilizer inactivation+chemical fertilizer (T2), chemical fertilizer (T3), and blank control (T4). The results showed that the application of the bio-organic fertilizer could significantly improve rice leaf area and content of chlorophyll, number of tillers, and dry matter quantity ( $P < 0.05$ ); The number of differential genes of T2vsT1, T3vsT1, T4vsT1, and T4vsT3 was 6593, 4796, 6976 and 1866, respectively, and the quantity of differential gene expression was the largest for bio-organic fertilizer combined with chemical fertilizer, then for inactivated bio-organic fertilizer, the least for treatment of chemical fertilizer; GO analysis showed that the application of bio-organic fertilizer mainly influenced the biosynthesis and metabolism of rice leaf peptides and amides, translation processes, organelles and organelle membranes, etc., the differential genes were not significantly enriched ( $P > 0.05$ ) for biological processes of rice leaves affected by chemical fertilizers; KEGG analysis showed that the significantly different genes in the application of bio-organic fertilizer were mainly enriched in the ribosome and energy metabolism-related pathways, and ribosome-related genes expressed more differentially, perhaps there were important regulatory genes for rice to respond to the bio-organic fertilizer, the energy metabolism pathway involved photosynthesis and photosynthesis-antenna protein, the photosynthesis-antenna protein metabolism pathway-related genes were significantly up-regulated, and the number of photosynthesis and photosynthesis-antenna protein up-regulated genes in T4vsT1 greater than T3vsT1, T3vsT1 greater than T4vsT3, indicating that the application of bio-organic fertilizer could improve the light-harvesting ability of leaves and enhance photosynthesis, and the effect of bio-organic fertilizer combined with chemical fertilizer was better than that of single application of biological organic fertilizer or chemical fertilizer, T2vsT1, T3vsT1, and T4vsT1 treatment comparisons revealed that in plant hormone signal transduction the carotenoid synthesis genes were up-regulated and rice stress resistance enhanced, the number of up-regulated genes for plant-pathogen interaction metabolic pathway in T3vsT1 and T4vsT1 was more than down-regulated, indicating that the bio-organic fertilizer and bio-organic fertilizer combined with chemical fertilizer has a certain promotion effect on improving rice disease resistance. The analysis of salt-tolerant gene transcription factors showed that there were 111 transcription factors that caused rice leaves to respond to salt stress by microorganisms, 93 by bio-organic fertilizers, 97 by bio-organic fertilizers combined with chemical fertilizers, and 40 by chemical fertilizers, indicating that bio-organic fertilizer could effectively promote the expression of genes in response to salt stress in plants and enhance the salt tolerance of rice. Therefore, the application of bio-organic fertilizer in saline-alkali soil can significantly affect the up-regulation of rice ribosomal and photosynthetic genes, and the trend of up-regulation of stress resistance genes is obvious, it has a certain theoretical value for revealing the potential mechanism of rice growth promotion by bio-organic fertilizer in saline-alkali soil.

**Key Words:** bio-organic fertilizer; saline-alkaline soil; rice; transcriptome; differential gene expression; transcriptional regulation

盐渍土又称盐碱土是盐土和碱土以及不同程度盐化和碱化土壤的统称<sup>[1]</sup>,严重影响植物生长发育和农业生产力的发展<sup>[2-3]</sup>。盐胁迫会导致植物体内产生渗透胁迫和离子毒害作用,间接影响植物的光合作用、能量代谢、膜透性和生长发育<sup>[4]</sup>。水稻是我国四大主粮之一,种植水稻是生物改良盐碱地的一种有效途径<sup>[5]</sup>,但在盐碱胁迫下水稻整个生育周期性状都会受到影响,叶片逐渐变短、变小,颜色随之变浅<sup>[6]</sup>,植株生物量和分蘖能力下降,产量降低<sup>[7-8]</sup>。随着人口不断增加,耕地面积逐渐减少,开发利用盐碱地对增加耕地资源,改善生态环境具有重要意义<sup>[9-10]</sup>。

盐碱地修复改良方法主要为水利工程、化学、生物等措施<sup>[11]</sup>,生物修复包括植物和微生物修复,具有投入低、修复效果好、生态效益高等优点<sup>[12-13]</sup>。生物有机肥在盐碱地修复改良中发挥着重要的作用,既能作为传统有机肥增加土壤有机质和养分、改善物理结构<sup>[14-16]</sup>,又能外源输入有益微生物,调节土壤微生物群落结构,

抑制病虫害<sup>[17-18]</sup>,改善作物水分状况、膜完整性和光合作用<sup>[19]</sup>,还可以减轻作物盐碱胁迫、提高作物产量及品质<sup>[20-22]</sup>,减轻化肥过量使用造成的环境污染<sup>[23]</sup>。

高通量 RNA-Seq 技术作为揭示植物响应盐胁迫分子机制的重要手段,已取得了多项重要成果。张丽丽和张富春研究发现<sup>[24]</sup>,盐生植物盐穗木(*Halostachys caspica*)能够通过促进渗透调节和活性氧清除,提高短期盐胁迫适应能力;董明等<sup>[25]</sup>研究表明,高粱在盐胁迫下光合作用受到抑制,激素信号和类黄酮的合成在响应盐胁迫中发挥着重要作用;在水稻响应盐胁迫中,翻译调控<sup>[26]</sup>、脱落酸和油菜素甾醇等植物激素信号<sup>[27-29]</sup>、酚类和类黄酮物质合成<sup>[30]</sup>、Ca<sup>2+</sup>信号转导、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联、转录因子(TFs)、转录调节因子(TRs)、蛋白激酶(PKs)和其他关键功能蛋白起着重要作用<sup>[31]</sup>。

施用生物有机肥能有效修复改良盐碱地、改善水稻农艺性状<sup>[32]</sup>,但在基因表达水平上知之甚少。本研究采用转录组测序技术,对生物有机肥不同处理下水稻叶片差异基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,功能和代谢通路注释,为探究生物有机肥对盐碱地水稻生长影响的生物学机制提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

本试验地位于宁夏回族自治区银川市贺兰县金贵镇银光村(106.43°E,38.49°N),属于温带大陆性季风气候,全年日照时数 2851—3106 h,有效积温 1534.9℃,年降水量 200 mm 左右,时空分布不均,多集中在 6—9 月。试验地土壤为淤灌土,pH 8.40、全盐 1.83 g/kg、有机质 9.9 g/kg、全氮 1.18 g/kg、全磷 0.59 g/kg、解碱氮 42 mg/kg、有效磷 3.38 mg/kg、速效钾 320 mg/kg,属于轻度盐碱土。

### 1.2 试验设计

试验采用随机区组排列,小区面积 20 m<sup>2</sup>(5 m×4 m),小区之间起垄覆膜,单独排灌。水稻育苗插秧种植,品种为宁粳 48 号。供试生物有机肥配方及(嗜)耐盐菌种均由课题组提供,宁夏某生态肥业有限公司生产,配料中加入硅元素制成盐碱地水稻专用生物有机肥[N+P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+K<sub>2</sub>O>5%,有机质>45.0%,有效活菌数(枯草芽孢杆菌、多黏类芽孢杆菌、盐单胞菌、乳酸菌、光合细菌等)>500 亿/kg];供试化肥为市售磷酸二铵(含 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 46%,N 18%)。试验共设置 4 个处理,T1:生物有机肥+化肥,T2:生物有机肥灭活+化肥,T3:化肥,T4:空白对照(不施肥)。生物有机肥作为基肥,施用量为 1500 kg/hm<sup>2</sup>;化肥施用量为当地农户施肥习惯的 1/2,施用量为 213.75 kg/hm<sup>2</sup>,按照基肥、分蘖肥、穗肥 5:3:2 的量施用,水肥管理与大田一致。

### 1.3 水稻农艺性状测定

水稻灌浆期测定健康植株叶绿素含量、叶面积指数、株高、根长、有效分蘖数,干物质量。叶绿素含量用 SPAD-502 便携式叶绿素仪测定;叶长、株高、根长用钢卷尺测量;叶宽用游标卡尺测量;用长宽矫正法来测定叶面积(叶面积指数=叶片长×宽×0.75)<sup>[33]</sup>;干物质量采用烘干法测定,每个处理取 15 个重复。

### 1.4 样品采集

取水稻灌浆后期叶片,用无菌水洗去灰尘后装入 2 mL 冻存管中,随即放入液氮中速冻,干冰送样,委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成 RNA 的提取、质控、建库及 Illumina HiSeqTM 测序,每个处理取 3 次重复。

### 1.5 文库构建及测序

提取样品 RNA,总量 ≥ 1 μg,通过 Oligo(dT)磁珠富集水稻叶片中带有 poly A 尾的 mRNA,随后在 NEB Fragmentation Buffer 中用二价阳离子将得到的 mRNA 随机打断。以片段化的 mRNA 为模版,随机寡核苷酸为引物,在 M-MuLV 逆转录酶体系中合成 cDNA 第一条链,然后用 RNaseH 降解 RNA 链,并在 DNA polymerase I 体系下,以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第二条链。纯化后的双链 cDNA 经过末端修复,加 A 尾并连接测序接头,用 AMPure XP beads 筛选 250—300 bp 左右的 cDNA,进行 PCR 扩增并再次使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物,最终获得文库,然后进行转录组测序。

### 1.6 数据处理与分析

利用 clusterProfiler 3.4.4 软件进行差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析, $P < 0.05$  作为显著性富集的阈

值;利用 SPSS 软件对叶绿素相对含量、有效分蘖数、根长、叶面积和干物质重量进行方差分析、多重比较,株高进行非参数检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同生物有机肥处理对水稻生长的影响

由表 1 可知,施用生物有机肥+化肥后,水稻叶片中叶绿素含量、有效分蘖数、根长、叶面积和干物质重量均显著高于化肥和空白对照( $P<0.05$ ),株高也大于其他处理,说明施用生物有机肥能有效促进盐碱地水稻生长。

表 1 水稻灌浆期农艺性状

Table 1 Agronomic characters of rice at grain filling stage

处理 Treatment	叶绿素相对含量 Relative content of chlorophyll	有效分蘖数 Number of effective tillers/(个/株)	株高 Plant height/cm	根长 Root length/cm	叶面积 Leaf area/cm <sup>2</sup>	干物质重量 Dry matter weight/g
T1	43.95±3.61Aa	2.67±0.72Aa	98.89±4.99Aa	18.14±2.45Aa	22.23±5.95Aa	15.65±4.08Aa
T2	41.33±3.37ABa	2.07±0.70ABb	98.33±7.76Aa	16.50±2.34ABab	25.50±5.41Aa	14.08±4.06ABab
T3	38.19±3.54BCb	1.67±0.62Bbc	91.90±8.52Bb	15.80±3.22ABb	13.82±4.8Bb	11.71±2.83BCbc
T4	36.63±4.37Cb	1.53±0.64Bc	81.33±8.12Cc	14.73±2.12Bb	12.21±4.53Bb	10.51±2.37Cc

T1:生物有机肥+化肥 Bio-organic fertilizer+chemical fertilizer;T2:生物有机肥灭活+化肥 Bio-organic fertilizer inactivation+chemical fertilizer;T3:化肥 Chemical fertilizer;T4:空白对照 Blank control;表中数据为平均值±标准差,同列数据不同大、小写字母分别表示不同处理间差异达 0.01、0.05 水平;Q20:测序质量值≥20 的碱基所占的百分比 Percentage of bases with a sequencing quality value greater than or equal to 20;Q30:测序质量值≥30 的碱基所占的百分比 Percentage of bases with a sequencing quality value greater than or equal to 30;

GC: G 和 C 两种碱基所占总碱基的百分比 Percentage of G and C bases in total bases

### 2.2 测序质量分析

为了保证数据分析的质量,在分析前对原始数据进行处理,去掉带接头、含无法确定碱基信息、低质量(Qphred≤20 的碱基数占整个 read 长度的 50%以上)的 reads,统计见表 2。整体上,每个样品最终得到 4000—7000 万条 Clean reads, Q20 为 96.86%—98.33%, Q30 为 91.87%—95.09%, GC 含量为 50.04%—55.22%,数据整体测序错误率为 0.03%,小于 1%,表明测序质量良好,数据可用于后续生物信息学分析。

表 2 转录组测序数据统计

Table 2 Statistics of transcriptome sequencing data

样品名 Sample	原始 read Total raw reads	过滤后 read/% Total clean reads	测序错误率/% error rate	Q20 比例 Q20%	Q30 比例 Q30%	GC 比例 GC%
T1-1	64088278	63393898(98.92%)	0.03	96.92	91.91	51.23
T1-2	50907448	50243748(98.7%)	0.03	97.29	92.64	51.56
T1-3	56069862	55243950(98.53%)	0.03	97.45	92.97	51.32
T2-1	57616424	56456528(97.99%)	0.03	97.29	92.68	52.08
T2-2	53123648	52425186(98.69%)	0.03	97.54	93.18	50.04
T2-3	42212280	40813840(96.69%)	0.02	98.33	95.09	50.81
T3-1	42482600	41989962(98.84%)	0.03	96.95	91.89	52.86
T3-2	47412764	46801644(98.71%)	0.03	97.12	92.28	51.14
T3-3	50198746	49472502(98.55%)	0.03	97.30	92.60	50.51
T4-1	45064262	44278554(98.26%)	0.03	97.29	92.6	50.9
T4-2	46393136	45339886(97.73%)	0.03	96.86	91.87	51.91
T4-3	58827290	57934848(98.48%)	0.03	96.94	92.01	51.28

T1-1、T1-2、T1-3、T2-1、T2-2、T2-3、T3-1、T3-2、T3-3、T4-1、T4-2、T4-3 分别为不同处理的 3 个生物学重复。

### 2.3 不同处理差异表达基因分析

利用 DESeq 2 软件比较生物有机肥不同处理下水稻叶片的基因,以  $P < 0.05$  且  $|\log_2\text{FoldChange}| > 0.0$  作为筛选基准,图 1 为差异基因表达火山图,T2 和 T1 之间检测到差异基因 6593 条,说明生物有机肥中的微生物在参与调控水稻叶片基因表达中发挥了重要作用;T4 和 T3 之间的 1866 条差异基因是由施用化肥引起的,T3 和 T1 之间的 4796 条差异基因是由生物有机肥引起的,说明生物有机肥对水稻叶片基因调控作用大于化肥;

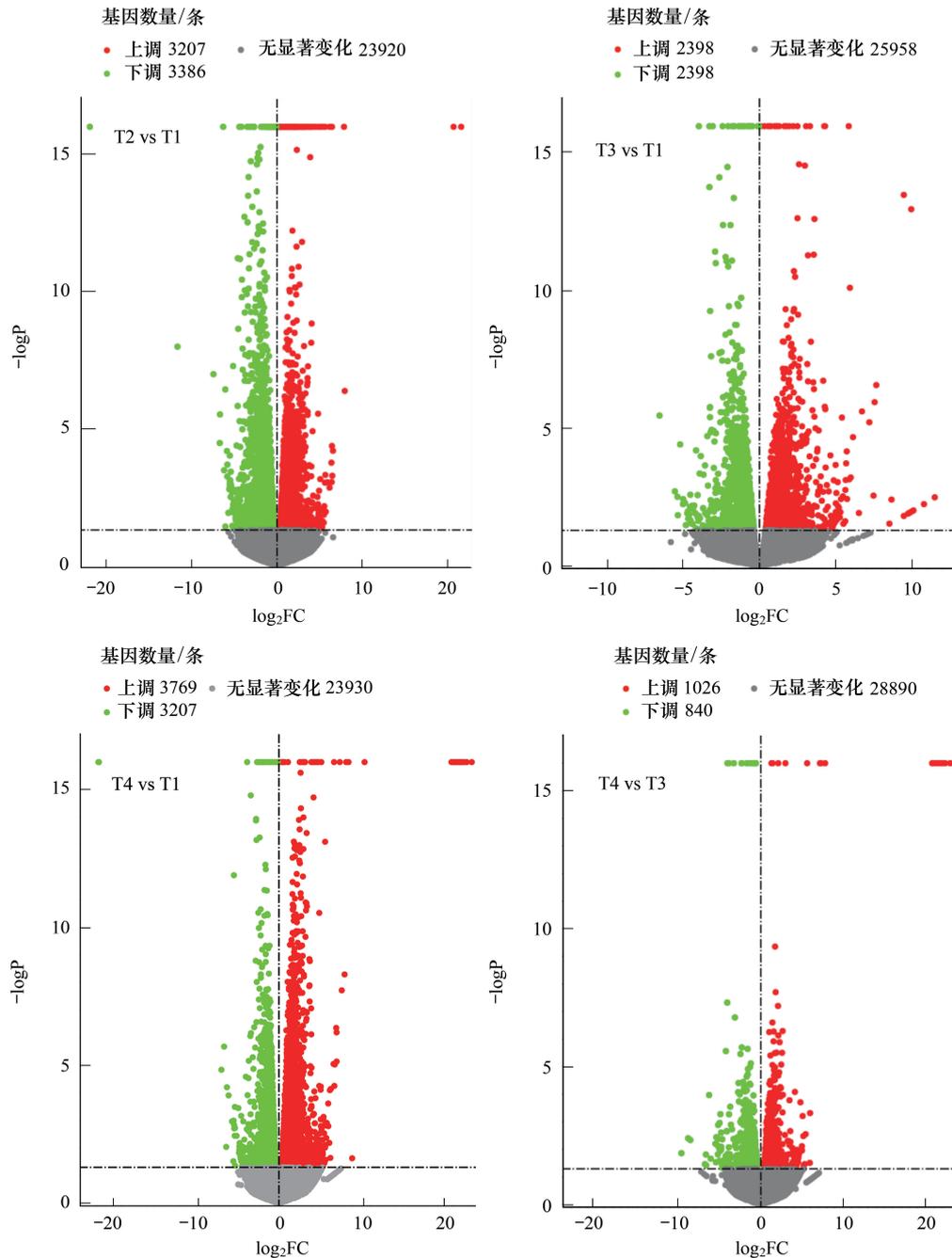


图 1 基因火山图

Fig.1 Volcano map of gene

T1:生物有机肥+化肥 Bio-organic fertilizer+chemical fertilizer; T2:生物有机肥灭活+化肥 Bio-organic fertilizer inactivation+chemical fertilizer; T3:化肥 Chemical fertilizer; T4:空白对照 Blank control; vs: 两组样品中的基因表达比较,将 vs 之前的定义为表达量为 1; FC: 表示两样品(组)间表达量的比值 Fold Change

T4 和 T1 之间检测到差异基因 6976 条,高于 T4vsT3 与 T3vsT1 差异基因数量之和,说明生物有机肥与化肥对水稻基因调控作用具有协同作用。生物有机肥对水稻基因表达具有重要意义,因此对其进行进一步进行 GO 功能富集与 KEGG 富集分析。

#### 2.4 差异转录基因的 GO 富集分析

将得到的目标基因进行 GO 功能富集分析能够确定差异基因的主要生物学功能,即生物学过程、细胞组分、分子功能三个主类。T2vsT1 结果注释差异基因共 4780 条,其中生物学过程 1643 条,细胞组成 635 条,分子功能 2502 条,分别占比 34.37%、13.28%、52.34%,由此可以看出大多数差异基因与分子功能显著相关,各组分最显著的 10 个 Term 见图 2,生物学过程方面主要表现在翻译、肽生物合成和代谢、酰胺生物合成和代谢、有机氮化合物的生物合成、DNA 构象变化等方面;在细胞组分中,主要参与核糖体、细胞内核糖核蛋白复合物、核糖核蛋白复合体、非膜细胞器、细胞内非膜细胞器、细胞质部分、细胞质等方面;在分子功能中,主要集中在核糖体的结构成分和结构分子活性等方面。

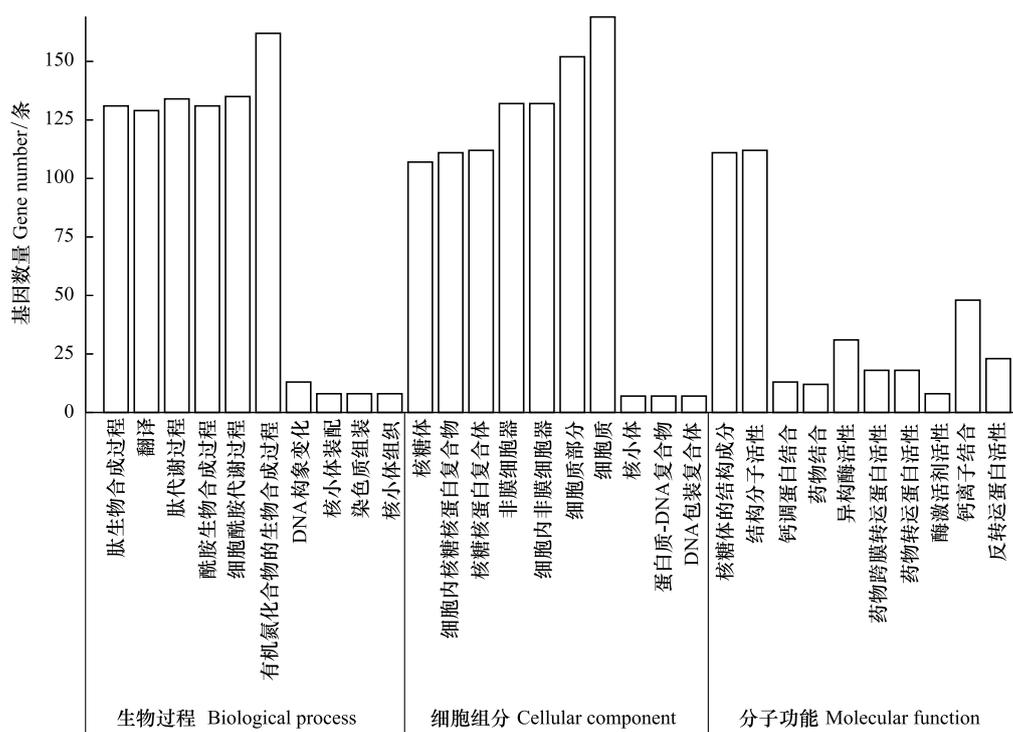


图 2 T2vsT1 差异基因本体功能富集分析

Fig.2 T2vsT1 differential gene ontology function enrichment analysis

T3vsT1 共注释到差异基因 3829 条,生物学过程 1335 条,细胞组成 506 条,分子功能 1988 条,分别占比 34.87%、13.21%、51.92%,可以看出施用生物有机肥影响水稻叶片的分子功能,各组分最显著的 10 个 Term 见图 3,生物学过程主要表现在光合作用、翻译、肽生物合成与代谢、酰胺生物合成与代谢;细胞组分中,主要参与类囊体、类囊体部分、光系统、膜蛋白复合物、光合膜、核糖体、光系统 II、高尔基体相关囊泡、高尔基体相关囊泡膜、细胞质部分、核糖核蛋白复合体、细胞质和细胞内核糖核蛋白复合物等方面;在分子功能中,主要集中在结构分子活性、核糖体的结构成分、转录因子活性,序列特异性 DNA 结合、核酸结合转录因子活性等方面。

T4vsT1 共注释到差异基因 5252 条,生物学过程 1840 条,细胞组成 731 条,分子功能 2681 条,分别占比 35.03%、13.92%、51.05%,说明生物有机肥与化肥联合作用能有效促进叶片基因差异表达,各组分最显著的 10 个 Term 见图 4,生物学过程主要表现在翻译、肽生物合成与代谢、细胞酰胺生物合成与代谢、有机氮化合物的生物合成、光合作用、蛋白质转运等方面;细胞组分中,主要参与核糖体、核糖核蛋白复合体、细胞内核糖核

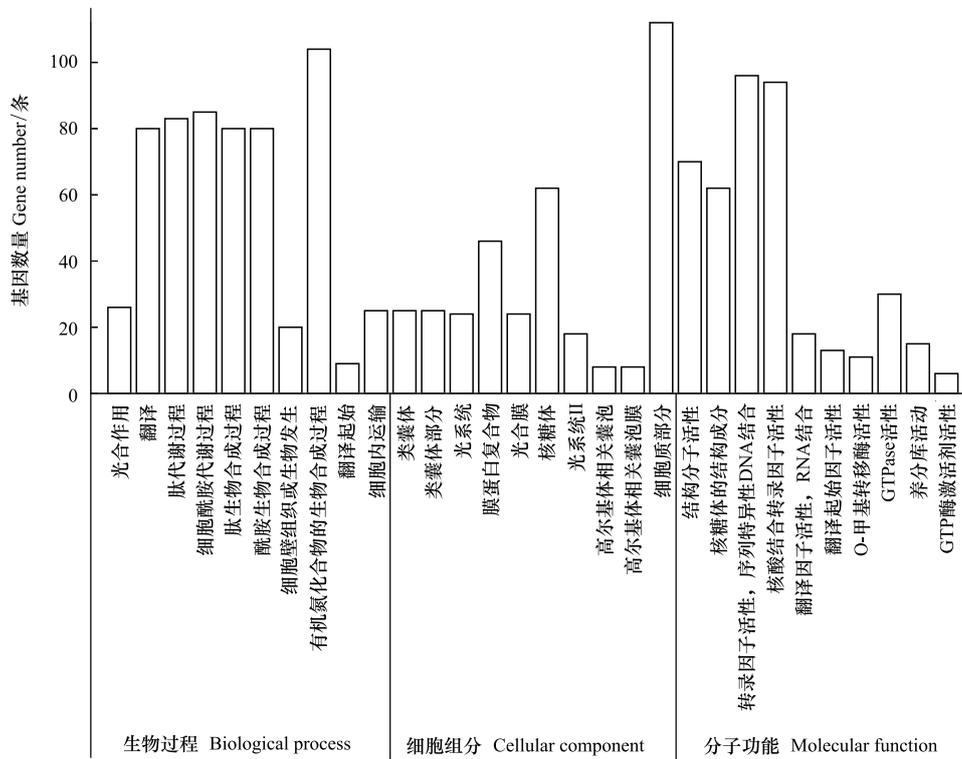


图3 T3vsT1 差异基因本体功能富集分析

Fig.3 T3vsT1 differential gene ontology function enrichment analysis

蛋白复合物、细胞质部分、细胞质、非膜细胞器、细胞内非膜细胞器等方面;在分子功能中,主要集中在结构分子活性、核糖体的结构成分、RNA 结合、翻译因子活性, RNA 结合、rRNA 结合等方面。

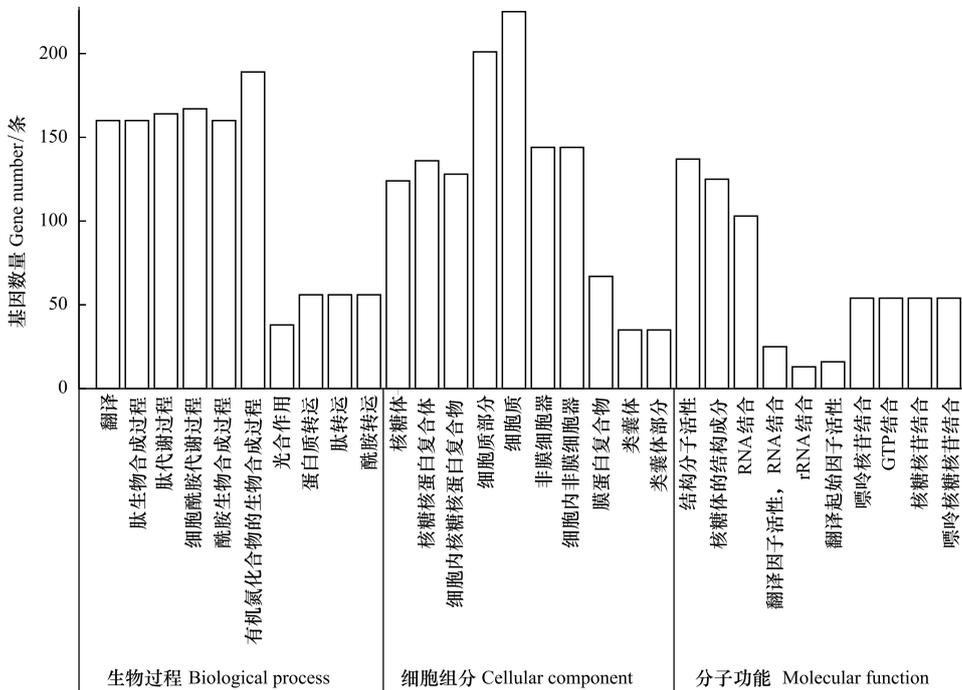


图4 T4vsT1 差异基因本体功能富集分析

Fig.4 T4vsT1 differential gene ontology function enrichment analysis

T4vsT3 共注释到差异基因 1396 条,生物过程 523 条,细胞组成 131 条,分子功能 742 条,分别占比 37.46%、9.38%、53.15%,差异显著的基因集中在细胞组分和分子功能,可以看出施用化肥主要对水稻叶片的生物学过程影响较小,各组分最显著的 10 个 Term 见图 5。在细胞组分中,差异基因主要参与的生物学过程包括类囊体、类囊体部分、光合膜等方面;在分子功能中,差异基因主要集中在血红素结合、四吡咯结合、氧化还原酶活性作用于成对的供体上并结合或还原分子氧、铁离子结合等方面。

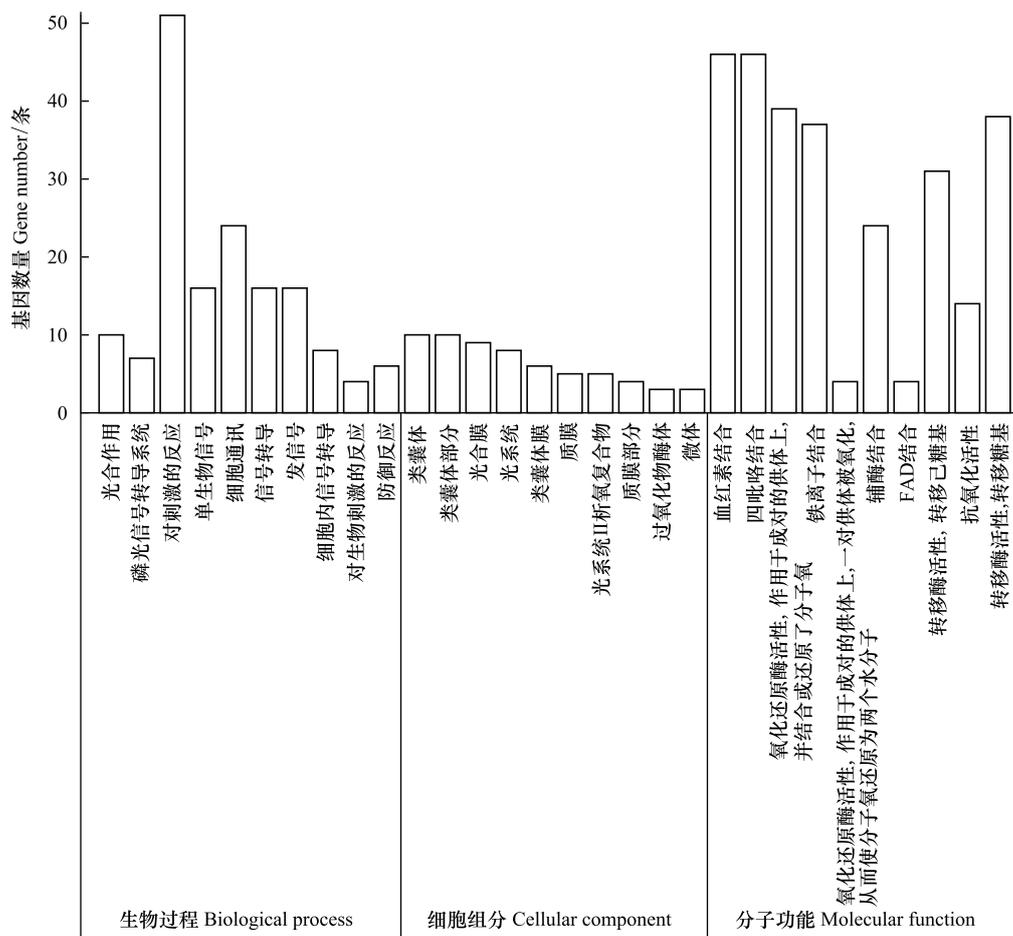


图 5 T4vsT3 差异基因本体功能富集分析

Fig.5 T4vsT3 differential gene ontology function enrichment analysis

## 2.5 差异基因 KEGG 通路富集分析

为了进一步表达差异基因的生物行为,根据 KEGG 数据库注释结果,对生物有机肥不同处理下,盐碱地水稻叶片差异基因进行分析。

T2vsT1 共有 965 条差异基因注释到 KEGG 数据库中,分布在 112 个分类代谢途径中,最显著的 20 个通路见图 6,涉及差异基因最多的代谢通路是核糖体(142 条),其次是植物激素信号转导(55 条)、剪接体(47 条)、植物-病原体相互作用(45 条)、氨基酸生物合成(41 条)、碳代谢(40 条)、嘌呤代谢(38 条)、MAPK 信号传导途径-植物(35 条)、内质网中蛋白质加工(34 条)、胞吞作用(30 条)等,其中有 2 个代谢通路显著富集( $P < 0.05$ ),分别是核糖体和光合作用(22 条)。

T3vsT1 共有 732 条差异基因得到注释,分布在 109 个分类代谢途径中,最显著的 20 个通路见图 7,涉及差异基因最多的代谢通路是核糖体(81 条),其次是碳代谢(43 条)、植物激素信号转导(40 条)、内质网中蛋白质加工(32 条)、氨基酸生物合成(31 条)、谷胱甘肽代谢(30 条)、氨基糖和核苷酸糖代谢(26 条)、苯丙烷

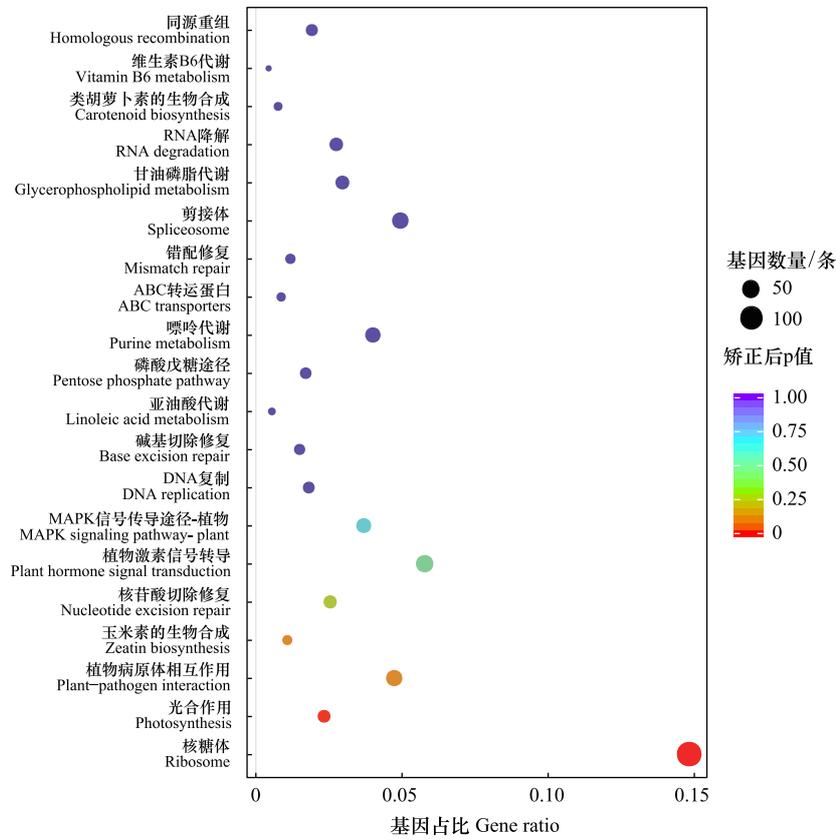


图6 T2vsT1 差异基因 KEGG 富集通路

Fig.6 T2vsT1 differential gene KEGG enrichment pathway

KEGG: 京都基因与基因组百科全书 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; ABC: 转运蛋白的全称为腺苷三磷酸结合盒转运蛋白 (ATP-Binding cassette) (ATP binding cassette transporters); MAPK: 丝裂原激活的蛋白激酶 Mitogen-activated protein kinase

生物合成 (26 条)、MAPK 信号传导途径-植物 (25 条)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (24 条) 等, 其中有 4 个代谢通路显著富集 ( $P < 0.05$ ), 分别是核糖体、光合作用、光合作用-天线蛋白和谷胱甘肽代谢。

T4vsT1 共有 1076 条差异基因得到注释, 分布在 109 个分类代谢途径中, 最显著的 20 个通路见图 8, 涉及差异基因最多的代谢通路是核糖体 (147 条)、碳代谢 (71 条)、氨基酸生物合成 (48 条)、RNA 转运 (46 条)、内质网中蛋白质加工 (45 条)、嘌呤代谢 (35 条)、剪接体 (35 条)、植物激素信号转导 (34 条)、光合作用 (32 条)、谷胱甘肽代谢 (32 条) 等, 有 5 个代谢通路显著富集 ( $P < 0.05$ ), 分别是核糖体、光合作用、光合作用-天线蛋白、鞘脂代谢、卟啉与叶绿素代谢。

T4vsT3 共有 263 条差异基因得到注释, 共 100 条代谢通路, 最显著的 20 个通路见图 9, 涉及差异基因最多的代谢通路是苯丙烷生物合成 (21 条)、碳代谢 (21 条)、植物激素信号转导 (17 条)、氨基酸生物合成 (17 条)、乙醛酸和二羧酸代谢 (13 条)、脂肪酸降解 (12 条)、光合作用 (12 条)、糖酵解/糖异生 (12 条)、脂肪酸代谢 (11 条)、MAPK 信号传导途径-植物 (11 条) 等, 有 7 个代谢通路显著富集 ( $P < 0.05$ ), 是脂肪酸降解、光合作用、苯丙烷生物合成、乙醛酸和二羧酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成、 $\alpha$ -亚麻酸代谢、脂肪酸代谢。

各组差异基因 KEGG 显著富集通路统计见表 3, 结果表明, 施用生物有机肥后, 核糖体和光合作用代谢通路显著富集 ( $P < 0.05$ ), 与前文 GO 分析中核糖体和光合作用相互佐证, 说明盐碱地施用生物有机肥诱导水稻叶片中的 RNA 合成蛋白质, 对其光合作用具有显著影响; 谷胱甘肽是生物体内最主要的非蛋白巯基和含量最丰富的低分子量多肽, 具有很强的抗氧化性, 参与植物抗逆中的多项功能活动<sup>[34]</sup>, 在本研究中, T3vsT1 和 T4vsT1 中谷胱甘肽代谢通路基因上调 23 和 27 条, 下调 7 和 5 条, 说明生物有机肥能够提高盐碱地水稻抗逆性。

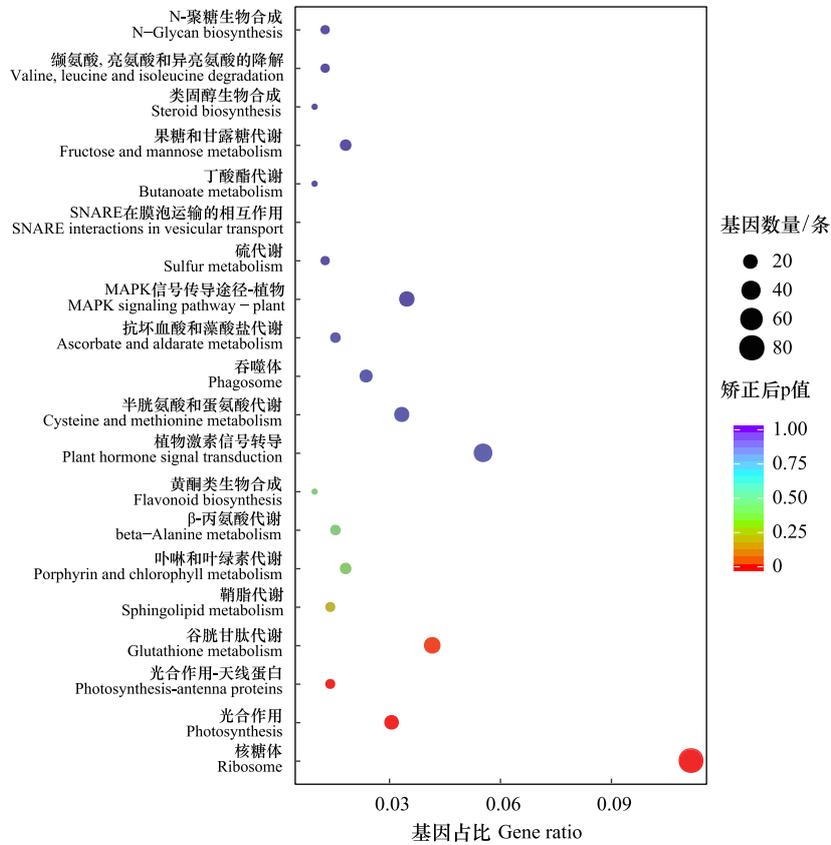


图7 T3vsT1 差异基因 KEGG 富集通路

Fig.7 T3vsT1 differential gene KEGG enrichment pathway

表3 差异基因 KEGG 显著富集通路

Table 3 KEGG pathway enrichment of differentially expressed genes

组别 Group	代谢通路 Metabolic pathway	数量 Count	上调 Up	下调 Down
T2vsT1	核糖体	142	141	1
	光合作用	22	19	3
T3vsT1	核糖体	81	15	66
	光合作用	22	22	0
	光合作用-天线蛋白	10	10	0
	谷胱甘肽代谢	30	23	7
T4vsT1	核糖体	147	32	115
	光合作用	32	31	1
	光合作用-天线蛋白	12	12	0
	鞘脂代谢	15	4	11
T4vsT3	卟啉与叶绿素代谢	21	18	3
	脂肪酸降解	12	3	9
	光合作用	12	12	0
	苯丙烷生物合成	21	10	11
	乙醛酸和二羧酸的代谢	13	6	7
	不饱和脂肪酸的生物合成	8	5	3
	α-亚麻酸代谢	9	2	7
脂肪酸代谢	11	5	6	

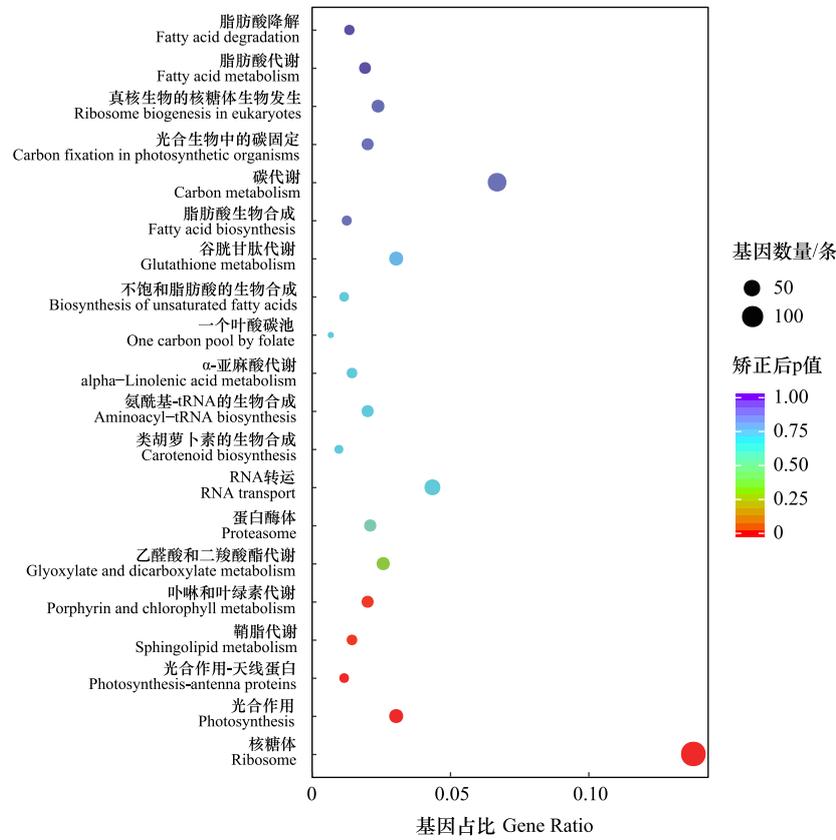


图8 T4vsT1 差异基因 KEGG 富集通路

Fig.8 T4vsT1 differential gene KEGG enrichment pathway

## 2.6 差异基因耐盐转录因子分析

转录因子是细胞响应外界胁迫以后主要调控某些基因转录的调控因子<sup>[35]</sup>。目前,已鉴定出参与植物盐胁迫应答反应的转录因子有 AP2/EREBP、MYB、WRKY 以及 bZIP 转录因子家族成员<sup>[36]</sup>。图 10 为各组差异基因注释在转录因子家族的基因数量,T2vsT1 中 4 个转录因子家族共有 111 条差异基因,其中上调 39 条 (MYB 家族 23 条),下调 72 条 (AP2 家族 23 条,MYB 家族 22 条,WRKY 家族 21 条);T3vsT1 共有 93 条差异基因,上调 44 条 (AP2 家族 10 条,bZIP 家族 10 条,MYB 家族 15 条),下调 49 条 (AP2 家族 20 条,MYB 家族 15 条,WRKY 家族 10 条);T4vsT1 共有 97 条差异基因,上调 53 条 (AP2 家族 19 条,bZIP 家族 11 条,MYB 家族 18 条),下调 44 条 (AP2 家族 13 条,MYB 家族 19 条),T4vsT3 共有 40 条差异基因,上调 24 条 (AP2 家族 11 条),下调 18 条 (MYB 家族 13 条)。

## 3 讨论

转录组学是功能基因组学的重要组成部分,它是从整体水平上研究细胞中基因转录的情况及其转录调控规律<sup>[37]</sup>。植物对逆境胁迫的响应机制十分复杂,当细胞感受到逆境胁迫时,相应的受体将会收到信号,控制相关的基因表达,并产生生理反应,同时在转录和翻译等水平做出应答<sup>[38]</sup>。本研究中,从水稻农艺性状可以看出,施用生物有机肥能有效减轻盐分对水稻的胁迫,促进盐碱地水稻生长。对不同生物有机肥处理下盐碱地水稻叶片进行转录测序分析,Q30 碱基百分比大于 91.87 及以上,表明测序质量良好,满足转录组分析的基本要求。

施肥不仅可以开启一些基因上调表达,同时也可以关闭一些基因表达(基因沉默),还可以调节一些基因下调表达<sup>[39]</sup>。王莹燕<sup>[40]</sup>在 NPK 定位实验中发现,化肥配施农家肥能明显促进 16S rRNA 和 *nosZ* 基因拷贝

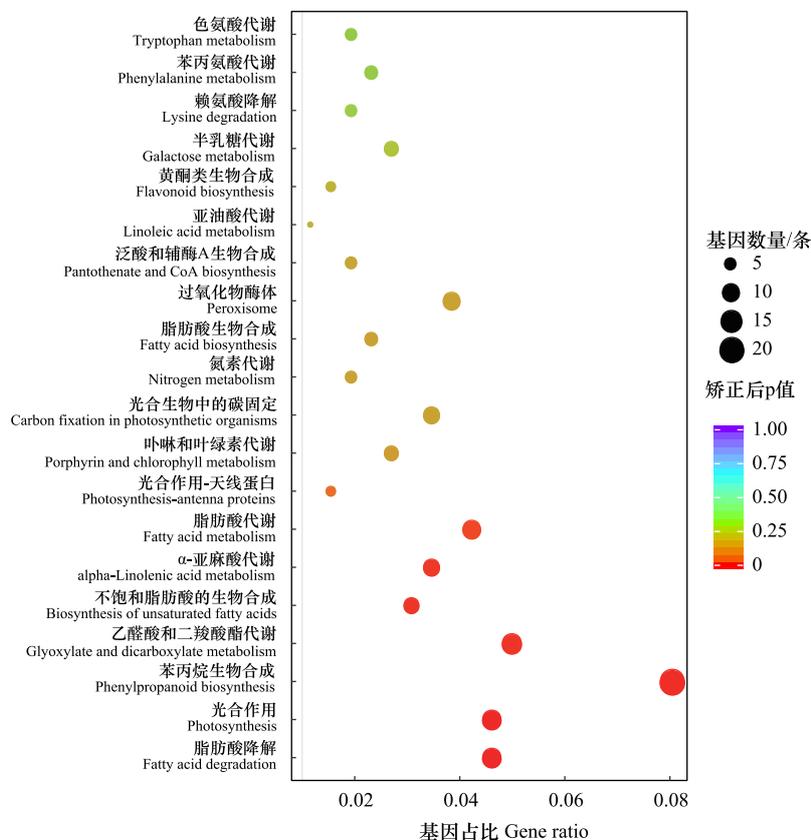


图9 T4vsT3 差异基因 KEGG 富集通路

Fig.9 T4vsT3 differential gene KEGG enrichment pathway

数。本研究 GO 功能分析中, T2vsT1 中差异基因引起显著差异的功能有 16 个, T3vsT1 中有 36 个, T4vsT1 中有 60 个, 说明施用生物有机肥能有效刺激水稻叶片基因差异表达, 这些差异基因在生物学过程中细胞学过程、代谢过程相关基因分布较多; 细胞组分中主要集中在细胞器、细胞器膜; 在分子功能中差异显著表达基因与结合、催化活性有关。张敏瑜<sup>[41]</sup>接种 AM 真菌和 Foc4 能诱导巴西蕉的基因差异表达, 且 2 株菌同时接种时差异基因显著表达量大于单株菌的表达量。Chandra 研究结果表明<sup>[42]</sup>, 耐盐解淀粉芽孢杆菌能够调节水稻基因差异表达提高水稻耐盐性。本研究中, T2vsT1 中差异显著上调基因均大于下调数量, 说明生物有机肥中的枯草芽孢杆菌等(嗜)耐盐菌株对盐碱地水稻生物学过程具有重要的影响。

核糖体是最古老的、精细复杂的细胞器, 其结构和组成从原核到真核保持着高度的保守性<sup>[43]</sup>, 是细胞机制的一个重要部分, 负责蛋白质合成, 在控制细胞生长、分裂和发育中起着重要作用<sup>[44]</sup>, 核糖体相关基因表达可能会影响生物体的一些机能。谢丽霞<sup>[45]</sup>从极端嗜盐曲霉核糖体中克隆出 *Sp RPS3ae* 和 *Sp RPL44* 两条蛋白基因导入植物和微生物中均能有效提高其抗盐性, 夏丽丹等<sup>[46]</sup>在分析盐肤木对铅胁迫的响应时发现, 核糖体相关基因是盐肤木应对铅胁迫的主要调节基因。在本研究中, 差异表达基因的 GO 与 KEGG 的分析中均发现, 核糖体相关基因在 T2vsT1、T3vsT1、T4vsT1 中均差异表达, 说明核糖体内可能是盐碱地水稻施用生物有机

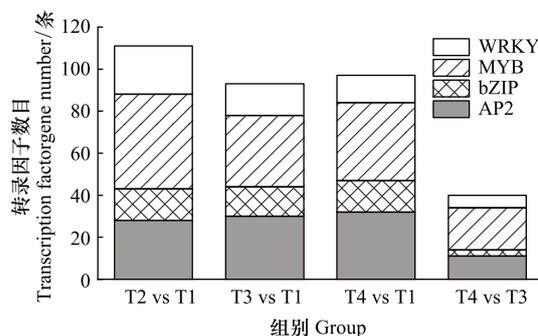


图10 响应盐胁迫家族基因数量统计

Fig.10 Number statistics of family genes in response to salt stress

肥后应对盐碱环境的重要调节基因。

光合作用是植物产生能量的主要途径,叶片是植物进行光合作用的重要器官,对植物的生长发育至关重要<sup>[25]</sup>。但盐碱胁迫会造成植物细胞膜损伤、气孔关闭、CO<sub>2</sub>同化速率降低,从而降低光合速率、蒸腾速率、气孔开放、细胞间 CO<sub>2</sub>浓度和叶绿素含量影响水稻生长发育,从而影响作物产量<sup>[47-48]</sup>。本研究中 KEGG 代谢途径的生物信息学分析发现,T3vsT1 和 T4vsT1 中光合作用和光合作用-天线蛋白代谢通路基因均显著上调,而光合作用-天线蛋白是光反应中原初反应中的一类补光蛋白复合体,能够捕获光能并把能量传递至反应中心<sup>[25]</sup>,说明施用生物有机肥能有效促进盐碱地水稻叶片对光能的捕获,从而增强水稻光合作用。

植物激素不但调控植物的生长发育,而且还参与植物的非生物胁迫<sup>[25]</sup>,在 T2vsT1、T3vsT1 和 T4vsT1 中分别有 55 条、40 条、34 条差异基因注释在植物激素信号传导通路上,涉及的植物激素有生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸、乙烯、油菜素甾醇、茉莉素和水杨酸,意味着施用生物有机肥对植物激素具有一定影响,脱落酸是植物利用类胡萝卜素参与合成的一种应激反应激素<sup>[49]</sup>,能激发质膜结合通道或从细胞内 Ca<sup>2+</sup> 储存库释放 Ca<sup>2+</sup> 与第二信使 Ca<sup>2+</sup> 整合,帮助植物在盐胁迫下存活<sup>[50]</sup>,在植物应对环境胁迫中发挥着重要作用<sup>[51]</sup>。在本研究中类胡萝卜素生物合成通路基因在 T3vsT1 中上调 5 条、下调 1 条,在 T4vsT1 中上调 10 条,无下调基因,说明盐碱地施用生物有机肥能促进类胡萝卜素生物合成,促进水稻抗性提高。

植物经常受到病原性细菌、真菌、病毒、线虫等的攻击<sup>[52]</sup>,但是植物具有天生的免疫系统来抵御病原体<sup>[53]</sup>,当受到病原体攻击时,每个细胞都能够自主识别和应对病原体<sup>[54]</sup>。枯草芽孢杆菌能有效防治水稻的纹枯病<sup>[55]</sup>、稻瘟病<sup>[56]</sup>等病害,本研究中 T3vsT1 和 T4vsT1 中植物-病原体相互作用代谢路上调基因数量大于下调基因数量,说明施用生物有机肥在一定程度上能够激活盐碱地水稻叶片自身对病原体的抗性,微生物在其中可能发挥了重要作用,在 T2 中对生物有机肥进行了灭活处理,但在 T2vsT1 中上调基因数量小于下调基因,其原因需要进一步研究。

参与响应盐胁迫的转录因子在盐胁迫下呈现出不同的应答反应模式,表明这些转录因子在盐胁迫应答途径中扮演着不同的角色<sup>[36]</sup>。AP2/EREBP 是一个大的转录因子家族,包含 EREBP 和 AP2 等 2 个亚族。研究证实,AP2/EREBP 转录家族基因与植物逆境响应有关<sup>[57]</sup>,MYB 蛋白在包括盐胁迫在内的植物非生物胁迫调控中有重要作用<sup>[58]</sup>,WRKY 转录因子具有高度保守的 WRKY 结构域,能够参与损伤、衰老、发育、抗病等抗逆反应<sup>[59]</sup>。不同生物有机肥处理诱导盐胁迫下水稻叶片响应盐胁迫的转录因子家族基因开始表达,其中施生物有机肥能促使水稻叶片已知响应盐胁迫的家族基因差异表达,主要参与盐胁迫响应的基因都属于 AP2 和 MYB 转录因子家族,说明施用生物有机肥能有效促进植物响应盐胁迫基因表达,增强作物耐受性。

#### 4 结论

以生物有机肥不同处理下的盐碱地水稻叶片为研究材料,运用 RNA-Seq 技术进行转录组测序,并对差异基因进行 GO 和 KEGG 代谢通路富集分析,解析其参与的生物学功能和代谢途径。施用生物有机肥能够改变盐碱地水稻基因表达,从而调控水稻的生物学功能和代谢过程,影响水稻的生长发育。本研究初步揭示了生物有机肥施用对盐碱地水稻促生和抗逆作用的生物学机制。

#### 参考文献 (References):

- [1] 王遵亲. 中国盐渍土. 北京: 科学出版社, 1993.
- [2] Ahmad H R, Aziz T, Hussain S, Akraam M, Sabir M, Kashif S U R, Hanafi M M. Zinc-enriched farm yard manure improves grain yield and grain zinc concentration in rice grown on a saline-sodic soil. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2012, 14(5): 787-792.
- [3] 杨海霞, 郭绍霞, 刘润进. 盐碱地生境中丛枝菌根真菌多样性与功能变化特征. *应用生态学报*, 2015, 26(1): 311-320.
- [4] 吉福桑, 杨振, 徐亚, 汪奇, 李新国, 乔飞. 盐胁迫下巴西蕉叶片的转录组和蛋白质组关联分析. *分子植物育种*, 2020, 18(23): 7671-7678.
- [5] 罗成科, 肖国举, 张峰举, 李茜. 不同浓度复合盐胁迫对水稻产量和品质的影响. *干旱区资源与环境*, 2017, 31(1): 137-141.

- [6] 陈丽珍, 叶剑秋, 王荣香. 水稻盐胁迫的研究进展. 热带农业科学, 2011, 31(3): 87-93.
- [7] 吕海艳. 盐碱胁迫对水稻根系形态特征及产量的影响[D]. 长春: 中国科学院研究生院(东北地理与农业生态研究所), 2014.
- [8] 梁正伟, 杨福, 王志春, 陈渊. 盐碱胁迫对水稻主要生育性状的影响. 生态环境, 2004, 13(1): 43-46.
- [9] 尹志荣, 黄建成, 桂林国. 稻作条件下不同施肥模式对原土盐碱地的改良培肥效应. 土壤通报, 2016, 47(2): 414-418.
- [10] 王才林, 张亚东, 赵凌, 路凯, 朱镇, 陈涛, 赵庆勇, 姚姝, 周丽慧, 赵春芳, 梁文化, 孙明法, 严国红. 耐盐碱水稻研究现状、问题与建议. 中国稻米, 2019, 25(1): 1-6.
- [11] 杨帆, 王志春, 马红媛, 杨福, 田春杰, 安丰华. 东北苏打盐碱地生态治理关键技术研发与集成示范. 生态学报, 2016, 36(22): 7054-7058.
- [12] 张涛, 李素艳, 孙向阳, 王振宇, 张洋, 张乐, 龚小强, 赵秀芳, 谢志远, 宋国香. 磷石膏、红糖等对蚯蚓改良滨海盐土的促进作用. 土壤学报, 2017, 54(1): 255-264.
- [13] 张永宏, 吴秀梅, 班乃荣, 雷金银. 盐碱地的生物修复研究. 农业科技通讯, 2009, (7): 99-101.
- [14] Chavada N B, Patel R, Vanpuria S, Raval B P, Thakkar P V. A study on isolated diazotrophic (Non-Symbiotics) bacteria from saline desert soil as a Biofertilizer. International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences, 2010, 1(1): 52-54.
- [15] 李晓爽. 掺沙及施用生物有机肥对盐碱地水盐运移和冬小麦生长发育影响的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [16] 张金柱, 郭春景, 张兴, 王金刚, 车代弟. 生物有机肥对中度盐碱土壤理化性质影响的研究. 湖北农业科学, 2008, 47(12): 1420-1422.
- [17] Zheng X F, Zhu Y J, Wang Z R, Zhang H F, Chen M C, Chen Y P, Wang J P, Liu B. Effects of a novel bio-organic fertilizer on the composition of rhizobacterial communities and bacterial wilt outbreak in a continuously mono-cropped tomato field. Applied Soil Ecology, 2020, 156: 103717.
- [18] Luo J, Ran W, Hu J, Yang X M, Xu Y C, Shen Q R. Application of bio-organic fertilizer significantly affected fungal diversity of soils. Soil Science Society of America Journal, 2010, 74(6): 2039-2048.
- [19] Chauhan P S, Lata C, Tiwari S, Chauhan A S, Mishra S K, Agrawal L, Chakrabarty D, Nautiyal C S. Transcriptional alterations reveal *Bacillus amyloliquefaciens*-rice cooperation under salt stress. Scientific Reports, 2019, 9(1): 11912.
- [20] Subowo Y B. Penambahan pupuk hayati jamur sebagai pendukung pertumbuhan tanaman padi (*Oryza sativa*) pada tanah salin. Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia, 2015, 1(1): 150-154.
- [21] Fu R M, Xing W H, Zhang H, Wu X W, Xue T T, Gu Y N, Wang Y Y, Yu F, Du M L, Chen W L. Isolation and screening of halo-tolerant strains and their application in saline soil remediation. Journal of Simulation, 2015, 3(2): 24-28.
- [22] 李北齐, 王倡突, 孟瑶, 刘杜金, 孟庆有, 李新达, 王贵强. 生物有机肥对盐碱土壤养分及玉米产量的影响. 中国农学通报, 2011, 27(21): 182-186.
- [23] El-Shahat R M, Sherif A E A, Mohamed F M. Response of barley grown in saline soil to bio-fertilizer as a partial substitutive of mineral fertilizer. Global Journal of Scientific Researches, 2014, 2(5): 144-153.
- [24] 张丽丽, 张富春. 短期盐胁迫下盐穗木的转录组分析. 植物研究, 2018, 38(1): 91-99.
- [25] 董明, 再吐尼古丽·库尔班, 吕芑, 杜瑞恒, 叶凯, 侯升林, 刘国庆. 高粱苗期耐盐性转录组分析和基因挖掘. 中国农业科学, 2019, 52(22): 3987-4001.
- [26] Li Y F, Zheng Y, Vemireddy L R, Panda S K, Jose S, Ranjan A, Panda P, Govindan G, Cui J X, Wei K N, Yaish M W, Naidoo G C, Sunkar R. Comparative transcriptome and translome analysis in contrasting rice genotypes reveals differential mRNA translation in salt-tolerant Pokkali under salt stress. BMC Genomics, 2018, 19(S10): 935.
- [27] 楚乐乐, 罗成科, 李芳兰, 路旭平, 马天利, 李培富. 盐胁迫下 *O<sub>s</sub>DSR2* RNAi 转基因水稻的生理特性及转录组学分析. 植物遗传资源学报, 2020, 21(4): 954-965.
- [28] 栗露露, 殷文超, 牛梅, 孟文静, 张晓星, 童红宁. 油菜素甾醇调控水稻盐胁迫应答的作用研究. 植物学报, 2019, 54(2): 185-193.
- [29] Wang W S, Zhao X Q, Li M, Huang L Y, Xu J L, Zhang F, Cui Y R, Fu B Y, Li Z K. Complex molecular mechanisms underlying seedling salt tolerance in rice revealed by comparative transcriptome and metabolomic profiling. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(1): 405-419.
- [30] Chandran A K N, Kim J W, Yoo Y H, Park H L, Kim Y J, Cho M H, Jung K H. Transcriptome analysis of rice-seedling roots under soil - salt stress using RNA-Seq method. Plant Biotechnology Reports, 2019, 13(6): 567-578.
- [31] Kong W L, Zhong H, Gong Z Y, Fang X Y, Sun T, Deng X X, Li Y S. Meta-analysis of salt stress transcriptome responses in different rice genotypes at the seedling stage. Plants, 2019, 8(3): 64.
- [32] 曹力毅. 微生物肥料对盐碱地水稻生长及其土壤环境的影响[D]. 银川: 宁夏大学, 2019.
- [33] 陶洪斌, 林杉. 打孔称重法与复印称重法和长宽校正法测定水稻叶面积的方法比较. 植物生理学通讯, 2006, 42(3): 496-498.
- [34] 麦维军, 王颖, 梁承邨, 张明永. 谷胱甘肽在植物抗逆中的作用. 广西植物, 2005, 25(6): 570-575.
- [35] 马进, 郑钢. 利用转录组测序技术鉴定紫花苜蓿根系盐胁迫应答基因. 核农学报, 2016, 30(8): 1470-1479.
- [36] 朱冬梅, 贾媛, 崔继哲, 付畅. 植物对盐胁迫应答的转录因子及其生物学特性. 生物技术通报, 2010, (4): 16-21.

- [37] 张贤, 王建红, 喻曼, 曹凯, 庄俐, 徐昌旭, 曹卫东. 基于 RNA-seq 的能源植物芒转录组分析. 生物工程学报, 2015, 31(10): 1437-1448.
- [38] 吴孚桂, 刘慧芳, 聂佳俊, 韦云飞, 马启林. 水稻幼穗响应盐胁迫的转录组分析. 热带作物学报. (2020-07-03)[2020-12-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.S.20200703.0855.002.html>.
- [39] 齐明, 何贵平, 王海蓉, 邱勇斌, 程亚平, 徐肇友. 杉木施肥引发基因表达响应机制的转录组分析. 中南林业科技大学学报, 2020, 40(4): 101-110.
- [40] 王莹燕. 石灰性紫色水稻土中 *nirS* 和 *nosZ* 基因对不同施肥处理的响应特征及其垂直分布[D]. 成都: 四川农业大学, 2017.
- [41] 张敏瑜. 丛枝菌根真菌与香蕉 Foc4 的互作效应及其抗枯分子机制[D]. 厦门: 华侨大学, 2019.
- [42] Nautiyal C S, Srivastava S, Chauhan P S, Seem K, Mishra A, Sopory S K. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 66: 1-9.
- [43] 靳聪聪, 侯名语, 潘延云. 拟南芥核糖体蛋白生物学功能研究进展. 植物生理学报, 2018, 54(2): 203-212.
- [44] Barakat A, Szick-Miranda K, Chang I F, Guyot R, Blanc G, Cooke R, Delseny M, Bailey-Serres J. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiology*, 2001, 127(2): 398-415.
- [45] 谢丽霞. 极端嗜盐曲霉核糖体蛋白基因 *SpRPS3ae* 和 *SpRPL44* 的克隆及其抗逆功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [46] 夏丽丹, 张虹, 胡华英, 曹升, 周垂帆. RNA-Seq 定量分析盐肤木对铅胁迫的响应. 农业环境科学学报, 2019, 38(7): 1459-1467.
- [47] Aminian R, Mohammadi S, Hoshmand S, Khodombashi M. Chromosomal analysis of photosynthesis rate and stomatal conductance and their relationships with grain yield in wheat (*Triticum aestivum* L.) under water-stressed and well-watered conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33(3): 755-764.
- [48] 程海涛, 姜华, 薛大伟, 郭龙彪, 曾大力, 张光恒, 钱前. 水稻芽期与幼苗前期耐碱性状 QTL 定位. 作物学报, 2008, 34(10): 1719-1727.
- [49] Yu Z P, Duan X B, Luo L, Dai S J, Ding Z J, Xia G M. How plant hormones mediate salt stress responses. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(11): 1117-1130.
- [50] Edel K H, Kudla J. Integration of calcium and ABA signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, 33: 83-91.
- [51] Yang L, Liu Q H, Liu Z B, Yang H, Wang J M, Li X F, Yang Y. *Arabidopsis* C3HC4-RING finger E3 ubiquitin ligase AtAIRP4 positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(1): 67-80.
- [52] Hupp S, Rosenkranz M, Bonfig K, Pandey C, Roitsch T. Noninvasive phenotyping of plant - pathogen interaction: consecutive *in situ* imaging of fluorescing *Pseudomonas syringae*, plant phenolic fluorescence, and chlorophyll fluorescence in *Arabidopsis* leaves. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1239.
- [53] de Wit P J G M. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64(21): 2726-2732.
- [54] Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 2008, 20(1): 10-16.
- [55] Jamali H, Sharma A, Roohi, Srivastava A K. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Basic Microbiology*, 2020, 60(3): 268-280.
- [56] 朱华珺, 周瑚, 任佐华, 刘二明. 枯草芽孢杆菌 JN005 胞外抗菌物质及对水稻叶瘟防治效果. 中国水稻科学, 2020, 34(5): 470-478.
- [57] 马进, 郑钢, 裴翠明, 张振亚. 南方型紫花苜蓿根系盐胁迫应答转录因子鉴定与分析. 浙江农林大学学报, 2016, 33(2): 201-208.
- [58] 陈娜, 迟晓元, 潘丽娟, 陈明娜, 禹山林. MYB 转录因子在植物盐胁迫调控中的研究进展. 植物生理学报, 2015, 51(9): 1395-1399.
- [59] 田林, 尹丹丹, 成铁龙, 夏新莉, 尹伟伦. 盐胁迫下比拉底白刺差异表达基因的转录组分析. 林业科学研究, 2020, 33(1): 1-10.