

DOI: 10.20103/j.stxb.202306051189

杨瑛斌, 付国香, 郝文芳. 小沙冬青对干旱胁迫的生理响应和转录组分析. 生态学报, 2025, 45(2): 854-865.

Yang Y B, Fu G X, Hao W F. Physiological response and transcriptome analysis of *Ammopiptanthus nanus* to drought stress. Acta Ecologica Sinica, 2025, 45(2): 854-865.

小沙冬青对干旱胁迫的生理响应和转录组分析

杨瑛斌¹, 付国香^{1,2}, 郝文芳^{1,*}

1 西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100

2 博济医药科技股份有限公司, 广州 510000

摘要: 利用分子育种技术培育耐旱植物的过程中, 了解植物的抗旱机制和拥有大量的候选基因是必要的。耐旱植物是了解耐旱机制和挖掘耐旱基因的优秀材料。以小沙冬青为材料, 通过聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG-6000) 模拟干旱胁迫, 研究胁迫开始后 0、1、3、6、12 h 的小沙冬青幼苗叶片光合色素、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、可溶性糖、可溶性蛋白、脯氨酸 (Pro) 含量, 利用 RNA-Seq 技术对小沙冬青叶片进行转录组测序。分析结果表明, 干旱胁迫下, 小沙冬青叶片中可溶性糖、Pro、叶片光合色素含量增加。SOD、POD 对干旱响应迅速, 活性显著增加, 这对消除干旱引起的过量活性氧具有重要作用。而 CAT 在 12h 内未对干旱做出有效响应。转录组分析鉴定到 15188 个差异表达基因, 其中共差异表达基因有 805 个, 上调表达的基因数量和下调表达的基因数量相近。在 GO 富集分析中, 这 805 个基因在“核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶”和“脱落酸激活信号通路的负调控”途径中大量富集。P 值最小的四条通路 (“叶绿素结合”、“光系统 II”、“光合作用”, “光捕捉、光系统 I”) 均与光合作用相关。KEGG 分析表明, 共差异表达基因主要富集在包括“光合作用-天线蛋白”、“光合生物中的碳固定”在内的 6 条代谢途径中。在小沙冬青中, 7-羟甲基叶绿素 a 还原酶在干旱胁迫下持续下调表达, 抑制了叶绿素的降解, 有效保护了光合系统。研究重点关注了植物激素的信号转导途径, 发现脱落酸信号通路发生明显改变。此外, 茉莉酸信号通路中茉莉酸 ZIM 结构域蛋白 (JAZ) 的响应相较于其他物种有明显的不同。研究结果为小沙冬青适应干旱环境的生理和分子机制提供新的证据, 为后续抗旱相关候选基因克隆及功能验证奠定基础。

关键词: 小沙冬青; 干旱胁迫; 生理特性; 转录组分析

Physiological response and transcriptome analysis of *Ammopiptanthus nanus* to drought stress

YANG Yingbin¹, FU Guoxiang^{1,2}, HAO Wenfang^{1,*}

1 College of Life Sciences, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

2 Boji Medical Technology Co., Ltd., Guangzhou 510000, China

Abstract: In the process of cultivating drought-tolerant plants by using molecular breeding technology, it is necessary to understand the drought resistance mechanism of plants and possess a large number of candidate genes. Drought-tolerant plants are excellent materials for understanding drought tolerance mechanisms and mining drought-tolerant genes. In this study, *Ammopiptanthus nanus* was used as the material. Polyethylene glycol (PEG-6000) was used to simulate drought stress. The photosynthetic pigments content, superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), soluble sugar, soluble protein, and proline (Pro) content in the leaves of *A. nanus* seedlings were analyzed at 0, 1, 3, 6, and 12 h after PEG treatment. Meanwhile, the gene expression changes of *A. nanus* under the drought were analyzed by using RNA-Seq technology. The results indicated that the contents of soluble sugar, Pro, and photosynthetic pigments in the leaves of

基金项目: 陕西林业科技创新重点专项 (SXLK2022-02-2); 全国中药资源普查项目 (财社[2018]43 号)

收稿日期: 2023-06-05; 网络出版日期: 2024-10-10

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: haowenfang@nwsuaf.edu.cn

A. nanus were increased under drought stress. SOD and POD responded quickly to drought, and their activities were increased significantly, which played an important role in eliminating excessive reactive oxygen species caused by drought. However, CAT did not respond effectively to drought within 12 hours. Transcriptome analysis identified 15188 differentially expressed unigenes, among which there were 805 co-differentially expressed unigenes. The number of up-regulated unigenes was similar to that of down-regulated unigenes. In the Gene Ontology (GO) enrichment analysis, these 805 unigenes were highly enriched in pathways such as ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and negative regulation of abscisic acid-activated signaling pathway. The four pathways with the smallest *P*-value (chlorophyll binding, photosystem II, photosynthesis, and light harvesting, photosystem I) are all related to photosynthesis. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis showed that the co-differentially expressed unigenes are mainly enriched in six metabolic pathways including photosynthesis - antenna proteins and carbon fixation in photosynthetic organisms. In *A. nanus* leaves, 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase was continuously down-regulated under drought stress, which inhibiting the degradation of chlorophyll and effectively protecting the photosynthetic system. This study also focused on the signal transduction pathways of plant hormones and finds that the abscisic acid signaling pathway had changed significantly. In addition, in *A. nanus* leaves, the response of jasmonate ZIM-domain protein (JAZ) to drought was significantly different from that of other species. This study provides new insight into the adaptation mechanisms of *A. nanus* under drought environment from physiological and molecular level and lays a foundation for the subsequent cloning and functional verification of the drought-related candidate genes.

Key Words: *Ammopiptanthus nanus*; drought stress; physiological characteristics; transcriptome analysis

干旱是全球植物面临的最重要的胁迫之一,近年来,由于持续的全球气候变化,干旱胁迫的严重程度和频率稳步上升^[1]。植物在与生存环境的长期选择和适应中,在生理和分子水平形成了独特的干旱信号转导机制以及较为系统的缺水逆境应对策略^[1],如植物通过调控 ABA 信号通路、钙离子信号通路和促有丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)级联信号通路等与干旱密切相关的信号通路,来增加根系水分吸收、关闭气孔减少水分流失、组织内的渗透调节,从而积极适应干旱环境。如此复杂的调控网络需要多个调控基因和功能基因的作用下进行。研究表明,某些基因的异源表达能提高植物的耐旱性^[2],而拥有大量耐旱相关的候选基因,是提高转基因植物耐旱性的前提条件。因此,以耐旱植物或干旱环境适生植物为材料的转录组数据分析,可以深入认识抗旱生理及分子机制,挖掘抗旱关键基因,为分子设计育种提供更多的数据支持。

小沙冬青(*Ammopiptanthus nanus*)隶属于豆科(Leguminosae)沙冬青属(*Ammopiptanthus*),常绿灌木,作为荒漠植被的重要物种,形成了特殊的抗逆表型,如栅栏组织发达且存在粘液细胞、表皮细胞中存在大液泡等^[3-4]。小沙冬青还可通过“午休”机制、改变氨基酸代谢(特别是脯氨酸和天冬氨酸)水平,来抵御干旱胁迫^[5]。表型是环境和基因共同作用的结果,转录组能够在一定程度上反映这种结果。近年来人们已从小沙冬青的同属近缘种蒙古沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)中鉴定出多个耐旱基因^[6-15],而在小沙冬青的 *AnDHN*、*AnEXPA1*、*AnEXPA2* 等,被证明能够赋予植物较好的耐旱性^[16-23]。本研究对小沙冬青幼苗叶片进行转录组测序,挖掘小沙冬青耐旱基因及代谢通路,为逆境适生植物的抗旱基因挖掘提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

小沙冬青种子采集自新疆乌恰县。挑选健康饱满的种子,用1%高锰酸钾消毒10 min,用蒸馏水洗净后播种于装有等量沙土的花盆中,于28℃培养,光照16 h/d,黑暗8 h/d,待幼苗长到5—6叶期时,将长势健康且一致的幼苗连根挖出,用蒸馏水冲洗幼苗根部,将幼苗转移入1/2 Hoagland 营养液中进行缓苗处理,2—3 d后,将幼苗转移入含25%PEG-6000的1/2 Hoagland 营养液中模拟干旱胁迫处理,以在1/2 Hoagland 营养液中

培养的幼苗为对照,分别于处理的 0、1、3、6、12 h 进行取样,每个处理 3 次重复。转录组测序委托华大基因股份有限公司开展。

1.2 生理指标测定及方法

采集完整健康的小沙冬青新鲜叶片用于测定生理指标测定,光合色素含量采用乙醇提取法,可溶性糖含量采用蒽酮比色法测定,Pro 含量采用酸性茚三酮法测定,SOD 活性的测定采用 NBT 光还原法,CAT 活性的测定采用紫外吸收法、POD 活性的测定采用愈创木酚法^[24]。

1.3 RNA 提取、文库构建与转录组测序

提取样品 RNA 后,用 Nanodrop 分光光度计及 Agilent2100 生物分析仪检测 RNA 纯度、浓度及完整性等。RNA 样品质量检测合格后,进行 cDNA 文库构建,使用 Agilent2100 检测文库的大小、浓度。

利用 BGISEQ-500 平台对上述构建合格的 cDNA 文库进行测序。测序得到的原始数据,通过 FastQC 软件进行质量评估,采用 trimmomatic 软件^[25] 过滤掉低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量大于 5% 的 reads。使用 Bowtie2^[25] 将 clean reads 比对到参考基因序列,之后再使用 RSEM 计算基因和转录本的表达水平。使用 Trinity^[25] 对 clean reads 进行组装,通过 Tgic1^[25] 进行去冗余得到 Unigenes,再用 BUSCO^[25] 与保守基因进行比较,对组装质量进行评估。将对组装得到的 Unigenes 进行 KEGG、GO、NR、NT、SwissProt、Pfam 和 KOG 功能数据库注释,获得其注释信息。差异基因筛选条件为 $P\text{-adjust} < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1$,采用 R (版本:4.2.2) 对差异基因进行 KEGG 和 GO 富集分析, $P \leq 0.05$ 判断此 KEGG 通路或 GO 功能存在显著富集。

1.4 差异基因 qRT-PCR 验证

挑选 6 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证,植物样品 RNA 提取及质量检测方法同上,设计引物(表 1),利用天根反转录试剂盒进行 cDNA 模板构建,用于后续 qRT-PCR 试验,以 Actin 基因为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量。

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

基因 Unigene	正向引物序列 Forward primer sequence	反向引物序列 Reverse primer sequence
Unigene878_All	CCGTCCGTCCAAGAGCCAAA	AAGCCGTCGTTGCTGGAAC
CL2228.Contig14_All	ATGCCGAATGCCCGTGAAGT	GCAATAGTGGTCGGGACCAAGAAA
CL4706.Contig2_All	GATGACGTCGATGCCGGGTT	CGGTGTCGCGAATCACATCG
CL8804.Contig2_All	CCGCAGGAAAGTAAGACTGGCA	GGTGGAAAGCCCAGAAGGAACA
CL4964.Contig1_All	ATGCCGAATGCCCGTGAAGT	GCAATAGTGGTCGGGACCAAGAAA
CL1237.Contig3_All	TGTGGTGGCTGTGCATGATGA	GCTGGGCCACAAAGCAGGTA
CL4854.Contig1_All	ACAAAGGAAGAAGCAGCTCGGT	GCTTGCAATAGCTGCTCGCT
CL2854.Contig6_All	CACCATGGGTGGGATTGGCA	CACCACCACCACCAGCTGAA
CL9080.Contig3_All	CCTGGCAGAACTGCCGCATA	CCTGGCAGAACTGCCGCATA
Unigene30166_All	TGGCATTGCTTGACCTGGA	CGGCAACATGGTGTGGACCT
Actin	CCAGGCTGTCCTCCCTGT	GATGGCATGAGGGAGCCGAT

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫下小沙冬青幼苗叶片生理指标的影响

随着干旱胁迫时间的增加,小沙冬青幼苗叶片的叶绿素 a 和类胡萝卜素含量呈先下降再上升的趋势;叶绿素 b 含量呈先上升再下降趋势,并于 12 h 时达到峰值;可溶性糖含量大体上呈上升趋势;Pro 含量呈上升趋势;SOD、POD 活性先增加后维持稳定,并于 3 h 达到峰值;CAT 的活性差异不显著。干旱有助于提高小沙冬青叶片光合色素含量,增加抗氧化酶活性和渗透调节物质,其中 Pro 与 SOD 的含量和活性提升较为明显(图 1)。

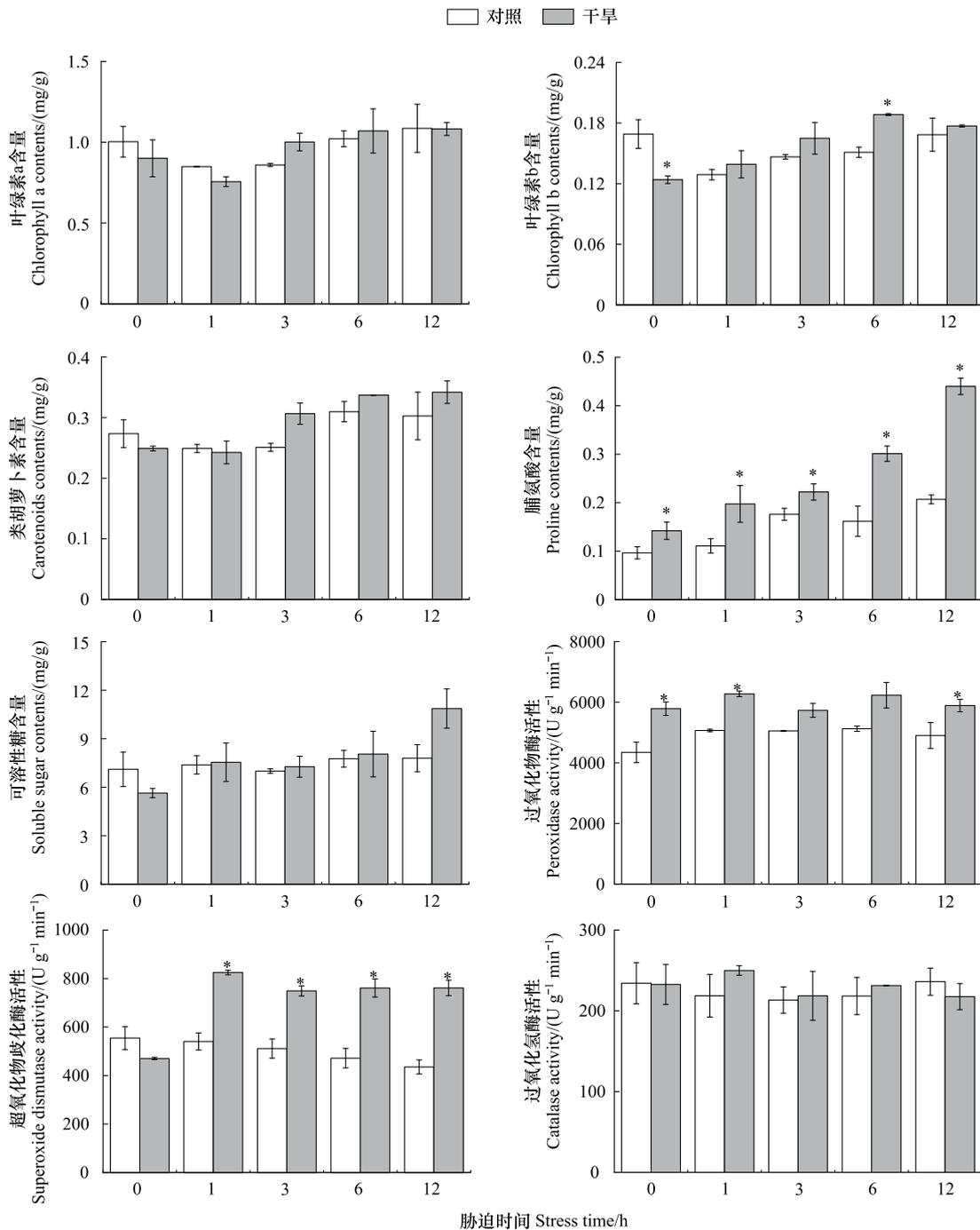


图1 小沙冬青幼苗叶片中的光合色素、渗透调节物质含量,抗氧化酶活性

Fig.1 Content of photosynthetic pigments and osmoregulatory substances, antioxidant enzyme activity in leaves of *A. nanus* seedlings

* 表示干旱处理组在同一时期下与对照组差异显著 ($P < 0.05$)

2.2 测序质量与数据组装

使用 BGISEQ-500 平台对 15 个样本进行测序,共获得了 94.83 Gb 数据,Q30 碱基分布在 89.23%—90.78%,GC 含量在 42.23%—42.74%,说明测序结果准确度较高,可以用于后续分析。经 Trinity 组装后共获得 122053 条 Unigenes,平均长度为 1707 bp,N50 长度为 2453 bp,GC 含量为 39.43%。长度分布在 200—1000 bp 的 Unigenes 有 44475 条,占总数的 36.43%,长度分布在 1000—2000 bp 的 Unigenes 有 36165 条,占 29.63%,在 2000—3000 bp 的 Unigenes 有 23465 条,占 19.23%,在 3000 bp 以上的有 17948 条,占 14.70%。结果表明小

冬沙青无参转录组测序数据和拼接结果良好,可以进行后续的转录组学分析。

2.3 Unigenes 的功能注释

将小沙冬青测序得到的所有 Unigenes 分别与 NR、NT、SwissProt、KEGG、KOG、GO 和 Pfam 数据库进行比对,结果表明有注释信息的 Unigenes 为 100869 条,占总 Unigenes 的 82.64%,其中,注释到 NR 数据库的数量最多,有 94523 条 Unigenes,占 77.44%,注释到 GO 数据库的最少,有 67918 条,占 55.65%,且在 GO 数据库有注释的 Unigenes 均能在其他数据库得到注释(表 2,图 2)。将 Unigenes 序列与 NR 非冗余蛋白数据库进行比对,在自然资源中匹配的不同物种之间的同源性显示在所有 Unigenes 中有 35.20%与狭叶羽扇豆(*Lupinus angustifolius*)匹配,其次是相思子(*Abrus precatorius*)、木豆(*Cajanus cajan*)(图 3)。

表 2 Unigene 功能注释

Table 2 Function annotation of Unigene

数据库 Database	非冗余 蛋白库 NR	核酸序列 数据库 NT	京都基因 与基因组 百科全书 KEGG	同源蛋白簇 KOG	瑞士蛋白质 序列数据库 Swissprot	蛋白质家族 数据库 Pfam	基因本体 数据库 GO
基因数量 Unigene number	94523	93621	76171	74089	70688	69720	67918
占比 Percentage/%	77.44	76.71	62.41	60.70	57.92	57.12	55.65

NR:非冗余蛋白库 Non-redundant protein sequence database;NT:核酸序列数据库 Nucleotide sequence database;KEGG:京都基因与基因组百科全书 Kyoto encyclopedia of genes and genomes;KOG:同源蛋白簇 Clusters of orthologous groups of proteins;Swissprot:瑞士蛋白质序列数据库 Swiss-prot protein sequence database;Pfam:蛋白质家族数据库 Protein family analysis and modeling;GO:基因本体数据库 Gene ontology

2.4 差异基因分析

2.4.1 差异基因筛选及统计分析

以 $P\text{-adjust} < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1$ 为筛选条件,将对对照组(0 h)和干旱处理后 1 h、3 h、6 h、12 h 的小沙冬青叶片转录组比对分析发现,随着处理时间的增加,差异基因数量增加(图 4)。在所有对比中,共有 15188 个基因表现出差异,但共同表达的 DEGs 仅有 805 个(图 5)。

2.4.2 共表达差异基因的富集分析

以 $P < 0.05$ 为限定条件,对共表达差异基因进行 GO 富集分析。在 805 个共表达差异基因中有 117 个富集到 46 个 GO 通路上,其中富集率最高的是“核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶”,其次是“脱落酸激活信号通路的负调控”、“谷氨酰 tRNA 还原酶活性”。 P 最小的四条通路(“叶绿素结合”、“光系统 II”、“光合作用”、“光捕捉、光系统 I”)均与光合作用相关(图 6)。共表达差异基因中上调和下调表达的基因数量相近,而显著富集到通路上的差异表达基因和未获得注释的 23 个差异表达基因大部分下调表达(图 7)。

以 $P < 0.05$ 为阈值,对共表达差异基因进行 KEGG 富集分析,共富集到 6 个 KEGG 通路,分别为“光合作用-天线蛋白”、“光合生物中的碳固定”、“乙醛酸及二羧酸代谢”、“氨基乙酸、丝氨酸和苏氨酸代谢”、“碳素代谢”、“次生代谢产物的生物合成”(图 6)。

2.4.3 植物激素信号转导代谢通路及相关基因分析

对干旱胁迫下小沙冬青与激素信号转导相关的共差异表达基因进行分析,在生长素、细胞分裂素、赤霉

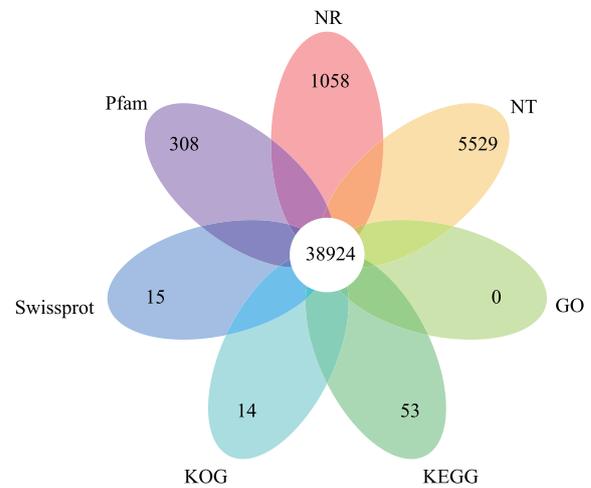


图 2 基因注释花瓣图

Fig.2 Flower plots of unigene annotation

图中数据为在各个数据库中注释到的 Unigenes 数量;NR:非冗余蛋白库 Non-redundant protein sequence database;NT:核酸序列数据库 Nucleotide sequence database;KEGG:京都基因与基因组百科全书 Kyoto encyclopedia of genes and genomes;KOG:同源蛋白簇 Clusters of orthologous groups of proteins;Swissprot:瑞士蛋白质序列数据库 Swiss-prot protein sequence database;Pfam:蛋白质家族数据库 Protein family analysis and modeling;GO:基因本体数据库 Gene ontology

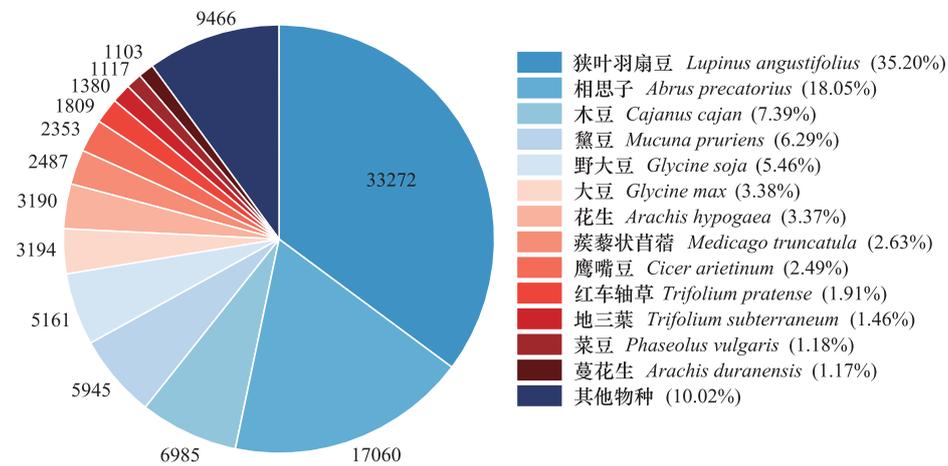


图 3 NR 注释物种分布

Fig.3 Annotation species distribution of NR

饼图中的数字表示 Unigene 的数量

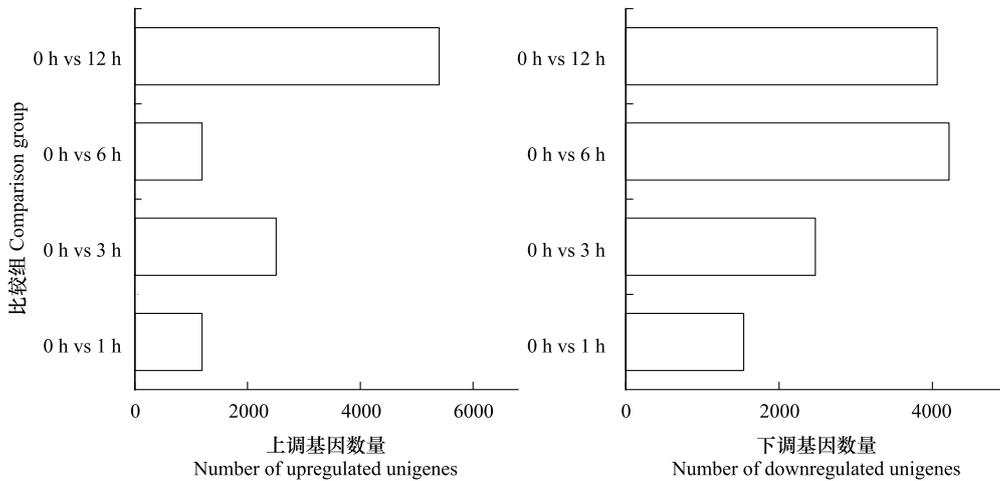


图 4 差异表达基因数量统计

Fig.4 Number of differentially expressed unigenes

素、脱落酸、油菜素甾醇、茉莉酸、水杨酸激素信号转导通路中,共有 30 个共差异表达基因,编码 17 个蛋白质家族(图 7)。其中生长素应答型 *GH3* 基因家族(Auxin responsive *GH3* gene family)、双组分响应调节器 ARR-A 家族(Two-component response regulator ARR-A family)、蛋白磷酸酶 2C(Protein phosphatase 2C)、油菜素类固醇不敏感蛋白 1(Protein brassinosteroid insensitive 1)、茉莉酸 ZIM 结构域(Jasmonate ZIM domain)、转录因子 MYC2 (Transcription factor MYC2)均富集到 2 个及以上基因。

共筛选到 5 个与生长素信号转导相关的基因,在整个胁迫过程中,注释到运输抑制剂响应蛋白 1 个基因下调,这导致了 1 个生长素应答蛋白基因的上调,此外 SAUR 家族蛋白的 1 个基因表达上调,*GH3* 基因家族的

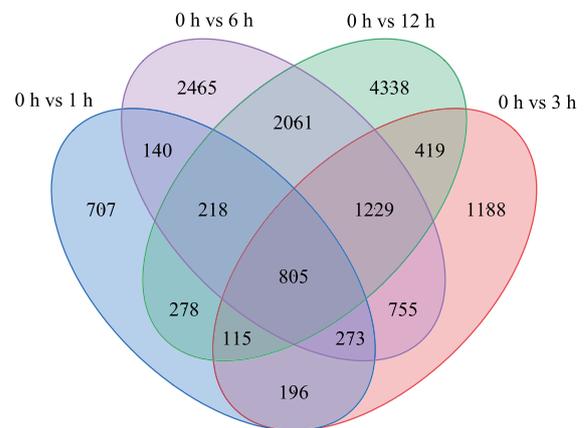


图 5 差异表达基因 Venn 图

Fig.5 Venn diagram of differentially expressed unigenes

图中数据为 DEGs 的数量

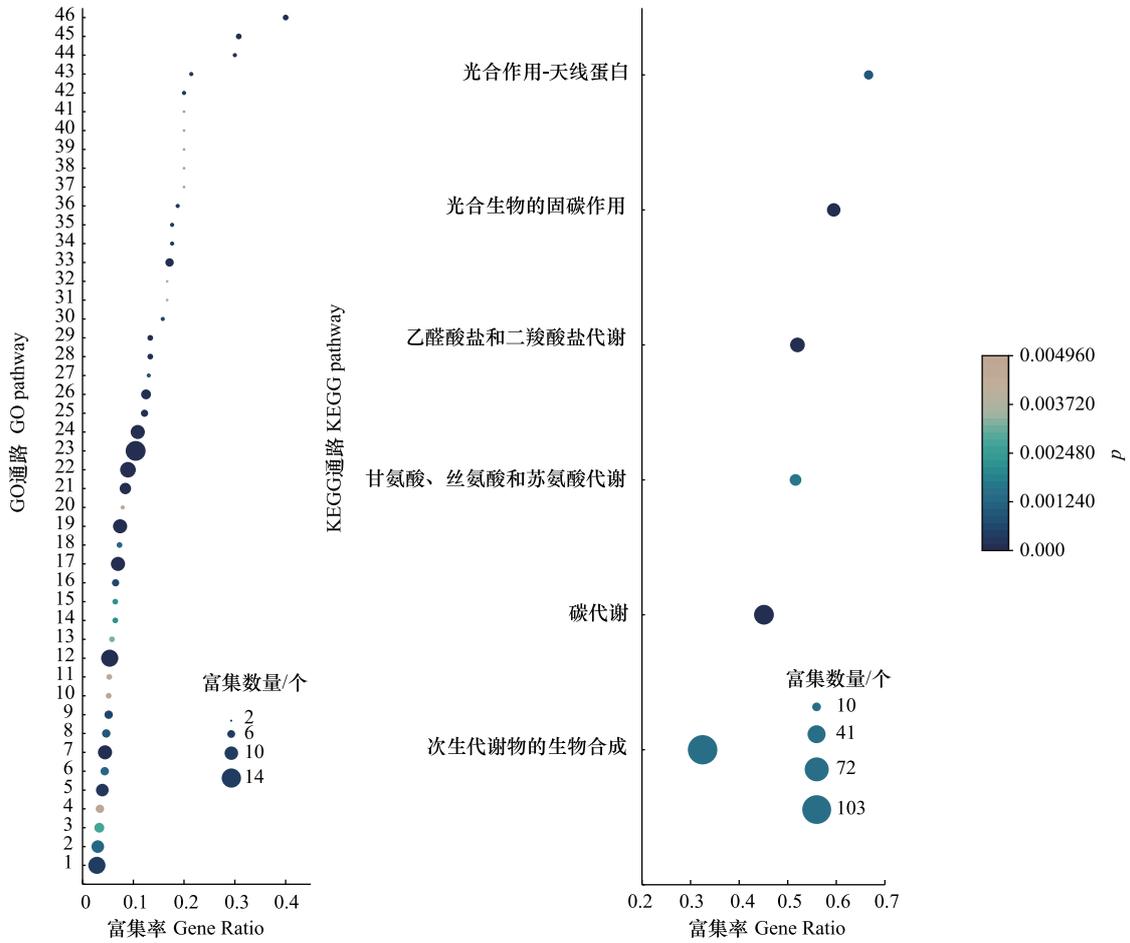


图 6 共差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集

Fig.6 GO and KEGG enrichment of co-differentially expressed unigenes

1:叶绿体类囊体膜;2:NAD 结合;3:金属离子迁移;4:对盐胁迫的反应;5:氧化还原酶活性,作用于供体的醛基或氧基,NAD 或 NADP 作为受体;6:SCF 泛素连接酶复合物;7:光合作用;8:葡萄糖代谢过程;9:转氨酶活性;10:寡肽跨膜转运蛋白活性;11:类囊体;12:NADP 结合;13:萜合酶活性;14:肽跨膜转运蛋白活性;15:肽,质子同向转运体活性;16:转录的正向调控,DNA 模板化;17:蛋白质发色团连接;18:质体小叶;19:叶绿素结合;20:无机阴离子交换活性;21: β -葡萄糖苷酶活性;22:光系统 II;23:光系统 I;24:光合作用、光收集;25:果糖二磷酸缩酶活性;26:东莨菪碱 β -葡萄糖苷酶活性;27:NADPH 结合;28:光合作用,光系统 I 中的光收集;29:作用于成对供体的氧化还原酶活性,一对供体的氧化导致氧分子还原为两分子水;30:L-脯氨酸生物合成过程;31:L-阿拉伯糖代谢过程;32:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(NADP⁺) (磷酸化)活性;33:硫苷分解代谢过程;34:谷氨酸-5-半醛脱氢酶活性;35:1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶活性;36:谷氨酸 5-激酶活性;37:谷氨酰胺酶活性;38:对蓝光的反应;39:系统性获得性耐药性的调节;40:磷酸吡哆醛生物合成;41:鞘氨醇羟化酶活性;42:DNA 分解代谢过程;43:异戊烯基二磷酸生物合成方法,甲基赤霉素 4-磷酸途径参与萜类生物合成过程;44:谷氨酰 tRNA 还原酶活性;45:脱落酸激活信号的负调控通路;46:核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶。

2 个基因表现出相反的表达趋势。与细胞分裂素相关的双组分响应调节器 ARR-A 家族和 ARR-B 家族共筛选到 3 个基因,且在干旱胁迫下都有不同程度的下调。在脱落酸信号转导通路中,干旱胁迫抑制了小沙冬青 PYR/PYL 的表达从而促进了 5 个 PP2C 家族基因的表达(图 8)。

2.5 差异基因的 qRT-PCR 验证

为验证转录组数据的可靠性,选取了如图 9 所示的 6 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证,qRT-PCR 结果和转录组数据中基因表达趋势一致,这表明转录组测序结果真实可信(图 9)。

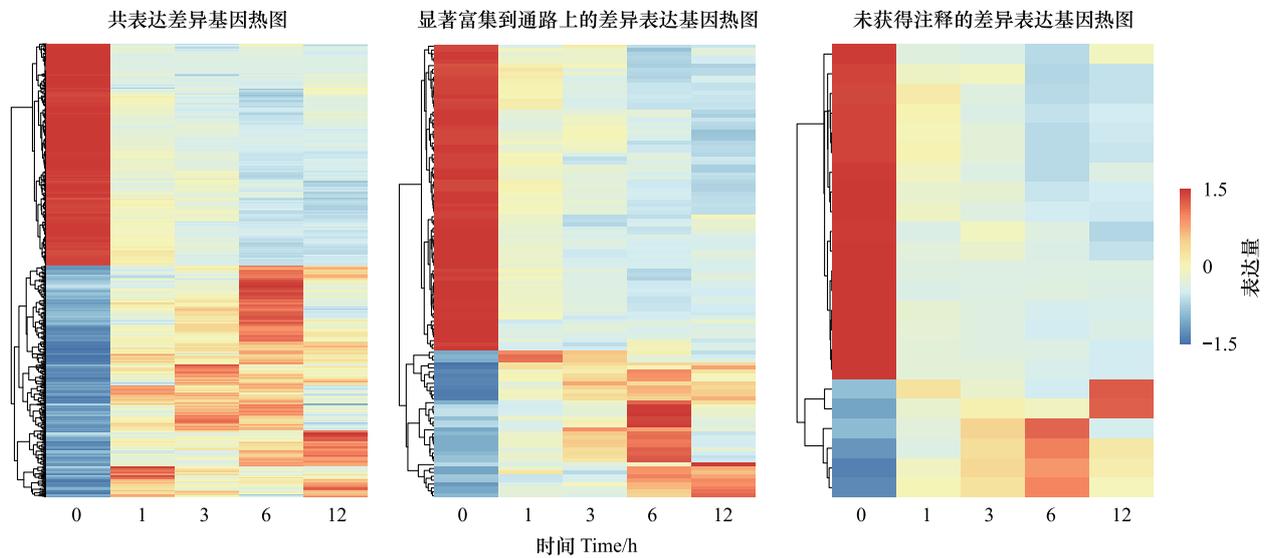


图 7 差异表达基因热图

Fig.7 Heat map of differentially expressed unigenes

3 讨论

植物体内水分亏缺会直接影响叶绿体结构,进而影响叶绿素含量。在干旱胁迫下,抗性越强的种质叶绿体结构完整度越高,叶绿素含量也越高^[26]。在受到胁迫时,植物体内 Pro 含量的增加有助于植物细胞和组织的持水和防止脱水、清除活性氧,并作为细胞结构保护剂、逆境胁迫信号物质等^[27-29],降低逆境胁迫对植物造成的伤害,维持植物正常生长发育。在干旱胁迫下,小沙冬青叶绿素含量未显著下降,甚至出现叶绿素含量上升的现象,Pro 含量增加显著且迅速,这说明小沙冬青具有较强的耐旱性。

本研究对小沙冬青进行干旱处理,通过转录组测序分析共获得 122053 条 Unigenes,在数据库中的注释率达 82.64%,该注释率在非模式植物中较高^[30-34],排除技术因素,推测未注释的一部分 Unigenes 可能是由于该物种特有基因或快速进化的基因,也有一些是基因的非翻译区^[35]。随着胁迫时间的增加,小沙冬青差异表达基因数量增加,共差异表达基因上调与下调数量相近,未获得注释的共差异表达基因下调较多。

光合作用是植物对各种非生物胁迫最为敏感的生理过程^[36]。在小沙冬青中,光合系统对于干旱胁迫的响应迅速,在干旱胁迫 1 h 内,大量光合系统相关基因表达下调,但有一个注释到苹果酸脱氢酶的基因上调表达。结合桑树(*Morus alba*)^[37]、香蕉(*Musa nana*)^[38]、梨(*Pyrus bretschneideri*)^[39]等植物中苹果酸脱氢酶对干旱的响应差异,及苹果酸脱氢酶在耐冷和耐盐中的作用^[40],可以推测编码小沙冬青苹果酸脱氢酶的基因是一个小沙冬青值得深入研究的耐旱候选基因。在干旱胁迫下,植物会发生叶绿素降解^[41],过表达 7-羟甲基叶绿素 a 还原酶能够加速暗诱导的叶绿素降解^[42],相反,7-羟甲基叶绿素 a 还原酶活性降低会导致叶绿素降解受阻^[43],7-羟甲基叶绿素 a 还原酶基因在小沙冬青受到干旱时持续下调表达,这说明防止叶绿素降解在小沙冬青抵御干旱胁迫时起重要作用。

植物激素信号是调节干旱或缺水反应的关键特征^[44]。脱落酸生物合成过程的调控在植物应对干旱胁迫过程中发挥着重要作用^[45]。脱落酸的增加可抑制 PYR/PYL 表达,促进 PP2C 表达^[46],干旱胁迫下,小沙冬青 PYR/PYL 下调表达、PP2C 上调表达,说明小沙冬青通过提高脱落酸水平来适应干旱胁迫。脱落酸对植物中 SnRK2 和 ABF 家族基因表达的影响存在物种特异性^[47],脱落酸诱导小沙冬青 ABF 上调表达。在油菜素甾醇信号通路中,注释到 BRI1 的基因出现不同的表达趋势,这可能与该基因对脱落酸和油菜素甾醇信号间的“协同-拮抗机制”^[48]响应有关。MYC2 是茉莉酸信号转导通路中的正调控因子,转录抑制因子会与 MYC2 结

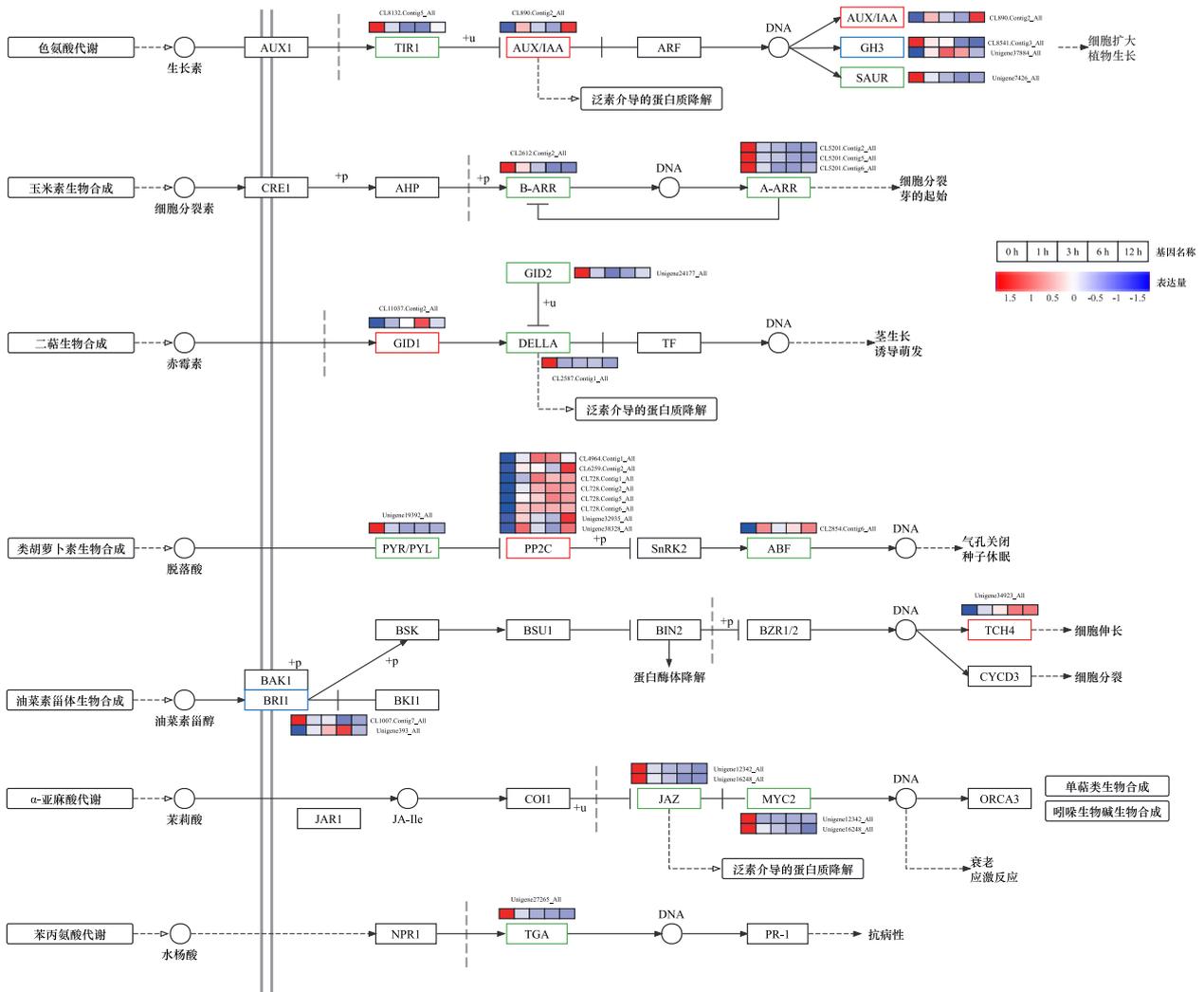


图 8 植物激素信号转导代谢通路及相关基因表达量

Fig.8 Plant hormone signal transduction pathway and related unigenes expression

AUX1:生长素流入载体 Auxin influx carrier;TIR1:转运抑制应答因子 1 Transport inhibitor response 1;AUX/IAA:生长素反应蛋白 IAA auxin-responsive protein IAA;ARF:生长素响应因子 Auxin response factor;GH3:生长素响应 GH3 基因家族 Auxin responsive GH3 gene family;SAUR: SAUR 家族蛋白 SAUR family protein;CRE1:细胞分裂素受体 Cytokinin receptor;AHP:含组氨酸的磷酸传递蛋白质 Histidine-containing phosphotransfer peotin;B-ARR:双组分反应调节因子 ARR - B 家族 Two-component response regulator ARR-B family;A-ARR:双组分反应调节因子 ARR - A 家族 Two-component response regulator ARR-A family;GID1:赤霉素受体 GID1 gibberellin receptor GID1;GID2:F-box 蛋白 GID2 F-box protein GID2;DELLA:DELLA 蛋白 DELLA protein;TF:光敏色素相互作用因子 4 Phytochrome-interacting factor 4;PYR/PYL:脱落酸受体 PYR/PYL 家族 Abscisic acid receptor PYR/PYL family;PP2C:蛋白磷酸酶 2C Protein phosphatase 2C;SnRK2:丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 SRK2 Serine/threonine-protein kinase SRK2;ABF:ABA 响应元件结合因子 ABA responsive element binding factor;BAK1:油菜素内酯不敏感 1 相关受体激酶 1 Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1;BRI1:蛋白质油菜素内酯不敏感 1 Protein brassinosteroid insensitive 1;BK11: BRI1 激酶抑制剂 1 BRI1 kinase inhibitor 1;BSK:BR 信号激酶 BR-signaling kinase;BSU1:丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 BSU1 Serine/threonine-protein phosphatase BSU1;BIN2:Shaggy 相关蛋白激酶 (油菜素内酯不敏感蛋白 2) Shaggy-related protein kinase (protein brassinosteroid insensitive 2);BZR1/2:油菜素内酯抗性 1/2 Brassinosteroid resistant 1/2;TCH4:木葡聚糖:木葡糖基转移酶 TCH4 Xyloglucan: xyloglucosyl transferase TCH4;CYCD3:植物细胞周期素 D3 Plant cyclin D3;JAR1:茉莉酸-氨基合成酶 Jasmonic acid-amino synthetase;JA-Ile:(-)茉莉酮基-L-异亮氨酸 (-)-Jasmonoyl-L-isoleucine;COI1:冠素不感蛋白 1 Coronatine-insensitive protein 1;JAZ:茉莉酸 ZIM 结构域蛋白 Jasmonate ZIM domain-containing protein;MYC2:转录因子 MYC2 transcription factor MYC2;ORCA3:AP2 结构域 DNA 结合蛋白 ORCA2/3 AP2-domain DNA-binding protein ORCA2/3;NPR1:调节蛋白 NPR1 Regulatory protein NPR1;TGA:转录因子 TGA Transcription factor TGA;PR-1:病程相关蛋白 1 Pathogenesis-related protein 1

合从而抑制 MYC2 对下游基因的调控。在本研究中,注释到 JAZ 和 MYC2 的基因均下调表达,干旱可能抑制了茉莉酸信号通路的正向调控。在很多植物中,JAZ 表达上调以响应干旱胁迫^[49-52],小沙冬青茉莉酸信号转

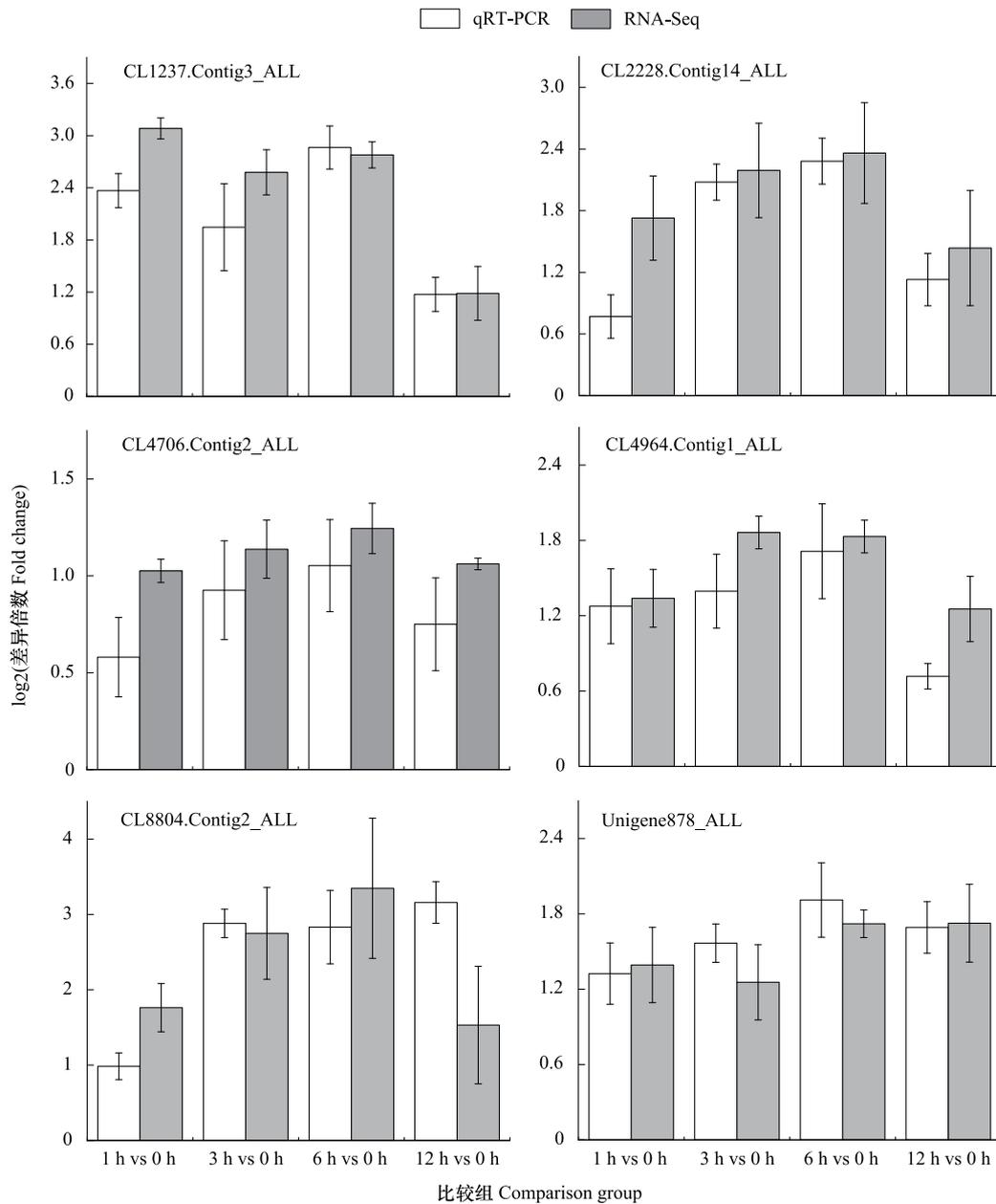


图9 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig.9 Validation of differentially expressed genes by qRT-PCR

导通路对干旱胁迫的响应与其他物种差异较大,可能是其他 JAZ 和 MYC2 相关基因未被注释导致的。

4 结论

植物对干旱的适应是众多基因与信号通路共同参与、相互协调的过程。本研究解析了小沙冬青在不同时长缺水环境中光合色素、抗氧化酶的变化,从基因转录水平对小沙冬青响应干旱逆境的分子调节机制进行了探索。结果表明,干旱胁迫下,小沙冬青的光合系统具有较强的稳定性,共差异表达基因显著富集到“光合作用-天线蛋白”、“光合生物中的碳固定”等多个信号通路,这些信号通路积极参与了光合作用对干旱的适应。小沙冬青叶片内的 POD 和 SOD 积极参与干旱胁迫下的抗氧化调节,而 CAT 活性变化较小。根据已有的理论基础,本研究筛选出一些与小沙冬青耐旱相关的候选基因,如 CL10713.Contig5_All(编码 7-羟甲基叶绿素 a 还

原酶)、CL432.Contig3_All(编码 PetA) 等与光合作用和植物激素信号通路相关的差异表达基因及转录因子。本研究为小沙冬青抗旱生理和分子机制的深入探究提供一定的理论参考。

参考文献 (References):

- [1] 张婷茹, 苗荣庆, 臧威, 庞秋颖, 张爱琴. 角果碱蓬响应干旱胁迫的转录组分析. 植物生理学报, 2023, 59(1): 89-100.
- [2] 王彬, 陈敏氨, 林亮, 叶新如, 朱海生, 温庆放. 植物干旱胁迫的信号通路及相关转录因子研究进展. 西北植物学报, 2020, 40(10): 1792-1806.
- [3] 刘楠. 蒙古沙冬青根响应干旱的蛋白质组学分析[D]. 北京: 中央民族大学, 2013.
- [4] 刘美芹, 卢存福, 尹伟伦. 珍稀濒危植物沙冬青生物学特性及抗逆性研究进展. 应用与环境生物学报, 2004, 10(3): 384-388.
- [5] 郝文芳, 周禧琳, 王海珍, 刘艳萍. 濒危植物小沙冬青研究进展. 植物科学学报, 2019, 37(1): 109-115.
- [6] 张敏, 王学峰, 马利, 刘佳杰, 张慧玲, 王茅雁. 蒙古沙冬青 AmRD22 基因的克隆及耐逆功能研究. 西北植物学报, 2022, 42(7): 1083-1092.
- [7] 唐宽刚, 董博, 温小俊, 殷玉梅, 薛敏, 苏子先, 王茅雁. 异源表达蒙古沙冬青 AmDREB1F 基因提高转基因拟南芥的耐逆性. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4329-4341.
- [8] 张宇, 周克伟, 任美艳, 马利, 唐宽刚, 郭慧琴, 庞新跃, 王茅雁. 蒙古沙冬青 AmNAC2 蛋白转录激活活性及其编码基因表达分析. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(Z4): 3576-3583.
- [9] 魏伟. 蒙古沙冬青干旱胁迫表达谱及三个 AmERF 转录因子基因的功能分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [10] 张文君. 蒙古沙冬青脂肪酶去饱和酶基因 AmFAD2s 的克隆与功能分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [11] 庞新跃, 薛敏, 武雅琪, 任美艳, 唐宽刚, 郭慧琴, 王茅雁. 干旱胁迫下蒙古沙冬青 AmNAC1 基因的表达差异及功能分析. 兰州大学学报: 自然科学版, 2019, 55(6): 808-813.
- [12] 王杨. 沙冬青 AmDE1 及 AmCDP 基因提高转基因大肠杆菌与拟南芥非生物胁迫抗性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- [13] Tang K G, Zhang Y X, Ren M Y, Xue M, Zhang M, Pang X Y, Wang M Y. Constitutive expression of a membrane-bound NAC transcription factor AmN1L1 from a desert shrub *Ammopiptanthus mongolicus* enhances abiotic stress tolerance of transgenic *Arabidopsis*. South African Journal of Botany, 2023, 156: 99-109.
- [14] Cui H W, Wang Y, Yu T Q, Chen S L, Chen Y Z, Lu C F. Heterologous expression of three *Ammopiptanthus mongolicus* dehydrin genes confers abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plants: Basel, Switzerland, 2020, 9(2): 193.
- [15] Ren M Y, Wang Z L, Xue M, Wang X F, Zhang F, Zhang Y, Zhang W J, Wang M Y. Constitutive expression of an A-5 subgroup member in the DREB transcription factor subfamily from *Ammopiptanthus mongolicus* enhanced abiotic stress tolerance and anthocyanin accumulation in transgenic *Arabidopsis*. PLoS One, 2019, 14(10): e0224296.
- [16] 任静怡. 新疆沙冬青 Defensin 和 Bet v 1 基因家族的进化和功能分析[D]. 北京: 中央民族大学, 2022.
- [17] 郭新. 转矮沙冬青液泡膜氢离子焦磷酸酶(AnVP1)基因耐旱玉米株系的回交转育[D]. 成都: 四川农业大学, 2022.
- [18] Sun Y B, Liu L H, Sun S K, Han W Z, Irfan M, Zhang X J, Zhang L, Chen L J. AnDHN, a dehydrin protein from *Ammopiptanthus nanus*, mitigates the negative effects of drought stress in plants. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 788938.
- [19] Yu H Q, Qu J T, Guo X, Li L, Zhang X F, Yang Q Q, Lu Y L, Li W C, Fu F L. Overexpression of vacuolar H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) gene from *Ammopiptanthus nanus* enhances drought tolerance in maize. Journal of Agronomy and Crop Science, 2022, 208(5): 633-644.
- [20] Tang Y M, Lu F Z, Feng W Q, Liu Y, Cao Y, Li W C, Fu F L, Yu H Q. Genome-wide identification and expression analyses of *AnSnRK2* gene family under osmotic stress in *Ammopiptanthus nanus*. Plants: Basel, Switzerland, 2021, 10(5): 882.
- [21] Liu Y P, Zhang L, Hao W F, Zhang L, Liu Y, Chen L Q. Expression of two α -Type expansins from *Ammopiptanthus nanus* in *Arabidopsis thaliana* enhance tolerance to cold and drought stresses. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(21): 5255.
- [22] 于好强. 矮沙冬青四个抗逆基因的功能研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.
- [23] 陈世龙. 矮沙冬青甜菜碱醛缩酶基因(AnBADH)转化烟草及其对耐旱和耐盐性的改良[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [24] 张署军, 尹本丰, 张庆, 陆永兴, 臧永新, 沙亚古丽·及格尔, 殷进飞, 张元明, 买买提明·苏来曼. 荒漠藜类植物齿肋赤藜对4年积雪深度变化的生理生化响应. 生态学报, 2023, 43(2): 838-848.
- [25] 张皖皖. 菊花 CmERF1 调控开花与花发育的分子机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [26] 张一龙, 孙晓梵, 李硕, 李培英, 孙宗玖. 不同抗旱性狗牙根种质的抗旱生理响应差异分析. 中国农业科技导报, 2023, 23(6): 59-70.
- [27] 张林, 陈翔, 吴宇, 于敏, 蔡洪梅, 柳彬彬, 倪芊芊, 刘绿洲, 许辉, 房浩, 李金才. 脯氨酸在植物抗逆中的研究进展. 江汉大学学报: 自然科学版, 2023, 51(1): 42-51.
- [28] 郭春芳, 孙云. 干旱胁迫下植物的渗透调节及脯氨酸代谢研究进展. 福建教育学院学报, 2015, 16(1): 114-118.

- [29] 张振, 马静, 卢剑, 叶协锋, 荆永锋, 徐亮, 李雪利, 高峻. 田间盆栽条件下复合盐对洛阳烟区烤烟生长发育及光合特性的影响. 烟草科技, 2020, 53(3): 10-17.
- [30] 李静宇, 徐友阳, 蔡时可, 王继华. 中泰南五味子转录组测序及生物信息学分析. 广州中医药大学学报, 2022, 39(10): 2387-2393.
- [31] 孙诗瑶, 王晓丽, 曹子林, 张博林, 郭紫微, 赵思懿. 千针万线草根转录组测序及黄酮类化合物合成相关基因挖掘. 福建农业学报, 2022, 37(8): 1008-1015.
- [32] 王建武, 杨涛, 严加坤, 相微微, 冯光惠, 刘翠英, 尚爱军. 沙棘刺和芽的组织解剖与转录组分析. 西北植物学报, 2022, 42(7): 1133-1143.
- [33] 孙森, 许钦奕, 朱志鹏, 刘方方, 沈敏, 洪键, 崔国强, 张言周, 康贻军. 耳叶牛皮消的全长转录组测序及其重要活性物质代谢通路的分析. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(6): 1286-1304.
- [34] Chen R, Wei Q H, Liu Y H, Wei X, Chen X B, Yin X P, Xie T. Transcriptome sequencing and functional characterization of new sesquiterpene synthases from *Curcuma wenyujin*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2021, 709: 108986.
- [35] 董博. 蒙古沙冬青转录组测序和 AmDREB1F 基因的克隆[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- [36] 李铭铭. 干旱胁迫对地黄生长、成分含量和基因转录的影响及相关基因的功能分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2022.
- [37] 孙红梅. 桑树(*Morus alba*)三个干旱诱导基因的表达规律及 MaCDSP32 基因的功能分析[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2020.
- [38] 张建斌, 贾彩红, 邓秋菊, 金志强, 刘菊华, 张建平, 徐碧玉. 香蕉苹果酸脱氢酶基因克隆及其逆境胁迫表达. 西北植物学报, 2012, 32(10): 1942-1949.
- [39] Yang S, Bai M D, Hao G W, Zhang X W, Guo H P, Fu B C. Transcriptome survey and expression analysis reveals the adaptive mechanism of 'Yulu Xiang' Pear in response to long-term drought stress. PLoS One, 2021, 16(2): e0246070.
- [40] 王庆杰. 苹果细胞质苹果酸脱氢酶基因的抗逆功能鉴定及机制研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
- [41] Shan D Q, Chanyu W, Song H D, Bai Y X, Zhang H X, Hu Z H, Wang L, Shi K, Zheng X D, Yan T C, Sun Y Z, Zhu Y P, Zhang T, Zhou Z Y, Guo Y, Kong J. The MdMEK2-MdMPK6-MdWRKY17 pathway stabilizes chlorophyll levels by directly regulating MdSUF6 in apple under drought stress. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2021, 108(3): 814-828.
- [42] Liu W K, Chen G L, Chen J Q, Jahan M S, Guo S R, Wang Y, Sun J. Overexpression of 7-hydroxymethyl chlorophyll *a* reductase from cucumber in tobacco accelerates dark-induced chlorophyll degradation. Plants: Basel, Switzerland, 2021, 10(9): 1820.
- [43] 张向娜, 熊立瑰, 温贝贝, 王坤波, 刘仲华, 黄建安, 李娟. 茶树叶色变异研究进展. 植物生理学报, 2020, 56(4): 643-653.
- [44] Gupta A, Rico-Medina A, Caño-Delgado A I. The physiology of plant responses to drought. Science, 2020, 368(6488): 266-269.
- [45] Waadt R, Sella C A, Hsu P K, Takahashi Y, Munemasa S, Schroeder J I. Plant hormone regulation of abiotic stress responses. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23: 680-694.
- [46] 曾莞棋. 不同激素处理对天女木兰种子休眠解除的影响及 ABA 受体 MsPYR1 基因的功能分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- [47] 徐佳慧, 代宇佳, 罗晓峰, 舒凯, 谭伟明. 植物激素研究中的化学生物学思路与应用. 植物学报, 2020, 55(3): 369-381.
- [48] Li Q Q, Xu F, Chen Z, Teng Z F, Sun K, Li X C, Yu J Y, Zhang G X, Liang Y, Huang X H, Du L, Qian Y W, Wang Y C, Chu C C, Tang J Y. Synergistic interplay of ABA and BR signal in regulating plant growth and adaptation. Nature Plants, 2021, 7(8): 1108-1118.
- [49] 赵鑫. 白刺花苗期响应干旱的生理和分子机制研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2022.
- [50] 廖沛然. 干旱胁迫影响三七皂苷合成途径的分子机制研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2019.
- [51] 徐冰沁. 基于转录组和蛋白质组学的谷子(*Setaria italica* L.)幼苗对干旱的响应机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- [52] 张文利. 小麦 ABA 依赖型和非 ABA 依赖型信号通路中干旱胁迫应答基因的鉴定与分析[D]. 新乡: 河南师范大学, 2018.