

基于转录组测序解析干旱胁迫对祁连山黄参基因表达的调控

张春梅^{1,2}, 祁世明^{1,2}, 闫芳^{2,3}, 赵刚^{1,2},
宋海², 张喜峰^{1,2}, 陈叶^{1,2}

(1.河西学院农业与生态工程学院,甘肃张掖734000; 2.甘肃省河西走廊特色资源利用重点实验室,甘肃张掖734000;
3.河西学院生态与绿洲农业研究院,甘肃张掖734000)

摘要:以栽培2个月的黄参为试材,设置对照(土壤相对含水量70%~80%)和适度干旱胁迫(土壤相对含水量55%~60%)处理,利用高通量转录组测序BGISEQ-500平台,对测序结果进行基因功能注释、差异表达基因(DEGs, differentially expressed genes)筛选。结果表明:(1)获得的68193条Unigene中,分别有34230(50.20%)、34170(50.11%)、31727(46.53%)、27701(40.62%)、27092(39.73%)和22793(33.42%)个Unigene分别被分配到NCBI非冗余蛋白(NR)、eggNOG(基因的进化谱系, Evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups)、基因本体(Gene ontology, GO)、Pfam (Protein family)、SwissProt (Reviewed protein sequence database)和KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)六大功能数据库。(2)DEGs分析显示,黄参块状根和叶中分别有10674个和13402个DEGs;GO富集结果表明,根和叶中的DEGs功能部位中的分布基本一致,主要富集在生物过程、DNA的复制和翻译调控、氧化还原过程、蛋白质磷酸化、防御响应等;KEGG富集分析表明,根中DEGs显著富集在苯丙烷类生物合成、半乳糖代谢、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、植物-病原菌相互作用、植物激素信号转导等途径,叶中DEGs则主要富集在半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、苯丙烷类生物合成、戊糖、葡萄糖醛酸转换、植物激素信号转导等途径,说明淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢、苯丙烷类生物合成途径、植物激素信号转导途径在黄参应对干旱胁迫中起重要作用。干旱胁迫影响黄参不同器官中差异基因的表达,为解析黄参耐受干旱的生物学途径、黄参药效成分的生物合成和分子机制提供了理论依据。

关键词:黄参;干旱胁迫;转录组学测序;差异基因

中图分类号:S567.5; Q945.78 **文献标志码:**A

Sequencing and analysis of transcriptome on regulating gene expression of *Sphallerocarpus gracilis* in Qilian Mountains under drought stress

ZHANG Chunmei^{1,2}, QI Shiming^{1,2}, YAN Fang^{2,3}, ZHAO Gang^{1,2},
SONG Hai², ZHANG Xifeng^{1,2}, CHEN Ye^{1,2}

(1. College of Agriculture and Ecological Engineering, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China;
2. Key Laboratory of Hexi Corridor Resources Utilization of GanSu, Zhangye, Gansu 734000, China;
3. Ecological & Oasis Agricultural Research Institute of Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China)

Abstract: This study used the roots and leaves of 2-month-old *S. gracilis* from moderate drought stressed group and control group (the relative water content in soil was 55%~60% and 70%~80%, respectively) as the test material. The transcriptome sequencing analysis was carried out by using BGISEQ-500. After obtaining transcriptome data, gene function annotation, and differentially expressed genes (DEGs) screening of *S. gracilis* leaf and root were performed. The results showed: (1) A total of 34230 (50.20%), 34170 (50.11%), 31727 (46.53%), 27701 (40.62%), 27092 (39.73%), and 22793 (33.42%) were annotated by non-redundant protein sequence database (NR), eggNOG, gene ontology (GO), Pfam databases, SwissProt and Kyoto Encyclo-

pedia of genes and genomes (KEGG) respectively. (2) There were 10674 and 13402 DEGs in roots and leaves, respectively. At the same time, GO enrichment analysis showed that DEGs of root and leaf were distributed the same in GO functional annotations, mainly focusing on biological process, regulation of transcription, DNA-templated, protein phosphorylation, oxidation-reduction process and defense response. Moreover, the KEGG pathway analysis showed that DEGs in roots were significantly enriched in phenylpropanoid biosynthesis, galactose metabolism, cysteine and methionine metabolism, starch and sucrose metabolism, plant-pathogen interaction and plant hormone signal transduction. The DEGs in leaves were mainly concentrated in galactose metabolism, starch and sucrose metabolism, phenylpropanoid biosynthesis, pentose and glucuronate interconversions and plant hormone signal transduction, indicating that drought stress mainly affected starch and sucrose metabolism, galactose metabolism, phenylpropanoid biosynthesis pathways and plant hormone signal transduction in the roots and leaves of *S. gracilis* as well as these biological pathways played an important role in the response under drought stress. The high-throughput transcriptome sequencing revealed the regulatory characteristics of moderate drought stress on gene expression in different organs of *S. gracilis*. In short, drought stress affected the expression of differential genes in different organs. The study can provide a theoretical basis for analyzing the biological pathway of tolerance of *S. gracilis*, biosynthesis and molecular mechanism of effective components under drought stress.

Keywords: *Sphallerocarpus gracilis*; drought stress; transcriptomics sequencing; differentially expressed genes

干旱是影响植物生长发育和限制农作物生产的重要非生物胁迫因素^[1]。挖掘抗旱植物资源、培育耐旱品种是农业可持续发展亟需解决的问题。植物干旱响应受复杂代谢网络调控,由多个抗旱调控基因和功能基因协同作用参与干旱胁迫应答^[2]。因此,深入挖掘抗旱分子机制和抗旱关键基因是提高作物抗旱能力的重点研究内容。

黄参(*Sphallerocarpus gracilis*)是伞形科迷果芹属的单种植物,零星分布于我国西北、东北、华北地区,尤其分布于祁连山、焉支山(甘肃张掖市境内),像张掖市山丹县这样大面积形成群落优势的情况很罕见。研究黄参对祁连山区水土保持、遏制草场沙漠化和维持生物多样性具有重要的生态和经济意义。黄参具有补气养血、滋补肝肾、通经活络等功效,其肉质根富含人体必需的16种氨基酸,被誉为“小人参”。中药典籍中将黄参(也叫藏药迷果芹)列为补益药物,可作为“五根散”和“唐蕃补脑液”的首药,主要营养成分是蛋白质、多糖、氨基酸、淀粉与类胡萝卜素,具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫力、延缓疲劳等作用,其中多糖是最重要的生物活性成分之一^[3]。作为营养丰富、经济、药用价值极高的天然珍品,黄参已成为甘肃特产及西部交易会指定产品,在食品、医药、化工等领域具有极大的应用潜力与开发前景。由于生态环境恶化及当地百姓的掠夺式经营,野生黄参种群数量骤减。

绝大部分非模式生物缺乏基因组数据^[4]。转录组学有利于研究无参考基因组的非模式植物^[5]。转录组测序技术能从 mRNA 水平研究物种基因功

能、量化基因表达、挖掘重要功能基因及调控机制,有助于揭示植物对干旱的应答机理,对构建逆境基因组转录调控网络、发现代谢途径关键基因具有重大意义^[6]。因此,应用转录组测序技术研究植物在干旱条件下的复杂网络调控是当今研究的热点。转录组已被广泛用于植物逆境胁迫的相关研究,如张蕾等^[7]研究了甘蓝型油菜响应干旱胁迫的转录组学;孙晓琛等^[8]利用转录组测序分析了干旱胁迫对党参基因表达的调控机制;李倩^[9]通过转录组分析挖掘了黄花苜蓿中抗旱关键基因;魏晓芸^[10]通过转录组学明确了红砂响应干旱的分子机制;杨亚桐^[11]利用转录组测序技术筛选出与玉米籽粒耐旱性相关的蛋白、基因和代谢途径;李晓艳等^[12]揭示了干旱胁迫对丹参不同组织基因表达的调控;魏正欣等^[13]研究了干旱胁迫下蚕豆 *ASPAT* 基因家族的转录组信息;祁伟亮等^[14]探究了与干旱相关的代谢通路和基因调控表达;白明兴等^[15]采用了 RNA-Seq 技术和 iTRAQ 技术研究了耐旱性不同的两个玉米自交系的耐旱机制。

黄参作为耐旱性强的祁连山特色资源,探究其耐受干旱逆境的调控机理十分必要。对黄参的抢救性保护及其遗传结构研究迫切需要基因组资源。本课题组前期开展了黄参蛋白质组和转录组研究,但从转录组学水平解析干旱对濒危黄参种质不同部位基因表达调控尚未见报道。因此,本研究以黄参块状根及叶为材料,分别设置对照和适度干旱胁迫处理,利用高通量转录组测序 BGISEQ-500 平台和差异表达基因(DEGs)来分析黄参叶和根响应适

度干旱胁迫的代谢通路及调控机制,以期丰富非模式植物黄参基因组数据库,为揭示黄参响应干旱胁迫的分子机制提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

于 2023 年 4 月 5 日在甘肃省张掖市山丹县军马场采集带土野生黄参 (*Sphallerocarpus gracilis*) 并带回实验室。为防止自然降水的影响,试验全程在室内进行,按常规栽培方法将黄参根段栽至盆底直径为 18.0 cm、上部直径 30.0 cm、盆深 38.0 cm 的花盆中,每盆 4 株,盆栽土为花盆容积 2/3 的等量灭菌营养土,待植株生长 2 个月后,选取长势一致的黄参随机分为 2 组。用盆栽法模拟自然干旱过程,每盆的外界条件(温度、光照等)保持一致。对照处理(CK)的土壤相对含水量控制为田间持水量的 70%~80%,采用称重法控制土壤含水量,于每日 18:00 称量补水;适度干旱胁迫处理为自然干旱,每日采用称重法测定土壤相对含水量,含水量下限控制为田间持水量的 55%~60%。土壤吸湿水含量采用烘干称重法(105℃±2℃)测定。处理 15 d 后,分别采收对照和干旱胁迫处理黄参的根和叶,各 3 次重复,蒸馏水清洗干净,吸水纸吸干水分,用液氮速冻,置于-80℃冰箱保存备用。

1.2 主要试剂及仪器

主要仪器:震荡仪(Shaker, Thermo, 美国);分析天平(BSA224S, Sartorius, 德国);Bio-Rad 凝胶成像系统(ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad 公司, 美国);NanoDrop 2000 微量分光光度计(Thermo Scientific, 美国);生物分析仪(Agilent2100 Bioanalyzer, 安捷伦公司, 美国)。

主要试剂:TRIzol® Reagent(Invitrogen 公司, 美国);氯仿、异丙醇、乙醇等化学试剂(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);BGISEQ-500v1.5 试剂盒(Illumina 公司, 美国)。

1.3 试验方法及步骤

1.3.1 黄参生长指标测定 用游标卡尺和卷尺测定不同处理植株的根长、苗高;用水将地上和地下部分冲洗干净并于 105℃ 杀青 30 min,再于烘箱中 80℃ 烘至恒重后称取根和叶干质量,并计算根冠比。

1.3.2 黄参根、叶 RNA 提取及转录组测序 分析对照组和干旱处理试验组,每处理 3 份生物学重复。液氮速冻并保存于-80℃冰箱中,以保证 RNA 的相态保持在刚采摘时的状态。叶肉细胞移入 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL Trizol 试剂,混匀,室温静置 5

min;加入 0.2 mL 氯仿,振荡 15 s,静置 2 min;4℃ 12 000 g 离心 15 min,裂解液分层成水相和有机相,取上清液;加入 0.5 mL 异丙醇,将管中液体轻轻混匀,室温静置 10 min;4℃ 12 000 g 离心 10 min,弃上清液,水相转移后,加入 1 mL 75%乙醇,洗涤沉淀。4℃ 7 500 g 离心 5 min,吸去残留液体,弃上清液;晾干 3~5 min;将获得的 RNA 沉淀溶于 30 μL 的 DEPC(焦炭酸二乙酯)水中。

1.3.3 cDNA 文库构建及转录组序列组装 取一定量的 RNA 样品,使用 oligo(dT)磁珠通过 2 轮纯化对其中的带有 PolyA(多聚腺苷酸)的 mRNA 进行特异性捕获。将捕获到的 mRNA 在高温条件下利用镁离子打断试剂盒进行片段化,94℃ 5~7 min。将片段化的 RNA 通过逆转录酶的作用合成 cDNA。使用 *E. coli* DNA polymerase I (NEB, cat.m0209, 美国)与 RNase H (NEB, cat.m0297, 美国)进行二链合成,利用磁珠对其片段大小进行筛选和纯化。对 PCR 反应及产物进行回收、扩增,得到文库。委托陕西致研生物科技有限公司使用 NanoDrop ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, 美国)对总 RNA 的量与纯度进行质量控制并通过 Bioanalyzer 2100 (Agilent, CA, 美国)对 RNA 的完整性进行检测,检测合格后采用 BGISEQ-500 测序。利用 Trinity 软件对 reads 进行序列组装,使用 BUSCO 软件进行质量评估。

1.3.4 功能注释及差异基因筛选 利用生物信息学分析获得黄参的 Unigene。由于黄参未完成基因组测序,尚无详细遗传信息可以参考,使用全新比对软件 DIAMOND 进行 Unigene 的功能注释,注释使用 6 种权威的数据库,包括 NCBI_NR (NCBI non-redundant protein sequences)、GO (gene ontolog)、KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)、Pfam (protein family)、SwissProt (reviewed protein sequence database) 和 eggNOG (evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups)。eggNOG 对更全面的物种和更大量蛋白序列进行分类,扩大物种和序列数据量,采用了非监督聚类方法进行计算。NCBI_NR、Pfam、SwissProt 和 eggNOG 数据库仅保留最佳匹配结果,GO、KEGG 数据库保留所有满足设置阈值的注释结果。差异表达基因通常从差异倍数和显著水平两方面同时对基因进行筛选。

1.3.5 差异表达基因的功能注释与代谢通路富集分析 使用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)将得到的非冗余转录本序列与 GO (Gene

Ontology) 和 KEGG 数据库比对,获得转录本的注释信息,描述差异表达基因可能行使的分子功能。应用超几何检验,找出与整个 Unigene 的 GO 和 KEGG 注释结果相比,在显著性差异表达 Unigene 中显著富集的 GO 条目和 KEGG 通路。使用 KEGG 数据库对差异表达基因所属的代谢通路进行显著性富集分析。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫对黄参幼苗生长的影响

由表 1 可知,与对照相比,干旱处理的根长和苗高分别下降 20.78% 和 23.04% ($P < 0.05$),叶干质量和根干质量分别显著下降 69.23% 和 33.33% ($P < 0.01$),根冠比降低 27.08%,说明干旱明显影响根和叶生物量的积累,其中对叶的生物量影响更明显。

2.2 高通量测序和 de novo 组装

研究物种黄参没有合适的参考基因组,所以使用的是无参考转录组的分析。使用 Trinity 软件对测序得到的 reads 进行 de novo 从头组装,各样本的 Q20 与 Q30 分别高于 97% 和 93%,GC 含量均高于 42.55% (见表 2)。使用 BUSCO 软件进行质量评估,注释覆盖了大约 92.19% 的黄参基因组,表明获得了高质量注释。组装长度分布图可以直观地展示基因或转录本的长度分布情况,由图 1 可知,长度介于 200~300 bp 的 Unigene 最多,达到 21840 条,占

32.03%,长度介于 300~600 bp 的 Unigene 有 19021 条 (27.89%),长度为 600~2000 bp 的 Unigene 有 17147 条 (25.14%),10185 条 Unigene (14.94%) 的长度大于 2000 bp。另外,代表组装质量的 Unigene N50 为 2044 bp。转录本和 Unigene 组装统计结果见表 3。本研究中干旱胁迫处理下的黄参转录组测序数据和组装完整性较高,说明可以进行后期的转录组学分析。

2.3 黄参转录组基因总体注释情况

黄参 Unigene 功能注释总表见表 4。结果显示,黄参注释成功的有 68193 条 Unigene。注释成功的 Unigene 数目最多的是 NR (34230 条),占总 Unigene 的 50.20%;其次为 eggNOG,为 34170 条,占总 Unigene 的 50.11%;GO 为 31727 条,占比 46.53%;Pfam 为 27701 条,占比 40.62%;SwissProt 为 27092 条,占比 39.73%;KEGG 为 22793 条,占比 33.42%。

2.3.1 NR 功能注释 与 NR 数据库进行比对,可确定同源序列所属物种。结果表明(图 2,见 74 页),转录组所得 Unigene 与胡萝卜 (*Daucus carota*) 同源序列最多,占注释 Unigene 的 72.6%;其后依次为陆地棉 (*Gossypium hirsutum*)、雷蒙氏油棉 (*Gossypium raimondii*)、木棉 (*Gossypium arboretum*)、海岛棉 (*Gossypium barbadense*)、栓皮栎 (*Quercu suber*) 和其他物种 (14.47%)。

表 1 干旱胁迫对黄参幼苗生长的影响

Table 1 Effects of drought stress on seedlings growth of *Sphallerocarpus gracilis*

处理 Treatment	根长/cm Root length	苗高/cm Stem height	根干质量/(g·株 ⁻¹) Root dry mass	叶干质量/(g·株 ⁻¹) Leaf dry mass	根冠比 Root-shoot ratio
对照组 Control group	6.35±0.20aA	6.64±0.29aA	0.12±0.002aA	0.13±0.012aA	0.48±0.03aA
干旱处理 Drought treatment	5.03±0.27bA	5.11±0.03bB	0.08±0.017bB	0.04±0.013bB	0.35±0.04abA

注:不同大、小写字母分别表示在 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Different uppercase and lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

表 2 转录组测序产量统计

Table 2 Statistical analysis of sequencing yields of *Sphallerocarpus gracilis*

样品 Sample	测序部位 Sequencing site	原始序列/(10 ⁹ bp) Raw reads	有效序列/(10 ⁹ bp) Valid reads	碱基有效率/% Base efficiency	Q20/%	Q30/%	GC 含量/% GC content
对照组 Control group	叶 Leaf	6.58	6.33	97.54	97.95	93.72	42.94
	根 Root	6.40	6.18	97.88	97.77	93.26	43.11
干旱处理 Drought treatment	叶 Leaf	6.46	6.24	97.71	97.86	93.49	42.91
	根 Root	5.70	5.46	97.32	98.13	94.10	42.55

注:Q20、Q30 为质量值大于等于 20 或 30 的碱基所占百分比(测序错误率小于 0.01 或 0.001)。

Note: Q20 and Q30 are the percentage of bases with mass values greater than or equal to 20 or 30 (sequencing error rate is less than 0.01 or 0.001).

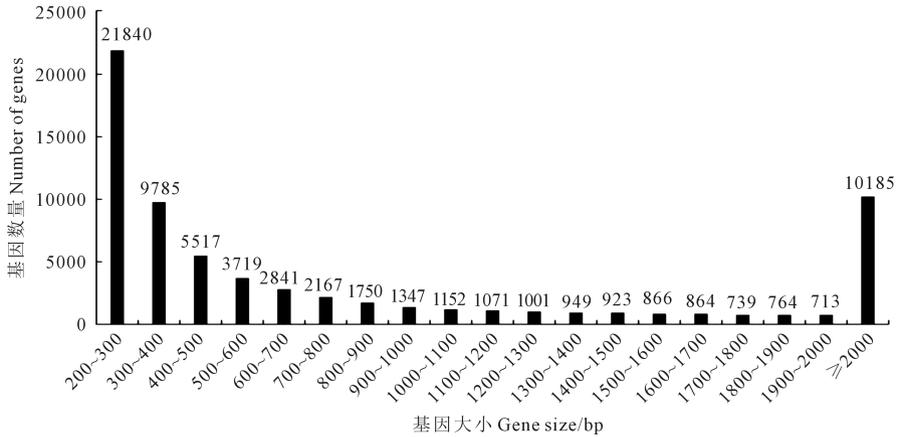


图 1 黄参总 Unigene 的长度分布

Fig.1 Length distribution of Unigene of *Sphallerocarpus gracilis*

表 3 黄参测序后的转录本和 Unigene 组装统计

Table 3 Data assembly for transcript and Unigene in the transcriptome of *Sphallerocarpus gracilis*

拼接长度范围 Splicing length range/bp	转录本数量 Transcript No.	单基因数量 Gene No.
总数量 All	316140	68193
组装总碱基数 Total assembled bases	593857686	66311516
最大长度 Max. length	15723	15723
最小长度 Min. length	183	201
平均长度 Median length	1597	439
N50	2650	2044

表 4 黄参转录组基因注释结果统计

Table 4 Unigene annotation result of *Sphallerocarpus gracilis* transcriptome

数据库名称 Database	Unigene 注释数目 Annotated gene number	注释数占总 Unigene 数的比例 Ratio/%
NR	34230	50.20
SwissProt	27092	39.73
KEGG	22793	33.42
eggNOG	34170	50.11
Pfam	27701	40.62
GO	31727	46.53

2.3.2 GO 注释与分类 对所得的 Unigene 进行 GO 功能注释,如图 3 所示,共有 31727 条 Unigene 被成功注释到生物过程(Biological process, BP)、细胞组分(Cellular component, CC)和分子功能(Molecular function, MF)三大类的 50 个功能条目中,其中生物过程注释条目最多,为 25 个,细胞组分为 15 个功能组,分子功能分为 10 个功能组,注释基因数目超过 3000 条的 7 个功能条目分别为:生物过程(3506 条),细胞组分中依次为细胞核(9432 条)、细胞质(5466 条)、质膜(5318 条)、膜的整体成分(3832

条)、细胞溶质(3725 条),分子功能中的结合蛋白(5498 条)。

2.3.3 eggNOG 功能分类 对黄参 Unigene 的可能功能进行比对,共有 34170 条 Unigene 被注释到 23 个功能类别。如图 4 所示,最大的功能组是翻译后修饰、蛋白质转换及分子伴侣(2639 条,7.72%),其次是信号转导机制(1954 条,5.72%),转录(1896 条,5.55%),翻译、核糖体结构和生物起源(1235 条,3.61%)。

2.3.4 KEGG 代谢通路分析 由图 5 可知,注释的基因参与 KEGG 数据库中 6 个类别下的 20 种次级代谢途径,注释为代谢类的基因数最多(7020 条),其包含的代谢通路种类也最多。与有机系统相关的通路获得 665 个注释,遗传信息处理、环境信息处理和细胞过程注释分别是 4369 个、1139 个和 932 个,人类疾病注释数最少(60 个)。进一步细分为 20 个子类代谢途径中,翻译获得注释最多,为 1842 个;其次为糖类代谢和折叠、分类和降解,分别为 1775 个和 1410 个注释,信号转导和脂类代谢均为 973 个注释。这为筛选黄参活跃的生物代谢途径提供了科学依据。

2.4 干旱胁迫下黄参差异基因表达(DEGs)分析

由图 6A 可知,根系得到 10674 个 DEGs,根的上调基因数(6258)大于下调基因数(4416),而叶片得到 13402 个 DEGs,叶片上调基因数(5957)小于下调基因数(7445)。黄参在根系、叶片不同器官中差异表达重叠基因有 4532 个(图 6B)。与根部相比,黄参叶片对干旱环境更为敏感。

2.5 干旱胁迫下黄参差异基因 GO 功能富集

对 GO 功能注释的差异表达基因进行富集分析,图 7A、B 分别显示了干旱胁迫下黄参根系、叶片中 DEGs 在 GO 二级节点的注释结果。由图 7 可知,

黄参根系和叶片中的 DEGs 在生物过程、细胞组分、分子功能的分布一致,含有差异基因数目条目最多的是细胞组分。代谢过程类 DEGs 主要集中于生物过程、DNA 的复制和翻译调控、氧化还原过程、蛋白质磷酸化、防御响应;细胞组分类 DEGs 均主要集中于细胞核、细胞质、质膜、膜的整体成分、细胞溶质;分子功能类 DEGs 主要集中于分子功能和结合蛋白。

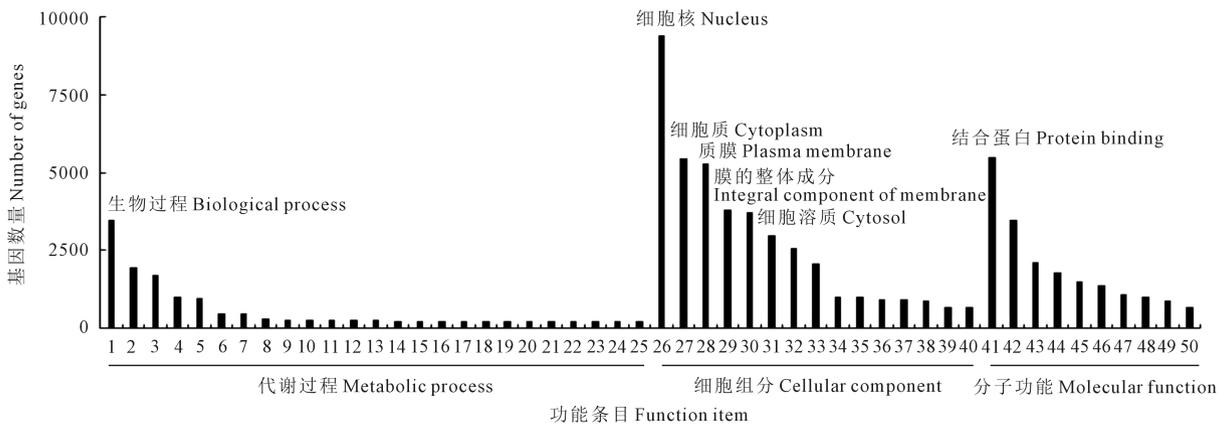
2.6 干旱胁迫下黄参差异基因的 KEGG 代谢通路富集分析

为确定差异基因参与的主要生化代谢途径和信号转导途径,分别将黄参根系和叶片中的 DEGs 进行 KEGG 途径富集分析,如图 8 可知,黄参根系中显著富集到的 KEGG 途径分为 2 类,第 1 类为信号转导途径,包括植物-病原菌相互作用、植物激素信号转导,第 2 类则是苯丙烷类生物合成、半乳糖代谢、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢途径。叶片中 DEGs 则主要富

集在淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导、半乳糖代谢、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、苯丙烷类生物合成等途径。说明上述途径明显受到干旱胁迫影响,尤其是根系和叶片中同时表达的植物激素信号转导、半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、苯丙烷类生物合成可能在黄参耐受干旱生理代谢调节中发挥主要作用。

3 讨论

植物响应干旱胁迫的过程涉及多方面、多层次,利用转录组测序技术研究植物适应干旱的复杂调控机制,有助于揭示植物干旱应答机理,对逆境基因组转录调控网络的构建具有重大意义^[16]。本研究采用高通量转录组测序 BGISEQ-500 平台和差异表达基因(DEGs)对干旱胁迫下黄参根和叶片的 mRNA 进行测序,获得了大量的 Unigene,建立了非模式植物黄参的转录组数据库,很大程度上丰富了黄参的基因信息资源库。



注:1:生物过程;2:DNA 的复制和翻译调控;3:转录、DNA 复制;4:蛋白质磷酸化;5:氧化还原反应;6:防御响应;7:翻译;8:对盐胁迫的响应;9:对脱落酸的反应;10:对镉离子的反应;11:蛋白质水解;12:信号转导;13:缺水响应;14:磷酸化;15:蛋白质泛素化;16:冷胁迫响应;17:细胞壁组织;18:多细胞生物发育;19:对细菌的防御反应;20:跨膜转运;21:细胞分化;22:种子休眠期间种胚发育停止;23:热响应;24:蛋白质折叠;25:转录的正调控、DNA 复制;26:细胞核;27:细胞质;28:质膜;29:膜的整体成分;30:叶绿体;31:细胞溶质;32:线粒体;33:胞外区;34:膜;35:高尔基体;36:胞间连丝;37:液泡;38:细胞壁;39:内质网;40:叶绿体基质;41:分子功能;42:结合蛋白;43:DNA 结合转录因子活性;44:DNA 结合;45:ATP 结合;46:金属离子结合;47:蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性;48:激酶活性;49:序列特异性 DNA 结合;50:RNA 结合。

Note: 1: Biological process; 2: Regulation of transcription, DNA-templated; 3: Transcription, DNA-templated; 4: Protein phosphorylation; 5: Oxidation-reduction process; 6: Defense response; 7: Translation; 8: Response to salt stress; 9: Response to abscisic acid; 10: Response to cadmium ion; 11: Proteolysis; 12: Signal transduction; 13: Response to water deprivation; 14: Phosphorylation; 15: Protein ubiquitination; 16: Response to cold; 17: Cell wall organization; 18: Multicellular organism development; 19: Defense response to bacterium; 20: Transmembrane transport; 21: Cell differentiation; 22: Embryo development ending in seed dormancy; 23: Response to heat; 24: Protein folding; 25: Positive regulation of transcription, DNA-templated; 26: Nucleus; 27: Cytoplasm; 28: Plasma membrane; 29: Integral component of membrane; 30: Chloroplast; 31: Cytosol; 32: Mitochondrion; 33: Extracellular region; 34: Membrane; 35: Golgi apparatus; 36: Plasmodesma; 37: Vacuole; 38: Cell wall; 39: Endoplasmic reticulum; 40: Chloroplast stroma; 41: Molecular_function; 42: Protein binding; 43: DNA binding transcription factor activity; 44: DNA binding; 45: ATP binding; 46: Metal ion binding; 47: Protein serine/threonine kinase activity; 48: Kinase activity; 49: Sequence-specific DNA binding; 50: RNA binding.

图3 Unigene 的 GO 功能分类

Fig.3 GO function classification of Unigene

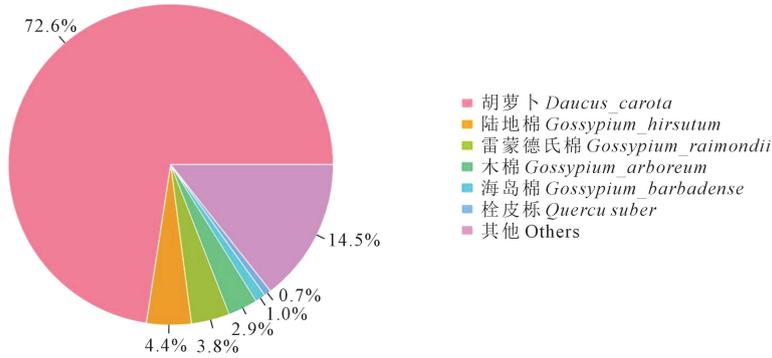


图 2 NR 数据库物种注释分布情况

Fig.2 NR database comparison of species distribution

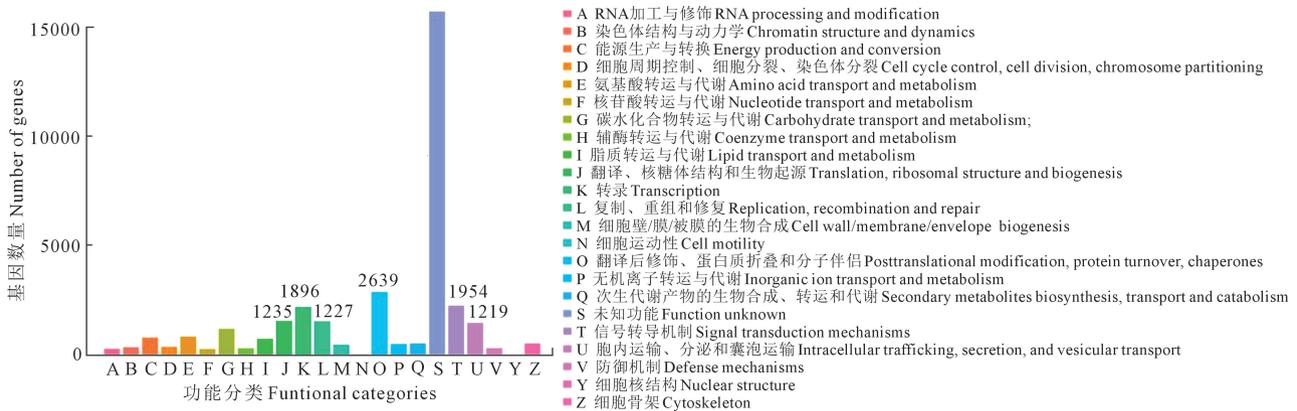
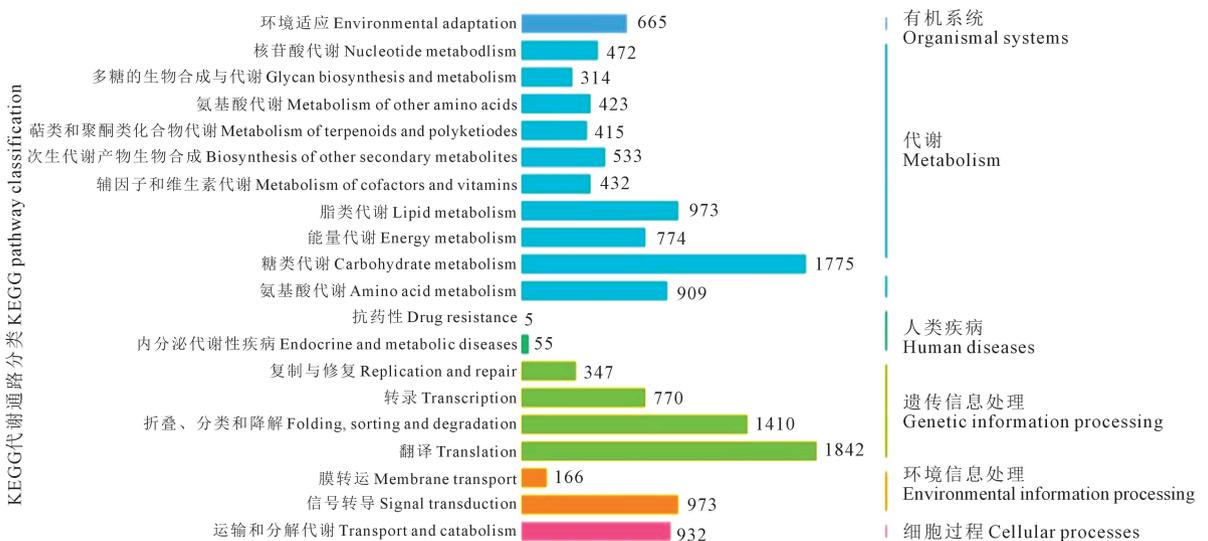


图 4 Unigene 的 eggNOG 功能分类

Fig.4 Histogram of Unigene' eggNOG function classification



注:图中不同颜色代表所属大类,由图例标注。条形图的每一行为所属小类,数字为该类中 Unigene 的数量。

Note: Different colors represent the category, marked by legend. Each behavior of the bar graph belongs to a subclass, and the number is the number of Unigene in the class.

图 5 Unigene 的 KEGG 通路及二级通路分类

Fig.5 Histogram of Unigene' KEGG pathways classification and secondary pathway classification

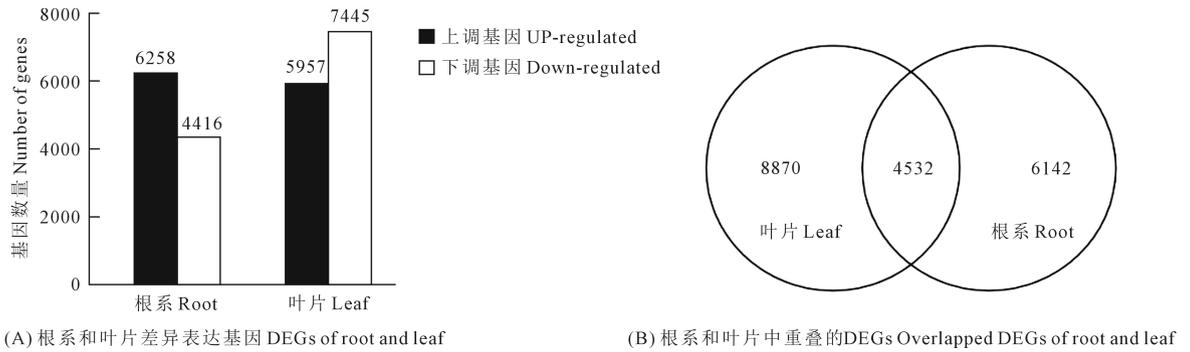


图 6 根系和叶片差异表达基因总数

Fig.6 Number of total DEGs in root and leaf

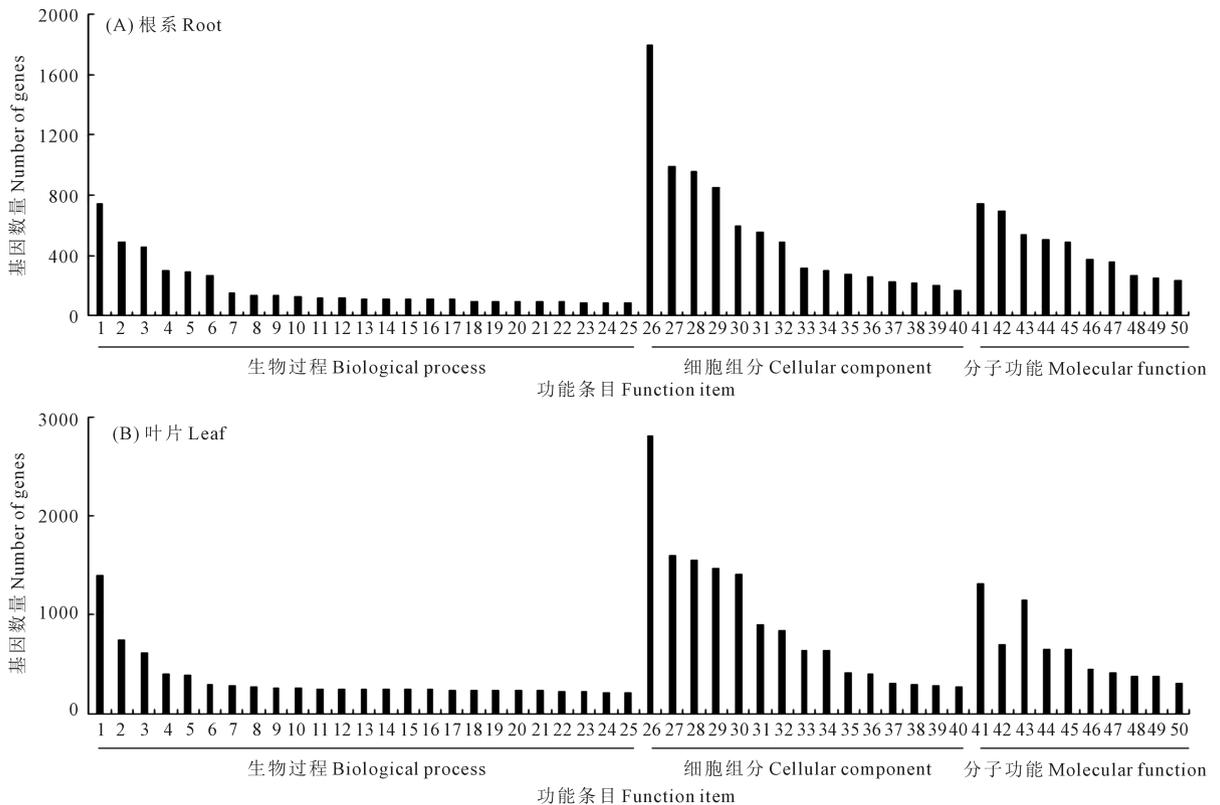


图 7 适度干旱胁迫下黄参根和叶中 DEGs 的 GO 功能分类条目

Fig.7 GO function classification of DEGs in roots and leaves of *S.gracilis* under moderate drought stress

3.1 不同器官在黄参响应干旱胁迫中的作用

本研究对适度干旱胁迫下的黄参根系和叶片进行了转录组测序和差异表达基因(DEGs)分析,黄参根系的上调基因数(6258)大于下调基因数(4416),而叶片上调基因数(5957)小于下调基因数(7445)。基因下调是一种适应机制,植物通过减缓其新陈代谢和抑制生长来适应干旱胁迫,而表达基因上调可能是植物一种积极的环境适应策略^[16]。本研究中生长指标分析显示,干旱明显影响根和叶生物量的积累,其中对叶的生物量影响更明显。在叶片和根系中分别检测出 8870 和 6142 个 DEGs,其

中有 4532 个重叠的 DEGs,叶片的 DEGs 多于根系,表明黄参叶片对干旱胁迫的响应比根部更敏感,这与生长指标反应一致,说明在遭受干旱胁迫时,根和叶两种器官可能具有不同的响应机制。叶片中的 DEGs 比根系中高,这也说明黄参受到干旱胁迫时叶片中可能会诱导更多抗旱相关基因的表达,使黄参能够在干旱逆境下正常生长。但 GO 富集结果表明,黄参根系和叶片中的 DEGs 功能部位中的分布规律基本一致,这与干旱胁迫下甘草^[17]、豌豆^[18]转录组学分析结果相似。分析黄参显著表达的 DEGs,主要富集在生物过程、DNA 的复制和翻译调

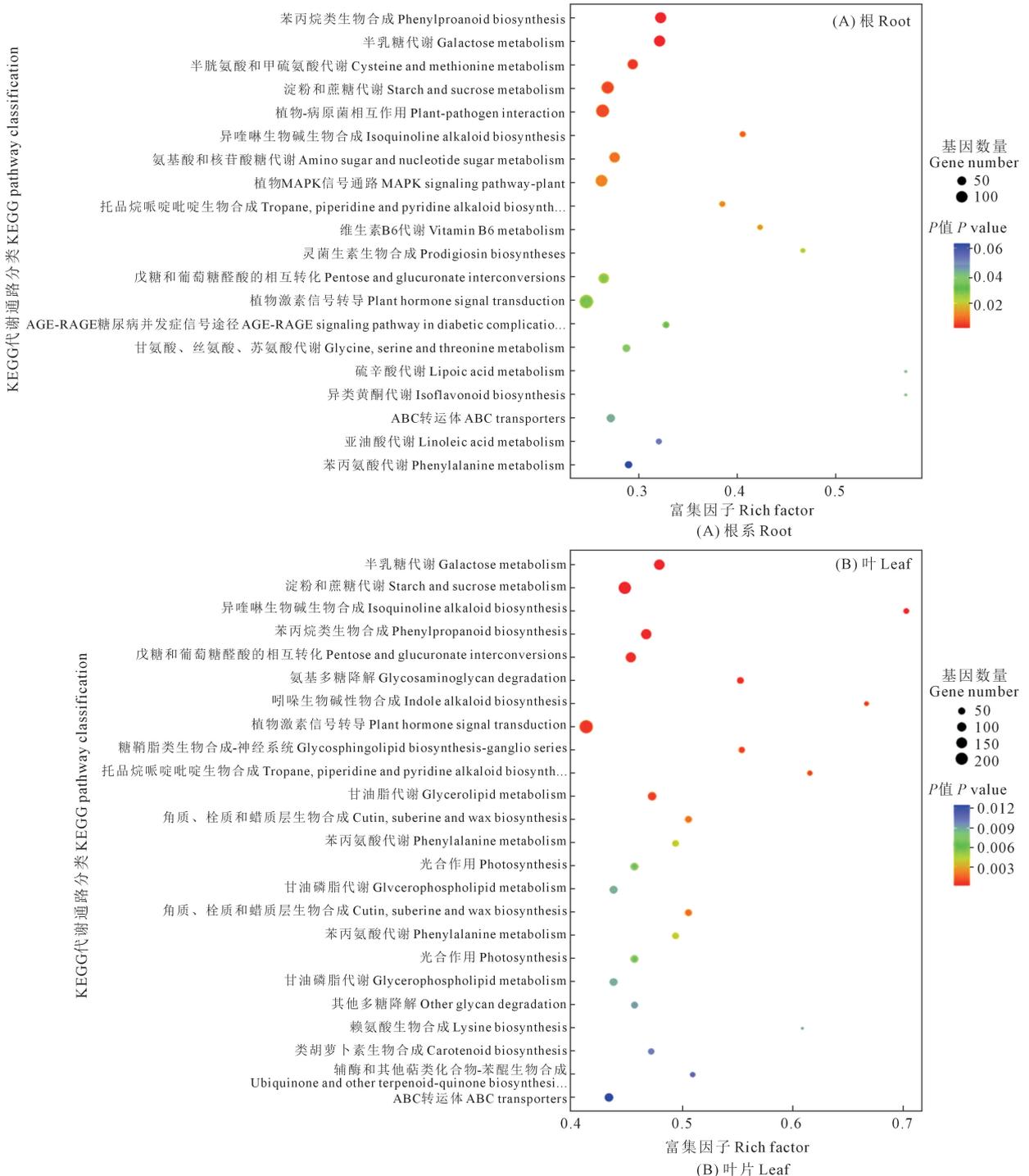


图 8 适度干旱胁迫下黄参根和叶中 DEGs 的 KEGG 代谢途径分类及富集情况

Fig.8 KEGG pathway definition and enrichment of DEGs in roots and leaves of *S. gracilis* under moderate drought stress

控、氧化还原过程、蛋白质磷酸化、防御响应等功能,这表明黄参可能通过上述这些生物过程抵御干旱胁迫。

3.2 不同器官中的 KEGG 代谢途径与黄参响应干旱胁迫的关系

KEGG 途径富集分析表明,根系中 DEGs 显著富集在苯丙烷类生物合成、半乳糖代谢、半胱氨酸

和甲硫氨酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、植物-病原菌相互作用、植物激素信号转导等途径。叶片中 DEGs 则主要富集在半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、苯丙烷类生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、植物激素信号转导等途径。根系与叶片中参与代谢途径存在部分差异,表明在黄参不同器官中起保护作用的代谢途径不同。蔗糖作为主要的可溶性糖,干

干旱胁迫下能充当调节转运蛋白、诱导植物体内抗性基因表达的的信号物质^[19]。本研究中,根系和叶片中 DEGs 均显著富集在淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢、苯丙烷类合成途径和植物激素信号转导途径,表明这些代谢途径对黄参响应干旱胁迫发挥着重要作用,黄参通过增加碳和能量供给和苯丙烷类化合物的生物含量来应对干旱胁迫。同时表明,黄参中多糖的合成是涉及到根、叶乃至整个植株的复杂过程,干旱胁迫能促进黄参活性成分积累。推测黄参的抗旱性可能与渗透调节物质的合成有关,这进一步验证了合成和积累次生代谢产物是药用植物最重要的防御环境胁迫策略,环境胁迫导致药用植物次生代谢产物的积累^[19]。适宜的干旱胁迫被认为有利于药用植物中活性成分的积累和药材品质的提高^[20],因此在黄参大田种植中,可通过适当的干旱胁迫来提高黄参品质。综上所述,黄参会通过干旱信号感知和传导来调控不同代谢和信号转导途径,进而调控耐旱响应。

本研究还发现,根系和叶片中差异表达基因高度富集在能量代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、蛋白质翻译、折叠等通路,这可能有助于缓解胁迫和维持干旱胁迫适应过程中的能量平衡^[21],验证了能量储备和氨基酸是植物耐受胁迫环境的响应基础^[22-24],表明黄参可能通过积极快速调整氨基酸和蛋白质稳态来应对干旱逆境,本研究结果与角果碱蓬^[2]、党参^[8]、黄花苜蓿^[9]的研究结果相似。众多研究发现,植物的干旱耐受性与碳代谢、淀粉和蔗糖代谢等代谢途径的响应过程有关^[25-28],说明不同植物在遭受干旱胁迫时有相似的代谢途径。

3.3 类胡萝卜素生物合成途径与黄参响应干旱胁迫的关系

黄参中蛋白质、多糖与类胡萝卜素含量较高^[7]。类胡萝卜素生物合成途径包括番茄红素、胡萝卜素和叶黄素 3 个生物合成分支^[29]。本研究中,根系 DEGs 分析没有发现与类胡萝卜素相关的生物合成途径,叶片中只有少量富集 DEGs,说明类胡萝卜素在黄参应答干旱胁迫的防御过程中不发挥重要作用,这与已报道的楸子、甘蓝响应干旱胁迫的分子机制不完全一致^[29-30],楸子干旱胁迫时有 16 个根系 DEGs 涉及到类胡萝卜素相关的生物合成途径,甘蓝叶片响应干旱胁迫的主要代谢通路是植物激素信号转导和类胡萝卜素合成途径。这说明黄

参在响应干旱胁迫时的主要代谢途径可能具有其特殊性。

植物抗旱的分子机制相当复杂,组学工作只是初步提供了部分信号转导系统基因、调控基因和功能基因的表达信息,它们可能直接或间接参与了干旱胁迫的防御或修复响应。目前对祁连山特色植物黄参的干旱胁迫分子响应机制研究甚少,没有可供参考的遗传信息,大大限制了黄参功能基因的挖掘。这些重要基因的具体生物学功能还需要未来大量工作去分析,以期为进一步研究伞形科药用植物遗传多样性、分子标记辅助育种和遗传图谱构建以及揭示黄参多糖合成机制和推广优质黄参栽培提供理论依据。

4 结 论

1) 通过高通量转录组测序可知,注释成功的 Unigene 有 68193 条,分别有 34230 (50.20%)、34170 (50.11%)、31727 (46.53%)、27701 (40.62%)、27092 (39.73%) 和 22793 (33.42%) 个 Unigene 被分配到 NCBI 非冗余蛋白 (NR)、eggNOG、基因本体 (GO)、Pfam、SwissProt 和 KEGG 六大功能数据库中。Unigene 注释到 NR 中数量最多的是胡萝卜 (*Daucus carota*),占注释 Unigene 的 72.6%,其后依次为陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 和雷蒙氏油棉 (*Gossypium raimondii*)。

2) 差异表达基因 (DEGs) 分析显示,黄参块状根系和叶片中的 DEGs 分别有 10674、13402 个。黄参根系的上调基因数 (6258) 大于下调基因数 (4416),而叶片上调基因数 (5957) 小于下调基因数 (7445)。GO 富集结果表明,黄参根系和叶片中的 DEGs 功能部位中的分布一致,主要富集在生物过程、DNA 的复制和翻译调控、氧化还原过程、蛋白质磷酸化、防御响应等功能。KEGG 途径富集分析表明,根系中 DEGs 显著富集在苯丙烷类生物合成、半乳糖代谢、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、植物-病原菌相互作用、植物激素信号转导等途径,叶片中 DEGs 则主要富集在半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、苯丙烷类生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、植物激素信号转导等途径。说明干旱胁迫主要影响黄参根系和叶片中淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢、苯丙烷类生物合成途径和植物激素信号转导途径,表明这些生物学途径在黄参应对

干旱胁迫中起重要作用。

3) 根系 DEGs 分析未发现与类胡萝卜素相关的生物合成途径, 叶片中有少量富集 DEGs, 说明类胡萝卜素在黄参响应干旱胁迫中不起主要作用。

参考文献:

- [1] 王乐乐, 王权, 黄亚茹, 等. 水稻叶片气孔导度及叶肉导度对干旱胁迫的响应机理研究进展[J]. 生命科学, 2022, 34(4): 448-458.
- WANG L L, WANG Q, HUANG Y R, et al. Research progress on response mechanism of leaf stomatal conductance and mesophyll conductance to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2022, 34(4): 448-458.
- [2] 张婷茹, 苗荣庆, 臧威, 等. 角果碱蓬响应干旱胁迫的转录组分析[J]. 植物生理学报, 2023, 59(1): 89-100.
- ZHANG T R, MIAO R Q, ZANG W, et al. Transcriptomic analysis of *Suaeda corniculata* in response to drought stress [J]. Plant Physiology Communications, 2023, 59(1): 89-100.
- [3] 皮立, 韩发, 邓黎, 等. 藏药迷果芹的研究综述[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 193-195.
- PI L, HAN F, DENG L, et al. Advances in study on *Sphallerocarpus gracilis* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2015, 26(1): 193-195.
- [4] 李静. 竹节参响应胁迫转录组基因挖掘与皂苷积累相关性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2023.
- LI J. Study on the correlation between transcriptome gene mining and saponin accumulation in response to stress in *Panax japonicus* [D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2023.
- [5] 慧芳, 刘秀岩, 李宗谕, 等. 转录组测序技术在药用植物研究中的应用[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6149-6155.
- HUI F, LIU X Y, LI Z Y, et al. Application of transcriptome sequencing in study of medicinal plants [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(24): 6149-6155.
- [6] 倪知游, 梁东, 高帆, 等. 植物响应干旱的转录组学研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(8): 2460-2465.
- NI Z Y, LIANG D, GAO F, et al. Advances in transcriptome research on plant response to drought [J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(8): 2460-2465.
- [7] 张蕾, 阮羽萱, 潘娇, 等. 甘蓝型油菜响应干旱胁迫的转录组分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(5): 51-55.
- ZHANG L, RUAN Y X, PAN J, et al. Transcriptome analysis of *Brassica napus* in response to drought stress [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(5): 51-55.
- [8] 孙晓琛, 栗锦鹏, 原静静, 等. 基于转录组测序分析干旱胁迫对党参不同组织基因表达的调控[J]. 中草药, 2022, 53(14): 4465-4475.
- SUN X C, LI J P, YUAN J J, et al. Sequencing and analysis of transcriptome to reveal regulation gene expression in different tissues of *Codonopsis pilosula* under drought stress [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(14): 4465-4475.
- [9] 李倩. 黄花苜蓿干旱胁迫响应的转录组分析及 MIERF053 基因的功能研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2022.
- LI Q. Transcriptome analysis of medicago falcata in response to drought stress and functional characterization of MIERF053 gene [D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2022.
- [10] 魏晓芸. 干旱胁迫下红砂幼苗的生理和转录组学分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021.
- WEI X Y. Study on the physiological and transcriptomics analysis of *Reaumuria soongorica* seedlings under drought stress [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2021.
- [11] 杨亚桐. 基于组学的玉米灌浆期干旱胁迫的分子响应研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2021.
- YANG Y T. Research on molecular response of maize drought stress during grain filling based on omics [D]. Baoding: HeBei Agricultural University, 2021.
- [12] 李晓艳, 周敬雯, 严铸云, 等. 基于转录组测序揭示适度干旱胁迫对丹参基因表达的调控[J]. 中草药, 2020, 51(6): 1600-1608.
- LI X Y, ZHOU J W, YAN Z Y, et al. Sequencing and analysis of transcriptome to reveal regulation of gene expression in *Salvia miltiorrhiza* under moderate drought stress [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(6): 1600-1608.
- [13] 魏正欣, 刘昌燕, 陈宏伟, 等. 基于干旱胁迫转录组信息的蚕豆 ASPAT 基因家族分析[J]. 作物学报, 2023, 49(7): 1871-1881.
- WEI Z X, LIU C Y, CHEN H W, et al. Analysis of ASPAT gene family based on drought-stressed transcriptome sequencing in *Vicia faba* L [J]. Acta Agronomica Sinica, 2023, 49(7): 1871-1881.
- [14] 祁伟亮, 任迎虹, 杨财容, 等. 干旱胁迫下桑树活性氧信号传导及转录组分析[J]. 干旱地区农业研究, 2023, 41(2): 50-60.
- QI W L, REN Y H, YANG C R, et al. Signal transduction and transcriptome analysis of reactive oxygen species in mulberry under drought stress [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2023, 41(2): 50-60.
- [15] 白明兴, 庄泽龙, 姬祥卓, 等. 转录组和 iTRAQ 技术联合揭示玉米根系的耐旱机制[J]. 干旱地区农业研究, 2022, 40(2): 59-68.
- BAI M X, ZHUANG Z L, JI X Z, et al. Research on drought-tolerant regulatory mechanism of maize roots using transcriptome and iTRAQ techniques [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2022, 40(2): 59-68.
- [16] 王琪. 芍药响应干旱胁迫的转录组学分析及相关转录因子的功能研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2020.
- WANG Q. Transcriptomics analysis of *Paeonia lactiflora* in response to drought stress and functional study of related transcription factors [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020.
- [17] 关思静, 王楠, 徐蓉蓉, 等. 甘草幼苗响应干旱胁迫的光合、

- 抗氧化特性及转录组分析[J]. 草业科学, 2021, 38(11): 2176-2190.
- GUAN S J, WANG N, XU R R, et al. Photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and transcriptome sequencing analyses of *Glycyrrhiza uralensis* seedlings in response to drought stress[J]. Pratacultural Science, 2021, 38(11): 2176-2190.
- [18] MIN X Y, LIN X S, NDAYAMBAZA B, et al. Coordinated mechanisms of leaves and roots in response to drought stress underlying full-length transcriptome profiling in *Vicia sativa* L[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 165.
- [19] 许小涵, 唐志强, 刘谦, 等. 干旱胁迫下忍冬全基因组 DNA 甲基化和转录组分析[J]. 中草药, 2023, 54(16): 5339-5349.
- XU X H, TANG Z Q, LIU Q, et al. Whole genome DNA methylation and transcriptome analysis of *Lonicera Japonica* in response to drought stress[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(16): 5339-5349.
- [20] SALLAM A, ALQUDAH A M, DAWOOD M F A, et al. Drought stress tolerance in wheat and barley: advances in physiology, breeding and genetics research[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(13): 3137.
- [21] 马彦军, 段慧荣, 魏佳, 等. NaCl 胁迫下黑果枸杞转录组测序分析[J]. 生物技术通报, 2020, 36(2): 100-109.
- MA Y J, DUAN H R, WEI J, et al. Transcriptome sequencing analysis of lycium ruthenicum Murr. under NaCl stress[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(2): 100-109.
- [22] OZTURK M, TURKYILMAZ UNAL B, GARCÍA-CAPARRÓS P, et al. Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants[J]. Physiologia Plantarum, 2021, 172(2): 1321-1335.
- [23] YADAV A K, CARROLL A J, ESTAVILLO G M, et al. Wheat drought tolerance in the field is predicted by amino acid responses to glasshouse-imposed drought[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(18): 4931-4948.
- [24] HAO P C, ZHU J T, GU A Q, et al. An integrative proteome analysis of different seedling organs in tolerant and sensitive wheat cultivars under drought stress and recovery[J]. Proteomics, 2015, 15(9): 1544-1563.
- [25] 刘春妮, 宋明桂, 陈思远, 等. 干旱耐受型和敏感型玉米应答干旱的比较转录组学分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2021, 49(4): 29-39.
- LIU C N, SONG M G, CHEN S Y, et al. Comparative transcriptome analysis of drought stress responses in drought-tolerant and drought-sensitive maize inbred lines[J]. Journal of Northwest A & F University(Natural Science Edition), 2021, 49(4): 29-39.
- [26] HU L, XIE Y, FAN S J, et al. Comparative analysis of root transcriptome profiles between drought-tolerant and susceptible wheat genotypes in response to water stress[J]. Plant Science, 2018, 272: 276-293.
- [27] 李铂, 彭亮, 王楠, 等. 聚乙二醇模拟干旱胁迫下半夏茎段转录组分析[J]. 中草药, 2020, 51(21): 5579-5589.
- LI B, PENG L, WANG N, et al. Transcriptome analysis of *Pinellia ternata* under drought stress simulated by PEG[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(21): 5579-5589.
- [28] 朱智博, 郁万文, 曹福亮, 等. PEG6000 模拟干旱胁迫下银杏幼苗叶片的转录组分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(24): 8061-8069.
- ZHU Z B, YU W W, CAO F L, et al. Transcriptome analysis of *Ginkgo biloba* leaves under PEG 6000 simulated drought stress[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(24): 8061-8069.
- [29] 王顺才, 李超, 马锋旺, 等. 基于转录组鉴定楸子叶片和根系干旱响应基因[J]. 分子植物育种, 2021, 19(24): 8121-8132.
- WANG S C, LI C, MA F W, et al. Identification of drought-responsive genes in leaves and roots of *malus prunifolia* based on transcriptome[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(24): 8121-8132.
- [30] 费思明, 王冰倩, 王婉红, 等. 甘蓝幼苗响应干旱胁迫的 miRNA 转录组分析[J/OL]. 分子植物育种: 1-14. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20230920.2143.006.html>.
- FEI S M, WANG B Q, WANG W H, et al. miRNA transcriptome analysis of cabbage seedlings in response to drought stress[J/OL]. Molecular Plant Breeding: 1-14. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20230920.2143.006.html>.