

黄杰, 杨会肖, 廖焕琴, 等. 尾叶桉响应水肥单、双因素胁迫的差异表达基因分析 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(5): 73-81.
HUANG Jie, YANG Huixiao, LIAO Huanqin, et al. Analyses of differentially expressed genes of *Eucalyptus urophylla* in response to single and dual factor stresses of water and nutrient[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(5): 73-81.

尾叶桉响应水肥单、双因素胁迫的差异表达基因分析

黄 杰, 杨会肖, 廖焕琴, 张卫华, 徐 放, 潘 文, 杨晓慧
(广东省森林培育与保护利用重点实验室/广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要:【目的】比较尾叶桉 *Eucalyptus urophylla* 对水肥单、双因素胁迫的分子响应机制, 为桉树抗逆育种提供思路和分子基础。【方法】以无性系 ZQUA44 为试验材料, 设 3 个水肥胁迫处理和 1 个对照(CK)。水肥双因素胁迫: 20%~40% 田间持水量, 基肥 [钙镁磷肥 (CMPF) 250 g]; 水分单因素胁迫: 20%~40% 田间持水量, 基肥 (CMPF 250 g+复合肥 150 g); 养分单因素胁迫: 60%~80% 田间持水量, 基肥 (CMPF 250 g); CK: 60%~80% 田间持水量, 基肥 (CMPF 250 g+复合肥 150 g)。水分单因素胁迫和对照在种植 2 个月 after 施尿素 100 g, 8 月份施复合肥 150 g, 第 2 年春天施复合肥 100 g。对受胁迫处理的尾叶桉进行生长指标测定, 并取叶片进行转录组测序, 对测序结果进行拼接, 利用生物信息学手段获得差异表达基因, 对差异基因进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析。最后随机选择 4 个具有不同表达模式的差异表达基因进行 qRT-PCR, 验证转录组测序数据的可信度。【结果】3 种胁迫处理均在一定程度上抑制尾叶桉的生长发育, 胁迫处理下尾叶桉各项生长指标多显著低于对照。水肥双因素胁迫、水分单因素胁迫和养分单因素胁迫处理共得到 5 547 个差异表达基因, 分别有 2 585、1 472 和 1 490 个差异表达基因, 各有 1 195、222 和 665 个基因表达上调和 1 390、1 250 和 825 个基因表达下调; 3 种胁迫处理分别获得 155、75 和 108 个基因编码转录因子。水肥单、双因素处理的差异表达基因均显著富集在苯丙烷的生物合成路径中。qRT-PCR 结果与转录组测序结果基本一致, 说明测序结果可信。【结论】尾叶桉在 3 种胁迫处理下的转录变化具有明显的普遍性和特异性, 综合胁迫对植物生长的影响比单独胁迫的影响更大, 不同胁迫条件下植物可能具有不同的响应方式。

关键词: 尾叶桉; 水肥双因素胁迫; 单因素胁迫; 转录组; 差异表达基因; qRT-PCR
中图分类号: S718.46; Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)05-0073-09

Analyses of differentially expressed genes of *Eucalyptus urophylla* in response to single and dual factor stresses of water and nutrient

HUANG Jie, YANG Huixiao, LIAO Huanqin, ZHANG Weihua, XU Fang, PAN Wen, YANG Xiaohui
(Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization/
Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China)

Abstract: 【Objective】To compare the molecular response mechanisms of *Eucalyptus urophylla* under single and dual factor stresses of water and nutrient, and provide insight and molecular basis for resistance breeding of *Eucalyptus*. 【Method】The experiment selected *E. urophylla* clone ZQUA44 as matetial, and set three stress treatments and one control (CK). Water and nutrient deficiency stress: 20%–40% field moisture capacity,

applying 250 g calcium magnesium phosphate fertilizer (CMPF) as base fertilizer; Water deficiency stress: 20%–40% field moisture capacity, applying 250 g CMPF and 150 g compound fertilizer as base fertilizer; Nutrient deficiency stress: 60%–80% field moisture capacity, applying 250 g CMPF as base fertilizer; CK: 60%–80% field moisture capacity, applying 250 g CMPF and 150 g compound fertilizer as base fertilizer. The urea of 100 g was applied at two months after planting, 150 g compound fertilizer in August, and 100 g compound fertilizer in the next spring in water deficiency stress and control treatments. High-throughput transcriptome sequencing was performed to *E. urophylla* leaves in different stress treatments, and the growth indexes of plant were determined. After assembling, differentially expressed genes were obtained using bioinformatics methods, and GO functional annotations and KEGG pathway analyses were performed. Finally, four differentially expressed genes with different expression patterns were randomly selected for qRT-PCR to validate the reliability of transcriptome sequencing data. 【Result】 All three stress treatments partly suppressed the growth and development of *E. urophylla*. Most of the growth indexes of *E. urophylla* in three stress treatments were significantly lower than those in control. A total of 5 547 differentially expressed genes were obtained in water and nutrient deficiency treatment, water deficiency treatment and nutrient deficiency treatment. The 2 585, 1 472 and 1 490 differentially expressed genes were obtained, including 1 195, 222 and 665 up-regulated genes and 1 390, 1 250 and 825 down-regulated genes, respectively. The 155, 75, 108 gene encoding transcription factors were respectively obtained in three stress treatments. The differentially expressed genes in three stress treatments were all significantly enriched in phenylpropane biosynthetic pathway. The qRT-PCR results were basically consistent with transcriptome sequencing results, indicating that the sequencing results were credible. 【Conclusion】 The transcriptional changes of *E. urophylla* in three stress treatments have obvious universality and specificity, and the effects of dual factor stress on plant growth are more than that of single factor stress. Plant may have different response modes in different stress conditions.

Key words: *Eucalyptus urophylla*; water and nutrient deficiency stress; single factor stress; transcriptome; differentially expressed gene; qRT-PCR

在世界范围内，非生物胁迫是制约植物生长的重要因素。随着世界优质土地资源的减少及气候的变化，植物的生存环境更加恶劣。在野外，非生物胁迫对植物的影响是普遍的，且这些胁迫很少单独出现，植物通常会同时受到几种非生物因素的综合胁迫，而且很多胁迫对植物是致命的^[1-4]。在此背景下，了解植物的抗逆性和逆境适应机制非常重要，有利于制定合理高效的植物栽培管理方案。

桉树 *Eucalyptus* 是桃金娘科桉树属植物，原产澳洲，因为速生性和强适生性成为世界上公认的三大造林树种之一，是我国华南地区重要的纸浆材造林树种，也是我国南方地区重要的造林树种，具有良好的经济效益和生态价值。为了更好地了解这一重要树种的联合抗逆机制，我们研究了尾叶桉 *Eucalyptus urophylla* 在水分和养分单独和组合胁迫下的转录响应。

当前国内外对植物应对非生物胁迫有诸多研究，但主要集中在单因素胁迫上，对综合胁迫研究较少^[1]。与单独胁迫相比，植物对综合胁迫的响应具有特异性，有研究表明拟南芥和烟草对干旱和热的联

合胁迫的响应是独特的，这种综合胁迫下确立的基因和功能途径可能为植物应对逆境胁迫提供新思路^[5-7]。前期综合胁迫研究的材料多集中于一些模式植物，如拟南芥^[7]、玉米^[8]、高粱^[9]等草本植物，对长生长周期的木本植物鲜有报道^[10]。木本植物的优良生物学特性及丰富的遗传特征不能被模式植物解释和代表^[10]；所以，加强非模式木本植物抗性的分子生物学研究不仅对加深植物抗性机理理解、丰富优良遗传基因资源具有重要的意义，也是我国林木育种研究的新方向。综上所述，本研究基于分子生物学研究手段，对尾叶桉开展组合逆境响应防御的分子生物学机制研究具有重要的现实意义和理论价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料、胁迫处理和样品采集

基于广东省林业科学研究院木本花卉与竹子研究团队前期尾叶桉水肥精准测定试验结果，选取在各个处理中均表现较好的尾叶桉无性系 ZQUA44 为试验材料。2015 年 3 月，将长势基本一致、状态良好的 3 月生尾叶桉幼苗种植于黑色定植

袋中, 以黄心土为基本栽培基质, 通过施加不同量的基肥及追肥控制养分含量; 以黑白膜覆盖定植袋口控制外界水分进入, 通过定量浇水控制水分含量。养分和水分各自设置 2 个处理, 分别为处理和对照。养分处理包括缺养 [基肥: 钙镁磷肥 (Calcium magnesium phosphate fertilizer, CMPF) 250 g] 和对照 (基肥: CMPF 250 g+复合肥 150 g), 水分处理包括缺水 (20%~40% 田间持水量) 和对照 (60%~80% 田间持水量)^[41]。试验采用两因素两水平正交试验, 每个处理重复 3 次, 培养周期 18 个月。于 2015 年 3 月在自然条件下控制材料水分、养分进行试验。各处理如下所示。水肥双因素胁迫: 20%~40% 田间持水量, 基肥为 CMPF 250 g; 水分单因素胁迫: 20%~40% 田间持水量, 基肥为 CMPF 250 g+复合肥 150 g; 养分单因素胁迫: 60%~80% 田间持水量, 基肥为 CMPF 250 g; CK: 60%~80% 田间持水量, 基肥为 CMPF 250 g+复合肥 150 g。水分单因素胁迫和对照处理在种植 2 个月后施尿素 100 g, 8 月份施复合肥 150 g, 第 2 年春天施复合肥 100 g。样本处理周期较长, 试验过程中要一直模拟野外不利环境条件, 确保样本长期处于胁迫中。

1.2 试验方法

1.2.1 生长指标测定 对 4 种处理下生长 18 个月的植物样本进行生长指标测定。采用测量杆测定树高、冠长等指标, 采用游标卡尺测定地径。收集 4 种处理下的植物样本测定生物量, 采用托盘天平测量新鲜样本的叶片、主干、侧枝和根的鲜质量; 将所有样本组织放入 75 ℃ 烘箱 48 h 后, 测量各处理叶片、主干、侧枝和根的干质量。

1.2.2 RNA 提取、转录组测序及数据分析 采集 4 种处理下尾叶桉叶片组织样本, 采用 RNAprep pure Plant Kit 试剂盒 (Qiagen China, 上海) 进行总 RNA 提取和纯化。利用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 采用纳米分光光度计检测 RNA 纯度和含量。每个样品取 3 μg 高质量 RNA 进行 cDNA 文库构建, 然后采用 Illumina Hiseq 测序平台进行双末端测序。整个测序流程包括文库构建、测序、数据预处理, 全面委托诺禾致源生物技术有限公司完成。以巨桉 *Eucalyptus grandis* 基因组为参考基因组, 采用 TopHat v2.0.9 软件将高质量 clean reads 比对到参考基因组上, 后经 Scripture (beta2) 和 Cufflinks(v2.1.1) 组装获得转录本全长。各个基因的表达量采用 Cuffdiff(v2.1.1) 软件计算获得, 将 $Q < 0.05$ 的基因定义为差异表达基因。

1.2.3 差异表达基因验证 为了验证转录组测序得到的表达数据, 随机选取 4 个具有不同表达模式的差异表达基因进行逆转录实时荧光定量 PCR

(qRT-PCR) 验证。采用 FastKing RT Kit [(天根生化科技 (北京) 有限公司)] 合成 cDNA。采用 NCBI Primer-BLAST(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer/blast/index.cgi?LINK_LOC) 设计特异性引物 (表 1)。以 18s rRNA 为内参, 采用 FastKing RT Kit 在 7 500 Real-time PCR 仪器中进行 qRT-PCR, 每个基因重复 3 次。使用 R(版本 3.1.3, <http://cran.r-project.org/>) 软件对 4 种处理下 qRT-PCR 数据和转录组测序数据进行相关性分析。

表 1 qRT-PCR 验证的引物信息
Table 1 Primers for qRT-PCR validation

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence
<i>Eucgr.F02337.1</i>	F: 5'-CTGTTTCGGTGAATTGCCACG-3' R: 5'-AGGGATCTGCTGCGAGAATG-3'
<i>Eucgr.F00180.1</i>	F: 5'-CTCGTCGCTCGAATGGAAGA-3' R: 5'-CTTCTTGGAGTGAGGCTCCG-3'
<i>Eucgr.K02129.1</i>	F: 5'-GGGAACGACTGACAGCTGAA-3' R: 5'-CCGGATGTATGCTCGGAGAC-3'
<i>Eucgr.B03214.1</i>	F: 5'-CCAACACCACTTCGACCTCTC-3' R: 5'-TGACCTTGAAGGAGAGGGACT-3'

1.2.4 功能注释、GO 和 KEGG 分类 以巨桉 (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!bulk?org=Org_Egrandis) 和 TAIR(<https://www.arabidopsis.org/>) 数据库对每个差异表达基因进行功能注释。在 3 种胁迫处理中, 以拟南芥为背景 (FDR < 0.05), 通过 AgriGO(<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/index.php>) 对每个处理的上、下调差异表达基因进行 GO 分类, 同时通过 KOBAS 3.0(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/index.php>, $P < 0.01$) 对差异表达基因进行 KEGG 通路分析。

2 结果与分析

2.1 不同水肥单、双因素胁迫影响树木生长

为了研究水肥单、双因素胁迫对尾叶桉 ZQUA44 的影响, 我们在处理后 18 个月测量了参试基因型的生长性状。结果表明, 与对照相比, 不同处理条件下尾叶桉的鲜质量、干质量和冠长等生长指标均受到不同程度的抑制 (图 1)。其中, 水肥双因素胁迫的总生物量 (鲜质量 547.30 g, 干质量 197.76 g) 低于水分单因素胁迫 (鲜质量 2 355.14 g, 干质量 1 562.78 g)($P < 0.05$) 和养分单因素胁迫 (鲜质量 985.72 g, 干质量 395.61 g)($P > 0.05$)(图 1A); 在地下部分生物量、树高、地径、冠长等指标中出现了同样的规律 (图 1B、1D、1E、1F), 说明双因素综合胁迫对植物生长性状的影响远大于单因素胁迫, 且差

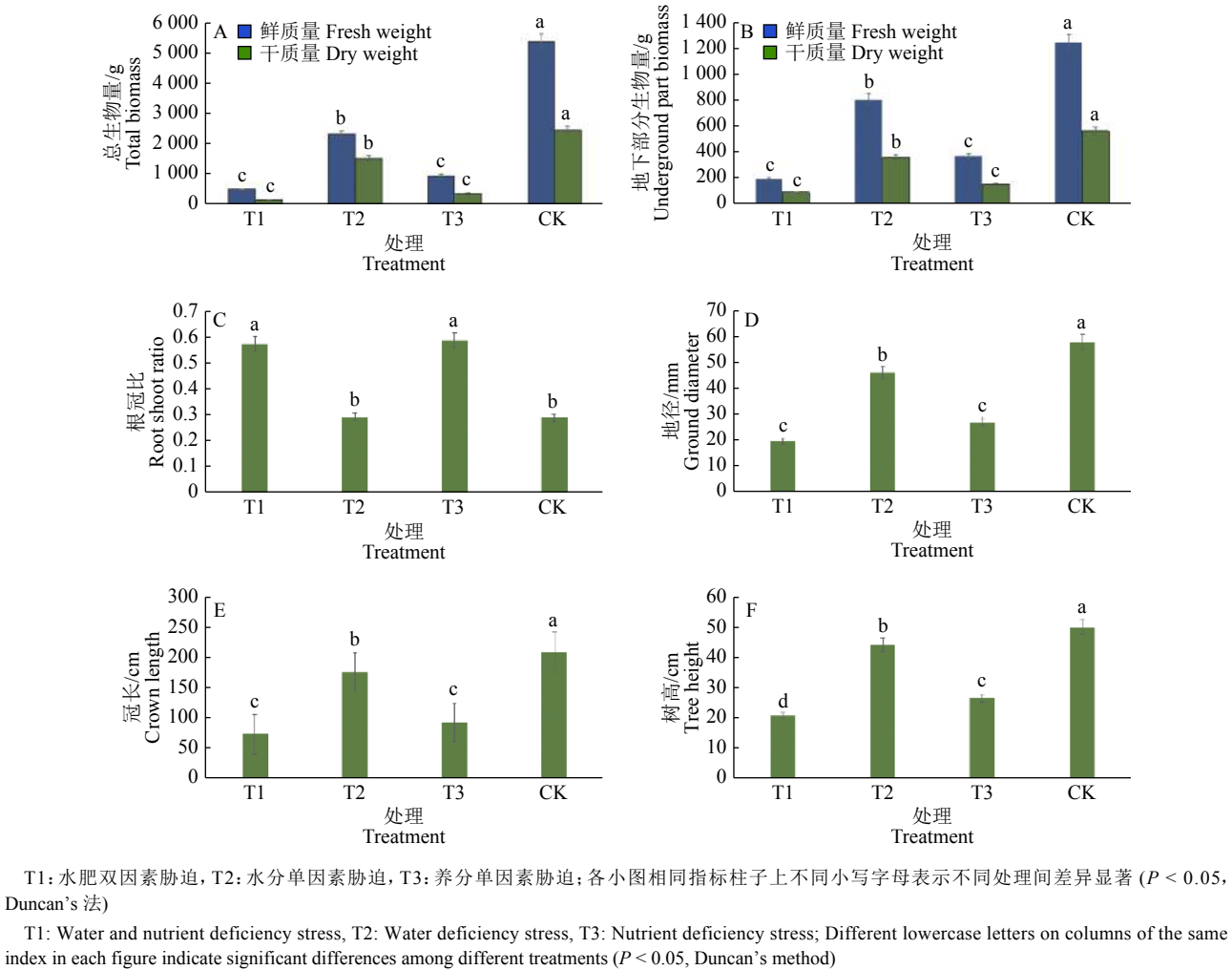


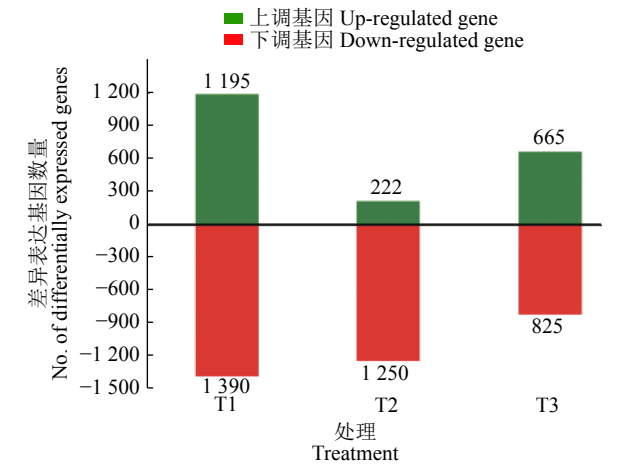
图 1 4 种不同水肥处理中尾叶桉无性系生长指标的变化

Fig. 1 Growth index changes of *Eucalyptus urophylla* clones in four different water and fertilizer treatments

异显著。养分单因素胁迫的根冠比 (0.594) 与水肥双因素胁迫 (0.582) 差异不明显, 但显著大于水分单因素胁迫 (0.302) 和对照 (0.296)(图 1C)。结果表明, 在不同胁迫处理条件下植物地上、地下部分受到的影响不完全相同。

2.2 转录组测序和差异表达基因筛选

由表 2 可知, 水肥双因素胁迫、水分单因素胁迫和养分单因素胁迫转录组测序各获得 3.01×10^8 、 2.69×10^8 和 2.74×10^8 条 clean reads; Q20、Q30 均在 88.20% 以上, 碱基测序错误率 $\leq 0.02\%$, 测序质量较高, 确保了测序结果的可靠性。3 种胁迫处理下共获得 5 547 个差异表达基因, 其中 2 082 个上调, 3 465 个下调, 下调数量多于上调, 说明在外界环境的非生物胁迫下, 植物的生命活动受到一定程度的抑制; 水肥双因素胁迫的差异表达基因数量远高于水分单因素胁迫和养分单因素胁迫, 说明双因素胁迫条件下植物生命活动受到的抑制作用高于单因素胁迫 (图 2)。



T1: 水肥双因素胁迫, T2: 水分单因素胁迫, T3: 养分单因素胁迫
T1: Water and nutrient deficiency stress, T2: Water deficiency stress, T3: Nutrient deficiency stress

图 2 3 种胁迫处理中尾叶桉差异表达基因分布情况
Fig. 2 Distribution of differentially expressed genes of *Eucalyptus urophylla* in three stress treatments

与对照相比, 将不同胁迫下的差异表达基因进行比较 (图 3) 发现, 水肥双因素胁迫、水分单因

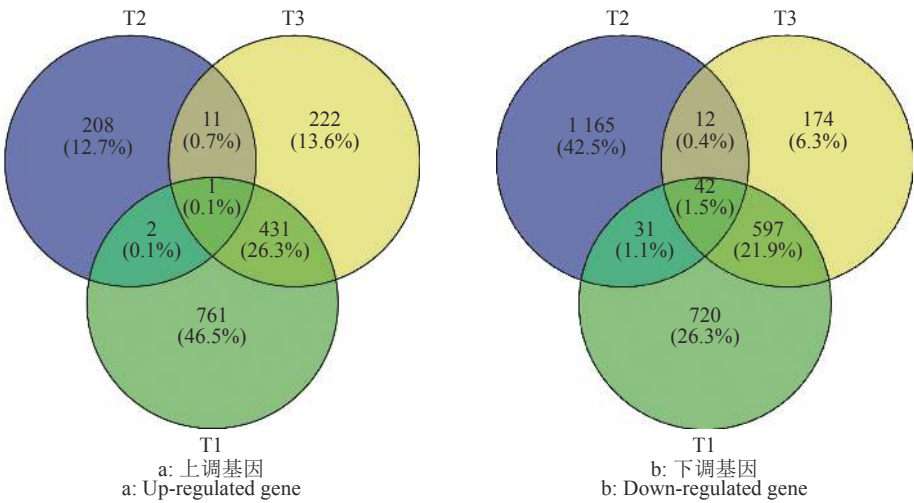
表 2 3 种胁迫处理中尾叶桉叶片转录组测序质量¹⁾

Table 2 Transcriptome sequencing quality of *Eucalyptus urophylla* leaves in three stress treatments

处理	重复	原始序列数	去杂序列数	去杂碱基数/(×10 ⁹)	错误率/%	Q20/%	Q30/%	GC含量/%
Treatment	Replicate	No. of raw reads	No. of clean reads	No. of clean bases	Error rate	Q20/%	Q30/%	GC content
CK	1	102 875 922	98 982 508	14.85	0.01	97.84	94.29	47.41
	2	91 836 470	88 460 334	13.07	0.02	96.61	91.37	47.30
	3	88 160 956	85 873 298	12.82	0.02	95.22	88.34	45.19
T1	1	118 961 564	112 278 350	16.84	0.02	95.26	88.29	47.78
	2	99 694 016	96 296 560	14.44	0.01	98.23	95.22	47.15
	3	96 089 830	93 089 066	13.96	0.02	97.23	92.76	50.93
T2	1	93 283 460	90 948 242	13.64	0.01	98.39	95.68	45.45
	2	91 547 658	88 602 608	13.27	0.02	95.06	87.93	45.32
	3	92 936 506	90 084 620	13.51	0.01	98.15	95.05	46.51
T3	1	94 953 336	91 803 584	13.55	0.02	96.68	91.55	47.04
	2	90 612 280	87 845 130	13.11	0.02	95.14	88.20	48.26
	3	97 341 022	94 914 876	14.24	0.01	97.47	93.33	44.54

1) T1: 水肥双因素胁迫, T2: 水分单因素胁迫, T3: 养分单因素胁迫; Q20: Phred数值大于20的碱基占总碱基的百分比, Q30: Phred数值大于30的碱基占总碱基的百分比; GC含量: 去杂序列中G与C在4种碱基中占的百分比

1) T1: Water and nutrient deficiency stress, T2: Water deficiency stress, T3: Nutrient deficiency stress; Q20: Percentage of bases with phred greater than 20 in total bases; Q30: Percentage of bases with phred greater than 30 in total bases; GC content: Percentage of G and C in four bases in clean reads



T1: 水肥双因素胁迫, T2: 水分单因素胁迫, T3: 养分单因素胁迫; 括号中的百分数表示该基因在所有上调或下调基因中占的比例
T1: water and nutrient deficiency stress, T2: water deficiency stress, T3: Nutrient deficiency stress; The percentage in parenthesis indicates the proportion of the gene in all up-regulated or down-regulated genes

图 3 3 种胁迫处理中尾叶桉差异表达基因韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of differentially expressed genes of *Eucalyptus urophylla* in three stress treatments

素胁迫和养分单因素胁迫分别有 1 195、222、665 个上调基因, 1 390、1 250、825 个下调基因。上调的差异表达基因中, 水肥双因素胁迫有 761 个基因具有表达特异性, 远高于水分单因素胁迫 (208 个) 和养分单因素胁迫 (222 个)。有 12 个差异表达基因在水分单因素胁迫和养分单因素胁迫中共同表达, 3 个在水分单因素胁迫和水肥双因素胁迫中共同表达, 432 个在水肥双因素胁迫和养分单因素胁迫中共同表达, 3 种胁迫处理仅有 1 个相同

的上调基因。下调的差异表达基因中, 水肥双因素胁迫、水分单因素胁迫、养分单因素胁迫处理的特异性差异表达基因分别有 720、1 165 和 174 个。此外, 有 54 个基因在水分单因素胁迫和养分单因素胁迫中共同表达, 73 个在水肥双因素胁迫和水分单因素胁迫中共同表达, 639 个在水肥双因素胁迫和养分单因素胁迫中共同表达, 42 个在 3 种胁迫处理中共同表达。3 种胁迫处理分别获得 155、75 和 108 个基因编码转录因子。

2.3 差异表达基因的 GO 和 KEGG 分析

为了研究不同处理条件下差异表达基因的生物学功能,对差异表达基因进行 GO 和 KEGG 分类。GO 分类结果 (图 4) 显示,水肥双因素胁迫的差异表达基因显著富集于 35 个类别中,分别为生物过程中的类黄酮代谢过程、跨膜转运蛋白活性等,分子功能中的转移酶活性、催化活性等;水分单因

素胁迫的差异表达基因显著富集于 42 个 GO 分类中,包括生物过程中的苯丙烷代谢过程、细胞表面受体信号通路,分子功能中的催化活性、氧化还原酶活性等;养分单因素胁迫的差异表达基因显著富集在 50 个 GO 类别中,在生物过程中显著富集于运输活性、类黄酮代谢过程等,在分子功能中显著富集于运输活性、转移酶活性等。

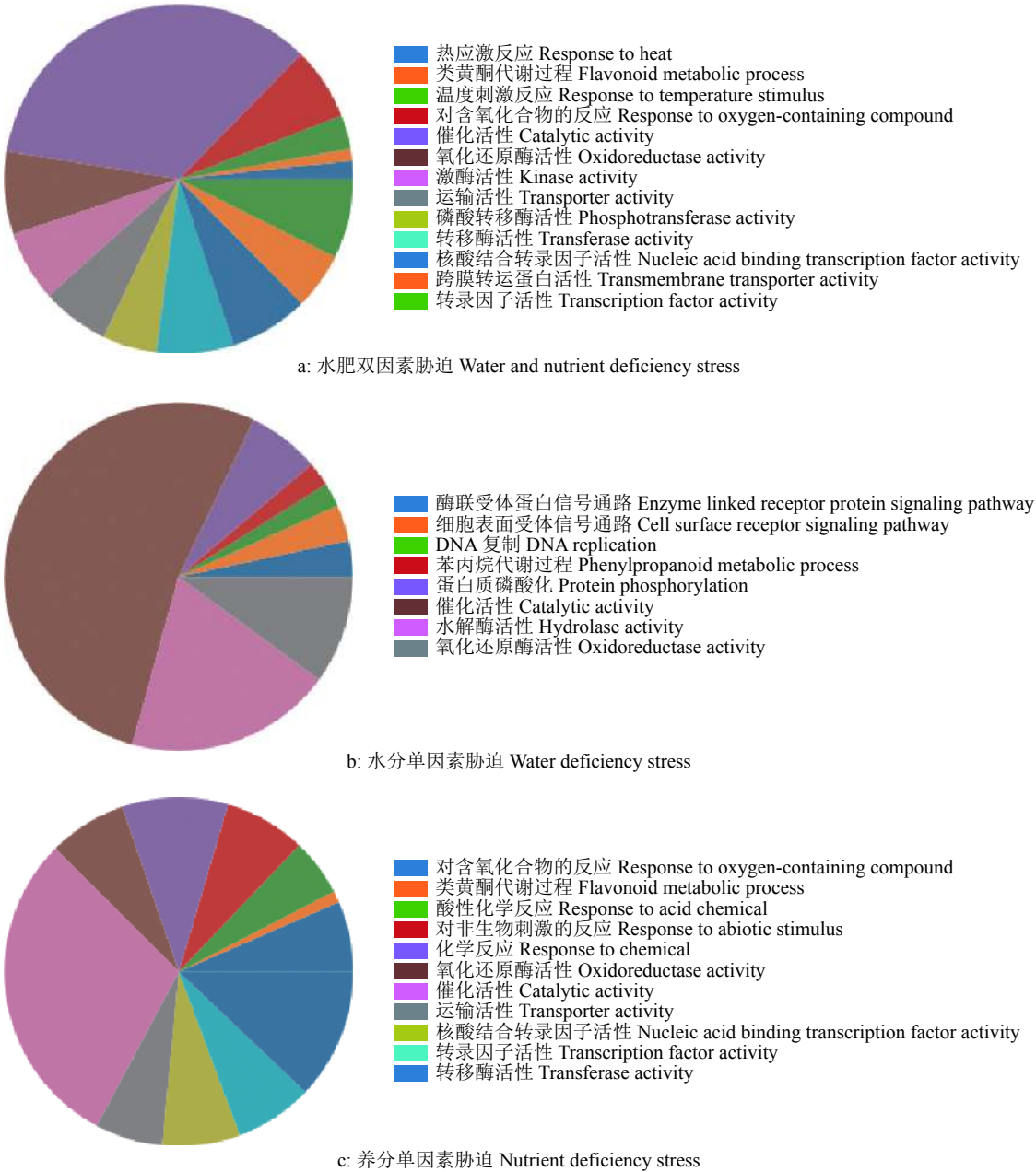


图 4 3 种胁迫处理中尾叶桉差异表达基因的 GO 分类

Fig. 4 GO categories of differentially expressed genes of *Eucalyptus urophylla* in three stress treatments

KEGG 通路显著性富集分析结果 (图 5) 显示,水肥双因素胁迫的差异表达基因主要富集在苯丙烷生物合成、糖酵解/糖异生等 13 个途径中 ($P < 0.000\ 01$, $Q < 0.01$);水分单因素胁迫的差异表达基因主要富集在苯丙烷生物合成、DNA 复制等 5 个途径中;养分单因素胁迫的差异表达基因主要富集在苯丙烷生物合成、抗坏血酸和藻酸盐代谢等 16 个途径中。KEGG 结果显示苯丙烷生物合成途径相关基因广泛参与植物的抗逆过程。

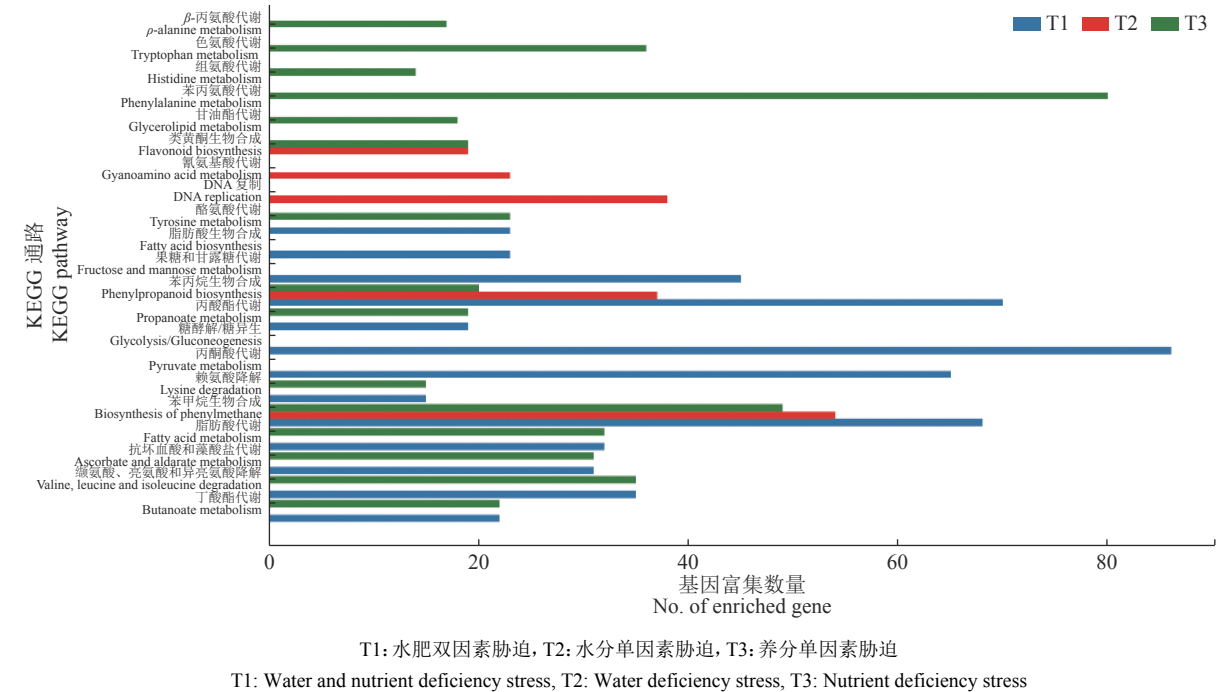


图 5 3 种胁迫处理中尾叶桉差异表达基因的 KEGG 分析

Fig. 5 KEGG analyses of differentially expressed genes of *Eucalyptus urophylla* in three stress treatments

2.4 转录组数据的 qRT-PCR 验证分析

为了验证转录组测序数据的可信度, 随机选取 4 个具有不同表达模式的差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。结果 (图 6) 显示: 转录组测序获得的数据与 qRT-PCR 结果相关性较高, $R^2 = 0.705$, 说明转录组测序结果可靠。

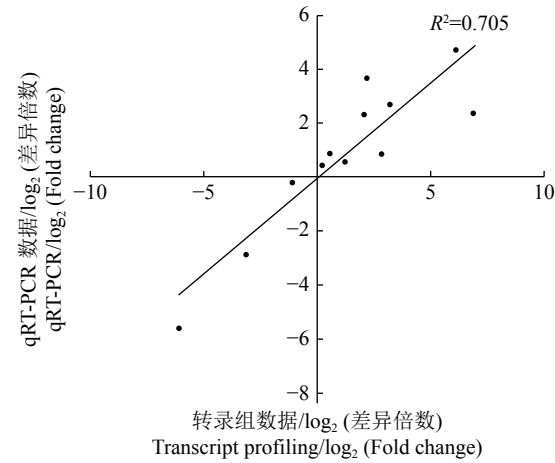


图 6 4 个基因的转录组测序结果与 qRT-PCR 验证结果的相关性分析

Fig. 6 Correlation analyses between transcriptome profiling and qRT-PCR verification results of four genes

3 结论与讨论

3.1 水肥单、双因素胁迫对尾叶桉生长发育的影响
植物生长受外界环境影响, 本研究 3 种胁迫处

理下尾叶桉各项生长指标多显著低于对照, 说明 3 种胁迫处理均在一定程度上抑制植物的生长发育。水肥双因素胁迫下尾叶桉总生物量最低, 干质量 197.76 g, 鲜质量 547.30 g; 其次为养分单因素胁迫, 干质量 395.61 g, 鲜质量 985.72 g; 生长受到影响最小的是水分单因素胁迫, 干质量 1 562.78 g, 鲜质量 2 355.14 g; 说明与单因素胁迫相比, 双因素胁迫对植物生长发育的影响更大。同时, 本研究结果显示, 养分单因素胁迫对植物生长发育的影响显著大于水分单因素的影响, 说明在土壤水分充足时, 养分在尾叶桉的生长发育过程中起重要作用。在植物生长发育过程中, 地上部分和地下部分的养分分配均受外界环境影响。不同营养元素或不同营养水平对根冠比的影响也不同。氮素少时, 首先确保根的生长, 运到冠部的氮素减少, 根冠比变大。磷、钾肥可以调节碳水化合物的转化和运输, 促进光合产物向根和贮藏器官转移, 增加根冠比^[12]。本研究水肥双因素胁迫的根冠比 (0.582) 和养分单因素胁迫的根冠比 (0.594) 均大于对照 (0.296), 说明在受到水肥双因素胁迫和养分单因素胁迫时, 尾叶桉可能通过将养分分配给根系促进根部生长、降低地上部分生物量来应对逆境。

本研究结果揭示在 3 种胁迫处理下尾叶桉的生长发育变化具有特异性, 综合胁迫对植物生长的影响比单独胁迫更加复杂, 不同胁迫下植物可能具有不同的响应方式。

3.2 转录组分析揭示尾叶桉在响应水肥胁迫时差异基因的表达变化

面临胁迫时,植物改变其生化 and 分子机制以适应环境的变化。胁迫信号会被细胞表面的受体感知并启动相关的信号转导途径,转录调控基因的表达,积极对胁迫做出响应。尾叶桉在不同胁迫条件下的响应方式与其内在的分子调控机制密不可分。水肥单、双因素 3 种胁迫处理差异表达基因的 GO 分析显示尾叶桉在养分单因素胁迫下的功能分类与其他植物^[13]类似,差异基因显著富集于类黄酮代谢过程、苯丙烷代谢过程、胁迫响应细胞信号转导、细胞增殖和生长调控等相关途径。水分单因素胁迫诱导大量离子转运和跨膜转运蛋白相关基因的表达改变,这很可能是胁迫破坏了细胞内、细胞间以及根际环境中的离子平衡或引发细胞膜电位的变化,导致离子重新分配^[14-15]。在水肥双因素胁迫中,除上述代谢途径外,还包括蜡代谢过程、脱落酸响应途径、糖代谢途径等相关基因也发生差异表达。尾叶桉在水分、养分单因素胁迫下差异表达基因表达模式的相似性,揭示不同胁迫之间可能存在共同的信号转导及基因表达调控机制,双因素胁迫是不尽相同的复杂过程,可能涉及更多的基因和转录途径。

在 3 种胁迫处理中差异表达基因均富集在类黄酮代谢、苯丙烷代谢途径,说明不同胁迫之间可能存在共同的信号转导及基因表达调控机制。苯丙烷类代谢产物经类黄酮途径产生黄酮类化合物间接参与呼吸代谢,可作为植物体特殊贮藏帮助植物体清除自由基等^[3]。干旱、高盐等非生物胁迫会使植物产生大量活性氧,从而诱导合成黄酮类化合物以避免细胞氧化损伤。黄酮类化合物还可以与铜等金属离子结合,从而降低金属离子对胞质结构的破坏^[16]。

3.3 尾叶桉胁迫应答的转录因子及调控机制

转录调控主要通过转录因子与相应的顺式作用元件相互作用实现^[17]。与植物抗逆相关的转录因子主要包括 MYB、bZIP、AP2/EREBP、WRKY 和 NAC^[17-23] 等 5 类。本文通过对 3 种胁迫处理的转录组数据进行分析,发现以上述转录因子为主的多种不同家族的转录因子在受胁迫后均差异表达,它们可以通过调控应答基因、植物抗逆信号通路基因和自身基因的表达来启动植物对非生物胁迫的适应机制。这几类转录因子的大量表达说明它们在尾叶桉应对水肥单、双因素胁迫的多种不同应答途径中起着十分重要的作用。

除此之外,我们在水肥双因素胁迫处理下差异表达的转录因子中还发现了一些特有的转录家族,WOX 转录因子家族的 WOX4、ARF 转录因子家族的 ARF10 以及 DBB 类锌指蛋白。WOX 蛋白家族是植物特有的一类转录因子家族,是植物胚胎建成、干细胞维持和器官发生等发育过程中的重要调控因子。有研究表明,WOX 蛋白家族通过相似或特异的调控网络参与植物初级和次级分生组织等各级干细胞的维持和分化^[24-25]。WOX4 为 WOX 蛋白家族的进化支,GUS 染色和原位杂交试验表明 WOX4 主要在维管分生组织中表达。植物独有的 WOX 蛋白家族对植物体的生长发育有非常重要的作用,WOX 成员通过特化干细胞属性和维持分生组织动态平衡来参与植物体发育的各个过程,这些功能都与它促进细胞分裂和(或)抑制细胞分化密切相关^[24-26]。在水肥双因素胁迫中尾叶桉 WOX4 基因表达上调,由此推测在水肥双因素胁迫条件下 WOX4 转录因子被正向调控参与初级分生组织和次级分生组织的分化,通过促进细胞分裂和(或)抑制细胞分化来维持分生组织的平衡,从而调节尾叶桉生长发育各个过程;但其具体的转录调控机制尚不清楚,对其转录调控机制的揭示有利于进一步理解在水肥双因素胁迫中尾叶桉生长发育过程中的分子调控机制。

参考文献:

[1] ZHOU Q, GUO J J, HE C T, et al. Comparative transcriptome analysis between low- and high-cadmium-accumulating genotypes of pakchoi (*Brassica chinensis* L.) in response to cadmium stress[J]. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(12): 6485-6494.

[2] JOHNSON S M, LIM F L, FINKLER A, et al. Transcriptomic analysis of *Sorghum bicolor* responding to combined heat and drought stress[J]. *BMC Genomics*, 2014: 15. doi: 10.1186/1471-2164-15-456.

[3] AHUJA I, DE VOS R C H, BONES A M, et al. Plant molecular stress responses face climate change[J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(12): 664-674.

[4] MITTLER R. Abiotic stress, the field environment and stress combination[J]. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(1): 15-19.

[5] RIZHSKY L, LIANG H J, SHUMAN J, et al. When defense pathways collide: The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(4): 1683-1696.

[6] RAMPINO P, MITA G, FASANO P, et al. Novel durum wheat genes up-regulated in response to a combination of heat and drought stress[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, 56: 72-78.

[7] RIZHSKY L, LIANG H J, MITTLER R. The combined

effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco[J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(3): 1143-1151.

[8] MESEKA S, MENKIR A, BOSSEY B, et al. Performance assessment of drought tolerant maize hybrids under combined drought and heat stress[J]. *Agronomy-Basel*, 2018, 8(12).

[9] MACHADO S, PAULSEN G M. Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum[J]. *Plant Soil*, 2001, 233(2): 179-187

[10] 张胜. 侧柏对干旱与自然低温胁迫响应的分子机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.

[11] 潘文, 张卫华, 杨会肖, 等. 尾叶桉苯丙氨酸解氨酶基因的克隆、表达与单核苷酸多态性分析[J]. *华南农业大学学报*, 2018, 39(2): 89-94.

[12] 赛佳. 根冠比[EB/OL]. [2019-12-20]. <https://baike.sogou.com/v8081475.htm?fromTitle>.

[13] 曹维. 苗期玉米叶片响应非生物胁迫的转录组分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.

[14] 杨献光, 梁卫红, 齐志广, 等. 植物非生物胁迫应答的分子机制[J]. *麦类作物学报*, 2006, 26(6): 158-161.

[15] 周峰. 干旱胁迫对植物生长及其生理的影响[J]. *北京农业*, 2014.

[16] 白禹, 卯丹, 王继玥. 黄酮类物质的生物合成及对干旱胁迫响应的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2018, 46(16): 24-26.

[17] 王冰, 程宪国. 干旱、高盐及低温胁迫下植物生理及转录因子的应答调控[J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(6): 1565-1574.

[18] ABE H, URAO T, ITO T, et al. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 63-78.

[19] SEO P J, XIANG F, QIAO M, et al. The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in Arabidopsis[J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(1): 275-289.

[20] 关淑艳, 焦鹏, 蒋振忠, 等. MYB 转录因子在植物非生物胁迫中的研究进展[J]. *吉林农业大学学报*, 2019, 41(3): 253-260.

[21] 戚莹雪, 王蕾, 王尧尧, 等. 植物 WRKY 类转录因子在非生物胁迫下的功能与作用机制[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(18): 5973-5979.

[22] MA T, LI M, ZHAO A, et al. *LcWRKY5*: An unknown function gene from sheepgrass improves drought tolerance in transgenic Arabidopsis[J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(9): 1507-1518.

[23] CHEN Y F, LI L Q, XU Q, et al. The WRKY6 transcription factor modulates *PHOSPHATE1* expression in response to low Pi stress in Arabidopsis[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(11): 3554-3566.

[24] 于燕杰, 张大兵, 袁政. WOX 蛋白家族调控干细胞发育分子机制的研究进展[J]. *植物学报*, 2016, 51(4): 565-574.

[25] HIRAKAWA Y, KONDO Y, FUKUDA H. TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *WOX4* homeobox gene in Arabidopsis[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(8): 2618-2629.

[26] JI J, STRABLE J, SHIMIZU R, et al. WOX4 promotes procambial development[J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(3): 1346-1356.

【责任编辑 李庆玲】