

冯 娇, 王 武, 侯旭东, 等. 基于转录组测序技术探究 GA₃ 和 CPPU 抑制葡萄果锈产生的机理[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 895-903.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.026

基于转录组测序技术探究 GA₃ 和 CPPU 抑制葡萄果锈产生的机理

冯 娇, 王 武, 侯旭东, 陶建敏

(南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为探究 GA₃(赤霉素) 和 CPPU[*N*-(2-氯-4-吡啶基)-*N'*-苯基脲] 抑制葡萄果锈生成的内在机理, 以阳光玫瑰葡萄为试验材料, 在盛花期用 25 mg/L GA₃ 处理花穗, 花后 2 周用 25 mg/L GA₃ + 10 mg/L CPPU 再次处理花穗, 以清水处理作为对照, 取果锈生成关键期的 2 个葡萄果皮样品, 应用 Illumina RNA-Seq 测序系统进行转录组分析。共获得 55 314 986 条有效数据和 2 373 个差异基因, GO 功能注释到细胞组分、分子功能及生物学过程 3 个大类 30 个功能组, 大量基因富集于碳水化合物代谢、生物合成等生物学过程。KEGG 代谢通路分析结果显示将 1 186 个差异表达基因注释到 126 条代谢通路, 富集于“代谢途径”与“苯丙烷合成”代谢通路。通过 qRT-PCR 方法对筛选的 9 个差异表达基因进行验证, 荧光定量结果与测序结果相符。研究结果说明 GA₃ 和 CPPU 处理减少葡萄果锈的产生主要与苯丙烷合成及类黄酮代谢相关, GA₃ 和 CPPU 显著抑制苯丙烷及类黄酮合成相关基因表达, 进而降低了果锈生成路径中相关酶的活性, 减少了果锈生成相关次生代谢物的产生, 抑制葡萄果锈的生成。

关键词: 葡萄; 果锈; 转录组测序; 代谢通路; 差异表达基因; GA₃(赤霉素); CPPU[*N*-(2-氯-4-吡啶基)-*N'*-苯基脲]

中图分类号: S663.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017) 04-0895-09

Underlying mechanism of GA₃ and CPPU inhibiting grape fruit russet discovered based on transcriptome sequencing

FENG Jiao, WANG Wu, HOU Xu-dong, TAO Jian-min

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To probe into the mechanism of GA₃(gibberellin A₃) and CPPU(forchlorfenuron) inhibiting the tiny red-dish-brown blotches on the surface of grape berries, the floral clusters of Shine Muscat grape was treated with 25 mg/L GA₃ at full blossom, and 25 mg/L GA₃ combined with 10 mg/L CPPU 2 weeks after full blossom. Water treatment was set as control. Two pericarp samples at critical period for fruit russet-genesis were subjected to transcriptome sequencing using Illumina RNA-Seq system. Approximately 55 314 986 clean data and 1 186 differentially expressed genes (DEGs) were identified.

Gene ontology (GO) functions annotated to 30 functional groups belonging to three categories: cell components, molecular functions, and biological processes. A large amount of genes were enriched in the biological processes ‘ carbohydrate metabolism ’ and ‘ biosynthesis ’. Analysis of KEGG metabolic pathways demonstrated that most enriched EDGs were associated with ‘ metabolic pathway ’ and ‘ phenylpropanoid synthesis ’ out of 126 to-

收稿日期: 2017-04-06

基金项目: 国家现代农业葡萄产业技术体系项目(CARS-30); 国家“ 948 ” 重点项目(2016-X19); 江苏省科技厅设施条件下葡萄高效栽培新技术研究与应用项目(BE2014326)

作者简介: 冯 娇(1992-), 女, 山西运城人, 硕士, 主要从事果树生理与分子技术研究。(E-mail) 478710492@qq.com

通讯作者: 陶建敏, (E-mail) tjm266@sina.com

tal pathways. QRT-PCR assay results for 9 selected DEGs showed that the expression levels of 9 genes were consistent with the data obtained by RNA-seq. It was indicated that GA₃ and CPPU treatment might have inhibited the gene expression and enzyme activity of 'phenylpropanoid biosynthesis' and 'flavonoid metabolism' pathways which in turn reduced the production of secondary metabolites, the precursors of reddish-brown blotches, thereby inhibiting the skin browning of grape fruits.

Key words: Shine Muscat; berry reddish-brown blotches; transcriptome sequencing; metabolism pathway; differently expressed genes; GA₃; CPPU

葡萄是世界上广泛种植的果树之一,中国的鲜食葡萄产量占全球葡萄产量的 14%^[1]。阳光玫瑰葡萄 (*Vitis labruscana* Bailey × *V. vinifera* L. 'Shine Muscat') 是目前国内新主栽鲜食葡萄品种,果实品质优良,具有极高的经济价值,然而在果实成熟期往往出现果锈现象,严重影响葡萄果实的观赏及食用效益。果锈是一层为抵御逆境和保护自身而产生的次生保护组织——木栓层^[2-5],性状为条状或不规则锈斑,是由果实表皮细胞角质层破裂、木栓化程度加深引起表皮细胞、甚至皮层细胞死亡所致,主要表现为果实表面浮生锈色木栓化物质^[6-7]。

Yuka 等^[8]的研究结果表明,阳光玫瑰葡萄浆果成熟期果面锈斑生成与多酚化合物及其氧化反应相关,但对于阳光玫瑰葡萄果锈生成的分子机理,尚未有更深入的研究。在砂梨和苹果上,已鉴定出与外果皮果锈生成特定相关的基因和代谢通路。角质层合成基因被抑制,而胁迫响应基因和木栓质沉积基因加强是外果皮锈斑产生的基础^[9]。梨果实生长初期,气孔保卫细胞破裂,一团突出果面的木栓化细胞逐渐出现,果点形成,果点周围木栓化聚集成锈,之后覆盖整个果皮表面^[10]。枇杷果实表皮细胞受损导致木栓化,产生果锈。

在葡萄的生产栽培中,GA₃(赤霉素)和 CPPU [N-(2-氯-4-吡啶基)-N'-苯基脲]作为植物生长调节剂已有广泛应用^[12-15]。GA₃参与果树生长发育的各个环节,已成为重要的促生长激素,广泛应用于农林园艺业^[16-18]。CPPU 属于苯基脲类细胞分裂素,是一种新型植物生长调节剂。CPPU 的生理活性极高,大量田间试验结果证明,它能刺激果树生长,显著促进浆果类果实发育,改善果实品质,可广泛应用于各种果树上,是目前最有前途的生长调节剂之一^[19]。GA₃和 CPPU 组合使用能显著改善葡萄果实外观品质,促进果粒肥大,提高坐果率和无核率^[20-21]。

转录组测序 (RNA-Seq) 是一种新的、有效的转

录组学技术,在多样化的转录组研究中应用日益广泛^[22]。RNA-Seq 是植物功能基因组学研究的一种重要手段,已成为果树学研究上的一个新切入点和突破点^[23],在葡萄、柑橘、香蕉、草莓、苹果、梨、杨梅、芒果等常见果树中已有成功应用^[24-30]。RNA-Seq 和生物信息学研究在果树上的迅速发展,使得人们对于果树生长发育成熟、响应逆境等代谢的生理分子机制的认识日趋完善^[31]。在葡萄上,芽休眠、山葡萄果实白藜芦醇含量差异机理等的转录组学研究已有一定进展^[1,32],然而,葡萄果锈问题的转录组学研究至今鲜有报道。

本试验以阳光玫瑰葡萄为材料,用 GA₃ 和 CPPU 处理花穗,清水处理为对照,取果锈生成关键期的葡萄果皮样品,应用 Illumina HiSeq™ X Ten 高通量测序平台进行 RNA-Seq 测序,初步确定与果锈生成相关的代谢通路,筛选显著差异基因,并通过 qRT-PCR 对 RNA-Seq 测序结果进行验证,从分子角度探究 GA₃ 和 CPPU 抑制阳光玫瑰葡萄果锈生成的机理,为指导阳光玫瑰葡萄的标准化生产栽培提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2015 年 5-10 月在南京农业大学汤山葡萄实验基地进行。供试品种为 6 年生阳光玫瑰葡萄,采用平棚架避雨栽培,株行距为 3.0 m × 6.0 m, H 型树形,土肥水管理及病虫害防治同常规。

1.2 方法

1.2.1 田间处理 选取树势基本一致的阳光玫瑰葡萄,处理前将花穗修剪至距离穗尖约 4 cm 的位置。处理 (CP): 盛花期采用 25 mg/L GA₃ 处理花穗,花后 2 周用 25 mg/L GA₃ + 10 mg/L CPPU 再次浸蘸花穗 5~10 s; 对照 (CK): 清水处理。处理前集中疏果,每穗大小及遮阴情况保持一致。

1.2.2 样品采集 8 月中旬 (果锈生成前的关键时

期,成熟前3周)采集果实样品,用冰袋带回实验室。取果皮,用液氮速冻,储存于-80℃备用。成熟期(9月18日)采集果实样品,带回实验室拍照。

1.2.3 RNA提取与检测 采用RNA提取试剂盒(成都福际生物技术有限公司产品)提取果皮总RNA。用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA纯度以及完整性,利用RNA检测仪(Biophotometer)检测RNA样品浓度和 OD_{260}/OD_{280} 值。委托深圳恒创基因有限公司完成建库,以及用Illumina HiSeq™ X Ten进行测序。

1.3 数据分析

1.3.1 数据处理 测序得到的原始序列中含有带接头的、低质量的Reads(读长),为了保证信息分析质量,必须对Raw reads(原始测序数据)进行过滤,得到Clean reads(过滤后的序列数据),保证后续分析数据的可靠性。

1.3.2 差异表达基因(DEG)的筛选 运用FPKM(Fragments per kb per million fragments)法计算基因的表达量,依据基因表达量(FPKM值)计算得到不同样品之间基因的差异表达倍数。差异基因筛选的标准为: $FDR(\text{错配率}) \leq 0.001$,同时倍数差异 $|\log_2(CP/CK)| \geq 1$ 的基因。筛选出差异基因后,进行相关的GO分析和KEGG pathway分析。

1.3.3 基因功能注释与分类 筛选出的DEG注释到GO(Gene ontology)数据库和KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库以分析这些差异基因的主要生物学功能。GO功能注释:依据NR数据库上的注释信息,运用Blast2GO软件分析基因序列,得到Unigene的GO注释信息,采用WEGO软件进行GO功能分类。KEGG功能注释:将基因序列比对到KEGG数据库进行注释,分析其参与的代谢通路及其相关功能^[33]。通过GO和KEGG数据库,确定参与葡萄果锈生成的关键途径。

1.3.4 DEG的qRT-PCR验证 以提取的总RNA为模板利用Takara Prime Script™ RT-PCR试剂盒反转录合成cDNA,并将合成后的cDNA用无菌ddH₂O稀释,浓度稀释至150 μg/μl,保存于-20℃冰箱中备用。随机选取9个差异基因,利用Becan Designer 7.9软件设计引物(表1),引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。实时荧光定量PCR以VvEF1和VvUbiquitin为内参基因。实时荧光定量PCR反应体系(20 μl)为:TaKaRa SYBR Premix Ex Taq(TaKa-

Ra公司产品)10.0 μl,上游引物和下游引物各0.4 μl,稀释10倍的cDNA 1.0 μl和8.2 μl去离子水。反应程序:95℃预变性4 min;95℃变性20 s,60℃退火20 s,72℃延伸40 s,40个循环。每个样品做3次平行反应,运用ABI7300软件和 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算相对表达量。内参基因VvEF1和VvUbiquitin的引物序列(5'→3')分别为:正向TCAATCTGTCTAG-GAAAGGAAG,反向GCGGGCAAGAGATACCTCAA;正向GTGGTATTATTGAGCCATCCTT,反向AAC-CTCCAATCCAGTCATCTAC。

表1 荧光定量引物序列

Table 1 The primer sequences for qRT-PCR

基因ID	基因名称	引物序列(5'→3')
100232838	MYB相关转录因子(VvMYBA2)	F:CAAGCCTCAGGACAGAAG R:CAGAAGCCCACATCAAATG
100241377	苯丙氨酸解氨酶基因	F:ATAAGCCACATAGCCAAGA R:GTTCACTGCGTGTCTCTAC
100232999	类黄酮3'羟化酶基因	F:CATCCAGCAGTAGAGT R:GCAGGTCCAAATCAGTTAC
100240945	苏氨酸蛋白激酶RLK1基因	F:GCGACAGATTGGATAAGC R:GCACAGGAACCTCAACAA
100232938	类黄酮合酶基因	F:CGCCATTACCATTCTTATC R:CTCGTCTTCTCCTTGTTC
100854997	苯丙氨酸解氨酶基因	F:GACTTCTACAACAATGGACTG R:AGGAGTTCACATCTTGGTT
100854106	黄烷酮3-双加氧酶基因	F:ACTATTATCCCGCTGTC R:CATCCTTGAGAACTGAAGAC
100245184	异黄酮还原酶基因	F:GATGACATTGGCACCTATAC R:GGCTTCTTGGATGTTCTTC
100245465	细胞色素P450 77A2基因	F:GTGAAGACGCCGATATAAC R:CTTGCCAGCATTAGGTTTC

2 结果

2.1 GA₃和CPPU处理后阳光玫瑰葡萄果皮变化

同一成熟时期,对照葡萄果皮表面出现果锈,颜色偏黄,而GA₃和CPPU处理的葡萄果皮表面未出现果锈,颜色偏绿。

2.2 葡萄果皮转录组文库测序产量统计

对构建好的GA₃+CPPU处理和对照葡萄果皮

转录组文库通过 Illumina 平台进行高通量测序,分别获得24 718 020条和30 878 996条 Raw reads,去掉低质量的序列后分别得到 24 652 194 条和 30 662 792 条 Clean reads,总核苷酸数分别为

3 696 829 100和4 599 418 800,序列 Q20 大于 95% (测序错误率<1%),序列 Q30 大于 90%,GC 含量大于 45%(表 2)。说明测序数据量和质量均较好,可以用于后续序列组装和分析。

表 2 葡萄阳光玫瑰果皮转录组测序产量统计

Table 2 Statistics of transcriptome sequencing results of pericarp of grape Shine Muscat

样品	原始序列数	过滤后的序列数	过滤后的总核苷酸数	G,C 含量 (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
对照 (CK)	30 878 996	30 662 792	4 599 418 800	45.93	96.90	92.27
GA ₃ +CPPU 处理	24 718 020	24 652 194	3 696 829 100	46.80	95.52	90.42

Q20:质量分数大于 20 的碱基所占的比例;Q30:质量分数大于 30 的碱基所占的比例。

2.3 葡萄果皮差异表达基因 (DEG) 比较分析

对 GA₃+CPPU 处理和对照的 RNA-Seq 数据进行差异比较分析,获得2 373个差异表达基因,其中上调表达基因 769 个,下调表达基因1 604个。

2.4 葡萄果皮差异表达基因的 GO 功能聚类

基于 GO 数据库,将测序得到的差异基因进行 GO 功能聚类,以 P 值 ≤ 0.05 作为阈值来分析差异基因的生物学功能。结果显示差异基因总共有 30

类,其中细胞组分 4 类,生物学过程 14 类,分子功能 12 类。细胞组分类主要包括膜的整体组分、胞间连丝、细胞壁形态,生物学过程类主要包括碳水化合物代谢、生物合成过程、生物胁迫应激反应、氧化还原反应、L-苯丙氨酸代谢过程。分子功能类中差异基因主要参与以下过程:蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、苯丙氨酸解氨酶活性、转移酶及酰基转移酶活性、NAD 转移酶活性、铁离子结合蛋白活性(图 1)。

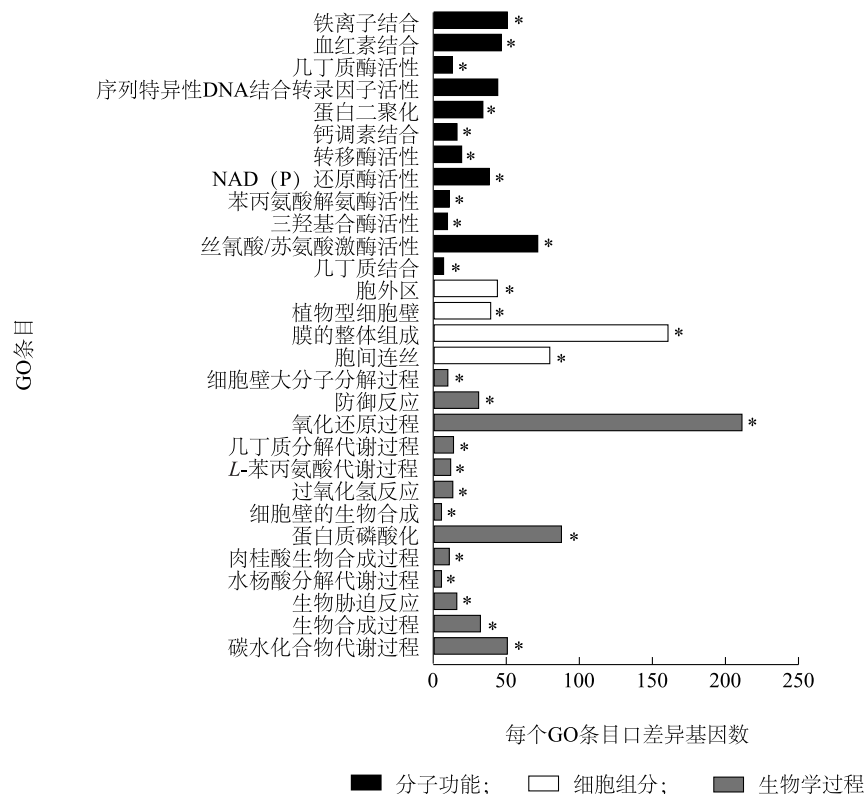


图 1 葡萄果皮差异表达基因 (DEG) 的 GO 功能分类

Fig.1 Gene ontology classification of differentially expressed genes (DEGs) of grape pericarp

2.5 葡萄果皮差异表达基因的 KEGG 代谢通路分析

基于 KEGG 数据库,分析与葡萄果锈生成相关的 DEG 代谢通路以深入研究这些基因的生物学功能。将1 186个 DEG 注释到 126 个代谢通路分支,涉及较多的通路有代谢途径(342 个)、次生代谢产物合成(290 个)和植物激素信号转导(138 个)等,表明果锈生成关键期葡萄果皮次生代谢旺盛,分别有 50 个 Unigene 参与苯丙烷合成代谢,36 个 Unigene 参与类黄酮合成代谢,20 个 Unigene 参与苯丙

氨酸代谢。由表 3 可知,在 Q 值 ≤ 0.05 的阈值下,总体来看下调的 DEG 数目大于上调的 DEG 数目,苯丙烷合成、苯丙氨酸代谢等次级代谢途径下调基因数显著大于上调基因数,表明 GA₃+CPPU 处理抑制了相关基因的表达水平。参考 KEGG 数据库,参与醚脂类代谢途径的磷脂酶和参与戊糖和葡糖醛酸转化途径的果胶裂解酶、果胶激酶、多聚半乳糖醛酸酶基因表达水平显著上调,可能与果锈产生前期细胞壁次生代谢旺盛有关。

表 3 葡萄果锈生成相关 DEG 显著富集的代谢通路

Table 3 Significantly enriched pathways of grape fruit russet-related DEGs

代谢通路 ID	代谢通路	注释到代谢通路的差异基因数	Q 值	上调的差异基因数	下调的差异基因数
K001110	次级代谢产物合成	286(24.11%)	8.22×10^{-19}	85	201
K000945	二苯乙烯类、二苯基庚烷类和姜辣素生物合成	58(4.89%)	5.29×10^{-18}	14	44
K000940	苯丙烷合成	50(4.22%)	1.07×10^{-7}	9	41
K000360	苯丙氨酸代谢	20(1.69%)	9.43×10^{-7}	2	18
K004075	植物激素信号转导	123(10.37%)	6.06×10^{-7}	35	88
K000941	类黄酮合成	36(3.04%)	2.41×10^{-7}	5	31
K001100	代谢途径	352(29.68%)	1.60×10^{-2}	111	241
K000592	α -亚麻酸代	16(1.35%)	2.31×10^{-4}	4	12
K000903	柠檬烯和蒾烯降解	21(1.77%)	2.14×10^{-3}	3	18
K000040	戊糖和葡糖醛酸转化	31(2.61%)	1.60×10^{-2}	16	15
K000500	淀粉和糖代谢	45(3.79%)	1.62×10^{-2}	20	25
K000520	氨基酸和核苷酸糖代谢	22(1.85%)	2.55×10^{-2}	8	14
K000073	角质、木栓质和蜡质生物合成	13(1.10%)	2.92×10^{-2}	1	12
K000904	二萜类化合物生物合成	14(1.18%)	3.14×10^{-2}	5	9
K000944	黄酮和黄酮醇生物合成	17(1.43%)	4.15×10^{-2}	2	15

2.6 与苯丙烷合成及类黄酮合成相关差异基因

采用差异基因的有效性 (FDR) ≤ 0.001 且 $|\log_2(CP/CK)| \geq 1$ 来判断对照和处理之间差异基因的有效性。通过分析并筛选对照与 GA₃+CPPU 处理之间苯丙烷合成及类黄酮合成途径差异基因,得到了 51 个与苯丙烷合成相关的差异基因,其中上调的有 7 个,其余均为下调基因;与类黄酮合成差异基因有 25 个,上调的 3 个,下调的 22 个。从上调及下调基因的数量及其参与的途径可明显看出,GA₃+CPPU 处理显著抑制了苯丙烷及类黄酮合成相关基因表达,特别是苯丙氨酸解氨酶(LOC100854997、LOC100251137、LOC100240904、LOC100241377)及

查尔酮合成酶(LOC100263443、LOC100258106、LOC100232843)基因表达量显著降低(表 4),抑制了葡萄果锈前体物质的产生。

2.7 DEG 的实时荧光定量 PCR 验证

为验证 RNA-Seq 数据的可靠性,随机选取 LOC100232823、LOC100241377、LOC100232999、LOC100240945、LOC100232938、LOC100854997、LOC100854106、LOC100245184、LOC100245465 共 9 个基因,通过 qRT-PCR 计算分析其在不同处理样品中的表达水平,与 RNA-Seq 的序列数据丰度进行比较。结果表明 RNA-Seq 的测序结果与 qRT-PCR 的结果相符,重复性良好,进一步证明测序质量较好。

表 4 参与苯丙烷合成与类黄酮合成的 DEGs

Table 4 The DEGs involved in phenylpropanoid biosynthesis and flavonoid biosynthesis

类别	基因 ID	RPKM _{对照}	RPKM _{处理}	$\log_2(RPKM_{处理}/RPKM_{对照})$	基因注释
苯丙烷类生物合成	LOC100267863	775.21	19.51	-4.69	细胞色素 P450 84A1
	LOC100253077	36.82	0.00	-4.69	中链脂肪酸-CoA 连接酶
	LOC100254698	1 061.81	30.66	-4.49	4-香豆酸-CoA 连接酶
	LOC100241377	1 515.59	45.52	-4.43	苯丙氨酸解氨酶
	LOC100854172	1 481.75	51.10	-4.24	咖啡酸 3-O-甲基转移酶
	LOC100260786	25.87	0	-4.18	槲皮素 3-O-甲基转移酶
	LOC100263633	253.76	9.29	-4.15	细胞色素 P450 98A2
	LOC100233087	171.16	6.50	-4.10	咖啡酰辅酶 A O-甲基转移酶
	LOC100251623	177.13	7.43	-3.95	双二氢黄酮醇还原酶/黄酮还原酶
	LOC100262575	21.89	0.00	-3.94	过氧化物酶 20
	LOC100259314	128.37	5.57	-3.90	类似细胞色素 P450 71A1
	LOC100265990	10.95	0	-3.83	槲皮素 3-O-甲基转移酶
	LOC100253493	2 425.14	111.49	-3.82	反式肉桂酸 4-单加氧酶
	LOC100244323	122.40	6.50	-3.61	伯胺氧化酶
	LOC100245991	190.07	10.22	-3.59	4-香豆酸-CoA 连接酶
	LOC100854997	192.06	11.15	-3.48	苯丙氨酸解氨酶
	LOC100251137	206.99	12.08	-3.48	苯丙氨酸解氨酶
	LOC100240904	63.69	4.65	-3.15	苯丙氨酸解氨酶
	LOC100248812	97.52	7.43	-3.09	UDP-糖基转移酶 85A3
	LOC100241575	157.23	13.01	-2.97	苯丙氨酸解氨酶
	LOC100245997	298.54	25.08	-2.95	苯丙氨酸解氨酶
	LOC100267215	1 096.64	100.34	-2.83	反式肉桂酸 4-单加氧酶
	LOC100251984	27.86	2.79	-2.70	UDP-糖基转移酶 87A2
	LOC100265530	190.07	20.44	-2.59	羟基肉桂酰 CoA 莽草酸/羟基肉桂酰转移酶
	LOC100261390	165.19	18.58	-2.53	苯丙氨酸解氨酶基因
	LOC100250277	283.61	32.52	-2.50	细胞色素 P450 84A1
	LOC100266593	423.93	60.39	-2.19	苯丙氨酸解氨酶
	LOC100256293	25.87	3.72	-2.18	苯丙氨酸解氨酶
	LOC100253987	746.35	115.20	-2.07	二氢黄酮醇还原酶
	LOC100249245	154.25	27.87	-1.85	BAHD 酰基转移酶 DCR
	LOC100854817	161.21	31.59	-1.73	过氧化物酶 12
	LOC100248810	31.84	6.50	-1.67	细胞色素 P450 76C4
	LOC100242338	76.63	16.72	-1.57	过氧化物酶 17
	LOC100264063	1 756.41	386.49	-1.56	羟基肉桂酰 CoA 莽草酸/羟基肉桂酰转移酶
	LOC100250514	62.69	13.94	-1.55	过氧化物酶 64
	LOC100263428	1 029.96	233.20	-1.52	类黄酮 3'-单加氧酶
	LOC100257005	3 704.88	844.52	-1.51	过氧化物酶 4
	LOC100262607	608.03	144.93	-1.45	可能的肉桂醇脱氢酶 6

续表 4 Continued

	基因 ID	RPKM _{对照}	RPKM _{处理}	log ₂ (RPKM _{处理} /RPKM _{对照})	基因注释
类黄酮生物合成	LOC100243978	5 551.84	1 330.42	-1.44	咖啡酰辅酶 A O-甲基转移酶
	LOC100244875	37.82	9.29	-1.40	黄烷酮 7-O-葡萄糖苷、2'' - O-β-L-鼠李糖
	LOC100262839	264.71	74.33	-1.21	二氢黄酮醇-4-还原酶
	LOC100242108	177.13	53.89	-1.09	咖啡酸 3-O-甲基转移酶
	LOC100256632	1 335.47	415.29	-1.06	推定的过氧化物酶体 CoA 合成酶
	LOC100257863	561.25	180.24	-1.02	双二氢黄酮醇还原酶/黄酮还原酶
	LOC100247942	1 197.14	1 586.85	1.03	推定的酰基辅酶 A 合成酶 YngI
	LOC100253488	422.93	702.37	1.35	二氢黄酮醇还原酶
	LOC100257320	314.46	585.31	1.52	β-葡萄糖苷酶 11
	LOC100243028	52.74	157.01	2.20	线粒体天冬氨酸转氨酶
	LOC100260726	9.95	39.95	2.63	过氧化物酶 43
	LOC100261249	41.80	240.63	3.15	过氧化物酶 31
	LOC100241493	1.99	16.72	3.69	呋喃果糖水解酶
	LOC100232938	219.92	1.86	-6.26	黄酮醇合酶
	LOC100263443	420.94	20.44	-3.74	查尔酮合酶
	LOC100259799	84.59	5.57	-3.30	蛋白质 SRG1
	LOC100233112	223.90	14.87	-3.29	无色花青素还原酶 2
	LOC100258106	197.04	15.79	-3.02	查尔酮合酶
	LOC100263992	4 838.33	396.71	-2.99	蛋白质 SRG1
	LOC100233142	1 087.68	131.00	-2.43	无色花色素双加氧酶
	LOC100254114	59.71	7.43	-2.38	细胞色素 P450 76C4
	LOC100248986	637.88	87.33	-2.25	细胞色素 P450 76C4
	LOC100233078	1 186.20	170.02	-2.18	查尔酮异构酶
	LOC100247586	82.60	13.01	-2.04	可能的 NAD(P)H 依赖性氧化还原酶
	LOC100233079	293.56	54.81	-1.80	黄烷酮 3-羟化酶
	LOC100253950	13 220.33	2 612.54	-1.72	黄烷酮 3-羟化酶
	LOC100854106	146.28	32.52	-1.55	黄烷酮 3-羟化酶
	LOC100232843	1 414.08	367.91	-1.32	查尔酮合酶
	LOC100251201	60.70	15.79	-1.32	细胞色素 P450 76A2
	LOC100247063	635.89	175.59	-1.23	蛋白质 SRG1
	LOC100255484	417.96	118.92	-1.19	异黄酮还原酶同系物
	LOC100254096	135.34	39.95	-1.14	黄烷酮 3-羟化酶
	LOC100232891	77.62	23.23	-1.12	与成熟相关的 P-450 酶
	LOC100266596	185.09	57.60	-1.06	1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶
	LOC100263035	192.06	60.39	-1.05	细胞色素 P450 76C4
	LOC100249316	30.85	88.26	2.14	醛醇还原酶家族 4 成员 C9
	LOC100245184	371.18	1 267.25	2.39	异黄酮还原酶
	LOC100260701	8.96	92.91	4.00	细胞色素 P450 82C4

RPKM:每百万个读长中来自某基因每千碱基长度的读长数。

3 讨论

近年来, RNA-Seq 测序技术的广泛应用, 为高效建立果树分子研究平台提供了快速便捷的途径^[34]。本研究以 GA₃+CPPU 处理的阳光玫瑰葡萄为材料, 选取果锈生成关键期(成熟前 3 周)的果皮, 利用 II-

lumina HiSeq™ X Ten 高通量测序平台, 构建了处理和对照两个转录组文库, 分别获得 24 652 194 条和 30 662 792 条 Clean read, Q20、GC 含量等的分析结果表明测序数据量和质量均较好, 满足对葡萄果皮转录组分析的基本要求。

测序得到的差异基因 GO 功能注释到细胞组

分、分子功能和生物学过程等 3 大类 30 个功能组,大量基因与碳水化合物合成、生物合成和 *L*-苯丙氨酸代谢等生物学过程相关。依据 KEGG 代谢通路数据库,将 GA_3 +CPPU 处理与对照的 1 186 个差异表达基因定位到 126 个代谢通路中,差异基因主要富集于代谢途径、次生代谢产物合成、植物激素信号转导、苯丙烷合成、苯丙氨酸代谢和类黄酮合成等代谢通路,表明在果锈生成关键期,葡萄果皮代谢旺盛,次生代谢产物的合成对果锈生成起重要作用。次生代谢途径中,基因注释最多的是苯丙烷合成通路,其次是类黄酮合成和苯丙氨酸代谢,这些数据信息为筛选可能影响果锈生成的次生代谢产物合成调控过程中涉及到的相关基因奠定了基础。

金冠苹果、黄金梨和砂梨等外果皮果面果锈形成的研究表明,果锈是由生长应力和外在因素导致微观裂隙,随后通过外表皮细胞的细胞壁内侧木栓质积累形成高塑性的外周膜引起的果皮生理性紊乱,是一层为抵御逆境保护自身而产生的次生木栓化组织,主要表现为果面浮生锈色木栓化物质^[2,5,6,9]。木质素是苯丙烷合成代谢途径的主要终产物,是木栓质形成、果实木质化的标志^[35]。Heng 等^[36]在砀山酥梨突变体品种秀酥梨调控果皮锈斑生成基因的研究中发现,苯丙烷代谢和次生代谢可能参与秀酥梨果锈生成,控制苯丙烷代谢途径的 *MYB8* 转录因子在突变体品系中表达量上升,直接调控木质素合成的 *CCoAOMT* 基因表达量上升,从而间接导致外果皮木质素含量升高,果面锈斑生成。欧阳光察等^[37]研究发现,多种植物的木质化组织中苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)、肉桂酸-4-羟化酶(*C4H*)和香豆酸辅酶 A 连接酶(*4CL*)活性较高且有木质素的合成,木质素是细胞次生壁加厚的结构组分,为木质细胞所特有。在外果皮生锈的砂梨和苹果中,咖啡酸-*O*-甲基转移酶基因(*COMT*)和 *C4H* 基因等木栓质合成基因的表达加强,外表皮细胞的细胞壁内侧木栓质的积累形成果锈^[36,38-40]。本研究 RNA-Seq 分析结果表明,苯丙烷合成代谢途径中,与对照相比, GA_3 +CPPU 处理后,催化苯丙氨酸直接脱氨产生肉桂酸的 *PAL* 基因(LOC100241377、LOC100854997、LOC100251137、LOC100240904 和 LOC100266593 等)表达水平显著被抑制,催化对-香豆酸活化为对-香豆酰辅酶 A 的 *4CL* 酶基因(LOC100254698 和 LOC100245991)表达水平显著

下调,*POD* 酶基因(LOC100262575、LOC100854817、LOC100242338、LOC100250514 和 LOC100260726 等)和细胞色素 P450 基因(LOC100267863、LOC100259314 和 LOC100248810 等)表达量均显著下调,木质素前体物质的合成被抑制,木质素合成量减少,木栓化减弱,从而影响果锈的生成。在豌豆中,细胞色素 P450 影响 ω -羟基脂肪酸的 9,10-环氧化物等脂肪族化合物的合成,这些化合物是木栓质大分子的重要组成部分,细胞色素 P450 基因表达下调,木栓质代谢活动减弱,影响果锈的生成^[41]。

类黄酮和苯丙烷合成代谢途径中具有共同的前体物质,这些前体物质的合成起始于苯丙氨酸。查尔酮合成酶(*CHS*)是将苯丙烷代谢引向类黄酮合成的第 1 个酶^[42-44]。转录组测序结果表明, GA_3 +CPPU 处理后,阳光玫瑰葡萄果皮类黄酮合成代谢途径中,*CHS* 酶基因(LOC100263443、LOC100258106、LOC100232843)表达量显著下调,可能与 GA_3 和 CPPU 抑制果锈生成有关,具体原因尚有待深入探究。

参考文献:

- [1] KHALILURREHMAN M, SUN L, LI C X, et al. Comparative RNA-seq based transcriptomic analysis of bud dormancy in grape[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17 (1): 18.
- [2] 周朝华,刘金凤.黄金梨果锈发生严重的原因及预防措施[J].落叶果树,2005, 37(5):37-39.
- [3] 滕元文,沈玉英,周先.砂梨果皮锈斑成因及解决对策[J].中国南方果树,2005, 34(3):52-54.
- [4] OGORO A, ONO T, KAGAMI H, et al. Skin-browning occurred on berries of 'Suihou' grape[J]. Bull Okayama Agri Exp Sta, 2007, 25:5-10.
- [5] 李亚锋.关于金冠苹果果锈形成原因的研究[J].吉林农业,2010(9):66.
- [6] 聂继云,重雅凤,马智勇,等.金冠苹果果锈的发生原因及防治[J].北方果树,2001(3):3-4.
- [7] 李健花,高晶晶,冯新新,等.'金冠'苹果与其无锈芽变的果皮性状比较和防锈技术研究[J].园艺学报,2014,41(1):35-43.
- [8] YUKA S, KEISUKE M, HIROYUKI I, et al. Skin browning and expression of PPO, STS, and CHS genes in the grape berries of 'Shine Muscat' [J]. Journal Japanese Society for Horticultural Science, 2014, 83(2): 122-132.
- [9] WANG Y Z, DAI M S, CAI D Y, et al. A review for the molecular research of russet/semi-russet of sand pear exocarp and their genetic characters [J]. Scientia Horticulturae, 2016, 210: 138-142.
- [10] 马克元,程福厚,傅玉珊,等.鸭梨果实果点和锈斑的发育[J].

- 园艺学报, 1995, 22(3): 295-296.
- [11] 郑永华, 李三玉, 席 芳. 枇杷冷藏过程中果肉木质化与细胞壁物质变化的关系[J]. 植物生理学报, 2000, 26(4): 306-310.
- [12] RETAMALES J, BANGERTH F, COOPER T, et al. Effects of CPPU and GA₃ on fruit quality of 'Sultanina' table grape [J]. Plant Bioregulators in Horticulture, 1995, 394: 149-158.
- [13] 辛守鹏, 刘 帅, 余 阳, 等. 赤霉素与细胞分裂素对葡萄果实邻近叶光合特性及果实品质的影响[J]. 应用生态学报, 2015, 26(7): 1814-1820.
- [14] 顾克余, 周蓓蓓, 宋长年, 等. 植物生长调节剂及其在葡萄生产上的应用综述[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 13-16.
- [15] 陈国品, 白先进, 文仁德, 等. 赤霉素对延后栽培酿酒葡萄西拉生长发育及果实品质的影响[J]. 南方农业学报, 2016, 47(5): 694-699.
- [16] 吴 俊, 钟家煌, 徐 凯, 等. 外源 GA₃对藤稔葡萄果实生长发育及内源激素水平的影响[J]. 果树学报, 2001, 18(4): 209-212.
- [17] 夏瑾华, 喻慧荣, 邹如意, 等. 6-BA、赤霉素和水杨酸对甜瓜种子萌发的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(12): 204-206.
- [18] 张 溢, 袁雅珍, 余露霞, 等. 植物生长调节剂对月季切花保鲜效果的影响[J]. 南方农业学报, 2016, 47(3): 454-458.
- [19] 刘耀光, 曹 慧. CPPU对红地球葡萄果实主要经济性状的影响[J]. 山西果树, 2007(2): 3-4.
- [20] 侯玉茹, 王宝刚, 冯晓元, 等. CPPU 和 GA₃在葡萄中的残留动态及对果实品质的影响[J]. 果树学报, 2012, 29(1): 36-41.
- [21] 余智莹, 张 萌, 陶建敏. GA₃和 CPPU对凉玉葡萄果实品质的影响[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2010(7): 49-51.
- [22] CHEN G, WANG C, SHI T L. Overview of available methods for diverse RNA-Seq data analyses[J]. Science China Life Sciences, 2011, 54(12): 1121-1128.
- [23] 冯 超, 朱长青, 徐昌杰, 等. RNA-Seq在果树学研究中的应用[J]. 果树学报, 2016, 31(01): 115-124.
- [24] FOLTA K M, CLANCY M A, CHAMALA S, et al. A transcript accounting from diverse tissues of a cultivated strawberry[J]. Plant Genome, 2010, 3(2): 90-105.
- [25] ZHANG J Z, AI X Y, SUN L M, et al. Transcriptome profile analysis of flowering molecular processes of early flowering trifoliate orange mutant and the wild-type [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] by massively parallel signature sequencing [J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 63.
- [26] D HONT A, DENOEUD F, AURY J M, et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants [J]. Nature, 2012, 488(7410): 213-217.
- [27] FENG C, CHEN M, XU C J, et al. Transcriptomic analysis of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit development and ripening using RNA-Seq[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 19.
- [28] WU J, WANG Z, SHI Z, et al. The genome of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. Genome Research, 2012, 23(2): 396-408.
- [29] ZHANG Y, ZHU J, DAI H. Characterization of transcriptional differences between columnar and standard apple trees using RNA-Seq[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 30(4): 957-965.
- [30] LUCA V, ALBERTO F, SARA Z, et al. De novo transcriptome characterization of *Vitis vinifera* cv. *Corvina* unveils varietal diversity[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 41.
- [31] 王云生, 聂 飞, 林顺权. 果树高通量测序的最新研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(9): 2034-2043.
- [32] 殷向静. 山葡萄果实转录组分析及白藜芦醇调控机理研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.
- [33] 李锡花, 吴 嫚, 于霁雯, 等. 棉花纤维发育早期 RNA-Seq 转录组分析[J]. 棉花学报, 2013, 25(3): 189-196.
- [34] 张少平, 洪建基, 邱珊莲, 等. 紫背天葵高通量转录组测序分析[J]. 园艺学报, 2016, 43(5): 935-946.
- [35] 吴锦程, 唐朝晖, 陈 群, 等. 不同贮藏温度对枇杷果肉木质化及相关酶活性的影响[J]. 武汉植物学研究, 2006, 24(3): 235-239.
- [36] HENG W, LIU L, WANG M D, et al. Differentially expressed genes related to the formation of russet fruit skin in a mutant of 'Dangshansuli' pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) determined by suppression subtractive hybridization [J]. Euphytica, 2014, 196(2): 285-297.
- [37] 欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控[J]. 植物生理学通讯, 1988(3): 9-16.
- [38] WANG Y Z, DAI M S, ZHANG S J, et al. Exploring candidate genes for pericarp russet pigmentation of sand pear (*Pyrus pyrifolia*) via RNA-Seq data in two genotypes contra sting for pericarp color[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e83675.
- [39] WANG Y Z, ZHANG S, DAI M S, et al. Pigmentation in sand pear (*Pyrus pyrifolia*) fruit: biochemical characterization, gene discovery and expression analysis with exocarp pigmentation mutant [J]. Plant Mol Biol, 2014, 85: 123-134.
- [40] LEGAY S, GUERRIERO G, DELERUELLE A, et al. Apple russetting as seen through the RNA-Seq lens: strong alterations in the exocarp cell wall [J]. Plant Mol Biol, 2015, 88: 21-40.
- [41] KOBAYASHI S, ISHIMARU M, DING C K, et al. Comparison of UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGFT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin [J]. Plant Science, 2001, 160(3): 543-550.
- [42] 王 莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508.
- [43] 秦秋琳. 银杏中与木质素合成和苯丙氨酸代谢相关的转录调控因子的克隆与研究[D]. 上海: 复旦大学, 2007.
- [44] 张宽朝, 金 青, 蔡永萍, 等. 苯丙氨酸解氨酶与其重要次生代谢产物调控中的作用研究进展[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 59-62.

(责任编辑: 张震林)