

翟彩娇, 徐 鹏, 范昕琦, 等. 盐胁迫下旱地棉叶片数字化基因表达谱分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 481-489.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.001

## 盐胁迫下旱地棉叶片数字化基因表达谱分析

翟彩娇<sup>1,2</sup>, 徐 鹏<sup>2</sup>, 范昕琦<sup>2</sup>, 郭 琪<sup>2</sup>, 张香桂<sup>2</sup>, 徐珍珍<sup>2</sup>, 沈新莲<sup>2</sup>

(1.南京农业大学, 江苏 南京 210095; 2.江苏省农业科学院经济作物研究所/农业部长江下游棉花油菜重点实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了深入研究棉花耐盐的分子机理, 利用数字化基因表达谱技术, 分析了盐胁迫处理 3 h 和 72 h 时旱地棉叶片中基因表达差异, 分别获得 1 778(1 046 个上调、732 个下调) 和 2 873(2 065 个上调、808 个下调) 个差异表达基因。功能注释分析结果表明, 这些差异表达基因主要参与了信号转导、逆境应答、能量代谢和转录调节等方面。随机挑选 10 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证, 结果表明, qRT-PCR 结果与数字化基因表达谱分析结果基本一致。

**关键词:** 旱地棉; 盐胁迫; 数字化表达谱分析

**中图分类号:** S562 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)03-0481-09

## Digital gene expression profile of *Gossypium aridum* leaves under salt stress

ZHAI Cai-jiao<sup>1,2</sup>, XU Peng<sup>2</sup>, FAN Xin-qi<sup>2</sup>, GUO Qi<sup>2</sup>, ZHANG Xiang-gui<sup>2</sup>, XU Zhen-zhen<sup>2</sup>, SHEN Xin-lian<sup>2</sup>

(1. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Cotton and Rapeseed, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To uncover the salt tolerance mechanisms of *Gossypium aridum* and improve salinity resistance, the technique of digital gene expression profile was involved to analyze the variations of gene expression in the leaves of upland cotton exposed to 200 mmol/L NaCl for 3 h and 72 h, respectively. There were 1 778(1 046 up-regulated/732 down-regulated) and 2 873(2 065 up-regulated/808 down-regulated) differentially expressed genes, respectively. Functional annotation analysis revealed that the genes were involved in various metabolic pathways including signal transduction, stress response, energy metabolism, and transcriptional regulation. A total of 10 differentially expressed genes were randomly selected for qRT-PCR validation, and the results were basically consistent with those by the digital gene expression profile.

**Key words:** *Gossypium aridum*; salt stress; digital gene expression profile

随着耕地面积的减少, 粮棉油安全供给的矛盾

愈加突出, 对抗逆棉花品种的需求愈加迫切。作为盐碱地的先锋作物, 陆地棉耐盐水平总体不高, 并且基础种质过于集中, 耐盐品种的遗传基础相当狭窄<sup>[1]</sup>。种质资源的拓展对于作物育种工作具有重要作用。由于缺乏高抗盐碱的陆地棉资源, 使得棉花耐盐常规育种进展比较缓慢, 不能满足生产的需求。棉属野生种具有栽培种所缺乏的许多优良性状, 是改良陆地棉品种产量、品质、抗逆性等方面的重要基础。我们在多年研究中通过盐胁迫发芽试验

收稿日期: 2015-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471545); 国家转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX08005-004-002); 江苏省农业自主创新基金项目[ CX (14) 2065 ]

作者简介: 翟彩娇(1990-), 女, 河南周口人, 硕士, 主要从事棉花分子育种研究。(Tel) 15150531855; (E-mail) 15150531855@163.com

通讯作者: 沈新莲, (Tel) 025-84390291; (E-mail) xlshen68@126.com

及植株形态比较发现,来自南美洲 D 染色体组的二倍体旱地棉(*Gossypium aridum*)具有较好的耐盐、耐旱特性,是研究非生物胁迫分子机理及大规模克隆逆境胁迫相关基因的理想材料。

非生物胁迫会诱导植物发生一系列反应,包括基因表达的改变,植物激素的积累,渗透活性化合物的产生,可清除氧自由基或作为分子伴侣的保护性蛋白质的合成<sup>[2-7]</sup>。这些反应由分子网络所调控,通过激活胁迫反应机制建立渗透平衡,保护和修复受到损伤的蛋白质和膜<sup>[8]</sup>。目前为止,在棉花中已有多个盐胁迫相关基因的报道,但这些研究结果大多集中于单个基因的克隆和功能验证<sup>[9-12]</sup>。棉花的盐胁迫抗性是复杂的数量性状,单个基因对棉花耐盐性提高并不显著。因此在深入研究逆境胁迫分子机理的基础上,研究整个盐胁迫棉花基因网络调控,精确地控制基因在空间与时间上的表达在作物抗逆改良中非常重要。

当前基因组学的研究方向正由结构基因组学向功能基因组学转变,研究基因转录表达水平是功能基因组学研究的一个主要内容。高通量测序的数字化基因表达谱(Digital gene expression profile, DGE)技术利用新一代高通量测序技术和高性能计算分析技术对某一物种特定组织和状态下的基因表达情况进行序列捕捉和精确解析,是新发展起来的分析生物基因表达的方法,以检测数据范围更大、精度更高、操作简单等优势正逐步取代基因芯片技术<sup>[13-19]</sup>。本研究利用基于高通量测序的数字化基因表达谱技术,对盐胁迫下旱地棉叶片中基因表达情况进行深入研究,分析不同盐胁迫处理时期旱地棉叶片中基因表达的差异。应用生物信息学对差异表达基因所行使的功能和参与代谢途径进行深入研究,进一步认识棉花的耐盐机制,以期对棉花耐盐性改良提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

棉属野生种旱地棉(*G. aridum*)种子由中国农业科学院棉花研究所海南岛野生棉种植园提供。将旱地棉种子播于钵钵中,待长至约 20 cm 将小苗从土中取出,洗去根上的泥土,将小苗浸在含 200 mmol/L NaCl 的营养液(其中  $C_{Na^+} : C_{Ca^{2+}}$  为 15:1)中,分别处理 0 h、3 h 和 72 h,取不同时期的叶片,液

氮速冻后于-70℃保存。

### 1.2 样本制备及数字表达谱测序

用改良的 CTAB 法<sup>[20]</sup>提取旱地棉叶片 RNA, -70℃保存。由深圳华大基因科技有限公司制备样本和测序,具体方法步骤参照文献[21]。

### 1.3 数据分析

棉花 EST 数据库来自于 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),与旱地棉转录组数据库<sup>[22]</sup>整合后,利用 CD\_HIT<sup>[23]</sup> (<http://www.bioinformatics.org/cd-hit/>)快速批量去除冗余序列,获得非冗余的 Unique 序列作为参考数据库。检索 mRNA 上所有的 CATG 位点,生成 CATG+17nt 碱基的参考标签数据库。然后将全部 Clean tag 与参考数据库比对,允许最多 1 个碱基错配,对其中唯一比对到 1 个基因的标签进行基因注释,统计每个基因对应的原始 Clean tag 数,然后对原始 Clean tag 做标准化处理(每个基因包含的原始 Clean tag 数/该样本中总 Clean tag 数 $\times 1\,000\,000$ ),获得标准化的基因表达量(TPM)。以 FDR(False discovery rate) $\leq 0.001$  且存在 2 倍以上表达差异作为判断基因表达差异显著的阈值。

利用 Blast2GO 软件并对其进行本地化之后进行 GO 功能显著性富集分析。首先把所有差异表达基因向 Gene ontology 数据库(<http://www.geneontology.org/>)的各 Term 映射,计算每个 Term 的基因数目,然后应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比在差异表达基因中显著富集的 GO 条目,计算得到的 P-value 进行 Bonferroni 校正,以校正的 P-value $\leq 0.05$  为阈值,满足此条件的 GO term 定义为在差异表达基因中显著富集的 GO term。Pathway 显著性富集分析以 KEGG Pathway 为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比在差异表达基因中显著富集的 Pathway。Q value $\leq 0.05$  的 Pathway 定义为在差异表达基因中显著富集的 Pathway。

### 1.4 qRT-PCR 分析

应用反转录试剂盒 Reverse transcription system Promega 进行 cDNA 合成。每个样品中取 1  $\mu$ g 总 RNA 进行反转录,反转录酶为 Super Script RT,反应体积 20  $\mu$ l。采用基于 SYBR Green 的荧光实时定量 PCR 验证基因表达谱测序数据的可靠性。利用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物(表 1),扩增产物长度 80~300 bp,通过 qRT-PCR 对引物进行检

测,以棉花组成型表达基因  $\beta$ -actin 作为定量分析的内参基因。用 ABI7500 Real time PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 检测,反应程序:95 ℃ 预变性 30 s,

PCR 反应 95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,40 个循环,每个样品进行 3 次重复。

表 1 用于 qRT-PCR 分析的引物

Table 1 Primers used in real time quantitative RT-PCR analysis

基因编号	Gene ID	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
1	Unigene91622_G3	GCTCAAGCCTTGTCATTT	TGCGCTTGCTTGCTTGAG
2	Unigene29703_G3	ATTTAGCGAAGCCGACAC	GATTTTCGGGCAGAACCAC
3	Unigene93932_G3	GCCTGTTTCTTGTCCTCG	GTTGAATTGCTGCTGCTG
4	Unigene98222_G3	CAGGATTAGCGTGCCAAGT	TGGCTGCTTGCTGCTTCC
5	Unigene97855_G3	GATTTTCGGCTTGCCACCAT	TCCGCTTTCACAACACTC
6	Unigene36735_G3	GCACAACAAGGGCAGAA	TTCCGAGGAAACGTGCTT
7	Unigene33031_G3	TATTAGGCTGGCGGAGGG	TTCCAAGCGCTGGCGATA
8	Unigene97230_G3	AGAATTAAGACATGGCAGGGT	TCCTGATAGAGCGACTGC
9	Unigene29118_G3	CATCGCAAGGCAACCCAA	CGGTGAAGATAAAGTGTCG
10	Unigene39528_G3	GGCACCAATGGCAAGTCC	GTCTTCGCCGGAACATCG

## 2 结果与分析

### 2.1 测序评估

为了对盐胁迫下旱地棉叶片中差异基因进行表达谱分析,本研究共构建了 3 个表达谱文库,分别命名为 Y0(不处理,对照)、Y3(盐胁迫 3 h)、Y72(盐胁迫 72 h)。测序深度达到 6 M,对原始数据进行处理后,每个表达谱文库获得 Clean tag 的种类大约 0.15~0.17 M。不均一性是细胞 mRNA 表达的显著特征,少量种类 mRNA 表达丰度极高,而大部分种类 mRNA 表达水平很低甚至极低。Clean tag 数据中,tags 拷贝数反映了相应基因的表达量。本研究中,大多数 Clean tag 的表达水平都很低,3 个表达谱文库中拷贝数大于 100 的高表达 tag 数分别占 72.69%、73.44%和 71.41%,在数量上占有绝对优势;而拷贝数小于 5 的低表达 tag 种类分别占 62.26%、56.18%和 54.12%(图 1)。说明占 mRNA 总量 70%以上是种类 6%左右的少数 mRNA,而占种类 60%左右的 mRNA 仅占总量的 5%以下。因此,从整体上评估测序数据是正常的。将所有的 Clean tag 比对到上述参考数据库,大约有 60.06%~74.98%的 tag 能够比对上参考数据库(表 2)。

### 2.2 不同盐胁迫时间的差异基因分析

将每个胁迫时间所有的 Clean tag 比对到参考

数据库,选择其中唯一比对到 1 个基因的 Tag,进而统计基因的表达量,将不同盐胁迫时间处理与对照比较,筛选差异表达的基因。分别对各个时间的 Clean tag 标准化处理,获得标准化的基因表达量,然后根据基因在不同处理间的  $|\log_2 \text{ratio}| \geq 1$  并且  $FDR \leq 0.001$  作为筛选标准。与对照 Y0 相比较,Y3 叶片中有 1 046 个 Unigene 上调表达,732 个 Unigene 下调表达;Y72 有 2 065 个 Unigene 上调表达,808 个下调表达(图 2)。在旱地棉响应盐胁迫时期,表现为上调的 Unigene 数量明显多于下调的 Unigene 数量,上调表达的 Unigene 以及下调表达的 Unigene 的数目均随着盐胁迫时间的延长而不断增加,然而这些增加的 Unigene 大部分表现为上调表达。与根部<sup>[22]</sup>比较,盐胁迫 3 h,根部上调表达的 Unigene 多于下调 Unigene 的数量,而盐胁迫 72 h,下调表达的 Unigene 则明显多于上调的 Unigene 数量,表明旱地棉根部和叶片中响应盐胁迫应答机制有所不同;此外,盐胁迫 3 h 根部差异表达的 Unigene 明显多于叶片中的,而 72 h 后两者差异表达的基因数量则相当,表明叶片响应盐胁迫则相对迟缓于根部。选择差异 100 倍以上( $|\log_2 \text{ratio}| \geq 6.7$ )作为筛选标准,与 Y0 相比,Y3 上调表达的 Unigene 141 个,下调表达的 Unigene 51 个;Y72 有 326 个上调表达的 Unigene,82 个下调表达的 Unigene。以差异 10 倍以上并小于

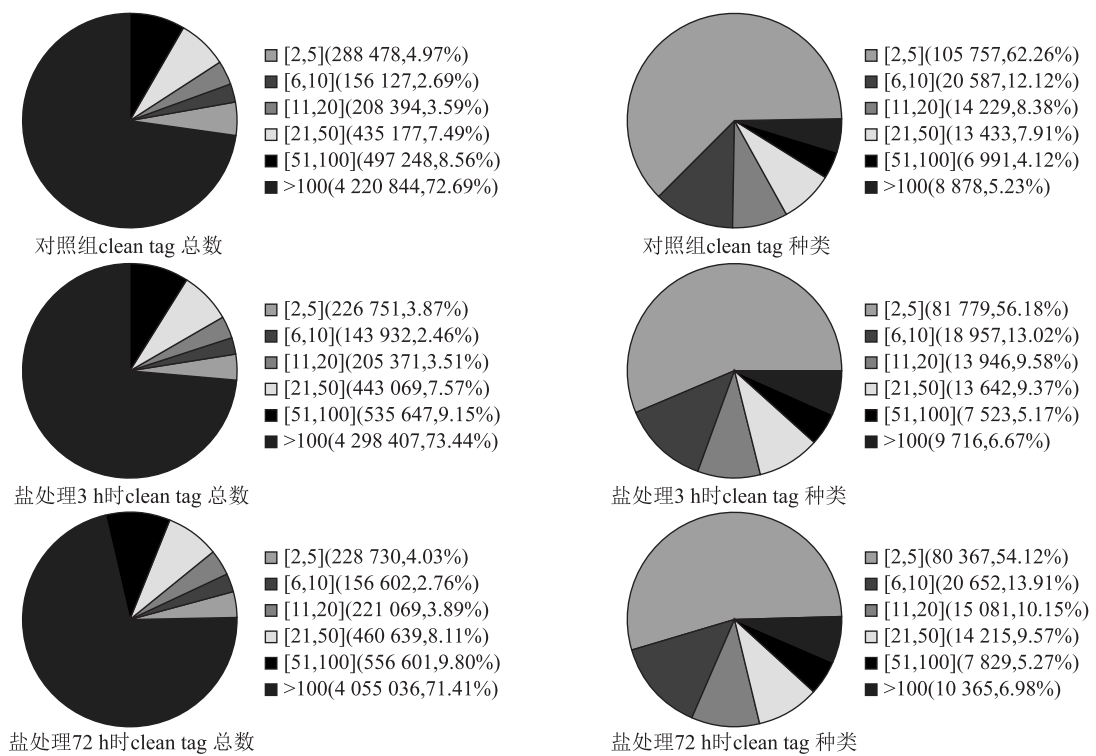


图1 Clean tag 拷贝数分布统计  
Fig.1 Distribution of total clean tags and distinct clean tags

表2 3个表达谱文库 DGE 测序统计  
Table 2 Statistics of DGE sequencing of three libraries

表达谱文库	Tag 数	Tag 种类	Clean tag 种类	比对到参考数据库的 Clean tag 种类	未比对到参考数据库的 Clean tag 种类
Y0	6 083 462	446 867	169 875	102 023 (60.06%)	67 852 (39.94%)
Y3	6 082 826	374 992	145 563	102 279 (70.26%)	43 284 (29.74%)
Y72	586 6714	336 442	148 509	111 348 (74.98%)	37 161 (25.02%)

Y0:对照表达谱文库;Y3:盐胁迫 3 h 表达谱文库;Y72 盐胁迫 72 h 差异谱文库。

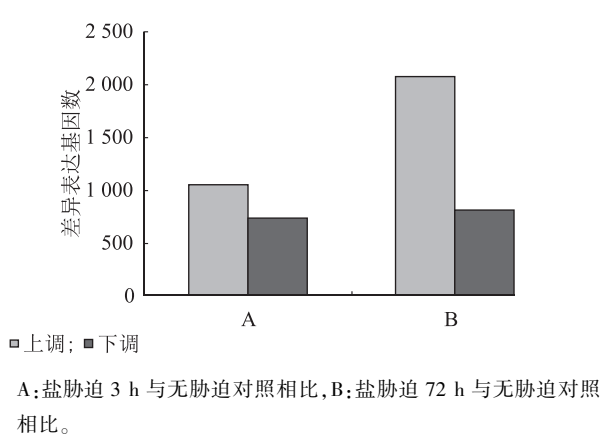


图2 盐胁迫不同时间旱地棉叶片差异表达基因  
Fig.2 Differentially expressed genes in the leaves of *Gossypium aridum* under salt stress

100 倍 ( $6.7 \geq |\log_2 \text{ratio}| \geq 3.3$ ) 作为筛选标准,与 Y0 相比, Y3 有 92 个 Unigene 上调表达, 79 个 Unigene 下调表达; Y72 有 209 个 Unigene 上调表达, 73 个 Unigene 下调表达。这些差异表达的 Unigene 为进一步研究棉花的耐盐机理提供了基础。

### 2.3 差异表达基因功能注释

通过 Gene ontology (GO) 功能显著性富集分析能确定差异表达基因行使的主要生物学功能,发掘与基因差异表达相关联的特征功能分类。通过 GO 基因功能分类体系分别将 Y3 和 Y72 与对照 Y0 相比获得的差异表达基因进行功能分类注释,以  $P\text{-value} \leq 0.05$  为阈值。在细胞组分中,显著性富集的 GO 条目总共有 13 个,除质体 (Plastid) 条目外,其余所有 GO 条目在两个时期均表现为显著性富



集。在分子功能组分中,总共有 14 个显著性富集的 GO 条目,其中有 8 个 GO 条目在两个时期都显著性富集。在生物进程组分中,总共有 26 个显著富集的 GO 条目,其中仅阴离子转运 (Anion transport) 条目在两个时期均表现为显著富集,盐胁迫前期和后期界定较明显。前期主要富集的条目为信号 (Signaling)、光合作用 (Photosynthesis)、细胞自动调节 (Cellular homeostasis)、有机酸转运 (Organic acid transport)、羧酸转运 (Carboxylic acid transport) 以及氨基酸转运 (Amino acid transport) 等;后期主要富集的条目为转录因子 (Transcription)、大分子修饰 (Macromolecule modification)、对内在刺激以及有机物的响应 (Response to endogenous stimulus or organic substance) 以及核酸代谢 (Nucleic acid or RNA metabolic process) 等 (图 3)。Pathway 分析参照 KEGG 公共数据库,通过 Pathway 富集能确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。两个时期都显著富集的 Pathway 为植物激素信号转导 (Plant hormone signal transduction)、植物病原菌互作 (Plant-pathogen interaction)、光合作用 (Photosynthesis)、调控自噬 (Regulation of autophagy)。

为了鉴定盐胁迫下潜在的转录因子,筛选两组盐胁迫时间差异表达基因的并集,共获得 3 463 个差异表达的 Unigene。通过本地化的 BlastX 程序<sup>[24]</sup>将所有差异表达的 Unigene 比对到拟南芥转录因子数据库 ([http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de, version3.0](http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/version3.0)),该数据库总共含有 2 757 种蛋白质,属于 81 个基因家族。结果显示,总共有 132 个差异基因能够比对到拟南芥转录因子数据库中的 36 个基因家族,其中大部分转录因子表现为上调表达。100 个 (75.8%) 上调表达的 Unigene 能够比对到 32 个拟南芥转录因子家族,bZIP 家族上调表达的转录因子最多。仅 32 个 Unigene (24.2%) 表现为下调表达,共比对到 16 个拟南芥转录因子家族,下调表达最多的属于 bHLH 转录因子家族 (图 4)。

#### 2.4 不同盐胁迫时间差异表达的共同基因

不同盐胁迫处理组间的差异表达基因之间有较大差异,但也存在共同表达的差异基因。两组盐胁迫处理时间共筛选到 1 188 个差异表达的共同基因,其中 752 个上调表达,412 个下调表达,24 个 Unigene 两个盐胁迫时间表达方向不一致。以差异 10 倍作为筛选标准,共有 229 个差异表达的共同基

因,其中上调表达的 Unigene 169 个,下调表达的 Unigene 60 个。对盐胁迫下上调或下调 10 倍以上的差异表达的共同基因进行功能注释,其中有 46 个在 nr 库中没有注释,107 个是假定蛋白质基因或未知功能的蛋白质基因,仅 76 个基因可编码有已知功能的蛋白质。以差异 100 倍作为筛选标准,共有 119 个差异表达的共同基因,101 个表现为上调表达,下调表达的仅 18 个。功能注释结果表明,绝大部分差异表达的共同基因 (77 个) 没有功能注释或注释为未知功能蛋白质基因,仅 42 个注释为已知功能蛋白质基因。主要包括以下几类:①信号转导相关基因,如蛋白激酶基因等;②胁迫应答类相关基因,如水通道蛋白基因、ATP 结合蛋白基因等;③能量代谢相关基因,如淀粉合成酶基因、乙醇脱氢酶基因等;④氧化胁迫相关基因,如细胞色素 P450 基因、金属硫蛋白基因、环氧化物酶基因等;⑤调控基因表达的转录因子,主要有 WRKY、NAC、乙烯响应转录因子等。大部分已知功能的 Unigene 都存在于已知的盐胁迫相关的通路中。

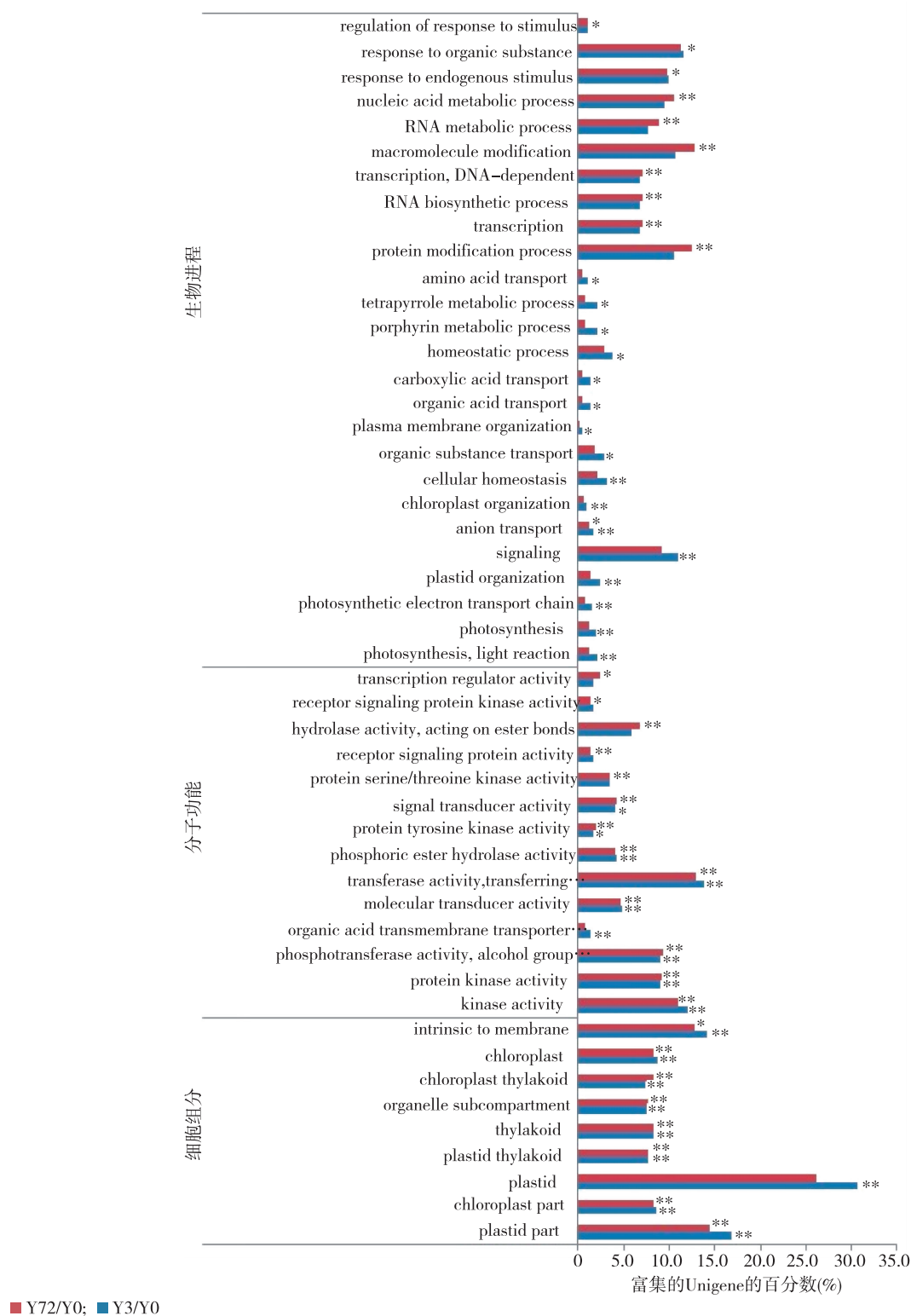
#### 2.5 qRT-PCR 验证差异表达基因

为了验证数字化基因表达谱数据的可靠性,以棉花  $\beta$ -actin 基因作为内参基因,随机挑选了 10 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。结果表明,qRT-PCR 与数字化基因表达谱结果基本一致,虽然在基因上调和下调表达倍数上存在一定的差异,但是其上调或下调的趋势基本是一致的 (图 5),说明表达谱检测结果较为可靠。

### 3 讨论

在影响农作物产量的各种因素中,盐害和干旱对于作物产量潜力发挥的影响最为严重,在世界范围内所造成的减产可达 40%<sup>[25]</sup>。中国棉花田中有超过 15% 的旱碱地,旱碱棉田棉花产量仅相当于常规棉田产量的 30%~50%,植棉效益差。因此,盐胁迫对棉花的生长发育有十分重要的影响。

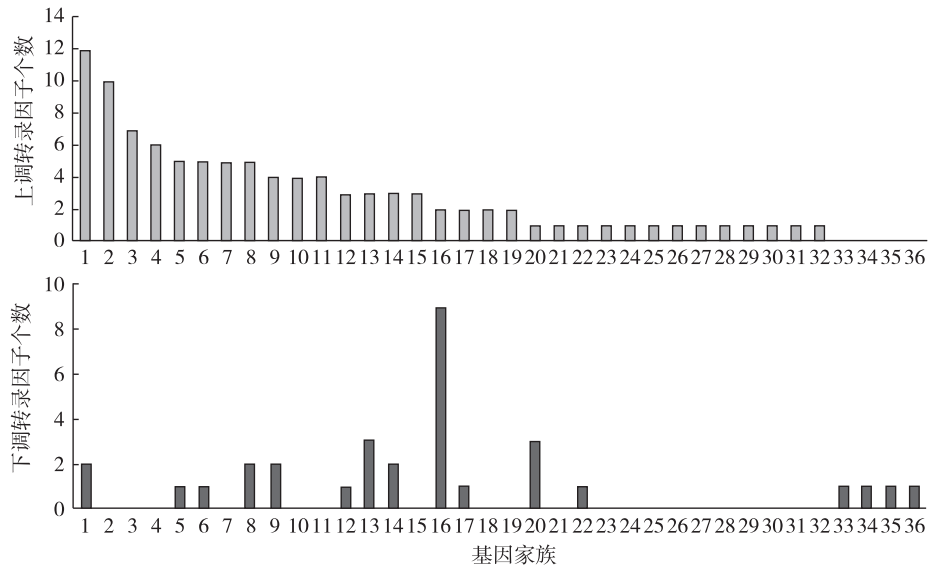
通过杂交技术、差异显示技术、表达序列标签技术 (EST) 等可获得不同生长发育阶段和处理条件下的基因表达谱<sup>[26]</sup>,但只能获得有限的基因表达模式信息。基因芯片能够大规模地开展基因表达研究,但也存在弊端<sup>[27]</sup>。数字基因表达谱技术以检测数据范围更大、精度更高、操作简单等优势正逐步取代基因芯片技术。本研究利用高通量测序的数字化



注: \*、\*\* 分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著。Y72/Y0 指盐胁迫处理 72 h 与盐胁迫处理 0 h(对照)比较, Y3/Y0 指盐胁迫处理 3 h 与盐胁迫处理 0 h(对照)比较。

图 3 不同盐处理时间差异表达基因 GO 富集分析

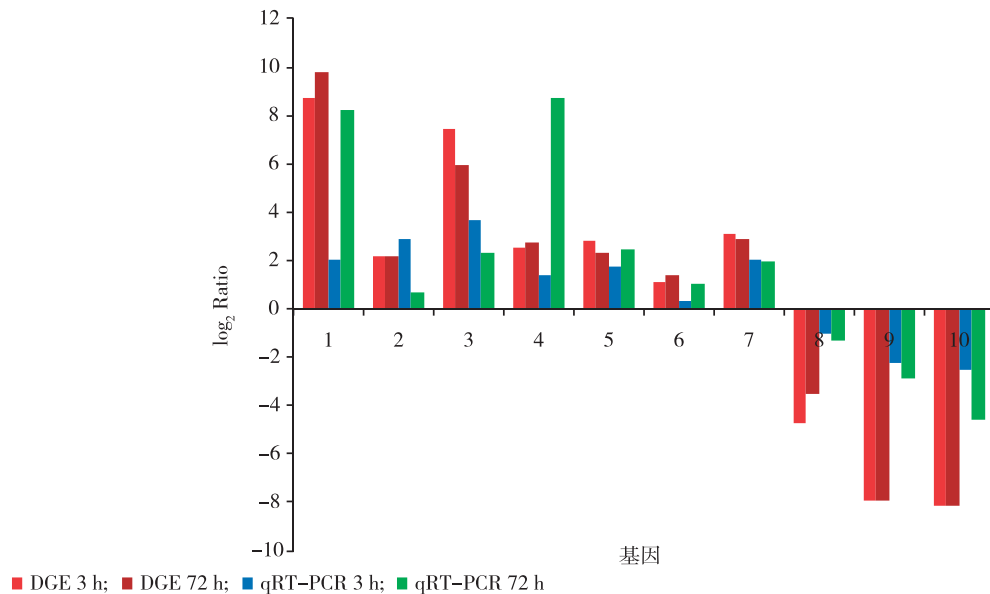
Fig.3 GO function enrichment analysis of differentially expressed genes in the leaves of *G. aridum* under salt stress



1: bZIP; 2: AP2-EREBP; 3: G2-like; 4: WRKY; 5: C2C2-YABBY; 6: C3H; 7: HB; 8: MyB-related; 9: C2C2-CO-like; 10: NAC; 11: PHD; 12: ARF; 13: MYB; 14: Orphans; 15: TRAF; 16: bHLH; 17: C2C2-DOF; 18: HSF; 19: TUB; 20: AUX/IAA; 21: BES; 22: C2H2; 23: CAMTA; 24: CCAAT; 25: DBP; 26: EIL; 27: GRF; 28: LOB; 29: SNF2; 30: SNF-BAF 60b; 31: TAZ; 32: TifY; 33: C2C2-GAT; 34: GNAT; 35: Sigma70-like; 36: TOP

图4 盐胁迫不同时间差异表达的转录因子

Fig.4 Differentially expressed transcription factors under salt stress



■ DGE 3 h; ■ DGE 72 h; ■ qRT-PCR 3 h; ■ qRT-PCR 72 h

1: Unigene91622 \_ G3; 2: Unigene29703 \_ G3; 3: Unigene93932 \_ G3; 4: Unigene98222 \_ G3; 5: Unigene97855 \_ G3; 6: Unigene36735 \_ G3; 7: Unigene33031 \_ G3; 8: Unigene97230 \_ G3; 9: Unigene29118 \_ G3; 10: Unigene39528 \_ G3。

图5 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig.5 Validation of the differentially expressed genes by qRT-PCR

基因表达谱技术,对旱地棉盐胁迫不同处理时间叶片中基因表达情况进行了研究,进一步认识棉花的耐盐机制,以期为棉花耐盐改良提供理论依据。

目前关于棉花耐盐转录组方面的研究已经有不少报道。Yao 等<sup>[28]</sup>用 100 mmol/L NaCl 处理陆地棉 TM-1 3 h 后,鉴定出 1 503 个上调的探针以及 1 490

个下调探针,富集分析结果表明显著富集的 GO 条目为激素代谢以及信号转导。Rodriguez-Urbe 等<sup>[29]</sup>利用基因芯片技术鉴定了 720 个盐胁迫响应的基因,其中 695 个表现为下调,表现为上调表达的仅 25 个,GO 分析结果显示一部分盐胁迫响应的转录本与盐胁迫相关的代谢通路相关,主要包括渗透物、脂类代谢、细胞壁结构以及膜合成。Wang 等<sup>[30]</sup>通过基于 Solexa 测序的全基因组基因表达分析,研究转录动力学与陆地棉耐盐之间的关系,发现最显著富集的类别为信号通路、环境响应以及转录调控。本实验室前期的研究<sup>[22]</sup>中对 200 mmol/L NaCl 处理下旱地棉根中差异基因进行了数字表达谱分析,GO 以及 Pathway 富集分析结果表明,在整个盐胁迫时期,转运、对激素刺激的响应以及信号转导等代谢途径均起着很重要的作用,同时发现,在盐处理前期显著富集的 GO 条目为蛋白激酶活性,盐处理后期显著富集的 GO 条目为转运活性。

本研究中很多盐胁迫下差异表达 10 倍以上的 Unigene 与耐盐碱胁迫有关。比如水通道蛋白基因编码的 Unigene39528 \_ G3, gi | 13352802 | gb | BG443150.1 | BG443150,它是一种小分子跨膜蛋白质,参与介导多个植物生长发育的生理活动,如细胞伸长、种子发育及逆境胁迫响应等<sup>[31-32]</sup>;参与细胞信号转导的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶基因编码的 Unigene35463 \_ G3, gi | 31073031 | gb | CA993310.1 | CA993310,与胁迫条件下细胞的信号转导有关<sup>[33-34]</sup>;乙烯响应转录因子 gi | 109890119 | gb | DW519085.1 | DW519085<sup>[35-36]</sup>等等。植物耐盐过程涉及大量基因的协同表达,此外,仍然有大量 10 倍以上差异表达基因没有功能注释或注释为未知功能的蛋白质基因,这些 Unigene 在不同时期表现为不同程度的上调或下调表达,它们的差异表达原因及作用机制还不清楚,有待开展深入的研究,为进一步阐明盐胁迫信号传导途径,构建相关基因调控网络,更全面地了解棉花耐盐胁迫反应调控机制提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] 沈法富. 棉花耐盐碱生理指标研究 [J]. 中国棉花, 1991, 18 (4): 9-10.
- [2] WANG W, VINOCUR B, ALTMAN A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance [J]. *Planta*, 2003, 218: 1-14.
- [3] 李刚波, 李 慧, 丛 郁, 等. 非生物胁迫下杜梨 *PbCBL4* 基因的表达 [J]. 江苏农业学报, 2014, 30(5): 1132-1138.
- [4] 许 奕, 徐碧玉, 胡 伟, 等. 盐胁迫下 MaAQP1 转基因拟南芥幼苗的生长和生理响应 [J]. 江苏农业学报, 2014, 30(6): 1279-1285.
- [5] 余璐璐, 曹中权, 刘龙山, 等. 盐芥 CAS 基因的生物信息学分析及在盐胁迫下的表达 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 25-29.
- [6] 马沛勤. 硫酸镁、复合盐胁迫下抗虫棉幼苗抗氧化生理反应 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 59-61.
- [7] 卢 军, 姜 伟, 罗 琳, 等. 低温和长时间贮藏对烟草种子萌发和幼苗渗透调节物质的影响 [J]. 南方农业学报, 2014, 45 (11): 1943-1946.
- [8] RAMACHANDRA-REDDY A, CHAITANYA K V, VIVEKANANDAN M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2004, 161: 1189-1202.
- [9] ZHANG L, XI D M, LI S W, et al. A cotton group C MAP kinase gene, *GhMPK2* positively regulates salt and drought tolerance in tobacco [J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 77: 17-31.
- [10] LI D D, WU Y J, RUAN X M, et al. Expressions of three cotton genes encoding the PIP proteins are regulated in root development and in response to stress [J]. *Plant Cell Reports*, 2009, 28: 291-300.
- [11] LI G, TAI F J, ZHENG Y, et al. Two cotton Cys2/His2-type zinc-finger proteins, *GhDi19-1* and *GhDi19-2*, are involved in plant response to salt/drought stress and abscisic acid signaling [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 74: 437-452.
- [12] SHI J, ZHANG L, AN H, et al. *GhMPK16*, a novel stress-responsive group D MAPK gene from cotton, is involved in disease resistance and drought sensitivity [J]. *BMC Molecular Biology*, 2011, 12: 22.
- [13] WANG Q Q, LIU F, CHEN X S, et al. Transcriptome profiling of early developing cotton fiber by deep-sequencing reveals significantly differential expression of genes in a fuzzless/lintless mutant [J]. *Genomics*, 2010, 96: 369-376.
- [14] TAO T, ZHAO L, LV Y D, et al. Transcriptome sequencing and differential gene expression analysis of delayed gland morphogenesis in *Gossypium australe* during seed germination [J]. *Plos One*, 2013, 8(9): e75323.
- [15] HUANG H R, TAN P C, LASCOUX M, et al. Flowering time and transcriptome variation in *Capsella bursa-pastoris* (Brassicaceae) [J]. *New Phytologist*, 2012, 194(3): 676-689.
- [16] WANG X W, LUAN J B, LI J M, et al. *De novo* characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 400.
- [17] XIANG L X, HE D, DONG W R, et al. Deep sequencing-based transcriptome profiling analysis of bacteria-challenged *Lateolabrax japonicus* reveals insight into the immune-relevant genes in marine fish [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 472.
- [18] ASMANN Y W, KLEE E W, THOMPSON E A, et al. 3' tag dig-



- ital gene expression profiling of human brain and universal reference RNA using Illumina Genome Analyzer [J]. BMC Genomics, 2009,10:531.
- [19] XUE J, BAO Y Y, Li B L, et al. Transcriptome analysis of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* [J]. Plos One, 2010, 5 (12):e14233.
- [20] 胡根海, 喻树迅. 利用改良的 CTAB 法提取棉花叶片总 RNA [J]. 棉花学报, 2007, 19(1): 69-70.
- [21] 李余良, 刘建华, 郑锦荣, 等. 高温胁迫下甜玉米雌穗发育基因差异表达谱分析[J]. 作物学报, 2013,39(2): 269-279.
- [22] XU P, LIU Z W, FAN X Q, et al. *De novo* transcriptome sequencing and comparative analysis of differentially expressed genes in *Gossypium aridum* under salt stress [J]. Gene, 2013,525:26-34.
- [23] LI W, GODZIK A. cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences[J]. Bioinformatics, 2006, 22(13):1658-1659.
- [24] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFFER A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25: 3389-3402.
- [25] BOYER J S. Plant productivity and environment [J]. Science, 1982, 218:443-448.
- [26] DONSON J, FANG Y, ESPIRITU-SANTO G, et al. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48: 75-97.
- [27] EVELAND A L, SATOH-NAGASAWA N, GOLDSCHMIDT A, et al. Digital gene expression signatures for maize development [J]. Plant Physiology, 2010, 154: 1024-1039.
- [28] YAO D, ZHANG X, ZHAO X, et al. Transcriptome analysis reveals salt-stress-regulated biological processes and key pathways in roots of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Genomics, 2011, 98, 47-55.
- [29] RODRIGUEZ-URIBE L, HIGBIE S M, STEWART J M, et al. Identification of salt responsive genes using comparative microarray analysis in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Plant Science, 2011,180: 461-469.
- [30] WANG G, ZHU Q G, MENG Q W, et al. Transcript profiling during salt stress of young cotton (*Gossypium hirsutum*) seedlings via Solexa sequencing [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2012, 34 (1): 107.
- [31] CHAUMONT F, BARRIEU F, WOJCIK E, et al. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize [J]. Plant Physiology, 2001, 125: 1206-1215.
- [32] KATSUHARA M, KOSHIO K, SHIBASAKA M, et al. Overexpression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants [J]. Plant and Cell Physiology, 2003, 44:1378-1383.
- [33] XIANG Y, HUANG Y, XIONG L. Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement [J]. Plant Physiology, 2007,144:1416-1428.
- [34] 何亮, 李富华, 沙莉娜, 等. 玉米 2C 型丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (PP2C) 活性与耐旱性关系 [J]. 作物学报, 2008, 34 (5): 899-903.
- [35] MA H L, ZHOU H L, ZHANG H Y, et al. Cloning and expression analysis of an AP2/ERF gene and its responses to phytohormones and abiotic stresses in rice [J]. Rice Science, 2010,17: 1-9.
- [36] ZHU Q, ZHANG J, GAO X, et al. The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses [J]. Gene, 2010, 457:1-12.

(责任编辑:张震林)