

李 敏, 郭 聪, 李玉娟, 等. 旱柳转录组测序及生物学分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2): 271-281.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.02.005

旱柳转录组测序及生物学分析

李 敏, 郭 聪, 李玉娟, 冯新民, 王 莹, 张 健, 谈 峰

(江苏沿江地区农业科学研究所, 江苏 南通 226541)

摘要: 对盐敏感旱柳沿江柳和耐盐旱柳 9901 的杂交 F_1 代根部进行了 RNA-Seq 测序和分析, 共获取了 107 950 条 Unigene, 平均长度为 1 076.96 bp。通过与 COG、GO 等 8 个数据库比对, 60 848 个基因获得注释信息, 其中 38 182 条 Unigene 在 GO 数据库中获得注释, 24 101 条 Unigene 在 KEGG 数据库中获得注释。GO 和 KEGG 富集分析结果表明, 差异表达基因主要调节核糖体代谢、植物激素信号转导等生物学功能。

关键词: 旱柳; 转录组分析; 盐胁迫; 差异表达基因

中图分类号: S718.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)02-0271-11

Transcriptome sequencing and biological analysis of willow (*Salix matsudana*)

LI Min, GUO Cong, LI Yu-juan, FENG Xin-min, WANG Ying, ZHANG Jian, TAN Feng

(Institute of Agricultural Sciences of Jiangsu Changjiang River Bank District, Nantong 226541, China)

Abstract: In this study, RNA-Seq sequencing and analysis were performed on the roots of F_1 hybrids of salt sensitive Yanjiang *Salix matsudana* and salt tolerant 9901 *S. matsudana*, and a total of 107 950 unigenes were obtained. The average length was 1 076.96 bp. By comparing with eight databases including COG and GO, annotation informations of 60 848 genes were obtained, of which 38 182 unigenes were annotated in the GO database and 24 101 unigenes were annotated in the KEGG database. The GO and KEGG enrichment analysis results showed that differentially expressed genes regulated some biological functions, such as ribosome metabolism and phytohormone signal transduction.

Key words: *Salix matsudana*; transcriptome analysis; salt stress; differentially expressed gene

土壤盐渍化是阻碍植物生长并严重降低植物生产力的主要环境胁迫因素之一^[1]。根据粮农组织和教科文组织的不完全统计资料, 全世界约有 4.0×10^8 hm^2 盐碱地, 而中国约有 3.6×10^7 hm^2 。由于自然环境变化和人为因素, 导致土壤退化, 土壤盐碱化面积逐渐增加^[2]。盐胁迫对光合作用、能量生产和营养获取等植物基本过程具有很大的负面影响, 它

破坏细胞膜的完整性和各种酶的活性, 这可能进一步导致许多有害作用, 例如缺水、渗透胁迫、二次氧化胁迫以及动态平衡和离子毒性的破坏^[3-6]。许多研究者借助分子和基因组学的方法阐明耐盐植物的耐盐机制。通过转录组分析, 许多耐盐基因已经被发现^[7-9], 涉及盐胁迫信号转导的几种重要途径, 例如盐敏感性蛋白(SOS)^[10]、钙依赖性蛋白激酶(CDPK)^[10]和有丝分裂原激活蛋白(MAP)^[11]。

过去几十年, 不同植物耐盐胁迫的转录组分析已被报道, 比如棉花^[12]、大豆^[13]、冰叶日中花^[14]、草地早熟禾^[15]、欧洲油菜^[16]、沙漠杨树^[17]和小麦^[18]。这些研究结果表明, 与氧化还原过程和脯氨酸代谢有关的差异表达基因以及许多转录因子都在植物耐

收稿日期: 2018-04-28

基金项目: 江苏省重点研发计划“现代农业”项目(BE2016328); 第十四批“六大人才高峰”高层次人才项目(2017-NY-141)

作者简介: 李 敏(1981-), 女, 江苏如东人, 硕士, 副研究员, 研究方向为耐盐林木育种与栽培, (E-mail) alice04@163.com

通讯作者: 郭 聪, (E-mail) guocong5532@126.com

盐中发挥重要作用^[15-16]。目前,一些模式植物,比如水稻^[19]、玉米^[20]和拟南芥^[21]等已经进行了转录组测序。这些模式植物的DNA序列信息和转录组序列信息都已经很完善,可用于测序、绘图和组装基因等研究。然而,非模式木本盐生植物的转录组研究很少。非模式木本盐生植物基因组和转录组数据库的缺乏很大程度上限制了其相关的研究。

柳树(*Salix* L.)属于杨柳科物种,其种类繁多,在中国就存在256种以上,其生长潜力大,顶端优势比较明显,腋芽萌发力比较强,具有抗性强、适应性广等特性^[22]。柳树根部是应对盐胁迫的首要部位,根部对Na⁺的选择性吸收、外排和区域化对柳树响应盐胁迫具有重要作用。本研究利用Illumina HiSeq高通量测序平台对旱柳沿江柳和耐盐旱柳9901的杂交F₁代根部进行转录组测序分析,比较耐盐柳树和盐敏感柳树中基因表达的差异,以期通过RNA-Seq技术获得与耐盐性相关的基因序列,为揭示柳树耐盐分子机制和培育柳树耐盐新品系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

试验材料为盐敏感旱柳沿江柳(采自江苏沿江地区农业科学研究所)和耐盐旱柳9901(采自山东省林业科学研究院)的杂交F₁代。2017年6月,将F₁代进行耐盐分离群体试验,选择15个耐盐材料和15个盐敏感材料,每5个材料混合为1个样品,作为1个重复。经0 mmol/L和150 mmol/L NaCl溶液处理4 h后,取柳树的新鲜根,立即放入液氮中保存备用。

1.2 总RNA的提取及检测

使用TIANCEN公司的多糖多酚植物试剂盒提取柳树根的总RNA,样品的纯度、浓度和完整度分别用Nanodrop、Qubit 2.0、Agilent 2100分析。柳树总RNA的提取、质量检测及无参考基因组序列的转录组高通量测序分析均由北京百迈客生物科技有限公司进行。

1.3 cDNA文库构建和转录组测序

用检测合格的柳树总RNA样品构建cDNA文库。以mRNA为模板,利用AMPure XP beads试剂盒依次进行纯化、末端修复和片段大小选择,通过PCR富集得到柳树cDNA文库。cDNA文库质量用Agilent 2100检测,再通过Illumina Hi-Seq平台完成RNA-Seq测序分析。

1.4 De novo 组装及质量控制

获得的原始数据(Raw reads)经过滤得到Clean reads。将其用Trinity拼接,得到contigs。利用De Bruijn图方法和测序Read信息,在片段集合中读取转录本序列,最长contig即为最终转录本的Uni-gene。每个样品测序产出不少于6 Gb Clean data, Q30碱基百分比达到85%。

1.5 Unigene 功能注释

使用BLAST软件将差异表达基因(DEG)序列与NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、eggNOG4.5、KEGG数据库分别比对,获得相关注释信息。

2 结果与分析

2.1 旱柳转录组测序与 de novo 组装

利用Illumina Hi-Seq对12个旱柳根样品进行转录组测序,共获得83.81 Gb Clean data,各样品Clean data均达到6.31 Gb以上(表1)。Q30碱基百分比均不小于89.21%,GC含量百分比在44%以上,可以用于下一步的de novo组装。利用Trinity软件将所有短序列拼接组装得到107 950条Uni-gene,总长度116 257 763 bp,平均长度为1 076.96 bp。其中长度在500~1 000 bp的Unigenes所占比例最高,为29.39%,Unigene的N50为1 690 bp,组装完整性较高(图1),获得的Mapped reads可用于后续分析。

2.2 旱柳差异基因表达量分析

在差异表达分析过程中采用了公认有效的Benjamini-Hochberg方法对原有假设检验得到的显著性 p 值进行校正,并最终采用校正后的 p 值,即FDR(False discovery rate)作为差异表达基因筛选的关键指标,以降低对大量基因的表达值进行独立统计假设检验带来的假阳性。

在筛选过程中,将FDR小于0.01且差异倍数FC[两样品(组)间表达量的比值] ≥ 2 作为筛选标准。在盐敏感柳树中,以0 mmol/L NaCl溶液处理为对照,在150 mmol/L盐胁迫下,共有1 235个DEG表达量发生了改变,其中1 130个DEG上调,105个DEG下调;在耐盐柳树中,2 629个DEG表达量发生了改变,其中2 059个DEG上调,570个DEG下调。在150 mmol/L盐胁迫下,盐敏感柳树与耐盐柳树相对比,共有193个DEG表达量发生了改变,其中69个DEG上调,124个DEG下调(表2)。将不同组的

差异基因进行对比并绘制维恩图,展示对比后各组特有的差异基因数量,以及共有的差异基因数量。其中盐敏感柳树在不同盐浓度处理下与耐盐柳树在不同盐浓度处理下一共有 853 个重复差异基因;盐

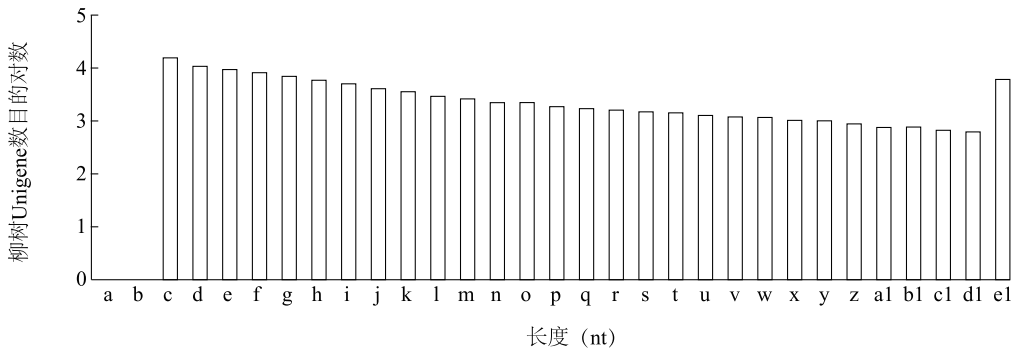
敏感柳树和耐盐柳树在 150 mmol/L 盐胁迫下与盐敏感柳树在不同盐处理下有 59 个差异基因,而与耐盐柳树在不同盐处理下有 99 个差异基因,三者有 5 个共同的差异基因(图 2)。

表 1 旱柳样品测序数据评估

Table 1 Evaluation of sequencing data of willow samples

样品名称	编号	Clean reads 数目	Clean data	GC 含量(%)	Q30 碱基百分比(%)	Mapped reads 数目
0-敏-1	T01	25 578 589	7 531 508 862	44.85	90.13	15 073 581
0-敏-2	T02	26 421 335	7 797 364 710	45.15	90.62	15 588 955
0-敏-3	T03	22 245 921	6 579 520 468	45.32	90.04	12 705 683
150-敏-1	T04	22 257 488	6 577 183 488	44.56	89.95	12 952 433
150-敏-2	T05	21 538 540	6 396 186 834	44.97	89.43	12 449 832
150-敏-3	T06	21 252 245	6 315 759 964	45.37	89.34	12 329 554
0-盐-1	T07	25 104 772	7 454 658 666	45.00	90.26	14 836 707
0-盐-2	T08	25 141 779	7 487 006 450	45.45	89.71	14 675 901
0-盐-3	T09	23 802 232	7 064 283 298	44.98	90.26	13 893 426
150-盐-1	T10	23 095 949	6 857 514 622	45.20	89.44	13 543 068
150-盐-2	T11	21 350 772	6 334 276 966	45.26	89.21	12 282 086
150-盐-3	T12	25 402 681	7 418 748 980	45.00	90.89	15 225 365

样品名称中,0 表示对照,150 表示 150 mmol/L NaCl 处理,敏表示盐敏感,盐表示耐盐,1、2、3 分别为第 1、2、3 批样品。



a:0~100;b:101~200;c:201~300;d:301~400;e:401~500;f:501~600;g:601~700;h:701~800;i:801~900;j:901~1 000;k:1 001~1 100;l:1 101~1 200;m:1 201~1 300;n:1 301~1 400;o:1 401~1 500;p:1 501~1 600;q:1 601~1 700;r:1 701~1 800;s:1 801~1 900;t:1 901~2 000;u:2 001~2 100;v:2 101~2 200;w:2 201~2 300;x:2 301~2 400;y:2 401~2 500;z:2 501~2 600;a1:2 601~2 700;b1:2 701~2 800;c1:2 801~2 900;d1:2 901~3 000;e1:>3 000。

图 1 旱柳 Unigene 长度分布图

Fig.1 Length distribution of willow unigenes

表 2 旱柳差异表达基因数目

Table 2 The number of differentially expressed genes (DEGs) of willow

差异表达基因集名称	差异表达基因数目	上调表达基因数目	下调表达基因数目
T01-T02-T03 相对于 T04-T05-T06	1 235	1 130	105
T04-T05-T06 相对于 T10-T11-T12	193	69	124
T07-T08-T09 相对于 T10-T11-T12	2 629	2 059	570

T01 等为样品编号,见表 1。

2.3 旱柳差异表达基因功能注释

通过选择 BLAST 参数 (E 值 $\leq \times 10^{-5}$) 和 HMMER 参数 (E 值 $\leq \times 10^{-10}$), 将全部 Unigene 序列与 COG、GO 等 8 个数据库进行比对(表 3、表 4), 最后得到 60 848 个有注释信息的基因。其中长度在 1 000 bp 以上的基因注释效率为 52.39%, 而未得到注释的 Unigene 为 47 102 条(43.63%)。

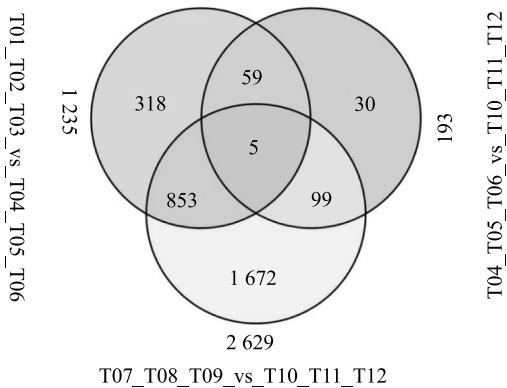


图2 旱柳差异表达基因分析维恩图
Fig.2 Venn diagram of DEGs analysis of willow

表3 旱柳 Unigene 注释统计表
Table 3 Table of willow unigene annotated statistics

功能数据库名称	注释到该数据库的 Unigene 数量	300≤长度<1 000	长度≥1 000
COG_Annotation	18 986	5 923	11 800
GO_Annotation	38 182	13 316	21 159
KEGG_Annotation	24 101	9 536	11 946
KOG_Annotation	32 910	11 268	18 640
Pfam_Annotation	38 360	11 292	24 734
Swissprot_Annotation	37 000	12 585	21 282
eggNOG_Annotation	55 120	19 945	29 879
nr_Annotation	59 693	22 169	31 578
All_Annotated	60 848	22 793	31 878

表4 注释的旱柳差异表达基因数量
Table 4 The number of annotated DEGs of willow

差异表达基因集名称	Annotated	COG	GO	KEGG	KOG	Pfam	Swiss-Prot	eggNOG	nr
T01-T02-T03 相对于 T04-T05-T06	1 031	293	689	320	485	776	726	968	1 019
T04-T05-T06 相对于 T10-T11-T12	180	71	113	86	87	152	115	168	159
T07-T08-T09 相对于 T10-T11-T12	2 106	718	1 459	728	1 050	1 589	1 492	1 927	2 096

T01 等为样品编号,见表1。Annotated:注释到的差异表达基因数目;第3列到最后一列为各功能数据库注释到的差异表达基因数目。

2.4 旱柳差异表达基因 GO 分类和功能富集

将旱柳差异表达基因在 GO 数据库中进行对比,有38 182条 Unigene 在 GO 数据库中得到相关注释,其中每2个样品相比得到的差异基因在 GO 数据库中注释率最多达 69.28%,注释的基因参与生物学过程、细胞组分和分子功能调控(表5),功能组

涉及到54个(图3、图4、图5)。生物学过程的注释显示,Unigene 表达差异显著顺序依次为代谢过程、细胞过程和单组织过程;在细胞成分分类信息中,细胞部分和细胞显著富集;在分子功能分类中,富集程度最高的是生物合成和催化活性。

表5 GO 数据库3大功能主类基因数目
Table 5 The number of three main function gene in GO database

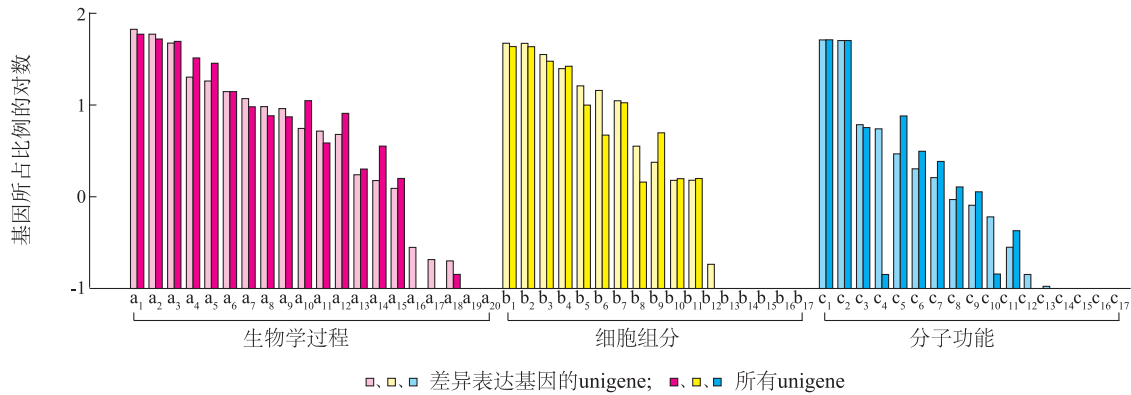
差异表达基因集名称	生物学过程 基因数	细胞组分 基因数	分子功能 基因数	注释到 GO 的 差异基因总数	差异 基因总数
T01-T02-T03 相对于 T04-T05-T06	549	373	561	689	1 235
T04-T05-T06 相对于 T10-T11-T12	102	79	98	113	193
T07-T08-T09 相对于 T10-T11-T12	1 199	812	1 231	1 459	2 629

T01 等为样品编号,见表1。

2.5 旱柳差异表达基因 KEGG 注释和富集分析

有24 101条(39.61%) Unigene 在 KEGG 数据库得到注释,涉及209条 KEGG 代谢通路。其中盐敏感柳树组,以0 mmol/L NaCl 溶液处理为对照,在150 mmol/L盐胁迫下,获得注释的189条差异表达基因(DEG)可以被分配到77个 KEGG 通路(图6);150 mmol/L盐胁迫下,盐敏感柳树组与耐盐柳树组对比,获得注释的72条差异表达基因可以被分配

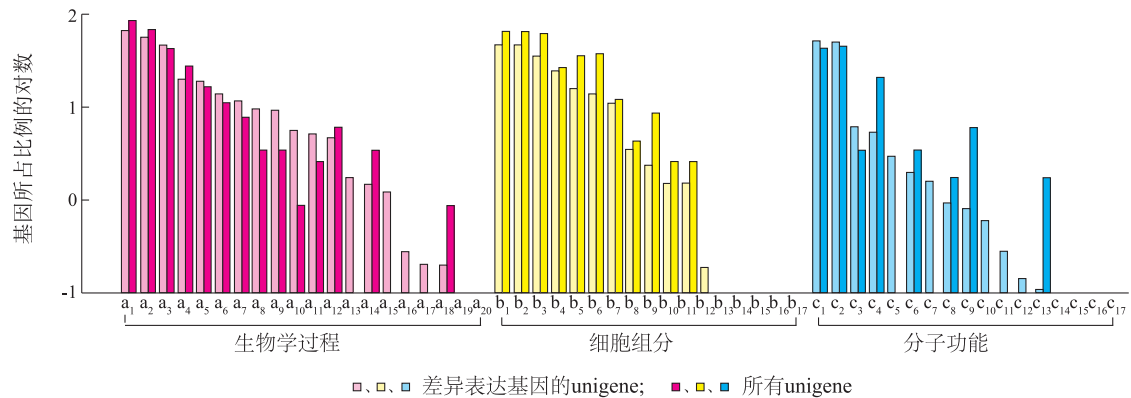
到35个 KEGG 通路(图7)。耐盐柳树组,以0 mmol/L NaCl 溶液处理为对照,在150 mmol/L盐胁迫下,获得注释的487条差异表达基因可以被分配到97个 KEGG 通路(图8),其中在同一个 KEGG 通路中10个以上差异表达基因主要涉及细胞途径、遗传信号响应、环境信号响应、新陈代谢和生物系统5个方面。这5个方面中新陈代谢类最大,包括碳水化合物、氨基酸、多糖生物合成、能量、次生物质等;



a₁:代谢过程;a₂:细胞过程;a₃:单一生物过程;a₄:刺激反应;a₅:生物调节;a₆:定位;a₇:细胞组分组织或生物发生;a₈:发育过程;a₉:多细胞有机体过程;a₁₀:信号;a₁₁:生殖过程;a₁₂:多种生物过程;a₁₃:生长;a₁₄:免疫系统过程;a₁₅:繁殖;a₁₆:生物粘附;a₁₇:生物相;a₁₈:节律过程;a₁₉:运动;a₂₀:细胞杀伤;b₁:细胞;b₂:细胞部分;b₃:细胞器;b₄:膜;b₅:细胞器部分;b₆:高分子配合物;b₇:膜部分;b₈:膜封闭腔;b₉:胞外区;b₁₀:细胞连接;b₁₁:共质体;b₁₂:类核;b₁₃:细胞外基质;b₁₄:胞外区部分;b₁₅:病毒粒子;b₁₆:病毒粒子部分;b₁₇:细胞外基质部分;c₁:结合;c₂:催化活性;c₃:转运活性;c₄:结构分子活性;c₅:核酸结合转录因子活性;c₆:电子载流子活性;c₇:分子传感器活性;c₈:酶活性调节;c₉:抗氧化活性;c₁₀:受体活性;c₁₁:蛋白结合转录因子活性;c₁₂:鸟苷酸核苷酸交换因子活性;c₁₃:营养库活性;c₁₄:金属伴侣蛋白活性;c₁₅:蛋白质标签;c₁₆:翻译调节活性;c₁₇:信道调节器活性。

图3 盐敏感柳树 0 mmol/L 和 150 mmol/L NaCl 胁迫下 GO 注释功能富集图

Fig.3 Comparison of the GO annotation functional enrichment area between 0 mmol/L and 150 mmol/L NaCl stress in salt sensitive willow



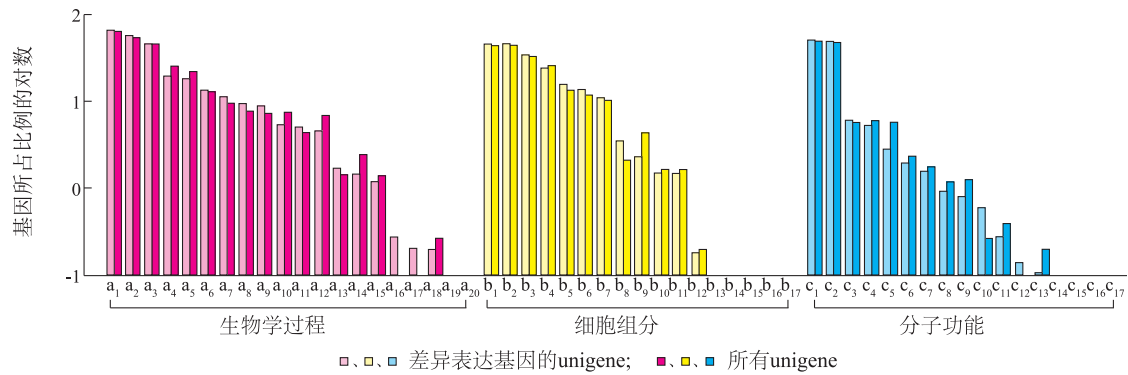
a₁:代谢过程;a₂:细胞过程;a₃:单一生物过程;a₄:刺激反应;a₅:生物调节;a₆:定位;a₇:细胞组分组织或生物发生;a₈:发育过程;a₉:多细胞有机体过程;a₁₀:信号;a₁₁:生殖过程;a₁₂:多种生物过程;a₁₃:生长;a₁₄:免疫系统过程;a₁₅:繁殖;a₁₆:生物粘附;a₁₇:生物相;a₁₈:节律过程;a₁₉:运动;a₂₀:细胞杀伤;b₁:细胞;b₂:细胞部分;b₃:细胞器;b₄:膜;b₅:细胞器部分;b₆:高分子配合物;b₇:膜部分;b₈:膜封闭腔;b₉:胞外区;b₁₀:细胞连接;b₁₁:共质体;b₁₂:类核;b₁₃:细胞外基质;b₁₄:胞外区部分;b₁₅:病毒粒子;b₁₆:病毒粒子部分;b₁₇:细胞外基质部分;c₁:结合;c₂:催化活性;c₃:转运活性;c₄:结构分子活性;c₅:核酸结合转录因子活性;c₆:电子载流子活性;c₇:分子传感器活性;c₈:酶活性调节;c₉:抗氧化活性;c₁₀:受体活性;c₁₁:蛋白结合转录因子活性;c₁₂:鸟苷酸核苷酸交换因子活性;c₁₃:营养库活性;c₁₄:金属伴侣蛋白活性;c₁₅:蛋白质标签;c₁₆:翻译调节活性;c₁₇:信道调节器活性。

图4 150 mmol/L NaCl 胁迫下盐敏感柳树和耐盐柳树 GO 注释功能富集图

Fig.4 Comparison of the GO annotation functional enrichment area between salt sensitive willow and salt tolerant willow in 150 mmol/L NaCl stress

生物系统类最小。同时,KEGG 注释结果也显示,差异基因主要参与核糖体、植物激素信号转导、淀粉与

蔗糖代谢、碳代谢以及植物病原菌的相互作用等通路(表6)。



a_1 : 代谢过程; a_2 : 细胞过程; a_3 : 单一生物过程; a_4 : 刺激反应; a_5 : 生物调节; a_6 : 定位; a_7 : 细胞组分组织或生物发生; a_8 : 发育过程; a_9 : 多细胞有机体过程; a_{10} : 信号; a_{11} : 生殖过程; a_{12} : 多种生物过程; a_{13} : 生长; a_{14} : 免疫系统过程; a_{15} : 繁殖; a_{16} : 生物粘附; a_{17} : 生物相; a_{18} : 节律过程; a_{19} : 运动; a_{20} : 细胞杀伤; b_1 : 细胞; b_2 : 细胞部分; b_3 : 细胞器; b_4 : 膜; b_5 : 细胞器部分; b_6 : 高分子配合物; b_7 : 膜部分; b_8 : 膜封闭腔; b_9 : 胞外区; b_{10} : 细胞连接; b_{11} : 共质体; b_{12} : 类核; b_{13} : 细胞外基质; b_{14} : 胞外区部分; b_{15} : 病毒粒子; b_{16} : 病毒粒子部分; b_{17} : 细胞外基质部分; c_1 : 结合; c_2 : 催化活性; c_3 : 转运活性; c_4 : 结构分子活性; c_5 : 核酸结合转录因子活性; c_6 : 电子载流子活性; c_7 : 分子传感器活性; c_8 : 酶活性调节; c_9 : 抗氧化活性; c_{10} : 受体活性; c_{11} : 蛋白结合转录因子活性; c_{12} : 鸟苷酸核苷酸交换因子活性; c_{13} : 营养库活性; c_{14} : 金属伴侣蛋白活性; c_{15} : 蛋白质标签; c_{16} : 翻译调节活性; c_{17} : 信道调节器活性。

图5 耐盐柳树 0 mmol/L 和 150 mmol/L NaCl 胁迫下 GO 注释功能富集图

Fig.5 Comparison of the GO annotation functional enrichment area between 0 mmol/L and 150 mmol/L NaCl stress in salt tolerant willow

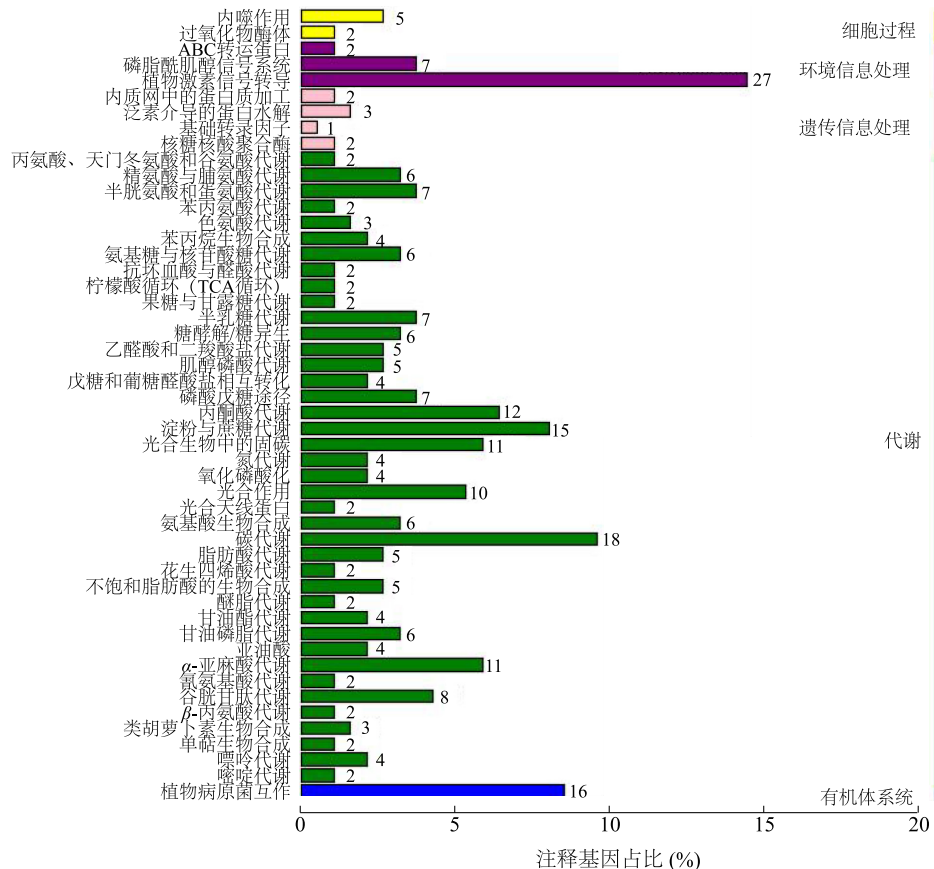


图6 盐敏感柳树 0 mmol/L 和 150 mmol/L NaCl 胁迫下 KEGG 注释富集图

Fig.6 Comparison of the KEGG annotation functional enrichment area between 0 mmol/L and 150 mmol/L NaCl stress in salt sensitive willow

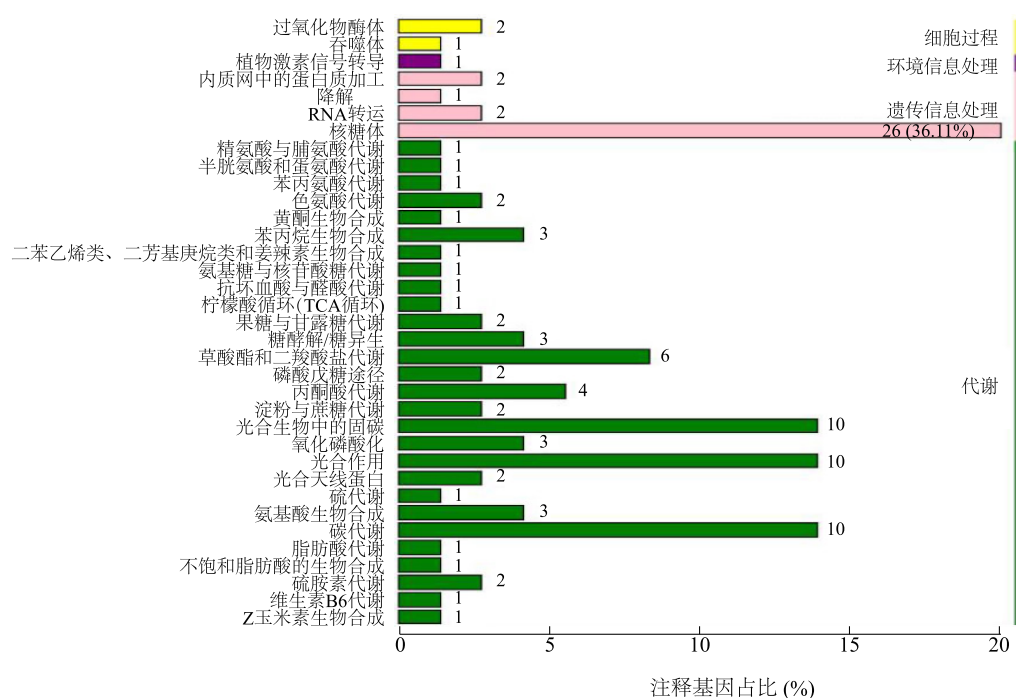


图7 150 mmol/L NaCl胁迫下盐敏感柳树和耐盐柳树 KEGG 注释功能富集图

Fig.7 Comparison of the KEGG annotation functional enrichment area between salt sensitive willow and salt tolerant willow in 150 mmol/L NaCl stress

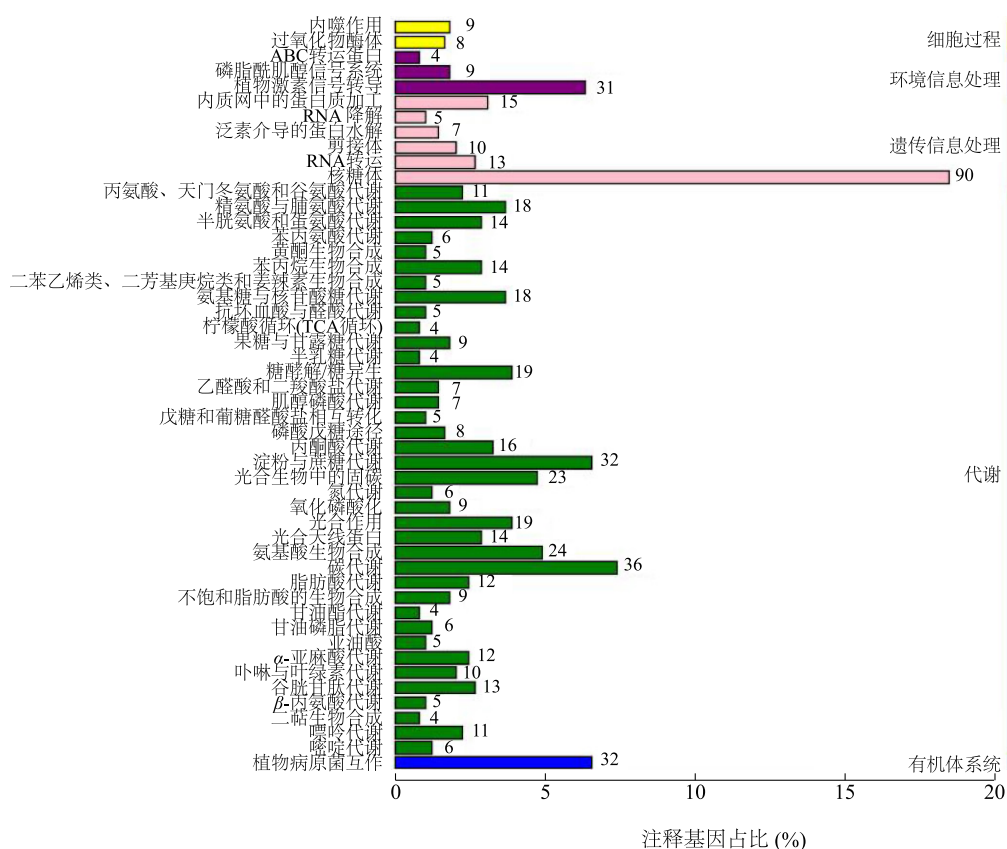


图8 耐盐柳树 0 mmol/L和 150 mmol/L NaCl胁迫下 KEGG 注释富集图

Fig.8 Comparison of the KEGG annotation functional enrichment area between 0 mmol/L and 150 mmol/L NaCl stress in salt tolerant willow

表 6 KEGG 通路中 10 个以上差异表达基因代谢通路

Table 6 Metabolic pathways of more than ten differentially expressed genes in the KEGG pathway

差异表达基因集名称	通路	路径中差异表达基因数	百分比 (%)	通路号
T01-T02-T03 相对于 T04-T05-T06	植物激素信号系统	27	14.29	ko04075
	碳代谢	18	9.52	ko01200
	植物病原菌的相互作用	16	8.47	ko04626
	淀粉和蔗糖代谢	15	7.94	ko00500
	丙酮酸代谢	12	6.35	ko00620
	光合生物固碳	11	5.82	ko00710
	α -亚麻酸代谢	11	5.82	ko00592
	光合作用	10	5.29	ko00195
T04-T05-T06 相对于 T10-T11-T12	核糖体	26	36.11	ko03010
	光合生物固碳	10	13.89	ko00710
	光合作用	10	13.89	ko00195
	碳代谢	10	13.89	ko01200
T07-T08-T09 相对于 T10-T11-T12	核糖体	90	18.48	Ko03010
	碳代谢	36	7.39	Ko01200
	淀粉与蔗糖代谢	32	6.57	Ko00500
	植物病原菌的相互作用	32	6.57	ko04626
	植物激素信号转导	31	6.37	Ko04075
	安尼诺酸的生物合成	24	4.93	Ko01230
	光合生物固碳	23	4.72	Ko00710
	糖酵解途径	19	3.90	Ko00010
	光合作用	19	3.90	Ko00195
	丙氨酸和脯氨酸代谢	18	3.70	Ko00330
	氨基糖和核苷酸糖代谢	18	3.70	Ko00520
	丙酮酸代谢	16	3.28	Ko00620
	蛋白质加工内质网	15	3.08	Ko04141
	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	14	2.87	Ko00270
	苯丙素的生物合成	14	2.87	Ko00940
	光合天线蛋白	14	2.87	Ko00196
	谷胱甘肽代谢	13	2.67	Ko00480
	RNA 转运	13	2.67	Ko03013
	α -亚麻酸代谢	12	2.46	Ko00592
	脂肪酸代谢	12	2.46	Ko01212
	嘌呤代谢	11	2.26	Ko00230
	丙氨酸,天门冬氨酸和谷氨酸代谢	11	2.26	Ko00250
	卟啉与叶绿素代谢	10	2.05	Ko00860
	剪接体	10	2.05	Ko03040

T01 等为样品编号,见表 1。

2.6 旱柳差异表达基因注释结果分析

在盐胁迫下,差异表达基因上调 2 倍以上才有意义,现筛选高水平差异表达($\log_2 FC$ 达 7 倍以上)

的基因(表 7)。高水平差异表达的注释基因中,在 150 mmol/L 盐胁迫下,盐敏感柳树相对于耐盐柳树类似叶绿体的基因 BMK_Unigene_064460 表达下调

水平显著。与对照相比,盐胁迫下盐敏感柳树中高水平差异基因表达都是上调的,主要包括稳定蛋白、细胞色素 p450 家族蛋白、细胞周期蛋白等。与对照

相比,盐胁迫下耐盐柳树中高水平差异基因表达都是上调的,主要包括水通道蛋白、TPR 结构蛋白、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶、谷胱甘肽 s 转移酶等。

表 7 log₂ FC 达 7 倍以上的差异表达的基因及注释结果

Table 7 The differentially expressed genes with log₂ FC more than seven times and annotation results

差异表达基因集名称	基因 ID	log ₂ FC	基因长度 (bp)	基因注释
T01-T02-T03 相对于 T04-T05-T06	BMK_Unigene_037098	8.948 410	1 069	假设的蛋白质 pop1-0003 s12530g
	BMK_Unigene_064484	8.712 107	5 093	-
	BMK_Unigene_001972	7.837 052	485	稳定蛋白 1
	BMK_Unigene_055489	7.753 470	2 082	类周期蛋白-5-1
	BMK_Unigene_088488	7.736 747	1 417	类 TIFY10A 蛋白
	BMK_Unigene_052540	7.627 718	809	类 rap2 的蛋白质
	BMK_Unigene_038508	7.514 897	1 656	假设蛋白质 pop1-0017s 11980g
	BMK_Unigene_024541	7.508 988	511	细胞色素 p450 家族蛋白
	BMK_Unigene_021060	7.320 205	1 577	转录因子 bhh118
	BMK_Unigene_083940	8.222 768	303	假设蛋白二 09-207p20
	BMK_Unigene_040789	-7.057 830	664	无特征蛋白 loc101756790
	BMK_Unigene_064460	-8.783 410	1 365	类氯胺嘧啶合酶 2
T07-T08-T09 相对于 T10-T11-T12	BMK_Unigene_088488	10.911 650	1 417	类 TIFY10A 蛋白
	BMK_Unigene_095864	9.105 110	2 869	假设的蛋白质菌落 0001s33080g
	BMK_Unigene_052929	8.691 576	1 197	谷氨酰胺转移酶类-i 域含家族蛋白
	BMK_Unigene_038508	8.207 684	1 656	假蛋白质菌种_0017s 11980g(杨树)
	BMK_Unigene_020469	7.999 048	2 202	假蛋白质 CHLNCDRAFT-138316
	BMK_Unigene_014725	7.732 615	1 785	类脱水反应结合蛋白 1f
	BMK_Unigene_037098	7.489 349	1 096	假设的蛋白质 pop1-0003 s12530g
	BMK_Unigene_017179	7.468 032	742	可能的蛋白质磷酸酶 2c51
	BMK_Unigene_009051	7.351 412	2 732	假设的蛋白质 VOLCADRAFT-78607
	BMK_Unigene_072151	7.180 758	4 053	丙酮-5-羧酸盐合成酶
	BMK_Unigene_052357	7.162 110	1 860	假设的蛋白质 CHLREDRAFT-177657
	BMK_Unigene_027810	7.116 626	715	假设的蛋白质 jcz-00922
	BMK_Unigene_060740	7.055 797	2 398	假设的蛋白质菌落-0001s33080g

T01 等为样品编号,见表 1。

3 讨论

当植物受到干旱、高盐、高温、低温等非生物胁迫时,植物细胞表达相关抗逆基因来适应外界不利刺激。这些抗逆基因与各种代谢途径、抗氧化过程等密切相关^[23]。本试验中,将盐胁迫下的 F₁代和正常生长的 F₁代旱柳植株转录组进行比较,发现两者之间的基因表达具有较大差异,包括差异表达基因数量、表达量、发生上下调的基因数量。植株对盐胁迫

的抵御能力往往需要这些差异表达的基因来调节。我们对正常生长和盐胁迫下的 F₁代旱柳植株的根进行了转录组测序,并以 FDR 小于 0.01 且差异倍数大于等于 2 的标准进行筛选,分别在 0-盐敏(清水处理的盐敏感柳树) F₁代柳树相对于 150-盐敏(150 mmol/L处理的盐敏感柳树) F₁代柳树,150-盐敏 F₁代柳树相对于 150-耐盐(150 mmol/L处理的耐盐柳树)) F₁代柳树以及 0-耐盐(清水处理的耐盐柳树) F₁代柳树相对于 150-耐盐 F₁代柳树中得到符

合该标准的差异表达基因。0-盐敏 F_1 代柳树相对于 150-盐敏 F_1 代柳树和 0-耐盐 F_1 代柳树相对于 150-耐盐 F_1 代柳树的差异表达基因数量分别为 1 235 和 2 629, 说明耐盐 F_1 代柳树的耐盐机制中参与调控的基因较多, 可能有更好的抵御能力。150-盐敏 F_1 代柳树相对于 150-耐盐 F_1 代柳树的差异表达基因数目为 193, 进一步说明两种 F_1 代柳树对盐胁迫的抵御能力是有差异的。

不同组织器官、发育阶段以及不同处理下样本间基因表达的比较能够有效地揭示分子机制^[24]。本研究中, 我们对正常生长和盐胁迫下的柳树 F_1 植株进行转录组测序分析, 结果显示 60 848 个 Unigene 通过 COG、GO 等 8 个数据库比对得到注释信息, 其中有 38 182 个 Unigene 在 GO 数据库中得到相关注释, 24 101 个 Unigene 在 KEGG 数据库中得到注释。通过进一步 GO 富集分析发现, 大量差异表达基因在代谢过程、细胞过程、单组织过程、细胞部分、生物合成以及催化活性等 GO 条目中显著富集。通过 KEGG 显著性富集分析发现差异表达基因主要在核糖体、植物激素信号传导、淀粉与蔗糖代谢、碳代谢以及植物病原菌的相互作用等通路较为活跃, 说明它们在柳树响应盐胁迫中发挥重要作用。

另外, 我们对 $\log_2 FC$ 达到 7 倍以上的差异表达基因进行了注释分析。结果表明, 盐敏感柳树中高水平差异基因都是上调表达, 主要包括蛋白质、细胞色素 p450 家族蛋白以及细胞周期蛋白等。耐盐柳树中高水平差异基因也都是上调表达的, 主要包括水通道蛋白、TPR 蛋白、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶以及谷胱甘肽 s 转移酶等。因此, 这些差异表达基因可能是柳树耐盐的关键因子。

总之, 通过转录组分析, 我们比较全面地了解了柳树响应盐胁迫的转录水平变化, 为进一步研究柳树耐盐分子机制, 培育柳树耐盐品系提供了重要的信息。

参考文献:

- [1] SHABALA S, CUIN T A. Potassium transport and plant salt tolerance[J]. *Physiol Plant*, 2008, 133(4): 651-669.
- [2] NAN G, ZHANG Y, LI S, et al. NaCl stress-induced transcriptomics analysis of *Salix linearistipularis* (*Salix mongolica*) [J]. *J Biol Res (Thessalon)*, 2016, 23: 1.
- [3] CHINNUSAMY V, ZHU J, ZHU J K. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance[J]. *Genet Eng*, 2006, 27: 141-177.
- [4] MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 651-681.
- [5] CHEN S, POLLE A. Salinity tolerance of *Populus*[J]. *Plant Biol (Stuttg)*, 2010, 12(2): 317-333.
- [6] NISHIYAMA R, LE D T, WATANABE Y, et al. Transcriptome analyses of a salt-tolerant cytokinin-deficient mutant reveal differential regulation of salt stress response by cytokinin deficiency[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e32124.
- [7] WARD J M, HIRSCHI K D, SZE H. Plants pass the salt[J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8(5): 200-201.
- [8] NISHIYAMA R, WATANABE Y, FUJITA Y, et al. Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(6): 2169-2183.
- [9] KRASENSKY J, JONAK C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks[J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(4): 1593-1608.
- [10] SANCHEZ-BARRENA M J, MARTINEZ-RIPOLL M, ZHU J K, et al. The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response[J]. *J Mol Biol*, 2005, 345(5): 1253-1264.
- [11] NAKAGAMI H, PITZSCHKE A, HIRT H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(7): 339-346.
- [12] XU P, LIU Z, FAN X, et al. De novo transcriptome sequencing and comparative analysis of differentially expressed genes in *Gossypium aridum* under salt stress[J]. *Gene*, 2013, 525(1): 26-34.
- [13] BUYUK I, INAL B, ILHAN E, et al. Genome-wide identification of salinity responsive HSP70s in common bean[J]. *Mol Biol Rep*, 2016, 43(11): 1251-1266.
- [14] TSUKAGOSHI H, SUZUKI T, NISHIKAWA K, et al. RNA-seq analysis of the response of the halophyte, *Mesembryanthemum crystallinum* (ice plant) to high salinity[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(2): e0118339.
- [15] BUSHMAN B S, AMUNDSEN K L, WARNKE S E, et al. Transcriptome profiling of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) accessions in response to salt stress[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 48.
- [16] LONG W, ZOU X, ZHANG X. Transcriptome analysis of canola (*Brassica napus*) under salt stress at the germination stage[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(2): e0116217.
- [17] ZHANG J, JIANG D, LIU B, et al. Transcriptome dynamics of a desert poplar (*Populus pruinosa*) in response to continuous salinity stress[J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(9): 1565-1579.
- [18] GOYAL E, AMIT S K, SINGH R S, et al. Transcriptome profiling of the salt-stress response in *Triticum aestivum* cv. Kharchia Local[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27752.

- [19] KUMARI S, SABHARWAL V P, KUSHWAHA H R, et al. Transcriptome map for seedling stage specific salinity stress response indicates a specific set of genes as candidate for saline tolerance in *Oryza sativa* L. [J]. *Funct Integr Genomics*, 2009, 9(1): 109-123.
- [20] OHTSU K, SMITH M B, EMRICH S J, et al. Global gene expression analysis of the shoot apical meristem of maize (*Zea mays* L.) [J]. *Plant J*, 2007, 52(3): 391-404.
- [21] WEBER A P, WEBER K L, CARR K, et al. Sampling the *Arabidopsis* transcriptome with massively parallel pyrosequencing [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(1): 32-42.
- [22] 李 敏,王 莹,李玉娟,等. 2 个柳树亲本耐盐性比较试验 [J]. *浙江农业科学*, 2017(7):1220-1222.
- [23] WICKER T, SCHLAGENHAUF E, GRANER A, et al. 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 275.
- [24] MOROZOVA O, HIRST M, MARRA M A. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2009, 10: 135-151.

(责任编辑:张震林)