

陈亚辉, 张师场, 杨庆山, 等. 多枝柽柳叶片响应 NaCl 胁迫的转录组分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(5): 1188-1202.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.05.005

## 多枝柽柳叶片响应 NaCl 胁迫的转录组分析

陈亚辉<sup>1</sup>, 张师场<sup>2</sup>, 杨庆山<sup>3</sup>, 宋志忠<sup>4</sup>, 姜 姜<sup>1</sup>

(1. 南京林业大学林学院, 江苏 南京 210037; 2. 不列颠哥伦比亚大学理学院, 温哥华 V6T 1Z4; 3. 山东省林业科学研究院盐碱地造林试验站, 山东 济南 250000; 4. 鲁东大学农林工程研究院, 山东 烟台 264039)

**摘要:** 在转录组层面解析盐生植物多枝柽柳响应盐胁迫的分子机制, 为进一步挖掘耐盐关键基因提供参考。用 200 mmol/L NaCl 处理多枝柽柳 0 h、48 h、168 h 后, 采集叶片进行转录组测序, 分析差异表达基因 (DEGs) 并进行 qRT-PCR 验证。转录组测序原始数据拼接出 Unigenes 105 702 个, 同时在 KEGG、KOG、NR 和 SwissProt 4 大功能数据库中检索到注释的 Unigenes 为 27 670 个。NaCl 胁迫处理 48 h 后, 多枝柽柳叶片中 6 374 个基因的表达水平上调, 5 380 个基因的表达水平下调; NaCl 胁迫处理 168 h 后, 叶片中有 3 837 个基因的表达水平上调, 7 808 个基因的表达水平下调。根据注释到 KEGG 通路中的 DEGs, 筛选获得 8 个表达差异极其显著的 DEGs, 主要编码 WRKY 和 bZIP 家族转录因子。此外, 由 KEGG 通路分析可知, MAPK 信号转导途径可能参与多枝柽柳生长发育及其对 NaCl 胁迫的应答反应。本研究通过测定和解析在高盐胁迫下多枝柽柳叶片转录组信息, 揭示了盐胁迫激活 MAPK 信号转导途径以及 WRKY、MYB 和 bZIP 等转录因子参与耐盐调控过程, 为进一步研究多枝柽柳耐盐分子机制奠定了基础。

**关键词:** 多枝柽柳; NaCl 胁迫; 转录组测序; 转录因子; MAPK 信号转导途径

**中图分类号:** Q753 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)05-1188-15

## Transcriptome analysis of *Tamarix ramosissima* leaves in response to NaCl stress

CHEN Ya-hui<sup>1</sup>, ZHANG Shi-yang<sup>2</sup>, YANG Qing-shan<sup>3</sup>, SONG Zhi-zhong<sup>4</sup>, JIANG Jiang<sup>1</sup>

(1. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Faculty of Science, University of British Columbia, Vancouver V6T 1Z4, Canada; 3. Saline-alkali Afforestation Experimental Station, Shandong Academy of Forestry Sciences, Jinan 250000, China; 4. The Engineering Research Institute of Agriculture and Forestry, Ludong University, Yantai 264039, China)

**Abstract:** To uncover the molecular mechanism of halophyte *Tamarix ramosissima* (*T. ramosissima*) in response to salt stress was analyzed at the transcriptome level to provide references for further exploration of key salt-tolerant genes. *T. ramosissima* plants were treated with 200 mmol/L NaCl for 0 h, 48 h and 168 h, respectively, and the leaves were collected for transcriptome sequencing. The differentially expressed genes (DEGs) were excavated and further verified by qRT-PCR. In total, 105 702 unigenes were spliced from the raw data of transcriptome sequencing, of which 27 670 were retrieved from KEGG, KOG, NR and SwissProt. After 48 hours of NaCl stress treatment, the expression levels of 6 374 genes in *T. ramosissima* leaves were up-regulated and 5 380 genes were down-regulated. After 168 hours of NaCl stress treatment, the expression levels of 3 837 genes were up-regulated and 7 808 genes were down-regulated. According to the DEGs annotated to the KEGG pathway, eight highly differentially expressed DEGs were obtained, which mainly encoded transcription factors such as WRKY and bZIP families. In addition, the analysis of KEGG pathway showed that

收稿日期: 2022-01-20

基金项目: 山东省农业良种工程项目 (2019LZGC009); 国家自然科学基金面上项目 (32071612); 国家留学基金委项目 (202108320311)

作者简介: 陈亚辉 (1990-), 男, 江苏泰州人, 博士, 助理研究员, 研究方向为生态修复。 (E-mail) chenyahui01@163.com

通讯作者: 姜 姜, (E-mail) ecologyjiang@gmail.com

MAPK signal transduction pathway may be involved in the growth and development of *T. ramosissima* and its response to NaCl stress. This research article aims to measure and analyze the transcriptome information of *T. ramosissima* under high salinity stress conditions. This article also reveals that the salt stress activates the MAPK signal transduction pathway and WRKY, MYB, bZIP and other possible transcription factors involved in the salt tolerance regulation process. This research builds a foundation for future research on transcriptome information of *T. ramosissima*.

**Key words:** *Tamarix ramosissima*; NaCl stress; transcriptome sequencing; transcription factor; MAPK signal transduction pathway

盐渍土在全球分布广泛,其土壤中盐分含量高,土壤理化性质差,严重危害植物的生长发育<sup>[1-3]</sup>。盐渍土含有大量的  $\text{Na}^+$  类盐分,  $\text{Na}^+$  能够破坏蛋白质和膜的稳定性,产生渗透胁迫和离子毒害,导致细胞内活性氧 ROS (Reactive oxygen species) 信号的产生,使植物细胞功能紊乱,影响植物正常生长,严重时会导致植物死亡<sup>[4-6]</sup>。近二十年来,受全球人类活动和气候变化的影响,盐渍土面积不断扩大<sup>[7]</sup>,如何科学修复盐渍化土壤和改善生态环境成为学者们关注的热点<sup>[8]</sup>。

多枝怪柳 (*Tamarix ramosissima* Ledeb) 属于双子叶泌盐盐生植物<sup>[9]</sup>,能通过被称为囊状毛状体或“盐腺”的特殊结构将盐从叶片表面排出<sup>[10]</sup>。在长期进化过程中,多枝怪柳形成了耐盐、耐干旱、抗风沙等优良特性,以适应恶劣的生存环境。在怪柳属植物中,对刚毛怪柳 (*Tamarix hispida* Willd.) 耐盐分子机制的研究较为深入。Lei 等<sup>[11]</sup>发现在 150 mmol/L NaCl 胁迫条件下,刚毛怪柳 *ThCOL2* 基因过表达后,可通过调控保护酶的活性并降低体内  $\text{O}_2^{\cdot-}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的积累,进而增强转基因刚毛怪柳对 ROS 的清除能力,以减少细胞损伤和死亡,增强植物对盐胁迫的适应能力。因此,推测 *ThCOL2* 基因能够响应盐胁迫。王培龙等<sup>[12]</sup>在刚毛怪柳中通过克隆获得 *ThPP2C* 基因,研究发现该基因参与植物耐盐胁迫和脱落酸、茉莉酸等激素应答。此外,有关多枝怪柳耐盐研究多集中在其在盐胁迫条件下的生长和生理响应,如鲁艳等<sup>[13]</sup>发现低浓度 ( $\leq 100$  mmol/L) NaCl 胁迫会促进多枝怪柳的生长,而高浓度 ( $\geq 200$  mmol/L) NaCl 胁迫则抑制其生长;刘咏梅等<sup>[14]</sup>采用液体培养法分析了甘肃怪柳 (*T. gansuensis* H. Z. Zhang)、多枝怪柳和细穗怪柳 (*T. leptostachys* Bunge) 3 种怪柳材料在不同浓度 NaCl 胁迫条件下的生理指标和 *SOS1* 基因的表达水平,结果表明,3 种多枝怪柳表现出较强的耐盐能力,可将多枝怪柳作为怪柳属代表性植物进行耐盐机制研究。

近年来,转录组测序 (RNA-Seq) 技术已被广泛用于植物抗逆研究,对揭示植物耐盐的分子机理起到推动作用<sup>[15-16]</sup>。WRKY、bHLH、bZIP、NAC、MYB、AP2/ERF 等转录因子均参与盐胁迫<sup>[17-27]</sup>。张惠媛等<sup>[17]</sup>的研究结果表明,小麦 WRKY 转录因子基因 *TaWRKY33* 受盐胁迫诱导表达,提高了转基因拟南芥和小麦的耐盐性;屈兴红等<sup>[28]</sup>研究发现 WRKY 转录因子通过调控相关基因来参与调控超氧化物歧化酶 (SOD) 等氧化还原酶基因的转录表达以适应盐胁迫;练冬梅等<sup>[29]</sup>发现黄秋葵在盐胁迫处理 24 h 后,MYB4 转录因子基因呈上调表达,黄秋葵幼苗耐盐性增强;Wang 等<sup>[30]</sup>研究刚毛怪柳 *ThbZIP1* 基因时,发现过表达 *ThbZIP1* 可以增强过氧化物酶 (POD) 和超氧化物歧化酶的活性,并增加可溶性糖和可溶性蛋白质的含量,这表明 *ThbZIP1* 是通过介导多种生理途径的信号传导来促进耐盐性。此外,MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 级联是广泛存在于真核生物中重要的信号转导途径<sup>[31]</sup>,参与植物生长发育及对盐胁迫的应答反应。它由 MAP-KKK-MAPKK-MAPK3 类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶组成,通过磷酸化将信号进行传递和放大<sup>[32]</sup>。MAPK 级联反应途径作用于下游靶蛋白进而激活相应的抗逆基因表达,调节渗透平衡、离子平衡以及氧化还原平衡,从而提高植物抵抗逆境胁迫的能力。有研究结果表明 MKK4/5-MAPK3/MAPK6 在信号传递过程中通过未知的机制启动转录因子 WRKY22/WRKY29,诱导防御基因的表达<sup>[33]</sup>。Teige 等<sup>[34]</sup>研究发现拟南芥中 AtMEKK1-AtMAPKK2-AtMAPK4/AtMAPK6 反应途径在抵抗盐胁迫中发挥重要作用,能够提高对盐胁迫的抗性。

本研究以多枝怪柳为研究材料,通过高通量转录组测序筛选 200 mmol/L NaCl 胁迫处理下叶片中的差异表达基因,并利用 qRT-PCR 验证候选基因的表达差异,从转录水平揭示多枝怪柳响应盐胁迫的

关键基因及其潜在的调控网络,为研究柞柳属植物耐盐机制提供理论支撑和基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试多枝柞柳由山东省林业科学院东营试验基地提供,试验于 2019 年 10 月-2021 年 3 月在南京林业大学林木遗传育种与生物技术重点实验室完成。选取 5 个月苗龄、长势相近的多枝柞柳扦插苗转移至盛有 1/2 Hoagland 营养液的 24 孔水培箱(尺寸为 40 cm×30 cm×16 cm)中,放置于温度(26±2)℃、相对湿度 40%~55% 的温室大棚中驯化培养 2 个月后备用。

### 1.2 试验处理

试验设置对照组和处理组,每组 8 株,3 次重复。以 1/2 Hoagland 营养液培养多枝柞柳为对照组(CK),以添加 200 mmol/L NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液培养多枝柞柳为处理组,每 3 d 更换 1 次培养液。分别在处理 0 h、48 h、168 h 时采集叶片样品,并立即放置于液氮中处理,然后移至-80℃冰箱保存备用。

### 1.3 转录组测序

液氮处理后的叶片样品送往基迪奥生物科技(广州)有限公司进行高通量转录组测序。采用 Illumina HiSeq™4000 将纯化后的 PCR 产物根据标准操作在平台上进行双端测序(PE150)分析,利用 Fastp 软件进行质量控制,对原始数据进行数据过滤,得到过滤后的数据,使用 Trinity 软件<sup>[35]</sup>对过滤后的数据进行组装。首先将具有一定长度的重叠的过滤后的数据连成更长的片段,通过数据重叠得到不含高于 RawReads 百分比的组装片段,组装出 Unigene,再使用 BLAST2 GO<sup>[36]</sup>和 KOBAS<sup>[37]</sup>得到 GO 功能和 KEGG 注释。

### 1.4 差异基因筛选

使用 DESeq2<sup>[38]</sup> 软件对测序所得的 reads count 数据进行分析,得到最终正确的 FDR 值(经过 BH 校正后的 P 值),FDR<0.05 被认为是显著富集。基于差异分析结果,我们筛选 FDR<0.05 且  $|\log_2 FC|>1$  的基因为显著差异基因。

### 1.5 qRT-PCR 验证

利用 Omega Bio-Tek 公司(美国)的 Omega 试剂盒提取叶片材料的总 RNA,采用宝生物工程(大

连)有限公司的 PrimerScript™RT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒将其反转录成 1 链 cDNA 作为模板。设计 DEGs 特异性表达引物,使用赛默飞世尔科技(中国)有限公司的 PowerUp™SYBR Green Master mix 试剂,在应用生物系统 ABI ViiA™7 Real-time PCR system 仪器进行 qRT-PCR 检测,所用引物见表 1,每个候选基因进行 4 次技术重复,3 次生物学重复。以 Actin 为内参基因,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[39]</sup>进行相对表达量的计算。

表 1 特异性表达引物序列

Table 1 Sequences of specific primers

基因	引物序列(5'→3')
Unigene0104732	F:TGGCCGGTCCACCCGTATCC R:GCTGACAACCGAACGGCGGA
Unigene0028215	F:CGGTGGCGCAAGGAGCTGTT R:CATCACCACCGCCACCGACC
Unigene0083695	F:ACCCTGCGCCCATCCCTCTT R:CGGCGGAGGGCCGAGTTTAT
Unigene0069097	F:AGCAGCCGATTGTCTCTCTGGGA R:GCACTGCTCTTTCTCCCTCTGC
Unigene0090596	F:TCCCGCAGTACCTGCTCACGA R:TGGAGACCCCGACGAGGTGG
Unigene0024962	F:ACCATGTGCGCCCGCTTGAC R:TCCGCTGCAGTGGCCCTAGT
Unigene0007135	F:AGGAAGGCGGTGAGGCTGCT R:GCAGCACCGGAGTCTGTAGC
Unigene0088781	F:GGTGGTGGCGCGCGGTGATAC R:TGCTGCAACTGCCGCTCCTC
Actin	F:TCGTAGCAGAGCATCGGAGAA R:TGACCCATGCCAACCATAACA

### 1.6 数据处理

使用 Excel 进行数据统计,使用 SPSS 26.0 进行显著性分析,使用 Origin 2018 软件制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 转录组测序质量分析

2.1.1 转录组数据分析 利用 IlluminaHiSeq™4000 进行高通量转录组测序,在 200 mmol/L NaCl 胁迫条件下,多枝柞柳叶片在处理 0 h、48 h 和 168 h 时均得到多条高质量碱基序列(碱基长度:6 017 997 220~6 782 061 623 bp),且 Q20、Q30 分别达到 95%以上和 90%以上,且 G+C 含量均达到

44%以上(表2),表明本研究开展的转录组测序质量较高,符合进一步研究的要求。

表2 碱基信息统计表

Table 2 Statistics of base information

样品	过滤前原始数据 (bp)	过滤后有效数据 (bp)	Q20 以上水平的 碱基占比 (%)	Q30 以上水平的 碱基占比 (%)	过滤后的序列 碱基 G+C 占比 (%)
CK1-0 h	6 341 519 400	6 017 997 220	97.34	92.65	45.15
CK2-0 h	6 216 526 200	6 057 604 903	97.54	93.11	45.12
CK3-0 h	6 627 399 900	6 507 140 412	97.77	93.55	45.24
NaCl1-48 h	6 654 895 800	6 541 177 895	98.78	95.93	45.04
NaCl2-48 h	6 888 168 900	6 782 061 623	98.72	95.71	44.94
NaCl3-48 h	6 720 560 700	6 605 897 734	98.79	95.94	44.90
NaCl1-168 h	6 691 086 000	6 551 036 697	98.85	96.17	45.42
NaCl2-168 h	6 181 114 500	6 032 346 218	98.83	96.16	45.44
NaCl3-168 h	6 396 633 600	6 256 461 214	98.93	96.43	45.35

CK1-0 h、CK2-0 h、CK3-0 h 分别表示对照组处理 0 h 的 3 个重复,NaCl1-48 h、NaCl2-48 h、NaCl3-48 h 表示 200 mmol/L NaCl 处理 48 h 的 3 个重复,NaCl1-168 h、NaCl2-168 h、NaCl3-168 h 表示 200 mmol/L NaCl 处理 168 h 的 3 个重复。

2.1.2 Unigene 基本注释 转录组测序结果显示,共拼接获得105 702个 Unigene,在 NR、KEGG、KOG 和 SwissProt 数据库中获得基因注释的 Unigene 分别有 53 385个、46 062个、31 587个和36 087个,同时在这 4 个数据库均有注释的 Unigene 共27 670个(图1)。

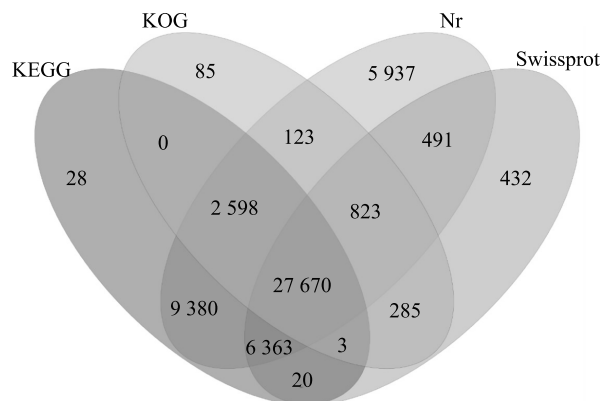


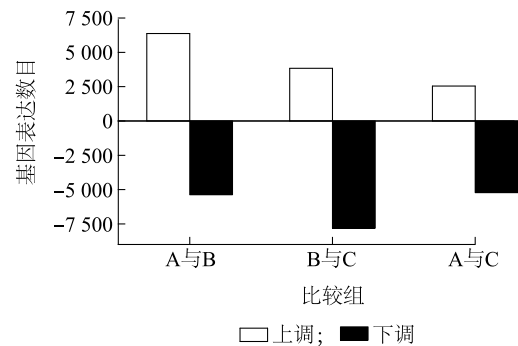
图1 NaCl胁迫下多枝桉柳叶片表达基因注释到4大数据库的韦恩图

Fig.1 Venn diagrams of gene expression in *Tamarix ramosissima* leaves annotated to four major databases under NaCl stress

## 2.2 差异表达基因数量分析

将多枝桉柳在 NaCl 胁迫处理后 0 h、48 h 和 168 h 的转录数据与对照进行比较,以 $FDR < 0.05$  且  $|\log_2 FC| > 1$  筛选差异表达基因。在 CK-0 h 与 200 mmol/L NaCl-48h 比较组中共检测到11 754个基因的表达水平发生改变,其中6 374个基因的表达水平上调,5 380个基因的表达水平下调;在 200 mmol/L

NaCl-48 h 与 200 mmol/L NaCl-168h 比较组中共 11 645个基因表达发生了改变,有3 837个基因的表达水平受 NaCl 胁迫诱导上调,7 808个基因的表达水平受抑制下调;在 CK-0 h 与 200 mmol/L NaCl-168 h 比较组中共检测到7 768个基因的表达发生改变,其中2 542个基因受 NaCl 胁迫诱导上调,5 226个基因的表达水平受抑制下调(图2)。



A 表示 CK-0 h;B 表示 200 mmol/L NaCl-48 h;C 表示 200 mmol/L NaCl-168 h。CK-0 h、200 mmol/L NaCl-48 h、200 mmol/L NaCl-168 h 见表2注。

图2 差异表达基因分析

Fig.2 Analysis of differentially expressed genes

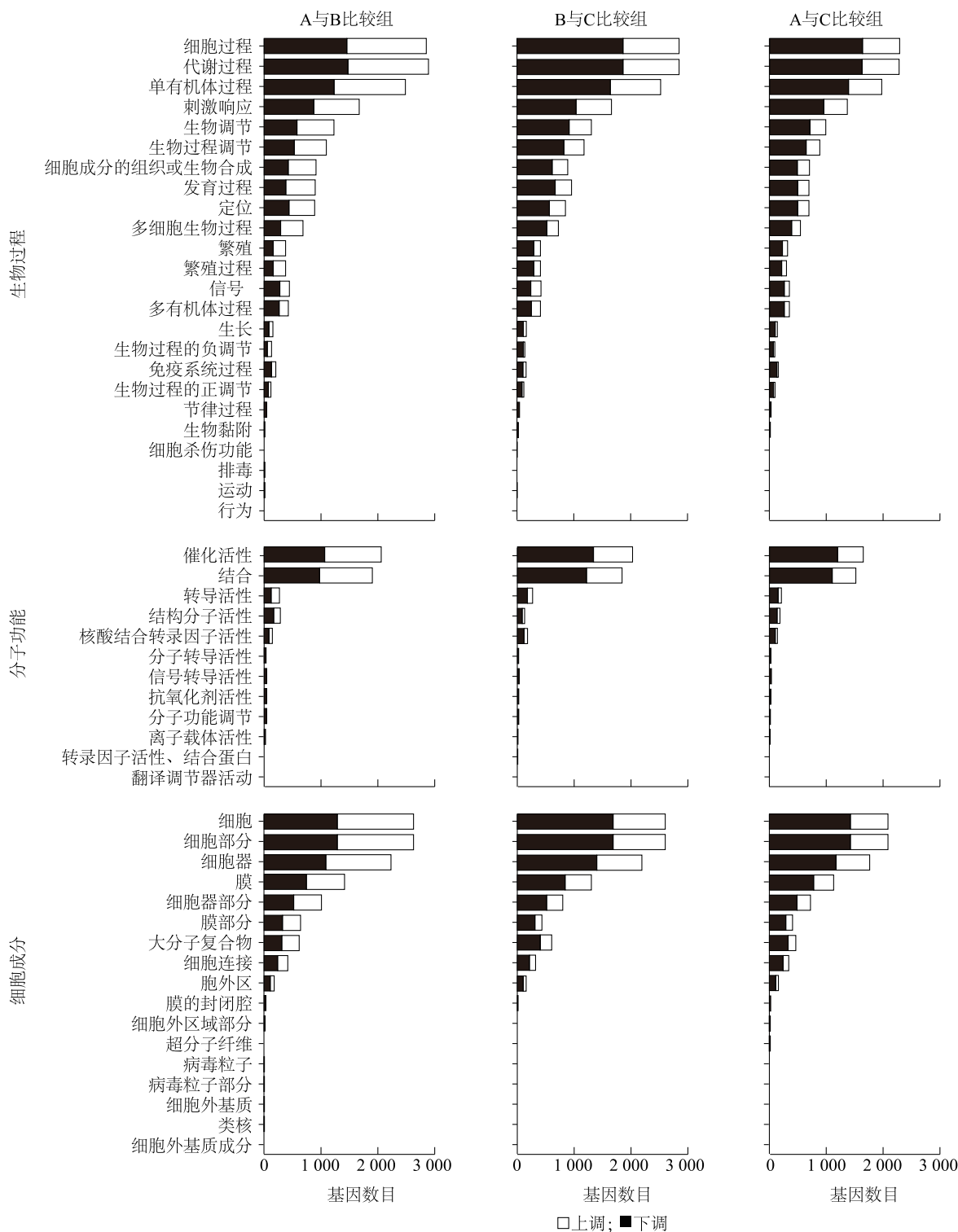
## 2.3 差异表达基因的 GO 分析

通过 GO 注释分析,上述差异表达基因(DEGs)可分为生物过程、细胞组分和分子功能3大类别,共 51 个不同分类组(图3)。在生物过程大类中,DEGs 主要富集在细胞过程、代谢过程、单有机体过程和刺激响应中;在分子功能大类中,DEGs 主要富集在催



化活性、结合、转导活性和结构分子活性;在细胞成分大类中,DEGs 主要富集在细胞、细胞部分、细胞器和膜。此外,随着 NaCl 胁迫时间的延长,上调的

DEGs 数量显著减少,且 DEGs 整体数量下降。由此推测,随着高盐胁迫时间的延长,多枝桉柳叶片在转录水平有大量 DEGs 表达水平出现下调。



A 表示 CK -0 h; B 表示 200 mmol/L NaCl-48 h; C 表示 200 mmol/L NaCl-168 h。CK-0 h, 200 mmol/L NaCl-48 h, 200 mmol/L NaCl-168 h 见表 2 注。

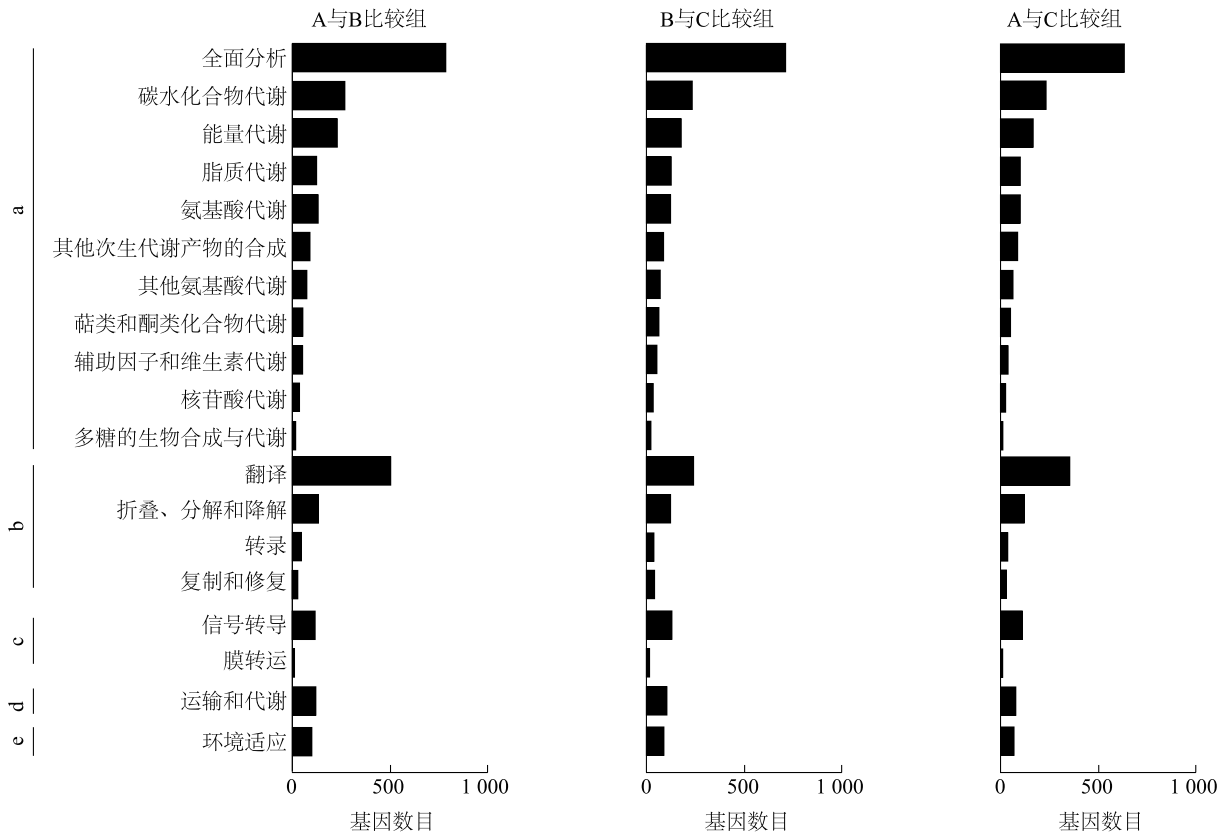
图 3 差异表达基因 GO 功能分析

Fig.3 GO function analysis of differentially expressed genes

## 2.4 差异表达基因的 KEGG 富集分析

对上述 DEGs 进行 KEGG 富集分析,根据其不同的代谢和信号通路可分为 5 个 KEGG 通路分支,包括代谢、遗传信息处理、环境信息处理、有机系统和细胞过程,这 5 个通路分支又进一步分成 19 个小类(图 4),更加直观地显示了多枝桉柳在盐胁迫下发生调节和改变的代谢过程和信号通路。特别地,CK-0 h 与 200 mmol/L NaCl-48 h 比较组中参与代谢、遗传信息处理、环境信息处理、有机系统和细胞过程通路分支的差异基因分别为 1 882 个、716 个、132 个、121 个和 99 个。在 200 mmol/L NaCl-48 h 与 200 mmol/L NaCl-168 h 比较组中参与代谢、遗传

信息处理、环境信息处理、有机系统和细胞过程等通路分支的差异基因分别为 1 700 个、446 个、146 个、103 个和 87 个。在 CK-0 h 与 200 mmol/L NaCl-168 h 比较组中参与代谢、遗传信息处理、环境信息处理、有机系统和细胞过程等通路分支的差异基因分别为 1 514 个、545 个、121 个、80 个和 69 个。在 3 个比较组中,参与代谢通路分支的差异表达基因最多,参与细胞过程通路分支的差异表达基因最少。此外,随着高盐胁迫时间的延长,5 个 KEGG 通路分支的 DEGs 数量均逐渐下降,其中,遗传信息处理通路中的下降最为明显。



A 表示 CK-0 h;B 表示 200 mmol/L NaCl-48 h;C 表示 200 mmol/L NaCl-168 h。CK-0 h,200 mmol/L NaCl-48 h,200 mmol/L NaCl-168 h 见表 2 注。a:代谢;b:遗传信息处理;c:环境信息处理;d:有机系统;e:细胞过程。

图 4 差异表达基因 KEGG 功能分析

Fig.4 KEGG function analysis of differentially expressed genes

## 2.5 差异表达基因的 KEGG 通路分析

由 KEGG 通路分析结果可知,在 CK-0 h 与 200 mmol/L NaCl-48 h、200 mmol/L NaCl-48 h 与 200 mmol/L NaCl-168 h 和 CK-0 h 与 200 mmol/L NaCl-168 h 比较组中分别注释到的 1 762 个、1 426

个和 1 366 个 DEGs,并分别富集到 129 个、133 个和 127 个 KEGG 通路中(图 5),更加直观地反映出植物盐胁迫下是哪些代谢通路的表达发生了变化。其中,在 CK-0 h 与 200 mmol/L NaCl-48 h 比较组中,在前 20 个 KEGG 通路中,核糖体

(ko03010) 注释到 435 个 DEGs, 占 24.69%, 其后依次是次生代谢物的生物合成(ko01110)、植物病原体相互作用(ko04626)、苯丙烷生物合成(ko00940)、植物激素信号转导(ko04075)和植物 MAPK 信号通路(ko04016), 分别注释到 416 个(23.61%)、88 个(4.99%)、69 个(3.92%)、69 个(3.92%) 和 59 个(3.35%) DEGs。200 mmol/L NaCl-48 h 与 200 mmol/L NaCl-168 h 比较组在前 20 个通路中, 代谢途径(ko1100) 通路注释到 684 个 DEGs, 占 47.97%; 其后依次是次生代谢物的生物合成(ko01110)、植物激素信号转导(ko04075)、植物病原体相互作用(ko04626)、植物 MAPK 信号通路(ko04016) 和苯丙烷生物合成(ko00940) 等, 分别注释到 382 个(26.79%)、82 个(5.75%)、72 个(5.05%)、64 个(4.49%) 和 59 个(4.14%) DEGs。CK-0 h 与 200 mmol/L NaCl-168 h 比较组在前 20 个通路中, 代谢途径(ko1100) 通路注释到 614 个 DEGs, 占 44.95%; 其后依次是次生代谢物的生物合成(ko01110)、核糖体(ko03010)、植物激素信号转导(ko04075)、植物病原体相互作用(ko04626) 和植物 MAPK 信号通路(ko04016) 等, 分别注释到 351 个(25.70%)、296 个(21.67%)、72 个(5.27%)、63 个(4.61%) 和 49 个(3.59%) DEGs。由此可知, 多枝桤柳受到高盐胁迫后, DEGs 在代谢途径、次生代谢物的生物合成、植物激素信号转导、植物病原体相互作用、植物 MAPK 信号通路和苯丙烷生物合成等 KEGG 通路上显著富集。

## 2.6 注释到 KEGG 通路的关键差异表达基因分析

转录因子在调控植物生长发育、适应环境中起到主要作用, 尤其是在响应盐胁迫中具有重要作用。本研究有 8 个差异表达转录因子基因注释到 KEGG 通路中, 主要为 WRKY 和 bZIP 2 种类型。

注释到 KEGG 通路(ko04626 和 ko04016) 中响应盐胁迫的 WRKY 转录因子基因共 5 个, 其中 *Unigene0010090*、*Unigene0077293* 和 *Unigene0079542* 在处理 0 h、48 h 和 168 h 时的表达水平呈先下降后上升趋势, 而 *Unigene0014406* 和 *Unigene0024962* 在处理 0 h、48 h 和 168 h 时的表达水平一直呈上升趋势(表 3)。有 3 个 bZIP 转录因子基因注释到 KEGG 通路(ko04016、ko01100、ko01110、ko01200、

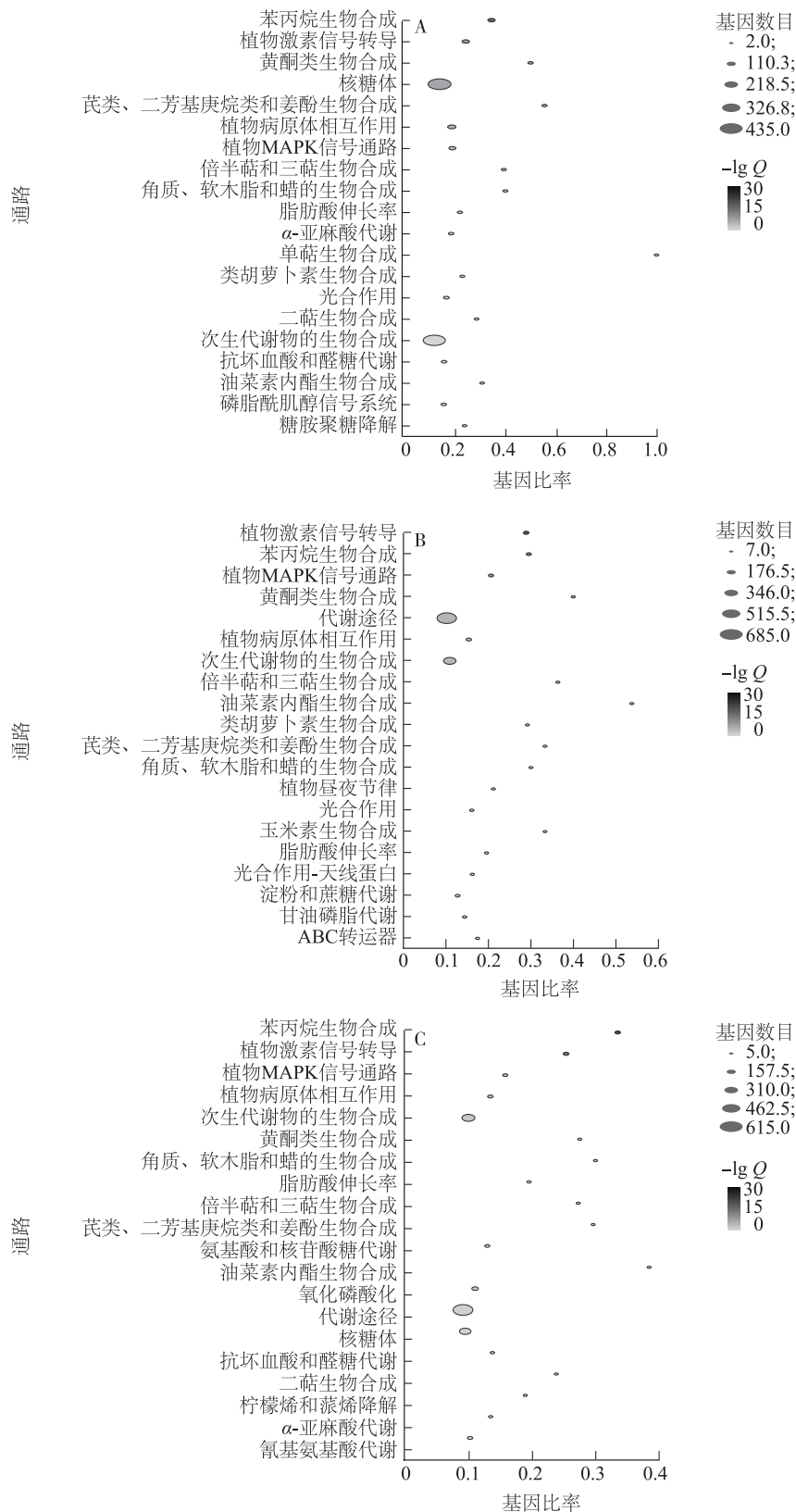
ko01212、ko04146、ko00071、ko00640、ko00410、ko01040、ko00592 和 ko04075) 来参与盐胁迫的调控, 其中 *Unigene0026888* 和 *Unigene0008868* 在处理 0 h、48 h 和 168 h 时的表达水平呈先上升后下降趋势, 而 *Unigene0010561* 在 0 h、48 h 和 168 h 时的表达水平呈先下降后上升趋势(表 3)。

## 2.7 KEGG 通路中 MAPK 信号转导途径分析

MAPK 级联是重要的信号转导途径, 参与植物生长发育及对盐胁迫的应答反应等生理过程。由图 6 可知, CK-0 h 与 200 mmol/L NaCl-48 h 和 200 mmol/L NaCl-48 h 与 200 mmol/L NaCl-168 h 比较组在 KEGG 通路中, DEGs 表达水平发生显著变化。

由图 6 可知, 本研究中共有 16 个 DEGs 参与 NaCl 胁迫条件下 MAPK 信号转导途径。在病原体攻击——细胞死亡和  $H_2O_2$  产生(图 6A) 信号传递过程中 MKK4/MKK5、MPK3/MPK6 和 WRKY22/WRKY29 含有的基因(*Unigene0054151*、*Unigene0055797* 和 *Unigene0070215*)、病原体攻击——植物防御中活性氧的积累(图 6A) 信号传递过程中 MPK4 含有的基因(*Unigene0016609*) 以及盐——耐盐性(图 6B) 信号传递过程中 MKK4/6 含有的基因(*Unigene0016609*) 表达均在 0 h、48 h 和 168 h 呈先下降后上升趋势。

图 6A 表明,  $H_2O_2$  可以激活 ANP1-MKK4/MKK5-MAPK3/MAPK6 信号途径来调节相关基因的表达。本研究中, 多枝桤柳在受到盐胁迫后, 信号从 MKK4/MKK5 传递到 MPK3/MPK6 过程中, 在 NaCl 处理 168 h 时可能启动了 WRKY22/WRKY29 防御基因, 导致表达上调(图 6A、表 4); 同时, 盐胁迫下 MEKK1 被激活后, 又激活了 MKK2, 再直接靶向 MPK4/MPK6, 组成 MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6 模块介导抵御盐胁迫的应答反应(图 6B、表 4)。此外, 在病原体攻击——植物防御中活性氧积累的信号传递过程中, MEKK1 在盐胁迫下被激活, 传递给未知机制, 再到达 MPK4, 最终形成一个防御活性氧积累信号。其中, 图 6A 中的 MPK4 和图 6B 中的 MPK4/MPK6 中都包含相同基因(*Unigene0016609*), 且激活过程相近。由此推断, 盐胁迫下在病原体攻击——植物防御中活性氧积累的信号传递过程中, 可能是 MKK2 激活了 MPK4。



A 表示 CK-0 h; B 表示 200 mmol/L NaCl-48 h; C 表示 200 mmol/L NaCl-168 h。CK-0 h、200 mmol/L NaCl-48 h、200 mmol/L NaCl-168 h 见表 2 注。

图 5 NaCl 胁迫下多枝桉柳叶片中排名前 20 的 KEGG Pathway

Fig.5 Top 20 KEGG pathways in *T. ramosissima* leaves under NaCl stress



表 3 注释到 KEGG 通路的转录因子基因

Table 3 Transcription factor genes annotated to the KEGG pathway

基因	注释	通路	变化倍数的对数值		
			A 与 B 比较组	B 与 C 比较组	A 与 C 比较组
<i>Unigene0010090</i>	转录因子 WRKY33	ko04626、ko04016	-0.75	0.35	-0.40
<i>Unigene0014406</i>	WRKY DNA 结合蛋白 27	ko04626、ko04016	0.46	0.33	0.79
<i>Unigene0024962</i>	转录因子 WRKY1	ko04626	0.64	0.06	0.69
<i>Unigene0077293</i>	转录因子 WRKY	ko04626、ko04016	-1.96	-0.08	-2.04
<i>Unigene0079542</i>	转录因子 WRKY11	ko04626	-0.20	0.38	0.18
<i>Unigene0026888</i>	转录因子 bZIP4	ko04016	0.67	-0.31	0.36
<i>Unigene0008868</i>	转录因子 bZIP2	ko01100、ko01110、ko01200、ko01212、ko04146、ko00071、ko00640、ko00410、ko01040、ko00592	0.64	-0.65	-0.01
<i>Unigene0010561</i>	转录因子 bZIP10	ko04075	-0.82	0.43	-0.39

A 表示 CK-0 h; B 表示 200 mmol/L NaCl-48 h; C 表示 200 mmol/L NaCl-168 h。CK-0 h、200 mmol/L NaCl-48 h、200 mmol/L NaCl-168 h 见表 2 注。

在盐胁迫——胁迫适应信号传递过程中,由脱落酸(ABA)信号传递给 PYR/PYL 信号,在 PYR/PYL 信号传递中有 2 个基因(*Unigene0071368* 和 *Unigene0030832*)表达在盐胁迫 0 h、48 h 和 168 h 后呈先下降后上升趋势;有 3 个基因(*Unigene0011883*、*Unigene0017324* 和 *Unigene0005290*)表达在盐胁迫 0 h、48 h 和 168 h 后呈先上升后下降趋势。当信号传递到 PP2C 时,有 3 个基因(*Unigene0002530*、*Unigene0087395* 和 *Unigene0051628*)在 0 h、48 h 和 168 h 时表达先上调后下调,与信号传递到 SnRK2 时 *Unigene0056876* 基因的

表达一致。信号传递到 MAPKKK17/MAPKKK18 时,有 1 个基因(*Unigene0025820*)在 0 h、48 h 和 168 h 时表达一直下调。经 MAPKKK17/MAPKKK18 信号传递到 MPK1/MPK2 时,*Unigene0064719* 基因表达在 0 h、48 h 和 168 h 中呈先下降后上升趋势(图 6C,表 4)。由此可以推论,在 ABA 信号中 SnRK2 起主要的调控作用。多枝桠柳受到高盐胁迫后,SnRK2 与 ABA 结合的 PYR/PYL 蛋白和 PP2C 相互作用并抑制其活性,使 SnRK2 始终保持磷酸化活性状态,来激活胁迫响应途径。

表 4 MAPK 信号途径相关的 KEGG 基因注释

Table 4 KEGG annotation of genes involved in MAPK signaling pathway

基因	注释	通路	变化倍数的对数值		
			A 与 B 比较组	B 与 C 比较组	A 与 C 比较组
<i>Unigene0054151</i>	丝裂原活化蛋白激酶 5	ko04626、ko04016、ko04075	-1.27	1.47	0.20
<i>Unigene0055797</i>	丝裂原活化蛋白激酶 3	ko04626、ko04016、	-2.95	2.69	-0.27
<i>Unigene0070215</i>	转录因子 WRKY27	ko04626、ko04016、	-3.61	3.85	0.24
<i>Unigene0016609</i>	丝裂原活化蛋白激酶同源物 MMK2	ko04626、ko04016、	-2.09	1.34	-0.75
<i>Unigene0071368</i>	脱落酸受体 PYL4	ko04016、ko04075	-6.75	5.21	-1.54
<i>Unigene0030832</i>	脱落酸受体 PYL4	ko04016、ko04075	-1.27	1.17	-0.09
<i>Unigene0011883</i>	脱落酸受体 PYL2	ko04016、ko04075	1.26	-1.10	0.17
<i>Unigene0017324</i>	脱落酸受体 PYL12	ko04016、ko04075	2.11	-4.67	-2.56
<i>Unigene0005290</i>	脱落酸受体 PYL9	ko04016、ko04075	2.54	-2.14	0.39
<i>Unigene0002530</i>	丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶	ko04016、ko04075	1.21	-2.04	-0.82
<i>Unigene0087395</i>	蛋白磷酸酶 2C56	ko04016、ko04075	2.18	-2.32	-0.14
<i>Unigene0051628</i>	蛋白磷酸酶 2C37	ko04016、ko04075	2.52	-2.56	-0.04
<i>Unigene0056876</i>	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 SAPK3	ko04016、ko04075	-1.59	2.01	0.43
<i>Unigene0025820</i>	丝裂原活化蛋白激酶 18	ko04016	-1.90	-1.86	-3.77
<i>Unigene0064719</i>	丝裂原活化蛋白激酶 7 异构体 X2	ko04016	-2.70	1.45	-1.25

A 表示 CK-0 h; B 表示 200 mmol/L NaCl-48 h; C 表示 200 mmol/L NaCl-168 h。CK-0 h、200 mmol/L NaCl-48 h、200 mmol/L NaCl-168 h 见表 2 注。

## 2.8 qRT-PCR 验证

本研究随机选取 8 个与耐盐相关的 DEGs 进行 qRT-PCR 验证,结果(表 5)显示, *Unigene0104732*、*Unigene0083695* 和 *Unigene0069097* 基因表达水平受 NaCl 胁迫诱导呈先上升后下降趋势; *Unigene0024962* 响应 NaCl 胁迫,表达水平显著上升, *Unigene0090596*、*Unigene0007135* 和 *Unigene0088781*

基因表达水平受 NaCl 胁迫影响先下降后上升,而 *Unigene0028215* 基因表达水平受 NaCl 抑制显著下降。qRT-PCR 验证结果与转录组测序分析结果完全一致(图 7),证明本研所得的转录组数据是准确可靠的,可为研究多枝桤柳耐盐机制提供基因资源和转录水平依据。

表 5 qRT-PCR 验证差异表达基因的表达变化

Table 5 Verification of differentially expressed gene expression by qRT-PCR

基因	注释	变化倍数的对数值		
		A 与 B 比较组	B 与 C 比较组	A 与 C 比较组
<i>Unigene0104732</i>	转录因子 bHLH48	0.90	-0.80	0.10
<i>Unigene0028215</i>	转录因子 bHLH112 异构体 X1	-0.91	-0.96	-1.88
<i>Unigene0083695</i>	转录因子 bZIP44	-0.04	-0.16	-0.20
<i>Unigene0069097</i>	液泡膜 Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> 逆向转运体	1.34	-0.15	1.19
<i>Unigene0090596</i>	钠转运蛋白 HKT1	-2.55	1.24	-1.31
<i>Unigene0024962</i>	转录因子 WRKY1	0.64	0.06	0.69
<i>Unigene0007135</i>	转录因子 WRKY33-1	-2.01	0.64	-1.37
<i>Unigene0088781</i>	转录因子 MYB4	-1.17	0.65	-0.52

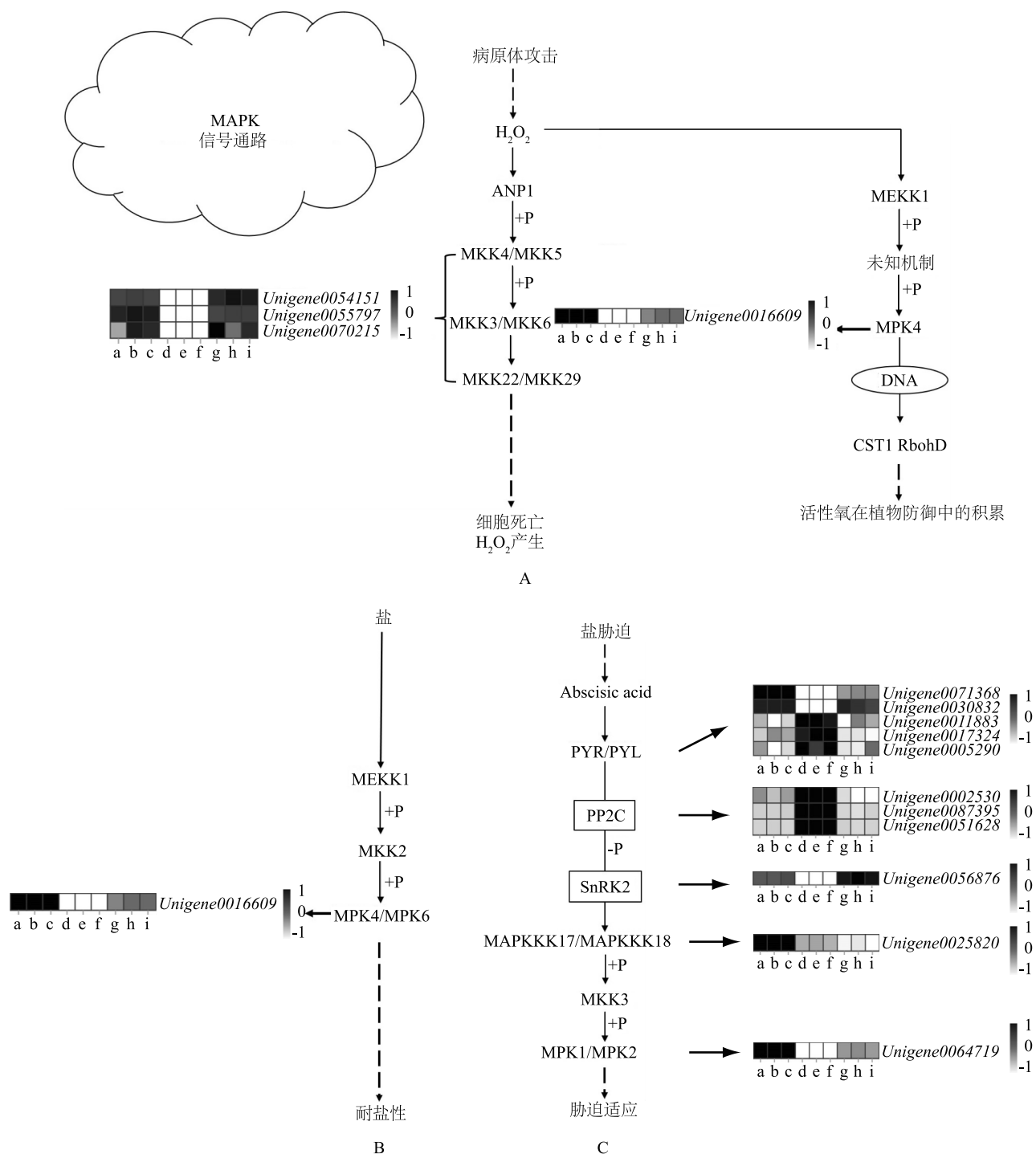
A 表示 CK-0h; B 表示 200 mmol/L NaCl-48h; C 表示 200 mmol/L NaCl-168h。CK-0h、200 mmol/L NaCl-48h、200 mmol/L NaCl-168h 见表 2。

## 3 讨论

桤柳属(*Tamarix* Linn.)植物在适应环境的长期过程中演变出一系列复杂的机制抵抗盐胁迫。从分子层面来讲,植物响应盐胁迫是一个多基因参与及调控的复杂过程,涉及代谢、信号传导、能量产生和运输、离子渗透和转运等诸多通路的相关基因<sup>[40-41]</sup>。因此,对多枝桤柳植物进行全面的转录组分析,有助于揭示桤柳属植物应答盐胁迫环境的响应机制。

桤柳属植物长期以来进化出复杂的调节网络以适应非生物胁迫的不利逆境<sup>[42]</sup>,转录因子是所有非生物胁迫反应中最重要的调节因子<sup>[43]</sup>。WRKY 是转录因子的大家族之一,已被证明参与多种代谢过程,并在与植物生物胁迫和非生物胁迫反应相关的转录重编程调节中发挥重要作用<sup>[44-46]</sup>。本研究中,编码 WRKY 转录因子的 *Unigene0024962* 在 200 mmol/L NaCl 处理 48 h 和 168 h 后表达水平呈上升趋势,WRKY 转录因子编码基因 *Unigene0079542* 的表达水平在 200 mmol/L NaCl 处理 48 h 时出现下降,而在 168 h 时呈上升,表明随着盐胁迫时间的变

化, *Unigene0079542* 响应盐胁迫的方式发生了改变,与大豆<sup>[47]</sup>和长叶红砂<sup>[48]</sup>中 WRKY 转录因子编码基因受 NaCl 处理而上调的报道相类似。然而,与本研究结果相反的是, Lin 等<sup>[49]</sup>发现辣椒 *CaWRKY27* 基因在转录水平的表达量受 NaCl 胁迫而下调。本研究发现 WRKY 转录因子 *Unigene0014406* 持续受 NaCl 胁迫处理的诱导,暗示该基因可能持续参与盐生植物多枝桤柳响应盐胁迫的应答反应。此外, bZIP 转录因子在植物生长和环境胁迫应答中发挥重要的调控作用<sup>[50-51]</sup>。多枝桤柳叶片中 bZIP 转录因子编码基因 *Unigene0008868* 表达受 NaCl 诱导而显著上调,这与 Huang 等<sup>[52]</sup>在苎麻中发现的 *bZIP2* 表达规律相似,并暗示 bZIP 转录因子在植物对高盐胁迫的响应中起重要的调控作用。同时, MYB 是植物体内数量和功能最多多样化的转录因子家族之一,在非生物胁迫中也起到非常重要的作用<sup>[53-55]</sup>。本研究中 MYB 编码基因 *Unigene0088781* 在多枝桤柳叶片中的表达水平受 NaCl 胁迫先下降后上升,暗示该基因在受 NaCl 胁迫一定时间后才开始响应盐胁迫,类似现象已在紫花苜蓿幼苗<sup>[56]</sup>和玫瑰花瓣<sup>[57]</sup>中报道。综上可知, WRKY、MYB 和 bZIP 等转录因子参



A: 病原体攻击——细胞死亡和  $H_2O_2$  产生; B: 盐——耐盐性; C: 盐胁迫——胁迫适应。a: CK1-0 h; b: CK2-0 h; c: CK3-0 h; d: NaCl1-48 h; e: NaCl2-48 h; f: NaCl3-48 h; g: NaCl1-168 h; h: NaCl2-168 h; i: NaCl3-168 h; CK1-0 h、CK2-0 h、CK3-0 h、NaCl1-48 h、NaCl2-48 h、NaCl3-48 h、NaCl1-168 h、NaCl2-168 h、NaCl3-168 h 见表 2 注。

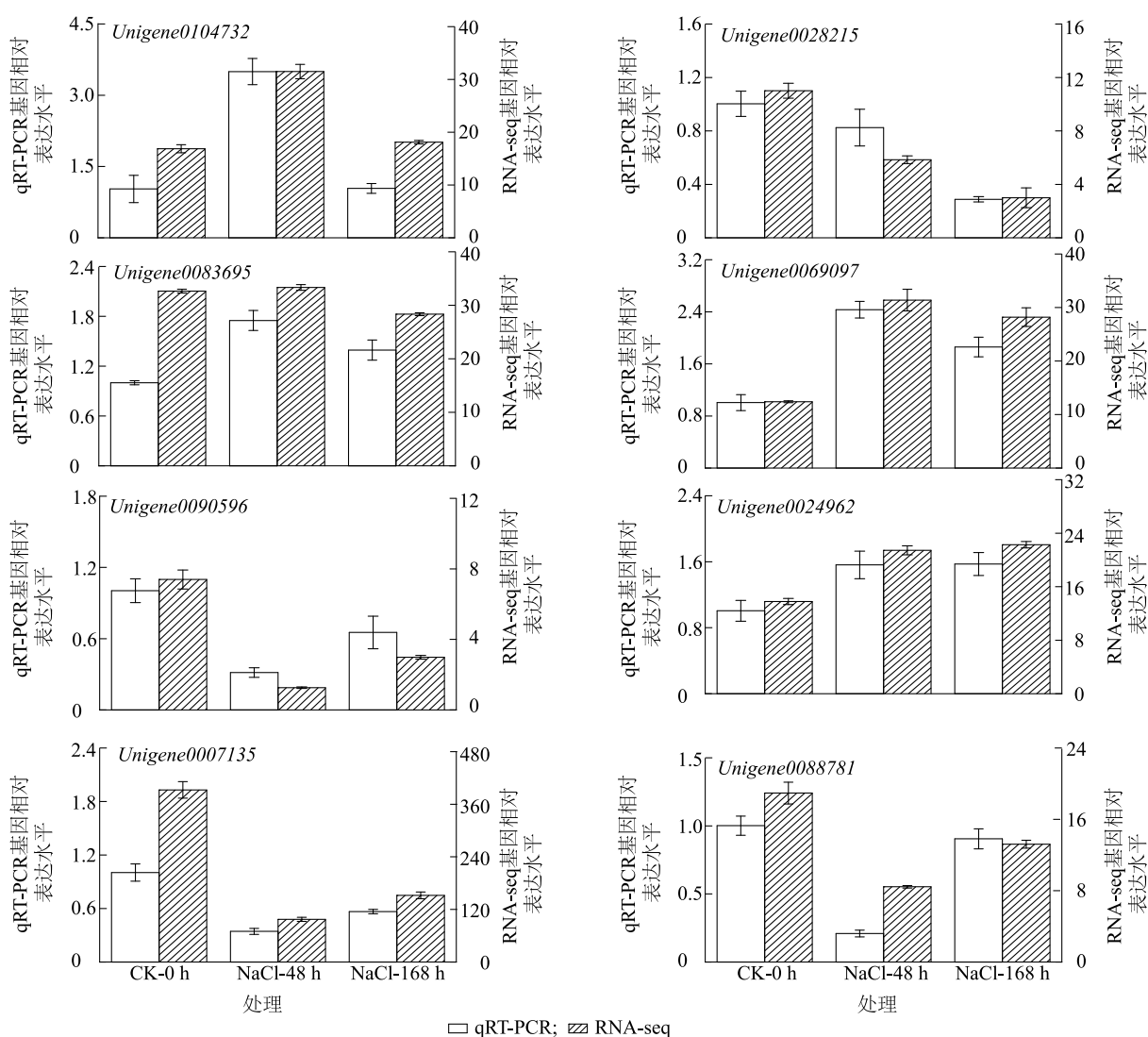
图 6 NaCl 胁迫下多枝柞柳 KEGG 通路中 MAPK 信号途径

Fig.6 MAPK signaling pathway from KEGG pathway in *T. ramosissima* under NaCl stress

与多枝柞柳应答盐胁迫的调控过程。

植物 MAPK 级联的功能包括参与生长发育、抗病反应、非生物胁迫应答和激素信号转导等过

程<sup>[58-64]</sup>。已有研究结果表明, MEKK1-MPK4 能够介导水稻的盐胁迫信号, 水稻在盐胁迫下, *OsMEKK1* 基因的表达受盐胁迫诱导上调, 且 *OsMEKK1* 会磷酸



CK-0 h, 200 mmol/L NaCl-48 h, 200 mmol/L NaCl-168 h 见表 2 注。

图 7 NaCl 胁迫下多枝桤柳叶片中差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig.7 qRT-PCR validation of differentially expressed genes in leaves of *T. ramosissima* under NaCl stress

化 *OsMPK4*, 而 NaCl 胁迫激活水稻中 *OsMEKK1* 和 *OsMPK4* 的酶活性进而调控水稻对 NaCl 的耐受性, 并且 MEKK1-MPK4 级联通过调控相关转录因子的表达介导盐信号<sup>[31,65]</sup>。Mehlmer 等<sup>[66]</sup> 研究发现在拟南芥中, 盐胁迫下的 MKK2-MPK4/MPK6 途径负责适应盐胁迫。与前人研究结果<sup>[66]</sup> 相同的是, 本研究中多枝桤柳可能也是通过 MEKK1-MPK4 和 MKK2-MPK4/MPK6 途径响应盐胁迫信号。此外, MAPK 级联还参与植物多种激素信号, 包括水杨酸 (SA)<sup>[67]</sup>、生长激素 (AUX)<sup>[68]</sup>、脱落酸 (ABA)<sup>[69]</sup> 和茉莉酸 (JA)<sup>[70]</sup> 等, 其中, 脱落酸参与高等植物生长发育、抗逆等生理过程, 在非生物胁迫中起着关键作

用, 高盐、高温等非生物胁迫可刺激植物体内脱落酸的合成, 并启动相关信号途径来激活植物抗逆机制<sup>[71]</sup>。ABA-PYR-PP2C-SnRK2 负责脱落酸信号感应和传递的中央信号转导复合体, PYR/PYL/RCAR 家族成员几乎都参与了脱落酸信号转导途径<sup>[72-73]</sup>。本研究中多枝桤柳在 NaCl 胁迫下也可能形成 PYR-PP2C-SnRK2 信号转导复合体, 进而参与脱落酸激活, 启动抗盐机制。

## 4 结论

在高盐胁迫下, WRKY、MYB 和 bZIP 等转录因子参与多枝桤柳的耐盐调节过程; 高盐胁迫下多枝

怪柳的 MAPK 信号转导途径被激活,通过多种途径调节相关转录因子基因表达响应盐胁迫。本研究为进一步研究多枝怪柳耐盐分子机制提供了基础。

## 参考文献:

- [1] CHENG Y, YANG P, ZHAO L H, et al. Studies on genome size estimation, chromosome number, gametophyte development and plant morphology of salt-tolerant halophyte *Suaeda salsa* [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 473-485.
- [2] 李建国,濮励杰,朱明,等. 土壤盐渍化研究现状及未来研究热点[J]. *地理学报*, 2012, 67(9): 1233-1245.
- [3] 俞仁培,陈德明. 我国盐渍土资源及其开发利用[J]. *土壤通报*, 1999, 30(4): 3-5.
- [4] 鲁琳,杨尚谕,刘维东,等. 基于转录组测序花烟草响应盐胁迫活性氧清除相关基因的挖掘[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(12): 42-53.
- [5] 张永兰,解莉楠. HKT1 在植物耐盐机制中的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(6): 213-224.
- [6] ACOSTA-MOTOS J R, ORTUÑO M F, BERNAL-VICENTE A, et al. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms[J]. *Agronomy*, 2017, 7(1): 18-56.
- [7] 王华笑,刘环,杨国平,等. *Bacillus amyloliquefaciens* YM6 对盐胁迫条件下玉米促生长作用研究[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(12): 45-49.
- [8] 郭伟,薛帅,张哲超,等. 生物技术修复盐碱化草地研究进展[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(7): 200-208.
- [9] 吴欣欣,白天惠,张乐,等. 泌盐盐生植物的泌盐机理研究进展[J]. *植物生理学报*, 2020, 56(12): 2526-2532.
- [10] WILSON H, MYCOCK D, WEIERSBYE I M. The salt glands of *Tamarix usneoides* E. Mey. ex Bunge (South African Salt Cedar) [J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2016, 19(6): 587-595.
- [11] LEI X, TAN B, LIU Z Y, et al. *ThCOL2* improves the salt stress tolerance of *Tamarix hispida* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 1-13.
- [12] 王培龙,刘中原,张腾倩,等. 刚毛怪柳 *ThPP2C* 基因的克隆和表达分析[J]. *植物研究*, 2017, 37(3): 395-401.
- [13] 鲁艳,雷加强,曾凡江,等. NaCl 处理对多枝怪柳(*Tamarix ramosissima*)生长及生理的影响[J]. *中国沙漠*, 2014, 34(6): 1509-1515.
- [14] 刘咏梅,程聪,姜黎,等. NaCl 胁迫下 3 种怪柳属植物生长、盐离子分布和 *SOS1* 基因相对表达量的比较[J]. *植物资源与环境学报*, 2019, 28(1): 1-9.
- [15] 祁云霞,刘永斌,荣威恒. 转录组研究新技术:RNA-Seq 及其应用[J]. *遗传*, 2011, 33(11): 1191-1202.
- [16] 崔凯,吴伟伟,刁其玉. 转录组测序技术的研究和应用进展[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(7): 1-9.
- [17] 张惠媛,刘永伟,杨军峰,等. 小麦转录因子基因 *TaWRKY33* 的耐盐性分析[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(24): 4591-4602.
- [18] 刘慧洁,徐恒,邱文怡,等. bZIP 转录因子在植物生长发育及非生物逆境响应的作用[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(7): 1205-1214.
- [19] 田烨,王爽,路正禹,等. 甜菜应答盐胁迫诱导表达 *bHLH* 基因的鉴定与分析[J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2020, 37(6): 712-717.
- [20] 马彦军,谢军,马瑞,等. NaCl 胁迫下黑果枸杞 *bHLH* 转录因子家族鉴定与生物信息学分析[J]. *中草药*, 2020, 51(20): 5311-5319.
- [21] 潘凌云,马家冀,李建民,等. 植物盐胁迫应答转录因子的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(1): 50-65.
- [22] 李君霞,王春义,丁宇涛,等. MYB 转录因子在植物耐盐基因工程中的应用进展[J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(10): 1910-1920.
- [23] 樊艳,王星斗,黄娟娟,等. 杨树 ERF、MYB 和 NAC 转录因子家族基因耐盐胁迫表达特性分析[J]. *植物生理学报*, 2021, 57(8): 1668-1678.
- [24] 张桐,李智强,伍国强. WRKY 转录因子在植物逆境响应中的作用[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(10): 203-215.
- [25] ZHANG J, SHI S Z, JIANG Y N, et al. Genome-wide investigation of the AP2/ERF superfamily and their expression under salt stress in Chinese willow (*Salix matsudana*) [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11076.
- [26] LI M, CHEN R, JIANG Q Y, et al. GmNAC06, a NAC domain transcription factor enhances salt stress tolerance in soybean [J]. *Plant Molecular Biology*, 2021, 105(3): 333-345.
- [27] WANG Y J, ZHANG Y, FAN C J, et al. Genome-wide analysis of MYB transcription factors and their responses to salt stress in *Casuarina equisetifolia* [J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 328.
- [28] 屈兴红,曾洪学. 金冕草 (*Paspalum notatum*) 盐胁迫转录组差异性分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(11): 3515-3523.
- [29] 练冬梅,赖正锋,姚运法,等. 黄秋葵盐胁迫下的转录组分析[J]. *中国蔬菜*, 2021(6): 42-48.
- [30] WANG Y C, GAO C Q, LIANG Y N, et al. A novel bZIP gene from *Tamarix hispida* mediates physiological responses to salt stress in tobacco plants. [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(3): 222-230.
- [31] 刘亚菲,张帆,梁卫红. 水稻 MAPK 级联的功能和作用机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(12): 1569-1576.
- [32] HAMEL L P, NICOLE M C, SRITUBTIM S, et al. Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families[J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11(4): 192-198.
- [33] 孔祥培,李德全. MAPK 和活性氧参与植物抗病防卫反应的信号转导[J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45(1): 73-79.
- [34] TEIGE M, SCHEIKL E, EULGEM T, et al. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Cell*, 2004, 15(1): 141-152.
- [35] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference ge-



- nome[J]. Nat Biotechnol, 2011,29(7): 644-652.
- [36] CONESA A, GOTZ S, GARCIA-GOMEZ J M, et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. Bioinformatics, 2005,21(18): 3674-3676.
- [37] MAO X, TAO C, OLYARCHUK J G, et al. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary[J]. Bioinformatics, 2005,21(19): 3787-3793.
- [38] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014,15(12): 550.
- [39] 彭洁,邓孟胜,张杰,等. 马铃薯 *StSN2* 的克隆、定位及表达分析[J]. 生物技术通报, 2021,37(5): 11-18.
- [40] THOMAS W, EDITH S, ANDREAS G, et al. 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley[J]. BioMed Central, 2006,7(1): 275-286.
- [41] 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.
- [42] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016,167(2): 313-324.
- [43] YAO W J, WANG S J, ZHOU B, et al. Transgenic poplar overexpressing the endogenous transcription factor *ERF76* gene improves salinity tolerance.[J]. Tree Physiology, 2016,36(7): 896-908.
- [44] HAN D G, ZHANG Z Y, DING H B, et al. Isolation and characterization of *MbWRKY2* gene involved in enhanced drought tolerance in transgenic tobacco[J]. Journal of Plant Interactions, 2018,13(1): 163-172.
- [45] CHEN F, HU Y, VANNOZZI A, et al. The WRKY transcription factor family in model plants and crops[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2018,36(5/6): 311-335.
- [46] DAI Z, WEI M Y, ZHANG B X, et al. VuWRKY, a group I WRKY gene from *Vaccinium uliginosum*, confers tolerance to cold and salt stresses in plant[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2021,147(1): 157-168.
- [47] WANG Y J, JIANG L, CHEN J Q, et al. Overexpression of the alfalfa *WRKY11* gene enhances salt tolerance in soybean[J]. PLoS One, 2018,13(2): e192382.
- [48] DU C, ZHAO P P, ZHANG H R, et al. The *Reaumuria trigyna* transcription factor RWRKY1 confers tolerance to salt stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. Journal of Plant Physiology, 2017, 215: 48-58.
- [49] LIN J H, DANG F F, CHEN Y P, et al. *CaWRKY27* negatively regulates salt and osmotic stress responses in pepper[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019,145: 43-51.
- [50] LI Z Y, CHAO J T, LI X X, et al. Systematic analysis of the bZIP family in tobacco and functional characterization of NtZIP62 involvement in salt stress[J]. Agronomy, 2021,11(1): 148-165.
- [51] ZHAO P, YE M H, WANG R Q, et al. Systematic identification and functional analysis of potato (*Solanum tuberosum* L.) bZIP transcription factors and overexpression of potato bZIP transcription factor StbZIP-65 enhances salt tolerance[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020,161: 155-167.
- [52] HUANG C J, ZHOU J H, JIE Y C, et al. A ramie bZIP transcription factor BnbZIP2 is involved in drought, salt, and heavy metal stress response[J]. DNA and Cell Biology, 2016,35(12): 776-786.
- [53] SHEN X J, GUO X W, GUO X, et al. *PacMYBA*, a sweet cherry R2R3-MYB transcription factor, is a positive regulator of salt stress tolerance and pathogen resistance[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017,112: 302-311.
- [54] WEI Q, ZHANG F, SUN F S, et al. A wheat MYB transcriptional repressor TaMyb1D regulates phenylpropanoid metabolism and enhances tolerance to drought and oxidative stresses in transgenic tobacco plants[J]. Plant Science, 2017,265: 112-123.
- [55] SEO P J, PARK C M. MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. New Phytologist, 2010,186(2): 471-483.
- [56] DONG W, GAO T X, WANG Q, et al. Salinity stress induces epigenetic alterations to the promoter of *MsMYB4* encoding a salt-induced MYB transcription factor[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020,155: 709-715.
- [57] JIANG X Q, LI S C, DING A Q, et al. The novel rose MYB transcription factor RhMYB96 enhances salt tolerance in *Transgenic Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2018,36(3): 406-417.
- [58] JAGODZIK P, TAJDEL-ZIELINSKA M, CIESLA A, et al. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling [J]. Frontiers in Plant Science, 2018,9: 1387.
- [59] KOMIS G, ŠAMAJOVÁ O, OVEČKA M, et al. Cell and developmental biology of plant mitogen-activated protein kinases[J]. Annual Review of Plant Biology, 2018,69(1): 237-265.
- [60] ZHANG M M, SU J B, ZHANG Y, et al. Conveying endogenous and exogenous signals: MAPK cascades in plant growth and defense[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2018,45: 1-10.
- [61] XU J, ZHANG S Q. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development[J]. Trends in Plant Science, 2015,20(1): 56-64.
- [62] MENG X Z, ZHANG S Q. MAPK cascades in plant disease resistance signaling[J]. Annual Review of Phytopathology, 2013,51(1): 245-266.
- [63] 刘璐,刘芸伯,佟佳欣,等. 低温胁迫下牛皮杜鹃 MAPK 级联参与 ABA 信号转导的基因表达分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(17): 59-65.
- [64] 岳宁波,李云洲,李玉龙,等. 番茄 *SlMAPK6* 基因克隆及其表达特性分析[J]. 南方农业学报, 2020,51(7): 1625-1633.
- [65] WANG F Z, JING W, ZHANG W H. The mitogen-activated protein kinase cascade MKK1-MPK4 mediates salt signaling in rice [J]. Plant Science, 2014,227: 181-189.

- [66] MEHLMER N, WURZINGER B, STAEL S, et al. The  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in Arabidopsis [J]. The Plant Journal, 2010, 63(3): 484-498.
- [67] 王 畅, 傅竞也, 湛琴琴, 等. MAPK 级联在玉米抗病反应和植保素代谢调控中的作用分析[J]. 玉米科学, 2018, 26(6): 39-44.
- [68] 黄荣峰, 徐通达. 生长素通过 MAPK 介导的超长链脂肪酸合成调控侧根发育[J]. 植物学报, 2021, 56(1): 6-9.
- [69] 单鸿轩, 付 畅. 逆境胁迫下植物 MAPK 级联反应途径研究新进展[J]. 核农学报, 2017, 31(4): 680-688.
- [70] 李悦鹏, 张晓兰, 于 雷, 等. MAPK 级联途径激酶结构特点及其信号转导途径在园艺作物逆境中的作用[J]. 植物生理学报, 2018, 54(8): 1305-1315.
- [71] GONG Z, XIONG L, SHI H, et al. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency [J]. Science China Life Sciences, 2020, 63(5): 635-674.
- [72] 苏 杰, 郭荣起, 高 阳, 等. *VHA-c2&c4* 双基因沉默株系拟南芥对 NaCl 与 ABA 的响应[J]. 生物技术通报, 2020, 36(7): 48-54.
- [73] VISHWAKARMA K, UPADHYAY N, KUMAR N, et al. Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 161-173.

(责任编辑:陈海霞)