

付涛, 宋帅杰, 李文, 等. 樱花响应水胁迫的转录组分析及相关耐涝基因的挖掘[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(7): 1456-1470.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.07.017

樱花响应水胁迫的转录组分析及相关耐涝基因的挖掘

付涛¹, 宋帅杰², 李文¹, 刘峰¹, 何月秋¹, 丰凯¹, 刘亮¹, 王志龙¹

(1. 宁波城市职业技术学院, 浙江 宁波 315100; 2. 汇绿园林建设发展有限公司, 浙江 宁波 315100)

摘要: 本研究旨在利用转录组分析耐涝种质沼生矮樱与敏涝种质华中樱在水涝胁迫下产生的差异表达基因和代谢路径, 挖掘相关耐涝基因, 为樱花耐涝品种及砧木的选育提供理论依据。对经历长时间水胁迫处理的材料——华中樱(每3 d浇1次水, HZ)、华中樱(每天浇1次水, XP)和沼生矮樱(每3 d浇1次水, ZS)进行叶片转录组测序, 进而对差异表达基因进行功能注释、富集分析及耐涝基因挖掘, 并利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)对筛选到的基因进行表达验证。结果表明, 通过基因本体论数据库(GO)、京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)、蛋白质直系同源簇数据库(COG)、非冗余蛋白数据库(NR)、瑞士蛋白数据库(Swiss-Prot)、蛋白家族数据库(Pfam)六大功能数据库的联合注释, 共鉴定出31 891个已知功能基因。差异表达基因分析结果显示, ZS与HZ比较组、XP与HZ比较组及ZS与XP比较组分别识别到3 670个、2 248个和5 423个差异表达基因。功能富集分析结果显示, 在ZS与HZ比较组中, 差异表达基因主要显著富集于氨基酸代谢和降解、半乳糖代谢、黄酮类生物合成、硫代谢、萜类物质合成等途径; 在XP与HZ比较组中, 差异表达基因主要显著富集于氨基酸代谢和降解、淀粉和蔗糖代谢、甘油酯代谢、脂肪酸降解、糖酵解/糖异生、柠檬酸循环、半乳糖代谢、萜类物质合成、抗坏血酸和醛酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢等途径; 在ZS与XP比较组中, 差异表达基因主要显著富集在半乳糖代谢、类胡萝卜素生物合成、二萜生物合成、氨基酸代谢与降解、甘油酯代谢、脂肪酸降解、黄酮类生物合成、糖酵解/糖异生、抗坏血酸和醛酸代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、淀粉和蔗糖代谢等途径。通过对差异表达基因的分析, 在XP与ZS比较组中筛选出与耐涝相关差异表达基因31个, 在HZ与ZS比较组中筛选出与耐涝相关差异表达基因5个, 在HZ与XP比较组中筛选出与耐涝相关差异表达基因6个。qRT-PCR验证结果表明, 10个与耐涝相关的差异表达基因的表达趋势与转录组测序结果趋势一致。本研究通过长时间水涝胁迫试验, 采用转录组分析得出樱花对长时间水涝胁迫的耐受能力主要涉及淀粉和蔗糖代谢、糖酵解/糖异生、黄酮生物合成、脂肪酸降解、抗坏血酸和醛酸代谢等途径, 其中涉及的耐涝基因主要有*ERF*、*SUS*、*RAMY*和*EXP*等4类, 这些基因资源可为后续通过基因工程或分子育种手段培育樱花耐涝品种及砧木提供核心基因资源。

关键词: 樱花; 水涝胁迫; 转录组测序; 富集分析; 差异表达基因; 耐涝基因

中图分类号: S685.99; Q786

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2026)07-1456-15

Transcriptome analysis and excavation of related waterlogging tolerance genes of cherry blossom response to water stress

FU Tao¹, SONG Shuaijie², LI Wen¹, LIU Feng¹, HE Yueqiu¹, FENG Kai¹, LIU Liang¹, WANG Zhilong¹

(1. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo 315100, China; 2. Huili Garden Construction and Development Co., Ltd., Ningbo 315100, China)

收稿日期: 2025-06-06

基金项目: 宁波市“科创甬江 2035”重点技术研发计划项目(2025Z096);

高校国内访问工程师校企合作项目(FG2024302)

作者简介: 付涛(1988-), 男, 安徽定远人, 硕士, 高级实验师, 主要从事植物生理生化与分子生物学研究。(E-mail) futao@nbcc.cn

通讯作者: 王志龙, (E-mail) wangzhil01@163.com

Abstract: This study aims to utilize transcriptome analysis to investigate the differentially expressed genes and metabolic pathways generated under waterlogging stress in the flooding-tolerant germplasm *Prunus jingnensis* and the flooding-sensitive germplasm *Prunus conradinae*, and to explore related flooding-tolerant genes, pro-

viding a theoretical basis for the breeding of flooding-tolerant varieties and rootstocks. Leaf transcriptome sequencing analysis was conducted for materials subjected to prolonged water stress treatment, *Prunus conradinae* watered every three days was denoted as HZ, *Prunus conradinae* watered every day was denoted as XP, and *Prunus jingningensis* watered every three days was denoted as ZS. Subsequently, functional annotation, enrichment analysis, and flooding-tolerant gene mining were conducted on differentially expressed genes, and the selected genes were verified for expression using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The results showed that a total of 31 891 known functional genes were identified through joint annotation of six functional databases: Gene Ontology Database (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Database (KEGG), Clusters of Orthologous Groups Database (COG), Non-redundant Protein Database (NR), Swiss Protein Database (Swiss-Prot), and Protein Family Databases (Pfam). Differential gene expression analysis revealed that 3 670, 2 248, and 5 423 differentially expressed genes were identified in the ZS vs. HZ, XP vs. HZ, and ZS vs. XP comparison groups, respectively. Functional enrichment analysis indicated that in the ZS vs. HZ comparison group, differentially expressed genes were significantly enriched in pathways such as amino acid metabolism and degradation, galactose metabolism, flavonoid biosynthesis, sulfur metabolism, and terpenoids synthesis; in the XP vs. HZ comparison group, they were significantly enriched in pathways such as amino acid metabolism and degradation, starch and sucrose metabolism, glyceride metabolism, fatty acid degradation, glycolysis/gluconeogenesis, citric acid cycle, galactose metabolism, terpenoids synthesis, ascorbic acid and aldehyde acid metabolism, and glyoxylic acid and dicarboxylic acid metabolism; in the ZS vs. XP comparison group, they were significantly enriched in pathways such as galactose metabolism, carotenoids biosynthesis, diterpene biosynthesis, amino acid metabolism and degradation, glyceride metabolism, fatty acid degradation, flavonoid biosynthesis, glycolysis/gluconeogenesis, ascorbic acid and aldehyde acid metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, and starch and sucrose metabolism. Through the analysis of differentially expressed genes, 31 genes related to waterlogging tolerance were identified in the XP and ZS comparison group, five genes in the HZ and ZS comparison group, and six genes in the HZ and XP comparison group were also identified. qRT-PCR verification results indicated that the expression trends of ten differentially expressed genes related to waterlogging tolerance were consistent with the transcriptome sequencing results. Through prolonged waterlogging stress experiments and transcriptome analysis, this study concluded that the tolerance of cherry blossoms to prolonged waterlogging stress mainly involved pathways such as starch and sucrose metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, flavonoid biosynthesis, fatty acid degradation, ascorbic acid and aldehyde acid metabolism. The waterlogging-tolerant genes primarily involved four types: *ERF*, *SUS*, *RAMY*, and *EXP*. These gene resources can provide core gene resources and theoretical support for the subsequent cultivation of waterlogging-tolerant varieties and rootstocks of cherry blossoms through genetic engineering or molecular breeding methods.

Key words: cherry blossom; waterlogging stress; transcriptome sequencing; enrichment analysis; differentially expressed gene; waterlogging tolerance gene

全球的樱花品种约 150 种,分布于中国的约有 50 种,中国是樱花种植与消费的主要国家。然而,国内栽培品种多引自日本,南方地区常用砧木草樱,虽然其繁殖难度低、育苗易成活,但耐涝性与抗病性较差,加之南方多雨易涝,常导致樱花生长受阻甚至死亡。因此,选育适宜中国南方地区的耐涝樱花品种或砧木尤为迫切。

水分是植物生长的关键影响因子,过量则引发涝害。涝胁迫造成土壤缺氧,抑制根系呼吸,损伤细胞膜结构,降低水分与矿质吸收能力,最终影响植株正常生长^[1]。近年来,已鉴定出多个植物耐涝基因中的关键基因^[2-3],如转录因子 SUB1、HRE 及 CIPK,它们被证实在水稻和拟南芥耐涝中起重要作

用^[4-5]。此外, α -淀粉酶(*RAMY*)与蔗糖合成酶(*SUS*)基因也参与耐涝调控^[6];乙醇脱氢酶(*ADH*)和丙酮酸脱羧酶(*PDC*)基因的过量表达有助于提升作物的耐涝性^[7];而涝胁迫下扩张蛋白基因(*EXP*)在地上部表达受到抑制,可延缓生长、节约能耗,从而提高耐涝能力^[8]。

目前,转录组测序已成为研究植物耐涝胁迫机制的有力工具^[9]。Kumutha 等^[10]发现在木豆中,涝害胁迫由还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)氧化酶介导,引发了活性氧(ROS)的增加;Klumb 等^[11]研究发现鳄梨经历 48 h 水涝胁迫后,与脂类、糖和四吡咯次生代谢相关的基因显著上调表达,与光呼吸、硝酸盐和细胞壁代谢相关的基因显

著下调表达;宋春晖等^[12]利用特异性位点扩增片段测序(SLAF-seq)技术筛选苹果砧木耐涝基因,成功筛选出耐涝基因乙醇脱氢酶基因(*ADH1*);刘慧春等^[13-14]利用基因克隆及转基因技术,证实转脱水素基因 *PsDHN1* 和 *PsGRP* 的拟南芥植株的耐涝能力要优于野生型植株,研究结果为进一步开展牡丹耐涝性的分子育种提供了参考依据;Lü 等^[15]的研究结果表明,过表达 *ERF2.4* 可增强拟南芥的水涝抗性;Xu 等^[16]在拟南芥上的研究表明,过量表达 *RAP2.2* 有助于提高在水涝逆境下拟南芥的存活率;研究结果表明,SnRK1 蛋白在植物耐涝性中起关键作用^[17-18]。Yu 等^[17]发现水稻 *SnRK1A* 基因调控种子萌发与幼苗生长;而丁晓东等^[18]证实,超表达野生大豆 *GsSnRK1.1* 可通过上调 *PDC1* 和 *ADH1* 基因,显著增强拟南芥的淹水胁迫抗性。此外,王倩^[19]指出,沂蒙山樱桃的耐涝性可能由 *PsERF* 而非 *PsCIPK* 基因调控。

前期野外调查发现,沼生矮樱(*Prunus jingnensis*)能在含水量较高的沼泽地等特殊生境条件下生存,其抗涝性能远强于一般樱花种质,但该物种植株矮小、长势慢、花量小,不适合作为观赏和砧木使用。因此,本研究拟利用耐涝种质沼生矮樱与敏涝种质华中樱(*Prunus conradinae*)为研究对象,通过对水涝胁迫的转录组分析挖掘相关耐涝基因,为后续樱花分子育种与砧木选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理方法

2023 年 5-6 月于宁波城市职业技术学院樱花苗圃基地采集沼生矮樱与华中樱种子,采集后的种子经清洗、晾干、完成后熟等步骤后,2023 年 8 月 10 日将种子与湿河沙(体积比 1:1)混合置于 4℃ 冰箱冷藏 3 个月,2023 年 11 月初播种,2024 年待小苗长出 5 片真叶后移栽到容器中进行种植,试验分为 3 组,第 1 组为华中樱(编号 HZ1、HZ2 和 HZ3),记为 HZ,每 3 d 浇 1 次水;第 2 组为华中樱(编号 XP1、XP2 和 XP3),记为 XP,每 1 d 浇 1 次水;第 3 组为沼生矮樱(编号 ZS1、ZS2 和 ZS3),记为 ZS,每 3 d 浇 1 次水。每组各 3 个重复,每次浇水以容器底部快速滴水为浇透标准。试验地点为宁波城市职业技术学院校内基地,试验时间为 2024 年 4 月 1 日至 2024 年 5 月 1 日,试验结束后采集健康、无病害叶

片迅速放入液氮中速冻,随后放入 -80℃ 冰箱保存,用于后续试验。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取、文库构建及测序 总 RNA 提取采用 Trizol 法。经脱氧核糖核酸酶(*DNase*)处理后,利用磁珠富集 mRNA,随后将 mRNA 片段化,通过反转录合成第一链 cDNA,再合成双链 cDNA。之后经 PCR 扩增,完成文库构建。最终,用 9 个质检合格的 cDNA 文库进行测序。

1.2.2 原始数据的处理与拼接 原始测序数据经过去除接头、低质量序列、含不确定碱基的读段以及过短序列,获得高质量清洁数据(Clean data)。将该数据比对至 *Prunus yedoensis* var. *nudiflor* 的参考基因组,得到比对数据(Mapped data)用于后续分析。最后使用 StringTie 软件将重叠的读段合并为超级读段(Super-reads),再比对至参考基因组并构建序列组装图谱,最终选取高覆盖度的路径完成转录本组装。

1.2.3 基因的功能注释 将组装得到的转录本与基因本体论数据库(GO)、京都基因与基因组百科全书数据库(KEGG)、蛋白质直系同源簇数据库(COG)、非冗余蛋白数据库(NR)、瑞士蛋白数据库(Swiss-Prot)、蛋白家族数据库(Pfam)进行比对,以相似度最高的蛋白质序列作为对应非冗余基因的功能注释依据。

1.2.4 差异表达基因分析与富集分析 基因表达量采用每千个碱基的转录本每百万映射读数的片段数(FPKM)进行量化。以 $\log_2 FC$ (倍数变化值)且 $P \leq 0.05$ 作为差异表达基因筛选的标准,同时要求错误发现率(FDR) < 0.01。使用 Benjamini-Hochberg(BH)法对 P 值进行校正,并以 FDR 作为最终判定指标。

1.2.4.1 GO 富集分析 GO 功能富集分析通过 Goatools 软件完成,采用 Fisher 进行精确检验,并使用 BH 法校正 P 值。当 $FDR < 0.05$ 时,判定该 GO 条目为显著富集。

1.2.4.2 KEGG 富集分析 KEGG 通路富集分析通过 R 脚本完成,统计方法与 GO 富集一致(使用 Fisher 进行精确检验,使用 BH 法校正)。FDR < 0.05 的通路视为显著富集。

1.2.5 耐涝基因挖掘与实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析 为验证转录组数据,随机选取 10 个耐

涝相关差异基因进行 qRT-PCR 分析。试验使用 Primer 5 设计并合成特异性引物(表 1),以 β -actin 作为内参基因。首先利用 HiScript Q RT SuperMix 试剂盒(诺唯赞生物科技有限公司产品)合成 cDNA,随后在 QuantStudio 实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增。反应体系为 20.0 μ L,包含 ChamQ SYBR Color 预混液、cDNA 模板及特异性引物。扩增程序包括 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;每个循环包括 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个扩增循环;循环结束后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保温备用。所有样本均设 3 个技术重复,基因相对表达水平通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称	引物名称	引物序列(5'→3')	长度 (bp)
<i>Pyn_27359</i>	FT-27359F	GCGATGTCGGGAAGTTGAAC	120
	FT-27359R	CAGAACCGCCACTCGTGCTA	
<i>Pyn_31179</i>	FT-31179F	TCTATGGAGGAGGTGATGCC	274
	FT-31179R	AAATGTTGCTGTGGAGGGTT	
<i>Pyn_27819</i>	FT-27819F	CGTGTGTGGCTGGGAACCTT	178
	FT-27819R	CGATCTCGGCCTTGAATGA	
<i>Pyn_37967</i>	FT-37967F	CACCACCACAGAAAGAAGAA	114
	FT-37967R	CGTAAATGCGAGGGAACAAT	
<i>Pyn_07353</i>	FT-07353F	CTTCCTTATGGGTTTGTITT	164
	FT-07353R	CCCTGACTGTAGAGGTTTCC	
<i>Pyn_39001</i>	FT-39001F	AAGCCAAACAGATGCTCAAA	132
	FT-39001R	TAACACGAACGTATTCCCAA	
<i>Pyn_06024</i>	FT-06024F	TGTGGACTTCCAACATTTCGC	102
	FT-06024R	AGCTTGATCACCATGATACG	
<i>Pyn_05459</i>	FT-05459F	TTTCATCCATGTGCTCCTCT	104
	FT-05459R	ACCATTTGCCTGACTTCTTC	
<i>Pyn_05270</i>	FT-05270F	CTGGCTTATCTCCTTCTTTT	132
	FT-05270R	TTCCCTTTCCTAGTGCTCTC	
β -actin	Actin1	CAGTGGTCGTACAACCTGGTAT	200
	Actin2	AGGTAGCTCATAGCTCTTCTC	

2 结果与分析

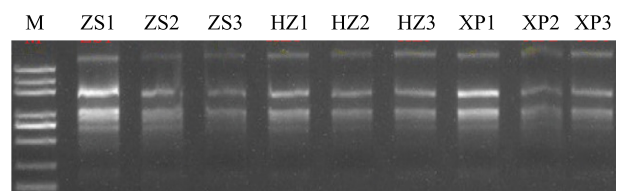
2.1 转录组测序质量、序列比对与组装分析

对 9 个样品提取的 RNA 进行质量检测,结果显

示所有样品的波长为 260 nm 处的光密度与波长为 280 nm 处的光密度比值(OD_{260}/OD_{280})均为 1.8~2.1,且所有样品的 RNA 条带均清晰完整、无明显拖带与降解(图 1),表明 RNA 纯度符合标准,满足后续试验要求。

通过高通量测序,共获得 60.59 Gb 的高质量 Clean data,每个样品数据量均不低于 6.02 Gb。测序错误率为 0.025%~0.026%,Q20(在整个测序数据集中,质量值大于或等于 20 的碱基数量占总碱基数的百分比)和 Q30(在整个测序数据集中,质量值大于或等于 30 的碱基数量占总碱基数的百分比)分别 $\geq$ 97.72%和 93.11%,G+C 含量为 44.81%~45.80%(表 2)。主成分(PCA)分析结果(图 2)显示生物学重复样本间变异较小,重复性良好,表明测序质量及试验处理过程具有较高一致性,数据适用于后续分析。

各样品 Clean reads 与参考基因组的比对分析结果(表 3)表明,覆盖率为 75.77%~78.88%,其中唯一覆盖率为 67.54%~70.18%,多重覆盖率为 7.89%~9.30%,表明测序数据与参考基因组匹配效果理想。



M:marker,对应的条带大小从上往下依次为 5 000 bp、3 000 bp、2 000 bp、1 000 bp、750 bp、500 bp、250 bp、100 bp;ZS1、ZS2 和 ZS3 为沼生矮樱每 3 d 浇 1 次水的 3 个重复处理;HZ1、HZ2 和 HZ3 为华中樱每 3 d 浇 1 次水的 3 个重复处理;XP1、XP2 和 XP3 为华中樱每天浇 1 次水的 3 个重复处理。

图 1 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 RNA agarose gel electrophoresis results

基于 Mapped 比对序列(reads)进行转录本组装,共获得 82 186 个转录本。其长度分布情况为,位于 0~200 bp 区间的转录本有 1 237 个,201~400 bp 区间 13 021 个,401~600 bp 区间 9 543 个,601~800 bp 区间 8 032 个,801~1 000 bp 区间 7 147 个,1 001~1 200 bp 区间 6 610 个,1 201~1 400 bp 区间 6 111 个,1 401~1 600 bp 区间 5 565 个,1 601~1 800 bp 区间 4 502 个,大于 1 800 bp 的转录本数量为 20 418 个(图 3)。

表 2 转录组的数据质量信息

Table 2 Data quality of transcriptome

样品	过滤数据(条)	过滤后碱基(Gb)	错误率(%)	Q20(%)	Q30(%)	G+C(%)
XP1	44 679 608	6.60	0.026	98.03	93.85	45.74
XP2	48 958 824	7.27	0.025	97.98	93.76	45.38
XP3	42 195 948	6.25	0.025	97.95	93.64	44.81
ZS1	44 938 400	6.66	0.025	98.11	94.04	45.65
ZS2	42 345 216	6.29	0.026	97.90	93.54	45.36
ZS3	40 518 094	6.02	0.025	98.14	94.13	45.37
HZ1	57 900 642	8.50	0.025	98.13	94.10	45.79
HZ2	43 877 432	6.46	0.026	97.72	93.11	45.76
HZ3	44 218 300	6.53	0.026	97.92	93.61	45.80

Q20:在整个测序数据集中,质量值大于或等于 20 的碱基数量占总碱基数的百分比;Q30:在整个测序数据集中,质量值大于或等于 30 的碱基数量占总碱基数的百分比。

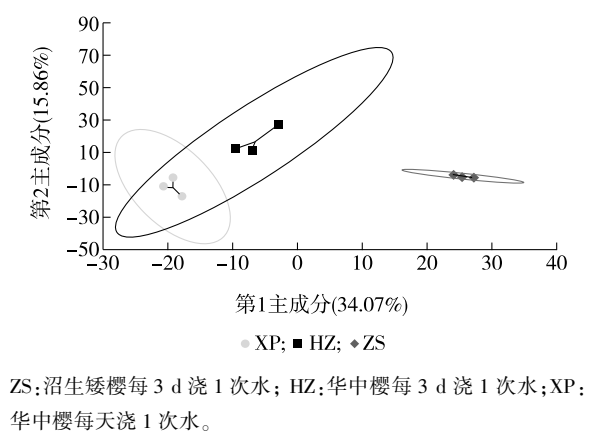


图 2 转录组主成分分析

Fig.2 Principal component analysis chart of transcriptome

表 3 转录组的数据比对信息

Table 3 The data alignment information of transcriptome

样品	总读数(条)	覆盖率(%)	多个覆盖率(%)	唯一覆盖率(%)
XP1	44 679 608	75.91	8.37	67.54
XP2	48 958 824	75.77	7.89	67.89
XP3	42 195 948	77.92	8.09	69.83
ZS1	44 938 400	78.55	8.90	69.65
ZS2	42 345 216	76.14	7.92	68.22
ZS3	40 518 094	78.88	8.70	70.18
HZ1	57 900 642	78.72	9.30	69.41
HZ2	43 877 432	78.48	8.73	69.76
HZ3	44 218 300	76.16	8.32	67.85

ZS1、ZS2 和 ZS3 表示沼生矮樱每 3 d 浇 1 次水的 3 个重复处理;HZ1、HZ2 和 HZ3 表示华中樱每 3 d 浇 1 次水的 3 个重复处理;XP1、XP2 和 XP3 表示华中樱每天浇 1 次水的 3 个重复处理。

2.2 基因的功能注释分析

基于基因本体论数据库(GO)、京都基因与基因

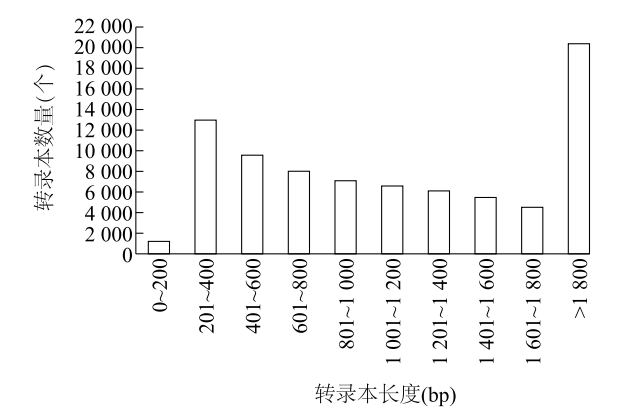


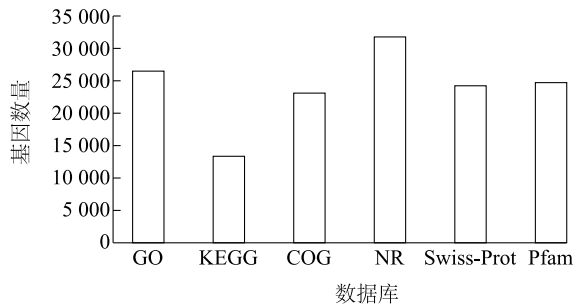
图 3 转录组长度分布

Fig.3 Histogram of transcriptome length distribution

组百科全书数据库(KEGG)、蛋白质直系同源簇数据库(COG)、非冗余蛋白数据库(NR)、瑞士蛋白数据库(Swiss-Prot)、蛋白家族数据库(Pfam)的功能注释结果,共有31 891个基因获得已知功能注释(图4)。其中,NR 数据库的注释覆盖度最高(99.89%),达31 855个基因,其次为 GO(26 548个,83.25%)、Pfam (24 763 个,77.65%)、Swiss-Prot (24 267 个,76.09%)、COG (23 221 个,72.81%) 和 KEGG(13 392 个,41.99%)。

2.3 差异表达基因分析与富集分析

2.3.1 差异表达基因分析 为鉴定差异表达基因,按照 $|\log_2 FC| \geq 2$ 、 $P \leq 0.05$ 且 $FDR < 0.01$ 的标准,对 ZS 与 HZ、XP 与 HZ 以及 ZS 与 XP 3 个比较组进行了分析。分析结果(图5)显示,ZS 与 HZ 比较组共筛选出3 670个差异表达基因,其中 ZS 组相较于 HZ 组有1 759个基因表达上调,1 911个基因表达下调。在 XP 与 HZ 的比较组中,共发现 2 248 个差异表达

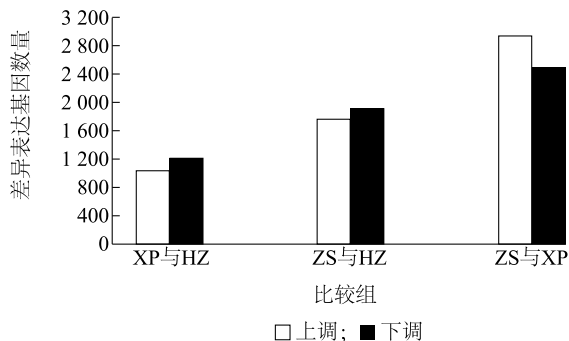


GO:基因本体论数据库;KEGG:京都基因与基因组百科全书数据库;COG:蛋白质直系同源簇数据库;NR:非冗余蛋白数据库;Swiss-Prot:瑞士蛋白数据库;Pfam:蛋白家族数据库。

图4 不同数据库功能注释统计结果

Fig.4 Statistics chart of different database function notes

基因,包含1 036个上调基因和1 212个下调基因。差异表达基因数量最多的是 ZS 与 XP 组,达到 5 423个,其中 ZS 组相对于 XP 组有2 939个基因上调,2 484个基因下调(图5)。



ZS:沼生矮樱每3 d浇1次水;HZ:华中樱每3 d浇1次水;XP:华中樱每天浇1次水。

图5 差异表达基因分析

Fig.5 Statistical chart of differentially expressed genes

2.3.2 差异表达基因的 GO 富集分析 对 ZS 与 HZ 比较组、XP 与 HZ 比较组和 XP 与 ZS 比较组差异表达基因进行 GO 富集分析,分别统计显著性最高的前 20 项进行 GO 富集分析。结果(表4)表明,ZS 与 HZ 比较组的显著富集条目被注释到细胞组分(1个)、分子功能(14个)和生物过程(5个)类别,其中相关氧化酶活性和糖类代谢过程富集与耐涝密切相关。在 XP 与 HZ 比较组,条目被注释到细胞组分(3个)、分子功能(8个)和生物过程(9个),其中糖类代谢过程及相关酶活性富集与耐涝密切相关。在 ZS 与 XP 组,条目被注释到分子功能(9个)与生物

过程(11个),其中细胞壁生物发生、糖类代谢过程及相关酶活性富集与耐涝密切相关。

2.3.3 差异表达基因的 KEGG 富集分析 KEGG 富集分析针对 ZS 与 HZ 比较组、XP 与 HZ 比较组和 XP 与 ZS 比较组进行差异表达基因分析,并选取显著性最高的前 20 个条目予以展示。功能富集分析结果(表5)显示,在 ZS 与 HZ 比较组中,差异表达基因主要显著富集于氨基酸代谢和降解、半乳糖代谢、黄酮类生物合成、硫代谢、萜类物质合成等途径;在 XP 与 HZ 比较组中,差异表达基因主要显著富集于氨基酸代谢和降解、淀粉和蔗糖代谢、甘油酯代谢、脂肪酸降解、糖酵解/糖异生、柠檬酸循环、半乳糖代谢、萜类物质合成、抗坏血酸和醛酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢等途径;在 ZS 与 XP 比较组中,差异表达基因主要显著富集在半乳糖代谢、类胡萝卜素生物合成、二萜生物合成、氨基酸代谢与降解、甘油酯代谢、脂肪酸降解、黄酮类生物合成、糖酵解/糖异生、抗坏血酸和醛酸代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、淀粉和蔗糖代谢等途径。在 ZS 与 HZ 比较组中,有 19 个通路被显著富集在代谢方面,有 1 个被显著富集在环境信息处理方面;在 XP 与 HZ 比较组中,有 19 个通路被显著富集在代谢方面,有 1 个被显著富集在细胞过程方面;在 ZS 与 XP 比较组中,有 19 个通路被显著富集在代谢方面,有 1 个被显著富集在遗传信息处理方面。

2.4 耐涝基因筛选与 qRT-PCR 分析

2.4.1 耐涝基因的筛选结果 转录组分析结果(表6)表明,耐涝性差异主要体现于 XP 组与 ZS(对照组)的比较组中。XP 与 ZS 比较组筛选出最多的耐涝相关差异表达基因(31个),显著富集于 *HRE*、*SUS*、*ADH* 和 *EXP* 等关键基因家族。相比之下,HZ 与 ZS 比较组的差异基因数量较少(5个),主要为 *HRE* 和 *CIPK* 基因。而 HZ 与 XP 的比较组则发现了 6 个差异基因,涉及 *HRE*、*RAMY*、*SUS* 和 *EXP* 家族。

对耐涝差异表达基因进行 KEGG 分析,其中有 11 个功能基因(*Pyn_39003*、*Pyn_39001*、*Pyn_04762*、*Pyn_06023*、*Pyn_06024*、*Pyn_04600*、*Pyn_04599*、*Pyn_28734*、*Pyn_33356*、*Pyn_33355* 和 *Pyn_14669*)显著富集在淀粉和蔗糖代谢途径中。有 2 个功能基因(*Pyn_37711*,即 *ADH5*; *Pyn_37967*,即 *ADH1*)同时显著富集在脂肪酸降解、酪氨酸代谢、糖酵解/糖异生途径中,此外,基因 *ADH1* 也显著富集于 α -亚麻酸代谢。

表 4 差异表达基因的 GO 富集分析

Table 4 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

比较组	编号	类型分类	功能	注释基因数 (个)	显著基因数 (个)	显著性 水平统计值
ZS 与 HZ	GO:0005811	细胞组分	脂肪滴	39	11	5.41×10^{-6}
	GO:0016758	分子功能	转移己糖基类转移酶活性	824	82	1.92×10^{-6}
	GO:0005506	分子功能	铁离子结合	678	70	2.20×10^{-6}
	GO:0004497	分子功能	单加氧酶活性	588	62	2.40×10^{-6}
	GO:0046906	分子功能	四吡咯结合	787	80	2.45×10^{-6}
	GO:0016757	分子功能	转移糖基类转移酶活性	1 300	117	2.96×10^{-6}
	GO:0020037	分子功能	血红素结合	753	76	3.27×10^{-6}
	GO:0046527	分子功能	葡萄糖转移酶活性	328	40	3.90×10^{-6}
	GO:0048037	分子功能	辅因子结合	1 862	160	4.09×10^{-6}
	GO:0016705	分子功能	氧化还原酶活性(作用于成对供体,分子氧掺入或还原)	759	73	5.40×10^{-6}
	GO:0016491	分子功能	氧化还原酶活性	3 100	239	5.67×10^{-6}
	GO:0010410	生物过程	半纤维素代谢过程	108	19	6.40×10^{-6}
	GO:0003824	分子功能	催化活性	18 906	1 188	9.62×10^{-6}
	GO:0005975	生物过程	碳水化合物代谢过程	1 695	136	1.18×10^{-5}
	GO:0010383	生物过程	细胞壁多糖代谢过程	133	21	1.23×10^{-5}
	GO:0044262	生物过程	细胞内碳水化合物代谢过程	542	55	1.50×10^{-5}
	GO:0009063	生物过程	细胞内氨基酸分解代谢过程	115	19	1.63×10^{-5}
	GO:0097599	分子功能	木聚糖酶活性	17	7	1.79×10^{-5}
	GO:0008236	分子功能	丝氨酸型肽酶活性	432	46	2.58×10^{-5}
	GO:0017171	分子功能	丝氨酸水解酶活性	432	46	2.58×10^{-5}
XP 与 HZ	GO:0044042	生物过程	葡聚糖代谢过程	323	26	5.16×10^{-7}
	GO:0044262	生物过程	细胞碳水化合物代谢过程	542	38	7.35×10^{-7}
	GO:0044436	细胞组分	类囊体部分	288	23	8.51×10^{-7}
	GO:0046527	分子功能	葡萄糖转移酶活性	328	30	6.86×10^{-7}
	GO:0035251	分子功能	UDP(二磷酸尿苷)葡萄糖基转移酶活性	288	25	8.51×10^{-7}
	GO:0006073	生物过程	细胞内葡聚糖代谢过程	317	26	1.28×10^{-6}
	GO:0044264	生物过程	细胞多糖代谢过程	386	30	1.32×10^{-6}
	GO:0005975	生物过程	碳水化合物代谢过程	1 695	81	2.42×10^{-6}
	GO:0005976	生物过程	多糖代谢过程	564	34	2.54×10^{-6}
	GO:0044434	细胞组分	叶绿体部分	672	42	1.72×10^{-6}
	GO:0044435	细胞组分	质体部分	685	43	1.96×10^{-6}
	GO:0016758	分子功能	转移己糖基类转移酶活性	824	46	1.78×10^{-6}
	GO:0008194	分子功能	UDP 糖基转移酶活性	554	35	2.18×10^{-6}
	GO:0004553	分子功能	水解 O-糖基化合物水解酶活性	839	46	2.42×10^{-6}
	GO:0015114	分子功能	磷酸离子跨膜转运蛋白活性	11	5	3.55×10^{-6}
	GO:0006820	生物过程	阴离子转运	274	21	4.80×10^{-6}
	GO:0016798	分子功能	作用于糖基键的水解酶活性	904	46	5.22×10^{-6}
	GO:0042594	生物过程	对饥饿的反应	68	10	5.93×10^{-6}
	GO:0016757	分子功能	转移糖基类转移酶活性	1 300	59	9.01×10^{-6}
	GO:0016036	生物过程	细胞内对磷酸盐饥饿的反应	32	7	1.02×10^{-5}
ZS 与 XP	GO:0015893	生物过程	药物转运	23	13	5.16×10^{-7}
	GO:0016054	生物过程	有机酸分解代谢过程	165	41	1.43×10^{-6}

续表4 Continued4

比较组	编号	类型分类	功能	注释基因数 (个)	显著基因数 (个)	显著性 水平统计值
	GO:0046395	生物过程	羧酸分解代谢过程	165	41	1.43×10^{-6}
	GO:0009833	生物过程	植物类型初级细胞壁生物发生	57	19	1.67×10^{-6}
	GO:0044282	生物过程	小分子分解代谢过程	247	55	1.98×10^{-6}
	GO:0044262	生物过程	细胞碳水化合物代谢过程	542	103	2.56×10^{-6}
	GO:0044264	生物过程	细胞多糖代谢过程	386	72	3.49×10^{-6}
	GO:0044042	生物过程	葡聚糖代谢过程	323	60	4.05×10^{-6}
	GO:0016157	分子功能	蔗糖合成酶活性	28	15	9.68×10^{-7}
	GO:0035251	分子功能	UDP 葡萄糖基转移酶活性	288	72	1.70×10^{-6}
	GO:0046527	分子功能	葡糖转移酶活性	328	84	1.95×10^{-6}
	GO:0008194	分子功能	UDP 糖基转移酶活性	554	108	2.27×10^{-6}
	GO:0016758	分子功能	转移己糖基类转移酶活性	824	151	3.51×10^{-6}
	GO:0080043	分子功能	槲皮素 3-O-葡萄糖基转移酶活性	99	26	3.90×10^{-6}
	GO:0080044	分子功能	槲皮素 7-O-葡萄糖基转移酶活性	99	26	3.90×10^{-6}
	GO:0016757	分子功能	转移糖基类转移酶活性	1 300	201	4.10×10^{-6}
	GO:0004497	分子功能	单加氧酶活性	588	97	4.57×10^{-6}
	GO:0006073	生物过程	细胞内葡聚糖代谢过程	317	60	5.21×10^{-6}
	GO:0005975	生物过程	碳水化合物代谢过程	1 695	240	5.38×10^{-6}
	GO:0044242	生物过程	细胞脂质分解代谢过程	79	22	7.59×10^{-6}

ZS 表示沼生矮樱每 3 d 浇 1 次水; HZ 表示华中樱每 3 d 浇 1 次水; XP 表示华中樱每天浇 1 次水。显著性水平统计值 <0.05 为显著。

表 5 差异表达基因的 KEGG 富集分析

Table 5 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

比较组	通路 ID	分类	功能描述	注释基因数 (个)	显著基因数 (个)	显著性水平 统计值
ZS 与 HZ	map00250	代谢	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	87	16	4.59×10^{-5}
	map00052	代谢	半乳糖代谢	103	17	1.11×10^{-4}
	map00960	代谢	托烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成	41	8	2.47×10^{-3}
	map00260	代谢	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	141	17	4.16×10^{-3}
	map00350	代谢	酪氨酸代谢	110	14	5.48×10^{-3}
	map00410	代谢	β -丙氨酸代谢	72	10	9.71×10^{-3}
	map00670	代谢	一个叶酸碳池	42	7	1.10×10^{-2}
	map00943	代谢	异黄酮生物合成	30	6	7.46×10^{-3}
	map00280	代谢	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	71	10	8.81×10^{-3}
	map00920	代谢	硫代谢	44	7	1.41×10^{-2}
	map00360	代谢	苯丙氨酸代谢	76	10	1.40×10^{-2}
	map00904	代谢	二萜生物合成	56	8	1.68×10^{-2}
	map00909	代谢	倍半萜和三萜生物合成	61	8	2.69×10^{-2}
	map00966	代谢	硫代葡萄糖苷生物合成	21	4	3.28×10^{-2}
	map00520	代谢	氨基糖和核苷酸糖代谢	202	19	3.15×10^{-2}
	map00230	代谢	嘌呤代谢	146	15	2.67×10^{-2}
	map00944	代谢	黄酮和黄酮醇生物合成	5	2	3.12×10^{-2}
	map00450	代谢	硒化合物代谢	30	5	3.00×10^{-2}
	map02010	环境信息处理	ABC 转运蛋白	108	12	2.62×10^{-2}
	map00561	代谢	甘油酯代谢	145	15	2.52×10^{-2}

续表5 Continued5

比较组	通路 ID	分类	功能描述	注释基因数 (个)	显著基因数 (个)	显著性水平 统计值
XP 与 HZ	map00330	代谢	精氨酸和脯氨酸代谢	93	12	1.40×10^{-5}
	map00500	代谢	淀粉和蔗糖代谢	355	26	1.32×10^{-5}
	map00460	代谢	氰基氨基酸代谢	195	16	1.67×10^{-4}
	map00561	代谢	甘油酯代谢	145	13	2.85×10^{-4}
	map00250	代谢	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	87	9	8.73×10^{-4}
	map00071	代谢	脂肪酸降解	86	9	8.02×10^{-4}
	map00010	代谢	糖酵解/糖异生	210	15	1.13×10^{-3}
	map00020	代谢	柠檬酸循环(TCA 循环)	75	8	1.37×10^{-3}
	map00052	代谢	半乳糖代谢	103	9	2.86×10^{-3}
	map00196	代谢	光合作用-天线蛋白	25	4	5.27×10^{-3}
	map00710	代谢	光合有机物的碳固定	101	8	8.62×10^{-3}
	map00920	代谢	硫代谢	44	5	8.28×10^{-3}
	map00360	代谢	苯丙氨酸代谢	76	7	6.14×10^{-3}
	map00380	代谢	色氨酸代谢	100	8	8.13×10^{-3}
	map04146	细胞过程	过氧化物酶体	140	10	7.23×10^{-3}
	map00909	代谢	倍半萜和三萜生物合成	61	6	7.97×10^{-3}
	map00310	代谢	赖氨酸降解	67	6	1.24×10^{-2}
	map00053	代谢	抗坏血酸和醛酸代谢	67	6	1.24×10^{-2}
	map00630	代谢	乙醛酸和二羧酸代谢	129	9	1.22×10^{-2}
	map00280	代谢	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	71	6	1.62×10^{-2}
ZS 与 XP	map00052	代谢	半乳糖代谢	103	29	4.67×10^{-7}
	map00906	代谢	类胡萝卜素生物合成	59	15	8.82×10^{-4}
	map00904	代谢	二萜生物合成	56	15	4.86×10^{-4}
	map00920	代谢	硫代谢	44	12	1.47×10^{-3}
	map00280	代谢	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	71	17	8.64×10^{-4}
	map00250	代谢	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	87	19	1.45×10^{-3}
	map00561	代谢	甘油酯代谢	145	27	2.19×10^{-3}
	map00410	代谢	β -丙氨酸代谢	724	16	2.77×10^{-3}
	map00860	代谢	卟啉与叶绿素代谢	72	16	2.77×10^{-3}
	map00071	代谢	脂肪酸降解	86	17	7.35×10^{-3}
	map00944	代谢	黄酮和黄酮醇生物合成	5	3	9.78×10^{-3}
	map00010	代谢	糖酵解/糖异生	210	33	1.18×10^{-2}
	map00053	代谢	抗坏血酸和醛酸代谢	67	13	2.05×10^{-2}
	map00970	遗传信息处理	氨酰基 tRNA 生物合成	129	22	1.48×10^{-2}
	map00130	代谢	泛醌和其他萜醌生物合成	60	12	2.03×10^{-2}
	map00520	代谢	氨基糖和核苷酸糖代谢	202	31	1.95×10^{-2}
	map00230	代谢	嘌呤代谢	146	24	1.74×10^{-2}
	map00500	代谢	淀粉和蔗糖代谢	355	50	1.88×10^{-2}
	map00254	代谢	黄曲霉素生物合成	3	2	3.07×10^{-2}
	map00511	代谢	其他聚糖降解	23	6	2.78×10^{-2}

ZS 表示沼生矮樱每 3 d 浇 1 次水; HZ 表示华中樱每 3 d 浇 1 次水; XP 表示华中樱每天浇 1 次水。显著性水平统计值<0.05 为显著。

此外,根据 40 个差异基因在 3 个样本中的表达趋势,将其分成 4 组(图 6)。在第 I 组中 7 个差异表达基因(*Pyn_12413*、*Pyn_31963*、*Pyn_30069*、*Pyn_17851*、*Pyn_39003*、*Pyn_14669*、*Pyn_28734*)的基因表达量变化趋势较接近,其中在 ZS 组和 HZ 组中表达量较高,而在 XP 组中表达量较低。在第 II 组中 18 个差异表达基因(*Pyn_06023*、*Pyn_20339*、*Pyn_04762*、*Pyn_37967*、*Pyn_31179*、*Pyn_16421*、*Pyn_14787*、*Pyn_01496*、*Pyn_39001*、*Pyn_37711*、*Pyn_32826*、*Pyn_05270*、*Pyn_27819*、*Pyn_06024*、*Pyn_38757*、*Pyn_07353*、*Pyn_28139* 和 *Pyn_05459*)的基

因表达量变化趋势较接近,其中在 ZS 组中表达量较高,而在 HZ 组和 XP 组中大部分表达量较低。在第 III 组中 12 个差异表达基因(*Pyn_04599*、*Pyn_33356*、*Pyn_19597*、*Pyn_09272*、*Pyn_21559*、*Pyn_06071*、*Pyn_11112*、*Pyn_33355*、*Pyn_25789*、*Pyn_27359*、*Pyn_24814* 和 *Pyn_04600*)的基因表达量变化趋势较接近,其中在 ZS 组中表达量较低,而在 HZ 组和 XP 组中大部分表达量较高。在第 IV 组中 3 个差异基因(*Pyn_27403*、*Pyn_30752* 和 *Pyn_33272*)的基因表达量变化趋势较接近,其中在 ZS 组和 XP 组中表达量较高,而在 HZ 组中表达量较低。

表 6 与耐涝相关的差异表达基因

Table 6 Differentially expressed genes related to waterlogging tolerance

比较组	基因名称	基因描述	长度(bp)	差异倍数	与参考基因组 基因同源性(%)
XP 与 ZS	<i>Pyn_14787</i>	乙烯反应性转录因子 ERF053	1 398	-3.128	97
	<i>Pyn_27359</i>	AP2/ERF 和 B3 结构域的转录因子 RAV1	1 269	2.593	98
	<i>Pyn_27819</i>	AP2/ERF 和 B3 结构域的转录因子 RAV2	864	-2.115	95
	<i>Pyn_38757</i>	AP2/ERF 和 B3 结构域类似转录因子 RAV2 亚类	834	-1.845	97
	<i>Pyn_17851</i>	乙烯反应性转录因子 ERF062	1 311	-2.618	99
	<i>Pyn_19597</i>	乙烯反应性转录因子 ERF027	543	2.323	99
	<i>Pyn_06071</i>	乙烯反应性转录因子 ERF118 亚型 X1	1 281	1.628	98
	<i>Pyn_25789</i>	乙烯反应性转录因子 ERF027 亚类	555	1.885	96
	<i>Pyn_11112</i>	乙烯反应性转录因子 ERF118	1 020	1.110	99
	<i>Pyn_09272</i>	乙烯反应性转录因子 ERF039	264	4.635	98
	<i>Pyn_24814</i>	钙调神经磷酸酶 B 亚类蛋白 4	531	1.038	99
	<i>Pyn_20339</i>	钙调神经磷酸酶 B 亚类蛋白 10 亚型 X1	489	-1.430	99
	<i>Pyn_31963</i>	α -淀粉酶	633	-3.270	96
	<i>Pyn_14669</i>	推定 α -淀粉酶 2	903	-1.189	99
	<i>Pyn_06023</i>	蔗糖合成酶	2 031	-2.914	99
	<i>Pyn_28734</i>	蔗糖合成酶 3	2 184	-1.370	100
	<i>Pyn_39003</i>	蔗糖合成酶 3	1 560	-1.133	100
	<i>Pyn_04599</i>	蔗糖合成酶 2 亚型 X4	1 197	5.579	98
	<i>Pyn_33356</i>	蔗糖合成酶 4 亚类	219	4.417	99
	<i>Pyn_04600</i>	蔗糖合成酶 2 亚型 X1	606	4.389	98
	<i>Pyn_04762</i>	蔗糖合成酶	2 232	-2.842	99
	<i>Pyn_39001</i>	蔗糖合成酶 3	411	-2.228	99
	<i>Pyn_33355</i>	蔗糖合成酶 2	2 298	2.432	99
	<i>Pyn_06024</i>	蔗糖合成酶	375	-2.205	99
	<i>Pyn_37967</i>	乙醇脱氢酶 1	1 140	-1.005	98
	<i>Pyn_37711</i>	乙醇脱氢酶亚类 7 亚型 X2	828	-2.468	100
	<i>Pyn_31179</i>	扩张蛋白-A1 亚类	750	-4.282	100
	<i>Pyn_16421</i>	扩张蛋白-A1	672	-4.151	100
	<i>Pyn_07353</i>	扩张蛋白 2	753	-1.985	99
	<i>Pyn_21559</i>	扩张蛋白	762	2.945	100

续表6 Continued6

比较组	基因名称	基因描述	长度(bp)	差异倍数	与参考基因组 基因同源性(%)
HZ 与 ZS	<i>Pyn_01496</i>	扩张蛋白亚类 A2	375	-1.106	99
	<i>Pyn_28139</i>	乙烯反应性转录因子 ERF061	924	-1.455	97
	<i>Pyn_30752</i>	乙烯反应性转录因子 ERF061	921	-1.340	98
	<i>Pyn_05459</i>	钙调神经磷酸酶 B 亚类蛋白 10 亚型 X3	801	-1.295	99
	<i>Pyn_32826</i>	钙调神经磷酸酶 B 亚类蛋白 10 亚型 X1	501	-6.908	97
	<i>Pyn_05270</i>	钙调素亚类蛋白 1	513	-7.292	98
HZ 与 XP	<i>Pyn_12413</i>	乙烯反应性转录因子 ERF011	528	1.154	99
	<i>Pyn_27403</i>	乙烯反应性转录因子 ERF018	1 020	-7.916	99
	<i>Pyn_30069</i>	α-淀粉酶	576	4.076	96
	<i>Pyn_28734</i>	蔗糖合成酶 3	2 184	1.098	100
	<i>Pyn_06023</i>	蔗糖合成酶	2 031	1.066	99
	<i>Pyn_33272</i>	扩张蛋白-A15	726	-4.026	99

ZS 表示沼生矮樱每 3 d 浇 1 次水; HZ 表示华中樱每 3 d 浇 1 次水; XP 表示华中樱每天浇 1 次水。

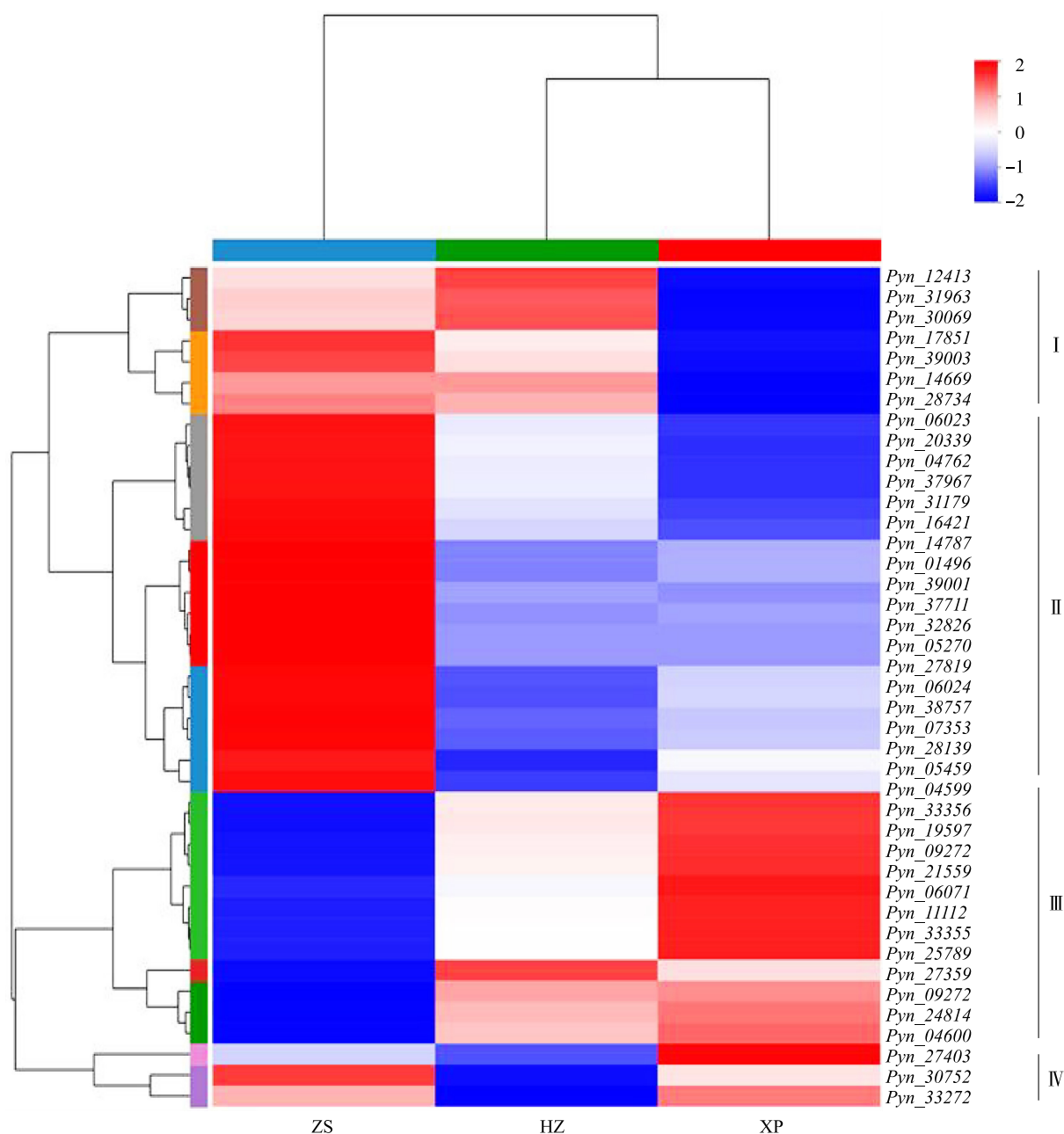
2.4.2 qRT-PCR 分析 为验证转录组数据的可靠性,随机选取 10 个耐涝相关差异基因进行 qRT-PCR 分析。采用相对定量法检测其在沼生矮樱(ZS)与华中樱(HZ、XP)中的表达,结果显示其表达趋势与转录组测序结果高度一致(图 7),证实了数据的可靠性。

3 讨论

目前,转录组分析技术已成为挖掘植物功能基因的重要手段,如张恩亮等^[20]通过转录组分析揭示了楸树(*Catalpa bungei*)不定根发育的分子机制;细胞分裂素与乙烯的互作主要促进愈伤组织形成,而生长素与油菜素内酯的互作则主导不定根的伸长。彭亮等^[21]利用转录组分析茜草(*Rubia cordifolia*)中与蒽醌类化合物合成相关的基因,挖掘出与茜草蒽醌类化合物生物合成相关的 *acetyl-CoA C-acetyltransferase*等 64 条基因。张飞等^[22]通过转录组测序分析高粱(*Sorghum bicolor*)的耐盐机制,发现苯丙烷类生物合成、苯丙氨酸代谢及类黄酮生物合成途径中基因的显著上调是响应盐胁迫的关键。田梅等^[23]利用转录组分析铁棒锤(*Aconitum pendulum*)中与乌头碱生物合成相关的基因,推测 *ApBAHD1*、*ApBAHD2*、*ApBAHD8* 基因参与 2-羟基乌头碱等生物合成,*ApBAHD10* 基因参与乌头碱等的生物合成。刘恋等^[24]对 3 个品种的金柑(*Fortunella japonica*)果皮进行转录组分析,得出果皮韧性差与苯丙烷生物合成代谢较弱引起木质素含量差异有密

切关联。张瑞等^[25]利用转录组分析垂丝海棠(*Malus halliana*)响应盐碱胁迫的分子机制,得出垂丝海棠叶片对盐碱胁迫的耐受能力主要涉及钙信号通路、植物激素信号转导、氨基酸生物合成、类胡萝卜素生物合成等途径。邓娇等^[26]利用转录组分析揭示,双色花莲花瓣边缘红色区域的花色苷选择性积累,是导致其花色形成的主要原因。本研究通过对耐涝种质沼生矮樱(ZS)与敏涝种质华中樱(HZ 和 XP)的转录组分析,通过两两比较(ZS 与 HZ,ZS 与 XP 和 XP 与 HZ)得出樱花对水胁迫的耐受能力主要涉及淀粉和蔗糖代谢、糖酵解/糖异生、黄酮生物合成、脂肪酸降解、抗坏血酸和醛酸代谢等途径,其中涉及的耐涝基因有 *ERF*、*SUS*、*RAMY*、*ADH* 和 *EXP* 等 5 类基因。研究表明,*ERF* 能够特异性激活 *PDC*、*ADH* 和 *RAMY* 的表达,同时抑制 *SUS* 和 *EXP* 的表达,这种双向调控机制形成了完整的代谢重塑网络,实现了细胞内能量资源的战略性重分配,显著增强了植物在水涝胁迫下的适应能力^[27-28]。

转录因子通过激活下游靶基因调控植物对逆境胁迫的响应,增强其耐逆性。*AP2/ERF* 广泛参与植物生长发育、初生与次生代谢及逆境响应等过程。乙烯作为重要激素调控植物的耐涝性,其合成前体乙酰辅酶 A 羧化酶(*ACC*) 在涝胁迫下由根系经木质部运输至茎部,进而转化为乙烯并提升耐涝能力^[29]。作为一种信号分子,乙烯可通过信号转导途径诱导 *ERF* 基因表达^[30]。近年的研究发现,香蕉 *MaERF11*^[31] 和苹果 *MdERF2*^[32] 等基因可通过抑制



ZS 表示沼生矮樱每 3 d 浇 1 次水; HZ 表示华中樱每 3 d 浇 1 次水; XP 表示华中樱每天浇 1 次水。图中红色方块表示基因在对应样本中显著上调,蓝色方块表示显著下调,颜色深浅反映表达量变化幅度。

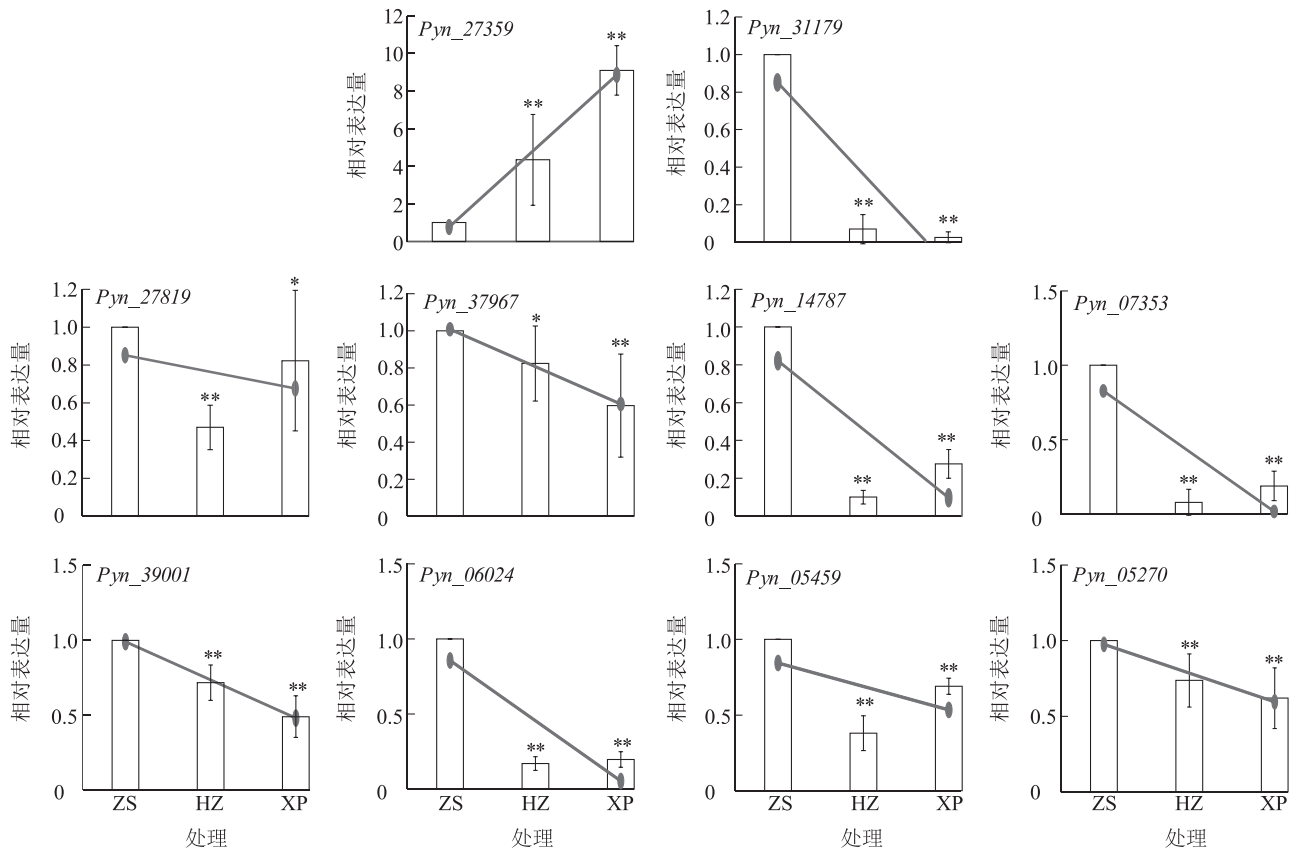
图 6 耐涝基因表达热图

Fig.6 Expression heatmap of waterlogging tolerance gene

ACS 与 ACO 表达,调控逆境下植物器官的乙烯释放。此外,CIPK 与钙调磷酸酶 B 样蛋白(CBL)形成的 CBL-CIPK 信号网络在植物逆境应答中亦发挥关键作用。本研究中 XP 与 ZS 比较组中与耐涝相关的 31 个差异表达基因中包含 10 个 HRE 基因(其中 6 个上调表达,4 个下调表达),2 个 CIPK 基因(其中 1 个上调表达,1 个下调表达),然而本研究中

CIPK 并未与 CBL 构成 CBL-CIPK,表明 AP2/ERF 类转录因子中的 HRE 基因在樱花耐涝过程中起到主要作用,这与王倩^[19]的研究结果一致。

在淹涝胁迫下,植物通过诱导特定碳水化合物代谢基因表达以应对能量需求。糖酵解作为关键供能途径,其相关基因在此过程中发挥重要调控作用^[33]。RAMY 与 SUS 是碳水化合物代谢的核心酶基因,涝胁迫



ZS 表示沼生矮樱每 3 d 浇 1 次水; HZ 表示华中樱每 3 d 浇 1 次水; XP 表示华中樱每天浇 1 次水。趋势线表示转录组测序得到的该基因在 HZ、XP 与 ZS 之间的表达趋势。* 表示 HZ、XP 与 ZS 之间差异表达基因的表达差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 7 实时荧光定量 PCR 验证

Fig.7 The validation of real-time quantitative PCR

胁迫可增强 α -淀粉酶与蔗糖合成酶活性,促进葡萄糖合成与 ATP 生成,为植株维持生长提供能量,进而提升耐涝性^[6]。能量亏缺还会激活 *RRAMY* 及相关基因表达,通过水解淀粉增加可溶性糖含量,增强植物抗逆能力^[34]。此外,蔗糖合成酶通过分解蔗糖产生果糖和 UDP (二磷酸尿苷)-葡萄糖,提高细胞渗透压,同时抑制叶片伸长与生长,以减少能量消耗。研究结果表明,马铃薯和玉米在缺氧条件下 *SUS* 的 mRNA 水平及酶活性显著上升^[35]。而水稻在涝胁迫下地上部叶片 *SUS* 基因表达受到抑制,同样有助于降低能量损耗^[36]。本研究中,XP 与 ZS 比较组中与耐涝相关的 31 个差异表达基因中包含 10 个 *SUS* 基因 (其中 4 个上调表达,6 个下调表达),2 个 *RAMY* 基因 (2 个均下调表达);HZ 与 XP 比较组中有 2 个 *SUS* 基因 (2 个均上调表达),1 个 *RAMY* 基因 (上调表达);而 HZ 与 ZS 比较组中无 *RAMY* 和 *SUS* 差异表达基因。表明 *RAMY* 和 *SUS* 基因在樱花耐涝过程中也起到十分重

要的作用。

在水涝胁迫下,植物主要依赖以 *ADH* 和 *PDC* 为关键酶的乙醇发酵途径进行无氧呼吸。增强 *ADH* 与 *PDC* 等相关基因的表达,进而提高乙醇发酵速率,是改善植物耐涝性的有效策略之一^[7]。本研究中,XP 与 ZS 比较组中包含 2 个 *ADH* 基因 (均下调表达),无 *PDC* 差异表达基因,此外,在 HZ 与 XP 比较组和 HZ 与 ZS 比较组中,并未出现 *ADH* 和 *PDC* 基因的显著性差异表达。由此推测在华中樱水胁迫逆境条件下,乙醇发酵途径活跃度不高。此外,XP 组较 HZ 组中的 *ADH* 基因表达量还要低,表明在长时间水胁迫条件下乙醇发酵途径并未增强,反而减弱,因此,推测乙醇发酵途径在樱花水涝胁迫下短时间内可能起到一定耐涝作用,但在长时间水涝胁迫下,乙醇发酵途径在樱花耐涝方面并不起作用,甚至出现关键酶基因表达量显著下降。本研究结果表明,*ADH* 和 *PDC* 基因在樱花长时间水涝胁迫下并不能增强耐涝能力,也不

是沼生矮樱天然耐涝的原因。

EXP 是一类具有组织特异性并受发育阶段调控的细胞壁酶蛋白,参与调控植物根系与细胞组织生长等过程^[37-38]。研究表明,在涝胁迫下,耐涝植物如水稻的地上部分中 EXP 基因表达会受到抑制,从而限制细胞伸长与植株生长,有助于减少能量消耗以维持生存^[36,39]。本研究中仅 XP 与 ZS 比较组中包含 5 个 EXP 基因(其中 1 个上调表达,4 个下调表达),而在 HZ 与 XP 比较组和 HZ 与 ZS 比较组中,并未出现 EXP 基因的显著差异表达,由此推测华中樱在水胁迫逆境条件下,EXP 基因下调表达,以此增强其耐涝能力。沼生矮樱为矮小灌木,可能与 EXP 基因在地上部分的表达量本身较低有关。本研究还发现在 ZS 与 HZ 比较组和 XP 与 HZ 比较组的差异表达基因中,均有差异表达基因在黄酮类生物合成途径中被显著富集,而在 ZS 与 XP 比较组无此富集,这可能与黄酮类化合物具有清除活性氧、维持细胞内氧化还原稳态的功能有关^[40],这也可能是造成沼生矮樱(ZS)具有天然抗涝性的原因之一。此外,本研究中氨基酸代谢、抗坏血酸和醛酸代谢增强也有利于樱花抵御涝灾,增强樱花对逆境的耐受力^[41]。

本研究通过樱花响应水胁迫的转录组分析,发现 HZ 与 XP 比较组中与耐涝相关的差异表达基因仅有 6 个,HZ 与 ZS 比较组中与耐涝相关的差异表达基因也只有 5 个,而 XP 与 ZS 比较组中与耐涝相关差异表达基因却有 31 个,远远高于前 2 组,表明华中樱在有水胁迫下(XP)和没有水胁迫情况下(HZ)相比,差异表达的耐涝基因较少,耐涝基因多数表达量差异不大,说明华中樱耐涝性较差;而华中樱在没有水胁迫情况下(HZ)与沼生矮樱(ZS)相比,差异表达的抗涝基因也较少,说明在正常生长环境下(非涝害情况下),耐涝基因多数表达差异不大;但华中樱在有水胁迫情况下(XP)与沼生矮樱(ZS)相比,差异表达的耐涝基因却大幅度提高,表明与沼生矮樱相比,华中樱在水胁迫下大部分耐涝基因出现差异表达,说明沼生矮樱耐涝性较好。

4 结 论

本研究通过长时间水涝胁迫试验,采用转录组分析,得出樱花对长时间水涝胁迫的耐受能力主要涉及淀粉和蔗糖代谢、糖酵解/糖异生、黄酮生物合

成、脂肪酸降解、抗坏血酸和醛酸代谢等途径,其中涉及的耐涝基因主要有 ERF、SUS、RAMY 和 EXP 等 4 类。本研究鉴定的耐涝基因为通过转基因或基因调控技术培育樱花耐涝品种(或砧木)提供了关键靶点,为樱属植物耐涝种质选育奠定了坚实的理论基础。

参考文献:

- [1] Yamauchi T, Colmer T D, Pedersen O, et al. Regulation of root traits for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-flooding stress[J]. Plant Physiology, 2018, 176(2): 1118-1130.
- [2] Pedersen O, Malik A I, Colmer T D. Submergence tolerance in *Hordeum marinum*: dissolved CO₂ determines underwater photosynthesis and growth[J]. Functional Plant Biology, 2010, 37(6): 524-531.
- [3] Peña-Castro J M, Van Zanten M, Lee S C, et al. Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in *Arabidopsis* uncovers flowering inhibition as a submergence tolerance mechanism[J]. The Plant Journal, 2011, 67(3): 434-446.
- [4] Lee K W, Chen P W, Lu C G, et al. Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding[J]. Science Signaling, 2009, 2(91): 61.
- [5] Licausi F, Van Dongen J T, Giuntoli B, et al. HRE1 and HRE2, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic responses in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2010, 62(2): 302-315.
- [6] Jung K H, Seo Y S, Walia H, et al. The submergence tolerance regulator Sub1A mediates stress-responsive expression of AP2/ERF transcription factors[J]. Plant Physiology, 2010, 152(3): 1674-1692.
- [7] Morimoto K, Yamasue Y. Differential ability of alcohol fermentation between the seeds of flooding-tolerant and flooding-susceptible varieties of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv[J]. Weed Biology and Management, 2007, 7(1): 62-69.
- [8] Lee D K, Ahn J H, Song S K, et al. Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean[J]. Plant Physiology, 2003, 131(3): 985-997.
- [9] 张 健,唐 露,张雅洁,等. 转录组测序技术在植物水淹胁迫研究中的应用[J]. 分子植物育种, 2019, 17(4): 1191-1202.
- [10] Kumutha D, Ezhilmathi K, Sairam R K, et al. Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes[J]. Biologia Plantarum, 2009, 53(1): 75-84.
- [11] Klumb E K, Arge L W P, Do Amaral M N, et al. Transcriptome profiling of *Prunus persica* plants under flooding[J]. Trees, 2017, 31(4): 1127-1135.
- [12] 宋春晖,陈晓菲,王枚阁,等. 基于 SLAF-seq 技术鉴定苹果砧木耐涝候选基因[J]. 中国农业科学, 2021, 54(18): 3932-3944.
- [13] 刘慧春,张加强,马广莹,等. 牡丹 *PsDHN1* 基因克隆及转基因

- 拟南芥的耐涝性分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2021, 47(3): 335-346.
- [14] 刘慧春, 张加强, 周江华, 等. 牡丹 *PsGRP* 基因克隆及转基因拟南芥的耐涝性分析[J]. 植物生理学报, 2021, 57(2): 373-384.
- [15] Lü Y Y, Fu S X, Chen S, et al. Ethylene response factor BnERF2-like (*ERF2.4*) from *Brassica napus* L. enhances submergence tolerance and alleviates oxidative damage caused by submergence in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Crop Journal, 2016, 4(3): 199-211.
- [16] Xu B B, Cheng Y, Zou X L, et al. Ethanol content in plants of *Brassica napus* L. correlated with waterlogging tolerance index and regulated by lactate dehydrogenase and citrate synthase[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2016, 38(3): 81.
- [17] Yu S M, Lee H T, Lo S F, et al. How does rice cope with too little oxygen during its early life? [J]. New Phytologist, 2021, 229(1): 36-41.
- [18] 丁晓东, 张 晴, 于海燕, 等. 野生大豆 *GsSnRK1.1* 蛋白激酶在淹水胁迫下功能分析[J]. 东北农业大学学报, 2021, 52(11): 1-8.
- [19] 王 倩. 樱桃耐涝相关基因 *PsERF* 和 *PsCIPK* 的功能验证研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [20] 张恩亮, 马玲玲, 杨如同, 等. IBA 诱导楸树嫩枝扦插不定根发育的转录组分析[J]. 林业科学, 2018, 54(5): 48-61.
- [21] 彭 亮, 张 岗, 颜永刚, 等. 茜草转录组分析及其萜类化合物合成相关基因的挖掘[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1890-1896.
- [22] 张 飞, 王艳秋, 朱 凯, 等. 不同耐盐性高粱在盐逆境下的比较转录组分析[J]. 中国农业科学, 2019, 52(22): 4002-4015.
- [23] 田 梅, 陈灵丽, 靳保龙, 等. 铁棒锤转录组分析及乌头碱生物合成相关基因的挖掘[J]. 药学学报, 2021, 56(12): 3353-3361.
- [24] 刘 恋, 唐志鹏, 李菲菲, 等. ‘融安金柑’‘滑皮金柑’及‘脆蜜金柑’贮藏期品质、贮藏特性及果皮转录组分析[J]. 中国农业科学, 2021, 54(20): 4421-4433.
- [25] 张 瑞, 张夏斌, 赵 婷, 等. 基于转录组分析垂丝海棠响应盐碱胁迫的分子机制[J]. 园艺学报, 2022, 49(2): 237-251.
- [26] 邓 娇, 苏梦月, 刘雪莲, 等. 基于转录组分析揭示双色花莲‘大洒锦’花色形成机理[J]. 园艺学报, 2022, 49(2): 365-377.
- [27] Loreti E, Van Veen H, Perata P. Plant responses to flooding stress [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2016, 33: 64-71.
- [28] Su J S, Li C W, Ou X L, et al. CmWAT6.1, mined by high-density genetic map-based QTL mapping, enhances waterlogging tolerance in *Chrysanthemum*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2024, 219: 105612.
- [29] Sasidharan R, Voesenek L A C J. Ethylene-mediated acclimations to flooding stress[J]. Plant Physiology, 2015, 169(1): 3-12.
- [30] Rzewuski G, Sauter M. Ethylene biosynthesis and signaling in rice [J]. Plant Science, 2008, 175(1/2): 32-42.
- [31] Han Y C, Kuang J F, Chen J Y, et al. Banana transcription factor *MaERF11* recruits histone deacetylase MaHDA1 and represses the expression of MaACO1 and expansins during fruit ripening [J]. Plant Physiology, 2016, 171(2): 1070-1084.
- [32] Li T, Jiang Z Y, Zhang L C, et al. Apple (*Malus domestica*) *MdERF2* negatively affects ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing MdACS1 transcription[J]. The Plant Journal, 2016, 88(5): 735-748.
- [33] Perata P, Voesenek L A C J. Submergence tolerance in rice requires *Sub1A*, an ethylene-response-factor-like gene[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(2): 43-46.
- [34] Sheng L X, Meng X Y, Wang M, et al. Improvement in submergence tolerance of cherry through regulation of carbohydrate metabolism and plant growth by *PsERF* and *PsCIPK*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 184(1): 63-79.
- [35] Geigenberger P. Response of plant metabolism to too little oxygen [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6(3): 247-256.
- [36] Fukao T, Xu K N, Ronald P C, et al. A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice [J]. The Plant Cell, 2006, 18(8): 2021-2034.
- [37] Aschi-Smiti S, Chaibi W, Brouquisse R, et al. Assessment of enzyme induction and aerenchyma formation as mechanisms for flooding tolerance in *Trifolium subterraneum* ‘Park’ [J]. Annals of Botany, 2003, 91(2): 195-204.
- [38] Pandey G K, Cheong Y H, Kim B G, et al. CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis* [J]. Cell Research, 2007, 17(5): 411-421.
- [39] Fukao T, Bailey-Serres J. Submergence tolerance conferred by *Sub1A* is mediated by *SLR1* and *SLRL1* restriction of gibberellin responses in rice [J]. PNAS, 2008, 105(43): 16814-16819.
- [40] Brunetti C, Di Ferdinando M, Fini A, et al. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(2): 3540-3555.
- [41] Ren C G, Kong C C, Yan K, et al. Elucidation of the molecular responses to waterlogging in *Sesbania cannabina* roots by transcriptome profiling[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 9256.

(责任编辑: 陈海霞)