

研究报告

Research Report

低温胁迫对冰菜转录组水平响应分析

赖正锋* 姚运法* 林碧珍 练冬梅 洪建基**

福建省农业科学院, 亚热带农业研究所, 漳州, 363005

* 同等贡献作者

** 通信作者, Hjianji@163.com

摘要 利用二代高通量测序技术对低温胁迫处理冰菜测序, 构建冰菜转录组数据库。分别得到 24.13 Gb 有效数据和 24 045 条 Unigene 的注释, 得到 DEGs 1 902 个(T0 vs T1)和 2 134 个(T0 vs T2)。(T0 vs T1)组和(T0 vs T2)组分别有 40 和 41 个功能小类化归 GO 数据库; 分别有 20 个和 24 个功能分类注释到 KOG 数据库; 155 和 272 条基因得到注释到 KEGG 数据库, 并分别富集在 74 和 105 条代谢通路。(T0 vs T1)组 DEGs 主要注释到植物信号转导等 4 个代谢通路; (T0 vs T2)组 DEGs 注释到苯丙醇类生物合成等 11 代谢通路, 其中正向影响代谢途径: 丙酮醇类生物合成、嘌呤代谢、谷胱甘肽代谢、脂肪酸代谢、类黄酮代谢、氨基酸的生物合成代谢途径等; 负向影响代谢途径: 植物-病原互作、植物激素信号转导、淀粉和蔗糖代谢等途径。通过对其中淀粉和蔗糖代谢途径关键基因分析表明: 低温胁迫 1 h (T1), 海藻糖 6-磷酸合酶、海藻糖-6-磷酸酯酶、 β -淀粉酶、葡萄糖-1-磷酸腺苷酰转移酶、糖原磷酸化酶等 5 个关键基因表现为上调表达, 未见下调表达基因; 低温胁迫 36 h (T2), 海藻糖-6-磷酸合酶、己糖激酶、 β -淀粉酶等 3 个关键基因上调表达, 葡萄糖内酯-1,3- β -葡萄糖苷酶基因下调表达。选取淀粉和蔗糖代谢途径中 8 个 DEGs, 经 qRT-PCR 分析, 8 个 DEGs 的相对表达量与转录组表达水平相符。

关键词 冰菜, 转录组, 差异表达基因, 淀粉和蔗糖代谢

Analysis of Transcriptome Response to Low Temperature Stress in *Mesembryanthemum crystallinum* Linn.

Lai Zhengfeng* Yao Yunfa* Lian Dongmei Lin Bizhen Hong Jianji**

Subtropical Agriculture Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou, 363005

* These authors contributed equally to this work

** Corresponding author, Hjianji@163.com

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0035

Abstract The second generation of high throughput sequencing technology was used to sequence ice plant under low temperature stress and to construct transcriptome database. 24.13 Gb of valid data and 24 045 annotations of Unigene were obtained. DEGs of 1 902 (T0 vs T1) and 2 134 (T0 vs T2) were obtained. Two groups of DEGs were classified into 40 and 41 functional small categories respectively by GO database and were obtained respectively 20 and 24 functional categories by KOG database and were annotated 55 and 272 genes by comparing DEGs with KEGG database, which were enriched in 74 and 105 metabolic pathways respectively. DEGs of T0 vs T1 group mainly annotated to 4 metabolic pathways; DEGs of T0 vs T2 group mainly annotated to 11 metabolic

本文首次发表在《分子植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 9 月 21 日; 接受日期: 2020 年 9 月 23 日; 发表日期: 2020 年 9 月 24 日

引用格式: 赖正锋, 姚运法, 林碧珍, 练冬梅, 洪建基, 2020, 低温胁迫对冰菜转录组响应分析, 分子植物育种 (网络版), 18 (40): 1-11 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0040) (Lai Z.F., Yao Y.F., Lian D.M., Lin B.Z., and Hong J.J., 2020, Analysis of transcriptome response to low temperature stress in *Mesembryanthemum crystallinum* Linn., Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(40): 1-11 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0040))

pathways. It were showed that there were the metabolic pathways of positive correlation: acetone alcohol biosynthesis, purine metabolism, glutathione metabolism, fatty acid metabolism, brass metabolism, amino acid biosynthesis and other metabolic pathways, and the metabolic pathways of negative correlation: plant-pathogen interaction, plant hormone signal transduction, starch and sucrose metabolism. The key genes of starch and sucrose metabolism pathway were analyzed: the expression of 5 key genes, such as trehalose 6-phosphate synthase, trehalose-6-phosphatase, beta-amylase, glucose-1-adenosine phosphate transferase and glycogen phosphorylase, were up-regulated, but down-regulated gene was not observed during T1 (1h) of low-temperature stress; Three key genes of trehalose-6-phosphosynthase, hexokinase and beta-amylase, were up-regulated and the glucolactone-1,3-beta-glucosidase gene was down-regulated under low temperature stress at T2 (36h). Eight DEGs in starch and sucrose metabolism pathway were selected and analyzed by Quantitative Real-time PCR. The relative expression level of 8 DEGs was consistent with the transcriptome expression profile analysis.

Keywords Ice plant, Transcriptome, DEGs, Starch and sucrose metabolism

冰菜,学名冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum* Linn.),是番杏科日中花属(*Mesembryanthemum L.*)的一年生或二年生草本植物。其茎匍匐、叶肉质,具有较高食用价值(王志和等, 2016)。原产非洲南部,世界各地均有引种栽培,近年来引种中国。冰菜作为新兴蔬菜,具有耐干旱、盐碱,高阳光,怕寒及水涝等特点,最适合生长的温度是 5℃~25℃,低于 5℃或高于 30℃会出现枯萎。研究表明,低温胁迫对蔬菜的产量和品质均有显著影响(钱恒彦等, 2019)。冰菜作为一种新型特菜资源,研究低温胁迫对冰菜生长发育变化的影响具有重要意义。

低温胁迫是作物生长过程中遭受的重要环境胁迫因素之一,其响应属于多因素协同过程,主要体现在细胞膜系统、酶活性、细胞质失水等,会导致细胞代谢失衡,进而细胞衰亡等(刘文盈, 2018)。糖类物质是植物细胞构建和能量消耗重要物质基础,通过与多种激素及生长因子相互作用,具有调节渗透势、增强细胞保水力、保护生物膜及生物大分子等活性(Hincha et al., 2002),进而调节植物生长、发育和抗逆境等过程(何亚飞等, 2016)。近年来还发现糖类物质还可作为信号分子作用,参与植物低温胁迫调控等生理过程。例如,低温胁迫中,植物体内碳水化合物代谢加强,淀粉、蔗糖、果糖、葡萄糖、果聚糖、海藻糖等可溶性糖含量上升(孙永梅等, 2015);海藻糖作为信号分子参与植物抗逆反应和生长发育调控(Matthew et al., 2008);另外在低温胁迫下,糖类物质含量及种类具有物种差异性(沈婕等, 2019; 刁倩楠等, 2019)。因此,开展冰菜低温胁迫下可溶性糖代谢生理和分子机制研究非常必要性。

近年来,在中国冰菜设施栽培越来越广泛,对其低温胁迫条件下转录组水平表达及代谢调控机理研

究具有重要意义。通过对冰菜 4℃低温胁迫处理,处理时长分别为 1 h 和 36 h,利用 Illumina Hi-seq 2500 高通量测序技术,研究冰菜低温胁迫响应机制及其可溶性糖代谢相关基因变化。筛选冰菜耐低温基因、分析关键基因表达的机制,不仅阐述冰菜对低温胁迫的响应机制,还有助于挖掘耐低温的冰菜品种资源,为冰菜耐低温育种积累经验。

1 结果与分析

1.1 数据质量评价与分析

经转录组测序,得到 24.13 Gb Clean data,其中 T0 Clean data 为 8.47 Gb, T02 Clean data 为 7.69 Gb, T03 Clean data 为 8.00 Gb, Q30 均超过 92.0% (表 1)。测序数据良好,利于相关分析。数据组装统计分析(表 2),转录本序列(Transcript)装配出 153 971 条转录本序列,平均长度为 1 384.0 bp, N50 长 2 397 bp; 由单基因序列(Unigene)装配出 76 907 条,平长度为 751.4 bp, N50 长 1 215 bp。

1.2 Unigene 注释

经与 COG、GO、KOG、KEGG、Pfam、Swiss-Prot、eggNOG、NR 数据库的比对,对 Unigene 功能注释情况进行统计(表 3),在 76907 条序列中,其中 24 045 条

表 1 有效数据评估统计

Table 1 Statistics of clean data

样品	读数	碱基	GC 含量(%)	Q30 (%)
Samples	Read	Base	GC Content (%)	
T0	28 360 950	8 466 724 784	47.10%	92.72%
T1	25 735 464	7 689 769 894	46.98%	92.73%
T2	26 684 607	7 974 101 406	46.72%	92.95%

表 2 组装结果统计分析

Table 2 Statistics of assembled results

长度区间(bp)	转录本序列数量	单基因序列数量
Length range (bp)	Transcript number	Unigene number
200~300	31 005 (20.14%)	27 377(35.60%)
300~500	24 991 (16.23%)	19 389(25.21%)
500~1000	25 523 (16.58%)	14 189(18.45%)
1 000~2 000	33 023 (21.45%)	9 226(12.00%)
2000+	39 429 (25.61%)	6 726(8.75%)
总数量	153 971	76 907
Total Number		
总长度	213 095 569	57 787 754
Total Length		
N50 长度	2 397	1 355
N50 Length		
平均长度	1 384 00	75 140
Mean Length		

Unigene 得到注释结果,占比 31.26%。其中与 COG 数据库比对,得到 7627 条注释,占总注释基因的 31.72%;与 KOG 数据库比对,得到 12913 条注释,占总注释基因的 53.70%;与 GO 数据库比对,得到 13 771 条注释,占总注释基因的 57.27%;与 KEGG 数据库比对,得到 8 625 条注释,占总注释基因的 35.87%;与 Pfam 数据库比对,得到 16 296 条注释,占总注释基因的 67.77%;与 Swiss-Prot 数据库比对,得到 15 787 条注释,占总注释基因的 65.66%;与 eggNOG 数据库比对,得到 21 585 条注释,占总注释基因的 89.77%;与 NR 数据库比对,得到 23 510 条注释,占总注释基因的 89.77%。

表 3 单基因序列注释统计表

Table 3 Unigene functions annotated

生物信息数据库	注释单基因数	单基因长度(300≤长度<1000)	单基因长度(长度>1000)	百分比(%)
Bioinformation database	Annotated unigene number	Unigene length (300≤length<1000)	Unigene length (length>1000)	Percentage (%)
COG	7 627	1 144	5 299	31.72
KOG	12 913	2 962	7 812	53.70
GO	13 771	3 232	7 929	57.27
KEGG	8 625	1 927	5 266	35.87
Pfam	16 296	3 464	10 892	67.77
Swiss-Prot	15 787	3 822	9 735	65.66
eggNOG	21 585	5 406	12 465	89.77
NR	23 510	6 445	12 805	97.78
总注释单基因序列数	24 045	6 563	12 823	100
All annotated unigenes sequence number				

1.3 DEGs 的筛选比较与注释分析

1.3.1 两组 DEGs 比较

通过 DEGs 的比较分析,得到冰菜低温胁迫 DEGs 1 902 个(T0vsT1)和 2 134 个(T0vsT2),其中 T0 vsT1 组表达量上调的基因 1 317 个,下调基因 585 个;T0vsT2 组表达量上调的基因 1 184 个,下调基因 950 个(表 4)。通过对两组(T0vsT1, T0vsT2) DEGs 维恩图分析,低温胁迫 1 h 非共表达基因 1 392 个,其中上调表达基因 1 048 个,下调表达基因 344 个;低温胁迫 36 h 非共表达基因 1 624 个,其中上调表达基因 915 个,下调表达基因 709 个;低温胁迫 1 h 和 36 h 共表达基因 510 个,其中上调表达基因为 269 个,下调表达基因 241 个。结论是:T1 非共表达基因比 T2 增加 163.67%,其中上调表达基因减少 12.69%,下调表达基因增加 106.10%;T1 与 T2 共表达基因中,上调表达基因数(269 个)与下调表达基因数(241 个)基本一致(图 1)。

将 T0 vs T1 和 T0 vs T2 两组 DEGs 分别注释到 NR 等 8 个数据库,分别得到 1 089 个和 1 512 个基因,其中 COG 数据库分别 340 个和 575 个,GO 数据库分别 625 个和 897 个,KEGG 数据库分别 317 个和 501 个,KOG 数据库分别 457 个和 744 个,Pfam 数据库分别 868 个和 1 220 个,Swiss-Prot 数据库分别 825 个和 1 176 个,eggNOG 数据库分别 1 021 个和 1 425 个;NR 数据库分别 1 091 个和 1 500 个(表 5),其中 NR 数据库注释比最高,均超过 99%。

1.3.2 GO 数据库注释情况

GO 数据库由 B 生物学过程(Biological process)、

表 4 差异基因表达情况

Table 4 Expression of differential genes

分组	所有基因	上调基因	下调基因
Group	All genes	Up-regulation gene	Down-regulation gene
T0vsT1	1902	1317	585
T0vsT2	2134	1184	950
共表达差异基因	510	269	241
Co-expression gene			

C 细胞组成(Cellular component)和 M 分子功能(Molecular function)三大类组成。低温胁迫不同处理时间 T1、T2 冰菜 DEGs 进行统计,结果显示:两组 DEGs 分别被归到 40 和 41 个功能小类(表 6)。生物学过程方面:DEGs 主要集中在“代谢过程”、“细胞过程”、“单一生物过程”、“生物调节”、“定位”、“刺激应答”和“细胞成分或生物合成”等 6 个功能小类占比高。两组 DEGs 比值差异来看,“繁殖”、“繁殖过程”和“细胞成分和生物合成”等 3 个过程比值较大,均超过 2.0 倍。认为:冰菜低温胁迫下,生物学过程中“细胞成分和生物合成”过程具有重要影响。细胞组分过程方面:DEGs 主要集中在“膜结构”、“膜成分”、“细胞”、“细胞成分”、“细胞器”和“细胞器成分”功能小类;两组 DEGs 比值差异来看:“细胞器成分”和“细胞器”等 2 个过程比值较高,分别为 2.96 倍和 2.07 倍。认为:冰菜低温胁迫下对细胞组分过程“细胞器成分”和“细胞器”功能小类有明显影响。分子功能过程方面:DEGs 主要集中在“催化活性”、“结合活性”和“转运活性”功能小类。两组 DEGs 比值差异来看:“分子功能调节”和“电子载体活性”过程比值达 3.00 倍和 2.00 倍,“核酸结合转录因子活性”过程比值为 0.5 倍。初步认为:低温胁迫对冰菜转录组水平“分子功能调节”、“电子载体活性”、“核酸结合转录因子活性”过程均有重要影响。

1.3.3 KOG 功能注释

将 T0vsT1 和 T0vsT2 两组 DEGs 注释到 KOG 数据库,通过对注释结果直系同源性分析,分别得到

表 5 差异表达基因注释数量统计

Table 5 Statistics of annotated DEGs

差异基因	注释	蛋白质直	基因本体	京都基因	真核生物蛋	蛋白质	经过注释	基因的进化谱	非冗余
分组	Annotated	系同源簇	数据库	与基因组	白相邻类的	家族的	的蛋白质	系:非监督直系	数据库
DEG_Set		数据库	GO	百科全书	聚簇数据库	数据库	序列数据库	群数据库	NR
		COG	KEGG	KOG	Pfam	Swiss-Prot	eggNOG		
T0vsT1	1 098	340	625	317	457	868	825	1 021	1 091
T0vsT2	1 512	575	897	501	744	1 220	1 176	1 425	1 500

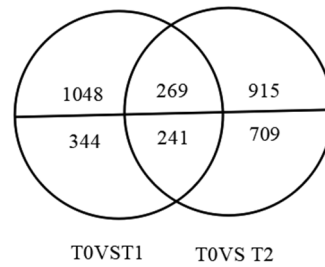


图 1 DEGs 韦恩图

注:上方和下方数字分别代表上调和下调基因数

Figure 1 Differentially expressed genes Venn diagram

Note: The above and below number represented up and down genes respectively

20 个和 24 个功能分类,其中 R (一般功能预测),分别得到 83 和 151 个注释,占比 18.17%和 20.29%;T (信号转导机制) 分别得到 72 和 77 个注释,分别占比 15.09%和 10.35%;O (翻译后修饰,蛋白质转换,伴侣),分别得到 46 和 94 个注释,分别占比 10.06%和 12.63%;Q (次生代谢产物生物合成,转运和代谢)得到 40 和 68 个注释,分别占比 8.75%和 9.14%;G (碳水化合物转运与代谢) 得到 28 个和 68 个注释结果,占比 6.13%和 9.14%;I (脂质转运与代谢)得到 21 个和 50 个注释,占比 4.59%和 6.72%;K (转录)得到 31 和 38 个注释结果,占比 6.78%和 5.11%。对两组 KOG 功能注释差值分析,R (一般功能预测),差值为 68 个;O (翻译后修饰,蛋白质转换,伴侣),差值为 48 个;G (碳水化合物转运与代谢),差值为 40 个;I (脂质转运与代谢),差值为 29 个;Q (次生代谢产物生物合成,转运和代谢),C (能源的产生和转化)差值为 28 个(表 7)。

1.3.4 KEGG 功能注释

将两组 DEGs 与 KEGG 数据库比对(表 8),T0vsT1 和 T0vsT2 分别有 155 和 272 条基因得到注释,分别富集在 74 条和 105 条代谢通路,其中 T0vsT1 组 DEGs 主要注释到植物信号转导(27 个)、淀粉和蔗糖代谢(16 个)、植物-病原互作(16 个)和苯丙醇类生物合成(12 个)等 4 个代谢通路;T0vsT2 组 DEGs 主要注释到苯丙醇类生物合成(24 个)、植物信号转导(18 个)、

表 6 低温胁迫处理差异表达基因 GO 功能注释比较

Table 6 comparisons of DEGs GO annotation by low temperature stress treatment

Go 条目	Go 层级	T0 vs T1	T0 vs T02	差异基因比值(T0vs_T1)/(T0vsT2)
Go term	Go classify			Ratio of DEGs (T0vsT02)/(T0vsT2)
生物学过程	代谢过程	247	429	1.74
Biological process	Metabolic process			
	细胞过程	239	356	1.49
	Cellular process			
	单一生物过程	171	301	1.76
	Single-organism process			
	生物调节	98	110	1.12
	Biological regulation			
	定位	58	97	1.67
	Localization			
	刺激应答	76	98	1.29
	Response to stimulus			
	细胞成分或生物合成	23	51	2.22
	Cellular component organization or biogenesis			
	发育过程	23	34	1.48
	Developmental process			
	多细胞生物过程	16	25	1.56
	Multicellular organismal process			
	繁殖	10	25	2.50
	Reproduction			
	繁殖过程	10	25	2.50
	Reproductive process			
细胞组分	细胞	166	298	1.80
Cellular component	Cell			
	细胞成分	160	290	1.81
	Cell part			
	膜结构	226	329	1.46
	Membrane			
	细胞器	88	182	2.07
	Organelle			
	膜成分	177	266	1.50
	Membrane part			
	细胞器成分	24	71	2.96
	Organelle part			
	复杂大分子	19	37	1.95
	Macromolecular complex			
	胞外区	22	37	1.68
	Extracellular region			
	细胞连接	10	18	1.80
	Cell junction			
分子功能	催化活性	289	502	1.74
Molecular function	Catalytic activity			
	结合活性	254	414	1.63
	Binding			

Go 条目	Go 层级	T0 vs T1	T0 vs T02	差异基因比值(T0vs_T1)/(T0vsT2)
Go term	Go classify			Ratio of DEGs (T0vsT02)/(T0vsT2)
分子功能	转运活性	42	61	1.45
Molecular function	Transporter activity			
	核酸结合转录因子活性	24	12	0.50
	Nucleic acid binding transcription factor activity			
	分子功能调节	4	12	3.00
	Molecular function regulator			
	抗氧化活性	9	13	1.44
	Antioxidant activity			
	电子载体活性	6	12	2.00
	Electron carrier activity			

谷胱甘肽代谢(13 个)、淀粉和蔗糖代谢(12 个)、嘌呤代谢(12 个)、氨基酸生物合成(12 个)、碳代谢(11 个)、氨基糖和核苷酸糖代谢(11 个)、精氨酸和脯氨酸代谢(10 个)、脂肪酸代谢(10 个)、类黄酮代谢(9 个)等 11 代谢通路。

T0vsT1 和 T0vsT2 两组 DEGs 差值分析表明,不同低温胁迫处理的冰菜(T1 与 T2),正向影响的代谢途径有:丙酮醇类生物合成、嘌呤代谢、谷胱甘肽代谢、脂肪酸代谢、类黄酮代谢、氨基酸的生物合成等代谢途径;负向影响代谢途径有:植物-病原互作、植物激素信号转导、淀粉和蔗糖代谢等途径。本研究着重选择淀粉和蔗糖代谢通路,寻找代谢差异发生的关键基因,为研究冰菜低温胁迫下淀粉和蔗糖代谢相关机理提供理论基础。

1.4 低温胁迫对冰菜淀粉和蔗糖代谢途径影响

对冰菜低温胁迫 1 h KEGG 中淀粉和蔗糖代谢途径中海藻糖 6-磷酸合酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)、海藻糖 6-磷酸酯酶(trehalose 6-phosphate phosphatase, TPP)、 β -淀粉酶(beta-amylase, BAL)、葡萄糖-1-磷酸腺苷酰转移酶、糖原磷酸化酶等共 5 个关键基因表现为上调表达,且未见下调表达基因。在 KEGG 代谢通路(Ko0500)中 D-葡萄糖(D-Glucose)、UDP-葡萄糖(UDP-Glucose)为催化底物的 TPS 显著上调表达,促进海藻糖 6-磷酸(Trehalose-6P)产物的积累,同时胞外海藻糖(Trehalose)通过具有对糖起到运输和磷酸化作用糖磷酸转移酶系统基因(phosphotransferase system, PTS),生成海藻糖 6-磷酸,TPP 对两种来源海藻糖 6-磷酸催化生成胞内海藻糖。胞内海藻糖类物质累积,初步认为是冰菜初期低温胁迫响应机制。另外,麦芽糖

糊精(Maltodextrin)和淀粉、糖原(Starch, glycogen)均在 BAL 催化下生成麦芽糖和糊精类物质;淀粉、糖原在糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, PYG)、葡萄糖-1-磷酸腺苷酰转移酶(Glucose-1-phosphate adenylyltransferase)催化下,生成 ADP-葡萄糖。冰菜低温胁迫 36h KEGG 中淀粉和蔗糖代谢途径中发现 TPS、己糖激酶(HK)、BAL 等共 3 个关键基因表现为上调表达,葡萄糖内酯-1,3- β 葡萄糖苷酶(Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, GLGC)基因表现为下调表达,另外在低温胁迫 1 h 和 36 h 时 TPS 和 BAL 均表现为基因多拷贝上调表达(表 9)。

麦芽糖和糊精类物质随低温胁迫时长增加而进一步在冰菜叶片中累积,明确麦芽糖和糊精类物质对冰菜低温胁迫的正向响应机制。本实验中,冰菜低温胁迫 T1 与 T2 表现差异为:随着低温胁迫时间延长,TPS 表达上调,TPP 相对表达下调,使得海藻糖 6-磷酸大量累积;T1 时期,淀粉和糖原通过 PYG 和 GLGC 催化生成 ADP-葡萄糖较强,T2 时期 ADP-葡萄糖积累较弱,且恢复至 T0 水平;另外,T2 条件下己糖激酶(hexokinase, HK)出现上调表达,促进 D-葡萄糖和 D-果糖(D-Fructose)磷酸化为 D-葡萄糖 6-磷酸(D-Glucose-6-P)和 D-果糖 6-磷酸(D-Fructose-6-P);葡萄糖内酯-1,3- β 葡萄糖苷酶(Glucan endo-1,3-beta-glucosidase)的下调表达,抑制 1,3- β -葡聚糖(1,3- β -Glucan)向 D-葡萄糖转化,间接累积 1,3- β -葡聚糖。最后, β -葡萄糖苷酶(β -D-Glucosidase)随着低温胁迫时间的延长,部分 β -葡萄糖苷酶家族基因表达量表现为先下调,后下调;部分 β -葡萄糖苷酶家族基因表现为先正常,后下调或上调,部分 β -葡萄糖苷酶家族基因表现为先上调,后正常现象。冰菜不同低温胁迫条件下, β -葡萄糖苷酶引起的响应效

表 7 低温胁迫处理差异表达基因 KOG 功能注释比较

Table 7 comparisons of DEGs KOG annotation by low temperature stress treatment

KOG	功能分类 Function classification	T0vsT1	T0vsT2	差异基因差值(T0vsT2)-(T0vsT1) Differences of DEGs (T0vsT2)-(T0vsT1)
A	RNA 的加工和修饰 RNA processing and modification	6	16	10
C	能源的产生和转化 Energy production and conversion	13	41	28
D	细胞周期调控, 细胞分裂, 染色体分配 Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	10	24	14
E	氨基酸转运与代谢 Amino acid transport and metabolism	22	40	18
G	碳水化合物转运与代谢 Carbohydrate transport and metabolism	28	68	40
I	脂质转运与代谢 Lipid transport and metabolism	21	50	29
K	转录 Transcription	31	38	7
L	复制, 重组和修复 Replication, recombination and repair	5	21	16
M	细胞壁/细胞膜的生物发生 Cell wall/membrane/envelope biogenesis	9	15	6
O	翻译后修饰, 蛋白质转换, 伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	46	94	48
Q	次生代谢产物的合成, 转运和代谢 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	40	68	28
R	一般功能预测 General function prediction only	83	151	68
S	未知功能 Function unknown	15	29	14
T	信号转导机制 Signal transduction mechanisms	72	77	5
U	胞质运输, 分泌和囊泡运输 Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	12	19	7
V	防御机制 Defense mechanisms	5	16	11
Z	细胞骨架 Cytoskeleton	11	25	14

应不明确。

1.5 冰菜淀粉和蔗糖代谢途径关键差异基因验证分析

将表 9 中部分 DEGs 进行荧光实时定量, 差异表达基因中 TPS (c22439)、TPS (c37455)、TPS (c31293)、TPP (c21588)、HK (c30615)、BAL (c36048)、BAL (c3-6010)、PYG (c36980) 共 8 个。以冰菜 *Actin* 基因 (c38220) 作为内参, 进行 qRT-PCR 验证。qRT-PCR 中 DEGs 的相对表达量与转录组表达水平相符(图 2), 表明其转录组水平分析结果可信, 其中 BAL (c36010)

基因 T0 与 T1, T0 与 T2 表达量差异均达极显著水平, 为冰菜淀粉和蔗糖代谢途径响应低温胁迫关键基因克隆提供研究基础。

2 讨论

低温胁迫条件下, 通过叶片中淀粉的水解, 增加细胞内可溶性糖含量, 被认为是植物响应低温胁迫的重要途径(Benina et al., 2013)。目前, 糖代谢在植物低温胁迫中的作用已被广泛关注和证实(Janska et al.,

表 8 低温胁迫差异表达基因 KEGG 功能注释比较

Table 8 Comparisons of DEGs KEGG function annotation by low temperature stress treatment

编号 Number	KEGG 功能注释 KEGG function annotation	T0vsT1	T0vsT2	差值(T0vsT2)-(T0vsT1) Differences (T0vsT2)-(T0vsT1)
ko00940	苯丙醇类生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	12	24	12
ko00230	嘌呤代谢 Purine metabolism	0	12	12
ko00480	谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	3	13	10
ko01212	脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism	1	10	9
ko00941	类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthesis	0	9	9
ko01230	氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	4	12	8
ko00330	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	3	10	7
ko00071	脂肪酸降解 Fatty acid degradation	1	8	7
ko00053	抗坏血酸和醛酸代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	0	6	6
ko01200	碳代谢 Carbon metabolism	5	11	6
ko00500	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	16	12	-4
ko04075	植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	27	18	-9
ko04626	植物-病原互作 Plant-pathogen interaction	16	6	-10

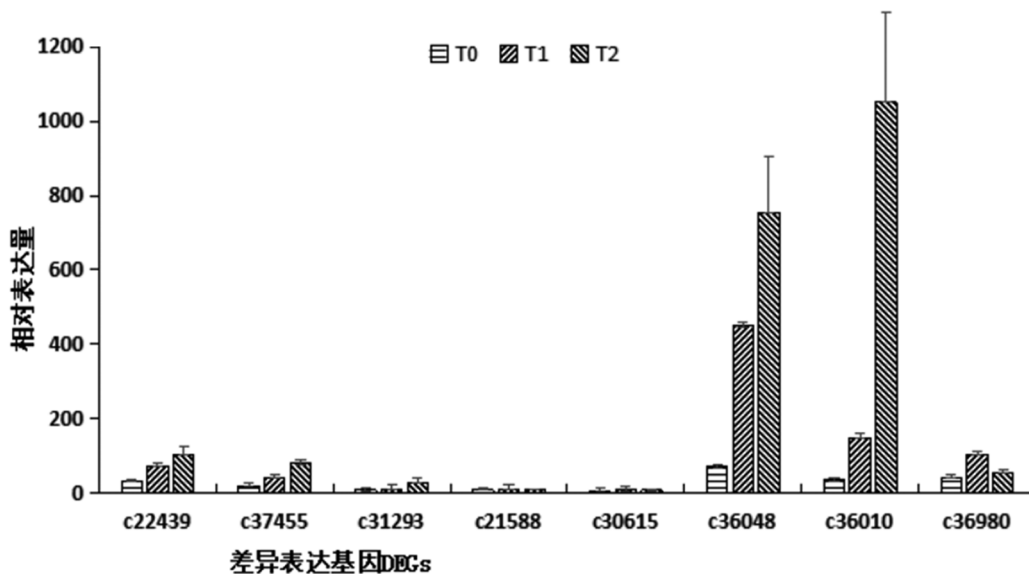


图 2 差异表达基因荧光实时定量 PCR 相对表达量

Figure 2 The relative expression levels of DEGS by qRT-PCR

表 9 低温胁迫下冰菜淀粉与蔗糖代谢途径关键基因差异表达情况

Table 9 Expression of the key genes of starch and sucrose metabolism under low-temperature?stress

酶 Enzyme	名称 Name	简称 Abbreviation	FPKM			(T0 T1)基因表达 (T0 T1) Genes expression	(T0 T2)基因表达 (T0 T2) Genes expression	基因 ID Gene ID
			T0	T1	T2			
EC:2.4.1.15	海藻糖 6- 磷酸合酶 Trehalose 6-phosphate synthase	TPS	30.24	70.41	103.89	UP	UP	c22439
EC:2.4.1.15	海藻糖 6- 磷酸合酶 Trehalose 6-phosphate synthase	TPS	19.23	39.55	78.8	UP	UP	c37455
EC:2.4.1.15	海藻糖 6- 磷酸合酶 Trehalose 6-phosphate synthase	TPS	2.84	9.42	28.39	UP	UP	c31293
EC:3.1.3.12	海藻糖 -6- 磷酸酯酶 Trehalose 6-phosphate phosphatase	TPP	3.58	9.11	3.94	UP	_	c21588
EC:2.7.1.1	己糖激酶 Hexokinase	HK	1.25	2.8	6.64	_	UP	c30615
EC:3.2.1.2	β - 淀粉酶 beta-amylase	BAL	69.65	448.56	754.81	UP	UP	c36048
EC:3.2.1.2	β - 淀粉酶 beta-amylase	BAL	34.08	147.57	1050.72	UP	UP	c36010
EC:2.7.7.27	葡萄糖 -1- 磷酸腺苷酰转移酶 Glucose-1-phosphate adenyltransferase	/	26.23	172.87	18.53	UP	_	c16507
EC:2.4.1.1	糖原磷酸化酶 Glycogen phosphorylase	PYG	40.18	101.63	55.08	UP	_	c36980
EC:3.2.1.39	葡萄糖内酯 -1,3- β 葡萄糖苷酶 Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	/	28.6	14.69	6.94	_	DOWN	c20139

2011)。在淀粉代谢中， β - 淀粉酶是植物中参与淀粉水解的关键酶类，在茶树应对低温胁迫中发挥重要作用(岳川, 2015)，本研究冰菜低温胁迫 T1 与 T2 与其研究结果相一致；在植物海藻糖代谢中，主要以 TPS/TPP 途径进行合成，TPS 和 TPP 是调节海藻糖合成过程中的关键酶(丁泽红等, 2019)，其成员多数能够参与到调节植物的抗逆生理过程(Jiang et al., 2014)；当作物在遭受低温时，植物体海藻糖能够迅速合成，以保护机体(王琦等, 2019)。冰菜 T1 和 T2 时期海藻糖合成关键基因显著表达，导致海藻糖和海藻糖 -6- 磷酸迅速合成，对低温条件下冰菜叶片起到良好的保护作用(徐铭等, 2017)。另外，HK 启动子上含有低温顺式表达元件，易受到低温诱导引起葡萄糖 -6- 磷酸和 D- 果糖 -6- 磷酸积累(赵锦等, 2015)。通过对冰菜低温胁迫条件下淀粉和蔗糖代谢途径分析 DEGs 分析，初步阐明：低温胁迫 T1 初期，海藻糖、麦芽糖、糊精和 ADP- 葡萄糖类可溶性糖在冰菜叶片中得到累积；低温胁迫 T2 时期，海藻糖 -6- 磷酸、麦芽糖、糊精、D- 葡萄糖 -6- 磷酸、D- 果糖 -6- 磷酸、1,3- β - 葡聚糖亦进一步在冰菜叶片中累积，与

低温解除细叶百合过程中糖类成分积累规律相似(刘芳等, 2016)。经实时 qRT-PCR 分析，DEGs 相对表达量与转录组表达水平相符。

利用高通量转录组测序技术，前期项目组初步对冰菜盐胁迫相关代谢分析和关键基因挖掘(练冬梅等, 2019)，在此基础上，继续开展冰菜低温胁迫条件下，蔗糖与淀粉代谢等过程变化和糖类物质的积累规律研究，并初步阐明期分子机理，为下一步研究调控低温胁迫过程的转录因子及其关键功能基因、信号转导途径提供参考。以上盐胁迫、低温逆境冰菜分子机制的研究，有助于冰菜抗逆新品种的改良及培育，并在指导冰菜生产实践上具有重要意义。

3 材料与方法

3.1 试验材料

试验材料：冰菜；种植地点：福建省农业科学院亚热带农业研究所试验农场；种植和处理时间：2019 年 12 月 11 日育苗，次年 1 月 10 日定植，2 月 15 日放

- tabolizing to chilling stress in melon seedlings, Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 39(3): 498-505 (刁倩楠, 田守波, 陈幼源, 熊浩楠, 张永平, 2019, 甜瓜幼苗叶片内源一氧化氮和蔗糖代谢对低温胁迫的响应, 西北植物学报, 39(3): 498-505)
- Ding Z.H., Wu C.L., Yan.Y., Fu L.L., and Hu.W., 2019, Cloning and expression analysis of trehalose-6-phosphate phosphatase gene *MeTPP6* in cassava, Jiangsu Nongye Kexue (Jiangsu Agricultural Sciences), 47(6): 31-35(丁泽红, 吴春来, 颜彦, 付莉莉, 胡伟, 2019, 木薯海藻糖-6-磷酸酯酶 *MeTPP6* 基因克隆及其表达分析, 江苏农业科学, 47(6): 31-35)
- He Y.F., Li X., and Xie Y.F., 2016, Research progress in sugar signal and its regulation of stress in plants, Zhiwu Shengli Xuebao (Plant Physiology Communications), 52(3): 241-249 (何亚飞, 李霞, 谢寅峰, 2016, 植物中糖信号及其对逆境调控的研究进展, 植物生理学报, 52(3): 241-249)
- Janska A., Aprile A., Zamecnik J., Cattivelli L., and Ovesna J., 2011, Transcriptional responses of winter barley to cold indicate nucleosome remodelling as a specific feature of crown tissues, Funct. Integr. Genom., 11(2): 307-325
- Jiang T., Zhai H., Wang F.B., Zhou H.N., Si Z.Z., He S.Z., and Liu Q.C., 2014, Cloning and characterization of a salt tolerance-associated gene encoding trehalose-6-phosphate synthase in sweet potato, Journal of Integrative Agriculture, 13 (8): 1651-1661
- Lian D.M., Lai Z.F., Yao Y.Y., Lin B.Z., and Hong J.J., 2019, Transcriptome analysis of *Mesembryanthemum crystallinum* under salt stress, Redai Yaredai Zhiwu Xuebao (Journal of Tropical and Subtropical Botany), 27(3): 279-284 (练冬梅, 赖正锋, 姚运法, 林碧珍, 洪建基, 2019, 冰菜盐胁迫下的转录组分析, 热带亚热带植物学报, 27(3): 279-284)
- Liu F., Chen Y.W., Li D.D., Lian H., Wu X., Yang J., Li Y.Q., Xie S.F., and Chen X.W., 2016, Changes in carbohydrate status and related enzymes of *Lilium pumilum* bulbs during breaking dormancy under refrigerated conditions, Caoye Xuebao (Acta Prataculturae Sinica), 25(5): 60-68 (刘芳, 陈业雯, 李丹丹, 廉华, 吴瑕, 杨瑾, 李雨琦, 谢守峰, 陈学武, 2016, 细叶百合低温解除休眠过程中鳞茎内糖分及相关酶的研究, 草业学报, 25(5): 60-68)
- Liu W.Y., 2018, The effects of low temperature stress on the callus of *Lycium ruthenicum* Murr., Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 37 (1): 408-412 (刘文盈, 低温胁迫对黑果枸杞愈伤组织的影响, 基因组学与应用生物学, 37(1): 408-412)
- Matthew J.P., Lucia F.P., Deveraj J., and Zhang Y.H., 2008, Trehalose metabolism and signaling, Annual Review of Plant Biology, 59(1): 417-441
- Qian H.Y., Pan B.G., Diao W.P., Yi W., Guo G. J., Liu J. B., Chen X. H., and Wang S. B., 2019, Research progress on low temperature resistance of vegetable crops in China, Zhongguo Shucai (China Vegetables), 1(6): 29-34 (钱恒彦, 潘宝贵, 刁卫平, 戈伟, 郭广君, 刘金兵, 陈学好, 王述彬, 2019, 我国蔬菜作物耐低温性研究进展, 中国蔬菜, 1(6): 29-34)
- Shen J., Li S.X., and Peng M., 2019, Analysis and identification of differentially expressed proteins in response to low temperature stress in cassava, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 17(4): 1121-1129 (沈婕, 李淑霞, 彭明, 2019, 木薯响应低温胁迫差异蛋白质的功能分析及鉴定, 分子植物育种, 17(4): 1121-1129)
- Sun Y.M., Liu L.J., Feng M.F., Wang J.H., Cang J., Li S., Bao Y. Z., and Wang X.T., 2015, Research progress of sugar metabolism of plants under cold stress, Dongbei Nongye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Agricultural University), 46(7): 95-102 (孙永梅, 刘丽杰, 冯明芳, 王军虹, 苍晶, 李速, 包雨卓, 王秀田, 2015, 植物在低温胁迫下的糖代谢研究进展, 东北农业大学学报, 46(7): 95-102)
- Wang Q., Liu T.R., Liu N., Xiong F., Zhang Y.M., and Dong L. L., Cloning and expression analysis of trehalose-6-phosphate synthase gene *PhTPS6* from *Petunia hybrida*, Xibei Nongye Xuebao (Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica), 28(2): 273-278 (王琦, 刘同瑞, 刘娜, 熊枫, 张水明, 董丽丽, 矮牵牛海藻糖-6-磷酸合酶基因 *PhTPS6* 的克隆与表达分析, 西北农业学报, 28(2): 273-278)
- Wang Z.H., and Yu Y.L., 2016, The high-yield cultivation technique of African *Mesembranthemum crystallinum* L., Nongye Kexue Yu Jishu (Agricultural Science & Technology), 17(12):2769-2770 (王志和, 于丽艳, 2016, 非洲冰菜高效栽培技术, 农业科学与技术, 17(12): 2769-2770)
- Xu M., Nie X.Y., Chen H., and Lin J., 2017, Transcriptome analysis of low-temperature-induced proteins in late-stage anther of *Arabidopsis thaliana*, Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 36(7): 2954-2964 (徐铭, 聂昕怡, 陈虎, 林娟, 2017, 低温诱导蛋白在拟南芥花药晚期的转录组分析, 基因组学与应用生物学.36(7): 2954-2964)
- Yue C., 2015, Cloning and expression analysis of sugar-related genes during cold acclimation in tea plant, Dissertation for Ph.D, Zhongguo Nongye Kexueyuan (Chinese Academy of Agricultural Sciences), Supervisor: Yang Y.J., pp.111-112 (岳川, 2015, 茶树糖类相关基因的挖掘及其在茶树冷驯化中的表达研究, 博士学位论文, 中国农业科学院, 导师: 杨亚军, pp.111-112)
- Zhao J., Sun M.H., Hu D.G., and Hao Y.J., 2015, Molecular cloning and expression analysis of a hexokinase gene *Md-HXK1* in apple, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 42(8): 1437-1447 (赵锦, 孙美红, 胡大刚, 郝玉金, 2015, 苹果己糖激酶基因 *MdHXK1* 的克隆与表达分析, 园艺学报, 42(8): 1437-1447)