



赵茜, 南瓜干旱胁迫相关基因的转录组分析[J]. 黑龙江农业科学, 2020(10):25-29, 30.

南瓜干旱胁迫相关基因的转录组分析

赵 茜

(黑龙江省农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:南瓜是一种重要的经济作物,干旱是南瓜生产的主要限制因素之一。为探索南瓜耐旱的分子机制和挖掘耐旱相关基因,本研究通过 PEG-6000 模拟干旱胁迫处理南瓜品种金贝 1 号,对不同时期南瓜叶片进行高通量测序。结果表明:共获得 1 254 个共表达差异基因,通过基因功能注释和富集分析,126 个基因参与耐旱生物进程。值得关注的是,其中表达量最高的 5 个基因均参与糖酵解通路,因此,推测糖酵解是南瓜的耐旱分子机制的重要途径。

关键词:南瓜;金贝 1 号;转录组;干旱胁迫;耐旱相关基因

南瓜是一年生蔓生草本植物,作为一种重要的园艺作物被广泛种植。尽管育种工作者一直在通过杂交选育来培育适宜地区的耐旱南瓜新品种,但还是无法覆盖整个产区的市场需求。

随着南瓜基因组测序的完成和分子生物技术的不断进步,高通量测序近年来发展迅速,特别是 RNA 测序(RNA-seq),可以实现转录组和差异表达基因的同步分析,其结果可以在动态范围准确鉴定基因表达情况,从而更好地理解分子机制,尤其是在植物抗逆性基因解析方面。目前, RNA-seq 技术已经成功用于植物耐盐性^[1-4]、耐碱性^[5-7]、抗虫性^[8-10]、营养缺失及利用效率^[11-12]和种子活性^[13-14]等领域研究。RNA 测序技术具有检测分辨率高、样品用量少、快速、性价比高等特点,最主要的是其操作简单,经过简单修饰直接可以进行高通量平台测序。RNA-seq 应用在南瓜作物分子生物学研究中较晚,基础研究薄弱,仅有关于南瓜转录组组装及标记开发^[15-16]、果实大小差异^[17]、抗白粉病基因表达^[18]的研究报道。目前,南瓜的抗逆性研究主要集中在一些生理指标,如抗氧化酶活性、脂质过氧化和脯氨酸积累的测定^[19],未见关于南瓜耐旱性基因表达相关的报道。本研究通过 PEG6000 处理南瓜幼苗模拟干旱胁迫,进行南瓜耐旱性转录组基因表达分析,旨在为南瓜耐旱抗逆育种提供基因源信息。

1 材料与方法

1.1 材料

所用材料为黑龙江省农业科学院经济作物研究所育成的籽用南瓜品种金贝 1 号。试剂聚乙二醇(PEG-6000,沪试)为化学分析纯。

1.2 方法

将南瓜种子在清水中浸泡 24 h,待其充分吸水膨胀,然后置于混合培养土(蛭石:土=1:1)中,放入湿度为 75%的人工培养箱培养,设置温度为 28 ℃ 16 h/20 ℃ 8 h,光照 16 h·d⁻¹,光强≥3 000 lx,待萌发出苗至第三片叶展开,洗净根土,置于溶液浓度为 150 mmol·L⁻¹ PEG-6000 的三角瓶(同时以清水设置对照)处理,每样品设置 2 个生物学重复。分别取未处理(C1、C2)、处理 1 d(T11、T12)、2 d(T21、T22)和 4 d(T41、T42)的 8 份南瓜顶端嫩叶液氮保存,后续的 RNA 提取和测序分析在苏州金唯智生物科技有限公司完成。

利用 Illumina 技术构建金贝 1 号南瓜 cDNA 文库,并进行随机测序。测序所得原始数据经质量控制,将低质量数据和含有测序载体或接头的的数据删除后,8 份样品共获得 Clean Data 约 58.5 Gb。使用 RSEM 软件(V1.2.4)计算基因表达量 FPKM(Fragment Per Kilo bases per Million reads)值,FPKM 计算公式为:

$$FPKM = 10^9 C / NL$$

式中:C 为唯一比对到基因的片段数,N 为唯一比对到全部基因的总片段数,L 为基因的碱基长度。

收稿日期:2020-07-08

基金项目:黑龙江省农业科学院院级科研项目(2018YYYYF004,2019JCQN003);黑龙江省农业科学院创新工程项目(HNK2019CX14,HNK2019CX08);黑龙江省自然科学基金优秀青年基金(YQ2020C040)。

作者简介:赵茜(1982-),女,博士,助理研究员,从事植物病理研究。E-mail:zhaoqian0401@sina.com。

2 结果与分析

2.1 测序数据

测序数据详见表 1,其中所有样品的 Q20 值都在 99% 以上,同时 GC 含量为 47.67%~48.35%,表明测序数据质量较高,完全可以进行

下一步的基因组组装和差异基因表达分析。两次生物学重复之间的基因表达相关性较高,相关系数(R^2)分别为对照组 C1/C2(0.971)、T11/T12(0.979)、T21/T22(0.942)和 T41/T42(0.983)。

表 1 测序所得 Clean Data 统计
Table 1 Clean Data statistics from sequencing

样品 Sample	长度 Length/bp	读长 Reads	碱基数 Bases	Q20/%	GC/%
C1	124.46	60125334	7483023388	99.36	48.35
C2	123.26	54128778	6672136929	99.23	47.68
T11	124.43	62422020	7767035278	99.33	47.67
T12	124.32	57381976	7133819421	99.30	47.84
T21	124.46	60066230	7475872559	99.37	47.87
T22	118.03	61827146	7576301305	99.64	47.81
T41	124.41	56385726	7014765750	99.35	47.96
T42	124.26	59471292	7390119324	99.31	48.03

2.2 基因组组装

南瓜基因组组装的完成^[20]为其干旱胁迫基因转录调控表达的研究奠定了基础。利用 Bowtie2 (v2.1.0)软件将转录组测序数据 Clean Data 进行基因组有参比对(表 2)(参考基因组见 <http://cucurbitgenomics.org/organism/8>),各样

品的总比对数介于 22.31~26.6 Mb(比对率:38.88%~44.74%),比对到参考基因组多个位置的比对数在 14.19~16.99 Mb。将比对到基因组唯一位置的比对数用于后续的基因表达分析,其数量为 8.06~9.67 Mb,占有所有对比数的 14.04%~17.74%。

表 2 基因比对结果
Table 2 Blast results of genes

样品 Samples	总比对数 Total mapped/Mb	唯一比对数 Unique mapped/Mb	多位置比对数 Multi mapped/Mb	比对率 Mapped rate/%	唯一比对率 Unique mapped rate/%
C1	25.807774	90.37386	16.770388	42.92	15.03
C2	23.792226	96.00424	14.191802	43.95	17.74
T11	26.632880	96.37906	16.994974	42.67	15.44
T12	22.307914	80.55084	14.252830	38.88	14.04
T21	25.957230	96.98022	16.259208	43.21	16.15
T22	25.777362	93.36434	16.140928	42.38	15.35
T41	25.227542	92.02726	16.024816	44.74	16.32
T42	26.454904	96.67984	16.786920	44.48	16.26

对不同表达水平区间(0~0.1,0.1~1.0,1.0~3.0,3.0~15.0,15.0~60.0和>60.0)的基因数量分布由图 1 可知,各样本 FPKM 值超过 1 的基因数量占有所有基因的 59.96%~78.66%。

通过所有基因 FPKM 的盒形图对不同实验条件下的基因表达水平进行比较(图 2),每个区

域的盒形图对应 5 个统计量(至上而下分别为最大值,上四分位数,中值,下四分位数和最小值)。通过图 2 中基因表达水平及其丰度对比发现,各样品生物学重复间基因表达水平基本一致,说明已经获得的各样本的 RNA 数据,可用于进一步分析不同处理间基因表达量差异分析。

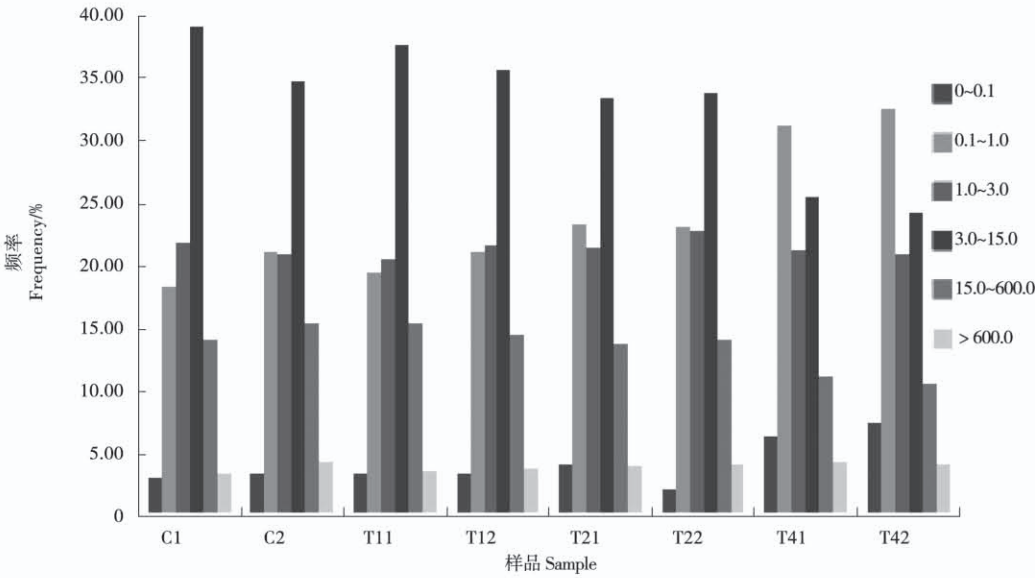


图 1 基因表达频率

Fig. 1 Frequency of gene expression

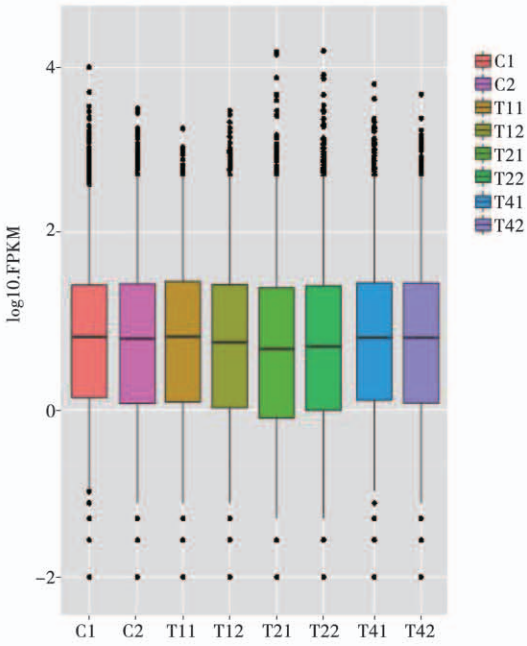


图 2 基因表达水平对比

Fig. 2 Comparison of gene expression level

2.3 差异表达基因

将所有基因利用 Bioconductor 软件包的 DESeq(V1.14.0) 进行基因差异表达分析, 基于负二项分布模型, 获得不同处理的差异表达基因, 按照差异基因表达变化 2 倍以上且 $FDR \leq 0.05$ 的条件筛选获得 15 734 个显著表达基因, 处理组 1 d(T1)、2 d(T2) 和 4 d(T4) 较对照组(C) 分别获得差异表达基因为图中紫色表示对照与 T1 之间

差异表达基因的个数, 共 1 450 个(上调基因 683 个、下调基因 767 个); 图中黄色表示对照与 T2 之间的差异表达基因的个数, 共 4 017 个(上调基因 2 675 个、下调基因 1 342 个); 图中绿色表示对照与 T4 之间的差异表达基因的个数, 共 10 267 个(上调基因 6 667 个、下调基因 3 600 个)(图 3), 其中对照与 T1、T2 和 T4 共表达基因为 1 254 个, 占有差异表达基因的 11.8%(图 3)。

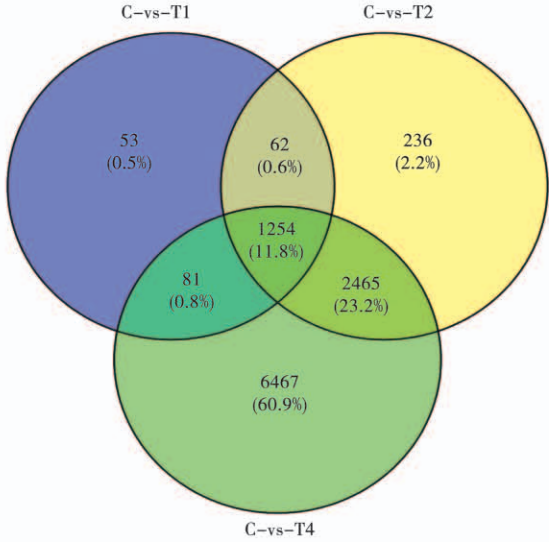


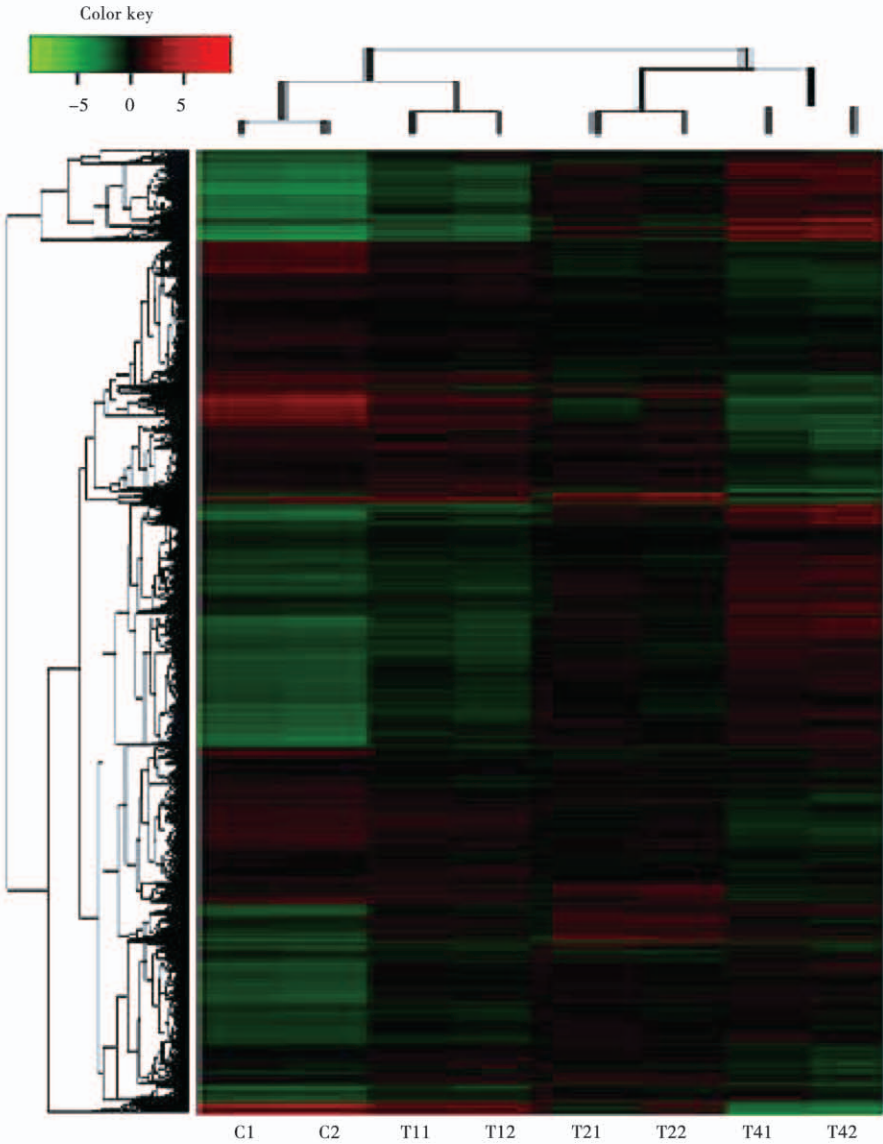
图 3 差异表达基因分布

Fig. 3 Distribution of differentially expressed genes

为判别不同处理差异基因的表达模式, 将 1 254 个共表达基因进行层次聚类分析, 从而识别

位置基因的功能或抑制基因的位置功能,由图 4 可见,不同处理的两次重复具有相似的功能或参与相同的生物学过程,对照与处理之间表达模式

存在着显著差异,不同处理之间等位基因表达存在着差异。



图中不同颜色区域表示不同的聚类分组信息,同组内的基因表达模式相近,可能具有相似的功能或参与相同的生物学过程(图中红色表示高表达基因,绿色表示低表达基因,颜色从绿到红,表示基因表达量越高)。
Different color regions in the figure represent different cluster grouping information. Gene expression patterns in the same group are similar, and they may have similar functions or participate in the same biological process (red represents high-expressed genes, green represents low-expressed genes, and the color from green to red represents higher gene expression).

图 4 差异表达基因聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of differentially expressed genes

2.4 差异表达基因的富集和注释

利用 Gene Ontology (GO)描述基因的分子功能 (molecular function)、细胞组分 (cellular component) 和参与的生物过程 (biological process)。将所有差异表达基因向 Gene Ontology 数据库 (<http://www.geneontology.org/>) 的

各个 term 映射, P-value 阈值设置 0.05, 找出与整个南瓜基因组背景下差异表达基因中显著富集的 GO 条目, 进行差异表达显著基因的 GO 功能显著性富集分析, 共获得分子功能相关基因 239 个, 细胞组分相关基因 86 个, 参与的生物过程相关基因 126 个。

对南瓜的耐旱性研究更倾向于分析参与生物过程的相关差异表达基因,对 126 个生物过程相关基因进行的 GO 功能富集,分析得到表达量最高的 5 个差异基因,其中 3 个上调基因:醛脱氢酶(ALDH, EC: 1. 2. 1. 3)、6-磷酸果糖激酶 1(PFK, EC: 2. 7. 1. 11)、6-磷酸葡萄糖差向异构酶 1(EC: 5. 1. 3. 15)和 2 个下调基因:1,6-二磷酸果糖激酶 1(FBP, EC: 3. 1. 3. 11)、二磷酸果糖醛缩酶 I 类(ALDO, EC: 4. 1. 2. 13),进一步对这些基因进行 KEGG 功能注释,发现这 5 个基因都在糖酵解循环通路(GLYCOLYSIS/GLUCONEOGENESIS, ko00010)中表达,表明在南瓜应对干旱胁迫中,糖酵解循环可能为主要的缓解逆境调控途径。

3 结论

通过转录本差异表达分析,筛选到南瓜品种金贝 1 号的 15 734 个显著表达基因,其中共表达基因 1 254 个,占有差异表达基因的 11. 8%,进一步的 GO 分析,获得分子功能相关基因 239 个(细胞组分相关基因 86 个,参与的生物过程相关基因 126 个)。其中表达量最高的 3 个上调基因和 2 个下调基因。同时,对进行 KEGG 功能注释,发现这 5 个基因都在糖酵解循环通路中表达,表明在南瓜应对干旱胁迫中,糖酵解循环是主要的缓解逆境调控途径。

参考文献:

- [1] Chen P, Zuo L, Yu X, et al. Response mechanism in *Populus* × *Euramericana* cv. '74/76' revealed by RNA-seq under salt stress[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2018, 40(5): 96.
- [2] Wu J, Zhao Q, Wu G, et al. Comprehensive analysis of differentially expressed unigenes under NaCl stress in flax(*Linum usitatissimum* L.) using RNA-Seq[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(2): 369.
- [3] Bazakos C, Manioudaki M E, Therios I, et al. Comparative transcriptome analysis of two olive cultivars in response to NaCl-stress[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42931.
- [4] 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.
- [5] Li N, Liu H, Sun J, et al. Transcriptome analysis of two contrasting rice cultivars during alkaline stress[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 9586.
- [6] Chang Y, Tang R, Dou X, et al. Transcriptome and expression profiling analysis of *Leuciscus waleckii*: An exploration of the alkali-adapted mechanisms of a freshwater teleost[J]. *Molecular Biosystems*, 2014, 10(3): 491-504.
- [7] Guo D, Lv D K, Xi B, et al. Global transcriptome profiling of wild soybean (*Glycine soja*) roots under NaHCO₃ treat-

- ment[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(1): 153.
- [8] Irani S, Trost B, Waldner M, et al. Transcriptome analysis of response to *Plasmodiophora brassicae* infection in the *Arabidopsis* shoot and root[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 23.
- [9] Li H, Jiang W, Zhang Z, et al. Transcriptome analysis and screening for potential target genes for RNAi-mediated pest control of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e65931.
- [10] Firmino A A P, Fonseca F C D A, Macedo L L P D, et al. Transcriptome analysis in cotton boll weevil(*Anthonomus grandis*) and RNA interference in insect pests[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e85079.
- [11] Sinha S K, Sevanti V A M, Chaudhary S, et al. Transcriptome analysis of two rice varieties contrasting for nitrogen use efficiency under chronic N starvation reveals differences in chloroplast and starch metabolism-related genes[J]. *Genes*, 2018, 9(4): 206.
- [12] Huang J, Wei H, Li L, et al. Transcriptome analysis of nitric oxide-responsive genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0192367.
- [13] Su X, Xin L, Li Z, et al. Physiology and transcriptome analyses reveal a protective effect of the radical scavenger melatonin in aging maize seeds[J]. *Free Radical Research*, 2018, 52(10): 1-221.
- [14] Dong-Hun L, Hudson M K, Kihong K, et al. Transcriptome analysis of tomato flower pedicel tissues reveals abscission zone-specific modulation of key meristem activity genes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55238.
- [15] Xanthopoulou A, Psomopoulos F, Ganopoulos I, et al. De novo transcriptome assembly of two contrasting pumpkin cultivars[J]. *Genomics Data*, 2016, 7(C): 200-201.
- [16] Wu T, Luo S, Rui W, et al. The first Illumina-based de novo transcriptome sequencing and analysis of pumpkin(*Cucurbita moschata* Duch.) and SSR marker development[J]. *Molecular Breeding*, 2014, 34(3): 1437-1447.
- [17] Xanthopoulou A, Ganopoulos I, Psomopoulos F, et al. De novo comparative transcriptome analysis of genes involved in fruit morphology of pumpkin cultivars with extreme size difference and development of EST-SSR markers [J]. *Gene*, 2017, 622: 50-66.
- [18] Guo W L, Chen B H, Chen X J, et al. Transcriptome profiling of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) leaves infected with powdery mildew [J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190175.
- [19] Kusvuran S, Ellialtioglu S, Polat Z. Antioxidative enzyme activity, lipid peroxidation, and proline accumulation in the callus tissues of salt and drought tolerant and sensitive pumpkin genotypes under chilling stress[J]. *Horticulture Environment & Biotechnology*, 2013, 54(4): 319-325.
- [20] Sun H, Wu S, Zhang G, et al. Karyotype stability and unbiased fractionation in the Paleo-allotetraploid cucurbita genomes[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(10): 1293-1306.



王舒, 万平, 吕国丽, 等. 高纬寒地种植京农小豆品种筛选与农艺性状初步评价[J]. 黑龙江农业科学, 2020(10):30-33.

高纬寒地种植京农小豆品种筛选与农艺性状初步评价

王舒¹, 万平², 吕国丽¹, 蔡鑫鑫¹, 谭娟¹

(1. 黑龙江省农业科学院 黑河分院, 黑龙江 黑河 164300; 2. 北京农学院 植物科技学院, 农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:为丰富黑河第四积温带地区红小豆品种, 引进小豆品种京农 21、京农 23 和京农 26, 以黑河当地主种农家品种为对照进行比较试验, 比较评价生育期、农艺性状和产量及构成。结果表明: 京农 23 与黑河红小豆对照品种生育期接近, 京农 21 比黑河红小豆晚 20 d, 但也能成熟, 京农 26 在当地不能成熟。

关键词:京农小豆; 高纬寒地; 第四积温带

小豆(*Vigna angularis*)起源于中国, 是豆科虹豆属一年生草本植物, 俗称红小豆、赤豆和红豆等^[1], 其高营养, 富含铁锌、维生素 B、叶酸、类黄酮等生物活性物质, 含有其他豆类缺乏或很少含有的三萜皂甙等成分, 因此具有解毒、利尿、补血等功效^[2], 其提取物具有良好的抗氧化性和对多种疾病的预防、治疗作用^[3], 是中国主要栽培的食用豆类之一。随着国家对农业供给侧结构性改革措施的推动, 杂粮杂豆的种植面积显著增多。其中红小豆以其种子富含淀粉、维生素 B 族、蛋白质^[4]及良好的医用价值等优点, 越来越受到人们的喜爱。

黑龙江省是我国粮食种植大省, 大部分地区属于中温带, 土质比较肥沃, 适宜种植食用豆类,

是近年来国内最大的小豆产区^[5]。中国的红小豆种植虽然已经有几千年的历史, 但由于大家把重点都放在大豆玉米等主要农作物上, 忽视了红小豆等其他食用豆类的种植, 投入的科研力量少也导致新筛选培育的品种少, 也忽略了红小豆品种资源的保护。

我国红小豆种质资源丰富, 在国家种质资源库保存的种质约 5 000 份^[6]。农民长期种植地方品种, 品种资源薄弱、可选优良品种少, 品种纯度低, 抗逆性、抗病性等能力变差, 营养品质和商品性严重退化, 产量减少, 甚至有的品种面临濒危的处境^[7]。加上生产过程中缺乏科学指导, 产品中科技含量不高, 导致红小豆在市场上的竞争力下降^[8-9]。虽然小豆品种存在着诸多不足, 但是红小豆对环境的适应性很强, 在盐碱地、贫瘠地、干旱地均可生长, 因此小豆经常被用为恶劣生长环境下主要的栽培作物。由于其根系也具有固氮功能, 小豆也被用作禾谷类作物间作套种和良好的前茬作物, 是轮作过程中较好的选择, 对培肥地力

收稿日期: 2020-07-06

基金项目: 北京农学院科技成果培育计划(CGPY202009)。

第一作者: 王舒(1983-), 女, 学士, 助理研究员, 从事作物资源栽培研究。E-mail: wangshu1024hh@163.com。

通信作者: 万平(1962-), 女, 博士, 教授, 从事食用豆基因组学和分子遗传育种研究。E-mail: pingwan3@163.com。

Transcriptome Analysis of Pumpkin Under Drought Stress

ZHAO Qian

(Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: Pumpkin is one of the important economic crops in northeast China, drought is the main limiting factor for pumpkin production. In order to explore the molecular mechanism of drought tolerance and drought tolerance related genes in pumpkin, pumpkin variety Jinbei No. 1 was treated with PEG-6000 to simulate drought stress, high throughput sequencing of pumpkin leaves at different stages was carried out. The results showed that 1 254 differentially expressed genes were obtained, and 126 genes were involved in the biological process of drought tolerance through gene function annotation and enrichment analysis. It is worth noting that the five genes with the highest expression levels were involved in the glycolysis pathway. Therefore, it is speculated that glycolysis is an important pathway in the molecular mechanism of drought tolerance in pumpkin.

Keywords: pumpkin; Jinbei No. 1; transcriptome; drought stress; drought-tolerant genes