

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220180

# 金丝楸幼苗响应盐碱胁迫的生理和转录组分析

郜新强<sup>1,4</sup>, 王小艳<sup>1</sup>, 焦伟<sup>2</sup>, 李娜<sup>5</sup>, 王静<sup>1,3</sup>, 郑丽月<sup>1</sup>,  
王丹宁<sup>1</sup>, 王兴云<sup>1</sup>, 侯立江<sup>1</sup>, 尚增振<sup>1</sup>, 刘彦珍<sup>1,4\*</sup>

(1. 安阳工学院生物与食品工程学院, 河南 安阳 455000; 2. 滑县园林绿化管理处, 河南 安阳 455000;  
3. 三峡大学生物与制药学院, 湖北 宜昌 443000; 4. 河南省太行山林业有害生物野外科学观测研究站,  
河南 林州 456550; 5. 安阳市游园管理站, 河南 安阳 455000)

**摘要:** [目的] 研究不同盐碱胁迫对金丝楸幼苗生长、光合和生理指标的影响, 并结合转录组测序分析, 探究楸树耐盐碱的生理机制和分子机制。[方法] 采用盆栽法对金丝楸幼苗进行不同盐碱胁迫处理, 分析其生物量、光合及生理指标对不同盐碱响应的差异, 采用 Illumina 高通量测序技术进行转录组测序, 通过生物信息学分析盐碱胁迫对转录水平的影响。[结果] 不同盐碱胁迫下, 金丝楸幼苗叶片受伤害程度为  $\text{Na}_2\text{CO}_3 > \text{混合盐碱} > \text{NaCl}$ ; 新增株高和地径、地上部和根的干质量和鲜质量、生物量、根冠比均受到明显抑制, 并随盐碱浓度增加而抑制加强, 但生长胁迫指数均随浓度的增加而降低; 丙二醛 (MDA) 含量和相对电导率都随胁迫浓度增加而不同程度上升, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、可溶性糖含量、脯氨酸 (Pro) 含量、叶绿素总量和光合速率都呈现先上升后下降的趋势。转录组测序共产生约 60.4 Gb 原始数据, 组装得到 55 793 个 Unigenes, 其中 29 534 (52.93%) 个 Unigenes 获得了注释; 通过差异表达基因 (DEGs) 分析, 3 个比较组 (CK vs NaCl, CK vs  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 CK vs 混合盐碱) 分别筛选出 1 779、2 835 和 4 059 个 DEGs; DEGs GO 富集分析表明, 膜的整体成分、膜的内在成分、催化活性、类异戊二烯代谢和合成过程、氧化还原酶活性等条目被显著富集; DEGs KEGG 分析表明, 苯丙素生物合成、淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导、萜类主干生物合成和精氨酸代谢等通路被显著富集; 此外, 在 DEGs 中鉴定的 bHLH、ERF、MYB-related、NAC、C2H2、WRKY、MYB 和 bZIP 转录因子家族成员最多。[结论] 金丝楸主要通过积累可溶性糖和 Pro, 提高 SOD 酶活和光合作用来抵御盐碱胁迫, 但都呈现“低促高抑”的现象, 说明其具有一定阈值。金丝楸通过调节膜成分、催化活性、类异戊二烯代谢和生物合成过程、苯丙素生物合成、淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导等生物过程和代谢途径, 并结合有关转录因子共同响应盐碱胁迫。本研究为深入研究楸树耐盐碱生理机制和分子机制提供科学的理论依据。

**关键词:** 金丝楸; 盐碱胁迫; 转录组; 差异表达基因; 耐盐碱机制

中图分类号: S722

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2023)01-0166-13

当前, 全球土地盐碱化是人类面临的主要生态危机之一, 给农业生产带来了巨大损失, 严重威胁人类生存。据不完全统计, 全球盐碱地面积约为  $9.54 \times 10^9 \text{ hm}^2$ , 约占可耕地面积的 10%, 而我国盐碱地面积约有  $9.87 \times 10^8 \text{ hm}^2$ , 位居世界第三,

大部分为土壤盐化和碱化同时存在的复合盐碱地<sup>[1]</sup>。目前, 科学合理地开发和利用盐碱地已经成为我国农业和林业发展过程中面临的严峻挑战。

楸树 (*Catalpa bungei* C. A. Mey.) 是我国特有的珍贵优质用材和园林观赏树种, 属于紫葳科

收稿日期: 2022-04-14 修回日期: 2022-05-25

基金项目: 基于学生深度参与为导向的田间试验与统计课程建设探索与实践 (2020JGLX144) 省级; 卷丹百合高效再生体系的建立与优化技术条件及多倍体诱导的研究 (182102110209) 省级; 耐盐碱楸树材料筛选体系的建立 (安科 2018-25) 区级

\* 通讯作者: 刘彦珍, 副教授, 研究方向: 植物生理学。邮箱: 1135953615@qq.com

(Bignoniaceae) 梓属 (*Catalpa*) 落叶乔木, 其材质好、用途广、经济价值高, 自古就有“木王”的美誉。金丝楸自然分布于河南、山东和安徽等省, 是楸树的一个地理变种, 具有特殊金色纹理、生长快和干型通直的优点, 近年来得到大面积推广<sup>[2]</sup>。目前, 楸树的研究主要集中在嫁接繁育<sup>[3]</sup>、组培快繁<sup>[4]</sup>、扦插繁殖<sup>[5]</sup>、遗传转化<sup>[6]</sup>、遗传多样性分析<sup>[7]</sup>等方面, 关于楸树耐盐碱的研究鲜有报道。认识和了解楸树耐盐碱机制, 对指导楸树抗盐碱遗传改良和利用盐碱地具有重要的理论价值和现实意义。

近年来, 转录组测序技术 (RNA-Seq) 发展迅速, 该技术无须了解物种基因组信息, 弥补了非模式植物转录组研究中缺乏基因组信息的不足<sup>[8]</sup>。利用转录组解析植物的抗逆机制已经成为逆境研究的热点之一。目前, 利用 RNA-Seq 已进行了大麦<sup>[9]</sup>、水稻<sup>[10]</sup>、高粱<sup>[11]</sup>等盐胁迫的转录组分析, 对这些植物响应盐胁迫机理的探讨, 加深了人们对植物耐盐机制的认识。但是, 通过转录组分析楸树耐盐碱分子机制的研究尚未见报道, 仅有通过转录组分析楸树雄性不育和不定根发育分子机制的极少数报道<sup>[12-13]</sup>。

本研究以金丝楸幼苗为试验材料, 分析不同盐碱胁迫对金丝楸生长情况、光合及生理特性的影响, 探究其耐盐碱生理机制。进一步利用 RNA-Seq, 对处理组和对照组进行 DEGs 分析, 在转录水平上对楸树耐盐碱机制进行探索, 以期对楸树应

答盐碱胁迫的分子机制研究提供理论参考, 同时也为重要基因的克隆及其功能研究等奠定基础。

## 1 研究方法

### 1.1 试验材料和设计

试验于安阳工学院温室中进行, 2020年6月, 选择生长健壮、形态一致、根系完整的金丝楸幼苗种于盆中, 每盆种3株, 共种40盆。正常栽培管理, 60 d后进行盐碱胁迫处理。分别设置中性盐 A (NaCl)、碱性盐 B ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )、混合盐碱 C ( $\text{NaCl}:\text{Na}_2\text{CO}_3=1:1$ ) 3种盐碱胁迫处理, 总盐浓度设置 50、100、150、200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  4个梯度, A1-A4、B1-B4、C1-C4 分别代表从低到高的 NaCl、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、混合盐碱胁迫的 4个浓度, 共 12个处理浓度。2020年8月, 将试验材料随机分成 13组, 每组 3盆, 每盆浇 2.0 L 相应浓度的处理液, 对照组浇等体积的清水。期间正常栽培管理, 胁迫 30 d后进行生长、光合及生理指标的测定。胁迫 7 d后取长势一致且大小相近的 4组 (CK、A2、B2 和 C2) 叶片用于转录组测序, 生物学重复 2次。

### 1.2 盐碱胁迫危害调查

各处理组在盐碱胁迫后定期 (14、21、28 d) 对植株和叶片进行危害调查, 根据胁迫伤害症状, 设置分级标准 (图 1) 如下:

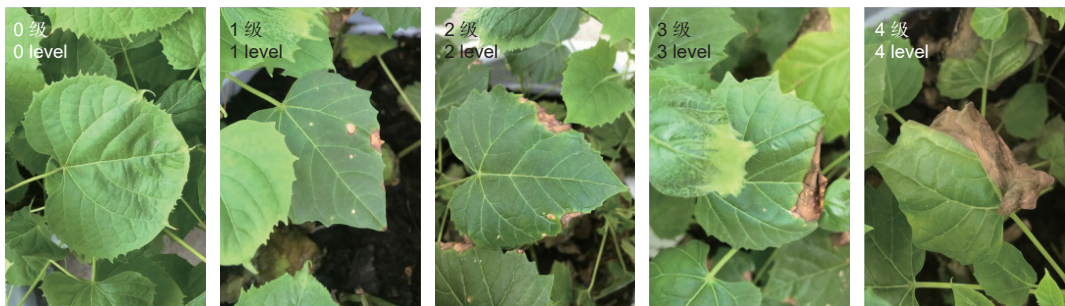


图 1 金丝楸不同伤害等级的叶片盐碱胁迫症状

Fig. 1 The symptom of different damage level on leaves of *C. bungei* under different saline-alkali stress

0 级: 枝条和叶片未见盐碱胁迫危害症状;

1 级: 有极少部分叶尖、叶缘和叶脉变黄, 枝条外观正常;

2 级: 有少部分的叶尖、叶缘焦枯, 枝条外观正常;

3 级: 约有 1/4 叶片有叶尖、叶缘焦枯和落叶

现象;

4 级: 约有 1/2 叶片枝枯、叶落直至死亡。

### 1.3 生长、光合及生理测定

1.3.1 新增株高和地径测定 对照组和处理组均选择 3 株进行编号, 处理前用卷尺和游标卡尺测定株高和地径, 胁迫 30 d后, 再次测定上述指标,

计算净生长量。

**1.3.2 生物量测定** 胁迫 30 d 后, 取对照组和处理组编号植株的根和地上部称其鲜质量, 80 °C 烘干至恒质量, 称其干质量, 计算生物量 (根干质量 + 地上部干质量)、根冠比 (根干质量/地上部干质量) 及生长胁迫指数 (处理组植株干质量/对照组植株干质量)<sup>[14]</sup>。

**1.3.3 光合指标测定** 用 SPAD-502Plus 叶绿素仪测定叶绿素总量, EBA-PE1001 高光效仪测定光合速率。

**1.3.4 生理生化指标测定** 用电导仪法测定相对电导率, 用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量, 用氮蓝四唑法测定 SOD 酶活, 用蒽酮显色法测定可溶性糖含量, 用酸性茚三酮法测定 Pro 含量<sup>[14]</sup>。

## 1.4 转录组测序和分析

**1.4.1 转录组测序** 样品经过 RNA 抽提、纯化、建库后, 基于 Illumina HiSeq 测序平台进行双末端测序。

**1.4.2 测序读长分析及拼接** 对原始数据进行过滤, 将带接头、小于 50 bp、平均质量在 Q20 以下的 Reads 去除, 得到高质量序列 (Clean Reads), 使用 Trinity 对 Clean Reads 进行 De novo 拼接得到转录本序列, 挑选最长的转录本作为 Unigene<sup>[8]</sup>。

**1.4.3 Unigenes 功能注释、分类、代谢途径分析及表达量计算** 用 Blast 对 Unigenes 进行 NR、GO、KEGG、eggNOG、SwissProt 和 Pfam 注释; 对所有 Unigenes 进行 GO 功能分析和 KEGG 代谢途径分析。用转录组表达定量软件 RSEM<sup>[15]</sup>, 计算每个基因的 FPKM 值<sup>[16]</sup>, 来代表每个基因的表达水平。

**1.4.4 差异表达基因分析** 用 DESeq 对基因表达进行差异分析, 筛选 DEGs 条件为: 表达差异倍数  $|\log_2\text{FoldChange}| > 1$ , 显著性  $P\text{-value} < 0.05$ 。然后将得到的 DEGs 再进行 GO 和 KEGG 分析。

**1.4.5 转录因子分析** 将蛋白质序列与 Plant TFDB 数据库比较<sup>[17]</sup>, 分析得到转录因子及其所属家族信息。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同盐碱胁迫对金丝楸生长的影响

不同盐碱胁迫后, 金丝楸均出现盐碱胁迫危害

症状。 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  胁迫对叶片伤害较大, 随胁迫浓度和时间的增加, 伤害等级增大, 胁迫处理 14 d,  $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时伤害等级达到 3 级, 而  $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时达到 4 级; 而 NaCl 胁迫对叶片伤害较小, 胁迫处理 21 d,  $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时伤害等级达到 2 级,  $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时达到 4 级; 混合盐碱胁迫下叶片伤害介于  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和 NaCl 之间。

不同盐碱胁迫下, 金丝楸的生长情况受到不同程度的影响 (表 1)。 $\text{NaCl}$  胁迫下,  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时新增株高被极显著的抑制, 且浓度越高抑制作用越显著;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  胁迫对新增株高的影响较小, 在  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时新增株高显著降低, 且随浓度增加株高极显著降低; 混合盐碱胁迫对新增株高抑制作用最轻, 但也都达到极显著水平。此外, 低浓度 NaCl 和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  胁迫对地径有增粗作用, 在  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 胁迫下, 新增地径显著增加, 而在  $150$ 、 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  不同盐碱胁迫下, 新增地径均极显著减小。

植物在盐碱胁迫下生物量的变化可直观反映生长状况 (表 1)。与对照组相比, NaCl 和混合盐碱处理组,  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时地上部干质量和鲜质量都有增加, 但随浓度增加而下降;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  处理组地上部干质量和鲜质量随着浓度增加而下降。根干质量和鲜质量只在  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  混合盐碱处理组有增加, 其它处理组都随浓度增加而下降。生物量的变化趋势与地上部干质量的变化基本一致。各处理组的根冠比均显著降低。不同盐碱胁迫下生长胁迫指数均随胁迫浓度的增加而降低,  $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时各处理组生长胁迫指数分别为 0.26、0.18、0.23, 可以看出  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  胁迫降幅较大, NaCl 和混合盐碱胁迫对生长胁迫指数影响较小。这些结果表明,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  和混合盐碱胁迫对金丝楸的生长发育抑制更严重, 与对叶片危害的影响一致。

### 2.2 不同盐碱胁迫对金丝楸生理和光合指标的影响

不同盐碱胁迫对金丝楸生理和光合指标的影响见表 2。各处理组中, MDA 含量和相对电导率都随处理浓度的增加而显著上升。NaCl 和混合盐碱处理组中, 可溶性糖含量在  $50\sim 150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时逐渐积累, 而在  $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时小幅下降; 而  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  处理组中, 在  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时达到最大值, 随浓度增加而下降。各处理组中, Pro 含量都



表 1 不同盐碱胁迫对金丝楸幼苗生长的影响

Table 1 Effects of different saline-alkali stress on the growth of *C. bungei* seedlings

处理 Treatment		新增株高 Net growth of plant height/ cm	新增地径 Net growth of stem diameter/ mm	地上部overground part		
				鲜质量 Fresh weight/g	干质量 Dry weight/g	
CK	0	18.68 ± 0.62	1.23 ± 0.09	24.60 ± 1.14	5.70 ± 0.19	
NaCl胁迫 NaCl stress	50	12.58 ± 0.62**	1.50 ± 0.13*	27.06 ± 1.08	6.75 ± 0.25*	
	100	10.00 ± 0.53**	0.98 ± 0.09*	15.94 ± 0.07**	3.31 ± 0.05**	
	150	8.14 ± 0.36**	0.66 ± 0.10**	10.13 ± 0.14**	2.14 ± 0.09**	
	200	5.92 ± 0.79**	0.40 ± 0.07**	6.92 ± 0.18**	1.54 ± 0.08**	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 胁迫 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> stress	50	17.64 ± 0.98*	1.26 ± 0.10	18.87 ± 0.62**	4.68 ± 0.18**	
	100	12.68 ± 0.58**	1.03 ± 0.09	11.20 ± 0.84**	3.14 ± 0.22**	
	150	10.48 ± 1.36**	0.57 ± 0.09**	6.87 ± 0.24**	1.73 ± 0.09**	
	200	6.58 ± 0.74**	0.37 ± 0.05**	4.80 ± 0.10**	1.12 ± 0.05**	
混合盐碱胁迫 Mixed saline-alkali stress	50	16.74 ± 0.77**	1.18 ± 0.08	35.18 ± 0.42**	9.13 ± 0.20**	
	100	13.58 ± 1.06**	0.84 ± 0.13	15.56 ± 0.42**	3.35 ± 0.29**	
	150	10.10 ± 0.62**	0.59 ± 0.08**	13.09 ± 0.47**	2.67 ± 0.30**	
	200	9.50 ± 1.22**	0.37 ± 0.08**	6.76 ± 0.33**	1.40 ± 0.05**	
处理 Treatment		根 root		生物量 Biomass/g	根冠比 Root-shoot ratio	生长胁迫指数 Growth stress index
		鲜质量 Fresh weight/g	干质量 Dry weight/g			
CK	0	8.99 ± 0.15	1.28 ± 0.05	6.97 ± 0.24	0.22 ± 0.01	
NaCl胁迫 NaCl stress	50	8.00 ± 0.16*	0.90 ± 0.03*	7.65 ± 0.27	0.13 ± 0.01**	1.10 ± 0.04
	100	4.08 ± 0.09**	0.48 ± 0.03**	3.97 ± 0.07**	0.15 ± 0.01**	0.54 ± 0.01
	150	3.29 ± 0.08**	0.33 ± 0.03**	2.47 ± 0.12**	0.15 ± 0.01**	0.35 ± 0.02
	200	2.57 ± 0.07**	0.26 ± 0.04**	1.79 ± 0.11**	0.17 ± 0.02*	0.26 ± 0.02
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 胁迫 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> stress	50	4.90 ± 0.27**	0.74 ± 0.09*	5.42 ± 0.20**	0.16 ± 0.02*	0.78 ± 0.03
	100	2.55 ± 0.43**	0.31 ± 0.07**	3.44 ± 0.29**	0.10 ± 0.01**	0.49 ± 0.04
	150	2.51 ± 0.45**	0.27 ± 0.04**	2.00 ± 0.12**	0.16 ± 0.01*	0.29 ± 0.02
	200	1.31 ± 0.19**	0.13 ± 0.02**	1.25 ± 0.07**	0.12 ± 0.01**	0.18 ± 0.01
混合盐碱胁迫 Mixed saline-alkali stress	50	12.44 ± 0.90*	2.02 ± 0.18*	11.15 ± 0.37**	0.22 ± 0.02	1.60 ± 0.05
	100	6.09 ± 0.92*	0.65 ± 0.06**	4.00 ± 0.34**	0.19 ± 0.02**	0.57 ± 0.05
	150	2.62 ± 0.56**	0.28 ± 0.04**	2.95 ± 0.33**	0.10 ± 0.01**	0.42 ± 0.05
	200	1.86 ± 0.27**	0.22 ± 0.04**	1.62 ± 0.08**	0.15 ± 0.02*	0.23 ± 0.01

注: “\*”表示处理间差异显著( $P < 0.05$ ), “\*\*”表示处理间差异极显著( $P < 0.01$ ), ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ ), 下同

Note: “\*” indicated significant difference among different treatments ( $P < 0.05$ ), “\*\*” indicated extremely significant difference among different treatments ( $P < 0.01$ ), ( $\bar{x} \pm SD$ ,  $n=3$ ). The same as below

明显增加, 均在  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时达到最大值, 之后随处理浓度的增加而逐渐下降, 但仍明显高于对照组。各处理组中, SOD 活性在中低浓度都有所增加, 其中,  $100 \sim 150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时显著增加,  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时下降。各处理组中, 低浓度时叶绿素总量和光合速率增加, 都在  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时达到最大值, 之后随处理浓度的增加而逐渐下降。

### 2.3 转录组测序、组装和分析

对试验中的 8 个样品测序后分别获得了约 50 000 000 条原始序列, 共测得约 60.4 Gb 原始数据。过滤后 Clean datas 约占原始序列数据的 93%; 碱基数约占原始碱基数的 93%; Q20 和 Q30 值分别在 97% 和 93% 以上。混合 2 个样品的 Clean datas, 用 Trinity 软件进行 De novo 组

表 2 不同盐碱胁迫对金丝楸幼苗生理和光合指标的影响

Table 2 Effects of different saline-alkali stress on physiological and photosynthetic indicators of *C. bungei* seedlings

处理 Treatment	相对电导率 Relative conductivity/%	可溶性糖含量 soluble sugar/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	脯氨酸含量 Contents of Pro/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	SOD活性 SOD enzymatic activity/ ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )	丙二醛含量 Contents of MDA/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	叶绿素总量 Contents of total chlorophyll	光合速率 Photosynthetic rate/( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	
CK	0	6.35 ± 0.23	14.68 ± 0.64	0.028 ± 0.002	4.88 ± 0.13	7.23 ± 0.34	37.40 ± 2.03	9.63 ± 0.94
NaCl胁迫 NaCl stress	50	18.04 ± 1.42**	16.36 ± 0.92	0.034 ± 0.003	5.27 ± 0.78	8.61 ± 0.54	38.04 ± 2.22	11.80 ± 1.08*
	100	22.27 ± 1.78**	18.92 ± 1.05*	0.049 ± 0.002*	7.42 ± 0.63*	9.11 ± 0.75*	40.20 ± 3.27	13.07 ± 0.42*
	150	34.59 ± 2.67**	19.24 ± 0.75*	0.041 ± 0.001*	6.51 ± 0.52*	9.43 ± 0.66*	36.30 ± 2.89	10.40 ± 1.14
	200	48.82 ± 3.94**	19.03 ± 0.84*	0.037 ± 0.002*	4.33 ± 0.35	9.06 ± 0.49*	35.40 ± 0.97	7.40 ± 0.46*
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 胁迫 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> stress	50	25.33 ± 3.65**	15.93 ± 0.56	0.039 ± 0.001*	5.92 ± 0.57	7.82 ± 0.48	38.50 ± 1.27	13.40 ± 0.44*
	100	36.25 ± 2.61**	19.87 ± 0.90*	0.052 ± 0.003*	8.64 ± 0.79*	8.49 ± 0.51	41.08 ± 3.07*	13.67 ± 1.10
	150	43.73 ± 4.82**	17.54 ± 0.75	0.044 ± 0.002*	7.58 ± 0.63*	9.82 ± 0.75*	37.88 ± 1.58	11.70 ± 0.95
	200	52.57 ± 4.21**	17.06 ± 0.79	0.035 ± 0.003	5.58 ± 0.75	9.55 ± 0.81*	33.70 ± 0.44*	9.43 ± 0.49
混合盐碱胁迫 Mixed saline-alkali stress	50	17.68 ± 1.23**	16.03 ± 0.67	0.036 ± 0.001	5.23 ± 0.37	8.05 ± 0.61	34.28 ± 1.29	14.67 ± 0.78**
	100	24.54 ± 2.01**	17.85 ± 0.83	0.047 ± 0.003*	7.94 ± 0.51*	8.74 ± 0.56	41.02 ± 2.73	14.37 ± 1.99*
	150	33.78 ± 3.24**	19.08 ± 0.91*	0.043 ± 0.002*	7.16 ± 0.69*	9.27 ± 0.94*	36.72 ± 1.60	10.03 ± 0.57
	200	50.36 ± 4.27**	18.91 ± 0.76*	0.032 ± 0.001	5.19 ± 0.57	9.46 ± 0.83*	35.84 ± 1.46	8.57 ± 0.76

装, 共得到 171 339 个 Transcripts, 55 793 个 Unigenes。Transcript 和 Unigene 序列平均长度分别为 1 768.34 bp 和 1 275.65 bp, N50 分别为 2 597 bp 和 2 263 bp, GC 含量分别为 39.59% 和 38.72%。

## 2.4 注释结果分析

对 55 793 个 Unigenes 进行基因功能注释, 在 NR、GO、KEGG、Pfam、eggNOG 和 Swiss-Prot 数据库中分别注释 28 722 个 (51.48%)、13 185 个 (23.63%)、11 967 个 (21.45%)、15 837 个 (28.39%)、27 242 个 (48.83%) 和 21 694 个 (38.88%), 其中, 29 534 (52.93%) 个 Unigenes 最少被 1 个数据库注释, 5 124 (9.18%) 个 Unigenes 被 6 个数据库注释。28 722 个 Unigenes 在 NR 数据库中获得注释, 其中, 5.8% Unigenes 与之完全匹配, 15.94% Unigenes 不完全匹配。相似度在 95%~100%、80%~95%、60%~80%、40%~60% 和 ≤40% 的 Unigenes 比例分别为 5.98%、32.12%、35.43%、20.45% 和 6.02%。被注释到芝麻 (*Sesamum indicum* L.)、地黄猴面花 (*Erythranthe guttata* DC.)、施蒴苣苔 (*Dorcocheras hygrometricum* B.)、葡萄 (*Vitis vinifera* L.)、咖啡 (*Coffea canephora* PF.)、大麦 (*Hordeum vulgare* L.)、可可 (*Theobroma*

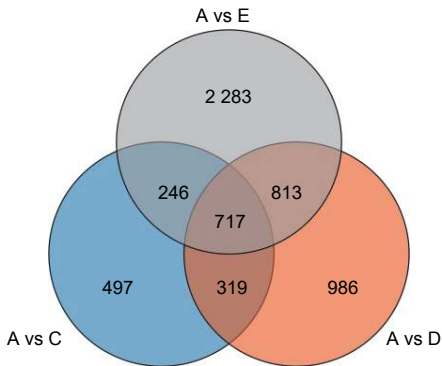
*cacao* L.) 和其他物种 Unigenes 比例分别为 55.95%、14.67%、3.35%、2.09%、0.97%、0.91%、0.76% 和 21.31%。

基因 GO 注释后, 将成功注释的基因依照 GO 的三个大类进行分类。Unigenes 富集最多的是代谢过程和细胞过程、细胞膜和细胞、结合和催化活性。KEGG 代谢通路上, 基因注释最多的分别为碳水化合物代谢、翻译、信号分解代谢、运输分解代谢和内分泌系统。eggNOG 比对注释, 基因注释最多目录分别为功能未知、仅通用功能预测、信号传导机制和翻译后修饰、蛋白质周转、伴侣。

## 2.5 差异表达基因分析

为进一步了解楸树对不同盐碱胁迫反应的转录组特征, 分析比较了对照组和 3 种处理组的 DEGs。对照组与 NaCl 处理组 (A vs C) 产生 1 779 个 DEGs (上调 844 个, 下调 935 个), 对照组与 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 处理组 (A vs D) 产生 2 835 个 DEGs (上调 1 326 个, 下调 1 509 个), 对照组与混合盐碱处理组 (A vs E) 产生 4 059 个 DEGs (上调 2 295 个, 下调 1 764 个), 说明这些 DEGs 与不同盐碱胁迫应答密切相关。根据差异分析的结果, 维恩图进一步展示了各比较组间特异 DEGs 的个数以及比较组间的重叠关系。A vs C 与 A vs D 之间有 1 036 个共有 DEGs, A vs

D 与 A vs E 之间有 1 530 个共有 DEGs, A vs C 与 A vs E 之间有 963 个共有 DEGs, 3 个比较组之间有 717 个共有 DEGs。A vs C 有 497 个特异 DEGs, A vs D 有 986 个特异 DEGs, A vs E 有 2 283 个特异 DEGs (图 2)。说明共有 DEGs 可能由不同的盐碱胁迫共同引起的, 特异 DEGs 可能响应不同的盐碱胁迫反应。



注: A: CK, C: NaCl, D: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, E: 混合盐碱, 下同

Notes: A: CK, C: NaCl, D: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, E: Mixed saline-alkali, the same as below

图 2 特异和共有差异表达基因的维恩图分析

Fig. 2 Venn diagrams analysis of specific and shared DEGs

## 2.6 差异表达基因富集分析

对 DEGs 进一步 GO 富集分析发现, 在细胞组分、分子功能和生物过程方面存在差异。在细胞组分方面, 膜的整体成分、膜的内在成分、膜等在不同盐碱胁迫下被显著富集。在分子功能方面, 催化活性、氧化还原酶活性、信号传感器活性、单加氧酶活性、水解酶活性、水解  $\alpha$ -糖基化合物等在不同盐碱胁迫下被显著富集。在生物过程方面, 类异戊二烯代谢和生物合成过程、防卫反应、碳水化合物代谢过程等在不同盐碱胁迫下被显著富集 (图 3~5)。

通过对 DEGs 进一步 KEGG 分析发现, DEGs 主要集中在代谢途径。NaCl 胁迫下显著富集的通路为: 萜类主干生物合成、苯丙素的生物合成、植物激素信号转导、光合生物中的碳固定 (图 6); Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 胁迫下显著富集的通路为: 淀粉和蔗糖代谢、苯丙素的生物合成、 $\alpha$ -氨基酸代谢、精氨酸生物合成 (图 7); 混合盐碱胁迫下显著富集的通路为: 淀粉和蔗糖代谢、萜类主干生物合成、苯丙素的生物合成、植物激素信号转导 (图 8)。

## 2.7 转录因子分析

植物转录因子广泛参与多种生物过程, 并在转录水平上调控基因的表达, 是许多逆境胁迫响应基因的重要调控因子, 在植物对逆境胁迫的应答过程中发挥重要作用。为了进一步研究楸树中可能参与盐碱胁迫的转录因子, 笔者共鉴定出 6 725 个差异表达转录因子, 分属于 57 个不同的转录因子家族, 其中, bHLH、ERF、MYB-related、NAC、C2H2、WRKY、MYB 和 bZIP 转录因子家族成员最多。

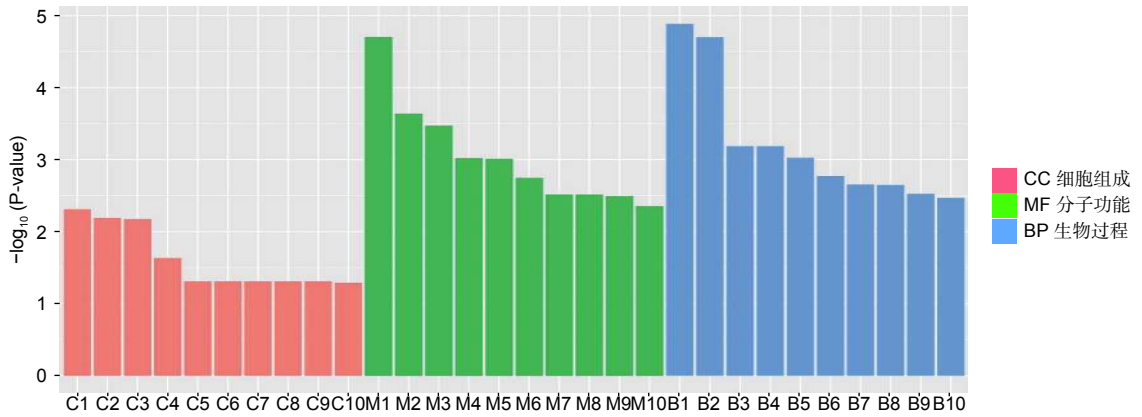
## 3 讨论

### 3.1 不同盐碱胁迫对金丝楸生长的影响

盐碱胁迫对植物最直接的影响就是抑制其正常的生长发育<sup>[18]</sup>。本研究发现, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 胁迫对金丝楸叶片伤害程度最大, NaCl 最小, 与前人研究结果一致<sup>[19]</sup>。不同盐碱胁迫导致了金丝楸新增株高和地径、生物量、根冠比不同程度的降低, 并且随着胁迫浓度的增加而加强 (表 1), 表明其对不同盐碱胁迫的忍耐能力存在差异, 这与其它植物中的研究结果相同<sup>[20]</sup>。分析对新增株高的影响程度依次为 NaCl > Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> > 混合盐碱, 3 种胁迫的中高浓度都极显著抑制新增地径的增长 (表 1)。对地上部和根的干质量以及生物量积累的影响程度依次为 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> > NaCl > 混合盐碱, 但 50 mmol·L<sup>-1</sup> 时 NaCl 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 胁迫对地径有增粗作用, 其中 NaCl 胁迫显著增加, 50 mmol·L<sup>-1</sup> 时混合盐碱胁迫对地上部和根的干质量和鲜质量均显著或极显著增加 (表 1), 其它植物的研究也得到类似结果<sup>[21]</sup>。

### 3.2 不同盐碱胁迫对金丝楸生理代谢和光合作用的影响

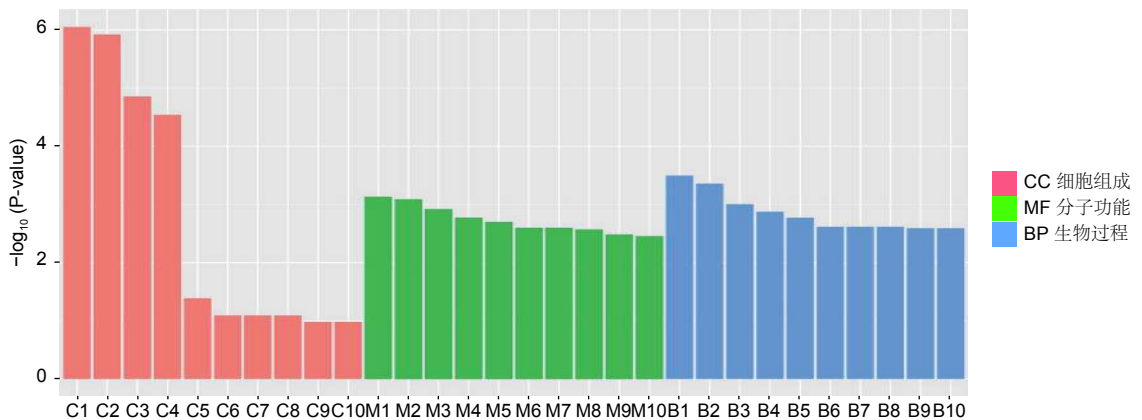
盐碱胁迫还会影响植物的生理代谢和光合作用。MDA 是植物体内膜脂过氧化的产物, 常作为对逆境反应强弱的指标。本研究发现, 不同盐碱胁迫后 MDA 都不同程度增加, 其中, 在中高浓度胁迫后显著增加 (表 2), 该结果与前人研究结果一致<sup>[22]</sup>。Pro 能调节渗透势和改善细胞内环境, 可溶性糖能维持细胞渗透势和提供碳源, 它们是植物通过渗透调节作用对逆境胁迫的一种生理响应<sup>[23]</sup>。本研究发现, 不同盐碱胁迫后, Pro 和可溶性糖含量都显著上升, 在 100 或 150 mmol·L<sup>-1</sup> 时达到最大值, 浓度继续升高后会小幅降低, 但仍高于对照组 (表 2), 这一结果与之前关于盐碱胁迫对 Pro 和



注/Notes: C1 integral component of membrane 膜的整体成分; C2 intrinsic component of membrane 膜的内在成分; C3 membrane 膜; C4 membrane part 膜部分; C5 storage vacuole 储存液泡; C6 protein storage vacuole 蛋白质储存液泡; C7 peroxisomal matrix 过氧化物酶体基质; C8 cytoplasmic stress granule 细胞质应激颗粒; C9 microbody lumen 微体腔; C10 endoplasmic reticulum 内质网; M1 catalytic activity 催化活性; M2 oxidoreductase activity 氧化还原酶活性; M3 lyase activity 裂解酶活性; M4 phospholipase activity 磷脂酶活性; M5 monooxygenase activity 单加氧酶活性; M6 lipase activity 脂肪酶活性; M7 oxidoreductase activity, acting on the CH-NH<sub>2</sub> group of donors, NAD or NADP as acceptor 氧化还原酶活性, 作用于 CH-NH<sub>2</sub> 组供体, NAD 或 NADP 作为受体; M8 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase activity 2C 甲基 D 赤藓糖醇 4 磷酸胞苷转移酶活性; M9 oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors 氧化还原酶的活性, 作用于供体的硫群; M10 fructose-bisphosphate aldolase activity 果糖-二磷酸醛缩酶活性; B1 isoprenoid metabolic process 类异戊二烯代谢过程; B2 isoprenoid biosynthetic process 类异戊二烯生物合成过程; B3 dimethylallyl diphosphate biosynthetic process 二甲基烯丙基二磷酸的生物合成过程; B4 dimethylallyl diphosphate metabolic process 二甲基烯丙基二磷酸盐代谢过程; B5 dicarboxylic acid metabolic process 二羧酸代谢过程; B6 cell redox homeostasis 细胞氧化还原稳态; B7 oxidation-reduction process 氧化还原过程; B8 negative regulation of hydrolase activity 水解酶活性负调控; B9 protein repair 蛋白质修复; B10 cellular homeostasis 细胞自动调节

图 3 DEGs GO 富集分析 (A Vs C)

Fig. 3 GO enrichment analysis of the DEGs (A Vs C)

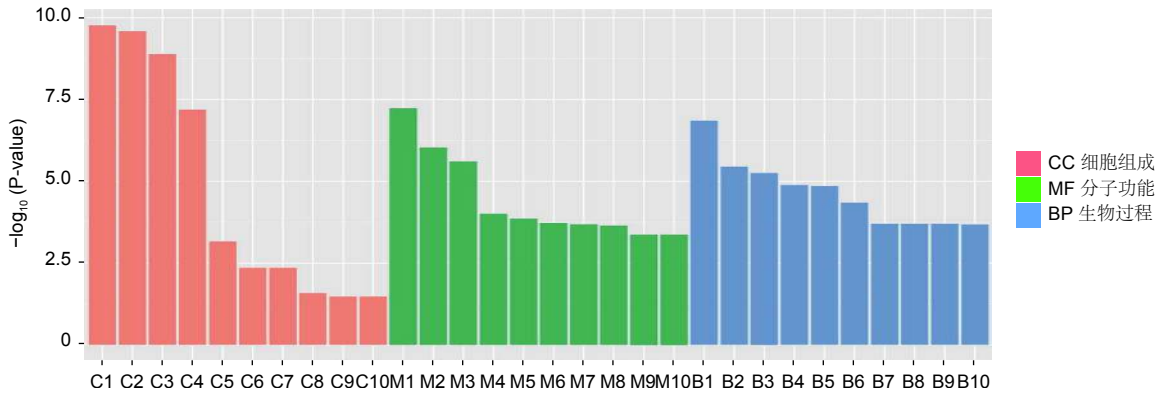


注/Notes: C1 intrinsic component of membrane 膜的整体成分; C2 integral component of membrane 膜的内在成分; C3 membrane 膜; C4 membrane part 膜部分; C5 side of membrane 膜侧; C6 cytoplasmic stress granule 细胞质应激颗粒; C7 SCAR complex SCAR 复合体; C8 Fanconi anaemia nuclear complex 范可尼贫血核复合体; C9 plant-type vacuole 植物型液泡; C10 plant-type vacuole membrane 植物型液泡膜; M1 signal transducer activity 信号传感器活性; M2 monooxygenase activity 单加氧酶活性; M3 heme binding 血红素结合; M4 catalytic activity 催化活性; M5 hydrolase activity, acting on glycosyl bonds 水解酶活性, 作用于糖基键的酶活性; M6 drug transmembrane transporter activity 药物跨膜转运体活性; M7 drug transporter activity 药物转运体活性; M8 hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds 水解酶活性, 水解 o-糖基化合物; M9 oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen 氧化还原酶活性, 作用于配对供体, 与分子氧的加入或还原; M10 foxidoreductase activity 氧化还原酶活性; B1 defense response 防卫反应; B2 isoprenoid biosynthetic process 类异戊二烯生物合成过程; B3 phosphorelay signal transduction system 磷酸化继电器信号转导系统; B4 isoprenoid metabolic process 类异戊二烯代谢过程; B5 polyol biosynthetic process 多元醇生物合成过程; B6 drug transmembrane transport 药物跨膜运输; B7 drug transport 药物转运; B8 response to drug 对药物反应; B9 dimethylallyl diphosphate biosynthetic process 二甲基烯丙基二磷酸生物合成过程; B10 dimethylallyl diphosphate metabolic process 二甲基烯丙基二磷酸盐代谢过程

图 4 DEGs GO 富集分析 (A Vs D)

Fig. 4 GO enrichment analysis of the DEGs (A Vs D)

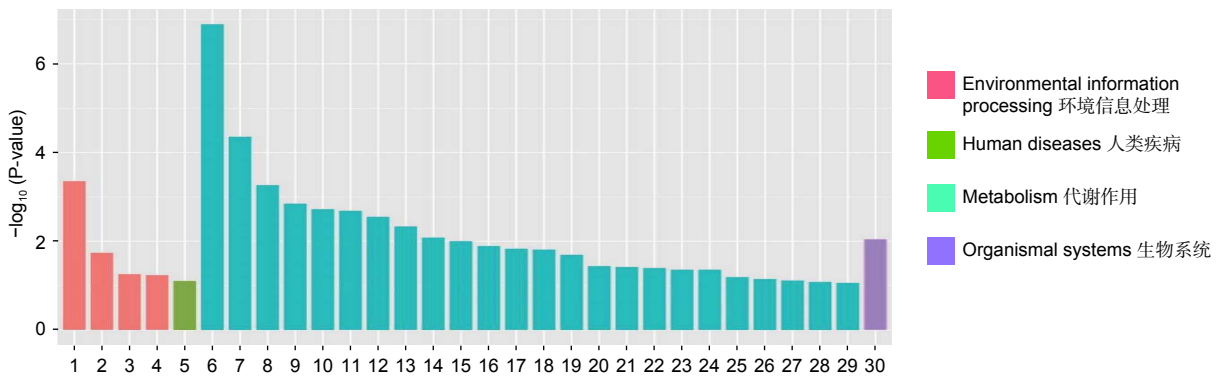




注/Notes: C1 integral component of membrane 膜的整体成分; C2 intrinsic component of membrane 膜的内在成分; C3 membrane 膜; C4 membrane part 膜部分; C5 MCM complex MCM 复合物; C6 cell wall 细胞壁; C7 external encapsulating structure 外部封装结构; C8 extracellular region 胞外区; C9 plant-type vacuole 植物型液泡; C10 plant-type vacuole membrane 植物型液泡膜; M1 catalytic activity 催化活性; M2 hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds 水解酶活性, 水解  $\alpha$ -糖基化合物; M3 hydrolase activity, acting on glycosyl bonds 水解酶活性, 作用于糖苷键酶活性; M4 galactosidase activity 半乳糖苷酶活性; M5 amylase activity 淀粉酶活性; M6 secondary active transmembrane transporter activity 二级活性跨膜转运体活性; M7 chalcone isomerase activity 查尔酮异构酶活性; M8 oxidoreductase activity 氧化还原酶活性; M9  $\alpha$ -galactosidase activity  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性; M10 oxidoreductase activity, acting on CH or CH<sub>2</sub> groups 氧化还原酶活性, 作用于 CH 或 CH<sub>2</sub> 组; B1 carbohydrate metabolic process 碳水化合物代谢过程; B2 isoprenoid biosynthetic process 类异戊二烯生物合成过程; B3 isoprenoid metabolic process 类异戊二烯代谢过程; B4 oligosaccharide metabolic process 低聚糖代谢过程; B5 disaccharide metabolic process 二糖代谢过程; B6 trehalose metabolic process 海藻糖代谢过程; B7 dimethylallyl diphosphate biosynthetic process 二甲基烯丙基二磷酸生物合成过程; B8 dimethylallyl diphosphate metabolic process 二甲基烯丙基二磷酸代谢过程; B9 trehalose biosynthetic process 海藻糖生物合成过程; B10 oxidation-reduction process 氧化还原过程

图 5 DEGs GO 富集分析 (A Vs E)

Fig. 5 GO enrichment analysis of the DEGs (A Vs E)

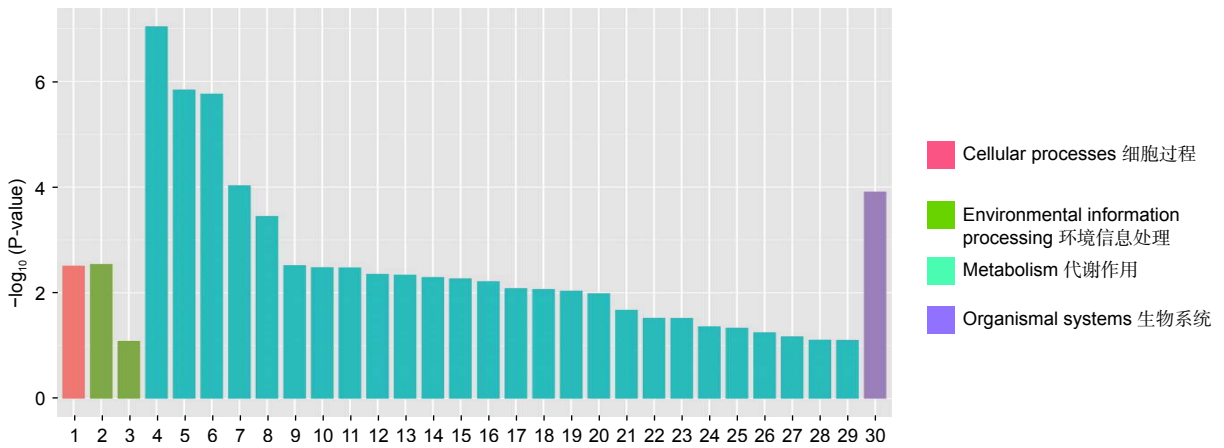


注/Notes: 1 Plant hormone signal transduction 植物激素信号传导; 2 MAPK signaling pathway-plant 植物 MAPK 信号通路; 3 ABC transporters ABC 转运体; 4 Phosphatidylinositol signaling system 磷脂酰肌醇信号传导系统; 5 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications 糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路; 6 Terpenoid backbone biosynthesis 萜类主干生物合成; 7 Phenylpropanoid biosynthesis 苯丙素的生物合成; 8 Carbon fixation in photosynthetic organisms 光合生物中碳固定; 9 Carotenoid biosynthesis 类胡萝卜素生物合成; 10 Glycolysis/Gluconeogenesis 糖酵解/糖异生; 11 Phenylalanine metabolism 苯丙氨酸代谢; 12 Fructose and mannose metabolism 果糖和甘露糖代谢; 13 Tyrosine metabolism 酪氨酸代谢; 14 Starch and sucrose metabolism 淀粉和蔗糖代谢; 15 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成; 16 Alanine, aspartate and glutamate metabolism 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; 17 Zeatin biosynthesis 玉米素生物合成; 18 Arginine biosynthesis 精氨酸生物合成; 19 Glycine, serine and threonine metabolism 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; 20 Ether lipid metabolism 醚脂质代谢; 21 Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis 类二苯基、二芳基庚烷和姜辣素生物合成; 22 Flavonoid biosynthesis 黄酮类生物合成; 23 Isoquinoline alkaloid biosynthesis 异喹啉生物碱生物合成; 24 Arachidonic acid metabolism 花生四烯酸代谢; 25 Nitrogen metabolism 氮素代谢; 26 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis 倍半萜和三萜生物合成; 27 Pentose phosphate pathway 磷酸戊糖途径; 28 Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series 糖鞘脂生物合成-乳糖和新乳糖系列; 29 Cyanoamino acid metabolism 氰氨基酸代谢; 30 Plant-pathogen interaction 植物病原体相互作用

图 6 DEGs KEGG 富集分析 (A Vs C)

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of the DEGs (A Vs C)

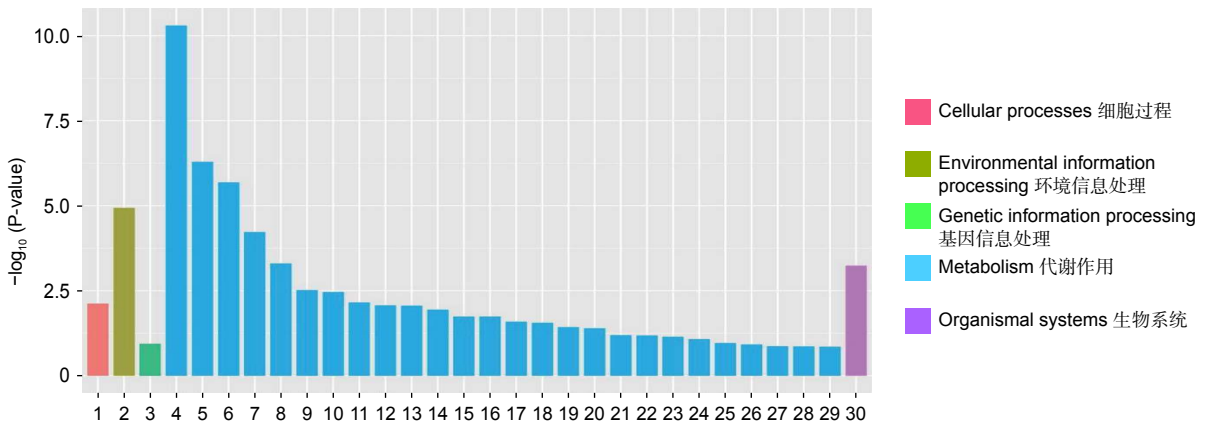




注/Notes: 1 Peroxisome 过氧化物酶体; 2 Plant hormone signal transduction 植物激素信号转导; 3 MAPK signaling pathway-plant 植物 MAPK 信号通路; 4 Starch and sucrose metabolism 淀粉和蔗糖代谢; 5 Phenylpropanoid biosynthesis 苯丙素生物合成; 6 Cyanoamino acid metabolism 氰氨基酸代谢; 7 Arginine biosynthesis 精氨酸生物合成; 8 Terpenoid backbone biosynthesis 萜类主干生物合成; 9 Vitamin B6 metabolism 维生素 B6 代谢; 10 Nitrogen metabolism 氮素代谢; 11 Carotenoid biosynthesis 类胡萝卜素生物合成; 12 Ether lipid metabolism 醚脂质代谢; 13 Purine metabolism 嘌呤代谢; 14 Phenylalanine metabolism 苯丙氨酸代谢; 15 Flavonoid biosynthesis 黄酮类生物合成; 16 Carbon fixation in photosynthetic organisms 光合生物中的碳固定; 17 Glutathione metabolism 谷胱甘肽代谢; 18 Fatty acid degradation 脂肪酸降解; 19 Arachidonic acid metabolism 花生四烯酸代谢; 20 Alanine, aspartate and glutamate metabolism 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; 21 Zeatin biosynthesis 玉米素生物合成; 22 Linoleic acid metabolism 亚油酸代谢; 23 Glycolysis/Gluconeogenesis 糖酵解/糖异生; 24 Tyrosine metabolism 酪氨酸代谢; 25 Fructose and mannose metabolism 果糖和甘露糖代谢; 26 Glycine, serine and threonine metabolism 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; 27 Galactose metabolism 半乳糖代谢; 28 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis 倍半萜和三萜生物合成; 29 beta-Alanine metabolism  $\beta$ -丙氨酸代谢; 30 Circadian rhythm-plant 植物昼夜节律

图 7 DEGs KEGG 富集分析 (A Vs D)

Fig. 7 KEGG enrichment analysis of the DEGs (A Vs D)



注/Notes: 1 Peroxisome 过氧化物酶体; 2 Plant hormone signal transduction 植物激素信号转导; 3 DNA replication DNA 复制; 4 Starch and sucrose metabolism 淀粉和蔗糖代谢; 5 Terpenoid backbone biosynthesis 萜类主干生物合成; 6 Phenylpropanoid biosynthesis 苯丙素生物合成; 7 Cyanoamino acid metabolism 氰氨基酸代谢; 8 Glutathione metabolism 谷胱甘肽代谢; 9 Fatty acid degradation 脂肪酸降解; 10 Pentose and glucuronate interconversions 戊糖和葡萄糖醛酸盐的相互转化; 11 Flavonoid biosynthesis 黄酮类生物合成; 12 Carotenoid biosynthesis 类胡萝卜素生物合成; 13 Glycosphingolipid biosynthesis-globo and isoglobo series 糖鞘脂生物合成-球蛋白和异红蛋白系列; 14 Tyrosine metabolism 酪氨酸代谢; 15 Glycine, serine and threonine metabolism 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢; 16 Galactose metabolism 半乳糖代谢; 17 Fatty acid biosynthesis 脂肪酸生物合成; 18 Glycolysis/Gluconeogenesis 糖酵解/糖异生; 19 Monoterpenoid biosynthesis 单萜生物合成; 20 Alanine, aspartate and glutamate metabolism 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; 21 Pyruvate metabolism 丙酮酸代谢; 22 Ascorbate and aldarate metabolism 抗坏血酸和醛酸代谢; 23 beta-Alanine metabolism  $\beta$ -丙氨酸代谢; 24 Lysine biosynthesis 赖氨酸生物合成; 25 Nicotinate and nicotinamide metabolism 烟酸盐和烟酰胺的代谢; 26 Photosynthesis-antenna proteins 光合作用-天线的蛋白质; 27 Fructose and mannose metabolism 果糖和甘露糖代谢; 28 Glycosphingolipid biosynthesis-ganglio series 糖鞘脂生物合成-神经节系列; 29 Carbon fixation in photosynthetic organisms 光合生物中碳固定; 30 Circadian rhythm-plant 植物昼夜节律

图 8 DEGs KEGG 富集分析 (A Vs E)

Fig. 8 KEGG enrichment analysis of the DEGs (A Vs E)

可溶性糖含量影响的研究结果相吻合<sup>[24-25]</sup>。说明在一定浓度范围内楸树可以通过增加体内 Pro 和可溶性糖的含量, 降低细胞渗透势, 超过这个范围, Pro 和可溶性糖合成受到抑制。盐碱胁迫会使植物产生大量的活性氧自由基, 破坏细胞膜系统, 抗氧化酶活性的升高可增强自由基清除能力, 减轻伤害<sup>[26]</sup>。本研究发现, 不同盐碱胁迫下 SOD 都随浓度增加呈先升后降的趋势 (表 2), 这与孙海菁等之前发现的情况一致<sup>[27]</sup>。说明当盐碱胁迫超出阈值后, 过量的自由基对植物造成损伤, SOD 活性降低。叶绿素是植物光合作用的物质基础, 是反映光合能力的重要指标。本研究发现, 在低浓度盐碱胁迫下叶绿素总量升高, 光合速率显著提高 (表 2), 说明低浓度胁迫能够促进叶绿素的合成和光合作用, 而在高浓度胁迫下叶绿素总量和光合速率下降。该结果和地上部生物量的结果基本一致, 但与前人的研究结果不完全一致<sup>[28-29]</sup>, 可能与物种差异有关, 有待进一步研究。

### 3.3 差异表达基因分析

RNA-Seq 是研究植物非生物胁迫分子机制的良好手段<sup>[8,30]</sup>, 楸树作为非模式植物, 缺乏基因组背景, RNA-Seq 为从转录水平研究楸树耐盐碱分子机制、基因挖掘及相关代谢通路的发现提供了可能。本研究分别对 NaCl、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和混合盐碱处理组及对照组进行转录组测序及分析。DEGs GO 富集结果表明, 在细胞组分方面, 膜的整体成分、内在成分和膜在不同盐碱胁迫下均显著富集, 说明膜及其成分在不同盐碱胁迫下都发挥积极作用。在分子功能方面, 富集结果相差较大, 催化活性和氧化还原酶活性主要响应 NaCl 胁迫; 信号传感器活性和单加氧酶活性主要响应 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 胁迫; 催化活性和水解 o-糖基化合物主要响应混合盐碱胁迫, 说明不同分子功能响应不同的盐碱胁迫。在生物过程方面, 类异戊二烯代谢和生物合成过程在不同盐碱胁迫下都显著富集, 说明类异戊二烯对植物耐盐碱非常重要; 二甲基烯丙基二磷酸生物合成过程、防卫反应和碳水化合物代谢过程分别单独显著富集 (图 3~5)。DEGs KEGG 分析结果表明, 苯丙素生物合成在不同盐碱胁迫中均显著富集, 植物激素信号转导和萜类主干生物合成在 NaCl 和混合盐碱胁迫中都显著富集, 淀粉和蔗糖代谢在 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和混合盐碱胁迫中都显著富集, 还有光合生物碳固定、精氨酸代谢和生物合成分别在 NaCl、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 胁迫中单独显著富集 (图 6~8)。

说明苯丙素生物合成、植物激素信号转导、淀粉和蔗糖代谢、萜类主干生物合成、类异戊二烯通路在应答盐碱胁迫时至关重要, 与前人转录组测序分析结果一致<sup>[11,31-32]</sup>。以上结果暗示这些功能与途径可能在楸树响应不同盐碱胁迫中起着重要作用, 这些注释信息也为进一步挖掘楸树抗不同盐碱基因提供了数据资源。

### 3.4 转录因子分析

转录因子在植物对多种逆境胁迫的应答过程中发挥重要作用<sup>[33]</sup>。目前, 已报道的响应盐碱胁迫的转录因子有 WRKY、NAC、bZIP、MYB、bHLH 等家族成员<sup>[34]</sup>。WRKY 是一类锌指蛋白家族, 对植物抗逆有着重要作用<sup>[35]</sup>。玉米 ZmWRKY33、高粱 SbWRKY50 和花生 AhWRKY75 等 WRKY 转录因子对耐盐性起作用<sup>[36-38]</sup>。NAC 是植物特有的转录因子家族, 在植物发育、逆境应答等过程中发挥多重作用<sup>[39]</sup>。水稻 ONAC022、小麦 TaNAC67 和大豆 GmSIN1 等 NAC 转录因子与耐盐能力有关<sup>[40-42]</sup>。bZIP 转录因子参与依赖 ABA 信号的途径, 调控相关抗盐碱基因的表达<sup>[43]</sup>。棉花 GhABF2、玉米 ABP9 和大豆 GmbZIP2 等 bZIP 转录因子控制盐碱耐性<sup>[44-46]</sup>。MYB 转录因子广泛参与植物的生长发育、逆境响应和激素信号转导<sup>[47]</sup>。拟南芥 MYB111、大豆 GmMYB12 和菠萝 AcoMYB4 等 MYB 转录因子调控盐胁迫响应基因<sup>[48-50]</sup>。bHLH 转录因子同样在非生物胁迫应答中起着重要作用。小麦 TabHLH1、水稻 OsbHLH035 和杨梅 MfbHLH38 等 bHLH 转录因子应答盐胁迫反应<sup>[51-53]</sup>。本研究鉴定出 bHLH、ERF、MYB-related、NAC、C2H2、WRKY、MYB 和 bZIP 转录因子家族成员最多, 这些转录因子与不同盐碱耐性相关, 说明楸树耐盐碱机制是由多种转录因子共同调控的。

## 4 结论

本研究通过对不同盐碱胁迫下金丝楸幼苗生长情况、生理指标和光合特性进行测定及分析, 新增株高和地径、生物量、根冠比等都明显受到抑制, 生长情况受抑制程度为 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> > 混合盐碱 > NaCl。金丝楸幼苗主要通过积累渗透调节物质、提高抗氧化酶系统和光合作用来共同抵御盐碱胁迫, 但都呈现“低促高抑”的现象, 具有一定阈值。

通过对对照组和3种处理组叶片进行转录组测序及分析,3个比较组分别筛选出1 779、2 835和4 059个DEGs。通过DEGs GO功能和KEGG通路分析,理清了DEGs富集的生物过程与代谢通路。金丝楸通过调节膜成分、催化活性、类异戊二烯代谢和生物合成过程、苯丙素生物合成、淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导等生物过程和代谢途径,并结合相关转录因子共同响应盐碱胁迫(图9)。综上所述,本研究的首次尝试为全面解析楸树耐盐碱机制研究提供理论参考,同时也为后期重要基因克隆及其功能分析等奠定基础。

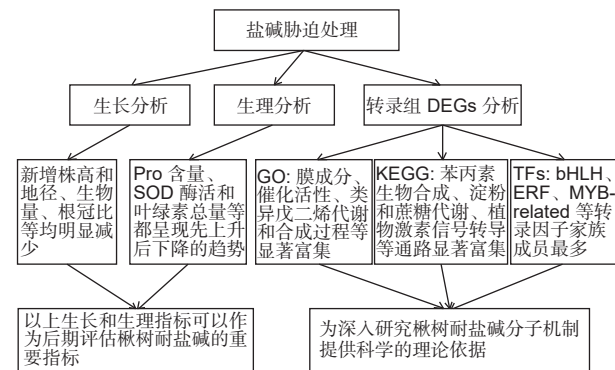


图9 结论示意图

Fig. 9 Schematic diagram of conclusion

## 参考文献:

- [1] 张建锋, 张旭东, 周金星, 等. 世界盐碱地资源及其改良利用的基本措施[J]. 水土保持研究, 2005, 12(6): 32-34.
- [2] 范国强, 翟晓巧, 毕会涛, 等. 金丝楸的离体培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 359.
- [3] 辛建华, 许庆标, 刘建军, 等. 不同树龄楸树种质资源的嫁接成活影响因素[J]. 山东林业科技, 2021, 51(4): 71-74.
- [4] 张蕊, 石娜, 孙玲凌, 等. 楸树无糖组织培养快繁技术初探[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(1): 45-50.
- [5] 王改萍, 王良桂, 王晓晓, 等. 楸树嫩枝扦插生根发育及根系特征分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2020, 44(6): 94-102.
- [6] 岑云昕, 刘佳, 陈发菊, 等. 农杆菌介导的楸树遗传转化体系[J]. 林业科学, 2021, 57(8): 195-204.
- [7] 杨丹丹, 马玲玲, 李亚, 等. 楸树EST-SSR标记开发及种质资源的遗传多样性分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(4): 1216-1223.
- [8] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(7): 644-652.
- [9] BAHIELDIN A, ATEF A, SABIR J S M. RNA-Seq analysis of the wild barley (*H. spontaneum*) leaf transcriptome under salt stress[J]. Comptes Rendus Biologies, 2015, 338(5): 285-297.

- [10] WANG W S, ZHAO X Q, LI M, et al. Complex molecular mechanisms underlying seedling salt tolerance in rice revealed by comparative transcriptome and metabolomic profiling[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(1): 405-419.
- [11] 董明, 再吐尼古丽·库尔班, 吕芃, 等. 高粱苗期耐盐性转录组分析和基因挖掘[J]. 中国农业科学, 2019, 52(22): 3987-4001.
- [12] 毛伟兵, 陈发菊, 王长兰, 等. 楸树雄性不育花芽转录组测序及分析[J]. 林业科学, 2017, 53(6): 141-150.
- [13] 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.
- [14] 张丽. 平欧杂种榛抗盐碱生理机制研究及其耐盐性评价[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [15] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 323-338.
- [16] MARIANI J C, MASON C E, MANE S M, et al. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays[J]. Genome research, 2008, 18(9): 1509-1517.
- [17] JIN J, TIAN F, YANG D C, et al. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants[J]. Nucleic acids research, 2017, 45(D1): D1040-D1045.
- [18] VICENTE O, BOSCAIU M, NARANJO M A, et al. Responses to salt stress in the halophyte *Plantago cyassifolia* (Plantaginaceae)[J]. Journal of Arid Environments, 2004, 58(4): 463-481.
- [19] YANG C W, CHONG J N, LI C Y, et al. Osmotic adjustment and ion balance traits of an alkali resistant halophyte *Kochia sieversiana* during adaptation to salt and alkali conditions[J]. Plant Soil, 2007, 294(12): 263-276.
- [20] NASR S M H, PARSAKHO A, NAGHAVI H, et al. Effect of salt stress on germination and seedling growth of *Prosopis juliflora* (Sw.) [J]. New Forests, 2012, 43(1): 45-55.
- [21] MEGDICHE W, AMOR N B, DEBEZ A, et al. Salt tolerance of the annual halophyte *Cakile maritima* as affected by the provenance and the developmental stage[J]. Acta Physiol Plant, 2007, 29(4): 375-384.
- [22] 李子英, 丛日春, 杨庆山, 等. 盐碱胁迫对柳树幼苗生长和渗透调节物质含量的影响[J]. 生态学报, 2017, 37(24): 8511-8517.
- [23] ANOWER M R, PEEL M D, MOTT I W, et al. Physiological processes associated with salinity tolerance in an alfalfa half-sib family[J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2017, 203(6): 506-518.
- [24] LI R L, SHI F C, FUKUDA K, et al. Effects of salt and alkali stresses on germination, growth, photosynthesis and ion accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2010, 56(5): 725-733.
- [25] YANG C W, XU H H, WANG L L, et al. Comparative effects of salt-stress and alkali-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants[J]. Photosynthetica, 2009, 47(1): 79-86.

- [26] MELONI D A, OLIVA M A, MARTINEZ C A, *et al.* Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2003, 49(1): 69-76.
- [27] 孙海菁, 王树凤, 陈益泰. 盐胁迫对6个树种的生长及生理指标的影响[J]. *林业科学研究*, 2009, 22 ( 3 ): 315-324.
- [28] 邓敏捷, 张晓申, 范国强, 等. 四倍体泡桐对盐胁迫生理响应的差异[J]. *中南林业科技大学学报*, 2013, 33 ( 11 ): 42-46.
- [29] SANTOS C V. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves[J]. *Scientia Horticulturae*, 2004, 103(1): 93-99.
- [30] SICILIA A, SANTORO D F, TESTA G, *et al.* Transcriptional response of giant reed (*Arundo donax* L.) low ecotype to long-term salt stress by unigene-based RNAseq[J]. *Phytochemistry*, 2020, 177: 112436.
- [31] 李 红, 李 波, 邬婷婷, 等. 紫花苜蓿耐苏打盐碱相关基因的转录组学分析[J]. *草地学报*, 2019, 27 ( 4 ): 848-859.
- [32] 张 瑞, 张夏焱, 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.
- [33] KHAN S A, LI M Z, WANG S M, *et al.* Revisiting the role of plant transcription factors in the battle against abiotic stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(6): 1634-1663.
- [34] ERPEN L, DEVI H S, GROSSER J W, *et al.* Potential use of the DREB/ERF, MYB, NAC and WRKY transcription factors to improve abiotic and biotic stress in transgenic plants[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2018, 132(1): 1-25.
- [35] LI W, PANG S, LU Z, *et al.* Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants[J]. *Plants*, 2020, 9(11): 1515-1530.
- [36] LI H, GAO Y, XU H, *et al.* *ZmWRKY33*, a WRKY maize transcription factor conferring enhanced salt stress tolerances in *Arabidopsis*[J]. *Plant Growth Regul*, 2013, 70(3): 207-216.
- [37] SONG Y S, LI J L, SUI Y, *et al.* The sweet Sorghum *SbWRKY50* is negatively involved in salt response by regulating ion homeostasis[J]. *Plant Molecular Biology*, 2020, 102(6): 603-614.
- [38] ZHU H, JIANG Y, GUO Y, *et al.* A novel salt inducible WRKY transcription factor gene, *AhWRKY75*, confers salt tolerance in transgenic peanut[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 160: 175-183.
- [39] PURANIK S, SAHU P P, SRIVASTAVA P S, *et al.* NAC proteins: Regulation and role in stress tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(6): 369-381.
- [40] HONG Y, ZHANG H, HUANG L, *et al.* Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(4): 1-19.
- [41] MAO X, CHEN S. Novel NAC transcription factor TaNAC67 confers enhanced multi-abiotic stress tolerances in *Arabidopsis*[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e84359-84374.
- [42] LI S, WANG N, JI D, *et al.* A GmSIN1/GmNCD3s/GmRbohBs Feed-forward loop acts as a signal amplifier that regulates root growth in soybean exposed to salt stress[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31: 2107-2130.
- [43] BANERJEE A, ROYCHOUDHURY A. Abscisic-acid-dependent basic leucine zipper (bZIP) transcription factors in plant abiotic stress[J]. *Protoplasma*, 2015, 254(1): 1-14.
- [44] LIANG C, MENG Z, MENG Z, *et al.* GhABF2, a bZIP transcription factor, confers drought and salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 35040-35054.
- [45] WANG C, LU G, HAO Y, *et al.* ABP9, a maize bZIP transcription factor, enhances tolerance to salt and drought in transgenic cotton[J]. *Planta*, 2017, 246(6): 1-19.
- [46] YANG Y, YU T F, MA J, *et al.* The soybean bZIP transcription factor gene *GmbZIP2* confers drought and salt resistances in transgenic plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(2): 670-689.
- [47] LI J L, HAN G L, SUN C F, *et al.* Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2019, 14(8): 1-9.
- [48] LI B, FAN R, GUO S, *et al.* The *Arabidopsis* MYB transcription factor, MYB111 modulates salt responses by regulating flavonoid biosynthesis[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2019, 166(2): 807-834.
- [49] WANG F, REN X, ZHANG F, *et al.* A R2R3-type MYB transcription factor gene from soybean, *GmMYB12*, is involved in flavonoids accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2019, 13: 219-233.
- [50] CHEN H H, LAI L Y, LI L X, *et al.* AcoMYB4, an *Ananas comosus* L. MYB transcription factor, functions in osmotic stress through negative regulation of ABA signaling[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(16): 5727-5742.
- [51] YANG T R, YAO S F, HAO L, *et al.* Wheat bHLH-type transcription factor gene *TabHLH1* is crucial in mediating osmotic stresses tolerance through modulating largely the ABA-associated pathway[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(11): 2309-2323.
- [52] CHEN H C, CHENG W H, HONG C Y, *et al.* The transcription factor OsbHLH035 mediates seed germination and enables seedling recovery from salt stress through ABA-dependent and ABA-independent pathways, respectively[J]. *Rice*, 2018, 11(1): 50-67.
- [53] QIU J R, HUANG Z, XIANG X Y, *et al.* MfbHLH38, a *Myrothamnus flabellifolia* bHLH transcription factor, confers tolerance to drought and salinity stresses in *Arabidopsis*[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 542-556.



# Physiological and Transcriptomic Analysis of *Catalpa bungei* Seedlings in Response to Saline-alkali Stresses

GAO Xin-qiang<sup>1,4</sup>, WANG Xiao-yan<sup>1</sup>, JIAO Wei<sup>2</sup>, LI Na<sup>5</sup>, WANG Jing<sup>1,3</sup>, ZHENG Li-yue<sup>1</sup>,  
WANG Dan-ning<sup>1</sup>, WANG Xing-yun<sup>1</sup>, HOU Li-jiang<sup>1</sup>, SHANG Zeng-zhen<sup>1</sup>, LIU Yan-zhen<sup>1,4</sup>

(1. College of Biological and Food Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang 455000, He'nan, China; 2. Hua County Landscaping Management Office, Anyang 455000, He'nan, China; 3. College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei, China; 4. Taihang Mountain, Forest Pests Observation and Research Station of Henan Province, Linzhou 456550, He'nan, China; 5. Anyang Park Management Station, Anyang 455000, He'nan, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the physiological and molecular mechanism of saline-alkali tolerance in *Catalpa bungei*, we studied the influence of different saline-alkali stress on the growth, photosynthetic and physiological indicators of *C. bungei* seedlings combining with transcriptome sequencing. [Methods] Pot experiment was used to study the different responses of biomass, photosynthetic and physiological indicators of *C. bungei* seedlings to different saline-alkali stress. Illumina high-throughput sequence technology was used to sequence the transcriptome, and the effect of saline-alkali stress on transcriptional level was analyzed by bioinformatics. [Results] Under different saline-alkali stress, the damage degree of leaves was  $\text{Na}_2\text{CO}_3 > \text{mixed saline-alkali} > \text{NaCl}$ . Net growth of plant height and stem diameter, fresh weight and dry weight of overground part and root, biomass, root-shoot ratio were all significantly suppressed with increasing saline-alkali concentration. But the growth stress index decreased with increasing concentration. Contents of MDA and relative conductivity both rose to varying degrees with increasing concentration. SOD enzymatic activity, contents of soluble sugar and Pro, contents of total chlorophyll and photosynthetic rate increased firstly and decreased then with increasing concentration. Transcriptome sequencing generated a total of 60.4 Gb of raw data. Finally, we obtained 55 793 Unigenes after assembling, of which 29 534 (52.93%) Unigenes were annotated. Through differentially expressed genes (DEGs) analysis, 1 779, 2 835 and 4 059 DEGs were screened from three comparison groups (CK vs NaCl, CK vs  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and CK vs mixed saline-alkali) respectively. GO functional enrichment analysis of these DEGs indicated that they were significantly enriched in integral component of membrane, intrinsic component of membrane, catalytic activity, isoprenoid metabolic and biosynthetic process, oxidoreductase activity. KEGG functional enrichment analysis of these DEGs indicated that they were significantly enriched in phenylpropanoid biosynthesis, starch and sucrose metabolism, plant hormone signal transduction, terpenoid backbone biosynthesis and arginine biosynthesis. Moreover, the most abundant differentially expressed transcription factors (TFs) were bHLH, ERF, MYB-related, NAC, C2H2, WRKY, MYB and bZIP families. [Conclusion] *C. bungei* mainly resists from saline-alkali stress by accumulating contents of soluble sugars and Pro, improving SOD enzymatic activity and photosynthesis, but all of them show the phenomenon of "low promotion and high suppression", indicating that it has a certain threshold value. *C. bungei* common responses to saline-alkali stress by regulating biological processes and metabolic pathways including component of membrane, catalytic activity, isoprenoid metabolic and biosynthetic process, phenylpropanoid biosynthesis, starch and sucrose metabolism, plant hormone signal transduction, and interacting with TFs. This study provides a scientific theoretical basis for deeply studying the physiological and molecular mechanisms of saline-alkali tolerance in *C. bungei*.

**Keywords:** *Catalpa bungei*; saline-alkali stress; transcriptome; differentially expressed gene; mechanism of saline-alkali resistance