

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220417

秋茄低温胁迫转录组分析及脱落酸信号途径基因挖掘

郭晋敏¹, 杨升¹, 刘星¹, 王金旺^{1,2}, 王文卿³, 陈秋夏^{1*}

(1. 浙江省亚热带作物研究所, 浙江温州 325000; 2. 温州市资源植物创新利用重点实验室, 浙江温州 325000; 3. 厦门大学环境与生态学院, 福建厦门 361102)

摘要: [目的] 深入了解秋茄响应低温胁迫的分子机制以及培育秋茄的抗寒新品种。[方法] 以耐寒红树植物‘龙港’秋茄 1 年生容器苗为实验材料, 15 °C 处理 12 h 为对照组 (CK), -5 °C 处理 12 h 为低温组 (LT), 采用 Illumina HiSeq 测序平台进行转录组测序, 挖掘脱落酸信号途径相关基因。[结果] 转录组测序共鉴定到 148 个转录因子, 分属于 25 个转录因子家族, 其中, ERF、NAC、WRKY、bHLH、MYB、bZIP、HB-other 和 MYB-related 等家族所包含的基因数量较多, 分别为 17、14、12、12、10、9、6 和 6; 差异组共筛选到 1 330 个差异表达基因 (Differentially Expressed Genes, DEGs), 其中, 698 (52.48%) 个上调表达, 632 (47.52%) 个下调表达; KEGG 通路富集分析发现, DEGs 显著富集在植物激素信号转导、苯丙素生物合成、半乳糖代谢、光合作用-天线蛋白和 α -亚麻酸代谢等通路中; 脱落酸信号途径相关基因 *KoPYL1*、*KoABF1* 和 *KoABF2* 上调表达, *KoPP2C1* 和 *KoABF3* 下调表达, 且这些基因表达情况与 qRT-PCR 验证结果一致。[结论] ERF、NAC、WRKY、bHLH、MYB、bZIP、HB-other 和 MYB-related 等家族转录因子对秋茄响应低温胁迫起重要调控作用。植物激素信号转导、苯丙素生物合成、半乳糖代谢、光合作用-天线蛋白和 α -亚麻酸代谢等是秋茄响应低温胁迫的重要 KEGG 通路。脱落酸信号途径中的 *KoPYL1*、*KoPP2C1*、*KoABF1*、*KoABF2* 和 *KoABF3* 基因可作为后期研究秋茄响应低温胁迫的重要候选基因。

关键词: 秋茄; 低温胁迫; 转录组; 转录因子; 脱落酸信号途径

中图分类号: S718.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2023)02-0039-11

红树林是分布于热带亚热带沿海潮间带的特有植物群落^[1]。秋茄 (*Kandelia obovata* Sheue, H. Y. Liu & J. Yong) 是最耐寒的红树植物^[2]。它自然分布于越南的北部, 中国的海南、香港、广东、福建、台湾, 日本的南部, 人工引种最北到中国浙江省温州市西门岛一带^[3]。低温是限制秋茄分布的最主要因素^[4]。在全球气候变暖的大背景下, 高纬度地区冬季逐渐变暖, 这使得冷敏感植物跨出之前的分布范围向北移动^[5]。与此同时, 高纬度地区冬季

不时发生的极端低温天气对北移的冷敏感植物生存造成极大危害, 如 2008 年和 2016 年中国南方发生的多起极端寒潮事件对当地红树林造成了严重影响^[6], 更有甚者如 2016 年温州西门岛一带发生 50 年一遇的极端低温寒潮 (-5 °C 左右) 对当地引种的秋茄造成了极其严重的冻害^[7]。因此, 秋茄的抗寒研究极其紧迫和重要。

转录因子的转录调控是植物响应低温胁迫的关键部分, 转录因子通过识别下游基因启动子上的功

收稿日期: 2022-08-23 修回日期: 2022-11-28

基金项目: 浙江省高质量红树林营建与碳汇能力研究 (2022SY08); 浙江省“十四五”育种专项林木协作组课题“沿海防护林树种新品种选育” (2021C02070-6)

作者简介: 郭晋敏, 硕士研究生。主要研究方向: 红树植物抗逆研究。电话: 17794525225 Email: gjm17794525225@163.com

* 通讯作者: 陈秋夏, 博士研究生, 研究员。主要研究方向: 滨海植物育种与生态修复技术。电话: 13906635980。Email: yzscqx@163.com

能元件来激活或者抑制目标基因表达,引起植株体内低温相关代谢途径产生变化,从而改变植物对于外界低温胁迫刺激的适应能力^[8]。目前,在80多个转录因子家族中,只有NAC、MYB、WRKY、bZIP和ERF等少数在非生物胁迫响应中起重要作用的转录因子家族被深入研究过^[9]。Sharma等^[10]研究发现,在低温胁迫条件下,拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)中有43个家族转录因子表达上调,其中,WRKY、NAC、MYB、AP2/ERF和bZIP转录因子基因在所有基因集中高度富集,调控了56%冷胁迫下常见的表达基因。在秋茄响应低温胁迫的相关研究中,Fei等^[11]和Su等^[12]将bHLH、MYB-related和WRKY等转录因子认定为秋茄低温应激反应中有价值的候选调节因子,而其他转录因子在秋茄抗寒的相关研究中鲜有报道。

脱落酸(abscisic acid, ABA)是一类对植物生长、果实成熟和非生物胁迫响应起至关重要作用的植物激素^[13],自20世纪60年代首次被发现以来^[14],ABA信号通路响应低温胁迫的相关研究获得了重大突破。植物遭遇低温胁迫时,ABA与ABA受体蛋白(pyrabactin resistance/PYR-like/regulatory component of ABA receptor, PYR/PYL/RCAR)结合,形成的复合体会抑制2C型蛋白磷酸酶(type 2C protein phosphatases, PP2Cs)的活性,导致III类SNF-1相关蛋白激酶2(class III SNF-1-related protein kinase 2, SnRK2/SRK2)的激活和释放,该蛋白直接磷酸化并积极控制ABF/AREB转录因子,最终调控相关抗寒基因的表达^[15]。ABA信号途径响应低温胁迫已在水稻(*Oryza sativa* L.)^[16]、苹果(*Malus pumila* Mill.)^[17]、花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim)^[18]等多种植物中得到证实,而在秋茄抗寒的相关研究中少有报道。

本研究通过高通量测序技术对低温胁迫下秋茄叶片进行了转录组学分析,并对ABA信号途径中关键基因进行挖掘,旨在为深入了解秋茄响应低温胁迫的分子机制提供了科学参考,为抗寒品种的培育提供了可能。

1 材料与方法

1.1 材料

以浙江省亚热带作物研究所选育的耐寒红树植

物‘龙港’秋茄1年生容器苗为植物材料,挑选生长良好,长势一致,无病害植株作为供试材料(图1)。试验于2020年12月在浙江省农业科学院蔬菜研究所内进行,将供试材料置于人工气候室(型号:SAFE-DG-ZJNKY-6)中,光照时间为 $11\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理12h为对照组(CK), $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理12h为低温组(LT),各处理设置4次生物学重复。各处理结束后采集完全展开的功能叶片用锡箔纸包裹并编号(CK组编号为:CK-1、CK-2、CK-3和CK-4;LT组编号为:LT-1、LT-2、LT-3和LT-4),将包裹好的叶片迅速置于液氮中速冻,最后转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存备用。



图1 实验所用秋茄材料

Fig. 1 The *Kandelia obovata* material used in the experiment

1.2 方法

1.2.1 转录组测序 将8份样品(CK-1、CK-2、CK-3、CK-4、LT-1、LT-2、LT-3和LT-4)委托上海美吉生物医药科技有限公司进行样品RNA的提取、质控、建库及转录组测序,用Illumina Novaseq 6000平台进行测序。

1.2.2 数据分析 将测序所获得的clean reads与秋茄参考基因组(<https://bigd.big.ac.cn/gwh/Assembly/990/show>)进行比对并统计比对率,比对分析软件为HISAT。

FPKM (fragments per kilobase million)即每100万条序列中,每个基因以1000个碱基为单位,比对上的reads。以FPKM值计算基因表达量,计算软件为RSEM。

基于表达量定量结果进行组间差异基因分析,获得2组间发生差异表达的基因,差异分析软件为DESeq2,筛选阈值为 $|\log_2\text{FC}| \geq 1$ 和 $\text{padjust} < 0.05$ 。同时利用美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com>)对筛选得到的DEGs进行GO功能注释和KEGG富集分析。

1.2.3 qRT-PCR 验证 为验证测序结果准确性, 本研究选择了 6 个 *KoHB-others* 和 5 个 ABA 信号途径 DEGs 进行实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR) 验证。利用 primer 5.0 软件对所

挑选基因进行特异性引物设计, 内参基因为 *KoACT2*^[19], 引物及内参序列见表 1, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 DEGs 的相对表达水平。

表 1 qRT-PCR 引物序列信息
Table 1 Primer sequences by qRT-PCR analysis

序号 No.	基因名称 (基因ID) Gene name (Gene ID)	引物序列 (5'-3') Primers sequence	
		正向 Forward	反向 Reverse
1	<i>KoHB-other1</i> (Maker00002036)	GCACCAACATCGGGACAAA	CTCATCCACCACCGCACTC
2	<i>KoHB-other2</i> (Maker00003789)	ACAATGTTTCAGGGCAGAG	ACCAATGAAGTGAGGGAGC
3	<i>KoHB-other3</i> (Maker00008096)	CAAGAAAGTTTACGAGGAG	TCTTACATTAGTGCCATCC
4	<i>KoHB-other4</i> (Maker00014773)	AAGACCCTGTGATTGGAGT	TAGAAGTTGAGATGTGGC
5	<i>KoHB-other5</i> (Maker00016058)	GCTACGACCACGGACAATA	GGCTTCATCCCAATCATCT
6	<i>KoHB-other6</i> (Maker00017922)	ATGATGCTCCCTTACTACCC	TTGGCAACATTATCCTGAA
7	<i>KoPYL1</i> (Maker00013579)	TAAGATTGTTGGTGGTGAT	GTCTCGTCCTTCGTATTTTC
8	<i>KoPP2C1</i> (Maker00008505)	TGTTGACCATAAGCCTGAC	GATACGCATCGCCAATAGA
9	<i>KoABF1</i> (Maker00004855)	AGATGACCTTGGAGGATTT	GCTGATACTGCGGATGTTG
10	<i>KoABF2</i> (Maker00005324)	TGAATGATGCCTCTGGTGA	GTTGTTGATGCTGCCCTTT
11	<i>KoABF3</i> (Maker00011633)	ATAGTGTAGGCTTTGGTGT	TTTCTGTTTGACAAGGGAC
12	<i>KoACT2</i> (内参reference gene)	ACCGAGGCTCCTCTTAATCC	AGCTGGCACATTGAAGGTCT

2 结果与分析

2.1 测序数据质控分析

对秋茄叶片样品进行 RNA 提取后, 经转录组测序获得样品原始数据。通过排除低质量数据和序列拼接, 获得了 48 669 538 ~ 61 694 828 的 Clean reads (即质控后测序数据的总条目数), 错误

率仅为 0.02% 左右, Q20 均高于 98.14%, Q30 均高于 94.41%, GC 含量在 45.11% ~ 45.60% (表 2)。同时, 样品主成分分析结果 (图 2) 表明: CK 组与 LT 组各处理分别聚为一类, 说明样品间的生物学重复性较好。因此, 本研究的转录组测序结果较理想, 后续的分析较可信。

表 2 转录组测序数据质控分析
Table 2 Quality test of transcriptome sequencing data

样品名称 Sample	过滤序列 Clean reads	过滤后总数据量 Clean bases	碱基错误率 Error rate/%	Q20 Q20 content/%	Q30 Q30 content/%	GC含量 GC content/%
CK-4	61 694 828	9 195 255 893	0.024 4	98.26	94.75	45.60
CK-3	53 516 676	7 984 971 936	0.024 3	98.30	94.83	45.28
CK-2	58 608 596	8 751 226 148	0.024 3	98.29	94.83	45.41
CK-1	58 170 210	8 665 931 104	0.024 4	98.27	94.76	45.44
LT-4	57 684 098	8 613 236 032	0.024 7	98.14	94.41	45.39
LT-3	55 311 392	8 240 665 850	0.024 4	98.28	94.76	45.11
LT-2	48 669 538	7 257 847 489	0.024 3	98.30	94.83	45.33
LT-1	48 871 524	7 274 047 403	0.024 5	98.23	94.65	45.44

2.2 与参考基因组对比

本研究参考基因为 *Kandelia obovata* (<https://bigd.big.ac.cn/gwh/Assembly/990/show>), 所参

考基因组版本为 ko01。通过将质控后的 clean data 与参考基因组进行对比发现, 实验所产生的测序序列的比对率均高于 96% (表 3), 包括总比

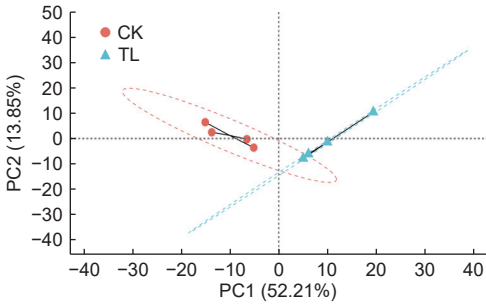


图2 样品主成分分析

Fig. 2 PCA analysis of samples

对（能定位到基因组上的 clean reads 数目）、多方比对（在参考序列上有多个比对位置的 clean reads 数目）和唯一比对（在参考序列上有唯一比对位置的 Clean reads 数目）。

2.3 转录因子分析

本研究转录组测序共鉴定到 148 个转录因子，分属于 25 个转录因子家族，其中，ERF、

NAC、WRKY、bHLH、MYB、bZIP、HB-other 和 MYB-related 等转录因子家族所包含的基因数目较多，分别占 11.49%、9.46%、8.11%、8.11%、6.76%、6.08%、4.05% 和 4.05%（表 4）。其中，HB-other 家族转录因子包含 6 个 DEGs，*KoHB-other1*（Maker00002036）、*KoHB-other2*（Maker00003789）和 *KoHB-other3*（Maker00008096）下调表达，*KoHB-other4*（Maker00014773）、*KoHB-other5*（Maker00016058）和 *KoHB-other6*（Maker00017922）上调表达（图 3）。

2.4 差异表达基因鉴定

以 $P < 0.05$ 、上下调差异倍数 $FC > 2$ 或者 $FC < 0.5$ 为筛选条件，进一步对 DEGs 数量进行统计学分析。结果表明，LT 组和 CK 组的 DEGs 共有 1330 个，其中，698 个 DEGs 上调表达（52.48%），632 个 DEGs 下调表达（47.52%）（图 4）。

表 3 比对结果

Table 3 comparison results

样品名称 Sample	过滤序列 Clean reads	总比对（比对率/%） Total mapped (Mapping ratio)	多方比对（比对率/%） Multiple mapped (Mapping ratio)	唯一比对（比对率/%） Uniquely mapped (Mapping ratio)
CK-4	61 694 828	59 530 651(96.49)	2 721 385(4.41)	56 809 266(92.08)
CK-3	53 516 676	51 710 126(96.62)	1 903 142(3.56)	49 806 984(93.07)
CK-2	58 608 596	56 414 468(96.26)	1 904 490(3.25)	54 509 978(93.01)
CK-1	58 170 210	56 184 040(96.59)	1 957 228(3.36)	54 226 812(93.22)
LT-4	57 684 098	55 686 289(96.54)	2 175 795(3.77)	53 510 494(92.76)
LT-3	55 311 392	53 452 339(96.64)	1 753 405(3.17)	51 698 934(93.47)
LT-2	48 669 538	47 076 980(96.73)	1 401 233(2.88)	45 675 747(93.85)
LT-1	48 871 524	47 282 051(96.75)	1 585 312(3.24)	45 696 739(93.50)

表 4 部分转录家族及相应基因数量

Table 4 Partial transcription factor family and corresponding gene numbers

序号 No.	转录因子家族 TF family	基因数量 Number	序号 No.	转录因子家族 Family	基因数量 Number
1	ERF	17	11	ARF	4
2	NAC	14	12	Dof	4
3	WRKY	12	13	GRF	4
4	bHLH	12	14	MIKC	4
5	MYB	10	15	M_type	4
6	bZIP	9	16	SBP	3
7	HB-other	6	17	DBB	2
8	MYB_related	6	18	GATA	2
9	AP2	5	19	HD-ZIP	2
10	B3	5	20	SRS	2

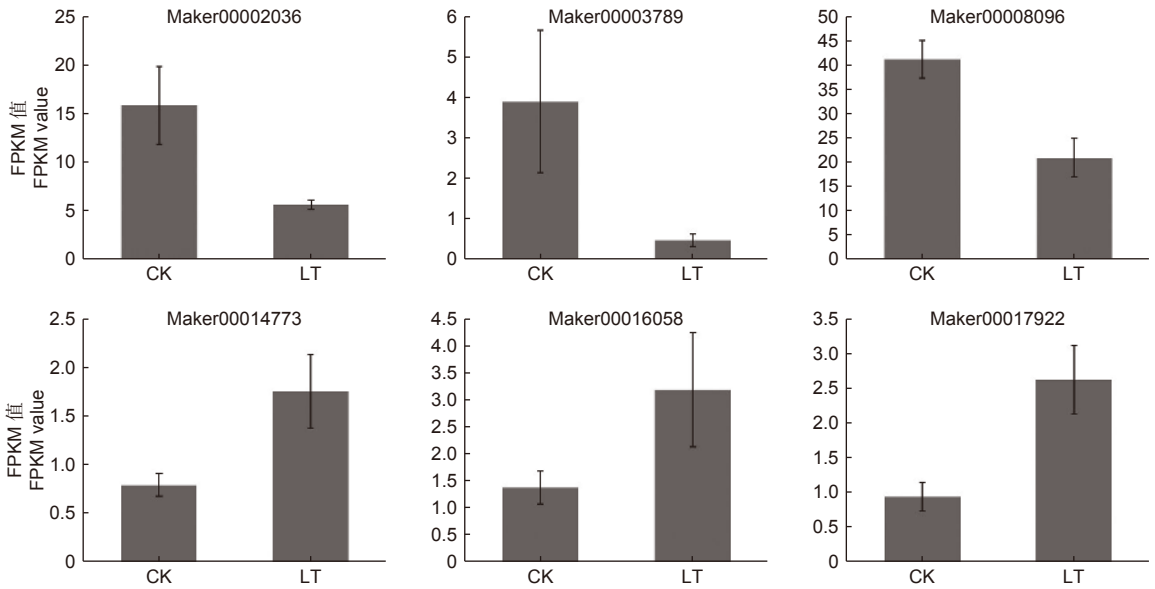


图3 HB-other 转录因子差异基因表达情况

Fig. 3 Expression of HB-Other transcription factors DEGs

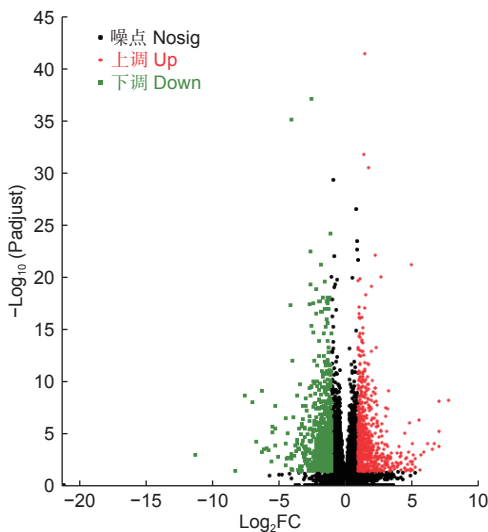


图4 差异表达基因火山图

Fig. 4 DEGs volcano

2.5 差异表达基因 KEGG 通路富集分析

从基因数量上看, DEGs 主要富集在植物激素信号转导、苯丙素生物合成、植物与病原体互作、淀粉与蔗糖代谢、MAPK 信号通路-植物、半乳糖代谢、光合作用-天线蛋白和 α -亚麻酸代谢等通路中 (表 5)。以 P 值作为参考, DEGs 则显著富集在苯丙素的生物合成、植物激素信号转导、光合作用-天线蛋白、半乳糖代谢、“角质、亚伯碱和蜡的生物合成”和 α -亚麻酸代谢等通路中 (表 6)。综合基因数量和 P 值看, 低温胁迫下秋茄叶片 DEGs 显著富集在植物激素信号转导、苯丙素生物

合成、半乳糖代谢、光合作用-天线蛋白和 α -亚麻酸代谢这 5 条 KEGG 通路上, 其中, 植物激素信号转导通路中富集到的 DEGs 数量最多, 且差异显著性最高。

2.6 脱落酸信号途径相关基因挖掘

ABA 信号途径是植物激素信号转导通路中一条重要激素途径, 对该途径中的 DEGs 进行深入挖掘发现, *KoPYL1* (Maker00013579)、*KoABF1* (Maker00005324) 和 *KoABF2* (Maker00011633) 基因上调表达, *KoPP2C1* (Maker00008505) 和 *KoABF3* (Maker00004855) 基因下调表达 (图 5)。

2.7 qRT-PCR 验证

对重点关注的 6 个 *KoHB-others* 和 5 个脱落酸信号途径 DEGs 进行了 qRT-PCR 验证, 结果表明这 11 个基因的变化趋势与转录组测序结果一致 (图 6), 表明转录组数据准确可靠。

3 讨论

转录组测序 (RNA-seq) 技术对基因挖掘具有较高的准确性和灵敏性^[20], 被广泛用于拟南芥^[10]、油菜 (*Brassica rapa* L.)^[21]、新疆野苹果 (*Malus sieversii* (Ledeb.) Roem.)^[22] 等多种植物耐寒基因的研究中, 使植物抗寒分子机制被不断地深入发掘。本研究中, 各样品 Q20 碱基百分比均大于 98%, 且 Q30 碱基百分比均大于 94%, GC 含量介于 45% ~ 46%, 测序序列与参考基因组的比对

表 5 差异基因数量前十的 KEGG 通路

Table 5 Top 10 KEGG pathways of DEGs number

KEGG途径 KEGG pathway	通路ID Pathway id	差异基因数量 DEGs number	P值 P value	一级分类 First Category	二级分类 Second Category
植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	map04075	31	0.000 006 7	环境信息处理 Environmental Information Processing	信号传导 Signal transduction
苯丙素的生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	map00940	22	0.000 000 2	代谢 Metabolism	其他次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites
植物病原体互作 Plant-pathogen interaction	map04626	12	0.104 924 3	有机系统 Organismal Systems	环境适应 Environmental adaptation
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	map00500	11	0.054 418 7	代谢 Metabolism	碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism
MAPK信号通路-植物 MAPK signaling pathway - plant	map04016	11	0.124 596 7	环境信息处理 Environmental Information Processing	信号传导 Signal transduction
半乳糖代谢 Galactose metabolism	map00052	9	0.001 003 6	代谢 Metabolism	碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism
光合作用-天线蛋白 Photosynthesis - antenna proteins	map00196	7	0.000 063 0	代谢 Metabolism	能量代谢 Energy metabolism
α -亚麻酸代谢 alpha-Linolenic acid metabolism	map00592	7	0.007 326 3	代谢 Metabolism	脂类代谢 Lipid metabolism
甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	map00561	7	0.124 661 2	代谢 Metabolism	脂类代谢 Lipid metabolism
半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	map00270	7	0.345 086 9	代谢 Metabolism	氨基酸代谢 Amino acid metabolism

表 6 差异显著性前十的 KEGG 通路

Table 6 Top 10 KEGG pathways with significant differences

KEGG途径 KEGG pathway	通路ID Pathway id	差异基因数量 DEGs number	P值 P value	一级分类 First Category	二级分类 Second Category
苯丙素的生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	map04075	22	0.000 000 2	代谢 Metabolism	其他次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites
植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	map00940	31	0.000 006 7	环境信息处理 Environmental Information Processing	信号传导 Signal transduction
光合作用-天线蛋白 Photosynthesis - antenna proteins	map04626	7	0.000 063 0	代谢 Metabolism	能量代谢 Energy metabolism
半乳糖代谢 Galactose metabolism	map00500	9	0.001 003 6	代谢 Metabolism	碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism
角质、亚伯碱和蜡的生物合成 Cutin, suberine and wax biosynthesis	map04016	5	0.002 427 7	代谢 Metabolism	脂类代谢 Lipid metabolism
α -亚麻酸代谢 alpha-Linolenic acid metabolism	map00052	7	0.007 326 3	代谢 Metabolism	脂类代谢 Lipid metabolism
糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	map00196	4	0.010 236 6	人类疾病 Human Diseases	内分泌代谢病 Endocrine and metabolic disease
倍半萜和三萜生物合成 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	map00592	4	0.012 627 6	代谢 Metabolism	萜类和多酮类的代谢 Metabolism of terpenoids and polyketides
类胡萝卜素生物合成 Carotenoid biosynthesis	map00561	5	0.013 924 4	代谢 Metabolism	萜类和多酮类的代谢 Metabolism of terpenoids and polyketides
氮代谢 Nitrogen metabolism	map00270	5	0.013 924 4	代谢 Metabolism	能量代谢 Energy metabolism

率均高于 96%。此外, qRT-PCR 结果显示, 所挑选 DEGs 的变化趋势与转录组结果基本一致。因

此, 本研究转录组测序数据结果良好, 可满足后续分析需求。

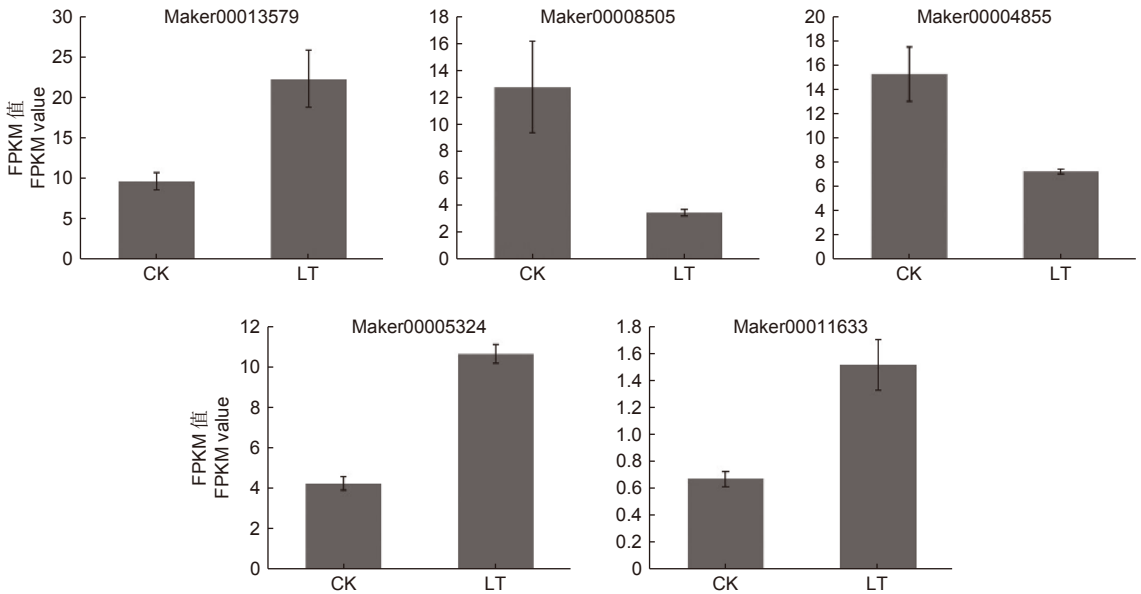


图 5 脱落酸信号途径差异基因表达情况

Fig. 5 Expression of DEGs in ABA signaling pathway

转录因子通过与胁迫应答基因启动子中的特定顺式作用元件结合, 成为植物抗非生物胁迫的主要中介因子, 从而使植物能够抵御不利的环境条件 [23]。ERF、NAC、WRKY、bHLH、MYB、bZIP 和 MYB-related 等家族转录因子参与了多种植物的非生物胁迫响应过程 [24], 在对拟南芥 [25]、沙冬青 (*Ammopiptanthus Mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.) [26]、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) [27]、山荆子 (*Malus baccata* (L.) Borkh.) [28]、玉米 (*Zea mays* L.) [29] 和水稻 [30] 等的研究发现, 相关家族转录因子均能一定程度上提升植株的耐寒性, 有些甚至是适应冷胁迫所必须的。值得关注的是, HB-other 转录因子响应非生物胁迫的研究较少, 仅在脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) [31] 和地梢瓜 (*Cynanchum thesioides* (Freyn) K. Schum) [32] 的干旱胁迫响应中被鉴定到, 而在低温胁迫的相关研究中尚未见报道。在本研究中, 共鉴定到 148 个转录因子, 分属于 25 个转录因子家族, 其中, ERF、NAC、WRKY、bHLH、MYB、bZIP、HB-other 和 MYB-related 等转录因子家族所包含的基因数目较多。这些转录因子中除 HB-other 在抗寒相关的研究中未被鉴定到外, 其余均被鉴定到并被证明是与抗寒相关的重要转录因子家族, 特别是 bHLH、MYB-related 和 WRKY 在前期秋茄抗寒相关的研究中被认定为低温应激反应中有价值的候选调节因子 [11-12] 在本次秋茄低温胁迫

中首次鉴定出 HB-other 转录因子, 并且 *KoHB-other* 的表达情况与 qRT-PCR 验证结果一致, 推测其可能对秋茄响应低温胁迫起重要调控作用, 在后期的研究中还有待被证实。

京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 是用于分析代谢途径、生物系统和基因功能的信号通路数据库 [33]。许多 KEGG 通路 with 植物响应低温胁迫有关, 如橄榄 (*Canarium album* (Lour.) Ruesch.) 在低温胁迫下的 DEGs 富集到了 α -亚麻酸代谢、类胡萝卜素生物合成、光合-天线蛋白和昼夜节律相关等通路上 [34], 文冠果 (*Xanthoceras sorbifolium* Bunge) 在低温胁迫下 DEGs 显著富集在淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢和氨基酸代谢等通路上 [35]。本研究中, 秋茄叶片 DEGs 显著富集在植物激素信号转导、苯丙素生物合成、半乳糖代谢、光合作用-天线蛋白和 α -亚麻酸代谢等多条 KEGG 通路上, 且这些通路已经被大量研究证实与抗寒相关, 其中, 植物激素信号转导、 α -亚麻酸代谢和苯丙酸生物合成等通路在前期秋茄抗寒相关的研究中已经得到证明 [12]。因此, 植物激素信号转导、苯丙素生物合成、半乳糖代谢、光合作用-天线蛋白和 α -亚麻酸代谢等是秋茄响应低温胁迫的重要 KEGG 通路。

植物激素是一种小的内源性信号分子, 如 ABA、茉莉酸和生长素等, 在响应非生物胁迫过程

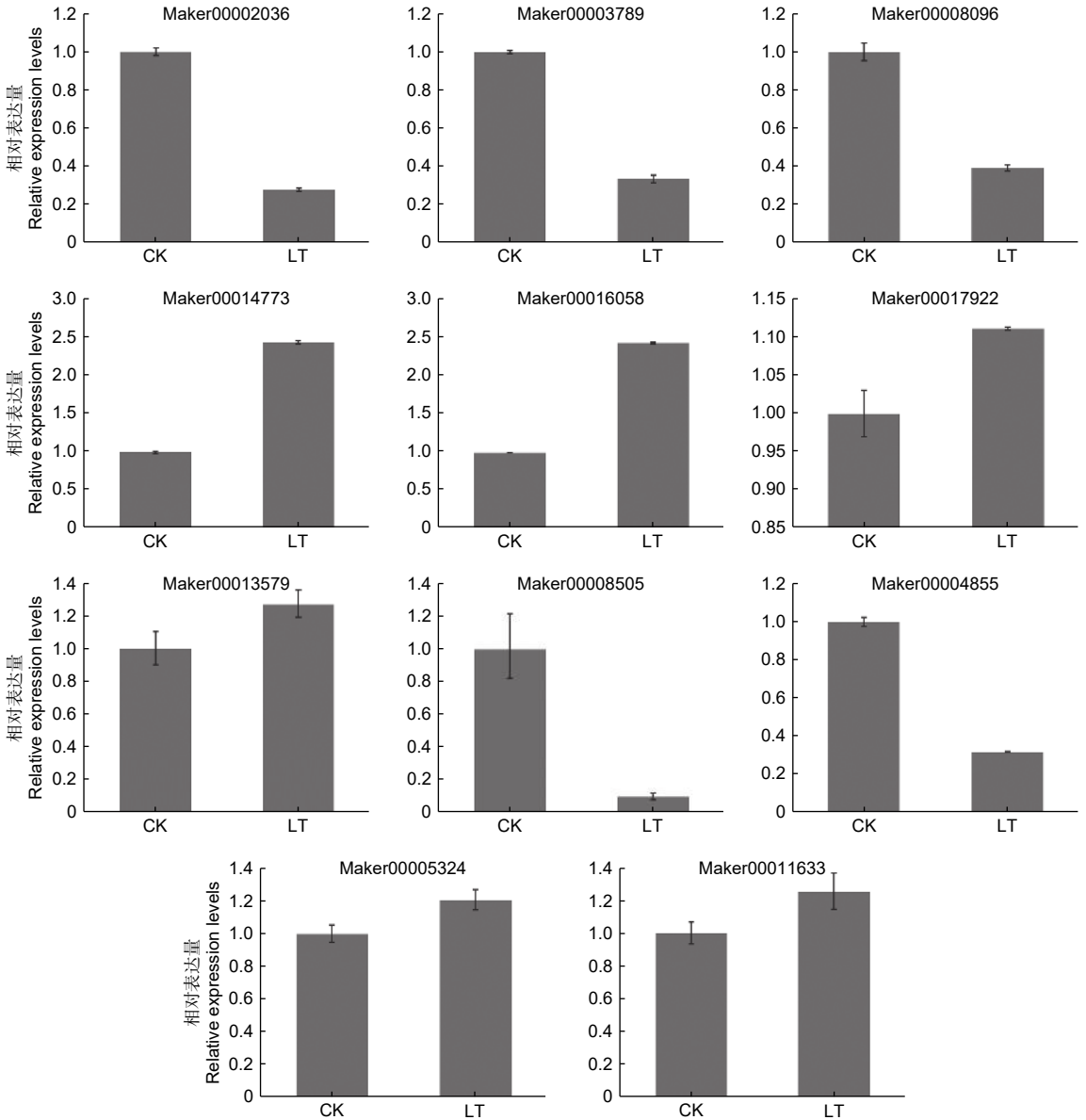


图 6 qRT-PCR 验证

Fig. 6 qRT-PCR validation of DEGs

中参与信号转导途径^[36]。ABA 是植物适应低温胁迫的重要信号分子^[37]，并且其响应低温胁迫的“PYR/PYL/RCAR-|PP2Cs|-SnRK2-ABF/AREB-靶基因”途径已经研究的较为清晰^[38]。ABA 信号途径基因已在许多植物中被鉴定和研究。Zhang 等^[39]研究发现，拟南芥过表达的 *RCAR12* 或 *RCAR13* 可以通过诱导低温响应基因 CBFs 的表达来耐受低温胁迫。Ren 等^[40]在葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 愈伤组织和拟南芥中过表达 *VaPYL4* 基因可增强转基因株系的耐寒性。大量研究表明，PP2Cs 负向调控 ABA 信号途径^[41]；但 Hu 等^[42]在烟草中过表达玉米根部的 *ZmPP2C2* 基

因增强了烟草对低温胁迫的耐受性，表明 *ZmPP2C2* 基因可能是玉米抗寒性的正向调控基因，这与大部分抗寒相关的研究结论相反，这可能是 *ZmPP2Cs* 的调控方式具有特殊性，具体原因还有待进一步的研究。高山离子芥 (*Chorispora bungeana* Fisch. et Mey.) 的 *CbABF1* 在烟草中表达提高了植株对冷胁迫的耐受性，且转基因植株的存活率高于野生型^[43]。在本研究中，*KoPYL1* (Maker00013579)、*KoABF1* (Maker00005324) 和 *KoABF2* (Maker00011633) 上调表达，*KoPP2C1* (Maker00008505) 和 *KoABF3* (Maker00004855) 下调表达，这和其他植物的

相关研究结果一致,且这些基因的表达情况与 qRT-PCR 验证结果一致。因此, *KoPYL1*、*KoPP2C1*、*KoABF1*、*KoABF2* 和 *KoABF3* 基因可作为后期研究秋茄响应低温胁迫的重要候选基因。

4 结论

ERF、NAC、WRKY、bHLH、MYB、bZIP、HB-other 和 MYB-related 等家族转录因子对秋茄响应低温胁迫起重要调控作用;植物激素信号转导、苯丙素生物合成、半乳糖代谢、光合作用-天线蛋白和 α -亚麻酸代谢等是秋茄响应低温胁迫的重要 KEGG 通路;ABA 信号途径中的 *KoPYL1*、*KoPP2C1*、*KoABF1*、*KoABF2* 和 *KoABF3* 等基因可作为后期研究秋茄响应低温胁迫的重要候选基因。

参考文献:

[1] 王文卿, 张林, 张雅棉, 等. 红树林退塘还林研究进展[J]. 厦门大学学报, 2021, 60(2): 348-354.

[2] 陈泳滨, 经佐琴, 徐斌, 等. 不同种源秋茄引种至上海的生长状况比较[J]. 复旦学报(自然科学版), 2022, 61(4): 424-434.

[3] TOMLINSON P B. The botany of mangroves[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2016.

[4] OSLAND M J, STEVENS P W, LAMONT M M, et al. Tropicalization of temperate ecosystems in North America: The northward range expansion of tropical organisms in response to warming winter temperatures[J]. Global Change Biology, 2021, 27(13): 3009-3034.

[5] OSLAND M J, HUGHES A R, ARMITAGE A R, et al. The impacts of mangrove range expansion on wetland ecosystem services in the southeastern United States: current understanding, knowledge gaps, and emerging research needs[J]. Global Change Biology, 2022, 28(10): 3163-3187.

[6] CHEN L Z, WANG W Q, LI Q Q, et al. Mangrove species' responses to winter air temperature extremes in China[J]. Ecosphere, 2017, 8(6): e01865.

[7] 郑春芳, 陈威, 刘伟成, 等. 低温胁迫后红树植物秋茄幼苗光合特性及蔗糖代谢的恢复机制[J]. 生态学杂志, 2020, 39(12): 4048-4056.

[8] ABDULLAH S N A, AZZEME A M, YOUSEFI K. Fine-Tuning cold stress response through regulated cellular abundance and mechanistic actions of transcription factors[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 850216.

[9] BAILLO E H, KIMOTHO R N, ZHANG Z, et al. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement[J]. Genes, 2019, 10(10):

771.

[10] SHARMA R, SINGH G, BHATTACHARYA S, et al. Comparative transcriptome meta-analysis of *Arabidopsis thaliana* under drought and cold stress[J]. PLoS ONE, 2018, 13(9): e0203266.

[11] FEI J, WANG Y S, CHENG H, et al. The *Kandelia obovata* transcription factor *KoWRKY40* enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1): 274.

[12] SU W, YE C, ZHANG Y, et al. Identification of putative key genes for coastal environments and cold adaptation in mangrove *Kandelia obovata* through transcriptome analysis[J]. Science of the Total Environment, 2019, 681: 191-201.

[13] FINKELSTEIN R R, GAMPALA S S, ROCK C D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings[J]. The Plant Cell, 2002, 14(Suppl): S15-45.

[14] OHKUMA K, LYON J L, ADDICOTT F T, et al. Abscission II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit[J]. Science, 1963, 142(3599): 1592-1593.

[15] MA Y, SZOSTKIEWICZ I, KORTE A, et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors[J]. Science, 2009, 324(5930): 1064-1068.

[16] 胡潇婕, 毛东海. 基于RNA-Seq技术分析植物激素信号途径在水稻幼苗中对低温胁迫的应答规律[J]. 农业现代化研究, 2019, 40(5): 878-890.

[17] 田玉珍, 党兆霞, 吕前前, 等. 树体休眠期前苹果花芽对低温早期响应的转录组分析[J]. 果树学报, 2020, 37(5): 615-624.

[18] 田介云. 花椒幼苗低温胁迫下生理和分子响应机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.

[19] HONG L, SU W, ZHANG Y, et al. Transcriptome profiling during mangrove viviparity in response to abscisic acid[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 770.

[20] WANG K, BAI Z Y, LIANG Q Y, et al. Transcriptome analysis of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in response to low temperature stress[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 319.

[21] MA L, COULTER J A, LIU L, et al. Transcriptome analysis reveals key cold-stress-responsive genes in winter rapeseed (*Brassica rapa* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(5): 1071.

[22] ZHOU P, LI X, LIU X, et al. Transcriptome profiling of *Malus sieversii* under freezing stress after being cold-acclimated[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 681.

[23] SONG L, HUANG S C, WISE A, et al. A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network[J]. Science, 2016, 354(6312): aag1550.

[24] LI M Y, LIU J X, HAO J N, et al. Genomic identification of AP2/ERF transcription factors and functional characterization of two cold resistance-related AP2/ERF genes in celery (*Apium graveolens* L.)[J]. Planta, 2019, 250(4): 1265-1280.

[25] ILLGEN S, ZINTL S, ZUTHER E, et al. Characterisation of the

- ERF102 to ERF105 genes of *Arabidopsis thaliana* and their role in the response to cold stress[J]. *Plant Molecular Biology*, 2020, 103(3): 303-320.
- [26] PANG X, XUE M, REN M, *et al.* *Ammopiptanthus mongolicus* stress-responsive NAC gene enhances the tolerance of transgenic *Arabidopsis thaliana* to drought and cold stresses[J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2019, 42(3): 624-634.
- [27] XU W, ZHANG N, JIAO Y, *et al.* The grapevine basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor positively modulates CBF-pathway and confers tolerance to cold-stress in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(8): 5329-5342.
- [28] YAO C, LI W, LIANG X, *et al.* Molecular cloning and characterization of *MbMYB108*, a *Malus baccata* MYB transcription factor gene, with functions in tolerance to cold and drought stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(9): 4846.
- [29] MA H, LIU C, LI Z, *et al.* *ZmbZIP4* contributes to stress resistance in maize by regulating ABA synthesis and root development[J]. *Plant Physiology*, 2018, 178(2): 753-770.
- [30] SU C F, WANG Y C, HSIEH T H, *et al.* A novel MYBS3-dependent pathway confers cold tolerance in rice[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(1): 145-158.
- [31] 刘林芝, 欧阳欢, 李兴涛, 等. ‘赣南早’脐橙在干旱胁迫下的生理及转录组研究[J]. *热带作物学报*, 2022, 43 (5): 893-903.
- [32] ZHANG X, YANG Z, LI Z, *et al.* De novo transcriptome assembly and co-expression network analysis of *Cynanchum thesioides*: Identification of genes involved in resistance to drought stress[J]. *Gene*, 2019, 710: 375-386.
- [33] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27-30.
- [34] LAI R, FENG X, CHEN J, *et al.* De novo transcriptome assembly and comparative transcriptomic analysis provide molecular insights into low temperature stress response of *Canarium album*[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 10561.
- [35] WANG J, GUO J, ZHANG Y, *et al.* Integrated transcriptomic and metabolomic analyses of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia*) in response to cold stress[J]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e0236588.
- [36] WU K, DUAN X, ZHU Z, *et al.* Physiological and transcriptome analysis of *Magnolia denudata* leaf buds during long-term cold acclimation[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 460.
- [37] SAH S K, REDDY K R, LI J. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 571.
- [38] FUJITA Y, FUJITA M, SATOH R, *et al.* AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(12): 3470-3488.
- [39] ZHANG Q, KONG X, YU Q, *et al.* Responses of PYR/PYL/RCAR ABA receptors to contrasting stresses, heat and cold in *Arabidopsis*[J]. *Plant Signal Behavior*, 2019, 14(12): 1670596.
- [40] REN C, KUANG Y, LIN Y, *et al.* Overexpression of grape ABA receptor gene *VaPYL4* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in *Arabidopsis*[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 271.
- [41] GONZÁLEZ-GARCÍA M P, RODRÍGUEZ D, NICOLÁS C, *et al.* Negative regulation of abscisic acid signaling by the *Fagus sylvatica* *FsPP2C1* plays a role in seed dormancy regulation and promotion of seed germination[J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(1): 135-144.
- [42] HU X, LIU L, XIAO B, *et al.* Enhanced tolerance to low temperature in tobacco by over-expression of a new maize protein phosphatase 2C, *ZmPP2C2*[J]. *Journal Plant Physiology*, 2010, 167(15): 1307-1315.
- [43] YUE X, ZHANG G, ZHAO Z, *et al.* A cryophyte transcription factor, *CbABF1*, confers freezing, and drought tolerance in tobacco[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 699.

Transcriptome Analysis and Gene Discovery of Abscisic Acid Signaling Pathway in *Kandelia obovata* under Low Temperature Stress

GUO Jin-min¹, YANG Sheng¹, LIU Xing¹, WANG Jin-wang^{1,2}, WANG Wen-qing³, CHEN Qiu-xia¹

(1. Zhejiang Institute of Subtropical Crops, Wenzhou 325000, Zhe'jiang, China; 2. Wenzhou Key Laboratory of Resource Plant Innovation and Utilization, Wenzhou 325000, Zhe'jiang, China; 3. College of Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102, Fu'jian, China)

Abstract: [Objective] To understand the molecular mechanism of *Kandelia obovata* in response to low temperature stress and cultivate new varieties of cold resistance. [Method] Based on the annual container seedlings of 'Longgang' *K. obovata*, a cold-tolerant mangrove cultivar, the control group (CK) was treated at 15 °C for 12 h and the low temperature group (LT) was treated at -5 °C for 12 h. Illumina HiSeq sequencing platform was used for transcriptome sequencing, and the genes related to abscisic acid signaling pathway were discovered. [Result] The results showed that a total of 148 transcription factors were identified by transcriptome sequencing, which belonged to 25 transcription factor families. Among them, ERF, NAC, WRKY, bHLH, MYB, bZIP, HB-other and MYB-related families contained more genes, which were 17, 14, 12, 12, 10, 9, 6 and 6, respectively. A total of 1 330 differentially expressed genes (DEGs) were screened in the differential group, of which 698 (52.48%) were up-regulated and 632 (47.52%) were down-regulated. KEGG pathway enrichment analysis showed that DEGs were significantly enriched in plant hormone signal transduction, phenylpropanoid biosynthesis, galactose metabolism, photosynthesis-antenna protein, and alpha-Linolenic acid metabolism. Among the abscisic acid signaling pathways, *KoPYL1*, *KoABF1*, and *KoABF2* were up-regulated and *KoPP2C1* and *KoABF3* were down-regulated, and the expression of these genes was consistent with the qRT-PCR validation results. [Conclusion] ERF, NAC, WRKY, bHLH, MYB, bZIP, HB-other and MYB-related play an important role in regulating the response of *K. obovata* to low temperature stress. Phytohormone signal transduction, phenylpropanoid biosynthesis, galactose metabolism, photosynthesis-antenna protein and alpha-Linolenic acid metabolism are important KEGG pathways in *K. obovata* in response to low temperature stress. *KoPYL1*, *KoPP2C1*, *KoABF1*, *KoABF2* and *KoABF3* genes in abscisic acid signaling pathway can be used as important candidate genes for future studies on the response of *K. obovata* to cold stress.

Keywords: *Kandelia obovata*; cold stress; transcriptome; transcription factor; abscisic acid signaling pathway

(责任编辑: 张 研)