



PEG 模拟干旱胁迫下马铃薯茎段转录组分析

赵 龙¹, 王 舰^{1,2,3,4,5}, 王 芳^{1,2,3,4,5*}

(1 青海大学, 西宁 810016; 2 青海省农林科学院, 西宁 810016; 3 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016; 4 青藏高原生物技术教育部重点实验室, 西宁 810016; 5 青海省马铃薯育种重点实验室, 西宁 810016)

摘 要: 该研究以‘青薯 9 号’马铃薯无菌苗为材料, 采用转录组测序技术分析模拟干旱胁迫下马铃薯茎段的差异表达, 探究茎段在干旱胁迫下的分子机制。结果表明: (1) 不同程度干旱胁迫下, 马铃薯叶片脯氨酸、可溶性糖以及可溶性蛋白含量明显增加; 马铃薯茎段差异表达基因下调的数量均多于上调, 其中 3 种处理条件下共有的差异表达基因有 657 个。(2) GO 富集分析表明, 马铃薯茎段差异表达基因主要集中在氧化还原过程、激素响应、氧化还原酶活性以及糖基水解酶活性; Pathway 富集分析表明, 马铃薯茎段差异表达基因主要集中在植物激素信号转导、苯丙酸生物合成、玉米素生物合成、苯丙氨酸代谢、淀粉和蔗糖代谢以及次生代谢产物的生物合成。(3) 实时荧光定量 PCR 验证结果表明, 6 个差异表达基因在不同程度干旱胁迫中的差异表达与转录组分析的结果基本一致, 证明转录组数据的可靠性。该结果对进一步研究马铃薯干旱胁迫响应机制有一定参考价值, 也丰富了马铃薯抗旱育种的基因资源。

关键词: 马铃薯; 干旱胁迫; 转录组分析; 差异表达基因

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

Transcriptome Analysis of Potato Stem under Drought Stress Simulated by PEG

ZHAO Long¹, WANG Jian^{1,2,3,4,5}, WANG Fang^{1,2,3,4,5*}

(1 Qinghai University, Xining 810016, China; 2 Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Xining 810016, China; 3 State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Xining 810016, China; 4 Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Biotechnology of Ministry of Education, Xining 810016, China; 5 Key Laboratory of Potato Breeding of Qinghai, Xining 810016, China)

Abstract: In this paper, we studied the plantlets of potato variety ‘Qingshu 9’ under simulated drought stress to explore the molecular mechanism of potato stem under drought stress, respectively, and the stems of plantlets were used for transcriptome sequencing. The results showed that: (1) the contents of proline, soluble sugar and soluble protein were increased with the increasing concentration of PEG6000. Under three different drought-stressed conditions, there were more down-regulated candidate genes than up-regulated candidate genes with a total of 657 differential expression genes (DEGs) in potato stem. (2) GO enrichment analysis showed that the DEGs in potato stems mainly focused on oxidation-reduction process, response to hormone, oxidoreductase activity, glycosylhydrolase activity. KEGG pathway enrichment analysis showed that the DEGs in potato stems mainly involved in plant hormone signal transduction,

收稿日期: 2019-11-19; 修改稿收到日期: 2020-02-26
基金项目: 国家自然科学基金(31660417); 国家马铃薯产业技术体系项目(CARS-09); 青海省科技厅重大专项(2019-NK-A1)
作者简介: 赵 龙(1993—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事马铃薯遗传育种研究。E-mail: 591904298@qq.com
* 通信作者: 王 芳, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事马铃薯遗传育种研究。E-mail: qhwhf324@163.com

phenylpropanoid biosynthesis, zeatin biosynthesis, phenylalanine metabolism, starch and sucrose metabolism, biosynthesis of secondary metabolites. (3) Real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) was used to verify the expressions of six DEGs under different drought-stress conditions. The results were basically consistent with the transcriptome profile that proved the reliability of our RNA-seq data. Our research provided the valuable information for understanding the drought resistance mechanism of potato, and enriching the genetic resources of drought resistant potato breeding.

Key words: potato; drought stress; transcriptome analysis; DEGs

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是茄科茄属双子叶植物,含有大量淀粉、蛋白质以及人体所需的微量元素^[1],被广泛应用于食品和工业等领域^[2]。在125个国家均有种植,全球每天超过10亿人以马铃薯为食^[3]。2015年,中国马铃薯主粮化战略的启动,人们对马铃薯的需求日益增加^[4]。

干旱是作物生产中最重要非生物胁迫之一,全球范围内45%的农业用地经常周期性的缺水,造成的产量损失近50%^[5]。干旱使渗透调节物质大量积累,并产生大量活性氧消除物质,影响了马铃薯的生长发育和生理代谢,严重时甚至造成不可逆的伤害,导致整个植株死亡,降低马铃薯的品质、产量和商品属性^[6-7]。干旱胁迫下,马铃薯根和叶片相关性状变化以及响应机制一直是研究的重点,但茎的研究通常被忽略^[8]。茎段是马铃薯生长发育过程中重要的组织器官,根系吸收水分和矿物质通过茎运输到地上部分,光合产物同样依赖茎输送到植株的各个部位。茎是作物代谢必经的流器官,在产量形成过程中又扮演暂存库的作用,茎中储存的非结构性碳水化合物,主要包括蔗糖、果聚糖、果糖、葡萄糖以及淀粉等,其含量与植物的碳供应能力、植物生长、存活能力以及应对外界胁迫干扰的缓冲能力密切相关,因此提高潜在的库容有望提高粮食的产量^[9-11]。

干旱是影响植物生长发育的重要因素,众多基因参与马铃薯抗旱反应,研究表明,过表达 *StMYB1R-1* 以及 *StDREB1*, 均能够增强马铃薯的脱水耐受性^[12-13]。通过转录组测序技术能够发现多个参与抗旱反应的基因以及调控途径,可以为抗旱基因的挖掘以及抗旱品种的选育提供新思路。马铃薯不同组织干旱胁迫的转录组研究对解析抗旱的分子机制具有重要意义。干旱胁迫马铃薯叶片转录组分析发现,上调表达基因与植物激素信号转导和内质网中的蛋白质加工相关,下调表达基因与光合作用和光合生物固碳作用相关^[14]。干旱胁迫马铃薯根系的转录组发现差异表达基因主要富集在谷胱甘肽及其代谢途径以及相关植物激素信号转导等途径^[15]。而干旱胁迫马铃薯茎段的转录组研究尚未报道。

本研究利用转录组测序技术,构建‘青薯9号’马铃薯无菌苗在不同浓度PEG胁迫下马铃薯茎段转录组文库,从转录水平分析鉴定干旱胁迫应答基因,通过GO和Pathway富集分析,挖掘抗旱相关基因,对解析干旱胁迫下马铃薯生理与分子机制具有重要的价值,为马铃薯抗旱品种改良提供理论支持和基因资源。

1 材料和方法

1.1 实验材料与处理

‘青薯9号’是青海省农林科学院生物技术研究自主培育品种,具有抗逆、丰产等特点。本实验利用不同浓度PEG6000 [5% (P₅)、10% (P₁₀)和15% (P₁₅)]模拟不同程度干旱胁迫,用不加PEG6000的作为对照(CK)。

将生长至4~6片叶的‘青薯9号’马铃薯无菌苗转移到CK以及P₅、P₁₀、P₁₅的MS培养基,于14 h/d, 2 000 Lx、22 °C光温条件下胁迫处理15 d,植株如图所示(图1)。4个处理,每个处理3个生物学重复,取倒数第2片和倒数第4片叶中间部分茎段以及主茎的顶端裂叶,每个重复取3株,混样后液氮速冻,其中茎段用于总RNA的提取,叶片用于生理指标的测定。

1.2 方法

1.2.1 生理指标的测定 游离脯氨酸含量采用磺基水杨酸法测定^[16];可溶性糖含量采用蒽酮法测定^[17];可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝G-250染色法测定^[18]。用Excel 2016进行实验数据的处理,用SPSS 20.0进行数据统计分析。

1.2.2 总RNA的提取、文库的构建及测序 采用植物RNA提取试剂盒(TaKaRa)提取马铃薯茎段总RNA。利用Nanodrop超微量分光光度计对RNA纯度进行检测,利用Qubit和Agilent 2100检测RNA的浓度和完整性,利用琼脂糖凝胶电泳,检测RNA是否降解。检测合格的RNA样品,用于cDNA文库构建。文库构建以及转录组测序委托北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

表 1 表达验证的基因及其 qRT-PCR 引物
Table 1 qRT-PCR primers for the selected genes

代号 Code	基因 ID Gene ID	正向引物 Forward primer (5'→3')	反向引物 Reverse primer (5'→3')
	Actin	AGATGCTTACGCTGGATGGAATGC	TTCCGGTGTGGTTGGATTCTGTTC
I	G400002044	TCGGAGGACGGTGATGAAGTGAG	CAGACGTTGCAGTATCCACGAGTG
II	G400003123	ACGGTGAACACGGCATTGACAG	TCTGCGACCTGCTGAGGAGTG
III	G400027654	GTGTCCGCCGTGGAACAGATG	GAGCGACAGCCACTCAATGCC
IV	G400011530	AACTGGTGCTGCTAAGGCTGTG	TGAACGACAAGGTCCACAAGTGA
V	G400004652	CGTTCCTCATCGGTCAGTTCAGTC	CTCCAGTGGCTGTCTCGTTATGC
VI	G400007375	GCCAAGCCTGTCTCTTCTGGTAG	ATCACCTCCAAGTCCAGGTTCTTG

注:由于基因 ID 过长,将重复部分 PGSC0003DMG 简化为 G。下同
Note: Because the gene ID is too long, the repetitive part of PGSC0003DMG is simplified to G. The same as below

1.2.3 测序数据的处理 转录组测序的原始数据文件经识别分析转化为原始测序序列(raw reads)。过滤原始测序序列中带接头、低质量的 reads,得到过滤后的测序数据(clean reads)。基因表达水平、基因长度以及测序深度与 reads 正相关,为了使不同基因、不同实验间估计的基因表达水平具有可比性,采用 FPKM 来估算基因表达水平。

1.2.4 GO 富集分析以及 Pathway 富集分析 以 $|\log_2(\text{fold change})|>1, P<0.01$ 为标准筛选差异表达基因(differential expression genes, DEGs),通过 GO 富集分析,研究差异基因在 GO 中的分布情况,阐述其功能上的分类。通过 Pathway 显著性富集分析,找出与基因组相比,显著性富集的 Pathway。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 根据 DEGs 的 CDS 序列设计引物,Actin 为内参(表 1)。采用荧光反转试剂盒(TaKaRa),以 500 ng RNA 为模板反转成 cDNA。利用荧光定量试剂盒(TaKaRa)进行 qRT-PCR,程序为 95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。利用 Excel 2016 对基因表达荧光数据进行整理和分析,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相对表达量,每个样品重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 干旱对马铃薯生理指标的影响

脯氨酸作为植物体内重要的渗透调节物质,其含量变化间接反映了植物遭受逆境胁迫的程度;植物体内糖类物质以及可溶性蛋白在干旱胁迫下,通过调节渗透压对植物起到一定的保护作用。本实验结果发现,干旱胁迫下,马铃薯脯氨酸、可溶性糖以及可溶性蛋白含量明显增加(表 2),与 CK 相比,脯氨酸、可溶性蛋白在 P₅、P₁₀、P₁₅ 中均达到显著水平,可溶性糖在 P₁₀、P₁₅ 中达到显著水平。随着 PGE 浓

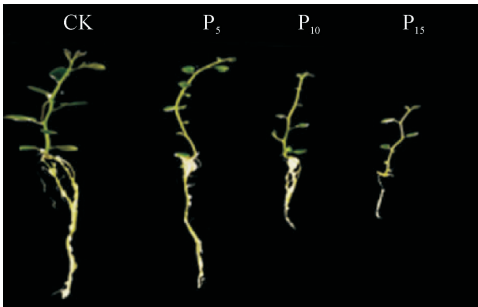


图 1 转录组检测样品
Fig. 1 Transcriptome detection samples

表 2 干旱胁迫对马铃薯叶片生理指标的影响
Table 2 Effects of drought stress on physiological indexes of potato

样品名称 Sample name	脯氨酸 Proline/(μg/g)	可溶性糖 Soluble sugar/(μg/g)	可溶性蛋白 Soluble protein/(μg/g)
CK	82.73±2.17d	1.81±0.11c	2.36±0.11d
P ₅	98.36±1.34c	1.98±0.13c	3.21±0.08c
P ₁₀	142.86±3.27b	3.48±0.12b	3.86±0.05b
P ₁₅	197.79±4.12a	4.36±0.16a	4.18±0.17a

注:不同小写字母表示在 P<0.05 水平上差异显著
Note: Different normal letters in each column indicate significant difference (P<0.05)

度的增加,马铃薯植株的高度、根长、叶片数均呈现下降趋势(图 1)。说明干旱胁迫,影响了马铃薯的生理代谢以及生长发育。

2.2 测序数据质量评估

根据测序序列 reads 质量,可知马铃薯茎段对照和 3 种不同程度干旱胁迫所有样本(12 个)测序所得原始序列介于 42 094 020~52 579 328 条之间,过滤后的序列介于 40 168 658~50 015 728 之间,比例介于 94.99%~98.19%之间。 Q_{20} 的概率介于 93.90%~97.07%, Q_{30} 的概率介于 86.07%~92.51%,G 和 C 碱基数量总和占总碱基数量的 42.31%~42.68%(表 3)。综合以上测序数据质量的评估,说明茎段样品测序质量较高,可以进行下一步数据的分析以及 DEGs 的筛选。

2.3 干旱胁迫马铃薯茎段差异表达基因分析

对筛选出来 DEGs 统计分析,可知 P_5 与 CK 相比,茎段 DEGs 有 2 115 个,其中上调 881 个,下调 1 234 个; P_{10} 与 CK 相比,茎段 DEGs 有 2 012 个,其中上调 841 个,下调 1 171 个; P_{15} 与 CK 相比,茎段 DEGs 有 3 023 个,其中上调 1 093 个,下调 1 930 个(图 2)。3 种干旱胁迫下 DEGs 下调数量均多于上调,其中在 P_{15} 中 DEGs 最多。 P_5 与 P_{10} 共有的 DEGs 1 050 个; P_5 与 P_{15} 共有的 DEGs 963 个; P_{10} 与 P_{15} 共有的 DEGs 1 041 个;3 种干旱胁迫下共有 DEGs 657 个(图 3)。

2.4 差异表达基因的 GO 分类与富集分析

为了全面分析不同程度干旱胁迫下马铃薯茎段

的 DEGs,研究其功能上的宏观分布,将检测到的 DEGs 进行 GO 注释。结果发现马铃薯茎段 DEGs 的 GO 分类主要集中在 10 个功能组中,其中生物过程、细胞组分和分子功能分别有 6、1、3 个功能分类(表 4)。在生物过程这一类中,DEGs 在氧化还原过

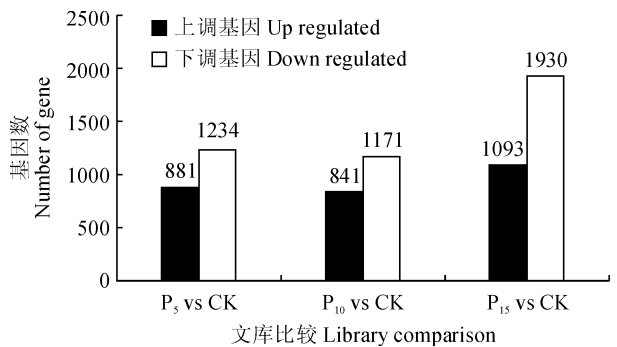


图 2 干旱胁迫下马铃薯茎段 DEGs 数量
Fig. 2 The number of DEGs in potato stems after drought stress

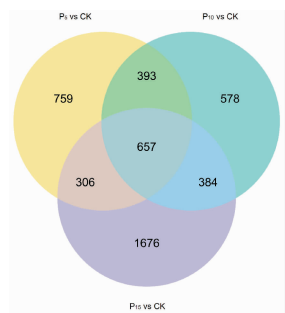


图 3 干旱胁迫马铃薯茎段 DEGs
Fig. 3 DEGs in potato stems after drought stress

表 3 测序序列质量
Table 3 Quality assessment of reads

样品名称 Sample name	原始序列数据 Raw reads	过滤后的测序数据 Clean reads	Q_{20} / %	Q_{30} / %	碱基 G 和 C 比例 GC content / %
CK-1	48 311 858	45 889 700	94.47	87.14	42.60
CK-2	46 772 722	44 463 068	94.56	87.31	42.61
CK-3	52 579 328	50 015 728	94.81	87.76	42.55
P_5 -1	42 321 316	40 168 658	94.87	87.95	42.59
P_5 -2	51 196 894	47 972 622	93.90	86.07	42.68
P_5 -3	49 552 008	47 139 566	94.72	87.65	42.60
P_{10} -1	49 478 504	47 186 658	94.78	87.69	42.65
P_{10} -2	48 028 274	45 758 312	94.98	88.16	42.60
P_{10} -3	45 261 882	43 153 202	94.67	87.47	42.54
P_{15} -1	44 797 640	43 888 482	97.07	92.51	42.34
P_{15} -2	42 371 552	41 593 184	97.00	92.41	42.31
P_{15} -3	42 094 020	41 332 360	97.04	92.48	42.46

程以及对激素的响应中所占的比例最高;细胞组分中主要为细胞外区;分子功能中主要为氧化还原酶活性以及糖基水解酶活性。随着胁迫浓度的升高,氧化还原系统中,上调基因数量减少,下调基因数量逐渐增加;植物激素途径中,上调基因数量几乎没有变化,而下调基因数量先减少后增加;糖代谢相关的水解酶,在 P₁₅ 中下调基因的数量明显多于 P₅ 和

P₁₀。说明干旱胁迫对马铃薯茎段的氧化还原相关系统、糖代谢以及相关激素的影响较大,并且随着干旱胁迫程度的增加,所涉及的 DEGs 数量具有一定的差异。

2.5 差异表达基因的 Pathway 显著性富集分析
Pathway 富集分析可以进一步了解 DEGs 的生物学功能。将 DEGs 通过 KEGG 数据库对比,并列

表 4 DEGs 富集的 GO 分类
Table 4 Thet enriched gene ontology of DEGs

类别 Type	GO 注释 GO annotation	P ₅ vs CK		P ₁₀ vs CK		P ₁₅ vs CK	
		上调 Up	下调 Down	上调 Up	下调 Down	上调 Up	下调 Down
生物过程 Biological process	氧化还原过程 Oxidation-reduction process	142	121	112	123	109	197
	生长素的响应 Response to auxin	0	49	3	42	3	94
	对化学物质的响应 Response to chemical	46	86	38	76	43	146
	对激素的响应 Response to hormone	14	63	14	51	14	111
	对有机物的响应 Response to organic substance	27	75	23	60	27	122
	对内生刺激的响应 Response to endogenous stimulus	14	63	14	51	15	112
细胞组分 Cellular component	细胞外区 Extracellular region	21	37	27	40	25	53
分子功能 Molecular function	氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity	141	128	114	134	114	203
	水解酶活性,作用于糖基键 Hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	28	29	30	33	23	44
	水解 O-糖基化合物的水解酶活性 Hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	26	27	30	32	23	44

表 5 DEGs 富集 KEGG Pathways
Table 5 The enriched KEGG Pathways of DEGs

KEGG 代谢通路 KEGG pathway	KEGG 编号 KEGG ID	差异表达基因数量 Number of DGEs		
		P ₅ vs CK	P ₁₀ vs CK	P ₁₅ vs CK
次生代谢产物的生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	sot01110	139	132	154
植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	sot04075	61	56	98
苯丙酸生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	sot00940	46	48	58
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	sot00500	34	35	41
玉米素生物合成 Zeatin biosynthesis	sot00908	14	10	13
苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	sot00360	28	31	33
内质网蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	sot04141	37	—	—
不饱和脂肪酸的生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	sot01040	11	—	—
氰胺酸代谢 Cyanoamino acid metabolism	sot00460	11	—	—
二萜生物合成 Diterpenoid biosynthesis	sot00904	12	9	—
角质、亚角质和蜡的生物合成 Cutin, suberine and wax biosynthesis	sot00073	—	11	—
戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化 Pentose and glucuronate interconversions	sot00040	—	21	—
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	sot00480	—	34	36
类胡萝卜素生物合成 Carotenoid biosynthesis	sot00906	—	—	11
倍半萜和三萜生物合成 Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	sot00909	—	—	10
ABC 转运 ABC transporters	sot02010	—	—	8

注:—, 通路差异不显著
Note:—. The pathway was not significant

表 6 植物激素信号转导途径 DEGs 信息

Table 6 Information of DEGs involved in plant hormone signal transduction

名称 Name	基因 ID Gene ID	基因表达模式 Gene expression model		
		P ₅ vs CK	P ₁₀ vs CK	P ₁₅ vs CK
生长素应答蛋白 Auxin-responsive protein	G400001498	D	D	D
	G400020139	D	D	D
吲哚-3-乙酰胺合成酶 GH3.6 Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.6	G400019274	D	D	D
	G400021803	D	D	D
	G400026186	D	D	D
生长素诱导的 SAUR Auxin-induced SAUR	G400001609	D	D	D
	G400001611	D	D	D
	G400001647	D	D	D
	G400001648	D	D	D
	G400001649	D	D	D
脱落酸受体 PYL4 Absciscic acid receptor PYL4	G400011033	U	U	U
	G400015897	U	U	U
	G400023949	U	U	D
蛋白磷酸酶 2C Protein phosphatase 2C	G400030332	D	D	U
	G400016742	D	D	U

注:U. 上调; D. 下调。下同

Note: U. Up regulation; D. Down regulation. The same as below

出不同程度干旱胁迫下前 10 条富集的通路,共计 16 条代谢通路(表 5)。根据 DEGs 富集 KEGG Pathway,发现相同的 Pathway 有 6 条,其中次生代谢产物的生物合成、植物激素信号转导途径中 DEGs 所占的比例最高,其次为苯丙酸生物合成、淀粉和蔗糖代谢、玉米素生物合成以及苯丙氨酸代谢。而内质网蛋白质加工等 4 条 Pathway 在 P₅ 中显著富集,角质、亚角质和蜡的生物合成等 4 条 Pathway 在 P₁₀ 中显著富集,谷胱甘肽代谢等 4 条 Pathway 在 P₁₅ 中显著富集。说明马铃薯茎段对不同程度干旱胁迫的响应是一个非常复杂的过程,涉及多个基因,多种途径以及多种代谢产物的生物合成。而最富集 Pathway 同样涉及植物激素信号转导、糖代谢以及活性氧消除,与 GO 富集分析结果相一致。因此本研究对植物激素、糖代谢以及氧化还原相关的关键 DEGs 进行进一步鉴定分析。

2.6 差异表达基因鉴定分析

2.6.1 茎段植物激素差异表达基因分析 KEGG Pathway 富集分析发现,P₅ 中植物激素信号转导途径有 61 个 DEGs,P₁₀ 中 56 个,P₁₅ 中 98 个,主要涉及生长素以及脱落酸信号转导途径。其中,生长素信号转导途径中 2 个生长素应答蛋白 AUX/IAA

基因、3 个吲哚-3-乙酰胺合成酶 GH3 基因、5 个生长素诱导的 SAUR 基因,在不同程度干旱胁迫下均下调表达;脱落酸信号转导途径中 3 个 ABA 的受体蛋白 PYL4 在 P₅、P₁₀ 中上调表达,2C 型蛋白磷酸酶(PP2C)与 PYL4 的变化趋势恰好相反,呈下调表达;而 P₁₅ 的变化与 P₅、P₁₀ 存在一定的差异,说明不同程度干旱胁迫下基因的表达模式存在一定的差异(表 6)。

2.6.2 茎段糖代谢差异表达基因分析 干旱胁迫下,植物通过增加可溶性糖等渗透调节物质,以维持正常的生长发育。糖代谢数字表达谱中发现 4 个葡萄糖基转移酶、3 个 β-葡萄糖苷酶、3 个 β-半乳糖苷酶、1 个 β-果糖苷酶、2 个 β-淀粉酶基因,在干旱胁迫下呈现不同程度的上调表达(表 7)。可以推测这些糖代谢相关酶基因的上调表达,增加了可溶性糖的含量,以响应干旱胁迫。

2.6.3 氧化还原系统差异表达基因分析 干旱胁迫下,植物会合成一系列活性氧消除相关物质,以减轻活性氧积累所造成的损伤。转录组分析发现 2 个氧化还原酶、2 个谷胱甘肽、3 个过氧化物酶、1 个超氧化物歧化酶基因,在干旱胁迫下呈现不同程度的上调表达(表 8)。表明干旱胁迫下,植物产生氧化还

表 7 糖代谢 DEGs 信息

Table 7 Information of DEGs involved in carbohydrate metabolism

名称 Name	基因 ID Gene ID	基因表达模式 Gene expression model		
		P ₅ vs CK	P ₁₀ vs CK	P ₁₅ vs CK
葡萄糖基转移酶 Glucosyltransferase	G400024344	U	U	U
	G400009411	U	U	U
	G400005960	U	U	U
	G400029490	U	U	U
β-葡萄糖苷酶 Beta-glucosidase	G400025239	U	U	U
	G400005021	U	U	U
	G400002462	U	U	U
β-半乳糖苷酶 Beta-galactosidase	G400002590	D	U	U
	G400030954	U	U	U
	G400000339	U	U	U
β-呋喃果糖苷酶 Beta-fructofuranosidase	G401028252	U	U	U
β-淀粉酶 Beta-amylase	G402020509	U	U	U
	G400001549	U	D	U

表 8 氧化还原系统 DEGs 信息

Table 8 Information of DEGs involved in redox system

名称 Name	基因 ID Gene ID	基因表达模式 Gene expression model		
		P ₅ vs CK	P ₁₀ vs CK	P ₁₅ vs CK
氧化还原酶 Oxidoreductase	G402003479	U	U	U
	G400016293	U	U	D
谷胱甘肽 Glutaredoxin	G400011379	U	U	U
	G400011406	U	U	U
过氧化物酶 Peroxidase	G400006386	U	U	U
	G400022541	U	U	U
	G400003748	U	U	U
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	G400000417	U	U	D

原相关的酶和还原性物质来消除多余的活性氧,以响应干旱。

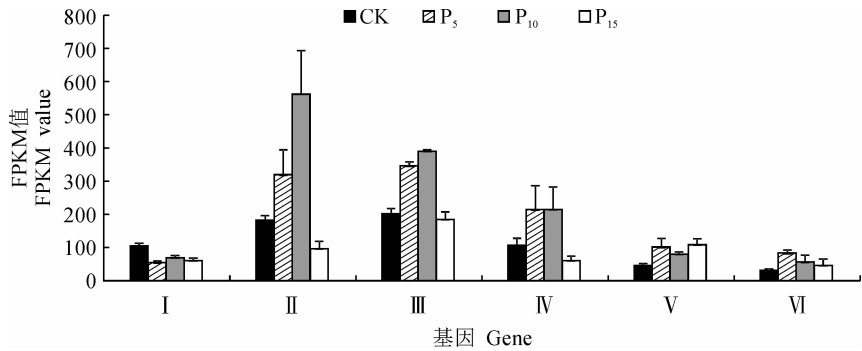
2.7 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

从马铃薯茎段转录组中随机选取 6 个 DEGs,其中 I 为 bHLH145 转录因子,在不同程度干旱胁迫中呈下调表达;II、III 和 IV 分别为果糖二磷酸醛缩酶、乙醇酸氧化酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 a,在 P₅ 和 P₁₀ 中上调表达,在 P₁₅ 中下调表达;V、VI 为丝氨酸丙酮酸转氨酶和叶绿素 a/b 结合蛋白,在不同程度干旱胁迫中呈上调表达(图 4)。同时对选取的 6 个基因进行 qRT-PCR 验证,并计算其相对表达量(图 5),可知 6 个 DEGs 表达量的变化与转录组中 FPKM 的变化一致,验证了转录组数据的可靠性;

但表达量变化倍数不完全相同,说明两种检测方法灵敏度存在一定差异。

3 讨 论

人们对光合作用的源器官叶片和具有储存作用的库器官块根研究较多,而对马铃薯茎段的研究较少。茎段作为马铃薯重要的流器官,同时储存大量的碳水化合物,对不同生育期以及外界环境具有一定的缓冲和调节作用^[19]。本研究通过对模拟不同程度干旱胁迫马铃薯茎段进行转录组测序,对转录组数据定性和定量的多重比对,通过模拟不同干旱胁迫下转录丰度的变化,了解马铃薯茎段对干旱胁迫的响应和适应过程。GO 和 Pathway 富集分析表



I ~ VI 同表 1。下同

图 4 RNA-Seq 基因表达谱

I ~ VI are the same as Table 1. The same as below

Fig. 4 Gene expression profiles of RNA-Seq

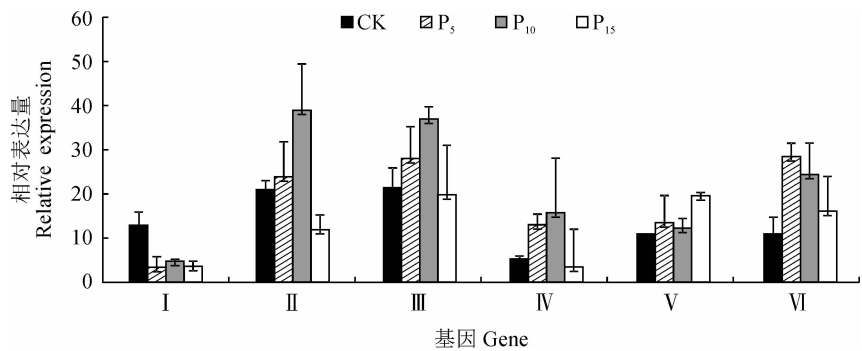


图 5 qRT-PCR 验证基因表达水平

Fig. 5 Experimental verification of gene expression levels by qRT-PCR

明了马铃薯茎段在干旱胁迫下具有一定的复杂性和一致性。qRT-PCR 验证与茎段转录组基因表达谱的对比分析,验证了转录组数据的可靠性。

3.1 茎段植物激素信号转导分析

在 GO 和 Pathway 富集分析发现,植物激素信号转导在不同程度干旱胁迫下均显著富集,与甜高粱在干旱胁迫下的结果一致^[20]。本研究发现生长素和脱落酸信号转导途径中 DEGs 最多;同时 DEGs 在类胡萝卜素和玉米素生物合成 Pathway 中也显著富集。生长素信号转导途径中,AUX/IAA、GH3 和 SAUR 在不同程度干旱胁迫下均呈下调表达。AUX/IAA 蛋白是活性阻遏物,其稳定性和活性受生长素调节^[21];GH3 和 SAUR 是生长素早期响应基因,对植物生长和发育过程中起重要作用^[22]。脱落酸信号转导途径中,PYR/PYL 与 PP2C 的变化相反。PYR/PYL 受体在气孔开度的定量调控和转录反应中起重要作用^[23],同时 PYR/PYL 对 PP2C 蛋白磷酸酶的活性具有抑制作用,PP2C 在 ABA 调控途径中起负调控作用,过表达会降低植物的耐受性^[24]。ABA 对于干旱胁迫的影响是

多方面的,包括气孔关闭的调节、保卫细胞中通道活性以及一些 ABA 应答基因表达^[25]。而 P₁₅ 中 PYR/PYL 和 PP2C 的变化与 P₅、P₁₀ 存在一定的差异,可能是不同程度干旱胁迫下,植物对其的调控有差异,这个结果有待进一步探讨。类胡萝卜素是 ABA 生物合成中重要物质^[26],也是植物体内非酶抗氧化系统中的还原性物质,与活性氧消除相关^[27]。研究表明外施玉米素以及玉米素处理的植物能提高对干旱的抵抗性,说明马铃薯在不同程度干旱胁迫产生的玉米素对抵御逆境胁迫同样具有重要意义^[28]。

3.2 茎段糖代谢途径分析

研究结果显示随着干旱胁迫程度的增加,马铃薯脯氨酸、可溶性糖以及可溶性蛋白含量均呈上升趋势,这与在干旱胁迫下,植物通过积累脯氨酸、可溶性糖以及可溶性蛋白等渗透调节物质,来维持正常的生长发育结果一致^[29]。研究结果还发现糖基水解酶等代谢过程在 GO 中显著富集,淀粉和蔗糖代谢在 Pathway 中显著富集,表明干旱胁迫严重影响了马铃薯糖代谢过程,这与小桐子转录组的结果

一致^[30]。可溶性糖是一种重要的渗透调节物质,其含量的积累可以增强干旱的适应性^[31]。本研究发现多种与糖代谢相关 DEGs,其中 UPD-葡萄糖基转移酶 (G400009411)、葡萄糖苷酶 (G400025239、G400005021)、β-半乳糖苷酶 (G400000339)、β-呋喃果糖苷酶 (G401028252)、β-淀粉酶 (G402020509) 共 6 个基因在不同种程度干旱胁迫下均显著上调。其中 β-半乳糖苷酶 (β-gals) 是一个广泛的糖基水解酶家族,被认为参与植物中半乳糖苷、糖蛋白和细胞壁多糖的代谢循环^[32]。β-呋喃果糖苷酶又称蔗糖转化酶,能将蔗糖转化为其它糖、醇以及苯酚等。UPD-葡萄糖基转移酶,是许多植物生长和发育过程所必需的,也参与非生物胁迫适应^[33]。这些酶的存在可以将多糖分解为低聚糖,增加茎中渗透势,增强抗旱性。

3.3 茎段氧化还原系统分析

活性氧的过度积累,使膜磷脂和脂肪酸被破坏,导致膜脂质过氧化,造成细胞损伤,严重时导致细胞死亡^[34]。研究结果表明,马铃薯茎段中产生大量的活性氧消除相关的物质来抵消活性氧积累造成的损伤。干旱胁迫下,各种膜蛋白或酶空间构型受到干扰,导致膜透性和离子泄漏增加,叶绿素破坏,代谢紊乱,造成严重伤害或死亡^[35]。为了保护细胞免受过度活性氧的有害影响,植物进化出一系列复杂的

酶和非酶抗氧化防御机制,以维持细胞内氧化还原状态的稳态^[36]。本研究发现保护酶抗氧化系统中,氧化还原酶基因 (G402003479)、过氧化物酶基因 (G400006386、G400022541、G400003748) 以及非酶抗氧化防御中谷胱甘肽基因 (G400011379、G400011406),在干旱胁迫下呈上调表达。说明茎段通过产生的活性氧消除相关酶与还原性物质来消除干旱胁迫产生的活性氧,以减轻干旱对植物的损伤。

研究表明过表达的 WRKY13、MYB48 可以增加植物对非生物胁迫的抗性^[37-38]。本研究发现大量转录因子被诱导,主要包括 AP2-EREBP、MYB、WRKY、bHLH、bZIP、NAC 等。其中转录因子 WRKY13 (G400010987) 和转录因子 MYB48 (G400030397) 在 3 种干旱胁迫下均上调表达,这可能对马铃薯抗旱性的提高具有重要意义。在干旱胁迫下,稳定生物结构的小分子有机化合物的积累可以直接保护植物细胞免受损伤,本研究发现一个水通道蛋白基因 (G400028182),在不同程度干旱胁迫下呈上调表达。

综上,本研究为马铃薯茎段抗性基因的挖掘、克隆以及验证等后续研究提供了一定的基因资源,为马铃薯抗旱品种的筛选累积了资料,对进一步研究马铃薯干旱胁迫响应机制有一定参考价值。

参考文献:

[1] 田甲春,胡新元,田世龙,等. 19 个品种马铃薯营养成分分析[J]. 营养学报, 2017,**39**(1): 102-104.
TIAN J C, HU X Y, TIAN S L, *et al.* Analysis of nutrient composition of 19 variety potatoes[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2017,**39**(1): 102-104.

[2] 郭俊峰. 马铃薯淀粉的改性及在调湿涂料中的应用[D]. 兰州: 西北师范大学, 2010.

[3] MULLINS E, MILBOURNE D, PETTI C, *et al.* Potato in the age of biotechnology[J]. *Trends in Plant Science*, 2006, **11**(5): 254-260.

[4] 景彩艳,王海荣. 定西市安定区马铃薯主粮化发展分析[J]. 中国马铃薯, 2016,**30**(3): 186-190.
JING C Y, WANG H R. Analysis on development of potato as staple food in Anding district[J]. *Chinese Potato Journal*, 2016,**30**(3): 186-190.

[5] PENNISI E. The blue revolution, drop by drop, gene by gene[J]. *Science*, 2008,**320**(5 873): 171-173.

[6] 白江平,王晓斌,高慧娟,等. 干旱和盐胁迫对马铃薯试管苗亚细胞结构及生理生化指标的影响[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(11): 2 233-2 240.
BAI J P, WANG X B, GAO H J, *et al.* Effects of drought and salt stress on subcellular structure and physiological and

biochemistry indicators of potato plantlets[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016,**36**(11): 2 233-2 240.

[7] 王彧超,郭 妙. 马铃薯抗旱性研究进展[J]. 山西农业科学, 2017,**45**(11): 1 890-1 893.
WANG Y C, GUO M. Research progress on drought resistance of potato[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2017,**45**(11): 1 890-1 893.

[8] WISHART J. Field phenotyping of potato to assess root and shoot characteristics associated with drought tolerance[J]. *Plant and Soil*, 2014,**378**(1-2): 351-363.

[9] KOYRO H W. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.)[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006,**56**(2): 136-146.

[10] DUQUE L O, SETTER T L. Cassava response to water deficit in deep pots: root and shoot growth, ABA, and carbohydrate reserves in stems, leaves and storage roots[J]. *Tropical Plant Biology*, 2013,**6**(4): 199-209.

[11] KITAJIMA M K. Carbohydrate storage enhances seedling shade and stress tolerance in a neotropical forest[J]. *Journal of Ecology*, 2007,**95**(2): 383-395.

[12] SHIN D, MOON S J, HAN S, *et al.* Expression of *St-MYB1R-1*, a novel potato single MYB-Like domain transcrip-

- tion factor, increases drought tolerance[J]. *Plant Physiology*, 2011, **155**(1): 421-432.
- [13] BOUAZIZ D, PIRRELLO J, CHARFEDDINE M, *et al.* Overexpression of *StDREB1* transcription factor increases tolerance to salt in transgenic potato plants[J]. *Molecular Biotechnology*, 2013, **54**(3): 803-817.
- [14] 王 洁. 干旱胁迫马铃薯叶片转录组分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [15] 王晓娇, 蒙美莲, 曹春梅, 等. 马铃薯萌芽出苗期根系对水分胁迫的响应机理分析[J]. 灌溉排水学报, 2019, **38**(5): 12-18. WANG X J, MENG M L, CAO C M, *et al.* Response of roots of potato at seedling stage to water stress[J]. *Journal of Irrigation and Drainage*, 2019, **38**(5): 12-18.
- [16] 陈建勋. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002.
- [17] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [18] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [19] SLEWINSKI T L. Non-structural carbohydrate partitioning in grass stems: a target to increase yield stability, stress tolerance, and biofuel production[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, **63**(13): 4 647-4 670.
- [20] 邵丹阳. 干旱胁迫下甜高粱(辽甜一)转录组分析[D]. 郑州: 河南大学, 2018.
- [21] TIWARI S B, WANG X J, GUILFOYLE H T J, *et al.* AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin[J]. *The Plant Cell*, 2001, **13**(12): 2 809-2 822.
- [22] 朱宇斌, 孔莹莹, 王君晖. 植物生长素响应基因 SAUR 的研究进展[J]. 生命科学, 2014, **26**(4): 407-413. ZHU Y B, KONG Y Y, WANG J H. Research advances in auxin-responsive SAUR genes[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2014, **26**(4): 407-413.
- [23] GONZALEZ-GUZMAN M, PIZZIO G A, ANTONI R, *et al.* *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid[J]. *The Plant Cell*, 2012, **24**(6): 2 483-2 496.
- [24] ARSHAD M, MATTSSON J. A putative poplar PP2C-encoding gene negatively regulates drought and abscisic acid responses in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. *Trees*, 2014, **28**(2): 531-543.
- [25] CHOI H I, HONG J H, HA J O, *et al.* ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(3): 1 723-1 730.
- [26] HAIDER I, ANDREO-JIMENEZ B, BRUNO M, *et al.* The interaction of strigolactones with abscisic acid during the drought response in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, **69**(9): 2 403-2 414.
- [27] BLOKHINA O, VIROLAINEN E, FAGERSTEDT K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a Review[J]. *Annals of Botany*, 2003, **91**(2): 179-194.
- [28] 李林洁, 郭蔚尔, 常智慧. 玉米素对高羊茅和多年生黑麦草抗旱性影响的研究[J]. 草原与草坪, 2017, **37**(1): 61-66. LI L J, GUO W E, CHANG Z H. Effect of zeatin on drought resistance of tall fescue and perennial ryegrass[J]. *Grassland and Turf*, 2017, **37**(1): 61-66.
- [29] 韩 冷, 徐 敏, 张 萍. 干旱胁迫下新疆野核桃幼苗叶片渗透调节物质变化研究[J]. 天津农业科学, 2018, **24**(8): 1-3. HAN L, XU M, ZHANG P. Changes of osmoregulation in Xinjiang wild walnut seedlings under drought stress [J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2018, **24**(8): 1-3.
- [30] 王君珂, 王莎莎, 张 博, 等. 基于 RNA-Seq 解析小桐子棉子糖代谢途径在干旱适应中的作用[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, **37**(9): 3 978-3 987. WANG J K, WANG S S, ZHANG B, *et al.* Analysis of roles of the raffinose metabolism pathways in adaptation of *Jatropha curcas* to drought stress based on RNA-Seq [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2018, **37**(9): 3 978-3 987.
- [31] 胡根海, 董 娜, 晁毛妮, 等. PEG 模拟干旱胁迫对不同抗逆性棉花的生理特性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2017, **35**(5): 223-228. HU G H, DONG N, CHAO M N, *et al.* Effects of drought stress simulated by PEG6000 on physiological characteristics of different upland cotton[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2017, **35**(5): 223-228.
- [32] SABZEVARY A G, HOSSEINI R. Two main domains with different roles discovered an a new tomato beta-galactosidase [J]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2016, **42**(5): 522-531.
- [33] FRANCISCA B H, ADRIAN A M, RODRIGO T, *et al.* The UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase (UGGT), a key enzyme in ER quality control, plays a significant role in plant growth as well as biotic and abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, **15**(1): 1-12.
- [34] CARVALHO M H C D. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, **3**(3): 156-165.
- [35] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, **48**(12): 909-930.
- [36] MITTLER R, VANDERAUWERA S, SUZUKI N, *et al.* ROS signaling: the new wave? [J]. *Trends in Plant Science*, 2011, **16**(6): 300-309.
- [37] XIAO J, CHENG H, LI X, *et al.* Rice WRKY13 regulates cross talk between abiotic and biotic stress signaling pathways by selective binding to different *cis*-elements[J]. *Plant Physiology*, 2013, **163**(4): 1 868-1 882.
- [38] WANG Y, WANG Q, LIU M L, *et al.* Overexpression of a maize MYB48 gene confers drought tolerance in transgenic *arabidopsis* plants[J]. *Journal of Plant Biology*, 2017, **60**(6): 612-621.