

基于转录组学的蓖麻耐盐基因的挖掘

李艳肖¹, 张春兰², 徐兴源¹, 陈艳秋¹, 向殿军¹, 刘 鹏¹

(¹内蒙古民族大学农学院, 通辽 028000; ²内蒙古民族大学生命科学与食品学院, 通辽 028000)

摘要: 为获取蓖麻耐盐基因的序列信息, 挖掘盐胁迫下差异表达基因及相关代谢途径, 本研究以盐胁迫(300 mmol/L NaCl)处理0、12和24 h后通蓖5号的幼苗真叶为试验材料, 借助高通量测序技术进行转录组测序分析。结果表明, 在盐胁迫12 h和24 h分别有4822和3103个差异表达基因。对共有的1872个差异表达基因进行共表达模式聚类分析, 发现这些基因共有3种表达模式。KEGG代谢通路分析结果显示, 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解(ko00280)、植物昼夜节律调控(ko04712)以及淀粉和蔗糖代谢(ko00500)3个通路在盐胁迫适应过程中显著富集; GO功能富集分析结果显示, 多数差异表达基因被富集到生物过程中, 其中细胞进程(GO:0009987)和响应非生物胁迫(GO:0009628)过程富集到差异表达基因的数目最多。另外, 共有19个转录因子参与蓖麻的盐胁迫响应。植物激素信号转导通路中有42个差异表达基因, 其中有97.6%的基因分别在12 h和24 h是上调表达的。此外, 还筛选出包括光合作用途径、抗氧化调节、Na⁺、K⁺和Ca²⁺转运相关参与蓖麻幼苗盐胁迫的差异表达基因。qRT-PCR结果证明了上述试验结果可靠。综上, 该研究可为蓖麻耐盐基因挖掘及盐胁迫适应机制的解析提供理论依据。

关键词: 蓖麻; 幼苗; 盐胁迫; 转录组; qRT-PCR

Transcriptomics-Assisted Mining of Salt-Tolerant Genes in *Ricinus communis*

LI Yanxiao¹, ZHANG Chunlan², XU Xingyuan¹, CHEN Yanqiu¹, XIANG Dianjun¹, LIU Peng¹

(¹College of Agriculture Life Science, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000;

²College of Life Science and Food Engineering, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000)

Abstract: To obtain the sequence information of salt-tolerant genes in castor bean, we conducted a study to explore differentially expressed genes and related metabolic pathways under salt stress. We used seedling leaves of castor bean (cultivar Tongbi No. 5) treated with salt stress (300 mmol/L NaCl) for 0, 12, and 24 hours as experimental materials. Transcriptome sequencing analysis was performed using high-throughput sequencing technology. The results showed that there were 4822 and 3103 differentially expressed genes at 12 and 24 hours of salt stress, respectively. Co-expression pattern clustering analysis was conducted on the shared 1872 differentially expressed genes, and three expression patterns were identified. KEGG pathway analysis revealed significant enrichment of three pathways, namely valine, leucine, and isoleucine degradation (ko00280), plant circadian rhythm regulation (ko04712), and starch and sucrose metabolism (ko00500), in the adaptation process to salt stress. GO functional enrichment analysis showed that most differentially expressed genes were enriched in biological processes, with the highest enrichment in cellular processes (GO:0009987) and response to non-biological stress (GO:0009628). In addition, a total of 19 transcription factors were found to be involved

收稿日期: 2023-05-06 修回日期: 2023-06-04 网络出版日期: 2023-06-20

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230506002>

第一作者研究方向为作物遗传育种, E-mail: 2338245452@qq.com

通信作者: 向殿军, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: xiangdianjun00@126.com

刘 鹏, 研究方向为作物遗传改良与种质创新, E-mail: mindaliupeng@126.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(31860389, 32060492); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2020LH03006, 2022MS03057, 2023MS03032); 内蒙古自治区直属高校基本科研业务费项目(GXKY23Z047)

Foundation projects: National Natural Science Foundation Projects (31860389, 32060492); Natural Science Foundation of Inner Mongolia (2020LH03006, 2022MS03057, 2023MS03032); The Basic Scientific Research Business Fee Project of Colleges and Universities Directly under the Inner Mongolia Autonomous Region(GXKY23Z04)

in the salt stress response of castor bean. In the plant hormone signal transduction pathway, 42 differentially expressed genes were identified, with 97.6% of genes showing upregulated expression at 12 and 24 hours. Furthermore, we identified differentially expressed genes involved in photosynthesis, antioxidant regulation, and Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} transport related to salt stress in castor bean seedlings. qRT-PCR results confirmed the reliability of the above experimental results. In conclusion, this study provides a theoretical basis for the exploration of salt-tolerant genes and the analysis of salt stress adaptation mechanisms in castor bean.

Key words: castor; seedlings; salt stress; transcriptome; qRT-PCR

近年来土壤盐渍化日渐严重,这是由气候因素和人为因素共同造成的^[1-2]。气候驱动的土地盐渍化是由降雨模式、降雨量和海平面上升综合驱动的,是造成土壤盐渍化的主要原因^[1];人为驱动的土地盐渍化则是因为过度灌溉导致土地中积累了大量的难溶性盐^[2]。内蒙古通辽位于中国的东北地区,这里常年干旱少雨且多为沙质土壤,为灌溉型农业,这加剧了当地土壤的盐渍化($>40 \text{ mmol/m}^2 \text{ NaCl}$),减少了实际土地的使用面积,更严重的会使作物减产,损害当地农民的利益^[3]。因此,盐碱地的改良就显得尤为重要。而蓖麻(*Ricinus communis*)作为目前盐碱地改良的模式植物^[4],了解其在盐胁迫下的调控机制是必要的。

植物在盐胁迫环境下主要受两个阶段的影响:早期反应(渗透相)和晚期反应(离子相)^[5]。早期反应是指植物在短期内通过诱导水分降低而引起渗透胁迫进而损害植物生长,最先损伤植物的根系统,表现出抑制水分吸收、根系生长、叶片发育、新叶减少和蒸腾叶细胞损伤等^[6];晚期反应则是指长期的盐胁迫诱导毒性离子的积累导致细胞质中养分不均衡进而损伤植物,主要表现在老叶片凋亡、光合作用减弱和酶活性的抑制等^[6-8]。为了生存,植物发展了复杂的防御机制来抵消盐胁迫的影响,如渗透调节机制和ROS解毒机制^[9]。

植物对盐胁迫的适应性是极其复杂的,由多种与胁迫相关性状的复杂信号网络调控,而对盐胁迫的耐受性或敏感性在很大程度上取决于植物的发育阶段^[10]。如水稻(*Oryza sativa*)在发芽期、分蘖活跃时期和成熟期对盐胁迫相对耐受,但在苗期(1~3周龄)、穗部萌发期和开花期对盐胁迫非常敏感^[11]。各种组学研究的兴起为解析植物不同发育时期的识别应激反应提供了便利的条件,如关键基因、蛋白质、代谢产物和复杂信号通路的绘制等^[12]。转录组学作为其中之一,能够有效地从分子水平上阐明植物的生长,并成功地预测出植物受环境胁迫影响的动态特征^[13]。葡萄(*Vitis vinifera*)盐胁迫转录组分析表明,包括活性氧清除、离子运输、热休克蛋白

和激素信号在内的多个生物通路参与葡萄盐胁迫的应答机制^[14]。苦荞(*Fagopyrum Tataricum*)的转录组分析显示,与氨基酸、脂质和核苷酸代谢相关的基因对盐胁迫反应最强烈,参与苦荞对盐胁迫适应的调控^[15]。两种不同表型的大白菜(*Brassica rapa*)转录组数据显示,在盐胁迫下,耐盐型青花45的差异表达基因明显多于敏盐型碧玉春花,且半乳糖胺醇合成酶和可溶性蛋白合成的增加有助于大白菜适应盐胁迫^[16]。

蓖麻是原产于非洲的一种多年生草本植物,是世界十大油料作物之一,其籽粒的出油率达到了45%~55%^[17]。蓖麻油的衍生物现已被广泛应用于工业、机械制造业和美妆行业等,如涂料、润滑剂和化妆品等^[18]。蓖麻还与红花(*Carthamus tinctorius*)和鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)共同被列为世界三大耐旱作物,有着极强的耐旱性^[19]。此外,蓖麻不与粮食作物竞争土地,可以在许多贫瘠的土地上生长,例如在盐碱、干燥和重金属污染的土壤中均表现出良好的适应能力,有效地解决了我国耕地面积不足的现状^[4]。但是,蓖麻作为双子叶植物,在幼苗阶段易受细菌感染和盐胁迫的危害,导致幼苗存活率降低^[20]。因此,借助转录组学研究蓖麻幼苗耐盐相关的代谢途径,了解蓖麻响应盐胁迫的分子调控机制,挖掘蓖麻耐盐的优良基因,对使用分子育种手段培育蓖麻耐盐新品种具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料处理及生理指标测定

试验材料通篦5号由通辽市农业科学院提供,该品种是由哲ImAB₃(母本)和哲蓖2号(父本)杂交,通过系谱法培育而来,是我区主推的经济作物品种,在自然条件下,枯萎病率(约0.1%)和田间倒伏率(平均0.2%)均低,种子的含油量(50.53%)和种子产量(最高可达3484.50 kg/hm²)较高,且比其他品种有较强的抗寒和耐盐碱能力。本研究将籽粒饱满的通篦5号种子在28℃催芽后,挑选发芽

整齐一致的种子均匀地摆放在发芽盒(规格 32 cm×25.5 cm×12 cm)中,在 25℃、16 h 光照/8 h 黑暗(450 μmol/m²·s)、相对湿度 70%~75% 的光照培养箱中培养,待 2 片子叶完全展开后开始浇灌 1/2 霍格兰营养液,至 4 叶龄,对幼苗进行 300 mmol/L NaCl(1/2 霍格兰营养液配制)胁迫处理 0、2、4、8、12、24、30 和 48 h,以未处理(0 h)的幼苗作为对照。分别剪取不同时间处理的相同位置幼苗真叶,并迅速置于液氮罐中存放 6 h,然后存于-80℃冰箱中备用。游离脯氨酸(FP, free proline)含量和超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)活性分别采用茚三酮比色法和氮蓝四唑(NBT, nitro-blue tetrazolium)法测定。3 株幼苗的叶片计为 1 次生物学重复,每个处理重复 3 次。

1.2 植物总 RNA 提取、文库构建及测序

使用 Total RNA Extractor(Sangon)试剂盒提取植物的总 RNA,使用 Qubit2.0 RNA 检测试剂盒(Life)在 Qubit2.0 荧光计(Invitrogen)上检测 RNA 浓度及纯度。将按照时间梯度处理的 0、12 和 24 h 这 3 个时间点的 RNA 样品分别命名为 S0 h、S12 h 和 S24 h,处理间的 3 次重复样品分别命名为 S0 h-1~S0 h-3、S12 h-1~S12 h-3 和 S24 h-1~S24 h-3。cDNA 文库的构建、质控和测序(Illumina Novaseq 6000)部分由上海生工生物公司完成。

1.3 数据处理、功能注释及差异转录因子筛选

将原始数据经过 FastQC 评估过滤后,使用 Trimmomatic 删除含有接头和低质量的序列,得到高质量的 Clean reads。使用 HISAT2 将 Clean reads 映射到蓖麻的参考基因组(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Ricinus+communis%5Borgn%5D>),统计 Mapping 信息并评估样品数据质量。使用 StringTie(<http://www.ccb.jhu.edu/software/stringtie/>)对中靶基因组的序列进行组装,然后利用 GffCompare 软件与蓖麻的基因组进行比较,发现新的转录区域。使用 Hmmer 3.0 软件和 Pfam(<http://pfam-legacy.xfam.org/>)数据库将新基因的编码氨基酸序列进行比对,得到新转录本的注释信息。基因的表达水平直接体现其转录本的丰度情况,基因的表达量与转录本丰度成正比。为了使基因间和样本间的基因表达水平拥有可比性,使用 TPM(Transcripts per million)算法统计单个转录本在 RNA 池中的比例,计算公式如下:

$$TPM_i = \frac{X_i}{L_i} \times \frac{1}{\sum_j \frac{X_j}{L_j}} \times 10^6$$

式中 X_i 代表总外显子片段/读数, L_i 代表外显子长度/kb。|log₂FC| ≥ 1 且 qValue < 0.05 为筛选标准,使用 DESeq2 筛选出差异表达基因。使用 GO 和 KEGG 数据库对差异表达基因进行功能注释和代谢通路富集分析, P 值为 0.05。

根据 PlantTFDB(planttfdb.gao-lab.org)释放的蓖麻转录因子信息,使用 Blastn 程序将差异表达基因(DEGs, differentially expressed genes)与转录因子的 CDS 序列进行比对,获得对应差异表达转录因子的基因 ID, E -value 值设置为 $1e^{-10}$ 。使用 Excel 2021 进行数据统计, SPSS 26.0 进行显著差异分析;利用 Hiplot(<https://hiplot-academic.com/>)科研绘图工具和微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)绘制气泡富集图;TBtools 软件绘制差异表达基因热图。

1.4 qRT-PCR 验证

植物总 RNA 的提取同 1.2,取 1 μL 反转录成单链 cDNA 并稀释 10 倍作为 PCR 扩增的模板,按照 2× SG Fast qPCR Master Mix 的说明书操作步骤,在 LightCycler480 II 型 PCR 仪上完成对基因的扩增。反应程序为:预变性 95℃ 3min;变性 95℃ 5 s,退火和延伸 59℃ 30 s,45 个循环。以 *RcActin* (NC_063262.1)基因作为内参基因,用 2^{-(ΔΔCt)} 法计算基因的相对表达量。为了测量结果的可靠性,每个样品进行了 3 次生物学重复和 3 次技术重复,引物的设计使用 Primer Premier 5 软件,引物的合成委托生工公司,序列详见表 1。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下蓖麻叶片生理指标测定及表型观察

由图 1 可知,随着盐胁迫时间的延长,通篦 5 号幼苗叶片的 SOD 酶呈现出先升高后降低的趋势,在处理 12 h 时酶活性最高,较 0 h 提高了 96.98%;游离脯氨酸含量同 SOD 酶活性的趋势一致,也在 12 h 时达到最大值,较 0 h 增加了 61.18%。而胁迫后表型图片显示(图 1C),叶缘在 12 h 和 24 h 较 0 h 干枯,且叶面萎蔫,表明植株受损伤严重。因此,选取胁迫 12 h 和 24 h 的蓖麻叶片进行后续转录组测序。

2.2 盐胁迫下蓖麻幼苗的转录组分析

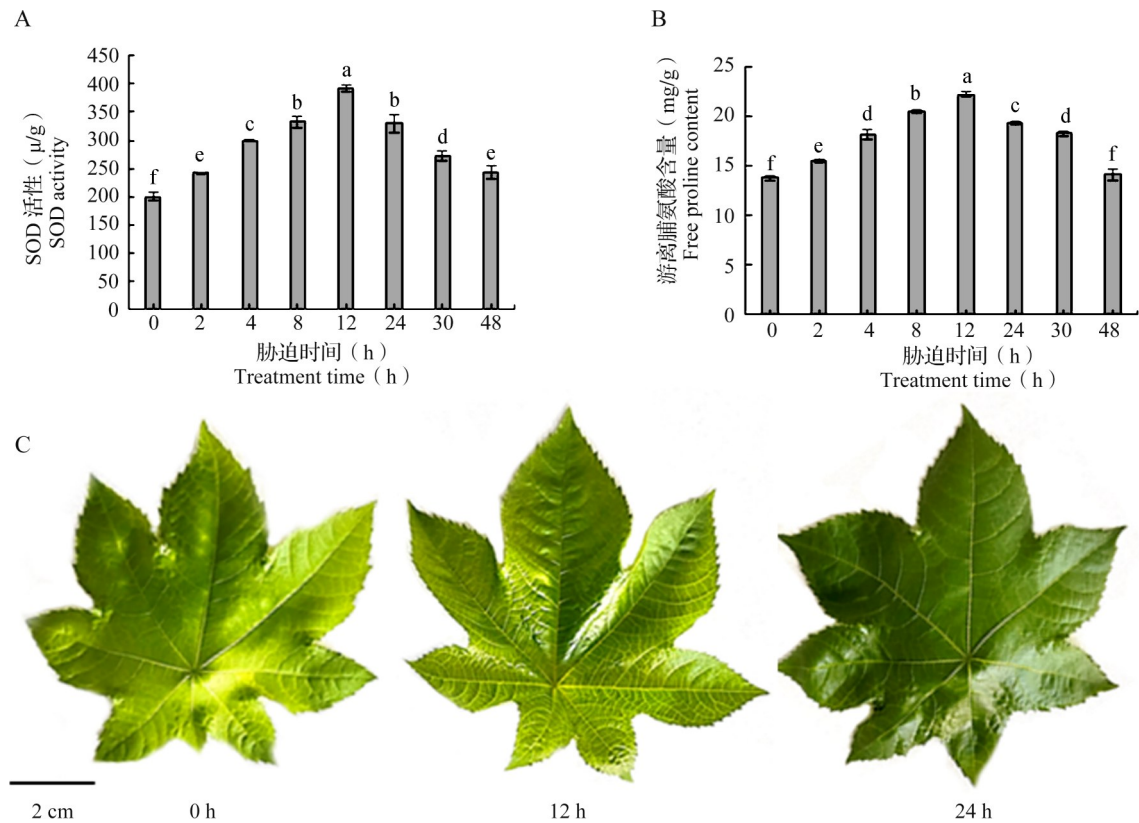
对通篦 5 号盐胁迫处理 3 个时间梯度的 9 个 RNA 样品经 Illumina 测序后,共得到 65.05 Gb 的 Clean bases,每个文库的 Clean reads 在 39,936,016 条以上, Q30 均超过 93.45%,说明碱基识别的准确性较高。在 HISTA 2 对 Clean reads 组装和拼接后,

映射到蓖麻基因组的 Reads 比例为 94.97% ~ 98.40%, 这些 Reads 比对到基因组中的单个位置的比例为 86.49% ~ 95.30%。将处理 0 h、12 h 和 24 h 的 RNA 样品分别命名为 S0 h、S12 h 和 S24 h, 利用 Pearson 相关性评估样本时发现, S0 h 的 3 次生物学重复间的相关系数分别为 0.99、0.97 和 1, S12 h 的 3

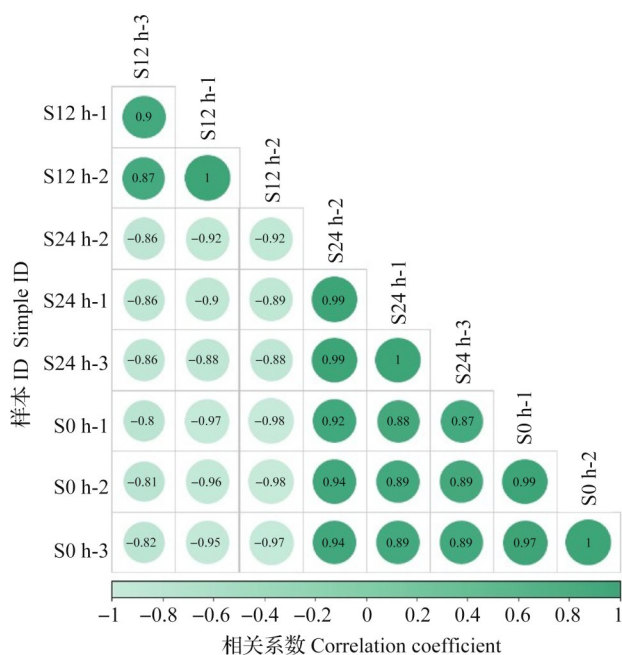
次生物学重复间的相关系数分别为 1、0.87 和 0.9, S24 h 的 3 次生物学重复间的相关系数分别为 0.99、1 和 0.99, 相同处理下 Pearson 相关系数均大于 0.8, 说明 3 次生物学重复是可靠的、可重复性较高(图 2)。综合以上数据, 9 个样品的测序结果达到了后续生物学分析要求。

表 1 试验所需引物
Table 1 Primers required for test

引物名称 Primer name	描述 Description	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
<i>LOC8268921</i>	可能的锌金属蛋白酶 EGY3	TGTTCTGTGTTTGGCTTGGG	TGGGGAAAAGGGTGAGGAAA
<i>LOC125370484</i>	谷胱甘肽转移酶 U7-like	GTCACAGAGTCGAAC TTGCC	TGACCCAATGCTCTCACCTCC
<i>LOC8289823</i>	异柠檬酸脱氢酶[NADP]	GATTACTCGCCATGTCCAGC	AGAAGAGAAAGCGAGGCGAT
<i>LOC8270317</i>	半胱氨酸蛋白酶抑制剂 5	TCCGCAATCTTTCTCCTGGT	AGAACCTTCCCAACTCCTGC
<i>LOC8263265</i>	番茄红素异构酶	CCCCAATGTCCTTCCCTCTT	GTCATCGACCAACAGAGTGC
<i>LOC8268009</i>	GAST1 蛋白	TGATGATGAGGAAGCAAGC	AGCACAACACTTTTGGCAGA
<i>LOC8276068</i>	β-淀粉酶 3	AATCAAGCCATCATGCCGTC	GCAGCATCACAAACACTGGA
<i>RcActin</i>	β-内参	TCCCTCAGTACGTTCAGCA	CACCTCCATACTCCTCCCT



柱子上方字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著
The letters above the column indicate a significant difference at $P<0.05$ level
图 1 蓖麻叶片生理指标测定及表型观察
Fig.1 Physiological index measurement and phenotypic observation of castor leaf



S0 h, S12 h and S24 h 分别表示盐胁迫处理 0 h、12 h 和 24 h, -1、-2 和 -3 则分别表示 3 次生物学重复, 下同

S0 h, S12 h, and S24 h represent salt stress treatments at 0 hours, 12 hours, and 24 hours, respectively, while -1, -2, and -3 represent three biological replicates, the same as below

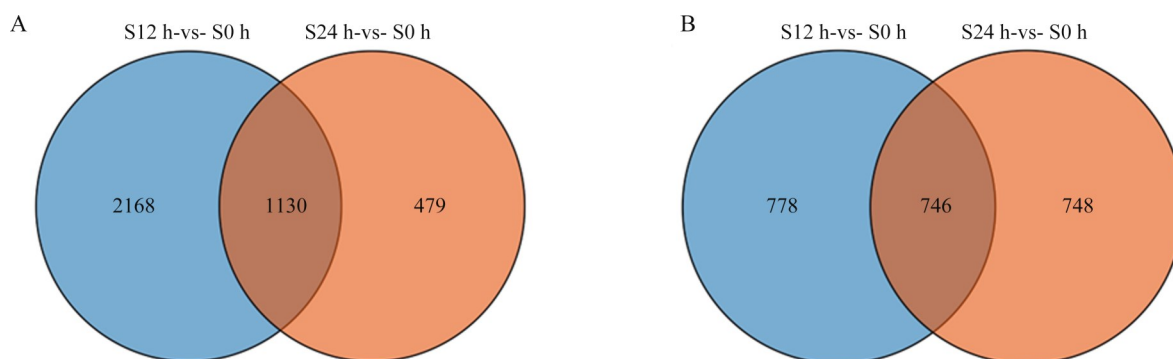
图2 不同盐胁迫时间点转录组间的 Pearson 相关分析
Fig. 2 Pearson correlation analysis between transcription groups at different salt stress time points

2.3 盐胁迫下差异表达基因筛选及共表达模式分析

根据 DESeq2 筛选结果, 在盐胁迫处理 S12 h 和

S24 h 分别鉴定出 4822 和 3103 个差异表达基因(相较于 S0 h), 并且随着胁迫时间的延长上调表达的差异表达基因数目远多于下调表达的差异表达基因数目(图 3)。在盐胁迫处理 S12 h 和 S24 h 的上调表达基因分别有 3298 和 1609 个(相较于 S0 h), 下调表达基因分别有 1524 和 1494 个。在 S12 h-vs-S0 h 和 S24 h-vs-S0 h 有分别独立上调表达的 2168 和 479 个基因、分别独立下调表达的 778 和 748 个基因, 这些基因可能在蓖麻幼苗遭受盐胁迫的早期和后期发挥特定作用(相较于 S0 h)。

对 S12 h-vs-S0 h 和 S24 h-vs-S0 h 共有的 1130 个上调表达基因和 746 个下调表达基因进行共表达模式聚类分析, 依据不同盐胁迫处理梯度时间的 TPM 表达值, 绘制这些差异表达基因的不同表达模式(图 4)。共有基因的表达模式可以被聚为 3 类(图 4a), 上调的基因表达模式可以分为 2 类, A 类与 C 类, 分别有 412 和 746 个基因, 它们均在 0~12 h 上调表达, 但 C 类的基因对盐胁迫更敏感, 在 12~24 h 下调表达的幅度比 A 类大; 下调的基因表达模式为 B 类, 这类基因在 S0 h 有表达峰值, 随着盐胁迫时间的增加表达量均低于 S0 h(图 4b)。差异表达基因的共表达模式分析表明, 蓖麻幼苗在响应盐胁迫的过程中存有复杂的调控机制。



A: 上调表达基因的韦恩图; B: 下调表达基因的韦恩图; 数字表示差异表达基因的数量。S12 h-vs-S0 h 和 S24 h-vs-S0 h 分别表示盐胁迫 12 h 和 24 h 相较于 0 h 的差异表达基因, 下同

A: Venn diagram of up-regulated genes; B: Venn diagram of down-regulated genes; the numbers indicate the number of DEGs. S12 h-vs-S0 h and S24 h-vs-S0 h represent differentially expressed genes at 12 h and 24 h under salt stress compared to 0 h, respectively, the same as below

图3 蓖麻盐胁迫差异表达基因的韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of DEGs in castor salt stress

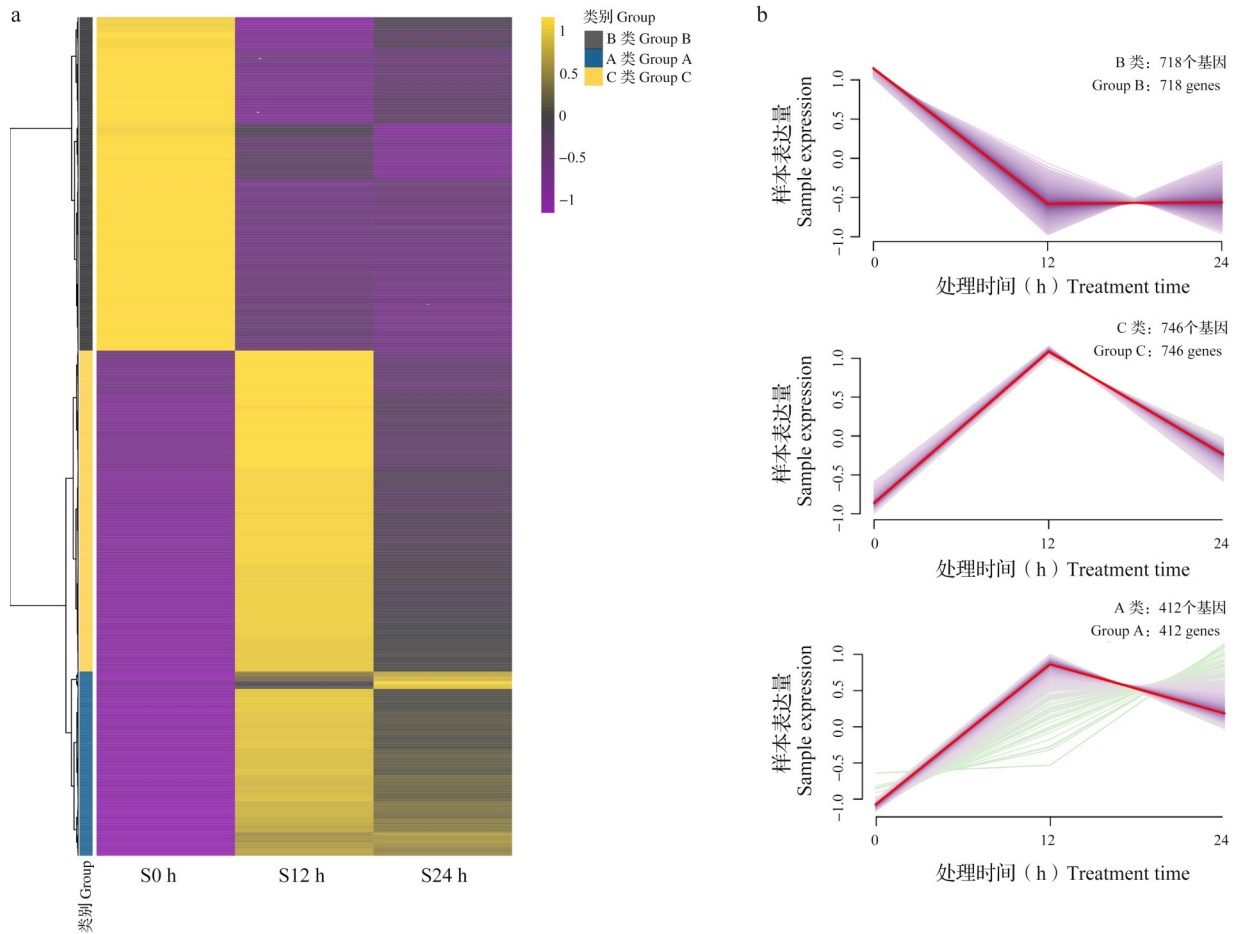
2.4 差异表达基因的功能注释和富集分析

使用 KEGG 数据库识别蓖麻幼苗盐胁迫反应过程中的关键途径。在盐胁迫处理 S12 h-vs-S0 h, 识别到 1037 个差异表达基因被分配到 250 个途径, 其中缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 (ko00280: Valine,

leucine and isoleucine degradation) 和植物昼夜节律调控 (ko04712: Circadian rhythm - plant) 显著富集; 在 S24 h-vs-S0 h 有 692 个差异表达基因被分配到 262 个代谢通路, 其中淀粉和蔗糖代谢 (ko00500: Starch and sucrose metabolism) 和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸

酸降解显著富集(图5)。此外,在蓖麻幼苗遭受盐胁迫的0~24 h中,植物昼夜节律调控通路(详见<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230506002>,附表1)和植物-病原相互作用(ko04626: Plant-pathogen

interaction)(详见<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230506002>,附表1)通路中富集了较多的差异表达基因,推测这些差异表达基因可能在蓖麻的盐胁迫适应过程中起到了关键作用。



a: 共有差异表达基因表达聚类; b: 共有差异表达基因表达模式

a: Common DEGs expression clustering; b: common DEGs expression patterns

图4 差异表达基因的共表达模式分析

Fig. 4 Analysis of DEGs co-expression patterns

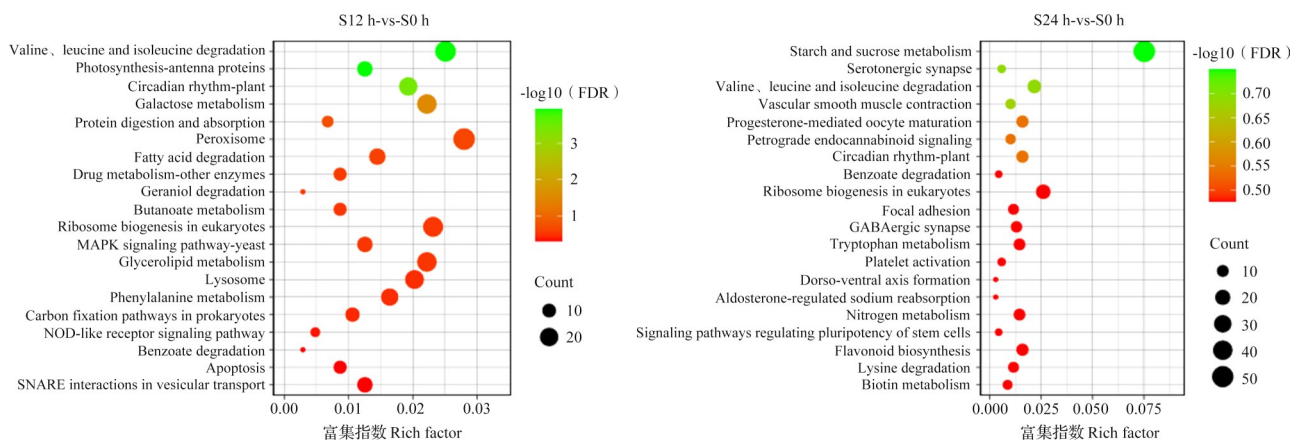


图5 蓖麻盐胁迫的KEGG富集途径

Fig. 5 KEGG enrichment pathways of castor under salt stress

为深入了解差异表达基因的功能,当校正后的 P 值 <0.05 时,将不同处理间的差异表达基因分配到GO条目,分别富集到183(S12 h-vs-S0 h)和299(S24 h-vs-S0 h)个条目。在生物过程(BP, biological process)、细胞成分(CC, cellular component)和分子功能(MF, molecular function)这3类中,BP所占比例最多,在S12 h-vs-S0 h和S24 h-vs-S0 h中分别占61.2%

(112个)和54.8%(164个)。而在BP的亚类中,细胞进程(GO:0009987, Cellular process)在S12 h-vs-S0 h中富集差异表达基因条数最多,响应非生物胁迫过程(GO:0009628, Response to abiotic stimulus)在S24 h-vs-S0 h中富集差异表达基因条数最多;MF的亚类中催化活性(GO:0003824, Catalytic activity)在2个时间段均富集差异表达基因条数最多(图6)。

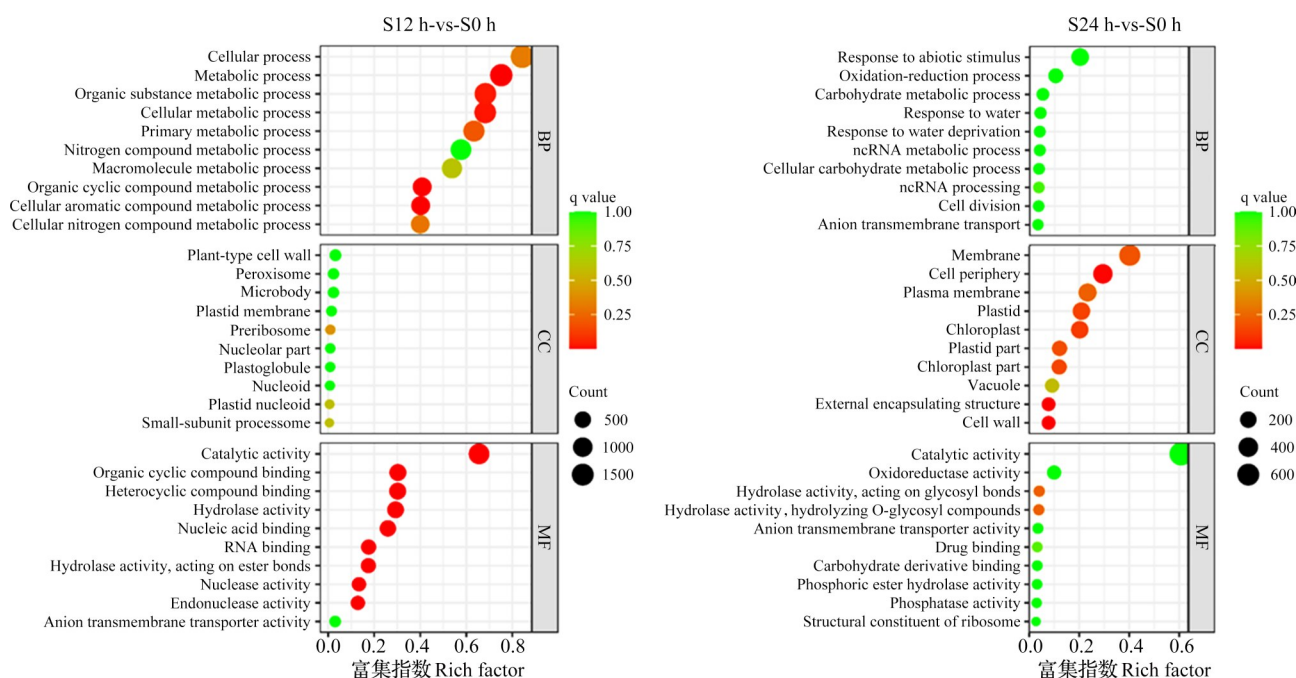


图6 蓖麻差异表达基因的GO富集分析
Fig. 6 GO enrichment analysis of castor DEGs

2.5 差异表达转录因子的分析

在差异表达基因中共鉴定出19个包括 *WRKY*、*NAC*、*AP2/ERF*、*bZIP*、*MYB*、*bHLH*和其他转录因子,其中 *WRKY*和 *AP2/ERF*家族基因数量最多,均有3个基因参与蓖麻幼苗盐胁迫的响应(图7)。这些转录因子中有68.4%(13个)在S12 h-vs-S0 h和S24 h-vs-S0 h是上调表达的,除 *ERF109* (*LOC8275304*) 在0~24 h持续上调表达,其他12个转录因子均在S12 h有表达峰值,说明这些转录因子是被盐胁迫转录激活而不是被抑制且在盐胁迫早期就积极响应。*WRKY31*、*WRKY24*和 *WRKY75*的表达量在盐胁迫处理12 h迅速攀升,表明3个 *WRKY*转录因子参与蓖麻幼苗对于盐胁迫的反应。有31.6%(6个)的转录因子在胁迫处理24 h(相较于S0 h)是下调表达的,表明这些转录因子在盐胁迫下的转录是受到抑制的。因此,这19个转录因子在蓖麻幼苗的耐盐机制中可能发挥着重要作用。

2.6 植物激素信号转导过程中差异表达基因的表达模式

植物激素信号转导产生的一些复合物参与了盐胁迫反应。因此,根据富集到植物激素信号转导(ko04075: Plant hormone signal transduction)过程中上调表达的差异表达基因绘制表达热图(图8)。结果如下,42个基因中均有97.6%分别在S12 h(除 *LOC8288491 AHP1_ARATH*)和S24 h(除 *LOC8271170 IAA32*)上调表达(相较于S0 h),其中生长素信号和脱落酸信号中的基因数目最多,分别有11和10个基因。另外, *bZIP23* (*LOC8275294*)、*PP2C 51* (*LOC8274369*)、*GID1C* (*LOC8288487*)、*TIFY10B* (*LOC8260450*)和 *TIFY10A* (*LOC8259079*) 在S12 h和S24 h(相较于S0 h)是持续上调表达的,说明这些基因在蓖麻幼苗的盐胁迫反应中被积极诱导表达,参与盐胁迫反应。

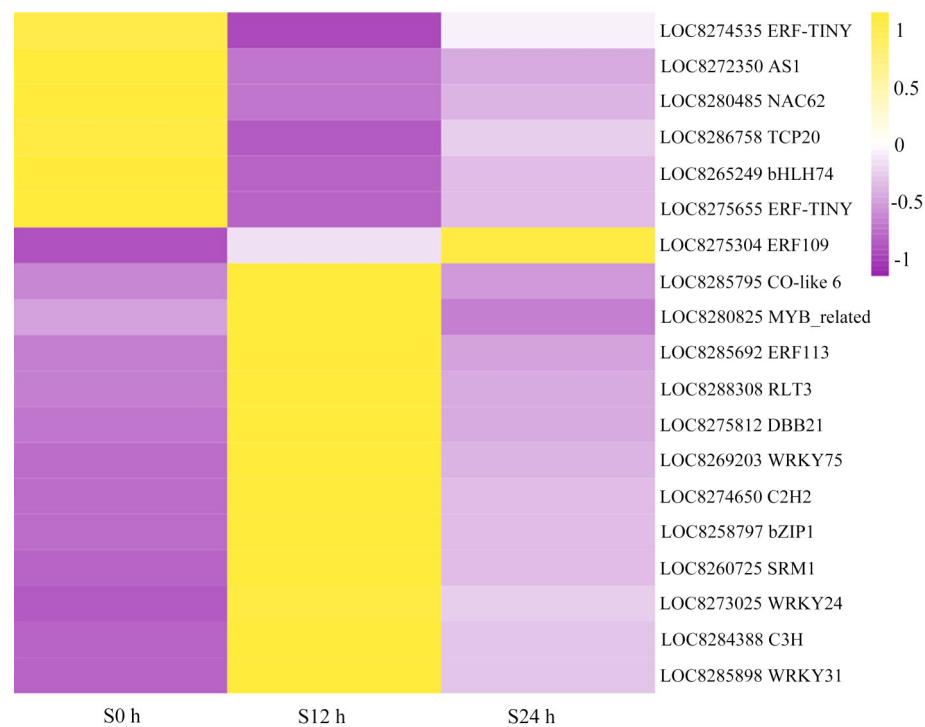


图7 蓖麻转录因子表达热图

Fig. 7 Transcription factor expression heat map of castor

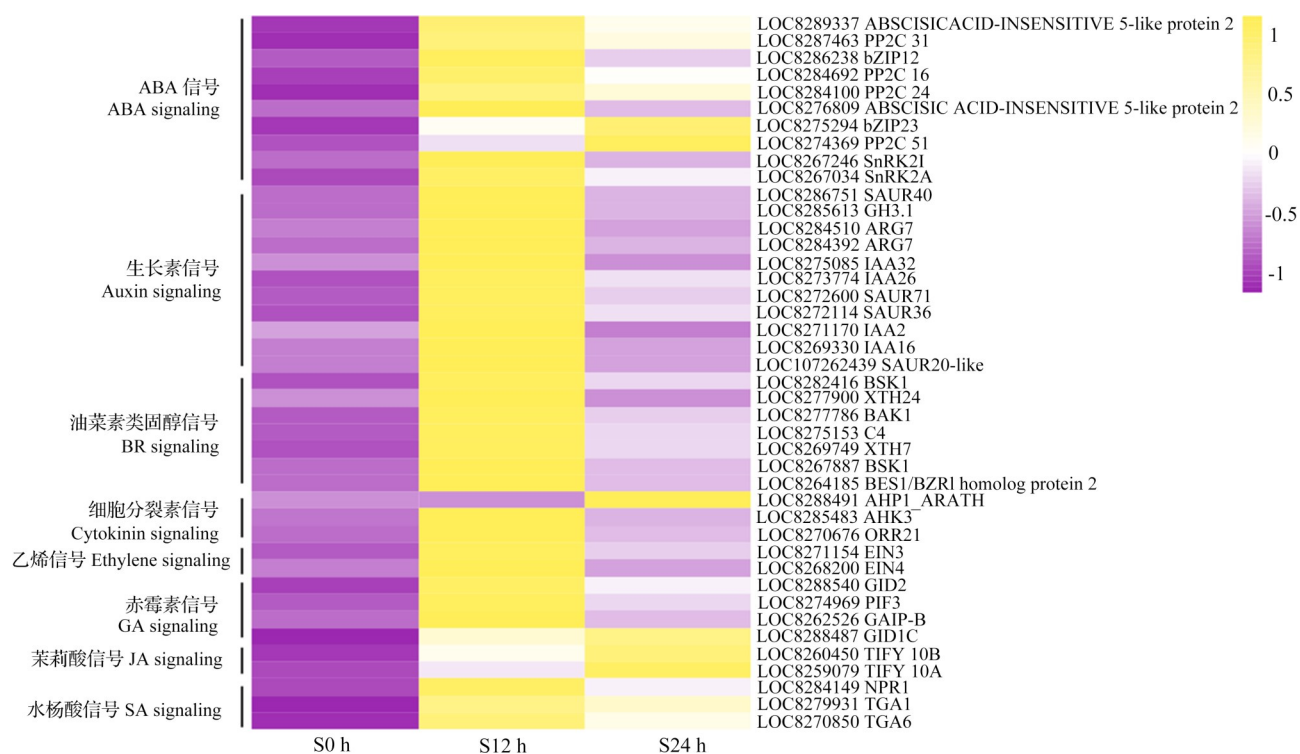


图8 植物激素信号转导过程中差异表达基因的表达模式

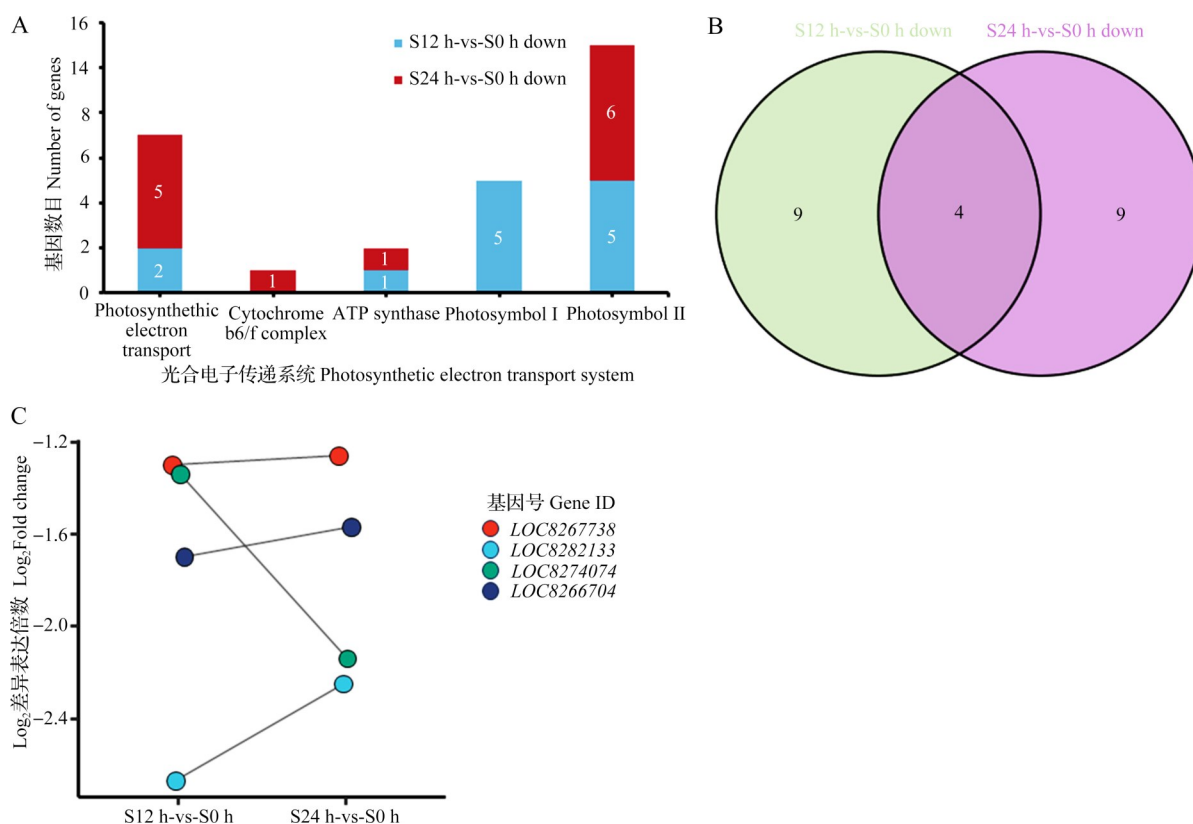
Fig. 8 The expression pattern of DEGs in plant hormone signal transduction

2.7 蓖麻盐胁迫下差异表达基因分析

2.7.1 光合途径相关的差异表达基因分析

高等植物在遭受盐胁迫后会降低光合速率减少水分的流失以缓解环境压力,细胞色素 b6/f 复合体 (Cytochrome b6/f complex)、ATP 合酶 (ATP synthase)、光系统I (PSI, Photosymbol I) 和光系统II (PSII, Photosymbol II) 等元件共同组成了光合电子传递系统,因此分析蓖麻盐胁迫下差异表达基因的表达情况,能够为渗透胁迫、离子毒害和糖分积累等反馈抑制机制提供参考 (图 9)。结果共统计到 22 个与光和电子传递系统相关的差异表达基因,

且这些基因均是下调表达的,其中与光合产物电子传递 (Photosynthetic electron transport) 和 PSII 相关的差异表达基因较多,分别有 7 和 11 个基因 (图 9A)。另外,有 4 个基因在组间均差异表达 (图 9B),包括编码 *PetF* 相关基因 *LOC8267738*、*ATPFID* 相关基因 *LOC8282133*、*Psb28* 相关基因 *LOC8266704* 和 *PsbS* 相关基因 *LOC8274074*,其中 *LOC8274074* 是持续下调表达基因,*LOC8282133* 在盐胁迫 S12 h 时差异表达倍数最大。综上,在盐胁迫下蓖麻中与光合作用相关基因的表达是被抑制而不是被激活。



A: 参与光和电子传递的差异表达基因统计; B: 差异表达基因不同处理间的韦恩图; C: 共有差异表达基因的差异表达倍数线图; 图中 down 表示基因的差异表达倍数 < 1, 下调表达

A: DEGs statistics involved in light and electron transport; B: The venn diagram of DEGs between different treatments; C: Differential expression fold line of common DEGs; The term down in the figure represents the fold change in gene expression, which is less than 1, indicating downregulated expression

图 9 参与光合作用途径的差异表达基因分析

Fig. 9 DEGs analysis involved in photosynthesis pathway

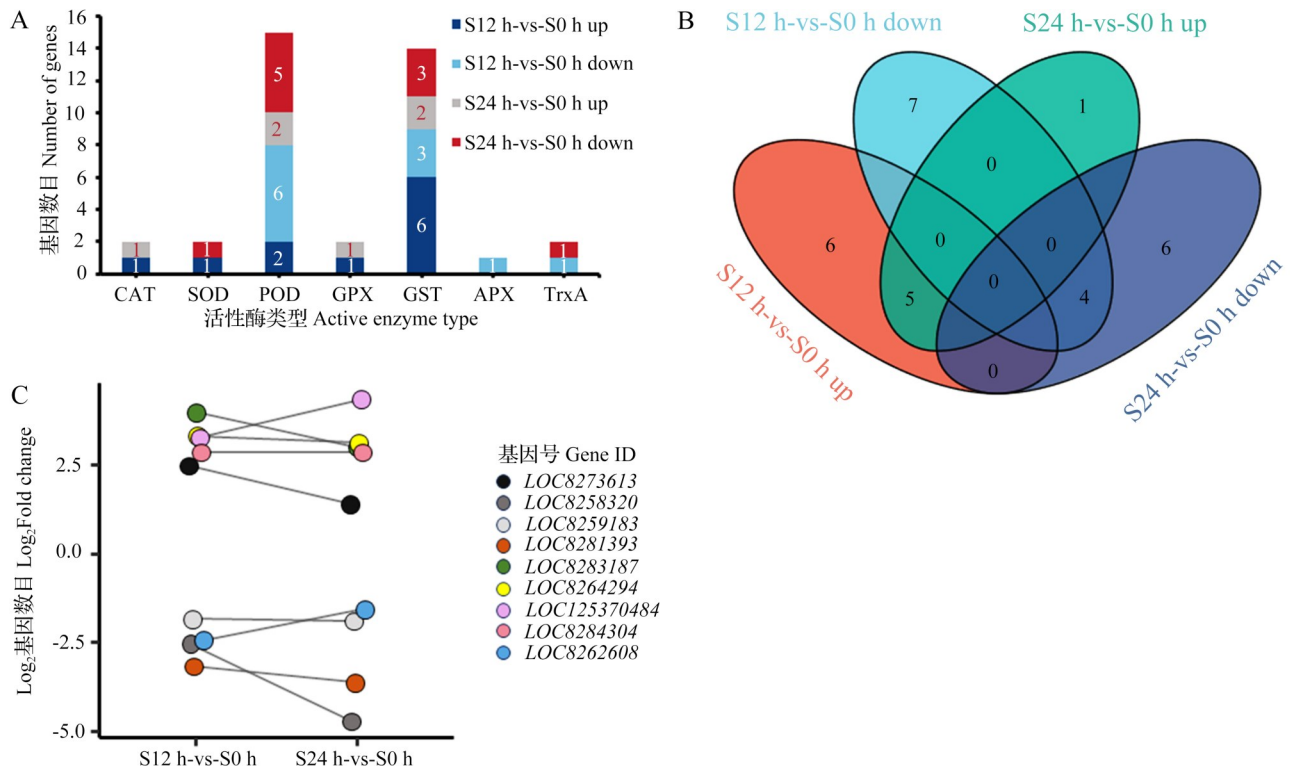
2.7.2 抗氧化调节相关的差异表达基因分析

高等植物在受到盐胁迫后会体内活性氧 (ROS) 消除系统被激活, 导致参与编码过氧化氢酶 (CAT, catalase) 途径、过氧化物酶 (POD, peroxidase) 途径、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX, glutathione peroxidase) 途径、抗坏血酸-谷胱甘肽 (AsA-GSH, ascorbate-glutathione) 循环途径和过氧化物酶/硫氧还蛋白

(PrxR-Trx, sulfiredoxin peroxiredoxin) 等途径的基因被激活表达。因此, 分析了与抗氧化调节相关的差异表达基因 (图 10)。共筛选出 29 个差异表达基因参与 ROS 消除, 其中参与 POD 途径和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST, glutathione-S-transferase) 途径的差异表达基因最多, 分别有 15 和 14 个差异表达基因参与盐胁迫 (图 10A、B), 在盐胁迫 S12 h 的差异表达

基因多于 S24 h, 且多数基因是下调表达的, 说明通蓖 5 号在盐胁迫早期敏感。此外, 分别有 13 和 7 个基因分别在 S12 h-vs-S0 h 和 S24 h-vs-S0 h 独立表达, 有 5 个基因在 S12 h-vs-S0 h 和 S24 h-vs-S0 h 共同上调表达, 其中参与 GTS 途径的 *LOC125370484* 基因是持续上调表达的, 有 4 个基因在胁迫 S12 h 和

S24 h (相较于 S0 h) 下调表达, 其中参与 POD 途径的 *LOC8258320* 基因是持续下调表达的 (图 10B), 且这 2 个基因的差异表达倍数在同表达模式基因中最高 (图 10C), 说明调控 GTS 和 POD 合成基因在蓖麻盐胁迫过程中非常重要。



A: 抗氧化酶数量统计; B: 差异表达基因不同处理间的韦恩图; C: 共有差异表达基因的差异表达倍数线图; 图中 up 和 down 分别表示基因的差异表达倍数 >1 和 <1, 分别表示上调表达基因和下调表达基因, 下同

A: Antioxidant enzyme quantity statistics; B: The venn diagram of DEGs between different treatments; C: Differential expression fold line of common DEGs. In the figure, the terms up and down represent the fold change in gene expression, with up indicating an increase in gene expression and down indicating a decrease in gene expression, the same as below

图 10 抗氧化调节相关的差异表达基因

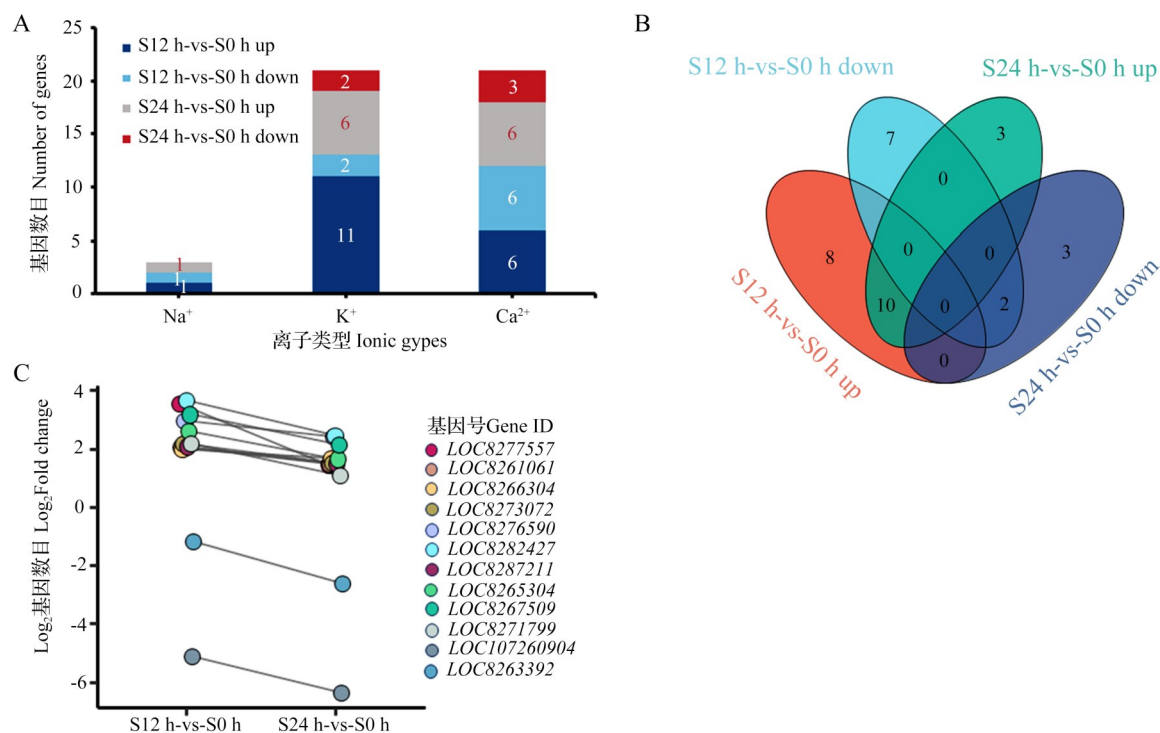
Fig. 10 Antioxidant regulation related DEGs

2.7.3 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 转运相关的差异表达基因分析 本研究共筛选出 33 个参与 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 转运相关的差异表达基因, 其中参与 K^+ 和 Ca^{2+} 转运的差异表达基因较多, 参与 Na^+ 转运的基因较少 (图 11)。在 S12 h-vs-S0 h 和 S24 h-vs-S0 h 组间独立上调表达基因分别有 8 和 3 个, 独立下调表达基因分别有 7 和 3 个; 组间共同上调和共同下调表达基因分别有 10 和 2 个, 其中与 Ca^{2+} 转运相关的 *LOC107260904* 和 *LOC8263392* 这 2 个基因在组间是持续下调表达的 (图 11B、C)。这些结果表明参与蓖麻幼苗在盐胁迫下 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 转运相关的差异

表达基因多数是被激活表达而不是被抑制表达, 且在胁迫 S12 h 的差异表达倍数要高于胁迫 S24 h (相较于 S0 h) (图 11C)。

2.8 qRT-PCR 验证

为验证转录组测序 (RNA-seq) 结果的可靠性, 筛选了 4 个持续上调表达的差异表达基因和 3 个持续下调表达的差异表达基因进行 qRT-PCR 验证, 基因的相对表达量以胁迫 0 h 作为对照组。结果显示, qRT-PCR 与 RNA-seq 两者表达趋势一致, 表明 RNA-seq 的试验结果是可靠的 (图 12)。



A: Na^+ , K^+ and Ca^{2+} related differential expression gene number statistics; B: Differential expression gene Venn diagram between different treatments; C: Differential expression fold line of common DEGs

图 11 参与 Na^+ , K^+ 和 Ca^{2+} 转运相关的差异表达基因

Fig. 11 DEGs involved in Na^+ , K^+ and Ca^{2+} transport

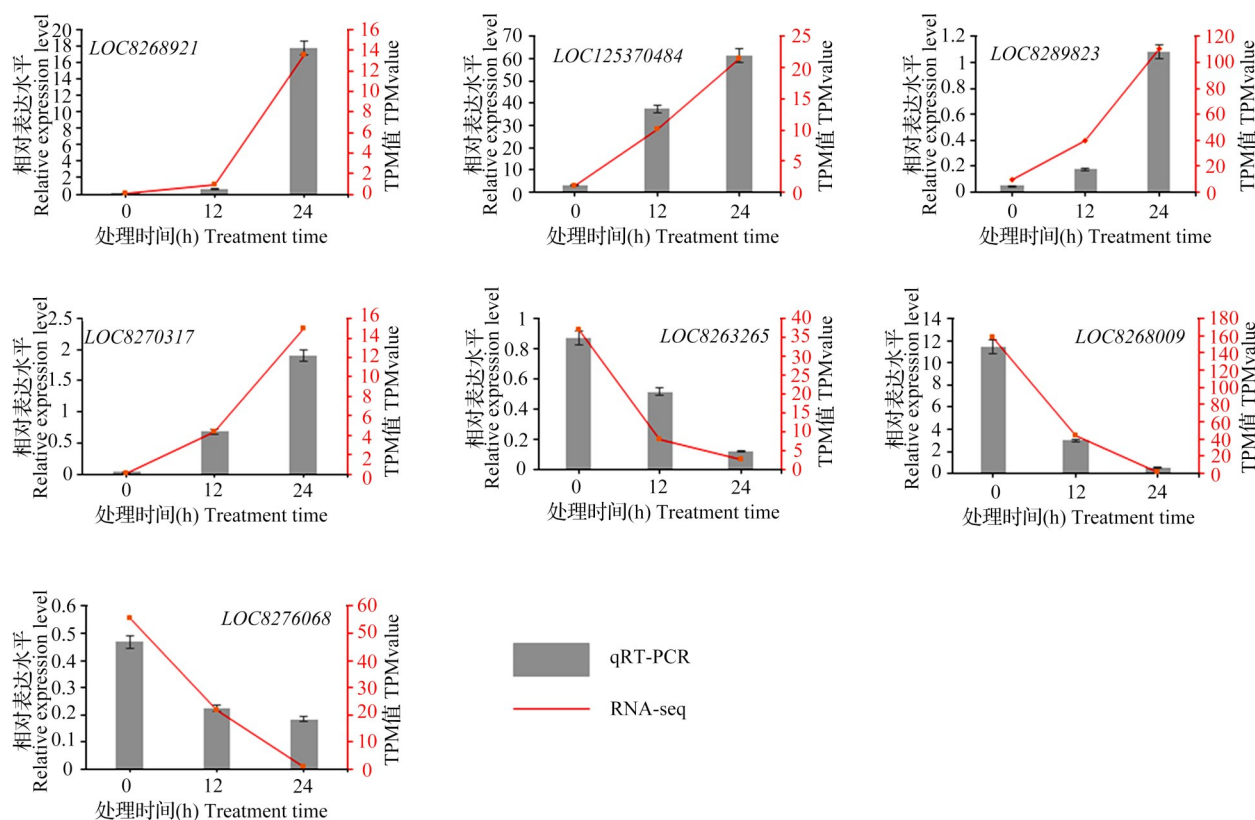


图 12 差异表达基因的测序与 qRT-PCR 验证结果

Fig. 12 Sequencing and qRT-PCR validation results of DEGs

3 讨论

蓖麻苗期遭受盐胁迫会对植株的根和叶片等组织造成损伤,出现发育迟缓现象,阻遏了其发挥实际的遗传潜力^[21]。目前,蓖麻耐盐性的研究主要集中在与盐胁迫相关的生理参数的比较上,对其耐盐性分子机制的研究相对较少^[21-22]。而伴随蓖麻基因组数据的释放,多组学技术已经广泛被应用于蓖麻盐胁迫的研究中^[23-24]。Wang等^[21]通过对盐胁迫(100 mmol/L NaCl)下 ZB306 的转录组学及组蛋白甲基化联合分析发现,盐处理组相较于对照组共筛选出 741 个差异表达基因($|\log_2FC| \geq 2$; $qValue < 0.05$),多数基因表达被激活而不是被抑制,且这些差异表达基因的功能多集中在激素信号转导、光合作用、氧化磷酸化、淀粉和蔗糖代谢等通路;Lei等^[24]通过对野生蓖麻品种和栽培品种(通篦 5 号)在不同浓度盐胁迫(0、50 和 100 mmol/L NaCl)处理下的比较转录组学分析显示,两个蓖麻品种在盐胁迫下产生的上调表达基因数目均多于下调表达基因,差异表达基因的 KEGG 分析结果显示,碳代谢、激素信号转导与淀粉和蔗糖代谢等通路被显著富集。Li等^[25]认为,100 mmol/L 和 200 mmol/L NaCl 属于低盐胁迫,而 300 mmol/L NaCl 则属于高盐胁迫。本研究旨在研究高盐胁迫对通篦 5 号基因表达及代谢通路的影响。结果显示,下调表达基因数目明显少于上调表达基因数目,表明多数基因在盐胁迫下是被激活表达的(图 3);差异表达基因的功能预测结果显示,淀粉和蔗糖代谢以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解显著富集(图 5),这与前人研究结果相似^[23-25]。

3.1 参与蓖麻盐胁迫的差异表达基因

在盐胁迫下植物会产生一系列的细胞反应和分子机制从而缓解或抵消损伤^[5-9]。转录因子作为植物中一种结构特殊的、调节基因表达的蛋白质分子,其家族成员在植物的盐胁迫应答过程中有着中枢调节和分子开关的功效,如 *WRKY*、*NAC*、*AP2/ERF*、*bZIP*、*MYB*、*bHLH* 等家族基因会通过直接或间接表达来减轻植株的受损伤程度^[26-30]。研究发现,过表达 *WRKY75* 基因的杨树(*Populus*)对盐胁迫和渗透胁迫的敏感性强于野生型,且 *WRKY75* 基因降低了胁迫下活性氧清除和脯氨酸积累的能力,并且正向调节叶片失水率^[26];Gupta等^[27]为了研究盐胁迫处理对番茄(*Lycopersicon esculentum*)基因表达和抗氧化活性酶的影响,利用 qRT-PCR 检测了

ERF(*SIERF80*)和 *WRKY*(*SIWRKY31* 和 *SIWRKY39*)家族基因在盐胁迫(0、10 和 100 mmol/L NaCl)下的表达能力,结果发现 *SIERF80*、*SIWRKY31* 和 *SIWRKY39* 均被诱导表达,且在 10 mmol/L 浓度下表达活性最强烈,说明这些基因积极地参与番茄对于盐胁迫的响应。另外,过表达 *PalERF109* 基因正向调节了转基因杨树的耐盐性^[28]; *OsERF1* 和 *OsERF113* 作为 *OsSTAP1* 在盐胁迫调控过程中的下游表达基因,可以提高胁迫过程中的抗氧化酶活性,是增强盐胁迫耐受性的正向调节剂^[29-30]。相似的是,本研究同样发现了包括 *WRKY75* (*LOC8269203*)和 *WRKY31* (*LOC8285898*)在内的 3 个 *WRKY* 家族成员、*ERF109* (*LOC8275304*)和 *ERF113* (*LOC8285692*)在内的 3 个 *AP2/ERF* 家族成员参与蓖麻幼苗盐胁迫响应(图 7)。

研究发现,盐胁迫诱导产生的自由基可以通过提高抗氧化酶活性的方式加以清除,从而消除细胞和组织的氧化损伤^[31-33]。编码抗氧化酶相关基因在清除自由基的过程中起着至关重要的作用,如 Luo等^[31]发现过表达 *GhSOD1* 和 *GhCAT1* 能够提高棉花(*Gossypium spp*)植株在盐胁迫下的适应能力,并且共表达 *GhSOD1* 和 *GhCAT1* 比单独过表达 *GhSOD1* 和 *GhCAT1* 的植株对盐胁迫的耐受性更强,说明编码 SOD 和 CAT 的基因可以相互协作提高植株的耐盐能力;Yan等^[32]发现过表达 *CuZnSOD* 和 *APX* 基因在盐敏感型甘薯(*Dioscorea esculenta*)品种内会增强其耐盐性,且野生型甘薯的根在盐胁迫下较转基因植株发育明显迟缓,且胁迫下的 *CuZnSOD* 和 *APX* 基因表达量较野生型甘薯显著提高,说明编码 SOD 和 *APX* 基因的上调表达会缓解植株损伤;Qi等^[33]研究表明转 *GST* 基因的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 *GST* 和 *GPX* 酶活性显著提高,并且在盐胁迫下种子的萌发率和幼苗的耐盐性均得到改善,所以抗氧化酶活性与盐胁迫的适应性密切相关。本研究分别发现了 1 个编码 SOD (*LOC8276651*) 和 CAT (*LOC8273613*) 相关基因,并且在盐胁迫早期均上调表达,可能会共同协作来抵御盐胁迫;1 个编码 *GPX* (*LOC8264294*) 基因被发现且在盐胁迫的 0~24 h 保持着较高的表达水平;还鉴定到多个差异表达的编码 *GST* 相关基因(图 10),推测这些基因的表达会提高蓖麻幼苗的盐胁迫适应能力,这与前人研究结果相似^[31-33]。

研究表明, K^+ 的含量是决定高等植物在高 Na^+ 环境中生存的关键因素,耐盐植物的主要特征之一

就是对 K^+ 吸收的亲合力高于 Na^+ ^[34]。本研究中蓖麻幼苗在盐胁迫下与合成 K^+ 转运体相关的基因要远多于合成 Na^+ 转运体相关的基因,且在胁迫前期鉴定到的差异表达基因多于胁迫后期,因此推测蓖麻在盐胁迫下会诱导合成 K^+ 转运体相关基因的表达来提高对 K^+ 的亲合力,进而减缓细胞内外的渗透压失衡速率,从而降低蓖麻在盐胁迫下的损伤。 Ca^{2+} 可以通过SOS途径和MAPK途径降低植物本身的 Na^+ 含量从而维持细胞的渗透压,其作为植物遭受盐胁迫的重要信号,胁迫下 Ca^{2+} 含量会增加^[14]。本研究发现多个 Ca^{2+} 转运ATP酶合成基因,推测这些基因的差异表达是造成盐胁迫下 Ca^{2+} 含量增加的主要原因。

3.2 参与植物昼夜节律调控通路的差异表达基因

植物昼夜节律调控又被称为植物生物钟调控,在应对非生物胁迫如盐、低温和缺水等环境时会诱导生物钟调控基因的表达来缓解压力^[35]。开花时间调节因子(GI, GIGANTEA)作为植物昼夜节律调控通路中的关键因子,是连接植物不同生育时期发育和环境应激表达网络的枢纽^[36-37]。Ke等^[36]过表达*PagGls*基因发现*PagGls*使转基因拟南芥的开花提前,并提升了植株对盐胁迫的敏感性;而经过RNAi干扰处理的杨树*PagGls*基因则下调表达,这反而提升了杨树的生物量,植株的长势和盐胁迫适应能力均被增强。同样地,本研究鉴定到了1个GI基因LOC8283208,其在12 h的差异表达倍数高于24 h,说明蓖麻幼苗在12 h对盐胁迫响应最敏感,而随着胁迫时间的增加,多基因相互协作会缓解盐胁迫压力,LOC8283208基因的表达量也随之减少,因此,LOC8283208基因也可作为反映蓖麻遭受盐胁迫程度的靶标基因(详见<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230506002>,附表1)。拟南芥假反应调节因子(PRRs, two-component response regulator)是生物钟通路中的一种转录激活剂,多个PRRs基因的突变会产生对非生物胁迫耐受的表型^[37]。本研究鉴定到了1个转录活性被激活的基因LOC8271709和1个转录活性被抑制的基因LOC8264789参与蓖麻幼苗的盐胁迫响应(详见<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230506002>,附表1)。

3.3 参与植物-病原相互作用的差异表达基因

热休克蛋白HSP90(Heat shock protein90)作为真核细胞生理和应激条件下调节蛋白质平衡的关键分子伴侣,介导植物的非生物胁迫和生物胁迫抗性^[38]。现已报道拟南芥的HSP90基因在热胁迫和

盐胁迫下的表达量增加^[39],而小麦的HSP90基因遭受冷胁迫后下调表达^[40],Haxim等^[40]通过转录组学测序发现马齿苋(*Portulaca oleracea*)胁迫后HSP90基因积极参与植物-病原相互作用通路。本研究发现有2个HSP90基因(LOC8264649、LOC8273552)参与蓖麻幼苗盐胁迫下的植物-病原相互作用通路,并且相较于S0 h在S12和S24 h均是上调表达的(表4),这与前人研究结果一致^[39-40]。

3.4 参与植物激素信号转导过程的差异表达基因

研究表明,植物激素信号转导过程中的相关基因也积极地参与植物的盐胁迫反应^[41]。例如,脱落酸(ABA, abscisic acid)作为一种胁迫响应类激素,可迅速识别盐胁迫并积累ABA从而缓解压力^[41]。核细胞质受体PYR/PYL/RCAR(Pyrabactin resistance/Pyrabactin resistance-like/Regulatory component of ABA receptor receptors)、2型蛋白磷酸酶(PP2C, protein phosphatase 2C)和SNF1相关蛋白激酶(*SnRK2*, sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2)被认为是ABA信号通路中的核心成分^[42]。植物在盐胁迫下ABA通路被激活,ABA快速积累并结合PYR/PYL/RCAR抑制PP2CS的活性,PP2CS的失活会激活*SnRK2s*的转录,*SnRK2s*会调节ABA响应基因的表达最终调节植物在胁迫下的生理过程^[43]。本研究检测到蓖麻PP2CS、bZIP和*SnRK2s*基因上调表达,揭示ABA信号转导与蓖麻的盐胁迫响应有关(图8)。

生长素(Auxin)作为一种促生长激素,在盐胁迫下Auxin转运蛋白AUX1和PIN1/2的定位会发生改变,根组织的Auxin会发生极性运输,Auxin积累量减少,根生长速度会减缓,使植物在盐环境中生存^[44]。在蓖麻幼苗叶片中检测到4个IAA基因、4个SAUR基因和1个GH3基因等Auxin应答基因,且在盐胁迫反应中均上调表达(图8),推测这些基因在叶片中的积累与根组织的极性运输有关,耐盐性可能与蓖麻的生长受到抑制有关。

油菜素类固醇(BRs, brassinosteroids)是一组植物类固醇激素,参与植物的细胞分裂和伸长、生殖发育、光形态建成、叶片的衰老和各种胁迫反应^[45]。内源BRs含量的增加在盐胁迫和干旱胁迫中有着积极的作用,Krishna^[46]发现增强拟南芥中的BRs信号活性可以提高在盐胁迫中的耐受性,BRs缺陷的突变体植株DET2-1表现出对盐胁迫极度敏感且植株生长受到抑制,外源喷施BRs可减轻这种影响^[47]。Xu等^[48]发现油菜素类固醇反应性木葡聚糖

内转葡糖基化酶/水解酶19和23(*XTH19*和*XTH23*)过表达降低了拟南芥中ROS的积累,减轻了盐胁迫下植株的氧化损伤,增强了植株耐盐性。本研究在BR信号转导过程中发现了2个*XTH*上调表达基因(图8),推测其参与蓖麻盐胁迫过程中ROS的清除。此外,2个上调表达的*BSK*基因也被鉴定出来(图8),前人研究发现*BR11*或*BSK5*基因的表达能够降低叶片的气孔导度从而适应盐胁迫环境,而*BR11*或*BSK5*基因的缺失导致植物对盐胁迫不耐受^[49]。

细胞分裂素(CK, cytokinins)调节着植物的细胞分裂、营养分配、叶片衰老、维管和茎分化等一系列发育过程^[50]。研究发现,盐胁迫下植物根系中的CK合成及地上部分CK供应量的减少会改善胁迫带来的影响,表明CK在渗透应激反应中起负调控作用^[51]。本研究检测到1个*AHP*同源基因*LOC8288491*和1个*AHK3*同源基因*LOC8285483*在盐胁迫后上调表达(图8),推测其上调表达可能会抑制CK信号转导,降低CK的合成,从而抑制蓖麻幼苗在盐胁迫下的生长。

乙烯(Ethylene)是一种气体植物激素,在植物的盐响应中有着重要作用^[52]。据报道乙烯反应受体(*ETR1/ETR2*, ethylene receptor)、乙烯反应传感器(*ERS1/ERS2*, ethylene receptor single1/2)和乙烯不敏感4基因(*EIN4*, ethylene insensitive 4)在无乙烯的环境中是活跃表达的,转录因子*EIN3*作为盐胁迫下乙烯信号传导的关键成分,在转录水平下是被激活表达的,而且*ESE1*和*ERF1*作为*EIN3*的靶点基因在NaCl胁迫后表达水平也明显增加,表明*EIN3*基因是胁迫下的正向调节因子,且*EIN3*基因功能缺失的拟南芥植株表现出对盐环境的高敏感性^[53]。本研究发现蓖麻*EIN3*基因(*LOC8271154*)在盐胁迫下表达量激增,*EIN4*基因(*LOC8268200*)转录表达攀升水平略低但均是上调表达的(图8)。乙烯含量的增加抑制着植物的生长,*LOC8271154*基因的高表达可能与蓖麻的耐盐性有关。

综上,本研究在通篁5号苗期盐胁迫过程中发现了多个响应盐胁迫的关键基因,均可以作为盐胁迫下优秀的靶标基因来探究蓖麻的盐胁迫响应机制。

4 结论

本研究对通篁5号在300 mmol/L NaCl胁迫下进行RNA-Seq分析,在S12 h和S24 h(相较于S0 h)分别筛选出4822和3103个差异表达基因,其中上

调表达的差异基因数目要高于下调表达的差异基因数目。功能注释和富集分析结果表明,差异表达基因主要富集在淀粉和蔗糖代谢以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解途径。此外,分别有19个转录因子、42个激素传导途径相关基因、29个参与ROS消除途径基因和33个与离子转运相关的基因,这些基因可能在蓖麻幼苗参与盐胁迫响应的过程中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Zhang T T, Zeng S L, Gao, Y, Ouyang Z T, Li B, Fang C M, Zhao B. Assessing impact of land uses on land salinization in the Yellow River Delta, China using an integrated and spatial statistical model. *Land Use Policy*, 2011, 28 (4) : 857-866
- [2] Okur B, Ren N. Soil salinization and climate change. *Climate Change and Soil Interactions*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818032-7.00012-6>
- [3] Chi W, Zhao Y, Kuang W, Pan T, Ba T, Zhao J, Jin L, Wang S. Impact of cropland evolution on soil wind erosion in inner mongolia of China. *Land*, 2021, 10(6):583
- [4] Yin X, Lu J, Agyenim-Boateng K G, Liu S. Breeding for climate resilience in castor: Current status, challenges, and opportunities. *Genomic Designing of Climate-Smart Oilseed Crops*, 2019, 2: 441-498
- [5] Zhang J L, Shi H. Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynthesis Research*, 2013, 115(1) : 1-22
- [6] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 651-681
- [7] Munns R. Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytologist*, 2005, 167(3):645-663
- [8] de Oliveira A B, Alencar N L M, Gomes-Filho E. Comparison between the water and salt stress effects on plant growth and development. *Responses of Organisms to Water Stress*, 2013, 4: 67-94
- [9] Tester M, Davenport R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 2003, 91(5):503-527
- [10] Roy S J, Negrão S, Tester M. Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 26: 115-124
- [11] Raza A, Tabassum J, Fakhra A Z, Sharif R, Chen H, Zhang C, Ju L, Fotopoulos V, Siddique K H M, Singh R K, Zhuang W, Varshney R K. Smart reprogramming of plants against salinity stress using modern biotechnological tools. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022, 15:1-28
- [12] Singh R K, Kota S, Flowers T J. Salt tolerance in rice: Seedling and reproductive stage QTL mapping come of age. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(11):3495-3533
- [13] Kashyap S P, Prasanna H C, Kumari N, Mishra P, Singh B. Understanding salt tolerance mechanism using transcriptome

- profiling and *de novo* assembly of wild tomato *Solanum chilense*. *Scientific Reports*, 2020, 10(1):15835
- [14] Nagano A J, Sato Y, Mihara M, Antonio B A, Motoyama R, Itoh H, Nagamura Y, Izawa T. Deciphering and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions. *Cell*, 2012, 51(6):1358-1369
- [15] Guan L, Haider M S, Khan N, Nasim M, Jiu S, Fiaz M, Zhu X, Zhang K, Fang J. Transcriptome sequence analysis elaborates a complex defensive mechanism of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in response to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12):4019
- [16] Ma W, Kim J K, Jia C, Yin F, Kim H J, Akram W, Hu X, Li X. Comparative transcriptome and metabolic profiling analysis of buckwheat (*Fagopyrum Tataricum* (L.) Gaertn.) under salinity stress. *Metabolites*, 2019, 14, 9(10):225
- [17] Thatikunta R, Siva Sankar A, Sreelakshmi J, Palle G, Leela C, Durga Rani C V, Gouri Shankar V, Lavanya B, Narayana Reddy P, Dudhe M Y. Utilization of in silico EST-SSR markers for diversity studies in castor (*Ricinus communis* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2016, 22(4): 535-545
- [18] Nian H X, Chen G X, Wang Z A, Zhao L T. Applications of castor oil in lubrication field. *Synthetic. Lubrication*, 2011, 38: 32-34
- [19] Azad A K, Rasul M G, Khan M M K, Sharma S C, Mofijur M, Bhuiya M M K. Prospects, feedstocks and challenges of biodiesel production from beauty leaf oil and castor oil: A nonedible oil sources in Australia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 61: 302-318
- [20] Kallamadi P R, Nadigatla V P R G R, Mulpuri S. Molecular diversity in castor (*Ricinus communis* L.) . *Industrial Crops and Products*, 2015, 66: 271-281
- [21] Wang Y, Jie W, Peng X, Hua X, Yan X, Zhou Z, Lin J. physiological adaptive strategies of oil seed crop *Ricinus communis* early seedlings (cotyledon vs. true leaf) under salt and alkali stresses: from the growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 9: 1939
- [22] de Lima G S, Nobre R G, Gheyi H R. Physiology, growth and yield of castor bean under salt stress and nitrogen doses in phenophases. *Idesia*, 2014, 32(3): 91-99
- [23] Wang Y, Peng X, Salvato F. Salt-adaptive strategies in oil seed crop *Ricinus communis* early seedlings (cotyledon vs. true leaf) revealed from proteomics analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171: 12-25
- [24] Lei P, Liu Z, Hu Y. Transcriptome analysis of salt stress responsiveness in the seedlings of wild and cultivated *Ricinus communis* L. *Journal of Biotechnology*, 2021, 327: 106-116
- [25] Li G, Wan S W, Zhou J, Yang Z Y, Qin P. Leaf chlorophyll fluorescence, hyperspectral reflectance, pigments content, malondialdehyde and proline accumulation responses of castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings to salt stress levels. *Industrial Crops & Products*, 2010, 31(1):13-19
- [26] Zhao K, Zhang D, Lv K. Functional characterization of poplar *WRKY75* in salt and osmotic tolerance. *Plant Science*, 2019, 289: 110259
- [27] Gupta R, Leibman-Markus M, Anand G. Nutrient elements promote disease resistance in tomato by differentially activating immune pathways. *Phytopathology*, 2022, 112(11): 2360-2371
- [28] Chen N N, Tong S H, Tang H, Zhang Z Y, Liu B, Lou S L, Liu J Q, Liu H H, Ma T, Jiang Y Z. The *PalERF109* transcription factor positively regulates salt tolerance via *PalHKT1*; 2 in *Populus alba* var. *pyramidalis*. *Tree Physiology*, 2020, 6(40): 717-730
- [29] Liu P, Sun F, Gao R. *RAP2.6L* overexpression delays waterlogging induced premature senescence by increasing stomatal closure more than antioxidant enzyme activity. *Plant Molecular Biology*, 2012, 79(6): 609-622
- [30] Wang Y, Wang J, Zhao X. Overexpression of the transcription factor gene *OsSTAP1* increases salt tolerance in rice. *Rice*, 2020, 13(1): 1-12
- [31] Luo X, Wu J, Li Y. Synergistic effects of *GhSOD1* and *GhCAT1* overexpression in cotton chloroplasts on enhancing tolerance to methyl viologen and salt stresses. *PLoS ONE*, 2013, 8(1): e54002
- [32] Yan H, Li Q, Park S C, Wang X, Liu Y J, Zhang Y G, Tang W, Kou M, Ma D F. Overexpression of *CuZnSOD* and *APX* enhance salt stress tolerance in sweet potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 109: 20-27
- [33] Qi Y C, Liu W Q, Qiu L Y. Overexpression of glutathione S-transferase gene increases salt tolerance of Arabidopsis. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, 57(2): 233-240
- [34] Kausar A, Ashraf M Y, Niaz M. Some physiological and genetic determinants of salt tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) : Biomass production and nitrogen metabolism. *Pakistan Journal of Botany*, 2014, 46(2): 515-519
- [35] 高晓敏, 王璐钢, 刘亚男, 马海洋, 陈菁, 石伟琦. 植物昼夜节律及其对非生物逆境的响应. *植物生理学报*, 2017, 53(10): 1833-1841
- Gao X M, Wang J G, Liu Y N, Ma H Y, Chen J, Shi W Q. The plant circadian rhythm and its response to abiotic stresses. *Plant Physiology Journal*, 2017, 53(10): 1833-1841
- [36] Ke Q, Kim H S, Wang Z. Down-regulation of GIGANTEA-like genes increases plant growth and salt stress tolerance in poplar. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(3): 331-343
- [37] Nakamichi N, Takao S, Kudo T. Improvement of Arabidopsis biomass and cold, drought and salinity stress tolerance by modified circadian clock-associated PSEUDO-RESPONSE REGULATORS. *Plant and Cell Physiology*, 2016, 57(5): 1085-1097
- [38] Zhang K, He S, Sui Y. Genome-wide characterization of *HSP90* gene family in cucumber and their potential roles in

- response to abiotic and biotic stresses. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 584886
- [39] Mishra R C, Grover A. Constitutive over-expression of rice ClpD1 protein enhances tolerance to salt and desiccation stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Science*, 2016, 250: 69-78
- [40] Haxim Y, Si Y, Liu X. Genome-wide characterization of *HSP90* gene family in *malus sieversii* and their potential roles in response to *valsa mali* infection. *Forests*, 2021, 12 (9) : 1232
- [41] Raza A, Salehi H, Rahman M A. Plant hormones and neurotransmitter interactions mediate antioxidant defenses under induced oxidative stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:961872
- [42] Wang X, Wu Y, Sun M. Dynamic transcriptome profiling revealed key genes and pathways associated with cold stress in castor (*Ricinus communis* L.). *Industrial Crops and Products*, 2022, 178: 114610
- [43] Golldack D, Li C, Mohan H. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 151
- [44] Wang R, Estelle M. Diversity and specificity: Auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 21: 51-58
- [45] Vriet C, Russinova E, Reuzeau C. Boosting crop yields with plant steroids. *The Plant Cell*, 2012, 24(3): 842-857
- [46] Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2003, 22(4): 289-297
- [47] Wei L J, Deng X G, Zhu T. Ethylene is involved in brassinosteroids induced alternative respiratory pathway in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings response to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 982
- [48] Xu P, Fang S, Chen H. The brassinosteroid - responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 19 (*XTH19*) and *XTH23* genes are involved in lateral root development under salt stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2020, 104 (1) : 59-75
- [49] Li Z Y, Xu Z S, He G Y. A mutation in *Arabidopsis BSK5* encoding a brassinosteroid-signaling kinase protein affects responses to salinity and abscisic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 426 (4) : 522-527
- [50] Mok D W S, Mok M C. Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Biology*, 2001, 52: 89
- [51] Nishiyama R, Le D T, Watanabe Y. Transcriptome analyses of a salt-tolerant cytokinin-deficient mutant reveal differential regulation of salt stress response by cytokinin deficiency. *PLoS ONE*, 2012, 7(2): e32124
- [52] Dubois M, Van den Broeck L, Inzé D. The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in Plant Science*, 2018, 23 (4): 311-323
- [53] Jiang C, Belfield E J, Cao Y. An *Arabidopsis* soil-salinity-tolerance mutation confers ethylene-mediated enhancement of sodium/potassium homeostasis. *The Plant Cell*, 2013, 25(9): 3535-3552

附表 1 重要通路的差异表达基因

Table S1 Differentially expressed genes in important pathways

通路 Pathway	基因号 Gene ID	描述 Description	Log ₂ 差异表达倍数 Log ₂ Fold change	
			S12 h-vs-S0 h	S24 h-vs-S0 h
植物昼夜节律调控 Circadian rhythm regulation of plants	LOC8270678	Adagio 蛋白质 3	6.85	3.23
	LOC8276060	酪蛋白激酶 II 亚基 β -1	2.39	1.62
	LOC8273082	查尔酮合成酶 2	-5.60	-5.74
	LOC8258350	隐花色素-1	2.27	1.51
	LOC8274228	成花素基因 1	-2.95	-3.44
	LOC8283208	开花时间调节因子 GIGANTEA	3.65	1.18
	LOC8259475	转录因子 HY5	-2.04	-1.08
	LOC8264789	双组分响应调节剂-like PRR37	-3.76	-1.80
	LOC8271709	双组分响应调节剂-like PRR37	3.21	2.58
	LOC8263730	WD 重复蛋白 RUP2	-2.81	-1.46
植物-病原相互作用 Plant-pathogen interaction	LOC8281914	抗病蛋白 RPM1 - like	2.56	1.96
	LOC8264649	热激蛋白 90-5	2.26	2.14
	LOC8273552	热激蛋白 90-6	2.42	2.20
	LOC8261004	可能的钙结合蛋白 CML35	2.88	2.21
	LOC8272995	可能的钙结合蛋白 CML41	5.44	4.17
	LOC8271938	可能的钙结合蛋白 CML48	2.47	1.75
	LOC8269747	PTI1 样酪氨酸蛋白激酶 3	2.45	1.40
	LOC8275460	呼吸爆发氧化酶同源蛋白 C	3.22	1.75
	LOC8273025	WRKY 型转录因子 WRKY24	4.41	2.84