

两个柠檬品种叶片离区响应乙烯利处理的转录组分析

董美超¹, 尹拓², 周东果¹, 张汉尧², 杨帆¹, 王绍华¹, 龙春瑞¹, 付小猛¹,
刘红明¹, 郭莉娜¹, 李丹萍¹, 高俊燕¹

(¹云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所, 保山 678000; ²西南林业大学林学院, 昆明 650224)

摘要: 艾伦尤力克是尤力克柠檬的一个芽变品种, 结果性状优良, 但冬季落叶严重, 影响翌年产量, 且其落叶的响应机制目前尚不清楚。为探究柠檬叶片脱落的分子调控机制, 以2个冬季落叶程度不同的柠檬品种艾伦尤力克和云柠1号为材料, 分别于落叶前期(E24)、落叶中期(E48)和落叶后期(E72)采集叶柄离区, 通过转录组测序比较2个品种间的差异表达基因。分析表明, 落叶前期、落叶中期和落叶后期分别获得1400个、2466个和935个差异表达基因, 其中落叶中期的差异基因数量最多。GO分析表明血红素结合、四吡咯结合、氧化还原酶活性、铁离子结合、转录调节活性以及对氧化应激的反应、细胞葡聚糖代谢过程、葡聚糖代谢过程、细胞外围、细胞壁等相关基因在这3个时期品种间均表现出显著差异。KEGG分析表明, 落叶中期富集的差异基因数及相关代谢途径最多, 主要集中在植物激素信号转导、苯丙烷生物合成、植物病原体相互作用和MAPK信号通路-植物等途径, 通过对以上4个途径的差异表达显著的基因进行分析, 最后筛选得到木葡聚糖内转葡糖基酶/水解酶蛋白、吲哚乙酸诱导蛋白、吲哚-3-乙酸-氨基合成酶、过氧化物酶、 β -葡萄糖苷酶、发病相关基因转录激活因子AP2和发病机制相关蛋白等13个基因, 这些基因可能与柠檬叶片脱落的调控有关。qRT-PCR验证这些基因的表达与转录组数据相一致。以上结论丰富了柠檬叶片脱落相关研究, 为柠檬落叶候选基因筛选、落叶途径解析提供可靠数据。

关键词: 柠檬; 落叶; 转录组; 差异表达基因

Transcriptome Analysis of Leaf Abscission Zones Post Ethephon Treatment in Two Lemon Varieties

DONG Meichao¹, YIN Tuo², ZHOU Dongguo¹, ZHANG Hanyao², YANG Fan¹, WANG Shaohua¹,
LONG Chunrui¹, FU Xiaomeng¹, LIU Hongming¹, GUO Lina¹, LI Danping¹, GAO Junyan¹

(¹Institute of Tropical Subtropical Economic Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Baoshan 678000;

²College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224)

Abstract: 'Allen Eureka' is a progeny variety of the variety 'Eureka lemon' due to bud mutation. This variety showed excellent performance at fruiting traits, while it was susceptible to winter defoliation, eventually resulting in severe leaf shedding and decreasing the yield production in the coming year. The mechanism of leaf shedding remains unknown. Two lemon cultivars ('Allen Eureka' and 'Yunning No. 1') with degrees of winter defoliation were used to investigate the molecular regulatory mechanisms of leaf abscission. The petiole abscission zones were collected at three stages, namely, the pre-defoliation stage (E24), mid-defoliation stage (E48), and post-defoliation stage (E72), and subjected for transcriptome sequencing. The differentially expressed genes (DEGs) between two lemon varieties were identified, revealing a total of 14002466, and 935 DEGs in pre-defoliation stage, mid-defoliation stage, and post-defoliation stage, respectively. The largest number of DEGs was found in mid-defoliation stage. GO enrichment analysis revealed that these DEGs were

收稿日期: 2023-10-31 网络出版日期: 2024-02-08

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231031006>

第一作者研究方向为果树遗传育种, E-mail: rjsdmc@yaas.org.cn

通信作者: 高俊燕, 研究方向为柑橘遗传育种, E-mail: rjsgjy@yaas.org.cn

基金项目: 国家自然科学基金(31960574); 英才兴边计划(2022RC001); 创新引导与科技型企业培育计划(202304BI090025)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31960574); Talent Revitalization Program (2022RC001); Innovation Leadership and Technology-based Business Incubation Program(202304BI090025)

mainly enriched in the processes of heme binding, tetrapyrrole binding, oxidoreductase activity, iron ion binding, transcription regulator activity and response to oxidative stress, cellular glucan metabolic process, glucan metabolic process, cell periphery, cell wall in the defoliation stages. KEGG analysis showed that the DEGs were concentrated in mid-defoliation stage and involved in plant hormone signal transduction, phenylpropanoid biosynthesis, plant-pathogen interaction, and MAPK signaling pathway. By analyzing the genes with significant differential expression of the four pathways, 13 genes including xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein, indoleacetic acid-induced protein, indole-3-acetic acid-amido synthetase, peroxidase, β -glucosidase, pathogenesis-related genes transcriptional activator *AP2* and pathogenesis-related protein were selected. They might be associated with the regulation of lemon leaf abscission. qRT-PCR verified that the expression of these genes was consistent with the transcriptomic data. This study raised new insights in deciphering the lemon leaf abscission, as well as provided reliable data to identify lemon defoliation candidate genes and uncover the analysis of leaf shedding pathways.

Key words: lemon; defoliation; transcriptome; differentially expressed genes

柠檬(*Citrus limon* (L.) Burm. F.)属芸香科柑橘属枸橼类常绿果树,可能是酸橙与枸橼的自然杂种^[1-2],起源于印度东北部、缅甸北部以及中国南方地区^[3-4]。据2021年联合国粮农组织对柠檬的数据统计,全球收获面积为1338321 hm²,总产量20828739 t,目前柠檬产量排名前五的国家分别是印度、墨西哥、中国、阿根廷和巴西;中国柠檬主产区分布在四川、云南、广东等地,且柠檬生产规模呈逐渐增长的趋势。柠檬属常绿不落叶果树,生产中发现艾伦尤力克柠檬产量高,但落叶量明显高于其他品种,导致有机养分的大量损失,致使翌年树木开花推迟及产量下降。阐明艾伦尤力克柠檬落叶原因,有利于研发降低艾伦尤力克落叶率并保持产量的方法,对调整柠檬品种结构及活跃柠檬种植产区经济发展具有重要意义。

柠檬落叶既是植物受干旱、低温等非生物胁迫的一种损伤表现,也是减少水分散失、保护树木的一种防御机制,然而其内在机理仍不明确。有报道以黄羽扇豆为研究对象,提供了干旱诱导器官脱落的新视角,干旱胁迫下的器官脱落是一种细胞壁修饰导致的细胞重塑行为,该过程主要依赖于离层中甲基化高半乳糖醛酸(HG, methylated homogalacturonans)的重组以及果胶甲基酯酶(PME, pectin methylesterase)和多聚半乳糖醛酸酶(PG, polygalacturonase)的上调^[5]。研究表明,柑橘干旱后复水所引起的落叶的主要原因是干旱条件下根系中能够积累大量的1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC, 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid),1-氨基环丙烷-1-羧酸是乙烯合成的前体物质,复水后1-氨基环丙烷-1-羧酸会从根系转移到嫩枝,合成

乙烯,导致柑橘落叶^[6]。此外,也有研究报道将水胁迫引起的柑橘叶片脱落归因于其根部积累了大量的脱落酸^[7]。

转录组测序是对某一物种特定组织在特定时刻的mRNA进行高通量测序,能够动态反映基因转录水平,同时鉴定和定量稀有转录本和正常转录本,并且提供样品特异的转录本序列结构信息^[8-9]。目前转录组测序被大量运用于植物器官脱落研究中,甜瓜成熟果实早期阶段果柄离层中MAD-box、AP2/ERF和Aux/IAA转录因子下调,Homeobox、Zinc finger bZIP、WRKY等转录因子上调,而在后期调控阶段,离层中MYB转录因子上调,所以甜瓜离层的前后期被不同基因调控^[10]。Gao等^[11]对月季花3个时期的花瓣离区进行转录组测序分析,共鉴定出2592个差异表达基因,在这些差异表达基因中,约有150个基因可能编码转录因子,包括锌指、WRKY、ERF和Aux/IAA基因家族,测得有108个差异表达基因与激素途径有关,其中生长素和乙烯相关的差异表达基因是最大的组类,分别包括52个和41个基因,并鉴定出1个在花瓣脱落过程中上调的Aux/IAA基因*RhIAA16*,说明该基因与离区启动相关。在柑橘中,使用乙烯利诱导柑橘叶片脱落,并对处理后的离层部位进行转录组测序,RNA-Seq结果分析表明细胞壁修饰酶基因、胁迫相关基因、病原菌相关基因、MAPK激酶相关基因、转录因子以及乙烯生物合成和信号传导基因在离层位置显著表达^[12-13]。

本研究选用两个柠檬品种,一个为冬季落叶明显的艾伦尤力克(Allen Eureka)(尤力克芽变),另一个为冬季落叶不明显的云柠1号(Yunning No.1)(尤

力克系),对两个柠檬品种在乙烯利处理后的不同落叶时期进行转录组分析,以期对柠檬落叶候选基因筛选、落叶分子和生理机制解析提供理论基础,为培育高质量高抗逆性的柠檬品种提供理论基础和科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

选取艾伦尤力克和云柠1号两个柠檬品种接穗,于2019年11月嫁接到一年生枳壳砧木上,待两个柠檬品种嫁接苗达到平均株高60 cm时,分别选取两个柠檬品种生长状况良好,且大小基本一致的苗木进行移栽培养,培养容器为塑料桶(桶口直径60 cm,桶底直径55 cm,桶高60 cm),培养基质为椰糠:红壤土:有机肥=6:3:1。每个品种各选取180株,每桶栽种1株,总共栽种360株,摆放于云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所避雨拱棚中,棚高3.2~3.5 m,期间正常管理,待植株达到平均株高200 cm,平均冠幅150 cm以上,进行喷施乙烯利处理试验。

1.2 采样

以水为溶剂,分别配制400 mg/L、600 mg/L、800 mg/L、1000 mg/L 4个浓度梯度的乙烯利溶液对艾伦尤力克和云柠1号同时进行喷施,喷施过程中不断观察叶片上的水滴,直至有水滴连续落下时停止喷施,每个浓度每个品种各6株。随后每隔8 h进行一次观测(最后一次观测时间为96 h),观测柠檬落叶数量及落叶时间,确定最适宜的乙烯利喷施浓度及采样时间。选取艾伦尤力克和云柠1号两个柠檬品种各90株,将所有植株同时喷施最适浓度乙烯利,喷施至水滴滴落速率不再加大停止喷施。分别于上午8:00~10:00进行采样,每个品种采取3组,采集落叶前期(E24)、落叶中期(E48)及落叶后期(E72)不同处理时期桶栽植株的中下部成熟叶叶柄离区(叶柄基部0.3~0.5 cm),样品采集后转至液氮速冻,并置于-80℃冷冻保存备用。

1.3 RNA提取及转录组测序

在落叶前期、中期、后期3个时期,采集喷施乙烯利浓度为600 mg/L的两个柠檬品种各3株的叶柄离区组织共18个样品,艾伦尤力克记为AE24-1,AE24-2,AE24-3,AE48-1,AE48-2,AE48-3,AE72-1,AE72-2,AE72-3;云柠1号记为YE24-1,YE24-2,YE24-3,YE48-1,

YE48-2, YE48-3, YE72-1, YE72-2, YE72-3, 使用植物RNA提取试剂盒(QIAGEN, Germany)分别从18个柠檬样品中提取总RNA,用Agilent 2100 Bioanalyzer精确检测RNA完整性和总量。将18个RNA样品送至诺禾致源(中国天津)构建RNA序列文库并测序。

1.4 转录组数据分析

测序得到的序列数据(Reads),使用fastp软件(<https://github.com/OpenGene/fastp>)对原始数据进行过滤,过滤标准为:(1)去除包含接头的Reads;(2)去除N比例10%以上的reads;(3)去除低质量(质量值小于20)碱基占比大于50%的Reads。最后使用FastQC软件对Clean data进行质量检测,质检合格后进行后续分析。

使用HISAT2 v2.0.5^[14-15]将质检合格的Clean reads比对到参照基因组*C. limon* L. Burm f. genome v1.0 (<https://www.citrusgenomedb.org/Analysis/1470607>)上,接着使用StringTie^[16]软件根据Clean data与参考基因组的比对结果对所有基因转录本丰度程度进行统计,并计算每个基因的FPKM(Fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments),对每个基因的表达量进行量化。在本研究中使用DESeq2^[17]进行差异基因分析,将 $|\log_2(\text{Fold Change})| \geq 1$ 且 $P\text{-value} \leq 0.05$ 的基因定义为显著差异表达基因。使用clusterProfiler(3.8.1)软件对差异表达基因进行GO功能和KEGG通路富集分析。

1.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析

使用构建RNA-Seq文库的cDNA样品,从两个柠檬品种的RNA seq数据中各随机选取4个差异表达基因通过qRT-PCR进行验证。使用Primer5.0软件设计特异性引物,引物(表1)由北京天一辉远生物科技有限公司合成。20 μL PCR反应体系:SYBR PCR mix 10 μL, cDNA 2 μL, 去离子水 6.8 μL, 上游引物、下游引物、ROX Reference Dye2 各0.4 μL。PCR反应程序:预变性95℃ 5 min;95℃ 10 s 60℃ 30 s,40个循环;4℃保存。以Actin为内参校正个体间差异,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法评估基因表达水平。

1.6 试验数据统计与分析

利用Microsoft Office Excel 2016进行数据统计处理以及作图,结果以平均值±标准差表示。使用R软件WGCNA v1.69包构建基因共表达网络。

表1 差异基因引物序列

Table 1 Differential gene primer sequences

基因 Gene ID	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(5'-3')
CL2G044587012_alt(AL)	ATTGGTACGAGGCAGAACGG	CGTCACGCTCAGAATGTTAGGA
CL4G049264012_alt(AL)	CCGTCCATTACAATCCCTCTG	AGCGCCGTAACAATCATCATC
CL7G060523012_alt(AL)	CTCTTGGTCAGCTTCACCGTC	GATTGGACCATTACCTGTGCG
CL8G065380012_alt(AL)	CCAGAGCGATAGGCGACAAC	AGCAACACTTGTCCGTCGTCT
CL9G066930012_alt(YN)	ACGGCAGCATTGTGAAGGT	ATCACCCACGAGCATCCAGT
CL2G044126012_alt(YN)	TGTGAGGAATGACCGTGGC	ACTTGTGTCGTGGAGCTTGTGG
CL3G046634012_alt(YN)	CAACTCCGCTAGCAAGACAC	CTCCACAAGCATCCAATCTC
CL7G062118012_alt(YN)	TGCTCTGAACGATACGGTGC	CCTCTCACGTCAACACCTCCA
<i>Actin</i>	ACTCATCGTACTCAGCCTTTG	TGCACCCTGTCTTCTTACTG

AL: 艾伦尤力克; YN: 云柠1号; 下同

AL: Allen Eureka; YN: Yunning No. 1; The same as below

2 结果与分析

2.1 喷施乙烯利浓度及采样时间确定

通过喷施不同浓度的乙烯利溶液观测柠檬叶片脱落情况, 最终确定喷施乙烯利浓度为 600 mg/L。该浓度处理下叶片总体脱落量最大, 并发现在喷施

乙烯利 24 h 后叶片开始少量脱落, 喷施乙烯利 48 h 后叶片脱落达到高峰, 喷施乙烯利 72 h 后叶片落叶量减少, 96 h 后叶片基本不再脱落(图 1), 且两个品种叶片脱落量及脱落时间相似, 所以最终确定采样时间为喷施乙烯利后 24 h, 48 h 和 72 h。

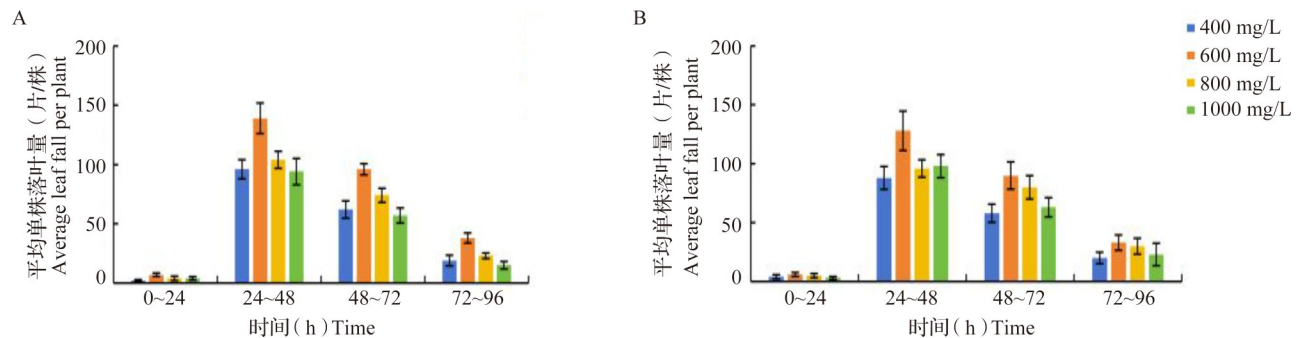


图1 艾伦尤力克(A)和云柠1号(B)不同时期平均单株落叶量

Fig.1 Average leaf fall per plant at different periods in AL (A) and YN (B)

2.2 离区转录组测序数据统计

经过测序质量分析, 艾伦尤力克和云柠1号3个时期3个重复共构建了18个文库。18个样品共获得116.78 Gb的Clean reads, Q30>89.62%。Raw reads数为38142002~47745166。比对到参考基因组唯一位置的比对率均大于79%(表2), 说明选择的参考基因组是合适的。各样本的生物学重复之间皮尔森相关性系数为0.89~0.97。这些结果表明, 数据量和测序质量可用于进一步分析。

2.3 艾伦尤力克和云柠1号两个柠檬品种不同落叶时期差异表达的基因数

为了识别柠檬落叶相关基因, 在两个柠檬品种落叶前期、落叶中期和落叶后期, 分别进行艾伦尤

力克和云柠1号表达基因的两两比较。在落叶前期(E24), 艾伦尤力克相对于云柠1号有1400个基因表达存在差异, 其中有569个基因表达上调, 831个基因表达下调。在落叶中期(E48), 艾伦尤力克相对于云柠1号, 差异表达基因最多, 有2466个, 其中1688个基因上调, 778个基因下调。在落叶后期(E72), 艾伦尤力克相对于云柠1号, 有935个基因表达差异, 其中564个基因上调, 371个基因下调(图2A)。根据3个时期所有差异表达基因绘制韦恩图(图2B), 两个品种在落叶前期(E24)特异的差异基因有892个, 落叶中期(E48)特异的差异基因个数最多, 达2005个, 落叶后期(E72)特异的差异基因为510个, 3个时期共表达差异基因为100个。

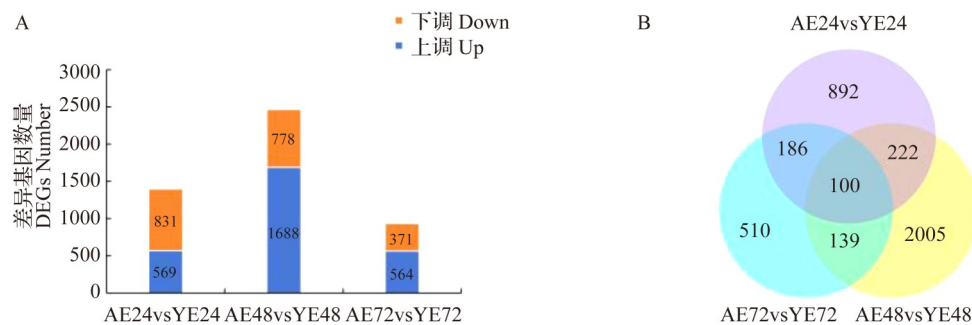
表 2 样品测序和数据比对统计

Table 2 Sample sequencing and data comparison statistics

样本 Sample	过滤后数据 Clean reads	Q20 值 (%) Q20	Q30 值 (%) Q30	GC 含量 (%) GC content	比对到基因组上的 reads 数 及其百分比 Total-map	比对到参考基因组唯一位 置的 reads 数及其百分比 Unique-map
AE24_1	45527386	96.09	89.87	42.66	38755427(85.13%)	36215469(79.55%)
AE24_2	43342828	97.53	92.99	42.69	37400306(86.29%)	34930875(80.59%)
AE24_3	38042304	97.26	92.71	42.73	32383027(85.12%)	30240516(79.49%)
AE48_1	45474990	96.36	90.38	43.04	38795674(85.31%)	36126586(79.44%)
AE48_2	42603926	97.55	93.07	42.97	36630565(85.98%)	34078369(79.99%)
AE48_3	42591272	96.83	91.51	43.35	36651284(86.05%)	33889022(79.57%)
AE72_1	45056882	96.00	89.62	43.68	38741202(85.98%)	36067637(80.05%)
AE72_2	43128740	97.67	93.29	43.29	37387633(86.69%)	34745453(80.56%)
AE72_3	42392946	97.56	93.04	43.25	36665272(86.49%)	34090164(80.41%)
YE24_1	43798896	96.05	89.80	42.86	37457248(85.52%)	35019048(79.95%)
YE24_2	42468276	97.32	92.50	42.35	36437766(85.80%)	34014359(80.09%)
YE24_3	43396902	97.64	93.19	42.48	37588101(86.61%)	35090424(80.86%)
YE48_1	44535892	96.11	89.96	43.35	38131548(85.62%)	35480613(79.67%)
YE48_2	43075852	97.58	93.15	42.75	37226624(86.42%)	34563814(80.24%)
YE48_3	42127656	96.98	91.90	43.61	36481255(86.60%)	33668529(79.92%)
YE72_1	46809228	96.24	90.11	43.78	40535248(86.60%)	37779149(80.71%)
YE72_2	43153904	97.40	92.63	42.84	37273671(86.37%)	34679392(80.36%)
YE72_3	40986418	97.59	93.15	42.98	35477481(86.56%)	32992398(80.50%)

24, 48, 72 为样品喷施乙烯利处理 24 h, 48 h, 72 h; -1, -2, -3 为样品的 3 个重复; AE: 艾伦尤力克乙烯利处理; YE: 云柠 1 号乙烯利处理

24, 48, 72 are the sample sprayed with ethylene glycol treatment for 24 h, 48 h, 72 h; -1, -2, -3 are 3 repetitions of the sample; AE: Allen Eureka ethephon treatment; YE: Yunning No. 1 ethephon treatment



A: 各落叶时期艾伦尤力克和云柠 1 号之间的差异表达基因数量; B: 艾伦尤力克和云柠 1 号各落叶时期的差异表达基因韦恩图

A: Number of DEGs between AL and YN in each defoliation period; B: Venn diagram of AL and YN in each defoliation period

图 2 各落叶时期艾伦尤力克和云柠 1 号之间的差异表达基因数量及韦恩图

Fig. 2 Number of DEGs and differential gene expression Venn diagram between AL and YN in each defoliation period

2.4 艾伦尤力克和云柠 1 号两个柠檬品种不同落叶时期差异表达基因的 GO 富集分析

GO 富集分析显示, 艾伦尤力克和云柠 1 号柠檬在 3 个时期的差异基因分别有 236 个(落叶前期 E24)、190 个(落叶中期 E48)和 110 个(落叶后期 E72)被注释到 GO 数据库。两个品种差异基因表达

在生物过程、细胞组成和分子功能中分别包含了 9 个、5 个和 28 个功能小类(图 3)。

在生物过程这一类中, 差异表达基因在对氧化应激的反应(Response to oxidative stress)、细胞葡聚糖代谢过程(Cellular glucan metabolic process)、葡聚糖代谢过程(Glucan metabolic process)、细胞多糖

代谢过程 (Cellular polysaccharide metabolic process)、多糖代谢过程 (Polysaccharide metabolic process)、细胞壁组织或生物发生 (Cell wall organization or biogenesis) 中所占比例最高; 在细胞组分这一类中, 细胞外围 (Cell periphery)、细胞壁 (Cell wall)、外部封装结构 (External encapsulating structure) 小类中占比例最高; 在分子功能这一类中, 两个品种的差异基因主要富集在血红素结合

(Heme binding)、四吡咯结合 (Tetrapyrrole binding)、氧化还原酶活性 (Oxidoreductase activity, acting on paired donors)、铁离子结合 (Iron ion binding)、转录调节活性 (Transcription regulator activity)、DNA 结合转录因子活性 (DNA binding transcription factor activity) 和转移酶活性 (Transferase activity, transferring glycosyl groups) 等小类中, 不过, 两个品种差异基因在不同时期所占比例均有变化。

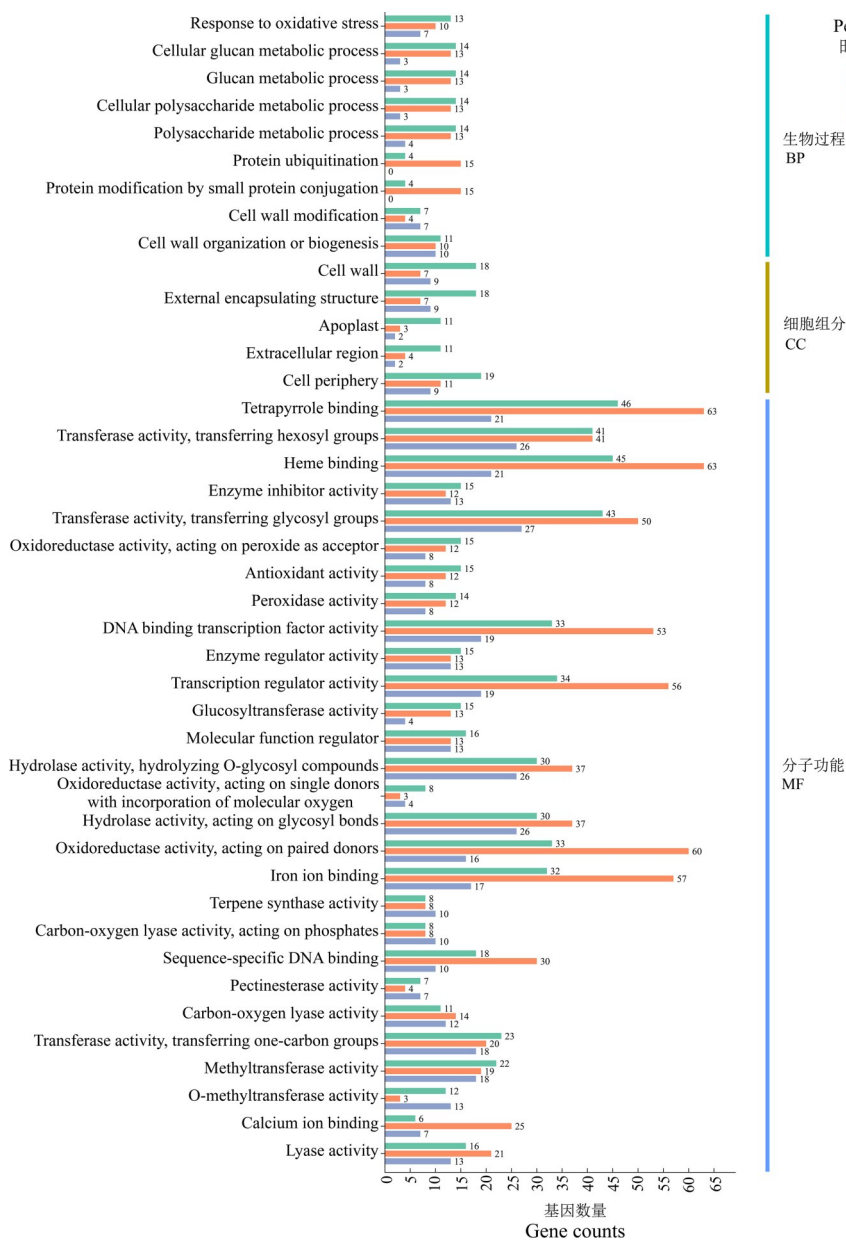


图3 艾伦尤力克和云柠1号柠檬各落叶时期差异表达基因GO功能富集

Fig. 3 GO functional enrichment of differentially expressed genes in AL and YN lemons at each defoliation period

2.5 艾伦尤力克和云柠1号两个柠檬品种不同落叶时期差异表达基因的代谢途径分析

2.5.1 KEGG富集分析 对3个时期艾伦尤力克和云柠1号两个柠檬品种之间差异表达基因进行

KEGG富集分析, 结果(图4)显示, 落叶中期(E48)富集的差异基因数最多, 相关代谢途径主要集中在植物激素信号转导 (Plant hormone signal transduction)、植物病原体相互作用 (Plant-pathogen interaction)、

苯丙烷生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)、内质网中的蛋白质加工(Protein processing in endoplasmic reticulum)、MAPK 信号通路-植物(MAPK signaling pathway-plant)、甘油磷脂代谢(Glycerophospholipid metabolism)、甘油酯代谢(Glycerolipid metabolism)等。落叶前期(E24)富集的差异基因数较多,相关代谢

途径主要集中在苯丙烷生物合成、内质网中的蛋白质加工、植物激素信号转导、植物病原体相互作用和 MAPK 信号通路-植物等途径。落叶后期(E72)富集的差异基因数相对较少,代谢途径主要集中在苯丙烷生物合成、植物病原体相互作用、内质网中的蛋白质加工和 MAPK 信号通路-植物等途径。

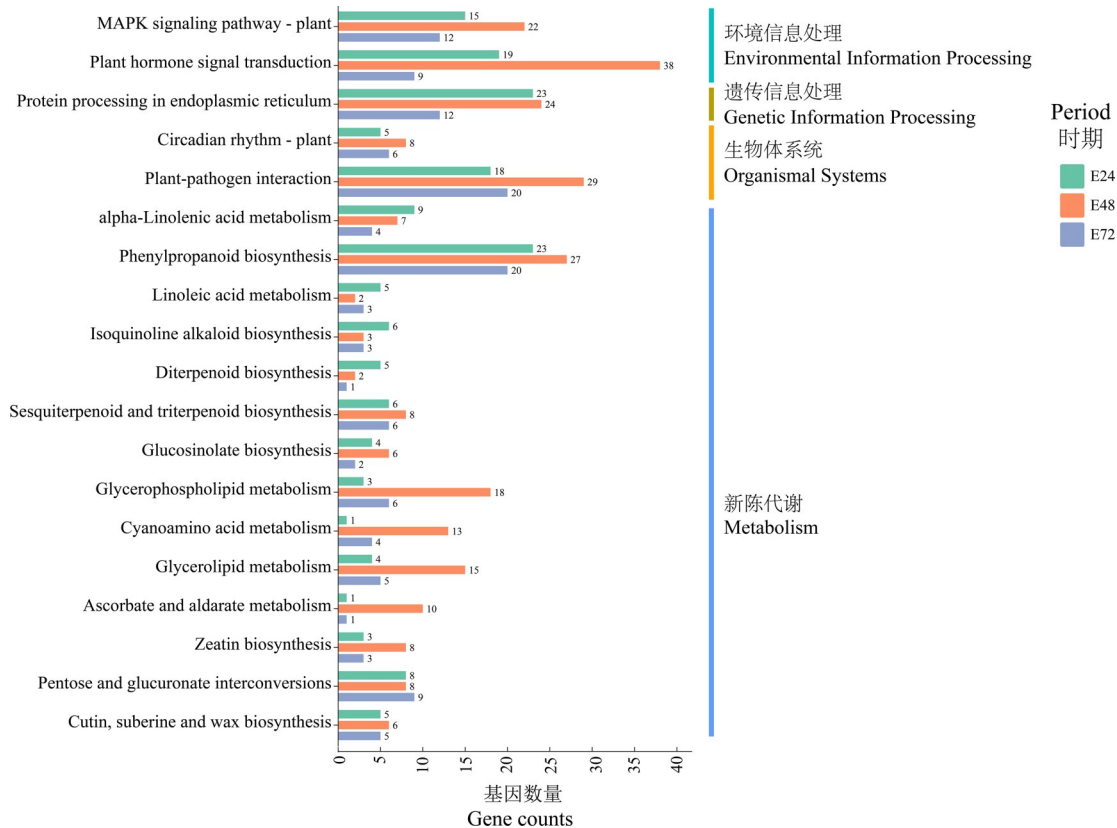


图4 艾伦尤力克和云柠1号柠檬各落叶时期差异表达基因 KEGG 代谢通路富集
Fig. 4 Enrichment of KEGG metabolic pathway of differentially expressed genes in AL and YN lemons at each defoliation period

2.5.2 代谢途径差异表达基因 通过KEGG分析结果,艾伦尤力克和云柠1号柠檬之间的差异表达基因主要富集在植物激素信号转导、苯丙烷生物合成、植物病原体相互作用以及MAPK 信号通路-植物等代谢途径(图5,图5中标记差异表达基因注释见表3)。

在植物激素信号转导途径中,艾伦尤力克和云柠1号柠檬之间落叶中期(E48)的差异表达基因最多,为38个,落叶前期(E24)19个,落叶后期(E72)最少,为9个。对这些差异表达基因进行聚类分析,结果表明木葡聚糖内转葡糖基酶/水解酶蛋白(*CL4G051299012_alt*、*CL0G071451012_alt* 和 *CL4G051300012_alt*)在落叶中期(E48)相对表达量较落叶前期(E24)均明显上调,且艾伦尤力克的表达量显著高于云柠1号。两个品种的叫哚乙酸诱导蛋白(*CL9G066930012_alt*、*CL3G046634012_alt*)和

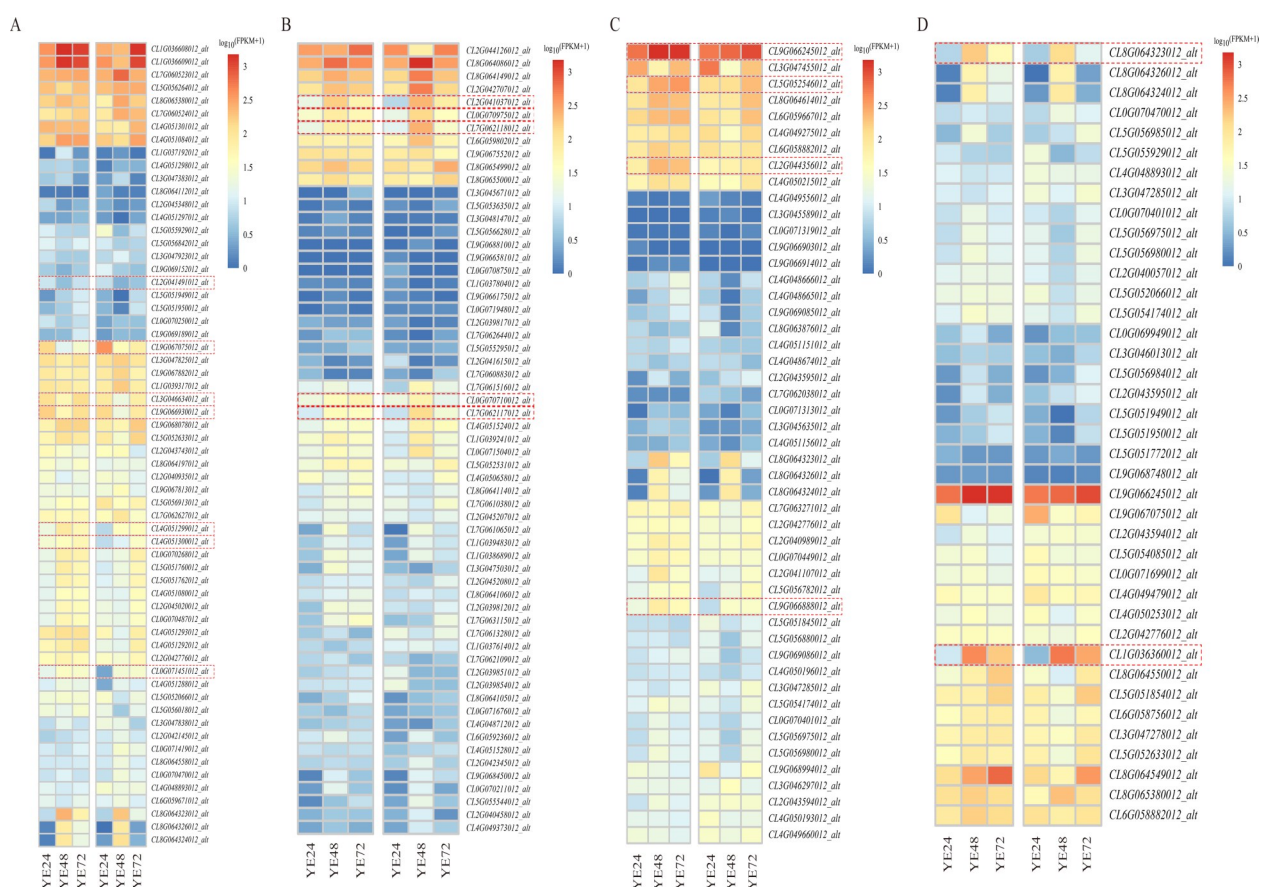
叫哚-3-乙酸-氨基合成酶 GH3 (*CL2G041491012_alt*) 在落叶中期(E48期)相对表达量较落叶前期(E24)和落叶后期(E72)均明显下调。而乙烯响应因子(*CL9G067075012_alt*)在落叶前期(E24)相对表达量较高,在落叶中期(E48)和落叶后期(E72)表达量均明显下调(图5A)。

在苯丙烷生物合成途径中,两个柠檬品种在3个落叶时期的差异表达基因数较相似,落叶中期(E48)27个,落叶前期(E24)23个,落叶后期(E72)20个;对这些差异表达基因进行聚类分析,结果显示两个品种过氧化物酶(*CL0G070710012_alt*、*CL2G041037012_alt*、*CL0G070975012_alt*)和 β -葡萄糖苷酶(*CL7G062117012_alt*、*CL7G062118012_alt*)在落叶中期(E48)相对表达量较落叶前期(E24)均明显上调(图5B)。

表3 与落叶相关的差异表达基因注释

Table 3 Annotation of differentially expressed genes associated with defoliation

基因ID Gene ID	基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	基因名称 Gene name
CL4G051299012_alt	木葡聚糖内转葡萄糖基酶/水解酶蛋白	CL0G070975012_alt	过氧化物酶
CL0G071451012_alt	木葡聚糖内转葡萄糖基酶/水解酶蛋白	CL7G062117012_alt	β -葡萄糖苷酶
CL4G051300012_alt	木葡聚糖内转葡萄糖基酶/水解酶蛋白	CL7G062118012_alt	β -葡萄糖苷酶
CL9G066930012_alt	吡啶乙酸诱导蛋白	CL2G044356012_alt	发病相关基因转录激活因子
CL3G046634012_alt	吡啶乙酸诱导蛋白	CL9G066888012_alt	钙结合蛋白
CL2G041491012_alt	吡啶-3-乙酸-氨基合成酶	CL9G066245012_alt	钙结合蛋白
CL9G067075012_alt	乙烯反应性转录因子	CL5G052546012_alt	钙结合蛋白
CL0G070710012_alt	过氧化物酶	CL8G064323012_alt	发病机制相关蛋白
CL2G041037012_alt	过氧化物酶	CL1G036360012_alt	几丁质酶



A: 植物激素信号转导途径; B: 苯丙烷生物合成途径; C: 植物病原体相互作用途径; D: MAPK 信号通路-植物途径; 红色虚线框基因为与落叶相关的基因

A: Plant hormone signal transduction; B: Phenylpropanoid biosynthesis; C: Plant-pathogen interaction; D: MAPK signaling pathway-plants;

Red dashed box genes are genes associated with defoliation

图5 艾伦尤力克和云柠1号柠檬各落叶时期代谢途径差异表达基因的表达特性

Fig. 5 Expression characteristics of differentially expressed genes of metabolic pathways in each defoliation period of AL and YN lemons

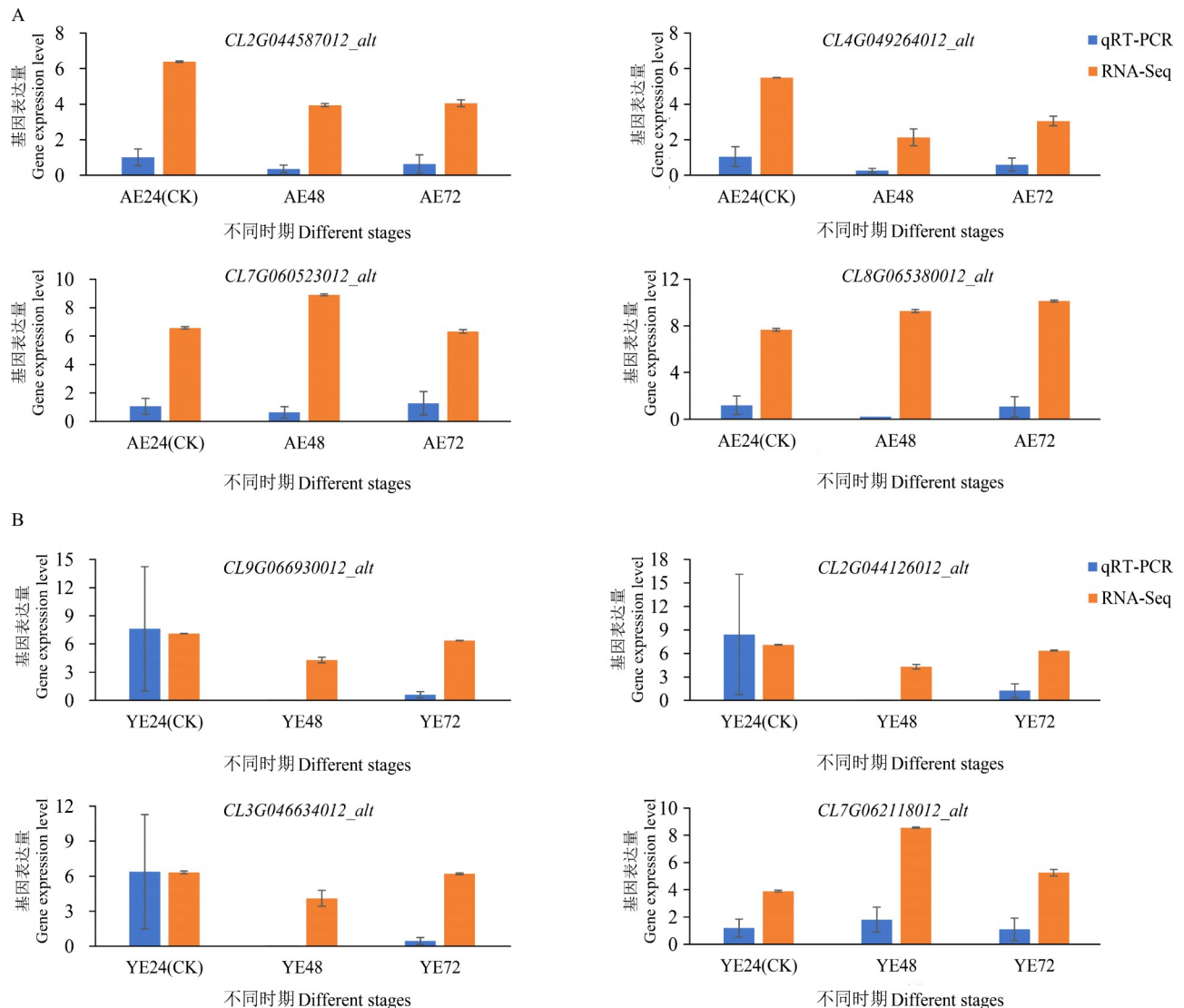
在植物病原体相互作用途径中,两个品种差异表达基因最多的在落叶中期(E48),有29个,其次为落叶后期(E72)20个和落叶前期(E24)18个。Blast 比对注释结果显示,两个品种发病相关基因转录激活因子 *AP2* (*CL2G044356012_alt*) 和钙结合蛋白 (*CL9G066888012_alt*、*CL9G066245012_alt* 和 *CL5G052546012_alt*) 在落叶中期(E48)相对表达量较落叶前期(E24期)均明显上调(图5C)。

在 MAPK 信号通路-植物途径中,两个品种差异表达基因最多的在落叶中期(E48),有22个,其次为落叶前期(E24)15个,落叶后期(E72)最少,有12个,对这些差异表达基因进行 Blast 比对注释,结果

发现两个品种发病机制相关蛋白 (*CL8G064323012_alt*) 和几丁质酶 (*CL1G036360012_alt*) 在落叶中期(E48)相对表达量较落叶前期(E24)也均明显上调(图5D)。

2.6 差异表达基因 qRT-PCR 验证

本研究采用 qRT-PCR 对来自艾伦尤力克和云柠1号两个柠檬品种的部分显著差异基因的表达模式进行了验证,艾伦尤力克选取的4个基因分别为弱乙烯不敏感蛋白 *EIN3* (*CL2G044587012_alt*)、转录调节因子 DELLA 蛋白 *GRAS* (*CL4G049264012_alt*)、生长素转运蛋白 *PIN* (*CL7G060523012_alt*)、蛋白磷酸酶 *PP2C* (*CL8G065380012_alt*); 云柠1号



A: 艾伦尤力克; B: 云柠1号。为了更加清楚的观察乙烯利处理后各个基因表达量变化的趋势,使用 $\log_2^{(FPKM)}$ 对基因的表达量进行了标准化

A: AL. B: YN To observe more clearly the trend of changes in the expression of individual genes after ethylene glycol treatment,

we normalized the expression of genes using $\log_2^{(FPKM)}$

图6 8个差异表达基因的表达水平验证

Fig. 6 Validation of expression levels of eight differentially expressed genes

选取的4个基因分别为吲哚乙酸诱导蛋白质 IAA14 (*CL9G066930012_alt*)、过氧化物酶 POD (*CL2G044126012_alt*)、生长素诱导蛋白 AUA/IAA (*CL3G046634012_alt*)、 β -葡萄糖苷酶 BGLU24 (*CL7G062118012_alt*)。如图6A所示,艾伦尤力克中 *CL2G044587012_alt* 和 *CL4G049264012_alt* 基因的荧光定量表达水平的变化与转录组基因丰度变化趋于一致,而 *CL7G060523012_alt* 和 *CL8G065380012_alt* 基因的荧光定量表达水平的变化与转录组基因丰度变化趋势存在一定偏差,可能是由于RNA降解导致;如图6B所示,4个云柠1号差异表达基因的荧光定量表达水平的变化与转录组基因丰度变化趋于一致。

3 讨论

脱落是指整个营养器官和生殖器官因细胞分离而脱落,过程发生在植物体特定位置离区,从进化的角度来看,脱落是一个非常有利的过程,可使果实和种子得以散播以及脱落不再有用的器官。但在农业生产中,大量器官的脱落可能会成为限制作物产量的一个主要因素^[18-19]。目前,大量研究主要集中在果树落花、落果方面,如桃^[20]、苹果^[21]、柑橘^[22]、芒果^[23]、荔枝^[24]、葡萄^[25]、樱桃^[26]等落果对产量影响的研究,但对叶片脱落机制研究相对较少^[27]。本研究从分子生物学层面探讨柠檬叶片脱落的机制,旨在为科学指导柠檬种植及新品种选育提供理论依据。

本研究通过KEGG分析得出,两个品种植物激素信号转导途径中吲哚乙酸诱导蛋白(*CL9G066930012_alt*、*CL3G046634012_alt*)和吲哚-3-乙酸-氨基合成酶 *GH3* (*CL2G041491012_alt*) 在落叶中期(E48)相对表达量较落叶前期(E24)均明显降低,说明生长素信号转导途径被抑制,这些生长素早期响应基因可能参与调控柠檬叶片脱落。而乙烯响应因子(*CL9G067075012_alt*)在落叶前期(E24)相对表达量较高,在落叶中期(E48)和落叶后期(E72)表达量均明显下调,说明乙烯反应性转录因子可能在落叶前期(E24)对叶片脱落具有调节作用。植物生长素响应因子(*ARFs*)已被证明是花器官脱落的调节因子,这其中主要是 *ARF1*、*ARF2*、*ARF7* 和 *ARF19* 这些转录调节因子在花器官脱落中起作用。有报道称 *ARF1*、*ARF2* 可以促进花朵脱落,并且在 *arf2* 突变体中发现有3个 *ACS* 基因在花器官脱落过程中表达被抑制,表明 *arf2* 对脱落的影响可能与乙

烯有关^[28]。除植物生长素响应因子 *ARF* 基因家族外,生长素响应基因还包括生长素早期响应基因家族(*AUX/IAA*)、生长素酰胺合成酶基因(*GH3*)和小生长素上调(*SAUR*)这3个基因家族,它们统称为生长素早期响应基因^[29-30]。在植物脱落器官离区的生长素含量水平通常较低,而在花部离区的 *AUX/IAA* 家族基因存在差异,夜香树花中 *Ce-IAA1/5* 可能调控花朵的脱落^[30-31]。生长素酰胺合成酶基因家族多个蛋白可以催化游离的生长素结合氨基酸形成结合态生长素,而 *Aux/IAA* 成员可以通过与生长素应答因子结合来抑制生长素信号的转导,从而降低活性生长素的浓度^[32]。在柑橘脱落小果的离区转录组中,共有29个与生长素、脱落酸和乙烯等激素相关的基因差异表达,其中也包括生长素酰胺合成酶基因(*GH3*)在内的生长素响应相关的基因家族^[30,33]。

本研究发现一些细胞壁重塑基因,如木葡聚糖内转葡糖基酶/水解酶蛋白(*CL4G051299012_alt*、*CL0G071451012_alt* 和 *CL4G051300012_alt*)、 β -葡萄糖苷酶(*CL7G062117012_alt*、*CL7G062118012_alt*)和过氧化物酶(*CL0G070710012_alt*、*CL2G041037012_alt*、*CL0G070975012_alt*)等,这些基因在两个品种落叶中期(E48)均显著上调,可能是柠檬叶片脱落的重要原因之一。植物器官的脱落是一个极其复杂的生理过程,是离区的区域细胞壁降解所导致的^[34]。植物器官脱落最直接的原因是由于细胞壁水解酶(*Hydrolase*)活性改变,导致细胞壁降解,从而引起器官的脱落^[30]。而与细胞壁修饰相关的基因,如纤维素酶(*Cellulase*)、果胶酯酶(*Pectinesterase*)、多聚半乳糖醛酸酶、 β -半乳糖苷酶(β -*galactosidase*)、过氧化物酶(*Peroxidase*)、扩展蛋白(*Expansin*)以及木聚糖水解酶(*Xyloglucan in glycosyl transferase hydrolase*)的表达变化与衰老^[30,35]和器官脱落^[36-37]均有关。并且早有研究发现,在拟南芥离区与细胞壁重塑相关的基因表达显著上调^[38]。硫代硫酸银是一种乙烯抑制剂,它在表型上显著延缓了玫瑰花瓣脱落,并降低了与细胞壁降解相关的两种酶(果胶酶和纤维素酶)的活性^[39]。近年来,通过对柑橘果柄离区进行转录组分析,同样发现大量与植物细胞壁重塑相关的基因在离区显著上调,这表明细胞壁的重塑在器官脱落过程中具有重要的作用^[37]。

本研究在植物病原体相互作用途径中,发现发病相关基因转录激活因子 *AP2* (*CL2G044356012_*

alt)在两个品种的落叶中期(E48)均显著上调,说明 *AP2*可能在叶片脱落过程中起到调节作用。叶片脱落是植物体的重要生理现象之一,对植物体具有重要意义,可以保护植物体,调节水分平衡,储存养分,促进萌芽^[40]等。木薯具有优良抗旱特性的重要原因之一是干旱能诱导木薯离区分化形成而脱落一部分叶片以适应新的干旱环境;Liao等^[41]在乙烯胁迫和缺水胁迫诱导木薯叶片脱落的6个阶段,利用微阵列分析技术共发现99个 *AP2/ERF*基因在木薯叶柄离区中表达。Nakano等^[42]发现 *AP2/ERF*转录因子 *SIERF52*在番茄花梗脱落中也发挥重要作用。

参考文献

- [1] Barrett H C, Rhodes A M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. *Jsystematic Botany*, 1976, 1: 105-136
- [2] Gulsen O, Roose M L. Lemons: Diversity and relationships with selected citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. *Journal of the American Society for Horticulturalence*, 2001, 126(3): 309-317
- [3] Sarton G. Introduction to the history of science. Vol. I. From Homer to Omar Khayyam. *Jouranl of Chemical Education*, 1972, 4(12): 1562
- [4] Tolokowsky S. *Hesperides. A History of the culture and use of Citrus fruits*. London: John Bale, Sons and Curnow, 1938:371
- [5] Florkiewicz A B, Kuko A, Kapusta M, Burchardt S, Wilmowicz E. Drought disrupts auxin localization in abscission zone and modifies cell wall structure leading to flower separation in yellow lupine. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21: 6848
- [6] Darius T, Eduardo PM. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiology*, 1992, 100: 131-137
- [7] Gomez-Cadenas A, Tadeo F R, Talon M, Primo-Millo E. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiology*, 1996, 112 (1) : 401-408
- [8] 王丽鸳. 基于EST数据库和转录组测序的茶树DNA分子标记开发与应用研究. 北京:中国农业科学院, 2011
Wang L Y. Mining and application of molecular markers from EST database and transcriptome sequencing in tea plant (*Camellia sinensis*). Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011
- [9] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(1): 57-63
- [10] Corbacho J, Romojaro F, Pech J C, Latché A, Gomez-Jimenez M C. Transcriptomic events involved in melon mature-fruit abscission comprise the sequential induction of cell-wall degrading genes coupled to a stimulation of endo and exocytosis. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e58363
- [11] Gao Y, Liu C, Li X, Xu H, Liang Y, Ma N, Fei Z, Gao J, Jiang C Z, Ma C. Transcriptome profiling of petal abscission zone and functional analysis of an *Aux/IAA* family gene *RhLAA16* involved in petal shedding in rose. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1375
- [12] Agustí J, Merelo P, Cercós M, Tadeo F R, Talón M. Ethylene-induced differential gene expression during abscission of citrus leaves. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(10): 2717-2733
- [13] Agustí J, Merelo P, Cercós M, Tadeo F R, Talón M. Comparative transcriptional survey between laser-microdissected cells from laminar abscission zone and petiolar cortical tissue during ethylene-promoted abscission in citrus leaves. *BMC Plant Biology*, 2009, 9: 127
- [14] Kim D, Langmead B, Salzberg S. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 2015, 12 (4): 357-360
- [15] Shirasawa K, Isuzugawa K, Ikenaga M, Saito Y, Yamamoto T, Hirakawa H, Isobe S. The genome sequence of sweet cherry (*Prunus avium*) for use in genomics-assisted breeding. *DNA Research*, 2017, 24 (5): 499-508
- [16] Perteu M, Perteu G M, Antonescu C M, Chang T C, Mendell J T, Salzberg S L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3):290-295
- [17] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 2014, 15(12), 550
- [18] Estornell L H, Agustí J, Merelo P, Talón M, Tadeo F R. Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Science*, 2013, 199-200: 48-60
- [19] Ying P, Li C, Liu X, Xia R, Zhao M, Li J. Identification and molecular characterization of an IDA-like gene from litchi, *LcIDL1*, whose ectopic expression promotes floral organ abscission in Arabidopsis. *Scientific Report*, 2016, 6: 37135
- [20] Wu X, Yu M, Chen H, Ma R, Yu Z. Regulation of the protein and gene expressions of ethylene biosynthesis enzymes under different temperature during peach fruit ripening. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2018, 40(3): 1-9
- [21] Nakano T, Kato H, Shima Y, Ito Y. Apple SVP family MADS-Box proteins and the tomato pedicel abscission zone regulator JOINTLESS have similar molecular activities. *Plant and Cell Physiology*, 2015, 56(6): 1097-1106
- [22] Xie R, Dong C, Ma Y, Deng L, He S, Yi S, Lv Q, Zheng Y. Comprehensive analysis of *SAUR* gene family in citrus and its transcriptional correlation with fruitlet drop from abscission zone A. *Funct Integr Genomics*, 2015, 15(6): 729-740
- [23] Hagemann M H, Winterhagen P, Hegele M, Wünsche J N.

- Ethephon induced abscission in mango: Physiological fruitlet responses. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 706
- [24] Li C, Wang Y, Huang X, Li J, Wang H, Li J. An improved fruit transcriptome and the identification of the candidate genes involved in fruit abscission induced by carbohydrate stress in litchi. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 439
- [25] Domingos S, Scaffidi P, Cardoso V, Leitao A E, Di Lorenzo R, Oliveira C M, Goulao L F. Flower abscission in *Vitis vinifera* L. triggered by gibberellic acid and shade discloses differences in the underlying metabolic pathways. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 457
- [26] Jones J E, Mertes E, Close D C. Does carbohydrate availability play a role in sweet cherry fruitlet abscission? *Acta Horticulturae*, 2016(1119): 53-58
- [27] 毕楷杰, 孙耀国, 杨敏生, 张军. 银腺杨不同部位叶片形态、生理及转录差异分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(3): 829-842
- Bi K J, Sun Y G, Yang M S, Zhang Jun. Leaf morphology and physiological analysis of different parts of silver glandular poplar. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(3): 829-842
- [28] Woodward A W, Bartel B. Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 2005, 95(5): 707
- [29] Abel S, Theologis A. Early genes and auxin action. *Plant Physiology*, 1996, 111(1):9-17
- [30] 仇志浪. 贵州甜樱桃异常生理落果的分子机制. 贵阳: 贵州大学, 2021
- Chou Z L. Molecular mechanisms of abnormal physiological fruit drop in sweet cherry. Guiyang: Guizhou University, 2021
- [31] Abebie B, Lers A, Philosoph-Hadas S, Goren R, Riov J, Meir S. Differential effects of NAA and 2, 4-D in reducing floret abscission in cestrum (*Cestrum elegans*) cut flowers are associated with their differential activation of *Aux/IAA* homologous genes. *Annals of Botany*, 2008, 101(2): 249-259
- [32] Peer W A. From perception to attenuation: Auxin signalling and responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2013, 16(5): 561-568
- [33] Xie R, Ge T, Zhang J, Pan X, Ma Y, Yi S, Zheng Y. The molecular events of IAA inhibiting citrus fruitlet abscission revealed by digital gene expression profiling. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 130: 192-204
- [34] Sawicki M, Ait Barka E, Clément C, Vaillant-Gaveau N, Jacquard C. Cross-talk between environmental stresses and plant metabolism during reproductive organ abscission. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(7): 1707-1719
- [35] Glazinska P, Wojciechowski W, Kulasek M, Glinkowski W, Marciniak K, Klajn N, Keszy J, Kopcewicz J. De novo transcriptome profiling of flowers, flower pedicels and pods of *Lupinus luteus* (Yellow Lupine) reveals complex expression changes during organ abscission. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 641
- [36] Kim J, Sundaresan S, Philosoph-Hadas S, Yang R, Meir S, Tucker M L. Examination of the abscission-associated transcriptomes for soybean, tomato, and arabidopsis highlights the conserved biosynthesis of an extensible extracellular matrix and boundary layer. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1109
- [37] Merelo P, Agustí J, Arbona V, Costa M L, Estornell L H, Gómez-Cadenas A, Coimbra S, Gómez M D, Pérez-Amador M A, Domingo C, Talón M, Tadeo F R. Corrigendum: Cell wall remodeling in abscission zone cells during ethylene-promoted fruit abscission in Citrus. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 301
- [38] Lashbrook C C, Cai S. Cell wall remodeling in Arabidopsis stamen abscission zones: Temporal aspects of control inferred from transcriptional profiling. *Plant Signaling and Behavior*, 2008, 3(9): 733-736
- [39] Zhang J, Zhang Y, He Y, Du T, Shan D, Fan H, Wang W, Qin Z, Xin C, Pei H. Metabolome and transcriptome integration reveals insights into the process of delayed petal abscission in rose by STS. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1045270
- [40] Wei J, Yang Q, Ni J, Gao Y, Tang Y, Bai S, Teng Y. Early defoliation induces auxin redistribution, promoting paradormancy release in pear buds. *Plant Physiology*, 2022, 190(4):2739-2756
- [41] Liao W, Li Y, Yang Y, Wang G, Peng M. Exposure to various abscission-promoting treatments suggests substantial ERF subfamily transcription factors involvement in the regulation of cassava leaf abscission. *BMC Genomics*, 2016, 17:538
- [42] Nakano T, Fujisawa M, Shima Y, Ito Y. The AP2/ERF transcription factor SIERF52 functions in flower pedicel abscission in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(12), 3111-3119