

# 干旱胁迫下藜麦种子糖代谢转录组学研究

王春妹<sup>1,2</sup>, 王 梅<sup>1,2</sup>, 王红霞<sup>1,2</sup>, 卢 川<sup>3</sup>, 王晓霞<sup>1,2</sup>, 魏博翔<sup>1,2</sup>, 吕 玮<sup>3</sup>, 穆国俊<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>河北农业大学农学院/华北作物改良与调控国家重点实验室/河北省作物种质资源实验室, 保定 071000;

<sup>2</sup>河北省藜麦产业技术研究院, 张家口 075000; <sup>3</sup>河北省科技创新服务中心, 石家庄 050000)

**摘要:** 藜麦(*Chenopodium quinoa* Willd.)营养丰富且抗逆性较强。本研究以M059(胚根生长快)和M024(胚根生长慢)两种藜麦种质材料为研究对象,采用PEG-6000模拟干旱胁迫,观察种子表型的解剖结构,对发芽种子进行糖含量测定,并对正常水处理和干旱处理的材料进行转录组测序。种子表型及糖含量测定结果显示:与正常水处理相比,15% PEG-6000处理24 h后M059和M024胚根长度分别降低68.65%和71.43%;在正常水处理条件下,M059的可溶性总糖、蔗糖、葡萄糖和果糖含量较M024高18.58%、97.84%、70.54%和32.77%;在15% PEG-6000处理24 h后,M024的蔗糖含量比M059高23.01%,M059的可溶性总糖和葡萄糖含量比M024分别高7.26%和25.00%。韦恩图分析结果表明,C1vsD1、C2vsD2、C1vsC2和D1vsD2比较组中共有差异表达基因211个,特异性差异表达基因分别为132个、1270个、578个和914个。GO富集分析表明,与干旱胁迫下藜麦种子糖代谢的分子响应密切相关的GO通路有5条。KEGG富集分析表明,与干旱胁迫下藜麦种子糖代谢密切相关的代谢途径有3条。根据差异表达基因的功能注释,有10个差异表达基因(*LOC110702784\_AGAL2*, *LOC110719866\_INV1*, *LOC110717843\_TPPJ*, *LOC29490\_CELB*, *LOC110719843\_bglx*, *LOC110689796\_SUS1*, *LOC110690728\_MAN6*, *LOC110729879\_HK2*, *LOC110712726\_EGLC*, *LOC110734349\_FK7*)与糖代谢相关,且这10个差异表达基因的qRT-PCR验证结果与转录组结果一致。本研究结果将对深入解析藜麦响应干旱的分子调控机制提供参考。

**关键词:** 藜麦; 干旱胁迫; 淀粉和蔗糖代谢; 转录组; qRT-PCR

## Transcriptomics of Glucose Metabolism in Quinoa Seeds under Drought Stress Treatment

WANG Chunmei<sup>1,2</sup>, WANG Mei<sup>1,2</sup>, WANG Hongxia<sup>1,2</sup>, LU Chuan<sup>3</sup>, WANG Xiaoxia<sup>1,2</sup>,

WEI Boxiang<sup>1,2</sup>, LYU Wei<sup>3</sup>, MU Guojun<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy, Hebei Agricultural University/State Key Laboratory of North China Crop Improvement and Regulation/Laboratory of Hebei Provincial Crop Germplasm Resources, Baoding 071000; <sup>2</sup>The Research Institute of Quinoa Industry Technology of Hebei Province, Zhangjiakou 075000; <sup>3</sup>Hebei Science and Technology Innovation Service Center, Shijiazhuang 050000)

**Abstract:** Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) has rich nutritional and strong stress resistance. In this study, two kinds of quinoa germplasm materials, M059 (fast radicle growth) and M024 (slow radicle growth), were used to simulate drought stress with PEG-6000. The anatomical structure of seed phenotypes was observed, glucose contents were determined in germinated seeds, and transcriptome sequencing was performed on materials treated with normal water and drought. The results of seed phenotype and glucose contents determination showed that the radicles length of M059 and M024 decreased by 68.65% and 71.43%, respectively, after 15% PEG-6000 treatment for 24 h compared with normal water treatment. Under normal water treatment conditions, the contents of total soluble sugar, sucrose, glucose and fructose in M059 were

收稿日期: 2023-11-09 网络出版日期: 2024-01-15

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231109002>

第一作者研究方向为种质资源创制与利用, E-mail: 1445899919@qq.com

通信作者: 吕 玮, 研究方向为种质资源创制与利用, E-mail: lvwei91@126.com

穆国俊, 研究方向为种质资源创制与利用, E-mail: mgj99999@126.com

**基金项目:** 河北省科技计划结转项目农业高质量发展关键共性技术攻关专项(19227527D); 现代种业科技创新专项(21326305D)

**Foundation projects:** Hebei Province Science and Technology Plan Carryover Project Agricultural High-quality Development Key Common Technology Research Project (19227527D); Modern Seed Industry Science and Technology Innovation Project (21326305D)

18.58%, 97.84%, 70.54% and 32.77% higher than those in M024. After being treated with 15% PEG-6000 for 24 h, the sucrose content of M024 was 23.01% higher than that of M059, and the soluble total sugar and glucose content of M059 were 7.26% and 25.00% higher than that of M024, respectively. Venn diagram analysis showed that there were 211 differentially expressed genes in C1vsD1, C2vsD2, C1vsC2 and D1vsD2 comparison groups, and 132, 1270, 578 and 914 differentially expressed genes, respectively. GO and KEGG enrichment analyses showed that 5 GO terms and 3 metabolic pathways were closely related to the molecular response of glucose metabolism in quinoa seeds under drought stress. Based on functional annotations of differentially expressed genes, there were 10 differentially expressed genes (*LOC110702784\_AGAL2*, *LOC110719866\_INV1*, *LOC110717843\_TPPJ*, *LOC29490\_CELB*, *LOC110719843\_bglx*, *LOC110689796\_SUS1*, *LOC110690728\_MAN6*, *LOC110729879\_HK2*, *LOC110712726\_EGLC*, *LOC110734349\_FK7*) were related to glucose metabolism, and the qRT-PCR verification results of these 10 differentially expressed genes were consistent with the transcriptomic results. The results of this study will provide reference for further analysis of the molecular regulatory mechanism under drought stress in quinoa.

**Key words:** quinoa; drought stress; starch and sucrose metabolism; transcriptome; qRT-PCR

藜麦 (*Chenopodium quinoa* Willd.,  $2n=4x=36$ ) 为苋科藜属一年生双子叶常异花授粉植物,起源于南美洲安第斯山区,距今已有 5000 ~ 7000 年种植历史,是印加土著居民的传统食物,被称为“黄金谷物”、“粮食之母”<sup>[1]</sup>。藜麦种子含有丰富的微量和宏量营养素,如铁、钾、泛酸和碳水化合物,其次级代谢物也对健康有益<sup>[2]</sup>。藜麦含有 58.1% ~ 64.2% 的淀粉,血糖指数低 (GI=35),藜麦淀粉中直链淀粉与支链淀粉的比例为 1:3,其直链淀粉含量为 3% ~ 22%,低于小麦或玉米的直链淀粉含量<sup>[3]</sup>。藜麦具有丰富的遗传多样性以及广泛的生态适应性,对于干旱、盐碱、霜冻等非生物胁迫均有较好的耐受性<sup>[4]</sup>。干旱和半干旱地区大约占全球 1/3 的陆地地区,大多数陆地地区经常发生周期性气候干旱<sup>[5]</sup>。水分胁迫不仅影响植物呼吸作用、糖代谢和光合作用等生理活动,还会降低细胞水势,影响细胞生长和伸长<sup>[6]</sup>。作物在干旱胁迫下的直接反应是渗透调节<sup>[7]</sup>。碳水化合物,尤其是水溶性碳水化合物,在渗透保护、信号转导和碳储存等方面发挥着重要作用<sup>[8]</sup>。已知的可溶性碳水化合物(蔗糖、果糖和葡萄糖)作为重要的渗透调节物质在干旱胁迫下维持细胞膨胀<sup>[9]</sup>。干旱胁迫下可溶性糖作为信号分子,可溶性糖含量的变化调节植物防御反应和代谢过程中许多关键基因的表达,从而控制植物的抗性和生长<sup>[10]</sup>。干旱胁迫增加了水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种叶片、根组织和韧皮部汁液中的蔗糖含量<sup>[11]</sup>。玉米 (*Zea mays* L.) 在干旱条件下蔗糖合酶基因 *sus1* (*sucrose synthase 1*) 和 *SH-1* (*shrunk 1*) 表达下调,抑制蔗糖向 UDP-葡萄糖的转移<sup>[12]</sup>。烟草

(*Nicotiana tabacum* L.) 转化酶基因家族的全基因组鉴定和分析表明, *NtNINV10* 参与糖代谢,抑制 *NtNINV10* 基因的表达可降低烟草叶片中葡萄糖和果糖的含量<sup>[13]</sup>。PEG-6000 处理对 *FRK3* 和 *FRK5* 均有显著的诱导作用, *FRK3* 和 *FRK5* 在甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.) 对干旱胁迫的响应中起主要作用,葡萄糖磷酸化为 D-葡萄糖-6-磷酸 (D6P, D-glucose-6-phosphate) 和果糖磷酸化为 D-果糖-6-磷酸 (F6P, D-fructose-6-phosphate) 参与了甘蔗对干旱胁迫的响应<sup>[14]</sup>。碱性  $\alpha$ -Gal 转基因烟草在盐胁迫下种子发芽率和生长性能均高于野生型烟草<sup>[15]</sup>。在 GH27 家族中,玉米 *ZmAGAL2* 在干旱胁迫下上调表达<sup>[16]</sup>。低温胁迫后,黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 叶片中各可溶性糖含量上升<sup>[17]</sup>。*GhTPP22* 基因沉默棉花比对照植株对干旱胁迫更敏感<sup>[18]</sup>。水稻己糖激酶 HXK9 (Hexokinase9) 活性下降进而抑制胚呼吸代谢,导致细胞中 ATP 积累缓慢,从而抑制种子的萌发<sup>[19]</sup>。碳水化合物不仅是植物生命活动的重要营养物质,同时也是一种重要的信号分子,对种子萌发和应激反应均起重要调节作用<sup>[20]</sup>。

目前,国内外鲜有关于干旱胁迫下藜麦种子糖代谢的相关报道。本研究通过石蜡切片对干旱胁迫下藜麦种子的解剖结构进行观察,测定不同处理样品的蔗糖、葡萄糖、果糖和可溶性总糖含量,利用转录组分析干旱胁迫下藜麦种子糖代谢相关的差异表达基因,并通过 qRT-PCR 验证关键差异表达基因。本研究结果将为深入研究干旱胁迫下藜麦种子糖代谢相关的分子调控机制提供重要参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为发芽种子胚根生长最快品系 M059 (代码:1)和胚根生长最慢品系 M024(代码:2),由河北省科技创新服务中心提供(图1)。采用高渗法 PEG-6000 模拟干旱胁迫,设置3个不同的浓度(5%、15%和25%),以筛选最适的胁迫浓度。采用最适胁迫浓度(代码:D)处理 M059 和 M024,并以正常水处

理(代码:C)为对照,观察 C1、C2、D1 和 D2 四个样品在胁迫处理后 6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 的生长情况,以筛选最适的胁迫时间。C1、C2、D1 和 D2 四个样品在顶置光源人工气候箱内进行纸上培养。第一阶段(模拟光照)25.0℃,10000 lx,70% 相对湿度(RH,relative humidity),培养 12 h;第二阶段(模拟黑暗)22.0℃,70% 相对湿度,培养 12 h。取 C1、D1、C2 和 D2 发芽种子各 3 g,3 次生物学重复,放入冻存管,液氮速冻,-80℃超低温冰箱保存。

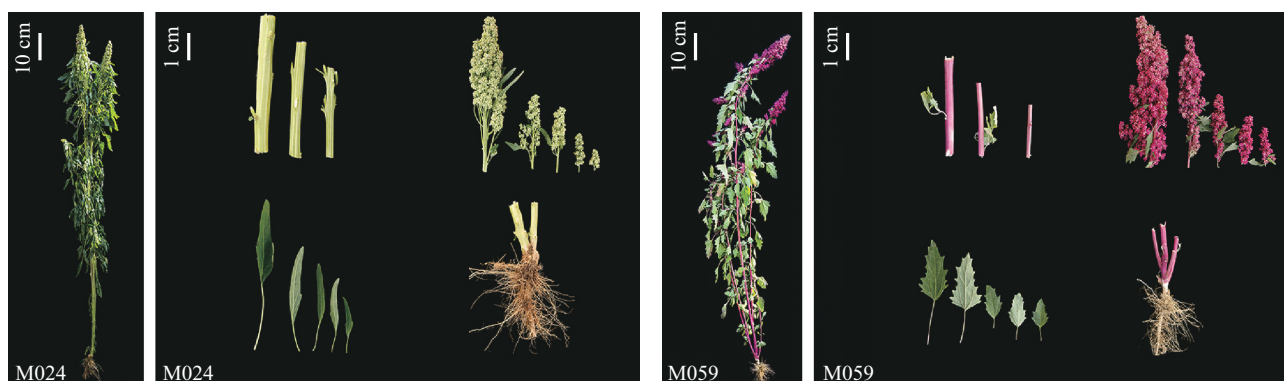


图1 参试藜麦品系表型图

Fig.1 Phenotype of test quinoa strains

### 1.2 藜麦种子切片染色及图像采集

取最适胁迫时间处理的 C1、D1、C2 和 D2 发芽种子各 10 粒立即投入组织固定液内固定 24 h 以上,常温保存。按照脱水浸蜡、包埋、切片、贴片、烘干-染色-封片的步骤制作发芽种子的石蜡切片<sup>[21]</sup>。用病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,中国)对发芽种子进行纵切,厚 8  $\mu\text{m}$ ,3 次生物学重复。用植物番红固绿染液(Servicebio,货号:G1031-100 ML)对发芽种子进行双重染色,3 次生物学重复。用正置光学显微镜(日本尼康公司)对发芽种子的石蜡切片进行观察、拍照,3 次生物学重复。采用切片扫描仪(Pannoramic DESK, 3DHISTECH, 匈牙利)对发芽种子的石蜡切片进行数字扫描、成像,利用 CaseviewerC.V2.4 进行切片的图像采集分析。

### 1.3 糖含量的测定

**1.3.1 蔗糖、果糖、葡萄糖含量的测定** 参考张友杰<sup>[22]</sup>的方法,取 0.5 g 最适胁迫时间处理的藜麦发芽种子,用研钵研磨后放置 15 mL 离心管中,加入 10 mL 75% 乙醇,置于水浴锅中 80℃ 水浴 15 min。冷却后离心,上清液转移至 25 mL 容量瓶中,再向残渣中加入少量 75% 乙醇,反复冲洗离心管及残渣,全部定容至 25 mL 容量瓶中。采用蒽酮-硫酸比色法测定葡萄糖、果糖含量,采用 KOH-蒽酮-硫酸法测定蔗

糖含量,3 次生物学重复。

**1.3.2 可溶性总糖含量的测定** 称取已粉碎样品 0.2 g 于 15 mL 离心管中,加入 10 mL 蒸馏水。沸水浴提取 30 min,取出冷却,离心。上清液转移至 25 mL 容量瓶中,再向残渣中加入 10 mL 蒸馏水,沸水浴提取 20 min,取出冷却,全部转移至 25 mL 容量瓶中。采用蒽酮比色法<sup>[23]</sup>测定可溶性总糖的含量,3 次生物学重复。采用 Microsoft Excel 2010 进行数据整理,SPSS Statistics 26.0 软件进行显著性分析,GraphPad Prism 8.0 进行作图。

### 1.4 转录组测序

**1.4.1 RNA 文库构建和质控** 参照 Rio 等<sup>[24]</sup>的 Trizol 沉淀法提取 C1、D1、C2 和 D2 发芽种子 RNA。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 纯度和完整性。RNA-Seq 样品要求为 RNA 完整性数  $> 7.5$ ;  $1.9 < \text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} < 2.1$ ;  $28\text{S}/18\text{S} \geq 1.5$ 。样品检测合格后,经过 5 项流程进行文库构建。采用 Illumina 平台(<http://www.illumina.com>)对样品材料进行测序,3 次生物学重复。采用边合成边测序(SBS, sequencing by synthesis)技术对获得的原始数据(Raw reads)计算碱基质量值。利用 Fastp<sup>[25]</sup>进行质控,去除含有接头的 Reads、N 的比例大于 10% 的 Reads 以及质量值  $Q \leq 10$  的碱基数占整条 Read 的



50%以上的 Reads,得到高质量的 Clean reads。基于表达量信息,利用 R 语言(<http://www.r-project.org/>)开展主成分分析,利用降维的方法研究样本间的距离关系,计算每两个样品之间的皮尔斯相关系数,再以热图形式直观地展示任意两个样品表达量之间的相关性。

**1.4.2 差异表达基因筛选** 利用 HISAT2 软件<sup>[26]</sup>将高质量的 Clean reads 与四倍体的藜麦参考基因组([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid63459\[orgn\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid63459[orgn]))进行比对。利用 BLAST 等数据库进行比对,包括 Nr(<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/>)、GO(<http://www.geneontology.org/>)、KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>)等,最后利用 HMMER 软件<sup>[27]</sup>与 Pfam 数据库比对获得注释信息。为了真实地反映转录本表达水平,进行归一化处理。StringTie<sup>[28]</sup>通过最大流量算法,采用每千个碱基的转录每百万映射读取值(FPKM, fragments per kilobase per million)作为基因表达水平的指标。利用 DESeq2<sup>[29]</sup>计算差异比较样本之间的 FPKM 比值,以及误差率(FDR, false discovery rate)。将  $|\log_2(FC)| \geq 1$  和  $FDR < 0.05$  作为差异表达基因筛选标准,其中,当  $\log_2(FC) \geq 1$  时,差异表达基因表达量上调;当  $\log_2(FC) < -1$  时,差异表达基因表达量下调。利用 R 语言进行火山图的绘制直观展示各比较组中差异表达基因的统计情况。使用韦恩图 v2.1 在线网络工具(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)绘制韦恩图,以展示各比较组之间的独有基因和重叠基因。

**1.4.3 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析** 利用 GO 数据库,对转录组筛选出的所有差异表达

基因做 GO 富集分析。将与糖代谢相关的差异表达基因向 GO 数据库的各条目映射,并计算每个条目的基因数,从而得到具有某个 GO 功能的基因列表及基因数目统计。应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在糖代谢相关的差异表达基因中显著富集的 GO 条目。KEGG 是有关通路的主要公共数据库,以 KEGG 通路为单位,应用超几何检验,找出与整个背景相比,在差异基因中显著性富集的通路。通过通路显著性富集确定差异基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。

**1.4.4 差异表达转录因子分析** 筛选出的与糖代谢相关的差异表达基因与藜麦基因组数据库进行 BLAST 比对,结合植物转录因子数据库(<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>)筛选差异表达转录因子。进一步分析藜麦抗旱相关的转录因子家族及相关基因。利用皮尔斯系数法测定关键差异表达基因与转录因子间的相关性,并绘制热图,分析差异表达转录因子的表达模式。

**1.4.5 qRT-PCR 验证** 从获得的与糖代谢相关的差异表达基因中挑选关键差异表达基因进行 qRT-PCR 验证,3 个生物学重复。利用 HiFiScript gDNA Removal RT Master Mix 反转录试剂盒合成 cDNA,使用 2×SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒进行 qRT-PCR。反应程序为:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 15 s,40 个循环。以 *LOC110715281(CqACT-1)* 作为内参基因,依据目的基因所需序列库对应的 CDS 序列,利用 Premier5.0 软件设计引物(表 1),采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[30]</sup>对 qRT-PCR 结果进行相对表达量计算,采用 *t*-test 检验进行相对表达量数据显著性分析。

表 1 引物序列信息

Table1 Primers sequence information

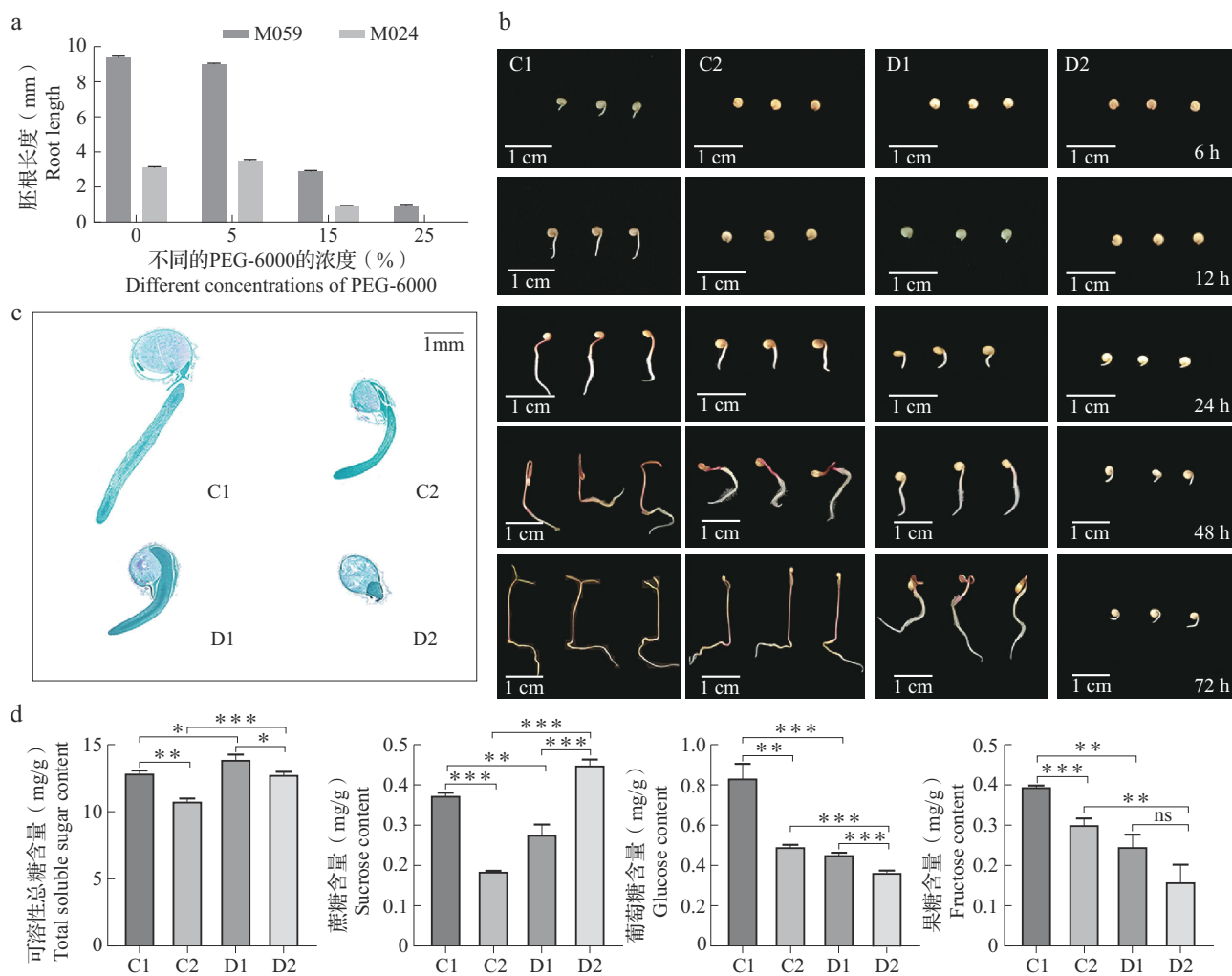
引物名称 Primer name	正向序列(5'-3') Forward sequences(5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence(5'-3')
<i>LOC110702784</i>	GCGAAAACCTTTGCTCCTG	ACAGCCATCCTCTCTGAGT
<i>LOC110719866</i>	GAGATCCGTCTACTGCGTGG	GGAATTGCCTGAAGTCCGGA
<i>LOC110717843</i>	CAACGGCAATTGTGAGTGGG	ACCTTGACCTCGGTCTCTCA
<i>LOC110729879</i>	AGTCCAAACCACCACAAGCA	TCGAGTGTGAAGCAGCAACA
<i>LOC110712726</i>	CCTTTTCCGTCCTCTTCCCC	CCACAAGCCCAATCCAAAGC
<i>LOC110719843</i>	TGGATGACCTTCAACGAGCC	CGAGTTTTCTTGCGGACCGA
<i>LOC29490</i>	ACAAGGCTTCGACGAATGGT	GAGGCACCAAGGGTAGCATT
<i>LOC110689796</i>	CAGGGGCCGACATGACTATC	AGAAGGACCACCATGGCATG
<i>LOC110690728</i>	TGCAGGGCTCTCTGAATTGG	TATCGCCAGAGGGGTCAGAA
<i>LOC110734349</i>	GCAGCAACGAATTCCAGCAA	TGCGGGAGTTTCAGCTAGTG
<i>LOC110715281</i>	GTATTGTTGGTCGTCCCCGT	GGCTGTCTCCATTTCCTGCT

## 2 结果与分析

### 2.1 藜麦种子表型、解剖结构观察及糖组分的差异

在4个PEG-6000浓度处理中,与正常水处理相比,5% PEG-6000处理M024胚根长度增加了11.11%,在低浓度5% PEG-6000处理条件下没有出现抑制作用,反而促进了藜麦胚根的生长。在高浓

度25% PEG-6000处理下导致M024藜麦种子难以萌发。15% PEG-6000处理阻碍了藜麦种子的萌发(图2a)。在6 h和12 h条件下,PEG-6000处理后的M059和M024种子没有萌发,而在24 h条件下,C1、C2、D1和D2四个样品藜麦种子全部萌发,且胚根长度最先出现差异(图2b)。因此,本研究最适的PEG-6000胁迫浓度为15%,最适胁迫时间为24 h。



a: 4个PEG-6000浓度处理24 h下M059和M024胚根长度; b: 4个样品的种子表型观察; C1: 正常水处理下的M059; C2: 正常水处理下的M024; D1: 15% PEG-6000处理下的M059; D2: 15% PEG-6000处理下的M024; c: 4个样品种子胚根纵切扫描图; d: \*, \*\*, \*\*\*分别代表在 $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ 水平下差异显著; ns代表差异不显著;下同

a: Radicle length of M059 and M024 was treated with 4 concentrations of PEG-6000 for 24 h; b: Seed phenotypic observation of four samples; C1: M059 under normal water treatment; C2: M024 under normal water treatment; D1: M059 under 15% PEG-6000 treatment; D2: M024 treated with 15% PEG-6000; c: Four samples of seed radicle longitudinal scanning; d: \*, \*\*, and \*\*\* indicated significant differences at the levels of  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively; ns indicated no significant differences; The same as below

图2 藜麦种子表型、解剖结构图及糖组分差异显著性

Fig. 2 Phenotype, anatomical structure map and significant difference of sugar components of quinoa seeds

在正常水和15% PEG-6000处理24 h时,对M059和M024胚根的解剖结构进行显微观察(图2c)。C1、C2、D1和D2四个样品胚根长度分别是 $9.25 \pm 0.03$  mm、 $3.15 \pm 0.01$  mm、 $2.90 \pm 0.01$  mm和

$0.90 \pm 0.01$  mm。15% PEG-6000处理24 h时M059和M024胚根长度较正常水处理24 h分别降低68.65%和71.43%;正常水处理24 h时M024较M059胚根长度降低65.95%,在15% PEG-6000处理24 h时

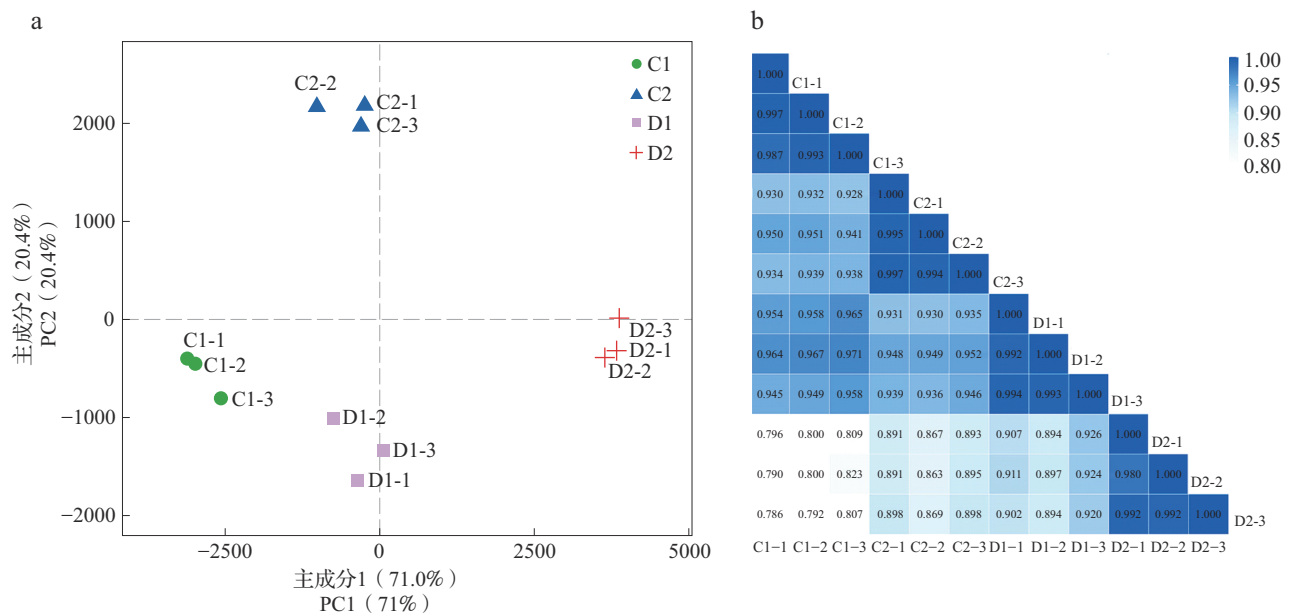
M024较M059胚根长度降低68.97%。M059在正常水处理24 h时根尖饱满,有较大的皮层细胞和较少的皮层细胞层数,在15% PEG-6000处理24 h时根尖相对皱缩,细胞小且排列紧密。M024在正常水处理24 h时细胞变小且排列密集,在15% PEG-6000处理24 h时细胞增大,表皮受到损坏。结果表明在干旱胁迫下,M059种子内部细胞小且排列紧密,并通过皮层变薄来吸收水分,表现出适应干旱地区生态条件的结构特性。

在正常水处理24 h时M059的可溶性总糖、蔗糖、葡萄糖和果糖含量分别比M024高18.58% ( $P < 0.01$ )、97.84% ( $P < 0.001$ )、70.54% ( $P < 0.01$ )和32.77% ( $P < 0.001$ )。在15% PEG-6000处理24 h时,M024的蔗糖含量比M059高23.01% ( $P < 0.001$ ),M059的可溶性总糖和葡萄糖含量分别比M024高7.26% ( $P < 0.05$ )和25.00% ( $P < 0.001$ ),果糖含量差异不显著。M059在15% PEG-6000处理24 h时的可

溶性总糖含量比正常水处理24 h时高8.60% ( $P < 0.05$ )。M024在15% PEG-6000处理24 h时的可溶性总糖和蔗糖含量分别比正常水处理24 h时高20.09% ( $P < 0.001$ )和142.70% ( $P < 0.001$ ) (图2d)。

## 2.2 转录组学分析

**2.2.1 RNA测序和质控分析** 对C1、D1、C2、D2四个RNA样品进行cDNA文库构建,共获得72.58 Gb的Clean Data;过滤后样本碱基信息Q20 $\geq$ 97.95%,Q30 $\geq$ 93.74%,N=0,GC含量控制在43.17%~43.48%之间。两个样本全部的可以定位到基因组上的Reads数量占有效Reads比例在96.86%~97.71%之间。主成分分析结果显示,第1主成分和第2主成分分别占变异的71.0%和20.4%,样本聚类分明(图3a)。相关性热图分析显示,皮尔逊相关系数在0.786~1.000之间,其中C1、C2、D1和D2四个样品的生物学重复之间的主成分分类 $>0.8$ ,说明各样品的重复性高,数据结果可靠(图3b)。



a: 样本主成分分析, -1, -2, -3 分别代表 4 个样品 C1、C2、D1 和 D2 的 3 次生物学重复; b: C1、C2、D1 和 D2 四个样品间相关性分析热图  
a: Principal component analysis, -1, -2, and -3 represent three biological replicates of the four samples C1, C2, D1, and D2, respectively;  
b: Heat map of correlation analysis between C1, C2, D1 and D2 samples

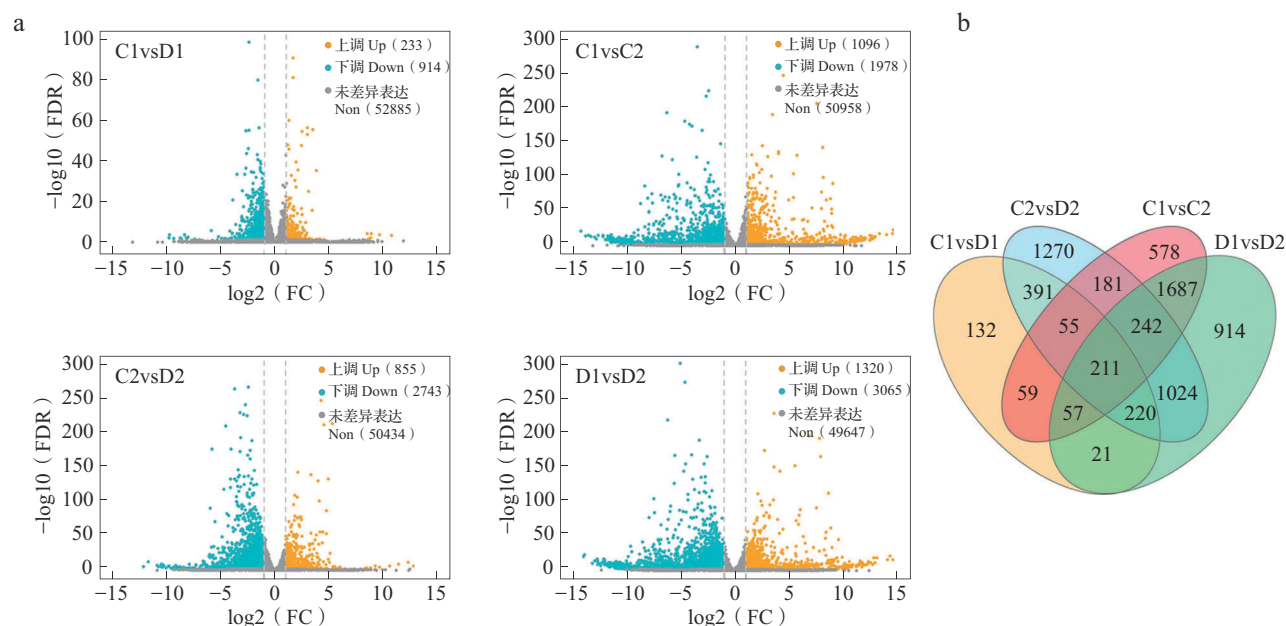
图3 样本关系分析图

Fig.3 Sample relationship analysis diagram

**2.2.2 差异表达基因的鉴定** 转录组学分析共鉴定出54033个基因。在C1vsD1比较组(D1相对于C1)中,上调基因233个,下调基因914个;在C2vsD2比较组(D2相对于C2)中,上调基因855个,下调基因2743个;在C1vsC2比较组(C2相对于C1)中,上调基因1096个,下调基因1978个;在D1vsD2比较组(D2相对于D1)中,上调基因1320个,下调基

因3065个(图4a)。韦恩图分析结果显示,4个比较组获得共有基因211个,而C1vsD1、C2vsD2、C1vsC2和D1vsD2比较组中分别有132个、1270个、578个和914个特异性基因(图4b)。两材料间分析表明,M024比M059存在更多下调基因。不同处理间分析表明,在干旱胁迫下M024比M059存在更多下调基因。





a: 差异表达基因火山图, C1vsD1 表示 D1 相对于 C1, 以此类推; FDR: 误差率; FC: 差异倍数; b: 4 个比较组中差异表达基因韦恩图, 数字表示的差异表达基因数目

a: Volcano map of differentially expressed genes, C1vsD1 means D1 compared with C1, and so on; FDR: False discovery rate; FC: Foldchange;  
b: Venn diagram of the number of differentially expressed genes in the four comparison groups, numerically represented by the number of differentially expressed genes

图4 差异表达基因统计分析

Fig.4 Statistical analysis of the differentially expressed genes

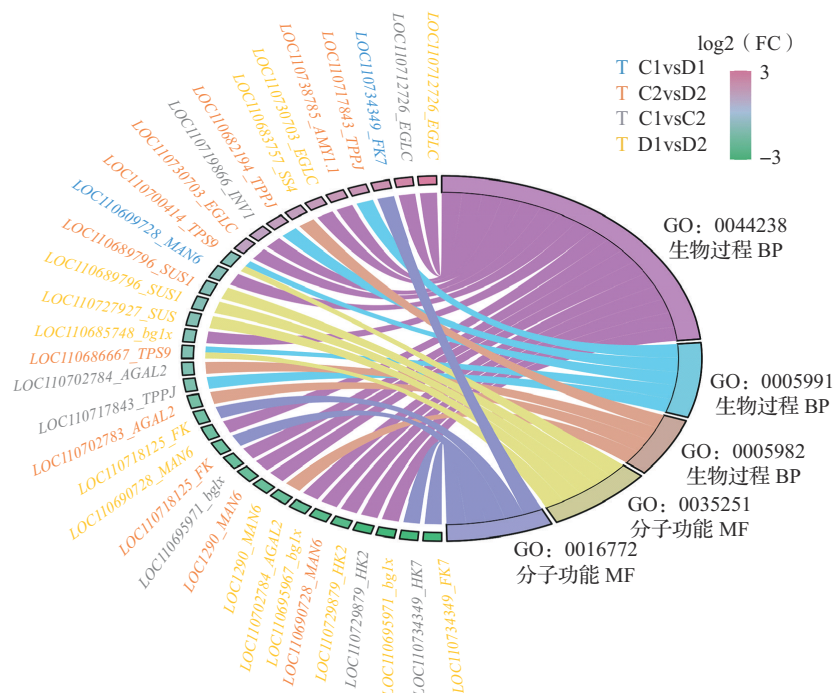
**2.2.3 GO 富集分析** 为了分析两个材料对于干旱胁迫的响应, 对所有的差异表达基因进行 GO 富集分析。GO 富集分析显示, C1vsD1、C2vsD2、C1vsC2 和 D1vsD2 四个比较组中所有的差异表达基因分别富集了 828 条、1373 条、1359 条、1589 条 GO 条目。所有的差异表达基因主要富集于 7 个条目中, 分别是细胞组分的细胞 (GO:0005623) 和细胞部分 (GO:0044464), 生物过程的代谢过程 (GO:0008152)、细胞过程 (GO:0009987) 和单组织过程 (GO:0044699), 分子功能的催化活性 (GO:0003824) 和结合 (GO:0005488)。

注释分析结果表明, 5 条 GO 条目与干旱胁迫下藜麦糖代谢的分子响应密切相关 (图 5), 其中注释到分子功能的条目有 2 条, 分别是 UDP-葡萄糖基转移酶活性 (GO:0035251) 和转移酶活性转移含磷基团 (GO:0016772)。注释到生物过程的条目有 3 条, 分别是初级代谢过程 (GO:0044238)、海藻糖代谢过程 (GO:0005991) 和淀粉代谢过程 (GO:0005982)。

**2.2.4 KEGG 富集分析** KEGG 代谢通路富集分析显示, C1vsD1、C2vsD2、C1vsC2 和 D1vsD2 四个比较组中所有的差异表达基因分别被富集到 91 条、113 条、117 条和 125 条通路。糖代谢相关的差异表达基因主要被富集到 3 条通路 (图 6), 分别是淀粉和

蔗糖代谢 (Starch and sucrose metabolism, ko00500)、半乳糖代谢 (Galactose metabolism, ko00052) 与果糖和甘露糖代谢 (Fructose and mannose metabolism, ko00051)。半乳糖代谢富集因子最高, C1vsD1、C2vsD2、C1vsC2 和 D1vsD2 四个比较组中半乳糖代谢途径的富集因子分别是 0.071、0.107、0.134 和 0.116。淀粉和蔗糖代谢富集到的基因数目最多, 分别是 9 个、29 个、23 个和 29 个。

**2.2.5 转录因子分析** C1vsD1、C2vsD2、C1vsC2 和 D1vsD2 四个比较组中, 分别有 15 个、156 个、67 个和 158 个显著差异表达转录因子 (图 7a)。在 C1vsD1 比较组中, 有 2 个上调转录因子和 13 个下调转录因子。在 C2vsD2 比较组中, 有 44 个上调转录因子和 112 个下调转录因子。在 C1vsC2 比较组中, 有 24 个上调转录因子和 43 个下调转录因子。在 D1vsD2 比较组中, 有 40 个上调转录因子和 118 个下调转录因子。本研究共富集到 42 个来自 WRKY 和 bHLH 家族的显著差异表达转录因子 (表 2)。从 4 个比较组的总体趋势来看, LOC110720931 (WRKY6)、LOC110731563 (WRKY54)、LOC110735049 (WRKY4) 和 LOC110719592 (WRKY56) 下调表达, LOC110725693 (SPCH)、LOC110681689 (HEC3)、LOC110706295 (bHLH25) 和 LOC110717813 上调表达。



GO:0044238 为初级代谢过程;GO:0005991 为海藻糖代谢过程;GO:0005982 为淀粉代谢过程;GO:0035251 为 UDP-葡萄糖基转移酶活性;GO:0016772 为转移酶活性转移含磷基团。基因用基因 ID 表示,基因的颜色表示不同的比较组

BP: Biological process;MF: Molecular function;GO: 0044238;Primary metabolic process; GO: 0005991;Trehalose metabolic process; GO: 0005982; Starch metabolic process;GO:0035251; UDP-glucosyltransferase activity; GO:0016772; Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups. Genes are indicated by gene ID, the colors of genes indicate different comparison groups

图5 糖代谢差异表达基因 GO 富集分析弦图

Fig.5 Chord diagram of enrichment analysis of GO differentially expressed genes in glycometabolism of quinoa

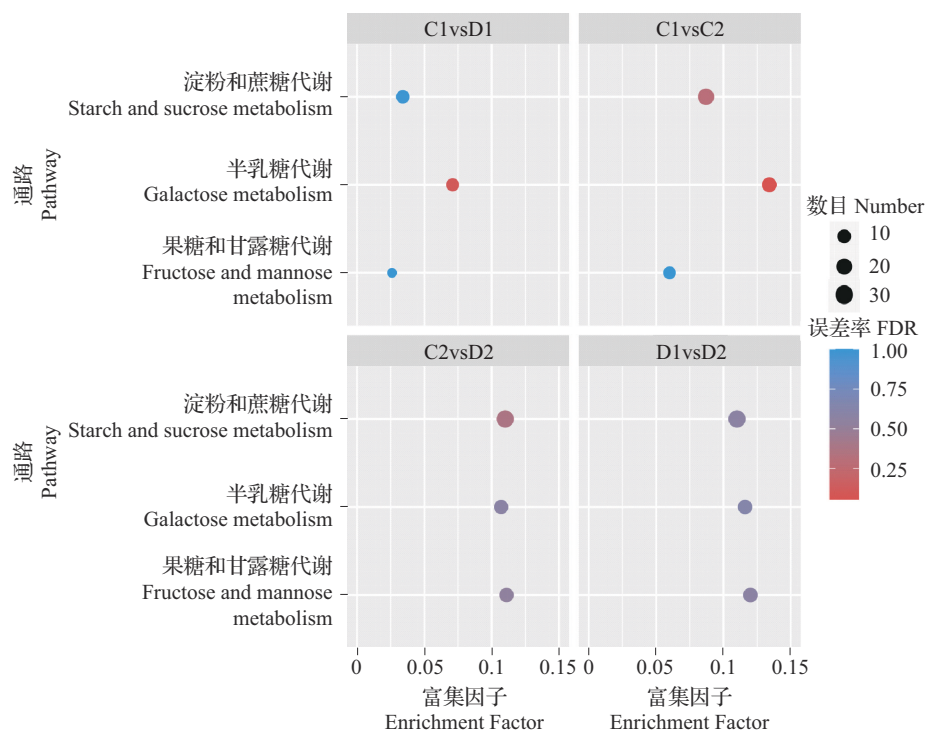


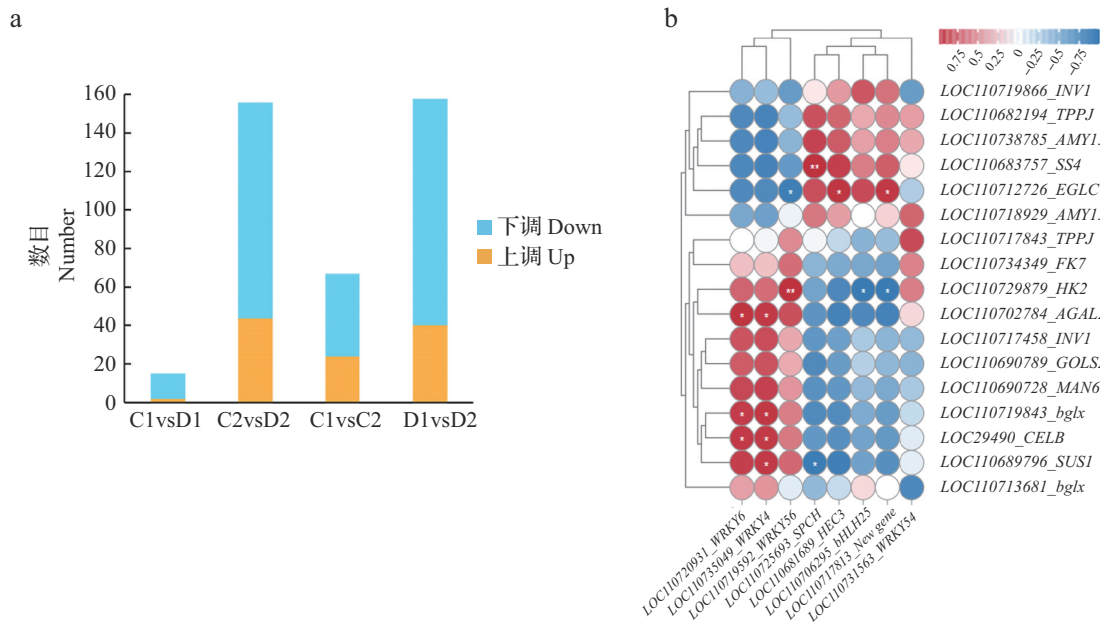
图6 关键差异表达基因 KEGG 富集分析气泡图

Fig.6 KEGG enrichment analysis of the key differentially expressed genes



利用皮尔逊系数法测定关键差异表达基因与转录因子间的相关性,对GO富集到的来自淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢与果糖和甘露糖代谢3条代谢途径中的17个关键差异表达基因与8个转录因子间进行相关性分析(图7b)。*LOC110683757\_SS4*与*LOC110725693\_SPCH*呈极显著正相关。*LOC110712726\_EGLC*与*LOC110681689\_HEC3*、*LOC110717813*呈显著正相关,与*LOC110719592\_WRKY56*呈显著负相关。*LOC110729879\_HXK2*与

*LOC110719592\_WRKY56*呈极显著正相关,与*LOC110706295\_bHLH25*、*LOC110717813*呈显著负相关。*LOC110720931\_WRKY6*和*LOC110735049\_WRKY4*两个转录因子基因与*LOC110702784\_AGAL2*、*LOC110719843\_bglx*和*LOC29490\_CELB*之间均呈显著正相关。*LOC110689796\_SUS1*与*LOC110735049\_WRKY4*呈显著正相关,与*LOC110725693\_SPCH*呈显著负相关。



a: 显著差异表达转录因子统计分析; b: 转录因子家族基因与差异表达基因之间的皮尔逊相关系数热图  
a: Statistical analysis of significant differential expression TFs; b: Heatmap of pearson correlation coefficient between TF family genes and differentially expressed genes

图7 转录因子的统计分析以及与差异表达基因间相关性热图

Fig.7 Statistical analysis of transcription factors and correlation with differentially expressed genes

表2 转录因子在各样品中的 FPKM 值

Table 2 FPKM values of transcription factors in each sample

转录因子 TFs	名称 Name	基因名称 Gene ID	C1	C2	D1	D2
WRKY	WRKY72	LOC110690435	2.2600	2.6533	1.8327	1.1000
	WRKY50	LOC110710397	0.2233	0.7600	0.3827	0.0367
	WRKY22	LOC110719591	0.2933	1.0767	0.3220	0.3000
	WRKY6	LOC110720931	2.5133	1.3167	1.4620	0.3033
	WRKY41	LOC110725171	1.5033	2.1000	1.0447	0.7967
	WRKY54	LOC110731563	0.7067	0.1600	0.8513	0.7333
	WRKY40	LOC110733669	0.9433	1.4167	0.8840	0.4933
	WRKY4	LOC110735049	3.3033	2.2067	2.2460	0.9300
	WRKY40	LOC110739966	11.6133	15.0233	9.4033	6.7400
	WRKY28	LOC110690337	1.3433	0.4067	1.2300	0.3000

表 2 ( 续 )

转录因子 TFs	名称 Name	基因名称 Gene ID	C1	C2	D1	D2
bHLH	<i>WRKY13</i>	<i>LOC110682067</i>	1.0533	1.0600	1.2967	0.6900
	<i>WRKY56</i>	<i>LOC110719592</i>	0.2667	0.0167	0.2327	0.0000
	<i>WRKY48</i>	<i>LOC110733008</i>	4.3733	4.2300	3.4187	1.3967
	<i>BHLH55</i>	<i>LOC110697415</i>	0.3467	0.0733	0.1060	0.0000
	<i>BHLH137</i>	<i>LOC110683995</i>	1.6300	1.0067	0.9753	0.1700
	<i>FIT</i>	<i>LOC110691768</i>	1.4200	4.0433	1.5527	1.6900
	<i>BHLH90</i>	<i>LOC110694167</i>	0.7633	0.4933	0.7153	1.0100
	<i>BHLH55</i>	<i>LOC110697152</i>	0.9700	0.4200	0.6000	0.0633
	<i>BHLH120</i>	<i>LOC110697154</i>	6.9833	2.7600	4.5547	0.9467
	<i>BHLH125</i>	<i>LOC110702384</i>	4.1000	3.5133	4.3767	0.8033
	<i>BEE3</i>	<i>LOC110702898</i>	2.9667	2.4333	1.9960	0.2333
	<i>BHLH25</i>	<i>LOC110706296</i>	3.5667	8.4367	3.5087	2.2800
	<i>BHLH120</i>	<i>LOC110719265</i>	3.7867	2.5800	3.3833	1.0767
	<i>BHLH85</i>	<i>LOC110724362</i>	2.0133	1.1467	1.3160	0.2100
	<i>BHLH85</i>	<i>LOC110724364</i>	3.1833	1.8533	1.9793	0.5667
	<i>SPCH</i>	<i>LOC110725693</i>	0.1633	0.2367	0.1700	0.7100
	<i>PIL15</i>	<i>LOC110726386</i>	1.2700	0.9000	1.0480	0.2533
	<i>BHLH126</i>	<i>LOC110729752</i>	2.1200	1.0800	1.0120	0.1533
	<i>BHLH14</i>	<i>LOC110731636</i>	1.4333	1.4267	1.5720	0.3967
	<i>BHLH14</i>	<i>LOC110732803</i>	0.5367	0.9700	0.8633	0.3167
	<i>HEC3</i>	<i>LOC110681689</i>	0.7700	1.9067	1.1153	2.9433
	<i>BHLH25</i>	<i>LOC110706295</i>	2.5867	5.9600	3.4893	5.6233
	<i>BHLH137</i>	<i>LOC110709935</i>	1.1000	0.2500	0.5920	0.1967
	<i>BHLH106</i>	<i>LOC110710653</i>	1.6967	0.5733	0.9580	0.4800
	<i>BHLH14</i>	<i>LOC110714364</i>	0.3767	0.0700	0.1993	0.0200
	<i>FAMA</i>	<i>LOC110716316</i>	0.6600	0.2367	0.3693	0.0733
	–	<i>LOC110717813</i>	2.6467	5.5333	3.3500	6.1567
	<i>BHLH84</i>	<i>LOC110692226</i>	0.5800	0.2500	0.4600	0.0500
	<i>HEC3</i>	<i>LOC110695361</i>	1.2833	1.8200	1.5087	3.3800
	<i>PRE4</i>	<i>LOC110700562</i>	12.6000	11.0400	16.0880	9.1067
	<i>UNE10</i>	<i>LOC110700658</i>	0.7333	0.6800	0.7747	0.3333
	<i>BEE3</i>	<i>LOC110724202</i>	5.0800	4.5400	3.9040	0.8533

– 表示转录因子的名称未知

– indicates that the name of the transcription factor is unknown

### 2.3 qRT-PCR 验证

为了验证测序结果的可靠性,筛选不同代谢通路中 10 个糖代谢相关的差异表达基因进行荧光定量 PCR 验证,验证结果如图 8。结果表明,C1vsD1 比较组有 5 个基因(*LOC110719866\_INV1*、

*LOC110717843\_TPPJ*、*LOC29490\_CELB*、*LOC110690728\_MAN6*、*LOC110734349\_FK7*) 得到验证。C2vsD2 比较组有 7 个基因(*LOC110702784\_AGAL2*、*LOC110719866\_INV1*、*LOC110717843\_TPPJ*、*LOC29490\_CELB*、*LOC110719843\_bg1x*、*LOC11068*

9796\_SUS1、LOC110690728\_MAN6) 得到验证。C1vsC2 比较组有 6 个基因(LOC110702784\_AGAL2、LOC110719866\_INV1、LOC110717843\_TPPJ、LOC110729879\_HK2、LOC110712726\_EGLC、LOC110734349\_FK7)得到验证。D1vsD2 比较组有 7 个基因(LOC110702784\_AGAL2、LOC110729879\_HK

2、LOC110712726\_EGLC、LOC29490\_CELB、LOC110689796\_SUS1、LOC110690728\_MAN6、LOC110734349\_FK7)得到验证。10 个关键候选差异表达基因在四个比较组中 qRT-PCR 表达趋势和转录组检测结果差异倍数相近,从而得出转录组数据可靠。

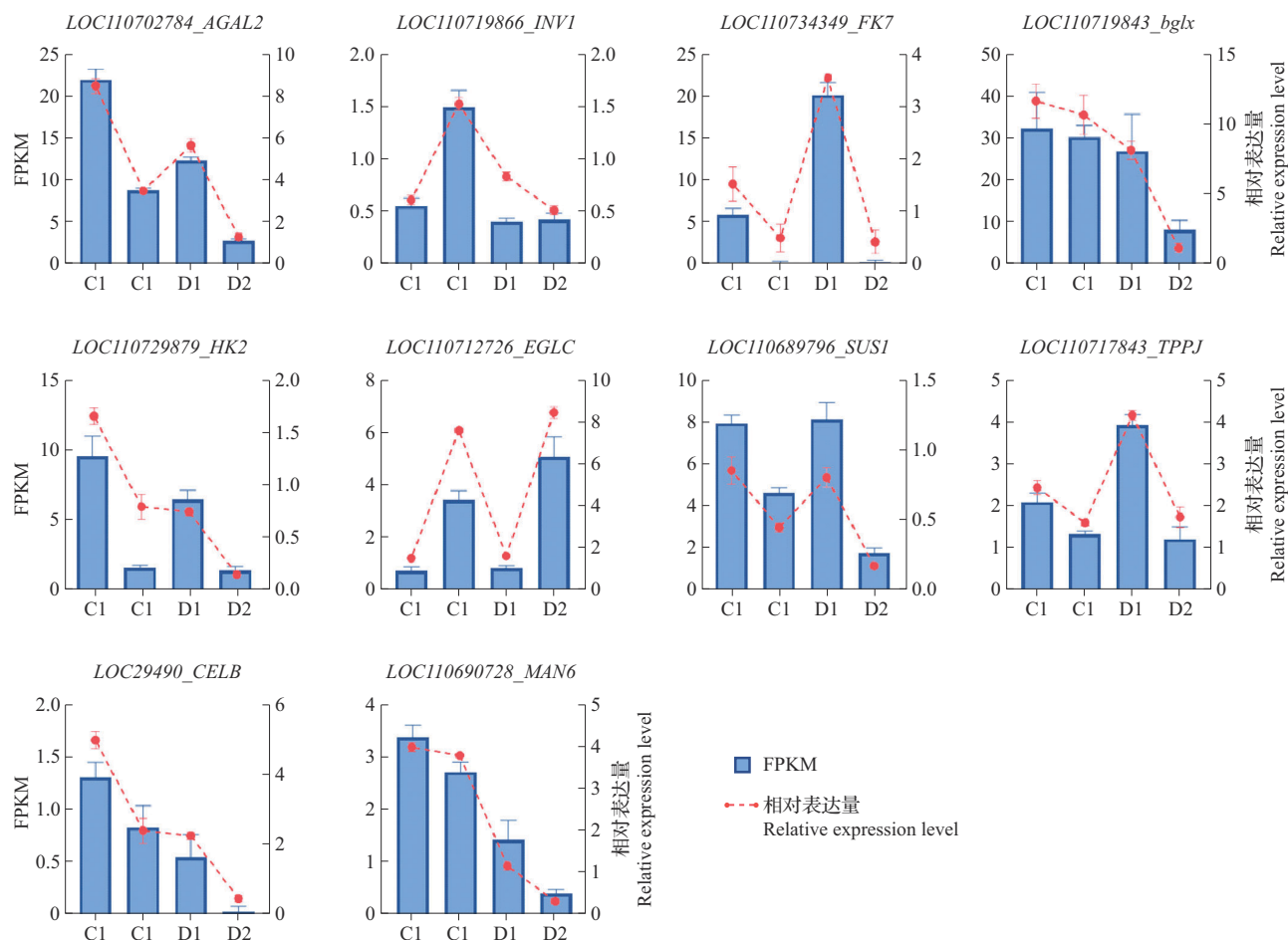


图8 10个关键基因的 qRT-PCR 验证

Fig. 8 The qRT-PCR detection of 10 key differentially expressed genes

### 3 讨论

藜麦不仅具有很高的营养价值,同时具有耐非生物胁迫的独特优势<sup>[31]</sup>。在正常水处理 24 h 条件下 M059 的可溶性总糖、蔗糖、葡萄糖和果糖含量较 M024 分别高 18.58%、97.84%、70.54% 和 32.77%。M024 比 M059 存在更多下调基因, M059 的可溶性总糖、蔗糖、葡萄糖和果糖含量高于 M024, 推测是正常水处理 24 h 条件下 M059 藜麦种子胚根生长速度快的主要原因。利用 RNA 测序对燕麦 (*Avena sativa* L.) 幼苗进行干旱胁迫和复水的响应研究发现, 燕麦有 1065 个基因对于干旱胁迫有显著响应, 其中 386 个上调, 679 个下调, 下调基因的数量多于上

调基因<sup>[32]</sup>。幼苗生长势与蔗糖和 D-葡萄糖的积累表现一致<sup>[33]</sup>。在本研究中, 利用转录组学分析藜麦种子糖代谢的分子调控机制, 干旱胁迫下藜麦种子胚根长度的差异主要受 *CqAGAL2*、*CqTPPJ*、*CqINV*、*CqFK7* 等基因的调控。

#### 3.1 干旱处理对藜麦种子糖含量的影响

干旱胁迫通常导致植物水分状况不平衡<sup>[34]</sup>。植物可以通过渗透调节物质的有效积累来增强其抗逆性, 维持细胞的渗透潜能<sup>[35]</sup>。在种子萌发过程中, 储存的有机物(淀粉、脂肪等)转化为可溶性糖<sup>[36]</sup>。在拟南芥对于干旱胁迫的渗透调节中, 水溶性糖的贡献比脯氨酸大<sup>[36]</sup>。在本研究中, 干旱处理后 M059 和 M024 的可溶性总糖含量升高, 在玉米<sup>[37]</sup>和



油菜籽<sup>[38]</sup>等作物中也存在相同的报道。干旱处理下 M024 的蔗糖含量高于 M059, 而 M059 的葡萄糖含量高于 M024, 果糖含量差异不显著。M059 和 M024 在干旱处理下胚根的长度差异是由于渗透保护剂含量不同所致, 干旱胁迫会使藜麦种子中的可溶性总糖、蔗糖和葡萄糖含量显著增加, 以维持细胞的膨压。

### 3.2 转录因子分析

bHLH 转录因子在促进植物的非生物胁迫耐受性方面起作用<sup>[39]</sup>。过表达 *AtbHLH146* 的拟南芥表现出更强的耐旱性<sup>[40]</sup>。在过表达 *TaAKSI* 的小麦植株中, 脯氨酸含量显著增加, 耐旱性也有所提高<sup>[41]</sup>。在本研究中, 发现 *bHLH TF CqSPCH* 与 *CqSS4*、*CqSUS1* 之间均呈相关性。*bHLH TF CqSPCH* 与 *CqSS4* 之间存在极显著正相关, 与 *CqSUS1* 呈显著负相关。因此推测 *bHLH TF CqSPCH* 通过识别和结合 *CqSS4* 和 *CqSUS1* 的启动子区域元件, 调控上述结构基因 *CqSS4* 和 *CqSUS1* 的表达, 通过藜麦种子中淀粉的积累, 将更多的淀粉转化成葡萄糖。

WRKY 转录因子可以正向或负向调控植物防御, 调节非生物胁迫反应, 包括干旱、盐度、辐射和寒冷<sup>[42-43]</sup>。毛白杨 *PtoWRKY68* 基因等位变异与气孔导度显著关联, 在拟南芥中异源过表达 *PtoWRKY68* 基因, 提高了转基因植株的耐旱性<sup>[44]</sup>。在拟南芥中, *AtWRKY46/54/70* 通过抑制干旱诱导的基因表达, 负向调控耐旱性<sup>[45]</sup>。在本研究中, *CqWRKY56* 与 *CqEGLC* 之间存在呈显著负相关, 与 *CqHXYK2* 呈极显著正相关, 这与火龙果中蔗糖代谢基因的研究结果一致<sup>[46]</sup>。当 *CqWRKY56* 与应激诱导基因 *CqEGLC*、*CqHXYK2* 启动子中特定的顺式反应元件相互作用时, 整个信号转导级联被激活。转录因子调控机制较为复杂, 其具体的调控机制, 还需要通过过表达的转基因植株进行验证。

### 3.3 关键差异表达基因的调控

$\alpha$ -半乳糖苷酶 (AGAL,  $\alpha$ -galactosidase) 能水解棉子糖系列寡糖<sup>[47]</sup>。在玉米种子萌发初期研究,  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性与种子脱水耐性的关系, 发现 4 个玉米品种  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性均在吸胀 24 h 达到峰值, 抗旱品种的  $\alpha$ -半乳糖苷酶活性在种子吸胀萌发过程中均高于干旱敏感品种<sup>[48]</sup>。在拟南芥中过表达玉米的 *ZmAGAL* 会降低成熟种子中棉子糖和半乳糖苷的含量, 从而导致种子发芽率更高<sup>[48]</sup>。在脱水胁迫下, 花生参与棉子糖分解代谢的 *AGAL* 基因表现出整体下调的模式<sup>[49]</sup>。在本研究中, 与正常

水处理相比, 在干旱处理下, M059 中 *CqAGAL2* 没有差异表达, 而 M024 中 *CqAGAL2* 下调表达。因此推测干旱处理下 *CqAGAL2* 下调表达抑制藜麦种子的萌发。

海藻糖 (Trehalose) 是一种主要的渗透保护物质, 在植物组织中积累, 以应对非生物胁迫<sup>[50]</sup>。海藻糖 6-酸性磷酸磷酸酶 (TPP, trehalose 6-acid phosphate phosphatase) 是合成海藻糖的关键酶。*HcTPPJ* 在红麻的根、茎、叶中均有表达, 随着干旱胁迫时间的延长, *HcTPPJ* 表达显著上调<sup>[51]</sup>。干旱胁迫下玉米幼苗抗性植物比易感植物 *TPP* 表现出更快的响应, 抗性植株的 *TPP* 表达在前 2 h 出现上调, 且反应速度更快<sup>[52]</sup>。本研究中, 干旱处理下 M059 和 M024 两个材料中 *CqTPPJ* 均上调表达。*CqTPPJ* 基因参与藜麦种子干旱胁迫响应过程, *CqTPPJ* 基因在两个材料中上调表达出现的时间需要进行下一步的研究。

蔗糖转化酶 (INV, invertase) 是向植物提供碳营养的核心, 而且在糖信号传导中起着重要作用。蔗糖转化酶根据其最适 pH 值和亚细胞位置, 蔗糖转化酶可分为细胞壁亚群、细胞质亚群和液泡亚群<sup>[53]</sup>。Trouverie 等<sup>[54]</sup>研究发现玉米叶片在中度干旱胁迫下, 早期会出现 *INV* 基因表达量和酶活性上调的现象, 导致液泡中已糖积累增加, 从而提高植株渗透势和吸水能力。干旱敏感型大蒜材料各组织中 *AsINV* 表达量均出现不同程度下调表达<sup>[55]</sup>。在本研究中, 与正常水处理相比, 在干旱处理下, M024 中 *CqINV1* 下调表达, 而 M059 中 *CqINV1* 上调表达, 将蔗糖更多的水解成葡萄糖和果糖来响应干旱胁迫。

果糖激酶 (FK, fructokinase) 是蔗糖水解过程中 D-果糖形成 D-6-磷酸果糖、D-6-磷酸葡萄糖的关键调节激酶<sup>[56]</sup>。在玉米中, 短期的盐胁迫使 *FK2* 基因的表达量上调, 这可以作为盐胁迫的早期标志<sup>[57]</sup>。在向日葵中, 干旱胁迫导致 *FK* 及相关的蛋白表达共同上调, 与对照植物相比, 受到干旱胁迫的植物根芽比增加<sup>[58]</sup>。在本研究中, 与正常水处理相比, 在干旱处理下, M059 中 *CqFK7* 表达量上调, 而 M024 中 *CqFK7* 没有差异表达。推测 *CqFK7* 是藜麦种子响应干旱胁迫分子研究的候选基因, *CqFK7* 基因如何调控下游代谢物的表达是后续研究的重点。

## 4 结论

(1) 淀粉和蔗糖代谢途径 (ko00500) 中 *CqINV1*、*CqTPPJ*、*Cqbg1x*、*CqSUS1*、*CqHXYK2*、*CqCELB*、

*CqEGLC*、*CqFK7*等基因的差异表达以及半乳糖代谢(ko00052)中*CqAGAL2*、果糖和甘露糖代谢(ko00051)中*CqMAN6*的差异表达对于旱胁迫下藜麦种子糖代谢起重要作用。*CqAGAL2*基因(*LOC110702784*)、*CqTPPJ*基因(*LOC110717843*)、*CqINV*基因(*LOC110719866*)和*CqFrK*基因(*LOC110734349*)可能是干旱胁迫下控制藜麦种子胚根生长的关键结构基因。

(2)对转录组中富集到的转录因子分析表明,bHLH 转录因子 CqSPCH 和 CqWRKY56 调控某些关键结构基因共同参与干旱胁迫下藜麦种子的糖代谢。

### 参考文献

- [1] Zurita-Silva A, Fuentes F, Zamora P, Jacobsen S E, Schwember A R. Breeding quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Potential and perspectives. *Molecular Breeding*, 2014, 34(1):13-30
- [2] Yao Y, Yang X, Shi Z, Ren G. Anti-inflammatory activity of saponins from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages cells. *Journal of Food Science*, 2014, 79(5): 1018-1023
- [3] Vega-Gálvez A, Miranda M, Vergara J, Uribe E, Puente L, Martínez E A. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: A review. *Journal of Agricultural and Food Sciences*, 2010, 90(15):2541-2547
- [4] Ruiz K B, Biondi S, Osés R, Acuña-Rodríguez I S, Antognoni F, MartínezMosqueira E A. Quinoa biodiversity and sustainability for food security under climate change: A review. *Agronomy Sustain*, 2014, 34: 349-359
- [5] Fang Y J, Xiong L Z. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell Molecular Life Science*, 2015, 72(4): 673-689
- [6] Xu Z, Zhou G, Shimizu H. Plant responses to drought and rewatering. *Plant Signaling Behavior*, 2010, 5(6):649-654
- [7] Ozturk M, Turkyilmaz Unal B, García-Caparrós P, Khurshed A, Gul A, Hasanuzzaman M. Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Plant Physiology*, 2021, 172(2): 1321-1335
- [8] 周倩. 基于RNA-Seq解析非结构性糖代谢途径在小桐子幼苗对于旱胁迫响应与适应中的作用. 昆明: 云南师范大学, 2019  
Zhou Q. The role of non-structural glucose metabolism pathway in response and adaptation to drought stress in *Jatropha* seedlings based on RNA-Seq. Kunming: Yunnan Normal University, 2019
- [9] Subbarao G V, Nam N H, Chauhan Y S, Johansen C. Osmotic adjustment, water relations and carbohydrate remobilization in pigeonpea under water deficits. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 157(6): 651-659
- [10] Rosa M, Prado C, Podazza G, Interdonato R, González J A, Hilal M, Prado F E. Soluble sugars-metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant Signaling Behavior*, 2009, 4(5): 388-393
- [11] Mathan J, Singh A, Ranjan A. Sucrose transport in response to drought and salt stress involves ABA-mediated induction of *OsSWEET13* and *OsSWEET15* in rice. *Plant Physiology*, 2021, 171(4): 620-637
- [12] Li H, Tiwari M, Tang Y, Wang L, Yang S, Long H, Guo J, Wang Y, Wang H, Yang Q, Jagadish S V K, Shao R. Metabolomic and transcriptomic analyses reveal that sucrose synthase regulates maize pollen viability under heat and drought stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 246:114191
- [13] Cheng L, Jin J, He X, Luo Z, Wang Z, Yang J, Xu X. Genome-wide identification and analysis of the invertase gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum*) reveals *NtNIN10* participating the sugar metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1164296
- [14] Chen Y, Zhang Q, Hu W, Zhang X, Wang L, Hua X, Yu Q, Ming R, Zhang J. Evolution and expression of the fructokinase gene family in *Saccharum*. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 197
- [15] Daldoul S, Amar A B, Gargouri M, Limam H, Mliki A, Wetzel T. A grapevine-Inducible gene *Vv-α-gal/SIP* confers salt and desiccation tolerance in *Escherichia coli* and tobacco at germinative stage. *Biochemical Genetics*, 2018, 56(1-2): 78-92
- [16] Zhao T Y, Corum III J W, Mullen J, Meeley R B, Helentjaris T, Martin D, Downie B. An alkaline α-galactosidase transcript is present in maize seeds and cultured embryo cells, and accumulates during stress. *Seed Science Research*, 2006, 16(2): 107-121
- [17] 陆慢. 黄爪低温胁迫与恢复过程中水苏糖合成酶与α-半乳糖苷酶在RFOs代谢中的作用. 扬州: 扬州大学, 2019  
Lu M. Roles of hydrothreose synthetase and α-galactosidase in RFOs metabolism in cucumber during low temperature stress and recovery. Yangzhou: Yangzhou University, 2019
- [18] Wang W, Cui H, Xiao X, Wu B, Sun J, Zhang Y, Yang Q, Zhao Y, Liu G, Qin T. Genome-Wide identification of cotton (*Gossypium spp.*) trehalose-6-Phosphate Phosphatase (TPP) gene family members and the role of GhTPP22 in the response to drought stress. *Plants*: Basel, 2022, 11(8): 1079
- [19] 叶煜. 水稻已糖激酶HXX9基因敲除对水稻种子萌发相关的生理机制研究. 杭州: 浙江大学, 2021  
Ye Y. Physiological mechanism of *HXX9* gene knockout on rice seed germination. Hangzhou: Zhejiang University, 2021
- [20] Wang W, Zhang C, Zheng W, Lv H, Li J, Liang B. Seed priming with protein hydrolysate promotes seed germination via reserve mobilization, osmolyte accumulation and antioxidant systems under peg-induced drought stress. *Plant*

- Cell Reports, 2022, 41(11): 2173-2186
- [21] 姚艳丽, 吴严, 李明伟, 付琼, 刘胜辉, 朱祝英, 张秀梅. 水心病菠萝果肉组织石蜡切片显微观察与分析. 热带作物学报, 2023, 44(12): 2514-2519  
Yao Y L, Wu Y, Li M W, Fu Q, Liu S H, Zhu Z Y, Zhang X M. Observation and microscopic analysis of paraffin section of pineapple pulp in water heart disease. Journal of Tropical Crops, 2023, 44(12): 2514-2519
- [22] 张友杰. 以蒽酮分光光度计法测定果蔬中的葡萄糖、果糖、蔗糖和淀粉. 分析化学, 1976, 5(3): 167-171  
Zhang Y J. Glucose, fructose, sucrose and starch in fruits and vegetables were determined by anthrone spectrophotometer. Analytical Chemistry, 1976, 5(3): 167-171
- [23] 王学奎. 植物生理生化试验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2006: 202-204  
Wang X K. Principles and techniques of plant physiological and biochemical tests. Beijing: Higher Education Press, 2006: 202-204
- [24] Rio D C, Ares M J, Hannon G J, Nilsen T W. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harbor Protocols, 2010, (6): 5439
- [25] Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics, 2018, 34(17): 1884-1890
- [26] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. Nature Methods, 2015, 12(4): 357-360
- [27] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. EdgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139-140
- [28] Florea L, Song L, Salzberg S L. Thousands of exon skipping events differentiate among splicing patterns in sixteen human tissues. F1000Research, 2013, 2: 188
- [29] 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
- [30] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [31] 刘文瑜, 杨发荣, 谢志军, 王旺田, 黄杰, 魏玉明, 杨钊. 不同品种藜麦幼苗对干旱胁迫的生理响应及耐旱性评价. 干旱地区农业研究, 2021, 39(6): 10-18  
Liu W Y, Yang F R, Xie Z J, Wang W T, Huang J, Wei Y M, Yang Z. Physiological response and drought tolerance evaluation of different varieties of quinoa seedlings to drought stress. Agricultural Research in the Dry Areas, 2021, 39(6): 10-18
- [32] Zhang D, Cheng Y, Lu Z, Wang J, Ye X, Zhang X, Luo X, Wang H, Zhang B. Global insights to drought stress perturbed genes in oat (*Avena sativa* L.) seedlings using RNA sequencing. Plant Signaling Behavior, 2021, 16(2): 1845934
- [33] Li C, Wan Y, Shang X, Fang S. Integration of transcriptomic and metabolomic analysis unveils the response mechanism of sugar metabolism in *Cyclocarya paliurus* seedlings subjected to PEG-induced drought stress. Plant Physiology Biochemistry, 2023, 201: 107856
- [34] Shan C, Wang Y. Exogenous salicylic acid-induced nitric oxide regulates leaf water condition through root osmoregulation of maize seedlings under drought stress. Brazilian Journal of Botany, 2017, 40: 591-597
- [35] Jang J H, Shang Y, Kang H K, Kim S Y, Kim B H, Nam K H. Arabidopsis galactinol synthase 1 (AtGOLS1) negatively regulates seed germination. Plant Science, 2018, 267: 94-101
- [36] Gurrieri L, Merico M, Trost P, Forlani G, Sparla F. Impact of drought on soluble sugars and free proline content in selected arabidopsis mutants. Biology: Basel, 2020, 9(11): 367
- [37] Jiang F, Lv S, Zhang Z, Chen Q, Mai J, Wan X, Liu P. Integrated metabolomics and transcriptomics analysis during seed germination of waxy corn under low temperature stress. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 190
- [38] Channaoui S, El Kahkahi R, Charafifi J, Mazouz H E, Fechtali M, Nabloussi A. Germination and seedling growth of a set of rapeseed (*Brassica napus*) varieties under drought stress conditions. International Journal Environment Agricultural Biotechnol, 2017, 2: 487-494
- [39] Sun X, Wang Y, Sui N. Transcriptional regulation of bHLH during plant response to stress. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018, 503(2): 397-401.
- [40] 贾雨彤. 拟南芥转录因子 bHLH146 的功能研究. 长春: 吉林大学, 2022  
Jia Y T. Functional study of Arabidopsis transcription factor bHLH146. Changchun: Jilin University, 2022
- [41] Du L, Huang X, Ding L, Wang Z, Tang D, Chen B, Ao L, Liu Y, Kang Z, Mao H. *TaERF87* and *TaAKSI* synergistically regulate *TaP5CS1/TaP5CRI*-mediated proline biosynthesis to enhance drought tolerance in wheat. New Phytologist, 2023, 237(1): 232-250
- [42] Pandey S P, Somssich I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. Plant Physiology, 2009, 150(4): 1648-1655
- [43] Banerjee A, Roychoudhury A. WRKY proteins: Signaling and regulation of expression during abiotic stress responses. Scientific World Journal, 2015, 2015: 807560
- [44] Fang Y, Wang D, Xiao L, Quan M, Qi W, Song F, Zhou J, Liu X, Qin S, Du Q, Liu Q, El-Kassaby Y A, Zhang D. Allelic variation in transcription factor PtoWRKY68 contributes to drought tolerance in Populus. Plant Physiology, 2023, 193(1): 736-755
- [45] Chen J, Nolan T M, Ye H, Zhang M, Tong H, Xin P, Chu J, Chu C, Li Z, Yin Y. Arabidopsis WRKY46, WRKY54, and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses. Plant Cell, 2017, 29(6): 1425-1439



- [46] Wei W, Cheng M N, Ba L J, Zeng R X, Luo D L, Qin Y H, Liu Z L, Kuang J F, Lu W J, Chen J Y. *Pitaya HpWRKY3* is associated with fruit sugar accumulation by transcriptionally modulating sucrose metabolic genes *HpINV2* and *HpSuSy1*. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20 (8): 1890
- [47] 陈博文. 香菇中 $\alpha$ -半乳糖苷酶的研究. 晋中: 山西农业大学, 2019  
Chen B W. Study on  $\alpha$ -galactosidase in mushroom. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2019
- [48] 张丁方, 关涛, 严俊, 韩庆辉. 玉米种子萌发初期碱性 $\alpha$ -半乳糖苷酶活性与种子脱水耐性的关系. 西北农业学报, 2013, 22(9): 48-54  
Zhang D F, Guan T, Yan J, Han Q H. Relationship between alkaline  $\alpha$ -galactosidase activity and seed dehydration tolerance in early germination of maize seeds. Journal of Northwest Agricultural Sciences, 2013, 22(9): 48-54
- [49] Vinson C C, Mota A P Z, Porto B N, Oliveira T N, Sampaio I, Lacerda A L, Danchin E G J, Guimaraes P M, Williams T C R, Brasileiro A C M. Characterization of raffinose metabolism genes uncovers a wild *Arachis* galactinol synthase conferring tolerance to abiotic stresses. Science Report, 2020, 10(1):15258
- [50] MacIntyre A M, Meline V, Gorman Z, Augustine S P, Dye C J, Hamilton C D, Iyer-Pascuzzi A S, Kolomiets M V, McCulloh K A, Allen C. Trehalose increases tomato drought tolerance, induces defenses, and increases resistance to bacterial wilt disease. PLoS ONE, 2022, 17(4):10266254
- [51] 李辉, 李德芳, 邓勇, 潘根, 陈安国, 赵立宁, 唐慧娟. 红麻海藻糖生物合成关键酶基因 *HcTPPJ* 的克隆及响应逆境的表达分析. 作物学报, 2020, 46(12): 1914-1922  
Li H, Li D F, Deng Y, Pan G, Chen A G, Zhao L N, Tang H J. Cloning of *HcTPPJ*, a key enzyme in trehalose biosynthesis of kenaf, and analysis of its expression in response to stress. Acta Agronomica Sinica, 2019, 46(12): 1914-1922
- [52] Acosta P P, Camacho Z B D, Espinoza S E A, Gutiérrez S G, Zavala G F, Abraham J M J, Sinagawa G S R. Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase genes and analysis of its differential expression in Maize (*Zea mays*) Seedlings under Drought Stress. Plants: Basel, 2020, 9(3): 315
- [53] Dahro B, Wang F, Peng T, Liu J H. PtrA/NINV, an alkaline/neutral invertase gene of *Poncirus trifoliata*, confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses by modulating ROS levels and maintaining photosynthetic efficiency. BMC Plant Biology, 2016, 16: 76
- [54] Trouverie J, Chateau J S, Thévenot C, Jacquemot M P, Prioul J L. Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. Planta, 2004, 219(5): 894-905
- [55] 铁原毓, 田洁. 大蒜蔗糖转化酶基因 *AsINV* 的克隆及其响应低温和干旱胁迫的表达分析. 植物生理学报, 2021, 57(12): 2258-2270  
Tie Y Y, Tian J. Cloning and expression analysis of garlic sucrose invertase gene *AsINV* in response to low temperature and drought stress. Chinese Journal of Plant Physiology, 2017, 57(12): 2258-2270
- [56] Chen Y, Zhang Q, Hu W, Zhang X, Wang L, Hua X, Yu Q, Ming R, Zhang J. Evolution and expression of the fructokinase gene family in *Saccharum*. BMC Genomics, 2017, 18(1): 197
- [57] Zörb C, Schmitt S, Mühling K H. Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions. Proteomics, 2010, 10(24): 4441-4449
- [58] Fulda S, Mikkat S, Stegmann H, Horn R. Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant biology (Stuttg), 2011, 13 (4): 632-642