

低温胁迫下四倍体黄肉中华猕猴桃转录组分析

杜朝金, 李贻沛, 尹拓, 杨娜, 杨秀瑶, 张梦洁, 韩沛辰, 奚登贤, 刘小珍, 张汉尧

(西南林业大学林学院西南地区生物多样性保育国家林业与草原局重点实验室 / 云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室, 昆明 650224)

摘要: Hort16A 黄肉猕猴桃 (*Actinidia chinensis* Planch.) 的一个品种, 其营养价值高, 受到了广大消费者们的青睐, 但该品种抗冻性不强, 抗溃疡病、枝腐病能力差等原因严重影响了其推广种植。此外黄肉猕猴桃低温胁迫响应机制目前尚不清楚。本研究通过对低温胁迫的黄肉猕猴桃进行转录组分析, 为了解其相关机制以及后续进行抗寒研究提供理论参考。以前期筛选出的抗寒四倍体植株作为材料, 将低温 (0 °C) 处理 5 h 的作为试验组和常温处理的作为对照组, 取样利用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行转录组测序。比较试验组和对照组的转录组数据共发现 1630 个基因表达差异达到显著水平, 其中 619 个上调表达, 1011 个下调表达。GO 富集分析表明 1013 个差异表达基因被富集到分子功能、细胞组分和生物过程三大功能中; KEGG 富集分析表明 410 个差异基因被富集到植物激素信号转导、MAPK 植物信号通路、淀粉和蔗糖代谢等 89 个代谢通路中。初步推定 *PYL*、*PSR*、*TPS*、*GH3*、*SAUR*、*PP2C* 等 9 个基因与黄肉猕猴桃抗寒响应有关。本研究结果可为进一步研究四倍体黄肉猕猴桃低温胁迫响应机制提供理论参考。

关键词: Hort16A 黄肉猕猴桃; 四倍体; 转录组; 抗寒基因

Transcriptome Analysis of Cold-treated Tetraploid Yellow-fleshed *Actinidia chinensis* Planch.

DU Chao-jin, LI Yi-pei, YIN Tuo, YANG Na, YANG Xiu-yao, ZHANG Meng-jie, HAN Pei-chen,
XI Deng-xian, LIU Xiao-zhen, ZHANG Han-yao

(Key Laboratory of Forest Genetic Improvement and Breeding/The Key Laboratory of Biodiversity Conservation of Southwest China, National Forestry and Grassland Administration, College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224)

Abstract: Hort16A, a variety of *Actinidia chinensis* Planch., is highly popular among consumers due to its high nutritional value. However, this variety is sensitive to frost and susceptible to ulcer disease and branch rot. The response mechanism of yellow-fleshed *A. chinensis* upon cold temperature remains still unclear. In this study, transcriptome analysis of yellow-fleshed kiwifruit under low temperature stress was performed to provide theoretical references for understanding the mechanisms involved and subsequent studies on cold resistance. The cold-resistant tetraploid materials and the plants treated at low temperature (0 °C) for 5 h were used as the experimental group, and those not specially treated at room temperature were used as the control group, and the samples were taken for transcriptome sequencing using Illumina NovaSeq 6000 platform. GO enrichment analysis revealed 1013 differentially expressed genes, which were enriched into three categories: molecular function, cellular component, and biological process. KEGG enrichment analysis showed that 410 differentially expressed genes were enriched in the three main functions of plant hormone signal transduction, MAPK signaling pathway-plant, starch and sucrose metabolism, and 89 other metabolic pathways. Nine genes related to cold resistance in yellow-fleshed kiwifruit, including *PYL*, *PSR*, *TPS*, *GH3*, *SAUR*, and *PP2C*, were tentatively identified. The results of this study can provide theoretical references for further studies on the

收稿日期: 2022-08-11 修回日期: 2022-09-03 网络出版日期: 2022-09-23

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220811001>

第一作者研究方向为林业(林木遗传育种方向), E-mail: 2206019867@qq.com

通信作者: 张汉尧, 研究方向为林木和酵母遗传育种, E-mail: hanyaoz@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(32160556)

Foundation project: National Natural Science Foundation of China (32160556)

response mechanism of tetraploid yellow-fleshed kiwifruit to low temperature stress.

Key words: Hort16A yellow-fleshed kiwifruit; tetraploid; transcriptome; cold resistance genes

猕猴桃遗传资源非常丰富,全世界约有 54 个种,21 个变种,75 个分类单元,其中我国有 52 个种,73 个分类群^[1],是原产于我国南方的果树^[2]。中华猕猴桃作为我国主要栽培的猕猴桃品种之一,其栽培面积占全国猕猴桃栽培面积的 24%。其中黄肉中华猕猴桃果实营养丰富,其维生素 C 的含量比柑橘、苹果、梨等常见水果要高很多,且适合儿童、老人、青少年等大众人群,具有较高的经济和药用价值,广泛受到了消费者们的青睐。近年来黄肉中华猕猴桃栽培面积还在迅猛增长。但因为寒害等灾难性天气和溃疡病的发生严重限制了黄肉猕猴桃的生长区域,影响了其产业的发展。目前防止黄肉猕猴桃受到寒害的手段主要是选择适宜的区域种植以及在栽培方面做好防御措施^[3],但成效均不理想,都未能从根本上解决问题。想要从根本上解决这个问题就必须进行抗寒选育,因此选育抗寒黄肉猕猴桃受到了广大研究人员的关注。

多倍体植株通常具有适应能力强、抗逆性强,营养丰富等诸多优点^[4],培育多倍体黄肉猕猴桃品种是解决其抗寒问题的重要途径之一。前人的大量研究表明,多倍体诱导是培育抗逆品种的重要手段,现已经培育出草莓、葡萄、枣、苹果、樱桃、越橘、柑橘梨等多倍体植株^[5],大大提高了果树的抗性 & 果实品质。

转录组测序是通过高通量测序技术快速全面地获得某一物种特定细胞或组织在某一状态下的几乎所有的转录本及基因序列,可以用于研究基因表达量、基因功能、结构、可变剪接和新转录本预测等^[6]。目前转录组测序被大量运用于植物抗寒相关研究中,王莹^[7]通过对低温胁迫下的云雾贡茶进行转录组分析发现,低温胁迫下云雾贡茶谷胱甘肽氧化物酶(GPX, glutathione oxidase)、多酚氧化酶(PPO, polyphenol oxidase)、吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS, pyrrolin-5-carboxylic acid synthase)、赤霉素 3 β 双加氧酶(GA3OX, gibberellin 3 β -dioxygenase)和 9-顺式环氧双加氧酶(NCED, 9-cis-epoxy carotenoid)的表达水平分别与过氧化物酶(POD, peroxidase)活性、PPO 活性、脯氨酸(Pro, proline)含量、赤霉素(GA, gibberellin)含量和脱落酸(ABA, abscisic acid)含量呈极显著正相关。梁雨晨等^[8]对狭叶薰衣草叶片转录组进行分析发现,Pti5、SUGT1、

WRKY25、GI、FKF1 等基因参与响应植物低温胁迫。刘奕清^[9]对低温胁迫下两种桉树进行转录组分析发现,超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化氢(CAT, catalase)和 POD 等保护酶可清除细胞内的活性氧,与植物抗寒密切相关。

本研究拟对低温胁迫下的四倍体黄肉中华猕猴桃进行转录组分析,研究其对低温胁迫响应机理,为选育抗寒黄肉猕猴桃品种提供一定的理论基础。以前期筛选的抗寒四倍体植株作为材料,将低温(0 ℃)处理 5 h 四倍体 Hort16A 黄肉中华猕猴桃品系作为试验组和常温处理的对照组进行转录组测序分析,寻找与黄肉猕猴桃低温胁迫相关的基因和通路,为进一步研究四倍体黄肉猕猴桃低温胁迫响应机制提供理论参考,为选育抗寒猕猴桃品种打下坚实的基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

前期经过 L-羟基脯氨酸(L-Hyp)不同浓度处理后筛选出的抗寒四倍体黄肉中华猕猴桃^[10]组培苗(愈伤培养基: MS+2.5 mg/L ZT+0.3 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+4.5 g/L 琼脂;不定芽分化培养基: MS+2.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+4.5 g/L 琼脂;生根培养基: 1/2 MS+0.5 g/L IBA+100 mg/L AC+15 g/L 蔗糖+4.5 g/L 琼脂)的生根苗作为材料。该材料相对于二倍体有较强的耐寒性,经过试验得知:在 0 ℃处理 3 h 时,四倍体存活率为 88.89%,二倍体存活率为 17.78%;在 0 ℃处理 5 h 时,四倍体存活率为 80.00%,二倍体存活率为 4.44%;在 0 ℃处理 8 h 时,四倍体存活率为 42.22%,二倍体几乎完全死亡,考虑到 0 ℃处理 8 h 时四倍体存活率已经不足 50%,所以本次处理组设置为 0 ℃处理 5 h。随机抽取 6 瓶(每瓶 3 棵)生长良好的无菌生根组培苗作为取样材料,其中 3 瓶置于常温环境下,另外 3 瓶置于 0 ℃低温胁迫处理 5 h。常温环境下的 3 瓶苗作为对照组,分别编号为:C_1、C_2、C_3,低温胁迫处理的 3 瓶为处理组,编号为:T_1、T_2、T_3,分别进行取样并用锡箔纸装好并标记,迅速放置在液氮中保存,最后将 6 个样品寄到安徽微基因科技有限公司进行转录组测序。

1.2 试验方法

将测序获得的RNA-Seq数据比对到猕猴桃基因组数据库(<https://kiwifruitgenome.org/>)中华猕猴桃红阳的参考基因组上,基于比对结果,进行基因表达定量,筛选差异表达基因,并对差异基因进行Cluster差异基因聚类、GO富集和KEGG富集分析、蛋白互作分析。

1.2.1 测序数据过滤及表达分析 首先提取样品总RNA,构建cDNA文库,接着使用Illumina NovaSeq 6000平台进行测序,测序策略为PE150。对测序得到的原始数据(Raw Reads)进行质控,剔除低质量的Reads。

先采用Bowtie2(<https://zhuanlan.zhihu.com/p/91317299>)将质控后的Clean reads比对到参考基因组上,再利用RSEM(<https://cloud.tencent.com/developer/article/1677000>)对比对结果进行统计,得到的每个样品比对到每个参考基因组上的Reads数目,并计算每个基因的FPKM(Fragments Per Kilobase per Million bases),来自同一个Fragment的Paired-end Reads计数为一个Fragment,进而得到基因和转录本的表达水平。此外本研究还采用皮尔森相关系数来衡量样品之间的相关性。使用R包EdgeR进行差异表达分析。将FDR(False discovery rate) <0.05 , \log_2FC (Fold change) >1 或 $\log_2FC<-1$ 的基因定义为差异基因。

表1 过滤数据产出统计

Table 1 Clean data output statistics

样本名称 Sample name	过滤得到的总reads数目(Mb) Clean reads number	过滤得到的总碱基数目(Gb) Clean reads base	质量值大于20的碱基在 过滤数据中的占比(%) Q20	质量值大于30的碱基在 过滤数据中的占比(%) Q30	rRNA含量(%) rRNA ratio
C_1	59.86	9.13	96.85	91.58	0.06
C_2	58.98	8.99	96.94	91.76	0.03
C_3	74.14	11.29	96.91	91.57	0.03
T_1	58.22	8.87	96.6	91.04	0.03
T_2	73.76	11.25	97.17	92.07	0.03
T_3	77.45	11.79	96.98	91.74	0.06

C_1, C_2, C_3为对照组的3个重复;T_1, T_2, T_3为处理组的3个重复;下同

C_1, C_2, C_3 are the three replicates of the control group; T_1, T_2, T_3 are the three replicates of the treatment group; The same as below

2.2 表达水平分析

与参考基因组比对结果显示,常温处理的四倍体Hort16A黄肉中华猕猴桃品系对照组(C_1、C_2、C_3)过滤后的Reads比对到参考基因组的总数分别为31383274、30923792和38872286;唯一比对的Reads的比例均大于80%;低温处理的四倍体Hort16A黄肉中华猕猴桃品系(T_1、T_2、T_3)过滤后的

1.2.2 差异表达基因GO、KEGG富集分析 GO富集分析是基因功能国际标准分类体系^[11]。使用GO数据库对差异表达基因进行功能注释,选取FDR ≤ 0.05 的GO term作为显著富集的GO条目进行分析。

使用KEGG Pathway数据库对差异表达基因进行功能注释^[12],根据注释结果推测基因在通路中的作用。

1.2.3 蛋白互作分析 String蛋白质互作数据库中记录了大量物种的蛋白互作关系,本研究使用在线蛋白互作分析工具String(<http://string-db.org/>)进行蛋白互作网络的构建。

2 结果与分析

2.1 测序数据过滤结果

为了提高转录组数据分析结果的准确性,在数据分析之前对四倍体Hort16A黄肉中华猕猴桃品系6个样品经过Illumina NovaSeq 6000平台测序得到原始数据进行过滤。高质量碱基与rRNA含量是评判数据是否准确的重要指标,6个样品在Clean data中的质量值大于30的碱基在raw data中的占比均高于90%;6个样品的rRNA含量比例均低于10%(表1)。由此证明了该样品转录组测序数据质量较高,为筛选和分析相关抗寒基因的准确性提供了保障。

Read总数分别为30523275、38673701和40607956;唯一比对的Reads的比例均大于80%(表2)。从对比的结果可以看出样品的质量和数据可靠,这些是筛选抗寒相关基因的前提和保障。

根据比对结果对每个样本的所有基因进行表达定量,结果表明(表3),在FPKM ≤ 1 区间黄肉猕猴桃对照组对应的平均基因数比例为18.07%,处理组

为 20.98%; 在 $1 < \text{FPKM} \leq 15$ 区间对照组为 52.23%, 处理组为 50.51%; $15 < \text{FPKM} \leq 60$ 区间对照组为 23.01%, 处理组为 21.78%; $\text{FPKM} > 60$ 区间对照组

为 6.69%, 处理组为 6.73%。对 FPKM 数值区间进行细分, 统计各个区间基因表达量的情况, 可以了解基因表达量的高低。

表 2 参考基因组对比结果统计

Table 2 Reference genome comparison results statistics

样本 Sample	过滤数据总数目 Total reads	唯一比对的 reads 数目 Uniq-Mapped	比对到多处的 reads 数目 Multi-Mapped	不能比对的 reads 数目 UnMapped
C_1	31383274	25405716 (80.95%)	1132872 (3.61%)	4844686 (15.44%)
C_2	30923792	25285763 (81.77%)	1172135 (3.79%)	4465894 (14.44%)
C_3	38872286	31968422 (82.24%)	1491299 (3.84%)	5412565 (13.92%)
T_1	30523275	24700937 (80.92%)	1280460 (4.20%)	4541878 (14.88%)
T_2	38673701	32738604 (84.65%)	1484031 (3.84%)	4451066 (11.51%)
T_3	40607956	33527116 (82.56%)	1421886 (3.50%)	5658954 (13.94%)

括号内的数据为比对数量占总数目的百分比

The data in parentheses are the percentage of number of mapped reads of total reads

表 3 不同表达水平 FPKM 区间对应的基因数比例

Table 3 Proportion of gene numbers corresponding to different expression levels of FPKM intervals (%)

FPKM 区间 FPKM intervals	C_1	C_2	C_3	T_1	T_2	T_3
$\text{FPKM} \leq 1$	19.15	17.88	17.17	20.86	21.10	20.98
$1 < \text{FPKM} \leq 15$	51.67	52.22	52.80	50.89	50.56	50.08
$15 < \text{FPKM} \leq 60$	22.80	23.20	23.04	21.88	21.52	21.94
$\text{FPKM} > 60$	6.38	6.71	6.99	6.37	6.81	7.00

FPKM ≤ 1 时该基因未表达; $1 < \text{FPKM} \leq 15$ 时基因低丰度表达; $15 < \text{FPKM} \leq 60$ 时基因中丰度表达; $\text{FPKM} > 60$ 时基因高丰度表达

The gene was not expressed when $\text{FPKM} \leq 1$; The gene was expressed in low abundance when $1 < \text{FPKM} \leq 15$; The gene was expressed in medium abundance when $15 < \text{FPKM} \leq 60$; The gene was expressed in high abundance when $\text{FPKM} > 60$

样品间基因表达水平相关性是检验实验可靠性和样本选择是否合理的重要指标, 相关系数越接近 1, 表明样品之间表达模式的相似度越高。检测结果显示(图 1), 组内相似系数等于 1 或接近 1, 最低为 0.93, 相似度较高, 组间相关性较低, 对照组和试验组之间存在较大差异, 可能是试验组在经过低温胁迫后部分基因应激表达, 导致二者之间的相关系数降低。

2.3 差异表达基因分析

2.3.1 差异表达分析 差异表达分析结果表明四倍体 Hort16A 黄肉中华猕猴桃品系常温对照与低温处理共有 1630 条基因表达差异达到显著水平, 其中 619 条表现为上调, 1011 条下调, 下调表达的差异基因条数显著多于上调表达的差异基因条数(表 4)。通过绘制 C、T 两组样本间的 Volcano plot(火山图), 直观显示了全部基因在两组样本间的错误发现率(FDR, false discovery rate)和差异倍数(FC, fold change)值的分布情况(图 2)。再利用 Venn 图还可以看出在 3 个比较组中有 13 个差异上调基因和 7 个差异下调基因同时表达(图 3)。这些基因在低温胁迫后应激表达, 调控植物对低温进行响应, 从而提高植物的抗寒能力。

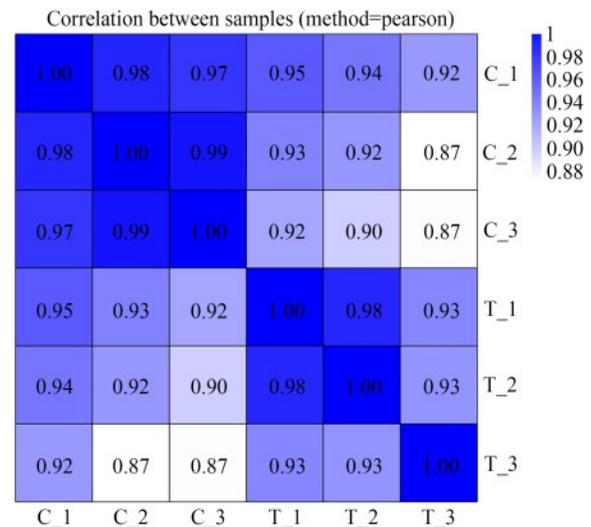


图 1 样本间基因差异表达水平相关性

Fig.1 Schematic diagram of correlation of differential gene expression levels between samples

2.3.2 差异表达基因聚类分析结果 聚类结果表明, 差异基因聚类热图分为 3 个主要类群。根据图中信息可知试验组相对于对照组在聚类 III 中部分差异基因下调表达, 包括 Acc13882、Acc32762、Acc07281 等; 部分上调表达, 包括 Acc28866、Acc25258、

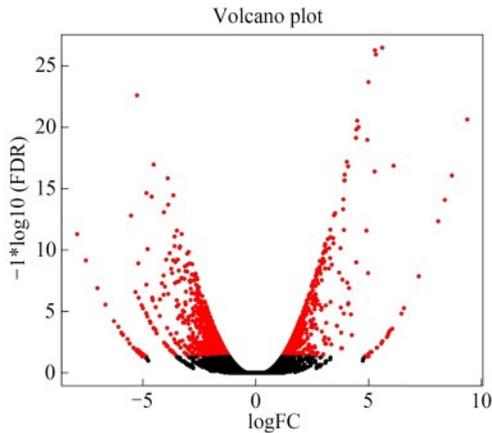
表4 所有比较组差异表达基因统计表

Table 4 Statistical group of differentially expressed genes in all comparison groups

组别 Group	总差异表达的基因数 Total	上调的差异表达的基因数 Up	下调的差异表达的基因数 Down
C-T	1630	619	1011
C_1-T_1	169	81	88
C_2-T_2	281	133	148
C_3-T_3	836	274	562

C: 对照组; T: 处理组; C-T、C_1-T_1、C_2-T_2、C_3-T_3指处理组相对于对照组差异表达比较组别信息; 下同

C-: Control group; T: Treatment group; C-T, C_1-T_1, C_2-T_2, C_3-T_3 refer to the differential expression of the treatment group relative to the control group comparative group information; The same as below

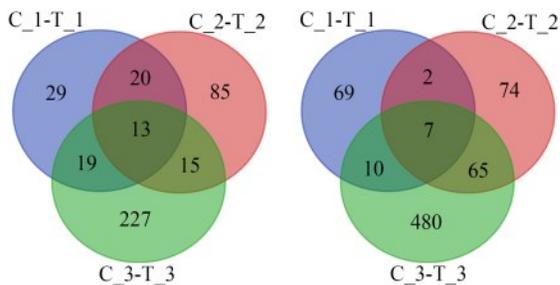


图中横坐标为差异倍数的对数值,纵坐标为FDR的负对数值。黑点指差异表达不显著的基因,红点指差异表达显著的基因,正值为上调表达,负值为下调表达

The horizontal coordinates of the graph are the logarithmic values of the differential ploidy and the vertical coordinates are the negative logarithmic values of the FDR. Black dots refer to genes with insignificant differential expression, red dots refer to genes with significant differential expression, positive values are up-regulated expression, negative values are down-regulated expression

图2 差异基因表达火山图

Fig.2 Volcano plot of differential gene expression



左图为上调基因韦恩图,右图为下调基因韦恩图,图中数字代表差异表达基因的数量

The left graph is the up-regulated gene Venn diagram, the right graph is the down-regulated gene Venn diagram, the numbers in the graph represent the number of differentially expressed genes

图3 差异表达基因韦恩图

Fig.3 Venn diagram of differentially expressed genes

Acc11316等。在聚类I中试验组相对于对照组有部分差异基因下调表达。在聚类II中,试验组与对照

组无明显表达差异。聚类III相对于聚类I、聚类II占比较大(图4),差异表达基因较多,所以接下来的抗寒相关基因的挖掘以聚类III中的差异表达基因为主。

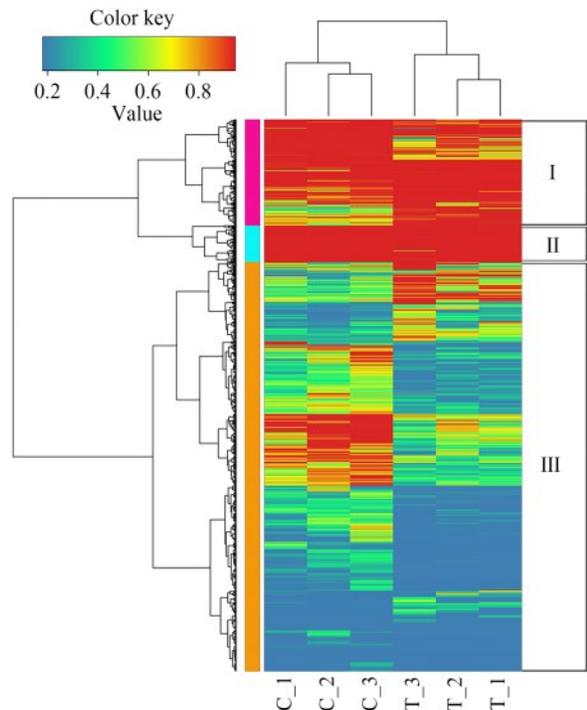


图4 基因表达量聚类图

Fig.4 Gene expression pattern clustering map

2.4 差异表达基因GO功能分类及富集分析

GO富集分析共将1013个差异表达基因富集到分子功能(Molecular function)、细胞组分(Cellular component)和生物过程(Biological process)3个大类的44个功能类别中,其中分子功能中包含10个功能类别,细胞组分包含13个功能类别,生物过程包含21个功能类别(图5)。在分子功能中GO富集到结合(Binding)功能中的差异表达基因数目最多,为520个;在生物过程功能中GO富集到代谢过程(Metabolic process)功能中的差异表达基因数目最多,为496个;在细胞组分功能中GO富

集到细胞(Cell)和细胞组分(Cell part)功能中的差异表达基因数目最多,为397个。细胞作为植物最基本的组成单位,无论是细胞膜还是细胞内物质都在植物寒害防御中起着非常重要的作用;很多代谢

通路中的基因在植物低温胁迫后被激活,并分泌代谢产物来抵抗寒害,所以细胞功能和代谢过程中差异表达基因的数目较多是猕猴桃响应寒害的正常表现。

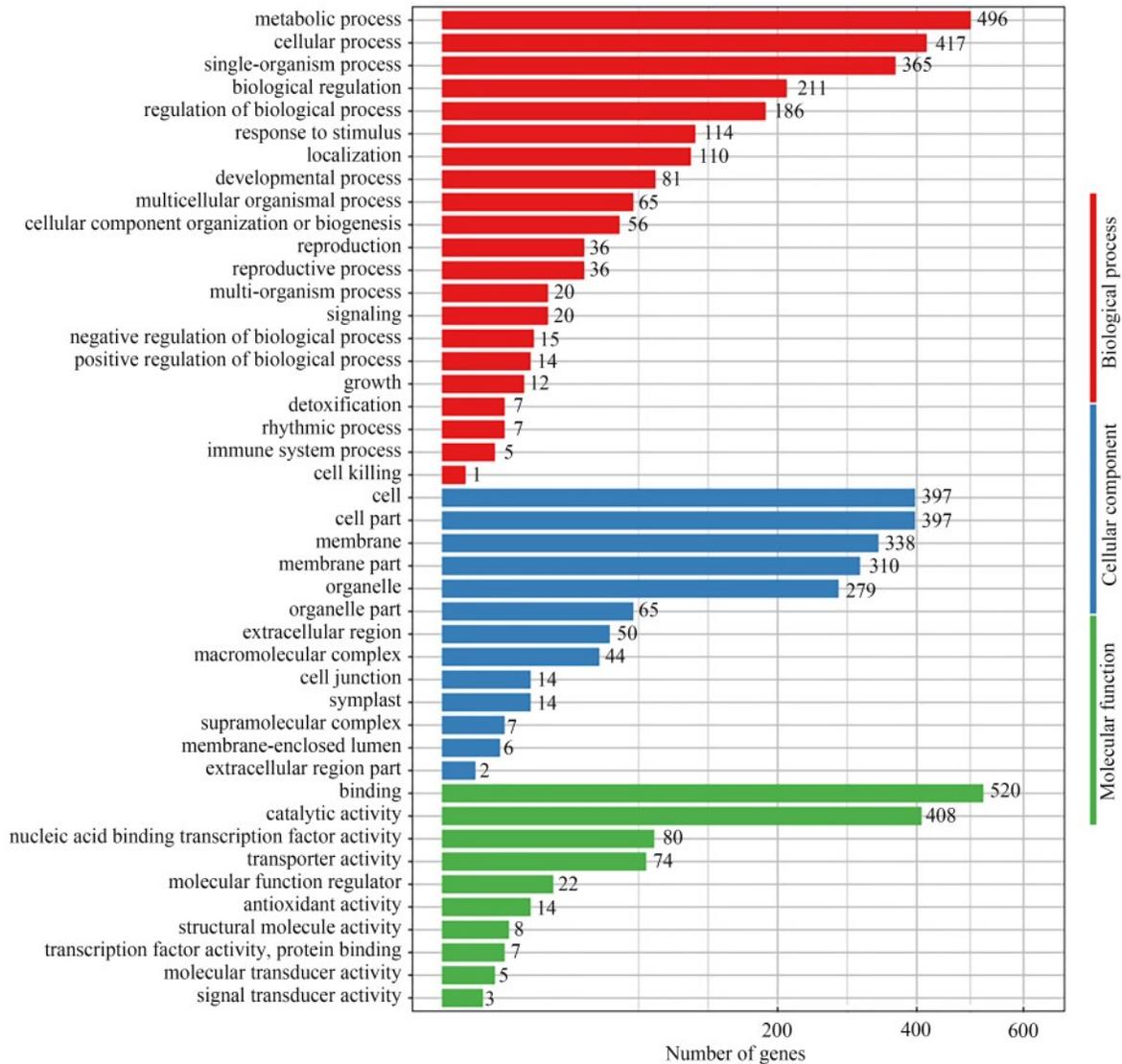


图5 差异表达基因GO分类条形图

Fig.5 Differentially expressed gene GO classification bar graph

2.5 KEGG 功能分类及富集分析

KEGG Pathway 功能分类及富集分析结果表明,差异表达基因主要被富集到:细胞过程(Cellular Processes)、环境信息处理(Environmental Information Processing)、遗传信息处理(Genetic Information Processing)、代谢(Metabolism)和有机系统(Organismal Systems)KEGG 代谢通路(图6)。

在四倍体黄肉中华猕猴桃对照组和试验组中,共有410个差异基因被显著富集到89个代谢通路上,其中植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)通路上富集到的差异基因最多(25个),

其次为苯丙烷类生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)通路(24个),碳代谢(Carbon metabolism)通路(14个),植物MAPK信号通路(MAPK signaling pathway-plant)(12个),淀粉和蔗糖代谢通路(Starch and sucrose metabolism)(8个)。前人的研究中表明植物激素信号转导通路^[13]、植物MAPK信号通路^[14]、淀粉和蔗糖代谢通路^[15]在植物抗寒中发挥着重要作用。本研究将结合前人在抗寒方面的研究,从植物激素信号转导、植物MAPK信号通路和淀粉和蔗糖代谢3个通路中筛选出猕猴桃相关抗寒基因。

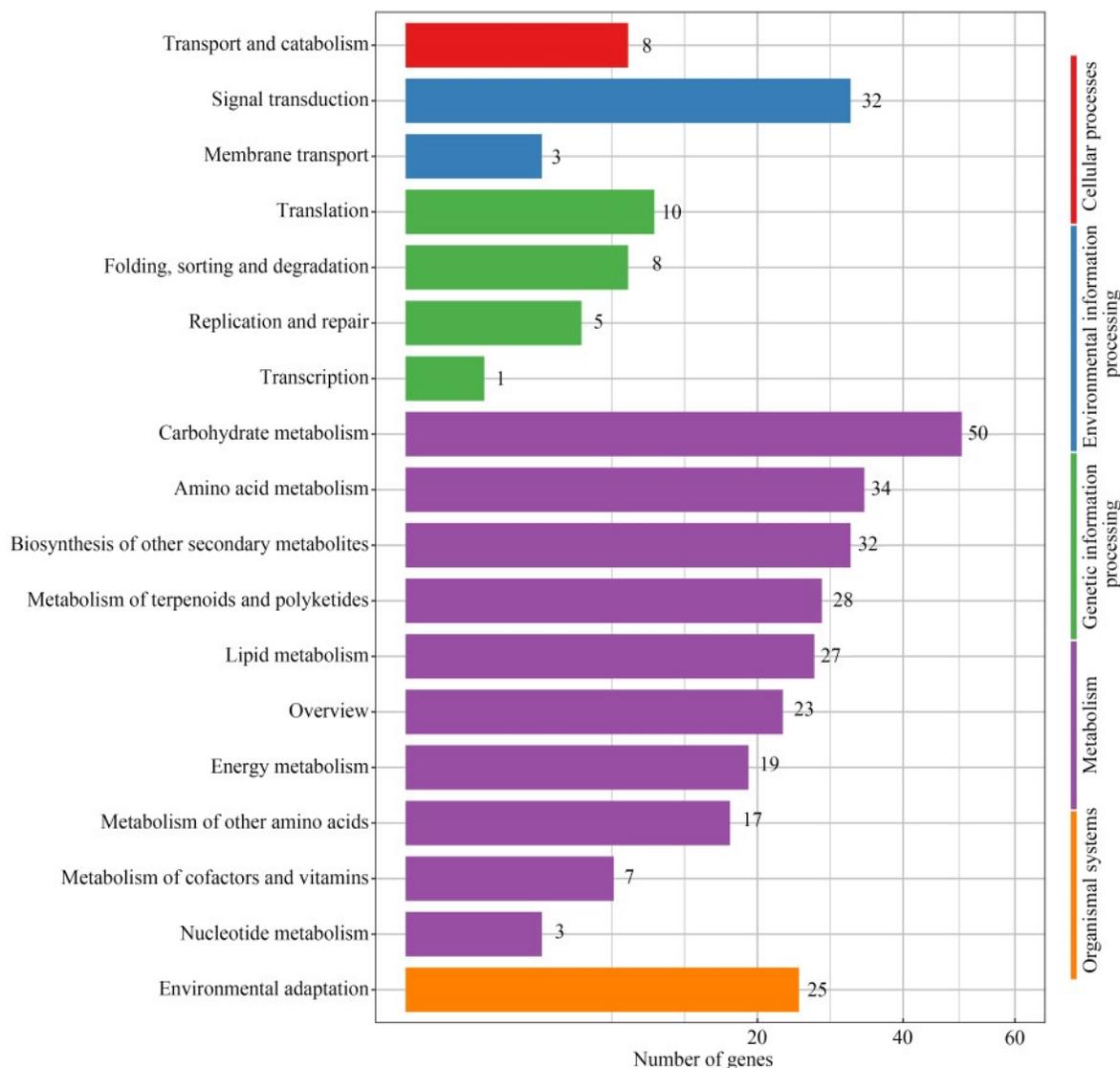


图6 差异表达基因KEGG分类条形图

Fig.6 Bar chart of KEGG classification of differentially expressed genes

本研究中富集到植物激素信号转导通路 (KO04075) 上的差异表达基因最多, 共 25 个, 其中 Acc10294 (*GH3.3*, indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.3)、Acc03316 (*PYL*, pyr1-Like)、Acc07445 (*PR1*, pathogenesis-related protein 1) 等 6 个基因上调表达; 其余 Acc28473 (*IAA*, auxin-responsive protein)、Acc03517 (*PP2C*, protein phosphatase 2C)、Acc32114 (*VITISV*, hypothetical protein VITISV) 等 19 个表现为下调。植物 MAPK 信号通路上共富集到了 12 个差异表达基因, 其中 Acc03316 (*PYL*)、Acc25019 (*RBOH*, respiratory burst oxidase homologue)、Acc24536 (*Ca²⁺-binding protein*) 等 7 个基因上调表达; Acc03517 (*PP2C*)、Acc03023 (*WRKY*, WRKY family transcription factor family protein)、Acc06865 (*Pathogenesis-related protein*) 等 5 个基因下调表达。

淀粉和蔗糖代谢通路中共有 8 个差异表达基因, 其中 Acc26744 (*TPS*, trehalose synthase gene)、Acc28966 (*PSR*, puccinia striiformis repeat)、Acc16756 (Trehalose 6-phosphate phosphatase) 等 6 个基因上调表达; Acc17108 (*Beta-glucosidase*) 和 Acc04508 (*Alpha-amylase*) 基因下调表达。

2.6 差异基因编码蛋白互作网络分析

低温是多年生植物生命周期中最易受到的非生物胁迫之一, 植物抵御低温胁迫的过程是一个涉及复杂生理及多基因共同作用协同调控的过程。在本研究中, 为了分析基因间是否存在相互协作关系来提高植物抵御低温的能力, 从富集到植物激素信号转导通路、植物 MAPK 信号通路、淀粉和蔗糖代谢 3 个通路上的基因中, 筛选出 $|\log_2(\text{FC})| > 2$ 的差异表达基因来构建蛋白互作网络图 (表 5)。

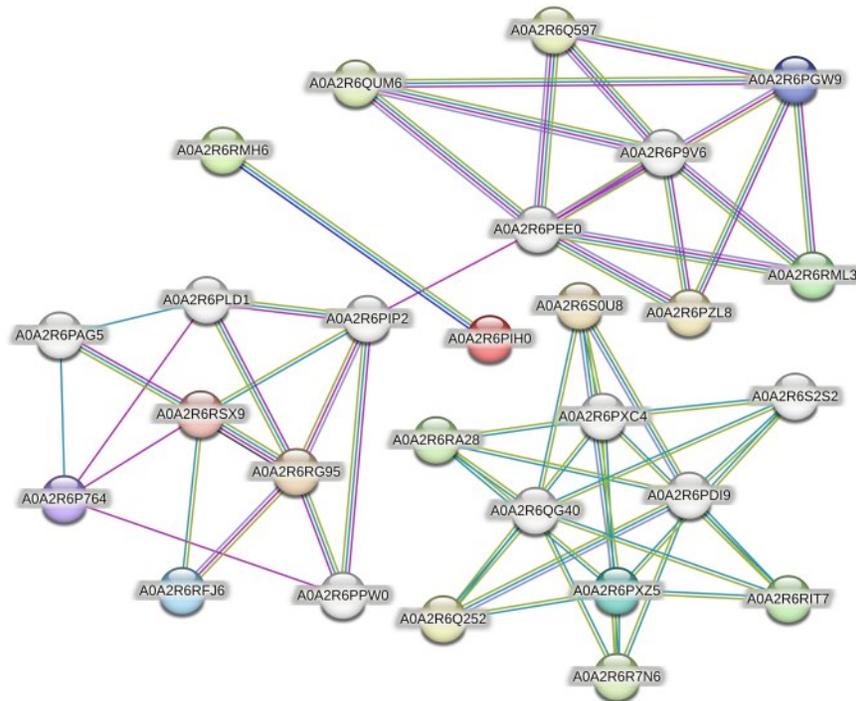
表 5 显著表达差异基因统计表

Table 5 Statistical table of significantly differentially expressed genes

基因ID GeneID	蛋白ID proteinID	基因长度 Gene length	差异倍数 log ₂ (FC)	错误发现率 FDR	表达方式 Expression	基因名 Gene name
Acc02338	A0A2R6RYT7	643	2.99165	0.031014	Up	<i>CALM</i>
Acc03316	A0A2R6RFJ6	978	2.41040	5.87E-05	Up	<i>PYL</i>
Acc03517	A0A2R6RSX9	1315	3.74278	0.014071	Down	<i>PP2C</i>
Acc04508	A0A2R6RMH6	1435	2.92270	3.20E-08	Down	<i>PSS</i>
Acc04566	A0A2R6RML8	1001	2.75594	2.10E-05	Down	<i>SAUR</i>
Acc07283	A0A2R6RBQ4	736	4.08074	1.19E-08	Down	<i>SAUR</i>
Acc07445	A0A2R6RC56	648	5.28216	5.36E-27	Up	<i>PRI</i>
Acc23775	A0A2R6Q080	1718	2.82747	1.01E-08	Down	<i>CYCD3</i>
Acc25019	A0A2R6PXZ5	3118	8.08480	4.53E-13	Up	<i>RBOH</i>
Acc26372	A0A2R6PTM6	2067	2.50992	0.039422	Down	<i>GH3</i>
Acc26744	A0A2R6PUB6	2652	3.12213	0.004341	Up	<i>TPS</i>
Acc28473	A0A2R6PGW9	851	2.79533	5.75E-05	Down	<i>IAA</i>
Acc28966	A0A2R6PIH0	1926	2.16098	9.05E-06	Up	<i>PSR</i>
Acc32114	A0A2R6P764	1035	2.16270	0.000318	Down	<i>ABF</i>

结果表明当植物受到低温胁迫时部分基因通过直接相互作用来帮助猕猴桃提高抗寒能力,如: Acc03316 (*PYL*)、Acc03517 (*PP2C*) 和 Acc32114 (*ABF*) 3 个基因联系在一起共同作用; 而 Acc26744

(*TPS*)、Acc28473 (*IAA*)、Acc07283 (*SAUR*) 等, 它们之间没有互作关系, 可能单独作用来提高猕猴桃的抗寒能力, 也可能需要其他基因才能将其联系起来共同抵御寒害来提高植物的抗寒性(图 7)。



图中圆圈不同的颜色代表不同的蛋白, 不同颜色的线条则代表两个蛋白之间的关联不同
The different colors of the circles in the diagram represent different proteins, and the different colored lines represent the different associations between two proteins

图 7 差异显著表达基因蛋白网络互作图

Fig.7 Interaction diagram of protein network of differentially significantly expressed genes

3 讨论

目前在猕猴桃果肉色泽变化、果实色素变化、果实发育、细菌性溃疡病、洪涝胁迫等多方面已经通过转录组得到了比较全面的研究^[16-17],但与抗寒相关转录组的分析少之又少。以前期筛选出的抗寒四倍体 Hort16A 黄肉中华猕猴桃品系植株作为材料,将低温(0℃)处理5h的猕猴桃植株作为试验组和常温处理的对照组进行转录组分析,为进一步研究四倍体黄肉中华猕猴桃低温胁迫响应机制提供理论参考,为选育抗寒猕猴桃品种打下坚实的基础。

前人的大量研究表明 *GH3* 基因家族^[18]、*bZIP* 转录因子家族^[19-20]以及 *SAUR* 基因家族^[21-22] 基因的表达调控可以有效提高植株的抗寒性。*GH3* 基因表达可以编码吲哚-3-乙酸-酰胺合成酶调控生长素的动态平衡进而有效提高植物的抗寒性^[23]。本研究发现属于猕猴桃 *GH3* 基因家族的 *Acc26372*、*Acc07415*、*Acc13744* 基因均下调表达,因此推测这3个基因的负调控可能在四倍体黄肉猕猴桃抗寒中发挥着重要作用;*Acc13130* 被注释为编码 *bZIP* 基因家族蛋白的基因,推测 *Acc13130* 可能为抗寒基因;*Acc07283*、*Acc04566*、*Acc04564*、*Acc16267*、*Acc19743*、*Acc28473* 都属于 *SAUR* 基因家族,且都为下调表达,负调控生长素的动态平衡进而有效提高植物的抗寒性。

越来越多的研究表明,糖在植物抗寒性中起着至关重要的作用^[24]。 β -淀粉酶催化淀粉分解产生麦芽糖,麦芽糖有助于保护植株在胁迫环境中叶绿素中的电子传递链和蛋白质,通过调节可溶性糖含量来提高植物的抗寒性^[25]。在拟南芥中,海藻糖、棉子糖等可溶性糖的积累参与稳定冷驯化叶细胞的光系统II(PSII)^[26],有效提高植物抗寒性。海藻糖-6-磷酸合酶可保护生物细胞膜和蛋白质不受到破坏^[27]。在淀粉和蔗糖代谢通路中,*Acc26744*、*Acc16756* 被注释为编码海藻糖-6-磷酸合酶的基因,*Acc28966*、*Acc16695*、*Acc08918* 被注释为编码 β -淀粉酶的基因,其中 *Acc26744* 和 *Acc28966* 基因的 $|\log_2(\text{FC})|$ 值为 3.12 和 2.16,均大于 2 且 FDR 值都小于 0.01,因此推测 *Acc26744*、*Acc28966* 在黄肉猕猴桃抗寒中起着重要作用。

当受到低温胁迫时,植物通常会进化出各种生理生化变化,并调节基因表达以实现冷适应,例如增加抗氧化酶、抗氧化剂和渗透溶质^[28]。低温胁迫

诱导自由基积累增强^[29],破坏植物活性氧代谢的动态平衡,降低渗透溶质^[30]。通过维持活性氧清除系统,降低氧自由基对细胞的毒性,减少细胞结构的破坏,提高植物的抗寒性^[31]。*Acc25019* 被注释为编码呼吸爆发氧化酶的基因,且 $|\log_2(\text{FC})|$ 和 FDR 的值分别为 8.08 和 4.53×10^{-13} ,所以推测 *Acc25019* 可能在黄肉猕猴桃抗寒中发挥着重要作用。

脱落酸(ABA)作为一种植物激素,在植物逆境方面具有重要意义^[32-33],在马铃薯、小麦、冬油菜和拟南芥的研究中发现 ABA 可以通过调控植物抗寒基因表达进而调控植物的生理代谢过程,使植物的抗寒性增强^[34]。脱落酸信号传导源于脱落酸受体在其过程中的互作作用^[35]。在 MAPK 信号通路和植物激素信号转导通路中 *Acc03316* 都被注释为编码脱落酸受体的基因。此外研究还发现,ABA 信号转导途径中存在双重抑制机制调控植物对低温进行响应,即:在缺乏 ABA 时,蛋白激酶(SnRK2, sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2)与 PP2C 相互作用,抑制 PP2C 活性,响应植物低温灾害;在 ABA 充足的情况下,PYL/PYLs(ABA 受体)与 ABA 结合,并一起与 PP2C 作用,使 SnRK2 保持活性并激活 ABA 依赖型基因,使植物对低温进行响应^[36],本研究中 *Acc03316* 被注释为编码 ABA 蛋白的基因,*Acc03517* 被注释为编码磷酸酶 2C 家族蛋白基因。值得注意的是 *Acc03517*(*PP2C*)、*Acc03316*(*PYL*)两个基因在蛋白互作网络中存在直接互作关系,并且 *Acc03517*(*PP2C*)基因表现为显著上调, $|\log_2(\text{FC})|$ 和 FDR 的值分别为 3.74 和 0.01,*Acc03316*(*PYL*)表现为显著下调, $|\log_2(\text{FC})|$ 和 FDR 的值分别为 2.41 和 5.87×10^{-5} ,因此推断在黄肉猕猴桃的 MAPK 通路和植物激素信号转导通路上也存在 ABA 与受体结合抑制 PP2C 蛋白活性调控植物对低温进行响应的双重抑制机制。

4 结论

本研究首次对低温胁迫处理后的四倍体 Hort16A 黄肉中华猕猴桃进行转录组分析,测序结果中和抗寒相关的差异基因主要富集在植物激素信号转导(Plant hormone signal transduction)、植物 MAPK 信号(MAPK signaling pathway-plant)通路、淀粉和蔗糖代谢(Starch and sucrose metabolism)等通路中。通过前人在植物抗寒性方面的研究和 3 个通路的差异表达显著的基因进行分析,最后筛选得到 *Acc26372*(*GH3*)、*Acc07283*(*SAUR*)、*Acc04566*

(*SAUR*)、*Acc28473 (IAA)*、*Acc03316 (PYL)*、*Acc03517 (PP2C)*、*Acc25019 (RBOH)*、*Acc26744 (TPS)* 和 *Acc28966 (PSR)* 9 个基因, 这些基因可能参与黄肉猕猴桃抗寒响应。本研究丰富了猕猴桃抗寒相关研究, 为之后抗寒基因的验证和选育抗寒猕猴桃品种打下了一定的基础。

参考文献

- [1] 廖慧苹, 梅兵, 鲍荣粉, 罗中魏, 叶青. 中国猕猴桃资源的利用与品种开发研究. 落叶果树, 2018, 50(3): 33-35
Liao H P, Mei B, Bao R F, Luo Z W, Ye Q. Utilization and variety development of *Actinidia chinensis* resources in China. *Deciduous Fruits*, 2018, 50(3): 33-35
- [2] 孙雷明, 方金豹. 我国猕猴桃种质资源的保存与研究利用. 植物遗传资源学报, 2020, 21(6): 1483-1493
Sun L M, Fang J B. Conservation, research and utilization of kiwifruit germplasm resources in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21(6): 1483-1493
- [3] 刘殊. 猕猴桃的冻害及其预防. 中国农资, 1999(4): 25
Liu S. Frost damage in kiwifruit and its prevention. *China Agriculture Production News*, 1999(4): 25
- [4] 王利虎, 卢彦琦, 苏行, 张琼, 赵志军, 陈敬谊, 丁保朋. 果树多倍化育种研究进展. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2022, 42(3): 14-24
Wang L H, Lu Y Q, Su H, Zhang Q, Zhao Z J, Chen J Y, Ding B P. Research progress on polyploidy breeding of fruit trees. *Journal of Shanxi Agricultural University: Natural Sciences Edition*, 2022, 42(3): 14-24
- [5] 张宏宇, 朱心慰, 侯鹏奇, 胡锐峰, 黄玺, 侯义龙. 果树单倍体和多倍体研究进展. 分子植物育种, 2019, 17(2): 606-611
Zhang H Y, Zhu X W, Hou P Q, Hu R F, Huang X, Hou Y L. Research progress and prospect of fruit tree haploid and polyploid. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(2): 606-611
- [6] 李智奕, 宁维, 陈利平, 李瑜, 韩亚伟, 史媛媛. 新一代测序技术及其在植物转录组研究中的应用. 河南农业科学, 2013(12): 1-5
Li Z Y, Ning W, Chen L P, Li Y, Han Y W, Shi Y Y. The next-generation sequencing technology and its application in plant transcriptome. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2013(12): 1-5
- [7] 王莹. 云雾贡茶低温胁迫下的转录组分析及 *CsPPO* 基因的功能鉴定. 贵阳: 贵州大学, 2021
Wang Y. Transcriptome analysis and functional identification of *CsPPO* gene under low temperature stress in Yunwu tribute tea. Guiyang: Guizhou University, 2021
- [8] 梁雨晨, 蒯海娇, 侯一航, 李玲, 王芊乔, 付畅, 苑泽宁. 狭叶薰衣草叶片转录组耐寒相关差异表达基因分析. 分子植物育种, 2021, URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210604.1045.010.html>
Liang Y C, Lin H J, Hou Y H, Li L, Wang Q Q, Fu C, Yuan Z N. Analysis of differentially expressed genes related to cold tolerance in the leaf transcriptome of *Lavandula angustifolia* Mill. *Molecular Plant Breeding*, 2021, URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210604.1045.010.html>
- [9] 刘奕清. 低温胁迫下两种桉树的生理响应特征及转录表达差异研究. 北京: 中国农业大学, 2015
Liu Y Q. Physiological response characteristics and transcriptomic comparison of two *Eucalyptu* trees under low temperature stress. Beijing: China Agricultural University, 2015
- [10] Li S, Liu X, Liu H, Zhang X, Ye Q, Zhang H. Induction, identification and genetics analysis of tetraploid *Actinidia chinensis*. *Royal Society Open Science*, 2019, 6: 191052
- [11] 刘粉香, 杨文国, 孙勤红. 基于转录组测序数据分析及高通量 GO 注释理论的研究. 安徽农业科学, 2018, 46(31): 88-91
Liu F X, Yang W G, Sun Q H. Transcriptome sequencing data analysis and high-throughput GO annotation. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2018, 46(31): 88-91
- [12] 周贺, 李浩男, 蔡斌华, 乔玉山. 砂梨果皮转录组 SNP 位点发掘及其功能注释分析. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 2014, 31(2): 105-111
Zhou H, Li H N, Cai B H, Qiao Y S. SNP mining and functional annotation in transcriptome of sand pear. *Journal of Qingdao Agricultural University: Natural Science*, 2014, 31(2): 105-111
- [13] 田玉珍, 党兆霞, 吕前前, 毛娟, 褚明宇, 马宗恒, 左存武, 陈佰鸿. 树体休眠期前苹果花芽对低温早期响应的转录组分析. 果树学报, 2020, 37(5): 615-624
Tian Y Z, Dang Z X, Lü Q Q, Mao J, Chu M Y, Ma Z H, Zuo C W, Chen B H. Transcriptomic analysis of early responses of apple flower buds to low temperature before tree dormancy. *Journal of Fruit Science*, 2020, 37(5): 615-624
- [14] 林俐, 吴健. 植物 MAPK 级联在逆境胁迫响应中的作用研究进展. 分子植物育种, 2018, 16(1): 280-288
Lin L, Wu J. Progress in plant MAPK cascades in response to environmental stresses. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(1), 280-288
- [15] Fan M L, Zhang Y, Li X L, Wu S, Yang M Y, Yin H F, Liu W X, Fan Z Q, Li J Y. Multi-approach analysis reveals pathways of cold tolerance divergence in *Camellia japonica*. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 811791
- [16] 高洁. 黄肉猕猴桃果实发育过程中色素变化及转录组与转色期 DGE 分析. 南昌: 江西农业大学, 2013
Gao J. Studies on variation of the flesh pigments and analysis of transcriptome and DGE in color turning phases of yellow kiwifruit. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2013
- [17] 涂美艳, 李明章, 孙淑霞, 李靖, 陈栋, 宋海岩, 江国良, 廖明安. 黄肉猕猴桃中果皮和内果皮不同时期比较转录组分析. 分子植物育种, 2019, 17(5): 1479-1486
Tu M Y, Li M Z, Sun S X, Li J, Chen D, Song H Y, Jiang G L, Liao M A. Comparative transcriptome analysis of different development stages of yellow-fleshed kiwifruit sarcocarp and endocarp. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(5): 1479-1486

- [18] Ding X H, Cao Y L, Huang L L, Zhao J, Xu C G, Li X H, Wang S P. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell*, 2008, 20(1):228-240
- [19] 张计育,渠慎春,郭忠仁,杜小丽,都贝贝,章镇. 植物bZIP转录因子的生物学功能. *西北植物学报*, 2011, 31(5): 1066-1075
Zhang J Y, Qu S C, Guo Z R, Du X L, Du B B, Zhang Z. Biology function of *bZIP* transcription factors in plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, 31(5): 1066-1075
- [20] Cai W, Yang Y, Wang W, Guo G, Liu W, Bi C. Overexpression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) bZIP transcription factor gene, TabZIP6, decreased the freezing tolerance of transgenic *Arabidopsis* seedlings by down-regulating the expression of CBFs. *Plant Physiol Biochem*. 2018, 124: 100-111
- [21] 李傲,崔梦杰,陈珂,许瀛之,贾海峰,房经贵. 葡萄SAUR基因家族鉴定与生物信息学分析. *植物遗传资源学报*, 2018, 19(2): 326-337
Li A, Cui M J, Chen K, Xu Y Z, Jia H F, Fang J G. Identification and bioinformatics analysis of the SAUR gene family in grape. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(2): 326-337
- [22] 潘巧文,武军艳,马学才,王亚林,马骊,徐新宇,李鹏,姚彦林,徐芳,崔小茹,孙万仓. 白菜型油菜BraSAUR基因家族鉴定及其表达分析. *干旱地区农业研究*, 2022, 40(5): 1-12, 23
Pan Q W, Wu J Y, Ma X C, Wang Y L, Ma L, Xu X Y, Li P, Yao Y L, Xu F, Cui X R, Sun W C. Identification and expression analysis of BraSAUR gene family in rapeseed (*Brassica rapa* L.). *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2022, 40(5): 1-12, 23
- [23] Du H, Wu N, Fu J, Wang S P, Li X H, Xiao J H, Xiong L Z. A GH3 family member, OsGH3-2, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(18): 6467-6480
- [24] 夏全超,张玉霞,孙明雪,张庆昕,杜晓艳,王显国,王东儒. 施磷深度对低温胁迫苜蓿根颈糖类物质含量及抗寒性的影响. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2022(11): 2-9
Xia Q C, Zhang Y X, Sun M X, Zhang Q X, Du X Y, Wang X G, Wang D R. Effects of phosphate fertilizer application depth on carbohydrate content and cold resistance of alfalfa root crown under low temperature stress. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2022(11): 2-9
- [25] Peng T, Zhu X F, Duan N, Liu J H. PtrBAM1, a β -amylase-coding gene of *Poncirus trifoliata*, is a CBF regulon member with function in cold tolerance by modulating soluble sugar levels. *Plant Cell and Environment*, 2014, 37(12), 2754-2767
- [26] Knaupp M, Mishra K B, Nedbal L, Heyer A G. Evidence for a role of raf-finose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles. *Planta*, 2011, 234: 477-486
- [27] 王彩丽. 棉花海藻糖6-磷酸合酶11和3个LEA基因的功能鉴定. 泰安:山东农业大学, 2014
Wang C L. The functional identification of the trehalose-6-phosphate synthase 11 and three late embryogenesis abundant genes. Taian: Shandong Agricultural University, 2014
- [28] Li S, Yang Y, Zhang Q, Liu N, Xu Q, Hu L. Differential physiological and metabolic response to low temperature in two zoysiagrass genotypes native to high and low latitude. *PLoS ONE*, 2018, 13(6): e0198885
- [29] Caverzan A, Passaia G, Rosa S B, Ribeiro C W, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 2012, 35(4): 1011-1019
- [30] Song L X, Xu X C, Wang F N, Wang Y, Xia X J, Shi K, Zhou Y H, Zhou J, Yu J Q. Brassinosteroids act as a positive regulator for resistance against root-knot nematode involving respiratory burst oxidase homolog-dependent activation of MAPKs in tomato. *Plant Cell and Environment*, 2018, 41(5): 1113-1125
- [31] Liu A, Hu Z, Bi A, Fan J, Gitau M M, Amombo E, Chen L, Fu J. Photosynthesis, antioxidant system and gene expression of bermudagrass in response to low temperature and salt stress. *Ecotoxicology*, 2016, 25(8): 1445-1457
- [32] 丁海东,朱晓红,刘慧,张冬平,陈一,梁建生. ABA信号转导途径中的MAPKs. *植物生理学报*, 2011, 47(12): 1137-1144
Ding H D, Zhu X H, Liu H, Zhang D P, Chen Y, Liang J S. Mitogen-activated protein kinases in abscisic acid signal transduction. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47(12): 1137-1144
- [33] 张庆怡,李悦,董佳伟,徐洪伟,周晓馥. 外源ABA对低温胁迫下牛皮杜鹃气孔性状及光合性能的影响. *北方园艺*, 2022(1): 72-79
Zhang Q Y, Li Y, Dong J W, Xu H W, Zhou X F. Effects of exogenous ABA on stomatal characters and photosynthetic characteristics of *Rhododendron chrysanthemum* Pall under low temperature stress. *Northern Horticulture*, 2022(1): 72-79
- [34] Nagao M, Minami A, Arakawa K, Fujikawa S, Takezawa D. Rapid degradation of starch in chloroplasts and concomitant accumulation of soluble sugars associated with ABA-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162: 169-180
- [35] Hubbard K E, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff E D, Schroeder J I. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Development*, 2010, 24: 1695-1708
- [36] Boneh U, Biton I, Schwartz A, Ben-Ari G. Characterization of the ABA signal transduction pathway in *Vitis vinifera*. *Plant Science*, 2012, 187: 89-96