

网络出版时间:2019-01-24 16:29

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.08.012

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190124.1628.024.html

蒙古扁桃菌根苗对干旱胁迫的分子响应机制

赵敏¹, 宁心哲², 谢旭强¹, 闫三强¹, 王琚钢³, 白淑兰¹

(1 内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2 呼伦贝尔市林业科学研究所, 内蒙古 海拉尔 021008;

3 中国热带农业科学院 南亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091)

【摘 要】【目的】探明菌根对蒙古扁桃(*Prunus mongolica*)抗旱能力影响的分子机制。【方法】对生长 45 d 的菌根化蒙古扁桃与非菌根化蒙古扁桃进行非干旱胁迫和干旱胁迫处理, 非干旱胁迫蒙古扁桃在处理期间每天补充水分; 干旱胁迫处理蒙古扁桃从培育 45 d 开始停止浇水, 模拟自然干旱胁迫, 持续时间 15 d。试验结束后, 每个处理选 12 株进行叶长、叶宽、叶片脱落数及生物量的测定和统计; 另选 12 株采用高通量测序方法进行转录组测序, 并对其差异表达转录本进行 GO 和 KEGG 富集分析。【结果】干旱胁迫条件下, 菌根化苗木底部的一些叶片会脱落, 而非菌根化苗木叶片几乎不脱落; 同时, 菌根化苗木的地下生物量显著高于非菌根化苗木。通过高通量测序发现, 4 个处理文库共获得 43 641 个转录本; 在 $P < 0.001$ 时, 菌根化蒙古扁桃干旱胁迫(MD)与非干旱胁迫(MCK)处理相比, 存在 820 个差异表达转录本; 干旱胁迫条件下, 菌根化苗木(MD)与非菌根化苗木(ND)相比, 存在 3 751 个差异表达转录本; 非干旱胁迫条件下, 菌根化苗木(MCK)与非菌根化苗木(NCK)相比, 存在 2 315 个差异表达转录本。GO 富集分析发现, MD 与 ND 处理文库间的细胞组分、分子功能和生化过程 3 类主要功能分类的差异表达转录本, 较 MD 与 MCK 处理文库间均增加; MCK 与 NCK 处理文库间差异转录本的分类结果同 MD 与 ND 处理文库间基本相同, 只是在分子功能分类中多出通道调节活性这一功能。经 KEGG 富集分析发现, 天线蛋白、类胡萝卜素生物合成途径、激素信号传导途径、N 代谢途径、过氧化物酶体、植物昼夜节律和 MAPK 信号途径等与干旱胁迫存在密切联系。实时荧光定量 PCR 表明转录组测序数据可靠。【结论】菌根化处理可以提高蒙古扁桃的抗旱能力。

【关键词】蒙古扁桃; 菌根苗; 干旱胁迫; 高通量测序; 抗旱机制

【中图分类号】S662.901

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2019)08-0090-10

Molecular mechanisms of *Prunus mongolica* mycorrhizal seedlings responding to drought stress

ZHAO Min¹, NING Xinzhe², XIE Xuqiang¹, YAN Sanqiang¹,
WANG Jugang³, BAI Shulan¹

(1 College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019, China;

2 Forestry Science Institute of Hulunbeier City, Hailar, Inner Mongolia 021008, China; 3 Institute of South Subtropical Crops Research, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524091, China)

Abstract: 【Objective】This study aimed at exploring the molecular mechanism of mycorrhiza on drought resistance of *Prunus mongolica*. 【Method】The mycorrhizal *P. mongolica* and non-mycorrhizal *P. mongolica* almonds were treated with non-drought stress and drought stress for 45 days. The non-drought stress seedlings were replenished with water every day during the treatment to maintain the maximum water holding capacity (48.7%). The watering for seedlings in drought stress treatment were stopped 45 days

【收稿日期】2018-07-04

【基金项目】国家自然科学基金项目(41761055); 内蒙古自然科学基金项目(2016MS0343)

【作者简介】赵敏(1990—), 女, 内蒙古乌兰察布人, 在读博士, 主要从事菌根生物技术研究。E-mail: zhaomin19900101@163.com

【通信作者】白淑兰(1960—), 女(蒙古族), 内蒙古通辽人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事菌根生物技术研究。

E-mail: baishulan0079@imau.edu.cn

after cultivation, and the natural drought stress was simulated for 15 days. After 60 days, twelve seedlings were selected from each treatment to measure and count leaf length, leaf width, leaf abscission number and biomass. Twelve seedlings were sequenced by high-throughput sequencing and their differentially expressed transcripts were analyzed by GO and KEGG enrichments. 【Result】 Under drought stress, some leaves at the bottom of mycorrhizal seedlings fell off, while non-mycorrhizal seedlings barely fell off. The underground biomass of mycorrhizal seedlings was significantly higher than that of non-mycorrhizal seedlings. A total of 43 641 transcripts were obtained from the four processed libraries by high-throughput sequencing. At $P < 0.001$, there were 820 differentially expressed transcripts in mycorrhizal *P. mongolica* under drought stress (MD) and non-drought stress (MCK) conditions. There were 3 751 differentially expressed transcripts compared to MD and non-mycorrhizal (ND) seedlings under drought stress. There were 2 315 differentially expressed transcripts in MCK and non-mycorrhizal seedlings (NCK) under non-drought stress conditions. GO enrichment analysis showed that the differential expression transcripts of the three major functional categories of cellular components, molecular functions and biological processes were increased between the MD and ND processing libraries compared to the MD and MCK processing libraries. The classification results of differential transcripts between MCK and NCK processing libraries were basically the same between MD and ND, but it only had a function of channel regulation activity in the molecular function classification. The KEGG enrichment analysis showed that antenna protein, carotenoid biosynthetic pathway, hormone signaling pathway, nitrogen metabolic pathway, peroxisomes, circadian rhythm-plant and MAPK signaling pathway were closely related to drought stress. Real time quantitative PCR showed that transcriptome sequencing data were reliable. 【Conclusion】 Mycorrhiza can improve the drought resistance of *P. mongolica*.

Key words: *Prunus mongolica*; mycorrhizal seedling; drought stress; high-throughput sequencing; drought resistance mechanism

蒙古扁桃(*Prunus mongolica*)广泛分布于蒙古高原西南部的戈壁荒漠区,属稀有濒危种,被列为国家重点保护物种。它能够在戈壁荒漠区极端干旱贫瘠的生境中生存,除了其地上部分具有非凡的保水能力外,地下根系也具有非常强大的保水和对水分、养分的吸收利用能力。但目前对其抗旱机制的研究主要集中在形态特征^[1]和水分特性^[2]上,而对其根际微生物与抗逆性关系的研究相对较少。众所周知,丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhiza fungi, AMF)能够与 80% 以上的陆地植物形成共生体,这种共生体对植物在恶劣生境中的生存具有重要作用^[3]。大量研究证实,AMF 可以帮助宿主植物抵御干旱胁迫带来的多种影响^[4-6]。本课题组前期研究也发现,蒙古扁桃是一种典型的丛枝菌根植物,其形成菌根后可以提高水分利用效率,改变体内激素平衡,提高脱落酸(ABA)含量促使部分叶片脱落,从而使抗旱性增强^[7]。随着分子生物学技术的不断发展,有关菌根真菌结构与功能多样性以及菌根植物抗非生物胁迫的研究取得了长足进步。Alimoham-madi 等^[8]利用高通量测序技术结合 cDNA-AFLP

技术对野扁桃(*Prunus scoparia*)的抗旱基因进行了分析;Mousavi 等^[9]利用高通量测序技术分析扁桃(*Prunus dulcis*)对寒冷胁迫的应答基因。另外,有关菌根真菌转录组也有研究,Tisserant 等^[10]对 *Glomus intraradices* 转录组的第 1 个全基因组进行了分析。但目前针对菌根植物转录组结合逆境胁迫的相关研究尚未见报道。因此,本研究首先对干旱胁迫、非干旱胁迫条件下菌根化与非菌根化蒙古扁桃的生长状况进行了测定,在此基础上利用高通量测序技术测定了不同处理苗木的转录组表达情况并进行比对,旨在揭示菌根化蒙古扁桃对于干旱胁迫的分子响应机制,从而为蒙古扁桃菌根化苗木的定向培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

供试蒙古扁桃种子采集于阿拉善荒漠区(103° 20' E, 39° 14' N)。从中挑选饱满成熟的种子,去除内果皮,用体积分数 10% 的 H_2O_2 消毒 10 min,再用蒸馏水冲洗干净,然后放入已经灭菌的铺有两层

根据 DETs 的基因本体(gene ontology,GO)编号来注释基因的 GO 功能分类,把所有得到的 DETs 映射到 GO 数据库。利用 Blast 算法通过序列相似性与 NCBI 的非冗余蛋白数据库(non-redundant protein sequences,Nr)和通用蛋白数据库

(universal protein, Uniprot) (<http://www.uniprot.org/>)^[16] 进行比对,然后采用 Blast2Go (<https://www.blast2go.com/>)^[17] 对 GO 注释信息进行提取。根据 *P* 值筛选显著富集的 GO 功能类别,绘制 MD 与 MCK、MD 与 ND、MCK 与 NCK 处理间 DETs 的 GO 分类图。然后将 DETs 在京都基因与基因组百科全书数据库 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 中进行注释,通过基于 *P* 值筛选的 Pathway 显著性富集确定 DETs 参与的最主要生化代谢途径和信号传导。最后对高通量测序所得数据进行实时荧光定量 PCR 验证,反应体系及程序同 1.3 节。

2 结果与分析

2.1 各处理蒙古扁桃苗木生长状况

幼苗生长 45 d 后,对接种与非接种处理蒙古扁

桃苗木根系进行染色与镜检,在接种处理苗木根部观察到泡囊、丛枝及根内菌丝等典型的 AMF 结构,而非接种处理未观察到此类结构。从表 1 可以看出,干旱胁迫之前,菌根苗(MCK 和 MD)叶长均显著大于非菌根苗(NCK 和 ND),而 NCK 与 ND、MCK 与 MD 处理间无显著差异,叶宽间也无显著差异,说明此时苗木生长状况基本一致。干旱胁迫之后,MCK 与 MD 处理叶长无显著差异,但均显著大于其他 2 个处理,4 个处理间叶宽没有显著差异。干旱胁迫过程中,苗木底部的一些叶片脱落,其中 MD 处理苗木叶片脱落数最多,达 6.60 片,而 ND 处理叶片几乎不脱落,说明菌根的形成可促使叶片脱落,以增强蒙古扁桃的抗旱性。60 d 后,菌根化处理苗木的各部分生物量均显著高于非菌根化处理,尤其是地下生物量,以 MD 处理最大,说明在干旱胁迫下,菌根的形成促进了苗木地下生物量的积累。

表 1 干旱胁迫前后蒙古扁桃的叶片生长状况与生物量变化

处理 Treatment	干旱胁迫前 Before drought stress		干旱胁迫后 After drought stress		叶片脱落数 No. of fallen leaves	地上生物量/ (g·盆 ⁻¹) Above-ground biomass	地下生物量/ (g·盆 ⁻¹) Under-ground biomass
	叶长/cm	叶宽/cm	叶长/cm	叶宽/cm			
	Length	Width	Length	Width			
NCK	3.25±0.16 b	1.21±0.12 a	3.78±0.14 b	1.30±0.21 a	0.40±0.70 c	0.28±0.07 b	0.16±0.04 b
ND	3.26±0.12 b	1.18±0.09 a	3.43±0.21 c	1.20±0.12 a	0.60±1.87 b	0.26±0.06 b	0.15±0.02 b
MCK	3.52±0.37 a	1.28±0.17 a	4.05±0.39 a	1.41±0.22 a	1.40±0.70 bc	0.30±0.08 a	0.25±0.05 a
MD	3.49±0.23 a	1.25±0.24 a	3.89±0.33 ab	1.33±0.08 a	6.60±2.07 a	0.29±0.07 a	0.26±0.05 a

注:同列数据后标不同字母表示在 *P*<5% 水平上差异显著,数据为“平均值±标准差”。下表同。
Note: Different letters represent significant difference at the *P*<5% level. The data is “mean±standard deviation”. The same below.

2.2 各处理蒙古扁桃苗木转录组测序质量评估与分析

从表 2 可知,无论是蒙古扁桃菌根苗还是非菌根苗,非干旱胁迫处理(NCK 和 MCK)苗木转录组

所得的数据量均大于干旱胁迫处理(ND 和 MD)。4 个处理文库的 GC 含量均在 50% 左右。NCK 和 ND 处理的 Q20、Q30 均低于 MCK 和 MD 处理。

表 2 干旱胁迫前后蒙古扁桃转录组原始数据

处理文库 Processing libraries	Reads 总数 Total reads	碱基总数/bp Total length	GC 含量/% GC contents	Q20/%	Q30/%
NCK	57 427 470	5 742 747 000	49.2	96.02	89.85
ND	53 300 266	5 330 026 600	51.7	95.83	89.34
MCK	62 134 948	6 275 629 748	52.0	96.58	91.75
MD	56 716 458	5 728 362 258	48.9	96.83	91.99

经 *de novo* 拼接后,4 个文库共获得 43 641 个转录本(表 3)。最长的为 17 393 bp,最短的为 301 bp,平均长度 1 003 bp,中值为 623 bp。从图 1 可以

看出,转录本长度主要集中在 301~500 bp,且随着长度增加,转录本数量下降。

表 3 不同处理蒙古扁桃转录本的拼接结果

转录本数 Transcript	最长转录本/bp Max length	最短转录本/bp Min length	均值/bp Mean	中值/bp Median	总长度/bp Total length
43 641	17 393	301	1 003	623	43 811 380

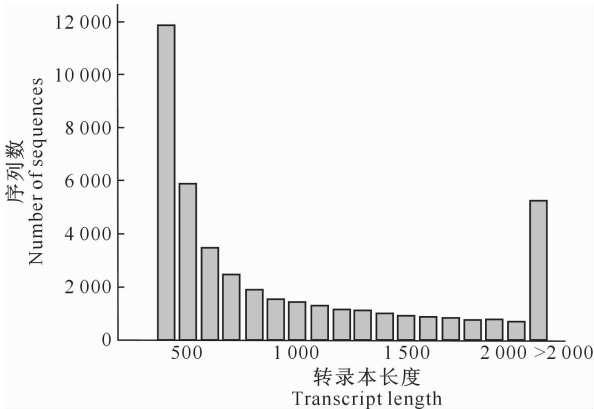


图 1 不同处理蒙古扁桃 Reads 拼接后转录本的长度分布
Fig.1 Length distribution of Reads spliced transcript of *P. mongolica* in different treatments

去除 4 个文库中的 Reads 接头序列,与每条 Reads 的对照序列进行比对,结果见表 4。

表 4 蒙古扁桃 4 个处理文库测序 Reads 与对照序列的比对结果

Table 4 Comparison of Reads sequencing with reference sequences in 4 processing libraries of *P. mongolica*

处理文库 Processing libraries	总 Reads 数 Total Reads	匹配数 Mapped	匹配率/% Mapped rate
NCK	56 826 400	47 594 862	83.75
ND	52 154 166	43 939 796	84.25
MCK	60 790 504	50 620 202	83.27
MD	55 618 426	44 284 468	79.62

注:总 Reads 为各文库中去除测序接头后的 Reads。
Note:Sequencing adaptor in the each library was removed in total Reads.

由表 4 可知,在 4 个处理文库中,NCK、ND和

MCK 3 个处理文库的匹配率均在 83%以上,分别为 83.75%,84.25%和 83.27%;而 MD 处理文库的匹配率最低,为 79.62%,但也非常接近 80%。说明拼接结果能满足后续分析的需求。

2.3 不同处理蒙古扁桃转录组的 DETs

从表 5 可以看出,在 $P<0.001$ 水平上,MD 与 MCK 处理文库间的 DETs 数最少,为 820 个;而 MD 与 ND 处理文库间的 DETs 数最多,为 3 751 个。3 组比对分析中,MD 与 ND 处理文库间上调转录本最多,为 2 208 个,下调转录本也最多,为 1 543 个;只有 MCK 与 NCK 处理文库间上调转录本数少于下调转录本数,而其他 2 组则相反。

表 5 蒙古扁桃 4 个处理文库间差异表达转录本在 $P<0.001$ 显著水平上的 DETs 数量

Table 5 Number of DETs between different treatment libraries of *P. mongolica* at $P<0.001$ level

组间比对 Inter-group comparison	总数 Total	上调 Up	下调 Down
MD/MCK	820	738	82
MD/ND	3 751	2 208	1 543
MCK/NCK	2 315	867	1 448

2.4 蒙古扁桃不同处理文库间 DETs 的 GO 分析

从表 6 可知,MD 与 MCK 处理文库间的 DETs 总数较少,细胞组分、分子功能和生化过程 3 类主要功能分别为 7 种、6 种和 15 种 DETs。在分子功能分类中,最多的是结合和催化剂活性,其余 4 种功能分别是电子载体活性、酶调节因子活性、结构分子活性和运输活性。

表 6 蒙古扁桃不同处理文库间 DETs 的 GO 功能分类

Table 6 GO functional classification of DETs between different processing libraries of *P. monogolica*

组间比对 Inter-group comparison	细胞组分 Cellular component	分子功能 Molecular function	生化过程 Biological process
MD/MCK	细胞 Cell	结合 Binding	生物调节 Biological regulation
	细胞部分 Cell part	催化剂活性 Catalytic activity	细胞过程 Cellular process
	大分子复合物 Macromolecular complex	结构分子活性 Structural molecule activity	细胞组分组织或生物形成 Cellular component organization or biogenesis
	膜 Membrane	酶调节因子活性 Enzyme regulator activity	多细胞有机体过程 Multicellular organismal process
	膜部分 Membrane part	电子载体活性 Electron carrier activity	定位建立 Establishment of localization
	细胞器 Organelle	运输活性 Transporter activity	定位 Localization
	细胞器部分 Organelle part		移位 Locomotion
			代谢过程 Metabolic process
			多有机体过程 Multi-organism process
			发育过程 Developmental process
			繁殖 Reproduction
			繁殖过程 Reproductive process
			刺激反应 Response to stimulus
			信号 Signaling
			单一有机体过程 Single-organism process

表 6(续) Continued table 6

组间比对 Inter-group comparison	细胞组分 Cellular component	分子功能 Molecular function	生化过程 Biological process
MD/ND	细胞 Cell	抗氧化活性 Antioxidant activity	生物粘附 Biological adhesion
	细胞部分 Cell part	结合 Binding	生物调节 Biological regulation
	胞外区 Extracellular region	催化剂活性 Catalytic activity	细胞过程 Cellular process
	细胞器部分 Organelle part	核苷酸结合转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity	细胞组分组织或生物形成 Cellular component organization or biogenesis
	膜 Membrane	酶调节因子活性 Enzyme regulator activity	发育过程 Developmental process
	膜封闭腔 Membrane-enclosed lumen	分子传导活性 Molecular transducer activity	定位建立 Establishment of localization
	膜部分 Membrane part	电子载体活性 Electron carrier activity	生长 Growth
	细胞器 Organelle	营养库活性 Nutrient reservoir activity	免疫系统过程 Immune system process
	大分子复合物 Macromolecular complex	蛋白结合转录因子活性 Protein binding transcription factor activity	多细胞有机体过程 Multicellular organismal process
		受体活性 Receptor activity	移位 Locomotion
		结构性分子活性 Structural molecule activity	代谢过程 Metabolic process
		运输活性 Transporter activity	多有机体过程 Multi-organism process
			定位 Localization
			繁殖 Reproduction
			繁殖过程 Reproductive process
			刺激反应 Response to stimulus
			信号 Signaling
			单一有机体过程 Single-organism process
MCK/NCK	细胞 Cell	抗氧化活性 Antioxidant activity	生物调节 Biological regulation
	细胞部分 Cell part	结合 Binding	定位建立 Establishment of localization
	胞外区 Extracellular region	催化剂活性 Catalytic activity	细胞过程 Cellular process
	膜 Membrane	通道调节活性 Channel regulator activity	发育过程 Developmental process
	大分子复合物 Macromolecular complex	核苷酸结合转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity	细胞组分组织或生物形成 Cellular component organization or biogenesis
	胞外区部分 Extracellular region part	酶调节因子活性 Enzyme regulator activity	多细胞有机体过程 Multicellular organismal process
	膜封闭腔 Membrane-enclosed lumen	分子传导活性 Molecular transducer activity	定位 Localization
	膜部分 Membrane part	电子载体活性 Electron carrier activity	代谢过程 Metabolic process
	细胞器 Organelle	营养库活性 Nutrient reservoir activity	多有机体过程 Multi-organism process
	细胞器部分 Organelle part	蛋白结合转录因子活性 Protein binding transcription factor activity	生长 Growth
		受体活性 Receptor activity	繁殖 Reproduction
		结构性分子活性 Structural molecule activity	繁殖过程 Reproductive process
		运输活性 Transporter activity	刺激反应 Response to stimulus
			节律过程 Rhythmic process
			信号 Signaling
			单一有机体过程 Single-organism process

MD 与 ND 处理文库间细胞组分、分子功能和生化过程各有 9 种、12 种和 18 种 DETs,较 MD 与 MCK 处理文库间均有增加。在 3 个功能分类中 DETs 最多的均与 MD 和 MCK 处理文库一致,在分子功能分类中多出抗氧化活性、分子转导活性、核苷酸结合转录因子活性、蛋白结合转录因子活性、营养库活性和受体活性;另外,在生化过程功能中存在生长转录本,表明菌根形成促进了植物的生长。

MCK 和 NCK 处理文库间 DETs 的 GO 分类结果与 MD 处理和 ND 处理文库间基本一致,只是在分子功能分类中多出通道调节活性这一功能。

2.5 蒙古扁桃不同处理间 DETs 的 KEGG 通路分析

通过 KEGG 富集分析,可以确定不同处理的蒙古扁桃 DETs 参与的主要生化代谢途径和信号途径。结果(表 7)显示,MD 与 ND 处理、MD 与 MCK 处理 2 组比对的叶绿体天线蛋白表达发生了明显变化,MD 与 ND 处理相比,存在 9 个转录本上调,1 个转录本下调;MD 与 MCK 处理相比,上调和下调转录本均只有 1 个。在碳固定途径中,MD 与 ND 处理相比,有 10 个转录本上调,5 个转录本下调;MD 与 MCK 处理相比,也有 10 个转录本上调。

表 7 蒙古扁桃不同处理文库间 DETs 的 KEGG 通路分析

Table 7 Analysis of KEGG pathway in DETs between different processing libraries of *P. monogolica*

影响途径 Influence way	组间比对 Inter-group comparison	代谢通路 Pathway	通路 ID Pathway ID	上调转录 本数 Up	下调转录 本数 Down
苗木生长 Seedlings growth	MD/ND	天线蛋白 Antenna proteins	ko00196	9	1
	MD/MCK			1	1
	MD/ND	碳固定途径 Carbon fixation pathway	ko00710	10	5
	MD/MCK			10	—
苗木激素平衡 Hormonal balance of seedlings	MD/ND	类胡萝卜素生物合成途径 Carotenoid biosynthesis pathway	ko00906	4	1
	MCK/NCK			—	2
	MD/ND	色氨酸代谢途径 Tryptophan metabolism pathway	ko00380	9	3
	MD/MCK			4	—
	MD/NCK	玉米素生物合成途径 Zeatin biosynthesis pathway	ko00908	4	5
	MD/NCK			2	1
	MD/ND	类萜骨架生物合成途径 Terpenoid backbone biosynthesis pathway	ko00900	3	5
	MD/ND	油菜素内酯生物合成途径 Brassinosteroid biosynthesis pathway	ko00905	1	—
苗木营养 Seedlings nutrition	MD/ND	激素信号传导途径 Plant hormone singal transduction	ko04075	1	1
	MD/NCK			1	1
	MD/ND	氮代谢途径 Nitrogen metabolism pathway	ko00910	6	3
	MD/ND	果糖和甘露糖代谢途径 Fructose and mannose metabolism pathway	ko00051	12	2
苗木渗透调节物质 Osmotic adjustment substances in seed- lings	MD/MCK			9	—
	MD/NCK	精氨酸和脯氨酸代谢途径 Arginine and proline metabolism pathway	ko00330	2	2
	MD/ND			15	4
	MD/ND	甜菜红碱生物合成途径 Betalain biosynthesis pathway	ko00965	2	—
	MD/MCK			2	—
苗木抗氧化活性 Antioxidant activity of seedlings	MD/ND	过氧化物酶体 Peroxisome	ko04146	10	10
	MD/MCK			6	—
	MD/NCK	谷胱甘肽代谢途径 Glutathione metabolism	ko00480	3	6
	MD/ND			7	5
	MD/MCK			6	—
	MD/NCK			1	3
苗木其他 KEGG 路径 Other KEGG path- ways of seedlings	MD/ND	植物昼夜节律 Circadian rhythm-plant	ko04712	3	2
	MD/NCK			3	4
	MD/ND	MAPK 信号路径 MAPK signaling pathway	ko04011	12	1
	MD/MCK			4	—
	MD/NCK	钙信号路径 Calcium signaling pathway	ko04020	—	1
	MD/ND			5	3
	MD/MCK			6	—
	MD/NCK			1	5

本研究发现,菌根化蒙古扁桃在干旱胁迫过程中叶片发生脱落,而非菌根化蒙古扁桃的叶片几乎没有脱落。同时,在前期研究中发现,菌根化苗木体内的 ABA 含量均较非菌根化苗木显著升高,且叶片脱落最多的接种处理 ABA 含量也最高;菌根化苗木体内的可溶性糖含量也显著高于非菌根化苗木。说明菌根的形成可以提高蒙古扁桃体内的 ABA 含量,从而促使更多叶片脱落,降低蒸腾面积,增加一些渗透调节物质含量,以应对干旱胁迫,这可

能是其在恶劣环境中能够生存的重要机制^[7]。本研究也发现了涉及 ABA 合成的类胡萝卜素生物合成途径(表 7),在此途径中,MD 与 ND 处理相比有 4 个转录本上调、1 个转录本下调;MCK 与 NCK 处理相比,只有 2 个转录本下调,这意味着非干旱胁迫下,菌根化苗木的 ABA 合成受到抑制。在氮代谢途径中,MD 与 ND 处理相比,有 6 个转录本上调。在过氧化物酶体中,MD 与 MCK 处理相比有 6 个转录本上调,这说明菌根苗在干旱胁迫下抗氧化酶

活性显著增强。MAPK 信号传导路径在 MD 与 ND、MD 与 MCK、MD 与 NCK 这 3 组处理比中均存在 DETs,其中 MD 与 ND 处理相比,转录本上调最多,达 12 个;MD 与 MCK 处理相比,只有 4 个转录本上调;转录本上调能促进植物细胞在渗透休克和高渗透压过程中细胞壁的重塑与体内渗透调节物质的合成,说明在干旱胁迫条件下,菌根化蒙古扁桃通过自身转录本表达变化使植物能更好地应对干旱胁迫。

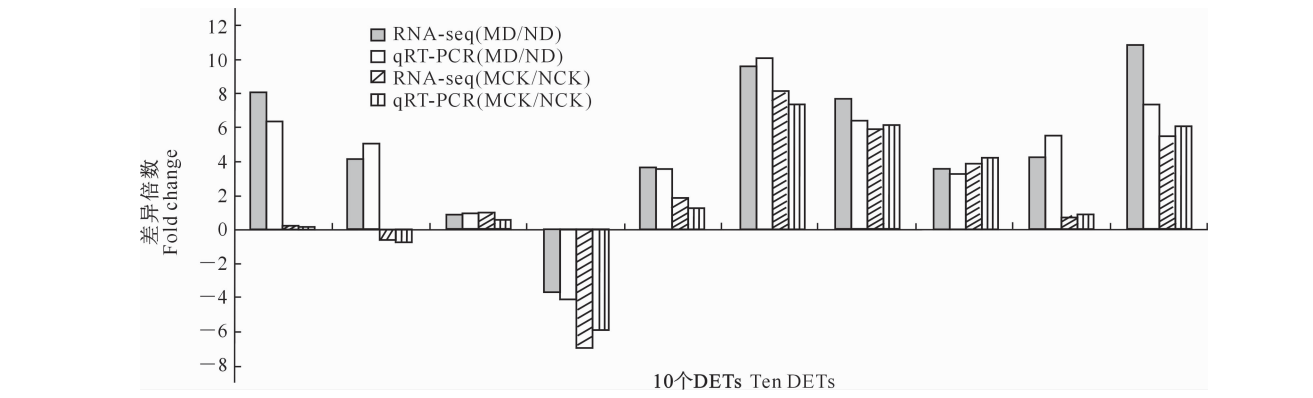


图 2 蒙古扁桃 10 个 DETs RNA-seq 数据的 qRT-PCR 验证

Fig. 2 The qRT-PCR verification results of 10 transcript RNA-seq data of *P. mongolica*

3 讨论与结论

随着测序技术的不断进步和升级,植物基因组与转录组数据越来越容易获取。本研究中,蒙古扁桃 4 个处理文库的测序数据量远高于桃子(*Prunus persica*)^[18]和梅花(*Prunus mume*)^[19]等 2 个李属植物基因组长度的数据量。在胡杨(*Populus euphratica*)^[20]和滇杨(*Populus yunnanensis*)^[21]的高通量测序中,非干旱胁迫处理测序获得的 Reads 数大于干旱胁迫处理,这是因为植物在正常水分下生长旺盛,可以获得更多的高质量 RNA,本研究结果证实了这一结论。本研究中,4 个文库的转录本数、转录本平均长度等均高于扁桃(*Prunus dulcis*)的转录组数据^[9],说明本研究测序准确度非常高,能满足后续的分析要求。本研究还利用实时荧光定量 PCR 验证了 RNA-seq 数据的可靠性。

光合作用变化是植物受干旱等逆境胁迫的最直接反映^[22],耐旱性较强的植物能维持相对较高的光合速率^[20]。有研究表明,干旱胁迫下 AMF 可将有限的光合产物运送到根部,帮助植物吸收更多的水分,从而显著增加地下生物量^[4],本研究结果也符合这一规律。本研究中,在天线蛋白通路中,MD 与 ND 处理相比有 9 个转录本上调,这意味着干旱胁迫

2.6 蒙古扁桃 RNA-seq 与 qRT-PCR 验证结果比较

为了验证 RNA-seq 数据的正确性,随机选择蒙古扁桃 10 个 DETs,对 MD 与 ND 处理及 MCK 与 NCK 处理间的比对结果进行 qRT-PCR 验证,结果见图 2。从图 2 可以看出,虽然 qRT-PCR 验证数据与 RNA-seq 数据存在小的偏差,但大多数转录本数据在两者之间基本一致,说明本研究获得的蒙古扁桃 RNA-seq 测序结果可靠。

迫下菌根化苗木的光合作用比非菌根化苗木强,Tang 等^[20]对胡杨的研究也得出了相同的结论。本研究中,在干旱胁迫下,菌根的形成促进了蒙古扁桃的碳固定途径,这可能是因为碳途径可以提高强光高温下的光合速率。由此可以得出,在干旱胁迫下,菌根的存在可以维持植物较高的光合作用,从而增强植物的抗旱能力。

在干旱、寒冷、高温和盐渍等逆境条件下,植物通过产生 ABA、细胞分裂素、生长素等一系列激素来增强其抗逆性。有研究表明,在逆境条件下,菌根能促进植物体内 ABA 迅速增加^[23]。本研究表明,在 ABA 生物合成的类胡萝卜素生物合成途径中,MD 与 ND 处理相比有 4 个转录本上调,说明在干旱胁迫条件下,菌根的存在使蒙古扁桃体内 ABA 合成增加,这与 Zhang 等^[23]的研究结果一致。玉米素是蒙古扁桃体内细胞分裂素的主要体现形式。细胞分裂素可以促进细胞分裂并调控其分化^[24],因此,在 MD 与 ND 处理文库间 DETs 的 GO 功能分类中存在着生长发育的转录本。

有研究发现,AMF 能促进植物对氮的吸收^[3]。本研究中高通量测序结果显示,干旱胁迫能诱导菌根化蒙古扁桃对氮的吸收,这可能是在 DETs GO 功能分类中,MD 与 ND 处理文库间存在营养库活

性功能转录本的原因。即 AMF 植物利用氮源的主要形式是铵根^[25],同时,干旱胁迫诱导菌根化苗木亚硝酸还原酶的表达上调^[26]。本研究也发现,在氮代谢途径中,干旱胁迫下菌根苗与非菌根苗相比,有 6 个转录本上调。

干旱胁迫下,植物会主动积累一些渗透调节物质来提高细胞的吸水和保水能力,从而提高植物的耐旱力,植物中常见的渗透保护剂包括脯氨酸、可溶性糖、甜菜碱等有机物^[27]。本研究表明,果糖和甘露糖代谢途径中,干旱胁迫下菌根的形成有利于维持果糖的正常含量,菌根苗与非菌根苗相比有 12 个转录本上调。脯氨酸积累是植物对水分胁迫的暂时反应^[28],脯氨酸合成途径主要包括谷氨酸和鸟氨酸两条途径,而且鸟氨酸合成途径主要在氮相对较高的环境中起作用^[29]。本研究中,在脯氨酸代谢途径中,干旱胁迫下菌根化苗与非菌根化苗相比有 15 个转录本上调,说明菌根形成后提高了蒙古扁桃对氮的吸收。Mo 等^[30]研究指出,干旱胁迫能促使接种地衣球囊霉(*Glomus versiforme*)的西瓜幼苗中抗氧化物酶的基因表达,且 AMF 共生体的存在能调控这种影响。本研究也发现,菌根化蒙古扁桃在干旱胁迫条件下抗氧化酶活性显著增强,这也可能是受到 AMF 共生体的影响,所以在 DETs 的 GO 功能分类中,MD 与 ND 处理文库间有抗氧化物质活性功能转录本的存在。

有研究表明,干旱胁迫能调控植物 MAPK 某些基因的表达来帮助植物适应环境胁迫^[27]。本研究也发现,在 MAPK 信号传导途径中,干旱胁迫下菌根化苗与非菌根化苗相比有 12 个转录本上调。在一定条件下,额外施加 Ca^{2+} 有利于缓解植物因干旱胁迫带来的伤害^[31]。本研究获取的 RNA-seq 数据表明,在干旱条件下,菌根苗与非菌根苗相比,钙信号路径中有 5 个转录本上调,说明较高的钙含量有助于提高植物的耐旱力^[32]。

[参考文献]

[1] 王 进,张 勇,赵 刚,等.蒙古扁桃种子萌发和幼苗生长对渗透胁迫的响应[J].干旱地区农业研究,2014,32(1):191-195.
Wang J,Zhang Y,Zhao G,et al. Response of mongolian almond seed germination and seedling growth to osmotic stress [J]. Agricultural Research in the Arid Areas,2014,32(1):191-195.
[2] 王 进,马国泰,宋 涛,等.干旱、半干旱地区蒙古扁桃种子萌发对土壤水分和播种深度的响应特征[J].冰川冻土,2014,36(5):1313-1320.

Wang J, Ma G T, Song T, et al. The response characteristics of germination of *Prunus mongolica* seed to soil moisture and sowing depth in the arid and semi-arid regions [J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2014, 36(5): 1313-1320.
[3] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal symbiosis [M]. New York: Academic Press, 2008.
[4] Smith S E, Facelli E, Pope S, et al. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas [J]. Plant and Soil, 2010, 326(1/2): 3-20.
[5] Jayne B, Quigley M. Influence of arbuscular mycorrhiza on growth and reproductive response of plants under water deficit: a meta-analysis [J]. Mycorrhiza, 2014, 24(2): 109-119.
[6] Li T, Hu Y J, Hao Z P, et al. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* [J]. New Phytologist, 2013, 197(2): 617-630.
[7] 王琚钢, 高晓敏, 白淑兰, 等. 丛枝菌根对蒙古扁桃抗旱性影响研究 [J]. 干旱区资源与环境, 2014, 28(12): 138-142.
Wang J G, Gao X M, Bai S L, et al. Effects of arbuscular mycorrhiza on the drought tolerance of *Prunus mongolica* [J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2014, 28(12): 138-142.
[8] Alimohammadi A, Shiran B, Martinez-gómez P, et al. Identification of water-deficit resistance genes in wild almond (*Prunus scoparia*) using cDNA-AFLP [J]. Scientia Horticulturae, 2013, 159(7): 19-28.
[9] Mousavi S, Alisoltani A, Shiran B, et al. *De novo* transcriptome assembly and comparative analysis of differentially expressed genes in *Prunus dulcis* Mill. in response to freezing stress [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104541.
[10] Tisserant E, Kohler A, Dozolme-seddas P, et al. The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont [J]. New Phytologist, 2012, 193(3): 755-769.
[11] 王琚钢. 基于高通量测序技术分析菌根对蒙古扁桃抗旱机制的影响 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015.
Wang J G. Analysis the influence of mycorrhizae on the drought resistance mechanisms of Mongolian Almond (*Prunus mongolica* Maxim) by using the next generation sequencing technology [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2015.
[12] 刘润进, 陈应龙. 菌根学 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
Liu R J, Chen Y L. Mycorrhizal [M]. Beijing: Science Press, 2007.
[13] 刘洪博, 刘新龙, 苏火生, 等. 干旱胁迫下割手密根系转录组差异表达分析 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(6): 1167-1178.
Liu H B, Liu X L, Su H S, et al. Transcriptome difference analysis of *Saccharum spontaneum* roots in response to drought stress [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(6): 1167-1178.
[14] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with

- Bowtie 2 [J]. Nature Methods, 2012, 9(4): 357-359.
- [15] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139-140.
- [16] Consortium U. The universal protein resource(UniProt) [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(Suppl1): D190-D195.
- [17] Conesa A, Götz S, García-gómez J M, et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research [J]. Bioinformatics, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [18] Verda I, Abbott A G, Scalabrin S, et al. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution [J]. Nature Genetics, 2013, 45(5): 487-494.
- [19] Zhang Q, Chen W, Sun L, et al. The genome of *Prunus mume* [J]. Nature Communications, 2012, 3(4): 1318.
- [20] Tang S, Liang H, Yan D, et al. *Populus euphratica*: the transcriptomic response to drought stress [J]. Plant Molecular Biology, 2013, 83(6): 539-557.
- [21] Peng S, Jiang H, Zhang S, et al. Transcriptional profiling reveals sexual differences of the leaf transcriptomes in response to drought stress in *Populus yunnanensis* [J]. Tree Physiology, 2012, 32(12): 1541-1555.
- [22] Rao D E, Chaitanya K V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants [J]. Biologia Plantarum, 2016, 60(2): 1-18.
- [23] Zhang J, Jia W, Yang J, et al. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses [J]. Field Crops Research, 2006, 97(1): 111-119.
- [24] Courtney, Lappas. The plant hormone zeatin riboside inhibits T lymphocyte activity via adenosine A2A receptor activation [J]. Cellular & Molecular Immunology, 2015, 12(1): 107-112.
- [25] Miransari M. Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake [J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(2): 77-81.
- [26] 刘敏. 灌木铁线莲根围 AMF 多样性及其菌根苗对干旱胁迫的响应机制 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- Liu M. Research on the arbuscular mycorrhizal fungal diversity in the rhizosphere of *Clematis fruticosa* and the mechanisms of mycorrhizal seedlings response to drought stress [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017.
- [27] Rivero R M, Mestre T C, Mittler R, et al. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants [J]. Plant Cell & Environment, 2014, 37(5): 1059-1073.
- [28] Filippou P, Bouchagier P, Skotti E, et al. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity [J]. Environmental & Experimental Botany, 2014, 97(1): 1-10.
- [29] Kishor P B K, Sangam S, Amrutha R N, et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance [J]. Current Science, 2005, 54(4): 271-275.
- [30] Mo Y, Wang Y, Yang R, et al. Regulation of plant growth, photosynthesis, antioxidation and osmosis by an arbuscular mycorrhizal fungus in watermelon seedlings under well-watered and drought conditions [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7(454): 1-15.
- [31] Zou J J, Li X D, Ratnasekera D, et al. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase 8 and catalase 3 function in abscisic acid-mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress [J]. Plant Cell, 2015, 27(5): 1445-1460.
- [32] Hammer E C, Nasr H, Pallon J, et al. Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity [J]. Mycorrhiza, 2011, 21(2): 117-129.

(上接第 89 页)

- [25] 韩志平, 郭世荣, 郑瑞娜, 等. 盐胁迫对小型西瓜幼苗体内离子分布的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(4): 908-917.
- Han Z P, Guo S R, Zheng R N, et al. Effect of salinity on distribution of ions on mini-watermelon seedlings [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2013, 19(4): 908-917.
- [26] 孙健. 胡杨响应盐胁迫与离子平衡调控信号网络研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- Sun J. Signaling network in the perception of salt stress and ionic homeostasis regulation in *Populus euphratica* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2011.
- [27] Horie T, Schroeder J I. Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions [J]. Plant Physiology, 2004, 136(1): 2457-2462.
- [28] 苏丹, 殷小琳, 董智, 等. 白榆无性系生长特性及离子分布对 NaCl 胁迫的响应 [J]. 北京林业大学学报, 2017, 39(5): 48-57.
- Su D, Yin X L, Dong Z, et al. Response in growth and ionic distribution of elm clones under NaCl stress [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2017, 39(5): 48-57.
- [29] 张海燕. 盐胁迫下盐地碱蓬体内无机离子含量分布特点的研究 [J]. 西北植物学报, 2002, 22(1): 129-135.
- Zhang H Y. A study on the characters of content of inorganic ions in salt-stressed *Suaeda salsa* [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2002, 22(1): 129-135.
- [30] 杨成龙, 段瑞军, 李瑞梅, 等. 盐生植物海马齿耐盐的生理特性 [J]. 生态学报, 2010, 30(17): 4617-4627.
- Yang C L, Duan R J, Li R M, et al. The physiological characteristics of salt-tolerance in *Sesuvium portulacastrum* L [J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30(17): 4617-4627.