

低温胁迫下鹅掌楸抗寒性相关基因的差异表达分析

陆 畅, 李 斌, 郑勇奇^①

(国家林木遗传育种重点实验室 中国林业科学研究院林业研究所 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要: 对 4 ℃ 和 -30 ℃ 低温条件下引种自安徽大别山的 1 株鹅掌楸 [*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.] 植株顶芽总 RNA 进行了数字基因表达谱构建和差异表达基因筛选, 并对筛选出的抗寒性相关基因进行了实时荧光定量 PCR 分析。结果表明: 获得的总 RNA 样品质量符合实验要求。数字基因表达谱分析结果表明: 每个样品的质量控制后序列的总长度均在 0.5 Gbp 以上, 碱基错误率为 0.01%, Q20 值超过 99%, Q30 值为 96.99% ~ 97.23%, GC 含量为 44.97% ~ 47.06%, 并且每个样品比对成功的序列条数占质量控制后序列总数的百分率均在 90% 以上。差异表达基因筛选结果显示: 共发现 9 个与鹅掌楸抗寒性有关的差异表达基因, 分别为 *HSP*、*MYB*、*NAC*、*AP2*、*Zinc finger*、*WRKY*、*FAD*、*Phospholipase* 和 β -*amylase* 基因。实时荧光定量 PCR 分析结果表明这 9 个基因共有 3 种表达模式, 其中, *HSP* 和 *FAD* 基因的相对表达量均随着温度的降低而减少, 表现为基因下调表达; *AP2*、*NAC* 和 *Zinc finger* 基因的相对表达量随着温度的降低而增多, 表现为基因上调表达; 而 β -*amylase*、*WRKY*、*Phospholipase* 和 *MYB* 基因的相对表达量则表现为 4 ℃ 时增加、-30 ℃ 时减少。从基因的相对表达量来看, 最大相对表达量超过 5 的基因有 *NAC* 和 *WRKY*, 介于 2 ~ 5 之间的基因有 *AP2*、*Zinc finger*、 β -*amylase* 和 *MYB*, 低于 2 的基因有 *Phospholipase*、*HSP* 和 *FAD*。结果显示 *NAC* 和 *WRKY* 基因可能在鹅掌楸的抗寒过程中起主要作用。

关键词: 鹅掌楸; 低温胁迫; 抗寒性相关基因; 数字基因表达谱; 差异表达基因; 相对表达量

中图分类号: Q948.112+.2; Q946-33; S792.21 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2015)03-0025-07
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2015.03.04

Analysis on differential expression of cold resistance related genes of *Liriodendron chinense* under low temperature stress LU Chang, LI Bin, ZHENG Yongqi^① (State Key Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, Research Institute of Forestry of Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of State Forestry Administration, Beijing 100091, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2015, 24(3): 25-31

Abstract: Under 4 ℃ and -30 ℃ low temperature conditions, digital gene expression profile of total RNA from apical buds of one individual of *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. introduced from Dabieshan of Anhui was constructed and differential expression genes were selected, and cold resistance related genes selected were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. The results show that qualities of total RNA samples obtained meet the experimental requirements. Analysis results of digital gene expression profile show that total length of reads after quality control of each sample is above 0.5 Gbp, error rate of base is 0.01%, Q20 value is more than 99%, Q30 value is 96.99% - 97.23%, GC content is 44.97% - 47.06%, and percentage of successfully mapped read number to total read number after quality control of each sample is above 90%. Selection result of differential expression genes shows that nine differential expression genes related to cold resistance of *L. chinense* are founded totally, they are *HSP*, *MYB*, *NAC*, *AP2*, *Zinc finger*, *WRKY*, *FAD*, *Phospholipase* and β -*amylase* genes, respectively. Real-time fluorescence quantitative PCR analysis result shows that these nine genes have three expression modes, in which, relative expressions of *HSP* and *FAD* genes both decrease with decreasing of temperature, appearing gene down-regulated expression; those of *AP2*, *NAC* and *Zinc*

收稿日期: 2015-05-31

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2013BAD01B06)

作者简介: 陆 畅(1986—), 女, 安徽蚌埠人, 博士研究生, 主要研究方向为林木遗传育种。

^① 通信作者 E-mail: zyq8565@126.com

finger genes increase with decreasing of temperature, appearing gene up-regulated expression; while those of β -amylase, WRKY, Phospholipase and MYB genes appear increasing at 4 °C and decreasing at -30 °C. On the view of gene relative expression, genes with maximum relative expression over 5 are NAC and WRKY, genes with that between 2-5 are AP2, Zinc finger, β -amylase and MYB, and genes with that under 2 are Phospholipase, HSP and FAD. It is suggested that NAC and WRKY genes may play a major role in the process of cold resistance of *L. chinense*.

Key words: *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.; low temperature stress; cold resistance related gene; digital gene expression profile; differential expression gene; relative expression

鹅掌楸 [*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.] 为木兰科 (Magnoliaceae) 鹅掌楸属 (*Liriodendron* Linn.) 植物, 为中国特有种, 属于少数花叶共赏树种, 并为世界珍贵树种^[1]; 鹅掌楸材性良好, 具有一定的药用价值, 被列为中国珍稀濒危保护植物^[2], 自然分布于中国南方江西、贵州、福建等省的山地中。在引种栽培过程中, 抗寒性差是限制鹅掌楸向北方推广种植的主要因素。因此, 明确鹅掌楸的抗寒机制对于鹅掌楸的推广种植和培育抗寒品种具有重要意义。然而, 目前关于鹅掌楸抗寒性的研究主要集中在表型性状评价方面^[3-4], 尚未见从基因水平上探究鹅掌楸抗寒性的相关研究报道。

目前研究基因功能的方法较多, 其中, 差减杂交、cDNA 代表性差异分析及 mRNA 差异显示技术等无法全面系统的分析基因功能, 基因克隆技术和遗传转化技术则存在实验周期较长的问题^[5], 只有转录组测序技术可以实现大规模转录本的快速鉴定和功能分析^[6]。因此, 转录组测序技术已成为研究植物基因功能的重要手段, 被广泛应用于植物的冷适应和低温响应基因的研究^[7-9]。

为了从基因水平上明确鹅掌楸的抗寒机制, 作者对 4 °C 和 -30 °C 低温条件下来源于鹅掌楸天然分布区北缘的安徽大别山 10 年生植株的顶芽总 RNA 进行数字基因表达谱构建和差异表达基因筛选, 并对获得的抗寒性相关基因进行实时荧光定量 PCR 分析, 以期比较鹅掌楸各抗寒性相关基因间的表达差异, 为从基因水平上研究其抗寒机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试样株引种自鹅掌楸天然分布区北缘的安徽大别山, 种植于中国林业科学研究院内, 为 10 年生植株。于 2014 年 7 月中旬分别采集植株树冠上、中、下

层北侧的 1 年生幼嫩枝条 (带叶, 且枝条顶端保留叶芽), 每层各采集 3 份样品, 每份样品 10 个枝条, 根据预实验结果进行低温冻害实验。各取 1 份树冠上、中、下层枝条, 分别混匀后平均分成 3 组; 第 1 组为对照 (CK), 于常温下立即采集枝条顶芽, 并用锡箔纸包裹后迅速投入液氮中, 并用液氮罐带回实验室, 置于 -80 °C 超低温冰箱中保存、备用; 第 2 组和第 3 组枝条样品分别用塑料袋包装后置于 4 °C 冰箱中, 24 h 后取出; 采集第 2 组枝条的顶芽, 用锡箔纸包裹后迅速投入液氮中, 置于 -80 °C 超低温冰箱中保存、备用, 记为 T1; 同时将第 3 组枝条样品迅速放入 -30 °C 冰箱中, 30 min 后取出, 采集枝条的顶芽, 用锡箔纸包裹后迅速投入液氮中, 置于 -80 °C 超低温冰箱中保存、备用, 记为 T2。对各层枝条样品均如此处理, 每个温度处理各 3 个重复, 共 9 份样品。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及质量检测 采用离心柱型 RNA Prep Pure Plant Kit 试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 分别提取各样品的总 RNA, 并利用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 测定获得的总 RNA 样品溶液的浓度及 OD_{260}/OD_{280} , 并对获得的总 RNA 样品质量进行检测。将质量检测合格的总 RNA 样品分成两部分: 一部分用于数字基因表达谱构建; 另一部分置于 -80 °C 超低温冰箱中保存, 用于后期的实时荧光定量 PCR 分析。

1.2.2 数字基因表达谱的构建 数字基因表达谱构建过程由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成, 采用 RNA Library Prep Kit for Illumina 试剂盒 (美国 NEBNext® Ultra™ 公司)、按照操作指南构建表达谱测序文库。使用带有 Oligo(dT) 的小磁珠分离纯化出总 RNA 样品中的 mRNA; 随后加入 Fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段, 并使用随机引物将待测的 mRNA 逆转录合成单链 cDNA; 加入缓冲液、dNTPs、

DNA polymerase I 和 RNase H 合成双链 cDNA;使用 Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒(美国 Backman 公司)纯化双链 cDNA,并对其进行末端修复、3'末端加 polyA 尾巴和连接测序接头等工作,对获得的产物进行 PCR 扩增,并用 Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒纯化获得的 PCR 产物,得到待测序文库。使用 Agilent 2100 生物芯片分析系统(美国 Agilent 公司)并采用 Q-PCR 方法对待测序文库进行质量检测;使用 Illumina HiSeq™ 2500 高通量测序平台(美国 Illumina 公司)进行单端测序(single-end, SE),测序的序列标签长度为 50 bp。实验共构建了 3 个数字基因表达谱数据库,分别为 CK、T1 和 T2,每个表达谱样本测序进行 3 次生物学重复。

1.2.3 差异表达基因的筛选 将上述测序获得的序列与 Nr、Nt、SwissProt、GO、KOG 和 KEGG 数据库进行比对,获得上述测序序列的注释信息;对 3 个表达谱数据库进行两两组合,比较基因的差异表达水平。共 3 个比较组合,分别为 CK vs. T1、CK vs. T2 和 T1 vs. T2。本研究中的差异基因筛选条件为 q -value < 0.005 并且 $|\log_2(\text{foldchange})| > 1$ 。对差异检验的 p 值进行多重假设检验校正,并通过控制错误发现率(false discovery rate, FDR)来决定 p 值。根据测序获得的转录组数据和表达谱测序数据,按基因功能对转录组数据中的 KEGG 代谢通路显著富集的序列进行分类。对候选基因序列在 GenBank 中重新进行 BLASTx 同源性比对,以获取基因的准确信息。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析 从 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱中取出总 RNA 样品,室温下解冻后配制逆转录反应体系,包括总 RNA $0.5\text{ }\mu\text{g}$ 、 $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Oligo(dT)

$0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ random 6mers $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $5\times$ PrimeScript buffer $2.0\text{ }\mu\text{L}$ 和 PrimeScript RT Enzyme Mix I $0.5\text{ }\mu\text{L}$,并用 Nuclease-free H_2O 将反应体系总体积补足至 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。将上述反应体系置于 9700 型 PCR 仪(美国 ABI 公司)中于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 保温 15 min 完成逆转录反应,再于 $85\text{ }^\circ\text{C}$ 保温 5 s 终止逆转录反应;加入 $90\text{ }\mu\text{L}$ Nuclease-free H_2O ,置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存、备用。

采用 Roche LCPDS2 软件、根据筛选出的差异表达基因序列设计引物,并由上海捷瑞生物工程有限公司合成,各引物序列及其扩增的条带长度见表 1。选择稳定表达的 18S rRNA 作为内参基因进行 PCR 扩增。在 LightCycler® 480 II 型荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)上使用 LightCycler® 480 SYBR Green I Master 试剂盒(瑞士 Roche 公司)进行 PCR 扩增反应,每个扩增反应重复 3 次。反应体系总体积为 $10\text{ }\mu\text{L}$,包括 $2\times$ LightCycler® 480 SYBR Green I Master $5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正向引物 $0.2\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 反向引物 $0.2\text{ }\mu\text{L}$ 、cDNA 模板 $1.0\text{ }\mu\text{L}$ 和 Nuclease-free H_2O $3.6\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增程序为: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 10 min ; $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s , $60\text{ }^\circ\text{C}$ 退火和延伸各 30 s ,共 40 个循环。扩增反应结束后利用熔解曲线检测产物特异性;将该反应体系从 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 缓慢升温至 $97\text{ }^\circ\text{C}$,每升高 $1\text{ }^\circ\text{C}$ 采集 5 次荧光信号。

采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行基因相对表达量的计算,计算公式为:基因相对表达量 $= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。其中, $\Delta\Delta\text{Ct}$ 计算公式为: $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{实验组}) - \Delta\text{Ct}(\text{对照组})$,实验组或对照组的 ΔCt 计算公式为: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{目的基因}) - \text{Ct}(\text{内参基因})$ 。

表 1 用于鹅掌楸差异表达基因实时荧光定量 PCR 扩增的特异引物序列及扩增条带长度

Table 1 Sequence and amplified band length of special primers used for real-time fluorescence quantitative PCR amplification of differential expression gene of *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.

序列编号 No. of sequence	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')		扩增条带长度/bp Length of amplified band
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	
comp144834_c1	CATTCCTATGCTCGGTTCTTT	TCTCGACTCGAACCATACT	114
comp118790_c0	CTCCAAGGGCCCTTTGATT	TCTGCTCCCATCTCCTCTA	113
comp133557_c0	TTCTCTCCAAATAATCGGCG	AGTCAAGCCGTTCTGTTCA	109
comp138270_c0	CCCTCCAATTTCGATGACC	ACACCTGTTTCCTTTCTTCATA	113
comp143973_c0	TATGGTCACCCACAACCG	ACTAAAAGTTCACACATGGGCTA	109
comp132916_c0	CAAAACCTGCCCTTAATCTAGT	GTTGTGGTTCCCTTTCGTAT	123
comp142526_c0	CATAACAGTATCTGGCAAGGTC	TCTGTGTGCTGTGTTGTAGT	100
comp141644_c0	ATCAATGGATGGGTTAATGCAA	AATTCTCCTTCGACGAGAC	107
comp137127_c0	AGCTTGTAGCGGTTCTAT	CCATTACATTGAGAATCGCC	112
18S rRNA	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT	187

2 结果和分析

2.1 总 RNA 样品质量的检测结果分析

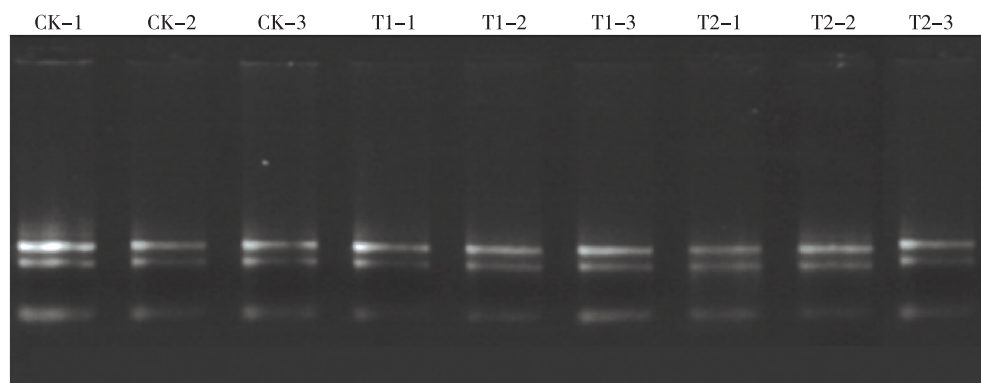
检测结果(表 2)显示:提取获得的鹅掌楸顶芽总 RNA 样品溶液的 OD_{260}/OD_{280} 介于 1.8 ~ 2.1 之间,说明提取获得的总 RNA 样品的纯度较高,杂质污染程度较小,获得的总 RNA 样品的质量能够满足后续实验的要求;获得的每份总 RNA 样品的总量为 34 ~ 117 μg ,均可以满足 2 次或者 2 次以上后续实验的需要量,便于开展 3 次重复实验。

电泳检测结果(图 1)显示:获得的总 RNA 样品的 18S 和 28S RNA 条带清晰、亮度高,并且后者条带亮度高于前者,说明获得的总 RNA 样品可用于实时荧光定量 PCR 分析。

表 2 低温胁迫下鹅掌楸顶芽总 RNA 质量的检测结果
Table 2 Detection result of quality of total RNA from apical buds of *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. under low temperature stress

编号 ¹⁾ Number ¹⁾	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Concentration	体积/ μL Volume	总量/ μg Total	OD_{260}/OD_{280}
CK-1	2.09	35	73	2.06
CK-2	0.37	100	37	2.03
CK-3	0.99	45	45	2.03
T1-1	0.63	100	63	2.07
T1-2	0.42	135	57	2.06
T1-3	0.97	35	34	2.04
T2-1	0.37	100	37	2.08
T2-2	0.63	185	117	2.01
T2-3	0.57	69	39	2.03

¹⁾ CK-1, CK-2, CK-3: 表示对照(常温)的 3 个重复 Representing three replications of the control (normal temperature); T1-1, T1-2, T1-3: 表示 4 °C 低温处理的 3 个重复 Representing three replications of 4 °C low temperature treatment; T2-1, T2-2, T2-3: 表示 -30 °C 低温处理的 3 个重复 Representing three replications of -30 °C low temperature treatment.



CK-1, CK-2, CK-3: 表示对照(常温)的 3 个重复 Representing three replications of the control (normal temperature); T1-1, T1-2, T1-3: 表示 4 °C 低温处理的 3 个重复 Representing three replications of 4 °C low temperature treatment; T2-1, T2-2, T2-3: 表示 -30 °C 低温处理的 3 个重复 Representing three replications of -30 °C low temperature treatment.

图 1 低温胁迫下鹅掌楸顶芽总 RNA 检测的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of detection of total RNA from apical buds of *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. under low temperature stress

2.2 数字基因表达谱的测序结果分析

对 9 份鹅掌楸顶芽总 RNA 样品的数字基因表达谱进行测序,结果(表 3)表明:每个样品的质量控制后序列的总长度均在 0.5 Gbp 以上,碱基错误率均为 0.01%;Q20 值均超过 99%,Q30 值在 96.99% ~ 97.23% 之间,GC 含量为 44.97% ~ 47.06%。每个样品比对成功的序列条数占该样品质量控制后序列总数的百分率均在 90% 以上。

2.3 差异表达基因的筛选结果分析

使用 $\log_2(\text{foldchange})$ 表示比较组合中某一基因在 2 个样品间的表达差异。假设 $\log_2(\text{foldchange})$ 值为 x ,则样品 A 对比样品 B 的表达倍数(fold change)

为 2^x 倍。使用校正后的 p 值表现基因表达量变化的统计学显著程度,校正后的 p 值越小, $-\log_{10}$ (校正后的 p 值)越大,即差异越显著。在实验设置的 3 个比较组合中,CK vs. T2 组合的差异表达基因数最多,共有 3 485 个差异表达基因,包括 2 272 个上调基因和 1 213 个下调基因;CK vs. T1 组合的差异表达基因有 1 687 个,包括 1 126 个上调基因和 561 个下调基因;T1 vs. T2 组合的差异表达基因数最少,仅有 152 个,包括 28 个上调基因和 124 个下调基因。

结合前人关于植物抗寒性相关基因的研究结果^[7-9],共筛选出 9 个与鹅掌楸抗寒性相关的差异表达基因(表 4)。与 GenBank 数据库中的相关信息进

行同源比对,其中6个差异表达基因(序列编号分别为 comp144834_c1、comp118790_c0、comp133557_c0、comp138270_c0、comp143973_c0 和 comp132916_c0)被认为是潜在的转录因子,推测其分别为 *HSP*、*MYB*、*NAC*、*AP2*、*Zinc finger* 和 *WRKY* 基因;推测序列编号 comp141644_c0 的差异表达基因为脂肪酸去饱和酶

(*fatty acid desaturase*, *FAD*) 基因;推测序列编号 comp142526_c0 的差异表达基因为与 β -淀粉酶合成相关的基因,即 β -*amylase* 基因;推测序列编号 comp137127_c0 的差异表达基因为磷脂酶 (*Phospholipase*) 基因。

表3 低温胁迫下鹅掌楸顶芽总 RNA 的数字基因表达谱的分析结果¹⁾

Table 3 Analysis result of digital gene expression profile of total RNA from apical buds of *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. under low temperature stress¹⁾

编号 ²⁾ Number ²⁾	Nr	Nq	Lq/Gbp	Re/%	Q20/%	Q30/%	GC 含量/% GC content	P/%
CK-1	11 560 846	11 125 313	0.56	0.01	99.09	97.06	47.06	93.21
CK-2	11 597 108	11 158 384	0.56	0.01	99.10	97.10	46.27	92.89
CK-3	10 706 615	10 242 343	0.51	0.01	99.12	97.21	46.96	93.73
T1-1	11 323 359	10 870 470	0.54	0.01	99.05	96.99	46.60	92.61
T1-2	10 882 719	10 473 402	0.52	0.01	99.09	97.11	45.65	92.60
T1-3	10 787 546	10 308 974	0.52	0.01	99.09	97.10	46.26	91.65
T2-1	10 508 686	10 130 883	0.51	0.01	99.02	97.04	44.97	92.52
T2-2	10 383 784	10 010 891	0.50	0.01	99.11	97.23	45.74	92.47
T2-3	11 677 850	11 240 380	0.56	0.01	99.07	97.13	45.96	92.12

¹⁾ Nr: 原始序列总条数 Total number of raw reads; Nq: 质量控制后的序列总条数 Total number of reads after quality control; Lq: 质量控制后序列的总长度 Total length of reads after quality control; Re: 碱基错误率 Error rate of base; P: 比对成功的序列条数占质量控制后序列总数的百分率 Percentage of successfully mapped read number to total read number after quality control.

²⁾ CK-1, CK-2, CK-3: 表示对照(常温)的3个重复 Representing three replications of the control (normal temperature); T1-1, T1-2, T1-3: 表示 4 °C 低温处理的3个重复 Representing three replications of 4 °C low temperature treatment; T2-1, T2-2, T2-3: 表示 -30 °C 低温处理的3个重复 Representing three replications of -30 °C low temperature treatment.

表4 低温胁迫下鹅掌楸差异表达基因的筛选结果

Table 4 Selection result of differential expression gene of *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. under low temperature stresses

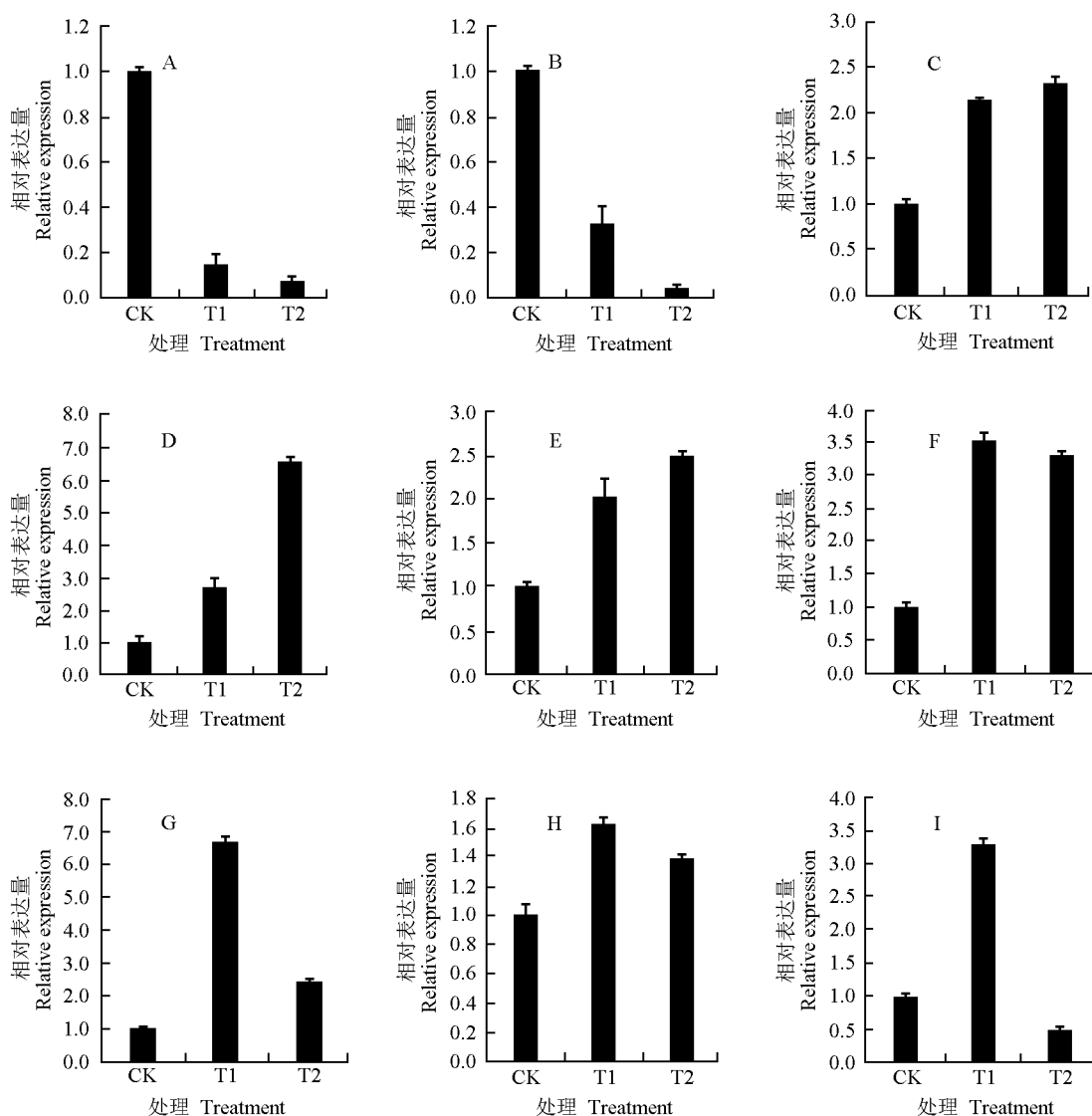
序列编号 No. of sequence	GenBank 中相似序列的蛋白名称 Name of protein with similar sequence in GenBank	基因名称 Gene name	序列长度/bp Length of sequence
comp144834_c1	HSF30 (葡萄 <i>Vitis vinifera</i>)	<i>HSP</i>	2 668
comp118790_c0	MYB124 (大豆 <i>Glycine max</i>)	<i>MYB</i>	866
comp133557_c0	NAC (苹果 <i>Malus domestica</i>)	<i>NAC</i>	1 141
comp138270_c0	AP2/ERF (predicted) (可可 <i>Theobroma cacao</i>)	<i>AP2</i>	1 491
comp143973_c0	Zinc finger protein (拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>Zinc finger</i>	3 633
comp132916_c0	WRKY 6 (野大豆 <i>Glycine soja</i>)	<i>WRKY</i>	2 116
comp142526_c0	β -amylase 9 (predicted) (葡萄 <i>Vitis vinifera</i>)	β - <i>amylase</i>	2 176
comp141644_c0	Uncharacterized protein LOC100245192 (predicted) (葡萄 <i>Vitis vinifera</i>)	<i>FAD</i>	753
comp137127_c0	Hypothetical protein VITISV_043921 (葡萄 <i>Vitis vinifera</i>)	<i>Phospholipase</i>	1 232

2.4 实时荧光定量 PCR 检测结果分析

对筛选出的9个鹅掌楸抗寒性相关基因进行实时荧光定量 PCR 检测,结果(图2)表明:筛选出的9个鹅掌楸抗寒性相关基因共有3种表达模式:其中,*HSP* 和 *FAD* 基因的相对表达量均随着温度的降低而逐渐减少,表现为基因下调表达;*AP2*、*NAC* 和 *Zinc finger* 基因的相对表达量随着温度的降低而逐渐增多,表现为基因上调表达; β -*amylase*、*WRKY*、*MYB* 和

Phospholipase 基因的相对表达量则随着温度降低表现为 4 °C 时增多、-30 °C 时减少。

由图2还可以看出:在不同低温胁迫条件下,在9个鹅掌楸抗寒性相关基因中,最大基因相对表达量超过5的高表达基因为 *NAC* 和 *WRKY*;最大基因相对表达量在 2 ~ 5 的基因为 *AP2*、*Zinc finger*、 β -*amylase* 和 *MYB*;最大基因相对表达量低于2的低表达基因为 *HSP*、*FAD* 和 *Phospholipase*。



CK: 对照(常温) The control (normal temperature); T1: 低温处理(4 °C) Low temperature treatment (4 °C);
T2: 低温处理(-30 °C) Low temperature treatment (-30 °C).

A: HSP 基因 HSP gene; B: FAD 基因 FAD gene; C: AP2 基因 AP2 gene; D: NAC 基因 NAC gene; E: Zinc finger 基因 Zinc finger gene; F: β -amylase 基因 β -amylase gene; G: WRKY 基因 WRKY gene; H: Phospholipase 基因 Phospholipase gene; I: MYB 基因 MYB gene.

图2 低温胁迫下鹅掌楸9个抗寒性相关基因相对表达量的变化
Fig. 2 Change in relative expression of nine cold resistance related genes of *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. under low temperature stress

3 讨 论

转录因子(transcription factor)既是植物对冷胁迫特异性反应的开关,又是信号传导的终点^[6]。上调表达的转录因子很可能在植物防御和应激反应中起到重要作用^[10-11]。本研究中,随着低温胁迫温度的降

低,基因表达上调的3个基因AP2、NAC和Zinc finger均为转录因子类基因,其中AP2和Zinc finger基因的相对表达量变化幅度在25 °C降温至4 °C的过程中最大,而NAC基因的相对表达量变化幅度则在4 °C降温至-30 °C的过程中最大;并且,NAC基因的最大相对表达量超过5。陈新^[12]的研究结果表明:NAC基因能够参与植物对冷胁迫的响应,并调控植物的开花过

程,而且还能够诱导 *SNAC2* 等基因的表达,提高植物对冷和盐胁迫的抗性。据此推测该基因可能与鹅掌楸的抗寒性密切相关。

为了达到渗透平衡,植物体可积累包括可溶性糖、糖醇和低分子量化合物在内的物质作为应对冷胁迫的低温保护剂^[13]。因此,参与上述物质相关新陈代谢的基因同样会在植物对低温胁迫的响应过程中发生表达量的变化。 β -淀粉酶可以将淀粉降解为可溶性糖,鹅掌楸的 β -淀粉酶基因在25℃降温至4℃的过程中表现为上调表达,而在4℃降温至-30℃的过程中则表现为下调表达。根据邓菊庆等^[14]的研究结果推断:温度下降初期,淀粉酶活性提高,可溶性糖含量随之升高,细胞膜流动性增强,从而提高鹅掌楸的抗寒性;但是,当温度持续下降至极端低温时,淀粉酶活性受到抑制,可溶性糖合成受阻,细胞膜流动性减弱,从而使鹅掌楸的抗寒性也随之减弱。植物遇冷害后,冻害造成细胞脱水致使膜系统首先受到伤害,脂肪酸去饱和酶起到调节不饱和脂肪酸的作用,从而进一步调节细胞膜的流动性。徐呈祥^[15]认为:植物细胞膜中的不饱和脂肪酸含量越高,其抗寒性越强。本研究中鹅掌楸的 *FAD* 基因在低温胁迫过程中始终表现为下调表达,说明随着温度的降低,鹅掌楸体内的脂肪酸去饱和酶活性降低,不饱和脂肪酸合成减少,细胞膜的流动性减弱,从而使鹅掌楸的抗寒性减弱。磷脂酶是植物体内重要的磷脂水解酶,兼具跨膜信号转导的作用,能够影响植物的抗冻性^[16]。鹅掌楸的 *Phospholipase* 基因在25℃降温至4℃的过程中表现为上调表达,说明在对低温环境的响应过程中鹅掌楸的抗寒性增强,但是该基因在4℃降温至-30℃的过程中表现为下调表达,这一变化是否与-30℃造成鹅掌楸细胞组织损伤、致使该基因无法正常表达有关,尚待进一步研究。

总体而言,通过数字基因表达谱技术从鹅掌楸顶芽总RNA中共筛选出9个差异表达基因,这9个基因均与鹅掌楸的抗寒性有关,表现为3种表达模式,其中 *NAC* 和 *WRKY* 基因的相对表达量最大,推测这2个基因可能在鹅掌楸的抗寒过程中起到主要作用。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第三十卷第一分册[M]. 北京:科学出版社,1980:196-198.

- [2] 傅立国. 中国植物红皮书:稀有濒危植物(第一册)[M]. 北京:科学出版社,1992:408-409.
- [3] 吴君,李庆卫,王悦. 不同小气候对杂种鹅掌楸冻害情况的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(3):165-167.
- [4] 姜磊,王恭祎. 华北地区鹅掌楸属树种苗木木生长特性初探[J]. 林业应用技术,2007(6):4-6.
- [5] WANG J M, YANG Y, LIU X H, et al. Transcriptome profiling of the cold response and signaling pathways in *Lilium lancifolium* [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 203-222.
- [6] ZHANG G J, GUO G W, HU X D, et al. Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome[J]. Genome Research, 2010, 20: 646-654.
- [7] PANG T, YE C Y, XIA X L, et al. De novo sequencing and transcriptome analysis of the desert shrub, *Ammopiptanthus mongolicus*, during cold acclimation using Illumina/Solexa [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 488-502.
- [8] XU W R, LI R M, ZHANG N B, et al. Transcriptome profiling of *Vitis amurensis*, an extremely cold-tolerant Chinese wild *Vitis* species, reveals candidate genes and events that potentially connected to cold stress[J]. Plant Molecular Biology, 2014, 86: 527-541.
- [9] WANG X C, ZHAO Q Y, MA C L, et al. Global transcriptome profiles of *Camellia sinensis* during cold acclimation [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 415-430.
- [10] SINGH K B, FOLEY R C, OÑATE-SÁNCHEZ L. Transcription factors in plant defense and stress responses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5: 430-436.
- [11] SARAH F, THOMAS W M F. Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway[J]. Plant Cell, 2002, 14: 1675-1690.
- [12] 陈新. 榛子花芽转录组文库的 Solexa 测序及冷调节基因的表达谱分析[D]. 北京:中国林业科学研究院林业研究所,2011:35-38.
- [13] XIN Z, BROWSE J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures [J]. Plant, Cell and Environment, 2000, 23: 893-902.
- [14] 邓菊庆,蹇洪英,李淑斌,等. 五种野生蔷薇属植物抗寒力的综合评价[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2012,37(4):70-75.
- [15] 徐呈祥. 提高植物抗寒性的机理研究进展[J]. 生态学报,2012,32(24):7966-7980.
- [16] 曾正兵,梅旭荣,钟秀丽,等. 磷脂酶 D α 在拟南芥低温驯化过程中的作用途径分析[J]. 基因组学与应用生物学,2009,28(4):703-708.

(责任编辑:佟金凤)