

芳樟叶片和枝的转录组分析及生物炭复合肥对芳樟醇合成调控基因表达特性的影响

向 双^{a,b}, 陈德强^{a,b}, 孙维红^{a,b}, 肖 琳^{a,b}, 邹双全^{a,b,①}

(福建农林大学: a. 林学院, b. 自然生物资源保育利用福建省高校工程研究中心, 福建 福州 350002)

摘要: 以芳樟(*Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita)为研究材料,对施肥前及施肥后第1、第3和第5个月叶片和枝中芳樟醇相对含量进行了比较;利用高通量测序平台构建了施肥前后芳樟的转录组数据库并注释 unigenes 的功能,对芳樟醇合成途径进行预测,并分析了相关调控基因的表达特性变化。结果显示:施肥前后芳樟叶片的芳樟醇相对含量均高于枝,且施肥后叶片和枝中的芳樟醇相对含量均显著提高;施肥后第3个月叶片和枝中芳樟醇相对含量均最高,分别为 89.89% 和 84.83%。从芳樟转录组中共获得 72 560 个 unigenes,总长度 96 543 844 bp,N50 值为 2 054 bp,GC 含量为 43.19%,其中,注释到 7 个数据库的 unigenes 共有 52 613 个。在 NR 数据库中,芳樟与荷花(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)和博落回[*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.]的同源序列匹配度较高,占比分别为 27.09% 和 14.91%。通过 GO 数据库,共有 39 186 个 unigenes 注释到生物过程、细胞成分和分子功能 3 大类 24 亚类中。在 KEGG 数据库中,共有 40 698 个 unigenes 注释到细胞过程、环境信息处理、遗传信息加工、代谢和生物系统 5 大类 19 亚类中;根据 KEGG 数据库的注释结果,推测芳樟醇主要通过 MEP(甲基赤藓醇磷酸)途径合成前体物质,并在 LIS(芳樟醇合酶)的作用下生成芳樟醇。通过 KOG 数据库对基因功能进行预测,共有 40 096 个 unigenes 注释到 24 个类别中。从芳樟叶片和枝的转录组中共鉴定出 23 个与芳樟醇合成相关的基因,且各基因的表达具有组织特异性;施肥后第3个月,叶片中有 18 个基因表达水平上调,枝中有 15 个基因表达水平上调,在叶片和枝中均上调表达的基因包括 3 个 *DXS* 基因、1 个 *DXR* 基因、2 个 *HDS* 基因、1 个 *HDR* 基因、2 个 *IDI* 基因、1 个 *GPPS* 基因和 3 个 *LIS* 基因,说明这些基因可能参与芳樟醇合成的调控。综合分析结果表明:施用生物炭复合肥后,芳樟叶片和枝中芳樟醇相对含量均显著提高,与芳樟醇合成调控基因表达水平上调有一定关系。

关键词: 芳樟; 芳樟醇; 转录组测序; 调控基因; 生物炭复合肥

中图分类号: Q943.2; S792.23 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2021)04-0031-10
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2021.04.04

Analysis on transcriptomes from leaf and branch of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* and effect of biochar compound fertilizer on expression characteristics of regulator genes related to linalool synthesis XIANG Shuang^{a,b}, CHEN Deqiang^{a,b}, SUN Weihong^{a,b}, XIAO Lin^{a,b}, ZOU Shuangquan^{a,b,①} (Fujian Agriculture and Forestry University: a. Forestry College, b. Engineering Research Center of Natural Biological Resources Conservation & Utilization of Fujian Province, Fuzhou 350002, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2021, 30(4): 31-40

Abstract: Taking *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita as research materials, relative contents of linalool in leaf and branch before fertilization and in the first, third, and fifth months after fertilization were compared; the transcriptome databases of *C. camphora* var. *linaloolifera* before and after fertilization were constructed by using high-throughput sequencing platform and the functions of unigenes were

收稿日期: 2021-01-05

基金项目: 中央财政林业科技推广示范项目(闽[2020]TG07号); 福建省林业科技项目(2021FKJ19)

作者简介: 向 双(1997—),女,重庆开州人,硕士研究生,主要从事森林培育方面的研究。

①通信作者 E-mail: zou@fafu.edu.cn

引用格式: 向 双, 陈德强, 孙维红, 等. 芳樟叶片和枝的转录组分析及生物炭复合肥对芳樟醇合成调控基因表达特性的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2021, 30(4): 31-40.

annotated, the synthesis pathway of linalool was predicted, and the variation of expression characteristics of related regulator genes were analyzed. The results show that the relative contents of linalool in leaf of *C. camphora* var. *linaloolifera* before and after fertilization are all higher than those in branch, and the relative contents of linalool in leaf and branch after fertilization all increase significantly; the relative contents of linalool in leaf and branch in the third month after fertilization are the highest, which are 89.89% and 84.83%, respectively. There are 72 560 unigenes obtained from the transcriptome of *C. camphora* var. *linaloolifera* in total, the total length is 96 543 844 bp, the N50 value is 2 054 bp, and the GC content is 43.19%, in which, there are 52 613 unigenes annotated to 7 databases. In NR database, *C. camphora* var. *linaloolifera* has relatively high homologous sequence identity with *Nelumbo nucifera* Gaertn. and *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br., and the percentages are 27.09% and 14.91%, respectively. In total, 39 186 unigenes are annotated to 24 subcategories of 3 categories namely biological process, cellular component, and molecular function via GO database. In KEGG database, there are 40 698 unigenes annotated to 19 subcategories of 5 categories containing cellular process, environment information processing, genetic information processing, metabolism, and organismal system; according to the annotation result of KEGG database, it is speculated that the precursor of linalool is mainly synthesized via MEP (methyl erythritol phosphate) pathway, and linalool is subsequently formed under the action of LIS (linalool synthetase). The gene functions were predicted through KOG database, and 40 096 unigenes are annotated to 24 categories. In total, 23 genes related to linalool synthesis are identified in the transcriptomes from leaf and branch of *C. camphora* var. *linaloolifera*, and the expression of each gene are tissue-specific; in the third month after fertilization, 18 genes in leaf are up-regulated, 15 genes in branch are up-regulated, and genes up-regulated in both leaf and branch contain 3 *DXS* genes, 1 *DXR* gene, 2 *HDS* genes, 1 *HDR* gene, 2 *IDI* genes, 1 *GPPS* gene, and 3 *LIS* genes, indicating these genes may be involved in the regulation of linalool synthesis. The comprehensive analysis result shows that after biochar compound fertilizer application, the relative contents of linalool in leaf and branch of *C. camphora* var. *linaloolifera* increase significantly, which may be associated with the up-regulation of regulator genes of linalool synthesis.

Key words: *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita; linalool; transcriptome sequencing; regulator gene; biochar compound fertilizer

芳樟 (*Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita) 是典型的芳香植物,其香气的关键成分为芳樟醇。芳樟醇是全球最常用和消耗较多的香料之一^[1],具有多种生物活性^[2-4],广泛应用于食品、医药和化妆品等行业^[5],市场需求量巨大。芳樟醇可分为天然芳樟醇和合成芳樟醇2类,其中,合成芳樟醇为右旋体、具有消光性,其品质远差于左旋体的天然芳樟醇^[6],但由于天然芳樟醇植物源提取物产量较低,加之芳樟自然资源有限,导致天然芳樟醇产量供应不足,使天然芳樟醇的开发利用受到限制。通过基因工程技术对芳樟进行改良,明确其芳樟醇合成调控基因,可为高芳樟醇芳樟品种资源的培育提供新思路和新途径。

近年来,植物的转录组测序在挖掘功能基因、探明活性成分代谢通路和明确次生代谢物合成关键酶基因等方面得到广泛应用^[7-8],通过转录组学研究已经解析了黄酮类^[9]、甾体皂苷类^[10]和三萜类^[11]等成分的生物合成途径。本项目组前期研究结果表明:芳

樟精油中的芳樟醇含量受多种因子的影响,不仅因品种、品系(无性系)不同而异^[12-14],也因采收时间不同而变化^[15];并且,对芳樟植株采取不同的栽培措施(例如施肥时间和肥料种类)后,其精油含量和芳樟醇含量也有明显的差异^[16-17]。而目前这些影响因子的作用机制尚不明确,特别是对芳樟醇合成过程中分子调控机制缺乏全面而深入的研究,不利于芳樟资源的进一步开发利用。

为了明确芳樟醇合成途径中的关键调控基因,探讨芳樟醇合成相关基因对外在因子的响应机制,本文利用高通量测序平台构建芳樟叶片和枝的转录组数据库,对 unigenes 进行功能注释,挖掘其芳樟醇合成过程中的关键调控基因;并以“生物炭复合肥对芳樟醇含量有影响效应”的研究结果(另文发表)为基础,比较施肥前后芳樟幼树叶片和枝中芳樟醇含量和相关调控基因表达特性的变化,以期芳樟中芳樟醇关键基因克隆和功能验证及其品种的遗传改良等奠定研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为芳樟优质品系‘MD1’,由厦门牡丹香化实业有限公司培育,种植于福建省泉州市安溪县半林国有林场(东经 117°57′、北纬 24°55′)。样地面积 10 m×10 m,按株距 1 m、行距 1 m 种植 60 株 2 年生幼树;幼树平均株高 77.11 cm,平均地径 15.89 mm,平均冠幅 80.95 cm。样地为近年采伐迹地,土质疏松,地力较肥沃,坡度较缓,适合芳樟种植。

根据项目组前期的研究结果确定生物炭复合肥配方,包括 3.40 g 生物炭(在 500 °C 高温厌氧条件下热解玉米秸秆 2 h 制备)、115.00 g 尿素(总 N 含量大于等于 46.0%)、15.00 g 过磷酸钙(P_2O_5 含量大于等于 16.0%)和 15.00 g 氯化钾(K_2O 含量大于等于 60%),其中,生物炭购自四川省久晟农业有限责任公司,尿素购自安阳中盈化肥有限公司,过磷酸钙购自瓮福有限责任公司,氯化钾购自中国农业生产资料集团公司。

1.2 方法

1.2.1 施肥处理及样品采集 于 2019 年 6 月 9 日进行施肥处理,按株施肥,每株施肥量 148.40 g,均一次性施入。分别于 6 月 9 日施肥前以及 7 月 9 日、9 月 9 日和 11 月 9 日(即施肥后第 1、第 3 和第 5 个月)采集无病虫害的当年生叶片和枝,在样株东、南、西、北 4 个方位分别采集叶片和枝,各自混合装袋,每袋 100 g,每份样品 3 袋,记为 3 次重复,用于精油提取和芳樟醇含量测定。转录组分析样品用 5 mL 冻存管收集,每份样品 3 管,记为 3 次重复,置于 -80 °C 下保存、备用。

1.2.2 精油提取和芳樟醇相对含量测定 采用水蒸气蒸馏法^[18]提取芳樟叶片和枝的精油,并采用 HPLC 法测定精油中芳樟醇的相对含量。

精密称取 43.5 mg 芳樟醇标准品(CAS 号 78-70-6,纯度在 97% 及以上,购自美国 Acros Organics 公司),加入甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司)溶解并定容至 10 mL,配制成质量浓度 $4.35 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芳樟醇标准品溶液;分别吸取 2、4、6、8、10 和 12 μL 标准品溶液,按下述色谱条件进行检测。色谱条件:Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Dikma Diamonsil C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5

μm);流动相为 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=70:30$ 混合液,等度洗脱,流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 210 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL 。记录色谱图,并以标准品峰面积为纵坐标(y)、标准品质量为横坐标(x)绘制标准曲线,回归方程为 $y=(6 \times 10^8)x+61162$ ($R^2=0.9999$),线性范围为 4.35~52.20 μg 。

称取 100 g 叶片或枝,于 50 °C 烘干至含水率 5%~13%,粉碎后置于 500 mL 挥发油提取器中,加入 200 mL 超纯水加热提取 60~90 min,蒸馏后取上层精油,经无水硫酸钠干燥后称量,按照公式“芳樟精油提取率=芳樟精油质量/样品鲜质量×100%”计算芳樟精油提取率。精密称取各精油样品 45 mg,用甲醇定容至 10 mL,过滤,滤液即为供试样品溶液;按照上述色谱条件进样测定,每份样品测定 3 次,记录各样品中芳樟醇的峰面积。

根据芳樟醇标准曲线和样品中芳樟醇的峰面积,按照公式“芳樟醇相对含量=(样品溶液中芳樟醇的峰面积/芳樟醇标准品的峰面积)×(芳樟醇标准品的浓度/样品溶液的浓度)×100%”计算样品中芳樟醇的相对含量。

1.2.3 转录组测序与组装 根据精油提取率和芳樟醇相对含量测定结果,以施肥前及施肥后第 3 个月的叶片和枝为材料,用 RNA 试剂盒(美国 Omega Bio-Tek 公司)提取总 RNA;用 NanoDrop 微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)检测其纯度,并用 Agilent 2100 生物分析仪(美国 Agilent Technology 公司)检测其浓度和完整性。

随后,用 Oligo(dT)磁珠从总 RNA 中分离和纯化 mRNA,并在富集后进行片段化处理,用随机引物和逆转录酶以 mRNA 为模版合成 cDNA,将 cDNA 片段末端修复,构建芳樟转录组的 cDNA 文库。用 DNBSEQ 高通量测序平台(武汉华大基因科技有限公司)对检测合格的 cDNA 文库进行测序;过滤低质量、接头污染及未知碱基 N 含量过高的 reads,得到高质量 reads;用 Trinity 软件^[19]对高质量 reads 进行从头组装,并用 TGICL 软件^[20]将组装后的转录本进行聚类去冗余,最终得到 unigenes。

1.2.4 Unigenes 功能注释 用 NCBI BLASTx 软件^[21]将 unigenes 与 NR(NCBI 非冗余蛋白质序列数据库)、NT(核酸序列数据库)、Swiss-Prot(经实验验证的蛋白质序列数据库)、Pfam(蛋白质家族数据库)、GO(基因本体数据库)、KEGG(京都基因与基因组百

科全书)和 KOG(真核生物直系同源基因数据库)7个数据库分别进行比对,并对 unigenes 进行功能注释、预测和分类。

1.2.5 基因表达特性分析 用 Bowtie2 软件^[22]分别对芳樟叶片和枝转录组进行序列比对,并用 RSEM 软件计算基因的表达水平,得到每个 unigene 的表达水平(FPKM)。用 DESeq2 软件^[23],根据筛选条件“阈值为 $|\log_2FC| > 1$ ”和“错误率(FDR)小于 0.01”,对与芳樟醇合成有关的调控基因进行筛选,并对各基因的表达水平进行分析。

1.3 数据处理和分析

用 EXCEL 2017 软件对芳樟转录组 unigenes 数进行统计并制图,用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行方差分析,采用 Dunnett 检验进行多重比较。

2 结果和分析

2.1 转录组测序和组装及 unigenes 功能注释

2.1.1 转录组测序和组装结果 通过 DNBSEQ 测序平台,从芳樟叶片和枝的转录组中共获得 72 560 个 unigenes,平均长度为 1 330 bp,unigenes 总长度达到 96 543 844 bp, N50 值为 2 054 bp, GC 含量为 43.19%。

由 unigenes 长度分布数据(表 1)可见:在 72 560 个 unigenes 中,长度小于 300 bp 的 unigenes 有 12 086 个,仅占 unigenes 总数的 16.7%;长度 3 000 bp 以上的 unigenes 有 6 441 个,长度大于 1 000 bp 的 unigenes 数占 unigenes 总数的 49%以上,表明芳樟叶

表 1 芳樟叶片和枝转录组 unigenes 的长度分布¹⁾

Table 1 Length distribution of unigenes in transcriptomes from leaf and branch of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita¹⁾

Unigenes 长度范围 Range of unigenes length	Unigenes 数 Number of unigenes	Unigenes 长度范围 Range of unigenes length	Unigenes 数 Number of unigenes	Unigenes 长度范围 Range of unigenes length	Unigenes 数 Number of unigenes
200 bp ≤ l < 300 bp	12 086	1 200 bp ≤ l < 1 300 bp	2 253	2 200 bp ≤ l < 2 300 bp	1 151
300 bp ≤ l < 400 bp	5 993	1 300 bp ≤ l < 1 400 bp	2 099	2 300 bp ≤ l < 2 400 bp	980
400 bp ≤ l < 500 bp	4 167	1 400 bp ≤ l < 1 500 bp	1 978	2 400 bp ≤ l < 2 500 bp	915
500 bp ≤ l < 600 bp	3 397	1 500 bp ≤ l < 1 600 bp	1 982	2 500 bp ≤ l < 2 600 bp	880
600 bp ≤ l < 700 bp	3 089	1 600 bp ≤ l < 1 700 bp	1 875	2 600 bp ≤ l < 2 700 bp	767
700 bp ≤ l < 800 bp	2 845	1 700 bp ≤ l < 1 800 bp	1 809	2 700 bp ≤ l < 2 800 bp	690
800 bp ≤ l < 900 bp	2 754	1 800 bp ≤ l < 1 900 bp	1 610	2 800 bp ≤ l < 2 900 bp	613
900 bp ≤ l < 1 000 bp	2 563	1 900 bp ≤ l < 2 000 bp	1 565	2 900 bp ≤ l < 3 000 bp	587
1 000 bp ≤ l < 1 100 bp	2 503	2 000 bp ≤ l < 2 100 bp	1 407	l ≥ 3 000 bp	6 441
1 100 bp ≤ l < 1 200 bp	2 277	2 100 bp ≤ l < 2 200 bp	1 284		

¹⁾ l: Unigenes 长度 Unigenes length.

片和枝的转录组序列完整性较高,可用于 unigenes 功能注释。

2.1.2 Unigenes 功能注释结果 对获得的芳樟叶片和枝转录组 unigenes 进行数据库比对注释,结果显示:在 72 560 个 unigenes 中,共有 52 613 个 unigenes 被注释到 7 个数据库中,占 unigenes 总数的 72.51%。其中,在 NR 数据库中注释到 50 149 个 unigenes,占 unigenes 总数的 69.11%,是注释 unigenes 数最多的数据库;分别有 36 090、39 232、40 698、40 096、39 995、39 186 个 unigenes 注释到 NT、Swiss-Prot、KEGG 和 KOG、Pfam 和 GO 6 个数据库中,注释的 unigenes 数分别占 unigenes 总数的 49.74%、54.07%、56.09%、55.26%、55.12%和 54.00%。同时注释到 7 个数据库

的 unigenes 数有 21 055 个,占 unigenes 总数的 29.02%。

2.1.2.1 序列相似性分析 将芳樟叶片和枝转录组 unigenes 与 NR 数据库中一些植物转录组 unigenes 进行序列相似性比较。结果显示:芳樟与荷花(*Nelumbo nucifera* Gaertn.)的同源序列匹配度最高,相似序列比例达到 27.09%;其次为博落回[*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.],相似序列比例为 14.91%;与葡萄(*Vitis vinifera* Linn.)、油棕(*Elaeis guineensis* Jacq.)和海枣(*Phoenix dactylifera* Linn.)的同源序列匹配度也较高,相似序列比例分别为 5.85%、5.43%和 3.95%;与其他植物的同源序列匹配度均较低,这部分序列比例为 42.76%。

2.1.2.2 GO 注释分析 在 GO 数据库对芳樟叶片和枝转录组 unigenes 功能进行注释,结果见图 1。

由图 1 可见,共有 39 186 个 unigenes 注释到生物过程 (biological process)、细胞成分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 3 大类 24 亚类中,其中注释到分子功能的 unigenes 最多。在注释到生物过程类别的 21 993 个 unigenes 中,注释到

细胞过程 (cellular process) 的 unigenes 最多,有 9 520 个;在注释到细胞成分类别的 28 829 个 unigenes 中,注释到膜部分 (membrane part) 的 unigenes 最多,有 12 323 个;而在注释到分子功能类别的 44 405 个 unigenes 中,注释到结合 (binding) 和催化活性 (catalytic activity) 的 unigenes 较多,分别有 20 456 和 18 905 个。

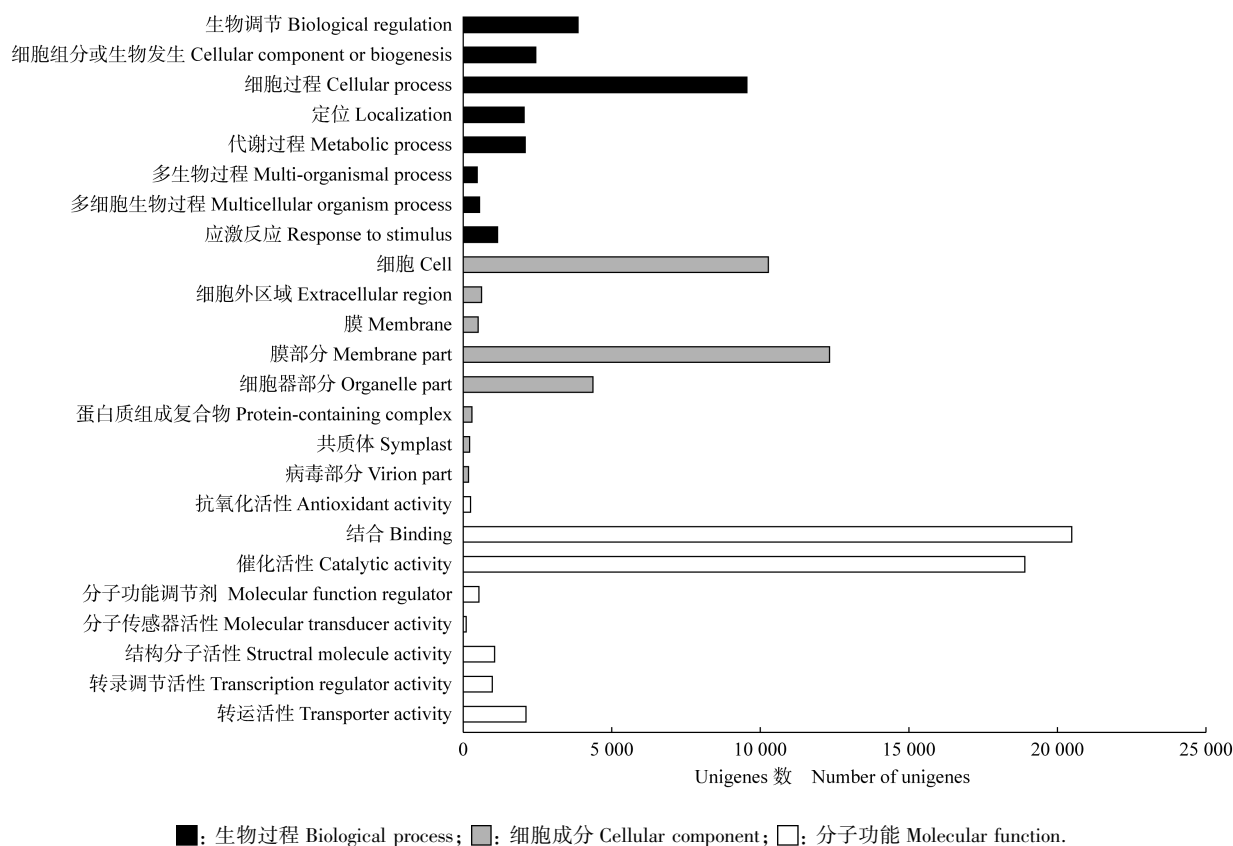


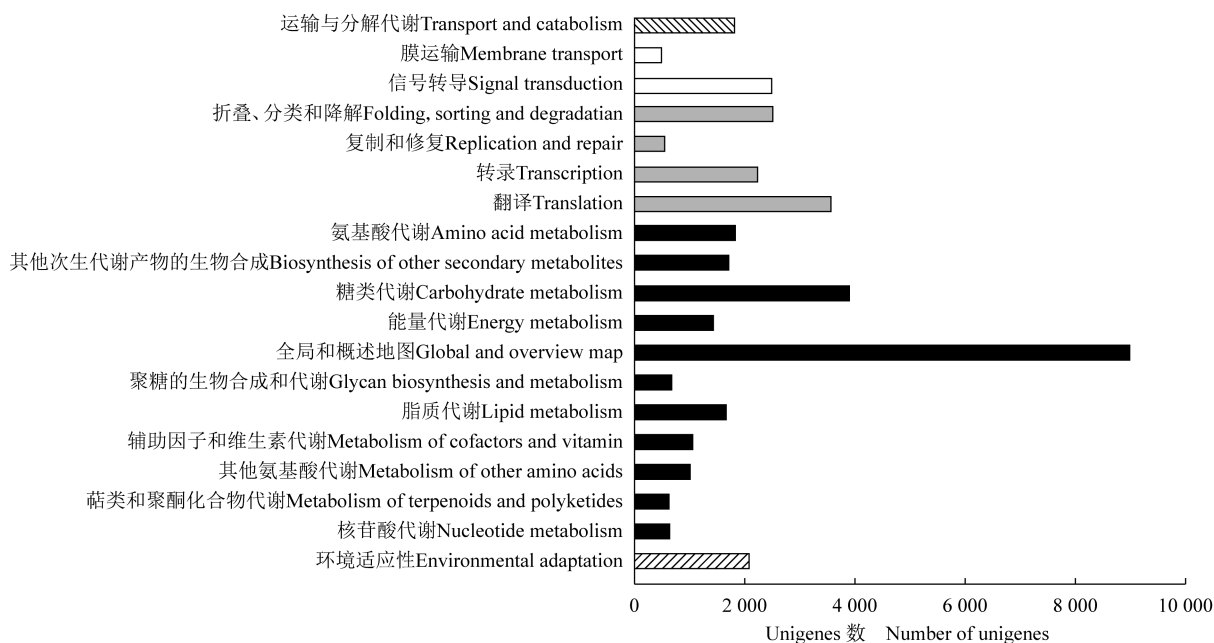
图 1 芳樟叶片和枝转录组 unigenes 的 GO 功能分类结果
Fig. 1 Result of GO function classification of unigenes in transcriptomes from leaf and branch of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita

2.1.2.3 KEGG 代谢途径分析 通过 KEGG 数据库对芳樟叶片和枝转录组 unigenes 功能进行注释,结果见图 2。

由图 2 可见,共有 40 698 个 unigenes 注释到细胞过程 (cellular process)、环境信息处理 (environment information processing)、遗传信息加工 (genetic information processing)、代谢 (metabolism) 和生物系统 (organismal system) 相关的代谢通路中,共 5 大类 19 亚类,且主要集中在代谢和遗传信息处理 2 大类中。

注释到细胞过程类别的所有 unigenes 均注释到

运输与分解代谢 (transport and catabolism) 亚类中,共有 1 808 个 unigenes。注释到环境信息处理类别的 unigenes 共有 2 923 个,其中注释到信号转导 (signal transduction) 亚类的 unigenes 较多,有 2 470 个。注释到遗传信息加工类别的 unigenes 共有 8 829 个,其中注释到翻译 (translation) 亚类的 unigenes 最多,有 3 553 个。注释到代谢类别的 unigenes 共有 23 363 个,其中注释到全局和概述地图 (global and overview map) 亚类的 unigenes 最多,有 8 972 个。注释到生物系统类别的所有 unigenes 均注释到环境适应性



▨: 细胞过程 Cellular process; □: 环境信息处理 Environment information processing; ▤: 遗传信息加工 Genetic information processing; ■: 代谢 Metabolism; ▧: 生物系统 Organismal system.

图2 芳樟叶片和枝转录组 unigenes 的 KEGG 功能分类结果
Fig. 2 Result of KEGG function classification of unigenes in transcriptomes from leaf and branch of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita

(environmental adaptation)亚类中,共有 2 057 个。

芳樟醇主要通过 MEP(甲基赤藓醇磷酸)途径合成前体物质,因此,根据 KEGG 数据库的注释结果,筛选出与芳樟醇合成相关的基因及其对应的酶,并推测芳樟醇的合成途径。结果显示:DXS(1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶)催化丙酮酸和 3-磷酸甘油醛生成 DXP(1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸),是芳樟醇合成的第 1 个限速酶;随后 DXR(1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶)催化 DXP 生成 2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸,并在 CMS(2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸胞苷酰转移酶)、CMK[4-(5'-焦磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶]、MDS(2-C-甲基-D-赤藓糖醇-2,4-环二磷酸合成酶)、HDS(4-羟基-3-甲基-2-丁烯基二磷酸合成酶)、HDR(4-羟基-3-甲基-2-丁烯基二磷酸还原酶)和 GPPS(牻牛儿基焦磷酸合酶)等一系列酶的作用下合成 GPP(牻牛儿基二磷酸),最后在 LIS(芳樟醇合酶)的作用下生成芳樟醇。

2.1.2.4 KOG 功能预测结果 通过 KOG 数据库对芳樟叶片和枝转录组 unigenes 的功能进行预测,结果见图 3。

由图 3 可见:共有 40 096 个 unigenes 注释到 24 个 KOG 类别中。其中,注释到一般功能预测(general function prediction only)的 unigenes 有 9 104 个,数量最多,说明功能预测是芳樟叶片和枝转录组中最主要的功能分类。另外,注释到信号转导机制(signal transduction mechanism)功能的 unigenes 有 5 352 个,注释到翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣(posttranslational modification, protein turnover and chaperone)功能的 unigenes 有 3 182 个,注释到转录(transcription)功能的 unigenes 有 2 544 个,注释到 RNA 加工和修饰(RNA processing and modification)功能的 unigenes 有 1 522 个,注释到次生代谢产物生物合成、运输和分解代谢(secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism)功能的 unigenes 有 1 043 个。上述 unigenes 也是芳樟叶片和枝转录组较为重要的基因。

2.2 施肥后芳樟醇相对含量及其合成调控基因表达水平的变化

2.2.1 芳樟醇相对含量的变化 施肥前后芳樟叶片和枝中芳樟醇相对含量的变化见表 2。比较结果显示:不论是施肥前还是施肥后,叶片中芳樟醇相对含

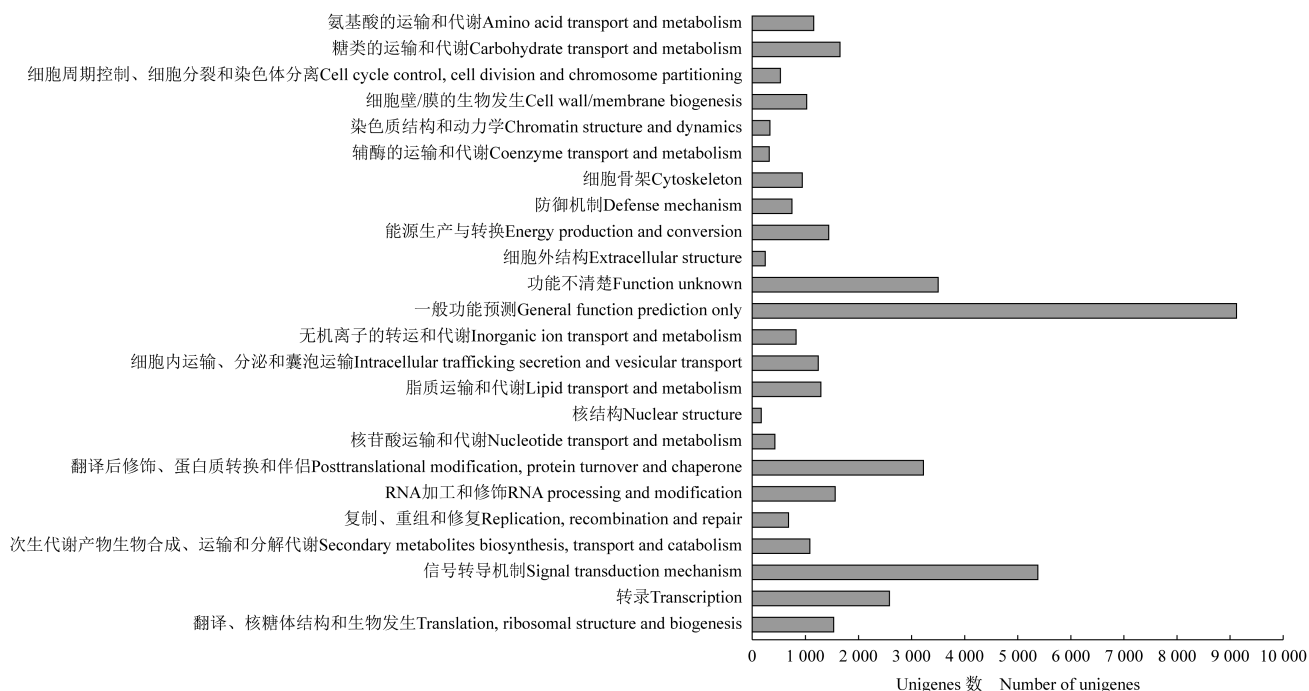


图 3 芳樟叶片和枝转录组 unigenes 的 KOG 功能分类结果
 Fig. 3 Result of KOG function classification of unigenes in transcriptomes from leaf and branch of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita

表 2 施肥前后芳樟叶片和枝芳樟醇相对含量变化 ($\bar{X} \pm SD$)
 Table 2 Change of relative contents of linalool in leaf and branch of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita before and after fertilization ($\bar{X} \pm SD$)

取样时间 ¹⁾ Sampling time ¹⁾	不同部位芳樟醇相对含量/% ²⁾ Relative content of linalool in different parts ²⁾	
	叶片 Leaf	枝 Branch
T1	84.91±0.02c	74.65±0.01c
T2	87.39±0.05b	83.92±0.05ab
T3	89.89±0.01a	84.83±0.06a
T4	86.54±0.41b	83.13±0.61b

¹⁾ T1: 施肥前 Before fertilization; T2: 施肥后第 1 个月 The first month after fertilization; T3: 施肥后第 3 个月 The third month after fertilization; T4: 施肥后第 5 个月 The fifth month after fertilization.

²⁾ 同列中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

量均高于枝,但差异幅度不大。但施肥后不同时间叶片和枝中芳樟醇相对含量均高于施肥前,差异均达显著 ($P < 0.05$) 水平;并在施肥后第 3 个月叶片和枝中芳樟醇相对含量均达到最高,分别为 89.89% 和 84.83%,但在施肥后第 5 个月叶片和枝中芳樟醇相对含量则显著下降。

2.2.2 芳樟醇合成调控基因及其表达水平变化 结合芳樟叶片和枝中芳樟醇的代谢途径,进一步筛选关键调控基因,并对施肥前后各基因的表达水平

(FPKM) 进行分析,结果见表 3。

由表 3 可见:从施肥前芳樟叶片和枝的转录组数据中共鉴定出 23 个与芳樟醇合成相关的基因,其中,15 个基因在枝中的表达水平高于叶片,8 个基因在叶片中的表达水平高于枝,说明在芳樟不同部位这些基因的表达具有组织特异性。

由表 3 还可见:与施肥前相比,施肥后第 3 个月叶片中有 18 个基因表达水平上调,枝中有 15 个基因的表达水平上调,叶片和枝中均上调表达的基因有 13 个,包括 3 个 *DXS* 基因 (*DXS1*、*DXS3* 和 *DXS6*)、1 个 *DXR* 基因、2 个 *HDS* 基因 (*HDS1* 和 *HDS2*)、1 个 *HDR* 基因 (*HDR2*)、2 个 *IDI* 基因 (*IDI1* 和 *IDI2*)、1 个 *GPPS* 基因 (*GPPS1*) 和 3 个 *LIS* 基因 (*LIS1*、*LIS2* 和 *LIS4*);另外,虽然施肥后叶片中 *CMS* 和 *GPPS2* 基因以及枝中 *CMK*、*MDS* 和 *IDI3* 基因的表达水平下调,但这些基因的总表达水平较高,表明这些基因都可能参与芳樟醇合成的调控。

在施肥前后,叶片中 *MDS* 和 *IDI2* 基因以及枝中 *GPPS1* 基因的表达水平差异显著 ($P < 0.05$),表明施用生物炭复合肥可能对这些基因的表达有一定的影响。且这些基因表达水平均上调,表明施用生物炭复合肥可能对基因表达有促进作用。而其他基因尽管

表3 施肥前和施肥后第3个月芳樟叶片和枝中芳樟醇合成调控基因表达水平(FPKM)的变化($\bar{X} \pm SD$)¹⁾
 Table 3 Change of expression level (FPKM) of regulator genes related to linalool synthesis in leaf and branch of *Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita before fertilization and the third month after fertilization ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

基因 Gene	叶片中各基因的表达水平 Expression level of each gene in leaf		枝中各基因的表达水平 Expression level of each gene in branch	
	施肥前 Before fertilization	施肥后第3个月 The third month after fertilization	施肥前 Before fertilization	施肥后第3个月 The third month after fertilization
<i>DXS1</i>	66.91±8.84	90.30±0.39	79.37±20.52	109.83±2.65
<i>DXS2</i>	0.33±0.01	0.77±0.05	1.36±0.13	1.18±0.16
<i>DXS3</i>	73.87±6.79	80.25±4.38	55.65±1.05	63.54±0.45
<i>DXS4</i>	0.19±0.08	0.44±0.05	0.16±0.01	0.08±0.04
<i>DXS5</i>	2.10±2.01	1.28±0.13	4.19±0.43	1.29±0.06
<i>DXS6</i>	7.08±0.02	7.48±0.33	7.33±0.31	7.44±0.30
<i>DXR</i>	204.86±7.42	233.38±24.13	146.50±21.14	170.40±26.76
<i>CMS</i>	13.13±2.73	9.32±1.68	23.31±1.04	23.49±0.41
<i>CMK</i>	34.61±4.51	39.37±6.04	55.63±5.27	51.67±1.05
<i>MDS</i>	48.73±1.78	54.23±1.84*	52.95±2.60	46.29±3.54
<i>HDS1</i>	58.58±2.35	71.32±3.48	72.11±14.12	72.91±6.66
<i>HDS2</i>	32.31±1.91	38.15±3.03	30.28±9.27	38.42±2.86
<i>HDR1</i>	0.05±0.00	0.00±0.00	0.10±0.01	0.07±0.03
<i>HDR2</i>	103.34±4.21	130.62±0.78	169.03±20.88	170.22±2.64
<i>ID11</i>	15.79±7.31	23.70±3.96	34.58±1.57	38.47±0.23
<i>ID12</i>	20.82±1.34	27.23±0.76*	23.53±2.71	25.37±2.95
<i>ID13</i>	5.24±0.23	6.25±0.02	6.65±0.18	6.00±0.11
<i>GPPS1</i>	2.40±0.68	3.08±0.04	4.58±0.09	5.57±0.01*
<i>GPPS2</i>	9.89±0.78	9.55±0.58	12.42±0.30	12.84±0.08
<i>LIS1</i>	3.59±1.80	6.25±0.44	1.84±0.12	2.07±0.55
<i>LIS2</i>	14.75±4.98	24.82±5.13	4.37±1.24	7.17±0.11
<i>LIS3</i>	0.18±0.07	0.00±0.00	0.08±0.04	0.03±0.00
<i>LIS4</i>	4.52±0.28	6.16±3.34	1.27±0.13	1.92±0.08

¹⁾ * : 施肥前与施肥后第3个月同一部位的基因表达水平差异显著($P < 0.05$) The gene expression level of the same part is significantly ($P < 0.05$) different between before fertilization and the third month after fertilization.

在施肥前后表达水平差异不显著,但也出现不同程度的上调或下调,表明施用生物炭复合肥对这些基因的影响较小。

3 讨论和结论

上述高通量测序结果表明:从芳樟叶片和枝的转录组中共获得 72 560 个 unigenes,平均长度 1 330 bp, N50 值为 2 054 bp,转录组数据较为完整,基因信息较为丰富;而江香梅等^[24]对 5 种化学型樟树叶片转录组进行测序,共获得 55 955 个 unigenes,平均长度 584 bp, N50 值为 1 023 bp,造成这一差异的原因可能与转录组的来源器官、株龄以及栽培措施和生境条件等因子有关。本研究结果表明:通过 KEGG 数据库比对,芳樟叶片和枝的转录组中有 40 698 个 unigenes 被注释到 5 大类 19 亚类代谢途径中,涵盖了多糖、甾体皂苷、萜类和苯丙素类等生物合成相关

基因。其中,注释到萜类和聚酮化合物代谢的有 603 个 unigenes,明显少于花生(*Arachis hypogaea* Linn.)转录组(1 033 个)^[25],可能与花生的萜类和聚酮化合物比芳樟更丰富有关。

萜类化合物合成途径分为 MEP 和 MVA(甲羟戊酸)两类途径^[26],其中 MEP 途径主要合成单萜和二萜及类胡萝卜素和叶绿素等多萜类化合物,MVA 途径主要合成倍半萜和甾醇等三萜类化合物。芳樟醇是单萜醇,主要通过 MEP 途径生成前体物质 GPP,然后在 LIS 的作用下生成芳樟醇;芳樟醇是桂花 [*Osmanthus fragrans* (Thunb.) Loureiro]^[27]、夜来香 [*Telosma cordata* (Burm. F.) Merr.]^[28] 和小苍兰 (*Freesia refracta* Klatt)^[29] 等芳香植物的特征香气成分之一,也是芳樟叶片和枝精油的重要成分之一。本研究鉴定出 23 个与芳樟醇合成相关的基因,其中,15 个基因在枝中表达水平高于叶片,8 个基因在叶片中表达水平高于枝,揭示出这些基因在芳樟中的表达具

有组织特异性。枝中有 15 个基因的表达水平高于叶片,但枝中的芳樟醇含量反而低于叶片,推测这 15 个基因对芳樟醇合成调控的影响作用小于在叶片中表达较高的 8 个基因。DXS 是芳樟萜类合成中第 1 个限速酶^[30],在拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]^[31]、银杏 (*Ginkgo biloba* Linn.)^[32] 和番茄 (*Lycopersicon esculentum* Miller)^[33] 等植物中,DXS 基因过量表达可使各种单萜类化合物产量显著提高。而在芳樟转录组数据中,2 个 DXS 基因表达水平较低,并且施肥后芳樟醇相对含量提高,3 个 DXS 基因表达水平也上调,因此,可以通过调控 DXS 基因的表达水平改变芳樟醇含量。在芳樟叶片和枝的转录组中,尽管施肥后 LIS1、LIS3 和 LIS4 这 3 个基因的表达水平有所上调,但 4 个 LIS 基因的表达水平总体上仍较低,说明 LIS 基因也是芳樟醇合成的限速酶。值得注意的是,杨艳萍^[34]认为 DXR 是萜类合成中的第 2 个限速酶,但本研究结果则显示:在施肥前后芳樟叶片与芳樟醇合成相关的调控基因中,DXR 基因的表达水平均最高,且在施肥后枝中该基因的表达水平也升至最高,推测 DXR 基因参与芳樟醇合成过程的调控,但并不起限速作用,这种现象可能与 DXR 基因的表达具有种类特异性有关^[30]。

芳樟醇的形成、积累和转化过程非常复杂,受到遗传和环境因子的综合影响。黄秋良等^[35]的研究结果表明:施用微生物菌剂能够促进芳樟生长和精油积累;而在本研究中,施用生物炭复合肥也可显著提高芳樟叶片和枝中芳樟醇的相对含量,说明施用合适的肥料对植物次生代谢产物合成有一定的促进作用。芳樟叶片和枝中的芳樟醇相对含量在施肥后第 3 个月达到最高,在施肥后第 5 个月不同程度下降,这一现象可能与气温变化及芳樟生长期有关。施肥后第 3 个月正好是 9 月中旬,气温开始下降,植株即将进入一个生长周期的末期,生长和生理代谢速率均减缓,使芳樟醇的合成同步减缓。并且,施肥后芳樟叶片和枝中的芳樟醇相对含量提高,多数基因的表达水平也不同程度的上调,尤其是叶片中的 MDS 和 IDI2 基因以及枝中的 GPPSI 基因的表达水平显著上调,说明施用生物炭复合肥可能对这些基因的表达有一定的影响。

综上所述,施用生物炭复合肥后,芳樟叶片和枝中芳樟醇的相对含量均显著提高,多数基因表达水平也不同程度的上调,说明生物炭复合肥可能影响芳樟醇

合成调控基因的表达特性,从而影响芳樟醇含量,但其中关键基因的功能还有待进一步验证。

参考文献:

- [1] 陈尚妍,赵玲华,徐小军.天然芳樟醇资源及其开发利用[J].林业科技开发,2013,27(2):13-17.
- [2] CHENG B H, SHEEN L Y, CHANG S T. Evaluation of anxiolytic potency of essential oil and S-(+)-linalool from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaves in mice[J]. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2015, 5: 27-34.
- [3] LEE S C, XU W X, LIN L Y, et al. Chemical composition and hypoglycemic and pancreas-protective effect of leaf essential oil from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum* Kanehira) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61: 4905-4913.
- [4] CHENG B H, SHEEN L Y, CHANG S T. Hypolipidemic effects of S-(+)-linalool and essential oil from *Cinnamomum osmophloeum* ct. linalool leaves in mice [J]. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2018, 8: 46-52.
- [5] 姜冬梅,朱源,余江南,等.芳樟醇药理作用及制剂研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(18):3530-3533.
- [6] 林翔云.天然芳樟醇与合成芳樟醇[J].化学工程与装备,2008(7):21-26.
- [7] 慧芳,刘秀岩,李宗谕,等.转录组测序技术在药用植物研究中的应用[J].中草药,2019,50(24):6149-6155.
- [8] 吴吉妍,姚丹,吴海楠,等.一款基于转录组差异基因表达分析的软件包:findDEG[J].南京林业大学学报(自然科学版),2019,43(2):93-99.
- [9] 蒋会兵,夏丽飞,田易萍,等.基于转录组测序的紫芽茶树花青素合成相关基因分析[J].植物遗传资源学报,2018,19(5):967-978.
- [10] 单春苗,王晨凯,施圆圆,等.多花黄精甙体皂苷生物合成途径分析及关键酶基因研究[J].中国中药杂志,2020,45(12):2847-2857.
- [11] 魏一丁,熊超,张天缘,等.基于转录组数据对七叶树中三萜皂苷合成途径的研究[J].中国中药杂志,2019,44(6):1135-1144.
- [12] 张国防,于静波,冯娟.芳樟无性系叶精油及芳樟醇含量变异分析[J].植物资源与环境学报,2012,21(2):117-118.
- [13] 张北红,肖祖飞,张海燕,等.柠檬醛型樟组植物优良单株的筛选[J].植物资源与环境学报,2021,30(2):45-51.
- [14] 张国防,冯娟,于静波,等.不同化学型芳樟叶精油及主成分含量的时间变化规律[J].植物资源与环境学报,2012,21(4):82-86.
- [15] 肖祖飞,李凤,邢梦雪,等.采收和存放时间对樟树叶片出油率和含水率的影响[J].西北林学院学报,2020,35(6):147-152.
- [16] 于静波,张国防,李左荣,等.不同施肥处理对芳樟叶精油及其主成分芳樟醇含量的影响[J].植物资源与环境学报,2013,22(1):76-81.
- [17] 黄秋良,袁宗胜,谢亚兵,等.不同微量元素和有机肥对芳樟

- 油料林精油的影响[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(2): 57-28.
- [18] 福建农林大学, 福建农大科技开发总公司. 一种高效提取香樟叶精油的方法; CN109628225A[P]. 2019-04-16.
- [19] KIM C S, WINN M D, SACHDEVA V, et al. K-mer clustering algorithm using a MapReduce framework: application to the parallelization of the Inchworm module of Trinity [J]. BMC Bioinformatics, 2017, 18: 467.
- [20] PERTEA G, HUANG X Q, LIANG F, et al. TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets[J]. Bioinformatics, 2003, 19(5): 651-652.
- [21] PIROOZNIYA M, PERKINS E J, DENG Y. Batch Blast Extractor: an automated blastx parser application[J]. BMC Genomics, 2008, 9(S2): S10.
- [22] LANGDON W B. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks[J]. BioData Mining, 2015, 8: 1.
- [23] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biology, 2014, 15: 550.
- [24] 江香梅, 伍艳芳, 肖复明, 等. 樟树 5 种化学类型叶片转录组分析[J]. 遗传, 2014, 36(1): 58-68.
- [25] 王海霞, 王铭伦, 丁雨龙. 花生异型雄蕊转录组分析[J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29(5): 21-29.
- [26] 陈 瑶, 谢琴鼎, 唐亚琴, 等. 植物萜类合成代谢途径及限速酶的研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(7): 2371-2379.
- [27] 刘 偲, 席 婉, 袁金梅, 等. 桂花‘莲籽丹桂’芳樟醇合酶基因 *OJTPS5* 的克隆及功能鉴定[J]. 园艺学报, 2020, 47(2): 310-320.
- [28] 吕特衡, 杨华丽, 吕科良, 等. 夜来香 *LIS* 基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(7): 2525-2531.
- [29] 樊荣辉, 黄敏玲, 钟淮钦, 等. 小苍兰芳樟醇合酶基因的克隆及表达分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(10): 1185-1190.
- [30] 秦 政. 樟树 MEP 途径重要基因的进化与功能研究[D]. 南昌: 江西农业大学林学院, 2019: 3-6.
- [31] ESTÉVEZ J M, CANTERO A, REINDL A, et al. 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(25): 22901-22909.
- [32] GONG Y F, LIAO Z H, GUO B H, et al. Molecular cloning and expression profile analysis of *Ginkgo biloba* *DXS* gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway [J]. Planta Medica, 2006, 72(4): 329-335.
- [33] ENFISSI E M A, FRASER P D, LOIS L-M, et al. Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato[J]. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3(1): 17-27.
- [34] 杨艳萍. 萜类化合物 MEP 代谢途径 *dxs* 基因的克隆表达和酶功能分析鉴定[D]. 西安: 西北大学生命科学学院, 2012: 11-13.
- [35] 黄秋良, 杨先吉, 罗佳佳, 等. 不同微生物菌剂组合处理对芳樟生长和精油积累的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29(2): 38-45.

(责任编辑: 郭严冬)

《植物遗传资源学报》2022 年征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会共同主办的学术期刊, 为中国科技核心期刊、全国中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊, 被国内多家数据库收录, 被美国 CA 化学文摘(2014)、JST 日本科学技术振兴机构数据库(2018)和 CABI(2021)收录, 荣获 2015 年度中国自然资源学会高影响力十佳期刊, 2017 年和 2020 年连续入选中国精品科技期刊。据《中国科技期刊引证报告》(核心版)统计: 在农艺学类 22 种期刊中, 2020 年《植物遗传资源学报》的影响因子、总被引频次和综合评价总分排名均有所提升, 核心影响因子为 1.788, 排名居农艺学期刊首位。

报道内容为有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。如种质资源的考察、收集、保存、评价、利用和创新, 信息学, 管理

学等; 起源、演化、分类等系统学; 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究等。

本刊为双月刊, 大 16 开本, 每期 320 页, 彩色铜版纸印刷。每期定价 68 元, 全年定价 408 元。各地邮局发行, 邮发代号 82-643。国内统一连续出版物号 CN 11-4996/S, 国际标准连续出版物号 ISSN 1672-1810。本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 3 元。

地址: 北京市中关村南大街 12 号《植物遗传资源学报》编辑部(邮编 100081); 电话: 010-82105794, 010-82105795; 网址: <http://www.zwyczy.cn>; E-mail: zwyczyxb2003@163.com, zwyczyxb2003@sina.com; 微信 ID: 植物遗传资源学报; 作者 QQ 群: 372958204, 1107885410。