

高光胁迫下香果树叶片生理生化指标变化及 相关基因差异表达和功能分析

宋丽莉, 吴 琼, 吉喜燕, 罗瑞莉, 刘文娜, 赵华强^①, 侯梅芳^①

(上海应用技术大学生态技术与工程学院, 上海 201418)

摘要: 以光照强度 $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 为对照, 对高光胁迫 (光照强度 $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 下香果树 (*Emmenopterys henryi* Oliv.) 幼苗叶片的部分生理生化指标变化进行分析; 采用 RNA-seq 技术筛选高光胁迫下的差异表达基因, 并对其进行功能和表达分析及 qRT-PCR 验证。结果表明: 高光胁迫下, 香果树叶片的净光合速率、核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活性和叶绿素含量显著下降, 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶和抗坏血酸过氧化物酶活性以及花青素和脱落酸含量显著升高。高光胁迫下, 香果树的差异表达基因有 6 776 个, 其中上调和下调差异表达基因分别有 3 063 和 3 713 个。GO 功能富集分析结果显示: 上调和下调差异表达基因富集到的 GO 功能条目分别有 2 022 和 1 835 个, 显著富集的 GO 功能条目分别有 196 和 129 个, 基因功能均包括生物过程、分子功能和细胞组分 3 类。KEGG 代谢通路富集分析结果显示: 这些差异表达基因显著富集到次生代谢物生物合成、代谢途径、光合作用等 20 个代谢通路中。其中, 光合作用相关基因 *Lhca4*、*Lhcb1*、*Lhcb2*、*Lhcb5*、*psaA*、*psaE*、*psaG*、*psaH*、*psaK*、*psaL*、*psaO*、*psbC*、*psbK*、*psbO*、*psbP*、*psbQ*、*psbR*、*psbW*、*petA*、*petC*、*petG*、*petE*、*atpC1*、*atpI*、*RBCS*、*rbcl*、*RCA*、*HEMA1*、*PORA* 以及脱落酸合成及信号通路相关基因 *NCED1*、*NCED3*、*CYP707A*、*PP2C51* 的表达水平显著下调; 而光合作用相关基因 *psbS*、*atpA*、*atpD*、花青素合成相关基因、抗氧化酶相关基因以及脱落酸合成及信号通路相关基因 *BGLU11*、*BGLU46*、*BGLU23*、*BGLU24*、*BGLU34*、*PYR/PYL*、*SnRK2C* 的表达水平显著上调。qRT-PCR 验证结果显示: 供试 8 个差异表达基因的表达水平与 RNA-seq 检测结果一致。综上所述, 香果树主要通过调控光合作用、抗氧化酶系统、脱落酸代谢及信号通路以及花青素代谢通路响应高光胁迫。

关键词: 香果树; 高光胁迫; 转录组; 差异表达基因; 功能分析

中图分类号: Q945.78; Q946-33; S718.43 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2022)06-0052-11
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.06.06

Variations of physiological and biochemical indexes and differential expression and functional analyses on related genes in leaves of *Emmenopterys henryi* under high light stress SONG Lili, WU Qiong, JI Xiyan, LUO Ruili, LIU Wenna, ZHAO Huaqiang^①, HOU Meifang^① (School of Ecological Technology and Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, 31(6): 52-62, 83

Abstract: Taking illumination intensity of $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ as the control, variations of some physiological and biochemical indexes in leaves of *Emmenopterys henryi* Oliv. seedlings under high light stress (illumination intensity of $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) were analyzed; differentially expressed genes under high light stress were screened by using RNA-seq technology, and their functional and expression analyses and qRT-PCR verification were conducted. The results show that under high light stress, net photosynthetic rate, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity, and chlorophyll content in

收稿日期: 2022-05-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32270393)

作者简介: 宋丽莉(1968—),女,山西长治人,博士,教授,主要从事植物逆境生理研究。

^①通信作者 E-mail: hqzhao@sit.edu.cn; mfhhou@sit.edu.cn

引用格式: 宋丽莉, 吴 琼, 吉喜燕, 等. 高光胁迫下香果树叶片生理生化指标变化及相关基因差异表达和功能分析[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(6): 52-62, 83.

leaves of *E. henryi* significantly decrease, activities of superoxide dismutase, catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase, contents of anthocyanin and abscisic acid significantly increase. There are 6 776 differentially expressed genes in *E. henryi* under high light stress, in which, up-regulated and down-regulated differentially expressed genes are 3 063 and 3 713, respectively. The GO functional enrichment analysis result shows that the up-regulated and down-regulated differentially expressed genes are enriched into 2 022 and 1 835 GO functional items, respectively, and there are 196 and 129 GO functional items enriched significantly, respectively, the gene function contains three categories namely biological process, molecular function, and cellular component. The KEGG metabolic pathway enrichment analysis result shows that these differentially expressed genes are significantly enriched into 20 metabolic pathways including biosynthesis of secondary metabolites, metabolic pathways, photosynthesis, etc. In which, the expression levels of photosynthesis-related genes *Lhca4*, *Lhcb1*, *Lhcb2*, *Lhcb5*, *psaA*, *psaE*, *psaG*, *psaH*, *psaK*, *psaL*, *psaO*, *psbC*, *psbK*, *psbO*, *psbP*, *psbQ*, *psbR*, *psbW*, *petA*, *petC*, *petG*, *petE*, *atpC1*, *atpI*, *RBCS*, *rbcL*, *RCA*, *HEMA1*, *PORA* and abscisic acid synthesis and signal pathway-related genes *NCED1*, *NCED3*, *CYP707A*, *PP2C51* are significantly down-regulated, while those of photosynthesis-related genes *psbS*, *atpA*, *atpD*, anthocyanin synthesis-related genes, antioxidase-related genes, and abscisic acid synthesis and signal pathway-related genes *BGLU11*, *BGLU46*, *BGLU23*, *BGLU24*, *BGLU34*, *PYR/PYL*, *SnRK2C* are significantly up-regulated. The qRT-PCR verification result shows that the expression levels of eight test differentially expressed genes are consistent with the RNA-seq detection result. Taken together, *E. henryi* mainly responds to high light stress via regulating photosynthesis, antioxidase system, abscisic acid metabolism and signal pathway, and anthocyanin metabolic pathway.

Key words: *Emmenopterys henryi* Oliv.; high light stress; transcriptome; differentially expressed gene; functional analysis

光是植物进行光合作用的能量来源,也是调节植物生长发育和形态建成的重要环境信号,还是影响植物生长、存活和分布的重要生态因子^[1]。但是,当植物吸收的光能超过其光合作用所需能量时,过剩的光能会引起活性氧积累,导致光系统受到损伤,光合水平下降,植物生长发育受阻^[2]。

香果树 (*Emmenopterys henryi* Oliv.) 系茜草科 (Rubiaceae) 香果树属 (*Emmenopterys* Oliv.) 惟一种,是中国特有的单属植物,也是茜草科植物系统发育进化、形态演替及中国植物地理区系研究的重要材料^[3]。此外,香果树还具有很高的观赏、药用和材用价值。然而,野生香果树种群正在不断衰退,分布区域逐渐缩小^[4],早在 1991 年就被《中国植物红皮书》^[5]列为稀有种,并在《国家重点保护野生植物名录》^[6]中被列为国家二级重点保护野生植物。自然状态下,香果树的种子萌发及幼苗生长状况直接影响其种群个体数量^[7]。研究发现,光照强度过高会导致香果树的种子萌发率显著下降;而且,香果树幼苗的需光性随着植株发育阶段而改变,随着苗龄增长由喜阴逐渐转为喜光^[8]。大田实验表明:香果树 1 年生幼苗在全光照条件下生长缓慢,并出现掉叶现象甚至死亡^[9];2 年生香果树幼苗虽然能够基本适应全光照

环境,但适度遮光更有利于其生长^[10]。比较而言,林窗中的香果树幼苗生长最快,生物量最大,更适宜香果树幼苗生存;而林缘(光照强度过大)和林冠(光照强度过弱)中的香果树幼苗生长缓慢,成活率低^[3,8,11]。因此,探究香果树的高光适应机制对于揭示其濒危机制具有重要价值,对于香果树合理保育措施的制订及种群恢复也具有重要意义。

研究发现,高光胁迫可导致香果树叶片的净光合速率、PS II 活性、最大光化学效率、实际光化学效率、非光化学猝灭系数、光化学猝灭系数、调节性能量耗散和相对电子传递速率等叶绿素荧光参数显著降低,而非调节性能量耗散则显著升高^[12]。为了探明香果树应对高光胁迫的分子机制,笔者对对照和高光胁迫(光照强度分别为 54 和 180 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)下香果树幼苗叶片的净光合速率、光合作用相关酶活性、抗氧化酶活性、激素水平、次生代谢物含量进行比较,利用 RNA-seq 技术对高光胁迫下香果树幼苗的转录组进行测序分析,对差异表达基因进行 GO 功能分析和 KEGG 代谢通路分析,对光合作用、花青素代谢、抗氧化酶以及脱落酸(ABA)代谢和信号通路相关基因的表达水平进行分析,并采用 qRT-PCR 技术验证转录组测序结果的可靠性。

1 材料和方法

1.1 材料

将香果树组培苗种植于装有 $V(\text{草炭}) : V(\text{珍珠岩}) = 2.5 : 1.0$ 混合基质的花盆(上口边长 10.0 cm、下口边长 7.0 cm、高度 8.5 cm)中,置于 DRXM-508 光照培养箱(宁波江南仪器厂)中培养,培养条件为光照强度 $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光照时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、空气相对湿度 70%,每 7 d 浇 1 次水。在上述条件下培养至幼苗长出 6 枚叶时,选取株高约 15 cm、生长状态较为一致的植株进行高光胁迫实验。

1.2 方法

1.2.1 高光胁迫处理 将供试香果树组培苗分为 2 组,每组 12 株,在其他培养条件不变的情况下,一组继续置于光照强度 $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 条件下培养,即对照组;另一组则置于光照强度 $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 条件下培养,即高光胁迫组。培养 48 h 后,采样并进行相关指标测定分析。

1.2.2 生理生化指标测定 每组随机选取 3 株植株,采用 LI-6400XT 便携式光合作用测定仪(美国 LICOR 公司)测定植株中部的 1 对对生叶的净光合速率,测定时,叶室光源采用红蓝光源,叶室内气流速率为 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$, CO_2 浓度为 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

净光合速率测定结束后,采集植株中部的 1 对对生叶,混匀后取样测定各生理生化指标,每个指标重复取样检测 3 次。参照 Hao 等^[12]的方法测定叶片的叶绿素和花青素含量;参照 Song 等^[13]的方法测定叶片的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性;采用核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活性检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,产品编号 BC0440)测定叶片的核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活性;参照陈霞等^[14]的方法测定 ABA 含量。

1.2.3 差异表达基因筛选及功能分析 每组随机选取 6 株植株,分别取植株中部的 1 对对生叶,即为 6 个生物学重复,经液氮速冻后置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,用于转录组测序。转录组测序工作由上海中科新生命生物科技有限公司完成。采用 Trizol(美国 Invitrogen 公司)提取叶片总 RNA,样品检测合格后用于 cDNA 文库的构建,使用 Illumina HiSeq 平台(美国 Illumina 公司)将构建的 cDNA 文库进行测序。对测

序得到的原始数据进行去除低质量序列、接头污染及 N 比例大于 5% 的 reads 等处理,得到高质量的有效测序数据(clean reads);使用 Trinity 软件(<https://trinityrnaseq.sourceforge.net/>)对 clean reads 进行 *de novo* 组装,获得 unigenes;使用 DESeq2 软件^[15]进行基因差异表达分析,差异显著性标准为 $|\log_2 \text{FC}| > 1$ 、 $P - \text{adjust} < 0.05$,其中,FC 为差异倍数(fold change);对差异表达基因进行 GO 功能富集分析和 KEGG 代谢通路富集分析。

1.2.4 差异表达基因的 qRT-PCR 验证 采用与转录组测序相同的植物材料,随机选择 8 个差异表达基因进行 qRT-PCR 分析,验证转录组测序分析结果的可靠性。使用 Primer Premier 5.0 软件,根据预测基因的 CDS 序列设计荧光定量特异性引物,以香果树 *GAPDH* 基因(TRINITY_DN54866_c2_g1)作为内参基因,候选基因的引物序列见表 1。所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用 Thermo Fisher QuantStudio™1 Plus 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)进行 qRT-PCR 扩增。扩增体系总体积 $20.0 \mu\text{L}$,包括 SybrGreen qPCR Master Mix $10.0 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正向和反向引物各 $0.4 \mu\text{L}$ 、cDNA 模板 $2.0 \mu\text{L}$,用 ddH_2O 将扩增体系体积补足至 $20.0 \mu\text{L}$ 。

表 1 用于香果树差异表达基因 qRT-PCR 验证的引物序列
Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR verification of differentially expressed genes of *Emmenopterys henryi* Oliv.

基因 Gene	引物序列(5'→3') ²⁾ Primer sequence (5'→3') ²⁾
<i>GAPDH</i> ¹⁾	F: CTTCTGGTCTTTCACAACGG R: GGAGCAAGGCAGTTAGTCGT
<i>MYB8</i>	F: TGGCGAAACATTCCTAAAGC R: AGGTCTTCTTCATCTTCAGCAAA
<i>F3H</i>	F: GCCTCCTTCTGCCATTAACACTAC R: CTTACCCGCCATACCATC
<i>MYB113</i>	F: CATCACGGCAAGCAACATAG R: GGAGTTTCATCGCTTGTCTGT
<i>SnRK2C</i>	F: TATGCGGCTGGAGGAGAA R: TGGGGCTATACTGCCATTTAA
<i>atpD</i>	F: GGTGAAGGTAGAGGTGAGGGA R: CGCCCATCTCCAACAAACT
<i>PORA</i>	F: CTGCTGTTTACTTACCAACTGCTA R: ATAATGACTCTCTTTGAAGGGTGA
<i>Lhcb1</i>	F: GCGACTACGGATGGGACAC R: TGGGGTTGCCGAGGTAGT
<i>psbO</i>	F: ATCACATGCTCTCTGCAGTCTG R: AGGAGTCAACACCCGCCGT

¹⁾ 内参基因 Reference gene.

²⁾ F: 正向引物 Forward primer; R: 反向引物 Reverse primer.

扩增程序:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 15 s、60 °C 退火 30 s,共 45 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因的相对表达量,并换算成 $\log_2 FC$,以便与 RNA-seq 检测结果进行比较。

1.3 数据处理及统计分析

使用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析,采用单因素方差分析法(one-way ANOVA)和 Duncan's 新复极差法进行方差分析和多重比较。

2 结果和分析

2.1 高光胁迫下香果树叶片生理生化指标的变化

检测结果(表 2)表明:与对照(光照强度 $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)相比,高光胁迫(光照强度 $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

下香果树叶片的净光合速率、核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活性和叶绿素含量均显著下降,降幅分别为 48.44%、26.69%和 35.71%;花青素含量、超氧化物歧化酶活性、过氧化物酶活性、过氧化氢酶活性、抗坏血酸过氧化物酶活性和脱落酸含量显著升高,增幅分别为 56.25%、10.14%、52.66%、35.57%、34.06%和 1 116.46%。

2.2 高光胁迫下香果树差异表达基因筛选及功能分析

2.2.1 差异表达基因筛选 统计结果表明:与对照(光照强度 $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)相比(光照强度 $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$),高光胁迫下香果树含有 6 776 个差异表达基因,其中,上调差异表达基因有 3 063 个,下调差异表达基因有 3 713 个。

表 2 高光胁迫下香果树叶片生理生化指标的变化¹⁾

Table 2 Changes of physiological and biochemical indexes in leaves of *Emmenopterys henryi* Oliv. under high light stress¹⁾

处理 Treatment	Pn	Rubisco	Chl	Ant	抗氧化酶活性/($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)				ABA
					SOD	POD	CAT	APX	
CK	1.28±0.09a	494.70±6.32a	207.86±4.01a	0.16±0.01b	296.00±2.65b	84.50±3.12b	183.67±2.31b	307.33±6.55b	20.17±0.18b
HL	0.66±0.02b	362.67±3.51b	145.65±3.65b	0.25±0.01a	326.00±5.57a	129.00±5.22a	249.00±6.25a	412.00±2.08a	245.36±4.23a

¹⁾ Pn: 净光合速率 Net photosynthetic rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); Rubisco: 核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活性 Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$); Chl: 叶绿素含量 Chlorophyll content ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); Ant: 花青素相对含量 Anthocyanin relative content ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$); SOD: 超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase; POD: 过氧化物酶 Peroxidase; CAT: 过氧化氢酶 Catalase; APX: 抗坏血酸过氧化物酶 Ascorbate peroxidase; ABA: 脱落酸含量 Abscisic acid content ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$). CK: 对照(光照强度 $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) The control (illumination intensity of $54 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$); HL: 高光胁迫(光照强度 $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) High light stress (illumination intensity of $180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). 同列中不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著 Different lowercases in the same column indicate the significant difference at 0.05 level.

2.2.2 GO 功能富集分析 上调差异表达基因的 GO 功能富集分析结果显示:上述上调差异表达基因富集到的 GO 功能条目共有 2 022 个,其中显著富集的 GO 功能条目有 196 个,分为生物过程(97 个)、分子功能(70 个)和细胞组分(29 个)3 类。各类型中富集程度排名前 10 的 GO 功能条目见表 3。由表 3 可见:在生物过程中,富集到氧化还原过程的上调差异表达基因最多(155 个);在分子功能中,被富集到氧化还原酶活性的上调差异表达基因最多(196 个),富集到裂解酶活性的上调差异表达基因较多(48 个);在细胞组分中,富集到细胞质、细胞质部分、质体和叶绿体的上调差异表达基因均较多,分别有 352、299、206 和 179 个,且富集到其余条目的上调差异表达基因均超过 30 个。

下调差异表达基因的 GO 功能富集分析结果显示:上述下调差异表达基因富集到的 GO 功能条目共

有 1 835 个,其中显著富集的 GO 功能条目有 129 个,分为生物过程(76 个)、分子功能(39 个)和细胞组分(14 个)3 类。各类型中富集程度排名前 10 的 GO 功能条目见表 4。由表 4 可见:在生物过程中,富集到磷酸化、核酸模板转录、RNA 生物合成过程、DNA 模板转录及蛋白质磷酸化的下调差异表达基因均超过 150 个,富集到其余条目的下调差异表达基因有 115~117 个;在分子功能中,富集到转移酶活性、转移酶活性(转移含磷基团)、催化活性(作用于蛋白质)、激酶活性、磷酸转移酶活性(以醇基为受体)、蛋白激酶活性及 DNA 结合的下调差异表达基因均超过 150 个,富集到其余条目的下调差异表达基因有 69~95 个;在细胞组分中,富集到膜的下调差异表达基因最多(718 个),富集到 MCM 复合物的下调差异表达基因相对最少(仅 4 个),被富集到其余条目的下调差异表达基因有 19~30 个。

表3 高光胁迫下香果树上调差异表达基因的GO功能富集分析¹⁾
Table 3 GO functional enrichment analysis on up-regulated differentially expressed genes in *Emmenopterys henryi* Oliv. under high light stress¹⁾

功能分类 Functional classification	基因数 Gene number
生物过程 Biological process	
氧化还原过程 Oxidation-reduction process	155
α -氨基酸分解过程 α -amino acid catabolic process	20
细胞氨基酸分解过程 Cellular amino acid catabolic process	20
甘氨酸分解过程 Glycine catabolic process	11
丝氨酸家族氨基酸分解过程 Serine family amino acid catabolic process	11
甘氨酸代谢过程 Glycine metabolic process	14
有机酸分解过程 Organic acid catabolic process	21
羧酸分解过程 Carboxylic acid catabolic process	21
L-苯丙氨酸代谢过程 L-phenylalanine metabolic process	12
赤藓糖 4-磷酸/磷酸烯醇丙酮酸家族氨基酸代谢过程 Erythrose 4-phosphate/phosphoenolpyruvate family amino acid metabolic process	12
分子功能 Molecular function	
氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity	196
甘氨酸脱氢酶(脱羧)活性 Glycine dehydrogenase (decarboxylating) activity	8
氧化还原酶活性(以二硫化物为受体,作用于 CH-NH ₂ 基团供体) Oxidoreductase activity (acting on CH-NH ₂ group of donors, disulfide as acceptor)	8
氨裂解酶活性 Ammonia-lyase activity	9
柚皮素-查尔酮合酶活性 Naringenin-chalcone synthase activity	5
紫黄质去环氧化酶活性 Violaxanthin de-epoxidase activity	5
苯丙氨酸氨裂解酶活性 Phenylalanine ammonia-lyase activity	8
转移酶活性(转移烷基或芳基基团,甲基除外) Transferase activity (transferring alkyl or aryl groups, except methyl)	19
裂解酶活性 Lyase activity	48
氧化还原酶活性(作用于硫基团供体) Oxidoreductase activity (acting on sulfur group of donors)	19
细胞组分 Cellular component	
质体 Plastid	206
叶绿体 Chloroplast	179
质体部分 Plastid part	86
叶绿体部分 Chloroplast part	81
细胞质部分 Cytoplasm part	299
细胞质 Cytoplasm	352
类囊体 Thylakoid	50
叶绿体类囊体 Chloroplast thylakoid	33
质体类囊体 Plastid thylakoid	33
类囊体膜 Thylakoid membrane	31

¹⁾表中仅列出富集程度排名前10的条目 The table only list the items with enrichment of the top 10.

表4 高光胁迫下香果树下调差异表达基因的GO功能富集分析¹⁾
Table 4 GO functional enrichment analysis on down-regulated differentially expressed genes in *Emmenopterys henryi* Oliv. under high light stress¹⁾

功能分类 Functional classification	基因数 Gene number
生物学过程 Biological process	
蛋白质磷酸化 Protein phosphorylation	152
磷酸化 Phosphorylation	202
核酸模板转录 Nucleic acid-templated transcription	168
RNA生物合成过程 RNA biosynthetic process	168
DNA模板转录 DNA-templated transcription	161
核酸模板转录调控 Regulation of nucleic acid-templated transcription	117
RNA生物合成过程调控 Regulation of RNA biosynthetic process	117
DNA模板转录调控 Regulation of DNA-templated transcription	115
RNA代谢过程调控 Regulation of RNA metabolic process	117
含核碱基化合物代谢过程调控 Regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	117
分子功能 Molecular function	
激酶活性 Kinase activity	281
蛋白激酶活性 Protein kinase activity	228
磷酸转移酶活性(以醇基为受体) Phosphotransferase activity (alcohol group as acceptor)	232
转移酶活性(转移含磷基团) Transferase activity (transferring phosphorus-containing groups)	291
DNA结合转录因子活性 DNA binding transcription factor activity	69
转移酶活性 Transferase activity	440
转录调节因子活性 Transcription regulator activity	74
蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性 Protein serine/threonine kinase activity	95
催化活性(作用于蛋白质) Catalytic activity (acting on a protein)	290
DNA结合 DNA binding	151
细胞组分 Cellular component	
膜 Membrane	718
微管 Microtubule	21
聚合物细胞骨架纤维 Polymeric cytoskeletal fiber	21
MCM复合物 MCM complex	4
超分子复合物 Supramolecular complex	21
超分子聚合物 Supramolecular polymer	21
超分子纤维 Supramolecular fiber	21
细胞骨架部分 Cytoskeletal part	30
细胞壁 Cell wall	19
外部封装结构 External encapsulating structure	19

¹⁾表中仅列出富集程度排名前10的条目 The table only list the items with enrichment of the top 10.

2.2.3 KEGG 代谢通路富集分析 差异表达基因的 KEGG 代谢通路富集分析结果(表5)表明:上述上调

差异表达基因显著富集到 15 条代谢通路中,共包含 353 个上调差异表达基因。其中,富集到代谢途径的上调差异表达基因最多(122 个),富集到次生代谢物生物合成的上调差异表达基因次之(83 个),富集到抗生素生物合成、光合作用、碳代谢、长寿调解途径-蠕虫、类黄酮生物合成及卟啉和叶绿素代谢的上调差异表达基因有 10~29 个,而富集到光合生物的碳固定、类胡萝卜素生物合成、苯丙氨酸代谢及硫胺代谢等 7 个代谢通路的上调差异表达基因较少(均低于 10 个)。

由表 5 还可见:上述下调差异表达基因仅显著富集到 5 条代谢通路中,共包含 86 个差异表达基因。其中,富集到植物-病原体相互作用、植物激素信号转导和 MAPK 信号途径-植物的下调差异表达基因相对较多,分别有 29、28 和 18 个,富集到间隙连接和油菜素甾醇生物合成的下调差异表达基因较少,分别只有 7 和 4 个。

2.3 高光胁迫下香果树差异表达基因的表达分析

2.3.1 光合作用相关差异表达基因分析 高光胁迫下香果树光合作用相关差异表达基因分析结果(表 6)显示:编码光系统 I 中捕光复合物(LHC I)的基因 *lhca4* 以及编码光系统 I 中反应中心蛋白的基因 *psaA*、*psaE*、*psaG*、*psaH*、*psaK*、*psaL* 和 *psaO* 的表达水平均显著下降;编码光系统 II 中捕光复合物(LHC II)的基因 *lhcb1*、*lhcb2* 和 *lhcb5* 以及编码光系统 II 中相关蛋白的基因 *psbC*、*psbK*、*psbO*、*psbP*、*psbQ*、*psbR* 和 *psbW* 的表达水平均显著下降。此外,编码细胞色素 *b₆f* 复合物的基因 *petA*、*petC* 和 *petG*,编码光合电子传递链成员质体蓝素的基因 *petE*,编码 ATP 合成酶的基因 *atpC1* 和 *atpI* 的表达水平均显著下降;编码核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大、小亚基的基因 *rbcL*

和 *RBCS* 以及编码核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的基因 *RCA* 的表达水平显著下降;编码叶绿素合成关键酶谷氨酰-tRNA 还原酶和原叶绿素酸酯氧化还原酶 A 的基因 *HEMAI* 和 *PORA* 的表达水平也显著下降。仅编码光系统 II 中 22 ku 蛋白的 *psbS* 基因以及编码 ATP 合成酶 α 亚基的 *atpA* 基因和 ATP 合成酶 δ 链的 *atpD* 基因的表达水平显著上升。

表 5 高光胁迫下香果树差异表达基因的 KEGG 代谢通路富集分析
Table 5 Enrichment analysis on KEGG metabolic pathway of differentially expressed genes in *Emmenopterys henryi* Oliv. under high light stress

代谢通路 Metabolic pathway	基因数 Gene number
上调差异表达基因 Up-regulated differentially expressed genes	
次生代谢物生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	83
代谢途径 Metabolic pathway	122
光合作用 Photosynthesis	19
类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthesis	11
卟啉和叶绿素代谢 Porphyrin and chlorophyll metabolism	10
细胞周期-茎菌属 Cell cycle-Caulobacter	5
长寿调节途径-蠕虫 Longevity regulating pathway-worm	14
磷酸戊糖途径 Pentose phosphate pathway	9
类胡萝卜素生物合成 Carotenoid biosynthesis	5
抗生素生物合成 Biosynthesis of antibiotics	29
甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	7
苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	6
硫胺代谢 Thiamine metabolism	5
光合生物的碳固定 Carbon fixation in photosynthetic organisms	9
碳代谢 Carbon metabolism	19
下调差异表达基因 Down-regulated differentially expressed genes	
植物-病原体相互作用 Plant-pathogen interaction	29
植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	28
MAPK 信号途径-植物 MAPK signaling pathway-plant	18
间隙连接 Gap junction	7
油菜素甾醇生物合成 Brassinosteroid biosynthesis	4

表 6 高光胁迫下香果树光合作用相关差异表达基因分析

Table 6 Analysis on of differentially expressed genes related to photosynthesis in *Emmenopterys henryi* Oliv. under high light stress

基因 Gene	$\log_2 FC^{(1)}$ ($\bar{X} \pm SE$)	编码蛋白 Encoded protein
<i>Lhca1</i>	-0.30±0.00	光系统 I 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 1 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 1 in photosystem I
<i>Lhca2</i>	0.28±0.00	光系统 I 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 2 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 2 in photosystem I
<i>Lhca3</i>	-0.99±0.01	光系统 I 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 3 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 3 in photosystem I
<i>Lhca4</i>	-1.25±0.11	光系统 I 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 4 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 4 in photosystem I
<i>Lhcb1</i>	-1.34±0.12	光系统 II 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 1 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 1 in photosystem II
<i>Lhcb2</i>	-1.37±0.07	光系统 II 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 2 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 2 in photosystem II
<i>Lhcb3</i>	-0.50±0.00	光系统 II 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 3 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 3 in photosystem II
<i>Lhcb4.1</i>	-0.37±0.00	光系统 II 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 4.1 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 4.1 in photosystem II

续表6 Table 6 (Continued)

基因 Gene	$\log_2 FC^{1)}$ ($\bar{X} \pm SE$)	编码蛋白 Encoded protein
<i>Lhcb4.2</i>	-0.37±0.00	光系统 II 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 4.2 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 4.2 in photosystem II
<i>Lhcb5</i>	-1.37±0.12	光系统 II 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 5 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 5 in photosystem II
<i>Lhcb6</i>	0.16±0.00	光系统 II 中的捕光复合物叶绿素 <i>a/b</i> 结合蛋白 6 Light-harvesting complex chlorophyll <i>a/b</i> binding protein 6 in photosystem II
<i>psaA</i>	-2.06±0.31	光系统 I 中的叶绿素 <i>a</i> 脱辅基蛋白 A1 Chlorophyll <i>a</i> apoprotein A1 in photosystem I
<i>psaB</i>	-0.75±0.01	光系统 I 中的叶绿素 <i>a</i> 脱辅基蛋白 A2 Chlorophyll <i>a</i> apoprotein A2 in photosystem I
<i>psaD</i>	-0.76±0.01	光系统 I 中的反应中心亚基 II Reaction center subunit II in photosystem I
<i>psaE</i>	-1.92±0.13	光系统 I 中的反应中心亚基 IV Reaction center subunit IV in photosystem I
<i>psaF</i>	-0.90±0.01	光系统 I 中的反应中心亚基 III Reaction center subunit III in photosystem I
<i>psaG</i>	-1.98±0.21	光系统 I 中的反应中心亚基 V Reaction center subunit V in photosystem I
<i>psaH</i>	-1.21±0.11	光系统 I 中的反应中心亚基 VI Reaction center subunit VI in photosystem I
<i>psaK</i>	-1.26±0.13	光系统 I 中的反应中心亚基 X Reaction center subunit X in photosystem I
<i>psaL</i>	-1.49±0.12	光系统 I 中的反应中心亚基 XI Reaction center subunit XI in photosystem I
<i>psaO</i>	-1.37±0.22	光系统 I 中的亚基 Subunit in photosystem I
<i>psbA</i>	0.24±0.00	光系统 II 中的 D1 蛋白 Protein D1 in photosystem II
<i>psbB</i>	-0.81±0.00	光系统 II 中的反应中心蛋白 CP47 Reaction center protein CP47 in photosystem II
<i>psbC</i>	-1.25±0.06	光系统 II 中的反应中心蛋白 CP43 Reaction center protein CP43 in photosystem II
<i>psbD</i>	0.89±0.01	光系统 II 中的 D2 蛋白 Protein D2 in photosystem II
<i>psbK</i>	-1.17±0.08	光系统 II 中的反应中心蛋白 K Reaction center protein K in photosystem II
<i>psbO</i>	-1.62±0.10	光系统 II 中的放氧增强蛋白 1 Oxygen-evolving enhancer protein 1 in photosystem II
<i>psbP</i>	-1.08±0.07	光系统 II 中的放氧增强蛋白 2 Oxygen-evolving enhancer protein 2 in photosystem II
<i>psbQ</i>	-1.29±0.06	光系统 II 中的放氧增强蛋白 3 Oxygen-evolving enhancer protein 3 in photosystem II
<i>psbR</i>	-1.42±0.03	光系统 II 中的 10 ku 多肽 10 ku polypeptide in photosystem II
<i>psbS</i>	2.10±0.13	光系统 II 中的 22 ku 蛋白 22 ku protein in photosystem II
<i>psbT</i>	-0.64±0.00	光系统 II 中的 5 ku 蛋白 5 ku protein in photosystem II
<i>psbW</i>	-1.29±0.08	光系统 II 中的反应中心蛋白 W Reaction center protein W in photosystem II
<i>petA</i>	-1.30±0.01	细胞色素 <i>f</i> Cytochrome <i>f</i>
<i>petB</i>	0.18±0.00	细胞色素 <i>b₆</i> Cytochrome <i>b₆</i>
<i>petC</i>	-1.20±0.08	细胞色素 <i>b₆f</i> 复合体铁硫亚基 Cytochrome <i>b₆f</i> complex iron-sulfur subunit
<i>petD</i>	0.80±0.01	细胞色素 <i>b₆f</i> 复合体亚基 4 Cytochrome <i>b₆f</i> complex subunit 4
<i>petG</i>	-1.57±0.11	细胞色素 <i>b₆f</i> 复合体亚基 5 Cytochrome <i>b₆f</i> complex subunit 5
<i>petE</i>	-1.61±0.23	质体蓝素 Plastocyanin
<i>atpA</i>	1.39±0.13	ATP 合成酶的 α 亚基 Subunit α of ATP synthase
<i>atpB</i>	-0.94±0.01	ATP 合成酶的 β 亚基 Subunit β of ATP synthase
<i>atpC</i>	0.32±0.00	ATP 合成酶的 γ 亚基 Subunit γ of ATP synthase
<i>atpC1</i>	-1.05±0.05	ATP 合成酶的 $\gamma 1$ 链 Chain $\gamma 1$ of ATP synthase
<i>atpD</i>	2.76±0.25	ATP 合成酶的 δ 链 Chain δ of ATP synthase
<i>atpE</i>	-0.50±0.00	ATP 合成酶的 ϵ 链 Chain ϵ of ATP synthase
<i>atpF</i>	-0.24±0.00	ATP 合成酶的 <i>b</i> 亚基 Subunit <i>b</i> of ATP synthase
<i>atpH</i>	0.38±0.00	ATP 合成酶的 <i>c</i> 亚基 Subunit <i>c</i> of ATP synthase
<i>atpI</i>	-2.12±0.14	ATP 合成酶的 <i>a</i> 亚基 Subunit <i>a</i> of ATP synthase
<i>RBCS</i>	-2.21±0.17	核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的小亚基 Small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
<i>rbcl</i>	-1.20±0.13	核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶的大亚基 Large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
<i>RCA</i>	-1.42±0.06	核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶 Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase
<i>HEMA1</i>	-2.52±0.13	谷氨酰-tRNA 还原酶 1 Glutamyl-tRNA reductase 1
<i>PORA</i>	-3.15±0.17	原叶绿素酸酯氧化还原酶 A Protochlorophyllide oxidoreductase A
<i>HEMC</i>	-0.17±0.00	胆色素原脱氨酶 Porphobilinogen deaminase
<i>HEMF2</i>	-0.33±0.00	粪卟啉原-III 氧化酶 2 Coproporphyrinogen-III oxidase 2
<i>CAO</i>	-0.79±0.00	叶绿素酸酯 <i>a</i> 加氧酶 Chlorophyllide <i>a</i> oxygenase

1) FC: 差异倍数 Fold change.

2.3.2 花青素合成相关差异表达基因分析 高光胁迫下香果树花青素合成相关差异表达基因分析结果(表 7)显示:编码花青素合成关键酶的基因 *PAL*、*CHS*、*F3H*、*UFGT6* 和 *UFGT3* 的表达水平均显著上升,同时,编码花青素合成转录因子的基因 *MYB6*、*MYB7*、*MYB8*、*MYB12*、*MYB36*、*MYB111*、*MYB113* 和 *GL3* 的表达水平也显著上升。

表 7 高光胁迫下香果树花青素合成相关差异表达基因分析
Table 7 Analysis on differentially expressed genes related to anthocyanin synthesis in *Emmenopterys henryi* Oliv. under high light stress

基因 Gene	log ₂ FC ¹⁾ ($\bar{X} \pm SE$)	编码蛋白 Encoded protein
<i>PAL</i>	3.87±0.13	苯丙氨酸裂解酶 Phenylalanine ammonia-lyase
<i>CHS</i>	3.07±0.22	查尔酮合成酶 Chalcone synthase
<i>F3H</i>	4.50±0.34	黄酮醇 3-羟化酶 Flavanone 3-hydroxylase
<i>DFR</i>	4.77±0.32	二氢黄酮醇 4-还原酶 Dihydroflavonol 4-reductase
<i>UFGT3</i>	4.85±0.25	UDP-葡萄糖:类黄酮 3-O-糖苷转移酶 3 UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase 3
<i>UFGT6</i>	3.53±0.23	UDP-葡萄糖:类黄酮 3-O-糖苷转移酶 6 UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase 6
<i>MYB6</i>	5.05±0.31	转录因子 MYB6 Transcription factor MYB6
<i>MYB7</i>	3.01±0.21	转录因子 MYB7 Transcription factor MYB7
<i>MYB8</i>	3.45±0.18	转录因子 MYB8 Transcription factor MYB8
<i>MYB12</i>	4.36±0.24	转录因子 MYB12 Transcription factor MYB12
<i>MYB36</i>	2.62±0.19	转录因子 MYB36 Transcription factor MYB36
<i>MYB111</i>	8.60±0.35	转录因子 MYB111 Transcription factor MYB111
<i>MYB113</i>	1.75±0.12	转录因子 MYB113 Transcription factor MYB113
<i>GL3</i>	3.87±0.13	转录因子 GL3 Transcription factor GL3

¹⁾ FC: 差异倍数 Fold change.

2.3.3 抗氧化酶相关差异表达基因分析 高光胁迫下香果树抗氧化酶差异表达基因分析结果(表 8)显示:*Fe-SOD*、*Cu/Zn-SOD*、*CAT1*、*CAT2*、*CAT3*、*PER2*、*PER12*、*PER48*、*APX1* 和 *APX3* 基因的表达水平均显著上升。

2.3.4 脱落酸合成及信号通路相关差异表达基因分析 高光胁迫下香果树脱落酸合成及信号通路相关差异表达基因分析结果(表 9)显示:*NCED1* 和 *NCED3* 基因的表达水平显著下降,*BGLU11*、*BGLU23*、*BGLU24*、*BGLU34* 和 *BGLU46* 基因的表达水平显著上升,而催化脱落酸分解的关键酶 8'-羟化酶基因 *CYP707A* 的表达水平显著下降。另外,编码脱落酸受体 *PYR/PYL* 蛋白家族的基因 *PYR/PYL* 以及对脱落酸信号通路起正向调控作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2C 的编码基因 *SnRK2C* 的表达水平显著上升,

而对脱落酸信号通路起负向调控作用的蛋白磷酸酶 2C 51 的编码基因 *PP2C51* 的表达水平却显著下降。

表 8 高光胁迫下香果树抗氧化酶相关差异表达基因分析
Table 8 Analysis on differentially expressed genes related to antioxidase in *Emmenopterys henryi* Oliv. under high light stress

基因 Gene	log ₂ FC ¹⁾ ($\bar{X} \pm SE$)	编码蛋白 Encoded protein
<i>Fe-SOD</i>	1.76±0.11	Fe-超氧化物歧化酶 Fe-superoxide dismutase
<i>Cu/Zn-SOD</i>	3.58±0.07	Cu-Zn 超氧化物歧化酶 4A Cu-Zn superoxide dismutase 4A
<i>CAT1</i>	1.53±0.13	过氧化氢同工酶 1 Catalase isozyme 1
<i>CAT2</i>	1.75±0.14	过氧化氢同工酶 2 Catalase isozyme 2
<i>CAT3</i>	1.20±0.08	过氧化氢同工酶 3 Catalase isozyme 3
<i>PER2</i>	1.20±0.13	过氧化物酶 2 Peroxidase 2
<i>PER12</i>	2.00±0.19	过氧化物酶 12 Peroxidase 12
<i>PER48</i>	4.97±0.25	过氧化物酶 48 Peroxidase 48
<i>APX1</i>	1.00±0.05	L-抗坏血酸过氧化物酶 1 L-ascorbate peroxidase 1
<i>APX3</i>	1.75±0.14	L-抗坏血酸过氧化物酶 3 L-ascorbate peroxidase 3

¹⁾ FC: 差异倍数 Fold change.

表 9 高光胁迫下香果树脱落酸合成及信号通路相关差异表达基因分析 ($\bar{X} \pm SE$)
Table 9 Analysis on differentially expressed genes related to abscisic acid synthesis and signal pathway in *Emmenopterys henryi* Oliv. under high light stress ($\bar{X} \pm SE$)

基因 Gene	log ₂ FC ¹⁾ ($\bar{X} \pm SE$)	编码蛋白 Encoded protein
<i>NCED1</i>	-3.38±0.15	9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 1 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1
<i>NCED3</i>	-3.23±0.19	9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 3 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3
<i>BGLU11</i>	1.50±0.10	β -葡萄糖苷酶 11 β -glucosidase 11
<i>BGLU23</i>	1.20±0.04	β -葡萄糖苷酶 23 β -glucosidase 23
<i>BGLU24</i>	1.75±0.08	β -葡萄糖苷酶 24 β -glucosidase 24
<i>BGLU34</i>	2.18±0.13	β -葡萄糖苷酶 34 β -glucosidase 34
<i>BGLU46</i>	1.01±0.07	β -葡萄糖苷酶 46 β -glucosidase 46
<i>CYP707A</i>	-2.75±0.17	8'-羟化酶 8'-hydroxylase
<i>PYR/PYL</i>	1.44±0.06	脱落酸受体 <i>PYR/PYL</i> 蛋白家族 Abscisic acid receptor <i>PYR/PYL</i> protein family
<i>PP2C51</i>	-3.22±0.15	蛋白磷酸酶 2C 51 Protein phosphatase 2C 51
<i>SnRK2C</i>	1.80±0.20	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2C Serine/threonine-protein kinase 2C

¹⁾ FC: 差异倍数 Fold change.

2.4 高光胁迫下香果树差异表达基因的 qRT-PCR 验证

为验证基于 RNA-seq 技术检测的香果树转录组数据的可靠性,从上述差异表达基因中随机选择 8 个显著差异表达的基因进行 qRT-PCR 验证。统计结

果(表 10)表明:在 RNA-seq 检测结果中,这 8 个差异表达基因的表达水平与 qRT-PCR 检测结果一致,说明基于 RNA-seq 技术的香果树差异表达基因表达水平分析结果真实、可靠。

表 10 基于 RNA-seq 和 qRT-PCR 技术的高光胁迫下香果树 8 个差异表达基因表达水平的比较 ($\bar{X} \pm SE$)

Table 10 Comparison on expression levels of eight differentially expressed genes in *Emmenopterys henryi* Oliv. under high light stress based on RNA-seq and qRT-PCR technologies ($\bar{X} \pm SE$)

基因 Gene	$\log_2 FC^{1)}$	
	qRT-PCR	RNA-seq
<i>MYB8</i>	1.81±0.14	3.01±0.21
<i>F3H</i>	1.41±0.07	4.50±0.34
<i>MYB113</i>	1.09±0.10	8.60±0.35
<i>SnRK2C</i>	2.28±0.30	1.80±0.20
<i>atpD</i>	1.53±0.06	2.76±0.25
<i>PORA</i>	-4.18±0.42	-3.15±0.17
<i>Lhcb1</i>	-3.18±0.21	-1.34±0.12
<i>psbO</i>	-1.23±0.15	-1.62±0.10

¹⁾ FC: 差异倍数 Fold change.

3 讨论和结论

3.1 香果树响应高光胁迫的光合通路分析

捕光复合物(light harvesting complex, LHC)是一种特殊的蛋白质,在植物进行光合作用的过程中发挥着吸收和传递光能的重要功能。通常认为,LHC I 包括 Lhca1、Lhca2、Lhca3 和 Lhca4 蛋白,LHC II 包括 Lhcb1、Lhcb2、Lhcb3、Lhcb4 (CP29)、Lhcb5 (CP26) 和 Lhcb6 (CP24) 蛋白^[16,17]。其中,CP29、CP26 和 CP24 除了收集太阳能并将其转移到反应中心外,还可以在高光照条件下耗散多余的激发能,起到光保护作用^[18]。在高光胁迫下,拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] *Lhca1-4* 和 *Lhcb1-6* 基因的表达水平显著下调^[19],香果树 *Lhca4*、*Lhcb1*、*Lhcb2* 和 *Lhcb5* 基因的表达水平也显著下调。据此推测,高光胁迫可能导致香果树部分捕光复合物数量减少,致使叶绿体的捕光能力下降,相关光保护能力也同时降低。

本研究结果显示:在高光胁迫下,编码香果树光系统 I 中反应中心蛋白的基因 *psaA*、*psaE*、*psaG*、*psaH*、*psaK*、*psaL* 和 *psaO* 的表达水平显著下调,这一研究结果与拟南芥的相关研究结果一致^[19]。最新研究发现,叶绿体 NADP 库的大小随光照强度变化而改变,叶绿体可根据 NADP 库的大小调整 PsaA 和 PsaB

蛋白的合成速率,从而改变光系统 I 的数量和活性,并且 PsaA 和 PsaB 蛋白合成的调控是在蛋白质翻译阶段而不是转录阶段^[20]。那么,高光胁迫下香果树反应中心蛋白转录水平下降与光系统 I 数量和活性的变化究竟有何直接关系,尚待进一步深入研究。

在光系统 II 中,*psbB* 和 *psbC* 基因编码的核心天线复合物 CP47 和 CP43 以及 PsoO、PsbP、PsbQ、PsbR 均与光系统 II 的放氧活性密切相关^[21],PsbK 和 PsbW 对光系统 II 的结构稳定起到关键作用^[22];PsbS 在 qE 型非光化学猝灭中起重要作用,可保护植物免受过量光照引起的光损害^[23]。本研究中,高光胁迫下,香果树的 *psbC*、*psbK*、*psbO*、*psbP*、*psbQ*、*psbR* 和 *psbW* 基因的表达水平显著下降,而 *psbS* 基因的表达水平显著上调,表明高光胁迫抑制了光系统 II 的结构蛋白和放氧复合物核心蛋白的表达,同时激活了光损伤保护机制。最近研究证实,光系统 II 是植物光损伤的关键部位,过量光照导致放氧活性中心蛋白的氧化损伤和放氧活性丧失,核心蛋白亚基 D1、D2、CP47 和 CP43 发生明显的降解和解离^[24]。然而,关于香果树光损伤的分子机制尚未明确,应将转录组学和蛋白质组学方法结合起来进行研究。

高光胁迫下,香果树细胞色素 b_6/f 复合物基因 *petA*、*petC* 和 *petG*,质体蓝素基因 *petE* 以及 ATP 合成酶相关基因 *atpC1* 和 *atpI* 的表达水平均显著下调,表明高光胁迫下香果树的光合电子传递过程和光合磷酸化过程均受到影响。对高光胁迫下拟南芥的研究结果显示:其细胞色素 b_6/f 复合物基因 *petM* 的表达水平显著下调,但 ATP 合成酶基因的表达水平并没有发生明显变化^[19]。表明不同植物种类对高光胁迫的响应机制存在差异。

核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶是光合作用碳同化过程中的关键酶,核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶是调控核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活性的关键酶^[25]。在高光胁迫下,香果树核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大、小亚基的编码基因以及核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶基因的表达水平显著下调,推测这可能会造成核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活性明显下降。谷氨酰-tRNA 还原酶和原叶绿素酸酯氧化还原酶是叶绿素生物合成途径中的关键酶^[26],在高光胁迫下,这 2 种酶相关基因的表达水平显著下调可能是造成香果树叶绿素含量显著降低的重要原因。

3.2 香果树响应高光胁迫的花青素代谢通路分析

研究发现,强光可诱导植物体内花青素的积累^[27],而花青素对强光有过滤作用,可减轻光系统Ⅱ的光损伤程度^[23,28]。大量研究表明:花青素合成相关基因的表达以及花青素的积累受到 MYB 和 bHLH 转录因子的调控^[29-31],其中,MYB6、MYB7、MYB8、MYB12、MYB36、MYB111 和 MYB113 可正向调控拟南芥叶、毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)叶、紫胡萝卜[*Daucus carota* subsp. *sativus* (Hoffm.) Arcang.]肉质根、月季(*Rosa chinensis* Jacq.)花瓣、海棠[*Malus spectabilis* (Ait.) Borkh.]叶、丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)花中花青素的合成^[19,32-36];bHLH 类转录因子 GL3 可促进‘红阳’猕猴桃(*Actinidia chinensis* ‘Hongyang’)果实中花青素的合成^[37]。本研究中,高光胁迫下,编码香果树花青素合成酶的基因 *PAL*、*CHS*、*F3H*、*UFGT6* 和 *UFGT3* 的表达水平显著上调,与花青素合成相关的转录因子编码基因 *MYB6*、*MYB7*、*MYB8*、*MYB12*、*MYB36*、*MYB111*、*MYB113* 和 *GL3* 的表达水平也显著上调。说明在高光胁迫下,这些转录因子可能通过对香果树花青素合成相关基因表达的正向调控来控制花青素的合成,从而使花青素积累显著增加。前人的研究表明,参与调节花青素合成的转录因子主要包括 3 类,即 R2R3-MYB、bHLH 和 WD40,这些转录因子通常通过形成 MYB-bHLH 或 MYB-bHLH-WD40 复合物来调控花青素的合成^[38]。关于香果树中 MYB 和 bHLH 转录因子之间是否存在互作关系以及二者之间的互作机制尚不清楚,有待进一步深入研究。

3.3 香果树响应高光胁迫的抗氧化酶系统分析

Hao 等^[12]认为,高光胁迫会导致光系统中的活性氧过度积累,对光系统Ⅱ造成损伤并引起光抑制。植物活性氧的清除主要依赖于体内的抗氧化酶(如 SOD、POD、CAT 和 APX 等)^[24,39]。在高光胁迫下,香果树 SOD、POD、CAT 和 APX 的活性显著升高,且香果树 *Cu/Zn-SOD*、*Fe-SOD*、*CAT1*、*CAT2*、*CAT3*、*PER2*、*PER12*、*PER48*、*APX1* 和 *APX3* 基因的表达水平显著上调。说明香果树可能通过在转录水平促进相关抗氧化酶基因表达来调控抗氧化酶活性,从而提高其清除自由基的能力。

3.4 香果树响应高光胁迫的脱落酸代谢及信号通路分析

脱落酸在植物体内的积累不仅与脱落酸的生物

合成和分解代谢相关,也与脱落酸糖基水解酶催化的无活性脱落酸向有活性脱落酸转化的过程有关^[40]。9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(NCED)是催化脱落酸生物合成的关键酶^[41]。CYP707A1、CYP707A2、CYP707A3 和 CYP707A4 这 4 种细胞色素 P450 单加氧酶是脱落酸分解代谢的关键酶^[42]。高光胁迫下,尽管香果树脱落酸合成关键酶基因 *NCED* 的转录表达显著下调,但是催化无活性脱落酸向有活性脱落酸转化的脱落酸糖基水解酶的基因 *BGLU* 显著上调表达,同时催化脱落酸分解的细胞色素 P450 单加氧酶基因 *CYP707A* 表达量显著下调。说明高光胁迫下香果树脱落酸水平升高可能是由脱落酸分解速率下降和有活性脱落酸含量增加造成的。

脱落酸是植物响应逆境胁迫的重要信号分子^[43]。环境胁迫可诱导植物体内的脱落酸水平升高,脱落酸与其受体 PYR1/PYLs 结合后即可启动脱落酸信号转导途径,ABA-PYR1/PYLs 受体复合物与蛋白磷酸酶 2C(PP2C)结合,从而释放在静息状态下被 PP2C 抑制的 SnRK2s 激酶;SnRK2s 被激活后可磷酸化下游的 bZIP 类转录因子(包括 ABIs 等),从而激活下游基因,引起植物产生生理生化变化^[44]。本研究结果显示:高光胁迫下香果树的脱落酸受体基因 *PYR/PYL*、脱落酸核心信号元件蛋白磷酸酶激酶基因 *SnRK2C* 的表达水平显著上调,而脱落酸信号途径的负调控因子 PP2C 的编码基因 *PP2C51* 的表达水平显著下调,表明高光胁迫可促进香果树体内脱落酸的积累,进而激活脱落酸信号转导途径。在对拟南芥的研究中,尽管脱落酸水平受高光胁迫诱导显著增加,但多数脱落酸受体基因的表达量下调,而几乎所有的 PP2C 类磷酸酶基因却显著上调^[19],这与香果树的研究结果存在明显差异。可见,脱落酸调控不同植物响应高光胁迫的机制可能存在较大差异。

3.5 结论

综上所述,高光胁迫下香果树的生理生化变化与相关差异表达基因的表达水平变化一致,且这些差异表达基因主要富集在光合作用、氧化还原、植物激素代谢和信号转导、次生代谢等通路中,初步推断香果树主要通过调控光合作用、抗氧化酶系统、脱落酸代谢及信号通路、花青素代谢通路响应高光胁迫。

参考文献:

[1] 许宁, 慈宏艳, 甘小洪. 光照及地面覆盖物对水青树种子萌

- 发和幼苗初期生长的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2015, 24(3): 85-93.
- [2] XIONG H, HUA L, REYNA-LLORENS I, et al. Photosynthesis-independent production of reactive oxygen species in the rice bundle sheath during high light is mediated by NADPH oxidase [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(25): e2022702118.
- [3] 郭连金, 杜佳朋, 吴艳萍, 等. 香果树实生苗的光合特性及其与环境因子的关系[J]. 应用生态学报, 2017, 28(5): 1473-1481.
- [4] 郭连金. 濒危植物香果树(*Emmenopterys henryi*)种群结构与动态[J]. 武汉植物学研究, 2009, 27(5): 509-514.
- [5] 傅立国, 金鉴明. 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: 568.
- [6] 国家林业和草原局, 农业农村部. 国家重点保护野生植物名录[EB/OL]. (2021-09-07)[2022-09-18]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-09/09/content_5636409.htm.
- [7] 康华靖, 陈子林, 周钰鸿, 等. 濒危植物香果树种子萌发及幼苗生长动态的比较[J]. 中南林业科技大学学报, 2011, 31(1): 32-37.
- [8] 杨开军, 张小平. 稀有植物香果树的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2007, 26(2): 1-4.
- [9] 刘 鹏, 康华靖, 张志详, 等. 香果树(*Emmenopterys henryi*)幼苗生长特性和叶绿素荧光对不同光强的响应[J]. 2008, 28(11): 5656-5664.
- [10] 李冬林, 金雅琴, 崔梦凡, 等. 遮荫对香果树叶片生理特性及叶肉细胞超微结构的影响[J]. 植物研究, 2020, 40(1): 29-40.
- [11] 郭连金, 薛莘莘, 邵兴华, 等. 香果树根萌苗生长特性及影响因素分析[J]. 植物科学学报, 2015, 33(2): 165-175.
- [12] HAO Y F, FENG Y Y, CAI L J, et al. Effect of ABA on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Emmenopterys henryi* Oliv. under high light [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2021, 68(3): 510-518.
- [13] SONG L, JIANG Y, ZHAO H, et al. Comparative study on calli from two reed ecotypes under heat stress[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2012, 59(3): 381-388.
- [14] 陈 霞, 陈千思, 刘萍萍, 等. UPLC-MS/MS法测定新鲜烟草中的脱落酸和茉莉酸[J]. 烟草科技, 2015(2): 53-57.
- [15] 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.
- [16] 高志民, 刘 成, 刘颖丽, 等. 毛竹捕光叶绿素 *a/b* 结合蛋白基因 *cab-PhEI* 的克隆与表达分析[J]. 林业科学, 2009, 45(3): 145-149.
- [17] 孙萌萌, 王莹慧, 汪育文, 等. 南粳 5055 及其亲本的光合特性[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(1): 1-9.
- [18] SU X, MA J, WEI X, et al. Structure and assembly mechanism of plant C₂S₂M₂-type PS II-LHCII supercomplex [J]. Science, 2017, 357(6353): 815-820.
- [19] HUANG J, ZHAO X, CHORY J. The *Arabidopsis* transcriptome responds specifically and dynamically to high light stress[J]. Cell Reports, 2019, 29(12): 4186-4199.
- [20] JI D, LI Q, GUO Y, et al. NADP⁺ supply adjusts the synthesis of photosystem I in *Arabidopsis* chloroplasts[J]. Plant Physiology, 2022, 189(4): 2128-2143.
- [21] 李明星, 洪 健. 植物光系统蛋白的研究进展[J]. 计算生物学, 2018, 8(1): 1-7.
- [22] WEI X, SU X, CAO P, et al. Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution [J]. Nature, 2016, 534(7605): 69-74.
- [23] 董潇潇, 靳红磊, 王宏斌. 植物光系统高光适应机制研究进展[J]. 植物生理学报, 2016, 52(11): 1725-1732.
- [24] ZHOU Y, LIU Z, YAO M, et al. Elucidating the molecular mechanism of dynamic photodamage of photosystem II membrane protein complex by integrated proteomics strategy [J]. CCS Chemistry, 2021, 3: 443-454.
- [25] 陈候鸣, 陈 跃, 王 盾, 等. 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶在植物抗逆性中的作用[J]. 植物生理学报, 2016, 52(11): 1637-1648.
- [26] ZHANG S, HEYES D J, FENG L, et al. Structural basis for enzymatic photocatalysis in chlorophyll biosynthesis [J]. Nature, 2019, 574(7780): 722-725.
- [27] YU J, QIU K, SUN W, et al. A long noncoding RNA functions in high-light-induced anthocyanin accumulation in apple by activating ethylene synthesis[J]. Plant Physiology, 2022, 189: 66-83.
- [28] SHI Y, KE X, YANG X, et al. Plants response to light stress[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2022, 49(8): 735-747.
- [29] 侯泽豪, 王书平, 魏淑东, 等. 植物花青素生物合成与调控的研究进展[J]. 广西植物, 2017, 37(12): 1603-1613.
- [30] DENG J, LI J, SU M, et al. A *bHLH* gene *NnTT8* of *Nelumbo nucifera* regulates anthocyanin biosynthesis [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 158: 518-523.
- [31] 后 猛, 李 臣, 宋炜涵, 等. 紫肉甘薯及其突变体花青素积累差异的比较转录组分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(2): 313-325.
- [32] WANG L, LU W, RAN L, et al. R2R3-MYB transcription factor MYB6 promotes anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis but inhibits secondary cell wall formation in *Populus tomentosa* [J]. The Plant Journal, 2019, 99(4): 733-751.
- [33] XU Z S, YANG Q Q, FENG K, et al. Changing carrot color: insertions in *DcMYB7* alter the regulation of anthocyanin biosynthesis and modification [J]. Plant Physiology, 2019, 181: 195-207.
- [34] 曾 媛, 龚 胜, 李 婧, 等. 三色堇 *VivMYB8* 基因的克隆及其在月季中的瞬时表达分析[J]. 分子植物育种, 2016, 14(4): 844-850.
- [35] TIAN J, ZHANG J, HAN Z Y, et al. McMYB12 transcription factors co-regulate proanthocyanidin and anthocyanin biosynthesis in *Malus crabapple* [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 43715.

- undisturbed old-growth Norway spruce forest on the rising Bothnian coastline [J]. *Forest Ecology and Management*, 2001, 151: 67-79.
- [33] MCEVOY P M, MCADAM J H, MOSQUERA-LOSADA M R, et al. Tree regeneration and sapling damage of pedunculate oak *Quercus robur* in a grazed forest in Galicia, NW Spain: a comparison of continuous and rotational grazing systems [J]. *Agroforestry System*, 2006, 66(2): 85-92.
- [34] 李辛雷, 孙振元, 李纪元, 等. 濒危植物杜鹃红山茶种群结构和动态变化[J]. *植物资源与环境学报*, 2018, 27(2): 17-23.
- [35] 曾庆昌, 缪绅裕, 唐志信, 等. 广东连州田心梅树冲伯乐树种群及其生境特征[J]. *西部林业科学*, 2014, 43(5): 68-75.
- [36] 吴富勤. 极小种群野生植物大树杜鹃的保护生物学研究[D]. 昆明: 云南大学生命科学学院, 2015: 87-91.
- [37] 许恒, 刘艳红. 极小种群樟叶槭种群结构及动态特征[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2019, 43(2): 47-54.
- [38] 杨彪, 张全建, 龚旭, 等. 雅砻江冬麻豆 (*Salweenia bouffordiana*) 种群结构与动态特征[J]. *生态学报*, 2020, 40(4): 1184-1194.
- [39] COMITA L S, HUBBELL S P. Local neighborhood and species' shade tolerance influence survival in a diverse seedling bank [J]. *Ecology*, 2009, 90(2): 328-334.
- [40] 林建勇, 李娟, 李俊福, 等. 采集干扰对闽楠种群结构和数量的动态影响[J]. *森林与环境学报*, 2020, 40(4): 377-385.
- [41] 张文辉, 祖元刚, 刘国彬. 十种濒危植物的种群生态学特征及致危因素分析[J]. *生态学报*, 2002, 22(9): 1512-1520.
- [42] 韩文娟, 袁晓青, 张文辉. 油松人工林林窗对幼苗天然更新影响[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(11): 2940-2948.
- (责任编辑: 佟金凤)

(上接第62页 Continued from page 62)

- [36] JIANG T, ZHANG M, WEN C, et al. Integrated metabolomic and transcriptomic analysis of the anthocyanin regulatory networks in *Salvia miltiorrhiza* Bge. flowers [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20: 349.
- [37] 李文彬, 刘义飞, 彭明. '红阳'猕猴桃中花青素转录调控因子 *AdGL3* 的克隆及表达分析[J]. *热带作物学报*, 2014, 35(9): 1741-1746.
- [38] 李崇晖, 杨光穗, 张志群, 等. 红掌 R2R3-MYB 转录因子基因 *AaMYB6* 调控花青素苷合成[J]. *园艺学报*, 2021, 48(10): 1859-1872.
- [39] 赵嫚, 陈仕勇, 李亚萍, 等. 外源 GABA 对盐胁迫下金花菜种子萌发及幼苗抗氧化能力的影响[J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(2): 310-316.
- [40] WANG C, CHEN S, DONG Y, et al. Chloroplastic Os3BGlu6 contributes significantly to cellular ABA pools and impacts drought tolerance and photosynthesis in rice [J]. *New Phytologist*, 2020, 226: 1042-1054.
- [41] EDEL K H, KUDLA J. Integration of calcium and ABA signaling [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, 33: 83-91.
- [42] WANG Z, WANG F X, HONG Y C, et al. The flowering repressor SVP confers drought resistance in *Arabidopsis* by regulating abscisic acid catabolism [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(9): 1184-1197.
- [43] ZHANG H, ZHU J, GONG Z, et al. Abiotic stress responses in plants [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2022, 23(2): 104-119.
- [44] WANG Z, REN Z, CHENG C, et al. Counteraction of ABA-mediated inhibition of seed germination and seedling establishment by ABA signaling terminator in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(9): 1284-1297.
- (责任编辑: 佟金凤)