

研究报告 Original Papers

盐胁迫下两个甜瓜品种转录因子的转录组分析

陈嘉贝, 张芙蓉, 黄丹枫, 张利达, 张屹东*

上海交通大学农业与生物学院, 植物科学研究所, 上海200240

摘要: 利用新一代高通量测序手段——转录组测序(RNA-Seq)技术研究在300 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下两个甜瓜(*Cucumis melo* L.)品种‘玉露’和‘冰雪脆’的转录因子基因表达变化。这两个甜瓜品种在叶绿素荧光参数上的差异表明其在盐胁迫下有不同的生理反应。转录组测序结果表明, 盐胁迫与对照相比, ‘玉露’共有属于19个转录因子家族的56个转录因子基因表达发生变化(在转录水平, 属于7个转录因子家族的22个转录因子上调表达, 属于14个转录因子家族的34个转录因子下调表达)。(‘冰雪脆’有属于20个转录因子家族的47个转录因子基因表达发生变化(在转录水平上, 属于5个转录因子家族的17个转录因子上调表达, 属于17个转录因子家族的30个转录因子下调表达)。盐胁迫下, 两个甜瓜品种差异表达的转录因子既表现特异性, 也存在部分重叠。‘玉露’有29个转录因子特异响应, ‘冰雪脆’有20个特异响应。盐胁迫响应重叠的转录因子有27个, 其中9个上调表达, 18个下调表达。采用实时荧光定量PCR对几个转录因子进行了盐胁迫下的表达检测, 其趋势与转录组分析结果基本一致。

关键词: 甜瓜; 盐胁迫; 高通量测序; 转录因子; 转录组分析

Transcriptome Analysis of Transcription Factors in Two Melon (*Cucumis melo* L.) Cultivars under Salt Stress

CHEN Jia-Bei, ZHANG Fu-Rong, HUANG Dan-Feng, ZHANG Li-Da, ZHANG Yi-Dong*

School of Agriculture and Biology, Institute of Plant Science, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Abstract: The expression changes of transcription factor genes in two melon (*Cucumis melo* L.) cultivars (‘Yvlu’ and ‘Bingxuecui’) were analyzed under salt stress by the next-generation high-throughput sequencing technology—RNA-Seq. The differences in the chlorophyll fluorescence parameters between these two cultivars indicated significant difference in their salt tolerance. The results showed that 56 differential expressed transcription factor genes belonged to 19 transcription factors families of ‘YL’ (at the transcription level, 22 up-regulated genes were belonged to 7 transcription factors families and 34 down-regulated were belonged to 14 transcription factors families) and 47 transcription factor genes belonged to 20 transcription factors families of ‘BXC’ (at the transcription level, 17 up-regulated genes were belonged to 5 transcription factors families and 30 down-regulated genes were belonged to 17 transcription factors families) under salt stress. The expression of transcription factors genes was affected by salt-stress in melon, and there were genes of cultivar special-response as well as there were genes overlap between ‘YL’ and ‘BXC’. 29 transcription factors from ‘YL’ and 20 from ‘BXC’ were cultivar-special in response to salt stress respectively. There were 27 transcription factor genes exhibited the same current in response to salt stress in both ‘YL’ and ‘BXC’, with 9 up-regulated and 18 down-regulated at the transcription level, respectively. Finally, the results of transcriptome analyses were verified by real-time quantitative PCR.

Key words: melon (*Cucumis melo*); salt stress; high-throughput sequencing; transcription factors; transcriptome analysis

土壤盐渍化是一个世界性生态环境问题, 是严重影响植物生长发育和农业生产的主要因子之一(Zhang等2011)。甜瓜是我国重要的经济栽培作物。葫芦科中, 甜瓜的耐盐性仅次于南瓜, 但较高的盐分也会对甜瓜栽培造成危害(Botía等2005), 如抑制甜瓜生长、影响代谢、降低产量及品质等

(Mendlinger和Fossen 1993; Franco等1997; Carvajal

收稿 2013-09-03 修定 2013-12-27

资助 国家自然科学基金(31372079)、上海市自然科学基金(13ZR1422400)和上海市园艺学重点学科建设项目。

* 通讯作者(E-mail: zhyd@sjtu.edu.cn; Tel: 021-34205576)。

等1998; Mavrogianopoulos等1999; del Amor等2000)。研究甜瓜耐盐机制对于了解作物耐盐性和盐渍化土壤改良具有重要意义。

甜瓜耐盐性的研究主要集中在生理特性方面,如在盐胁迫下甜瓜的离子浓度、气孔开度、光合能力、抗氧化酶活性等方面(Mendlinger和Pasternak 1992; Mavrogianopoulos等1999; del Amor等2000; Rodríguez-López等2000; Sivritepe等2005)。利用分子生物学手段来研究甜瓜盐胁迫下的转录调控鲜有报道。转录调控是植物对逆境胁迫产生应答的关键步骤(Kawaura等2008), 转录因子在植物对逆境胁迫的应答过程中有重要作用。当植物受到逆境胁迫时, 转录因子会与相应的顺式作用元件结合启动相应基因的转录表达, 调控并减轻逆境胁迫给植物带来的伤害(刘强等2000)。研究盐胁迫下植物转录因子表达的特性和规律对揭示植物耐盐机理具有重要意义。

转录组研究发现大量转录因子在盐胁迫条件下表达发生变化。利用微阵列技术分析盐胁迫条件下拟南芥转录组的变化, 发现有289个转录因子受盐胁迫诱导上调表达, 139个转录因子的表达被抑制(Jiang 和Deyholos 2006)。同样, 在苜蓿中发现171个基因被盐胁迫诱导而上调表达, 其中20%是转录因子(Gruber等2009)。

本研究利用新一代高通量测序手段——转录组测序(RNA-Seq)技术, 通过转录组分析来研究不同品种甜瓜叶片中盐胁迫响应转录因子表达特性, 以期更好地理解甜瓜对盐胁迫响应的分子机制, 增加对作物耐盐机理的认识, 并为培育耐盐品种提供参考。

材料与方法

1 甜瓜品种

本试验采用2种不同地区的甜瓜(*Cucumis melo* L.)品种‘冰雪脆’(‘BXC’, 产地济南, 光皮)和‘玉露’(‘YL’, 产地台湾, 网纹)为试验材料。

2 材料培养

本试验于上海交通大学农业与生物学院现代农业工程训练中心玻璃温室区进行。选取籽粒饱满、大小一致的种子, 浸种催芽后播种于盛有混合基质(蛭石:珍珠岩=1:1)的128孔穴盘中。萌发后

每隔2 d浇1/2“花无缺”营养液(N:P:K=20:20:20)(上海永通化工有限公司), 培养基质含水量维持在相对湿度75%左右。待幼苗长到两叶一心时, 移栽到20 L的PVC桶中(每桶种1株), 所用混合基质为草炭:蛭石:珍珠岩:有机肥=4:4:1:1, 测定基质的EC值为1.0, pH为7.03。温室条件为日温24~28 °C, 夜温18 °C; 光周期14 h·d⁻¹(光照强度大于87.5 μmol·m⁻²·s⁻¹)。

以去离子水为对照, 用300 mmol·L⁻¹浓度的NaCl溶液进行处理。为避免盐冲击效应, 采用每天递增75 mmol·L⁻¹盐浓度方式处理。达终浓度后每隔2 d浇足量终浓度盐溶液, 以冲洗基质中残留盐分, 保证基质盐浓度在最小的范围内波动。期间视需要同时浇以“花无缺”营养液。每个处理随机取样3株, 重复3次。在达到终浓度后第7天时进行叶绿素荧光指标的测定和分析, 且取甜瓜叶片经液氮处理并于-80 °C下保存备用。

3 叶绿素荧光参数测定

将各处理植株充分暗适应30 min以上, 用FMS-2型便携式荧光仪(英国Hansatech公司)在室温下测定每株叶片暗适应下的光系统II最大光化学效率(F_v/F_m)、初始荧光(F_0)和光化学量子效率(Φ_{PSII})。每个指标测定重复6次, 取平均值。利用Microsoft Excel 2007整理测定数据, 采用Sigma Plot 11.0作图, 方差分析用SAS 9.0处理。

4 叶片总RNA的提取、纯化以及cDNA文库构建

按Trizol试剂盒(Invitrogen公司, 美国)说明书提取总RNA, 并用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen公司, 荷兰)纯化。用NanoDrop-1000分光光度计测定所抽提RNA样品的 A_{260} 、 A_{280} 值, 计算样品浓度, 并用变性琼脂糖凝胶电泳定性检测所提取RNA的质量。每个处理取3个生物学重复的RNA样品混合为50 μL, 用于RNA-Seq转录组测序。

5 转录组测序

高质量RNA样品由上海翰宇生物科技有限公司进行测序文库构建, 利用Illumina HiSeq 2000高通量测序平台对文库进行转录组测序, 具体方法参见Xu等(2012)。利用base calling将测序后得到的原始图像数据转化为序列数据, 即原始序列数据(raw reads)。

6 转录组数据分析

用Tophat软件(Trapnell等2009)将去除接头和

低质量后得到的Clean reads比对甜瓜基因组序列(Jordi等2012), 随后利用Cufflinks软件(Trapnell等2010)组装比对结果, 得到Unigenes, 并且根据RPKM (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads)方法计算样本间的基因表达差异。在本研究中, 以B0 (‘冰雪脆’, 无盐处理)、Y0 (‘玉露’, 无盐处理)作为对照, 将相对应的B2 (‘冰雪脆’, 300 mmol·L⁻¹ NaCl处理)、Y2 (‘玉露’, 300 mmol·L⁻¹ NaCl处理)符合 $P < 0.05$ 且差异倍数在2倍以上的基因定义为差异表达基因。通过Blast2-GO软件对Cufflinks组装得到的所有Unigenes与NCBI的nr蛋白质序列数据库比对, 对Unigene进行

功能注释和分类(Conesa等2005)。

7 实时荧光定量PCR分析

选择差异表达的NAC、WRKY和MYB家族的各2个转录因子, 用Primer Premier 5软件设计引物(表1), 进行实时荧光定量PCR分析。将各样品3次生物学重复的RNA采用第一链cDNA合成试剂盒(Takara公司, 日本)反转录为cDNA, 以反转录产物为模板, 以Actin为内参, 采用QIAGEN公司的SYBR Green RT-PCR试剂盒, 利用FTC-3000 qPCR系统(Funglyn Biotech公司, 上海)进行荧光定量检测。各样品每个基因重复3次, 按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法进行定量计算相对表达量。

表1 实时荧光定量PCR所用的引物

Table 1 Primers for real-time quantitative PCR

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>Actin</i>	GAAGCACCCTCAACCC	TCCGACCACTGGCATAG
<i>NAC1</i>	AAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGGGA	GATTAGAGGAGATTGTAAGGAGGAGA
<i>MRKY1</i>	ATCAGATGCTTGGGGTAGTGGTT	GCTGCTTTTCGTTTTCTGGATTT
<i>MYB1</i>	AAAGAATGCTGGGCTGTTGAG	CCGATTTCCAAGAGTCGTATGC
<i>NAC2</i>	TGGCGGAAACACTCAAAA	GGAAGTATCAAACGGCGGC
<i>MRKY2</i>	AGGCTAACAAGAGATGAAGGGG	GTGGTTGATGATGAAATGGAAGA
<i>MYB2</i>	CTTGATGGGAAGTTCGTGTAGTT	CCACCGTCGTGATAATAATCTTTC

实验结果

1 盐胁迫下甜瓜叶片的叶绿素荧光参数

由图1可以看出, 300 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫‘冰雪脆’和‘玉露’后, F_0 、 F_v/F_m 和 Φ_{PSII} 值与对照组相比有不同程度的下降。和对照相比, 盐胁迫后, ‘玉

露’的 F_0 由0.7下降到0.65, 下降幅度为7.7%; ‘冰雪脆’的 F_0 由0.81下降到0.43, 下降幅度为47.3%, 品种间差异显著。‘玉露’和‘冰雪脆’的 F_v/F_m 分别在盐胁迫后下降18.01%和47.35%, Φ_{PSII} 分别下降了15.12%和48.11%。品种间比较可以看出, ‘玉露’的

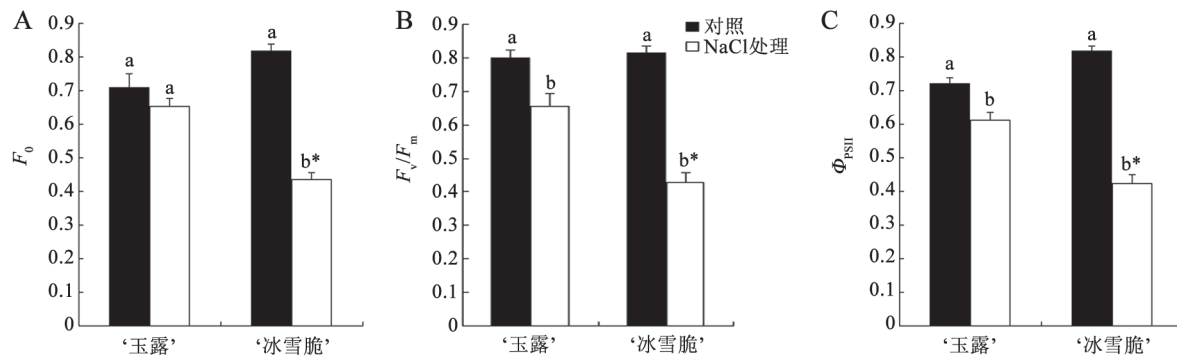


图1 盐胁迫下甜瓜叶片叶绿素荧光参数的变化

Fig.1 Changes in chlorophyll fluorescence parameters of leaves under NaCl stress

不同小写字母表示在不同处理在0.05水平上差异显著。*表示不同品种在0.05水平上差异显著。

F_0 、 F_v/F_m 和 Φ_{PSII} 值均高于‘冰雪脆’中的, 品种间差异显著。

2 不同甜瓜品种叶片响应盐胁迫转录因子的数量和变化幅度

与对照相比, ‘玉露’在盐胁迫下共有56个转录因子的转录水平发生了改变。其中, 上调表达的转录因子基因22个, 上调倍数在7.31~61.82之间, 其中最大上调基因为MELO3C020971。转录水平下调表达的有34个, 下调倍数在7.89~243.88, 其中

MELO3C01364基因下调243.88倍。‘冰雪脆’在盐胁迫下与对照相比, 共有47个转录因子转录本表达发生变化(表2)。其中, 上调表达有17个, 上调幅度在6.19~94.35倍之间; 下调表达的30个, 表达幅度变化在7.16~141.04倍之间。

3 不同甜瓜品种对盐胁迫响应的品种特异和重叠转录因子数量

不同甜瓜品种响应盐胁迫品种响应转录因子的变化表现出品种特异性(图2)。“玉露”所涉及

表2 甜瓜叶片响应盐胁迫的转录因子的数量和变化幅度

Table 2 The quantity and range ability of transcription factors genes in response to salt stress of leaves in melon

品种	上调表达基因			下调表达基因		
	基因数	表达量变化范围	平均值	基因数	表达量变化范围	平均值
‘玉露’	22	7.31~61.82	26.72	34	7.89~244.83	24.76
‘冰雪脆’	17	6.19~94.35	26.54	30	7.16~141.04	22.94

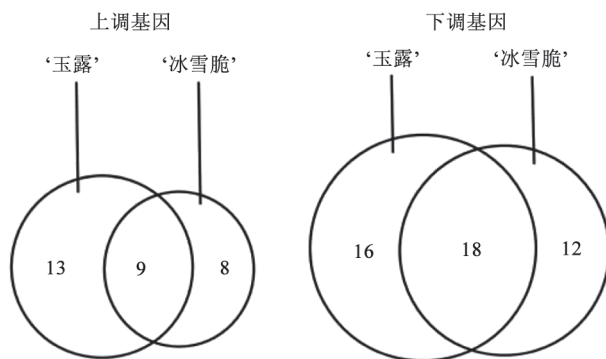


图2 不同甜瓜品种对盐胁迫响应的品种特异和重叠转录因子数量

Fig.2 The quantity of specific and overlap transcription factors of different cultivars of melon in response to salt stress

56个盐胁迫响应转录因子中有29个基因表现出品种特异性, 占总数的51.8%。其中转录水平上调表达的转录因子基因有13个, 下调的有16个。‘冰雪脆’在盐胁迫下有20个特异响应的转录因子, 占有所有应答转录因子基因的42.6%。其中盐胁迫抑制的基因有12个, 盐胁迫诱导的有8个。‘玉露’和‘冰雪脆’对盐胁迫共同响应的转录因子有27个, 其中有9个为上调表达, 18个表现为下调表达。

4 盐胁迫响应的转录因子分类及部分转录因子

结果(表3)表明, 甜瓜在盐胁迫下有25个转录

因子家族的差异表达。其中差异表达显著且包含转录因子数量较多的转录因子数较多的家族有AP2/EREBP、NAC、Homeobox、WRKY、MYB、Zinc finger、Ttcp7/9、bHLH和Gata等。

盐胁迫下叶绿素荧光含量变化幅度较小的‘玉露’其表达发生变化的56个转录因子转录本属于19个转录因子家族。表3和4可以看出, NAC家族上调表达的转录因子最多, 为6个(27.3%), 上调表达幅度最大的是MELO3C017185为61.119倍; Zinc finger家族下调表达转录因子最多, 为7个(22.6%)。有的转录因子家族既有转录水平上调的, 也有转录水平下调的, 如MYB家族、NAC家族和ERF家族。与‘冰雪脆’相比, homeobox-leucine zipper protein athb-7和heat stress transcription factor b-3是‘玉露’特有的盐胁迫应答转录因子, 并且此两类转录因子主要表现为上调表达。

‘冰雪脆’中表达发生变化的转录因子转录本属于20个转录因子家族, 其中上调表达幅度最大的是NAC家族的MELO3C017185, 表达量上调了94.136倍, 下调表达幅度最大的是MYB家族中的MELO3C006313, 下调了141.04倍。4个转录因子家族中的转录因子转录本在盐胁迫下转录水平表达上升和下降同时存在, 这些家族分别为AP2/EREBP、NAC、MYB、Zinc finger 家族。与‘玉露’

表3 甜瓜‘玉露’和‘冰雪脆’对盐胁迫响应的转录因子分类

Table 3 Categories of the transcription factors in response to salt stress in ‘YL’ and ‘BXC’

转录因子家族	‘玉露’				‘冰雪脆’			
	上调数目	上调比例/%	下调数目	下调比例/%	上调数目	上调比例	下调数目	下调比例/%
AP2/EREBP	4	18.2	5	16.1	1	5.9	4	13.3
NAC	6	27.3	2	6.5	6	35.3	1	3.3
WRKY	4	18.2	0	0	3	17.6	0	0
MYB	5	22.7	1	3.2	4	23.5	2	6.7
Zinc finger	0	0	7	22.6	3	17.6	7	23.3
bHLH	1	4.5	1	3.2	0	0	1	3.3
Ttcp7/9	0	0	4	12.9	0	0	3	10.0
Gata	0	0	2	6.5	0	0	2	6.7
homeobox-leucine zipper protein atbh-7	1	4.5	0	0	0	0	0	0
heat stress transcription factor b-3	1	4.5	1	3.2	0	0	0	0
transcription activator glk1-like	0	0	1	3.2	0	0	1	3.3
HD domain class	0	0	0	0	0	0	1	3.3
palmate-like pentafoliata 1	0	0	0	0	0	0	1	3.3
mixta-like transcription factor	0	0	0	0	0	0	1	3.3
其他	0	0	5	16.1	0	0	6	20.0

相比,‘冰雪脆’特有盐胁迫应答转录因子为HD domain class、palmate-like pentafoliata 1和mixta-like transcription factor,并且这些转录因子主要表现为下调表达。

‘冰雪脆’和‘玉露’共同上调的转录因子家族有AP2/EREBP、NAC、WRKY和MYB家族;共同下调的转录因子家族有AP2/EREBP、NAC、MYB、Zinc finger、bHLH、Ttcp7/9、Gata、transcription activator glk1-like和GRAS,这些共性的转录因子可能是甜瓜耐盐性研究重要的分子线索。

5 实时定量PCR分析验证

分别选取‘玉露’和‘冰雪脆’中NAC、WRKY和MYB家族的2个基因,利用实时荧光定量PCR对其盐处理前后表达变化进行分析。由荧光定量结果(表5和图3)可以看出,虽然在表达变化幅度上有些差异,但从6个基因的表达趋势来看,实时荧光定量分析结果与转录组分析结果基因的表达趋势基本一致,说明Illumina测序获得的转录组数据的可靠性。

讨 论

转录调控是植物对逆境胁迫产生应答的关键步骤,转录因子在植物对逆境胁迫的应答过程中发挥重要的作用。目前已经鉴定出AP2/EREBP、

MYB、WRKY、NAC以及bZIP/HD-ZIP等转录因子家族的成员参与了植物对盐胁迫的应答反应(朱冬梅等2010),特定转录因子表达水平的变化能极大地影响植物适应逆境的能力。转录因子在盐胁迫下呈现出不同的应答反应模式,表明这些转录因子在盐胁迫应答途径中扮演着不同的角色(Jiang和Deyholos 2006; Kawaura等2008; Gruber等2009)。本文研究结果表明,盐胁迫可以诱导或抑制众多转录因子表达,且不同品种甜瓜的转录因子在其转录水平表现出一定的品种特异性。盐胁迫下,两个甜瓜品种‘玉露’和‘冰雪脆’叶片的叶绿素荧光参数相差较大,说明两个品种在耐盐性方面有一定的差异。‘玉露’有51.8%的转录因子是盐胁迫特异响应,‘冰雪脆’中则有42.6%的盐胁迫逆境响应转录因子表现为特异响应。盐胁迫下2种甜瓜品种表现的不同叶绿素荧光参数也体现了2个品种盐胁迫时转录水平调控方式可能有所差异,其盐胁迫的适应机理可能也有所差异。由于转录因子数目众多,其调控方式表现出丰富的多样性,测序数据分析结果也可以看出这两个品种在盐胁迫逆境下,有的转录因子家族中既有上调表达的,也有下调表达。这种表达的差异可能是植物重新组织和调节生理生化活动,以提高或改善某些代谢途径来适应盐逆境胁迫,减少伤害。两种甜瓜

表4 甜瓜‘玉露’和‘冰雪脆’对盐胁迫响应的部分转录因子

Table 4 Some transcription factors in response to salt stress in ‘YL’ and ‘BXC’

‘玉露’			‘冰雪脆’		
基因位点	转录因子家族	表达倍数*	基因位点	转录因子家族	表达倍数*
MELO3C020971	AP2/EREBP	5.948	MELO3C023484	AP2/EREBP	5.177
MELO3C022010	AP2/EREBP	5.603	MELO3C013916	AP2/EREBP	-3.298
MELO3C026158	AP2/EREBP	5.120	MELO3C005466	AP2/EREBP	-3.945
MELO3C022985	AP2/EREBP	3.676	MELO3C012217	AP2/EREBP	-4.977
MELO3C017645	AP2/EREBP	-3.098	MELO3C017645	AP2/EREBP	-5.955
MELO3C003002	AP2/EREBP	-3.709	MELO3C003002	AP2/EREBP	-6.650
MELO3C016285	AP2/EREBP	-3.869	MELO3C011093	MADS-box	-4.701
MELO3C008014	AP2/EREBP	-4.331	MELO3C006728	MYB	6.425
MELO3C005466	AP2/EREBP	-5.448	MELO3C021284	MYB	3.895
MELO3C022281	AP2/EREBP	-5.819	MELO3C002090	MYB	4.814
MELO3C012217	AP2/EREBP	-5.855	MELO3C023633	MYB	6.135
MELO3C006728	MYB	5.889	MELO3C020225	MYB	-4.712
MELO3C021284	MYB	4.023	MELO3C006313	MYB	-7.144
MELO3C023633	MYB	5.939	MELO3C013287	NAC	3.089
MELO3C022997	MYB	5.838	MELO3C002628	NAC	4.505
MELO3C002090	MYB	3.468	MELO3C017185	NAC	4.234
MELO3C025295	MYB	-4.496	MELO3C022002	NAC	4.614
MELO3C002628	NAC	4.741	MELO3C016536	NAC	4.963
MELO3C017185	NAC	6.557	MELO3C014505	NAC	4.813
MELO3C008790	NAC	5.312	MELO3C01364	NAC	-5.490
MELO3C012114	NAC	3.681	MELO3C011295	WRKY	3.587
MELO3C022002	NAC	4.238	MELO3C014896	WRKY	4.348
MELO3C016536	NAC	6.131	MELO3C020967	WRKY	3.046
MELO3C015427	NAC	-5.243	MELO3C025049	Ttcp7/9	-4.776
MELO3C01364	NAC	-7.933	MELO3C025357	Ttcp7/9	-5.099
MELO3C007409	WRKY	3.223	MELO3C022520	Ttcp7/9	-3.096
MELO3C014896	WRKY	3.311	MELO3C02307	Gata	-3.596
MELO3C011295	WRKY	4.460	MELO3C015468	Gata	-4.874
MELO3C024135	WRKY	2.868	MELO3C003968	bHLH	-5.880

*Fold=log₂(Ratio)。

表5 荧光定量PCR涉及基因的Blastx分析及基因描述

Table 5 Blastx analysis and categorization of the genes selected for analysis by real-time PCR

基因位点	转录因子名称	表达倍数	
		‘冰雪脆’	‘玉露’
MELO3C016536	nac transcription factor 1 (NAC1)	6.131	4.963
MELO3C011295	wrky transcription factor 1 (WRKY1)	4.460	3.587
MELO3C021284	myb transcription factor 1 (MYB1)	4.023	3.895
MELO3C017185	nac transcription factor 2 (NAC2)	6.557	4.234
MELO3C014896	wrky transcription factor 2 (WRKY2)	3.311	4.348
MELO3C002090	myb transcription factor 12 (MYB2)	3.468	4.814

在盐胁迫条件下所表达的转录因子也有部分相同,表明其在盐胁迫时有某种相同的反应机制,这种机制可能与基础抗性有关。

植物AP2/EREBP转录因子家族能够对包括盐胁迫在内的多种非生物胁迫产生应答(Kizis等2008)。本研究发现甜瓜响应盐胁迫的AP2/EREBP

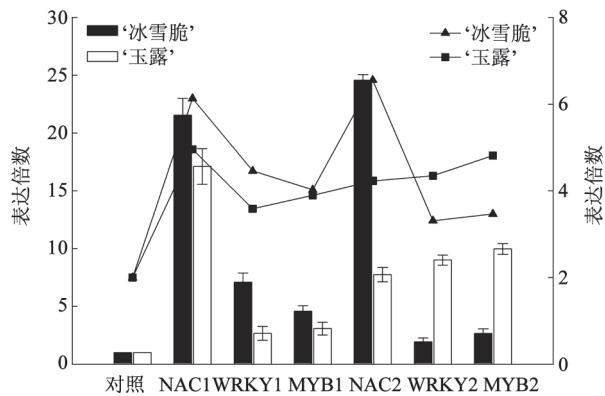


图3 部分转录因子表达变化的real-time PCR分析及转录组分析

Fig.3 Expression profiles of some transcription factors by real-time PCR and transcriptome analysis

左边为柱状图纵坐标, 代表基因在实时荧光定量分析中的表达倍数; 右边为折线图纵坐标, 代表基因在转录组分析中的表达倍数。

转录因子大部分属于ERFs转录因子家族(ethylene-responsive factors)。ERF广泛参与植物生长发育及各种逆境胁迫反应的调控(莫纪波等2011)。如对转入ERF类转录因子*OPBPI*基因的烟草分析发现,*OPBPI*的过表达能提高烟草的抗盐能力(刘文奇等2002); 番茄ERF类转录因子*JERF3*既是GCC-box结合蛋白, 又能识别DRE元件。*JERF3*在番茄中能被乙烯、茉莉酸、低温、高盐和脱落酸诱导, 同时能提高转基因烟草的耐盐性(Wang等2004)。本研究中, 部分AP2/EREBP基因参与甜瓜应对盐胁迫的分子调控过程, 2种甜瓜中表达发生变化的AP2/EREBP基因大都不同且数量也不同。在‘玉露’中有11个, 其中4个上调表达, 7个下调表达; ‘冰雪脆’中有6个, 其中仅有1个表现为上调。在盐胁迫下, 一些AP2/EREBP基因表现为上调, 而另一部分基因却表现为表达抑制, 说明不同的基因参与环境胁迫响应的调节方式不同。近几年, 植物ERFs转录因子在基因克隆和功能研究方面取得了很大进展, 但目前对ERFs转录因子整体调控机制还不很明确(莫纪波等2011)。ERFs转录因子在植物胁迫应答反应中的深入研究, 将为培育耐逆性作物新品种提供参考。

植物对逆境胁迫的应答与NAC家族转录因子有密切关系(Purani等2012; Nakashima等2012)。对普通小麦的转录组分析发现53个NAC基因中有23

个NAC基因受盐胁迫诱导上调表达(Glenn等1999)。NAC家族基因在拟南芥根部对NaCl应答最为显著, 表明它是拟南芥根部对盐胁迫应答反应中潜在的重要调节因子(Vannini等2004; Jiang和Deyholos 2006)。本研究也检测到受盐胁迫诱导的NAC类转录因子, 在‘玉露’和‘冰雪脆’中上调表达的NAC类转录因子都比下调表达的多, 表明这两种甜瓜中NAC转录因子在盐胁迫下主要通过诱导表达起调控作用。植物中对盐胁迫特异性应答以及超高水平应答的NAC转录因子过表达大多能使转基因植物提高一种或几种胁迫耐受性, 对植物耐盐基因工程具有重要参考价值(李小兰等2013)。

WRKY基因在植物体内的表达受生物和非生物环境的诱导, 其表达具有快速、瞬时等特点(Zhou等2008)。在葡萄中, 逆境相关的信号物质, 如脱落酸、高盐和低温等逆境胁迫均可诱导3个WRKYs基因的表达, 表明WRKYs参与了葡萄抵御逆境胁迫的过程(侯丽霞等2013)。本研究也检测到在盐胁迫下不同甜瓜品种中WRKY均为上调表达, 表明它是甜瓜对盐胁迫应答反应中潜在的重要调节因子, 主要通过上调表达对作物起保护机制。2种甜瓜中表达发生变化的WRKY基因类型不同且数量也不同, 表明WRKY基因在不同的甜瓜品种中对盐胁迫响应的调控机制不同。

MYB类转录因子对植物抗逆起重要的调控作用, 是植物胁迫应答反应数量最多、功能最多样化的转录因子家族之一(刘蕾等2008; Dubos等2010)。不同种类生物体在逆境胁迫条件下耐性与其体内的类黄酮化合物含量、类型和结构等有密切关系。类黄酮的生物代谢途径主要与植物色素合成相关, MYB转录因子已被证实广泛参与类黄酮代谢途径的调控(刘蕾等2008)。本研究也检测到受盐胁迫诱导的MYB类转录因子, 但不同甜瓜品种上调和下调表达的MYB类转录因子数目或表达变化程度不同。盐胁迫导致植物叶绿素含量减少, 其主要原因可能是盐胁迫提高了叶绿素酶的活性, 促进了叶绿素降解(张其德2000)。光合色素则是光能吸收、电子传递最重要的组成部分, 在一定范围内叶绿素含量的高低则通过影响叶绿素荧光参数直接影响叶片的光合能力(张永强等2002)。我们推测, MYB转录因子通过调控类黄酮

代谢途径, 参与光合色素的调控过程, 进而影响到不同品种甜瓜的叶绿素荧光含量, 但这是否是这两种甜瓜叶片叶绿素荧光参数对盐胁迫响应不同的原因值得进一步研究。

植物耐盐性是多基因控制的数量遗传性状, 种质资源间耐盐性存在较大差异并且耐盐机制各不相同, 从而使得不同品种甜瓜在盐胁迫条件下对转录因子的表达也不尽相同。选用盐胁迫下叶绿素荧光含量不同的2个甜瓜品种, 通过对其转录组分析比较在盐胁迫后的转录因子表达差异, 有利于加深对甜瓜转录因子表达特性的了解, 为进一步深入研究这些转录因子的功能提供参考。另外通过高通量测序方法获得的一批甜瓜耐盐相关的转录因子, 可为甜瓜及葫芦科植物耐盐功能研究提供基因资源。

参考文献

- 侯丽霞, 王文杰, 郭秀萍, 傅佩宁, 刘新(2013). 三个葡萄WRKYs基因的克隆及表达特性分析. 植物生理学报, 49 (3): 289~296
- 李小红, 胡玉鑫, 杨星, 于晓东, 李秋莉(2013). 非生物胁迫相关NAC转录因子的结构及功能. 植物生理学报, 49 (10): 1009~1017
- 刘蕾, 杜海, 唐晓凤, 吴燕民, 黄玉碧, 唐益雄(2008). MYB转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理. 遗传, 30 (10): 1265~1271
- 刘强, 张贵友, 陈受宣(2000). 植物转录因子的结构与调控作用. 科学通报, 45 (14): 1465~1474
- 刘文奇, 陈旭君, 徐晓晖, 凌建群, 郭泽建(2002). ERF类转录因子OPBP1基因的超表达提高烟草的耐盐能力. 植物生理与分子生物学报, 28 (6): 473~478
- 莫纪波, 李大勇, 张慧娟, 宋凤鸣(2011). ERF转录因子在植物对生物和非生物胁迫反应中的作用. 植物生理学报, 47 (12): 1145~1154
- 张其德(2000). 盐胁迫对植物及其光合作用的影响. 植物杂志, (1): 28~29
- 张永强, 毛学森, 孙宏勇, 李文杰, 于沪宁(2002). 干旱胁迫对冬小麦叶绿素荧光的影响. 中国生态农业学报, 10 (4): 13~15
- 朱冬梅, 贾媛, 崔继哲, 付畅(2010). 植物对盐胁迫应答的转录因子及其生物学特性. 生物技术通报, (4): 16~21
- Botía P, Navarro JM, Cerdá A, Martínez V (2005). Yield and fruit quality of two melon cultivars irrigated with saline water at different stages of development. Europ J Agron, 23 (3): 243~253
- Carvajal M, del Amor FM, Fernandez-Ballester G, Martínez V, Cerdá A (1998). Time course of solute accumulation and water relation in muskmelon plants exposed to salt during different growth stages. Plant Sci, 138 (1): 103~112
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics. Bioinformatics, 21 (18): 3674~3676
- del Amor FM, Ruiz-Sanchez MC, Martínez V, Cerdá A (2000). Gas exchange, water relations, and ion concentrations of salt-stressed tomato and melon plant. J Plant Nutr, 23 (9): 1315~1325
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. Trends Plant Sci, 15 (10): 573~581
- Franco JA, Fernandez JA, Banon S, González A (1997). Relationship between the effects of salinity on seedling leaf area and fruit yield of six muskmelon cultivars. HortScience, 32 (4): 642~644
- Glenn EP, Brown JJ, Blumwald E (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. Crit Rev Plant Sci, 18 (2): 227~255
- Gruber V, Blanchet S, Diet A, Zahaf O, Boualem A, Kakar K, Alunni B, Udvardi M, Frugier F, Crespi M (2009). Identification of transcription factors involved in root apex responses to salt stress in Medicago truncatula. Mol Genet Genomics, 281 (1): 55~66
- Jiang Y, Deyholos MK (2006). Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed Arabidopsis roots reveals novel classes of responsive genes. BMC Plant Biol, 6: 25 (PMC1621065)
- Jordi GM, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González V M, Hénaff E, Cámara F, Cozzuto L, Lowy E et al (2012). The genome of melon (Cucumis melo L.). Proc Natl Acad Sci USA, 109 (29): 11872~11877
- Kawaura K, Mochida K, Ogihara Y (2008). Genome-wide analysis for identification of salt-responsive genes in common wheat. Funct Integr Genomics, 8 (3): 277~286
- Kizis D, Lumberras V, Pagès M (2001). Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. FEBS Lett, 498 (2-3): 187~189
- Mavrogianopoulos GN, Spanakis J, Tsikalas P (1999). Effect of carbon dioxide enrichment and salinity on photo synthesis and yield in melon. Sci Hort, 79 (1-2): 51~63
- Mendlinger S, Fossen M (1993). Flowering, vegetative growth, yield and fruit quality in muskmelons under saline conditions. J Am Soc Hortic Sci, 118 (6): 868~872
- Mendlinger S, Pasternak D (1992). Screening for Salt Tolerance in Melons. HortScience, 27 (8): 905~907
- Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochim Biophys Acta, 1819 (2): 97~103
- Puranik S, Sahu PP, Srivastava PS, Prasad M (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. Trends Plant Sci, 17 (6): 369~381
- Rodríguez-López JN, Espín JC, del Amor F, Tudela J, Martínez V, Cerdá A, García-Cánovas F (2000). Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (Cucumis melo L.) cultivated under different salinity conditions. J Agric Food Chem, 48 (5): 1537~1541
- Sivritepe HÖ, Sivritepe N, Eriş A, Turhan E (2005). The effects of NaCl pre-treatments on salt tolerance of melons grown under long-term salinity. Sci Hort, 106 (4): 568~581
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics, 25 (9): 1105~1111

- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*, 28 (5): 511~515
- Vannini C, Locatelli F, Bracela M, Magnani E, Marsoni M, Osnato M, Mattana M, Baldoni E, Coraggio I (2004). Over expression of the rice *OsMyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J*, 37 (1): 115~127
- Wang H, Huang Z, Chen Q, Zhang Z, Zhang H, Wu Y, Huang D, Huang R (2004). Ectopic over expression of tomato JERF3 in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Mol Biol*, 55 (2): 183~192
- Xu DL, Long H, Liang JJ, Zhang J, Chen X, Li JL, Pan ZF, Deng GB, Yu MQ (2012). De novo assembly and characterization of the root transcriptome of *Aegilops variabilis* during an interaction with the cereal cyst nematode. *BMC Genomics*, 13: 133
- Zhang Y, Véry A-A, Wang L, Deng Y, Sentenac H, Huang D (2011). A K⁺ channel from salt-tolerant melon inhibited by Na⁺. *New Phytol*, 189 (3): 856~868
- Zhou QY, Tian AG, Zou HF, Xie ZM, Lei G, Huang J, Wang CM, Wang HW, Zhang JS, Chen SY (2008). Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnol J*, 6 (5): 486~503