

## 聚乙二醇模拟干旱胁迫下半夏茎段转录组分析

李 铂<sup>1,2</sup>, 彭 亮<sup>3</sup>, 王 楠<sup>1,2</sup>, 孙晓春<sup>1,2</sup>, 何懿菡<sup>1,2</sup>, 宋忠兴<sup>1,2</sup>, 张永强<sup>3</sup>, 唐志书<sup>1,2\*</sup>, 黄文静<sup>1,2\*</sup>

1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 陕西 咸阳 712083

2. 秦药特色资源研究与开发国家重点实验室(培育), 陕西 咸阳 712083

3. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

**摘要:** 目的 通过分析 30% 聚乙二醇(PEG)模拟的干旱胁迫处理下半夏茎段转录组数据, 挖掘响应干旱胁迫的相关基因, 探索干旱胁迫下半夏发生“倒苗”的分子机制。方法 以干旱胁迫下半夏发生“倒苗”时的茎段作为研究材料, 采用 Illumina HiSeq 2500 平台进行转录组双向测序, 并对数据进行生物信息学相关分析。结果 共获得 23.00 Gb clean data, 对照组与干旱胁迫处理组分别获得 37 467 952 和 39 903 362 个 clean reads, 经 Trinity 软件组装获得 100 274 个 unigenes。通过将组装所得 unigenes 分别与 Nr、eggNOG、Pfam、Swiss-Prot、KOG、GO、KEGG、COG 等数据库进行比对分析, 41 132 个 unigenes 获得功能注释。最终筛选得到差异表达基因 4 052 个, 其中 2 080 个 DEGs 表达上调, 1 972 个 DEGs 表达下调。KEGG 通路富集分析显示, 差异表达基因主要集中在核糖体、碳代谢、淀粉和蔗糖代谢、植物激素信号转导和氨基酸生物合成等过程; 基因表达水平分析显示, 半夏中编码植物激素代谢与信号转导、氧化还原相关酶、热激蛋白和液泡加工酶等基因在干旱胁迫处理后表达水平显著上升, 多数编码水通道蛋白的 DEGs 表达水平下降。结论 通过对 PEG 模拟的干旱胁迫处理下半夏转录组测序结果进行分析, 获得半夏水分代谢、激素代谢与信号转导、相关响应蛋白等候选基因, 可为揭示干旱胁迫导致半夏“倒苗”的发生机制提供基因资源和理论依据。

**关键词:** 半夏; 聚乙二醇; 干旱胁迫; 转录组分析; 差异表达基因; 水分代谢; 激素代谢; 信号转导

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5579-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.023

## Transcriptome analysis of stems of *Pinellia ternata* under drought stress simulated by PEG

LI Bo<sup>1,2</sup>, PENG Liang<sup>3</sup>, WANG Nan<sup>1,2</sup>, SUN Xiao-chun<sup>1,2</sup>, HE Yi-han<sup>1,2</sup>, SONG Zhong-xing<sup>1,2</sup>, ZHANG Yong-qiang<sup>3</sup>, TANG Zhi-shu<sup>1,2</sup>, HUANG Wen-jing<sup>1,2</sup>

1. Co-construction Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization by Shaanxi & Education Ministry, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

2. State Key Laboratory of Research & Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Xianyang 712083, China

3. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

**Abstract: Objective** In this study, the transcriptome profile of the stems from *Pinellia ternata* treated by 30% polyethylene glycol simulated drought stress was analyzed, the key enzyme genes responded to the drought stress were explored, so as to explore the molecular mechanism of *P. ternata* sprout tumble responded to the drought stress. **Methods** The stem segments of *P. ternata* under drought stress were used as research materials. The Illumina HiSeq 2500 platform was applied for transcriptome sequencing, and bioinformatics analysis was performed on the transcriptome data. **Results** A total of 23.00 Gb clean data was obtained, 37 467 952 and 39 903 362 clean reads were gained from the control groups and the drought stress treatment, respectively, and 100 274 unigenes

收稿日期: 2020-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81703652); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-21); 陕西省教育厅自然科学专项项目(18JK0223); 咸阳市重大科技专项计划项目(2017k01-26)

作者简介: 李 铂, 男, 博士, 讲师, 主要从事药用植物生理与次生代谢调控研究。Tel: (029)38035207 E-mail: boli\_sntcm@163.com

\*通信作者: 黄文静, 副教授, 研究方向为药用植物栽培与生理。Tel: (029)38035207 E-mail: alone77@qq.com

唐志书, 教授, 研究方向为中药资源开发与综合利用。Tel: (029)38182201 E-mail: tzs6565@163.com

were assembled by Trinity software. A total of 41 132 unigenes were finally obtained with functional annotations against the Nr, eggNOG, Pfam, Swiss-Prot, KOG, GO, KEGG, and COG databases. Furthermore, 4 052 differentially expressed genes (DEGs) were obtained, in details, 2 080 DEGs were up-regulated while 1 972 DEGs were with down-regulated expression. KEGG Pathway enrichment analysis showed that DEGs were mostly involved in ribosome, carbon metabolism, starch and sucrose metabolism, plant hormone signal transduction and biosynthesis of amino acids process. The expression levels of the genes encoded plant hormone metabolism and signal transduction, redox-related enzymes, heat shock proteins and vacuolar processing enzymes were significantly promoted after drought stress treatment, while most of the DEGs encoded aquaporins were down-regulated. **Conclusion** By analyzing the transcriptome profiles of *P. ternata* under drought stress simulated by PEG, the candidate genes associated with water metabolism, plant hormone and signal transduction, as well as the related responsive proteins were obtained, which could provide abundant genetic resources and theoretical basis for understanding the mechanism of *P. ternata* sprout tumble caused by drought stress.

**Key words:** *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; polyethylene glycol; drought stress; transcriptome analysis; differentially expressed genes; water metabolism; hormone metabolism; signal transduction

半夏作为我国传统大宗药材之一，其基原植物为天南星科 (Araceae) 半夏属半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.<sup>[1]</sup>。现代研究表明，块茎作为半夏的传统入药部位，富含有机酸、生物碱、甾醇类、黄酮类、挥发油等化合物，具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结等功效，临床主要用于治疗湿痰寒痰、风痰眩晕、呕吐反胃等<sup>[2]</sup>。半夏作为广布种，对生长发育所处环境中生态因子的需求范围较为宽泛，在农田、草坡，温暖、潮湿、荫蔽的疏林下均可正常生长<sup>[3]</sup>。近年来，随着气候环境变化和滥采滥伐加剧，半夏野生资源逐渐减少，人工栽培已成为获取半夏药材的主要方式。

在半夏的生长发育期，由于外界环境温度和光照强度过高，造成土壤含水量降低，往往导致半夏地上部分倒伏并逐渐枯黄，俗称“倒苗”，高温、干旱造成的土壤缺水是导致半夏发生“倒苗”的主要因素之一<sup>[4]</sup>。现代研究认为，坏死 (necrosis)<sup>[5]</sup>和细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD)<sup>[6]</sup>是生物体自我调节细胞存亡的典型形式，在植物生长发育、生物或非生物胁迫等过程中发挥重要作用。高温、高盐、低氧、金属离子等非生物环境，病原体和昆虫等生物影响因子，以及干旱胁迫导致的活性氧代谢紊乱均可导致植物 PCD 的发生<sup>[7-8]</sup>。同时，逆境胁迫下半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase)<sup>[9]</sup>和液泡加工酶 (vacuolar processing enzyme)<sup>[10]</sup>在植物体内大量表达，进一步调控 PCD 过程，最终可能导致植物发生“倒苗”现象。

近年来，转录组测序已成为研究药用植物功能基因组的重要手段，能够反映植物个体在生长发育、逆境胁迫等过程中的基因转录和调控水平，揭示不同环境中生物体内分子水平的变化和互作规律。在干旱、高温等逆境胁迫下，药用植物细

胞内源激素合成与代谢、信号转导途径、生物大分子的合成与调控等均有可能发生改变；运用高通量转录组测序，可以预测植物生理活动过程中某些未知基因的生物学功能，挖掘参与逆境胁迫相关的关键基因<sup>[11]</sup>。目前，基于高通量测序技术的药用植物响应干旱胁迫转录组分析策略研究十分普遍，已获得干旱胁迫下丹参<sup>[12]</sup>、甘草<sup>[13]</sup>、黄芪<sup>[14]</sup>等数种中药的转录组信息，为研究中药材种质资源遗传基础和逆境胁迫提供了丰富的基因信息。本研究旨在对聚乙二醇 (PEG) 模拟干旱胁迫处理的半夏茎段进行转录组高通量测序分析，筛选和挖掘半夏响应干旱胁迫的相关基因，为揭示导致半夏发生“倒苗”的相关生物学机制，促进半夏药材增产增收提供基因资源与理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用半夏块茎采自甘肃省清水县，经陕西中医药大学王继涛研究员鉴定为天南星科植物半夏 *P. ternata* (Thunb.) Breit.。取 30 cm×25 cm 塑料花盆，装入适量石英砂，每盆栽植 6 颗半夏块茎 (直径 1 cm，播种深度 8 cm)。实验在人工气候培养箱中进行，光周期：2 000 lx 光照 10 h/黑暗 14 h，(23±1) °C 恒温培养，相对湿度 (60±10) %；每日用喷壶向盆中喷洒 400 mL 1/5 Hoagland 营养液。待半夏株高 10 cm 左右，3 片小叶完全展开时，向盆中一次性浇灌 500 mL 30% PEG 6000 溶液模拟干旱处理 (T<sub>1</sub>)，共处理 5 盆，以未添加 PEG 溶液的半夏植株作为对照 (T<sub>0</sub>)。处理 4 d 后多数半夏植株地上部分倒伏，随机剪取 10 株已发生“倒苗”的半夏茎段作为试验材料，洗净，拭干水分，混匀，用锡箔纸包裹，投入液氮中速冻，转入-80 °C 冰箱保存，待用。

## 1.2 总 RNA 提取与检测

利用植物总 RNA 提取试剂盒 (型号: DP441, 天根生化科技有限公司, 北京) 提取半夏茎段总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 降解和污染情况, 采用 IMPLLEN 超微量分光光度计、Qubit 2.0 荧光计和安捷伦 2100 型生物分析系统检测 RNA 样品的纯度、浓度和完整性。

## 1.3 文库构建与测序

文库构建与测序由安诺优达基因科技 (北京) 有限公司完成。mRNA 经富集、裂解后, 利用随机引物和 M-Mulv 逆转录酶合成 cDNA 第 1 链, 随后采用 DNA 聚合酶 I 和 RNase H 合成 cDNA 第 2 链。获得的 cDNA 经末端修复、加尾、连接测序接头后, 进行 PCR 扩增。使用 NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB 公司, 美国) 生成测序文库, 并利用 AM Pure XP 系统对 PCR 产物进行纯化, 得到对照组与处理组半夏茎段 cDNA 文库。最终, 采用 Illumina Hiseq 2500 平台进行转录组双向测序。

## 1.4 转录组数据组装与功能注释

转录组测序得到的 raw reads 经去除接头序列、去除多聚核苷酸序列及低质量的 reads, 获得高质量 clean reads; 同时, 计算 Q30、GC 含量。利用 Tophat2 软件对所得 clean reads 进行 map, 利用 Trinity 软件进行序列拼接与组装。将组装得到的 unigenes 分别与 Nr (Non-redundant protein sequence database)、eggNOG (evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups)、Pfam (Protein family)、Swiss-Prot、KOG (euKaryotic Orthologous Groups)、GO (Gene Ontology)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、COG (the Clusters of Orthologous Groups databases) 等数据库进行比对, 以 BLAST 参数  $E$  值  $\leq 1 \times 10^{-5}$  和 HMMER 参数  $E$  值  $\leq 1 \times 10^{-10}$  作为筛选条件, 进行 unigenes 功能注释与代谢通路富集等分析。

## 1.5 差异表达基因分析

使用 EBSeg R 软件进行数字基因表达谱的分

析, 针对对照组和 PEG 处理组半夏茎段转录组数据进行比较分析 ( $T_0$  vs.  $T_1$ ), 以  $q$  value  $< 0.005$  和  $|\log_2(\text{fold change})| > 1$  作为筛选差异表达基因 DEGs (differentially expressed genes) 的临界值, 以 FPKM 值 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 表示 DEGs 的相对表达水平。同时, 对筛选得到的 DEGs 进行 GO 分类、KEGG 通路富集分析。

## 1.6 SSR 检测

利用 MicroSAteellite 软件对转录组测序所得 unigenes (长度  $> 1\ 000$  bp) 中的简单重复序列 SSR (simple sequences repeat) 位点进行分析, 统计不同重复序列的类型及数量。

## 2 结果与分析

### 2.1 半夏转录组测序结果与数据组装

通过对半夏茎段转录组原始数据进行处理, 共获得 23.00 Gb Clean Data, 对照组和 PEG 处理组数据平均大小为 11.50 Gb。从对照组和处理组的转录组数据中分别获得 37 467 952、39 903 362 个 reads 片段, 分别包含 11 135 259 328、11 860 558 224 个核苷酸序列。经过测序质量控制分析, Q30 碱基数分别到达 90.53%、91.00%, GC 含量分别为 57.76%、56.17%。通过对不同处理组 clean reads 进行序列比对, 分别得到 22 029 563 条和 26 507 578 条 mapped reads, mapped ratio 分别达到 58.80% 和 66.43% (表 1)。

利用 Trinity 软件对所得序列进行拼接, 共获得 177 715 个 transcript, 平均长度为 835.5 bp, N50 为 1 338 bp。通过对所得转录本进一步组装, 获得 100 274 个 unigenes, 平均长度 649.1 bp, N50 为 996。对组装得到的 unigenes 片段长度进行分析, 结果 (表 2) 表明, unigenes 长度主要分布在 200~300 bp, 共有 36 758 条, 占总体的 36.66%; 长度在 300~500 bp 的 unigenes 为 28 303 条, 占总体的 28.23%; unigenes 长度在 1 000~2 000 bp 的为 10 962 条, 占总体的 10.93%; 长度大于 2 000 bp 的 unigenes 为 5 768 条, 占总数的 5.75%。

表 1 干旱胁迫处理的半夏转录组测序数据比较

Table 1 Transcriptome sequencing data comparison of *P. ternata* under drought stress

处理	Clean Reads	核苷酸序列	Q30/%	GC 含量/%	Mapped Reads	Mapped Ratio/%
$T_0$	37 467 952	11 135 259 328	90.53	57.76	22 029 563	58.80
$T_1$	39 903 362	11 860 558 224	91.00	56.17	26 507 578	66.43

表 2 干旱胁迫处理的半夏转录组数据组装结果

Table 2 Assembly results of transcriptome data from *P. ternata* under drought stress

基因组	200~300 bp	300~500 bp	500~1 000 bp	1 000~2 000 bp	>2 000 bp	总数	平均长度	N50
Transcripts	44 997	43 267	41 207	32 650	15 594	177 715	835.5	1 338
Unigenes	36 758	28 303	18 483	10 962	5 768	100 274	649.1	996

2.2 Unigene 功能注释

将所有组装得到的 unigene 序列分别与 Nr、eggNOG、Swiss-Prot、Pfam、KOG、KEGG、GO、COG 等数据库进行比对,得到 unigene 对应的基因、蛋白功能注释和分类信息,最终获得 41 132 个有注释信息的 unigenes, 占所组装 unigenes 的 41.02%。Nr 数据库注释到的 unigenes 数量最多, 为 39 365 条, 占全部 unigenes 的 39.26%; 其中 4 379 条 unigenes 序列与棕榈科植物油棕 *Elaeis guineensis* Jacq. 的基因序列高度同源, 占总数的 11.14% (图 1)。KOG 数据库注释得到 24 466 条 unigenes, 占所有 unigenes 的 24.40%, 其中注释到一般功能预测 (general function prediction only), 转录后修饰、蛋白质折叠、分子伴侣 (posttranslational modification, protein turnover, chaperones) 和信号转导机制 (signal transduction mechanisms) 的 unigenes 数量最多, 分别为 6 821 条 (25.34%)、2 635 条 (9.79%)、2 204 条 (8.19%) (图 2)。KEGG 数据库注释到 16 381

条 unigenes, 占总数的 16.34%; 能够注释到 COG 数据库的 unigenes 最少, 数量为 11 203 条, 占总数的 11.17% (表 3)。

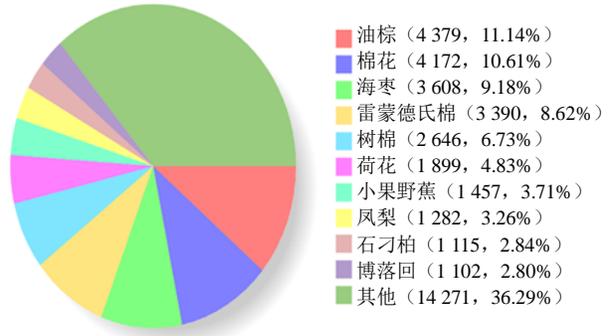


图 1 基于 Nr 数据库分析的半夏转录组 unigenes 同源物种分布图

Fig. 1 Homologous species distribution of unigenes from *P. ternata* transcriptome against non-redundant protein sequence database

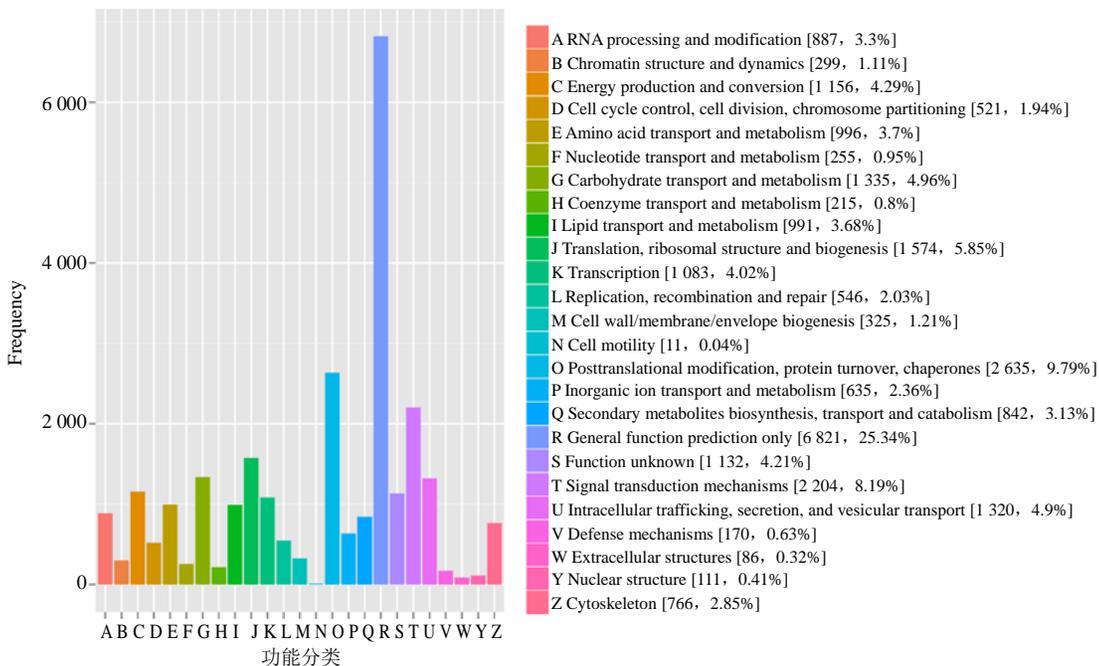


图 2 半夏转录组 unigenes 的 KOG 分类

Fig. 2 KOG classification of unigenes from *P. ternata* transcriptome

表 3 半夏转录组 unigenes 不同数据库注释结果

Table 3 Unigenes annotated results of *P. ternata* transcriptome against different databases

注释数据库	unigenes 数量	百分比/%
Nr	39 365	39.26
eggNOG	37 476	37.37
Swiss-Prot	26 485	26.41
Pfam	27 268	27.19
KOG	24 466	24.40
KEGG	16 381	16.34
GO	15 942	15.90
COG	11 203	11.17
All_Annotated	41 132	41.02

2.3 SSR 分析

利用 MISA 软件对半夏转录组 unigenes 进行 SSR 分析, 共搜索到 7 954 个 SSR 位点。其中, 以二碱基重复 SSR 数量最为丰富, 共有 2 741 个, 占总数的 34.46%; 单碱基重复 SSR 数量次之, 共

有 2 521 个, 占总数的 31.69%; 三碱基、四碱基和五碱基重复数量分别为 2 134、52、8 个; 六碱基重复 SSR 数量最少, 仅有 5 个, 占总数的 0.06% (表 4)。基于上述 SSR 数据分析结果, 有助于开展半夏种质资源的 SSR 分子标记及遗传多样性研究。

2.4 差异表达基因分析

通过将对照组与干旱胁迫处理的半夏茎段转录组数据进行比较分析, 最终获得差异表达的 unigenes。T<sub>0</sub> vs. T<sub>1</sub> 对比分析结果显示, 对照组与干旱胁迫处理组之间的差异表达基因总数达到 4 052 个, 其中表达上调的 DEGs 数量为 2 080、1 972 个 DEGs 表达水平发生下调, 20 073 个 unigenes 的表达水平未发生变化。同时, 表明干旱胁迫下半夏茎段 unigenes 当中表达上调的 DEGs 数目略高于表达下调的 DEGs 数量 (图 3)。

2.4.1 差异表达基因的 GO 分析 GO 数据库是一个结构化的标准生物学注释系统, 干旱胁迫处理的

表 4 半夏转录组 unigenes SSR 分析

Table 4 Simple sequences repeat analysis of unigenes from *P. ternata* transcriptome

重复类型	重复单元数量												合计
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	≥16	
单碱基重复	0	0	0	0	0	1 253	513	276	146	102	93	138	2 521
二碱基重复	0	547	399	500	719	483	89	4	0	0	0	0	2 741
三碱基重复	1 317	599	201	17	0	0	0	0	0	0	0	0	2 134
四碱基重复	45	5	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	52
五碱基重复	6	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
六碱基重复	0	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5
复合型重复						493							493

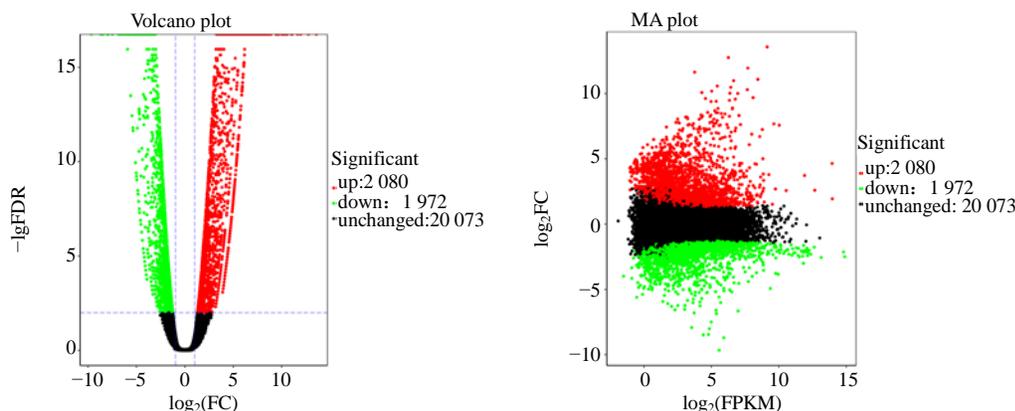


图 3 干旱胁迫处理的半夏转录组差异表达基因数

Fig. 3 Differentially expressed genes in *P. ternata* transcriptome under drought stress treatment

半夏转录组数据经 GO 分类分析, 共有 1 477 条 DEGs 注释到生物过程 (biological process), 细胞组件 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 3 大类中的 50 个分支。其中, 涉及生物过程的 DEGs 主要聚集于代谢过程 (metabolic process, 899)、细胞过程 (cellular process, 749)

和单生物体过程 (single-organism process, 617); 细胞 (cell, 632)、细胞组分 (cell part, 632) 和细胞器 (organelle, 494) 为细胞组件类别的主要组成部分; 参与分子功能的 DEGs 则主要分布在催化活性 (catalytic activity, 824) 和结合蛋白 (binding, 596) 类别 (图 4)。

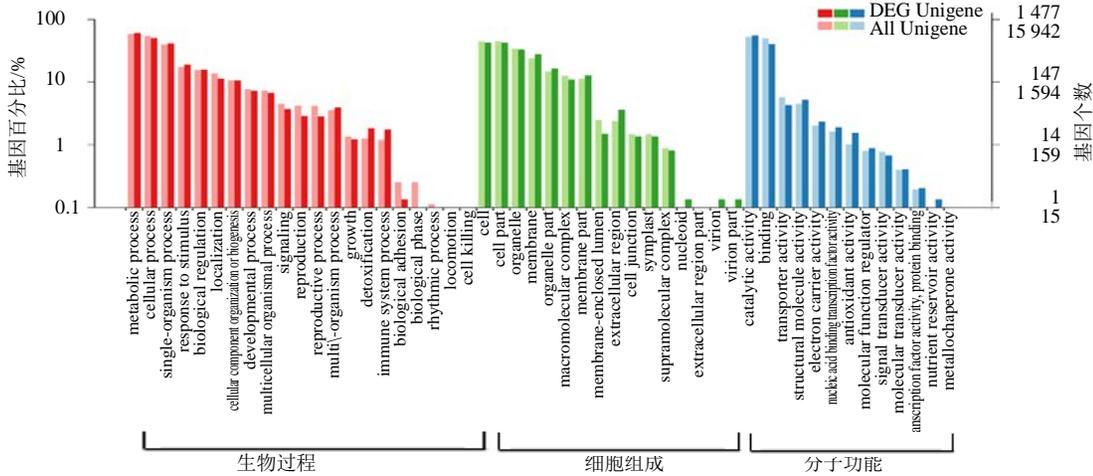


图 4 干旱胁迫处理的半夏转录组 DEGs 的 GO 分类

Fig. 4 Go classification of differentially expressed genes in *P. ternata* transcriptome under drought stress treatment

**2.4.2 差异表达基因的 KEGG 分类与通路富集分析** 根据 KEGG 数据库注释与分类结果, 干旱胁迫处理的半夏转录组数据中, 1 296 条 DEGs 被注释到细胞过程 (cellular processes, 57 条)、环境信息处理 (environmental information processing, 52 条)、遗传信息处理 (genetic information processing, 189 条)、代谢 (metabolism, 969 条) 和生物系统 (organismal systems, 29 条) 5 大类共 106 个 KEGG 标准代谢通路, 依照获得注释 DEGs 数量排名的前 50 个代谢通路信息如图 5 所示: 获得 DEGs 注释信息最多的前 5 个分类单元依次为核糖体 (ribosome, 96 条)、碳代谢 (carbon metabolism, 61 条)、淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism, 45 条)、植物激素信号转导 (plant hormone signal transduction, 40 条) 和氨基酸生物合成 (biosynthesis of amino acids, 40 条)。进一步对获得的 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析 ( $T_0$  vs.  $T_1$ ), 结果表明: 干旱胁迫处理后, 半夏茎段中表达上调 DEGs 的功能主要涉及核糖体 (ribosome),  $\alpha$ -亚麻酸代谢 (alpha-linolenic acid metabolism) 和鞘磷脂代谢 (sphingolipid metabolism) 途径; 表达下调的 DEGs 主要集中在光合作用天线蛋白 (photosynthesis-antenna proteins)、光合作用 (photosynthesis)、叶

绿素与叶绿素代谢 (porphyrin and chlorophyll metabolism) 途径 (图 6)。

**2.5 差异表达基因的功能鉴定**

**2.5.1 植物激素代谢与信号转导相关 DEGs 分析** 干旱胁迫导致的水分亏缺, 可能引起植物细胞内激素水平、信号转导及代谢网络发生适应性变化。通过差异表达基因 KEGG 通路富集分析, 结合基因表达水平 (FPKM 值) 比较分析, 干旱胁迫处理的半夏茎段转录组数据中, 3 个生长素应答蛋白相关 DEGs 表达水平上升, 多数生长素应答蛋白 (12 个)、生长素输出/内载体蛋白 (3 个) 和植物生长素响应基因 SAUR (1 个) 相关 DEGs 的表达水平下降。赤霉素 2-氧化酶 (3 个)、赤霉素受体蛋白 (1 个)、细胞分裂素核苷水解酶 (1 个)、细胞分裂素受体蛋白 (1 个) 等 DEGs 的表达水平在干旱胁迫处理后上调明显; 4 个细胞分裂素受体蛋白、1 个细胞分裂素脱氢酶和 1 个细胞分裂素羟化酶相关 DEGs 表达下调。编码茉莉酸甲酯 ZIM 结构域 (3 个) 和茉莉酸甲酯 O-甲基转移酶 (3 个) 的 DEGs 在干旱胁迫处理后分别表现为上升和下调; 同时, 1 个芸薹素内酯氧化酶相关 DEG 的表达水平下降 (表 5)。表明半夏在受到干旱胁迫处理后, 编码不同植物激素合成、应答、转运相关蛋白差异表达基因的表达谱

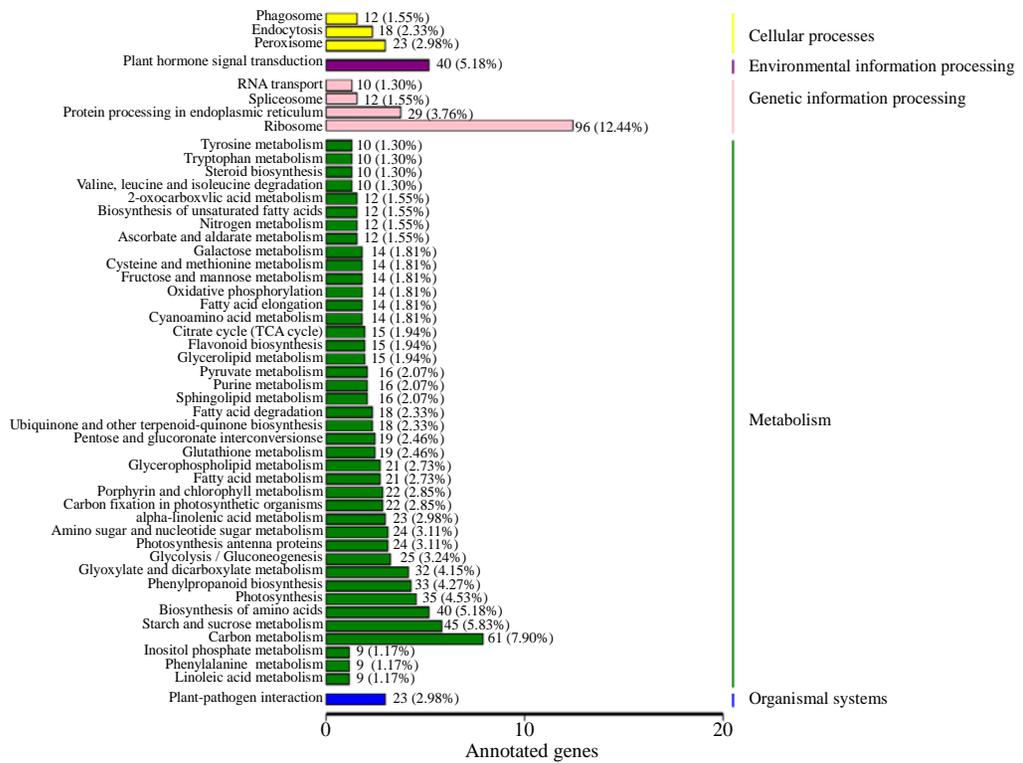


图 5 干旱胁迫处理的半夏转录组 DEGs KEGG 分类

Fig. 5 KEGG classification of differentially expressed genes in *P. ternata* transcriptome under drought stress treatment

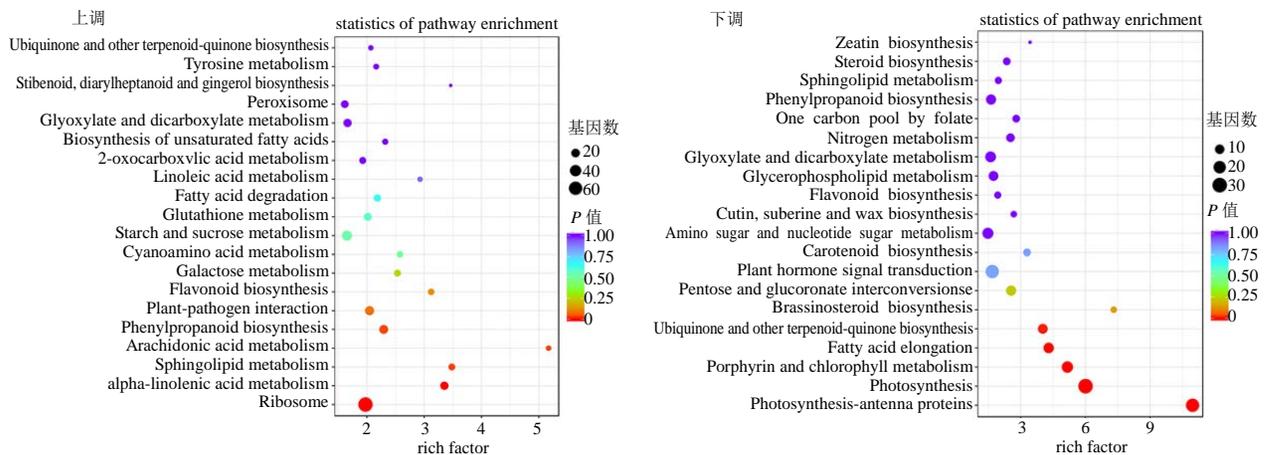


图 6 干旱胁迫处理的半夏转录组 DEGs KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment of differentially expressed genes in *P. ternata* transcriptome under drought stress treatment

呈现多样化分布，赤霉素代谢及其受体蛋白相关 DEGs 的表达水平呈现明显的上升趋势。

**2.5.2 水分代谢相关 DEGs 分析** 水通道蛋白 (aquaporins, AQPs) 是植物体内一类高效运输水分的跨膜蛋白，能增强细胞膜对水分的通透性，AQPs 的表达受到生长发育、干旱、植物激素等多种因素的影响。本研究通过分析干旱胁迫处理下半夏茎段转录组中差异表达基因，结果表明 1 条编码水通道

蛋白 NIP (NOD26-like intrinsic protein) 的 DEG 表达水平上调，其余多条 AQPs 的表达水平均呈现不同程度的下降趋势，其中包括：1 条编码水通道蛋白 NIP 的 DEG, 3 条编码质膜内在蛋白 PIP (plasma membrane intrinsic protein) 的 DEGs 和 6 条编码液泡膜内在蛋白 TIP (tonoplast intrinsic protein) 的差异表达基因 (表 6)。

**2.5.3 氧化还原相关 DEGs 分析** 干旱胁迫下，保护

表 5 植物激素代谢及信号转导相关 DEGs 分析

Table 5 Analysis of DEGs related to plant hormone metabolism and signal transduction

名称	基因编号	表达模式
生长素应答蛋白	c100672.graph_c0; c81536.graph_c0; c91667.graph_c0	上调
生长素应答蛋白	c90930.graph_c0; c88269.graph_c0; c96908.graph_c0; c97782.graph_c0; c92365.graph_c0; c101470.graph_c3; c92523.graph_c0; c90209.graph_c0; c85216.graph_c0; c100132.graph_c0; c103943.graph_c0; c94015.graph_c0	下调
生长素输出/内运载体蛋白	c91412.graph_c0; c85481.graph_c0; c93474.graph_c0;	下调
生长素介导的 SAUR	c95477.graph_c0	下调
赤霉素 2-氧化酶	c87529.graph_c0; c95434.graph_c1; c92204.graph_c0	上调
赤霉素受体蛋白	c104738.graph_c0	上调
细胞分裂素核苷水解酶	c93785.graph_c0	上调
细胞分裂素受体蛋白	c104495.graph_c0	上调
细胞分裂素受体蛋白	c87570.graph_c1; c88490.graph_c0; c87570.graph_c0; c104439.graph_c0	下调
细胞分裂素脱氢酶	c105534.graph_c0	下调
细胞分裂素羟化酶	c88887.graph_c0	下调
茉莉酸甲酯 ZIM 结构域	c97564.graph_c0; c101642.graph_c0; c102094.graph_c1	上调
茉莉酸甲酯 O-甲基转移酶	c98666.graph_c0; c90094.graph_c0; c98317.graph_c0	下调
芸薹素内酯氧化酶	c90804.graph_c0	下调

表 6 水分代谢相关 DEGs 分析

Table 6 Analysis of DEGs related to water metabolism

名称	基因编号	表达模式
水通道蛋白 NIP	c103118.graph_c0	上调
水通道蛋白 NIP	c97941.graph_c0	下调
水通道蛋白 PIP	c90936.graph_c0; c88824.graph_c0; c99484.graph_c0	下调
水通道蛋白 TIP	c30461.graph_c0; c103704.graph_c4; c61394.graph_c0 c103704.graph_c3; c92238.graph_c1; c103704.graph_c0	下调

酶系统与活性氧迸发/清除存在动态平衡的过程,以减轻活性氧对植物细胞的损伤。同时,谷胱甘肽是生物体内抗氧化系统中重要的小分子蛋白质。干旱胁迫处理的半夏转录组数据分析发现,1个超氧化物歧化酶,7个过氧化物酶,1个谷胱甘肽过氧化物酶,2个抗坏血酸过氧化物酶基因的表达水平呈现不同程度上调;同时,发现3个谷胱甘肽水解酶,1个谷胱甘肽谷氨酰半胱氨酰基转移酶和7个谷胱甘肽S-转移酶基因表达水平升高。干旱胁迫调控半夏中表达水平下降的DEGs主要包含3个超氧化物歧化酶,6个过氧化物酶和3个抗坏血酸过氧化物酶基因;同时,1个乳酰谷胱甘肽裂解酶基因的表达水平下降明显(表7)。

**2.5.4 相关响应蛋白 DEGs 分析** 热激蛋白不仅参与植物对热胁迫的响应,还广泛参与水分胁迫、

盐胁迫、冷胁迫和氧化胁迫等多种逆境胁迫过程。转录组分析结果显示,26个编码热激蛋白的DEGs的表达水平均呈现上调,表明半夏茎段在受到干旱胁迫处理后热激蛋白大量表达,从而在维持细胞稳态、提高机体抵御逆境胁迫的能力等方面发挥重要作用。液泡加工酶通过发挥类似半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的作用,进而调控植物细胞程序性死亡过程。本研究发现半夏转录组中2条编码液泡加工酶的DEGs在干旱胁迫处理后表达上调,表明其可能参与干旱胁迫导致的半夏PCD发生过程(表8)。

### 3 讨论

药用植物转录组分析提供了一种快速、高通量、全面解读基因组信息的技术手段,为药用植物功能基因的挖掘、响应逆境胁迫的分子机制研究提供了

表 7 氧化还原相关 DEGs 分析

Table 7 Analysis of DEGs related to oxidation and reduction

名称	基因编号	表达模式
超氧化物歧化酶	c96039.graph_c0	上调
超氧化物歧化酶	c102346.graph_c0; c102346.graph_c1; c101093.graph_c0	下调
过氧化物酶	c105164.graph_c0; c92925.graph_c1; c101588.graph_c0; c102256.graph_c0; c101588.graph_c3; c100299.graph_c0; c95191.graph_c0	上调
过氧化物酶	c99369.graph_c0; c89679.graph_c0; c95907.graph_c0; c86623.graph_c1; c97842.graph_c0; c94947.graph_c0	下调
谷胱甘肽过氧化物酶	c100352.graph_c0	上调
抗坏血酸过氧化物酶	c79814.graph_c0; c92397.graph_c0	上调
抗坏血酸过氧化物酶	c96116.graph_c0; c100260.graph_c0; c100260.graph_c1;	下调
谷胱甘肽水解酶	c106249.graph_c0; c100268.graph_c0; c106191.graph_c1	上调
谷胱甘肽谷氨酰半胱氨酰基转移酶	c79648.graph_c0	上调
谷胱甘肽 S-转移酶	c66729.graph_c0; c85424.graph_c0; c91000.graph_c0; c99710.graph_c1; c96210.graph_c1; c95910.graph_c0; c99142.graph_c1	上调
乳酰谷胱甘肽裂解酶	c108325.graph_c4	下调

表 8 相关响应蛋白 DEGs 分析

Table 8 Analysis of DEGs related to responsive proteins

名称	基因编号	表达模式
热激蛋白	c89888.graph_c0; c91948.graph_c0; c94805.graph_c0; c71619.graph_c0; c101650.graph_c0; c82815.graph_c0; c86310.graph_c1; c100142.graph_c1; c95308.graph_c0; c100142.graph_c0; c73649.graph_c0; c101595.graph_c2; c92563.graph_c0; c96508.graph_c0; c90834.graph_c0; c59007.graph_c0; c86135.graph_c0; c64140.graph_c0; c93791.graph_c0; c97875.graph_c0; c97573.graph_c2; c101595.graph_c1; c90505.graph_c0; c92817.graph_c1; c71756.graph_c0; c93120.graph_c0	上调
液泡加工酶	c102079.graph_c0; c97928.graph_c0	上调

新思路和新方法。干旱作为药用植物生长发育过程极易发生的逆境胁迫，不仅会造成植物减产，严重时可对植株造成不可逆伤害，最终导致植株死亡。中药半夏在生长发育关键期，由于环境高温、土壤缺水等引起的干旱胁迫，导致地上部分枯萎，严重时发生“倒苗”，最终影响药材生物量的积累。黄文静等<sup>[15]</sup>研究发现，随着干旱胁迫时间的延长，半夏茎中叶绿素含量及水势不断下降，相对电导率、可溶性糖和 MDA 含量不断升高；随着干旱持续时间增加，半夏茎段细胞表现出明显的细胞程序性死亡特征。因此，结合生理特性改变和高通量转录组分析，进一步揭示半夏发生“倒苗”的生物学机制，对于促进半夏增产增收和制定合理的耕作措施具有重要的指导作用。

本研究采用 Illumina Hiseq 2500 高通量测序技

术针对 30% PEG 模拟干旱胁迫处理的半夏茎段进行转录组测序，样本平均数据量为 11.50 Gb，经 Trinity 组装得到 100 274 个 unigenes，其中 41 132 个 unigenes 在 Nr、eggNOG、Pfam、Swiss-Prot、KOG、GO、KEGG、COG 等数据库得到功能注释，占总数的 41.02%，这为进一步挖掘干旱胁迫下半夏中编码水分代谢、激素代谢与调控网络、相关响应蛋白的 DEGs 提供了丰富的基因资源。同时，从干旱胁迫处理的半夏茎段转录组数据中得到 4 052 个差异表达基因，表达上调的 DEGs 数量略高于表达水平下调 DEGs。此外，从半夏转录组数据中共搜索到 7 954 个 SSR 位点，以二碱基重复 SSR 的数量最为丰富，单碱基重复 SSR 数量次之。这为深入开展半夏药用植物遗传多样性分析、遗传图谱构建与分子标记辅助育种等研究提供了丰富的试验依据。

研究表明, 干旱胁迫可引起体内植物激素的生物合成与信号转导过程<sup>[16]</sup>。半夏转录组中差异表达基因功能的鉴定结果表明, 干旱胁迫对编码生长素、细胞分裂素和茉莉酸甲酯生物合成/代谢及其相关受体蛋白的多个 DEGs 均具有双向调控作用, 表达水平下调的生长素应答蛋白、细胞分裂素受体蛋白相关 unigenes 的数量远高于表达上调的 DEGs。同时, 干旱胁迫处理显著促进了半夏中编码赤霉素代谢途径关键酶—赤霉素 2-氧化酶(c87529.graph\_c0, c95434.graph\_c1, c92204.graph\_c0) 及其受体蛋白(c104738.graph\_c0) 基因的表达。研究发现, 赤霉素 2-氧化酶(gibberellin 2-oxidase) 能够将有生物活性的 GA1、GA4 催化生成无活性的 GA 类物质, 以维持细胞内赤霉素的动态平衡<sup>[17-18]</sup>; 适宜浓度的赤霉素浸种能够减轻干旱和盐胁迫对黄芪种子萌发的抑制作用, 通过诱导并提高相关酶的合成与活性, 以抵御逆境胁迫对机体造成的损伤<sup>[19]</sup>。

水通道蛋白 AQPs 多以四聚体存在于生物膜上, 具有 6 个跨膜的  $\alpha$ -螺旋结构, 与膜两侧 5 个亲水环相连, 形成一个双向运输水分的孔道, 主要负责植物体内水分的跨细胞运输过程<sup>[20]</sup>。Mahdieh 等<sup>[21]</sup>发现适度干旱胁迫下烟草细胞中水通道蛋白 PIP 的表达水平下降, 通过降低细胞内水分流失, 增加机体对干旱胁迫的耐受性。本研究采用 30% PEG 模拟的干旱胁迫处理半夏植株, 差异表达基因分析结果显示, 茎段中仅有 1 个编码水通道蛋白 NIP 的 DEG 表达水平上调, 其余 10 个编码水通道蛋白 NIP、PIP 和 TIP 的 DEGs 均表现为负调控, 表明半夏通过降低 AQPs 生物合成相关基因的转录水平, 进一步调节细胞内水分的跨膜运输以抵御外界干旱胁迫。

转录组数据分析结果表明, 干旱胁迫对半夏中编码氧化还原体系相关酶合成与代谢相关的 DEGs 亦具有双向调控作用。干旱胁迫诱导的细胞内活性氧迸发与保护酶活性之间存在动态平衡, 以超氧化物歧化酶、过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、抗坏血酸过氧化物酶等为代表, 通过清除细胞内的活性氧和超氧化物, 降低其对细胞质膜和蛋白质等大分子的损伤, 以抵御逆境胁迫<sup>[22]</sup>。谷胱甘肽(glutathione) 作为一类重要的非酶促活性氧清除剂, 参与清除干旱胁迫导致的自由基和过氧化物, 并发挥对外源物质的解毒作用<sup>[23]</sup>。本研究中, 干旱胁迫下编码谷胱甘肽水解酶、谷胱甘肽谷氨酰半胱氨酰

基转移酶和谷胱甘肽 S-转移酶的 DEGs 表达水平均表现为显著上调, 通过调控谷胱甘肽的代谢参与多个生物学过程<sup>[24]</sup>。

研究表明, 热激蛋白(heat shock proteins, HSPs) 由 5 个基因家族编码, 通过维持蛋白功能与结构的稳定性, 维护生物膜的完整性, 参与活性氧清除等生物学过程, 在植物抵御逆境胁迫、维持内环境稳态等方面发挥重要作用<sup>[25]</sup>; 同时, 热激蛋白还参与逆境胁迫导致的植物细胞程序性死亡过程<sup>[26]</sup>。本研究中, 当半夏植株受到干旱胁迫处理后, 编码 HSPs 的 26 个 DEGs 的表达水平均表现为显著上调, 大量热激蛋白高表达, 以维持半夏细胞的正常生理功能。液泡加工酶(vacuolar processing enzyme, VPE) 具有与天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶 caspase 相同的 Peptidase\_C13 结构域和活性位点, 当植物体受到病原体侵染、逆境胁迫等, VPE 被活化促使液泡裂解, 进而启动 PCD 过程<sup>[27-28]</sup>。本研究发现干旱胁迫对半夏中编码 VPE 的 2 条 DEGs 具有正调控作用, 表明干旱胁迫导致的半夏“倒苗”可能伴随细胞程序性死亡的发生。

本研究利用高通量转录组测序技术, 对 30% PEG 模拟干旱胁迫处理的半夏茎段进行测序和分析, 筛选得到参与编码植物激素代谢与信号转导、水通道蛋白、氧化还原体系和逆境相关响应蛋白的多个差异表达基因, 为深入研究半夏响应干旱胁迫的分子机制提供了丰富的基因资源, 为药用植物逆境生理的调控网络研究提供一定的理论依据。

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 左 军, 牟景光, 胡晓阳. 半夏化学成分及现代药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(9): 26-29.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [4] 张 明, 钟国跃, 马开森, 等. 半夏倒苗原因的实验观察研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3): 273-274.
- [5] Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: Towards a molecular definition [J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(1): 37-43.
- [6] Reape T J, Molony E M, McCabe P F. Programmed cell death in plants: Distinguishing between different modes [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(3): 435-444.
- [7] 李云霞, 程晓霞, 代小梅, 等. 植物在逆境胁迫中的细胞程序性死亡 [J]. 生物技术通报, 2009(4): 7-11.

- [8] 潘建伟, 陈虹, 顾青, 等. 环境胁迫诱导的植物细胞程序性死亡 [J]. 遗传, 2002, 24(3): 385-388.
- [9] 陈宇亮, 张飞雄, 张贵友. 植物细胞程序性死亡中的类 caspases 蛋白酶 [J]. 植物学通报, 2008(5): 616-623.
- [10] Hatsugai N, Yamada K, Goto-Yamada S, *et al.* Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death [J]. *Front Plant Sci*, 2015, doi: 10.3389/fpls.2015.00234.
- [11] 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.
- [12] 李晓艳, 周敬雯, 严铸云, 等. 基于转录组测序揭示适度干旱胁迫对丹参基因表达的调控 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1600-1608.
- [13] 张春荣, 桑雪雨, 渠萌, 等. 基于转录组测序揭示适度干旱胁迫对甘草根基因表达的调控 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(24): 4817-4823.
- [14] Jia X, Sun C S, Zuo Y C, *et al.* Integrating transcriptomics and metabolomics to characterise the response of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) to progressive drought stress [J]. *BMC Genom*, 2016, 17: 188.
- [15] 黄文静, 孙晓春, 李铂, 等. 干旱胁迫诱导半夏倒苗的细胞程序性死亡研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(10): 2020-2025.
- [16] 赵龙, 王舰, 王芳. PEG 模拟干旱胁迫下马铃薯茎段转录组分析 [J]. 西北植物学报, 2020, 40(3): 403-412.
- [17] Zhong T X, Zhang L J, Sun S S, *et al.* Effect of localized reduction of gibberellins in different tobacco organs on drought stress tolerance and recovery [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2014, 8(5): 399-408.
- [18] 姜山, 代常波, 孙玉合. 烟草赤霉素 2-氧化酶基因 NtGA2ox1 的克隆、表达及亚细胞定位分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(1): 132-137.
- [19] 王楠, 高静, 黄文静, 等. 赤霉素浸种时长和施用浓度对重度干旱和盐胁迫下黄芪幼苗发育的影响 [J]. 生态学杂志, 2019, 38(9): 2693-2701.
- [20] Kapilan R, Vaziri M, Zwiazek J J. Regulation of aquaporins in plants under stress [J]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 1-11.
- [21] Mahdih M, Mostajeran A, Horie T, *et al.* Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(5): 801-813.
- [22] 李明, 王根轩. 干旱胁迫对甘草幼苗保护酶活性及脂质过氧化作用的影响 [J]. 生态学报, 2002, 22(4): 503-507.
- [23] 王玮玮, 唐亮, 周文龙, 等. 谷胱甘肽生物合成及代谢相关酶的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(7): 89-95.
- [24] 张雪, 陶磊, 乔晟, 等. 谷胱甘肽转移酶在植物抵抗非生物胁迫方面的角色 [J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(3): 92-98.
- [25] 栗振义, 龙瑞才, 张铁军, 等. 植物热激蛋白研究进展 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(2): 7-13.
- [26] Rowarth N M, Dauphinee A N, Denbigh G L, *et al.* Hsp70 plays a role in programmed cell death during the remodelling of leaves of the lace plant (*Aponogeton madagascariensis*) [J]. *J Exp Bot*, 2020, 71(3): 907-918.
- [27] 修林春, 张炜. 高等植物液泡加工酶 VPE 家族的生物信息学分析 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(3): 19-25.
- [28] Hatsugai N, Yamada K, Goto-Yamada S, *et al.* Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 234.