• 药材与资源 •

基于转录组测序分析干旱胁迫对党参不同组织基因表达的调控

孙晓琛[1, 2]，栗锦鹏[1, 2]，原静静[1, 2]，王惠珍[1, 2*]

1. 甘肃中医药大学药学院，甘肃 兰州 730000
2. 西北中藏药省部共建协同创新中心，甘肃 兰州 730000

摘 要：目的 对不同干旱胁迫程度下党参 *Codonopsis pilosula* 叶、茎、根进行转录组测序，探究干旱胁迫对党参差异基因和多糖合成相关酶基因的调控。**方法** 利用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序技术对正常水分（85%～90%）和轻度（65%～70%）、中度（50%～55%）、重度干旱胁迫（35%～40%）下生长旺盛期党参叶、茎、根组织进行测序并建立 cDNA 数据库，经 *de novo* 拼接后得到 Unigene，并进一步开展生物信息学分析。**结果** 共获得 Unigene 60 377 条，分别有 51 477、29 896、33 479、35 912、47 378、18 649、31 833 条被非冗余数据库（non-redundant protein sequence database，NR）、真核生物蛋白相邻类的聚簇（clusters of orthologous group for eukaryotic complete，KOG）、基因本体（gene ontology，GO）、Swiss-Prot、eggNOG、京都基因与基因组数据库（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）、Pfam 等数据库注释，筛选到 9 个差异组 DEGs 总和 89 369 条，GO 富集分析发现，党参叶、茎、根中的 DEGs 在 GO 功能注释中分布基本一致，主要集中于细胞、细胞部分、细胞过程、代谢过程、结合蛋白、催化活性等功能。KEGG 途径富集结果表明，干旱胁迫下叶中 DEGs 显著富集在不饱和脂肪酸、苯丙烷生物合成，茎中 DEGs 主要富集在苯丙烷、角质、琥珀和蜡、淀粉和蔗糖、单萜的生物合成，根中 DEGs 主要富集于黄酮、苯丙烷、二苯乙烯、二芳基庚烷和姜酚的生物合成及戊糖、葡萄糖醛酸转换。轻度干旱能引起叶中多糖合成途径关键酶基因的表达上调，是促进党参多糖成分积累的基础。**结论** 通过转录组测序，初步表明干旱胁迫影响党参不同组织差异基因的表达，并调控党参根中多糖合成的相关酶基因，以期为从分子基因培育优质党参提供参考和依据。

关键词：党参；干旱胁迫；转录组测序；差异基因表达；差异代谢通路；党参多糖生物合成

中图分类号：R286.12 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2022)14 - 4465 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.025

Sequencing and analysis of transcriptome to reveal regulation gene expression in different tissues of *Codonopsis pilosula* under drought stress

SUN Xiao-chen[1, 2], LI Jin-peng[1, 2], YUAN Jing-jing[1, 2], WANG Hui-zhen[1, 2]

1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China
2. Northwest Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine Co-constructed by Gansu Province & MOE of PRC, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective Transcriptome sequencing was performed on leaves, stems and roots of *Codonopsis pilosula* under different drought stress levels to explore the regulation of different genes and enzymes related to polysaccharide synthesis in *C. pilosula* under drought stress. **Methods** Illumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing technology was used to sequence the leaves, stalks and roots of *C. pilosula* in the control (85%—90%), light (65%—70%), moderate (50%—55%), and severe (35%—40%) drought treatments and establish cDNA database. Unigene was obtained by *de novo* splicing, and further biochemistry analysis was carried out. **Results** A total of 51 477, 29 896, 33 479, 35 912, 47 378 ,18 649 and 31 833 were annotated by non-redundant protein sequence database (NR), clusters of orthologous group for eukaryotic complete (KOG), gene ontology (GO), Swiss-Prot, eggNOG, Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) and Pfam databases respectively. A total of 89 369 DEGs were screened from nine difference groups. GO enrichment analysis showed that DEGs of leaf, stem and root weight were distributed basically the same in GO functional annotations, mainly focusing on cells, cell parts, cell

收稿日期：2021-11-03

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81760683）；国家自然科学基金资助项目（81960683）；现代农业产业技术体系建设专项资金资助（CARS-21）；甘肃省教育厅“双一流”科研重点项目（GSSYLXM-05）；研究生创新基金资助项目（2021CX48）

作者简介：孙晓琛（1994—），女，硕士研究生，研究方向为药用植物生理生态学。Tel: 15194178932 E-mail: sxc1142755959@163.com

***通信作者：**王惠珍，女，博士，教授，主要从事药用植物栽培及生理生态学研究。Tel: 18919890133 E-mail: whz1974828@163.com

processes, metabolic processes, binding proteins, catalytic activity and other functions. KEGG pathway enrichment results showed that DEGs were significantly enriched in the biosynthesis of unsaturated fatty acids and phenylpropanol under drought stress. In the stem, DEGs were mainly enriched in the biosynthesis of phenylpropanoid, cutin, suberine and wax, starch and sucrose, monoterpene. Light drought could up-regulate the expression of key enzyme genes of polysaccharide synthesis pathway in leaves, which was the basis of promoting polysaccharide accumulation in *C. pilosula*. **Conclusion** Through transcriptome sequencing, the expression of differential genes in different tissues of *C. pilosula* under drought stress was reveal, and the regulation of drought on polysaccharide synthesis of *C. pilosula* was analyzed, providing irrigation reference and genetic basis for cultivating high-quality *C. pilosula*.

Key words: *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf; drought stress; transcriptome sequencing; differentially expressed genes; differential metabolic pathway; biosynthesis of polysaccharides from *Codonopsis pilosula*

党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.是桔梗科多年生草本植物，以干燥根入药，主治脾肺气虚、食少倦怠、咳嗽虚喘、心悸气短、内热消渴等症[1]。在降低血压、提高免疫力、保护血管、改善微循环、增强造血功能等方面疗效显著[2-3]。党参多糖（conopsispolysaccharides，CPPs）是其发挥免疫活性的主要成分，主要由单糖及其衍生物组成，其生物合成主要由 UDP-半乳糖、UDP-*L*-阿拉伯糖、UDP-鼠李糖、GDP-甘露糖等单糖组成的氨基糖和核苷糖代谢途径（amino sugar and nucleotide sugar metabolism，ko00520），蔗糖、UDP-葡萄糖和果糖组成的淀粉和蔗糖代谢途径（starch and sucrose metabolism，ko00500）以及糖酵解/糖异生代谢途径（glycolysis/gluconeogenesis，ko00010）联合作用[4]。

党参在我国主要分布于西北干旱和半干旱地区，在西北地区主产于甘肃渭源、陇西等地[5]。目前党参的研究主要集中于本草考证、商品资源以及化学成分和药理作用等方面[6-8]，在植物的非生物胁迫方面研究较少，而干旱胁迫是影响党参生长发育和品质形成的重要因素，课题组前期研究发现党参可通过调节渗透物质含量和抗氧化酶活性抵御干旱[9]，在药效成分合成方面，仅有王赞文[5]研究发现，适度水分处理有助于党参地上部分与根中多糖和党参炔苷的积累，重度干旱则促进其苍术内脂III的生物合成，轻度干旱有助于丁香苷的积累，表明干旱胁迫对党参代谢物质的积累作用显著。

转录组测序技术（RNA-seq）能够量化基因的表达，挖掘生物重要功能基因，是培育物种优良性状和基因功能的重要手段。现已被用于植物逆境胁迫的相关研究中，如张大燕等[10]对乌头根、茎、叶等组织进行转录组分析，发现其萜类生物碱的合成代谢受干旱因素的调控；渠萌[11]利用测序筛选出干旱胁迫对甘草黄酮类有效成分合成相关的基因，通过生信分析，初步揭示了干旱胁迫对甘草基因表达的调控；李晓艳等[12]通过 RNA-seq 揭示了适度干旱胁迫对丹参不同组织基因表达的调控特征。但从转录组水平解析干旱对党参各部位的基因表达调控鲜见报道，因此本实验以党参为研究对象，在 4 种干旱胁迫处理下，利用 RNA-seq 技术测定生长旺盛期党参根、茎、叶中基因表达情况，通过数据库注释探寻差异基因和代谢通路，探索干旱对党参根、茎、叶组织中差异基因表达的影响以及对党参多糖合成相关基因的调控，以期为从分子水平改善党参品质、培育优质党参提供理论基础。

1 材料

本研究所用党参种苗来自甘肃省渭源县清源镇党参种植基地，经甘肃中医药大学杜弢教授鉴定为党参 *C. pilosula* (Franch.) Nannf.。

2 方法

2.1 试验设计

于 2020 年 4 月 5 日选取均匀一致的党参种苗移植到营养钵培育，待 6 月 15 日选取长势一致的党参进行控水处理，共设置 4 个水分梯度，分别为对照（CK）、轻度干旱（LD）、中度干旱（MD）、重度干旱（SD），各占田间最大持水量的 85%～90%、65%～70%、50%～55%、35%～40%。为避免受其他因素干扰，实验全程在大棚内进行，并在干旱处理后每天 18:00 左右进行称定质量，补充损失水分，控制水分保持在指定范围。至 8 月中旬党参生长旺盛期，分别取 4 个处理下党参根、茎、叶组织作为实验材料，各 3 次重复，共 36 个样本，用蒸馏水清洗干净后，吸水纸吸干表面水分，迅速放于液氮中冻存，当天带回实验室后转入−80 ℃冰箱保存备用。根据取样组织和干旱处理分别编号分别为叶对照（LC）、叶轻度干旱（LLD）、叶中度干旱（LMD）、叶重度干旱（LSD）；茎对照（SC）、茎轻度干旱（SLD）、茎中度干旱（SMD）、茎重度干旱（SSD）；根对照（RC）、根轻度干旱（RLD）、根中度干旱（RMD）、

根重度干旱（RSD）。

2.2 RNA 提取、cDNA 文库构建与测序

总 RNA 采用植物 RNA 试剂盒 mirVana™ miRNA ISOlation Kit（Ambion-1561 美国）提取，通过 Agilent 2100 Bioanalyzer（Agilent，Santa Clara，美国）检测其纯度、浓度和完整性。与上海欧易生物医学科技有限公司合作进行转录组建库与测序工作，具体步骤为提取样品总 RNA 并使用 DNase 消化 DNA 后用带有 Oligo（dT）的磁珠富集 mRNA；加入打断试剂将 mRNA 打断成短片段，以打断后的 mRNA 为模板，用六碱基随机引物合成一链 cDNA，然后配制二链合成反应体系合成二链 cDNA，纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头，然后进行片段大小选择，最后进行 PCR 扩增；构建好的文库质检合格后使用 Illumina HiSeqTM 2500 进行测序。

2.3 De novo 组装及功能注释

党参基因序列全长目前未知，在不依赖参考基因组的情况下，将有 overlap 的 reads 连接成一个更长的序列，经过不断的延伸，拼接成 transcript，根据序列相似性以及长度，挑选出最长的一条作为 Unigene；之后再利用 CD-HIT 软件聚类去冗余得到一套最终的 Unigene，以此作为后续分析的参考序列。利用 diamond 软件将 Unigene 比对到非冗余数据库（non-redundant protein sequence database，NR）、真核生物蛋白相邻类的聚簇（clusters of orthologous group for eukaryotic complete，KOG）、基因本体联合会（gene ontology，GO）、Swiss-prot、eggNOG、京都基因与基因组（Kyoto Encyclopedia of genes and genomes，KEGG）数据库以及利用 HMMER 软件比对 Pfam 数据库来进行 Unigene 的功能注释。

2.4 差异基因分析

本实验共设置 9 个差异分组，分别为叶 LLD *vs* LC、LMD *vs* LC、LSD *vs* LC；茎 SLD *vs* SC、SMD *vs* SC、SSD *vs* SC；根 RLD *vs* RC、RMD *vs* RC、RSD *vs* RC；利用 DESeq 软件对各个样本基因的 counts 数目进行标准化处理（采用 BaseMean 值来估算表达量），计算差异倍数，并采用 NB（负二项分布检验的方式）对 reads 数进行差异显著性检验，最终以 FC＞2 和 P＜0.05 为截止值，来筛选差异蛋白编码基因（DEGs）。

2.5 qRT-PCR 表达量验证

提取总 RNA，然后利用试剂盒将待测 RNA 逆转录成 cDNA。逆转录完毕后加入 90 μL Nuclease-free H_2O 储存在−20 ℃冰箱备用。设计好引物后（表 1），利用 PerfectStartTM Green qPCR SuperMix 试剂盒在 LightCycler® 480 II 型荧光定量 PCR 仪（Roche，Swiss）上进行反应。PCR 程序：94 ℃、30 s；94 ℃、5 s，60 ℃、30 s，45 个循环。循环结束后利用熔解曲线检测产物特异性：从 60 ℃缓慢升温至 97 ℃，采集荧光信号 5 次/℃。最后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算表达量。本实验采用肌动蛋白（ACT）酶作为内参基因并选 4 个 Unigene 进行表达量验证。

表 1 PCR 引物设计

Table 1 Design of PCR primer

基因名称	序列上游引物（5’→3’）	序列下游引物（5’→3’）	长度/bp	温度/℃
ACT	CCCAAAGCCAACAGAGAGAA	CGTCCACTGGCATATAGAGAAAG	107	60
GPI	ACAGGTTAGCATGGAGAGT	ACTATGCTGCCCATTTGT	112	60
SacA	TGTAACCGTGTACCGTCC	TGATTGGTTGACACCGCT	96	60
MAN	AACTCATGGTGGGTTGTT	ACCCTCGGCATAATCTTAAT	100	60
AXS	GCAAAGCCAGTTGTGAGTTA	ACCCTCCTCCACCCATTA	83	60

3 结果与分析

3.1 测序与功能注释

为全面研究干旱胁迫下党参根、茎、叶转录组特征。36 个样本经过测序共获得 250.41 Gb clean data，各样本的有效数据量分布在 6.61～7.33 G，Q30 碱基分布在 95.1%～96.2%，平均 GC 含量为 45.59%，说明测序结果准确度较高，可以用于后续分析。拼接出 Unigene 60 377 条，总长度为 106 848 387 bp，平均长度为 1 179.07 bp。Unigene 组装长度分布如图 1 所示，序列长度主要集中于 300～2000 nt，大于 2000 nt 的序列占总序列的 21.5%，其分布符合预期测序结果。

将拼接得到的 Unigene 注释到功能数据库，结果见图 2。按照注释比例发现，注释到 NR 库基因最多，有 51 477 条（56.80%），其中 NR 数据库注释到基因同源物种分布图显示注释到菜蓟的 Unigene 最多，占 10.12%。在 eggNOG、Swissprot 库分别有 47 378 条（52.28%）和 35 912 条（39.63%）基因显著匹配，其中 eggNOG 分为 26 个特定类别，包含基因最多的是翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣

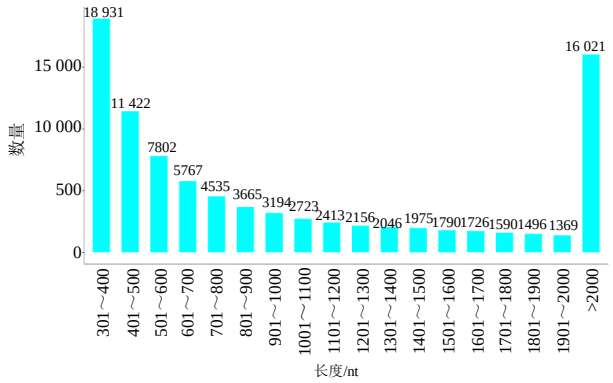
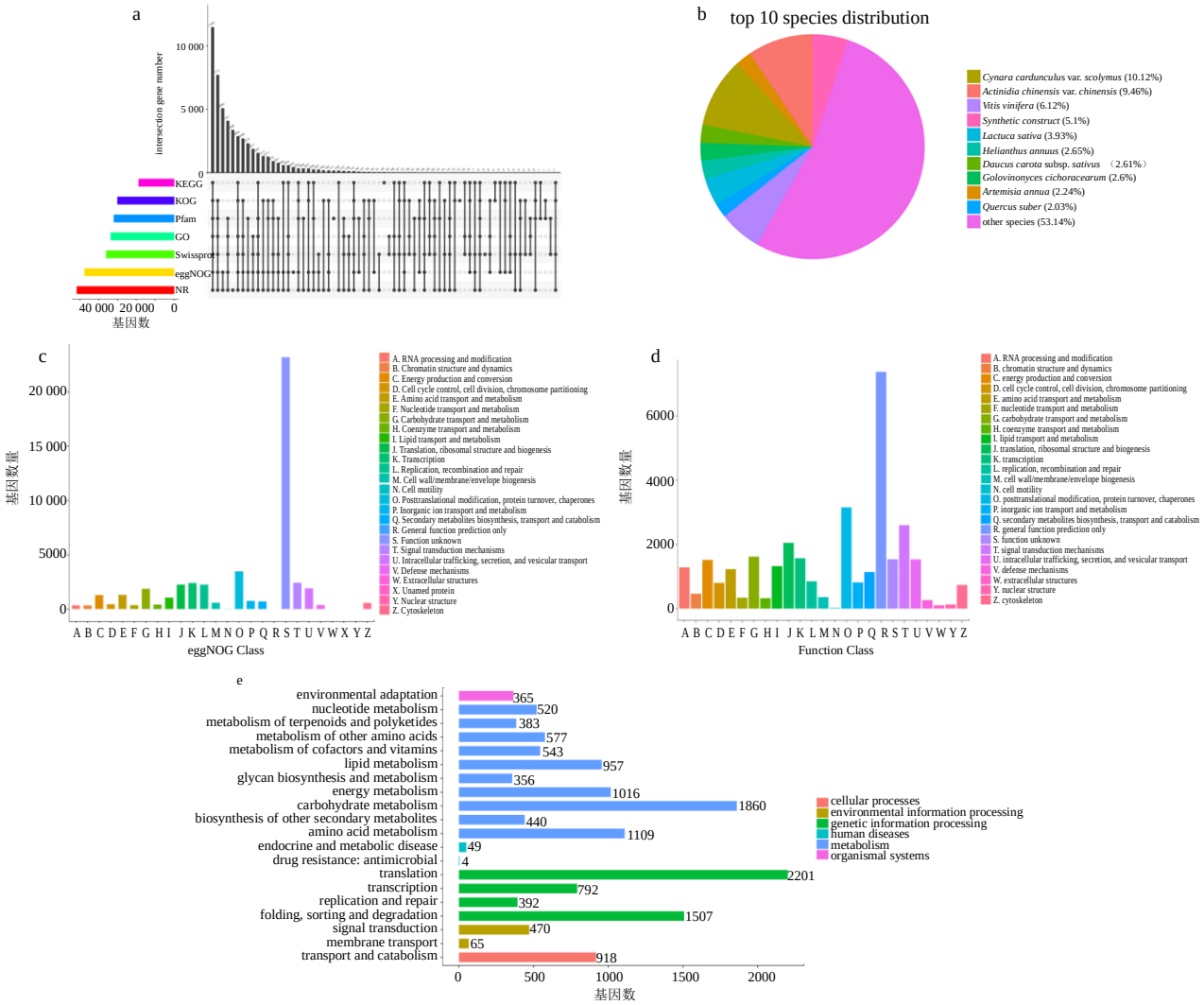


图 1　Unigenes 长度分布图

Fig. 1　Length distribution of Unigenes of *C. pilosula* transcriptome

（3468 条），其次是信号转导机制类别（2431 条）和转录（2256 条）；在 GO 库中 33 479 条（36.94%）基因被分为 3 大类：生物学途径（27 646 条）、分子功能（28 710 条）、细胞学组件（29 983 条）；31 833 条（35.13%）基因注释到 Pfam；18 649 条（32.99%）基因注释到 KOG 库；注释到 KEGG 库有 18 649 条（20.58%）基因，分配到代谢水平的基因最多（7 761 条），其中碳水化合物代谢（1860 条）、氨基酸代谢（1109 条）和代谢能量（1016 条）所占比例较高，其次是脂质代谢（957 条）、核苷酸代谢（520 条）和其他氨基酸代谢（577 条），辅助因子和维生素的代谢（543 条）、萜类聚酮类代谢（383 条）、聚糖的



a-数据库功能注释图　b-NR 数据库功能注释图　c-eggNOG 功能注释　d-KOG 功能注释图　e-KEGG 数据库功能注释图

a-database function annotated diagram　b-NR database functional annotation chart　c-eggNOG functional annotation diagram　d-KOG functional annotation diagram　e-KEGG database functional annotation chart

图 2　Unigene 的功能注释

Fig. 2　Unigene functional annotation

合成与代谢（356 条）以及其他次生代谢产物的生物合成（440 条）占一定比重。

3.2 干旱胁迫下党参差异基因表达分析

本实验叶、茎、根组织中分别有 42 388、20 151、26 812 条 DEGs 响应干旱胁迫，见表 2。叶中以上调为主有 25 816 条，上调基因中 LLD 4715 条、LMD 11 753 条、LSD 9348 条，茎和根中均以下调基因为主各 11 018 条、15 244 条。各组 DEGs 上下调情况如表 1 所示，进一步分析发现，9 组均含有特有基因（图 3），其中叶 LLD *vs* LC 组 1949 条、LMD *vs* LC 组 879 条、LSD *vs* LC 组 619 条；茎 SLD *vs* SC 组 1193 条、SMD *vs* SC 组 914 条、SSD *vs* SC 组 928 条；根 RLD *vs* RC 组 1073 条、RMD *vs* RC 组 1968 条、RSD *vs* RC 组 2057 条。9 个差异组共有 DEGs 26 条。

3.3 干旱胁迫下党参差异基因 GO 功能富集

差异基因聚类分析可寻找差异表达基因的聚类模式，比较不同样本组合之间的差异倍数。对 DEGs 进行 GO 富集分析，发现其中一部分基因具有重要的生物信息学功能，并对其进行 GO 功能分类（图 4）。

表 2 差异基因表达分析

Table 2 Differential genes expression analysis

组织	组别	上调基因/条	下调基因/条	总数/条
叶	LLD *vs* LC	11 753	7550	19 303
	LMS *vs* LC	9348	5794	15 142
	LSD *vs* LC	4715	3228	7943
茎	SLD *vs* SC	3755	3795	7550
	SMD *vs* SC	2514	3555	6069
	SSD *vs* SC	2864	3668	6532
根	RLD *vs* RC	3644	3653	7297
	RMD *vs* RC	4299	5870	10 169
	RSD *vs* RC	3643	5721	9364

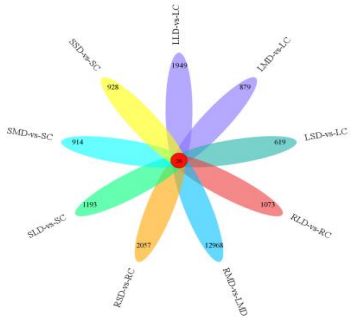


图 3 特有及共有差异基因统计

Fig. 3 Endemic and common differential gene statistics

从图中可以看出细胞学成分（cellular component）类 DEGs 均主要集中于细胞（cell）和细胞部分（cell part）以及细胞器（organelle）和细胞器部分（organelle part）；生物学过程类（biological processes）DEGs 均主要集中于细胞过程（cellular process）和代谢过程（metabolic process）；分子功能类（molecular function）DEGs 主要集中于结合蛋白（binding）和催化活性（catalytic activity）。叶和茎的轻度干旱胁迫（LLD、SLD）下 DEGs 占比最多，而根中度干旱胁迫（RMD）DEGs 占比较高。值得注意的是，节律过程（rhythmic process）相关 DEGs 在 RMD 中占比最高，表明中度干旱胁迫下，节律过程可能在调节党参根代谢过程和抵御干旱的生理过程发挥重要作用。

3.4 干旱胁迫下党参差异基因 KEGG 功能富集

对筛选得到的 DEGs 进行 KEGG 途径分类分析发现其主要归于碳水化合物代谢（carbohydrate metabolism）、能量代谢（energy metabolism）、氨基酸代谢（amino acid metabolism）、脂质代谢（lipid metabolism）、其他氨基酸代谢（metabolism of other amino acids）、辅因子和维生素代谢（metabolism of cofactors and vitamins）、核苷酸代谢（nucleotide metabolism）、其他次生代谢产物生物合成（biosynthesis of other secondary metabolites）、萜类化合物和聚酮类化合物的代谢（metabolism of terpenoids and polyketides）、聚糖的生物合成和代谢（glycan biosynthesis and metabolism）10 大类。此外，通过对全部差异 Unigene（包括上调和下调）进行 KEGG 功能富集，筛选出各差异分组中前 5 名的差异代谢通路（表 3）。表明干旱胁迫处理下，表中代谢通路中差异 Unigene 受干旱影响显著。

3.5 干旱胁迫对党参多糖合成相关酶基因的调控

党参多糖的合成主要依赖于淀粉和蔗糖代谢（ko00500）、氨基糖和核苷糖代谢（ko00520）以及糖酵解/糖异生代谢通路（ko00010）[4]（图 5）。通过 KEGG map 分析并结合前人研究发现干旱胁迫下有 20 个编码酶基因在多糖代谢中发挥重要作用（表 4），并且这些酶基因在党参不同组织和不同干旱胁迫程度下均存在差异表达（图 6）。

3.5.1 淀粉和蔗糖代谢途径 UGP2 酶是党参多糖生物合成过程中的关键酶，UGP2 可以和 SS、SPS 相互作用调控植物体内蔗糖的合成与代谢，本实验

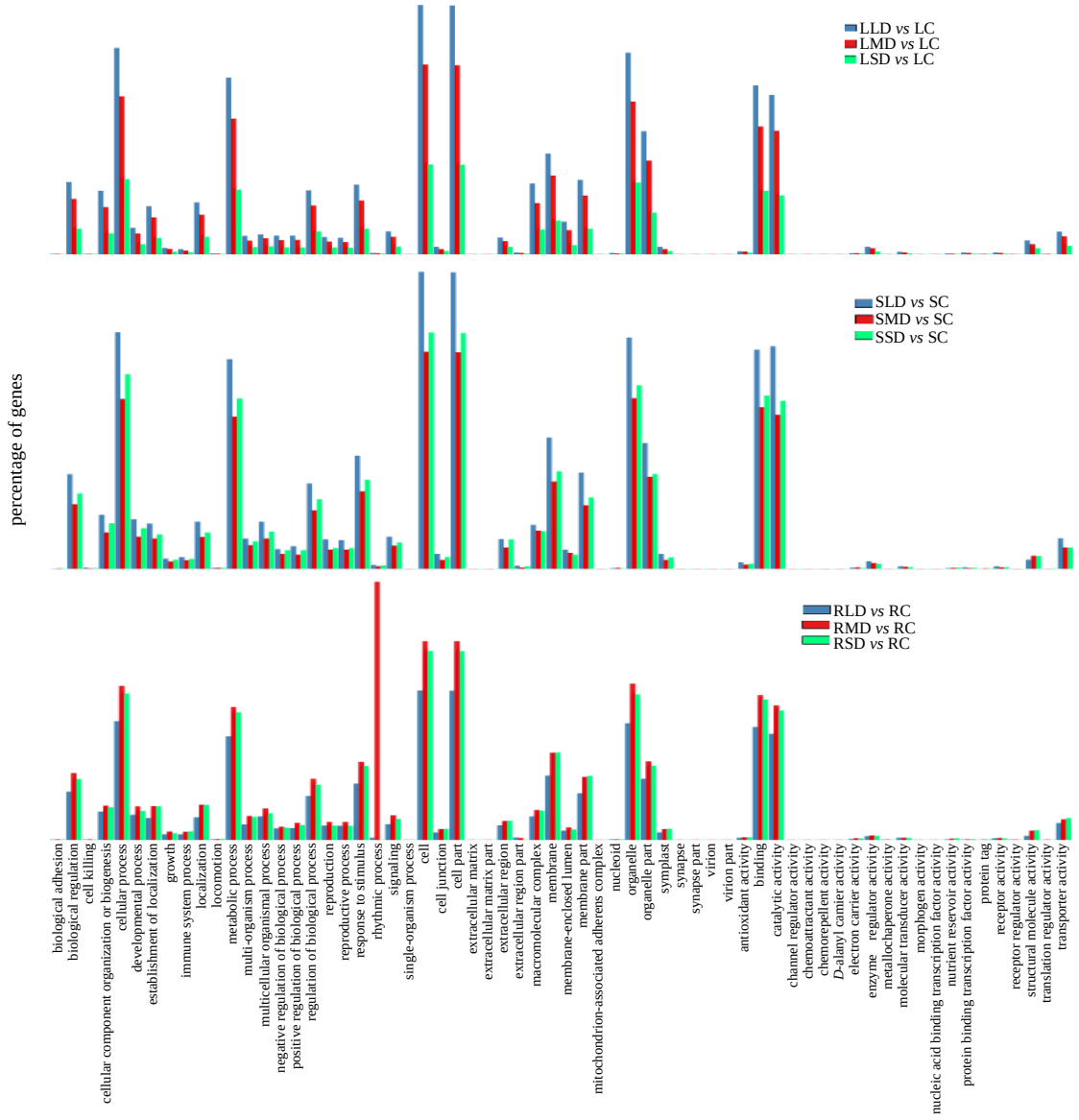


图 4　党参叶、茎、根差异基因 GO 功能分类

Fig. 4　GO functional classification of differential genes in *C. pilosula* leaves, stem and root

中编码 UGP2 的基因在叶中上调，且表达量 LLD 高于 LMD 高于 LSD，推测干旱胁迫正调控该基因的表达参与叶中蔗糖合成。编码 SS 的基因在茎和根中无差异表达，在叶 LLD 和 LMD 中上调，编码 SPS 的基因在 SSD 中上调表达。并且在该通路中蔗糖能在 sacA 的催化下生成 *D*-果糖，然后经过 HK 和 scrK 进一步催化生成 β-*D*-果糖-6 磷酸，参与后续物质的合成，转录组数据中编码 sacA 的基因在叶中上调高表达且 LMD 高于 LLD，即干旱胁迫正调控党参 sacA 表达。

3.5.2　核苷糖和氨基糖代谢途径　在核苷糖和氨基糖代谢通路中 UDP-葡萄糖分别通过 4 个支路分解为 UDP-半乳糖，UDP-葡萄糖醛酸酯、UDP-半乳糖醛酸酯、UDP-木糖、UDP-阿拉伯糖、UDP-鼠李糖以及 GDP-甘露糖，主要涉及 15 个相关酶。其中 UGDH、GAE 和 RHM 编码基因显著高表达，在醛酸酯合成支路中编码 UGDH 的基因、编码 GAE 的基因和在 UDP-鼠李糖合成支路中编码 RHM 的基因中均在 LLD 中上调高表达，推测轻度干旱胁迫能正调控 UGDH 和 RHM 编码基因从而激活酶活性催化 UDP-葡糖糖分解为 UDP-葡萄糖醛酸酯和 UDP-4-脱氢-6-脱氧-*D*-葡萄糖，并进一步调控 GAE 酶基因催化 UDP-葡萄糖醛酸酯和 UDP-半乳糖醛酸酯的转化。叶 LLD、茎 SLD 以及根 RMD、RSD 处理下

表 3 差异基因显著富集 KEGG 途径

Table 3 Significantly enriched KEGG pathway of DEGs

组织	干旱程度	KEGG 途径	通路 ID	*P* 值
叶	轻度干旱	蛋白酶体	ko03050	4.19×10^{-5}
		吞噬体	ko04145	1.71×10^{-4}
		氧化磷酸化	ko00190	6.74×10^{-4}
		不饱和脂肪酸生物合成	ko01040	1.18×10^{-3}
		氨酰 tRNA 生物合成	ko00970	1.38×10^{-3}
	中度干旱	光合作用-天线蛋白	ko00196	6.41×10^{-8}
		不饱和脂肪酸代谢	ko01040	1.41×10^{-5}
		苯丙烷生物合成	ko00940	3.84×10^{-5}
		甘油磷脂代谢	ko00564	8.83×10^{-4}
		甘油酯代谢	ko00561	1.48×10^{-3}
	重度干旱	氧化磷酸化	ko00190	4.90×10^{-8}
		苯丙烷生物合成	ko00940	2.02×10^{-5}
		内质网中蛋白质的加工	ko04141	9.45×10^{-5}
		核糖体	ko03010	1.31×10^{-4}
		吞噬体	ko04145	1.33×10^{-4}
茎	轻度干旱	苯丙烷生物合成	ko00940	1.67×10^{-22}
		淀粉和蔗糖代谢	ko00500	4.42×10^{-8}
		氰基氨基酸代谢	ko00460	4.89×10^{-6}
		单萜生物合成	ko00902	1.37×10^{-6}
		α-亚油酸代谢	ko00592	2.88×10^{-5}
	中度干旱	苯丙烷生物合成	ko00940	2.23×10^{-8}
		植物-病原菌互作	ko04626	1.63×10^{-7}
		角质、琥珀和蜡的生物合成	ko00073	1.27×10^{-4}
		淀粉和蔗糖代谢	ko00500	1.43×10^{-4}
		氰基氨基酸代谢	ko00460	1.95×10^{-4}
	重度干旱	苯丙烷生物合成	ko00940	2.23×10^{-8}
		角质、琥珀和蜡的生物合成	ko00073	1.27×10^{-4}
		类单萜生物合成	ko00902	2.09×10^{-5}
		淀粉和蔗糖代谢	ko00500	2.91×10^{-4}
		亚油酸代谢	ko00591	2.69×10^{-3}
根	轻度干旱	黄酮生物合成	ko00941	7.62×10^{-9}
		苯丙烷生物合成	ko00940	2.15×10^{-8}
		二苯乙烯、二芳基庚烷和姜酚的生物合成	ko00945	6.37×10^{-6}
		光合作用-天线蛋白	ko00196	1.67×10^{-5}
		植物激素信号转导	ko04075	6.78×10^{-5}
	中度干旱	葡糖异硫氰酸盐生物合成	ko00966	0.00
		苯丙烷生物合成	ko00940	2.70×10^{-6}
		植物激素信号转导	ko04075	1.03×10^{-5}
		α-亚油酸代谢	ko00592	3.24×10^{-5}
		黄酮生物合成	ko00941	6.91×10^{-5}
	重度干旱	葡糖异硫氰酸盐生物合成	ko00966	0.00
		苯丙烷生物合成	ko00940	1.55×10^{-7}
		光合作用-天线蛋白	ko00196	8.26×10^{-6}
		黄酮生物合成	ko00941	2.23×10^{-4}
		甘油酯代谢	ko00561	3.88×10^{-4}

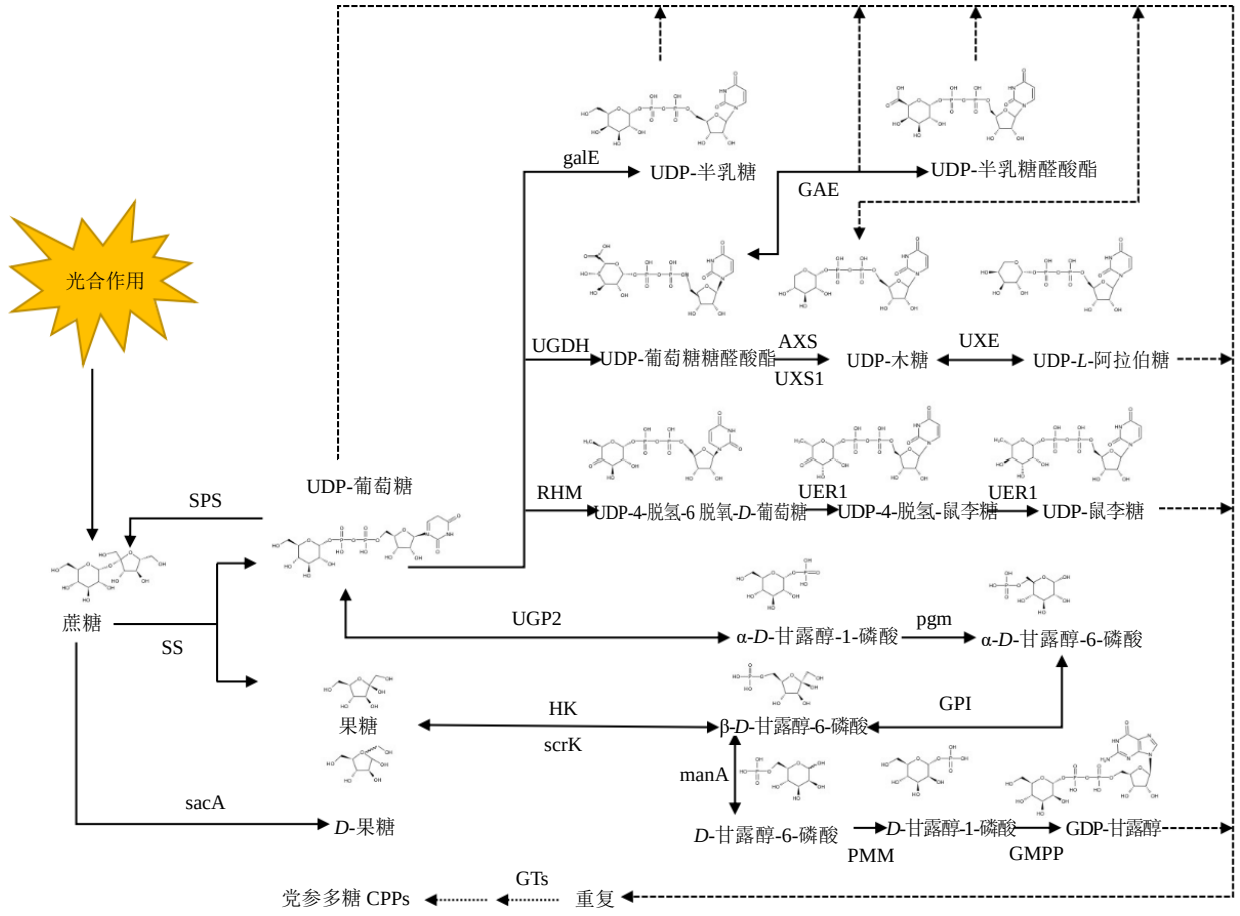


图 5　党参多糖生物合成途径

Fig. 5　Biosynthetic pathway of CPPs

表 4　党参多糖生物合成相关酶

Table 4　Related enzymes biosynthetic of CPPs

KEGG 基因名称	酶名称	基因 ID
sacA	β-呋喃果糖苷酶	TRINITY_DN21667_c0_g1_i1_2
UGP2	尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶	TRINITY_DN34312_c0_g1_i1_1
SPS	蔗糖磷酸合酶	TRINITY_DN24615_c0_g1_i4_2
SS	蔗糖合酶	TRINITY_DN22043_c0_g1_i10_3
galE	尿苷-葡萄糖 4-差向异构酶	TRINITY_DN23680_c5_g2_i5_4
GAE	尿苷-葡萄糖醛酸 4-差向异构酶	TRINITY_DN19588_c0_g1_i1_3
UGDH	尿苷-葡萄糖 6-脱氢酶	TRINITY_DN24858_c2_g1_i2_5
AXS	尿苷-芹菜糖/木糖合酶	TRINITY_DN25053_c0_g1_i3_1
UXE	尿苷-阿拉伯糖 4-差向异构酶	TRINITY_DN26066_c1_g2_i6_1
RHM	尿苷-葡萄糖-4,6 磷酸脱水酶	TRINITY_DN22301_c0_g1_i4_5
pgm	葡萄糖磷酸变位酶	TRINITY_DN6424_c0_g1_i1_1
GPI	葡萄糖-6-磷酸异构酶	TRINITY_DN23907_c0_g1_i3_2
manA	甘露糖-6-磷酸异构酶	TRINITY_DN28223_c0_g1_i8_4
PMM	磷酸甘露糖变位酶	TRINITY_DN44308_c0_g1_i1_6
GMPP	甘露糖-1-磷酸-鸟苷转移酶	TRINITY_DN30213_c0_g3_i1_1
GAPDH	磷酸甘油醛脱氢酶	TRINITY_DN3646_c0_g1_i1_6
UXS1	尿苷二磷酸葡糖醛酸脱羧酶	TRINITY_DN22361_c0_g1_i9_2
UER1	3,5-差向异构酶/4-还原酶	TRINITY_DN24529_c0_g4_i1_4
HK	己糖激酶	TRINITY_DN18697_c0_g1_i1_5
scrK	果糖激酶	TRINITY_DN30863_c1_g2_i3_1

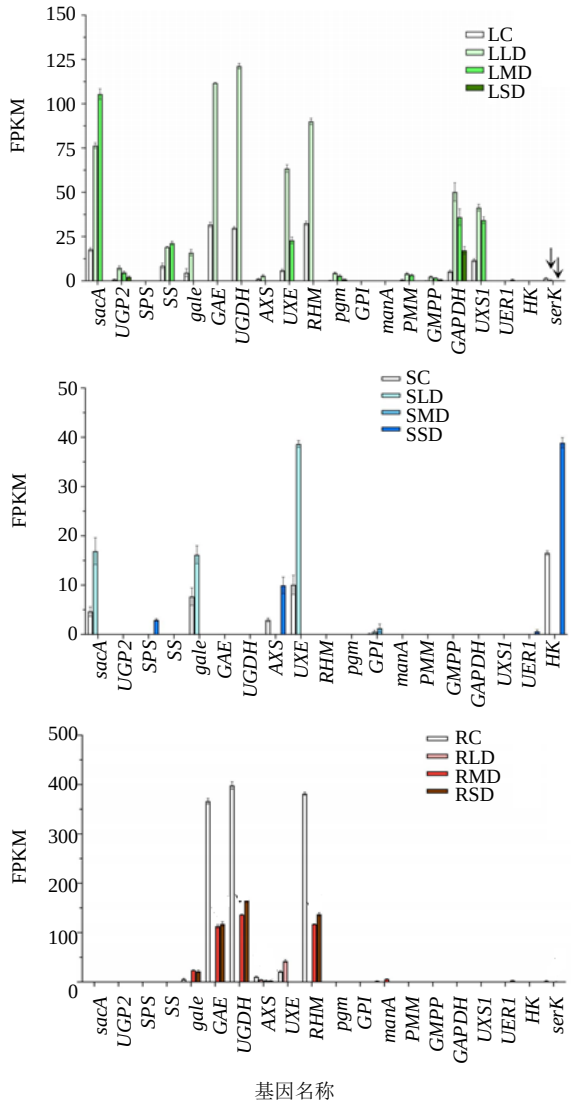


图 6 不同干旱胁迫程度下党参叶、茎、根中多糖合成相关基因表达量

Fig 6. Expression levels of genes related to CPPs biosynthetic in leaves, stems and roots under different drought stress levels

galE 均呈现上调趋势，有利于 UDP-半乳糖的合成。此外，AXS 基因在 LLD 和 SSD 中上调表达，UXS1 基因在 LLD 和 LMD 中上调表达，UXE 基因在 LLD、LMD、SLD、RLD 中均上调高表达，推测轻度胁迫下 AXS 和 UXS1 协同促进叶中 UDP-木糖的合成，重度胁迫下 AXS 发挥主要作用，然后进一步在 UXE 的催化下正调控根、茎、叶中 UDP-*L*-阿拉伯糖的合成。

GDP-甘露糖支路中的酶基因多表现为上调，且具有明显的组织差异性，编码 PMM 的基因、编码 GMPP 的基因和编码 pgm 基因在叶中特异性表达，且 LLD 高于 LMD 高于 LSD；编码 GPI 基因表达量较低且仅在茎中存在差异表达；编码 manA 的基因基因仅在 RMD 中上调。推测干旱胁迫对多糖合成前体物质甘露糖合成具有一定程度的促进作用。

3.5.3 糖酵解/糖异生途径 GAPDH 主要存在细胞质中以同型四聚体形式在糖酵解途径中发挥作用，本试验中其编码基因在叶中特异性上调表达，且表达量 LLD 高于 LMD 高于 LSD，推测干旱胁迫正调控该基因在叶中的表达，且轻度干旱对其表达量影响最大。

3.6 qRT-PCR 表达量验证

为保证试验结果的可靠性，从党参转录组数据中选取 4 个党参糖类成分合成相关的酶基因（*GPI*、*SacA*、*MAN*、*AXS*），进行 qRT-PCR 表达量验证（图 7，LLD、LMD、LSD、SLD、SMD、SSD、RLD、RMD、RSD 为 PCR 验证组 lld、lmd、lsd、sld、smd、ssd、rld、rmd、rsd 为测序组），图中可以看出，转录组测序基因 FC 变化趋势与 PCR 验证结果基本一致。

4 讨论

干旱是影响植物生长发育的主要限制因子之一，植物在响应干旱胁迫过程中涉及一些功能基因和调节基因的差异表达，形成了系列复杂的信号调控网络。现代研究通过转录组测序技术能够量化基因的表达，挖掘出生物重要功能基因，是培育物种优良性状和基因功能的重要手段[13]。

本研究通过 RNA-seq 技术对轻度、中度、重度干旱胁迫下的党参叶、茎、根组织进行转录组测序和差异基因表达分析，对筛选得到的 DEGs 进行 GO 功能富集发现干旱胁迫下党参 DEGs 在细胞、细胞部分、细胞过程、代谢过程、结合蛋白、催化活性等功能显著富集，和适度干旱下丹参的 GO 功能富集结果相似[12]。

植物通过光合作用合成蔗糖，蔗糖含量与 SS 和 SPS 密切相关，SS 能进一步将蔗糖分解，催化 UDP＋蔗糖⇌UDP-Glc＋果糖之间葡萄糖基的可逆转移，还能影响植物非生物逆境响应[13-14]，可通过调节酶活性改善糖含量[15]。SPS 是植物蔗糖生物合成途径中的关键速率限制酶，Huang 等[16]研究发现该基因的表达能促进木薯植物根中淀粉的积累。UGP2 是一种葡萄糖基供体，在高等植物中以活化糖形式存在[17]，在叶片中能通过已经催化生成的尿苷二磷酸葡萄糖（UDPG）提供给 SPS 或 SS 合成蔗糖，在库组织中能催化 UDP-葡萄糖生成淀粉和

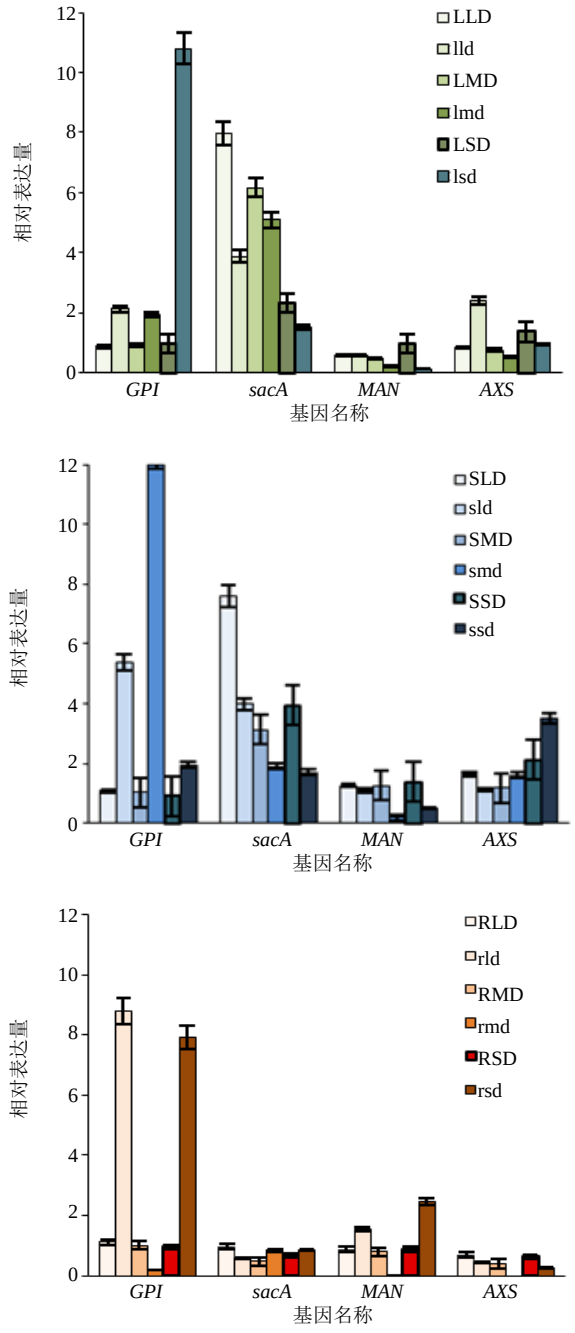


图 7　干旱胁迫下 4 个 Unigene 在党参叶、茎、根中的相对表达量

Fig. 7　Relative expression of four genes in leaves, stems and roots of *C. pilosula* under drought stress

蔗糖代谢通路中的中心成分 α-*D*-葡萄糖-1-磷酸[18]。Ciereszko 等[19]研究发现拟南芥离体叶片中添加蔗糖或低温处理下编码 UGP2 的基因上调表达，本实验与其结果相似。UDP-葡萄糖和果糖再经过一系列的催化分解成 UDP-半乳糖、UDP-木糖、UDP-*L*-阿拉伯糖、UDP-鼠李糖、GDP-甘露糖等，这些糖在各种糖基转移酶的催化下循环往复进一步合成 CPPs[4]。此外，糖酵解/糖异生途径在 CPPs 的单糖合成过程中发挥重要作用，其中 GAPDH 为糖代谢过程中关键酶基因并常用作内参基因，前人研究表明，干旱胁迫下 GAPDH 的表达与党参多糖的积累有一定的相关性[20]，该酶基因的功能与党参抗旱性具有一定的联系。

本实验轻度干旱处理下叶中编码 UGDH、GAE、RHM 的基因显著高表达，其次 *AXS*、*UXE*、*UXS1* 基因也均上调表达，推测轻度干旱促进叶中 UDP-葡萄糖的代谢和党参多糖合成前体物质 UDP-葡萄糖醛酸酯合成以及 UDP-半乳糖醛酸酯的合成与转化，并且 UXS1 与 AXS 协同催化 UDP-木糖的合成，UXE 进一步催化 UDP-*L*-阿拉伯糖的合成与转化，RHM 则催化 UDP-鼠李糖合支路 UDP-4-脱氢-6-脱氧-*D*-葡萄糖合成，表明轻度干旱对叶组织中上述多糖合成酶基因影响显著。整体数据表明轻度干旱胁迫正向调控叶中 CPPs 合成酶基因，也影响茎中部分 CPPs 合成酶基因，但是干旱胁迫对根中 CPPs 合成酶基因影响多表现为负调控，由于党参多糖的合成是涉及整个植株的复杂过程，推测本实验中干旱条件不利于根中多糖前体物质的合成，单糖的合成主要发生在叶中，干旱胁迫下糖类物质通过光合作用分解为多种单糖，后经茎部向根组织传输并在多中糖基转移酶的作用下转化为多糖在根中积累。

目前对党参的干旱胁迫分子响应机制研究较少，可供参考的遗传信息较少，在一定程度上限制了党参功能基因的挖掘。本研究获得了党参叶、茎、根的转录组信息，比较每种组织的轻度、中度、重度干旱胁迫下的 DEGs 的表达情况和功能，尤其是调控党参多糖合成相关酶基因的表达差异性，为进一步揭示党参多糖合成机制和培养优质党参提供基因依据。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 293-294.

[2] Fu Y P, Feng B, Zhu Z K, *et al*. The polysaccharides from *Codonopsis pilosula* modulates the immunity and intestinal microbiota of cyclophosphamide-treated immunosuppressed mice [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1801.

[3] Yang X B, Zhao Y, Ruan Y, *et al*. Development and

application of a capillary electrophoretic method for the composition analysis of a typical heteropolysaccharide from *Codonopsis pilosula* NANNF [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(10): 1860-1865.

[4] Gao J P, Wang D, Cao L Y, *et al*. Transcriptome sequencing of *Codonopsis pilosula* and identification of candidate genes involved in polysaccharide biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117342.

[5] 王赞文. 土壤水分对党参生长发育和成分积累的影响 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2018.

[6] 樊长征, 洪巧瑜. 党参对人体各系统作用的现代药理研究进展 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(10): 39-43.

[7] 谢琦, 程雪梅, 胡芳弟, 等. 党参化学成分、药理作用及质量控制研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(8): 94-104.

[8] 冀宪武, 樊晓璐, 李武佳, 等. 2007—2019 年中国党参研究文献计量分析 [J]. 图书情报导刊, 2020, 5(6): 60-65.

[9] 王惠珍, 陆国弟, 陈红刚, 等. 干旱胁迫对成药期党参生理特性的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(3): 72-76.

[10] 张大燕, 文欢, 王伟, 等. 乌头非生物胁迫下萜类化合物次级代谢的转录组学研究 [J]. 中药材, 2017, 40(10): 2301-2306.

[11] 渠萌. 适度干旱胁迫对甘草黄酮类化合物积累及相关基因表达的调控 [D]. 广州: 广东药学院, 2015.

[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] 何艺涛, 王广亚, 范春芬, 等. 植物蔗糖合酶研究进展 [J]. 植物生理学报, 2020, 56(6): 1165-1176.

[14] Schmölzer K, Gutmann A, Diricks M, *et al*. Sucrose synthase: A unique glycosyltransferase for biocatalytic glycosylation process development [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(2): 88-111.

[15] 王秀贞, 吴琪, 王志伟, 等. 花生子仁糖含量与相关酶活性关系的研究 [J]. 山东农业科学, 2020, 52(9): 19-22.

[16] Huang T W, Luo X L, Wei M G, *et al*. Molecular cloning and expression analysis of sucrose phosphate synthase genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 20707.

[17] 吕楠, 安红强, 裴薇, 等. 铁皮石斛尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因的克隆与分析 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(7): 1215-1219.

[18] 李晶, 郭琼琼, 孙海峰, 等. 党参 CpUGPase 基因的克隆、序列分析与原核表达 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3876-3883.

[19] Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski L A. Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis* [J]. *Biochem J*, 2001, 354(Pt 1): 67-72.

[20] 王晓林, 吉姣姣, 高建平. 党参 CpGAPDH 基因的克隆及表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(4): 712-720.

[责任编辑 时圣明]