

夏丽丹, 张虹, 胡华英, 等. RNA-Seq定量分析盐肤木对铅胁迫的响应[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(7): 1459–1467.

XIA Li-dan, ZHANG Hong, HU Hua-ying, et al. Molecular responses of *Rhus chinensis* to lead stress revealed by RNA-Seq[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(7): 1459–1467.

## RNA-Seq定量分析盐肤木对铅胁迫的响应

夏丽丹<sup>1,2,3</sup>, 张虹<sup>1,2,3</sup>, 胡华英<sup>1,2,3</sup>, 曹升<sup>1,2,3</sup>, 周垂帆<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 福建农林大学林学院, 福州 350002; 2. 海峡两岸水土保持协同创新中心, 福州 350002; 3. 福建长汀红壤丘陵生态系统国家定位观测研究站, 福州 350002)

**摘要:**为探究重金属污染地生态修复先锋植物——盐肤木对重金属胁迫的分子响应机制, 设置3个铅胁迫水平(0、250、1000 mg·kg<sup>-1</sup>), 应用Illumina HiSeq™ 2000进行盐肤木根系的转录组测序, 并通过Gene Ontology(GO)与Pathway功能显著富集分析方法, 分析说明盐肤木响应不同铅胁迫水平下的差异表达基因。结果表明, 盐肤木在遭受轻度铅胁迫时, 主要有4类水解酶与2类磷酸酶相关基因显著富集, 说明盐肤木主要通过调节细胞内水解酶与磷酸酶相关基因来抵御胁迫, 而在重度铅胁迫下, 主要有6类氧化还原酶相关基因出现显著富集, 此时氧化还原酶相关基因起到主要调节作用; 盐肤木在铅胁迫下细胞受损, 在轻、重度铅胁迫下, 分别有24、16类细胞相关基因显著富集, 但其自身可通过调节细胞内细胞器、细胞质等相关的细胞运动以应对逆境; 核糖体代谢通路是盐肤木适应铅胁迫的主要代谢通路。研究表明, 核糖体相关基因是盐肤木响应铅胁迫的主要应答与调节基因。

**关键词:**盐肤木; 铅胁迫; 核糖体; RNA-Seq

中图分类号: X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2019)07-1459-09 doi:10.11654/jaes.2018-1571

### Molecular responses of *Rhus chinensis* to lead stress revealed by RNA-Seq

XIA Li-dan<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Hong<sup>1,2,3</sup>, HU Hua-ying<sup>1,2,3</sup>, CAO Sheng<sup>1,2,3</sup>, ZHOU Chui-fan<sup>1,2,3\*</sup>

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Collaborative Innovation Center for Soil and Water Conservation Across the Taiwan Straits, Fuzhou 350002, China; 3. National Positioning Observation and Research Station of Red Soil Hill Ecosystem in Changting, Fujian, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** *Rhus chinensis* is one of the pioneer plants for ecological restoration of heavy-metal-polluted areas. Since this species shows good tolerance to heavy metals such as lead and chromium, exploring its molecular response mechanism to heavy metal stress can provide a reference for the ecological restoration of heavy-metal pollution. In this study, we exposed *R. chinensis* to three concentrations of lead, corresponding to no, mild, and severe lead stress, respectively (0, 250, 1000 mg·kg<sup>-1</sup>), and performed transcriptome sequencing of the roots on the Illumina HiSeq™ 2000 system. Significant enrichment analysis was performed for Gene Ontology (GO) and Pathway functions, and the differentially expressed genes in response to the different lead concentrations were analyzed. Four types of hydrolases and two types of phosphatase-related genes were found to be differentially expressed in the mild lead-stress condition, which indicated that *R. chinensis* was mainly regulated by intracellular hydrolase and phosphatase-related genes. Under severe lead stress, six types of oxidoreductase-related genes were significantly enriched and played a major regulatory role. The cells were damaged under lead stress, and 24 and 16 cell-related genes were significantly enriched under mild and severe lead stress, respectively. However, *R. chinensis* could cope with this adversity by regulating cellular movements such as the movement of organelles and cytoplasm in cells. The ribosomal metabolic pathway was found to be the main metabolic pathway for salt tolerance and adaptation to lead stress, and ribosome-associated genes appeared to be the major regulatory genes induced in response to lead stress in *R. chinensis*.

**Keywords:** *Rhus chinensis*; lead stress; ribosome; RNA-Seq

收稿日期: 2018-12-11 录用日期: 2019-05-05

作者简介: 夏丽丹(1995—), 女, 安徽马鞍山人, 硕士研究生, 从事土壤改良研究。E-mail: 754760499@qq.com

\*通信作者: 周垂帆 E-mail: zhouchuifan@163.com

基金项目: 福建省环保科技计划项目(2018R012); 福建农林大学科技创新专项基金项目(CXZX2018137, CXZX2018132)

**Project supported:** Environmental Protection Science and Technology Plan of Fujian Province, China (2018R012); Science and Technology Innovation, Fujian Agriculture and Forestry University, Fujian, China (CXZX2018137, CXZX2018132)

铅是一种有毒的重金属,采矿、印染、电镀等行业排放的废弃物中含有大量的铅,这使得土壤环境污染严重,且铅具有强累积性,可通过食物链进入人体,与人体中的多种酶发生反应,损伤人的免疫、消化、神经与生殖系统,从而威胁人体健康<sup>[1]</sup>。

铅不是植物生长的必需元素,过量的铅会对植物产生毒害效应:叶片小、发育不良、生物量减少、叶绿素含量降低、光合作用下降等<sup>[2-4]</sup>。但植物在长期的进化过程中会形成特定的各种适应性的生长习性和生理、形态特征<sup>[5]</sup>,一些植物则会表现出较强的重金属耐性。揭示植物适应铅胁迫的分子机制,有利于抗性植物的培育,从而发挥植物修复物种的最大优势。目前的研究已发现并推测出众多参与重金属响应的基因,其中以与重金属运输相关的蛋白基因的研究最为广泛,主要包括HMAs(重金属ATP酶)家族,ABC(ATP结合盒)转运家族、CDF(阳离子扩散促进者)家族和ZIP(锌/铁调节转运蛋白)家族等,这些蛋白基因在提高植物对重金属的耐性上起到了一定的作用。此外,还有一些基因家族对重金属离子在细胞中的运输及提高植物的抗性等具有重要作用,主要有YSL(黄色条纹样)蛋白家族、Nramps(天然抗性相关巨噬细胞蛋白)家族与CTR(铜离子转运蛋白)家族等<sup>[6-7]</sup>。现已有40多种木本植物完成全基因组测序工作,但大多集中于葡萄、石榴等可食用果树<sup>[8]</sup>,而对重金属耐性植物的研究较少。

盐肤木(*Rhus chinensis*)是我国主要经济树种之一,具有良好的经济与药用价值。调查研究发现,盐肤木是重金属污染严重矿区为数不多的能够自然定居的木本植物,生物量较高、生长快、适应性强、根系发达、根萌蘖性强,对铅、铬等重金属表现出较强的耐性,因此可作为南方重金属污染区生态修复的先锋植物<sup>[4,9-10]</sup>。但目前关于盐肤木重金属胁迫的研究主要集中于重金属污染胁迫下的生理学响应及光谱特征<sup>[11]</sup>、迁移机制及富集特征<sup>[4]</sup>等,而有关盐肤木重金属胁迫下基因响应机制的研究鲜有报道。这极大制约了我们对盐肤木蛋白基因在重金属耐性方面的认知。目前,RNA-Seq技术是以新一代高通量测序为平台的RNA测序技术,该技术能够在单核苷酸水平上对

任一物种的整体转录情况进行检测,能够更精确、更广泛地提供物种在特定状态下的基因表达情况,是深入研究复杂转录组的强大工具<sup>[12-14]</sup>。

鉴于此,本研究利用Illumina HiSeq™ 2000高通量转录组测序技术对盐肤木铅胁迫下的根系组织进行转录组测序,并对差异基因进行Gene Ontology(GO)与Pathway分析,试图揭示盐肤木响应铅胁迫的相关分子机理,以期盐肤木应用于南方土壤重金属污染修复提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料的种植与处理

本研究以盐肤木为供试植物。取大小均一、饱满的盐肤木种子,在98%浓硫酸中浸泡消毒90~105 min,每隔10 min用玻璃棒搅拌一次。消毒完成后,用流水清洗种子,搓去种子表面黑色蜡质,并用纯水浸泡24 h,而后洗净置于湿滤纸上培养,每2 d更换一次滤纸,并移除发霉和空壳的种子。该发芽过程在20±2℃人工气候培养箱中避光进行。待芽长至约2 cm,将其移至营养土中栽培,待植株长至20 cm左右,取长势较为一致的幼苗进行土培胁迫试验。

胁迫试验土壤取自福建农林大学后山红黄壤,参考鲁如坤<sup>[15]</sup>的土壤元素测定方法,测得土壤背景值,结果见表1。试验用土1.5 kg·盆<sup>-1</sup>,每盆种植1株,重复3次。设置土壤铅浓度为0(CK)、250(Pb250)、1000(Pb1000) mg·kg<sup>-1</sup>(实测值分别为0、278.843、1 103.498 mg·kg<sup>-1</sup>),铅以Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>溶液的形式加入土壤中,用纯水浇灌保持土壤湿度为40%~50%。土壤平衡2~3 d后,将盐肤木植株移栽到供试土壤中(福建农林大学下安温室大棚),温度为25℃左右,胁迫一个月后取根进行测序试验。

### 1.2 RNA提取与测序

总RNA的提取采用Trizol法<sup>[16]</sup>,由广州基迪奥生物公司完成RNA的提取、质控、文库构建与测序。

### 1.3 基因功能表达、注释及富集分析

#### 1.3.1 Unigene注释

Unigene基本功能注释信息给出Unigene的蛋白功能注释、COG/KOG功能注释、GO功能注释、Path-

表1 土壤背景值  
Table 1 Soil background value

元素Element	Ca	Cu	Fe	Mg	Na	K	Zn
含量Content/g·kg <sup>-1</sup>	3.107	0.048	21.289	25.478	0.838	2.141	0.133

way 注释等。通过 blastx 将 Unigene 序列比对到蛋白数据库 Nr、Swissprot、KEGG(系统分析基因产物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物功能的数据库)和 COG/KOG( $e$ -value<0.000 01)(基因产物进行直系同源分类的数据库),得到与给定 Unigene 具有最高序列相似性的蛋白,从而得到该 Unigene 的蛋白功能注释信息。

### 1.3.2 GO 功能显著性富集分析

GO 是一个国际化的基因功能分类体系,提供了一套动态更新的标准词汇表来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 功能分析一方面给出差异表达基因的 GO 功能分类注释;另一方面给出差异表达基因的 GO 功能显著性富集分析,通过 GO 功能显著性富集分析能确定差异表达基因行使的主要生物学功能。计算得到的  $p$ -value 通过 FDR<sup>[17]</sup>校正之后,以  $q$ -value≤0.05 为阈值,满足此条件的 GO term 定义为在铅胁迫下样品间差异表达基因中显著富集的 GO term。

### 1.3.3 Pathway 功能显著性富集分析

在生物体内,不同基因相互协调行使其生物学特性,基于 Pathway 的分析有助于更进一步了解基因的生物学功能。KEGG 是有关 Pathway 的主要公共数据库<sup>[18]</sup>。Pathway 显著性富集分析以 KEGG Pathway 为单位,应用超几何检验,找出与整个基因组背景相比,在差异表达基因中显著性富集的 Pathway。通过 Pathway 显著性富集分析能确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。通过计算以

$q$ -value≤0.05 为阈值筛选出样品间差异基因的主要代谢途径。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品测序质量与组装结果

使用短 reads 比对软件 Bowtie 2<sup>[19]</sup>将高质量 clean reads 比对参考基因序列(表 2),CK、Pb250、Pb1000 与参考基因的匹配率分别为 85.69%、84.58%、84.56%,表明测序数据可用性较高。使用短 reads 组装软件 Trinity<sup>[20]</sup>做转录组从头组装(表 3)发现,转录本拼接长度大多集中在 200~299 nt,转录本长度介于 201~15 581 nt,N50 值为 1566,拼装组装效果符合要求。

### 2.2 Unigene 基本注释统计

#### 2.2.1 数据库注释统计

如图 1 所示,盐肤木 70 459 个 Unigene 与 KEGG、KOG、Nr 与 Swissprot 四大数据库分别比对得到 20 363、23 655、41 047、34 476 个 Unigene,共有 43 006 个 Unigene 得到注释,27 453 个 Unigene 未得到注释,说明盐肤木转录组中还存在大量未知基因,而有 14 087 个 Unigene 在四大数据库中均得到注释,占比 32.76%。

#### 2.2.2 物种分布统计

利用 blastx 将组装出来的 Unigene 序列与 Nr 数据库进行比对,有 9927 个 Unigene 与柑橘、3509 个 Unigene 与可可、1563 个 Unigene 与麻风树等植物的序列同源(图 2)。这些基因为本研究转录组的注释提供了丰富的参考序列,并且从这些数据中可以推断

表 2 各样品测序质量统计

Table 2 Sampling quality statistics of each sample

项目 Items	CK	Pb250	Pb1000
原始 reads 总数量 Total number of original reads	34 973 468	37 186 104	38 974 742
过滤后 reads 数量(占原始总数比例) Number of reads after filtering(Proportion of the original total)	34 640 182(99.05%)	36 755 622(98.84%)	38 499 584(98.78%)
过滤后 Q20(占过滤后碱基比例) Filtered after Q20(Proportion of filtered bases)	5 116 666 943(98.80%)	5 419 306 882(98.66%)	5 311 848 700(96.70%)
样品表达的参考基因数(匹配率) Number of reference genes expressed in the sample(Matching rate)	34 590 872(85.69%)	36 699 612(84.58%)	38 460 468(84.56%)

表 3 组装结果统计

Table 3 Assembly result statistics

基因数 Number of genes	N50	最小长度 Minimum length/nt	最大长度 Maximum length/nt	200~299 nt	平均长度 Average length/nt	组装序列总长度 Total length of assembly sequence/nt
70 459	1566	201	15 581	23 486	826	58 202 114

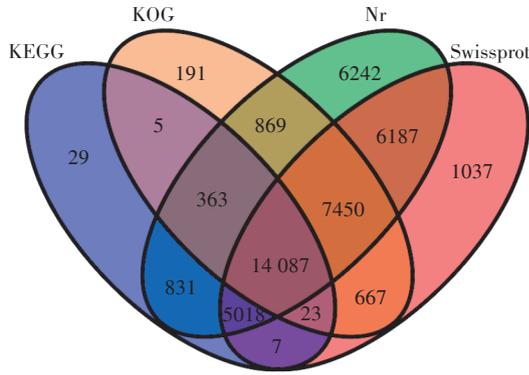
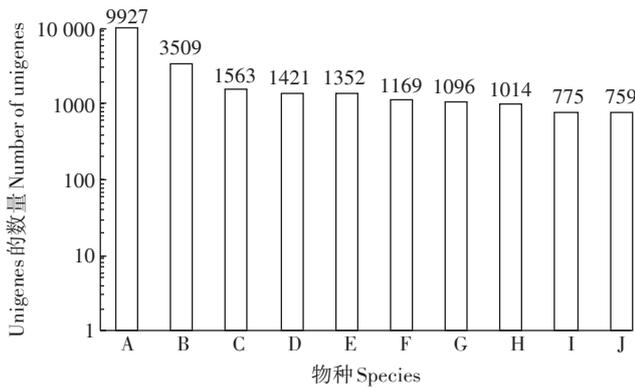


图1 四大数据库注释维恩图

Figure 1 Four big database annotations Venn diagram



A: 柑橘; B: 可可; C: 麻风树; D: 葡萄; E: 胡杨; F: 树棉; G: 亚洲棉;  
H: 甘蓝型油菜; I: 蒺藜苜蓿; J: 梅

A: *Citrus sinensis*; B: *Theobroma cacao*; C: *Jatropha curcas*; D: *Vitis vinifera*; E: *Populus euphratica*; F: *Gossypium arboreum*; G: *Gossypium raimondii*; H: *Brassica napus*; I: *Medicago truncatula*; J: *Prunus mume*

图2 物种分布统计图

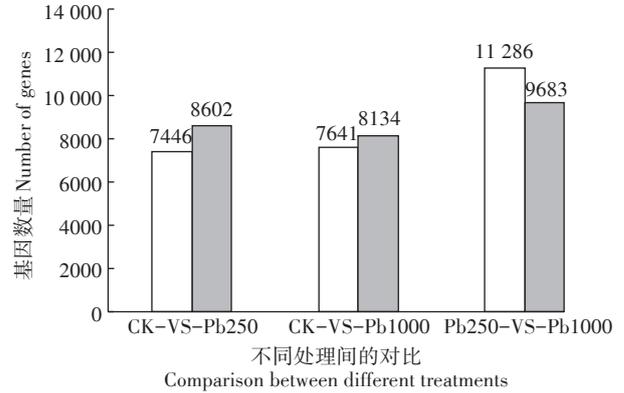
Figure 2 Species distribution chart

出盐肤木与柑橘的进化关系较近。

### 2.3 差异基因数量统计

对3个样品间的差异基因进行两两比较,用FDR与log<sub>2</sub>FC来筛选差异基因,筛选条件为FDR<0.05且|log<sub>2</sub>FC|>1,结果见图3。

在本研究中,CK-VS-Pb250、CK-VS-Pb1000的上调基因表达量分别为7446、7641个,下调基因分别为8602、8134个。相对于CK而言,Pb1000的上调基因比Pb250增加了195个,表明盐肤木在较高铅浓度下一些平常不表达的基因开始表达,这与其抵御铅胁迫的耐性相关<sup>[21]</sup>;Pb1000的下调基因比Pb250降低了468个,这可能是因为铅胁迫对盐肤木的生理系统造成了伤害,使其活性降低,基因表达量下降<sup>[22]</sup>。Pb250-VS-Pb1000的上调、下调基因分别为11286、



□ 上调表达的差异基因 The differential gene that is up-regulated  
■ 下调表达的差异基因 The differential gene that is down-regulated

图3 样品间差异基因数量统计

Figure 3 Quantitative statistics of differential genes between samples

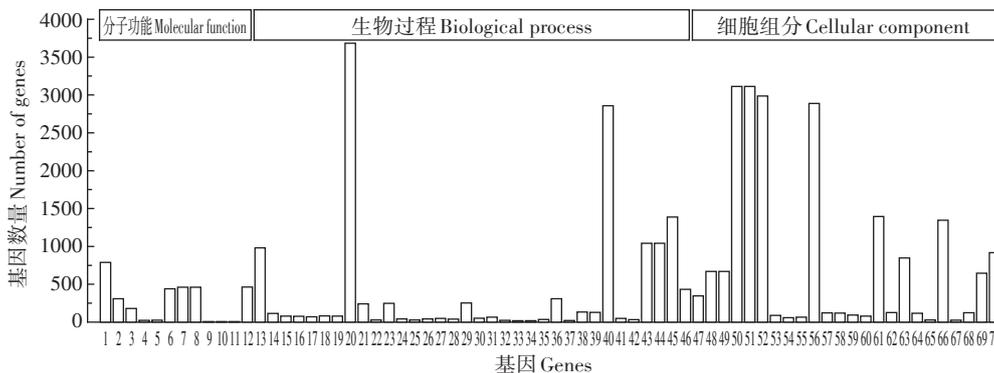
9683个,皆大于前两者,表明盐肤木在遭受高浓度铅胁迫时,虽然大量基因表达量降低,但其自身会调用更多不常用的基因来应对逆境。

### 2.4 差异基因的GO分析

GO共有3个本体,分别描述基因的分子功能(Molecular function)、细胞组分(Cellular component)及参与的生物过程(Biological process)。盐肤木铅胁迫转录组基因注释结果如图4和图5所示。

CK-VS-Pb250 GO分类统计见图4:在分子功能分类中,共有12个差异表达基因显著富集,分别是结构分子活性、2类RNA结合相关基因、4类水解酶相关基因、2类磷酸酶相关基因、2类聚合酶相关基因和西格玛因子活动;在生物过程分类中,共有34个差异表达基因显著富集,分别是基因表达、电子传递链、氧化还原过程、光合电子传递链、RNA修饰、细胞离子稳态、核糖体、17类代谢过程相关基因、5类合成过程相关基因、3类复合物相关基因和2类光合作用相关基因;在细胞组分分类中,共有24个差异表达基因显著富集,分别是膜蛋白复合物、3类核糖体亚基相关基因、4类细胞器相关基因、3类细胞质相关基因、4类细胞及细胞器相关基因和9类光合作用相关基因。

CK-VS-Pb1000 GO分类统计见图5:在分子功能分类中,共有11个差异表达基因显著富集,分别是结构分子活性、四吡咯结合、6类氧化还原酶相关基因、单加氧酶活性、脂肪酶激活剂活性和rRNA结合;在生物过程分类中,共有2个差异表达基因显著富集,分别是基因表达和碳水化合物生物分解代谢过程;



1: 结构分子活动; 2: RNA 结合; 3: 翻译因子活性, RNA 结合; 4: 三烷基硫水解酶活性; 5: 水解酶活性, 作用于醚键; 6: 核苷-三磷酸酶活性; 7: 焦磷酸酶活性; 8: 在含磷酸酐中作用于酸酐的水解酶活性; 9: 转录因子活性, 核心 RNA 聚合酶结合; 10: 核心 DNA 依赖性 RNA 聚合酶结合启动子特异性活性; 11: 西格玛因子活动; 12: 水解酶活性, 作用于酸酐; 13: 基因表达; 14: 产生前体代谢物和能量; 15: 吡啶核苷酸代谢过程; 16: 烟酰胺核苷酸代谢过程; 17: NADP 代谢过程; 18: 氧化还原辅酶代谢过程; 19: 含吡啶的化合物代谢过程; 20: 代谢过程; 21: 核苷酸代谢过程; 22: 光合作用, 光反应; 23: 核苷磷酸盐代谢过程; 24: 四萜类生物合成过程; 25: 光合作用; 26: 四萜代谢过程; 27: 萜类化合物生物合成过程; 28: 电子传递链; 29: 含核碱基的小分子代谢过程; 30: 类异戊二烯生物合成过程; 31: 氧化还原过程; 32: 肌醇磷酸代谢过程; 33: 肌醇磷酸酯生物合成过程; 34: 多元醇生物合成过程; 35: 多元醇代谢过程; 36: 有机磷代谢过程; 37: 光合电子传递链; 38: RNA 修饰; 39: 辅酶代谢过程; 40: 有机物质代谢过程; 41: 淀粉代谢过程; 42: 细胞离子稳态; 43: 细胞内核糖核蛋白复合物; 44: 核糖核蛋白复合物; 45: 大分子复合物; 46: 核糖体; 47: 核糖体亚基; 48: 非膜有界细胞器; 49: 细胞内非膜结合细胞器; 50: 细胞部分; 51: 细胞; 52: 细胞内; 53: 类囊体部分; 54: 光合; 55: 光合膜; 56: 细胞内部分; 57: 类囊体; 58: 大核糖体亚基; 59: 小核糖体亚基; 60: 质体类囊体; 61: 细胞质; 62: 叶绿体; 63: 细胞内细胞器部分; 64: 叶绿体部分; 65: 类囊体腔; 66: 细胞质部分; 67: 质体类囊体腔; 68: 膜蛋白复合物; 69: 质; 70: 细胞器部分

1: Structural molecule activity; 2: RNA binding; 3: Translation factor activity, RNA binding; 4: Trialkylsulfonium hydrolase activity; 5: Hydrolase activity, acting on ether bonds; 6: Nucleoside-triphosphatase activity; 7: Pyrophosphatase activity; 8: Hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides; 9: Transcription factor activity, core RNA polymerase binding; 10: Core DNA-dependent RNA polymerase binding promoter specificity activity; 11: Sigma factor activity; 12: Hydrolase activity, acting on acid anhydrides; 13: Gene expression; 14: Generation of precursor metabolites and energy; 15: Pyridine nucleotide metabolic process; 16: Nicotinamide nucleotide metabolic process; 17: NADP metabolic process; 18: Oxidoreduction coenzyme metabolic process; 19: Pyridine-containing compound metabolic process; 20: Metabolic process; 21: Nucleotide metabolic process; 22: Photosynthesis, light reaction; 23: Nucleoside phosphate metabolic process; 24: Tetraterpenoid biosynthetic process; 25: Photosynthesis; 26: Tetraterpenoid metabolic process; 27: Terpenoid biosynthetic process; 28: Electron transport chain; 29: Nucleobase-containing small molecule metabolic process; 30: Isoprenoid biosynthetic process; 31: Oxidation-reduction process; 32: Inositol phosphate metabolic process; 33: Inositol phosphate biosynthetic process; 34: Polyol biosynthetic process; 35: Polyol metabolic process; 36: Organophosphate metabolic process; 37: Photosynthetic electron transport chain; 38: RNA modification; 39: Coenzyme metabolic process; 40: Organic substance metabolic process; 41: Starch metabolic process; 42: Cellular ion homeostasis; 43: Intracellular ribonucleoprotein complex; 44: Ribonucleoprotein complex; 45: Macromolecular complex; 46: Ribosome; 47: Ribosomal subunit; 48: Non-membrane-bounded organelle; 49: Intracellular non-membrane-bounded organelle; 50: Cell part; 51: Cell; 52: Intracellular; 53: Thylakoid part; 54: Photosystem; 55: Photosynthetic membrane; 56: Intracellular part; 57: Thylakoid; 58: Large ribosomal subunit; 59: Small ribosomal subunit; 60: Plastid thylakoid; 61: Cytoplasm; 62: Chloroplast; 63: Intracellular organelle part; 64: Chloroplast part; 65: Thylakoid lumen; 66: Cytoplasmic part; 67: Plastid thylakoid lumen; 68: Membrane protein complex; 69: Plastid; 70: Organelle part

图4 CK-VS-Pb250 差异基因 GO 功能注释

Figure 4 CK-VS-Pb250 differential gene GO function annotation

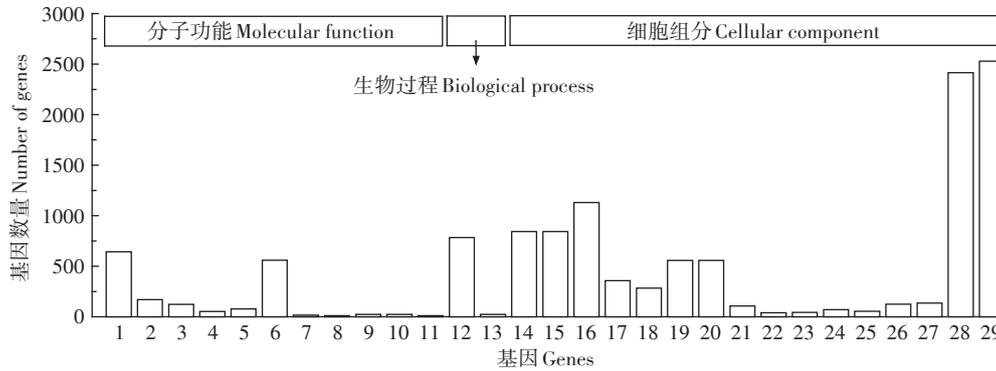
在细胞组分分类中,共有 16 个差异表达基因显著富集,分别是 3 类复合物相关基因、4 类核糖体及核糖体亚基相关基因、2 类细胞器相关基因、4 类细胞相关基因和 3 类光合作用相关基因。

由图 4 和图 5 可得,在分子功能上,Pb250 胁迫下磷酸酶与水解酶相关基因表达量较高,而 Pb1000 胁迫下则是氧化还原酶,此外,四吡咯结合相关基因也有较高的基因表达量。在生物过程上,Pb250 胁迫下富集了 34 个差异基因,而 Pb1000 仅有 2 个,表明植物受损严重,基因表达量骤降;Pb250 富集量最多的差异基因是代谢过程,主要是有机物质的代谢,其中核糖体蛋白相关基因居多,如 40S 核糖体 S3-3 样蛋白、60S 核糖体蛋白 L7、核糖体蛋白 L11 等。在细胞组分

上,Pb250 胁迫下主要是细胞结构相关基因富集较多,也存在较少数量的核糖体亚基,而 Pb1000 下核糖体相关基因出现大量富集,主要为核糖体相关亚基与核糖核蛋白复合物。

## 2.5 差异基因的 KEGG 分析

由表 4 可得,核糖体是 CK-VS-Pb250、CK-VS-Pb1000 与 Pb250-VS-Pb1000 差异样品中共有的代谢通路,表明核糖体是盐肤木适应铅胁迫的主要代谢通路。在 CK-VS-Pb250 与 CK-VS-Pb1000 中分别有 1211、1026 个核糖体 DEGs,表明高浓度铅胁迫使得核糖体相关基因表达量减少。光合作用代谢通路仅存在于 CK-VS-Pb250 中,表明轻度铅胁迫下,盐肤木仍能有效进行光合作用,而重度铅胁迫使得植物光合



1: 结构分子活动; 2: 四吡咯结合; 3: 作用于配对供体的氧化还原酶活性, 掺入或减少分子氧; 4: 氧化还原酶活性, 作用于配对供体, 加入或减少分子氧, NAD(P)H 作为一个供体, 并掺入一个氧原子; 5: 单加氧酶活性; 6: 氧化还原酶活性; 7: rRNA 结合; 8: 氧化还原酶活性, 作用于供体的 CH-CH 基团, 醌或相关化合物作为受体; 9: 氧化还原酶活性, 作为供体的二酚和相关物质, 氧作为受体; 10: 氧化还原酶活性, 作为供体, 作用于二酚和相关物质; 11: 脂肪酶激活剂活性; 12: 基因表达; 13: 碳水化合物衍生物分解代谢过程; 14: 细胞内核糖核蛋白复合物; 15: 核糖核蛋白复合物; 16: 大分子复合物; 17: 核糖体; 18: 核糖体亚基; 19: 非膜有界细胞器; 20: 细胞内非膜结合细胞器; 21: 大核糖体亚基; 22: 光合; 23: 光合膜; 24: 小核糖体亚基; 25: 类囊体部分; 26: 外部封装结构; 27: 细胞周边; 28: 细胞内; 29: 细胞

1: Structural molecule activity; 2: Tetrapyrrole binding; 3: Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; 4: Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, NAD(P)H as one donor, and incorporation of one atom of oxygen; 5: Monooxygenase activity; 6: Oxidoreductase activity; 7: rRNA binding; 8: Oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors, quinone or related compound as acceptor; 9: Oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxygen as acceptor; 10: Oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors; 11: Lipase activator activity; 12: Gene expression; 13: Carbohydrate derivative catabolic process; 14: Intracellular ribonucleoprotein complex; 15: Ribonucleoprotein complex; 16: Macromolecular complex; 17: Ribosome; 18: Ribosomal subunit; 19: Non-membrane-bounded organelle; 20: Intracellular non-membrane-bounded organelle; 21: Large ribosomal subunit; 22: Photosystem; 23: Photosynthetic membrane; 24: Small ribosomal subunit; 25: Thylakoid part; 26: External encapsulating structure; 27: Cell periphery; 28: Intracellular; 29: Cell

图5 CK-VS-Pb1000 差异基因 GO 功能注释

Figure 5 CK-VS-Pb1000 differential gene GO function annotation

表4 差异表达基因的 KEGG 代谢途径分析

Table 4 Analysis of KEGG metabolic pathways of differentially expressed genes

差异样品(差异表达基因总数) Differential sample (Total number of differentially expressed genes)	代谢通路 Pathway	差异基因数量(占差异基因数量的比例) Number of differential genes (Proportion of the number of differential genes)	注释到某条代谢通路的基因数(占总基因数量的比例) Number of genes annotated to a metabolic pathway (Proportion of total gene count)	p-value	q-value
CK-VS-Pb250 富集的代谢通路 CK-VS-Pb250 Pathway enrichment (3501)	核糖体 Ribosome	1211 (34.59%)	2906 (22.82%)	0	0
	光合天线蛋白 Photosynthesis-antenna proteins	18 (0.51%)	21 (0.16%)	0	0.000 003
	光合作用 Photosynthesis	38 (1.09%)	87 (0.68%)	0.000 829	0.034 818
CK-VS-Pb1000 富集的代谢通路 CK-VS-Pb1000 Pathway enrichment (3105)	核糖体 Ribosome	1026 (33.04%)	2906 (22.82%)	0	0
	光合天线蛋白 Photosynthesis-antenna proteins	16 (0.51%)	21 (0.16%)	0.000 001	0.000 053
Pb250-VS-Pb1000 富集的代谢通路 Pb250-VS-Pb1000 Pathway enrichment (3922)	核糖体 Ribosome	1221 (31.13%)	2906 (22.82%)	0	0

作用受到抑制, 植物生长受到影响。此外, 光合天线蛋白代谢通路的差异表达基因主要有叶绿素 a/b 结合蛋白 II 型前体、叶绿素 a/b 结合 13、叶绿素 a/b 结合蛋白 3、预测叶绿素 a/b 结合蛋白 CP24 10B 等与叶绿素相关的基因。与 CK 相比, Pb1000 较 Pb250 的光合天线蛋白通路减少了 2 个 DEGs, 分别是叶绿素 a/b 结合蛋白和预测叶绿素 a/b 结合蛋白 1D 样。

### 3 讨论

水解酶(XTH)是植物细胞壁重构过程中的关键酶之一, 不仅具有松弛细胞壁、促进细胞生长的作用, 而且也具有强化细胞壁和维持细胞壁完整性的作用<sup>[23-24]</sup>。在轻度铅胁迫下有 4 类水解酶相关基因出现显著富集, 表明盐肤木在轻度铅胁迫下通过提高细胞

中水解酶活性修复受损细胞壁。同时,在拟南芥和番茄中发现,超量表达CaXTH3能够提高转基因植株抗旱性和耐盐性<sup>[25-26]</sup>。核苷三磷酸酶通过提供能量来促进核内成熟mRNA穿过核孔复合体进入胞浆,是细胞核mRNA出核转运的主要限速酶<sup>[27]</sup>;焦磷酸盐是控制细胞内焦磷酸浓度的关键酶,而焦磷酸是RNA、DNA、蛋白质及糖原等生物大分子生物学合成过程中的副产物,其浓度会影响细胞内部分生理反应的平衡<sup>[28]</sup>。在轻度铅胁迫下这两类磷酸酶相关基因出现显著富集,表明盐肤木在轻度铅胁迫下通过提高相关磷酸酶活性来调节细胞内被扰乱的平衡,以维持细胞内的正常运作。同时,Park等<sup>[29]</sup>将拟南芥H<sup>+</sup>-PPase基因转入番茄中发现,转基因植株与野生型植株相比生长速度快、根系发达,且有较强的抗旱能力。在高浓度铅胁迫下,盐肤木的各类氧化还原酶活性显著增强,氧化还原酶能够进行大量的催化反应,生物合成结构复杂的化合物<sup>[30]</sup>,以抵御铅侵害。此外,四吡咯化合物是植物光合作用、呼吸作用等生物学过程不可或缺的重要组分,维系着植物的生长和发育,当四吡咯合成途径受阻时,一些光敏型中间代谢物积累,则会产生氧化胁迫,诱导细胞死亡,严重阻碍植物生长<sup>[31]</sup>。在重度铅胁迫下四吡咯结合相关基因出现显著富集,表明高浓度铅胁迫已对四吡咯化合物的结合产生阻碍,影响了植物正常生长。施翔等<sup>[4]</sup>和Souza等<sup>[32]</sup>发现,高浓度重金属胁迫下植物生物量降低。综上,通过不同浓度铅胁迫发现,细胞内水解酶、磷酸酶等相关基因在轻度铅胁迫下主要通过提高自身活性来增强细胞抗性,而在重度铅胁迫下,则是氧化还原酶相关基因通过合成各类化合物以抵御逆境。

中心体是非膜细胞器之一,是细胞中的微管组织中心,在提供细胞器定向运输支架和细胞运动调节中发挥重要作用<sup>[33]</sup>。此外,核糖体也属于非膜细胞器,本研究发现,无论是在轻度还是重度铅胁迫下,非膜细胞器相关基因都出现大量富集,表明盐肤木在铅胁迫下细胞受损严重,而其自身首先通过细胞器调节相关的细胞运动以应对逆境。细胞质是生命活动的主要场所,绝大多数的化学反应都在细胞质中进行,主要成分为核糖体、多种酶类和中间代谢物、各种营养物质等。在轻度铅胁迫下有3类细胞质相关基因出现显著富集,表明盐肤木在遭受轻度铅胁迫时,通过调节自身基因抵御侵害,如提高酶类基因表达、增强代谢等。Yao等<sup>[34]</sup>发现在番茄与苹果愈伤组织中过量表达细胞质苹果脱氢酸酶基因,不仅能够促进细胞发育

和植物生长,促进质子泵相关基因的表达和三磷酸腺苷酶的生成,而且能够调节有机酸转运和溶质势,减少ROS的生成,从而提高转基因作物对寒冷和盐胁迫的抗性。综上,铅的侵入使得盐肤木根系细胞受损严重,而盐肤木会通过调节细胞内细胞器、细胞质等相关的细胞运动以应对逆境。

从差异表达基因的GO与KEGG的分析中均发现,核糖体相关基因是盐肤木应对铅胁迫的主要调节基因。核糖体蛋白不仅参与了rRNA的加工、折叠、核糖体亚基组装和转运过程,还在亚基结构的稳定性、核糖体与各种翻译因子的相互作用和新生肽的折叠与定位等过程中发挥作用,甚至还可能承担着核糖体外的生物学功能<sup>[35-37]</sup>。核糖体由rRNA和蛋白质构成,是细胞内蛋白质合成的分子机器,如果核糖体不起作用,细胞就无法分裂,植物生长将停止。与CK相比,Pb1000较Pb250核糖体通路减少了185个DEGs,因此推测高浓度铅胁迫影响盐肤木根系的正常代谢,抑制植株正常生长,通过对根系生理特性如SOD、CAT等抗氧化酶和MDA的测定分析也印证了这一点<sup>[38]</sup>。此外,光合作用代谢通路中的捕光叶绿素a/b结合蛋白等能够促进叶绿体合成辅酶并提高光能利用率<sup>[39]</sup>,表明在高浓度铅胁迫下,光合作用受到一定的抑制,植物生长受到影响,笔者在对叶绿素含量的研究分析中也发现铅显著抑制了盐肤木叶绿素含量<sup>[38]</sup>。姚广等<sup>[40]</sup>也发现,铅胁迫显著抑制了玉米地上部分和地下部分的生长、降低了叶片光合色素含量,杜连彩<sup>[41]</sup>也有相似的研究结果。综上,核糖体相关基因是盐肤木应对铅胁迫的主要应答与调节基因。

## 4 结论

(1)轻度铅胁迫下,盐肤木通过调节细胞内水解酶与磷酸酶相关基因抵御胁迫,而在重度铅胁迫下,则是氧化还原酶相关基因起到主要调节作用。

(2)盐肤木在铅胁迫下细胞受损,其自身通过调节细胞内细胞器、细胞质等相关的细胞运动以应对逆境。

(3)核糖体代谢通路是盐肤木适应铅胁迫的主要代谢通路,核糖体相关基因是盐肤木应对铅胁迫的主要调节基因。

## 参考文献:

- [1]徐军.植物促生细菌和EDTA对植物生长与富集土壤重金属的影响及机制研究[D].南京:南京农业大学,2012.

- XU Jun. Effects of plant growth-promoting bacteria and EDTA on the growth and heavy metal accumulation of plants[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [2] Kumar G H, Kumari J P. Heavy metal lead influent toxicity and its assessment in phytoremediating plants: A review[J]. *Water, Air & Soil Pollution*, 2015, 226(10): 1-11.
- [3] Bharwana S A, Shafaqat A, Farooq M A, et al. Influence of lead stress on growth, photosynthesis and lead uptake in the seedlings of cotton[J]. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 2013, 4(10): 2492-2501.
- [4] 施翔, 王树凤, 潘红伟, 等. 盐肤木幼苗对铅胁迫的生理响应[J]. 林业科学研究, 2016, 29(1): 147-153.  
SHI Xiang, WANG Shu-feng, PAN Hong-wei, et al. Physiological responses of *Rhus chinensis* under lead stress[J]. *Forest Research*, 2016, 29(1): 147-153.
- [5] 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.  
ZHANG Chun-rong, SANG Xue-yu, QU Meng, et al. *De novo* sequencing and analysis of root transcriptome to reveal regulation of gene expression by moderate drought stress in *Glycyrrhiza uralensis*[J]. *China Journal of Chinese Medicine*, 2015, 40(24): 4817-4823.
- [6] Gong J M, Lee D A, Schroeder J I. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(17): 10118-10123.
- [7] 迟春宁, 丁国华. 植物耐重金属的分子生物学研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(3): 6-11.  
CHI Chun-ning, DING Guo-hua. Research progress of the molecular biology in heavy metal tolerance of plants[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(3): 6-11.
- [8] 刘海琳, 尹佟明. 全基因组测序技术研究及其在木本植物中的应用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2018, 42(5): 172-178.  
LIU Hai-lin, YIN Tong-ming. Progress on the whole genome sequencing and the application in woody plants[J]. *Journal of Nanjing Forestry University(Natural Science Edition)*, 2018, 42(5): 172-178.
- [9] 陈晶, 穆燕, 陈明, 等. 盐肤木对重金属铬胁迫的生理生化反应研究[J]. 生态科学, 2017, 36(2): 26-31.  
CHEN Jing, MU Yan, CHEN Ming, et al. Response of physiology and biochemistry of *Rhus chinensis* to heavy metal chromium stress[J]. *Ecological Science*, 2017, 36(2): 26-31.
- [10] 黄凯, 张雪娇, 冯媛, 等. 河南省尾矿库土壤重金属污染评价及优势植物重金属累积特征[J]. 黑龙江农业科学, 2018(1): 51-56.  
HUANG Kai, ZHANG Xue-jiao, FENG Yuan, et al. Evaluation of heavy metal pollution in soil of a tailings reservoir in Henan and accumulation of heavy metals in the dominant plants[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2018(1): 51-56.
- [11] Li Q T, Yang F J, Zhang B, et al. Biogeochemistry responses and spectral characteristics of *Rhus Chinensis* Mill under heavy metal contamination stress[J]. *Journal of Remote Sensing*, 2008, 12(2): 284-290.
- [12] Marioni J C, Mason C E, Mane S M, et al. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays[J]. *Genome Research*, 2008, 18(9): 1509-1517.
- [13] Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing[J]. *Science*, 2008, 320(5881): 1344-1349.
- [14] 祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用[J]. 遗传, 2011, 33(11): 1191-1202.  
QI Yun-xia, LIU Yong-bin, RONG Wei-heng. RNA-Seq and its applications: A new technology for transcriptomics[J]. *Hereditas*, 2011, 33(11): 1191-1202.
- [15] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.  
LU Ru-kun. Soil argrochemistry analysis protocols[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [16] 吴凯朝, 黄诚梅, 李杨瑞, 等. Trizol 试剂法快速高效提取 3 种作物不同组织总 RNA[J]. 南方农业学报, 2012, 43(12): 1934-1939.  
WU Kai-chao, HUANG Cheng-mei, LI Yang-rui, et al. Fast and effective total RNA extraction from different tissues in 3 crops through the Trizol reagent method[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43(12): 1934-1939.
- [17] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing[J]. *Journal of the Royal Statistical Society*, 1995, 57(1): 289-300.
- [18] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 36(Suppl1): D480-D484.
- [19] Li R, Yu C, Li Y, et al. SOAP2: An improved ultrafast tool for short read alignment[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(15): 1966-1967.
- [20] Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency[J]. *Annals of Statistics*, 2001, 29(4): 1165-1188.
- [21] 刘家佳. 工业大麻盐胁迫转录组学研究[D]. 昆明: 云南大学, 2016.  
LIU Jia-jia. RNA-Seq analysis of industrial hemp under salt stress[D]. Kunming: Yunnan University, 2016.
- [22] 叶珊. 利用差异显示与 RNA-Seq 技术进行萝卜铬胁迫响应相关基因鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.  
YE Shan. Identification of genes involved in response to chromium stress with DD-PCR and RNA-SEQ in radish (*Raphanus sativus* L.) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.
- [23] Cosgrove, Daniel J. Growth of the plant cell wall[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6(11): 850-861.
- [24] Catala C, Rose J K C, York W S, et al. Characterization of a *Lycopersicon esculentum* Mill. xyloglucan endotransglycosylase gene that is down-regulated by auxin in etiolated hypocotyls[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(3): 1180-1192.
- [25] Cho S K, Kim J E, Park J A, et al. Constitutive expression of abiotic stress-inducible hot pepper CaXTH3, which encodes a xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase homolog, improves drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Febs Letters*, 2006, 580(13): 3136-3144.
- [26] Choi J Y, Seo Y S, Su J K, et al. Constitutive expression of CaXTH3, a hot pepper xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, enhanced tol-

- erance to salt and drought stresses without phenotypic defects in *Lycopersicon esculentum* Mill. plants (*Solanum lycopersicum* cv. Dotaerang) [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(5):867-877.
- [27] Tomassoni M L, Amori D, Magni M V. Changes of nuclear membrane lipid composition affect RNA nucleocytoplasmic transport[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 258(2):476-481.
- [28] 贤加欢, 张美萍, 孙春玉, 等. 可溶性焦磷酸酶的研究进展[J/OL]. 基因组学与应用生物学. (2018-10-20). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20181020.1613.006.html>.  
XIAN Jia-huan, ZHANG Mei-ping, SUN Chun-yu, et al. Review on soluble pyrophosphatase[J/OL]. *Genomics and Applied Biology*. (2018-10-20). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20181020.1613.006.html>.
- [29] Park S, Li J, Pittman J K, et al. Up-regulation of a H<sup>+</sup>-pyrophosphatase (H<sup>+</sup>-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(52):18830-18835.
- [30] Eckstein M, Thomas Dau, Mann, Kragl U. Recent developments in NAD(P)H regeneration for enzymatic reductions in one- and two-phase systems[J]. *Biocatalysis*, 2004, 22(2):89-96.
- [31] 王晚晴. 拟南芥 FHY3/FAR1 转录因子调控四吡咯合成与植物免疫的机理研究[D]. 北京:中国科学院大学, 2014.  
WANG Wan-qing. Mechanism of *Arabidopsis thaliana* FHY3/FAR1 transcription factor regulating tetrapyrrole synthesis and plant immunity[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2014.
- [32] Souza R D S, Adrián L d A S, Anjos d S L, et al. Lead tolerance and phytoremediation potential of Brazilian leguminous tree species at the seedling stage[J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 110(4):299-307.
- [33] 梁前进. 细胞器不依赖于DNA的复制:中心体自主复制解读[J]. 科学通报, 2017, 62(13):1333-1345.  
LIANG Qian-jin. Organellar replication that is independent of DNA: Unscrambling the autonomous centrosomal replication[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2017, 62(13):1333-1345.
- [34] Yao Y X, Dong Q L, Zhai H, et al. The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2011, 49(3):257-264.
- [35] Komili S, Farny N G, Roth F P, et al. Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression[J]. *Cell*, 2007, 131(3):557-571.
- [36] Barakat A, Szick-Miranda K, Chang I F, et al. The organization of cytoplasmic ribosomal protein genes in the *Arabidopsis* genome[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(2):398-415.
- [37] 靳聪聪, 侯名语, 潘延云. 拟南芥核糖体蛋白生物学功能研究进展[J]. 植物生理学报, 2018, 54(2):203-212.  
JIN Cong-cong, HOU Ming-yu, PAN Yan-yun. Research progress of ribosomal protein function in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(2):203-212.
- [38] Zhou C, Huang M, Ren H, et al. Bioaccumulation and detoxification mechanisms for lead uptake identified in *Rhus chinensis* Mill. seedlings[J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2017, 142:59-68.
- [39] 李跃建, 梁根云, 刘小俊, 等. 黄瓜嫁接苗和自根苗的蛋白质组学研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(8):1147-1152.  
LI Yue-jian, LIANG Gen-yun, LIU Xiao-jun, et al. Proteomic study on grafted and non-grafted cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36(8):1147-1152.
- [40] 姚广, 高辉远, 王未未, 等. 铅胁迫对玉米幼苗叶片光系统功能及光合作用的影响[J]. 生态学报, 2009, 29(3):1162-1169.  
YAO Guang, GAO Hui-yuan, WANG Wei-wei, et al. The effects of Pb-stress on functions of photosystems and photosynthetic rate in maize seedling leaves[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(3):1162-1169.
- [41] 杜连彩. 铅对苹果砧木平邑甜茶、八楞海棠的毒害机理及耐性比较研究[D]. 济南:山东师范大学, 2006.  
DU Lian-cai. The study on mechanism of Pb toxicity apple stock *M. hupehensis*, *M. micromalus* and comparison of their tolerance[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2006.