

基于 RNA-Seq 的镉、铅胁迫下间作续断菊根 差异基因的转录组分析*

蒲麟陇, 梅馨月, 湛方栋, 祖艳群, 李元**

(云南农业大学 资源与环境学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】初步探索间作系统中重金属超富集植物续断菊对镉、铅吸收、转运、结合的分子机制, 为进一步进行超富集植物续断菊转录组差异表达基因分析及耐重金属相关基因、重金属转运相关基因挖掘奠定基础。【方法】本研究采用 RNA-Seq 技术对间作系统中续断菊根组织转录组进行分析。【结果】通过 Illumina HiSeq™ 2000 测序和 *De novo* 组装共得到 19.23 GB 的过滤后数据和 65 357 个续断菊根 Unigenes, 对差异显著的基因进行分析共得到上调的基因有 52 个, 下调的有 116 个。对获得的 Unigenes 进行功能注释, 在 Nr、Swissprot、KOG 和 KEGG 四大数据库共注释到 44 059 个。【结论】间作显著提高了续断菊生物量、镉铅含量和转运系数; GO 功能富集分析显示: 差异表达基因归类为生物学过程、细胞组分和分子功能, 间作使得续断菊对与重金属镉、铅的吸收、转运和结合的相关基因表达量有显著影响, 结合和吸收功能增强; KEGG Pathway 富集分析表明: 这些差异表达基因主要参与生物素代谢、氧化磷酸化、自噬调控等途径。

关键词: 间作; 续断菊; 重金属; 转录组

中图分类号: X 53

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2018) 02-0324-10

Transcriptome Analysis of the Root of *Sonchus asper* under Cadmium and Lead Stress in the Intercropping System with RNA-Seq

PU Linlong, MEI Xinyue, ZHAN Fangdong, ZU Yanqun, LI Yuan

(College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] In order to explore the cadmium and lead absorption, transportation and binding mechanisms by *Sonchus asper* root, for the further analysis of the differential expression genes and discovering the heavy metal tolerance related genes and heavy metal transported related gene of the heavy metal hyperaccumulators in the transcriptome, this study was conducted. [Method] RNA-Seq was employed to analyze the transcriptional profiles of root tissue in intercropping system. [Result] After Illumina HiSeq™ 2000 transcriptome sequencing and *De novo* assembling, we got 19.23 GB filtered raw data and 65 357 Unigenes; After analyzing the significantly expressed genes, we got 52 up-regulated and 116 down-regulated genes. 44 059 Unigenes were severally matched to the Nr,

收稿日期: 2017-02-15

修回日期: 2017-04-20

网络出版时间: 2018-04-10

*基金项目: 国家自然科学基金(41461093); 国家自然科学基金—云南省联合基金项目(U1202236); 云南省农田无公害生产科技创新团队(2017HC015)。

作者简介: 蒲麟陇(1988—), 男, 四川阆中人, 在读硕士研究生, 主要从事土壤重金属污染修复研究。

E-mail: pu.linlong@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 李元(1963—), 男, 云南大姚人, 博士, 教授, 主要从事紫外辐射生态学、重金属污染生态修复等研究。E-mail: liyuan@ynau.edu.cn

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201702021](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201702021)

Swiss-Prot and KGO and KEGG databases by blasting. [**Conclusion**] Intercropping significantly enhanced biomass, Cd and Pb contents, and heavy metal transfer coefficient of *S. asper*. Gene ontology enrichment analysis showed that intercropping made the *S. asper* taking significant effect on genes expression of up taking, transporting, binding Cd and Pb, and binding and up taking function were enhanced, and DEGs were classified into biological process, cellular component and molecular function, respectively. KEGG pathway enrichment analysis revealed that the DEGs were mainly involved in Biotin metabolism, oxidative phosphorylation and Regulation of autophagy pathways.

Keywords: intercropping; *Sonchus asper*; heavy metals; transcriptome

转录组是指特定组织或细胞在某一发育阶段或功能状态下转录出来的所有 RNA 的总和, 主要包括 mRNA 和非编码 RNA (non-coding RNA, nc RNA)^[1-2]。转录组学研究可用来确定基因的转录结构、剪接模式和转录后修饰, 研究不同发育时期或不同条件下转录本在生物体内表达水平的变化, 揭示基因表达与生物表型的内在关系。转录组学的研究方法主要包括基于杂交和基于测序的方法^[3]。“测序法”包括基于标签序列代表基因的方法, SAGE, CAGE, MPSS 以及基于高通量测序的和 *De novo* 序列拼接。基于高通量测序的 RNA-Seq 技术可以对几乎全部的 RNA 转录本进行分析。利用 *De novo* 拼接方法进行的非模式生物转录组研究涵盖了动物、植物、微生物等不同生物界的多个物种^[4-6]。

间作是中国传统的种植方式, 植物种间互作可以对重金属吸收积累产生影响。大量研究成果表明^[7-11]: 将超积累植物与作物间作, 通过根系互作既能够提高超积累植物对重金属的吸收积累效率, 又可以降低作物对重金属的吸收, 达到充分利用和修复重金属污染农田的目的, 对当前中国的农村环保问题和农产品安全问题具有现实的指导意义。

续断菊 (*Sonchus asper* L. Hill.) 是新近发现的一种重金属镉、铅的超积累植物, 为菊科苦苣菜属的双子叶植物^[12-13]。研究表明^[7]: 续断菊/玉米间作促进了续断菊对镉的积累量, 同时抑制了玉米各部位镉的积累量; 重金属镉、铅在土壤中被玉米与续断菊吸收以后, 对于续断菊地上部主要积累镉, 地下部主要积累铅。为了揭示续断菊/玉米间作对重金属镉、铅的吸收、转运、固定机制, 本研究旨在探明续断菊根组织基因表达对

镉、铅胁迫条件下续断菊/玉米间作的响应特征, 以期从分子水平对间作植物重金属污染修复的机理进行解释。

1 材料与方法

1.1 试验设计

盆栽试验在室温条件下进行, 设续断菊单作、续断菊/玉米间作两个处理, 每个处理 5 个重复, 盆间距 5 cm, 随机排列整齐。试验土壤为红壤, 土壤背景值为全氮 1.54 g/kg, 全磷 1.75 g/kg, 全钾 7.44 g/kg, 碱解氮 59.98 mg/kg, 速效磷 28.2 mg/kg, 速效钾 122 mg/kg, CEC 28.2 cmol/kg, 有机质 16.1 g/kg, 镉含量 11.76 mg/kg, 铅含量 600 mg/kg 和 pH 值 5.5。选择续断菊营养生长期样品, 单作续断菊 (MS)、与玉米间作的续断菊 (IS) 两个处理的续断菊地上部分 (shoot, S)、地下部分 (root, R)、MS-S-1、MS-S-2、MS-S-3; MS-R-1、MS-R-2、MS-R-3; IS-S-1、IS-S-2、IS-S-3; IS-R-1、IS-R-2、IS-R-3 分别测定重金属镉、铅含量。单作续断菊、玉米续断菊间作两个处理的续断菊根组织, MS-1、MS-2、IS-1、IS-2, 每个样品 2 g 左右, 液氮速冻 -80 ℃ 后, 置于干冰中保存, 每个样品单独提取 RNA, 分别用于转录组测序和分析。

1.2 Cd、Pb 含量测定与分析

植物生物量的测定: 采样时将续断菊分成地上和地下两部分, 分别用自来水冲洗后, 再用去离子水冲洗干净, 晾干后于 105 ℃ 杀青 30 min, 然后 70 ℃ 烘干至恒重, 分别测定干物质量。

植物 Cd、Pb 含量测定: 称取过 0.25 mm 筛的均匀样品 0.5 g 置于 150 mL 三角瓶中, 用少量去离子水湿润样品, 加浓硝酸 10 mL, 低温加热至微沸 (140~160 ℃), 待棕色氮氧化物基本赶走

后, 取下冷却, 沿壁加入高氯酸 5~10 mL, 继续加热消化呈灰白色糊状, 取下冷却, 加去离子水过滤到 50 mL 容量瓶中定容。将定容后的溶液转移到小白瓶中, 用火焰原子分光光度计测定 Pb、Cd 含量。Cd、Pb 转运特征用转运系数和有效转运系数表示^[14]:

转运系数=植物地上部含量/地下部分含量;

有效转运系数=(植物地上部含量×地上部生物量)/(地下部分含量×地下部分生物量)。

1.3 RNA 测序

总 RNA 提取采用 Trizol 试剂提取法提取, 成功提取的总 RNA 于 -80 °C 保存。之后, 用带有 Oligo (dT) 的磁珠富集 mRNA, 完成整个文库制备工作, 纯化后的 cDNA 经过一系列的前处理后, 用 Illumina HiSeq™ 2000 进行测序。测序获得的原始序列数据经初步过滤得到 clean data 或 clean reads, 对 Unigene 进行组装及结果质量评估: 用 N50 (将所有 Unigene 从长到短排序, 并依次累加长度。当累加片段长度达到所有 Unigene 的总长度的 50% 时, 对应那个片段的长度和数量, 即为 Unigene N50 长度和数量) 数值来评估, 基因 N50 越长, 数量越少, 说明组装质量越好。原始序列数据经过比对核糖体, 将 High quality clean reads 过滤所得数据作为后续分析的基础。用短 reads 比对软件 Bowtie 2^[15] 将 High quality clean reads 比对参考基因序列得到比对率。Unigene 表达量使用 RPKM 法 (Reads Per kb per Million reads) 计算, 得到的 Unigene 表达量可直接用于比较不同样品间的 Unigene 表达差异, 利用 log₂FC (即 log₂ Ratio (ISR/MSR)) 与 FDR 来筛选差异基因, 筛选条件为 |log₂FC|>1, 且 FDR<0.05。

1.4 Unigene 注释

Unigene 基本功能注释信息给出 Unigene 的蛋白功能注释、Pathway 注释、COG/KOG (蛋白相邻类的聚簇) 功能注释、Gene Ontology (GO, 基因本体) 功能注释等。用 WEGO 软件^[16] 对所有 Unigene 做 GO 功能分类统计, 以便从宏观上认识物种的基因功能分布特征。通过 BLASTX 将 Unigene 序列比对到蛋白数据库 Nr、SwissProt、KEGG (京都基因与基因组百科全书, 基因组破译方面的数据库) 和 COG/KOG (E-value<0.000 01)

(基因产物进行直系同源分类的数据库), 得到与给定基因具有最高序列相似性的蛋白, 从而获得该基因的蛋白功能注释信息。

1.5 Gene Ontology 功能显著性富集分析

Gene Ontology (简称 GO), 一个国际化的基因功能分类体系。GO 所提供的一套动态更新的标准词汇表 (controlled vocabulary), 可以全面描述生物体中基因和基因产物的属性。GO 功能分析既能给出差异表达基因的 GO 功能分类注释; 又能给出差异表达基因的 GO 功能显著性富集分析。GO 总共有 3 个 ontology, 分别描述基因分子功能 (molecular function)、所处细胞位置 (cellular component) 和参与生物过程 (biological process)。和参考基因比较后在差异表达基因中显著富集的 GO 功能条目, 筛选出与某些生物学功能显著相关的差异表达基因, 即 GO 功能显著性富集分析。再将符合质谱鉴定要求的序列在 Gene ontology 程序 (<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/blast.cgi>) 中进行功能分类。

1.6 Pathway 显著性富集分析

生物体内的不同基因, 只有相互协调才能行使其生物学功能, 基于 pathway 的分析有助于更进一步了解基因的生物学功能。KEGG 数据库 (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 是有关 pathway 的主要公共数据库, 是目前分析基因或者蛋白质参与代谢途径的有力工具。将前述试验获得的与代谢相关的序列在 KEGG 数据库中进行代谢途径的分析 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/program.inputFor-m.do?program=Annotate>)。基本操作如下: 将这些序列与 KEGG 中代谢途径的序列进行 BLAST 比对。比对结果筛选的标准为 E-value≤1e⁻⁵。Pathway 显著性富集分析以 KEGG pathway 为单位, 应用超几何检验, 找出与整个基因组相比较后差异表达基因中显著性富集的 pathway, 计算公式同 GO 功能显著性富集分析, 将 Q-value≤0.05 的 pathway 定义为在差异表达基因中显著富集的 pathway。通过 Pathway 显著性富集分析, 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。

2 结果与分析

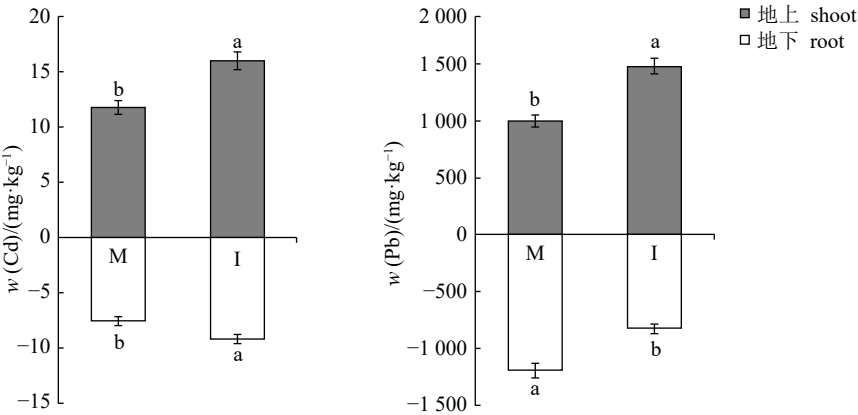
2.1 间作对续断菊 Cd、Pb 含量及转运系数的影响

间作使得续断菊地上部分、地下部分单株生物量均显著提高(表 1)，分别提高了 44.29%，23.26%；总生物量提高了 39.34%。在镉、铅胁迫条件下，

表 1 续断菊单株生物量 (mean±SD, n=3)
Tab. 1 The biomass of *S. asper* g

处理 treatment	地上部 shoot	地下部 root
间作 intercropping	2.02±0.15 a	0.53±0.05 a
单作 monoculture	1.40±0.11 b	0.43±0.03 b

注：不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)；下同。
Note: Different letters indicate significant difference ($P<0.05$); the same as below.



注：M.单作；I.间作；不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)；下同。
Notes: M. monoculture; I. intercropping; Different letters indicate significant difference ($P<0.05$); the same as below.

图 1 续断菊 Cd、Pb 含量 (n=3)
Fig. 1 The contents of Cd and Pb in *S. asper*

作分别提高了 13.33%、125.00%；有效转运系数

表 2 续断菊 Cd、Pb 转运系数
Tab. 2 The transport coefficients of *S. asper*

重金属 heave metal	处理 treatment	转运系数 the transport coefficients	有效转运系数 the effective transport coefficients
Cd	I	1.7	6.5
	M	1.5	4.9
Pb	I	1.8	6.9
	M	0.8	2.7

分别提高了 32.65%、155.56%。

2.2 测序质量控制及组装基因

对两次平行的结果进行了相关性分析(图 2)，同一样本两次平行之间 RPKM 分布集中于对角线，相关系数比较高。皮尔森相关系数：间作(IS)为 0.661 7，单作(MS)为 0.893 6，间作、单作处理的两个重复样本重复性较好，为试验数据的可信度提供了保障。

单作、间作处理续断菊根 (MS-1、MS-2、IS-

间作、单作模式下的续断菊生物量均为地上部分>地下部分。

间作对续断菊 Cd、Pb 含量产生了显著影响(图 1)。与单作相比，间作使续断菊地上部、地下部 Cd 含量显著增加，分别增加了 35.81%、19.71%；地上部 Pb 含量显著增加，增加了 48.55%；地下部 Pb 含量显著降低，降低了 30.91%。

间作使得续断菊对 Cd、Pb 的转运产生了影响。由表 2 可见：间作续断菊 Cd、Pb 转运系数和有效转运系数均比单作提高了，转运系数比单

1 和 IS-2) 高通量测序获得 19.23 GB 的过滤后数据。通过 Trinity^[17]组装(表 3)共得到 65 357 个基因，单作平均 54 277 (83.05%)、间作平均 52 642 (80.55%)。组装的碱基总数为 46 746 003 个，其中最长 12 075 nt，长度为 200~299 nt 的最多，有 19 144 个。有 11~100 个 reads 的基因数为 24 996 个。本次测序 N50 为 1 095，说明组装质量非常好。所有样品检测基因数目为 56 762 个，占参考基因总数的 86.85%，其中样品的 reads 在基因上的覆盖 80%~100% 的基因分别为 51 763、46 633、39 575 和 46 521 个。

2.3 Unigene 基本注释统计

2.3.1 大数据库注释统计

如图 3 所示：续断菊 65 357 个 Unigene 与 Nr、Swissprot、KOG 和 KEGG 四大数据库分别比对到 42 869、33 322、27 895、18 592 个，获得注释的 Unigene 一共 44 059 个，未获得注释的

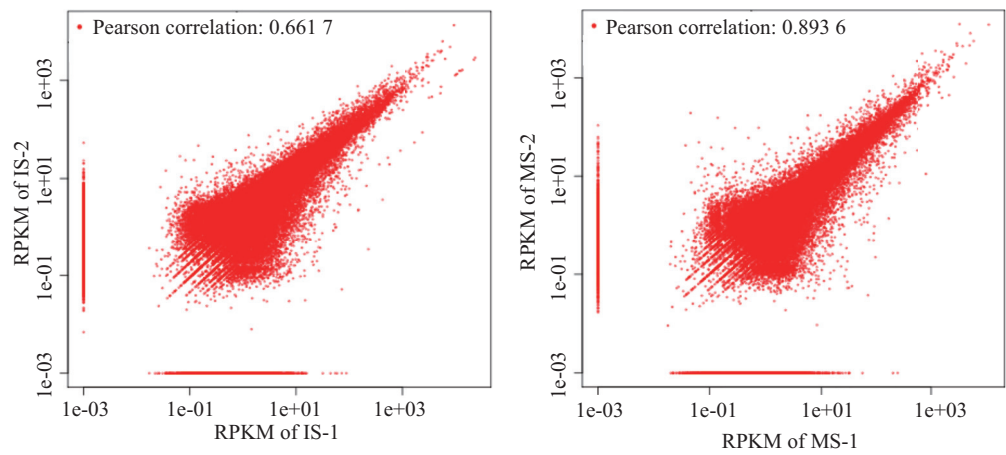


图 2 样品间重复性分析结果

Fig. 2 Result of sample repeatability analysis

表 3 组装结果数据统计

Tab. 3 Statistic of assembly result

项目 items	MS-1	MS-2	IS-1	IS-2
原始 reads 总数量 total number of raw reads	39 729 206	38 434 668	37 380 586	40 691 148
过滤后总 reads 数量 (占原始 reads 总数比例/%) total number of reads after filter (ratio)	39 111 218 (98.44)	37 846 702 (98.47)	36 793 754 (98.43)	40 064 300 (98.46)
原始碱基总长度/bp total base-pairs	4 966 150 750	4 804 333 500	4 672 573 250	5 086 393 500
过滤后碱基总长度/bp total base-pairs after filter	4 888 902 250	4 730 837 750	4 599 219 250	5 008 037 500
样品表达的基因数目 (占基因总数比例/%) genes number (ratio)	51 360 (78.58)	48 493 (74.2)	46 090 (70.52)	48 784 (74.64)

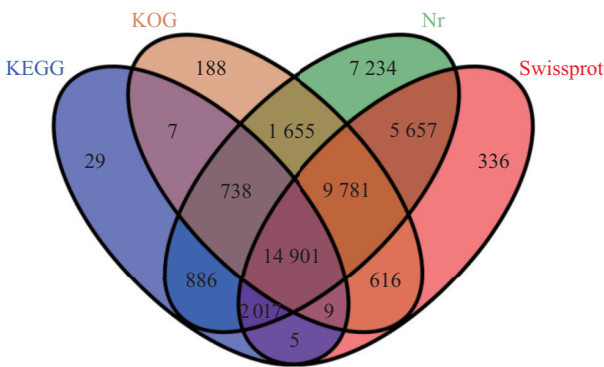


图 3 四大数据库注释维恩图

Fig. 3 Venn diagram of four databases

有 21 298 个；在四大数据库中均注释到的 14 901 个，占注释到的 31.98%。

2.3.2 物种分布统计

与 Nr 蛋白数据库比对，有 3 926 个 Unigene 与葡萄 (*Vitis vinifera*)、3 126 个与芝麻 (*Sesamum indicum*)、2 471 个与可可树 (*Theobroma cacao*) 等植物的序列同源 (图 4)。

2.3.3 KOG 功能分类

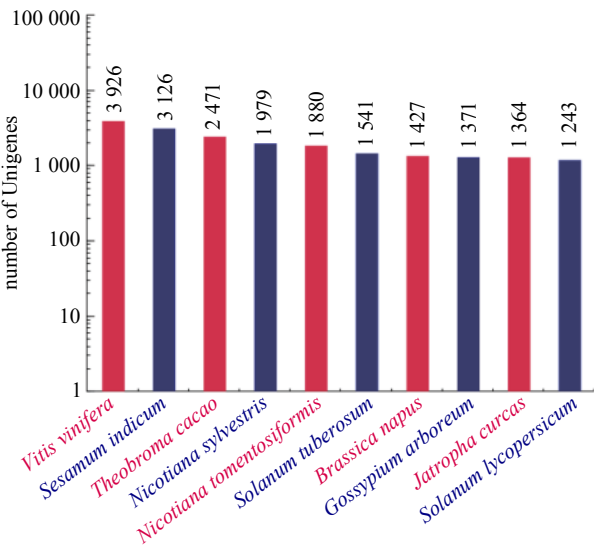


图 4 物种分布统计图

Fig. 4 Statistics of species distribution

Unigene 在 KOG (真核生物进行 KOG 注释) 功能分类体系中，获得功能注释涉及功能类别，其中翻译后修饰 (posttranslational modifica-

tion), 蛋白质转换 (protein turnover), 伴侣蛋白、分子 (chaperones) 5 531 个, 信号转导机制 (signal transduction mechanisms) 4 892 个, 翻译 (translation), 核糖体结构和生物合成 (ribosomal structure and biogenesis) 2 712 个和 RNA 加工与修饰 (RNA processing and modification) 2 518 个。

2.4 功能显著性富集分析

2.4.1 GO 功能显著性富集分析

续断菊间作处理与单作相比, 共 168 个差异 Unigene (图 5), 上调基因 52 个, 下调基因 116 个。将差异基因进行分类, 可分为生物过程、细胞组分和分子功能三大类, 分别包含了个 13、8、9 个功能组。生物过程 12 类基因下调、9 类基因上调; 细胞组分 8 类基因下调、7 类基因上调; 分子功能 7 类基因下调、6 类基因上调。

生物功能中, 参与代谢过程的上调基因数 12 个、下调基因数 24 个。其次, 参与细胞过程的上调基因数 8 个、下调基因数 16 个; 参与单一的生物过程的上调基因数 7 个、下调基因数 18 个; 参与定位的上调基因数 2 个、下调基因数 11 个; 参与生物调节的上调基因数 1 个、下调基因数 10 个; 参与刺激响应的上调基因数 1 个、下调基因数 9 个; 参与发育过程、细胞组成组织或生物合成的上调基因数均为 1 个、下调基因数均为 2 个。参与多细胞生物过程的只有 1 个上调基因, 多生物过程、信号、免疫系统进

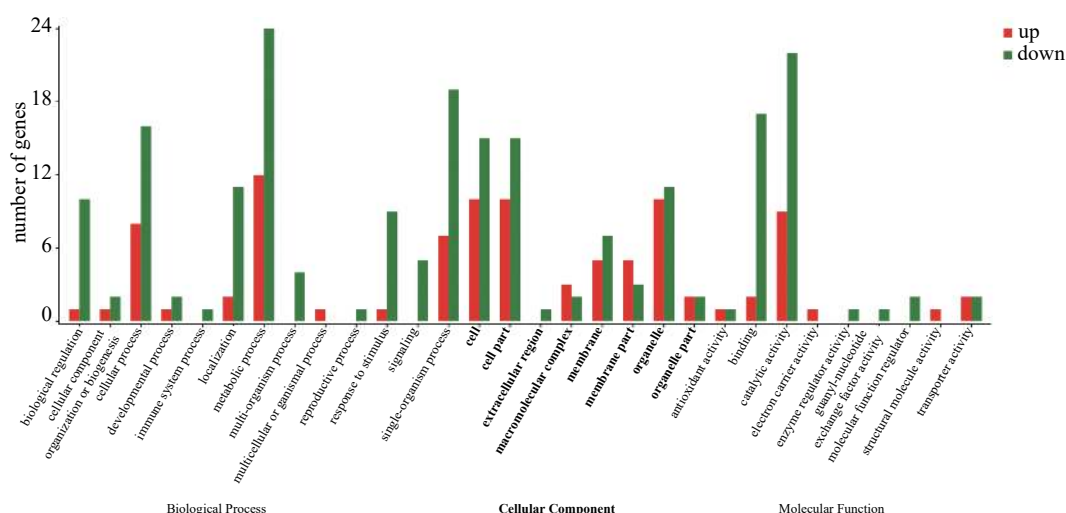
程、生殖过程的只有下调基因, 分别为 4 个、5 个、1 个、1 个。

细胞组分中, 参与细胞的上调基因数 10 个、下调基因数 15 个; 参与细胞组成的上调基因数 10 个、下调基因数 15 个; 参与细胞器的上调基因数 10 个、下调基因数 11 个, 均有上下调且下调基因数目较多。参与细胞膜的上调基因数 5 个、下调基因数 7 个; 参与细胞膜组成的上调基因数 5 个、下调基因数 3 个; 参与高分子复合物的上调基因数 3 个、下调基因数 2 个; 参与细胞器部分的上调基因数 3 个、下调基因数 2 个。参与胞外区的只有 1 个下调基因。

在分子功能中, 参与催化剂活性的上调基因数 9 个、下调基因数 22 个; 参与结合的上调基因数 2 个、下调基因数 17 个; 参与转运体活性的上调基因数 2 个、下调基因数 2 个; 参与抗氧化活性的上调基因数 1 个、下调基因数 1 个。参与电子载体活性的上调基因数 1 个; 参与结构分子活性的上调基因数 1 个。参与分子功能调节的下调基因数 2 个; 参与鸟嘌呤核苷酸交换因子活性的下调基因数 1 个; 参与酶调节活性的下调基因数 1 个。

2.4.2 Pathway 显著性富集分析

利用超几何检验的方法对差异表达的 Pathway 富集进行分析, 将 $P \leq 0.05$ 的 pathway 进行



注: up 表示间作的基因表达上调; down 表示间作的基因表达下调。

Notes: Up means the up regulation of genes after intercropping; down means the down regulation of genes after intercropping.

图 5 续断菊组间 GO 功能分类图汇总

Fig. 5 MSR-VS-ISR functional classification of GO

统计分析 (表 4), 我们得到了 5 个差异表达基因中显著性富集的路径, 有 2 个差异基因参与生物素代谢途径, 有 4 个差异基因参与氧化磷酸化途径; 有 2 个差异基因参与自噬调控途径; 有 2 个

差异基因参与不饱和脂肪酸生物合成途径; 有 3 个差异基因参与氨基糖与核苷酸糖代谢途径。

内吞作用 P 值为 0.262 721(>0.05), 在统计学上虽然不显著, 但有 2 个差异基因参与内吞作用

表 4 间作处理差异基因的 Pathway 显著性富集分析
Tab. 4 Pathway significant enrichment analysis of differential gene of intercropping

路径编号 pathway ID	路径 pathway	差异基因 DEGs with pathway annotation (25)	全部基因 all genes with pathway annotation (10 365)	P 值 P value
ko00780	生物素代谢 biotin metabolism	2(8%)	50(0.48%)	0.006
ko00190	氧化磷酸化 oxidative phosphorylation	4(16%)	375(3.63%)	0.012
ko04140	自噬调控 regulation of autophagy	2(8%)	86(0.83%)	0.018
ko01040	不饱和脂肪酸生物合成 (无图) biosynthesis of unsaturated fatty acids (no map in kegg database)	2(8%)	105(1.01%)	0.026
ko00520	氨基糖与核苷酸糖代谢 amino sugar and nucleotide sugar metabolism	3(12%)	283(2.73%)	0.030
ko04144	内吞作用 endocytosis	2(8%)	413(3.98%)	0.263

表 5 调控内吞作用的差异基因表达
Tab. 5 Differentially expressed genes of endocytosis

差异表达基因 differentially expressed genes	单作表达量 MSR _rpkm	间作表达量 ISR _rpkm	差异倍数 log ₂ Ratio (ISR/MSR)	P 值 P value	FDR 检验的 P 值 FDR	显著性 significance	基因描述 description
Unigene0003926	2.217	0.001	-11.11	6.50E-05	0.027 6	yes	ADP 核糖基化因子 1 [蓝藻] ADP-ribosylation factor 1 [<i>Monoraphidium neglectum</i>] 预测: 热激蛋白 70 [青梅]
Unigene0030401	1.665	0.001	-10.70	5.24E-07	0.001 0	yes	predicted: heat shock 70 ku protein [<i>Prunus mume</i>]

途径, 表达显著, 且与本研究内容关联性很强, 所以将其单独列出 (表 5)。

3 讨论

转录组测序技术是用来研究某一生物对象在特定生物过程中基因表达差异的技术, 结合了转录组文库实验方法与数字基因表达谱的信息分析手段, 可广泛应用于动植物生理调控、农作物安全生产和环境污染生物修复等重要领域。同水稻、玉米、拟南芥等植物相比, 续断菊分子基础研究薄弱、遗传背景了解较少、对重金属修复的分子机理尚未被阐明。近年来, 基于 Illumina 测序平台的转录组测序技术被广泛应用, 为快速而高效地搭建植物分子基础平台提供了更优的方法。

3.1 间作对续断菊吸收、转运、结合重金属的影响

大量研究表明: 超累积植物与作物的间作可以同时

对重金属污染土壤修复和进行农作物生

产, 既有超累积植物对污染土壤中重金属的提取作用, 又有防止农产品可食用部分重金属超标的作用。
超累积植物伴矿景天与丝瓜间作^[18], 可用于镉低污染土壤进行边修复边生产; 麦季间作伴矿景天^[19], 既能降低土壤中重金属镉、锌浓度又能减少小麦重金属安全风险; 间作方式可提高富集植物油菜对重金属镉的提取效率^[20], 这种方式相当于使用了化学螯合剂的螯合诱导植物修复方式。玉米间作超累积植物续断菊^[7], 地上部主要积累镉, 地下部主要积累铅, 续断菊间作玉米, 促进了续断菊对镉的积累量, 同时抑制了玉米各部位镉的积累量。超累积植物和作物间作, 富集植物既能减少作物对重金属的吸收量, 又能明显提高超富集植物吸收、累积和转运重金属的效率^[14]。原因可能是间作体系增加了植物地上部和根部的生物有效性, 改善了生态功能, 改变了根

际环境和根系分泌物的种类和数量, 从而影响了续断菊基因的表达。

总之, 间作对续断菊吸收、转运、结合重金属作用的影响有可能是多方面相互作用的结果, 具体的作用机制还有待进一步证实。

3.2 间作对续断菊基因差异表达的影响

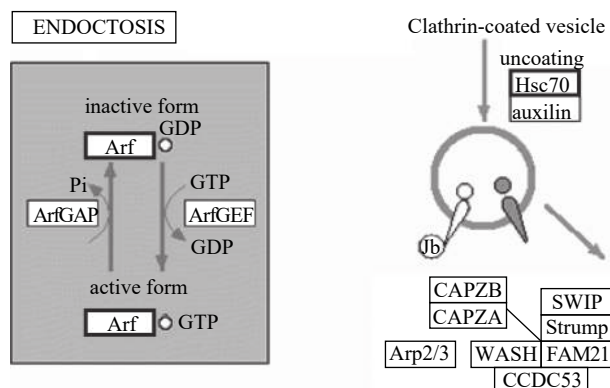
镉、铅不是植物生长发育过程中的必需元素, 一定浓度的镉、铅对植物具有毒害作用, 植物生长会受到抑制^[7, 21]。参与生物学过程中的代谢过程上调基因数和下调基因数最多, 说明间作对续断菊的代谢具有一定的调节作用, 可能是受到重金属胁迫的影响。研究表明: 已发现的与植物中镉离子转运有关的 ABC 转运体家族基因主要是 PDR 亚族和 MRP 亚族成员^[22], 金属硫蛋白 (MT) 基因能够增加植物对镉的耐性^[23]。分子功能的催化剂活性功能和结合功能的差异基因数较多, 说明间作可能使得续断菊对重金属镉、铅的结合和吸收功能增强。转运功能的控制基因也出现上下调, 表明间作使得续断菊对重金属镉、铅的转运功能强弱程度发生了变化。本试验差异表达基因的筛选标准为 $|\log_2FC| > 1$, 且 $FDR < 0.05$, 因此可能还有部分对续断菊吸收、转运、结合重金属进行调控的基因, 但不符合标准而未被筛选到。

综上所述, 间作能使续断菊的多生物过程、信号、免疫系统过程、生殖过程、分子功能调节、鸟嘌呤核苷酸交换因子活性、酶活性调节、胞外区相关的基因均下调, 对续断菊的信号传递、免疫功能、生殖功能、酶活性调节功能等可能具有抑制作用。多细胞生物过程、电子载体活性、结构分子性能相关的基因均是上调的, 可能促进了续断菊细胞的分化、金属的转运, 提高了续断菊金属胁迫的抗逆性。此外, 参与续断菊的定位、代谢过程、单一的生物过程、刺激响应、发育过程、细胞过程、催化性能、结合、细胞、生物调节、转运体性能、细胞膜部分、高分子复合物、抗氧化活性、细胞膜、细胞组成组织或生物合成、细胞器部分的基因均有上下调, 影响续断菊响应刺激的性能、发育、代谢功能、抗氧化性能、转运能力、对金属的结合功能、细胞膜功能等。间作对续断菊基因差异表达的影响的机理机制还有待进一步研究和挖掘证实。

3.3 基因差异表达对续断菊吸收、转运、结合重金属的影响

自噬是真核生物细胞内一个进化保守的分解代谢过程^[24], 能够帮助有机体抵抗各种环境胁迫: 通常情况下, 自噬的发生过程主要涉及自噬相关同源蛋白的参与, 同时需要一系列胞质中蛋白和代谢小分子调控其发生水平; 此外, 某些受体蛋白还可以帮助自噬相关蛋白识别特定的降解底物包括某些受损的细胞器和蛋白质, 选择性自噬的发生以此为介导。自噬是一种生理机制^[25], 在饥饿 (氨基酸和营养因子缺乏的状态)、低氧和代谢应激的刺激下, 作为一种临时的生存手段, 自噬为生物大分子循环提供了另一种途径; 而持续、过量的细胞应激诱导的自噬将导致细胞死亡。自噬分离胞质内容物可通过形成双层膜完成, 该过程受 ATG 蛋白的逐级调控^[26]。高玲等^[27]研究镉胁迫对拟南芥的毒害作用时发现: 在镉胁迫的初期, 会观察到自噬的发生; 随着处理时间的延长, 植物细胞内累积了大量的 ROS 和镉离子, 当植物不足以通过自噬途径抵抗胁迫时, 就会导致生长受阻最终对光合系统造成损伤。

因而, 自噬是一种保护机制, 保护细胞免受损伤。可能当低剂量或短时间镉暴露时, 自噬是一种生存机制; 当保护性的自噬反应超过细胞阈值时, 反而会破坏细胞结构和功能的完整性, 此时自噬或者与凋亡联合, 再或者通过独立的通路导致细胞死亡^[28]。自噬的这种双重作用究竟是通过何种途径来实现的, 自噬与重金属吸收的关系, 目前还不十分清楚。内吞作用路径中 (图 6),



注: 黑色加粗线框代表下调的基因。

Note: The bold black line frame means down regulation of genes after intercropping.

图 6 参与内吞作用的路径图

Fig. 6 Pathway of endocytosis participation

Unigene0003926 参与了 Arf 的调节, Unigene-0030401 参与了 Hsc70 的调节。

ADP 核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, Arf) 是一类小 GTP 水解酶^[29], 通过特定反应将 GTP 水解为 GDP, 释放出高能磷酸键, 为细胞内某些特定生理过程的发生提供了能量。在模式植物拟南芥中^[30], 共有 21 个基因编码 Arf 蛋白, 它们与小鼠脑中的 Ras 类似蛋白、Ras 同源蛋白和 Ras 相关核蛋白等其他类型小 GTP 水解酶参与内涵体、液泡、反面高尔基体-后高尔基体囊泡、细胞极化、内质网-高尔基体系统、极性分泌、高尔基体-内质网逆转运等的形成或运输过程。对大多数非耐性或非超积累植物而言, 根系所吸收的铅大部分被固定在根系组织 (比例大约为 95% 或更高), 仅有少部分铅可借助共质体途径向地上部输送并累积; 超积累植物具有向地上部转运重金属的能力, 某些铅超积累植物能将较高浓度的铅转运到地上部而不对植物基本代谢功能造成损害^[31]。利用 X 射线微分析技术发现, 浮萍 (*Lemna minor*) 根分生组织的液泡内存在许多含铅的囊泡, 而细胞质中没有检测到铅, 由此推测内吞作用参与了铅向胞内的转运^[31-32]。但内吞作用与重金属吸收、转运的关系还有待进一步研究。

近年来的研究发现: 植物热激蛋白 (heat shock protein, Hsp) Hsp70 不仅受高温诱导, 而且干旱、高盐、高寒、重金属、化学物质、激素等多种逆境都能对其进行诱导, 并且一旦产生, 植物的抗逆性将大大增强。因而, 深入了解植物 Hsp70 的基因结构、调控机理和生物学功能, 可进一步揭示植物在应对环境胁迫下的适应机理, 为降低逆境对植物的伤害提供理论指导^[33]。热激蛋白同系蛋白 (heat shock cognate, Hsc) 参与一些重要的细胞生理活动^[34], 在正常状态下 Hsc70 参与新生肽的运转、折叠及促进蛋白质复合体的组装。Hsp70 是热激基因转录中的重要调节因子, Ca^{2+} 是 HSF 的激活信号, 研究表明^[35]: 玉米细胞质 Hsc70 能在 Ca^{2+} 存在的条件下与钙调素结合, 且具有典型的 CaM 结合蛋白特性, 这两种在细胞生理功能上都十分重要的蛋白的相互作用可能对细胞生命活动有十分重要的意义。Unigene-0003926 和 Unigene0030401 对于续断菊内吞作用的具体作用机制还有待进一步研究证实。

此外, 间作对续断菊基因差异表达影响了续断菊对重金属镉、铅的吸收、转运、结合系列作用的机制还需对转录组测序的数据进行深入挖

掘, 待进一步证实。

4 结论

间作显著提高了续断菊生物量、镉铅含量和转运系数。间作对续断菊根中重金属镉、铅的吸收、转运和结合的相关基因表达量有显著影响, 影响了续断菊对重金属的吸收、转运、结合的作用, 续断菊结合和吸收重金属的功能增强; 内吞作用对续断菊转运重金属具有重要影响。研究结果为进一步明确间作对续断菊重金属吸收、转运、结合的调控机制以及挖掘新的相关基因提供了数据资源。

间作体系修复是土壤重金属污染修复一条行之有效的途径, 植物间相互作用的分子机理尚不清楚, 需要加强研究。间作续断菊对重金属的修复能力会随生育进程而发生变化, 各时期的研究结果和规律也可能不尽相同, 因而需要加强植株生长全生育期的动态性研究。

转录组测序技术作为植物功能基因组研究的重要手段, 可在续断菊功能基因的挖掘中发挥重要作用; 这些基因的发现为续断菊的转录组研究提供了基础数据, 同时也为续断菊对重金属吸收、转运、结合的研究奠定了基础。

本研究采用基于 RNA-Seq 数据的 *De novo* 分析与组装, 获得了较好质量的续断菊转录组信息, 有新基因发现、基因克隆、表达谱分析、QTL 定位等多种用途, 为以后功能基因的发掘和基因组研究等对续断菊分子生物学提供了重要的依据, 同时也可为非模式作物的 RNA-Seq 研究和 *De novo* 组装提供新思路。

[参考文献]

- [1] COSTA V, ANGELINI C, DE FEIS I, et al. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq[J]. Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2010(5757): 853916. DOI: 10.1155/2010/853916.
- [2] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. Nature Reviews Genetics, 2009, 10(1): 57. DOI: 10.1038/nrg2484.
- [3] 肖之夏, 郑用琰. 大刍草苗期转录组 RNA-Seq 数据的 *de novo* 拼接[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(2): 15. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2421.2014.02.003.
- [4] 何涛, 王端青, 胡亚欧, 等. 基于 RNA-Seq 数据识别果蝇剪接位点和可变剪接事件[J]. 中国科学 (生命科学), 2011(10): 1016.
- [5] 李滢, 孙超, 罗红梅, 等. 基于高通量测序 454 GS

- FLX 的丹参转录组学研究[J]. 药学学报, 2010(4): 524.
- [6] 蔡元锋, 贾仲君. 基于新一代高通量测序的环境微生物转录组学研究进展[J]. 生物多样性, 2013, 21(4): 401. DOI: [10.3724/SP.J.1003.2013.10031](#).
- [7] 谭建波, 陈兴, 郭先华, 等. 续断菊与玉米间作系统不同植物部位 Cd、Pb 分配特征[J]. 生态环境学报, 2015(4): 700. DOI: [10.16258/j.cnki.1674-5906.2015.04.023](#).
- [8] 杨晖, 梁巧玲, 赵鹏, 等. 7 种蔬菜型作物重金属积累效应及间作鸡眼草对其重金属吸收的影响[J]. 水土保持学报, 2012, 26(6): 209.
- [9] 李凝玉, 李志安, 丁永祯, 等. 不同作物与玉米间作对玉米吸收积累镉的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(6): 1369.
- [10] 蒋成爱, 吴启堂, 吴顺辉, 等. 东南景天与不同植物混作对土壤重金属吸收的影响[J]. 中国环境科学, 2009, 29(9): 985. DOI: [10.3321/j.issn:1000-6923.2009.09.017](#).
- [11] 谭建波, 湛方栋, 刘宁宁, 等. 续断菊与蚕豆间作下土壤部分化学特征与 Cd 形态分布状况研究[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(1): 53. DOI: [10.11654/jaes.2016.01.007](#).
- [12] 李元, 方其仙, 祖艳群. 2 种生态型续断菊对 Cd 的累积特征研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(6): 1150.
- [13] 秦丽, 祖艳群, 李元. Cd 对超累积植物续断菊生长生理的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(z1): 48.
- [14] 秦丽, 祖艳群, 湛方栋, 等. 续断菊与玉米间作对作物吸收积累镉的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013(3): 471.
- [15] LI R Q, YU C, LI Y R, et al. SOAP2: an improved ultra-fast tool for short read alignment[J]. Bioinformatics (Oxford, England), 2009, 25(15): 1966. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp336](#).
- [16] YE J, FANG L, ZHENG H K, et al. WEGO: a web tool for plotting GO annotations[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(Web Server issue): W293. DOI: [10.1093/nar/gkl031](#).
- [17] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(7): 644. DOI: [10.1038/nbt.1883](#).
- [18] 王京文, 蔡梅, 郑洁敏, 等. 丝瓜与伴矿景天间作对土壤 Cd 形态及丝瓜 Cd 吸收的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(12): 2292. DOI: [10.11654/jaes.2016-0825](#).
- [19] 居述云, 汪洁, 宓彦彦, 等. 重金属污染土壤的伴矿景天/小麦—茄子间作和轮作修复[J]. 生态学报, 2015, 34(8): 2181.
- [20] 卫泽斌, 郭晓方, 丘锦荣, 等. 间套作体系在污染土壤修复中的应用研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(z1): 267.
- [21] 陈会, 任艳芳, 陈秀兰, 等. 镉胁迫下不同耐性水稻植株幼苗生长和抗氧化酶的变化[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(6): 1099. DOI: [10.3969/j.issn.1000-2286.2012.06.005](#).
- [22] 张标金, 张祥喜, 罗林广. 与植物镉吸收转运相关的主要基因家族[J]. 基因组学与应用生物学, 2013(1): 127. DOI: [10.3969/gab.032.000127](#).
- [23] SEKHAR K, PRIYANKA B, REDDY V D, et al. Metallothionein 1 (CcMT1) of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) confers enhanced tolerance to copper and cadmium in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2011, 72(2): 131. DOI: [10.1016/j.envexpbot.2011.02.017](#).
- [24] 曾笑威, 刘翠翠, 韩凝, 等. 植物自噬的调控因子和受体蛋白研究进展[J]. 遗传, 2016, 38(7): 644. DOI: [10.16288/j.ycz.15-525](#).
- [25] 王棋文, 宋德荣, 刘其昌, 等. 镉诱导细胞自噬的研究进展[J]. 生物技术通报, 2015(10): 56. DOI: [10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.10.012](#).
- [26] DALBY K N, TEKEDEREI I, LOPEZ-BERESTEIN G, et al. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer[J]. Autophagy, 2010, 6(3): 322. DOI: [10.4161/auto.6.3.11625](#).
- [27] 高玲, 张卫娜, 陈文利. 镉胁迫对拟南芥的毒害作用及自噬现象的观测[J]. 生物物理学报, 2011, 27(8): 676.
- [28] CHIARELLI R, ROCCHERI M C. Heavy metals and metalloids as autophagy inducing agents: focus on cadmium and arsenic[J]. Cells (Basel, Switzerland), 2012, 1(3): 597. DOI: [10.3390/cells1030597](#).
- [29] SANTY L C, CASANOVA J E. GTPase signaling: bridging the GAP between ARF and Rho[J]. Current Biology, 2002, 12(10): R360. DOI: [10.1016/S0960-9822\(02\)00860-6](#).
- [30] 许峰, 闫素辉, 张从宇, 等. 小麦 *ArfGAP* 基因的克隆、半定量 RT-PCR 分析及原核表达[J]. 麦类作物学报, 2015, 35(12): 1631. DOI: [10.7606/j.issn.1009-1041.2015.12.04](#).
- [31] 段德超, 于明革, 施积炎. 植物对铅的吸收、转运、累积和解毒机制研究进展[J]. 应用生态学报, 2014, 25(1): 287.
- [32] SAMARDAKIEWICZ S, WOŹNY A. The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip[J]. Plant and Soil, 2000, 226(1): 107. DOI: [10.1023/A:1026440730839](#).
- [33] 王明强, 张道远. 植物热激蛋白 70 基因家族及其生物学功能研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2015(02): 421.
- [34] 李冰, 刘宏涛, 李国良, 等. 玉米细胞质 Hsc70 的分离纯化及其抗体的制备[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(5): 486.
- [35] 孙旭彤, 周人纲, 汤文强, 等. 玉米细胞质 Hsc70: 一种钙调素结合蛋白[J]. 植物学报, 1998(3): 105.

责任编辑: 何承刚