

根蘖与嫁接繁殖灵武长枣不同时期果实差异表达基因分析

杨荣 刘佳嘉*

宁夏大学林业与草业学院

摘要:【目的】研究灵武长枣根蘖繁殖与嫁接繁殖果实品质内在机理差异,为提高其果实品质提供基础研究。【方法】本研究以灵武长枣根蘖繁殖与嫁接繁殖白熟期(NB)、着色期(NZ)、成熟期(NC)和嫁接繁殖白熟期(JB)、着色期(JZ)、成熟期(JC)的果实作为试验材料,采用高通量测序技术进行果实转录组测序,筛选与根蘖和嫁接繁殖的灵武长枣果实品质差异相关的差异基因,初步探究根蘖和嫁接繁殖灵武长枣果实不同时期基因表达差异情况。【结果】结果表明,灵武长枣果实发育各时期组间分析对比中,果实白熟期(JB-vs-NB)、着色期(JZ-vs-NZ)、成熟期(JC-vs-NC)各组间分别筛选出 65、4509 和 1534 个差异基因。GO 功能富集到生物过程、分子功能和细胞组分三大类中的 50 个亚类中,KEGG 通路注释将差异基因显著富集在次生代谢物生物合成、代谢途径、氨基酸生物合成等通路中,成熟期差异基因富集在糖酸相关通路的显著性较高。【结论】在淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢,乙醛酸和二羧酸代谢、丁酸代谢 5 条与果实可溶性糖和总酸含量相关的代谢途径中筛选出了 ncbi_107424266、ncbi_107414286、ncbi_107425230、ncbi_107429837 等 31 个差异基因,分别在果实发育不同时期的糖酸代谢途径中差异表达,调控各时期果实中可溶性糖及总酸含量。

关键词: 灵武长枣; 根蘖繁殖; 嫁接繁殖; 差异基因。

Differential gene expression analysis of Lingwuchangzao jujube fruit at different stages of root tillering and grafting reproduction

Yang Rong Liu Jiajia*

College of Forestry and Prataculture, Ningxia University

Abstract: The differences in the internal mechanism of fruit quality between root tiller reproduction and grafting reproduction of 'Lingwuchangzao' jujube were studied to provide basic research for improving its fruit quality. In this study, the fruits of Lingwu long jujube root tiller reproduction and grafting reproduction at white maturity stage (NB), coloring stage (NZ), maturity stage (NC) and grafting reproduction at white maturity stage (JB), coloring stage (JZ) and maturity stage (JC) were used as experimental materials. High-throughput sequencing technology was used to sequence the fruit transcriptome. The differential genes related to the quality difference of Lingwu long jujube fruit of root tiller and grafting reproduction were screened, and the gene expression differences of Lingwu long jujube fruit of root tiller and grafting reproduction at different stages were preliminarily explored. The results showed that 65, 4509 and 1534 differential genes were screened out among the white ripe stage (JB-vs-NB), coloring stage (JZ-vs-NZ) and mature stage (JC-vs-NC) of Lingwu long jujube fruit. The GO function was enriched into 50 subcategories of three categories: biological process, molecular function and cellular component. The KEGG pathway annotation significantly enriched the differentially expressed genes in secondary metabolite biosynthesis, metabolic pathway, amino acid biosynthesis and other pathways. The differentially expressed genes in mature stage were significantly enriched in sugar and acid related pathways. Among the five metabolic pathways related to fruit soluble sugar and total acid content, starch and sucrose metabolism, galactose metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, glyoxylic acid and dicarboxylic acid metabolism, and butyric acid metabolism, 31 differential genes such as ncbi_107424266, ncbi_107414286, ncbi_107425230, ncbi_107429837 were screened out, which were differentially expressed in the sugar and acid metabolic pathways at different stages of fruit development, regulating the soluble sugar and total acid content in fruits at different stages.

Keywords : Lingwuchangzao jujube ; root tiller reproduction ; grafting propagation ; differential genes.

灵武长枣是宁夏重要的经济林树种，是优秀的鲜食枣品种，其果皮颜色鲜艳、口感脆甜多汁、营养丰富，受到广大消费者的青睐（李百云等，2021）。随着灵武长枣产业的蓬勃发展，消费者对于灵武长枣的果实品质也提出了更高的要求（刘孟军等，2022）。在实际生产中，灵武长枣主要采取传统的根蘖繁殖和嫁接繁殖两种方式进行繁殖（李振强等，2022）。根蘖繁殖可以保持母树抗旱、耐盐碱、容易成活的优良遗传特性，但所产出的根蘖苗数量有限（Zhang Z *et al*, 2016），生长速度缓慢，嫁接繁殖具有生长快、树势强、结果早等优势（Gaikwad S P *et al*, 2017），但生产及研究中都发现嫁接苗的枣果风味及营养品质不如根蘖苗，两种繁殖方式各有优劣，所以在生产中都有广泛的应用（万仲武等，2013；纪晴等，2015）。目前关于枣树不同繁殖方式下果实品质的差异性研究分析还较少，且多存在于物候期（陈丽华等，2020；Shifu C *et al*, 2018）、生长（李振强，2022）及叶片（MK G *et al*, 2020）等生长表现上，但对不同繁殖方式对枣树果实品质影响差异的内在机理研究较少。

本研究采集三个发育时期的灵武长枣果实提取 RNA，采用高通量转录组测序技术，比较两种繁殖方式下果实基因序列的差异，筛选与根蘖和嫁接繁殖的灵武长枣果实品质差异相关的差异基因，初步探究根蘖和嫁接繁殖灵武长枣果实营养品质和基因表达差异情况，以期为后续探明两种繁殖方式的灵武长枣果实品质差异调控机理提供基础研究参考。

1 试验材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于宁夏灵武市万亩设施果业基地（东经 106°15'3.95"，北纬 38°4'22.22"，海拔高度 1115 m），该地气候类型为大陆性季风气候，年平均气温 8.8 °C，年均降水量 206.2-255.2 mm。

1.2 试验材料

本试验供试样树为 8 年生灵武长枣根蘖植株和以酸枣为砧木的灵武长枣嫁接植株（嫁接时间一致），根蘖植株平均地径 83 mm、树高 2.45 m、冠幅 2.51×2.42 m，嫁接植株平均地径 89 mm、树高 2.63 m、冠幅 2.53×2.49 m。分别选取 5 株生长基本一致，无病虫害的灵武长枣根蘖植株和嫁接植株进行果实采集，在灵武长枣果实白熟期、着色期和成熟期时，每株采集 5 颗果实，各时期每个处理得到 25 颗果实，混合后作为试验材料。

1.3 高通量测序及数据分析

对所得的试验材料随机取样，并设置 3 个生物学重复，共得到 18 个样品。将样品送至广州基迪奥生物科技有限公司进行测序。样品编号分别为灵武长枣嫁接植株不同时期果实（JB, JZ, JC），灵武长枣根蘖植株不同时期果实（NB, NZ, NC）。基于 Illumina Novaseq 6000 测序平台，对样品的所有 mRNA 进行测序，采用 Illumina TruseqTM RNA sample prep Kit 方法进行文库构建。对转录组测序产生的原始数据进行质量监控，经过滤后得到高质量的 Clean Reads，利用 Trinity 软件对得到的 Clean Reads 进行拼接组装，将测序数据以冬枣基因组为参考基因组进行比对、注释。利用 R 语言 DESeq 数据包筛选差异表达的基因，以 FPKM=1 为基因表达标准，以 $FDR < 0.05$, $|\log_2 FC| > \log_2(2)$ 作为差异基因筛选条件。利用 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/>)和 The Gene Ontology Resource(<http://geneontology.org/>)数据库对差异基因进行注释,利用 R 语言完成 GO 和 KEGG pathway 显著性富集分析。

2 结果与分析

2.1 转录组数据质量检测

经过转录组测序、原始数据净化和质量过滤，从 18 个灵武长枣样品中，一共获得 138.26Gb 数据（表 1）。测序质量在 99 %和 99.9 %以上的碱基占总碱基的百分比（Q20,Q30）分别在 97.02 %和 91.81 %之上，GC 碱基含量（GC content）在 43.10 %~43.90 %之间，且单个碱基位置的测序错误率小于 1 %，说明根蘖与嫁接繁殖的灵武长枣果实各时期转录组的测序质量较高，数据可靠，可用于下一步数据分析。

表 1 质控数据统计表
Tab. 1 List of Pretreatment Results of Sequencing Data Quality

样本	原始数据	质控数据	Q20	Q30	N	GC
Sample	Raw Data (Gb)	Clean Data (Gb)				
JB-1	9.20	9.06	97.69%	93.48%	0.00%	43.35%
JB-2	8.07	7.95	97.70%	93.46%	0.00%	43.42%
JB-3	7.93	7.84	97.71%	93.50%	0.00%	43.31%
JZ-1	8.00	7.91	97.89%	93.93%	0.00%	43.89%
JZ-2	8.54	8.45	97.58%	93.18%	0.00%	43.87%
JZ-3	5.43	5.38	97.58%	93.24%	0.00%	43.69%
JC-1	5.91	5.85	97.15%	92.30%	0.00%	43.53%
JC-2	8.14	8.06	97.42%	92.72%	0.00%	43.72%
JC-3	8.25	8.17	97.66%	93.36%	0.00%	43.73%
NB-1	8.22	8.12	97.65%	93.28%	0.00%	43.18%
NB-2	8.63	8.54	97.55%	93.03%	0.00%	43.41%
NB-3	8.81	8.70	97.48%	92.91%	0.00%	43.10%
NZ-1	7.80	7.72	97.59%	93.18%	0.00%	43.81%
NZ-2	5.93	5.88	97.02%	91.81%	0.00%	43.73%
NZ-3	5.84	5.79	97.29%	92.59%	0.00%	43.90%
NC-1	8.30	8.22	97.96%	94.05%	0.00%	43.56%
NC-2	8.40	8.32	97.51%	93.03%	0.00%	43.73%
NC-3	8.39	8.30	97.54%	93.09%	0.00%	43.46%

将根蘖与嫁接繁殖的灵武长枣测序数据比对到参考基因组冬枣（NCBI_GCF_020796205.1）上，18 个样品的 Clean reads 与参考基因组的比对效率(Total mapped)在 93.77 %~95.10 %之间（表 2），比对到参考基因组唯一位置的 reads 在 89.73 % ~ 91.10 %之间，两种繁殖方式的灵武长枣果实与参考基因组的匹配率都较高，证明选择的参考基因组能够为本次分析实验提供正确可靠的背景信息。

表 2 与参考基因组比对情况表
Tab. 2 Comparison with Reference Genome

样本	总读长	未比对率	唯一比对率	多重比对率	总比对率
----	-----	------	-------	-------	------

Sample	Total	Unmapped(%)	Unique_Mapped(%)	Multiple_Mapped(%)	Total_Mapped(%)
JB-1	60759092	3253695 (5.36%)	55045499 (90.60%)	2459898 (4.05%)	57505397 (94.64%)
JB-2	53342530	2701873 (5.07%)	48443477 (90.82%)	2197180 (4.12%)	50640657 (94.93%)
JB-3	52475622	3096864 (5.90%)	47297104 (90.13%)	2081654 (3.97%)	49378758 (94.10%)
JZ-1	52980164	2638638 (4.98%)	48265671 (91.10%)	2075855 (3.92%)	50341526 (95.02%)
JZ-2	56573154	2897803 (5.12%)	51350292 (90.77%)	2325059 (4.11%)	53675351 (94.88%)
JZ-3	35963162	1872818 (5.21%)	32672597 (90.85%)	1417747 (3.94%)	34090344 (94.79%)
JC-1	39094038	2228509 (5.70%)	35327715 (90.37%)	1537814 (3.93%)	36865529 (94.30%)
JC-2	53977912	2781670 (5.15%)	49007938 (90.79%)	2188304 (4.05%)	51196242 (94.85%)
JC-3	54613124	2877104 (5.27%)	49572165 (90.77%)	2163855 (3.96%)	51736020 (94.73%)
NB-1	54405484	2740408 (5.04%)	49532442 (91.04%)	2132634 (3.92%)	51665076 (94.96%)
NB-2	57115288	2804652 (4.91%)	51956413 (90.97%)	2354223 (4.12%)	54310636 (95.09%)
NB-3	58277088	3029247 (5.20%)	52943383 (90.85%)	2304458 (3.95%)	55247841 (94.80%)
NZ-1	51669358	2534211 (4.90%)	46991031 (90.95%)	2144116 (4.15%)	49135147 (95.10%)
NZ-2	39321756	2017248 (5.13%)	35756980 (90.93%)	1547528 (3.94%)	37304508 (94.87%)
NZ-3	38686812	2409713 (6.23%)	34712818 (89.73%)	1564281 (4.04%)	36277099 (93.77%)
NC-1	55026004	2794045 (5.08%)	49861332 (90.61%)	2370627 (4.31%)	52231959 (94.92%)
NC-2	55645054	2949433 (5.30%)	50343554 (90.47%)	2352067 (4.23%)	52695621 (94.70%)
NC-3	55564412	2982470 (5.37%)	50372241 (90.66%)	2209701 (3.98%)	52581942 (94.63%)

基于表达量信息，利用 R 语言开展主成分分析（PCA，Principal Component Analysis），研究样本间的距离关系。如图 1 所示，主成分 PC1 的贡献率为 93.4%，主成分 PC2 的贡献率为 3.3%。三次生物学重复的样本聚集程度较高，表明不同重复间转录组数据的高度重现性和实验数据的可靠性，且不同组间存在良好的分离现象，说明三个生长发育时期基因表达量存在差异，为下一步实验奠定基础。

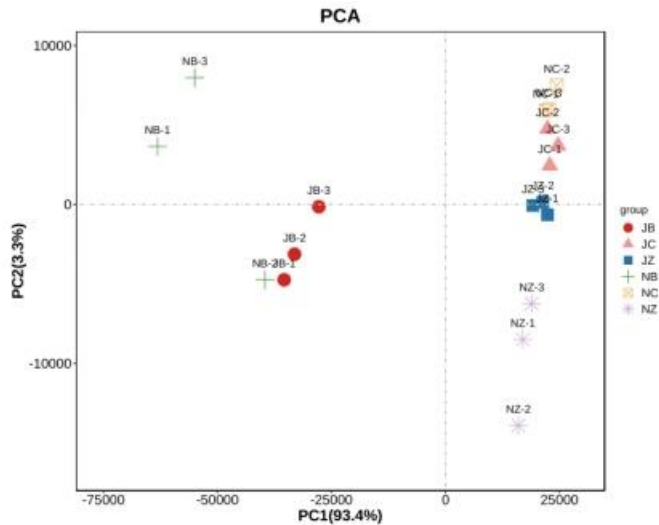


图 1 样本主成分分析
Fig. 1 Principal Component Analysis of Samples

2.2 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣不同时期差异基因表达量分析

不同发育时期灵武长枣果实差异基因表达量结果显示（图 2），两种繁殖方式的果实在白熟期（JB-vs-NB）的对比中共筛选到 65 个差异基因，其中上调表达的基因 30 个，下调表达的基因 35 个；着色期（JZ-vs-NZ）相比，得到 4509 个差异表达的基因，其中上调基因 2892 个，下调基因 1617 个；成熟期（JC-vs-NC）处理相比，筛选到 1534 个差异基因，包括 677 个上调基因，857 个下调基因。

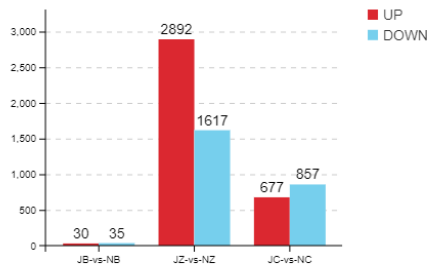


图 2 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育不同时期基因表达量统计图

Fig. 2 Statistical diagram of gene expression in Lingwuchangzao jujube fruit at different development stages propagated by tillers and grafting.

通过绘制不同发育时期灵武长枣果实差异基因表达量韦恩图发现（图 3），根蘖与嫁接繁殖的灵武长枣果实在白熟期（JB-vs-NB）有 39 个差异基因特异表达，着色期（JZ-vs-NZ）有 3938 个差异基因特异表达，成熟期（JC-vs-NC）有 976 个差异基因特异表达。根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育三个时期筛选出的共有差异基因有 7 个（表 3），分别是 MSTRG.1546、MSTRG.21442、MSTRG.9423、ncbi_107404917、ncbi_107423910、ncbi_107426831 和 ncbi_125420622，7 个差异基因目前未明确注释在 KEGG 途径中，其中 ncbi_107426831 和 ncbi_125420622 由 RAV 转录因子调控表达量，相关研究表明 RAV 转录因子在植物生长发育和抗逆反应调控中起着重要作用（Margarita H *et al.*,2017）。

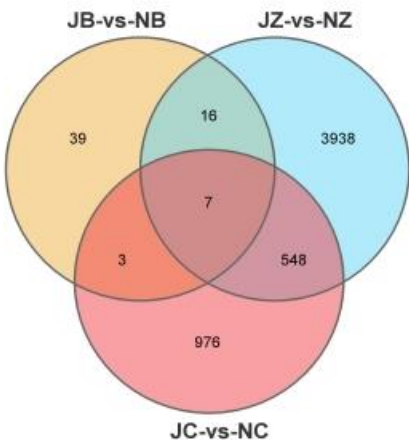


图 3 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育不同时期差异基因韦恩图

Fig. 3 Wayne diagram of gene expression in Lingwuchangzao jujube fruit at different development stages propagated by tillers and grafting.

表 3 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育不同时期共表达差异基因信息表

Table 3 Information Tables of Co-expression Differential Genes at Different Fruit Development Stages of LingwuChangzao by Root Tiller and Grafting Propagation

基因 ID	基因注释信息	转录因子家族
MSTRG.1546	假想蛋白 fnv 43 _ RR13411[红色毛鼠]	--
	hypothetical protein FNV43_RR13411 [Rhamnella rubrinervis]	
MSTRG.21442	环核苷酸门控通道 1[扁桃]	--
	cyclic nucleotide gated channel 1 [Prunus dulcis]	
MSTRG.9423	MuDRA 样转座酶[薄皮甜瓜][甜瓜]	--
	MuDRA-like transposase [Cucumis melo var. makuwa] [Cucumis melo]	
ncbi_107404917	XP_015888121.1 推定钙转运 ATP 酶 13, 质膜型[酸枣]	--
	XP_015888121.1 putative calcium-transporting ATPase 13, plasma membrane-type	
ncbi_107423910	[Ziziphus jujuba]	--
	XP_015889047.1 蛋白 LURP 酮-1 相关 6[酸枣]	
ncbi_107426831	XP_015889047.1 protein LURP-one-related 6 [Ziziphus jujuba]	RAV
	KAH7546188.1 假想蛋白 FEM 48 _ zijuj01G10174000	
ncbi_125420622	[酸枣变种][酸枣]	RAV
	KAH7546188.1 hypothetical protein FEM48_Zijuj01G0174000	
ncbi_125420622	[Ziziphus jujuba var. spinosa] [Ziziphus jujuba]	RAV
	假想蛋白 FEM 48 _ zijuj01G10174100[酸枣变种][酸枣]	
ncbi_125420622	KAH7546189.1 hypothetical protein FEM48_Zijuj01G0174100	RAV
	[Ziziphus jujuba var. spinosa] [Ziziphus jujuba]	

2.3 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣不同时期差异基因 GO 功能富集分析

根据根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育不同时期差异基因 GO 功能富集的结果显示(图 4),三个时期差异基因均注释到生物过程、分子功能、细胞组分 3 个类别中,白熟期(JB-vs-NB)、着色期(JZ-vs-NZ)、成熟期(JC-vs-NC)在 GO 数据库中分别鉴定出 203、20312、7176 个差异基因。在生物过程大类中,白熟期(JB-vs-NB)差异基因主要注释在细胞过程、代谢过程、刺激反应、生物调节、生物过程调节、定位、发育过程等 16 个亚类中,着色期(JZ-vs-NZ)差异基因注释在 29 个条目中,成熟期(JC-vs-NC)差异基因主要注释有 27 个条目。在分子功能大类中,JB 和 NB 组差异基因主要注释在结合、催化活性、转运活性、ATP 依赖性活性、转录调节因子活性、结构分子活性等 7 个亚类中,JZ 和 NZ 组差异基因注释在 18 个条目中,JC 和 NC 组中差异基因注释在 15 个条目中;在细胞组分大类中,JB 和 NB 组注释到细胞结构实体和含蛋白质复合体 2 个亚类中,分别有 21 和 5 个差异基因,JZ 和 NZ、JC 和 NC 注释在 3 个亚类中,包括细胞结构实体、含蛋白质复合体和病毒体成分。

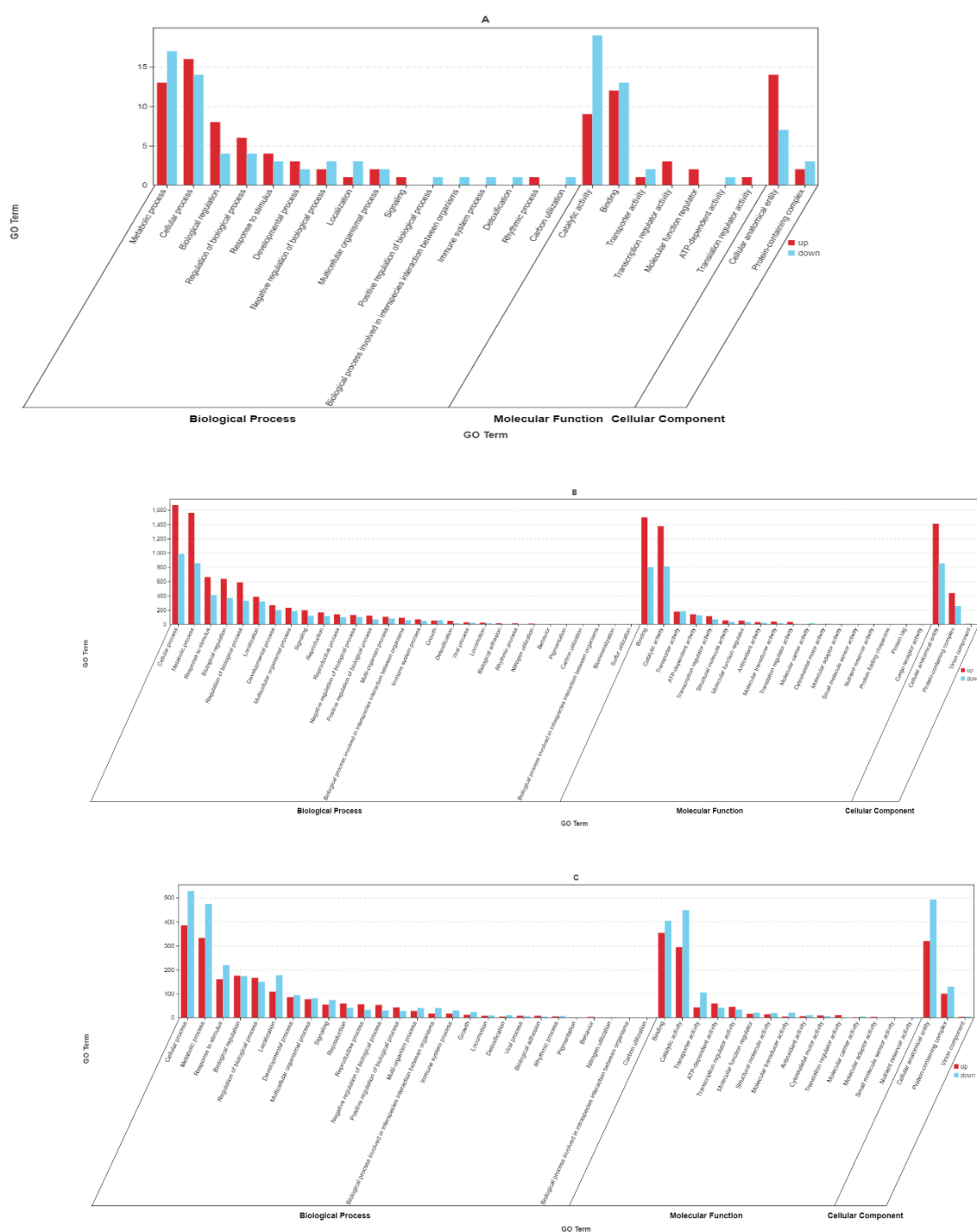


图4 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实不同发育时期差异基因 GO 富集图

A: JB-vs-NB; B: JZ-vs-NZ; C: JC-vs-NC

Fig. 4 GO Enrichment map of differential gene in different development stages of

Lingwu jujube propagated by tillers and grafting A: JB-vs-NB; B: JZ-vs-NZ C: JC-vs-NC

2.4 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣不同时期差异基因 KEGG 富集分析

对根蘖与嫁接繁殖灵武长枣不同时期筛选出的差异基因进行 KEGG 富集分析, 结果表明, 白熟期 (JB-vs-NB) (图 5A) 差异基因主要富集在次生代谢物生物合成、代谢途径、类胡萝卜素生物合成、淀粉和蔗糖代谢、乙醛酸和二羧酸代谢等通路中, 着色期 (JZ-vs-NZ) (图 5B) 差异基因主要富集在代谢途径、光合

作用、次生代谢物生物合成、卟啉代谢等通路中，其中参与代谢途径的基因数量最多(510 个)，占比 56.6%；成熟期（JC-vs-NC）（图 5C）差异基因主要富集在氨基酸和核苷酸糖代谢（20，6.29%）、代谢途径（174，54.72 %）、丁酸代谢（5，1.57 %）、半乳糖代谢（9，2.83 %）等通路中。

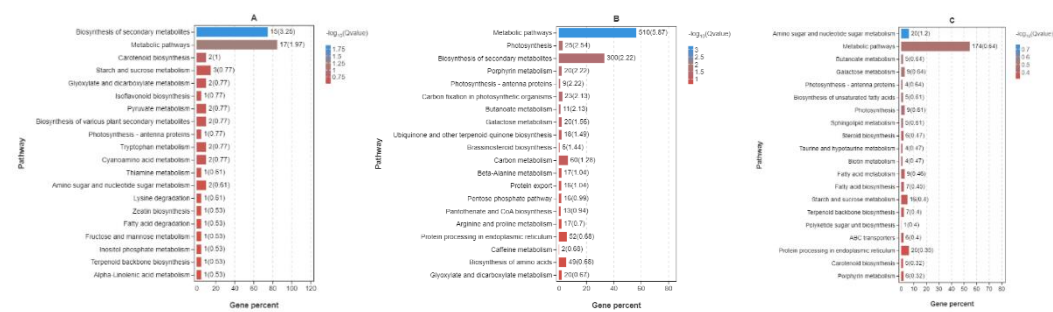


图 5 根蘖繁殖灵武长枣果实发育不同时期差异基因 KEGG 富集条形图

Fig. 5 The Bar Chart of KEGG Enrichment of Differentially Expressed Genes in Lingwu Long Jujube at Different Stages of Fruit Development by Tillers

2.5 果实品质形成相关的主要差异基因筛选

根据根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育白熟期、着色期和成熟期的差异基因 KEGG 通路富集结果，差异显著性较强的与果实可溶性糖和总酸含量密切相关的途径有淀粉和蔗糖代谢（Starch and sucrose metabolism, ko 00500）、半乳糖代谢（Galactose metabolism, ko 01187）、氨基糖和核苷酸糖代谢（Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, ko 13648）、乙醛酸和二羧酸代谢（Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, ko 00630）和丁酸代谢（Butanoate metabolism, ko 00650）等，本研究以这 5 条作为主要关注通路，根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育白熟期、着色期和成熟期三个时期分别有不同数量差异基因注释在 5 条相关通路上，各通路之间互相作用，相互影响，共同构成了根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实品质差异的复杂网络调控机制。本研究选取各通路中差异倍数排序前五的差异基因进行展示。

2.5.1 果实发育白熟期

根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育白熟期对比，差异基因相对着色期和成熟较少，富集在淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、乙醛酸和二羧酸代谢三条通路中的差异基因数共 7 个。其中在淀粉和蔗糖代谢通路中有 ncbi_107410850 和 ncbi_107424266 两个上调基因差异表达，差异倍数分别是 2.18 和 2.66。ncbi_107412669 基因下调表达，差异倍数为 4.82。氨基糖和核苷酸糖代谢通路中有 ncbi_107424266 一个差异基因上调表达，差异倍数为 2.66 倍，ncbi_107404967 基因下调表达，差异倍数为 34.80；乙醛酸和二羧酸代谢通路中有 1 个差异基因 ncbi_107417353 上调表达，1 个差异基因 ncbi_107415024 下调表达，差异倍数分别是 2.3287 倍和 6.6703 倍。总体上，根蘖与嫁接繁殖果实发育白熟期可溶性糖含量相关的 2 条主要途径中有 3 个差异基因上调表达，2 个基因下调表达，与总酸含量相关的 1 条通路中上调基因数和下调基因数均为 1 个。

表 4 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育白熟期差异基因表达情况统计表

Tab. 4 Statistics of Differential Gene Expression in White Maturity Period of Lingwuchangzao Jujube by tillers and Grafting

Propagation				
通路名称	差异基因 ID	JB_FPKM	NB_FPKM	log2(fc)
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	ncbi_107410850	34.9960	76.3193	1.12
	ncbi_107412669	1.2237	0.2537	-2.27

	ncbi_107424266	1.4157	3.7690	1.41
氨基糖和核苷酸糖代谢	ncbi_107424266	1.4157	3.7690	1.41
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ncbi_107404967	0.8353	0.0240	-5.12
乙醛酸和二羧酸代谢	ncbi_107415024	10.2810	1.5413	-2.74
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ncbi_107417353	40.7610	94.9193	1.22

2.5.2 果实发育着色期

根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育着色期注释在可溶性糖和总酸相关的 5 条通路中的到 25 个差异基因，与可溶性糖相关的上调表达的基因有 4 个，下调表达的基因有 11 个，与总酸相关的上调表达的基因有 5 个，下调表达的基因 5 个。在淀粉和蔗糖代谢途径中，ncbi_107430563 和 ncbi_107432082 两个基因上调表达，差异倍数为 31.19、20.03。基因 ncbi_107409332、ncbi_107430302、ncbi_112491050 下调表达，差异倍数分别是 19.83、22.79、28.57；在半乳糖代谢途径中，仅 ncbi_107432082 基因上调表达，其余四个基因均下调表达；在氨基糖和核苷酸糖代谢途径中，1 个基因上调表达，4 个基因下调表达，差异倍数在 4.5109—19.8305 之间，在乙醛酸和二羧酸代谢途径中，基因 ncbi_107405417、ncbi_107433052 和 ncbi_107423244 上调表达，差异倍数分别是 3.38、3.54、5.78，基因 ncbi_107415024 和 ncbi_107429892 下调表达，差异倍数分别是 3.99、3.37；丁酸代谢途径中，2 个基因上调表达，差异倍数分别是 3.18、3.30，3 个基因下调表达，差异倍数最高为 4.24。

表 5 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育着色期差异基因表达情况统计表

Tab.5 Statistics of Differential Gene Expression in Coloring period of Lingwuchangzao Jujube by tillers and Grafting Propagation

通路名称	差异基因 ID	JZ_FPKM	NZ_FPKM	log2(fc)
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	ncbi_107409332	42.7407	2.1553	-4.3096
	ncbi_107430302	47.8577	2.1000	-4.5103
	ncbi_107430563	0.0073	0.2277	4.9563
	ncbi_107432082	0.0667	1.3357	4.3245
	ncbi_112491050	23.3723	0.8180	-4.8366
半乳糖代谢 Galactose metabolism	ncbi_107418415	5.3387	0.2757	-4.2755
	ncbi_107411640	13.9183	1.2020	-3.5335
	ncbi_107426117	0.3700	0.0010	-8.5314
	ncbi_107430302	47.8577	2.1000	-4.5103
	ncbi_107432082	0.0667	1.3357	4.3245
氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ncbi_107409332	42.7407	2.1553	-4.3096
	ncbi_107405417	2.4720	15.8617	2.6818
	ncbi_107429837	98.4553	21.8260	-2.1734
	ncbi_107404967	101.7550	14.1473	-2.8465
乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ncbi_107416404	2.3280	0.3387	-2.7812
	ncbi_107423244	10.3627	59.9267	2.5318
	ncbi_107415024	1063.4003	265.8757	-1.9999
	ncbi_107434802	8.7093	29.4120	1.7558
	ncbi_107429892	97.0463	28.8210	-1.7516
丁酸代谢	ncbi_107433052	1.0500	3.7147	1.8228
	ncbi_107410635	20.6783	6.0447	-1.7744

Butanoate metabolism	ncbi_107422411	19.1517	60.9260	1.6696
	ncbi_107428053	117.6553	42.3217	-1.4751
	ncbi_107425230	1.8153	5.9910	1.7226
	ncbi_107405248	98.7087	23.2730	-2.0845

2.5.3 果实发育成熟期

根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育成熟期在可溶性糖和总酸相关的 5 条通路中注释的差异基因共有 18 个。与可溶性糖相关的上调表达的基因有 4 个，下调表达的基因有 8 个，与总酸相关上调表达的基因有 1 个，下调表达的基因 5 个。淀粉和蔗糖代谢途径中基因 ncbi_125422819 上调表达，差异倍数为 5.51，4 个差异基因下调表达，差异倍数最高为 6.62；在半乳糖代谢途径中，2 个基因 ncbi_107418468、ncbi_125422819 均上调表达，差异倍数分别是 2.85、5.51；氨基糖和核苷酸糖代谢途径中仅 1 个基因 ncbi_112492524 上调表达，其余 4 个基因均下调表达，差异倍数最高为 7.49；乙醛酸和二羧酸代谢途径中仅有 1 个基因 ncbi_107415818 下调表达，差异倍数为 2.16；丁酸代谢途径中 1 个差异基因 ncbi_107423578 上调表达，4 个差异基因下调表达，差异倍数在 2.00 至 6.07 之间。

表 6 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育成熟期差异基因表达情况统计表

Tab. 6 Statistics of Differential Gene Expression in mature period of Lingwuchangzao Jujube by tillers and Grafting Propagation

通路名称	差异基因 ID	JC_FPKM	NC_FPKM	log2(fc)
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	ncbi_112492534	96.8013	20.9693	-2.2067
	ncbi_125422819	0.4113	2.2653	2.4613
	ncbi_107430147	0.8703	0.1913	-2.1855
	ncbi_107421001	1.1147	0.2737	-2.0261
	ncbi_107415022	1.0260	0.3463	-1.5668
半乳糖代谢 Galactose metabolism	ncbi_107418468	4.4997	12.8257	1.5111
	ncbi_125422819	0.4113	2.2653	2.4613
氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	ncbi_107409338	15.4497	3.0800	-2.3266
	ncbi_107426770	22.5577	7.7397	-1.5433
	ncbi_107422361	59.9890	13.2680	-2.1767
	ncbi_107424396	22.5647	6.5477	-1.7850
	ncbi_112492524	0.0683	0.5113	2.9036
乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	ncbi_107415818	42.4077	19.6360	-1.1108
丁酸代谢 Butanoate metabolism	ncbi_107415793	52.2860	8.6177	-2.6011
	ncbi_107415818	42.4077	19.6360	-1.1108
	ncbi_107404604	4.9203	1.8067	-1.4454
	ncbi_107419655	15.5647	6.9883	-1.1553
	ncbi_107423578	1.5640	3.1300	1.0009

2.5.4 三个时期差异表达基因对比

在根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育白熟期、着色期和成熟期对比的差异基因中发现（图 7），与可溶性糖有关的淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢，与总酸含量相关的乙醛酸和二羧酸代谢、丁酸代谢 5 条途径中，共有 31 个差异基因在果实发育不同时期或同一时期不同途径中均有富集，其中与可溶性糖相关的有 28 个差异基因，与总酸相关的有 3 个差异基因。

在根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育白熟期，基因 *ncbi_107424266* 同时富集在淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢两条途径中；着色期有 *ncbi_107414286*、*ncbi_107425230*、*ncbi_107429837* 等 7 个基因同时富集在淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢等途径中的至少 2 条途径中，其中与可溶性糖有关的有 6 个差异基因，仅 1 个差异基因 *ncbi_107425230* 与总酸含量相关。着色期和成熟期均存在且富集在 2 条以上糖酸相关途径中的差异基因共有 *ncbi_107409332*、*ncbi_107414395*、*ncbi_107418468* 和 *ncbi_107420179* 四个，两时期共同存在差异仅富集在单条途径上的差异基因有 *ncbi_107405417*、*ncbi_107412906*、*ncbi_107418465* 等 16 个，其中 14 个富集在可溶性糖含量相关途径上，2 个基因 *ncbi_107404604* 和 *ncbi_107419655* 富集在丁酸代谢途径中；果实成熟期 *ncbi_125422819* 富集在淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢 2 条途径中，*ncbi_107421126* 同时富集在半乳糖代谢和氨基糖和核苷酸糖代谢途径中。果实发育白熟期和成熟期无共同富集的差异基因。

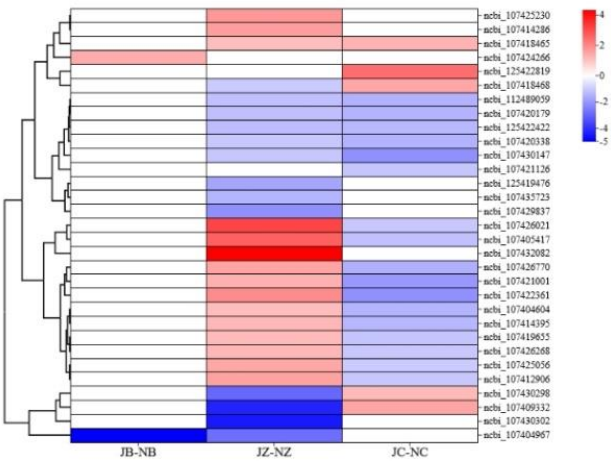


图 7 根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育不同时期主要基因聚类热图

Fig. 7 Cluster thermogram of main genes in different stages of fruit development of Lingwuchangzao jujube propagated by tillers and grafting.

3 讨论

目前开展了一些灵武长枣转录组方面的研究，但转录组信息仍比较少，并缺少不同时期灵武长枣果实转录组信息，本研究利用根蘖和嫁接两种繁殖方式下的灵武长枣果实各发育时期存在大量的差异表达基因，并且上、下调基因数量不等，表明果实在成熟过程中上、下调基因在基因差异表达中的促进或抑制作用复杂。果实白熟期差异表达基因较少，着色期和成熟期差异表达基因增加。本研究中主要关注与果实中可溶性糖和和总酸含量相关的代谢途径，在淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢，乙醛酸和二羧酸代谢、丁酸代谢 5 条途径中筛选出了 31 个差异基因，为下一步探究根蘖和嫁接繁殖灵武长枣果实不同发育期糖酸等营养物质含量的分子调控机制提供基础研究数据。

马亚平、白琳云等人（马亚平等，2021）研究了根蘖和嫁接灵武长枣成熟果实转录组之间的差异，共分析筛选到 27 个显著差异表达基因，其中 9 个显著上调，18 个显著下调；GO 富集分析表明 15 个差异基因显著富集到 GO 的三大功能类别分子功能、细胞组分、生物过程中；KEGG 富集分析表明 10 个差异表达基因显著富集到 12 条代谢通路中，其中包括 3 个上调基因和 7 个下调基因。进一步筛选到调控糖及有机酸代谢关键差异基因 *BAM1*、*PCO* 和 *HAOX1* 在淀粉和蔗糖代谢、牛胆素和亚牛磺酸代谢、乙醛

酸和二羧酸代谢中显著表达,并在糖和有机酸的相互转化中起着关键调控作用;苏媚等用(苏媚等,2016)同一果园不同砧木的8年生嫁接香橙、红桔和枳砧脐橙成熟果实作为试验材料,分析其生理和生化指标及糖酸代谢相关基因的表达情况。结果显示,砧木对可食率、可滴定酸含量及果皮色泽均无明显影响,但对脐橙果实的单果质量、果皮厚度、可溶性固形物含量、维生素C含量、可溶性糖含量和有机酸含量存在较大影响。香橙砧脐橙的单果质量和果皮厚度显著大于枳砧脐橙。红桔砧脐橙果肉中糖、酸的含量均显著低于香橙砧和枳砧脐橙。其分子机理是红桔砧脐橙果肉中蔗糖转运蛋白基因 *CsSUC1* 和 *CsSC4* 表达量低,糖酵解途径关键酶之一的丙酮酸激酶基因 *CsPKP3* 表达量高;柠檬酸合成酶 *CsCS2* 表达量较低,柠檬酸降解酶谷氨酸脱羧酶基因 *Cs-GDH1* 和谷氨酰胺合成酶基因 *Cs-GH1* 表达量高。类似的研究也表明,葡萄和苹果都有几个 MYB 转录因子参与果皮花色素苷的生物合成,有时也与 b HLH 和 WD40 相互影响(程娇,2022)。在对“泰山红”和“牡丹”两个石榴品种成熟期果实转录组的研究中发现,鉴定出参与石榴果实糖酸代谢的关键基因有17个,“泰山红”中 FRK、SS、BGLU、UXS、FBA 和 ADH 的表达量高于“牡丹”。石榴果实中,葡萄糖和果糖是主要的糖组分,酸以柠檬酸和苹果酸为主,‘泰山红’中 FRK、SS、BGLU、UXS、FBA 和 ADH 的表达量高于‘牡丹’(冯立娟等,2022)。石榴果实中,葡萄糖和果糖是主要的糖组分,酸以柠檬酸和苹果酸为主,差异基因在糖酸代谢中如何调控还需进一步的深入研究。

植物细胞转录表达后,涉及转录后修饰(Chaudhary S *et al.*,2019)、蛋白质翻译(Kwanuk L *et al.*,2016)、翻译后修(Cezary W *et al.*,2015;Shou-Ling X *et al.*,2017)的过程,转录结果才能在代谢水平上呈现。转录组是基因表达的媒介,而代谢组反映细胞表型和功能的变化(蔡净蓉等,2022)。本研究中主要对根蘖与嫁接繁殖的灵武长枣在果实发育时期存在的差异基因进行了初步探究,其在代谢物水平也可能存在一定差异性,后续研究中可以进一步深入探讨代谢物水平的异同之处,并可分析其代谢调控分子机制。

4 结论

基于转录组测序技术,根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育各时期组间分析对比中,果实白熟期(JB-vs-NB)、着色期(JZ-vs-NZ)、成熟期(JC-vs-NC)各组间分别鉴定出65、4509和1534个差异基因。GO功能富集到生物过程、分子功能和细胞组分三大类中的50个亚类中,KEGG通路注释将差异基因显著富集在次生代谢物生物合成、代谢途径、氨基酸生物合成等通路中,成熟期差异基因富集在糖酸相关通路的显著性较高。

根蘖与嫁接繁殖灵武长枣果实发育白熟期、着色期和成熟期果实在淀粉和蔗糖代谢、半乳糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢,乙醛酸和二羧酸代谢、丁酸代谢5条与果实可溶性糖和总酸含量相关的代谢途径中筛选出了ncbi_107424266、ncbi_107414286、ncbi_107425230、ncbi_107429837等31个差异基因,分别在果实发育不同时期的糖酸代谢途径中差异表达,调控各时期果实中可溶性糖及总酸含量。

参 考 文 献

- 李白云,李慧.2021.灵武长枣早熟优系选育.果树资源学报,2(06):81-86.
(Li Baiyun,, Li Hui. 2021. Breeding of Early Maturing Superior Lines of Lingwu Long Jujube. Journal of Fruit Tree Resources, 2(06):81-86. [in Chinese])
刘孟军,刘平,刘志国.2022.中国鲜枣产业发展阶段划分及其4.0版展望.果农之友,(05):4-6.
(Liu Mengjun, Liu Ping, Liu Zhiguo. 2022. The development stage division of China's fresh jujube industry and its 4.0 version prospect. Friends of fruit farmers, (05):4-6. [in Chinese])

- 李振强, 马旭, 田应明, 范志懿, 万仲武, 刘佳嘉. 2022. 不同施氮量对灵武长枣各发育阶段果实品质的影响. 经济林研究, 40(04):124-132.
- (Li Zhenqiang, Ma Xu, Tian Yingming, Fan Zhiyi, Wan Zhongwu, Liu Jiajia. 2022. Effects of different nitrogen application rates on fruit quality of Lingwu long jujube at different developmental stages. Economic forest research, 40(04):124-132. [in Chinese])
- Zhang Z, Wei T, Zhong Y, *et al.* 2016. Construction of a high-density genetic map of *Ziziphus jujuba* Mill. using genotyping by sequencing technology. Tree Genetics & Genomes, 12(4).
- Gaikwad S P, Chalak S U, Kamble A B. Effect of Spacing on Growth, Yield and Quality of Mango[J]. Journal of Krishi Vigyan, 2017,5(2).
- 万仲武, 芮长春, 张治业. 2013. 灵武长枣物候期与气温和地温的关系研究. 北方园艺, (15):47-50.
- (Wan Zhongwu, Rui Changchun, Zhang Zhiye. 2013. Research on the relationship between phenological period of Lingwu long jujube and air temperature and ground temperature. Northern Horticulture, (15):47-50. [in Chinese])
- 纪晴, 石倩倩, 徐世宏等. 枣产品开发现状及未来趋势研究. 农村经济与科技, 2015, 26 (07):11-12.
- (Jian Jiqing, Shi Qianqian, Xu Shihong *et al.* 2015. Research on the current situation and future trend of jujube product development. Rural economy and science and technology, 26(07):11-12. [in Chinese])
- 陈丽华, 杨喜盟, 贾昊, 宋丽华. 2020. 气温升高与干旱对灵武长枣果实糖积累、蔗糖代谢关键酶及相关基因表达的影响. 核农学报, 34(09):2112-2123.
- (Chen Lihua, Yang Ximeng, Jia Hao, Song Lihua. 2020. Effects of temperature rise and drought on sugar accumulation, key enzymes of sucrose metabolism and related gene expression in Lingwu long jujube fruit. Acta Agriculturae Nuclear, 34(09):2112-2123. [in Chinese])
- Shifu C, Yanqing Z, Yaru C, *et al.* 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics (Oxford, England), 34(17).
- 李振强. 2022. 根蘖与嫁接繁殖对灵武长枣生长、叶片性状及根系生长的影响. 宁夏大学.
- (Li Zhenqiang. 2022. Effects of root tillers and grafting propagation on growth, leaf traits and root growth of Lingwu long jujube. Ningxia University. [in Chinese])
- M K G, L T R, L J K. 2020. Retrospective Analysis of Pediatric and Adult Populations Using an LC-MS/MS Method for Oxcarbazepine/Eslicarbazepine Metabolite. The journal of applied laboratory medicine, 6(3).
- Margarita H, C G E, Alicia M, *et al.* 2017. Metabolic and transcriptional elucidation of the carotenoid biosynthesis pathway in peel and flesh tissue of loquat fruit during on-tree development. BMC plant biology, 17(1).
- 马亚平, 白琳云, 徐伟荣等. 2021. 灵武长枣嫁接和根蘖繁殖植株果实转录组差异分析. 分子植物育种, 19 (16):5297-5306.
- (Ma Yaping, Bai Linyun, Xu Weirong *et al.* 2021. Analysis of fruit transcriptome differences between grafted and root-tillering plants of Lingwu long jujube. Molecular plant breeding, 19 (16):5297-5306. [in Chinese])
- 苏媚, 伊华林. 2016. 砧木对脐橙果实品质及糖酸代谢相关基因表达的影响. 中国南方果树, 45(05):34-37.
- (Su Mei, Yi Hualin. 2016. Effects of rootstocks on fruit quality and expression of genes related to sugar and acid metabolism in navel orange. Southern China Fruit Trees, 45(05):34-37. [in Chinese])
- 程娇. MeSA 处理调控桃李采后果实花色苷合成代谢的研究[D]. 浙江工商大学, 2022.
- (Cheng Jiao. 2022. Study on the regulation of anthocyanin synthesis and metabolism in postharvest peach plum fruit by MeSA treatment. Zhejiang Technology and Business University. [in Chinese])
- 冯立娟, 付莹, 王传增, 杨雪梅, 尹燕雷, 陶吉寒. 2022. 基于 RNA-Seq 鉴定不同石榴品种间果实糖酸代谢基因. 植物生理学报, 58(06):1161-1172.
- (Feng Lijuan, Fu Ying, Wang Chuanzeng, Yang Xuemei, Yin Yanlei, Tao Jihan. 2022. Identification of fruit sugar and acid metabolism genes among different pomegranate varieties based on RNA-Seq. Plant Physiology, 58(06):1161-1172. [in Chinese])
- Chaudhary S, Jabre I, Reddy A S N, *et al.* Perspective on Alternative Splicing and Proteome Complexity in Plants. Trends in Plant Science, 2019,24(6).
- Kwanuk L, Hunseung K. Emerging Roles of RNA-Binding Proteins in Plant Growth, Development, and Stress Responses. Molecules and cells, 2016,39(3).
- Cezary W, Salma A, Silke J, *et al.* Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. Journal of experimental botany, 2015,66(10).

Shou-Ling X, J C R, C M J, et al. Proteomic analysis reveals O-GlcNAc modification on proteins with key regulatory functions in Arabidopsis .[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017,114(8).

蔡净蓉, 王杰, 赵俊跃等. 2022. 成熟期不同橄榄品种 (系) 果实代谢组及其差异. 热带作物学报, 43 (11) :2304-2315.

(Cai Jingrong, Wang Jie, Zhao Junyue et al.. Fruit metabolomes of different olive varieties (lines) at mature stage and their differences. Journal of Tropical Crops, 2022,43 (11):2304-2315. [in Chinese])