

桃嫩枝扦插不定根发育的分子机制

郝兰兰^{1,2}, 李小兰^{1,2}, 张帆¹, 张雪冰¹, 王鸿^{1,2*}

(1. 甘肃省农业科学院 林果花卉研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学 园艺学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:利用高通量测序技术对桃砧木‘GF677’生根发育的4个时期进行转录组测序和数据分析,为阐明桃不定根发育的分子机制奠定理论基础。以扦插后0(对照)、7(激活期)、14(愈伤形成期)、21(不定根形成期)、28 d(不定根伸长期)插穗基部的韧皮部为材料进行RNA-seq测序并研究其生根机理。结果表明,生根过程中不同时期共鉴定出25 656个差异表达基因,其中上调13 166个,下调12 490个。GO功能注释表明,差异表达基因主要富集在代谢过程、细胞过程、细胞、细胞组分、细胞器黏合物和催化活性等代谢途径中。KEGG富集结果显示,差异表达基因主要响应糖酵解、半胱氨酸和蛋氨酸、精氨酸和脯氨酸、核糖体和氨基酸生物合成。应用实时荧光定量qRT-PCR对主要通路的15个DEGs表达模式进行验证,其中13个基因表达水平的变化与转录组基因丰度的变化基本一致,表明转录组数据具有较高的可靠性。总之,糖酵解通路关键基因显著上调,参与激活期的能量补给;蛋氨酸代谢通路诱导基因的表达,参与韧皮部维管组织的分化与形成;精氨酸代谢激活NOS基因的表达,有利于NO的传递,实现根源信号向地上部的运输,进而调控桃的不定根发育过程。

关键词:桃;扦插生根;转录组;差异表达基因;qRT-PCR

中图分类号:S662.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2023)03-0108-09

Molecular Mechanism of Adventitious Root Development in Peach Softwood Cutting

HAO Lan-lan^{1,2}, LI Xiao-lan^{1,2}, ZHANG Fan¹, ZHANG Xue-bing¹, WANG Hong^{1,2*}

(1. Institute of Fruit and Floriculture Research, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu, China;
2. College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: In this study, high-throughput sequencing technology was used to perform transcriptome sequencing and data analysis on the four periods of rooting development of peach rootstock ‘GF677’ to lay a theoretical foundation for elucidating the molecular mechanism of peach adventitious root development. RNA-seq sequencing was carried out using 0 d (control), 7 d (activation phase), 14 d (callus formation phase), 21 d (adventitious root formation phase), 28 d (adventitious root elongation) phloem at 5 cm at the base of the cuttings as materials and studied their rooting mechanism. The results showed that a total of 25 656 differentially expressed genes were identified at different stages during the rooting process, of which 13 166 were upregulated and 12 490 were downregulated. The gene ontology (GO) function annotation showed that differentially expressed genes were significantly enriched in metabolic pathways such as metabolic processes, cellular processes, cells, cell components, organelle binders, and catalytic activity. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment results showed that differentially expressed genes mainly responded to glycolysis, cysteine and methionine, arginine and proline, ribosomals and amino acid biosyn-

收稿日期:2022-04-26 修回日期:2022-06-21

基金项目:财政部和农业农村部:国家桃产业技术体系(CARS30-1-6);院列中青年博士基金(2022GAAS51);国家自然科学基金(31760558)。

第一作者:郝兰兰。研究方向:果树栽培生理。E-mail:3312361973@qq.com

* 通信作者:王鸿,博士,研究员。研究方向:果树栽培和育种。E-mail:wrh991130@126.com

thesis. Real-time fluorescence quantification qRT-PCR was used to verify the expression patterns of 15 DEGs of the main pathways, and the changes in the expression levels of 13 genes were basically consistent with the changes in gene abundance in the transcriptome, indicating that the transcriptome data had high reliability. In short, the key genes of the glycolysis pathway were significantly upregulated and participated in the energy replenishment of the activation period; the expression of methionine metabolic pathways induced gene, involved in the differentiation and formation of vascular tissue in the phloem; arginine metabolism activated the expression of NOS genes, which was conducive to the transmission of NO, realized the transport of root signals to the upper part of the ground, and then regulated the development process of adventitious roots of peaches.

Key words: peach; cutting rooting; transcriptome; differentially expressed gene; qRT-PCR

桃树(*Prunus persica*)属蔷薇科(Rosaceae)李属(*Prunus*)桃亚属(*Amygdalus*)植物,是世界上最重要的落叶果树之一,分布广泛,历史悠久^[1]。随着人民生活水平提高,对果品(桃)的需求量大幅度提高^[2-3]。扦插繁殖作为桃树生产中最主要的繁殖方式之一,具有操作简便、能稳定维持母株优良性状、大幅降低生产成本等优点,是解决桃产业规模化生产的重要手段^[4-6]。此外,研究发现,桃扦插繁殖过程中生根率低的问题普遍存在,国内外学者通过试验证实适宜比例的基质有助于桃生根^[7-9]。同时,一定质量浓度的植物激素亦可促进桃绿枝扦插生根率^[10]。然而关于植物激素调控桃绿枝扦插不定根形成的分子尚不清晰。故而,本试验利用激素 IBA 和 NAA 诱导桃砧木‘GF677’的插穗生根,取不定根形成期 4 个关键期的插穗进行转录组测序,从基因水平阐明其作用机理对于提高桃扦插生根率有重要意义。

不定根发育是一个受激素调控且多基因互作的复杂过程^[11],受诸多因素影响,如插条自身条件(品种、基因、内源激素、酶活力、营养物质以及木质化程度等)、环境条件(温度、湿度、光照等)以及植物生长调节剂(种类、质量浓度)等^[5]。本研究组经过长期的探索,制订出一系列提高扦插成活率的措施,在前期的研究中发现 200 mg · L⁻¹ IBA 和 120 mg · L⁻¹ NAA 对插条速蘸 10 s 的生根效果最好^[12-13]。生长素作为第 1 个被发现的植物激素,受到数种基因调控,具有显著促进插枝生根效果^[14]。Thomas 等^[15]应用生长素处理葡萄插条后,发现插穗内的 PRP1 和 PRP2 基因表达量明显上调,在葡萄扦插不定根形成的早期起重要作用。另一方面,IBA 也是一种被广泛应用于植物扦插育苗中的植物激素。例如, Li 等^[16]在芒果中研究发现,IBA 可通过诱导 AUX/LAX 和 PIN 基因的表达以影响该植株的生根率,表达模式为前期表达水平较低,4 d 后则呈现出急剧升高。董志丹^[17]在苹果砧木中研究发现,IBA 处

理后,诱导上调生根基因(*MdLBD29*、*MdLBD16*、*MdWOX11*、*MdARRO1*)的表达,从而使根原基形成,产生大量的不定根。同样的,在经外源 IBA 处理后苹果砧木‘T337’中发现 *MdCRF8*、*MdCRF10* 和 *MdCRF11* 参与调控苹果砧木不定根发育^[18]。由此可知,生长素在调控不定根形成中具有重要意义,然而对其在桃扦插生根中的应用较为鲜见。

转录组测序具有数据量大以及精确度高等特点,为探究基因结构与功能提供基础^[19-20],已被广泛应用于不定根形成的机理研究^[21-22]。因此,本研究以桃砧木‘GF677’的嫩枝为试验材料,对其进行 GO 分析和 KEGG 代谢通路分析,筛选出能够促进桃扦插生根的关键基因,探究桃树不同发育时期生长发育和生化代谢的分子机制,为桃规模化、工厂化扦插生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理方法

于 2021 年 6 月选取无病害、长势良好的桃砧木‘GF677’的当年嫩枝作为试验材料,取样地点为甘肃省农业科学院桃园。将嫩枝处理成 10~15 cm 长的插穗,每个插穗留 3~4 片叶,放入浓度为 200 mg · L⁻¹ IBA 和 120 mg · L⁻¹ NAA 溶液中处理 10 s 后,插入珍珠岩的穴盘中,深度为 5~8 cm。扦插完后用遮荫网遮盖防晒,自动喷雾装置喷雾供水。于 0(对照)、7(激活期)、14(愈伤形成期)、21(不定根形成期)、28 d(不定根伸长期)后采集基部附近的韧皮部,每个时期 3 个重复。随后将所有样品放入液氮中速冻,-80 °C 保存备用。

1.2 RNA-seq 文库制备及测序

转录组测序由华大基因科技有限公司负责。RNA 提取采用 CTAB 法^[23],对总 RNA 样品的纯度、浓度和完整性进行检测与评估。桃 mRNA 被富集通过 Oligo(dT)磁珠,先将 mRNA 随机打断,随后以其为模板,以六碱基随机引物合成 cDNA

链,利用 AMPure XPbeads 纯化双链 cDNA,cDNA 文库获得借助于 PCR 富集,文库的有效浓度采用 Q-PCR 方法进行准确定量,进而完成库检。待质检合格后,借助于 IlluminaHiSeqTM2000 实施高通量测序,长度是 PE150。

1.3 原始数据的处理与拼接

为保证数据结果的可靠性,将测序得到的包含低质量、接头污染以及未知碱基 N 含量过高的原始读序(raw reads)进行过滤,得到高质量的干净读序 clean reads 进而保证所得数据可用性。使用比对软件 Bowtie 将 clean reads 比对到参考基因序列得到比对结果,以及测序样品的序列特征信息,接着每个基因的 FPKM 值依据基因的长度和比对到该基因的次数来进行估算。

1.4 差异表达基因的功能富集分析

样品的差异表达分析采用分析软件

DESeq2^[24],筛选标准依据于 FPKM(fragments per kilobases per millionreads)值以及借助于 $|\log_2 \text{fold changes}| \geq 1$ 与校正后 $P < 0.05$,筛选得到差异表达基因。将 GO (gene ontology) 和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 分析与 DEGs 进行比较,从而获得与基因对应的功能注释。

1.5 实时荧光定量 qRT-PCR 分析

对选取的 15 个差异基因进行 qRT-PCR 分析。引物设计通过在线软件 Primer3.0 (<http://primer3.ut.ee/>) 进行(表 1),Actin 作为内参基因。利用 Light Cycler[®] 96 Real-Time PCR System (Roche) PCR 仪进行扩增,扩增体系为 ddH₂O 6 μ L、上下游引物各 1 μ L、cDNA 2 μ L、TBGreen- II 10 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 10 s;60 $^{\circ}$ C 退火 10 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s;40 个循环。最后,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对定量所得数据进行分析与计算。

表 1 实时荧光定量引物

Table 1 qRT-PCR primers

基因	基因编号	上游引物(5'-3')	下游引物(3'-5')
NOS	LOC18787454	TCGCTTGTTGTTATGGGTGTGGAG	GCTGGTGGTGTTCCTTCTTCAATGC
TAT2	LOC18780545	GGGCATCTGGCTATTGGAGGTAAAC	CAACCAAGTCGCCATCCAGGAAC
HMT	LOC18791688	ATGCTGAGTTGCTTGAGGAAGAAGG	ATCGCCACTGACCACATTGATTCC
FBPase	LOC18774825	AGGGATCGGATGGCAGTGCTAG	TTCTCCACCTCCTCCACGCTTC
PGM	LOC18784733	CCTCTCTCCTCCAAACCATCTCTC	GGCTTTAATGGTGAGGGAGTGTGAG
OAT	LOC18778148	GAGTGATCTGGAGTGGAAGGAGGAG	ACGACGGGAATTGGGTGGTAATTG
PpADC	LOC18766643	ATTGGAGGCGGTCTGGGTATCG	ACAACAGCGGCAGCATACTCTTC
MGL	LOC18776049	CCCTCCTGACCCACTTCTTCCC	CCTCACCATGTCCATGTCGTGTATG
MHM	LOC18770067	ATGGCGTCTCACATTGTTGGATACC	TGTAAATCTTCGGCACTGGTCTTCC
SMS	LOC18785691	AGGAAGAGGTTTGAATGCCAGAAG	AAGCCCTAGCCTTCAAGCAACAAG
CGS	LOC18782333	ACAACAACCTCAACTCAGGCATTCC	TTTCAAACACCACCTCGTCACCAC
PGI	LOC18793964	GCACAAAAGGGCAACCGATTGAAG	GCAGAAGCGTAGGAAGATCAGCAG
PFP	LOC18781818	GATGCGGTTTGCTACGAACCTTG	CCCAACTGTCCATTGCTCCACTG
GADPH	LOC18769767	TGGCATTGGGTCACAAGGAATCAC	GCTGTAAGAAGGTGTTGGCAAGTTG
GAPC	LOC18788518	TCGGTCGTTTGTTGCTAGAGTTG	TAGTCGGTGGTGTGAAGGGATCG

2 结果与分析

2.1 转录组测序数据统计及质量分析

将 15 个样品经过 DNBSEQ 平台进行转录组测序,经 raw reads 过滤后得到 44 000 000 多个 clean reads。各样品测得数据过滤后,比对到参考基因组的序列为 79.66%~84.73%,Q20 的百分比达到 97%以上,Q30 碱基百分比达到 92%(表 2),说明测得的数据准确度较高,可以作为后续数据的分析。

2.2 生根过程中差异表达基因的分析

分析不同时期的差异表达基因,共检测到 25 656 个差异表达基因(图 1A)。与对照 0 d 相比较,处理 7、14、21、28 d 中分别有 3 277、2 746、

3 975、3 168 个基因上调,3 342、2 828、3 844、2 476 个基因下调。随着处理时间的增加,在 21 d 处理下差异基因数最多,也许是因为 21 d 为愈伤至不定根形成的关键期,多种基因表达从而为不定根形成创造条件。韦恩图分析表明(图 1B),在各处理中有 1 776 个高度保守基因和 9 958 个特异表达基因。

2.3 差异表达基因 GO 富集分析

对前 20 项的 GO 富集分析可知(图 2),差异表达基因富集过程主要有生物过程、细胞组分和分子功能 3 大类。其中,生物过程中,主要存在代谢过程以及细胞过程;细胞组分中,主要富集在细胞、细胞组分和细胞器过程;分子功能中,主要集中在结合、催化活性等过程。

表 2 转录组测序数据分析

Table 2 Analysis of transcriptome sequencing data

样品	过滤数据	比对参考基因组(占比)	Q20(%)	Q30(%)	数据对比效率(%)
0 d_1	44 336 330	81.77	97.62	93.78	97.28
0 d_2	44 405 308	81.62	97.38	93.12	97.44
0 d_3	44 954 748	83.66	98.11	94.43	98.64
7 d_1	44 739 052	82.34	98.16	94.55	98.17
7 d_2	44 223 746	82.00	97.41	93.19	97.04
7 d_3	44 702 664	82.52	98.16	94.57	98.09
14 d_1	44 272 460	80.90	97.50	93.44	97.14
14 d_2	44 297 046	82.33	97.49	93.39	97.20
14 d_3	44 544 516	82.23	98.25	94.80	97.74
21 d_1	44 570 636	81.10	98.22	94.75	97.80
21 d_2	44 633 760	80.95	98.31	95.04	97.94
21 d_3	44 255 656	79.66	97.49	93.41	97.11
28 d_1	44 739 058	82.03	98.18	94.62	98.17
28 d_2	44 521 146	84.73	97.39	93.15	97.69
28 d_3	44 769 944	83.39	97.16	92.52	98.24

注:Q20%是碱基质量值大于 20 所占的比例,Q30%是碱基质量值大于 30 所占比例。

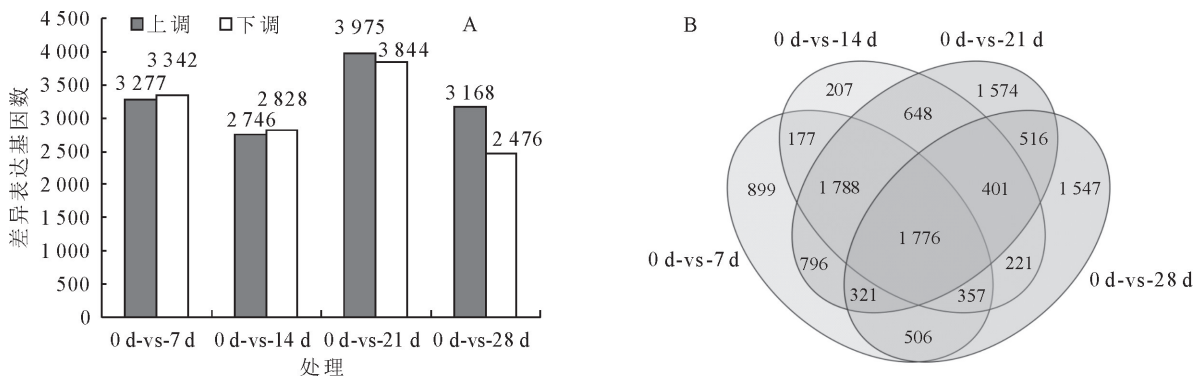


图 1 桃不同发育时期的差异基因柱形图(A)和韦恩图(B)

Fig. 1 Differential gene bar plots (A) and Venn plots (B) of different developmental stages of peach

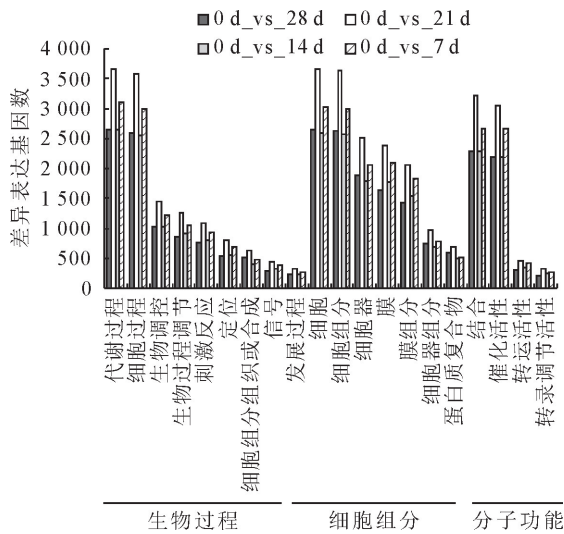


图 2 桃不同发育时期的差异表达基因 GO 功能富集结果

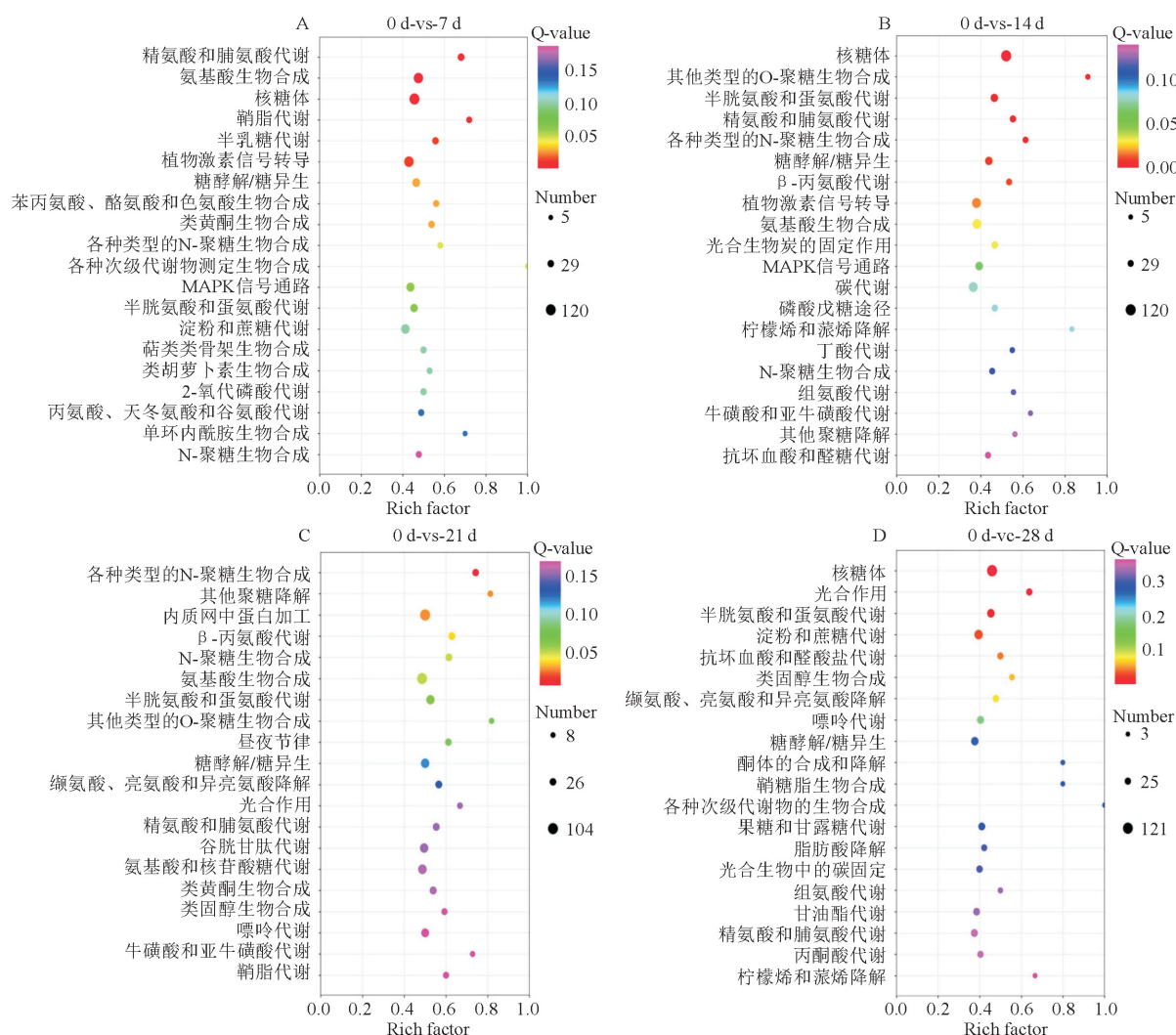
Fig. 2 Results of GO function enrichment of differentially expressed genes at different developmental stages of peach

2.4 差异表达基因 KEGG 富集分析

KEGG 途径富集分析结果揭示,差异基因显著富集在半胱氨酸和蛋氨酸、精氨酸和脯氨酸以及糖酵解/糖异生代谢途径(图 3A);在图 3B 中,差异基因主要响应核糖体、其他类型的 O-聚糖生物合成以及植物信号激素转导等过程;图 3C 中,差异基因主要参与各种类型的 N-聚糖生物合成、其他聚糖降解、内质网中蛋白质加工等代谢途径;在图 3D 中,主要富集于核糖体、光合作用、淀粉和蔗糖代谢等途径。值得注意的是,半胱氨酸和蛋氨酸、糖酵解/糖异生、精氨酸和脯氨酸在桃生长发育的 4 个时期均被显著富集。故而,推测这些代谢途径直接或间接地参与桃生根过程。

2.5 桃不定根发育过程中相关通路的 DEGs 分析

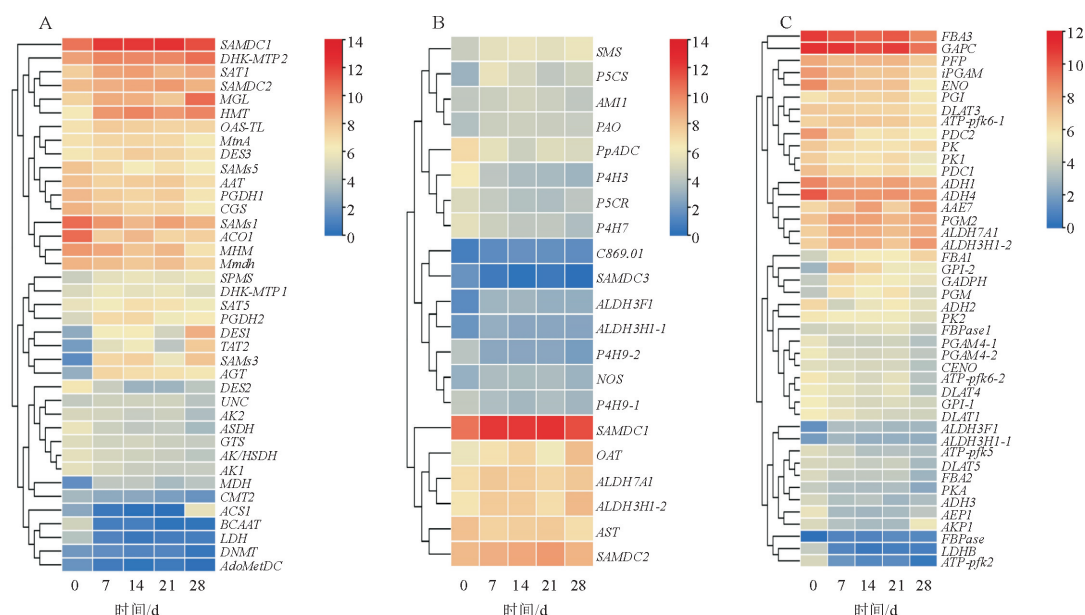
通过 KEGG 富集发现,半胱氨酸和蛋氨酸、精氨酸和脯氨酸、糖酵解/糖异生代谢途径在桃生根过程中至关重要(图 4)。图 4A 中,共有 39 个差异表达基



注:纵轴表示基因富集到的通路;横轴的 Rich factor 值越大,代表越显著富集;点的大小代表基因数目;点的颜色对应于不同的 Qvalue 范围。

图 3 桃不同发育时期的差异表达基因 KEGG 富集散点图

Fig. 3 Divergence of KEGG enrichment dispersion point of differentially expressed genes at different developmental stages of peach



注:A. 半胱氨酸和蛋氨酸代谢途径;B. 精氨酸和脯氨酸代谢途径;C. 糖酵解/糖异生代谢途径。

图 4 不同代谢通路相关热图

Fig. 4 Heat map of different metabolic pathways

因富集在半胱氨酸和蛋氨酸代谢途径。与对照(0 d)相比,S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶原酶(S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme, *SAMDC1*)和同型半胱氨酸 S-甲基转移酶 3(homocysteine S-methyltransferase 3, *HMT*)在各处理下均显著上调表达。由图 4B 可见,共有 21 个差异表达基因参与精氨酸和脯氨酸代谢,其中 S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶原酶(S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme, *SAMDC1*)、鸟氨酸氨基转移酶,线粒体(ornithine aminotransferase, mitochondrial, *OAT*)和醛脱氢酶家族(aldehyde dehydrogenase family, *ALDH*)在桃 4 个发育时期均显著上调,但 *SAMDC1* 基因的表达量较高。而脯氨酸 4-羟化酶系

(probable prolyl 4-hydroxylase, *P4H*)基因下调。此外,在糖酵解代谢通路,有 44 个差异基因表达,糖代谢/糖异生途径与愈伤组织形成和不定根发生关系密切,磷酸葡萄糖酶,细胞质(phosphoglucosomutase, cytoplasmic, *PGM2*)和醛脱氢酶家族(aldehyde dehydrogenase family, *ALDH*)基因上调表达(图 4C)。

2.6 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

对参与半胱氨酸和蛋氨酸、糖酵解、精氨酸和脯氨酸代谢通路中的 15 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。由图 5 可见,除 *PGI* 和 *PFP* 外,其余 13 个基因的表达模式与 RNA-seq 的相一致。表明转录组测序结果准确可靠。

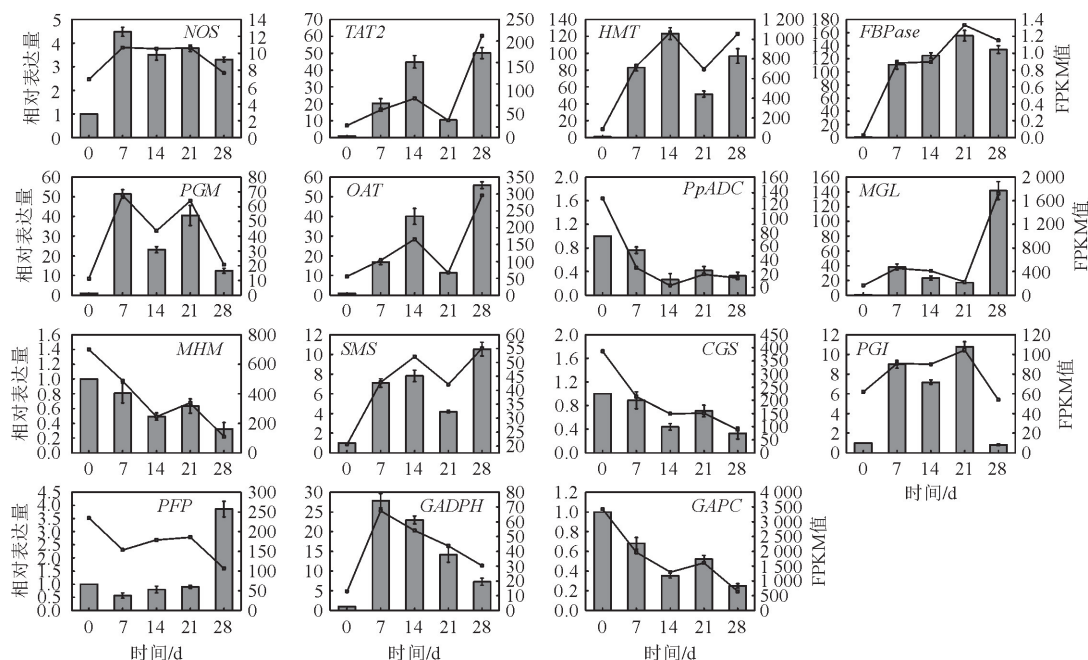


图5 桃 15 个功能基因的荧光定量验证(qRT-PCR:直方图;FPKM:折线图)

Fig. 5 Fluorescence quantitative verification of 15 functional genes of peach. Histograms were used to describe qRT-PCR, and line charts were used to describe RNA-Seq

3 结论与讨论

对桃砧木‘GF677’4 个不同发育时期的插条韧皮部进行了转录组分析。结果表明,糖酵解通路关键基因显著上调,参与激活期的能量补给;蛋氨酸代谢通路诱导基因的表达,参与韧皮部维管组织的分化与形成;精氨酸代谢激活 *NOS* 基因的表达,有利于 NO 的传递,实现根源信号向地上部的运输,进而调控桃的不定根发育过程。

扦插繁殖是获得自根苗最经济有效的技术手段之一^[25]。桃扦插成功的关键是诱导不定根形成,且生根过程受诸多因素影响,除与植物自身的遗传特性密切相关外,温度、湿度、扦插基质和植物生长调

节剂等也对桃生根率有不同程度的影响^[26-27]。植物激素在生根生长发育中起关键作用。李立佼^[28]在蓝莓上研究发现 IBA 和 IAA 通过影响愈伤组织和根原基的形成而调控不定根的生长发育。随后,权金娥^[29]发现 IBA 通过调控 MTA 关键通路中的 *SAMs* 和 *MTN* 基因来调控不定根生长。本试验通过转录组研究发现,糖酵解、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、核糖体和酮体的合成与降解等通路显著富集,这些通路有可能是生根形成的关键途径。

糖酵解代谢途径参与植物多种发育过程,此过程将葡萄糖和糖原降解为丙酮酸并伴随着 ATP 形成^[30]。研究证实,蔗糖、葡萄糖和果糖之间的转化

主要依赖于糖酵解代谢完成,同时也可诱导不定根的形成^[31-32]。本研究在 KEGG 富集分析中发现糖酵解在激活期果糖-二磷酸醛缩酶 1,细胞质(fructose-bisphosphate aldolase 1,cytoplasmic,*FBA3*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶,胞质(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,cytosolic,*GAPC*)、和烯醇化酶(enolase,*ENO*)等基因显著上调,这与张恩亮等^[21]在楸树上的研究结果一致,激活期是响应内外源信号分子的关键时期,此阶段细胞受到刺激而抑制不定根生长,糖酵解产生的能量与其互补。这可能是糖酵解在不定根形成过程中显著富集的主要原因。

氨基酸是植物生长发育系统中次生代谢物合成的关键前体。其中,同型半胱氨酸是蛋氨酸代谢过程中的重要中间产物^[33-34]。正因为蛋氨酸作为多胺(PA)、烟胺(NA)和乙烯生物合成过程的副产物,故而蛋氨酸代谢对植物生长发育甚是重要^[35-36]。Waduware-Jayabahu 等^[35]在拟南芥中研究发现,蛋氨酸代谢参与韧皮部维管组织的分化与形成。乙烯作为蛋氨酸代谢循环产物可诱导不定根的形成,故而抑制乙烯的生物合成将影响不定根形成^[37]。*SAMS* 和 *MTN* 基因作为蛋氨酸代谢的关键基因,其中在 *SAMS* 基因作用下可生成 SAM,而 *MTN* 是催化蛋氨酸生成 MTR 酶,涉及不定根形成^[38-39]。本研究发现,采用 IBA 和 NAA 处理的插穗在不定根原基形成期 SAM 的基因大量表达,且前面的研究与本试验在桃不定根发育中的研究相符,表明蛋氨酸代谢在桃生根过程中起着重要的作用,且蛋氨酸代谢与 IBA 诱导生根存在一定的关系。

PA 和 NO 为植物中重要信使分子,参与植物体内几乎所有的生理生化过程,包括生长发育、抗逆性等^[40-41]。Corpas 等^[42]研究表明,植物内源 NO 主要存在于木质部和韧皮部,这有利于 NO 的传递,从而能够实现根源信号向地上部的运输。L-精氨酸在植物体内不仅是一种重要的再利用氮素贮藏营养物质,也是生成 PA 和一氧化氮(NO)的合成前体。研究表明,精氨酸可经过 ADC 或精氨酸酶-鸟氨酸脱羧酶(ODC)途径形成 PA,也可经 NOS 途径形成 NO^[40]。本研究中,一氧化氮合酶(putative nitric oxide synthase,*NOS*)基因在不定根形成过程中呈上调表达,说明多胺可能参与不定根根原基的形成,这与屈东海等^[43]在锯缘落地生根的研究结果相吻合。此外,已有研究表明,植物体内脯氨酸的代谢主要包括鸟氨酸(Orn)和谷氨酸(Glu)2 个途径^[44]。其中,吡咯啉-5-羧酸合成酶(Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase,*P5CS*)、吡咯啉-5-羧酸还原酶

(pyrroline-5-carboxylate reductase,*P5CR*)和鸟氨酸 σ -氨基转移酶(ornithine σ -aminotransferase, σ -OAT)是合成脯氨酸的关键酶,而脯氨酸脱氢酶(proline dehydrogenase,*PDH*)则是脯氨酸降解过程中的限速酶^[45]。本研究中,*OAT* 基因显著上调,*P5CR*、*P5CS* 和脯氨酸 4-羟化酶系中(probable prolyl 4-hydroxylase,*P4H*)基因显著下调。由此可知,植物体内氨基酸的调节与合成酶相关基因表达之间存在着很大的相关性,这与曾钰^[46]在枳砧上的研究结果相一致。

参考文献:

- [1] 何平,李林光,王海波,等.基于转录组分析不同着色桃果皮花青苷表达模式与转录因子[J].植物生理学报,2019,55(3):310-318.
HE P,LI L G,WANG H B,*et al.* Comparative analysis of anthocyanin expression patterns and transcription factors in different colored peach skins based on transcriptome data[J]. Plant Physiology Journal,2019,55(3):310-318. (in Chinese)
- [2] OLIVEIRA J,SILVA D,BRUCKNER C H,*et al.* Initial development of peach rootstock genotypes propagated by herbaceous cuttings[J]. Revista Brasileira de Fruticultura,2020,42(3):100-294.
- [3] 王富荣,王会良,龚林忠,等.4 种桃砧木品种硬枝扦插生根研究[J].安徽农业科学,2016,44(17):39-40,60.
WANG F R,WANG H L,GONG L Z,*et al.* Hardwood cuttage rooting of four varieties of peach rootstocks[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences,2016,44(17):39-40,60. (in Chinese)
- [4] ALEKSANDAR M,MELPOMENA P,VIKTOR G. Investigation of the possibility for production of some stone fruit rootstocks by rooting cuttings[J]. Acta Agriculturae Serbica,2015,20(39):75-83.
- [5] 张帆,王鸿.桃绿枝扦插研究进展[J].中国果树,2019(2):20-25.
ZHANG F,WANG H. Research progress of peach greenwood cutting[J]. China Fruits,2019(2):20-25. (in Chinese)
- [6] 周亮.NAA 和 IBA 生根剂对柳叶马鞭草插条生根的影响[J].西北林学院学报,2015,30(5):161-164,171.
ZHOU L. Effects of NAA and IBA on the rooting of *Verbena bonariensis* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2015,30(5):161-164,171. (in Chinese)
- [7] TSIPOURIDIS C,THOMIDIS T,MICHAILIDES Z. Influence of some external factors on the rooting of GF677, peach and nectarine shoot hardwood cuttings[J]. Australian Journal of Experimental Agriculture,2005,45:107-113.
- [8] DESSY S,RADICE S,ANDORNO A,*et al.* GF655-2 rootstocks: propagation by cuttings with growth regulators and bottom heat[J]. Acta Horticulturae,2004,658:629-635.
- [9] LORETI F,MORINI F,GRILLI A. Rooting response of P. S. B2 and GF677 rootstock cuttings [J]. Acta Horticulturae,1985,173:261-269.

- [10] 王艳晶,彭祚登.不同生根促进剂对国槐嫩枝扦插生根过程中内源激素变化的影响[J].西北林学院学报,2017,32(5):109-114.
WANG Y J,PENG Z D. Effects of different rooting accelerators on the changes of endogenous hormones in *Sophora japonica* during softwood-cutting rooting process[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(5): 109-114. (in Chinese)
- [11] YANG H, YVONNE K, HAJIREZAEI M R, *et al.* Role of auxin homeostasis and response in nitrogen limitation and dark stimulation of adventitious root formation in petunia cuttings[J]. Annals of Botany, 2019(6): 1053-1066.
- [12] 张帆,王鸿.基质和激素对桃砧木 GF677 硬枝扦插生根的影响[J].林业科技通讯,2018(12):53-56.
ZHANG F,WANG H. Effect of Substrate and hormone on hard branch cuttage rooting of peach rootstock GF677[J]. Forest Science and Technology, 2018(12): 53-56. (in Chinese)
- [13] 张帆,王鸿.桃硬枝扦插生根机理研究进展[J].植物生理学报,2019,55(11):1595-1606.
ZHANG F,WANG H. Research status of rooting mechanism of peach hardwood cutting[J]. Plant Physiology Journal, 2019,55(11):1595-1606. (in Chinese)
- [14] PACURAR, D I, PERRONE I. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting[J]. Physiol Plantarum, 2014, 151(1): 83-96.
- [15] THOMAS P, LEE M M, SCHIEFEIBELN J W. Molecular identification of proline-rich protein genes induced during root formation in grape (*Vitis vinifera* L.) stem cuttings[J]. Plant Cell & Environment, 2010, 26(9): 1497-1504.
- [16] LI Y H, ZOU M H, FENG B H, *et al.* Molecular cloning and characterization of the genes encoding an auxin efflux carrier and the auxin influx carriers associated with the adventitious root formation in mango (*Mangifera indica* L.) cotyledon segments[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 55: 33-42.
- [17] 董志丹. IBA 和 GO 调控苹果砧木不定根形成的生理与分子机制研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2021.
- [18] 李珂. 苹果砧木不定根发育转录组及候选基因 MdRRs 和 MdCRFs 筛选与表达分析[D]. 陕西杨陵:西北农林科技大学, 2018.
- [19] HAMILTON J P, BUELL C R. Advances in plant genome sequencing[J]. The Plant Journal, 2012, 70(1): 177-190.
- [20] 王楚彪,卢万鸿,林彦,等.转录组测序的发展和应用[J].桉树科技,2018,35(4):20-26.
WANG C B, LU W H, LIN Y, *et al.* Development and application of transcriptome sequencing[J] Eucalypt Science & Technology, 2018, 35(4): 20-26. (in Chinese)
- [21] 张恩亮,马玲玲,杨如同,等. IBA 诱导榿树嫩枝扦插不定根发育的转录组分析[J].林业科学,2018,54(5):48-61.
ZHANG E L, MA L L, YANG R T, *et al.* Transcriptome profiling of IBA-Induced adventitious root formation in softwood cuttings of catalpa bungei 'yu-1'[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2018, 54(5): 48-61. (in Chinese)
- [22] 姜福星,杨丽娟,陈其兵,等.泸定百合转录组测序与特性分析[J].西北林学院学报,2015,30(5):143-150.
JIANG F X, YANG L J, CHEN Q B, *et al.* Transcriptome sequencing and characteristic analysis of lilium sargentiae wilson[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(5): 143-150. (in Chinese)
- [23] 刘春晓,黄小庆,刘自广,等.十字花科植物种子低分子 RNA 提取方法比较[J].基因组学与应用生物学,2019,38(3):1236-1241.
LIU C X, HUANG X Q, LIU Z G, *et al.* Comparison of low molecular RNA extraction methods in cruciferae seeds[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(3): 1236-1241. (in Chinese)
- [24] ELIE M. In papyro comparison of TMM(edgeR), RLE(DESeq 2), and MRN normalization methods for a simple two-conditions-without-replicates RNA-seq experimental design[J]. Frontiers in Genetics, 2016, 7: 164.
- [25] 杜学梅,杨廷桢,高敬东,等.苹果扦插繁殖生根机理研究进展[J].农学学报,2019,9(12):17-22.
DU X M, YANG T Z, GAO J D, *et al.* Progress of rooting mechanism study in apple cutting propagation[J]. Journal of Agriculture, 2019, 9(12): 17-22. (in Chinese)
- [26] SINGH A, KHAN M A. Comparative effect of IAA, IBA and NAA on rooting of hardwood stem cuttings of Celtis australis Linn[J]. Range Management & Agroforestry, 2009, 30(1): 78-80.
- [27] AN H, MENG J, XU F, *et al.* Rooting ability of hardwood cuttings in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) using different indole-butyric acid concentrations[J]. Hort Science, 2018, 54(2): 194-199.
- [28] 李立佼.南高丛蓝莓绿枝扦插促根技术与生根机理初探[D].成都:四川农业大学, 2014.
- [29] 权金娥. IBA 诱导下四倍体刺槐插穗生根的分子调控机制研究[D]. 陕西杨陵:西北农林科技大学, 2015.
- [30] PLAXTON W C. The organization and regulation of plant glycolysis[J]. Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology, 1996, 47(47): 185-214.
- [31] WANG Y, WEATHERS P J. Sugars proportionately affect artemisinin production[J]. Plant Cell Report, 2007, 26(7): 1073-1081.
- [32] AHKAMI A H, MELZER M, GHAFARI M R, *et al.* Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation[J]. Planta, 2013, 238(3): 499-517.
- [33] PI E, ZHU C, FAN W, *et al.* Quantitative phosphoproteomic and metabonomicanalyses reveal GmMYB173 optimizes flavonoid metabolism in soybean under salt stress[J]. Molecular & Cellular Proteomics Mcp, 2018, 17(2): 1209-1224.
- [34] SHIVANI S, ISHA S, NAVDEEP K. Auxin: a master regulator in plant root development[J]. Plant Cell Reports, 2013, 32(6): 741-757.
- [35] WADUWARA-JAYABAHU I, OPPERMAN Y, WIRTZ M. Recycling of methylthioadenosine is essential for normal vascular development and reproduction in arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2012, 158(4): 1728-1744.

- [36] ALBERS E. Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine[J]. *Iubmb Life*, 2010, 61(12): 1132-1142.
- [37] LI S, XUE L, XU S, *et al.* Mediators, genes and signaling in adventitious rooting[J]. *Botanical Review*, 2009, 75(2): 230-247.
- [38] VAN DE B, BULENS I, OPPERMANN Y, *et al.* S-adenosyl-L-methionine usage during climacteric ripening of tomato in relation to ethylene and polyamine biosynthesis and transmethylation capacity[J]. *Physiologia Plantarum*, 2012, 148(2): 176-188.
- [39] BÜRSTENBINDER K, WADUWARA I, SCHOOR S. Inhibition of 5'-methylthioadenosine metabolism in the Yang cycle alters polyamine levels, and impairs seedling growth and reproduction in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2010, 62(6): 977-988.
- [40] 杨洪强, 高华君. 植物精氨酸及其代谢产物的生理功能[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2007, 33(1): 1-8.
- YANG H Q, GAO H J. Physiological function of arginine and its metabolites in plants[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2007, 33(1): 1-8. (in Chinese)
- [41] 王伟, 刘世豪, 郑先波, 等. 桃 PpCuAO 家族基因鉴定及在果实发育和成熟中的表达分析[J]. *果树学报*, 2021, 38(9): 1413-1422.
- WANG W, LIU S H, ZHEN X B, *et al.* Genomic identification and expression pattern of copper-amine oxidase genes during peach fruit development and ripening[J]. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(9): 1413-1422. (in Chinese)
- [42] CORPAS F J, BARROSO J B, RARROSO L. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells[J]. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(4): 145-150.
- [43] 屈东海, 仇汉林, 黄勇, 等. 锯缘落地生根的器官特征及多梳蛋白 KsRING1 的组织表达分析[J]. *植物生理学报*, 2018, 54(9): 1441-1450.
- QU D H, QIU H L, HUANG Y, *et al.* Organ characteristics and expression analysis of polycomb subunit KsRING1 in *Kalanchoe serrata* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(9): 1441-1450. (in Chinese)
- [44] KU H M, HU C C, CHANG H J. Analysis by virus induced gene silencing of the expression of two proline biosynthetic pathway genes in *Nicotiana benthamiana* under stress conditions[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2011, 49(10): 1147-1154.
- [45] 王康, 刘艳香, 董洁. 盐胁迫对菊苣幼苗脯氨酸积累及其代谢途径的影响[J]. *草地学报*, 2011, 19(1): 102-106.
- WANG K, LIU Y X, DONG J. Effects of NaCl stress on proline accumulation and metabolic pathways of chicory (*Cichorium intybus* L.) seedlings[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2011, 19(1): 102-106. (in Chinese)
- [46] 曾钰. 外源脯氨酸对硼胁迫下枳砧生长及脯氨酸代谢的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.

(上接第 77 页)

- [20] GALE M R, GRIGAL D E. Vertical root distributions of northern tree species in relation to successional status[J]. *Canadian Journal of Forest Research*, 1987, 17(8): 829-834.
- [21] 夏延国, 董芳宇, 吕爽, 等. 极端干旱区胡杨细根的垂直分布和季节动态[J]. *北京林业大学学报*, 2015, 37(7): 37-44.
- XIA Y G, DONG F Y, LÜ S, *et al.* Vertical distribution and seasonal dynamics of fine roots of *Populus euphratica* in extreme arid areas [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2015, 37(7): 37-44. (in Chinese)
- [22] 田乐宇, 王鑫, 孙衍汤, 等. 海南中部丘陵区 3 种林分根系分布特征[J]. *应用与环境生物学报*, 2021, 27(6): 1530-1537.
- TIAN L Y, WANG X, SUN Y T, *et al.* Root distribution characteristics of three stands in hilly area of central Hainan [J]. *Journal of Applied and Environmental Biology*, 2021, 27(6): 1530-1537. (in Chinese)
- [23] 李志新, 赵曦阳, 杨成君, 等. 转 TaLEA 基因小黑杨株系变异及生长稳定性分析[J]. *北京林业大学学报*, 2013, 35(2): 57-62.
- LI Z X, ZHAO X Y, YANG C J, *et al.* Analysis of strain variation and growth stability of transgenic *Populus nigra* with TaLEA gene [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2013, 35(2): 57-62. (in Chinese)
- [24] HUANG Y, ZHEN Z, CUI Z, *et al.* Growth and arthropod community characteristics of transgenic poplar 741 in an experimental forest[J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 162(1): 113284.
- [25] 王瑞雪, 邱彤, 刘红梅, 等. Ri 质粒 T-DNA 对 6 年生转基因三倍体毛白杨生长和生理性状的影响[J]. *核农学报*, 2017, 31(6): 1046-1052.
- WANG R X, QIU T, LIU H M, *et al.* Effects of Ri plasmid T-DNA on the growth and physiological characteristics of 6-year-old transgenic triploid *Populus tomentosa* [J]. *Journal of Nuclear Agriculture*, 2017, 31(6): 1046-1052. (in Chinese)