

黄秋葵对南方根结线虫抗性的转录组分析

练冬梅 赖正锋 姚运法 林碧珍 洪建基*

(福建省农业科学院亚热带农业研究所,福建 漳州 363005)

摘要:为了解黄秋葵抗南方根结线虫相关基因组学,利用 Illumina Hi-seq TM2500 高通量测序技术研究受南方根结线虫侵染后黄秋葵种质 12C2 转录组基因的差异表达。结果表明,接种南方根结线虫 18 h 后,从接种和未接种的黄秋葵种质 12C2 根尖中共获得 71.49 Gb 有效数据,Q30 碱基百分比均达到 94.0%以上。共获得 2 318 个差异表达基因(DEGs),包括 1 156 个上调基因,1 162 个下调基因,其中功能注释基因 2 202 个。根据 unigene 库序列进行 GO、KOG 和 KEGG 注释,细胞壁代谢相关基因——内切葡聚糖酶基因家族、聚半乳糖醛酸酶基因家族、葡聚糖内-1,3- β 葡糖苷酶基因家族和果胶裂解酶基因家族下调表达,植物激素代谢相关基因——生长素响应蛋白基因、生长素流入运输载体基因下调表达,茉莉酸合成酶基因上调表达,调控相关基因表达的 WRKY 和 MYB 转录因子基因家族上调表达,参与植物细胞的膜联蛋白基因家族上调表达,植物细胞周期蛋白基因家族下调表达。本研究结果为开展黄秋葵抗南方根结线虫基因组学和分子生物学研究奠定了基础。

关键词:黄秋葵;南方根结线虫;转录组;差异表达基因

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.12.2692

黄秋葵 (*Abelmoschus esculentus* L.) 锦葵科 (Malvaceae) 秋葵属 (*Abelmoschus*)^[1], 又名秋葵 (okra)、补肾草、咖啡葵等,一年或多年生草本植物。原产于非洲,20 世纪 20 年代初从印度引入我国。黄秋葵作为一种特色的保健型蔬菜,在广东、福建、山东等地区均有大规模种植^[2]。在福建省,漳州地区每年黄秋葵种植面积累计达到 1 333 hm²,建宁、泰宁和将乐等地区种植的黄秋葵品种洋辣、痴椒也已有百年之久^[3]。黄秋葵根结线虫病害主要由南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 引起^[4]。随着黄秋葵生产规模化、设施化和连作化,南方根结线虫已成为分布最广、危害最大的植物寄生线虫之一,严重影响黄秋葵的生长和产量^[5]。因此,黄秋葵南方根结线虫病防控技术的研究受到越来越多关注,包括黄秋葵嫁接玫瑰茄砧木^[6]、筛选抗病品种^[5,7-8]等手段。抗性品种的选育或抗性基因的挖掘与利用是防治黄秋葵南方根结线虫最有效的方法之一。

基于测序技术的进步,近年来在番茄^[9]、甘薯^[10]、

烟草^[11]、火参果^[12]、苜蓿^[13]等植物上已利用转录组测序技术对寄主与南方根结线虫分子互作机制进行了较深入的研究。邢雪霞^[11]对抗感南方根结线虫病烟草表达的 289 个差异基因进行功能注释和富集分析,发现细胞壁修饰、蛋白激酶、激素信号转导和转录因子等相关基因共同参与了烟草抗线虫反应。Ye 等^[12]发现火参果木质素的沉积、有毒化合物的合成、细胞壁的增强、线虫摄食的抑制和抗性蛋白的积累以及多种转录因子的激活都可能参与了南方根结线虫的抗性反应。Olga 等^[13]研究了苜蓿抗感材料在被南方根结线虫侵染时的差异表达基因,认为常见基因如抗病蛋白、类受体蛋白、假想蛋白等的差异表达对苜蓿抗性品种的抗病途径具有特殊作用。转录组分析是揭示植物抗病分子机制的主流方法,可以全面、系统地反映植物的抗病分子机制。张少平等^[14]和姚运法等^[15]通过转录组测序技术对黄秋葵的功能基因组学进行相关研究,但高抗南方根结线虫病种质资源在根结线虫侵染下的分子调控机制仍不清楚。本研究采用 Illumina HiSeq 2500

收稿日期:2019-06-19 接受日期:2019-08-27

基金项目:福建省公益类科研院所专项(2018R1101025-2)

作者简介:练冬梅,女,助理研究员,主要从事特色蔬菜研究。E-mail:woshildm1987@163.com

* 通讯作者:洪建基,男,研究员,主要从事特色经济作物研究。E-mail:76227508@qq.com

高通量测序技术,从分子层面研究和解析黄秋葵抗南方根结线虫病基因的表达变化,以期寻找黄秋葵抗病关键基因,为黄秋葵南方根结线虫病的防治和抗病品种选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试虫源:南方根结线虫由海南省农业科学院植物保护研究所提供,并长期培养保存于易感黄秋葵上。

黄秋葵种质来自于福建省农业科学院亚热带农业研究所,为高抗南方根结线虫种质资源 12C2^[16]。

1.2 盆栽接种

黄秋葵种子经 3% H₂O₂ 消毒 3 min,流水冲洗数次,将种子催芽露白后播种于盆中,花盆规格为直径 10 cm、高 20 cm。基质采用消毒培养土。每盆播 5 粒种子,播种 6 盆,待黄秋葵幼苗长至三叶一心时,每盆选取长势一致的 3 株留作接种试验。接种前,挑取黄秋葵根上南方根结线虫卵块,于蒸馏水中孵化 24~72 h,制备浓度为 1 000 头·mL⁻¹的 2 龄幼虫悬浮液。每盆接种 2 mL 悬浮液(约 2 000 头线虫),接种 3 盆,作为接种线虫处理组;3 盆接种等量清水,作为对照组。

1.3 采样

分别取未接种和接种 18 h 后的黄秋葵根尖约 1.5 cm,各 3 个重复(未接种的 3 次生物学重复分别记为 T01、T02、T03;接种的 3 次生物学重复分别记为 T04、T05、T06)。迅速放入液氮速冻,存于-80℃超低温冰箱备用。

1.4 转录组测序和分析

采用 RNAprep Pure Plant Kit 试剂盒(天根科技公司)提取黄秋葵根尖总 RNA。分别采用 Nanodrop、Qubit 2.0、Aglient 2100 技术检测 RNA 样品的纯度、浓度和完整性,构建 cDNA 文库,再使用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time, PCR)方法对文库的有效浓度进行准确定量,以保证文库质量。库检合格后,用 Illumina Hiseq TM2500(美国 Illumina 公司)进行高通量测序。运用生物信息学技术和方法对测序数据进行前期处理、序列比对、基因及基因组的注释、基因表达分析等。按照每千个碱基转录每百万映射读取的片段(fragment per kilobase of exon per million reads mapped, FPKM)法计算差异基因的表达量,若 log₂Fold change>0,则上调表达,反之,下调表达。

2 结果与分析

2.1 数据组装与分析

接种和未接种南方根结线虫的黄秋葵根尖经高通量测序和质量控制,共获得 71.49 Gb 有效数据(clean data),其 Q30 碱基百分比均达到 94.0%以上(表 1),表明测序结果可靠,可用于后续分析。对组装结果进行统计(表 2),共产生 53 556 条单基因序列(unigene)和 166 549 条转录本序列(transcript),N50 分别为 1 654 和 1 682 bp,组装完整性较高;其中长度为 300~500 bp 的单基因序列数量最多,为 20 844 条,占 38.92%,且随着长度的增加,单基因序列的数目减少。

表 1 有效数据评估统计
Table 1 Statistics of clean data

编号 Number	读数 Read	碱基 Base	GC 含量 GC content/%	≥Q30 /%
T01	24 753 409	7 405 298 280	44.67	94.28
T02	24 804 362	7 426 915 290	44.66	94.12
T03	26 516 083	7 938 429 874	45.38	94.15
T04	25 684 819	7 693 596 070	45.08	94.12
T05	27 129 755	8 120 986 092	44.60	94.57
T06	28 748 871	8 595 739 602	44.90	94.61

表 2 组装结果统计
Table 2 Statistics of assembled results

项目 Item	转录本序列数量 Transcript number	单基因序列数量 Unigene number
300~500 bp	36 351	20 844
500~1 000 bp	48 918	14 272
1000~2 000 bp	53 147	10 878
≥2 000 bp	28 133	7 562
总数 Total	166 549	53 556
总长度 Total length	206 659 252 bp	56 178 119 bp
N50/bp	1 682	1 654
平均 Mean	1 240.83 bp	1 048.96 bp

2.2 unigene 功能注释

为获得 unigene 的功能注释信息,通过 NR、Swiss-Prot、KEGG、COG、KOG、eggNOG、GO 和 Pfam 等 8 个数据库进行注释分析(表 3),在 53 556 条 unigene 中,共获得 38 196 条(71.32%)注释,以上 8 个数据库分别获得 37 555 (70.12%)、25 627 (47.85%)、15 453

表3 单基因序列的功能注释
Table 3 Function annotated of unigenes

数据库 Database	注释单基 因数 Unigene annotated	比例		比例 Proportion /%
		300~1 000 bp	>1 000 bp	
NR	37 555	20 378	17 177	70.12
Swiss-Prot	25 627	12 324	13 303	47.85
KEGG	15 453	8 441	7 012	28.85
COG	11 154	4 479	6 675	20.83
KOG	20 381	10 265	10 116	38.06
eggNOG	34 559	17 862	16 697	64.53
GO	21 510	13 107	8 403	40.16
Pfam	23 460	9 789	13 671	43.80
总数 Total	38 196	20 968	17 228	71.32

(28.85%)、11 154 (20.83%)、20 381 (38.06%)、34 559 (64.53%)、21 510 (40.16%) 和 23 460 条 (43.80%) 注释。

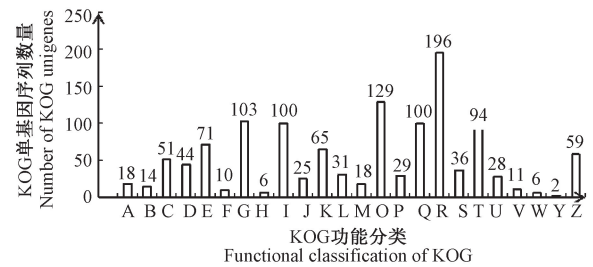
2.3 差异表达基因分析

抗病黄秋葵种质 12C2 未接种和接种 18 h 后根尖差异基因的表达分析,共获得 2 318 个差异表达基因 (differential expression genes, DEGs),包括 1 156 个上调基因,1 162 个下调基因,将其 DEGs 单基因序列分别在 8 个数据库中进行注释,共获得 2 202 条基因功能注释,COG、GO、KEGG、KOG、Pfam、Swiss-Prot、eggNOG 和 NR 分别注释 839、1 122、821、1 102、1 719、1 763、2 095 和 2 199 条,其中以 NR 数据库注释比率最高,达 99.86%。

2.3.1 DEGs 的 GO 功能注释 抗病黄秋葵种质 12C2 未接种和接种 18 h 后根尖差异基因 GO 功能注释的 1 122 条 DEGs,共分为三大类,分别为生物过程、细胞组分和分子功能,共划分为 44 个功能小类(表 4),生物过程的 DEGs 以代谢过程(49.2%)、细胞过程(38.8%)和单一生物过程(33.9%) 3 个功能小类的数量最多;细胞组分的 DEGs 以内膜(40.2%)、内膜组分(34.2%)、细胞(33.2%)、细胞组分(32.7%)和细胞器(20.8%) 5 个功能小类的数量最多;分子功能的 DEGs 以催化活性(56.3%)和结合活性(43.9%) 2 个功能小类的数量最多。

2.3.2 DEGs 的 KOG 功能注释 抗病黄秋葵种质 12C2 未接种和接种 18 h 后根尖差异基因 KOG 数据库注释的 1 102 条 DEGs 进行直系同源分类,并获得 24 个功能分类(图 1),主要集中在 R(一般性功能预测,

17.8%) 和 O(翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣,11.7%)。植物生长发育过程有大量基因表达,在南方根结线虫侵染下,部分涉及到了碳水化合物转运与代谢(9.3%),以及次生代谢产物的合成、转运和分解代谢(9.1%)、脂质转运与代谢(9.1%)、信号转导机制(8.5%)等过程,说明这些生物学过程对于黄秋葵生命活动具有重要作用。



注:A:RNA 的加工和修饰;B:染色体结构和动态变化;C:能源的产生和转化;D:细胞周期调控、细胞分裂和染色体分配;E:氨基酸转运与代谢;F:核苷酸转运与代谢;G:碳水化合物转运与代谢;H:辅酶转运与代谢;I:脂质转运与代谢;J:翻译、核糖体结构和生物合成;K:转录;L:复制、重组和修复;M:细胞壁/细胞膜的生物发生;O:翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣;P:无机离子转运与代谢;Q:次生代谢产物的合成、转运和分解代谢;R:一般性功能预测;S:未知功能;T:信号转导机制;U:细胞内运输、分泌和囊泡运输;V:防御机制;W:细胞外结构;Y:核结构;Z:细胞骨架。

Note: A: RNA processing and modification. B: Chromatin structure and dynamics. C: Energy production and conversion. D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning. E: Amino acid transport and metabolism. F: Nucleotide transport and metabolism. G: Carbohydrate transport and metabolism. H: Coenzyme transport and metabolism. I: Lipid transport and metabolism. J: Translation, ribosomal structure and biogenesis. K: Transcription. L: Replication, recombination and repair. M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis. O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones. P: Inorganic ion transport and metabolism. Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism. R: General function prediction only. S: Function unknown. T: Signal transduction mechanisms. U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport. V: Defense mechanisms. W: Extracellular structures. Y: Nuclear structure. Z: Cytoskeleton.

图1 差异表达基因 KOG 功能注释

Fig.1 KOG annotation of DEGs

2.3.3 DEGs 的 KEGG 功能注释 由表 5 可知,抗病黄秋葵种质 12C2 未接种和接种 18 h 后根尖差异基因分别富集在 821 条 KEGG 代谢通路,通路主要分为五类:第一类为细胞过程,涉及 3 个通路,分别为内吞作用、过氧化物酶体和吞噬体;第二类为环境信息处理,共有 1 个通路,为植物激素信号转导;第三类为遗传

表 4 差异表达基因 GO 功能注释

Table 4 GO annotation of DEGs

	GO 功能 GO function	数量 Number	比例 Proportion/%	
生物过程 Biological process	代谢过程 Metabolic process	552	49.2	
	细胞过程 Cellular process	435	38.8	
	单一生物过程 Single-organism process	380	33.9	
	刺激应答 Response to stimulus	97	8.6	
	生物调节 Biological regulation	151	13.5	
	定位 Localization	96	8.6	
	细胞成分或生物合成 Cellular component organization or biogenesis	95	8.5	
	发育过程 Developmental process	54	4.8	
	多细胞生物过程 Multicellular organismal process	55	4.9	
	信号传导 Signaling	40	3.6	
	繁殖过程 Reproductive process	36	3.2	
	生殖 Reproduction	36	3.2	
	生长 Growth	6	0.5	
	解毒作用 Detoxification	9	0.8	
	有节奏的过程 Rhythmic process	3	0.3	
	多生物过程 Multi-organism process	15	1.3	
	免疫系统过程 Immune system process	5	0.4	
	细胞组分 Cellular component	细胞 Cell	372	33.2
		细胞组分 Cell part	367	32.7
		细胞连接 Cell junction	23	2.0
核状小体 Nucleoid		1	0.1	
细胞器 Organelle		233	20.8	
内膜 Membrane		451	40.2	
病毒体组分 Virion part		2	0.2	
内膜组分 Membrane part		384	34.2	
细胞器组分 Organelle part		91	8.1	
胞外区 Extracellular region		49	4.4	
胞外区域组分 Extracellular region part		1	0.1	
膜封闭腔 Membrane-enclosed lumen		9	0.8	
高分子配合物 Macromolecular complex		36	3.2	
共质体 Symplast		23	2.0	
超分子复合物 Supramolecular complex		26	2.3	
分子功能 Molecular function		催化活性 Catalytic activity	632	56.3
		结合活性 Binding	492	43.9
		转运活性 Transporter activity	66	5.9
		转录因子活性,蛋白质结合 Transcription factor activity, protein binding	2	0.2
		信号传感器活性 Signal transducer activity	5	0.4
	结构分子活性 Structural molecule activity	13	1.2	
	抗氧化活性 Antioxidant activity	9	0.8	
	营养储藏活性 Nutrient reservoir activity	4	0.4	
	分子传感器活性 Molecular transducer activity	5	0.4	
	分子功能调节器 Molecular function regulator	18	1.6	
	核酸结合转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity	25	2.2	
电子载体活性 Electron carrier activity	12	1.1		

表5 差异表达基因 KEGG 功能注释
Table 5 KEGG annotation of DEGs

	KEGG 代谢通路 KEGG pathway	数量 Number	比例 proportion/%
细胞过程 Cellular processes	吞噬体 Phagosome	10	1.2
	内吞作用 Endocytosis	13	1.6
	过氧化物酶体 Peroxisome	20	2.4
环境信息处理 Environmental information processing	植物激素信号转导 Plant hormone signal transduction	29	3.5
遗传信息处理 Genetic information processing	RNA 降解 RNA degradation	10	1.2
	DNA 复制 DNA replication	15	1.8
	真核生物核糖体生物合成 Ribosome biogenesis in eukaryotes	6	0.7
	内质网蛋白加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	8	1.0
	泛素介导的蛋白水解作用 Ubiquitin mediated proteolysis	9	1.1
新陈代谢 Metabolism	半乳糖代谢 Galactose metabolism	10	1.2
	2-氧代羧酸代谢 2-Oxocarboxylic acid metabolism	10	1.2
	甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	11	1.3
	酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	12	1.5
	柠檬酸循环 Citrate cycle	12	1.5
	光合生物固碳作用 Carbon fixation in photosynthetic organisms	12	1.5
	乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	14	1.7
	甘油磷脂代谢 Glycerophospholipid metabolism	14	1.7
	脂肪酸生物合成 Fatty acid biosynthesis	15	1.8
	亚麻酸代谢 Alpha-Linolenic acid metabolism	15	1.8
	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation	16	1.9
	氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	18	2.2
	苯丙素的生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	19	2.3
	糖酵解和糖异生 Glycolysis/Gluconeogenesis	20	2.4
	丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	20	2.4
	脂肪酸降解 Fatty acid degradation	22	2.7
	戊糖、葡萄糖醛酸转换 Pentose and glucuronate interconversions	23	2.8
	脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism	24	2.9
	氨基酸生物合成 Biosynthesis of amino acids	28	3.4
	碳代谢 Carbon metabolism	36	4.4
	淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	36	4.4
	精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	6	0.7
	丙酮代谢 Propanoate metabolism	6	0.7
	赖氨酸降解 Lysine degradation	6	0.7
	磷酸肌醇代谢 Inositol phosphate metabolism	6	0.7
	类固醇生物合成 Steroid biosynthesis	6	0.7
	精氨酸生物合成 Arginine biosynthesis	6	0.7
	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	6	0.7
	果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism	7	0.9
	不饱和脂肪酸生物合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	7	0.9

表 5(续)

KEGG 代谢通路 KEGG pathway	数量 Number	比例 proportion/%
生物素代谢 Biotin metabolism	7	0.9
抗坏血酸和醛酸代谢 Ascorbate and aldarate metabolism	7	0.9
色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	8	1.0
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	8	1.0
氮代谢 Nitrogen metabolism	8	1.0
嘌呤代谢 Purine metabolism	8	1.0
半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	9	1.1
嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	9	1.1
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	9	1.1
苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	9	1.1
有机系统 Organismal systems	昼夜节律-植物 Circadian rhythm-plant	16 1.9

信息处理,涉及 5 个通路,以 DNA 复制最多;第四类为新陈代谢,共有 40 个通路,最多的为碳代谢(4.4%)、淀粉和蔗糖的代谢(4.4%),其次为氨基酸的生物合成(3.4%);第五类为有机系统,共有 1 个通路,为昼夜节律-植物。

2.4 差异基因分析

通过对抗病黄秋葵种质 12C2 未接种和接种 18 h 后根尖转录组测序结果进行功能注释、功能分类及代谢途径分析表明(表 6),线虫侵染黄秋葵根部时,4 个内切葡聚糖酶基因、4 个聚半乳糖醛酸酶基因、5 个葡聚糖内-1,3- β 葡糖苷酶基因、4 个果胶裂解酶基因下调表达,主要参与细胞壁组成成分纤维素和果胶质的生物代谢过程;生长素响应蛋白基因、生长素流入运输载体基因下调表达,茉莉酸合成酶基因上调表达,其主要参与植物激素调控;3 个 WRKY 转录因子基因、2 个 MYB 转录因子基因上调表达,其主要参与相关基因表达调控;2 个膜联蛋白基因上调表达,6 个植物细胞周期蛋白基因下调表达,其主要参与植物细胞相关基因的表达。

3 讨论

运用转录组测序技术研究南方根结线虫与黄秋葵的互作,挖掘抗病基因的研究尚鲜见报道。转录组主要指所有编码蛋白质的 mRNA 总和^[17],能够从整体水平探索基因的结构和功能。黄秋葵为非模式植物,需要通过同源物种的测序信息进行比对分析,研究各种特定的生物学过程和分子机理。本研究利用 Illumina HiSeq TM2500 高通量测序技术构建了黄秋葵

在南方根结线虫侵染下的根尖转录组数据库,借助其他物种已有数据库信息,对差异表达基因进行比对分析,表明线虫侵染后黄秋葵高抗种质 12C2 根尖的植物防御反应、植物激素代谢、转录因子及其他相关功能蛋白基因的表达发生了改变。

植物细胞壁由纤维素、亚纤维素和果胶质组成,它作为第一道防线阻止线虫入侵^[18]。线虫能够分泌细胞修饰酶类侵染植物根部,诱导植物细胞壁中的修饰蛋白基因表达^[19]。在本研究中,内切葡聚糖酶基因家族、聚半乳糖醛酸酶基因家族和葡聚糖内-1,3- β 葡糖苷酶基因家族在抗病种质 12C2 中下调表达,抑制细胞壁降解,这可能是黄秋葵对南方根结线虫侵染的一种防御反应。

植物激素几乎参与了所有的生命活动,其对线虫侵染的响应也不例外。植物体中的激素没有明显的专一性,一种激素可以调节多种生理过程,而多种激素又具有调节同一生理过程的作用^[20]。在植物激素信号转导途径中,生长素和茉莉酸主要调控植物生长发育以应对线虫入侵。在本研究中,生长素响应蛋白基因、生长素流入运输载体基因下调表达,导致细胞中生长素含量下降,生长素无法大量积累可能导致根部巨型细胞的大量形成受阻,这与前人研究黄瓜^[21]和烟草^[22]对南方根结线虫抗性的结论一致。茉莉酸作为一种信号物质,其过量表达可以提高番茄对南方根结线虫的防御^[23],说明茉莉酸合成酶上调表达,有利于黄秋葵抗南方根结线虫。

在植物根部受根结线虫侵染后形成根结的过程中,转录因子对相关基因表达调控起关键性作用^[24-26]。郑井元^[27]研究发现,辣椒受到南方根结线

表6 南方根结线虫侵染下黄秋葵部分差异基因的表达

Table 6 Some DEGs of okra under *M. incognita* infect

ID	基因 Genes	Log ₂ FC	表达 Expression
c130110.graph_c0	内切葡聚糖酶 11 基因 <i>Endoglucanase 11 gene</i>	-3.87	↓
c130591.graph_c1	内切葡聚糖酶 8 基因 <i>Endoglucanase 8 gene</i>	-2.40	↓
c124965.graph_c0	内切葡聚糖酶 24 基因 <i>Endoglucanase 24 gene</i>	-2.31	↓
c134437.graph_c2	内切葡聚糖酶 6 基因 <i>Endoglucanase 6 gene</i>	-2.12	↓
c124569.graph_c0	聚半乳糖醛酸酶 3 基因 <i>Polygalacturonase 3 gene</i>	-4.0	↓
c130071.graph_c0	聚半乳糖醛酸酶 1 基因 <i>Polygalacturonase 1 gene</i>	-3.61	↓
c123940.graph_c0	聚半乳糖醛酸酶同种型 X2 基因 <i>Polygalacturonase isoform X2 gene</i>	-3.46	↓
c120989.graph_c0	聚半乳糖醛酸酶 At1g48100 基因 <i>Polygalacturonase At1g48100 gene</i>	-3.04	↓
c124443.graph_c0	葡聚糖内-1,3-β 葡糖苷酶 12 基因 <i>Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 12 gene</i>	-2.80	↓
c129529.graph_c0	葡聚糖内-1,3-β 葡糖苷酶 1 基因 <i>Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 1 gene</i>	-2.59	↓
c124443.graph_c1	葡聚糖内-1,3-β 葡糖苷酶 13 基因 <i>Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 gene</i>	-2.34	↓
c127987.graph_c0	葡聚糖内-1,3-β 葡糖苷酶 2 基因 <i>Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 2 gene</i>	-2.17	↓
c129577.graph_c1	葡聚糖内-1,3-β 葡糖苷酶 4 基因 <i>Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 4 gene</i>	-2.04	↓
c123016.graph_c1	果胶裂解酶 12 基因 <i>Pectate lyase 12 gene</i>	-3.77	↓
c122895.graph_c1	果胶裂解酶 5 基因 <i>Pectate lyase 5 gene</i>	-3.47	↓
c122193.graph_c0	果胶裂解酶 15 基因 <i>Pectate lyase 15 gene</i>	-3.38	↓
c107268.graph_c0	果胶裂解酶 1 基因 <i>Pectate lyase 1 gene</i>	-3.07	↓
c124433.graph_c0	生长素响应蛋白 27 基因 <i>Auxin-responsive protein 27 gene</i>	-2.26	↓
c99288.graph_c0	生长素流入运输载体 5 基因 <i>Auxin transporter protein 5 gene</i>	-3.08	↓
c81676.graph_c0	茉莉酸合成酶 1 基因 <i>Jasmonic acid-amido synthetase 1 gene</i>	2.39	↑
c118036.graph_c0	WRKY65 转录因子基因 <i>WRKY65 gene</i>	3.40	↑
c131229.graph_c1	WRKY35 转录因子基因 <i>WRKY35 gene</i>	1.98	↑
c126898.graph_c0	WRKY23 转录因子基因 <i>WRKY23 gene</i>	1.55	↑
c134388.graph_c1	MYB1 转录因子基因 <i>MYB1 gene</i>	3.39	↑
c127265.graph_c2	MYB108 转录因子基因 <i>MYB108 gene</i>	2.01	↑
c120497.graph_c0	膜联蛋白 D4 基因 <i>Annexin D4 gene</i>	2.62	↑
c120122.graph_c0	膜联蛋白 D3 基因 <i>Annexin D3 gene</i>	2.13	↑
c129721.graph_c1	植物细胞周期蛋白 D3-3 基因 <i>Cyclin D3-3 gene</i>	-3.15	↓
c132976.graph_c0	植物细胞周期蛋白 2 基因 <i>Cyclin 2 gene</i>	-2.61	↓
c116118.graph_c0	植物细胞周期蛋白 A2-4 基因 <i>Cyclin A2-4 gene</i>	-3.14	↓
c120126.graph_c0	植物细胞周期蛋白 S13-7 基因 <i>Cyclin S13-7 gene</i>	-2.87	↓
c131573.graph_c0	植物细胞周期蛋白 B2-4 基因 <i>Cyclin B2-4 gene</i>	-2.29	↓
c127590.graph_c1	植物细胞周期蛋白 D3-1 基因 <i>Cyclin D3-1 gene</i>	-2.22	↓

虫侵染后会引起 WRKY 转录因子的强烈表达。魏潇^[28]研究表明,红根甘肃桃通过 MYB 调控增加南方根结线虫抗性。本研究通过转录组测序发现,黄秋葵高抗种质 12C2 受南方根结线虫侵染后,WRKY、MYB 转录因子基因家族上调表达,有利于增强南方根结线虫抗性,与前人研究结果一致。

膜联蛋白是一种位于质膜上的钙磷脂结合蛋白,

在植物应对不良环境时具有重要作用^[29]。当植物受到逆境胁迫时,膜联蛋白生物活性被激活,特异地提高细胞内 Ca²⁺ 浓度,提高植物抗逆性^[30]。在本研究中,膜联蛋白基因家族上调表达,增加了黄秋葵种质 12C2 对南方根结线虫的抗性。在植物与线虫亲和反应中,细胞周期蛋白基因在线虫侵染后被激活^[31],本研究中植物细胞周期蛋白基因家族下调表达,能够抑制根部

巨型细胞的形成。

4 结论

在南方根结线虫侵染下,抗病黄秋葵种质 12C2 在一系列关键基因家族(内切葡聚糖酶基因家族、聚半乳糖醛酸酶基因家族、葡聚糖内-1,3- β 葡糖苷酶基因家族、果胶裂解酶基因家族、生长素响应蛋白基因、生长素流入运输载体基因、茉莉酸合成酶基因、WRKY、MYB 转录因子基因家族、膜联蛋白基因和植物细胞周期蛋白基因家族)共同作用下进行自我防御,能够抵御南方根结线虫的侵染。本研究从分子水平分析了抗病基因及其差异表达,为筛选黄秋葵抗南方根结线虫关键基因和功能验证提供了重要的基础,同时对黄秋葵南方根结线虫病防治及抗病品种选育具有重要意义。

参考文献:

- [1] Nipaporn S, Leonard M C S, Renko D V, Henk A S, Tanaboon S, Alphons G J V. Physicochemical properties of pectins from okra[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 24(1): 35-41
- [2] 吴剑夫,程安玮,孙金月,祝霞. 超声波辅助提取秋葵果胶工艺优化及理化性质分析[J]. 核农学报, 2018, 32(10): 2002-2011
- [3] 刘东祥,叶花兰,刘国道. 黄秋葵的应用价值及栽培技术研究进展[J]. 安徽农业科学杂志, 2006, 34(15): 3718-3720, 3725
- [4] 练冬梅,赖正锋,姚运法,洪建基. 黄秋葵根结线虫病的病原鉴定[J]. 福建农业科技, 2019(3): 40-42
- [5] Mukhta T, Hussain M A, Kayani M Z. Yield responses of 12 okra cultivars to southern root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) [J]. Bragantia, 2017, 76(1): 108-112
- [6] Marin M V, Santos L S, Gaion L A, Rabelo H O, Franco C A, Diniz G M M, Silva E H C, Braz L T. Selection of resistant rootstocks to *Meloidogyne enterolobii* and *M. incognita* for okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) [J]. Chilean Journal of Agricultural Research, 2017, 77(1): 58-64
- [7] Hussain M, Kamran M, Singh K, Zouhar M, Rysanek P, Anwar S A. Response of selected okra cultivars to *Meloidogyne incognita* [J]. Crop Protection, 2016, 82: 1-6
- [8] Tariq M, Muhammad A H, Muhammad Z K, Muhammad N A. Evaluation of resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in okra cultivars[J]. Crop Protection, 2014, 56: 25-30
- [9] Shukla N, Yadav R, Kaur P, Rasmussen S, Goel S, Agarwal M, Jagannath A, Gupta R, Kumar A. Transcriptome analysis of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)-infected tomato (*Solanum lycopersicum*) roots reveals complex gene expression profiles and metabolic networks of both host and nematode during susceptible and resistance responses[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(3): 615-633
- [10] Lee I H, Shim D, Jeong J C, Sung Y W, Nam K J, Yang J W, Ha J, Lee J J, Kim Y H. Transcriptome analysis of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)-resistant and susceptible sweetpotato cultivars[J]. Planta, 2019, 249(2): 431-444
- [11] 邢雪霞. 烟草对南方根结线虫抗性机理研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2018: 8-9
- [12] Ye D Y, Qi Y H, Cao S F, Wei B Q, Zhang H S. Histopathology combined with transcriptome analyses reveals the mechanism of resistance to *Meloidogyne incognita* in *Cucumis metuliferus* [J]. Journal of Plant Physiology, 2017, 212: 115-124
- [13] Olga A P, Maria H, Jonathan S, Andrea S, Lev G N. Transcriptome analysis of resistant and susceptible *Alfalfa* cultivars infected with root-knot nematode *Meloidogyne incognita*[J]. PLoS One, 2015, 10(2): 1-17
- [14] 张少平,邱珊莲,郑云云,张帅,吴松海,何炎森,郑开斌. 紫色黄秋葵转录组功能基因测序及分析[J]. 核农学报, 2017, 31(4): 643-653
- [15] 姚运法,张少平,练冬梅,赖正锋,黄慧明,洪建基. 黄秋葵花和果荚转录组测序及类黄酮代谢差异表达分析[J]. 西北植物学报, 2018, 38(11): 2000-2009
- [16] 洪建基,余文权,赖正锋. 黄秋葵种质资源图册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018
- [17] 刘红亮,郑丽明,刘青青,权富生,张涌. 非模式生物转录组研究[J]. 遗传, 2013, 35(8): 955-970
- [18] Hüchelhoven R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility [J]. Annual Review of Phytopathology, 2007, 45(1): 101-127
- [19] Tucker M L, Burke A, Murphy C A, Thai V K, Ehrenfried M L. Gene expression profiles for cell wall-modifying proteins associated with soybean cyst nematode infection, petiole abscission, root tips, flowers, apical buds, and leaves [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(12): 3395-3406
- [20] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance [J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59(1): 651-681
- [21] Wang X, Cheng C Y, Zhang K J, Tian Z, Xu J, Yang S Q, Lou Q F, Li J, Chen J F. Comparative transcriptomics reveals suppressed expression of genes related to auxin and the cell cycle contributes to the resistance of cucumber against *Meloidogyne incognita*[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 583-596
- [22] Xing X X, Li X H, Zhang M Z, Wang Y, Liu B Y, Xi Q L, Zhao K, Wu Y J, Yang T Z. Transcriptome analysis of resistant and susceptible tobacco (*Nicotiana tabacum*) in response to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infection [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 482(4): 1114-1121
- [23] 张立宁,程继鸿,杨瑞,孙中华,吴春霞,王绍辉. 茉莉酸合成相关基因 *Spr2* 与 *LePrs* 在番茄抗根结线虫中的作用[J]. 中国农业科学, 2011, 44(19): 4022-4028
- [24] Glazebrook J. Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis-2001 status [J]. Plant Biology, 2001, 4(4): 301-308
- [25] 茆振川. 辣椒与根结线虫不亲和互作相关基因的分离及功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007: 4-5

- [26] Singh M, Khan Z, Kumar K M, Dutta M, Pathania A, Dahiya O P, Kumar J. Sources of resistance to *Fusarium wilt* and root-knot nematode in indigenous chickpea germplasm [J]. *Plant Genetic Resources*, 2012, 10(3): 258–260
- [27] 郑井元. 辣椒 WRKY 转录因子 CaWJUCJr6 和 CaWRKY30 基因的克隆、表达及功能分析[D]. 长沙: 中南大学, 2011: 97–109
- [28] 魏潇. 红根甘肅桃抗根结线虫相关 MYB 转录因子基因的克隆与定位[D]. 郑州: 中国农业科学院研究生院, 2010: 6
- [29] 王立科, 张边江, 唐宁, 杨平, 周峰, 陈全战. 植物膜联蛋白基因研究进展[J]. *分子植物育种*, 2016(8): 2060–2065
- [30] Delmer D P. Amory Cellulose biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 987–1000
- [31] Favery B, Complainville A, Vinardell J M, Lecomte P, Vaubert D, Mergaert P, Kondorosi A, Kondorsi E, Crespi M, Abad P. The endosymbiosis-induced genes *ENOD40* and *CCS52a* are involved in endoparasitic-nematode interactions in *Medicago truncatula* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(10): 1008–1013

Transcriptome Analysis of Okra Resistance for *Meloidogyne incognita*

LIAN Dongmei LAI Zhengfeng YAO Yunfa LIN Bizhen HONG Jianji*

(Subtropical Agriculture Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005)

Abstract: In order to understand the related genomics of okra germplasm 12C2 resistance for *Meloidogyne incognita*, the differential expression genes (DEGs) was studied using Illumina Hiseq TM2500 high-throughput sequencing technology. The results showed that there were 71.49 Gb glean data from the root tip treated and untreated with *M. incognita* after 18 h, the base percentage of Q30 was more than 94.0%. Among them, there were 2 318 DEGs, including 1 156 up-regulated genes and 1 162 down-regulated genes, among which 2 202 genes were annotated. The GO, KOG and KEGG are annotated according to the sequence of unigene library. The cell wall metabolism-related genes, including endoglucanase gene family, polygalacturonase gene family, glucan endo-1,3-beta-glucosidase gene family and pectate lyase gene family were down-regulated. Among the plant hormone metabolism-related genes, auxin responsive protein gene and auxin influx carrier gene were down-regulated, and jasmonic acid synthase gene was up-regulated. WRKY and MYB gene family that regulate the expression of related genes were down-regulated. Annexin gene family and cyclin gene family involved in the expression of plant cells related genes were up and down-regulated, respectively. The results would provide a foundation for studying on genomics and molecular biology of okra resistance for *M. incognita*.

Keywords: okra, *Meloidogyne incognita*, transcriptome, DEGs