植物遗传资源学报
Journal of Plant Genetic Resources DOI：10.13430/j.cnki.jpgr.20240104002

甘薯储藏期低温胁迫的转录组分析和关键基因挖掘

肖世卓，张毅，戴习彬，周志林，孙健，曹清河

（江苏徐淮地区徐州农业科学研究所/农业农村部甘薯生物学与遗传育种重点实验室，徐州 221131）

摘要： 甘薯在储藏过程中受到低温冷害会大大降低甘薯的商品价值，研究甘薯耐低温储藏的分子机制，减少低温在甘薯储藏过程中的影响具有重要意义。本研究选取了较耐低温储藏、不耐低温储藏以及表现居中的三个甘薯品种‘商薯 19’（S19）、‘烟薯 25’（Y25）和‘苏薯 16’（S16），分别在 9℃和 6℃储藏 35 天，通过比较转录组分析，发现与对照相比，S19 在低温储藏后的差异表达基因较少，而 Y25 则相反，S16 居中。对差异表达基因进行 KEGG 和 GO 分析，发现甘薯块根在低温胁迫下，蛋白酶体相关基因的表达水平较高。最终，我们通过比较不同品种不同温度下的转录组数据，得到响应储藏期低温胁迫的候选基因 *Ibat.Brg.02F_G010830*，该基因注释为冷胁迫响应类受体蛋白激酶。qRT-PCR 验证该基因的表达与转录组数据相一致。我们进一步分析了该基因及其等位基因和同源基因的进化关系，并分析了该基因在不同品种中的变异。该研究将为甘薯低温储藏响应机制解析以及耐低温储藏品种的选育提供支撑。

关键词： 甘薯；储藏；低温胁迫；转录组；类受体蛋白激酶。

Transcriptome Analysis and Key Gene Mining of Sweetpotato under Low Temperature Stress during Storage

Xiao Shizhuo, Zhang Yi, Dai Xibin, Zhou Zhilin, Sun Jian, Cao Qinghe

(*Xuzhou Institute of Agricultural Sciences in Jiangsu Xuhuai District/ key Laboratory of Biology and Genetic Breeding of Sweetpotato, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Xuzhou 221131*)

Abstract: Low temperature stress during storage will greatly reduce the commodity value of sweetpotato. It is of great significance to study the molecular mechanism of cryopreservation tolerance and reduce the influence of low temperature in the storage process of sweetpotato. In this study, three sweetpotato varieties, ‘Shangshu 19’ (S19), ‘Yanshu 25’ (Y25) and ‘Sushu 16’ (S16), were stored at 9 ℃ and 6 ℃ for 35 days, respectively. Through comparative transcriptome analysis, we found that S19 had fewer differentially expressed genes after low temperature storage, while the opposite was observed for Y25, and S16 was intermediate. KEGG and GO analysis of differentially expressed genes showed that the expression level of proteasome related genes was higher in tuberous roots under low temperature stress. Finally, by comparing the transcriptome data of tuberous root of different varieties under different storage temperatures, a candidate gene *Ibat.Brg.02F_G010830* that responds to low temperature stress during storage was

收稿日期: 2024-01-04 修回日期: 2024-02-19 网络出版日期:
URL:
第一作者研究方向为甘薯种质资源保存、鉴定以及优异基因的挖掘，E-mail：xiaoshizhuo@jaas.ac.cn
通信作者：曹清河，研究方向为甘薯种质资源，E-mail：caoqinghe@jaas.ac.cn
基金项目：江苏省自然科学基金面上项目（BK20221213）；国家甘薯产业技术体系（CARS-10）;国家自然科学基金专项项目（M2242001）；江苏省重点研发计划（BE2021384）
Foundation projects: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20221213); China Agriculture Research System (CARS-10)； National Natural Science Foundation of China (M2242001)； Key Research and Development Program of Jiangsu Province (BE2021384)

obtained and it was annotated as cold-responsive protein kinase 1-like. qRT-PCR verified that the expression of this gene was consistent with the transcriptome data. The phylogenetic analysis of this gene and its alleles and orthologs was conducted, as well as the variation of this gene in different varieties. This study will provide support for the resolution of response mechanism under low temperature storage and the selection of varieties with low temperature storage tolerance.

Key words: sweetpotato; storage; cold stress; transcriptome; receptor-like protein kinases

甘薯[*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]是旋花科番薯属多年生双子叶草本植物，是重要的粮食、饲料和能源作物，广泛种植于世界上 100 多个国家或地区，据统计，2020 年甘薯总产量居所有粮食作物中的第七位。中国是世界上最大的甘薯生产国，种植面积达 220.61 万公顷，占全球的 29.77%，鲜薯年产量达到了 4783.49 万吨，占世界总产量的一半以上，在世界甘薯生产中的地位举足轻重[1]。甘薯皮薄、肉嫩，水分含量高达 65-75%，营养丰富，采后极易出现失水萎缩、发芽劣变、腐烂变质等现象[2]。提高甘薯的耐储藏性、延长储藏时间可以保证甘薯的周年供应，大大提高种植利润。甘薯对储藏温度较为敏感，当储藏温度达到 15℃以上，薯块呼吸旺盛，容易发芽；当储藏温度低于 9℃则易受冷害，水溶性软果胶变为不溶性硬果胶，蒸煮时硬心[3]。除此之外，甘薯块根遭遇冷害后还会引起软腐病和由块根细胞壁破坏引起的普遍软化，造成经济损失率高达 30%以上[4]。而北方甘薯收获之后，越冬保存时的室外温度常低于 9℃。因此，研究甘薯低温储藏下的生理生化变化和分子机制，对耐低温储藏品种的选育和提高甘薯的耐低温储藏能力具有重要意义。

作物调节低温适应能力的基因众多，主要包括与细胞膜系统、抗氧化酶、碳水化合物代谢和激素代谢等相关基因[5]。甘薯是基因组杂合的六倍体作物，基因组较为复杂，分子遗传学的研究较为迟缓[6]。关于甘薯耐冷分子机制的研究主要集中于转录组学，包括地上部分和地下部的耐冷相关研究。例如，周桦楠等[7]以耐冷品种‘辽薯 36’为试验材料，在低温处理不同的时间段取样对地上部进行转录组测序，通过比较分析，获得 283 个共有基因在低温处理不同的时间段均上调表达，26 个基因下调表达，差异表达基因被大量富集到蛋白激酶活性、过氧化物酶活性、氧化还原酶活性等生物学通路中。Xie 等[8]通过比较 4℃和 14℃下甘薯品种‘徐薯 18’的转录组数据，发现差异基因主要集中于细胞膜系统、抗氧化酶、碳代谢和激素代谢通路。Ji 等[9]对低温胁迫以及胁迫恢复后的甘薯叶片进行转录组分析，鉴定到甘薯中的 *COR* 基因并非类似于拟南芥中的上调表达，表明甘薯可能存在独特的低温胁迫应答机制。Lee 等[10]克隆得到了甘薯中的过氧化物酶基因 *IbLfp*，在甘薯中过表达该基因能提高甘薯对低温的耐受性，这种耐受性是通过增强过氧化物酶（POD）的活性，提高活性氧（ROS）的清除能力来实现的。microRNA 也参与到了植物生长发育的各个阶段，Xie 等[11]通过对冷胁迫下甘薯薯块转录组的深度测序，共鉴定到 26 个差异表达的 miRNA，进一步分析显示 miRNA 介导的 SA、ABA 和 ROS 途径参与甘薯块根在储藏期间对低温胁迫的反应。

类受体蛋白激酶（receptor-like protein kinases，RLKs）是植物中较大的基因家族之一，其主要作用是通过胞外结构域感知外界刺激，激活胞内结构域从而将信号传导至细胞内，该过程对植物的抗逆、抗病以及

信号转导等重要生理过程有重要意义[12]。冷胁迫也属于逆境胁迫，同样需要蛋白激酶的感知和传导，但是关于这方面的内容研究还较少，主要集中在模式植物中[13]。例如水稻钙依赖蛋白激酶 OsCPK24 可能通过谷氧还蛋白途径调节谷胱甘肽积累，进而参与抵御冷胁迫引起的氧化刺激[14]。CTB4a 是一种定位在叶绿体的富含亮氨酸的重复受体激酶，CTB4a 通过与 AtpB 互作，通过调节冷胁迫下 ATP 含量来调控水稻应对低温胁迫的能力[15]。OsSAPK8 是水稻低温信号转导途径中的关键蛋白激酶，可以与环核苷酸门控离子通道 OsCNGC9 互作，通过将 OsCNGC9 磷酸化从而改变它的通道活性，进而促进低温胁迫诱导的胞外钙离子内流、胞内钙离子浓度上升和低温胁迫相关的基因表达[16]。

总体来讲，甘薯储藏期间对低温胁迫响应的分子机制研究并不清晰，尤其缺乏对甘薯耐低温基因的挖掘。本研究前期在低温地区筛选到对低温储藏表现差异的不同品种，通过对其不同温度下储藏后的转录组进行分析，获得其差异表达基因（DEGs），进一步挖掘到影响甘薯储藏期响应低温胁迫的候选基因。本研究旨在探索甘薯耐低温储藏的分子机制，为甘薯的低温储藏提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所选用的试验材料为较耐低温储藏的甘薯品种‘商薯 19 号’（S19）、不耐低温储藏的品种‘烟薯 25 号’（Y25）以及表现居中的品种‘苏薯 16 号’（S16）[17]。三个品种种植于江苏徐州试验基地（117.30°E，34.28°N），薯块收获洗去泥土之后，各品种分别选取外观匀称均一的三个薯块储藏于 9℃（样本命名为-9）和 6℃（样本命名为-6）的恒温柜中，湿度保持在 40%。储藏 35 天之后，将薯块取出，去皮后取薯块中间部分薯肉，置于液氮中迅速冷冻，-80℃条件下储藏。三个品种刚收获的薯块取相同的组织部位视为对照样品（CK）。每个处理设置 3 个重复，分别编码为-1、-2 和-3。

1.2 cDNA 文库构建和测序

使用 TIANGEN RNAprep pure Plant Kit 试剂盒（天根生化科技有限公司，中国北京）提取上述共 27 份样品的总 RNA。使用 NanoDrop 1000（NanoDrop 公司，美国威明顿）检测 RNA 的浓度和纯度，使用 Agilent Bioanalyzer 2100 的 RNA Nano 6000 分析试剂盒（安捷伦科技公司，美国帕洛阿托）评估 RNA 完整性。使用 Illumina HiSeq 2000 平台构建 cDNA 文库并测序。

1.3 数据比对和表达量统计

首先，我们对下机的原始数据（raw reads）利用 fastp[18]进行质控，过滤低质量数据，得到有效数据（clean reads），使用 HISAT2 软件[19]将有效数据比对至甘薯参考基因组‘Beauregard’（http://sweetpotato.uga.edu/）。根据比对结果，我们利用 Stringtie[20]重构转录本，并利用 RSEM[21]计算每个样本中所有基因的表达量。

1.4 差异表达基因分析

基因差异表达分析的输入数据为基因表达水平分析中得到的reads count数据，使用DESeq2[22]软件分析，对 read count 进行标准化，根据模型进行假设检验概率（*p* value）的计算，最后进行多重假设检验校正，得到错误发现率（FDR）。基于差异分析结果，我们筛选差异显著基因，差异筛选条件如下：FDR<0.05，$|\log_2 FC|>\log_2(2)$。差异表达基因基于 GO（Gene Ontology）数据库和 KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）数据库进行功能注释。数据统计和可视化在 https://www.omicsmart.com/云平台进行。

1.5 qRT-PCR 分析

使用 MonScript RTIII All-in-One Mix with dsDNase（莫纳生物科技有限公司）对构建文库的所有 RNA 反转录成 cDNA，使用 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix（TOTOBO 生物科技有限公司）进行 qRT-PCR 分析。以 *Actin* 作为内参，引物序列：上游引物，CCAGACTCCTCATACTCCCCT；下游引物，TGGTGGCTCTACAATGTTCCC。*Ibat.Brg.02F_G010830* 基因扩增引物序列：上游引物，ACTGTGTTCTGCGACTGGAG；下游引物，ACTCCTTCACCCCCTGTCTT。反应体系为 20 μL，反应条件为 95℃ 60s；95℃ 15 S，60℃ 15S，72℃ 45S，40 个循环；溶解曲线分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量，将 Y25 的其中一组对照表达量设置为 1，对其它数据进行标准化。

1.6 候选基因分析

使用 DeepTMHMM[23]在线预测蛋白质的跨膜结构域，使用 ProtComp 9.0 在线预测蛋白质的亚细胞定位。

我们在参考基因组中寻找与候选基因注释相同的基因，视为同源基因，下载上述基因的氨基酸序列，有可变剪切的基因以最长的序列为准。使用 MEGA X[24]的 ClastalW 方法进行比对，获得比对结果后以最大似然法，选择默认参数构建进化树。进化树的图形化由 FigTree 完成。

我们从 Zenodo 数据库中（DOI：10.5281/zenodo.7184909）下载 314 份甘薯种质资源的 SNP 和 InDel 数据集[25]，找到候选基因在上述数据集中的位置并通过 bcftools 提取出在候选基因中的变异进行分析，包含候选基因起始密码子上游 2kb 和下游 1kb 的序列。

2 结果与分析

2.1 转录组测序和数据比对

本研究供试的 27 个样本，所有样本测序获得原始数据量分布于 6.87~8.86 Gb，过滤之后得到的有效数据量为 6.80~8.79 Gb，有效数据的质量达到 Q30 的占比最低为 92.11%。有效序列比对至参考基因组的比例为 93.23%~94.43%，比对到基因组上的平均比例为 93.77%。我们对比对区域进行了统计，86.04%~89.28%的序列比对至外显子区域，6.27%~8.37%的序列比对至内含子区域，4.41%~5.83%的序列比对至基因间区域(表 1)。

表 1 转录组测序数据统计

Table1 The statistics of RNA-seq data

样品名称 Sample name	原始数据 (Gb) Raw data(Gb)	有效数据 (Gb) Clean data(Gb)	高质量（≥Q30）数据占比(%) Ratio of high-quality （≥Q30） data(%)	有效读长比对率 (%) mapping rate of clean data(%)	比对至外显子的读长占比（%） Ratio of reads on exon	比对至内含子的读长占比（%） Ratio of reads on intron	比对至基因间隔的读长占比（%） Ratio of reads on intergenic
S16-CK-1	8.0816562	8.00565087	92.37	93.33	86.9	7.42	5.69
S16-CK-2	8.4178035	8.34188703	92.59	93.46	86.99	7.39	5.62
S16-CK-3	7.3566081	7.293900654	92.54	93.48	87.06	7.34	5.6
S16-6-1	7.9799151	7.912614	92.45	93.71	89.1	6.29	4.61
S16-6-2	7.771035	7.703952757	92.59	93.62	89	6.32	4.68
S16-6-3	8.8648614	8.786821388	93.17	93.99	89.1	6.27	4.62
S16-9-1	7.3616382	7.278328632	93.3	94.31	88.56	6.56	4.88
S16-9-2	7.2715296	7.187873533	93.1	93.9	88.19	6.81	5
S16-9-3	7.9199019	7.830058385	92.11	93.23	88.73	6.44	4.84
S19-CK-1	7.9176966	7.844781889	93.54	93.37	85.8	8.37	5.83
S19-CK-2	7.2216567	7.145712651	93.6	93.3	86.04	8.16	5.8
S19-CK-3	7.5867468	7.522070461	93.47	93.57	86.49	7.87	5.64
S19-6-1	7.6128828	7.549274699	93.54	94.14	89.22	6.33	4.45
S19-6-2	8.2413606	8.170225299	94.04	94.22	89.12	6.4	4.48
S19-6-3	6.9817263	6.905972235	93.08	93.29	89.28	6.32	4.41
S19-9-1	7.1775672	7.100079816	93.75	93.77	88.63	6.71	4.66
S19-9-2	8.0454645	7.959873431	92.86	93.46	88.57	6.76	4.67
S19-9-3	6.8735613	6.803186045	92.59	93.58	88.68	6.7	4.62
Y25-CK-1	7.7430738	7.65278667	92.52	93.52	86.76	7.54	5.7
Y25-CK-2	7.3654053	7.287397894	93.75	94.16	86.89	7.48	5.63
Y25-CK-3	7.8008352	7.710995114	93.5	93.87	86.84	7.52	5.63
Y25-6-1	6.9148086	6.848221023	93.56	94.23	88.71	6.43	4.86
Y25-6-2	7.2133281	7.137973979	94.17	94.43	88.65	6.43	4.91
Y25-6-3	7.6484625	7.58135109	93.05	93.96	88.56	6.52	4.93

Y25-9-1	7.2547428	7.197959963	93.17	93.96	89.02	6.27	4.71
Y25-9-2	7.2039702	7.139341628	94.27	94.18	88.81	6.41	4.78
Y25-9-3	7.4085021	7.334954029	93.37	93.88	88.99	6.29	4.72

S16-CK 为收获后未储藏的 S16 样品，S16-9 为收获后 9℃储藏 35 天的 S16 样品，S16-6 为收获后 6℃储藏 35 天的 S16 样品。S19 和 Y25 以此类推。-1、-2 和-3 为三次重复。

S16-ck means the S16 that was not stored after harvest, S16-9 means the S16 stored at 9 ° C for 35 days after harvest, and S16-6 means the S16 stored at 6 ° C for 35 days after harvest. And so on for S19 and Y25. -1, -2, and -3 mean three replicates.

2.2 基因注释和表达量分析

根据转录组注释，所有样本共获得已知基因 156,714 个，占参考基因组基因总数的 75.52%。利用 Stringtie 重构转录本后，寻找出本次测序结果中被发现，但未被参考基因组收录的新基因（Novel gene）共 5210 个，其中有功能注释的基因 3418 个。

我们以基因的 FPKM 值来统计基因的表达量，取任意两个样品中的表达量，计算每两个样品之间的皮尔逊（pearson）相关系数。结果显示同一处理下的不同重复之间样品的相关系数较高，均大于 0.99，说明样品之间的重复性较好（图 1）。同一品种不同处理之间的相关性则呈现出明显的品种差异性，较为耐储藏的品种 S19，无论是 9℃还是 6℃储藏 35 天后，基因的表达与对照之间仍存在较高的相关性，相关系数均高于 0.84，说明 S19 储藏较长时间之后，块根内的基因表达较为稳定；而在 6℃和 9℃条件下储藏的样本之间相关系数均高于 0.94，说明 S19 对储藏期低温并不敏感。而较不耐低温储藏的品种 Y25，在 9℃保存 35 天时，基因的表达与对照相比仍有较高相关性，相关系数高于 0.84，而当在 6℃保存 35 天后，内部基因的表达则呈现出剧烈的变化，相关系数最低甚至跌至 0.12，说明 Y25 的对储藏期间的低温较为敏感。S16 的表现则居中（图 1）。

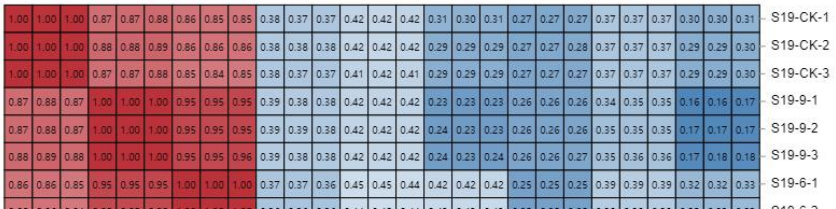


图 1 样本相关性热图

Fig.1 Heat map of samples correlation

2.3 差异表达基因分析

我们进一步分析了不同样本间的 DEGs，相比于对照（CK）而言，在 6℃条件下储藏，差异表达基因最多的品种是 Y25，达到了 35723 个（22564 个上调表达和 13159 个下调表达基因）（图 2）；S16 次之，共 25763 个差异表达基因（16495 个上调表达和 9268 个下调表达基因）；S19 的差异表达基因最少，为 19712 个（10219 个上调表达和 9493 个下调表达基因）。如果比较同一品种不同温度（6℃和 9℃）储藏条件下的差异表达基因，Y25 最多，为 19809 个（9730 个上调表达和 10079 个下调表达基因），S16 次之，为 13962 个（6912 个上调表达和 7050 个下调表达基因），S19 最少，为 8895 个（4662 个上调表达和 4233 个下调表达基因）。上述结果进一步印证了 Y25 在低温储藏的条件下，块根内的基因表达发生了较大变化，表现出对低温储藏敏感的特性，而 S19 对低温储藏较不敏感，S16 表现居中。

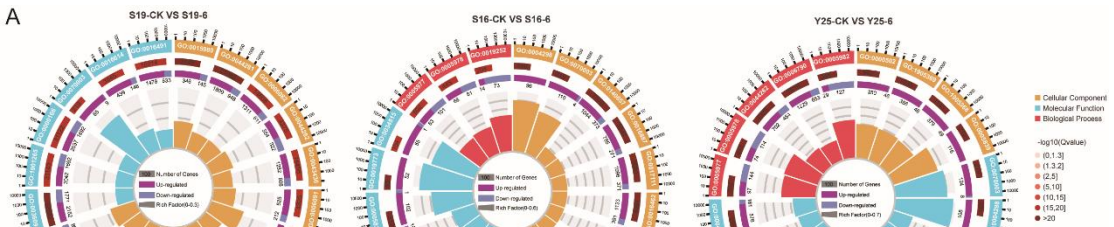
图 2 差异表达基因数量

Fig.2 The number of differentially expressed genes

2.4 差异表达基因的 GO 和 KEGG 分析

为了进一步明确不同品种在低温下的分子响应，我们分别对不同品种在低温储藏（6℃）条件下与对照相比的 DEGs 进行了 GO 富集分析。从细胞组分分析，发现对低温储藏较敏感的 Y25，排名前三的 DEGs 富集于蛋白酶体复合体（GO:0000502）、内肽酶复合物（GO:1905369）和肽酶复合物（GO:1905368）通路，S16 同样条件下的 DEGs 排名前三的同样是这三个通路，而对低温储藏不敏感的品种 S19 排名前三的 DEGs 则是 MCM 复合体（GO:0042555）、蛋白酶体复合体和蛋白酶体核心复合体（GO:0005839）（图 3A）。除了蛋白酶体相关通路基因富集，MCM 复合体的富集可能是 S19 更耐低温储藏的原因之一。从分子功能角度分析，6℃下储藏的 Y25 与对照相比，排名前三的 DEGs 富集于苏氨酸型肽酶活性（GO:0070003）、苏氨酸型内肽酶活性（GO:0004298）和核苷三磷酸酶活性（GO:0017111）；S16 的 DEGs 富集也主要集中于蛋白酶活性通路，而 S19 则是富集于小分子结合（GO:0036094）、核苷磷酸盐结合（GO:1901265）以及核苷酸结合（GO:0000166）。从生物学功能角度分析，6℃下储藏的 Y25 与对照相比，排名前三的 DEGs 富集于糖原代谢过程（GO:0005977）、糖原生物合成过程（GO:0005978）和细胞碳水化合物代谢过程（GO:0044262）；S16 的 DEGs 也是主要富集于糖和淀粉的合成和代谢过程；S19 则是富集于有机化合物氧化的能量释放（GO:0015980）、小分子代谢过程（GO:0044281）和有机酸代谢过程（GO:0006082）（图 3A）。

KEGG 富集分析发现，与对照相比 6℃储藏条件下 Y25 的 DEGs 主要富集于蛋白酶体（ko03050）、淀粉和糖代谢（ko00500）以及氨基糖和核苷酸糖的代谢（ko00520）；S16 则主要富集于蛋白酶体、氨基糖和核苷酸糖的代谢以及精氨酸和脯氨酸代谢（ko00330），而 S19 则主要富集于次级代谢产物的生物合成（ko01110）、DNA 复制（ko03030）以及蛋白酶体（图 3B）。



A：差异表达基因（DEGs）的 GO 富集图；B：DEGs 的 KEGG 富集图。不同的圈图表示不同的比较组，最外层标尺用于描述通路中差异基因的数量，第一圈表示通路 ID，不同颜色代表不同的通路，第二圈表示背景基因集中富集到该通路的基因数目，第三圈表示差异基因集中富集到通路的基因数目，不同颜色表示上调和下调表达，第四圈表示第三圈数值与第二圈数值的比值。

A: GO enrichment diagrams of differentially expressed genes (DEGs); B: KEGG enrichment diagrams of DEGs. Different circles represent different comparison groups, the outermost scale is used to describe the number of DEGs in the pathway. The first circle represents the pathway ID, different colors represent different pathways; the second circle represents the number of genes enriched in the background gene set; the third circle represents the number of DEGs enriched in the pathway; and different colors represent up-regulated and down-regulated expression; the fourth circle represents the values ratio of the third and second circle.

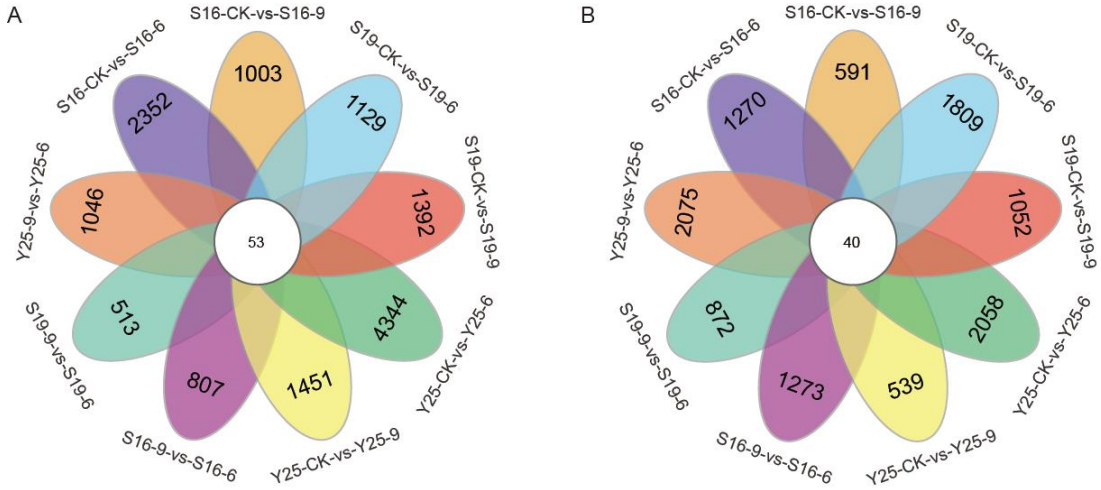
图 3 差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集图

Fig.3 GO and KEGG enrichment diagrams of differentially expressed genes

2.5 候选基因的选择

我们分析了 3 个品种里，CK vs 9℃ vs 6℃表达都是上升或者下降的基因集，最后获得 53 个上调表达基因和 40 个下调表达的基因（图 4），排除等位基因之后，余下 42 个上调表达基因和 35 个下调表达的基因，我们将其作为最终影响甘薯储藏期响应低温胁迫的候选基因集，其中上调基因中包含 9 个与线粒体能量代谢相关基因、8 个蛋白激酶基因、5 个与质膜稳定或渗透调节有关的基因、6 个转录因子、6 个与物质代谢相关的酶和 2 个抗氧化酶。说明甘薯在储藏过程中受到低温胁迫首先会通过相应激酶的表达迅速响应，然后提高能量的供给抵御低温，同时调节代谢来保证质膜系统的稳定，以及通过增强抗氧化酶的表达来清除胁迫产生的过氧化物和超氧阴离子。35 个下调的基因中，包含 10 个与物质代谢相关的基因、5 个与抗病相

关基因、3 个与能量代谢相关基因、3 个与细胞信号转导相关基因、2 个与激素相关。说明薯块在储藏过程中受到低温胁迫会主动减少非必须的生理过程（例如抗病），有限的能量更倾向于分配给最基本的生理活动。



A：上调表达基因韦恩图；B：下调表达基因韦恩图。椭圆中数字表示各比较组所独有的差异表达基因，

中心圆形数字表示所有比较组所共有的差异表达基因。

A: Venn diagram of up-regulated genes; B: Venn diagram of down-regulated genes. Numbers in ovals indicate DEGs unique to each comparison group,

and the numbers in central circular indicate the DEGs shared by all comparison groups.

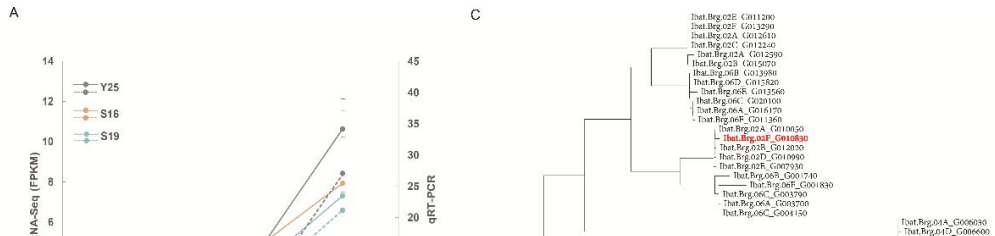
图 4 差异表达基因韦恩图

Fig.4 Venn diagrams of DEGs

2.6 候选基因分析

在候选基因集中，*Ibat.Brg.02F_G010830* 基因功能注释为冷胁迫响应蛋白激酶（cold-responsive protein kinase 1-like），是候选基因集中仅有的注明与冷胁迫相关的基因。该基因属于类受体蛋白激酶基因家族，有可能参与了甘薯块根在储藏过程中的低温胁迫响应，我们对该基因进行了进一步的分析。首先，我们使用 qRT-PCR 来验证转录组数据的可靠性，设计扩增引物来分析所有样本中 *Ibat.Brg.02F_G010830* 基因的表达量，结果显示其表达量变化趋势与转录组数据相一致（图 5A）。这进一步证明了转录组数据以及候选基因选择的可靠性。

我们首先通过在线工具预测了该基因编码蛋白质的跨膜区，发现该基因编码的蛋白不存在跨膜结构（图 5B）。亚细胞定位在线预测结果显示 *Ibat.Brg.02F_G010830* 基因编码蛋白可能定位于质膜（表 2），这与跨膜预测结果不一致。前人研究表明，拟南芥类受体蛋白激酶 CRPK1 没有明显的跨膜结构，但是激光共聚焦显微镜观察其特异地定位于原生质体的细胞质膜，并且低温并不影响其定位[26]。而甘薯 Ibat.Brg.02F_G010830 蛋白的亚细胞定位可能与之类似，这需要进一步的实验验证。



A：*Ibat.Brg.02F_G010830* 基因的表达分析。实线为转录组测序获得的相对表达量，虚线表示 qRT-PCR 获得的相对表达量，数据显示为平均值±SD；B：*Ibat.Brg.02F_G010830* 基因编码蛋白质跨膜结构预测。C，*Ibat.Brg.02F_G010830* 及其同源基因的进化树分析。

A: Expression analysis of the *Ibat.Brg.02F_G010830* gene. The solid line is the relative expression obtained by transcriptome sequencing, the dashed line represents the relative expression obtained by qRT-PCR, and the data are shown as the mean ±SD. B: *Ibat.Brg.02F_G010830* gene encoding protein transmembrane structure prediction. C, *Ibat.Brg.02F_G010830* and phylogenetic tree analysis of its orthologs

图 5 *Ibat.Brg.02F_G010830* 基因分析

Fig.5 Analysis of *Ibat.Brg.02F_G010830* gene

表 2 Ibat.Brg.02F_G010830 蛋白质的亚细胞定位预测

Table 2 Prediction of subcellular localization of Ibat.Brg.02F_G010830

位置权重 Locationweights:	潜在位置分值 LocDB	潜在位点分值 PotLocDB	神经网络分值 NeuralNets	五聚体分值 Pentamers	积分值 Integral
细胞核 Nucleus	0	0	0	0	0.03
质膜 Plasma membrane	10	1.2	1	1.08	8.07
细胞外 Extracellular	0	0	1	0	0
细胞质 Cytoplasmic	0	0.9	0	0.79	0.6

线粒体 Mitochondrial	0	0	0	2.41	0.09
内质网 Endoplasm. retic.	0	0	0	1.11	0.51
过氧化物酶体 Peroxisomal	0	0	1	0	0
高尔基体 Golgi	0	0	0	0.13	0
叶绿体 Chloroplast	0	0.9	0	0.41	0.61
液泡 Vacuolar	0	0	0	0	0.1

我们进一步分析了候选基因的同源基因，甘薯基因组中共有 85 个基因与 *Ibat.Brg.02F_G010830* 基因有着相同的功能注释，我们使用这些基因构建进化树，发现该基因有 5 个等位基因，位于 Ibat.Brg.02C 染色体上的等位基因可能丢失（图 5C）。其中，位于 Ibat.Brg.02A 染色体上的基因 *Ibat.Brg.02A_G010050* 与其差异最小。除了等位基因，位于 6 号染色体上的 5 个同源基因（其中 Ibat.Brg.06C 染色体上存在两个拷贝）与其亲缘关系最近。

我们从数据库中下载 314 份甘薯的重测序数据，分析候选基因在不同品种中的变异情况。我们首先找到 *Ibat.Brg.02F_G010830* 基因在重测序数据参考基因组（‘徐薯 18’）中对应的基因 *Iba_chr03aCG14160*。该基因在不同的甘薯品种间存在 131 个 SNP 和 14 个 InDel，其中 5’上游存在 29 个 SNP 和 4 个 InDel，外显子存在 36 个 SNP，包含 5 个非同义突变，内含子存在 24 个 SNP 和 5 个 InDel，3’下游存在 42 个 SNP 和 5 个 InDel（表 3）。

表 3 位于 *Ibat.Brg.02F_G010830* 基因的变异统计

Table 3 The statistics of variations on *Ibat.Brg.02F_G010830*

候选基因 Candidate gene	‘徐薯 18’中的对应基因 Corresponding gene in 'Xushu18'	5’上游 5’ up-stream	外显子 Exon	非同义变异 Non-synonymous	内含子 Intron	3’下游 3’ down-stream	总变异数 Total
Ibat.Brg.02F_G010830	Iba_chr03aCG14160	29/4[a]	36/0	5/0	24/5	42/5	131/14

‘/’前后分别代表的是 SNP 和 InDel 的数量

The number before and after the symbol ‘/’ represent the SNPs and InDels, respectively

3 讨论

提高甘薯在储藏过程中的耐低温能力不仅可以节约储藏成本，又能延长储藏时间，有利于提高甘薯的经济价值，但是甘薯响应低温储藏的分子机制仍不清晰。不同的甘薯品种对低温储藏的耐受性不同，本研究选取了对低温储藏耐受性表现不同的三个主栽甘薯品种，在不同的温度下进行储藏，并获取其转录组信息进行比较，来探寻甘薯耐低温储藏的分子机制。研究发现，储藏过程中较为耐低温的甘薯品种 S19 在低温胁迫下体内基因的表达变化明显少于不耐低温的品种 Y25，表现出了明显的低温不敏感特征（图 1）。不

同的甘薯品种低温储藏下蛋白酶体相关基因的表达都显著上升，说明低温胁迫导致薯块体内蛋白质的降解（图 2）。从 KEGG 以及 GO 的多个角度分析，Y25 在低温储藏条件下与对照相比的 DEGs 主要集中于蛋白质降解、淀粉降解等，而 S19 则是集中于核苷酸结合、DNA 复制和次级代谢物合成等，说明 S19 在低温胁迫下具备更强的调控、修复和抗氧化能力。

我们通过比较不同品种在低温储藏条件下处于一直上调或者下调的基因，取交集来寻找调控甘薯储藏期响应低温的基因，总共获得了 42 个上调表达基因和 35 个下调表达的基因，上调基因主要是与线粒体能量代谢、蛋白激酶以及质膜稳定有关，下调基因主要与物质代谢、抗病、细胞信号转导等相关。

我们从上调基因中选取注释为冷响应蛋白的基因 *Ibat.Brg.02F_G010830* 作为候选基因做了进一步的研究。该基因属于类受体蛋白激酶，蛋白激酶是一类催化蛋白质磷酸化反应的酶，可以将磷酸基团从一个供体转移到基质蛋白受体。植物类受体蛋白激酶的工作机理主要是通过胞外信号分子与其胞外区结构域特异结合，结合后激活胞内激酶域而完成跨膜信号的转导。低温对于植物是一种逆境刺激，感受低温刺激的受体非常重要，但是这方面的研究较少。研究人员通过筛选拟南芥 T-DNA 突变体库，发现了一个类受体激酶 CRPK1 负调控植物抗冻性，进一步研究发现低温激活 CRPK1 活性，并磷酸化 14-3-3 蛋白，磷酸化的 14-3-3 蛋白从细胞质进入细胞核后与转录因子 CBF1/3 蛋白相互作用并促使其降解，避免过度冷响应造成的生长抑制，从而使植物更好地平衡生长发育和抵抗逆境间的关系[26]。这对甘薯 *Ibat.Brg.02F_G010830* 基因响应低温应答的分子机制研究具有重要的借鉴意义。拟南芥 CRPK1 没有明显的跨膜结构域，但是亚细胞定位显示其定位于细胞膜，并且低温不影响其定位，它是怎么定位到细胞膜上的仍不清楚。而结构预测显示 Ibat.Brg.02F_G010830 也没有跨膜结构域，但是亚细胞定位预测其可能定位于质膜。这说明 Ibat.Brg.02F_G010830 可能与拟南芥 CRPK1 有着类似的工作模式，即在冷胁迫的信号传导过程中发挥作用，但是该蛋白是否真正定位于细胞膜以及通过什么方法定位到细胞膜，需要进一步的实验来验证。关于甘薯类受体蛋白激酶与低温胁迫的研究较少，但是甘薯中其它蛋白激酶的研究对本研究也有借鉴之处。研究人员在甘薯中过表达丝裂原活化蛋白激酶基因（*MAPK*），转基因植株在低温条件下仍能保持高光效和较低的细胞膜损伤，进一步研究发现转基因植株中的过氧化物酶表达水平较高，导致过氧化物积累水平较低，从而保证转基因植株表现出对低温的耐受性增强[27]。进一步对该转基因植株进行转录组测序，获得了与野生型之间的差异基因集，并通过酵母双杂交筛选到了与 IbPAMK3 互作的蛋白[28]。*Ibat.Brg.02F_G010830* 基因在甘薯中有 85 个同源基因，其中包含 5 个不同的等位基因，位于 Ibat.Brg.02C 染色体上的等位基因可能在进化的过程中丢失。该基因在甘薯的种质资源中含有 145 个变异（SNP 和 InDel），其中 5 个非同义的突变，这些变异可能造成了该基因不同等位基因的分化表达以及不同品种中表达和功能上的差异。

综上所述，我们通过对三个不同的甘薯品种在不同温度储藏下的薯块进行转录组测序，获得了甘薯储藏期应对低温胁迫的转录组图谱，通过差异比较，得到了甘薯储藏过程中响应低温胁迫的基因，并对其中

一个候选基因 *Ibat.Brg.02F_G010830* 进行了深入分析，上述结果将为甘薯低温储藏响应机制的研究以及耐低温储藏品种的选育提供支撑。

参考文献

[1] FAO. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. 2021 [2023/10/1].

[2] Ravi V, Aked J, Balagopalan C. Review on tropical root and tuber crops I. Storage methods and quality changes. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1996, 36(7): 661-709.

[3] 解则义, 李洪民, 马代夫, 陈天娇, 韩永华, 李宗芸. 低温胁迫影响甘薯贮藏的研究进展. 植物生理学报, 2017, 53(05): 758-767.

Xie Z Y, Li H M, Ma D F, Chen T J, Han Y H, Li Z Y. Research progress of low temperature stress on sweet potato storage. Plant Physiology Journal, 2017, 53(05): 758-767.

[4] 马代夫, 刘庆昌, 张立明. 中国甘薯. 2021: 南京：江苏凤凰科学技术出版社.

Ma D F, Liu Q C, Zhang L M. Chinese sweet potato. 2021: Nanjing: Jiangsu Phoenix Science Press.

[5] 刘振雷, 潘家荃, 周桦楠, 刘冠求, 于涛. 甘薯耐冷组学及分子生物学研究进展. 江苏农业科学, 2021, 49(24): 45-48.

Liu Z L, Pan J Q, Zhou H N, Liu G Q, Yu T. Advances in cold tolerance omics and molecular biology of sweet potato. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(24): 45-48.

[6] Liu Q. Improvement for agronomically important traits by gene engineering in sweetpotato. Breed Science, 2017, 67(1): 15-26.

[7] 周桦楠, 潘家荃, 刘冠求, 万博, 王凯, 于涛. 甘薯响应冷胁迫的转录组分析. 植物遗传资源学报, 2022, 23(04): 1202-1212.

Zhou H N, Pan J Q, Liu G Q, Wan B, Wang K, Yu T. Transcriptome analysis of sweetpotato under low temperature stress. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(04): 1202-1212.

[8] Xie Z, Zhou Z, Li H, Yu J, Jiang J, Tang Z, Ma D, Zhang B, Han Y, Li Z. High throughput sequencing identifies chilling responsive genes in sweetpotato (*Ipomoea batatas* Lam.) during storage. Genomics, 2019, 111(5): 1006-1017.

[9] Ji C Y, Kim H S, Lee C-J, Kim S-E, Lee H-U, Nam S-S, Li Q, Ma D-f, Kwak S-S. Comparative transcriptome profiling of tuberous roots of two sweetpotato lines with contrasting low temperature tolerance during storage. Gene, 2020, 727: 144244.

[10] Lee C-J, Park S-U, Kim S-E, Lim Y-H, Ji C Y, Kim Y-H, Kim H S, Kwak S-S. Overexpression of *IbLfp* in sweetpotato enhances the low-temperature storage ability of tuberous roots. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 167: 577-585.

[11] Xie Z, Wang A, Li H, Yu J, Jiang J, Tang Z, Ma D, Zhang B, Han Y, Li Z. High throughput deep sequencing reveals the important roles of microRNAs during sweetpotato storage at chilling temperature. Scientific Reports, 2017, 7(1): 16578.

[12] 朱巍巍, 马天意, 张梅娟, 沙伟. 类受体蛋白激酶在植物中的研究进展. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(01): 451-458.

Zhu W W, Ma T Y, Zhang M J, Sha W. Research progress of receptor-like protein kinases in plants. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(01): 451-458.

[13] Chen X, Ding Y, Yang Y, Song C, Wang B, Yang S, Guo Y, Gong Z. Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(1): 53-78.

[14] Liu Y, Xu C, Zhu Y, Zhang L, Chen T, Zhou F, Chen H, Lin Y. The calcium-dependent kinase OsCPK24 functions in cold stress responses in rice. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60(2): 173-188.

[15] Zhang Z, Li J, Pan Y, Li J, zhou L, Shi H, Zeng Y, Guo H, Yang S, Zheng W, Yu J, Sun X, Li G, Ding Y, Ma L, Shen S, Dai L, Zhang H, Yang S, Guo Y, Li Z. Natural variation in CTB4a enhances rice adaptation to cold habitats. Nature Communications, 2017, 8(1): 14788.

[16] Wang J, Ren Y, Liu X, Luo S, Zhang X, Liu X, Lin Q, Zhu S, Wan H, Yang Y, Zhang Y, Lei B, Zhou C, Pan T, Wang Y, Wu M, Jing R, Xu Y, Han M, Wu F, Lei C, Guo X, Cheng Z, Zheng X, Wang Y, Zhao Z, Jiang L, Zhang X, Wang Y F, Wang H, Wan J. Transcriptional activation and phosphorylation of OsCNGC9 confer enhanced chilling tolerance in rice. Molecular Plant, 2021, 14(2): 315-329.

[17] 张毅, 庞林江, 岳瑞雪, 张文婷, 马晨, 邓少颖, 于涛, 孙健. 不同贮藏温度对冷凉地区甘薯块根品质的影响. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(22): 172-180.

Zhang Y, Pang L J, Yue R X, Zhang W T, Ma C, Deng S Y, Yu T, Sun J. Effects of different storage temperature on the quality of sweet potato tubers in cold regions. Journal of Food Safety and Quality, 2023, 14(22): 172-180.

[18] Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics, 2018, 34(17): i884-i890.

[19] Kim D, Paggi J M, Park C, Bennett C, Salzberg S L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 907-915.

[20] Pertea M, Pertea G M, Antonescu C M, Chang T-C, Mendell J T, Salzberg S L. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. Nature Biotechnology, 2015, 33(3): 290-295.

[21] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323.

[22] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology, 2014, 15(12): 550.

[23] Hallgren J, Tsirigos K, Pedersen M, Armenteros J, Marcatili P, Nielsen H, Krogh A, Winther O, DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. bioRxiv; 2022.

[24] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.

[25] Xiao S, Dai X, Zhao L, Zhou Z, Zhao L, Xu P, Gao B, Zhang A, Zhao D, Yuan R, Wang Y, Wang J, Li Q, Cao Q. Resequencing of sweetpotato germplasm resources reveals key loci associated with multiple agronomic traits. Horticulture Research, 2023, 10(1): uhac234.

[26] Liu Z, Jia Y, Ding Y, Shi Y, Li Z, Guo Y, Gong Z, Yang S. Plasma membrane CRPK1-mediated phosphorylation of 14-3-3 proteins induces their nuclear import to fine-tune CBF signaling during cold response. Molecular Cell, 2017, 66(1): 117-128.e115.

[27] Jin R, Kim H S, Yu T, Liu M, Yu W, Zhao P, Zhang A, Zhang Q, Liu Y, Cao Q, Kwak S-S, Tang Z. Overexpression of *IbMPK3* increases low-temperature tolerance in transgenic sweetpotato. Plant Biotechnology Reports, 2022, 16(1): 91-100.

[28] Jin R, Yu T, Guo P, Liu M, Pan J, Zhao P, Zhang Q, Zhu X, Wang J, Zhang A, Cao Q, Tang Z. Comparative transcriptome and interaction protein analysis reveals the mechanism of *IbMPK3*-overexpressing transgenic sweet potato response to low-temperature stress. Genes, 2022, 13(7): 1247.