



PEG 模拟干旱胁迫下野生大豆转录组分析

张小芳, 王冰冰, 徐 燕, 张炜坤, 赵 恢, 张 镡, 乔亚科, 李桂兰

(河北科技师范学院 农学与生物科技学院, 河北 昌黎 066600)

摘要: 为研究耐旱型野生大豆在干旱胁迫下基因表达谱的变化, 从备选野生大豆材料中筛选抗旱性强的野生大豆品种, 同时探讨最适 PEG 胁迫浓度, 而后以野生大豆永 46 为试验材料, 利用 RNA-seq 技术对 20% PEG6000 处理不同时间的叶片进行基因表达谱差异分析。结果显示: 获得 39 183 个序列信息, 其中各时期共有序列 27 875 个。随干旱胁迫时间延长, 差异表达基因数量发生变化, 胁迫 12 h 达到最多。根据 GO 功能分析可将序列大致分为分子功能、细胞成分和生物学过程三大类, 其差异表达基因广泛涉及糖、脂类、蛋白质和核酸等生物大分子代谢、能量代谢以及次生代谢过程。在 KEGG 数据库中, 依据代谢途径可将其定位在 127 个分支, 包括植物-病原体互作、植物激素信号转导、RNA 降解、ABC 转运蛋白等, 其中植物激素信号转导途径在不同时间处理下的变化都显著。转录因子分析发现在干旱胁迫下变化明显的转录因子家族包括 MYB、bHLH、AP2/EREBP、WRKY 和 NAC 等。对 4 个不同功能基因干旱胁迫后不同时间的表达量进行荧光定量分析, 其变化趋势与转录组数据相同。

关键词: 野生大豆; RNA-seq; 干旱胁迫; 转录组

The Transcriptome Analysis of Wild Soybean Under Drought Stress Simulated by PEG

ZHANG Xiao-fang, WANG Bing-bing, XU Yan, ZHANG Wei-kun, ZHAO Hui, ZHANG Kai, QIAO Ya-ke, LI Gui-lan

(College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600, China)

Abstract: In order to estimate the gene expression profiles affected by drought stress, a drought-resistant wild soybean accession Yong 46 was used to detect the differentially expressed genes under 20% PEG6000 by RNA-seq technology. A total of 39 183 unigenes were screened out, of which 27 875 differentially expressed genes (DEGs) were coincident. All the assembled unigenes could be broadly divided into cellular component, molecular function and biological process by gene ontology, these DEGs were involved in metabolisms of carbohydrate, lipid, protein, nucleic acid and energy, and secondary metabolism. 127 classes according to their metabolic pathway were found by the analyze of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway, including the plant-pathogen interaction, plant hormone signal transduction, RNA degradation and ABC transporters. The pathway of plant hormone signal transduction changed the most obviously under different times. The most evident change transcription factor families included MYB, bHLH, AP2-EREBP, WRKY and NAC under drought stress. The results of qRT-PCR were in conformity with the RNA-seq. These results provided a base for further study on drought stress functional genes screening in wild soybean.

Keywords: *Glycine soja*; RNA-seq; Drought stress; Transcriptome

野生大豆 (*Glycine soja*) 是栽培大豆的近缘野生种^[1], 比栽培大豆拥有更丰富的遗传多样性。Lam 等^[2]对野生大豆与栽培大豆的基因组重测序发现了栽培大豆在人工驯化过程丢失的基因, 抗旱性基因就是其中之一^[3]。Kim 等^[4]对野生大豆品种 IT182932 的深度测序发现野生大豆中特有的新基

因, 说明野生大豆资源对改善栽培大豆品质有巨大潜力。我国野生大豆资源丰富^[5], 蕴藏丰富的抗逆基因资源, 因此野生大豆是大豆育种中重要的种质资源。

近年来, 随着高通量测序的不断发展, 组学的应用逐渐变得广泛^[6-8]。Wang 等^[9]在对大豆根响

收稿日期: 2018-04-23

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2014ZX0800404B); 河北省自然科学基金 (C2016407100, C2014407051); 河北省研究生创新资助项目 (CXZZSS2018148)。

第一作者简介: 张小芳 (1993 -), 女, 硕士, 主要从事植物遗传资源研究及植物分子生物学研究。E-mail: zxf13214@163.com。

通讯作者: 李桂兰 (1963 -), 女, 博士, 教授, 主要从事作物遗传资源及作物基因工程研究。E-mail: lgl63@126.com。

应干旱的蛋白质组学研究中,鉴定出了干旱胁迫下根组织中表达的相关蛋白。转录组(transcriptome)则是指某一个特定功能的状态下,该生物细胞内所有进行转录表达的基因总和^[10]。通过转录组分析,可以揭示不同时间或处理下相同基因的表达式差异。Liu等^[11]对莴苣抽薹时赤霉素调控基因和转录因子的作用进行了研究,Gao等^[12]发现刚毛柞柳在盐胁迫环境下通过增强抗氧化物质表达来清除活性氧类物质。姚敏磊等^[13]对大豆响应低磷胁迫的数字基因表达谱分析时,筛选出33个差异表达基因。由此可见,转录组学的方法在各方面都得到了有效利用。在挖掘大豆差异表达基因的研究中,如荫蔽胁迫下大豆茎秆的形态建成^[14]和大豆根系应答重金属Cd的胁迫^[15],以及大豆再生相关的差异表达基因的筛选^[16]上,都应用了RNA-seq技术。

尽管目前的测序技术有了很大进步,但利用RNA-seq挖掘野生大豆的优质资源的报道相对较少^[17-18]。随着大豆基因组重测序的完成,对野生大豆基因组的遗传多样性的研究更加深入,本研究以实验室筛选鉴定的抗旱性强的野生大豆为材料,通过在转录水平上分析野生大豆在干旱胁迫下的基因表达变化,为野生大豆干旱相关基因的挖掘和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用5份野生大豆材料:永5、永26、永46、永52和永64,均采自冀东沿海地区(昌黎县),于河北科技师范学院植物细胞工程实验室保存。

1.2 试验设计

1.2.1 抗旱性鉴定试验设计 采用两种试验进行干旱胁迫处理,从而在备选材料中筛选耐旱型最强的品种,同时探讨用于转录组测序的干旱胁迫的最佳PEG6000处理浓度。

选取饱满的5种供试野生大豆种子,播种于8 cm×8 cm营养钵中,钵中装入定量的干净细沙,播5钵,每营养钵播5粒,每个处理设置3次重复。于子叶期留3株长势一致的幼苗,定期浇定量霍格兰营养液,在苗龄达30 d时,进行PEG6000干旱胁迫处理,胁迫前1 d不浇水和营养液。PEG6000设置4个浓度:适宜水分(对照0% PEG6000)与干旱胁迫(10% PEG6000,20% PEG6000,30% PEG6000模拟干旱)。

选取饱满的供试野生大豆种子,播种于8 cm×8 cm营养钵中,钵中装入定量的自然土,播3钵,每

营养钵播10粒,每个处理设置3次重复。于子叶期留5株长势一致的幼苗。定期浇定量水。在苗龄达15 d时,进行干旱胁迫,适宜水分处理及时补水,干旱胁迫处理不补水。

1.2.2 转录组测序的试验设计 将野生大种子播种于营养钵中,出苗后保留长势一致的幼苗10株,设置3次重复。定期浇定量霍格兰营养液,在苗龄达30 d时,加入最适处理浓度的PEG6000进行干旱胁迫处理,分别在未处理时(0 h)及处理后6,12,24和48 h取同一叶位的复叶,保存在液氮中备用。

1.2.3 选择差异表达基因试验设计 对野生大豆永46进行干旱胁迫处理,在5个不同时期取样,随机选取4个不同功能基因进行qRT-PCR分析以验证转录组数据的可靠性。

1.3 方法

1.3.1 冠层萎蔫指数法抗旱鉴定 采用Carter等^[19]在大豆抗旱育种中提出的20%~30%的植株出现萎蔫时开始统计冠层萎蔫指数,萎蔫指数分为6级:

- 0级:无萎蔫;
- 1级:轻微萎蔫(萎蔫出现在个别植株);
- 2级:萎蔫(一半的植株或较多的植株);
- 3级:明显萎蔫(多数植株萎蔫);
- 4级:严重萎蔫(叶片灼伤或大部分植株叶片卷曲);
- 5级:完全萎蔫(叶片黄化、褐化或大部分叶片死亡和脱落)。

1.3.2 叶片萎蔫度鉴定法抗旱鉴定 在苗龄达到15 d时开始处理,适宜水分处理及时补水,干旱胁迫不补水,胁迫10 d时开始进行叶片萎蔫程度的观测及等级评定,以90%植株萎蔫为记载标准。根据叶片萎蔫程度评定不同材料的抗旱等级^[20]:

- I类:播种至90%植株萎蔫的天数为37 d以上,抗旱型;
- II类:播种至90%植株萎蔫的天数为34~36 d,较抗旱型;
- III类:播种至90%植株萎蔫的天数为31~33 d,中间型;
- IV类:播种至90%植株萎蔫的天数为28~30 d,干旱较敏感型;
- V类:播种至90%植株萎蔫的天数为25~27 d,干旱敏感型。

1.3.3 总RNA的提取 按照宝生物工程有限公司TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit试剂盒提供的方法提取野生大豆叶片的总RNA,取2 μL

用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.4 转录组测序与组装 提取的野生大豆总 RNA 用 DNase I 去除 DNA,用 Oligo(dT) 磁珠富集野生大豆 mRNA,加入打断试剂使 mRNA 片断化,然后以其为模板逆转录合成 cDNA。对 cDNA 纯化后进行末端修复、3' 末端加 poly(A) 以及添加测序接头,之后进行 PCR 扩增,至此,测序文库制备完成。用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI Step One Plus Real-Time PCR System 对构建好的文库进行质量和产量检测,检测合格后进行测序(深圳华大基因科技有限公司)。测序得到的原始图像数据转化为序列数据(称为 raw reads),过滤后的数据(称为 clean reads) 进行碱基的组成和质量值分布绘制。之后,将 clean reads 比对到参考序列与基因组序列。

1.3.5 转录组测序结果分析 通过 BLAST 比对到公共数据库,首先跟 NCBI 的 Nr 库完成比对,再进行 GO 功能显著性富集分析([http://www. geneontol-ogy. org/](http://www.geneontology.org/))、pathway 显著性富集分析([http://www. genome. jp/kegg/pathway. html](http://www.genome.jp/kegg/pathway.html)) 和转录因子分析(Plant TFDB) 等更深入的挖掘分析。

1.3.6 差异表达基因的荧光定量 PCR 验证 采用定量 PCR 验证差异表达基因,随机选定 4 个基因,预测的编码蛋白分别为乙烯应答元件结合蛋白(glysoja_008938)、bZIP 转录因子(glysoja_034252)、WRKY 转录因子(glysoja_005221) 和水通道蛋白(glysoja_008314)。选取转录组中部分差异表达基因,采用荧光定量 PCR 方法验证转录组数据的可靠性。利用 Premier 5. 0 软件设计 PCR 引物,以大豆 β -actin 作为内参基因。使用 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit(TaKaRa) 试剂盒提取野生大豆叶片的总 RNA,而后采用 BcaBEST™ RNA PCR Kit Ver. 1. 1 (TaKaRa) 试剂盒进行反转录,再以稀释 10 倍的反转录混合液为模板,根据 TB Green™ Premix Ex Taq™ II(TaKaRa) 试剂盒提供的

方法进行荧光定量 PCR 反应。每份样品进行 3 次生物学重复。扩增条件为 95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 10 s,60℃ 延伸 30 s,循环 40 次。基因上下游引物序列如下:

β -actin: 5'-GAGCTATGAATTGCCTGATGG-3' 和 5'-CGTTTCATGAATTCCAGTAGC-3';

glysoja_005221: 5'-AACTCGGCAAACCCTGATATC-3'和 5'-GTTGTCAAAGCTAAGGAACCTTGG-3';

glysoja_008938: 5'-TTTACAGAAGGACGGGAAG-ATG -3'和 5'-AACTCCCCTGAACTTAATAGCG-3';

glysoja_008314: 5'-GTCTTGATAAGGGCGTTGT-3'和 5'-GCACCCAAAGCAGTACCATT-3';

glysoja_034252: 5'-GTCCAGAGCCAGAAAACAGG-3'和 5'-AGCGCTGCAACTCTTTCAAT-3'。

1.4 数据分析

用 Excel 2007 软件分析数据,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对所选基因进行相对定量分析。

2 结果与分析

2.1 野生大豆抗旱性分析

对 5 个野生大豆品种进行抗旱性分析。在冠层萎蔫指数鉴定法中,不同大豆材料随 PEG6000 浓度的增加冠层萎蔫指数随之增加,PEG6000 处理浓度为 0% 时与 20% 和 30% 时的冠层萎蔫指数差异显著($P>0.05$),20% 与 30% 之间的冠层萎蔫指数差异不显著,因此可将 20% PEG6000 作为野生大豆干旱胁迫转录组测序的适宜浓度。在 20% 和 30% PEG6000 处理时,不同野生大豆表现的抗旱能力各有不同(表 1)。永 26 和永 46 在 PEG6000 达到 30% 时均表现为无萎蔫(表 1,图 1 B 和 C)。在叶片萎蔫度鉴定法中,永 46 的 90% 植株萎蔫的天数达 40 d,抗旱等级达到 I 类(表 2)。综合两种抗旱性鉴定结果,永 46 的抗旱性最强,因此确定该材料为进行转录组测序材料。

表 1 干旱胁迫下野生大豆苗期的冠层萎蔫指数测定

Table 1 Canopy wilting index of wild soybean seedling under drought stress

材料名称 Variety	冠层萎蔫指数分级 Grades of canopy wilting index			
	0% PEG6000	10% PEG6000	20% PEG6000	30% PEG6000
永 5 Yong 5	0	1	2	3
永 26 Yong 26	0	0	0	0
永 46 Yong 46	0	0	0	0
永 52 Yong 52	0	0	1	2
永 64 Yong 64	0	1	3	3



A:永 5;B:永 26;C: 永 46;D:永 52;E:永 64。
A: Yong 5;B: Yong 26;C: Yong 46;D: Yong 52;E: Yong 64.

图1 不同 PEG6000 浓度处理下的野生大豆萎蔫情况

Fig.1 The wilting situation of wild soybean deal with different PEG6000

表 2 干旱胁迫下苗期野生大豆抗旱级别鉴定

Table 2 The identification of drought resistant level of wild soybean seedling under drought dress

名称	90% 萎蔫日数	抗旱级别
Variety	90% wilting days/d	The level of drought resistance
永 5 Yong 5	28	Ⅳ
永 26 Yong 26	36	Ⅱ
永 46 Yong 46	40	Ⅰ
永 52 Yong 52	31	Ⅲ
永 64 Yong 64	28	Ⅳ

2.2 转录组数据加工及质量分析

将野生大豆永 46 干旱胁迫后不同时间点取样进行转录组测序,获取转录组数据。通过使用软件 BWA 将过滤所得的数据 (clean reads) 与参考基因组比对,各个样品与参考基因组序列的比对率在 80% 左右吻合,吻合程度最低为 80.65% (48 h),最高为 82.62% (6 h),由于遗传背景和注释信息量的限制,比对率仍在 70% 以上,初步判断试验数据可靠,可进行后续的数据分析。

表 3 过滤数据与参考基因组序列的比对分析

Table 3 Sequence comparison of clean reads with reference genome (条)

样品 Sample	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
数据过滤后序列 Total reads	12902443	12964876	12899528	12925704	12881464
可定位序列 Total mapped reads	10642246	10711403	10508131	10673474	10388493
匹配序列 Perfect match	8084300	7938817	8126035	7918321	7829983
不匹配序列 Mismatch	2557946	2772586	2382096	2755153	2558510
唯一定位序列 Unique match	8310074	8252163	8621802	8302300	8086855
多定位序列 Multiple match	2332172	2459240	1886329	2371174	2301638

2.3 差异表达基因分析

对获取的转录组数据进行整理,共获得了 39 183个序列信息。干旱胁迫 0,6,12,24,48 h 下野生大豆永 46 对应的序列信息分别为 31 856, 34 134,34 067,34 034和33 564条。共有的序列信息为27 875条(图 2)。

绘制以上每个结果列表中所有基因表达量的散点图(图 3),筛选差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs),筛选阈值为 $P\text{-value} \leq 0.05$, $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$,其中 Fold Change 为 PEG6000 处理后的材料与未处理的材料中各基因表达量的比值。对于差异表达基因,其 $\log_2 \text{Fold Change} > 0$ 时,

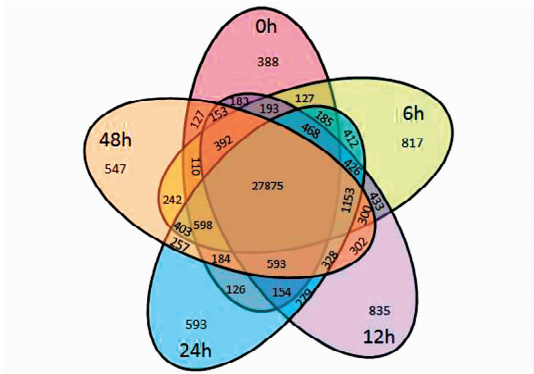


图2 各时期的序列信息统计维恩图
Fig.2 Venn diagram of unigenes under the different periods

则认为该差异表达基因是上调的,反之,若 \log_2 Fold Change <0 ,认为该差异表达基因是下调的。通过散点图可以清楚、直观的看出各不同时期表达谱中基

因的表达情况。经统计,6,12,24 和 48 h 上调基因各有 642,13 857,5 783 和 4 992 个,下调基因各有 1 282,2 330,1 188 和 1 083 个(图 4)。

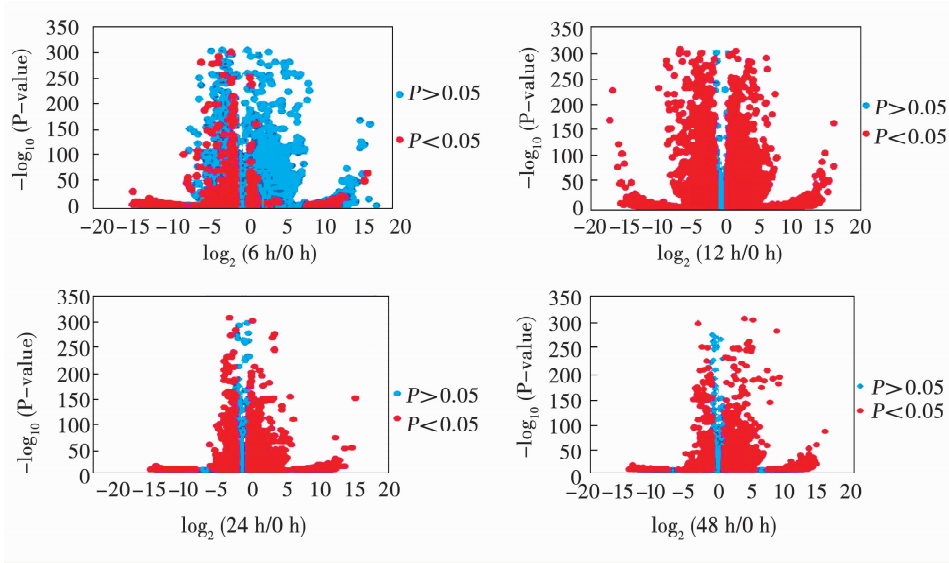


图 3 差异表达基因分析火山图

Fig. 3 The volcano plot of differentially expressed genes

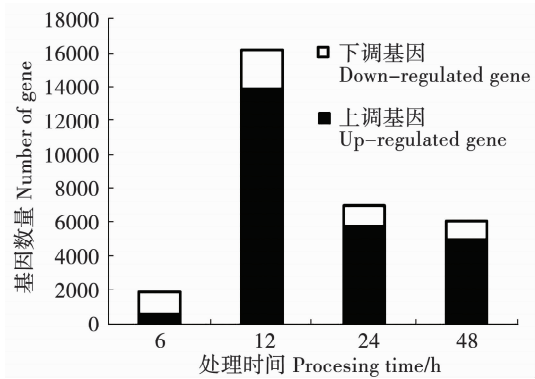


图 4 相对于未干旱处理时的各时期差异表达基因统计

Fig. 4 Statistical analysis of DGEs under the different periods

2.4 差异基因功能分析

2.4.1 GO 功能显著性富集分析 Gene Ontology (简称 GO) 是一个国际标准化的基因功能分类体系,GO 总共有 3 个本体(ontology),分别描述基因的细胞成分(cellular component)、分子功能(molecular function)、参与的生物过程(biological process)。GO 功能显著性富集的差异表达基因进行功能分析,可以确定差异表达基因行使的主要生物功能。本研究共对 3 的本体中的 15 类细胞成分基因,12 类分子功能基因和 21 类生物过程基因进行功能分析。如图 5 所示为干旱胁迫 12 h 时 3 个本体中前 10 个显著差异表达的 GO 分类情况。在细胞成分本体

中,细胞和细胞部分涉及到的差异表达基因最多,为 3 098 个,其次是胞内区,为 2 916 个,细胞质最少,为 1 419 个;在分子功能本体中,催化活性和结合活性所占比例最大,为 38.3%,各有 3 947 个和 3 515 个;在参与的生物过程本体中,代谢进程的差异表达基因达 4 012 个,是所有 GO 分类当中差异蛋白最多的,细胞进程和有机体进程的差异表达基因也都在 3 000 以上,分别是 3 462 个和 3 073 个。

2.4.2 差异基因途径分析 在 KEGG 数据库中,4 个不同处理时间下共有 127 个生物途径被注释到,对应各时期分别有 123,125,121 和 120 个生物途径存在差异表达基因,其中 119 个为各时期都注释到的生物学途径。它们主要涉及植物-病原体互作、植物激素信号转导、RNA 降解、ABC 转运蛋白等。

其中,注释到的基因在 500 个以上的途径是植物-病原体互作植物激素信号转导,它们分别有 835 和 740 个基因被注释到。注释到的基因少于 5 个的途径包括生物素代谢、咖啡碱代谢、花色素苷的生物合成和甜菜红色素的生物合成途径,分别有 3,3,2 和 1 个基因被注释到。其中植物信号转导途径中差异表达基因较全面,所有激素转导途径均出现明显的上调和下调变化。在 ABA 信号通路相关中有 23 个差异表达基因,其中上调基因有 16 个,下调基因有 7 个(表 4)。

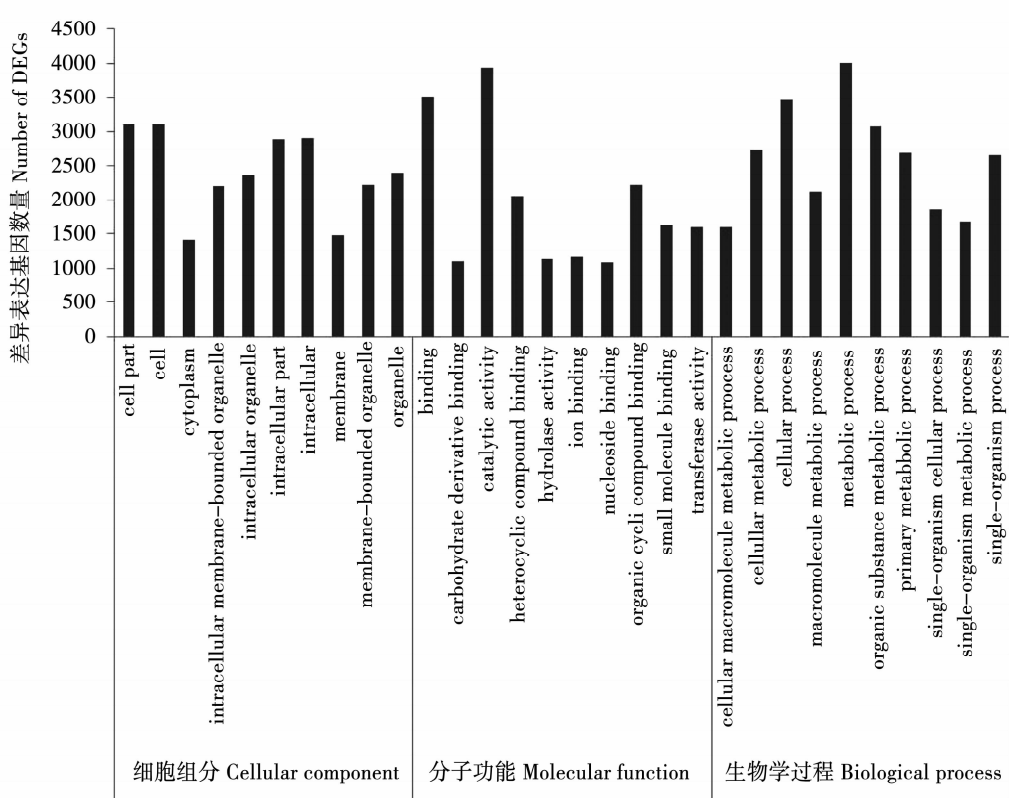


图5 干旱处理 12 h 的差异表达基因 GO 分类情况

Fig.5 Histogram of gene ontology classification with DGEs in processed 12 h

表4 ABA 通路下的差异表达基因

Table 4 The DEGs in the pathway of ABA

基因	log ₂	log ₂	log ₂	log ₂	基因注释
Gene	(6 h/0 h)	(12 h/0 h)	(24 h/0 h)	(48 h/0 h)	Gene annotation
glysoja_005522	12.226	9.570	10.512	10.877	G-box-binding factor 4-like [<i>Glycine max</i>]
glysoja_034252	3.053	2.801	1.773	2.163	bZIP47[<i>Glycine max</i>]
glysoja_030100	-2.695	-1.164	-0.589	-0.301	VIP1 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_001912	2.716	2.878	1.316	1.703	Probable PP2C 5-like isoform X1 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_008010	2.444	1.186	1.871	0.075	Probable PP2C 38-like isoform X1 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_004312	1.860	3.897	1.727	0.792	Probable PP2C 42-like [<i>Glycine max</i>]
glysoja_012060	1.685	0.452	1.086	1.010	Hypothetical protein PHAVU_007G199100g [<i>Phaseolus vulgaris</i>]
glysoja_013457	1.726	1.102	1.497	1.190	PP2C 37-like [<i>Glycine max</i>]
glysoja_050113	1.741	3.214	1.684	2.312	Uncharacterized protein LOC100787942 isoform X1 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_017943	1.433	2.377	2.009	1.604	PP2C 37 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_017420	1.222	0.352	1.055	-0.093	Probable PP2C 38-like isoform X1 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_028225	1.095	0.598	0.233	0.164	Uncharacterized protein LOC100781476 isoform X1 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_028444	-11.355	-1.785	1.594	0.972	Probable PP2C 68-like isoform 1 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_002738	-2.743	-0.202	0.506	-0.288	Probable PP2C 6-like [<i>Glycine max</i>]
glysoja_009838	-1.914	-1.022	0.449	-0.103	Probable PP2C 40-like [<i>Glycine max</i>]
glysoja_025384	5.615	-1.387	4.225	4.091	-
glysoja_015693	-1.423	-0.842	-0.673	0.230	Uncharacterized protein LOC100526923 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_021136	-1.283	0.827	-0.727	-0.443	Uncharacterized protein LOC100810273 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_018893	4.690	5.735	1.170	2.768	Protein kinase isoform X1 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_046490	1.952	3.273	0.113	-0.430	Threonine-protein kinase SRK21-like isoform 1 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_047040	1.897	2.694	0.112	-0.620	Threonine-protein kinase SRK21-like isoform 1 [<i>Glycine max</i>]
glysoja_012867	1.287	2.770	0.629	0.399	Protein kinase [<i>Glycine max</i>]
glysoja_024912	-1.640	-0.662	-0.797	-0.653	Hypothetical protein PHAVU_005G181900g [<i>Phaseolus vulgaris</i>]

2.4.3 转录因子分析 在进行转录因子分析时,共鉴定到了53类转录因子家族。其中涉及到的差异表达基因有472个,以MYB类转录因子最多,为51个,其次为bHLH、AP2-EREBP、WRKY、NAC和ARF

等转录因子家族,差异表达基因为20个以上。排名前15的转录因子家族差异表达基因均在10个以上。有9个转录因子家族仅涉及到1个差异基因的变化,具体结果如表5所示。

表 5 野生大豆永 46 转录因子家族鉴定结果统计

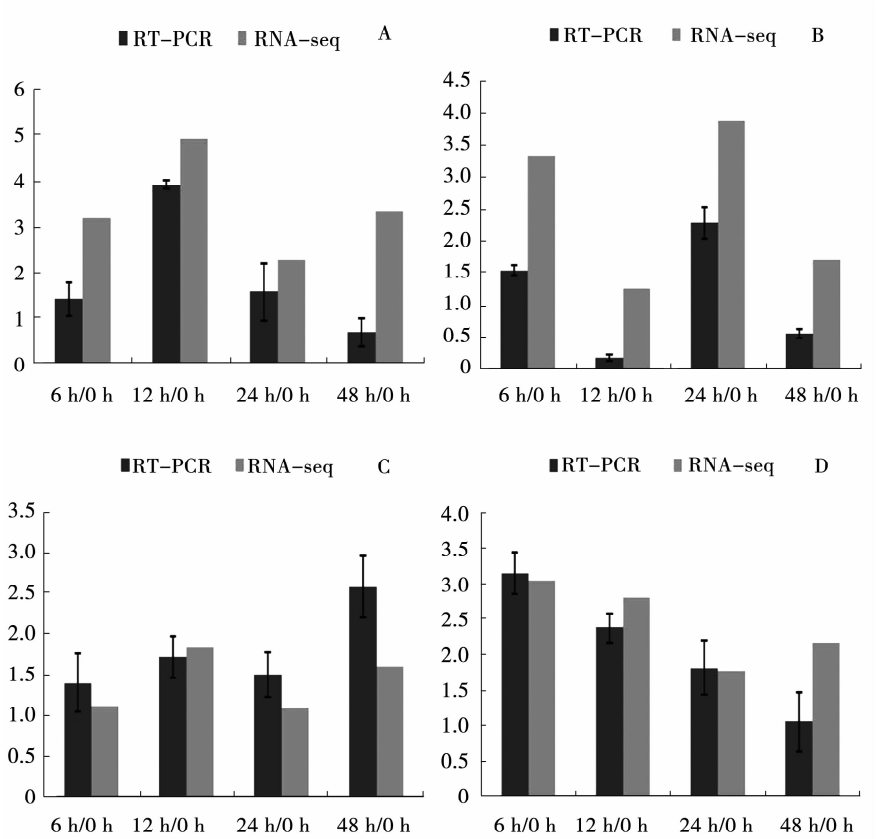
Table 5 Transcription factor families identified in the *Glycine soja* Yong 46

转录因子家族	数目	转录因子家族	数目	转录因子家族	数目	转录因子家族	数目
TF family	Number	TF family	Number	TF family	Number	TF family	Number
MYB	51	mTERF	10	Sigma70-like	5	PLATZ	2
bHLH	38	Tify	10	CPP	4	S1Fa-like	2
AP2-EREBP	37	C2C2-GATA	9	GRF	4	CSD	1
WRKY	29	SBP	9	HB	4	HRT	1
NAC	24	TIG	9	LOB	4	MADS	1
ARF	22	Trihelix	9	RWP-RK	4	NOZZLE	1
GRAS	19	ABI3VP1	8	BSD	3	SRS	1
C3H	18	TUB	8	C2C2-YABBY	3	ULT	1
C2C2-Dof	13	ARR-B	7	LIM	3	VARL	1
C2H2	13	CAMTA	7	TCP	3	VOZ	1
G2-like	12	HSF	7	BBR/BPC	2	zf-HD	1
C2C2-CO-like	10	Alfin-like	5	DBP	2		
FAR1	10	BES1	5	GeBP	2		
FHA	10	bZIP	5	OFP	2		

2.5 荧光定量分析

验证的 4 个基因在干旱胁迫下均为上调表达 (图 6)。glysoja_005221 的 qRT-PCR 和转录组数据趋势相同,均在干旱胁迫 12 h 时表达量达到最高 (图 6A);glysoja_008314 的 qRT-PCR 与转录组变化趋势一致,均表现为先降后升再降,在干旱胁迫 12 h 时表达量最低 (图 6B);glysoja_008938 的表达趋势与转录组也相同,均表现为先升后降再升 (图 6C);

glysoja_034252 的表达变化趋势较为平缓,表达量随时间增加而降低,在 6 ~ 24 h 表达趋势与转录组相同,在 48 h 表达趋势有所不同 (图 6D)。将 RNA-seq 和 qRT-PCR 中基因差异表达量进行 log₂ 转化后进行相关性分析,各时期表达量综合分析的皮尔森相关系数为 0.742,在 0.01 水平上显著相关,对处理 12 h 的 4 个基因的表达量进行单独相关性分析时,皮尔森相关系数为 0.958,说明 RNA-seq 的结果可靠。



A: glysoja_005221; B: glysoja_008314; C: glysoja_008938; D: glysoja_034252.

图 6 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig. 6 Validation of the DGEs by qRT-PCR

3 讨论

我国是大豆的起源地,野生大豆资源丰富,其中绝大多数是我国特有的种质资源,为改良栽培大豆基因提供了种类繁多的优异基因。河北省野生大豆资源极其丰富,不同生态环境蕴藏着高度抗旱的基因资源^[19-22],永46是本课题组采集并多次鉴定的抗旱性能较强的试验材料之一^[19-20],为野生大豆抗旱机制研究提供了优良的试验材料。

目前,转录组测序技术已广泛应用于发现新基因及比较基因组学的研究中^[23-26]。本研究发现野生大豆随干旱胁迫时间变化,差异表达基因数量不同,胁迫12 h达到最多,有16 187个差异表达基因,其中13 857上调表达,2 330下调表达;差异基因生物途径主要涉及植物-病原体互作、植物激素信号转导、RNA降解、ABC转运蛋白等;在ABA信号通路中,出现16/7个差异表达基因上调/下调表达。

植物碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)蛋白是一类保守性较高的植物转录因子^[27]。周宏^[28]在对桑树的抗旱相关转录因子家族进行分析时,鉴定出桑树bZIP转录因子家族成员有32个。WRKY转录因子是响应植物逆境胁迫的一类转录因子,在多数植物中有分布^[29]。Zhou等^[30]报道,大豆来源的*GmWRKY13*、*GmWRKY21*和*GmWRKY54*基因在拟南芥中过表达,都能够提高抗旱性。乙烯应答元件结合蛋白(EREBP)为植物所特有,且分布广泛,刘鑫等^[31]在研究玉米乙烯应答元件结合蛋白基因启动子时,发现模拟不同逆境条件下该基因上调表达。水通道蛋白(water channel protein)是控制运输水分的膜蛋白,在干旱胁迫下,可能涉及调控细胞的水分状态^[32]。Guerrero等^[33]鉴定出豌豆中第一个水胁迫诱导的水通道蛋白基因。近两年,豇豆的水通道蛋白基因^[34]也被克隆了出来。在本研究中干旱胁迫下的野生大豆转录组差异表达基因,有118个WRKY转录因子家族基因和104个bZIP转录因子家族基因,说明这两个基因家族在干旱胁迫条件下变化明显;EREBP基因的表达量亦显示为上调表达;水通道蛋白基因有27个表达变化差异显著,为研究野生大豆抗旱相关基因提供了新的依据。

对4个不同功能的基因干旱胁迫下的荧光定量分析,glysoja_005221表现为干旱胁迫12 h时表达量达到最高。glysoja_008314在干旱胁迫12 h时表达量变化达到最低;glysoja_008938的表达趋势为先升后降再升;glysoja_034252在48 h表达趋势有所不同,这可能和验证材料与进行转录组测序的材料为不同批次有关。

4 结论

野生大豆永46干旱胁迫下差异表达基因丰富,在干旱胁迫12 h差异表达基因数量最多,以上调差异表达基因居多;差异基因生物途径主要涉及植物-病原体互作、植物激素信号转导、RNA降解、ABC转运蛋白等;差异表达转录因子中以MYB类转录因子最多;干旱胁迫差异表达基因荧光定量验证结果与转录组数据表达趋势大致相同,转录组数据可用于野生大豆抗旱相关基因的克隆等方面研究。

参考文献

[1] Yuan C P, Wang Y J, Zhao H K, et al. Genetic diversity of *rhg1* and *rhg4* loci in wild soybeans resistant to soybean cyst nematode race 3 [J]. *Genetics & Molecular Research*, 2016, 15 (2): gmr7386.

[2] 杨如萍,包振贤,陈光荣,等.大豆抗旱性研究进展[J].作物杂志,2012(5):8-12. (Yang R P, Bao Z X, Chen G R, et al. The research progress in drought resistance of soybean[J]. *Crops*, 2012(5):8-12.)

[3] Lam H M, Xu X, Liu X, et al. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(12):1053-1059.

[4] Kim M Y, Lee S, van K, et al. Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107:22032-22037.

[5] 王克晶,李向华.国家基因库野生大豆(*Glycine soja*)资源最近十年考察与研究[J].植物遗传资源学报,2012(4):507-514. (Wang K J, Li X H. Exploration and studies of wild soybean germplasm resources in the China genebank during recent decade [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012(4):507-514.)

[6] Kosová K, Vítámvás P, Urban M O, et al. Plant abiotic stress proteomics: The major factors determining alterations in cellular proteome[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:122.

[7] Teng Z Q, Hui-Qing F U, Jia S H, et al. Review of current progress in the metabolomics for plant response to abiotic stress[J]. *Crop Research*, 2011, 35(1):110-118.

[8] Fan X D, Wang J Q, Yang N, et al. Gene expression profiling of soybean leaves and roots under salt, saline-alkali and drought stress by high-throughput Illumina sequencing[J]. *Gene*, 2013, 512(2):392-402.

[9] Wang X, Oh M, Sakata K, et al. Gel-free/label-free proteomic analysis of root tip of soybean over time under flooding and drought stresses[J]. *Journal of Proteomics*, 2016, 130:42.

[10] Berretta J, Morillon A. Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation[J]. *Embo Reports*, 2009, 10(9):973-982.

[11] Liu X, Lyu S, Liu R, et al. Transcriptomic analysis reveals the roles of gibberellin-regulated genes and transcription factors in regulating bolting in lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. *Plos One*,

- 2018, 13(2): e0191518.
- [12] Gao C, Wang Y, Liu G, et al. Expression profiling of salinity-alkali stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Tamarix hispid*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66(3): 245-258.
- [13] 姚敏磊, 张璟曜, 周汐, 等. 大豆响应低磷胁迫的数字基因表达谱分析[J]. *大豆科学*, 2016, 35(2): 213-221. (Yao M L, Zhang J Y, Zhou X, et al. The digital gene expression profiling analysis of genes in response to low phosphorus stress in soybean [J]. *Soybean Science*, 2016, 35(2): 213-221.)
- [14] 任梦露, 刘卫国, 刘婷, 等. 荫蔽胁迫下大豆茎秆形态建成的转录组分析[J]. *作物学报*, 2016, 42(9): 1319-1331. (Ren M L, Liu W G, Liu T, et al. Transcriptome analysis of stem morphogenesis under shade stress in soybean [J]. *Acta Automatica Sinica*, 2016, 42(9): 1319-1331.)
- [15] 张晓娜, 朴春兰, 董友魁, 等. 大豆根系应答重金属 Cd 胁迫的转录组分析[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(5): 1633-1641. (Zhang X N, Piao C L, Dong Y K, et al. Transcriptome analysis of response to heavy metal Cd stress in soybean root [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(5): 1633-1641.)
- [16] Liu A, Xiao Z, Li M W, et al. Transcriptomic reprogramming in soybean seedlings under salt stress [J]. *Plant Cell & Environment*, 2018, 12(12): e0189159.
- [17] 吴倩, 张磊, 黄志平, 等. 转录组测序及其在野生大豆基因资源发掘中的应用[J]. *大豆科学*, 2013, 32(6): 845-851. (Wu Q, Zhang L, Huang Z P, et al. Transcription sequencing and its application on discovering the gene resources of wild soybean [J]. *Soybean Science*, 2013, 32(6): 845-851.)
- [18] Wei C, Yao Q, Patil G B, et al. Identification and comparative analysis of differential gene expression in soybean leaf tissue under drought and flooding stress revealed by RNA-Seq[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1044.
- [19] Carter T E Jr, de Souza P I, Purcell L C. Recent advances in breeding for drought and aluminum resistance in soybean [C]. Chicago: Proceedings of World Soybean Research Conference VI, 1999: 106-125.
- [20] 蒲伟凤. 不同类型大豆种质资源抗旱性比较及野生大豆抗旱性筛选[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2010. (Pu W F. Comparison of drought resistance in different soybean types and screening of drought resistance in *Glycine soja* [D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science and Technology, 2010.)
- [21] 乔亚科, 李桂兰, 高书国, 等. 昌黎沿海野生大豆分布及其耐盐性[J]. *河北职业技术师范学院学报*, 2001(2): 9-13. (Qiao Y K, Li G L, Gao S G, et al. Geographical distribution and salt-tolerance of wild soybean (*Glycine soja*) in inshore regions in Changli Hebei province [J]. *Journal of Hebei Vocation-Technical Teachers College*, 2001(2): 9-13.)
- [22] 王丹, 乔亚科, 韩粉霞, 等. 河北东部沿海地区野生大豆 SSR 多样性分析[J]. *大豆科学*, 2010, 29(4): 555-558. (Wang D, Qiao Y K, Han F X, et al. Diversity of *Glycine soja* in eastern coastal area of Hebei province [J]. *Soybean Science*, 2010, 29(4): 555-558.)
- [23] Zhang X, Jiang H, Wang H, et al. Transcriptome analysis of rice seedling roots in response to potassium deficiency [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5523.
- [24] Prince S J, Joshi T, Mutava R N, et al. Comparative analysis of the drought-responsive transcriptome in soybean lines contrasting for canopy wilting [J]. *Plant Science*, 2015, 240: 65-78.
- [25] 刘洪博, 刘新龙, 苏火生, 等. 干旱胁迫下割手密根系转录组差异表达分析[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(6): 1167-1178. (Liu H B, Liu X L, Su H S, et al. Transcriptome difference analysis of *saccharum spontaneum* roots in response to drought stress [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(6): 1167-1178.)
- [26] 刘振山. 小麦苗期干旱、高温和旱热共胁迫转录表达谱及 ABD 部分同源基因表达分化分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2015. (Liu Z S. Transcriptome profiling and differential homeologous genes expression analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings during drought stress, heat stress and their [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015.)
- [27] Fujita Y, Fujita M, Satoh R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(12): 3470-3488.
- [28] 周宏. 桑树抗旱相关 4 个转录因子家族鉴定与表达分析[D]. 镇江: 江苏科技大学, 2017. (Zhou H. Identification and expression analysis of drought-resistant related 4 transcription factor families in mulberry (*Morus L.*) [D]. Zhenjiang: Jiangsu University of Science and Technology, 2017.)
- [29] Jiang J J, Ma S H, Ye N H, et al. WRKY transcription factors in plant responses to stresses [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2017, 59(2): 86-101.
- [30] Zhou Q Y, Tian A G, Zou H F, et al. Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6(5): 486-503.
- [31] 刘鑫, 邹郁陶, 牟巍, 等. 玉米乙烯应答元件结合蛋白基因启动子克隆与功能验证[J]. *核农学报*, 2016, 30(4): 629-637. (Liu X, Zou Y T, Mu W, et al. Cloning and functional validation of promoter of ethylene-responsive element-binding protein gene in maize [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2016, 30(4): 629-637.)
- [32] Hu W, Hou X, Huang C, et al. Genome-wide identification and expression analyses of aquaporin gene family during development and abiotic stress in banana [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(8): 19728-19751.
- [33] Guerrero F D, Jones J T, Mullet J E. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes [J]. *Plant Molecular Biology*, 1990, 15(1): 11.
- [34] 叶国良, 宋娟娟, 叶清. 两种不同抗旱能力的豇豆根系水通道蛋白基因的克隆与分析[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(8): 1977-1985. (Ye G L, Song J J, Ye Q. Cloning and analysis of aquaporins in roots of two cow pea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivars with contrasting drought tolerance [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(8): 1977-1985.)