



耐低钾大豆品种筛选及低钾胁迫下 Lee 68 的差异表达基因分析

陆 潭^{1,2}, 陈华涛², 张 威², 陈 新^{1,2}

(1. 南京农业大学 生命科学学院, 江苏 南京 200095; 2. 江苏省农业科学院 经济作物研究所, 江苏 南京 210014)

摘 要: 为了从分子水平上研究大豆幼苗对低钾胁迫的耐性机理, 本研究首先依据生物量指标从 25 份大豆材料中筛选出耐低钾品种 Lee 68, 并对低钾胁迫下大豆 Lee 68 幼苗进行转录组测序和分析。通过对转录组 Solexa/Illumina 高通量测序数据的分析, 共得到 160 211 759 个 reads, 将获得的数据与大豆 Williams 82 基因组序列比对, 比对率达到 92. 83% 以上。比较组 LK_VS_CK 中差异表达基因为 3 521 个, 其中下调和上调基因分别为 2 393 和 1 128 个。GO 功能聚类分析显示 LK_VS_CK 比较组的差异表达基因主要富集于植物的代谢过程、胁迫响应及信号转导; KEGG pathway 分析中, LK_VS_CK 比较组有 390 个差异表达基因显著富集在 19 个 pathway 途径中, 其中富集最为显著的是代谢途径, 包括氨基酸代谢、脂肪酸和类脂代谢以及碳水化合物代谢等; COG 分类统计结果表明 LK_VS_CK 比较组除 649 个差异表达基因具有一般性功能之外, 377 个基因被划分到转录因子功能类, 343 个基因被划分到信号转导机制功能中。结合差异表达基因的功能分析及茉莉酸信号转导调控机制, 筛选到了茉莉酸信号途径上可能参与钾离子吸收转运过程的 8 个关键候选基因, 分别是 *Glyma09g08290*、*Glyma09g33730*、*Glyma03g32890*、*Glyma04g39010*、*Glyma08g09720*、*Glyma12g36310*、*Glyma16g32821*、*Glyma19g45260*。研究结果对深入研究大豆钾胁迫下与钾离子高效吸收相关基因的调控及克隆研究具有重要的参考价值。

关键词: 大豆; 低钾胁迫; 差异表达基因; 转录组测序

Screening of Tolerant Soybean Varieties and Analysis of Differential Expressed Genes of Lee 68 Under Low-Potassium Stress

LU-Tan^{1,2}, CHEN Hua-tao², ZHANG Wei², CHEN Xin^{1,2}

(1. School of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 200095, China; 2. Cash Crop Research Institute, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to study the tolerance mechanism of soybean seedlings to low potassium stress at the molecular level, this study selected the low potassium tolerant variety Lee 68 from 25 soybean materials according to the biomass index firstly, and used Lee 68 as test materials in transcriptome sequencing under low potassium stress. Through the analysis of Solexa/Illumina sequencing data, 160 211 759 reads were obtained. The alignment rate reached more than 92. 83% compared with the genome sequence of Williams 82. The total differential expressed genes of LK_VS_CK were 3 521, of which down/up-regulated genes were 2 393/1 128 respectively. The GO functional clustering analysis showed that the differential expressed genes in the LK_VS_CK group were mainly enriched in plant metabolic processes, stress response, and signal transduction. The KEGG pathway analysis showed that there were 390 differential expressed genes in LK_VS_CK group and enriched in 19 pathway approach, especially in the metabolic pathways, including amino acids, fatty acid and lipid metabolism, and carbohydrate metabolism. COG classification statistics showed that in the LK_VS_CK comparison group, beside the 649 differentially expressed genes with general function, 377 genes were classified into the function of transcription, and 343 genes were classified into the function of signal transduction mechanism. Combination the function analysis of differential expressed genes with jasmonic acid signal transduction regulation mechanism, eight key candidate genes were screened as follow: *Glyma09g08290*, *Glyma09g33730*, *Glyma03g32890*, *Glyma04g39010*, *Glyma08g09720*, *Glyma12g36310*, *Glyma16g32821*, and *Glyma19g45260*, which may participate in the uptake of potassium ion transport process in jasmonic acid signaling pathway. These results provide an important reference for further study on the regulation and cloning of genes related to potassium efficient absorption in soybean under potassium stress.

Keywords: Soybean; Low-potassium stress; Differential expressed genes; Transcriptome sequencing

大豆是中国主要的油料作物和优质蛋白质来源, 其产量和品质受钾素的影响较大^[1-2]。据统计, 全世界 13. 9 亿 hm² 耕地中有 22. 5% 受到严重营养胁迫, 而其中大约 40% 是因缺钾引起的^[3]。目前中

收稿日期: 2019-01-15

基金项目: 国家自然科学基金(31401407)。

第一作者简介: 陆潭(1990-), 男, 硕士, 主要从事大豆生理及分子生物学研究。E-mail: 1134034827@qq. com。

通讯作者: 陈新(1970-), 男, 博士, 研究员, 主要从事豆类作物新品种选育与配套栽培技术研究。E-mail: cx@jaas. ac. cn。

国农业生产中面临的一个突出问题是不断降低的农田土壤钾素及钾肥利用效率限制了作物产量潜力的发挥和产品品质的进一步改善^[4]。因此通过改良大豆种质资源和基因来培育耐低钾的大豆品种是应对上述问题行之有效的办法之一。

大豆应对低钾胁迫的响应过程是极其复杂的,包括生理代谢过程、钾离子吸收转运的分子调控及信号通路机制等^[5-8]。随着分子生物学技术的迅猛发展,利用高通量测序技术可以获取植物全基因组功能信息,包括差异表达基因以及新基因的序列信息等,这对于研究大豆在钾胁迫下通过基因表达调控钾离子吸收转运的过程具有重要作用^[9-10]。

高通量测序技术又称下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术,或二代测序技术。是相对于 Sanger 测序法为代表的传统测序技术而言的,可实现大规模的基因组研究,同时对数百万个 DNA 分子实施测序^[11]。NGS 技术在微生物学研究领域应用较为广泛,尤其在新发传染病疫情的发现和控制过程中发挥了不可替代的重要作用^[12]。在医学领域,随着当代科学技术的进步,NGS 平台已逐渐被引入包括肿瘤学在内的众多领域中,为包括个体化癌症和精准医学在内的临床诊疗提供了一个崭新的平台,具有广阔的应用前景^[13-15]。在动植物研究领域,高通量测序引领了一次具有里程碑意义的科学研究模式革新,科研人员利用该技术在基因组、转录组和表观基因组等领域展开多层次、多方面、多水平研究^[16]。对已完成全基因组测序的物种进行转录组测序,可得到基因表达差异、基因结构优化、可变剪接、单核普酸多态性等分析结果并发现新基因,为植物分子生物学的研究提供更多数据依据^[17]。2011 年,范秀朵^[18]研究了基于高通量测序技术的干旱胁迫下大豆根和叶表达谱,并应用 RT-PCR 方法验证分析了 Illumina 测序出的 6 个基因,对进一步研究大豆的抗旱机理及培育抗旱大豆新品种具有重要的经济意义和利用价值。本课题组前期分别进行了大豆 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因 *GmRDR1*、*GmRDR6a* 和 *GmRDR6b* 的克隆与分析,这些基因对盐和干旱胁迫具有明显响应^[19-20]。然而,对大豆低钾胁迫耐性的研究目前大多还停留在生理机制的探索,分子基因层面的机制研究鲜有报道。因此,本研究拟通过建立系统的耐低钾性状评价指标,对不同基因型大豆进行筛选,再利用 Illumina 高通量测序技术来研究耐性品种的转录组表达水平,通过对胁迫响应基因的差异表达分析,探究大豆钾胁迫下的耐性分子调控机制,以期分析低钾胁迫耐受性调控网路,为大豆的分子育种及提高产量

奠定更加坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试大豆 25 个供筛选大豆品种(表 1)均来自于江苏省农业科学研究院经济作物研究所大豆种质资源库。

1.1.2 试剂与耗材 霍格兰营养液配方:505.5 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O, 493 mg·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 2.86 mg·L⁻¹ H₃BO₃, 0.22 mg·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 1.81 mg·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 0.02 mg·L⁻¹ H₂MoO₄·H₂O, 0.08 mg·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 5.57 mg·L⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 7.45 mg·L⁻¹ EDTA·2Na, pH6.0。

RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司, DP432); Zero Background p-TOPO-TA Cloning Kit(北京艾德莱生物有限公司, CV1401); Trans-Taq DNA Polymerase High Fidelity(北京全式金生物技术有限公司, AP131-12); 胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司, AP-GX-50); DL2000 DNA Marker(南京钟鼎生物技术有限公司, DM1201); Gel-Stain(北京全式金生物技术有限公司, GS101-01); DEPC(Sigma, D5758-25ML); Agarose(西班牙 Biowest, 91622); 离心管(美国 Axygen, 311-01-051); 枪头(美国 Axygen)。其它试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 超微量紫外分光光度计(Thermo, NanoDrop2000); 基因扩增梯度 PCR 仪(杭州博日, TC-96/G/H(b)C); 台式高速冷冻离心机(美国 BECKMAN, Allegra 21R); 电子天平(美国 AHOMS, AR5120); 紫外透射仪(美国 Amersham Pharmacia, Hofer MV-25); 电泳仪(BIO-RAD, TY2795); 电泳槽(BIO-RAD, Sub-Cell GT Cell); 凝胶成像分析系统(BIO-RAD, GelDocXR); 雪花状制冰机(日本 SANYO, SIM-F140AY65); 移液器(德国 Eppendorf)。

1.2 方法

1.2.1 水培试验 参照 Wang 等^[21]方法,选取整齐一致,饱满无虫害的大豆种子,以 1.2% 次氯酸钠溶液消毒 20 min 后用蒸馏水冲洗 5 次,洗净除杂后放入牛皮纸袋中,袋底沾适量水分保湿,并防止烂芽,于(25±2)℃培养箱暗培养。选取出芽一致的种子播于铺有蛭石的小花盆中,每种 3 盆,每盆 4 粒,将花盆移至光照培养箱中培养 7 d,相对湿度 60%,光照条件 16 h 光照/8 h 黑暗,白天 28℃/夜晚 22℃。待子叶长出时,全部移至于装有 Hoagland 营养液的蓝色方盒中。待植株长出 2 片真叶时,将大豆移至 1/8 Hoagland 营养液中培养,用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 或 HCl 调至 pH6.0。隔 1 d 后换 1/4 的 Hoagland 营

养液,为预防烧苗,直到 4 d 后才换成全 Hoagland 营养液。随后用低钾营养液进行胁迫处理。低钾营养液由 Hoagland 营养液调配,钾素来源于 KCl。品种筛选采用 2 个钾处理浓度:低钾($0.01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、适钾($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。每个处理 3 次重复,将试验材料置于光照培养箱中水培至 6~7 叶期收获,期间每 7 d 更换 1 次营养液。

1.2.2 低钾和适钾条件下植株地上部及根系生物量比值的测定 植株收获、清理后,分成根系和地上部,先于 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杀青 30 min,再于 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下烘干 48 h 至恒定重量,用万分之一天平称量其根系和地上部干重,再分别计算低钾和适钾条件下根系干重比值、地上部干重比值,对 25 个品种的耐低钾水平进行综合评价。

1.2.3 总 RNA 的提取、文库构建和测序 利用 Trizol 试剂盒(天根生化科技有限公司,DP432)提取大豆根部组织总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 浓度及完整性,并用酶标仪检测总 RNA 的浓度及 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值,比值为 $1.8\sim 2.2$,且 28S 和 18S 条带分布明显的 RNA,用于文库构建和测序。建库和测序委托百迈客生物科技有限公司完成,通过 Illumina HiSeq 2500 平台进行测序。

1.2.4 数据的过滤、拼接 使用 Trimmomatic(<http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic>)对获得的转录组原始数据进行过滤,去除包含接头的 reads、未知碱基 N 含量大于 5% 的 reads、以及去除低质量 reads 和 rRNA 序列,通过 TopHat 软件^[22]将过滤后的高质量 clean reads 序列与大豆 Williams 82 基因(<http://www.phytozome.net/soybean>)参考基因组序列进行比对,利用 HISAT(<http://www.ccb.jhu.edu/software/hisat>)将 clean reads 比对到参考基因组序列,利用 Cufflinks(<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks>)软件将比对结果组装构建转录本。

1.2.5 差异基因的筛选、GO 富集分析和 KEGG pathway 分析 利用基于 R 语言的 DESeq 算法包获得差异表达基因,使用 FPKM 法(fragments per kb per million fragments)量化基因的表达水平,以 $\text{Fold Change}\geq 2$ 和 $\text{FDR}<0.01$ 为标准筛选差异基因。利用 TBtools 软件将筛选出的差异表达基因进行 GO 富集和进一步筛选及 KEGG pathway 分析。

1.3 数据分析

试验结果均以“均值 \pm 标准差”($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析,2 组均数间差异分析采用 t 检验,认为 $P<0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 耐低钾大豆品种的筛选

低钾/适钾条件下植株地上部生物量比值的测定结果表明:与对照组相比,低钾胁迫下 25 个大豆品种的地上部干重都不同程度降低,其中 Lee 68、常熟花母鸡、淮安新黑豆、涟水二母生大豆 4 个材料地上部干重降低程度相对较小,且品种间耐性强度没有显著性差别($P<0.05$),说明这 4 个材料耐受性较强,均为耐低钾品种。而大丰绿皮大豆、通州水白豆、昆山陪稻青大豆、六合大黑豆、吴江同里毛豆、大丰救命大豆、Jackson、昆山牛踏扁、盱眙黄豆、昆山瞎子毛豆这 10 个品种地上部干重降低程度明显,品种之间敏感性没有显著性差别($P<0.05$),均为低钾敏感材料(表 1)。

表 1 不同品种大豆地上部生物量比值(低钾/适钾) 方差分析
Table 1 Variance analysis of aboveground biomass ratio with low/suitable potassium content of different soybean varieties

品种 Variety	平均值 \pm 标准差 Average \pm SD	$P<0.05$	$P<0.01$
Lee 68	0.95 ± 0.11	a	A
常熟花母鸡 Changshuhuamuji	0.80 ± 0.08	ab	AB
淮安新黑豆 Huai'anxinheidou	0.79 ± 0.06	abc	AB
涟水二母生大豆 Lianshui'ermushengdadou	0.76 ± 0.07	abc	ABC
如皋九华大豆 Rugaojiuhuadadou	0.71 ± 0.03	bc	ABCD
溧阳上皇大豆 Liyangshanghuangdadou	0.70 ± 0.05	bc	ABCD
泰兴古溪绿毛豆 Taixingguxilyumadou	0.69 ± 0.06	bc	ABCD
大丰牛踏扁毛豆 Dafengniutabianmaodou	0.66 ± 0.05	bcd	ABCDE
大丰黑眼睛 Dafengheiyanjing	0.64 ± 0.02	bcde	BCDEF
溧阳乌黑大豆 Liyangwuheidadou	0.61 ± 0.07	bcdef	BCDEFG
吴江同里大豆 Wujiangtonglidadou	0.60 ± 0.08	bcdef	BCDEFG
涟水大连大青豆 Lianshuidaliandaqingdou	0.59 ± 0.01	bcdef	BCDEFG
太仓黑皮毛豆 Taicangheipimaodou	0.58 ± 0.04	bcdef	BCDEFG

续表 1

品种 Variety	平均值 ± 标准差 Average ± SD	<i>P</i> < 0. 05	<i>P</i> < 0. 01
东台安丰大豆 Dongtaianfengdadou	0. 56 ± 0. 03	cdefg	BCDEFGH
赣榆红皮黄豆 Ganyuhongpihuangdou	0. 47 ± 0. 04	defgh	CDEFGHI
大丰绿皮大豆 Dafenglyupidadou	0. 45 ± 0. 02	defghi	DEFGHI
通州水白豆 Tongzhoushuibaidou	0. 42 ± 0. 03	defghi	DEFGHI
昆山陪稻青大豆 Kunshanpeidaoqingdadou	0. 38 ± 0. 01	efghi	DEFGHI
六合大黑豆 Lihedaheidou	0. 33 ± 0. 03	fghi	EFGHI
吴江同里毛豆 Wujiangtonglimadou	0. 32 ± 0. 02	fghi	EFGHI
大丰救命大豆 Dafengjiumingdadou	0. 31 ± 0. 02	ghi	FGHI
Jackson	0. 29 ± 0. 01	hi	GHI
昆山牛踏扁 Kunshanniutabian	0. 27 ± 0. 02	hi	HI
盱眙大黄豆 Xuyidahuangdou	0. 27 ± 0. 01	hi	HI
昆山瞎子毛豆 Kunshanxiazimaodou	0. 19 ± 0. 02	i	I

低钾/适钾条件下植株根系生物量比值的测定结果表明,25 个大豆品种都分别在低钾和适钾培养液中培养后,其根系干重比值各不相同。Lee 68、常熟花母鸡、太仓黑皮毛豆、吴江同里大豆、泰兴古溪绿毛豆、如皋九华大豆、赣榆红皮黄豆、通州水白豆和东台安丰大豆 9 个耐低钾的品种耐性强度没有显著性差别。而盱眙大黄豆、吴江同里毛豆、Jackson、大丰救命大豆、昆山瞎子毛豆、昆山牛踏扁 6 个对低钾敏感品种之间其敏感性强度没有显著性差别(表 2)。

表 2 不同品种大豆根系干重比值(低钾/适钾)对比
Table 2 Comparison of root dry weight with low/suitable potassium content of different soybean varieties

品种 Variety	平均值 ± 标准差 Average ± SD	<i>P</i> < 0. 05	<i>P</i> < 0. 01
Lee 68	0. 92 ± 0. 09	a	A
常熟花母鸡 Changshuhuamuji	0. 84 ± 0. 08	ab	AB
太仓黑皮毛豆 Taicangheipimaodou	0. 81 ± 0. 10	abc	ABC

续表 2

品种 Variety	平均值 ± 标准差 Average ± SD	<i>P</i> < 0. 05	<i>P</i> < 0. 01
吴江同里大豆 Wujiangtonglidadou	0. 77 ± 0. 07	abcd	ABCD
泰兴古溪绿毛豆 Taixingguxilyumaodou	0. 76 ± 0. 07	abcd	ABCD
如皋九华大豆 Rugaojiuhuadadou	0. 75 ± 0. 08	abcd	ABCD
赣榆红皮黄豆 Ganyuhongpihuangdou	0. 71 ± 0. 09	abcde	ABCD
通州水白豆 Tongzhoushuibaidou	0. 71 ± 0. 06	abcde	ABCD
东台安丰大豆 Dongtaianfengdadou	0. 70 ± 0. 07	abcde	ABCDE
大丰牛踏扁毛豆 Dafengniutabianmaodou	0. 64 ± 0. 05	bcdef	ABCDE
淮安新黑豆 Huai anxinheidou	0. 63 ± 0. 04	bcdef	ABCDE
涟水大连大青豆 Lianshuidaliandaqingdou	0. 58 ± 0. 04	cdefg	ABCDEF
大丰黑眼睛 Dafengheiyanjing	0. 55 ± 0. 05	cdefg	BCDEF
涟水二母生大豆 Lianshuiernmushengdadou	0. 54 ± 0. 06	defg	BCDEF
溧阳乌黑大豆 Liyangwuheidadou	0. 50 ± 0. 03	defg	BCDEF
溧阳上皇大豆 Liyangshanghuangdadou	0. 47 ± 0. 03	defgh	BCDEFG
昆山陪稻青大豆 Kunshanpeidaoqingdadou	0. 47 ± 0. 04	efgh	CDEFG
大丰绿皮大豆 Dafenglyupidadou	0. 46 ± 0. 02	efgh	CDEFG
六合大黑豆 Lihedaheidou	0. 43 ± 0. 02	efgh	CDEFG
盱眙大黄豆 Xuyidahuangdou	0. 42 ± 0. 03	fghi	DEFG
吴江同里毛豆 Wujiangtonglimadou	0. 40 ± 0. 04	fghi	DEFG
Jackson	0. 35 ± 0. 03	ghi	EFG
大丰救命大豆 Dafengjiumingdadou	0. 26 ± 0. 03	hi	FG
昆山瞎子毛豆 Kunshanxiazimaodou	0. 22 ± 0. 02	hi	FG
昆山牛踏扁 Kunshanniutabian	0. 17 ± 0. 02	i	G

低钾/适钾条件下植株地上部分和根系生物量比值的测定结果表明:低钾处理下大豆地上部及根部干重均低于适钾处理下的干重,但 Lee 68 和常熟花母鸡等品种对低钾胁迫症状不显著,而 Jackson 和昆山牛踏扁等品种对低钾胁迫症状较为显著,表明不同基因型大豆对不同钾水平的适应能力具有显著差异。其中 Lee 68 的地上部和根部的 2 个指标值均最高,因此, Lee 68 属于高效耐低钾品种。而 Jackson、昆山牛踏扁及昆山瞎子毛豆等品种耐低钾能力均很弱,因此它们均属于低钾敏感品种。因此,本研究选用 Lee 68 作为耐低钾品种用于转录组测序,探究大豆对钾离子吸收及转运机制。

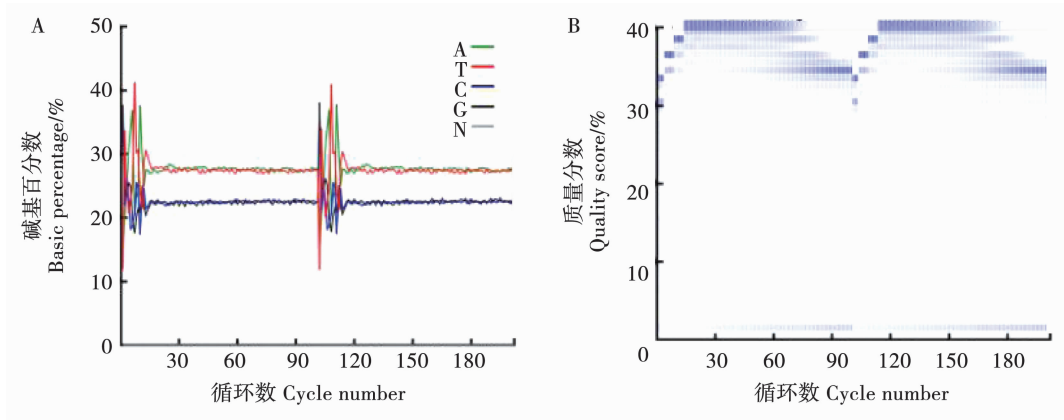


图 1 测序碱基含量分布 (A) 及质量值分布 (B)
Fig. 1 Distribution of basic percentage (A) and quality score (B)

表 3 测序数据分析统计
Table 3 Analysis and statistics of sequencing data

样品编号 Sample No.	公司编号 BMK-ID	Read 总数 No. of total reads	总碱基数 No. of total bases	GC 含量 GC content/%	Q30 /%
LK-1	T1	20431149	4126812392	46. 06	88. 36
LK-2	T2	23010304	4647673454	45. 34	87. 66
LK-3	T3	24661754	4981318074	45. 75	87. 74
CK1	T4	30471207	6154676531	46. 03	87. 97
CK2	T5	30565231	6163573622	46. 54	88. 12
CK3	T6	31072114	6239873712	46. 38	88. 29

LK:低钾处理; CK:对照处理。
LK:Low potassium treatment; CK:The contrast treatment.

2.2.2 差异表达基因筛选 将低钾组与对照组比较 (LK_vs_CK), 共得到3 521个差异表达基因, 其中下调表达基因2 393个, 上调表达基因1 128个。

2.2.3 差异表达基因 GO 功能富集分析 LK_VS_CK 比较组中所有差异表达基因 GO 分类统计结果显示: 共3 136个差异表达基因富集在细胞组成、分子功能以及生物过程中, 其中2 864个基因富集在 18 个细胞组成中; 2 589个基因富集在 16 个分子功能中; 2 899个基因富集在 24 个生物过程中 (图 2)。

2.2 钾胁迫下 Lee 68 大豆差异表达基因分析

2.2.1 Solexa/Illumina 高通量测序质量分析 测序共获得160 211 759个序列读取片段 (reads), 总碱基数为 32. 31 G (表 3), G 和 C 碱基含量基本相同, A 和 T 碱基的含量相似 (图 1A)。Q30 是指 1 个碱基的识别可靠性等于 99. 9%, 即出错可能性是 0. 1%, 本转录组 Solexa 测序结果显示 Q30 > 85% (图 1B), 达到 88. 02% (表 3)。

统计比对结果显示: 有 6 个样品的 reads 与参考基因组的比对效率较高, 均在 92. 83% 以上, 可以满足后续分析的需要 (表 3)。

Tbtools 软件进一步筛选结果显示: 682 个差异基因显著富集到 23 个分子功能中 ($P < 0. 05$), 其中编码微管运动相关功能显著性最高, 包含 79 个差异表达基因; 其次是纤维素合酶 (形成 UDP) 活性和 L - 抗坏血酸氧化酶活性分子功能, 包含的基因分别为 27 和 22 个; 显著性最小的功能是阳离子结合功能, 包含差异基因 28 个。在这些差异基因中, 参与铜离子结合和钙调蛋白结合功能的差异基因最多, 分别有 100 和 88 个。说明较多的金属离子转运、吸收等相

关的基因响应了低钾胁迫。有 29 个生物过程被显著富集到 ($P < 0.05$), 共包含 1 812 个差异基因, 绝大部分差异基因参与到了植物的代谢过程、响应胁迫、信号转导过程以及生长发育过程中, 其中包括伤害防御、茉莉酸的响应、氧化胁迫的响应、盐胁迫响应和脱落酸响应等生物过程。茉莉酸响应、氧化

胁迫的响应和脱落酸响应分别包含 90, 75 和 148 个基因, 参与响应胁迫过程最多的是盐胁迫响应, 共包含 180 个基因。植物激素在植物的生长发育及应对各种胁迫过程发挥重要作用, 本研究发现大豆耐低钾胁迫时茉莉酸信号转导及生物合成过程相关激素富集最为显著, 包含的相关基因有 130 个。

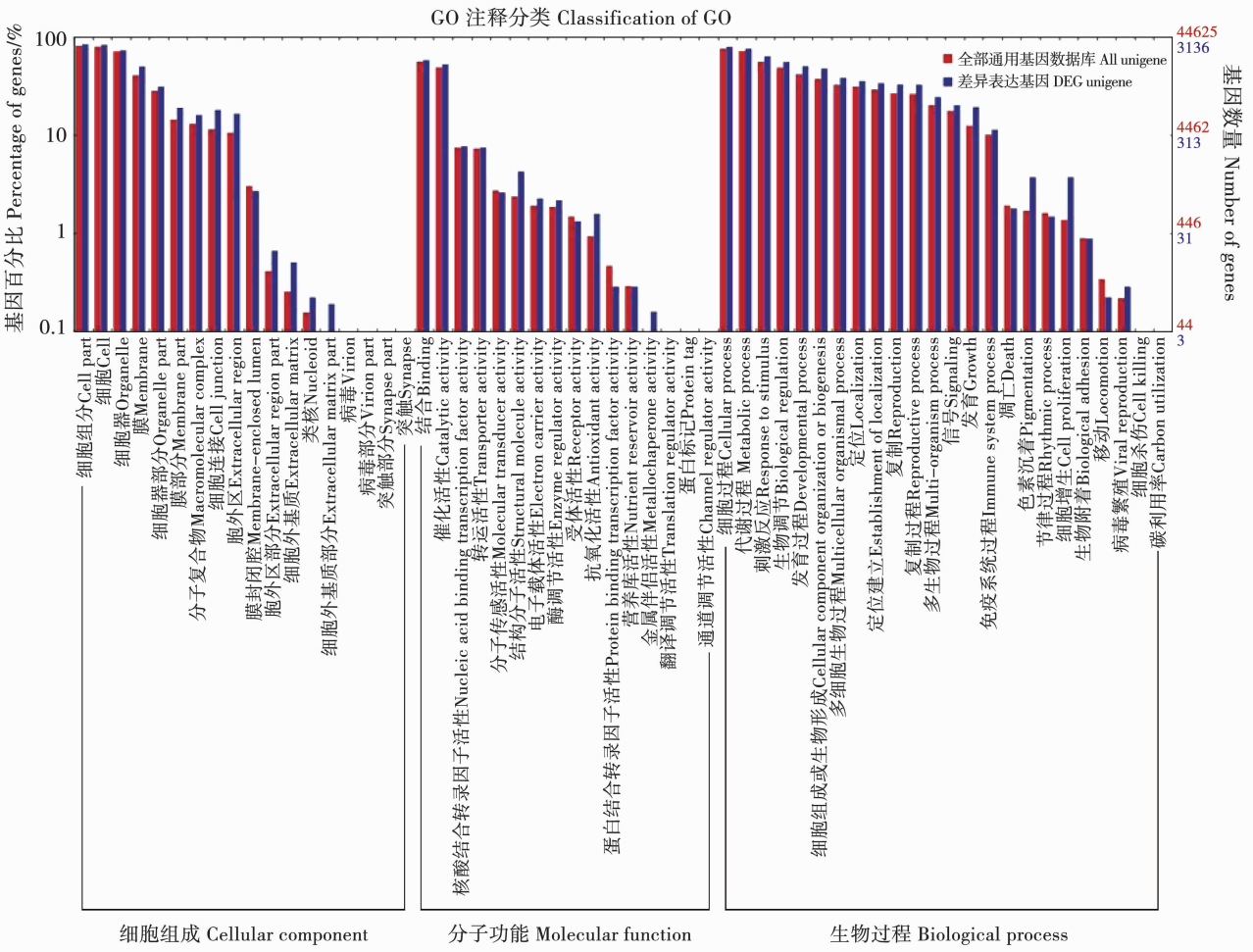


图2 差异表达基因 GO 注释分类统计

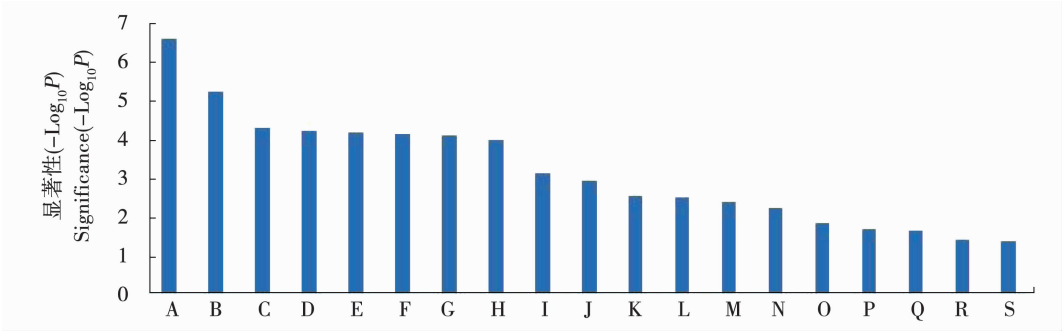
Fig. 2 GO annotation classification and statistics of differential expressed genes

2.2.4 差异表达基因 KEGG pathway 分析 通过对 LK_VS_CK 转录组比较的 pathway 富集分析发现, 有 390 个差异表达基因显著 ($P < 0.05$) 富集在 19 个途径 (pathway) 中, 氮素代谢是最显著富集的代谢途径 (图 3)。氨基酸代谢途径主要包括丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢代谢, 差异表达基因达到 20 个; 其次是甘氨酸, 丝氨酸和苏氨酸的代谢, 共有 16 个基因, 氰基氨基酸、苯丙氨酸和精氨酸和脯氨酸代谢分别包含 9, 19 和 19 个基因。这些氨基酸对植物的作用不仅体现在为植物提供氮源, 对植物的生理代谢也有着不可低估的贡献, 如苯丙氨酸可以有效地参与到植物的抗病反应, 精氨酸具有储存氮元素营养的功能, 参与植物的抗逆性生理生物过程, 脯氨酸在植物受到干旱胁迫下可引起渗透压的下降,

参与植物器官等组织的生长发育。另外, 其中脂肪酸生物合成途径的基因有 14 个; 碳水化合物代谢途径中淀粉和蔗糖代谢途径上差异表达基因基因最多, 共 28 个基因; 氨基糖和核苷酸糖代谢代谢途径的基因有 22 个。这说明低钾胁迫下大豆的氮素代谢、脂肪酸代谢和碳水化合物代谢受到显著影响。

2.2.5 差异表达基因 COG 注释 COG (cluster of orthologous groups of proteins) 数据库是基于细菌、藻类、真核生物的系统进化关系构建得到的, 利用 COG 数据库可以对基因产物进行直系同源分类。样品 LK_VS_CK 间差异表达基因 COG 分类统计结果表明: 649 个差异表达基因被划分为具有一般性功能类, 其次是 377 个基因被划分到转录因子功能类, 343 个基因被划分到信号转导机制功能中, 除此

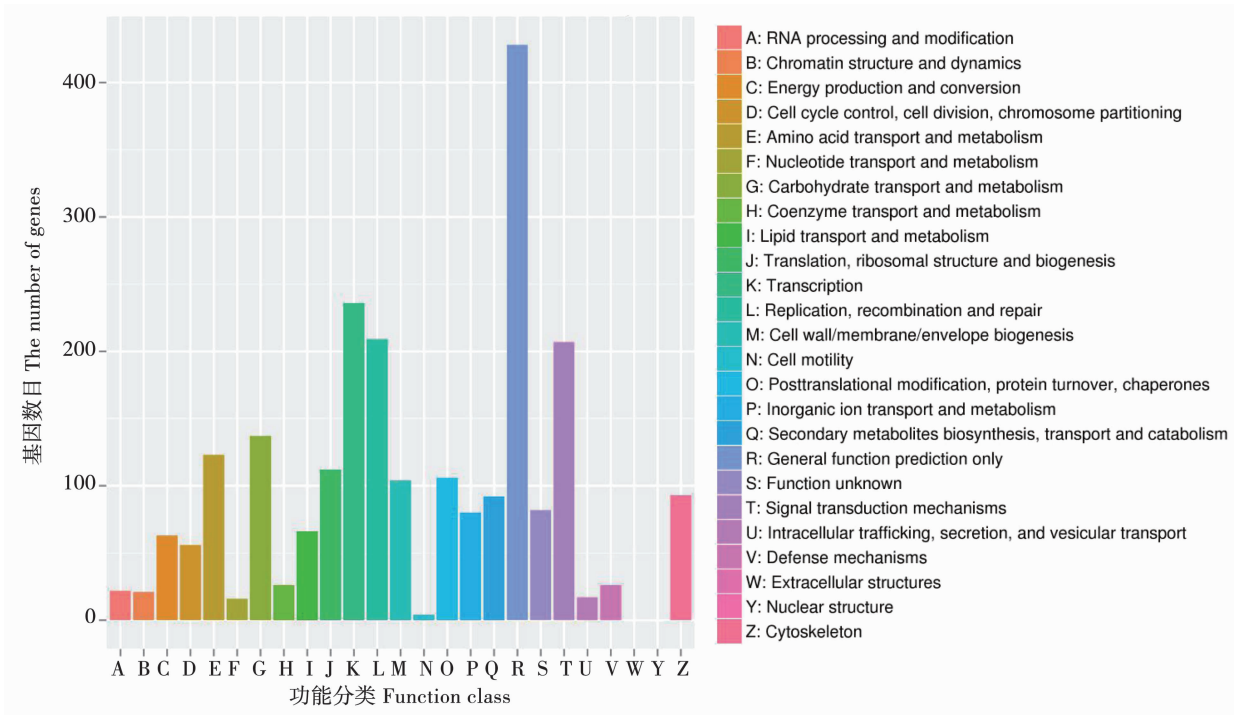
之外还有部分基因被划分至其它功能类,如 213 个基因被划分至碳水化合物的运输与代谢功能类、168 个基因被划分至氨基酸的运输与代谢功能类、133 个基因被划分至次生代谢物的生物合成及运输代谢功能类、108 个基因被划分至无机离子的运输与代谢功能类等(图 4)。



A:氮素代谢;B:核糖体;C:脂肪酸生物合成;D:戊糖、葡萄糖醛酸转换;E:萜类化合物骨架生物合成;F:丙氨酸,天门冬氨酸和谷氨酸代谢;G:苯丙素生物合成;H:类固醇生物合成;I:吞噬体;J:甘氨酸,丝氨酸和苏氨酸代谢;K:丙酮酸代谢;L:真核生物核糖体生物合成;M:酪蛋白氨基酸代谢;N:苯丙氨酸代谢;O:氨基糖和核苷酸糖代谢;P:精氨酸和脯氨酸代谢;Q:淀粉和蔗糖的代谢;R:维生素 B6 代谢;S:抗坏血酸和醛酸代谢。

A: Nitrogen metabolism; B: Ribosome; C: Fatty acid biosynthesis; D: Pentose and glucuronate interconversions; E: Terpenoid backbone biosynthesis; F: Alanine, aspartate and glutamate metabolism; G: Phenylpropanoid biosynthesis; H: Steroid biosynthesis; I: Phagosome; J: Glycine, serine and threonine metabolism; K: Pyruvate metabolism; L: Ribosome biogenesis in eukaryotes; M: Cyanoamino acid metabolism; N: Phenylalanine metabolism; O: Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; P: Arginine and proline metabolism; Q: Starch and sucrose metabolism; R: Vitamin B6 metabolism; S: Ascorbate and aldarate metabolism.

图 3 KEGG 通路途径的富集分析
Fig. 3 Enrichment analysis of the KEGG pathways



A: RNA 加工和修改;B: 染色质结构和动力学;C: 能源生产和转换;D: 细胞周期控制、细胞分裂、染色体分割;E: 胺酸的转运和代谢;F: 核苷酸运输和代谢;G: 碳水化合物的运输和代谢;H: 辅酶的运输和代谢;I: 脂质运输和代谢;J: 翻译、核糖体结构和生物发生;K: 转录;L: 复制、重组和修复;M: 细胞壁/膜/包膜生物发生;N: 细胞运动;O: 蛋白质翻译后修饰、转换、伴侣;P: 无机离子转运和代谢;Q: 次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢;R: 一般性功能;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。

图 4 差异表达基因 COG 注释分类统计
Fig. 4 COG annotation classification statistics of differentially expressed genes

2.2.6 差异表达基因功能分析 编码转录因子:转录因子是一类在真核基因转录起始阶段能够识别和结合启动子的各种特异的蛋白因子。当植物受到低钾胁迫时,各种转录因子可以由细胞质进入细胞核中,通过识别和特异性地结合到细胞核中靶基因调控区的顺式作用元件(包括启动子、增强子、调控序列、可诱导元件)上,从而共同参与基因表达的调控,或调控基因的表达强度,或调控靶基因的时空特异性表达,或响应外界刺激和环境胁迫。本研究发现大量的转录因子参与到大豆应对低钾胁迫过程,比较 LK_VS_CK,共发现 139 个编码转录因子的差异基因,其中包括 52 个上调基因和 87 个下调基因,且 $|\log_2(FC)|$ 为 1.05 ~ 6.58。这些差异表达基因分别编码 21 个 bHLH 家族转录因子、13 个 ERF(ethylene-responsive factor)转录因子、12 个 WRKY 家族转录因子、12 个 MYB 家族转录因子、9 个热应激转录因子、6 个 trihelix 转录因子、5 个 GATA 家族转录因子、6 个 ARF(auxin response factor)、5 个 bZIP 家族转录因子和 2 个 MYC2 转录因子(Glyma07g05740、Glyma09g33730)等。

编码蛋白激酶:蛋白激酶是一类磷酸转移酶,可通过磷酸化或去磷酸化作用参与到植物信号转导机制。许多蛋白激酶可有效调节钾通道和钾转运蛋白的活性,影响 K^+ 在植物体内的运输^[23]。本研究中低钾胁迫造成 240 个编码蛋白激酶基因的差异表达,其中 93 个上调、147 个下调,且 $|\log_2(FC)|$ 为 1.02 ~ 7.26。这些差异表达基因包含 5 个 MAPK 蛋白激酶,79 个编码丝氨酸/苏氨酸的蛋白激酶,其中有 47 个编码受体丝氨酸/苏氨酸激酶、5 个编码 CIPK 蛋白激酶、7 个编码富含半胱氨酸的类受体激酶、6 个编码丝裂原激活蛋白激酶、6 个编码钙依赖蛋白激酶(CDPKs)等。

编码转运蛋白:植物转运蛋白是一种介导生物膜内外化学物质运输及信号传递的膜蛋白,在植物营养的摄入、生物合成及代谢,以及信号转导等过程中起着十分重要的作用^[24]。本研究共发现 113 个编码转运蛋白的差异表达基因,其中 41 个上调、72 个下调。在这些差异基因中 18 个编码 ABC 转运体家族、12 个硝酸盐转运蛋白、9 个编码钾转运蛋白(包括 5 个编码钾转运体蛋白基因 Glyma09g05830、Glyma18g18810、Glyma15g17080、Glyma08g09720 和 Glyma19g45260、3 个编码钾离子通道蛋白基因 Glyma14g39330、Glyma02g41040 和 Glyma20g19000、1 个编码 K^+ 逆向转运体基因 Glyma16g32821)、8 个编码硫酸盐转运蛋白、5 个编码铵转运蛋白、5 个编

码生长素转运蛋白、3 个编码铝激活苹果酸转运蛋白、4 个编码硼转运蛋白、3 个编码阳离子/ H^+ 逆向转运体(Glyma11g02220、Glyma04g39010 和 Glyma03g32890)、3 个编码糖转运蛋白等。

2.3 茉莉酸信号转导途径及关键候选基因的差异表达

大量的研究指出,植物在受到低钾胁迫下,会产生许多植物内源激素信号,而这些植物激素通过信号的传递使得激素信号响应蛋白参与到植物低钾胁迫下钾离子吸收转运的过程。这些激素信号包括茉莉酸信号、乙烯信号、水杨酸信号以及脱落酸信号等。本研究中富集在茉莉酸信号途径的差异基因最显著,其 KEGG 途径如图 5。有研究表明,当 JA 信号启动后,JAZ 蛋白的降解会释放 EIN3/EIL1 的活性,从而可以启动乙烯信号下游基因的表达,实现 JA 信号与乙烯信号协同分级调控植物的抗病及生长发育过程^[25]。而本研究发现,在 139 个响应低钾胁迫转录因子中,13 个编码乙烯响应蛋白的基因参与到了茉莉酸信号途径中。这一结果意味着茉莉酸信号也可能协同乙烯信号共同参与了 Lee 68 低钾胁迫下钾离子的吸收过程。

另外,本研究还富集到 12 个编码 WRKY 转录因子的基因,12 个编码 MYB 转录因子的基因,2 个编码 MYC2 转录因子的基因(Glyma07g05740、Glyma09g33730),1 个编码 NAC 转录因子基因(Glyma19g28476)以及一些其它转录因子编码基因都参与到了大豆 Lee 68 的茉莉酸信号转导途径中。有研究指出,在茉莉酸信号途径中,植物主要是通过 SCF 型泛素连接酶 E3 来传递信号,并且以 SCF^{COI1} 的复合物形式起信号转导作用。SCF^{COI1} 复合物是由结合蛋白 SKP1(S-phase kinase-associated protein 1)、骨架蛋白 CUL1(Cullin1)、蛋白 RBX1(Ring-box1)以及茉莉酸受体蛋白 F-box 蛋白家族基因 COI1 组合而成的^[26-27],而 SCF^{COI1} 的复合物的靶蛋白正是 JAZ 家族蛋白,即受体 COI1 蛋白的 C 段特异性地识别了 JAZ 靶蛋白,因此 JAZ 家族蛋白是茉莉酸转导途径上重要的调控因子^[28-29],并且 JAZ 家族蛋白因其含有统一的 TIFY 基序也被称为 TIFY 家族蛋白。本研究发现能够响应茉莉酸信号的 TIFY 家族蛋白编码基因共有 4 个,分别是 Glyma09g08290、Glyma13g17180、Glyma01g41290 以及 Glyma15g19840,其中 Glyma09g08290 的差异倍数最大,达到 2.07 倍,并且在低钾处理转录本中时上调的,因此 Glyma09g08290 也成为后期研究茉莉酸信号调控大豆钾离子吸收转运过程的首选基因。

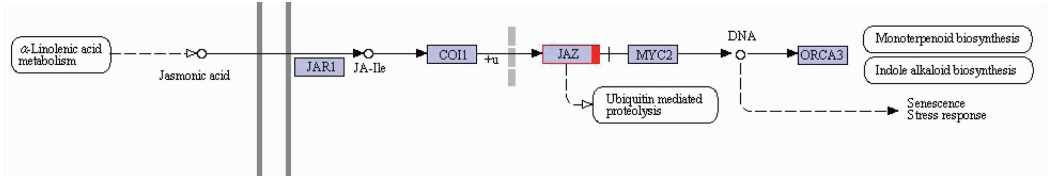


图 5 茉莉酸信号转导途径

Fig. 5 Jasmonic acid signal transduction pathway

综合本研究转录组差异基因表达情况、KEGG 富集分析、GO 富集分析、基因的功能注释以及茉莉酸信号转导调控机制,最终挑选了茉莉酸信号途径上关键的 8 个候选基因,分别是 *Glyma09g08290*、*Glyma09g33730*、*Glyma03g32890*、*Glyma04g39010*、

Glyma08g09720、*Glyma12g36310*、*Glyma16g32821* 和 *Glyma19g45260*,转录本的分析结果也暗示这 8 个差异基因很可能参与了茉莉酸信号介导的大豆 Lee 68 对钾离子吸收转运的过程,这 8 个基因的差异表达情况具体见表 4。

表 4 茉莉酸信号途径上关键候选基因的差异表达

Table 4 Differential expression of key candidate genes in the JA signaling pathway

基因编号 Gene ID	FDR	log ₂ FC	调控作用 Regulated effect	注释 Annotation
<i>Glyma09g08290</i>	5. 29E-15	2. 0652	上调	Protein TIFY 10A-like
<i>Glyma09g33730</i>	1. 49E-06	1. 2276	上调	Transcription factor MYC2-like
<i>Glyma03g32890</i>	3. 92E-09	2. 2922	上调	Cation/H ⁺ antiporter 20-like
<i>Glyma04g39010</i>	0. 0001836	1. 7624	上调	Cation/H ⁺ antiporter 15-like
<i>Glyma08g09720</i>	4. 47E-08	2. 3774	上调	Probable potassium transporter 17-like
<i>Glyma12g36310</i>	0. 0001283	3. 2063	上调	Sodium-dependent transporter yocS-like
<i>Glyma16g32821</i>	0. 0009384	1. 2830	上调	K ⁺ efflux antiporter 5-like
<i>Glyma19g45260</i>	0. 0001392	1. 0792	上调	Potassium transporter 5-like

3 讨论

本研究通过水培试验筛选出耐低钾大豆品种 Lee 68。中国野生大豆资源丰富^[30],蕴藏丰富的抗逆基因资源, Lee 68 是世界公认的大豆耐盐品种^[31],其对钾离子的吸收、转运及再利用是一个由众多基因参与的动态过程。许多学者曾选用 Lee 68 和 Jackson 这 2 个品种大豆分别作为耐低钾和低钾敏感型品种进行相关研究^[32-34]。

高等植物对钾离子的吸收主要是通过钾通道并在钾转运体的协助下,将土壤中的钾离子跨膜转运到植物的根系细胞中,再由根系细胞通过木质部将 K⁺ 运输至各营养器官^[5,35]。本研究利用 Solexa/Illumina 高通量测序分析技术构建了 1 个基因比较文库,即 LK_VS_CK,采用 GO 富集分析,旨在挖掘大豆在低钾胁迫下差异表达基因的潜在功能,为基因功能验证研究提供参考。通过比对共发现 3 521 个差异表达基因,其中 2 393 个基因表达上调,1 128 个基因表达下调。在 LK_VS_CK 的比较文库中发现 12 个编码与钾离子运输蛋白相关的差异基因,包括 5 个编码钾转运体蛋白的差异基因 *Glyma09g05830*、*Glyma18g18810*、*Glyma15g17080*、*Glyma08g09720* 和

Glyma19g45260;3 个编码钾离子通道蛋白的基因 *Glyma14g39330*、*Glyma02g41040* 和 *Glyma20g19000*; 3 个编码阳离子/H⁺ 逆向转运体的基因 *Glyma11g02220*、*Glyma04g39010* 和 *Glyma03g32890*;1 个编码 K⁺ 逆向转运体的基因 *Glyma16g32821*。这些编码与钾离子运输蛋白相关的差异表达基因都可能参与到了植物在钾胁迫下钾离子吸收转运的过程。推测这些编码与离子运输蛋白相关的差异基因可能参与到了植物在低钾胁迫下钾离子吸收转运的过程,在后续的基因功能研究中成为本研究的重点对象。另外,本研究在 LK_VS_CK 比较文库中还发现了大量的编码蛋白激酶的差异基因,已有研究表明蛋白激酶在响应外界胁迫以及应对胁迫能力上都发挥了一定的重要作用^[27]。其中编码丝氨酸/苏氨酸的蛋白激酶最多,为 79 个,包含 5 个编码 CIPK 蛋白,6 个编码钙依赖蛋白激酶(CDPKs)。CBL 和 CDPK 都是植物中 Ca²⁺ 信号感受器,其中 CBL 可以与 CIPK 互作,共同组成植物体内 Ca²⁺ 信号介导的 CBL-CIPK 转导途径,如拟南芥中 AtCBL1/AtCBL9 作为 Ca²⁺ 信号感受器可以与蛋白激酶 CIPK23 互作,使其磷酸化,从而激活拟南芥中 AtAKT1 介导的 K⁺ 吸收机制,且 AKT1 在保卫细胞中还受到 CIPK23

的调节^[36]。另外,CIPK23 还能通过磷酸化作用激活 HAK5 介导的高亲和 K⁺ 吸收^[37]。因此,这也暗示了这些编码与钙信号途径相关蛋白激酶的差异基因可能能够提高植物适应低钾胁迫的能力,促进植物低钾胁迫下钾离子吸收转运。

除此之外,植物在低钾或缺钾环境下还存在其它多种钾离子吸收途径以及调控机制,其中植物体内的许多转录因子的调控也是植物应对低钾胁迫重要机制之一^[38],这表明植物中转录因子对提高植物的耐低钾能力也具有十分重要的作用^[39]。在本研究的比较文库中,发现了大量编码转录因子的差异表达基因,所编码的转录因子包括 WRKY、ERF、MYB、bHLH、NAC、GATA 及 MYC2 等,这些转录因子均在植物的生长发育、响应胁迫以及信号转导调控中发挥着重要作用^[40]。

4 结 论

本研究通过水培试验从 25 个品种中筛选出耐低钾大豆品种 Lee 68,通过 Solexa 测序共获得 160 211 759个 reads,与大豆 Wilams 82 基因组序列的比对率达到 92. 83% 以上。LK_VS_CK 比较组的差异表达基因筛选获得3 521个差异表达基因;GO 功能聚类分析显示 LK_VS_CK 比较组的差异表达基因主要富集于植物的代谢过程、响应胁迫、信号转导及钾离子跨膜运输过程中;KEGG pathway 分析中,LK_VS_CK 比较组有 390 个差异表达基因显著富集在 19 个 pathway 途径中($P < 0.05$),其中富集最为显著的是代谢途径,包括氨基酸代谢、脂肪酸和类脂代谢以及碳水化合物代谢等;COG 分类统计结果表明 LK_VS_CK 比较组中 649 个差异表达基因具有一般性功能,377 个被划分到转录因子功能类,343 个被划分到信号转导机制功能中。筛选到茉莉酸信号途径上可能参与对钾离子吸收转运过程的 8 个关键候选基因,分别是 *Glyma09g08290*、*Glyma09g33730*、*Glyma03g32890*、*Glyma04g39010*、*Glyma08g09720*、*Glyma12g36310*、*Glyma16g32821* 和 *Glyma19g45260*。本研究结果为挖掘大豆耐在钾胁迫下相关基因的调控作用以及钾离子吸收高效基因的克隆和功能研究提供奠定了基础。

参考文献

[1] 姜存仓,王运华,鲁剑巍,等. 植物钾效率基因型差异机理的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2004, 23 (4):483-487. (Jiang C C, Wang Y H, Lu J W, et al. Advances of study on the K-efficiency indifferent plant genotypes [J] . Journal of Huazhong Agricultural University, 2004, 23(4) :483-487.)

[2] 黄初女,金东淳,董艺兰,等. 浅谈大豆蛋白质品质改良[J]. 吉林农业科学, 2006, 31(1) : 37-40. (Huang C N, Jin D C, Dong Y L, et al. Talking about the improvement of soybean protein quality[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2006, 31(1) : 37-40.)

[3] 李兴涛,佟晓楠,于海秋,等. 不同低钾耐性大豆品种钾素效率的差异[J]. 大豆科学, 2014, 33(3) : 385-388. (Li X T, Tong X N, Yu H Q, et al. Potassium efficiency of different low K tolerant soybean varieties[J]. Soybean Science, 2014, 33(3) : 385-388.)

[4] 王利,陈防,万开元. 植物钾效率及其评价的研究进展与展望[J]. 土壤, 2010, 42 (2) :164 -170. (Wang L, Cheng F, Wang K Y. Progress and expectation of the research on plant K efficiency and its evaluation[J]. Soils, 2010, 42(2) :164-170.)

[5] Ahmad I, Maathuis F J. Cellular and tissue distribution of potassium: Physiological relevance, mechanisms and regulation [J]. Journal of Plant Physiology, 2014, 171(9) : 708-714.

[6] Wang Y, Wu W H. Regulation of potassium transport and signaling in plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2017, 39(10) : 123-128.

[7] Marschner H, Kirkby E A, Engels C. Importance of cycling and recycling of mineral nutrients within plants for growth and development[J]. Plant Biology, 2015, 110(4) : 265-273.

[8] Bari R, Jones J D. Role of plant hormones in plant defense responses[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69: 473-488.

[9] Croucher N J, Fookes M C, Perkins T T, et al. A simple method for directional transcriptome sequencing using Illumina technology [J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(22) :e148.

[10] Lopez-maestre H, Brinza L, Marchet C, et al. SNP calling from RNA-seq data without a reference genome: Identification, quantification, differential analysis and impact on the protein sequence [J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(19) : 1-13.

[11] 李妍,徐兴祥. 高通量测序技术的研究进展[J]. 中国医学工程, 2019, 27(3) :32-37. (Li Y, Xu X X. Research progress of high-throughput sequencing technology [J]. China Medical Engineering, 2019, 27(3) :32-37.)

[12] 刘永杰,王渊,付强,等. 高通量测序技术在病原生物学方面的研究进展[J]. 口岸卫生控制, 2019, 24(1) :6-9. (Liu Y J, Wang Y, Fu Q, et al. Advances in high-throughput sequencing technology in the field of pathogen biology [J]. Port Health Control, 2019, 24(1) :6-9.)

[13] Park S T, Kim J. Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing[J]. International Neurourology Journal, 2016, 20(Supplement 2) : 76-83.

[14] Boycott K M, Vanstone M R, Bulman D E, et al. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: Discovery to translation [J]. Nature Review Genetic, 2013, 14 (10) : 681-691.

[15] Müllauer L. Next generation sequencing: Clinical applications in solid tumours [J]. Magazine of European Medical Oncology, 2017, 10(4) : 244-247.

[16] 岳桂东,高强,罗林海,等. 高通量测序技术在动植物研究领域中的应用[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(2) :107-124. (Yue K D, Gao Q, Luo L H, et al. The application of High-throughput sequencing technology in plant and animal research

- [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2012, 42(2):107-124.)
- [17] 曹盈. 高通量测序技术在植物转录组研究中的应用[J]. 北京农业, 2013(6):6-7. (Cao Y. The application of high-throughput sequencing technology in plant transcriptome research[J]. *Beijing Agriculture*, 2013(6):6-7.)
- [18] 范秀朵. 基于高通量 Illumina 测序技术的干旱胁迫下大豆根和叶 mRNA 表达谱研究[D]. 吉林:吉林农业大学, 2011: 10-39. (Fan X D. Investigation of gene expression profiles of soybean leaves and roots under drought stress by high-throughput Illumina sequencing [D]. Jilin: Jinlin Agricultural University, 2011:10-39.)
- [19] 吴冰月, 沈良, 宋普文, 等. 大豆 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因 *GmRDR1* 的克隆与表达特性分析[J]. 大豆科学, 2015, 34(1):19-25. (Wu B Y, Shen L, Song P W, et al. Cloning and expression pattern analysis of a RNA-dependant RNA polymerase gene *GmRDR1* in soybean[J]. *Soybean Science*, 2015, 34(1): 19-25.)
- [20] 吴冰月, 宋普文, 陈华涛, 等. 2 个大豆 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因 *GmRDR6a* 和 *GmRDR6b* 的克隆与分析[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(3): 27-34. (Wu B Y, Song P W, Chen H T, et al. Cloning and expression pattern analysis of *GmRDR6a* and *GmRDR6b* in soybean [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(3): 27-34.)
- [21] Wang C, Chen H, Hao Q, et al. Transcript profile of the response of two soybean genotypes to potassium deficiency[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e39856.
- [22] Cole T, Lior P, Steven L, et al. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(9):1105-1111.
- [23] Wang Y H, Garvin D F, Kochian L V. Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium, and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizosphere-mediated signals[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(3): 1361-1370.
- [24] Van Kleeff P J M, Gao J, Mol S, et al. The *Arabidopsis* GORK K^+ -channel is phosphorylated by calcium-dependent protein kinase 21 (CPK21), which in turn is activated by 14-3-3 proteins [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2018, 125: 219-231.
- [25] Chini A, Fonseca S, Chico J M, et al. The ZIM domain mediates-homo-and heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins[J]. *The Plant Journal*, 2009, 59(1): 77-87.
- [26] Adams E, Turner J. Illuminating COI1: A component of the *Arabidopsis* jasmonate receptor complex also interacts with ethylene signaling [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2010, 5(12): 1682-1684.
- [27] 王秀燕, 孙莉萍, 张建锋, 等. F-box 蛋白家族及其功能[J]. 生命科学, 2008, 20(5): 807-811. (Wang X Y, Sun L P, Zhang J F, et al. F-box protein families and their functions[J]. *Life Science*, 2008, 20(5): 807-811.)
- [28] Staswick P E. JAZing up jasmonate signaling[J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(2): 66-71.
- [29] Valenzuela-Riffo F, Garrido-Bigotes A, Figueroa P M, et al. Structural analysis of the woodland strawberry COI1-JAZ1 co-receptor for the plant hormone jasmonoyl-isoleucine [J]. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2018, 85: 250-261.
- [30] 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.)
- [31] 徐晓燕, 唐迪. 耐盐性不同的大豆品种幼苗的蛋白质组学比较研究[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(1): 38-41. (Xu X Y, Tang D. Comparative analysis of proteomics in soybean cultivar seedlings with different salt resistance [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(1): 38-41.)
- [32] Luo Q, Yu B, Liu Y. Differential sensitivity to chloride and sodium ions in seedlings of *Glycine max* and *G. soja* under NaCl stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(9): 1003-1012.
- [33] Chen X Q, Yu B J, Liu Y L. Relationship between chloride tolerance and polyamine accumulation in *Glycine max*, *Glycine soja*, and their hybrid seedlings[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2007, 33(1):46-52.
- [34] Ma H, Song L, Shu Y, et al. Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(5):1529-1546.
- [35] Very A A, Nieves-Cordones M, Daly M, et al. Molecular biology of K^+ transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(9): 748-769.
- [36] Chen G, Hu Q, Luo L, et al. Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2015, 38(12):2747-2765.
- [37] Chen H T, He H, Yu D Y. Overexpression of a novel soybean gene modulating Na^+ and K^+ transport enhances salt tolerance in transgenic tobacco plants [J]. *Physiologia Plantarum*, 2011, 141(1): 11-18.
- [38] Zhao S, Zhang M L, Ma T L, et al. Phosphorylation of ARF2 relieves its repression of transcription of the K^+ transporter gene HAK5 in response to low potassium stress[J]. *Plant Cell*, 2016, 28(12):3005-3019.
- [39] Chen X, Li C, Wang H, et al. WRKY transcription factors: Evolution, binding, and action [J]. *Phytopathology Research*, 2019(1):1-13.
- [40] Huang H, Gao H, Liu B, et al. bHLH13 regulates jasmonate-mediated defense responses and growth [J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2018, 14: 1-8.