



大豆 OPR 基因家族全基因组鉴定与表达分析

王艳微¹,王 敏¹,王 江¹,张庆祝^{2,3},解莉楠¹

(1. 东北林业大学 生命科学院/东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 东北林业大学 生命科学院,黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 东北林业大学 林木遗传育种国家重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:为了揭示大豆 12-氧-植物二烯酸还原酶(12-oxo-phytodienoic acid reductase, OPR)家族成员 *GmOPRs* 在大豆生长发育中和非生物胁迫下发挥的作用,本研究运用生物信息学方法进行大豆 OPR 基因家族全基因组鉴定及表达分析。结果显示:大豆基因组中共有 12 个 OPR 家族基因成员,分布在 8 条不同染色体上。系统发育进化分析、基因结构分析和保守基序分析结果显示, *GmOPRs* 可分为两个亚组,含有外显子 4~5 个,内含子 3~5 个, *GmOPR* 蛋白之间保守基序分布相似。共线性分析鉴定表明共有 4 对基因存在共线关系,均为片段复制。 *GmOPRs* 启动子区域含有响应厌氧、干旱和低温等非生物胁迫以及 JA、ABA 等多种激素的顺式作用元件。不同的大豆品种及不同的组织中, *GmOPRs* 的表达模式有差异。 *GmOPR1*、*GmOPR4* 和 *GmOPR9* 受干旱胁迫影响后表达量下降, *GmOPR7*、*GmOPR8*、*GmOPR11* 和 *GmOPR12* 随着盐胁迫影响时间的增长表达量增加,表明 *GmOPRs* 基因通过多种表达模式响应干旱和盐胁迫。 *GmOPRs* 在系统发育进化和基因结构上比较保守,基因家族数量的扩增主要归因于片段重复。 *GmOPRs* 受干旱、盐胁迫等非生物胁迫的影响,表现出不同的表达模式,表明 *GmOPR* 基因家族可能在响应非生物胁迫中发挥重要作用。

关键词:大豆;OPR 基因家族;非生物胁迫;表达分析;生物信息学分析

Genome-wide Identification and Expression Analysis of Soybean OPR Gene Family

WANG Yan-wei¹, WANG Min¹, WANG Jiang¹, ZHANG Qing-zhu^{2,3}, XIE Li-nan¹

(1. College of Life Science, Northeast Forestry University/Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration, Ministry of Education, Harbin 150040, China; 2. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 3. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: In order to reveal the role of *GmOPRs*, a member of soybean 12-oxo-phytodienoic acid reductase (OPR) family in soybean growth and development under abiotic stress, we identified and analyzed the whole genome of soybean OPR gene family with bioinformatics method. The results showed that there were twelve OPR genes distributed on 8 chromosomes in soybean genome. The phylogenetic analysis, gene structure analysis and conserved motifs analysis showed that *GmOPRs* could be divided into two subgroups, containing 4-5 exons and 3-5 introns respectively. The conserved motifs of *GmOPR* proteins were similar in distribution. Colinear analysis identified colinear relationship among four pairs of genes, all of which were fragment replication. The promoter region of *GmOPRs* contained *cis*-acting elements responding to abiotic stress such as anaerobic, drought and low temperature, JA, ABA and other hormones. The expression patterns of *GmOPRs* were different in different soybean varieties and tissues. The expression of *GmOPR1*, *GmOPR4* and *GmOPR9* decreased under drought stress, while the expression of *GmOPR7*, *GmOPR8*, *GmOPR11* and *GmOPR12* increased over time under salt stress, suggesting that the *GmOPRs* responded to drought and salt stress through multiple expression patterns. *GmOPRs* were conserved in phylogenetic evolution and gene structure, and the amplification of the gene families was mainly attributed to fragment repetition. *GmOPRs* were affected by abiotic stresses such as drought and salt stress, and showed different expression patterns. The results suggest that *GmOPR* gene family may play an important role in abiotic stress responding.

Keywords: *Glycine max*; OPR gene family; abiotic stress; expression analysis; bioinformatics

茉莉酸(Jasmonic Acid, JA)以及其挥发性甲酯衍生物茉莉酸甲酯(Methyl-Jasmonate, MeJA)和氨基酸衍生物统称为茉莉酸类化合物。茉莉酸类化合物是植物应对生物和非生物胁迫的调节剂,是重要的植物激素,广泛地存在于植物的幼嫩组织和发育生殖器官中^[1-2]。外源植物激素应用在植物体可以

促进防御基因的表达,诱导植物进行防御,在植物防御食草动物、根结线虫、坏死性病原体和各种非生物应激源方面发挥关键作用^[3-6]。茉莉酸生物合成始于细胞膜释放的亚麻酸,在脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)、丙二烯氧化合酶(Allene Oxide Synthase, AOS)和丙二烯氧化环化酶(Allene Oxide

收稿日期:2021-10-04

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31871220,31801444);黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2021C005);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(CAFYBB2019ZY003);中央高校基本科研业务费专项资金(2572020DP01)。

第一作者:王艳微(1998—),女,硕士研究生,主要从事植物表观遗传学研究。E-mail:w18767646675@163.com。

通讯作者:解莉楠(1978—),女,博士,副教授,主要从事植物抗逆生物学研究。E-mail:linanxie@nefu.edu.cn。

Cyclase, AOC)的作用下通过十八烷酸途径转化为12-氧-植物二烯酸(12-oxo-phytodienoic acid, OPDA)。继而由12-氧-植物二烯酸还原酶(12-oxophytodienoic acid reductase, OPR)将具有光学活性的OPDA还原成茉莉酸的前体OPC-8:0^[7-8]。最后, OPC-8:0经1个还原反应和3个 β -氧化反应及甲酯化生成甲基茉莉酸^[1]。

植物OPRs是一种依赖于黄素单核苷酸(Flavin Mononucleotide, FMN)的氧化还原酶,属于古老黄酶(Old Yellow Enzyme, OYE)家族^[9]。典型的OPR蛋白只有1个Oxidored_FMN(PFAM ID: PF00724)结构域。植物中第一个OPR同源基因是从拟南芥中克隆出来的。它在三硝基甲苯等异生物质的解毒中发挥生理作用^[10]。随后*AtOPR2*、*AtOPR3*在拟南芥中被鉴定并表征。拟南芥中的3个OPR家族成员可根据其底物特异性分为OPRI组和OPRII组^[11]。OPRI组由*AtOPR1*、*AtOPR2*组成,优先催化9R,13R-12-植物二烯酸(9R,13R-OPDA)。而9R,13R-OPDA被认为是植物中9S,13S-12-OPDA主要的同分异构体,不参与JA合成^[12-13]。OPRII仅包括*AtOPR3*,其参与JA合成,有效地催化9S,13S-OPDA转化为JA的前体OPC-8:0^[14]。

随着研究的深入,OPR基因在多种单、双子叶植物中被鉴定。植物的OPRs通常由多基因家族编码,不同物种中家族成员数目不同。先前研究表明,拟南芥有3个OPR基因^[13,15-16],玉米有8个OPR基因^[17],番茄有3个OPR基因^[18],水稻有13个OPR基因^[19],小麦有48个OPR基因^[20],豌豆有6个OPR基因^[21]。与双子叶植物不同,OPR家族基因在单子叶植物中被分为5个亚组^[9]。例如在小麦中,48个OPR基因分为5个亚组:I组6个,II组4个,III组33个,IV组3个,V组2个^[20]。植物OPR家族成员表现出多种生物学功能,可被JA、乙烯(ET)、脱落酸(ABA)和水杨酸(SA)等各种激素以及各种生物和非生物胁迫诱导。在水稻中,*OsOPR7*参与JA生物合成过程,响应多种非生物胁迫^[15]。同时,*OsOPR7*对内源性JA有正反馈作用,内源性JA随着*OsOPR7*表达量的增加而增加。利用CRISPR-Cas9编辑*OsOPR7*,其突变体表现为雄性不育表型,内源JA水平降低,其可育性可以通过MeJA恢复^[22-23]。在烟草中异源过表达水稻OPR基因的结果显示,过表达OPR烟草对重金属Cd²⁺的抗性提高^[24]。*AtOPRs*可以通过多种信号通路参与内环境和外界环境的反馈,在应对非生物胁迫反应中扮演着重要的角色。在六倍体小麦中过表达*AtOPR3*可增加小麦中JA的基础水平。*AtOPR3*的

过表达使小麦植株发生发芽延迟、生长缓慢、开花时间和衰老延迟等变化,同时也改变了小麦对环境胁迫尤其是短期冷冻条件的耐受性^[25]。在小麦中,*TaOPR1*通过ABA介导的信号网络,在非生物应激中发挥作用。*TaOPR1*过表达显著提高小麦的耐盐水平,而其在拟南芥中的异源表达可减轻盐分和氧化剂对拟南芥根系的生长限制^[26]。与*TaOPR1*不同,*TaOPR2*通过JA信号通路参与非生物胁迫响应,其表达可受损伤、干旱和MeJA诱导,而*TaOPR2*的组成型表达可以改善拟南芥*opr3*突变体的雄性不育表型^[27]。在玉米中,双突变体*opr7opr8*的JA水平在所有器官中都显著降低,双突变体导致了大量的发育缺陷和对病原体和昆虫的极端易感性^[28]。

大豆(*Glycine max*)是中国重要的经济作物。作为植物油、植物蛋白和动物饲料蛋白质的主要来源,大豆在我国农业生产中具有重要的地位。但随着全球气候变暖,极端天气频发等气候、土质问题使大豆在生长过程更容易受到高温、冷害、洪水、干旱、高盐等非生物因素的影响^[29],这不仅限制了大豆的产量和品质,也局限了大豆的种植区域。OPR家族基因催化植物激素合成代谢,参与多种激素响应,广泛参与植物生长发育、诱导植物防御、响应外界胁迫,对植物的生长发育调控、抗逆性起到重要作用,但目前并没有关于大豆OPR基因家族的相关研究。

本研究通过生物信息学方法,鉴定大豆OPR家族成员,对*GmOPRs*基因结构、进化关系、启动子顺式作用元件、共线性关系和表达模式等进行预测分析,并进行干旱胁迫下基因表达量qRT-PCR分析,为分析其在调控生长发育、应对胁迫反应等方面发挥的作用及其分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为Williams 82。

1.2 方法

1.2.1 基因家族成员鉴定及其理化性质预测分析
从NCBI网站下载大豆全基因组、CDS、蛋白序列和位置信息;从PFAM(<http://pfam.xfam.org/>)数据库下载Oxidored_FMN家族(PF00724)的隐马尔科夫模型(HMM)图谱^[30]。利用HMMER 3.0软件的HMMsearch工具对大豆蛋白序列进行初步筛选^[31]。利用NCBI Conserved Domain Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)和SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)两个在线软件验证候选基因的FMN结构域,鉴定大豆OPR

基因家族成员。利用 ExPASy(<https://www.expasy.org/>)网站预测分析 GmOPR 蛋白氨基酸序列长度、分子量、等电点、不稳定系数、蛋白质亲水性等,通过 WoLF PSORT(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)网站预测分析蛋白亚细胞定位。

1.2.2 基因家族系统进化树构建 从 NCBI 下载拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*) 的 OPR 家族成员氨基酸序列,从 phytozome 数据库下载蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的 OPR 家族成员氨基酸序列。利用 Clustal X 软件对大豆、拟南芥、水稻、玉米和蒺藜苜蓿的 OPR 氨基酸序列进行多序列比对,使用 MEGAX 软件,采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 进行系统进化分析,并运用 Bootstrap (自展法) 进行 3 000 次可信度检测^[32],最后利用 Evolview(<https://evolgenius.info/evolview-v2/#login>) 软件绘制进化树。

1.2.3 基因染色体定位及共线性分析 根据大豆基因组注释信息,获取 12 个大豆 OPR 基因家族成员在染色体上的位置信息,利用 TBtools 软件进行染色体定位预测,绘制其染色体可视化分布图^[33]。利用 MCScanX 和 Circos 软件分析大豆 OPR 家族成员间的共线性关系。

1.2.4 基因结构和保守基序分析 利用在线软件 GSDS 2.0 分析大豆 OPR 家族成员的外显子和内含子结构^[34]。利用 MEME 分析大豆 OPR 家族成员保守基序^[35],并通过 TBtools 软件实现可视化。

1.2.5 基因启动子顺式作用元件分析 利用 plantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析基因 CDS 区上游 2 000 bp 序列顺式作用元件^[33],并通过 TBtools 软件实现可视化。

1.2.6 不同品种、部位和胁迫条件下的基因表达预测分析 从 NCBI SRA 数据库下载干旱胁迫、盐胁迫 (Na) 和 VC 期大豆不同组织部位的转录组数据 (PRJNA574626^[36]、PRJNA246058^[37]、PRJNA666-499^[38])。通过 RNA-seq 分析计算 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped) 值,分析不同 OPR 基因成员在 Williams 82 和 Jack 大豆品种顶端分生组织、上胚轴、下胚轴、真叶以及根 5 个部位中,以及干旱、盐胁迫条件下的表达模式,利用 DESeq2 软件分析品种间的差异表达 OPR 基因,并进行 Wald 检验,最后通过 R 语言进行可视化。

1.2.7 干旱胁迫下大豆 OPR 基因家族的实时定量分析 将 Williams 82 幼苗置于温度 26 ℃ 和光暗周期 14 h/10 h 的温室中培育。在 V1 期,对大豆进行干旱以及复水处理,以正常生长植株为对照。在干旱处理前 1 d,干旱处理后第 6 天以及复水处理后第 1 天采集大豆根系。进行 3 次重复,所有鲜样立刻进行液氮固样,然后在 -80 ℃ 保存备用。

使用上海普洛麦格生物产品有限公司的 RNA 提取试剂盒提取不同材料总 RNA,使用 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 反转录试剂盒合成 cDNA。使用 Primer-BLAST 软件设计 *GmOPR4* 特异性上、下游引物 (5'-GGGGGAAATTAAGACCCAAAGTT-3'、5'-AACGGTGCCAGACAATCCT-3') 和 *GmOPR9* 上、下游引物 (5'-GCCCCGACATCATTTCTTCGC-3'、5'-AGAAAGGGACAGACAGACAGA-3')。使用 Roche 公司的 SYBR Green I Master mixture 进行 qRT-PCR。反应体系为: cDNA 模板 6.3 μL、SYBR Green Supermix 7.5 μL、上游引物 0.6 μL、下游引物 0.6 μL。反应程序为: 95 ℃、5 min; 95 ℃、15 s, 60 ℃、1 min, 40 个循环。溶解曲线程序为: 95 ℃、15 s, 60 ℃、1 min, 95 ℃、15 s。反应结束后采用 2^{-ΔΔCt} 方法^[38] 计算基因的相对表达量。

1.3 数据分析

使用 Fastp v 0.20.0 软件进行数据质控,使用 HISAT2 v 2.1.0 和 Bowtie2 v 2.3.4.3 软件测序 reads 与长度参考序列比对,使用 Samtools v 1.10 进行高通量测序数据交互,使用 Stringtie v 2.1.2 进行 RNA-Seq 比对和潜在转录本组装,使用 Gffcompare v 0.11.2 进行比较、合并、注释及估计 1 个或多个 GFF 文件的准确性。

2 结果与分析

2.1 大豆 OPR 基因家族成员鉴定和理化性分析

通过鉴定分析最终获得 12 个大豆 OPR 基因,将其命名为 *GmOPR1* ~ *12*。利用生物信息学方法对基因编码蛋白理化性质分析预测的结果如表 1 所示,氨基酸序列长度为 352 ~ 402 aa,分子量为 39.08 ~ 45.19 kDa,等电点为 5.21 ~ 8.22。各蛋白不稳定系数均小于 40,稳定性较好;脂肪指数为 72.32 ~ 86.56,表明大豆 OPR 家族蛋白热稳定性较高;各蛋白的亲水指数均小于 0,均为亲水性蛋白;蛋白分别位于线粒体、细胞质和叶绿体中。

表 1 大豆 OPR 家族成员蛋白质序列特征

Table 1 The sequence characteristics of soybean OPR family proteins

GenBank 登录号	基因	氨基酸数量	分子量	等电点	不稳定系数	脂肪指数	亲水性指数	亚细胞定位
Gene ID	Gene	Number of amino acid/aa	Molecular weight/kDa	pI	Instability index	Aliphatic index	GRAVY	Subcellular location
Glyma.19G057500	GmOPR1	365	40530.16	7.70	38.60	82.55	-0.323	线粒体
Glyma.11G007600	GmOPR2	371	41523.86	6.12	38.01	84.12	-0.353	胞质
Glyma.01G235600	GmOPR3	402	45186.02	6.36	39.86	76.67	-0.432	线粒体
Glyma.06G016900	GmOPR4	375	41874.44	6.03	33.57	77.49	-0.342	胞质/叶绿体
Glyma.17G209900	GmOPR5	352	39085.05	5.21	27.67	83.44	-0.284	胞质
Glyma.14G223600	GmOPR6	393	43793.36	6.47	30.75	72.32	-0.516	线粒体/胞质
Glyma.15G223900	GmOPR7	361	40331.59	6.50	34.45	80.00	-0.409	胞质/线粒体
Glyma.13G186200	GmOPR8	367	41006.39	5.96	31.67	81.34	-0.365	胞质/线粒体
Glyma.17G050000	GmOPR9	398	44192.25	8.22	33.58	84.60	-0.298	线粒体
Glyma.13G109700	GmOPR10	398	44096.12	8.22	34.10	84.12	-0.286	线粒体
Glyma.17G049900	GmOPR11	381	42049.67	6.34	30.93	86.56	-0.182	线粒体
Glyma.13G109800	GmOPR12	388	42936.47	5.96	32.27	81.49	-0.231	叶绿体/线粒体

2.2 植物 OPR 家族成员的系统进化分析

对 3 个拟南芥 *AtOPR* 氨基酸序列、13 个水稻 *OsOPR* 氨基酸序列、8 个玉米 *ZmOPR* 氨基酸序列、10 个蒺藜苜蓿 *MtrOPR* 氨基酸序列以及 12 个大豆 *GmOPR* 氨基酸序列构建系统发育进化树的结果如图 1 所示,大豆 OPR 蛋白被分成 5 个亚组 Group1 ~ Group5。水稻和玉米的 OPRs 几乎分布在每个 Group 中,而大豆、蒺藜苜蓿和拟南芥的 OPRs 只集中分布在两个亚组中,这与以往对单、双子叶植物

的 OPR 基因进化分类的研究相符^[9,13,20]。12 个 *GmOPR* 分布于两个亚组,Group3 和 Group5。*GmOPR1* ~ *GmOPR8* 与 *AtOPR1*、*AtOPR2*、*MtrOPR1*、*MtrOPR3* ~ *GmOPR10*、*ZmOPR5* 和 *OsOPR11* 的亲缘关系比较接近,属于 Group5; *GmOPR9* ~ *GmOPR12* 与 *AtOPR3*、*OsOPR7*、*ZmOPR7*、*ZmOPR8* 和 *MtrOPR2* 的亲缘关系比较近,属于 Group3。*GmOPRs* 数量明显多于 *AtOPRs*,可能是因为在十字花科和豆科植物分化后大豆全基因组发生了复制事件。

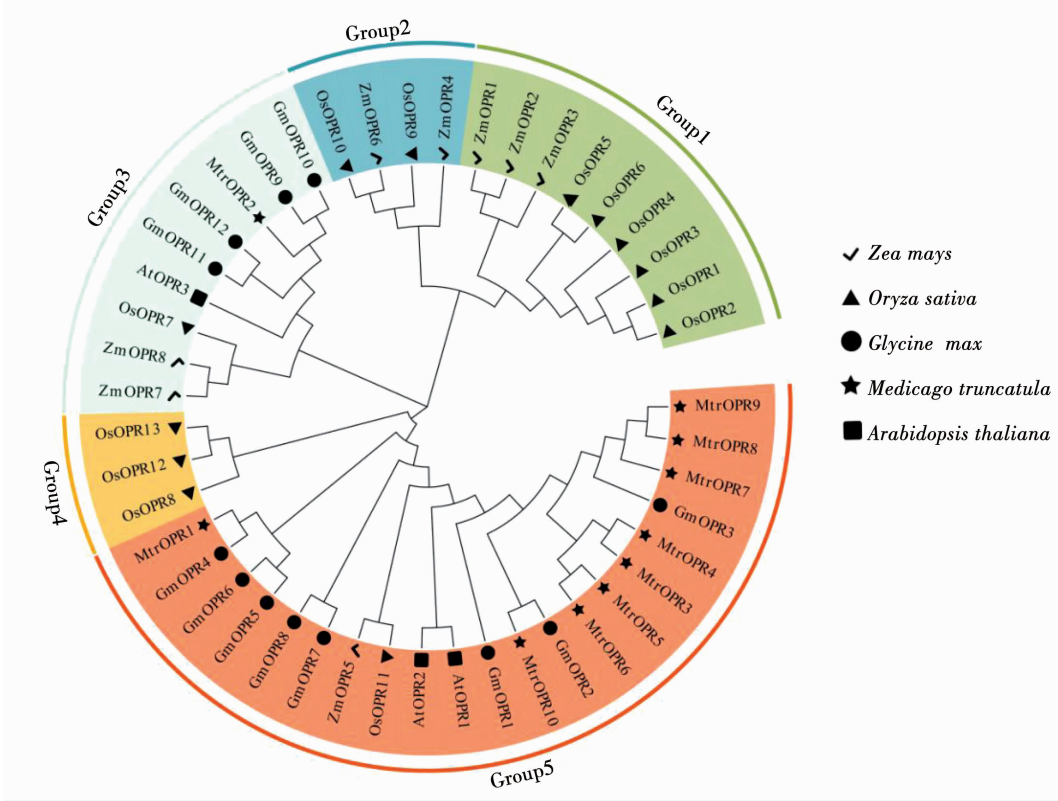


图 1 蒺藜苜蓿、拟南芥、水稻、玉米和大豆 OPR 蛋白系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree of OPR proteins of *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays* and *Glycine max*

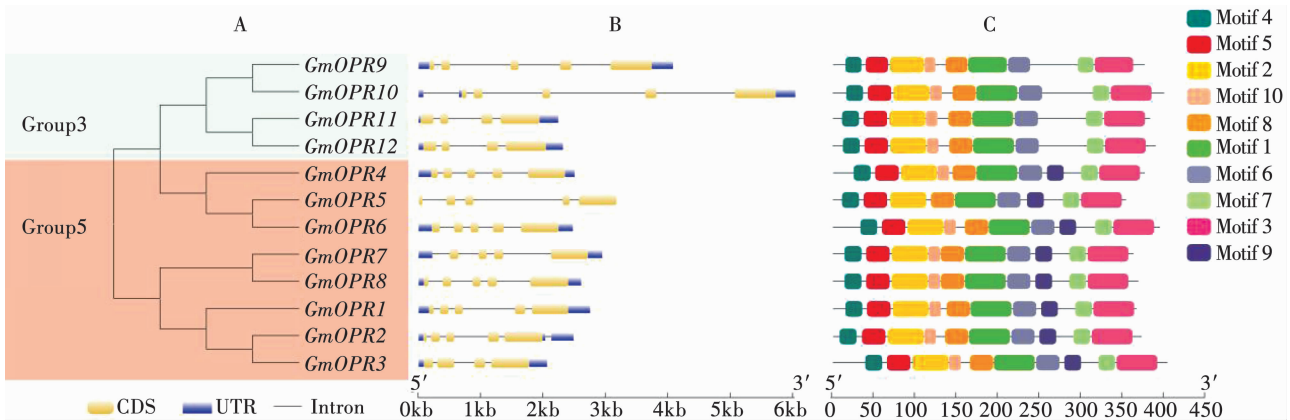
2.3 大豆 OPR 基因结构和序列保守性分析

参考系统发育进化树(图 1),进行 GmOPR 蛋白序列进化关系分析的结果如图 2A 所示,Group 3 中 GmOPR9 和 GmOPR10 亲缘关系较近,GmOPR11 和 GmOPR12 亲缘关系较近;Group5 中 GmOPR5 和 GmOPR6 亲缘关系较近,GmOPR7 和 GmOPR8 亲缘关系较近,GmOPR2 和 GmOPR3 亲缘关系较近。

基因结构图分析结果如图 2B 所示,GmOPR 家族成员结构较为相似,Group3 和 Group5 之间没有太多差异。基因成员外显子数量为 4~5,内含子数

量为 3~5,较多的内含子数量增加了翻译后蛋白质的多样性^[39]。

GmOPRs 蛋白保守基序分析结果如图 2C 所示,每个蛋白最多发现 10 个保守基序。每个 GmOPR 蛋白都包含 8 个常见的保守基序(Motif 4、Motif 5、Motif 2、Motif 8、Motif 1、Motif 6、Motif 7 和 Motif 3),Group3 基因的保守基序分布完全相同。与 Group5 相比,Group3 的序列共同缺少 Motif 9(图 2C)。这可能是双子叶 OPR 基因分类的依据之一,Motif 9 在选择底物的功能方面可能发挥着重要的作用。



注:A. 蛋白序列进化关系;B. 基因内含子-外显子结构分布;C. 保守基序分布。
Note: A. Sequence evolution relationship of proteins; B. Gene intron-exon structure distribution; C. Conservative motif distribution.

图 2 大豆 OPR 家族基因结构及其蛋白保守基序分析

Fig. 2 The gene structure and protein conserved motif analysis of GmOPR gene family members

2.4 大豆 OPR 基因染色体定位和共线性分析

染色体定位结果如图 3 所示,12 个 GmOPR 基因分布在 20 条染色体中的 8 条染色体上,OPR 基因

在大豆染色体上不均匀分布,具有随机性。1、6、11、14、15、19 号染色体上各有 1 个 GmOPR 基因,13、17 号染色体上各有 3 个 GmOPR 基因。

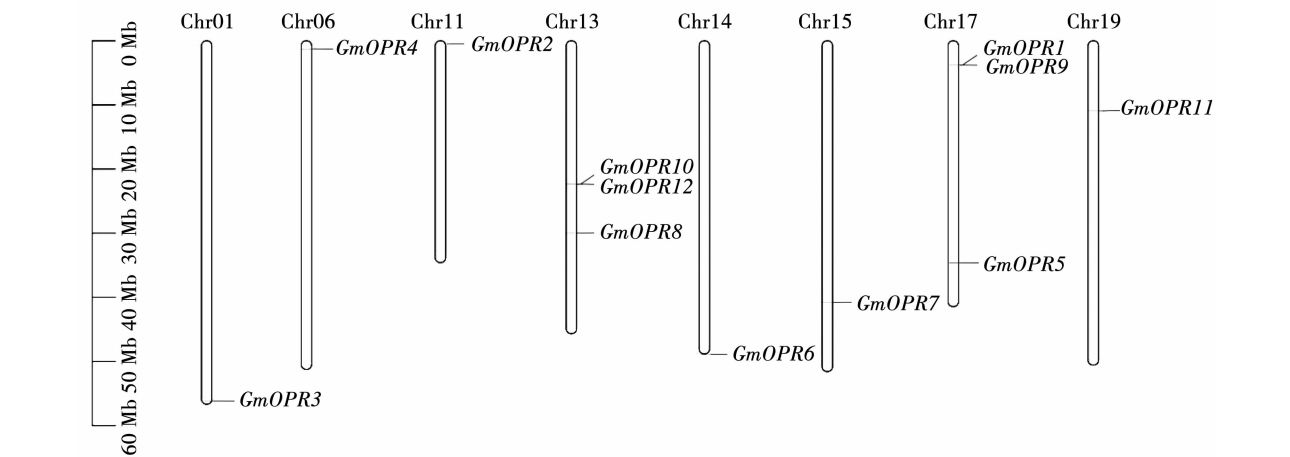


图 3 大豆 OPR 基因家族染色体定位分析

Fig. 3 The chromosome mapping of soybean OPR gene family

共线性分析结果如图 4 所示, GmOPR4 与 GmOPR6、GmOPR7 与 GmOPR8、GmOPR2 与 GmOPR3、GmOPR10 与 GmOPR11 之间发生了片段复制,表明大豆 OPR 基因数量的扩增主要归因于片段重复。

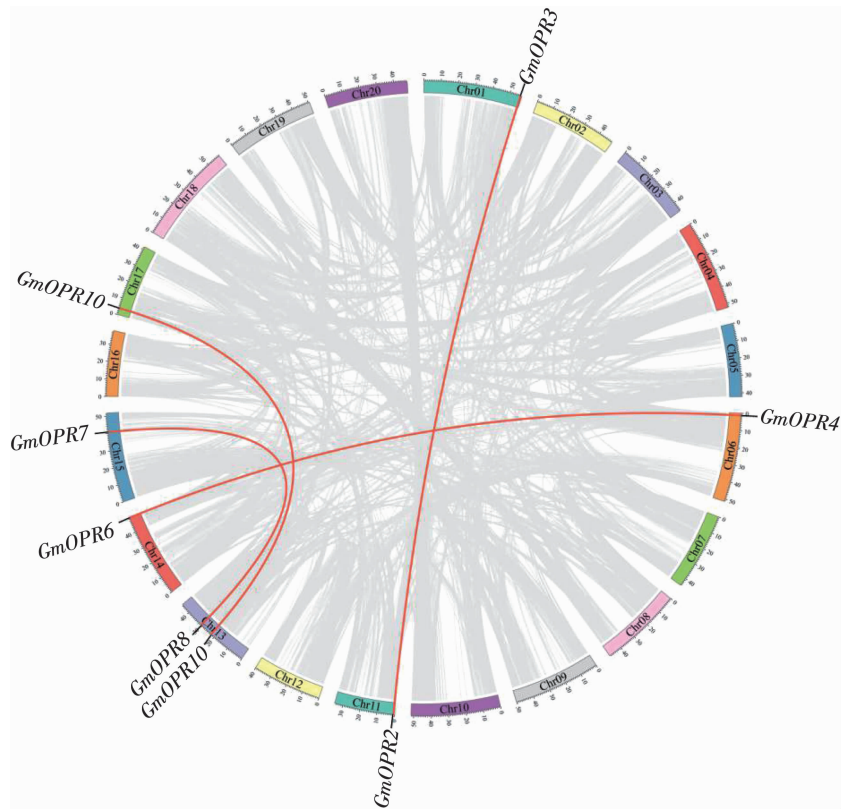
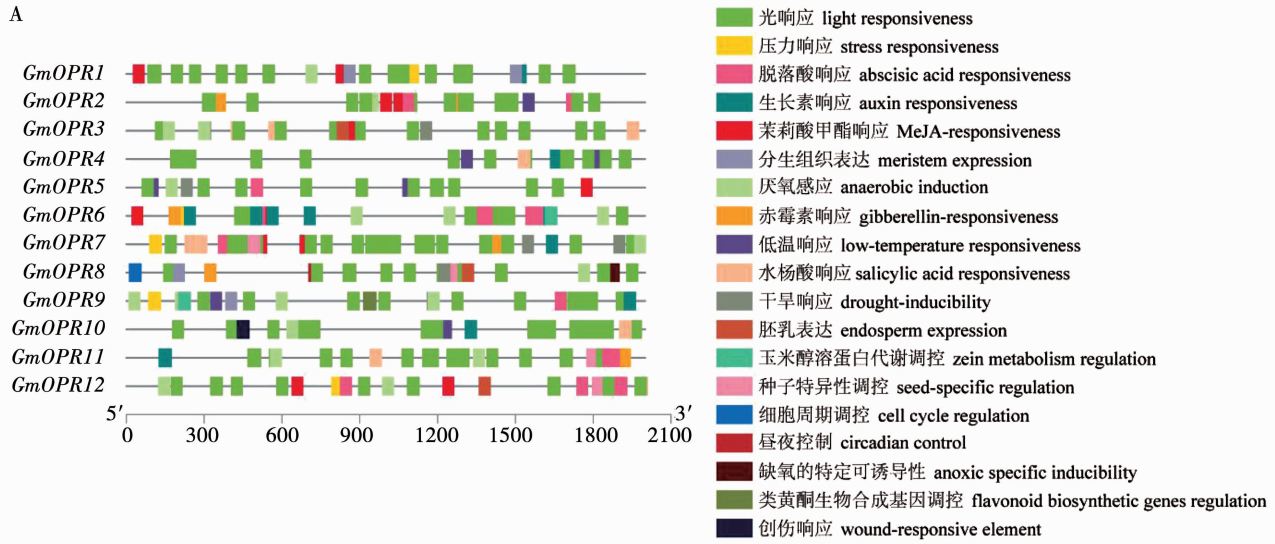


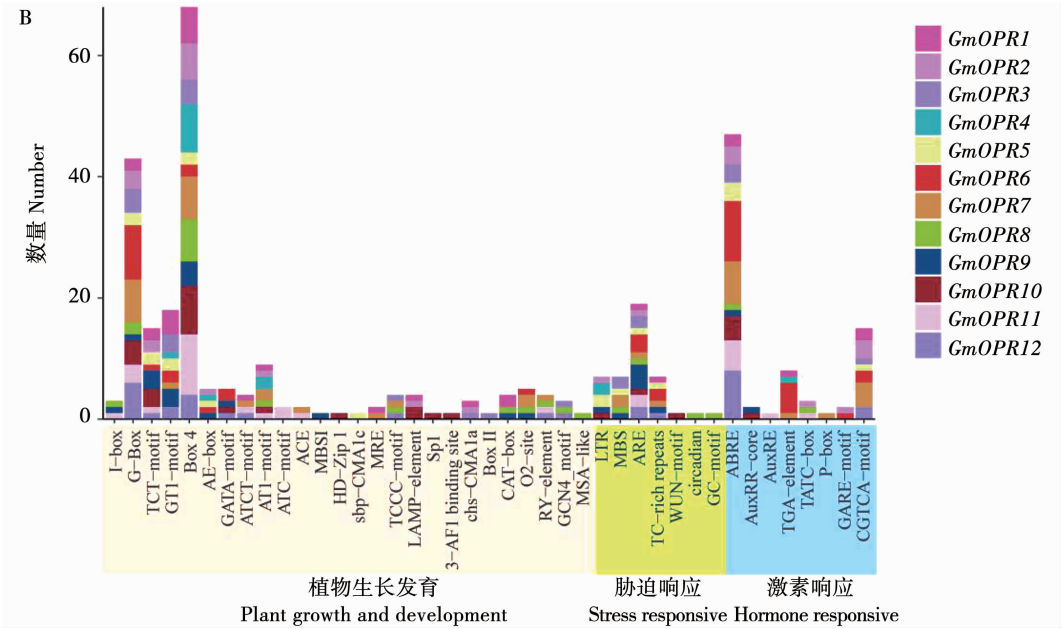
图 4 大豆 OPR 基因家族的共线性分析
Fig. 4 The collinearity analysis of OPR gene family in soybean

2.5 大豆 OPR 基因启动子区顺式作用元件分析

基因启动子序列分析结果如图 5 所示,共鉴定出 42 种与调节生长发育、逆境胁迫和激素相关的顺式作用元件。调节植物生长发育的元件在所有元件中占比最大,光响应元件 Box4 和 G-Box 分别出现了 68 和 43 次,在所有的元件中出现频次最高。鉴定出的生长发育相关元件包括:胚乳表达元件、顶端分生组织表达元件、栅栏叶肉细胞元件、类黄酮生物合成基因调控元件。鉴定出的逆境胁迫顺式作用元件包括:低温响应元件、压力响应元件、干旱

响应元件和厌氧诱导反应元件。鉴定出的激素信号通路相关元件包括: MeJA 响应元件、脱落酸 (ABA) 响应元件、水杨酸 (SA) 响应元件、赤霉素 (GA) 响应元件和生长素 (IAA) 响应元件。其中, ABA 响应元件的数量最多,且含有 ABA 响应元件的 *GmOPRs* 数量也最多,为 11 个;其次,包含 MeJA 响应元件 CGTCA-motif 的 *GmOPRs* 为 7 个。结果说明 *GmOPRs* 可能在响应厌氧、压力和干旱等非生物胁迫与激素刺激方面发挥重要作用。





注: A. 启动子区顺式作用元件分布分析; B. 各顺式作用元件数量。
Note: A. Analysis of *cis*-element distribution in promoter region; B. Number of each *cis*-element.

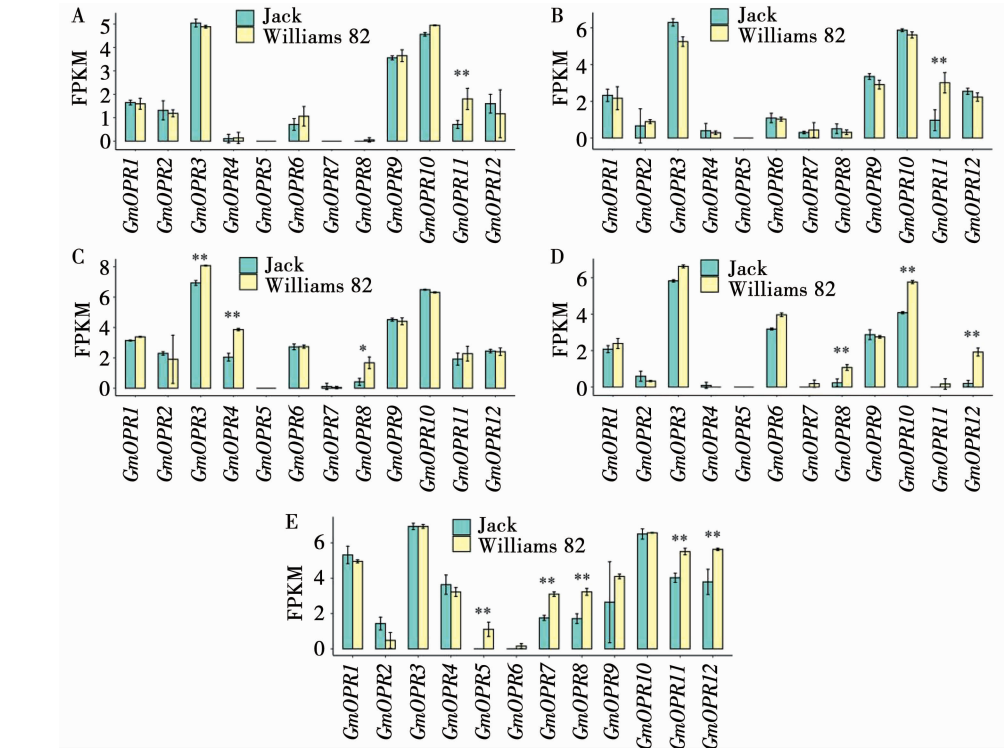
图 5 GmOPR 基因启动子顺式作用元件预测

Fig. 5 The prediction of the *cis*-elements in the promoter of GmOPR genes

2.6 不同大豆品种各部位 OPR 基因表达情况的预测分析

基因组织特异性分析结果如图 6 所示,顶端分生组织中的 *GmOPR11*,上胚轴中的 *GmOPR11*,下胚轴中的 *GmOPR3* 和 *GmOPR4*,真叶中的 *GmOPR8*、

GmOPR10 和 *GmOPR12*, 以及根中的 *GmOPR5*、*GmOPR7*、*GmOPR8*、*GmOPR11* 和 *GmOPR12* 基因的表达量表现出极显著差异。下胚轴中 *GmOPR8* 基因的表达量表现出显著差异。结果说明 *GmOPRs* 基因的表达具有组织特异性。



注: A. 顶端分生组织; B. 上胚轴; C. 下胚轴; D. 真叶; E. 根。* 表示差异显著 ($P < 0.05$) ; ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$) 。

Note: A. Meristem; B. Epicotyl; C. Hypocotyl; D. Unifoliate leaf; E. Root. * mean significant difference ($P < 0.05$) ; ** mean extremely significant difference ($P < 0.01$) .

图 6 Williams 82 和 Jack 不同组织部位 *GmOPRs* 基因表达量分析

Fig. 6 The analysis of *GmOPRs* expression in different tissues of Williams 82 and Jack

在 Jack 中,大部分 *GmOPRs* 在根和下胚轴中表达量较高。*GmOPR1*、*GmOPR3*、*GmOPR9* 和 *GmOPR10* 没有表现出明显的组织特异性。*GmOPR2* 在根、下胚轴与顶端分生组织中表达情况不同,*GmOPR5* 在所有组织中都不表达,*GmOPR7* 仅在根中表达,*GmOPR8* 仅在根中表达,*GmOPR12* 在真叶中几乎不表达,这些基因表现出一定的组织特异性。在 Williams 82 中,大部分 *GmOPRs* 在根和下胚轴中表达量较高,在顶端分生组织以及上胚轴中表达量较低。*GmOPR3*、*GmOPR9* 和 *GmOPR10* 在 5 个组织中的表达量均较高,*GmOPR1* 和 *GmOPR12* 在不同组织中均表达,在根中表达最高,均没有表现出明显的组织特异性。*GmOPR2* 仅在下胚轴表达,*GmOPR4* 仅在根和下胚轴中表达,*GmOPR5* 和 *GmOPR7* 仅在根中表达,*GmOPR6* 仅在根中几乎不表达,*GmOPR8* 在根、下胚轴和叶中表达,*GmOPR11* 仅在真叶不表达,这些基因均表现出了明显的组织特异性。综合来看,*GmOPR5* 和 *GmOPR7* 表现出了组织特异性和品种特异性。*GmOPR11* 基因在 Williams 82 的 5 个组织中表达水平均高于 Jack,说明 *GmOPR11* 基因可能在 Williams 82 的非生物胁迫响应方面发挥了重要的作用。同时,Williams 82 与 Jack 品种间的差异基因多位于根,且大部分基因在 Williams 82 中表达量更高,说明两者根中 OPR 家族基因的作用模式不同(图 6)。

2.7 基于 RNA-seq 数据的非生物胁迫下 OPR 基因表达分析

2.7.1 干旱胁迫 利用 NCBI SRA 数据库中干旱胁迫下大豆的 RNA-seq 数据,进行基因表达分析的结果如图 7 所示,在干旱条件下,12 个 *GmOPRs* 基因的表达模式不同。*GmOPR3* 和 *GmOPR10* 在各个干旱处理阶段均高表达,*GmOPR7*、*GmOPR8* 和 *GmOPR6* 在各个干旱处理阶段均为低表达或者不表达。*GmOPR1*、*GmOPR4* 和 *GmOPR9* 在干旱处理后表达受到抑制,复水后表达回升。*GmOPR11* 在干旱处理后表达升高,响应干旱胁迫。*GmOPR2* 在干旱处理后表达下降。*GmOPR8* 和 *GmOPR12* 在干旱处理后表达呈先下降后上升趋势,基因表达在干旱早期受到抑制。

2.7.2 盐胁迫 利用 NCBI SRA 数据库中盐胁迫下大豆的 RNA-seq 数据,进行基因表达分析的结果如图 8 所示,盐胁迫下不同 *GmOPRs* 基因表达模式存在差别。*GmOPR10*、*GmOPR3*、*GmOPR9* 和 *GmOPR1* 在各盐处理阶段表达基本不变。*GmOPR7*

和 *GmOPR8* 在盐处理初期不表达,盐处理后后期表达升高,盐处理 6 h 后表达量上升至峰值。*GmOPR11* 和 *GmOPR12* 持续响应盐胁迫。*GmOPR2* 和 *GmOPR4* 表达量随盐处理时间增长而降低,受盐胁迫抑制。*GmOPR5* 和 *GmOPR6* 在胁迫环境下不表达,不响应盐胁迫。结果说明 *GmOPRs* 可能通过上调表达在大豆响应盐胁迫中发挥重要作用。

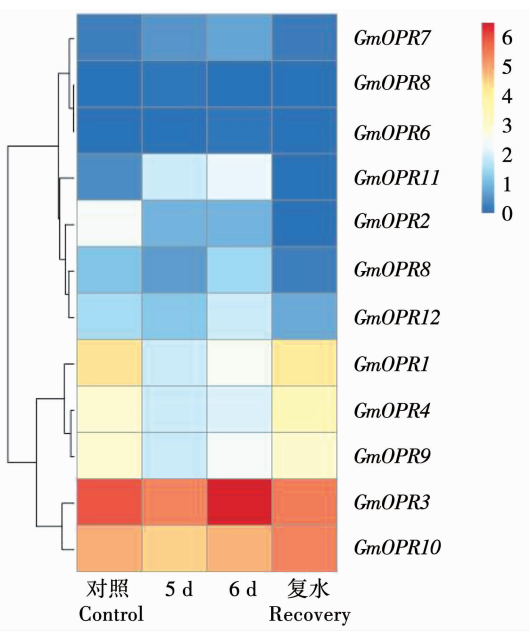


图 7 *GmOPRs* 在干旱胁迫下的表达模式
Fig. 7 The expression pattern of *GmOPRs* in response to drought stress

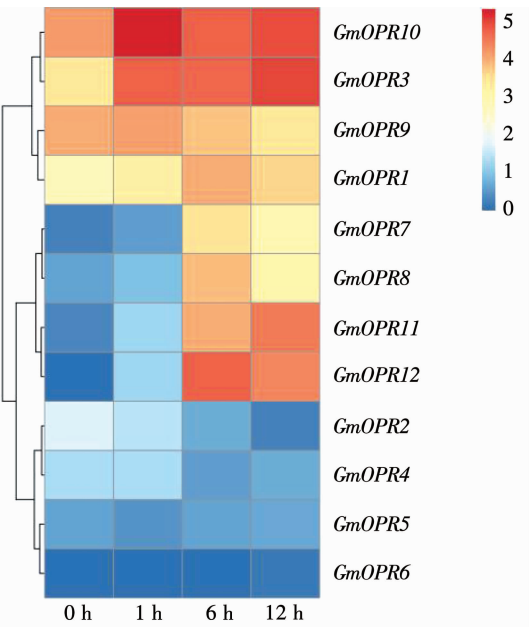
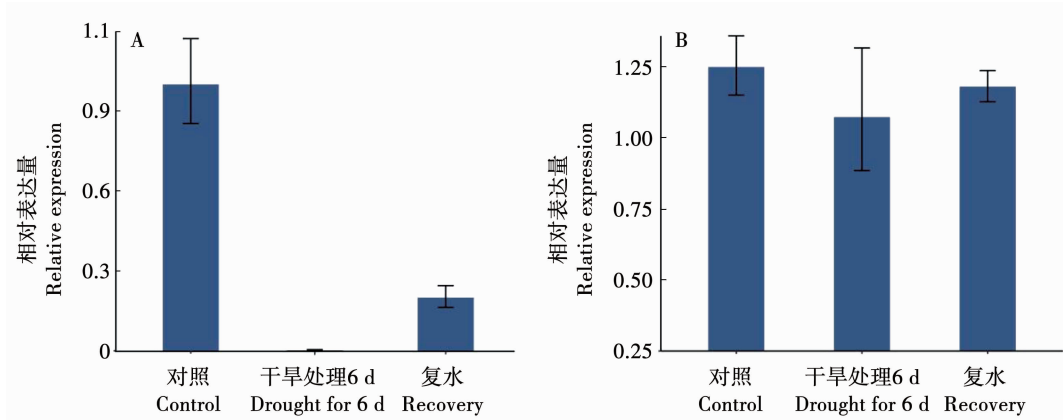


图 8 *GmOPRs* 在盐胁迫下的表达模式
Fig. 8 The expression pattern of *GmOPRs* in response to salt stress

2.8 干旱胁迫基因表达量 qRT-PCR 验证分析

为验证转录组数据分析结果的准确性,选择干旱处理中变化趋势较明显的 *GmOPR4* 与 *GmOPR9* 基因进行表达模式验证,分析结果如图 9 所示,与对

照组相比,干旱处理 6 d 后,*GmOPR4* 与 *GmOPR9* 表达量均下降,复水后表达量上升。其表达量变化趋势分析结果与转录组分析结果一致,说明 *GmOPR* 家族基因表达受干旱影响。



注:A. *GmOPR4*; B. *GmOPR9*。
图9 干旱胁迫和复水条件下 *GmOPRs* 基因表达 qRT-PCR 分析
Fig.9 The *GmOPRs* expression by qRT-PCR under drought and recovery condition

3 讨论

本研究从大豆中鉴定出 12 个 OPR 基因,理化性质和亚细胞定位分析表明,*GmOPR* 蛋白位于细胞质、叶绿体或线粒体内,发挥不同的功能。在系统进化树分析和保守基序分析中,大豆 OPR 基因家族可以分为两个亚组,这和以往对双子叶植物 OPR 基因的研究结果相符。*GmOPR9*、*GmOPR10*、*GmOPR11* 和 *GmOPR12* 与 *AtOPR3* 被分为同一组, *GmOPR1* ~ *GmOPR8* 与 *AtOPR1* 和 *AtOPR2* 被分为同一组。进化树中亲缘关系越近,其具有相似的基因功能的可能性也越大。因此推测 *GmOPR9* ~ *GmOPR12* 与 *AtOPR3* 有相似的功能,可以有效地催化 9R, 13R-OPDA, 使其转化为 JA 的前体 OPC-8:0^[14]。*GmOPRs* 数量明显多于 *AtOPRs*,推测随着进化的发生,OPRs 的数量和功能在不同的物种中可能发生着变化,在十字花科和豆科植物分化后大豆全基因组发生了复制事件。

基因结构分析显示,*GmOPR* 基因外显子数量为 4 ~ 5,内含子数量为 3 ~ 5,家族成员间外显子与内含子数量差异较小,这与西瓜中 OPR 家族的研究相似^[40]。*GmOPR* 蛋白均具有 8 个保守基序 Motif 1 ~ Motif 8,其中 *GmOPR9* ~ *GmOPR12* 与其他家族成员相比均缺少 Motif 9。推测由于 Motif 1 ~ Motif 8 基因中存在较多保守结构域,为了避免其优先催化 9R, 13R-OPDA,它们失去对该底物的特异性。

顺式作用元件的分析显示,12 个 *GmOPRs* 可能参与了调节生长发育、逆境胁迫和激素相关的信号

通路。*GmOPRs* 可能与各种刺激密切相关,包括 MeJA、ABA、SA、GA 和 IAA 激素刺激以及干旱、光、低温和创伤等非生物胁迫刺激。在激素相关的元件中,包含茉莉酸甲酯响应元件的 *GmOPRs* 基因数量较多,表明 OPR 基因的表达受 JA 信号分子的调控,这与先前玉米 OPR 基因受 JA 调控的研究一致^[18]。另外,*GmOPRs* 启动子含大量的 ABA 响应元件。研究表明, *TaOPR2* 的表达受到 ABA 的抑制^[23],而 *ZmOPR6*、*ZmOPR7* 和 *ZmOPR8* 在 ABA 的处理下被高度诱导^[18],两者表现并不相同。推测随着进化的发生,OPRs 的功能在不同的物种中可能发生着变化,这值得进一步研究。而在非生物胁迫相关的元件中,LTR、MBS、ARE 和 TC-rich 元件多次出现。植物激素信号是调节植物对于干旱或缺水反应的关键,推测 *GmOPRs* 可能在低温、厌氧和压力响应,特别是干旱响应方面发挥重要的作用^[41]。

不同组织和品种以及非生物胁迫下 *GmOPRs* 的表达情况不同。在拟南芥中,*AtOPRs* 主要在根中表达,在其他部位中,来自两个不同亚家族的 *AtOPR1* 和 *AtOPR3* 基因表现出组织特异性,*AtOPR1* 主要在幼莲座(叶)中表达,而 *AtOPR3* 主要在幼花中表达,且 *AtOPR3* 突变体为雄性不育。这表明它们以不同的表达模式参与不同的生物学过程^[13,17,20]。在大豆中,*GmOPRs* 与 *AtOPRs* 的表达规律相似,主要在根中表达,具有很强的组织特异性。这与以往对拟南芥、水稻等的研究结果一致^[13,15]。*GmOPRs* 在不同品种间的表达存在差异,这也暗示着在不同的大豆品种中 *GmOPRs* 的作用存在差异。

拟南芥、小麦和水稻 OPR 在生长发育以及胁迫响应方面的相关研究较多。*AtOPR3* 可以通过参与拟南芥 JA 和 IAA 信号通路响应线虫等生物胁迫。小麦中,蚜虫的生物胁迫和干旱、高温、盐、创伤等非生物胁迫以及 MeJA、ABA、SA 等外源激素处理可不同程度地诱导小麦 OPRs 表达^[20]。*OsOPR1* 可以参与对干旱、盐、紫外线等非生物和真菌等生物胁迫以及 JA、ABA、SA 等植物激素刺激的防御反应。本研究发现 *GmOPR11* 的表达量随着干旱胁迫时间的增长而升高, *GmOPR7*、*GmOPR8*、*GmOPR11* 和 *GmOPR12* 的表达量随盐胁迫时间的增长而升高,说明 *GmOPRs* 基因响应盐和干旱等非生物胁迫,可能在大豆应对盐胁迫和干旱胁迫中发挥重要作用。

4 结论

本研究从大豆基因组中鉴定出 12 个 OPR 家族成员,不均匀地分布在 8 条染色体上,并将其命名为 *GmOPR1* ~ *GmOPR12*。系统发育进化树将 *GmOPRs* 分为 Group3 和 Group5 两组,且两组内基因的结构及保守基序高度保守。*GmOPRs* 含有响应厌氧、干旱和低温等非生物胁迫以及 JA、ABA 等多种激素的顺式作用元件。大豆 OPR 家族基因在大豆品种间的表达有差异,具有组织表达特异性,根组织中表达水平较高。大豆 OPR 家族基因响应盐、干旱胁迫,表现出不同的表达模式。结果表明 *GmOPR* 基因家族可能在非生物胁迫响应中发挥重要的作用。本研究解析了 *GmOPRs* 基因的特征以及潜在的功能,为后续探索其抗逆相关功能及分子机制奠定理论基础。

参考文献

- [1] 蒋科技,皮妍,侯嵘,等. 植物内源茉莉酸类物质的生物合成途径及其生物学意义[J]. 植物学报,2010, 45(2): 137-148. (JIANG K J, PI Y, HOU R, et al. Jasmonate biosynthetic pathway: Its physiological role and potential application in plant secondary metabolic engineering[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2010, 45(2): 137-148.
- [2] 宋云,李林宣,卓凤萍,等. 茉莉酸信号传导在植物抗逆性方面研究进展[J]. 中国农业科技导报,2015, 17(2): 17-24. (SONG Y, LI L X, ZHUO F P, et al. Progress on jasmonic acid signaling in plant stress resistant[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2015, 17(2): 17-24.
- [3] LI C, WILLIAMS M M, LOH Y T, et al. Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid-signaling pathway[J]. Plant Physiology, 2002, 130(1): 494-503.
- [4] 孙清鹏,王小菁. 植物伤反应中的茉莉酸类信号[J]. 植物学报通报,2003, 20(4): 481-488. (SUN Q P, WANG X J.

- Jasmonates in plant wound signaling[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2003, 20(4): 481-488.
- [5] HOWE G A. Jasmonates as signals in the wound response[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2004, 23(3): 223-237.
- [6] WASTERNAK C, STENZEL I, HAUSE B, et al. The wound response in tomato - role of jasmonic acid[J]. Journal of Plant Physiology, 2006, 163(3): 297-306.
- [7] WASTERNAK C, HAUSE B. A bypass injasmonate biosynthesis the OPR3-independent formation[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23(4): 276-279.
- [8] TURNER J G, ELLIS C, DEVOTO A. The jasmonate signal pathway[J]. The Plant Cell, 2002, 14(1): S153-S164.
- [9] LI W, LIU B, YU L, et al. Phylogenetic analysis, structural evolution and functional divergence of the 12-oxo-phytodienoate reductase gene family in plants[J]. BMC Evolutionary Biology, 2009, 9(1): 1-19.
- [10] BEYNON E R, SYMONS Z C, JACKSON R G, et al. The role of oxophytodienoate reductases in the detoxification of the explosive 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2009, 151(1): 253-261.
- [11] SCHALLER F, WEILER E W. Molecular cloning and characterization of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana*: Structural and functional relationship to yeast old yellow enzyme [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(44): 28066-28072.
- [12] LAUDERT D, HENNIG P, STELMACH B A, et al. Analysis of 12-oxo-phytodienoic acid enantiomers in biological samples by capillary gas chromatography-mass spectrometry using cyclodextrin stationary phases[J]. Analytical Biochemistry, 1997, 246(2): 211-217.
- [13] STINTZI A. The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000, 97(19): 10625-10630.
- [14] SCHALLER F, HENNIG P, WEILER E W. 12-Oxophytodienoate-10, 11-reductase: Occurrence of two isoenzymes of different specificity against stereoisomers of 12-oxophytodienoic acid[J]. Plant Physiology, 1998, 118(4): 1345-1351.
- [15] SCHALLER F, BIESGEN C, MÜSSIG C, et al. 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis[J]. Planta, 2000, 210(6): 979-984.
- [16] BIESGEN C, WEILER E W. Structure and regulation of *OPR1* and *OPR2*, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10, 11-reductases from *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 1999, 208(2): 155-165.
- [17] ZHANG J, SIMMONS C, YALPANI N, et al. Genomic analysis of the 12-oxo-phytodienoic acid reductase gene family of *Zea mays* [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59(2): 323-343.
- [18] BREITHAUP T, KURZBAUER R, LILIE H, et al. Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: Self-inhibition by dimerization [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(39): 14337-14342.
- [19] LI W, ZHOU F, LIU B, et al. Comparative characterization, expression pattern and function analysis of the 12-oxo-phytodienoic

acidreductase gene family in rice[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(6): 981-995.

[20] MOU Y, LIU Y, TIAN S, et al. Genome-wide identification and characterization of the OPR gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(8): 1-18.

[21] MATSUI H, NAKAMURA G, ISHIGA Y, et al. Structure and expression of 12-oxophytodienoatereductase (subgroup I) genes in pea, and characterization of the oxidoreductase activities of their recombinant products [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 271(1): 1-10.

[22] PAK H, WANG H, KIM Y, et al. Creation of male-sterile lines that can be restored to fertility by exogenous methyl jasmonate for the establishment of a two-line system for the hybrid production of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(2): 365-374.

[23] TANI T, SOBAJIMA H, OKADA K, et al. Identification of the *OsOPR7* gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice[J]. Planta, 2008, 227(3): 517-526.

[24] 夏凡, 代婷婷, 姚新转, 等. 水稻 OPR 基因的克隆及其在烟草中抗镉性分析[J]. 种子, 2020, 39(5): 53-58. (XIA F, DAI T T, YAO X C, et al. Cloning of *Oryza sativa* OPR gene and its cadmium resistance in tobacco [J]. Seed, 2020, 39(5): 53-58.

[25] PIGOLEV A V, MIROSHNICHENKO D N, PUSHIN A S, et al. Overexpression of *Arabidopsis OPR3* in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) alters plant development and freezing tolerance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 1-17.

[26] DONG W, WANG M, XU F, et al. Wheat oxophytodienoate reductase gene *TaOPR1* confers salinity tolerance *via* enhancement of abscisic acid signaling and reactive oxygen species scavenging [J]. Plant Physiology, 2013, 161(3): 1217-1228.

[27] WANG Y, YUAN G, YUAN S, et al. *TaOPR2* encodes a 12-oxo-phytyldienoic acid reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 470(1): 233-238.

[28] YAN Y, CHRISTENSEN S, ISAKEIT T, et al. Disruption of *OPR7* and *OPR8* reveals the versatile functions of jasmonic acid in maize development and defense [J]. The Plant Cell, 2012, 24(4): 1420-1436.

[29] 林延慧, 唐力琼, 徐靖, 等. 大豆响应涝害 bZIP 基因 *Glyma04g04170* 的生物信息学分析及互作蛋白预测[J]. 大豆科学, 2020, 39(5): 727-733. (LIN Y H, TANG L Q, XU J, et al. Bioinformatics analysis and interacting protein prediction of soybean bZIP gene *Glyma04g04170* in response to submergence stress[J]. Soybean Science, 2020, 39(5): 727-733.

[30] EL-GEHALI S, MISTRY J, BATEMAN A, et al. The Pfam protein families database in 2019 [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D427-D432.

[31] FINN R D, CLEMENTS J, EDDY S R. HMMER web server: Interactive sequence similarity searching [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(suppl_2): W29-W37.

[32] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.

[33] CHEN N C, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.

[34] HU B, JIN J, GUO A Y, et al. GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server [J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297.

[35] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: Tools for motif discovery and searching [J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(suppl_2): W202-W208.

[36] TAMANG B G, LI S, RAJASUNDARAM D, et al. Overlapping and stress-specific transcriptomic and hormonal responses to flooding and drought in soybean [J]. The Plant Journal, 2021, 107(1): 100-117.

[37] BELAMKAR V, WEEKS N T, BHARTI A K, et al. Comprehensive characterization and RNA-Seq profiling of the HD-Zip transcription factor family in soybean (*Glycine max*) during dehydration and salt stress [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1-25.

[38] WANG M, CHEN B, ZHOU W, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *AT-hook Motif Nuclear Localized* gene family in soybean [J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 1-26.

[39] WANG T Y, LIU Q, REN Y, et al. A pan-cancer transcriptome analysis of exon splicing identifies novel cancer driver genes and neoepitopes [J]. Molecular Cell, 2021, 81(10): 2246-2260.

[40] GUANG Y, LUO S, AHAMMED G J, et al. The *OPR* gene family in watermelon: Genome-wide identification and expression profiling under hormone treatments and root-knot nematode infection [J]. Plant Biology, 2021, 23(1): 80-88.

[41] GUPTA A, RICO-MEDINA A, CAÑO-DELGADO A I. The physiology of plant responses to drought [J]. Science, 2020, 368(6488): 266-269.