



模拟干旱胁迫下大豆耐旱突变体的生理和转录组分析

曹颖^{1,2}, 竹龙鸣², 邓平³, 陈紫芸², 袁凤杰^{2,3}

(1. 浙江农林大学 现代农学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江省农业科学院 作物与核技术利用研究所, 浙江 杭州 310021; 3. 湘湖实验室, 浙江 杭州 311231)

摘要: 为了明确大豆苗期响应干旱胁迫的关键基因, 解析其耐旱机制, 本研究以浙春 3 号及其突变体 *Gm-lpa-ZC-2* (ZC-2) 为材料, 利用 20% PEG6000 胁迫处理其幼苗后, 对比两品种表型差异并测定相关生理生化指标, 再利用 RNA-seq 技术进行转录组学分析。结果表明: 突变体 ZC-2 的耐旱性强于浙春 3 号, 随着干旱胁迫时间的延长, 突变体 ZC-2 的最大光化学效率 (Fv/Fm)、相对含水量、可溶性糖和可溶性蛋白含量均显著高于亲本浙春 3 号, 相对电导率和丙二醛 (MDA) 含量低于浙春 3 号。转录组数据分析表明: PEG6000 胁迫后, 浙春 3 号和 ZC-2 之间共存在 7 879 个差异表达基因, 其中上调表达的差异基因有 4 208 个, 下调表达的差异基因有 3 671 个; 胁迫处理 2 和 4 d 共同表达的差异基因为 571 个。KEGG 富集分析表明, 这 571 个基因主要富集在 84 条代谢途径, 包括光合作用-天线蛋白、半乳糖代谢、内质网中的蛋白质加工、类黄酮生物合成等通路。进一步筛选到光合作用和糖代谢相关通路基因以及可能与干旱胁迫相关的基因, 包括 *TIFY10A*、*ZAT10*、*RD22*、*PM19L* 和 *XTH6* 等。研究结果可为挖掘大豆苗期耐旱候选基因和解析大豆耐旱机制提供一定基础。

关键词: 大豆; 干旱胁迫; PEG; 苗期; 生理指标; 转录组

Physiological and Transcriptomic Analysis of A Soybean Drought-tolerant Mutant Under Simulate Drought Stress

CAO Ying^{1,2}, ZHU Longming², DENG Ping³, CHEN Ziyun², YUAN Fengjie^{2,3}

(1. College of Modern Agriculture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China; 2. Institute of Crop Science and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 3. Xianghu Laboratory, Hangzhou 311231, China)

Abstract: In order to identify the key genes responsive to drought stress and to elucidate the underlying mechanism in drought tolerance of soybean seedlings, Zhechun 3 and its mutant *Gm-lpa-ZC-2* (ZC-2) were test in this research. The phenotype, relevant physiological and biochemical indexes were observed and determined after stress treatment under 20% PEG6000, and RNA-seq technology used for transcriptomic analysis. The results showed that the relative water content, the maximum quantum yield of PSII (Fv/Fm), soluble sugar content and soluble protein content of the mutant ZC-2 were significantly higher than those of Zhechun 3, and relative electrolyte leakage rate (REC) and malondialdehyde (MDA) content were lower than those of Zhechun 3, which could indicate that the mutant ZC-2 was more drought tolerant than Zhechun 3. The transcriptomic data indicated that there were totally 7 879 differentially expressed genes (DEGs) between Zhechun 3 and ZC-2, including 4 208 up-regulated genes and 3 671 down-regulated genes. There were 571 differential genes expressed on both day 2 and day 4 under treatment. In addition, the 571 DEGs were involved in 84 metabolic pathways. KEGG enrichment analysis indicated that DEGs were mainly enriched in pathways such as photosynthesis-antenna proteins, galactose metabolism, protein processing in endoplasmic reticulum, and flavonoid biosynthesis. Moreover, genes related to photosynthesis and sugar metabolism pathway as well as gene associated with drought stress, including *TIFY10A*, *ZAT10*, *RD22*, *PM19L* and *XTH6*, were detected. This study provided a foundation for mining candidate genes related to drought tolerance in soybean seedlings and studying the mechanism of soybean drought tolerance.

Keywords: soybean; drought stress; PEG; seedling; physiological indicators; transcriptome

干旱是非生物胁迫中最常见的一种类型, 对植物生长和作物产量有巨大影响^[1]。大豆 (*Glycine max*) 作为一种具有重要经济价值的油料作物, 在世界范围内得到广泛种植^[2]。大豆需水量较多, 根系不发达, 是豆类作物中对水分最敏感的植物^[3]。干旱胁迫会造成大豆大幅度减产, 给农民和种植者造成一定的经济损失。创制耐旱种质资源, 解析耐旱

机理, 选育耐旱品种, 是提高大豆耐旱性最经济有效的途径。

干旱胁迫对植物的形态、生理和分子过程都有一系列影响^[4]。植物对干旱胁迫的响应受到多种因素的调节, 包括渗透调节、环境信号、光合作用、激素调节、CO₂ 浓度和呼吸作用等^[5]。在干旱胁迫下, 植物体内的脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含

收稿日期: 2023-11-03

基金项目: 浙江省农业(旱粮新品种选育)新品种选育重大科技专项(2021C02064-5)。

第一作者: 曹颖(1998—), 女, 硕士研究生, 主要从事大豆耐旱相关基因研究。E-mail: caoy2023@126.com。

通讯作者: 袁凤杰(1971—), 女, 博士, 研究员, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: fyyuanhz@126.com。

量会增加^[4];同时,干旱会使植物叶片气孔关闭,影响光合作用过程中植物对 CO₂ 的吸收,使叶片光合速率降低,光合产物积累减少^[6]。干旱胁迫还会激活一些信号通路来应对胁迫的不利影响,如 MAPK 级联、Ca²⁺ 信号通路和植物激素信号通路^[7]。许多干旱胁迫响应蛋白也已经被发现,如干旱响应蛋白(RD22)和胚胎发生晚期丰富蛋白(LEA),它们增强了干旱胁迫下细胞的水结合能力^[8-9]。还有一些转录因子已被证实与植物的耐旱性有关,如 AP2/ERF、NAC、WRKY、MYB、bZIP、bHLH 等^[10]。虽然目前关于干旱的研究已有一些报道,但是对大豆苗期耐旱分子调节机制仍不明确,发掘大豆苗期耐旱关键基因和干旱分子响应机制方面的研究具有重要意义。

干旱胁迫直接影响大豆苗期(V2~V3)的出苗率和质量,并最终影响大豆产量^[7]。聚乙二醇(PEG)因其相对分子质量很高,可通过模仿质壁分离造成土壤干旱,在大豆苗期干旱胁迫鉴定中已有应用^[11]。近年来随着新一代测序成本的降低, RNA-seq 技术已应用于大豆营养生长^[11-13]和生殖生长^[14]耐旱机制的研究。大量差异表达的基因和代谢途径表明,大豆应对干旱的机制比较复杂。*Gm-lpa-ZC-2*(ZC-2)是浙春3号经过辐照获得的稳定遗传的突变体,其种子出苗率与其亲本相似,不受种子来源及其低植酸(*low phytic acid*, *lpa*)突变的影响^[15]。本研究采用 PEG6000 模拟大豆苗期干旱条件,鉴定大豆苗期耐旱性的表型和生理指标,并使用 RNA-seq 方法研究浙春3号及其突变体 ZC-2 的转录组谱,筛选耐旱候选基因,为提高大豆幼苗对干旱胁迫的耐受性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为浙春3号(ZC-3)和 *Gm-lpa-ZC-2* (ZC-2),其中浙春3号为浙江省农科院选育的高蛋白高产品种,ZC-2 为浙春3号经 150 Gy ⁶⁰Co- γ 射线辐照诱变而来的突变体;2份材料均由浙江省农业科学院杭州大豆改良分中心提供。

1.2 试验设计

将浙春3号与 ZC-2 播种于培养箱中,生长环境设置为 25℃,光周期为 16 h/8 h(明/暗)培养。待两片真叶完全展开后,每 3 d 加入霍格兰营养液 100 mL。取 14 d(V2~V3 期)幼苗进行胁迫处理,每天上午注入含 20% PEG6000 的霍格兰营养液 100 mL,连续处理 5 d。在处理前 0 d 及干旱处理后 1,2,3,4,5 d 记录表型变化,并取 0,2 和 4 d 样品倒数第二叶和倒数第三叶的混合叶片,液氮冷冻后置于 -80℃ 冰箱内保存,测定生理生化指标,并进行

转录组学分析。每个处理 3 个生物重复。

1.3 方法

1.3.1 大豆幼苗表型与生理指标测定 表型指标:测定幼苗冠鲜重,再将其放入铝盒内杀青(105℃,20 min)、烘干(65℃,72 h)至恒重,记录单株干重。

相对含水量:采用张志良^[16]的称重法测定。

相对电导率:采用高俊凤^[17]的 DDS-11A 法测定。

丙二醛含量:使用丙二醛测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行测定。

最大光化学效率(Fv/Fm):采用 PlantExplorer™ 仪器(PhenoVation, Netherlands)测定^[18]。

可溶性蛋白含量:采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定^[19]。

可溶性糖含量:使用可溶性糖测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定。

1.3.2 转录组测序和数据分析 总 RNA 提取:使用 Trizol 试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)提取总 RNA。使用 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)评估 RNA 质量,并使用 RNase 琼脂糖凝胶电泳进行检查。

cDNA 文库的构建:使用 Oligo(dT) 珠富集真核细胞 mRNA,然后使用片段缓冲液将其片段化为短片段,并使用 NEB Next Ultra RNA 文库 Prep Kit for Illumina(NEB #7530, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)反转录成 cDNA。使用 Gene Denovo 生物技术有限公司(中国,广州)的 Illumina Novaseq 6000 对所得到的 cDNA 文库进行测序。

测序数据分析:使用 fastp(0.18.0 版本)对原读取数据进行过滤,以获得高质量的清洁数据^[20]。构建大豆参考基因组(Wm82.a4)的索引,并使用 HISAT2.2.4 和默认参数绘制获得成对的末端清洁 reads。使用 StringTie v1.3.1 计算每 1 000 碱基的片段数,量化基因的表达丰度和变异。使用 DESeq2 和 edgeR 进行差异表达分析^[21]。采用 R package gmodels(<http://www.rproject.org/>)进行主成分分析(PCA),评价样品与重复间的关系。使用 KOBAS 软件对差异表达基因(DEGs)进行 GO 和 KEGG 通路富集分析^[22]。

1.3.3 荧光定量 PCR 使用 SYBR Green Real time PCR Master MIX-Plus-(TOYOBO Biotech Co. Ltd)试剂盒,在 Roche(USA)全定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR。以 *Tublin* 为内参基因,使用 Primer 5.0 软件设计引物(表 1)。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT}法^[22]计算基因的相对表达量。反应程序为:95℃ 30 s,1 个循环;95℃ 变性 5 s,55℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 15 s,40 个循环;95℃ 10 s,70℃ 10 s,40℃ 10 s,1 个循环。

表 1 qRT-PCR 引物
Table 1 Primer of qRT-PCR

基因 Gene	基因 ID Gene ID	正向引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
<i>Tublin</i>	<i>Glyma.03G124400</i>	GGAGTTCACAGAGGCAGAG	CACCTTACGCATCACATAGCA
<i>XTH6</i>	<i>Glyma.11G044800</i>	CCCATGGGGTACGCCTCTTC	TCATTTGCCCTCTTCCCCAAA
<i>GPT2</i>	<i>Glyma.15G105900</i>	TCTTGGCATCGTGTGATGATGA	CCATCCATTATAGTGCTGGCT
<i>RD22</i>	<i>Glyma.04G180400</i>	AATGCCATCTCACCCCTTCCTC	GAGCTGTCA TCAGGATCAGATTG
<i>TIFY10A</i>	<i>Glyma.15G179600</i>	CCAGACCTGTTGTTTATCTGCC	AGAAGGCCCATTTGCTACTTGA
<i>PM19L</i>	<i>Glyma.10G205900</i>	TGCACTGCACCACCTTTGTT	CACCACACAATGTCATGCTACA
<i>ZAT10</i>	<i>Glyma.06G045400</i>	CAAGCACAAGCACAAGCACTTC	CGGCTACGCTTAGAACGCT
<i>LHCB5</i>	<i>Glyma.09G154700</i>	TCACAACACAAATCCACATCCAC	TGAGCTGGAAGATTGCTTGC
<i>LHCB3</i>	<i>Glyma.13G282000</i>	CCCACCACCAACTCACACTAAA	GCCATGACTTCCAACCTCCT
<i>CAB3</i>	<i>Glyma.16G165200</i>	TGCAAGCGAGCAAAAACCTG	CACGGAACATCTCAGTGGGT

1.4 数据分析

表型和生理指标采用单因素方差分析方法分析数据之间的差异。利用 SPSS 22.0 软件和 Excel 2014 软件,对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 PEG 胁迫处理下浙春 3 号和 ZC-2 的表型差异

为研究大豆浙春 3 号和 ZC-2 的表型,选取 14 d 幼苗进行 PEG6000 模拟干旱胁迫处理。在胁迫处理下,浙春 3 号与 ZC-2 的植株地上部表现出不同程

度的影响(图 1A)。胁迫处理 3 d 时,浙春 3 号叶片开始出现失绿现象,而 ZC-2 叶片状态良好;在处理 4~5 d 时,浙春 3 号的叶片出现明显萎蔫和失水, ZC-2 的叶片出现轻微失绿现象。

PEG 胁迫处理下植物的生物量发生相应的变化。在处理前,浙春 3 号冠部的鲜重与干重均高于 ZC-2(图 1B、1C)。随处理时间的延长,两个材料冠部的鲜重和干重均呈先增加后下降的趋势,且 ZC-2 的冠鲜重和冠干重增长幅度明显高于浙春 3 号;在处理第 4~5 天,浙春 3 号的冠鲜重下降幅度显著高于 ZC-2,说明浙春 3 号受胁迫失水更多。

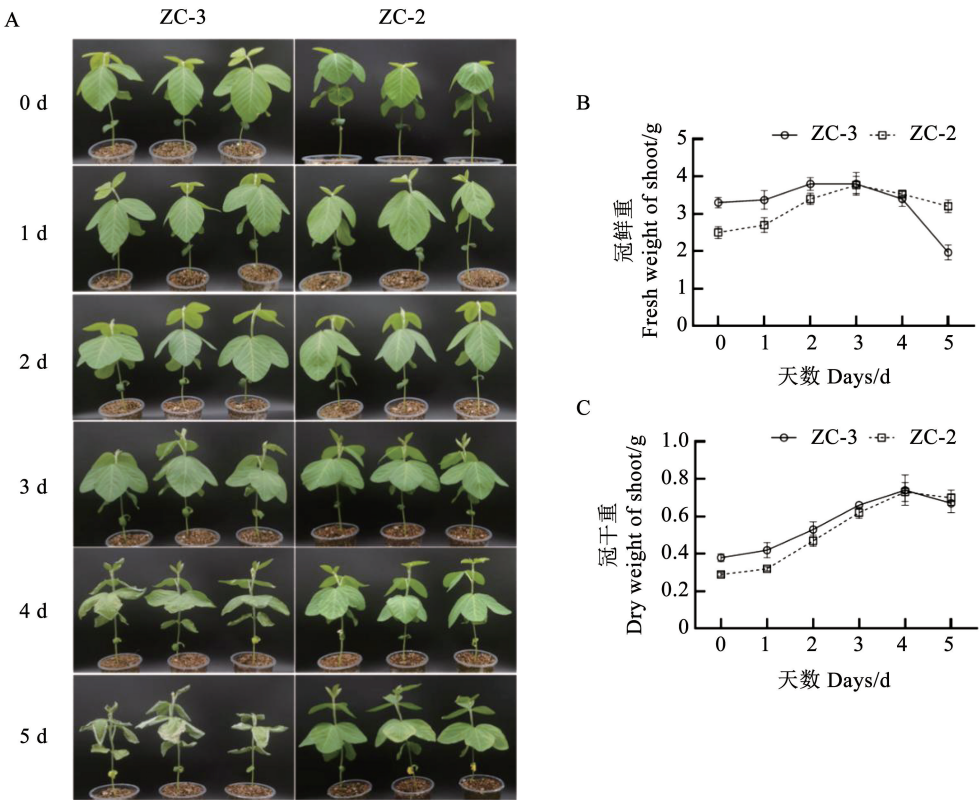


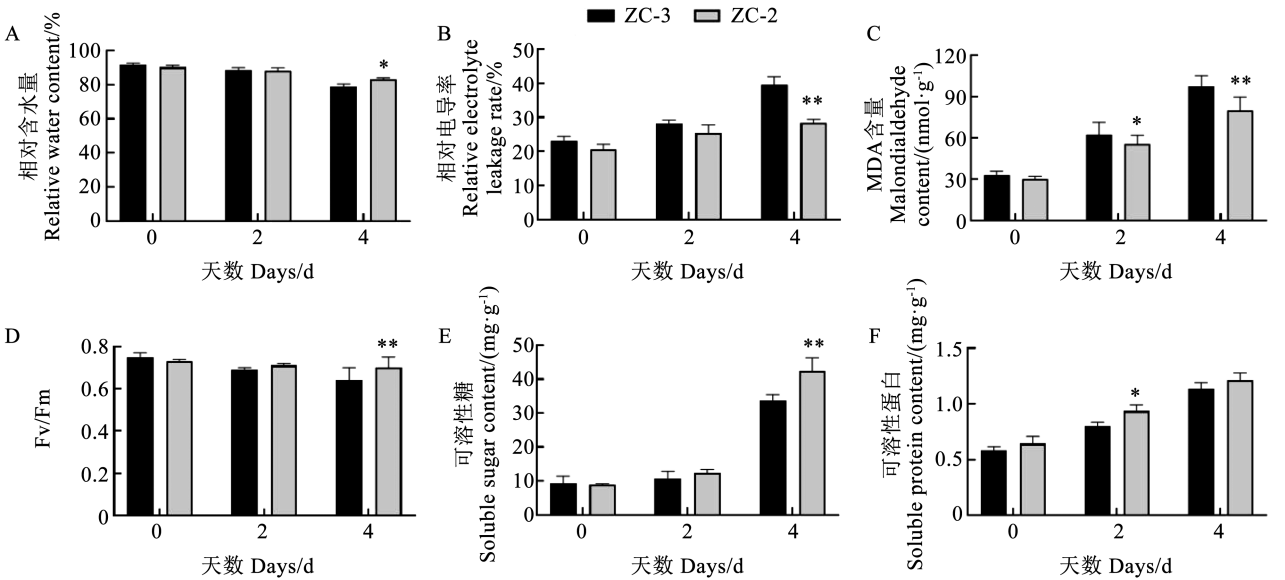
图 1 PEG 胁迫处理下浙春 3 号和 ZC-2 的表型变化

Fig. 1 Phenotypic changes of Zhechun 3 and ZC-2 under PEG stress treatment

2.2 PEG 胁迫处理下浙春 3 号和 ZC-2 的生理指标变化

在 PEG6000 模拟干旱条件下,随处理时间的延长,叶片的相对含水量呈减少趋势,在处理后的第 4 天,ZC-2 相对含水量显著高于野生型亲本浙春 3 号(图 2A)。相对电导率和丙二醛(MDA)含量随着干旱处理时间的延长呈增加趋势,在干旱胁迫第 4 天,浙春 3 号的相对电导率极显著高于 ZC-2(图 2B);

在第 2 天和第 4 天,浙春 3 号的丙二醛含量显著高于 ZC-2(图 2C)。Fv/Fm 值随着处理时间的延长呈减少趋势,在处理第 4 天,浙春 3 号的 Fv/Fm 值显著低于 ZC-2,说明浙春 3 号受胁迫程度更高(图 2D)。可溶性糖和可溶性蛋白含量随着胁迫处理时间延长呈增长趋势,在处理第 4 天,ZC-2 的可溶性糖含量极显著高于浙春 3 号(图 2E),在干旱胁迫第 2 天,ZC-2 的可溶性蛋白含量显著高于浙春 3 号(图 2F)。



注: * 代表与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$); ** 代表与对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$)。
Note: * indicate significant difference among different treatments at 0.05 level; ** indicate extremely significant difference among different treatments at 0.01 level.

图 2 PEG 胁迫处理下浙春 3 号和 ZC-2 的生理指标变化

Fig. 2 Effects of drought stress on physiological indicators of Zhechun 3 and ZC-2

2.3 转录组数据质量分析

转录组测序共生成了 18 个 cDNA 文库,每个 cDNA 文库的数据量(总碱基数)为 5.69 ~ 6.31 G, Q20 碱基含量为 97.50% ~ 97.71%, Q30 碱基含量

为 92.83% ~ 93.27%, GC 含量为 44.39% ~ 44.90%, 各样本测序数据质量良好。将过滤所得的 Clean reads 与参考基因组比对,各样本可以比对到基因组上的有效 Reads 占比 96.82% 以上(表 2)。

表 2 转录组测序质量及参考基因组比对统计表

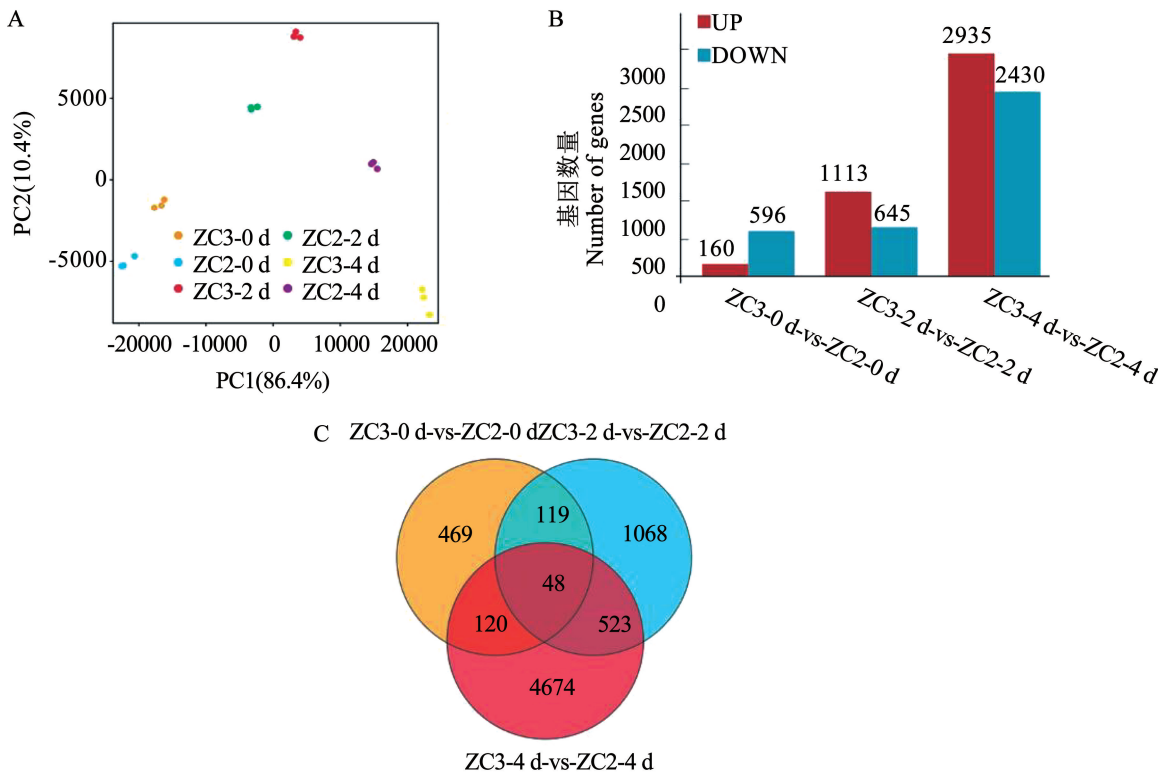
Table 2 List of quality of RNA-Seq raw data and mapping results

样品 Sample	原始数据 Raw data/bp	过滤后数据 Clean data/bp	Q20/%	Q30/%	GC 含量 GC content/%	比对率 Total mapped/%
ZC3-0d	5694605400	5628404640	97.56	93.04	44.84	96.87
ZC2-0d	6191342500	6120610264	97.57	93.02	44.90	96.97
ZC3-2d	6312465800	6242851123	97.52	92.90	44.39	97.18
ZC2-2d	5952156100	5885061065	97.71	93.27	44.57	97.37
ZC3-4d	5773959500	5711489565	97.66	93.16	44.41	96.82
ZC2-4d	5910547900	5849559183	97.50	92.83	44.56	96.93

2.4 差异表达基因筛选

对浙春 3 号与 ZC-2 的转录组数据进行比较分析。主成分分析显示,主要成分 PC1 和 PC2 分别占总变异的 86.4% 和 10.4%,不同处理时间点下浙春 3 号和 ZC-2 可清晰区分,表明干旱胁迫下两品种之间的基因表达存在差异(图 3A);样品的 3 个生物学重复聚集在一起,表明试验样品重复性较好。比较差异表达基因数量表明,在 $FDR \leq 0.05$ 且 $|\log_2 \text{FoldChange}| \geq 1$ 的筛选条件下,ZC-2 与浙春 3 号相

比共获得差异表达基因(DEGs)7 879 个,其中上调表达基因 4 208 个,下调表达基因 3 671 个(图 3B)。干旱处理第 2 天获得的差异表达基因共有 1 758 个,第 4 天获得差异表达基因 5 365 个。Venn 图分析表明,1 068 个基因仅在处理第 2 天有差异表达,4 674 个基因仅在第 4 天有差异表达;3 个处理时间点共同表达的 DEGs 有 48 个,胁迫处理第 2 天和第 4 天共同表达的差异基因 571 个(图 3C)。



注:A.主成分分析散点图;B.差异表达基因(DEGs)的数量柱状图;C.韦恩图。
Note: A. Principal component analysis scatterplot; B. Histogram of the number of differentially expressed genes; C. Venn.

图 3 浙春 3 号和 ZC-2 的转录组差异分析图

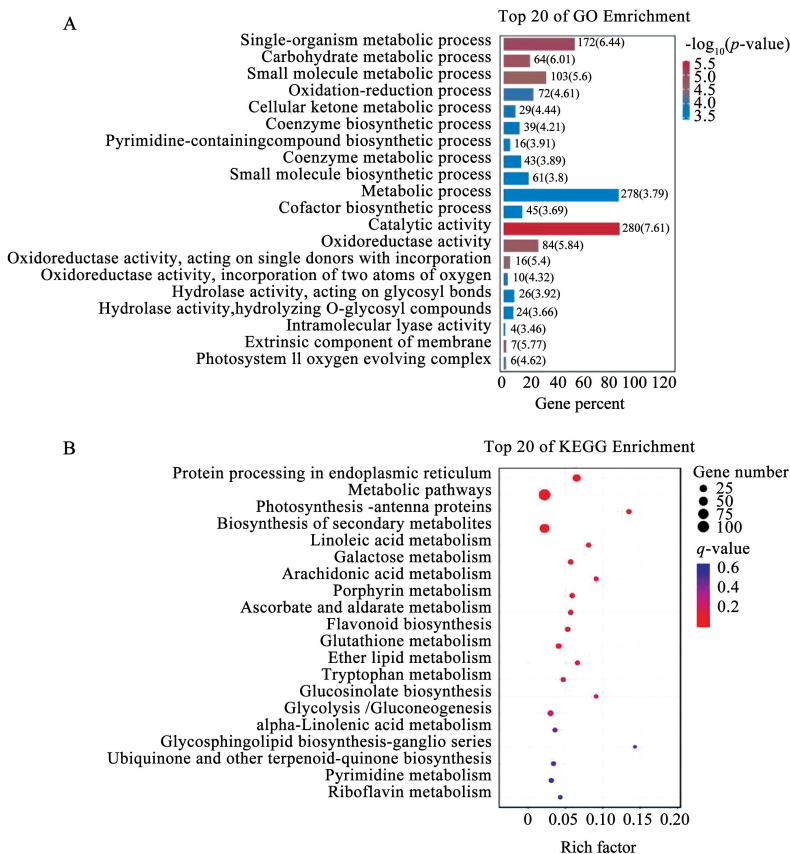
Fig. 3 Transcriptome analysis of Zhechun 3 and ZC-2

2.5 差异表达基因 GO 和 KEGG 富集

对浙春 3 号和 ZC-2 在胁迫处理 2 和 4 d 共同表达的 571 个差异表达基因进行 GO 和 KEGG 富集分析结果如图 4 所示,GO 聚类分析图表明差异表达基因显著富集在细胞组分、分子功能、生物过程中的 47 个亚类,其中细胞组分(GO:0005575)13 个、分子功能(GO:0003674)13 个、生物过程(GO:0008150)21 个。富集前 20 的 GO 条目中位于前 5 的 GO 项为:催化活性(GO:0003824),单一有机体过程(GO:0044699),碳水化合物代谢过程(GO:0005975),氧化还原酶活性(GO:0016491)以及小分子代谢过程(GO:0044281)(图 4A)。

KEGG 富集分析表明,浙春 3 号和 ZC-2 的 571 个 DEGs 共参与了 84 条代谢途径,其中参与次生代谢物生物合成(Biosynthesis of secondary metabolites)

和代谢途径(Metabolic pathways)的基因分别有 105 个和 60 个,参与内质网中的蛋白质加工通路(Protein processing in endoplasmic reticulum)的 DEGs 有 28 个,糖酵解/糖原异生信号通路(Glycolysis/Gluconeogenesis)的 DEGs 有 9 个,半乳糖代谢(Galactose metabolism)的 DEGs 有 8 个,淀粉和蔗糖代谢通路(Starch and sucrose metabolism)的 DEGs 有 8 个。富集前 20 的代谢途径途径中显著富集的代谢通路包括:光合作用-天线蛋白通路(Photosynthesis-antenna proteins)、抗坏血酸和醛酸代谢(Ascorbate and aldarate metabolism)、谷胱甘肽的代谢(Glutathione metabolism)和类黄酮的生物合成(Flavonoid biosynthesis)等通路(图 4B)。这些结果表明,PEG 胁迫处理影响了大豆苗期的基础代谢过程,其中包括光合作用和糖代谢等多个通路。



注:A. 富集前 20 位的 GO 分类图;B. 富集前 20 位的 KEGG 气泡图。
Note: A. GO ontology classification of the top 20; B. KEGGs enrichment bubble plots of the top 20.

图 4 浙春 3 号和 ZC-2 之间差异表达基因的 GO 功能分类图和 KEGG 富集分析图

Fig. 4 GO ontology classification and KEGGs enrichment analysis of differentially expressed genes between Zhechun 3 and ZC-2

2.6 干旱胁迫下差异表达基因的筛选

为了挖掘参与抗旱胁迫相关基因,对光合作用-天线蛋白和糖代谢相关途径涉及的基因进行热图分析,结果如图 5 所示,包括葡萄糖-6-磷酸/磷酸转运体(GPT)、半乳糖异构酶(Galm)、β-葡萄糖苷酶(BGLU)、捕光叶绿素 a/b 结合蛋白(LHCB)、叶绿

素 a/b 结合蛋白(CAB)等编码基因在亲本与突变体中基因表达量差异显著。同时,在差异表达基因中还筛选出一些与逆境胁迫相关的基因,包括木葡聚糖内糖基水解酶/转移酶(XTH)、脱水应答蛋白 22(RD22)、质膜蛋白(PM19L)和转录因子 TIFY、ZAT 等可能与突变体耐旱性强相关。

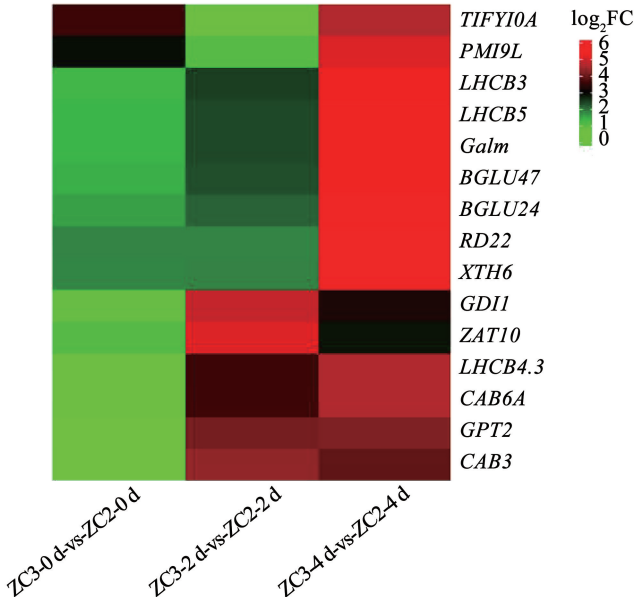


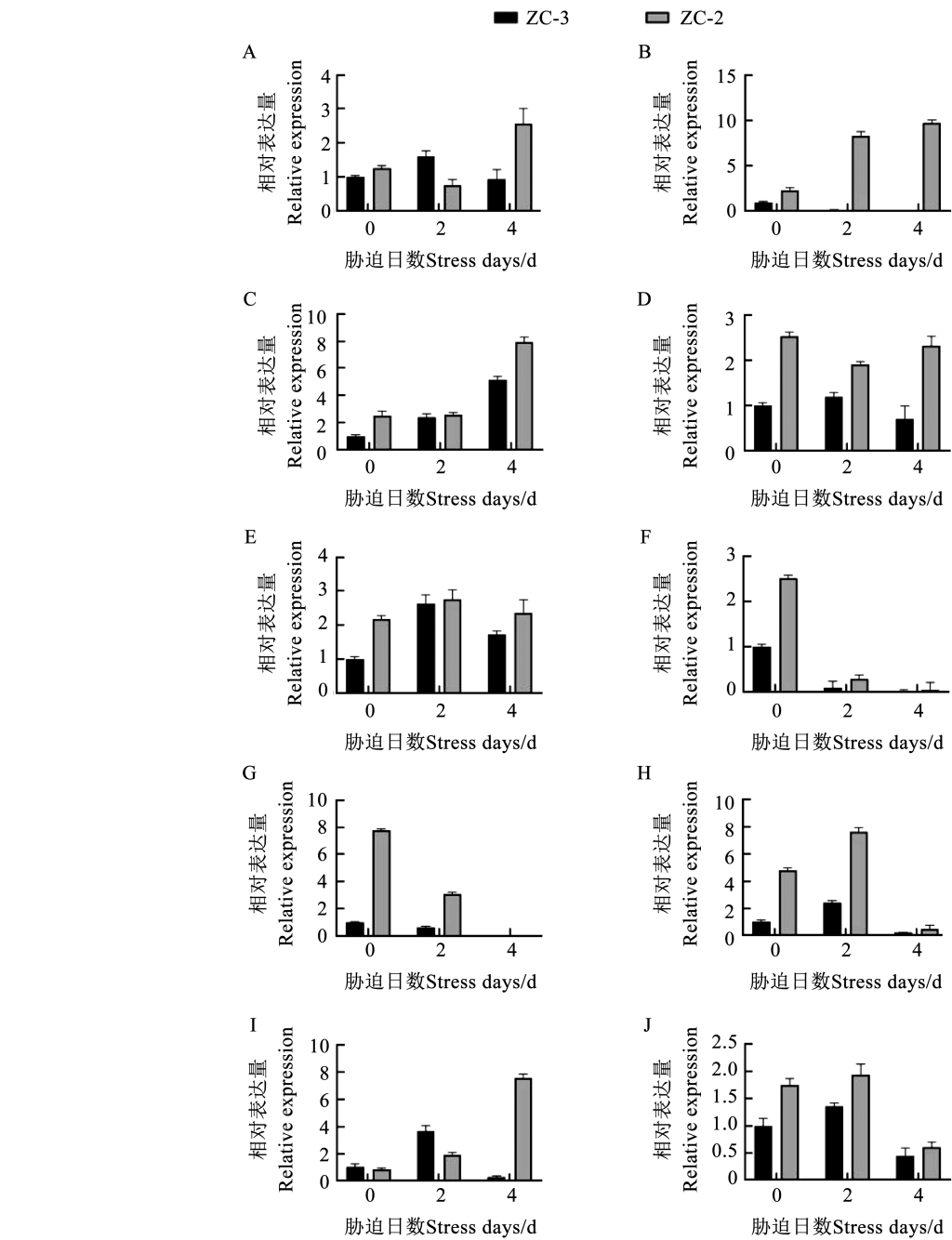
图 5 干旱胁迫相关基因热图

Fig. 5 Heatmaps of genes related to drought stress

2.7 差异表达基因定量 PCR 分析

为了进一步筛选出导致亲本浙春 3 号与突变体 ZC-2 产生耐旱表型差异的关键基因,挑选 10 个差异表达基因进行相对表达量的测定,其中包括光合作用通路相关基因 *LHCB5* (*Glyma. 09G154700*)、*LHCB3*(*Glyma. 13G282000*)、*CAB3* (*Glyma. 16G165200*)和糖类代谢通路相关基因 *Galm*(*Glyma. 06G191500*)、

GPT2(*Glyma. 15G105900*),以及 5 个与逆境胁迫相关的基因 *XTH6* (*Glyma. 11G044800*)、*RD22* (*Glyma. 04G180400*)、*TIFY10A* (*Glyma. 15G179600*)、*PM19L* (*Glyma. 10G205900*)和 *ZAT10* (*Glyma. 06G045400*)。这些基因的差异表达暗示它们在大豆苗期抵抗干旱胁迫过程中可能发挥一定响应或调控作用(图 6)。



注:A~J 分别为 *Galm*、*GPT2*、*CAB3*、*LHCB3*、*LHCB5*、*TIFY10A*、*PM19L*、*ZAT10*、*XTH6* 和 *RD22*。

Note: A-J indicate *Galm*, *GPT2*, *CAB3*, *LHCB3*, *LHCB5*, *TIFY10A*, *PM19L*, *ZAT10*, *XTH6* and *RD22* respectively.

图 6 干旱胁迫下差异表达基因定量 PCR 分析
Fig. 6 Quantitative PCR analysis of differentially expressed genes under drought stress

3 讨论

干旱胁迫会影响大豆的生长发育,使大豆株高和茎粗降低,茎、叶质量减少^[23]。本研究选择了耐旱性不同的大豆材料浙春3号及其突变体ZC-2,根据苗期耐旱性表型的鉴定,判断ZC-2的耐旱性强于浙春3号。在PEG胁迫处理0~3 d,ZC-2的冠鲜重与冠干重增长幅度均高于浙春3号,并且在处理3 d后,浙春3号冠鲜重下降更多,表明亲本浙春3号受胁迫失水更多。大豆在遭受干旱胁迫时,会产生大量的活性氧自由基,导致细胞膜生理功能受损^[24]。为了维持植物的正常代谢,植物通过积累渗透调节物质,维持细胞膨压,以缓解干旱胁迫对植物正常代谢的潜在有害影响^[25]。本研究中PEG模拟干旱胁迫后叶片的相对电导率和丙二醛含量增加,并且浙春3号的相对电导率和丙二醛含量在第4 d均显著高于ZC-2,结果也说明浙春3号叶片的质膜受到的胁迫损伤更严重。

本研究发现,突变体ZC-2中可溶性糖含量在干旱胁迫4 d积累量显著多于浙春3号,这与贾斯淳等^[23]报道的缺水条件时,抗旱性强的大豆可溶性糖和还原性糖含量增加显著高于抗旱性差的品种结果一致。通过对浙春3号和ZC-2的转录组数据分析发现,富集在ZC-2中淀粉和蔗糖代谢以及半乳糖代谢相关通路的一些DEGs表达量比浙春3号高,包括半乳糖异构酶和葡萄糖-6-磷酸/磷酸转运体的编码基因(*Galm*、*GPT2*)。在半乳糖代谢途径中,D-半乳糖通过Leloir途径产生更有利于代谢利用的D-葡萄糖-1-磷酸,*Galm*是该过程第一步需要的酶,在半乳糖代谢途径有着重要作用^[26]。杨海鹏等^[27]研究表明,*Galm*参与了玉米在高温胁迫下的半乳糖代谢途径,可以催化D-半乳糖转化为 α -D-半乳糖。*GPT2*编码质体葡萄糖-6-磷酸转运体(*Glucose-6-phosphate/phosphate translocator*, *GPTs*)。Dyson等^[28]研究表明,*GPT2*活性会促进葡萄糖-6-磷酸从细胞质进入到叶绿体中,从而增加淀粉的合成,导致野生型拟南芥在强光照下积累的淀粉比基因敲除株系*gpt2.2*多,表明*GPT2*在叶绿体和细胞质之间的物质传递和信号传导中起着一定作用。推测ZC-2中这些基因的表达量上升可能促进了PEG胁迫下可溶性糖的积累。

最大光化学效率(F_v/F_m)代表了植物光合机构最大光能转化效率,可以体现植株叶片的光合能力与PSII受伤害的程度^[29]。在干旱胁迫第4天,ZC-2的 F_v/F_m 值显著大于浙春3号,表明ZC-2在受胁迫下光合能力大于浙春3号。光合作用过程中,同

化CO₂的能量来源是光反应产生的ATP,捕光叶绿素a/b结合蛋白(LHCB, light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein)是获取光能的关键^[30]。LHCB蛋白作为光系统II中丰度极高的一类膜蛋白,与耐逆性密切相关^[29]。Xu等^[31]研究发现,LHCB亚家族的任何成员受损都可导致拟南芥对干旱胁迫的耐受性降低。本研究中,KEGG通路分析发现参与光合作用-天线蛋白通路的差异表达基因*LHCB3*、*LHCB5*和*CAB3*在ZC-2胁迫处理第4天大量富集,荧光定量PCR结果也验证了这些基因在ZC-2中相对表达量比浙春3号高,这些基因的表达可能影响了ATP的合成,进而使得同化CO₂的效率以及生物量的积累产生差异,和表型及生理变化相互印证。

本研究还通过荧光定量PCR验证了一些与逆境胁迫相关基因的表达量。木葡聚糖内糖基水解酶/转移酶(XTH)属于碳水化合物活性酶糖苷水解酶的GH16亚家族,可以调控细胞壁松弛和细胞生长^[32]。有研究表明,苹果中*MdXTH6*和*MdXTH24*共同响应干旱和水杨酸的表达,在大豆中过表达*GmXTH1*基因株系抗旱性较野生型增强^[33-34]。脱水应答蛋白22(RD22)是BURP蛋白家族中的一个亚族^[35],已有研究表明大豆中*GmRD22*的启动子区含ABA应答元件ABRE,其表达对ABA和渗透胁迫有明显响应,在拟南芥和水稻中过表达*GmRD22*可提高植株耐盐性及抗旱性^[35-36]。TIFY基因家族是一类植物特异性蛋白家族,其特征是含有高度保守的TIF[F/Y]XG氨基酸基序,这个家族共有TIFY、JAZ、PPD、ZML 4个亚家族^[37]。研究表明,过表达水稻*OsTIFY11a*和棉花*GaJAZ5*基因可显著提高植株对干旱胁迫的耐受性^[38-39]。本研究还鉴定到了1个*PM19L*基因,*PM19L*是编码AWPM-19家族蛋白的成员之一,该家族蛋白与植物胚发育、种子萌发、休眠以及对干旱等环境胁迫都有响应^[40]。有研究表明,*OsPM1*编码水稻AWPM-19蛋白,负责ABA向胞内转运过程,该基因的表达受AREB/ABF家族转录因子*OsZIP46*的调控,在相同水分胁迫条件下,*OsPM1*过表达系的存活率远高于野生型,而RNAi系的存活率低于野生型,表明*OsPM1*在干旱响应中起重要作用^[41]。ZAT是一种C₂H₂锌指转录因子,在拟南芥中*ZAT10*的表达可提高活性氧防御物质的表达,增强植物对盐、热和渗透胁迫的耐受性^[42]。Xiao等^[43]利用启动子*Actin1*和水稻*HVA22*同源物的胁迫诱导启动子驱动*ZAT10*基因转化到水稻中,并在田间条件下进行耐旱性试验,结果表明*HVA22P::ZAT10*单株产量显著高于WT,表明田间条件下*ZAT10*在提高转基因水稻耐旱性方面的

效果较好。本研究中鉴定到的 *TIFY10A*、*ZAT10*、*RD22* 和 *PMI9L* 基因在 *ZC-2* 胁迫过程中相对表达量均高于浙春 3 号, *XTH6* 基因在 *ZC-2* 胁迫第 4 天的相对表达量显著高于浙春 3 号, 以上这些基因可能是导致大豆突变体 *ZC-2* 在短时间内能够抵抗逆境胁迫的重要原因, 有关大豆苗期的耐旱分子机制还有待进一步研究。

4 结论

本研究选择了耐旱性不同的大豆材料浙春 3 号及其突变体 *ZC-2*, 根据苗期耐旱性表型的鉴定以及相关生理指标的测定, 推断 *ZC-2* 的耐旱性强于浙春 3 号。在干旱胁迫下, *ZC-2* 的相对含水量、*Fv/Fm* 值、可溶性糖和可溶性蛋白含量大于浙春 3 号, 相对电导率、丙二醛(MDA)小于浙春 3 号, 表明 *ZC-2* 抗旱性更强。同时, 利用转录组测序技术比较分析了这两个大豆品种在苗期对干旱胁迫的响应机制, 通过差异基因分析和 KEGG 分析确定了两品种间差异表达基因和相关富集通路, 差异基因主要富集在光合作用-天线蛋白、半乳糖代谢、内质网中的蛋白质加工和类黄酮生物合成等通路。进一步筛选到光合作用和糖代谢相关通路基因以及可能与干旱胁迫相关的基因, 包括 *TIFY10A*、*ZAT10*、*RD22*、*PMI9L* 和 *XTH6* 等, 对这些差异基因的功能验证和研究有助于深入理解大豆苗期的抗旱机制。

参考文献

[1] 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.)

[2] 李博书, 陈晶, 杨亮, 等. 干旱胁迫对不同生育时期大豆叶片抗氧化酶活性的影响[J]. 大豆科技, 2022(3): 12-17. (LI B S, CHEN J, YANG L, et al. Effects of drought stress on antioxidant enzymes activities in soybean leaves at different growth stages[J]. Soybean Science & Technology, 2022(3): 12-17.)

[3] 赵兴震, 徐江源, 于莉莉, 等. 大豆种质田间耐旱性评价及优异种质筛选[J]. 大豆科学, 2020, 39(6): 825-832. (ZHAO X Z, XU J Y, YU L L, et al. Field drought tolerance evaluation and excellent germplasm identification of soybean germplasm[J]. Soybean Science, 2020, 39(6): 825-832.)

[4] NABI R B S, TAYADE R, HUSSAIN A, et al. A novel *DUF569* gene is a positive regulator of the drought stress response in *Arabidopsis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(10): 5316.

[5] GONG L, ZHANG H, LIU X, et al. Ectopic expression of *HaNAC1*, an ATAF transcription factor from *Haloxylon ammodendron*, improves growth and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 2020, 151:

535-544.

[6] WANG X, WU Z, ZHOU Q, et al. Physiological response of soybean plants to water deficit [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 12: 809692.

[7] 郭数进, 杨凯敏, 霍瑾, 等. 干旱胁迫对大豆鼓粒期叶片光合能力和根系生长的影响[J]. 应用生态学报, 2015, 26(5): 1419-1425. (GUO S J, YANG K M, HUO J, et al. Influence of drought on leaf photosynthetic capacity and root growth of soybeans at grain filling stage [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(5): 1419-1425.)

[8] XUAN H, HUANG Y, ZHOU L, et al. Key soybean seedlings drought-responsive genes and pathways revealed by comparative transcriptome analyses of two cultivars[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2893.

[9] LÓPEZ-CORDOVA A, RAMÍREZ-MEDINA H, SILVA-MARTINEZ G A, et al. *LEA13* and *LEA30* are involved in tolerance to water stress and stomata density in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plants, 2021, 10(8): 1694.

[10] 张敏, 王学峰, 马利, 等. 蒙古沙冬青 *AmRD22* 基因的克隆及耐逆功能研究[J]. 西北植物学报, 2022, 42(7): 1083-1092. (ZHANG M, WANG X F, MA L, et al. Cloning of *AmRD22* gene from *Ammopiptanthus mongolicus* and its function in stress tolerance[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2022, 42(7): 1083-1092.)

[11] HOANG X L T, NHI D N H, THU N B A, et al. Transcription factors and their roles in signal transduction in plants under abiotic stresses[J]. Current Genomics, 2017, 18(6): 483-497.

[12] 张春兰, 曹帅, 满丽莉, 等. PEG 胁迫下两个大豆品种苗期的耐旱性与相关响应基因表达分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(18): 5891-5898. (ZHANG C L, CAO S, MAN L L, et al. Analysis of PEG stress on drought tolerance and related response genes expression in soybean seedlings of two varieties [J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(18): 5891-5898.)

[13] 张小芳, 乔亚科, 王冰冰, 等. 干旱胁迫下野生大豆 ABC 转运蛋白转录组测序分析[J]. 核农学报, 2019, 33(8): 1474-1482. (ZHANG X F, QIAO Y K, WANG B B, et al. Sequence analysis of ABC transporter transcriptome in wild soybean under the drought stress[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(8): 1474-1482.)

[14] LI M, LI H, SUN A, et al. Transcriptome analysis reveals key drought-stress-responsive genes in soybean [J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 1060529.

[15] YUAN F J, ZHAO H J, REN X L, et al. Generation and characterization of two novel low phytate mutations in soybean (*Glycine max* L. Merr.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115:945-957.

[16] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社, 1993. (ZHANG Z L. Plant physiology laboratory instruction (second edition) [M]. Beijing: Higher Education Press,1993.)

[17] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社, 2006. (GAO J F. Plant physiology laboratory instruction [M]. Beijing: Higher Education Press,2006.)

[18] LAZAREVIC'B, ŠATOVIE'Z, NIMAC2'A, et al. Application of phenotyping methods in detection of drought and salinity stress in

Basil (*Ocimum basilicum* L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 18:629441.

[19] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000. (LI H S. *Plant physiology biochemistry experiment principle and technology* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.)

[20] CHEN S, ZHOU Y, CHEN Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34 (17): i884-i890.

[21] MICHAEL I L, WOLFGANG H, SIMON A. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.

[22] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1):27-30.

[23] 贾斯淳, 王娜, 郝兴宇, 等. 不同干旱胁迫处理对大豆品种生长及逆境生理的影响[J]. *华北农业学报*, 2019, 34(5): 137-144. (JIA S C, WANG N, HAO X Y, et al. Effects of different drought stresses on growth and physiological properties of soybean [J]. *Acta Agriculture Boreali-Sinica*, 2019, 34(5):137-144.)

[24] 马春玲, 杨柳, 张鹏, 等. 植物耐旱基因工程的研究进展[J]. *现代化农业*, 2016(2):32-33. (MA C L, YANG L, ZHANG P, et al. Progress in genetic engineering of drought tolerance in plants [J]. *Modernizing Agriculture*, 2016(2):32-33.)

[25] 孙存华, 李扬, 贺鸿雁. 藜对干旱胁迫的生理生化反应[J]. *生态学报*, 2005, 25(10):2556-2561. (SUN C H, LI Y, HE H Y. Physiological and biochemical responses of chenopodium album to drought stresses [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(10): 2556-2561.)

[26] SCOTT A, TIMSON D J. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* galactose mutarotase/UDP-galactose 4-epimerase protein, Gal10p[J]. *FEMS Yeast Research*, 2007, 7(3):366-371.

[27] 杨海鹏, 曹丹, 刘小红, 等. 玉米半乳糖代谢相关酶蛋白基因的克隆及表达[J]. *种子*, 2021, 40(7):18-25. (YANG H P, CAO D, LIU X H, et al. Cloning and expression analysis of genes mediated galactose metabolism in maize[J]. *Seed*, 2021, 40(7): 18-25.)

[28] DYSON B C, ALLWOOD J W, FEIL R, et al. Acclimation of metabolism to light in *Arabidopsis thaliana*: the glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT2 directs metabolic acclimation [J]. *Plant Cell Environment*, 2015, 38 (7): 1404-1417.

[29] ZHANG Q, MA C, WANG X, et al. Genome-wide identification of the light-harvesting chlorophyll a/b binding (Lhc) family in *Gossypium hirsutum* reveals the influence of *GhLhcb2.3* on chlorophyll a synthesis[J]. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 2021, 23(5):831-842.

[30] JANSSON S. A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*[J]. *Trends in Plant Science*, 1999, 4(6):236-240.

[31] XU Y H, RUI L Y, LIU Z Q, et al. Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63 (3):1095-1106.

[32] FENG S, CHEN Y, YANG F, et al. Development of a clickable probe for profiling of protein Glutathionylation in the central cellular metabolism of *E. coli* and *Drosophila*[J]. *Chemistry and Biology*, 2015, 22(11):1461-1469.

[33] 龙晓刚. 不同品种苹果果实细胞形态及发育相关基因 *MdXTH* 的鉴定分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2018. (LONG X G. Identification and analysis of different cultivars of apple fruit cell morphology and XTH gene related to development [D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2018.)

[34] 张野, 张瀚竹, 杜叶垚, 等. 过表达 *GmXTH1* 基因大豆对干旱胁迫的生理生化响应[J]. *大豆科学*, 2021, 40(3):327-333. (ZHANG Y, ZHANG H Z, DU Y Y, et al. Physiological and biochemical responses of *GmXTH1* overexpression soybean to drought stress at seedling stage[J]. *Soybean Science*, 2021, 40 (3): 327-333.)

[35] XU H, LI Y, YAN Y, et al. Genome-scale identification of soybean BURP domain-containing genes and their expression under stress treatments[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10:197.

[36] WANG H, ZHOU L, FU Y, et al. Expression of an apoplast-localized BURP-domain protein from soybean (*GmRD22*) enhances tolerance towards abiotic stress [J]. *Plant Cell and Environment*, 2012, 35(11): 1932-1947.

[37] BAI Y, MENG Y, HUANG D, et al. Origin and evolutionary analysis of the plant-specific TIFY transcription factor family[J]. *Genomics*, 2011, 98(2): 128-136.

[38] YE H, DU H, TANG N, et al. Identification and expression profiling analysis of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 71(3): 291-305.

[39] ZHAO G, SONG Y, WANG C, et al. Genome-wide identification and functional analysis of the TIFY gene family in response to drought in cotton[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291(6): 2173-2187.

[40] RANFORD J C, BRYCE J H, MORRIS P C. PM19, a barley (*Hordeum vulgare* L.) gene encoding a putative plasma membrane protein, is expressed during embryo development and dormancy [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(366): 147-148.

[41] YAO L, CHENG X, GU Z, et al. The AWPM-19 family protein OsPM1 mediates abscisic acid influx and drought response in rice [J]. *The Plant Cell*, 2018, 30:1258-1276.

[42] SAKAMOTO H, ARAKI T, MESHI T, et al. Expression of a subset of the *Arabidopsis* Cys₂/His₂-type zinc-finger protein gene family under water stress[J]. *Gene*, 2000, 248:23-32.

[43] XIAO B Z, CHEN X, XIANG C B, et al. Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions[J]. *Molecular Plant*, 2009, 2:73-83.