



# 外源硅对逆境胁迫下大豆抗逆相关转录因子表达的影响

李换丽,马燕斌,罗晓丽,吴霞,王新胜

(山西省农业科学院 棉花研究所,山西 运城 044000)

**摘要:**为探究外源硅对逆境胁迫下大豆转录因子的表达模式,分析大豆晋豆 37 号幼苗在盐、干旱胁迫和外源硅作用下 NAC 家族 GmNAC2、GmNAC3、GmNAC4、GmNAC5 以及 WRKY 家族 GmWRKY1、GmWRKY25、GmWRKY38、GmWRKY54 转录因子的表达情况。结果表明:在盐、干旱逆境胁迫下,大豆植株生长受抑制,与对照相比,逆境胁迫下的植株鲜重、干重、株高、叶片数、叶片相对含水量均不同程度下降,而加入外源硅后这些指标较单独胁迫明显升高。NAC 家族和 WRKY 家族的 8 个转录因子在大豆叶、茎和根系均有表达,在盐、干旱胁迫下,GmNAC2、GmNAC3、GmNAC4、GmNAC5 以及 GmWRKY1、GmWRKY25、GmWRKY38、GmWRKY54 的表达量明显低于对照,而在胁迫下加入外源硅后其表达量明显比单独胁迫高,且随逆境胁迫时间延长,转录因子的表达量变化趋势基本一致,不同处理时间单独施加硅处理和对照无显著差异。说明外源硅能够在盐、干旱逆境胁迫下影响大豆相关转录因子的表达。

**关键词:**大豆;外源硅;盐;干旱;NAC 家族转录因子;WRKY 家族转录因子

## The Effect of Exogenous Silicon on Expression of Stress Related Transcription Factors in Soybean Under Adverse Stress

LI Huan-li, MA Yan-bin, LUO Xiao-li, WU Xia, WANG Xin-sheng

(Institute of Cotton, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, China)

**Abstract:** In order to explore the expression analysis of exogenous silicon on soybean transcription factors under adverse stress, this study analyzed the expression of GmNAC2, GmNAC3, GmNAC4, GmNAC5 from NAC transcription factors family and GmWRKY1, GmWRKY25, GmWRKY38, and GmWRKY54 from WRKY family in Jindou 37 soybean seedlings under salt, drought stress and exogenous silicon treatment. The results showed that soybean plant growth was inhibited under salt and drought stress. Compared with the control group, the fresh weight, dry weight, plant height, leaf number and relative water content under stress decreased to different degree, while the addition of exogenous silicon under stress increased significantly compared with the stress alone. The eight transcription factors were all expressed in soybean leaves, stems and roots. Under salt and drought stress, the expression of GmNAC2, GmNAC3, GmNAC4, GmNAC5 and GmWRKY1, GmWRKY25, GmWRKY38, GmWRKY54 was significantly lower than the amount of control, while the expression along with the exogenous silicon under stress was significantly higher than the single stress value, and with prolonged adversity stress, the expression of transcription factor quantity trends were basically identical. There was no significant difference between silicon alone treatment and the control treatment during the different time in the experiment. It is suggested that exogenous silicon can affect the expression of related transcription factors under salt and drought stress.

**Keywords:** Soybean; Exogenous silicon; Salt; Drought; NAC transcription factors; WRKY transcription factors

大豆[*Glycine max*(L.)Merrill]是中国主要的粮油兼饲料作物。但是土壤盐渍化和干旱等逆境胁迫已经成为限制大豆产量和品质的主要因素。硅作为地壳中第二大元素,在改善植物生长和品质方面起着至关重要的作用。大量研究表明,外源硅能够增强植物在逆境胁迫下的抗性<sup>[1]</sup>。目前对积累硅较多的单子叶植物,如水稻<sup>[2]</sup>、高粱<sup>[3]</sup>、小麦<sup>[4-5]</sup>、大麦<sup>[6]</sup>等抗逆机理研究的较多,而对于吸收硅较少的双子叶植物研究甚少。大豆作为主要的双子叶

植物,关于外源硅对大豆抗逆性的研究主要集中在生理生化方面,例如在干旱胁迫下,外源硅能够通过一定程度上增强大豆幼苗的新陈代谢和渗透调节能力,从而提高其抗旱能力<sup>[7-8]</sup>;在遮阴及弱光下,外源硅能够明显促进大豆生长<sup>[9]</sup>;在盐胁迫下,外源硅能够通过提高光合作用和降低叶片中的丙二醛含量及抗氧化酶活性增强大豆的抗逆性<sup>[10]</sup>。

研究发现,植物转录因子参与逆境胁迫的应答<sup>[11-12]</sup>。NAC 家族和 WRKY 家族是植物特有的两

收稿日期:2019-12-05

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08010-003);山西省农业科学院优势课题(YYS1710)。

第一作者简介:李换丽(1989-),女,硕士,助研,主要从事植物基因功能研究。E-mail: 719992362@qq.com。

通讯作者:马燕斌(1978-),男,博士,副研究员,主要从事植物基因功能研究。E-mail:mybin-wx@163.com。

个庞大的基因家族。在植物遭受各种逆境胁迫时诱导表达。目前关于 GmNAC 和 GmWRKY 的研究主要集中在抗逆分子机理、基因功能等方面。Le 等<sup>[13]</sup>研究发现大豆中有 152 个 NAC 转录因子,实时定量结果发现多数转录因子的表达量在脱水处理后发生变化。Pinheiro 等<sup>[14]</sup>发现多数 NAC 转录因子在植物体内的表达受高盐、寒冷等因素的影响。此外,大豆的不同组织、发育阶段的 NAC 转录因子的表达量不同,同一转录因子在不同的干旱处理下表达量也不同<sup>[15]</sup>。Schmutz 等<sup>[16]</sup>研究发现大豆中有 197 个 WRKY 转录因子的基因序列被检测到,多数基因在大豆逆境胁迫中起着重要的作用。Yu 等<sup>[17]</sup>发现 *GmWRKY20*、*GmWRKY47*、*GmWRKY71*、*GmWRKY76* 等参与盐胁迫的应答。过表达 *GmWRKY12* 的毛状根其抗旱性和耐盐性增强<sup>[18]</sup>。而关于外源硅对大豆逆境胁迫下转录因子的表达模式研究未见报道。

大豆 NAC 和 WRKY 家族转录因子在逆境胁迫中的作用一直是研究的热点。目前 NAC 家族 *GmNAC2*、*GmNAC3*、*GmNAC4*、*GmNAC5* 的生物学功能研究甚少,同时对于 WRKY 家族 *GmWRKY1*、*GmWRKY25*、*GmWRKY38* 的生物学功能及组织特异性分析未见报道,而研究发现,外源硅能够在一定程度上提高大豆的抗逆性。本研究通过外源硅对大豆幼苗在盐、干旱胁迫下 NAC 家族 *GmNAC2*、*GmNAC3*、*GmNAC4*、*GmNAC5* 以及 WRKY 家族 *GmWRKY1*、*GmWRKY25*、*GmWRKY38*、*GmWRKY54* 转录因子编码基因的表达模式进行分析,为进一步研究外源硅对大豆逆境胁迫的缓解机制及 NAC、WRKY 家族基因的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试大豆品种为晋豆 37 号,由山西省农业科学院提供。

### 1.2 试验设计

于 2018 年 12 月在山西省农业科学院棉花研究所温室(温度 15~28℃,自然光照)培养大豆植株。待大豆幼苗 3~4 片真叶时进行不同试验处理。

其中盐胁迫试验设置 4 个处理:CK(对照)、Si(2.0 mmol·L<sup>-1</sup>Si)、Na(150 mmol·L<sup>-1</sup>NaCl)、Na + Si(150 mmol·L<sup>-1</sup>NaCl + 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>Si)。干旱胁迫试验设置 4 个处理:CK(对照)、Si(2.0 mmol·L<sup>-1</sup>Si)、PEG(20% PEG6000)、PEG + Si(20% PEG6000 + 2.0 mmol·L<sup>-1</sup>Si)。

整个试验过程采用基质培养。期间浇灌 1/2

Hoagland 营养液。其中外源硅由 Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O 提供,用稀硫酸调节营养液 pH6.0~6.5。每 3 d 浇灌 1 次处理营养液,以每次完全从花盆底部渗出为准。对各处理 7 d 的生长指标(植株鲜重、干重、株高、叶片数、叶片相对含水量)进行测定,其中叶片数为植株剩余的叶片数;植株干鲜重、植株高度均为 6 个生物学重复,叶片相对含水量 3 个生物学重复。同时用液氮取对照叶、茎和根 3 个组织部位,每个组织 3 个生物学重复,-80℃保存,用于后期对不同组织部位的 NAC 和 WRKY 家族相关转录因子的表达量进行分析。此外分别取各处理 1、3 和 5 d 的大豆鲜样叶片组织,每个处理 3 个生物学重复,提取 RNA,研究外源硅对逆境胁迫下大豆转录因子表达情况的影响。

### 1.3 测定项目与方法

1.3.1 生物量的测定 用蒸馏水快速清洗大豆植株 3 次,擦干后快速称量鲜重,然后放入烘箱中 105℃杀青 15 min 后于 75℃下烘干至恒重,称量干重。

1.3.2 叶片相对含水量的测定 参考 Gong 等<sup>[19]</sup>方法,采用快速称重法。首先快速清洗大豆完全展开的第二片功能叶,擦干后称量,即为鲜重(FW);然后置于含有蒸馏水的黑暗环境,吸水饱和,称量即为饱和重(SW);最后将其放入烘箱杀青并烘干,称量即为干重(DW)。叶片相对含水量 RWC(%) = (FW - DW)/(SW - DW) × 100。

1.3.3 大豆 NAC 和 WRKY 家族转录因子编码基因的组织特异性表达分析 利用 RNA 试剂盒(TIANGEN,DP432)提取总 RNA。取 2 μg RNA 模板,利用反转录试剂盒(TaKaRa,RR047A)进行反转录。从 NCBI 查找大豆 NAC 和 WRKY 家族相关转录因子的序列,用 Primer 5.0 软件设计特异性引物,由北京奥科生物公司合成引物。其中 *GmNAC2*、*GmNAC3*、*GmNAC4*、*GmNAC5*、*GmWRKY1*、*GmWRKY25*、*GmWRKY38* 和 *GmWRKY54* 的引物序列见表 1。用内参基因 *Actin* 作为对照。使用荧光染料(TaKaRa)和 Real-Time PCR 仪(Bio-Rad, iQ5)进行荧光定量 PCR。PCR 体系 20 μL,其中 cDNA 溶液 1 μL,正向和反向引物各 0.4 μL,SYBR Premix Ex TaqII 10 μL,ddH<sub>2</sub>O 8.2 μL。

### 1.4 数据分析

用 Excel 2003 整理数据,利用 SPSS 19.0 统计分析,采用最小显著极差法(LSD)进行差异显著性检测( $P < 0.05$ )。荧光定量 PCR 数据为相对定量法获得,采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法分析计算<sup>[20]</sup>。其中 CT 是实时定量反应中的临界循环次数,ΔCT 是目的基因与内参基因 CT 值的差。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列  
Table 1 Primer sequence for real-time PCR

| 基因<br>Gene      | 引物序列<br>Primer sequence  |
|-----------------|--------------------------|
| <i>GmNAC2</i>   | F:TGTACTGCCCCAACAAAGTCC  |
|                 | R:GTGGTCGCATGGTGAGTCAG   |
| <i>GmNAC3</i>   | F:TGGATGCACCTTTGGAGGAG   |
|                 | R:CTGAGCCCCGCTAACAAATCGG |
| <i>GmNAC4</i>   | F:AGACGCAAGGCATGGTGAA    |
|                 | R:CTGGACCCGTTGGTTTCTCA   |
| <i>GmNAC5</i>   | F:TGGCAACAACACCAAAGCAC   |
|                 | R:CCTGAAGTTGAACCCCTGA    |
| <i>GmWRKY1</i>  | F:TCCACCCTCAGCCATAGTCA   |
|                 | R:ATGGTGCAGAGTTGAGAGC    |
| <i>GmWRKY25</i> | F:AAAGGCCAAGCCTGAAAGGT   |
|                 | R:TCTCCACCGGTACCCATCAT   |
| <i>GmWRKY38</i> | F:CCAGTCTCTGGCTTCTTCTC   |
|                 | R:GGCAGTGACAGCAACAACGC   |
| <i>GmWRKY54</i> | F:GTACGGTCAAAAGGCCGTGA   |
|                 | R:AGAGACAACCTGAGCGAGGC   |

F:正向引物; R:反向引物。  
F: Forward primer; R: Reverse primer.

表 2 外源硅对盐、干旱胁迫下大豆幼苗生长指标的影响

Table 2 Effect of exogenous silicon on the growth of soybean seedlings under salt and drought stress

| 处理<br>Treatment        |          | 单株鲜重<br>Fresh weight per plant/g | 单株干重<br>Dry weight per plant/g | 株高<br>Plant height/cm | 叶片数<br>Leaf number | 叶片相对含水量<br>Relative water content of leaf/% |
|------------------------|----------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------|---|
| 盐胁迫<br>Salt stress     | CK       | 2. 871 ± 0. 042 a                | 0. 251 ± 0. 003 b              | 44. 81 ± 0. 42 a      | 10. 5 ± 0. 7 a     | 91. 81 ± 1. 88 a                            |
|                        | Si       | 2. 892 ± 0. 014 a                | 0. 275 ± 0. 007 a              | 44. 75 ± 0. 35 a      | 10. 6 ± 0. 8 a     | 91. 56 ± 2. 62 a                            |
|                        | Na       | 1. 334 ± 0. 028 c                | 0. 125 ± 0. 005 d              | 31. 71 ± 0. 72 c      | 3. 5 ± 0. 3 c      | 63. 06 ± 3. 37 c                            |
|                        | Na + Si  | 1. 915 ± 0. 021 b                | 0. 171 ± 0. 014 c              | 35. 35 ± 0. 21 b      | 8. 1 ± 0. 5 b      | 79. 55 ± 3. 94 b                            |
| 干旱胁迫<br>Drought stress | CK       | 2. 883 ± 0. 051 a                | 0. 265 ± 0. 012 a              | 45. 21 ± 0. 34 a      | 10. 5 ± 0. 5 a     | 89. 04 ± 0. 89 a                            |
|                        | Si       | 2. 886 ± 0. 048 a                | 0. 267 ± 0. 013 a              | 45. 31 ± 0. 45 a      | 10. 5 ± 0. 7 a     | 90. 49 ± 2. 89 a                            |
|                        | PEG      | 1. 221 ± 0. 028 c                | 0. 101 ± 0. 004 c              | 32. 17 ± 0. 76 c      | 3. 3 ± 0. 6 c      | 58. 48 ± 2. 99 c                            |
|                        | PEG + Si | 1. 923 ± 0. 014 b                | 0. 171 ± 0. 014 b              | 42. 83 ± 0. 29 b      | 8. 3 ± 0. 5 b      | 76. 42 ± 1. 39 b                            |

不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平存在显著差异。下同。  
Different lowercase indicate significant differences at the  $P < 0.05$  level. The same below.

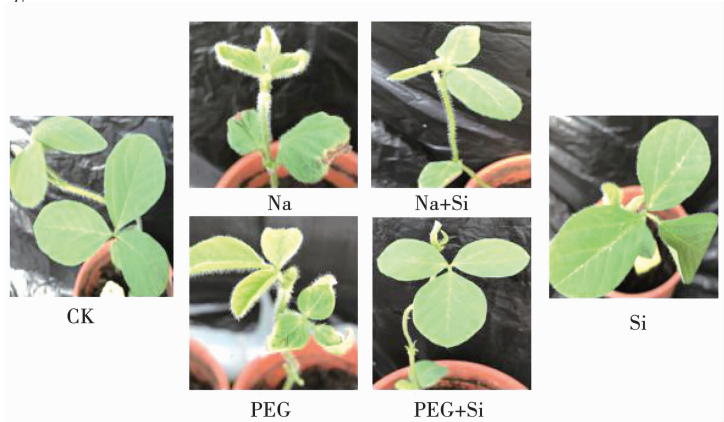


图 1 硅对盐、干旱胁迫下幼苗生长的影响

Fig. 1 Effect of exogenous silicon on the growth of soybean seedlings under salt and drought stress

2 结果与分析

2.1 外源硅对盐、干旱胁迫下大豆幼苗生长指标的影响

如表 2 所示,与对照相比,单独在盐胁迫或者 PEG 胁迫下,植株生物量(鲜重和干重)、株高、叶片数及叶片相对含水量都显著下降,且和对照达到显著差异水平。在盐胁迫下,上述 5 个指标较对照分别下降 53.5%、50.1%、29.2%、66.7% 和 31.3%。在干旱胁迫下,5 个指标较对照分别下降 57.6%、61.9%、28.8%、68.6% 和 34.3%。而在 2 种逆境胁迫下加入外源硅后,各个生长指标均有不同程度的提高。其中,在盐胁迫下,加入外源硅后的指标数值比单独盐胁迫分别增加 30.3%、26.9%、10.2%、56.8% 和 20.7%。在干旱胁迫下,加入外源硅后的指标数值比单独干旱胁迫分别增加 36.5%、40.9%、24.9%、60.2% 和 23.5%。由图 1 可知胁迫下加入外源硅能改善胁迫对大豆幼苗的影响,且方差分析表明单独外源硅处理与对照未达到显著差异。说明单独添加硅对大豆幼苗的生长没有显著影响,但在盐、干旱逆境胁迫下加入硅,对大豆幼苗生长所受的抑制具有明显的缓解作用。

2.2 大豆 NAC 和 WRKY 家族转录因子的组织特异性表达分析

如图 2 所示,NAC 和 WRKY 家族相关转录因子在大豆的不同组织中均有表达。同一转录因子在大豆的不同组织中表达量不同,且不同转录因子在大豆的相同组织中表达量也不同。其中 GmNAC2、GmNAC3 和 GmNAC4 都是在根系的表达量最高,其次是叶片,而在茎中的表达量最低。而 GmNAC5 在叶片中的表达量最高,在茎中的表达量最低。

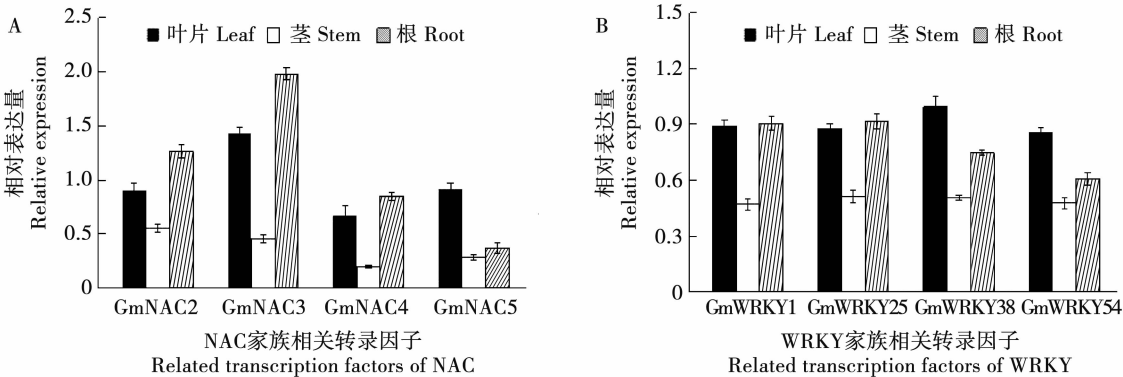


图 2 大豆 NAC 和 WRKY 家族转录因子的组织特异性表达分析

Fig. 2 The expression analysis of soybean NAC and WRKY transcription factors in different tissues

2.3 外源硅对大豆苗期盐胁迫下 NAC 和 WRKY 家族转录因子表达模式的影响

如图 3 所示,盐胁迫下加入外源硅能够影响 8 个 NAC 和 WRKY 转录因子的表达水平。在盐胁迫 1 d 时,8 个转录因子的表达量明显较对照下降。其中 NAC 家族转录因子较对照下降 38.8% ~ 55.0%,下降最少的是 GmNAC4 (38.8%),下降最多的是 GmNAC3 (55.0%)。WRKY 家族转录因子较对照下降 17.6% ~ 57.1%,下降最少的是 GmWRKY54 (17.6%),下降最多的是 GmWRKY1 (57.1%)。在盐胁迫下加入外源硅后,NAC 家族转录因子表达量比单独盐胁迫升高 30.5% ~ 44.4%,WRKY 家族转录因子表达量比单独盐胁迫升高 15.5% ~ 47.8%。NAC 家族中表达量升高最小的是 GmNAC2 (30.5%),其次是 GmNAC4 (34.4%) 和 GmNAC5 (35.4%),升高幅度最大的是 GmNAC3 (44.4%)。WRKY 家族中表达量升高最小的是 GmWRKY38 (15.5%),其次是 GmWRKY25 (21.4%) 和 GmWRKY54 (47.4%),表达量升高幅度最大的是 GmWRKY1 (47.8%)。

随盐胁迫时间延长至 3 d 时,8 个转录因子的表达量与对照相比明显下降。其中 NAC 家族转录因子较对照下降 43.2% ~ 60.1%,WRKY 家族转录因子较对照下降 43.6% ~ 59.8%。NAC 家族下降最少的是 GmNAC4 (43.2%),其次是 GmNAC5 (50.5%) 和 GmNAC3 (59.0%),下降最多的是 GmNAC2 (60.1%)。WRKY 家族下降最少的是 GmWRKY38 (43.6%),其次是 GmWRKY1 (44.3%) 和

GmWRKY1 和 GmWRKY25 在根系中的表达量最高,在叶片中的表达量低于根系,但没有显著差异 ( $P < 0.05$ ),在茎中的表达量最低。GmWRKY38 和 GmWRKY54 的表达模式相同,均是在叶片中的表达量最高,在茎中的表达量最低。叶片能够在一定程度上直观地反映植物的生长状况,因此后续将研究不同处理时间外源硅对叶片部位 NAC 和 WRKY 家族相关转录因子表达水平的影响。

GmWRKY25 (51.0%),下降最多的是 GmWRKY54 (59.8%)。加入外源硅后,NAC 家族转录因子比单独盐胁迫表达量升高 19.2% ~ 46.1%,WRKY 家族转录因子比单独盐胁迫表达量升高 10.6% ~ 38.3%。NAC 家族转录因子表达量变化最小的是 GmNAC4 (19.2%),其次是 GmNAC5 (43.0%) 和 GmNAC2 (43.7%),表达量变化最大的是 GmNAC3 (46.1%)。WRKY 家族转录因子变化最小的是 GmWRKY54 (10.6%),其次是 GmWRKY1 (27.2%) 和 GmWRKY38 (27.8%),变化最大的是 GmWRKY25 (38.3%)。

当盐胁迫 5 d 时,NAC 家族转录因子表达量较对照下降 60.8% ~ 68.0%,WRKY 家族转录因子表达量较对照下降 51.5% ~ 67.0%。其中 NAC 家族下降最少的是 GmNAC3 (60.8%),下降最多的是 GmNAC2 (68.0%)。WRKY 家族下降最少的是 GmWRKY38 (51.5%),下降最多的是 GmWRKY54 (67.0%)。加入外源硅后,NAC 家族转录因子表达量比盐胁迫升高 43.1% ~ 51.4%,WRKY 家族转录因子表达量比盐胁迫升高 35.3% ~ 43.3%。其中 NAC 家族转录因子升高幅度最小的是 GmNAC2 (43.1%),升高幅度最大的是 GmNAC5 (51.4%)。WRKY 家族转录因子升高幅度最小的是 GmWRKY1 (35.3%),升高幅度最大的是 GmWRKY54 (43.3%)。单独加入外源硅后,上述转录因子的表达量与对照相比,除第 1 天的 GmNAC2、GmWRKY1 的表达较对照低,其余均和对照没有达到显著差异。

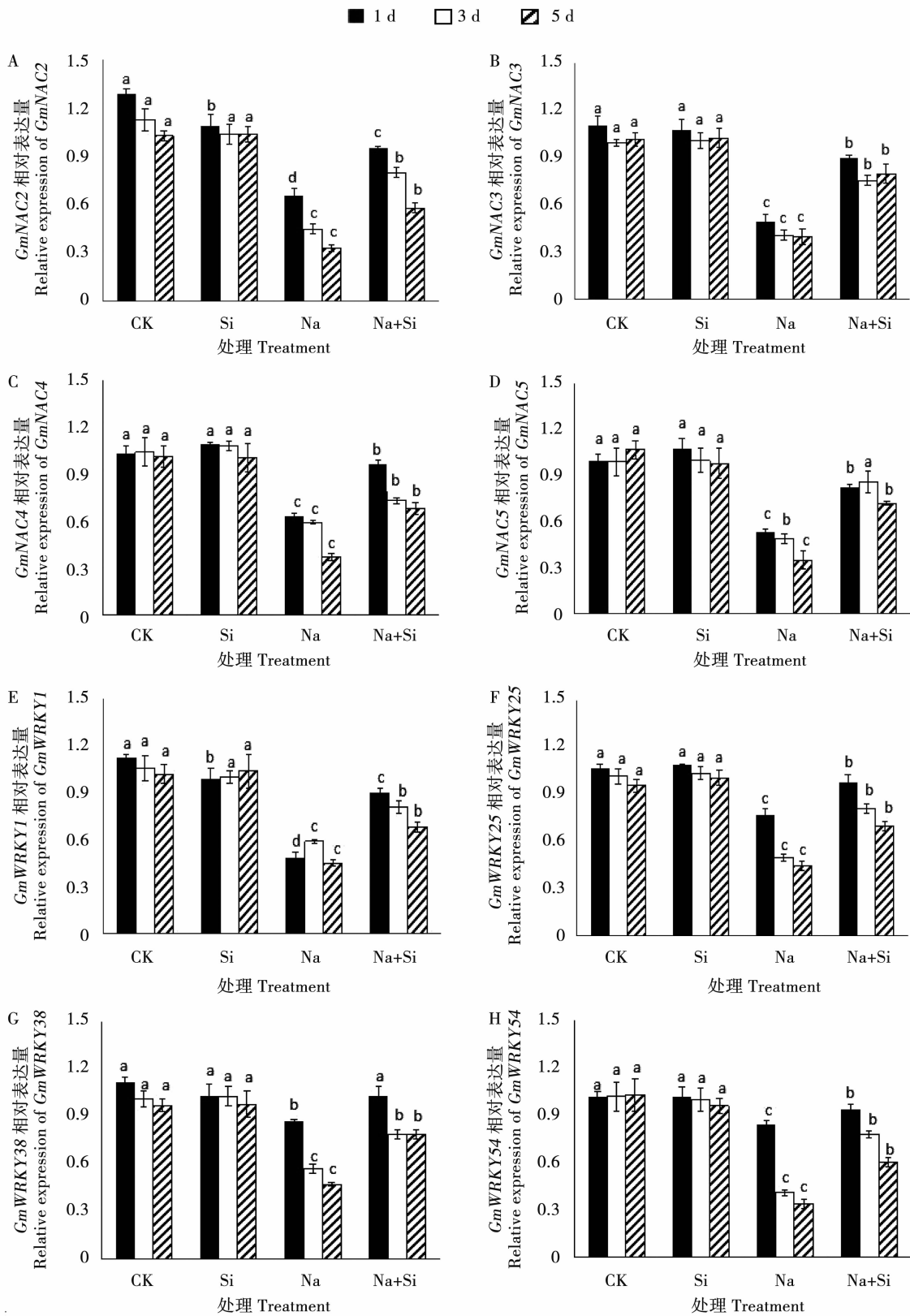


图3 外源硅对大豆幼苗盐胁迫下 NAC 和 WRKY 家族转录因子表达模式的影响  
Fig.3 Effect of exogenous silicon on the expression of NAC and WRKY transcription factors in the soybean seedlings under salt stress

2.4 外源硅对大豆苗期干旱胁迫下 NAC 和 WRKY 家族转录因子表达模式的影响

如图4所示,干旱胁迫下加入外源硅能够影响其相关转录因子的表达水平。在干旱胁迫1 d时,8

个转录因子的表达量较对照明显下降。其中 NAC 家族转录因子表达量下降 22.4% ~ 59.0%, 下降幅度最小的是 GmNAC5 (22.4%), 下降幅度最大的是 GmNAC2 (59.0%)。WRKY 家族转录因子表达量

下降 17.5% ~41.7% ,其中下降幅度最小的是 GmWRKY25(17.5%) ,下降幅度最大的是 GmWRKY38(41.7%) 。而在干旱胁迫下加入外源硅后,8 个转录因子的表达量比单独干旱胁迫升高。其中 NAC 家族转录因子表达量升高 6.0% ~ 44.6% ,WRKY 家族转录因子表达量升高 11.5% ~ 41.2% 。NAC

家族转录因子表达量升高幅度最小的是 GmNAC5(6.0%) ,升高幅度最大的是 GmNAC2(44.6%) 。WRKY 家族转录因子表达量升高幅度最小的是 GmWRKY25(11.5%) ,升高幅度最大的是 GmWRKY38(41.2%) 。

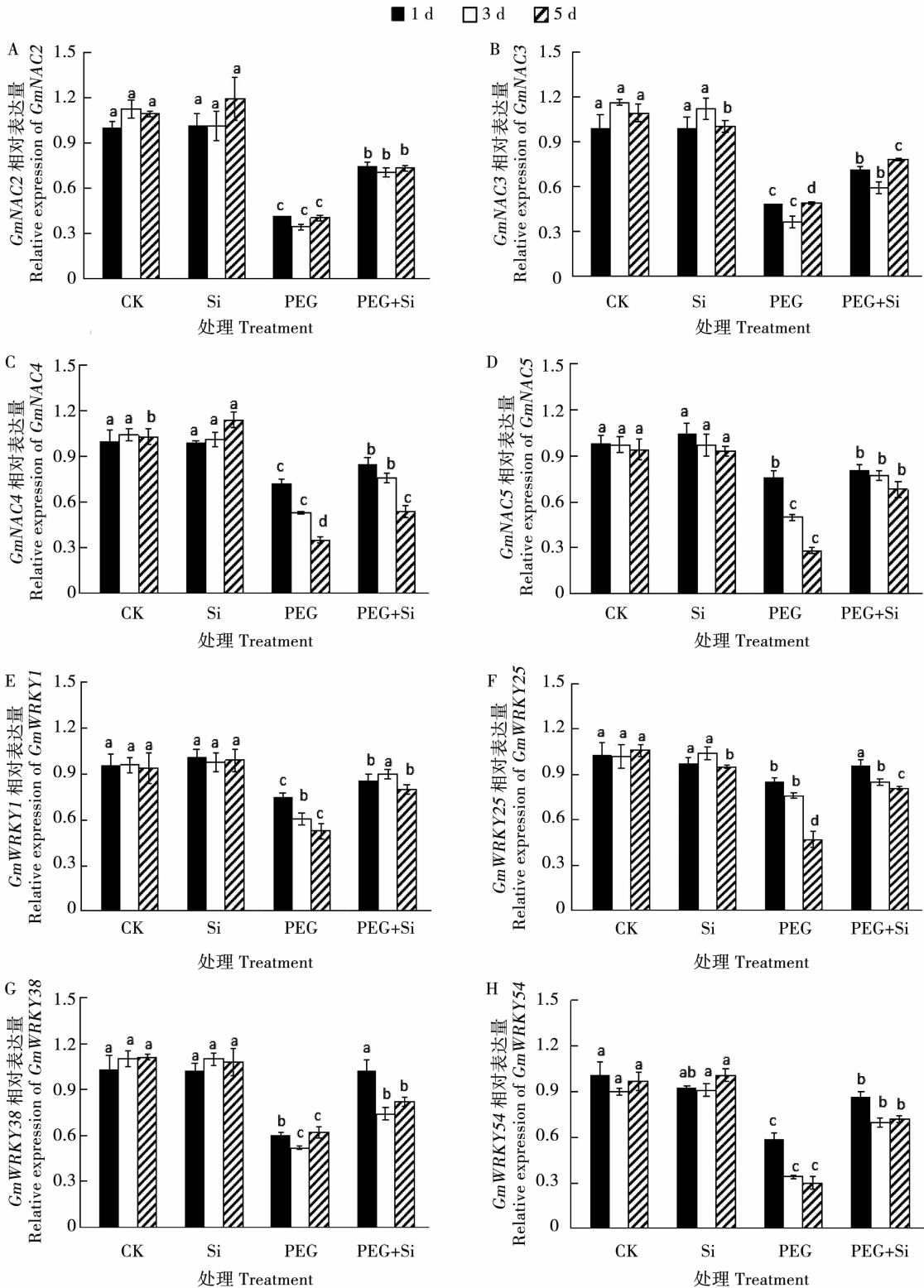


图4 外源硅对大豆幼苗干旱胁迫下NAC和WRKY家族转录因子表达模式的影响  
Fig.4 Effect of exogenous silicon on the expression of NAC and WRKY transcription factors in the soybean seedlings under drought stress

随着干旱胁迫时间延长至 3 d, NAC 家族转录因子的表达量比对照下降 48.5% ~ 69.6%, 其中下降最少的是 GmNAC5 (48.5%), 下降最多的是 GmNAC2 (59.0%)。WRKY 家族转录因子表达量比对照下降 25.5% ~ 62.2%, 其中下降最少的是 GmWRKY25 (25.5%), 下降最多的是 GmWRKY54 (62.2%)。在干旱胁迫下加入外源硅后, NAC 家族转录因子表达量比单独干旱胁迫升高 30.2% ~ 51.4%, WRKY 家族转录因子表达量明显比单独干旱胁迫升高 10.6% ~ 51.4%。NAC 家族转录因子表达量升高幅度最小的是 GmNAC4 (30.2%), 其次是 GmNAC5 (35.1%) 和 GmNAC3 (39.0%), 升高幅度最大的是 GmNAC2 (51.4%)。WRKY 家族转录因子表达量升高幅度最小的是 GmWRKY25 (10.6%), 其次是 GmWRKY38 (29.7%) 和 GmWRKY1 (32.2%), 升高幅度最大的是 GmWRKY54 (51.4%)。

当干旱胁迫 5 d 时, NAC 家族转录因子表达量比对照下降 55.0% ~ 70.2%, 其中下降最少的是 GmNAC3 (55.0%), 下降最多的是 GmNAC5 (70.2%)。WRKY 家族转录因子表达量比对照下降 43.6% ~ 69.1%, 其中下降最少的是 GmWRKY1 (43.6%), 下降最多的是 GmWRKY54 (69.1%)。在干旱胁迫下加入外源硅后, NAC 家族转录因子表达量比单独干旱胁迫升高 35.2% ~ 58.8%, WRKY 家族转录因子表达量比单独干旱胁迫升高 24.4% ~ 58.3%。NAC 家族转录因子表达量升高幅度最小的是 GmNAC4 (35.2%), 升高幅度最大的是 GmNAC5 (58.8%)。WRKY 家族转录因子表达量升高幅度最小的是 GmWRKY38 (24.4%), 升高幅度最大的是 GmWRKY54 (58.3%)。单独加入外源硅后, 除了在第 5 天的 GmNAC3 和 GmWRKY25 的表达量较对照低, GmNAC4 的表达量较对照高之外, 其余转录因子的表达与对照相比均没有达到显著差异。

### 3 讨论

盐胁迫和干旱胁迫是目前大豆应答的主要非生物胁迫。它们通过影响大豆生长、水分代谢、光合作用、离子平衡、渗透胁迫等生理代谢过程最终导致大豆产量和品质下降。研究发现, 外源硅能够在一定程度上缓解大豆的逆境胁迫。何淑平等<sup>[21]</sup>发现外源硅通过增加干旱胁迫下四棱豆的生物量、提高根系活力、减少膜脂过氧化损伤等增强其耐旱

性。牟英辉等<sup>[22]</sup>研究发现硅肥能够改善大豆的农艺性状、促进大豆生长等。本研究表明, 盐和干旱胁迫下, 外源施加硅后, 大豆的生物量、叶片数, 大豆植株高度增加。此外, Li 等<sup>[23]</sup>研究发现外源硅能够提高盐胁迫下番茄的叶片相对含水量。Zhu 等<sup>[24]</sup>发现黄瓜品种津优 1 号和津春 5 号在盐胁迫下叶片相对含水量下降, 而加入外源硅后明显上升。本研究也同样发现, 盐和干旱胁迫下, 外源硅施加后, 大豆幼苗叶片相对含水量提高。

随着现代分子生物学研究的深入, 科研人员对植物在生物和非生物胁迫下转录组学、基因组学、蛋白组学、代谢组学等研究有一定的突破, 但是关于外源硅缓解植物非生物逆境胁迫的组学研究报道较少。Van Bockhaven 等<sup>[25]</sup>研究发现外源硅加入水稻能够诱导多个基因差异表达。Zhu 等<sup>[26]</sup>对黄瓜的研究发现, 在盐胁迫下叶片有大量基因差异表达, 而在加入外源硅后其相关基因的表达趋于对照水平, 而对于外源硅缓解大豆逆境胁迫的相关基因表达模式研究未见报道。研究发现, NAC 和 WRKY 家族转录因子主要参与种子萌发、植株发育、病原菌危害、非生物胁迫、开花调控、植株成熟和衰老等方面, 因此对于植物改良具有重要作用。目前主要通过高通量测序、转基因手段等研究大豆相关转录因子的功能。Tran 等<sup>[27]</sup>通过高通量筛选研究, 在大豆幼苗中获得了 31 个 GmNAC 家族基因, 其中与盐、干旱等逆境有关的 GmNAC 基因 9 个。Jin 等<sup>[28]</sup>发现过表达 GmNAC2 的烟草对盐、干旱和低温较为敏感, 进一步研究发现此转录因子在逆境胁迫下作为负调控因子行使功能。本研究发现, GmNAC2 主要在根系表达, 在盐胁迫下表达量急剧下降, 而在加入外源硅后有明显的提高。Jin 等<sup>[29]</sup>研究发现 GmNAC5 主要在根部和未成熟的种子中表达, 同时在高盐胁迫下大量表达。而本研究发现 GmNAC5 主要在叶片表达, 其次是茎段和根系, 在盐胁迫下, 表达量急剧下降。加入外源硅后表达量显著提高。出现不同结果的原因可能和试验品种、取材时间、处理方式、盐胁迫浓度不同等有关。除 GmNAC2、GmNAC5 外, 本研究同时探究了大豆 NAC 家族 GmNAC3、GmNAC4 的组织特异性分析及盐、干旱等处理下的表达模式。结果发现, GmNAC3、GmNAC4 的表达主要在根系, 其次在叶片和茎。在盐、干旱等单独胁迫下, 随胁迫时间延长, GmNAC3、GmNAC4 的表达量与对照相比明显下降, 且差异显著, 加入外源硅后均有不同程度的提高。Song 等<sup>[30]</sup>通



过转录组学分析得出,在盐胁迫下 *GmWRKY92*、*GmWRKY144* 和 *GmWRKY165* 基因表达增加。Zhou 等<sup>[31]</sup> 研究发现过表达 *GmWRKY54*、*GmWRKY13* 和 *GmWRKY21* 的转基因拟南芥对盐、干旱、寒冷均有不同程度的抗性,同时还发现 *GmWRKY54* 的表达量和盐、干旱逆境胁迫有关,而对于它的组织特异性表达模式未研究。同时对于 *GmWRKY1*、*GmWRKY25*、*GmWRKY38* 的生物学功能和表达模式未见报道。对 4 个不同转录因子表达的组织特异性及盐、干旱诱导处理下的表达模式的研究结果表明 *GmWRKY1*、*GmWRKY25*、*GmWRKY38*、*GmWRKY54* 在叶片、茎和根系都有表达。其中 *GmWRKY1*、*GmWRKY25* 主要在根系中表达,其次在叶片和茎中表达;*GmWRKY38* 和 *GmWRKY54* 主要在叶片中表达,其次在根系和茎中表达。在单独盐、干旱胁迫下,4 个基因的表达模式大致相同,都是随着胁迫时间延长,其表达量与对照相比明显下降,加入外源硅后都明显提高。

本研究探讨了外源硅对逆境胁迫下大豆转录因子表达模式的影响,但研究对象仅为单一品种晋豆 37 号,后续还需要考察对多个不同品种进行相关研究。同时本研究仅对盐胁迫和干旱胁迫下硅的作用进行研究,实际生产中大豆所遭受的其它非生物逆境胁迫(冷害、热害以及生物胁迫疫霉菌、黑豆锈病、胞囊线虫等)的作用情况有待研究。NAC 和 WRKY 家族基因庞大,目前只有少数基因功能被验证,绝大多数的基因功能尚待研究。关于外源硅对逆境胁迫下大豆转录因子影响的表达分析未曾研究。本研究结果将有助于阐释外源硅的缓解机理,进一步验证相关转录因子的功能,并对改善大豆的品质具有重要作用,同时为进一步研究外源硅能够在较短时间内致使一系列生化反应相关转录因子的表达发生变化的原理奠定基础。

### 4 结 论

在盐、干旱逆境胁迫下,大豆植株鲜重、干重、株高、叶片数、叶片相对含水量都有不同程度的减少,而加入外源硅后明显升高。在盐、干旱胁迫下,大豆 NAC 家族相关转录因子 *GmNAC2*、*GmNAC3*、*GmNAC4*、*GmNAC5* 以及 WRKY 家族转录因子 *GmWRKY1*、*GmWRKY25*、*GmWRKY38*、*GmWRKY54* 的表达量明显低于对照,而加入外源硅后的表达量明显比单独胁迫高,且随逆境胁迫时间延长,转录因子的表达量变化趋势基本一致。研究证明逆境胁迫下,外源加硅能够影响 NAC 家族和 WRKY 家族转录因子的表达水平。

### 参考文献

[1] 朱永兴,夏雨晨,刘乐承,等. 外源硅对植物抗盐性影响的研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2019, 25(3): 498-509. (Zhu Y X, Xia Y C, Liu L C, et al. Beneficial effects of silicon on salt tolerance in plants[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2019, 25(3): 498-509.)

[2] Gong H J, Randall D P, Flowers T J. Silicon deposition in the root reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by reducing bypass flow[J]. Plant, Cell and Environment, 2006, 29(10): 1970-1979.

[3] Yin L N, Wang S W, Li J Y, et al. Application of silicon improves salt tolerance through ameliorating osmotic and ionic stresses in the seedling of *Sorghum bicolor* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2013, 35: 3099-3107.

[4] Chen D Q, Yin L N, Deng X P, et al. Silicon increases salt tolerance by influencing the two-phase growth response to salinity in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(9): 2531-2535.

[5] Tuna A L, Kaya C, Higgs D, et al. Silicon improves salinity tolerance in wheat plants[J]. Environmental and Experimental Botany, 2008, 62(1): 10-16.

[6] Liang Y C, Zhang W H, Chen Q, et al. Effect of exogenous silicon (Si) on H<sup>+</sup>-ATPase activity, phospholipids and fluidity of plasma membrane in leaves of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Environmental and Experimental Botany, 2006, 57(3): 212-219.

[7] 梁喜龙,段立华,梁鹏飞,等. 外源硅包衣对干旱胁迫下大豆幼苗生长的调控效应[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2019, 31(2): 7-12. (Liang X L, Duan L H, Liang P F, et al. Regulation effects of exogenous silicon coating on soybean seedling growth under drought stress[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019, 31(2): 7-12.)

[8] 郑世英,郑晓彤,耿建芬,等. 硅对干旱胁迫下野生大豆幼苗生长和生理特性的影响[J]. 大豆科学, 2018, 37(2): 263-267. (Zheng S Y, Zheng X T, Geng J F, et al. Effects of silicon on growth and physiological characteristics of wild soybean seedlings under drought stress[J]. Soybean Science, 2018, 37(2): 263-267.)

[9] 李淑贤,刘卫国,高阳,等. 硅对人工荫蔽胁迫下大豆幼苗生长及光合特性的影响[J]. 中国农业科学, 2018, 51(19): 3663-3672. (Li S X, Liu W G, Gao Y, et al. Effects of silicon on plant growth and photosynthetic characteristics of soybean seedlings under artificial shade stress[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(19): 3663-3672.)

[10] 王丽燕. 硅对野生大豆幼苗耐盐性的影响及其机制研究[J]. 大豆科学, 2013, 32(5): 659-663. (Wang L Y. Effects of Silicon on salt tolerance of *glycine soja* seedlings and its mechanism [J]. Soybean Science, 2013, 32(5): 659-663.)



[11] 李换丽, 雷佳, 吴霞, 等. 大豆 WRKY 转录因子及其生物学功能研究进展[J]. 大豆科学, 2019, 38(5): 813-820. (Li H L, Lei J, Wu X, et al. Studies on WRKY transcription factors and their biological functions in soybean[J]. Soybean Science, 2019, 38(5):813-820. )

[12] 李珍, 华秀婷, 张积森. 高等植物 WRKY 转录因子家族的演化及功能研究进展[J]. 热带作物学报, 2018, 39(2): 405-414. (Li Z, Hua X T, Zhang J S. Evolution and gene function of WRKY Transcription factor families in higher plants[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(2): 405-414. )

[13] Le D T, Nishiyama R, Watanabe Y, et al. Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress [J]. DNA Research, 2011, 18: 263-276.

[14] Pinheiro G L, Marques C S, Costa M D B L, et al. Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response[J]. Gene, 2009, 444: 10-23.

[15] Le D T, Nishiyama R, Watanabe Y, et al. Differential gene expression in soybean leaf tissues at late developmental stages under drought stress revealed by genome-wide transcriptome analysis[J]. PLoS One, 2012, 7: e49522.

[16] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 463 (7278): 178-183.

[17] Yu Y C, Wang N, Hu R B, et al. Genome-wide identification of soybean WRKY transcription factors in response to salt stress[J]. Springer Plus, 2016, 5: 920.

[18] Shi W Y, Du Y T, Ma J, et al. The WRKY transcription factor GmWRKY12 confers drought and salt tolerance in soybean[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19: 4087.

[19] Gong H J, Chen K M. The regulatory role of silicon on water relations, photosynthetic gas exchange, and carboxylation activities of wheat leaves in field drought conditions [J]. Acta Physiology Plant, 34:1589-1594.

[20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[21] 何淑平, 靳亚忠, 王 鹏. 硅对于旱胁迫下四棱豆幼苗生物量和生理特性的影响[J]. 水土保持学报, 2015, 29(2): 263-266, 298. (He S P, Ji Y Z, Wang P. Effects of silicon on biomass and physiological properties of winged bean seedling under drought stress[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2015, 29(2): 263-266, 298. )

[22] 牟英辉, 陈志梁, 程艳波, 等. 硅肥对大豆农艺性状产量及品质的影响[J]. 大豆科学, 2012, 31(4): 625-629. (Mu Y H, Chen Z L, Cheng Y B, et al. Effects of silicon fertilization on agronomic traits, yield and quality of soybean[J]. Soybean Science, 2012, 31(4): 625-629. )

[23] Li H L, Zhu Y X, Hu Y H, et al. Beneficial effects of silicon in alleviating salinity stress of tomato seedlings grown under sand culture[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(4): 71.

[24] Zhu Y X, Xu X X, Hu Y H, et al. Silicon improves salt tolerance by increasing root water uptake in *Cucumis sativus* L. [J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(9): 1629-1646.

[25] Van Bockhaven J, Steppe K, Bauweraerts I, et al. Primary metabolism plays a central role in moulding silicon-inducible brown spot resistance in rice[J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(8): 811-824.

[26] Zhu Y X, Yin J L, Liang Y F, et al. Transcriptomic dynamics provide an insight into the mechanism for silicon-mediated alleviation of salt stress in cucumber plants[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 174: 245-254.

[27] Tran L S, Nakashima K, Sakuma Y, et al. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter[J]. The Plant Cell, 2004, 16(9): 2481-2498. )

[28] Jin H X, Huang F, Cheng H, et al. Overexpression of the *GmNAC2* gene, an NAC transcription factor, reduces abiotic stress tolerance in tobacco[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31(2): 435-442. )

[29] Jin H X, Xu G L, Meng Q C, et al. GmNAC5, a NAC transcription factor, is a transient response regulator induced by abiotic stress in soybean [J]. The Scientific World Journal, 2013: 768972.

[30] Song H, Wang P F, Hou L, et al. Global analysis of WRKY genes and their response to dehydration and salt stress in soybean[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 9.

[31] Zhou Q Z, 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.