

文章编号:1000-8551(2019)08-1474-09

干旱胁迫下野生大豆 ABC 转运蛋白转录组测序分析

张小芳 乔亚科 王冰冰 徐燕 张锴 李桂兰*

(河北科技师范学院农学与生物科技学院,河北 秦皇岛 066600)

摘要:为获取干旱胁迫状态下 ABC 转运蛋白家族相关基因,以抗旱性强的野生大豆为试验材料,浇灌 20%PEG 6000 模拟干旱胁迫,分别在干旱处理 0、6、12、24 和 48 h 后取叶片提取 RNA 进行转录组测序;以 GO、KEGG 和 NR 三大数据库注释的结果为基础,再以 ABC 转运蛋白为关键词进行筛选。结果表明,共获得 337 条 ABC 转运蛋白相关序列,包括 8 大亚家族(ABCA、ABCB、ABCC、ABCD、ABCE、ABCF、ABCG 和 ABCI)。差异表达分析结果表明,共有 182 条表现差异表达。GO 注释到的差异表达基因多数为嘌呤核苷酸分解过程,KEGG 注释到的差异表达基因分布在 5 个亚家族(ABCA、ABCB、ABCC、ABCD 和 ABCG)。对 NR 数据库有注释的 168 条差异表达基因进行进化分析,结果表明 ABCE、ABCF、ABCG 家族与 ABCI11 为一类,ABCB、ABCC 家族与 ABCI10 为一类,ABCA、ABCD 家族与 ABCI19 为一类。本研究为进一步研究野生大豆干旱胁迫下 ABC 转运蛋白抗旱基因提供了一定的理论依据。

关键词:野生大豆;转录组测序;干旱胁迫;ABC 转运蛋白

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2019.08.1474

野生大豆(*Glycine soja*)是栽培大豆的近缘野生种^[1]。研究表明,野生大豆中携带着特有的新基因^[2],而栽培大豆在人工驯化过程丢失了许多与环境适应相关的重要基因,包括一些与抗逆相关的基因^[3]。因此对野生大豆抗逆基因的挖掘具有重要意义。

三磷酸腺苷结合盒(ATP-binding cassette, ABC)跨膜转运蛋白是植物细胞膜蛋白的重要组成部分,参与植物激素运输、气孔调节、次生代谢物的运输以及响应环境胁迫等过程^[4]。最初人们对 ABC 转运蛋白家族的研究多集中于多药耐药性研究^[5-6],随着对 ABC 转运蛋白家族的进一步研究发现,植物中任何特定的生理过程都至少需要 1 个 ABC 转运蛋白^[7],因此对植物 ABC 转运蛋白的研究具有重要意义。

近年来,已有关于植物 ABC 转运蛋白家族的结构和转运机制的研究报道^[8-10],除对拟南芥^[11]、水稻^[12]的 ABC 转运蛋白家族进行整体研究外,在铁皮石斛^[13]、葡萄^[14]和黄瓜^[15]等中也开展了部分基因的研

究,鉴定的 ABC 转运蛋白主要在 ABCB、ABCC 和 ABCG 家族^[16-19]中。目前大豆的基因组已经完成测序,但关于豆科 ABC 转运蛋白各家族相关基因的研究尚鲜见报道^[20-21]。

随着高通量转录组测序技术的发展,利用生物信息学对转录组测序的深入挖掘已成为研究重点^[22-25],目前,已有多种具有特定功能的大豆或野生大豆基因被挖掘与利用^[26-29]。本研究以抗旱性较强的野生大豆永 46 为试验材料,对其转录组测序结果进行功能注释后,以 ABC 转运蛋白为关键词进行筛选,对获得的 ABC 转运蛋白进行多角度分析,探讨 ABC 转运蛋白家族与干旱之间的关系,以期对 ABC 转运蛋白家族基因的挖掘和利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以河北科技师范学院野生大豆种质资源课题组筛

收稿日期:2018-06-26 接受日期:2018-10-04

基金项目:河北省自然科学基金项目(C2016407100),河北省研究生创新资助项目(CXZZSS2018148),现代农业产业技术体系河北省创新团队建设基金项目(HBCT2018090203)

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

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

选鉴定的抗旱性强的野生大豆永 46 为试验材料^[30], 采自河北省秦皇岛市昌黎县, 并在河北科技师范学院植物细胞工程实验室保存。

1.2 转录组测序

将野生大豆永 46 的种子播种于营养钵中, 出苗后保留长势一致的幼苗 10 株, 设 3 次生物学重复。定期浇定量霍格兰营养液, 在苗龄达 30 d 时, 加入 20% PEG 6000 进行干旱胁迫处理, 分别在处理前(0 h)及处理后 6、12、24 和 48 h 取同一个叶位的复叶, 按照 RNA 提取试剂盒[TaKaRa(日本)]提供的方法提取野生大豆叶片总 RNA。取 2 μ L 所得 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。检测合格后送至深圳华大基因科技有限公司进行测序, 具体步骤参考张小芳等^[31]的方法。

1.3 功能注释及 ABC 转运蛋白关键词搜索

BLAST 比对到公共数据库, 包括非冗余数据库(non-redundant, NR)、基因本体论数据库(Gene Ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Gnomes, KEGG), 之后以 ABC 转运蛋白为关键词进行筛选, 最终获得 ABC 转运蛋白家族相关信息。

1.4 数据分析

根据获得的 ABC 转运蛋白家族信息, 利用 Excel 2007、ClustalX 和 MEGA5.1 分析获得的 ABC 转运蛋白基因簇的关系。

2 结果与分析

2.1 ABC 转运蛋白相关基因簇信息分析

对转录组中 39 183 条基因簇以 ABC 转运蛋白为关键词在 NR、GO、KEGG 3 个数据库中进行筛选, 结果共有 337 条基因簇被注释, 这些基因簇的表达量 FPKM 值介于 0~180.57 之间, 序列拼接长度介于 165~6 827 bp 之间。这些被注释的基因簇中, 87.83% 在 3 个数据库中均有注释, 3.86% 只注释到了 1 个数据库中。有 299 条被 GO 数据库注释, 321 条被 KEGG 数据库注释, 146 条被 NR 数据库注释。GO 本体中注释的细胞组分数数据库有 13 个, 分子功能数据库有 34 个, 生物过程数据库有 68 个; NR 数据库中注释的 ABC 转运蛋白家族有 8 个, 包括 ABCA、ABCB、ABCC、ABCD、ABCE、ABCF、ABCG 和 ABCI(表 1)。KEGG 注释的有 28 个代谢途径分支, 排名前 10 的为 K05658(226 个)、K00924(102 个)、K12843(81 个)、K05681(80 个)、K04733(54 个)、K05666(40 个)、K02065(20 个)、K13430(15 个)、K05643(13 个)、K05663(13 个)。

表 1 ABC 转运蛋白家族相关基因簇统计

Table 1 Statistical of Unigene about ABC transporter family

项目 Item	数目 Number
ABC 转运蛋白 A 家族 ABC transporter A family	7
ABC 转运蛋白 B 家族 ABC transporter B family	36
ABC 转运蛋白 C 家族 ABC transporter C family	31
ABC 转运蛋白 D 家族 ABC transporter D family	4
ABC 转运蛋白 E 家族 ABC transporter E family	1
ABC 转运蛋白 F 家族 ABC transporter F family	7
ABC 转运蛋白 G 家族 ABC transporter G family	55
ABC 转运蛋白 I 家族 ABC transporter I family	7

2.2 ABC 转运蛋白相关差异表达基因分析

对获取的原始基因簇信息进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)筛选, 筛选阈值为 $P\text{-value} \leq 0.05$, $|\log_2 \text{Fold Changes}| > 1$, 其中 Fold Changes 为处理材料与未处理材料中基因表达量的比值, 对于差异表达基因, 其 $\log_2 \text{Fold Change} > 0$ 时, 则认为该差异表达基因是上调的, 反之, 若 $\log_2 \text{Fold Change} < 0$, 则认为该差异表达基因是下调的。筛选获得的 DEGs 共 182 个。干旱胁迫处理 12 h 时涉及到的差异表达基因最丰富。在干旱胁迫处理 12 h 时, 差异表达基因为 118 个, 其中上调基因 93 个, 下调基因 25 个。干旱胁迫处理 24 h 时, 差异表达基因涉及范围变小, 与未经干旱胁迫(0 h)相比, 仅有 36 个表现为差异表达, 与干旱胁迫处理 12 h 相比, 上调基因减少, 下调基因增多, 说明部分基因在干旱胁迫处理 24 h 时表达量上调, 之后恢复原始表达量或低于原始表达量。干旱胁迫处理 48 h 时, 其变化趋势与干旱胁迫处理 24 h 相同, 涉及的差异表达基因数无明显变化, 较干旱胁迫处理 24 h 表现为差异表达的基因仅有 14 个(图 1)。

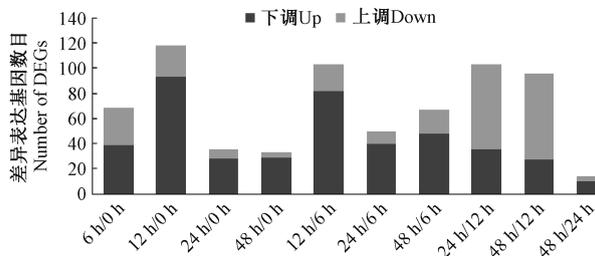


图 1 不同胁迫处理时期的差异表达基因统计分析

Fig.1 Statistical analysis of DEGs under different stress treatment periods

2.3 ABC 转运蛋白相关差异表达基因功能分析

2.3.1 GO 功能显著性富集分析 GO 共有 3 个本体

(ontology), 分别描述基因的细胞组分 (cellular component)、分子功能 (molecular function)、生物过程 (biological process)。在被注释的 13 个细胞组分数据库、34 个分子功能数据库和 68 个生物过程数据库中分别有 11 个、28 个和 50 个数据库注释到差异表达基因。由图 2 可知, 多数基因有分子功能和生物学过程注释。分子功能主要为 ATP 酶活性 (ATPase activity)、蛋白激酶活性 (protein kinase activity)、转运

活性 (transferase activity)、氧化活性 (oxidoreductase activity) 等; 生物学过程主要为嘌呤核苷酸分解过程 (purine ribonucleotide catabolic process)、磷酸化合物代谢过程 (phosphate-containing compound metabolic process)、蛋白质修饰 (cellular protein modification process)、囊泡运输 (vesicle-mediated transport)、羧酸转运 (carboxylic acid transmembrane transporter activity)、激素应答 (response to hormone stimulus) 等。

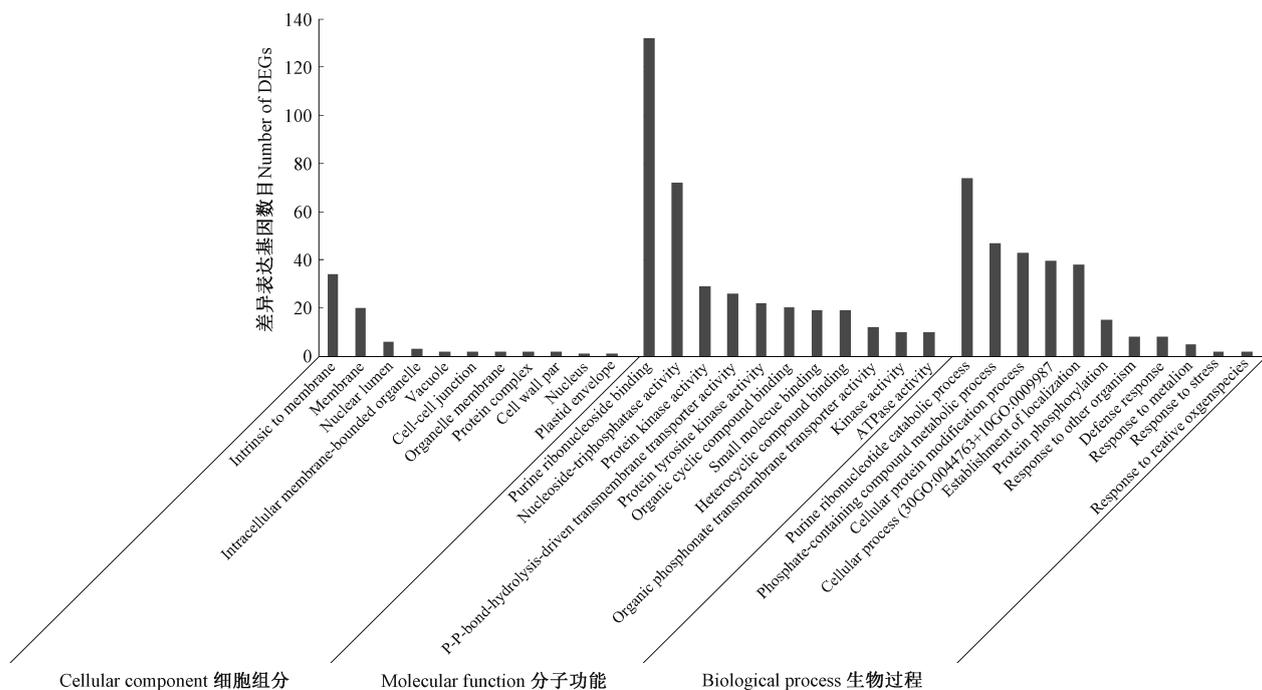


图 2 3 个 GO 本体中数量排名前 10 的 GO 分类统计情况
Fig.2 The number of top 10 in 3 gene ontology classification

由表 2 可知, 6 个细胞组分数据库、4 个分子功能数据库和 17 个生物过程数据库中注释的基因均表现为差异表达, 在细胞组分本体中, 主要定位在细胞膜系统中, 与 ABC 转运蛋白作用场所相符; 在分子功能本体中, 功能分类为转运活性或转移酶活性, 与其作用功能相一致; 在生物学过程本体中, 注释的生物学过程多样, 充分体现了 ABC 转运蛋白的功能多样性。

2.3.2 KEGG 功能显著性富集分析 在 KEGG 数据库中注释的 28 个途径分支中, 有 9 个途径分支被注释到了 ABC 转运蛋白途径 (map02010)。这 9 个途径分支分别是 K05641 (ABCA1)、K05643 (ABCA3)、K05658 (ABCB1)、K05663 (ATM)、K05656 (ABCB9)、K05657 (ABCB10)、K05666 (ABCC2)、K05677 (ABCD3)、K05681 (ABCG2),

共包括 ABCA、ABCB、ABCC、ABCD 和 ABCG 5 个亚家族。K05658 途径在各个时期均出现差异表达基因, K05681 途径在各个时期均有上调基因分布, K05666 途径在各个时期均有下调基因分布, K05663 途径仅在干旱胁迫处理 48 h/6 h 有下调基因分布, 且下调基因仅有 1 个。在各时期中, 干旱胁迫处理 6 h 和 12 h 的差异表达基因最多, 之后基因表达量变化范围变小, 直至恢复到原始水平 (表 3)。

2.3.3 NR 功能聚类分析 对符合筛选条件的 182 个差异表达基因在 NR 数据库注释功能, 获得差异表达基因的蛋白信息 (有 14 个没有注释, 共统计 168 个)。用邻接法对差异表达基因的氨基酸序列进行进化分析。分析结果表明, 可将这 168 个差异表达基因分为

表 2 不同 GO 下的差异表达基因注释统计
Table 2 Statistical of DEGs in different GO

不同 GO Different GO	GO ID	GO 注释 GO annotation	数目 Number
细胞组分 Cellular component	GO:0031981	核腔 Nuclear lumen	6
	GO:0005773	液泡 Vacuole	2
	GO:0043234	蛋白质复合体 Protein complex	2
	GO:0031090	细胞器膜 Organelle membrane	2
	GO:0044426	细胞壁部分 Cell wall part	2
	GO:0005634	细胞核 Nucleus	1
分子功能 Molecular function	GO:0019787	泛素蛋白转移酶活性 Ubiquitin-like protein transferase activity	2
	GO:0046943	羧酸跨膜转运活性 Carboxylic acid transmembrane transporter activity	1
	GO:0051183	维生素转运活性 Vitamin transporter activity	1
生物过程 Biological process	GO:0001871	结合模式 Pattern binding	1
	GO:0006952	防御反应 Defense response	8
	GO:0000302	活性氧应答反应 Response to reactive oxygen species	2
	GO:0006007	葡萄糖分解代谢 Glucose catabolic process	2
	GO:0006950	应激反应 Response to stress	2
	GO:0006970	响应渗透胁迫 Response to osmotic stress	2
	GO:0006996	细胞器官 Organelle organization	2
	GO:0007275	生物发育 Multicellular organismal development	2
	GO:0009404	毒素代谢反应 Toxin metabolic process	2
	GO:0009856	授粉 Pollination	2
	GO:0014070	响应有机环化物 Response to organic cyclic compound	2
	GO:0016192	囊泡运输 Vesicle-mediated transport	2
	GO:0030243	纤维素代谢过程 Cellulose metabolic process	2
	GO:0032446	蛋白修饰 Protein modification by small protein conjugation	2
	GO:0032989	细胞组分形态建成 Cellular component morphogenesis	2
	GO:0042044	液体转运 Fluid transport	2
GO:0044248	细胞分解代谢 Cellular catabolic process	2	
GO:0048588	细胞发育 Developmental cell growth	2	

三大类 25 小类。第一大类有 3 小类,包括 43 个差异表达基因,第二大类有 6 小类,包括 43 个差异表达基因,第三大类有 16 小类,包括 82 个差异表达基因。第一大类主要是 ABC 转运蛋白家族的 ABCE (1 个)、ABCF (5 个)、ABCG 家族 (23 个) 以及多药耐药蛋白 (pleiotropic drug resistance protein); 第二大类主要是 ABC 转运蛋白家族的 ABCB (21 个) 与 ABCC (17 个) 家族; 第三大类涉及基因最为广泛,除 ABCA 家族 (4 个)、ABCD 家族 (2 个) 外,还包括锌指结构域蛋白 (zinc finger CCCH domain-containing protein)、U-box 结构域蛋白 (U-box domain-containing protein)、L 型外源凝集素受体蛋白 (L-type lectin-domain containing

receptor kinase)、富亮氨酸重复受体蛋白 (leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase) 以及其他不同的蛋白激酶家族成员等。在进化分析时, NR 注释功能为 ABCI 家族的蛋白序列共有 3 个 (ABCI10、ABCI11、ABCI19), 这 3 个序列分别聚类在了第二大类、第一大类和第三大类中 (图 3)。

对注释功能为 ABC 转运蛋白家族的基因进行统计分析。除 ABCC 家族外,各家族中涉及的差异表达基因多为上调基因; ABCA 家族共涉及 4 个基因, 3 个为上调基因, 1 个为下调基因; ABCB 家族共涉及 21 个基因, 其中 *glysoja_016804* 表达量差异倍数达 -10.75, *glysoja_023579* 表达量差异倍数达 10.54, 为注

表 3 差异表达基因的 KEGG 通路富集分析
Table 3 Statistical of DEGs in different pathway

项目 Item	上/下调 Up/Down	ABC 转运蛋白途径分支 (mapo2010) Branch of ABC transporter pathway (mapo2010)								
		K05641	K05643	K05658	K05663	K05656	K05657	K05666	K05677	K05681
6 h/0 h	Up	2	3	27	2	0	1	9	1	14
	Down	1	1	26	0	2	3	3	1	5
12 h/0 h	UP	2	4	66	1	0	1	6	2	17
	Down	1	1	16	0	2	2	5	1	5
24 h/0 h	UP	1	2	16	1	0	0	2	0	12
	Down	0	0	6	0	0	0	2	0	1
48 h/0 h	UP	1	1	18	1	0	0	3	0	1
	Down	0	0	4	0	0	0	1	0	9
12 h/6 h	UP	1	2	63	0	0	2	12	0	15
	Down	2	2	13	0	1	1	3	0	7
24 h/6 h	UP	1	1	32	0	2	4	9	0	9
	Down	0	0	7	0	0	1	1	0	5
48 h/6 h	UP	2	2	35	0	2	3	11	1	8
	Down	1	0	14	1	0	1	1	0	7
24 h/12 h	UP	1	2	25	0	2	2	7	1	10
	Down	1	2	51	0	0	2	6	2	11
48 h/12 h	UP	0	0	18	0	2	2	6	1	6
	Down	0	2	53	0	0	2	6	2	13
48 h/24 h	UP	0	0	6	0	0	0	0	0	3
	Down	0	0	4	0	0	0	1	0	0

释到的基因中表达量变化最大的 2 个基因;ABCC 家族共涉及 17 个基因,表达量变化明显,最高差异表达倍数为 9.32;ABCD 家族共涉及 2 个基因,表达量变化幅度较小;ABCE 家族仅涉及 1 个基因,且该基因为上

调基因;ABCF 家族共涉及 5 个基因,均表现为上调表达;ABCG 家族共涉及 23 个基因,上调表达较多;ABCI 家族共涉及 3 个基因(表 4)。

表 4 ABC 转运蛋白家族的差异表达基因分析
Table 4 Statistical of DEGs in ABC transporter family

家族 Family	上调数目 Up number	最高表达量 Maximum expression	基因 ID Genes ID	下调数目 Down number	最低表达量 Minimum expression	基因 ID Genes ID
ABCA	3	3.12	<i>glysoja_012663</i>	1	-2.06	<i>glysoja_048887</i>
ABCB	16	10.54	<i>glysoja_023579</i>	5	-10.75	<i>glysoja_016804</i>
ABCC	8	9.32	<i>glysoja_011467</i>	9	-8.02	<i>glysoja_023329</i>
ABCD	1	1.54	<i>glysoja_014379</i>	1	-2.21	<i>glysoja_026552</i>
ABCE	1	1.23	<i>glysoja_020507</i>	0	1.23	<i>glysoja_020507</i>
ABCF	5	1.71	<i>glysoja_049083</i>	0	1.23	<i>glysoja_044116</i>
ABCG	17	4.96	<i>glysoja_036876</i>	6	-5.26	<i>glysoja_003050</i>
ABCI	2	2.44	<i>glysoja_040856</i>	1	-1.30	<i>glysoja_011884</i>

表 5 差异表达基因表达量分析
Table 5 Analysis on the expression of DEGs

基因 ID Gene ID	0 h FPKM	6 h FPKM	12 h FPKM	log ₂ (6 h/0 h)	log ₂ (12 h/0 h)	基因功能 Gene function
<i>glysoja_001111</i>	3.23	6.79	7.28	1.07	1.17	受体激酶 Receptor-like kinase
<i>glysoja_002097</i>	1.12	0.54	0.45	-1.05	-1.32	ABCC4 ABC transporter C family member 4-like
<i>glysoja_005076</i>	2.96	2.84	8.63	-0.06	1.54	含 U-box 域蛋白 33 U-box domain-containing protein 33-like isoform X1
<i>glysoja_005213</i>	5.91	23.29	15.14	1.98	1.36	FERONIA 受体激酶前体 FERONIA receptor-like kinase precursor
<i>glysoja_005423</i>	23.48	3.16	5.71	-2.89	-2.04	非典型蛋白 LOC100798404 Uncharacterized protein LOC100798404
<i>glysoja_008864</i>	115.12	99.58	180.57	-0.21	0.65	非典型蛋白 LOC100809679 Uncharacterized protein LOC100809679 isoform X1
<i>glysoja_010547</i>	13.84	7.64	21.22	-0.86	0.62	蛋白激酶 APK1A, 叶绿体中 Protein kinase APK1A, chloroplastic-like
<i>glysoja_010956</i>	139.58	17.85	48.31	-2.97	-1.53	ABCC14 ABC transporter C family member 14-like isoform X1
<i>glysoja_013434</i>	12.02	9.10	26.65	-0.40	1.15	蛋白激酶 APK1A, 叶绿体中 Protein kinase APK1A, chloroplastic-like isoform 1
<i>glysoja_017978</i>	0	0	2.14	-	11.06	蛋白激酶 Protein kinase isoform X1
<i>glysoja_019668</i>	1.13	2.27	18.86	1.01	4.06	蛋白激酶 Protein kinase isoform X1
<i>glysoja_024284</i>	8.54	9.73	4.40	0.19	-0.96	含 U-box 域蛋白 50 Putative U-box domain-containing protein 50-like
<i>glysoja_046362</i>	0.67	3.87	7	2.53	3.39	蛋白激酶 APK1B, 叶绿体中 Protein kinase APK1B, chloroplastic-like
<i>glysoja_047568</i>	0	0.67	4.20	9.39	12.04	丝/苏氨酸蛋白激酶 At1g18390 Serine/threonine-protein kinase At1g18390-like

Byrne 等^[33]发现黑麦草在亚硒酸钠的诱导下 ABCA 家族的基因表达量显著增加, Maathuis 等^[34]发现 *AtATH14* 与 *AtATH15* 在盐胁迫下表达下调; Wu 等^[35]发现 *AtABCB19* 可以使种子萌发后下胚轴快速的伸长。Lee 等^[36]发现 *AtABCB14* 可通过将苹果酸盐从质外体运输到保卫细胞, 提高渗透压来调控气孔对 CO₂ 的响应, 从而调控气孔的开合; *AtABC5* 也可以通过调节气孔开闭来增强植物的抗逆性^[37]; 拟南芥中 *AtABCG40*、*AtPDR12* 基因的表达能够提高植物的抗旱能力^[2]; 水稻 *OsABCG36* 基因也参与了植物的抗旱反应^[38]; 大豆 *GmPDR12* 基因在水杨酸及功能类似物质的诱导下能够快速大量表达^[7]。本研究中, 注释到的 ABCA 家族基因既有上调也有下调, 注释基因有 *ABCA1*、*ABCA2* 和 *ABCA7*; *ABCA1* 主要参与胆固醇的逆转运过程^[39], *AtABCA2* (别名 *AtATH1*) 与拟南芥的开花相关^[40], *ABCA7* 与人体的阿尔茨海默病相关^[41], 但在植物中的功能尚不清楚; 注释到的 ABCB 家族基因上调和下调明显, 注释基因有 *ABCB1*、*ABCB4*、*ABCB6*、*ABCB11*、*ABCB13*、*ABCB25*、*ABCB26* 等, 与徐杏等^[42]的研究结果一致; 注释到的 ABCC 家族除已知的与干旱胁迫相关的 *ABCC5* 外, 还包括 *ABCC8*、*ABCC10*、*ABCC13* 和 *ABCC14* 等, *AtABCC10* 证实与病原反应相关^[13], *AtABCC13* 与营养生长相关^[32]; 注释到的 ABCG 家族包含的基因种类最多, 关于 *ABCG11*、*ABCG14*、*ABCG22*、*ABCG32*、*ABCG36* 基因功能已有研

究报道^[11,43], 本研究中还注释到了 *ABCG3*、*ABCG7*、*ABCG15*、*ABCG21*、*ABCG41* (*PDR13*) 等, *AtABCG3* 参与 PC-Cd 的运输^[44]; *VvABCG7* 与葡萄的胚珠发育有关^[11], 注释到的 ABCD 家族仅包含 2 个基因 (*ABCD1* 和 *ABCD2*), 研究表明 *ABCD1* 可能对植物与病原菌、有害动植物以及共生体间相互作用有关键作用^[45], *ABCD2* 的功能仍未知, 尚需要进一步的研究证明。

4 结论

本研究结果表明, 野生大豆 ABC 转运蛋白基因在干旱胁迫 12 h 差异表达数量最多, 且在 24 h 和 48 h 无明显差异。ABC 转运蛋白的不同家族基因对干旱胁迫的响应存在差异, ABCB、ABCC 和 ABCG 家族的响应基因最多, ABCE 家族的响应基因最少。出现差异表达的基因也是 ABCB、ABCC 和 ABCG 家族最多, ABCE 家族最少。在 GO 生物学过程中, 嘌呤核苷酸分解代谢过程的注释基因最多。在注释到 KEGG 途径的 ABC 转运蛋白途径中, K05658 (*ABCB1*), K05681 (*ABCG*) 和 K05666 (*ABCC*) 的注释基因最多, K05663 (*ATM*) 最少。本研究结果为抗旱基因的挖掘提供了新的基因资源。

参考文献:

- [1] Yuan C P, Wang Y J, Zhao H K, Zhang L, Wang Y M, Liu X D,

- Zhong X F, Dong Y S. Genetic diversity of *rhg1* and *Rhg4* loci in wild soybeans resistant to soybean cyst nematode race 3[J]. *Genetics & Molecular Research*, 2016, 15(2):1-10
- [2] Kim M Y, Lee S, Van K, Kim T H, Jeong S C, Choi I Y, Kim D S, Lee Y S, Park D, Ma J, Kim W Y, Kim B C, Park S, Lee K A, Kim D H, Kim K H, Shin J H, Jang Y E, Kim K D, Liu W X, Chaisan T, Kang Y J, Lee Y H, Kim K H, Moon J K, Schmutz J, Jackson S A, Bhak J, Lee S H. Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(51):22032-22037
- [3] Lam H M, Xu X, Liu X, Chen W, Yang G, Wong F L, Li M W, He W, Qin N, Wang B, Li J, Jian M, Wang J, Shao G, Wang J, Sun S S, Zhang G. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(12):1053-1059
- [4] Higgins C F. ABC transporters: From microorganisms to man [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1992, 8(1):67-113
- [5] 曹冠华, 柏旭, 陈迪, 张晓蓉, 贺森. ABC 转运蛋白结构特点及在植物和真菌重金属耐性中的作用与机制 [J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(10):1617-1628
- [6] Beis K. Structural basis for the mechanism of ABC transporters [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2015, 43(5):889
- [7] Broehan G, Kroeger T, Lorenzen M, Merzendorfer H. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of *Tribolium castaneum* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1):6
- [8] 刘艳青, 赵永芳. ABC 转运蛋白结构与转运机制的研究进展 [J]. *生命科学*, 2017, 29(3):223-229
- [9] 曹冠华, 柏旭, 陈迪, 张晓蓉, 贺森. ABC 转运蛋白结构特点及在植物和真菌重金属耐性中的作用与机制 [J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(10):1617-1628
- [10] 邵若玄, 沈忆珂, 周文彬, 方佳, 郑炳松. 植物 ATP 结合盒 (ABC) 转运蛋白研究进展 [J]. *浙江农林大学学报*, 2013, 30(5):761-768
- [11] Kang J, Pei Z M. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(5):2355-2360
- [12] Schulz B, Kolkusaoglu H U. Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? [J]. *Febs Letters*, 2006, 580(4):1010-1016
- [13] 李依民, 雷根平, 颜永刚, 彭亮, 张娜, 刘亮亮, 黑小斌, 李欢, 张岗, 郭顺星. 铁皮石斛 2 个 F 家族 ABC 转运蛋白基因的克隆和表达研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(15):3153-3159
- [14] 唐玉瑾. 葡萄 ABCG 基因亚家族半分子成员克隆及表达分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016
- [15] 吴鹏, 郭茜茜, 武涛, 秦智伟. 黄瓜 ABC 转运蛋白基因 (*abca19*) 的克隆及其对农药霜霉胁迫的响应 [J]. *作物杂志*, 2015(3):45-51
- [16] Rea P A. Plant ATP-binding cassette transporters [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2007, 58:347-375
- [17] Kaneda M, Schuetz M, Lin B S, Chanis C, Hamberger B, Western T L, Ehrling J, Samuels A L. ABC transporters coordinately expressed during lignification of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(6):2063
- [18] 卢金森, 李琴, 李智平. 表观遗传学因素对转运蛋白 ABCB1 的影响及其在药代动力学方面的作用 [J]. *儿科药理学杂志*, 2018, 24(5):50-54
- [19] Mcfarlane H E, Shin J J, Bird D A, Samuels A L. Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(9):3066-3075
- [20] 赵胡. 阜豆 *GmABC* 基因的克隆及表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2012, 32(9):1726-1730
- [21] 王玲玲. 大豆 ABC 转运蛋白基因的克隆及响应铝和重金属胁迫的表达分析 [C]//江苏省遗传学会第八届会员代表大会暨学术研讨会论文集. 江苏: 江苏省遗传学会, 2010:90-91
- [22] 马进, 郑钢. 利用转录组测序技术鉴定紫花苜蓿根系盐胁迫应答基因 [J]. *核农学报*, 2016, 30(8):1470-1479
- [23] 李惠华, 常强, 王伟, 曾碧玉, 徐剑, 苏明华. 基于转录组测序的枇杷五环三萜合成途径差异基因的分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(2):222-233
- [24] 张少平, 张少华, 邱珊莲, 张帅, 吴松海, 何炎森, 郑开斌, 郑加协. 基于转录组测序的紫背天葵花青素相关基因分析 [J]. *核农学报*, 2018, 32(4):639-645
- [25] 王洋. NaHCO₃ 模拟盐碱混合胁迫下野生大豆转录组研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014
- [26] Zhang J, Wang J, Jiang W, Liu J, Yang S, Gai J, Li Y. Identification and analysis of NaHCO₃ stress responsive genes in wild Soybean (*Glycine soja*) roots by RNA-seq [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7:1842
- [27] Shi G, Huang F, Gong Y, Xu G, Yu J, Hu Z, Cai Q, Yu D. RNA-Seq analysis reveals that multiple phytohormone biosynthesis and signal transduction pathways are reprogrammed in curled-cotyledons mutant of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1):510
- [28] Yuan S, Rong L, Chen S, Chen H, Zhang C, Chen L, Hao Q, Shan Z, Yang Z, Qiu D, Zhang X, Zhou X. RNA-Seq analysis of differential gene expression responding to different rhizobium strains in Soybean (*Glycine max*) roots. [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(6):7363
- [29] Duanmu H, Wang Y, Bai X, Cheng S, Deyholos M K, Wong G K, Li D, Zhu D, Li R, Yu Y, Cao L, Chen C, Zhu Y. Wild soybean roots depend on specific transcription factors and oxidation reduction related genes in response to alkaline stress [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2015, 15(6):651-660
- [30] 蒲伟凤. 不同类型大豆种质资源抗旱性比较及野生大豆抗旱性筛选 [D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2010
- [31] 张小芳, 王冰冰, 徐燕, 张炜坤, 赵恢, 张锴, 乔亚科, 李桂兰. PEG 模拟干旱胁迫下野生大豆转录组分析 [J]. *大豆科学*, 2018, 37(5):681-689
- [32] 朱璐, 许杰, 张大兵. 拟南芥 ABC 转运类蛋白家族的分子进化、表

- 达模式和蛋白功能网络预测分析[J].植物生理学报,2012,48(12):1151-1166
- [33] Byrne S L, Durandea K, Nagy I, Barth S. Identification of ABC transporters from *Lolium perenne* L. that are regulated by toxic levels of selenium [J]. *Planta*, 2010, 231(4):901-911
- [34] Maathuis F J, Filatov V, Herzyk P C, Krijger G B, Axelsen K, Chen S, Green B J, Li Y, Madagan K L, Sanchez-Fernandez R, Forde B G, Palmgren M G, Rea P A, Williams L E, Sanders D, Amtmann A. Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress [J]. *Plant Journal*, 2003, 35(6): 675-692
- [35] Wu G, Carville J S, Spalding E P. *ABCB19*-mediated polar auxin transport modulates *Arabidopsis* hypocotyl elongation and the endoreplication variant of the cell cycle [J]. *Plant Journal*, 2016,85(2): 209-218
- [36] Lee M, Choi Y, Burla B, Kim Y Y, Jeon B, Maeshima M, Yoo J Y, Martinoia E, Lee Y. The ABC transporter *AtABCB14* is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂ [J]. *Nature Cell Biology*, 2008, 10(10): 1217-1223
- [37] Nagy R, Grob H, Weder B, Green P, Klein M, Frelet-Barrand A, Schjoerring J K, Brearley C, Martinoia E. The *Arabidopsis* ATP-binding cassette protein *AtMRP5/AtABCC5* is a high affinity inositol Hexakisphosphate transporter involved in guard Cell signaling and phytate storage [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(48):33614-33622
- [38] Galbati M, Simoni L, Pavesi G, Cominelli E, Francia P, Vavasseur A, Nelson T, Bevan M, Tonelli C. Gene trap lines identify *Arabidopsis* genes expressed in stomatal guard cells [J]. *Plant Journal*, 2010, 53(5):750-762
- [39] Hafiane A, Genest J. ATP binding cassette A1 (ABCA1) mediates microparticle formation during high-density lipoprotein (HDL) biogenesis [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 257:90-99
- [40] 张利国. 拟南芥 OFP1 与 BLH3、ATH1 蛋白互作与相关功能分析 [D]. 哈尔滨:东北农业大学,2016
- [41] Roeck A D, Duchateau L, Dongen J V, Cacace R, Bjerke M, Van den Bossche T, Cras P, Vandenberghe R, De Deyn P P, Engelborghs S, Van Broeckhoven C, Slegers K. An intronic VNTR affects splicing of *ABCA7*, and increases risk of Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathologica*, 2018, 135(6):1-11
- [42] 徐杏,邱杰,徐扬,徐辰武.水稻 ABCB 转运蛋白基因的分子进化和表达分析[J].中国水稻科学,2012,26(2):127-136
- [43] 张婧,陈梦词,马清,未丽,王锁民.植物 ABCG 转运蛋白研究进展[J].草业学报,2015,24(7):180-188
- [44] 王晓珠,孙万梅,马义峰,韩三琴,韩丽慧,王邦俊.拟南芥 ABC 转运蛋白研究进展[J].植物生理学报,2017,53(2):133-144
- [45] Bussell J D, Reichelt M, Wiszniewski A A, Gershenzon J, Smith S M. Peroxisomal ATP-binding cassette transporter COMATOSE and the multifunctional protein abnormal INFLORESCENCE MERISTEM are required for the production of benzoylated metabolites in *Arabidopsis* seeds [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(1):48-54

Sequence Analysis of ABC Transporter Transcriptome in Wild Soybean Under the Drought Stress

ZHANG Xiaofang QIAO Yake WANG Bingbing XU Yan ZHANG Kai LI Guilan*

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

Abstract: In order to obtain the genes related to ABC transporter protein family under the conditions of drought stress, the drought-resistant wild soybean accession was used as experimental material which was treated with 20% PEG6000 solution to simulate drought stress. RNA was extracted from leaves of drought treated 0, 6, 12, 24 and 48 h respectively, and transcriptome sequencing was carried out by Illumina Hi Seq 2000 platform. Based on the results of GO, KEGG and NR 3 major database notes, and then using ABC transporter as the key words to screen, a total of 337 ABC transporter related sequences were obtained, including 8 subfamilies (ABCA、ABCB、ABCC、ABCD、ABCE、ABCF、ABCG 和 ABCI). Differential expression analysis showed that there were 182 differentially expressed genes. Most of the differentially expressed genes annotated by GO database were purine ribonucleotide catabolic processes, while the Unigenes annotated by KEGG database were distributed in the 5 subfamilies (ABCA、ABCB、ABCC、ABCD、ABCE、ABCF、ABCG 和 ABCI). The evolutionary analysis of 168 differentially Unigenes annotated in the NR database shows that the ABCE, ABCF, ABCG families and ABCI11 were clustered to a group, the ABCB, ABCC families and ABCI10 were clustered to a group, and the ABCA, ABCD families and ABCI19 were clustered to a group. The information obtained from ABC transporters provides a theoretical basis for further study on drought resistance genes of ABC transporters in wild soybean.

Keywords: wild soybean, RNA-seq, drought stress, ABC transporter