

DOI:10.11686/cyxb2024185

<http://cyxb.magtech.com.cn>

马婷, 陈奋奇, 王勇, 等. NaCl胁迫下鹰嘴紫云英根系基因差异表达及相关通路分析. 草业学报, 2025, 34(4): 104—123.

MA Ting, CHEN Fen-qi, WANG Yong, et al. Differentially expressed genes and related pathways in root systems of *Astragalus cicer* under NaCl stress. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(4): 104—123.

NaCl胁迫下鹰嘴紫云英根系基因差异表达 及相关通路分析

马婷, 陈奋奇, 王勇, 哈雪, 李亚君, 马晖玲*

(甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 土壤盐渍化严重影响植物的生长和产量, 限制农业生态经济的发展。鹰嘴紫云英作为优良生态草种、高效绿肥作物和优质蛋白饲草, 探究其对NaCl胁迫适应性的分子机制, 对提高鹰嘴紫云英的耐盐性, 促进其在盐渍土中的栽培具有重要意义。本研究对NaCl胁迫下不同时间点(0、12、48和72 h)的鹰嘴紫云英根系进行转录组学分析, 以探究鹰嘴紫云英对NaCl胁迫的响应机制。结果表明, 与0 h相比, NaCl胁迫处理12、48和72 h后鹰嘴紫云英根系中分别有46051、45653和42869个差异表达基因, 包括上调基因8027、10053和11042个, 下调基因38024、35600和31827个。GO富集和KEGG富集显示, 鹰嘴紫云英根系主要通过氧化还原酶活性、类黄酮生物合成和苯丙素生物合成等通路来响应NaCl胁迫。通过趋势分析, 发现苯丙素生物合成和类黄酮生物合成通路的差异基因在胁迫处理48 h上调表达或恢复到初始量。C2H2、C3H、NAC、MYB、WRKY和bZIP等转录因子在胁迫处理不同时间点下均有表达, 可能与鹰嘴紫云英的耐盐性密切相关。本研究结果为进一步探究鹰嘴紫云英耐盐机制提供了基础数据, 也为后续提高鹰嘴紫云英的耐盐性提供了理论支撑。

关键词: 鹰嘴紫云英; 根系; 转录组; NaCl胁迫; 差异表达基因; 代谢通路

Differentially expressed genes and related pathways in root systems of *Astragalus cicer* under NaCl stress

MA Ting, CHEN Fen-qi, WANG Yong, HA Xue, LI Ya-jun, MA Hui-ling*

Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem of Ministry of Education, Pratacultural Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China

Abstract: Soil salinization seriously affects the growth and yield of plants, and limits the development of agricultural and ecological economies. *Astragalus cicer* is a versatile ecological grass species, an efficient green manure crop, and a superior protein forage. Exploring the molecular mechanism of its adaptability to NaCl stress is of great significance for enhancing its salt tolerance and advancing its cultivation in saline soil. To investigate its responses to NaCl stress, transcriptomic analyses were performed on the roots of *A. cicer* at different time points (0, 12, 48, and 72 hours) during an NaCl treatment. The results showed that, compared with 0 hour, after 12, 48, and 72 hours of NaCl stress, there were, respectively, 46051, 45653, and 42869 differentially expressed genes (DEGs) in the roots of *A.*

收稿日期: 2024-05-20; 改回日期: 2024-06-25

基金项目: 苜蓿育种项目(2022ZD0401102)资助。

作者简介: 马婷(1998—), 女, 甘肃天水人, 在读硕士。E-mail: 1670140986@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: mahl@gsau.edu.cn

cicer, including 8027, 10053, and 11042 up-regulated DEGs and 38024, 35600, and 31827 down-regulated DEGs, respectively, at the three time points. Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analyses showed that the pathways responding to NaCl stress in the roots of *A. cicer* were oxidoreductase activity, flavonoid biosynthesis, and phenylpropanoid biosynthesis. A trend analysis showed that the DEGs in phenylpropanoid biosynthesis and flavonoid biosynthesis pathway were still up-regulated or had returned to their baseline levels at 48 hours of NaCl treatment. Genes encoding C2H2, C3H, NAC, MYB, WRKY, and bZIP transcription factors were expressed at different time points during the NaCl treatment, suggesting that these transcription factors are closely related to salt tolerance in *A. cicer*. The results of this study provide basic data for further exploration of the mechanism of salt tolerance of *A. cicer*, and also provide theoretical support for breeding to improve salt tolerance.

Key words: *Astragalus cicer*; roots; transcriptome; NaCl stress; differentially expressed genes; metabolic pathway

土壤盐碱化是在气候、地形、水文等自然因素和人类活动的长期互动下形成的土地退化过程,已成为危害世界农业发展的非生物胁迫因素之一^[1]。目前,随着灌溉土地和农业用地逐渐盐碱化,世界盐碱地面积约有9.55亿 hm^2 ,占全球陆地面积的10%^[2],这使全球粮食安全受到极大挑战。耕地保护是国家粮食安全的基本保障,盐碱地可以作为储备资源,通过分区分类改造盐碱地,提高可耕种面积和改善生态环境,实现经济和生态同步发展。然而,种植耐盐植物的生物措施是最经济环保有效的。根据植物在钠离子含量为 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上的盐碱环境能否完成正常生命周期,将其分为盐生植物和甜生植物^[3]。为应对盐碱胁迫,盐生植物进化出避盐、耐盐的适应方式。根据避盐性可分为3类,分别是依靠盐腺向外分泌或盐囊向内贮存的盐分泌植物;通过钠离子积累在肉质化叶茎和液泡储存水分来稀释盐分的稀盐植物,也叫作真盐生植物;通过细胞质膜选择性吸收离子的拒盐植物^[4]。植物的耐盐性则通过调节渗透平衡、离子平衡、活性氧清除平衡、内源激素信号等途径响应盐胁迫。此外,盐生植物还会通过改变自身形态结构进而适应生存环境^[5]。甜生植物没有进化出避盐性特征,但可以通过耐盐性响应盐胁迫。为合理改良和利用盐碱地,实现经济和生态效益最大化,寻找适宜的耐盐植物及探究其耐盐分子机制具有重要意义。

有研究表明,植物为抵御非生物胁迫发生了一系列应对策略^[6]。为探究植物复杂的耐盐机制,人们从转录组层面探究植物应对非生物胁迫的分子机制^[7]。目前,转录组测序已被应用于研究模式植物和作物与盐胁迫相关的基因表达调控网络机制。例如,李红燕等^[8]通过转录组分析揭示小麦(*Triticum aestivum*)根系在NaCl处理下,抗氧化、植物激素信号传导、氨基酸合成等通路的差异基因在不同时间都有表达。Deng等^[9]通过转录组分析,发现小黑麦(*Triticosecale*)根系在盐胁迫不同时间处理下,有30个转录因子和60个候选差异表达基因参与了氧化还原和糖代谢等途径。Frosi等^[10]对盐胁迫处理下的4种豇豆(*Vigna unguiculata*)进行比较转录组分析,每种耐盐种质有27个差异基因显著表达,其中两个差异基因具有SNP变异,这为豇豆育种提供了理论基础。Fang等^[11]通过生理和转录组分析揭示两个水稻(*Oryza sativa*)品种在NaCl胁迫不同时间处理的差异基因在抗氧化和渗透平衡通路中显著富集,有4个基因在两个品种都上调表达,还有4个基因只在HH11品种上调表达,挑选出水稻耐盐品种的关键候选基因。Li等^[12]对盐胁迫处理下柽柳(*Tamarix chinensis*)的根、茎、叶进行转录组分析,发现不同器官的差异表达基因在转录因子家族、维持离子平衡、渗透平衡等途径富集,但其表达模式不同,表明不同器官适应盐胁迫的能力不同。然而,关于鹰嘴紫云英(*Astragalus cicer*)响应NaCl胁迫的差异表达基因的信息却十分缺乏。

鹰嘴紫云英,又名鹰嘴黄芪,是豆科黄芪属多年生牧草^[13]。它不仅是保持水土的优良植物,还是高效绿肥作物和优质蛋白饲草^[14-15]。侯文静等^[16]和杨迎月等^[17]研究报道鹰嘴紫云英可以在一定范围内的盐碱地种植,高盐环境会抑制生长、降低出芽数。王建华^[18]研究发现鹰嘴紫云英苗期的根系生长最快,主要分布在0~10 cm的土壤中,在分枝期和花期时向更深的土壤生长,在表土层生出纵横交错的根状茎,形成分布广、纵深长的根系特征。

根系不仅是接触盐碱环境的首要器官,而且具有快速响应能力,研究根系如何响应盐胁迫具有重要意义^[19]。目前,鹰嘴紫云英对盐胁迫的响应主要集中在生理生化和生长指标,转录组学的研究还未有报道。因此,本研究首次以NaCl胁迫下的鹰嘴紫云英根系为材料,在转录水平上分析不同胁迫时间点的相关基因表达,并对差异表达基因进行功能富集分析、相关通路分析和转录因子调控分析,以期初步解析鹰嘴紫云英根系响应NaCl胁迫机理,为研究其对盐胁迫的响应提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料与水培试验

试验材料为鹰嘴紫云英品种‘甘绿2号’(A. cicer ‘Ganlv 2’),由甘肃创绿草业科技有限公司提供。选取籽粒饱满、大小一致无虫眼的种子,将其在温水中浸泡12 h打破种皮,然后播种于营养土中,于2023年10月培养在甘肃农业大学草业学院组织培养室(光照/黑暗;25℃/20℃;16 h/8 h;相对湿度60%~70%;光照强度5000 lx)中育苗。待生长至两叶一心后移植于96孔的水培盒(长12 cm×宽8 cm×高11 cm)中,一个水培盒中移植12株芽苗,水培盒中Hoagland营养液体积为1000 mL,间隔2 d向水培盒中补充Hoagland营养液至1000 mL,将水培盒放在组织培养室(光照/黑暗;25℃/20℃;16 h/8 h;相对湿度60%~70%;光照强度5000 lx)中培养,每隔7 d换一次营养液。幼苗生长至六叶一心后进行150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫处理。根据混样法分别在胁迫处理0、12、48和72 h时间点采集根系样品,即每个时间点的样品为在3个水培盒中采集的生长一致幼苗的根系组织(共36株),每个时间点处理下有3个生物学重复。所有样品于-80℃超低温冰箱中贮存备用,用于RNA测序分析。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA提取与RNA测序 将NaCl胁迫处理0、12、48和72 h下鹰嘴紫云英根系组织的总RNA按照天根试剂盒(Tiangen,中国)说明进行提取。利用Agilent 2100生物分析仪(Agilent Technologies,美国)检测RNA完整性及总量,具体步骤参考张金青^[20]的研究。然后,在检测合格的样品中取至少1 μg的总RNA,构建cDNA文库,库检后在Illumina NovaSeqTM 6000平台测序。测序完成得到原始数据,过滤原始数据并去除原始数据中带接头的、含N的(N表示无法识别碱基信息)及低质量的序列后获得高质量的干净数据。转录本组装以Trinity^[21]拼接技术为基础,并对转录本序列进行Corset层次聚类^[22]后做参考序列,参考序列比对采用RSEM软件^[23]。组装完成后,采用BUSCO(benchmarking universal single-copy orthologs)(<http://busco.ezlab.org/>)、tblastn、augustus和hmmer等软件对转录本组装进行完整性评估。并通过NR(NCBI non-redundant protein sequences)数据库进行转录本功能注释。所有RNA测序原始数据上传至NCBI公共数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),数据编号为PRJNA1109981。

1.2.2 差异表达基因及功能富集分析 将鹰嘴紫云英根系胁迫处理0、12、48和72 h的干净数据进行基因表达分析,获得基因表达量。通过DESeq 2软件^[24]将不同时间处理比较组合进行差异分析,以 $|\log_2FC| \geq 1$ 且 $p_{adj} < 0.05$ 为阈值筛选各比较组合的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。以 $p_{adj} < 0.05$ 为标准,将差异表达基因在基因本体(gene ontology, GO)数据库和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库分别进行注释和富集分析。

1.2.3 DEGs的表达模式分析 使用Short Times-series Expression Miner(<https://www.omicstudio.cn/tool/37>)^[25]分析鹰嘴紫云英根系在NaCl胁迫处理0、12、48和72 h下所有差异基因的表达趋势。参数调整如下:数据处理为Normalize data;聚类方法为STEM Clustering Method;P值校正为Bonferroni;聚类个数为10个(相似趋势的文件将被合并);变化跨度为2。

1.2.4 qRT-PCR验证 随机选择9个基因,对RNA-seq结果进行验证。首先用RNAprep Pure Plant Plus Kit(Tiangen,中国)提取样品总RNA,然后将总RNA用反转录试剂盒Prime Script RT Reagent Kit(TaKaRa,日本)构建成cDNA。利用Primer-BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)在线网站设计引物,引物序列如表1所示,再进行qRT-PCR分析,试验流程参照Chen等^[26]的研究。以AcActin作为内参基因,用2^{-ΔΔCt}法^[27]计算基因的相对表达量。

表 1 鹰嘴紫云英根系差异基因的引物序列

Table 1 Sequence of primer for differentially expressed genes in *A. cicer* roots (5'-3')

名称 Name	描述 Description	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
<i>CHI</i>	查尔酮异构酶 Chalcone isomerase	TGCACCACCGAGGAAATAGG	GGGTATGGCAGCAACAATGG
<i>CHR1</i>	查尔酮还原酶 1 Chalcone reductase 1	AGCTCTTGGGAACAAACGTG	AGCTAGCAGGGGACCAAATG
<i>F3'H</i>	类黄酮 3'-羟化酶 Flavonoid 3'-hydroxylase	CGTCCAGCACAAAGGGTAT	GCCATAGCTCGTGACCCAAA
<i>CHS</i>	查尔酮合成酶 Chalcone synthase	CCAGGTGGTCTGCAATTCT	GAGGACACAAGCACTCGACA
<i>CHS1A-like</i>	查尔酮合成酶 1A-like Chalcone synthase 1A-like	TGTCACACATGCGTCTGAACT	CCTGCCACTGTCTTGGCAAT
<i>CYP450</i>	细胞色素 P450 Cytochrome P450	ACGCATTTTGCGCCAATGAT	TGGCCACCCAAGTTCTACAC
<i>C4H</i>	反肉桂酸 4 单加氧酶 Trans-cinnamate 4-monooxygenase	TGCGCACACACAAAAAGAG	CTCCACATGAGGGACCAACC
<i>PYL</i>	脱落酸感受器 Abscisic acid receptor	TGATGATGAACGCCACGTCA	TCCATGCGGAACATCAACCA
<i>bZIP</i>	bZIP 转录因子 bZIP transcription factor	TATGGTCCTAGTTTGGCGGC	ACAACACCAGCTCTCACCAA
<i>Actin</i>	肌动蛋白 Actin	TGTTCCCTGGCATTGCTGAT	CTTTCTCTCGGGTGGTGCAA

1.3 数据分析

差异表达基因分析以及 GO 和 KEGG 富集分析在诺禾致源云平台进行,采用 Microsoft Excel 2016 软件进行 qRT-PCR 分析、数据整理并作图。

2 结果与分析

2.1 测序数据质量控制

对鹰嘴紫云英进行 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫处理,与 0 h (未做处理) 相比,处理 12 h 后叶片无明显变化,处理 48 和 72 h 后部分叶片发黄 (图 1)。对 NaCl 胁迫下鹰嘴紫云英幼苗 12 个根系样品进行转录组测序,经测序数据质量控制后共获得 82.56 Gb 原始数据 (表 2),各样品干净读数平均数据量为 6.88 Gb,对照 0 h (r_0)、12 h (r_12)、48 h (r_48)、72 h (r_72) 得到的干净读数分别为 23246361、22399010、22493392、23606448, Q30 碱基百分比 $\geq 94.97\%$, GC 含量为 40.19%~42.49%,将每个样品的干净读数与 Trinity 拼接组装参考序列进行比对并过滤后,发现 12 个样本的总对比率均 $\geq 65.84\%$ 。结果表明鹰嘴紫云英根系组织测序质量可靠,可进行后续分析。

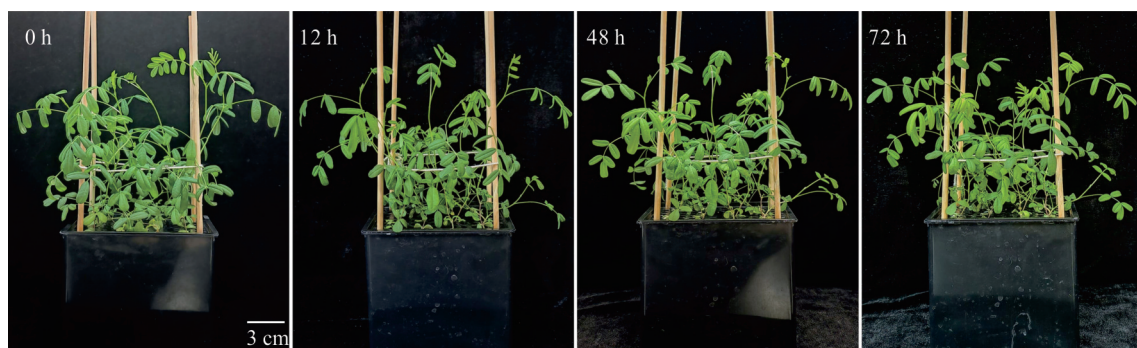


图 1 盐胁迫下鹰嘴紫云英表型变化

Fig. 1 Phenotypic changes of *A. cicer* under NaCl stress

2.2 DEGs 筛选和鉴定

通过对 NaCl 胁迫下鹰嘴紫云英的 4 个时间点两两比较 (表 3),进行 DEGs 筛选。其中 r_12 vs r_0 的差异基因数量最多,为 46051 个,上、下调基因分别为 8027 和 38024 个,占比为 17.43% 和 82.57%; r_48 vs r_0 差异基因总数为 45653 个,上、下调基因分别为 10053 和 35600 个,占比为 22.02% 和 77.98%; r_72 vs r_0 的差异基因总数为 42869 个,上、下调基因分别为 11042 和 31827 个,占比为 25.76% 和 74.24%; r_48 vs r_12 的差异基因总数为

表2 各样品测序数据质控统计

Table 2 Quality control statistics of sequencing data for each sample

样本 Sample	原始读数 Raw reads	原始数据量 Raw bases (Gb)	干净读数 Clean reads	干净数据量 Clean bases (Gb)	Q30 (%)	GC (%)	总对比率 Total mapped (%)
r_0_1	25608576	7.68	24842810	7.45	95.58	42.49	70.68
r_0_2	22654911	6.80	22160067	6.65	95.77	42.37	71.75
r_0_3	23401444	7.02	22736208	6.82	95.45	42.27	70.54
r_12_1	24325553	7.30	23233562	6.97	95.25	42.27	69.73
r_12_2	23471096	7.04	22839301	6.85	95.95	40.19	65.84
r_12_3	21972596	6.59	21124167	6.34	95.28	42.35	70.40
r_48_1	22903659	6.87	21974443	6.59	95.51	41.66	69.90
r_48_2	23716748	7.12	22832712	6.85	95.50	41.74	70.40
r_48_3	23380813	7.01	22673020	6.80	95.88	41.64	70.86
r_72_1	23445027	7.03	22237254	6.67	95.73	41.95	70.89
r_72_2	23476556	7.04	22400966	6.72	95.93	41.81	71.57
r_72_3	27057092	8.12	26181124	7.85	94.97	41.80	67.48

注: r_0、r_12、r_48 和 r_72 分别代表鹰嘴紫云英 NaCl 胁迫处理 0、12、48 和 72 h 的 4 个时间点。下同。Q30: 表示测序识别碱基质量值大于 30 的碱基占总碱基的比例。GC: 干净读数中鸟嘌呤与胞嘧啶所占的百分比。

Note: r_0, r_12, r_48 and r_72 represent four time points of *A. cicer* under NaCl stress at 0, 12, 48 and 72 hours, respectively. The same below. Q30: Represents the percentage of all base whose base sequencing recognition quality value is >30. GC: The percentage of guanine and cytosine in clean reads.

表3 6个比较组的差异表达基因数量

Table 3 Number of differentially expressed genes in six comparative groups

项目 Item	r_12 vs r_0	r_48 vs r_0	r_72 vs r_0	r_48 vs r_12	r_72 vs r_12	r_72 vs r_48
上调 Up-regulated	8027	10053	11042	11821	7633	4653
下调 Down-regulated	38024	35600	31827	5515	3768	4345
总数 Total	46051	45653	42869	17336	11401	8998

17336 个, 上、下调基因分别为 11821 和 5515 个, 占比为 68.19% 和 31.81%; r_72 vs r_12 的差异基因总数为 11401 个, 上、下调基因分别为 7633 和 3768 个, 占比为 66.95% 和 33.05%; r_72 vs r_48 的 DEG 最少, 为 8998 个, 上、下调基因分别为 4653 和 4345 个, 占比为 51.71% 和 48.29%。对 r_12 vs r_0、r_48 vs r_0、r_72 vs r_0、r_48 vs r_12、r_72 vs r_12、r_72 vs r_48 比较组的差异基因分别进行韦恩分析(图 2), 发现鹰嘴紫云英根系在 NaCl 胁迫下有 197 个基因持续表达。这些差异基因极有可能是鹰嘴紫云英根系响应 NaCl 胁迫的重要候选基因。

2.3 DEGs 的 GO 和 KEGG 富集分析

为了解 NaCl 胁迫下鹰嘴紫云英根系不同时间点 DEGs 的功能分布情况, 将不同时间点比较组的 DEGs 进行生物学过程、细胞组分及分子功能 3 大类的 GO 注释分析。对 6 个比较组的 GO 条目以 Q-value < 0.05 为标准进行排序, 统计每个比较组 Top15 的 GO 条目, 发现 6 个比较组中共有显著性 GO 条目为氧化还原酶活性过程(GO: 0016491)。对共有 GO 条目进行分析, 随着 NaCl 胁迫时间的增加, DEG 数量呈先增加后下降趋势。催化活性(GO: 0003824)在 r_48 vs r_0 和 r_72 vs r_12 比较组不显著富集, 在其他 4 个比较组中显著富集(表 4, 图 3); 阳离子结合(GO: 0043169)条目在 r_72 vs r_12 和 r_72 vs r_48 比较组不显著富集, 在其他 4 个比较组中显著富集。金属离子结合(GO: 0046872)、辅因子结合(GO: 00048037)、辅酶结合(GO: 00050662)和碳水化合物代谢过程(GO: 0005975)在 r_12 vs r_0、r_48 vs r_0 和 r_72 vs r_0 比较组中显著富集, 另外 17 和 31 个条目分别只在 2 和 1 个比较组中显著富集。结果表明 NaCl 胁迫可能激活了鹰嘴紫云英根系氧化还原酶活性的差异表达基因。

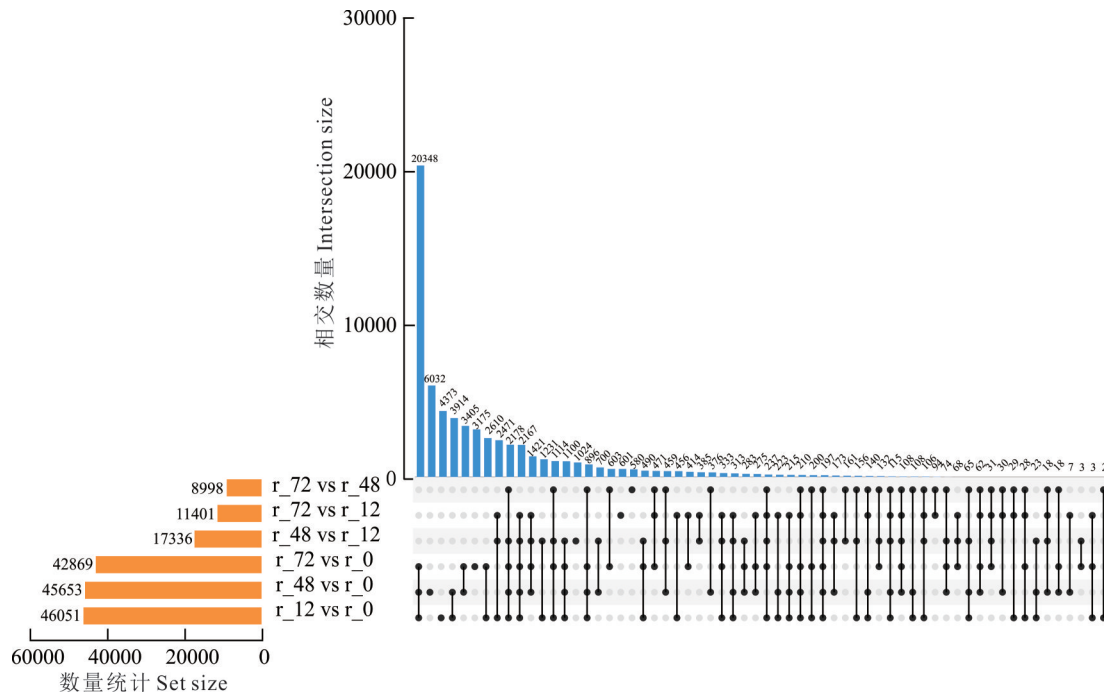


图 2 6 个比较组差异表达基因的韦恩分析

Fig. 2 Venn diagram of differentially expressed genes in six comparative groups

r_0、r_12、r_48 和 r_72 分别代表鹰嘴紫云英 NaCl 胁迫处理 0、12、48 和 72 h 的 4 个时间点。下同。r_0, r_12, r_48 and r_72 represent four time points of *A. cicer* under NaCl stress at 0, 12, 48 and 72 hours, respectively. The same below.

为了进一步明确不同比较组 DEG 富集的代谢通路,进行 KEGG 富集分析(图 4)。本研究对 6 个比较组的 KEGG 富集通路以 $\text{padj} < 0.05$ 为标准进行排序,发现 r_12 vs r_0 比较组显著富集 ($P < 0.05$) 的代谢通路为 0 条, r_48 vs r_0 比较组和 r_72 vs r_0 比较组显著富集 ($P < 0.05$) 的代谢通路为 1 条,都为核糖体通路,这 3 个比较组共有富集通路为核糖体、内质网中的蛋白质加工、剪接体、内分泌、RNA 转运、吞噬体、泛素介导的蛋白水解、糖酵解/糖异生、真核生物核糖体的生物发生。r_48 vs r_12 比较组、r_72 vs r_12 比较组和 r_72 vs r_48 比较组显著富集 ($P < 0.05$) 的代谢通路分别为 6、12 和 6 条,这 3 个比较组共有显著富集通路为淀粉和蔗糖代谢、苯丙素生物合成、光合生物的固碳作用、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、植物激素信号传导、倍半萜和三萜生物合成、氨基氨基酸代谢。值得注意的是,淀粉和蔗糖代谢、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、糖酵解/糖异生在 6 个比较组中都有差异基因表达,说明这些代谢通路可能为鹰嘴紫云英根系响应 NaCl 胁迫持续提供能量物质。其次,苯丙素生物合成、苯丙氨酸代谢、类黄酮生物合成和异黄酮生物合成通路的差异基因在 6 个比较组中均表达,表明苯丙类生物合成通路可能与鹰嘴紫云英根系响应 NaCl 胁迫密切相关。此外,6 个比较组的差异基因也被富集到植物激素信号传导、玉米素生物合成、谷胱甘肽代谢、过氧化物酶体、核糖体、氧化磷酸化、氮代谢等通路中,说明这些通路可能在鹰嘴紫云英根系响应 NaCl 胁迫中发挥重要作用(表 5)。

表 4 GO 条目注释信息

Table 4 Annotational information of the GO term

GO 条目 GO term	描述 Description
GO:0003824	催化活性 Catalytic activity
GO:0043169	阳离子结合 Cation binding
GO:0046872	金属离子结合 Metal ion binding
GO:0005515	蛋白结合 Protein binding
GO:0043167	离子结合 Ion binding
GO:0016740	转移酶活性 Transferase activity

续表 Continued Table

GO 条目 GO term	描述 Description
GO:0016491	氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity
GO:00048037	辅因子结合 Cofactor binding
GO:00050662	辅酶结合 Coenzyme binding
GO:0006629	脂质代谢过程 Lipid metabolic process
GO:0016301	激酶活性 Kinase activity
GO:00166787	水解酶活性 Hydrolase activity
GO:008233	肽酶活性 Peptidase activity
GO:0008152	代谢过程 Metabolic process
GO:00043412	大分子修饰 Macromolecule modification
GO:0005198	结构分子活性 Structural molecule activity
GO:0003735	核糖体的结构成分 Structural constituent of ribosome
GO:0022613	核糖核蛋白复合物生物发生 Ribonucleoprotein complex biogenesis
GO:0042254	核糖体生物发生 Ribosome biogenesis
GO:070011	肽酶活性,作用于L-氨基酸肽 Peptidase activity, acting on L-amino acid peptides
GO:1901564	有机氮化合物代谢过程 Organonitrogen compound metabolic process
GO:0019538	蛋白质代谢过程 Protein metabolic process
GO:0071704	有机物代谢过程 Organic substance metabolic process
GO:0005525	GTP 结合 GTP binding
GO:00009058	生物合成过程 Biosynthetic process
GO:1901576	有机物生物合成过程 Organic substance biosynthetic process
GO:00020037	血红素结合 Heme binding
GO:0046906	四吡咯结合 Tetrapyrrole binding
GO:0005975	碳水化合物代谢过程 Carbohydrate metabolic process
GO:0016684	氧化还原酶活性,作用于过氧化物作为受体 Oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor
GO:0004601	过氧化物酶活性 Peroxidase activity
GO:0071555	细胞壁组织 Cell wall organization
GO:0016798	水解酶活性,作用于糖基键 Hydrolase activity, acting on glycosyl bonds
GO:0071554	细胞壁组织或生物发生 Cell wall organization or biogenesis
GO:00045229	外部封装结构组织 External encapsulating structure organization
GO:0004553	水解酶活性,水解O-糖基化合物 Hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
GO:0006073	细胞葡聚糖代谢过程 Cellular glucan metabolic process
GO:00044042	葡聚糖代谢过程 Glucan metabolic process
GO:0005199	细胞壁的结构成分 Structural constituent of cell wall
GO:00009664	植物型细胞壁组织 Plant-type cell wall organization
GO:0071669	植物型细胞壁组织或生物发生 Plant-type cell wall organization or biogenesis
GO:00030312	外部封装结构 External encapsulating structure
GO:0005618	细胞壁 Cell wall
GO:0042546	细胞壁生物发生 Cell wall biogenesis
GO:00006032	几丁质分解代谢过程 Chitin catabolic process
GO:0046348	氨基糖分解代谢过程 Amino sugar catabolic process
GO:004264	细胞多糖代谢过程 Cellular polysaccharide metabolic process
GO:004262	细胞碳水化合物代谢过程 Cellular carbohydrate metabolic process
GO:0005976	多糖代谢过程 Polysaccharide metabolic process
GO:00044711	单体生物合成过程 Single-organism biosynthetic process
GO:0005982	淀粉代谢过程 Starch metabolic process
GO:0005985	蔗糖代谢过程 Sucrose metabolic process
GO:0005984	二糖代谢过程 Disaccharide metabolic process
GO:00044723	单体碳水化合物代谢过程 Single-organism carbohydrate metabolic process

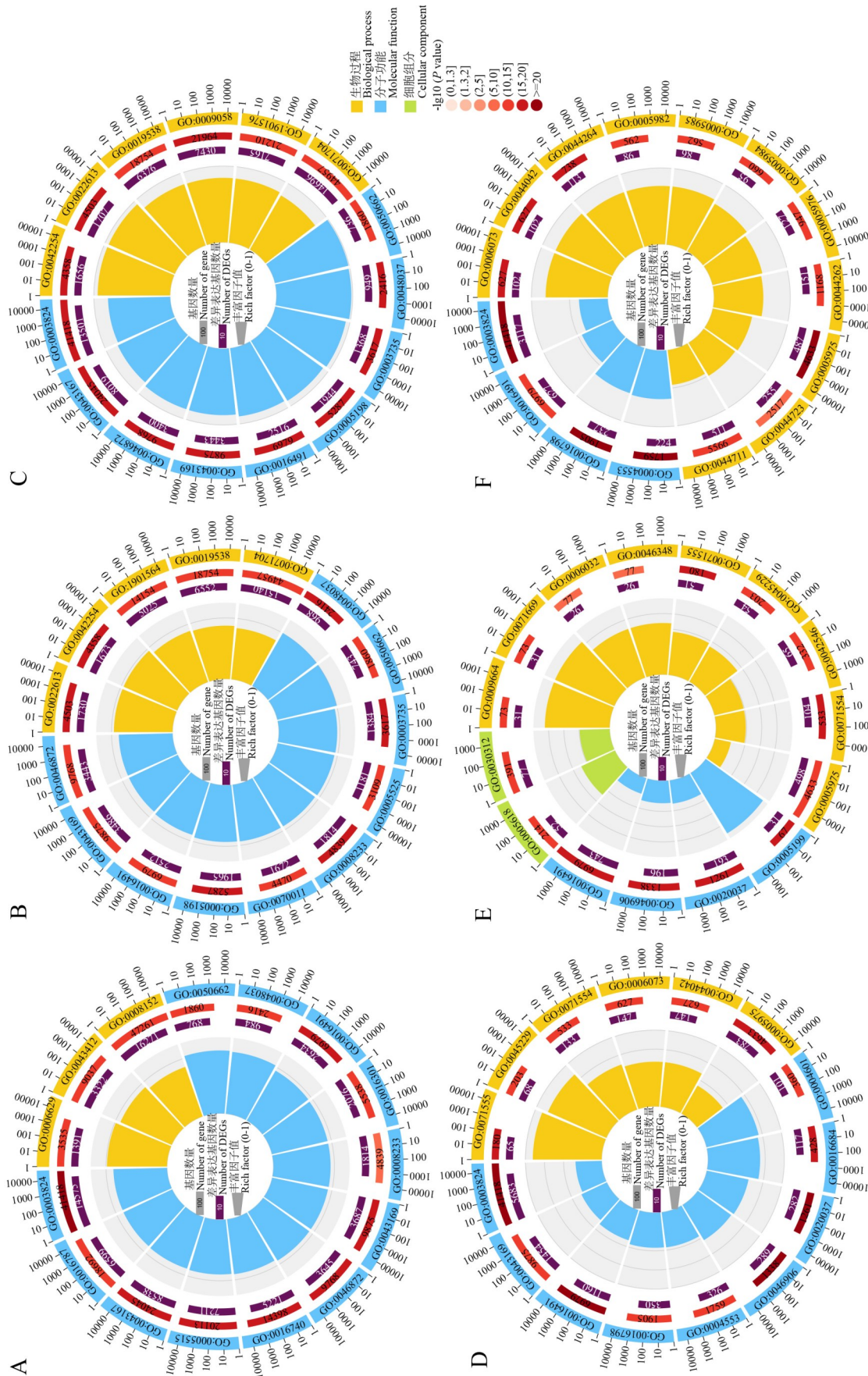


图 3 6 个比较组的 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis in six comparative groups

A; r_12 vs r_0; B; r_48 vs r_0; C; r_72 vs r_0; D; r_48 vs r_12; E; r_72 vs r_12; F; r_72 vs r_48; 富集圈图中从外到内有 4 个圆环, 第 1 个圆环显示了富集条目的数量, 第 2 个圆环显示了富集条目的数量, 第 3 个圆环显示了富集条目的数量, 第 4 个圆环显示了富集条目的数量, 背景辅助线的每个圆圈表示 0.1. The fourth loop displays the rich factor value for each term, with each circle of the background auxiliary line indicating 0.1.

2.4 DEG 聚类、表达模式和功能富集分析

为了比较 NaCl 胁迫下鹰嘴紫云英根系不同时间的基因表达,将所有比较组的 DEG 进行聚类分析,利用热图展示不同时间比较组间的表达模式(图 5A)。为了进一步分析基因表达模式,通过 STEM 软件将鹰嘴紫云英根系不同时间点的基因分别聚类到 10 个文件 Profiles 中。在 NaCl 胁迫下,鹰嘴紫云英根系在不同时间点的基因表达模式不同,显著表达的是 Profile2、0 和 8($P < 0.05$)。有趣的是,Profile2 和 Profile8 中基因表达趋势相反,Profile0 则是先下降后上升(图 5B)。

对显著表达的 Profiles 进行 KEGG 富集分析,结果表明,吞噬体、核糖体代谢通路在 Profile2 显著富集(图 6A),Profile0 中显著富集的代谢通路主要是类黄酮生物合成、昼夜节律—植物、苯丙素生物合成、苯丙氨酸代谢、植物激素信号传导、二苯乙烯、二芳基庚烷和姜酚的生物合成、甘油酯代谢、氰基氨基酸代谢、淀粉和蔗糖代谢、泛醌和其他萜类醌生物合成、半乳糖代谢、细胞周期—柄杆菌、类胡萝卜素生物合成(图 6B)。剪接体、RNA 转运、植物激素信号传导、真核生物核糖体的生物发生、信使核糖核酸监测途径、糖基磷脂酰肌醇—锚生物合成、RNA 降解在 Profile8 中显著富集(图 6C)。

2.5 转录因子分析

转录测序结果表明,转录因子对 NaCl 胁迫下鹰嘴紫云英根系进行了调控。将每个比较组的总数排名前 20 转录因子(transcription factor, TF)家族进行分析(图 7)。在 r_12 vs r_0 比较组中,差异表达基因较多的 TF 家族是 C2H2、C3H 和 MYB->MYB-related(图 7A),r_48 vs r_0 和 r_72 vs r_0 比较组较多的是 C2H2、C3H 和 bZIP(图 7B,C),r_48 vs r_12 比较组中,差异表达基因较多的 TF 家族是 C2H2、bHLH 和 MYB->MYB-related(图 7D),r_72 vs r_12 和 r_72 vs r_48 比较组较多的是 C2H2、AP2/ERF->AP2/ERF-ERF 和 bHLH(图 7E,F)。此外,每个比较组中 TF 家族的上、下调差异表达基因数量不同。6 个比较组 TF 家族数量为 57~79,较多的是 r_12 vs r_0 和 r_72 vs r_0,最少的是 r_72 vs r_48。

表 5 6 个比较组差异表达基因的 KEGG 通路分析

Table 5 KEGG pathway analysis of six comparative groups of differentially expressed genes

通路 Pathway	r_12 vs r_0		r_48 vs r_0		r_72 vs r_0		r_48 vs r_12		r_72 vs r_12		r_72 vs r_48	
	数目 Count	P-value	数目 Count	P-value	数目 Count	P-value	数目 Count	P-value	数目 Count	P-value	数目 Count	P-value
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	226	0.017998	203	0.230062	185	0.601430	88	0.107723	80	8.11×10^{-5}	43	0.999999
苯丙素生物合成 Phenylpropanoid biosynthesis	181	0.029187	130	0.999747	150	0.996604	122	5.14×10^{-9}	77	3.15×10^{-7}	69	7.50×10^{-5}
类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthesis	50	0.044437	19	0.998379	32	0.996604	40	4.03×10^{-7}	26	2.46×10^{-5}	9	0.514547
异黄酮生物合成 Isoflavonoid biosynthesis	28	0.043979	29	0.029884	26	0.078672	9	0.323606	5	0.517800	9	0.041910
氮代谢 Nitrogen metabolism	69	0.076543	72	0.039553	61	0.260467	39	0.001606	37	1.91×10^{-6}	20	0.057638
核糖体 Ribosome	1144	0.759257	1395	3.56×10^{-9}	1397	2.89×10^{-10}	447	0.797177	386	2.73×10^{-6}	270	0.697308
糖酵解/糖异生 Glycolysis/gluconeogenesis	253	0.810499	274	0.390901	261	0.602382	139	0.002737	73	0.366838	270	0.697308
过氧化氢酶 Peroxidase	223	0.581605	223	0.571524	207	0.837838	68	0.990070	36	0.999167	38	0.988140
淀粉和蔗糖代谢 Starch and sucrose metabolism	222	0.196406	185	0.916342	233	0.048074	160	9.97×10^{-13}	101	2.30×10^{-8}	103	9.56×10^{-11}
植物激素信号传导 Plant hormone signal transduction	175	0.201220	125	0.996328	134	0.970479	90	0.002681	76	4.14×10^{-6}	55	0.009351
戊糖和葡萄糖醛酸互转化 Pentose and glucuronate interconversions	85	0.282619	70	0.813382	69	0.818722	58	4.37×10^{-5}	41	8.50×10^{-5}	44	1.42×10^{-6}
苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	77	0.293092	78	0.255123	75	0.329733	42	0.014276	20	0.395872	28	0.011094
玉米素生物合成 Zeatin biosynthesis	22	0.432711	15	0.891593	12	0.970132	16	0.016634	16	0.000350	3	0.862414
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	297	0.992129	331	0.763437	323	0.822461	121	0.920165	75	0.945121	85	0.402692

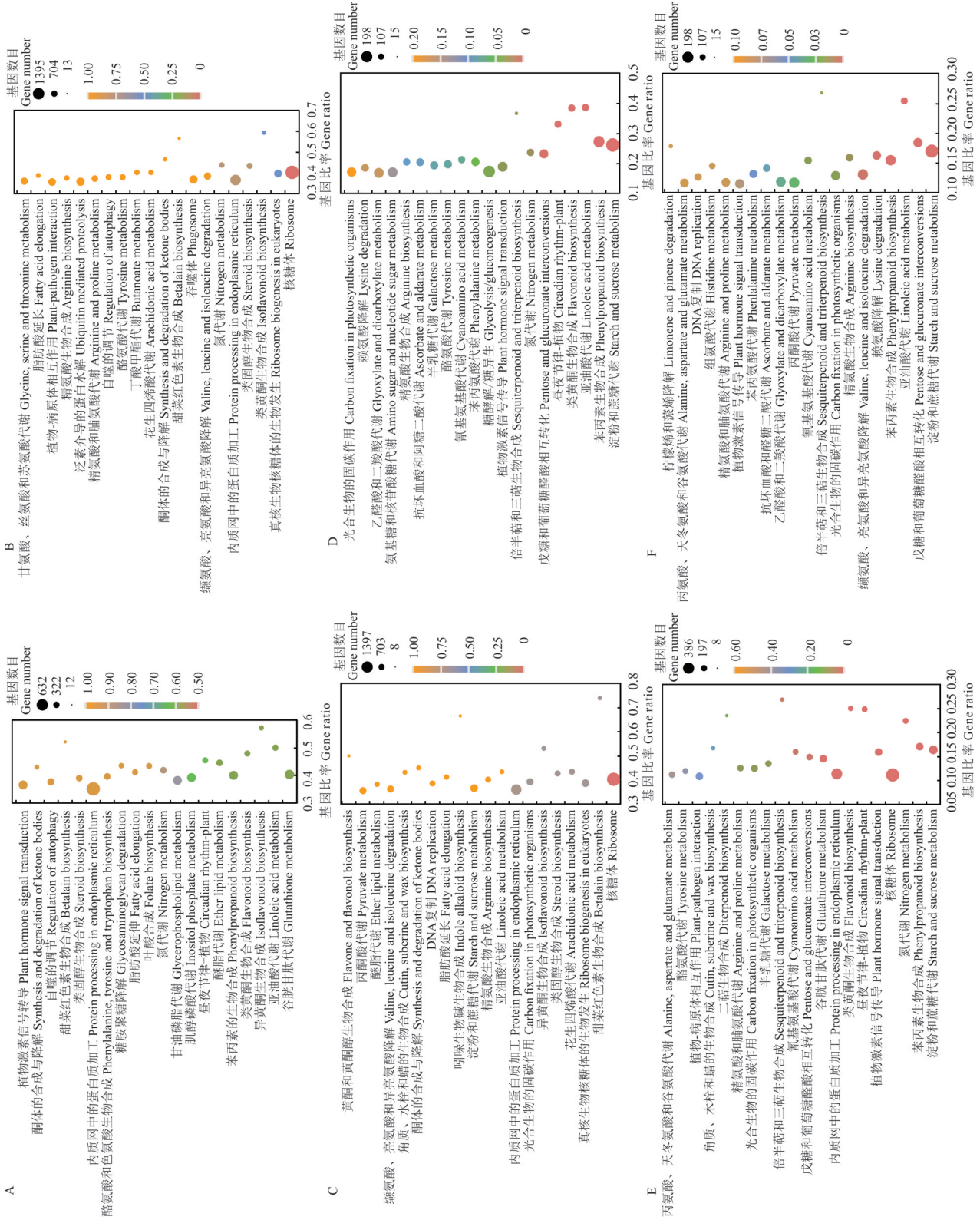


图 4 6 个比较组的 KEGG 富集分析 Fig. 4 KEGG enrichment analysis in six comparative groups

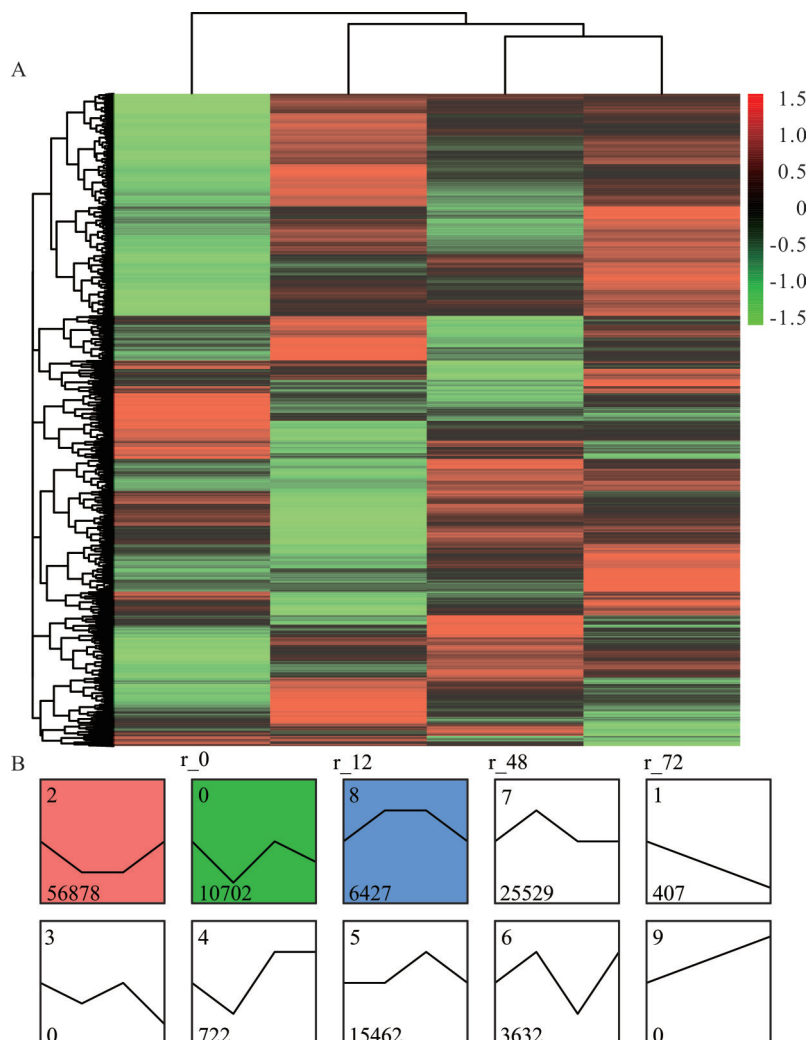


图5 差异表达基因聚类 and 模式分析

Fig. 5 Clustering and pattern analysis of differentially expressed genes

A: 基于倍数变化的差异表达基因的聚类分析 Clustering analysis of differentially expressed genes based on the fold change value; B: 基于FPKM在4个时间点的基因表达模式分析 Gene expression patterns analysis based on the FPKM at four time points; 左上角数字为文件名称, 左下角数字为基因数目 The number in the upper left corner represents the profile name, while the number in the lower left corner represents the number of genes.

2.6 苯丙素生物合成通路相关基因表达

将差异基因进行时序分析可知, Profile0中差异基因显著富集在苯丙素生物合成通路, 且 Profile2和 Profile8中也有差异基因表达。因此, 对这一通路进行差异基因聚类归一化分析(图8), 结果发现在不同比较组中上游途径的差异表达基因编码 PAL、C4H、4CL, 其中只有 *Cluster-3451.49092* 持续上调表达, *Cluster-3451.60720*、*Cluster-3451.58645*、*Cluster-3451.62270*、*Cluster-3451.53994*、*Cluster-3451.59276*、*Cluster-3451.59844* 在 12 和 72 h 下调表达, 48 h 恢复到初始表达量。*Cluster-3451.56465*、*Cluster-3451.30341* 持续下调表达, *Cluster-3451.68788* 在 12 和 72 h 下调表达, 48 h 上调表达。编码 HCT 的 *Cluster-3451.23539*、*Cluster-3451.55275*、*Cluster-11010.0* 在 12 h 上调表达, 其他基因在 12 h 全部下调表达, 但是在 48 h 基本恢复到初始表达量。编码 CSE 的 *Cluster-3451.16333* 持续上调表达, 其他基因全部下调表达。下游途径中编码 COMT 的基因参与阿魏酸、辛二酸、松柏醛物质的生成过程, 其中 *Cluster-3451.88542* 和 *Cluster-56279.0* 分别在 12 h 表达量最高和最低。CCR 催化肉桂酰辅酶 A、对香豆酰基辅酶 A 和咖啡酰辅酶 A 分别生成肉桂醛、对香豆素和咖啡醛的相关基因全部下调。以上结果表明, 苯丙素生物合成相关途径中, 不同途径不同比较组的差异基因表达趋势既可相同, 也可不同, 这有可能是基因调控鹰嘴紫云英根系响应 NaCl 胁迫的结果。

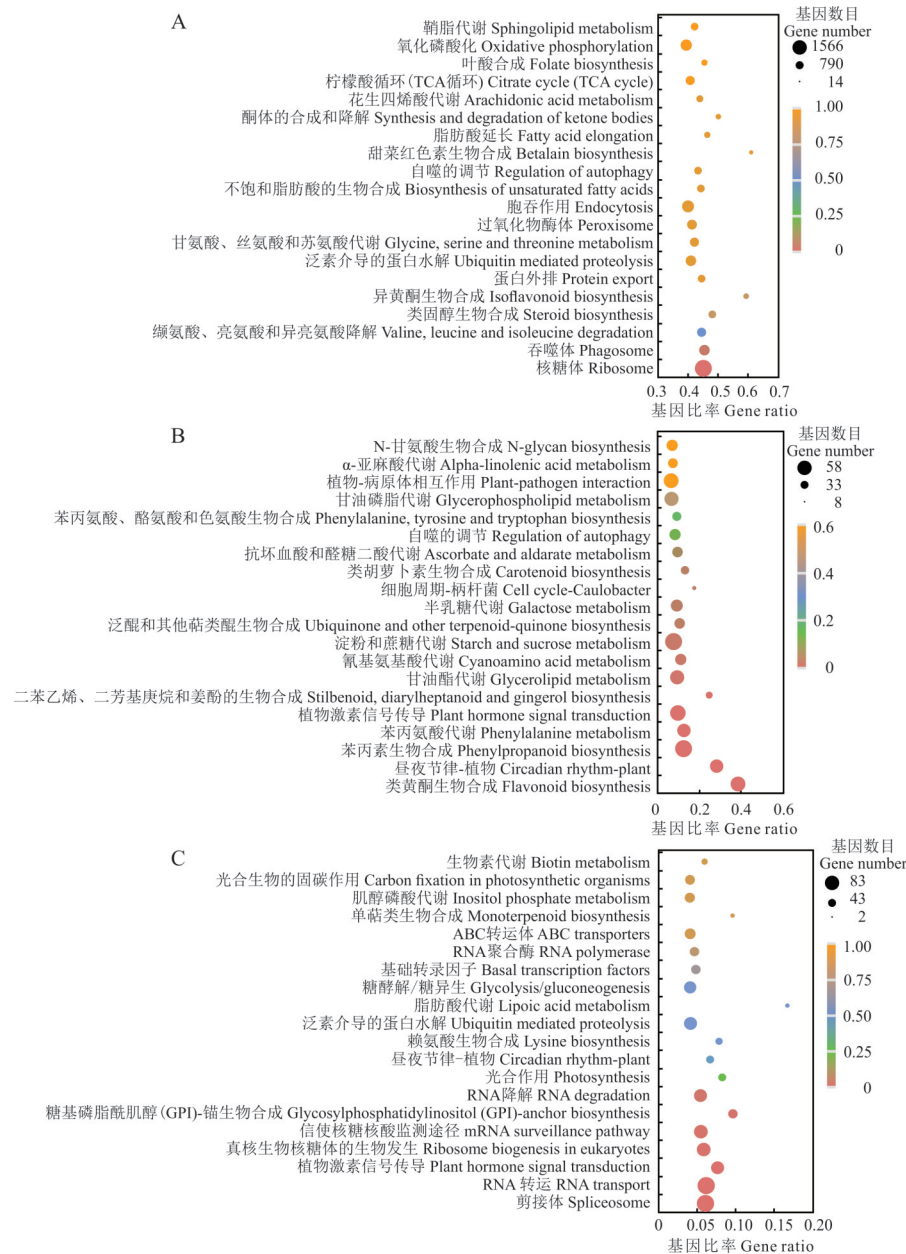


图 6 显著富集 Profiles 的 KEGG 富集分析

Fig. 6 Enrichment analysis of KEGG of significantly enriched profiles

A、B 和 C: 显著富集 Profile 2、0、8 的 KEGG 富集分析 KEGG enrichment analyses significantly enriched in Profile 2, 0, and 8, respectively.

2.7 类黄酮生物合成通路相关基因表达

类黄酮生物合成通路是苯丙素生物合成通路的重要分支,且在显著富集的 Profiles 中有差异表达基因(图 9)。编码 CHS 的基因中, *Cluster-8034.0* 在 12 h 上调表达,其余 11 个基因在 12 h 下调表达,但都在 48 h 上调表达。编码 CHI 的基因在 12 h 上调表达后,48 和 72 h 开始下调表达。CHR 中有 4 个基因持续上调表达,还有 3 个基因持续下调表达。编码 FLS 的基因在 48 h 都上调表达, *F3'5'H* 中的 *Cluster-3451.95232* 在 12 h 下调表达后,在 48 和 72 h 开始上调表达。以上结果表明,48 h 下,CHS、FLS、*F3'5'H* 可能促进查尔酮、高良姜素、槲皮素和杨梅素的合成,CHI 可能抑制松属素和柚皮素的合成。因此,推测 *CHS*、*FLS*、*F3'5'H*、*CHI* 可能是鹰嘴紫云英响应 NaCl 胁迫的关键基因。

2.8 qRT-PCR 验证

基于以上分析,随机选择参与苯丙素生物合成通路的 9 个基因(表 1)进行 qRT-PCR 验证,以验证 RNA-seq

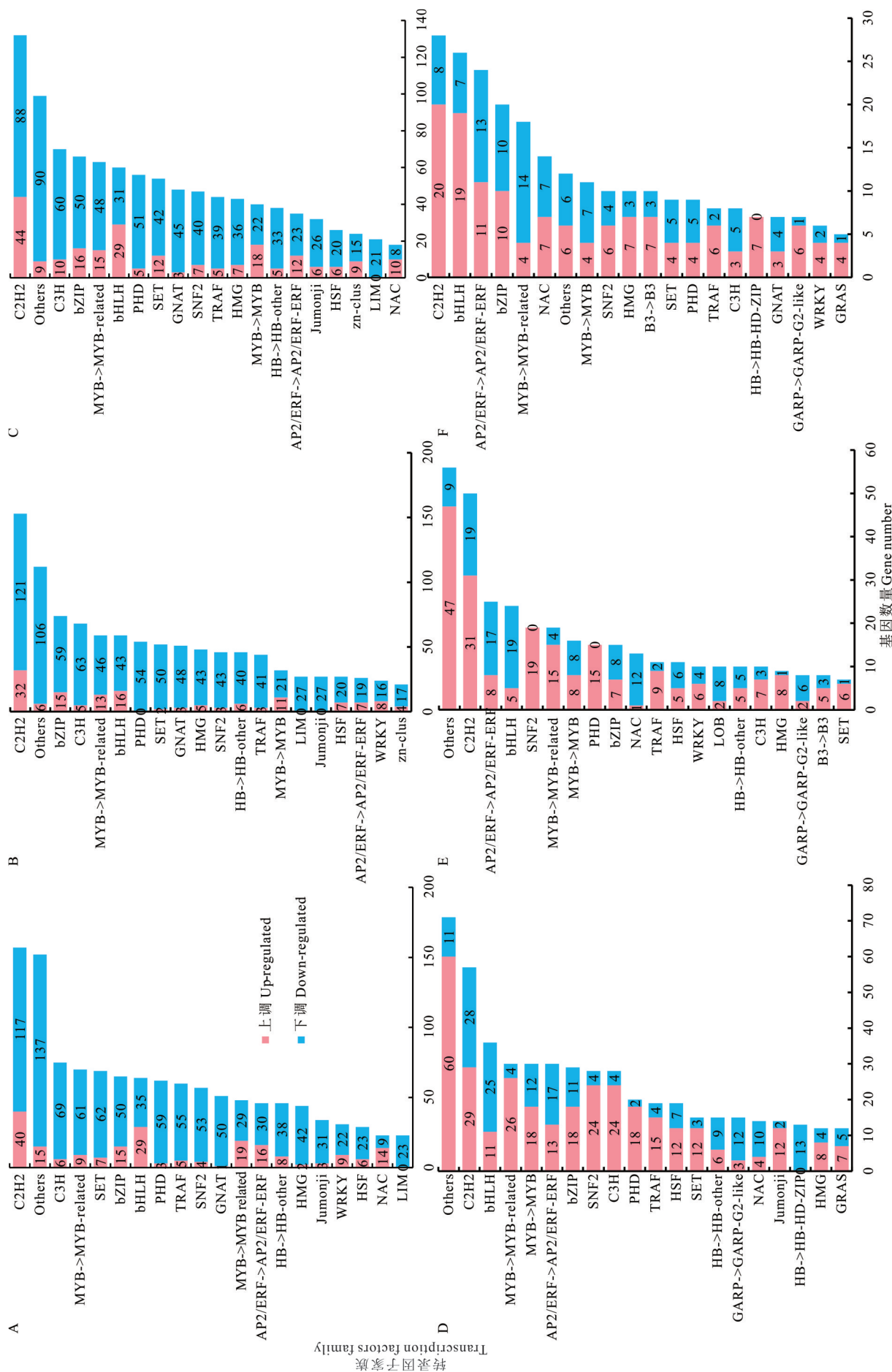


图 7 6 个比较组的转录因子分析
Fig. 7 Transcription factor analysis in six comparative groups

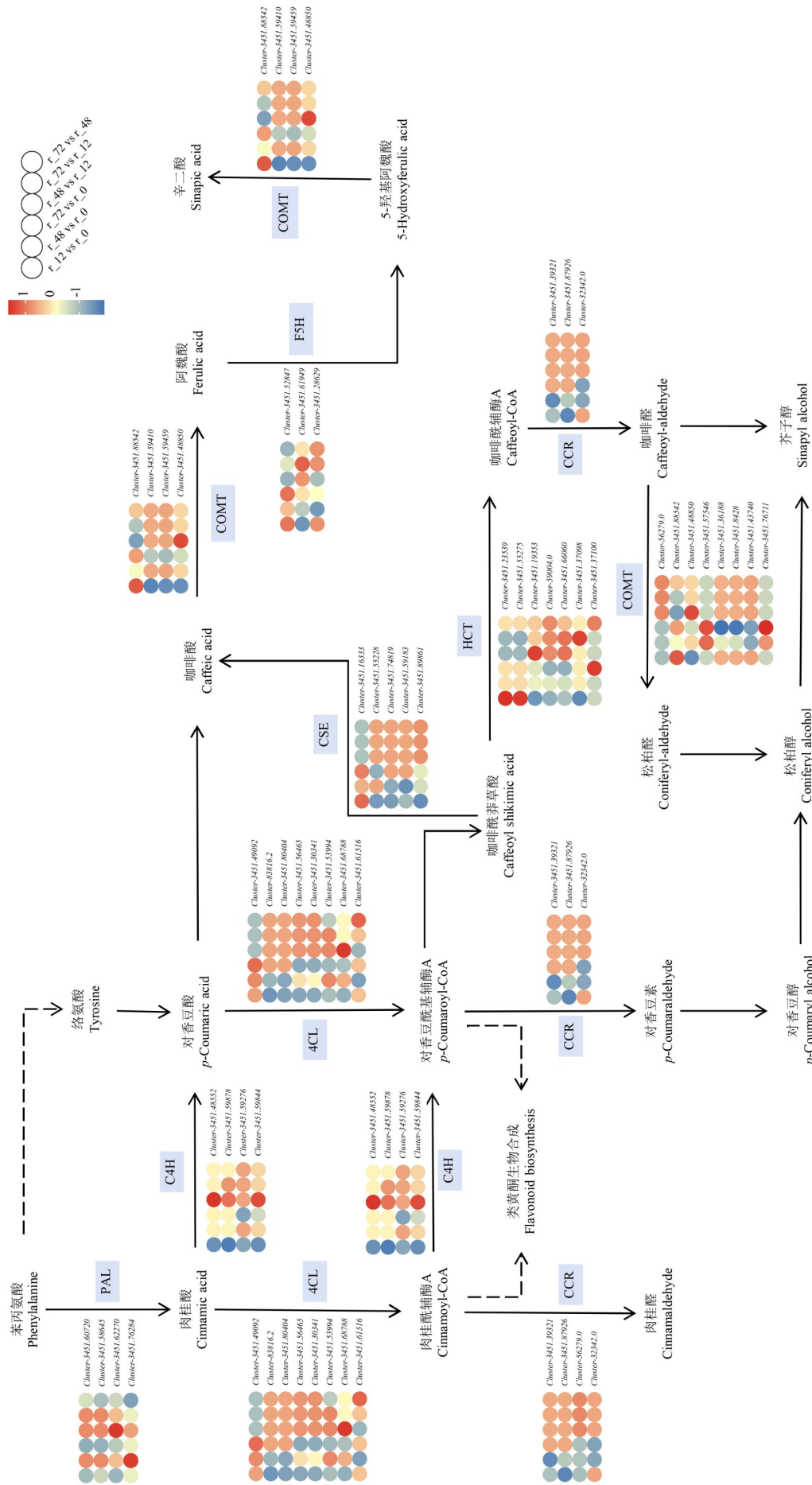


图 8 苯丙素生物合成通路中差异表达基因热图
Fig. 8 Heatmap of the differentially expressed genes within the phenylpropanoid biosynthesis pathway
 彩色圆圈显示了不同比较组中与苯丙素生物合成相关的关键基因的表达热图。The colored circles show the heatmap of expression of key gene associated with phenylpropanoid biosynthesis in different comparison groups; PAL: 苯丙氨酸裂解酶 Phenylalanine ammonia-lyase; C4H: 反肉桂酸 4-单加氧酶 Trans-cinnamate 4-monoxygenase; COMT: 咖啡酰辅酶A 连接酶 Caffeoyl-CoA ligase; CCR: 肉桂酰辅酶A 还原酶 Cinnamoyl-CoA reductase; HCT: 莽草酸羟基肉桂酰转移酶 Shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase; F5H: 阿魏酸-5-羟化酶 Ferulate-5-hydroxylase; CSE: 咖啡酰莽草酸酯酶 Caffeoyl shikimate esterase.

数据的准确性、真实性和可靠性(图 10)。结果表明鹰嘴紫云英转录组基因表达量与 qRT-PCR 的基因表达趋势一致,说明本次转录组测序数据是准确、真实和可靠的。

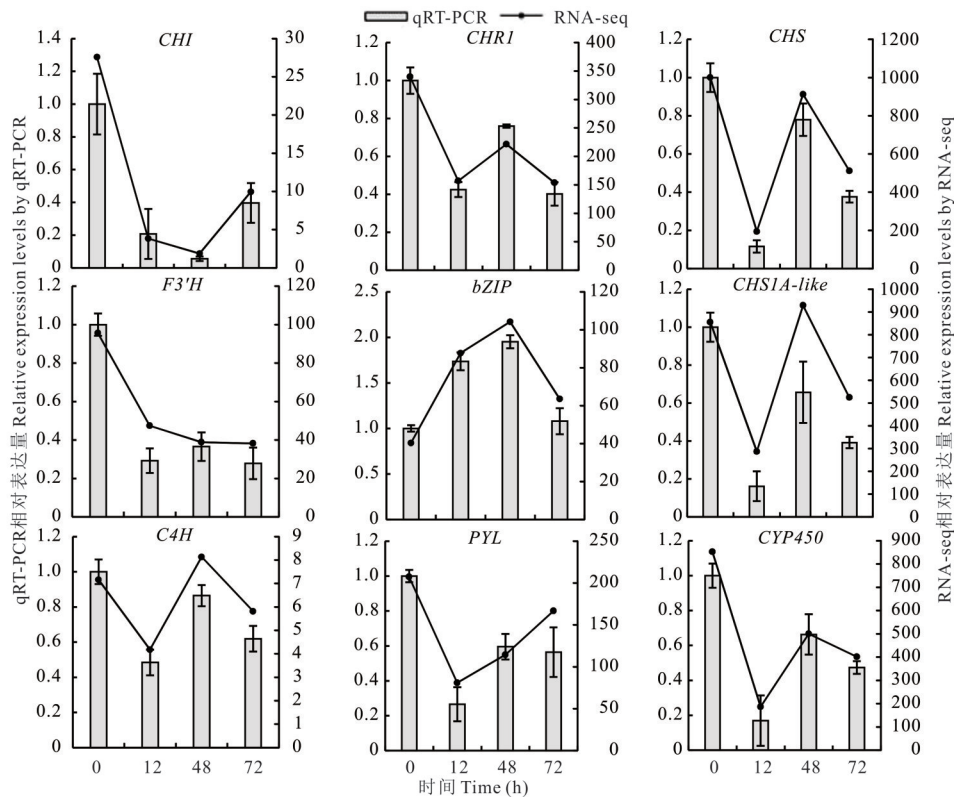


图 10 qRT-PCR 验证基因相对表达量

Fig. 10 The relative expression of genes verified by qRT-PCR

3 讨论

盐胁迫不仅严重威胁植物生长发育,而且影响着全球粮食安全。为探究植物抵御非生物胁迫的进化策略,人们在转录组学层面解析植物响应非生物胁迫的分子机制。因此,本研究首次对 NaCl 胁迫处理的鹰嘴紫云英根系进行转录组分析,基于 RNA-seq 方法,对 NaCl 胁迫处理 0、12、48 和 72 h 后鹰嘴紫云英根系进行分析,转录组测序结果表明数据质量较好,这为探究鹰嘴紫云英在 NaCl 胁迫下响应的关键通路及其关键基因提供了机会。NaCl 胁迫下的鹰嘴紫云英根系在不同时间点具有差异基因表达,将 6 个比较组的差异基因进行 GO 和 KEGG 分析,结果显示 6 个比较组共表达条目为氧化还原酶活性过程,共表达富集通路为淀粉和蔗糖代谢、戊糖和葡萄糖醛酸相互转化、糖酵解/糖异生、苯丙素生物合成、苯丙氨酸代谢、类黄酮生物合成、异黄酮生物合成通路、植物激素信号转导、玉米素生物合成、谷胱甘肽代谢、过氧化物酶体、核糖体、氧化磷酸化等。这与小麦^[8]、莎草(*Cyperus rotundus*)^[28]的研究结果相似,表明以上条目和通路可能调控鹰嘴紫云英根系耐盐机制。

本研究将所有 DEGs 进行时序分析,DEGs 在 4 个时间点的不同表达趋势被聚类到 10 个 Profiles 中,其中 Profile2、Profile0 和 Profile8 显著富集差异基因,且差异基因表达趋势不同。为了解 Profile2、Profile0 和 Profile8 的功能富集,将这 3 个 Profiles 中的差异基因进行 KEGG 分析,结果发现 Profile2 中吞噬体和核糖体代谢等通路的基因在 12 和 48 h 下调表达,72 h 恢复到 0 h 的表达量,说明这些基因可能在 12 和 48 h 响应 NaCl 胁迫;Profile0 中类黄酮生物合成、苯丙素生物合成等通路的基因在 12 h 下调表达,48 h 恢复到 0 h 的表达量,72 h 又开始下调表达,说明这些基因可能在 12 和 72 h 响应 NaCl 胁迫;Profile8 中剪接体、RNA 转运、植物激素信号转导等通路的基因在 12 和 48 h 上调表达,72 h 恢复到 0 h 的表达量,说明这些基因可能在 12 和 48 h 响应 NaCl 胁迫。这与番茄

(*Solanum lycopersicum*)^[29]、大麦(*Hordeum vulgare*)^[30]的研究结果相似,表明NaCl胁迫下DEGs不仅在不同通路中的表达趋势不同,而且在同一通路中的表达趋势不同。由此可见,鹰嘴紫云英根系具有复杂的耐盐机制。

植物在逆境生长过程中,为完成整个生命周期,导致其进化出适应环境的生存策略,而响应胁迫的主要策略之一是转录因子(TFs)的调控作用^[31]。TF是与基因的顺式作用元件特异性结合,通过增强或抑制其转录的DNA结合蛋白,并与蛋白质互作,调控植物功能的基因表达^[32]。因此,进一步分析TF在鹰嘴紫云英根系的差异表达,结果表明6个比较组有83个TF家族,其中6个比较组中共有49个,表明TF可能调控鹰嘴紫云英根系的耐盐机制。C2H2可以与离子稳态相关基因、参与渗透调节物质合成基因和清除活性氧相关基因进行靶向结合,通过调节离子平衡、增加渗透调节物质和维持活性氧稳态,来提高植物的耐盐性^[33-34]。例如,*TaZFP1*^[35]可以通过调控以上相关基因的机制,进而增强植物耐盐性。C2H2还可以通过其他机制来增强耐盐性。例如,含有*ZjZFN1*^[36]的转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)通过调控苯丙素生物合成和脱落酸信号通路来增强耐盐性。本研究中,随着NaCl胁迫时间的增加,6个比较组中排名最高的TF家族是C2H2,且下调基因数目多于上调基因,说明C2H2家族可能参与了鹰嘴紫云英根系的NaCl胁迫响应机制,应答基因可进行下一步功能验证。除此之外,据报道,*C3H*、*NAC*、*MYB*、*WRKY*和*bZIP*等基因家族不仅调控植物生长发育,而且调节植物在逆境下的适应性^[31]。例如,盐胁迫可诱导或抑制白桦木(*Betula platyphylla*)*PbeC3H*基因的表达水平,其应答基因可用于功能验证^[37]。本研究中,这些TF在不同时间点下差异表达,有可能在鹰嘴紫云英根系响应NaCl胁迫过程中起重要作用。

苯丙素生物合成途径不仅在植物生长发育中扮演重要角色,而且在应对逆境时发挥重要作用。苯丙素途径的PAL、C4H和4CL协同催化苯丙氨酸并构成肉桂酸和对香豆酸,下游途径是苯丙素代谢的各个分支,重要分支有木质素和类黄酮等途径^[38]。4CL调控拟南芥的苯丙素生物合成途径中的木质素和类黄酮生物合成^[39]。HCT作为双功能酶,它具有引导单酚生物合成和类黄酮生物合成的关键功能^[40]。木质素是由对香豆醇、松柏醇和芥子醇等酚类物质组成,并存在于植物细胞壁的酚类聚合物^[41]。本研究中,编码PAL、C4H和4CL的基因只有*Cluster-3451.49092*持续上调表达,其他基因既有全部下调表达,还有一部分基因在48h恢复到初始表达量或上调表达,说明这些基因可能协同调控苯丙氨酸生成上游代谢物,起到调节渗透平衡的作用。咖啡酰莽草酸酯酶和莽草酸羟基肉桂酰转移酶都有上调和下调基因表达,且催化咖啡酰莽草酸生成咖啡酸和咖啡酰辅酶A。下游代谢物阿魏酸、辛二酸、松柏醛被COMT催化,其中*Cluster-3451.88542*在12h上调了4.14倍,*Cluster-56279.0*在12、48和72h平均下调了5.4829倍。这说明NaCl胁迫下鹰嘴紫云英根系可能受到PAL、C4H、4CL、CCR和COMT的共同调控。在白桦^[42]中也发现NaCl胁迫可引起C4H、HCT、4CL、COMT和CCR的基因表达,增强了植物的耐盐性。

进一步发现,类黄酮生物合成通路中编码CHS、FLS、F3'5'H的基因在48h恢复到初始表达量或上调表达,CHI则相反。CHS和CHI是类黄酮生物合成过程的关键限速酶,对中间代谢物(柚皮素、甘草素等化合物)起到重要调控作用^[43]。F3'5'H作为关键酶催化二氢山柰酚生成二氢槲皮素和二氢杨梅素,这些黄酮醇化合物被FLS双加氧酶转化生成槲皮素和杨梅素^[44]。转录控制是苯丙素生物合成途径和类黄酮生物合成的核心调节过程,可以由MYB、bHLH和WD40组成的MBW复合物^[45]进行转录调控,它有4个成员,其中的R2R3-MYB是植物特异性转录因子,能够调节苯丙素生物合成途径和类黄酮生物合成途径的酚类化合物,这些具有抗氧化活性的代谢物通过清除活性氧增加了植物的耐盐性^[46]。此过程也可以由C2H2、WRKY等转录因子调控^[47]。以上分析推测,转录因子可能在48h正向调控苯丙素生物合成和类黄酮生物合成通路相关酶的表达,促进根系分泌酚类化合物,增加鹰嘴紫云英的耐盐性。

4 结论

本研究对不同时间点NaCl胁迫处理下的鹰嘴紫云英根系进行了转录组分析。结果表明,NaCl胁迫下,与0h相比,发现在12、48和72h分别有46051、45653和42869个差异表达基因,197个共有差异基因持续表达。差异基因聚类和表达模式的功能富集以及GO富集分析表明,氧化还原酶活性、类黄酮生物合成、苯丙素生物合成等

通路是鹰嘴紫云英抵御 NaCl 胁迫的重要调控途径。C2H2、C3H、NAC、MYB、WRKY 和 bZIP 等是鹰嘴紫云英根系抵御 NaCl 胁迫的重要转录因子。本研究初步解释了鹰嘴紫云英根系响应 NaCl 胁迫的分子机制,为后续研究鹰嘴紫云英耐盐基因的功能提供了数据支撑。

参考文献 References:

- [1] Fan C. Genetic mechanisms of salt stress responses in halophytes. *Plant Signaling and Behavior*, 2020, 15(1): e1704528.
- [2] Chele K H, Tinte M M, Piater L A, *et al.* Soil salinity, a serious environmental issue and plant responses: A metabolomics perspective. *Molecular Diversity Preservation International*, 2021, 11(11): 724.
- [3] Flowers T J, Colmer T D. Plant salt tolerance: adaptations in halophytes. *Annals of Botany*, 2015, 115(3): 327–331.
- [4] Liu J X, Zhang H L, Zou R S, *et al.* Research progress in Na⁺ antiport and physiological growth mechanisms of different halophytes adapted to salt stress. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(1): 59–71.
刘佳欣, 张会龙, 邹荣松, 等. 不同类型盐生植物适应盐胁迫的生理生长机制及 Na⁺ 逆向转运研究进展. *生物技术通报*, 2023, 39(1): 59–71.
- [5] Fu L, Liu J Z, Tao B X, *et al.* Adaptive mechanism of halophytes to saline soil environment: a review. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2021, 49(15): 32–39.
付丽, 刘加珍, 陶宝先, 等. 盐生植物对盐渍土壤环境的适应机制研究综述. *江苏农业科学*, 2021, 49(15): 32–39.
- [6] Liang X Y, Li J F, Yang Y Q, *et al.* Designing salt stress-resilient crops: Current progress and future challenges. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, 66(3): 303–329.
- [7] Chen C X, Shang X L, Sun M Y, *et al.* Comparative transcriptome analysis of two sweet sorghum genotypes with different salt tolerance abilities to reveal the mechanism of salt tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4): 2272–2281.
- [8] Li H Y, Chen X Q, Niu F J, *et al.* Time-course transcriptome analysis in wheat root in response to high salinity. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(2): 592–630.
李红燕, 陈向前, 牛凤娟, 等. 小麦根系响应高盐胁迫的时序转录组分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(2): 592–630.
- [9] Deng C H, Zhang Z B, Yan G R, *et al.* Salt-responsive transcriptome analysis of triticale reveals candidate genes involved in the key metabolic pathway in response to salt stress. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 20669.
- [10] Frosi G, Ferreira-Neto J R C, Bezerra-Neto J P, *et al.* Transcriptome of *Cenostigma pyramidale* roots, a woody legume, under different salt stress times. *Physiologia Plantarum*, 2021, 173(4): 1463–1480.
- [11] Fang X, Mo J J, Zhou H K, *et al.* Comparative transcriptome analysis of gene responses of salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars to salt stress. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 19065.
- [12] Li R X, Fu R, Li M, *et al.* Transcriptome profiling reveals multiple regulatory pathways of *Tamarix chinensis* in response to salt stress. *Plant Cell Reports*, 2023, 42(11): 1809–1824.
- [13] Shi H F, Guo Z F. Advances in research on germplasm resources and genetic breeding of *Astragalus sinicus*. *Pratacultural Science*, 2020, 37(12): 2507–2519.
施海帆, 郭振飞. 紫云英种质资源与遗传育种研究进展. *草业科学*, 2020, 37(12): 2507–2519.
- [14] Issah G, Schoenau J J, Lardner H A, *et al.* Nitrogen fixation and resource partitioning in alfalfa (*Medicago sativa* L.), cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.) and sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) using ¹⁵N enrichment under controlled environment conditions. *Agronomy*, 2020, 10(9): 1438–1452.
- [15] Pitcher L R, MacAdam J W, Ward R E, *et al.* Beef steer performance on irrigated monoculture legume pastures compared with grass- and concentrate-fed steers. *Animals (Basel)*, 2022, 12(8): 1017–1032.
- [16] Hou W J, Ma X, Zhang Z Y, *et al.* Effects of mixed saline-alkali stress on seed germination and physiological characteristics of *Astragalus cicer*. *Grassland and Turf*, 2020, 40(3): 90–98.
侯文静, 马祥, 张志莹, 等. 混合盐碱胁迫对鹰嘴紫云英种子萌发及幼苗生理特性的影响. *草原与草坪*, 2020, 40(3): 90–98.
- [17] Yang Y Y, Mao G L, Ma D M, *et al.* Germination characteristics of four forage seeds under different concentrations of NaCl or NaHCO₃ stress. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(3): 637–645.
杨迎月, 毛桂莲, 麻冬梅, 等. 四种牧草种子在不同浓度 NaCl 或 NaHCO₃ 胁迫下的萌发特性. *草地学报*, 2022, 30(3): 637–645.

- [18] Wang J H. The root system development of cicer milk vetch in the first year of growth. *Pratacultural Science*, 1990(1): 53–60.
王建华. 鹰嘴紫云英生长第一年根系发育动态的研究. *草业科学*, 1990(1): 53–60.
- [19] Wang H Q, Zhao X Y, Xuan W, *et al.* Rice roots avoid asymmetric heavy metal and salinity stress via an RBOH-ROS-auxin signaling cascade. *Molecular Plant*, 2023, 16(10): 1678–1694.
- [20] Zhang J Q. Molecular mechanism of apomixis embryogenesis of wild Kentucky bluegrass in Gansu province. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2023.
张金青. 甘肃野生草地早熟禾无融合生殖胚发生的分子遗传机理研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2023.
- [21] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644–652.
- [22] Davidson N M, Oshlack A. Corset: enabling differential gene expression analysis for de novo assembled transcriptomes. *Genome Biology*, 2014, 15(7): 410–424.
- [23] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323–339.
- [24] Love M I, Huber W G, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550–571.
- [25] Ernst J, Bar-Joseph Z. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7(1): 191–202.
- [26] Chen F Q, Fang P, Zeng W J, *et al.* Comparing transcriptome expression profiles to reveal the mechanisms of salt tolerance and exogenous glycine betaine mitigation in maize seedlings. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0233616.
- [27] Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [28] Zhang X J, Yao Y, Li X T, *et al.* Transcriptomic analysis identifies novel genes and pathways for salt stress responses in *Suaeda salsa* leaves. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 4236.
- [29] Jia C P, Guo B, Wang B K, *et al.* Integrated metabolomic and transcriptomic analysis reveals the role of phenylpropanoid biosynthesis pathway in tomato roots during salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13(12): 1023696.
- [30] Nefissi O R, Arasappan D, Abid G, *et al.* Transcriptomic analysis of salt-stress-responsive genes in barley roots and leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(15): 8155–8172.
- [31] Baillo E H, Kimotho R N, Zhang Z B, *et al.* Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes*, 2019, 10(10): 771–794.
- [32] Inukai S, Kock K H, Bulyk M L. Transcription factor-DNA binding: Beyond binding site motifs. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2017, 43(4): 110–119.
- [33] Han G L, Yuan F, Guo J R, *et al.* AtSIZ1 improves salt tolerance by maintaining ionic homeostasis and osmotic balance in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 2019, 285(8): 55–67.
- [34] Li Y, Chu Z N, Luo J Y, *et al.* The C2H2 zinc-finger protein SIZF3 regulates AsA synthesis and salt tolerance by interacting with CSN₅B. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(6): 1201–1213.
- [35] Sun B G, Zhao Y J, Shi S Y, *et al.* TaZFP1, a C2H2 type-ZFP gene of *T. aestivum*, mediates salt stress tolerance of plants by modulating diverse stress-defensive physiological processes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 136: 127–142.
- [36] Teng K, Tan P H, Guo W E, *et al.* Heterologous expression of a novel *Zoysia japonica* C2H2 zinc finger gene, *ZjZFN1*, improved salt tolerance in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1159–1172.
- [37] Liu C X, Xu X Y, Kan J L, *et al.* Genome-wide analysis of the C3H zinc finger family reveals its functions in salt stress responses of *Pyrus betulaefolia*. *PeerJ*, 2020, 8: e9328.
- [38] Fraser C M, Chapple C. The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*, 2011, 9: e0152.
- [39] Li Y, Kim J I, Pysh L, *et al.* Four isoforms of *Arabidopsis* 4-coumarate: CoA ligase have overlapping yet distinct roles in phenylpropanoid metabolism. *Plant Physiology*, 2015, 169(4): 2409–2421.
- [40] Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, *et al.* Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell*, 2007, 19(1): 148–162.
- [41] Xie M, Zhang J, Tschaplinski T J, *et al.* Regulation of lignin biosynthesis and its role in growth-defense tradeoffs. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9(1): 1427–1436.

- [42] Chen K Q, Song M R, Guo Y N, *et al.* *MdMYB46* could enhance salt and osmotic stress tolerance in apple by directly activating stress-responsive signals. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(12): 2341–2355.
- [43] Liu W X, Feng Y, Yu S H, *et al.* The flavonoid biosynthesis network in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23): 12824–12842.
- [44] Yu Z M, Dong W, Teixeira D S J A, *et al.* Ectopic expression of *DoFLS1* from *Dendrobium officinale* enhances flavonol accumulation and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, 2021, 258(4): 803–815.
- [45] Xu W J, Dubos C, Lepiniec L. Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(3): 176–185.
- [46] Pratyusha D S, Sarada D V L. MYB transcription factors-master regulators of phenylpropanoid biosynthesis and diverse developmental and stress responses. *Plant Cell Reports*, 2022, 41(12): 2245–2260.
- [47] Dong N Q, Lin H X. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 180–209.