

PHÂN TÍCH CÁC GEN BIỂU HIỆN KHÁC BIỆT TRONG MÔ LÁ ĐẬU TƯƠNG CỦA CÁC GIỐNG CHỐNG CHỊU VÀ MẮN CẢM VỚI NGẬP ÚNG ĐÃ BIỂU HIỆN BẰNG CÁCH GIẢI TRÌNH TỰ RNA

Sanjeev K. Dhungana, Hong - Sik Kim, Beom - Kyu Kang, Jeong - Hyun Seo, Hyun -Tae Kim, Jae - Hyeon Oh, Sang - Ouk Shin, In - Yeol Baek

TÓM TẮT

Ngập úng làm giảm năng suất đậu tương nghiêm trọng trên toàn thế giới. Sự phát triển của các giống cây trồng chịu được căng thẳng có thể một biện pháp hữu hiệu để giảm bớt tác động tiêu cực của ngập úng. Thông tin phân tử về biểu hiện các kiểu gen chống chịu và nhạy cảm với ngập úng có giá trị để cải thiện khả năng chống chịu ngập úng của cây đậu tương.

Mục tiêu cuat nghiên cứu này là phân tích các gen biểu hiện khác biệt (DEG) được biểu hiện qua trình tự RNA trong mô lá đậu tương của các giống cây trồng chống chịu (Paldalkong và Danbaekdong) và mẫn cảm ('NTS1116') chịu áp lực ngập úng.

Cây con được trồng trong điều kiện tưới nước tốt đến giai đoạn V1–V2 và cho ngập nước 10cm trong 14 ngày. Tổng cộng có 22.468 gen được biểu hiện khác biệt trong điều kiện ngập so với điều kiện kiểm soát tưới nước tốt, trong đó 13.729, 13.405 và 13.160 được thể hiện khác biệt tương ứng với Paldalkong, Danbaekdong và NTS1116. Một số gen liên quan đến khả năng chịu ngập cao hơn như lipoxxygenase, expansin, glutathione S-transferase và chất vận chuyển đường ra ngoài được điều chỉnh ở những giống có khả năng chịu đựng cao hơn so với những giống mẫn cảm. Số lượng một số yếu tố phiên mã liên quan đến axit abscisic của chủng leucine và myeloblastosis cơ bản cũng có tỷ lệ giống chống chịu cao hơn so với giống mẫn cảm. Thông tin phân tử về DEG các giống cây trồng có khả năng chống chịu và mẫn cảm thu được trong nghiên cứu này có thể có giá trị để cải thiện khả năng chịu ngập úng ở đậu tương.

Từ khóa: Gen biểu hiện khác biệt, Ngập úng, Giải trình tự ARN, Đậu tương, Dị ứng, Khả năng chịu đựng

GIỚI THIỆU

Xem xét các công dụng đa dạng của đậu tương là nguồn cung cấp thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, dầu diesel sinh học và các sản phẩm công nghiệp khác, những nỗ lực rộng rãi đã được thực hiện để tăng sản lượng đậu tương trên toàn thế giới.

Sự gia tăng giá trị thương mại và nhu cầu về đậu tương trên thị trường trong nước và quốc tế đã làm tăng diện tích trồng đậu tương. Tuy đậu tương là loại cây trồng cạn, việc trồng đậu tương trên ruộng lúa chuyển đổi đã được tăng lên trong một vài năm do so sánh lợi ích kinh tế, quản lý chất dinh dưỡng và chính sách của chính phủ (Nishida và cs, 2013; Singh 2010). Cây đậu tương thường nhạy cảm với ngập úng, gây cản trở cây tăng trưởng và làm giảm năng suất đáng kể (Ahmed và cs, 2013; Komatsu và cs, 2009). Ngập úng là kết quả của lượng mưa lớn hoặc tưới quá mức cùng với thoát nước kém. Tình trạng này càng trở nên tồi tệ hơn khi đất trồng lúa được phát triển đặc biệt để giữ nước trong thời gian lâu hơn.

Cây trồng, chịu áp lực ngập úng, nỗ lực để vượt qua sự căng thẳng bằng cách áp dụng các cơ chế khác nhau, bao gồm cả tránh ngập, chống chịu ngập và thích ứng với ngập

(Bailey-Serres và cs, [2012](#) ; Mustroph [2018](#); Yamauchi và cs, [2018](#)). Các cơ chế thích ứng khác nhau, cũng như phản ứng sinh lý, sinh hóa và phân tử trong điều kiện hạn hán và ngập úng, giúp tồn tại và duy trì sự phát triển bình thường ở thực vật (Dat và cs, [2004](#)). Thực vật nhận thức tín hiệu môi trường sau đó được truyền đến tín hiệu phân tử như là bước đầu tiên trong một phản ứng với căng thẳng. Trong số tập hợp các tín hiệu trong một số cách phản ứng căng thẳng, phụ thuộc axit abscisic (ABA) và phản ứng độc lập bao gồm các yếu tố phiên mã (TF). Phiên mã thông thường và quy định của nó dựa trên các yếu tố protein cụ thể, TFs, liên kết với các trình tự DNA nhất định trong các vùng điều hòa gen và kiểm soát quá trình phiên mã của chúng (Latchman, 1993). Một số chủng đa dạng của TFs chiếm khoảng 10% các gen ở đậu tương tham gia vào nhiều phản ứng sinh học và phản ứng phi sinh học với căng thẳng (<http://caytfdb.cbi.pku.edu.cn/chimuc.php?sp=Gma>).

Một số nỗ lực đã được thực hiện để làm sáng tỏ các cơ chế phân tử phức tạp tiềm ẩn những căng thẳng sinh học và phi sinh học khác nhau ở đậu tương. Các kỹ thuật phân tử như cấu trúc mảng vi mô đã được tiến hành để tạo ra dữ liệu gen biểu hiện của đậu nành và được lưu trữ trong cơ sở dữ liệu công cộng (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Các nền tảng vi mô có một số nhược điểm, như hạn chế độ nhạy, lai tạo và lai không cụ thể, và hữu ích trong điều kiện thiếu thông tin gen khan hiếm, đặc biệt là đối với đậu tương trong đó các mô hình gen chưa được mô tả tốt. Giải trình tự RNA (RNA-Seq), trình tự sắp xếp dựa trên kỹ thuật tiên tiến gần đây, có thể khắc phục những hạn chế của kỹ thuật mảng vi mô (Trapnell và cs, [2013](#)). Một số nghiên cứu RNA-Seq đã được thực hiện để điều tra sự biểu hiện gen trong các mô của đậu tương dưới căng thẳng sinh học và phi sinh học, như hạn hán (Vidal và cs, [2012](#)), hạn hán và lũ lụt (Chen và cs, [2016](#)), tấn công của giun chỉ thông thường (Du và cs, [2019](#)), muối (Zeng và cs, [2019](#)), và ngập úng (Sharmin và cs, [năm 2020](#)). Mục tiêu của nghiên cứu này là phân tích các gen biểu hiện khác biệt (DEG) được biểu hiện bởi RNA-Seq trong mô lá đậu tương chống chịu và mẫn cảm với ngập úng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu cây trồng và tình trạng phát triển

Hai giống đậu tương chịu úng (Paldalkong và Danbaekkong) và một giống mẫn cảm (NTS1116) được lựa chọn dựa trên cơ sở của một nghiên cứu trước đây (Koo và cs, [2014](#)).

Cây được trồng trong chậu tròn 20×30cm kích thước (đường kính trên và dưới × chiều cao), được giữ trong nhà kính của Bộ phận Khoa học Cây trồng miền Nam, Viện Khoa học Cây trồng Quốc gia, Miryang, Cộng hòa Hàn Quốc vào tháng 4 năm 2019. Các chậu đã được lấp đầy bằng đất chuẩn bị bằng cách trộn đất rẫy, phân hữu cơ và bùn non với tỷ lệ 1: 1: 0,75. Năm hạt được gieo trong ba lần lặp lại đối với từng loại cây trồng và điều kiện xử lý. Cây con đã tía thưa ở giai đoạn ba lá đầu tiên (V1) để giữ ba cây trong mỗi chậu. Các cây được trồng trong điều kiện được tưới nước tốt đến giai đoạn V1–V2 và tạo ngập úng 10cm trong 14 ngày. Các chậu đối chứng được trồng trong điều kiện tưới nước tốt trong suốt thời gian này.

Các mẫu lá được thu thập vào 14 ngày sau khi ngập, trong các ống 1,5mL, được đưa vào nitơ lỏng và được bảo quản ở -80°C cho đến khi chiết xuất RNA.

Đo khả năng chịu ngập úng

Hàm lượng diệp lục trong lá (CC) được đo vào ngày thứ hai làm tróc các lá của đối chứng và cây bị ngập úng sau 2–3 ngày, sử dụng máy đo diệp lục (SPAD-502Plus, Minolta Camera Co., Osaka, Nhật Bản). Chỉ số diệp lục lá (CCI) được tính bằng tỷ lệ giữa các giá trị CC trung bình thu được trong điều kiện ngập nước để kiểm soát (Dhungana và cs, 2019). Ba lần lặp lại được duy trì cho mỗi giống và giá trị trung bình của ba lần lặp lại đã được báo cáo.

Chiết xuất RNA và chuẩn bị thư viện

Tổng số RNA được chiết xuất bằng bộ tách chiết RNA (RNe-Asy Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ của RNA được đo bằng máy quang phổ NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Hoa Kỳ). Gộp chung các mẫu trong ba lần lặp lại đã được chuẩn bị cho từng giống và công thức đối chứng/xử lý ngập và do đó sáu mẫu RNA đã được áp dụng để phân tích RNA-Seq và DEGs.

Các DNA có thể bị ô nhiễm trong các mẫu RNA được gỡ bỏ bằng cách sử dụng DNase. Tổng số RNA đã được tinh chế thêm bằng cách sử dụng một bộ dụng cụ loại bỏ ribo-zero rRNA. Các thư viện cDNA là được xây dựng bằng cách sử dụng mẫu TruSeq RNA v2, Part # 15026495 Rev. F.

Chất lượng lọc và đọc bản đồ RNA-Seq

Đọc RNA-Seq kết thúc được tạo ra trên nền tảng Illumina Genome Analyzer và chất lượng của các lần đọc được đánh giá với FastQC (Bolger và cs, 2014). Các lần đọc RNA-Seq được căn chỉnh theo mức bộ gen tham chiếu *Glycine max* (Gmax2.1version) sử dụng bộ ký hiệu Bowtie2.

Đọc bản đồ được thực hiện bằng chương trình HISAT2 (Kim và cs, 2015).

Lắp ráp trình tự và đếm vi sai

Sau khi đọc bản đồ, bản sao lắp ghép đã được thực hiện thông qua chương trình StringTie (Pertea và cs, 2015). Sự phong phú gen ước tính của các mẫu đã được xác định về phân mảnh trên mỗi kilobase phiên mã trên mỗi triệu lần đọc bản đồ (FPKM). Các gen biểu hiện khác biệt (DEG) giữa ngập úng và đối chứng của ba giống đã được xác định bằng cách sử dụng tùy chọn StringTie-e. Các gen quy định sự tăng giảm đáng kể của mỗi giống được thu thập đối với ngập úng. Các gen có $\log_2$ thay đổi gấp $\geq +1,5$ và $\leq -1,5$, và tỷ lệ phát hiện sai số được điều chỉnh $P \leq 0,05$ thì được xác định là DEG.

Chức năng chú thích và làm giàu bản thể học gen

Các DEG đã được chú thích cho các thuật ngữ bản thể học gen (GO) và được nhóm lại thành ba loại: chức năng phân tử (MF), thành phần tế bào (CC) và quá trình sinh học (BP). Các phân tích làm giàu GO được thực hiện bằng gProfileR (Raud-vere và cs, 2019). Các DEG cũng được lập bản đồ tới Cơ sở dữ liệu Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) về đầu tương để tìm các gen liên kết với các KEGG khác nhau. Các yếu tố phiên mã (TF) và các gen liên quan đến phiên mã được xác định bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu nhân tố phiên mã thực vật (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/index.php?sp=Gma>) để phân tích vai trò tiềm năng của chúng trong khả năng chịu ngập úng.

Sàng lọc các DEG bằng cách sử dụng kết quả QTL để đánh giá chống chịu ngập úng

Để xác định các DEG cho các chức năng của chúng liên quan đến ngập úng phản ứng, vị trí vật lý của một số DEG trong bộ gen được so sánh với kết quả bản đồ trước đây của các tập hợp tính trạng số lượng (QTL) liên quan đến khả năng chịu ngập úng ở cây đậu tương. Các quần thể dòng lai tái tổ hợp (RIL) cho QTL được phát triển bằng cách sử dụng giống kháng (Paldalkong và Danbaekkong) và giống mẫn cảm (NTS1116) cũng như bố mẹ cũng được sử dụng cho RNA-Seq trong nghiên cứu này. Kết quả QTL của một trong các quần thể RIL đã được công bố (Dhungana và cs, 2020). QTL nhận dạng dựa trên bản đồ của DEG có thể cho phép chúng tôi tìm thấy các gen giả định liên quan đến khả năng chịu ngập úng và để xác minh kết quả của nghiên cứu RNA-Seq.

Bảng 1. Chỉ số diệp lục lá của 3 giống tại thời điểm 3, 7, 11 và 14 ngày sau ngập

Giống	3 ngày sau ngập	7 ngày sau ngập	11 ngày sau ngập	14 ngày sau ngập	Trung bình (11 và 14 ngày sau ngập)
Paldalkong	1,02	1,07	0,91	0,72	0,81
Danbaekkong	1,18	1,16	1,01	0,84	0,92
NTS1116	1,10	1,17	0,80	0,67	0,73

KẾT QUẢ

Chống chịu ngập lụt

Giá trị CCI cao nhất ở 14 ngày sau ngập (DAF) được tìm thấy trong Danbaekkong (0,84) tiếp theo là Paldalkong (0,72) và NTS1116 (0,67) như trong Bảng 1. Giá trị CCI của giống mẫn cảm NTS1116 giảm tương đối từ 7 DAF trở đi.

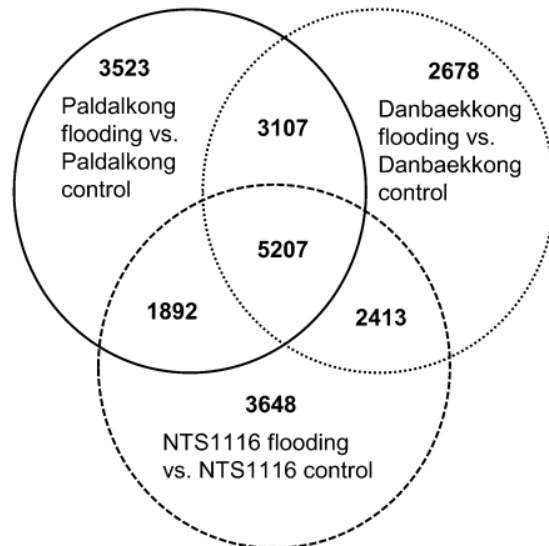
Lập bản đồ và phân tích DEG trong điều kiện ngập úng

Số lần đọc trung bình là 65,3, 67,5, 69,5, 60,1, 58,5 và 69,5 triệu tương ứng với Paldalkong đối chứng, Paldalkong ngập, Danbaekkong đối chứng, Danbaekkong ngập, NTS1116 đối chứng và NTS1116 ngập. Hơn 98,8% các lần đọc thô từ mỗi thư viện được giữ lại sau khi kiểm soát chất lượng và khoảng 97% số lần đọc trong mỗi thư viện đã được lập bản đồ (Bảng 2). Tóm tắt quy trình phân tích RNA-Seq được hiển thị trong Hình bổ sung S1.

Bảng 2. Tóm tắt phân tích trình tự RNA của giống Paldalkong, Danbaekkong, NTS1116 trong điều kiện có kiểm soát (C) và ngập (F)

Mẫu	Tổng số lần đọc	Số lần đọc rõ	Tỷ lệ đọc rõ (%)	Số lần đọc bản đồ	Tỷ lệ đọc bản đồ (%)
Paldalkong_C	65.313.216	64.600.620	98,91	62.835.414	97,27
Paldalkong_F	67.507.704	66.829.340	99,00	64.684.244	96,79
Danbaekkong_C	69.496050	68.826.752	99,0	66.948.601	97,27
Danbaekkong_F	60.135.754	59.465.180	98,88	57.677.847	96,99
NTS1116_C	58.519.816	57.906.926	98,95	56.431.463	97,45
NTS1116_F	69.466.266	68.755.798	98,98	66.490.644	96,71

Tổng cộng, 22.468 gen được biểu hiện một cách khác biệt trong điều kiện ngập úng so với điều kiện có kiểm soát (Bảng bổ sung S1). Tập hợp cốt lõi của DEG đã được phân tích trong ba tổ hợp, cụ thể là Paldalkong ngập và Paldalkong có kiểm soát, Danbaekkong ngập và Danbaekkong có kiểm soát, NTS1116 ngập và NTS1116 có kiểm soát. Các DEG riêng và chung giữa ba tổ hợp cũng được xác định (Hình. 1; Bảng bổ sung S2).



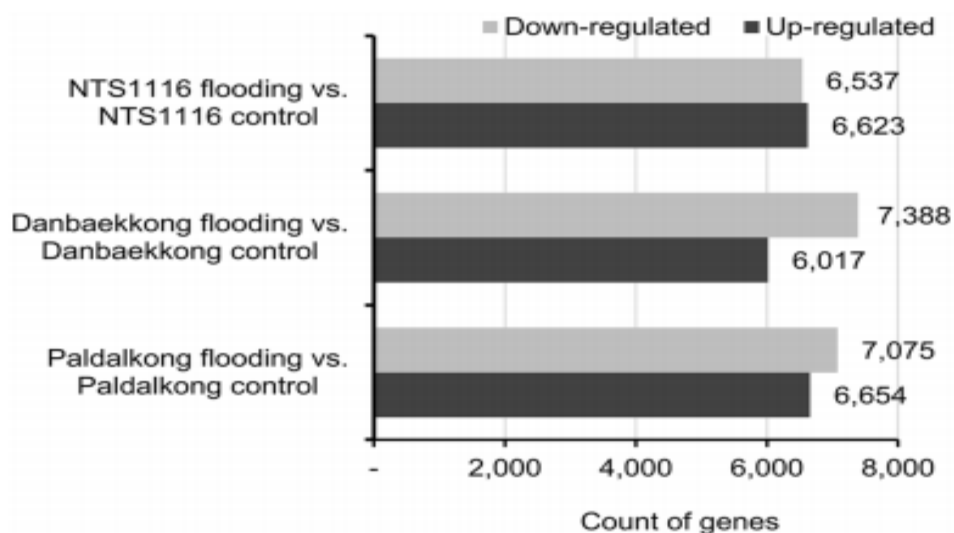
Hình 1. Biểu đồ Venn cho thấy sự khác biệt cụ thể và chung các gen biểu hiện ở Paldalkong có kiểm soát so với Paldalkong ngập, Danbaekkong có kiểm soát so với Danbaekkong ngập, NTS1116 có kiểm soát so với NTS1116 ngập.

Một số DEG liên quan đến căng thẳng chung cho cả các giống Paldalkong và Danbaekkong như lipoxxygenase (*LOC100785480*) đã tăng lên đáng kể chỉ điều chỉnh ở những giống kháng nhưng không được điều chỉnh ở giống mẫn cảm, NTS1116. Hai phosphofructokinase (*LOC100795344* và *LOC100798766*) được điều chỉnh tăng và hai cái khác (*LOC100782166* và *LOC100820495*) được điều chỉnh giảm ở các giống chống chịu nhưng điều chỉnh không đáng kể ở giống mẫn cảm. Bốn glutathione S-transferase (GST) (*LOC100306119*, *LOC100796296*, *LOC106796199* và *LOC100793025*) được điều chỉnh tăng và một *LOC100775492* được điều chỉnh giảm ở giống kháng; tuy nhiên, không có gen nào trong số năm gen này điều chỉnh có ý nghĩa ở giống mẫn cảm. Tương tự, hai gen vận chuyển đường (SWEET) (*GMSWEET30* và *GMSWEET40*) đã được điều chỉnh ở những giống kháng nhưng không có ở giống mẫn cảm.

Phân tích các DEG liên quan đến căng thẳng phổ biến của các giống chống chịu và mẫn cảm cho kết quả khác nhau, một số DEG đã được điều chỉnh tăng đáng kể và một số khác điều chỉnh giảm đối với giống chống chịu cũng như giống mẫn cảm. Lipoxxygenase *LOC100811820* đã lên ở Paldalkong và giảm ở NTS1116; *LOC100793614* bị hạ ở Danbaekkong nhưng được tăng ở NTS1116; trong khi *LOC100802887* và *LOC100800451* giảm ở Paldalkong và NTS1116. Gen mã hóa Expansin *LOC100799370* tăng ở Paldalkong nhưng giảm ở NTS1116; *LOC100807807* tăng ở Danbaekkong nhưng giảm ở Paldalkong và NTS1116; trong khi *LOC100807183*, *EXP2*, và *EXPB8* giảm ở Paldalkong và NTS1116. Phosphofructokinase *LOC100815278* tăng ở Paldalkong nhưng giảm ở NTS1116; *LOC100818755* và *LOC100803139* giảm ở Paldalkong nhưng tăng ở NTS1116; trong khi *LOC100780164* là tăng ở Danbaekkong và NTS1116. Ba GST được tăng ở Paldalkong, trong đó chỉ có một *GSTU58* tăng, *LOC100805827* và *LOC548030* được giảm ở NTS1116; trong khi đó, *EF1BGAMMA3* và *GSTZ3* được giảm ở các giống chống chịu cũng như mẫn cảm. Ba gen SWEET là *GMSWEET21*, *GMSWEET29* và *GMSWEET42* là giảm Danbaekkong và NTS1116.

Tổng số 13.729, 13.405 và 13.160 gen tương ứng với giống Paldalkong, Danbaekkong và NTS1116 cho thấy những thay đổi đáng kể ($P \leq 0,05$, thay đổi gấp $\geq + 1,5$ hoặc $\leq - 1,5$) trong điều kiện kiểm soát và ngập.

Số lượng gen quy định tăng và giảm được tìm thấy ở Paldalkong, Danbaekkong và NTS1116 tương ứng là 6.654 và 7.075; 6.017 và 7.388; 6.623 và 6.537 (Hình 2).



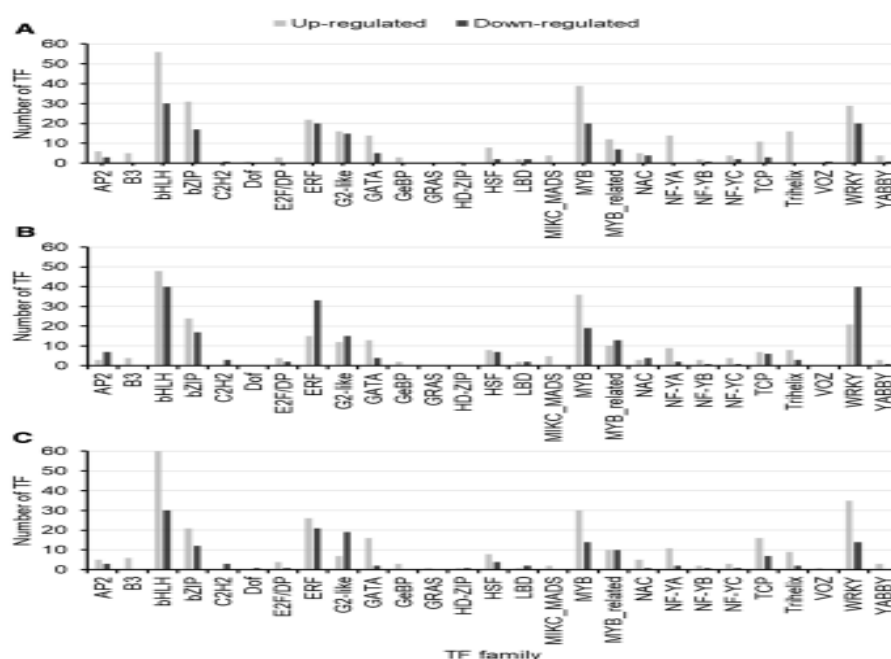
Hình 2. Sự biến thiên tăng và giảm trong biểu hiện gen ở giống Paldalkong, Danbaekkong và NTS1116 trong điều kiện có kiểm soát (C) và ngập (F).

Chức năng chú thích và làm giàu bản thể học gen (GO)

Phân tích GO được thực hiện để quan sát gen biểu hiện dựa trên ba loại: BP, MF và CC.

Các DEG được chú thích về mặt chức năng để khảo sát GO của chúng (Hình bổ sung. S2) và cũng được lập bản đồ đến KEGG để phân tích sự làm giàu chức năng của chúng. Các chú thích chức năng GO chỉ ra rằng các DEG đã tham gia vào một loạt các quá trình sinh học, như quang hợp, phản ứng ánh sáng, quá trình sinh tổng hợp, quá trình trao đổi chất và quá trình sinh thành tế bào. Các DEG cũng liên quan đến các chức năng phân tử sau: liên kết, vận chuyển và tiếp nhận tín hiệu. Ngoài ra, các DEG đã được các yếu tố cấu tạo của hệ thống quang hợp, màng, tế bào và các bào quan. Phân tích lộ trình KEGG cho thấy rằng một số con đường sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp, trao đổi cacbon, sinh tổng hợp axit amin, đường phân/gluconeoprotein, chuyển hóa tinh bột và sucrose và oxy hóa, quá trình phosphoryl hóa (Hình bổ sung. S3).

Tổng số 462, 464 và 437 TF biểu hiện khác biệt đã được xác định tương ứng ở Paldalkong, Danbaekkong và NTS1116. Phân tích RNA-Seq cho thấy 308 và 154; 244 và 220; 286 và 151 TF điều chỉnh tăng và giảm tương ứng ở Paldalkong, Danbaekkong và NTS1116 (Hình 3). Số TFs tăng lên cao hơn số TFs giảm ở tất cả các giống. Các họ bHLH, bZIP, ERF, MYB và WRKY, một số họ TF liên quan đến khả năng chống chịu căng thẳng, đại diện cho phần lớn TFs biểu hiện khác biệt ở tất cả các giống. Số lượng TF tăng trong bHLH, ERF và WRKY cao hơn ở cây trồng miễn cảm; trong khi đó của bZIP và MYB cao hơn ở các giống chống chịu. Một căng thẳng khác liên quan đến họ TF giống G2 cũng chứa một số lượng TF tăng ở các giống chống chịu lớn hơn so với giống miễn cảm.



Hình 3. Số lượng yếu tố phiên mã của các họ TF khác nhau được xác định trong DEG của ba giống. Tổng số 462 TF (308 tăng và 154 giảm) ở Paldalkong (A), 464 TF (244 tăng và 220 giảm) ở Danbaekkong (B), và 437 TF (286 tăng và 151 giảm) ở NTS1116 (C) được thể hiện một cách khác biệt.

Các gen biểu hiện khác nhau trong vùng QTL

Một số DEG liên quan đến căng thẳng phi sinh học bao gồm GST (*GLYMA_11G216400*), xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (*LOC100799976*), polygalacturonase (*GLYMA_07G066900*), protein calmodulin liên kết (*GLYMA_07G008400*), cysteineprotease (*GLYMA_12G039400*), gen NAC đậu tương (*GLYMA_07G050600*), gen helicase DEAD-box RNA (*GLYMA_07G056600*) và phản ứng mất nước nhanh liên kết (*GLYMA_07G017300*) nằm trong QTL liên quan đến khả năng chịu ngập úng của cây đậu tương. Hơn nữa, tất cả gen này (ngoại trừ GST) được tìm thấy trong các điểm nóng QTL đó là những khu vực chứa QTL tương đối ổn định hơn với sự biến đổi kiểu hình cao hơn. Một số DEG này, được tìm thấy trong QTL và được tiết lộ bởi phân tích RNA-Seq, được điều khiển tăng ở giống chống chịu và giảm ở giống mẫn cảm (Bảng bổ sung S1).

THẢO LUẬN

Kết quả chỉ ra rằng mức độ chịu ngập của cây trồng mẫn cảm giảm khi thời gian ngập kéo dài. Một số gen được phát hiện biểu hiện khác nhau trong những căng thẳng phi sinh học bao gồm ngập úng, hạn hán, nhiễm mặn và nhiệt độ thấp (Deshmukh và cs, 2014; Patil và cs, 2016). Mặc dù một số cơ chế sinh lý và phân tử có liên quan đến các phản ứng căng thẳng cụ thể, phần lớn các gen và con đường phổ biến trên các căng thẳng khác nhau (Deshmukh và cs, 2014). Phân tích biểu hiện RNA-Seq trong nghiên cứu này cho thấy các DEG ở các giống chống chịu và các giống mẫn cảm trong điều kiện ngập úng. Kết quả của các gen điều khiển tăng và giảm trong các giống chống chịu và mẫn cảm có thể cung cấp thông tin hữu ích để so sánh phân tích phiên mã của các giống cùng với sự chống chịu căng thẳng khác nhau. Phân tích phiên mã như vậy rất hữu ích trong việc thu thập thông tin về gen ứng viên liên quan đến khả năng chịu ngập úng sẽ giúp phát triển các giống cây trồng chịu ngập úng.

Thực vật trải qua nhiều cơ chế thích nghi khác nhau, bao gồm phản ứng phân tử bằng cách điều chỉnh một số gen, để tồn tại và duy trì sự phát triển bình thường trong điều kiện căng thẳng. Trong nghiên cứu này, một số gen cũng được phát hiện là thể hiện khác biệt

ở những giống chống chịu và mẫn cảm với ngập úng. Việc phân tích DEG về cơ bản tập trung vào các gen có liên quan đến cơ chế chống chịu căng thẳng.

Biểu hiện tương đối của các gen như lipoxygenase, expansin, phosphofructokinase, GST và SWEET giữa các giống chống chịu và mẫn cảm đã được phân tích. Mặc dù một số gen liên quan đến căng thẳng biểu hiện khác nhau giữa các giống, phân tích tổng thể cho thấy rằng số lượng gen tương đối cao hơn được điều chỉnh ở giống chống chịu so với giống mẫn cảm. Lipoxygenase đã được báo cáo đóng vai trò trong việc thích nghi của củ cải với căng thẳng sinh học và phi sinh học (Wang và cs, 2019). Kết quả với số lượng cao hơn các gen mã hóa expansin được điều chỉnh tăng cũng được tìm thấy trong hạt đậu tương chịu úng (Sharmin và cs, 2020). Các vai trò của expansin đối với sự nảy mầm, chiều dài rễ và số lượng rễ bên dưới áp lực phi sinh học đã được báo cáo (Lü và cs, 2013; Marowa và cs, 2016). Tăng biểu hiện của phosphofructokinase, một enzym đường phân liên quan đến con đường đường phân, có liên quan đến việc thích ứng với ngập úng và hạn hán ở đậu tương (Oh và Komatsu 2015). GST được cho là đóng vai trò bảo vệ chống lại ngập úng và hạn hán ở đậu tương (Chen và cs, 2016; Oh và Komatsu 2015). Các GSTs lọc các loại phản ứng oxy, có thể được sản xuất ở nồng độ cao do căng thẳng (Klok và cs, 2002) dẫn đến tế bào chết (Clement và cs, 2008; Wrzaczek và cs, 2011) và bảo vệ thực vật khỏi hư hỏng do oxy hóa. Điều chỉnh tăng lên của một số gen SWEET cũng được quan sát thấy ở các dòng đậu tương chịu hạn và ngập úng (Syed và cs, 2015). Nó được ngụ ý rằng quy định của các gen SWEET ảnh hưởng đến cân bằng đường trong tình trạng ngập úng (Mutava và cs, 2015). Vai trò của gen SWEET về sự phát triển của cây trồng và khả năng chống chịu căng thẳng cũng được báo cáo đối với *Arabidopsis* (Klemens và cs, 2013).

Như trong một nghiên cứu trước đây (Sharmin và cs, 2020), một số gen liên quan đến thành tế bào như *GLYMA_08G249800* và *GLYMA_18G272100* liên kết với COBRA giống như protein được điều chỉnh tăng lên và giảm xuống đáng kể tương ứng ở các giống chống chịu và mẫn cảm. Tuy nhiên, một số lượng cao hơn của các gen liên quan đến protein thành tế bào giàu proline, đã được điều chỉnh trong kiểu gen chống chịu (Sharmin và cs, năm 2020), đã được điều chỉnh giảm xuống trong nghiên cứu này. Sharmin và cs (2020) báo cáo rằng các gen liên quan đến thành tế bào này có một chức năng quan trọng trong việc duy trì tính linh hoạt của thành tế bào trong điều kiện ngập úng.

Axit abscisic (ABA) và các tín hiệu thượng nguồn khác có thể điều khiển phá hủy các con đường hạ lưu trong các phản ứng căng thẳng phi sinh học (Tuteja, 2007). Một số TF liên quan đến ABA như AP2, bZIP và MYB được điều khiển tăng lên ở Paldalkong và Danbaekkong hơn so với NTS1116. Các TFs AP2 đậu tương được cho là đóng một vai trò quan trọng trong việc tăng cường khả năng chống chịu căng thẳng phi sinh học ở cây *Arabidopsis* và đậu tương (Zhao và cs, 2019). Họ TF của bZIP và MYB cũng đã từng được báo cáo là có vai trò quan trọng trong phản ứng với căng thẳng phi sinh học ở đậu tương, thuốc lá và *Arabidopsis* (Cai và cs, 2015; Shukla và cs, năm 2015; Xu và cs, 2016). Các TF bZIP có thể điều khiển một số gen liên quan đến căng thẳng dẫn đến tích lũy proline (Hoang và cs, 2017). Proline được cho là góp phần ổn định các cấu trúc dưới tế bào, loại bỏ các gốc tự do và thể hiện các tín hiệu về khả năng chống chịu chéo đối với nhiều căng thẳng (Kaur và Asthir 2015). Số lượng của G2, giống như TF, điều chỉnh tăng cao hơn ở Paldalkong (16) và Danbaekkong (12) so với NTS1116 (7). Tahmasebi và cs (2019) ngụ ý rằng G2, giống như TF đã góp phần nâng cao khả năng chống chịu phi sinh học ở thuốc lá kể từ khi chúng tham gia vào sự hình thành và phát triển của lục lạp (Liu và cs, 2016).

Kết quả của một số DEG liên quan đến căng thẳng bằng RNA-Seq trong nghiên cứu này được phân tích tương đối với các gen giả định trong QTL liên quan đến khả năng chịu ngập úng (Dhungana và cs, 2020). Một số gen nằm trong vùng QTL là cũng được tìm thấy bằng RNA-Seq để góp phần chống chịu ngập úng và các căng thẳng phi sinh học khác. Ví dụ, các emzym tái cấu trúc thành tế bào như xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase duy trì độ cứng của thành tế bào và giúp vượt qua căng thẳng (Tenhaken, 2015). Polygalacturonase đã được tìm thấy đáp ứng với ngập úng ở đậu tương (Nanjo và cs, 2013). Đóng góp của protein liên kết calmodulin trong chống chịu sinh học và phi sinh học cũng đã được báo cáo (Wang và cs, 2015). Cysteine protease cho thấy tác động tích cực đến chống chịu căng thẳng phi sinh học ở đậu tương (Mangena, 2020). Biểu hiện quá mức của gen NAC của đậu tương tăng cường sự hình thành rễ và khả năng chống chịu căng thẳng phi sinh học ở *Arabidopsis* chuyển gen (Yang và cs, 2019). Cây cà chua với sự biểu hiện quá mức gen RNA helicase DEAD-box cho thấy khả năng chịu hạn và mặn (Zhu và cs, 2015). Gen liên kết phần tử phản ứng mất nước đã cải thiện khả năng chống chịu với nhiệt độ và khô hạn ở *Arabidopsis* (Mizoi và cs, 2013). Các báo cáo này hỗ trợ thêm cho đóng góp của DEGs vào khả năng chịu ngập úng và tăng tính hữu ích của thông tin di truyền của chúng đối trong các chương trình chọn giống đậu tương.

KẾT LUẬN

Các giống đậu tương chịu ngập úng và mặn cảm đã được trồng trong điều kiện căng thẳng và kiểm soát lũ lụt để điều tra các mô hình biểu hiện gen trong các mô lá bằng cách sử dụng RNA-Seq. Mức độ chịu ngập, được tính bằng chỉ số diệp lục của lá, của giống mặn cảm giảm như thời gian ngập kéo dài. Số lượng DEG trong các giống chống chịu cao hơn so với giống mặn cảm. Số lượng lớn hơn các gen khác nhau và các TF liên quan đến căng thẳng, bao gồm ngập, được điều khiển tăng ở giống chống chịu so với giống mặn cảm. Kết quả của QTL liên quan đến khả năng chịu ngập đã thu được với cùng một nền tảng di truyền của bố mẹ chống chịu, Paldalkong và Danbaekkong có thể hỗ trợ các phát hiện của các gen giả định bởi RNA-Seq trong nghiên cứu này. Sự biến đổi trong biểu hiện của một số gen ở giống chống chịu và nhạy cảm có thể cung cấp thông tin hữu ích về các gen ứng viên liên quan đến khả năng chịu ngập úng có thể có giá trị để phát triển các giống đậu tương chịu ngập úng.