

# 大豆响应低磷胁迫的数字基因表达谱分析

姚敏磊<sup>1</sup>, 张璟曜<sup>1</sup>, 周 汐<sup>1</sup>, 韩少怀<sup>1</sup>, 谢凤斌<sup>1</sup>, 朱月林<sup>1,2</sup>, 盖钧镒<sup>1</sup>, 杨守萍<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学 大豆研究所/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室(综合)/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:**以 *OsPT6* 转基因 T<sub>5</sub> 代大豆为材料, 以其受体亲本东农 50 为对照, 对低磷胁迫处理下的根系 cDNA 文库进行数字基因表达谱分析, 共筛选得到 33 个差异表达基因。以受体亲本为对照, 在 *OsPT6* 转基因大豆中上调表达的差异基因有 21 个、下调表达的差异基因有 12 个。GO 功能显著性富集分析表明, 有 25 个差异表达基因在蛋白、核酸等生物大分子代谢、次生代谢和酶活性调节等过程中表现为富集。KEGG 代谢通路分析表明仅有 1 个过氧化物酶超蛋白家族基因参与与苯丙合成、苯丙氨酸代谢和次生代谢产物合成等次生代谢途径中。综合分析表明: 通过光合作用相关酶类活性的调节控制光合作用速率从而影响次生代谢途径可能是大豆适应低磷胁迫的主要途径。以上结果为大豆响应低磷胁迫相关分子机制的深入研究和功能基因的筛选奠定了基础。

**关键词:** 大豆; 低磷胁迫; 数字基因表达谱; 差异表达基因

**中图分类号:** S565. 1      **文献标识码:** A      **DOI:** 10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2016. 02. 0213

## The Digital Gene Expression Profiling Analysis of Genes in Response to Low Phosphorus Stress in Soybean

YAO Min-lei<sup>1</sup>, ZHANG Jing-yao<sup>1</sup>, ZHOU Xi<sup>1</sup>, HAN Shao-huai<sup>1</sup>, XIE Feng-bin<sup>1</sup>, ZHU Yue-lin<sup>1,2</sup>, GAI Jun-yi<sup>1</sup>, YANG Shou-ping<sup>1</sup>

(1. Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean(General), Ministry of Agriculture/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In this study, the T<sub>5</sub> line of the soybean cultivar transferred with *OsPT6* gene and its receptor parent Dongnong 50 under low phosphorus stress were used to analyze their root cDNA library by digital gene expression profiling technology. The results showed that a total of 33 differential expressed genes (DEGs) were screened. Compared with the receptor parent, 21 DEGs were up-regulated and 12 DEGs were down-regulated in the *OsPT6* transgenic soybean. GO enrichment analysis showed that 25 DEGs were enriched in the processes of biological macromolecules metabolism, secondary metabolism and enzyme activity regulation. The KEGG pathway analysis showed that only one peroxidase superfamily protein was involved in the pathways such as phenylpropanoid biosynthesis, phenylalanine metabolism and biosynthesis of secondary metabolites. Comprehensive analysis showed that the photosynthesis rate affected the secondary metabolic pathways by regulating activity of the enzymes involved in photosynthesis, which could be the main way of soybean adapted to low phosphorus stress. These results provided a base for further study on the molecular mechanism in response to low phosphorus stress and functional genes screening in soybean.

**Keywords:** Soybean; Low phosphorus stress; Digital gene expression profiling; Differential expressed genes

大豆是一种重要的经济作物, 为人类提供大量的植物蛋白和油分。磷是植物生长发育所必需的元素之一, 是植物细胞结构的组成成分, 在磷脂、核酸和核蛋白中大量存在, 参与光合作用的同化和光合磷酸化过程, 在遗传信息的传递和细胞结构的维持中起着重要作用<sup>[1]</sup>。

植物对磷素的吸收主要是一个依靠磷酸盐转运蛋白介导的跨质膜转运过程<sup>[2]</sup>。在植物中, 磷转

运蛋白按照序列相似性可划分为 H<sup>+</sup>/Pi 共转运家族 (Ph1 家族) 和 Na<sup>+</sup>/Pi 共转运家族 (Ph2 家族) 两类<sup>[3]</sup>。水稻中含有 13 个 Ph1 家族成员, 用于从土壤中吸收磷以及磷在植物体内的运输, 其中 *OsPT6* 在缺磷和低磷诱导下强烈表达, 通过转基因手段将 *OsPT6* 基因转入大豆基因组, 发现转入 *OsPT6* 基因的大豆在低磷胁迫下, 磷吸收利用效率明显提高<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2015-07-01

基金项目: 国家农作物转基因重大专项 (2011ZX08004-005, 2013ZX08004-005, 2014ZX08004-005); 国家高技术研究发展计划“863 计划” (2011AA10A105); 国家重点基础研究发展计划“973 计划” (2011CB109301); 教育部长江学者和创新团队发展计划 (PCSIRT13073); 江苏省现代作物生产协同创新中心 (JCIC-MCP)。

第一作者简介: 姚敏磊 (1991-), 男, 硕士, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: yaominlei1991@sina.com。

通讯作者: 杨守萍 (1967-), 女, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: spyung@126.com。

由于土壤中的有效磷极易被固定,浓度通常在  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以下,而植物细胞的有效磷浓度则在  $5 \sim 20 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  范围<sup>[1]</sup>。因此,土壤中有效磷的含量和植物对磷元素的吸收能力是限制植物生长发育的主要因素之一<sup>[5]</sup>。磷肥的过度施用极易导致环境污染,磷资源的有限性等因素也决定了研究植物吸收、利用磷元素的分子生物学基础的重要性。

数字基因表达谱是一种从转录组层面上研究基因、基因表达水平以及样品间基因表达差异的技术,通常具有读长短、通量高、重复性好等特点<sup>[6]</sup>。且因其灵敏度和精确性较高,不仅能检测到差异表达较小的基因和丰度较低的基因,还可以发掘新的转录本<sup>[7]</sup>。近年来,随着测序数据的不断丰富,数字基因表达谱技术被逐渐应用于非生物胁迫下基因表达模式的分析,而大豆基因组测序的完成也为研究低磷胁迫下大豆基因表达差异提供了有利条件<sup>[8]</sup>。因此,本研究通过数字基因表达谱技术分析大豆在低磷胁迫下基因表达变化,试图阐述大豆响应低磷胁迫的分子机理,为大豆耐低磷相关基因的发掘和利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究以 *OsPT6* 转基因 T<sub>5</sub> 代大豆为试验材料,非转基因受体亲本东农 50 为对照。每个材料取大小一致、颗粒饱满的种子各 20 粒,在湿润的蛭石中萌发,待幼苗子叶完全展开后转入改良后的霍格兰营养液中培养,营养液采用  $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的低磷处理,所有试验在光照培养箱中进行,16 h 光照/8 h 黑暗,光照温度/黑暗温度为  $27^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ 。待两片真叶完全展开后剪去子叶,确保植株仅从营养液中汲取所需养分。每隔 1 d 调换植株位置,避免光照误差。每 3 d 更换一次营养液,第 15 天时,转基因大豆材料与对照材料的幼苗表型出现较明显差异,其中转基因大豆材料株高和根长均显著高于对照材料,侧根也更为发达,对照材料因缺磷表现出部分黄叶现象,而转基因大豆材料黄叶现象并不明显。此时,每个材料随机选取 3 株幼苗,剪下幼嫩根系后充分混合,液氮速冻,  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存。

### 1.2 大豆根系总 RNA 提取和基因表达谱测序

利用天根生化科技(北京)有限公司提供的总 RNA 提取试剂盒 RNAsimple Total RNA Kit(离心柱型)提取大豆根系总 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 降解程度以及是否有污染。检测合格后,用北京思尔成生物技术有限公司提供的 Dynabeads

Oligo(dT) 25 富集 mRNA。随后加入美国 NEB 公司提供的 NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer(5X) 消化纯化的 mRNA,以 mRNA 短片段为模板,合成一链 cDNA,然后合成二链 cDNA。对纯化过的双链 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,通过 PCR 富集大小不同的片段,得到最终的 cDNA 文库。文库构建完成后,使用生物分析仪 Agilent 2100 对文库的插入片段大小进行检测,符合预期后,使用 Q-PCR 方法检测文库质量。文库质检合格后,基于 Illumina HiSeq2500 技术测序平台,进行 SE50 单端测序,测序产生的原始 reads 中含有带接头和低质量的 reads,经过滤后得到的 clean reads 与大豆参考基因组比对,得到的具有唯一比对的 reads 可用于后续分析<sup>[9]</sup>。测序部分由诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

### 1.3 差异表达基因的筛选

在 RNA-seq 分析中,通过定位到基因组区域或外显子区域测序序列的 readcount 来估计基因的表达水平,用 edgeR 软件对基因表达水平分析中得到的 readcount 数据进行差异分析,筛选差异表达基因,筛选阈值为  $q\text{-value} < 0.05$ ,  $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$ ,其中 Fold Change 为 *OsPT6* 转基因材料与非转基因受体亲本中各基因表达量的比值。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  $\log_2 \text{Fold Change} < 0$ ,认为该差异表达基因是下调的。

### 1.4 GO 基因功能注释和 KEGG 代谢通路分析

参考基因组数据库和注释文件的数据信息来源于 ensembl 数据库(参考基因组:ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-23/plants fasta/glycine\_max/dna/,注释文件 ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-23/plants/gtf/glycine\_max/),差异表达基因的 GO 分析数据信息来自 Gene ontology 数据库(http://www.geneontology.org/),根据试验目的筛选差异基因后,通过 Goseq 方法假设验证得到一个特定的  $p\text{-value}$ 。小的  $p\text{-value}$  表示差异基因在该 GO 中出现了富集,一般校正后的  $p\text{-value} \leq 0.05$ ,该功能为富集项。使用 KOBAS(2.0)进行 Pathway 富集分析,当错误发现率  $\text{FDR} \leq 0.05$  时,表示差异表达基因在该通路中显著富集<sup>[10]</sup>。

### 1.5 qRT-PCR 验证

选取耐低磷相关的差异表达基因,采用 qRT-PCR 验证基因表达谱测序数据的可靠性。利用 Grant Premier 软件设计 PCR 引物,扩增产物长度为  $100 \sim 200 \text{bp}$ ,以大豆组成型表达基因  $\beta\text{-actin}$  作为内

参基因。每个样品取 1  $\mu\text{g}$  总 RNA,采用 TaKaRa 公司 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix 试剂盒进行反转录,反应体系为 20  $\mu\text{L}$ ,含 iTaq<sup>TM</sup> universal SYBR Green supermix(2  $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ 、上游引物和下游引物各 0.6  $\mu\text{L}$ 、cDNA 2  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu\text{L}$ 。使用实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad CFX96 touch<sup>TM</sup>)对反转录混合液进行 PCR 反应,扩增条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  10 min;95 $^{\circ}\text{C}$  15 s,60 $^{\circ}\text{C}$  1 min,共 40 个循环。每样品 3 次生物学重复。全部反应结束后使用 Origin 8 软件分析数据,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法进行基因的相对定量。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序质量分析

*OsPT6* 转基因大豆材料和受体亲本材料测序得到的 raw reads 经过过滤获得 clean reads 的比例较高,分别为 99.55%、99.67%,说明测序质量较好。由于注释信息量的限制,两试验材料中可被大豆参考基因组注释的 clean reads 分别占有所有 clean reads 的 91.65% 和 90.83% (表 1),说明大豆基因组注释相对较为完全。而且,可以比对到不同基因上的 reads 较少,多数在基因组上有唯一比对(转基因大豆材料中 79.7%,受体亲本材料中 79.11%) (表 1),说明 reads 质量比较好,长序列特异性比对率较高。测序随机性分析显示,reads 在基因中的分布均一,测序材料的 mRNA 片段化均一性和完整性都比较好,在序列分析过程中基本没有出现 mRNA 降解和偏向性的问题<sup>[11]</sup>。

表 1 Reads 与参考基因组比对分析

Table 1 Sequence comparison of reads with reference genome

材料名称	<i>OsPT6</i> 转基因大豆	受体亲本
Sample name	<i>OsPT6</i> transgenic soybean	Receptor parent
Total reads	12119991	10836721
Total mapped	11108135 (91.65%)	9842479 (90.83%)
Multiple mapped	1448497 (11.95%)	1269931 (11.72%)
Uniquely mapped	9659638 (79.70%)	8572548 (79.11%)
Non-splice reads	8323839 (68.68%)	7400260 (68.29%)
Splice reads	1335799 (11.02%)	1172288 (10.82%)

### 2.2 基因表达水平分析

通过高通量测序产生的数字基因表达谱分析获得了转录水平上 54 174 个参考基因的真实序列信息。以 RPKM > 1 为标准筛选表达显著的基因,发现有 59.43% 的基因在 *OsPT6* 转基因大豆中显著表达,59.36% 的基因在非转基因受体亲本中显著表达(表 2)。

表 2 不同表达水平区间的基因数量统计表

Table 2 The number of genes in different expression levels

RPKM 区间	<i>OsPT6</i> 转基因大豆	受体亲本
RPKM interval	<i>OsPT6</i> transgenic soybean	Receptor parent
0 ~ 1	21980 (40.57%)	22014 (40.64%)
1 ~ 3	7455 (13.76%)	7547 (13.93%)
3 ~ 15	16044 (29.62%)	16128 (29.77%)
15 ~ 60	7053 (13.02%)	6823 (12.59%)
>60	1642 (3.03%)	1662 (3.07%)

### 2.3 差异表达基因筛选

对差异表达基因进行筛选,阈值设定为:  $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$  且  $q\text{-value} < 0.05$ ,共筛选得到 33 个差异表达基因,以受体亲本为对照,在 *OsPT6* 转基因大豆材料中上调表达的差异基因有 21 个、下调表达的差异基因有 12 个。将这些差异表达基因中表达模式相同或相近的基因聚集成类,以 RPKM 值为表达水平,做层次聚类分析(图 1),同组内的基因表达模式相近,可能具有相似的功能或参与相同的生物学过程。

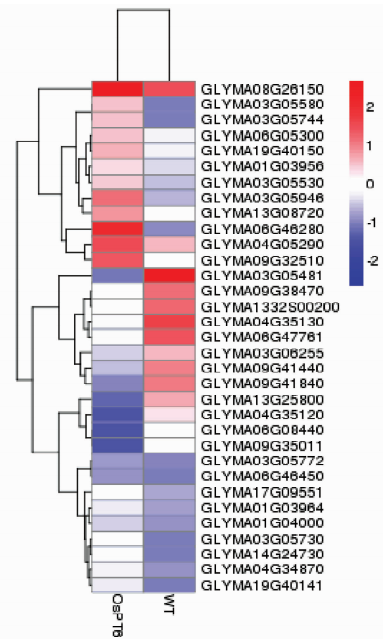


图 1 差异表达基因聚类热图

Fig. 1 Heat cluster for differential expressed genes

### 2.4 GO 富集分析

将差异表达基因比对到 Gene Ontology 数据库,发现有 25 个差异表达基因能富集到相关的 GO 分类条目,校正后  $p\text{-value} \leq 1$  的分类条目共有 288 个,其中生物学过程(biological process)、细胞组分(cellular component)和分子功能(molecular function)3 类条目所占比例分别为 45.14%、15.28% 和 39.58%。

从富集最显著的 30 个 GO 分类条目中可以看

出,差异基因主要涉及腺苷酸核糖核苷酸结合(GO:0032559)和腺嘌呤核苷酸结合(GO:0030554)等核酸类物质的结合,ADP结合(GO:0043531)、阴离子结合(GO:0043168)和肌动蛋白丝结合(GO:0051015)等小分子化合物的结合,TGF- $\beta$ 受体活性

(GO:005026)及其激活受体活性(GO:0005024)等的调节,氧化还原酶(GO:0052880)、质体醌/质体蓝素还原酶(GO:0009496)、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(GO:0004675)和跨膜受体蛋白激酶(GO:0019199)等酶类活性(表3)。

表3 富集最显著的30个GO分类条目

Table 3 The enrichment of the 30 most prominent GO terms

GO 编号 GO accession	功能注释 Annotation	差异表达基因 Differential expressed genes	功能分类 Term type
GO:0006611	Protein export from nucleus	GLYMA03G06255	Biological process
GO:0006998	Nuclear envelope organization	GLYMA03G06255	Biological process
GO:0006997	Nucleus organization	GLYMA03G06255	Biological process
GO:0006352	DNA-dependent transcription, initiation	GLYMA03G05580, GLYMA1332S00200	Biological process
GO:0006406	mRNA export from nucleus	GLYMA03G06255	Biological process
GO:0031965	Nuclear membrane	GLYMA03G06255	Cellular component
GO:0043531	ADP binding	GLYMA03G05946, GLYMA01G04000, GLYMA03G05772, GLYMA03G05730, GLYMA01G03964, GLYMA03G06255	Molecular function
GO:0046992	Oxidoreductase activity, acting on X-H and Y-H to form an X-Y bond	GLYMA01G03956	Molecular function
GO:0050485	Oxidoreductase activity, acting on X-H and Y-H to form an X-Y bond, with a disulfide as acceptor	GLYMA01G03956	Molecular function
GO:0005026	Transforming growth factor beta receptor activity, type II	GLYMA04G35130	Molecular function
GO:0032559	Adenyl ribonucleotide binding	GLYMA03G05730, GLYMA03G05946, GLYMA01G04000, GLYMA03G05772, GLYMA01G03964, GLYMA17G09551, GLYMA03G06255, GLYMA09G35011, GLYMA04G35130, GLYMA04G35120, GLYMA17G09551, GLYMA01G03964, GLYMA03G05772, GLYMA03G05946, GLYMA01G04000, GLYMA03G05730, GLYMA04G35120, GLYMA09G35011, GLYMA03G06255, GLYMA04G35130	Molecular function
GO:0030554	Adenyl nucleotide binding	GLYMA04G35130	Molecular function
GO:0005024	Transforming growth factor beta-activated receptor activity	GLYMA04G35130	Molecular function
GO:0001883	Purine nucleoside binding	GLYMA03G05772, GLYMA01G03964, GLYMA17G09551, GLYMA03G05730, GLYMA01G04000, GLYMA03G05946, GLYMA04G35130, GLYMA03G06255, GLYMA09G35011, GLYMA04G35120	Molecular function
GO:0032549	Ribonucleoside binding	GLYMA01G04000, GLYMA03G05946, GLYMA03G05730, GLYMA17G09551, GLYMA03G05772, GLYMA01G03964, GLYMA04G35120, GLYMA04G35130, GLYMA03G06255, GLYMA09G35011	Molecular function
GO:0032550	Purine ribonucleoside binding	GLYMA01G03964, GLYMA03G05772, GLYMA17G09551, GLYMA03G05730, GLYMA01G04000, GLYMA03G05946, GLYMA04G35130, GLYMA09G35011, GLYMA03G06255, GLYMA04G35120	Molecular function

续表 3

GO 编号 GO accession	功能注释 Annotation	差异表达基因 Differential expressed genes	功能分类 Term type
GO:0032555	Purine ribonucleotide binding	GLYMA03G05730, GLYMA01G04000, GLYMA03G05946, GLYMA01G03964, GLYMA03G05772, GLYMA17G09551, GLYMA04G35130, GLYMA09G35011, GLYMA03G06255, GLYMA04G35120	Molecular function
GO:0001882	Nucleoside binding	GLYMA01G03964, GLYMA03G05772, GLYMA17G09551, GLYMA03G05730, GLYMA03G05946, GLYMA01G04000, GLYMA09G35011, GLYMA03G06255, GLYMA04G35130, GLYMA04G35120	Molecular function
GO:0032553	Ribonucleotide binding	GLYMA17G09551, GLYMA03G05772, GLYMA01G03964, GLYMA03G05946, GLYMA01G04000, GLYMA03G05730, GLYMA04G35120, GLYMA03G06255, GLYMA09G35011, GLYMA04G35130	Molecular function
GO:0017076	Purine nucleotide binding	GLYMA17G09551, GLYMA03G05772, GLYMA01G03964, GLYMA03G05946, GLYMA01G04000, GLYMA03G05730, GLYMA04G35120, GLYMA03G06255, GLYMA09G35011, GLYMA04G35130	Molecular function
GO:0051015	Actin filament binding	GLYMA06G47761	Molecular function
GO:0000166	Nucleotide binding	GLYMA17G09551, GLYMA03G05772, GLYMA01G03964, GLYMA01G04000, GLYMA03G05946, GLYMA03G05730, GLYMA04G35120, GLYMA04G35130, GLYMA03G06255, GLYMA09G35011	Molecular function
GO:1901265	Nucleoside phosphate binding	GLYMA17G09551, GLYMA01G03964, GLYMA03G05772, GLYMA01G04000, GLYMA03G05946, GLYMA03G05730, GLYMA04G35120, GLYMA04G35130, GLYMA09G35011, GLYMA03G06255	Molecular function
GO:0043168	Anion binding	GLYMA17G09551, GLYMA01G03964, GLYMA03G05772, GLYMA03G05946, GLYMA01G04000, GLYMA03G05730, GLYMA04G35120, GLYMA09G35011, GLYMA03G06255, GLYMA04G35130	Molecular function
GO:0009496	Plastoquinol-plastocyanin reductase activity	GLYMA06G46450	Molecular function
GO:0052880	Oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, with copper protein as acceptor	GLYMA06G46450	Molecular function
GO:0004675	Transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity	GLYMA04G35130	Molecular function
GO:0036094	Small molecule binding	GLYMA01G03964, GLYMA03G05772, GLYMA17G09551, GLYMA03G05730, GLYMA03G05946, GLYMA01G04000, GLYMA09G35011, GLYMA03G06255, GLYMA04G35130, GLYMA04G35120	Molecular function
GO:0004674	Protein serine/threonine kinase activity	GLYMA13G25800, GLYMA04G35130	Molecular function
GO:0019199	Transmembrane receptor protein kinase activity	GLYMA04G35130	Molecular function

以校正后  $p \leq 0.05$  为显著性富集的标准,仅在分子功能类别中获得了 1 个显著性富集的 GO 分类条目,该 GO 分类条目(GO:0043531)主要与 ADP 结合相关。根据 Gene Ontology 数据库注释,共 614 个基因富集到这个 GO 分类条目中,包含 6 个差异表达基因,其中有 1 个表现上调、4 个表现下调,均

为 TIR-NBS-LRR 类假定抗病蛋白基因,另 1 个表现下调的为 NB-ARC 结构域抗病蛋白基因(表 4)。在植物体内,TIR-NBS-LRR 类假定抗病蛋白是超敏反应中的重要组成部分,可能在植物响应光调控、生物胁迫和非生物胁迫等过程中起到重要作用<sup>[12-14]</sup>。

表 4 ADP 结合相关差异表达基因

Table 4 Differential expressed genes related to ADP binding

基因编号 Gene ID	Log <sub>2</sub> 比值 Log <sub>2</sub> Fold Change	P 值 P-value	校正后 P 值 P-adjusted	基因功能注释 Gene annotation
GLYMA03G05946	4.64286	7.42E-19	1.01E-14	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative
GLYMA03G05730	9.248353	2.45E-18	2.65E-14	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
GLYMA01G04000	3.195597	6.78E-08	2.16E-04	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative
GLYMA01G03964	2.572662	1.06E-05	2.21E-02	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative
GLYMA03G05772	3.745354	1.47E-05	2.57E-02	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
GLYMA03G06255	-7.567464	2.95E-05	4.85E-02	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative

## 2.5 KEGG 富集分析

在 KEGG 数据库中对差异表达基因进行代谢通路分析,发现仅有 1 个过氧化物酶超蛋白家族基

因(GLYMA09G41440)参与到 4 个代谢途径中(表 5),这些代谢途径主要涉及苯丙合成、苯丙氨酸代谢、次生代谢产物合成等植物的次生代谢途径。

表 5 KEGG 富集到的代谢通路

Table 5 The pathways enriched in KEGG

代谢途径 Term	编号 ID	包含基因 Input genes	背景基因数 Background genes number	P 值 P-value	校正后 P 值 P-adjusted
Phenylalanine metabolism	gmx00360	GLYMA09G41440	229	0.048674	0.128311
Phenylpropanoid biosynthesis	gmx00940	GLYMA09G41440	304	0.064155	0.128311
Biosynthesis of secondary metabolites	gmx01110	GLYMA09G41440	1733	0.324634	0.432845
Metabolic pathways	gmx01100	GLYMA09G41440	3353	0.549605	0.549605

## 2.6 qRT-PCR 验证

对显著富集的 GO 分类条目(GO:0043531)中涉及的 6 个差异表达基因(GLYMA03G05946、GLYMA03G05730、GLYMA01G04000、GLYMA01G03964、GLYMA03G05772、GLYMA03G06255)和 KEGG 富集分析中涉及到的 1 个差异表达基因(GLYMA09G41440)进行 qRT-PCR 分析以验证数字基因表达谱数据的可靠性。结果表明,这 7 个差异表达基因的 qRT-PCR 表达模式均与它们在数字基因表达谱中检测到的表达趋势一致,表明数字基因表达谱的分析结果是可靠的(图 2)。

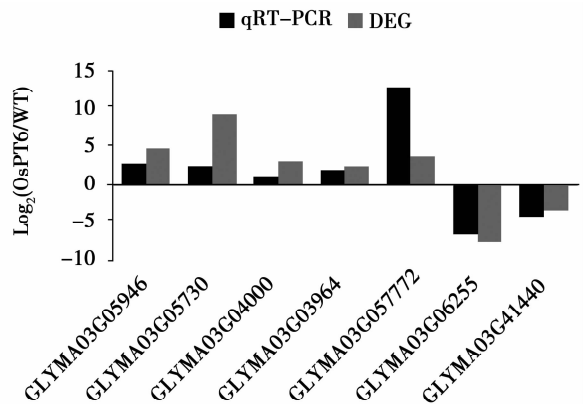


图 2 qRT-PCR 验证

Fig. 2 qRT-PCR verification

### 3 讨论

磷在核酸和生物膜的能量代谢和生物合成过程中必不可少,在光合作用、呼吸作用及一系列酶的调节中都扮演着重要角色,是影响植物新陈代谢和生长发育的重要矿质元素之一<sup>[15]</sup>。然而,磷肥极易以磷酸根的形式被土壤固定,导致土壤中的有效磷含量很低,同时过量施用的磷肥对水资源与土壤造成了严重的污染,另一方面磷矿又不可再生,全球磷资源趋于耗尽<sup>[16]</sup>。因此,研究植物吸收、利用磷元素的分子生物学基础对提高植物的磷利用效率具有重要意义。

数字基因表达谱和基因芯片等技术一样,都可用于基因的鉴定和基因表达模式的研究。但是基因芯片技术只能利用已知基因的探针去和样品进行杂交,因而只能对目的基因进行表达模式分析。而数字基因表达谱可以得到所有转录本的表达情况,除能检测目的基因的表达模式外还可以挖掘到未知的功能基因,使用范围比基因芯片更广、效率更高。低磷胁迫下,植物会通过改变基因的表达水平来调节不同代谢途径和信号转导途径,因此,利用数字基因表达谱技术可以从转录组层面上更为全面地研究植物在低磷胁迫下整个基因组的表达情况<sup>[17-20]</sup>。

本研究所用材料为转入了水稻磷转运蛋白 *Os-PT6* 的大豆材料及其受体亲本东农 50, *OsPT6* 转基因大豆材料由于转运蛋白受 *CaMV35S* 启动子的诱导表达,在低磷胁迫下仍能正常转运营养液中的有效磷,使体内的磷含量保持在相对稳定的状态,而非转基因受体亲本在受到低磷胁迫时,磷转运相关基因的表达出现相应变化。植物受到低磷胁迫过程中,根系是最先感知胁迫信号的器官,这也是本研究以大豆幼嫩根系为研究材料的主要原因。由于 *OsPT6* 转基因大豆材料与受体亲本间遗传背景差异较小,通过数字基因表达谱分析发现,受低磷胁迫诱导出现差异表达的基因只有 33 个,以受体亲本为对照, *OsPT6* 转基因大豆材料中大部分表现为上调,即受体亲本在低磷胁迫下部分基因出现抑制表达,而且这些差异表达基因在功能上表现出了高度的特异性。GO 功能分析表明,差异表达基因主要涉及叶绿体、类囊体、细胞核等光合相关细胞组分,包含了氧化还原酶、跨膜蛋白受体激酶、质体醌/质体蓝素还原酶等光合相关酶类活性,参与了次生物质代谢、能量转换、跨膜运输等生物过程。对 KEGG 富集中涉及到的几个通路分析也表明低磷胁迫可能对植物的次生代谢途径产生一定的

影响。

磷在光合作用影响方面的研究目前主要集中在低磷胁迫对光合作用的影响。缺磷会对植株同化力的形成和腺苷酸等物质的积累产生重要影响,从而导致低磷胁迫下的植株叶片中的 ATP 和 NADPH 含量明显下降。缺磷使 ATP 和 NADPH 含量下降主要是由于限制了类囊体膜上 ATP 合成酶的活性<sup>[21]</sup>。在植物光合作用中的光反应阶段,ADP 在类囊体薄膜上经氧化还原酶等多种酶类的催化与一个磷酸基团结合形成 ATP,质体醌/质体蓝素还原酶在这一过程中扮演着重要角色<sup>[22]</sup>,跨膜受体蛋白激酶活性对调节小分子化合物在类囊体薄膜上的跨膜转运起着重要作用<sup>[23]</sup>,这些酶类活性在富集最显著的 30 个 GO 功能分类中均有涉及,可见,大豆幼苗在响应低磷胁迫过程中可能通过相关酶类的活性来调节光合作用速率。另外,差异表达基因富集到几个 II 型 TGF- $\beta$  受体活性和丝氨酸/苏氨酸激酶活性相关的功能分类。II 型 TGF- $\beta$  的生物功能主要是组织修复,负责植物生长、分化及免疫功能的调节,其 R 胞浆区具有丝氨酸/苏氨酸激酶区。丝氨酸/苏氨酸激酶蛋白在接受到信号后,其丝氨酸/苏氨酸激酶区残基部位能迅速磷酸化而被激活<sup>[24]</sup>。这类蛋白在植物中很常见,通常会与其它的信号分子互相协同<sup>[25]</sup>,在植株遭遇各类非生物胁迫时被激活并进行一系列调控,最终将胁迫信号传递到细胞核,从而调节特异基因的表达<sup>[26]</sup>。因此,通过丝氨酸/苏氨酸激酶来调节 TGF- $\beta$  受体活性可能也是大豆受到低磷胁迫后自我修复的一种机制。

另外,KEGG 分析中富集到了苯丙合成、苯丙氨酸代谢等次生代谢相关的通路。在植物进化过程中,能量生产与活性物质的合成主要存在于叶绿体和内质网两个场所。前者通过光合作用合成 ATP、NADPH 以及碳水化合物,内质网则负责通过次生代谢途径的积累合成生物活性物质,其能量主要来自于 NADPH 的电子传递,因此 NADPH 的浓度限制了次生代谢物质的合成速度。而苯丙氨酸是苯丙烷类化合物生物合成的起始分子,通过莽草酸途径和丙二酸等途径将相关酶类组装固定在内质网上构成完整的次生代谢途径<sup>[27]</sup>。因此,大豆幼苗在响应低磷胁迫过程中可能通过光合作用速率来调节相应的次生代谢途径。

差异表达基因中有一部分在拟南芥中的同源基因为 TIR-NBS-LRR 类抗病蛋白,这类蛋白是一类具有 LRR (Leucine-Rich Repeat)、NBS (Nucleotide Binding Site) 及 TIR (Toll and Interleukin-1 Receptor) 等抗病基因保守结构域的抗病相关基因,通常存在

于细胞质中,NBS结构可能与ATP或GTP的结合有关<sup>[28]</sup>。而具有LRR结构的蛋白通常作为受体,结合某种诱导物,使信号传递过程产生抗病反应<sup>[29]</sup>。这类基因参与植物响应光调控、生物胁迫及非生物胁迫的调控,可能是大豆响应低磷胁迫的重要功能蛋白,它们的具体作用还有待进一步研究。

qRT-PCR结果分析发现,差异表达基因在低磷胁迫下*OsPT6*转基因大豆材料和受体亲本中的表达量与数字基因表达谱检测结果之间的上、下调倍数存在差异,但其整体表达变化的趋势是一致的,表明数字基因表达谱检测的结果是可靠的,表达量的差异可能是由于两种检测手段的不同所致。

本研究获得了一批可能与大豆响应低磷胁迫相关的基因,为大豆耐低磷功能基因的克隆及分子机制的研究奠定了基础,也为大豆耐低磷种质的筛选提供了借鉴。

## 4 结 论

通过对*OsPT6*转基因大豆材料与其受体亲本在低磷胁迫下进行数字基因表达谱分析,共筛选出33个差异表达基因,以受体亲本为对照,在*OsPT6*转基因大豆材料中上调表达的差异基因有21个、下调表达的差异基因有12个。差异表达基因主要涉及光合作用相关的蛋白、核酸等物质的代谢及转运、次生代谢、酶活性调节和能量代谢等生物学过程。通过光合作用相关酶类活性的调节控制光合作用速率从而影响次生代谢途径可能是大豆适应低磷胁迫的主要途径。

## 参考文献

[1] 董薇,练云,余永亮,等.大豆磷胁迫响应研究进展[J].大豆科学,2012,31(1):135-140. (Dong W, Lian Y, Yu Y L, et al. Advances in low phosphorus stress on soybean[J]. Soybean Science, 2012, 31(1):135-140.)

[2] Song H N, Yin Z T, Chao M N, et al. Functional properties and expression quantitative trait loci for phosphate transporter GmPT1 in soybean[J]. Plant Cell and Environment, 2014, 37(2):462-472.

[3] 郭强,孙淑斌,徐国华.水稻中的磷转运蛋白基因在异源表达系统中的功能分析[J].中国水稻科学,2008,22(3):227-233. (Guo Q, Sun S B, Xu G H. Functional analysis of a phosphate transporter from rice in a heterologous expression system[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2008, 22(3):227-233.)

[4] Yan W, Chen G H, Yang L F, et al. Overexpression of the rice phosphate transporter gene *OsPT6* enhances tolerance to low phosphorus stress in vegetable soybean [J]. Scientia Horticulturae, 2014, 177:71-76.

[5] Dyhrman S T, Jenkins B D, Rynearson T A, et al. The transcriptome and proteome of the diatom *Thalassiosira pseudonana* reveal a

diverse phosphorus stress response [J]. PLoS One, 2012, 7(3):1643-1646.

[6] Wang L K, Feng Z X, Wang X, et al. DEGseq: An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data [J]. Bioinformatics, 2009, 26(1):136-138.

[7] 葛淑娟,孙爱清,刘鹏,等.玉米响应渗透胁迫的数字基因表达谱分析[J].作物学报,2014,40(7):1164-1173. (Ge S J, Sun A Q, Liu P, et al. *In silico* expression profile of maize genes in response to osmotic stress [J]. Agronomica Sinica, 2014, 40(7):1164-1173.)

[8] Hao Q N, Zhou X A, Sha A H, et al. Identification of genes associated with nitrogen-use efficiency by genome-wide transcriptional analysis of two soybean genotypes [J]. BMC Genomics, 2011, 12:525-540.

[9] Trapnell C, Pachter L, Steven L, et al. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-seq [J]. Bioinformatics, 2009, 25(9):1105-1111.

[10] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 36:480-484.

[11] 孙爱清,张杰道,万勇善,等.花生干旱胁迫响应基因的数字表达谱分析[J].作物学报,2013,39(6):1045-1053. (Sun A Q, Zhang J D, Wan Y S, et al. *In silico* expression profile of genes in response to drought in peanut [J]. Agronomica Sinica, 2013, 39(6):1045-1053.)

[12] 杨晓杰,赵付安,唐中杰,等.瑟伯氏棉TIR-NBS-LRR类蛋白质编码基因的克隆与分析[J].江苏农业学报,2013,29(6):1228-1235. (Yang X J, Zhao F A, Tang Z J, et al. Cloning and analysis of genes encoding TIR-NBS-LRR-like proteins in *Gossypium thurberi* [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2013, 29(6):1228-1235.)

[13] 刘云飞,万红军,韦艳萍,等.番茄NBS-LRR抗病基因家族全基因组分析[J].核农学报,2014,28(5):790-799. (Liu Y F, Wan H J, Wei Y P, et al. Whole genome analysis of NBS-LRR resistance gene family in tomato [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2014, 28(5):790-799.)

[14] Tarr D E K, Alexander H M. TIR-NBS-LRR genes are rare in monocots: Evidence from diverse monocot orders [J]. BMC Research Notes, 2009, 2:197-207.

[15] 郭晓双,吴冬婷,周全,等.缺磷胁迫对大豆植株磷素与干物质积累的影响[J].大豆科学,2014,33(4):545-549. (Guo X S, Wu D T, Zhou Q, et al. Effect of phosphorus deficiency stress on phosphorus and dry matter accumulation in soybean [J]. Soybean Science, 2014, 33(4):545-549.)

[16] Lan P, Li W F, Schmidt W. Complementary proteome and transcriptome profiling in phosphate-deficient *Arabidopsis* roots reveals multiple levels of gene regulation [J]. Molecular and Cellular Proteomics, 2012, 11:1156-1166.

[17] 肖翔,官春云,尹明智,等.基因芯片技术在农业中应用的研究进展[J].中国农学通报,2012,28(33):187-193. (Xiao X, Guan C Y, Yin M Z, et al. Research progress on application of gene chip in agriculture [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(33):187-193.)

[18] 李杰,唐降龙,王亚东,等.基因表达谱聚类/分类技术研究及展望[J].生物工程学报,2005,21(4):667-673. (Li J, Tang J



- L, Wang Y D, et al. Research on gene expression data based on clustering classification technology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(4): 667-673. )
- [19] Marioni J C, Mason C E, Mane S M, et al. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays[J]. Genome Research, 2008, 18: 1509-1517.
- [20] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. Nature Methods, 2008, 5: 621-628.
- [21] 王琪, 徐程扬. 氮磷对植物光合作用及碳分配的影响[J]. 山东林业科技, 2005, 160(5): 59-62. ( Wang Q, Xu C Y. Affects of nitrogen and phosphorus on plant leaf photosynthesis and carbon partitioning[J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2005, 160(5): 59-62. )
- [22] Hope A B, Valente P, Matthews D B. Effects of pH on the kinetics of redox reactions in and around the cytochrome *b<sub>f</sub>* complex in an isolated system [J]. Photosynthesis Research, 1994, 42 ( 2 ) : 111-120.
- [23] Peng L, Wei W, Ouyang S Q, et al. Analysis of expressed receptor-like kinases (RLKs) in soybean[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2009, 36(10): 611-619.
- [24] 彭春雪. 干旱胁迫下甜菜生理及蛋白质组差异分析[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2013. ( Peng C X. Analysis of physiological and proteome differences in sugar beet under drought stress[D]. Harbin: Heilongjiang University, 2013. )
- [25] 刘谿, 赵琴平, 董惠芬, 等. TGF- $\beta$  信号传导通路及其生物学功能[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(1): 77-83. ( Liu R, Zhao Q P, Dong H F, et al. The TGF- $\beta$  signaling pathways and their biological functions [J]. Journal of Pathogen Biology, 2014, 9(1): 77-83. )
- [26] 杨郁文, 倪万潮, 张保龙, 等. 陆地棉一个丝氨酸/苏氨酸激酶蛋白基因的克隆与表达分析[J]. 棉花学报, 2006, 18(3): 140-144. ( Yang Y W, Ni W C, Zhang B L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a Serine/Threonine protein kinase gene in upland cotton[J]. Cotton Science, 2006, 18(3): 140-144. )
- [27] 王莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508. ( Wang L, Shi L L, Zhang Y X, et al. Biosynthesis and regulation of the secondary metabolites in plants[J]. Journal of Wuhan Botanical Research, 2007, 25(5): 500-508. )
- [28] Hans V L, Jordi G M, María C, et al. Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2005, 273(3): 240-251.
- [29] 张祥喜, 罗林广. 植物抗病基因研究进展[J]. 分子植物育种, 2003, 1(4): 531-537. ( Zhang X X, Luo L G. Progress of plant disease resistance gene [J]. Molecular Plant Breeding, 2003, 1(4): 531-537. )

## (上接第 212 页)

- [5] 陈金魁, 郑兆阳, 李静, 等. 安徽省大豆有害生物发生种类与综合防治技术[J]. 安徽农学通报, 2014, 20(5): 79-83. ( Chen J K, Zheng Z Y, Li J, et al. Harmful species and integrated control technique of soybean in Anhui province[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2014, 20(5): 79-83. )
- [6] 何中虎, 兰彩霞, 陈新民, 等. 小麦条锈病和白粉病成株抗性研究进展与展望[J]. 中国农业科学, 2011, 44(11): 2193-2215. ( He Z H, Lan C X, Chen X M, et al. Progress and perspective in research of adult-plant resistance to stripe rust and powdery mildew in wheat[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(11): 2193-2215. )
- [7] 黄清华, 景蕊莲, 吴新元, 等. 普通小麦白粉病成株抗性的 QTL 分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(8): 2528-2536. ( Huang Q H, Jing R L, Wu X Y, et al. QTL mapping for adult-plant resistance to powdery mildew in common wheat[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(8): 2528-2536. )
- [8] Buzzell R I, Hass J H. Inheritance of adult plant resistance to powdery mildew in soybeans[J]. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 1978, 20: 151-153.
- [9] Lohnes D G, Nickell C D. Effects of powdery mildew alleles Rmdc, Rmd, and rmd on yield and other characteristics in soybean [J]. Plant Disease, 1994, 73(3): 209-301.
- [10] Jun T H, Mian M A, Kang S T, et al. Genetic mapping of the powdery mildew resistance gene in soybean PI567301B [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125: 1159-1168.
- [11] Kang S T, Mian M. Genetic map of the powdery mildew resistance gene in soybean PI243540[J]. Genome, 2010, 53: 400-405.
- [12] 朴日花. 沿海地区南方夏大豆遗传多样性分析及核心种质构建[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2004: 10-11. ( Piao R H. Diversity of southern summer soybean and establishment of its core collection in the coastal areas[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2004: 10-11. )
- [13] 沈丽平. 黄瓜白粉病抗性遗传分析及相关 QTL 初步定位 [D]. 扬州: 扬州大学, 2009: 30-31. ( Shen L P. Study on genetic analysis and QTL mapping for resistant to powdery mildew in cucumber [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2009: 30-31. )
- [14] 付海宁, 孙素丽, 朱振东, 等. 加拿大豌豆品种(系)抗白粉病表型和基因型鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(5): 1028-1033. ( Fu H N, Sun S L, Zhu Z D, et al. Phenotypic and genotypic identification of powdery mildew resistance in pea cultivars or lines from Canada[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(5): 1028-1033. )
- [15] 任海龙, 宋恩亮, 马启彬, 等. 南方三省(区)抗大豆疫霉根腐病野生大豆资源的筛选[J]. 大豆科学, 2010, 29(6): 1012-1015. ( Ren H L, Song E L, Ma Q B, et al. Screening for resistance sources to *Phytophthora* root rot in *Glycine soja* from three provinces of Southern China[J]. Soybean Science, 2010, 29(6): 1012-1015. )