

不同浓度磷胁迫对大豆幼苗生长及根系 DNA 甲基化水平的影响

张文献^{1,2} 李增强^{1,2} 胡亚丽^{1,2} 梁志辰^{1,2} 罗登杰^{1,2}

卢海^{1,2} 唐美琼^{1,2} 陈鹏^{1,2*}

(1. 广西大学 农学院, 南宁 530004;

2. 广西壮族自治区高校植物遗传育种重点实验室, 南宁 530004)

摘 要 为明确不同浓度磷胁迫对大豆幼苗生长及基因组 DNA 甲基化水平的影响, 采用甲基化敏感扩增多态性 (MSAP) 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分析大豆材料 ‘CP016’ 的幼苗在不同浓度磷胁迫下根系 DNA 甲基化水平和相关基因的表达量变化。结果表明: 1) 随着磷浓度的逐渐增加, 大豆幼苗的株高、鲜重、根长和根表面积呈先升高后降低的趋势, 无磷和高磷胁迫 (1 000 $\mu\text{mol/L}$) 均显著抑制大豆的生长, 低磷胁迫 (100 $\mu\text{mol/L}$) 促进地上部生长, 极低磷胁迫 (10 $\mu\text{mol/L}$) 促进根系生长; 2) 随着磷浓度的逐渐增加, 大豆幼苗根系中的 POD 和 CAT 活性呈先降低后升高的趋势, SOD 活性、淀粉和蔗糖含量呈先升高后降低的趋势; 3) MSAP 分析表明, 随着磷浓度的增加, 大豆幼苗根系 DNA 甲基化率和全甲基化率逐渐升高。具体来说, 在无磷、正常供磷和高磷处理下, 大豆幼苗根系的 DNA 甲基化率分别为 43.04%、48.52% 和 51.05%; 4) qRT-PCR 分析结果表明, 无磷胁迫下, 调控大豆幼苗根系 POD 活性和淀粉合成相关基因以及甲基化酶基因 *DRM2* 的表达量显著升高; 调控 SOD 活性和蔗糖合成相关基因以及去甲基化酶基因 *ROS1* 的表达量显著降低。本研究表明, 无磷和高磷胁迫显著抑制大豆的生长, 并使其抗氧化酶系统紊乱, 淀粉和蔗糖含量降低, 但适度的低磷胁迫可以促进大豆幼苗的生长。无磷和高磷胁迫分别降低和提高大豆幼苗根系的 DNA 甲基化水平。

关键词 大豆; 磷胁迫; DNA 甲基化; 抗氧化酶; 甲基化敏感扩增多态性 (MSAP)

中图分类号 S565.1

文章编号 1007-4333(2020)12-0009-10

文献标志码 A

Effects of different concentrations of phosphorus stresses on soybean (*Glycine max* L.) seedling growth and DNA methylation in root system

ZHANG Wenxian^{1,2}, LI Zengqiang^{1,2}, HU Yali^{1,2}, LIANG Zhichen^{1,2},

LUO Dengjie^{1,2}, LU Hai^{1,2}, TANG Meiqiong, CHEN Peng^{1,2*}

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Guangxi Autonomous Region Colleges and Universities Key Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Nanning 530004, China)

Abstract To investigate the effects of different concentrations of phosphorus stress on soybean seedling growth and the genomic DNA methylation level, methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) and real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) were used to analyze the DNA methylation level and related gene expression in the root of soybean material ‘CP016’ seedlings under different concentrations of phosphorus stress. The results showed that: 1) With the increase of phosphorus concentration, the plant height, fresh weight, root length and root surface area of soybean seedlings increased first and then decreased. Both the phosphorus-free and high phosphorus (1 000 $\mu\text{mol/L}$) stresses significantly inhibited soybean growth, while the low phosphorus stress (100 $\mu\text{mol/L}$)

收稿日期: 2020-01-20

基金项目: 国家自然科学基金(31560341, 31960368)

第一作者: 张文献, 硕士研究生, E-mail: 1415627942@qq.com

通讯作者: 陈鹏, 教授, 主要从事作物遗传育种和分子生物学研究, E-mail: hustwell@gmail.com

promoted the growth of above ground and the extremely low phosphorus stress ($10 \mu\text{mol/L}$) promoted root growth. 2) With the gradual increase of phosphorus concentration, the POD and CAT activities decreased first and then increased in the root of soybean seedlings, while the SOD activities, starch and sucrose contents increased first and then decreased. 3) The results of MSAP analysis showed that the DNA methylation rate and full methylation rate of soybean seedlings increased gradually with the increase of phosphorus concentration. Specifically, the DNA methylated rates of soybean seedling roots treated with phosphorus-free, normal phosphorus and high phosphorus supply were 43.04%, 48.52% and 51.05%, respectively. 4) The results of qRT-PCR analysis showed that the expression levels of genes that regulate the activity of POD and synthesis of starch, and the methylase gene *DRM2* up-regulated significantly, while regulated SOD activity and sucrose synthesis, and *ROS1* down-regulated significantly under phosphorus-free stress. In conclusion, this study showed that the phosphorus-free and high phosphorus stress significantly inhibited soybean growth, disturbed its antioxidant enzyme system, and reduced the content of starch and sucrose. However, a certain degree of low phosphorus stress could promote the growth of soybean seedlings. The levels of DNA methylation in the root of soybean seedlings were decreased and increased under phosphorus-free and high phosphorus stress, respectively.

Keywords soybean; phosphorus stress; DNA methylation; antioxidant enzymes; methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP)

磷是植物生长发育必须的三大营养元素之一,参与植物体内众多化合物的组成及代谢过程,对作物的产量和品质有重要的影响。全世界约有 $1/2$ 的耕地处于缺磷状态,我国更是有 $2/3$ 的耕地缺磷^[1]。磷肥的过度施用容易导致环境污染,并且磷资源具有有限性和不可再生性。大豆是重要的粮油兼用作物,同时也是喜磷作物。大豆在低磷胁迫下不但吸收不到足够的磷素,甚至还会抑制根瘤的生长,降低固氮量^[2],最终严重降低大豆的产量和品质。

目前在大豆响应低磷胁迫方面的研究主要集中在大豆农艺性状的改变和磷效率相关性状的 QTL (quantitative trait loci) 定位等方面。严重的低磷胁迫会显著抑制大豆的植株生长,包括株高、茎粗和干物质积累量等显著降低^[3]。但在低磷胁迫下,大豆根长、根表面积和根体积极均比正常供磷时有所增加^[4],主要原因可能在于根系是植物吸收土壤水分和养分最直接、最主要的器官,低磷胁迫促使大豆扩大根系的吸收面积,缩短磷离子扩散到根部的距离。因此,通常把根长和根表面积作为筛选磷高效基因型大豆的重要指标^[5]。黄兰兰等^[6]汇总目前已报道的大豆磷效率相关的 96 个 QTL,并将其提交到大豆的公共遗传图谱 SoyMap 2 中,为大豆磷效率分子标记的辅助选择提供重要依据。姚敏磊等^[7]研究发现,大豆在低磷胁迫下的差异表达基因主要涉及光合作用、物质和能量代谢、酶活性调节等生物学过程,并推测光合作用在大豆响应低磷胁迫中起着重

要的角色。

DNA 甲基化在调控基因表达、维持基因组稳定性、调控植物生长发育、生物和非生物逆境胁迫响应等方面发挥着重要作用^[8]。甲基化敏感扩增多态性 (methylation sensitive amplified polymorphism, MSAP) 技术是在扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术的基础上发展起来的,现已广泛运用在植物的基因组 DNA 甲基化水平研究中^[9]。陈智华^[10]运用 MSAP 技术分析了大豆杂交种及其亲本的 DNA 甲基化差异。徐妍^[11]运用 MSAP 技术分析了灰斑病菌胁迫对大豆 DNA 甲基化水平的影响,表明灰斑病菌胁迫后,大豆叶片的 DNA 甲基化率降低,并推测 DNA 甲基化可能在大豆的抗性反应中起着重要的作用。何庆元等^[12]运用 MSAP 技术分析了硫化氢对盐胁迫下大豆 DNA 甲基化的影响,表明硫化氢溶液可以恢复盐胁迫所导致的甲基化类型和水平的改变,从而缓解盐胁迫造成的伤害。殷欣^[13]利用 MSAP 技术研究了镉胁迫下大豆的 DNA 甲基化变化,表明镉胁迫导致大豆 DNA 甲基化水平升高,并且甲基化水平与处理浓度呈正相关,推测甲基化差异基因广泛参与到植物响应逆境的过程。大豆响应非生物胁迫的相关报道主要集中在大豆农艺性状、多组学以及抗逆性相关基因的研究上,基因组 DNA 甲基化方面的相关研究却鲜有报道。本研究利用 MSAP 和 qRT-PCR 等技术,系统分析不同浓度的磷胁迫对大豆幼苗生长、生理生化、DNA 甲基化和

相关基因表达水平的影响,旨在明确磷胁迫下大豆幼苗的长势及 DNA 甲基化水平变化等情况,以期为进一步研究大豆高效吸收和利用磷肥的潜在机制提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

本试验以大豆‘CP016’为试验材料,先采用砂培法培养长势一致的幼苗用于后续试验,后采用水培法对幼苗进行不同浓度的 H_3PO_4 处理。光照培养箱中培养,光/暗周期为 9 h/15 h,温度 25 °C,光照度 20 000 Lx,湿度 60%。首先将种子用 3% 的 H_2O_2 消毒并冲洗后,均匀地种植在含有沙土的塑料盆(27 cm×18 cm×9 cm)中,定期定量地浇以蒸馏水。培养 5 d 后,选出长势一致的幼苗 90 株用于本试验,即为 5 个处理,每个处理 6 株,3 次生物学重复。把幼苗移栽到盛有育苗盘的托盘中处理 10 d,定期定量地更换处理液。处理液以改良 Hoagland 营养液配方为基础,把其中的 KH_2PO_4 更换为 KCl 和 H_3PO_4 以分别补充钾和磷。各处理均加 74.58 mg/L 的 KCl 以补充钾,之后分别加不同浓度(0,10,100,500,1 000 $\mu\text{mol/L}$)的 H_3PO_4 进行处理,注意使用氢氧化钠调节各组处理液的 pH 6.0。根据相关文献[14]中作物的需磷量,本试验中,500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_3PO_4 处理作为正常供磷水平,0、10、100 和 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_3PO_4 分别作为无磷、极低磷、低磷和高磷胁迫处理。

1.2 植物学性状及生理指标的测定

测定各处理组幼苗的株高、茎粗和全鲜重等植物学性状,并利用根系扫描分析仪(EPSON EXPRESSION 10000XL)对根系进行扫描分析,计算根长、根表面积和根体积等。之后将材料保存于-80 °C 冰箱,用于后续试验。分别采用氮蓝四唑法[15]、愈创木酚法[15]和紫外分光光度法[16]测定根系的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性。使用北京索莱宝科技有限公司的淀粉(货号:BC0700)和蔗糖(货号:BC2460)含量检测试剂盒测定根系的淀粉和蔗糖含量。

1.3 甲基化敏感扩增多态性(MSAP)分析

参照 Tang 等[17]的 MSAP 方法并略做改进,对部分处理幼苗的根系进行 DNA 甲基化水平分析。首先采用改良 CTAB 法[18]提取上述材料的基因组

DNA,之后用 *EcoR* I/*Hpa* II 和 *EcoR* I/*Msp* I 2 个组合分别进行双酶切,连接,预扩增、选择性扩增,聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染和显色,最后对 MSAP 多态性条带进行标记和统计。接头序列、预扩增和选择性扩增引物序列,见表 1。

MSAP 多态性条带标记方法如下:同一水平线上,*EcoR* I/*Hpa* II 和 *EcoR* I/*Msp* I 酶切都有带,记为 I 型(无甲基化);*EcoR* I/*Hpa* II 酶切有带而 *EcoR* I/*Msp* I 酶切无带,记为 II 型(半甲基化);*EcoR* I/*Hpa* II 酶切无带而 *EcoR* I/*Msp* I 酶切有带,记为 III 型(全甲基化);*EcoR* I/*Hpa* II 和 *EcoR* I/*Msp* I 酶切都无带,记为 IV 型(全甲基化)。DNA 甲基化水平统计方法如下:甲基化条带数=II 型+III 型+IV 型,甲基化率=(II 型+III 型+IV 型)/(I 型+II 型+III 型+IV 型)×100%;半甲基化条带数=II 型,半甲基化率=II 型/(I 型+II 型+III 型+IV 型)×100%;全甲基化条带数=III 型+IV 型,全甲基化率=(III 型+IV 型)/(I 型+II 型+III 型+IV 型)×100%。

1.4 qRT-PCR 分析

运用改良异硫氰酸胍法分别提取相应材料的 RNA[19],利用琼脂糖凝胶电泳和超微量紫外分光光度计检测 RNA 的质量和浓度,之后使用南京诺唯赞生物科技有限公司反转录试剂盒(货号:R223-01)反转录成 cDNA,并以此为模板进行 qRT-PCR 分析。以 *β -tubulin* 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法[20]计算基因的相对表达量,qRT-PCR 引物序列,见表 2。

1.5 数据处理

使用 Excel 软件进行数据分析及图表的制作,使用 IBM SPSS Statistics 22 软件进行生物学统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度磷胁迫对大豆幼苗植物学性状的影响

大豆幼苗经过不同浓度的磷胁迫处理后,植株外部形态差异明显。其中,无磷(0 $\mu\text{mol/L}$)和高磷(1 000 $\mu\text{mol/L}$)胁迫下的幼苗在株高、叶片大小和根系等方面的长势明显变差,其他 3 个浓度处理下的长势正常。极低磷(10 $\mu\text{mol/L}$)和低磷胁迫(100 $\mu\text{mol/L}$)下根系的长势最好,高磷胁迫下最差。

由表 3 可知,低磷胁迫下的幼苗株高和鲜重最高,其次是正常供磷(500 $\mu\text{mol/L}$)、极低磷、高磷和

表 1 引物序列

Table 1 Lists of primer sequences

引物类型 Primer type	引物名称		引物名称	
	<i>Eco</i> R I (E)	正向(5'→3')	<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I (HM)	反向(5'→3')
	Primer name	Forward (5'→3')	Primer name	Reverse (5'→3')
	<i>Eco</i> R I (E)		<i>Hpa</i> II / <i>Msp</i> I (HM)	
接头引物 Adapter primer	<i>EA1</i>	CTCGTAGACTGCGTACC	<i>HMA1</i>	GATCATGAGTCCTGCT
	<i>EA2</i>	AATTGGTACGCAGTCTAC	<i>HMA2</i>	CGAGCAGGACTCATGA
预扩增引物 Preamp primer	<i>E0</i>	GACTGCGTACCAATTCA	<i>HM0</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGG
选扩增引物 Selective primer	<i>E1</i>	GACTGCGTACCAATTCAAC	<i>HM1</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC
	<i>E2</i>	GACTGCGTACCAATTCAAG	<i>HM2</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCC
	<i>E3</i>	GACTGCGTACCAATTCAACA	<i>HM3</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCT
	<i>E4</i>	GACTGCGTACCAATTACAG	<i>HM4</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA
	<i>E5</i>	GACTGCGTACCAATTCACT	<i>HM5</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGT
	<i>E6</i>	GACTGCGTACCAATTACAGC	<i>HM6</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTA
	<i>E7</i>	GACTGCGTACCAATTACACC	<i>HM7</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC
	<i>E8</i>	GACTGCGTACCAATTACAGG	<i>HM8</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC
	<i>E9</i>	GACTGCGTACCAATTACAGT	<i>HM9</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGGTAC
	<i>E10</i>	GACTGCGTACCAATTACATC	<i>HM10</i>	ATCATGAGTCCTGCTCGGTGC

表 2 实时荧光定量 PCR 引物序列(5'→3')

Table 2 Primer sequences for qRT-PCR (5'→3')

引物名称 Primer name	正向 Forward	反向 Reverse
<i>CAT1</i>	TCCTGCTAATGCCCTAAGTG	ATCGGTATCTCTCCCCAGGTT
<i>Cu/Zn-SOD</i>	TCTTGGCAGCAGCGAGGG	CGTCCTCAGGGGCACCG
<i>DRM2</i>	AATCCATCCAGGTGTCTTAGTAGTG	CAACTGGAAGATTGTGTATGTAACCT
<i>Fe-SOD</i>	GGTTCAGGGTGGGCTTGG	TAGGGGGTTACAGCATTGG
<i>GBSS</i>	TAGCAGATTTGAGCCTTGTGGT	TGAAGGCACCCATCTGAAATC
<i>Mn-SOD</i>	TCGCCAAGAAAGATTCCCTCC	GTGTCAATAGCCCATCCCAGT
<i>POD</i>	TGCTCATCATTGTCAAACCGC	TCAAATGTCTTGCGACTTCCAG
<i>POD4</i>	CTCATCAACAAAAAGGTCTCC	TCCTTATCTGCCCATTGACC
<i>POD10</i>	TCTTGGCTTTGCTCAATGCT	ATGTGTTGGTGGTGACGGG
<i>POD11</i>	ACGCCGCTACCAACATCCAC	TCCCACAGGAACATCCCAGTAAG
<i>ROS1</i>	CAACCTTGATGATGAGACTGATAGA	GCTCGTCCTCGGAACACAT
<i>SSI</i>	AGTGCTGTTGAGAACGAAAATG	TCAGGGTATCAGGTGTTATTGTCT
<i>SS3</i>	TTGGGTTTGGGAAGAGCGAA	GTCAGTGTCTCCCCGCTTG
<i>SucS</i>	TTGCTCTGGCTGTTTCGTCC	CTCAAGCACAAAGTTGCCATTAG
<i>SucS2</i>	GAACTGGTCAACCTTGTTCGTAG	GCACCTTGTGTGTCTGCTATG
<i>SucS5</i>	ACTGTGGTTTGCCTACTTTTGC	TGTTCAATTATTCACCCGCCTC
<i>βtubulin</i> (内参基因 Reference gene)	GAATCTCATCCCTTTCCCTCG	CATTTGCTGTGTCAGCTCTGG

表 3 不同浓度 H_3PO_4 处理对大豆幼苗植物学性状的影响

Table 3 Effects of different concentrations of H_3PO_4 on botanical characteristics of soybean seedlings

H_3PO_4 处理浓度/ ($\mu\text{mol/L}$) H_3PO_4 concentration	株高/cm Height	茎粗/mm Stem diameter	鲜重/g Fresh weight	根长/cm Root length	根表面积/ cm^2 Root surface area	根体积/ cm^3 Root volume
0	37.92 d	2.70 a	18.07 d	88.94 b	17.79 ab	88.95 b
10	41.16 b	2.52 c	19.67 bc	105.33 a	19.94 a	105.34 a
100	42.58 a	2.64 b	24.00 a	98.54 ab	18.65 ab	98.55 ab
500	41.16 b	2.48 c	20.77 b	100.33 a	18.32 ab	100.37 ab
1 000	38.73 c	2.39 d	17.77 cd	71.14 c	14.37 b	71.14 c

注：表中不同小写字母表示 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。
Note: Different lowercase letters in the table indicate $P<0.05$ level difference is significant. The same below.

无磷处理,除正常供磷和极低磷处理外,其他处理之间均存在显著的差异,说明一定程度的低磷胁迫可以促进大豆幼苗的生长。值得注意的是,幼苗在无磷胁迫下茎最粗,高磷胁迫下茎最细,这可能是磷胁迫导致大豆幼苗发生的适应性变化。在幼苗的根系长势方面,极低磷胁迫下根系的根长、根表面积和根体积值最大,其次是正常供磷、低磷和无磷,4 个处理之间总体上无显著的差异。高磷胁迫下根系长势最差,且与其他浓度处理存在显著性差异,说明极低磷和低磷胁迫可以促进大豆幼苗根系的伸长生长,高磷胁迫对根系的抑制大于无磷胁迫。

2.2 不同浓度磷胁迫对大豆幼苗根系抗氧化酶活性及碳水化合物含量的影响

由图 1 可知,磷胁迫处理显著改变大豆幼苗根系的抗氧化酶活性和碳水化合物含量。不同浓度磷胁迫下根系的 SOD 活性呈先升高后降低的趋势,极低磷($10\ \mu\text{mol/L}$)和低磷($100\ \mu\text{mol/L}$)胁迫下的活性最高,其次是无磷和正常供磷($500\ \mu\text{mol/L}$)处理,高磷胁迫($1\ 000\ \mu\text{mol/L}$)下活性最低。POD 和 CAT 活性的变化趋势基本相同,都呈先降低后升高的趋势,高磷和正常供磷处理下的活性最高,其次是无磷胁迫,低磷和极低磷胁迫下活性最低。淀粉和蔗糖含量的变化趋势基本相同,都呈先升高后降低的趋势。正常供磷处理($500\ \mu\text{mol/L}$)下根系的淀粉含量最高,其次是低磷和极低磷胁迫,最后是无磷和高磷胁迫。低磷胁迫下根系的蔗糖含量最高,其次是极低磷和正常供磷处理,无磷和高磷胁迫下含量最低,并且低磷胁迫下的蔗糖含量是高磷胁迫下的 3 倍左右。

2.3 不同浓度磷胁迫对大豆幼苗根系 DNA 甲基化水平的影响

由图 2 可知,大豆幼苗根系在无磷和高磷($1\ 000\ \mu\text{mol/L}$)胁迫下均出现甲基化差异片段。由表 4 和表 5 可知,随着磷浓度的逐渐增加,大豆幼苗根系的 DNA 甲基化率和全甲基化率明显升高,半甲基化率逐渐降低。正常供磷($500\ \mu\text{mol/L}$)条件下,大豆幼苗根系的 DNA 甲基化率、半甲基化率和全甲基化率分别为 48.52%、14.35% 和 34.18%。无磷胁迫使根系的 DNA 甲基化率和全甲基化率降低,半甲基化率升高。高磷胁迫使根系的 DNA 甲基化率和全甲基化率升高,半甲基化率降低,但变化幅度较小。由此说明,磷胁迫改变大豆幼苗根系的 DNA 甲基化水平,且无磷胁迫比高磷胁迫的变化幅度更大。

2.4 甲基化酶及生理生化相关基因的 qRT-PCR 分析

由图 3 可知, Gu/Zn-SOD 、 Mn-SOD 和 Fe-SOD 基因的表达量都是无磷胁迫下比正常供磷($500\ \mu\text{mol/L}$)处理的低,且前两者呈显著性降低。 POD 、 POD4 、 POD10 和 POD11 基因的表达量都在无磷胁迫下显著提高, CAT1 基因的表达量稍高。说明磷胁迫改变调控抗氧化酶相关基因的表达水平,从而改变抗氧化酶活性,最终在响应磷胁迫中起到重要作用。颗粒结合型淀粉合成酶 GBSS (Granule-bound starch synthase, GBSS)和淀粉合酶(Starch synthase, SS)是淀粉合成中的关键酶,主要分别负责直链淀粉和支链淀粉的合成^[21]。GBSS、SS1 和 SS3 基因的表达量都在无磷胁迫下比

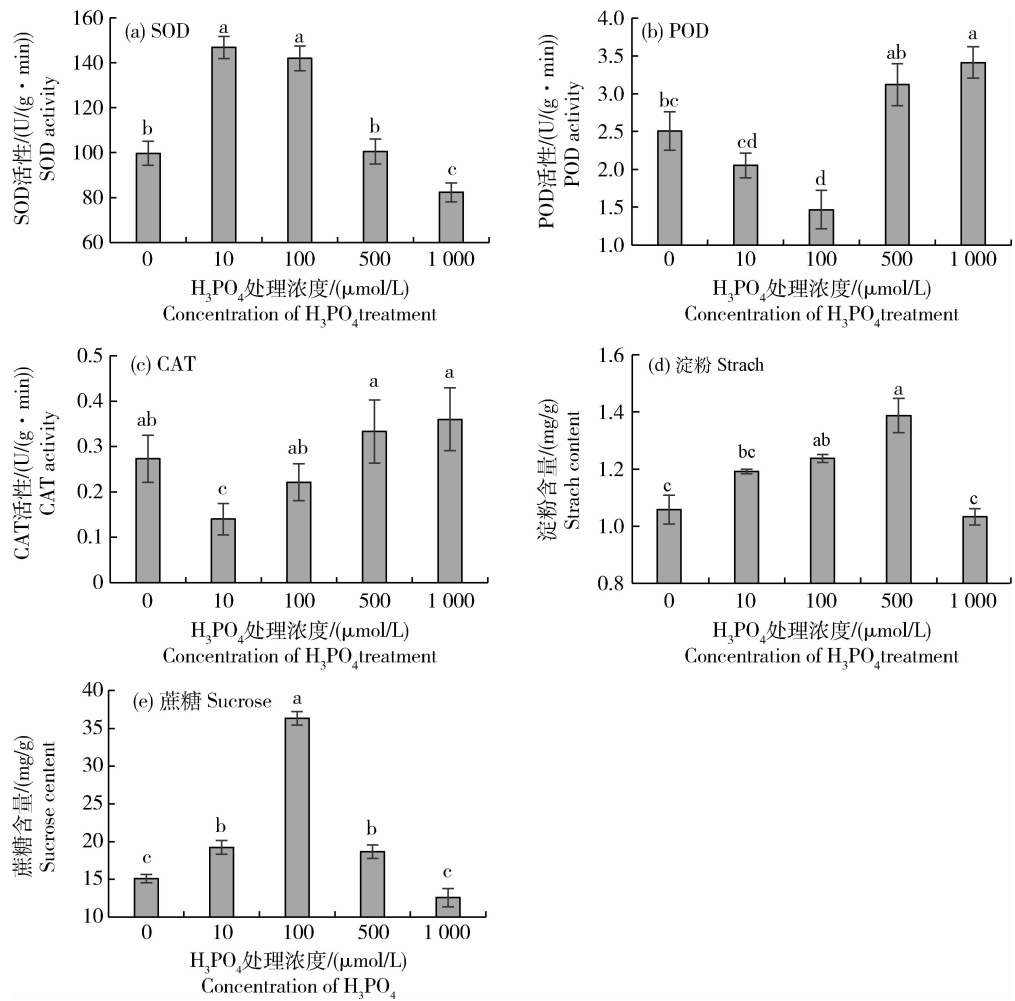


图1 不同浓度磷胁迫下大豆幼苗根系抗氧化酶活性及碳水化合物含量的变化

Fig. 1 Changes in antioxidant enzyme activity and carbohydrate content in roots of soybean seedling under different concentrations of phosphorus stress

正常供磷条件下显著提高。蔗糖合酶 SuS(sucrose synthase, SUS)是植物进行蔗糖代谢的关键酶之一,对淀粉的合成也具有调节作用^[22]。本研究发现 SuS、SuS2 和 SuS5 基因的表达量在无磷胁迫下显著降低,这与测得的蔗糖含量变化趋势是一致的。

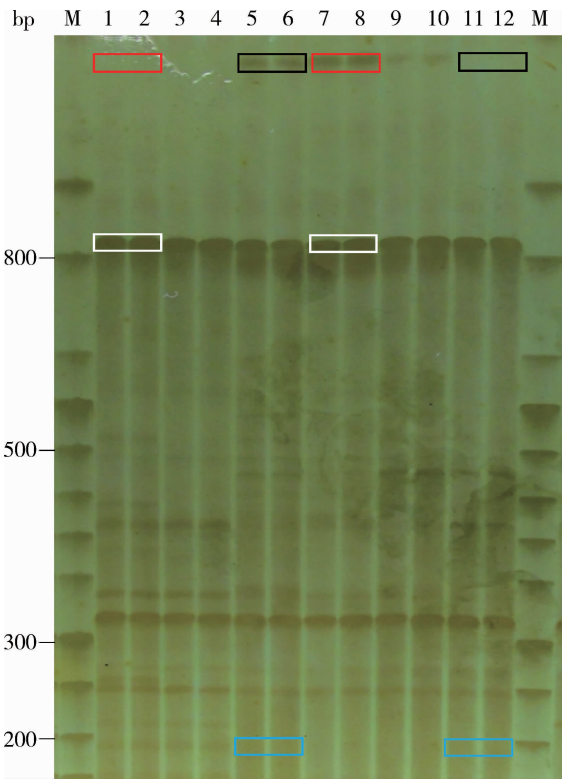
DRM2 和 ROS1 分别是植物中重要的甲基化酶和去甲基化酶,本研究发现 DRM2 基因在无磷胁迫下显著升高,ROS1 基因在无磷胁迫下显著降低,进一步说明磷胁迫使大豆幼苗 DNA 甲基化水平的显著变化。

3 讨论

低磷胁迫可以促进大豆植株的伸长生长^[23],但严重缺磷会对植株生长产生显著的抑制^[24]。在低

磷胁迫下,大豆主要通过刺激根系生长以提高对磷的吸收,以适应低磷环境,磷高效基因型大豆品种更是如此^[25]。本研究表明,低磷胁迫促进大豆材料‘CP016’的幼苗生长,极低磷胁迫下幼苗的长势减弱,但仍能显著促进根长、根表面积和根体积等,这些都是磷高效品种筛选的重要指标,说明此品种是潜在的磷高效基因型品种,值得深入研究。

植物遭受非生物逆境胁迫后,会使体内积累大量的活性氧。SOD、POD 和 CAT 等共同组成抗氧化酶系统,以缓解活性氧导致的氧化胁迫,但是严重的非生物胁迫会使这种抗氧化酶系统紊乱,对植物造成严重的损伤^[26-27]。本研究中,相较于低磷(100 $\mu\text{mol/L}$)和极低磷胁迫(10 $\mu\text{mol/L}$),无磷和高磷(1 000 $\mu\text{mol/L}$)胁迫下根系的 SOD、POD 和 CAT 活性比正常供磷处理下变化更大,这可能是无



M, 50 bp Marker; 1~6, *EcoR* I / *Hpa* II 酶切产物; 7~12, *EcoR* I / *Msp* I 酶切产物。1, 2, 7, 8 为 0 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_3PO_4 处理的样品产物; 3, 4, 9, 10 为 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_3PO_4 处理的样品产物; 5, 6, 11, 12 为 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_3PO_4 处理的样品产物。白色方框, I 型(无甲基化); 黑色方框, II 型(半甲基化); 红色方框, III 型(全甲基化); 蓝色方框, IV 型(全甲基化)。

M, 50 bp Marker; Lanes 1—6, digested with *EcoR* I / *Hpa* II; Lanes 7—12, digested with *EcoR* I / *Msp* I. The lane 1, 2, 7, 8; 3, 4, 9, 10; 5, 6, 11, 12 represented the concentration treatments of 0, 500 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$ H_3PO_4 , respectively. The white blacke, red and blue frames represented the type I (non methylation), type II (hemi-methylation), type III (full methylation) and type IV (full methylation), respectively.

图 2 MSAP 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2 MSAP acrylamide gel analysis

磷和高磷胁迫下的幼苗生长受到严重抑制的原因之一。碳水化合物是植物光合作用的主要产物,是维持植物生长发育所需的物质和能量主要来源。蔗糖和淀粉在植物生长发育过程中发挥着重要作用^[28]。无磷和高磷胁迫下,大豆幼苗的叶片明显变小,光合产物减少,因而蔗糖和淀粉含量大大降低。但是低磷和极低磷胁迫下幼苗的叶片大小、淀粉和蔗糖含量变化较小,甚至低磷胁迫下幼苗根系的蔗糖含量最高。

DNA 甲基化与植物的生长发育密切相关,植物体内的 DNA 甲基化水平总是处于一个动态平衡的状态,其建立和维持的机制与 DNA 甲基化酶以及 DNA 去甲基化酶密切相关^[29]。DNA 甲基化酶主要有 3 个家族:甲基转移酶 1 (MET1)、结构域重排甲基转移酶 (DRM) 和染色质甲基化酶 (CMT)^[30]。DNA 去甲基化酶主要有 4 个家族: DME、ROS1、DML2 和 DML3^[31]。当植物遭受生物或非生物逆境胁迫后, DNA 甲基化相关酶基因的表达量会发生显著变化,从而导致植物体内的 DNA 甲基化水平改变,以应对严峻的胁迫环境^[32]。本研究发现,在无磷胁迫下 *DRM2* 基因的表达量显著上调, *ROS1* 基因表达量显著下调。利用 MSAP 技术分析发现,无磷胁迫和高磷胁迫分别使 DNA 甲基化水平降低或提高,表明磷胁迫打破大豆幼苗根系 DNA 甲基化状态的动态平衡,这与殷欣^[13]对大豆 DNA 甲基化响应镉胁迫的研究结果一致。本研究发现高磷胁迫导致大豆幼苗根系 DNA 甲基化水平升高,而无磷胁迫导致甲基化水平降低,并且变化幅度更显著,2 种胁迫下的半甲基化率变化都较小,这说明了大豆幼苗应对不同胁迫环境 DNA 甲基化水平变化和响应的复杂性。

表 4 MSAP 差异片段统计分析

Table 4 Statistical analysis of MSAP differential fragments

H_3PO_4 处理浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	I 型条带数 Numbers of	II 型条带数 Numbers of	III 型条带数 Numbers of	IV 型条带数 Numbers of
H_3PO_4 concentration	Type I bands	Type II bands	Type III bands	Type IV bands
0	135	42	38	22
500	122	34	52	29
1 000	116	31	63	27

表 5 DNA 甲基化水平统计分析
Table 5 Statistical analysis of DNA methylation level

H ₃ PO ₄ 处理 浓度/ (μmol/L) H ₃ PO ₄ concentration	甲基化条 带总数 Total methylated bands	甲基化 比率/% Methylated ratio	半甲基化 条带数 Hemi- methylated bands	半甲基化 比率/% Hemi- methylated ratio	全甲基化 条带数 Total full methylated bands	全甲基化 比率/% Full methylated ratio
0	102	43.04	42	17.72	60	25.32
500	115	48.52	34	14.35	81	34.18
1 000	121	51.05	31	13.08	90	37.97

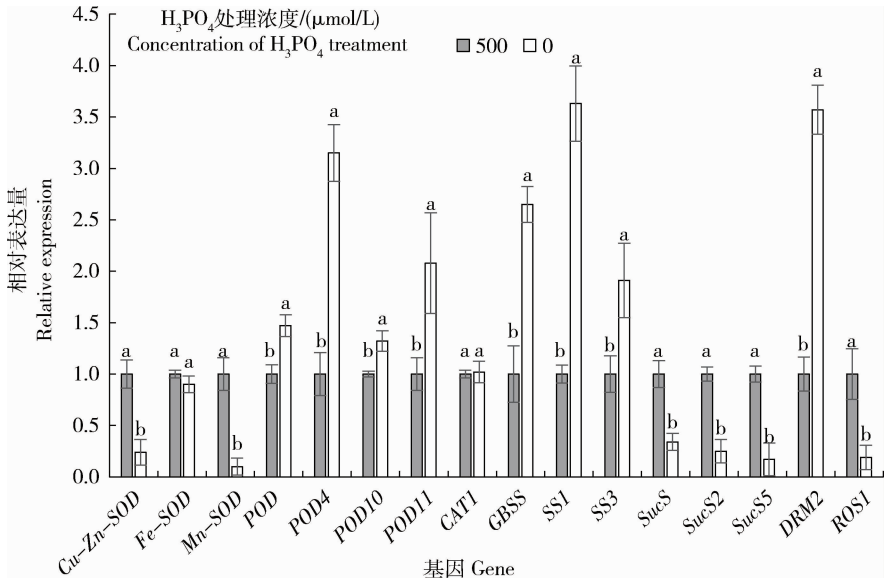


图 3 生理生化及甲基化酶相关基因的 qRT-PCR 分析

Fig. 3 qRT-PCR analysis of related genes about physiology biochemistry and methylase

本研究系统地比较不同浓度磷胁迫下大豆材料‘CP016’的幼苗长势、抗氧化酶活性、碳水化合物含量、DNA 甲基化水平以及相关基因的表达量变化,并得出施磷量为 100~500 μmol/L 为宜,且在此范围内,适度的低磷胁迫可以促进大豆的生长。

4 结 论

本研究首次利用 MSAP 技术得出大豆材料‘CP016’幼苗根系在正常供磷条件下,DNA 甲基化率、半甲基化率和全甲基化率分别为 48.52%、14.35%和 34.18%。无磷和高磷胁迫分别使大豆幼苗根系的甲基化率和全甲基化率降低或提高,且无磷胁迫对甲基化水平的影响更大。一定程度的低磷胁迫可以促进大豆幼苗,特别是根系的生长。无

磷和高磷胁迫均显著抑制大豆幼苗的生长,可能是由于根系的抗氧化酶系统紊乱,碳水化合物合成减少,DNA 甲基化水平变化引起众多相关基因的表达量发生改变所导致的。

参考文献 References

[1] 盛学斌,孙建中. 关于土壤磷素研究的现状与趋向[J]. 环境科学进展, 1995, 3(2): 11-21
Sheng X B, Sun J Z. Recent status and tendency of study on phosphorus in soil[J]. *Advances in Environmental Science*, 1995, 3(2): 11-21 (in Chinese)
[2] 王树起,韩晓增,乔云发,严君,李晓慧. 缺磷胁迫对大豆根瘤生长和结瘤固氮的影响[J]. 大豆科学, 2009, 28(6): 1000-1003
Wang S Q, Hang X Z, Qiao Y F, Yan J, Li X H. Nodule

- growth nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine Max* L) as affected by P deficiency stress[J]. *Soybean Science*, 2009, 28(6): 1000-1003 (in Chinese)
- [3] 丁洪, 李生秀. 大豆品种耐低磷和对磷肥效应的遗传差异[J]. 植物营养与肥料学报, 1998, 4(3): 257-263
Ding H, Li S X. Genetic difference of response of soybean (*Glycine Max* L) cultivars to low phosphorus stress and phosphorus fertilizer [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 1998, 4(3): 257-263 (in Chinese)
- [4] Ma Q, Rengel Z. Phosphorus acquisition and wheat growth are influenced by shoot phosphorus status and soil phosphorus distribution in a split-root system [J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2008, 171(2): 266-271
- [5] 张彦丽. 不同磷效率大豆基因型根形态构型对低磷胁迫的响应[J]. 中国农学通报, 2010, 26(14): 182-185
Zhang Y L. Response of low-phosphorus stress on root morphology and architecture of soybean (*Glycine Max* L) genotype with different phosphorus efficiency [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(14): 182-185 (in Chinese)
- [6] 黄兰兰, 钟开珍, 马启彬, 年海, 杨存义. 基于 Meta 分析的大豆磷效率相关 QTL 的整合[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(1): 25-32
Huang L L, Zhong K Z, Ma Q B, Nian H, Yang C Y. Integrated QTLs map of phosphorus efficiency in soybean (*Glycine Max* L) by Meta-analysis[J]. *Chinese Journal of Oil crop Sciences*, 2011, 33(1): 25-32 (in Chinese)
- [7] 姚敏磊, 张璟曜, 周汐, 韩少怀, 谢风斌, 朱月林, 盖钧镒, 杨守萍. 大豆响应低磷胁迫的数字基因表达谱分析[J]. 大豆科学, 2016, 35(2): 213-221
Yao M L, Zhang J Y, Zhou X, Han S H, Xie F B, Zhu Y L, Gei J Y, Yang S P. The digital gene expression profiling analysis of genes in response to low phosphorus stress in soybean (*Glycine Max* L)[J]. *Soybean Science*, 2016, 35(2): 213-221 (in Chinese)
- [8] He X J, Chen T, Zhu J K. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals[J]. *Cell Research*, 2011, 21(3): 442-465
- [9] 李增强, 史奇奇, 孔祥军, 汤丹峰, 廖小芳, 韦范, 何冰, 莫良玉, 周瑞阳, 陈鹏. 红麻不育系与保持系基因组 DNA 甲基化比较分析[J]. 中国农业大学学报, 2017, 22(11): 17-27
Li Z Q, Shi Q Q, Kong X J, Tang D F, Liao X F, Wei F, He B, Mo L Y, Zhou R Y, Chen P. Comparative analysis on the kenaf (*Hibiscus cannabinus* L) genomic DNA methylation of its male sterility line and maintainer line[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2017, 22(11): 17-27 (in Chinese)
- [10] 陈智华. 大豆杂交种及其亲本 DNA 胞嘧啶甲基化差异分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014
Chen Z H. Analysis of DNA methylation between soybean (*Glycine Max* L) hybrids and their parents[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2014 (in Chinese)
- [11] 徐妍. 灰斑病菌胁迫对大豆生理生化和 DNA 甲基化的影响[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2015
Xu Y. Stress on physiological and biochemical effects and the effects of DNA methylation of soybean (*Glycine Max* L)[D]. Harbin: Harbin Normal University, 2015 (in Chinese)
- [12] 何庆元, 向仕华, 李正鹏, 王松华, 祝嫦巍, 刘斌, 吴萍. 利用 MSAP 分析硫化氢对盐胁迫大豆甲基化的影响[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(2): 195-201
He Q Y, Xiang S H, Li Z P, Wang S H, Zhu C W, Liu B, Wu P. Methylation of soybean (*Glycine Max* L) under salt stress by H₂S treatment with MSAP[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2016, 38(2): 195-201 (in Chinese)
- [13] 殷欣. 镉胁迫下大豆生理生化特性及 DNA 甲基化变异的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2016
Yin X. Soybean (*Glycine Max* L) physiological and biochemical characteristics and DNA methylation variation under cadmium stress[D]. Harbin: Harbin Normal University, 2016 (in Chinese)
- [14] 吴良泉. 基于“大配方、小调整”的中国三大粮食作物区域配肥技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014
Wu L Q. Fertilizer recommendations for three major cereal crops based on regional fertilizer formula and specific adjustment in China[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [15] 王学奎, 黄见良. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2015
Wang X K, Huang J L. *Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2015 (in Chinese)
- [16] 曹翠玲, 麻鹏达. 植物生理学教学实验指导[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2016
Cao C L, Ma P D. *Laboratory Manual for Plant Physiology Teaching* [M]. Yangling: Northwest A&F University Press, 2016 (in Chinese)
- [17] Tang X M, Tao X, Wang Y, Ma D W, Li D, Yang H, Ma X R. Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289(6): 1075-1084
- [18] 王月月, 范龙, 张洁, 王冬梅. 大豆不同生长时期基因组 DNA 提取方法的优化[J]. 中国农学通报, 2013, 29(36): 319-325
Wang Y Y, Fan L, Zhang J, Wang D M. Extraction method optimization of soybean (*Glycine Max* L) DNA from different growth periods [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(36): 319-325 (in Chinese)
- [19] 付畅, 王豫颖, 代红杰. 大豆不同器官中的 RNA 的提取分析[J]. 大豆科学, 2004(4): 45-48
Fu C, Wang Y Y, Dai H J. Analysis of RNA lation from different soybean (*Glycine Max* L) organs [J]. *Soybean Science*, 2004(4): 45-48 (in Chinese)
- [20] Chen P, Ran S M, Li R, Huang Z P, Qian J H, Yu M L,