



谷子萌发吸水期关键代谢途径的筛选与分析

余爱丽, 赵晋锋, 成锴, 王振华, 张鹏, 刘鑫, 田岗, 赵太存, 王玉文

(山西省农业科学院谷子研究所, 山西长治 046011)

摘要:【目的】谷子适应性强, 抗旱耐瘠, 是起源于中国的重要作物。通过转录组测序技术分析谷子萌发不同吸水期的转录组差异, 以期获得谷子萌发过程中的差异表达基因, 寻找调控谷子萌发的重要代谢途径和代谢物。

【方法】以晋谷 20 为材料, 构建谷子萌发过程中开始快速吸水期、滞缓吸水期和重新大量吸水期的 cDNA 文库, 进行转录组分析; 采用 K-Means 开展基因表达聚类分析; 利用 DESeq 筛选差异表达基因; 通过 COG、GO、KEGG 等对差异表达基因进行功能注释; 利用 KEGG 富集挖掘不同吸水期调控种子萌发的关键代谢途径和关键基因; 并采用 qRT-PCR 验证其可靠性; 用 HPLC 分析关键代谢物含量。【结果】转录组测序分析获得谷子萌发开始快速吸水期、滞缓吸水期和重新大量吸水期覆盖整个基因组的基因表达谱, 共获得 33 643 个基因, 识别 9 个具有不同表达模式的共表达基因簇。比较种子萌发的开始快速吸水期与滞缓吸水期、滞缓吸水期与重新大量吸水期、开始快速吸水期与重新大量吸水期, 分别筛选出 3 893、4 612 和 8 472 个差异表达基因。KEGG 富集分析表明, 3 个比较的差异表达基因都显著富集到 phenylpropanoid biosynthesis、phenylalanine metabolism、starch and sucrose metabolism 代谢途径; 开始快速吸水期与滞缓吸水期、开始快速吸水期与重新大量吸水期的差异表达基因还显著富集到 plant hormone signal transduction 途径。并且 3 个比较中富集到 phenylpropanoid biosynthesis 和 phenylalanine metabolism 代谢途径的差异表达基因数都最多, 其中过氧化物酶基因(peroxidase) 比例最高。通过 qRT-PCR 对 4 个苯丙烷生物合成途径相关基因的分析表明, 其表达趋势与转录组分析结果基本一致, 其中, 4-香豆酸-CoA 连接酶 3 (4-coumarate-CoA ligase 3) 在谷子种子中存在已形成 mRNA, 萌发吸水过程中呈先下调后上调再下调的表达趋势。苯丙烷类相关代谢物含量分析显示, 芥子酸在种子中大量储备, 在萌发过程中呈下调趋势; 阿魏酸、对香豆酸和咖啡酸呈先上调后下调趋势。【结论】谷子萌发过程中, 不同吸水期的差异表达基因显著与苯丙烷生物合成途径和苯丙氨酸代谢途径相关; 其上游基因 4-香豆酰-辅酶 A 连接酶和下游基因过氧化物酶家族成员在谷子萌发响应水分过程中发挥调控作用; 中间产物芥子酸可能参与种子的休眠与萌发。

关键词: 谷子; 种子萌发吸水期; 转录组分析; 苯丙烷生物合成途径; 苯丙氨酸代谢途径

Screening and Analysis of Key Metabolic Pathways in Foxtail Millet During Different Water Uptake Phases of Germination

YU AiLi, ZHAO JinFeng, CHENG Kai, WANG ZhenHua, ZHANG Peng, LIU Xin,
TIAN Gang, ZHAO TaiCun, WANG YuWen

(Millet Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Changzhi 046011, Shanxi)

Abstract: 【Objective】 Foxtail millet (*Setaria italica* L.) is a hardy cereal and known for its tolerance against drought and barrenness, which originated in China. In this study, the transcriptome of foxtail millet was analyzed in germinating seeds during

收稿日期: 2019-07-17; 接受日期: 2020-02-02

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-06-13.5-A23)、山西省农业科学院科研项目 (YGG17021 和 YCX2018206)

联系方式: 余爱丽, E-mail: yuailimail@163.com. 赵晋锋, E-mail: zhaojfmil@126.com. 余爱丽和赵晋锋为同等贡献作者。通信作者王玉文, E-mail: gzwyyw@163.com

different uptake of water phases, which is to get a lot of differently expressed genes, and find the important metabolic pathways, key genes and metabolites of regulating germination in foxtail millet. 【Method】The cDNA libraries of Jingy 20 were constructed in germinating seeds during rapid initial uptake of water, plateau phase, further increase in water uptake for the transcriptome analysis. The cluster analysis of gene expression was performed by K-Means. Differential expression analysis used DESeq. The functional annotations of differentially expressed genes were obtained by using COG, GO, KEGG, and so on. The key metabolism pathways and genes that regulated germination in foxtail millet were found during different water uptake phase through KEGG enrichment of DEGs. The reliability of sequencing results was confirmed by qRT-PCR. The contents of metabolites were assayed by HPLC.

【Result】The genome-wide gene expression profile was obtained by RNA-sequencing during rapid initial uptake of water, plateau phase and further increase in water uptake. A total of 33 643 genes were expressed. Nine co-expression clusters with distinctive patterns were identified. There were 3 893, 4 612 and 8 472 DEGs in rapid initial uptake of water and plateau phase, plateau phase and further increase in water uptake, rapid initial uptake of water and further increase in water uptake, respectively. The KEGG pathway enrichment analysis showed that these DEGs of the three comparisons were significantly associated with phenylpropanoid biosynthesis, phenylalanine metabolism, starch and sucrose metabolism. The DEGs between rapid initial uptake of water and plateau phase, between rapid initial uptake of water and further increase in water uptake were also enriched in plant hormone signal transduction. And the number of genes enriched in the metabolism pathway of phenylpropanoid biosynthesis and phenylalanine metabolism was the largest in the three comparisons. The peroxidase genes had the highest proportion among these genes of the two pathways. The results obtained from four phenylpropanoids-related genes tested by qRT-PCR were consistent with the trend of regulation identified by gene expression profile. In dormant seeds of foxtail millet, there was the preformed mRNAs of 4-coumarate-CoA ligase 3, which displayed firstly decreasing, then increasing and finally declining patterns during the uptake of water stage. The contents of phenylpropanoids-related metabolites in germination seeds of foxtail millet indicated that large amounts of sinapic acid were stored in dormant seeds. During uptake of water by a dry seed, the content of sinapic acid gradually decreased, but those of p-coumaric acid, caffeic acid and ferulic acid increased first and then decreased. 【Conclusion】DEGs of foxtail millet were significantly related with phenylpropanoid biosynthesis and phenylalanine metabolism in germinating seeds during different uptake of water stages. The upstream and downstream genes of phenylpropanoid biosynthesis, such as 4-coumarate-CoA ligase 3 and peroxidase, played regulation roles in response to water during germination of foxtail millet. Sinapic acid participated in the dormancy and germination of millet seeds, which were the medium product of phenylpropanoid biosynthesis pathway.

Key words: foxtail millet; water uptake phase of seed germination; transcriptome analysis; phenylpropanoid biosynthesis; phenylalanine metabolism

0 引言

【研究意义】谷子为小粒作物, 千粒重仅 3 g 左右, 播种深度只有 3—5 cm。在各种复杂多变气候土壤条件下, 谷子种植常面临播种难、萌发出苗难、保苗难、苗不全等问题。种子萌发起始于干燥种子水分的吸收, 涉及一系列形态结构、生理生化和分子水平的变化, 并长成具有正常构造幼苗, 其中, 对水分的吸收与响应是植物生长周期起始的关键。因此, 研究谷子萌发过程中不同吸水期的各种变化和调节机制, 将有助于调控谷子萌发, 提高出苗率和全苗率, 并为谷子种子引发提供理论依据。【前人研究进展】种子萌发是植物生长周期的起点, 也是农作物种植生产的开始。狭义的种子萌发, 起始于水的吸收, 终止于胚轴的延伸, 以胚根突破种皮为萌发结束的标志^[1]。广义的种子萌发, 是指种胚恢复生长直至长成具有正常构造幼苗的过程, 包括吸胀、萌动、发芽和幼苗形态建

成^[2]。种子萌发过程中水分吸收大致分为 3 个阶段: 第一阶段开始快速吸水期; 第二阶段滞缓吸水期; 第三阶段重新大量吸水期。其中, 涉及呼吸、可溶物的渗漏、以现存和新 mRNA 为模板的蛋白质合成起始、DNA 修复、线粒体的修复和合成、细胞分化和 DNA 合成等过程^[3]。目前, 谷子萌发期的相关研究主要侧重于抗旱性鉴定、不同逆境的生理响应。如张锦鹏等^[4]利用甘露醇为胁迫剂, 以 5 个谷子品种为材料, 开展了萌发期人工模拟胁迫谷子耐旱性的鉴定。朱学海^[5]采用 PEG-6000、甘露醇 2 种渗透剂模拟水分胁迫, 确定了鉴定谷子芽期耐旱性的 PEG-6000 和甘露醇胁迫条件分别为-0.75 和-1.00 MPa, 种子萌发耐旱指数与相对根长宜作为谷子芽期耐旱性鉴定指标。秦岭等^[6]鉴定了 201 份不同生态区主要育成谷子品种芽期耐旱性。2018 年印度学者 BHEEMESH 等^[7]采用 4 种不同浓度的 PEG 对 60 个谷子品种进行萌发期干旱胁迫处理, 筛选出 4 个高耐受性谷子品种。逆境生理

响应方面, 王春梅等^[8]分析了不同浓度砷对谷子萌发的影响, 发现 $As < 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 促进谷子萌发, 高浓度 ($As \geq 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 抑制谷子萌发。裴帅帅等^[9]研究了晋谷 28、晋谷 45、晋谷 42 和晋谷 77-322 萌发期对干旱胁迫的生理响应, 结果表明, 在 18% PEG 的胁迫下, 谷子的可溶性蛋白、脯氨酸含量、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化物酶 (peroxidase, POD) 活性、丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量都有所升高, 差异较显著。其中, 晋谷 45 的脯氨酸含量、蛋白质含量、SOD 和 POD 活性比对照分别提高 462.34%、34.17%、113.84% 和 61.22%; 晋谷 28 的 MDA 含量增幅最小, 晋谷 42 增幅最大, 比 CK 增加 98.7%。杨净等^[10]研究超重力对谷子种子萌发及生理生化特性的影响, 结果表明, 中低速离心处理促进种子萌发, 增加了根长及鲜重, 减小了芽长, 降低了丙二醛含量, 提高了 SOD 活性, 除 3 000 r/min 离心 60 min 处理外, 都提高了 POD 活性。谷子萌发期分子机理研究较少, 2017 年, TANG 等^[11]分析了干旱胁迫下抗、感谷子在生理和转录水平上的差异, 鉴定出 20 个与苗期和萌发期抗旱相关的 QTL。窦祎凝等^[12]通过反向遗传学方法研究表明, 谷子转录因子 SiNAC18 通过 ABA 信号途径正向调控干旱条件下的种子萌发。2018 年, 许冰霞等^[13]对萌发 10 和 18 h 种子的对照组和 PEG 处理组构建 cDNA 文库并进行差异表达基因的表达式分析, 分别筛选出 456 和 545 个差异表达基因, 其中 87 和 267 个上调表达基因, 369 和 278 个下调表达基因; KEGG 富集分析表明, 差异表达基因参与到苯丙烷生物合成途径和植物激素信号转导过程; 苯丙烷生物合成途径的苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、肉桂酸-4-羟化酶 (CA4H) 基因在谷子萌发 10 和 18 h 均发生了下调表达。2019 年, 潘教文等^[14]分析了盐条件下培养 7 d, 去掉胚根胚芽萌发种子的转录物组, 发现 NaCl 处理下 DEGs 主要集中在胁迫响应、氧化还原、离子的跨膜转运、多胺、有机酸、苯丙烷的合成等过程。苯丙烷生物合成途径 (phenylpropanoid biosynthesis) 的上游为苯丙氨酸代谢途径 (phenylalanine metabolism), 其为苯丙烷类合成提供前体^[15]。苯丙烷生物合成途径可形成一系列间产物, 如反式肉桂酸、香豆酸等, 也可进一步转化成香豆素、绿原酸、类黄酮、异黄酮、花青素、植物激素、木质素等^[16-17]。苯丙烷类代谢物是植物特有的, 在植物生长、发育、与环境互作过程中发挥重要作用^[18-19]; 也可作为调节分子, 在植物防御

病原物、抵御捕食者、信号转导与其他生物互作过程中发挥重要作用^[20-21]。【本研究切入点】目前, 针对谷子萌发期主要侧重于干旱、盐等逆境胁迫条件下的萌发率、形态结构、生理生化和转录谱研究, 但对谷子不同萌发吸水期的转录组和代谢物变化及其调控机理鲜见报道。【拟解决的关键问题】本研究采用转录组分析方法探寻谷子在快速吸水期、滞缓吸水期、和重新大量吸水期的差异表达基因和关键代谢途径, 分析重要代谢物的含量变化, 从转录水平和代谢水平探讨谷子萌发吸水的调控机理, 为调节和引发谷子萌发, 提高出苗率的技术创制提供可借鉴依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

筛选成熟度好、大小均一的晋谷 20 为试验材料。用 3% NaClO 浸泡消毒 20 min, 其间不断混匀, 开盖透气, 然后用蒸馏水冲洗 4—5 次 (合计 20 min), 均匀播种于已铺放 3 层发芽纸的 9 cm 培养皿中, 每皿 50 粒, 加入蒸馏水 7 mL。放置于温度 24℃—26℃, 相对湿度 40%—50% 培养室中培养。每个取样时间点设 3 次重复, 共重复 2 轮。依据已经绘制的相同试验条件和试验材料的种子萌发吸水规律图, 选取吸水 3 和 5 h 收集开始快速吸水期样品, 混合, 两轮分别标记为 CK2 和 CK2R; 收集吸水 9 和 11 h 滞缓吸水期样品, 混合, 两轮分别标记为 CK8 和 CK8R; 采集吸水 15 和 17 h 重新大量吸水期样品, 混合, 两轮分别标记为 CK14 和 CK14R; 液氮速冻, -80℃ 保存, 用于转录组分析。相应的开始快速吸水期、滞缓吸水期和重新大量吸水期, 分别用 Phase I、Phase II、Phase III 表示。另外, 于相同条件下, 培养和收集吸水 0、2、3、5、8、9、11、14、15 和 17 h 的萌发种子, 液氮速冻 -80℃ 保存, 用于基因表达定量分析和代谢物含量分析。

1.2 总 RNA 的提取和检测

采用 CTAB 法提取总 RNA, 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行初步检测。由 NanoPhotometer® spectrophotometer (IMPLEN, CA, USA) 检测 RNA 的纯度, Agilent Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies, CA, USA) 分析 RNA 的完整性。合格的 RNA 进行 cDNA 文库构建。

1.3 cDNA 文库的构建及测序

cDNA 文库的构建和测序由中国北京百迈客公司完

成。每个样品取 1 μg RNA, 采用试剂盒 NEBNext®Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB, USA), 依据其说明书, 用 AMPure XP system (Beckman Coulter, Beverly, USA) 纯化的 200—250 bp 片段, 构建 cDNA 文库。用 Illumina Hiseq 2500 开展高通量转录组测序。共进行 6 个样本的高通量测序建库。

1.4 基因表达分析及功能注释

1.4.1 基因表达分析 采用 Tophat2^[22]将样品的 Clean reads 与参考基因组进行序列比对。利用 FPKM^[23]值来反应基因的表达丰度。将皮尔逊相关系数 *r* (Pearson's Correlation Coefficient) 作为生物学重复相关性的评估指标^[24], 分析 3 个不同吸水阶段的相关性。通过 K-Means 方法进行基因表达聚类分析。

1.4.2 差异表达基因分析 采用 DESeq^[25]进行差异表达分析, 然后采用 Benjamini-Hochberg 方法对差异显著性 *P*-values 进行校正。用 Fold Change ≥ 2 且 FDR (false discovery rate) < 0.01 作为标准, 筛选差异表达基因。开始快速吸水期和滞缓吸水期比较、滞缓吸水期与重新大量吸水期比较、开始快速吸水期与重新大量吸水期比较分别表示为 Phase I -Phase II、Phase II -Phase III 和 Phase I -Phase III。

1.4.3 功能注释 依据 NR (NCBI non-redundant protein sequences)^[26]、Swiss-Prot (A manually annotated and reviewed protein sequence database)^[27]、KEGG (Kyoto

Encyclopedia of Genes and Genomes)^[28]、COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins)^[29]和 GO (Gene Ontology)^[30]在线数据库, 对获得的差异表达基因进行功能注释。并进行差异表达基因的 GO 富集和 KEGG 通路富集。利用 topGO^[31]软件展示富集的 GO 节点 (Term) 及其层级关系, 然后用 ReviGO^[32]对富集 GO term 去冗余和进一步聚类。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

选取关键代谢途径的 4 个差异表达基因, 用实时荧光定量技术验证转录组分析数据的可靠性。通过 CTAB 法提取样品总 RNA, 使用荧光定量 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (TaKaRa) 和 Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Code.TP800) 进行试验。扩增体系为 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq II、1 μL 引物 (10 μmol·L⁻¹)、8.5 μL 无菌蒸馏水和 2 μL 的 cDNA 模板。扩增程序为 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。各基因特异引物具体见表 1。以谷子组成型表达基因 *β-Actin* (Seita.7G294000) 作为内参基因。采用双标准曲线法计算基因的相对表达量^[33], 每个样品设 3 个技术重复。

1.6 苯丙烷类关键代谢物含量分析

采用 HPLC 方法^[34], 分析不同萌发时期谷子中的肉桂酸、对香豆酸、咖啡酸、阿魏酸和芥子酸的含量变化。

表 1 苯丙烷类相关基因 qRT-PCR 表达分析引物

Table 1 Primers of phenylpropanoids-related genes for gene-expression results by quantitative real-time PCR

基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
<i>β-Actin</i>	Seita.7G294000	TGTGCCGGCCATGTATGT	CACACCATCACCAGAGTCCAA
<i>Cationic peroxidase SPC4 precursor</i>	Seita.3G004800	CGGCATCGTCAGGGATTT	AGGCGGGCTTTGTGTGGT
<i>4-coumarate--CoA ligase 3</i>	Seita.1G065800	TGGAGTTCGCCGAGGTGAT	CGAGTTAGCGAGTAGATGTGG
<i>Beta-glucosidase 6 precursor</i>	Seita.9G492600	CCGGCGTGTCACTAATGCT	GTCTTCCCTCTCCCATCTTCCT
<i>Peroxidase 4 precursor</i>	Seita.5G145500	TCTCGACGCTCCTGTCCAT	TTGGTGGCGGTGTCGTT

2 结果

2.1 谷子萌发 3 个吸水阶段转录物组分析

采用高通量测序方法分析 3 个吸水阶段的 6 个混合样品的转录物组。去除低质量数据和接头序列, 共获得 34.51 Gb Clean bases, 各样品 Clean bases 均达到 4.89 Gb 以上, 碱基质量值 Q30 在 85.13% 及以上。与谷子参考基因组进行序列比对, 比对效率为 79.47%—81.57% (表 2)。开始快速吸水期样本 CK2 和 CK2R

分别含有 4.89 和 4.98 Gb 的 Clean bases, 滞缓吸水期样本 CK8 和 CK8R 含有 7.07 和 5.47 Gb 的 Clean bases, 重新大量吸水期样本 CK14 和 CK14R 含有 5.90 和 6.17 Gb 的 Clean bases。3 个不同萌发吸水阶段的相关性分析结果表明, 开始快速吸水期和滞缓吸水期的相关性为 0.73—0.76, 开始快速吸水期与重新大量吸水期的相关性为 0.32—0.34; 滞缓吸水期与重新大量吸水期的相关性为 0.65—0.69, 说明不同吸水阶段涉及大量不同基因和代谢途径。

表 2 测序结果及其与参考基因组比对分析

Table 2 Summary of the sequencing and the reads mapping to the reference genome

分类 Classification	开始快速吸水期 Phase I		滞缓吸水期 Phase II		重新大量吸水期 PhaseIII	
	CK2	CK2R	CK8	CK8R	CK14	CK14R
总 reads Clean reads	38845760	39679812	56164700	43525742	46838670	49151796
总核苷酸 Clean bases	4894565760	4986871932	7076752200	5472201146	5901672420	6178141042
GC 含量 GC content (%)	58.72	57.83	57.53	56.81	57.21	56.36
碱基质量值 Q30 (%)	89.74	85.29	90.33	85.17	91.62	85.13
匹配的 reads Mapped reads	31007621 (79.82%)	31533133 (79.47%)	45812237 (81.57%)	35213766 (80.90%)	38024006 (81.18%)	39595878 (80.56%)
唯一位点匹配 reads Unique mapped reads	26519605 (68.27%)	27126368 (68.36%)	42124995 (75.00%)	31824703 (73.12%)	35017461 (74.76%)	35922812 (73.09%)
多位点匹配 reads Multiple mapped reads	4488016 (11.55%)	4406765 (11.11%)	3687242 (6.57%)	3389063 (7.79%)	3006545 (6.42%)	3673066 (7.47%)

依据 RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) 来反映基因的表达丰度, 共获得 33 643 个基因。以 $RPKM \geq 0.01$ 为筛选标准, 开始快速吸水期样本 CK2 和 CK2R 分别含 29 181 和 27 026 个基因, 滞缓吸水期样本 CK8 和 CK8R 分别含 27 655 和 26 247 个基因, 重新大量吸水期样本 CK14 和 CK14R 有 28 666 和 26 864 个基因。以 K-Means 方法分析基因表达规律, 共识别 9 个不同表达模式的基因簇 (图 1-A)。其中基因簇 3 含 227 个基因, 从开始快速吸水期, 经滞缓吸水期, 到重新大量吸水期, 基因表达量显著下降; 而基因簇 4 含 281 个基因, 从开始快速吸水期至重新大量吸水期, 基因表达量显著上调, 表明这些基因在谷子种子吸水萌发过程中具有不同的作用。同时以各基因簇的各个时期的所有样品的 RPKM 平均值为依据进行聚类分析, 结果表明, 1、3、5、9 基因簇聚为一大簇, 基因表达呈下调趋势, 2、4、6、7 和 8 基因簇聚成另一簇, 基因表达呈上调趋势 (图 1-B)。

2.2 谷子萌发 3 个吸水阶段的差异表达基因分析

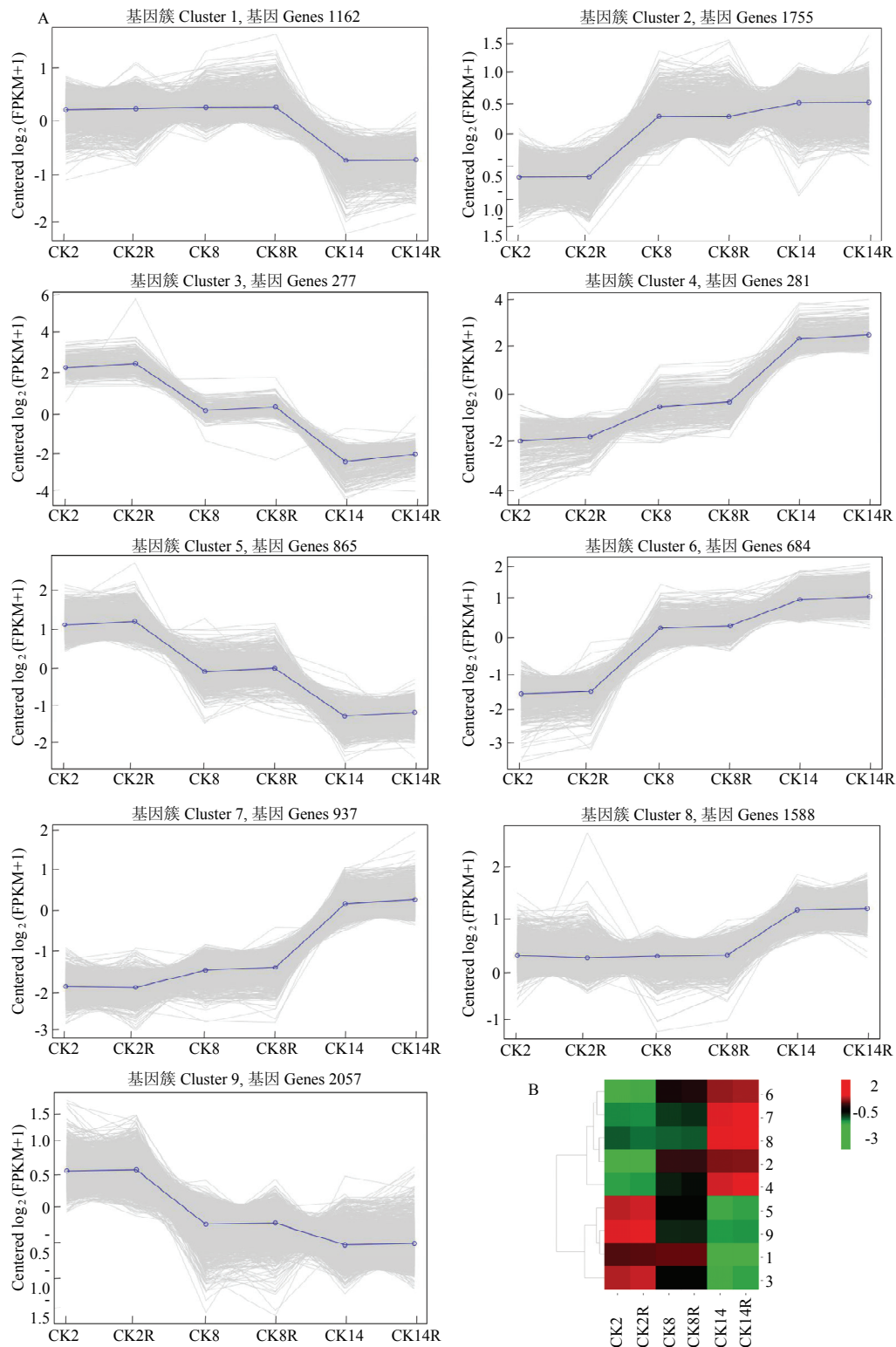
将 $Fold\ Change \geq 2$ 和 $FDR < 0.01$ 作为筛选标准, 对不同吸水阶段比较结果进行差异表达基因筛选, 开始快速吸水期与滞缓吸水期比较 (Phase I -Phase II) 识别了 3 893 个差异表达基因, 滞缓吸水期与重新大量吸水期之间 (Phase II -PhaseIII) 有 4 612 个差异表达基因, 开始快速吸水期与重新大量吸水期比较 (Phase I -PhaseIII) 中识别 8 472 个差异表达基因 (图 2)。3 个比较之间共有差异表达基因 1 277 个, 占有差异表达基因的 13.3%, 其中, 共有上调基因 625 个, 下调基因 642 个。Phase I -PhaseIII 和 Phase II -Phase III 的差异表达基因的数量大于 Phase I -Phase II, 表明

在重新大量吸水期中存在大量复杂的与谷子萌发发育相关的合成代谢途径 (图 2)。并且火山图 (图 3) 也直观整体地展示基因在各比较的 2 个时期之间表达水平存在显著差异, 在开始快速吸水期与重新大量吸水期比较中差异倍数大的基因最多。

2.3 差异表达基因功能的注释和富集分析

依据数据库 COG、GO 和 KEGG, 对 3 个比较的差异表达基因进行功能注释、分类和富集。COG 分类结果表明, 开始快速吸水期和滞缓吸水期比较、滞缓吸水期与重新大量吸水期比较、开始快速吸水期与重新大量吸水期比较的差异表达基因归属最多的功能类别为碳水化合物转运和代谢 (carbohydrate transport and metabolism)、转录 (transcription)、复制重组和修复 (replication, recombination and repair)、一般功能 (general function prediction only)、信号转导机制 (signal transduction mechanism)。Phase I -PhaseIII 还包括翻译核糖体结构和生物合成 (translation, ribosomal structure and biogenesis)、翻译后修饰蛋白质转换和伴侣 (posttranslation modification, protein turnover, chaperones)。

将 3 个不同吸水期间差异表达基因注释到 GO 数据库并进行功能分类, 结果显示, Phase I -Phase II、Phase II -PhaseIII 和 Phase I -PhaseIII 分别注释到生物过程 (biological process)、分子功能 (molecular function) 和细胞组分 (cellular component) 的差异表达基因分别有 2 028、1 182 和 330, 2 082、1 219 和 335, 2 498、1 572 和 434 个。对比较间差异表达基因进行 GO 富集分析, 以校正 $P\text{-value} \leq 0.01$ 为标准筛选富集到的 Term, 结果显示, Phase I -Phase II、



A: 具有不同表达模式的 9 个基因簇，纵坐标表示中心化的基因表达量的对数值；B: 9 个基因簇基因表达热图
A: Maps of nine clusters with different expression pattern. The Y-axis indicates the centered $\log_2(\text{FPKM}+1)$ in the maps of A; B: A heat map plot of gene expression related to nine clusters

图 1 基因表达谱 K-Means 聚类图
Fig. 1 K-Means clustering map of gene expression profiles

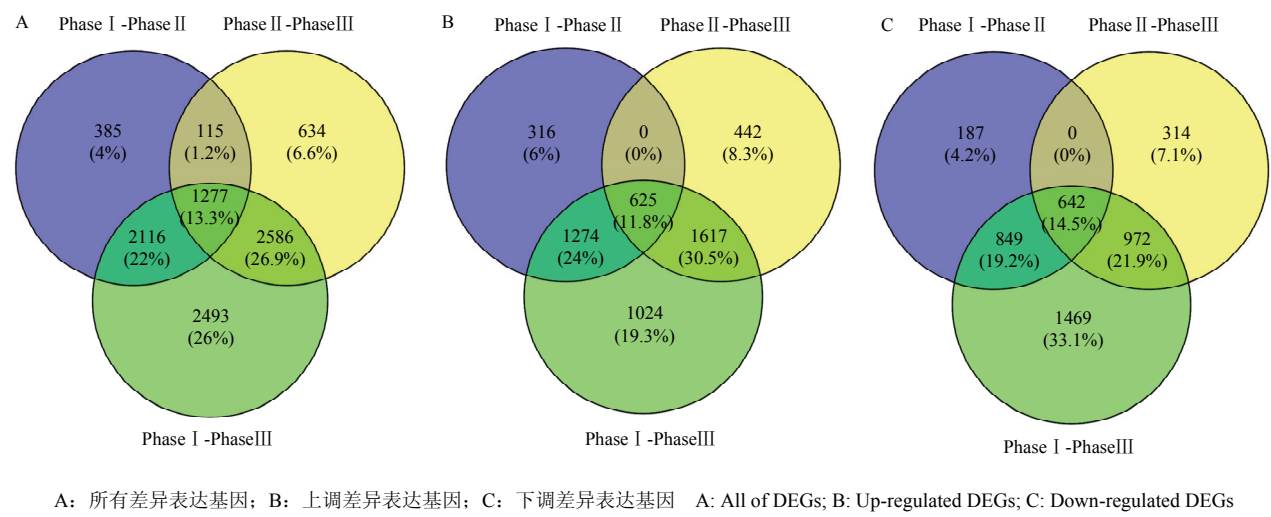


图 2 差异表达基因韦恩图
Fig. 2 A venn diagram of DEGs

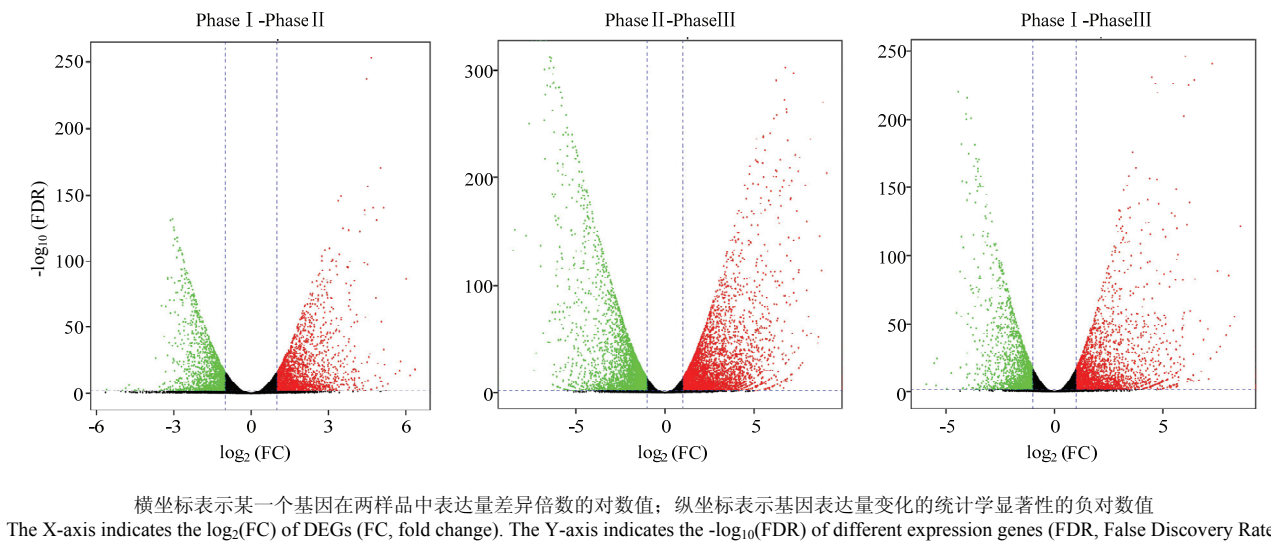


图 3 差异表达基因火山图
Fig. 3 A volcano plot of DEGs

Phase II -Phase III和 Phase I -Phase III分别注释到生物过程、细胞组分和分子功能的 26、15 和 7, 29、10 和 6, 23、14 和 6 个通路。对所有筛选到的富集 Term 进行分析, 结果表明, 3 个比较共同富集至 7 个通路, 反应于寒冷、缺水、缺氧、干枯、氧化压力、karrikin 通路和油菜素类固醇生物合成过程; 开始快速吸水期和滞缓吸水期比较特有 10 个通路; 滞缓吸水期与重新大量吸水期比较特有 12 个通路; 开始快速吸水期与重新大量吸水期比较特有 3 个通路。3 个比较的 GO 富集结果经软件 ReviGO 去冗余和进一步聚类后, 结果

表明, Phase I -Phase II 主要涉及对油菜素内脂的反应 (response to brassinosteroid)、根毛伸长 (root hair elongation)、甾醇生物合成 (sterol biosynthesis) 和水转运 (water transport) 4 个通路; Phase II -Phase III 主要集中氮的转运 (nitrate transport)、油菜素类固醇生物合成 (brassinosteroid biosynthesis)、真菌防御反应 (defense response to fungus)、乙酰辅酶 A 代谢 (acetyl-CoA metabolism) 和细胞板形成引起的细胞分裂 (cytokinesis by cell plate formation) 通路; Phase I -Phase III 主要与冷反应 (response to cold)、植物型细

胞壁松弛 (plant-type cell wall loosening)、油菜素类固醇生物合成 (brassinosteroid biosynthesis)、根毛伸长 (root hair elongation)、DNA 复制起始 (DNA replication initiation) 有关。可见在谷子萌发的不同吸水阶段启动了大量代谢通路, 并且各有不同, 过程非常复杂。

差异表达基因 KEGG 通路注释结果显示, 开始快速吸水期和滞缓吸水期比较涉及 111 代谢通路, 其中, 苯丙氨酸代谢 (phenylalanine metabolism) 和苯丙烷生物合成 (phenylpropanoid biosynthesis) 分别有 64 个和 80 个差异表达基因, 植物激素信号转导 (plant hormone signal transduction) 通路含 65 个差异表达基因, 淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism) 通路含 56 个。滞缓吸水期与重新大量吸水期比较的差异表达基因注释到 117 代谢通路, 其中 phenylalanine metabolism 和 phenylpropanoid biosynthesis 分别有 78 个和 106 个差异表达基因, plant hormone signal transduction 通路含 54 个差异表达基因, starch and sucrose metabolism 通路含 54 个, 碳代谢 (Carbon metabolism) 有 55 个差异表达基因。开始快速吸水期与重新大量吸水期比较涉及 120 代谢通路, 其中 phenylalanine metabolism 和 phenylpropanoid biosynthesis 分别有 105 个和 134 个差异表达基因, plant hormone signal transduction 通路含 110 个差异表达基因, starch and sucrose metabolism 通路含 93 个, 氨基酸生物合成 (biosynthesis of amino acids) 和 carbon metabolism 分别有 86 和 83 个, 蛋白质在内质网中的加工 (protein processing in endoplasmic reticulum) 含 72 个。

KEGG 富集结果进一步表明 (图 4), 3 个比较的差异表达基因全部显著富集于 phenylalanine metabolism 和 phenylpropanoid biosynthesis、starch and sucrose metabolism 通路; Phase I-Phase II 和 Phase I-Phase III 还显著富集于 plant hormone signal transduction 代谢通路。并且 3 个比较中富集于 phenylalanine metabolism 和 phenylpropanoid biosynthesis 代谢途径的基因数都最多。

2.4 苯丙烷生物合成和苯丙氨酸代谢途径相关基因分析

开始快速吸水期与滞缓吸水期比较中筛选到 83 个苯丙烷生物合成和苯丙氨酸代谢途径相关基因, 滞缓吸水期与重新大量吸水期比较、开始快速吸水期与重新大量吸水期比较分别筛选到 110、144 个相关差异表达基因。其中 3 个比较中共有 48 个苯丙烷生物合成

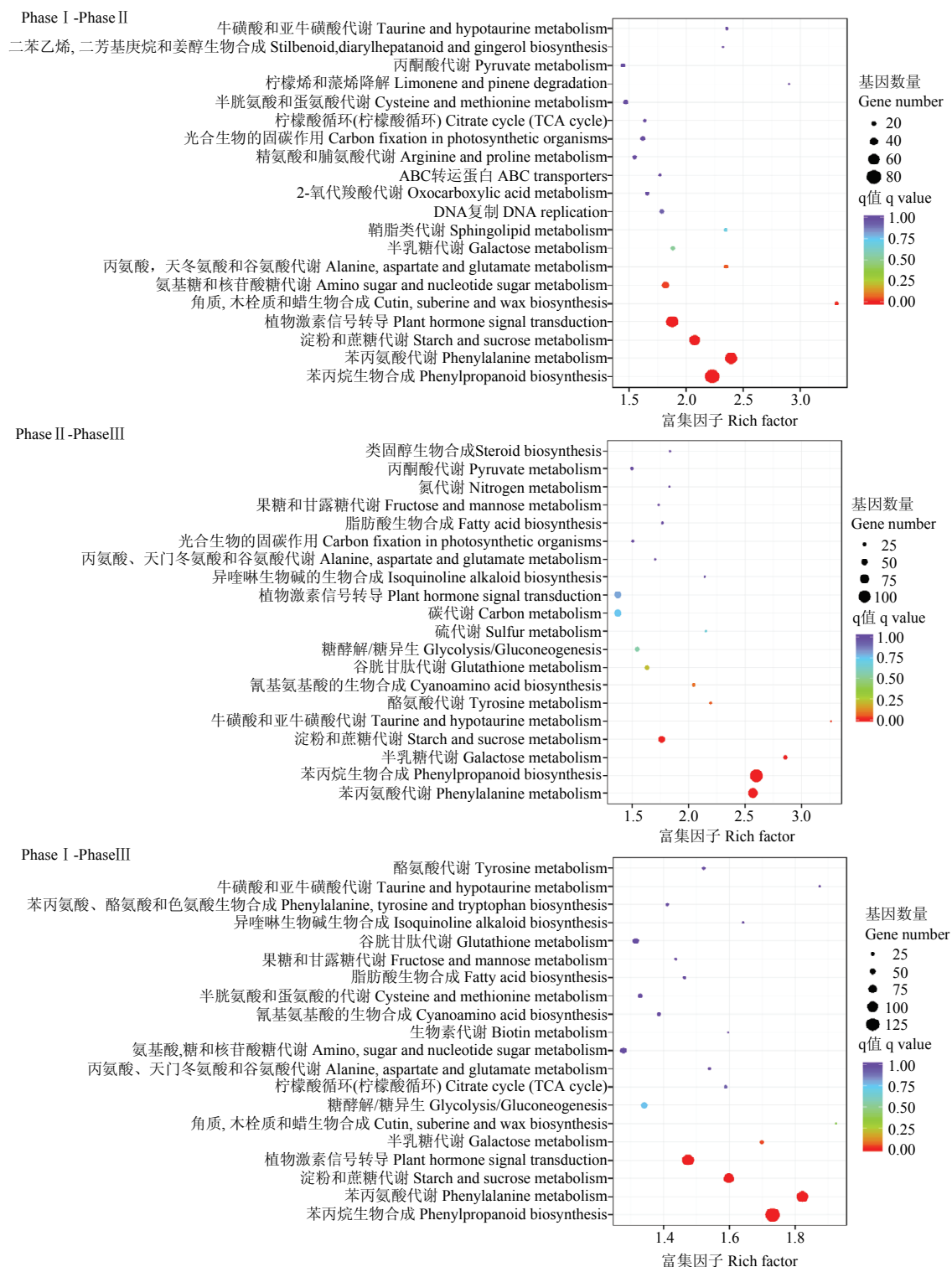
和苯丙氨酸代谢途径相关差异表达基因, Phase I -Phase II、Phase II -Phase III 和 Phase I -Phase III 分别特有 6、6 和 13 个差异表达基因。如图 5 所示, 各个苯丙烷生物合成和苯丙氨酸代谢相关差异表达基因在不同吸水时期样品中的表达量表明, 大部分相关基因表达量上调, 只有少量基因表达量下调, 这说明此部分基因在谷子萌发吸水启动中发挥重要作用, 特别是下调基因可能在种子中有已形成 mRNA 储备。基因家族归类分析表明 (图 6), 此部分基因中, 过氧化物酶 (peroxidase, EC:1.11.1.7) 占 59.2%, β -葡萄糖苷酶 (beta-glucosidase, EC:3.2.1.21) 为 14%, 其次为 4-香豆酰-辅酶 A 连接酶 (4-coumarate--CoA ligase, EC:6.2.1.12)、肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl alcohol dehydrogenase, EC:1.1.1.195) 和咖啡酸 3-O-甲基转移酶 (caffeic acid 3-O-methyltransferase, EC:2.1.1.68)。可见苯丙烷生物合成和苯丙氨酸代谢途径在谷子萌发过程中发挥重要作用, 并通过关键基因表达调控种子萌发。

2.5 差异表达基因的荧光定量 PCR 分析

挑选谷子苯丙烷生物合成途径关键基因进行 qRT-PCR 分析, 以整体观测其不同萌发时期的表达模式, 验证转录组分析结果, 结果表明, 在谷子萌发吸水的 17 h 过程中 (图 7), 4-coumarate--CoA ligase 3 (Seita.1G065800) 呈先下调后上调再下调表达趋势; beta-glucosidase 6 (Seita.9G492600) 和 cationic peroxidase SPC4 (Seita.3G004800) 呈上调趋势; peroxidase 4 (Seita.5G145500) 萌发后期呈上调趋势。这些基因在开始快速吸水期 (3 h 和 5 h)、滞缓吸水期 (9 h 和 11 h)、重新大量吸水期 (15 h 和 17 h) 表达趋势与转录组分析结果表达趋势一致, 除 Seita.3G004800 在 15 h 略有不同, 分析其原因可能由于 15 h 样品全部为培养 14 h 后移苗 1 h 的样品, 移苗可能对已经露白的萌发种子造成了伤害。再结合代谢图分析, Seita.1G065800 为上游代谢基因, Seita.9G492600、Seita.3G004800 和 Seita.5G145500 为下游代谢基因, 说明在谷子萌发过程中 Seita.1G065800 发挥重要作用, 并在种子中有所储备, 以利于种子的萌发。

2.6 苯丙烷类关键代谢物含量分析

鉴于苯丙烷生物合成途径重要性, 对其相关重要次生代谢物进行分析 (图 8), 结果表明, 芥子酸在种子中大量储备, 在萌发 0—17 h 中呈下调趋势; 肉桂酸在此阶段保持恒定; 阿魏酸、对香豆酸和咖啡酸呈先上调后下调趋势。可见芥子酸和苯丙烷生物合成途径可能在种子休眠萌发过程中发挥重要作用。



横坐标为富集因子 (Rich Factor), 表示差异表达基因中注释到某通路的基因比例与所有基因中注释到该通路的基因比例的比值。纵坐标表示通路名称; 圆圈的大小表示通路中富集的基因数目, 圆圈越大, 表示基因越多; 圆圈的颜色代表 q value

The x-axis indicated rich factor of DEGs, which represent percentages of DEGs belong to the corresponding pathway. The left y-axis represented the pathways. The sizes of bubble represent the number of DEGs in the corresponding pathway, and the colors of the bubble represent the enrichment q value of the corresponding pathway

图 4 差异表达基因 KEGG 通路富集图

Fig. 4 KEGG enrichment map of DEGs

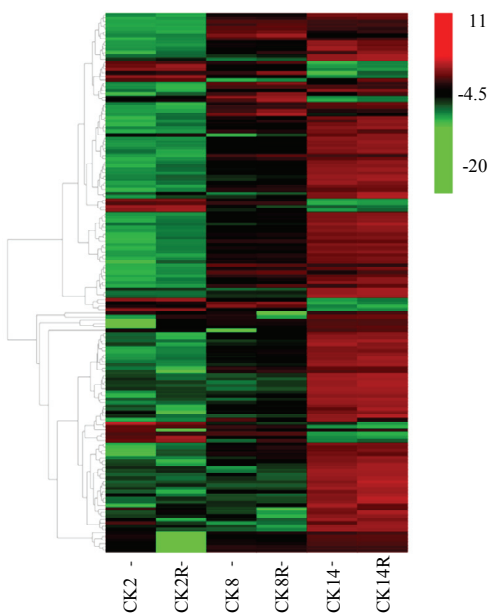


图 5 苯丙烷类相关的不同萌发吸水阶段间差异表达基因的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of phenylpropanoids-related DEGs between different water uptake stages of germination

3 讨论

3.1 谷种萌发相关代谢途径

植物生长发育始于种子萌发。种子萌发是植物恢复新的生命周期的一个复杂过程，涉及一系列生

长代谢和合成途径，以及分子、生理、生化和形态上的变化，如随着水吸入干种子细胞，呼吸强度明显增高、暂时的膜结构扰动、主要储存物质活化、多聚体的重聚、已形成 mRNAs 的翻译、新 mRNA 的合成、细胞膜和 DNA 的修复等^[35-36]。本研究比较谷子种子不同吸水阶段的转录物组差异，发现大量表达差异表达基因 COG 富集于碳水化合物转运和代谢、转录、复制重组和修复、翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣等途径。而 GO 富集更进一步将其聚焦于萌动种子对周围环境条件的感应，如对寒冷、缺水、缺氧、干枯、氧化压力、karrikin 等的反应。并且各个阶段各有所侧重，如 Phase I -Phase II 主要涉及对油菜素内脂的反应、根毛伸长、甾醇生物合成和水转运 4 个通路；Phase II -Phase III 主要集中氮的转运、油菜素类固醇生物合成、真菌防御反应、乙酰辅酶 A 代谢和细胞板形成引起的细胞分裂通路；Phase I -Phase III 主要与冷反应、植物型细胞壁松弛、油菜素类固醇生物合成、根毛伸长、DNA 复制起始。而 KEGG 富集将 3 个比较的差异表达基因显著富集于苯丙氨酸代谢、苯丙烷生物合成、淀粉和蔗糖代谢通路。这与许冰霞等^[13]分析谷子萌发期响应干旱胁迫的基因表达谱结果一致，PEG 胁迫处理 10 和 18 h 的谷子种子差异表达基因参与到苯丙烷生物合成过程。盐胁迫条件下，培养 7 d 去掉胚根胚芽的豫谷 2 和安 04 的萌发种子的 KEGG 富集分析也发现，上调 DEGs 主要富集于植物激素信号转导、精氨酸及脯氨

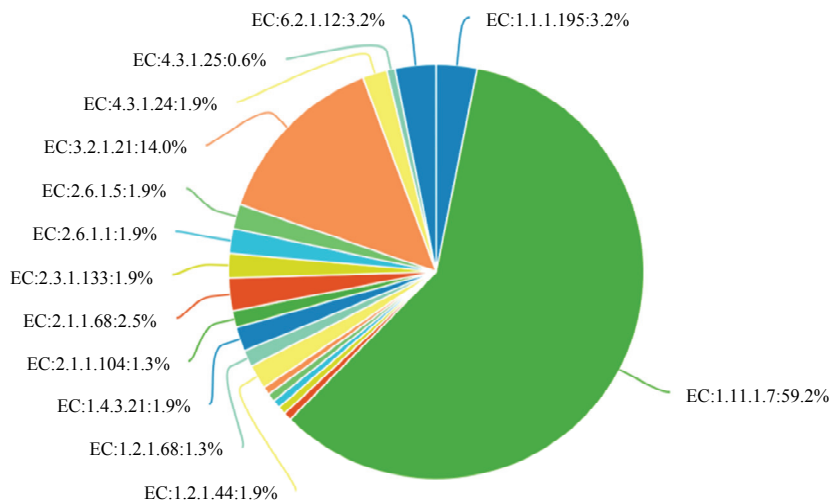


图 6 苯丙烷类相关的不同萌发吸水阶段间差异表达基因的功能分类

Fig. 6 Function classification of phenylpropanoids-related DEGs between different water uptake stages of germination

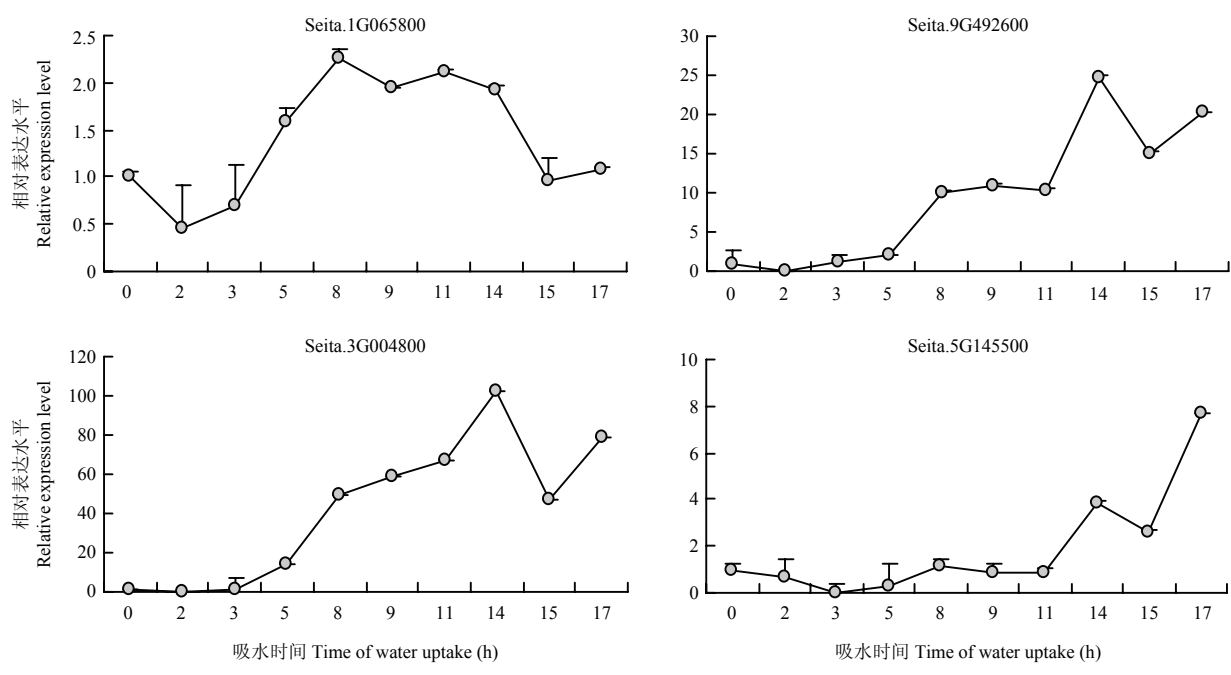


图 7 苯丙烷类相关基因在不同萌发吸水时期的 qRT-PCR 表达分析

Fig. 7 Expression analysis of phenylpropanoids-related genes by qRT-PCR at different water uptake periods of germination

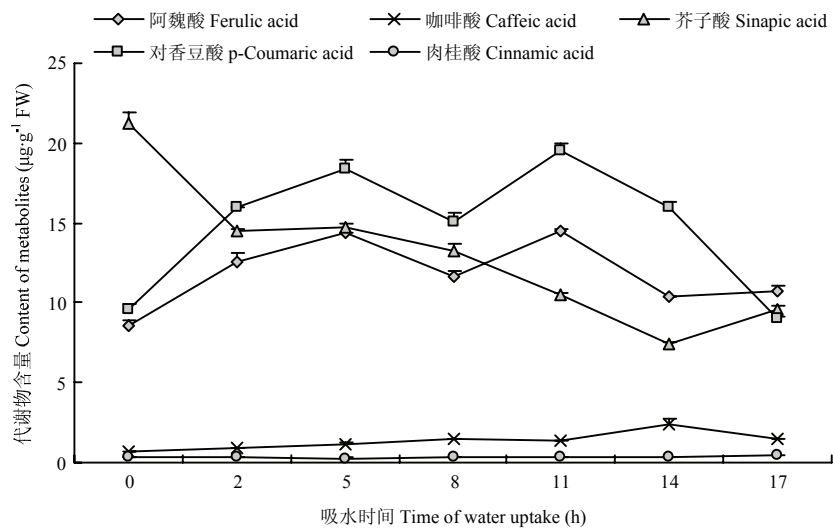


图 8 苯丙烷类相关代谢物不同萌发吸水时期含量变化

Fig. 8 Changes in the content of phenylpropanoids-related metabolites during water uptake stage in germinating seeds

酸代谢、淀粉及糖代谢、次生代谢物合成等途径；下调 DEGs 主要富集在氨基酸合成、甘油磷脂代谢、苯丙烷合成等代谢途径^[14]。

3.2 植物苯丙烷生物合成途径及其基因

苯丙氨酸代谢是苯丙烷生物合成的上游途径，为苯丙烷类合成提供前体。苯丙烷生物合成和苯丙氨酸

代谢途径涉及一系列的基因，纵观其代谢图（K00940 和 K00360）主要基因有苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia lyase, EC4.3.1.24 和 EC4.3.1.25)、4-香豆酸-CoA 连接酶（4-coumarate-CoA ligase, EC6.2.1.12）、肉桂酰-CoA 还原酶（Cinnamoyl-CoA reductase, EC1.2.1.44）、肉桂醇脱氢酶（cinnamyl alcohol

dehydrogenase, EC1.1.1.195)、过氧化物酶(peroxidase, EC1.11.1.7) 等。苯丙氨酸解氨酶 (PAL)催化 L-苯丙氨酸直接脱氨产生反式肉桂酸, 是苯丙烷生物合成途径的关键酶和限速酶, 在病原物侵害、伤害、营养缺乏、紫外线辐射、极端温度等条件下被诱导^[16,21,39-45], 并且涉及水杨酸的合成^[46-48]。过氧化物酶是一个多基因家族, 有非常多家族成员, 催化 H_2O_2 和各种还原物的氧化还原反应, 参与各种复杂生理过程^[49-50], 如激素代谢^[51]、活性氧和活性氮代谢^[52]、植物疾病防御等^[51,53-54]。植物所特有的过氧化物酶为 ClassIII过氧化物酶 (POX, EC1.11.1.7), 是苯丙烷生物合成途径的下游基因, 涉及分泌途径、液泡^[55-56], 细胞壁化合物聚合、抵御病原体攻击、耐盐性、氧化应激、植物激素和生物碱代谢、棉纤维伸长和枝根发育等^[50-51,57-60]。本研究谷子种子不同吸水阶段的差异表达基因功能富集分析结果表明, 谷子萌发与苯丙氨酸代谢和苯丙烷生物合成途径密切相关, 筛选到 157 个与 2 个途径相关的差异表达基因, 如过氧化物酶 (peroxidase, EC:1.11.1.7)、 β -葡萄糖苷酶 (beta-glucosidase, EC:3.2.1.21)、4-香豆酰-辅酶 A 连接酶 (4-coumarate--CoA ligase, EC:6.2.1.12)、肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl alcohol dehydrogenase, EC:1.1.1.195)、咖啡酸 3-O-甲基转移酶 (caffeic acid 3-O-methyltransferase, EC:2.1.1.68)、苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia lyase, PAL, EC4.3.1.24) 和肉桂酰-CoA 还原酶 (cinnamoyl-CoA reductase, CCR, EC1.2.1.44) 等。过氧化物酶 (EC:1.11.1.7) 基因共检测到 157 个, 其中 93 个与苯丙烷生物合成和苯丙氨酸代谢相关, 占全部苯丙烷生物合成和苯丙氨酸代谢途径相关差异表达基因的占 59.2%。相似结果出现低温萌发蓖麻转录物组中, WANG 等^[15]发现苯丙烷生物合成相关基因 *phenylalanine ammonia-lyase*、*4-coumarate--CoA ligase 2*、*Peroxidase 52 precursor*、*Peroxidase 73 precursor*、*Cationic peroxidase 2 precursor* 出现显著下调。许冰霞等^[13]分析 PEG 干旱胁迫处理 10 和 18 h 谷子萌发种子基因表达谱, 获知 PAL 可能在 PEG 胁迫下调节种子的萌发。显然苯丙烷生物合成和苯丙氨酸代谢相关基因在谷子萌发吸水过程中被精密调控, 特别是 POX 家族成员可能在谷子萌发木质素合成、细胞壁的形成、根系伸长过程中发挥重要作用。

3.3 植物苯丙烷类相关代谢物

植物中苯丙烷生物合成途径的形成是植物防御非生物和生物胁迫的长期进化结果^[37]。苯丙烷生物

合成途径可催化苯丙氨酸形成反式肉桂酸、香豆酸、阿魏酸等多种酚类化合物。目前已知苯丙烷及其相关代谢物, 如肉桂酸、阿魏酸、芥子酸等, 是抑制种子萌发的重要的他感物质^[38]。为此本研究分析了不同吸水阶段谷子萌发种子中几种他感物质的含量, 发现在未萌发种子中含有大量芥子酸, 在萌发过程中呈下调趋势, 阿魏酸、对香豆酸和咖啡酸呈先上调后下调趋势, 肉桂酸保持恒定, 暗示芥子酸和苯丙烷生物合成途径可能在种子萌发启动过程中发挥重要作用。

4 结论

谷子萌发开始快速吸水阶段、滞缓吸水阶段、重新大量吸水阶段的苯丙烷生物合成和苯丙氨酸代谢途径及其中间产物、基因在谷子萌发过程中发挥重要调控作用, 特别是芥子酸可能参与调控种子的休眠与萌发, 在未萌动种子中大量储备, 萌发吸水过程中显著下调; 上游基因 4-香豆酰-辅酶 A 连接酶在未萌发种子中存在已形成 mRNA, 在萌发吸水阶段呈先下调后上调再下调表达趋势; 下游基因过氧化物酶家族成员也参与谷子萌发过程。

References

- [1] BEWLEY J D, BLACK M. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. New York: Plenum Press, 1994.
- [2] 毕辛华, 戴心维. 种子学. 北京: 农业出版社, 1993.
BI X H, DAI X W. *Seed Science*. Beijing: Agricultural Press, 1993. (in Chinese)
- [3] BEWLEY J D. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 1997, 9: 1055-1066.
- [4] 张锦鹏, 王茅雁, 白云凤, 贾晋平, 王国英. 谷子品种抗旱性的苗期快速鉴定. 植物遗传资源学报, 2005(1): 59-62.
ZHANG J P, WANG M Y, BAI Y F, JIA J P, WANG G Y. Rapid evaluation on drought tolerance of foxtail millet at seedling stage. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005(1): 59-62. (in Chinese)
- [5] 朱学海. 谷子耐旱资源筛选及其遗传多样性分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
ZHU X H. Selecting drought resources and its analysis of genetic diversity in foxtail millet[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008. (in Chinese)
- [6] 秦岭, 杨延兵, 管延安, 张华文, 王海莲, 刘宾, 陈二影. 不同生态区主要育成谷子品种芽期耐旱性鉴定. 植物遗传资源学报, 2013, 14(1): 146-151.

- QIN L, YANG Y B, GUAN Y A, ZHANG H W, WANG H L, LIU B, CHEN E Y. Identification of drought tolerance at germination period of foxtail millet cultivars developed from different ecological regions. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(1): 146-151. (in Chinese)
- [7] BHEEMESH S J, SUBBA RAO M, REDDI SEKHAR M, LATHA P. Effect of PEG-induced drought stress on germination early seedling growth of foxtail millet varieties. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018, special issue-6: 2674-2681.
- [8] 王春梅, 闫双堆, 卜玉山, 刘利军, 张乃于. As 对谷子萌发、幼苗生长及抗氧化酶系统的影响. *水土保持学报*, 2018, 32(6):354-360.
- WANG C M, YAN S D, BU Y S, LIU L J, ZHANG N Y. Effect of As stress on millet germination, seedling growth and antioxidant system. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2018, 32(6): 354-360. (in Chinese)
- [9] 裴帅帅, 尹美强, 温银元, 黄明镜, 张彬, 郭平毅, 王玉国, 原向阳. 不同品种谷子种子萌发期对干旱胁迫的生理响应及其抗旱性评价. *核农学报*, 2014, 28(10): 1897-1904.
- PEI S S, YIN M Q, WEN Y Y, HUANG M J, ZHANG B, GUO P Y, WANG Y G, YUAN X Y. Physiological response of foxtail millet to drought stress during seed germination and drought resistance evaluation. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(10): 1897-1904. (in Chinese)
- [10] 杨净, 王宏富, 鱼冰星, 李智, 王钰云. 超重力对谷子种子萌发及生理生化特性的影响. *激光生物学报*, 2018, 27(4): 83-88.
- YANG J, WANG H F, YU B X, LI Z, WANG Y Y. Effects of hypergravity on seed germination and physiological and biochemical characteristics of foxtail millet. *Acta Laser Biology Sinica*, 2018, 27(4): 83-88. (in Chinese)
- [11] TANG S, LI L, WANG Y, CHEN Q, ZHANG W, JIA G, ZHI H, ZHAO B, DIAO X. Genotype-specific physiological and transcriptomic responses to drought stress in *Setaria italica* (an emerging model for Panicoideae grasses). *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10009.
- [12] 窦祎凝, 秦玉海, 闵东红, 张小红, 王二辉, 刁现民, 贾冠清, 徐兆师, 李连城, 马有志, 陈明. 谷子转录因子 SiNAC18 通过 ABA 信号途径正向调控干旱条件下的种子萌发. *中国农业科学*, 2017, 50(16): 3071-3081.
- DOU Y N, QIN Y H, MIN D H, ZHANG X H, WANG E H, DIAO X M, JIA G Q, XU Z S, LI L C, MA Y Z, CHEN M. Transcription factor SiNAC18 positively regulates seed germination under drought stress through ABA signaling pathway in foxtail millet (*Setaria italic* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(16): 3071-3081. (in Chinese)
- [13] 许冰霞, 尹美强, 温银元, 裴帅帅, 柯贞进, 张彬, 原向阳. 谷子萌发期响应干旱胁迫的基因表达谱分析. *中国农业科学*, 2018, 51(8): 1431-1447.
- XU B X, YIN M Q, WEN Y Y, PEI S S, KE Z J, ZHANG B, YUAN X Y. Gene expression profiling of foxtail millet (*Setaria italica* L.) under drought stress during germination. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(8): 1431-1447. (in Chinese)
- [14] 潘教文, 李臻, 王庆国, 管延安, 李小波, 戴绍军, 丁国华, 刘炜. NaCl 处理谷子萌发期种子的转录组学分析. *中国农业科学*, 2019, 52(22): 3964-3975.
- PAN J W, LI Z, WANG Q G, GUAN Y A, LI X B, DAI S J, DING G H, LIU W. Transcriptomics analysis of NaCl response in foxtail millet (*Setaria italica* L.) seeds at germination stage. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(22): 3964-3975. (in Chinese)
- [15] WANG X, WANG L J, YAN X C, WANG L, TAN M L, GENG X X, WEI W H. Transcriptome analysis of the germinated seeds identifies low-temperature responsive genes involved in germination process in *Ricinus communis*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(1): 6.
- [16] DIXON R A. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell Online*, 1995, 7: 1085-1097.
- [17] LA CAMERA S, GOUZERH G, DHONDT S, HOFFMANN L, FRITIG B, LEGRAND M, HEITZ T. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: The contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews*, 2004, 198: 267-284.
- [18] VOGT T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 2010, 3: 2-20.
- [19] LIU X Y, WANG P P, WU Y F, CHENG A X, LOU H X. Cloning and functional characterization of two 4-coumarate: CoA ligase genes from *Selaginella moellendorffii*. *Molecules*, 2018, 23: 595.
- [20] HAHNBROCK K, SCHEEL D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1989, 40: 347-369.
- [21] KIM D S, HWANG B K. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL1*) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(9): 2295-2306.
- [22] KIM D, PERTEA G, TRAPNELL C, PIMENTEL H, KELLEY R, SALZBERG S L. TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 2013, 14: R36.
- [23] FLOREA L, SONG L, SALZBERG S L. Thousands of exon skipping events differentiate among splicing patterns in sixteen human tissues.

- F1000Research*, 2013, 2: 188.
- [24] SCHULZE S K, KANWAR R, GÖLZENLEUCHTER M, THERNEAU T M, BEUTLER A S. SERE: Single-parameter quality control and sample comparison for RNA-Seq. *BMC genomics*, 2012, 13(1): 524.
- [25] ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology*, 2010, 11(10): R106.
- [26] 邓泱泱, 荔建琦, 吴松峰, 朱云平, 陈耀文, 贺福初. nr 数据库分析及其本地化. 计算机工程, 2006, 32(5): 71-74.
- DENG Y Y, LI J Q, WU S F, ZHU Y P, CHEN Y W, HE F C. Integrated nr database in protein annotation system and its localization. *Computer Engineering*, 2006, 32(5): 71-74. (in Chinese)
- [27] APWEILER R, BAIROCH A, WU C H, BARKER W C, YE H L S L. Uniprot: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(D1): D115-D119.
- [28] KANEHISA M, GOTO S, KAWASHIMA S, OKUNO Y, HATTORI M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*, 2004(32): D277-D280.
- [29] TATUS R L, GALPERIN M Y, NATALE D A, KOONIN E V. The COG database: A tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 33-36.
- [30] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY J M, DAVIS A P, DOLINSKI K, DWIGHT S S, EPPIG J T, HARRIS M A, HILL D P, ISSEL-TARVER L, KASARSKIS A, LEWIS S, MATESE J C, RICHARDSON J E, RINGWALD M, RUBIN G M, SHERLOCK G. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Gene*, 2000, 25(1): 25-29.
- [31] ALEXA A, RAHNENFUHRER J. topGO: Enrichment analysis for gene ontology. R package version 2.8, 2010.
- [32] SUPEK F, BOŠNJAK M, ŠKUNCA N, ŠMUC T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of Gene Ontology terms. *PLoS ONE*, 2011, 6: e21800
- [33] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29: 900.
- [34] MOLNÁR-PERL I, FÜZFAI Z. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1073: 201-227.
- [35] CATUSSE J, JOB C, JOB D. Transcriptome- and proteome-wide analyses of seed germination. *Comptes Rendus Biologies*, 2008, 331: 815-822.
- [36] RAJJOUL L, DUVAL M, GALLARDO K, CATUSSE J, BALLY J, JOB C, JOB D. Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63: 507-533.
- [37] FERRER J L, AUSTIN M B, STEWART C J R, NOEL J P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008, 46: 356-370.
- [38] REIGOSA M J, MALVIDO-PAZOS E. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. *Journal of Chemical Ecology*, 2007, 33: 1456-1466.
- [39] EDWARDS K, CRAMER C L, BOLWELL G P, DIXON R A, SCHUCH W, LAMB C J. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1985, 82: 6731-6735.
- [40] LIANG X W, DRON M, CRAMER C L, DIXON R A, LAMB C J. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264: 14486-14492.
- [41] LIANG X W, DRON M, SCHMID J, DIXON R A, LAMB C J. Developmental and environmental regulation of a phenylalanine ammonia-lyase- β -glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1989, 86: 9284-9288.
- [42] HUANG J, GU M, LAI Z, FAN B, SHI K, ZHOU Y H, YU J Q, CHEN Z. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 2010, 153: 1526-1538.
- [43] PAYYAVULA R S, NAVARRE D A, KUHLMANN J C, PANTOJA A, PILLAI S S. Differential effects of environment on potato phenylpropanoid and carotenoid expression. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 39.
- [44] JIN Q, YAO Y, CAI Y, LIN Y. Molecular cloning and sequence analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Dendrobium*. *PLoS ONE*, 2013, 8: e62352.
- [45] MACDONALD M J, D'CUNHA G B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 85: 273-282.
- [46] MAUCH-MANI B, SLUSARENKO A J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell*, 1996, 8: 203-212.
- [47] NUGROHO L H, VERBERNE M C, VERPOORTE R. Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, 40: 775-760.

- [48] CHAMAN M E, COPAJA S V, ARGANDONA V H. Relationships between salicylic acid content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and resistance of barley to aphid infestation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 2227-2231.
- [49] PASSARDI F, LONGET D, PENEL C, AND DUNAND C. The class III peroxidase multigenic in land plants family in rice and its evolution. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1879-1893.
- [50] PASSARDI F, COSIO C, PENEL C, AND DUNAND C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 2005, 24: 255-265.
- [51] HIRAGA S, SASAKI K, ITO H, OHASHI Y, MATSUI H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, 2001, 42(5): 462-468.
- [52] ALMAGRO L, GÓMEZ ROS L V, BELCHI-NAVARRO S, BRU R, ROS BARCELÓ A, PEDREÑO M A. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(2): 377-390.
- [53] HILAIRE E, YOUNG S A, WILLARD L H, MCGEE J D, SWEAT T, CHITTOOR J M, GUIKEMA J A, LEACH J E. Vascular defense responses in rice: Peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(12): 1411-1419.
- [54] COEGO A, RAMIREZ V, ELLUL P, MAYDA E, VERA P. The H₂O₂-regulated Ep5C gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. *The Plant Journal*, 2005, 42(2): 283-293.
- [55] WELINDER K G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 1992, 2: 388-393.
- [56] WELINDER K G, JUSTESEN A F, KJÆRSGÅRD I V H, JENSEN R B, RASMUSSEN S K, JEPERSEN H M, DUROUX L. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269: 6063-6081.
- [57] GABALDÓN C, LÓPEZ-SERRANO M, PEDREÑO M A, ROS BARCELÓ A. Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involves in lignin biosynthesis. *Plant Physiology*, 2005, 139: 1138-1154.
- [58] PASSARDI F, TOGNOLLI M, DE MEYER M, PENEL C, DUNAND C. Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta*, 2006, 223: 965-974.
- [59] COSTA, M M, HILLIOU F, DUARTE P, PEREIRA L G, ALMEIDA I, LEECH M, MEMELINK J, BARCELÓ A R, SOTTOMAYOR M. Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*, 2008, 146: 403-417.
- [60] MEI W, QIN Y, SONG W, LI J, ZHU Y. Cotton GhPOX1 encoding plant class III peroxidase may be responsible for the high level of reactive oxygen species production that is related to cotton fiber elongation. *Journal of Genetics and Genomics*, 2009, 36: 141-150.
- (责任编辑 李莉)