中国油料作物学报
Chinese Journal of Oil Crop Sciences
2026,48(4):47-57
doi:10.19802/j.issn.1007-9084.2025278

大豆PAH基因家族鉴定及其非生物胁迫和激素处理响应分析

李梓琪[1],刘新宇[1],王嘉珩[1],于涵[1],高迪[1],王博[1],李鹏宇[1],周洪成[1],徐瑞鸿[1],魏金鹏[2],费志宏[1],徐晶宇[1*]
(1. 黑龙江八一农垦大学农学院,黑龙江 大庆,163319;
2. 黑龙江八一农垦大学园林园艺学院,黑龙江 大庆,163319)

摘要:磷脂酸磷酸水解酶(phosphatidic acid hydrolase, PAH)是催化磷脂酸去磷酸化产生二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)的关键酶。为挖掘大豆PAH家族基因的功能,本研究利用全基因组鉴定到7个*GmPAH*基因,根据进化关系分为Cluster Ⅰ和Cluster Ⅱ亚家族;染色体定位显示7个*GmPAH*基因均匀分布在3、4、6、10、13、17和19染色体上;编码的氨基酸长度在183~917个氨基酸残基,分子量在58 857.39 Da~101 832.68 Da;实时荧光定量PCR结果表明*GmPAH*的表达受低温、甘露醇和茉莉酸胁迫的影响,其中在低温胁迫下,*GmPAH1*、*GmPAH3*、*GmPAH4*和*GmPAH7*基因显著上调;除*GmPAH5*和*GmPAH6*外,其他成员在茉莉酸处理下显著上调表达;*GmPAH1*、*GmPAH2*、*GmPAH3*、*GmPAH4*和*GmPAH7*基因在甘露醇胁迫后下调表达。以上结果表明*GmPAH*基因广泛参与大豆非生物胁迫响应和激素响应。

关键词:大豆;GmPAH基因家族;生物信息学;非生物胁迫;激素处理
中图分类号:S565.1　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1007-9084(2026)04-0047-11

Identification of soybean PAH gene family and its response to abiotic stress and hormone treatments

LI Zi-qi[1], LIU Xin-yu[1], WANG Jia-heng[1], YU Han[1], GAO Di[1], WANG Bo[1], LI Peng-yu[1], ZHOU Hong-cheng[1], XU Rui-hong[1], WEI Jin-peng[2], FEI Zhi-hong[1], XU Jing-yu[1*]
(1. *College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing* 163319, *China*; 2. *College of Garden and Horticulture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing* 163319, *China*)

Abstract: Phosphatidic acid hydrolase (PAH) is a key enzyme that catalyzes the dephosphorylation of phosphatidic acid to diacylglycerol. To explore the potential functions of PAH family genes in soybean, 7 *GmPAH* genes were identified by genome-wide identification, which were divided into Cluster Ⅰ and Cluster Ⅱ subfamilies according to the evolutionary relationship. Chromosome mapping showed that 7 *GmPAH* genes were evenly distributed on chromosomes 3, 4, 6, 10, 13, 17 and 19. Their coding length are 183 to 917 amino acids, with molecular weight 58 857.39 Da to 101 832.68 Da. Real-time fluorescence quantitative PCR results showed that *GmPAH* expression was affected by low temperature, mannitol and jasmonate acid stress. Among them, *GmPAH1*, *3*, *4* and *7* genes were significantly up-regulated under low temperature stress. Except for *GmPAH5* and *GmPAH6*, other members were significantly up-regulated under jasmonic acid treatment. *GmPAH1, 2, 3, 4,* and *7* were down-regulated after mannitol stress. In conclusion, *GmPAH* gene is widely involved in soybean abiotic stress response and hormone response.

Key words: soybean; GmPAH gene family; bioinformatics; abiotic stress; hormone treatment

大豆(*Glycine max*)作为全球最重要的豆科作物之一,在食品安全和粮食供应链中扮演着重要角色[1]。大豆种子中富含优质的蛋白质(35%~42%)和油脂(15%~22%)[2],为人类和动物提供了必需的

收稿日期:2025-12-09
基金项目:科技创新2030重大项目子课题(2023ZD0403202-03);黑龙江省自然基金重点项目(ZD2020C007);黑龙江八一农垦大学三横三纵重点专项(ZDZX202101);黑龙江八一农垦大学研究生创新项目(YJSCX2024-Z01)
作者简介:李梓琪(2001-),女,硕士研究生,主要从事作物分子育种研究,E-mail: 150454751330@163.com
* 通讯作者:徐晶宇,女,博士,教授,主要从事作物分子育种研究,E-mail: XujingyuHbau@163.com

营养成分。然而,大豆的生产稳定性受到多种环境胁迫因素的严重制约,包括盐碱、极端天气以及病虫害等生物胁迫[3]。这些因素不仅直接影响大豆的生长和发育,还会通过改变土壤养分有效性间接影响其生产力。从而影响到大豆生产业的高质量发展,因此发掘大豆抗逆性重要调控基因有助于揭示大豆胁迫响应的分子机制,特别是磷脂信号网络在胁迫转导中的作用,促进大豆生长和发育调控。

植物细胞中,甘油酯合成有两条独立的途径,即真核途径和原核途径[4]。磷脂酸(PA, phosphatidic acid)是所有甘油酯从头合成的前体物[5]。PA由甘油-3-磷酸(glycerol-3-phosphate, G3P)途径合成,在磷脂酸水解酶(PAP/PAH, phosphatidic acid phosphatase/ phosphatidic acid hydrolase)作用下生成二酰甘油(DAG, diacylglycerol)进而合成三酰甘油(TAG, triacylglycerol)[6,7]。植物中含有多种磷脂酸水解酶异构体,这些酶的功能在脂质代谢中发挥着重要作用[8]。PAP是调控生物体内PA和DAG含量的关键酶,根据酶的催化活性,PAP分为磷脂酸水解酶(phosphatidic acid hydrolase, PAH)和脂质酸磷酸酶(lipid phosphate phosphatase, LPP)[9]。PAH可以催化Mg^{2+}依赖的磷脂酸PA去磷酸化为DAG,由于其蛋白产物具有PA磷酸酶(磷酸水解酶)的功能,将其命名为PAH[10-13]。

PAH作为产生DAG的关键酶,对脂质代谢、细胞稳态和生长具有一定的影响[14]。2009年在拟南芥中发现酿酒酵母PAH1的同源直系物*PAH1*和*PAH2*[15,16]。研究发现拟南芥*atpah1 atpah2*双突变体植株幼苗中TAG含量降低,PC含量较野生型增加了47%,PA水平增加了26%,且双突变体种子的磷脂含量是野生型的两倍左右,*atpah1 atpah2*双缺失突变体植株的花器官中PA含量显著上升,花器官发育受阻[17,18]。*AtPAH1*和*AtPAH2*在维持叶绿体中类囊体膜的完整性并支持其光合作用活性方面发挥作用。Mietkiewska[19]等将拟南芥*PAH1*和油菜*PAH1A*在酵母*pah*突变体中表达,发现酵母*pah*突变体缺失的TAG得到补充。

有研究表明*AtPAH1*和*AtPAH2*在各组织和不同生长阶段均有表达,通过种子特异性表达*AtPAH1*和*AtPAH2*基因,转基因植株中种子发育后期和成熟种子中的TAG含量分别比野生型高20.9%和6.7%,*AtPAH1*和*AtPAH2*均在种子发育后期显著表达[20]。PA是一种重要的脂质信号分子,而PAH以PA作为唯一底物,能响应各种环境信号,对植物生长发育具有调控作用[21]。有研究学者发现*PAH*也参与逆境响应,低氮胁迫下,*atpah1 atpah2*突变体植株的DAG和TAG含量比野生型低,*AtPAH1*和*AtPAH2*过表达植株中的含量高于野生型,且三种植株的DAG脂肪酸组成有所不同,表明*PAH*缺乏或过表达会破坏DAG合成流程[17]。在$NaHCO_3$(100 mmol/L)胁迫下,玉米根系中*ZmPAH1*基因表达量在处理后24 h和72 h显著上调。*PAH*还响应低温胁迫,4℃低温处理玉米根系,*ZmPAH1*上调倍数达5倍以上[22,23]。目前关于大豆*PAH*的研究报道相对较少,仅在改善油含量和百粒重方面展开研究[24],但其在激素及非生物胁迫后的响应分子机制未被探索。

本研究通过全基因组鉴定和生物信息学分析大豆*GmPAH*基因,明确*GmPAH*基因在植物激素JA、ABA、SA和BR处理以及盐、碱、低温和甘露醇非生物胁迫后的表达模式,有助于理解大豆响应逆境胁迫的分子机制,为大豆抗逆改良提供了潜在的候选基因靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种为东农50(DN50)。挑选籽粒饱满的大豆种子,用5%次氯酸钠(NaClO)溶液消毒20 min后,立即用无菌水反复冲洗干净,置于装有无菌棉的培养瓶中催芽。每隔6 h用无菌水冲洗种子,3 d后选取发芽一致的大豆种子,用无菌水清洗根部后,移入营养土中进行培养。培养条件:温度25℃(白天)/20℃(夜晚),光照时间为14 h(光照)/10 h(黑暗),光照强度为15 000 lx,相对湿度为65%±10%,参照已报道的文献,试验设计4种非生物胁迫处理(冷、盐、碱和渗透胁迫)和4种激素处理(脱落酸、茉莉酸、油菜素内酯和水杨酸处理)[25]。4℃、150 mmol/L NaCl、100 mmol/L $NaHCO_3$和200 mmol/L甘露醇分别模拟冷、盐、碱和渗透胁迫。待幼苗生长至V1时期(第一个三出复叶完全展开)时,分别施用150 mmol/L NaCl、100 mmol/L $NaHCO_3$和200 mmol/L甘露醇[26,27],4种激素按100 μmol/L施用[28],在处理0、1、3、6、12、24和48 h时收集同一部位的叶片,迅速置于液氮中冷冻,后置于-80℃保存,以备后续RNA的提取[29]。以0 h作为对照,每个处理及每个时间点至少3次生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 大豆PAH家族成员鉴定及理化性质分析 通过文献获得拟南芥PAH蛋白登录号及蛋白序列,

在 Phytozome 数据库(https://phytozome. jgi. doe. gov/pz/portal)中以拟南芥 AtPAH1、AtPAH2 蛋白序列为递交序列,进行 BlastP 比对,与大豆有同源序列的基因为候选基因。此外,利用 SMART(https://smart. embl. de/)筛选 PAH 结构域,去除冗余后,最终得到 GmPAH 基因家族成员。使用 TBtools 软件预测大豆 PAH 基因家族的蛋白质长度、等电点、分子量和平均亲水性等[30],并用 WolF PSORT 网站(https:// wolfpsort. hgc. jp/)进行亚细胞定位预测。

1.2.2 系统发育树的构建和基因结构分析 为了确定不同物种间 PAH 基因家族的进化关系,将 7 条大豆、2 条拟南芥、2 条番茄、2 条水稻和 2 条玉米的 PAH 蛋白序列整合,使用 MEGA 软件中的 ClustalW 工具进行序列比对[31,32],选择最大自然标记法(maximum-likelihood, ML)构建进化树,为更直接观察物种间进化树的结构关系,用 ITOL(https://itol. embl. de/)进行美化[33]。

1.2.3 GmPAH 基因家族结构及蛋白质保守基序分析 利用 MEME(https://meme-suite. org/meme/doc/meme. html)在线工具预测大豆 PAH 蛋白保守基序,设置 motif 值为 15,并保持其他参数值为默认状态[34]。获得大豆 PAH 家族的内含子及外显子位置和数量信息。利用 TBtools 软件绘制 GmPAH 蛋白保守基序、外显子-内含子、结构域和进化树综合图[35]。

1.2.4 *GmPAH* 基因启动子顺式作用元件分析 通过 TBtools 软件从大豆全基因组文件中提取大豆 *PAH* 基因启动子上游 1500bp 序列[36],进一步提交至 Plant CARE(http://bioinformatics. psb. ugent. be/webtools/plantcare/html/)网站预测大豆 PAH 家族顺式作用元件[37],去除无功能的顺式元件,最后计算起始位点和终止位点间距,得到参与植物生长发育、植物激素调控和响应非生物胁迫的顺式作用元件,利用 Excel 统计各类元件数量。用 Tbtools 进行可视化。

1.2.5 *GmPAH* 基因染色体定位和共线性分析 使用 Tbtools 软件从大豆全基因组文件中提取染色体密度和 GmPAH 家族在染色体上的位置信息,对其染色体分布进行可视化。用 Advanced Circos 工具对 *GmPAH* 物种内共线性信息进行可视化。

1.2.6 GmPAH 基因家族在不同组织中的表达模式 从 SoyOD(https://bis. zju. edu. cn/soyod/transcriptom/tissue)数据库下载大豆 W82 不同组织部位(叶、花和根)及不同发育时期种子的转录组数据,从中获取 GmPAH 家族成员在不同组织和不同发育期种子的表达量数据,使用 Tbtools 中 heatmap 工具绘制差异表达热图。

1.2.7 RNA 提取和 RT-qPCR 采用试剂盒(Coolaber, Rapid Plant RNA Isolation Kit)提取不同激素处理和非生物胁迫后的样本 RNA,用琼脂凝胶电泳检测提取样本 RNA 的完整性。利用诺维赞试剂盒 HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)获取 cDNA,选用酶 Champagne Taq DNA Polymerase(Q711)进行 RT-qPCR,反应体系为 10 μL,其中包括上下游引物各 0.5 μL,cDNA 1 μL,PCR Mix 5 μL,ddH_2O 3 μL,PCR 反应程序设置为 95℃ 15 min;95℃ 10 s,60℃ 30 s,40 个循环,72℃ 10 min。设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复。内参基因选用前人已报道的大豆 *GAPDH* 和 *ACTIN* 基因[38]。引物由北京六合华大基因科技有限公司合成,具体引物序列见表 1。利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 *GmPAH* 基因的相对表达量[39]。

1.2.8 数据处理 使用 Excel 2016 对数据进行整理,使用 SPSS 25.0 对数据进行误差和显著性分析,

表 1 *GmPAH* 基因实时 RT-qPCR 引物

Table 1 Primers for RT-qPCR analysis of *GmPAH* genes

基因 Gene	上游引物(5′-3′) Forward primer (5′-3′)	下游引物(5′-3′) Reverse primer (5′-3′)
GmPAH1	TCACAGTCTGGAGTGGCAAG	GACAATAGCACGGGCACTCA
GmPAH2	TAATCCCAGGGGAGAGGTGG	ATGGCAGGAGGGGGTAGTTT
GmPAH3	TTTCTATTGATGCGCCGGGT	AACTTCCCCGTGAGCTTGTT
GmPAH4	CGTGGAGATTAAAAATCAAGAAGA	ACTGCAGGATGACTTGCATTA
GmPAH5	TTCAAAGGGCAGAATCCGAC	ACCGTCAACACTCACCAAGA
GmPAH6	GCGCGGTGGATATTGTTGTG	AGCTTCCCCATTACGGTTCA
GmPAH7	CGCCGTGGTATGTTCGCTT	TCAGCAACTTCAGGAGACCC
GmGAPDH	GACTGGTATGGCATTCCGTGT	GCCCTCTGATTCCTCCTTGA
GmActin	ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC	GCTGGTCCTGGCTGTCTCC

采用 t-test 和 Duncan 法进行显著性分析,使用 Graphpad prism10.0 和 TBtools 进行作图。

2 结果与分析

2.1 GmPAH 基因家族成员鉴定及理化性质分析

Phytozome 和 NCBI 数据库共鉴定到 9 个 GmPAH 蛋白,去除重复序列及冗余转录本后,保留包含 LNS2 和 Lipin-N(Lipin 和 N-terminal)两个保守结构域的序列,最终确定 7 个大豆 PAH 家族成员。根据 7 条基因在大豆 20 条染色体上的位置,将其命名为 *GmPAH1*-*GmPAH7*。统计家族成员的氨基酸数量、分子量、等电点和平均亲水性指数等基本信息(表 2)。*GmPAH* 基因长度 549 bp(*GmPAH1*)~2751 bp(*GmPAH7*),编码氨基酸长度从 183 aa(*GmPAH1*)~917 aa(*GmPAH7*),等电点 4.68(*GmPAH2*)~6.76(*GmPAH6*),分子量 58 857.39 Da(*GmPAH1*)~101 832.68 Da(*GmPAH7*)。亚细胞预测显示大多数 *GmPAH* 成员定位于细胞核和叶绿体,部分还位于线粒体、细胞质、过氧物酶体、液泡、细胞骨架和质膜中,说明 *GmPAH* 可能在多种细胞器中发挥功能。

2.2 GmPAH 基因家族成员的系统发育

为了解 *GmPAH* 基因的进化关系,对 7 个大豆与 2 个拟南芥、2 个水稻、2 个番茄、2 个玉米和 2 个高粱的 PAH 蛋白序列进行系统进化树构建(图 1)。PAH 蛋白成员分为 Cluster Ⅰ和 Cluster Ⅱ两个亚家族。Cluster Ⅰ和 Cluster Ⅱ进化支都有来自拟南芥、水稻、玉米和高粱的 PAH 蛋白成员,*AtPAH2* 与 *GmPAH2*、*3* 和 *6* 的亲缘关系最近,*AtPAH1* 与 *GmPAH1*、*4*、*5* 和 *7* 的亲缘关系较近;PAH 蛋白在进化过程中都是高度保守的,暗示它们具有特定功能相似性。

2.3 GmPAH 基因家族基因结构和保守基序分析

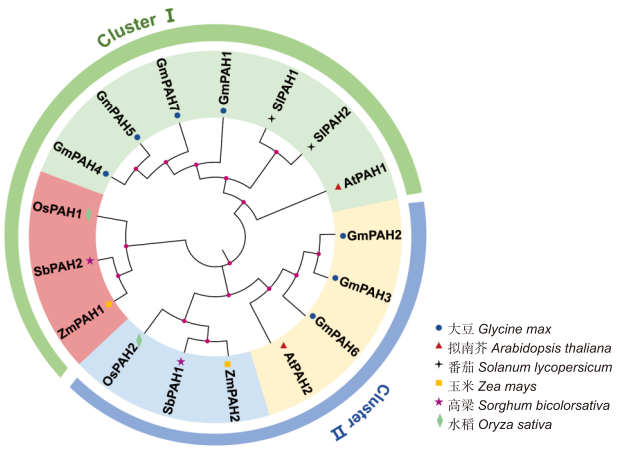


图 1 大豆、拟南芥、玉米、水稻、高粱和番茄 PAH 家族进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of PAH family in soybean, *Arabidopsis, Zea mays, Oryza sativa, Sorghum bicolorsativa and Solanum lycopersicum*

为深入了解 *GmPAH* 的基因结构和蛋白结构,对 GmPAH 蛋白的保守基序、结构域和基因结构进行分析(图 2)。鉴定到 *GmPAH* 基因在同一分支有相同的保守基序,它们之间有紧密的进化关系,GmPAH 成员均有 LNS2 和 Lipin-N(Lipin 和 N-terminal)结构域。

2.4 GmPAH 基因家族染色体定位及共线性分析

为揭示 *GmPAH* 在基因组中的分布,根据基因位置信息对 *GmPAH* 基因进行染色体定位分析(图 3)。结果显示,*GmPAH* 的 1-7 成员分别位于 3、4、6、10、13、17 和 19 号染色体上。

为揭示大豆 GmPAH 家族成员的进化关系,对 GmPAH 基因家族进行物种内共线性分析(图 4),*GmPAH1* 与 *GmPAH4*、*GmPAH5* 和 *GmPAH7* 有共线关系,*GmPAH2* 和 *GmPAH3*、*GmPAH6* 有共线关系,*GmPAH3* 和 *GmPAH6* 有共线关系,*GmPAH4* 和 *Gm-*

表 2 大豆 GmPAH 基因家族成员及理化性质分析

Table 2 Analysis of GmPAH gene family members and physicochemical properties of soybean

名称 Name	基因 ID Gene ID	染色体位置 Gene location	CDS /bp	蛋白质长度 Protein length /aa	分子量 Molecular weight /Da	等电点 PI	亚细胞定位 Subcellular localization
GmPAH1	Glyma.03G174900	Gm03:40025526..40029779 reverse	549	183	58857.39	6.16	Chlo, Mito, Cyto, Nucl
GmPAH2	Glyma.04G038200	Gm04:3023596..3033219 forward	2712	904	99258.12	4.68	Nucl, Chlo, Cyto, Pero
GmPAH3	Glyma.06G039200	Gm06:2953915..2962926 forward	2610	870	95464.03	4.79	Nucl, Chlo, Cyto, Mito
GmPAH4	Glyma.10G046400	Gm10:4122762..4131790 reverse	2676	892	98599.15	4.76	Nucl, Chlo, Vacu
GmPAH5	Glyma.13G134500	Gm13:23785778..23794068 reverse	2673	891	98440.14	4.81	Nucl, Chlo, Vacu, Cyto
GmPAH6	Glyma.17G242900	Gm17:39981312..39987506 reverse	1797	599	66830.24	6.76	Chlo, Nucl, Mito, Plas
GmPAH7	Glyma.19G175600	Gm19:44003723..44010947 reverse	2751	917	101832.68	4.7	Nucl, Chlo, Vacu

注:Chlo:叶绿体;Mito:线粒体;Cyto:细胞骨架;Nucl:细胞核;Pero:过氧化物酶体;Vacu:液泡;Plas:质膜

Note: Chlo: chloroplast; Mito: mitochondria; Cyto: cytoskeleton; Nucl: nucleus; Pero: peroxisome; Vacu: vacuole; Plas plasma membrane

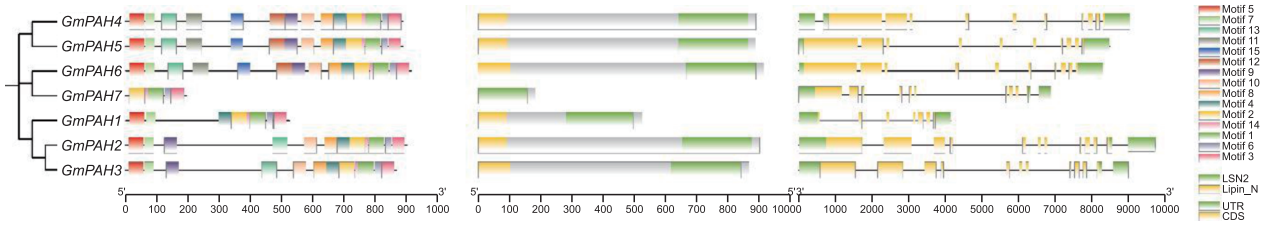


图 2　GmPAH 家族成员保守基序、保守结构域和基因结构

Fig. 2　Conserved motif, domain and gene structure of GmPAH

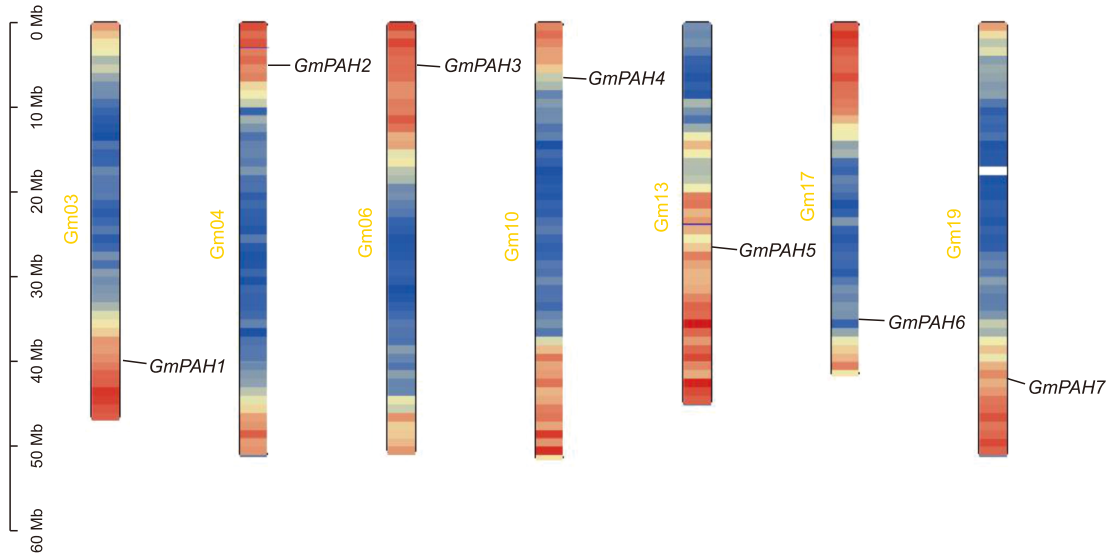


图 3　*GmPAH* 基因的 7 个成员在染色体上的分布

Fig. 3　Distribution of 7 *GmPAH* genes on chromosomes

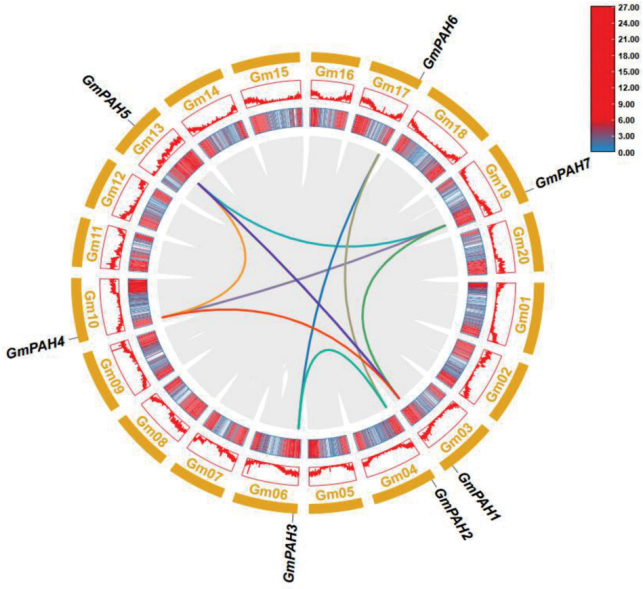


图 4　*GmPAH* 基因的 7 个成员共线性分析

Fig. 4　Collinearity analysis of 7 *GmPAH* genes

PAH5、*GmPAH7* 有共线关系，*GmPAH5* 和 *GmPAH7* 也有共线关系。

2.5　GmPAH 基因家族启动子顺式作用元件分析

为进一步揭示 *GmPAH* 基因的表达调控机制，对 *GmPAH* 基因启动子上游 1500 bp 序列进行顺式作用元件分析(图 5)。结构显示主要分为 3 大类：生物与非生物胁迫、植物生长发育和植物激素响应。生物与非生物胁迫相关的顺式作用元件有 WUN-motif、Wbox、TC-rich repeat、STRE、MYC、MYB、MBS、LTR 和 ARE，其中 *GmPAH7* 基因顺式作用元件个数最多，分为 5 类元件(ARE、MBS、MYB、MYC 和 STRE)，*GmPAH3* 基因顺式作用元件最少，仅有三类元件(MYB、MYC 和 STRE)。*GmPAH1*、*GmPAH2*、*GmPAH4*、*GmPAH5* 和 *GmPAH6* 基因分别都含有不同类别的顺式作用元件。*GmPAH1-7* 参与植物激素响应的顺式作用元件数量分别为 14、11、7、16、16、10 和 19 个，这些元件有生长素响应(TGA-element)、脱落酸响应(ABRE)、水杨酸响应(TCA-element 和 as-1)、茉莉酸甲酯响应(CGTCA-motif、TGACG-motif 和 P-box)、赤霉素响应(GARE-motif)和 ABRE 脱落酸响应；*GmPAH1*、*GmPAH2*、*GmPAH3*、*GmPAH6* 和 *GmPAH7* 基因均含有 ABRE 元件，其中 *GmPAH3* 基因包含 4 个 ABRE 元件。*GmPAH1-7* 参与植物生长发育相关的顺式作用元件数量分别是 2、3、0、1、3、4 和 4 个，这些元件有 CAT-box、TCT-motif、I-box、

GT1-motif、Box 4、ATCT-motif 和 AE-box,总体激素响应与非生物胁迫相关的顺式作用元件数量远多于植物生长发育的数量,推测 *GmPAH* 可能在非生物胁迫及植物激素调节方面发挥重要作用。

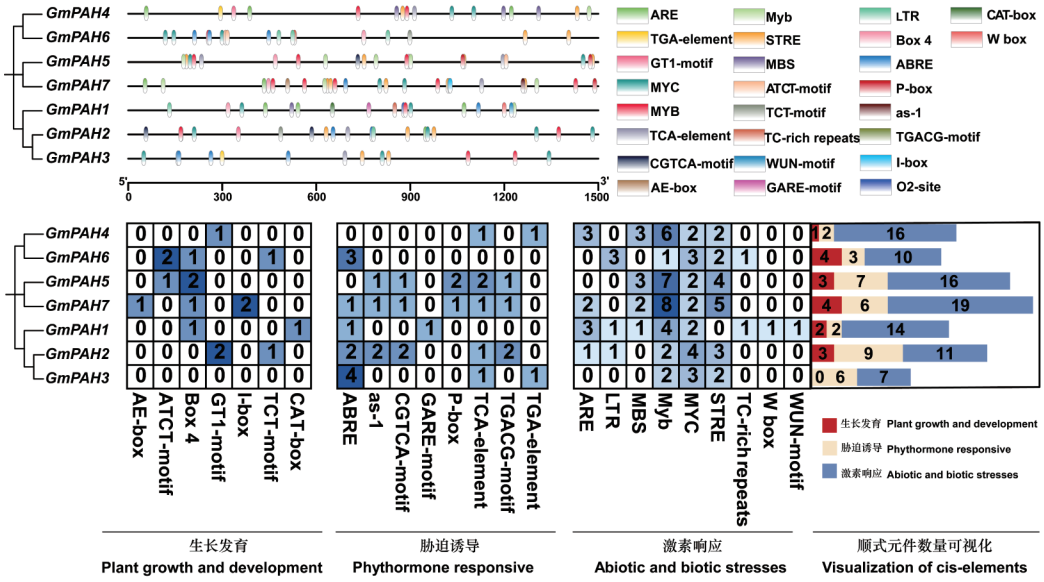
2.6 GmPAH 基因家族组织特异性表达分析

为进一步探究 GmPAH 基因家族成员是否存在组织特异性表达,根据 SoyOD 数据库中 *GmPAH* 基因的表达绘制组织表达热图,结果如图 6 所示。由图可知,*GmPAH* 在所有组织中均有表达,但其表达程度有所不一。其中,*GmPAH1* 和 *GmPAH7* 基因在所有组织和植物生长发育各时期表达水平均较低,*GmPAH1* 在花中表达水平最低,Log_2FPKM 值为 -4.29;*GmPAH7* 在种子中表达水平最低,Log_2FPKM 值为 -3.1;*GmPAH2* 和 *GmPAH3* 在荚果(R3 结荚始期到 R4 结荚盛期)、籽粒(R5 鼓粒始期到 R6 鼓粒盛期)和种子发育(种子发育期 R5 鼓粒期到 R8 成熟期)的表达水平较高,而在其他时期表达水平较低;*GmPAH6* 在 V1 三叶期(Log_2FPKM 值为 4.85)和 Podseed(Log_2FPKM 值为 3.2)时期表达量较高;*GmPAH5* 在花、叶片和根(Log_2FPKM 值分别为 3.65、3.12 和 3.09)组织部位高表达,而在种子发育时期低表达(Log_2FPKM 值为 -2.11);*GmPAH4* 在不同组织部位及不同发育时期中表达量居于中间水平。

2.7 激素处理和非生物胁迫下 *GmPAH* 的表达谱分析

为了更好地阐明 *GmPAH* 在激素应答中的生理功能,利用 RT-qPCR 技术进一步得到其对激素信号响应的瞬时表达水平差异(图 7)。该基因家族的各个成员在激素处理下的特定响应有所不同,与 0 h 相比,所有 *GmPAH* 基因均在茉莉酸(JA)处理 12 h 上调表达,其中 *GmPAH1* 在 JA 处理 12 h 表达量上调约 4 倍,*GmPAH7* 表达量上调约 5 倍。除 *GmPAH6* 外,其余基因在 JA 处理 6、12 和 24 h 均上调显著表达。在水杨酸(SA)处理后,*GmPAH2*、*3*、*4*、*5* 和 *6* 基因均表现为下调表达,并在 24 h 达到最低值。*GmPAH1* 在 SA 处理 12 h 表达量上调约 4 倍,*GmPAH7* 在 SA 处理 3 h 表达量上调约 4 倍。在 BR 处理下,*GmPAH2*、*3*、*4*、*5* 和 *6* 呈下调表达趋势,*GmPAH1* 无显著差异,表达量趋于稳定,*GmPAH7* 在 BR 处理 6 h 表达量上调约 3 倍。在 ABA 处理下 *GmPAH1* 表达量无显著变化,*GmPAH2*、*5* 和 *6* 呈下调表达趋势,其他成员则呈上调表达趋势。

为进一步揭示 *GmPAH* 在低温、盐、碱和甘露醇胁迫后的表达模式,对 7 个 *GmPAH* 基因进行 RT-



注:CAT-box 为与分生组织表达有关的元件;ABRE 为脱落酸响应元件;CGTCA-motif 和 TGACG-motif 为茉莉酸响应元件;GARE-motif、P-box 为赤霉素响应元件;as-1、TCA-element、TGA-element 为水杨酸响应元件;ARE 为抗氧化反应元件;LTR 为冷胁迫应答元件;MBS、Myb、MYC 为干旱胁迫应答元件;TC-rich repeats 为逆境应答元件;W box 为病原菌响应元件;WUN-motif 为损伤响应元件

Note: CAT-box is a component related to meristem expression ; ABRE is an abscisic acid response element ; CGTCA-motif and TGACG-motif are jasmonic acid response elements ; GARE-motif and P-box are gibberellin response elements ; as-1: TCA-element and TGA-element are salicylic acid response element ; ARE is an antioxidant response element ; lTR is a cold stress response element ; MBS, Myb and MYC are drought stress response elements ; TC-rich repeats are stress response elements ; the W box is a pathogen response element ; WUN-motif is a damage response element

图 5 *GmPAH* 基因的 7 个成员在启动子区域的顺式作用元件和数量

Fig. 5 Distribution and numeric statistics of *cis*-acting elements in *GmPAH* gene promoters

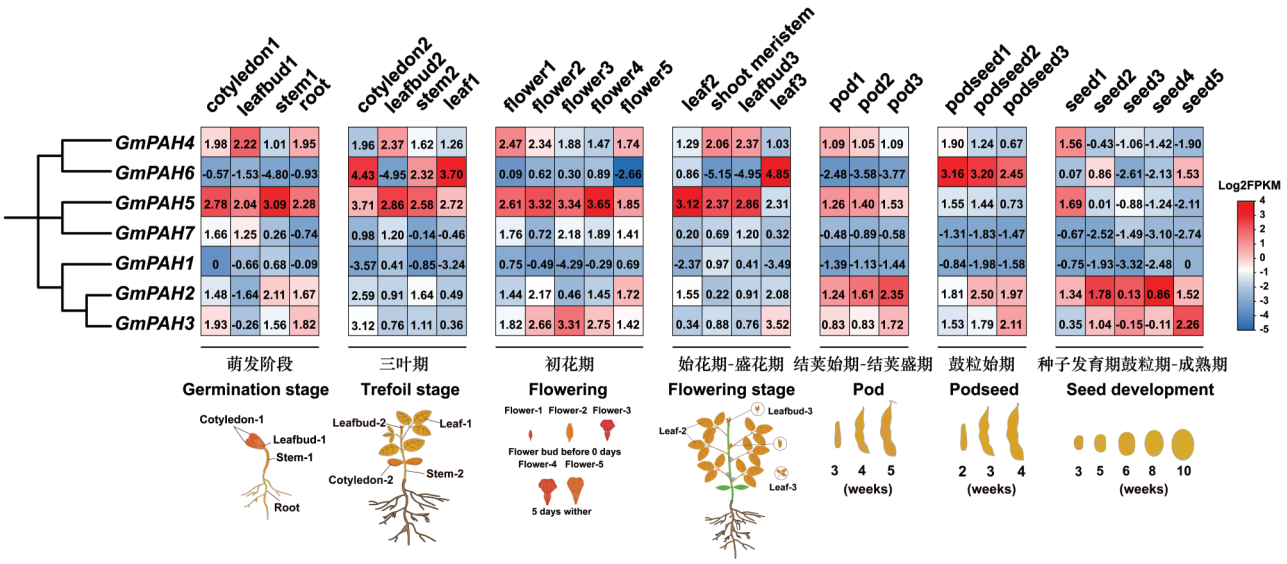
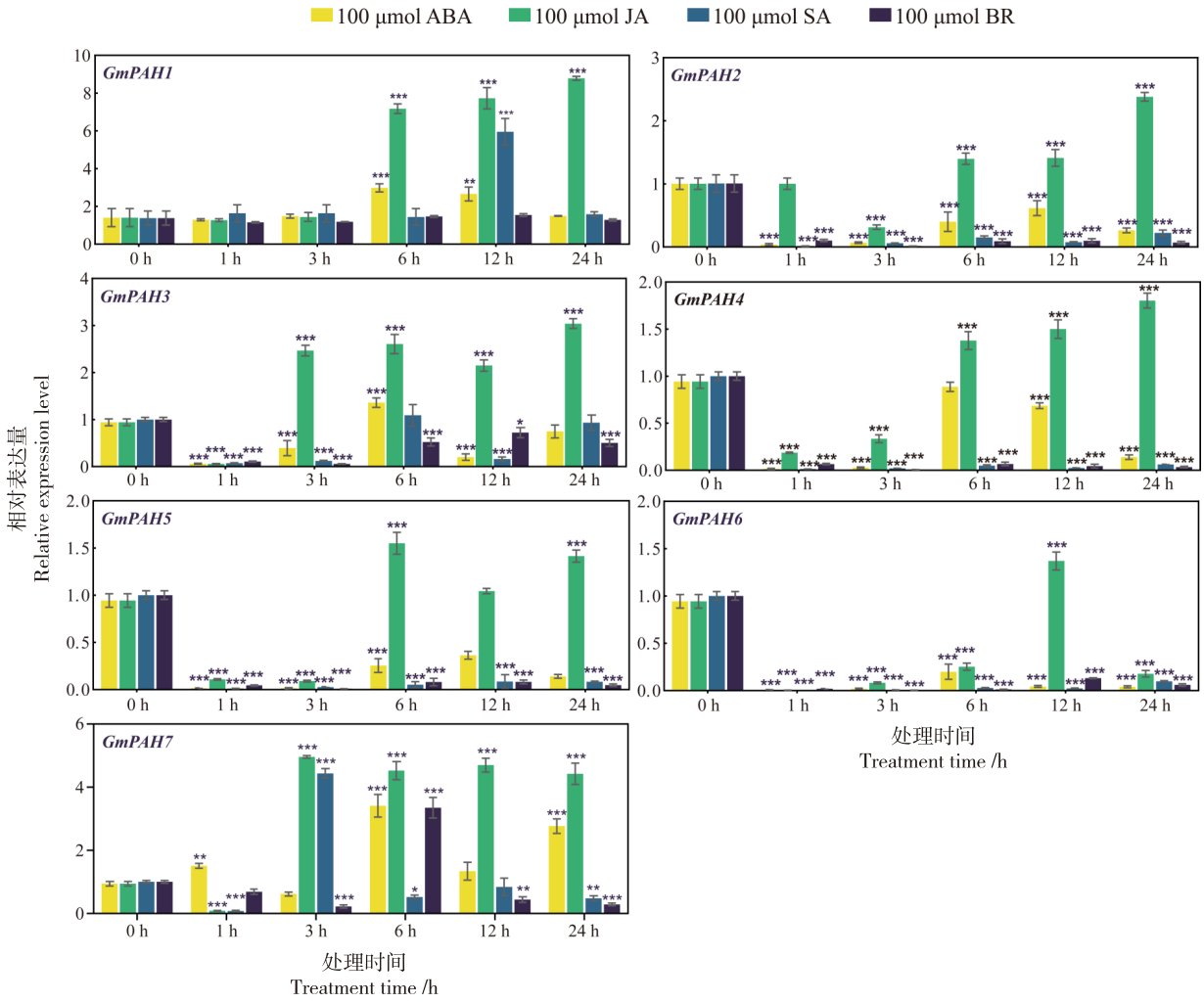


图 6　*GmPAH* 基因在不同组织的表达分析

Fig. 6　Expression analysis of *GmPAH* genes in different tissues



注:*:P< 0.05;**:P< 0.01;***:P< 0.001;ABA:脱落酸;JA:茉莉酸;SA:水杨酸;BR:油菜素内酯

Note: *: P< 0.05; **: P< 0.01; ***: P< 0.001; ABA: abscisic acid; JA: jasmonic acid; SA: salicylic acid; BR: brassin-asteroids

图 7　*GmPAH* 在激素处理下的表达模式

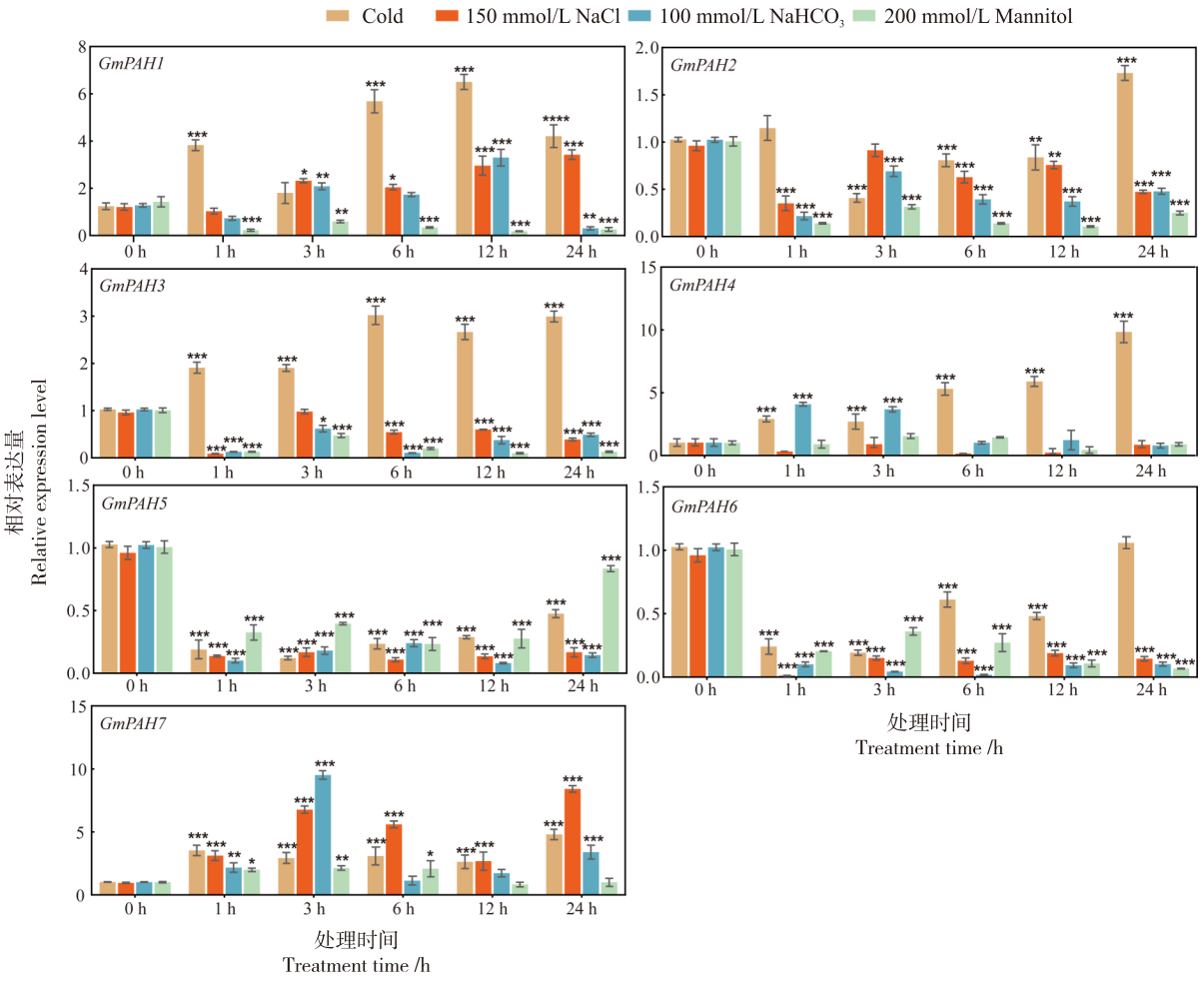
Fig. 7　Expression profiles of *GmPAH* under biotic stresses

qPCR分析。结果显示(图8),在4℃低温条件下,与0 h相比,*GmPAH1*、*2*、*3*、*4*和*7*基因均上调表达,*GmPAH1*和*GmPAH3*分别在12 h和6 h达到峰值,上调表达倍数约为6和3倍。NaCl胁迫下,*GmPAH5*和*GmPAH6*显著下调表达,下调倍数均约1倍,*GmPAH2*无显著变化,其余基因均上调表达,其中*GmPAH4*在NaCl处理后24 h表达量上调约8倍。$NaHCO_3$胁迫下,*GmPAH1*和*GmPAH4*呈上调表达趋势,*GmPAH2*、*GmPAH3*、*GmPAH5*和*GmPAH6*呈下调趋势,*GmPAH7*则呈现先上升后下降的趋势。*GmPAH*在受甘露醇刺激后,7个基因均呈现下调表达趋势。

3 讨论

磷脂酸磷酸水解酶(PAH)作为产生DAG的关键酶,对植物脂质代谢、细胞稳态和生长具有一定的影响。*PAH*基因的表达显著影响磷脂含量水平,在缺乏*PAH1*的情况下,内质网和核膜显著扩张,细胞内总磷脂含量增加约2倍[40]。有研究发现,*atpah1 atpah2*双突变体影响磷脂水平显著高于野生型[16]。有研究报道,烟草中过表达拟南芥*PAH2*可降低细胞中磷脂水平,抑制番茄丛矮病毒的复制,引发系统性坏死、矮化及叶片畸形等症状[41];但大豆中*PAH*相关研究未见报道。因此本研究通过生物信息学分析,系统地对大豆*GmPAH*基因家族成员进行基因结构、保守基序、顺式作用元件、染色体定位、基因共线性和表达模式分析。结合大豆各组织部位表达量数据和RT-qPCR试验结果,阐明GmPAH蛋白在大豆响应激素和非生物胁迫中的重要作用。

本研究在大豆中鉴定出7个*GmPAH*基因,划分为2个分支(Cluster Ⅰ和Cluster Ⅱ)。先前的研究发现拟南芥、玉米和紫苏均含有2个PAH蛋白[15,21,22]。而本研究中,发现大豆中含有7个GmPAH蛋白。物种间基因数量有明显差异,这可能与*GmPAH*基因在大豆中的扩增有关,表明了*GmPAH*可能在大豆中参与更多的生命活动。组织特异性表达通常与其在



注/Note:*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$. Cold: 低温; NaCl: 氯化钠; $NaHCO_3$碳酸氢钠; Mannitol: 甘露醇

图8 *GmPAH*在非生物胁迫下的表达模式

Fig. 8 Expression profiles of *GmPAH* under abiotic stresses

相应部位发挥生物学功能有关[42]。通过组织表达模式分析发现 *GmPAH5* 在 VE 发芽期、V1 三叶期、R1 始花期和 R2 盛花期阶段的相对表达量较高,在其他阶段的相对表达量较低,这表明 *GmPAH5* 基因可能参与大豆营养组织的形成。在拟南芥中,*AtPAH1* 和 *AtPAH2* 被发现能参与甘油酯的合成,且 *AtPAH1* 和 *AtPAH2* 两个基因在种子成熟后期表达水平较高[16]。本研究中,相比于其他 *GmPAH* 基因,与拟南芥 *AtPAH2* 位于同一个进化分支,*GmPAH2* 和 *GmPAH3* 在种子发育时期表达水平较高。这表明 *GmPAH2* 和 *GmPAH3* 与大豆种子中油脂形成阶段密切相关,其可能是催化 PA 生成甘油酯 DAG 的主效基因。

确定启动子区域顺式作用元件,对于理解基因表达的调控机制至关重要[43],顺式作用元件的类型和数量不同会导致基因表达有所差异[44]。基因启动子上不同的顺式作用元件可能与多种蛋白进行核酸蛋白互作,增加了基因调控的特异性和复杂性[45]。JA 激素信号途径广泛参与植物应对环境胁迫的响应过程,如病原菌侵染响应,是协同调控生物与非生物胁迫的重要信号物质[46]。本研究发现 *GmPAH* 启动子中含有大量的激素响应元件,其中 JA 响应元件最多。通过表达分析发现,除了 *GmPAH5* 和 *GmPAH6* 外,其余 *GmPAH* 基因均受 JA 诱导,表达水平显著提高。这可能是 *GmPAH* 基因之间存在茉莉酸响应基因竞争性结合位点,导致 *GmPAH5/6* 对 JA 应答不敏感。本研究提示 *GmPAH* 基因家族,尤其是除 *GmPAH5/6* 外的成员,可能广泛参与了大豆的 JA 信号途径,这为深入研究 JA 与脂质信号互作提供了线索。

另外发现,*GmPAH* 还含有大量胁迫响应元件,其中 *GmPAH1* 和 *GmPAH7* 含有的胁迫响应元件最多,且相比于其他 *GmPAH* 基因,其在盐和碱胁迫处理下表达水平显著提高。这表明 *GmPAH1* 和 *GmPAH7* 可能受盐碱相关基因调控,参与植物对盐碱胁迫的反应。本研究通过 RT-qPCR 发现 *GmPAH1*、*2*、*3*、*4* 和 *7* 参与植物的低温响应,受低温显著诱导,其表达水平显著提高。已有研究发现,5℃下,玉米根系 PA 含量显著增加,同时 *ZmPAH1* 表达显著上调,上调倍数高达 5 倍以上[23]。这表明低温影响了膜脂组分的变化,导致 PA 的积累,改变了膜的流动性,PAH 通过分解 PA,产生中性脂,以维持膜的稳定。有趣的是,在甘露醇处理下,与对照相比,*GmPAH* 表达显著降低或无明显变化,这可能是膜脂组分变化受甘露醇的影响较小,导致了 *GmPAH* 对甘露醇不敏感。

综上所述,本研究通过生物信息学系统的分析了 *GmPAH* 的进化关系与基因和蛋白的结构,初步明确了 *GmPAH* 响应 JA 激素,并参与植物非生物胁迫的应答。但未能通过创制遗传材料证明 *GmPAH* 参与上述过程。后续可以通过创制 *GmPAH1* 或 *GmPAH2* 过表达或基因编辑敲除的大豆材料,结合生理生化指标验证其在非生物及激素胁迫下的生理功能,并解析其介导的脂质信号转导途径,进一步完善 *GmPAH* 家族的功能研究。

4 结论

在大豆中鉴定到 7 个 *GmPAH* 家族成员,可以聚为两类,7 个基因随机分布在染色体上,无基因簇,在结构上较为保守。*GmPAH* 基因启动子含有多种光、激素、非生物胁迫和应激响应元件。且多数基因受 JA 诱导表达水平提高,表明 *GmPAH* 在植物激素信号转导中发挥重要作用。*GmPAH* 还积极响应低温和盐碱胁迫。

参考文献:

[1] 周国栋, 郭勇, 李海容, 等. 种植密度与灌溉方式对夏大豆生物学特性及产量的影响[J]. 作物研究, 2025, 39(6): 499-508.

[2] 宫丽影, 孙铁英. 大豆优质高产栽培关键技术与应用实践[J]. 种子科技, 2025, 43(22): 79-81.

[3] Fang X M, Zhang J, Fan C Y, et al. Molecular regulatory network of soybean responses to abiotic stress [J]. Plant Cell Environ, 2025: pce. 15600. DOI: 10.1111/pce.15600.

[4] Pranneshraj V, Sangha M K, Djalovic I, et al. Lipidomics-assisted GWAS (lGWAS) approach for improving high-temperature stress tolerance of crops[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9389. DOI:10.3390/ijms23169389.

[5] 李一路, 张晴晴, 胡卫芹, 等 磷脂酸磷酸酶在脂质代谢和信号转导中的作用及其调控[J]. 植物生理学报, 2017, 53(6): 897-904.

[6] Cook R, Lupette J, Benning C. The role of chloroplast membrane lipid metabolism in plant environmental responses[J]. Cells, 2021, 10(3): 706. DOI: 10.3390/cells10030706.

[7] Bates P D. Understanding the control of acyl flux through the lipid metabolic network of plant oil biosynthesis[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Biol Lipds, 2016, 1861 (9): 1214-1225. DOI: 10.1016/j. bbalip.2016.03.021.

[8] 董书言, 邢志, 尹苗, 等. 紫苏磷脂酸磷酸水解酶基

因(*PfPAH1*)的鉴定及功能分析[J]. 西北农业学报, 2024, 33(4): 695-706.

[9] 柏杨, 章文华. 二酰甘油从头合成途径的关键酶及其功能[J]. 植物生理学报, 2018,54(12): 1763 1773

[10] Han G S, Wu W I, Carman G M. The *Saccharomyces cerevisiae* lipin homolog is a Mg^{2+}-dependent phosphatidate phosphatase enzyme[J]. J Biol Chem, 2006, 281(14): 9210-9218. DOI:10.1074/jbc.m600425200.

[11] Stukey G J, Han G S, Carman G M. Architecture and function of yeast phosphatidate phosphatase Pah1 domains/regions[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Biol Lipds, 2024, 1869(8): 159547. DOI: 10.1016/j.bbalip.2024.159547.

[12] Pascual F, Soto-Cardalda A, Carman G M. PAH1-encoded phosphatidate phosphatase plays a role in the growth phase- and inositol-mediated regulation of lipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biol Chem, 2013, 288(50): 35781-35792. DOI: 10.1074/jbc.m113.525766.

[13] Han G S, Siniossoglou S, Carman G M. The cellular functions of the yeast lipin homolog Pah1p are dependent on its phosphatidate phosphatase activity[J]. J Biol Chem, 2007, 282(51): 37026-37035. DOI: 10.1074/jbc.m705777200.

[14] Pascual F, Carman G M. Phosphatidate phosphatase, a key regulator of lipid homeostasis[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Biol Lipds, 2013, 1831(3): 514-522. DOI:10.1016/j.bbalip.2012.08.006.

[15] Eastmond P J, Quettier A L, Kroon J T M, et al. PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHOHYDROLASE1 and 2 regulate phospholipid synthesis at the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2010, 22(8): 2796-2811. DOI:10.1105/tpc.109.071423.

[16] Nakamura Y, Koizumi R, Shui G H, et al. *Arabidopsis* lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(49): 20978-20983. DOI:10.1073/pnas.0907173106.

[17] Yoshitake Y, Sato R, Madoka Y, et al. *Arabidopsis* phosphatidic acid phosphohydrolases are essential for growth under nitrogen-depleted conditions[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1847. DOI:10.3389/fpls.2017.01847.

[18] Wang L P, Kazachkov M, Shen W Y, et al. Deciphering the roles of *Arabidopsis* LPCAT and PAH in phosphatidylcholine homeostasis and pathway coordination for chloroplast lipid synthesis[J]. Plant J, 2014, 80(6): 965-976. DOI:10.1111/tpj.12683.

[19] Mietkiewska E, Siloto R M , Dewald J, et al. Lipins from plants are phosphatidate phosphatases that restore lipid synthesis in a *pah1Δ* mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS J, 2011, 278(5): 764-775. DOI:10.1111/j.1742-4658.2010.07995.x.

[20] Craddock C P, Adams N, Bryant F M, et al. Phosphatidic acid phosphohydrolase regulates phosphatidylcholine biosynthesis in *Arabidopsis* by phosphatidic acid-mediated activation of ctp: phosphocholine cytidylyltransferase activity[J]. Plant Cell, 2015, 27(4): 1251-1264. DOI: 10.1105/tpc.15.00037.

[21] 董书言. 紫苏磷脂酸磷酸水解酶基因(*PfPAH1*)在低磷和低氮胁迫响应中的功能分析[D]. 太谷:山西农业大学, 2023.

[22] Xu X X, Zhang J J, Yan B W, et al. The adjustment of membrane lipid metabolism pathways in maize roots under saline - alkaline stress[J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 635327. DOI:10.3389/fpls.2021.635327.

[23] Zhao X C, Wei Y L, Zhang J J, et al. Membrane lipids' metabolism and transcriptional regulation in maize roots under cold stress[J]. Front Plant Sci, 2021, 12: 639132. DOI:10.3389/fpls.2021.639132.

[24] Chen B B, Li J W, Yao S B, et al. Seed-specific expression of phosphatidate phosphohydrolases increases soybean oil content and seed weight[J]. Biotechnol Biofuels Bioprod, 2025, 18(1): 23. DOI:10.1186/s13068-025-02620-x.

[25] Waadt R, Seller C A, Hsu P K, et al. Plant hormone regulation of abiotic stress responses[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(10): 680-694. DOI: 10.1038/s41580-022-00479-6.

[26] Liu X E, Su S P. Growth and physiological response of *Viola tricolor* L. to NaCl and $NaHCO_3$ stress[J]. Plants, 2023, 12(1): 178. DOI:10.3390/plants12010178.

[27] Ljunggren M, Sköld A, Dardashti A, et al. The use of mannitol in cardiopulmonary bypass prime solution: Prospective randomized double-blind clinical trial[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2019, 63(10): 1298-1305. DOI: 10.1111/aas.13445.

[28] 姜焕焕, 温思慧, 卢雨庭, 等. 二倍体野生种花生Oleosin基因家族全基因组鉴定及其表达分析[J]. 中国油料作物学报, 2025, 47(1): 94-104.

[29] 吴艳. 盐碱胁迫下不同品种白菜的生理生化与转录组学分析[D]. 齐齐哈尔: 齐齐哈尔大学, 2021.

[30] 李凯月, 邓晓霞, 殷缘, 等. 蓖麻LEA基因家族的鉴定和铝胁迫响应分析[J]. 生物技术通报, 2025,41(7): 128-138.

[31] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404.

[32] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Mol Biol Evol, 2021, 38(7): 3022-3027. DOI:10.1093/molbev/msab120.

[33] Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(W1): W293-W296. DOI:10.1093/nar/gkab301.

[34] Bailey T L, Boden M, Buske F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: W202-W208. DOI: 10.1093/nar/gkp335.

[35] Chen C J, Wu Y, Li J W, et al. TBtools-II: a "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. Mol Plant, 2023, 16(11): 1733-1742. DOI:10.1016/j.molp.2023.09.010.

[36] 章文益, 张宝会, 姚新转, 等. 茶树 ARR-B 基因家族的鉴定和表达模式分析[J]. 分子植物育种, 2025, 23(17): 5687-5698.

[37] Lescot M. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(1): 325-327. DOI:10.1093/nar/30.1.325.

[38] Gong W F, Song Q L, Ji K, et al. Full-length transcriptome from *Camellia oleifera* seed provides insight into the transcript variants involved in oil biosynthesis[J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(49): 14670-14683. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c05381.

[39] Stolf-Moreira R, de Macedo Lemos E G, Abdelnoor R V, et al. Identification of reference genes for expression analysis by real-time quantitative PCR in drought-stressed soybean[J]. Pesq Agropec Bras, 2011, 46(1): 58-65. DOI:10.1590/s0100-204x2011000100008.

[40] Choi H S, Su W M, Han G S, et al. Pho85p-Pho80p phosphorylation of yeast Pah1p phosphatidate phosphatase regulates its activity, location, abundance, and function in lipid metabolism[J]. J Biol Chem, 2012, 287(14): 11290-11301. DOI:10.1074/jbc.m112.346023.

[41] Chuang C, Barajas D, Qin J, et al. Inactivation of the host lipin gene accelerates RNA virus replication through viral exploitation of the expanded endoplasmic reticulum membrane[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(2): e1003944. DOI:10.1371/journal.ppat.1003944.

[42] 龚钰涵, 陈兰, 尚方慧子, 等. 茶树 TRB 基因家族鉴定及表达模式分析[J]. 生物技术通报, 2025, 41(7): 214-225.

[43] Chen H Y, Hsieh E J, Cheng M C, et al. ORA47 (octadecanoid-responsive AP2/ERF-domain transcription factor 47) regulates jasmonic acid and abscisic acid biosynthesis and signaling through binding to a novel *cis*-element[J]. New Phytol, 2016, 211(2): 599-613. DOI: 10.1111/nph.13914.

[44] 郝心愿, 岳川, 唐湖, 等. 茶树 β-淀粉酶基因 *CsBAM3* 的克隆及其响应低温的表达模式[J]. 作物学报, 2017, 43(10): 1417-1425.

[45] 张泽, 杨秀丽, 宁东贤. 花生 4CL 基因家族鉴定及对干旱与盐胁迫响应分析[J]. 生物技术通报, 2025, 41(7): 117-127.

[46] Chen Y M, Jin G C, Liu M Y, et al. Multiomic analyses reveal key sectors of jasmonate-mediated defense responses in rice[J]. Plant Cell, 2024, 36(9): 3362-3377. DOI:10.1093/plcell/koae159.

(责任编辑:郭学兰)