



转录因子 GmPTF1 促进大豆结瘤固氮功能研究

邢馨竹, 杨占武, 杜 汇, 李喜焕, 张彩英

(河北农业大学, 华北作物改良与调控国家重点实验室, 教育部华北作物种质资源研究与利用重点实验室, 河北 保定 071001)

摘 要:大豆根瘤固氮是高耗能过程,需大量磷素,缺磷影响根瘤发育与氮素固定。转录因子 GmPTF1 具有提高植物耐低磷功能,为探讨其在结瘤固氮中的作用,本研究克隆根瘤 *GmPTF1*,分析其上游启动子调控元件,研究基因时空表达,分析其在不同磷素处理下对大豆结瘤固氮的影响,明确基因功能。结果显示:*GmPTF1* 启动子序列含根瘤特异表达元件,qRT-PCR 证实其在根瘤优势表达,且低磷处理下的表达量高于正常磷处理,说明该基因与根瘤有关且响应低磷胁迫;进一步利用超表达和 RNAi 转基因复合植株分析发现,*GmPTF1* 超表达可显著提高低磷胁迫条件下转基因大豆复合植株的根瘤数量(32.3%)、鲜重(31.6%)、固氮酶活性(32.2%)以及磷含量(36.6%),而 RNAi 植株的根瘤则呈现相反趋势,其根瘤数量、鲜重、固氮酶活和磷含量分别降低 27.4%、36.7%、24.3% 和 29.0%。GmPTF1 结合基序 E-box 结瘤固氮基因在超表达转 *GmPTF1* 根瘤中的表达分析发现,与对照相比,上述基因表达量显著上升,暗示 *GmPTF1* 可能通过调控上述含 E-box 基因促进大豆结瘤固氮。因此,本研究明确了 GmPTF1 转录因子具有促进大豆结瘤固氮的功能,为实现结瘤固氮分子遗传改良提供了基因资源。

关键词:大豆;GmPTF1;转录因子;低磷逆境;结瘤固氮

Functional Analysis of Transcription Factor GmPTF1 for Facilitating Nodulation and Nitrogen-fixation in Soybean

XING Xinzhu, YANG Zhanwu, DU Hui, LI Xihuan, ZHANG Caiying

(State Key Laboratory of North China Crop Improvement and Regulation, North China Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Education of Ministry, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: Soybean nodule formation and nitrogen-fixation are energy-consuming processes, which need a high demand of phosphorus nutrition. Low phosphorus stress could significantly affect the nodule initiation, development and nitrogen-fixation in soybean. bHLH transcription factor GmPTF1 has been demonstrated to improve the ability of tolerance for phosphorus starvation in soybean, while its role in nodule development and nitrogen-fixation remains unclear. In view of this, the *GmPTF1* was cloned in soybean nodule, and its upstream promoter regulation elements was analyzed. And also, the gene expression and function in the process of nodule formation and nitrogen fixation under different phosphorus conditions were studied. The results showed that several nodule-specific expression elements were found in the promoter of *GmPTF1*, and a predominant expression of *GmPTF1* was demonstrated in nodules via qRT-PCR. Moreover, the relative higher expression levels of *GmPTF1* under low phosphorus condition were observed than that under normal phosphorus condition, which implied that *GmPTF1* could respond to phosphorus deficiency and might play an important function in nodules. Further analysis showed that the over-expression of *GmPTF1* in soybean complex plants significantly increased the nodule number (32.3%), fresh weight (31.6%), nitrogenase activity (32.2%) and phosphorus content (36.6%) under low phosphorus condition, while RNAi plants showed significant decrease on these related traits with nodule number (27.4%), fresh weight (36.7%), nitrogenase activity (24.3%) and phosphorus content (29.0%), respectively. In addition, the significant higher expressions of related genes containing E-box (binding motif of transcription factor GmPTF1) were found in the over-expressed transgenic nodules, suggesting that the promotion of GmPTF1 for nodulation and nitrogen-fixation might due to the regulation of these E-box containing related genes in soybean. Thus, the function of transcription factor GmPTF1 for facilitating nodulation and nitrogen-fixation is dissected in this study, which provides gene resource for nitrogen-fixation genetic improvement in soybean.

Keywords: soybean; GmPTF1; transcription factor; low phosphorus stress; nodulation and nitrogen-fixation

大豆是世界上重要的粮油作物,提供人类约 50% 的食用油和 25% 的植物蛋白^[1]。大豆与根瘤菌共生固氮可提供其生长发育所需氮素的 50% ~ 60%,对减少氮肥使用、降低生产成本、缓解能源危

机和解决环境污染等具有重要意义^[2]。然而,根瘤形成是一个高耗能过程,需要大量磷素参与,缺磷将直接影响根瘤发育以及氮素固定^[3-7]。有研究发现,大豆根瘤的磷含量远高于其他组织器官,如根、

收稿日期:2023-02-15

基金项目:河北省现代农业产业技术体系创新团队项目(HBCT2019190203,HBCT2023040204);现代农业科技奖励性后补助资金项目(17927670H)。

第一作者:邢馨竹(1994—),女,博士研究生,主要从事大豆遗传育种与分子生物学研究。E-mail:swkxl1301@163.com。

通讯作者:李喜焕(1974—),女,博士,教授,主要从事大豆遗传育种与分子生物学研究。E-mail:lixihuan@hebau.edu.cn;

张彩英(1960—),女,博士,研究员,主要从事大豆遗传育种与分子生物学研究。E-mail:zhangcaiying@hebau.edu.cn。

茎、叶等。因此,保障大豆根瘤足量磷素供应,维持根瘤磷素水平相对稳定对其共生固氮至关重要^[8-10]。

转录因子是一类能够与基因顺式作用元件发生特异性相互作用,进而调控基因表达的蛋白质,在植物生长发育各个阶段及抵御外界逆境胁迫中发挥重要调控作用。目前,已有多篇报道证实,转录因子在豆科植物结瘤固氮过程中具有重要功能。Vernié 等^[11]研究蒺藜苜蓿转录因子 EFD (ethylene response factor required for nodule differentiation) 发现,该转录因子属于乙烯响应因子家族,参与苜蓿根瘤形成过程,是苜蓿功能性固氮根瘤形成的必要条件。Jiang 等^[12]研究发现豆科植物 NIN-like 家族转录因子 NLP2 可直接激活豆血红蛋白基因的表达,敲除该转录因子基因导致豆血红蛋白基因表达量下降,从而影响根瘤固氮。本课题组前期研究发现,MYB 家族转录因子 GmPHR1 通过与下游基因 *GmPAP12* 启动子的低磷响应元件结合,进而调控低磷胁迫下的大豆结瘤固氮^[13]。

目前,已有报道证实 bHLH 转录因子参与植物抵御多种逆境胁迫。bHLH 转录因子具有 helix-loop-helix 结构,通过识别基因启动子区的 E-box (5'-CANNTG-3') 发挥作用^[14]。Yi 等^[15]发现,水稻 bHLH 转录因子 OsPTF1 具有正向调控低磷条件下植株耐低磷能力的功能;Li 等^[16-17]发现玉米转录因子 ZmPTF1 参与低磷和干旱逆境胁迫响应。本课题组前期克隆了大豆 bHLH 转录因子 GmPTF1, qRT-PCR 发现,该基因在大豆根系受低磷胁迫诱导表达,且在耐低磷品种中黄 15 中的表达量远高于磷敏感品种牛毛黄,转基因拟南芥证实 *GmPTF1* 参与低磷胁迫响应^[18];钟磊等^[19]发现,*GmPTF1* 超表达显著提高转基因大豆低磷胁迫下的根系长度、表面积、干重和植株磷含量。最近,Yang 等^[20]发现,*GmPTF1* 在大豆侧根中优势表达,受低磷胁迫诱导,进一步分析发现,GmPTF1 通过结合伸展蛋白编码基因 *GmEXPB2* 启动子区 E-box 从而调控基因表达,进而影响低磷胁迫下的根系构型,提高大豆根系磷素吸收利用效率。

可见,目前有关 bHLH 转录因子 GmPTF1 在植物根系抵御低磷逆境胁迫中的功能已经明确,但其是否参与低磷逆境胁迫下的大豆根瘤发育和固氮

过程仍然未知。鉴于此,本研究以转录因子 GmPTF1 为对象,通过分析基因在不同磷素处理下的大豆根瘤表达差异,明确其对结瘤固氮的响应;获得超表达和 RNAi 转 *GmPTF1* 基因大豆复合植株,研究基因在根瘤发育和固氮过程中的功能;筛选含 E-box 基序且在根瘤中表达的基因,分析其在超表达转 *GmPTF1* 大豆复合植株根瘤中的表达,发掘提高大豆结瘤固氮能力的新基因,旨在明确 GmPTF1 转录因子具有促进大豆结瘤固氮的功能,为实现结瘤固氮分子遗传改良提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种中黄 15 由河北农业大学大豆遗传育种课题组提供,慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供;大肠杆菌感受态 TOP10 购自北京博迈德基因技术有限公司,发根农杆菌 K599 感受态购自上海唯地生物技术有限公司;RNA 提取试剂盒购自上海普洛麦格生物制品有限公司;cDNA 反转录试剂盒、2×SYBR qRT-PCR 染料、DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T₄连接酶购自宝日医生物技术有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒购自天根生化技术有限公司。

1.2 试验设计

为探讨 *GmPTF1* 在大豆根瘤中的功能,首先对其上游 2 000 bp 启动子序列进行分析,结合 *GmPTF1* 在低氮处理接种根瘤菌 28 d 不同组织部位(根系、茎秆、叶片和根瘤)表达量以及不同磷素处理根瘤中的表达量,分析 *GmPTF1* 是否参与不同磷素水平大豆根瘤发育和固氮。

为进一步研究 *GmPTF1* 在两种磷处理条件下对大豆根瘤发育与固氮的功能,分别构建带 *GFP* 超表达载体和带 *GUS* 的 RNAi 载体,转化大豆复合植株毛状根并接种根瘤菌,GFP 鉴定超表达转基因复合植株毛状根,GUS 染色鉴定 RNAi 转基因复合植株毛状根,检测转基因毛状根的 *GmPTF1* 表达量,并分析复合植株在不同磷处理条件下的根瘤数量、鲜重、固氮酶活和磷含量。

为进一步验证 GmPTF1 促进大豆根瘤发育与固氮功能,对目前已报道的根瘤发育与固氮基因进行

启动子 E-box 基序分析,筛选含 E-box 且受 GmPTF1 调控的下游基因;利用课题组前期不同磷处理条件下的大豆根瘤不同发育时期转录组^[21]分析下游基因表达量,并通过 qRT-PCR 对已有文献^[20-22]报道与 GmPTF1 存在关联的 3 个下游基因 GmEXLB1、GmEXPB2 和 GmSPX8 进行表达量验证。

1.3 方法

1.3.1 大豆材料的种植与取样 大豆材料的种植与低磷处理:挑选饱满一致、大小均匀大豆种子,氯气消毒 10 h,置于无菌滤纸催芽,条件为恒温 28 ℃,滤纸保持湿润;催芽 3 d 后待芽长至 5 cm 左右,将其种植于装有蛭石花盆,每盆 1 株;将大豆幼苗在光照培养室培养,温度 28 ℃,湿度 60%,16 h 光照、8 h 黑暗,光照强度 10 000 Lx;幼苗生长期间,分别进行正常磷和低磷处理(2.5 mmol·L⁻¹ K₂SO₄、2 mmol·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、0.5 mmol·L⁻¹/0.005 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄、0.15 mol·L⁻¹ FeCl₂、0.1 mol·L⁻¹ NH₄NO₃、0.046 mmol·L⁻¹ H₃BO₃、0.004 2 mmol·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O、0.000 8 mmol·L⁻¹ ZnSO₄、0.000 5 mmol·L⁻¹ CuSO₄、0.001 mmol·L⁻¹ MoO₃、0.000 1 mmol·L⁻¹ CoCl₂·6H₂O)。

大豆根瘤菌接种与取样:将 USDA110 在 YMB 固体培养基活化 3 d,挑取单克隆并接种于 YMB 液体培养基,在恒温 28 ℃,180 r·min⁻¹ 摇床培养 USDA110 根瘤菌 3~4 d,至菌液 OD₆₀₀ 为 1.5~2.0,随后将菌液用水稀释至 OD₆₀₀ 为 0.08;用注射器将菌液接种于培养 7 d 的大豆植株根部,每株接种 30 mL。

在大豆植株接菌后 10、17 和 28 d(根瘤发育初期、中期和成熟期)分别取样,以 0 d 为对照,每个样品选择 15 株长势一致的植株进行根系(0 d)或根瘤(10、17 和 28 d)取样;并且对接种根瘤菌 28 d 的根系、茎秆、叶片和根瘤进行取样,液氮速冻,置于 -80 ℃ 冰箱保存。

1.3.2 GmPTF1 启动子序列与表达量分析 GmPTF1 启动子序列分析:利用植物基因组网站 Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 调取 GmPTF1 (Glyma.19G143900) 序列信息,利用基因启动子分析网站 PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/action=newplace>) 对 GmPTF1 上游 2 000 bp 启动子序列进行分析。

GmPTF1 表达量分析:分别提取两种磷素处理条件下接种 USDA110 根瘤菌 0、10、17 和 28 d 的大豆根瘤以及接菌 28 d 的根、茎、叶和根瘤 RNA,反转录为 cDNA^[21];利用 NCBI 的 Primer-Blast 设计 GmPTF1 定量分析引物(表 1);通过 BIORAD CFX96 Real-Time PCR 仪,采用 2×SYBR@ 染料法进行 qRT-PCR;反应体系为:SYBR 10 μL, cDNA 1 μL,前引物和后引物各 1 μL,H₂O 7 μL;反应程序为:95 ℃、30 s;95 ℃、15 s,58 ℃、15 s,72 ℃、15 s,30 个循环;10 ℃ 保温。

1.3.3 GmPTF1 在大豆结瘤固氮中的功能分析 GmPTF1 分子克隆:以接种 28 d 根瘤 cDNA 为模板,采用 GmPTF1 引物(表 1)扩增基因 CDS,扩增体系参照 TaKaRa 公司产品 PrimeSTAR@ Max DNA Polymerase 推荐方法,扩增程序为:98 ℃ 3 min;98 ℃ 10 s,58 ℃ 15 s,72 ℃ 30 s,34 个循环;72 ℃ 5 min;12 ℃ 保温。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳确定条带是否正确,利用胶回收试剂盒纯化目的条带;将回收的目的条带利用 T₄连接酶与 pMD19-T 载体连接,转化 TOP10 感受态细胞,培养在含氨苄青霉素 LB 固体培养基上;挑取单克隆进行菌液 PCR,将阳性菌液送至生工生物工程股份有限公司测序。

GmPTF1 超表达载体构建:利用 Xba I 和 Kpn I 双酶切上述测序正确的 pMD19-T-GmPTF1 载体,与经过相同酶切处理的超表达载体 pCamE-GFP 进行连接,转化大肠杆菌感受态细胞,在含卡那霉素的 LB 培养基进行 37 ℃ 培养;随后经菌液 PCR、双酶切和测序,确定超表达载体是否构建成功。

利用上述测序正确的 pMD19-T-GmPTF1 载体为模板,采用 GmPTF1 的 RNAi 特异引物进行扩增(表 1),随后分别用 Kpn I、Spe I、Sac I 和 BamH I 酶切扩增产物和 pTCK303-GUS 载体,经连接、转化、菌液 PCR 和测序等,确定 RNAi 载体是否构建成功。

GmPTF1 载体转化与转基因复合植株检测:采用热激法分别将构建好的 GmPTF1 超表达载体 pCamE-GmPTF1 和 RNAi 载体 PTCK303-GmPTF1 转化发根农杆菌 K599 感受态细胞。具体过程如下:将两种载体分别与 K599 感受态细胞混合,冰浴 10 min,液氮冷冻 4 min,37 ℃ 热激处理 4 min,涂布于含链霉素和卡那霉素 LB 固体培养基,28 ℃ 培养

48 h;将鉴定转化无误的含转化质粒的 K599 摇菌于 100 mL 含链霉素和卡那霉素液体 LB 培养基,随后收集沉淀,加甘油涂布于培养基;利用划伤侵染法^[13]转化大豆,获得转化复合植株;随后,利用荧光显微镜(Leica, DM2500)观察绿色荧光以鉴定超表达转基因大豆复合植株毛状根,利用 GUS 染色鉴定 RNAi 转基因大豆复合植株毛状根。

转 *GmPTF1* 复合植株毛状根的根瘤性状测定:利用 USDA110 根瘤菌对转基因大豆复合植株毛状根进行接种,接种 28 d 后进行根瘤性状测定,具体包括根瘤数量、根瘤鲜重、根瘤固氮酶活和磷含量,其中,磷含量测定采用消煮法^[13],固氮酶活性测定采用乙炔还原法^[21]。

1.3.4 *GmPTF1* 促进大豆结瘤固氮功能验证 含

E-box 基因筛选与表达分析:查找目前已报道的大豆根瘤发育与固氮相关基因^[20-27],利用 PLACE 在线软件分析其上游启动子是否含有 E-box;利用本课题组前期已有两种磷素处理(正常磷和低磷处理)条件下大豆中黄 15 在根瘤菌 USDA110 接种不同时间的转录组数据^[21],分析上述基因在大豆根瘤中的表达,筛选含 E-box 且受 *GmPTF1* 调控的下游基因。

超表达转 *GmPTF1* 根瘤中含 E-box 基因表达分析:利用前述获得的超表达转 *GmPTF1* 大豆根瘤,采用 qRT-PCR 方法对上述入选的下游基因中有文献^[20-22]报道与 *GmPTF1* 存在关联的 3 个基因 *GmEXLB1*、*GmEXPB2* 和 *GmSPX8* 进行表达量分析,验证 *GmPTF1* 促进大豆根瘤发育与固氮的功能,其中 qRT-PCR 所用引物详见表 1。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in the present study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'→3')	用途 Usage
<i>PTF1-Xba</i> I -GFP	AAAGTCGACATGGACCAAGCTCCGGGA	PcamE- <i>GmPTF1</i> 超表达载体构建
<i>PTF1-Kpn</i> I -GFP	GCGTCTAGAGAGCTCCATCTTCAATTGA	PcamE- <i>GmPTF1</i> 超表达载体构建
<i>PTF1</i> -RNAi1- <i>Kpn</i> I	ATAGTCGACGCCTAATTGCCATGTCAGCG	PTCK303- <i>GmPTF1</i> RNAi 载体构建
<i>PTF1</i> -RNAi1- <i>Bam</i> H I	ATAGGATCCCGGCTCGTTCTTCACTCTGT	PTCK303- <i>GmPTF1</i> RNAi 载体构建
<i>PTF1</i> -RNAi2- <i>Spe</i> I	CACACTAGTGCCTAATTGCCATGTCAGCG	PTCK303- <i>GmPTF1</i> RNAi 载体构建
<i>PTF1</i> -RNAi2- <i>Sac</i> I	ATAGAGCTCCGGCTCGTTCTTCACTCTGT	PTCK303- <i>GmPTF1</i> RNAi 载体构建
<i>EXPB2</i> -RT-F	TTGAATCAGGCGAAGGCTGT	<i>GmEXPB2</i> 表达量检测
<i>EXPB2</i> -RT-R	AGCATTGCGTAGCTTCTCGT	<i>GmEXPB2</i> 表达量检测
<i>EXLB1</i> -RT-F	AATGGAGCATACCTGGTGGC	<i>GmEXLB1</i> 表达量检测
<i>EXLB1</i> -RT-R	GACATTGCCGGTGTATGTGC	<i>GmEXLB1</i> 表达量检测
<i>SPX8</i> -RT-F	TTAAGGGTTCCGGGAAGAG	<i>GmSPX8</i> 表达量检测
<i>SPX8</i> -RT-R	GCCCTGTATAGTTGAGGGCAC	<i>GmSPX8</i> 表达量检测
<i>PTF1</i> -RT-F	GCCTAATTGCCATGTCAGCG	<i>GmPTF1</i> 表达量检测
<i>PTF1</i> -RT-R	CGGCTCGTTCTTCACTCTGT	<i>GmPTF1</i> 表达量检测
<i>Actin11</i> -RT-F	ATCTTGACTGAGCGTGTTATTCC	内参基因
<i>Actin11</i> -RT-R	GCTGGTCTCGGCTGTCTCC	内参基因

1.4 数据分析

利用 2^{-△△C_t}法对 *GmPTF1* 及其下游基因的 qRT-PCR 数据进行分析^[13];利用 GraphPad Prism8 对转基

因大豆复合植株的 *GmPTF1* 表达量进行单因素方差分析,对根瘤数量、根瘤鲜重、根瘤固氮酶活和磷含量等进行双因素方差分析并绘制柱形图和折线图。

2 结果与分析

2.1 GmPTF1 在大豆根瘤中的表达分析

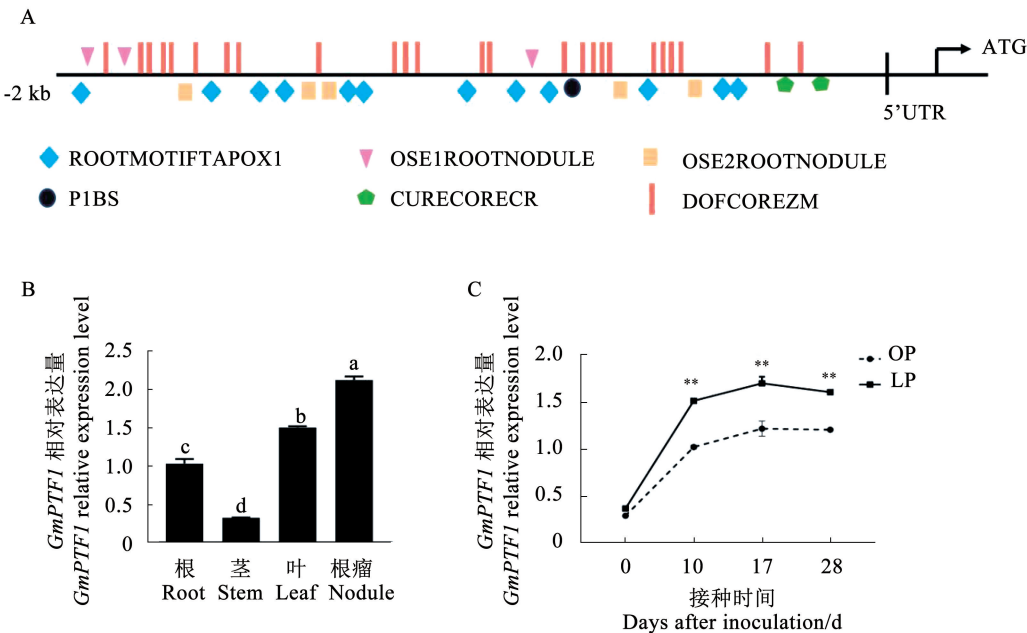
对 *GmPTF1* 上游 2 000 bp 启动子序列的分析结果如图 1A 所示,除含有启动下游基因表达的基本调控元件(如 TATA-box、CAAT-box)和抗逆应答元件(如 CURECORECR、DOFCOREZM)以外,还含有调控大豆根瘤表达的元件[如 OSE1ROOTNODULE(AAAGAT)和 OSE2ROOTNODULE(CTCTT)]等,暗示其可能参与大豆根瘤发育和固氮过程。另外,在启动子区还发现响应低磷胁迫的 P1BS(GNATATNC)元件,与前期研究工作中已证实的该基因具有提高转基因大豆耐低磷能力的结果相符。

GmPTF1 在低氮处理下接种根瘤菌 28 d 的大豆根系、茎秆、叶片和根瘤中的表达量分析结果如图 1B 所示,其在上述组织器官均有一定表达,且存在显著差异,并以根瘤中的表达量最高。

GmPTF1 在不同磷处理下的大豆根系接种根瘤菌不同时间的表达量分析结果如图 1C 所示,接种 0~10 d,*GmPTF1* 表达量随接菌时间呈现增加趋势,而在接菌后 10~28 d,*GmPTF1* 表达量随接菌时间变化不明显;并且发现,*GmPTF1* 在低磷处理下的表达量自接菌后一直高于正常磷处理,且存在显著差异,暗示其可能在两种磷处理条件下均与大豆根瘤发育及固氮有关。

2.2 GmPTF1 在根瘤发育与固氮中的功能分析

经转化大豆复合植株毛状根并接种根瘤菌获得了 pCamE-*GmPTF1* 超表达载体转基因复合植株毛状根(图 2A),借助 GUS 染色鉴定,获得了 RNAi 载体 PTCK303-*GmPTF1* 转基因复合植株毛状根(图 2B)。分别检测两种毛状根 *GmPTF1* 表达量,与空载体对照相比,超表达转基因毛状根的 *GmPTF1* 表达量提高了 93%,而 RNAi 毛状根的 *GmPTF1* 表达量则下降了 69%(图 2C)。

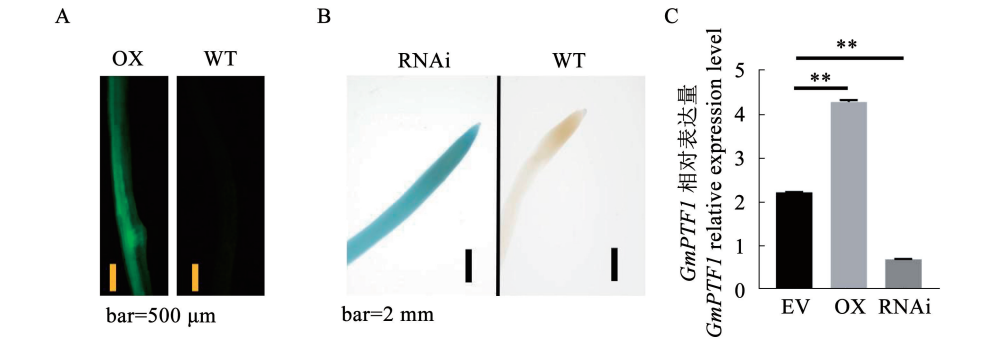


注:A. *GmPTF1* 启动子元件分析; B. *GmPTF1* 在大豆不同器官的表达分析; C. *GmPTF1* 在接种大豆根瘤菌不同时间的表达量分析;OP:正常磷处理;LP:低磷处理。*代表 0.05 水平差异显著,**代表 0.01 水平差异显著。下同。

Note: A. Promoter analysis of *GmPTF1*; B. Expressions of *GmPTF1* in different soybean organs; C. Expressions of *GmPTF1* at different time-points after inoculation of soybean rhizobia; OP: Optimum phosphorus; LP: Low phosphorus. * indicates significant difference at 0.05 level, ** indicates significant difference at 0.01 level. The same below.

图 1 *GmPTF1* 启动子元件和大豆根瘤中的表达模式分析

Fig. 1 Analysis of *GmPTF1* promoter and expressions in soybean nodules



注:A. 超表达转基因毛状根 GFP 鉴定;B. RNAi 毛状根 GUS 染色鉴定;C. 超表达和 RNAi 转基因毛状根 *GmPTF1* 表达量检测。

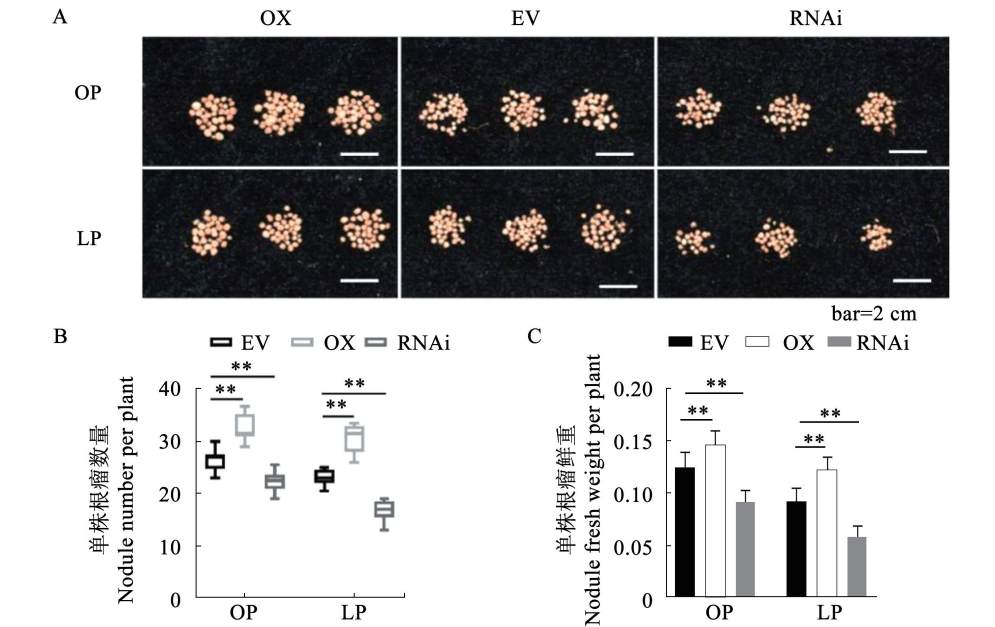
Note: A. GFP identification of transgenic hairy roots with over-expressed *GmPTF1*; B. GUS identification of transgenic hairy roots with RNAi-*GmPTF1*; C. Expression analysis of *GmPTF1* in overexpressed- and RNAi transgenic hairy roots.

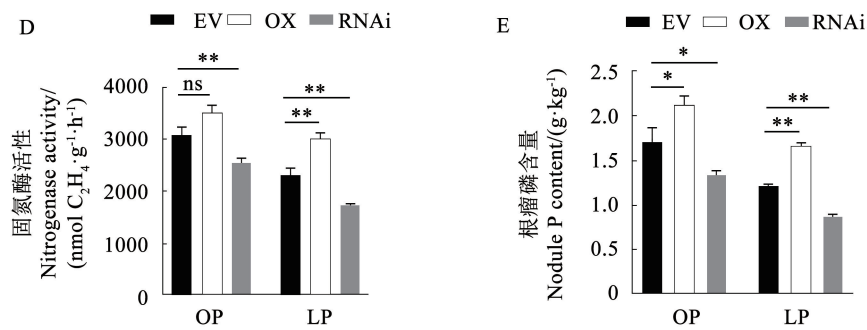
图2 超表达与 RNAi 转 *GmPTF1* 大豆毛状根的鉴定

Fig.2 Identification of transgenic soybean hairy roots with overexpressed- and RNAi-*GmPTF1*

对比分析在正常磷和低磷处理条件下根瘤生长情况发现,与野生型对照相比,超表达转基因复合植株根瘤数量分别增加 24.6% 和 32.3%,而 RNAi 植株根瘤则分别降低 14.9% 和 27.4% (图 3A 和图 3B);超表达复合植株单株根瘤鲜重分别提高 17.0% 和 31.6%,而 RNAi 植株则分别降低 21.0% 和 36.7% (图 3C)。分析正常磷和低磷处理条件下的根瘤固氮酶活性表明:超表达转基因复合植株的

根瘤固氮酶活性分别提高 14.1% 和 32.2%,而 RNAi 植株根瘤则分别降低 17.3% 和 24.3% (图 3D);并且超表达复合植株根瘤磷含量分别提高 34.3% 和 36.6%,而 RNAi 植株根瘤则分别降低 21.9% 和 29.0% (图 3E)。由此可见,bHLH 转录因子基因 *GmPTF1* 具有促进不同磷素处理条件下大豆根瘤发育及提高固氮能力的功能。





注:A. 不同磷处理下的超表达和 RNAi 转基因根瘤;B~C. 不同磷处理下的超表达和 RNAi 转基因根瘤数量和鲜重变化;D~E. 不同磷处理下的超表达和 RNAi 转基因根瘤固氮酶活性和磷含量变化。

Note: A. Phenotypes of nodules in hairy roots with overexpressed- and RNAi-*GmPTF1*; B-C. Differences of nodule number and fresh weight in soybean hairy roots with overexpressed- and RNAi-*GmPTF1*; D-E. Differences of nitrogenase activity and phosphorus content in soybean hairy roots with overexpressed- and RNAi-*GmPTF1*.

图3 GmPTF1 在大豆根瘤发育与固氮过程中的功能分析

Fig.3 Functional analysis of GmPTF1 in soybean nodulation and nitrogen fixation

2.3 GmPTF1 通过 E-box 调控大豆结瘤固氮相关基因表达

对目前已报道的大豆根瘤发育与固氮相关基因的上游启动子 E-box 基序进行分析的结果如表 2 所示。利用课题组前期已有不同磷处理条件下的大豆根瘤不同发育时期转录组数据进行表达量分析的结果如图 4 所示。8 个基因 (*GmEXLB1*、*GmEXPB2*、*GmSPX8*、*GmSPX5*、*GmBEHL1*、*GmYUC2a*、*GmMAX2* 和 *GmPT5*) 含有 E-box 序列且在大豆根瘤中具有较高表达水平,说明其可能受 GmPTF1 转录因子调控进而影响大豆根瘤发育和固氮。

在上述 8 个基因中, *GmEXLB1*、*GmEXPB2* 和

GmSPX8 已被文献^[20-22]证实与 GmPTF1 转录因子存在互作关系,因而,本研究进一步采用 qRT-PCR 技术分析这 3 个基因的表达量,3 个基因在超表达转 *GmPTF1* 复合植株中的表达量如图 5 所示,在两种磷处理条件下,与野生型对照相比,3 个基因的表达量均由于 *GmPTF1* 过量表达而呈现升高趋势,其中 3 个基因在低磷处理条件下的表达量较野生型对照分别提高 4.4、18.1 和 3.8 倍,在正常磷处理条件下的表达量较野生型对照分别提高 23.8、17.1 和 5.0 倍。由此可见,转录因子 GmPTF1 促进大豆根瘤发育及提高固氮能力可能是通过调控上述具有 E-box 基序且在根瘤中表达的基因而实现。

表 2 含 E-box 基序的大豆根瘤发育及固氮相关基因

Table 2 E-box containing genes related with soybean nodulation and nitrogen-fixation

基因名称	基因 ID	E-box 数量	E-box 位置	相关文献
Gene name	Gene ID	E-box number	E-box position	Related references
<i>GmEXLB1</i>	<i>Glyma. 17G147500</i>	2	5'UTR-645; Pro-873	[22]
<i>GmEXPB2</i>	<i>Glyma. 10G122300</i>	2	Pro-130; Pro-137	[20]
<i>GmSPX8</i>	<i>Glyma. 17G114700</i>	1	Pro-977	[21]
<i>GmSPX5</i>	<i>Glyma. 10G261900</i>	7	Pro-90/-226/-408/-453/ -532/-567/-596	[23]
<i>GmBEHL1</i>	<i>Glyma. 01G178000</i>	4	5'UTR-109; Pro-223/-723/-908	[24]
<i>GmPT5</i>	<i>Glyma. 10G036800</i>	5	5'UTR-122/-154/ -719/-808; Pro-65	[25]
<i>GmYUC2a</i>	<i>Glyma. 08G038600</i>	1	5'UTR-294	[26]
<i>GmMAX2</i>	<i>Glyma. 12G128600</i>	2	5'UTR-271; Pro-309	[27]

注:E-box 位置以其在基因上游 5'UTR 和启动子的位置标出。
Note:E-box position was presented as its position of gene upstream 5'UTR and promoter.

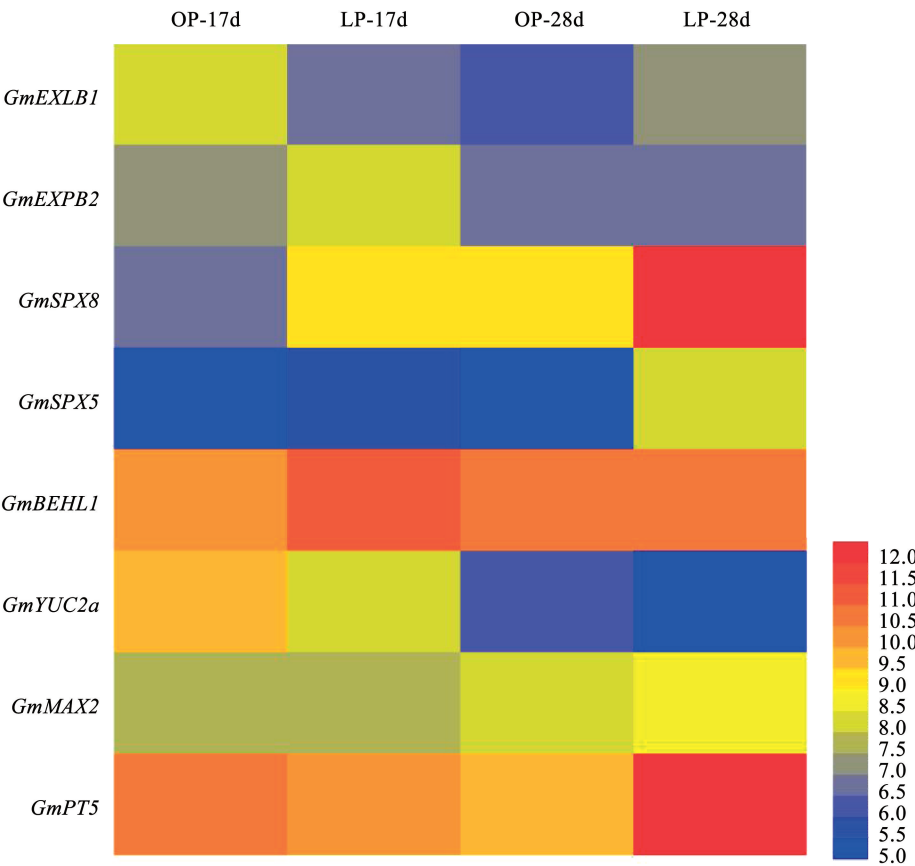
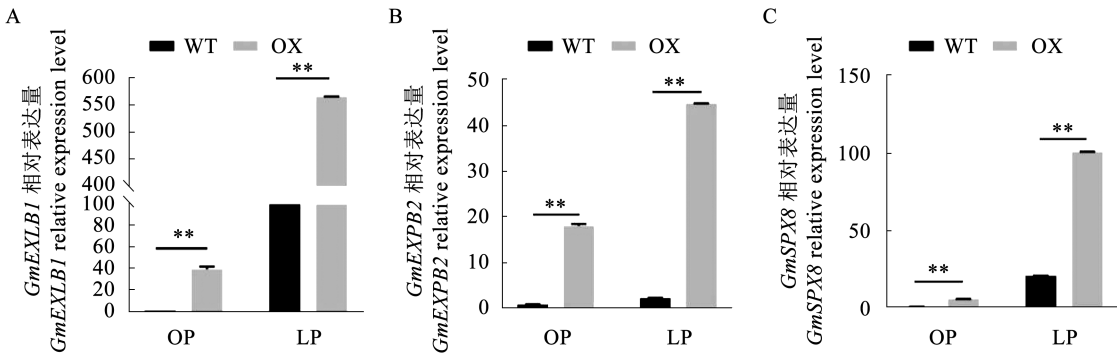


图 4 含 E-box 基因在大豆根瘤发育不同时期的表达量分析

Fig. 4 Expressions of E-box containing genes in soybean nodule developmental stages



注: A. *GmEXLB1*; B. *GmEXPB2*; C. *GmSPX8*。
Note: A. *GmEXLB1*; B. *GmEXPB2*; C. *GmSPX8*.

图 5 含 E-box 基因在超表达转 *GmPTF1* 大豆根瘤中的表达量分析

Fig. 5 Expressions of E-box containing genes in transgenic soybean nodules with over-expressed *GmPTF1*

3 讨论

3.1 转录因子 bHLH 家族成员 *GmPTF1* 是参与调控大豆结瘤固氮的新基因

目前,有关转录因子 bHLH 家族基因在调控豆科植物结瘤固氮过程中的作用已有报道。吴军^[28]

分析豆科植物 bHLH 转录因子家族演化进程发现,其与其他植物 bHLH 家族演化进程相比存在很大差别,暗示其可能与豆科植物特有的结瘤固氮功能有关;Godiard 等^[29] 分析苜蓿与根瘤菌共生互作过程中的转录组数据发现,bHLH 家族转录因子编码基因存在表达差异,进一步利用 qRT-PCR 检测基因表

达发现,该基因受根瘤菌诱导表达,可能与结瘤固氮有关;Ariel 等^[30]研究发现,苜蓿转录因子 bHLH47 可作为根瘤细胞中的细胞分裂素作用靶点而发挥功能,调控根瘤生长发育;Godiard 等^[31]分析苜蓿 *MibHLH1* 发现,受根瘤菌侵染诱导表达,沉默该基因则影响根瘤维管束发育,降低根瘤固氮能力。

除上述苜蓿中的研究外,Sakamoto 等^[32]分析大豆未接种和接种根瘤菌转录组数据发现,有很多 bHLH 家族成员表达量发生改变,说明其与大豆结瘤有关;Chiasson 等^[33]发现大豆 *GmBHLHm1* 编码共生结瘤的铵转运体 SAT1,对大豆和根瘤菌的共生体系形成非常重要,其活性丧失可引起根瘤菌和大豆共生效率降低,进而导致根瘤生长发育变缓。在本研究中,*GmPTF1* 是大豆 bHLH 转录因子家族成员,为探讨该基因是否也参与调控结瘤固氮,本研究首先从分析该基因的上游启动子是否含有根瘤表达调控元件入手,随后分析该基因是否在大豆根瘤表达,然后通过构建基因超表达载体和 RNAi 载体转化大豆复合植株毛状根,从正反两个方面进一步验证了 *GmPTF1* 在结瘤固氮过程中的功能,最后通过寻找含有该类转录因子结合位点(E-box)且前期已报道的参与结瘤固氮相关基因,分析基因在大豆根瘤中的表达,并研究与 *GmPTF1* 存在互作的基因在超表达转 *GmPTF1* 大豆根瘤中的表达,从而筛选含有 E-box 且表达量随 *GmPTF1* 过量表达而发生改变,为揭示转录因子 *GmPTF1* 调控大豆结瘤固氮分子机制提供依据。可见,本研究结果为大豆结瘤固氮性状分子遗传改良提供了新基因。

3.2 GmPTF1 具有同时调控大豆根系耐低磷和结瘤固氮双功能

土壤低磷胁迫不仅影响大豆植株根系和地上部正常生长发育,而且影响大豆根瘤形成、生长发育与共生固氮过程。本课题组在前期研究工作中发现,低磷胁迫条件下,大豆根瘤数量变少、根瘤鲜重和干重下降、根瘤固氮酶活性降低且固氮量下降^[13, 21]。Zhuang 等^[23]也发现,低磷胁迫显著降低大豆根瘤数量、鲜重、氮含量和磷含量等性状。由此可见,发掘在低磷逆境条件下能提高大豆结瘤固氮能力的功能基因对解决上述问题至关重要。

目前,有学者已证实大豆伸展蛋白基因 *GmEXPB2* 具有改变大豆根系构型和提高结瘤固氮能力的功能^[34]。同时,有研究发现,低磷胁迫条件下,*GmEXPB2* 具有提高转基因大豆根系耐低磷能力的功能,分析其作用机制发现 *GmEXPB2* 启动子区含有 E-box,暗示其可能受转录因子 *GmPTF1* 调控;进一步分析证实,*GmPTF1* 通过与 *GmEXPB2* 启动子区 E-box 结合从而调控 *GmEXPB2* 改变大豆根系构型,进而提高大豆耐低磷能力^[20]。本课题组在前期研究工作中曾利用低磷胁迫大豆根瘤转录组数据筛选到磷转运蛋白基因 *GmSPX8*,该基因具有在低磷胁迫下调控大豆根瘤生长发育与固氮的功能;进一步分析该基因作用机制发现,*GmSPX8* 启动子序列含有 E-box 基序,经酵母双杂交和 LUC 荧光素酶等方法证实 *GmSPX8* 与 *GmPTF1* 存在作用关系,说明 *GmSPX8* 在低磷胁迫下影响大豆结瘤固氮与 *GmPTF1* 有关^[21]。

综合分析前人研究报道发现,*GmPTF1* 可结合 *GmEXPB2* 上游启动子的 E-box 进而通过调控 *GmEXPB2* 表达实现提高大豆根系耐低磷能力的功能,而 *GmEXPB2* 同时具有影响大豆根系耐低磷能力和结瘤固氮的双功能。并且,*GmPTF1* 可结合 *GmSPX8* 上游启动子的 E-box,二者存在真实互作关系,而 *GmSPX8* 亦具有在低磷胁迫下调控大豆根瘤生长发育与固氮的功能。因而,本研究推测,转录因子 *GmPTF1* 具有同时调控大豆根系耐低磷和结瘤固氮双功能。

为验证上述推测是否正确,本研究分析了不同磷素处理条件下的超表达与 RNAi 转 *GmPTF1* 大豆复合植株结瘤固氮相关性状,结果发现,在正常磷供应条件下,超表达转基因复合植株根瘤数量、鲜重、固氮酶活性分别较对照提高 24.6%、17.0% 和 14.1%,而 RNAi 转基因复合植株根瘤数量、鲜重、固氮酶活性分别较对照降低 14.9%、21.0% 和 17.3%,说明 *GmPTF1* 参与正常供磷条件下的结瘤固氮。更重要的是,在低磷胁迫条件下,超表达转基因复合植株根瘤数量、鲜重、固氮酶活性分别较对照提高 32.3%、31.6% 和 32.2%,而 RNAi 转基因复合植株根瘤数量、鲜重、固氮酶活性分别较对照

降低 27.4%、36.7% 和 24.3%，充分说明 *GmPTF1* 还可以调控磷素缺乏条件下的大豆结瘤固氮，从而证实了转录因子 GmPTF1 具有同时调控大豆根系耐低磷和结瘤固氮双功能。

4 结论

本研究证实 bHLH 转录因子基因 *GmPTF1* 在大豆根瘤中优势表达，且低磷处理下的表达量显著高于正常磷；超表达 *GmPTF1* 显著提高低磷胁迫下的大豆复合植株固氮相关性状，RNAi 植株根瘤则呈现相反趋势；GmPTF1 通过识别 E-box 从而调控有关结瘤固氮基因表达。本研究结果为大豆结瘤固氮分子育种改良提供了新基因。

参考文献

[1] 曲厚兰, 姜振, 李晶, 等. 世界大豆产业发展现状及我国大豆产业发展建议[J]. 大豆科技, 2022(5): 28-33. (QU H L, JIANG Z, LI J, et al. Development status of world soybean industry and suggestions on the development of soybean industry in China[J]. Soybean Science and Technology, 2022(5): 28-33.)

[2] 杨占武, 杜汇, 邢馨竹, 等. 大豆细胞色素 P450 家族 GmCY-P78A71 固氮功能解析[J]. 中国农业科技导报, 2023, 25(1): 50-57. (YANG Z W, DU H, XING X Z, et al. Functional analysis of cytochrome P450 family GmCYP78A71 in soybean nodulation [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2023, 25(1): 50-57.)

[3] LIU A, CONTADOR C A, FAN K, et al. Interaction and regulation of carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in root nodules of legumes [J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1860-1878.

[4] HERNÁNDEZ G, VALDÉS-LÓPEZ O, RAMÍREZ M, et al. Global changes in the transcript and metabolic profiles during symbiotic nitrogen fixation in phosphorus-stressed common bean plants [J]. Plant Physiology, 2009, 151(3): 1221-1238.

[5] L' TAIEF B, SIFI B, ZAMANALLAH M, et al. Genotypic variability for tolerance to salinity and phosphorus deficiency among N₂-dependent recombinant inbred lines of common bean (*Phaseolus vulgaris*) [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(20): 4205-4213.

[6] CABEZA R A, LIESE R, LINGNER A, et al. RNA-seq transcriptome profiling reveals that *Medicago truncatula* nodules acclimate N₂ fixation before emerging P deficiency reaches the nodules [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(20):

6035-6048.

[7] VALENTINE A J, KLEINERT A, BENEDITO V A. Adaptive strategies for nitrogen metabolism in phosphate deficient legume nodules [J]. Plant Science, 2017, 256: 46-52.

[8] CHEN Z J, CUI Q Q, LIANG C Y, et al. Identification of differentially expressed proteins in soybean nodules under phosphorus deficiency through proteomic analysis [J]. Proteomics, 2011, 11(24): 48-59.

[9] XUE Y B, ZHUANG Q L, ZHU S G, et al. Genome wide transcriptome analysis reveals complex regulatory mechanisms underlying phosphate homeostasis in soybean nodules [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 2924-2947.

[10] LU M Y, CHENG Z Y, ZHANG X M, et al. Spatial divergence of PHR-PHT1 modules maintains phosphorus homeostasis in soybean nodules [J]. Plant Physiology, 2020, 184: 236-250.

[11] VERNIÉ T, MOREAU S, DEBILLY F, et al. EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula* [J]. Plant Cell, 2008, 20(10): 696-713.

[12] JIANG S, JARDINAUD M F, GAO J, et al. NIN-like protein transcription factors regulate leghemoglobin genes in legume nodules [J]. Science, 2021, 374(6567): 625-628.

[13] WANG Y, YANG Z, KONG Y, et al. *GmPAP12* is required for nodule development and nitrogen fixation under phosphorus starvation in soybean [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 450-462.

[14] TOLEDO-ORTIZ G, HUQ E, QUAIL P H. The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family [J]. Plant Cell, 2003, 15(8): 49-70.

[15] YI K K, WU Z C, ZHOU J, et al. OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice [J]. Plant Physiology, 2005, 138(4): 87-96.

[16] LI Z, GAO Q, LIU Y, et al. Overexpression of transcription factor *ZmPTF1* improves low phosphate tolerance of maize by regulating carbon metabolism and root growth [J]. Planta, 2011, 233(6): 1129-1143.

[17] LI Z, LIU C, ZHANG Y, et al. The bHLH family member ZmPTF1 regulates drought tolerance in maize by promoting root development and abscisic acid synthesis [J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(19): 5471-5486.

[18] LI X H, WU B, KONG Y B, et al. *GmPTF1*, a novel transcription factor gene, is involved in conferring soybean tolerance to phosphate starvation[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(1): 926-937.

[19] 钟磊, 乔亚科, 乔潇, 等. 转 *GmPTF1* 基因大豆在低磷胁迫下的表现[J]. 核农学报, 2013, 27(7): 1041-1047. (ZHONG L, QIAO Y K, QIAO X, et al. Performance of transgenic soybean with *GmPTF1* gene under low phosphorus stress [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 27(7): 1041-1047.)

[20] YANG Z, GAO Z, ZHOU H, et al. GmPTF1 modifies root architecture responses to phosphate starvation primarily through regulating *GmEXPB2* expression in soybean [J]. Plant Journal, 2021, 107(2): 525-543.

[21] XING X Z, DU H, YANG Z W, et al. *GmSPX8*, a nodule-localized regulator confers nodule development and nitrogen fixation under phosphorus starvation in soybean [J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1): 161-174.

[22] KONG Y B, WANG B, DU H, et al. *GmEXLB1*, a soybean expansin-like B gene, alters root architecture to improve phosphorus acquisition in *Arabidopsis* [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 808-820.

[23] ZHUANG Q, XUE Y, YAO Z, et al. Phosphate starvation responsive *GmSPX5* mediates nodule growth through interaction with GmNF-YC4 in soybean (*Glycine max*) [J]. Plant Journal, 2021, 108(5): 1422-1438.

[24] YAN Q, WANG L, LI X. GmBEHL1, a BES1/BZR1 family protein, negatively regulates soybean nodulation [J]. Science Reports, 2018, 8(1): 6-14.

[25] QIN L, ZHAO J, TIAN J, et al. The high-affinity phosphate transporter GmPT5 regulates phosphate transport to nodules and nodulation in soybean [J]. Plant Physiology, 2012, 159(4): 1634-1643.

[26] WANG Y, YANG W, ZUO Y, et al. *GmYUC2a* mediates auxin biosynthesis during root development and nodulation in soybean [J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(12): 3165-3176.

[27] AHMAD M Z, REHMAN N U, YU S, et al. GmMAX2-D14 and -KAI interaction-mediated SL and KAR signaling play essential roles in soybean root nodulation [J]. Plant Journal, 2020, 101(2): 334-351.

[28] 吴军. 豆科植物 bHLH 家族演化及大豆候选 bHLH 在结瘤中的功能验证[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020. (WU J. The evolution of bHLH family in legumes and functional validation of soybean candidate bHLH in nodulation [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.)

[29] GODIARD L, NIEBEL A, MICHELI F, et al. Identification of new potential regulators of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis using a large-scale suppression subtractive hybridization approach [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(3): 321-332.

[30] ARIEL F, BRAULT-HERNANDEZ M, LAFFONT C, et al. Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula* [J]. Plant Cell, 2012, 24(9): 3838-3852.

[31] GODIARD L, LEPAGE A, MOREAU S, et al. A bHLH transcription factor involved in *Medicago truncatula* nodule vascular patterning and nodule to plant metabolic exchanges [J]. New Phytologist, 2011, 191(2): 391-404.

[32] SAKAMOTO K, OGIWARA N, KAJI T, et al. Transcriptome analysis of soybean (*Glycine max*) root genes differentially expressed in *rhizobial*, *arbuscular mycorrhizal*, and dual symbiosis [J]. Journal of Plant Research, 2019, 132(4): 541-568.

[33] CHIASSON D M, LOUGHLIN P C, MAZURKIEWICZ D, et al. Soybean SAT1 (Symbiotic Ammonium Transporter 1) encodes a bHLH transcription factor involved in nodule growth and NH_4^+ transport [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, 2014, 111(13): 4814-4819.

[34] LI X, ZHAO J, TAN Z, et al. GmEXPB2, a cell wall β -expansin, affects soybean nodulation through modifying root architecture and promoting nodule formation and development [J]. Plant Physiology, 2015, 169(4): 2640-2653.