

李雅雪, 盘耀亮, 彭光粉, 等. *GmNtLs* 调控大豆根系响应低磷胁迫的功能研究 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(2): 221-229.
LI Yaxue, PAN Yaoliang, PENG Guangfen, et al. Functional characterization of phosphorus deficiency-responsive *GmNtLs* in soybean roots[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(2): 221-229.

GmNtLs 调控大豆根系响应低磷胁迫的功能研究

李雅雪✉, 盘耀亮, 彭光粉, 田江, 陆星✉, 梁翠月
(华南农业大学 资源环境学院/根系生物研究中心, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】低磷和铝毒胁迫是酸性土壤中限制作物生产的重要因素。植物 NTL 转录因子参与调控多种环境胁迫 (包括铝毒胁迫) 的适应性机制, 本文探究 *GmNtLs* 调控大豆 *Glycine max* 根系响应低磷胁迫的功能。【方法】通过 RT-qPCR 分析大豆 15 个 *GmNtLs* 基因在根系响应低磷胁迫的表达模式, 进一步构建了 *GmNtL1/4/7/8/10/12* 共 6 个 *GmNtLs* 基因的拟南芥超量表达材料, 探究 *GmNtL* 成员在拟南芥根系中响应低磷胁迫的功能。【结果】系统进化树及组织表达模式分析结果表明, *GmNtLs* 家族分 3 个亚族, 各亚族成员在大豆中组织表达模式不同。RT-qPCR 结果表明, 低磷处理 12 d 显著提高了 *GmNtL1/4/7/8/10/12* 在大豆根系中的表达。在拟南芥中超量表达不同 *GmNtL* 基因对低磷的响应不同。高磷处理下, 超量表达 *GmNtL4/10/12* 拟南芥的鲜质量显著增加; 低磷处理时, 超量表达 *GmNtL4* 显著提高拟南芥鲜质量, 而超量表达 *GmNtL1/12* 拟南芥的鲜质量显著降低。同时, 仅超量表达 *GmNtL12* 拟南芥的主根长显著缩短, 而超量表达其他基因对拟南芥植株的主根长无明显影响。【结论】*GmNtLs* 参与大豆根系对低磷胁迫的响应, 该结果可为培育磷高效型大豆品种提供数据支持。

关键词: 大豆; 根系; 低磷胁迫; *GmNtLs*; NTL 转录因子

中图分类号: Q945.78; S529

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)02-0221-09

Functional characterization of phosphorus deficiency-responsive *GmNtLs* in soybean roots

LI Yaxue✉, PAN Yaoliang, PENG Guangfen, TIAN Jiang, LU Xing✉, LIANG Cuiyue
(College of Natural Resources and Environment/Root Biology Center, South China
Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】Low phosphorus (P) availability and aluminum (Al) toxicity constrain crop production in acid soils. NTL transcription factors play an important role in the mechanisms of plant response to various abiotic stresses, including Al toxicity. This study focused on analyzing the function of *GmNtLs* in soybean roots responding to P deficiency. 【Method】Expression pattern were performed on 15 members of the *GmNtL* family in the soybean by RT-qPCR assays. We further investigated the function of some *GmNtLs* members in adaptation to low P by overexpressing the genes of *GmNtL1/4/7/8/10/12* in *Arabidopsis thaliana*. 【Result】The phylogenetic analysis and the tissue expression analysis of each subfamily members revealed that 15 *GmNtLs* were divided into three subgroups and different *GmNtL* family members had different tissue

收稿日期: 2022-04-16 网络首发时间: 2022-12-07 08:51:39

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail//44.1110.S.20221206.1137.002.html>

作者简介: 李雅雪, 硕士研究生, 主要从事大豆适应低磷胁迫的生理机制研究, E-mail: 2504269468@stu.scau.edu.cn; 通信

作者: 陆星, 助理研究员, 博士, 主要从事豆科作物根际养分调控的机制研究, E-mail: xinglu@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (32172659)

expression pattern in soybean. The RT-qPCR results showed that the expression levels of *GmNTL1/4/7/8/10/12* in soybean roots significantly increased after 12 days of low P treatment. Overexpression of different *GmNTLs* in *Arabidopsis* showed different responses to low P. The fresh weight of transgenic *Arabidopsis* overexpressing *GmNTL4/10/12* significantly increased compared to control lines under high P treatment. Overexpression of *GmNTL4* significantly improved fresh weight of transgenic *Arabidopsis* plant under low P deficiency; Whereas, the plant fresh weight of transgene lines overexpressing *GmNTL1/12* significantly decreased. Overexpression of *GmNTL12* reduced the primary root length of transgenic plants; Whereas, overexpression of other *GmNTLs* had no significant effect on primary root length. 【Conclusion】 *GmNTLs* involve in the response of soybean roots to low P stress, and these results can provide a theoretical basis for cultivating soybean varieties with high P efficiency.

Key words: *Glycine max*; Root; Low phosphorus stress; *GmNTLs*; NTL transcription factor

NAC(NAM、ATAF1/2、CUC2) 是与植物生长发育和胁迫相关的特异性转录因子^[1]。NTL(NAC with transmembrane motif like) 则是蛋白 C 端带有跨膜结构域的一类 NAC 转录因子^[2]。研究显示, NTL 家族成员在调控生物、非生物胁迫应答和植物发育过程中发挥重要作用^[3]。目前多个 NTL 的功能被报道, 例如, 超量表达拟南芥 *ANAC017/AtNLT7* 增强了转基因植株对内质网胁迫的耐受性^[4]; 在拟南芥中超量表达 *ANAC005* 抑制了与木质素、形成层、初生壁等生物合成相关的基因的表达, 造成植株矮化^[5]; 在拟南芥中异源表达玉米 *ZmNLT1*、*ZmNLT2* 和 *ZmNLT5*, 可以降低转基因拟南芥对 H₂O₂ 的敏感性^[6]; 超量表达 *AtNLT6* 增强转基因拟南芥植株的抗旱能力^[7]; *AtNLT8* 在盐胁迫下调控赤霉素 (GA) 途径促使种子萌发, 同时调控拟南芥的开花时间^[8]; *AtNLT6* 受冷胁迫, 诱导 *PR1*、*PR2* 和 *PR5* 等相关抗病基因的表达^[9]。

我国南方地区土壤多呈酸性。低磷和铝毒是酸性土壤中长期共存的营养逆境因子, 植物为了适应酸性土壤的缺磷和铝毒胁迫, 进化出各种协同调控和应答机制, 如分泌有机酸、改变根系形态构型等^[10-14]。大豆 *Glycine max* 是重要的粮油兼用作物, 我国大豆产量不足以满足国内需求, 需依赖进口^[15]。南方酸性土壤中存在低磷、铝毒胁迫从而限制了大豆的生产^[16]。在大豆基因组中鉴定到 15 个 *GmNLT* 同源基因并对其进行了功能分析, 结果表明, 超量表达 *GmNLT1*、*GmNLT7* 等显著提高转基因拟南芥对盐害和干旱的耐受能力^[17-19]。前期研究结果表明, *GmNLTs* 参与了大豆耐铝毒胁迫, 超量表达 *GmNLT4* 可能通过调控外排有机酸或细胞壁修饰相关基因来提高转基因拟南芥对铝的耐受性^[20]。进一步比较分析野生型 (WT) 和超量表达

GmNLT4 转基因拟南芥根系的转录组数据, 发现一些与根系生长相关的基因, 包括 *RGF2*、*Extensin*、*Auxin-responsive protein* 等, 均受 *GmNLT4* 调控, 而一些磷平衡相关基因, 包括紫色酸性磷酸酶基因 *PAP20* (At3g52780)、酸性磷酸酶基因 *VSP1* (At5g24780) 和 *VSP2* (At5g24770) 等, 也受 *GmNLT4* 调控, 但未发现磷转运子相关基因受 *GmNLT4* 调控^[20]。据此, 我们猜测 *GmNLTs* 可能参与了大豆生长对低磷的适应性机制。因此, 本研究首先对大豆基因组中 15 个 *GmNLT* 成员进行系统进化树和组织部位表达模式分析, 然后利用 RT-qPCR 测定该家族成员响应低磷胁迫的表达模式, 进一步构建 *GmNLTs* 超量表达转基因拟南芥株系, 对其鲜质量和总根长进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验采用的大豆材料为磷高效品种 ‘粤春 03-3’ (YC03-3); 拟南芥材料为哥伦比亚野生型 (Col-0)。

1.2 大豆 *GmNLTs* 基因家族进化及表达模式预测分析

在 Phytozome 网站 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 利用 BLAST 搜索引擎查找 *GmNLTs* 家族氨基酸序列。使用软件 MEGA7 (<http://http://www.mega software.net>) 以邻接法构建进化树。利用 SoyBase 数据库 (<https://www.soybase.org/soyseq/>) 获得大豆 *GmNLTs* 家族基因的组织表达数据。

1.3 大豆不同磷浓度处理

大豆磷处理试验在华南农业大学根系生物学研究中心的温室大棚中进行。用砂培萌发种子 3~4 d, 挑选长势均一的大豆幼苗转移至 Hoagland 营

养液中进行磷处理: 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 (高磷) 和 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 (低磷)。每个处理 4 次重复, 每次重复 4 株苗。收取处理 6、12 d 的大豆生理样品, 测量主根长, 称取鲜质量, 同时收取根系样品用液氮速冻后保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。设置 5、50 和 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 3 个磷浓度, 处理 12 d, 分析不同磷浓度下大豆 *GmNtLs* 家族基因的表达模式。

1.4 植物 RNA 的提取、反转录及 RT-qPCR

用 TRIzol(Omega, 美国) 法提取大豆根系 RNA; 使用 HiScript[®]1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒 (Promega, 北京), 将其反转录为 cDNA 单链。在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 设计 *GmNtLs* 基因及大豆看家基因 *GmEF1a* 的定量 PCR 引物 (*GmNtL1* 的正向引物为 GTCGTCGAGTGTTACCCACA, 反向引物为 CGTAGCTCGGTTCAACCTGT; *GmNtL4* 的正向引物为 GCCGTTAGGGTTCCGTTTC, 反向引物为 GCTCCTTCAAAGTGGGACGATA; *GmNtL7* 的正向引物为 CCAAGTGCATCAGAAGGCT, 反向引物为 GCAGTGTCTTTACCTGCTGC; *GmNtL8* 的正向引物为 CAATATGTGCGGAGGAAG, 反向引物为 GTGATGATGAGTAGTTGGATT; *GmNtL10* 的正向引物为 TTCTGCCCTACCGATGAGGA, 反向引物为 TTTGCTCTTTGCCAGTTGC; *GmNtL12* 的正向引物为 CATGGATATTGCTCACCCCTGC, 反向引物为 AGGCTTGTGCCATTTTCAGC; *GmEF1a* 的正向引物为 TGCAAAGGAGGCTGCTAACT, 反向引物为 CAGCATCACCGTTCTTCAAA), 用实时荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher, 美国) 测定, 相对表达量为目的基因表达量与看家基因表达量的比值。

1.5 大豆 *GmNtLs* 家族基因克隆及重组载体构建

从 Phytozome 数据库中获得大豆 *GmNtLs* 家族中 *GmNtL1*、*GmNtL4*、*GmNtL7*、*GmNtL8*、*GmNtL10* 和 *GmNtL12* 基因的 CDS 序列, 在 NCBI 网站设计其正反向引物, 按照一步克隆法连接华南农业大学根系生物研究中心保存的 35S:pTF101S 载体。测序正确后, 利用试剂盒 Hipure Fungal DNA Mini Kit (Magen, 广州) 抽取质粒, 保存备用。

1.6 超量表达 *GmNtLs* 转基因拟南芥的转化与筛选

将“1.5”获取的 6 个 *GmNtLs* 重组载体转化农杆菌 GV3101(唯地, 上海), 使用花序侵染法进行拟南芥转化。获得 T_0 代拟南芥转基因种子后, 取种子用 5% (φ) 次氯酸钠溶液进行表面消毒, 均匀种植

在含 0.025% (φ) 除草剂的拟南芥 MS 固体萌发培养基中, 放置在培养条件为日长 12 h、光照 4000 lx、温度 23 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 75%, 黑暗 12 h、温度 21 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 75% 的人工气候箱 (莱福仪器, 宁波) 中生长 14 d 左右。将正常存活且长出 4 片叶子的 T_1 代存活幼苗移植到蛭石、基质质量比为 1:3 的混合基质中, 在 12 h 光照/12 h 黑暗条件下生长, 待植株叶片较大时取样进行 PCR 检测来筛选阳性转基因株系。分株收取阳性 T_1 代种子重复上述的筛选步骤, 获得存活幼苗为 T_2 代, 选取 T_2 代种子于平板筛选阳性和阴性植株分离比为 3:1 的株系进行 T_3 代纯合体的筛选。

1.7 转基因拟南芥低磷胁迫处理

将 T_3 代转基因植株种子和野生型拟南芥种子消毒后播种在 MS 固体萌发培养基上, 待根长至 1 cm 左右, 挑选长势一致的幼苗移至 1 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 的高磷处理、12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 的低磷处理 MS 培养基上, 在“1.6”人工气候箱中处理 12 d, 收样, 测定植株鲜质量和主根长。

1.8 数据统计及分析

所有试验数据通过 Microsoft Excel 2019(Microsoft, 美国) 和 IBM SPSS Statistics V26.0(IBM SPSS, 美国) 进行处理及统计分析。用 TBtools 软件 (<http://www.tbtools.com/>) 绘制表达模式热图。

2 结果与分析

2.1 *GmNtLs* 蛋白家族进化树及组织表达模式分析

对 15 个 *GmNtLs* 家族构建系统进化树, 结果显示, *GmNtLs* 家族分为 I、II 和 III 3 个亚家族, 7 个复制对。其中 *GmNtL2/12* 和 *GmNtL8/13* 2 个复制对属于第 I 亚族; *GmNtL6/15* 和 *GmNtL7/14* 2 个复制对属于第 II 亚族, *GmNtL1/11*、*GmNtL3/4* 和 *GmNtL9/10* 3 个复制对及 *GmNtL5* 属于第 III 亚族 (图 1)。

利用 SoyBase 数据库对 *GmNtLs* 基因在不同组织部位的表达水平构建表达模式热图, (其中 *GmNtL5*、*GmNtL6* 和 *GmNtL9* 这 3 个基因未被收录), 结果如图 1 所示。第 I 亚家族成员在各组织部位中几乎不表达。第 II 亚族中 *GmNtL7* 和 *GmNtL14* 在各组织部位表达量都很低; *GmNtL15* 主要在根和根瘤中表达。第 III 亚族中 *GmNtL1* 在根中有较低表达量; *GmNtL3* 在新叶、根瘤、花后 14 d 的荚中表达量较高; *GmNtL4* 主要在根瘤和花后 14 d 的荚中表达, 其中在根瘤中的表达量最高。

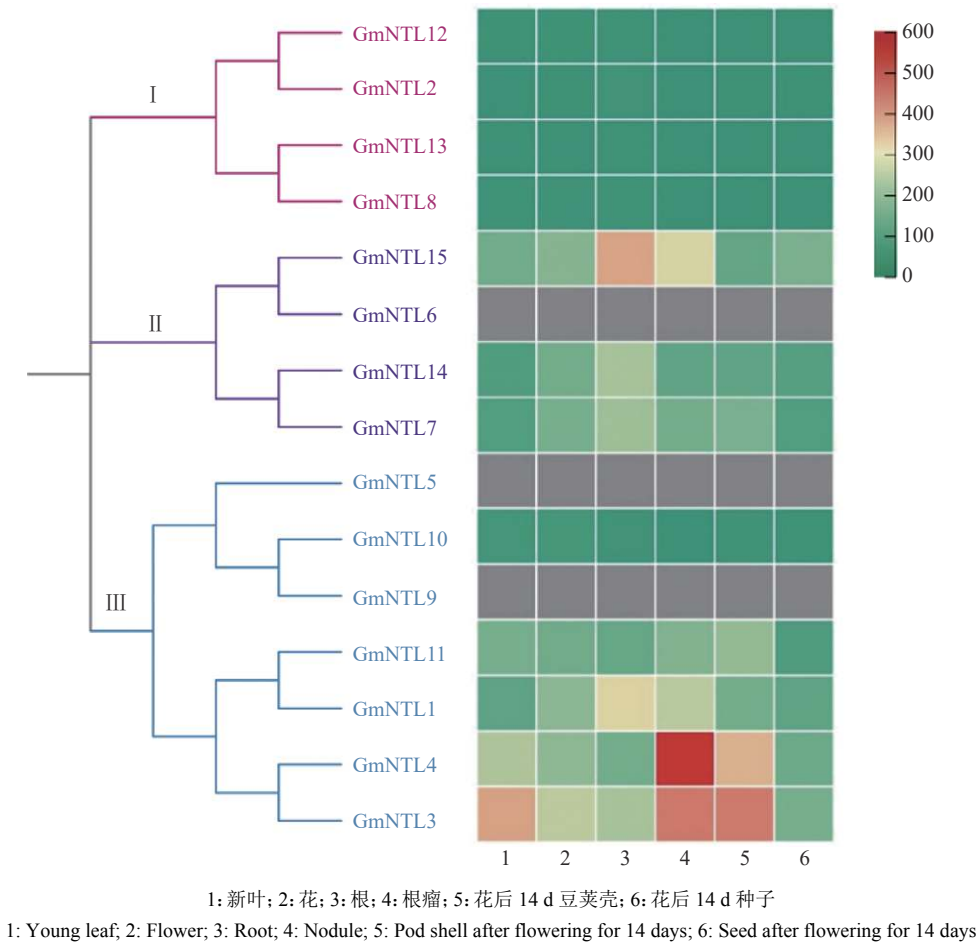


图 1 大豆 GmNTL 蛋白系统进化树及组织表达模式分析

Fig. 1 Phylogenetic tree and tissue expression analysis of GmNTL proteins in soybean

2.2 不同磷处理时间对大豆生长及 *GmNTLs* 基因家族表达模式的调控

使用水培体系对大豆 YC03-3 幼苗进行高磷 (250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4) 和低磷 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4) 处理 6、12 d 后分别收样。结果显示, 高、低磷处理 6、12 d 后, 高磷处理大豆的地上部生物量

要明显高于低磷处理的; 而低磷处理大豆的根系要比高磷处理的发达 (图 2、3)。具体表现为, 处理 6、12 d 后, 与高磷处理相比, 低磷处理的地上部干质量显著减少 3.6% 和 43%(图 3A); 同时, 处理 12 d 后, 低磷处理的根系干质量和总长度分别显著增加 5.5% 和 39%(图 3B、3C)。以上结果表明, 低磷处理

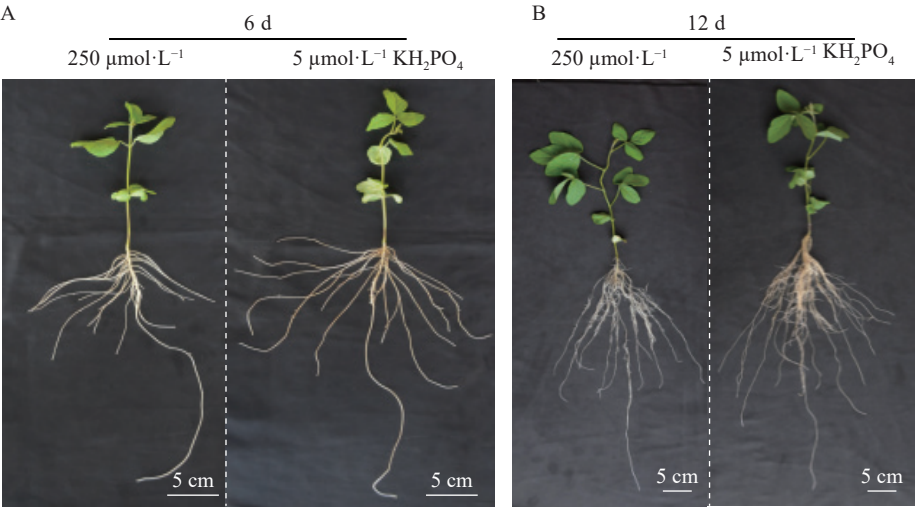
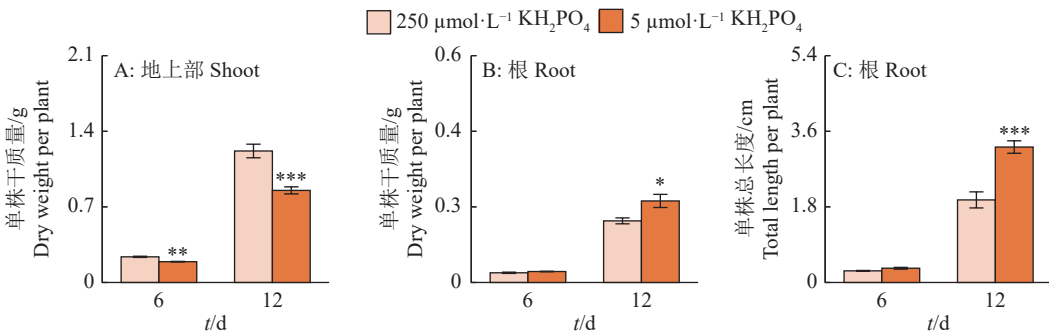


图 2 不同磷处理时间对大豆生长的影响

Fig. 2 Effect of different phosphorus treatment time on soybean growth



“*” “**” “***” 分别表示相同胁迫时间不同磷浓度处理在 $P < 0.05$, 0.01 , 0.001 水平差异显著 (t 检验)

“*” “**” “***” indicate significant differences between different phosphorus concentration treatments at the same stress time at $P < 0.05$, 0.01 and 0.001 levels, respectively (t test)

图 3 不同磷处理时间对大豆生物量和根长的影响

Fig. 3 Effect of different phosphorus treatment time on soybean biomass and root length

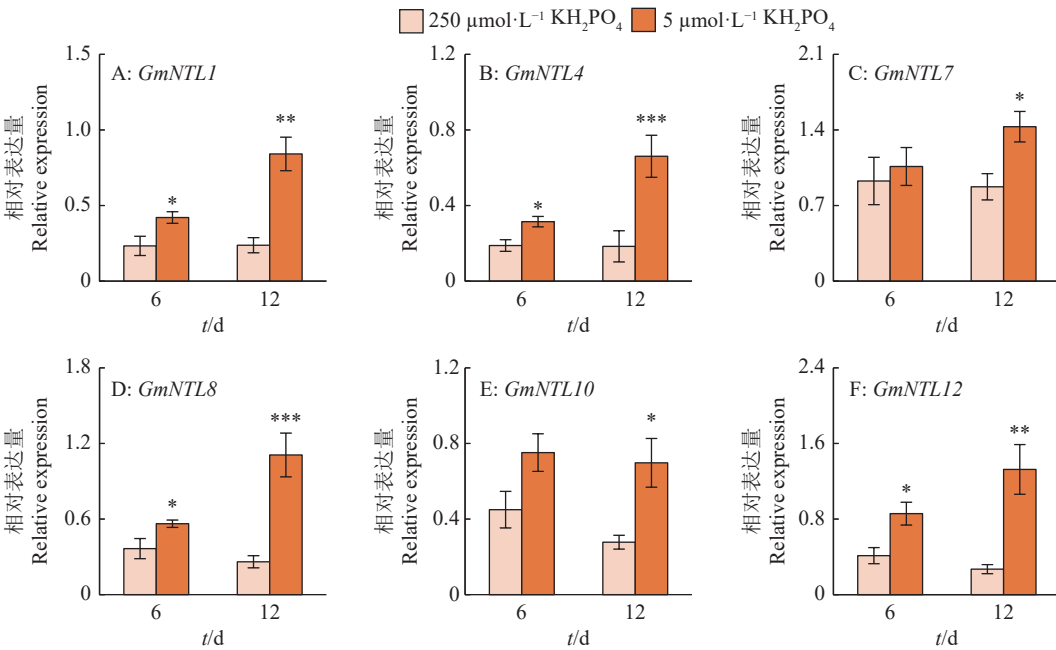
显著促进大豆根系的生长, 植物可以通过根系生长的变化来适应低磷胁迫。

根据系统进化树结果, 从 *GmNTLs* 家族的 6 个复制对中各挑取 1 个基因包括 *GmNTL1*、*GmNTL4*、*GmNTL7*、*GmNTL8*、*GmNTL10* 和 *GmNTL12*, 分析不同磷有效性和磷处理时间对大豆 *GmNTLs* 在根系表达水平的影响。结果显示, *GmNTLs* 家族基因的表达量均在 6 或 12 d 受低磷胁迫诱导显著上调 (图 4)。在磷处理 6 d 后, 低磷条件下, *GmNTL1*、*GmNTL4*、*GmNTL8* 和 *GmNTL12* 的表达水平分别比高磷的高 1.8、1.8、2.1 和 2.1 倍 (图 4A、4B、4D、4F), *GmNTL7/10* 与高

磷条件下无明显差异 (图 4C、4E)。磷处理 12 d 后, 低磷条件下 *GmNTL1*、*GmNTL4*、*GmNTL7*、*GmNTL8*、*GmNTL10* 和 *GmNTL12* 的表达水平分别比高磷条件下高 3.5、5.5、1.5、3.5、1.9 和 3.2 倍 (图 4), 这些结果表明 *GmNTLs* 参与了大豆根系适应低磷胁迫过程。

2.3 不同磷处理浓度对大豆根系中 *GmNTLs* 表达模式的影响

从 “2.2” 结果可知, 当磷处理 12 d 后, 大豆根系中 *GmNTLs* 的表达模式受低磷诱导上调较为显著, 因此进一步探究了不同磷浓度 (5、50 和 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4) 处理 12 d 对大豆根系 *GmNTLs*



“*” “**” “***” 分别表示相同胁迫时间不同磷浓度处理在 $P < 0.05$, 0.01 , 0.001 水平差异显著 (t 检验)

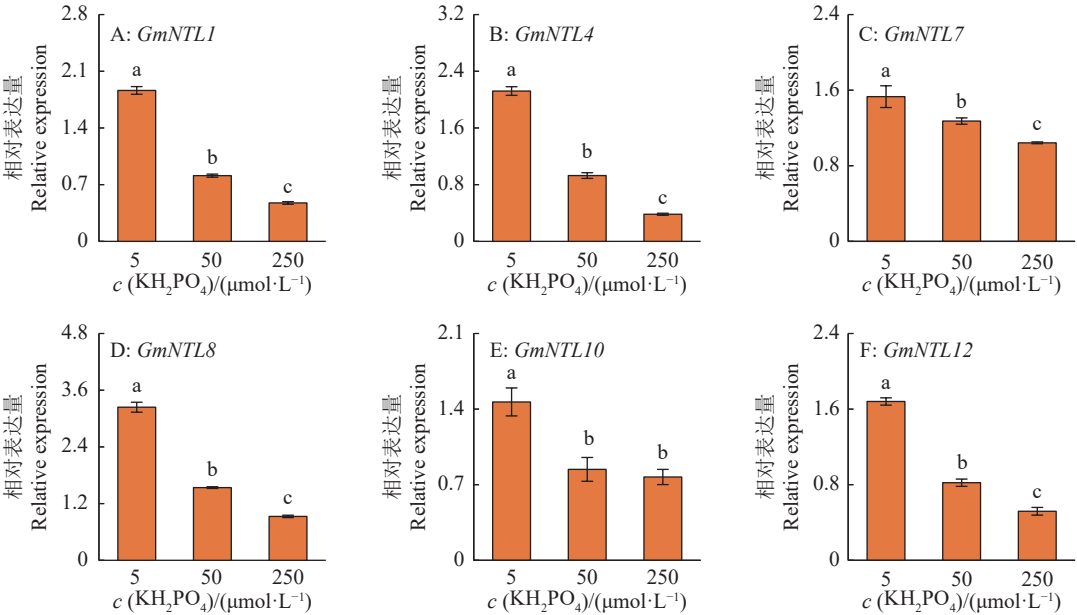
“*” “**” “***” indicate significant differences between different phosphorus concentration treatments at the same stress time at $P < 0.05$, 0.01 and 0.001 levels, respectively (t test)

图 4 不同磷处理时间对大豆根系 *GmNTLs* 表达模式的影响

Fig. 4 Effect of different phosphorus treatment time on relative expression of *GmNTLs* in soybean roots

表达模式的影响。结果表明:随着磷处理浓度的降低, *GmNTLs* 基因的表达量整体显著上调(图 5)。当磷浓度从 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下降到 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,除 *GmNTL10* 基因的表达量无明显变化外,其他基因的表达量均随磷浓度降低而显著上调,上调比例介

于 22.1%~142.6%;而当磷浓度从 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 进一步下降到 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,6 个 *GmNTLs* 的表达量均显著上调,上调比例介于 20.3%~129.7%。以上结果进一步表明 *GmNTLs* 基因参与了大豆根系响应低磷胁迫的过程,但各成员响应程度有差异。



各小图中, 柱子上的不同小写字母表示不同磷处理浓度间差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's t 法)

In each figure, different lowercase letters on bars indicate significant differences among different phosphorus concentrations ($P < 0.05$, Duncan's method)

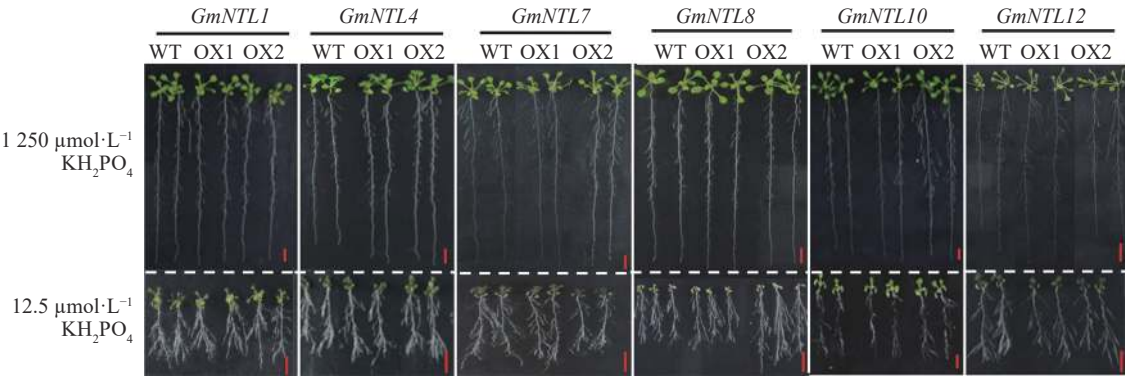
图 5 不同磷处理浓度下大豆根系 *GmNTLs* 相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *GmNTLs* in soybean roots under different phosphorus concentrations

2.4 低磷胁迫对超量表达 *GmNTLs* 拟南芥生长的影响

野生型和超量表达 *GmNTLs* 的转基因拟南芥幼苗在高、低磷 MS 固体培养基处理 12 d 后, 分析植株鲜质量和主根长。结果(图 6、7、8)显示, 与野生型 (WT) 相比, 高磷条件下, 超量表达 *GmNTL4*、*GmNTL10* 和 *GmNTL12* 促进了拟南芥植株的生长,

其鲜质量分别显著增加 11.0%、12.4%, 13.0%、14.4% 和 22.2%、16.2%(图 7B、7E、7F); 低磷条件下, 超量表达 *GmNTL4* 拟南芥鲜质量显著增加 8.3%、15.9%(图 7B), 而超量表达 *GmNTL1* 和 *GmNTL12* 拟南芥鲜质量显著减少 11.4%、13.3% 和 17.8%、17.5%(图 7A、7F)。与鲜质量相似, 在高磷条件下, 超量表达 *GmNTL4* 和 *GmNTL12* 植株的



WT: 拟南芥 Col-0 野生型; OX1 和 OX2: 超量表达株系; 标尺=1 cm

WT: *Arabidopsis* Col-0 wild-type; OX1 and OX2: Overexpressed lines; Bar = 1 cm

图 6 不同磷浓度下转基因拟南芥生长情况

Fig. 6 Growth of transgenic *Arabidopsis* under different phosphorus concentrations

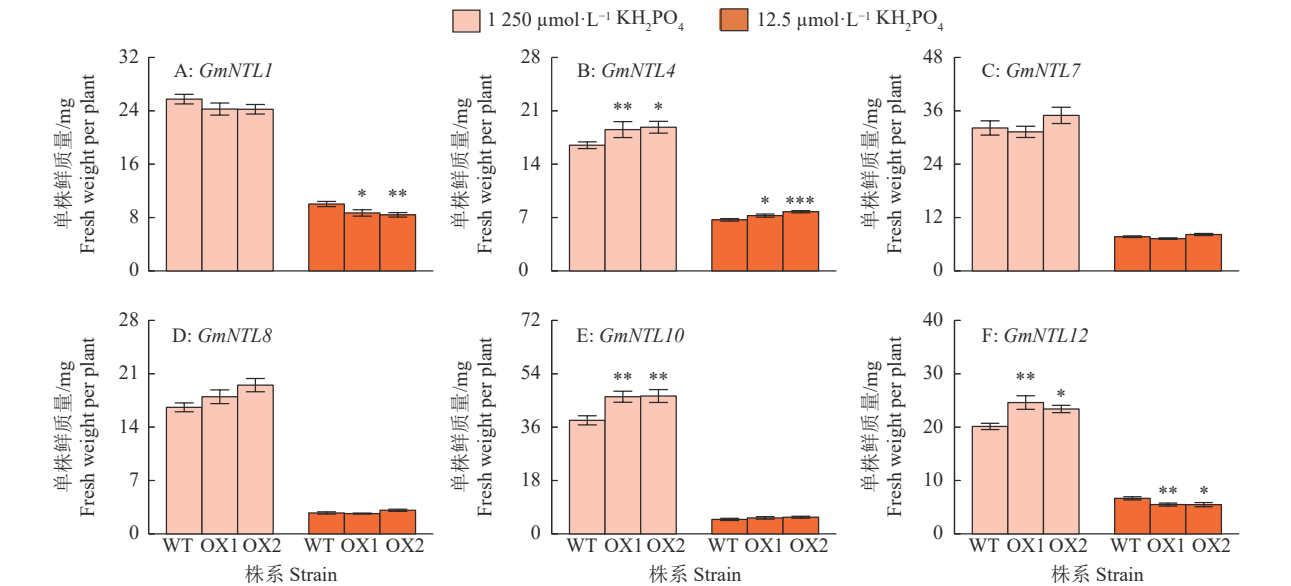


图 7 不同磷浓度下转基因拟南芥的生物量

Fig. 7 Biomass of transgenic *Arabidopsis* under different phosphorus concentrations

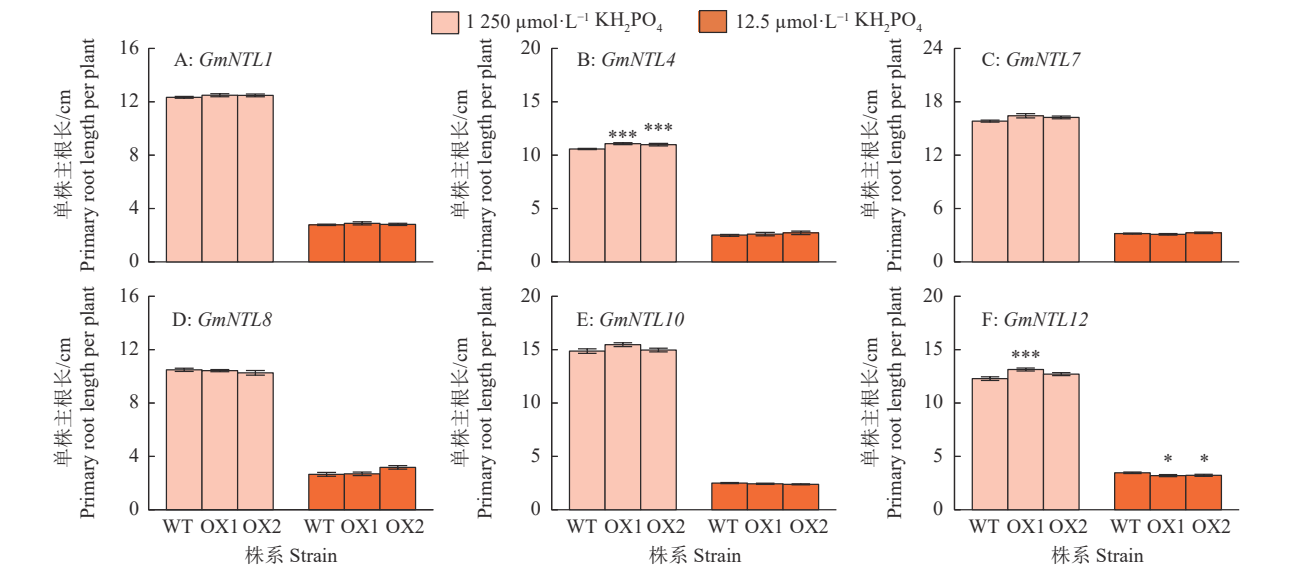


图 8 不同磷浓度下转基因拟南芥的主根长

Fig. 8 Primary root length of transgenic *Arabidopsis* under different phosphorus concentrations

主根长显著增加 4.7%、3.8% 和 7.0%(图 8B、8F); 在低磷条件下, 超量表达 *GmNTL12* 植株的主根长显著减少 7.7%、6.8%(图 8F)。超量表达 *GmNTL7* 和 *GmNTL8* 基因对转基因拟南芥的生长无明显影响(图 7C、7D、8C、8D)。结果表明不同 *GmNTL* 基因成员对拟南芥响应低磷胁迫的功能不同。

3 讨论与结论

植物 NTL 转录因子参与干旱、盐害、渗透和铝毒等非生物胁迫^[7, 18-23]。酸性土壤中铝毒和低磷胁迫共同存在, 植物进化出一系列协同调控应答机制^[10-14], Lin 等^[20]研究表明, *GmNTLs* 参与了大豆耐铝毒胁迫, 但是否调控大豆根系响应低磷胁迫还未

见报道。本研究通过设置不同磷浓度和不同胁迫时间处理,解析低磷胁迫对 *GmNLTs* 基因在大豆根系中表达水平的调控模式,发现 *GmNLTs* 基因成员都不同程度地受到低磷诱导上调表达,暗示这些 *GmNLTs* 基因均在大豆响应低磷胁迫中发挥作用;进一步分析发现,不同基因成员响应模式有所区别,其中 *GmNLT1*、*GmNLT4*、*GmNLT8* 和 *GmNLT12* 基因的表达量在低磷处理 6、12 d 后显著大幅度上调,而 *GmNLT7* 和 *GmNLT10* 基因的表达量在低磷处理 6 d 时无明显变化,只在 12 d 后显著上调。不同磷浓度处理的结果也类似, *GmNLT10* 基因的表达量只在极度缺乏磷时显著上调表达,而其他基因表达量随磷浓度减少不断显著增加,暗示这些 *GmNLTs* 基因在大豆适应低磷胁迫中可能起重要的作用。

为进一步验证 *GmNLTs* 在大豆根系响应低磷胁迫中的功能,本研究通过拟南芥的异源表达,构建了超量表达 *GmNLT1/4/7/8/10/12* 6 个基因的拟南芥转基因材料;结果显示,不同 *GmNLT* 基因成员在拟南芥响应低磷胁迫中的功能不同。超量表达 *GmNLT4* 和 *GmNLT12* 基因后,拟南芥转基因株系的鲜质量和主根长与野生型差异显著。例如,高磷条件下,超量表达 *GmNLT4* 的转基因拟南芥鲜质量和主根长均显著高于野生型,但低磷条件下其主根长无明显变化,说明 *GmNLT4* 可能参与了植株地上部生长对磷供应的适应性的调控,但对根系的调控作用不明显。另外,低磷条件下,超量表达 *GmNLT12* 的转基因拟南芥鲜质量和主根长均显著低于野生型,而高磷条件下,超量表达 *GmNLT12* 的转基因拟南芥表型与低磷相反。主根缩短是拟南芥根系响应低磷胁迫的重要反应之一^[24],低磷诱导的拟南芥主根生长是由生长素信号途径因子 *TIR1*、*AUX/IAA*、*AtARF19*, 以及 *STO1*、*LPR1* 和 *PDR2* 等多基因调控的综合结果^[25-28]。关于 *GmNLT12* 为什么在不同磷处理下对根系生长的影响不同,其调控机理还有待进一步研究。与 *GmNLT4* 相反,超量表达 *GmNLT1* 和 *GmNLT12* 显著降低了转基因株系在低磷条件下的鲜质量,暗示 *GmNLT1* 和 *GmNLT12* 可能参与植物适应低磷胁迫的负调控。无论是在高磷还是低磷条件下,超量表达 *GmNLT7* 和 *GmNLT8* 基因,对转基因拟南芥的鲜质量和主根伸长均无明显影响。当植物处于逆境时,膜结合转录因子转运到细胞核后发挥功能^[29]。超量表达 *NLTs* 全长的转基因幼苗与对照之间通常不存在表型差异,但是当去除过表达基因跨膜域后,表型出现明显差异^[21,30];推测超量表达 *GmNLT7* 和 *GmNLT8* 转

基因拟南芥在受到低磷胁迫时,可能没有诱导膜释放或膜释放不当,导致这 2 个转基因拟南芥与野生型无表型差异。

综上所述,低磷胁迫上调了大豆根系中 *GmNLT1/4/7/8/10/12* 基因的表达, *GmNLTs* 参与了大豆根系对低磷胁迫的响应。本研究结果可为后续深入研究 *NLT* 在大豆生长发育过程中的功能提供理论依据。

参考文献:

[1] OOKA H, SATOH K, DOI K, et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. *DNA Research*, 2003, 10(6): 239-247.

[2] KIM S Y, KIM S G, KIM Y S, et al. Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: Implications for membrane biology in genome regulation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(1): 203-213.

[3] 赵翠珠, 刘振华, 赵赫, 等. 植物 NAC 膜结合转录因子的研究进展[J]. *生命科学*, 2012, 24(1): 74-80.

[4] CHI Y H, MELENCION S, ALINAPON C V, et al. The membrane-tethered NAC transcription factor, AtNLT7, contributes to ER-stress resistance in *Arabidopsis*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 488(4): 641-647.

[5] ZHAO J, LIU J S, MENG F N, et al. ANAC005 is a membrane-associated transcription factor and regulates vascular development in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(5): 442-451.

[6] WANG D, YU Y, LIU Z, et al. Membrane-bound NAC transcription factors in maize and their contribution to the oxidative stress response[J]. *Plant Science*, 2016, 250: 30-39.

[7] KIM M J, PARK M, SEO P J, et al. Controlled nuclear import of the transcription factor NTL6 reveals a cytoplasmic role of SnRK2.8 in the drought-stress response[J]. *Biochemical Journal*, 2012, 448(3): 353-363.

[8] KIM S, LEE A, YOON H, et al. A membrane-bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid-mediated salt signaling in *Arabidopsis* seed germination[J]. *Plant Journal*, 2008, 55: 77-88.

[9] SEO P J, KIM M J, PARK J, et al. Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2010, 61(4): 661-671.

[10] KOCHIAN L V, HOEKENGA O A, PINEROS M A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 459-493.

[11] 吴佩, 李浩, 早浩龙, 等. 植物对缺磷和铝毒协同进化应答的分子生理机制[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(7): 170-181.

[12] LIAO H, WAN H, SHAFF J, et al. Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance, exudation of specific organic acids from differ-

ent regions of the intact root system[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(2): 674-684.

[13] LIANG C, PINEROS M A, TIAN J, et al. Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through *GmALMT1* to improve soybean adaptation to acid soils[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1347-1361.

[14] CHEN W, TANG L, WANG J, et al. Research advances in the mutual mechanisms regulating response of plant roots to phosphate deficiency and aluminum toxicity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1137. doi: 10.3390/ijms23031137.

[15] 于芮, 王斌, 王建忠, 等. 我国大豆市场发展现状及建议[J]. *合作经济与科技*, 2021(19): 92-93.

[16] 刘国选, 陈康, 陆星, 等. 大豆 *GmPIN2b* 调控根系响应低磷胁迫的功能研究[J]. *华南农业大学学报*, 2021, 42(4): 33-41.

[17] LI S, WANG N, JI D, et al. Evolutionary and functional analysis of membrane-bound NAC transcription factor genes in soybean[J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(3): 1804-1820.

[18] 向凤宁, 王楠. 大豆威廉姆斯 82 中 NAC 膜结合转录因子基因 *GmNTL1* 及其应用: CN106167801A[P]. 2018-08-28[2022-04-16].

[19] 向凤宁, 王楠. 大豆威廉姆斯 82 中 NAC 膜结合转录因子基因 *GmNTL7* 及其应用: CN106367423B[P]. 2017-02-01[2022-04-16].

[20] LIN Y, LIU G, XUE Y, et al. Functional characterization of aluminum (Al)-responsive membrane-bound NAC transcription factors in soybean roots[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23): 12854. doi: 10.3390/ijms222312854.

[21] PARK J, KIM Y S, KIM S G, et al. Integration of auxin and salt signals by the NAC transcription factor NTM2 during seed germination in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(2): 537-549.

[22] YOON H K, KIM S G, KIM S Y, et al. Regulation of leaf senescence by *NTL9*-mediated osmotic stress signaling in *Arabidopsis*[J]. *Molecules and Cells*, 2008, 25(3): 438-445.

[23] DUAN M, ZHANG R, ZHU F, et al. A lipid-anchored NAC transcription factor is translocated into the nucleus and activates *glyoxalase I* expression during drought stress[J]. *Plant Cell*, 2017, 29(7): 1748-1772.

[24] PERET B, CLEMENT M, NUSSAUME L, et al. Root developmental adaptation to phosphate starvation: Better safe than sorry[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(8): 442-450.

[25] PÉREZ-TORRES C, LÓPEZ-BUCIO J, CRUZ-RAMÍREZ A, et al. Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(12): 3258-3272.

[26] SHEN C, WANG S, ZHANG S, et al. OsARF16, a transcription factor, is required for auxin and phosphate starvation response in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Cell and Environment*, 2013, 36(3): 607-620.

[27] BALZERGUE C, DARTEVELLE T, GODON C, et al. Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15300. doi: 10.1038/ncomms15300.

[28] HAM B K, CHEN J, YAN Y, et al. Insights into plant phosphate sensing and signaling[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2018, 49: 1-9.

[29] CHEN Y N, SLABAUGH E, BRANDIZZI F. Membrane-tethered transcription factors in *Arabidopsis thaliana*: Novel regulators in stress response and development[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(6): 695-701.

[30] LEE S, LEE H J, HUH S U, et al. The *Arabidopsis* NAC transcription factor NTL4 participates in a positive feedback loop that induces programmed cell death under heat stress conditions[J]. *Plant Science*, 2014, 227: 76-83.

【责任编辑 李庆玲】