

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.  
LIU Guoxuan, CHEN Kang, LU Xing, et al. Function of *GmPIN2b* in soybean regulating root response to low phosphorus stress[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(4): 33-41.

# 大豆 *GmPIN2b* 调控根系响应低磷胁迫的功能研究

刘国选, 陈 康, 陆 星, 田 江, 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】研究生长素转运蛋白 PIN 基因家族在大豆 *Glycine max* 根系适应低磷胁迫中的功能。【方法】对大豆 23 个 GmPIN 家族成员进行进化树分析和表达模式分析, 并进一步对 *GmPIN2b* 进行功能分析。【结果】大豆 23 个 GmPIN 家族成员分散在 7 个不同的亚族, 其中, GmPIN2a、GmPIN2b 和 GmPIN9a、GmPIN9d 与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 AtPIN2 位于同一亚族。不同 GmPIN 家族成员在大豆中的组织表达定位及其受低磷调控的表达模式不同, 其中, *GmPIN2b* 在大豆根系中的表达水平在低磷胁迫 6 d 后显著上调, 回补表达 *GmPIN2b* 能够部分恢复 *Atpin2* 突变体的表型。无论在低磷还是高磷条件下, 回补表达 *GmPIN2b* 的转基因植株鲜质量和主根长均显著高于 *Atpin2* 突变体; 而且回补表达 *GmPIN2b* 显著提高了 *Atpin2* 突变体在低磷条件下的一级侧根数, 以及高磷条件下根系对重力的敏感性。【结论】*GmPIN2b* 在大豆根系形态建成响应低磷胁迫的过程中起重要的调控作用。

**关键词:** 大豆; 低磷胁迫; *GmPIN2b*; 根系; 生长素  
**中图分类号:** Q945.78; S184      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1001-411X(2021)04-0033-09

## Function of *GmPIN2b* in soybean regulating root response to low phosphorus stress

LIU Guoxuan, CHEN Kang, LU Xing, TIAN Jiang, LIANG Cuiyue  
(College of Natural Resources and Environment/Root Biology Center,  
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the function of auxin transporter PIN gene family in the adaptation of soybean (*Glycine max*) roots to low phosphorus stress. 【Method】A total of 23 GmPIN family members of soybean were conducted evolutionary tree and expression pattern analyses, so as to analyze the *GmPIN2b* function. 【Result】The 23 GmPIN family members of soybean were scattered in seven different sub-families, among which GmPIN2a, GmPIN2b and GmPIN9a, GmPIN9d were in the same subfamily as *Arabidopsis thaliana* AtPIN2. Different GmPIN family members had different tissue expression locations in soybean and their expression patterns regulated by low phosphorus were different. Among them, the expression level of *GmPIN2b* in soybean roots was significantly up-regulated after low phosphorus stress for six days. The complement expression of *GmPIN2b* could partially restore the phenotype of *Atpin2* mutants. The fresh weight and main root length of

transgenic plants expressing *GmPIN2b* were significantly higher than those of *Atpin2* mutant under both low or high phosphorus conditions. Moreover, the complement expression of *GmPIN2b* also significantly increased the number of primary lateral roots of *Atpin2* mutant in low phosphorus treatment, and increased the sensitivity of the root system to gravity in high phosphorus treatment. 【Conclusion】 *GmPIN2b* plays an important regulatory role in the process of root morphogenesis in response to low phosphorus stress.

**Key words:** *Glycine max*; low phosphorus stress; *GmPIN2b*; root; auxin

大豆 *Glycine max* 是重要的粮油作物, 在世界范围内广泛种植, 为食品和畜牧业提供了重要的蛋白和油脂来源, 也是生物柴油生产的主要原料<sup>[1-2]</sup>。我国南方水热条件充足, 但土壤大多呈酸性, 酸性土壤中磷的有效性低是限制大豆生产的重要因子<sup>[3-4]</sup>。研究发现改变根系形态构型是大豆适应低磷胁迫的重要机制之一<sup>[5-6]</sup>。低磷条件下, 大豆根冠比、根长度、根毛密度以及侧根数量均显著提高。根系形态构型的这些变化, 增加了植物根系与土壤接触的面积, 促进了植株对土壤磷的吸收和利用<sup>[7]</sup>。另外, 赵静等<sup>[8]</sup>研究表明, 浅根型大豆品种的生物量、磷含量和产量均明显高于深根型大豆品种, 说明浅根型大豆对耕层土壤磷的吸收效率更高。因此, 根系的向重性反应对于植株利用土壤中异质分布的磷至关重要<sup>[9-12]</sup>。

生长素是植物根系形态建成中的重要调控因子<sup>[13]</sup>。前期研究显示, 生长素的不对称分布在植物的根系生长和根系向重性反应中均起到了重要的调控作用<sup>[13-14]</sup>。植物的 *PIN*(*PIN-FORMED*) 基因家族是介导植物根系生长素不对称分布的重要因子<sup>[15]</sup>。模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的基因组中存在 8 个 *AtPIN* 同源基因<sup>[16]</sup>。其中, *AtPIN2* 介导了生长素从根尖侧皮层细胞到根伸长区皮层细胞的极性运输<sup>[17]</sup>。研究显示, 在拟南芥根系向重性反应的过程中, 根尖细胞的 *AtPIN2* 蛋白发生不对称分布, 使生长素在根系向地面的伸长区积累, 抑制了向地侧伸长区细胞的伸长, 最终导致根系生长弯曲, 产生向重性反应<sup>[14, 18]</sup>。因此, *AtPIN2* 突变后, 突变体根部下侧的生长素分布受到抑制, 根系的向地性功能明显缺失<sup>[19]</sup>。水稻、番茄、玉米、毛白杨、葡萄和桉树等植物的 *PIN2* 同源基因也有类似的保守结构或功能<sup>[20-23]</sup>。例如, 水稻的同源基因 *OsPIN2* 可以回补拟南芥突变体 *Atpin2* 的表型缺陷, 且 *OsPIN2* 的回补表达可以恢复突变体 *Atpin2* 在向重情况下根尖生长素的极性分布, 说明 *OsPIN2* 通过影响根尖生长素的极性转运调控了根系生长夹角, 在水稻根系的重力反应中起重要作用<sup>[20, 24-25]</sup>。

虽然关于 *PIN2* 基因在其他植物中的功能已取

得较大的研究进展, 但大豆中 *PIN2* 的同源基因是否也具有类似的功能, 且是否参与了低磷胁迫对大豆根系形态建成的调控尚未清楚。因此, 本研究首先对大豆 *GmPIN* 基因家族进行生物信息学分析; 然后, 选取与拟南芥 *AtPIN2* 同源性较高的 *GmPIN2b* 作为研究对象, 利用实时荧光定量 PCR 测定该基因响应低磷胁迫的表达模式; 进一步在拟南芥 *Atpin2* 突变体中回补表达该基因, 并对转基因植株的生长和根系向重性进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验采用的大豆材料为 ‘粤春 03-3’, 供试拟南芥为哥伦比亚野生型 Col-0 和 *Atpin2* 突变体 *CS8058*。拟南芥 *Atpin2* 突变体由浙江大学生命科学学院毛传澡教授课题组惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 生物信息学分析 以 *AtPIN2* 氨基酸序列为参考, 在植物基因组数据库 Phytozome (<http://www.phytozome.org/index.php>) 中通过 BLAST 比对获得拟南芥、大豆和水稻 *Oryza sativa* L. 等植物的 *PIN* 同源基因的氨基酸序列, 再利用软件 MEGA5.05 的邻接法 (Neighbor-joining method) 生成进化树。在 SOYBASE 数据库 (<https://www.soybase.org/soyseq/>) 中获得 *GmPIN* 基因的组织表达数据, 在已发表的大豆根系转录组测序结果<sup>[26]</sup> 中获得不同磷处理条件下 *GmPIN* 基因的表达水平的数据, 通过 TBtools 软件将这些数据制作成表达模式热图。

1.2.2 大豆低磷胁迫处理 挑选种皮无破损、大小均一的大豆种子, 利用 10%( $\varphi$ ) 次氯酸钠溶液表皮消毒后, 在沙子中萌发。待幼苗子叶张开, 将幼苗转移至 Hoagland 营养液中进行不同磷水平的处理。其中, 高磷处理的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度为 250  $\mu\text{mol/L}$ , 低磷处理的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度为 25  $\mu\text{mol/L}$ 。处理 3、6、12 和 15 d 后, 分析植株鲜质量、总根长和根冠比, 其中根冠比的计算方法为地下部鲜质量与地上部鲜质量的比值; 同时收取根系样品用液氮速冻后用

于基因表达水平的测定。每个处理设 4 次重复。

1.2.3 大豆 *GmPIN2b* 基因的克隆 从 Phytozome 数据库中获得大豆 *GmPIN2b*(*Glyma.17G057300*) 的 CDS 序列, 根据该序列设计正向引物 (ATGATC ACTGGTAAGGATATTTATG) 和反向引物 (TTAAACTCCAAGCAGCACGTA)。以大豆 ‘粤春 03-3’ 根系 cDNA 为模板, 扩增 *GmPIN2b* 基因, 将所得的 PCR 产物连接 T 载体, 测序验证, 选取阳性克隆保存备用。

1.2.4 回补表达 *GmPIN2b* 的拟南芥 *Atpin2* 突变体材料的构建 以拟南芥根系基因组 DNA 为模板, 设计正向引物 (TATGACCATGATTACGAATTCG CCCCTAGACCAAATAATATGG) 和反向引物 (CATAAATATCCTTACCAGTGATCATTTTGATT TACTTTTTCCGGC) 扩增拟南芥 *AtPIN2* 基因, 翻译起始密码子上游 3 229 bp 的启动子片段。以大豆根系 cDNA 为模板, 设计正向引物 (GCTACAAACCC TGCATTAACCATGATCACTGGTAAGGATATTT ATG) 和反向引物 (CCGGGTACCGAGCTCGAATTC TTAAACTCCAAGCAGCACGTA) 扩增 *GmPIN2b* 基因编码框全长。将扩增产物进行凝胶电泳, 利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (美基生物, 上海) 进行纯化回收。用 *Sal* I 对目标载体 pCambia1300 进行酶切, 获得线性化的载体。用 *Exnase*<sup>®</sup> Multis (诺唯赞生物, 中国) 将上述 PCR 纯化产物与线性化 pCambia1300 进行多片段连接, 转化大肠埃希菌, 经过测序无误后抽取质粒转化农杆菌 GV3101。

将 GV3101 平板划线活化, 挑取单克隆接种于添加卡那霉素和利福平添加剂量均为 10 μg/mL 的 10 mL YEP 培养液中, 放置培养箱于 180 r/min、28 ℃ 条件下培养过夜。之后取 3 mL 菌液转入 100 mL YEP 培养液中扩大培养, 然后 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用等体积的 1/4MS 培养液重悬菌体并加入 0.02%(φ)SilwetL-77 配成拟南芥转化液。利用花絮浸染法转化拟南芥突变体 *Atpin2*, 获得 *pAtPIN2::GmPIN2b* 回补表达的拟南芥转基因株系, T<sub>3</sub> 代纯合后用于进一步试验分析。拟南芥 *AtPIN2* 基因的检测引物为 At-F(正向引物): CCTTGCTTGGTCCCTTGTCT, At-R(反向引物): ATCGCAAACCCTGCTACTGA; *pAtPIN2::GmPIN2b* 回补表达的拟南芥转基因株系的检测引物为 At-F1(正向引物): GTGCATGAACGACTA CAATGG, Gm-R1(反向引物): GAAAGAA GTGGA ACTGCGAAC; 转基因拟南芥中 *GmPIN2* 基因表达水平的检测引物为 Gm-F2(正向引物): GATTTCTATGCCATGTTTCGCAA, Gm-

R2(反向引物): CTCAATCAATTCGTGAACAGCT。

1.2.5 *GmPIN2b* 回补拟南芥 *Atpin2* 突变体表型和根系向重性的分析 将野生型、*Atpin2* 突变体以及 *pAtPIN2::GmPIN2b* 转基因株系的种子表皮灭菌后, 在 1/2MS 固体培养基中萌发。待幼苗根长至 1.5 cm 左右, 将生长一致的幼苗转移到新的 1/2MS 固体培养基中进行不同磷水平处理。其中高磷处理含 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 250 μmol/L, 低磷处理含 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 μmol/L; 培养箱温度为 24 ℃; 光周期为 16 h/8 h。磷处理 8 d 后, 分析植株鲜质量、主根长和侧根数。另外, 将长势一致的幼苗转移到新的 1/2MS 固体培养基中进行上述磷处理, 然后将培养皿逆时针旋转 90°放置, 处理 30 h 后扫描植株根系, 并用 ImageJ (National Institutes of Health, 美国) 测定根系弯曲角度。每个处理设 4 次重复, 每次重复 8 棵植株。

1.2.6 植物 RNA 的提取及反转录 取约 0.1~0.2 g 植物鲜样用液氮研磨, 根据 Trizol(Omega, 美国) 的说明书在样品中加入预冷的 1 mL Trizol 震荡混匀; 再加入 0.2 mL 氯仿, 震荡混匀后, 室温静置 5 min。离心后吸取 0.5 mL 上清液, 往上清液中加入等体积的异丙醇, 冰上静置后离心, 所得的沉淀用 75%(φ) 乙醇溶液洗涤 2 次, 沉淀风干后加入无 RNA 酶的灭菌水溶解 RNA。用分光光度计 (IMPLEN, 美国) 测定 RNA 浓度, 然后参照反转录试剂盒 (Promega, 美国) 说明书, 合成 cDNA 第 1 链, 反应结束后, -20 ℃ 保存备用。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 设计 *GmPIN2b* 的定量 PCR 引物为 F(正向引物): AATTGCATTGCCCATAA CCATACTC, R(反向引物): ATTTCCCTTTCATC CACCCCGC; 大豆看家基因 *GmEF1a* 的定量 PCR 引物为 F(正向引物): TGCAAAGGAGGCT GCTAACT, R(反向引物): CAGCATCACCGTT CTTCAAA 和拟南芥 *AtEF1a* 的定量 PCR 引物为 F(正向引物): GTCGATTCTGGAAAGTCGACC, R(反向引物): AATGTCAATGGTGATACCACGC。将所得第 1 链稀释 20 倍做为定量 PCR 反应模板; 适量原液做梯度稀释为标准曲线模板。定量 PCR 反应体系: 10 μL 2× Go Taq<sup>®</sup> qPCR master mix(Promega, 美国); 正向引物和反向引物各 0.4 μL; 2 μL 模板; 0.2 μL CXR Reference; 补 H<sub>2</sub>O 至 20 μL。反应程序: 95 ℃ 预变性 10 min; 95 ℃ 15 s, 58 ℃ 15 s, 72 ℃ 1 min, 40 个循环。反应结束后用实时荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher, 美国) 携带的 Real-Time Analysis Software 6.0 计算每个样品的表达量。相对表达量为目的基因的表达量与看家基因表

达量的比值。

1.2.8 数据统计与分析 本文所有数据均使用 Microsoft Excel 2016(Microsoft Company, 美国) 和 IBM SPSS Statistics V21.0(IBM SPSS, 美国) 进行处理及统计分析。利用 TBtools 软件分析基因的表达模式和制作基因表达模式热图。

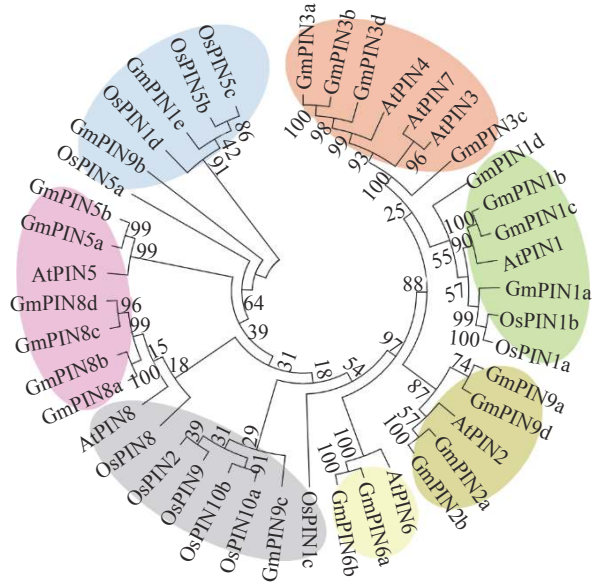
2 结果与分析

2.1 大豆 GmPIN 的系统进化分析及组织表达模式分析

利用 MEAG 5.05 对大豆、水稻和拟南芥的 PIN 蛋白进行系统进化树的构建。进化树分析结果显示, 拟南芥、水稻和大豆的 PIN 家族在进化树上可分为 7 个亚族(图 1)。其中, 大豆 GmPIN2a 和 GmPIN2b 与拟南芥 AtPIN2 位于同一亚族, 二者相似性超过 90%。对 SOYBASE 数据库中 23 个大豆 GmPIN 基因的组织表达水平构建表达模式热图, 结果(图 2)显示, GmPIN1e、GmPIN3b、GmPIN1a 和 GmPIN1c 等基因在各组织部位中均有较高的表达水平; 而 GmPIN2b、GmPIN2a 与 GmPIN5b 等基因在根部的表达水平较高。

2.2 低磷胁迫对 GmPIN 家族成员在大豆根系中表达模式的影响

利用已报道的大豆根系转录组数据<sup>[26]</sup>, 对低磷

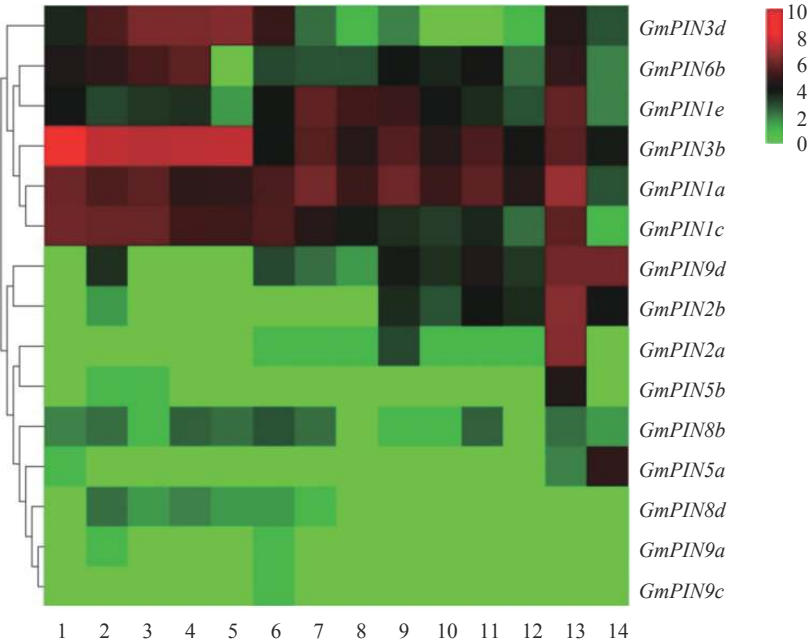


At: Arabidopsis thaliana, Gm: Glycine max, Os: Oryza sativa

图 1 GmPIN 系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of GmPIN

调控的 19 个 GmPIN 基因的表达模式进行了分析。结果(图 3)表明, GmPIN9d、GmPIN8d、GmPIN8a、GmPIN2a 与 GmPIN2b 这 5 个基因均受低磷胁迫上调表达, 其中, 低磷条件下 GmPIN2b 的表达量是高磷对照的 1.2 倍; 相反, GmPIN3d、GmPIN9b、GmPIN5a 与 GmPIN6b 这 4 个基因受低磷胁迫下调表达, 其中, GmPIN3d 的表达水平在低磷条件下仅为高磷对



1: 新叶, 2: 花, 3: 1 cm 豆荚, 4: 花后 10 d 的豆荚壳, 5: 花后 14 d 的豆荚壳, 6: 花后 10 d 的种子, 7: 花后 14 d 的种子, 8: 花后 21 d 的种子, 9: 花后 25 d 的种子, 10: 花后 28 d 的种子, 11: 花后 35 d 的种子, 12: 花后 42 d 的种子, 13: 根, 14: 根瘤  
1: Young leaf, 2: Flower, 3: Pod of 1 cm length, 4: Pod shell of 10 d after flowering, 5: Pod shell of 14 d after flowering, 6: Seed of 10 d after flowering, 7: Seed of 14 d after flowering, 8: Seed of 21 d after flowering, 9: Seed of 25 d after flowering, 10: Seed of 28 d after flowering, 11: Seed of 35 d after flowering, 12: Seed of 42 d after flowering, 13: Root, 14: Root nodule

图 2 GmPIN 基因组织表达模式

Fig. 2 Tissue expression pattern of GmPIN genes

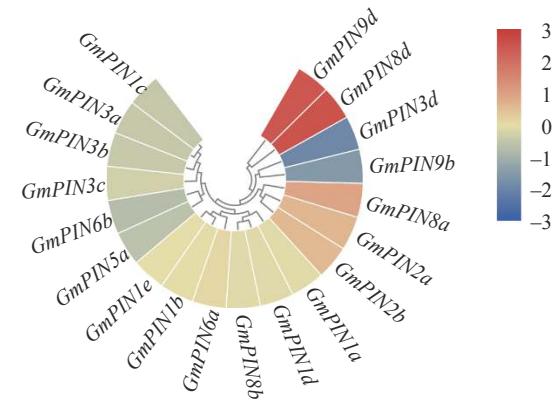


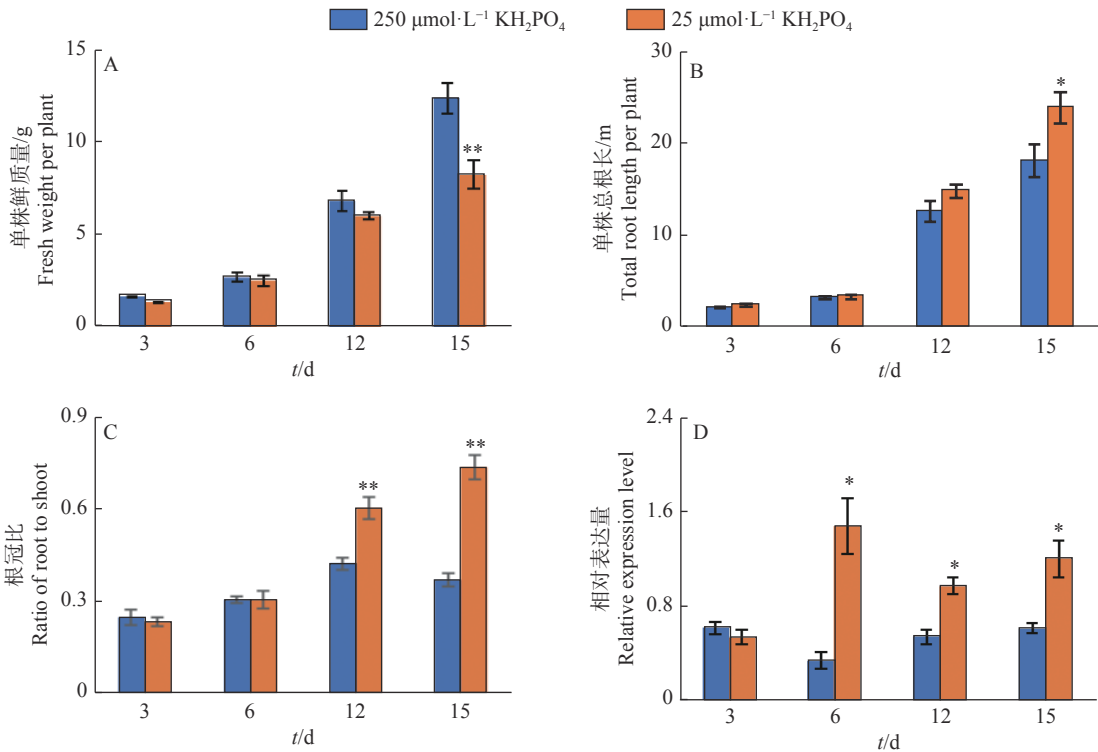
图 3 低磷胁迫下大豆根系中 *GmPIN* 基因表达模式

Fig. 3 Expression pattern of *GmPIN* genes in soybean roots in response to low phosphorus stress

照的 50%; 除此之外, 其他 *GmPIN* 基因成员的表达水平不受低磷胁迫的影响。

2.3 不同低磷胁迫时间对大豆生长和根系中 *GmPIN2b* 表达水平的影响

根据 SOYBASE 数据库中 *GmPIN* 同源基因的组织表达模式, 选取在根组织 (包括根和根瘤) 中均有表达的 *GmPIN2b* 作为研究对象, 进一步分析不同磷处理时间对该基因表达水平的影响。植物表型分析结果 (图 4) 显示, 低磷处理 12 和 15 d 后, 与高磷对照相比, 大豆单株鲜质量分别降低了 11% 和 33% ( $P<0.01$ ) (图 4A); 单株总根长分别为高磷对照的 1.18 和 1.32 倍 ( $P<0.05$ ) (图 4B); 根冠比极显著增加, 分别为高磷对照的 1.43 和 1.99 倍 ( $P<0.01$ ) (图 4C)。定量 PCR 结果显示, 低磷处理 6、12 和 15 d 后, 大豆根系中 *GmPIN2b* 的表达水平均显著上调, 分别是高磷对照的 4.19、1.77 和 1.93 倍 ( $P<0.05$ ) (图 4D)。



“\*” 和 “\*\*” 表示相同胁迫时间高磷对照和低磷处理在  $P<0.05$  和  $P<0.01$  水平差异显著 ( $t$  检验)  
“\*” and “\*\*” indicate significant differences at  $P<0.05$  and  $P<0.01$  levels between high phosphorus control and low phosphorus treatment at the same stress time ( $t$  test)

图 4 不同低磷处理时间对大豆生长和 *GmPIN2b* 表达水平的影响

Fig. 4 Soybean growth and *GmPIN2b* expression level in response to different periods of low phosphorus treatment

2.4 转基因拟南芥检测

将拟南芥 *AtPIN2* 启动子与大豆 *GmPIN2b* 的编码区融合, 构建了 *pAtPIN2::GmPIN2b* 表达载体, 转化拟南芥突变体 *Atpin2*, 获得了回补表达 *GmPIN2b* 的转基因材料。对转基因材料进行了转基因鉴定和 *GmPIN2b* 表达水平的分析, 结果显示, 转基因材料扩增出 *pAtPIN2* 启动子融合 *GmPIN2b* 基因

CDS 的片段, 表明 *GmPIN2b* 回补表达转基因材料为阳性植株 (图 5)。 *GmPIN2b* 在阳性株系 RA1 和 RA2 的根系和叶片中均有较高表达水平, 与野生型相比呈显著差异 ( $P<0.001$ ) (图 6)。

2.5 回补表达 *GmPIN2b* 对转基因拟南芥生长的影响

野生型、*pAtPIN2::GmPIN2b* 转基因株系和 *Atpin2* 突变体等材料的种子在 1/2MS 培养基上萌

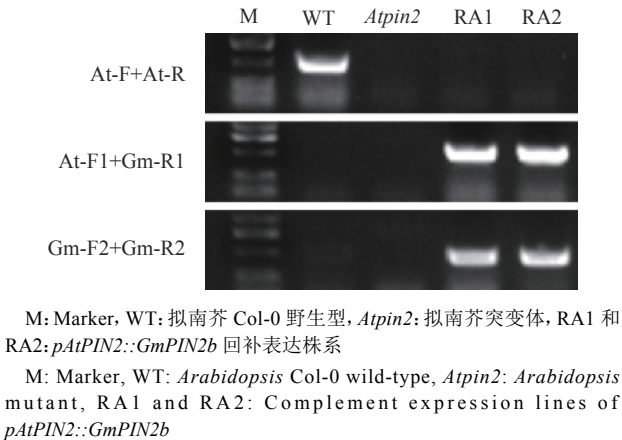
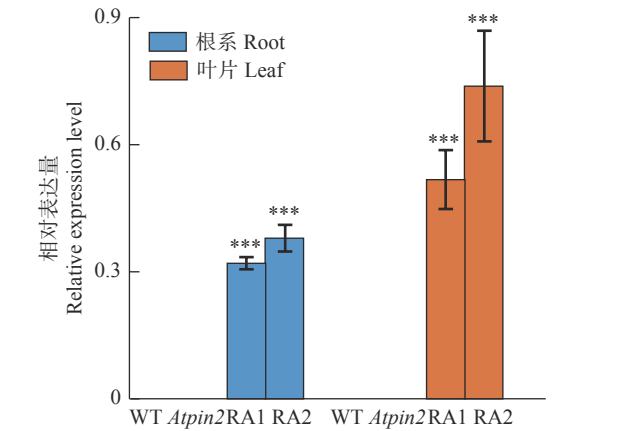


图 5 *GmPIN2b* 阳性转基因植株的检测

Fig. 5 Detection of *GmPIN2b* positive transgenic plants



WT: 拟南芥 Col-0 野生型, *Atpin2*: 拟南芥突变体, RA1 和 RA2: *pAtPIN2::GmPIN2b* 回补表达株系; “\*\*\*” 表示回补表达株系与野生型在  $P<0.001$  水平差异显著 ( $t$  检验)

WT: *Arabidopsis* Col-0 wild-type, *Atpin2*: *Arabidopsis* mutant, RA1 and RA2: Complement expression lines of *pAtPIN2::GmPIN2b*; “\*\*\*” indicates significant differences at  $P<0.001$  level between complement expression lines and wild-type ( $t$  test)

图 6 拟南芥回补表达株系根和叶片中 *GmPIN2b* 的表达水平

Fig. 6 Expression levels of *GmPIN2b* in the shoots and roots of *Arabidopsis* complement expression lines

发 5 d 后, 进行不同磷水平的处理, 8 d 后对其单株鲜质量、主根长度和侧根数等进行分析。与高磷对照相比, 低磷胁迫下植株较小, 主根生长均受到明显抑制 (图 7)。结果显示, 低磷条件下, 无论是野生型还是转基因材料, 单株鲜质量和主根长均比高磷对照显著降低 ( $P<0.001$ ) (表 1)。无论在高磷还是低磷条件下, *AtPIN2* 基因的突变均显著降低了拟南芥单株的鲜质量和主根长, 而回补表达 *GmPIN2* 能够部分恢复 *Atpin2* 的鲜质量和主根长突变表型 (图 8A、8B)。其中, 回补表达株系 RA1 和 RA2 的植株鲜质量在高磷和低磷条件下分别比突变体高 27%、28% 和 18%、16%, 其主根长度分别比突变体提高 33%、39% 和 43%、18%。另外, 低磷显著减少了拟南芥植株的一级侧根数 ( $P<0.001$ ) (表 1)。但在高磷条件下, 植株一级侧根数在不同材料之间无显著差别; 在低磷条件下, *Atpin2* 突变体的一级侧根数显著低于野生型, 而回补表达 *GmPIN2b* 后, 转基因株系 RA1 和 RA2 的一级侧根数均比突变体显著增加, 分别为突变体的 1.24 和 1.20 倍 (图 8C)。

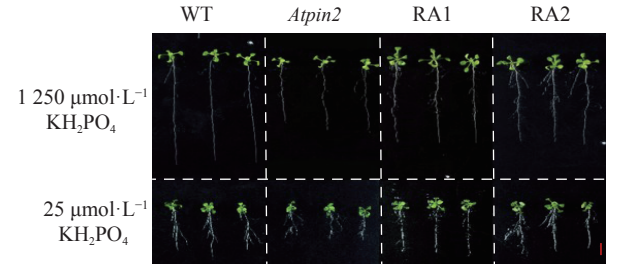


图 7 回补表达 *GmPIN2b* 对转基因拟南芥生长的影响

Fig. 7 Effect of *GmPIN2b* complement expression on growth of transgenic *Arabidopsis*

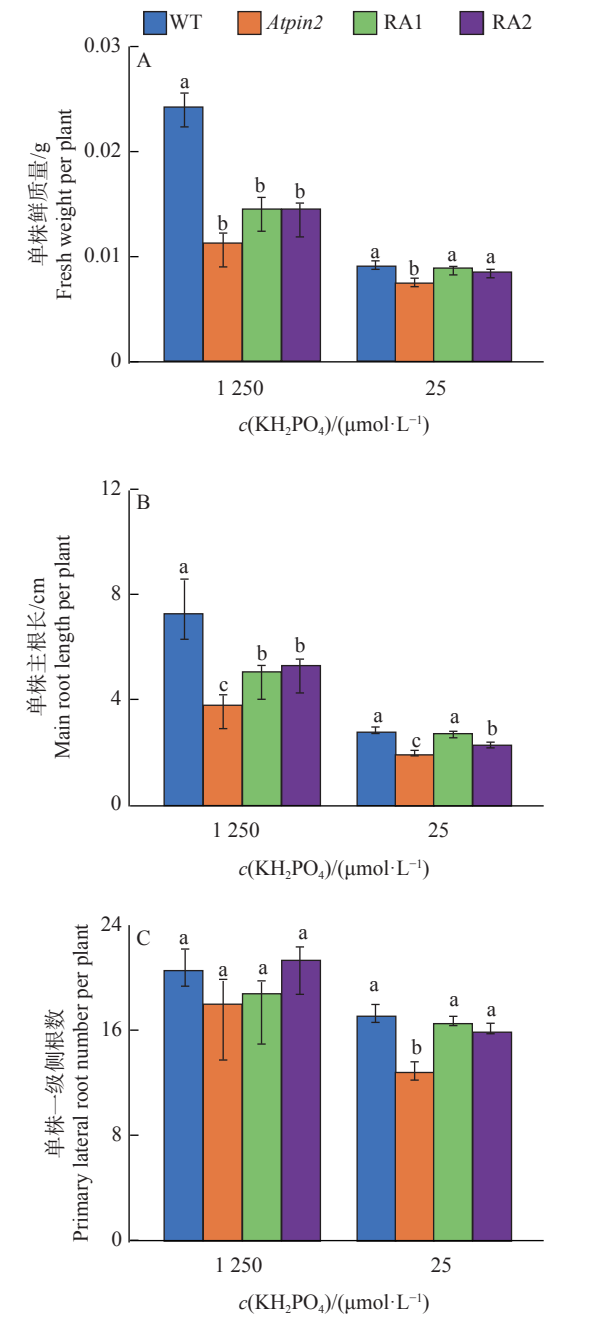
表 1 不同磷处理和转基因回补表达对拟南芥生理指标和根系向重性影响的双因素方差分析

Table 1 Two-way ANOVA of the effects of different phosphorus treatments and transgenic complement expression on *Arabidopsis* physiological indicators and root gravity

| 指标<br>Indicator                                  | $F^{(1)}$                   |                                             |                                                                        |
|--------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|                                                  | 磷处理<br>Phosphorus treatment | 转基因回补表达<br>Transgenic complement expression | 磷处理×转基因回补表达<br>Phosphorus treatment × transgenic complement expression |
| 单株鲜质量 Fresh weight per plant                     | 210.442***                  | 35.232***                                   | 23.287***                                                              |
| 单株主根长 Main root length per plant                 | 454.853***                  | 41.777***                                   | 17.297***                                                              |
| 单株一级侧根数<br>Primary lateral root number per plant | 44.212***                   | 5.271*                                      | 1.383                                                                  |
| 弯曲角度 Angle of curvature                          | 4.841*                      | 24.205***                                   | 1.549                                                                  |

1) “\*” :  $P<0.05$ , “\*\*” :  $P<0.01$ , “\*\*\*” :  $P<0.001$ (Duncan’s法)

1) “\*” :  $P<0.05$ , “\*\*” :  $P<0.01$ , “\*\*\*” :  $P<0.001$ (Duncan’s method)



WT: 拟南芥 Col-0 野生型, *Atpin2*: 拟南芥突变体, RA1 和 RA2: *pAtPIN2::GmPIN2b* 回补表达株系; 各小图中相同磷处理柱子上的不同小写字母表示株系间差异显著 ( $P < 0.05$ , Duncan's 法)

WT: *Arabidopsis* Col-0 wild-type, *Atpin2*: *Arabidopsis* mutant, RA1 and RA2: Complement expression lines of *pAtPIN2::GmPIN2b*; Different lowercase letters on the columns of the same phosphorus treatment in each figure indicate significant differences among different lines ( $P < 0.05$ , Duncan's method)

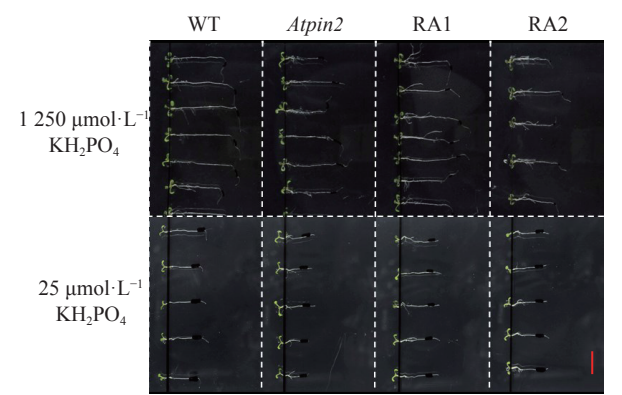
图 8 回补表达 *GmPIN2b* 对转基因拟南芥生长指标的影响

Fig. 8 Effects of *GmPIN2b* complement expression on growth indexes of transgenic *Arabidopsis*

2.6 回补表达 *GmPIN2b* 对转基因拟南芥根系向重性的影响

将萌发了 5 d、生长一致的幼苗转移到新的 1/2MS 固体培养基中进行不同磷水平处理, 将培养皿逆时针旋转 90°放置, 处理 30 h 后观察拟南芥主

根的弯曲角度。从拟南芥的表型可见, 高磷条件下野生型根系的弯曲程度较大, 突变体 *Atpin2* 较小; 而低磷条件下, 所有植株的根系生长均明显受阻, 但野生型根系的弯曲程度较其他根明显 (图 9)。拟南芥根系向重性受磷处理显著影响 ( $P < 0.05$ ), 在转基因回补表达株系间具有极显著差异 ( $P < 0.001$ ) (表 1)。无论在高磷还是低磷条件下, RA1、RA2 和 *Atpin2* 的主根弯曲角度均显著小于野生型 (图 10)。高磷条件下, RA1 和 RA2 主根弯曲的角度显著高于 *Atpin2*, 分别是 *Atpin2* 的 2.33 和 2.10 倍; 而低磷

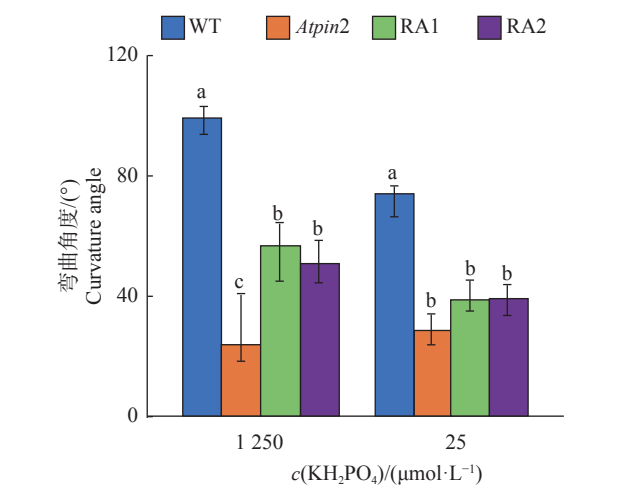


WT: 拟南芥 Col-0 野生型, *Atpin2*: 拟南芥突变体, RA1 和 RA2: *pAtPIN2::GmPIN2b* 回补表达株系; 标尺=1.5 cm

WT: *Arabidopsis* Col-0 wild-type, *Atpin2*: *Arabidopsis* mutant, RA1 and RA2: Complement expression lines of *pAtPIN2::GmPIN2b*; Bar=1.5 cm

图 9 回补表达 *GmPIN2b* 对转基因拟南芥根系表型的影响

Fig. 9 Effect of *GmPIN2b* complement expression on root phenotype of transgenic *Arabidopsis*



WT: 拟南芥 Col-0 野生型, *Atpin2*: 拟南芥突变体, RA1 和 RA2: *pAtPIN2::GmPIN2b* 回补表达株系; 各小图中相同磷处理柱子上的不同小写字母表示株系间差异显著 ( $P < 0.05$ , Duncan's 法)

WT: *Arabidopsis* Col-0 wild-type, *Atpin2*: *Arabidopsis* mutant, RA1 and RA2: Complement expression lines of *pAtPIN2::GmPIN2b*; Different lowercase letters on the columns of the same phosphorus treatment indicate significant differences among different lines ( $P < 0.05$ , Duncan's method)

图 10 回补表达 *GmPIN2b* 对转基因拟南芥主根弯曲角度的影响

Fig. 10 Effect of *GmPIN2b* complement expression on curvature angle of transgenic *Arabidopsis*

条件下, 回补表达株系的主根弯曲角度稍微高于 *Atpin2*, 差异不显著 (图 10)。

### 3 讨论与结论

生长素作为一种重要的生长调节激素参与植物根系的生长发育<sup>[13-14]</sup>。植物生长素输出载体 *PIN* 基因家族在介导植物生长素不对称分布、调控植株形态建成的过程中起着关键的作用。例如, 拟南芥的基因组中存在 8 个 *PIN* 同源基因, 这些基因参与拟南芥植株发育的重要调控过程, 包括调控胚和花粉的发育以及维管组织的分化<sup>[27-28]</sup>, 介导生长素在茎尖分生组织的环流和从地上部到根系的极性运输<sup>[27, 29-30]</sup>, 调控细胞内生长素的动态平衡<sup>[28, 31]</sup>, 参与根的向重性生长等<sup>[19, 32]</sup>。本研究对大豆的 *PIN* 同源基因进行分析, 发现大豆基因组中存在 23 个 *GmPIN* 同源基因, 其中大豆 *GmPIN2b* 与拟南芥 *AtPIN2* 位于同一亚族, 具有较高的相似性。*AtPIN2* 参与了根系向地生长的调控<sup>[13-14]</sup>, 但是大豆 *GmPIN* 调控根系生长和向重性的功能未见报道。因此, 本研究选取与 *AtPIN2* 较为相似的 *GmPIN2b* 作为研究对象, 获得了回补表达 *GmPIN2b* 的拟南芥 *Atpin2* 突变体的转基因材料。该转基因材料能够部分恢复 *Atpin2* 突变体根系向重性的表型。该结果与前人的研究结果相似, 例如, 水稻 *OsPIN2* 可以回补突变体 *Atpin2* 主根的向重性功能缺陷, 且 *OsPIN2* 的回补表达可以恢复 *Atpin2* 在向重情况下根尖生长素的极性分布<sup>[20]</sup>。*GmPIN2b* 能够回补 *Atpin2* 突变体的根系向重性这一结果进一步说明了植物 *PIN2* 在调控植物根系向重性反应的过程中具有一定的功能保守性。

早期研究表明, 植物根系形态构型的改变是植物适应低磷胁迫的重要机制<sup>[33]</sup>。本研究显示, 低磷处理 12 d 后的大豆总根长高于高磷对照, 这与前人的研究结果相同<sup>[12, 33]</sup>, 说明低磷胁迫条件下, 大豆通过促进根系生长、提高植株根冠比, 从而提高植株对外界环境磷的吸收和利用。另外, 低磷胁迫显著提高了 *GmPIN2b* 在大豆根系的表达水平, 回补表达 *GmPIN2b* 能够部分回补拟南芥 *Atpin2* 突变体的向重性。这些结果暗示了 *GmPIN2b* 介导的生长素不对称分布可能参与了低磷胁迫调控大豆根系生长的过程; 因此, 本研究观察了回补表达 *GmPIN2b* 的拟南芥 *Atpin2* 突变体在不同磷水平条件下根系的生长情况。研究发现无论高磷还是低磷条件下, 与 *Atpin2* 突变体相比, 回补表达 *GmPIN2b* 均明显增加了转基因植株的鲜质量和主根长; 尤其是低磷

条件下回补表达 *GmPIN2b* 显著提高了突变体的一级侧根数。最近有研究显示, 油菜素甾醇促进 *PIN2* 蛋白从根尖到伸长区的积累, 导致侧根数增加<sup>[19, 34]</sup>, 说明 *PIN2* 蛋白也参与了侧根发育的调控; 因此, 低磷条件下, 大豆可能通过提高 *GmPIN2b* 的表达水平, 改变主根尖生长素的向基运输以及侧根原基中生长素的浓度, 从而参与低磷条件下侧根的发育。

综上所述, 低磷胁迫提高了大豆根系中 *GmPIN2b* 的表达, 回补表达该基因能够部分回补 *Atpin2* 突变体的生物量、侧根数和根系向重性; 因此, *GmPIN2b* 在根系形态建成响应低磷胁迫的过程中可能起着重要的调控作用。本研究结果为进一步揭示大豆根系适应低磷胁迫的分子机制提供了重要的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] WOJCIECHOWSKI M F, LAVIN M, SANDERSON M J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family[J]. *American Journal of Botany*, 2004, 91(11): 1846-1862.
- [2] WANG Y, CHAI C, VALLIYODAN B, et al. Genome-wide analysis and expression profiling of the PIN auxin transporter gene family in soybean (*Glycine max*)[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 951. doi: 10.1186/s12864-015-2149-1.
- [3] ZHANG M K, XU J M. Restoration of surface soil fertility of an eroded red soil in southern China[J]. *Soil and Tillage Research*, 2005, 80(1): 13-21.
- [4] WANG X, YAN X, LIAO H. Genetic improvement for phosphorus efficiency in soybean: A radical approach[J]. *Annals of Botany*, 2010, 106(1): 215-222.
- [5] 刘灵, 廖红, 王秀荣, 等. 不同根构型大豆对低磷的适应性变化及其与磷效率的关系[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(4): 1089-1099.
- [6] XIE J N, ZHOU J, WANG X R, et al. Effects of transgenic soybean on growth and phosphorus acquisition in mixed culture system[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57(5): 477-485.
- [7] 严小龙, 张福锁. 植物营养遗传学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [8] 赵静, 付家兵, 廖红, 等. 大豆磷效率应用核心种质的根构型性状评价[J]. *科学通报*, 2004, 49(13): 1249-1257.
- [9] MANSKE G G B, ORTIZ-MONASTERIO J I, VAN GINKEL M, et al. Traits associated with improved P-uptake efficiency in CIMMYT's semidwarf spring bread wheat grown on an acid Andisol in Mexico[J]. *Plant and Soil*, 2000, 221(2): 189-204.
- [10] LIAO H, YAN X, RUBIO G, et al. Genetic mapping of basal root gravitropism and phosphorus acquisition efficiency in common bean[J]. *Functional Plant Biology*, 2004, 31(10): 959-970.
- [11] LYNCH J P. Root phenes for enhanced soil exploration

- and phosphorus acquisition: Tools for future crops[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(3): 1041-1049.
- [12] 严小龙, 廖红, 戈振扬, 等. 植物根构型特性与磷吸收效率[J]. *植物学通报*, 2000, 17(6): 511-519.
- [13] LIU H, LIU B, CHEN X, et al. AUX1 acts upstream of PIN2 in regulating root gravitropism[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 507(1/2/3/4): 433-436.
- [14] 潘建伟, 叶晓帆, 王超, 等. 拟南芥 PIN2 介导的生长素极性运输调控植物根向地性[J]. *浙江师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 31(1): 1-6.
- [15] GEISLER M, WANG B, ZHU J. Auxin transport during root gravitropism: Transporters and techniques[J]. *Plant Biology*, 2014, 16(S1): 50-57.
- [16] PAPONOV I A, TEALE W D, TREBAR M, et al. The PIN auxin efflux facilitators: Evolutionary and functional perspectives[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(4): 170-177.
- [17] FERARU E, FRIML J. PIN polar targeting[J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(4): 1553-1559.
- [18] ZHANG Y, XIAO G, WANG X, et al. Evolution of fast root gravitropism in seed plants[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 3470-3480.
- [19] MÜLLER A, GUAN C, GÄLWEILER L, et al. *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control[J]. *The EMBO Journal*, 1998, 17(23): 6903-6911.
- [20] WANG L, GUO M, LI Y, et al. LARGE ROOT ANGLE1, encoding OsPIN2, is involved in root system architecture in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 69(3): 385-397.
- [21] PATTISON R J, CATALA C. Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the *PIN* and *AUX/LAX* gene families[J]. *Plant Journal*, 2012, 70(4): 585-598.
- [22] FORESTAN C, FARINATI S, VAROTTO S. The maize *PIN* gene family of auxin transporters[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 16. doi: 10.3389/fpls.2012.00016.
- [23] LIU B, ZHANG J, WANG L, et al. A survey of *Populus* PIN-FORMED family genes reveals their diversified expression patterns[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(9): 2437-2448.
- [24] INAHASHI H, SHELLEY I J, YAMAUCHI T, et al. *OsPIN2*, which encodes a member of the auxin efflux carrier proteins, is involved in root elongation growth and lateral root formation patterns via the regulation of auxin distribution in rice[J]. *Physiologia Plantarum*, 2018, 164(2): 216-225.
- [25] SUN H, GUO X, XU F, et al. Overexpression of *OsPIN2* regulates root growth and formation in response to phosphate deficiency in rice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(20): 5144. doi: 10.3390/ijms20205144.
- [26] MO X, ZHANG M, LIANG C, et al. Integration of metabolome and transcriptome analyses highlights soybean roots responding to phosphorus deficiency by modulating phosphorylated metabolite processes[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 139: 697-706.
- [27] GÄLWEILER L, GUAN C, MÜLLER A, et al. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue[J]. *Science*, 1998, 282(5397): 2226-2230.
- [28] DING Z, WANG B, MORENO I, et al. ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 941. doi: 10.1038/ncomms1941.
- [29] KEUSKAMP D H, POLLMANN S, VOESENEK L A C J, et al. Auxin transport through PIN-FORMED 3 (PIN3) controls shade avoidance and fitness during competition[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(52): 22740-22744.
- [30] FRIML J, BENKOVÁ E, BLILOU I, et al. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 2002, 108(5): 661-673.
- [31] MRAVEC J, SKUPA P, BAILLY A, et al. Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter[J]. *Nature*, 2009, 459(7250): 1136-1140.
- [32] KLEINE-VEHN J, DING Z J, JONES A R, et al. Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(51): 22344-22349.
- [33] 刘君, 蔡昆争, 骆世明, 等. 磷处理对不同磷效率基因型大豆根系性状和干物质积累及产量的影响[J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2008, 25(3): 211-214.
- [34] LI L, XU J, XU Z, et al. Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(10): 2738-2753.

【责任编辑 李庆玲】