

DOI: 10.11689/sc.2024052101 CSTR: 32179.14.sc.2024052101

黄慧超, 王佳龙, 于春静, 等. 大豆根中响应早期共生固氮的转录组分析[J]. 土壤与作物, 2025, 14(1): 95–107.

HUANG H C, WANG J L, YU C J, et al. Transcriptome analysis of soybean roots in response to early symbiotic nitrogen fixation[J]. Soils and Crops, 2025, 14(1): 95–107.

大豆根中响应早期共生固氮的转录组分析

黄慧超, 王佳龙, 于春静, 潘钰, 赵晓宇, 周舒扬
(黑龙江省科学院微生物研究所, 黑龙江哈尔滨 150010)

摘要: 为挖掘大豆根中响应早期共生固氮过程中的关键基因, 并探究这些关键基因的功能和代谢途径, 本研究利用转录组学技术对不接种根瘤菌与接种根瘤菌 1 d 后的大豆根系材料进行 RNA 测序, 通过对差异表达基因进行 GO 富集和 KEGG 富集分析来挖掘参与早期共生固氮过程中的关键基因, 进一步筛选受根瘤菌调控的转录因子, 再对其中富集数量最多的 *AP2/ERF* 家族成员进行进化分析, 最后通过 qRT-PCR 验证其中部分基因的表达情况。研究共鉴定出 824 个响应根瘤菌感染的差异表达基因 (DEG), GO 富集和 KEGG 富集分析结果表明, DEG 主要富集在转录调控、激素相关以及次生代谢产物合成等通路上。进化分析结果, 表明大豆中 *AP2/ERF* 家族成员可根据与 *MtERN1/2* 和 *LjERN* 亲缘关系的远近聚为三个分支, 其中第 I 分支可能在诱导根瘤菌感染和根瘤器官发生中发挥作用。qRT-PCR 结果表明, *AP2/ERF* 转录因子在接种根瘤菌后确实受到不同程度地调控。本研究中发现的 DEG 为更好地理解早期共生固氮机制提供了候选分子。

关键词: 大豆; 共生固氮; 转录组; *AP2/ERF* 转录因子

中图分类号: S565.1 文献标识码: A

Transcriptome analysis of soybean roots in response to early symbiotic nitrogen fixation

HUANG Huichao, WANG Jialong, YU Chunjing, PAN Yu, ZHAO Xiaoyu, ZHOU Shuyang

(Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150010, China)

Abstract: In order to explore the key genes in response to early symbiotic nitrogen fixation in soybean roots as well as the functions and metabolic pathways of these key genes, this study used transcriptomics technology to perform RNA sequencing on soybean root materials one day after with or without inoculation of rhizobia. The key genes involved in the early symbiotic nitrogen fixation process were explored by GO enrichment and KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes, and the transcription factors regulated by rhizobia were further screened. The *AP2/ERF* family members with the largest number of enrichments were subjected to evolutionary analysis. Finally, the expression of some genes was verified by qRT-PCR. A total of 824 differentially expressed genes (DEGs) in response to rhizobium infection are identified. GO enrichment and KEGG enrichment analysis showed that DEGs are mainly enriched in transcriptional regulation, hormone-related and secondary metabolite synthesis pathways. Phylogenetic analysis showed that *AP2/ERF* family members in soybean could be clustered into three branches according to their genetic relationship with *MtERN1/2* and *LjERN*. Among them, branch I may play a role in inducing rhizobium infection and nodule organogenesis. The results of qRT-PCR showed that the *AP2/ERF* transcription factor is indeed regulated to varying degrees after inoculation with rhizobia. The DEGs found in this study provide candidate molecules for a better understanding of the early symbiotic nitrogen fixation mechanism.

Keywords: soybean; symbiotic nitrogen fixation; transcriptome; *AP2/ERF* transcription factor

收稿日期: 2024-05-21; 修回日期: 2024-07-19.

基金项目: 黑龙江省科学院中试熟化项目 (ZSSH2024SW01).

共同第一作者简介: 黄慧超 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物-微生物互作. E-mail: 934802559@qq.com.

王佳龙 (1977-), 男, 副研究员, 主要研究方向为农业微生物及微生物发酵工程技术. E-mail: 45523345@qq.com.

共同通信作者: 赵晓宇 (1979-), 男, 研究员, 研究方向为农业微生物. E-mail: zhaoxy_hlj@163.com.

周舒扬 (1983-), 女, 副研究员, 研究方向为农业微生物领域微生物与植物互作. E-mail: zhoushuyang1983@163.com.

0 引言

氮是植物生长发育所需的三大主要营养元素之一，其可利用性直接影响着作物生长状况和产量形成。大豆 (*Glycine max*) 作为全球广泛种植的作物之一，因其具有丰富的营养价值和极高的经济价值，因此，在我国的粮食和油料生产中占据着重要的地位。作为豆科植物的代表性作物，大豆可在土壤中氮含量不足的情况下，与根瘤菌共生形成根瘤并进行固氮，将大气中的氮气 (N_2) 转化为可吸收的氨 (NH_3)，为植株的生长发育提供氮源，进而提高大豆的产量^[1]。此外，共生固氮也减少了农业生产过程中对化学氮肥的依赖，具有重要的生态和经济意义。

在共生固氮过程中，豆科植物根系会在低氮的土壤中分泌黄酮类化合物，吸引相容的根瘤菌附着于根毛上，黄酮类化合物被根瘤菌识别后会与结瘤蛋白 (NodD) 发生互作，引发根瘤菌结瘤基因 (*nodA*, *nodB*, *nodC*) 的表达，合成并释放结瘤因子 (Nod factor, NFs) —— 一种类脂几丁质寡糖 (Lipo-chitooligosaccharides, LCOs)^[2-5]。宿主植物根部通过结瘤因子受体 (Nod factor receptors, NFRs) 感知结瘤因子后激活了 NF 下游信号通路产生结瘤信号，引发表皮中的根瘤菌侵染过程：根毛膨大变形并将根瘤菌包裹住，随后植物细胞壁水解、侵染点周围的质膜内陷使根瘤菌进入植物细胞并形成管状的侵染线 (Infection threads, ITs)^[1,6]；皮层细胞重新进入细胞周期并开始有丝分裂继而形成根瘤原基，与此同时根瘤菌随着侵染线伸长往皮层延伸最后定殖于根瘤原基中，并随根瘤原基一起发育为成熟根瘤进行固氮^[7-10]。

在早期共生固氮过程中，一系列的信号传导和基因调控网络被激活，来调节根瘤菌侵染和根瘤的形成。根瘤菌释放的 NF 由 NFR1 (Nod factor receptor 1) 和 NFR5 (Nod factor receptor 5) 以及共受体 SYMRK (Symbiosis receptor-like kinase) 形成的受体复合物所感知，导致根毛表皮细胞膜电位去极化引发膜内钙离子流和核内钙离子震荡，产生钙峰-结瘤信号激活依赖钙和钙调蛋白的蛋白激酶 (Calcium- and calmodulin-dependent protein kinases, CCaMK)^[6,11-13]。活化的 CCaMK 通过与转录因子 CYCLOPS 互作将其磷酸化，磷酸化的 CYCLOPS 以序列特异性的方式与 DELLAs 和 NSP (Nodulation signaling pathway) 1/2 相互作用，反式激活 *NIN* (Nodule inception) 的表达^[14-17]。此外，CYCLOPS 还能与 *ERN1* (Ethylene responsive factor required for nodulation1) 启动子特异结合，并与 CCaMK 形成复合物正向调节 *ERN1* 转录^[18]。同时，NSP1 能与 NSP2 互作形成异源二聚体并通过顺式元件 AATTT 直接与 *ENOD11* (Early nodulin 11) 启动子结合，*ENOD11* 是一个早期结瘤蛋白，在根瘤菌侵染前和侵染阶段的根和根瘤组织中转录^[19-20]。*ERN1*、*ERN2* 也能与 *ENOD11* 启动子特异性结合激活其表达，而 *ERN3* 抑制这种依赖 *ERN1*、*ERN2* 的 *ENOD11* 转录激活^[21]。*NIN* 是一个核心转录调控因子，有研究表明：*NIN* 参与根瘤菌侵染期间的侵染线形成、根瘤菌定殖等过程以及根瘤器官发生过程^[22-24]。尽管已经有大量研究关注了大豆-根瘤菌共生过程中的分子机制，但参与调控共生固氮的基因中仍存在大多数关键基因未被鉴定。

当前，转录组学技术具有高通量性和高灵敏度的特点，已成为挖掘大豆响应共生固氮关键基因的有力工具。利用转录组学技术探索在接种根瘤菌后的特定时间节点大豆基因的 mRNA 丰度，有助于更全面深入地理解大豆与根瘤菌之间的互作机制。Hayashi 等^[25] 通过用野生型根瘤菌或无效突变体 (*nodC*-) 菌株接种根，对结瘤区进行转录组分析鉴定出 2 915 个被根瘤菌产生的 Nod 因子信号特异性调控的基因。Yuan 等^[26] 采用 RNA-seq 方法研究了大豆根系在 5 个不同接种后时间点 (0.5、7-24 h, 5、16 和 21 d) 以及与两种不同菌株 (113-2 和 USDA205) 共生的差异表达基因，发现这些基因主要编码大豆抗性蛋白、NF 相关蛋白、结瘤蛋白和免疫防御蛋白，以及与类黄酮/黄酮/黄酮醇生物合成和植物-病原体相互作用的有关蛋白质。祁平等^[27] 对根瘤菌接种 12 h 后大豆根系进行转录组测序，发现 16 个编码损伤诱导短肽 (Wound-Induced Peptide, WIP) 的基因在根瘤菌侵染后被诱导表达。

本文旨在利用转录组学技术，通过分别比较大豆根在不接种根瘤菌与接种根瘤菌 1 d 后的基因表达谱，分析根瘤菌侵染后植物根部的表达变化，探究参与共生过程的关键基因和代谢途径，进而为揭示早期共生固氮的分子机制提供理论依据。通过这项研究，有助于研究和了解大豆根中的表达模式和调控，为提高大

豆产量和氮素利用效率提供新的理论和实践基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本研究所用大豆 (*Glycine max*) 材料为栽培品种 Williams 82 和慢生型根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) USDA110, 均来自中国科学院大豆分子设计育种重点实验室。

1.2 材料预处理与收集

将籽粒饱满、大小基本一致、表面无裂缝的大豆种子经氯气 (100 ml NaClO + 4 ml 浓 HCl) 灭菌 16 h 后于通风橱中吹走剩余氯气, 移至铺有湿润无菌滤纸的培养皿中于 23 °C 黑暗条件下放置 3 d 使其萌发出芽。待种子萌发后转移到装有无菌的蛭石和珍珠岩 (体积比为 2 : 1) 的盆中, 于温度为 28 °C、相对湿度为 50%、光照条件为 14 h 光照/10 h 黑暗交替进行的气候室中恒温培养。USDA110 (抗性为氯霉素) 在 28 °C 摇床活化至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.9 ~ 1.2, 将菌液 6 000 r·min⁻¹ 离心 5 分钟后倒掉上清液, 再用无氮营养液稀释至 OD₆₀₀ 值为 0.1 左右; 处理组在植物根部附近使用 5 ml 移液枪接种 10 ml 根瘤菌菌液, 对照组则用 10 ml 无氮营养液处理; 根瘤菌接种 1 d 后对植物根系进行取样, 该时间点是大豆根毛被根瘤菌侵染的关键时期, 此时有侵染线形成且皮层细胞开始分裂^[26]。将样品用液氮速冻后放在 -80 °C 冰箱保存。每个处理都有 3 个生物学重复。

1.3 RNA 提取和检测

使用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen, CA, USA) 按照说明书提取总 RNA, 再用 Bioanalyzer 2100 和 RNA 1000 Nano LabChip Kit (Agilent, CA, USA) 进行总 RNA 质量和纯度分析。总 RNA 经质检合格后方可用于后续文库构建和测序。

1.4 文库构建和测序

从提取的总 RNA 中富集 mRNA 并随机打断成短片段, 随后利用随机引物 (Random hexamers) 根据这些片段合成 cDNA 的第一条链, 再添加缓冲液、dNTPs、RNaseH 和 DNA 聚合酶 I 合成 cDNA 的第二条链。接着对合成的双链 cDNA 进行纯化并将其粘性末端修复为平末端, 同时在 3' 端加碱基 A 和测序接头, 经过片段选择后进行 PCR 扩增, 最终构建出用于测序的 cDNA 文库。在确认文库质量达标后, 使用 Illumina Novaseq™ 6000 仪器进行测序。文库的构建和转录组测序均由联川生物科技有限公司负责执行。

1.5 测序数据处理

1.5.1 测序数据预处理

通过 Cutadapt 软件过滤掉 (文库构建过程中引入的) 测序接头和 (由于测序仪自身误差产生的) 不合格的测序数据, 从而对原始数据进行预处理得到有效数据; 不合格的序列主要包括: 含有超过 5% 比例 N (N 表示无法确定碱基信息) 的 reads、低质量 reads (质量值 Q ≤ 10 的碱基数占整个 read 的比例超过 20%)。再通过使用 FastQC 软件统计原始测序量、有效测序量、Q20、Q30、GC 含量对整体测序质量进行分析。

1.5.2 与参考基因组进行比对

使用 HISAT2.0 软件将测序有效数据与大豆参考基因组 (<https://genome.jgi.doe.gov/pages/dynamicOrganismDownload.jsf?organism=Gmax>) 进行比对, 根据比对的结果使用 StringTie 软件来拼接与合并转录本并以 FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped reads) 值量化基因表达水平。同时根据 GO 数据库 (<http://geneontology.org>) 和 KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp/kegg>) 等数据库中的基因组注释文件对基因进行注释。

1.6 差异表达基因的富集分析

使用 edgeR 软件对两个处理下共 6 个样品中表达的基因进行差异表达鉴定并对其进行 GO 和 KEGG 功能富集分析, 差异表达基因 (Differentially expressed gene, DEG) 的筛选条件为 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold-}$

change ≥ 1 , FC (fold change) 为差异倍数, 然后通过使用 R 语言制作火山图、散点图等图形对差异表达结果进行可视化。以 $\log_2(\text{fold change})$ 为横坐标, $-\log_{10}(P \text{ value})$ 为纵坐标绘制火山图来了解 DEG 的整体分布情况。采用 ggplot2 分别绘制 DEG GO 富集和 KEGG 富集的分析结果的散点图。

1.7 转录因子分析以及 AP2/ERF 转录因子家族在不同组织中的表达模式分析

鉴于转录因子在早期共生固氮中的重要作用, 筛选出所有受根瘤菌侵染调控差异显著的转录因子并与植物转录因子数据库 PlantTFDB (<https://planttfdb.gao-lab.org/index.php>) 进行比对统计转录因子的数量和类型。将差异表达的 36 个 AP2/ERF 家族成员进一步与植物转录因子数据库 PlantTFDB 中已鉴定的大豆 AP2/ERF 各亚家族 (AP2、ERF、DREB、RAV 和 Soloist) 中的成员进行比对并分类。为了进一步了解响应早期共生固氮的 AP2/ERF 转录因子各亚家族成员在根、根瘤、地上部、叶等不同组织中的表达模式, 利用已公开的植物 RNA-seq 在线数据库 (<https://planrnadb.com/>)^[28] 下载这些家族成员基因在不同组织中的相关表达数据并使用 GrapPad Pism 8 制作基因表达热图。

1.8 AP2/ERF 转录因子家族进化分析

从 Phytozome 数据库 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) 中获取筛选出的 36 个大豆 AP2/ERF 转录因子家族成员的氨基酸序列, 同时从 NCBI 数据库中下载蒺藜苜蓿 ERN1/ERN2 和百脉根 ERN 的氨基酸序列。随后, 使用 MEGAX 软件对这些序列进行多序列比对, 并采用邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树, 设定 p-distance 作为遗传距离计算方法, 并执行了 1 000 次 bootstrap 自展值计算以提高发育树的可靠性, 同时选择了成对删除空位选项, 对于其他参数则保留了软件的默认设置。

1.9 qRT-PCR 分析

使用不接种根瘤菌和接种根瘤菌 1 d 后的根组织样品提取 RNA, 再以 *ELF-1b* 基因作为内参对 10 个差异表达的 AP2/ERF 转录因子家族成员基因进行 qRT-PCR 验证。采用 Trizol (Invitrogen, CA, USA) 法提取植物总 RNA, 用 Trans - Script® All-in-One-Step First-Strand cDNA Synthesis Super Mix for qPCR (One-Step gDNA Removal) (北京全式金生物技术有限公司) 试剂盒反转录成 cDNA, 在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 上设计引物 (表 1) 后由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成引物序列, 使用以下反应体系 (表 2) 和程序 (表 3) 进行 qRT-PCR 反应, 用 Excel 整理内参及基因表达数据, 基因转录水平用相对定量法进行计算后使用软件 GrapPad Pism 8 进行统计分析并作图。

表 1 qRT-PCR 引物名称及序列
Table 1 Primer name and sequence of qRT-PCR

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
qRT-Gm01G225000-F	GGAGGGAATGCGAGACAGAA	qRT-Gm03G111700-F	TTGAGATACCCGTAACGACGC
qRT-Gm01G225000-R	TGTTGTTGTGGGGCAATTCG	qRT-Gm03G111700-R	CTCCGCCCAATTCTCTGTCA
qRT-Gm16G040000-F	CCAAACCTGCAGCAACAGAAAT	qRT-Gm02G080200-F	TAGCATCTCAAAGGGTGTCTCTG
qRT-Gm16G040000-R	ATCTCAGCAACCCATCTCCC	qRT-Gm02G080200-R	TCCGTGAACCGCATAAACTCA
qRT-Gm17G210500-F	GGGAGTAAGACAGCGCCAAT	qRT-Gm03G162500-F	TCATGGGAAGAGCTGTTTTTCG
qRT-Gm17G210500-R	GCAGCCTCTGCTGTCTCAAA	qRT-Gm03G162500-R	ATTTTTCTTCAACGTGGCCGT
qRT-Gm07G091100-F	AGGCAAACCTCAGAAACAAGGAA	qRT-Gm12G073300-F	GACAGCGAAGTAGAAGCTGCAAG
qRT-Gm07G091100-R	GTGGCATCAGGGTCAGTGTA	qRT-Gm12G073300-R	CTGCCCATTTGGAAAGAAATTAGG
qRT-Gm17G169800-F	AGGGTGAAAACCTGAGACGACG	qRT-ELF1b-F	GTTGAAAAGCCAGGGGACA
qRT-Gm17G169800-R	GAAAACGGCGGTGTCGTAAG	qRT-ELF1b-R	TCTTACCCCTTGAGCGTGG
qRT-Gm05G186700-F	AACGACGTTGACCAGAGTTACA		
qRT-Gm05G186700-R	AAAGCAGAGATCATGGCTGACA		

表 2 qRT-PCR 反应体系
Table 2 qRT-PCR reaction system

试剂 Reagent	用量 Consumption/ μL
cDNA	1
Primer F	0.2
Primer R	0.2
ChamQ Blue Universal SYBR qPCR Master Mix	5
ddH ₂ O	3.6

表 3 qRT-PCR 反应程序
Table 3 qRT-PCR reaction procedure

温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	时间 Time/s	
95	30	
95	10	} 40 cycles
60	30	

2 结果与分析

2.1 测序数据质量分析

为了挖掘大豆根中响应早期共生固氮的关键基因, 收集根瘤菌 USDA110 侵染 1 d 的根系材料, 同时以水处理为对照, 每组 3 个生物学重复, 共 6 个样品进行转录组测序, 获得 86 149 352 条原始数据; 经预处理过滤掉不合格的序列后得到 83 943 518 条有效数据, 有效数据占比为 96.7%~97.5%, 质量值 ≥ 30 的碱基占比为 97.0%~97.3%, GC 含量占比均为 44.5% (表 4)。数据表明测序质量较高, 可用于后续分析。

表 4 测序数据质量分析
Table 4 Quality analysis of sequencing data

样品编号 Sample code	原始数据 Raw reads	有效数据 Valid reads	有效数据占比 Valid ratio/%	质量值 ≥ 30 的碱基占比 Q ≥ 30 /%	GC含量占比 GC content/%
NN_1d_CK1	41 981 696	40 909 042	97.44	96.98	44.5
NN_1d_CK2	42 443 112	41 316 398	97.35	97.28	44.5
NN_1d_CK3	43 652 536	42 547 784	97.47	97.32	44.5
NN_1d_Bj1	41 971 824	40 604 942	96.74	97.31	44.5
NN_1d_Bj2	41 274 128	40 152 166	97.28	97.25	44.5
NN_1d_Bj3	44 167 656	43 034 476	97.43	97.33	44.5

2.2 差异表达基因的富集分析

以 $FC \geq 2$ 或 $FC \leq 0.5$ 且 $P < 0.05$ 为标准, 共筛选出了 824 个 DEGs, 其中有 328 个基因上调表达, 496 个基因下调表达 (图 1)。328 个上调表达基因中有 43 个基因的转录本在不接种的根细胞中未发现, 表明这些基因对根瘤菌接种有特异性响应 (附表 1)。在这些差异表达基因中, *Glyma.01G028500*、*Glyma.09G187000*、*Glyma.02G311000*、*Glyma.01G241900*、*Glyma.06G184400* 这 5 个基因已经报道过在共生固氮中的作用。*Glyma.09G187000* (*FW2.2-like 1*, *GmFWL1*) 能响应根瘤菌侵染在根毛中表达并随后在根瘤发育过程中被强烈诱导表达, 可能参与植物细胞对根瘤菌侵染响应所需的细胞重塑程序, 如参与皮质

细胞分裂的起始和侵染线渗透到根瘤原基的过程, RNAi 沉默 *GmFWL1* 可显著减少根瘤数量并减小细胞核大小^[29]。*Glyma.01G241900* (*Nucleolar/Mitochondrial protein involved in nodulation a,GmNMNa*) 在根瘤菌侵染期间特异性表达, 其编码定位于核仁和线粒体、功能未知的蛋白质, RNA 介导的 *GmNMNa* 基因沉默导致结瘤数量减少、侵染细胞中的类菌体数量减少以及类菌体中聚- β -羟基丁酸酯 (Poly- β -hydroxybutyrate, PHB) 的积累明显减少^[30]。

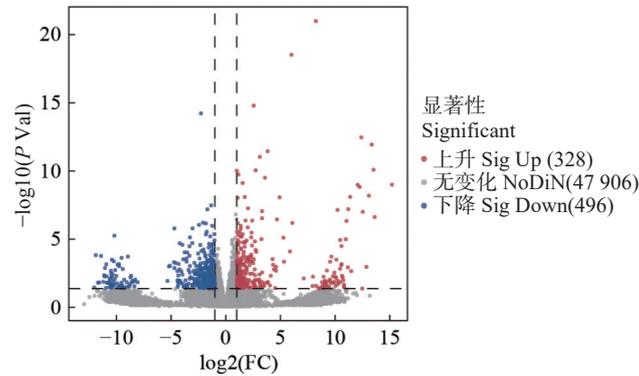


图 1 差异表达基因的整体分布情况

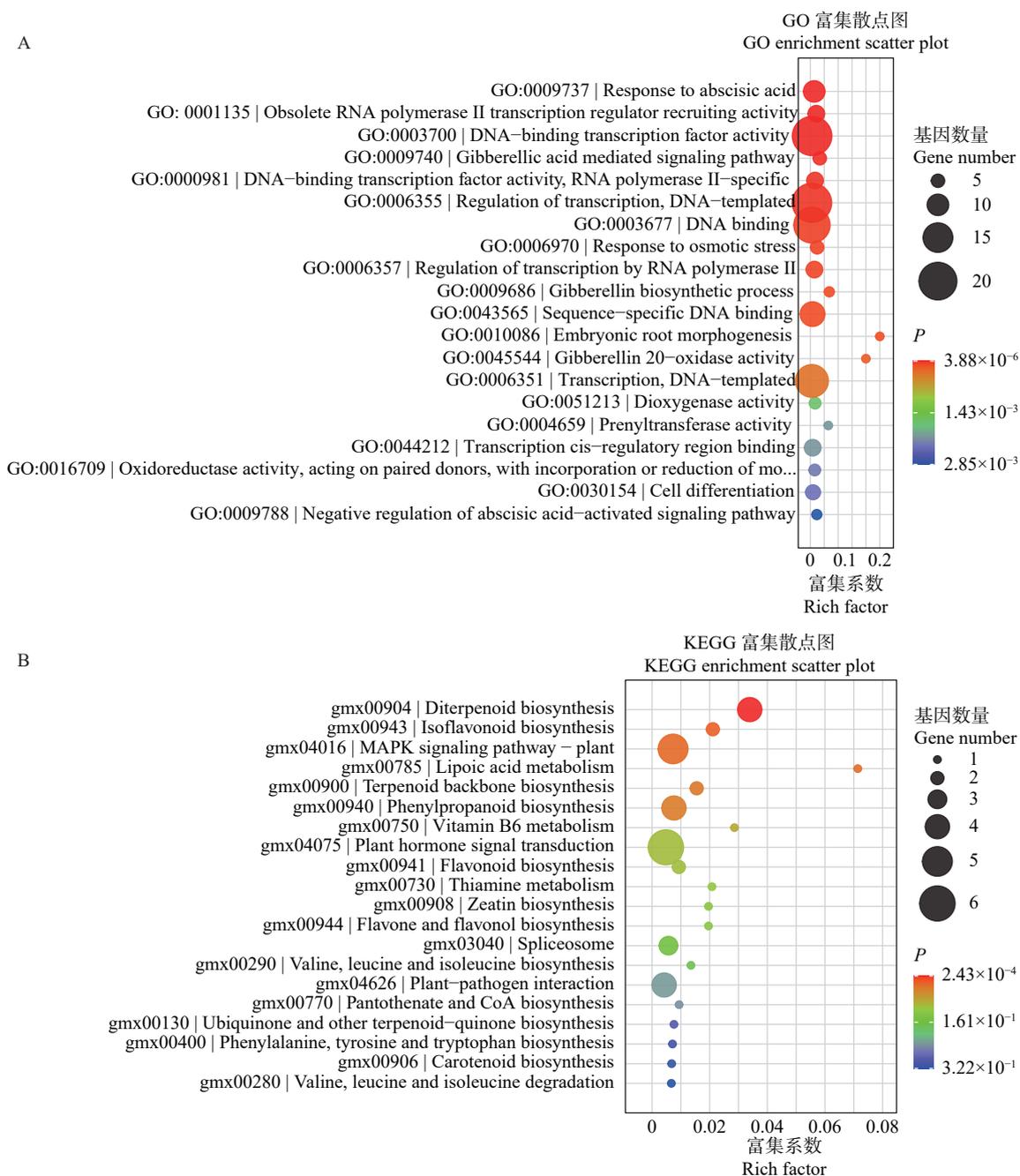
Fig. 1 Overall distribution of differentially expressed genes

为了解在大豆—根瘤菌早期共生互作过程中基因表达的特点, 对差异表达基因 (DEGs) 进行 GO 富集分析 (图 2A), 结果表明 DEGs 在与转录调控和激素相关的 GO 条目中显著富集, 如 DNA 结合转录因子活性 (DNA-binding transcription factor activity)、以 DNA 为模板的转录调控 (regulation of transcription, DNA-templated)、脱落酸响应 (response to abscisic acid)、赤霉素介导的信号通路 (gibberellic acid mediated signaling pathway)。此外, DEGs 还富集在胚根形态发生 (embryonic root morphogenesis)、细胞分化 (cell differentiation) 等与皮层细胞分裂有关的 GO 条目和赤霉素生物合成过程 (gibberellin biosynthetic process)、次级代谢产物生物合成过程 (secondary metabolite biosynthetic process) 等代谢产物合成的 GO 条目中。

通过 KEGG 富集分析进一步分析差异表达基因所影响的代谢通路 (图 2B), 结果表明 DEGs 主要富集在植物激素信号传导 (Plant hormone signal transduction)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway-plant)、植物-病原体互作 (Plant-pathogen interaction) 以及各种代谢产物合成和代谢通路上, 代谢产物合成通路主要包括二萜类化合物生物合成 (Diterpenoid biosynthesis)、异黄酮生物合成 (Isoflavonoid biosynthesis)、萜类化合物骨架生物合成 (Terpenoid backbone biosynthesis)、苯丙烷类化合物生物合成 (Phenylpropanoid biosynthesis)、类黄酮生物合成 (Flavonoid biosynthesis), 代谢产物代谢通路包括硫辛酸代谢 (Lipoic acid metabolism)、维生素 B6 代谢 (Vitamin B6 metabolism) 和硫胺素代谢 (Thiamine metabolism)。

2.3 早期共生固氮中转录因子的分析和 *AP2/ERF* 家族组织表达模式分析

由于 GO 富集分析发现差异表达基因在 DNA 结合转录因子活性条目中高度富集, 且也有许多文献中报道了多种转录因子在共生固氮中发挥重要作用, 因此我们进一步对响应早期共生固氮的转录因子进行筛选, 共筛选出 172 个差异表达的转录因子。将筛选出的差异表达的转录因子与植物转录因子数据库 Plant-TFDB (<https://plantfdb.gao-lab.org/index.php>) 进行比对后, 统计各转录因子家族的数量和类型, 结果表明差异表达的转录因子主要包括 *AP2/ERF* (36 个)、*MYB* (23 个, 包含 *MYB*-相关的)、*NAC* (8 个)、*WRKY* (10 个)、*bHLH* (17 个) 等家族 (图 3)。在差异表达的转录因子中, *AP2/ERF* 家族成员的转录因子数量最多, 且 *AP2/ERF* 家族转录因子已被报道参与植物生长发育、胁迫响应、激素信号转导等多个重要的生物学过程, 因此我们推测 *AP2/ERF* 转录因子可能在大豆早期共生固氮中发挥重要作用。由于



注: Rich factor 表示位于 GO 条目中的差异基因个数与总基因数的比值, 其大小与富集程度呈正比, 颜色与 P 值大小有关。

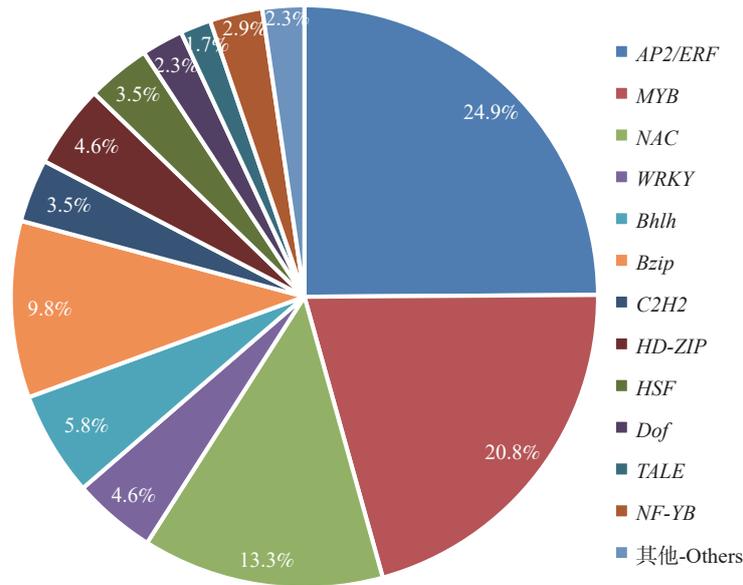
Note: Rich factor represents the ratio of the number of differentially expressed genes in the GO entries to the total number of genes, which is proportional to the degree of enrichment, and the color is related to the size of the P value.

图 2 差异表达基因的 GO 富集散点图 (A) 和差异表达基因的 KEGG 富集散点图 (B)

Fig. 2 GO enrichment scatter plot of differentially expressed genes (A) and KEGG enrichment scatter plot of differentially expressed genes (B)

AP2/ERF 家族可根据 *AP2/ERF* 结构域的数量以及是否含有其他结构域进一步分为 *AP2*、*ERF*、*DREB*、*RAV* 和 *Soloist5* 个亚家族, 分别将差异表达的 36 个 *AP2/ERF* 家族成员与已鉴定的大豆各亚家族成员进行比对, 发现差异表达的 *AP2/ERF* 家族成员中有 34 个来自 *ERF* 亚家族, 1 个 (*Glyma.01G087500*) 来自 *RAV* 亚家族, 1 个 (*Glyma.12G073300*) 来自 *AP2* 亚家族。

为了了解响应早期共生固氮的 *AP2/ERF* 转录因子各亚家族成员基因表达特点, 利用已公开的植物 RNA-seq 在线数据库 (<https://plantmadb.com/>)^[28] 下载 36 个 *AP2/ERF* 转录因子家族成员在根 (Root)、



注：其它中包括与转录因子数据库比对不上的推测转录因子以及个数在 2 以下的转录因子。

Note: Others include putative transcription factors that do not match the transcription factor database and transcription factor with a number of less than 2.

图 3 差异表达的转录因子类型及数量统计

Fig. 3 Differentially expressed transcription factor type and quantity statistics

根瘤 (nodule)、地上部 (shoot)、叶 (leaf) 等不同组织中的基因表达相关数据, 并使用 GrapPad Pism 8 制作基因表达热图, 对 AP2/ERF 各亚家族成员在不同组织中的表达模式进行分析。结果表明, 相较于其它成员, RAV 亚家族的 *Glyma.01G087500* 在根、根瘤和叶片中的表达水平比较高, AP2 亚家族的 *Glyma.12G073300* 在根和地上部的水平都比较高, ERF 亚家族中的 *Glyma.02G294100* 和 *Glyma.12G117000* 在根、根瘤和叶片中的表达水平比较高, *Glyma.11G036400* 和 *Glyma.06G290000* 在根中表达水平较高, 而 *Glyma.17G210500*、*Glyma.18G262800*、*Glyma.07G091100*、*Glyma.17G169800*、*Glyma.03G162600*、*Glyma.03G162500*、*Glyma.02G006200*、*Glyma.03G112400*、*Glyma.13G151900*、*Glyma.19G192400* 在 4 个组织中几乎不表达, 表明这 10 个基因可能为诱导表达基因 (图 4)。

2.4 AP2/ERF 家族进化分析

AP2/ERF 转录因子家族中的 ERN 在协调诱导菝葜苜蓿和百脉根根瘤菌侵染和根瘤器官发生方面发挥重要作用^[18,31-32]。为了解菝葜苜蓿中的 ERN1/ERN2、百脉根中的 ERN 及参与早期共生固氮的 AP2/ERF 家族成员之间的进化关系, 利用蛋白序列构建了系统进化树 (图 5), 结果表明根据遗传距离, 大豆中 AP2/ERF 家族成员可以聚为三类, 第 I 分支中的 *Glyma.19G113100*、*Glyma.16G040000*、*Glyma.16G154100*、*Glyma.18G262800*、*Glyma.07G091100* 等 18 个基因与 *MtERN1/2* 和 *LjERN* 亲缘关系较近, 其中 *Glyma.16G040000*、*Glyma.16G154100*、*Glyma.18G262800* 与 *MtERN1/2* 和 *LjERN* 的序列相似性达到 86% 及以上, 可能也在诱导根瘤菌侵染和根瘤器官发生中发挥作用, 而第 II 分支中的 9 个基因、第 III 分支中的 9 个基因则与 *MtERN1/2* 和 *LjERN* 亲缘关系较远。

2.5 qRT-PCR 验证

使用 *ELF-1b* 作为内参基因, 在差异表达的 AP2/ERF 家族成员中挑选了 10 个基因通过 qRT-PCR 验证基因表达量变化趋势是否与转录组数据一致, 根据转录组数据 *Glyma.01G225000*、*Glyma.16G040000*、*Glyma.17G210500*、*Glyma.07G091100*、*Glyma.17G169800*、*Glyma.12G073300* 这 6 个基因显示表达上调, *Glyma.05G186700*、*Glyma.03G111700*、*Glyma.02G080200*、*Glyma.03G162500* 这 4 个基因显示表达下调。验证结果如图 6 所示, *Glyma.01G225000*、*Glyma.16G040000*、*Glyma.17G210500*、*Glyma.07G091100*、

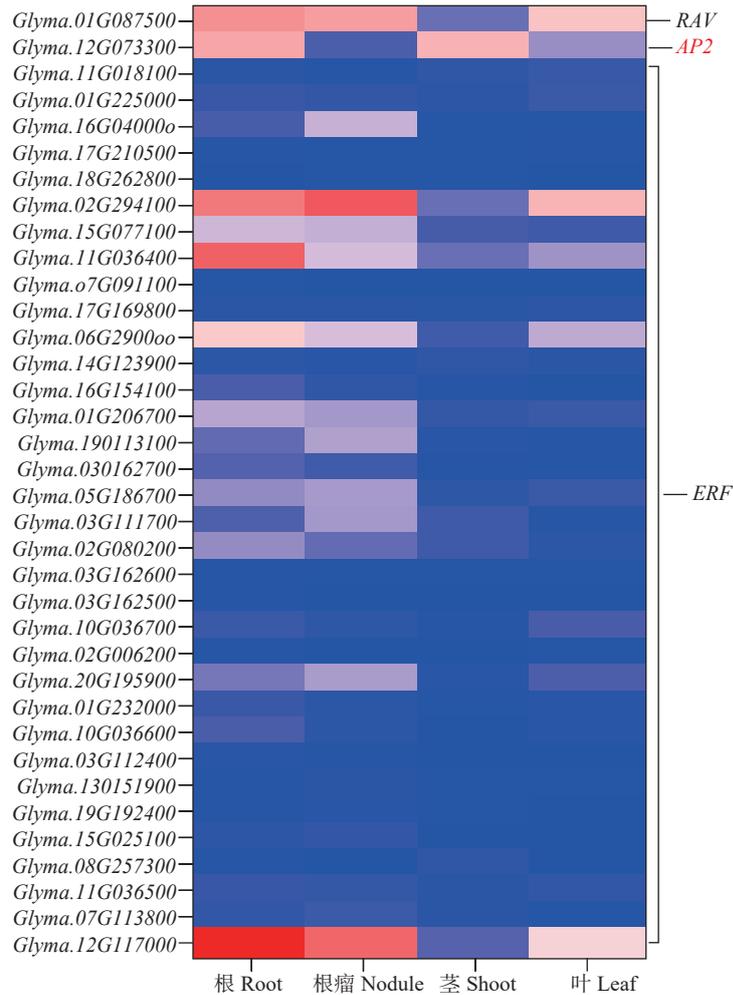


图 4 AP2/ERF 家族成员基因在不同组织中的表达热图

Fig. 4 Expression heat map of AP2/ERF family members in different tissues

Glyma.17G169800、*Glyma.05G186700*、*Glyma.12G073300* 这 7 个基因的表达情况与转录组数据趋势一致，其中 *Glyma.16G040000*、*Glyma.17G210500*、*Glyma.07G091100*、*Glyma.05G186700*、*Glyma.12G073300* 这 5 个基因的表达在不同程度上被显著调控。qRT-PCR 验证结果与转录组测序结果相符，表明 AP2/ERF 家族基因确实受到根瘤菌感染的调控。

3 讨论与结论

本研究利用 RNA-Seq 技术对不接种根瘤菌与接种根瘤菌 1 d 后的大豆材料的根组织进行转录组测序分析，来挖掘大豆根中响应早期共生固氮的关键基因。研究发现，接种根瘤菌后 1 分钟内即可发生根瘤菌在根毛上的附着，并诱导钙离子内流和膜去极化；随后在 12 h 内这些初步的细胞信号事件促使根毛发生变形和卷曲，在 24 h 内根瘤菌侵入根毛细胞并形成感染线；接着在 24 ~ 96 h 内表皮下的皮层细胞开始分裂，与此同时根瘤菌随着感染线伸长往皮层延伸^[33]。本研究共筛选出了 328 个受根瘤菌感染表达显著上调的基因和 496 个表达显著下调的基因，10 个基因中有 7 个（70%）的 qPCR 结果与转录谱数据趋势一致（图 6），表明 RNA-Seq 数据可靠。

在差异表达基因中 *Glyma.01G028500*、*Glyma.09G187000*、*Glyma.02G311000*、*Glyma.01G241900*、*Glyma.06G184400* 这 5 个基因在共生固氮中的作用已有文献报道。值得注意的是，*Glyma.09G187000* (*GmFWL1*) 响应根瘤菌感染在根毛中表达，且随后在根瘤发育过程中被强烈诱导表达，表明其在共生固

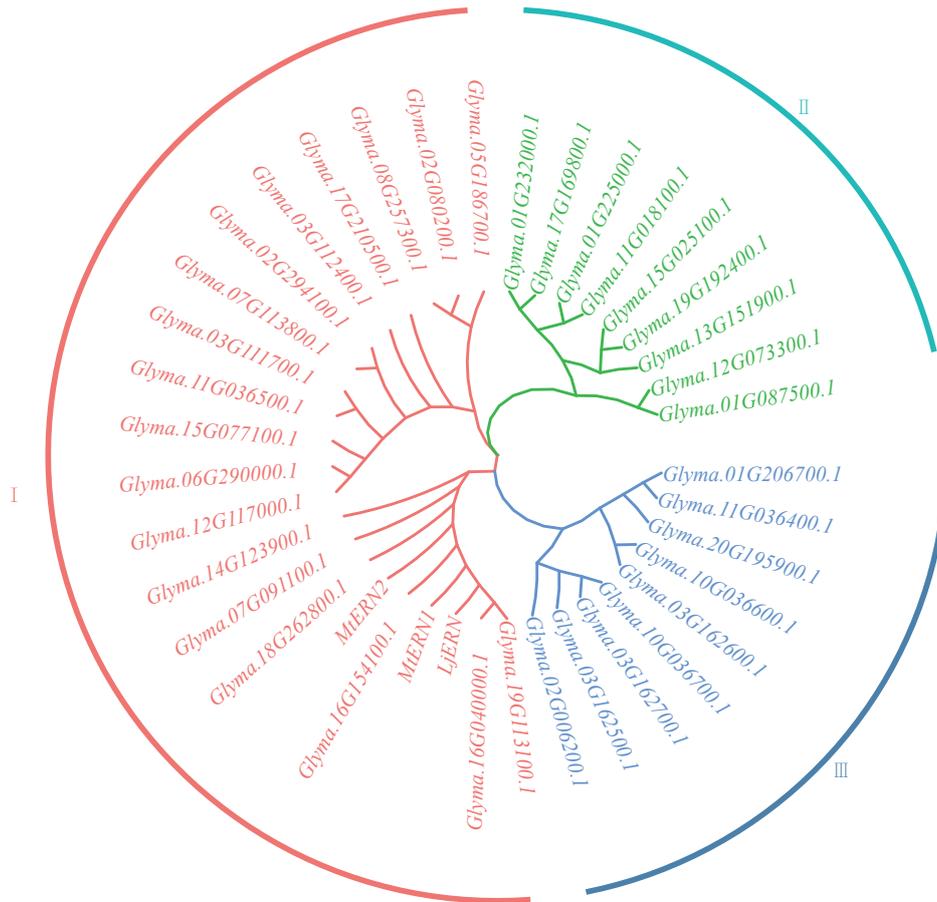
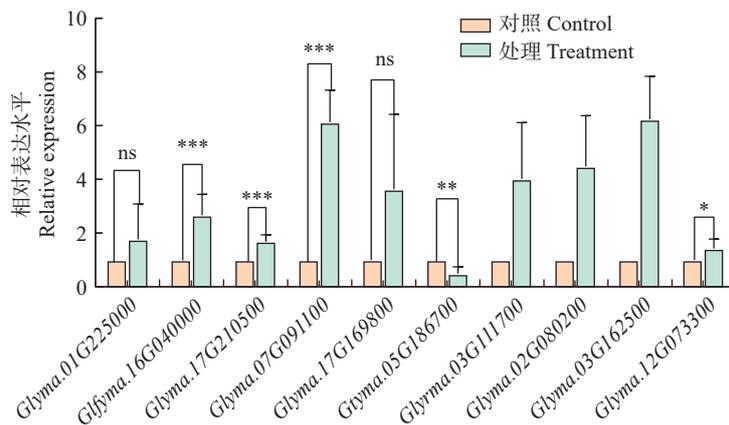


图 5 AP2/ERF 家族进化树分析

Fig. 5 AP2 / ERF family phylogenetic tree analysis



注: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$; ns 表示差异不显著。

Note: *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$; ns indicates the difference is not significant.

图 6 AP2/ERF 家族成员基因在接种根瘤菌 1 d 后的相对表达水平

Fig. 6 Relative expression levels of AP2 / ERF family members 1 d after inoculation with rhizobia

氮早期和结瘤过程中都发挥了作用。RNAi 沉默 *GmFWL1* 可显著减少根瘤数量并减小细胞核大小, 由于 *GmFWL1* 蛋白定位于质膜, 且植物中 *FWL* 基因家族具有强保守性, 表明 *GmFWL1* 可能是通过细胞级联反应来影响细胞核结构^[29]。 *GmFWL1* 蛋白是一种质膜微结构域相关蛋白, 能够与 remorin、prohibitins 和 flotillins 等多种膜微结构域相关蛋白互作。例如, *GmFWL1* 能和 *GmFLOT2/4* (与蒺藜苜蓿结瘤过程中的

一个主要调控因子 MtFLOT4 同源的蛋白质) 互作在根毛细胞尖端形成微结构域蛋白质复合物, 这种蛋白质复合物可以催化根瘤菌对根毛细胞的初始内吞渗透^[34]。 *Glyma.01G241900* (*GmNMNa*) 在共生固氮早期阶段调控根瘤菌入侵和存活, 其编码的蛋白质定位于核仁和线粒体, 沉默 *GmNMNa* 导致结瘤数量和感染细胞中的类菌体数量减少, 类菌体中 PHB 的积累也明显减少, 这可能是由于 *GmNMNa* 沉默影响了碳代谢 (较少的类菌体和 PHB), 破坏根瘤线粒体功能, 从而导致结瘤数量减少^[30]。与前期研究结果一致, 本研究中 *GmFWL1* 和 *GmNMNa* 的差异性表达为它们在共生固氮早期阶段发挥作用提供了有力的证据。

GO 富集和 KEGG 富集分析结果表明, DEGs 主要富集在转录调控、激素相关以及次生代谢产物合成等通路上。差异表达基因显著富集在转录调控上, 与在早期共生固氮中为响应根瘤菌侵染、细胞转录因子活性升高来激活结瘤信号通路以诱导基因表达以及接种根瘤菌 1 d 后皮层细胞开始分裂的观点一致^[23,35]。研究表明, 赤霉素、乙烯、脱落酸等植物激素信号传导对于豆科植物-根瘤菌共生至关重要^[36]。GA20 氧化酶 (GA20ox) 是一种催化赤霉素合成过程中的限速因子, 蒺藜苜蓿中的 MtGA20ox10 通过对赤霉素分解代谢的精准调控在根瘤菌侵染和根瘤发育过程中发挥重要作用, 与本研究中差异表达基因显著富集在赤霉素 20 氧化酶活性上也是一致的^[37]。

已有研究表明: 脱落酸能够调控植物中萜类化合物、苯丙烷类化合物以及其他类型次生代谢产物的生物合成途径^[38]。本研究表明: 根瘤菌侵染在共生固氮早期显著影响根系中代谢产物的积累, 尤其是二萜类化合物、异黄酮、萜类化合物骨架、苯丙烷类化合物、类黄酮等次生代谢产物。通过 RNAi 沉默查尔酮合成酶 (Chalcone synthase, CHS) 破坏类黄酮合成途径可抑制蒺藜苜蓿中根瘤的形成, 并阻止根瘤对生长素转运的调控, 降低其他的类黄酮化合物生物合成基因表达, 也在不同程度上抑制结瘤, 而外源施加类黄酮前体能挽救根瘤形成和类黄酮积累^[39-40]。此外, 转录因子在调控萜类合成方面具有重要作用, 目前在植物中已经鉴定出参与萜类合成调控的 MYB、AP2/ERF、WRKY、bHLH、NAC 和 bZIP 等转录因子家族^[41]。综合以上信息可以看出, 具有转录调控功能的转录因子在早期共生固氮中发挥了重要作用。

大豆 AP2/ERF 转录因子家族成员的组织表达模式分析结果显示, AP2/ERF 家族成员在不同组织中有不同程度的表达, *RAV* 亚家族的 *Glyma.01G087500* 在根、根瘤和叶片中的表达水平比较高, AP2 亚家族的 *Glyma.12G073300* 在根和地上部的水平都比较高, ERF 亚家族中的 *Glyma.02G294100* 和 *Glyma.12G117000* 在根、根瘤和叶片中的表达水平比较高, *Glyma.11G036400* 和 *Glyma.06G290000* 在根中表达水平较高, 而 *Glyma.17G210500*、*Glyma.18G262800*、*Glyma.07G091100*、*Glyma.17G169800*、*Glyma.03G162600*、*Glyma.03G162500*、*Glyma.02G006200*、*Glyma.03G112400*、*Glyma.13G151900*、*Glyma.19G192400* 在 4 个组织中几乎不表达, 表明这 10 个基因可能为诱导表达基因, 接种根瘤菌后其表达水平发生变化主要是由于受到根瘤菌侵染调控。

ERN1 是百脉根根瘤菌侵染的关键调节因子, 也是 CCaMK/CYCLOPS 复合体的直接靶标, 其在表皮中的表达依赖于 CYCLOPS^[42]。进化分析结果表明大豆中 AP2/ERF 家族成员可根据与 MtERN1/2 和 LjERN 亲缘关系的远近聚为三个分支。第 I 分支中的 *Glyma.19G113100*、*Glyma.16G040000*、*Glyma.16G154100*、*Glyma.18G262800*、*Glyma.07G091100* 等 18 个基因与 MtERN1/2 和 LjERN 亲缘关系较近, 其中 *Glyma.16G040000*、*Glyma.16G154100*、*Glyma.18G262800* 与 MtERN1/2 和 LjERN 的序列相似性达到 86% 及以上, 表明这 4 个基因可能也在诱导根瘤菌侵染和根瘤器官发生中发挥作用, 而与 MtERN1/2 和 LjERN 亲缘关系较远的第 II 分支、第 III 分支中的转录因子在早期共生固氮中发挥何种作用仍有待进一步探究。

参考文献 (References):

- [1] YANG J, LAN L Y, JIN Y, et al. Mechanisms underlying legume-rhizobium symbioses[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(2): 244-267.
- [2] DÉNARIÉ J, CULLIMORE J. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a minireview new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis[J]. *Cell*, 1993, 74(6): 951-954.

- [3] PETERS N K, FROST J W, LONG S R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes[J]. *Science*, 1986, 233(4767): 977–980.
- [4] REDMOND J W, BATLEY M, DJORDJEVIC M A, et al. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*[J]. *Nature*, 1986, 323: 632–635.
- [5] SHUMILINA J, SOBOLEVA A, ABAKUMOV E, et al. Signaling in legume-rhizobia symbiosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(24): 17397.
- [6] OLDROYD G E D. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(4): 252–263.
- [7] GUAN D, STACEY N, LIU C W, et al. Rhizobial infection is associated with the development of peripheral vasculature in nodules of *Medicago truncatula*[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(1): 107–115.
- [8] OLDROYD G E D, MURRAY J D, POOLE P S, et al. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45: 119–144.
- [9] MURRAY J D. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(6): 631–639.
- [10] 张雪, 邱丽娟, 阎哲. 豆科植物结瘤自调控分子机制研究进展 [J]. *土壤与作物*, 2022, 11(1): 1–9.
ZHANG X, QIU L J, YAN Z. Research progress on molecular mechanisms of autoregulation of nodulation in legumes[J]. *Soils and Crops*, 2022, 11(1): 1–9.
- [11] ANTOLÍN-LLOVERA M, RIED M K, PARNISKE M. Cleavage of the symbiosis receptor-like kinase ectodomain promotes complex formation with nod factor receptor 5[J]. *Current Biology*, 2014, 24(4): 422–427.
- [12] GLEASON C, CHAUDHURI S, YANG T B, et al. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition[J]. *Nature*, 2006, 441(7097): 1149–1152.
- [13] LÉVY J, BRES C, GEURTS R, et al. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses[J]. *Science*, 2004, 303(5662): 1361–1364.
- [14] YANO K, YOSHIDA S, MÜLLER J, et al. *CYCLOPS*, a mediator of symbiotic intracellular accommodation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(51): 20540–20545.
- [15] SINGH S, KATZER K, LAMBERT J, et al. *CYCLOPS*, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development[J]. *Cell Host and Microbe*, 2014, 15(2): 139–152.
- [16] FONOUNI-FARDE C, TAN S, BAUDIN M, et al. DELLA-mediated gibberellin signalling regulates Nod factor signalling and rhizobial infection[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12636.
- [17] JIN Y, LIU H, LUO D X, et al. DELLA proteins are common components of symbiotic rhizobial and mycorrhizal signalling pathways[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12433.
- [18] CERRI M R, WANG Q H, STOLZ P, et al. The *ERN1* transcription factor gene is a target of the CCaMK/CYCLOPS complex and controls rhizobial infection in *Lotus japonicus*[J]. *The New Phytologist*, 2017, 215(1): 323–337.
- [19] JOURNET E P, EL-GACHTOULI N, VERNOUD V, et al. *Medicago truncatula ENOD11*: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(6): 737–748.
- [20] HIRSCH S, KIM J, MUÑOZ A, et al. GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(2): 545–557.
- [21] ANDRIANKAJA A, BOISSON-DERNIER A, FRANCES L, et al. AP2-ERF transcription factors mediate nod factor-dependent *Mt ENOD11* activation in root hairs via a novel *cis*-regulatory motif[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(9): 2866–2885.
- [22] MARSH J F, RAKOCEVIC A, MITRA R M, et al. *Medicago truncatula NIN* is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(1): 324–335.
- [23] LIU C W, BREAKSPEAR A, GUAN D, et al. NIN acts as a network hub controlling a growth module required for rhizobial infection[J]. *Plant Physiology*, 2019, 179(4): 1704–1722.
- [24] MADSEN L H, TIRICHINE L, JURKIEWICZ A, et al. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*[J]. *Nature Communications*, 2010, 1(1): 10.
- [25] HAYASHI S, REID D E, LORENC M T, et al. Transient Nod factor-dependent gene expression in the nodulation-competent zone of soybean (*Glycine max*[L.] Merr.) roots[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(8): 995–1010.
- [26] YUAN S L, LI R, CHEN S L, et al. RNA-Seq analysis of differential gene expression responding to different *Rhizobium* strains in soybean (*Glycine max*) roots[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 721.
- [27] 祁平, 郑凯杰, 赵晓宇, 等. 根瘤菌侵染早期大豆根系的转录组分析 [J]. *大豆科学*, 2021, 40(3): 289–298.
QI P, ZHENG K J, ZHAO X Y, et al. Transcriptome analysis of soybean root system in the early stage of *Rhizobium* infection[J]. *Soybean*

- Science*, 2021, 40(3): 289–298.
- [28] YU Y M, ZHANG H, LONG Y P, et al. Plant Public RNA-seq Database: a comprehensive online database for expression analysis of ~45 000 plant public RNA-Seq libraries[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(5): 806–808.
- [29] LIBAULT M, ZHANG X C, GOVINDARAJULU M, et al. A member of the highly conserved *FWL* (tomato *FW_{2.2}-like*) gene family is essential for soybean nodule organogenesis[J]. *The Plant Journal*, 2010, 62(5): 852–864.
- [30] LIBAULT M, GOVINDARAJULU M, BERG R H, et al. A dual-targeted soybean protein is involved in *Bradyrhizobium japonicum* infection of soybean root hair and cortical cells[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(9): 1051–1060.
- [31] MIDDLETON P H, JAKAB J, PENMETS R V, et al. An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(4): 1221–1234.
- [32] CERRI M R, FRANCES L, KELNER A, et al. The symbiosis-related ERN transcription factors act in concert to coordinate rhizobial host root infection[J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(2): 1037–1054.
- [33] BRECHENMACHER L, KIM M Y, BENITEZ M, et al. Transcription profiling of soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(5): 631–645.
- [34] QIAO Z Z, BRECHENMACHER L, SMITH B, et al. The *GmFWL1* (*FW2-2-like*) nodulation gene encodes a plasma membrane microdomain-associated protein[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2017, 40(8): 1442–1455.
- [35] BREAKSPEAR A, LIU C W, ROY S, et al. The root hair "infectome" of *Medicago truncatula* uncovers changes in cell cycle genes and reveals a requirement for auxin signaling in rhizobial infection[J]. *The Plant Cell*, 2015, 26(12): 4680–4701.
- [36] FERGUSON B J, MATHESIUS U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2014, 40(7): 770–790.
- [37] CHU X T, SU H N, HAYASHI S, et al. Spatiotemporal changes in gibberellin content are required for soybean nodulation[J]. *The New Phytologist*, 2022, 234(2): 479–493.
- [38] 甄梦缘, 王丽芝, 孙超. 脱落酸及其调控植物次生代谢产物生物合成的研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2024, 43(3): 259–267.
ZHEN M Y, WANG L Z, SUN C. Research progress of abscisic acid and its regulation on biosynthesis of plant secondary metabolites[J]. *Journal of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 43(3): 259–267.
- [39] WASSON A P, PELLERONE F I, MATHESIUS U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(7): 1617–1629.
- [40] ZHANG J, SUBRAMANIAN S, STACEY G, et al. Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*[J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(1): 171–183.
- [41] 董燕梅, 张文颖, 凌正一, 等. 转录因子调控植物萜类化合物生物合成研究进展 [J]. 植物学报, 2020, 55(3): 340–350.
DONG Y M, ZHANG W Y, LING Z Y, et al. Advances in transcription factors regulating plant terpenoids biosynthesis[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2020, 55(3): 340–350.
- [42] CHAKRABORTY S, VALDÉS-LÓPEZ O, STONOHAR-ARTHER C, et al. Transcription factors controlling the *Rhizobium*-legume symbiosis: integrating infection, organogenesis and the abiotic environment[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2022, 63(10): 1326–1343.