



不同柱花草种质耐低磷综合评价及低磷响应基因挖掘

王林杰[†], 邹晓燕[†], 董荣书, 王文强, 刘国道^{*}, 陈志坚^{*}

中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 农业农村部华南作物基因资源与种质创制重点实验室, 海口 571101;

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: liuguodao2008@163.com; zjchen@catas.cn

收稿日期: 2023-11-08; 接受日期: 2024-02-07; 网络版发表日期: 2024-07-02

国家自然科学基金(批准号: 31861143013, 31801951)和国家牧草产业技术体系岗位科学家项目(批准号: CARS-34)资助

摘要 磷是植物生长发育所必需的大量营养元素之一, 参与光合作用、呼吸作用和能量代谢等重要过程. 柱花草是重要的热带豆科牧草, 其对热带酸性土壤低磷胁迫的适应性表现出基因型差异. 本研究对30份柱花草种质进行了耐低磷综合评价分析并挖掘了根系低磷响应基因. 结果表明, 低磷处理显著抑制了柱花草地上部的生长, 然而, 低磷促进了根系的生长, 且不同柱花草种质耐低磷能力存在显著差异. 综合评价分析表明, 不同柱花草种质可分为耐低磷种质(3份)、不耐低磷种质(14份)和中间型种质(13份)三大类型. 其中, 耐低磷柱花草种质“TF0277”可以通过增加总根长、根表面积、根体积以适应低磷胁迫. 本研究进一步通过转录组分析挖掘到柱花草“TF0277”根系低磷响应差异表达基因1496个, 包括791低磷上调表达和705个低磷下调表达基因. 参与磷活化利用、磷吸收和转运以及磷信号调控等相关基因可能在柱花草“TF0277”适应低磷胁迫中发挥重要作用. 因此, 挖掘耐低磷柱花草种质和低磷响应基因可为培育磷高效柱花草新品种提供种质材料和基因资源.

关键词 柱花草, 低磷胁迫, 隶属函数分析, 转录组, 低磷响应基因

磷(phosphorus, P)是植物生长发育所必需的大量营养元素之一, 参与植物的光合作用、呼吸作用、能量代谢和信号转导等过程^[1]. 磷也是植物细胞中多种生物大分子的重要组成成分, 如三磷酸腺苷(ATP)、磷脂、DNA和RNA^[2]. 虽然土壤中总磷含量较丰富, 但是, 磷在土壤中移动性较弱, 且容易被土壤固定形成不能被植物直接利用的难溶性磷^[3]. 缺磷会造成植株生长缓慢、矮小和发育受阻等, 进而降低作物产量^[4,5]. 因此, 土壤低磷胁迫是作物生长的主要限制因

素, 是农业生产中亟待解决的重要问题. 在传统农业生产中, 农民通过大量施用磷肥以提高作物的产量, 但这造成了土壤退化和水体富营养化问题^[6]. 更为重要的是, 磷肥是不可再生的磷矿资源, 预计会在不久的将来消耗殆尽^[7]. 因此, 选育耐低磷的作物品种对减少磷肥投入和生态农业可持续发展具有重要意义. 研究表明, 植物可以通过调控形态和生理变化的途径改善对磷的吸收和利用, 如优化根系形态和构型、增加有机酸和酸性磷酸酶的分泌、诱导磷转运蛋白基因的表

引用格式: 王林杰, 邹晓燕, 董荣书, 等. 不同柱花草种质耐低磷综合评价及低磷响应基因挖掘. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 1988–2002
Wang L J, Zou X Y, Dong R S, et al. Evaluation of low phosphorus tolerance and identification of low phosphorus responsive genes in various *Stylosanthes guianensis* accessions (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 1988–2002, doi: 10.1360/SSV-2023-0259

达、促进与有益微生物共生以及调控磷信号网络等^[5,8].

柱花草(*Stylosanthes guianensis*)起源于热带和亚热带地区, 是豆科蝶形花亚科的一个属. 柱花草适应性强, 产量高且富含蛋白质, 在世界热带地区被广泛用作草饲料喂养牲畜, 也可用于豆科绿肥植物和林果草生态工程建设等^[9,10]. 虽然柱花草对热带酸性土壤低磷等养分胁迫具有良好的适应性, 但是, 柱花草适应低磷胁迫表现出基因型差异^[11~15]. 例如, 已有研究把柱花草分成野生型、栽培型和磷高效型三种类型, 并发现13个柱花草基因型的根际酸化能力与植株吸磷量之间显著相关^[16,17]. 对不同的柱花草种质耐低磷能力进行分析, 发现柱花草对缺磷土壤的适应性具有基因型差异, 并且这种差异主要来自磷吸收效率的不同^[18]. 另外, 已有研究从不同柱花草种质中筛选了磷高效柱花草种质, 并初步分析了参与柱花草根系生长的扩展蛋白基因^[15].

目前我国比较缺乏耐受低磷胁迫的柱花草品种, 对高效吸收利用土壤磷素的柱花草研究有限, 并且, 迄今为止, 未见有对不同柱花草种质耐低磷综合评价分析的报道. 因此, 本研究以30份柱花草种质为材料, 分析了低磷处理对柱花草生长的影响, 运用变异系数分析、相关性分析、隶属函数分析和聚类分析等方法, 综合评价了柱花草的耐低磷能力, 筛选了耐低磷柱花草种质, 为培育磷高效柱花草新品种提供种质材料. 另外, 本研究利用RNA-seq技术挖掘柱花草根系低磷响应基因, 探讨了柱花草低磷应答的分子机制, 为柱

花草适应低磷胁迫分子机制的深入研究提供参考.

1 材料与方法

1.1 试验材料

不同柱花草种子由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所提供, 柱花草种质信息如表1所示.

1.2 柱花草培养与处理

将柱花草种子去种皮, 于80℃水浴3 min, 随后在湿润的滤纸上萌发2~3 d. 将萌发后的幼苗移到1/2 Hoagland营养液中预培养10 d, 然后对柱花草进行2个磷浓度处理, 分别为5 μmol/L KH₂PO₄(低磷处理, LP)和250 μmol/L KH₂PO₄(正常磷处理, HP)^[19]. 不同磷处理14 d后, 测定叶片数、分支数、株高、根系生长参数、地上部和根部干重、磷浓度和磷含量. 每个处理设置3个生物学重复. 收获部分根系样品, 用液氮速冻, -80℃保存, 用于RNA提取及转录组测序分析. 部分样品置于75℃烘干至恒重后测定干重和磷浓度.

1.3 根系生长参数分析

使用扫描仪12000XL(EPSON, 北京)扫描柱花草根系图片, 采用WinRhizo Pro软件分析总根长、根表面积和根体积^[19].

1.4 植株磷浓度测定

将烘干后的地上部和根部样品充分磨碎后, 称取

表 1 30份柱花草种质信息

Table 1 Information of the 30 *S. guianensis* accessions

编号	种质名称	原产地	编号	种质名称	原产地	编号	种质名称	原产地
1	TF0205	哥斯达黎加	11	TF0238	玻利维亚	21	Reyan 2	中国
2	TF0212	巴西	12	TF0240	哥伦比亚	22	Reyan 5	中国
3	TF0213	哥伦比亚	13	TF0244	哥伦比亚	23	TF0318	哥伦比亚
4	TF0216	哥伦比亚	14	TF0245	哥伦比亚	24	TF0319	哥伦比亚
5	TF0221	秘鲁	15	TF0250	巴西	25	TF0323	哥伦比亚
6	TF0224	委内瑞拉	16	TF0261	哥伦比亚	26	Reyan 18	中国
7	TF0227	哥伦比亚	17	TF0262	哥伦比亚	27	TF0387	委内瑞拉
8	TF0228	巴西	18	TF0266	澳大利亚	28	TF0285	澳大利亚
9	TF0235	哥伦比亚	19	TF0277	哥伦比亚	29	Reyan 22	中国
10	TF0237	哥伦比亚	20	TF0278	哥伦比亚	30	TPRC2001-28	中国

0.07 g样品, 在马弗炉中600℃灰化10 h, 加入8 mL 100 mmol/L HCl溶解样品, 采用钼锑抗显色法, 于分光光度计UV1900i(Shimadzu, 日本)测定 A_{700} 吸光值并计算磷浓度^[19].

1.5 柱花草转录组分析

选取1.2节中, 2个磷浓度处理下的耐低磷柱花草种质“TF0277”根系样品, 参照TRNzol Universal(Tiangen, 北京)试剂盒说明书方法, 提取根系样品总RNA^[13]. 采用Illumina NovoSeq 6000平台(Illumina, 美国)进行二代RNA-seq转录组测序分析, 测序策略为PE150, 序列数据经过过滤处理后得到Clean Data数据. 采用Trinity v2.4.0进行无参转录组序列组装, 采用TransDecoder v3.0.1预测组装序列的开放阅读框, 采用Trinotate v3.0.2进行基因功能注释, 采用RSEM软件计算基因表达量FPKM值, 采用DEGSeq2软件对处理组 and 对照组基因的表达式进行比较分析, 选取 q -value小于0.05且 $|\log_2(LP/HP)|$ 大于1的基因为差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs). 对差异表达基因进行GO(Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>)功能和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/>)通路分析, 应用Fisher检验, 对 P -value进行校正后, 以 $\text{Padj} < 0.05$ (q -value < 0.05)为阈值进行富集分析^[13]. 利用在线工具SRplot(<http://www.bioinformatics.com.cn/SRplot>)进行GO和KEGG结果作图展示. 转录组原始数据已上传至

GEO(Gene Expression Omnibus, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)公共数据库中, 序列号为GSE250319.

1.6 候选基因实时荧光定量(RT-qPCR)分析

使用实时荧光定量PCR仪QuantStudio™ Real-Time PCR(Thermo Fisher, 美国)和定量反应试剂盒SYBR Green(Vazyme, 南京)进行候选基因RT-qPCR分析, 并以柱花草*SgEF1a*为内参基因计算基因的相对表达量^[19]. 候选基因及其RT-qPCR引物如表2所示.

1.7 数据处理及分析

本研究各评价指标值均使用相对值来进行分析, 即指标相对值=低磷(LP)处理值/正常磷(HP)处理值, 并采用变异系数分析、相关性分析、隶属函数分析和聚类分析等方法, 对不同柱花草种质的耐低磷能力进行综合评价分析. 数据采用Microsoft Excel 2021进行计算和作图, 采用SPSS 26.0进行数据分析.

2 结果与分析

2.1 不同磷浓度处理对柱花草生长的影响

本研究首先分析了低磷(5 $\mu\text{mol/L}$ KH_2PO_4 , LP)和正常磷(250 $\mu\text{mol/L}$ KH_2PO_4 , HP)处理对柱花草8个生长相关指标、2个磷浓度和2个磷含量指标的影响. 如表3所示, 低磷处理抑制了柱花草地上部的生长, 包括叶片数、分支数、株高和地上部干重, 然而, 低磷促进

表2 候选基因及其RT-qPCR引物

Table 2 RT-qPCR primers for candidate genes

编号	基因名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')
U1	无机磷酸盐转运蛋白1-4	TTGGCGGCGATTACCCTCTCTC	CGGCGGCGACAATGAGTGATAC
U2	磷脂酶D(PLDZ)	CAAACCATTTGGGCTTGGCTC	CTTCGGAGGGTTGGTGTGT
U3	扩展蛋白A2	TTCCCATCAAAACCAGCCGT	AGCAGAAACCATGGAGCAGT
U4	紫色酸性磷酸酶23	ACTCCGATACCCACCACCTT	AGCCTTGGATCGGTTCATTGG
U5	含SPX结构域蛋白1	GTGGCCAAAGTGAAGTTTCC	CAACCGGATGAGAGCACCAG
U6	MYB相关蛋白Zm1	CACTGTCTCTGGCCCTTTGT	TTTCAATTGCGGGCTGTGTG
U7	WRKY75转录因子	TCCAGCGGTATCCATCATCA	TGTTGTTCCCTAGCTCATCGT
D1	ATP酶亚基6	TCGCAGCAAGTCGAACAGAT	ATATGTGCCCTTTCCGGTGCT
D2	铁还原酶	CAAGGCAAGAGACGAGCAGA	CAACCATCATGTCCCTGGT
D3	谷氨酸受体2.5	CTGATGCAAAGCTACACGGC	CCCCTCCGCGTAGATCATTC
	<i>SgEF1a</i> 内参基因	CACTTCAGGACGTGTACAAGATC	CTTGGAGAGCTTCATGGTGCA

表 3 低磷处理下30份柱花草种质的12项相对指标

Table 3 Twelve physiological response indices of 30 *S. guianensis* accessions under low P stress

编号	相对 叶片数	相对 分支数	相对 株高	相对 总根长	相对 根表面积	相对 根体积	相对 地上部干重	相对 根干重	相对地上部 磷浓度	相对根部 磷浓度	相对地上部 磷含量	相对根部 磷含量
1	0.730	0.500	0.739	1.005	0.795	0.760	0.498	1.150	0.230	0.168	0.115	0.194
2	0.604	0.500	0.921	2.797	2.302	2.022	0.839	1.666	0.173	0.135	0.144	0.215
3	0.566	0.563	0.744	1.177	1.154	1.140	0.508	1.307	0.097	0.063	0.049	0.082
4	0.536	0.542	0.782	1.252	1.073	0.924	0.493	1.076	0.115	0.128	0.057	0.132
5	0.540	1.083	0.683	1.128	1.140	1.150	0.650	1.333	0.124	0.133	0.119	0.235
6	0.567	0.700	0.722	1.724	1.662	1.605	0.674	1.751	0.149	0.134	0.103	0.226
7	0.318	0.447	0.610	1.404	1.388	1.519	0.443	1.225	0.123	0.084	0.054	0.104
8	0.545	0.167	0.660	1.000	0.849	0.794	0.408	0.692	0.222	0.122	0.090	0.092
9	0.566	0.600	0.673	2.152	1.789	1.871	0.679	1.548	0.250	0.146	0.178	0.230
10	0.563	0.750	0.681	2.176	2.298	2.433	0.670	1.065	0.106	0.118	0.070	0.128
11	0.730	0.688	0.822	1.868	1.626	1.471	0.687	1.377	1.161	0.162	0.811	0.226
12	0.580	0.600	0.769	1.587	1.367	1.179	0.579	1.169	0.126	0.297	0.073	0.328
13	0.611	0.433	0.686	1.884	1.806	1.740	0.678	1.341	0.268	0.100	0.181	0.157
14	0.285	0.200	0.732	1.079	0.950	0.848	0.509	1.010	0.452	0.348	0.227	0.352
15	0.317	0.278	0.534	0.870	0.615	0.514	0.372	0.856	0.505	0.349	0.186	0.299
16	0.620	0.642	0.660	1.246	1.246	1.405	0.573	1.210	0.152	0.094	0.092	0.102
17	0.280	0.350	0.493	0.854	0.430	0.407	0.285	0.411	0.228	0.989	0.065	0.416
18	0.592	0.540	0.693	1.969	1.973	2.304	0.715	1.962	0.122	0.076	0.086	0.150
19	0.591	0.768	0.774	2.102	2.171	2.243	0.680	2.128	0.127	0.133	0.087	0.272
20	0.517	0.638	0.584	1.080	1.035	1.100	0.509	1.219	0.139	0.064	0.073	0.080
21	1.169	0.667	0.923	2.668	2.352	1.897	1.111	1.413	0.135	0.095	0.233	0.169
22	0.667	0.506	0.680	1.335	1.436	1.379	0.571	1.312	0.111	0.074	0.065	0.113
23	0.597	0.700	0.748	1.727	1.540	1.513	0.592	1.475	0.181	0.114	0.110	0.167
24	0.429	0.308	0.589	1.185	1.157	1.374	0.409	1.109	0.138	0.063	0.056	0.066
25	0.585	0.375	0.673	1.306	1.230	1.163	0.440	1.181	0.135	0.095	0.058	0.115
26	0.524	0.328	0.824	1.492	1.538	1.584	0.813	2.352	0.119	0.078	0.124	0.193
27	0.431	0.321	0.691	1.139	1.024	0.922	0.520	1.103	0.113	0.121	0.060	0.135
28	0.612	0.500	0.728	1.752	1.564	1.492	0.650	1.785	0.223	0.072	0.144	0.114
29	0.465	0.342	0.755	1.618	1.466	2.193	0.539	1.298	0.192	0.101	0.107	0.136
30	0.613	0.463	0.883	1.289	1.454	1.876	0.660	1.619	0.324	0.200	0.225	0.284
均值	0.558	0.517	0.715	1.529	1.414	1.427	0.592	1.338	0.218	0.162	0.135	0.184
变异 系数	0.293	0.376	0.141	0.329	0.347	0.371	0.273	0.300	0.931	1.071	1.033	0.482

了大部柱花草种质根系的生长，包括总根长、根表面积、根体积和根干重。在低磷处理下，这12项测定指标的变异系数在0.141~1.071之间，表明30份柱花草种质的各指标性状之间存在一定的差异(表3)。其中，相对地上部磷浓度、相对根部磷浓度和相对地上部磷含量的变异系数均高于0.500，分别为0.931、1.071和1.033，说明这3项指标在低磷处理后的变化较大，而相

对叶片数、相对株高和相对地上部干重的变异系数均低于0.300，分别为0.293、0.141和0.273，说明这3项指标受低磷处理的影响较小(表3)。

2.2 低磷胁迫下柱花草各项测定指标的相关性

从表4可以看出，相对叶片数与相对株高、相对总根长、相对根表面积和相对地上部干重极显著正相

表 4 低磷处理下30份柱花草种质12项指标的皮尔森相关系数

Table 4 Pearson's correlation coefficients of 12 physiological response indices of 30 *S. guianensis* accessions under low P stress

	相对 叶片数	相对 分支数	相对株高	相对 总根长	相对 根表面积	相对 根体积	相对 地上部 干重	相对 根干重	相对 地上部 磷浓度	相对 根部磷 浓度	相对 地上部 磷含量
相对分支数	0.438*										
相对株高	0.640**	0.224									
相对总根长	0.574**	0.377*	0.607**								
相对根表面积	0.568**	0.441*	0.602**	0.949**							
相对根体积	0.387*	0.367	0.478**	0.804**	0.913**						
相对地上部干重	0.750**	0.445*	0.764**	0.823**	0.833**	0.672**					
相对根干重	0.342	0.329	0.561**	0.550**	0.658**	0.666**	0.676**				
相对地上部磷浓度	0.015	-0.071	0.097	-0.013	-0.097	-0.144	-0.018	-0.116			
相对根部磷浓度	-0.415*	-0.232	-0.372*	-0.316	-0.467**	-0.481**	-0.402*	-0.516**	0.19		
相对地上部磷含量	0.29	0.121	0.344	0.232	0.162	0.072	0.294	0.09	0.937**	0.024	
相对根部磷含量	-0.23	-0.002	0.049	-0.033	-0.147	-0.205	-0.012	-0.083	0.331	0.765**	0.251

*和**分别表示在0.05水平和0.01水平上显著相关

关,与相对分支数和相对根体积显著正相关;相对分支数与相对总根长、相对根表面积和相对地上部干重显著正相关;相对株高与相对总根长、相对根表面积、相对根体积、相对地上部干重和相对根干重极显著正相关;相对总根长与相对根表面积、相对根体积、相对地上部干重和相对根干重极显著正相关;相对根表面积与相对根体积、相对地上部干重和相对根干重极显著正相关;相对根体积与相对地上部干重和相对根干重极显著正相关;相对地上部干重与相对根干重极显著正相关;相对地上部磷浓度与相对地上部磷含量极显著正相关;相对根部磷浓度与相对根部磷含量极显著正相关;相对叶片数、相对株高、相对地上部干重与相对根部磷浓度显著负相关,相对根表面积、相对根体积和相对根干重均与相对根部磷浓度极显著负相关.以上结果表明,这12项测定指标间密切程度高.

2.3 不同柱花草耐低磷综合评价

隶属函数分析表明,不同柱花草种质耐低磷能力存在差异(表5).排在前三位的综合隶属函数值均在0.6以上,分别为0.732, 0.671和0.649,表明这3份种质耐低磷能力最强,种质编号分别为“Reyan 2”“TF0212”和“TF0277”;排在最后3位的隶属函数值均在0.2以下,分别为0.172, 0.160和0.131,表明这3份种质耐低磷能力最弱,种质编号分别为“TF0228” “TF0250”和

“TF0262”.聚类分析结果表明,在欧式距离5处可将30份柱花草种质划分为3大类(Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ):第Ⅰ类为耐低磷种质,含有3份种质,分别为“Reyan 2”“TF0212”和“TF0277”,约占总种质的10.00%;第Ⅱ类为中间型种质,含有13份种质,占总种质的43.33%;第Ⅲ类为不耐低磷种质,含有14份种质,占总种质的46.67%(图1).

2.4 柱花草根系低磷响应基因的挖掘

为进一步挖掘柱花草根系低磷响应基因,本研究以耐低磷能力较强的柱花草种质“TF0277”为材料,通过比较转录组方法,挖掘其根系低磷响应基因.从图2A和B可以看出,低磷(5 μmol/L)处理抑制了柱花草“TF0277”地上部的生长,但促进了根系的生长,与正常磷(250 μmol/L)处理相比,低磷处理下的根部干重增加了108.5%(图2B),而总根长、根表面积、根体积则分别增加了106.9%, 114.6和122.9%(图2D~F).低磷处理显著抑制了柱花草地上部和根部的磷浓度,与正常磷处理相比,低磷处理下的地上部和根部磷浓度分别减少了87.3%和86.9%(图2C).结果表明,耐低磷柱花草基因型“TF0277”可能通过调节根系生长适应低磷胁迫.

转录组分析表明(表6),从低磷(LP)和正常磷(HP)处理样本中获得总序列数分别为140780514条和139537510条,两个处理下共获得转录本和基因的数量

表 5 低磷处理下30份柱花草种质12项指标的隶属函数值
Table 5 Subordinate function values of 12 physiological response indices of 30 *S. guianensis* accessions under low P stress

编号	隶属函数值												D值	排序
	相对 叶片数	相对 分支数	相对 株高	相对 总根长	相对 根表面积	相对 根体积	相对 地上部 干重	相对 根干重	相对 地上部 磷浓度	相对 根部 磷浓度	相对 地上部磷 含量	相对 根部 磷含量		
1	0.506	0.364	0.572	0.077	0.190	0.175	0.258	0.381	0.125	0.113	0.086	0.367	0.303	21
2	0.365	0.364	0.996	1.000	0.974	0.797	0.671	0.646	0.072	0.078	0.125	0.426	0.671	2
3	0.322	0.432	0.584	0.166	0.376	0.362	0.270	0.461	0.000	0.000	0.000	0.044	0.326	19
4	0.288	0.409	0.672	0.205	0.334	0.255	0.252	0.342	0.017	0.070	0.010	0.188	0.317	20
5	0.293	1.000	0.443	0.141	0.369	0.367	0.442	0.475	0.026	0.075	0.091	0.482	0.415	16
6	0.322	0.582	0.533	0.448	0.641	0.591	0.471	0.690	0.049	0.076	0.071	0.456	0.503	10
7	0.043	0.305	0.273	0.283	0.498	0.549	0.192	0.419	0.025	0.023	0.007	0.107	0.297	22
8	0.298	0.000	0.390	0.075	0.218	0.191	0.149	0.145	0.118	0.063	0.054	0.074	0.172	28
9	0.321	0.473	0.419	0.668	0.707	0.723	0.477	0.585	0.144	0.089	0.169	0.470	0.517	8
10	0.319	0.636	0.437	0.680	0.972	1.000	0.466	0.337	0.009	0.059	0.028	0.177	0.540	6
11	0.507	0.568	0.766	0.522	0.622	0.525	0.487	0.498	1.000	0.107	1.000	0.458	0.573	4
12	0.337	0.473	0.643	0.377	0.487	0.381	0.356	0.390	0.027	0.252	0.031	0.751	0.439	14
13	0.372	0.291	0.450	0.530	0.716	0.658	0.475	0.479	0.161	0.040	0.173	0.261	0.459	12
14	0.005	0.036	0.558	0.116	0.270	0.218	0.271	0.308	0.334	0.308	0.233	0.817	0.296	23
15	0.042	0.121	0.095	0.008	0.096	0.053	0.106	0.229	0.384	0.309	0.179	0.668	0.160	29
16	0.383	0.518	0.390	0.202	0.424	0.493	0.349	0.411	0.053	0.033	0.056	0.104	0.350	18
17	0.000	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.123	1.000	0.020	1.000	0.131	30
18	0.351	0.407	0.465	0.574	0.803	0.936	0.520	0.799	0.024	0.014	0.048	0.238	0.550	5
19	0.350	0.656	0.654	0.642	0.906	0.906	0.479	0.884	0.029	0.075	0.050	0.590	0.649	3
20	0.267	0.515	0.212	0.116	0.314	0.342	0.271	0.416	0.040	0.001	0.031	0.040	0.265	25
21	1.000	0.545	1.000	0.934	1.000	0.736	1.000	0.516	0.036	0.035	0.242	0.295	0.732	1
22	0.436	0.371	0.437	0.247	0.523	0.480	0.347	0.464	0.014	0.011	0.021	0.133	0.366	17
23	0.356	0.582	0.595	0.449	0.577	0.546	0.371	0.548	0.080	0.055	0.080	0.289	0.461	11
24	0.168	0.155	0.224	0.170	0.378	0.477	0.151	0.359	0.039	0.000	0.008	0.000	0.233	27
25	0.343	0.227	0.420	0.232	0.416	0.373	0.187	0.396	0.036	0.035	0.011	0.140	0.295	24
26	0.274	0.176	0.770	0.328	0.576	0.581	0.639	1.000	0.021	0.016	0.098	0.363	0.514	9
27	0.170	0.168	0.460	0.147	0.309	0.254	0.285	0.356	0.016	0.063	0.014	0.196	0.255	26
28	0.373	0.364	0.548	0.462	0.590	0.536	0.442	0.708	0.119	0.010	0.124	0.137	0.452	13
29	0.208	0.191	0.609	0.393	0.539	0.882	0.308	0.457	0.090	0.041	0.076	0.200	0.423	15
30	0.375	0.323	0.909	0.224	0.533	0.725	0.455	0.622	0.214	0.148	0.231	0.623	0.530	7
权重	0.076	0.093	0.126	0.085	0.125	0.123	0.091	0.117	0.028	0.026	0.027	0.082		

分别为274835和108093个，转录本和基因的平均长度分别为1237和875 bp，转录本和基因的N50长度分别为2175和1632 bp。在获得的基因中，*q*-value小于0.05且|log₂(LP/HP)|大于1的基因被认为是差异表达基因。因此，两种磷处理条件下共获得1496个差异表达基因，其中，低磷处理上调和下调表达的差异基因数目分别

为791和705个(表6)。GO分析表明，已鉴定到的差异表达基因可以分为生物过程、细胞组分和分子功能三大类，分别包括15个、9个和15个GO条目(图3A)。其中，生物过程中的主要GO条目包括刺激响应、胁迫响应、防御响应和化学物质响应，细胞组分中的主要GO条目包括膜组分、

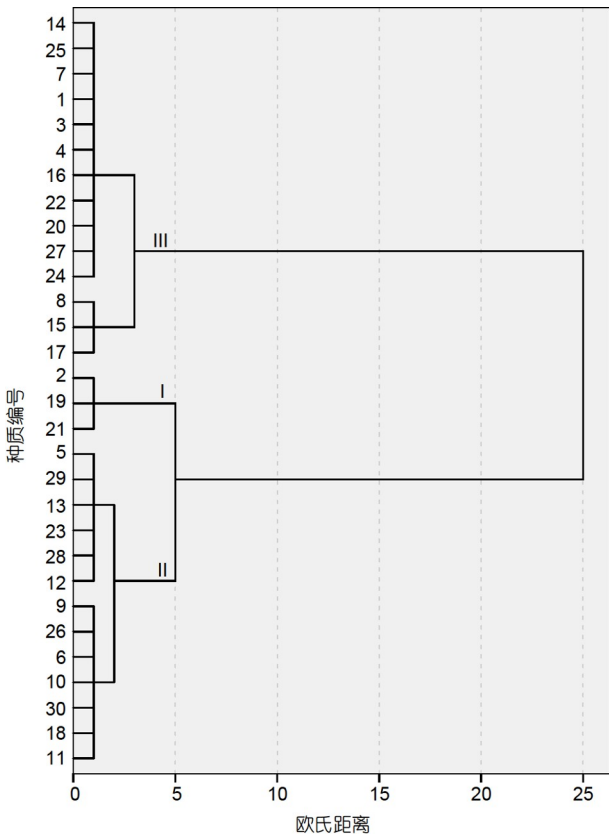


图 1 30份柱花草种质耐低磷聚类分析
Figure 1 Cluster analysis of 30 *S. guianensis* accessions under low P stress

膜固有组分、膜组成组分和细胞外区, 而分子功能中的主要GO条目包括氧化还原酶活性、辅因子结合、转录调节活性、DNA结合转录因子活性和跨膜转运蛋白活性(图3A). KEGG功能富集分析发现, 有6条KEGG途径显著富集, 包括MAPK信号通路、光合作用、ABC转运、单萜生物合成、倍半萜和三萜生物合成和异黄酮生物合成(图3B), 表明这些途径可能参与了柱花草“TF0277”响应低磷胁迫.

本研究进一步从GO富集分析的结果中筛选了与低磷胁迫相关的GO条目, 包括生物过程中的磷酸盐离子转运、磷酸离子稳态、细胞对磷饥饿的响应、细胞磷酸盐离子稳态和磷酸盐跨膜转运的调控等条目, 分子功能中的无机磷酸盐跨膜转运蛋白活性和酸性磷酸酶活性条目, 以及跨膜转运蛋白活性和转录调节活性等条目, 这些条目中共包含有137个差异表达基因(表7). 其中, 在低磷处理上调表达的基因中, 编码磷酸酶和磷脂酶的基因包括紫色酸性磷酸酶2、紫色酸性磷酸酶17、紫色酸性磷酸酶23、紫色酸性磷酸酶22、非活性紫色酸性磷酸酶样蛋白、磷酸酯酶PAH2和磷脂酶D(PLDZ)等; 编码磷转运蛋白的基因包括无机磷酸盐转运蛋白1-4和无机磷酸盐转运蛋白1-7等; 编码有机酸转运蛋白的基因包括MATE家族蛋白1/7和多效性耐药蛋白1/3; 编码ABC转运蛋白的基因包括ABC转运

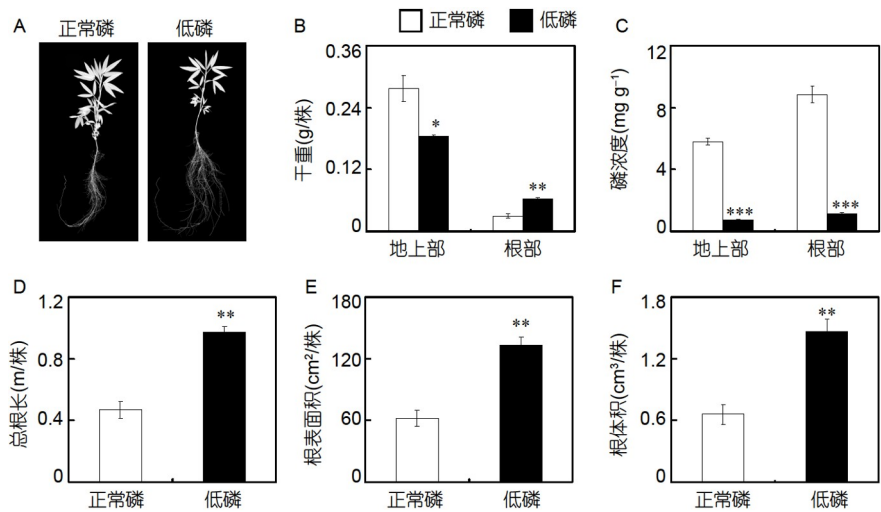


图 2 不同磷浓度处理对柱花草“TF0277”生长(A)、干重(B)、磷浓度(C)、总根长(D)、根表面积(E)和根体积(F)的影响. 正常磷处理: 250 μmol/L P. 低磷处理: 5 μmol/L P. “*”表示不同正常磷与低磷处理间差异显著(*, $P<0.05$; **, $0.001<P<0.01$; ***, $P<0.001$)
Figure 2 Effects of different P treatments on growth performance (A), dry weight (B), P concentration (C), total root length (D), root surface area (E) and root volume (F) of *S. guianensis* genotype “TF0277”. Normal P treatment: 250 μmol/L P. Low P treatment: 5 μmol/L P. “*” indicates significant differences between two P treatments (*, $P<0.05$; **, $0.001<P<0.01$; ***, $P<0.001$)

表 6 正常磷(250 μmol/L)和低磷(5 μmol/L)处理下柱花草“TF0277”根系转录组分析

Table 6 Transcriptomic analysis of root of *S. guianensis* genotype “TF0277” at normal P (250 μmol/L) and low P (5 μmol/L) treatments

测序数据分析	低磷处理 (5 μmol/L, LP)	正常磷处理 (250 μmol/L, HP)
总序列数(条)	140780514	139537510
总碱基数 (bp)	21117077100	20930626500
转录本数量(个)	274835	
转录本平均长度(bp)	1237	
转录本N50长度(bp)	2175	
基因数量(个)	108093	
基因平均长度(bp)	875	
基因N50长度(bp)	1632	
低磷上调基因数目(个)	791	
低磷下调基因数目(个)	705	

蛋白B家族成员7/19和转运蛋白ABC结构域蛋白; 参与蛋白调控的基因包括含SPX结构域蛋白1/3、衰老相关基因3亚型1、核糖核酸内切酶/激酶IRE1、谷氨酸受体3.2、LRR受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶GSO2; 另外, 参与转录调控的基因包括编码乙烯响应转录因子、MYB转录因子、bHLH转录因子、锌指转录因子和WRKY转录因子等转录因子的家族基因(表7). 这些基因可能在柱花草“TF0277”适应低磷胁迫过程中发挥重要作用.

2.5 差异表达基因的RT-qPCR鉴定

本研究选取了7个上调表达基因(U1~7)和3个下调表达基因(D1~3)进行RT-qPCR鉴定. 从图4可以看出, 所选的10个差异表达基因的RT-qPCR结果与转录组结

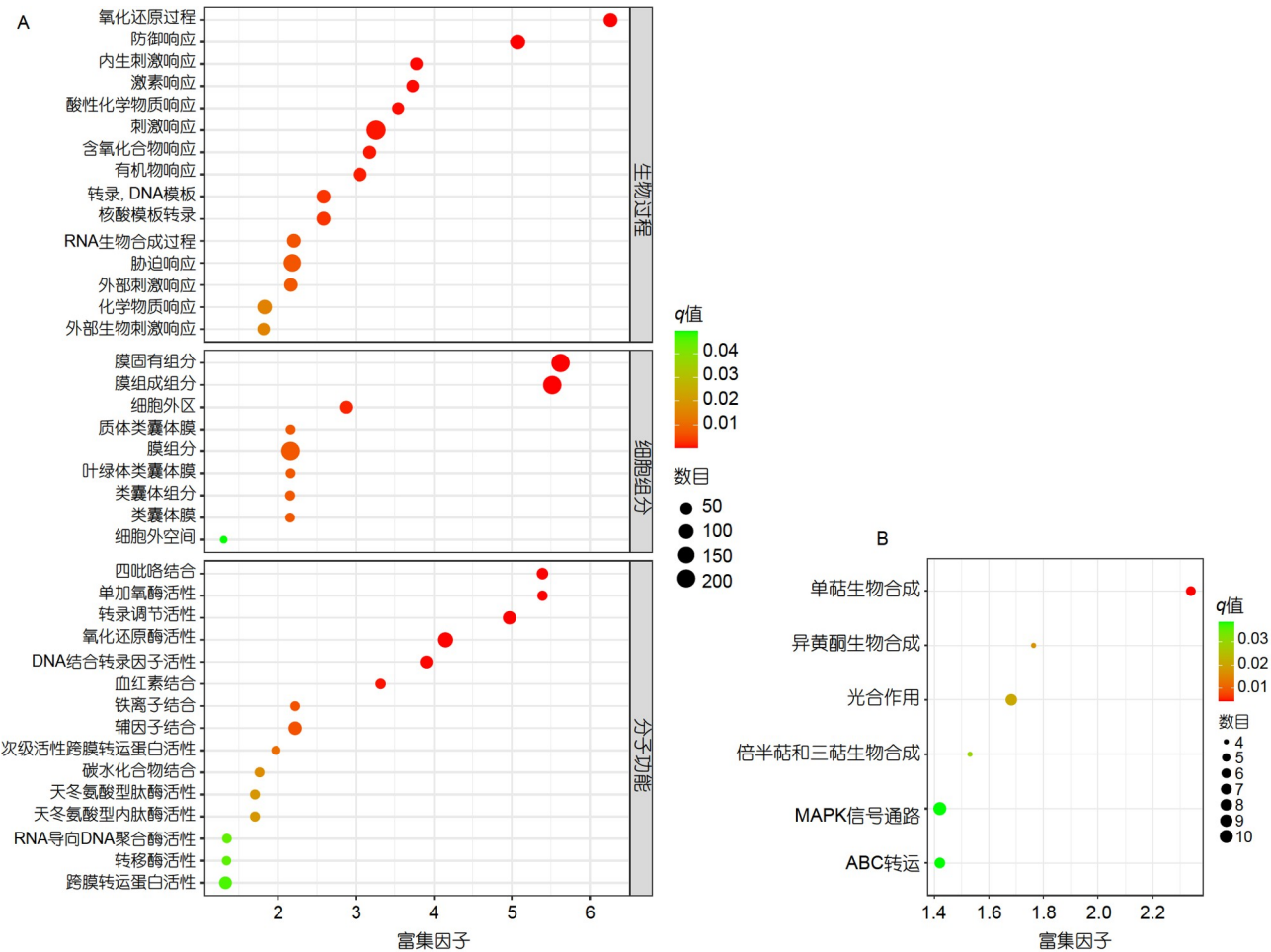


图 3 低磷处理下柱花草“TF0277”根系差异表达基因GO功能(A)和KEGG(B)途径分析

Figure 3 GO (A) and KEGG (B) analyses of DEGs in roots of *S. guianensis* under low P stress

表 7 柱花草根系低磷处理差异表达基因

Table 7 Differentially expressed genes in the roots of *S. guianensis* under low P treatment

基因描述	差异表达倍数	基因描述	差异表达倍数
磷酸酶和磷脂酶		转运蛋白ABC结构域蛋白	2.308
紫色酸性磷酸酶2	5.629	ABC转运蛋白B家族成员7	1.879
紫色酸性磷酸酶17	4.608	ABC转运蛋白B家族成员25	-1.229
核糖核酸酶1样前体	3.737	ABC转运蛋白B家族成员18	-3.84
甘油磷酸二酯磷酸二酯酶GDPD1	3.461	其他转运蛋白	
磷酸酯酶PAH2	2.392	钾转运蛋白样蛋白	3.188
磷脂酶D(PLDZ)	2.179	阳离子/H(+)反转运蛋白15样	2.066
紫色酸性磷酸酶23	1.662	双向糖转运蛋白SWEET10	1.835
紫色酸性磷酸酶22	1.522	液泡铁转运蛋白样蛋白	1.542
磺基喹啉基转移酶SQD2	1.305	钙转运ATP酶13	1.524
无活性紫色酸性磷酸酶样蛋白	1.149	镁转运蛋白NIPA1	1.367
无活性紫色酸性磷酸酶27	1.03	液泡氨基酸转运蛋白1	1.299
磷转运蛋白		钙转运ATP酶2	1.253
无机磷酸盐转运蛋白1-4	3.311	阳离子氨基酸转运蛋白5	1.133
推定甘油-3-磷酸转运蛋白1	2.164	多元醇转运蛋白6	1.072
无机磷酸盐转运蛋白1-7样	1.785	多元醇转运蛋白5	1.061
葡萄糖-6-磷酸/磷酸转运蛋白2	1.033	铁蛋白2(Fer2) mRNA	1.011
有机酸转运蛋白		溶质载体家族25成员44	1.006
MATE外排家族蛋白7	2.107	调控蛋白21	1.001
多效性耐药蛋白3	1.749	双向糖转运蛋白SWEET14	-1.021
多效性耐药蛋白1	1.167	NRT1/PTR系列7.3	-1.052
硫酸盐/碳酸氢盐/草酸转运蛋白sat-1	-1.014	肽/硝酸盐转运蛋白	-1.061
多药及毒性化合物外排转运蛋白1	-1.055	赖氨酸组氨酸转运蛋白1	-1.096
蛋白质脱毒蛋白49	-1.069	糖转运蛋白5	-1.107
耐药抗性蛋白	-2.138	含SPX结构域膜蛋白	-1.136
铝活化苹果酸转运蛋白家族蛋白	-2.186	糖转运蛋白ERD6	-1.163
ABC转运蛋白		硝酸盐转运蛋白1.3	-1.211
ABC转运蛋白B家族成员19	6.671	阳离子/H(+)反转运蛋白15	-1.218
ABC转运蛋白B家族成员11	2.474	糖转运蛋白家族MFS转运蛋白	-1.317
重金属转运/解毒结构域蛋白	-1.32	锌指CCCH结构域含蛋白49	-1.132
锌转运蛋白8	-1.439	锌指蛋白MAGPIE	-1.794
WAT1蛋白	-1.68	转录因子WRKY75	1.205
天然抗性相关巨噬细胞蛋白1	-1.707	转录因子WRKY70	-1.184
包膜蛋白	-1.869	转录因子WRKY50	-1.327
蛋白质gar2	-1.904	Scarecrow样蛋白	1.975
重金属相关异戊二烯化植物蛋白26样	-2.154	Scarecrow样蛋白21	1.159
镁转运蛋白MRS2-2	-2.319	Scarecrow样蛋白32	-1.915
细胞色素氧化酶亚基3	-3.037	Scarecrow样蛋白32	-2.158
细胞色素c氧化酶亚单位1	-3.204	TIFY 5A样蛋白	1.318
阳离子扩散转运蛋白11	-3.306	TIFY 10B样蛋白	1.171
神经丝介质多肽	-3.77	TIFY 3B样蛋白	1.041
铁还原酶	-4.284	RNA聚合酶II转录亚基15a样介质	-1.293

(表7续1)

基因描述	差异表达倍数	基因描述	差异表达倍数
蛋白调控		RNA聚合酶II转录亚基15a的介质	-2.075
含SPX结构域蛋白3	7.842	转录因子HBP-1b (c38)样	-1.088
含SPX结构域蛋白1	3.483	转录因子HBP-1b(c38)异构体X1	-1.288
衰老相关基因3亚型1	1.601	BZIP家族转录因子	-1.58
核糖核酸内切酶/激酶IRE1	1.288	bZIP转录因子	-1.847
谷氨酸受体3.2	1.03	DREB组蛋白	1.841
LRR受体样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶GSO2	1.01	DREB组蛋白	1.67
泛素结合酶E2 24	-1.157	转录因子TGA4	4.245
转录调控		核转录因子Y亚基C-1样	2.414
乙烯响应转录因子ERF017	2.31	干旱反应元件结合蛋白	2.341
乙烯响应转录因子ERF018	2.041	C-repeat结合因子1	1.574
乙烯响应转录因子13	1.83	UDP葡萄糖基转移酶家族蛋白	1.394
乙烯响应转录因子ERF021	1.697	DNA结合域蛋白mRNA	1.335
乙烯响应转录因子ERF109	1.68	同源盒亮氨酸拉链蛋白ATHB-13	1.292
乙烯响应转录因子	1.603	鳞片启动子结合样蛋白	1.26
乙烯响应转录因子ERF012	1.321	转录因子	1.214
乙烯响应转录因子ERF114	1.077	钙调素结合转录激活子3	1.207
MYB转录因子Zm1	3.951	三螺旋转录因子GT-3a	1.193
MYB转录因子MYB76	1.842	转录因子TCP2	-1.066
MYB转录因子	1.602	含BTB/POZ和TAZ结构域蛋白1	-1.147
MYB转录因子R2R3	1.173	蛋白质NLP4样异构体X1	-1.17
MYB转录因子Myb4	1.031	双组分响应调节因子ORR26样异构体X2	-1.236
转录因子bHLH18样	1.738	蛋白质不确定结构域5	-1.242
转录因子bHLH18样	1.229	转录因子HBP-1b(c38)	-1.251
转录因子bHLH18样	1.089	含NAC结构域的蛋白83	-1.28
转录因子bHLH25	1.061	转录因子ORG3	-1.331
转录因子bHLH122	-1.099	TCP1蛋白	-1.459
转录因子bHLH041	-1.436	不确定蛋白结构域5	-1.577
锌指蛋白ZAT11样蛋白	1.16	蛋白质SHOOT GRAVITROPISM 5	-2.605
Cys2-His2锌指转录因子	1.059	抗病蛋白	-6.238

果趋势一致, 表明转录组结果的可靠性高.

3 讨论

磷是植物生长发育所必需的大量营养元素, 缺磷会抑制作物的产量. 在本研究中, 相对250 $\mu\text{mol/L}$ 正常磷处理, 5 $\mu\text{mol/L}$ 低磷处理显著抑制了柱花草的叶片数、分支数、株高和地上部干重(表3). 类似的, 低磷处理也抑制了大豆(*Glycine max*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)和玉米(*Zea mays*)等作物的生长^[20-24]. 然而, 本研究发现,

相对正常磷处理, 低磷处理增加了大部分柱花草种质的相对总根长、相对根表面积、相对根体积和相对根干重(表3和图2), 说明低磷处理促进了柱花草根系的生长. 已往研究表明, 植物可通过促进侧根生长、增加根毛数量或产生排根等, 扩大根系在土壤中的分布来适应低磷胁迫^[5,25]. 例如, 在低磷条件下, 大豆和玉米会促进主根的生长来提高磷的吸收^[26,27], 而白羽扇豆(*Lupinus albus*)则能产生大量的排根, 从而有效地提高根系与土壤接触面, 进而增加对磷的获取^[28]. 因此, 调节柱花草根系的生长可能有利于其更好地吸收磷.

不同作物品种或基因型对低磷的适应性有所差

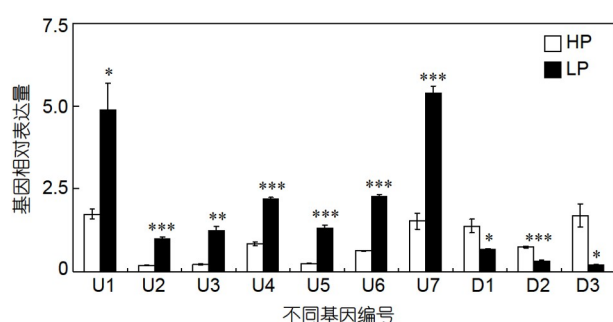


图4 差异表达基因的RT-qPCR鉴定. HP: 250 μmol/L磷处理. LP: 5 μmol/L磷处理. U1~7: 7个上调表达基因; D1~3: 3个下调表达基因; “*”表示LP处理与HP对照间差异显著(*, $P < 0.05$; **, $0.001 < P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

Figure 4 Validation of DEGs using RT-qPCR analysis. HP: 250 μmol/L P treatment. LP: 5 μmol/L P treatment. U1~7: seven up-regulated genes; D1~3: three down-regulated genes; “*” represents significant differences between two P treatments (*, $P < 0.05$; **, $0.001 < P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

异.例如,根据不同磷处理条件下大豆的干重、产量和磷含量,可将大豆核心种质分为磷低效基因型和磷高效基因型^[29],并且,磷高效大豆基因型在低磷胁迫下可以通过增加根长,根表面积和体积等方式提高磷效率^[30].本研究发现30份柱花草种质耐低磷能力存在差异,综合评价分析表明,不同的柱花草种质可分为耐低磷种质、不耐低磷种质和中间型种质(表5和图1).其中,与不耐低磷柱花草种质“TF0228”“TF0250”和“TF0262”相比,耐低磷种质“Reyan 2”“TF0212”和“TF0277”的相对总根长、相对根表面积、相对根体积和相对根干重均较高(表3).类似的,研究发现12个柱花草基因型的磷效率存在基因型差异,磷高效柱花草基因型“TPRC2001-I”根部干重和全磷含量明显高于磷低效基因型“Fine-stem”^[11,31].另外,已有研究将柱花草分为不同磷效率和磷响应类型,并筛选获得4份磷高效高响应柱花草基因型,这些基因型具有较发达的根系^[15].因此,柱花草对低磷的适应性可能与其根系生长调节密切相关,“Reyan 2”“TF0212”和“TF0277”可作为培育磷高效柱花草新品种的重要种质资源.

本研究发现,低磷胁迫促进了耐低磷柱花草基因型“TF0277”根系的生长,包括增加了总根长、根表面积、根体积(图2),暗示其可能通过调节根系生长适应低磷胁迫.因此,为进一步探讨柱花草适应低磷胁迫的分子机制,本研究通过转录组技术挖掘了柱花草“TF0277”根系差异表达基因.这些基因包括在拟南

芥、水稻和大豆等植物中被广泛报道的缺磷诱导表达基因,如编码磷酸酶和磷脂酶、磷转运蛋白、有机酸转运蛋白、含SPX结构域蛋白、MYB转录因子、WRKY转录因子和bHLH转录因子等的基因(表7).其中,多个编码酸性磷酸酶的基因(如紫色酸性磷酸酶2、紫色酸性磷酸酶17、紫色酸性磷酸酶22和紫色酸性磷酸酶23)在柱花草“TF0277”根系中被低磷增强表达(表7).增强酸性磷酸酶的活性通常被认为有助于植物水解有机磷释放无机磷^[32,33],如低磷处理增强了水稻、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)以及柱花草酸性磷酸酶基因的表达^[32,34~37].另外,低磷处理也增强了“TF0277”根系磷脂酶基因磷脂酶D(PLDZ)的表达(表7).在磷饥饿处理的拟南芥中,PLDZ被报道可以水解磷脂酰胆碱,从而为细胞代谢提供无机磷和为半乳糖脂质合成提供二酰基甘油^[38].增强这些编码酸性磷酸酶和磷脂酶基因的表达可能有利于柱花草“TF0277”根系对有机磷的活化利用.

本研究鉴定到2个低磷增强表达的磷转运蛋白基因(无机磷酸盐转运蛋白1-4和无机磷酸盐转运蛋白1-7)(表7).在大豆、水稻和苜蓿(*Medicago truncatula*)中也鉴定到多个具有调控磷吸收和转运功能的磷转运蛋白基因^[39~41].低磷上调的磷转运蛋白基因可能通过调节柱花草“TF0277”对磷的吸收和转运,从而维持根系生长适应磷缺乏.此外,本研究也鉴定到与有机酸转运相关的基因,如MATE家族蛋白7(表7).MATE同源基因已被证明参与了根系柠檬酸的转运^[42],根系分泌的柠檬酸可能有利于促进根系对土壤难溶性磷的活化利用.本研究发现,促进根系生长对柱花草“TF0277”获取磷尤为重要,而低磷增强表达的扩展蛋白A2基因可能调控了根系的生长(图4).扩展蛋白基因被认为参与了缺磷胁迫下植物根系的生长^[13,15,43,44].例如,与大豆扩展蛋白基因GmEXPB2高度同源的SgEXPB1可能具有调节根细胞分裂和伸长的生物学功能,是调控低磷胁迫下柱花草根系生长,进而影响磷吸收的重要基因^[44,45].因此,调节磷吸收和转运以及增强难溶性的磷活化利用可能是柱花草“TF0277”适应低磷胁迫的重要机制.

本研究鉴定到多种参与磷信号网络调节相关的基因,如属于MYB, WRKY, bHLH和ERF家族成员的基因(表7),这些转录因子和调节因子已被证明是磷信号通

路的关键参与者^[5,8]。例如,本研究鉴定到2个低磷增强表达的SPX结构域蛋白基因(含SPX结构域蛋白1/3)(表7)。SPX结构域蛋白是植物体内的磷素感受器,是拟南芥、水稻和大豆等植物磷信号通路的重要成分,参与调节植物磷信号和磷平衡^[46–48]。在拟南芥中,低磷增强了*AtSPX1*表达,而*AtSPX1*进一步激发了酸性磷酸酶*AtACP5*和核糖核酸酶*AtRNS1*等基因的表达,从而启动拟南芥低磷应答^[49]。类似的,在水稻中,*OsSPX1*基因也具有调控磷转运蛋白基因*OsPT2/8*表达的生物学功能^[50]。进一步研究发现,在拟南芥中,当磷充足时,*AtSPX1*可以结合MYB型转录因子*AtPHR1*(PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1),进而抑制了*AtPHR1*对下游磷饥饿响应基因的激活;然而,在低磷条件下,*AtSPX1*不能结合*AtPHR1*,游离的*AtPHR1*则

结合到下游靶基因启动子的P1BS元件上,从而激活靶基因的表达^[51]。在水稻中也发现了*OsSPX1/2*与*OsPHR2*的调控关系^[52]。另外,本研究也发现低磷处理增强了转录因子*WRKY75*的表达(表7)。在拟南芥中,*WRKY75*定位于细胞核中,且受低磷诱导表达^[53]。当*WRKY75*基因被抑制时,拟南芥出现花青素积累的缺磷症状,且抑制了磷饥饿响应基因的表达,包括磷酸酶和高亲和磷转运蛋白基因等,表明*WRKY75*可以正调控磷饥饿响应基因^[53]。SPX结构域蛋白和*WRKY*转录因子成员可能在柱花草“TF0277”中具有类似的调控作用,其生物学功能值得做进一步研究。因此,本研究为培育磷高效柱花草新品种提供种质材料和基因资源,对热带牧草产业和生态农业可持续发展具有重要意义。

参考文献

- Marschner H. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. London: Academic Press, 2012. 158
- Plaxton W C, Shane M W. The role of post-translational enzyme modifications in the metabolic adaptations of phosphorus-deprived plants. *Annu Plant Rev*, 2015, 48, 99–123
- Ao J, Chen Z, Wu M, et al. Phosphorus fractions of red soils in Guangdong Province of South China and their bioavailability for five crop species. *Soil Sci*, 2014, 179: 514–521
- López-Arredondo D L, Leyva-González M A, González-Morales S I, et al. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65: 95–123
- Chen Z, Wang L, Cardoso J A, et al. Improving phosphorus acquisition efficiency through modification of root growth responses to phosphate starvation in legumes. *Front Plant Sci*, 2023, 14: 1094157
- Zak D, Kronvang B, Carstensen M V, et al. Nitrogen and phosphorus removal from agricultural runoff in integrated buffer zones. *Environ Sci Technol*, 2018, 52: 6508–6517
- George T S, Hinsinger P, Turner B L. Phosphorus in soils and plants facing phosphorus scarcity. *Plant Soil*, 2016, 401: 1–6
- Ham B K, Chen J, Yan Y, et al. Insights into plant phosphate sensing and signaling. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, 49: 1–9
- Velásquez Ramírez M G, del Castillo Torres D, Guerrero Barrantes J A, et al. Soil recovery of alluvial gold mine spoils in the Peruvian Amazon using *Stylosanthes guianensis*, a promising cover crop. *Land Degrad Dev*, 2021, 32: 5143–5153
- Liu G D, Bai C J, He H X, et al. The selection and utilization of *Stylosanthes guianensis* cv. Reyan No.5 (in Chinese). *Acta Agrest Sin*, 2001, 1: 1–7 [刘国道, 白昌军, 何华玄, 等. 热研5号柱花草选育研究. 草地学报, 2001, 1: 1–7]
- Du Y M, Tian J, Liao H, et al. Aluminium tolerance and high phosphorus efficiency helps *Stylosanthes* better adapt to low-P acid soils. *Ann Bot*, 2009, 103: 1239–1247
- Liu P D, Xue Y B, Chen Z J, et al. Characterization of purple acid phosphatases involved in extracellular dNTP utilization in *Stylosanthes*. *J Exp Bot*, 2016, 67: 4141–4154
- Chen Z J, Song J L, Li X Y, et al. Physiological responses and transcriptomic changes reveal the mechanisms underlying adaptation of *Stylosanthes guianensis* to phosphorus deficiency. *BMC Plant Biol*, 2021, 21: 446
- Liu P D, Huan H F, Liu Y M, et al. Effects of phosphorus deficiency on acid phosphatase activity and phosphorus efficiency in a low-phosphorus tolerant *Stylosanthes* mutant (in Chinese). *Acta Pratacult Sin*, 2018, 27: 78–85 [刘攀道, 郇恒福, 刘一明, 等. 低磷胁迫对太空诱变耐低磷柱花草酸性磷酸酶活性和磷效率的影响. 草业学报, 2018, 27: 78–85]
- Liu Y X, Luo J J, Lei J, et al. Screening of phosphorus efficiency germplasm and analysis of root morphology responding to phosphorus

- deficiency in *Stylosanthes guianensis* (in Chinese). *Acta Agrestia Sin*, 2021, 29: 876–883 [刘允熙, 罗佳佳, 雷健, 等. 柱花草磷高效种质筛选及根系形态对低磷胁迫的响应分析. *草地学报*, 2021, 29: 876–883]
- 16 Yang M, Yan X L. Preliminary studies on morphological and physiological mechanisms of *Stylosanthes* for P efficiency on acid soil (in Chinese). *Acta Agrestia Sin*, 1998, 6: 212–220 [杨茂, 严小龙. 柱花草在酸性红壤中磷吸收效率及其形态和生理生化特性初探. *草地学报*, 1998, 6: 212–220]
- 17 Yang M, Yan X L. Genotypic variation of *Stylosanthes guianensis* in P efficiency on an acid soil of red earth region (in Chinese). *Acta Agrestia Sin*, 1999, 7: 113–120 [杨茂, 严小龙. 酸性红壤区柱花草磷效率基因型差异. *草地学报*, 1999, 7: 113–120]
- 18 Du Y M, Bai C J, Tian J, et al. Genotypic variations of *Stylosanthes* in adaptation to low-P acid soils and the possible physiological mechanisms (in Chinese). *J South China Agri Univ*, 2008, 29: 6–11 [杜育梅, 白昌军, 田江, 等. 柱花草适应酸性缺磷土壤的基因型差异及可能的生理机制. *华南农业大学学报*, 2008, 29: 6–11]
- 19 Wang L J, Miao Y, Zou X Y, et al. Cloning and expression analysis of *SgLPRI* in *Stylosanthes guianensis* (in Chinese). *Pratacult Sci*, 2023, 40: 1856–1865 [王林杰, 缪瑶, 邹晓燕, 等. 柱花草*SgLPRI*基因克隆与表达分析. *草业科学*, 2023, 40: 1856–1865]
- 20 Yan X, Liao H, Beebe S E, et al. QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. *Plant Soil*, 2004, 265: 17–29
- 21 Zhu J, Kaeppler S M, Lynch J P. Mapping of QTL controlling root hair length in maize (*Zea mays* L.) under phosphorus deficiency. *Plant Soil*, 2005, 270: 299–310
- 22 Gamuyao R, Chin J H, Pariasca-Tanaka J, et al. The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature*, 2012, 488: 535–539
- 23 Zhu S, Chen Z, Xie B, et al. A phosphate starvation responsive *malate dehydrogenase*, *GmMDH12* mediates malate synthesis and nodule size in soybean (*Glycine max*). *Environ Exp Bot*, 2021, 189: 104560
- 24 Zhang S G, Liu G D, Dou Y Q, et al. Effects of low-phosphorus and drought stresses on growth of wheat (*Triticum aestivum*) (in Chinese). *Acta Bot Boreal Occident Sin*, 2002, 22: 574–578 [张士功, 刘国栋, 窦玉清, 等. 低磷和干旱胁迫对小麦生长发育影响的研究初探. *西北植物学报*, 2002, 22: 574–578]
- 25 Liu D. Root developmental responses to phosphorus nutrition. *JIPB*, 2021, 63: 1065–1090
- 26 Wang F, Cui P, Tian Y, et al. Maize ZmPT7 regulates Pi uptake and redistribution which is modulated by phosphorylation. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 2406–2419
- 27 Liu P, Zhou G Q, Yan X L, et al. Effects of low phosphorus on taproot elongation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] (in Chinese). *Plant Physiol J*, 2008, 44: 726–728 [刘鹏, 周国权, 严小龙, 等. 低磷对大豆主根伸长生长的影响. *植物生理学报*, 2008, 44: 726–728]
- 28 Tang H L, Shen J B, Zhang F S, et al. Interactive effects of phosphorus deficiency and exogenous auxin on root morphological and physiological traits in white lupin (*Lupinus albus* L.). *Sci China Life Sci*, 2013, 56: 313–323 [唐宏亮, 申建波, 张福锁, 等. 磷和外源生长素对白羽扇豆 (*Lupinus albus* L.) 根形态和生理特性的影响. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43: 201–212]
- 29 Zhao J, Fu J, Liao H, et al. Characterization of root architecture in an applied core collection for phosphorus efficiency of soybean germplasm. *ChinSciBull*, 2004, 49: 1611–1620
- 30 Ao J, Fu J, Tian J, et al. Genetic variability for root morph-architecture traits and root growth dynamics as related to phosphorus efficiency in soybean. *Funct Plant Biol*, 2010, 37: 304–312
- 31 Liu P D, Sun L L, Chen Z J, et al. Dynamic effects of low phosphorus stress on acid phosphatase activity and isoforms in *Stylosanthes* (in Chinese). *Chin J Trop Crops*, 2013, 34: 1340–1346 [刘攀道, 孙丽莉, 陈志坚, 等. 低磷胁迫对柱花草酸性磷酸酶活性及其组成的动态影响. *热带作物学报*, 2013, 34: 1340–1346]
- 32 Liu P, Cai Z, Chen Z, et al. A root-associated purple acid phosphatase, *SgPAP23*, mediates extracellular phytate-P utilization in *Stylosanthes guianensis*. *Plant Cell Environ*, 2018, 41: 2821–2834
- 33 Zhu S, Chen M, Liang C, et al. Characterization of purple acid phosphatase family and functional analysis of *GmPAP7a/7b* involved in extracellular ATP utilization in soybean. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 661
- 34 Haran S, Logendra S, Seskar M, et al. Characterization of *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiol*, 2000, 124: 615–626
- 35 Zhang Q, Wang C, Tian J, et al. Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signalling. *Plant Biol*, 2011, 13: 7–15
- 36 Li C, Gui S, Yang T, et al. Identification of soybean purple acid phosphatase genes and their expression responses to phosphorus availability and

- symbiosis. [Ann Bot](#), 2012, 109: 275–285
- 37 Bhadouria J, Singh A P, Mehra P, et al. Identification of purple acid phosphatases in chickpea and potential roles of *CaPAP7* in seed phytate accumulation. [Sci Rep](#), 2017, 7: 11012
- 38 Li M, Welti R, Wang X. Quantitative profiling of arabidopsis polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D $\zeta 1$ and D $\zeta 2$ in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. [Plant Physiol](#), 2006, 142: 750–761
- 39 Liu F, Chang X J, Ye Y, et al. Comprehensive sequence and whole-life-cycle expression profile analysis of the phosphate transporter gene family in rice. [Mol Plant](#), 2011, 4: 1105–1122
- 40 Qin L, Zhao J, Tian J, et al. The high-affinity phosphate transporter *GmPT5* regulates phosphate transport to nodules and nodulation in soybean. [Plant Physiol](#), 2012, 159: 1634–1643
- 41 Cao Y, Liu J, Li Y, et al. Functional analysis of the phosphate transporter gene *MtPT6* from *Medicago truncatula*. [Front Plant Sci](#), 2021, 11: 620377
- 42 Magalhaes J V, Liu J, Guimarães C T, et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. [Nat Genet](#), 2007, 39: 1156–1161
- 43 Luo J, Liu Y, Zhang H, et al. Metabolic alterations provide insights into *Stylosanthes* roots responding to phosphorus deficiency. [BMC Plant Biol](#), 2020, 20: 85
- 44 Wang L, Wang W, Miao Y, et al. Development of transgenic composite *Stylosanthes* plants to study root growth regulated by a β -expansin gene, *SgEXPB1*, under phosphorus deficiency. [Plant Cell Rep](#), 2023, 42: 575–585
- 45 Guo W, Zhao J, Li X, et al. A soybean β -expansin gene *GmEXPB2* intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses. [Plant J](#), 2011, 66: 541–552
- 46 Yao Z, Tian J, Liao H. Comparative characterization of *GmSPX* members reveals that *GmSPX3* is involved in phosphate homeostasis in soybean. [Ann Bot](#), 2014, 114: 477–488
- 47 Lv Q, Zhong Y, Wang Y, et al. SPX4 negatively regulates phosphate signaling and homeostasis through its interaction with PHR2 in rice. [Plant Cell](#), 2014, 26: 1586–1597
- 48 Ried M K, Wild R, Zhu J, et al. Inositol pyrophosphates promote the interaction of SPX domains with the coiled-coil motif of PHR transcription factors to regulate plant phosphate homeostasis. [Nat Commun](#), 2021, 12: 384
- 49 Duan K, Yi K, Dang L, et al. Characterization of a sub-family of *Arabidopsis* genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. [Plant J](#), 2008, 54: 965–975
- 50 Wang C, Ying S, Huang H, et al. Involvement of *OsSPX1* in phosphate homeostasis in rice. [Plant J](#), 2009, 57: 895–904
- 51 Puga M I, Mateos I, Charukesi R, et al. SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 in *Arabidopsis*. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111: 14947–14952
- 52 Wang Z, Ruan W, Shi J, et al. Rice SPX1 and SPX2 inhibit phosphate starvation responses through interacting with PHR2 in a phosphate-dependent manner. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2014, 111: 14953–14958
- 53 Devaiah B N, Karthikeyan A S, Raghothama K G. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. [Plant Physiol](#), 2007, 143: 1789–1801

Evaluation of low phosphorus tolerance and identification of low phosphorus responsive genes in various *Stylosanthes guianensis* accessions

WANG LinJie, ZOU XiaoYan, DONG RongShu, WANG WenQiang, LIU GuoDao & CHEN ZhiJian

Institute of Tropical Crop Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou 571101, China

Phosphorus (P) is one of the essential macronutrients for plant growth and development, and it participates in important processes including photosynthesis, respiration and energy metabolism in plants. *Stylosanthes guianensis* is an important tropical leguminous forage. The adaptability of *S. guianensis* to low P stress exhibits genotypic variations. In this study, a comprehensive evaluation of low P tolerance in 30 *S. guianensis* accessions was conducted, and low P responsive genes were identified in *S. guianensis* roots. Our results showed that *S. guianensis* shoot growth was inhibited but the root growth was enhanced by low-P treatment, and genotypic variations in low P tolerance were observed among different *S. guianensis* accessions. Comprehensive evaluation analysis showed that various *S. guianensis* accessions could be divided into three groups, including three low-P-tolerant accessions, 14 low-P-intolerant accessions, and 13 intermediate accessions. Among them, the low-P-tolerant accession “TF0277” can adapt to low P stress by increasing total root length, root surface area and root volume. A total of 1496 differentially expressed genes were identified in the roots of low-P-tolerant *S. guianensis* accession “TF0277” through transcriptome analysis, including 791 upregulated and 705 downregulated genes. Furthermore, genes involved in P mobilization and utilization, P uptake and transport, and P signaling regulation may play important roles in the adaptation of *S. guianensis* “TF0277” to low P stress. Therefore, exploring low-P-tolerant *S. guianensis* germplasm and identifying candidate genes for low P tolerance will provide elite germplasm and gene resources for breeding new *S. guianensis* varieties with high P efficiency.

***Stylosanthes guianensis*, low phosphorus stress, subordinate function analysis, transcriptome, low P responsive genes**

doi: [10.1360/SSV-2023-0259](https://doi.org/10.1360/SSV-2023-0259)