

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94152

大豆 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 基因的克隆及功能探究

李国纪** 朱 林** 曹金山 王幼宁*

华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430070

摘 要: 拟南芥中硝酸盐的吸收、转运和分配是通过硝酸盐转运蛋白(nitrate transporter, NRT)实现的。尽管之前的生物信息学分析推测大豆 *GmNRT1.2s* 可能参与共生固氮过程, 但尚未开展相应的功能研究。本研究通过对其表达模式分析发现, *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 分别在根和叶中高表达, 且受硝酸盐诱导, 在接种根瘤菌与结瘤因子(nod factors, NFs)后表达量明显升高。功能研究结果显示, 过表达 *GmNRT1.2a* 或 *GmNRT1.2b* 后大豆根瘤数目显著增加。本研究为深入探究 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 调控大豆共生固氮过程的分子机制提供了一定的数据支持。

关键词: 大豆; 根瘤; 表达分析; 结瘤; 共生固氮

Cloning and functional analysis of *GmNRT1.2a* and *GmNRT1.2b* in soybean

LI Guo-Ji**, ZHU Lin**, CAO Jin-Shan, and WANG You-Ning*

College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: Nitrate transporters (NRTs) have been found to be involved in nitrate uptake, transport and allocation in *Arabidopsis*. The role of *GmNRT1.2s* in soybean (*Glycine max*) symbiotic nitrogen fixation process has been speculated by bioinformatics analysis, however, its biological function has not been explored yet. In this study, we mainly focused on analyzing the expression pattern and biological function of *GmNRT1.2a* and *GmNRT1.2b* in soybean. The relative expression levels of *GmNRT1.2a* and *GmNRT1.2b* were higher in leaves, which induced by nitrate and up-regulated with increasing nitrate concentration. *GmNRT1.2a* and *GmNRT1.2b* expressions were also induced by rhizobial inoculation and nod factor (NF) treatment. Overexpression of *GmNRT1.2a* or *GmNRT1.2b* caused dramatic increment of nodule number. The results provide some data for further investigating the molecular mechanism of *GmNRT1.2a* and *GmNRT1.2b* in regulating the symbiotic nitrogen fixation process of soybean.

Keywords: soybean; nodule; expression analysis; nodulation; symbiotic nitrogen fixation

氮素是植物生长所必需的大量元素之一, 其作为重要成分参与核酸、氨基酸、蛋白质和磷脂及酶的合成, 在植物生长发育及光合作用等多个重要过程中氮素都扮演着主要角色。缺乏氮素会显著影响植物的正常生长, 出现植株矮小和产量降低等诸多现象^[1]。在农业生产中, 氮素营养对于粮食生产与农业发展都具有至关重要的作用^[2]。

植物吸收土壤中的氮素是通过吸收、同化、转运几个步骤实现的^[3]。植物可以吸收 2 种不同形式的氮, 一是无机氮, 如硝酸盐和氨盐等, 二是有机

氮, 如尿素、氨基酸、蛋白质等。硝酸盐和铵盐是植物根系从土壤中获得氮素的最主要的 2 种形式, 植物根毛通过主动运输的方式吸收并利用 NO_3^- 和 NH_4^+ , 两者具有不同的理化性质, 因对植物的生长和代谢也会产生不同的生理效应^[4-5]。硝酸盐是植物生长过程中重要的无机氮源, 它不仅作为植物的营养元素, 调控叶面积指数和地上部分干物质累积量^[6]以及根系发育等植物生长发育过程^[7-8], 也作为一种信号分子, 调节植物生长发育的许多方面, 包括硝酸盐相关的基因表达^[9]、根系构型^[10]、种子休

本研究由国家科技重大专项(2018ZX0800919B)和国家自然科学基金项目(31872873)资助。

This study was supported by the National Transgenic Major Project of China (2018ZX0800919B) and the National Natural Science Foundation of China (31872873).

* 通信作者(Corresponding author): 王幼宁, E-mail: youningwang@mail.hzau.edu.cn

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 李国纪, E-mail: lgi2389868525@163.com; 朱林, E-mail: onelin@163.com

Received (收稿日期): 2019-10-09; Accepted (接受日期): 2020-03-24; Published online (网络出版日期): 2020-04-27.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200427.0828.006.html>

眠^[11]、开花时间^[12]等。

众所周知, 豆科作物与其他作物不同, 除可通过主动运输的方式吸收利用氮素营养外, 还可通过其根部特化的组织-根瘤进行共生固氮(symbiotic nitrogen fixation, SNF), 获取氮素营养。共生固氮过程是一个非常复杂的过程, 当土壤中氮元素缺乏时, 豆科植物的根系会释放出类黄酮类物质, 并以此吸引根瘤菌聚集到根系周围, 根瘤菌受到类黄酮类物质的诱导会释放结瘤因子(nod factor, NF)。结瘤因子被豆科植物根部的 LysM 型受体激酶 NFR 接受并由此激活 NF 信号通路。在百脉根(*Lotus japonicus*)中, 结瘤因子受体为 LjNFR1 及 LjNFR5 编码^[13-14], 苜蓿(*Medicago truncatula*) 中为 MtLYK3/MtLYK4 及 MtNFP^[15]; 在大豆(*Glycine max*)中编码结瘤因子受体蛋白的同源基因包括 *GmNFR1α/β* 及 *GmNFR5α/β*^[16-17]。结瘤因子受体接受 NF 后, 启动下游信号转导级联反应和激活质膜上的激酶(包括 LjSYMRK、MtDMI2、GmNORK 等), 引起“钙峰”进而导致根瘤菌和植物根系相互作用并形成侵染线。转录因子 NIN 在侵染线和根瘤原基形成过程中起着重要作用, 它与 NSP1 和 NSP2 结合共同调节表皮中的结瘤基因表达和结瘤过程。在豆科植物中相关基因报道已有许多, 但大豆中鉴定到的组分还为数不多, 除了经典的 *ENOD40*^[18]之外, 近年来 miR172c-NNC1^[19]、*GmEXPB2*^[20]、*GmPT7*^[21]、*GmBEHL1*^[22]等已被证明参与调控大豆的结瘤过程。G-protein 信号通路相关基因 *Gα*、*Gβ*、*Gγ*^[23-24]、*RGS*^[24]等也被发现可以介导大豆根瘤的发生发育。与此同时, 近年来的多项研究结果证明, 生长素合成与生长素信号通路多个组分参与大豆根瘤形成过程, 例如 *GmYUC2a*^[25]、miR393-GmTIR1/GmAFB3^[26]、miR160-ARF10/ARF16/ARF17^[27]和 miR167-GmARF8a/GmARF8b^[28]等。尽管如此, 对于复杂的菌植互作、根瘤发生发育和共生固氮过程, 还需要通过多种技术手段挖掘其调控的功能基因, 从而全面解析介导大豆共生固氮过程的分子调控网络。

硝酸盐转运蛋白(nitrate transporter, NRT)介导了硝酸盐的吸收、转运和分配, NRT 类转运蛋白主要由 NRT1 和 NRT2 两个亚家族组成。在拟南芥中, *AtNRT1.2* 属于 *NRT1* 亚家族, 并且由于其表达不受 NO_3^- 的诱导, 呈组成型表达^[29-30]。之前我们已经对大豆 *GmNRT1.2s* 有比较详细的生物信息学分析, 相关结果暗示 *GmNRT1.2s* 可能参与大豆共生固氮过

程。本研究通过对不同组织和不同浓度氮处理下 *GmNRT1.2a* (*Glyma.18G126500*)和 *GmNRT1.2b* (*Glyma.08G296000*)^[31]的表达检测, 并利用大豆毛状根转化体系研究二者在大豆结瘤过程中的功能, 证明二者在大豆根系结瘤过程中发挥重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆材料是已经完成基因组测序的品种 *Glycine max* var. Williams 82, 后文简称为 W82。

1.1.2 菌株和质粒 克隆基因所采用的大肠杆菌(*E. coli*)菌株是 DH5α, 大豆毛状根转化所用的发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)为 K599, 大豆慢生型根瘤菌菌株为 *Bradyrhizobium diaefficiens* USDA 110。载体构建涉及到的质粒为 T 载体 Blunt3, 基因过表达载体选用 pEGAD。

1.1.3 酶和试剂 KOD plus neo 高保真聚合酶购自 TOYOBO, 限制性内切酶购自 New England Biolabs (NEB), T4 连接酶购自 TaKaRa 公司。

利用 Adlab 公司的 TRI pure 试剂提取总 RNA, 用购自 TaKaRa 公司的 RNA 反转录试剂完成模板 cDNA 的合成, 选用北京天根公司的 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂盒进行荧光定量 PCR, 由上海生工生物公司合成引物, 质粒小提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司。

1.2 方法

1.2.1 大豆实生苗接种根瘤菌处理 将大豆 W82 种子用 70%的酒精灭菌 30 s, 于低氮营养液浸泡的蛭石中萌发, 基础营养液配方参考之前发表文章^[32], 其中以 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 作为氮源调整氮浓度至 0.25 mmol L^{-1} , 期间以水和低氮营养液交替培养。培养室中, 16 h 光/8 h 暗, 光强 $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 温度 26°C , 相对湿度为 70%。大豆萌发 15 d 后, 将大豆慢生根瘤菌 *Bradyrhizobium diaefficiens* USDA 110 (OD_{600} 为 0.08)轻轻浇灌在大豆幼苗根系周围, 接种量为每棵 30 mL, 分别在接菌后 10 d 和 28 d 取叶片、根和根瘤样品, 于液氮中速冻后保存于 -80°C 超低温冰箱中备用。

1.2.2 大豆实生苗氮浓度梯度处理 根据大豆生长发育过程的需氮量以 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 作为氮源, 分别设置了无氮(0N, 0 mmol L^{-1})、低氮(LN, 0.25 mmol L^{-1})和高氮(HN, $15.75 \text{ mmol L}^{-1}$) 3 个不同浓度

的硝酸盐营养液。将 W82 分别种植在含有不同浓度硝酸盐营养液浸泡的蛭石基质中, 期间补充相同浓度营养液保证处理一致性。于萌发后 15 d 取主根和侧根样品用于后续表达检测。

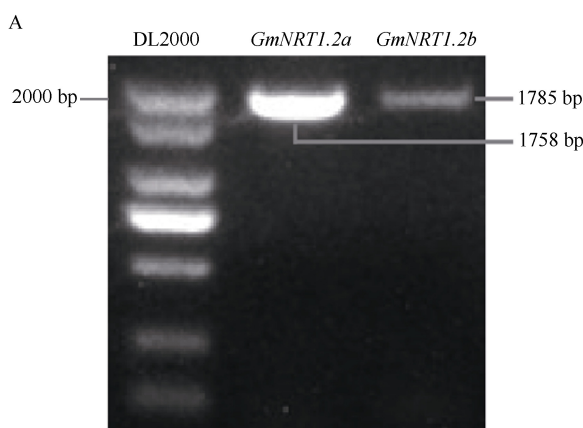
1.2.3 结瘤因子提取 结瘤因子是在宿主植物根系分泌的类黄酮作用下, 根瘤菌合成并分泌的一类多糖信号分子(脂壳寡糖), 可以激活结瘤因子信号通路。试验中将根瘤菌 *Bradyrhizobium diaefficiens* USDA 110 在 28℃, 150 ×g 震荡培养, 使 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6 制成种子液。取 5 mL 种子液加入 250 mL TY 培养基中, 28℃, 150 ×g 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0。加入 0.25 mL 5 mmol L⁻¹ 的染料木黄酮。将菌液 7000 ×g 离心 10 min 去菌体, 上清液经 1/5 体积正丁醇抽提 2 次, 1/10 体积正丁醇抽提 1 次, 之后利用旋转蒸发器在 80℃ 的条件下蒸干正丁醇, 用 2 mL 蒸馏水溶解, 过滤灭菌后 4℃ 黑暗保存。

1.2.4 大豆实生苗结瘤因子处理 在接种结瘤因子的试验中, 首先于低氮营养液浸泡的蛭石中萌发大豆, 萌发 5 d 后于大豆根部接种 1 mL 结瘤因子, 3 d 后收集根样品用于分析 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的表达。分别用 1 mL 蒸馏水和 1 mL 根瘤菌(OD₆₀₀ 为 0.08)接种的根样品用作对照, 取样方法同上。

1.2.5 总 RNA 提取及基因表达检测 利用 TRI pure 试剂提取总 RNA, 并且使用 RNA 反转录试剂完成模板 cDNA 的合成。根据 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 基因的 CDS 序列设计实时荧光定量 PCR 引物 *GmNRT1.2a*-QF: 5'-TGTTCTTGGCAGGCTCAACTACT-3', *GmNRT1.2a*-QR: 5'-CTTCTGGTTTCCTTGTTTGCAAT-3', *GmNRT1.2b*-QF: 5'-TTCACCTAACAGTT

GCTTCAACAGTAG-3', *GmNRT1.2b*-QR: 5'-TCTTACCCCTTGAGCGTGG-3'。按照北京天根公司的 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) 试剂盒操作说明, 以 *GmELF1b* 基因为内参基因, 引物序列为 *GmELF1b*-QF: 5'-GTTGAAAAGCCAGGGGACA-3', *GmELF1b*-QR: 5'-TCTTACCCCTTGAGCGTGG-3'。根据相对定量法 $\Delta\Delta CT$ 公式计算结果。

1.2.6 基因克隆及过重重组质粒构建 在构建 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 过表达载体的过程中, 自 Phytozome 数据库(<http://www.phytozome.net/>)获得 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的 CDS 序列, 二者序列长度分别为 1758 bp 和 1785 bp。选择植物表达载体 pEGAD 作为 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的过表达载体, 限制性酶切位点选择其上多克隆位点中的 *Sma* I 和 *Bam* HI, 具体引物序列为 *GmNRT1.2a*-F: 5'-TCCCCCGGGATGGAATTAGAACAAAACCAGAG-3', *GmNRT1.2a*-R: 5'-CGGGATCCTCAGTTGTTTGTAGTTCCTGTCC-3', *GmNRT1.2b*-F: 5'-TCCCCCGGGATGGAATTAGAACAAAACCAGAG-3', *GmNRT1.2b*-R: 5'-CGGGATCCTCAGTTGTTTGTAGTTCCTGTCC-3'。以 cDNA 为模板扩增目的片段(图 1-A), 将目的片段回收纯化后连接 T 载体进行测序。之后将测序正确的目的基因片段通过酶切酶连的方式连入植物表达载体 pEGAD (图 1-B)中, 获得 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的过表达载体 35S::*GmNRT1.2a* 与 35S::*GmNRT1.2b*。将构建完成的重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 挑取阳性的单克隆接种 LB 培养基进行扩大培养, 之后保菌并提取质粒转化发根农杆菌 K599, 挑取阳性单克隆扩繁, 将菌液以 1:1 体积与 30% 甘油混合, 在液氮中速冻后保存于 -80℃ 冰箱备用。



(图 1)

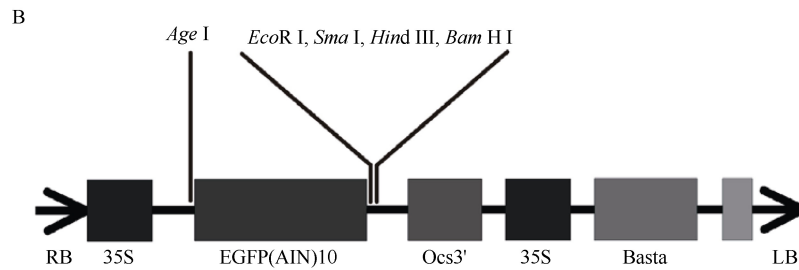


图 1 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 过表达载体构建

Fig. 1 Construction of *GmNRT1.2a* and *GmNRT1.2b* overexpression vectors

A: PCR 扩增后得到的 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 目的基因片段; B: pEGAD 过表达载体图谱及酶切位点。

A: the coding sequence of *GmNRT1.2a* and *GmNRT1.2b* were obtained through PCR amplification. B: the partial vector map of pEGAD.

1.2.7 大豆毛状根转化及根瘤表型观察 根据先前描述的方法^[33-34]及本实验室已报道体系^[19], 大豆萌发 3~4 d 后, 将带有重组质粒的农杆菌 K599 在 3~4 mL LB 液体培养基中 28℃ 下 150 转 min⁻¹ 震荡培养过夜(OD₆₀₀ 为 0.8~1.0)。以 1 : 1000 的比例将液体活化培养后的菌液接种于 50 mL LB 液体培养基中进行继代培养, 并在培养基中以 1 : 1000 的比例加入质粒及 K599 所带有的抗生素和 0.2 mol L⁻¹ Acetosyringone (AS), 菌液培养至 OD₆₀₀ 值约 0.8 后, 将菌液离心, 弃上清液, 用 50 mL 液体共培培养基 (CCM) 重悬菌液。挑选子叶完整未受损伤的发芽种子, 用解剖刀从胚轴上切下置于灭过菌的皿中(倒入少量菌液), 在子叶下端的 0.1~0.2 cm 下胚轴处切开, 切完之后将外植体在菌液中侵染 1 h。侵染完成后将外植体放在带有被 CCM 浸湿的滤纸的灭菌培养皿中, 将其放在暗下共培养 3 d 后, 把外植体移到低氮浓度营养液浸泡的蛭石中培养, 期间使用低氮营养液与蒸馏水交替培养, 10 d 后接种根瘤菌(OD₆₀₀ 为 0.8~1.0), 每棵接种 30 mL, 在接种根瘤菌 28 d 后,

观察根瘤表型, 拍照并统计根瘤数目, 之后取根样品进行后续的基因表达水平分析。

1.3 数据分析所用软件

借助 DNAMAN 7.0 设计相关引物, 使用 GraphPad Prism 5.0 统计根瘤数目, 利用 SigmaPlot 10.0 软件分析表达结果, 使用 SPSS 13.0 分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的组织表达模式分析

为了分析 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的组织表达模式, 将 W82 大豆种子种植到用低氮营养液浸泡的蛭石中, 在其生长到 15 d 时接种根瘤菌, 分别在接菌后 10 d 和 28 d 取叶、根和根瘤不同组织的样品。提取所取样品 RNA 并反转录成 cDNA, 对 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 基因进行组织表达分析。由图 2 可知, *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 在叶、根和瘤中均有表达, 且不同组织中表达量存在较大差

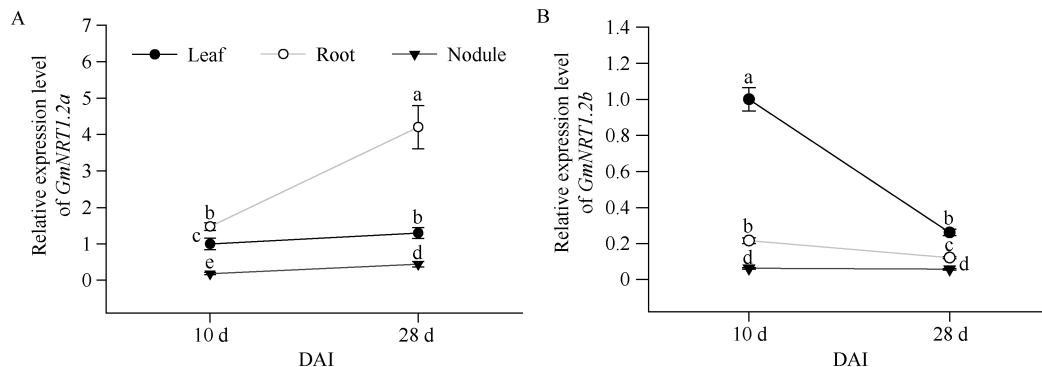


图 2 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 在大豆不同发育时期的组织表达模式分析

Fig. 2 Expression pattern of *GmNRT1.2a* and *GmNRT1.2b* in different developmental stages of soybean

标以不同小写字母的大豆不同组织中对对应基因的表达水平在 $P < 0.05$ 时差异显著。DAI: 接种后天数。

Mean values indexed with different letters are significantly different at $P < 0.05$. DAI: days after inoculation.

异。*GmNRT1.2a* 在 10 d 和 28 d 材料中有相同的表达趋势, 表达量根中最高, 叶中其次, 根瘤中最低。在 28 d 材料的叶、根和根瘤中, *GmNRT1.2a* 的表达量较其在 10 d 材料中均有显著上升, 在根中表现更为明显。与此相比, 10 d 和 28 d 材料中 *GmNRT1.2b* 在叶中表达量明显高于根和根瘤中, 而在 28 d 材料的叶和根中其表达量都有明显下降, 该结果在叶中表现尤为明显。

2.2 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 基因受硝酸盐诱导表达

为了验证不同浓度硝酸盐对 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 表达的影响, 本研究对大豆 W82 材料分别进行 0、0.25 和 15.75 mmol L⁻¹ 硝酸盐处理。取在不同氮浓度中萌发 15 d 后的主根和侧根的混合样品, 检测 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的基因表达。由图 3 可知, 与其在无氮营养液中的表达水平相比, 随着氮浓度的升高, *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的表达量有明显增加。表明 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 受硝酸盐尤其是高浓度硝酸盐的显著诱导表达。

2.3 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 响应根瘤菌及结瘤因子的表达模式分析

为了分析 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 是否响应根瘤菌侵染, 本研究将 W82 材料种植在用低氮营养

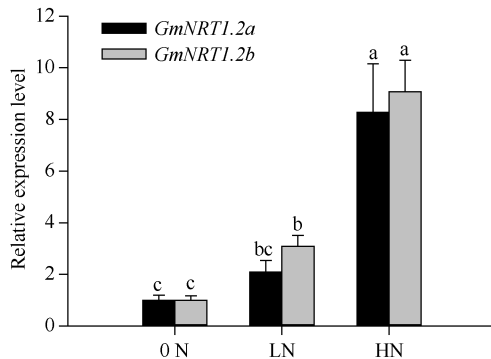


图 3 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 在不同浓度下的硝酸盐下的表达模式

Fig. 3 Expression pattern of *GmNRT1.2a* and *GmNRT1.2b* under different concentrations of nitrate

大豆在 0N (0 mmol L⁻¹)、LN (0.25 mmol L⁻¹) 和 HN (15.75 mmol L⁻¹) 3 种硝酸盐浓度梯度下生长到 15 d, 取大豆根部组织样品。用荧光定量 PCR 检测 *GmNRT1.2a* (A) 和 *GmNRT1.2b* (B) 的表达, *GmELF1b* 为内参基因。图中标以不同字母的基因表达水平在 $P < 0.05$ 时差异显著。

Soybeans were germinated in vermiculite at different nitrate concentrations (0N-0 mmol L⁻¹, LN-0.25 mmol L⁻¹, HN-15.75 mmol L⁻¹). The roots were collected at 15 days after germination. The expression of *GmNRT1.2a* (A) and *GmNRT1.2b* (B) was analyzed by RT-qPCR. Bars with different lowercase letters in each figure are significantly different at $P < 0.05$.

液浸泡的蛭石中, 于萌发后 5 d 每棵材料接种 1 mL 结瘤因子, 并以同时间点接种等体积根瘤菌或蒸馏水作为对照, 在处理 3 d 后取主根和侧根的混合样品, 分别对 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 进行表达分析, 并且以之前已报道的响应结瘤因子信号的 *GmENOD40-1* 作为阳性对照。由图 4 可知, *GmENOD40-1* 同时受到根瘤菌和结瘤因子诱导, 且受根瘤菌诱导更强。*GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的表达同时受到根瘤菌和结瘤因子诱导, 与其对根瘤菌侵染的响应模式相比, 二者受结瘤因子的诱导更为明显。推测它们可能通过经典的结瘤因子信号通路响应根瘤菌的侵染。

2.4 过表达 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 增加根瘤数目

为了进一步探究 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 对根瘤数目的影响, 利用毛状根转化体系分别将带有 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 过表达重组质粒转化大豆, 以空载体转化作为对照 (EV)。在接种根瘤菌 28 d 后观察根瘤表型并取样, 由图 5 可知, *GmNRT1.2a* 或 *GmNRT1.2b* 过表达材料中, 其表达量同对照相比均显著升高 (图 5-A, B)。空载体对照 (EV) 转化的毛状根的平均根瘤数目为 15.38, 而在过表达 *GmNRT1.2a* 与 *GmNRT1.2b* 的阳性毛状根中, 其平均结瘤数分别为 39.60 个与 24.63 个 (图 5-C, D)。说明低氮条件下过表达 *GmNRT1.2a* 或 *GmNRT1.2b* 都可以极大地增加大豆根瘤数目, 其中过表达 *GmNRT1.2a* 根瘤数目

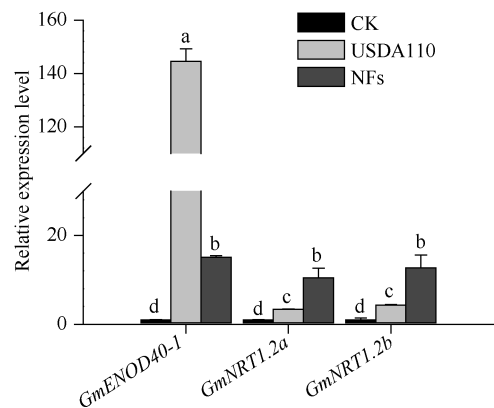


图 4 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 响应接种根瘤菌和结瘤因子表达模式分析

Fig. 4 Expression patterns of *GmNRT1.2a* and *GmNRT1.2b* in response to rhizobium inoculation and nod factors treatment

标以不同小写字母的基因表达水平在根瘤菌和结瘤因子处理的大豆植株与对照间在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

Values followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$.

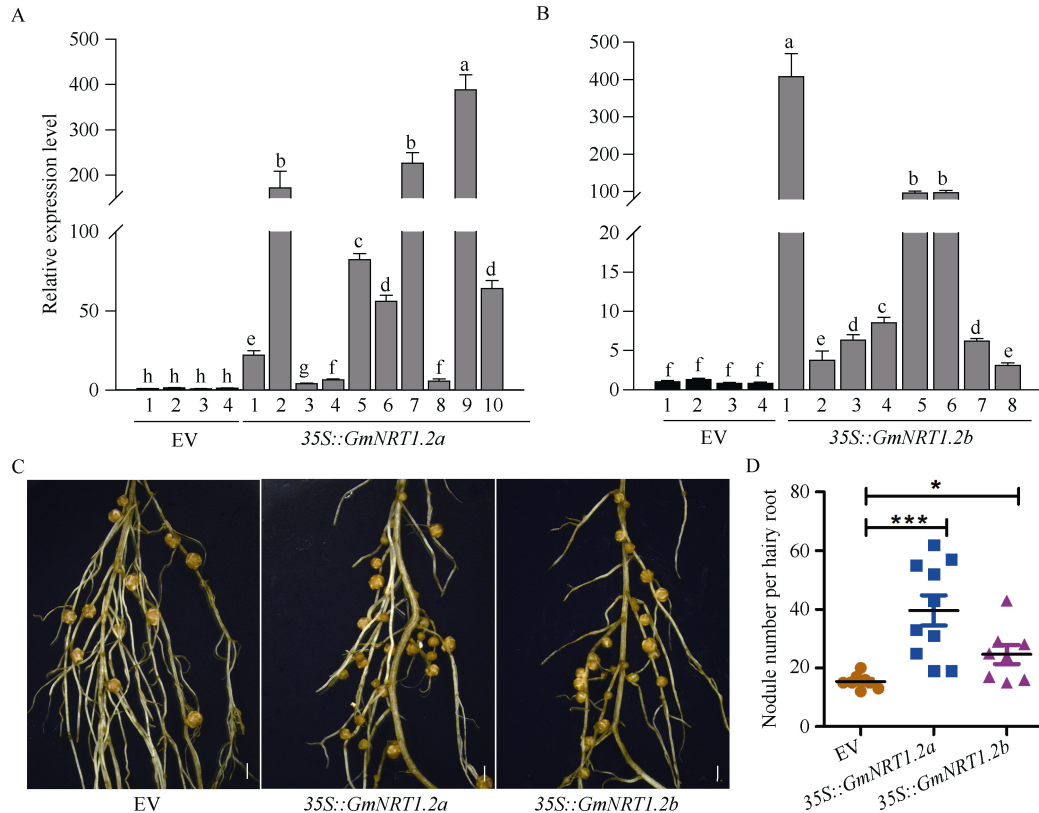


图 5 在低氮培养条件下过表达 *GmNRT1.2a* 或 *GmNRT1.2b* 增加结瘤数目

Fig. 5 Nodule number increased by 35S::GmNRT1.2a or 35S::GmNRT1.2b under low nitrate condition

A, B: 在接种根瘤菌 28 d 后, 利用荧光定量 PCR 检测 EV、35S::GmNRT1.2a 和 35S::GmNRT1.2b 单条毛状根表达, 以 *GmELF1b* 基因作为内参基因。标以不同小写字母的柱值在不同转基因大豆植株间在 $P < 0.05$ 时的差异显著。C: EV、35S::GmNRT1.2a 和 35S::GmNRT1.2b 的单条根的根瘤表型, Bar = 5 mm。D: 统计 EV、35S::GmNRT1.2a 和 35S::GmNRT1.2b 的根瘤数目。*和***分别表示转基因株系 35S::GmNRT1.2a 和 35S::GmNRT1.2b 的根瘤数目与对照在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.001$ 水平差异显著。

A, B: RT-qPCR analysis of *GmNRT1.2a* or *GmNRT1.2b* in single hairy root transformed with empty vector, 35S::GmNRT1.2a or 35S::GmNRT1.2b inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 at 10 and 28 days treatment. *GmELF1b* was used as an endogenous control for gene expression. Bars with different lowercase letters in each figure are significantly different at $P < 0.05$. C: the phenotype of nodule per hairy root transformed with empty vector (EV), 35S::GmNRT1.2a and 35S::GmNRT1.2b at 28 DAI. Bar = 5 mm. D: nodule number per hairy root transformed with empty vector (EV), 35S::GmNRT1.2a or 35S::GmNRT1.2b were counted at 28 DAI. The values followed by * and *** are significantly different at $P < 0.05$ and $P < 0.001$.

增加更明显, 表明 *GmNRT1.2a* 及 *GmNRT1.2b* 可能正向调控大豆结瘤。

3 讨论

近年来, 有关硝酸盐转运蛋白参与氮素营养吸收的研究已成为热点。目前的研究主要集中在拟南芥^[35]、水稻^[36-39]、番茄^[40]、小麦^[41]、油菜^[42]等植物, 对于大豆中该类蛋白的功能研究报道较少, 尚处于起步阶段。由于物种的特异性, 不同物种的同源基因之间可能存在着功能的分化。大豆 *GmNRT1.2s* 的相关生物信息学分析结果也显示, 大豆 *GmNRT1.2s* 的碱基和氨基酸序列与拟南芥中的 *NRT1.2* 存在一定差异^[31]。另外, 拟南芥中 *ATNRT1.2s* 为组成型表达, 即不受硝酸盐的诱导^[29-30], 而本研究中发现大豆 *GmNRT1.2a*

和 *GmNRT1.2b* 同时受到低浓度和高浓度硝酸盐诱导。除此之外, 大豆 *GmNRT1.2a* 在根中表达量最高, 而 *GmNRT1.2b* 主要在叶中表达, 二者主要的表达部位有着明显的不同, 这一差异也在一定程度上暗示着二者可能在某些功能上存在差异。

相关研究结果证明, *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 过表达后导致大豆的根瘤数目均显著增加, 但是对于 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的功能研究尚不完全。在之后的研究中可以利用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术和 CRISPR 基因编辑技术对 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的功能进行深入探究, 建立快速稳定的 RNAi 与 CRISPR 大豆毛状根转化体系, 对进一步研究 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 在结瘤过程中的作用具有重要意义。

基于大豆 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 受高浓度硝酸盐诱导, 并且在接种根瘤菌和结瘤因子后表达上调, 推测它们可能受某些转录因子调控。后续研究可以通过生物信息学分析预测其上游转录因子, 并通过酵母单杂技术进行文库筛选候选的转录因子, 进一步利用 ChIP-PCR 与 EMSA 技术验证转录因子对 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 的调控。为了完善对 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 调控大豆结瘤的分子机制研究, 还可以开展其互作蛋白的预测及鉴定, 例如, 通过 string 10 (<https://string-db.org/>) 网站进行互作预测, 同时利用酵母双杂交及 IP-MS 大规模寻找可能与 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 互作的蛋白, 从而更深入地解析 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 调控大豆结瘤的分子网络。

4 结论

GmNRT1.2a 和 *GmNRT1.2b* 分别在大豆根和叶中表达最高。*GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 受硝酸盐诱导表达, 且显著响应根瘤菌及结瘤因子处理。在毛状根转化体系中, 过表达 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 使大豆根瘤数目显著增加, 表明 *GmNRT1.2a* 和 *GmNRT1.2b* 在结瘤过程中发挥正向调控作用。

References

- [1] 张合琼, 张汉马, 梁永书, 南文斌. 植物硝酸盐转运蛋白研究进展. 植物生理学报, 2016, 52: 141–149.
Zhang H Q, Zhang H M, Liang Y S, Nan W B. Research progress of nitrate in plant transport mechanism. *Acta Phytophysiol Sin*, 2016, 52: 141–149 (in Chinese with English abstract).
- [2] 姜丽娜, 张凯, 宋飞, 张新敏, 蒿宝珍, 李春喜. 拔节期追氮对冬小麦产量、效益及氮素吸收和利用的影响. 麦类作物学报, 2013, 33: 716–721.
Jiang L N, Zhang K, Song F, Zhang X M, Hao B Z, Li C X. Effects of nitrogen topdressing at jointing stage on grain yield, benefit, absorption and utilization of nitrogen in winter wheat. *J Triticeae Crops*, 2013, 33: 716–721 (in Chinese with English abstract).
- [3] Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot*, 2010, 105: 1141–1157.
- [4] Dong C X, Shen Q R, Wang G. Tomato growth and organic acid changes in response to partial replacement of NO_3^- -N by NH_4^+ -N. *Pedosphere*, 2004, 14: 159–164.
- [5] Vojtišková L, Munzarová E, Votrubová O, Řihová A, Juřicová B. Growth and biomass allocation of sweet flag (*Acorus calamus* L.) under different nutrient conditions. *Hydrobiologia*, 2004, 518: 9–22.
- [6] 张富仓, 严富来, 范兴科, 李国栋, 刘翔, 陆军胜, 王英, 麻玮青. 滴灌施肥水平对宁夏春玉米产量和水肥利用效率的影响. 农业工程学报, 2018, 34(22): 111–120.
Zhang F C, Yan F L, Fan X K, Li G D, Liu X, Lu J S, Wang Y, Ma W Q. Effects of irrigation and fertilization levels on grain yield and water-fertilizer use efficiency of drip-fertigation spring maize in Ningxia. *Trans CSAE*, 2018, 34(22): 111–120 (in Chinese with English abstract).
- [7] Ren Y Z, Qian Y Y, Xu Y H, Zou C Q, Liu D C, Zhao X Q, Zhang A M, Tong Y P. Characterization of QTLs for root traits of wheat grown under different nitrogen and phosphorus supply levels. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 2096.
- [8] Walch-Liu P, Forde B G. Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonizes L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant J*, 2008, 54: 820–828.
- [9] Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford N M. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol*, 2003, 132: 556–567.
- [10] Forde B G. Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 21: 30–36.
- [11] Alboresi A, Gestin C, Leydecker M T, Bedu M, Meyer C, Truong H M. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 2005, 28: 500–512.
- [12] Castro Marín I, Loefer I, Bartetzko L, Searle I, Coupland G, Stitt M, Osuna D. Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta*, 2011, 233: 539–552.
- [13] Madsen E B, Madsen L H, Radutoiu S, Rakwalska M, Szczygłowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 2003, 425: 637–640.
- [14] Radutoiu S, Madsen L H, Madsen E B, Felle H H, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 2003, 425: 585–592.
- [15] Arrighi J F, Barre A, Ben Amor B, Bersoult A, Soriano L C, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet E P, Ghérandi M, Huguet T, Geurts R, Dénarié J, Rougé P, Gough C. The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol*, 2006, 142: 265–279.
- [16] Indrasumunar, A, Searle I, Lin M H, Kereszt A, Men A, Carroll B J, Gresshoff P M. Nodulation factor receptor kinase 1a controls nodule organ number in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant J*, 2011, 65: 39–50.
- [17] Searle I, Miyagi M, Li D X, Nguyen C D T, Men A, Carroll B J, Gresshoff P M. Inactivation of duplicated nod factor receptor 5 (NFR5) genes in recessive loss-of-function non-nodulation mutants of allotetraploid soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Cell Physiol*, 2010, 51: 201–214.
- [18] Röhrig H, Schmidt J, Miklashevichs E, Schell J, John M. Soybean *ENOD40* encodes two peptides that bind to sucrose synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 1915–1920.
- [19] Wang Y N, Wang L X, Zou Y M, Chen L, Cai Z M, Zhang S L, Zhao F, Tian Y P, Jiang Q, Ferguson B J, Gresshoff P M, Li X.

- Soybean miR172c targets the repressive AP2 transcription factor NNC1 to activate *ENOD40* expression and regulate nodule initiation. *Plant Cell*, 2014, 26: 4728–4801.
- [20] Li X, Zhao J, Tan Z, Zeng R, Liao H. GmEXPB2, a cell wall β -expansin, affects soybean nodulation through modifying root architecture and promoting nodule formation and development. *Plant Physiol*, 2015, 169: 2640–2653.
- [21] Chen L Y, Qin L, Zhou L, Li X, Chen Z, Sun L, Wang W, Lin Z, Zhao J, Yamaji N, Ma J F, Gu M, Xu J, Liao H. A nodule-localized phosphate transporter GmPT7 plays an important role in enhancing symbiotic N_2 fixation and yield in soybean. *New Phytol*, 2018, 221: 2013–2025.
- [22] Yan Q Q, Wang L X, Li X. GmBEHL1, a BES1/BZR1 family protein, negatively regulates soybean nodulation. *Sci Rep*, 2018, 8: 7614.
- [23] Choudhury S R, Pandey S. Specific subunits of heterotrimeric G proteins play important roles during nodulation in soybean. *Plant Physiol*, 2013, 162: 522–533.
- [24] Choudhury S R, Pandey S. Phosphorylation-dependent regulation of G-protein cycle during nodule formation in soybean. *Plant Cell*, 2015, 27: 3260–3276.
- [25] Wang Y N, Yang W, Zuo Y Y, Zhu L, Hastwell A H, Chen L, Tian Y P, Su C, Ferguson B J, Li X. *GmYUC2a* mediates auxin biosynthesis during root development and nodulation in soybean. *J Exp Bot*, 2019, 10: 3165–3176.
- [26] Cai Z M, Wang Y N, Zhu L, Tian Y P, Chen L, Sun Z X, Ullah I, Li X. GmTIR1/GmAFB3 - based auxin perception regulated by miR393 modulates soybean nodulation. *New Phytol*, 2017, 215: 672–686.
- [27] Bustos-Sanmamed P, Mao G, Deng Y, Elouet M, Khan G A, Bazin J, Lelandais-Brière C. Overexpression of miR160 affects root growth and nitrogen-fixing nodule number in *Medicago truncatula*. *Funct Plant Biol*, 2013, 40: 1208–1220.
- [28] Wang Y N, Li K X, Chen L, Zou Y M, Liu H P, Tian Y P, Li D X, Wang R, Zhao F, Ferguson B J, Gresshoff P M, Li X. MicroRNA167-directed regulation of the auxin response factors, GmARF8a and GmARF8b, is required for soybean nodulation and lateral root development. *Plant Physiol*, 2015, 168: 984–999.
- [29] Wang Y Y, Hsu P K, Tsay Y F. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci*, 2012, 17: 458–467.
- [30] Huang N C, Liu K H, Lo H J, Tsay Y F. Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell*, 1999, 11: 1381–1392.
- [31] 朱林, 左妍妍, 曹金山, 王小迪, 杨薇, 王幼宁. 大豆 *NRT1.2* 同源基因的生物信息学分析. 大豆科学, 2019, 38: 371–378. Zhu L, Zuo Y Y, Cao J S, Wang X D, Yang W, Wang Y N. Bioinformatic analysis of *NRT1.2* homologous gene in soybean. *Soybean Sci*, 2019, 38: 371–378 (in Chinese with English abstract).
- [32] Wang Y W, Li P C, Cao X F, Wang X J, Zhang A M, Li X. Identification and expression analysis of miRNAs from nitrogen-fixing soybean nodules. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378: 799–803.
- [33] Kereszt A, Li D X, Indrasumunar A, Nguyen C D T, Nontachaiyapoom S, Kinkema M, Gresshoff P M. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of soybean to study root biology. *Nat Protoc*, 2007, 2: 948–952.
- [34] Jian B, Hou W S, Wu C X, Liu B, Liu W, Song S K, Bi Y R, Han T F. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Superroot-derived *Lotus corniculatus* plants: a valuable tool for functional genomics. *BMC Plant Biol*, 2009, 9: 78.
- [35] Okamoto M, Vidmar J J, Glass A D. Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 304–317.
- [36] Araki R, Hasegawa H. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. *Breed Sci*, 2006, 56: 295–302.
- [37] Hu B, Wang W, Ou S J, Tang J Y, Li H2, Che R H, Zhang Z H, Chai X Y, Wang H R, Wang Y Q, Liang C Z, Liu L C, Piao Z Z, Deng Q Y, Deng K, Xu C, Liang Y, Zhang L H, Li L G, Chu C C. Variation in *NRT1.1B* contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nat Genet*, 2015, 47: 834–838.
- [38] Hu B, Jiang Z M, Wang W, Qiu Y H, Zhang Z H, Liu Y Q, Li A F, Gao X K, Liu L C, Qian Y W, Huang X H, Yu F F, Kang S, Wang Y Q, Xie J P, Cao S Y, Zhang L H, Wang Y C, Xie Q, Kopriva S, Chu C C. Nitrate-*NRT1.1B*-*SPX4* cascade integrates nitrogen and phosphorus signalling networks in plants. *Nat Plants*, 2019, 5: 401–413.
- [39] Zhang J Y, Liu Y X, Zhang N, Hu B, Jin T, Xu H R, Qin R Y, Yan P X, Zhang X N, Guo X X, Hui J, Cao S Y, Wang X, Wang C, Wang H, Qu B Y, Fan G Y, Yuan L X, Garrido-Oter R, Chu C C, Bai Y. *NRT1.1B* is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 676–684.
- [40] Lauter F R, Ninnemann O, Bucher M, Riesmeier J W, Frommer W B. Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 8139–8144.
- [41] Zhao X Q, Li Y J, Liu J, Li B, Liu Q Y, Tong Y P, Li J Y, Li Z S. Isolation and expression analysis of a high-affinity nitrate transporter *TaNRT2.3* from roots of wheat. *Acta Bot Sin*, 2004, 46: 347–354.
- [42] Zhou J J, Theodoulou F L, Muldin I, Ingemarsson B, Miller A J. Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *J Biol Chem*, 1998, 273: 12017–12023.