



大豆盐胁迫响应 *NRT* 基因的鉴定及 *GmNRT1.5A* 的克隆和表达分析

王玉斌, 张志贤, 张辰淼, 刘 薇, 张彦威, 张礼凤, 徐 冉

(山东省农业科学院 作物研究所/山东省特色作物工程实验室, 山东 济南 250100)

摘要: 硝酸盐转运蛋白(Nitrate Transporters, NRTs)在植物根系 NO_3^- 吸收或转运中发挥重要作用,为探究大豆 NRTs 基因在盐胁迫响应中的功能,本研究从前期盐胁迫处理的转录组数据中鉴定出 8 个持续响应盐胁迫的差异表达 *GmNRTs* 基因。这些 *GmNRTs* 基因的启动子上均含有多个与逆境胁迫或植物激素应答相关的元件,推测它们可能与大豆非生物胁迫应答或植物激素调控盐胁迫响应相关。同时,从齐黄 34 根系中克隆了盐胁迫处理上调倍数最大的基因 *GmNRT1.5A*,并对其进行了生物信息学和表达分析。结果显示:*GmNRT1.5A* 的蛋白质编码区全长为 1 794 bp,编码 597 个氨基酸,蛋白分子质量为 66.78 kD,理论等电点为 5.85。进化树分析结果表明,*GmNRT1.5A* 与 *AtNRT1.5* 同源性最高,含有 12 个跨膜结构域,含有典型的 NRT1s 保守结构域,二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主。实时荧光定量 PCR 分析表明,*GmNRT1.5A* 主要在籽粒和根系中表达,盐胁迫和干旱胁迫显著诱导根系中 *GmNRT1.5A* 的表达。此外,*GmNRT1.5A* 的表达受植物激素的调控,ABA 和 ACC 显著诱导其表达,但 GA_3 处理显著抑制 *GmNRT1.5A* 表达。本研究表明,*GmNRT1.5* 在响应盐胁迫逆境中发挥重要作用,为探索 *GmNRTs* 基因在响应逆境胁迫中的功能提供了新思路,也为深入研究 *GmNRT1.5* 基因的功能提供了基础。

关键词: 大豆;盐胁迫;*NRTs*;*GmNRT1.5A*;表达分析

Identification of Soybean Salt Stress Responsive *NRT* Genes and Cloning and Expression Analysis of *GmNRT1.5A*

WANG Yubin, ZHANG Zhixian, ZHANG Chenmiao, LIU Wei, ZHANG Yanwei, ZHANG Lifeng, XU Ran

(Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Shandong Engineering Laboratory of Featured Crops, Jinan 250100, China)

Abstract: Nitrate transporters (NRTs) play an important role in NO_3^- uptake or transporters in plant roots. In order to study the function of soybean NRTs genes in response to salt stress, eight differentially expressed *GmNRTs* genes that respond to salt stress were identified from the transcriptome data of salt stress treatment. The promoters of these *GmNRTs* genes contain multiple plant stress or plant hormones response elements, suggesting that these genes might be involved in abiotic stress or plant hormone regulation of salt stress response of soybean. At the same time, we cloned *GmNRT1.5A* from soybean roots, which was the most up-regulated gene under salt stress treatment. The *GmNRT1.5A* CDs of 1 794 bp in length, encoded a 597 amino acid, with molecular weight of 66.78 kD and isoelectric point (pI) of 5.85. Phylogenetic analysis revealed that *GmNRT1.5A* had a close relationship with *AtNRT1.5* and *ZmNRT2.5*, contained twelve transmembrane domains and typical NRT1s conserved domains, and the secondary structure of *GmNRT1.5A* was found to be composed of α -helix and random coils. Real-time quantitative PCR analysis showed that *GmNRT1.5A* was mainly expressed in seeds and roots. Salt stress and drought stress significantly induced the expression of *GmNRT1.5A* gene in root. In addition, the expression of *GmNRT1.5A* was significantly induced by ABA and ACC, while GA_3 treatment significantly inhibited the expression of *GmNRT1.5A*. This study showed that *GmNRT1.5A* played an important role in response to salt stress, which provides a new idea for exploring the function of NRTs genes in soybean response to stress, and also lays a foundation for in-depth research on the function of *GmNRT1.5A* gene in soybean.

Keywords: soybean; salt stress; *NRTs*; *GmNRT1.5A*; expression analysis

土壤盐碱化是影响农作物生长的主要非生物胁迫之一,主要发生在沿海和干旱/半干旱地区等我国粮食主产区^[1]。目前,由于全球气候变化、不合理灌溉和化肥施用不当等问题,超过 20% 的耕地受到盐胁迫的影响,土壤盐碱化问题日益突出,严

重威胁我国粮食安全^[2]。大豆是重要的粮油兼用经济作物,为人类提供 30% 以上油脂和 70% 以上蛋白资源,在人民生活 and 国民经济中占有举足轻重的地位,但盐胁迫严重影响大豆的产量与品质。因此,开展大豆耐盐机理研究,提高大豆耐盐性,对于

收稿日期:2022-03-17

基金项目:国家自然科学基金重点项目(U22A20467);山东省自然科学基金项目(ZR2020MC101);山东省农业科学院科技创新工程项目(cxgx2023A02);国家体系济南试验站项目(CARS-04-CES12)。

第一作者:王玉斌(1988—),男,博士,助理研究员,主要从事大豆耐逆基因功能研究。E-mail: wangyb_221@163.com。

通讯作者:张礼凤(1972—),女,研究员,主要从事大豆耐逆基因挖掘研究。E-mail: zhanglifeng9639@sina.com;

徐冉(1967—),男,博士,研究员,主要从事大豆遗传育种与耐逆基因挖掘研究。E-mail: soybeanxu@126.com。

扩大大豆适种范围、提高大豆产量具有重要的意义。

硝酸盐转运蛋白 (Nitrate Transporters, NRTs) 在植物吸收和利用土壤 NO_3^- 过程中发挥重要作用^[3]。目前,已鉴定的硝酸盐转运蛋白家族主要分为 4 种,其中, NRT1s/NPFs (Nitrate Transporter Protein 1s/peptide Transporters) 家族成员的研究最多^[3]。AtNRT1.1 (NPF6.3) 是植物中第一个被鉴定和克隆的重要 NO_3^- 转运体,也是目前功能研究最清楚的转运体。AtNRT1.1 不仅具有调控根部吸收硝酸盐并将其转运到地上部的功能,还可以作为 NO_3^- 信号感受器,参与 NO_3^- 的应答反应^[4]。水稻 NPF6.3 (OsNRT1.1B) 与 AtNRT1.1 同源,二者均为双亲和 NO_3^- 转运蛋白^[5-6]。目前报道玉米中与 *AtNRT1.1* 同源的基因有两个, *ZmNPR6.4* 和 *ZmNPF6.6*, 两者均被证明转运 NO_3^- 和 Cl^- ^[7]。拟南芥中已报道存在 53 个 NRT1 转运体,其中有 12 个成员 (AtNRT1.1 ~ NRT1.12) 被克隆鉴定,并证明参与硝酸盐的转运^[8]。除 NO_3^- 转运功能外,不同植物 NRTs 基因在转运多肽、 K^+ 、 Cl^- 、植物激素及参与植物响应生物胁迫和非生物胁迫方面均发挥重要作用^[9]。AtNRT1.5 是定位于细胞膜上的低亲和双向硝酸盐转运体,主要负责将硝酸盐转运出中柱鞘细胞,然后装载到木质部,将 NO_3^- 从根部转运到冠部^[10-11]。最新的研究结果表明,AtNRT1.5 在调控根部向冠部 K^+ 的转运中同样发挥重要作用,同时调控低钾胁迫下拟南芥主根发育^[12-13]。水稻中共有 93 个 NRT1s 成员,但只有个别成员的功能被鉴定^[14-15]。除拟南芥 NRT1.5 的功能研究较为清楚外,目前对 *NRT1.5* 基因鉴定及功能验证的研究较少,仅在玉米和甘蓝型油菜中被克隆报道^[16-17]。

近年来,NRTs 在植物中的功能研究主要集中在营养吸收方面,其响应非生物胁迫的报道较少。干旱处理诱导苹果中 *NRT2.4* 基因的表达,通过提高硝酸盐转运来响应干旱胁迫^[18];盐胁迫处理显著诱导盐地碱蓬 *NRT2.1* 基因的表达,从而增加根系和叶片中 NO_3^- 的积累^[19];超表达 *OsNRT2.3b* 基因可以提高水稻对酸胁迫的耐受能力^[20];Zhao 等^[21] 通过生物信息学分析,在柃桔中鉴定出 56 个 *NRT1s* 家族基因,其中多个 *NRT1s* 基因的表达受盐胁迫的调控。通过对花生叶片和根系盐处理转录组分析发现,盐胁迫处理显著诱导花生地上部和根部

NRT1.5 基因的表达^[22]。目前,通过生物信息学分析发现,野生大豆中一共包含 150 个 NRT1s 家族基因^[23]。栽培大豆中 *NRT1.3* 和 *NRT2* 基因在很久前被克隆报道^[24-25],除此之外,其它大豆 *NRTs* 基因鲜见报道,且目前大豆 *NRTs* 基因是否参与盐胁迫响应还不清楚。

虽然 *NRTs* 基因在植物响应非生物胁迫中同样发挥重要作用,但目前大豆 *NRTs* 基因是否参与盐胁迫响应还不清楚。本研究通过对前期盐胁迫处理的转录组数据进行分析,筛选出 8 个在 4 个处理时间点均差异表达的硝酸盐转运蛋白 (NRTs) 编码基因,并对盐胁迫诱导最强的 NRT1 家族基因 *GmNRT1.5A* 进行克隆和生物信息学分析。通过实时定量 PCR 技术分析了 *GmNRT1.5A* 基因在不同组织间的表达以及对植物激素 ABA (abscisic acid)、 GA_3 (gibberellin)、ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 和不同逆境 (NaCl、PEG) 的应答分析。本研究为进一步研究 *GmNRT1.5A* 基因在大豆盐胁迫响应中的功能提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆材料为耐盐品种齐黄 34^[26]。使用诺唯赞 RNA 试剂盒 (FastPure Universal Plant Total RNA Isolatin Kit) 提取齐黄 34 不同部位和不同处理根系 RNA,并利用该公司 HisScript RT SuperMix for qPCR 试剂进行反转录。基因克隆用到高保真酶 Rapid Taq Master Mix 也购自南京诺唯赞科技有限公司;胶回收、纯化回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 和菌液鉴定用到的 $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ 均购自天根生物科技有限公司;实时荧光定量 PCR (Polymerase Chain Reaction) 试剂盒购自莫纳生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 材料培养及处理 材料培养方式及激素处理方式具体参考文献^[27]。试验在山东省农业科学院作物所光照培养室进行,培养温度为 $26^\circ\text{C}/22^\circ\text{C}$,光照时间为 16 h,湿度控制为大约 60%。

1.2.2 RNA-seq 测序及 *GmNRTs* 基因的筛选 取盐处理和对照处理 1,3,6 和 12 h 的大豆根系,每个样品 3 个生物学重复,RNA 提取及测序工作均在北

京诺和致源科技股份有限公司完成。cDNA 文库构建好后采用 Illumina NovaSeq 6000 (illumina, USA), S4 上机测序。过滤得到的 CleanReads 通过 Tophat2 软件比对到大豆 W82 参考基因组 (pub/plants/release-52/fasta/glycine_max/)。比对结果用 Cufflinks 软件进行组装,然后通过 DESeq2 软件对各组样品进行基因表达水平分析。差异表达 *GmNRTs* 基因的筛选标准设置为 $|\log_2 FC| \geq 2$ 且 $P\text{-adjust value} < 0.05$, 且 4 个时间点均响应盐胁迫的 *GmNRTs* 基因。利用 TBtools 对筛选出来的差异 *GmNRTs* 基因进行作图。

1.2.3 *GmNRTs* 基因上游顺式作用元件分析 从 Phytozome 数据库中批量提取 8 个差异表达 *GmNRTs* 基因的 ATG 上游 2 000 bp 作为启动子序列,并利用 PlantCare 软件分析 8 个 *GmNRTs* 基因启动子可能存在的顺式作用元件。将分析结果在 GSGS2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 中进行可视化作图。

1.2.4 *GmNRT1.5A* 基因克隆及载体构建 从 Phytozome 数据库中下载 *GmNRT1.5A* 基因 CDS 序列并设计引物: *GmNRT1.5A*-F (ATGGGTTGTTTGT-ATTTTCT); *GmNRT1.5A*-R (CACTACTTCAGGCT-CTTCTT)。提取正常处理的齐黄 34 根系 RNA,反转录成 cDNA 后作为模板,利用高保真酶对 *GmNRT1.5A* 基因的全长进行克隆。扩增后的目的 PCR 产物与 pLB 载体连接后转化 DH5 α , 将菌液涂布于含有终浓度为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氨苄青霉素的培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑取单克隆后摇菌进行 PCR 鉴定,鉴定引物序列为: pLB-F (CGACTCACTATAGGGAGCGGC); pLB-R (AAGACATCGATTTTCCATGGAG), 反应程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$, 120 s;(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s)28 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。选取 2~3 个阳性克隆后进行测序,测序由青岛擎科生物科技有限公司完成。

1.2.5 *GmNRT2.5* 基因的生物信息学分析 利用 ExPASy、TMHMM、NetPhos3.1 和 NCBI CDS 对编码蛋白的二级结构、跨膜结构、磷酸化和保守结构域

进行分析。使用 MEGA5.0 软件的 Clustal W 比对 *GmNRT1.5A* 与 *AtNRT1s* 家族和 *ZmNRT1.5* 共 6 个基因的氨基酸序列,采用邻接法构建系统发育树。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 利用 NCBI 网站中的 Primer-Blast 在线软件设计用于检测基因 *GmNRT1.5A* 表达量的特异性引物,以大豆 *GmActin* 基因作为内参,引物序列为:*GmNRT1.5A*-F-qRT (GCCACAGATGAGATGCCAGG); *GmNRT1.5B*-R-qRT (TACAAGATCAGCTGCGGTGAG); *GmActin*-F (CGGTGGTTCTATCTTGGCATC); *GmActin*-R (GTCT-TTCGCTTCAATAACCCTA)。提取大豆不同组织(根系、茎、叶、荚和籽粒)及不同处理(NaCl、PEG、脱落酸、乙烯和赤霉素)后的齐黄 34 根系 RNA 并反转录成 cDNA,稀释 10 倍后用于 qRT-PCR。供试定量试剂为 SYBR green qPCRMix (莫纳生物科技有限公司),PCR 仪器为罗氏 480,每个样品进行 3 次生物学重复。反应程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;(95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s)40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量^[28]。

1.3 数据分析

利用 Excel 2018 进行数据的录入并绘制图表。用 SAS9.0 (SAS Institute Ltd., USA) 进行显著性统计分析。利用 Fisher's LSD ($P < 0.05$) 进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 响应大豆盐胁迫 *NRTs* 基因的筛选

对 NaCl 处理不同时间点的大豆根系转录组数据分析发现,与 0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理(对照)相比,150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理 1,3,6 和 12 h 后有 8 个大豆 *NRTs* 基因的表达量均发生显著变化。8 个基因中只有 *GmNRT2.4* 基因属于 *NRT2* 家族,其它基因均为 *NRT1* 家族基因。从结果可以看出,盐处理显著诱导了 *GmNRT1.2*、*GmNRT1.11*、*GmNRT1.14A*、*GmNRT1.14B*、*GmNRT1.5A*、*GmNRT1.5B* 基因的表达,相反,*GmNRT1.1* 和 *GmNRT2.4* 基因在 4 个时间点均显著下调(图 1)。

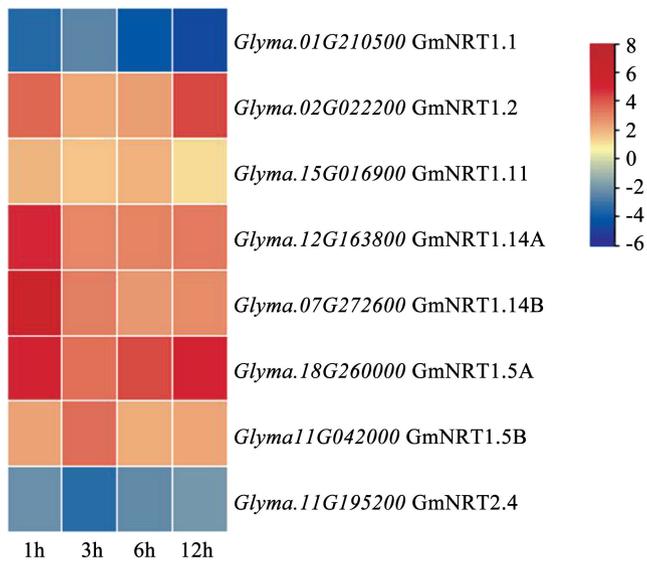


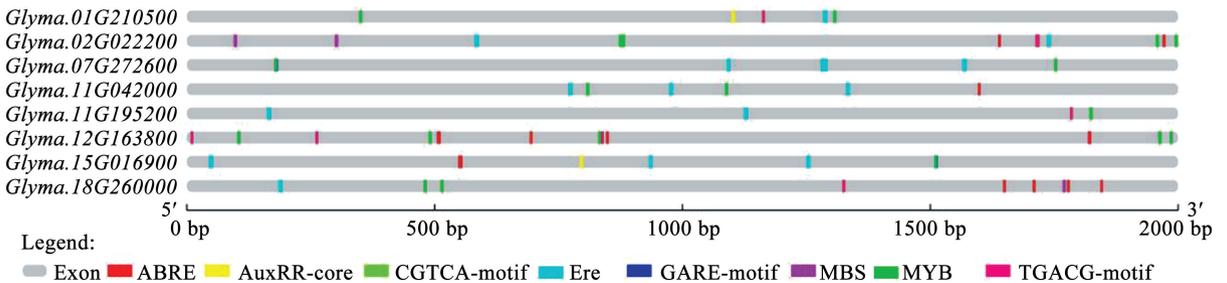
图 1 NaCl 处理不同时间点根系差异表达 *GmNRTs* 基因

Fig. 1 DEGs of *GmNRTs* in roots after NaCl treated for different times

2.2 *GmNRTs* 基因顺式作用元件分析

将 8 个差异表达的 *GmNRTs* 基因号输入到 Phytozome 中,批量提取 8 个 *NRTs* 基因起始密码子 ATG 上游 2 kb 的启动子序列。利用 PlantCARE 软件对 8 个 *NRTs* 基因启动子的顺式作用元件进行分析发现,这些基因的启动子中包含多个与非生物

胁迫相关的顺式作用元件和植物激素响应元件。胁迫响应元件包括干旱响应元件 (MYB 和 MBS); 植物激素响应元件包括:脱落酸响应顺式作用元件 ABRE、赤霉素响应元件 GARE-motif、乙烯响应元件 ERE、茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif (图 2)。



注: ABRE. 脱落酸响应元件; AuxRR-core. 生长素应答元件; GARE-motif. 赤霉素应答元件; ERE. 乙烯应答元件; MBS. 参与干旱诱导的 MYB 结合位点; MYB. MYB 结合位点; TGACG-motif. 茉莉酸甲酯响应元件。

Note: ABRE. Abscisic acid responsive element; AuxRR-core. Auxin-responsive element; GARE-motif. Gibberellin-responsive element; ERE. Ethylene responsive element; MBS. MYB binding site involved in drought-inducibility; MYB. MYB binding site; TGACG-motif. Methyl jasmonate responsive element.

图 2 大豆盐胁迫响应 *NRTs* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 2 Analysis of the predicted *cis*-elements in the promoter regions of the salt responsive soybean *NRT* genes

2.3 *GmNRT1.5A* 基因的克隆和生物信息学分析

对 NaCl 处理上调幅度最大的基因 *Glyma.18G260000* (*GmNRT1.5A*) 进行克隆与分析,从 Phytozome 中下载 *GmNRT1.5A* CDs 序列后设计引物,以齐黄 34 cDNA 为模板扩增 *GmNRT1.5A* 全长,

PCR 扩增获得长度为 1 794 bp 的片段(图 3)。将 PCR 产物连接到 T 载体 pGM-T 后转化大肠杆菌,挑取单克隆测序,测序结果经 DNAMAN 比对发现,齐黄 34 中的 *GmNRT1.5A* 基因序列与 W82 的参考基因组序列完全一致。

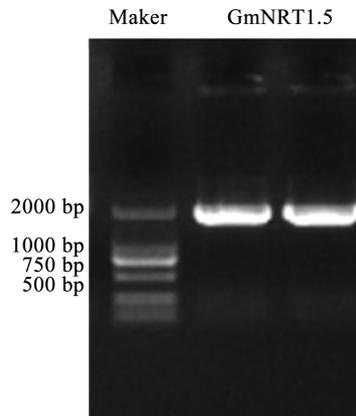


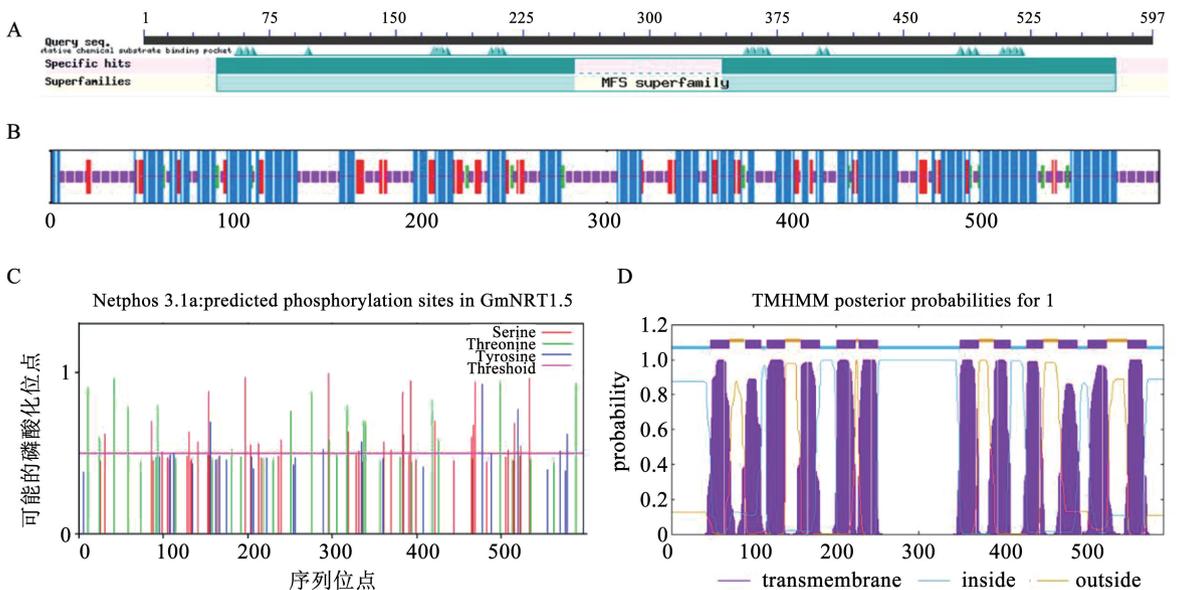
图3 大豆盐胁迫响应 *GmNRT1.5A* 基因的克隆

Fig. 3 Cloning of the salt responsive soybean *GmNRT1.5A* gene

通过对 *GmNRT1.5A* 编码蛋白的保守结构域进行分析发现,其编码的第 44 ~ 575 aa 为 MFS superfamily (NRT1/PTR family, NPF) 保守结构域(图 4A); *GmNRT1.5A* 编码的蛋白分子质量为 66.78 kD,理论等电点为 5.85;蛋白质二级结构预测结果表明, *GmNRT1.5A* 蛋白主要由 α -螺旋(47.24%)、无规则卷曲(37.52%)、延伸链(12.06%)和 β -折叠(3.18%)构成(图 4B);磷酸化

位点预测分析发现, *GmNRT1.5A* 蛋白共有 49 个磷酸化位点,其中 Tyr 7 个, Ser 26 个, Thr 16 个(图 4 C);对其编码的蛋白进行跨膜预测,结果显示该蛋白含有 12 个跨膜结构域(图 4 D),推测为膜定位蛋白。

将 *GmNRT1.5A* 氨基酸序列与拟南芥 NRT1s 家族和玉米 *ZmNRT1.5* 氨基酸序列进行系统进化树分析的结果表明, *GmNRT1.5A* 与 *AtNRT1.5* 亲缘关系最近(图 5)。



注: A. 结构域分析; B. 蛋白二级结构预测; C. 磷酸化位点预测; D. 蛋白跨膜结构域预测。

Note: A. Secondary structure prediction; B. Phosphate site prediction; C. Transmembrane domains prediction; D. Conservative domain prediction.

图4 *GmNRT1.5A* 蛋白生物信息学分析

Fig. 4 Bioinformatics analysis of *GmNRT1.5A* protein

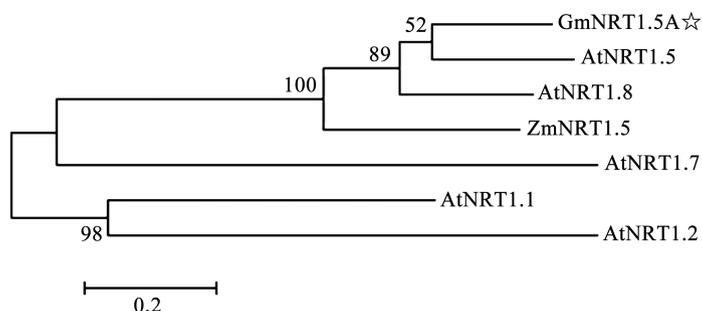


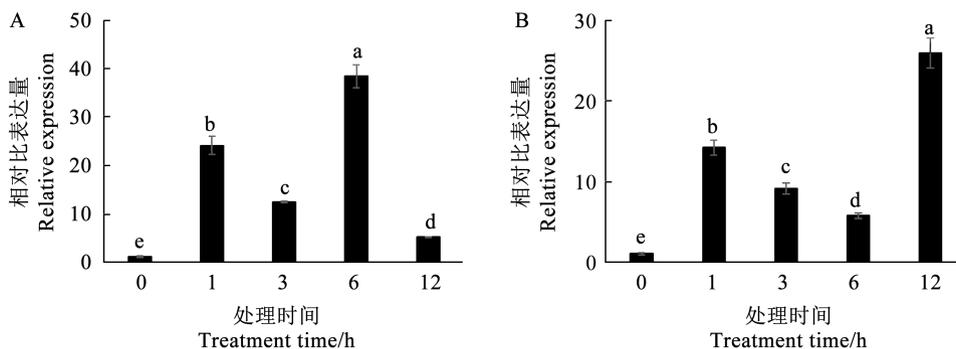
图5 大豆 *NRT1.5A* 基因与拟南芥 *NRT1s* 基因家族和玉米 *NRT1.5* 的亲缘关系

Fig.5 Genetic relationship between soybean *NRT1.5A* gene and *Arabidopsis NRT1s* and maize *NRT1.5* gene family

2.4 *GmNRT1.5A* 基因对逆境处理的响应

为验证 *GmNRT1.5A* 基因对盐胁迫的响应,重新对大豆幼苗进行不同时间点 NaCl 盐胁迫处理,取地下部样品提取 RNA 对 *GmNRT1.5A* 表达量进行验证的结果表明,盐胁迫处理 1,3,6 和 12 h 后,根

系中 *GmNRT1.5A* 基因表达迅速被诱导,6 h 的诱导倍数最高(图 6A)。此外,PEG 处理后对根系样品的表达量验证表明,与盐胁迫处理结果相同,PEG 处理不同时间后,根系中 *GmNRT1.5A* 基因表达迅速被诱导,其中,处理 12 h 后诱导倍数最高(图 6B)。



注: A. NaCl; B. PEG。误差线代表 3 次生物学重复间的标准差,不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: A. NaCl; B. PEG. Error bars represent the mean \pm SD of three biological replicates, different lowercase indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below.

图6 NaCl 和 PEG 处理不同时间后 *GmNRT1.5A* 基因在根系的相对表达量

Fig.6 Relative expression of *GmNRT1.5A* in root after NaCl and PEG treated for different times

2.5 *GmNRT1.5A* 基因组织表达分析及其对不同激素处理的响应分析

利用 qRT-PCR 检测 *GmNRT1.5A* 基因在大豆幼苗不同部位的表达模式的结果如图 7 所示, *GmNRT1.5A* 基因在大豆根系、茎、叶、芽、荚和籽粒中均不同程度表达,其中在根系、叶和籽粒中的表达量较高,而在茎中表达量较低。

分析不同植物激素,脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA_3) 和乙烯合成前体 (ACC) 处理对大豆幼苗根系中 *GmNRT1.5A* 基因表达的影响结果表明,在 ABA 处理 1,3,6,9 和 12 h 后 *GmNRT1.5A* 基因的表达在根系均显著上调(图 8A)。与 ABA 处理相同,乙烯合成前体 (ACC) 处理后 6 h,根系中 *GmNRT1.5A* 基因的表达被显著诱导(图 8B)。与 ABA 和 ACC 处

理相反,赤霉素 (GA_3) 处理不同时间后,根系中 *GmNRT1.5A* 基因的表达显著下调(图 8C)。

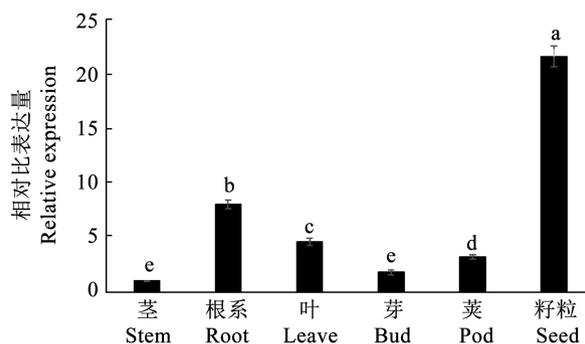
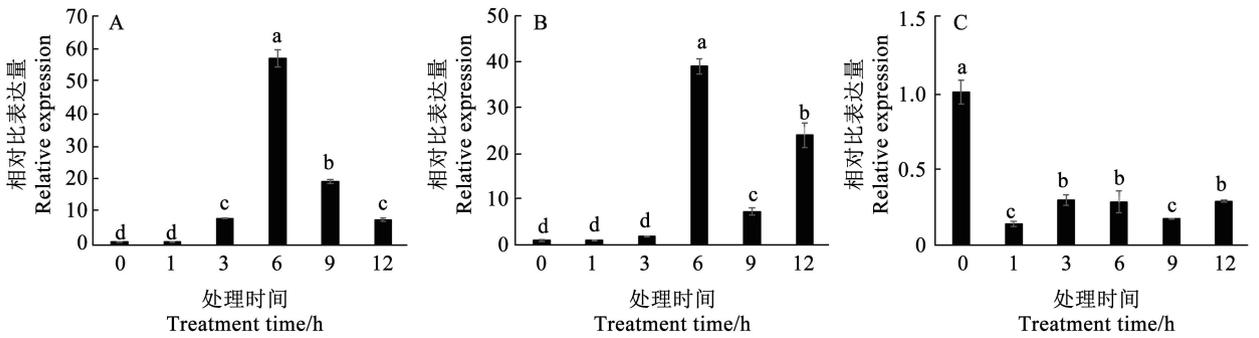


图7 *GmNRT1.5A* 基因在不同组织中的表达分析

Fig.7 Expression analysis of *GmNRT1.5A* gene in different tissues



注: A. ABA; B. ACC; C. GA₃。地上部和地下部单独分析显著性差异。

Note: A. ABA; B. ACC; C. GA₃. The significant difference between root and shoot were analyzed separately.

图8 不同激素处理下 *GmNRT1.5A* 基因表达分析

Fig. 8 Expression analysis of *GmNRT1.5A* under different hormone treatments

3 讨论

目前, NRT 在越来越多物种中被鉴定, 关于其功能研究也日益明确, 但目前对其功能的研究主要集中在 NO₃⁻ 吸收与转运方面, NRTs 对盐胁迫的响应报道较少。通过对盐胁迫处理不同时间点大豆根系转录组数据进行分析, 筛选出 8 个在 4 个处理时间点 (1, 3, 6 和 12 h) 均响应盐胁迫处理的差异表达 NRTs 基因, 其中有 7 个为 NRT1s 家族基因, 只有 *GmNRT2.4* 为 NRT2s 家族基因, 且 8 个基因中有 6 个基因的表达受盐胁迫诱导 (图 1)。这些研究结果表明, 盐胁迫处理主要影响大豆 NRT1s 家族基因的表达, 且主要是诱导 NRTs 基因的表达。有趣的是, 目前在拟南芥、水稻和玉米中的研究结果表明, NRT1s 家族基因除了参与 NO₃⁻ 的吸收与转运外, 还参与 K⁺ 和 Cl⁻ 转运。比如 *OsNPF2.4* 和 *AtNRT1.5* 参与 K⁺、Cl⁻ 从根系到叶片的转运^[9]; *ZmNPF6.3* 和 *ZmNPF6.4* 可以转运 Cl⁻^[7]。这些研究结果表明, 大豆 NRT1s 家族基因可能通过转运 K⁺ 和 Cl⁻ 参与响应盐胁迫。拟南芥中 NRTs 的转录除了受 NO₃⁻ 调控外, 也受到多种非生物胁迫的影响。已有研究表明, 盐胁迫、干旱和重金属镉胁迫等逆境处理均能抑制 NRTs 基因表达^[29], 而盐处理主要促进大豆 NRT1 基因表达 (图 1)。推测大豆中的 NRTs 家族基因与拟南芥的功能可能不完全相同。通过对 8 个 *GmNRTs* 基因的启动子分析发现, 所有基因启动子上均含有多个植物激素或逆境胁迫应答元件 (图 2)。已有研究报道, 植物激素在盐胁迫响应过程中具有重要的作用^[30-31]。本研究筛选出来的 8 个 *GmNRTs* 基因中均含有多个植物激素调控位点, 因此推测这些 *GmNRTs* 基因在大豆响应盐胁迫过程中

发挥重要作用。

本研究克隆到受盐胁迫诱导上调最大的 *GmNRTs* 基因 *GmNRT1.5A* (图 3), 进化树分析表明, *GmNRT1.5A* 与 *AtNRT1.5* 同源性最高 (图 5)。与拟南芥不同的是, 大豆 NRT1.5 基因有两个, 分别命名为 *GmNRT1.5A* 和 *GmNRT1.5B*。*AtNRT1.5* 主要在靠近木质部的中柱鞘细胞膜上表达, 负责将 NO₃⁻ 运出中柱鞘细胞到木质部中^[10], 也可以作为质子耦合的 H⁺/K⁺ 反转运体介导拟南芥根部到冠部 K⁺ 的长距离运输^[13]。玉米 NRT1.5 主要在种子中高表达, 负责将硝酸盐转运到胚乳中, 调控种子发育^[16]。本研究中, *GmNRT1.5A* 在籽粒中表达量最高, 其次主要在根中表达 (图 7)。生物信息学分析表明, *GmNRT1.5A* 含有典型的硝酸盐转运蛋白保守结构域, 且含有多个磷酸化位点。跨膜结构预测结果表明 *GmNRT1.5A* 蛋白包含 12 个跨膜区, 推测定位在细胞膜上, 执行 NO₃⁻ 吸收或 K⁺ 转运功能。这些研究结果表明, 不同物种中 NRT1.5 的组织表达存在差异, *GmNRT1.5A* 可能具有多种功能, 根系中表达主要负责 K⁺ 的转运, 从而参与盐胁迫响应中, 同时又在大豆籽粒发育中发挥重要作用。推测 NRT1.5 在作物 NO₃⁻ 从根中往地上部籽粒中转运的过程中起重要的调控作用, 可以重点研究。此外, 拟南芥中的研究结果表明, NRTs 通过参与盐胁迫下 Cl⁻ 运输, 缓解盐胁迫对植物造成的伤害^[9]。因此推测, *GmNRT1.5* 可能通过调控 Cl⁻ 转运响应大豆盐胁迫。

植物激素信号在盐胁迫响应过程中起到十分重要的调节作用。已有研究表明, 多种植物激素通过其信号转导途径调控下游盐胁迫响应基因的表达, 广泛参与到渗透调节、离子平衡调控等盐胁迫

响应过程中,其中研究比较多的是植物激素脱落酸(ABA)^[32]。此外,关于赤霉素和乙烯参与盐胁迫响应的相关机制也被陆续报道^[33-34],而且已有研究报道,外源添加 ACC 和 GA₃ 处理可以通过调控油菜或水稻 *NRTs* 基因的表达参与植物氮素吸收与转运^[35-36]。但目前关于植物激素是否可以通过调控 *NRTs* 基因的表达调节盐胁迫响应鲜见报道。本研究通过分析 *GmNRT1.5A* 基因启动子发现,其上包含植物激素乙烯(ERE)和脱落酸(ABRE)应答元件,推测其响应脱落酸和处理。qRT-PCR 结果表明该基因的表达在脱落酸和乙烯处理后不同时间发生显著变化(图 8)、说明该基因受到激素的调控,可能参与了 ABA 和乙烯信号转导途径。拟南芥中的研究表明,盐胁迫会激活乙烯或者 JA 的产生,进一步激活其信号转导途径。EIN3/EIL1 可以直接结合到 AtNRT1.5 启动子上,抑制其表达^[31]。前期在大豆中的研究也证明了盐胁迫会诱导乙烯的产生^[37]。因此推测乙烯信号在大豆响应盐胁迫过程中发挥重要调控作用,值得深入研究。此外,本研究虽然未在 *GmNRT1.5A* 基因启动子上发现赤霉素结合位点,但赤霉素处理后不同时间点,*GmNRT1.5A* 基因的表达均显著下调,这一结果说明 *GmNRT1.5A* 也受赤霉素的调控。分析原因可能是,每个基因的启动子序列位置不一样,个别基因的启动子序列大于 2.0 kb。以上结果表明,*GmNRT1.5A* 基因可能通过植物激素信号途径参与大豆盐胁迫响应调控过程。前期的研究结果表明植物激素参与调控大豆盐胁迫响应^[36],但具体机制还不清楚,而且植物化学调控剂也经常被应用于盐碱地土壤改良。该研究结果表明,植物激素可能通过调控大豆 *NRT1.5A* 基因的表达,影响大豆根系对土壤氮素等营养元素的吸收与转运,从而调控不同生育期大豆植株生长,影响大豆对盐胁迫的敏感性。

目前关于大豆 *NRTs* 响应非生物胁迫逆境还鲜见报道。本研究通过分析前期盐胁迫转录组数据筛选到 8 个响应盐胁迫的 *GmNRTs* 基因,为今后研究大豆 *NRTs* 基因在盐胁迫响应过程中的功能提供宝贵的资源。同时,对 *GmNRT1.5A* 的克隆与分析可为进一步研究大豆 *NRTs* 基因的功能提供理论基础。

4 结论

本研究通过转录组分析筛选得到 8 个持续响应盐胁迫的大豆 *NRT* 基因,这些基因的启动子上含有

多个与逆境胁迫或植物激素应答相关的元件,推测它们可能参与大豆非生物胁迫应答。*GmNRT1.5A* 对盐胁迫响应程度最大,该基因编码的蛋白含典型的 NRT1s 保守结构域。qRT-PCR 分析结果显示,*GmNRT1.5A* 主要在籽粒和根系中表达,*GmNRT1.5A* 表达不仅受盐胁迫和干旱胁迫强烈诱导,还受到植物激素脱落酸和乙烯的正向调控,赤霉素的负向调控。因此,推测 *GmNRT1.5A* 可能是大豆盐胁迫响应的重要候选基因之一。

参考文献

- [1] 杨劲松. 中国盐渍土研究的发展历程与展望[J]. 土壤学报, 2008, 45(5): 837-845. (YANG J S. Development and prospect of the research on salt-affected soils in China[J]. Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(5): 837-845.)
- [2] KUMAR N, SOREN K R, BHARADWAI C, et al. Genome-wide transcriptome analysis and physiological variation modulates gene regulatory networks acclimating salinity tolerance in chickpea[J]. Environment and Experiment Botany, 2021, 187: 104478.
- [3] XING J P, CAO X R, ZHANG M C, et al. Plant nitrogen availability and crosstalk with phytohormones signalings and their biotechnology breeding application in crops[J]. Plant Biotechnology Journal, 2023; 1-23.
- [4] LERAN S, MUNOS S, BRACHET C, et al. *Arabidopsis* NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation[J]. Molecular Plant, 2013, 6(6): 1984-1987.
- [5] WANG W, HU B, YUAN D Y, et al. Expression of the nitrate transporter gene OsNRT1.1A/OsNPF6.3 confers high yield and early maturation in rice[J]. Plant Cell, 2018, 30(3): 638-651.
- [6] HU B, WANG W, OU S J, et al. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies[J]. Nature Genetics, 2015, 47(7): 834-838.
- [7] WEN Z Y, TYERMANS D, DECHORGNATA J, et al. Maize NPF6 proteins are homologs of *Arabidopsis* CHL1 that are selective for both nitrate and chloride[J]. Plant Cell, 2017, 29(10): 2581-2596.
- [8] WANG Y Y, CHENG Y H, CHEN K E, et al. Nitrate transport, signaling, and use efficiency [J]. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69: 85-122.
- [9] 袁青云, 贺薇, 苏会, 等. 植物硝酸根/多肽转运蛋白 NPF 家族功能研究进展[J]. 植物生理学报, 2022, 58(10): 1840-1850. (YUAN Q Y, HE W, SU H, et al. Research progress in nitrate/peptide transporter NPF family in plants [J]. Plant Physiology Journal, 2022, 58(10): 1840-1850.)
- [10] LIN S H, KUO H F, GANIVENC G, et al. Mutation of the *Arabidopsis* NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport[J]. Plant Cell, 2008, 20(9): 2514-2528.
- [11] LI J Y, FU Y L, PIKE S M, et al. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap

- and mediates cadmium tolerance [J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 1633-1646.
- [12] WANG Y Y, WANG R, ZHAO S, et al. Transporter NRT1.5/NPF7.3 suppresses primary root growth under low K⁺ stress by regulating the degradation of PIN-FORMED2 [J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 330.
- [13] LI H, YU M, DU X Q, et al. NRT1.5/NPF7.3 functions as a proton-coupled H⁺/K⁺ antiporter for K⁺ loading into the xylem in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2017, 29(8), 2016-2026.
- [14] CAI C, WANG J Y, ZHU Y G, et al. Gene structure and expression of the high-affinity nitrate transport system in rice roots [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(4): 443-451.
- [15] FENG H, YAN M, FAN X, et al. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2011, 62(7): 2319-2332.
- [16] WEI Y M, REN Z J, WANG B H, et al. A nitrate transporter encoded by *ZmNPF7.9* is essential for maize seed development [J]. *Plant Science*, 2021:110901.
- [17] 梁桂红, 华营鹏, 周婷, 等. 甘蓝型油菜 NRT1.5 和 NRT1.8 家族基因的生物信息学分析及其对氮-镉胁迫的响应[J]. *作物学报*, 2019, 45(3): 365-380. (LIANG G H, HUA Y P, ZHOU T, et al. Bioinformatics analysis and response to nitrate-cadmium stress of NRT1.5 and NRT1.8 family genes in *Brassica napus* [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45(3): 365-380.)
- [18] BASSETT C L, BALDO A M, MOORE J T, et al. Genes responding to water deficit in apple (*Malus × domestica* Borkh) roots [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14:182.
- [19] LIU R R, CUI B, LU X B, et al. The positive effect of salinity on nitrate uptake in *Suaeda salsa* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 166: 958-963.
- [20] FAN X, TANG Z, TAN Y, et al. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2026, 113(26): 7118-7123.
- [21] ZHAO Z Q, LI M D, XU W W, et al. Genome-wide identification of NRT gene family and expression analysis of nitrate transporters in response to salt stress in *Poncirus trifoliata* [J]. *Genes*, 2022, 13(7): 1115.
- [22] 孔伟伟, 韩燕, 刘译阳, 等. 盐胁迫对花生硝酸盐积累及信号转导的影响 [J]. *山东农业科学*, 2018, 50(6): 86-89. (KONG W W, HAN Y, LIU Z Y, et al. Nitrate accumulation and signal transduction under salt stress in peanut [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2018, 50(6): 86-89.)
- [23] YOU H G, LIU Y M, MINH T N, et al. Genome-wide identification and expression analyses of nitrate transporter family genes in wild soybean (*Glycine soja*) [J]. *Journal of Applied Genetics*, 2020, 61(4): 489-501.
- [24] YOKOYAMA T, KODAMA N, AOSHIMA H, et al. Cloning of a cDNA for a constitutive NRT1 transporter from soybean and comparison of gene expression of soybean NRT1 transporters [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1518(1-2): 79-86.
- [25] RANAMALIN B H R, BRUXELLES G L, BRADDON M, et al. Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*) [J]. *Planta*, 1998, 206(1): 44-52.
- [26] 张彦威, 刘国峰, 李伟, 等. 黄淮海地区大豆种质资源耐盐性鉴定 [J]. *山东农业科学*, 2018, 50(11): 33-36. (ZHANG Y W, LIU G F, LI W, et al. Identification on salt tolerance of soybean germplasms in Huang-Huai-Hai region [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2018, 50(11): 33-36.)
- [27] 王玉斌, 张彦威, 刘薇, 等. 大豆盐胁迫响应扩展蛋白基因的筛选及 *GmEXPA17a* 的克隆和表达分析 [J]. *山东农业科学*, 2022, 54(11): 11-18. (WANG Y B, ZHANG Y W, LIU W, et al. Screening of soybean salt stress responsive expansins genes and cloning and expression analysis of *GmEXPA17a* [J]. *Soybean Science*, 2022, 41(5): 580-587.)
- [28] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [29] ZHANG G B, YI H Y, GONG J M. The *Arabidopsis* ethylene/jasmonic acid-NRT signaling module coordinates nitrate reallocation and the trade-off between growth and environmental adaptation [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(10): 3984-3998.
- [30] COLEBROOK E H, THOMAS S G, PHILLIPS A L, et al. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(1): 67-75.
- [31] PENG J, LI Z, WEN X, et al. Salt induced stabilization of EIN3/EIL1 confers salinity tolerance by deterring ROS accumulation in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(10): e1004664.
- [32] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants [J]. *Cell*, 2016, 167(2): 313-324.
- [33] JIANG C F, BELFIELD E J, CAO Y, et al. An *Arabidopsis* soil-salinity-tolerance mutation confers ethylene-mediated enhancement of sodium/potassium homeostasis [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(9): 3535-3552.
- [34] ZHANG Y S, WANG Y B, XING J P, et al. Copalyl diphosphate synthase mutation improved salt tolerance in maize (*Zea mays* L.) via enhancing vacuolar Na⁺ sequestration and maintaining ROS homeostasis [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 12: 762736.
- [35] LEMAIRE L, DELEU C, LE D E, et al. Modulation of ethylene biosynthesis by ACC and AIB reveals a structural and functional relationship between the (KNO₃)-N-15 uptake rate and root absorbing surfaces [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(10): 2725-2737.
- [36] LI S, TIAN Y H, WU K, et al. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture [J]. *Nature*, 2018, 560(7720): 595-600.
- [37] 王玉斌, 刘薇, 张彦威, 等. 乙烯对大豆幼苗盐胁迫响应的调控机制研究 [J]. *大豆科学*, 2022, 41(5): 580-587. (WANG Y B, LIU W, ZHANG Y W, et al. Regulation mechanism in soybean seedling response to salt stress of ethylene [J]. *Soybean Science*, 2022, 41(5): 580-587.)