

分类号:

密 级: 公开

学 号:

单位代码: 10759

石河子大学

# 硕 士 学 位 论 文



## 盐地碱蓬 *SsNRT1.1* 转基因番茄抗盐性研究和 串叶松香草遗传转化体系的构建

学 位 申 请 人	王 潇 雨
指 导 教 师	祝 建 波
申 请 学 位 类 别	理 学 硕 士
专 业 名 称	生 物 学
研 究 领 域	生 物 化 学 与 分 子 生 物 学
所 在 学 院	生 命 科 学 学 院

中国·新疆·石河子

年 月

***SsNRT1.1* Gene salt resistance study and optimization of genetic transformation system of string leaf rosin grass**

A Dissertation Submitted to  
In Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of  
**Natural Science**

By

**Biochemistry and Molecular Biology**

Dissertation Supervisor: Prof. Zhu jianbo

August, 2021

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：



时间：2024 年 7 月 9 日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：



时间：2024 年 7 月 9 日

导师签名：



时间：2024 年 7 月 9 日

## 摘要

串叶松香草长期以来被当作优质牧草，其鲜叶中丰富有的超氧化物歧化酶（SOD）使串叶松香草具有广泛的生物活性。在新疆，由于盐碱化土地使得植物生长缓慢，严重制约了该物种在新疆干旱区的开发利用，也阻碍了其向其他地区推广种植。盐地碱蓬 *SsNRT1.1* 基因有明显的抗盐性，通过基因工程技术将 *SsNRT1.1* 转入串叶松香草中，以提高串叶松香草抗胁迫能力。

本论文利用在线网站分析 *AtNRT1.1* 和 *SsNRT1.1* 的蛋白质结构、理化性质，使用 MAGE-X 构建其系统发育树。通过基因工程技术成功构建 pCAMBIA2300-*AtNRT1.1*/pCAMBIA2300-*SsNRT1.1* 植物表达载体，采用农杆菌介导的遗传转化方法将 *AtNRT1.1* 基因和 *SsNRT1.1* 基因转化到番茄中并获得转基因番茄植株。测定盐胁迫条件的转基因番茄叶片的相对电导率，丙二醛含量（MDA），超氧化物歧化酶（SOD），脯氨酸含量（Pro）结果表明在 250mol/L 的 NaCl 处理下，*SsNRT1.1* 转基因番茄有明显的抗盐效果。

以串叶松香草子叶为外植体，通过调整激素配比，经卡那霉素的筛选，农杆菌浓度的调整等构建串叶松香草遗传转化体系，结果表明：MS+0.3mg/L NAA+1.2mg/L 6-BA 培养基可高效诱导愈伤组织和不定芽的分化，其分化率是 53.75%，霍格兰培养基可以在 15 天左右 100%诱导生根，形成再生植株。使用 pCAMBIA2300-*SsNRT1.1* 植物表达载体，利用根瘤农杆菌转化到串叶松香草中，结果显示以农杆菌 GV3101 为介导菌株，以子叶为转化外植体，3d 预培养时间和 2 天共培养时间、60mg/L 卡那霉素筛选浓度转化效果较好。在这种转化体系中，我们筛选到 3 株 *SsNRT1.1* 转基因植株，为后期提高串叶松香草抗胁迫能力的基因工程提供基础技术。

**关键词：***SsNRT1.1* ； 盐胁迫； 串叶松香草； 遗传转化

## Abstract

Stringing pine grass has long been used as a high quality forage grass, and the abundant superoxide dismutase (SOD) in its fresh leaves have a wide range of bioactivities. In Xinjiang, due to the slow growth of plants caused by the salinized land, it has seriously restricted the development and utilization of this species in the arid area of Xinjiang, and also hindered its promotion and planting to other areas. The SsNRT1.1 gene changed SsNRT1.1 to improve the stress resistance.

In this paper, the protein structure and physicochemical properties of AtNRT1.1 and SsNRT1.1 and its phylogenetic tree were analyzed using MAGE-X. The pCAMBIA2300-AtNRT1.1/ pCAMBIA2300-SsNRT1.1 plant expression vector was transformed into the AtNRT1.1 gene and the AtNRT1.1 gene and SsNRT1.1 gene and the transgenic tomato plants. The results of measuring the relative conductivity, malondialdehyde content (MDA), superoxide dismutase (SOD) and proline content (Pro) of transgenic tomato leaves under salt stress conditions showed that SsNRT1.1 transgenic tomato had significant salt resistance under 250 mol/L NaCl treatment.

With string rosin cotyledon for explants, by adjusting the ratio of hormones, by kanamycin screening, adjustment of agrobacterium concentration such as string rosin grass genetic transformation system, the results show that: MS+0.3mg/L NAA+1.2mg/L 6-BA medium can be efficient induction of callus and indefinite bud differentiation, the differentiation rate is 53.75%, hogland medium can be induced in 100% in 15 days root, form regenerated plants. Using the pCAMBIA2300-SsNRT1.1 plant expression vector and transformed into the results showed better transformation with Agrobacterium GV3101 as the mediating strain and colobulons as transformed explants, 3d pre-culture time and 2 days co-culture time, 60 mg/L kanamycin screening concentration. In this transformation system, we screened three SsNRT1.1 transgenes to provide the basic technology for the genetic engineering to improve the stress resistance of string moraceae in the later stage.

**Key words:** SsNRT1.1; salt stress; string leaf rosin; genetic transformatio

# 目录

摘要 .....	I
Abstract .....	III
目录 .....	IV
主要缩略词 .....	VI
第 1 章 文献综述 .....	1
1.1 土壤盐渍化 .....	1
1.2 盐碱地对植物和土壤的危害 .....	2
1.2.1 生理干旱 .....	2
1.2.2 离子毒害 .....	2
1.2.3 根系受损 .....	2
1.2.4 破坏土壤结构 .....	3
1.3 盐生植物简介 .....	3
1.4.1 盐生植物的分类 .....	3
1.3.2 盐地碱蓬 .....	4
1.3.3 盐地碱蓬响应盐胁迫的机制 .....	4
1.4 硝酸盐转运蛋白 (Nitrate transporter, NRT) 研究进展 .....	5
1.4.1 NRT1.1 在非生物胁迫中的研究进展 .....	7
1.4.2 SsNRT1.1 抗盐机制 .....	8
1.5 串叶松香草研究现状 .....	8
1.6 遗传转化体系 .....	9
1.7 本研究的目的是和意义 .....	10
第 2 章 植物表达载体的构建及分析 .....	14
2.1 材料、试剂和仪器 .....	14
2.1.1 实验材料 .....	14
2.1.2 实验试剂 .....	14
2.1.3 实验仪器 .....	14
2.2 实验方法 .....	15

2.2.1 盐地碱蓬 SsNRT1.1 和拟南芥 AtNRT1.1 生物信息学分析 .....	15
2.2.2 盐地碱蓬 SsNRT1.1 基因和拟南芥 AtNRT1.1 的查找和筛选 .....	错误! 未定义书签。
2.2.3 拟南芥总 RNA 的提取和盐地碱蓬 RNA 提取 .....	15
2.3 结果与分析 .....	21
2.3.1 盐地碱蓬 SsNRT1.1 和拟南芥 AtNRT1.1 生物信息学分析 .....	21
2.3.2 拟南芥 AtNRT1.1 和盐地碱蓬 SsNRT1.1 表达载体的构建 .....	25
第 3 章 转基因番茄的生理检测 .....	27
3.1 材料、试剂和仪器 .....	27
3.1.1 实验材料 .....	27
3.1.2 实验试剂 .....	27
3.1.3 主要仪器 .....	27
3.2 实验方法 .....	29
3.3 结果与分析 .....	33
3.3.1 植物表达载体转化根癌农杆菌 .....	33
3.3.2 番茄的遗传转化和移栽 .....	34
3.3.3 SsNRT1.1 和 AtNRT1.1 番茄植株生物学性状分析 .....	35
3.3.4 两种转基因番茄在盐胁迫中的表型分析 .....	36
3.4 讨论 .....	39
3.5 小结 .....	39
第 4 章 串叶松香草遗传转化体系的构建 .....	40
4.1 材料、试剂和仪器 .....	40
4.1.1 实验材料 .....	40
4.1.2 实验试剂 .....	40
4.1.3 实验试剂 .....	40
4.2 实验方法 .....	41
4.3 结果与分析 .....	44
4.3.1 串叶松香草再生体系的优化 .....	44
4.3.2 遗传转化的体系构建 .....	46
4.3.3 转基因 SsNRT1.1 串叶松香草的获得 .....	48
4.4 讨论 .....	49
4.5 小结 .....	50
第 5 章 研究结果、创新点和展望 .....	51
参考文献 .....	53
致谢 .....	错误! 未定义书签。

## 主要缩略词

英文缩写	英文名	中文名
AS	Acetosyringone	乙酰丁香酮
cDNA	complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
ddH <sub>2</sub> O	Distilled deionized H <sub>2</sub> O	去离子水
sgRNA	small guide RNA	小向导 RNA
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	脱氧核糖核酸
GUS	B -glucuronidase	B-葡萄糖苷酸酶
Kan	Kanamycin	卡那霉素
KT	Kinetin	激动素
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
MS	MS Murashige & salt mixture	MS 粉
CH	Casein Hydrolysates	水解酪蛋白
NAA	$\alpha$ -Naphthalene Acetic Acid	$\alpha$ -萘乙酸
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
Rif	Rifampicin	利福平
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms	单核苷酸多态性
T-DNA	Transferred DNA	转移 DNA
Tim	Timentin	特美汀
tRNA	Transfer RNA	转移核糖核酸
Hyg	Hygromycin-B	潮霉素-B
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	2,4-二氯苯氧乙酸
6-BA	6-Benzylaminopurine	6-苄氨基嘌呤
MT	Metallothionein gene	金属硫蛋白基因

## 第1章 文献综述

盐胁迫是植物生长过程中经常面临的一种非生物胁迫，特别是在干旱、半干旱以及滨海盐渍土地地区，土壤盐分过高对植物的生长发育构成了严重威胁<sup>[1]</sup>。随着全球气候变化的加剧，土壤盐渍化问题日益突出，对农业生产和生态环境造成了严重影响。因此，研究植物在盐胁迫下的生理生态响应机制、抗性基因的挖掘以及耐盐性育种技术的开发，对于提高植物在盐渍化土壤中的生存能力和农业生产的可持续发展具有重要意义。

植物在盐胁迫下会表现出一系列的生理生化变化。为了应对盐胁迫带来的危害，植物通过一系列复杂的分子机制来调节自身的生理生化过程。这些机制包括离子转运蛋白的调节、渗透调节物质的合成与积累、抗氧化系统的激活以及信号转导途径的调控等<sup>[2]</sup>。其中，离子转运蛋白在维持植物体内离子平衡方面发挥着关键作用，它们通过选择性地将钠离子和氯离子排出细胞或将其区隔至液泡中，以降低细胞质中的盐分浓度<sup>[3]</sup>。渗透调节物质如脯氨酸、甜菜碱等的积累则有助于维持细胞的渗透压，防止水分流失<sup>[4]</sup>。抗氧化系统的激活则能够清除活性氧物质，减轻氧化损伤<sup>[5]</sup>。信号转导途径的调控则涉及多种激素和信号分子的相互作用，它们共同构成了一个复杂的网络，以实现植物对盐胁迫的快速响应和适应<sup>[6]</sup>。

### 1.1 土壤盐渍化

近年来，随着分子生物学和基因组学技术的快速发展，越来越多的耐盐基因被发现和克隆出来。这些基因在植物耐盐性育种中具有重要应用价值。通过遗传转化技术将这些基因导入作物中，可以显著提高作物的耐盐性<sup>[7]</sup>，为在盐渍化土地上开展农业生产提供了新的途径。此外，随着高通量测序技术的应用，越来越多的植物耐盐性相关基因和调控网络公布出来，这为深入研究植物耐盐性的分子机制提供了有力工具<sup>[8]</sup>。

尽管我们在植物耐盐性研究方面取得了显著进展，仍有许多问题亟待解决。例如，不同植物种类和品种在耐盐性方面存在显著差异，其背后的遗传和分子机制尚不完全清楚；盐胁迫与其他非生物胁迫（如干旱、高温等）对植物生长发育的影响也需要进一步探讨<sup>[2]</sup>，以及，如何将现有的耐盐性研究成果有效地应用于农业生产实践中，提高作物的耐盐性和产量，也是一个亟待解决的问题。

全国范围内，土壤的盐碱化问题已经成为农业生产的主要障碍，而在新疆，大约有三分之一的耕地遭受了不同程度的盐碱化问题，新疆地区因其独特的地理环境和一些人

为因素，已经成为我国盐碱地面积最广、分布最广的区域。盐碱地广泛分布在除山地和沙漠之外的所有其他地方，特别是在南疆，盐碱化土壤大约占据了土地总面积的 90%以上<sup>[9]</sup>。因此，研究盐生植物在盐碱条件下的独特生存方式变得尤为关键<sup>[10]</sup>。

## 1.2 盐碱地对植物和土壤的危害

### 1.2.1 生理干旱

盐碱土可以引起植物的生理干旱，即由于土壤中可溶性盐分过多，使土壤渗透压增加，植物不能吸收水分而最终导致植物脱水死亡<sup>[11]</sup>。作物对水分的吸收主要依赖于根毛的渗透能力。盐生植物的渗透压通常超过 40 个大气压，而普通植物的渗透压则在 10~20 个大气压之间<sup>[14]</sup>。当植物的渗透压超过土壤溶液渗透压的两倍时，它们就能持续地从土壤中吸取水分。随着土壤中可溶性盐分的增多，土壤溶液的浓度也随之上升，这导致渗透压增大，从而使得作物对水的吸收变得更为困难<sup>[15]</sup>。当土壤溶液的渗透压超过作物根细胞的渗透压时，会产生所谓的“反渗透效应”，导致作物像腌制咸菜那样出现“生理脱水”并最终死亡<sup>[16]</sup>。

### 1.2.2 离子毒害

钠离子和氯离子可以直接对作物产生毒害作用，当植物吸收较多的钠离子和氯离子时，会改变细胞膜的结构和功能<sup>[1]</sup>，破坏叶绿素，导致光合作用急剧下降，使植物叶片黄化，气孔扩张大量失水，生长缓慢；由于盐分在植物体内的积累，使原生质体被破坏，蛋白质合成受到阻碍，从而使植物生长发育不良，严重时会造成植物死亡<sup>[12]</sup>。尤其是盐分过多还会阻止气孔保卫细胞中淀粉的形成，进而影响植物气孔关闭，水分散失加快，使植物发生枯萎<sup>[13]</sup>。

### 1.2.3 根系受损

盐碱的环境对植物的根系有直接的杀伤作用，强碱性的碳酸钠可以破坏作物体内的各种酶，影响新陈代谢，对作物幼根和幼芽有较强的腐蚀作用，造成作物不易生根，影响生长，导致作物根系死亡<sup>[6]</sup>。

### 1.2.4 破坏土壤结构

大量的钠离子进入土壤胶体表面，会把土壤胶体吸附的钙离子替换出来，导致土壤颗粒分散，破坏土壤结构，造成土壤板结，透气透水性差，导致植物生长不良出现植株矮小，叶边或尖端枯萎坏死等<sup>[13]</sup>。

## 1.3 盐生植物简介

盐生植物，它们又被称为盐土植物<sup>[51]</sup>。这些植物以其独特的生理和生态特性，可以在盐分浓度较高的环境中生存，盐生植物主要分布在沿海的重盐渍土地和内陆的盐沼地带，它们能够通过吸收和积累钠元素来抵抗干旱胁迫和其他逆境条件。这些区域的土壤富含可溶性钠盐，大多数植物无法正常生长<sup>[20]</sup>，而盐生植物通过细胞内的离子平衡和渗透调节使其能够在高盐环境中正常生长<sup>[52]</sup>。盐生植物还能够合成和积累一些特殊的渗透调节物质，如多元醇、氨基酸等，这些物质能够降低细胞内的渗透压，使植物能够在高盐环境中保持正常的水分吸收和代谢活动。盐生植物在形态和结构上也表现出对高盐环境的适应性。盐生植物根系发达，能够深入土壤吸收水分和养分<sup>[51]</sup>；叶片肥厚多汁，能够储存大量的水分和盐分；茎干坚韧有力，能够支撑植物在强风等恶劣环境中生长。它们能够防止土壤侵蚀、固定沙丘、改善土壤结构，为其他生物提供栖息地和食物来源<sup>[53]</sup>。同时，盐生植物还能够吸收和固定土壤中的重金属和有毒物质，对环境的净化起到重要作用。

### 1.4.1 盐生植物的分类

盐生植物，顾名思义，是一类能在高盐土壤环境中生长并完成其生活史的植物，根据不同的分类标准，盐生植物可以分为多个类型。

按照生理适应性，盐生植物可以分为稀盐植物、泌盐植物和拒盐植物。稀盐植物通过降低体内盐分浓度来适应高盐环境<sup>[54]</sup>；泌盐植物则通过特殊的生理机制，将体内多余的盐分排出体外，以保持体内盐分的平衡；而拒盐植物则通过细胞壁的特殊结构或其他机制，阻止盐分进入细胞内部。根据生态学特点：盐生植物可以分为旱生盐生植物、中生盐生植物和水生盐生植物<sup>[55]</sup>。旱生盐生植物适应于干旱和高盐的环境，具有强大的保水能力和抗盐性；中生盐生植物则生长在盐分含量适中、水分条件也适中的环境中；水生盐生植物则能在盐度较高的水域中生长<sup>[56]</sup>。还有一种常见的分类方法，是根据盐生植物对盐分的吸收和积累方式，将其分为真盐生植物和泌盐生植物。真盐生植物，如盐地碱蓬、盐角草等，它们能从土壤中吸收大量可溶性盐分并积聚在体内而不受害，原

生质对盐类的抗性特别强，细胞液浓度高，具有极高的渗透压，因此能从高盐浓度的土壤中吸收水分<sup>[13]</sup>。而泌盐生植物，如大米草、二色补血草等，它们也能从盐渍土中吸取盐分，但并不积存在体内，而是通过茎、叶表面的盐腺细胞将盐分排出体外<sup>[57]</sup>。

### 1.3.2 盐地碱蓬

盐地碱蓬，学名为 *Suaeda salsa*，是藜科碱蓬属一年生草本植物。它原产北美西部及南美北部，它富含营养，被认为是一种高品质的蔬菜和油料作物<sup>[47]</sup>。在我国北方沿海及内陆均有种植，以辽宁省东部滨海盐碱土地区最为集中。碱蓬的茎部是直立的圆柱形，其高度可以达到 30~100 厘米。2~3 朵带柄的花聚集在叶腋的短柄上，形成一个团伞状的结构。当花被进入果期时，它们会呈现出五角星的形状。碱蓬是一种典型的盐生植物，其种植方法相对简单，主要生长在东北、西北、华北、河南、山东、江苏和浙江等地区。目前我国对盐地碱蓬研究较多，而关于盐地碱蓬耐盐机理的报道很少。盐地碱蓬的生长与其在滩涂土壤中的盐分含量有着紧密的联系<sup>[48]</sup>：当土壤的盐分含量超出 0.3% 时，盐地碱蓬能够健壮地生长；当盐的含量处于 0.4%~1% 的范围内时，盐地碱蓬整株植物展现出黄绿、翠绿或深绿色的生物学性状，其株体显得高大且茂盛，而叶片则显得纤细；当盐的含量在 1%~1.6% 的范围内时，盐地碱蓬的茎和叶子中的液泡组织会生成更多的甜菜红素<sup>[49]</sup>，叶子展现出浅红、赤红和紫红等不同的颜色。这种植物形态上的变化与盐碱土的 pH 和盐分有关，随着盐分含量增加，盐地碱蓬地上部分逐渐变成了淡红色，根系则呈黄色或黄绿色，并向周围蔓延扩展，最终导致死亡。随着时间的推移，植物的高度逐渐减小，20 厘米左右或更低，叶子的形态也从细长变为短粗，这使得它们能够吸收和储存大量的水分，以解决在盐渍环境下由于吸水困难导致的水分不足问题<sup>[50]</sup>。

### 1.3.3 盐地碱蓬响应盐胁迫的机制

盐地碱蓬作为一种真盐生植物，具有显著抗盐性，这主要得益于其盐胁迫响应机制。

从生理角度看，盐地碱蓬的叶子结构会随着盐的浓度上升而经历适应性变化。这种适应性变化是通过对其形态、组织和器官进行一系列改变来实现的<sup>[48]</sup>。由于盐地碱蓬细胞内液泡数量增多、细胞质膜变薄，导致了渗透调节物质含量上升。气孔在单位面积上的数量有所减少，气孔的大小缩小，角质层变得更厚，植物在受到盐分压力时减少水分损失<sup>[58]</sup>。盐的浓度逐渐上升，储存水分的组织变得更加厚实，盐地碱蓬的肉质也会变得更加坚硬，这有助于植物在受到盐分胁迫时保持水分的稳定<sup>[59]</sup>。

盐地碱蓬通过调控基因的表达来响应盐胁迫。例如，在盐胁迫的条件下，盐地碱蓬的液泡 H-ATPase B 亚基和 c 亚基的表达上调，提高液泡 H-ATPase 的活性，为盐地碱

蓬叶片液泡  $\text{Na}^+$  的区域化提供动力, 提高碱蓬植株的耐盐性<sup>[58]</sup>。碱蓬株体内存在着影响信号通路调节植物激素代谢的蛋白质、酶以及其他生物大分子物质, 进而对盐生植被的生长发育起到一定的促进作用, 盐地碱蓬会生成如  $\text{IP}_3$  和活性氧分子等第二信使。这些第二信使能够调节细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  水平, 触发蛋白磷酸化酶的级联反应, 直接或间接地促使与盐胁迫相关的基因表达。

盐地碱蓬在高盐环境下, 能够调控离子的吸收和转运。不同浓度的  $\text{NaCl}$  和  $\text{KCl}$  处理会让盐地碱蓬植株体内地上部  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  的含量发生变化<sup>[46]</sup>。当  $\text{NaCl}$  的浓度较高时, 盐地碱蓬体内地上部分的  $\text{Na}^+$  含量会明显下降, 但  $\text{KCl}$  的浓度较高时, 地上部分的  $\text{K}^+$  含量会明显上升, 同时,  $\text{Na}^+$  的含量则会下降。这种离子选择性的吸收和转运有助于盐地碱蓬维持细胞内外的离子平衡<sup>[47]</sup>, 减少盐胁迫对细胞的伤害。

盐地碱蓬通过调节抗氧化酶活性来响应盐胁迫。当  $\text{NaCl}$  的浓度较低时, 盐地碱蓬的 SOD 活性会明显上升, 但当  $\text{NaCl}$  和  $\text{KCl}$  的浓度较高时, SOD 活性则会下降<sup>[48]</sup>。无论是  $\text{NaCl}$  还是  $\text{KCl}$  处理, 都会使盐地碱蓬的 POD 活性显著增加。抗氧化酶活性的变化有助于盐地碱蓬清除因盐胁迫产生的活性氧物质, 保护细胞免受氧化损伤<sup>[64]</sup>。

#### 1.4 硝酸盐转运蛋白 (Nitrate transporter, NRT) 研究进展

氮肥投入约占肥料年施用总量的 60%, 是大多数非豆类作物种植中主要的生产投入。硝态氮是植物从土壤中获得的主要氮形态之一。关于植物如何从周围环境中获取硝态氮, 以及如何将硝态氮有效地分配到不同的植物组织中以响应环境变化, 如何感知和传播硝态氮信号等方面取得了重大进展。

硝酸盐和铵盐是植物可以利用的两种主要的氮形式。在有氧条件下, 根系吸收的硝态氮在细胞质中, 经过硝酸还原酶转化为亚硝酸盐。亚硝酸盐在质体或叶绿体中由亚硝酸还原酶转化成铵盐<sup>[65]</sup>。对植物而言, 过量的亚硝酸盐和铵盐是有毒的, 植物需要协调土壤中氮的供应量、自身氮的需求量、根据土壤碳氮比, 调控氮的吸收。植物吸收的硝态氮可以储存在液泡中, 整合不同组织的氮供应量和需求信息, 调节氮代谢过程中酶的活性, 并在转录水平、转录后水平调节代谢通路上各种组分的丰度, 结合翻译后修饰调控代谢通路中各组分的活性<sup>[66]</sup>。大部分 NPF 蛋白家族都是低亲和的硝酸盐转运蛋白, 但 *AtNPF6.3* (*NRT1.1/CHL1*) 和 *OsNPF6.5* (*OsNRT1.1B*) 表现出对硝态氮的双亲和性<sup>[67]</sup>。拟南芥含有 53 个 NPF 家族基因, 而水稻则有 93 个。此外, 拟南芥的 *NRT1/PTR* 家族共有 53 个成员, 其中 12 个 (*AtNRT1.1~1.12*) 已被证实与硝酸盐的转运有关<sup>[53]</sup>, *AtNRT1.1* 是 NPF 家族中首个被确认的成员<sup>[54]</sup>, 而其中的拟南芥 *NPF6.3* (*NRT1.1*) 是高等植物中首个被克隆出来的硝态氮转运蛋白, 这是一个具有双亲和性的硝态氮转运蛋白<sup>[55]</sup>。在突变体中, 无论外界氮供应水平是高还是低, 吸收的硝态氮都会减少。在氮含量较高的环

境中, *NPF6.3* 会生成二聚体, 这种二聚体具有相对刚性的构造, 并且其亲和力较低, 转运速度也相对缓慢, *NPF6.3* 容易产生多肽链和分子内氢键等相互作用导致构象改变而使其失去稳定性, 从而引起蛋白质空间结构变化, 进而影响细胞功能。在氮含量较低的环境中, *NPF6.3* 的 Thr101 会发生磷酸化反应, 形成二聚体解聚, 这个结构具有很高的亲和力<sup>[57]</sup>。在植物中发现了许多通过调节蛋白质翻译后修饰来调控细胞内氮源、磷素吸收利用及信号转导等生理过程的转录因子, 它们参与着不同类型的细胞信号传导通路。*NPF4.6* (*NRT1.2*) 是一种单纯的低亲和性转运蛋白, 它是一个组成型表达, 同时也可以转运 ABA<sup>[58]</sup>。在植物体内硝态氮代谢中起重要作用。*OsNPF6.5* (*OsNRT1.1B*) 与拟南芥 *NRT1.1* 具有相同的起源<sup>[59]</sup>, 它是一种具有双亲和性的硝态氮转运蛋白。在硝态氮代谢过程中起重要的调控作用。*OsNPF6.5* (*OsNRT1.1B*) 参与了硝态氮的摄取以及地上和地下硝态氮的转移过程。籼稻和粳稻中该基因一个单碱基变异导致氨基酸置换, Thr327Met 使得籼稻和粳稻对硝态氮的吸收转运存在差异, 籼稻的氮肥利用率高于粳稻<sup>[75]</sup>。

*NRT1.5* 负责引导硝态氮在木质部的装载过程。在拟南芥突变体中, 地上部分的硝态氮有所减少, 同时地上和地下的硝态氮比例也有所下降, 木质部的汁液中硝态氮的含量也有所减少<sup>[61]</sup>。*NRT1.5* 基因在韧皮部薄壁细胞表达, 且其表达水平受到 Cd 的诱导, 在拟南芥突变体中表现出氮依赖的 Cd 敏感表型。*NRT1.5* 基因通过增加根中氮的存留量提升逆境抵抗能力<sup>[77]</sup>。*AtNPF7.2* 和 *AtNPF7.3* 表现出镉胁迫下的拮抗功能, 二者作用相反, 也体现出植物既要适应逆境又要协调生长, 需要功能上相关的不同基因进行调控和平衡<sup>[78]</sup>。*AtNPF2.3* 作用于盐胁迫下的硝态氮转运, 减少逆境引发的根部氮积累<sup>[79]</sup>。*AtNPF2.9* 介导了硝态氮的韧皮部装载, 负调控硝态氮的地上地下运输。在高氮条件下, 拟南芥突变体地上/地下硝态氮比值升高<sup>[80]</sup>。*AtNPF5.11*、*AtNPF5.12* 和 *AtNPF5.16* 定位在液泡膜, 使储存在液泡的硝酸盐流出, 以便将这些积累的硝态氮运输到地上部<sup>[81]</sup>。当外界缺氮, 通过表达 *AtNPF5.11*、*AtNPF5.12* 和 *AtNPF5.16* 基因使根中积累的氮减少。*OsNPF2.2* 作用于硝态氮的地上地下运输及液泡发育。在正常条件和缺氮条件下突变体表现出相反的氮分配表型, 突变体中液泡的发育也受到影响。*OsNPF2.4* 是水稻的一个低亲和硝态氮转运蛋白, 作用于硝态氮吸收和地上地下硝态氮的转运, 还影响氮的再利用, 间接影响钾的地上地下分配<sup>[82]</sup>。*NPF8.9* (*OsNRT1*) 有两个不同剪接形式的转录本, *NPF8.9b* 有六次跨膜结构, 蛙卵异源表达系统确定其有 0.25mM 硝酸盐吸收活性, 过表达 *NPF8.9a* 和 *NPF8.9b* 可以增加植株地上干重。*AtNPF6.2* (*NRT1.4*) 介导了硝态氮在叶柄的储存<sup>[83]</sup>, 该基因在叶柄和叶片中脉高表达, 突变体中叶柄的硝态氮减少, 叶片更宽大。*AtNPF6.2* (*NRT1.4*) 基因使硝态氮储存在叶柄、叶脉, 进而调控叶片硝态氮稳态, 影响叶片发育<sup>[80]</sup>。*AtNPF1.1* (*NRT1.12*) 和 *AtNPF1.2* (*NRT1.11*) 将硝态氮分配到正在发育的组织, 在突变体中, 完全展开的叶片氮积累量高, 即使增加了土壤氮供应, 突变

体新生叶的硝酸盐仍然较少<sup>[84]</sup>。*AtNPF1.1* (*NRT1.12*) 和 *AtNPF1.2* (*NRT1.11*) 基因将硝态氮转入主脉韧皮部, 使木质部流向韧皮部的氮被新叶再利用。*AtNPF2.13* (*NRT1.7*) 作用于缺氮条件下硝酸盐向新叶的运输。缺氮时, 老叶的氮源流向新叶, 在突变体中老叶表现出氮积累<sup>[85]</sup>。缺氮时该基因的功能更为重要, 相应地降解 *AtNPF2.13* 的 E3 泛素连接酶 *NLA* 会在缺氮时受到 *miR827* 的抑制, 使得 *AtNPF2.13* 可以在缺氮时将硝态氮转入新叶<sup>[84]</sup>。

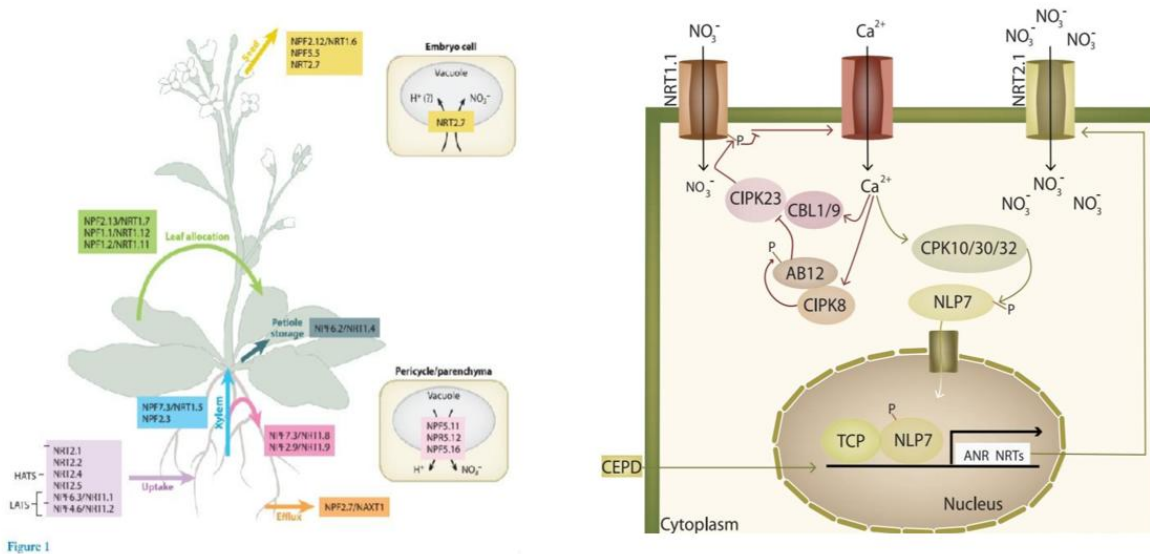


图 1-1 NRT 机制研究

Figure Figure 1-1 Mechanistic study of the NRT

#### 1.4.1 *NRT1.1* 在非生物胁迫中的研究进展

*NRT1.1* 作为硝酸盐转运蛋白, 在非生物胁迫中扮演着重要的角色。*NRT1.1* 在非生物胁迫中的研究进展涉及多个方面。

*NRT1.1* 为双亲和性硝酸盐转运体, 它能够使植物在不同浓度的硝酸盐环境正常生长, 在非生物胁迫条件下, 土壤盐渍化、干旱等, 植物对硝酸盐的吸收和利用受到严重影响<sup>[86]</sup>。*NRT1.1* 基因使植物能够在这些胁迫条件下更有效地吸收和利用硝酸盐, 增强植物的抗逆性<sup>[87]</sup>。

*NRT1.1* 作为硝酸盐的信号感受器, 能够感应外界硝酸盐浓度的变化, 在非生物胁迫条件下, 植物通过 *NRT1.1* 感应硝酸盐信号, 进而调节自身的生长和代谢过程, 以适应胁迫环境。*NRT1.1* 还显示出生长素转运活性<sup>[88]</sup>。*NRT1.1* 通过调控生长素的转运, 植物可以在胁迫条件下维持正常的生长和发育。*NRT1.1* 对非生物胁迫进行应答调控<sup>[89]</sup>。在土壤涝渍等灾害的低氧胁迫下, 植物通过 *NRT1.1* 调节自身的代谢和生长过程, 以适

应低氧环境。这种应答调控机制使得植物能够在非生物胁迫条件下保持一定的生长能力<sup>[90]</sup>。*NRT1.1* 在非生物胁迫中的，还与其他逆境响应蛋白或信号的互作，在胁迫环境下，植物需要多种基因和蛋白协同工作<sup>[91]</sup>。*NRT1.1* 作为关键基因，可能与其他逆境响应蛋白或信号分子形成复合物，共同调控植物响应非生物胁迫。随着基因编辑技术的发展，CRISPR-Cas9 系统，可以更深入地研究 *NRT1.1* 的功能。通过敲除、过表达或定点突变 *NRT1.1* 基因，我们可以了解其在非生物胁迫中的作用机制，以及如何通过调控 *NRT1.1* 来提高植物的抗逆性<sup>[92]</sup>。

#### 1.4.2 SsNRT1.1 抗盐机制

前期本实验已初步探究 SsNRT1.1 基因耐盐性具体工作机理。在正常条件下，NRT1.1 基因与 HINT1 基因的蛋白都在内质网表面，且两个基因存在蛋白互作的关系。在当植物受到盐胁迫刺激下，HINT1 蛋白进入细胞核，通过与 SOS1/2/3 作用来激活 SOS 信号通路。随着 SOS 信号通路被激活，相关的外排 Na<sup>+</sup>和吸收 K<sup>+</sup>的基因也被激活，使细胞内的 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>的比值开始升高，通过提高植物细胞内的 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>比值来实现增强植物的抗盐性的目的。

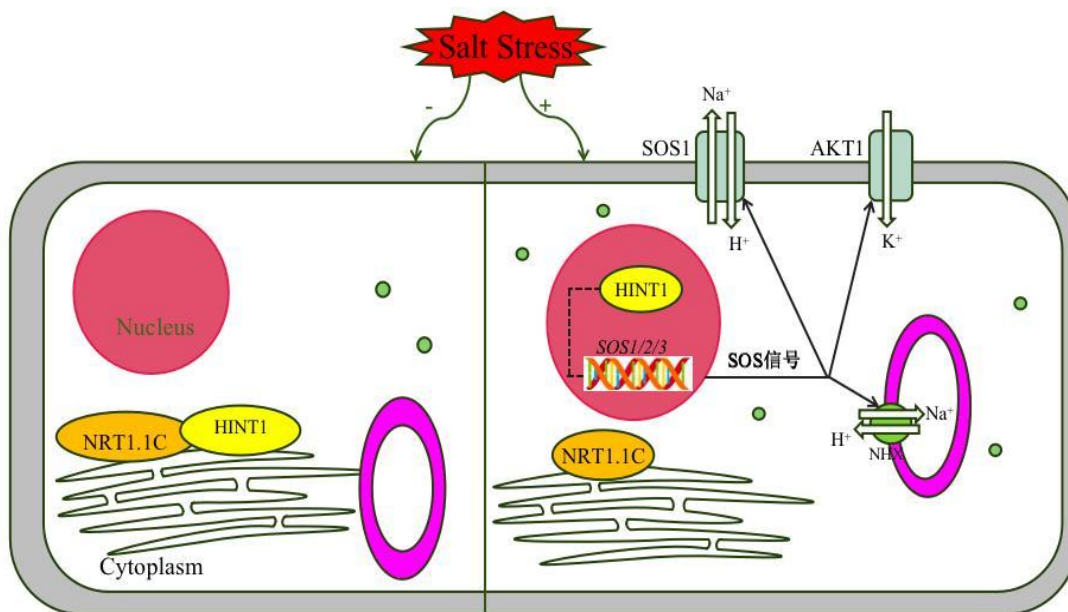


图 1-2 SsNRT1.1 耐盐性工作机理

Figure 1-2 Working mechanism of salt tolerance

#### 1.5 串叶松香草研究现状

串叶松香草，学名为 (*Silphiumper foliatum*L.)，属于菊科松香草属的一种植物。我国南方各省均有栽培。这是一种多年生的草本植物，其根系既发达粗壮，支根数量多，