©2025 Chin J Biotech, All rights reserved

·农业生物技术·

硝酸盐诱导的 GARP 类转录因子 AhNIGT1.2 调控花生结瘤的功能分析

李晓亮[1,2]，何海通[1,2]，何苏秦[1,2]，王路瑶[1]，张威[1,2]，孔照胜[1,2*]，王利祥[1,2*]

1 山西农业大学 农学院，山西 太谷 030801
2 山西省后稷实验室，山西 太原 030031

李晓亮，何海通，何苏秦，王路瑶，张威，孔照胜，王利祥. 硝酸盐诱导的 GARP 类转录因子 AhNIGT1.2 调控花生结瘤的功能分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 657-669.
LI Xiaoliang, HE Haitong, HE Suqin, WANG Luyao, ZHANG Wei, KONG Zhaosheng, WANG Lixiang. Functional analysis of a nitrate-induced GARP transcription factor AhNIGT1.2 in peanut nodulation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 657-669.

摘　要：花生是重要的经济及油料作物，富含丰富的蛋白质和油脂等，在我国广泛种植。花生能与根瘤菌共生形成根瘤，根瘤的固氮酶能将空气中 N_2 转化为自身可吸收利用的氨态氮。解析结瘤固氮对避免化肥过度施用、发展可持续农业具有积极意义。本研究通过生物信息学分析鉴定到一个主要在花生根瘤中表达的 NIGT 家族成员 *AhNIGT1.2*。进一步的时空表达分析表明 *AhNIGT1.2* 在根瘤中高表达，且显著响应高氮、低氮、高磷、低磷和根瘤菌处理，组化染色表明该基因主要在发育的根瘤中表达，并在成熟根瘤中和花生根系连接处表达。亚细胞定位表明 35S::AhNIGT1.2-GFP 融合蛋白定位于烟草表皮细胞的细胞核中。进一步的功能研究发现 *AhNIGT1.2*-OE 显著提高了花生的结瘤数量，*AhNIGT1.2*-RNAi 显著抑制花生根瘤数量，表明 *AhNIGT1.2* 正向调控花生结瘤。对 *AhNIGT1.2*-OE 根中硝酸盐转运和信号通路中的基因表达进行分析发现，*NRT1.2*、*NRT2.4*、*NLP1* 和 *NLP7* 的表达量显著降低，表明 *AhNIGT1.2* 可能通过影响硝酸盐转运和 *NLP1* 相关基因的表达进而调控花生的结瘤。对转化的 *AhNIGT1.2*-OE 和对照根进行转录组分析，发现过表达 *AhNIGT1.2* 会显著富集硝酸盐响应、结瘤因子信号通路、四萜类生物合成酶和类胡萝卜素生物合成等途径的差异表达基因。综上所述，*AhNIGT1.2* 可能通过影响硝酸盐转运、硝酸盐响应等通路调控花生的结瘤过程。本研究对解析氮磷营养调控豆科植物结瘤固氮的分子机制和创制在高氮环境高效结瘤固氮的豆科作物具有重要意义。

关键词：花生；*AhNIGT1.2*；硝酸盐转运；结瘤；转录组

资助项目：山西省自然科学基金面上项目(20210302123365)；国家重点研发计划(2021YFD1600600)；山西农业大学高层次人才启动经费(2021xG003, 2022xG0014)；山西省后稷实验室自主研发项目(202105D121010-23, 202204010910001-33)
This work was supported by the Shanxi Natural Science Foundation General Project (20210302123365), the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1600600), the Shanxi Agricultural University High-level Talent Start-up Funds (2021xG003, 2022xG0014), and the Independent Research and Development Project of Shanxi HouJi Laboratory (202105D121010-23, 202204010910001-33).
*Corresponding authors. E-mail: WANG Lixiang, lxwang@sxau.edu.cn; KONG Zhaosheng, zskong@sxau.edu.cn
Received: 2024-05-17; Accepted: 2024-06-03; Published online: 2024-06-03

Functional analysis of a nitrate-induced GARP transcription factor AhNIGT1.2 in peanut nodulation

LI Xiaoliang[1,2], HE Haitong[1,2], HE Suqin[1,2], WANG Luyao[1], ZHANG Wei[1,2], KONG Zhaosheng[1,2*], WANG Lixiang[1,2*]

1 College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China
2 Shanxi HouJi Laboratory, Taiyuan 030031, Shanxi, China

Abstract: Peanut, a major economic and oil crop known for the high protein and oil content, is extensively cultivated in China. Peanut plants have the ability to form nodules with rhizobia, where the nitrogenase converts atmospheric nitrogen into ammonia nitrogen that can be utilized by the plants. Analysis of nodule fixation is of positive significance for avoiding overapplication of chemical fertilizer and developing sustainable agriculture. In this study, *AhNIGT1.2*, a member of the *NIGT* family predominantly expressed in peanut nodules, was identified by bioinformatics analysis. Subsequent spatiotemporal expression analysis revealed that *AhNIGT1.2* was highly expressed in nodules and showed significant responses to high nitrogen, low nitrogen, high phosphorus, low phosphorus, and rhizobia treatments. Histochemical staining indicated that the gene was primarily expressed in developing nodules and at the connection region between mature nodules and peanut roots. The fusion protein AhNIGT1.2-GFP was located in the nucleus of tobacco epidermal cells. The *AhNIGT1.2*-OE significantly increased the number of peanut nodules, while *AhNIGT1.2*-RNAi reduced the number of nodules, which suggested a positive regulatory role of AhNIGT1.2 in peanut nodulation. The *AhNIGT1.2*-OE in roots down-regulated the expression levels of *NRT1.2*, *NRT2.4*, *NLP1*, and *NLP7*, which indicated that *AhNIGT1.2* influenced peanut nodulation by modulating nitrate transport and the expression of *NLP* genes. The transcriptome analysis of *AhNIGT1.2*-OE and control roots revealed that overexpressing *AhNIGT1.2* significantly enriched the differentially expressed genes associated with nitrate response, nodulation factor pathway, enzymes for triterpene biosynthesis, and carotenoid biosynthesis. These findings suggest that *AhNIGT1.2* play a key role in peanut nodulation by regulating nitrate transport and response and other related pathways. This study gives insights into the molecular mechanisms of nitrogen and phosphorus in regulating legume nodulation and nitrogen fixation, and sheds light on the development of legume crops that can efficiently fix nitrogen in high nitrogen environments.

Keywords: peanut; *AhNIGT1.2*; nitrate transport; nodulation; transcriptome

氮元素是调控植物生长发育最重要的大量元素之一[1]，因此，提高氮利用效率是确保作物高产稳产的重要保障。氮气两个原子之间的三键非常稳定[2]。豆科作物在氮饥饿条件下，与根瘤菌共生形成根瘤进行共生固氮，以满足在缺氮条件下的养分和生长发育需求[3]。据统计豆科作物可固定 5 000 万 t 氮素营养，约占全球生物固氮总量的 60%–70%，因此生物固氮也

是地球生态系统获取生物可利用氮的最重要的途径之一[4]。

豆科植物结瘤固氮受到诸多因素的调控，在现代农业生产中，由于氮肥过量施用，造成土壤氮素含量过高而抑制豆科植物天然的结瘤固氮能力，这个现象被称为“氮阻遏”效应[5-6]。揭示氮阻遏效应背后的分子机制，将为解除豆科植物的氮阻遏效应提供理论基础。研究表明，NIN 样蛋白(NIN-like proteins, NLPs)抑制 *NIN* 对三叶草中细胞分裂素反应 1 (cytokinin response 1, CRE 1)的转录激活，在硝酸盐抑制结瘤中发挥关键作用[7]。在蒺藜苜蓿中下调 *NLPs* 的表达能够降低硝酸盐对共生结瘤的抑制，*NLP* 能通过 PB1 结构域与 NIN 相互作用，通过核-质穿梭响应并传递硝酸盐信号[8]。苜蓿根瘤维管组织传递细胞特异表达的硝酸盐转运体 NPF7.6 (nitrate peptide family)，通过感知环境中硝酸盐浓度变化，介导其吸收与转运，调控豆血红蛋白基因表达来控制一氧化氮稳态及固氮酶活性，从而实现对根瘤发育与共生固氮的精细调控[9]。豆科植物具有适应性机制，可以根据土壤中氮素的含量调节结瘤。百脉根硝酸盐转运蛋白 2.1 (nitrate transporter 2.1, LjNRT2.1)的编码基因突变能减弱硝酸盐诱导的氮阻遏[10-14]。

磷饥饿抑制结瘤和固氮，导致豆科植物的结瘤数量、根瘤大小和固氮酶活性降低。因此，磷吸收和根瘤内的磷转运是豆科植物高效固氮和结瘤器官发生的关键。已有研究表明 *GmSPX5*、*GmSPX8*、*GmPT5*、*GmPT7* 和 *PHR1* (phosphate starvation response 1)等基因均参与调控豆科植物的结瘤和固氮过程[15-19]。GARP 型转录因子 NIGT1 (nitrate-inducible GARP-type transcriptional repressor 1)参与了氮和磷信号的整合，在低磷情况下，*AtNIGT1.2* 通过直接与 *PHT1*;*1* 和 *PHT1*;*4* 基因启动子的顺式作用元件结合上调磷转运蛋白基因的转录，并下调 NO_3^-转运蛋白编码基因 *NRT1.1* 的表达[20]，表明 NIGT1 是调节磷饥饿和氮饥饿反应的关键调节器。氮磷元素及其信号转导在豆科植物结瘤固氮过程中发挥关键调控作用，而目前关于 NIGT1 是否并如何调控豆科植物结瘤尚未见报道。本研究发现 *AhNIGT1.2* 主要在花生根瘤中表达并显著响应根瘤菌的侵染，*AhNIGT1.2* 通过调控硝酸盐转运和信号通路中的基因表达正调控花生结瘤，进一步的转录组分析表明 *AhNIGT1.2* 通过介导硝酸盐响应、结瘤因子信号通路、四萜类生物合成酶和类胡萝卜素生物合成等途径调控花生结瘤。本研究以期为解决豆科植物氮阻遏导致结瘤固氮能力下降问题提供帮助。

1 材料与方法

1.1 植物材料、主要试剂和质粒载体

本研究中所用的花生(*Arachis hypogaea* L.)、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、根瘤菌 CCBAU.051107 (GenBank 登录号：GCA_900116675.1)均来源于山西农业大学后稷实验室，花生种植在温度 24–27 ℃、湿度 60%、光周期为光照 16 h/黑暗 8 h 的人工气候室。克隆高保真酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司，*Hin*d III、*Bam*H I、*Xba* I、*Kpn* I、*Bas* I 等限制性内切酶和 T4 DNA Ligase 等购自 New England Biolabs 公司，凝胶 DNA 回收及质粒提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司，大肠杆菌感受态(*Escherichia coli*) DH5α、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 和发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) K599 等菌株均来自上海唯地生物技术有限公司。本研究所使用的超表达载体 pUBI-GFP-4×Myc、沉默载体 pK7WG2D、pEarleygate101-GFP 载体、pMDC162 载体均保存于山西农业大学后稷实验室。

1.2 多序列对比遗传进化树分析

利用 Phytozome 网站对花生(*Arachis hypogaea*

L.)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、大豆(*Glycine max*)、玉米(*Zea mays* L.)和苜蓿(*Medicago sativa* L.) 6 种作物的 NIGT1 氨基酸序列进行比对，利用 TBtools 进行遗传进化树绘制，计算采用邻接法(neighbor-joining method)，1 000 个 bootstrap 重复。

1.3 *AhNIGT1.2* 的 CDS 及启动子克隆构建

将花生种植于人工气候室，待 2 片真叶完全展开后接种根瘤菌(OD_{600}=0.08)，14 d 后分别取根、叶和根瘤样品，使用 TaKaRa 公司 TRIzol 试剂提取 RNA。使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司试剂盒 HiScript II One Step RT-PCR Kit (P611-01)进行反转录，将所得到的单链花生 cDNA 用于 *AhNIGT1.2* 基因的克隆。根据从 NCBI 中获取的 *AhNIGT1.2* 编码序列(coding sequence, CDS)和启动子序列(promoter)和 3′UTR 序列设计引物，引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，引物序列见表 1。扩增获得的 *AhNIGT1.2* CDS 及启动子片段分别连接到 pDONR207 质

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5′→3′)	Usage
AhNIGT1.2-F	ATGCAGCGACTGAAGACTATGATGG	Gene cloning
AhNIGT1.2-R	ATAGGCAGGGGAAGTAGTTGTGGT	Gene cloning
AhNIGT1.2-OE-F	ttgatgtgattacagtctagaATGCAGCGACTGAAGACTATGATGG	Overexpression
AhNIGT1.2-OE-R	gttaattaacccgctggtaccATAGGCAGGGGAAGTAGTTGTGGT	Overexpression
35S::AhNIGT1.2-GFP-F	ccaaatcgactctagaaagcttATGCAGCGACTGAAGACTATGATGG	Subcellular localization and RNAi
35S::AhNIGT1.2-GFP-R	ccactagtatttaaatgtcgacgATAGGCAGGGGAAGTAGTTGTGGT	Subcellular localization and RNAi
proAhNIGT1.2::GUS-F	ccaaatcgactctagaaagcttGAGTATTCTCTTTCAAACC	Histochemical staining
proAhNIGT1.2::GUS-R	ccactagtatttaaatgtcgacgGTCGCTGCATTCTTCAAAGAAGAGG	Histochemical staining
AhActin-F	GAAGTTCTCTTCCAACCATCC	RT-qPCR
AhActin-R	TTTCCTTGCTCATTCTGTCCG	RT-qPCR
AhNIGT1.2-RT-F	CGTCACACAAGCCATTGAAGCG	RT-qPCR
AhNIGT1.2-RT-R	CACCGCACCGCCTTTCTTATTG	RT-qPCR
AhNRT1.1-RT-F	TACCGATTCTTGGACAAGG	RT-qPCR
AhNRT1.1-RT-R	TGACACTGAGAATGTGCTC	RT-qPCR
AhNRT1.2-RT-F	GCCCTTTTGTATGCAAC	RT-qPCR
AhNRT1.2-RT-R	AGCCATATGCAGAACACAC	RT-qPCR
AhNRT2.4-RT-F	GCATGTTATAATGGGGATCATGG	RT-qPCR
AhNRT2.4-RT-R	GTTGCATACAAAAGGGCAAAGAC	RT-qPCR
AhNLP1-RT-F	GATTAACAGCCTCAAGTGCTTG	RT-qPCR
AhNLP1-RT-R	GATTAACAGCCTCAAGTGCTTG	RT-qPCR
AhNLP7-RT-F	GTCAAAGGAGGAACAACAACAACA	RT-qPCR
AhNLP7-RT-R	CTCTTCAAATTCACTGCCTCAAGA	RT-qPCR
AhNiR-RT-F	CCTGCTGTCTCTAACTTGCCA	RT-qPCR
AhNiR-RT-R	CCTCTGCGCATCTCTTAGCA	RT-qPCR

Lowercase base: Homologous arm used in enzyme digestion or gateway system.

粒与天津擎科生物技术有限公司 T 载体试剂盒 pClone007 Blunt Vector Kit 上，测序正确后分别连接到如下载体并分别构建 pUBI-GFP-4 (*AhNIGT1.2*-OE)、pK7WG2D-GFP (*AhNIGT1.2*-RNAi)、pEarleygate101-GFP (35S::AhNIGT1.2-GFP)和 pMDC162 (*proAhNIGT1.2*::GUS)载体。

1.4 *AhNIGT1.2* 的表达模式分析

对接种根瘤菌 CCBAU.051107 (OD_{600}=0.08) 14 d 后的花生根、叶和瘤等不同组织中 *AhNIGT1.2* 的表达模式采用实时荧光定量反转录 PCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)进行检测，使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司试剂盒 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix，检测仪器为 CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 公司)，数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。花生幼苗分别施加高氮(15.75 mmol/L KNO_3)、零氮(ddH_2O)、低氮(2.5 mmol/L KNO_3)、高磷(250 μmol/L KH_2PO_4)、低磷(5 μmol/L KH_2PO_4)和根瘤菌(OD_{600}=0.08)处理。分别于 0、1、3、6、12、24、48 h 取侧根，对不同时间段的不同处理样品的 *AhNIGT1.2* 表达量进行了 RT-qPCR 检测，*AhNIGT1.2* 的 RT-qPCR 引物序列见表 1。

组织表达模式检测：将构建好的 *proAhNIGT1.2*::GUS 电转至发根农杆菌 K599，并经过毛状根转化方式转入花生根系，在根瘤发育的不同阶段取样，用 GUS 染液进行染色。不同样品的 GUS 信号使用普通光学显微镜进行观察并拍照。

1.5 花生根毛转化

挑选均匀饱满完整的花生种子，萌发 2–3 d。制备好用于转化的农杆菌菌液(OD_{600}=0.80)，用无菌手术刀沿花生子叶节平行划伤 3–5 次制备外植体，置入侵染液中摇床(28 ℃, 100 r/min)振荡培养 1 h。侵染结束后，将外植体放入共培培养基中，在 28 ℃培养箱中避光培养 3–5 d。将共培好的外植体移至蛭石中培养 2 周后长出毛状根，用 LUYOR-3415 双波长荧光蛋白激发光源检测后，保留转基因的毛状根于蛭石中继续生长。

1.6 烟草亚细胞定位

将构建完成的 35S::AhNIGT1.2-GFP 重组融合蛋白质粒转入根癌农杆菌 GV3101 菌株。将 *AhNIGT1.2*-pEarleygate101-GFP、细胞核标记载体 pHBT-mCherry-NOS 菌液浓度调至 OD_{600}= 1.2–1.6，等量混匀 10 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸[2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, MES](pH5.6)。静置 3 h 后注射烟草，36–48 h 后用激光共聚焦显微镜观察 35S::AhNIGT1.2-GFP 的亚细胞定位。

1.7 转录组分析

分别取接种根瘤菌 1 d 和 5 d 后的 *AhNIGT1.2*-OE 以及空载(evaluation, EV)转化根，提取总 RNA。检测 RNA 样品的浓度和完整性，以确保后续数据分析的准确性，使用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行测序。对原始测序数据、基因长度和测序深度经过标准化分析之后，比较基因之间的表达量，进行组间差异基因分析，获得两组间差异表达基因。差异分析软件为 DESeq2，筛选阈值为$|\log_2 \text{fold change}|$>=1，*P*-adjust<0.05。

2 结果与分析

2.1 花生 NIGT 基因家族的生物信息学分析

为了分析花生的 NIGT 家族成员，以拟南芥 NIGT 氨基酸序列(TAIR 数据库登录号：AT1G68670.1)为模板在 Phytozome 数据库进行 BLAST，获取拟南芥、水稻、大豆、玉米、花生和苜蓿这 6 种植物的 NIGT 氨基酸序列进行比对并绘制进化树(图 1A)。为了鉴定可能参与调控花生结瘤的 NIGT 家族成员，利用 Phytozome

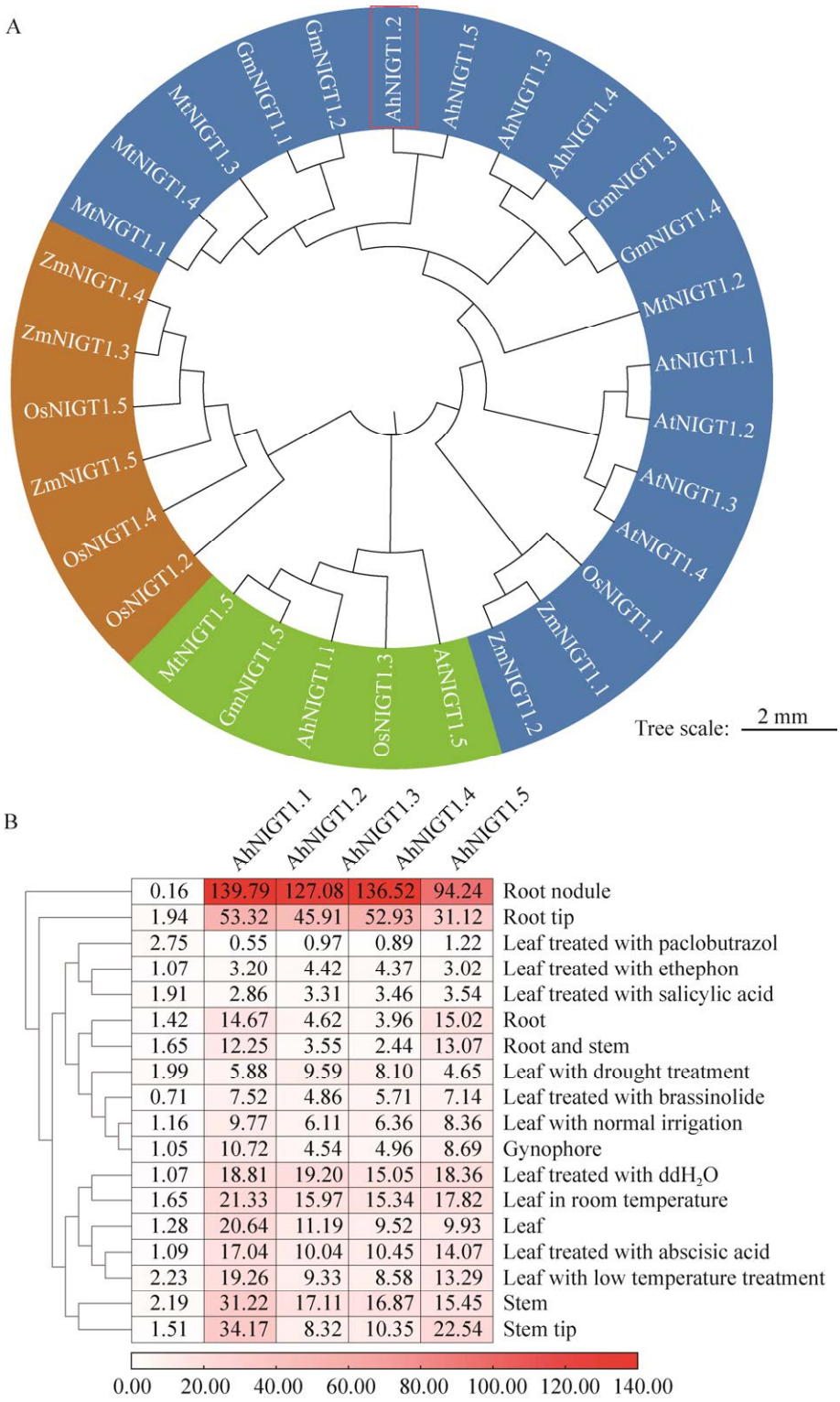

图 1　花生 NIGT 基因家族的生物信息学分析

Figure 1　Bioinformatic analysis of peanut NIGT gene family. A: Phylogenetic analysis of amino acid sequences of AhNIGT1.2 and NIGT proteins from other plants. B: Expression pattern of *AhNIGT1.2* in different tissues extracted from Phytozome.

数据库中可用的 RNA-seq 数据绘制 *AhNIGT*s 相对表达量热图(图 1B)。结果显示，*AhNIGT*s 在不同组织和不同时期均有表达，其中 *AhNIGT1.1* 在所有时期和组织中的表达均较低，*AhNIGT1.2* 在所有时期和组织中的表达均较高，而 *AhNIGT1.2* 在根和根瘤中表达都高于其他组织，表明其可能参与花生结瘤。

2.2 *AhNIGT1.2* 响应根瘤菌处理并在花生根瘤中高表达

为了探究 *AhNIGT1.2* 是否参与调控花生结瘤的过程，明确该基因在不同组织中的表达模式，接种花生根瘤菌 CCBAU.051107 (OD_{600}=0.08) 14 d 后，采用 RT-qPCR 对 *AhNIGT1.2* 在根、叶、瘤组织中的表达量进行了检测。结果显示，*AhNIGT1.2* 基因在花生根瘤中的表达量最高，而在叶和根中的表达量相对较低(图 2A)，表明 *AhNIGT1.2* 在花生结瘤和固氮过程中可能具有一定的功能。大多数参与调控豆科植物结瘤固氮的基因都能响应不同氮磷浓度处理和根瘤菌的侵染，因此分析了 *AhNIGT1.2* 在不同氮磷水平和根瘤菌处理条件下的表达模式分析，结果表明，*AhNIGT1.2* 在 1 h 内即对高氮(high nitrogen, HN)处理表现出显著的响应，表明其对氮素供应的变化极为敏感。此外，在低氮(low nitrogen, LN)、高磷(high phosphorus, HP)、低磷(low phosphorus, LP)以及根瘤菌(rhizobia, RHI)处理下，与处理前相比，*AhNIGT1.2* 的表达在 24 h 时被显著诱导(图 2B)。磷是植物体内不可缺少的营养元素，参与植物的根系生长和发育，而低氮是豆科植物结瘤固氮的前提条件，结合表达数据说明 *AhNIGT1.2* 极有可能参与植物氮磷营养信号及结瘤过程。

为了明确 *AhNIGT1.2* 在根瘤中表达模式，在根瘤菌接种 10、14、18、20、24、28 d 分别对转化 *proAhNIGT1.2*::GUS 的毛状根进行 GUS 染色分析。结果表明，在接种 10 d 转化根的中

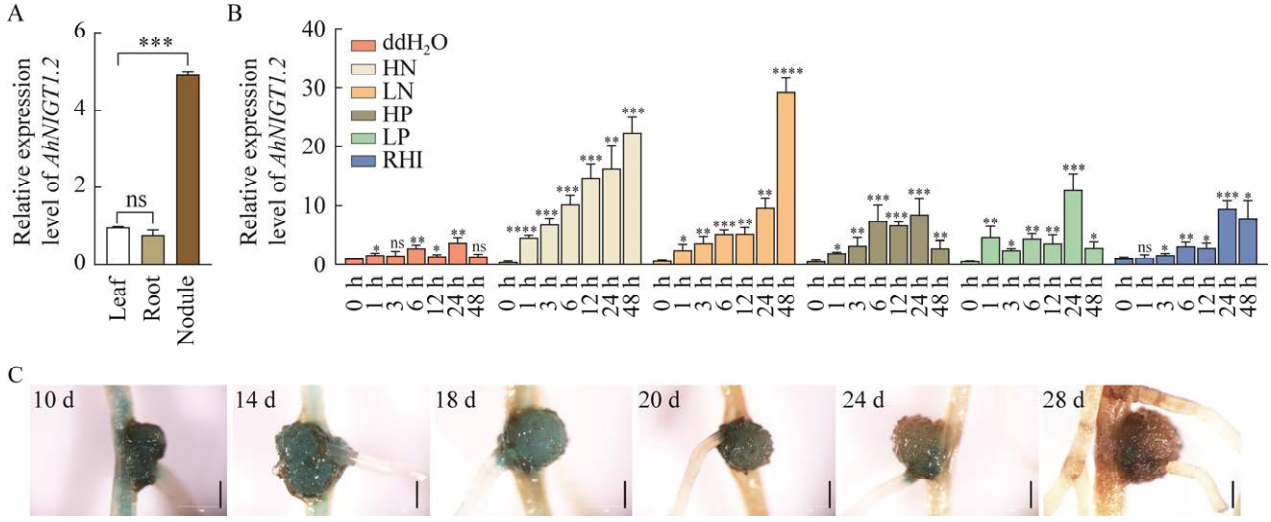

图 2 *AhNIGT1.2* 的时空表达模式和组织化学染色分析

Figure 2 Spatiotemporal expression pattern and histochemical staining analysis of *AhNIGT1.2*. A: Expression level of *AhNIGT1.2* in different tissues; B: Expression pattern of *AhNIGT1.2* under different treatment. HN: High nitrogen; LN: Low nitrogen; HP: High phosphorus; LP: Low phosphorus; RHI: Rhizobium. *n*=10. ns: Not significant; *P*>0.05; *: *P*<0.05; **: *P*<0.01; ***: *P*<0.001. C: Histochemical staining of *proAhNIGT1.2*::GUS expressed in peanut roots and nodules in different stages. Bar=1 mm.

柱鞘能够检测到 GUS 活性。随着根瘤的发育，GUS 信号在根系中的信号逐渐减弱，主要在根瘤中表达；当根瘤发育成熟后，GUS 信号主要在根/侧根和根瘤连接处表达(图 2C)。以上结果表明，在根瘤发育阶段 *AhNIGT1.2* 可能影响根瘤的发育，而在成熟根瘤内 *AhNIGT1.2* 可能影响氮素的转运。综上所述，*AhNIGT1.2* 极有可能参与花生的结瘤固氮过程。

2.3 花生 AhNIGT1.2 定位于细胞核中

已报道的 NIGT 主要定位于细胞核中以转录因子的形式发挥作用，为验证 AhNIGT1.2 是否也定位于细胞核中，构建了 35S::AhNIGT1.2- GFP 的融合表达载体。通过农杆菌转化将该载体导入本氏烟草叶片，用共聚焦显微镜观察该蛋白的亚细胞定位情况。结果表明，35S::AhNIGT1.2-GFP 融合蛋白主要定位于细胞核内，并与共转化的细胞核标记蛋白 35S::NLS-mCherry 重合，表明 AhNIGT1.2 和 NIGT 均定位于细胞核中作为转录因子发挥作用(图 3)。

2.4 *AhNIGT1.2* 正调控花生结瘤

为进一步鉴定 *AhNIGT1.2* 在花生结瘤固氮过程中的生物学功能，通过毛状根转化获得了 *AhNIGT1.2*-OE 及 *AhNIGT1.2*-RNAi 的转化根。如图 4A、4D 所示，与空载(EV)相比，*AhNIGT1.2* 在 *AhNIGT1.2*-OE 转化根中的表达量显著提升，在 *AhNIGT1.2*-RNAi 转化根中的表达量显著下降。而 *AhNIGT1.2*-OE 及 *AhNIGT1.2*-RNAi 的根系结构与对照相比并没有明显的变化。接种 14 d 后，每条 *AhNIGT1.2*-OE 根的平均结瘤数约为 18 个，而每条对照根平均产生 9 个根瘤，与对照相比 *AhNIGT1.2*-OE 根瘤数增加了 100% (图 4B、4C)。相反，每条 *AhNIGT1.2*-RNAi 根的平均结瘤数约为 4 个，而每条对照根平均产生 9 个根瘤，与对照相比 *AhNIGT1.2*-RNAi 根瘤数减少了 55.56% (图 4E、4F)。综上所述，*AhNIGT1.2*-OE 显著增加花生结瘤，*AhNIGT1.2*-RNAi 显著抑制花生结瘤，表明 *AhNIGT1.2* 是花生结瘤过程中的正调控因子。

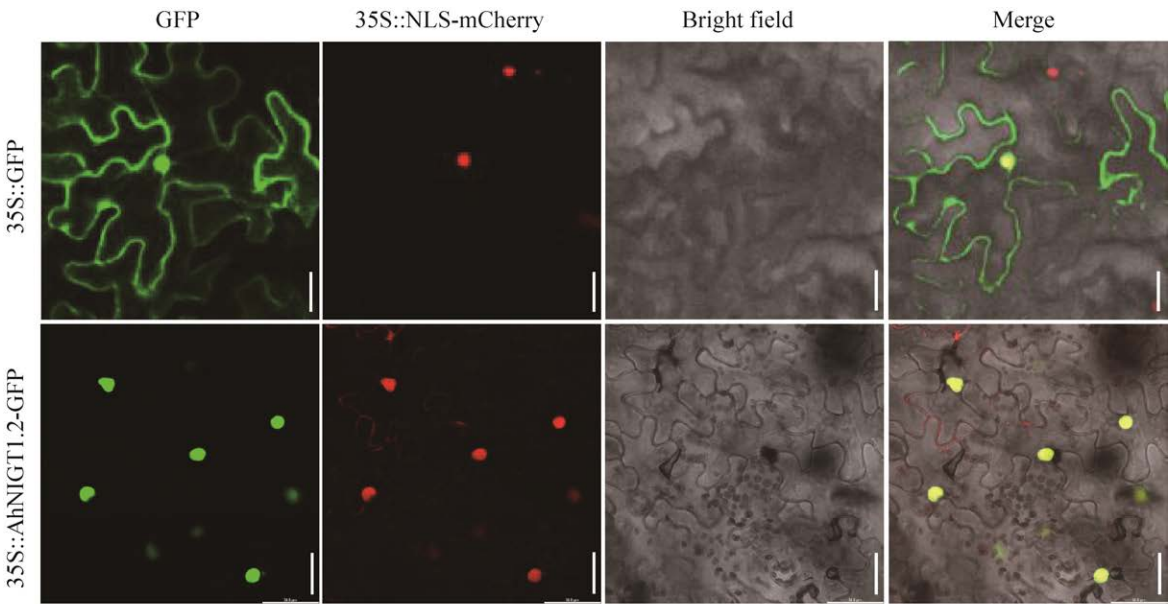

图 3 AhNIGT1.2 的亚细胞定位

Figure 3 Subcellular localization of AhNIGT1.2. GFP: Green fluorescent protein; mCherry: Red fluorescent protein (nuclei); Merge: Merged image of GFP, mCherry and bright field. Bar=70 μm.

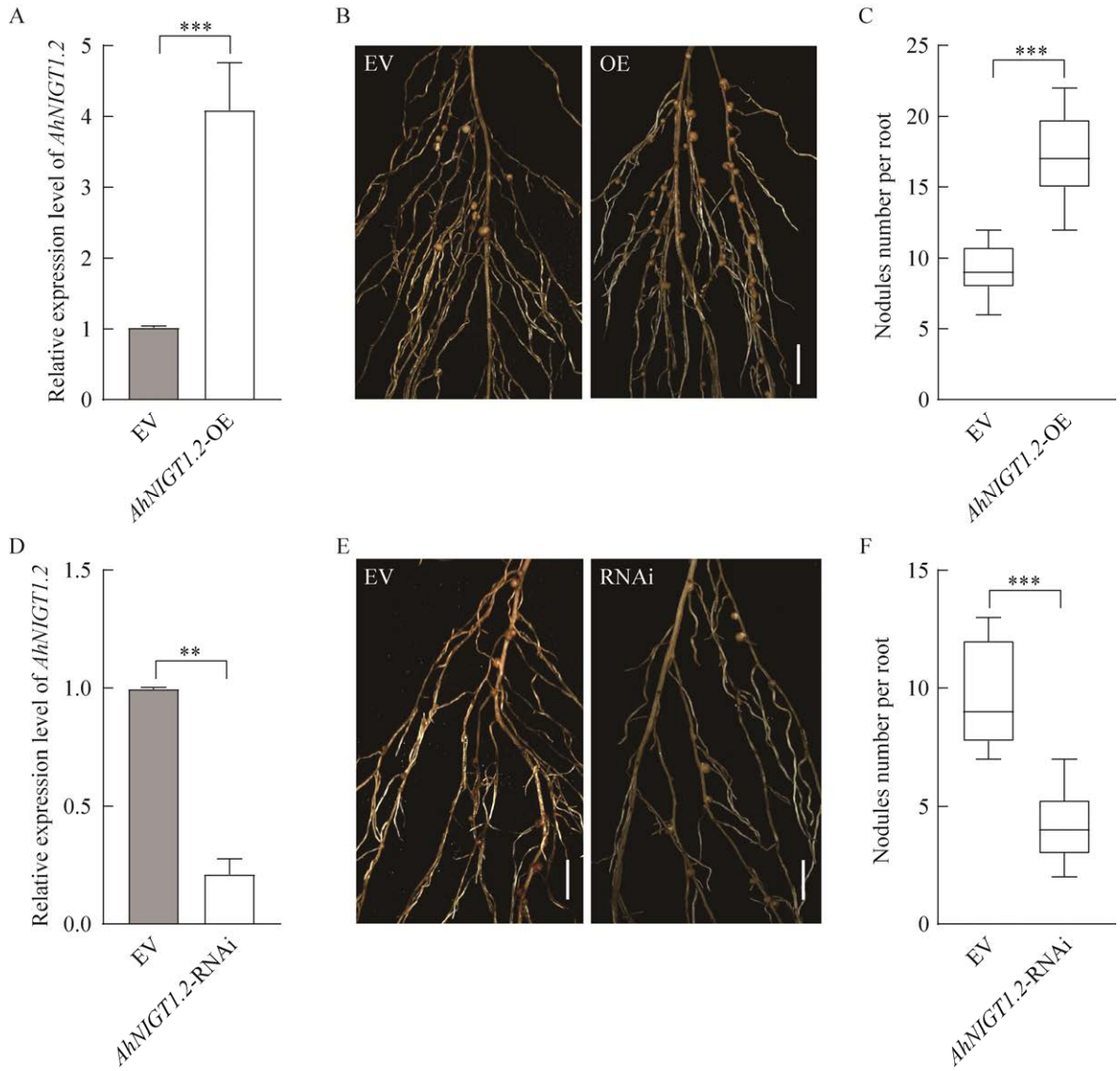

图 4　*AhNIGT1.2* 在花生结瘤中的功能分析

Figure 4　Functional analysis of *AhNIGT1.2* in peanut nodulation. A: Expression analysis of *AhNIGT1.2* in *AhNIGT1.2*-OE roots; B: Phenotype of *AhNIGT1.2*-OE roots; C: Number of nodules in AhNIGT1.2-OE roots; D: Expression analysis of *AhNIGT1.2* in *AhNIGT1.2*-RNAi roots; E: Phenotype of *AhNIGT1.2*-RNAi roots; F: Number of nodules in AhNIGT1.2-RNAi roots. Bar=2 mm. **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; $n=10$.

2.5　*AhNIGT1.2* 影响氮转运和氮信号转导相关基因介导花生结瘤

为了探究花生 *AhNIGT1.2* 在花生氮转运和氮信号转导中的作用，通过 RT-qPCR 检测了在 *AhNIGT1.2*-OE 和对照根中氮转运相关基因 *AhNRT1.1*、*AhNRT1.2*、*AhNRT2.4*、*AhNiR* 和氮信号转导通路关键基因 *AhNLP1*、*AhNLP7* 的表达。结果显示，与对照相比，*AhNRT1.2*、*AhNRT2.1*、*AhNLP1* 和 *AhNLP7* 在 *AhNIGT1.2*-OE 转基因根系的转录水平显著降低(图 5)，表明 *AhNIGT1.2* 可能通过调节氮转运和氮信号转导途径中相关基因的表达来调控花生的结瘤。

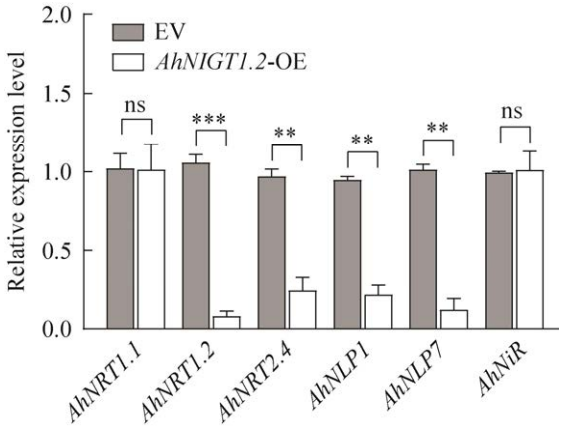

图 5 *AhNIGT1.2*-OE 转化根中氮转运相关基因的表达分析

Figure 5 Expression level of genes involved in nitrogen transportation in *AhNIGT1.2*-OE transformed roots. n=10. **: P<0.01; ***: P<0.001; ns: Not significant, P>0.05.

2.6 比较转录组揭示*AhNIGT1.2*调控花生结瘤的分子机制

为了明确 *AhNIGT1.2* 调控花生结瘤的机制，对接菌 1 d 和 5 d 的 *AhNIGT1.2*-OE 根系及空载根系进行比较转录组分析。在接菌 1 d 的根系中共鉴定出 3 345 个差异表达基因(differential expressed genes, DEGs)，包括 1 491 个上调基因(44.6%)和 1 854 个下调基因(55.4%)(图 6A)。在接菌 5 d 的根系中共鉴定到 9 486 个 DEGs，包括 4 561 个上调基因(48.1%)和 4 925 个下调基因(51.9%) (图 6C)。GO 富集分析表明接种 1 d 时的差异基因主要在“response to nitrate”“carotenoid biosynthesis”和“tetraterpenoid biosynthesis”等通路显著富集(图 6B)；接种 5 d 时的差异基因主要在“cell wall macromolecule”“aminoglycan metabolic”和“regulation of protein serine”等通路显著富集(图 6D)。进一步的分析表明 NRT 家族成员的表达受到 *AhNIGT1.2*-OE 的影响，在接种后 1 d 有 2 个 NRTs 表达下调(图 6E)，在接种后 5 d 有 3 个 NRTs 表达下调(图 6F)，进一步佐证了 *AhNIGT1.2* 通过影响氮转运相关基因的表达调节花生结瘤。除此之外，还发现 *AhNIGT1.2*-OE 影响了结瘤因子信号通路中的关键基因 *AhSYMREM*、*AhEFD*、*AhCyclops*、*AhHK*、*AhNSP1*、*AhCCamK* 等的表达(图 6G、6H)，表明 *AhNIGT1.2* 通过调节结瘤因子信号通路关键基因的表达进而影响花生结瘤。以上结果为初步解析 *AhNIGT1.2* 调控花生结瘤固氮的分子机制提供了重要的依据。

3 讨论与结论

花生是重要的豆科作物，是全球主要的油籽作物之一，与其他豆科植物物种相比，花生的固氮效率相对较低[21]。根瘤菌的成功侵染是根瘤共生的前提，大多数根瘤菌通过根毛卷曲和侵染线侵入。然而，在豆科植物中，约 25% 的物种采取与花生相似的“裂隙”侵染途径，于侧根基部的细胞间隙处完成侵入过程[22]。与模式豆类植物相比，花生结瘤的分子机制研究较少。NIGT1 家族蛋白在氮充足及氮饥饿条件下参与硝酸盐转运基因表达的调节，并在响应硝酸盐供应的转录调控网络中发挥着不可或缺的作用[23-24]。NIGT 基因家族在不同植物物种中具有进化保守性，表明其在硝酸盐信号转导过程中的重要性。研究不同植物中的 NIGT 基因可以揭示植物在进化过程中适应氮素环境变化的机制与途径，而尚未见关于 NIGT 调控豆科植物结瘤固氮的报道，本研究鉴定到的 *AhNIGT1.2* 主要在花生根瘤中表达，该基因显著响应根瘤菌的侵染，并通过介导氮转运和氮信号转导相关基因、豆科植物结瘤信号通路中关键基因的表达正调控花生结瘤。

豆科植物根瘤的形成和固氮是一个高耗能的生物学过程，因此豆科植物必须严格控制根瘤的数量，保证能量的高效分配[25]。因此低氮

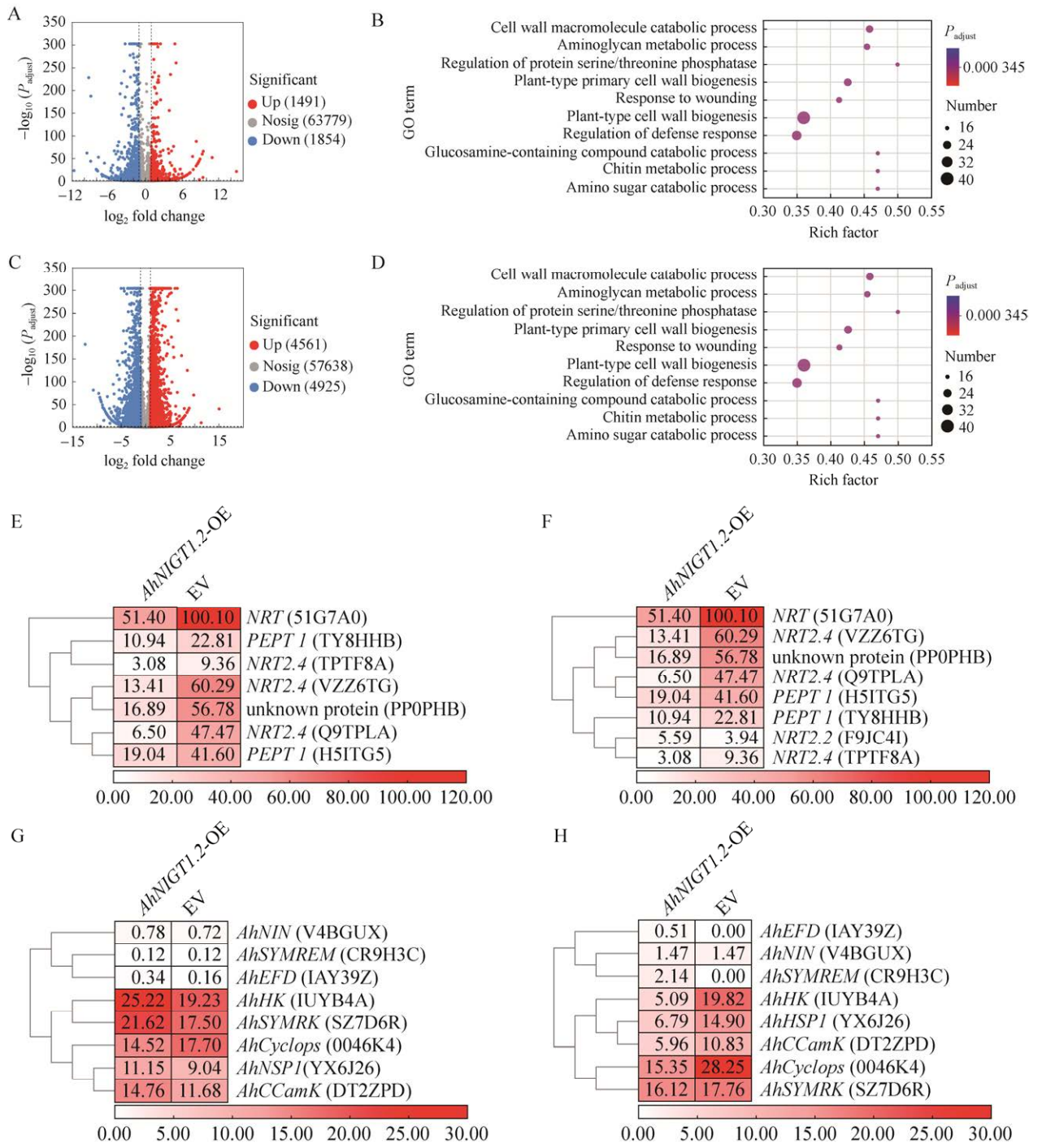

图 6　*AhNIGT1.2*-OE 与对照转录组差异比较分析

Figure 6　Identification of DEGs by comparative transcriptomic stusy between *AhNIGT1.2*-OE root and EV. Differentially expressed genes in *AhNIGT1.2*-OE transformed roots control 1 day (A) and 5 days (C) after inoculation; GO enrichment of differentially expressed genes in *AhNIGT1.2*-OE and EV transformed roots 1 day (B) and 5 days (D) after inoculation; Heat map showed the expression patterns of genes involved in symbiotic nodulation (E, F) and nitrate transport (G, H) in peanut roots 1 day and 5 days after inoculation, respectively.

条件是结瘤发生的前提，结瘤的数量和根瘤的固氮活性受到土壤氮素的可逆抑制造成了氮阻遏现象[26]。关于氮阻遏现象目前有亚硝酸盐毒性和碳饥饿这 2 种假说[27-28]。进一步解析氮阻遏发生的遗传基础将为解除豆科植物的“氮阻遏”效应提供帮助。已有的研究表明下调 *NLP1*、*NLP4*、*NPF7.6* 和 *NRT2.1* 会减弱硝酸盐诱导的氮阻遏[29-32]。然而这些基因在氮素吸收和转运过程中都发挥关键作用，敲除或者下调这些基因都可能影响植物的生长发育。本研究发现过表达 *AhNIGT1.2* 显著抑制 *AhNRT1.2*、*AhNRT2.1*、*AhNLP1* 和 *AhNLP7* 基因的表达，表明过表达 *AhNIGT1.2* 可能能够缓解对硝酸盐诱导的氮阻遏现象[7-9,14]。细胞分裂素在根瘤的发生和发育过程中发挥关键作用，在低硝酸盐浓度下，共生信号为细胞分裂素的诱导创造了有利的条件，进而促使根瘤的形成。相反，高硝酸盐对豆科根系的细胞分裂素积累和结瘤均有抑制作用。在细胞分裂素生物合成突变体对硝酸盐抑制根瘤发育、成熟和固氮表现出高度敏感性[6]。在 *NIGT* 敲除突变体中，细胞分裂素信号通路关键基因 *HK* 的表达显著下降，表明 NIGT 可能响应或者通过调控细胞分裂素信号转导参与调控花生结瘤。

除了调控氮素响应过程外，NIGT1/HHO/HRS1 转录因子还调控无机磷(Pi)吸收利用[33]。*NIGT1* 直接结合 *SPX1*、*SPX2* 和 *SPX4* 基因的启动子，促进植物积累花青素和磷酸盐转运体(phosphate transporter 1, *PHT1*)基因表达[34]。在缺 Pi 的情况下，*NTGT1* 是响应磷酸盐饥饿响应(phosphate starvation response，PSR)的主要调节因子[35]。因此，*NIGT1* 在调节氮磷平衡中发挥关键作用。Pi 吸收转运和磷饥饿信号通路中的关键基因 *GmSPX5*、*GmSPX8*、*GmPT5*、*GmPT7* 和 *PHR1* 等均参与调控豆科植物的结瘤和固氮过程。本研究发现 *AhNIGT1.2* 参与调控花生结瘤，进一步建立 NIGT 与 Pi 吸收转运和磷饥饿信号通路中的关键基因之间的调控关系，将完善 NIGT 调控豆科植物结瘤的调控网络。

REFERENCES

[1] ZHAO BY, JIA XQ, YU N, MURRAY JD, YI KK, WANG ET. Microbe-dependent and independent nitrogen and phosphate acquisition and regulation in plants[J]. The New Phytologist, 2024, 242(4): 1507-1522.

[2] OHYAMA T, FUJIKAKE H, YASHIMA H, TANABATA S, ISHIKAWA S, SATO T, NISHIWAKI T, OHTAKE N, SUEYOSHI K, ISHII S, FUJIMAKI S. Effect of nitrate on nodulation and nitrogen fixation of soybean[J]. Soybean Physiology and Biochemistry, 2011, 10: 333-364.

[3] SUZAKI T, YORO E, KAWAGUCHI M. Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria[J]. International Review of Cell and Molecular Biology, 2015, 316: 111-158.

[4] HERRIDGE DF, PEOPLES MB, BODDEY RM. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems[J]. Plant and Soil, 2008, 311(1): 1-18.

[5] WANG X, QIU ZM, ZHU WJ, WANG N, BAI MY, KUANG HQ, CAI CL, ZHONG XB, KONG FJ, LÜ PT, GUAN YF. The NAC transcription factors SNAP1/2/3/4 are central regulators mediating high nitrogen responses in mature nodules of soybean[J]. Nature Communications, 2023, 14: 4711.

[6] LIN JS, ROSWANJAYA YP, KOHLEN W, STOUGAARD J, REID D. Nitrate restricts nodule organogenesis through inhibition of cytokinin biosynthesis in *Lotus japonicus*[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 6544.

[7] FU MD, YAO XL, LI XL, LIU J, BAI MY, FANG ZJ, GONG JM, GUAN YF, XIE F. GmNLP1 and GmNLP4 activate nitrate-induced CLE peptides NIC1a/b to mediate nitrate-regulated root nodulation[J]. The Plant Journal, 2024, 119(2): 783-795.

[8] LIN JS, LI XL, LUO ZP, MYSORE KS, WEN JQ, XIE F. NIN interacts with NLPs to mediate nitrate inhibition of nodulation in *Medicago truncatula*[J]. Nature Plants, 2018, 4(11): 942-952.

[9] WANG Q, HUANG YG, REN ZJ, ZHANG XX, REN J, SU JQ, ZHANG C, TIAN J, YU YJ, GAO GF, LI LG, KONG ZS. Transfer cells mediate nitrate uptake to control root nodule symbiosis[J]. Nature Plants, 2020, 6(7): 800-808.

[10] YE JY, TIAN WH, JIN CW. A reevaluation of the contribution of NRT1.1 to nitrate uptake in *Arabidopsis* under low-nitrate supply[J]. FEBS Letters, 2019, 593(15): 2051-2059.

[11] YONG Z, KOTUR Z, GLASS ADM. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots[J]. The Plant Journal, 2010, 63(5): 739-748.

[12] ZHENG XJ, HE K, KLEIST T, CHEN F, LUAN S.

Anion channel SLAH3 functions in nitrate-dependent alleviation of ammonium toxicity in *Arabidopsis*[J]. Plant, Cell & Environment, 2015, 38(3): 474-486.
[13] RIVERAS E, ALVAREZ JM, VIDAL EA, OSES C, VEGA A, GUTIÉRREZ RA. The calcium ion is a second messenger in the nitrate signaling pathway of *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2015, 169(2): 1397-1404.
[14] LUO ZP, WANG J, LI FY, LU YT, FANG ZJ, FU MD, MYSORE KS, WEN JQ, GONG JM, MURRAY JD, XIE F. The small peptide CEP1 and the NIN-like protein NLP1 regulate NRT2.1 to mediate root nodule formation across nitrate concentrations[J]. The Plant Cell, 2023, 35(2): 776-794.
[15] ZHUANG QL, XUE YB, YAO ZF, ZHU SN, LIANG CY, LIAO H, TIAN J. Phosphate starvation responsive GmSPX5 mediates nodule growth through interaction with GmNF-YC4 in soybean[J]. The Plant Journal, 2021, 108(5): 1422-1438.
[16] XING XZ, DU H, YANG ZW, LI XH, KONG YB, LI WL, ZHANG CY. GmSPX8, a nodule-localized regulator confers nodule development and nitrogen fixation under phosphorus starvation in soybean[J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1): 161.
[17] CHEN LY, QIN L, ZHOU LL, LI XX, CHEN ZC, SUN LL, WANG WF, LIN ZH, ZHAO J, YAMAJI N, MA JF, GU M, XU GH, LIAO H. A nodule-localized phosphate transporter GmPT7 plays an important role in enhancing symbiotic N2 fixation and yield in soybean[J]. The New Phytologist, 2019, 221(4): 2013-2025.
[18] QIN L, ZHAO J, TIAN J, CHEN LY, SUN ZA, GUO YX, LU X, GU M, XU GH, LIAO H. The high-affinity phosphate transporter GmPT5 regulates phosphate transport to nodules and nodulation in soybean[J]. Plant Physiology, 2012, 159(4): 1634-1643.
[19] CHAN C. Coordinating phosphorus and jasmonate signaling: PHR1 partners with transcriptional regulators[J]. The Plant Cell, 2023, 35(6): 1960-1961.
[20] KLEMPNAUER KH, GONDA TJ, BISHOP JM. Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene[J]. Cell, 1982, 31(2 Pt 1): 453-463.
[21] PEOPLES MB, GILLER KE, JENSEN ES, HERRIDGE DF. Quantifying country-to-global scale nitrogen fixation for grain legumes: I. Reliance on nitrogen fixation of soybean, groundnut and pulses[J]. Plant and Soil, 2021, 469(1): 1-14.
[22] MORGANTE C, ANGELINI J, CASTRO S, FABRA A. Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(8): 1436-1444.
[23] MAEDA Y, KONISHI M, KIBA T, SAKURABA Y, SAWAKI N, KURAI T, UEDA Y, SAKAKIBARA H, YANAGISAWA S. A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in *Arabidopsis*[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1376.
[24] KIBA T, INABA J, KUDO T, UEDA N, KONISHI M, MITSUDA N, TAKIGUCHI Y, KONDOU Y, YOSHIZUMI T, OHME-TAKAGI M, MATSUI M, YANO K, YANAGISAWA S, SAKAKIBARA H. Repression of nitrogen starvation responses by members of the *Arabidopsis* GARP-type transcription factor NIGT1/HRS1 subfamily[J]. The Plant Cell, 2018, 30(4): 925-945.
[25] LI YH, PEI Y, SHEN YT, ZHANG R, KANG MM, MA YL, LI DY, CHEN YH. Progress in the self-regulation system in legume nodule development-AON (autoregulation of nodulation)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(12): 6676.
[26] LAWS MT, GRAVES WR. Nitrogen inhibits nodulation and reversibly suppresses nitrogen fixation in nodules of *Alnus maritima*[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2005, 130(4): 496-499.
[27] KATO K, KANAHAMA K, KANAYAMA Y. Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(3): 238-241.
[28] BACANAMWO M, HARPER JE. Regulation of nitrogenase activity in *Bradyrhizobium japonicum*/soybean symbiosis by plant N status as determined by shoot C: N ratio[J]. Physiologia Plantarum, 1996, 98(3): 529-538.
[29] ZHUO MN, SAKURABA Y, YANAGISAWA S. Dof1.7 and NIGT1 transcription factors mediate multilayered transcriptional regulation for different expression patterns of NITRATE TRANSPORTER2 genes under nitrogen deficiency stress[J]. The New Phytologist, 2024, 242(5): 2132-2147.
[30] LUO ZP, MOREAU C, WANG J, FRUGIER F, XIE F. NLP1 binds the CEP1 signalling peptide promoter to repress its expression in response to nitrate[J]. The New Phytologist, 2022, 234(5): 1547-1552.
[31] NISHIDA H, TANAKA S, HANDA Y, ITO M, SAKAMOTO Y, MATSUNAGA S, BETSUYAKU S, MIURA K, SOYANO T, KAWAGUCHI M, SUZAKI T. A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis *in Lotus japonicus*[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 499.
[32] XU N, WANG RC, ZHAO LF, ZHANG CF, LI ZH, LEI Z, LIU F, GUAN PZ, CHU ZH, CRAWFORD NM, WANG Y. The *Arabidopsis* NRG2 protein mediates nitrate signaling and interacts with and regulates key nitrate regulators[J]. The Plant Cell, 2016, 28(2): 485-504.
[33] WANG X, WANG HF, CHEN Y, SUN MM, WANG Y, CHEN YF. The transcription factor NIGT1.2 modulates both phosphate uptake and nitrate influx during phosphate starvation in *Arabidopsis* and maize[J]. The Plant Cell, 2020, 32(11): 3519-3534.
[34] UEDA Y, KIBA T, YANAGISAWA S. Nitrate-inducible NIGT1 proteins modulate phosphate uptake and starvation signalling via transcriptional regulation of *SPX* genes[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2020, 102(3): 448-466.
[35] ZHANG YX, ZHANG QQ, GUO MN, WANG XQ, LI TJ, WU QY, LI LH, YI KK, RUAN WY. NIGT1 represses plant growth and mitigates phosphate starvation signaling to balance the growth response tradeoff in rice[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2023, 65(8): 1874-1889.