

· 研究报告 ·

氮处理对大豆根瘤固氮能力及 *GmLbs* 基因表达的影响

杜梦柯, 连文婷, 张晓, 李欣欣*

福建农林大学根系生物学研究中心, 福州 350002

摘要 共生根瘤的固氮效率受外界氮素的严格调控。除固氮酶活性外, 豆血红蛋白(Lb)浓度亦是反应固氮能力的重要指标。为明确氮水平对生物固氮作用的影响, 以大豆(*Glycine max*)为材料, 在低氮($0.53 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)条件下接种根瘤菌, 30天后再进行高氮(5.3、10、20、30和40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理7天, 分析Lb浓度、固氮酶活性及类菌体发育状态。结果表明, 随着外界氮浓度的增加, 根瘤由红变绿, 且红色Lb明显减少而绿色Lb急剧增加; 固氮酶活性显著被抑制, 类菌体中感染细胞数目和面积显著下降, 表明高氮引起Lb形态的改变与固氮能力关系密切。利用生物信息学及公开表达谱等数据进行分析, 发现大豆根瘤中主要含有4个共生Lb基因, 即*GmLb1*、*GmLb2*、*GmLb3*和*GmLb4*。4个*GmLbs*亲缘关系很近且位于进化树的同一分支。进一步分析*GmLb1–4*转录水平对氮的响应, 结果表明, *GmLb1–4*的表达显著受高氮抑制。研究结果可为揭示氮介导根瘤衰老机制及生物固氮的应用提供依据。

关键词 生物固氮, *GmLbs*, 豆血红蛋白, 氮浓度, 大豆

杜梦柯, 连文婷, 张晓, 李欣欣 (2021). 氮处理对大豆根瘤固氮能力及 *GmLbs* 基因表达的影响. 植物学报 56, 391–403.

大豆(*Glycine max*)是典型的生物固氮作物。据统计, 大豆-根瘤菌共生体系每年固氮约为 $1.64 \times 10^7 \text{ t}$, 占豆科作物固氮总量的60%以上(Herridge et al., 2008), 为农业生态系统提供了大量不可替代的清洁氮源。在生产中, 利用豆科作物生物固氮作用, 不仅可以在减少氮肥投入的条件下增加作物产量、提高品质; 而且在间/套作栽培模式所带来的经济和生态效益方面也具有突出优势。例如, 大豆-玉米(*Zea mays*)间作的经济产量明显高于单作大豆或玉米, 大豆固定的氮可以向禾本科作物转移, 并成为其生长所需的一种重要氮源(Zhang et al., 2017; Chen et al., 2019a); 大豆-茶树或果树间作, 能显著促进茶树/果树生长, 增产的同时提高茶叶/果实品质; 作为绿肥, 豆科作物生物固氮在改良生态环境和小气候、减少病虫害与杂草发生以及降低管理成本等方面效果显著(黎健龙等, 2008; 农玉琴等, 2019)。此外, 豆科作物能够显著改善土壤理化性质、培肥土壤、改善微生物群落并维护土壤健康(李欣欣等, 2019)。由此可见, 充分发挥豆科作物的生物固氮作用, 对生态农业的可持续发展

具有重要的现实意义。

在共生固氮体系中, 根瘤菌感染豆科植物根系形成的根瘤是固氮的主要器官。结瘤与固氮过程均受土壤养分调控, 尤其是土壤中的氮含量, 直接影响生物固氮效率。首先, 高氮显著抑制根瘤的形成(Gan et al., 2004; Xia et al., 2017)。研究表明, 在水培条件下, 随着外界氮浓度的增加, 大豆根瘤数目显著减少, 当氮浓度达到 $5.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 大豆几乎不能结瘤(艾文琴等, 2018)。其次, 较高的氮浓度显著抑制根瘤发育, 使根瘤变小(Du et al., 2020)。第三, 高氮显著促进根瘤衰老、变绿, 固氮酶活性明显被抑制(Du et al., 2020)。目前, 关于氮素调控生物固氮的机制研究多集中于地下部-地上部长距离信号转导(Gautrat et al., 2021), 以及由microRNA参与的氮阻遏机制调控根瘤的形成与数目(Xu et al., 2021)。在固氮能力的影响方面, 一方面, 随着外界施氮水平的提高, 植物将碳水化合物优先分配至根系, 降低了根瘤碳的获取, 抑制类菌体的发育, 从而降低固氮酶活性(Khan and Khan, 1981; Fujikake et al., 2003); 另一方面,

收稿日期: 2021-02-13; 接受日期: 2021-05-07

基金项目: 国家自然科学基金(No.32072661)

* 通讯作者。E-mail: xxli@fafu.edu.cn

固氮反应是在较低氧分压条件下实现。也有研究表明,高氮会破坏根瘤类菌体的氧气屏障,促进根瘤衰老,进而抑制固氮能力(Minchin et al., 1986)。

研究表明,根瘤呈现粉红或红色时,表明根瘤活性强,固氮量高,粉红色/红色的维持取决于豆血红蛋白(leghemoglobin, Lb)的含量。由于固氮酶复合体对氧气敏感,为维持最优的氧分压,豆科植物进化出通过豆血红蛋白运输、传递清除氧气和一氧化氮(NO)的机制,从而实现高效固氮能力(Stasolla and Hill, 2017; Berger et al., 2020)。Lb在成熟根瘤中含量较高。大量研究表明,Lb含量与根瘤中固氮酶活性呈显著正相关,编码豆血红蛋白的基因是影响Lb含量和功能的关键。例如,在百脉根(*Lotus japonicus*)中,利用RNAi干涉法抑制豆血红蛋白基因的表达,导致豆血红蛋白含量降低、根瘤变白、游离氧增加,固氮酶活性显著被抑制,基本丧失了生物固氮能力(Ott et al., 2005, 2009)。在苜蓿(*Medicago truncatula*)中,植物球蛋白Phytoglob1.1主要在根瘤的过渡区和固氮区高表达,通过平衡NO浓度调控结瘤和固氮(Berger et al., 2020)。此外,豆血红蛋白还影响非生物胁迫引起的根瘤衰老。研究表明,苜蓿中的MtCAS31 (cold-acclimation specific 31)与MtLb120-1蛋白互作,以保护MtLb120-1免受干旱胁迫,敲除MtCAS31则红色根瘤比例降低,固氮酶活性显著下降,且根瘤衰老基因显著上调,从而加速根瘤衰老(Prudent et al., 2016; Li et al., 2018a)。综上,豆血红蛋白在豆科植物结瘤固氮过程中不可或缺。

在生产实践中,豆科植物的生长发育过程总会伴随一些绿色根瘤的形成。根瘤变绿,一方面是由于根瘤器官的衰老;另一方面取决于土壤氮浓度。当外界氮浓度较高时,不仅会抑制豆科植物结瘤,还会促进根瘤衰老,使根瘤类菌体变绿。关于这种变绿的蛋白,有观点认为豆血红蛋白复合体的铁四吡咯环被破坏,与二价铁的维持有关(Virtanen and Laine, 1946)。还有研究表明,豆血红蛋白能够与根瘤内的活性氮反应,虽然红色和绿色豆血红蛋白具有相同的球蛋白,但血红素配合物的4-乙烯基被硝基化后,便会促进产生绿色的Lb,血红素硝基化随着根瘤衰老而不断积累,而与硝基化血红素结合的Lb不再具有结合和传递氧气的能力(Navascués et al., 2012)。然而,无论哪种调控机制,绿色根瘤的形成会消耗宿主大量的

碳源,同时几乎不具备固氮能力。因此,豆血红蛋白是维持根瘤类菌体发育的关键因素,是决定共生固氮作用的基础。

在农田中,虽然施氮与根瘤衰老关系密切,但关于氮素如何影响豆血红蛋白浓度,编码豆血红蛋白的基因如何影响外界氮水平,及其与生物固氮的关系,这些研究相对较少。本研究以大豆为研究材料,在接种根瘤菌30天后,进行不同浓度氮处理,分析了固氮酶活性,建立了红色与绿色豆血红蛋白浓度测定方法。通过豆血红蛋白家族基因的生物信息学分析,进一步评估大豆中主要共生豆血红蛋白成员GmLb1-4对不同氮水平的表达响应。研究结果可为阐明氮调控豆血红蛋白介导的根瘤衰老机制提供理论依据,同时为推动生物固氮在农业生产中的应用,实现豆科作物绿色生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)品种为养分高效基因型HN66。供试根瘤菌为高效固氮根瘤菌菌株BXYD3 (程凤娴等, 2008)。

1.2 营养液成分

大豆营养液配制参照Li等(2015)的方法并进行改良。营养液具体成分: 151.65 mg·L⁻¹ KNO₃、283.38 mg·L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O、32.02 mg·L⁻¹ NH₄NO₃、39.72 mg·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄、123.24 mg·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、52.28 mg·L⁻¹ K₂SO₄、0.256 mg·L⁻¹ MnSO₄·H₂O、0.44 mg·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O、0.125 mg·L⁻¹ CuSO₄·5H₂O、0.2 mg·L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O、5.08 mg·L⁻¹ MgCl₂·6H₂O、0.024 mg·L⁻¹ CoCl₂·6H₂O、14.68 mg·L⁻¹ EDTA-Fe、0.95 mg·L⁻¹ Na₂B₄O₇·10H₂O和68.05 mg·L⁻¹ KH₂PO₄。根瘤菌YMA培养液成分: 10 g·L⁻¹ 甘露醇、0.2 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、0.1 g·L⁻¹ NaCl、3 g·L⁻¹ 酵母粉、0.25 g·L⁻¹ K₂HPO₄·3H₂O和0.25 g·L⁻¹ KH₂PO₄。

1.3 实验方法

1.3.1 大豆的氮处理及生长

将籽粒饱满的大豆种子播于蛭石中,在空气相对湿度为60%、光周期为16小时光照/8小时黑暗、温度为

26°C光照/24°C黑暗的步入式培养室中培养7天。挑选长势一致的幼苗, 将根系浸入根瘤菌接种液中2小时, 再将植株转入0.53 mmol·L⁻¹低氮营养液(补充176.424 mg·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O)中生长30天。随后, 再分别移至5.3、10、20、30和40 mmol·L⁻¹氮营养液中生长7天, 其中使用NH₄NO₃调整氮浓度。以0.53 mmol·L⁻¹低氮营养液再持续生长7天为对照, 每处理设置4个生物学重复。在生长过程中每2天监测营养液pH值, 并用KOH或H₂SO₄调pH值使其保持在5.8–6.0。营养液每隔30分钟通气1次, 每周更换1次营养液。收获根瘤样品, 分别用于RNA提取、qRT-PCR检测、固氮酶活性测定、类菌体发育分析和豆血红蛋白浓度测定。

1.3.2 根瘤菌培养

挑取根瘤菌单克隆接种于含有10 mL YMA的离心管中, 28°C摇菌, 3–5天后将其全部转移至含400 mL YMA的三角瓶中培养至OD₆₀₀=0.8, 离心收集菌液。利用上述大豆低氮营养液重悬, 并重新配置成OD₆₀₀=0.8的根瘤菌接种液。

1.3.3 豆血红蛋白基因家族的生物信息学分析

参照Du等(2020)的方法, 获得大豆、苜蓿、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米及水稻(*Oryza sativa*)的豆血红蛋白序列, 并在Phytozome (<http://www.phytozome.org/>)网站查找百脉根豆血红蛋白成员以及大豆*GmLbs*/*GmHbs*的基因登录号和Location coordinates (5'–3'), 利用MEGA 6.1软件构建系统进化树。利用ExPasy网站 (<https://www.expasy.org/>)预测大豆豆血红蛋白的结构。进一步通过NCBI网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测大豆*GmLbs*/*GmHbs*的功能域、查找NCBI number、Accession number和Location coordinates。

1.3.4 豆血红蛋白浓度测定

利用牛血红蛋白作为标准品, 称取1 mg粉末溶于0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(PBS, pH6.8)中配置成1 mg·mL⁻¹标准母液。随后, 使用移液管分别吸取0、1、2、3、4、5和6 mL母液至容量瓶中, 用上述磷酸缓冲液定容至10 mL, 获得浓度为0、0.1、0.2、0.3、

0.4、0.5和0.6 mg·mL⁻¹的溶液。参照LaRue和Child (1979)的方法, 使用分光光度计分别在520、540和560 nm处测定吸光值, 并绘制以牛血红蛋白浓度为横坐标, 以OD₅₄₀–0.5×(OD₅₂₀+OD₅₆₀)吸光值差值为纵坐标的标准曲线1, 以540 nm处的吸光值为纵坐标的标准曲线2。

取新鲜或–80°C冻存的根瘤组织于液氮中研磨成粉末, 称取0.2 g左右样品, 加入4倍体积的低温(4°C)PBS。悬浊液在4°C、100 ×g下离心15分钟, 吸取上清液并继续在4°C、12 000 ×g下离心20分钟。以磷酸缓冲液为空白对照, 将上清液在520、540和560 nm处测定吸光值。利用标准曲线1计算OD₅₄₀–0.5×(OD₅₂₀+OD₅₆₀)对应的值(C₁), 为红色豆血红蛋白浓度; 利用标准曲线2计算OD₅₄₀对应的值(C₂), C₂–C₁为绿色豆血红蛋白浓度。

1.3.5 根瘤固氮酶活性测定

参照Chen等(2019b)的乙炔还原法测定根瘤固氮酶活性。先将1–2颗鲜根瘤放入8 mL测量瓶内, 用封口膜密封, 用1 mL注射器抽出1 mL空气, 并注入1 mL乙炔气体, 再次密封后, 室温下反应2小时。随后, 注入0.5 mol·L⁻¹ NaOH溶液终止反应。用1 mL注射器抽取0.3 mL反应气体注入GC-2014气相色谱仪中, 测定反应生成乙烯(C₂H₄)的量。用1%乙烯分别稀释成1.78×10⁻³、3.56×10⁻³、7.12×10⁻³、1.424×10⁻²、2.136×10⁻²、2.848×10⁻²和3.56×10⁻² mol·L⁻¹浓度梯度, 制作乙烯标准曲线。以μmol (C₂H₄)·g⁻¹ (FW)·h⁻¹表示固氮酶活性大小, 计算公式如下:

$$\text{固氮酶活性 } \mu\text{mol}(\text{C}_2\text{H}_4) \cdot \text{g}^{-1}(\text{FW}) \cdot \text{h}^{-1} = C \times (V_1 - V_2) / (M \times \text{FW} \times H) \times 10^9$$

式中, C为标准曲线上对应的乙烯浓度(g·L⁻¹); V₁为瓶子的体积(L); V₂为装样品所占用的体积(L); M为乙烯分子量; FW为样品鲜重(g); H为加入乙炔后的培养时间(h)。

1.3.6 类菌体发育状态观察

利用石蜡切片甲苯胺蓝染色法观察类菌体发育状态(Li et al., 2015, 2018b)。将直径大于2 mm的根瘤进行石蜡包埋, 使用切片机(Leica RM2235)将包埋组织切成18 μm厚的薄片, 采用T0型生物制片透明剂脱蜡后, 使用0.1%甲苯胺蓝染液染色30分钟, ddH₂O冲

洗后盖片,在蔡司显微镜(AXIO Zoom.V16)下观察侵染细胞状态。利用Image J软件(<https://imagej.en.softonic.com/>)统计单位面积中的侵染细胞面积(mm^2)。每种氮处理设置4个生物学重复,每个重复随机选取2–3个根瘤,共取10个根瘤进行切片。每颗根瘤选取4个根瘤横截面,并统计单位面积(mm^2)的侵染细胞数目,每个横截面随机测定10个侵染细胞面积,取平均值为1个根瘤横截面的根瘤平均侵染细胞面积,即以40个根瘤横切面内的类菌体数目及侵染细胞面积代表每种处理下的根瘤发育情况。

1.3.7 大豆GmLbs基因的相对表达量

根据Li等(2018b)的方法提取根瘤组织RNA,并使用TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix试剂盒反转录为cDNA。以大豆看家基因*TefS1* (登录号为X56856)为参考基因,通过实时荧光定量PCR仪(qRT-PCR, Roche Diagnostics GmbH)对各样品*GmLb1–4*相对表达量进行检测。具体步骤如下:将反转录所得的cDNA样品稀释30倍作为定量PCR的反应模板;取1 μL cDNA稀释液、5 μL 2 \times TransStart Green qPCR SuperMix和10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的正反向引物(表1)各0.3 μL ,用ddH₂O补至10 μL 。PCR反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1分钟;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15秒,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火15秒,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30秒,40个扩增循环。利用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法(Livak and Schmittgen, 2001)计算基因的相对表达量。每组实验设3次生物学重复。

表1 用于qRT-PCR分析的基因特异性引物

Table 1 Gene-specific primers used for qRT-PCR analysis

Name	Primer sequence (5'–3')
GmLb1-qF	CCTCGATACTGGAGAAAGCACC
GmLb1-qR	CAAGTGCGGCATCAATCACC
GmLb2-qF	AATGGAACAGTGTTGGCTGA
GmLb2-qR	AGCACTGCTCAATTCGTCAC
GmLb3-qF	CCGCACTTGGTTCTGTTCAT
GmLb3-qR	TGCTGCCAATTCATCGTAGG
GmLb4-qF	GATCTACTATTGCCGTCAA
GmLb4-qR	GCATCGATTATGATTCACA

1.3.8 数据处理

所有实验数据均用Microsoft Excel 2016软件计算平

均值和标准误。使用SPSS 20.0软件对数据进行单因素方差分析及差异显著性检验(Duncan's新复极差法, $P<0.05$)。用GraphPad Prism 8作图。

2 结果与讨论

2.1 不同氮处理对大豆根瘤固氮能力的影响

为探明大豆根瘤固氮能力对外界氮(N)水平的响应,我们将接种BXYD3根瘤菌后的大豆HN66移苗至低氮营养液($0.53 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)中培养30天,此时根瘤具有较强的固氮酶活性。随后将植株分别转移至含有不同N浓度(5.3、10、20、30和40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的大豆营养液中继续培养7天,取部分植株作为对照组,持续在 $0.53 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 低氮营养液中生长。

根瘤横切面观察结果显示,随着外界N浓度的增加,根瘤中的类菌体由红变绿(图1A)。通过测定豆血红蛋白浓度,发现随着N浓度的增加,红色豆血红蛋白浓度逐渐降低,而绿色豆血红蛋白浓度呈现显著增加的趋势,但外界氮达到10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后不同氮处理间差异不明显(图1B)。此外,供氮水平对大豆根瘤固氮能力也产生显著影响,与低氮处理相比,供氮水平达到5.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,根瘤的固氮酶活性降低54%;当外界氮水平达到10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,固氮酶活性骤降至 $1.43 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,几乎丧失固氮能力(图1C)。上述结果表明,大豆根瘤固氮能力的维持需要在较低的氮水平下,过量施氮会显著降低红色豆血红蛋白浓度,使根瘤变绿,加速其衰老,继而抑制根瘤的固氮酶活性,降低其生物固氮能力。

2.2 氮浓度对大豆根瘤侵染细胞发育的影响

为了分析不同氮浓度对根瘤发育的影响,我们对根瘤进行石蜡切片,利用甲苯胺蓝染色,观察类菌体状态。结果表明,随着外界氮浓度的增加,侵染细胞数目由多到少且细胞饱满程度降低,细胞体积呈缩小的趋势(图2A)。与低氮($0.53 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理相比,5.3、10、20、30和40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氮处理每平方毫米的侵染细胞数目分别降低了9.4%、33.6%、46.0%、49.0%和53.3% (图2B),侵染细胞面积分别降低了17.3%、24.9%、31.7%、38.9%和43.5% (图2C)。上述结果表明,高氮显著抑制侵染细胞发育,导致侵染细胞数目和面积下降。

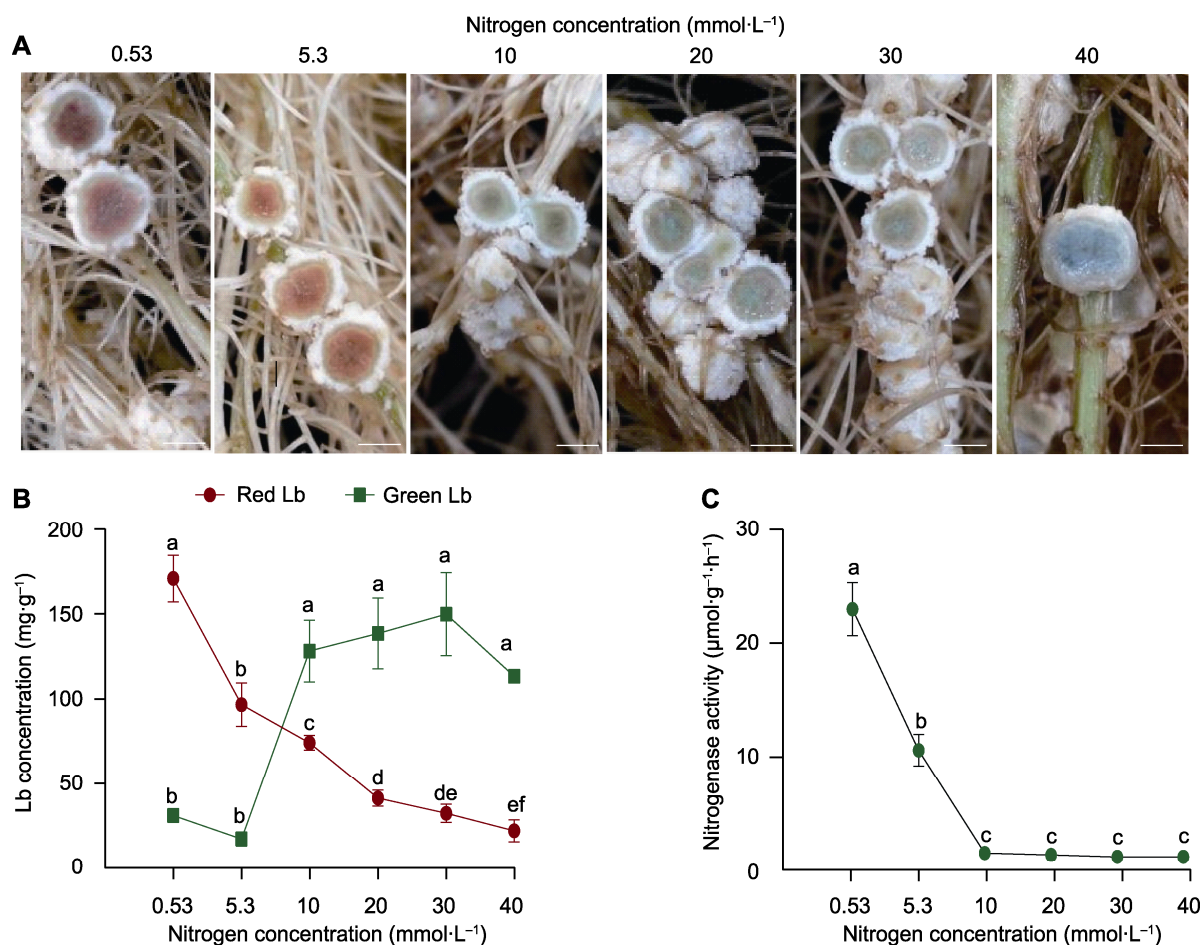


图1 供氮水平对大豆根瘤豆血红蛋白(Lb)浓度及固氮能力的影响

(A) 根瘤横切图; (B) 豆血红蛋白浓度; (C) 固氮酶活性。实验设置4个生物学重复, 每个重复随机取2或3个根瘤测定豆血红蛋白浓度和固氮酶活性。数据为10个根瘤的平均值±标准误。不同小写字母代表不同供氮水平间差异显著($P<0.05$)。Bars=2 mm

Figure 1 Effects of nitrogen supply on leghemoglobin (Lb) concentration and nitrogenase activity of soybean nodules (A) Cross section of nodules; (B) Leghemoglobin concentration; (C) Nitrogenase activity. There were 4 biological replicates, 2 or 3 nodules were randomly harvested for Lb concentration and nitrogenase activity analysis. Data are means±SE from 10 nodules. Different lowercase letters indicate significant differences among different N supply levels ($P<0.05$). Bars=2 mm

2.3 豆血红蛋白家族的生物信息学分析

由于高氮促使根瘤变绿, 豆血红蛋白浓度降低, 加速根瘤衰老。因此我们首先分析了豆血红蛋白基因家族, 结果表明, 大豆基因组共包含7个豆血红蛋白基因成员, 其中5个属于共生豆血红蛋白基因(*GmLbs*), 位于10号和20号染色体, 另2个均位于11号染色体, 编码非共生豆血红蛋白(*GmHbs*)。除*GmLb5*未在NCBI注册外, 其它基因均有相应的注册号。此外, 通过Phytozome网站获得家族成员的物理坐标, 我们发现*GmLbs*与*GmHbs*之间位置相对较远(表2)。

蛋白功能域预测结果表明, 大豆基因组中7个豆

血红蛋白均属于Globin-like超家族。其中, *GmLb1*、*GmLb3*和*GmLb4*蛋白的第4–144位氨基酸区域与Hoy和Hargrove (2008)发表的Class1-2_nsHbs_Lbs结构最为相近, 其分别含有多个血红素结合位点, 除了第92和98位的I/V不同外, 其它结合位点均相同; *GmLb2*和*GmLb5*具有相同的10个辅助因子结合位点(IHKLLLIHFV); *GmHb1*第6–154位氨基酸区域与*GmHb2*第9–157位氨基酸区域均与Hargrove等(2000)发现的Class1_nsHbs_like结构相近, 且都含有23个血红素结合位点以及11或12个多肽结合位点(图3A)。

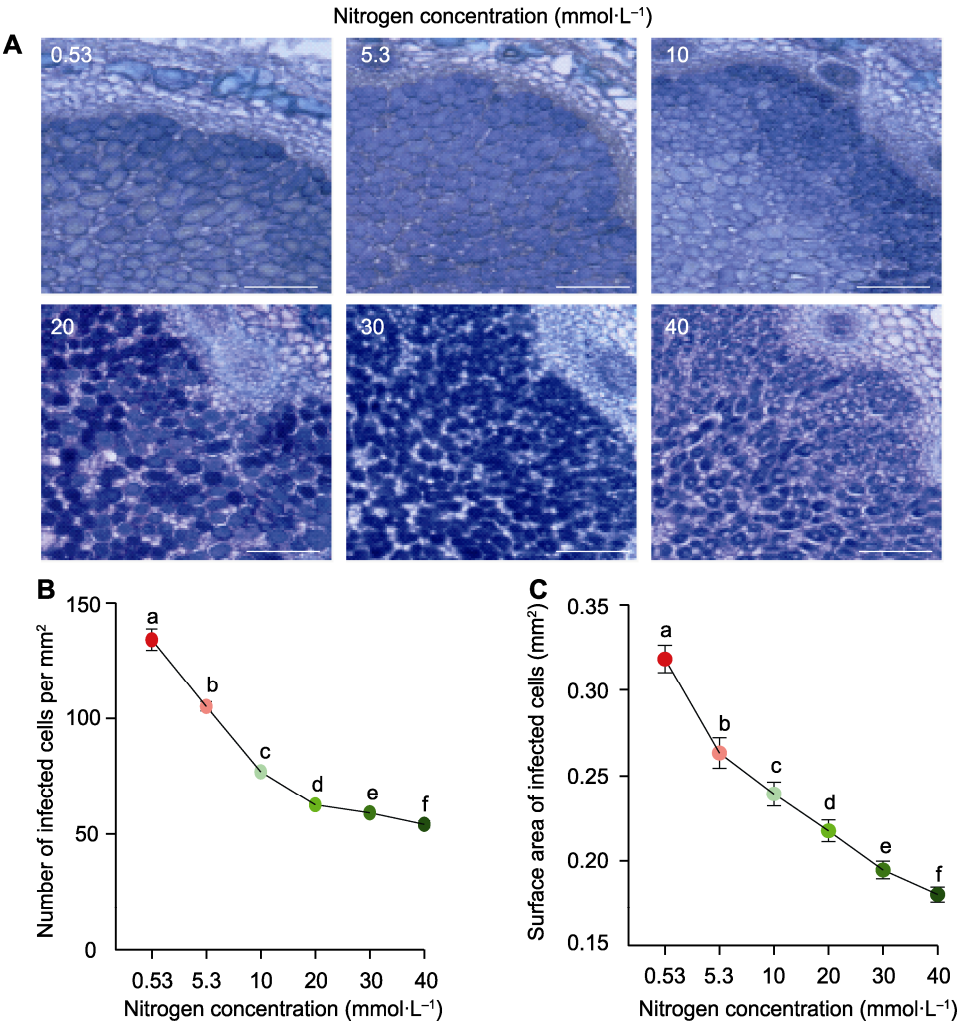


图2 供氮水平对根瘤侵染细胞发育的影响
(A) 甲苯胺蓝染色的根瘤横切面; (B) 侵染细胞数目; (C) 侵染细胞表面积。数据为40个根瘤横切面的平均值±标准误。不同小写字母代表不同供氮水平间差异显著($P<0.05$)。Bars=200 μm

Figure 2 Effects of nitrogen supply on the infected cell development in nodules
(A) Toluidine blue-stained nodule cross-sections; (B) Number of infected cells; (C) Surface area of infected cells. Data are means±SE from 40 cross of nodules. Different lowercase letters indicate significant differences among different N supply levels ($P<0.05$). Bars=200 μm

表2 大豆 *GmLbs*/*GmHbs* 基因信息

Table 2 Information of *GmLbs*/*GmHbs* genes in soybean

Gene name	Phytozome locus9.1	Phytozome locus12.0	NCBI number	Accession number	Location coordinates (5'–3')
<i>GmLb1</i>	<i>Glyma10g34260</i>	<i>Glyma.10G198800.1</i>	NM_001248494.2	BT092230	42996028–42997092
<i>GmLb2</i>	<i>Glyma10g34280</i>	<i>Glyma.10G199000.1</i>	NM_001358072.1	FK026737	43004554–43005947
<i>GmLb3</i>	<i>Glyma10g34290</i>	<i>Glyma.10G199100.1</i>	NM_001248999.3	BT092268	43009363–43011021
<i>GmLb4</i>	<i>Glyma20g33290</i>	<i>Glyma.20G191200.1</i>	NM_001248319.3	BT092218	42993081–42994203
<i>GmLb5</i>	<i>Glyma10g34275</i>	<i>Glyma.10G198900.1</i>	–	–	43000045–43003378
<i>GmHb1</i>	<i>Glyma11g12960</i>	<i>Glyma.11G121700.1</i>	NM_001255274.2	BT098807	9299437–9300752
<i>GmHb2</i>	<i>Glyma11g12980</i>	<i>Glyma.11G121800.1</i>	NM_001357481.1	BT096529	9303967–9305430

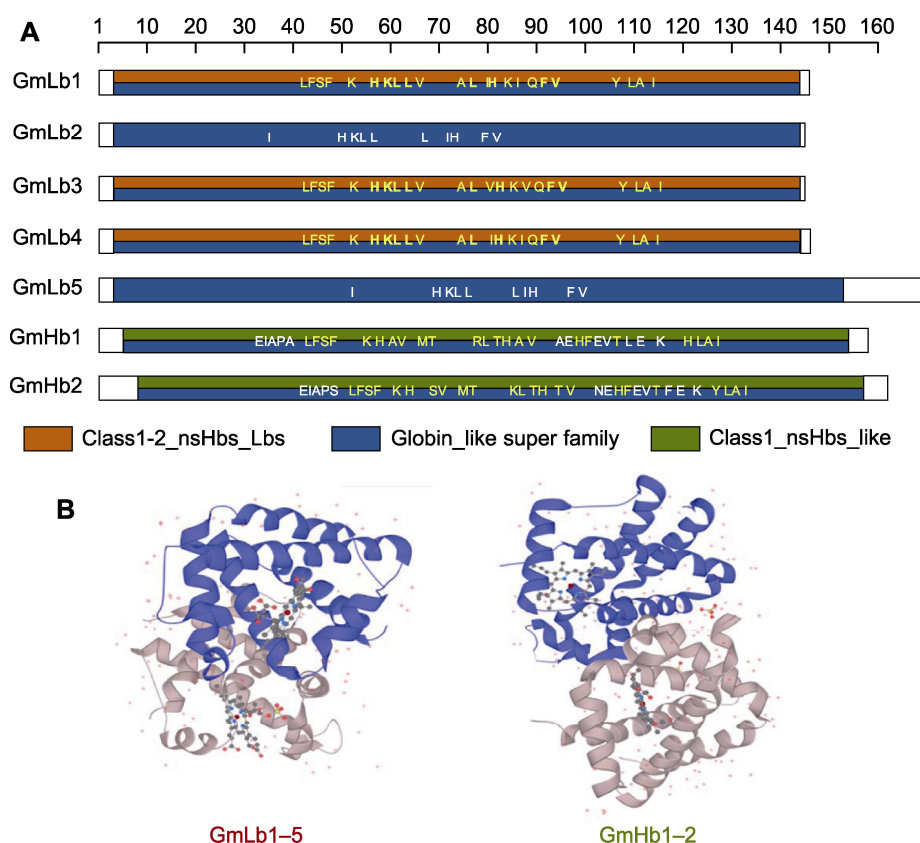


图3 豆血红蛋白功能域和3D结构预测

(A) 保守功能域预测(黄色字体为血红素结合位点, 黑色字体为辅助因子结合位点, 白色字体为多肽结合位点); (B) 蛋白3D结构预测

Figure 3 Prediction of the conserved domain and 3D protein structure of leghemoglobin

(A) Prediction of the conserved domains (the yellow font represents the heme binding site, the black font represents the cofactor binding site, and the white font represents polypeptide binding site); (B) Prediction of 3D protein structure

通过ExPasy网站(<https://www.expasy.org/>)预测GmLbs和GmHbs蛋白的3D结构, 结果表明, 7个豆血红蛋白均属于6/6-fold球蛋白结构, 其中5个共生豆血红蛋白Lbs的结构相似, 2个非共生豆血红蛋白Hbs的结构相似(图3B)。

2.4 血红蛋白系统进化分析

利用豆科植物(包括大豆、菜豆、百脉根和苜蓿)以及非豆科植物(包括拟南芥、水稻和玉米)的血红蛋白序列进行系统进化树分析, 结果表明, 不同植物的血红蛋白被分成2个分支: Class I和Class II (图4)。其中, Class I中均为非共生的血红蛋白Hbs, 而Class II均属于共生豆血红蛋白, 其成员包含5个GmLbs、3个LjLbs、5个PvLbs和12个MtLbs。4个大豆Lbs(GmLb1、GmLb2、GmLb3和GmLb4)亲缘关系非常

近, 而GmLb5与菜豆PvLb2单独形成1个亚群。以上结果表明Class I和Class II起源于共同的祖先, 且血红蛋白在进化过程中出现了分化, 形成不同亲缘关系的亚群, 暗示Class I和Class II在植物生长发育过程中发挥不同的生物学功能。

2.5 豆血红蛋白家族基因的表达模式

为了分析大豆中GmLbs/GmHbs基因成员在不同组织中的表达模式, 我们利用Soybase (<https://www.soybase.org/soyseq/>)网站上的RNA-seq数据库, 并参照Libault等(2010)的原始数据, 经过 $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ 计算, 获得GmLbs和GmHbs在大豆不同组织中的表达热图(图5)。结果表明, 大豆豆血红蛋白基因GmLb1-4在根瘤中表达水平最高, 虽然GmLb5只在根瘤中表达, 但表达量明显低于GmLb1-4; 而

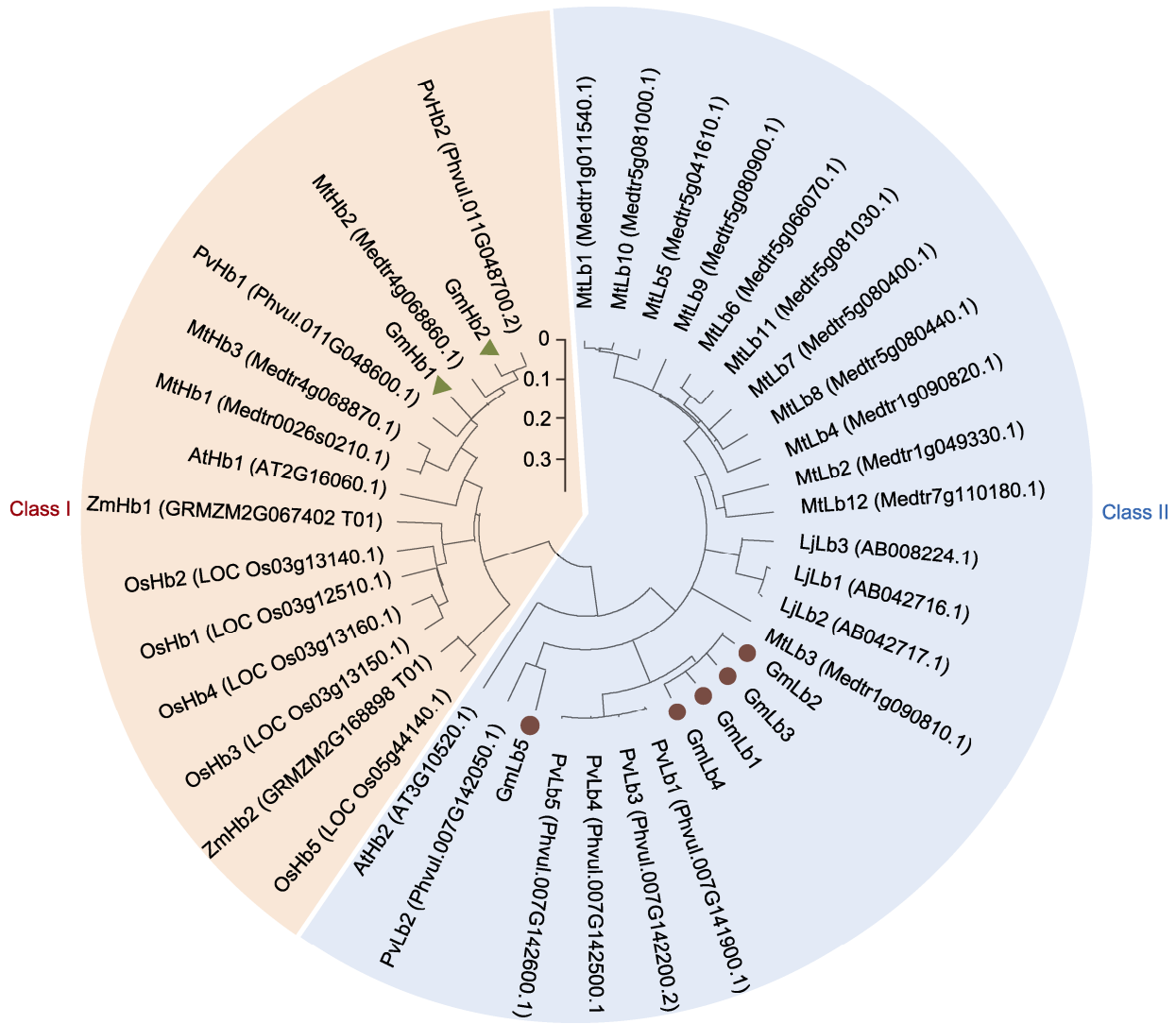


图4 血红蛋白系统进化树
利用MEGA 6.1软件中的邻接法构建系统进化树。

Figure 4 Phylogenetic tree of hemoglobin
This phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method in the MEGA 6.1 program.

非共生的血红蛋白基因 *GmHb1* 和 *GmHb2* 在多个组织中均有表达。*GmLbs* 和 *GmHbs* 的组织表达模式以及大豆中主要豆血红蛋白基因及其在大豆共生固氮中平衡氧分压的能力 (Fuchsman and Appleby, 1979; Brisson and Verma, 1982; Marcker et al., 1984; Du et al., 2020), 均表明 *GmLb1–4* 可能是大豆共生固氮的重要基因。

2.6 *GmLb1–4* 对不同氮浓度的响应

为了进一步探明豆血红蛋白基因对不同供氮水平的

响应机制, 我们分析了主要在根瘤中高表达的 *GmLb1–4* 在不同氮浓度下的相对表达量。qRT-PCR 结果表明, 随着外界氮浓度的增加, *GmLb1–4* 的表达水平均明显降低。当氮浓度从 $0.53 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增至 $5.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, *GmLb1*、*GmLb2*、*GmLb3* 和 *GmLb4* 的转录水平急剧下降, 与低氮条件下相比, 分别降低 57.2%、49.8%、55.8% 和 29.5%; 当外界的氮浓度达到 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, *GmLb1–4* 的转录水平分别降低了 84.9%、84.5%、92.3% 和 81.8% (图6)。上述结果表明, *GmLb1–4* 的表达受外界氮浓度调控, 高氮强烈抑

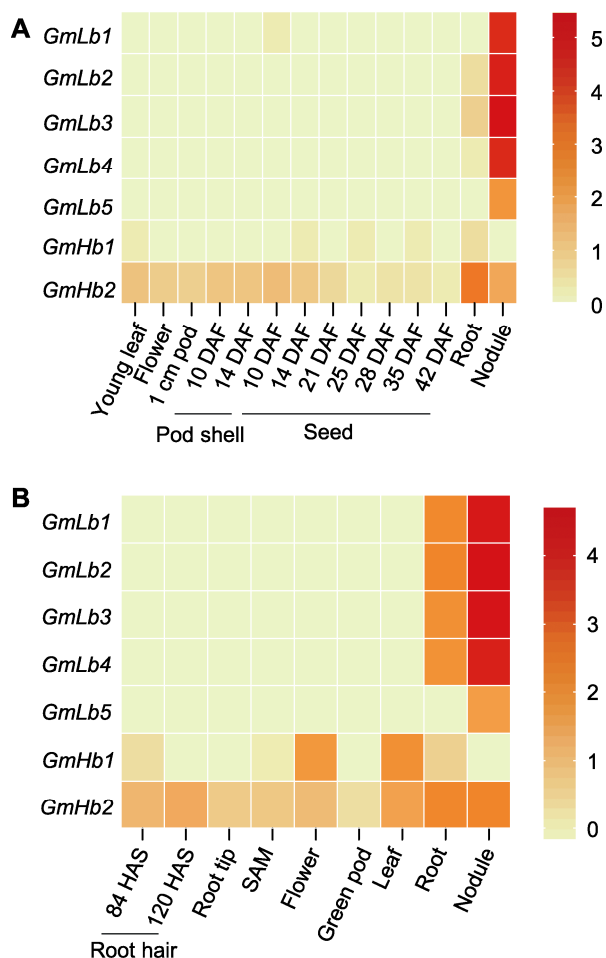


图5 大豆 *GmLbs* 和 *GmHbs* 基因表达热图

(A) RNA-seq 数据来源于 Soybase 网站 (<https://www.soybase.org>); (B) RNA-seq 数据来自 Libault 等(2010)。不同来源的 RNA-seq 数据通过 $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ 计算后进行热图分析。DAF: 开花后天数; HAS: 播种后小时数; SAM: 顶端分生组织

Figure 5 Heatmaps of *GmLbs* and *GmHbs* gene expression in soybean

(A) The RNA-seq data obtained from Soybase website (<https://www.soybase.org>); (B) The RNA-seq data obtained from Libault et al. (2010). RNA-seq data of different sources were calculated with $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ and further used to generate the heatmaps. DAF: Days after flowering; HAS: Hours after sowing; SAM: Shoot apical meristem

制豆血红蛋白基因的表达, 进而影响根瘤固氮过程中氧分压的平衡。

2.7 讨论

充分发挥豆科作物的生物固氮作用, 对减肥增效及农业可持续发展具有重要意义。然而, 根瘤的固氮能力

受外界氮素调控, 过量施用氮肥不仅会降低固氮酶活性, 促进根瘤衰老, 而且不能达到增产效果。因此, 阐明不同氮素水平对根瘤发育及固氮效率的影响, 可为生物固氮的生产实践应用及指导农田施肥提供理论参考。

大量研究表明, 高氮抑制根瘤的形成、发育及固氮过程。目前, 关于氮调控豆科植物结瘤方面的研究已取得较大进展。除固氮酶活性外, 根瘤中豆血红蛋白含量亦是反映固氮能力强弱的一个重要指标(Dakora, 1995; Sinclair and Serraj, 1995)。豆血红蛋白浓度越高, 根瘤的固氮酶活性也越高(Bergersen and Goodchild, 1973; Appleby, 1984; Dakora et al., 1991)。然而, 关于外界氮水平与豆血红蛋白的关系, 以及豆血红蛋白编码基因 *Lbs* 的表达响应还不十分清楚。本研究利用接种30天后的大豆材料, 经过不同浓度(5.3、10、20、30和40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)氮处理, 分析了根瘤的固氮酶活性、豆血红蛋白浓度及类菌体发育状态。研究结果与田间观察的现象以及前人的研究结果相似(Du et al., 2020), 随着氮浓度的增加, 根瘤由粉红色/红色变成绿色(图1A), 这与根瘤衰老的表型一致。此外, 虽然豆血红蛋白浓度的总量在各种氮处理下均维持在较高水平, 但其形态发生了转变。红色豆血红蛋白浓度随氮浓度的增加显著降低, 而绿色豆血红蛋白浓度急剧上升(图1B)。进一步将根瘤进行切片分析, 发现外界氮水平显著抑制类菌体的发育, 使侵染细胞数目减少, 侵染面积变小, 并由低氮的饱满发展到高氮类似于降解死亡的状态(图2)。由于类菌体是根瘤固氮的场所, 因此, 高氮主要通过降低红色豆血红蛋白的含量抑制类菌体发育, 促进根瘤衰老, 降低固氮酶活性, 进而显著抑制大豆固氮效率。

基于豆血红蛋白的重要性, 本研究首先分析了编码豆血红蛋白的基因家族成员。Fuchsman和Appleby (1979)报道了大豆中4个主要的 *Lbs*, 包括 *Lba* (Glyma.10G199100)、*Lbc₁* (Glyma.10G199000)、*Lbc₂* (Glyma.20G191200)和 *Lbc₃* (Glyma.10G 198800)。利用其编码的氨基酸序列进行同源基因比对, 我们发现大豆中共有7个 *Lbs*。根据同源性及进化关系, 我们将其重新命名(表2)。大豆中含有5个共生的 *GmLbs*, 2个非共生的血红蛋白(*GmHb1*和*GmHb2*), 明显分成 Class I和Class II两个类群(图4)。所有 *GmLbs* 和 *GmHbs* 成员均含有1个典型的球蛋白结构域(图3A),

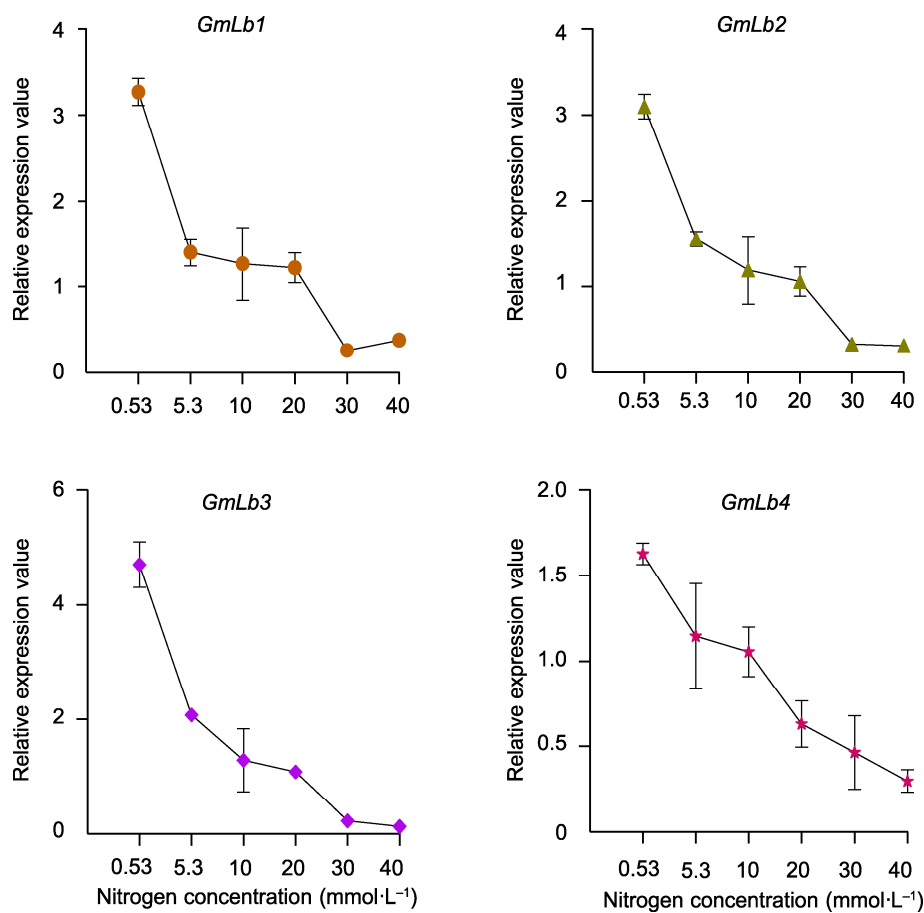


图6 *GmLb1-4*在不同氮浓度下的相对表达量
数据为3个生物学重复的平均值±标准误。

Figure 6 Relative expression value of *GmLb1-4* in soybean nodules under different nitrogen concentrations
Data are means±SE of 3 biological replicates.

属于球蛋白家族, 并含有不同的血红素、辅助因子和多肽结合位点。研究表明, 血红素作为豆血红蛋白的辅基, 形成血红素口袋, 是根瘤中氧气结合/运输的关键, 对Lb的生物学功能至关重要(Garrocho-Villagas et al., 2007; Hoy and Hargrove, 2008)。此外, 与以往报道的 2/2-fold 和 3/3-fold 球蛋白不同(Vázquez-Limón et al., 2012), 大豆 *GmLbs* 和 *GmHbs* 蛋白结构均属于 6/6-fold 结构(图3B)。这种复杂的3D构型可能与有限型根瘤的高效固氮能力有关, 然而其具体机制和功能还需进一步验证。

利用Soybase网站及Libault等(2010)的RNA-seq 数据分析 *GmLbs* 和 *GmHbs* 在不同组织中的表达情况。结果均表明, 共生型 *GmLbs* 主要在根瘤中高表达, 且 *GmLb1-4* 表达丰度最高(图5)。利用养分高效基因

型HN66分析 *GmLbs* 和 *GmHbs* 在大豆器官中的表达模式, 也发现 *GmLb1-4* 在根瘤中特异性高表达(Du et al., 2020)。此外, 研究发现, 大豆豆血红蛋白第30位的酪氨酸(Tyr³⁰) 在血红素口袋的末端是主要的硝基化修饰位点, 其次是第25位Tyr²⁵, 绿色Lbs通常含有较高浓度的硝基化豆血红蛋白(Navascués et al., 2012; Sainz et al., 2015)。多序列比对显示, 只有 *GmLb1-4* 含有Tyr³⁰和Tyr²⁵ (Du et al., 2020), 表明 *GmLb1-4* 是大豆根瘤中主要编码球蛋白的基因。因此, 本研究进一步分析了 *GmLb1-4* 的转录对氮水平的响应, 虽然在5.3 mmol·L⁻¹氮处理条件下, 根瘤依然显示出红色(图1A), 但4个Lb基因的表达量急剧下降, 并对氮浓度的供给表现出明显的响应, 即随着氮浓度的增加 *GmLb1-4* 表达量逐渐下降(图6), 结合Lb

浓度的变化(图1B), 表明高氮可能通过调控豆血红蛋白浓度及相关基因的表达影响根瘤的衰老。

综上, 本研究探讨了氮水平对大豆根瘤固氮能力的影响, 建立了豆血红蛋白测定方法, 进一步结合血红蛋白家族基因的生物信息学及表达谱, 明确了根瘤中 *GmLb1-4* 基因对外界氮素的响应。研究结果可为揭示根瘤衰老机制及推动生物固氮作用的实践应用提供参考。

参考文献

- 艾文琴, 姜瀚原, 李欣欣, 廖红 (2018). 一种高效研究大豆根瘤共生固氮的营养液栽培体系. 植物学报 **53**, 519–527.
- 程凤娴, 曹桂芹, 王秀荣, 赵静, 严小龙, 廖红 (2008). 华南酸性低磷土壤中大豆根瘤菌高效株系的发现及应用. 科学通报 **53**, 2903–2910.
- 黎健龙, 涂攀峰, 陈娜, 唐劲驰, 王秀荣, 年海, 廖红, 严小龙 (2008). 茶树与大豆间作效应分析. 中国农业科学 **41**, 2040–2047.
- 李欣欣, 杨永庆, 钟永嘉, 廖红 (2019). 豆科作物适应酸性土壤的养分高效根系遗传改良. 华南农业大学学报 **40**(5), 186–194.
- 衣玉琴, 黄少欣, 刘振洋, 廖春文, 韦锦坚, 陆金梅, 陈远权, 覃满敏 (2019). 茶豆间作体系氮素对茶叶营养成分的影响. 安徽农业科学 **47**(21), 160–162.
- Appleby CA (1984). Leghemoglobin and rhizobium respiration. *Annu Rev Plant Physiol* **35**, 443–478.
- Berger A, Guinand S, Boscari A, Puppo A, Brouquisse R (2020). *Medicago truncatula* Phytoglobin 1.1 controls symbiotic nodulation and nitrogen fixation via the regulation of nitric oxide concentration. *New Phytol* **227**, 84–98.
- Bergersen FJ, Goodchild DJ (1973). Cellular location and concentration of leghaemoglobin in soybean root nodules. *Aust J Biol Sci* **26**, 741–756.
- Brisson N, Verma DP (1982). Soybean leghemoglobin gene family: normal, pseudo, and truncated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 4055–4059.
- 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 (2019a). A nodule-localized phosphate transporter GmPT7 plays an important role in enhancing symbiotic N₂ fixation and yield in soybean. *New Phytol* **221**, 2013–2025.
- Chen P, Song C, Liu XM, Zhou L, Yang H, Zhang XN, Zhou Y, Du Q, Pang T, Fu ZD, Wang XC, Liu WG, Yang F, Shu K, Du JB, Liu J, Yang WY, Yong TW (2019b). Yield advantage and nitrogen fate in an additive maize-soybean relay intercropping system. *Sci Total Environ* **657**, 987–999.
- Dakora FD (1995). A functional relationship between leghaemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of the two proteins in legume root nodules. *Ann Bot* **75**, 49–54.
- Dakora FD, Appleby CA, Atkins CA (1991). Effect of pO₂ on the formation and status of leghemoglobin in nodules of cowpea and soybean. *Plant Physiol* **95**, 723–730.
- Du MK, Gao Z, Li XX, Liao H (2020). Excess nitrate induces nodule greening and reduces transcript and protein expression levels of soybean leghaemoglobins. *Ann Bot* **126**, 61–72.
- Fuchsman WH, Appleby CA (1979). Separation and determination of the relative concentrations of the homogeneous components of soybean leghemoglobin by isoelectric focusing. *Biochim Biophys Acta-Protein Struct* **579**, 314–324.
- Fujikake H, Yamazaki A, Ohtake N, Sueyoshi K, Matsubashi S, Ito T, Mizuniwa C, Kume T, Hashimoto S, Ishioka NS, Watanabe S, Osa A, Sekine T, Uchida H, Tsuji A, Ohyama T (2003). Quick and reversible inhibition of soybean root nodule growth by nitrate involves a decrease in sucrose supply to nodules. *J Exp Bot* **54**, 1379–1388.
- Gan YB, Stulen I, van Keulen H, Kuiper PJC (2004). Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N₂ fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW·g⁻¹ root dry weight) and specific N₂ fixation (N₂ fixed·g⁻¹ root dry weight) in soybean. *Plant Soil* **258**, 281–292.
- Garrocho-Villegas V, Gopalasubramaniam SK, Arredondo-Peter R (2007). Plant hemoglobins: what we know six decades after their discovery. *Gene* **398**, 78–85.
- Gautrat P, Laffont C, Frugier F, Ruffel S (2021). Nitrogen systemic signaling: from symbiotic nodulation to root acquisition. *Trends Plant Sci* **26**, 392–406.
- Hargrove MS, Brucker EA, Stec B, Sarath G, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Olson JS, Phillips GN Jr (2000). Crystal structure of a nonsymbiotic plant hemoglobin. *Structure* **8**, 1005–1014.
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil* **311**, 1–18.
- Hoy JA, Hargrove MS (2008). The structure and function of plant hemoglobins. *Plant Physiol Biochem* **46**, 371–379.

- Khan AA, Khan AA** (1981). Effects of nitrate nitrogen on growth, nodulation and distribution of ^{14}C -labelled photosynthates in cowpea. *Plant Soil* **63**, 141–147.
- LaRue TA, Child JJ** (1979). Sensitive fluorometric assay for leghemoglobin. *Anal Biochem* **92**, 11–15.
- Li X, Feng H, Wen JQ, Dong JL, Wang T** (2018a). MtCAS31 aids symbiotic nitrogen fixation by protecting the leghemoglobin MtLb120-1 under drought stress in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci* **9**, 633.
- Li XX, Zhao J, Tan ZY, Zeng RS, Liao H** (2015). *GmEXPB₂*, a cell wall β -expansin, affects soybean nodulation through modifying root architecture and promoting nodule formation and development. *Plant Physiol* **169**, 2640–2653.
- Li XX, Zheng JK, Yang YQ, Liao H** (2018b). *INCREASING NODULE SIZE 1* expression is required for normal rhizobial symbiosis and nodule development. *Plant Physiol* **178**, 1233–1248.
- Libault M, Farmer A, Joshi T, Takahashi K, Langley RJ, Franklin LD, He J, Xu D, May G, Stacey G** (2010). An integrated transcriptome atlas of the crop model *Glycine max*, and its use in comparative analyses in plants. *Plant J* **63**, 86–99.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. *Methods* **25**, 402–408.
- Marcker A, Lund M, Jensen EØ, Marcker KA** (1984). Transcription of the soybean leghemoglobin genes during nodule development. *EMBO J* **3**, 1691–1695.
- Minchin FR, Minguez MI, Sheehy JE, Witty JF, Skøt L** (1986). Relationships between nitrate and oxygen supply in symbiotic nitrogen fixation by white clover. *J Exp Bot* **37**, 1103–1113.
- Navascués J, Pérez-Rontomé C, Gay M, Marcos M, Yang F, Walker FA, Desbois A, Abián J, Becana M** (2012). Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 2660–2665.
- Ott T, Sullivan J, James EK, Flemetakis E, Günther C, Gibon Y, Ronson C, Udvardi M** (2009). Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of *Lotus japonicus* root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 800–808.
- Ott T, van Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK** (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* **15**, 531–535.
- Prudent M, Vernoud V, Girodet S, Salon C** (2016). How nitrogen fixation is modulated in response to different water availability levels and during recovery: a structural and functional study at the whole plant level. *Plant Soil* **399**, 1–12.
- Sainz M, Calvo-Begueria L, Pérez-Rontomé C, Wienkoop S, Abián J, Staudinger C, Bartesaghi S, Radi R, Becana M** (2015). Leghemoglobin is nitrated in functional legume nodules in a tyrosine residue within the heme cavity by a nitrite/peroxide-dependent mechanism. *Plant J* **81**, 723–735.
- Sinclair TR, Serraj R** (1995). Legume nitrogen fixation and drought. *Nature* **378**, 344.
- Stasolla C, Hill RD** (2017). Determining cellular responses: phytochemicals may direct the traffic. *Trends Plant Sci* **22**, 820–822.
- Vázquez-Limón C, Hoogewijs D, Vinogradov SN, Arredondo-Peter R** (2012). The evolution of land plant hemoglobins. *Plant Sci* **191–192**, 71–81.
- Virtanen AI, Laine T** (1946). Red, brown and green pigments in leguminous root nodules. *Nature* **157**, 25–26.
- Xia X, Ma CM, Dong SK, Xu Y, Gong ZP** (2017). Effects of nitrogen concentrations on nodulation and nitrogenase activity in dual root systems of soybean plants. *Soil Sci Plant Nutr* **63**, 470–482.
- Xu HY, Li YJ, Zhang KF, Li MJ, Fu SY, Tian YZ, Qin TF, Li XX, Zhong YJ, Liao H** (2021). *miR169c-NFYA-C-ENOD40* modulates nitrogen inhibitory effects in soybean nodulation. *New Phytol* **229**, 3377–3392.
- Zhang H, Zeng FP, Zou ZG, Zhang ZQ, Li YZ** (2017). Nitrogen uptake and transfer in a soybean/maize intercropping system in the karst region of southwest China. *Ecol Evol* **7**, 8419–8426.

Effects of Nitrogen Application on Nitrogen Fixation Capacity and *GmLbs* Expression in Soybean

Mengke Du, Wenting Lian, Xiao Zhang, Xinxin Li*

Root Biology Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract The nitrogen fixation efficiency of symbiotic nodules is tightly regulated by external nitrogen (N). In addition to nitrogenase activity, the leghemoglobin (Lb) amount is vital index contributing to N_2 fixation. To determine the effect of environmental N level on biological nitrogen fixation, soybean plants were inoculated with rhizobia for 30 d under low N condition ($0.53 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), then transplanted to hydroponic culture solution with relatively higher N concentrations, including 5.3, 10, 20, 30, and 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 7 d, respectively. Lb concentration, nitrogenase activity and bacteroid development status were measured. Nodule displayed changed color from red to green with increasing N concentrations. Consistently, the red Lb concentration gradually declined with increased green Lb concentration. Moreover, the nitrogenase activity, infected cell number and area in nodules were all significantly decreased, suggesting that changes in Lb forms caused by excess N are closely associated with nitrogen fixation capacity. Bioinformatics and public expression profile data displayed that four symbiosis-associated *Lbs*, including *GmLb1*, *GmLb2*, *GmLb3*, and *GmLb4* are the major *Lb* genes in soybean nodulation. These four *GmLbs* belong to the same clade of phylogenetic tree. Further analysis on the transcripts of *GmLb1–4* in response to N showed that the expression levels of *GmLb1–4* were all significantly inhibited by high N. This study services as a reference for future studies in understanding the underlying mechanisms of N-triggered nodule senescence as well as BNF application in agriculture.

Key words biological nitrogen fixation, *GmLbs*, leghemoglobin, nitrogen concentration, soybean

Du MK, Lian WT, Zhang X, Li XX (2021). Effects of nitrogen application on nitrogen fixation capacity and *GmLbs* expression in soybean. *Chin Bull Bot* 56, 391–403.

* Author for correspondence. E-mail: xxli@fafu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)