

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2024.44071

基于转录组分析的低铁胁迫下 Bt 棉杀虫蛋白表达量下降机制

王永慧* 贺江 张向向 娄向弟 高进 孙艳茹 曹婷 施洋

江苏沿海地区农业科学研究所 / 农业农村部沿海盐碱地农业科学观测实验站, 江苏盐城 224001

摘要: 研究低铁对 Bt 棉杀虫蛋白含量的影响及其生理和分子机制, 可为 Bt 棉抗虫性安全表达提供理论参考。本文以转基因抗虫棉品种中棉 50 为试验材料, 设置正常铁(CK, 20.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$)和低铁(LI, 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 2 个铁水平处理, 采用水培法研究了低铁胁迫下 Bt 棉苗期 Bt 杀虫蛋白含量变化及氮代谢生理特征, 通过转录组测序挖掘差异表达基因及其相关代谢途径, 并采用 qRT-PCR 方法对测序结果进行验证。结果表明, 与对照处理相比, 低铁胁迫下 Bt 棉根和叶片中杀虫蛋白含量显著下降, 且根中杀虫蛋白含量下降幅度更大。低铁胁迫降低了叶片中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量, 降低根和叶片中可溶性蛋白含量和全氮含量。根和叶片中硝酸还原酶、亚硝酸还原酶和谷氨酸合成酶活性的变化趋势与 Bt 杀虫蛋白含量表现一致。转录组结果表明, 根和叶片中分别鉴定出 11,661 个和 8972 个差异表达基因, 其中有 1652 个差异表达基因在根和叶片中均下调表达。GO 注释表明, 低铁处理根和叶片中差异基因的功能都主要富集于刺激反应、细胞壁、质膜、结合、氧化还原活性等。KEGG 富集分析显示, 苯丙烷类物质生物合成、苯丙氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、激素信号转导、玉米素生物合成、氮代谢、淀粉和蔗糖代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢和酪氨酸代谢等途径在根和叶片中均发生显著变化。低铁胁迫下与氮素还原、同化途径相关的 *NR*、*NiR* 和 *GLT1* 基因表达显著下调。以上结果表明, 低铁胁迫会抑制 Bt 棉氮代谢相关基因的转录水平, 减弱氮代谢的生理活性, 抑制 Bt 杀虫蛋白的合成。

关键词: Bt 棉; 杀虫蛋白; 低铁胁迫; 转录组

Mechanism of reduced insecticidal protein expression in Bt cotton under low-iron stress based on transcriptome analysis

WANG Yong-Hui*, HE Jiang, ZHANG Xiang-Xiang, LOU Xiang-Di, GAO Jing, SUN Yan-Ru, CAO Ting, and SHI Yang

Institute of Agricultural Sciences of Jiangsu Coastal Area / Observation and Experimental Station of Saline land of Costal Area, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yancheng 224001, Jiangsu, China

Abstract: To provide a theoretical basis for the safety of insecticidal efficiency in Bt cotton, this study investigated the effects of low iron on Bt insecticidal protein content and the physiological and molecular mechanisms in Bt cotton. Transgenic Bt cotton cultivar Zhongmian 50 was grown under low iron (LI, 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Fe(II)-EDTA) and normal iron (CK, 20.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Fe(II)-EDTA) conditions in hydroponic culture to assess the impact of low iron stress on Bt insecticidal protein content, activities of nitrogen metabolism-related enzymes, and substances in cotton seedlings. Differentially expressed genes (DEGs) were screened, and their relative expression patterns were analyzed by high-throughput sequencing, with results verified by qRT-PCR. The results showed that, compared with the control, the insecticidal protein contents significantly decreased under low iron conditions, with a more pronounced reduction in roots than in leaves. Iron deficiency decreased $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{NO}_3^-\text{-N}$ levels in leaves and reduced soluble protein and nitrogen contents in both roots and leaves. Significant reductions in the activities of nitrate reductase (NR), nitrite reductase (NiR), and glutamine synthetase (GS) were observed when Bt insecticidal protein contents in roots and leaves were significantly reduced. High-throughput sequencing identified 11,661 DEGs in roots and 8972 in leaves, with 1652

本研究由国家自然科学基金项目(31501267)和江苏省农业科技自主创新资金项目[CX(20)2065]资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31501267) and the Jiangsu Agriculture Science and Technology Innovation Fund [CX(20)2065].

* 通信作者(Corresponding author): 王永慧, E-mail: huiyw2008@163.com

Received (收稿日期): 2024-4-26; Accepted (接受日期): 2024-08-15; Published online (网络出版日期): 2024-09-02.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20240902.1422.018>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

genes down-regulated in both organs. GO annotation revealed that the functions of the differential genes in two organs were mainly concentrated in response to stimulus, cell wall, plasma membrane, binding, and catalytic activity. KEGG enrichment analysis demonstrated significant changes in phenylpropanoid biosynthesis, phenylalanine metabolism, cysteine and methionine metabolism, plant hormone signal transduction, zeatin biosynthesis, nitrogen metabolism, starch and sucrose metabolism, alanine, aspartate and glutamate metabolism, and tyrosine metabolism in both roots and leaves. Genes coding for *NR*, *NiR1*, and *GLT1* related to the nitrogen reduction and assimilation pathway were significantly down-regulated under iron deficiency treatment. Therefore, low iron stress inhibits the transcription levels of genes related to nitrogen metabolism in Bt cotton, weakens the physiological activities of nitrogen metabolism, and subsequently reduces Bt insecticidal protein.

Keywords: Bt cotton; insecticidal protein; low iron; transcriptome

棉花中过表达苏云金芽孢杆菌(Bt)杀虫蛋白可显著增强棉花对昆虫的抗性,控制棉铃虫等鳞翅目害虫的危害,减少化学农药的用量,已在农业生产上广泛应用。从 20 世纪 90 年代开始,我国转基因抗虫棉的应用面积迅速推广,至 2008 年已达近 200 多万公顷,占全国棉花种植面积七成以上,取得了显著的社会、经济和生态效益^[1-2]。然而,抗虫棉体内合成的 Bt 杀虫蛋白表达不稳定,易受外部不良环境因素的影响,从而降低其杀虫效果。前人研究表明,除外界极端温湿度、干旱、涝渍和高盐^[3-5]等环境因素外,营养元素的亏缺同样会造成 Bt 棉杀虫蛋白含量的显著下降^[6],如 Chen 等^[7]研究发现,低氮胁迫会降低 Bt 棉氮代谢,蛋白质合成下降而分解加快,导致 Bt 棉棉蕾中杀虫蛋白表达量的下降。

铁是植物生长与发育必需的微量矿质元素,在植物能量代谢与物质交换中发挥关键作用^[8]。铁作为多种酶的辅基,不仅参与植物 DNA 的合成及质体发育,还参与多种代谢途径如光合作用、呼吸作用、固氮作用^[9-10]。尽管地球土壤中总铁含量通常很高,但主要以较稳定的难溶性铁(氢)氧化物的形式存在,能够被植物吸收利用的有效铁含量较低。农田缺铁是一个全球性问题,特别是在通气性良好的石灰质和碱性土壤中更为常见,全球大约 40%的可耕地上的植物都遭受到不同程度的缺铁胁迫^[11-12]。缺铁不但会抑制叶片叶绿素合成,而且还会影响植物氮素吸收、转运和同化等代谢活动及相关基因的表达水平。Borlotti 等^[13]研究认为,黄瓜幼苗缺铁时,根和叶片中硝酸盐还原酶活性均降低,而叶片中谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合成酶活性及相应基因的 mRNA 表达水平显著升高。Li 等^[14]研究发现,低铁会抑制儿茶叶片中硝酸还原酶和谷氨酸合成酶活性,并下调参与氮同化途径的基因表达,降低儿茶地上部全氮和可溶性蛋白含量。虽然前人研究已表明铁营养亏缺会对作物氮素代谢有较大影响,但有关低铁胁迫对 Bt 棉氮代谢影响的系统研究相对较少。Bt 杀

虫蛋白是一种可溶性蛋白,作为蛋白质组分之一,易受棉花植株自身氮代谢的影响^[15]。因此,我们假设低铁胁迫会影响 Bt 棉氮素代谢,进而影响 Bt 杀虫蛋白的表达。

转录组测序(RNA-Seq)具有高通量、低成本、高精度等特点,能全面快速地获取生物体细胞、组织及器官中在特定环境下的绝大多数转录本信息,从整体水平上揭示特定生物学过程中的分子机制,已广泛应用于植物抗病、逆境胁迫响应机制的研究。因此,本文从生理代谢和转录组分析角度入手,探究低铁胁迫对 Bt 棉杀虫蛋白表达的影响及其相关机制,以为抗虫棉安全生产应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设计

试验于 2022 年 5 月至 6 月在江苏盐城南洋试验场试验温室中进行。以转基因 Bt 抗虫棉“中棉 50”为研究材料。选用大小均匀一致、完整无损的棉花种子,采用沙培法进行育苗。出苗 2 d 后选择长势一致的棉苗转移到水培塑料盒(10 L, 35 cm×25 cm×20 cm)中,每个塑料盒上配有 12 个孔的塑料板。用正常的 1/2 Hoagland 营养液进行 1 周缓苗,缓苗结束后每孔定植棉苗 1 株并进行低铁试验处理。

以 Fe(II)-EDTA 为铁源,设置低铁(LI, 0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$)和正常铁(CK, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 2 个铁浓度,其他营养元素的浓度为 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ KNO_3 、250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MgSO_4 、1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ MnCl_2 、1.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ZnSO_4 、0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CuSO_4 、0.15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 和 2.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_3BO_3 。处理期间,通过真空泵给营养液连续充气,以保持根系有充足的氧气,每隔 3 d 更换 1 次营养液,通过添加 KOH 或者 H_2SO_4 ,将水培营养液 pH 值维持在 6.4~6.5。低铁培养 21 d 后,每个处理随机选择 10 株棉苗,用无菌剪刀分棉花功能叶(去除主脉)、侧根两部位取样,将样品分为 4 个处

理, 分别为: 对照叶片(LCK)、高铁叶片(LLI)、对照根(RCK)和高铁根(RLI)等处理。液氮速冻后在-80℃冰箱保存, 用于理化指标的测定和转录组分析。每个处理设置 3 次生物学重复, 共 12 份样品。剩余的棉株分叶片和根烘干称重, 计算出棉苗单株叶片和根干物质质量, 样品粉碎过筛后用于铁离子含量测定。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 Bt 杀虫蛋白含量 采用酶联免疫法(ELISA)测定 Bt 杀虫蛋白含量, 试剂盒由中国农业大学提供, 测定方法参见文献[16]。

1.2.2 氮代谢相关酶活性和物质测定 采用离体比色法测定硝酸还原酶和亚硝酸还原酶活性^[17], 参考文献[18]的方法测定谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶活性, 按照苏州科铭生物技术有限公司试剂盒(ZATD-2-G、ZXTD-2-G)的使用手册, 测定铵态氮(NH₄⁺-N)、硝态氮(NO₃⁻-N)含量, 采用 Bradford 法^[19]测定可溶性蛋白含量, 浓硫酸消煮法^[18]测定全氮含量, 铁离子含量用原子吸收分光光度计测定^[20]。

1.3 RNA 的提取、文库构建和测序

由南京派森诺生物科技有限公司进行样品总 RNA 提取、质量检测、cDNA 文库构建以及高通量测序。简要流程如下: 通过 Oligo(dT)磁珠富集总 RNA 中带有 polyA 结构的 mRNA, 采用离子打断的方式, 将 RNA 打断到长度 300 bp 左右的片段。以 RNA 为模板, 用 6 碱基随机引物和逆转录酶合成 cDNA 第一链, 并以第一链 cDNA 为模板进行第二链 cDNA 的合成。文库构建完成后, 采用 PCR 扩增进行文库片段富集, 用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对文库总浓度及文库有效浓度进行检测。库检合格后, 在 Illumina HiSeq 平台上对文库进行双末端测序, 以生成原始数据。

1.4 转录组分析

使用 HISAT2 软件将过滤后的 Reads 比对到棉

花基因组数据库(www.cottongen.org), 对基因组注释文件中指定的基因位置信息进行统计学分析。通过计算原始测序、有效测序、Q30 和 GC 含量对测序质量进行综合评估。采用 FPKM^[21]对基因表达量进行标准化计算, 并利用 DESeq2 软件进行样品组间差异表达分析, 筛选差异表达基因条件为: 表达差异倍数|log₂ (Fold Change)| > 1, 显著性 P-value<0.05。筛选完成后, 将 4 个处理分 2 组进行转录组比对分析: 对照叶片(LCK) vs 高铁叶片组(LLI), 对照根(RCK) vs 高铁根组(RLI)。利用 GO (Gene Ontology) 数据库和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库对差异表达基因进行富集分析, 从而确定差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)行使的主要生物学功能和代谢通道。利用派森诺基因云平台(<https://genescloud.cn/>)的绘图工具绘制出部分差异基因表达量热图。

1.5 差异基因的 qRT-PCR 验证

以 ACT14 作为内参基因, 选择与氮代谢相关的 4 个差异基因为待验证基因, 利用在线工具 Primer 5.0 设计基因的特异引物, 引物序列见表 1。用 SYBR Green 染料进行 qRT-PCR, 每个样品设置 3 个技术重复, 采用 2^{-ΔΔCt} 法^[22]计算得出样本间表达量差异倍数关系。

1.6 数据处理及统计分析方法

运用 Microsoft Excel 2016 进行数据处理和作图, 采用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 在 P<0.05 时 LSD 检验不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 高铁胁迫对 Bt 棉干物重和铁离子含量影响

在高铁胁迫条件下, Bt 棉生长受到抑制, 叶片和根干物重显著下降, 与对照相比, Bt 棉根、叶片干物质质量分别下降 28.7%和 32.6%(图 1-A)。高铁胁

表 1 实时荧光定量引物
Table 1 Primers for qRT-PCR

基因名称 Gene name	正向引物 Forward sequence (5'-3')	反向引物 Reverse sequence (5'-3')	基因 ID Gene ID
ACT14	CTGGAGACTGCCAAGAGCAGCT	CCGGGCAACGGAATCTCTCAGC	
NR	GAGCATATCCCGGTGGGTTC	GCTGCACAGCGAACTGAATC	Gh_D02G0815
NiR1	GGGGCAGACATATTCTTGGGA	AGCTCCAAAGTGTTCCACCA	Gh_A13G0352
GSI.1	CAATTCGTGTTGGGCGAGAC	CAAACATGGGCTTCCCCTCA	Gh_A13G0512
GLT1	CGGAGGCTTGCTGCTGAGTAT	TCTGTACAGTGTGGGGCAAG	Gh_D12G2422

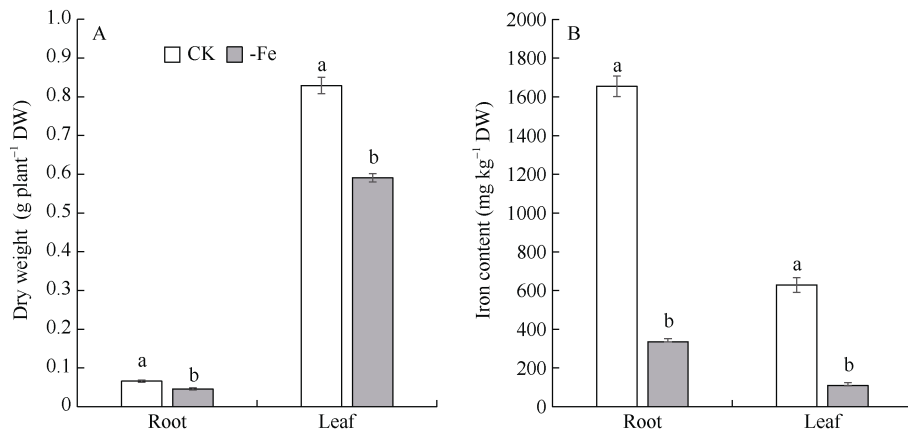


图 1 低铁对 Bt 棉根和叶片干物重及铁离子含量影响

Fig. 1 Effects of low iron stress on dry weight and iron content in the roots and leaves of Bt cotton

A: 低铁对 Bt 棉根和叶片干物重影响; B: 低铁对 Bt 棉根和叶片铁离子含量影响。CK: 对照处理; LI: 低铁处理。不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

A: effects of low iron stress on dry weight in the roots and leaves of Bt cotton; B: effects of low iron stress on iron content in the roots and leaves of Bt cotton. CK: $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ Fe (II)-EDTA; LI: $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ Fe (II)-EDTA. Different lowercase letters represent significant difference among treatments at the $P < 0.05$.

迫降低了 Bt 棉铁离子含量, 与对照相比, 低铁胁迫下 Bt 棉根、叶片中铁离子含量分别下降 82.5% 和 79.7% (图 1-B)。表明 $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的低铁处理能显著抑制根系对铁离子的吸收和转运。

2.2 低铁胁迫对 Bt 棉杀虫蛋白含量影响

由图 2 可知, 低铁处理可显著降低 Bt 棉根和叶片中杀虫蛋白含量。与对照相比, 根中杀虫蛋白含量下降 31.7%, 叶片中杀虫蛋白含量下降 13.8%, 说明根中杀虫蛋白的表达更容易受到低铁环境的影响。

2.3 低铁胁迫对 Bt 棉氮代谢相关酶活性和物质含量影响

由表 2 和表 3 可知, 低铁处理降低 Bt 棉氮代谢酶活性及相关物质的转运与合成。低铁处理下除叶片中 GS 活性与对照差异不显著外, 其余氮代谢相关酶活性均出现不同程度的下降, 其中根系中硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)、亚硝酸还原酶(nitrite reductase, NiR)、谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)和谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT)活性与对照相比, 分别下降 16.7%、11.2%、57.1%和 42.1%; 叶片中 NR、NiR 和 GOGAT 活性与对照相比, 分别下降 31.0%、16.5%和 20.6%。与对照相比, 低铁胁迫下根中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量无明显变化, 但叶片中 2 种无机氮素浓度显著降低, 分别比对照下降 21.7%和 33.3%, 表明低铁胁迫会影响根系中铵态氮和硝态氮向叶片中转运。低铁处理下根和叶片中可溶性蛋白含量、全氮含量同样出现明显下降, 与对照相比, 根系中可溶性蛋白含量、全

氮含量分别下降 26.7%和 13.5%, 叶片中可溶性蛋白含量、全氮含量分别下降 16.4%和 9.2%。

2.4 转录组数据质量分析

利用 Illumina HiSeq 平台对 Bt 棉幼苗 12 个样品进行转录组测序。原始数据过滤后得到的有效数据为 35,735,176~49,554,758, 数据 Q30 最小值为 94.03%, GC 含量平均占比大于 43%, 96%以上的测序数据可以映射到棉花基因组中, 并且 Uniquely Mapped 达 91%以上(表 4)。说明测序结果可靠性较高, 可以进行后续分析。

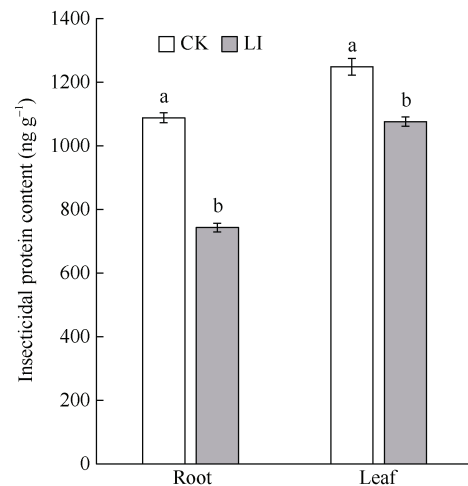


图 2 低铁对 Bt 棉根和叶片中杀虫蛋白含量影响

Fig. 2 Effects of low iron stress on insecticidal protein content in the roots and leaves of Bt cotton

处理同图 1。不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Treatments are the same as those given in Fig. 1. Different lowercase letters represent significant difference among treatments at the $P < 0.05$.

表 2 低铁胁迫对 Bt 棉根和叶片中硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合成酶活性的影响
Table 2 Effects of low iron stress on nitrate reductase (NR), nitrite reductase (NiR), glutamine synthetase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) activities in the roots and leaves of Bt cotton

器官/处理 Organ/ treatment	硝酸还原酶活性 Nitrate reductase activities ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	亚硝酸还原酶活性 Nitrite reductase activities ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	谷氨酰胺合成酶活性 Glutamine synthetase activities ($\Delta\text{A g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	谷氨酸合成酶活性 Glutamate synthase activities ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$)
根系 Root				
CK	3.35 a	7.85 a	0.77 a	0.76 a
LI	2.79 b	6.97 b	0.34 b	0.44 b
叶片 Leaf				
CK	5.13 a	10.82 a	0.86 a	1.02 a
LI	3.54 b	9.03 b	0.83 a	0.81 b

处理同图 1。不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。
Treatments are the same as those given in Fig. 1. Different lowercase letters represent significant difference among treatments at the $P < 0.05$.

表 3 低铁胁迫对 Bt 棉根和叶片中铵态氮、硝态氮、可溶性蛋白和全氮含量的影响
Table 3 Effects of low iron stress on $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$, soluble protein, and N content in the roots and leaves of Bt cotton

器官/处理 Organ/ treatment	铵态氮 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ($\mu\text{g g}^{-1} \text{FW}$)	硝态氮 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$)	可溶性蛋白含量 Soluble protein content ($\text{mg g}^{-1} \text{FW}$)	全氮含量 N content ($\text{mg g}^{-1} \text{DW}$)
根系 Root				
CK	6.6 a	13.4 a	12.7 a	41.4 a
LI	6.8 a	14.1 a	9.3 b	35.8 b
叶片 Leaf				
CK	13.2 a	26.4 a	21.3 a	57.1 a
LI	10.3 b	17.6 b	17.8 b	51.8 b

处理同图 1。不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。
Treatments are the same as those given in Fig. 1. Different lowercase letters represent significant difference among treatments at the $P < 0.05$.

表 4 转录组测序基础数据统计分析
Table 4 Statistical analysis of transcriptome sequencing basic data

样品 Sample	原始数据 Raw reads	有效数据 Clean reads	总映射率 Total mapped rate (%)	唯一映射率 Uniquely mapped rate (%)	Q30 (%)	GC 含量 GC content (%)
RCK_1	46,179,118	45,290,042	98.13	93.01	94.27	42.77
RCK_2	47,909,866	46,989,512	98.17	93.05	94.05	42.76
RCK_3	46,776,936	45,955,806	98.20	93.17	94.41	42.73
RLI_1	36,534,072	35,735,176	96.03	92.59	94.18	43.28
RLI_2	42,611,888	41,690,972	96.02	92.72	94.18	43.29
RID_3	36,994,328	36,155,932	95.98	92.77	94.03	43.30
LCK_1	47,984,028	47,017,502	98.50	91.19	94.25	44.13
LCK_2	54,041,314	53,158,296	98.55	92.01	94.24	44.13
LCK_3	45,829,824	44,978,082	98.55	91.28	94.13	44.15
LLI_1	37,090,636	36,270,280	98.48	91.46	94.09	43.65
LLI_2	46,722,582	45,791,778	98.49	91.67	94.26	43.65
LLI_3	50,516,840	49,554,758	98.46	91.53	94.34	43.62

RCK: 对照根; RLI: 低铁根; LCK: 对照叶片; LID: 低铁叶片。
RCK: CK roots; RLI: low iron roots; LCK: CK leaves; LLI: low iron leaves.

2.5 差异表达基因分析

对低铁胁迫和对照处理下 Bt 棉根和叶片差异表达基因情况进行统计。转录组数据中共筛选出差异表达基因 17,927 个, 其中在 RCK vs RLI 组筛选出差异基因 11,661 个, 其中有 6672 个基因上调, 4989 个基因下调; 在 LCK vs LLI 组筛选出差异基因 8972 个, 其中有 4134 个基因上调, 4838 个基因下调。维恩图显示, 有 2985 个基因在棉花根和叶片中共同表达, 其中包括 1333 个上调基因和 1652 个下调基因 (图 3), 表明在低铁胁迫下, Bt 棉根和叶片可能存在

共同或者独特的响应机制。

2.6 差异表达基因的 GO 注释与富集

对识别出的差异基因进行 GO 功能注释, 将其分为 3 个主要功能类别: 分子功能、细胞组分和生物过程。由表 5 可知, RCK vs RLI 和 LCK vs LLI 2 对比较组差异基因显著富集前 20 的 GO 条目中有 17 个条目都相同。多数基因被富集于刺激反应 (GO:0050896)、细胞壁(GO:0005618)、质膜(plasma membrane)、结合 (GO:0046906)、氧化还原活性 (GO:0016491)等代谢通路。

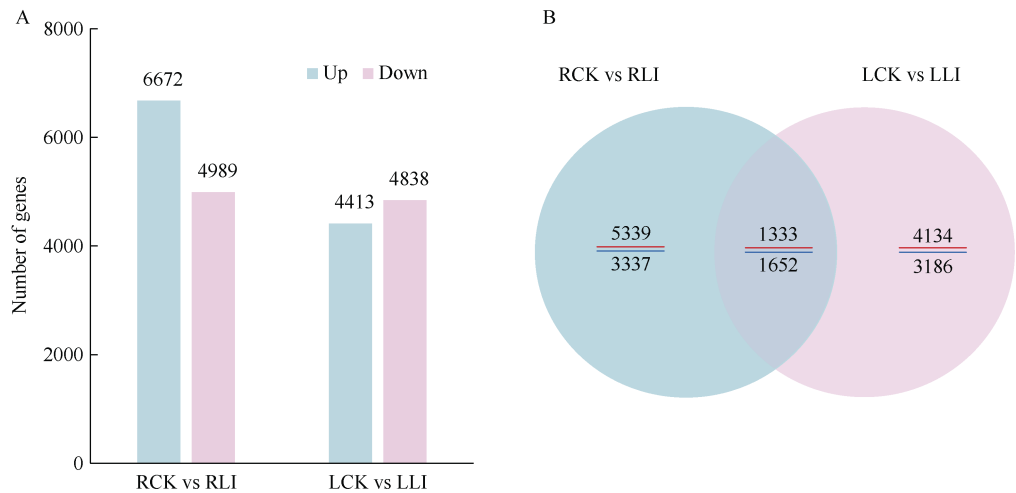


图 3 低铁胁迫下差异表达的基因

Fig. 3 Differentially expressed genes (DEGs) under low iron stress

A: 上调和下调的 DEG 数量; B: 差异表达基因 Venn 图。缩写同表 4。

A: numbers of up-regulate and down-regulate genes in each sample; B: Venn diagram of differentially expressed genes. Abbreviations are the same as those given in Table 4.

表 5 差异表达基因的 GO 注释

Table 5 GO annotation of differentially expressed genes (DEGs)

GO 号 GO ID	GO 功能 GO function	总基因数目 Total numbers	RCK vs RLI 差异基因数目 DEG numbers in RCK vs RLI	LCK vs LLI 差异基因数目 DEG numbers in LCK vs LLI	GO 类别 Category
GO:0071555	细胞壁组织 Cell wall organization	1433	349	319	BP
GO:0071554	细胞壁组织或生物发生 Cell wall organization or biogenesis	1904	447	398	BP
GO:0050896	刺激反应 Response to stimulus	15,817	3040	2434	BP
GO:0009725	对激素的反应 Response to hormone	5317	1134	885	BP
GO:0055072	铁离子平衡 Iron ion homeostasis	148	62	50	BP
GO:0005576	胞外区 Extracellular region	2833	733	588	CC
GO:0071944	细胞外围 Cell periphery	9137	1803	1528	CC

(续表 5)

GO 号 GO ID	GO 功能 GO function	总基因数目 Total numbers	RCK vs RLI 差异基因数目 DEG numbers in RCK vs RLI	LCK vs LLI 差异基因数目 DEG numbers in LCK vs LLI	GO 类别 Category
GO:0030312	外部封装结构 External encapsulating structure	1816	466	387	CC
GO:0005618	细胞壁 Cell wall	1775	453	375	CC
GO:0005886	质膜 Plasma membrane	7785	1470	1263	CC
GO:0031226	质膜的内在成分 Intrinsic component of plasma membrane	922	237	224	CC
GO:0031224	膜的内在成分 Intrinsic component of membrane	10,103	1841	1646	CC
GO:0031225	膜锚定组件 Anchored component of membrane	412	122	125	CC
GO:0003700	DNA 结合转录因子活性 DNA-binding transcription factor activity	3821	899	644	MF
GO:0016491	氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity	3512	827	671	MF
GO:0046906	四吡咯结合 Tetrapyrrole binding	863	246	194	MF
GO:0020037	血红素结合 Heme binding	736	236	156	MF

BP、CC、MF 分别代表生物学过程、细胞组分、分子功能。缩写同表 4。

BP: biological process; CC: cellular component; MF: molecular function. Abbreviations are the same as those given in Table 4.

2.7 差异基因的 KEGG 富集分析

KEGG 结果表明, RCK vs RLI 组的差异基因被富集到 123 条 KEGG 通路上, 其中有 45 条通路显著富集。LCK vs LLI 组的差异基因被富集到 121 条 KEGG 通路上, 其中 37 条通路显著富集。对富集程度最显著的 30 条通路进行 KEGG 富集图绘制(图 4)发现, 2 对比较组差异基因都在苯丙烷类物质生物合成、苯丙氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、酪氨酸代谢、植物激素信号转导、玉米素生物合成、淀粉和蔗糖代谢途径中显著富集。表明, Bt 棉可能通过渗透调节、抗氧化代谢和信号转导等过程来抵抗高铁胁迫。此外, 氮代谢途径也在根和叶片中共同显著富集, 表明高铁处理有可能通过对调节氮代谢来影响 Bt 杀虫蛋白表达。

2.8 氮素转运相关差异基因表达分析

植物硝酸根离子和铵离子的吸收和转运主要依赖于硝酸盐转运蛋白(nitrate transporter, NRT)基因家族和铵转运蛋白(ammonium transporter, AMT)基因家族。为探究 Bt 棉对高铁胁迫下氮素转运的响应机制, 本文对硝酸盐转运蛋白和铵转运蛋白相关的

差异基因进行分析, 并对其表达量进行热图绘制(图 5)。由图 5 可知, 高铁胁迫影响根系硝酸盐转运体 2 家族(NRT2)基因表达水平, *NRT2.1* (*Gh_D05G1003*)、*NRT2.3* (*Gh_D03G1308*)、*NRT2.5* (*Gh_D12G1457*、*Gh_A12G1331*)被显著诱导上调表达, 铵转运蛋白基因 *AMT1.1* (*Gh_D02G0484*、*Gh_A02G0434*、*Gh_D10G1604*)、*AMT2* (*Gh_A01G1981*)、*AMT3.1* (*Gh_A10G1378*、*Gh_D10G1085*)全部上调。与根中氮素转运蛋白基因变化相反, 叶片中 *NRT2.3* (*Gh_A03G0256*)基因下调表达, AMT 家族基因大多数表达水平受到抑制, 其中 *AMT1.1* (*Gh_A10G0954*、*Gh_A10G0956*)基因的表达量均下调。表明, 高铁胁迫会诱导根中氮素转运蛋白基因的上调表达, 但抑制叶片中相关基因的表达水平。

2.9 氮代谢通路中相关差异基因表达分析

Bt 棉杀虫蛋白表达与氮代谢密切相关, 本研究对氮代谢通路中相关差异基因进行统计分析(表 6)发现, 与对照相比, 高铁胁迫下根和叶片硝酸还原酶基因 *NR* (*Gh_D02G0815*、*Gh_A02G0769*)下调表达, *Gh_A01G1586*、*Gh_D01G1872* 仅在叶片中特异下调表达; 铁氧还蛋白-亚硝酸盐还原酶基因

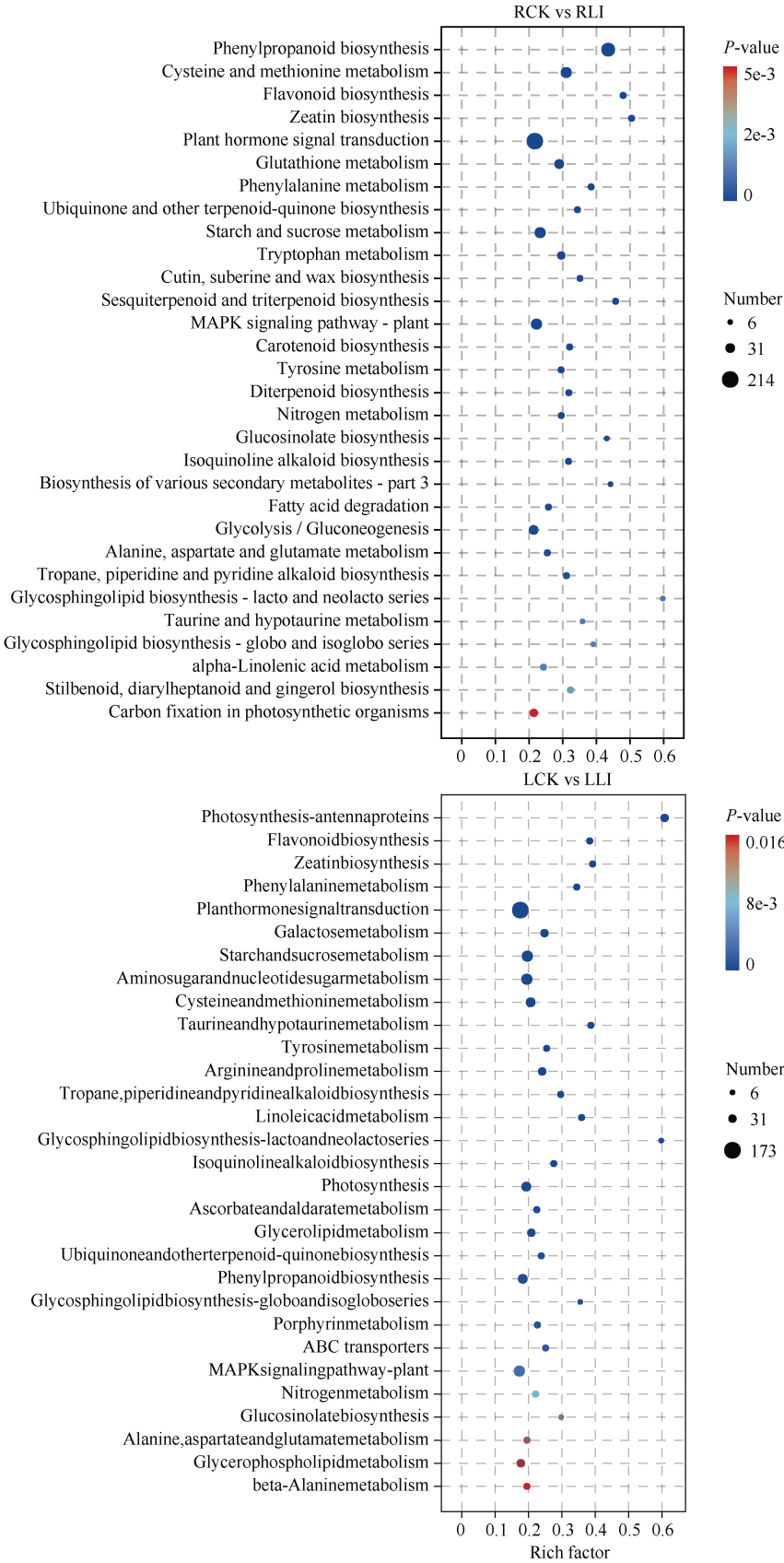


图 4 KEGG 通路富集散点图

Fig. 4 Scatter diagram of KEGG pathway enrichment
缩写同表 4。Abbreviations are the same as those given in Table 4.

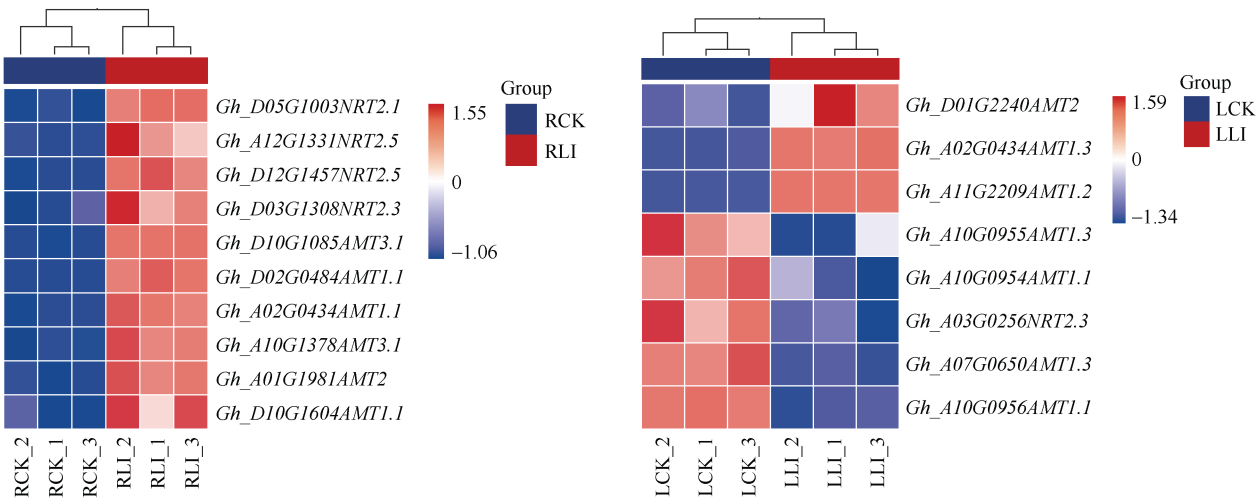


图 5 氮素转运相关差异基因表达热图
Fig. 5 Heatmaps of differentially expressed genes (DEGs) related NRT and AMT family
缩写同表 4。Abbreviations are the same as those given in Table 4.

表 6 氮代谢途径中差异基因表达分析
Table 6 Relative expression profiles of differentially expressed genes (DEGs) in the nitrogen metabolism pathway

基因 ID Gene ID	基因功能注释 Gene function annotation	调控 Regulation		基因名称 Gene name
		RCK vs RLI	LCK vs LLI	
Gh_D02G0815	硝酸还原酶[NADH] Nitrate reductase [NADH]	↓	↓	NR
Gh_A02G0769	硝酸还原酶[NADH] Nitrate reductase [NADH]	↓	↓	NR
Gh_A01G1586	硝酸还原酶[NADH] Nitrate reductase [NADH]	--	↓	NR
Gh_D01G1872	硝酸还原酶[NADH] Nitrate reductase [NADH]	↑	↓	NR
Gh_A13G0352	铁氧还蛋白-亚硝酸盐还原酶, 叶绿体 Ferredoxin-nitrite reductase, chloroplastic	↓	↓	NiR1
Gh_D07G1773	谷氨酰胺合成酶, 胞质同工酶 1 Glutamine synthetase, cytosolic isozyme 1	↑	↑	GS1;1
Gh_A13G0512	谷氨酰胺合成酶, 胞质同工酶 1 Glutamine synthetase, cytosolic isozyme 1	↑	↑	GS1;1
Gh_D13G0620	谷氨酰胺合成酶, 胞质同工酶 1 Glutamine synthetase, cytosolic isozyme 1	--	↑	GS1;1
Gh_D11G3479	谷氨酰胺合成酶, 结节同工酶 Glutamine synthetase, nodule isozyme	↑	↓	GS
Gh_D09G1909	谷氨酰胺合成酶, 叶同工酶, 叶绿体 Glutamine synthetase, leaf isozyme, chloroplastic	↓	--	GS
Gh_A09G1788	谷氨酰胺合成酶, 叶同工酶, 叶绿体 Glutamine synthetase, leaf isozyme, chloroplastic	↓	--	GS
Gh_D12G2422	谷氨酸合成酶 1 [NADH], 叶绿体 Glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic	↓	↓	GLT1
Gh_A12G2272	谷氨酸合成酶 1 [NADH], 叶绿体 Glutamate synthase 1 [NADH], chloroplastic	↓	--	GLT1

“↑”表示上调表达, “↓”表示下调表达, “--”表示正常表达。缩写同表 4。
“↑”: up-regulated; “↓”: down-regulated; “--”: normal. Abbreviations are the same as those given in Table 4.

NiR1 (*Gh_A13G0352*)在根和叶片中共同下调表达。谷氨酰胺合成酶基因 *GS1.1* 中 *Gh_A13G0512*、*Gh_D07G1773* 在根和叶片中共同上调表达, *Gh_D13G0620* 在叶片中特异上调表达; *GS* 基因中 *Gh_D09G1909*、*Gh_A09G1788* 仅在根中特异下调表达, *Gh_D11G3479* 在根中上调表达, 在叶片中下调表达。谷氨酸合成酶基因 *GLT1* (*Gh_D12G2422*) 在根和叶片中共同下调表达, *Gh_A12G2272* 仅在根中特异下调表达。表明低铁胁迫抑制了 Bt 棉根和叶片

中氮代谢相关的 *NR*、*NiR1*、*GLT1* 基因表达水平, 但诱导了 *GS1.1* 基因表达。

2.10 qRT-PCR 验证

转录组测序鉴定出低铁胁迫下 Bt 棉幼苗根和叶片中氮代谢相关的差异表达基因。为检验 RNA-seq 结果是否可靠, 本研究使用定量 qPCR 技术对 4 个酶基因进行了验证(图 6)。测定结果与 RNA-seq 结果的表达趋势相同, 表明转录组数据具有较高的可靠性。

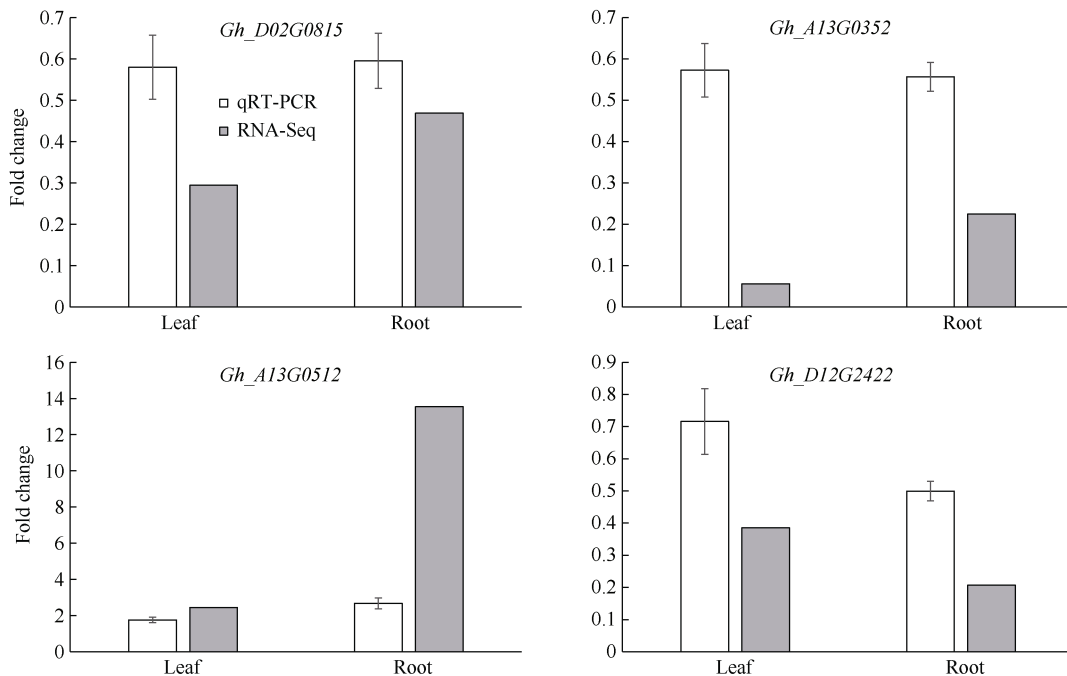


图 6 差异基因 qRT-PCR 验证

Fig. 6 Verification of the differentially expressed genes by qRT-PCR

3 讨论

前人研究表明, 营养元素的亏缺对 Bt 棉杀虫蛋白合成有一定影响。周冬生等^[23]和 Chen 等^[7,24]发现土壤缺氮可引起叶片、幼蕾和棉籽中杀虫蛋白含量降低, Bt 棉对棉铃虫低龄幼虫的杀虫活性和对高龄幼虫的抑制生长作用明显降低。Rochester 等^[6]研究认为, 除氮肥亏缺降低抗虫棉 Bt 棉杀虫蛋白合成外, 其他营养元素的缺乏也能降低 Bt 杀虫蛋白的表达。缺铁是一种常见植物营养障碍^[8,25], 世界上大部分干旱、半干旱土壤都存在植物缺铁问题, 尤其是在石灰质土壤中, 可溶性的 Fe^{2+} 极易被固定为不溶性的 Fe^{3+} , 使得土壤中有效铁含量降低, 影响植物对铁的正常吸收, 造成植物叶片黄化, 发育迟缓。已有文献报道^[26], 我国新疆摩尔多地区出现大面积棉

田缺铁黄化现象, 严重棉株叶缘出现红褐色斑点, 导致棉花产量大幅下降。本研究结果表明, 铁营养的亏缺会显著降低抗虫棉 Bt 杀虫蛋白含量, 且根系中 Bt 杀虫蛋白含量下降幅度更大。说明低铁不仅会对 Bt 棉产量有显著影响, 而且能显著降低抗虫棉 Bt 杀虫蛋白的合成。

$\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 是植物吸收的 2 种主要无机氮素形态, 植物对其吸收利用不但受外界环境影响, 还与植物体内硝酸盐转运蛋白和铵转运蛋白基因的表达水平有关^[27-28]。丁伟^[29]研究发现, 缺铁处理下杜梨组培苗根中硝酸盐低亲和和转运蛋白 *NRT1.3* 和 *NRT1.2* 基因在缺铁后期表达上调, 而 *NRT1* 基因和高亲和和转运蛋白 *NRT2* 基因表达量未发生显著变化。Jin 等^[25]研究表明, 低铁胁迫会导致香橙叶片 *NRT2.5* 转录水平大幅降低。本研究结果与之相类似,

根系中 NRT2 家族基因(*NRT2.1*、*NRT2.3*、*NRT2.5*)和 AMT 家族基因(*AMT1.1*、*AMT2*、*AMT3.1*)在低铁胁迫下均大幅上调,而叶片中 *NRT2.3* 基因和铵高亲和转运蛋白 *AMT1.1* 基因均下调表达。低铁处理下,棉花根中 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 含量无明显变化,而叶片中这 2 种形态氮素浓度显著降低。说明 Bt 棉根和叶片中氮素的吸收、转运对低铁胁迫的响应机制不同,低铁会诱导 Bt 棉根系加快氮素转运基因的转录速度,以利于根系氮素的吸收,而叶片氮素转运蛋白基因表达水平的下降,会降低氮素向叶片的转运效率。类似结果在植物缺氮胁迫^[30]、盐胁迫^[31]时也有报道。

根系吸收的 NO_3^- 首先被分布在细胞质内或细胞膜外的硝酸还原酶降解为 NO_2^- , NO_2^- 进入叶绿体或非绿色组织的质体后,在亚硝酸还原酶的催化下进一步还原为 NH_4^+ 。还原 NH_4^+ 在谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合成酶催化下进入谷氨酸合成循环转变为可被植物直接利用的有机态氮。研究表明,根系和叶片中硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、谷氨酸合成酶活性低铁胁迫后明显下降,相应的 *NR*、*NiR1*、*GLT1* 基因转录水平也与之相一致,多数基因表达下调。铁离子是氮素同化还原途径中关键酶的金属辅助因子,硝酸盐还原酶、亚硝酸盐还原酶和谷氨酸合成酶都需要铁作为 Fe-血红素基团或 Fe-S 簇^[8,32]。本文 GO 富集分析也发现,低铁胁迫下根和叶片差异基因的分子功能都富集于四吡咯结合(tetrapyrrole binding)、血红素结合(heme binding)。因此,上述 3 种酶活性的降低可能与基因转录抑制和血红素失活有关。与谷氨酰胺合成酶相关基因大多上调表达不同,叶片中谷氨酰胺合成酶变化较小,而根系中谷氨酰胺合成酶活性大幅降低。究其原因,一方面可能是由于谷氨酰胺合成酶活性的强弱受底物 NH_4^+ 、Glu 浓度的影响,叶片中氨态氮含量大幅下降,会影响谷氨酰胺合成酶催化效率,另一方面可能与谷氨酰胺合成酶转录后基因的调控(翻译速率、蛋白修饰等)相关。谷氨酰胺合成酶(GS)基于亚细胞定位可分为胞液型(GS1)和质体型(GS2)^[33],其中 *GS1* 主要参与叶片衰老过程中氮素的转运和再利用,*GS2* 主要负责对硝酸还原、光呼吸释放产生的氨进行同化。Ishiyama 等^[34]研究发现,缺氮可以诱导水稻 *OsGS1;1* 在根系表皮和外皮层中过量表达。Bernard 等^[35]研究认为,小麦 *TaGS1;2* 在叶片衰老时表达量明显上调,并在老叶氮素的转运过程中发挥主要作

用。本文转录组数据也得到类似的结果,根系和叶片中 *GS1.1* 表达量均显著上调。这也说明低铁胁迫后可能会引发 Bt 棉早衰,诱导 *GS1* 基因转录水平的提高。

此外,本文通过测定 Bt 棉根系和叶片可溶性蛋白含量和全氮含量可知,低铁会导致根系和叶片可溶性蛋白含量和氮素积累量显著下降。由此可见,Bt 棉在低铁环境下,氮代谢关键酶基因的显著下调抑制了氮素还原、同化相关酶的活性,降低了根系和叶片中蛋白质的合成,导致 Bt 棉杀虫蛋白含量显著下降。

综上所述,低铁胁迫会降低抗虫棉氮素代谢途径中关键酶基因的转录水平、生理活性,从而抑制蛋白质的合成,导致 Bt 杀虫蛋白含量下降。我国北方地区大部分棉田为碱性钙质土壤,土壤缺铁程度普遍较高^[9]。因此,生产上应通过增施有机肥料、合理调节土壤酸碱度、叶面喷施铁肥^[25]等栽培方式来促进 Bt 杀虫蛋白的稳定、高效表达,为转 Bt 基因棉的安全高产栽培提供有效保障。

4 结论

低铁胁迫会显著降低 Bt 棉棉苗根和叶片中杀虫蛋白含量。低铁处理抑制了 Bt 棉根和叶片中硝酸还原酶、亚硝酸还原酶和谷氨酸合成酶活性,降低了可溶性蛋白含量和全氮含量。转录组分析发现,低铁处理下 Bt 棉根和叶片中差异表达基因主要集中于苯丙氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、激素信号转导、玉米素生物合成、氮代谢等途径,低铁胁迫下调了氮代谢途径中 *NR*、*NiR1* 和 *GLT1* 基因表达水平。以上结果为解析低铁胁迫下 Bt 棉杀虫蛋白含量变化特征提供新的理论依据。

References

- [1] Wu K M, Lu Y H, Feng H Q, Jiang Y H, Zhao J Z. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. *Science*, 2008, 321: 1676–1678.
- [2] Qiao F B. Fifteen years of Bt cotton in China: the economic impact and its dynamics. *World Dev*, 2015, 70: 177–185.
- [3] 邢羽桐, 滕永康, 吴天凡, 刘媛媛, 陈源, 陈媛, 陈德华, 张祥. 高温干旱下缩节胺通过调节碳和氨基酸代谢提高 Bt 棉杀虫蛋白含量的生理机制. *中国农业科学*, 2023, 56: 1471–1483.
- Xing Y T, Teng Y K, Wu T F, Liu Y Y, Chen Y, Chen Y, Chen D H, Zhang X. Mepiquat chloride increases the CryI^{Ac} protein content through regulating carbon and amino acid metabolism of Bt cotton under high temperature and drought Stress. *Sci Agric Sin*, 2023, 56: 1471–1483 (in Chinese with English abstract).

- [4] 戴雨阳, 岳野, 刘震宇, 何润, 刘雨婷, 张祥, 陈德华, 陈媛. 低温胁迫对 Bt 棉纤维中杀虫蛋白含量及氮代谢的影响. 作物学报, 2024, 50: 709–720.
- Dai Y Y, Yue Y, Liu Z Y, He R, Liu Y T, Zhang X, Chen D H, Chen Y. Effects of low temperature on the expression of insecticidal protein in Bt cotton fibers and its physiological mechanism. *Acta Agron Sin*, 2024, 50: 709–720 (in Chinese with English abstract).
- [5] Wang Y H, Gao J, Sun M F, Chen J P, Zhang X, Chen Y, Chen D H. Impacts of soil salinity on Bt protein concentration in square of transgenic Bt cotton. *PLoS One*, 2018, 13: e207013.
- [6] Rochester I J. Effect of genotype, edaphic, environmental conditions, and agronomic practices on Cry1Ac protein expression in transgenic cotton. *J Cotton Sci*, 2006, 10: 252–262.
- [7] Chen Y, Liu Z Y, Tambel L I M, Zhang X, Chen Y, Chen D H. Reduced square *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein content of transgenic cotton under N deficit. *J Integr Agric*, 2021, 20: 100–108.
- [8] Liang G. Iron uptake, signaling, and sensing in plants. *Plant Commun*, 2022, 3: 100349.
- [9] Yuan J P, Li D H, Shen C W, Wu C H, Khan N, Pan F F, Yang H L, Li X, Guo W L, Chen B H, Li X Z. Transcriptome analysis revealed the molecular response mechanism of non-heading Chinese cabbage to iron deficiency stress. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 848424.
- [10] Li J, Nie K, Wang L Y, Zhao Y Y, Qu M N, Yang D L, Guan X Y. The molecular mechanism of *GhbHLH121* in response to iron deficiency in cotton seedlings. *Plants*, 2023, 12: 1955.
- [11] 张文静, 程建峰, 刘婕, 何萍, 王紫璇, 张祖健, 蒋海燕. 植物铁素(Fe)营养的生理研究进展. 中国农学通报, 2021, 37(36): 103–110.
- Zhang W J, Cheng J F, Liu J, He P, Wang Z W, Zhang Z J, Jiang H Y. Nutrition physiology of iron (Fe) in plants: research progress. *Chin Agric Sci Bull*, 2021, 37(36): 103–110 (in Chinese with English abstract).
- [12] Colombo C, Palumbo G, He J Z, Roberto P, Stefano C. Review on iron availability in soil: interaction of Fe minerals, plants, and microbes. *J Soils Sediments*, 2014, 14: 538–548.
- [13] Borlotti A, Viganì G, Zocchi G. Iron deficiency affects nitrogen metabolism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Bmc Plant Biol*, 2012, 12: 189.
- [14] Li J, Cao X M, Jia X C, Liu L Y, Cao H W, Qin W Q, Li M. Iron deficiency leads to chlorosis through impacting chlorophyll synthesis and nitrogen metabolism in *Areca catechu* L. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 710093.
- [15] Dong H Z, Li W J. Variability of endotoxin expression in Bt transgenic cotton. *J Agron Crop Sci*, 2007, 193: 21–29.
- [16] Chen D H, Ye G Y, Yang C Q, Chen Y, Wu Y K. The effect of high temperature on the insecticidal properties of Bt cotton. *Environ Exp Bot*, 2005, 53: 333–342.
- [17] Meng S, Zhang C, Su L, Li Y, Zhao Z. Nitrogen uptake and metabolism of *Populus simonii* in response to PEG-induced drought stress. *Environ Exp Bot*, 2016, 123: 78–87.
- [18] Hu W, Zhao W Q, Yang J S, Oosterhuis D M, Loka D A, Zhou Z G. Relationship between potassium fertilization and nitrogen metabolism in the leaf subtending the cotton (*Gossypium hirsutum* L.) boll during the boll development stage. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 101: 113–123.
- [19] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [20] Guo K, Tu L L, Wang P C, Du X Q, Ye S, Luo M, Zhang X L. Ascorbate alleviates Fe deficiency-induced stress in cotton (*Gossypium hirsutum*) by modulating ABA levels. *Front Plant Sci*, 2017, 7: 01997.
- [21] Roberts A, Trapnell C, Donaghey J, Rinn J L, Pachter L. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. *Genome Biol*, 2011, 12: R22.
- [22] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [23] 周冬生, 吴振廷, 王学林, 倪春耕, 郑厚今. 施肥量和环境温度对转 Bt 基因棉抗虫性的影响. 安徽农业大学学报, 2000, 27: 352–357.
- Zhou D S, Wu Z T, Wang X L, Ni C G, Zheng J H. Effects of fertilization and environmental temperature on the resistance of Bt transgenic cotton to cotton bollworm. *J Anhui Agric Univ*, 2000, 27: 352–357 (in Chinese with English abstract).
- [24] Chen Y, Li Y B, Zhou M Y, Cai Z Z, Tambel L I M, Zhang X, Chen Y, Chen D H. Nitrogen deficit decreases seed Cry1Ac endotoxin expression in Bt transgenic cotton. *Plant Physiol Biochem*, 2019, 141: 114–121.
- [25] Jin L F, Liu Y Z, Du W, Fu L N, Hussain S B, Peng S A. Physiological and transcriptional analysis reveals pathways involved in iron deficiency chlorosis in fragrant citrus. *Tree Genet Genomes*, 2017, 13: 51.
- [26] 朱彭玲, 杜秉海, 丁延芹, 杜志兵, 于素芳, 陈强. 新疆棉花根际土壤铁载体产生菌的遗传多样性及系统发育研究. 中国农业科学, 2009, 42: 1568–1574.
- Zhu P L, Du B H, Ding Y Q, Du Z B, Yu S F, Chen Q. Genetic diversity and phylogeny of siderophore producing bacteria isolated from cotton rhizosphere in China's Xinjiang. *Sci Agric Sin*, 2009, 42: 1568–1574 (in Chinese with English abstract).
- [27] 彭正萍. 植物氮素吸收、运转和分配调控机制研究. 河北农业大学学报, 2019, 42(2): 1–5.
- Peng Z P. Absorption, transportation and regulation of nitrogen element in plants. *J Hebei Agric Univ*, 2019, 42(2): 1–5 (in Chinese with English abstract).
- [28] 李晨阳, 孔祥强, 董合忠. 植物吸收转运硝态氮及其信号调控研究进展. 核农学报, 2020, 34: 982–993.
- Li C Y, Kong Q X, Dong H Z. Nitrate uptake, transport and signaling regulation pathways. *J Nucl Agric Sci*, 2020, 34: 982–993 (in Chinese with English abstract).
- [29] 丁伟. 缺铁胁迫对梨氮代谢及赤霉素信号转导相关基因表达的影响. 安徽农业大学硕士学位论文, 安徽合肥, 2015.
- Ding W. Effects of Iron-deficiency Stress on the Related Genes Expression of Nitrogen Metabolism and GA Signal Transduction of Pear. MS Thesis of Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui, China, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [30] Xin W, Zhang L, Zhang W Z, Gao J P, Yi J, Zhen X X, Li Z, Zhao Y, Peng C C, Zhao C. An integrated analysis of the rice transcriptome and metabolome reveals differential regulation of

- carbon and nitrogen metabolism in response to nitrogen availability. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 2349.
- [31] Abouelsaad I, Weihrauch D, Renault S. Effects of salt stress on the expression of key genes related to nitrogen assimilation and transport in the roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative. *Sci Hortic*, 2016, 211: 70–78.
- [32] Rae T D, Goff H M. The heme prosthetic group of lactoperoxidase: structural characteristics of heme I and heme I-peptides. *J Biol Chem*, 1998, 273: 27968–27977.
- [33] 冯万军, 邢国芳, 牛旭龙, 窦晨, 韩渊怀. 植物谷氨酰胺合成酶研究进展及其应用前景. *生物工程学报*, 2015, 31: 1301–1312.
Feng W J, Xing G F, Niu X L, Dou C, Han Y H. Progress and application prospects of glutamine synthetase in plants. *Chin J Biotechnol*, 2015, 31: 1301–1312 (in Chinese with English abstract).
- [34] Ishiyama K, Inoue E, Tabuchi M, Yamaya T, Takahashi H. Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 1640–1647.
- [35] Bernard S M, Møller A L B, Dionisio G, Kichey T, Jahn T P, Dubois F, Baudo M, Lopes M S, Tercé-Laforgue T, Foyer C H, Parry M A J, Forde B G, Araus J L, Hirel B, Schjoerring J K, Habash D Z. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol*, 2008, 67: 89–105.