DOI: 10. 11686/cyxb2025490 http://cyxb. magtech. com. cn
柯丹霞, 周兆源, 张可馨, 等. 百脉根糖转运蛋白*LjSWEET10*的克隆及抗盐功能分析. 草业学报, 2026, 35(12): 197－209.
KE Dan-xia, ZHOU Zhao-yuan, ZHANG Ke-xin, *et al*. Cloning and salt tolerance functional analysis of the sugar transporter gene *LjSWEET10* from *Lotus japonicus*. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(12): 197－209.

百脉根糖转运蛋白*LjSWEET10*的克隆及抗盐功能分析

柯丹霞*,周兆源,张可馨,林佳诺,宋晓莉
(信阳师范大学生命科学学院,河南 信阳 464000)

摘要:*SWEET*家族是一类参与糖类转运的膜蛋白,在植物韧皮部装载、生殖发育及逆境响应等关键生理过程中发挥重要功能。本研究从百脉根中克隆了一个编码糖转运蛋白的基因*LjSWEET10*,其开放阅读框编码一个由271个氨基酸残基组成的蛋白。生物信息学分析表明,LjSWEET10蛋白的二级结构由44.65%的无规卷曲、40.59%的α-螺旋和14.76%的延伸链构成;该蛋白包含SWEET家族特有的两个保守MtN3/saliva结构域,并具有7个典型的跨膜区。通过将LjSWEET10与来自拟南芥、大豆等11个不同物种的同源蛋白进行多序列比对,发现其氨基酸序列相似性为45.96%～72.69%。系统发育分析表明,LjSWEET10与菜豆PvSWEET10的亲缘关系最近。亚细胞定位试验证实该蛋白定位于拟南芥原生质体细胞质膜。表达模式分析显示,在盐胁迫条件下,*LjSWEET10*基因表达持续上调,胁迫后12 h达到峰值,约为胁迫前水平的7.6倍,至24 h回落至初始水平的4.2倍。利用酵母异源表达体系进行功能验证,结果表明LjSWEET10具备果糖转运活性。在拟南芥中过表达*LjSWEET10*基因可显著增强植株的耐盐性。随着盐处理浓度升高,叶片丙二醛含量呈上升趋势,但转基因株系的增幅显著低于野生型;叶绿素含量则随盐浓度升高而下降,但转基因株系的降幅显著低于野生型。此外,在盐胁迫条件下,*LjSWEET10*的过表达可显著上调多个胁迫响应相关基因(包括*AtSOS1*、*AtMYC2*、*AtABI5*和*AtDREB1A*)的表达水平。综上所述,LjSWEET10在植物盐胁迫响应过程中发挥正调控作用。本研究不仅深化了对SWEET蛋白在非生物胁迫中功能机制的认识,也为百脉根耐盐性的分子育种提供了重要的候选基因和理论依据,对盐碱地治理及牧草产业发展具有积极意义。

关键词:百脉根;糖转运蛋白;异源表达;耐盐性

Cloning and salt tolerance functional analysis of the sugar transporter gene *LjSWEET10* from *Lotus japonicus*

KE Dan-xia*, ZHOU Zhao-yuan, ZHANG Ke-xin, LIN Jia-nuo, SONG Xiao-li
College of Life Sciences, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, *China*

Abstract: The *SWEET* gene family encodes a class of membrane proteins involved in sugar transport, playing core roles in key physiological processes such as phloem loading, reproductive development, and stress response in plants. In this study, a gene encoding a sugar transporter protein, designated *LjSWEET10*, was cloned from *Lotus japonicus*. Its open reading frame encodes a protein consisting of 271 amino acid residues. Bioinformatics analysis revealed that the LjSWEET10 protein comprises 44.65% random coils, 40.59% α-helices, and 14.76% extended

收稿日期:2025-12-02;改回日期:2026-03-16
基金项目:国家自然科学基金(U1904102),河南省自然科学基金(252300423087)和信阳师范大学"南湖学者奖励计划"青年项目资助。
作者简介:柯丹霞(1983－),女,湖北十堰人,博士。
*通信作者 Corresponding author. E-mail: kdx_029@163.com

strands in its secondary structure. It contains two conserved MtN3/saliva domains characteristic of the SWEET family and possesses seven typical transmembrane domains. Multiple sequence alignment of LjSWEET10 with homologous proteins from 11 different species, including *Arabidopsis thaliana* and *Glycine max*, showed amino acid sequence identities ranging from 45.96% to 72.69%. Phylogenetic analysis indicated that LjSWEET10 is most closely related to the PvSWEET10 protein from *Phaseolus vulgaris*. Subcellular localization experiments confirmed that this protein localizes to the plasma membrane of *A. thaliana* protoplasts. Expression pattern analysis showed that under salt stress conditions, the expression of *LjSWEET10* was continuously upregulated, reaching a peak at 12 hours (approximately 7.6 times the pre-stress level) and declining to 4.2 times the initial level by 24 hours. Functional validation using a yeast heterologous expression system demonstrated that this gene possesses fructose transport activity. Overexpression of *LjSWEET10* in *A. thaliana* significantly enhanced the salt tolerance of the plants. With increasing salt concentrations, leaf malondialdehyde content increased, but the magnitude of the increase was significantly lower in transgenic lines compared to the wild type. Concurrently, chlorophyll content decreased with rising salt concentrations, but the decrease was significantly less pronounced in transgenic lines than in the wild type. Overexpression of *LjSWEET10* significantly upregulated the expression of multiple stress-responsive genes, including *AtSOS1*, *AtMYC2*, *AtABI5*, and *AtDREB1A*, under salt stress conditions. In conclusion, LjSWEET10 functions as a positive regulator in the plant response to salt stress. This study not only deepens the understanding of the functional mechanism of SWEET proteins in abiotic stress but also provides an important candidate gene and theoretical basis for molecular breeding of salt tolerance in *L. japonicus*. These results hold positive significance for the management of saline-alkali lands and the development of the forage industry.

Key words: *Lotus japonicus*; sugar transporter protein; heterologous expression; salt tolerance

土壤盐渍化已成为制约全球农业可持续发展的关键非生物逆境因子,世界约20%的灌溉农田均受其不利影响,导致作物生产力严重下降[1]。在我国,盐渍化土壤分布范围广、总面积大,约占可利用土地的5%,且因自然环境恶化、化学肥料滥用及灌溉方式不当等因素,其恶化程度与面积仍在加剧,对国家农业可持续发展构成了持续威胁[2-4]。百脉根(*Lotus japonicus*)是豆科百脉根属的多年生草本植物,原产于欧亚大陆温暖地带。其主根粗壮,侧根发达,茎丛生,株高可达90 cm,是我国西北等地一种产草量高、寿命长、营养丰富的优良牧草,兼具药用价值、土壤改良与水土保持功能。尽管百脉根拥有较强的抗旱、抗寒及抗病虫害能力,但其耐盐碱性较差,成为限制其在盐渍化区域推广应用的瓶颈[5]。

SWEET(sugars will eventually be exported transporters)是一类参与糖转运的膜蛋白家族,于2012年首次在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中被发现[6]。该家族蛋白能够根据糖浓度梯度实现细胞内外的双向糖转运。其结构特征是由仅6~7个跨膜螺旋构成的转运孔道,使其成为最小的转运蛋白家族之一[7-8]。*SWEET*基因家族通过介导细胞间和长距离糖运输,广泛参与多种生理功能,包括韧皮部运输[9]、花蜜分泌[10]、花粉营养[11]、胚胎发育[12]、种子灌浆[13]以及非生物胁迫响应[14]。采用在己糖转运缺陷型的酿酒酵母菌株EBY.VW4000中异源表达的方法,研究人员鉴定出多个SWEET蛋白的糖转运功能[15-16]。研究表明,不同物种的SWEET蛋白在糖类转运功能上存在显著分化,呈现了从专一到广谱的多种类型,揭示了该家族功能的多样性。

越来越多的研究表明,*SWEET*基因家族在植物响应干旱与高盐胁迫过程中发挥关键作用。拟南芥通过上调*AtSWEET11*、*AtSWEET12*、*AtSWEET13*和*AtSWEET15*等基因的表达,促进韧皮部蔗糖装载,增强糖从叶片向根部的转运,从而促进根系发育并提高抗旱性[17-19]。此外,液泡膜定位的*AtSWEET17*通过调节果糖介导的根系构型在耐旱中起关键作用[20]。水稻(*Oryza sativa*)*OsSWEET13*和*OsSWEET15*通过调控蔗糖转运参与干旱与高盐响应[21];玉米(*Zea mays*)*ZmSWEET15a*在干旱和高盐下表达显著上升,*ZmSWEET1b*可能通过调节气孔开闭影响水分利用效率[22-23]。盐胁迫可诱导拟南芥中*AtSWEET1*、*AtSWEET2*、*AtSWEET4*、*AtSWEET14*

和*AtSWEET15*等多个成员的表达，并上调水稻*OsSWEET1b*、*OsSWEET7c*和*OsSWEET15*等基因的表达[24]。值得注意的是，盐胁迫诱导的FLN2蛋白通过抑制*AtSWEET11*和*AtSWEET14*的表达调控糖代谢，进而增强耐盐性[25]。相反，过表达*AtSWEET15*和*AtSWEET16*会提高植株对盐的敏感性，而其突变体则表现出更强的耐盐性与根系活性[26]，表明不同SWEET成员在盐胁迫中功能存在分化。

尽管*SWEET*基因在植物盐胁迫响应中的重要作用已被揭示，但其在百脉根中的相关研究尚属空白。鉴于此，本研究克隆了百脉根中的*LjSWEET10*基因，并对其进行了生物信息学分析及亚细胞定位。*LjSWEET10*基因的表达受盐胁迫诱导，其在酵母中主要转运果糖。在拟南芥中过表达*LjSWEET10*基因能显著增强转基因植株的抗盐能力并促进下游盐胁迫响应相关基因的表达。本研究不仅为培育耐盐百脉根新种质奠定了理论基础，也为盐碱地牧草育种提供了新思路。

1　材料与方法

1.1　植物材料及生长条件

百脉根（MG-20）种子经表面消毒后，均匀播种于铺有双层滤纸的培养皿中，加入适量蒸馏水，置于22 ℃恒温培养箱内进行暗培养以促进萌发。培养3～4 d后，选取生长状态一致的幼苗，转至装有1/2 Hoagland营养液的无菌育苗盘中，在光照16 h/黑暗8 h的条件下继续培养。待幼苗长出第一片真叶时，进行盐胁迫处理：将幼苗转移至含有200 mmol·L^{-1} NaCl的1/2 Hoagland营养液中，分别于胁迫处理后的3、6、12和24 h收集根部样品。以未经盐处理的根组织作为0 h对照。取样后立即用液氮速冻，随后保存于－80 ℃超低温冰箱。盐处理3批幼苗，每一批取样3个重复。2024年5－6月完成样品采集工作。试验地点位于信阳师范大学生命科学学院。

拟南芥（哥伦比亚生态型）种子播种于含黑炭土的花盆中，并在植物生长室（昼/夜周期为12 h/24 ℃，12 h/20 ℃）内培养。取生长4周的拟南芥植株叶片用于原生质体的制备。

1.2　基因的克隆和生物信息学分析

根据百脉根*LjSWEET10*基因（登录号：XM_057567390.1）的编码序列（coding sequence，CDS）设计特异性引物（表1）。从百脉根根组织中提取总RNA后，参照天根生化科技（北京）有限公司反转录试剂盒说明书合成cDNA第一链。以其为模板，利用上述引物扩增*LjSWEET10*基因的完整编码区，所得PCR产物送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序验证。

利用在线网站EXPASY和SOPMA对LjSWEET10蛋白质的物理性质和二级结构进行预测和分析；通过PHYRE 2在线网站对其三级结构进行预测分析；使用NCBI中的Web CD-Search Tool对蛋白质序列进行保守结构域分析；使用DNAMAN软件进行氨基酸多序列比对和系统发育树的构建。2024年7月完成基因克隆测序及生信分析。

1.3　拟南芥原生质体共定位

拟南芥原生质体的分离参照前人[27]的方法进行。将携带GFP（绿色荧光蛋白，green fluorescent protein）标签的LjSWEET10（LjSWEET10-GFP）与携带RFP（红色荧光蛋白，red fluorescent protein）标签的细胞膜标记蛋白（PM-RFP）在拟南芥原生质体中共表达。以携带GFP标签的35S（35S-GFP）与PM-RFP在拟南芥原生质体中的共表达作为阳性对照。使用激光共聚焦扫描显微镜（LSM880，卡尔蔡司股份公司，德国）观察GFP与RFP的荧光信号。2024年9月完成蛋白亚细胞定位工作。

1.4　LjSWEET10的糖转运类型分析

将*LjSWEET10*基因的CDS克隆至酵母载体pDR196中，随后通过高效醋酸锂酵母转化法将重组质粒pDR196-*LjSWEET10*转入EBY.VW4000酵母菌株[28]。将转化后的菌液划线于含2%麦芽糖的缺失尿嘧啶的合成缺陷培养基（synthetic dropout medium lacking uracil，SD-ura）筛选平板上，倒置平板并于30 ℃培养3～5 d。挑取单菌落接种至含2%麦芽糖的SD-ura液体培养基（20 g·L^{-1}麦芽糖，6.7 g·L^{-1}酵母无氨基氮源，0.78 g·L^{-1}缺失尿嘧啶的缺陷型氨基酸混合物）中，于30 ℃振荡培养过夜。待培养液OD_{600}达到1.0时，收集菌液离心，用无菌超纯水重悬菌体沉淀以消除残留培养基的影响。以4 μL原菌悬液（×1稀释度）为基准，依次进行10、100及1000倍

梯度稀释。分别将各稀释度菌液点样于含不同唯一碳源(2% 麦芽糖、2% 葡萄糖、2% 果糖)的SD-ura筛选平板上,倒置平板并于30 ℃培养3~5 d后观察生长情况。2025年5—6月完成糖转运类型分析工作,试验重复3次。

1.5 转基因拟南芥植株的获得及盐胁迫处理

将*LjSWEET10*基因的CDS克隆至植物表达载体pCAMBIA1302中,通过农杆菌介导的花序浸染法将重组质粒转入拟南芥[29]。在潮霉素抗性筛选中获得阳性幼苗,经PCR检测确认目标基因的表达水平后,最终选取3个*LjSWEET10*基因过表达的拟南芥株系用于盐胁迫试验。

选取3个转基因株系(OE-1、OE-2、OE-3)的T_3代拟南芥种子,播种于含黑炭土的花盆中,在植物生长室(昼/夜周期为12 h/24 ℃,12 h/20 ℃)培养,正常生长两周后选取长势一致的植株进行盐胁迫试验:将每一个转基因株系平均分为3组,每天分别浇灌等体积(200 mL)的含有0、100和200 mmol·L^{-1} NaCl的1/8 Hoagland营养液,野生型拟南芥(wild type, WT)作为对照,每组处理15棵植株,共12组,盐胁迫处理1周后,对拟南芥的抗盐表型拍照并对生理指标进行测定,重复3次。2024年10月—2025年1月完成表型统计。

1.6 丙二醛含量的测定

采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛含量[29]。取相同叶位的叶片约0.2 g置于预冷液氮的研钵中研磨,加入2 mL 5% 三氯乙酸匀浆,转移至离心管离心。取上清液加入0.5% 硫代巴比妥酸溶液,混匀后于100 ℃水浴反应15 min,冷却后再次离心。以等体积0.5% 硫代巴比妥酸与5% 三氯乙酸混合液作为空白对照,使用紫外分光光度计(TU-1901,北京普析通用仪器有限责任公司,中国)测定反应液在450、532和600 nm波长下的吸光度:

$$丙二醛浓度(C,\ \mu mol\cdot L^{-1})=6.45\times(OD_{532}-OD_{600})-0.56\times OD_{450}$$

$$丙二醛含量(\mu mol\cdot g^{-1})=C\times提取液体积/样品质量$$

1.7 叶绿素含量的测定

取相同叶位的叶片0.2 g,研磨后加入1 mL预冷的80% 丙酮溶液,暗处理20 min。离心后收集上清液,加入两倍体积的80% 丙酮溶液,以纯80% 丙酮溶液作为对照。于663和645 nm波长下测定反应液的吸光度,并按下列公式计算叶绿素含量[29]:

$$叶绿素\ a=(12.72\times OD_{663}-2.59\times OD_{645})\times 稀释倍数$$

$$叶绿素\ b=(22.88\times OD_{645}-4.67\times OD_{663})\times 稀释倍数$$

$$总叶绿素=叶绿素\ a+叶绿素\ b$$

$$叶绿素含量(mg\cdot g^{-1})=(总叶绿素浓度\times 反应液体积\times 稀释倍数)/样品质量。$$

2025年1月完成生理指标测定,试验重复3次。

1.8 荧光定量PCR分析

为分析盐胁迫下*LjSWEET10*基因的表达模式,收集经200 mmol·L^{-1} NaCl处理不同时间后的百脉根根部组织。同时,为评估转基因拟南芥中胁迫响应相关基因*AtSOS1*(NM_126259)、*AtMYC2*(NM_102998)、*AtABI5*(NM_001336591)和*AtDREB1A*(AB007787)的表达水平,收集经200 mmol·L^{-1} NaCl处理1周后的野生型与转基因拟南芥根部组织进行荧光定量PCR试验。

使用TaKaRa试剂盒(大连,中国)提取总RNA并合成cDNA,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。qRT-PCR反应在CFX 96系统(伯乐生命医学产品有限公司,美国)上完成,程序设置参照TaKaRa PrimeScript RT 试剂盒说明书。利用相对定量法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)[30]公式计算基因的转录水平,以*AtACT*为拟南芥内参基因(表1)。技术重复和生物学重复各3次,使用Microsoft Excel分析数据并绘图。所示数据为平均值±标准差。采用Student's *t*-检验确定差异显著性(*: $P<0.05$;**: $P<0.01$)。2025年3—4月完成基因表达水平测定,试验重复3次。

1.9 数据处理

所有数据均通过Microsoft Excel 2010计算平均值与标准误差并进行统计分析。组间比较采用Microsoft Excel 2010中的Student's *t*检验完成。

表 1　本研究中所使用的引物

Table 1　The primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Sequence of primer（5′－3′）	引物 Primer	引物序列 Sequence of primer（5′－3′）
LjSWEET10-F	ATGGCCATTAGTCATGATTC	Q-AtABI5-R	GTTCGGGTTTGGATTAGGTTTAGG
LjSWEET10-R	TTACCCTTTGGTTTCTTG	Q-AtDREB1A-F	AGGAGACGTTGGTGGAGGCT
LjSWEET10-GFP-F	GGGGTACCATGGCCATTAGTCATGATTC	Q-AtDREB1A-R	ACGTCGTCATCATCGCCGTC
LjSWEET10-GFP-R	GCTCTAGATTACCCTTTGGTTTCTTG	Q-AtMYC2-F	GCGTTGATGGATTTGGAGTT
LjSWEET10-pDR196-F	TCCCCCCGGGATGGCCATTAGTCATG	Q-AtMYC2-R	TTGCTCTGAGCTGTTCTTGC
LjSWEET10-pDR196-R	AACTGCAGTTACCCTTTGGTTTCTTG	Q-AtSOS1-F	TCGTTTCAGCCAAATCAGAAAGT
Q-LjSWEET10-F	CACTTTGCTAAGTGGGG	Q-AtSOS1-R	TTTGCCTTGTGCTGCTTTCC
Q-LjSWEET10-R	CACTGAGAGAAGAGAAT	Q-AtACT-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
Q-AtABI5-F	AGAGGGATAGCGAACGAGTCTAGTC	Q-AtACT-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC

注：下划线区域为酶切位点序列。

Note：The underline region indicates the restriction enzyme cutting sites.

2　结果与分析

2.1　*LjSWEET10* 基因的克隆及蛋白结构预测

成功扩增出长度为 816 bp 的目的条带，经测序验证其序列正确，作为后续载体构建的模板（图 1A）。序列分析表明，*LjSWEET10* 基因编码一个由 271 个氨基酸组成的蛋白质。通过 EXPASY 网站进行预测，得到该蛋白的理论等电点（isoelectric point，pI）为 8.83，不稳定性指数为 43.47，脂肪族氨基酸指数为 111.81，平均亲水性值为 0.682。

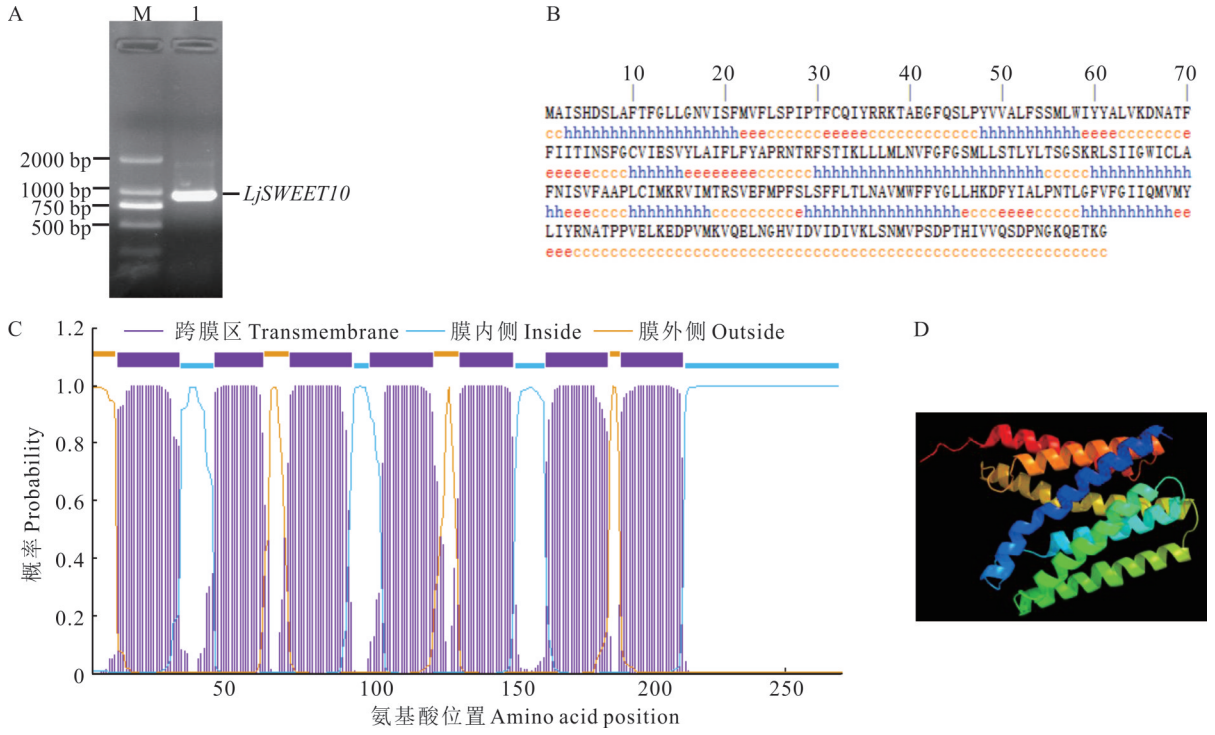


图 1　*LjSWEET10* 基因的克隆及蛋白结构的预测

Fig. 1　Cloning of the *LjSWEET10* gene and prediction of its protein structure

A：*LjSWEET10* 目的片段的 PCR 扩增 PCR amplification of the *LjSWEET10* target fragment；M：DL 2000 DNA 分子标记 DL2000 DNA marker；1：*LjSWEET10* 目的片段 The *LjSWEET10* target fragment；B：蛋白的二级结构预测 Prediction of the protein's secondary structure；C：蛋白的跨膜结构域预测 Prediction of the protein's transmembrane domains；D：蛋白的三级结构预测 Prediction of the protein's tertiary structure.

进一步采用生物信息学方法对LjSWEET10蛋白的结构进行预测。利用在线网站SOPMA对LjSWEET10蛋白质的二级结构进行分析,结果表明,无规则卷曲(random coil,c)含量为44.65%,α-螺旋(α-helix,h)含量为40.59%,延伸链(extended strand,e)含量为14.76%(图1B)。表明该蛋白以无规则卷曲和α-螺旋为主。跨膜结构域预测结果显示,LjSWEET10蛋白含有7个明显的跨膜区(图1C)。此外,通过PHYRE 2在线服务器对其三级结构进行建模,获得了该蛋白的三维空间结构模型(图1D)。

2.2 LjSWEET10的遗传进化分析

对百脉根LjSWEET10蛋白与来自大豆(*Glycine max*)、拟南芥、葡萄(*Vitis vinifera*)、狭叶羽扇豆(*Lupinus angustifolius*)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、花生(*Arachis hypogaea*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、亚麻荠(*Camelina sativa*)和豌豆(*Lathyrus oleraceus*)的同源蛋白进行多序列比对及系统发育分析。结果显示,这些蛋白的氨基酸序列相似性为45.96%~72.69%,且均含有SWEET家族特有的两个保守MtN3/saliva结构域(图2A)。该结构域由约60个氨基酸组成,通常以双拷贝形式存在,构成跨膜糖转运通道,是SWEET家族执行多种生物学功能的关键结构基础。系统发育分析显示,LjSWEET10与菜豆PvSWEET10蛋白亲缘关系最近,其次为花生AhSWEET10蛋白(图2B)。已知PvSWEET10通过介导低亲和力糖吸收及跨膜糖外流参与植物生理过程。结合序列比对中保守结构域的存在,推测百脉根糖转运蛋白LjSWEET10可能同样参与糖类化合物的运输过程。

2.3 LjSWEET10蛋白的亚细胞定位

为明确LjSWEET10的亚细胞定位情况,将LjSWEET10-GFP融合蛋白与细胞膜标记蛋白PM-RFP在拟南芥原生质体中共表达。共聚焦显微镜观察结果显示,阳性对照35S-GFP在细胞膜、细胞质和细胞核中均有表达,而LjSWEET10-GFP只在细胞膜检测到绿色荧光(图3)。结果表明,与跨膜结构域预测一致,LjSWEET10蛋白定位于细胞膜。

2.4 *LjSWEET10*基因的盐胁迫表达分析

采用荧光定量PCR技术分析了*LjSWEET10*基因在正常生长条件下(0 h)及200 mmol·L^{-1} NaCl处理3、6、12和24 h后的表达变化。结果显示,盐胁迫显著诱导了*LjSWEET10*的表达,其表达水平随时间呈动态上升趋势。具体而言,自胁迫开始后,该基因表达持续上调,在12 h达到峰值,表达量约为胁迫前的7.6倍;至24 h时虽略有回落,但仍为初始水平的4.2倍(图4)。上述结果表明,*LjSWEET10*的表达受盐胁迫显著激活,提示该基因可能参与了植物的盐胁迫响应过程。

2.5 LjSWEET10的糖转运类型分析

为验证LjSWEET10的糖转运功能,将空载体pDR196与重组质粒pDR196-*LjSWEET10*分别转化至己糖转运缺陷型酵母菌株EBY.VW4000中,并在以麦芽糖为唯一碳源的条件下培养。将转化后的酵母菌液进行梯度稀释(原液、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3})后,分别点样于以2%麦芽糖、2%葡萄糖和2%果糖为唯一碳源的SD-ura筛选平板上,于30 ℃倒置培养3~5 d观察生长情况。结果显示,在含2%麦芽糖的SD-ura平板上,空载体与重组质粒转化菌株均能正常生长;而在2%葡萄糖平板上,两者均无法生长。值得注意的是,在以2%果糖为唯一碳源的条件下,仅pDR196-*LjSWEET10*转化菌株能够生长(图5)。该结果表明,LjSWEET10在酵母中具有果糖转运能力。

2.6 转*LjSWEET10*基因拟南芥的耐盐表型分析

本研究通过农杆菌介导的花序浸染法获得转*LjSWEET10*基因拟南芥,经PCR验证其表达水平后,选取3个过表达株系(OE-1、OE-2和OE-3)用于后续试验(图6A)。将上述转基因株系与野生型(WT)拟南芥种子盆栽培养两周后,分别用0、100及200 mmol·L^{-1} NaCl处理1周。在正常生长条件下,各转基因株系与野生型植株表型无明显差异。经100 mmol·L^{-1} NaCl处理后,野生型植株生长明显受抑制,叶片黄化萎蔫,而转基因株系仍保持较好长势,叶片维持绿色。当盐浓度升至200 mmol·L^{-1}时,野生型植株大多萎蔫干枯,而转基因株系仅少数叶片出现黄化干燥,整体生长状态显著优于野生型(图6B)。

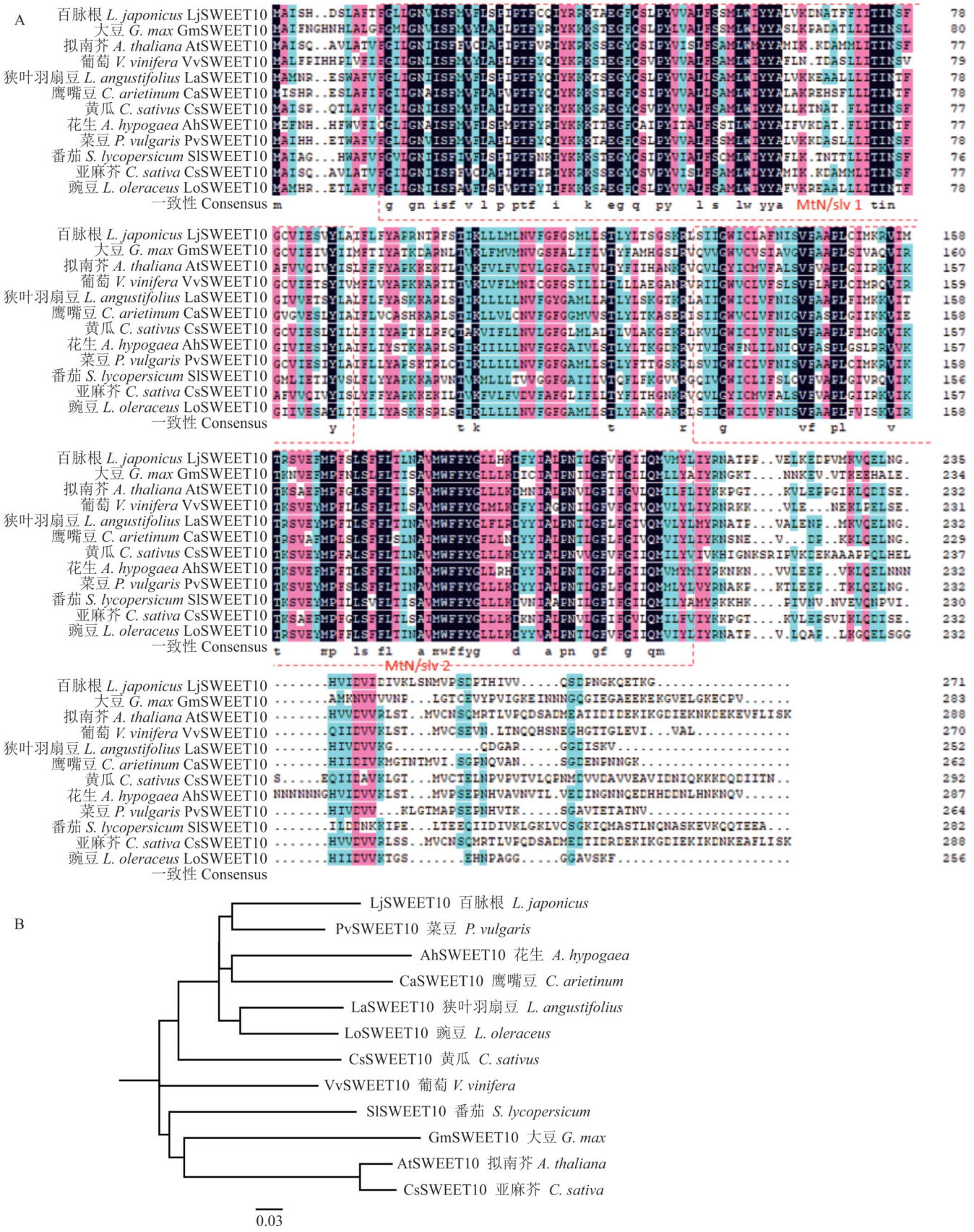


图 2　LjSWEET10 与同系物的序列比对及进化树分析

Fig. 2　Sequence alignment and phylogenetic analysis of LjSWEET10 and its homologs

红色虚线框标示出两个保守的 MtN3/saliva 结构域 The red dashed boxes indicate the two conserved MtN3/saliva domains；标尺代表遗传距离，反映物种间的亲缘关系远近 The scale represents genetic distance，indicating the proximity relationships among species.

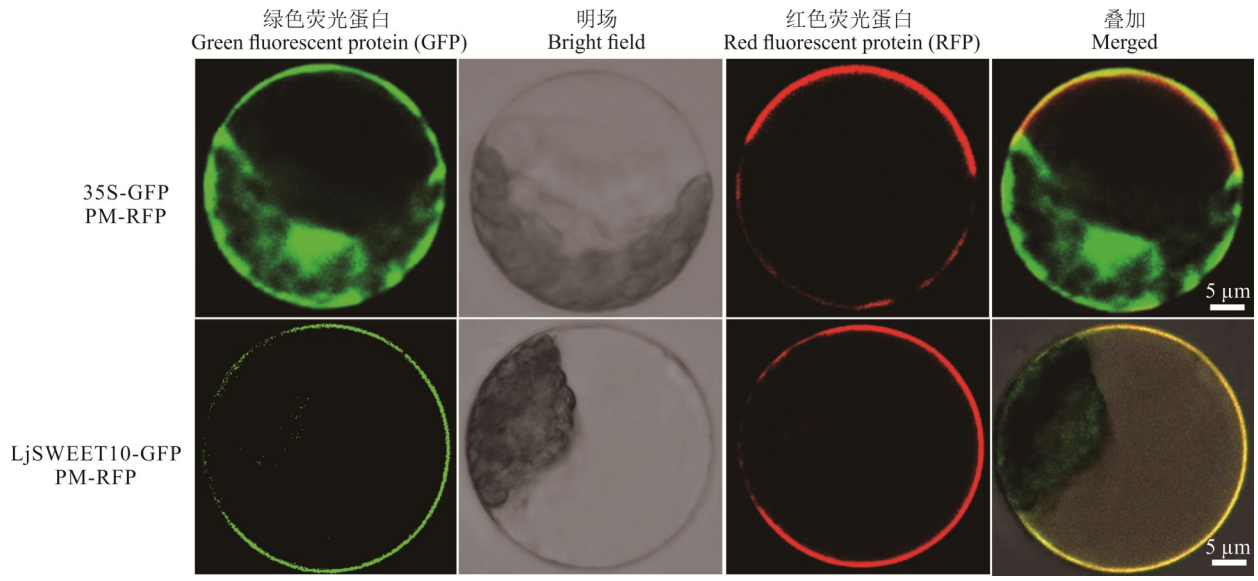


图3 LjSWEET10蛋白的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of LjSWEET10

进一步测定盐胁迫下植物的生理指标发现，正常条件下转基因与野生型植株的丙二醛(malondialdehyde，MDA)和叶绿素含量均无显著差异。随着盐浓度升高，叶片MDA含量上升，但转基因株系的增幅显著低于野生型，表明其细胞膜氧化损伤程度较轻，膜生理功能保持较好。同时，叶绿素含量随盐浓度上升而下降，但转基因株系的降幅明显小于野生型，说明其光合能力在胁迫下得到更好维持(图6C，D)。以上结果表明，*LjSWEET10*过表达能够增强拟南芥的耐盐性。

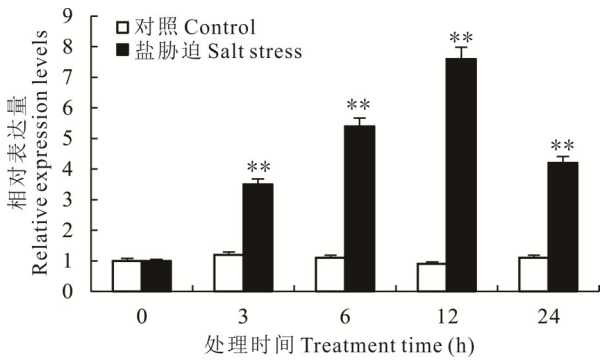


图4 百脉根*LjSWEET10*基因在盐胁迫下的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *LjSWEET10* gene in *L. japonicus* under salt stress

**：同一时间点不同处理间差异极显著($P<0.01$)。Extremely significant differences between treatments at the same time point ($P<0.01$).

2.7 转基因拟南芥逆境相关基因的表达分析

采用荧光定量PCR技术检测了转基因拟南芥中胁迫响应基因的表达情况。在200 mmol·L^{-1} NaCl处理一周后，包括*AtSOS1*、*AtMYC2*、*AtABI5*和*AtDREB1A*在内的4个基因在所有株系的根中均上调表达，且其在过表达株系中的上升幅度显著高于野生型；而在正常条件下，各株系间无显著差异(图7)。结果表明，*LjSWEET10*的过表达能够在盐胁迫条件下显著上调多个胁迫响应基因的表达，这些基因参与不同的胁迫信号通路，从而增强转基因拟南芥的耐盐性。

3 讨论

盐胁迫可导致植物苗期和生长期植株生长滞缓、矮小，表现为根系萎缩、茎秆细弱、叶片皱缩失绿；在生长后期则可能引发提前开花、生育期缩短，最终导致果实产量与品质的显著下降。土壤中过量的钠离子不仅直接损伤细胞结构，还会竞争性抑制其他必需离子的吸收；氯离子则干扰叶绿素代谢，引发叶片黄化与光合能力下降。与此同时，盐胁迫导致土壤溶液渗透压升高，阻碍根系水分吸收，造成植株水分亏缺，并迫使发育进程异常加速。植物通过激活Na^+/H^+逆向转运、调节激素信号通路以及启动渗透调节物质合成等途径，以维持离子与代谢的稳态[31-32]。

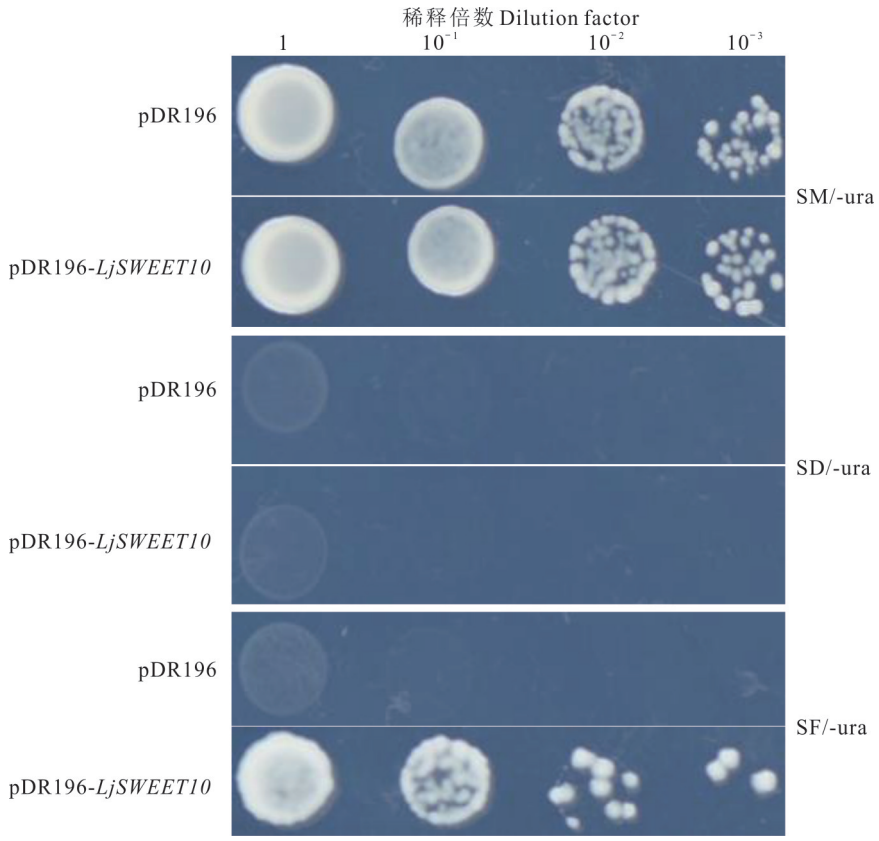


图 5　通过酵母分析 LjSWEET10 的己糖转运类型

Fig. 5　Analysis of hexose transport types by LjSWEET10 in yeast

SM：含麦芽糖的培养基 The medium containing maltose；SD：含葡萄糖的培养基 The medium containing glucose；SF：含果糖的培养基 The medium containing fructose；-ura：培养基中缺少尿嘧啶 The medium lacks of uracil；pDR196：阴性对照 The negative control.

在百脉根抗逆基因研究中，转基因技术已成为提高其耐盐及耐旱能力的关键手段。已有研究表明，超表达拟南芥液泡膜 H^+-焦磷酸酶编码基因 *AVP1* 的转基因百脉根同时提升耐盐与抗旱能力[33]，百脉根 bHLH 转录因子家族成员 *LjbHLH34* 在百脉根中的过表达可提高植株的抗旱性[34]。而强旱生植物霸王（*Zygophyllum xanthoxylum*）来源的离子区域化基因 *ZxNHX* 与 *ZxVP1* 共表达使百脉根在高盐环境中维持正常生长[35]。大豆来源的 *GmWRKY6* 基因在百脉根中过表达可显著提高植株的抗盐能力[36]；多醇转运蛋白 LjPLT3 在百脉根中过表达可能通过增强活性氧（reactive oxygen species，ROS）清除系统减轻氧化损伤，进而提高耐盐性[37]；而同源结构域－亮氨酸拉链转录因子 LjHDZ7 在拟南芥中过表达能显著增强其耐盐性[38]。

当植物遭受逆境胁迫时，其体内的 SWEET 蛋白在转录因子或翻译后修饰的调控下发生功能变化，进而调节糖的跨膜运输，重塑糖稳态以增强植物的抗逆能力。SWEET 蛋白的特殊结构为其在胁迫响应中的功能实现提供了分子基础[39]。该类蛋白通常由两个重复的 MtN3/saliva 结构域组成，每个结构域包含 3 个跨膜螺旋，共同形成 7 次跨膜的整体构象；两个结构域背对背排列，在膜中围成一个中心孔道，负责糖分子的选择性运输。这一高度保守的结构特征在百脉根糖转运蛋白 LjSWEET10 中也得到确认（图 1），说明其属于典型的 SWEET 家族成员。在盐胁迫条件下，*LjSWEET10* 基因表现出快速而精确的转录响应（图 4），其在酵母中具有果糖转运能力（图 5），揭示其在协调植物逆境适应与正常生长所需糖分配中起关键作用。进一步研究发现，高盐处理的转 *LjSWEET10* 基因拟南芥植株抗盐能力明显增强，生理指标测定发现叶绿素含量显著升高，而丙二醛含量显著降低（图 6）。与此同时，逆境胁迫关键基因 *AtSOS1*、*AtMYC2*、*AtABI5* 和 *AtDREB1A* 的表达水平也明显升高（图 7），表明 LjSWEET10 可能通过多途径协同作用增强植物的耐盐性。在拟南芥中过表达 *LjSWEET10* 可通过上

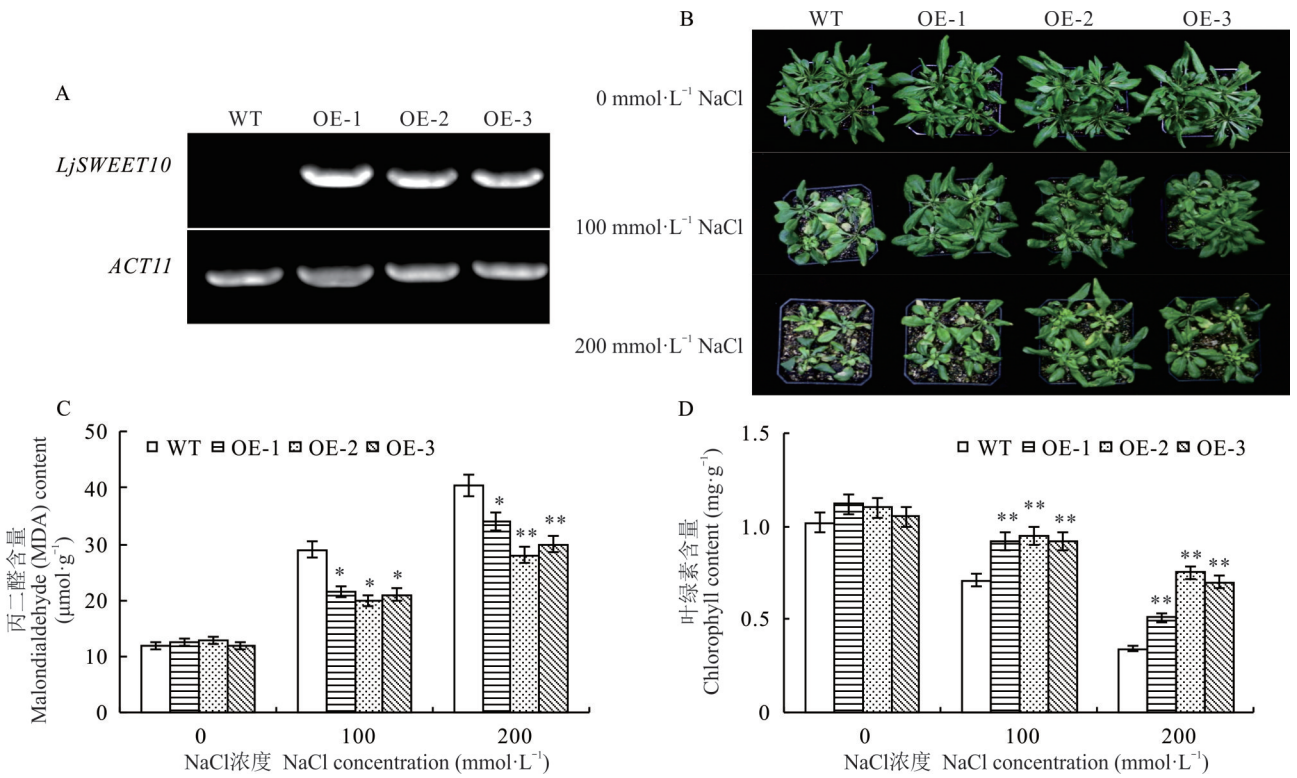


图6 过表达*LjSWEET10*转基因拟南芥的抗盐表型分析及生理指标检测

Fig. 6 Salt stress phenotype analysis and physiological index detection of transgenic *A. thaliana* overexpressing *LjSWEET10*

A：过表达转基因拟南芥株系中*LjSWEET10*基因表达水平的半定量RT-PCR分析 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *LjSWEET10* expression levels in transgenic *A. thaliana* lines. *ACT11*代表内参基因肌动蛋白-11 *ACT11* represents the reference gene *Actin-11*. B：野生型和3个转基因拟南芥株系盐处理一周后的抗盐表型 Response of the wild type and three transgenic *A. thaliana* lines to saline conditions. WT为野生型植株，OE-1，OE-2和OE-3分别为转基因拟南芥的不同株系，下同 WT represents the wild-type plants, while OE-1, OE-2 and OE-3 are different lines of transgenic *A. thaliana*. The same below. C：盐胁迫7 d后野生型和转基因拟南芥植株的丙二醛（malondialdehyde，MDA）含量测定 MDA content of the wild type and transgenic *A. thaliana* plants were measured 7 days after salt treatment. D：盐胁迫7 d后野生型和转基因拟南芥植株的叶绿素含量测定；Chlorophyll content of the wild type and transgenic *A. thaliana* plants were measured 7 days after salt treatment. 所有值均以3个独立重复的平均值表示（n=15） All values are presented as means of three independent replicates (n=15). *：在同一NaCl浓度下各株系间差异显著（P<0.05） Significant differences (P<0.05) among different lines at the same NaCl concentration. **：在同一NaCl浓度下各株系间差异极显著（P<0.01） Extremely significant differences (P<0.01) among different lines at the same NaCl concentration.

调质膜Na^+/H^+逆向转运蛋白基因*AtSOS1*的表达，增强盐胁迫下细胞内离子稳态的维持能力。过表达*LjSWEET10*可通过诱导脱落酸（abscisic acid，ABA）信号通路关键基因*AtABI5*与*AtMYC2*的表达，激活ABA介导的胁迫响应途径。同时，AP2/ERF家族转录因子基因*AtDREB1A*的表达上调，进一步激活了多个下游胁迫响应基因的表达网络。这些在转录水平上的协同调控作用，共同促使转基因植株在生理代谢和细胞功能上产生系统性适应响应，从而显著提升其对盐胁迫的整体抵抗能力[40]。

本研究为揭示糖转运蛋白在植物盐胁迫应答中的调控功能提供了新的理论基础，并为作物抗逆育种提供了候选基因资源。为深入解析LjSWEET10的生物学功能与作用机制，后续研究应着重开展以下工作：首先，需获得过表达*LjSWEET10*的百脉根稳定转化株系，通过在盐胁迫条件下系统比较转基因与野生型植株在生长发育、生理指标及离子平衡等方面的差异，验证该基因在豆科模式植物中的功能保守性。其次，应进一步探明*LjSWEET10*在盐胁迫响应中的上游调控网络。通过筛选与LjSWEET10启动子互作的转录因子，并结合染色质免疫共沉淀等技术，揭示其转录调控机制；同时，研究该蛋白是否受到翻译后修饰的精细调控，从而完善对其功能调控机制的认识。最后，从糖代谢与信号传导角度系统解析LjSWEET10的作用途径。通过分析转基因植株中糖组分含量、分布动态及其与胁迫信号分子（如ABA、ROS等）的互作关系，阐明该蛋白如何通过调节糖稳态参

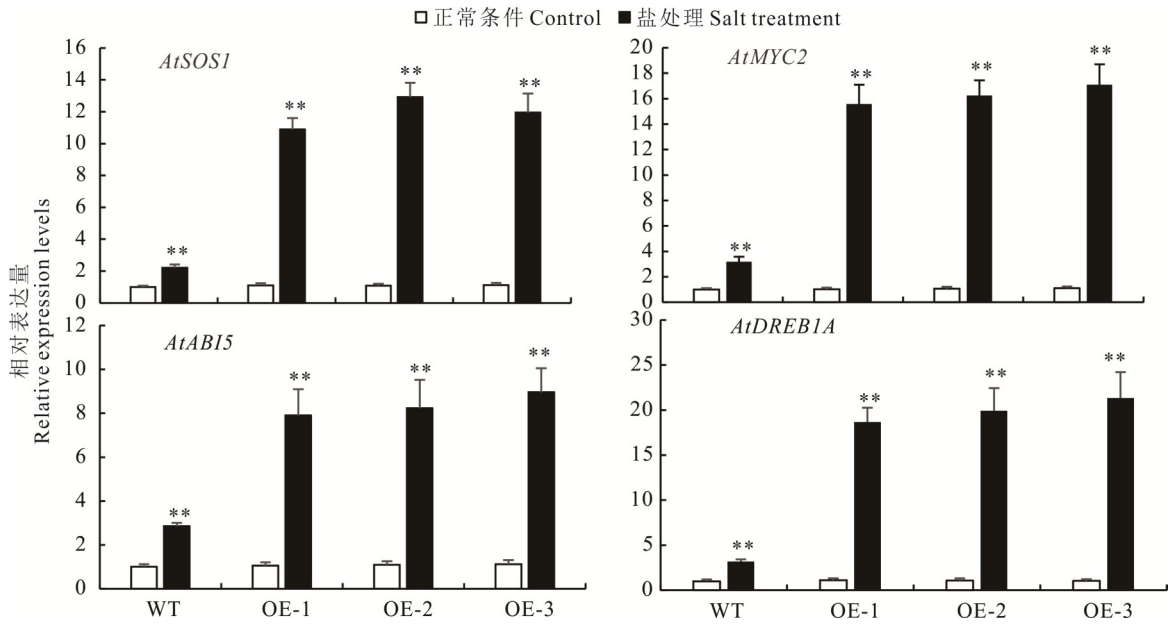


图 7　200 mmol·L^{-1} NaCl处理下转基因拟南芥胁迫相关基因的表达水平检测

Fig. 7　Expression of stress-related genes in transgenic *A. thaliana* treated with 200 mmol·L^{-1} NaCl

数据为3次重复的平均值±标准差 Data are expressed as the mean±standard deviation (SD) of three replicates; **表示同一株系正常条件与盐处理之间存在显著差异($P<0.01$)。** indicate a significant difference between control and salt treatment within the same plant line ($P<0.01$).

与盐胁迫应答,从而在整体水平上揭示糖转运蛋白在植物逆境适应中的调控作用[41]。通过上述研究,不仅能够从糖转运角度深入揭示LjSWEET10响应盐胁迫的分子机制,也为培育耐盐百脉根新品种提供了理论支撑与技术路径,对推动豆科牧草及绿肥作物在盐渍化地区的应用具有重要的实践意义。

4　结论

本研究成功克隆了百脉根糖转运蛋白基因*LjSWEET10*,该基因编码的蛋白具有典型SWEET家族保守结构域,定位于细胞膜,其表达受盐胁迫显著诱导。功能研究表明,*LjSWEET10*在酵母异源体系中主要介导果糖转运,在拟南芥中过表达该基因可显著增强植株耐盐性,并激活多个胁迫响应关键基因的表达。这些结果不仅揭示了SWEET家族蛋白在植物非生物胁迫应答中的新型功能,也为百脉根耐盐育种提供了理论依据与基因资源,对盐碱地植被恢复与牧草产业可持续发展具有积极意义。

参考文献 References:

[1] Qadir M, Quillérou E, Nangia V, *et al*. Economics of salt-induced land degradation and restoration. Natural Resources Forum, 2014, 38(4): 282-295.

[2] Liu Y F, Peng H, Wang W W, *et al*. Research progress on the physiological and molecular mechanisms of salt tolerance for plants. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(12): 30-36.
刘云芬, 彭华, 王薇薇, 等. 植物耐盐性生理与分子机制研究进展. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 30-36.

[3] Ziska L H, Bunce J A, Shimono H, *et al*. Food security and climate change: On the potential to adapt global crop production by active selection to rising atmospheric carbon dioxide. Proceedings, Biological Sciences, 2012, 279: 4097-4105.

[4] Park H J, Kim W, Yun D. A new insight of salt stress signaling in plant. Molecules and Cells, 2016, 39(6): 447-459.

[5] Ding Z Y. Evaluation of salt tolerance and seed mutagenesis screening of *Lotus corniculatus*. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022.
丁振宇. 百脉根耐盐性评价及种子诱变筛选. 南京: 南京农业大学, 2022.

[6] Chen L Q, Hou B H, Lalonde S, *et al*. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. Nature, 2010, 468: 527-532.

[7] Eom J S, Chen L Q, Sosso D, *et al*. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. Current

Opinion in Plant Biology, 2015, 25: 53－62.

[8] Tao Y, Cheung L S, Li S, *et al*. Structure of a eukaryotic SWEET transporter in a homotrimeric complex. Nature, 2015, 527: 259－263.

[9] Chen L Q, Qu X Q, Hou B H, *et al*. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. Science, 2012, 335(6065): 207－211.

[10] Lin I W, Sosso D, Chen L Q, *et al*. Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter SWEET9. Nature, 2014, 508(7497): 546－549.

[11] Sun M X, Huang X Y, Yang J, *et al*. *Arabidopsis* RPG1 is important for primexine deposition and functions redundantly with RPG2 for plant fertility at the late reproductive stage. Plant Reproduction, 2013, 26(2): 83－91.

[12] Chen L Q, Lin I W, Qu X Q, *et al*. A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. The Plant Cell, 2015, 27(3): 607－619.

[13] Sosso D, Luo D, Li Q N, *et al*. Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. Nature Genetics, 2015, 47(12): 1489－1493.

[14] La H V, Chu H D, Tran C D, *et al*. Insights into the gene and protein structures of the CaSWEET family members in chickpea (*Cicer arietinum*), and their gene expression patterns in different organs under various stress and abscisic acid treatments. Gene, 2022, 819: 146210.

[15] Wang L, Yao L N, Hao X Y, *et al*. Tea plant SWEET transporters: expression profiling, sugar transport, and the involvement of CsSWEET16 in modifying cold tolerance in Arabidopsis. Plant Molecular Biology, 2018, 96(6): 577－592.

[16] Yuan M, Wang S P. Rice MtN3/saliva/SWEET family genes and their homologs in cellular organisms. Molecular Plant, 2013, 6(3): 665－674.

[17] Xuan Y H, Hu Y B, Chen L Q, *et al*. Functional role of oligomerization for bacterial and plant SWEET sugar transporter family. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(39): 3685－3694.

[18] Durand M, Porcheron B, Hennion N, *et al*. Water deficit enhances C export to the roots in *Arabidopsis thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots. Plant Physiology, 2016, 170(3): 1460－1479.

[19] Chen Q C, Hu T, Li X H, *et al*. Phosphorylation of SWEET sucrose transporters regulates plant root: shoot ratio under drought. Nature Plants, 2022, 8(1): 68－77.

[20] Valifard M, Le H R, Muller J, *et al*. Vacuolar fructose transporter SWEET17 is critical for root development and drought tolerance. Plant Physiology, 2021, 187(4): 2716－2730.

[21] Mathan J, Singh A, Ranjan A. Sucrose transport in response to drought and salt stress involves ABA mediated induction of OsSWEET13 and OsSWEET15 in rice. Physiologia Plantarum, 2021, 171(4): 620－637.

[22] Wang H, Yan S J, Xin H J, *et al*. A subsidiary celllocalized glucose transporter promotes stomatal conductance and photosynthesis. The Plant Cell, 2019, 31(6): 1328－1343.

[23] Liu M T, Liu T Y, Lu J Y, *et al*. Characterization and functional analysis of *ZmSWEET15a* in maize. DNA and Cell Biology, 2022, 41(6): 564－574.

[24] Gautam T, Dutta M, Jaiswal V, *et al*. Emerging roles of SWEET sugar transporters in plant development and abiotic stress responses. Cells, 2022, 11(8): 1303.

[25] Chen G, Hu J, Dong L L, *et al*. The tolerance of salinity in rice requires the presence of a functional copy of *FLN2*. Biomolecules, 2019, 10(1): 17.

[26] Seo P J, Park J M, Kang S K, *et al*. An *Arabidopsis* senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. Planta, 2011, 233(1): 189－200.

[27] Ke D X, Hou S B, Zhou Z Y. GmIFS interacts with GmNFR1α and plays a positive role in soybean legume－rhizobia symbiosis. Plant Science, 2026, 365: 113011.

[28] Wang X Y, Wang Z M, Tang X Y, *et al*. The SlDOF9-SlSWEET17 module: A switch for controlling sugar distribution between nematode induced galls and roots in tomato. Advanced Science, 2025, 12(28): e2501771.

[29] Ke D X, He Y L, Fan L X, *et al*. The soybean TGA transcription factor GmTGA13 plays important roles in the response to salinity stress. Plant Biology, 2022, 24(2): 313－322.

[30] Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 2001, 25(4): 402－408.

[31] Horie T, Karahara I, Katsuhara M. Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice

plants. Rice, 2012, 5(1): 11.

[32] Shu S, TangY Y, Zhou X P, *et al*. Physiological mechanism of transglutaminase-mediated improvement in salt tolerance of cucumber seedlings. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 156: 333－344.

[33] Cheng X, Wang Y W, Bao A K, *et al*. Overexpression of *AVP1* enhanced salt and drought tolerance of transgenic *Lotus corniculatus* L. Plant Physiology Communications, 2010, 46(8): 808－816.
程星, 王燕雯, 包爱科, 等. 超表达*AVP1*基因提高转基因百脉根的耐盐性和抗旱性. 植物生理学通讯, 2010, 46(8): 808－816.

[34] Liu F, Chen C, Zhang K X, *et al*. Cloning and identification of drought tolerance function of the *LjbHLH34* gene in *Lotus japonicus*. Acta Prataculturae Sinica, 2023, 32(1): 178－191.
刘福, 陈诚, 张凯旋, 等. 日本百脉根 *LjbHLH34* 基因克隆及耐旱功能鉴定. 草业学报, 2023, 32(1): 178－191.

[35] Wang Y W. Studies on co-expression of *ZxVP1-1* and *ZxNHX* gene in *Lotus corniculatus* L. and identification the salt and drought tolerance of the transgenic plants. Lanzhou: Lanzhou University, 2011.
王燕雯. 共表达霸王 *ZxNHX* 及 *ZxVP1-1* 基因提高百脉根的耐盐性和抗旱性研究. 兰州: 兰州大学, 2011.

[36] Ke D X, Peng K P, Xia Y J, *et al*. Cloning of salt-stressed responsive gene *GmWRKY6* and salt resistance analysis of transgenic *Lotus japonicus*. Acta Prataculturae Sinica, 2018, 27(8): 95－106.
柯丹霞, 彭昆鹏, 夏远君, 等. 盐胁迫应答基因 *GmWRKY6* 的克隆及转基因百脉根的抗盐分析. 草业学报, 2018, 27(8): 95－106.

[37] Liu J, Liu L, Tian L, *et al*. Overexpression of *LjPLT3* enhances salt tolerance in *Lotus japonicus*. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(6): 5149.

[38] Wang D, Gong Y, Li Y, *et al*. Genome-wide analysis of the homeodomain-leucine zipper family in *Lotus japonicus* and the overexpression of *LjHDZ7* in *Arabidopsis* for salt tolerance. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 955199.

[39] Song C H, Yang Z J, Luo Z Y, *et al*. Research progress in plant sugar transporter SWEETs. Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition), 2024, 45(4): 58－67.
宋春晖, 杨梓健, 罗志勇, 等. 植物糖转运蛋白 SWEETs 研究进展. 首都师范大学学报(自然科学版), 2024, 45(4): 58－67.

[40] Li Y L, Zhou S H, Xue M Y, *et al*. Cloning of the gene *ZjWRKY63* from *Zoysia japonica* and its salt resistance analysis in transgenic *Arabidopsis*. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(12): 157－169.
李永龙, 周生辉, 薛梦瑶, 等. 结缕草 *ZjWRKY63* 基因的克隆及转基因拟南芥的耐盐性分析. 草业学报, 2025, 34(12): 157－169.

[41] Wang J, Wu Y D, Yang Y J, *et al*. SWEET family sugar transporters and their upstream regulatory factors in plant. Plant Physiology Journal, 2024, 60(4): 597－605.
王洁, 吴叶蝶, 杨亚军, 等. 植物SWEET家族糖转运蛋白及其上游调控因子. 植物生理学报, 2024, 60(4): 597－605.