

玉米氮胁迫响应 *NRT* 基因的鉴定及 *ZmNRT2.5* 的克隆和表达分析

王玉斌, 张志贤, 张岱奕, 刘 薇, 张彦威

(山东省农业科学院作物研究所/山东省特色作物工程实验室, 济南 250100)

摘 要: 硝酸盐转运蛋白(Nitrate Transporters, NRTs)在植物根系 NO_3^- 吸收或转运中发挥重要作用。为探究玉米 *NRTs* 基因在氮素吸收中的功能, 从前期转录组数据中鉴定出 7 个响应氮素处理的差异表达 *ZmNRTs* 基因。启动子顺式作用元件分析表明, 这些 *ZmNRTs* 基因的启动子均含有多个植物逆境或激素应答元件, 推测他们可能与玉米非生物胁迫应答或植物激素调控氮素吸收相关。从玉米根系中克隆了对氮素处理响应最大的 *ZmNRT2.5*, 该基因 CDs 全长为 1 563 bp, 编码 520 个氨基酸。进化树分析结果表明, *ZmNRT2.5* 与 *AtNRT2.5* 同源性最高, 含有保守的硝酸盐转运结构域, 二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 含 11 个跨膜结构域。实时荧光定量 PCR 分析表明, *ZmNRT2.5* 主要在根、老叶和叶鞘中表达。低氮处理显著诱导 *ZmNRT2.5* 在根中的表达, 植物激素脱落酸、赤霉素和乙烯均参与调控 *ZmNRT2.5* 的表达。同时, *ZmNRT2.5* 基因的表达受到盐胁迫的显著抑制。

关键词: 玉米; 氮胁迫; NRTs; *ZmNRT2.5*; 表达分析

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Identification of Maize Nitrogen Stress Responsive *NRT* Genes and Cloning and Expression of *ZmNRT2.5*

WANG Yu-bin, ZHANG Zhi-xian, ZHANG Dai-yi, LIU Wei, ZHANG Yan-wei

(Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences/

Shandong Engineering Laboratory of Featured Crops, Jinan 250100, China)

Abstract: Nitrate transporters(NRTs) play an important role in NO_3^- uptake or transporters in plant roots. To investigate the function of NRTs gene in maize nitrogen uptake, seven differentially expressed *ZmNRTs* genes that respond to nitrogen treatment were identified from the transcriptome data. Analysis of promoter cis-acting elements indicated that the promoters of these *ZmNRTs* genes contain multiple plant stress or hormones response elements, suggesting that these genes might be involved in abiotic stress or plant hormone regulation of nitrogen uptake of maize. The *ZmNRT2.5*, which showed the most significant response to nitrogen treatment, was cloned from maize roots. The *ZmNRT2.5* CDs of 1 563 bp in length, encoded a 520 amino acid. Phylogenetic analysis revealed that *ZmNRT2.5* had the highest homology with *AtNRT2.5*, containing a conserved nitrate transport domain, in which the secondary structure was composed of α -helix and random coils, including 11 transmembrane domains. Real-time quantitative PCR analysis showed that *ZmNRT2.5* was mainly expressed in roots, old leaves, and leaf sheaths. Low nitrogen treatment significantly induced the expression of *ZmNRT2.5* gene in root, plant hormones abscisic acid, gibberellin and ethylene regulated the expression of *ZmNRT2.5*. Concurrently, the expression of *ZmNRT2.5* was significantly inhibited by salt stress.

Key words: Maize; Nitrogen stress; NRTs; *ZmNRT2.5*; Expression analysis

录用日期: 2023-01-09

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2021QC090)、山东省农业科学院科技创新工程项目(cxgx2022E01)

作者简介: 王玉斌(1988-), 山东德州人, 博士, 助理研究员, 研究方向为玉米氮素吸收机制。E-mail: wangyb_221@163.com

氮(N)是植物生长发育最重要的营养元素之一, 对维持植物生长和代谢起到重要的调控作用。玉米(*Zea mays* L.)作为重要的粮饲兼用作物和工业原料, 对维护世界粮食安全具有重要作用。增施氮肥是玉米高产稳产的重要手段。由于目前对玉米氮素高效

吸收利用的机制缺少深入研究,长期的氮肥高投入并没有带来玉米产量的大幅度提升,相伴的是带来经济效益和生态效益的降低。尽管近年来国家通过提倡施用缓释肥等多种措施提高了玉米氮肥利用效率,但与发达国家相比仍存在较大差距。因此,深入研究玉米氮素高效吸收利用的机制,实现玉米产量和氮肥高效利用协同提高,对我国农业绿色可持续发展具有重大而现实的意义。

土壤中的氮素主要以 NO_3^- 和 NH_4^+ 两种形式存在,但植物吸收利用的主要是 NO_3^- 。由于 NO_3^- 在土壤中分布存在较大的空间差异,植物为了适应多变的土壤环境,当植物遭受氮素胁迫的时候,往往在植物形态和生理生化特征方面做出响应来更加高效的吸收土壤中的 NO_3^- ,其中生理特征的变化主要包括氮代谢、光合、次生代谢、植物激素信号变化以及氮素吸收与转运相关基因表达的改变等^[1-3]。当植物遭受氮胁迫时,一些与氮吸收与转运相关的硝酸盐转运蛋白基因(*NRTs*)的表达会显著被诱导上调以促进根系氮素吸收^[4]。

植物根系主要通过硝酸盐转运蛋白(Nitrate Transporters, *NRTs*)吸收土壤中 NO_3^- ^[5]。高等植物中主要存在两种 NO_3^- 转运系统,高亲和 NO_3^- 转运系统(HATS)和低亲和 NO_3^- 转运系统(LATS),两者分别在低浓度和高浓度硝酸盐环境下发挥氮吸收转运功能^[6,7]。*NRT1* 家族基因主要在 LAST 中起主要作用,而 *NRT2* 家族基因是 HATS 中负责 NO_3^- 吸收的主要转运蛋白。*NRT2* 转运蛋白家族含有典型的跨膜转运蛋白结构域,属于定位在质膜上的膜蛋白,一般由 500~600 个氨基酸组成,且含有较为保守的结构域^[8,9]。目前,关于 *NRT2* 基因的研究与功能验证主要集中在模式植物中,拟南芥和水稻中多个 *NRTs* 基因的功能已被鉴定^[10]。拟南芥 *NRT2* 家族一共包含 7 个成员^[11],而水稻 *NRT2* 家族中一共有 6 个基因^[12]。*AtNRT2.5* 主要在根中表达,而且已被证明在外界较低浓度 NO_3^- 情况下发挥高亲和硝酸盐吸收功能。除了在根中起吸收作用外,*AtNRT2.5* 也在地上部表达,参与硝酸盐从地下部往地上部韧皮部的转运^[13]。除拟南芥外,目前对 *NRT2.5* 基因鉴定及功能验证的研究较少,仅在茶树、大麦、木薯、衣藻等少数植物中被克隆报道^[14]。目前,玉米中只有 *ZmNRT1.1A* 和 *ZmNRT1.1B* 基因被克隆^[15],*ZmNRT2.5* 基因还未见报道。

本研究通过分析前期氮素处理转录组数据,鉴定出 7 个差异表达的硝酸盐转运蛋白(*NRTs*)基因,对低氮诱导最强的 *NRT2* 家族基因 *ZmNRT2.5* 进行

克隆、生物信息学分析。通过实时定量 PCR 技术分析 *ZmNRT2.5* 基因在不同组织间的表达以及对低氮、不同植物激素(ABA、 GA_3 和 ACC)和不同逆境(NaCl、PEG)的应答分析,为今后进一步研究 *ZmNRT2.5* 基因在玉米根系 NO_3^- 吸收和转运中的功能提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

本研究使用的玉米材料为 B73-329。使用诺唯赞 RNA 试剂盒(FastPure Universal Plant Total RNA Isolatin Kit)和反转录试剂盒(HiScript III RT Super-Mix for qPCR)提取玉米不同部位和不同处理的 RNA 并进行反转录;基因克隆用高保真酶 KOD-FX 酶购自 TOYOBO 公司;胶回收试剂盒、通用性 DNA 纯化回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 和菌液鉴定用 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 均购自天根生物科技有限公司;实时荧光定量 PCR 试剂盒购自莫纳生物科技有限公司。

1.2 材料培养及处理

挑选大小均匀的玉米种子,用 20% H_2O_2 (V/V)消毒后 20 min,用蒸馏水冲洗 5 遍,将消毒好的玉米种子均匀播种于石英砂中,深度保持一致。当玉米长至 1 心 1 叶期时,挑选地上部和地下部均生长一致的幼苗,去掉胚乳后移至盛有 5 L 改良 1/2 Hogland 营养液的塑料盒中进行缓苗培养,3 d 后进行低氮(LN, 0.05 mmol/L NO_3^-)和正常氮(NN, 2 mmol/L NO_3^-)处理,分别在 12、60、108 h 取根系组织为样本进行转录组测序^[16]。营养液具体配方参考文献[16]。半营养液缓苗 3 d 后,在正常氮处理的玉米幼苗中分别加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 赤霉素(GA_3)、10 $\mu\text{mol/L}$ 乙烯合成前体 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)、50 $\mu\text{mol/L}$ 脱落酸(ABA)、150 mmol/L NaCl 和 20% PEG-6000。在不同处理 0、3、6、9、12、24 h 后分别取根部和叶片组织为样本,每组处理均为 3 次生物学重复。

试验在山东省农业科学院作物研究所光照培养室进行,培养温度为 26 $^{\circ}\text{C}$ /22 $^{\circ}\text{C}$,光照时间为 16 h,湿度控制在大约 60%。

1.3 *ZmNRTs* 基因的筛选

将 $P\text{-adjust value} < 0.05$ 且 $|\log_2\text{FC}| \geq 1$ 的 *ZmNRTs* 基因定为差异表达基因,筛选 3 个时间点响应氮胁迫的 *ZmNRTs* 基因。将筛选出来的差异基因利用 TBtools 进行作图。

1.4 *ZmNRTs* 基因上游顺式作用元件分析

将差异表达的 *ZmNRTs* 基因的 V4 版本基因号

输入到 Ensemble Plant(<http://plants.ensembl.org>)在线软件中批量提取差异表达的 *ZmNRTs* 基因起始密码子上游 2 kb 序列作为基因的启动子,并利用 PlantCare 软件对启动子进行顺式作用元件分析,得到的结果在 GSGS2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)中进行可视化作图。

1.5 *ZmNRT2.5* 基因克隆及载体构建

利用 MaizeGDB 数据库查找 *ZmNRT2.5* 基因 CDS 序列去设计全长引物,引物序列如下:*ZmNRT2.5*-F: ATACACCAAATCGACTCTAGAATGGC-GGAGGGGGAGTTCAA; *ZmNRT2.5*-R: CATGGTACCGGATCCACTAGTCACGTCGGCCGGCGAGGACT; 以正常氮处理的玉米根系 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,用 KOD-FX 高保真酶进行 PCR 扩增。扩增后的 PCR 产物上样于 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳,将目的条带切胶回收。利用诺唯赞的无缝克隆试剂盒将纯化后的产物与 PCAMBIA1300-GFP 载体连接后转化 DH5 α ,菌液涂布于含有卡那霉素的 LB 固体培养基上。挑取单克隆,摇菌后用 PCAMBIA1300-GFP 通用引物进行 PCR 鉴定,引物序列: 1300-F: ACAGCAAGAACGGAATGC; 1300-R: GTGTGTCAGATGAACCTTCAG,测序由青岛擎科生物科技有限公司完成。

1.6 *ZmNRT2.5* 基因的生物信息学分析

利用在线分析软件 ExPASy、TMHMM、NetPhos3.1 和 NCBI CDS 进行编码蛋白的二级结构、跨膜结构、磷酸化和保守结构域分析。从 TAIR 软件中下载所有的拟南芥 *NRT2s* 基因氨基酸序列,使用 MEGA5.0 软件的 Clustal W 比对 *ZmNRT2.5* 与 *AtNRT2s* 家族 7 个基因的氨基酸序列,采用邻接法构建系统发育树。

1.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

利用 NCBI 网站中的 Primer-Blast 在线软件设计用于检测基因 *ZmNRT2.5* 表达量的特异性引物,以玉米泛素连接酶基因 *ZmUBQ(ubiquitin C)* 基因作为内参^[17],所需引物:*ZmNRT2.5*-F-qRT: TACAAGACGGAGACGGGGAT; *ZmNRT2.5*-R-qRT: GCGGTGTTGAAACCCTTGTC; *ZmUBQ*-F: CTGGT-GCCCTCTCTCCATATGG; *ZmUBQ*-R: CAACACTGACACGACTCATGACA。提取正常氮处理下玉米根、茎、老叶、新叶不同组织部位以及盐胁迫处理,PEG 处理以及不同植物激素处理(脱落酸、乙烯和赤霉素)的 RNA 并反转录成 cDNA。定量使用的是莫纳生物科技有限公司的 SYBR green qPCRMix 试剂,使用罗氏 480 荧光定量 PCR 仪器对基因进行表达量

检测,每个样品进行 3 次重复。反应程序为,95℃预变性 30 s;95℃变性 10 s,60℃退火 10 s,共进行 40 个循环;72℃延伸 30 s。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量^[18]。

1.8 数据分析

实验数据利用 Microsoft Excel 2010 进行录入和绘制图表。用 SAS9.0(SAS Institute Ltd., USA)进行显著性统计分析。差异显著性利用 Fisher's LSD($P < 0.05$)进行检验。

2 结果与分析

2.1 玉米氮响应 *NRTs* 基因的筛选

通过对 LN 处理不同时间点的玉米根部转录组数据^[15]结果分析表明,与 NN 处理相比,LN 处理 12、60、108 h 后有 7 个 *NRTs* 基因的表达均达显著变化。LN 处理显著诱导 *Zm00001d044529*、*Zm00001d054057*、*Zm00001d011679* 和 *Zm00001d003287* 基因的表达,*Zm00001d029932* 和 *Zm00001d014976* 基因在 LN 处理 3 个时间点均表现显著下调趋势,*Zm00001d054060* 基因在 LN 处理后表现先上调后下降趋势(图 1)。

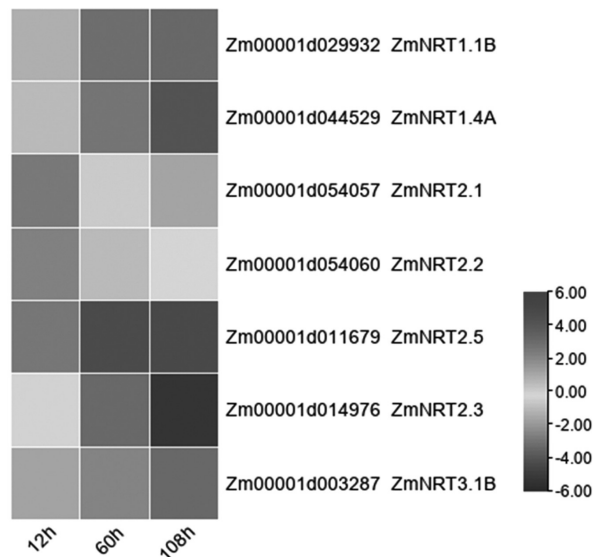


图 1 LN 处理不同时间点根系差异表达 *ZmNRTs* 基因

Fig.1 The DEGs of *ZmNRTs* in roots after LN treatment at different time points

2.2 *ZmNRTs* 基因顺式作用元件分析

将 7 个响应氮胁迫的玉米 *NRTs* 基因号输入到 EnsemblPlants 中,批量提取 7 个 *NRTs* 基因起始密码子 ATG 上游 2 kb 的启动子序列。利用 PlantCARE 软件对 7 个 *NRTs* 基因启动子进行顺式作用元件分析发现,这些基因的启动子中包含多个与非生物胁迫

迫相关的顺式作用元件和植物激素响应元件。胁迫响应元件包括干旱响应元件(MYB 和 MBS);植物激素响应元件包括脱落酸响应顺式作用元件 ABRE、

赤霉素响应元件 GARE、乙烯响应元件 ERE、茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif 和水杨酸响应元件 TCA (图 2)。

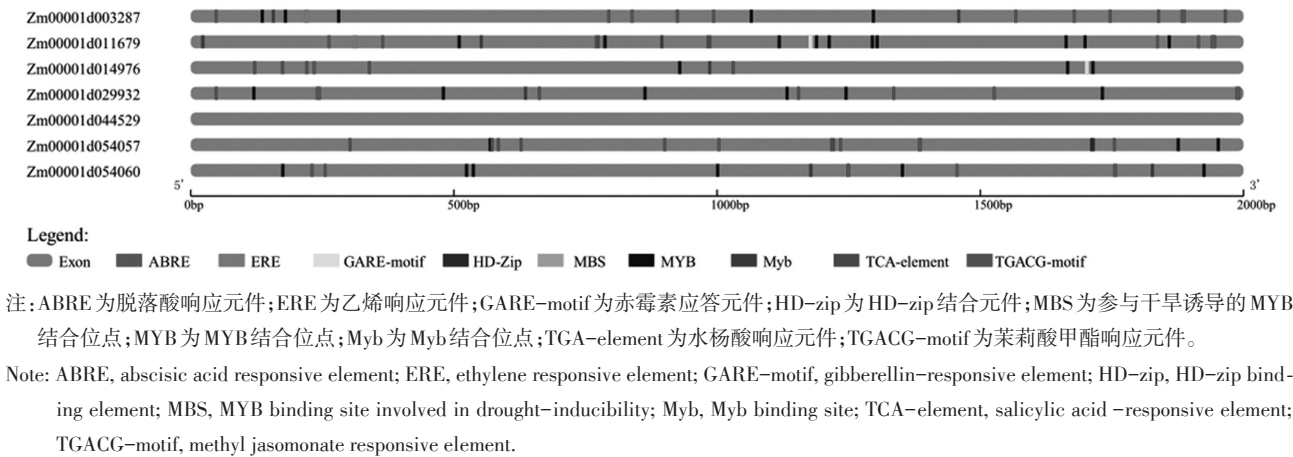


图2 玉米氮响应 *NRTs* 基因启动子顺式作用元件分析
Fig.2 The analysis of the predicted *cis*-elements in the promoter regions of the nitrogen responsive maize *NRT* genes

2.3 *ZmNRT2.5* 基因的克隆和生物信息学分析

本研究对 LN 处理上调幅度最大的基因 *Zm00001d011679* (*ZmNRT2.5*) 进行克隆与分析。从 MaizeGDB 中获取 *ZmNRT2.5* 基因序列后设计全长引物,通过 PCR 扩增获得长度为 1 563 bp 的片段(图 3),将 PCR 产物连接到植物表达载体 PCAM-BIA1300-GFP 上后转化大肠杆菌,挑取单克隆测序,测序结果经 DNAMAN 比对发现, B73-329 中的 *ZmNRT2.5* 基因序列与 MaizeGDB 中 B73 的参考基因组序列完全一致。

通过对 *ZmNRT2.5* 编码的蛋白进行保守结构域分析发现,其编码的第 26 ~ 493 氨基酸为 PLN00028 (Nitrate transmembrane transporter) 保守结构域(图 4),

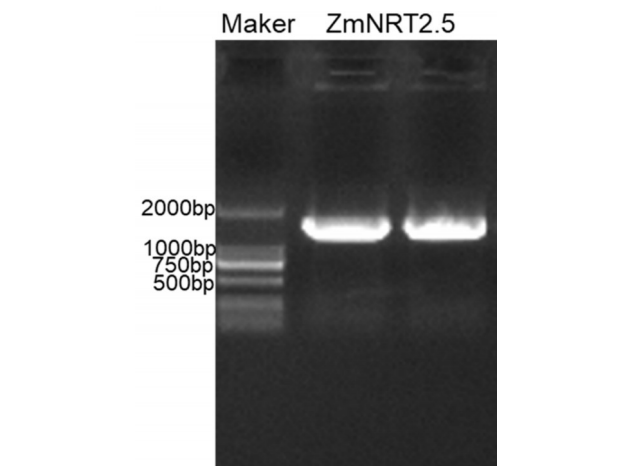


图3 玉米低氮胁迫响应 *ZmNRT2.5* 基因的克隆
Fig.3 Cloning of the LN responsive maize *ZmNRT2.5* gene

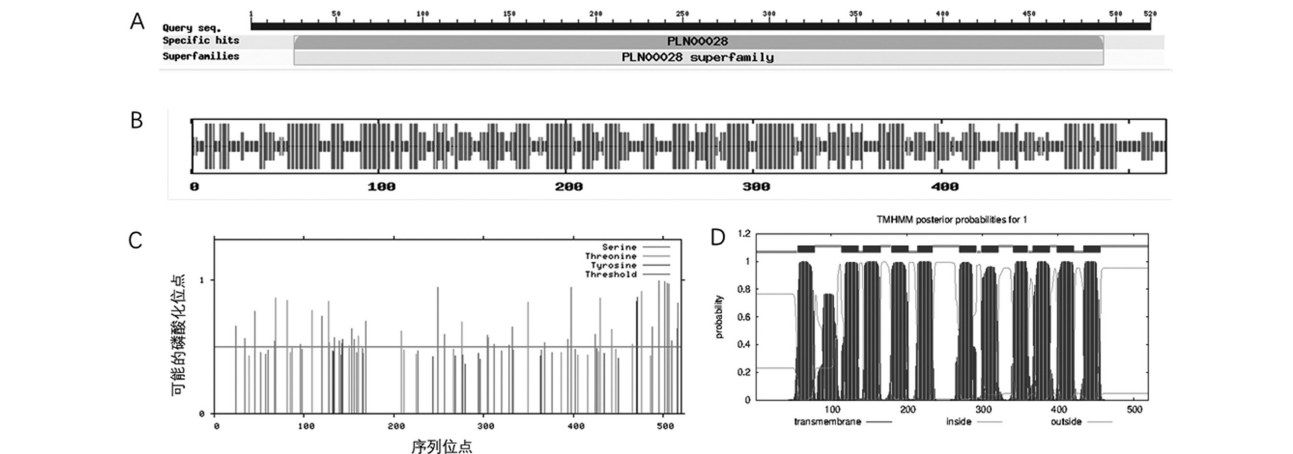


图4 *ZmNRT2.5* 蛋白保守结构域分析(A)、蛋白二级结构预测(B)、磷酸化位点预测(C)及蛋白跨膜结构域预测(D)
Fig.4 Conservative domain prediction of *ZmNRT2.5*(A); Secondary structure prediction(B); Phosphate site prediction(C); The transmembrane domains prediction(D)

ZmNRT2.5 编码的蛋白分子质量为 55.78 KD, 理论等电点为 8.94。蛋白质二级结构预测结果表明, *ZmNRT2.5* 蛋白主要由 α -螺旋(42.5%)、无规则卷曲(33.08%)、延伸链(18.85%)和 β -折叠(5.58%)构成。磷酸化位点预测分析发现, *ZmNRT2.5* 蛋白共有 49 个磷酸化位点, 其中, Tyr3 个、Ser29 个、Thr17 个。对

其编码的蛋白进行跨膜预测结果显示, 该蛋白含有 11 个跨膜结构域, 推测为膜定位蛋白。

拟南芥 *NRT2s* 家族一共包含 7 个成员, 从 TAIR 数据库中下载 7 个成员的氨基酸序列后利用 MEGA5 软件绘制系统进化树, 从图 5 结果可以看出, *ZmNRT2.5* 与 *AtNRT2.5* 亲缘关系最近。

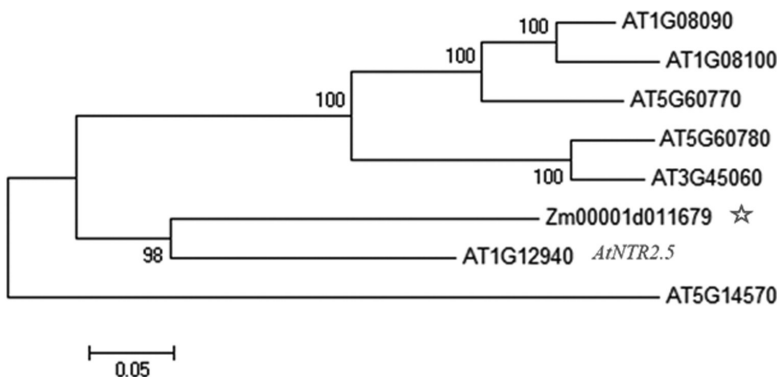
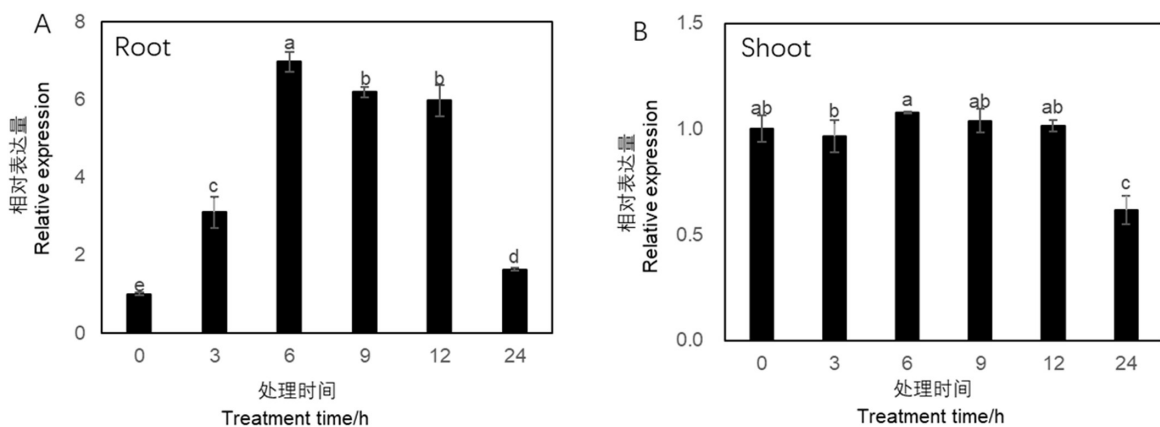


图5 玉米 *NRT2.5* 基因与拟南芥 *NRT2s* 基因家族的亲缘关系
Fig.5 Genetic relationship between maize *NRT2.5* gene and Arabidopsis *NRT2s* gene family

2.4 *ZmNRT2.5* 基因对氮素处理的响应

为验证 *ZmNRT2.5* 基因对氮素的响应, 重新对玉米幼苗进行不同时间点的 LN 胁迫处理, 分别取地下部和地上部样品提 RNA 进行 *ZmNRT2.5* 表达量验

证。结果表明, LN 处理 24 h 内, 根系中 *ZmNRT2.5* 基因表达迅速被诱导(图 6), 6 h 的诱导倍数最高。与根系中的表达不同, LN 处理后, 叶片中 *ZmNRT2.5* 基因的表达变化不大。



注: 误差线代表 3 次生物学重复间的标准差, 不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。下图同。
Note: The error bars represent the mean $\pm$ SD of three biological replicates, different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).
The same below.

图6 LN 处理后 *ZmNRT2.5* 基因地下部(A)和地上部(B)的相对表达量
Fig.6 Relative expression of *ZmNRT2.5* in root(A) and shoot(B) after LN treatment

2.5 *ZmNRT2.5* 基因组织表达分析及对不同激素和逆境胁迫处理的响应

利用 RT-qPCR 检测 *ZmNRT2.5* 基因在玉米幼苗不同部位的表达模式。图 7 结果显示, *ZmNRT2.5* 基因在玉米根、茎、新叶、老叶和叶鞘中均有不同程度的表达, 其中, 在根、老叶和叶鞘中的表达量最高,

而在茎和新叶中表达量较低。

进一步分析不同植物激素脱落酸(ABA)、赤霉素(GA_3)和乙烯(合成前体 ACC)处理对玉米幼苗根中和叶片中 *GmNRT2.5* 基因表达的影响。结果表明, 在 ABA 处理 3、6、9、12、24 h 后 *ZmNRT2.5* 基因的表达在根中和叶片中均显著下降, 与叶片相比, ABA

处理不同时间点对根中 *ZmNRT2.5* 抑制程度较大(图8)。与 ABA 处理相反, GA_3 处理诱导根中和叶片中 *ZmNRT2.5* 基因的表达, 与叶片相比, GA_3 处理对根中 *ZmNRT2.5* 诱导倍数大于叶片。与 ABA 和 GA_3 处理均不同的是, 乙烯合成前体(ACC)处理可以显著诱导根中 *ZmNRT2.5* 基因的表达, 但抑制叶片中其表达。这些结果表明, *ZmNRT2.5* 对脱落酸、赤霉素和乙烯均有响应, 植物激素参与调控玉米根系对氮素的吸收可能与 *ZmNRT2.5* 有关。

ZmNRT2.5 基因的表达受到盐、旱胁迫的调控。在 150 mmol/L 处理不同时间点后, 无论地上部叶片还是地下部根系, *ZmNRT2.5* 表达量均显著降低, 除了处理 12 h 外, 其他时间点下降倍数均较大(图9)。与 NaCl 胁迫处理不同, 在 20%PEG6000 胁迫处理不同时间点后, 叶片中 *ZmNRT2.5* 的表达均受到显著抑制, 而根中 *ZmNRT2.5* 的表达在处理 6 h

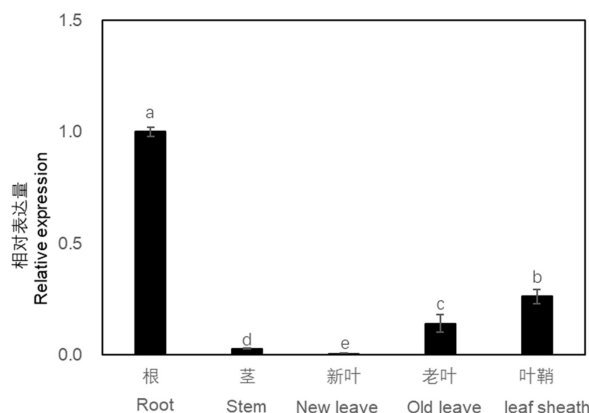
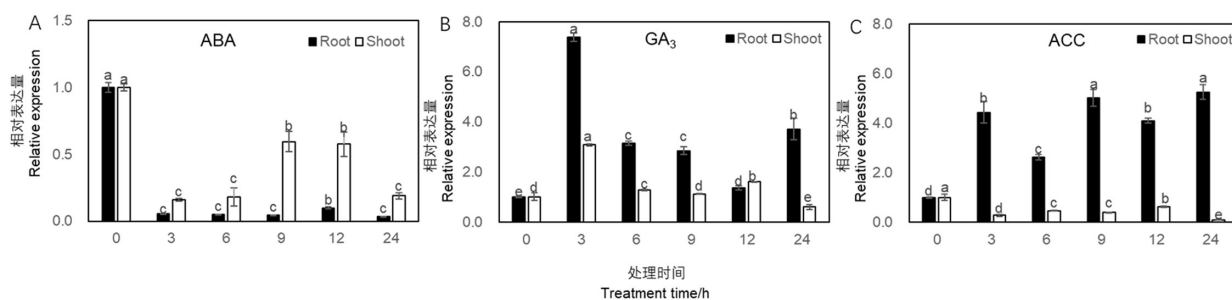


图7 *ZmNRT2.5* 基因的表达分析

Fig.7 Expression analysis of *GmZmNRT2.5*

和 9 h 后处于诱导上调状态, 而在 3 h 和 12 h 表达受到显著抑制。



注: 地上部和地下部单独分析显著性差异。下图同。

Note: The significant difference between root and shoot were analyzed separately. The same below.

图8 ABA(A)、 GA_3 (B)和 ACC(C)处理后 *ZmNRT2.5* 基因地下部和地上部的相对表达量

Fig.8 Relative expression of *ZmNRT2.5* in root and shoot after ABA(A), GA_3 (B) and ACC(B) treatments

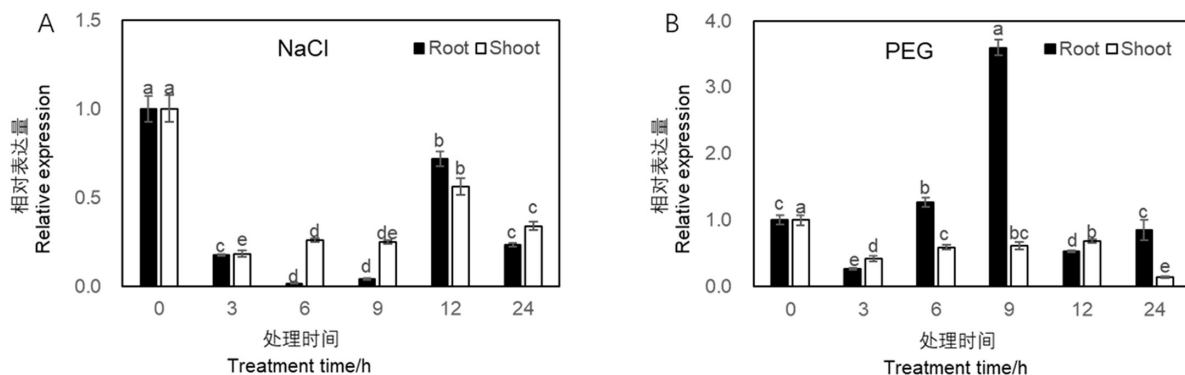


图9 NaCl(A)和 PEG(B)处理后 *ZmNRT2.5* 基因地下部和地上部的相对表达量

Fig.9 Relative expression of *ZmNRT2.5* in root and shoot after NaCl(A) and PEG(B) treatments

3 结论与讨论

硝酸盐转运蛋白(NRTs)在植物氮素吸收与转运中发挥重要作用。本研究通过对 LN 处理不同时间

点的玉米根系转录组进行分析, 筛选出 7 个响应氮胁迫处理的差异表达 *NRTs* 基因, 其中, LN 处理抑制 *NRT1* 家族 *ZmNRT1.1B* 和 *NRT2* 家族 *ZmNRT2.3* 基因的表达。目前研究结果表明, 与拟南芥 *NRT1.1* 只

有低亲和硝酸盐转运功能不同^[19], *ZmNRT1.1b* 具有双亲和硝酸盐转运功能^[15], 因此推测, 玉米中的 *ZmNRT1s* 和 *ZmNRT2s* 家族个别基因与拟南芥的功能可能不完全相同。通过对 7 个 *ZmNRTs* 基因的启动子分析发现, 所有基因启动子上均含有多个植物激素或逆境胁迫应答元件。已有研究报道, 植物激素在调控作物氮素高效利用中具有重要的作用^[20, 21]。本研究筛选出来的 7 个 *ZmNRTs* 基因中均至少含有 1 种植物激素调控位点, 因此推测这些 *ZmNRTs* 基因在植物激素调控玉米氮素吸收中也发挥重要作用。

本研究克隆到受 LN 诱导上调最大的基因 *ZmNRT2.5*, 进化树分析表明, *ZmNRT2.5* 与 *AtNRT2.5* 同源性最高, 且 *AtNRT2.5* 基因的功能已研究, 确保克隆得到的为玉米 *NRT2.5* 基因。生物信息学分析表明, *ZmNRT2.5* 含有典型的硝酸盐转运蛋白保守结构域, 且含有多个磷酸化位点。跨膜结构预测结果表明, *ZmNRT2.5* 蛋白包含 11 个跨膜区, 符合 *NRT2* 家族蛋白的跨膜结构特征, 推测定位在细胞膜上, 执行硝酸盐吸收或转运功能。 *AtNRT2.5* 在外界硝酸盐浓度较低的情况下发挥作用, 其在根和茎中的表达均受 LN 显著诱导。本研究结果与拟南芥和茶树相同, LN 处理显著诱导根中 *ZmNRT2.5* 的表达, 这些研究结果表明, *NRT2.5* 基因的功能可能较为保守。 *ZmNRT2.5* 基因在不同组织中存在表达差异, 主要在根中、老叶和叶鞘中表达。 *AtNRT2.5* 主要在主根和侧根的根毛区表达^[13], 茶树 *NRT2.5* 主要在根中和成熟叶中表达^[22], *MhNRT2.5* 主要在叶片中表达^[23]。这些研究结果表明, 不同物种中 *NRT2.5* 的组织表达存在差异, *ZmNRT2.5* 主要在根、老叶和叶鞘中表达, 推测其不仅参与低氮环境下根系硝酸盐吸收功能, 而同时又参与硝酸盐从根中往地上部转运后的再分配功能。

近年来研究表明, 植物激素信号可以通过调控 *NRTs* 表达影响植物根系氮素吸收。如赤霉素通过调控 *OsNRT2.3*、*OsNRT1.1B* 和 *ZmNRT2.1* 的表达影响水稻和玉米根系氮素吸收; 乙烯信号通过调控 *BnNRT2.1* 和 *AtNRT1.5* 基因的表达影响油菜氮素吸收及拟南芥氮素转运^[24, 25]。但目前关于植物激素是否可以调控 *NRT2.5* 基因的表达在不同作物中均未见报道。本研究通过分析 *ZmNRT2.5* 基因启动子发现, 其包含植物激素乙烯(ERE)、赤霉素(GARE)和脱落酸(ABRE)应答元件, 推测其响应乙烯、赤霉素和脱落酸处理。实时荧光定量 PCR 结果表明, 该基因的表达在脱落酸、赤霉素和乙烯处理后不同时间发生显著变化, 说明该基因受到激素的调控, 可能参与

了赤霉素、ABA 和乙烯信号转导途径。因此, *ZmNRT2.5* 基因可能同水稻 *NRTs* 基因一样, 通过植物激素信号参与调控根系硝酸盐的吸收。

目前对 *NRTs* 在不同作物中的研究主要集中在硝酸盐吸收与转运方面, 很少对其相应盐胁迫和干旱胁迫进行研究。本研究通过分析 *ZmNRT2.5* 启动子发现, 除了植物激素响应元件外, 其还含有多个干旱响应元件(MBS 和 MYB), 推测 *ZmNRT2.5* 可能同样响应干旱和盐胁迫处理。通过实验验证发现, 无论是地上部还是地下部, 盐胁迫处理不同时间点后 *ZmNRT2.5* 的表达量显著下调。与盐胁迫处理不同, 干旱处理对根中和叶片中 *ZmNRT2.5* 基因的调控存在差异。最新研究表明, 盐处理可以调控不同枸橼 *NRTs* 基因的表达^[26], 而且, 盐处理可以通过抑制花生和盐地碱蓬根系硝酸盐的吸收^[27, 28]。因此, 盐胁迫和干旱等逆境胁迫处理造成玉米减产的原因可能与抑制 *ZmNRT2.5* 基因的表达, 从而抑制根系硝酸盐的吸收有关^[29]。

本研究通过转录组测序筛选到 7 个响应氮素调控的 *ZmNRTs* 基因, 为今后研究玉米 *NRTs* 基因在氮素吸收及逆境胁迫响应过程中的功能提供了资源。同时, *ZmNRT2.5* 的克隆、生物信息学分析和激素应答分析为下一步研究其功能提供理论基础。

参考文献:

- [1] DING L, WANG K J, JIANG G M, et al. Post-anthesis changes in photosynthetic traits of maize hybrids released in different years[J]. Field Crop Research, 2005, 93: 108–115.
- [2] GARCÍA M J, ROMERA F J, LUCENA C, et al. Ethylene and the regulation of physiological and morphological responses to nutrient deficiencies[J]. Plant Physiology, 2015, 169: 51–60.
- [3] MU X H, CHEN Q W, WU X Y, et al. Gibberellins synthesis is involved in the reduction of cell flux and elemental growth rate in maize leaf under low nitrogen supply[J]. Environmental and Experimental Botany, 2018, 150: 198–208.
- [4] OKAMOTO M, JONE VIDMAR J, GLASS A D M. Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: Responses to nitrate provision[J]. Plant Cell Physiology, 2003, 44(3): 304–317.
- [5] KIBA T, KRAPP A. Plant nitrogen acquisition under low availability: regulation of uptake and root architecture[J]. Plant Cell Physiology, 2016, 57: 707–714.
- [6] LEE R B, DREW M C. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots[J]. Journal of Experimental Botany, 1986, 185: 1768–1779.
- [7] TSAY Y F, CHIU C C, TSAI C B. Nitrate transporters and peptide transporters[J]. FEBS Letters, 2007, 581: 2290–2300.
- [8] GALVAN A, FERNANDEZ E. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters[J]. Cellular and Molecular Life Science, 2001, 58: 225–233.
- [9] OKAMOTO M, VIDMAR J J, GLASS A D M. Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision[J]. Plant Cell Physiology, 2003, 44: 304–317.

- [10] 蒋志敏,王 威,储成才. 植物氮高效利用研究进展和展望[J]. 生命科学, 2018, 30(10): 1060–1071.
- JIANG Z M, WANG W, CHU C C. Towards understanding of nitrogen use efficiency in plants[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2018, 30(10): 1060–1071. (in Chinese)
- [11] ORSEL M, KRAPP A, DANIEL-VEDELE F. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis. Structure and gene expression[J]. Plant Physiology, 2002, 129: 886–896.
- [12] RYOICHI A, HIROSHI H. Expression of rice gene involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction [J]. Breeding Science, 2006, 56: 295–402.
- [13] LEZHNEVA L, KIBA T, FERIA-BOURRELLIER A B, et al. The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants[J]. Plant Journal, 2014, 80: 230–241.
- [14] LIU R R, JIA T, CUI B, et al. The expression patterns and put nitrate transporter 2.5 in plants[J]. Plant Signaling & Behavior, 2020, e1815980.
- [15] WEN Z Y, TYERMAN S D, DECHORGNAT J, et al. Maize NPF6 proteins are homologs of arabidopsis CHL1 that are selective for both nitrate and chloride[J]. Plant Cell, 2017, 29: 2581–2596.
- [16] WANG Y B, YAO Q Q, ZHANG Y S, et al. The role of gibberellins in regulation of nitrogen uptake and physiological traits in maize responding to nitrogen availability[J]. International Journal of Molecular Science, 2020, 21: 1824.
- [17] GAO Y Q, WU W H, WANG Y. The K⁺ channel KZM2 is involved in stomatal movement by modulating inward K⁺ currents in maize guard cells[J]. Plant Journal, 2017, 92: 662–675.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method [J]. Methods, 2001, 25: 402–408.
- [19] LERAN S, MUÑOS S, BRACHET C. Arabidopsis NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation [J]. Molecular Plant, 2013, 6: 1984–1987.
- [20] LI S, TIAN YH, WU K, et al. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture[J]. Nature, 2018, 560: 595–600.
- [21] WU K, WANG S S, SONG W Z, et al. Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice[J]. Science, 2020, 367: 641–649.
- [22] 冯素花,王丽鸳,陈常颂,等. 茶树硝酸根转运蛋白基因 NRT2.5 的克隆及表达分析[J]. 茶叶科学, 2014, 34(4): 364–370.
- FENG S H, WANG L Y, CHEN C S, et al. Cloning and expressing analysis of a nitrogen transporter 2.5 gene from tea plant(*Camellia sinensis* L.)[J]. Journal of Tea Science, 2014, 34(4): 364–370. (in Chinese)
- [23] 王新亮. 果树根系硝态氮信号响应关键基因的克隆与功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [24] LEMAIRE L, DELEU C, LE D E. Modulation of ethylene biosynthesis by ACC and AIB reveals a structural and functional relationship between the(KNO₃)-N-15 uptake rate and root absorbing surfaces [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(10): 2725–2737.
- [25] ZHANG G B, YI H Y, GONG J M. The Arabidopsis Ethylene/jasmonic acid-NRT signaling module coordinates nitrate reallocation and the Trade-Off between growth and environmental adaptation [J]. Plant Cell, 2014, 26(10): 3984–3998.
- [26] ZHAO Z Q, LI M D, XU W W, et al. Genome-Wide Identification of NRT gene family and expression analysis of nitrate transporters in response to salt stress in *Poncirus trifoliata*[J]. Genes, 2022, 13071115.
- [27] 孔伟伟,韩 燕,刘译阳,等. 盐胁迫对花生硝酸盐积累及信号转导的影响[J]. 山东农业科学, 2018, 50(6): 86–89.
- KONG W W, HAN Y, LIU Z Y, et al. Nitrate accumulation and signal transduction under salt stress in peanut[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2018, 50(6): 86–89. (in Chinese)
- [28] LIU R R, CUI B, LU X B, et al. The positive effect of salinity on nitrate uptake in *Suaeda salsa*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 166: 958–963.
- [29] 叶欣男,郭 嘉,柳 青,等. 玉米硝酸盐转运蛋白 *ZmNRT1.1B* 基因遗传多样性分析[J]. 东北农业科学, 2023, 48(6): 69–75.
- YE X N, GUO J, LIU Q, et al. Genetic diversity analysis of nitrate transporter gene *ZmNRT1.1B*[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2023, 48(6): 69–75. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)