文章编号：1005-0906(2026)01-0008-09 DOI: 10.13597/j.cnki.maize.science.20260102

玉米*ZmNRT2.1*基因的克隆和表达分析

卓世海[1,2],王怡凯[3],胡红梅[4],张 啸[2],罗博文[2],刘 丹[2],
吴 玲[2],高世强[2],高多江[2],高世斌[2]

(1.四川省农业科学院作物研究所/四川省种质资源中心,成都 610066; 2.四川农业大学,成都 611100;
3.中国农业科学院作物科学研究所,北京 100080; 4.川北医学院临床医学院,四川 南充 637100)

摘 要：成功克隆玉米硝酸盐转运蛋白基因*Zm00001d054057*(*ZmNRT2.1*),通过生物信息学分析其基本特性。*ZmNRT2.1*的编码区(CDS)全长为1 575 bp,编码524个氨基酸,其蛋白质的相对分子质量为56 674.73 Da,理论等电点为8.20,具有11个跨膜结构域,并含有硝酸盐跨膜转运体的保守结构域。*ZmNRT2.1*的启动子区域含有多种与激素和光响应相关的顺式作用元件。系统进化树分析显示,*ZmNRT2.1*和水稻中*OsNRT2.2*具有较高的亲缘关系。低氮胁迫条件下的表达模式分析表明,*ZmNRT2.1*在苗期根和叶中的表达呈现先上调后趋于稳定的趋势,在成熟期的不同组织中表达量相对较低。亚细胞定位显示,ZmNRT2.1蛋白定位于细胞膜。

关键词：玉米;氮胁迫;*ZmNRT2.1*;表达分析

中图分类号：S513.035.3 **文献标识码**：A

Cloning and Expression Analysis of Maize *ZmNRT2.1* Gene

ZHUO Shi-hai[1,2], WANG Yi-kai[3], HU Hong-mei[4], ZHANG Xiao[2], LUO Bo-wen[2], LIU Dan[2],
WU Ling[2], GAO Shi-qiang[2], GAO Duo-jiang[2], GAO Shi-bin[2]

(1. *Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences / Sichuan Germplasm Resources Center, Chengdu* 610066;
2. *Sichuan Agricultural University, Chengdu* 611100;
3. *Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100080;
4. *Clinical Medical College, North Sichuan Medical College, Nanchong* 637100, China)

Abstract: In this study, the maize nitrate transporter protein gene *Zm00001d054057*(*ZmNRT2.1*) was successfully cloned. The fundamental characteristics of the protein were examined through the utilisation of bioinformatics techniques. The coding region of the *ZmNRT2.1* gene is 1 575 base pairs in length and encodes 524 amino acids. The relative molecular mass of the protein is 56 674.73 Da, and the theoretical isoelectric point is 8.20. The protein has 11 transmembrane structural domains and contains conserved structural domains of nitrate transmembrane transporters. The promoter region of the *ZmNRT2.1* gene contains a variety of cis-acting elements related to hormone response, anaerobic induction response and light response. The phylogenetic tree analysis demonstrated a high degree of relatedness between *ZmNRT2.1* and *OsNRT2.2* in rice. An analysis of the expression pattern under low nitrogen stress conditions revealed that the expression of the *ZmNRT2.1* gene in roots and leaves at the seedling stage exhibited a tendency towards up-regulation, followed by stabilisation. Conversely, the expression in different tissues at the maturity stage was relatively low. Subcellular localisation experiments revealed that the ZmNRT2.1 protein is localised to the cell membrane. In conclusion, these results provide a theoretical and experimental basis for a deeper understanding of the crucial role of *ZmNRT2.1* in maize nitrogen utilization.

Key words: Maize; Nitrogen stress; *ZmNRT2.1*; Expression analysis

录用日期：2025-02-15

基金项目：国家现代农业产业技术体系项目、四川省突破性玉米及高粱育种材料和方法创新及品种选育(育种攻关项目)(2021YFYZ0017)

作者简介：卓世海(1995-),四川自贡人,硕士,助理研究员,研究方向为玉米有利基因挖掘及新品种选育。E-mail:736297902@qq.com
高世斌为本文通信作者。 E-mail:shibingao@163.com

氮是构成植物蛋白质、核酸和叶绿素等重要生物分子的关键元素，也是植物需求最多的矿质营养元素之一[1]。适时适量地追施氮肥对于确保作物高产、稳产和优质至关重要[2-3]。随着全球氮肥施用量的不断增加，粮食产量的增长却逐渐降低，并且过量的氮肥施用导致了一系列环境问题，如水体富营养化和土壤酸化[4-5]。此外，过度依赖氮肥不仅降低了作物对氮的利用效率(Nitrogen use efficiency，NUE)，还引发了如倒伏、病虫害加剧以及作物成熟延迟等问题，从而影响了作物的产量和品质[6]。因此，提高作物的NUE对于节约资源、减少生产成本、保护生态环境以及推动农业可持续发展具有重要意义。

植物对氮的利用是一个复杂的过程，涵盖了氮的响应、吸收、运输、同化以及再动员，并受到遗传和环境因素的共同影响[7-8]。氮响应表现为植物在形态和生理上的变化，在低氮环境中，植株通过延长主根来寻找更多的氮源；在高氮条件下，则促进侧根的萌发以增加氮吸收效率[9-10]。研究表明，玉米根尖过渡区(root apex transition zone)的转录组和蛋白组学分析揭示了氮响应与植物激素生物合成及信号传导之间的关联[11]。调控氮响应的转录因子在拟南芥中已有深入研究，如中央时钟基因*CCA1*(*At2g46830*)、*LATERAL ORGAN BOUNDARY DOMAIN(LBD)37/38/39*、*NIN-Like Protein*(*NLP*)7等[12-14]，这些转录因子通过调控氮吸收和同化过程中关键基因的表达，从而控制氮代谢过程。*ZmNLP5*作为一个重要的氮响应转录因子，其突变体表现出显著减弱的氮响应能力，同时氮同化产物的积累也显著降低[15]。*ZmNLP5*能够结合到硝酸盐响应元件(Nitrate-responsive cis-element，NRE)[16]上，激活*nitrite reductase1.1*(*ZmNIR1.1*)的表达[17]，对于维持正常的氮代谢至关重要。此外，*ZmNLP5*功能的丧失还会导致低氮环境下玉米根系生长受限[18]。

硝态氮(NO_3^-)是大多数陆生植物主要的氮源形式[19-21]。玉米等作物主要通过根部从土壤中吸收以硝态氮(NO_3^-)为主的氮素。除了作为营养元素，NO_3^-还充当信号分子，协同调控植物氮代谢途径中关键基因的表达，进而影响植物的新陈代谢、生理过程以及生长发育[22-24]。氮的吸收和运输依赖于硝酸盐转运体(Nitrate transporters，NRTs)，这些转运体在不同物种中表现出不同的特征。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中，NRT家族被研究的最深入，其基因组编码了至少67个NRT成员，分为3个主要亚家族，包括53个NRT1/(peptide transporter)PTR家族成员、7个NRT2家族成员和7个氯离子通道slow type anion channel(SLAC)/Aluminum-activated malate transporters(ALMT)家族成员[25]。相比之下，水稻(*Oryza sativa*)中的NRT家族规模较小，已知有5个重要的NRT成员，包括*OsNRT1.1A*[26]和*OsNRT1.1B*[27]属于NRT1/PTR家族，参与低亲和力硝酸盐吸收；*OsNRT2.1*[28]、*OsNRT2.2*[29]和*OsNRT2.3a*[30]属于NRT2家族，主要负责高亲和力硝酸盐吸收。在玉米中，nitrate transporter1/peptide transporter family(*ZmNPF6.4*)和*ZmNRT1.1B(ZmNPF6.6*)都参与了硝酸盐的吸收[31]。*ZmNRT1.1B*(*ZmNPF6.6*)不仅负责硝酸盐的吸收，还通过调节硝酸盐的转运和信号传导来影响氮的利用效率[31-32]。*ZmNRT2.1*在根部皮层细胞中表达，与硝酸盐的吸收密切相关[33]。研究发现，当Ca^{2+}缺乏时，过表达*ZmNRT2.1*的烟草植株比野生型具有更好的根系生长，高浓度K^+可以缓解这种效应，表明*ZmNRT2.1*的表达可能与Ca^{2+}信号通路相关[34]。*ZmNRT2.2*在根部皮层、中柱及侧根原基中表达，同样参与硝酸盐的吸收。*ZmNRT2.5*已被鉴定和克隆[35]，其在根、叶、穗轴、雄穗和苞叶中高表达，并且是唯一在低氮条件下上调的NRT2成员，这表明其可能参与对低氮限制的响应[36-37]。在0.5 mmol/L的NO_3^-条件下，*ZmNRT2.5*的表达在29 d后达到峰值，与玉米对NO_3^-的吸收能力峰值相似[38]。此外，转录因子如*ZmEREB97*和*Zmm28*也参与调控NRTs的功能。*ZmEREB97*通过Y1H筛选确定了NRT相关的下游靶基因，通过双荧光素酶报告(Dual-Luciferase Reporter)和凝胶迁徙技术(Electrophoretic Mobility Shift Assay，EMSA)实验验证了其与*ZmNPF6.4*、*ZmNPF6.6*、*ZmNRT2.1*和*ZmNRT2.5*基因启动子中的GCC-box的结合[39]。MADS-box家族的*Zmm28*转录因子的转基因玉米能提高氮吸收率和氮利用率[40]。

目前，玉米中NRT2硝酸盐转运体的研究主要体现在分析其表达模式和电生理学特性上。已有研究鉴定和克隆了*ZmNRT2.5*，但对其他NRT2家族成员的了解仍然有限，亟需从分子生物学角度进行全面系统的分析。在本研究中，通过玉米自交系178的苗期低氮处理条件下的转录组学筛选到1个响应低氮胁迫的基因*ZmNRT2.1*，对该基因进行克隆、生物信息学分析、表达模式分析和亚细胞定位研究，为进一步研究*ZmNRT2.1*基因在氮素利用效率的分子机制提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

本试验选择玉米自交系178作为研究材料，用

于基因克隆和表达模式分析，并使用本氏烟(Nicotiana benthamiana)进行亚细胞定位。试验中使用的试剂如下：RNA提取采用Invitrogen公司的Trizol试剂。反转录使用TakaRa公司的PrimeScript 11 1st Strand cDNA Synthesis Kit进行cDNA合成。RACE扩增利用Takara SMARTer® RACE(rapid amplification of cDNA end) 5′/3′试剂盒快速扩增cDNA末端。DNA纯化与回收使用TIANGEN公司的DNA纯化回收试剂盒和质粒小提试剂盒。荧光定量PCR采用罗氏公司的Fast Start Essential DNA Green Master染色进行。试验所用载体和菌株如下：中间载体pEASY®-Blunt Zero载体，购自全式金公司。融合表达载体pHB-YFP由四川农业大学水稻所提供，用于构建带有黄色荧光蛋白(YFP)标签的融合蛋白，以进行亚细胞定位研究。大肠杆菌菌株DH5α和农杆菌菌株EHA105均购自北京擎科新业生物技术有限公司。

1.2 材料培养与处理

玉米种子经过75%酒精浸泡5 min，再用10%过氧化氢浸泡15 min，随后用一级水清洗5～8次并浸泡12 h。处理后的种子放置于无菌玻璃培养皿中，铺有湿润滤纸，在28 ℃黑暗条件下催芽2 d。在低氮胁迫处理阶段，选择生长一致的幼苗，去除胚乳后移植至泡沫板水培。幼苗达到2叶1心期时，随机分为处理组(低氮霍格兰营养液，N：0.05 mmol/L)和对照组(正常氮霍格兰营养液，N：15 mmol/L)，pH值调至6.5～7.0。每3 d更换1次营养液，并定时通气12 h。在多个时间点(0、1、6、12、24 h，2、4、6、8、10、12、14 d)采集样品，确保每个处理有3次生物学重复。同时，将3叶1心的幼苗移栽到灭菌蛭石(MVP)中，适应性培养2 d，处理组与对照组分别使用低氮和全素营养液，每5 d更换1次。当玉米植株达到散粉吐丝期后，收集根、花丝、穗位叶、苞叶、雄穗和花药组织样本，立即用液氮速冻并保存于-80 ℃。本试验在四川农业大学雅安校区儆江农场温室大棚进行，白天温度28 ℃，晚上20 ℃，相对湿度60%；光照16 h，黑暗8 h。

1.3 *ZmNRT2.1*基因克隆

利用Gramene数据库获取了B73参考基因组中*Zm00001d054057*(*ZmNRT2.1*)的编码序列(CDS)，其序列具有较高的GC含量(约66%)，为此设计1对特异性引物用于CDS全长的扩增：ZmNRT2.1-F：ATGGCGGCCGTCGGCGCTCCG；ZmNRT2.1-R：TTAGACATGCTCCGGCGTGGCGGCG。以玉米自交系178的叶片RNA反转录合成的cDNA为模板，使用Phanta Max高保真酶，并添加二甲基亚砜(DMSO)以提高扩增效率。最后，将PCR产物直接送至成都擎科生物科技有限公司进行测序。

1.4 *ZmNRT2.1*基因的生物信息学预测分析

用Expasy-ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/)分析*ZmNRT2.1*基因编码氨基酸的数目、蛋白相对分子质量、理论等电点等理化性质；蛋白质二级结构预测用SPOMA(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)；跨膜结构域预测分析用TMHMM2.0(https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)；蛋白质三级结构预测用SWISS-MODEL(https://www.swissmodel.expasy.org/)；蛋白亲疏水性预测用Expasy-ProtScale(https://web.expasy.org/protscale/)；保守结构域分析用NCBI-CDD (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)；启动子顺式作用元件用PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/)预测，用TBtools软件进行可视化。

1.5 实时荧光定量PCR

用Beacon Designer 7软件设计*ZmNRT2.1*的特异性定量PCR引物：ZmNRT2.1-Q-F1：CACCTCCTCAACCTACTC；ZmNRT2.1-Q-R1：CTCTTCTCGTCGTCGTTC。选取*GAPDH*作为内参基因。选取低氮处理下不同时间点的玉米根和地上部以及生长至散粉吐丝期的根、穗位叶、雄穗、花药和苞叶。所有样品均用研钵研磨，并加入TRIzol™试剂提取总RNA。使用TaKaRa PrimeScriptTM II第一链cDNA合成试剂盒反转录总RNA。每1 μL原液稀释20倍后用于后续的qRT-PCR分析。采用罗氏公司的Fast Start Essential DNA Green Master Mix，在Analytik Jena AG的q TOWER3G荧光定量PCR仪上进行扩增。反应程序：预变性95 ℃ 30 s；95 ℃变性5 s，61 ℃退火及延伸30 s，95 ℃ 10 s开始记录荧光信号，共40个反应循环。基因相对表达量通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算。

1.6 ZmNRT2.1的亚细胞定位

将无终止密码子的全长*ZmNRT2.1*编码区序列克隆到表达载体pHB-YFP中，构建pHB-ZmNRT2.1-YFP融合质粒。使用的引物序列如下：ZmNRT2.1-S-F1：atttggagaggacagggtaccATGGCGGCCGTCGGCGCT；ZmNRT2.1-S-R1：cttgctcaccatggtactagtGACATGCTCCGGCGTGGC。将构建成功的pHB-ZmNRT2.1-YFP融合质粒和pHB-YFP空载分别转化到农杆菌GV3101中。转化的农杆菌悬浮液注射到本氏烟叶片中进行瞬时表达。同时，使用TaWPI6-mCherry[41-42]用作质膜标记。注射后的烟草

叶片被切成小块,并在注射后48 h使用激光共聚焦扫描显微镜(Nikon A1)进行成像。黄色荧光蛋白(YFP)的激发和发射波长为514～527 nm。

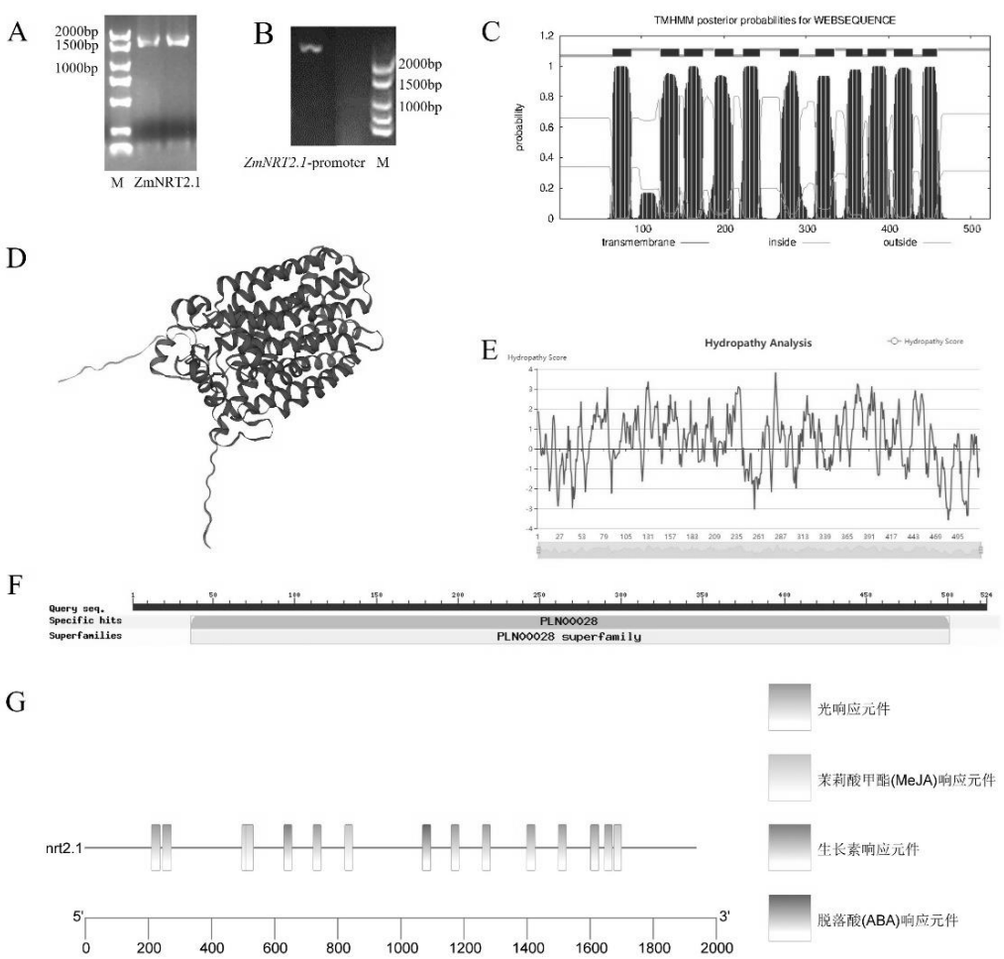
1.7　数据处理与分析

试验数据利用GraphPad Prism 8.0绘制图表,采用*t*检验进行差异显著性分析。

2　结果与分析

2.1　玉米*ZmNRT2.1*基因的克隆及生物信息学分析

为了克隆目的基因*Zm00001d054057*(*ZmNRT2.1*),从Gramene数据库检索并获得了其编码序列。通过PCR扩增,成功获得了全长为1 575 bp的*ZmNRT2.1* CDS,该序列编码524个氨基酸(图1)。此外,以B73参考序列的ATG起始密码子前2 kb作为目标启动子区域,成功扩增得到了1 934 bp的*ZmNRT2.1*启动子片段。生物信息学分析结果中,ZmNRT2.1蛋白相对分子质量为56 674.73 Da,理论等电点(pI)为8.20,不稳定指数(II)为41.07,表明该蛋白属于不稳定的碱性蛋白。蛋白二级结构分析表明,α螺旋占49.81%,无规则卷曲占40.65%,延伸链仅占9.54%。跨膜结构域分析表明,该蛋白存在11个跨膜结构区域。蛋白三级结构预测结果,蛋白亲疏水性的总平均疏水指数(GRAVY)为0.369,表明其是一个疏水性蛋白。保守结构域分析表明,该蛋白含有典型的硝酸盐跨膜转运体的保守结构域。对基因启动子上游1 934 bp序列进行顺式作用元件分析,发现含有茉莉酸甲酯(MeJA)、生长素、脱落酸(ABA)和光响应顺式作用元件。



注:A为*ZmNRT2.1* CDS的克隆(M为DL2000 DNA marker;5`RACE为5`末端;3` RACE为3`末端);B为*ZmNRT2.1*启动子的克隆;C为跨膜结构域预测;D为蛋白三级结构预测;E为亲疏水性预测;F为保守结构域预测;G为启动子顺式作用元件预测

Note: A, Cloning of *ZmNRT2.1* CDS(M, DL2000 DNA marker; 5`RACE, 5`−end; 3` RACE, 3`−end); B, Cloning of *ZmNRT2.1* promoter; C, Pre diction of transmembrane structural domains; D, Protein tertiary structure prediction; E, Prediction of hydrophilicity; F, Conservative struc tural domain prediction; G, Prediction of promoter cis−acting elements

图1　*ZmNRT2.1*基因克隆及生物信息学分析

Fig.1　Cloning and bioinformatics analysis of *ZmNRT2.1* gene

为了探究NRT2s家族在玉米(*Zea mays*)、水稻(*Oryza sativa*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的进化关系,从GenBank数据库下载了这些物种中NRT2s家族成员的氨基酸序列。玉米有7个NRT2s成员、水稻有5个(*OsNRT2.3a/OsNRT2.3b*为*OsNRT2.3*的不同转录本)、拟南芥有7个。使用MEGA7.0软件进行多序列比对,并构建系统进化树。结果显示,玉米中的ZmNRT2.1和ZmNRT2.2亲缘关系最近(图2),同时与水稻中的OsNRT2.1和OsNRT2.2亲缘关系较近,表明*ZmNRT2.1*与其余3个基因可能具有相似的功能。

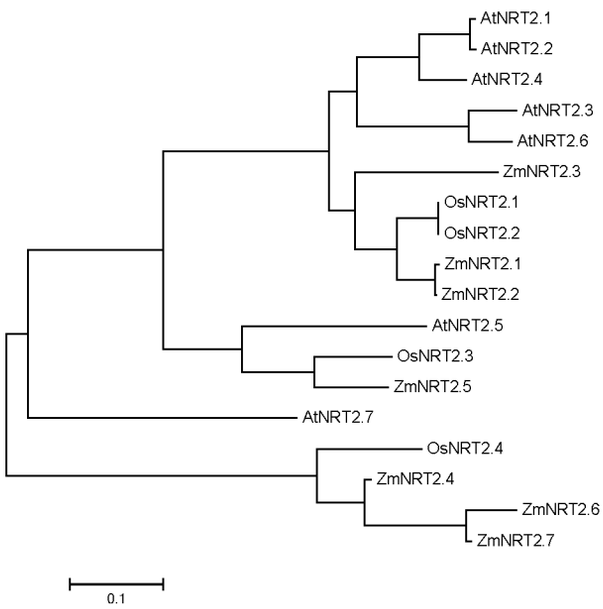
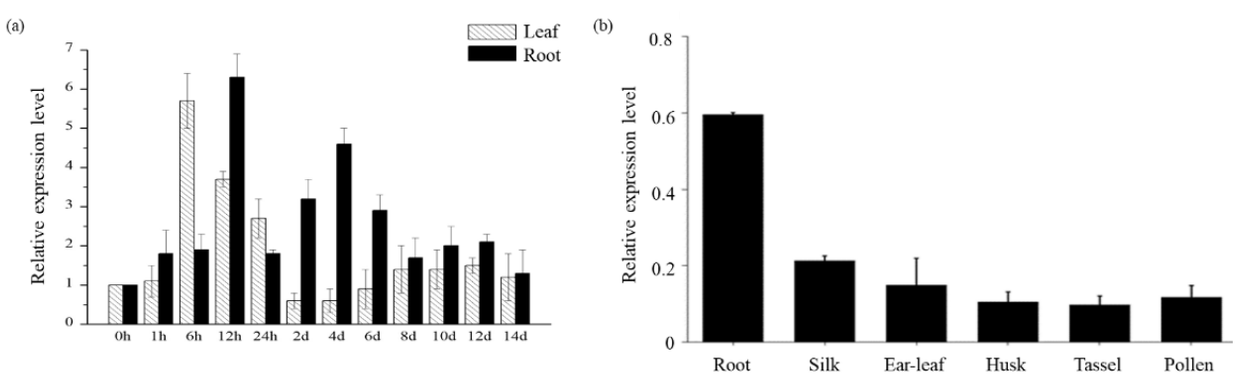


图2 *ZmNRT2.1*系统进化树分析

Fig.2 Phylogenetic tree analysis of *ZmNRT2.1*

2.2 *ZmNRT2.1*基因在低氮胁迫处理的表达模式分析

分析*ZmNRT2.1*基因在低氮处理条件下的表达模式。结果显示,在根中,0~12 h期间,*ZmNRT2.1*基因的表达量均显著上调,且上升趋势一直持续到12 h,并在12 h达到峰值;在24 h~14 d期间,根中的表达量均显著上调,在4 d达到峰值后呈下降趋势(图3)。在叶片中,0~12 h期间,*ZmNRT2.1*基因表达量同样显著上调,且上升趋势持续到6 h,并在6 h达到峰值;在24 h~14 d期间,叶片中表达量在2~6 d均下调,8 d时才显著上调,且上升趋势持续到12 d。结果表明,在短时间低氮胁迫下,



注:(a)为*ZmNRT2.1*基因在苗期低氮胁迫处理的表达模式分析;(b)为*ZmNRT2.1*基因在成熟期低氮胁迫处理的表达模式分析

Note: (a), Expression pattern analysis of *ZmNRT2.1* gene in low nitrogen stress treatment at seedling stage; (b), Expression pattern analysis of *ZmNRT2.1* gene in low nitrogen stress treatment at maturity stage

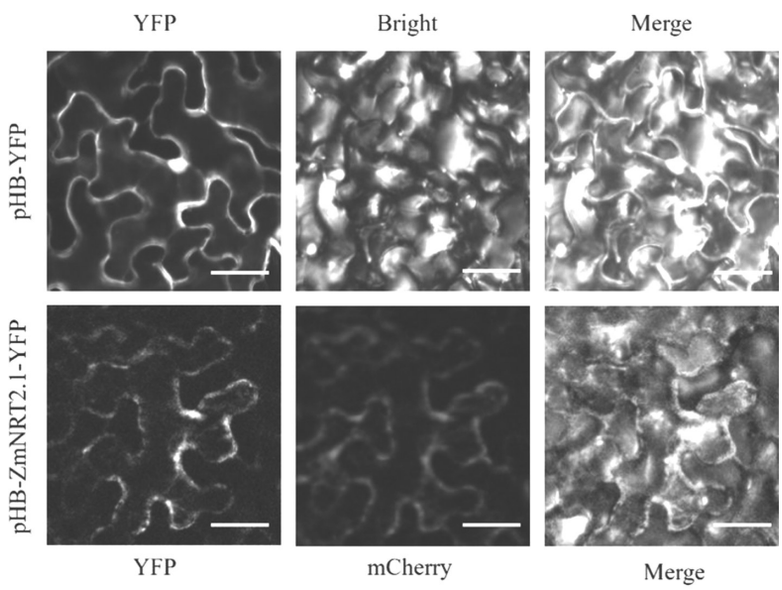
图3 *ZmNRT2.1*基因在低氮胁迫处理的表达模式分析

Fig.3 Expression pattern analysis of *ZmNRT2.1* gene in low nitrogen stress treatment

*ZmNRT2.1*基因在根和叶片中均能迅速并持续响应低氮胁迫；在长时间低氮胁迫下，根中的表达量和叶片中的表达量呈相反的趋势，说明*ZmNRT2.1*基因参与了低氮胁迫的应答。在玉米成熟期组织中，*ZmNRT2.1*在根系中表达量最高，在花丝、穗位叶、苞叶、雄穗和花粉中的相对表达量都较低。结果表明，在成熟期玉米受到低氮胁迫时，*ZmNRT2.1*不是主要的响应基因。综上推测，*ZmNRT2.1*基因在玉米不同生长阶段对低氮胁迫的响应机制可能存在差异。

2.3　ZmNRT2.1定位

为了明确ZmNRT2.1的亚细胞定位，构建了含有ZmNRT2.1与黄色荧光蛋白(YFP)融合表达载体pHB-ZmNRT2.1-YFP，通过农杆菌介导的转化法将其引入烟草叶片细胞。随后，将侵染后的叶片在黑暗条件下培养16 h。使用激光共聚焦显微镜观察处理后的叶片，结果显示，在含有pHB-ZmNRT2.1-YFP融合基因的烟草细胞中，YFP发出的黄色荧光集中在细胞膜上(图4)。结果表明，ZmNRT2.1蛋白定位于细胞膜。



注：YFP为黄色荧光通道；mCherry为细胞膜marker；Bright为明场通道；Merge为YFP、mCherry和Bright通道融合；pHB-ZmNRT2.1-YFP为转入目的基因的表达载体。Bar=50 cm

Note: YFP, yellow fluorescence channel; mCherry, cell membrane marker; Bright, bright field channel; Merge, fusion of YFP, mCherry and Bright channels; pHB-ZmNRT2.1-YFP, expression vector transferred into target gene. Bar=50 cm

图4　ZmNRT2.1在烟草叶片中的亚细胞定位

Fig.4　Subcellular localization of ZmNRT2.1 in tobacco leaves

3　结论与讨论

硝酸盐转运蛋白(NRTs)在植物氮素吸收、转运和利用中起着重要作用。本研究前期通过低氮胁迫处理下的玉米自交系178苗期转录组测序与分析，筛选出1个受低氮诱导的NRT基因*ZmNRT2.1*，对其进行生物信息学系统分析。结果显示，该基因编码的蛋白定位于细胞膜，包含有11个跨膜结构域以及硝酸盐转运蛋白家族特有的保守结构域，这些结构特征符合硝酸盐转运蛋白的典型模式，表明该基因很可能参与硝酸盐的吸收或转运过程。

启动子是调控基因表达的重要开关。*ZmNRT2.1*启动子区域含有多个响应元件，包括MeJA、ABA和生长素，以及光响应的元件。这些元件表明，*ZmNRT2.1*的表达可能受多种激素和光照条件的影响。已有研究表明，外源施加吲哚-3-乙酸(IAA)会诱导拟南芥*AtNRTl.1*基因的表达，增强拟南芥对硝酸盐的吸收能力[43]，对*NRT2.1*的转录有抑制作用[44]，推测生长素可能通过类似的机制影响*ZmNRT2.1*的转录水平。ABA的生物合成与NO_3^-供应密切相关，尤其在根系发育过程中[45]。如拟南芥中的*AtNRT1.2*(*AtNPF4.6*)介导细胞对ABA的吸收，参与种子萌发和萌发后的生长过程中的ABA信号转导。ABA与硝酸盐信号之间存在相互作用[46]，*AtNRT1.2*能够将维管组织中合成的ABA运输到保卫细胞，调节气孔开度[47]。因此，推测ABA信号可能会影响*ZmNRT2.1*的表达和功能。研究表明，拟南芥*AtNRT2.1*基因的表达不仅受氮素浓度调控，还受

光照，昼夜节律及蔗糖等的影响[48-49]，推测光照条件和外源糖处理也可能影响*ZmNRT2.1*的表达量。系统进化树分析显示，该蛋白与水稻中OsNRT2.2亲缘关系最为接近。OsNRT2.2是水稻高亲和硝酸盐转运蛋白，受硝酸盐上调，受NH_4^+和高温(37°C)抑制，其表达量在光照或外源糖处理下增加，并且能与OsNAR2.1互作，促进根系对硝酸盐的吸收[50]。同时，当水稻中敲除*OsNRT2.1*后使得*OsNRT2.1*表达量降低，从而降低对氮素的吸收[51]。推测玉米中可能也存在类似的互作模式，从而增强根系对硝酸盐的吸收。

在苗期，*ZmNRT2.1*在低氮条件下表现出显著上调表达。在成熟期，尽管其在各个组织中均有表达，但表达水平相对较低，尤其是在受到低氮胁迫时。推测在苗期，*ZmNRT2.1*可能主要参与氮素吸收和分配；在成熟期，它的功能可能更多地与维持正常的生理活动相关，而非直接参与逆境响应。综合上述结果，推断*ZmNRT2.1*可能有助于植物适应低氮环境，从而提高氮素利用率。

植物中硝酸盐响应机制是一个需要消耗能量的过程，会受到植物体内其他信号分子的调控。研究表明，低氮胁迫会诱导*AtNRT2.1*基因促进乙烯合成，但乙烯增加会对*AtNRT2.1*产生负反馈抑制，导致硝酸盐转运能力降低[52]。此外，根际细菌(PGPRs)通过分泌植物激素，包括吲哚-3-乙酸(IAA)和赤霉素(GA)等方式促进植物生长[53]，帮助植物抵御硝酸盐饥饿。已有研究表明，植物适应硝酸盐饥饿的调控机制与植物激素调控相关，如*ZmEREB97*转录因子能够与*ZmNRT2.1*等基因的启动子中的GCC-box的结合。推测*ZmNRT2.1*可能参与了由激素和转录因子共同构成的复杂调控网络，从而实现植物对低氮胁迫的响应机制。

本研究成功克隆了玉米中的硝酸盐转运蛋白基因*ZmNRT2.1*，其CDS全长为1 575 bp，编码524个氨基酸，包含11个跨膜结构域。启动子分析显示，*ZmNRT2.1*的启动子区域含有MeJA、ABA和生长素，以及光响应相关的顺式作用元件。系统进化树分析表明，ZmNRT2.1与水稻中的OsNRT2.2亲缘关系较为接近。*ZmNRT2.1*在低氮胁迫下，其表达模式在苗期根部和叶片中均呈现先上调后趋于稳定的趋势。在成熟期，*ZmNRT2.1*在根系中的表达量最高，而在其他组织中的表达水平较低，这表明在成熟期低氮胁迫条件下，*ZmNRT2.1*并非主要响应基因。亚细胞定位实验进一步证实，ZmNRT2.1定位于细胞膜。综上所述，*ZmNRT2.1*基因可能在植物生长早期应对低氮环境的适应机制中扮演重要角色。

参考文献：

[1] 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)：12．
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): 12. (in Chinese)

[2] ABBASI M K, TAHIR M M, RAHIM N. Effect of N fertilizer source and timing on yield and N use efficiency of rainfed maize(*Zea mays* L.) in Kashmir-Pakistan[J]. Geoderma, 2013, 195-196: 87-93.

[3] 姜涛．氮肥运筹对夏玉米产量、品质及植株养分含量的影响[J]．植物营养与肥料学报，2013，19(3)：559-565．
JIANG T. Effects of nitrogen application regime on yield, quality and plant nutrient contents of summer maize[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2013, 19(3): 559-565. (in Chinese)

[4] 朱兆良．中国土壤氮素研究[J]．土壤学报，2008(5)：778-783．
ZHU Z L. Research on soil nitrogen in China[J]. Acta Pedologica Sinica, 2008(5): 778-783. (in Chinese)

[5] 张维理，田哲旭，张宁，等．我国北方农用氮肥造成地下水硝酸盐污染的调查[J]．植物营养与肥料学报，1995(2)：82-89．
ZHANG W L, TIAN Z X, ZHANG N, et al. Investigation of nitrate pollution in ground water due to nitrogen fertilization in agriculture in north China[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 1995(2): 82-89. (in Chinese)

[6] DUAN F, WEI Z, SOUALIOU S, et al. Nitrogen partitioning in maize organs and underlined mechanisms from different plant density levels and N application rate in China[J]. Field Crops Research, 2023, 294: 108874.

[7] XU G, FAN X, MILLER A J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency[J]. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63(1): 153-182.

[8] KRAPP A. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2015, 25: 115-122.

[9] UEDA Y, KONISHI M, YANAGISAWA S. Molecular basis of the nitrogen response in plants[J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2017, 63: 329-341.

[10] YU P, EGGERT K, VON WIRéN N, et al. Cell type-tpecific tene expression analyses by RNA qequencing reveal local high nitrate-triggered lateral root initiation in shoot-borne roots of maize by modulating auxin-related cell cycle regulation[J]. Plant Physiology, 2015, 169(1): 690-704.

[11] TREVISAN S, MANOLI A, RAVAZZOLO L, et al. Nitrate sensing by the maize root apex transition zone: a merged transcriptomic and proteomic survey[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(13): 3699-3715.

[12] GUTIERREZ R, STOKES T, THUM K, et al. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock gene CCA1[J]. Proc Natl Acad Sci. USA, 2008, 105: 4939-4944.

[13] RUBIN G, TOHGE T, MATSUDA F, et al. Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2009, 21(11): 3567-3584.

[14] MARCHIVE C, ROUDIER F, CASTAINGS L, et al. Nuclear retention of the transcription factor *NLP7* orchestrates the early response to nitrate in plants[J]. Nature Communications, 2013, 4(1): 1713.

[15] GE M, LIU Y, JIANG L, et al. Genome-wide analysis of maize NLP transcription factor family revealed the roles in nitrogen response [J]. Plant Growth Regulation, 2018, 84(1): 95-105.

[16] KONISHI M, YANAGISAWA S. Identification of a nitrate-responsive cis-element in the *arabidopsis NIR1* promoter defines the presence of multiple cis-regulatory elements for nitrogen response[J]. The Plant Journal, 2010, 63(2): 269-282.

[17] GE M, WANG Y, LIU Y, et al. The NIN-like protein 5(ZmNLP5) transcription factor is involved in modulating the nitrogen response in maize[J]. The Plant Journal, 2020, 102(2): 353-68.

[18] 葛敏,王元琮,宁丽华,等 . 氮响应转录因子*ZmNLP5*影响玉米根系生长的功能研究[J] . 作物学报,2021,47(5):807-813 .
GE M, WANG Y Z, NING L H, et al. Function analysis of nitrogen-responsive transcription factor *ZmNLP5* affecting root growth in maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 2021, 47(5): 807-813. (in Chinese)

[19] CRAWFORD N M, GLASS A D M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants[J]. Trends in Plant Science, 1998, 3 (10): 3893-3895.

[20] GAO Y, QI S, WANG Y. Nitrate signaling and use efficiency in crops[J]. Plant Communications, 2022, 3(5): 100353.

[21] HIREL B, LE GOUIS J, NEY B, et al. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(9): 2369-2387.

[22] GIEHL R F H, VON WIRéN N. Root nutrient foraging[J]. Plant Physiology, 2014, 166(2): 509-517.

[23] JIA Z, GIEHL R F H, VON WIRéN N. Nutrient - hormone relations: driving root plasticity in plants[J]. Molecular Plant, 2022, 15 (1): 86-103.

[24] LIU Y, VON WIRéN N. Integration of nutrient and water availabilities via auxin into the root developmental program[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2022, 65: 102117.

[25] O'BRIEN JOSé A, VEGA A, BOUGUYON E, et al. Nitrate transport, sensing, and responses in plants[J]. Molecular Plant, 2016, 9 (6): 837-856.

[26] WANG W, HU B, YUAN D, et al. Expression of the nitrate transporter gene *OsNRT1.1A/OsNPF6.3* confers high yield and early maturation in rice[J]. Plant Cell, 2018: 638-651.

[27] HU B, WANG W, OU S, et al. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies[J]. Nature Genetics, 2015, 47(7): 834-838.

[28] KATAYAMA H, MORI M, KAWAMURA Y, et al. Production and characterization of transgenic rice plants carrying a high-affinity nitrate transporter gene(*OsNRT2.1*)[J]. Breeding Science, 2009, 59: 237-243.

[29] FENG H, YAN M, FAN X, et al. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(7): 2319-2332.

[30] FAN X, TANG Z, TAN Y, et al. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, 113(26): 7118-7123.

[31] TREVISAN S, BORSA P, BOTTON A, et al. Expression of two maize putative nitrate transporters in response to nitrate and sugar availability[J]. Plant Biology, 2008, 104: 462-475.

[32] CAO H, LIU Z, GUO J, et al. *ZmNRT1.1B*(*ZmNPF6.6*) determines nitrogen use efficiency via regulation of nitrate transport and signalling in maize[J]. Plant Biotechnology Journal, 2024, 22(2): 316-329..

[33] 黄慧梅,高永康,台玉莹,等 . 硝酸盐转运蛋白NRT2在植物中的功能及分子机制研究进展[J] . 植物学报,2023,58(5):783-798 .
HUANG H M, GAO Y K, TAI Y Y, et al. Research progress on the function and molecular mechanism of nitrate transporter NRT2 in Plants[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2023, 58(5): 783-798.(in Chinese)

[34] IBRAHIM A, JIN X L, ZHANG Y B, et al. Tobacco plants expressing the maize nitrate transporter *ZmNrt2.1* exhibit altered responses of growth and gene expression to nitrate and calcium[J]. Botanical Studies, 2017, 58(1): 51.

[35] 王玉斌,张志贤,张岱奕,等 . 玉米氮胁迫响应*NRT*基因的鉴定及*ZmNRT2.5*的克隆和表达分析[J] . 玉米科学,2024,32(2):39-46 .
WANG Y B, ZHANG Z X, ZHANG D Y, et al. Identification of maize nitrogen stress responsive *NRT* genes and cloning and expression of *ZmNRT2.5*[J]. Journal of Maize Sciences, 2024, 32(2): 39-46. (in Chinese)

[36] DECHORGNAT J, FRANCIS K L, DHUGGA K S, et al. Tissue and nitrogen-linked expression profiles of ammonium and nitrate transporters in maize[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 206.

[37] 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]. The Plant Journal, 2014, 80(2): 230-241.

[38] ZAMBONI A, ASTOLFI S, ZUCHI S, et al. Nitrate induction triggers different transcriptional changes in a high and a low nitrogen use efficiency maize inbred line[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2014, 56(11): 1080-1094.

[39] WU Q, XU J, ZHAO Y, et al. Transcription factor *ZmEREB97* regulates nitrate uptake in maize(*Zea mays*) roots[J]. Plant Physiology, 2024(1): 1.

[40] FERNANDEZ J A, HABBEN J E, SCHUSSLER J R, et al. *Zmm28* transgenic maize increases both N uptake- and N utilization-efficiencies[J]. Communications Biology, 2022, 5(1): 555.

[41] WU T M, LIN K C, LIAU W S, et al. A set of GFP-based organelle marker lines combined with DsRed-based gateway vectors for subcellular localization study in rice(*Oryza sativa* L.)[J]. Plant Molecular Biology, 2016, 90(1): 107-115.

[42] WANG Y, WU J, KIM S G, et al. A transient gene expression protocol for subcellular protein localization and protein secretion analyses in rice[J]. Protocol Exchange, 2013.

[43] 郑冬超,夏新莉,尹伟伦 . 生长素促进拟南芥*AtNRT1.1*基因表

达增强硝酸盐吸收[J]. 北京林业大学学报,2013,35(2):6.
ZHENG D C, XIA X L, YIN W L. Auxin promotes nitrate uptake by up-regulating *AtNRT1.1* gene transcript level in *arobidopsis thaliana*[J]. Journal of Beijing Forestry University 2013, 35(2): 6. (in Chinese)

[44] ASIM M, ULLAH Z, OLUWASEUN A, et al. Signalling overlaps between nitrate and auxin in regulation of the root system architecture: insights from the *Arabidopsis thaliana*[J/OL]. 2020, 21(8): 10.

[45] KROUK G. Hormones and nitrate: a two-way connection[J]. Plant Molecular Biology, 2016, 91(6): 599-606.

[46] GUAN P. Dancing with hormones: a current perspective of nitrate signaling and regulation in *arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8:1697.

[47] KANNO Y, HANADA A, CHIBA Y, et al. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109: 9653-9658.

[48] LAUGIER E, BOUGUYON E, MAURIèS A, et al. Regulation of high-affinity nitrate uptake in roots of *arabidopsis depends* predominantly on posttranscriptional control of the *NRT2.1/NAR2.1* transport system[J]. Plant Physiology, 2012, 158(2): 1067-1078.

[49] FILLEUR S, DORBE M-F, CEREZO M, et al. An *arabidopsis* T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake[J]. FEBS Letters, 2001, 489(2): 220-224.

[50] YAN M, FAN X, FENG H, et al. Rice *OsNAR2.1* interacts with *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* and *OsNRT2.3a* nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges[J]. Plant Cell Environ, 2011, 34(8): 1360-1372.

[51] 郑冬超. 调节转运蛋白*AtNRT1.1*、*AtNRT2.1*及*PdAMT1.1*基因表达对拟南芥和杨树氮素吸收的影响研究[D]. 北京:北京林业大学,2013.

[52] ASGHAR H, ZAHIR Z, ARSHAD M, et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L[J]. Biology and Fertility of Soils, 2002, 35(4): 231-237.

(责任编辑:李万良)