

## 超表达小麦硝态氮转运蛋白基因*TaNRT2.1*对拟南芥生长及氮吸收的影响

李文虎, 田汇\*, 高亚军

农业部西北植物营养与农业环境重点实验室/西北农林科技大学资源环境学院, 陕西杨凌712100

**摘要:** 为了阐明小麦硝态氮转运蛋白(nitrate transporters, NRT) *TaNRT2.1*及辅助蛋白*TaNAR2.1*的硝态氮转运功能, 本研究构建了*TaNRT2.1*单基因(单超)与*TaNRT2.1+TaNAR2.1*双基因超表达载体(双超), 通过农杆菌介导法转化野生型拟南芥, 利用潮霉素筛选与PCR鉴定分别获得了3个单超与2个双超的转基因拟南芥纯合株系。通过研究转基因拟南芥的硝态氮吸收动力学及氮含量发现: 在硝态氮浓度 $>1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 仅双超能够显著提高拟南芥的硝态氮吸收速率; 硝态氮浓度 $<1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 不论单超还是双超均不能提高拟南芥的硝态氮吸收速率。低氮( $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ )条件下, 2种转基因拟南芥的生长状况和氮吸收与野生型相比均无显著差异; 而在高氮( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ )条件下, 单超提高了拟南芥的角果重和植株生物量, 双超则显著提高了拟南芥的生物量、根系生长和总吸氮量。这些结果表明, *TaNRT2.1*转运蛋白需与辅助蛋白*TaNAR2.1*联合才能调控拟南芥对硝态氮的转运。

**关键词:** 超表达; *TaNRT2.1*; *TaNAR2.1*; 拟南芥; 氮效率; 小麦

硝态氮和铵态氮是植物的两大无机氮源, 但是在旱地土壤中由于硝化作用强烈, 铵态氮含量极低, 故硝态氮成为最主要的氮源(Crawford和Forde 2002)。氮素从土壤被植物吸收到根内是植物利用氮素的第一步, 在这一过程中, 位于根表皮细胞膜上的氮转运蛋白起关键作用。植物体内存在3种硝酸盐转运系统: 一种是高亲和转运系统(high-affinity transport system, HATS), 主要在外界硝酸盐浓度小于 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时起主要作用; 一种是低亲和转运系统(low-affinity transport system, LATS), 主要在外界硝酸盐浓度大于 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时负责硝酸盐的转运(Crawford和Glass 1998); 另一种是双亲和转运系统(double-affinity transport system), 它在外界硝酸盐浓度小于或大于 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时都起作用(Tsay等2007)。高低亲和硝态氮转运蛋白分别由*NRT2*与*NRT1*基因家族编码, 在拟南芥和水稻中分别发现了53个和80个*NRT1*转运蛋白基因(Tsay等2007)。*AtNRT2.1*主要定位于根表皮和皮层细胞的质膜上, 其转录体的数量与根系对 $\text{NO}_3^-$ 的高亲和活性相关性很高(Wirth等2007)。拟南芥*NRT2*家族中除*AtNRT2.7*外, 其它的*AtNRT2*蛋白都需要*AtNAR2.1* (nitrate assimilation related protein, 也称*AtNRT3.1*)蛋白的协助才能行使硝酸盐转运功能(Kotur等2012)。水稻*OsNRT2.1*和*OsNRT2.2*分享相同的基因编码区序列但有不同的UTR (untranslated region), 而且与其他单子叶植物*NRT2*基因具有很高的相似性。*OsNRT2.3*和*OsNRT2.4*与拟南芥*AtNRT2*更相似(Cai等

2008), 并且有研究发现*OsNRT2.3*可分为2种*OsNRT2.3a* (AK109776)和*OsNRT2.3b* (AK072215)。

目前关于NRTs基因的鉴定和功能的研究主要集中在模式植物及草本植物中, 它们的功能及调控机制已经得到较为详细的研究(张合琼等2016); 但在小麦中, 由于其复杂的基因组结构及遗传转化的难度较大, 人们对于小麦体内NRT基因的功能及表达规律的认识仍然十分有限。然而随着分子生物学研究技术和生物信息学的日趋成熟, 很多参与硝酸盐转运的基因已经被相继分离、克隆。小麦体内共发现了7个属于*NRT1*基因家族硝态氮转运蛋白基因*TaNRT1.1*、*TaNRT1.2*、*TaNRT1.3*、*TaNRT1.4*、*TaNRT1.5*、*TaNRT1.7*与*TaNRT1.8* (轩红梅等2014)、5个*NRT2*基因家族硝态氮转运蛋白基因*TaNRT2.1*、*TaNRT2.2*、*TaNRT2.3*、*TaNRT2.4*和*TaNRT2.5* (轩红梅等2014; Yin等2007; Zhao等2004) 以及两个*NAR2*蛋白基因*TaNAR2.1*和*TaNAR2.2* (Cai等2007)。但是只有少量文献报道了小麦根内NRT基因的表达调控特征。Yin等(2007)发现*TaNRT2.1*仅在小麦的根部表达, 并且能够受外界 $\text{NO}_3^-$ 的快速诱导表达, *TaNRT2.3*也有相似的表达规律(Zhao等2004)。Liu等(2015)研究发现在低氮条件下, 氮吸收高效小麦基因型中高亲和力硝

收稿 2017-11-08 修定 2018-03-14  
资助 中央高校基本科研业务费专项资金(2452015048和2452-015346)。

\* 通讯作者(tianh@nwsuaf.edu.cn)。

态氮转运蛋白基因*TaNRT2.1*的表达水平在灌浆期显著高于氮低效基因型,表明此基因在决定小麦氮吸收方面可能起着重要作用。但目前*TaNRT2.1*仍然是假定存在的硝态氮转运蛋白,其硝态氮转运功能并未得到直接验证,而且其是否与*TaNAR2.1*互作也鲜有报道。因此,本研究拟通过构建*TaNRT2.1*与*TaNAR2.1*+*TaNAR2.1*超表达载体,遗传转化野生型拟南芥,通过研究转基因拟南芥的生长和氮吸收表型来明确小麦*TaNRT2.1*的硝态氮转运功能以及其与*TaNAR2.1*的互作情况,这对于揭示小麦硝态氮吸收的分子机理具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 载体的构建与拟南芥的转化

用Primer premier 5.0软件设计引物扩增*TaNRT2.1* (登录号AF288688)和*TaNAR2.1* (登录号AY763794)的蛋白编码区,将*TaNRT2.1*的蛋白编码序列连接到表达载体pCAMBIA 1302 (购买自武汉隶科生物科技有限公司,以35S为启动子,将目的基因亚克隆至载体的*NcoI*与*NheI*之间)中,构建单基因超表达载体;同时将*TaNRT2.1*和*TaNAR2.1*双基因连接到表达载体中(*TaNRT2.1*亚克隆至pCAMBIA 1302载体的*SpeI*与*NheI*之间,*TaNAR2.1*与*Hygromycin*融合表达正向插入到pCAMBIA 1302载体8707位点的*XhoI*处,插入方向与CaMv35s启动子一致),构建双基因超表达载体,然后将表达载体转化到农杆菌菌株EHA105中。在人工气候室培养Columbia (Col)生态型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.),并将它记作野生型(wild type, WT),在开花期采用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的蘸花法来转化拟南芥,待拟南芥成熟后收获T<sub>0</sub>代种子。拟南芥培养条件如下:昼夜温度为23°C/21°C,光暗周

期为16 h/8 h,光照强度为500~600 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,空气相对湿度为80%~85%,培养过程中浇灌Hoagland全营养液以保证拟南芥的生长。

### 1.2 T<sub>0</sub>~T<sub>3</sub>代转基因植株的潮霉素抗性基因(*Hyg*)与*TaNRT2.1*基因表达检测

用含有50 mg·L<sup>-1</sup>潮霉素(Hygromycin)的1/2 MS固体培养基对T<sub>0</sub>代拟南芥种子进行阳性筛选,将筛选到的阳性苗移入经过高压灭菌的蛭石、珍珠岩和草炭灰(1:1:1)的混合基质中,移栽后约20 d时采取少量拟南芥叶片保存于液氮中,采用试剂盒法提取总RNA以及反转录(TransGen Biotech, China),cDNA置于-20°C冰箱中保存备用。设计合成特异性引物(表1)对转基因植株进行潮霉素和目标基因的PCR检测以排除假阳性。

### 1.3 转基因拟南芥植株的硝态氮吸收动力学研究

将WT和转基因拟南芥纯合株系先在基质中培养20 d,然后挑选生长状况基本一致的植株在Hoagland全营养液中水培,培养过程中用通气泵24 h通气,定期(7 d)更换营养液并监测pH变化。培养15 d后在0.2 mmol·L<sup>-1</sup>的CaSO<sub>4</sub>溶液中氮饥饿1 d,然后在浓度为0.05、0.10、0.25、0.50、0.75、1.00、2.00和3.00 mmol·L<sup>-1</sup>的<sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>溶液中培养,重复3次。吸收2 h之后取出植株采样,取根系样品时先用蒸馏水将根冲洗干净,然后用吸水纸擦干,烘干、称重后用球磨机磨碎,并用稳定同位素质谱仪(DELTA V Advantage, 德国)测定植株中<sup>15</sup>N的丰度。

### 1.4 转基因拟南芥全生育期氮吸收表型测定

将WT和转基因拟南芥纯合体株系先在基质中培养20 d,然后挑选生长状况基本一致的幼苗在低氮(0.1 mmol·L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)和高氮(10 mmol·L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)条件下水培至大部分角果成熟。培养过程中24 h

表1 引物序列与扩增片段及退火温度

Table 1 Primer sequences, amplified fragments and annealing temperature

基因	引物序列(5'→3')	扩增片段/bp	退火温度/°C
<i>Hyg</i>	F: TCCGGAGCCTCCGCTCGAAGTAG R: CTGAACTCACCGCGACGCTGTGC	750	55
<i>TaNRT2.1</i>	F: CTTCGTGGCATGGCGTATTG R: CCATGCAGTAGCCGTAGAGG	218	57
<i>AtActin</i>	F: AGGTATCGCTGACCGTATGAG R: CATCTGCTGGAATGTGCTGA	144	52

通气, 定期(7 d)更换营养液并监测pH变化。角果逐渐成熟后, 小心地取出植株冲洗根系, 然后用吸水纸吸干水分并用剪刀把植株地上部与根系分开, 一部分根系提取RNA检测*Hyg*与*TaNRT2.1*的基因表达; 另一部分用来测定植株地下部干重。将样品杀青、烘至恒重并测定地上/下部干重, 磨碎后用 $H_2SO_4-H_2O_2$ 法消煮植物全氮, 然后用AutoAnalyzer3连续流动分析仪测定植株地上/下部含氮量, 并用WinRHIZO根系分析系统扫描拟南芥的根系。

### 1.5 数据处理与分析

所有数据均采用SPSS 21.0、DPS软件及Excel 2013进行统计分析和制作图表, 采用LSD检验法对差异显著性( $P < 0.05$ )进行多重比较。

## 2 实验结果

### 2.1 转基因拟南芥阳性植株的筛选

待阳性拟南芥植株成熟后收获 $T_1$ 代种子, 然后对 $T_1$ 代种子继续进行潮霉素筛选与PCR检测得到 $T_2$ 代种子, 最终筛选得到5个 $T_3$ 代转基因纯合株系: 单独超表达*TaNRT2.1*基因植株N1-21、N1-26、N1-28 (WT转*TaNRT2.1*记作N1)与超表达双基因*TaNRT2.1+TaNAR2.1*拟南芥植株N2-18、N2-32 (WT转*TaNRT2.1+TaNAR2.1*记作N2)。

全生育期试验收获之后, 提取根系总RNA后反转录为cDNA, 以拟南芥看家基因*AtActin*为内参对 $T_3$ 代转基因植株进行了潮霉素抗性基因(*Hyg*)和目的基因(*TaNRT2.1*)的PCR鉴定。结果显示, 所有拟南芥植株中均检测到*AtActin*扩增条带, 阴性对照中均无扩增条带。除未转化对照WT外, 其余5个超表达株系均具有*Hyg*和*TaNRT2.1*扩增条带(图1), 表明成功地获得了转基因拟南芥植株。

### 2.2 超表达*TaNRT2.1*对拟南芥硝态氮吸收动力学的影响

高氮条件下, 单超株系N1-28与双超株系N2-18转基因拟南芥的生长状况均好于野生型, 且双超植株的根系表型优于单超(图2)。

随着溶液中 $^{15}N$ 浓度的逐渐升高, 野生型及转基因拟南芥根系的 $^{15}N$ 吸收速率也随之升高, 吸收速率曲线为抛物线, 且均达到了显著水平(图3-A)。在氮浓度为 $0.10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 单超株系的根系氮吸收速率显著低于野生型, 其它氮浓度下二者没有

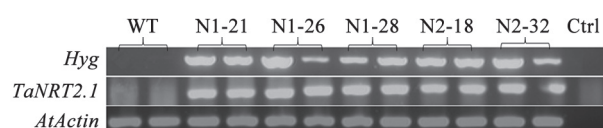


图1 不同 $T_3$ 代转基因拟南芥株系潮霉素抗性基因及*TaNRT2.1*基因的PCR检测

Fig.1 PCR detection of hygromycin resistance gene and *TaNRT2.1* gene in  $T_3$  transgenic plants of different lines  
Ctrl: 阴性对照,  $n=2$  (每个株系2个生物学重复)。

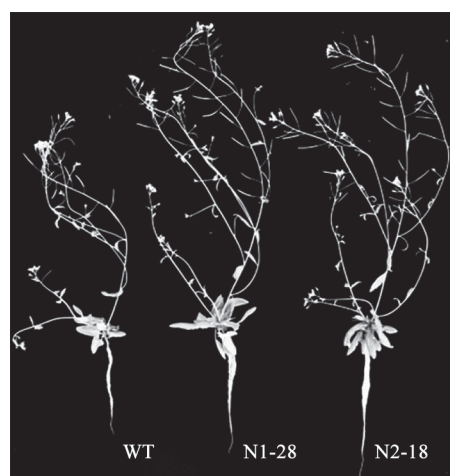


图2 高氮条件下不同转基因株系拟南芥的表型  
Fig.2 Phenotype of different transgenic lines of *Arabidopsis* with high concentration of nitrate

显著差异; 在氮浓度为 $0.05$ 和 $0.10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 双超株系的氮吸收速率显著低于野生型, 其它氮浓度下二者没有显著差异。但当浓度大于 $1.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 双超拟南芥植株的氮吸收速率与野生型相比有增加的趋势; 在氮浓度为 $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 双超拟南芥植株的氮吸收速率显著低于单超, 其它氮浓度下双超拟南芥植株的氮吸收速率有高于单超植株的氮吸收速率的趋势, 但均未达到显著水平(图3-A)。另外, 单超植株的最大吸收速率比野生型低19.9%, 但双超植株的最大吸收速率分别比野生型、单超植株高28.6%、54.3% (图3-B)。表明双超在氮浓度大于 $1.00 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可以提高拟南芥根系的硝态氮吸收速率。

### 2.3 超表达*TaNRT2.1*对拟南芥不同器官生物量的影响

低氮条件下, 2种转基因植株不同器官的生物量与野生型相比均有增加, 但差异不显著(表2)。



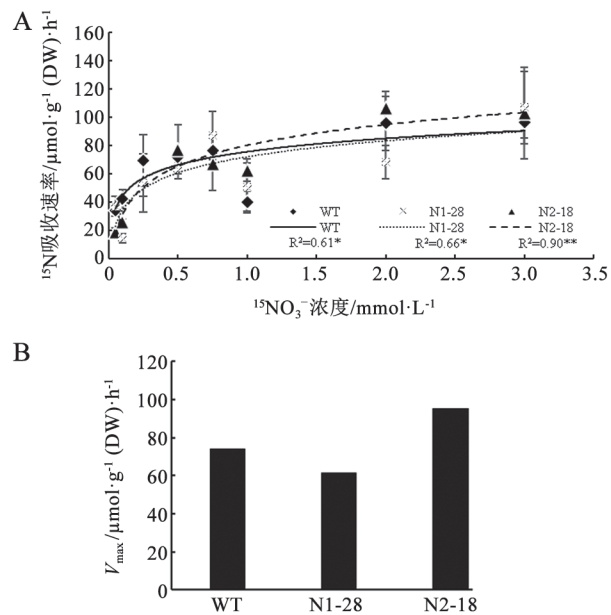


图3 不同转基因拟南芥根系<sup>15</sup>N吸收速率曲线(A)与最大吸收速率(B)

Fig.3 Dynamics of <sup>15</sup>N absorption (A) and the maximum absorption rate (B) of the wild type and transgenic *Arabidopsis* plants

*n*=3, A中\*, \*\*分别表示 $P<0.05$ 与 $P<0.01$ 下显著相关。

高氮条件下, 单超植株的茎叶干重与野生型相比没有显著差异, 双超植株的茎叶干重与野生型、

单超相比均显著增加; 除N1-21株系外, 2种转基因植株的角果干重约是野生型的3倍左右, 且达到了显著增加的水平; 与野生型相比, 单超植株的根干重没有显著差异, 双超植株的根干重则显著增加, 大约是野生型根系干重的2倍, 其中N2-32株系的根干重显著高于单超的3个株系(表3)。高氮条件下, 单超或双超对拟南芥地上部干重与总干重的影响趋势基本一致, 单超株系仅N1-26植株的地上部干重、总干重显著高于野生型。双超植株的地上部干重与总干重分别是野生型的2.81倍与2.78倍, 均显著增加。在双超的2个株系之中, 只有N2-32的地上部干重与总干重比单超的3个株系显著增加(表3)。以上结果表明单超与双超均能调控拟南芥的生长并提高转基因植株不同器官的生物量, 其中双超的作用更明显。

#### 2.4 超表达*TaNRT2.1*基因对拟南芥根系生长的影响

利用WinRHIZO根系分析系统扫描拟南芥根系后发现, 拟南芥根系生长参数的变化趋势与根系生物量的变化趋势基本相同。在低氮条件下, 与野生型植株相比, 转基因植株的总根长、总面积等根系参数差异均不显著(表4)。在高氮条件下, 除N1-21的总根长显著高于野生型, N1-28的根系平均直径显著高于野生型外, 单超植株的其他

表2 低氮条件下野生型与超表达*TaNRT2.1*基因拟南芥不同器官的生物量

Table 2 Biomass of different organs of the wild type and transgenic lines of *Arabidopsis* plants with low concentration of nitrate

基因型	株系	茎叶干重/mg·株 <sup>-1</sup>	角果干重/mg·株 <sup>-1</sup>	根干重/mg·株 <sup>-1</sup>	地上部干重/mg·株 <sup>-1</sup>	总干重/mg·株 <sup>-1</sup>
WT	Col	68.1±10.2 <sup>a</sup>	54.0±8.6 <sup>a</sup>	18.2±3.5 <sup>a</sup>	122.1±18.8 <sup>a</sup>	140.3±22.1 <sup>a</sup>
单超	N1-21	94.7±8.9 <sup>a</sup>	52.2±5.4 <sup>a</sup>	20.4±4.1 <sup>a</sup>	146.9±13.6 <sup>a</sup>	167.3±17.4 <sup>a</sup>
	N1-26	93.6±16.9 <sup>a</sup>	73.8±9.7 <sup>a</sup>	23.6±5.4 <sup>a</sup>	167.4±26.2 <sup>a</sup>	191.0±31.1 <sup>a</sup>
	N1-28	83.8±9.6 <sup>a</sup>	68.2±10.8 <sup>a</sup>	18.7±4.6 <sup>a</sup>	152.0±19.5 <sup>a</sup>	170.7±24.1 <sup>a</sup>
双超	N2-18	77.1±3.1 <sup>a</sup>	63.3±5.5 <sup>a</sup>	19.5±2.4 <sup>a</sup>	140.4±7.6 <sup>a</sup>	160.0±9.2 <sup>a</sup>
	N2-32	96.5±3.2 <sup>a</sup>	66.4±8.1 <sup>a</sup>	23.2±1.7 <sup>a</sup>	162.9±8.7 <sup>a</sup>	186.1±10.0 <sup>a</sup>

同列不同小写字母表示不同株系间差异显著( $P<0.05$ ); 数值为均值±标准误( $n=5$ ); 下表同此。

表3 高氮条件下野生型与超表达*TaNRT2.1*基因拟南芥不同器官的生物量

Table 3 Biomass of different organs of the wild type and transgenic lines of *Arabidopsis* plants with high concentration of nitrate

基因型	株系	茎叶干重/mg·株 <sup>-1</sup>	角果干重/mg·株 <sup>-1</sup>	根干重/mg·株 <sup>-1</sup>	地上部干重/mg·株 <sup>-1</sup>	总干重/mg·株 <sup>-1</sup>
WT	Col	132.4±14.9 <sup>c</sup>	40.4±4.0 <sup>b</sup>	15.1±1.2 <sup>c</sup>	172.8±17.5 <sup>d</sup>	187.9±18.5 <sup>d</sup>
单超	N1-21	249.4±35.2 <sup>bc</sup>	33.9±9.0 <sup>b</sup>	22.1±4.0 <sup>bc</sup>	283.3±42.5 <sup>cd</sup>	305.4±45.8 <sup>cd</sup>
	N1-26	213.6±43.6 <sup>c</sup>	140.7±35 <sup>a</sup>	23.1±4.3 <sup>abc</sup>	354.2±77.4 <sup>abc</sup>	377.4±81.7 <sup>abc</sup>
	N1-28	184.9±38.7 <sup>c</sup>	130.8±18.6 <sup>a</sup>	21.6±3.7 <sup>bc</sup>	315.7±57.2 <sup>bcd</sup>	337.4±60.8 <sup>cd</sup>
双超	N2-18	338.3±52.7 <sup>ab</sup>	143.8±18.3 <sup>a</sup>	29.4±4.3 <sup>ab</sup>	482.1±67.8 <sup>ab</sup>	511.5±72.0 <sup>ab</sup>
	N2-32	382.5±45.3 <sup>a</sup>	117.7±17.9 <sup>a</sup>	33.3±2.9 <sup>a</sup>	500.2±62.3 <sup>a</sup>	533.6±65.1 <sup>a</sup>

根系参数与野生型植株差异不显著; 而双超拟南芥中N2-32株系的6个根系生长参数均显著高于野生型, N2-18株系仅根系平均直径显著高于野生型。总体上看, 双超株系中, 特别是株系N2-32的根系生长参数好于单超株系(表5)。这些结果表明, 双超能改善拟南芥的根系形态与根系生长状况, 进而促进拟南芥地上部的生长与氮吸收。

### 2.5 超表达*TaNRT2.1*对拟南芥全生育期氮吸收的影响

低氮条件下, 除N1-26外, 野生型拟南芥的含氮量显著高于2种转基因植株的含氮量。野生型

与转基因拟南芥的总吸氮量没有显著差异。另外, 单超与双超拟南芥的含氮量与总吸氮量差异也均不显著(表6)。高氮条件下, 转基因植株的含氮量与野生型相比有降低趋势, 其中N1-26、N1-28与N2-18的含氮量显著低于野生型。与野生型相比, 单超拟南芥的3个株系均未使植株总吸氮量显著增加。双超拟南芥植株的总吸氮量显著高于野生型, 平均比野生型植株高2.3倍, 而且比单超拟南芥的总吸氮量大约高1.5倍。表明同时超表达*TaNRT2.1*与*TaNAR2.1*能显著地提高转基因植株的总吸氮量。

表4 低氮条件下野生型与转基因拟南芥的根系生长参数

Table 4 Root growth parameters of the wild type and transgenic *Arabidopsis* with low concentration of nitrate

基因型	株系	总根长/cm	总表面积/cm <sup>2</sup>	根系总体积/cm <sup>3</sup>	平均直径/mm	根尖数/个	分叉数/个
WT	Col	917.4±106.1 <sup>a</sup>	82.5±11.8 <sup>a</sup>	0.60±0.11 <sup>a</sup>	0.29±0.02 <sup>b</sup>	6 190.8±338.1 <sup>a</sup>	9 562.0±1 539.6 <sup>a</sup>
单超	N1-21	565.0±206.7 <sup>ab</sup>	54.0±19.8 <sup>a</sup>	0.42±0.16 <sup>a</sup>	0.32±0.04 <sup>ab</sup>	4 090.0±1 354.4 <sup>ab</sup>	5 972.3±2 208.7 <sup>ab</sup>
	N1-26	637.2±131.1 <sup>ab</sup>	60.3±11.8 <sup>a</sup>	0.46±0.09 <sup>a</sup>	0.30±0.01 <sup>ab</sup>	4 035.0±657.5 <sup>ab</sup>	6 833.7±1 302.5 <sup>ab</sup>
	N1-28	356.6±167.3 <sup>b</sup>	42.2±21.3 <sup>a</sup>	0.40±0.22 <sup>a</sup>	0.36±0.01 <sup>a</sup>	3 234.3±1 161.8 <sup>b</sup>	4 256.3±2 202.9 <sup>b</sup>
双超	N2-18	477.4±68.6 <sup>b</sup>	52.9±10.3 <sup>a</sup>	0.47±0.12 <sup>a</sup>	0.35±0.02 <sup>ab</sup>	4 413.7±479.1 <sup>ab</sup>	5 396.3±935.4 <sup>ab</sup>
	N2-32	533.2±36.6 <sup>ab</sup>	58.7±1.7 <sup>a</sup>	0.52±0.01 <sup>a</sup>	0.35±0.01 <sup>a</sup>	4 919.3±293.3 <sup>ab</sup>	6 113.0±316.4 <sup>ab</sup>

表5 高氮条件下野生型与转基因拟南芥的根系生长参数

Table 5 Root growth parameters of the wild type and transgenic *Arabidopsis* with high concentration of nitrate

基因型	株系	总根长/cm	总表面积/cm <sup>2</sup>	根系总体积/cm <sup>3</sup>	平均直径/mm	根尖数/个	分叉数/个
WT	Col	700.9±49.4 <sup>bc</sup>	54.6±3.4 <sup>bc</sup>	0.34±0.02 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>b</sup>	4 805.0±808.3 <sup>bc</sup>	6 380.4±489.3 <sup>bc</sup>
单超	N1-21	1 041.2±143.0 <sup>a</sup>	83.1±12.9 <sup>ab</sup>	0.53±0.10 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>b</sup>	7 543.8±1 564.7 <sup>ab</sup>	9 246.0±1 405.6 <sup>ab</sup>
	N1-26	651.0±78.4 <sup>bc</sup>	61.0±9.0 <sup>bc</sup>	0.46±0.08 <sup>b</sup>	0.29±0.01 <sup>b</sup>	5 994.8±668.7 <sup>ab</sup>	6 155.6±928.6 <sup>bc</sup>
	N1-28	430.9±74.7 <sup>c</sup>	49.0±10.1 <sup>c</sup>	0.45±0.11 <sup>b</sup>	0.36±0.01 <sup>a</sup>	3 114.4±508.4 <sup>c</sup>	4 696.8±1 004.3 <sup>c</sup>
双超	N2-18	613.4±148.4 <sup>bc</sup>	65.5±13.6 <sup>bc</sup>	0.57±0.10 <sup>b</sup>	0.37±0.04 <sup>a</sup>	5 338.2±1 333.2 <sup>abc</sup>	6 165.4±1 434.3 <sup>bc</sup>
	N2-32	895.7±52.3 <sup>ab</sup>	101.9±8.1 <sup>a</sup>	0.93±0.11 <sup>a</sup>	0.36±0.02 <sup>a</sup>	7 841.4±410.6 <sup>a</sup>	9 751.2±764.5 <sup>a</sup>

表6 不同氮水平下野生型与转基因拟南芥的含氮量与吸氮量的变化

Table 6 Changes in nitrogen and the total nitrogen contents in the wild type and transgenic *Arabidopsis* with different nitrogen levels

基因型	株系	低氮		高氮	
		含氮量/%	总吸氮量/mg·株 <sup>-1</sup>	含氮量/%	总吸氮量/mg·株 <sup>-1</sup>
WT	Col	1.84±0.04 <sup>a</sup>	2.61±0.44 <sup>a</sup>	4.78±0.10 <sup>a</sup>	8.97±0.88 <sup>c</sup>
单超	N1-21	1.67±0.05 <sup>b</sup>	2.80±0.34 <sup>a</sup>	4.11±0.44 <sup>ab</sup>	12.79±2.59 <sup>bc</sup>
	N1-26	1.71±0.05 <sup>ab</sup>	3.21±0.44 <sup>a</sup>	3.53±0.26 <sup>bc</sup>	13.22±2.96 <sup>bc</sup>
	N1-28	1.63±0.07 <sup>b</sup>	2.83±0.47 <sup>a</sup>	3.29±0.19 <sup>c</sup>	11.49±2.63 <sup>bc</sup>
双超	N2-18	1.60±0.04 <sup>b</sup>	2.57±0.19 <sup>a</sup>	3.57±0.23 <sup>bc</sup>	18.73±3.45 <sup>ab</sup>
	N2-32	1.69±0.04 <sup>b</sup>	3.16±0.22 <sup>a</sup>	4.48±0.11 <sup>a</sup>	23.74±2.63 <sup>a</sup>

### 3 讨论

近年来,植物转化技术日趋成熟,利用模式植物拟南芥(张合琼等2016;李宝珍等2009)或本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)来研究植物的基因功能是一种被广泛采用的方法。本研究使用农杆菌介导的遗传转化方法把小麦的*TaNRT2.1*基因在拟南芥中实现了超表达(图1),并且筛选鉴定得到了转基因纯合株系,再通过研究被转化拟南芥的生长与氮吸收状况验证了小麦*TaNRT2.1*的功能。由于小麦的基因组庞大复杂,直接对小麦进行遗传转化来验证基因功能的难度大,耗时长。因此,前人一般利用模式植物拟南芥来研究小麦的基因功能,比如Brini等(2007)研究发现超表达小麦*TNHX<sub>1</sub>*与*TVP<sub>1</sub>*提高了转基因拟南芥的耐盐与耐旱性。Zhang等(2010)通过对拟南芥超表达小麦*TaSnPK2.8*后发现转基因植株的耐旱性、耐盐性与耐低温性都比野生型显著提高。这些研究均采用了与本研究类似的思路。

植物对离子的主动吸收符合Michaelis-Menten酶促反应动力学原理,养分吸收动力学参数虽然只是植物吸收特性的量化描述,难以直接反应植物吸收能力的深层机理,但目前动力学研究已经在小麦(孙敏等2006)和烟草(何明洁等2017)等陆生植物的营养物质吸收特性方面得到了广泛的应用。本研究数据表明,随着溶液中硝态氮浓度的升高植物对硝态氮的吸收速率逐渐增大(图3-A),且符合抛物线规律,这与王晓等(2013)在香根草(*Vetiveria zizanioides*)、周晓红等(2008)在空心菜(*Ipomoea aquatica*)上的研究结果是一致的。双超拟南芥不论在氮吸收速率、对拟南芥生长的影响以及氮含量的影响方面均好于单超和野生型植株(图2和3,表3、5、6),这表明同时超表达*TaNRT2.1*+*TaNAR2.1*对拟南芥氮吸收的调控作用要强于单独超表达*TaNRT2.1*,由此可推测小麦*TaNRT2.1*需要与辅助蛋白*TaNAR2.1*互作来完成硝酸盐的转运。然而,要提供这两个蛋白互作的更直接证据,酵母双杂试验或爪蟾卵母细胞异源表达试验是将来需要进一步开展的工作。已有研究通过爪蟾卵母细胞异源表达发现了拟南芥的*AtNRT2.1*与辅助蛋白*AtNAR2.1*之间的互作(Orsel等2006)。Tong等(2005)通过爪蟾卵母细胞异源表达和酵母双杂试验发现

大麦中*HvNRT2.1*需要与辅助蛋白*HvNAR2.3*互作来完成硝酸盐的转运。Yan等(2011)发现在不同浓度的硝酸盐溶液中水稻中的*OsNRT2.1*、*OsNRT2.2*和*OsNRT2.3a*都需要与*OsNAR2.1*互作来转运 $\text{NO}_3^-$ 。我们的研究结果与这些研究结论类似。但也有研究表明拟南芥中*AtNRT2.7*不需要*AtNAR2.1*蛋白的协助就能行使硝酸盐转运功能(Kotur等2012)。Fan等(2016)也发现*OsNRT2.3b*可以不受其他基因的调控,能独立地完成转运硝酸盐的功能。通常情况下,高亲和转运系统(HATS)主要在介质中 $\text{NO}_3^-$ 浓度较低时发挥作用,但本研究结果表明,在硝态氮浓度较高的条件下双超拟南芥的生长及氮吸收显著高于野生型或单超(图3-A和表3、5、6),但在低硝态氮浓度下效果不明显,甚至在 $\text{NO}_3^-$ 浓度低于 $0.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时其吸收速率还有低于野生型的趋势(图3-A和表2、4、6),这表明小麦*TaNRT2.1*转运蛋白对硝态氮的亲合力是有一定的范围的,极低硝态氮浓度下此蛋白对硝态氮的转运能力有限。有研究表明,烟草超表达*NpNRT2.1*基因后,在高氮( $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{}^{15}\text{NO}_3^-$ )条件下根系 $^{15}\text{NO}_3^-$ 流入速率显著高于野生型,但在低氮( $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{}^{15}\text{NO}_3^-$ )条件下转基因烟草与野生型烟草的根系 $^{15}\text{NO}_3^-$ 流入速率没有差异(Fraiser等2000)。Fu等(2015)研究发现番茄(*Lycopersicon esculentum*)*LeNRT2.3*在高氮条件下能够显著提高卵母细胞的 $\text{NO}_3^-$ 吸收能力,但在低氮条件下没有作用,证明了*LeNRT2.3*介导低亲和力硝酸盐转运。我们的研究结果与这些研究也具有一定的相似性。然而,我们采用的方法并不能准确测定*TaNRT2.1*的亲合力,因为在拟南芥中超表达*TaNRT2.1*有可能引起拟南芥本身NRT2基因或其它氮代谢相关基因表达水平的改变。因此,使用爪蟾卵母细胞对此基因进行异源表达从而进一步准确测定*TaNRT2.1*的亲合力是未来需要开展的重要工作。

本研究结果表明,低氮条件下无论是单超还是双超拟南芥的生长状况、氮吸收与野生型均无显著差异(表2、4、6),但高氮条件下,双超显著改善了转基因拟南芥的生长状况,提高了氮含量或总吸氮量,提高了氮吸收效率(表3、5、6)。有研究发现尽管某些NRT基因具有转运 $\text{NO}_3^-$ 的功能,但却并不一定影响作物的氮吸收效率。如Fraiser等

(2000)对烟草内一个编码高亲和力硝态氮转运蛋白基因*NpNRT2.1*进行了超表达研究,发现在低氮条件下,转基因烟草体内*NpNRT2.1*基因的转录水平有了显著提高,但烟草硝态氮含量与野生型相比却没有显著变化,未能显著提高植物的氮效率。Katayama等(2009)研究表明在水稻内超表达*OsNRT2.1*基因后,某些转基因株系的生长速度要高于野生型,但是二者的总吸氮量并没有差异。但最近研究发现,将籼稻中的一个硝态氮转运蛋白基因*NRT1.1B*引入到粳稻中后能够显著改善粳稻在低氮条件下的生长状况、提高了产量和氮素吸收量,从而提高了水稻的氮吸收和利用效率(Chen和Ma 2015)。Fan等(2016)通过超表达*OsNRT2.3b*后使水稻产量与氮利用效率均提高了40%左右。Chen等(2016)研究表明在水稻中以*OsNAR2.1*作为启动子超表达*OsNRT2.1*基因后能显著增加水稻的生长速率、干物质积累总量和氮农学利用效率。这些结果与我们的研究结果一致,均表明植物NRT对植物的氮吸收效率具有重要影响。

#### 参考文献(References)

- Brini F, Hanin M, Mezghani I, et al (2007). Overexpression of wheat  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter *TNHX1* and  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase *TPPI* improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *J Exp Bot*, 2 (58): 301–308
- Cai C, Wang JY, Zhu YG, et al (2008). Gene structure and expression of the high-affinity nitrate transport system in rice roots. *J Integr Plant Biol*, 50 (4): 443–451
- Cai C, Zhao XQ, Zhu YG, et al (2007). Regulation of the high-affinity nitrate system in wheat roots by exogenous abscisic acid and glutamine. *J Integr Plant Biol*, 49: 1719–1725
- Chen JG, Zhang Y, Tan YW, et al (2016). Agronomic nitrogen-use efficiency of rice can be increased by driving *OsNRT2.1* expression with the *OsNAR2.1* promoter. *Plant Biotechnol J*, 14: 1705–1715
- Chen ZC, Ma JF (2015). Improving nitrogen use efficiency in rice through enhancing root nitrate uptake mediated by a nitrate transporter, *NRT1.1B*. *J Genet Genomics*, 42: 463–465
- Crawford NM, Forde BG (2002). Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The Arabidopsis Book*, 1 (1): e0011, doi/10.1199/tab.0011
- Crawford NM, Glass ADM (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci*, 3: 389–395
- Fan XR, Tang Z, Tan YW, et al (2016). Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (26): 7118–7123
- Fraisier V, Gojon A, Tillard P, et al (2000). Constitutive expression of a putative high affinity transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *Plant J*, 23 (4): 489–496
- Fu YL, Yi HY, Bao J, et al (2015). *LeNRT2.3* functions in nitrate acquisition and long-distance transport in tomato. *FEBS Lett*, 589: 1072–1079
- He MJ, Fan TF, Yang C, et al (2017). Physiological characterization of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  uptake kinetics of tobacco ‘K326’ and ‘Honghuadajinyuan’ using a short-time  $^{15}\text{N}$ -substrate labeling approach. *Plant Physiol J*, 53 (4): 572–580 (in Chinese with English abstract) [何明洁, 范腾飞, 杨超等 (2017).  $^{15}\text{N}$ 短时标记法鉴定烟草‘K326’和‘红花大金元’吸收 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 的生理动力学特征. *植物生理学报*, 53 (4): 572–580]
- Katayama H, Mori M, Kawamura Y, et al (2009). Production and characterization of transgenic rice plants carrying a high-affinity nitrate transporter gene (*OsNRT2.1*). *Breeding Sci*, 59: 237–243
- Kotur Z, Mackenzie N, Ramesh S, et al (2012). Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with *AtNAR2.1*. *New Phytol*, 194 (03): 724–731
- Li BZ, Fan XR, Xu GH (2009). Regulation for uptake and utilization of ammonium and nitrate in plant. *Plant Physiol Commun*, 45 (1): 80–88 (in Chinese with English abstract) [李宝珍, 范晓荣, 徐国华(2009). 植物吸收利用铵态氮和硝态氮的分子调控. *植物生理学通讯*, 45 (1): 80–88]
- Liu JS, Fu J, Tian H, et al (2015). In-season expression of nitrate and ammonium transporter genes in roots of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes with different nitrogen-uptake efficiencies. *Crop Pasture Sci*, 66: 671–678
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, et al (2006). Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. *Physiology and protein-protein interaction. Plant Physiol*, 142 (3): 1304–1317
- Sun M, Guo WS, Zhu XK, et al (2006). Kinetics of nitrate and ammonium uptake by different wheat genotypes at seedling stage. *J Trit Crops*, 26 (5): 84–87 (in Chinese with English abstract) [孙敏, 郭文善, 朱新开等(2006). 不同氮效率小麦品种苗期根系的 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 吸收动力学特征. *麦类作物学报*, 26 (5): 84–87]
- Tong YP, Zhou JJ, Li ZS, et al (2005). A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *Plant J*, 41:



- 442–450
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, et al (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett*, 581: 2290–2300
- Wang X, XU YL, Li GX, et al (2013). Study on uptake kinetic characteristics of different ammonium and nitrate by *Vetiveria zizanioides*. *J Cen China Nor Univ (Nat Sci)*, 6 (47): 836–839 (in Chinese with English abstract) [王晓, 徐玉良, 李光星等(2013). 香根草对不同形态氮吸收动力学特性研究. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 6 (47): 836–839]
- Wirth J, Chopin F, Santoni V, et al (2007). Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 282 (32): 23541–23552
- Xuan HM, Wang YH, Wei LT, et al (2014). Transcription analysis of the genes encoding nitrate transporter nrt1 and nrt2 families in response to nitrogen starvation in wheat seedlings leaves. *J Trit Crops*, 34 (8): 1019–1028 (in Chinese with English abstract) [轩红梅, 王永华, 魏利婷等(2014). 小麦幼苗叶片中硝酸盐转运蛋白NRT1和NRT2家族基因对氮饥饿响应的表达分析. *麦类作物学报*, 34 (8): 1019–1028]
- Yan M, FAN XR, Feng HM, et al (2011). Rice *OsNAR2.1* interacts with *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* and *OsNRT2.3a* nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. *Plant Cell Environ*, 34: 1360–1372
- Yin LP, Li P, Wen B, et al (2007). Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (*TaNRT2.1*) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other *NTR2* genes. *Plant Sci*, 172 (3): 621–631
- Zhang HQ, Zhang HM, Liang YS, et al (2016). Research progress of nitrate in plant transport mechanism. *Plant Physiol J*, 52 (2): 141–149 (in Chinese with English abstract) [张合琼, 张汉马, 梁永书等(2016). 植物硝酸盐转运蛋白研究进展. *植物生理学报*, 52 (2): 141–149]
- Zhang HY, Mao XG, Wang CS, et al (2010). Overexpression of a common wheat gene *TaSnRK2.8* enhances tolerance to drought, salt and low temperature in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 5: e16041
- Zhao XQ, Li YJ, Liu JZ, et al (2004). Isolation and expression analysis of a high-affinity nitrate transporter *TaNRT2.3* from roots of wheat. *Acta Bot Sin*, 46: 347–354
- Zhou XH, Wang GX, Yang F, et al (2008). Uptake kinetic characteristics of different ammonium and nitrate by *Ipomoea aquatica* forsk. *Res Soil Water Conserv*, 5 (15): 84–87 (in Chinese with English abstract) [周晓红, 王国祥, 杨飞等(2008). 空心菜对不同形态氮吸收动力学特性研究. *水土保持研究*, 5 (15): 84–87]



## Influence of over-expressing the wheat nitrate transporter genes *TaNRT2.1* on affected the growth and nitrogen uptake of *Arabidopsis thaliana*

LI Wen-Hu, TIAN Hui\*, GAO Ya-Jun

Key Laboratory of Plant Nutrition and Agri-Environment in Northwest China, Ministry of Agriculture, College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

**Abstract:** The function of the wheat nitrate transporter (NRT) gene *TaNRT2.1* in nitrate uptake was studied via over-expressing this gene in *Arabidopsis thaliana*. To investigate the cooperation of *TaNRT2.1* with the protein *TaNAR2.1*, a vector included these two genes promoted by 35s promoter was also constructed and transformed into *Arabidopsis*. Homozygotes of the transformed *Arabidopsis* plants were screened, and the nitrate uptake dynamics and nitrogen (N) content of the homozygotes were measured. The results indicated that only over-expressing both of *TaNRT2.1* and *TaNAR2.1* could significantly increase the nitrate uptake rates compared to the wild-type *Arabidopsis* plants in the high nitrate concentration ( $> 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). In the low nitrate condition ( $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ), the growth and total N uptake of the transgenic *Arabidopsis* plants were not different from the wild-type plants. In the high nitrate condition ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ ), over-expressing *TaNRT2.1+TaNAR2.1* significantly increased the biomass, root growth and total N uptake in *Arabidopsis* plants; and over-expressing *TaNRT2.1* singly only increased the silique dry weight and shoot biomass. The present study suggested that *TaNRT2.1* needed to cooperate with *TaNAR2.1* in mediating plant nitrate uptake.

**Key words:** over-expression; *TaNRT2.1*; *TaNAR2.1*; *Arabidopsis thaliana*; nitrogen uptake efficiency; wheat

Received 2017-11-08 Accepted 2018-03-14

This work was supported by Chinese Universities Scientific Fund (2452015048 and 2452015346).

\*Corresponding author (tianh@nwsuaf.edu.cn).