

# 高粱高亲和硝酸盐转运蛋白 *NRT2/3* 基因家族鉴定、表达与 DNA 变异分析

赵珊珊<sup>1</sup>, 郭志强<sup>1</sup>, 朱立勋<sup>1</sup>, 范佳利<sup>1</sup>, 杨博慧<sup>1</sup>, 柴文婷<sup>1</sup>, 孙慧琼<sup>1</sup>, 冯凡<sup>1</sup>, 梁月秀<sup>1</sup>, 邹春雷<sup>1</sup>, 姜晓东<sup>1</sup>, 赵威军<sup>2</sup>, 吕晋慧<sup>3</sup>, 张春来<sup>1\*</sup>

1 山西农业大学农学院 教育部省部共建黄土高原特色作物高效生产协同创新中心, 山西 太谷 030801

2 山西农业大学高粱研究所, 山西 榆次 030600

3 山西农业大学林学院, 山西 太谷 030801

赵珊珊, 郭志强, 朱立勋, 范佳利, 杨博慧, 柴文婷, 孙慧琼, 冯凡, 梁月秀, 邹春雷, 姜晓东, 赵威军, 吕晋慧, 张春来. 高粱高亲和硝酸盐转运蛋白 *NRT2/3* 基因家族鉴定、表达与 DNA 变异分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2743-2761.  
ZHAO Shanshan, GUO Zhiqiang, ZHU Lixun, FAN Jiali, YANG Bohui, CHAI Wenting, SUN Huiqiong, FENG Fan, LIANG Yuexiu, ZOU Chunlei, JIANG Xiaodong, ZHAO Weijun, LÜ Jinhui, ZHANG Chunlai. Identification, expression and DNA variation analysis of high affinity nitrate transporter *NRT2/3* gene family in *Sorghum bicolor*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2743-2761.

**摘要:** 硝态氮是作物吸收无机氮素的主要形态, 硝酸盐转运蛋白 2 (nitrate transporter 2, *NRT2*) 作为高亲和性的转运蛋白, 以硝酸盐作为特异性底物, 在可利用的硝酸盐受限时, 高亲和性转运系统被激活, 在硝酸盐吸收、转运过程中发挥着重要作用。大多数 *NRT2* 不能单独转运硝酸盐, 需在硝酸盐同化相关蛋白 2 (nitrate assimilation related protein 2, *NAR2*) 的协助下才能完成硝酸盐的吸收或转运。作物氮利用效率受环境条件影响, 品种间存在差异, 因此培育高氮素利用效率品种有重大意义。高粱(*Sorghum bicolor*)具有耐贫瘠特性, 对土壤中的氮素吸收和利用效率较高。本研究结合高粱基因组数据库对 *NRT2/3* 基因家族成员基因结构、染色体定位、理化性质、二级结构与跨膜结构域、信号肽与亚细胞定位、启动子区顺式作用元件、系统进化、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的识别与注释及选择压力进行了全面分析。通过生物信息学分析, 筛选出 5 个 *NRT2s* (命名为 *SbNRT2-1a*、*2-1b*、*SbNRT2-2-4*) 基因和 2 个 *NAR2s* (*SbNRT3-1-2*) 基因, 较谷子略少。分布在 3 条染色体上, 分为 4 个亚家族, 同一亚族中基因结构高度相似; 高粱 *NRT2/3* 亲水性平均值均为正值, 表明均为疏水性蛋白;  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲占二级结构总量的比例大于 70%; 亚细胞定位均在质膜上, 其中 *NRT2s* 蛋白不含信号肽, *NRT3s* 蛋白含信号肽; 进一步对其跨膜结构域

资助项目: 国家自然科学基金(31971944, 31470285); 山西省农科院博士基金(ybsjj1404); 山西省百人计划合作共建项目(晋组 2017-30); 山西农谷建设科研专项(SXNGJSKYZX201702)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31971944, 31470285), the Doctoral Fund of Shanxi Academy of Agricultural Sciences (ybsjj1404), the Shanxi Bairen Collaboration Programme (Jinzu 2017-30), and the Shanxi Agriculture Valley Construction Scientific Research Project (SXNGJSKYZX201702).

\*Corresponding author. E-mail: chunlaiz@hotmail.com

Received: 2022-10-06; Accepted: 2023-02-13; Published online: 2023-02-20

进行分析,发现 NRT2s 家族成员跨膜结构域个数均大于 10 个,而 NRT3s 家族成员跨膜结构域个数为 2 个;高粱与玉米(*Zea mays*) NRT2/3s 的共线性较好;蛋白结构域显示存在 MFS\_1 和 NAR2 蛋白结构域,可执行高亲和力硝酸盐转运;系统进化树分析可知,高粱与玉米和谷子的 NRT2/3 基因亲缘关系更近;基因启动子顺式作用元件分析发现, *SbNRT2/3* 基因的启动子区均具有数个植物激素和逆境应答元件,可以响应高粱生长和环境变化;基因表达热图显示低氮条件下在根诱导表达的是 *SbNRT2-1a*、*SbNRT2-1b* 和 *SbNRT3-1*,推测可在高粱根部表达并调控对硝酸盐的吸收或转运过程。在 *SbNRT2-4* 和 *SbNRT2-1a* 等发现多个非同义 SNP 变异;选择压力分析表明,高粱 NRT2/3 基因家族在进化过程中受纯化选择作用。*SbNRT2/3* 基因表达及蚜虫侵染影响与基因在不同组织中的表达分析结果一致, *SbNRT2-1b* 和 *SbNRT3-1* 在感染蚜虫品系 5-27sug 根部表达显著,高粱蚜虫侵染叶片显著降低了 *SbNRT2-3*、*SbNRT2-4* 和 *SbNRT3-2* 的表达水平。本研究初步对高粱全基因组 NRT2/3 基因家族进行鉴定、表达与 DNA 变异分析,为高粱氮高效研究提供了基础。

关键词: 高粱基因组; 硝酸盐转运蛋白 2 (NRT2); 硝酸盐同化相关蛋白 2 (NAR2); 基因表达; DNA 变异

## Identification, expression and DNA variation analysis of high affinity nitrate transporter *NRT2/3* gene family in *Sorghum bicolor*

ZHAO Shanshan<sup>1</sup>, GUO Zhiqiang<sup>1</sup>, ZHU Lixun<sup>1</sup>, FAN Jiali<sup>1</sup>, YANG Bohui<sup>1</sup>, CHAI Wenting<sup>1</sup>, SUN Huiqiong<sup>1</sup>, FENG Fan<sup>1</sup>, LIANG Yuexiu<sup>1</sup>, ZOU Chunlei<sup>1</sup>, JIANG Xiaodong<sup>1</sup>, ZHAO Weijun<sup>2</sup>, LÜ Jinhui<sup>3</sup>, ZHANG Chunlai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Ministry of Education and Shanxi Province Co-Funded Collaboration and Innovation Centre for Speciality Crops, College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

<sup>2</sup> Sorghum Research Institute, Shanxi Agricultural University, Yuci 030600, Shanxi, China

<sup>3</sup> College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

**Abstract:** Nitrate is the main form of inorganic nitrogen that crop absorbs, and nitrate transporter 2 (NRT2) is a high affinity transporter using nitrate as a specific substrate. When the available nitrate is limited, the high affinity transport systems are activated and play an important role in the process of nitrate absorption and transport. Most NRT2 cannot transport nitrates alone and require the assistance of a helper protein belonging to nitrate assimilation related family (NAR2) to complete the absorption or transport of nitrates. Crop nitrogen utilization efficiency is affected by environmental conditions, and there are differences between varieties, so it is of great significance to develop varieties with high nitrogen utilization efficiency. *Sorghum bicolor* has high stress tolerance and is more efficient in soil nitrogen uptake and utilization. The *S. bicolor* genome database was scanned to systematically analyze the gene structure, chromosomal localization, physicochemical properties, secondary structure and transmembrane domain, signal peptide and subcellular localization, promoter region

*cis*-acting elements, phylogenetic evolution, single nucleotide polymorphism (SNP) recognition and annotation, and selection pressure of the gene family members. Through bioinformatics analysis, 5 *NRT2* gene members (designated as *SbNRT2-1a*, *SbNRT2-1b*, *SbNRT2-2*, *SbNRT2-3*, and *SbNRT2-4*) and 2 *NAR2* gene members (designated as *SbNRT3-1* and *SbNRT3-2*) were identified, the number of which was less than that of foxtail millet. *SbNRT2/3* were distributed on 3 chromosomes, and could be divided into four subfamilies. The genetic structure of the same subfamilies was highly similar. The average value of *SbNRT2/3* hydrophilicity was positive, indicating that they were all hydrophobic proteins, whereas  $\alpha$ -helix and random coil accounted for more than 70% of the total secondary structure. Subcellular localization occurred on plasma membrane, where *SbNRT2* proteins did not contain signal peptides, but *SbNRT3* proteins contained signal peptides. Further analysis revealed that the number of transmembrane domains of the *SbNRT2*s family members was greater than 10, while that of the *SbNRT3*s were 2. There was a close collinearity between *NRT2/3*s of *S. bicolor* and *Zea mays*. Protein domains analysis showed the presence of MFS\_1 and NAR2 protein domains, which supported executing high affinity nitrate transport. Phylogenetic tree analysis showed that *SbNRT2/3* were more closely related to those of *Z. mays* and *Setaria italic*. Analysis of gene promoter *cis*-acting elements indicated that the promoter region of *SbNRT2/3* had several plant hormones and stress response elements, which might respond to growth and environmental cues. Gene expression heat map showed that *SbNRT2-3* and *SbNRT3-1* were induced by nitrate in the root and stem, respectively, and *SbNRT2-4* and *SbNRT2-3* were induced by low nitrogen in the root and stem. Non-synonymous SNP variants were found in *SbNRT2-4* and *SbNRT2-1a*. Selection pressure analysis showed that the *SbNRT2/3* were subject to purification and selection during evolution. The expression of *SbNRT2/3* gene and the effect of aphid infection were consistent with the expression analysis results of genes in different tissues, and *SbNRT2-1b* and *SbNRT3-1* were significantly expressed in the roots of aphid lines 5-27sug, and the expression levels of *SbNRT2-3*, *SbNRT2-4* and *SbNRT3-2* were significantly reduced in sorghum aphid infested leaves. Overall, genome-wide identification, expression and DNA variation analysis of *NRT2/3* gene family of *Sorghum bicolor* provided a basis for elucidating the high efficiency of sorghum in nitrogen utilization.

**Keywords:** *Sorghum bicolor* genome; nitrate transporter 2 (*NRT2*); nitrate assimilation related protein 2 (*NAR2*); gene expression; DNA variation

氮是植物需求量最大的营养元素,也是植物生长的关键限制因子<sup>[1-2]</sup>。除了部分豆科植物能够通过根瘤菌固氮外,绝大多数植物均需通过根从土壤中获取氮源。硝态氮是植物从土壤中获取氮源的主要形式,其吸收和转运主要由硝酸盐转运蛋白参与完成<sup>[3]</sup>。在模式植物拟南芥中鉴定到 4 类负责硝酸盐转运的蛋白分别为硝酸盐转运

蛋白 1 (nitrate transporter 1, *NRT1*)、硝酸盐转运蛋白 2 (nitrate transporter 2, *NRT2*)、氯通道家族 (chloride channel, *CLC*)和慢阴离子通道相关同系物 (slow anion channel-associated homologous, *SLAC/SLAH*),还有许多蛋白酶、激素等也参与其中,它们相互作用构成了错综复杂的调控网络<sup>[4-5]</sup>。硝酸盐吸收和转运主要由 *NRT1*s 和 *NRT2*s

实施, 根据它们转运硝酸盐的活性又分为低亲和性和高亲和性两类<sup>[3]</sup>。与 NRT1 不同, NRT2 的大多数成员具有高亲和性, 主要在低硝酸盐浓度下调控植物对硝酸盐的吸收或转运。在拟南芥中, 已克隆并鉴定到 7 个成员(*AtNRT2.1-2.7*)与硝酸盐转运相关<sup>[6-7]</sup>。这个家族大多数成员不能单独转运硝酸盐, 需在辅助蛋白 NAR2 的协助下完成。在拟南芥中有 2 个 NAR2 成员, 除了 *AtNRT2.7* 以外, 其余的转运蛋白都需要在 *AtNAR2.1* 的协助下才能完成硝酸盐的吸收或转运。目前, 在作物硝酸盐的吸收和转运上, 对水稻(*Oryza sativa*) NRT2/3 的研究也较为完善<sup>[8-9]</sup>。

高粱(*Sorghum bicolor*)是世界上仅次于小麦、水稻、玉米(*Zea mays*)和大麦的第五大粮食作物, 主要种植在干旱和半干旱地区, 具有耐贫瘠和耐盐碱等特性<sup>[10-11]</sup>。高粱是二倍体, 基因组约 750 Mbp, 基因组 DNA 测序工作在 2009 年初见报道, 并于最近得到完善<sup>[12]</sup>, 已成为功能基因组研究的重要模式植物。高粱品种间在吸收和积累氮素上存在较大的差异<sup>[13-15]</sup>, 与高亲和硝酸盐转运蛋白 NRT2/3 的功能密切相关, 但相关研究较少见报道<sup>[4-5]</sup>。高粱蚜即甘蔗黄蚜, 通过其刺吸式口器从侵染的叶片、茎和穗部获取营养, 分泌粘稠的蜜汁, 影响气孔开放和光合功能, 伤口还可导致细菌、真菌侵染和病毒传播, 是高粱上最重要的害虫, 生产上主要通过培育抗蚜品种进行防治<sup>[16]</sup>, 但目前对抗蚜机制有待深入研究。本研究聚焦 *SbNRT2/3* 的基因结构、表达与 DNA 变异, 为解析氮素吸收和转运机制、选育氮高效利用的高粱品种提供理论和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 高粱 NRT2/3 家族基本信息及染色体定位

以水稻(*O. sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis*

*thaliana*)的 NRT2/3 氨基酸序列作为参考, 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中进行 BLASTP 搜寻和比对, 获得高粱 NRT2 基因家族的基因序列、编码序列(coding sequence, CDS)以及氨基酸序列。水稻、玉米(*Zea mays*)、谷子(*Setaria italica*)的 NRT2 蛋白质序列来自 Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov>)数据库。应用 ExPASy 在线软件对高粱 NRT2/3 家族成员蛋白质理化性质进行了分析, 包括基因组位置、氨基酸数量、分子量、等电点(isoelectric point, pI)、脂肪系数、不稳定系数及总的平均吸水性。

采用 TBtools 软件, 从 Tx623B 高粱参考基因组注释信息中获取高粱 NRT2/3 基因家族染色体位置信息, 利用 TBtools 软件对筛选出来的位置信息进行可视化处理, 绘制染色体定位图。从 Phytozome 数据库中下载高粱 NRT2 蛋白的 fasta 格式, 并将其导入 Jalview 软件进行多蛋白序列比对分析, 手动剔除结构域缺失与不完整的序列, 设置阈值, 可视化序列比对结果及共有序列高低柱状图。

### 1.2 高粱 NRT2/3 家族系统进化及基因结构分析

通过 MEGA 7.0 软件的 NJ 邻接法构建系统进化树, 将进化树的结果复制树文本另存为 nwk 格式, 使用 GSDS2.0 软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)上传 CDS 结构、基因结构以及 nwk 格式树文本, 对基因结构结果进行分析。

### 1.3 高粱 NRT2/3 蛋白二级结构、信号肽预测与亚细胞定位

使用 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))对高粱 NRT2/3 蛋白的二级结构进行汇总分析; 利用 SignalP-4.1 Server ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/))在线工具, 预测高粱 NRT2/3 蛋白家族信号肽。采用 PSORT Prediction 软件(<http://psort1.hgc.jp/form>。

html)对高粱 *NRT2/3* 家族进行亚细胞定位。

#### 1.4 高粱 *NRT2/3* 蛋白跨膜结构域与三级结构预测

利用 TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对高粱 *NRT2/3* 蛋白跨膜螺旋进行预测;利用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)对高粱 *NRT2/3* 蛋白进行三级结构预测。

#### 1.5 高粱 *NRT2/3* 蛋白功能结构域分析

利用 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)在线软件,分析高粱 *NRT2/3* 蛋白序列,从高粱 Pfam 数据库信息中获取高粱家族各成员的蛋白结构域信息,并利用 TBtools 软件绘制结构域分布图进行可视化结果。

#### 1.6 高粱 *NRT2/3* 蛋白保守基序分析

利用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>)在线工具上传高粱 *NRT2/3* 蛋白序列,对家族中具有高相似性的基序进行分析。其中,保守序列的最大鉴定数目设置为 10,其余参数为默认设置,将所有参数设置好后开始搜索高粱 *NRT2/3* 蛋白序列中的保守基序。使用 TBtools 软件来绘制相关的 motif 可视化图像,并对其保守性进行分析。

#### 1.7 高粱 *NRT2/3* 基因家族启动子顺式作用元件分析

提取高粱 *NRT2/3* 的起始密码子上游的 2 000 bp 序列以及高粱 *NRT2/3* 基因家族 IDs,并将序列转换成大写,提交到 PlantCARE 数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),进行启动子区域顺式作用元件的预测。

#### 1.8 高粱 *NRT2/3* 蛋白系统发育分析

采用 ClustalW 方法,将高粱、拟南芥、水稻、玉米和谷子不同的 *NRT2* 蛋白序列进行多重比对;通过 MEGA 7.0 软件,将比对结果使用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树,将进

化树的结果复制树文本另存为 nwk 格式,利用 iTOL (<http://itol.embl.de>)在线工具上传 nwk 格式树文本,并将进化树进行美化。

#### 1.9 高粱 *NRT2/3* 基因在不同组织中的表达分析

在 Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中获取目的基因在高粱各个生育期、不同器官部位的表达量,再利用 TBtools 软件作出表达量的热图。

通过加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA),鉴定 *SbNRT2/3* 的共表达基因。

#### 1.10 高粱 *NRT2/3* 基因在氮胁迫条件下的表达分析

将高粱幼苗在含有 1 mmol/L  $\text{NH}_4^+$  的 IRRI 营养液中培养 2 周, N 饥饿 4 d 后分别供应缺氮(0 mmol/L  $\text{NO}_3^-$ )、0.25 mmol/L  $\text{NO}_3^-$ 、5 mmol/L  $\text{NO}_3^-$  和 5 mmol/L  $\text{NH}_4^+$  培养 24 h。对不同营养液不同形态、浓度氮素处理下的高粱幼苗根和叶片的差异 *NRT2/3* 基因进行实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)。获取目的基因表达量,利用 TBtools 软件作出表达量热图。

#### 1.11 不同品系高粱抗感蚜虫水平、*SbNRT2/3* 基因表达及蚜虫侵染影响

供试高粱品系为 2457B、5-27sug, 生长在光强 15 000 lx、光照/黑暗温度 25 °C 10 h/18 °C 14 h、湿度 70%的自动控制生长室,于 5 叶期将培养的蚜虫用毛刷轻轻接种于叶片上,每叶片接种 50 只。取高粱中下部叶片,每行取 3 株,用水合茚三酮比色法测定蚜虫侵害前后叶片含氮量。在自然条件下鉴定抗蚜性,蚜虫初发后,每隔 3 d 调查 1 次植株的蚜虫数量,每品系调查 30 株,共调查 4 次。根据蚜虫群体数量和植株受害程度确定抗、感染蚜虫水平。

取蚜虫侵染和对照叶片、根、茎,提取 RNA,

实时荧光定量 PCR 法检测 *SbNRT2/3* 基因的表达水平。qRT-PCR 参照范佳利等<sup>[17]</sup>对普通小麦 JAZ 家族鉴定及其响应冻害的表达与 DNA 变异分析的方法。基因专一性引物见表 1。反应体系为 25  $\mu\text{L}$ ，包含 SYBR Premix Ex *Taq II* (TaKaRa) 12.5  $\mu\text{L}$ ，上下游引物各 1.25  $\mu\text{L}$ ，cDNA 模板 2.5  $\mu\text{L}$ ，双蒸水(ddH<sub>2</sub>O) 7.5  $\mu\text{L}$ 。扩增程序：95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s；95  $^{\circ}\text{C}$  5 s，55  $^{\circ}\text{C}$  30 s，60  $^{\circ}\text{C}$  5 s，共 40 个循环。每个样品 3 次重复。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算基因相对表达量。

### 1.12 高粱 *NRT2/3* 家族进化选择压力分析

通过 BLAST 建库和 KaKs\_Calculator 2.0 对高粱 *NRT2/3* 基因核苷酸的非同义替换率(Ka)与同义替换率(Ks)进行计算，获取基因的 Ka/Ks 比率，进行选择压力分析。

### 1.13 高粱 *NRT2/3* 基因的 DNA 变异的鉴定

在 Phytozome 中参照 McCormick 等<sup>[10]</sup>重测序的 52 个高粱种质 DNA 重测序数据，用 BWA 软件与 Tx623B 参考基因组比对，用 GATK 进行 DNA 变异检测，对 *SbNRT2/3* 基因的单核苷酸多态性进行鉴定与注释。

### 1.14 高粱 *NRTs* 蛋白互作分析

利用 STRING (<https://cn.string-db.org/>)数据库，对高粱全基因组 *NRT* 氨基酸序列进行 *SbNRTs* 蛋白的互作分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 高粱 *NRT2/3* 家族基本信息及染色体定位

利用 NCBI 数据库下载得到高粱全基因组文件及 GFF 注释文件，结合高粱各组织的转录组测序数据并通过结构域验证，最终得到 5 个 *SbNRT2* 基因(命名为 *SbNRT2-1a*、*2-1b*、*SbNRT2-2-4*)和 2 个 *NAR2* 基因(命名为 *SbNRT3-1-2*)。高粱 *NRT2/3* 家族成员及理化性质如表 2 所示。*SbNRT2* 基因长度为 1 954–4 018 bp；氨基酸数目在 484–535 之间；分子量大小在 49 346.27–57 265.08 Da 之间；理论等电点在 7.03–8.94 之间；不稳定系数分析表明，除 *SbNRT2-2*、*SbNRT3-1* 为不稳定蛋白(不稳定系数>40)外，其他均为稳定蛋白；脂溶系数的高低决定了蛋白质的流动性，系数越高，流动性越好，除 *SbNRT2-4*、*SbNRT3-2* 蛋白外，其余蛋白的脂溶系数均小于 90，表明蛋白的流动性较弱；亲水性平均值均为正，表明所有高粱 *NRT2/3* 蛋白为疏水性蛋白。

*SbNRT2/3* 基因染色体分布(图 1)；它们分布在 *SBI-03*、*SBI-04* 和 *SBI-06* 共 3 条染色体的近末端或末端，其中 *SbNRT2-2*、*SbNRT2-1a*、*SbNRT2-1b* 集中在 4 号染色体上，进一步对这 3 个基因的蛋白序列进行比对发现，*SbNRT2-1a* 和

表 1 分析 *SbNRT2/3* 在高粱组织表达的 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers used for quantification of expression of *SbNRT2/3* in sorghum tissues by qRT-PCR

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>SbNRT2-1a</i>	TGGAACGACGACGAGAAGAG	GTAACAGCAGGTGAACATGGA
<i>SbNRT2-1b</i>	TGGAACGACGACGAGAAGAG	ACGTACATTTGAAGACCCATCG
<i>SbNRT2-2</i>	TACTCGACGGGAAAGGGAT	CTGCGGCATAGTAGCTCTCC
<i>SbNRT2-3</i>	CGGCGGAGGACTACTACAAC	GTGTGTGTTTCACACGTCGG
<i>SbNRT2-4</i>	GGTTGCCGCACGTGAATTTT	TCTATCCACGCTGTTGGCAC
<i>SbNRT3-1</i>	CGTCATCGAGAACCGCAAGA	CCAATCCATGGGAGCAACGA
<i>SbNRT3-2</i>	GCGGTGCAGTTGTAACACG	GGGATGACAGCGTCAACA
<i>18S rRNA</i>	GCCTTTCGAAGCACTTTCAC	AACCAAACCTCCATGCTCAC

*SbNRT2-1b* 的 DNA 和蛋白序列高度相似性，推测是由串联复制形成的。

2.2 高粱 *NRT2/3* 家族系统进化及基因结构分析

对 5 个高粱 *NRT2* 基因和 2 个 *NRT3* 基因的氨基酸序列进行多重序列比对并构建系统进化树(图 2A)，结果表明：高粱 *NRT2* 和 *NRT3* 蛋白

在系统进化树中绝大多数都是成对出现的，如 *SbNRT2-1a/SbNRT2-1b*、*SbNRT2-3/SbNRT2-4* 和 *SbNRT3-1/SbNRT3-2*。高粱的 5 个 *NRT2* 蛋白和 2 个 *NRT3* 蛋白共划分为 4 个亚族，在同一亚族中亲缘关系比较近，推测其在进化过程中可能发生了一些适应性变异。基因结构分析显示(图 2B)：除 *SbNRT3-1* 基因外，均存在上下游非编码

表 2 *SbNRT2/3* 蛋白家族成员及理化性质

Table 2 *SbNRT2/3* member and their physico-chemical analysis

Gene ID	Gene	Genome position	Length of amino acids (aa)	Molecular weight (Da)	pI	Instability coefficient	Fat factor	Total average water absorption
<i>SbNRT2-1a</i>	<i>Sobic.004G009400</i>	<i>SBI-04</i> : 803 923–805 984	527	57 053.17	7.96	35.71	88.54	0.37
<i>SbNRT2-1b</i>	<i>Sobic.004G009500</i>	<i>SBI-04</i> : 814 199–816 152	527	57 041.12	7.96	35.87	87.99	0.36
<i>SbNRT2-2</i>	<i>Sobic.004G009200</i>	<i>SBI-04</i> : 788 282–790 240	535	57 250.15	7.51	45.52	89.98	0.40
<i>SbNRT2-3</i>	<i>Sobic.003G270800</i>	<i>SBI-03</i> : 60 744 742–60 746 865	515	55 265.08	8.94	39.49	89.83	0.40
<i>SbNRT2-4</i>	<i>Sobic.003G188200</i>	<i>SBI-03</i> : 50 725 472–50 728 056	484	49 346.27	7.03	30.65	101.78	0.63
<i>SbNRT3-1</i>	<i>Sobic.004G202400</i>	<i>SBI-04</i> : 55 452 588–55 454 711	211	21 778.80	8.84	42.21	83.89	0.18
<i>SbNRT3-2</i>	<i>Sobic.006G121200</i>	<i>SBI-06</i> : 48 781 504–48 785 522	217	22 334.53	9.23	37.50	90.14	0.21

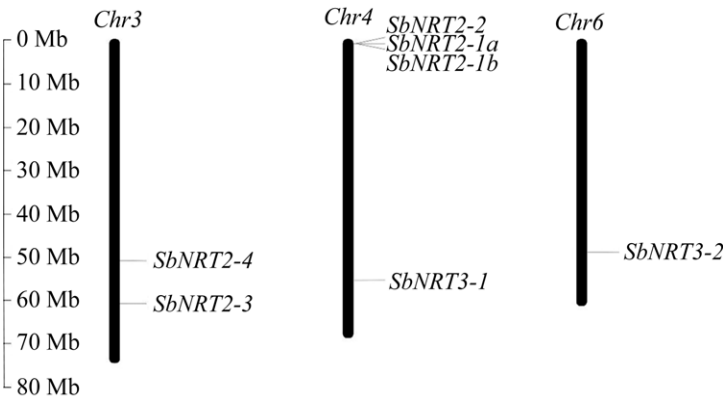


图 1 *SbNRT2/3* 基因家族染色体定位

Figure 1 Chromosome location of *SbNRT2/3* gene family.

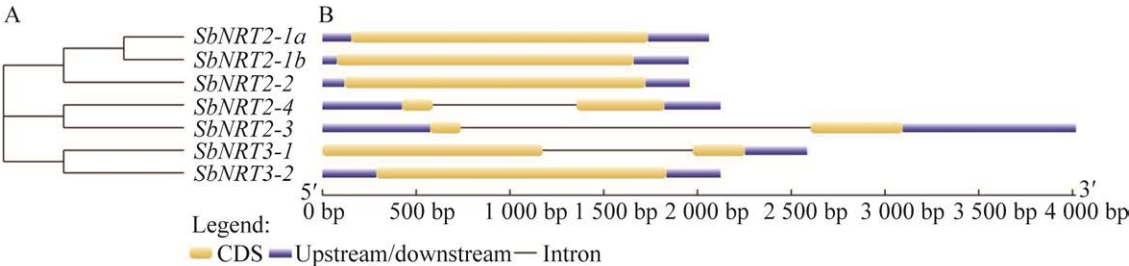


图 2 *SbNRT2/3* 基因家族系统进化树(A)与基因结构(B)

Figure 2 Phylogenetic tree (A) and gene structure (B) of *SbNRT2/3* family.

区; CDS 为编码蛋白产物的序列, *SbNRT2/3* 的 CDS 数量都维持在 1 个以上; *SbNRT2-3* 基因的内含子较长, 由于外显子与内含子接头区存在一段高度保守的一致序列, 使得这个基因相对其余的 *SbNRT2/3* 基因存在更多的高度保守序列数量。

### 2.3 高粱 NRT2/3 蛋白二级结构、信号肽预测与亚细胞定位分析

高粱 NRT2/3 家族成员蛋白的二级结构预测(表 3)结果表明: 二级结构中含有  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、延伸链和无规则卷曲, 并且主要由  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲构成(二者所占二级结构总量的比例大于 70%), 有利于形成蛋白质的特殊结构构象。而延伸链( $\beta$ -折叠的组成结构)、 $\beta$ -转角比例较低。由此可以推测出,  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲是 *SbNRT2* 和 *SbNRT3* 蛋白的大量结构元件, 而延伸链和  $\beta$ -转角则散布在整个蛋白质中。通过进行亚细胞定位研究, 可以确定基因在细胞中发生

功能的部位, 结果显示其蛋白均定位在质膜上; 其中 NRT2s 蛋白不含信号肽, NRT3s 蛋白含信号肽(表 4)。

### 2.4 高粱 NRT2/3 蛋白跨膜结构域与三级结构预测

对跨膜结构域进行分析(表 4)发现, *SbNRT2* 家族成员基因跨膜结构域均大于 10 个, 而 *SbNRT3* 家族成员基因跨膜结构域为 2 个。进一步对高粱 NRT2/3 基因家族中 7 个成员进行了蛋白跨膜螺旋预测(图 3)。结果显示, *SbNRT2-2* 蛋白有 10 个跨膜螺旋结构域, 其余成员蛋白均含有 11 个完整的跨膜结构域。*SbNRT2s* 和 *SbNRT3s* 蛋白成员分别有相似的 N 端和 C 端跨膜结构域, 且组成跨膜结构域的氨基酸数量与位置均相似。对高粱 *SbNRT2/3* 蛋白进行三级结构预测, 由图 4 可知, *SbNRT2-1b*、*SbNRT2-2* 和 *SbNRT2-3* 蛋白三级结构在空间结构上相似度很高。

表 3 *SbNRT2/3* 蛋白二级结构

Table 3 Secondary structure analysis of *SbNRT2/3*

Protein ID	Percentage (%)			
	$\alpha$ -helix	Extended strand	$\beta$ -turn	Random coil
<i>SbNRT2-1a</i>	42.88	17.08	6.26	33.78
<i>SbNRT2-1b</i>	43.07	15.94	4.93	36.05
<i>SbNRT2-2</i>	42.62	16.26	5.61	35.51
<i>SbNRT2-3</i>	45.44	15.15	5.44	33.98
<i>SbNRT2-4</i>	47.31	15.91	5.58	31.20
<i>SbNRT3-1</i>	28.44	26.54	5.69	39.34
<i>SbNRT3-2</i>	26.27	27.65	4.61	41.47

表 4 *SbNRT2/3* 蛋白信号肽与亚细胞定位预测

Table 4 Signal peptide and subcellular localization prediction of *SbNRT2/3* protein

Protein ID	Signal peptide	Subcellular localization	Number of transmembrane domains
<i>SbNRT2-1a</i>	No	Plasma membrane	11
<i>SbNRT2-1b</i>	No	Plasma membrane	11
<i>SbNRT2-2</i>	No	Plasma membrane	10
<i>SbNRT2-3</i>	No	Plasma membrane	11
<i>SbNRT2-4</i>	No	Plasma membrane	11
<i>SbNRT3-1</i>	Yes	Plasma membrane	2
<i>SbNRT3-2</i>	Yes	Plasma membrane	2



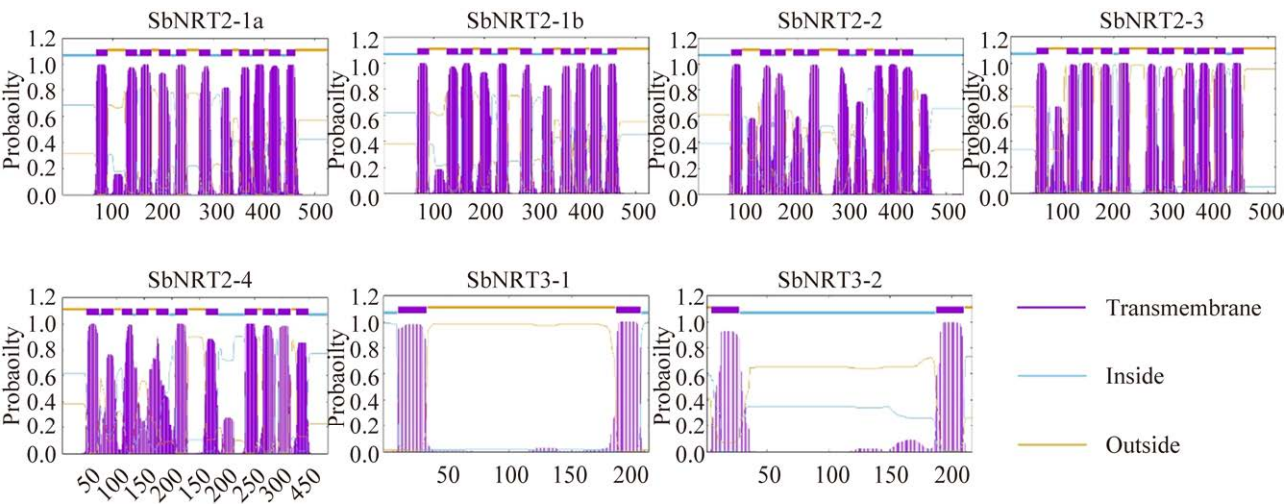


图 3 SbNRT2/3 蛋白跨膜螺旋预测  
Figure 3 Prediction of SbNRT2/3 protein transmembrane helix.

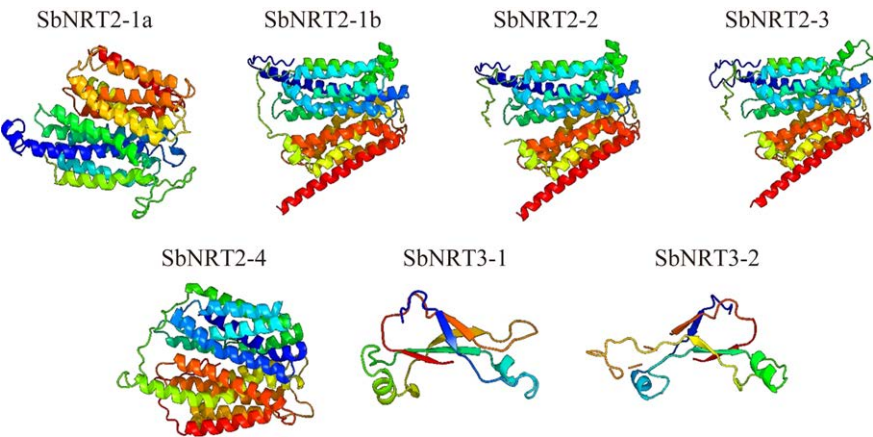


图 4 SbNRT2/3 蛋白三级结构预测  
Figure 4 Prediction of SbNRT2/3 protein transmembrane helix.

2.5 高粱 *NRT2/3* 蛋白功能结构域分析

SbNRT2 蛋白的结构域分析显示，所有 SbNRT2s 蛋白均含有 MFS\_1 结构域，而 SbNRT3s 蛋白含有 NAR2 结构域(图 5)。主要协同转运蛋白超家族 MFS 是目前已知最大的膜转运蛋白超家族之一，该家族膜转运蛋白广泛存在于整个生物界，作为膜转运蛋白其基本功能是协助完成物质的跨膜转运。NAR2 是高亲和力硝酸盐摄取的必需辅助，硝酸盐转运蛋白的活性受 NAR2 蛋白的协同调控，对于某些高亲和硝酸盐

转运蛋白需要其伴侣蛋白调控其活性。推测这些保守结构域的存在，SbNRT2/3 蛋白可进行高亲和力和硝酸盐转运。

2.6 高粱 *NRT2/3* 蛋白保守基序分析

对高粱 *NRT2/3* 基因的氨基酸序列进行基序分析(图 6A)，结果发现：*SbNRT2/3* 基因共包含 10 种保守基序，将其命名为 motif1–motif10；其中 motif1–motif5 和 motif8 均为 50 个氨基酸(图 6B)。在 SbNRT3s 蛋白序列中，只存在 motif9。而 SbNRT2s 蛋白序列中，可以明显看

出, 部分序列存在 motif7 和 motif9 的缺失, 其他 motif 在 *SbNRT2* 蛋白家族的排列位置基本一致。因此说明 motif1–motif10 是相对较为保守的基序, 推测蛋白质基序 motif1–motif10 很可能与 *SbNRT2/3* 执行硝酸盐吸收转密切相关。

## 2.7 高粱 *NRT2/3* 基因家族启动子区顺式作用元件分析

为更深入了解 *SbNRT2/3* 基因家族各成员的潜在功能, 对其启动子区的顺式作用元件进行了分析, 结果如图 7 所示, 其中, 高粱 *NRT2/3* 基因的启动子区均具有数个植物激素和逆境应答

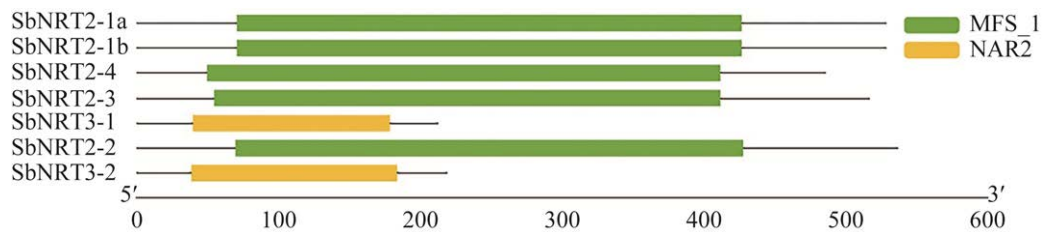


图 5 *SbNRT2/3* 蛋白功能结构域

Figure 5 Protein domain of *SbNRT2/3*.

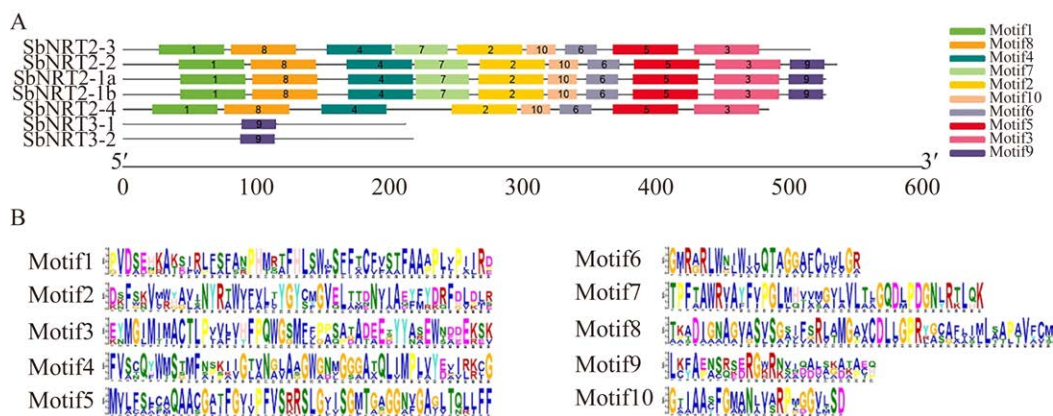


图 6 *SbNRT2/3* 氨基酸序列保守基序(A)及序列(B)

Figure 6 Amino acid sequence conserved motifs of *SbNRT2/3* (A) and sequence (B).

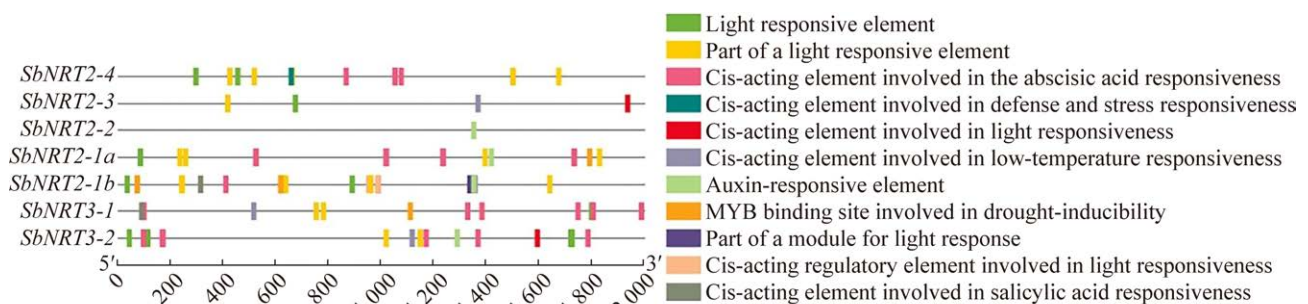


图 7 *SbNRT2/3* 基因启动子区顺式作用调控元件的功能注释

Figure 7 Functional annotation of the *cis*-acting regulatory elements of gene promoters of *SbNRT2/3*.

元件。所含顺式作用元件主要为两类,一类是与逆境响应相关的元件,另一类是与植物生长发育有关的元件;高粱 *NRT2* 基因中主要存在光响应元件;除 *SbNRT2-2*、*SbNRT2-3* 基因启动子区外,其余都存在脱落酸响应元件; *SbNRT2-1a*、*SbNRT2-1b*、*SbNRT2-2*、*SbNRT2-4* 启动子区存在水杨酸、生长素和防御应激响应元件;而 *SbNRT3* 基因中主要存在脱落酸响应元件; *SbNRT3-1* 基因启动子区存在低温、光响应元件; *SbNRT3-2* 基因启动子区存在生长素响应元件。值得注意的是, *SbNRT2-1b* 基因启动子区存在脱落酸、水杨酸、低温、干旱诱导相关 MYB 结合位点、光响应、生长素响应元件。推测能更快地响应多种逆境。

## 2.8 高粱 *NRT2/3* 蛋白系统发育分析

将高粱(*S. bicolor*) (7 个)、拟南芥(*A. thaliana*)

(9 个)、水稻(*O. sativa*) (6 个)、玉米(*Z. mays*) (6 个)、谷子(*S. italica*) (8 个)基因家族共 36 个 *NRT2/3* 蛋白,采用邻接法构建系统进化树。*NRT2/3* 蛋白系统进化树(图 8)分析可知,不同颜色范围代表不同亚族,36 个 *NRT2/3* 蛋白可以分为 3 个亚家族。其中 *SbNRT2-2* 与 *Zm00001D014976*, *SbNRT2-3* 与 *Si5G286900*, *SbNRT2-4* 与 *Zm00001D025783*, *SbNRT3-1* 与 *Zm00001D017095*, *SbNRT3-2* 与 *Zm00001D003287* 分别汇聚在同一分支下,且成对出现,说明高粱和玉米 *NRT2/3* 亲缘关系更近。

## 2.9 高粱 *NRT2/3* 基因在不同组织中的表达分析

高粱 *NRT2/3* 基因在不同发育期组织中的基因表达情况(图 9),可看出 *SbNRT2* 与 *SbNRT3* 基因的表达具有发育时期和组织专一性,在生育期根和叶片具有较高的表达水平。其中 *SbNRT2-3*、

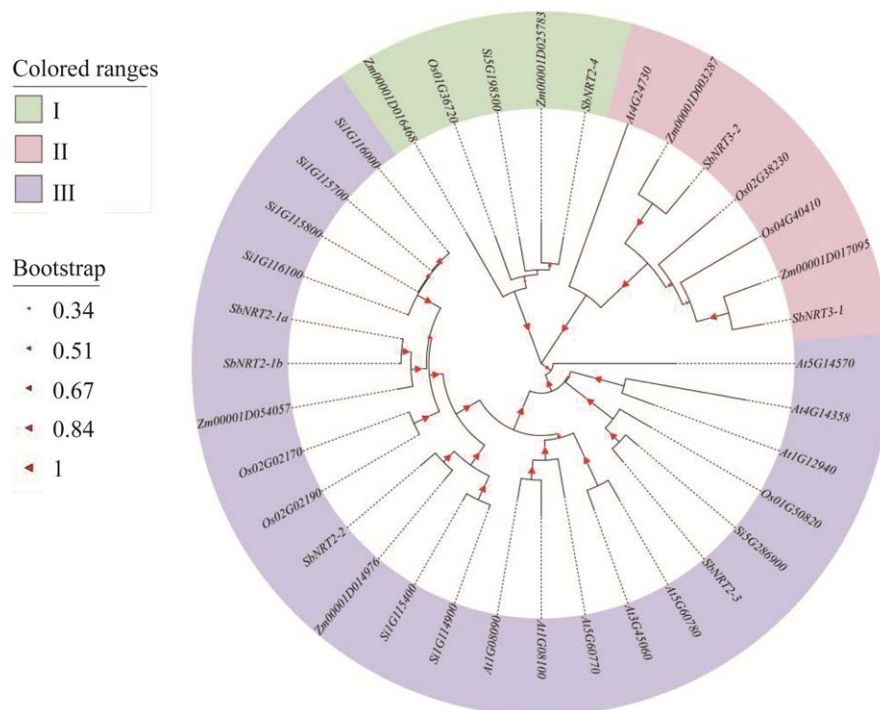


图 8 高粱与拟南芥、水稻、玉米和谷子 *NRT2/3* 系统进化树分析

Figure 8 Phylogenetic tree of *NRT2/3* family in *Sorghum bicolor*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, and *Setaria italica*.



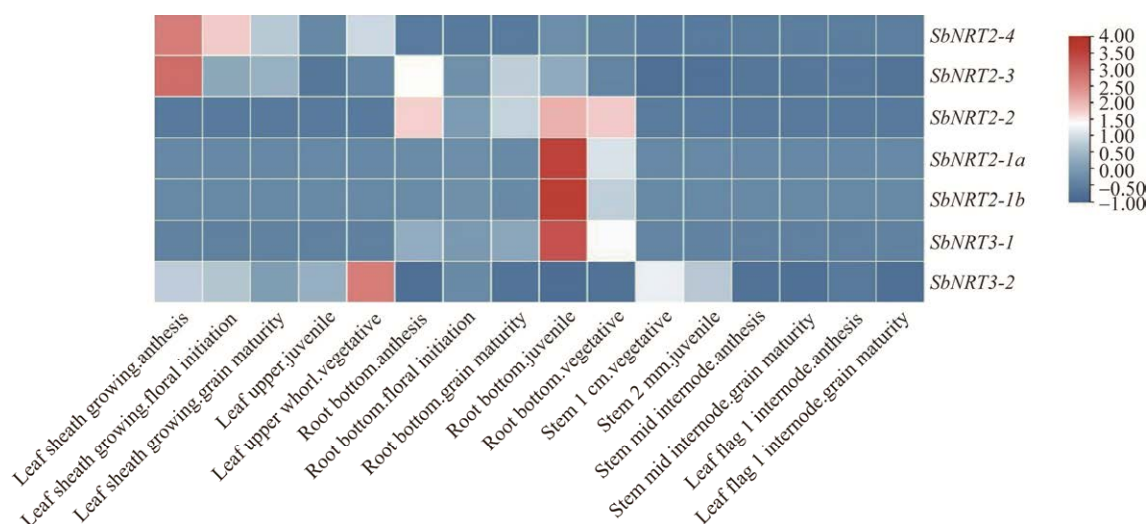


图9 *SbNRT2/3* 基因在不同组织中的表达分析

Figure 9 Tissue expression analysis of *SbNRT2/3* genes.

*SbNRT2-4* 在花期的叶鞘部位表达水平较高；*SbNRT2-2* 分别在苗期、拔节期、花期的根部表达水平较高；值得注意的是，*SbNRT2-1a*、*SbNRT2-1b* 在苗期的根部表达水平最高，其次是 *SbNRT3-1*；*SbNRT3-2* 在拔节期的叶片表达水平较高。推测 *SbNRT2-2* 在高粱早期生长发挥作用，而 *SbNRT2-1a*、*SbNRT2-1b* 及 *SbNRT3-1* 主要在高粱根部表达并调控对硝酸盐的吸收或转运过程。

WGCNA 基因共表达分析显示，与 *SbNRT2-3* 共表达的有转录起始因子  $\beta$  亚基 *TfIIIE2* *Sobic.001G257200* 和赖氨酸、组氨酸转运子 *Sobic.007G092400*、线粒体丙酮酸转运子 *Sobic.001G048766*、F-box 域蛋白 *Sobic.007G204500* 等；与 *SbNRT3-1* 的共表达基因有编码 GBP16 转录因子的 *Sobic.009g104100* 和 PCI 结构域蛋白的 *Sobic.001g283200* 等。

## 2.10 高粱 *NRT2/3* 基因在氮胁迫条件下的表达分析

高粱幼苗的根和茎组织中 *SbNRT2/3* 基因在氮胁迫条件下的 qRT-PCR 检测结果如图 10 所示，其中，*SbNRT2-1a*、*SbNRT2-1b* 和 *SbNRT3-1*

基因主要在 0.25 mmol/L 硝酸盐处理的根中表达量显著，表明 *SbNRT2-1a*、*SbNRT2-1b* 和 *SbNRT3-1* 基因主要在低浓度  $\text{NO}_3^-$  (0.25 mmol/L) 处理条件下的根中诱导表达。*SbNRT3-2* 基因主要在 5 mmol/L 硝酸盐处理的茎中表达量显著，表明 *SbNRT3-2* 基因主要在高浓度  $\text{NO}_3^-$  (5 mmol/L) 处理条件下的茎中诱导表达。

## 2.11 不同品系高粱抗感蚜虫水平、*SbNRT2/3* 基因表达及蚜虫侵染影响分析

田间调查结果见表 5，抗蚜性等级确定参照全国农作物品种资源鉴定专业组制定的高粱抗蚜性分级标准，据田间蚜虫数量分为 5-27sug 为感蚜品系(单株蚜量 701-1 000)，2457B 为抗蚜品系(单株蚜量 0-50)。5-27sug 植株上蚜虫群体大，接种后 6 d 表现为叶片部分失绿、坏死，12 d 后植株开始枯死，为感蚜品系；2457B 植株上蚜虫群体小，一直表现为正常绿色，无植株开始枯死，为抗蚜品系。

与基因在不同组织中的表达分析结果一致，在感蚜品系 5-27sug 根部表达显著的是 *SbNRT2-1b* 和 *SbNRT3-1*；在叶片上表达显著的是 *SbNRT2-3*、*SbNRT2-4*，其次是 *SbNRT3-2*。抗

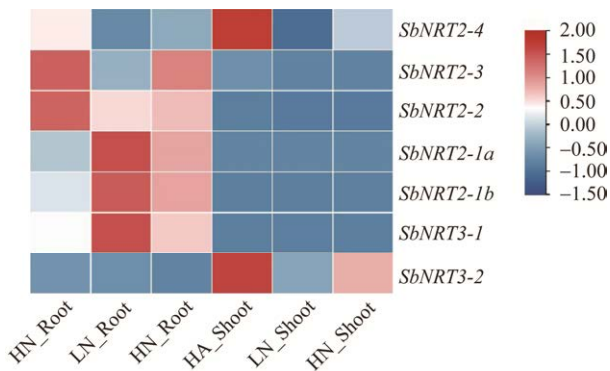


图 10 *SbNRT2/3* 基因在氮胁迫条件下的表达分析

Figure 10 Expression analysis of *SbNRT2/3* genes under nitrogen stress conditions. LN: 0.25 mmol/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; HN: 5 mmol/L NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; HA: 5 mmol/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

表 5 供试高粱品系抗蚜性的田间调查结果

Table 5 Field results of aphid resistance of sorghum lines

Lines	Type	Number of aphids per plant	Resistance grade
5-27sug	Sorghum	876	4 S
2457B	Sorghum	43	1 R

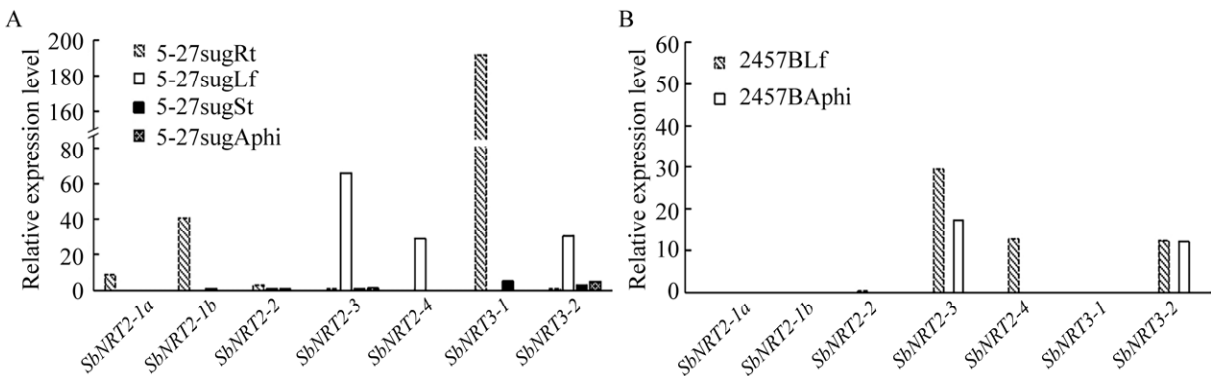


图 11 不同高粱组织 *SbNRT2/3* 表达模式及蚜虫侵染影响 A: 感蚜品系‘5-27sug’. B: 抗蚜品系‘2457B’.

5-27sugRt: ‘5-27sug’根(对照组); 5-27sugSt: ‘5-27sug’茎(对照组); 5-27sugLf: ‘5-27sug’叶(对照组); 5-27sugLfAphi: ‘5-27sug’蚜虫侵染叶(处理组); 2457BLf: ‘2457BLf’叶(对照组); 2457BLfAphi: ‘2457BLf’蚜虫侵染叶(处理组)

Figure 11 Expression profiles of *SbNRT2/3* in various sorghum tissues and effects of cane aphid infestation A: Infected with aphids line ‘5-27sug’. B: Resistant to aphids line ‘2457B’. 5-27sugRt: ‘5-27sug’ root (control); 5-27sugSt: ‘5-27sug’ stem (control); 5-27sugLf: ‘5-27sug’ leaf (control); 5-27sugLfAphi: ‘5-27sug’ aphid infestated leaf (experimental group); 2457BLf: ‘2457BLf’ leaf (control); 2457BLfAphi: ‘2457B’ aphid infestated leaf (experimental group).

Ka 值小于 Ks 值, Ka/Ks 值小于 1, 说明其受到了纯化选择, 可以保证 SbNRT2 蛋白功能的稳定性, 从而让 NRT2 蛋白保持对硝酸盐的敏感性, 在硝酸盐吸收、转运过程中发挥作用。

### 2.13 高粱 *NRT2/3* 基因的 DNA 变异的鉴定

参照 McCormick 等<sup>[10]</sup>重测序的 52 个高粱种质 *SbNRT2-1a*、*SbNRT2-1b*、*SbNRT2-2-4*、*SbNRT3-1* 和 *SbNRT3-2* 的 SNP 见表 6。其中, 辽 LR9198、矮 4、RTx7000 等的 *SbNRT2-1a* 在 SBI-04:804 083 非同义编码 SNP 变异, 氨基酸由 Thr 苏氨酸改变为 Ala 丙氨酸; 吉 2731、BTx642 等种质的 *SbNRT2-4* 在 SBI-03:50 725

869 的非同义 SNP 变异氨基酸由 Ala 丙氨酸变为 Ser 丝氨酸, 翻译的蛋白质和原来不同, 很可能会影响蛋白结构和功能。高粱种质 DNA 变异信息, 可用来指导基因克隆和分子标记筛选。

### 2.14 高粱 NRTs 蛋白互作分析

利用 STRING 数据库在线软件对 SbNRTs 蛋白进行蛋白互作网络构建(图 12), 全基因组的蛋白互作显示, SbNRT2/3 与硝酸还原酶及几个 SbNRT1 存在互作; SbNRT2-1a 处于核心位置(红色节点), 并且 SbNRT2/3 蛋白间互作关系更强。推测在硝酸盐吸收、转运等环节发挥着重要作用。

表 6 高粱种质 *SbNRT2/3* 的 SNP 鉴定与注释

Table 6 Identification and annotation of SNPs of *SbNRT2/3* in sorghum germplasms

Gene ID	Pos	Ref	Alt	Effect	Codon change	Mutated germplasm
<i>SbNRT2-1a</i>	804 083	A	G	Non_synonymous_coding	Acc/Gcc	LR9198, Ai4, 100 M, 80 M, IS3620C, Macia, PI525695, RTx7000, <i>S-bicolor</i> -PI226096, SC170-6-17, SC56-14E, Std-Broomcorn, Tx7000, Zengada-IBC-E-308
<i>SbNRT2-1b</i>	814 638	G	C	Non_synonymous_coding	aCc/aGc	<i>S-bicolor</i> -PI226096
<i>SbNRT2-2</i>	788 446	G	A	SYNONYMOUS_CODING	gcG/gcA	<i>S. bicolor</i> subsp. <i>drummondii</i> -PI330272, Zengada-IBC-E-308
<i>SbNRT2-3</i>	60 745 227	G	C	Synonymous_coding	gcG/gcC	Early-Hegari, Greenleaf, IS3620C, PI525695, <i>S-bicolor</i> -PI226096, SC170-6-17, SC62C
<i>SbNRT2-4</i>	50 725 722	G	T	Non_synonymous_coding	Gcc/Tcc	100 M, 80 M, BTx642, Hegari, SC170-6-17
<i>SbNRT2-4</i>	50 725 869	A	G	Non_synonymous_coding	Acg/Gcg	100 M, 80 M, BTx642, Hegari, IS3620C, Ji2731, SC170-6-17, Std-Broomcorn
<i>SbNRT3-1</i>	55 453 109	G	T	Non_synonymous_coding	Cgc/Agc	E-Tian, Keller
<i>SbNRT3-1</i>	55 453 282	G	A	Non_synonymous_coding	gCg/gTg	E-Tian, PI585749, SC62C
<i>SbNRT3-2</i>	48 782 608	G	T	Non_synonymous_coding	Ctg/Atg	IS3620C

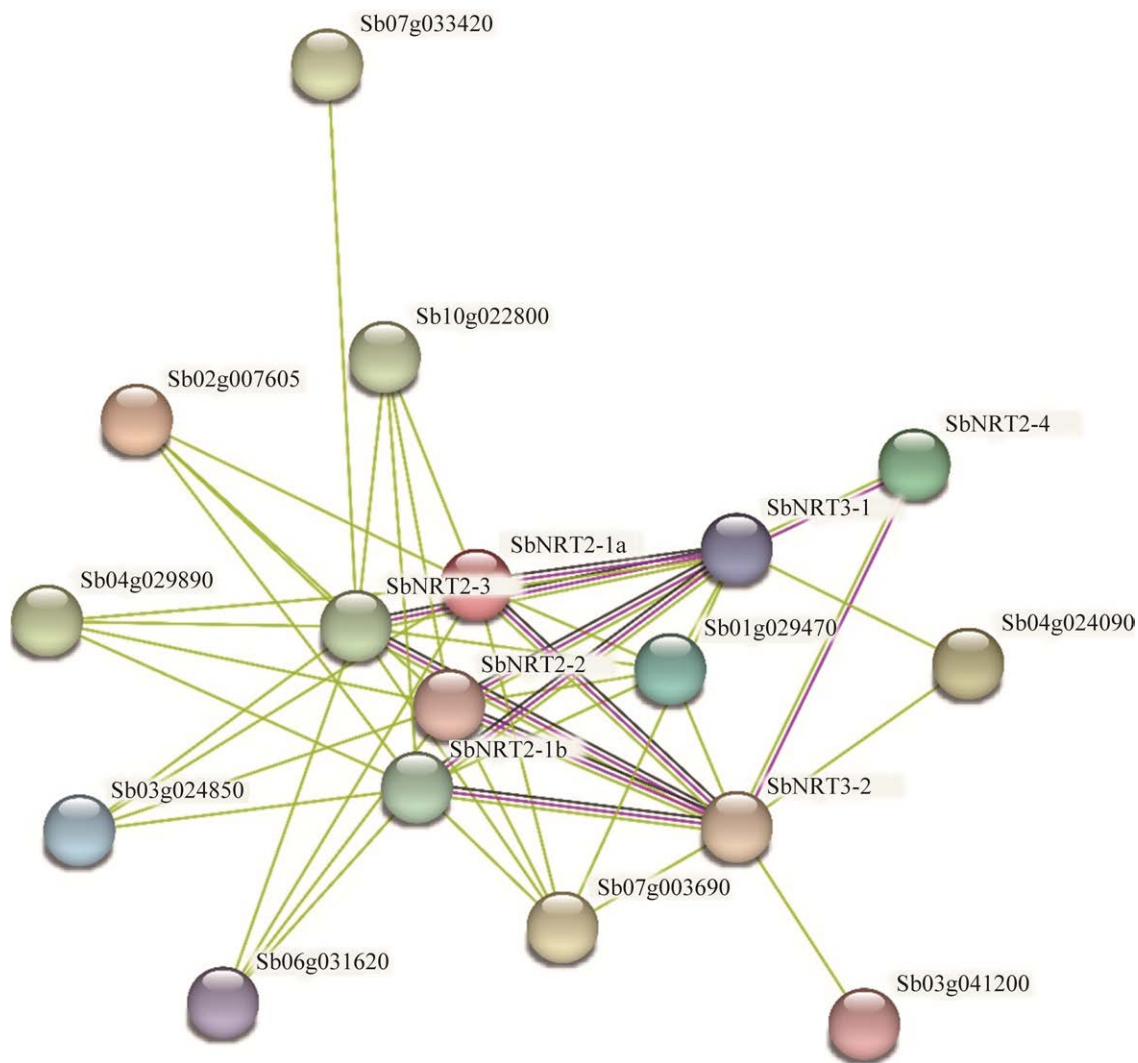


图 12 SbNRTs 蛋白互作网络  
Figure 12 Network of proteins interactive with SbNRTs.

3 讨论与结论

高粱在非洲、南亚是重要的口粮作物，在我国是重要的粮食作物、饲料作物以及生物燃料作物，具有耐贫瘠特性，对土壤中的氮素吸收和利用效率较高，对保证我国粮食安全和农业的可持续发展有着及其重要的意义。近年来高粱成为研究的热点，而绿色、高效生产为首要课题，其中挖掘和培育氮肥高效利用种质成为一个重要方向<sup>[15,18]</sup>。最近我们对高粱 *NRT1*、*CLC* 家族的表

达和 DNA 变异做了分析<sup>[4-5]</sup>。目前关于高粱 *SbNRT2* 与 *SbNRT3* 基因的鉴定和系统分析尚未见报道。本研究从全基因组水平上对高粱 *NRT2* 与 *NRT3* 基因家族进行鉴定，并进行了生物信息学分析，为研究其功能和建立分子标记辅助育种奠定了基础。

以往研究表明，拟南芥有 7 个 *AtNRT2s* 基因<sup>[6]</sup>和 2 个 *AtNAR2s* 基因<sup>[7]</sup>，水稻有 4 个 *NRT2s*<sup>[8]</sup>和 2 个 *NAR2s* 基因<sup>[9]</sup>，谷子有 8 个 *NRT2s* 基因<sup>[13]</sup>，玉米有 4 个 *NRT2s* 和 2 个 *NAR2s* 基因<sup>[14]</sup>。本研

究结果表明, 高粱全基因组内共鉴定出 5 个 *SbNRT2* 基因和 2 个 *SbNAR2/SbNRT3* 基因, 分布在 *SBI-03*、*SBI-04*、*SBI-06* 共 3 条染色体近末端; 尽管高粱更适应贫瘠土壤, *NRT2/3* 数量并未得到明显扩张。

*SbNRT2* 和 *SbNRT3* 蛋白质均为疏水性蛋白, 与先前分析结果一致<sup>[3,4,13]</sup>; 高粱 *NRT2/3* 基因家族与玉米拟南芥存在共线性关系的基因较多, 与这些物种的进化关系一致; 蛋白结构域显示 MFS<sub>1</sub> 和 NAR2 蛋白结构域的存在, 预测可执行高亲和力硝酸盐转运; 高粱 *NRT2/3* 基因在不同组织中的表达分析发现, *SbNRT2-1a*、*SbNRT2-1b*、*SbNRT3-1* 基因主要在高粱根部表达, 很可能执行对硝酸盐的吸收。*SbNRT2-3* 在叶片表达水平高, 可能参与叶面 N 的吸收或转运过程。

国内外报道的氮高效高粱种质有 China17、3Chi3、44B、Tx378B、398B 等, 而 Tx7000B、冀梁 2 号等氮效率较低<sup>[15,18]</sup>。Gelli 等<sup>[16,18]</sup>定位了低氮条件下 China17、3Chi3 衍生后代多个性状 QTL, 位于 *SBI-01*、*05*、*06*、*07* 和 *SBI-09*; 千粒重位点 *qTGW-3* 位于 *SBI-03*, 本研究分析的 *SbNRT2-3* 和 *SbNRT2-4* 位于该区间。且 2 个基因在抽穗期表达, 可能是候选基因。通过全基因组重测序, 已经初步得到了 *SbNRT2/3* 的 SNP (表 6), 为基因克隆和建立氮高效利用相关的分子标记奠定了基础。

Zhao 等<sup>[19]</sup>研究表明玉米 *GRMZM2G083176* 编码 NRT1/PTR6.1 为籽粒宽位点 *qKW-1* 的候选基因, Yang 等<sup>[20]</sup>研究了 NRT1/PTR7.9 成员 ZmSUGCAR1 可转运蔗糖, 调控灌浆过程。Fu 等<sup>[21]</sup>发现 *LeNRT2.3* 负责 N 的吸收和远距离运输, 控制侧根生长。小麦 NAC 转录因子 *TaNAC2-5A*、水稻 MADS 转录因子 *OsMADS57*、*OsMADS25* 和 *OsMADS27* 通过调节 *OsNRT2* 的

表达, 实现 N 高效利用。*OsNRT2.3* 可选择性剪切, 超表达 *OsNRT2.3b* 可改善水稻的磷吸收<sup>[22]</sup>。*OsNAR2.1* 可增强转基因水稻抗旱性和产量<sup>[23]</sup>。苜蓿 MtNRT1.3 可运输 ABA, 介导硝酸盐抑制初生根生长的效应<sup>[24]</sup>; 小麦 TaNRT2s/NARs 可联系 ABA 代谢与根部氮吸收<sup>[25]</sup>。Meta-QTL 分析水稻和小麦性状, 多个位点与 NRT 同位<sup>[26]</sup>。通过全基因组测序解析了科农 9204 小麦的氮高效特性, 发现后期扩增的 *NRT2* 基因对低氮及盐胁迫相应不同, 发生了功能分化, 20 个低氮敏感响应 *NRT2* 转录起始位点的开放性在低氮条件下显著提高; 发现 *G2-like* 转录因子和 *Nin-like* (*NLP*) 转录因子参与了 *NRT2* 的低氮诱导表达<sup>[27]</sup>。这些研究为解析高粱氮高效指明了方向, 也显示 *NRT2/3* 在作物改良上具有广泛的应用前景。

高粱蚜是高粱生产上最重要的虫害, 培育抗蚜品种需要了解抗蚜高粱种质的抗蚜机制。本研究检测到感蚜品系侵染后叶片 *SbNRT2-3*、*SbNRT2-4* 和 *SbNRT3-2* 的表达水平明显降低, 进一步说明硝酸盐的吸收及运转与蚜虫的诱导有一定关系。高粱蚜通过其刺吸式口器从植株获取营养, 会对叶片细胞造成较大伤害, 导致基因转录水平降低。蚜虫喜欢可溶性糖、氨基酸含量高的组织。较好的氮营养, 一般导致植株蛋白含量高, 叶片鲜嫩, 更易吸引蚜虫。植物抗蚜虫机制涉及茉莉酸(jasmonic acid, JA)、乙烯甚至水杨酸途径。硝酸盐处理对不同品种抗蚜水平影响有待进一步研究。另外, 虽然目前发现的抗蚜基因大部分属于 R 基因家族, 但对于蚜虫的抗性分子机理知之甚少。Broekgaarden 等<sup>[28]</sup>研究表明, R 基因抗病的下游效应与抗虫不同。此外, 加强对感蚜基因的研究, 即蚜虫入侵时可能会首先激活寄主中的某个或某些基因来避免或抑制寄主防卫系统, 但有关机制有待深入研究<sup>[29]</sup>。

高粱 *NRT2* 和 *NRT3* 基因的启动子区均具有



数个植物激素和逆境应答元件,可以响应体内和环境变化。低氮条件下,细胞分裂素、蛋白质合成收到抑制,表现叶片早衰和减产。本研究显示(图 8), *SbNRT2-1a*、*SbNRT2-1b* 和 *SbNRT2-4* 的启动子区存在水杨酸、生长素、脱落酸和防御应激响应元件, *SbNRT2-1b* 还有低温、干旱诱导相关 MYB 结合位点,为寻找上游调控基因提供指示。高粱 *NRT2/3* 基因及启动子可以用来异源表达,进一步提高谷子、玉米和小麦等作物的氮肥利用效率,减缓逆境胁迫。总之,本研究鉴定出 7 个高粱 *NRT2* 与 *NRT3* 基因家族成员,分析其基因表达、DNA 变异及不同高粱组织 *SbNRT2/3* 基因表达及蚜虫侵染影响之间的关系。为 *NRT2/3* 家族基因的克隆及功能,进一步解析和提高作物 N 吸收和转运效率研究创造了条件。

## REFERENCES

- [1] XU GH, FAN XR, MILLER AJ. Plant nitrogen assimilation and use efficiency[J]. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63: 153-182.
- [2] FAN XR, TANG Z, TAN YW, ZHANG Y, LUO BB, YANG M, LIAN XM, SHEN QR, MILLER AJ, XU GH. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(26): 7118-7123.
- [3] FORDE BG. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2000, 1465(1/2): 219-235.
- [4] 郭志强, 梁月秀, 冯凡, 朱立勋, 范佳丽, 姜晓东, 吕晋慧, 张春来. 高粱全基因组 *NRT1* 基因鉴定、表达与 DNA 变异分析[J]. 激光生物学报, 2021, 30(5): 459-467.  
GUO ZQ, LIANG YX, FENG F, ZHU LX, FAN JL, JIANG XD, LYU JH, ZHANG CL. Genome-wide identification of *NRT1* gene, expression profiling and DNA variation analysis in *Sorghum*[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2021, 30(5): 459-467 (in Chinese).
- [5] 朱立勋, 范佳利, 郭志强, 杨博慧, 柴文婷, 赵珊珊, 孙慧琼, 吕晋慧, 姜晓东, 张春来. 高粱 *CIC* 基因家族鉴定、表达与 DNA 变异分析[J]. 激光生物学报, 2022, 31(1): 87-95.  
ZHU LX, FAN JL, GUO ZQ, YANG BH, CHAI WT, ZHAO SS, SUN HQ, LYU JH, JIANG XD, ZHANG CL. Genome-wide identification, expression and DNA variation analysis of *CIC* gene family in *Sorghum*[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2022, 31(1): 87-95 (in Chinese).
- [6] FRANCK C, MATHILDE O, MARIE-FRANCE D, FABIEN C, HOAI-NAM T, MILLER ANTHONY J, ANNE K, FRANÇOISE DV. The *Arabidopsis* *ATNRT2.7* nitrate transporter controls nitrate content in seeds[J]. The Plant Cell, 2007, 19(5): 1590-1602.
- [7] CEREZO M, TILLARD P, FILLEUR S, MUÑOS S, DANIEL-VEDELE F, GOJON A. Major alterations of the regulation of root NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake are associated with the mutation of *Nrt2.1* and *Nrt2.2* genes in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2001, 127(1): 262-271.
- [8] LUO BB, XU M, ZHAO LM, XIE P, CHEN Y, HARWOOD W, XU GH, FAN XR, MILLER AJ. Overexpression of the high-affinity nitrate transporter *OsNRT2.3b* driven by different promoters in barley improves yield and nutrient uptake balance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(4): 1320.
- [9] XU N, YU B, CHEN RR, LI ST, ZHANG GC, HUANG JL. *OsNAR2.2* plays a vital role in the root growth and development by promoting nitrate uptake and signaling in rice[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 149: 159-169.
- [10] MCCORMICK RF, TRUONG SK, SREEDASYAM A, JENKINS J, SHU SQ, SIMS D, KENNEDY M, AMIREBRAHIMI M, WEERS BD, MCKINLEY B, MATTISON A, MORISHIGE DT, GRIMWOOD J, SCHMUTZ J, MULLET JE. The *Sorghum bicolor* reference genome: improved assembly, gene annotations, a transcriptome atlas, and signatures of genome organization[J]. The Plant Journal, 2018, 93(2): 338-354.
- [11] 张春来, 李艳锋, 赵威军, 赵靓, 王晨, 梁笃, 周福平. 高粱品质性状改良的分子遗传学基础[J]. 植物生理学报, 2015, 51(5): 610-616.  
ZHANG CL, LI YF, ZHAO WJ, ZHAO J, WANG C, LIANG D, ZHOU FP. Molecular genetic basis for

- biotechnological improvement of grain quality characteristics in *Sorghum*[J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(5): 610-616 (in Chinese).
- [12] 叶玲, 张洁, 郭永正, 赵雄伟, 王兴春. 谷子 NRT2 基因家族的鉴定及生物信息学分析[J]. 山西农业科学, 2020, 48(3): 283-290.
- YE L, ZHANG J, GUO YZ, ZHAO XW, WANG XC. Identification and bioinformatics analysis of NRT2 gene family in millet[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2020, 48(3): 283-290 (in Chinese).
- [13] ZAMBONI A, ASTOLFI S, ZUCHI S, PII Y, GUARDINI K, TONONI P, VARANINI Z. 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.
- [14] 刘鹏, 武爱莲, 王劲松, 南江宽, 董二伟, 焦晓燕, 平俊爱, 白文斌. 不同基因型高粱的氮效率及对低氮胁迫的生理响应[J]. 中国农业科学, 2018, 51(16): 3074-3083.
- LIU P, WU AL, WANG JS, NAN JK, DONG EW, JIAO XY, PING JA, BAI WB. Nitrogen use efficiency and physiological responses of different *Sorghum* genotypes influenced by nitrogen deficiency[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(16): 3074-3083 (in Chinese).
- [15] GELLI M, MITCHELL SE, LIU K, CLEMENTE TE, WEEKS DP, ZHANG C, HOLDING DR, DWEIKAT IM. Mapping QTLs and association of differentially expressed gene transcripts for multiple agronomic traits under different nitrogen levels in sorghum[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 1-18.
- [16] GELLI M, KONDA AR, LIU K, ZHANG C, CLEMENTE TE, HOLDING DR, DWEIKAT IM. Validation of QTL mapping and transcriptome profiling for identification of candidate genes associated with nitrogen stress tolerance in sorghum[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 1-18.
- [17] 范佳利, 朱立勋, 郭志强, 尹梦娇, 杨博慧, 柴文婷, 赵珊珊, 孙慧琼, 李莎莎, 丁鹏程, 王爱萍, 姜晓东, 贾举庆, 杨珍平, 吕晋慧, 高志强, 张春来. 普通小麦 JAZ 基因家族鉴定及其响应冻害时基因差异表达和 DNA 变异分析[J]. 植物生理学报, 2022, 58(10): 1873-1889.
- FAN JL, ZHU LX, GUO ZQ, YIN MJ, YANG BH, CHAI WT, ZHAO SS, SUN HQ, LI SS, DING PC, WANG AP, JIANG XD, JIA JQ, YANG ZP, LÜ JH, GAO ZQ, ZHANG CL. Identification of JAZ gene family and analysis on their differential expression under freezing stress and DNA variation in common wheat[J]. Plant Physiology Journal, 2022, 58(10): 1873-1889 (in Chinese).
- [18] CUEVAS HUGO E, KNOLL JOSEPH E, HARRISSHULTZ KAREN R, PUNNURI SOMASHEKHAR M. Genetic mapping of sugarcane aphid resistance in sorghum line SC112-14[J]. Crop Science, 2022, 62(6): 2267-2275.
- [19] ZHAO YM, MA XJ, ZHOU MM, WANG JY, WANG GY, SU CF. Validating a major quantitative trait locus and predicting candidate genes associated with kernel width through QTL mapping and RNA-sequencing technology using near-isogenic lines in maize[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 935654.
- [20] YANG B, WANG J, YU M, ZHANG ML, ZHONG YT, WANG TY, LIU P, SONG WB, ZHAO HM, FASTNER A, SUTER M, RENTSCH D, LUDEWIG U, JIN WW, GEIGER D, HEDRICH R, BRAUN DM, KOCH KE, McCARTY DR, WU WH, et al. The sugar transporter ZmSUGCAR1 of the nitrate transporter 1/peptide transporter family is critical for maize grain filling[J]. The Plant Cell, 2022, 34(11): 4232-4254.
- [21] FU YL, YI HY, BAO J, GONG JM. LeNRT2.3 functions in nitrate acquisition and long-distance transport in tomato[J]. FEBS Letters, 2015, 589(10): 1072-1079.
- [22] HUANG SJ, LIANG ZH, CHEN S, SUN HW, FAN XR, WANG CL, XU GH, ZHANG YL. A transcription factor, OsMADS57, regulates long-distance nitrate transport and root elongation[J]. Plant Physiology, 2019, 180(2): 882-895.
- [23] FENG HM, LI B, ZHI Y, CHEN JG, LI R, XIA XD, XU GH, FAN XR. Overexpression of the nitrate transporter, OsNRT2.3b, improves rice phosphorus uptake and translocation[J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(8): 1287-1296.
- [24] CHEN JG, QI TT, HU Z, FAN XR, ZHU LL, IQBAL MF, YIN XM, XU GH, FAN XR. OsNAR2.1 positively regulates drought tolerance and grain yield under drought stress conditions in rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 197.

- [25] PELLIZZARO A, CLOCHARD T, CUKIER C, BOURDIN C, JUCHAUX M, MONTRICHARD F, THANY S, RAYMOND V, PLANCHET E, LIMAMI AM, MORÈRE-LE PAVEN MC. The nitrate transporter MtNPF6.8 (MtNRT1.3) transports abscisic acid and mediates nitrate regulation of primary root growth in *Medicago truncatula*[J]. Plant Physiology, 2014, 166(4): 2152-2165.
- [26] SANDHU N, PRUTHI G, PRAKASH RAIGAR O, SINGH MP, PHAGNA K, KUMAR A, SETHI M, SINGH J, ADE PA, SAINI DK. Meta-QTL analysis in rice and cross-genome talk of the genomic regions controlling nitrogen use efficiency in cereal crops revealing phylogenetic relationship[J]. Frontiers in Genetics, 2021, 12: 807210.
- [27] SHI XL, CUI F, HAN XY, HE YL, ZHAO L, ZHANG N, ZHANG H, ZHU HD, LIU ZX, MA B, ZHENG SS, ZHANG W, LIU JJ, FAN XL, SI YQ, TIAN SQ, NIU JQ, WU HL, LIU XM, CHEN Z, et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses uncover the molecular basis of high nitrogen-use efficiency in the wheat cultivar Kenong 9204[J]. Molecular Plant, 2022, 15(9): 1440-1456.
- [28] BROEKGAARDEN C, SNOEREN TAL, DICKE M, VOSMAN B. Exploiting natural variation to identify insect-resistance genes[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(8): 819-825.
- [29] 刘国庆, 杜瑞恒, 侯升林, 吕芑, 籍贵苏, 李素英. 高粱抗蚜研究进展[J]. 植物学报, 2012, 47(2): 171-187.
- LIU GQ, DU RH, HOU SL, (LÜ/LV/LU/LYU) P, JI GS, LI SY. Resistance to aphids in *Sorghum*: a review[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2012, 47(2): 171-187 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)