

翟敏, 曹颖杰, 林晨俞, 等. 拟南芥异源过表达木薯 *MeNRT2.6* 基因对氮素利用效率的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2025, 46(4): 459-470.
ZHAI Min, CAO Yingjie, LIN Chenyu, et al. Effects of heterologously overexpressing *Manihot esculenta* Crantz *MeNRT2.6* gene in *Arabidopsis thaliana* on nitrogen utilization efficiency[J]. Journal of South China Agricultural University, 2025, 46(4): 459-470.

拟南芥异源过表达木薯 *MeNRT2.6* 基因对氮素利用效率的影响

翟敏^{1,2,3}, 曹颖杰^{2,4}, 林晨俞^{2,3,4}, 赵平娟^{2,3}, 李文彬^{2,3}, 于晓玲^{2,3},
廖文彬^{2,3}, 阮孟斌^{2,3}, 邹良平^{2,3}, 李壮¹

(1 四川农业大学 农学院, 四川 成都 611130; 2 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101; 3 中国热带农业科学院 三亚研究院/热带农业资源研究院, 海南 三亚 572024; 4 海南大学 热带农林学院, 海南 海口 570228)

摘要:【目的】高亲和硝酸盐转运蛋白家族 2(Nitrate transporter 2, NRT2) 基因在低氮条件下上调表达可促进植物对氮素的有效吸收, 对提升植物耐低氮胁迫能力至关重要。本研究聚焦木薯 *Manihot esculenta* Crantz 的 *MeNRT2.6* 基因功能研究, 通过在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中异源过表达 *MeNRT2.6*, 解析 *MeNRT2.6* 在氮素利用效率方面的功能, 为提高氮素利用效率的定向分子育种提供理论和技术支撑。【方法】以转录组筛选出的低氮条件下在木薯根、茎、叶中均具有较高表达的 *MeNRT2.6* 基因作为研究对象, 以木薯 C3 品种的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增获得 *MeNRT2.6* 基因片段。通过生物信息学和组织表达分析, 并结合原生质体瞬时表达系统确定 *MeNRT2.6* 的表达组织和亚细胞定位模式。利用浸花法创制在拟南芥中异源过表达 *MeNRT2.6* 的转基因株系, 测定转基因株系在低、高浓度硝态氮条件下生理指标以及 4 个氮代谢关键酶——硝酸还原酶 (Nitrate reductase, NR)、亚硝酸还原酶 (Nitrite reductase, NiR)、谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 和谷氨酸合成酶 (Glutamate synthase, GOGAT) 的活性。【结果】*MeNRT2.6* 与毛果杨 PtNRT2.7 的亲缘关系最近, 氨基酸序列相似性达 74.5%; 其启动子序列存在逆境和激素类顺式响应元件。*MeNRT2.6* 蛋白定位于细胞膜。在 0.5 mmol/L 硝态氮处理下, *MeNRT2.6* 根据不同处理方式分别在木薯根、茎、叶中被诱导表达; 在 39.5 mmol/L 硝态氮处理下, *MeNRT2.6* 基因只在叶中被诱导表达, 而与处理方式无关。0.5 mmol/L 硝态氮胁迫下异源过表达 *MeNRT2.6* 基因的拟南芥转基因株系的根长、株高、鲜质量增加, 氮代谢关键酶 GOGAT、NR 活性显著提升。【结论】木薯 *MeNRT2.6* 基因启动子区域存在低氮响应元件, 在拟南芥中异源表达 *MeNRT2.6* 基因能提高植株的氮素利用效率, 对木薯氮高效种质的开发具有参考意义。

关键词: 木薯; *MeNRT2.6* 基因; 异源过表达; 硝态氮胁迫; 氮素利用; 评价指标

中图分类号: S533

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2025)04-0459-12

Effects of heterologously overexpressing *Manihot esculenta* Crantz *MeNRT2.6* gene in *Arabidopsis thaliana* on nitrogen utilization efficiency

收稿日期: 2024-10-21 网络首发时间: 2025-06-18 09:08:09

首发网址: <https://link.cnki.net/urlid/44.1110.S.20250617.1726.002>

作者简介: 翟敏, E-mail: 1872765550@qq.com; 通信作者: 邹良平, 主要从事木薯营养分子生物学及应用研究, E-mail: zouliangping@itbb.org.cn; 李壮, 主要从事油菜品质改良、花青素代谢合成调控研究, E-mail: lizhuang2012@sicau.edu.cn

基金项目: 海南省科技专项 (ZDYF2023XDNY179); 海南省自然科学基金 (322MS146); 中国热带农业科学院热带生物技术研究所基本科研业务费 (1630052022026)

ZHAI Min^{1,2,3}, CAO Yingjie^{2,4}, LIN Chenyu^{2,3,4}, ZHAO Pingjuan^{2,3}, LI Wenbin^{2,3}, YU Xiaoling^{2,3},
LIAO Wenbin^{2,3}, RUAN Mengbin^{2,3}, ZOU Liangping^{2,3}, LI Zhuang¹

(1 College of Agriculture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2 Institute of Tropical Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 3 Sanya Research Institute/Institute of Tropical Agricultural Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya 572024, China; 4 School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: **【Objective】** The high-affinity nitrate transporter family 2 (NRT2), when upregulated under low nitrogen conditions, enhances plants' efficient nitrogen uptake and plays a crucial role in improving plant tolerance to low nitrogen stress. This study focused on functional characterization of the *MeNRT2.6* gene in cassava (*Manihot esculenta* Crantz), by examining the effects of heterologous overexpression of cassava *MeNRT2.6* in *Arabidopsis thaliana* on nitrogen use efficiency, to provide both theoretical foundation and technical support for targeted molecular breeding aimed at improving nitrogen utilization efficiency. **【Method】** The *MeNRT2.6* gene, which was identified through transcriptome screening as being highly expressed in cassava roots, stems and leaves under low nitrogen conditions, was selected as the research subject. The *MeNRT2.6* gene fragment was obtained by PCR amplification using cDNA from cassava cultivar C3 as template. Bioinformatics analysis and tissue expression profiling were performed, and the tissue expression pattern and subcellular localization of *MeNRT2.6* were determined combining a protoplast transient expression system. The transgenic *A. thaliana* lines heterologously overexpressing *MeNRT2.6* were generated via the floral dip method. The SPAD values and the activities of four key nitrogen metabolism enzymes, including nitrate reductase (NR), nitrite reductase (NiR), glutamine synthetase (GS), and glutamate synthase (GOGAT), under low and high nitrate conditions were measured. **【Result】** Phylogenetic analysis showed that *MeNRT2.6* was most closely related to *PtNRT2.7* from *Populus trichocarpa*, with 74.5% amino acid sequence similarity. Its promoter sequence contains stress- and hormone-responsive *cis*-elements. *MeNRT2.6* protein was localized to the cell membrane. Under 0.5 mmol/L nitrate nitrogen treatment, *MeNRT2.6* expression was induced in cassava roots, stems and leaves depending on the treatment method. Under 39.5 mmol/L nitrate nitrogen treatment, *MeNRT2.6* expression was specifically induced in leaves regardless of treatment method. Furthermore, *A. thaliana* plants heterologously overexpressing *MeNRT2.6* showed increased root length, plant height and fresh weight under 0.5 mmol/L nitrate nitrogen treatment, along with enhanced activities of key nitrogen metabolism enzymes GOGAT and NR. **【Conclusion】** The *MeNRT2.6* promoter contains low nitrogen-responsive elements. Heterologous overexpression of *MeNRT2.6* in *A. thaliana* improved nitrogen use efficiency, providing valuable insights for developing nitrogen-efficient cassava germplasms.

Key words: *Manihot esculenta* Crantz; *MeNRT2.6* gene; Heterologous overexpression; Nitrate nitrogen stress; Nitrogen utilization; Evaluation indicator

氮素作为一种关键的矿质营养元素^[1], 不仅参与众多生物大分子的结构构成, 其供给水平还直接影响农作物的产量和品质; 但过度施用所导致的土壤酸化、温室气体排放、水体富营养化和生产成本增加等问题日益突出^[2]。木薯 *Manihot esculenta* Crantz (Cassava) 作为热带地区第三大粮食作物, 粗生易栽, 适应性强, 在干旱贫瘠的山地丘陵地带也能获得较高产量^[3-7]。木薯特殊的形态特征、生理生化特性和自我调节机制, 使其具有较高的养分利用

效率^[8]; 挖掘木薯氮高效基因, 对于木薯及其他作物氮高效种质资源的改良和培育至关重要。高亲和硝酸盐转运蛋白家族 2 (Nitrate transporter 2, NRT2) 基因在低氮条件下的上调表达可提高作物对氮素的有效吸收, 对作物耐低氮胁迫至关重要^[9-12]。木薯 NRT2 有 6 个成员^[13], 其中, 木薯 *MeNRT2.6* 是拟南芥 *AtNRT2.7*、毛果杨 *PtNRT2.7*、水稻 *OsNRT2.4*、油菜 *BnNRT2.7a/b* 等的同源基因^[14-19]。毛果杨 *PtNRT2.7* 可以被硝酸盐以及水杨

酸、茉莉酸、赤霉素、生长素等多种激素诱导, 并且能够促进植物根系生长, 调控叶片硝酸盐同化和再吸收之间的平衡, 提高植物对氮素的吸收利用^[20]。花生 *AhNRT2.7* 能够响应低氮胁迫, 提高植物氮吸收和转运能力^[21]。与其他基因不同的是, *OsNRT2.4* 为双亲和力硝酸盐转运蛋白基因, 其表达受硝酸盐、生长素和茉莉酸的诱导, 调控水稻根系生长以及根、叶中硝酸盐向其他器官的分配^[17-18, 22]。因此, 本研究推测木薯 *MeNRT2.6* 可能也在硝酸盐转运、分配以及氮高效利用方面具有相似的功能。

本研究从低氮条件下 RNA-seq 差异基因数据中挖掘并克隆木薯 *MeNRT2.6* 基因, 通过浸花法获得转基因拟南芥 *Arabidopsis thaliana*, 解析 *MeNRT2.6* 在氮素利用效率方面的功能, 以期为木薯氮高效种质资源的筛选和创制提供一定的技术支持。

1 材料与方法

1.1 低氮条件下 RNA-seq 差异基因分析

为了筛选响应低氮诱导的木薯 NRT2 家族基因, 本研究使用中国热带农业科学院热带生物技术研究所木薯逆境生物学研究课题组已有的转录组数据^[23] 进行分析, 使用的材料为木薯栽培种 C3, 处理方式: 低氮 (0.2 mmol/L KNO₃ 溶液) 以及高氮 (10.0 mmol/L KNO₃ 溶液)。使用转录组数据分析响应低氮诱导的 *MeNRT2* 基因, 筛选条件为差异倍数 (Fold change, FC) ≥ 2、校正后 *P* ≤ 0.001。

1.2 生物信息学分析

从 JGI 植物基因组数据库以及 NCBI 数据库下载木薯 *MeNRT2.6* 和其他物种同源基因序列信息, 使用 MEGA11 软件的 ClustalW 算法进行多序列比对, 比对完成后, 采用邻接法 (Neighbor-joining algorithm) 构建进化树, bootstrap 值设置为 1 000。构建完成后, 使用在线工具 iTOL 美化进化树。利用在线分析工具 SWISS-MODEL、SPOMA 对 *MeNRT2.6* 蛋白进行结构预测分析。使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线工具对木薯 NRT2 蛋白结构域进行预测分析。木薯 *MeNRT2.6* 基因及其同源基因启动子序列从 NCBI 数据库中提取, 大小均为上游 2 000 bp。利用 PlantCARE 在线网站进行顺式作用元件预测分析, 并将结果通过 TBtools 软件进行可视化分析。

1.3 *MeNRT2.6* 基因的克隆

从木薯基因组数据库下载木薯 *MeNRT2.6* 基因序列信息, 使用 Primer5.0 软件设计特异引物, 引物

序列见表 1。以木薯 C3 叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。

表 1 引物名称及序列
Table 1 Primer names and sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
HYG-F	ATGAAAAAGCCTGAAC TCACC
HYG-R	CTATTTCTTTGCCCTCGGACG
GFP-F	ACAAGTTCAGCGTGTCCG
GFP-R	CTCGTTGGGGTCTTTGCT
Xba I/NRT2.6cds-F	GCTCTAGAGC/CATGGCTCAATC TCTTCTCCTGC
Kpn I/NRT2.6cds-R	GGGGTACCCC/GGTAATCTTCAG CATCTTCGGCAG
MeActin-F	TGATGAGTCTGGTCCATCCA
MeActin-R	CCTCTACGACCCAATCTCA
MeCN2.6-F	TCTGCGATCTCCTGGGTCTCTC
MeCN2.6-R	ATCCAGAACTGATTAGCGACGAAG

1.4 *MeNRT2.6* 蛋白亚细胞定位

将 *MeNRT2.6* 基因 CDS 全长构建于 16318-hGFP 表达载体, 将连接产物转化至大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α , 并将测序正确的重组载体质粒在拟南芥原生质体中瞬时表达。

1) 原生质体制备: 挑取长势良好的拟南芥叶片在超净工作台中切成 0.5~1.0 mm 宽的细丝, 放入装有已过滤除菌的酶解液的无菌锥形瓶中, 遮光处理后放入转速为 50 r/min 的摇床中酶解 2~3 h; 加入等体积的 W5 缓冲液终止酶解反应, 用去掉针头的注射器吸取酶解产物, 用 70 μ m 孔径 Cell Strainer 过滤至无菌锥形瓶中; 4 $^{\circ}$ C、800 r/min 离心 8 min, 弃上清液。向锥形瓶缓缓加入 10 mL 预冷 W5 缓冲液, 4 $^{\circ}$ C、800 r/min 离心 8 min, 弃上清液; 缓慢加入 10 mL 预冷 W5 缓冲液重悬原生质体, 冰浴 30 min; 4 $^{\circ}$ C、800 r/min 离心 8 min, 弃上清液; 用 MMG 缓冲液重悬原生质体。

2) 原生质体转化: 取 200 μ L 原生质体放入 2 mL EP 管中, 加入 10 μ g 重组质粒 16318-MeNRT2.6-hGFP(去内毒素), 轻弹管壁混匀, 室温放置 5 min。加入 210 μ L PEG 溶液, 立即轻柔颠倒混匀, 室温放置 20 min; 在室温下, 于 800 r/min 轻柔离心 8 min, 弃上清液; 用 1 mL WI 缓冲液重悬原生质体, 弱光下室温孵育过夜。在室温下, 于 800 r/min 轻柔离心 8 min, 弃上清液; 加入 1 mL WI 缓冲液重悬原生质体, 在室温下, 于 800 r/min 轻柔离心 8 min, 弃上清液; 重复上一步操作; 加入 100 μ L WI 缓冲液, 取 20 μ L 重悬液于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.5 木薯 *MeNRT2.6* 基因表达模式分析

为明确木薯 *MeNRT2.6* 基因在不同硝态氮处理条件下的表达模式, 分别提取不同硝态氮处理的木薯 C3 组培苗的根、茎、叶 RNA, 反转录后通过 RT-qPCR 进行表达模式分析。

1.5.1 材料处理 选取长势、长度、粗细等一致的木薯 C3 茎尖, 分别扦插于 MS 培养基 (NH_4^+ 浓度 19.5 mmol/L、 NO_3^- 浓度 39.5 mmol/L) 中生根发芽, 30 d 后木薯茎尖已长为幼苗。将生长发育状态基本一致的木薯 C3 组培苗在不同 KNO_3 浓度培养基中进行处理。

处理 1: 将木薯幼苗移至 0.5 mmol/L KNO_3 培养基 (NH_4^+ 浓度与 MS 培养基一致, 19.5 mmol/L) 中处理 6 d。

处理 2: 将木薯幼苗移至无氮条件处理 6 d 后, 直接转入 0.5 mmol/L KNO_3 培养基 (NH_4^+ 浓度为 0) 中处理 6 d。

处理 3: 将木薯幼苗无氮处理 6 d 后, 转入 39.5 mmol/L KNO_3 培养基 (NH_4^+ 浓度为 0) 中处理 6 d。

处理 4: 将木薯幼苗无氮处理 6 d 后, 先转入 0.5 mmol/L KNO_3 培养基 (NH_4^+ 浓度为 0) 中处理 6 d, 再移至 39.5 mmol/L KNO_3 培养基 (NH_4^+ 浓度为 0) 中处理 6 d。

处理 5: 将木薯幼苗无氮处理 6 d 后, 先转入 39.5 mmol/L KNO_3 培养基 (NH_4^+ 浓度为 0) 中处理 6 d, 再转至 0.5 mmol/L KNO_3 培养基 (NH_4^+ 浓度为 0) 中处理 6 d。

植株幼苗生长条件为光周期 12 h 光/12 h 暗、温度 25 ℃、相对湿度 50%。分别采集各处理幼苗根、茎、叶肉、叶脉、叶柄作为试验材料, 用液氮速冻后储存于-80 ℃ 冰箱内备用。

1.5.2 RT-qPCR 按照天根生物的 RNAPrep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书进行木薯 RNA 提取, 并利用艾科瑞生物科技有限公司的 EvoM-MLV 反转录预混型试剂盒将木薯 RNA 反转录为 cDNA。使用 SYBR Green Pro Taq HS 预混 qPCR 试剂盒进行 RT-qPCR 检测, 以 *MeActin* 为内参基因, 每个反应设 3 次生物学重复, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析结果, 使用 GraphPad Prism 8.3 进行制图和差异显著性分析。

1.6 *MeNRT2.6* 基因过表达拟南芥株系构建

采用浸花法构建异源表达拟南芥株系: 设计基因特异引物, 引物序列见表 1, 构建植物表达载体 pCambia1300-*MeNRT2.6*-GFP, 提取质粒后进行农杆菌 LBA4404 转化, 摇菌至 $D_{600\text{nm}} = 0.4\sim 0.5$, 浸

染拟南芥花序。收获的种子在含有 30 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的选择性培养基上进行筛选, 以获得带有目标基因的转基因植株 T_2 代纯合种子。利用天根生物的高效植物基因组 DNA 提取试剂盒提取初步筛选的 T_2 代转基因拟南芥植株叶片 DNA 和 RNA, 通过 PCR、RT-qPCR 进一步筛选并鉴定阳性植株。

1.7 低/高浓度硝态氮处理下过表达及野生型拟南芥氮同化关键酶活性等指标测定

将拟南芥种子消毒后播种于 MS 培养基中生根发芽, 待长出 2 片子叶后, 选取长势一致的幼苗分别移栽于 0.5、39.5 mmol/L KNO_3 培养基中处理 7 d。每个处理分别选取 6 棵植株进行指标检测: 用直尺测量植株的根长、株高; 擦干植株表面水分, 利用分析天平称量植株鲜质量; 分别采用苏州科铭生物技术有限公司的硝酸还原酶 (Nitrate reductase, NR) 活性测定试剂盒 (微量法)、亚硝酸还原酶 (Nitrite reductase, NiR) 试剂盒 (微量法)、谷氨酸合成酶 (Glutamate synthase, GOGAT) 试剂盒 (微量法)、谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 试剂盒 (微量法) 进行氮同化关键酶活性检测, 每个处理设置 3 次生物学重复, 取试验结果平均值进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 低浓度硝态氮条件下木薯 *MeNRT2* 基因的转录组数据

利用已有的转录组数据^[23], 从低氮处理中筛选低氮条件下表达量较高的 *MeNRT2* 基因。结果如图 1 所示: 低氮条件下, 根中表达量最高的基因为 *MeNRT2.2* 和 *MeNRT2.6*, 并且与 *MeNRT2.2* 基因不同的是, *MeNRT2.6* 基因在根、茎、叶中均有较高表达。

2.2 木薯 *MeNRT2.6* 蛋白系统进化

为研究木薯 *MeNRT2.6* 蛋白与其他物种中同源蛋白的亲缘关系, 本研究采用 MEGA 软件中的邻接法对木薯 *MeNRT2* 蛋白家族 (6 个成员)、拟南芥 *AtNRT2* 家族 (7 个成员) 以及玉米部分 *ZmNRT2* 家族 (5 个成员)、水稻 *OsNRT2* 家族 (4 个成员)、草莓 *FvNRT2.7*、毛果杨 *PtNRT2* 家族 (5 个成员)、番茄 *SINRT2.7* 以及 *LeNRT2* 家族 (4 个成员)、小麦 *TaNRT2-7A/B/D*、花生 *AhNRT2.7a/b*、白菜 *BnNRT2.7a/b*、烟草 *NtNRT2.4* 进行进化分析, 结果如图 2 所示。木薯 *MeNRT2.6* 蛋白与毛果杨 *PtNRT2.7* 亲缘关系最近, 序列相似性为 74.5%。与 *MeNRT2* 其他成员相比, *MeNRT2.5* 与 *MeNRT2.6* 的序列相似性较高, 也仅为 60.1%。上述结果表明, 木薯 *MeNRT2.6* 蛋白与毛果杨

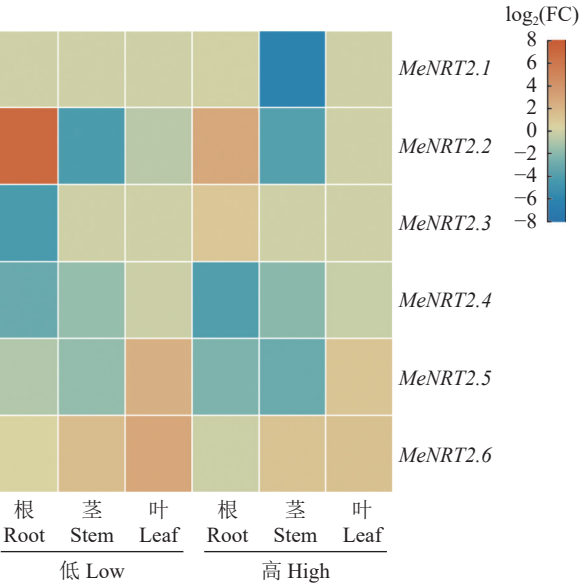


图 1 低、高浓度硝态氮条件下木薯 *MeNRT2* 基因转录组热图

Fig. 1 Transcriptome heatmap of cassava *MeNRT2* gene under low and high nitrate nitrogen conditions

PtNRT2.7 蛋白相似度较高, 推测二者功能可能存在一定相似性。

使用 SMART 在线工具对 *MeNRT2* 蛋白进行结构域预测, 6 个 *MeNRT2* 蛋白编码序列高度保守, 均包含 MFS_1 结构域和跨膜结构域。

2.3 木薯 *MeNRT2.6* 基因启动子顺式作用元件

通过 PlantCARE 网站对木薯 *MeNRT2.6* 基因及其他物种中同源基因上游 2 000 bp 启动子序列的顺式作用元件进行分析。木薯 *MeNRT2.6* 基因启动子顺式作用元件除包含大量的光响应元件外, 存在低氮、干旱等逆境类响应元件 (MYB、Myb、MRE) 以及激素类响应元件 (ABRE、ERE、GA-motif、CGTCA-motif、TGACG-motif)。表明木薯

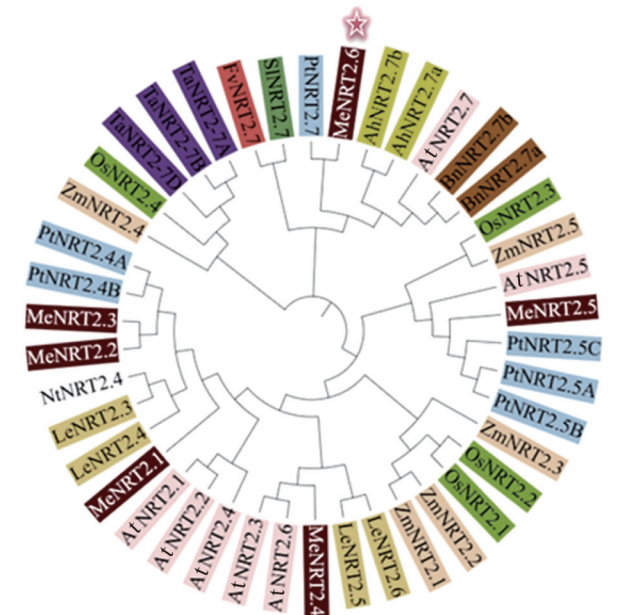


图 2 *MeNRT2.6* 蛋白系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *MeNRT2.6* protein

MeNRT2.6 基因除了受光、激素诱导外, 可能还参与植物低氮、干旱等逆境胁迫。

2.4 木薯 *MeNRT2.6* 蛋白结构

利用 SPOMA 以及 SWISS-MODEL 在线分析工具对木薯 *MeNRT2.6* 蛋白结构分析可知, *MeNRT2.6* 二级结构主要包括 α -螺旋、 β -折叠、延伸链和无规则卷曲, 其中 α -螺旋占比较高, 为 48.03%, 其次是无规则卷曲, 占比 30.26%。*MeNRT2.6* 蛋白三级结构主要包含 2 种单体, 分别为糖转运蛋白结构单体和 MFS 转运体的晶体结构。

2.5 木薯 *MeNRT2.6* 蛋白亚细胞定位

通过拟南芥原生质体瞬时表达, 在激光共聚焦显微镜下观察到, 16318-*MeNRT2.6*-hGFP 融合蛋白的绿色荧光信号出现在细胞膜上 (图 3), 并与膜定

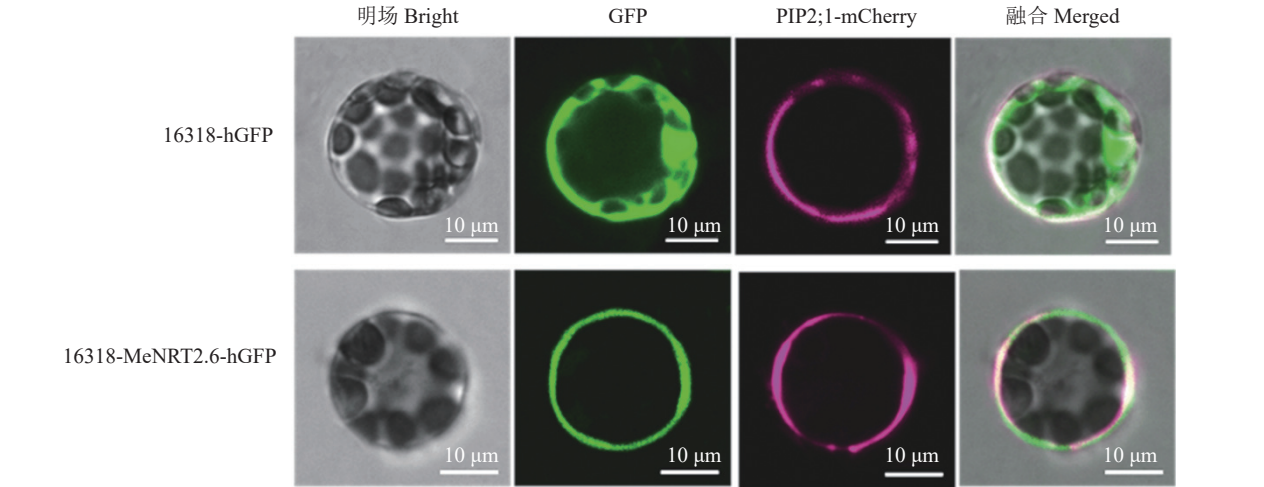


图 3 *MeNRT2.6* 蛋白亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of *MeNRT2.6* protein

位 marker 蛋白 PIP2;1-mCherry 的红紫光信号重合, 说明 MeNRT2.6 蛋白定位于细胞膜。

2.6 木薯 MeNRT2.6 基因表达模式

为了阐明不同硝态氮浓度下 MeNRT2.6 基因在木薯 C3 不同组织中的表达特性, 本研究分别提取低浓度和高浓度硝态氮处理木薯根、茎、叶脉、叶肉和叶柄 RNA, 反转录后进行 RT-qPCR 分析。

2.6.1 低浓度硝态氮处理下 MeNRT2.6 基因的表达模式 低氮处理分为 3 种处理方式, 分别为“1.5.1”的处理 1、2 和 5。处理 1 条件下 MeNRT2.6 基因主要在根中表达 (图 4A)。为消除 MS 培养基对木薯组培苗的影响, 随后统一对幼苗进行氮饥饿 (无氮) 处理 6 d, 再分别用不同浓度硝态氮进行处理。无氮处理后移入 0.5 mmol/L KNO₃ 处理 (处理 2), MeNRT2.6 基因主要在叶脉、茎中表达 (图 4B); 无

氮处理后先移入 39.5 mmol/L KNO₃ 处理, 再移入 0.5 mmol/L KNO₃ 处理 (处理 5), MeNRT2.6 基因主要在茎和叶肉中表达 (图 4C)。

在NH₄⁺存在时, 植株从 MS 培养基转移至低浓度硝态氮 (处理 1), MeNRT2.6 基因的表达主要在根中受到显著诱导 (图 5A)。而在没有NH₄⁺存在时, 植株从高浓度硝态氮 (MS 培养基) 转移至低浓度硝态氮 (处理 2 和 5), MeNRT2.6 基因主要在茎中表达, 不同浓度硝态氮处理下该基因在茎中的表达量无显著变化 (图 5B)。在没有NH₄⁺存在时, 植株从氮饥饿条件转至低浓度硝态氮处理 (处理 2), MeNRT2.6 基因主要在叶肉和叶脉中受显著诱导 (图 5C)。

2.6.2 高浓度硝态氮处理下 MeNRT2.6 基因的表达模式 高浓度硝态氮处理主要有 2 种方式, 即分别将木薯幼苗从无氮处理和低浓度硝态氮 (0.5

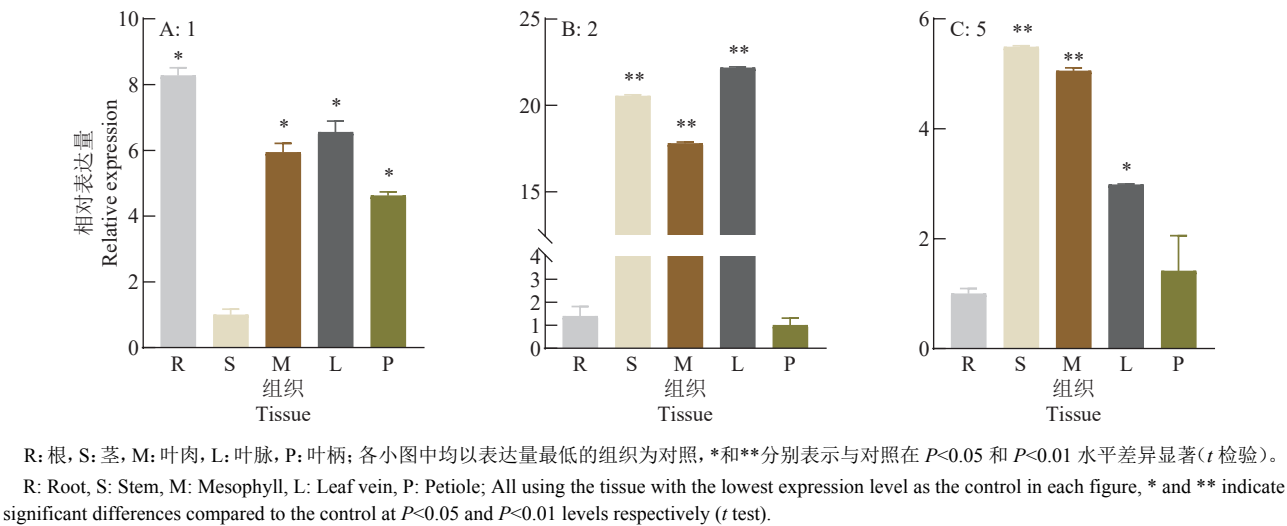


图 4 低浓度硝态氮处理 (1、2、5) 下木薯 MeNRT2.6 基因组织特异性表达

Fig. 4 Tissue-specific expression of cassava MeNRT2.6 gene under low concentration nitrate nitrogen treatment (1, 2, 5)

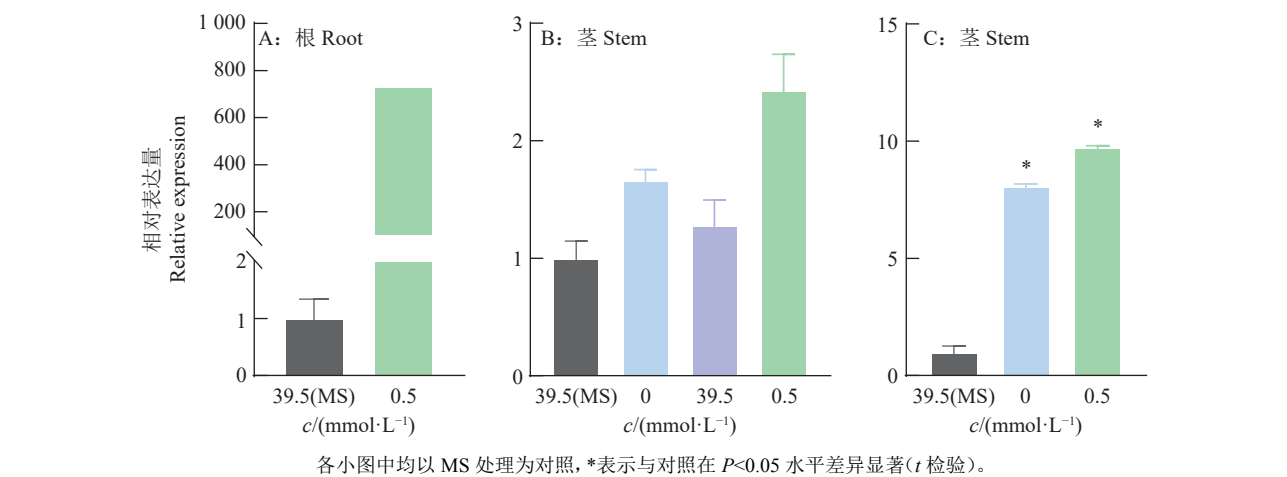


图 5 低浓度硝态氮处理下木薯 MeNRT2.6 基因的诱导表达

Fig. 5 Inducible expression of cassava MeNRT2.6 gene under low concentration nitrate nitrogen treatment

mmol/L KNO₃) 处理转移至高浓度硝态氮 (39.5 mmol/L KNO₃) 培养基 (处理 3、4)。RT-qPCR 结果表明, *MeNRT2.6* 在 2 种处理中均主要在叶肉和叶脉表达 (图 6)。

在这 2 种处理下, *MeNRT2.6* 基因在叶肉和叶脉中的表达模式大致相同, 均受氮饥饿处理显著抑制, 添加低浓度或高浓度硝态氮后, 抑制程度减弱 (图 7)。

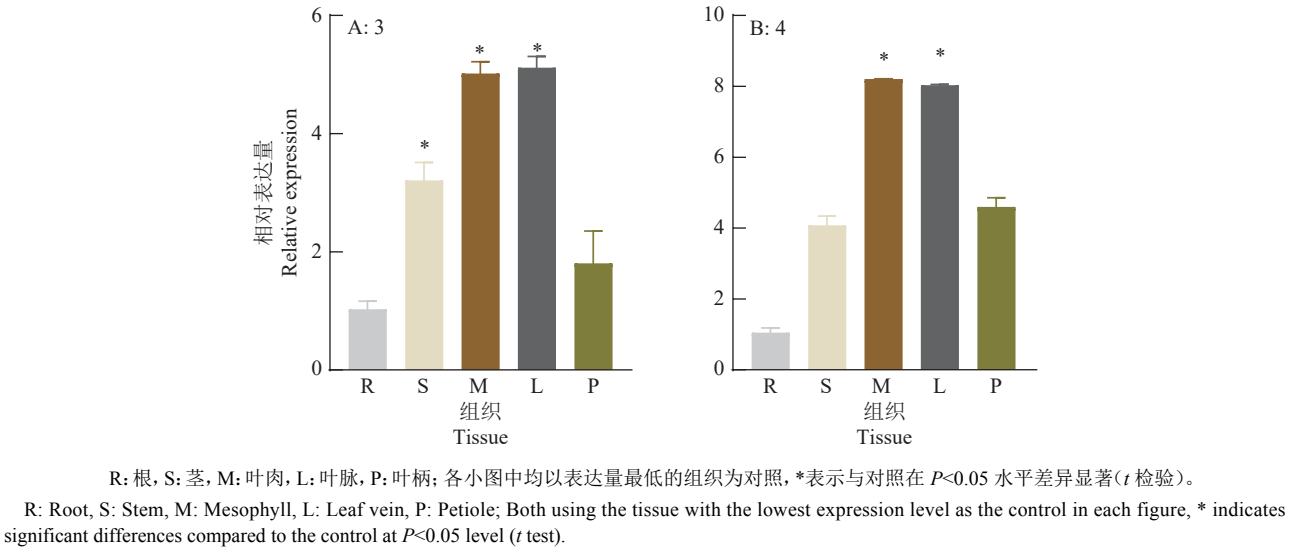


图 6 高浓度硝态氮处理 (3、4) 下木薯 *MeNRT2.6* 基因组织特异性表达

Fig. 6 Tissue-specific expression of cassava *MeNRT2.6* gene under high concentration nitrate nitrogen treatment (3, 4)

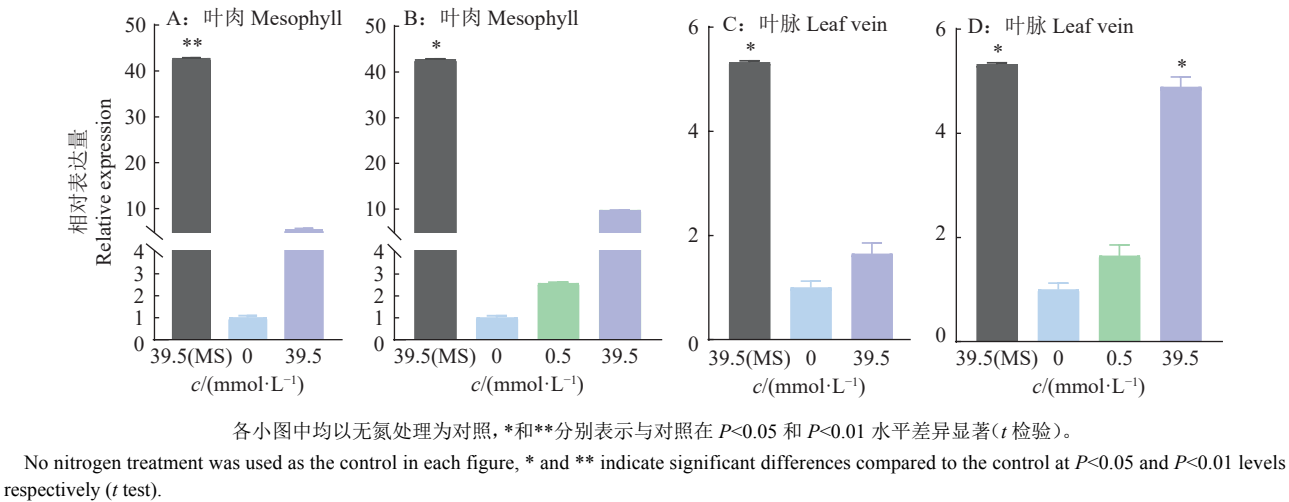


图 7 高浓度硝态氮处理下木薯 *MeNRT2.6* 基因的诱导表达

Fig. 7 Inducible expression of cassava *MeNRT2.6* gene under high concentration nitrate nitrogen treatment

2.7 拟南芥转基因植株鉴定

本研究通过浸花法创制稳定遗传的过表达 *MeNRT2.6* 基因的拟南芥 T₂ 代株系, 经 PCR(GFP 和 HYG 通用引物, 图 8A) 以及 RT-qPCR(图 8B) 鉴定, 以表达量最高的 3 个过表达纯系株系 OE2.6-1、OE2.6-2、OE2.6-6 作为后续研究对象。

2.8 低浓度硝态氮胁迫下过表达 *MeNRT2.6* 对拟南芥生长与氮代谢关键酶的影响

在无菌条件下, 待 *MeNRT2.6* 过表达纯系 OE2.6-1、OE2.6-2 和 OE2.6-6 转基因种子发芽长出

2 片子叶后分别转接至 0.5 mmol/L NO₃⁻ MS 培养基 (无 NH₄⁺) 中处理 7 d。肉眼可见, 过表达株系的茎段和叶柄部位偏紫色, 而野生型对照的相应部位并没有呈现出紫色表型 (图 9)。

进一步测量发现: 在 0.5 mmol/L NO₃⁻ 条件下, OE2.6-1、OE2.6-2 株系的主根长度分别为 5.90、5.35 cm, 均显著高于野生型 (3.28 cm)(图 10A)。3 个转基因株系的株高分别为 2.60、1.31、1.87 cm, 同样显著高于野生型 (0.61 cm) (图 10B)。过表达株系的鲜质量与野生型株系无显著差异 (图 10C)。

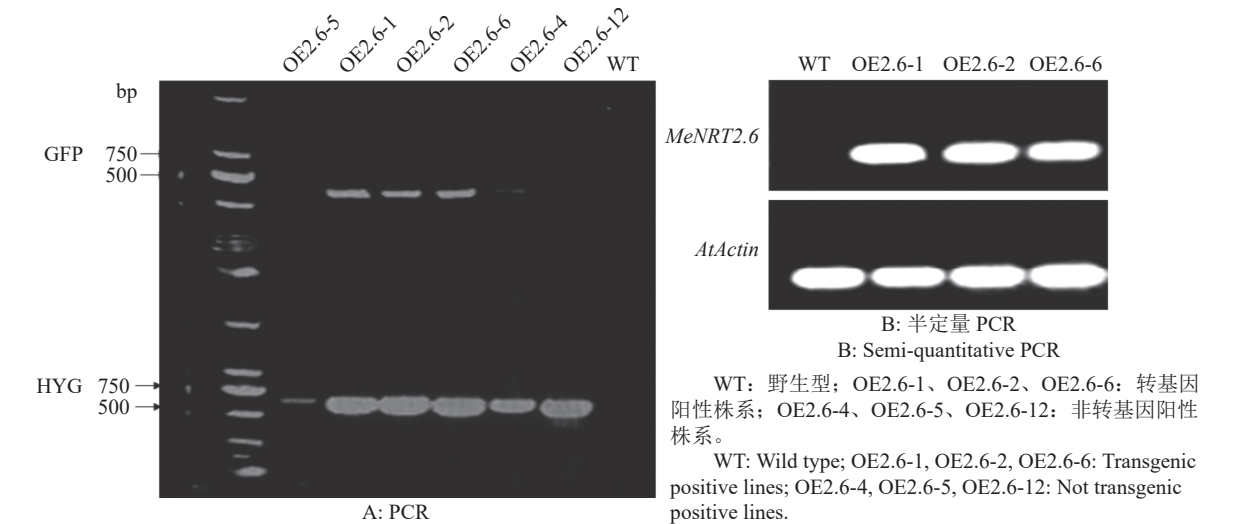


图 8 拟南芥 *MeNRT2.6* 过表达转基因株系鉴定

Fig. 8 Identification of *MeNRT2.6* overexpression transgenic lines in *Arabidopsis thaliana*

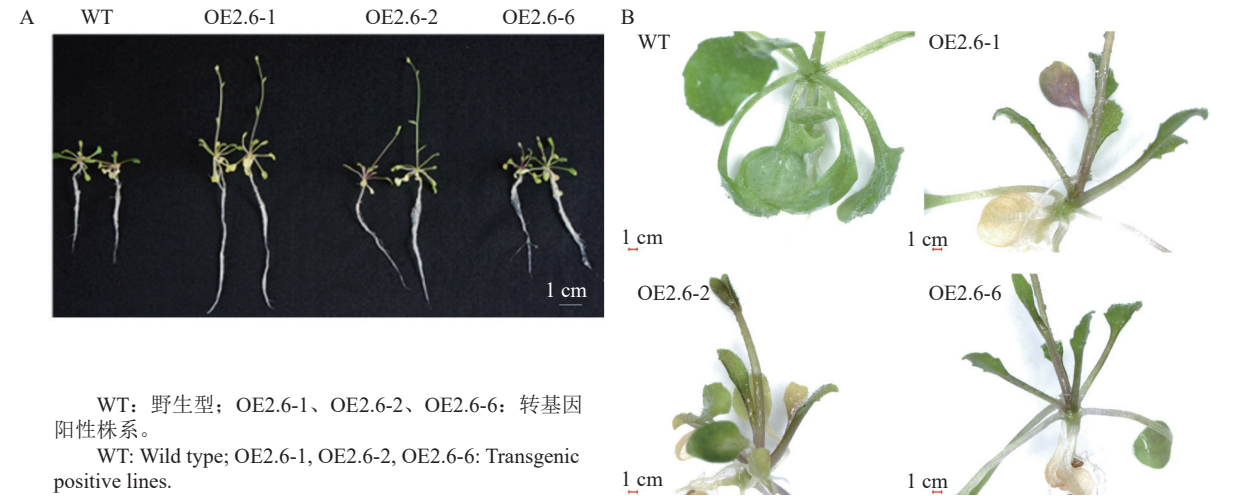


图 9 低浓度硝态氮胁迫下拟南芥 *MeNRT2.6* 过表达转基因植株表型

Fig. 9 Phenotype of *Arabidopsis thaliana* *MeNRT2.6* overexpression transgenic lines under low concentration nitrate nitrogen stress

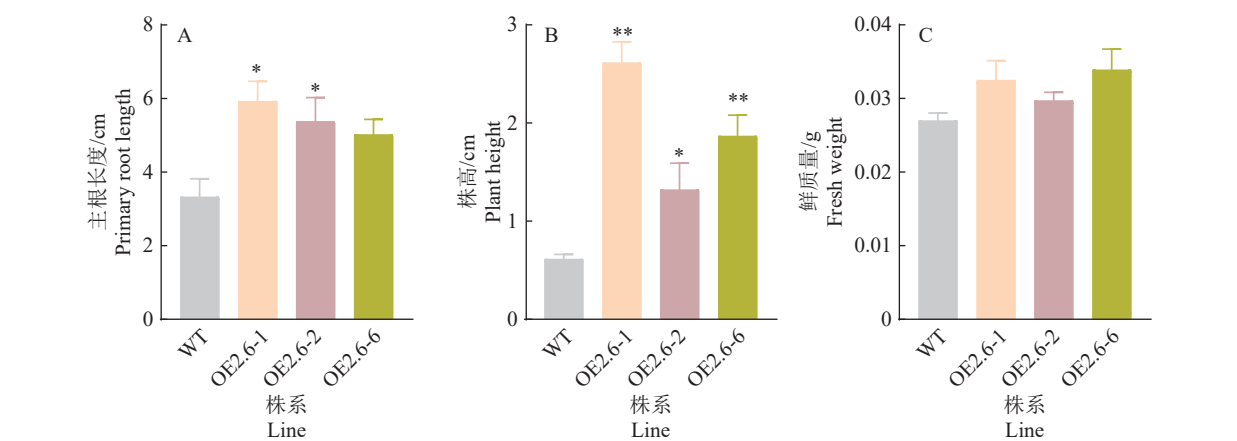
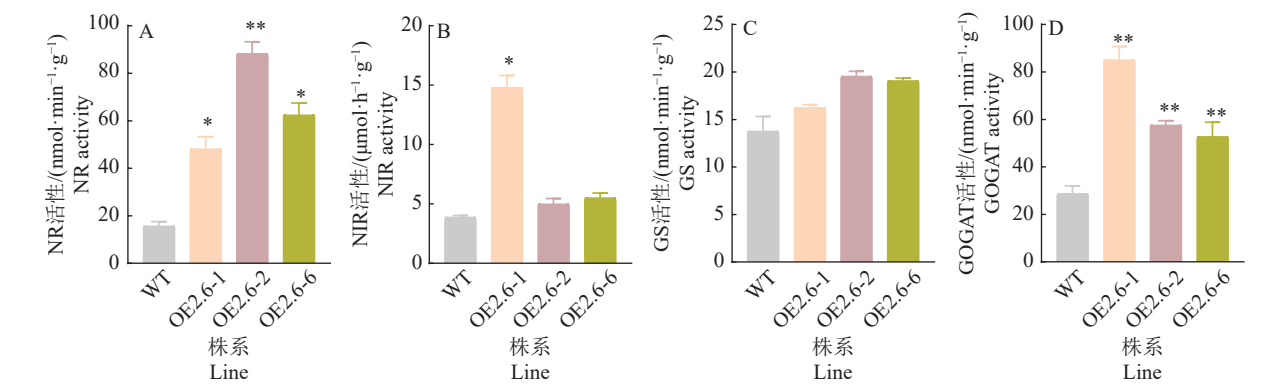


图 10 低浓度硝态氮胁迫下拟南芥 *MeNRT2.6* 过表达转基因株系表型指标

Fig. 10 Phenotypic indicators of *Arabidopsis thaliana* *MeNRT2.6* overexpression transgenic lines under low concentration nitrate nitrogen stress

为进一步明确低浓度硝态氮条件下在拟南芥中过表达 *MeNRT2.6* 是否会对植株氮素利用造成一定影响, 本研究对 3 个过表达株系与野生型的氮代谢关键酶活性进行了测定, 结果如图 11 所示。3 个转基因株系 OE2.6-1、OE2.6-2、OE2.6-6 的 NR 活性

分别为 48.06、88.25、62.35 nmol/(min·g), 显著高于野生型的 15.59 nmol/(min·g); 相较于野生型, 过表达转基因株系的 GS 活性提高了 18%~42%, NIR 活性提高了 28%~282%, GOGAT 活性提高了 94%~196%。



WT: 野生型; OE2.6-1、OE2.6-2、OE2.6-6: 转基因阳性株系。*和**分别表示与野生型在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著(t 检验)。
WT: Wild type; OE2.6-1, OE2.6-2, OE2.6-6: Transgenic positive lines. * and ** indicate significant differences compared to wild type at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels respectively (t test).

图 11 低浓度硝态氮胁迫下拟南芥 *MeNRT2.6* 过表达转基因株系氮代谢关键酶活性
Fig. 11 Key enzyme activities of nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana* *MeNRT2.6* overexpression transgenic lines under low concentration nitrate nitrogen stress

2.9 高浓度硝态氮处理下过表达 *MeNRT2.6* 对拟南芥生长与氮代谢关键酶的影响

本研究将已经生根发芽的野生型和 *MeNRT2.6* 过表达拟南芥株系移栽至添加有 39.5 mmol/L NO_3^- 的培养基中处理 7 d, 对转基因与野生型拟南芥的生理指标进行测定, 结果如图 12、13 所示。高浓度硝态氮处理 7 d 后, 过表达转基因株系 OE2.6-1、OE2.6-2、OE2.6-6 的主根长度分别为 8.33、9.10、8.31 cm, 野生型为 6.55 cm; 在株高方面, 仅 OE2.6-6 显著高于野生型; 转基因株系 OE2.6-1、OE2.6-2、

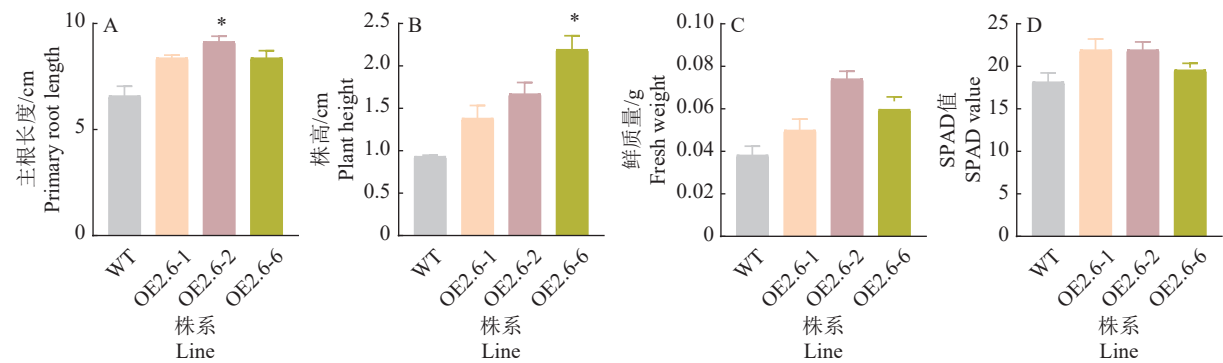
OE2.6-6 的植株鲜质量与野生型均无显著差异, 分别为 0.050、0.074、0.059、0.038 g, SPAD 值也均无显著差异。

为进一步明确高浓度硝态氮条件下在拟南芥中过表达 *MeNRT2.6* 是否会对植株氮素利用造成一定影响, 本研究对 3 个过表达株系与野生型的氮代谢关键酶活性进行了测定, 结果如图 14 所示。3 个转基因株系中仅 OE2.6-6 的 NR 活性与野生型差异显著, 分别为 116.90、44.81 nmol/(min·g) (图 14A)。OE2.6-1、OE2.6-6 的 NIR 活性分别为 9.89、10.21



WT: 野生型; OE2.6-1、OE2.6-2、OE2.6-6: 转基因阳性株系。
WT: Wild type; OE2.6-1, OE2.6-2, OE2.6-6: Transgenic positive lines.

图 12 高浓度硝态氮处理下拟南芥 *MeNRT2.6* 过表达转基因株系表型
Fig. 12 Phenotype of *Arabidopsis thaliana* *MeNRT2.6* overexpression transgenic lines under high concentration nitrate nitrogen treatment

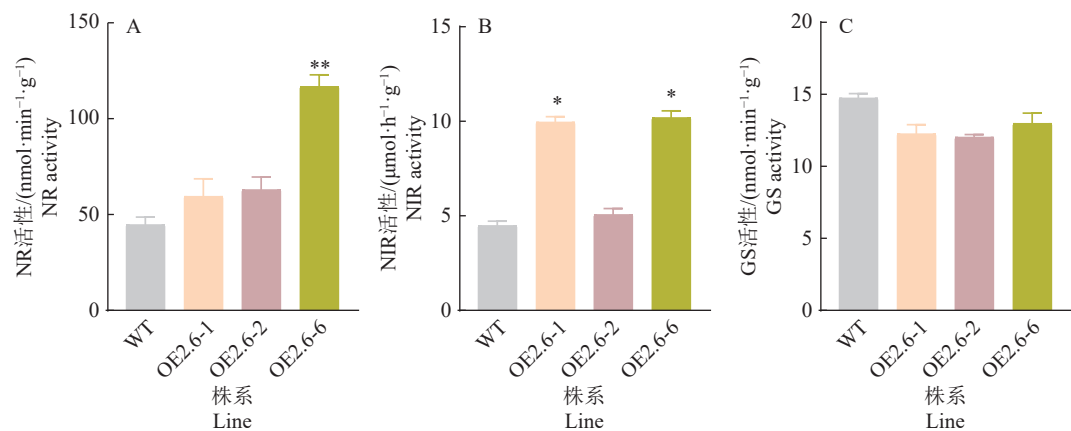


WT: 野生型; OE2.6-1、OE2.6-2、OE2.6-6: 转基因阳性株系。*表示与野生型在 $P<0.05$ 水平差异显著(t 检验)。

WT: Wild type; OE2.6-1, OE2.6-2, OE2.6-6: Transgenic positive lines. * indicates significant differences compared to wild type at $P<0.05$ level (t test).

图 13 高浓度硝态氮处理下拟南芥 *MeNRT2.6* 过表达转基因株系生理指标

Fig. 13 Physiological indicators of *Arabidopsis thaliana* *MeNRT2.6* overexpression transgenic lines under high concentration nitrate nitrogen treatment



WT: 野生型; OE2.6-1、OE2.6-2、OE2.6-6: 转基因阳性株系。*和**分别表示与野生型在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著(t 检验)。

WT: Wild type; OE2.6-1, OE2.6-2, OE2.6-6: Transgenic positive lines. * and ** indicate significant differences compared to wild type at $P<0.05$ and $P<0.01$ levels respectively (t test).

图 14 高浓度硝态氮处理下拟南芥 *MeNRT2.6* 过表达转基因株系氮代谢关键酶活性

Fig. 14 Key enzyme activities of nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana* *MeNRT2.6* overexpression transgenic lines under high concentration nitrate nitrogen treatment

$\mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$, 显著高于 WT 株系的 $4.45\ \mu\text{mol}/(\text{h}\cdot\text{g})$ (图 14B)。3 个转基因株系的 GS 活性略低于野生型, 但差异并不显著 (图 14C)。

3 讨论与结论

硝酸盐的吸收和利用是氮素有效利用的关键因素。NRT2 是植物氮吸收和转运系统中重要的生物大分子之一^[24-25], 在低浓度外源硝酸盐的吸收和利用中发挥重要作用^[10, 26-28]。在对木薯 *MeNRT2.6* 同源基因的研究中发现, 部分同源基因与植物氮素利用效率、根系生长高度相关^[14, 20-21], 在植物氮高效种质资源的开发和利用中具有较高潜力^[29-31]; 如氮利用效率相关参数与番茄 RO(基因型) 芽中 *SINRT2.7* 表达水平具有强相关性^[14], 过表达 *AhNRT2.7a* 能显著提高花生的氮素利用效率^[21] 等。

本研究以转录组筛选出的低氮条件下在木薯

根、茎、叶中均具有较高表达的 *MeNRT2.6* 基因作为研究对象。以木薯 C3 品种的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增获得 *MeNRT2.6* 基因片段, 由生物信息学与原生质体亚细胞定位分析可知, 木薯 *MeNRT2.6* 蛋白定位于细胞膜, 预测其三级结构含有糖转运蛋白结构单体和 MFS 转运体的晶体结构, 与前人研究结果^[32] 相似。唐贤礼等^[20] 研究表明, 毛果杨 *PtNRT2.7* 能够被茉莉酸、赤霉素等多种激素诱导, 并且参与调控叶片硝酸盐通量平衡^[20]。由生物信息学分析可知, 木薯 *MeNRT2.6* 与毛果杨 *PtNRT2.7* 蛋白的亲缘关系最近, 氨基酸序列相似性为 74.5%; 并且, 二者启动子区域均存在低氮、干旱等逆境类响应元件 (MYB、Myb、MRE) 以及赤霉素、生长素、茉莉酸等激素类响应元件 (ABRE、ERE、GA-motif、CGTCA-motif、TGACG-motif)。以上结果表明, 木薯 *MeNRT2.6* 蛋白可能与毛果杨 *PtNRT2.7*

功能相似,能响应多种激素信号并参与抵抗逆境胁迫^[20]。

为明确 *MeNRT2.6* 基因的表达模式,对木薯 *MeNRT2.6* 基因进行了 2 种硝态氮处理试验,分别为 0.5 mmol/L 低浓度硝态氮胁迫试验以及 39.5 mmol/L 高浓度硝态氮处理试验。其中,低浓度硝态氮胁迫试验分为 3 种处理,即 0.5 mmol/L KNO₃ (19.5 mmol/L NH₄⁺) 培养基中处理 6 d(处理 1);无氮处理 6 d 后,转入 0.5 mmol/L KNO₃ 培养基(无 NH₄⁺) 中处理 6 d(处理 2);无氮处理 6 d 后,先转入 39.5 mmol/L KNO₃ 培养基(无 NH₄⁺) 中处理 6 d,再转至 0.5 mmol/L KNO₃ 培养基(无 NH₄⁺) 中处理 6 d(处理 5)。在高浓度 NH₄⁺ (19.5 mmol/L) 存在时,植株从高浓度硝态氮移至低浓度硝态氮, *MeNRT2.6* 基因的表达主要在根中受到显著诱导。在没有 NH₄⁺ 时,植株从氮饥饿条件转至 0.5 mmol/L 硝态氮处理, *MeNRT2.6* 基因在叶中的表达量上调,表明 *MeNRT2.6* 基因可能参与调控叶片中硝酸盐含量;在没有 NH₄⁺ 存在时,植株从高浓度硝态氮移至低浓度硝态氮, *MeNRT2.6* 基因的表达在茎中被显著诱导。高浓度硝态氮试验主要有 2 种处理模式,将木薯幼苗从低浓度硝态氮(无氮、0.5 mmol/L KNO₃) 培养基移至 39.5 mmol/L KNO₃ 培养基, *MeNRT2.6* 基因均主要为在叶中的表达量受到明显诱导。以上结果反映了 *MeNRT2.6* 基因表达模式的复杂性,在不同氮浓度处理条件下, *MeNRT2.6* 基因的表达部位存在差异,基因发挥的功能可能也并不一致;因此, *MeNRT2.6* 基因功能具有复杂性。

衡量氮利用效率的标准受多种因素影响,静态的单一性状不能准确反映氮利用效率。植株对氮素的吸收、转运和利用均可能影响其氮素利用效率^[33-35]。多位学者^[36-41] 通过主成分分析和聚类分析对不同植物的多个品种进行氮效率评价,结果显示,相同植物氮高效品种的株高、鲜质量、叶绿素含量、总根长以及 NR、NiR、GS、GOGAT 等氮同化关键酶活性显著高于氮低效品种。叶利庭等^[42] 进一步研究发现,水稻 GS 活性在不同生长时期均与外部氮浓度呈显著 ($P<0.05$) 相关,而 NR 仅在齐穗期与氮浓度呈极显著 ($P<0.01$) 正相关。综上所述,植株 NR 活性、GS 活性、株高、鲜质量、叶绿素含量、总根长等可作为氮高效种质的筛选指标。本研究中,对将 *MeNRT2.6* 在拟南芥中异源过表达所获得的拟南芥转基因株系进行筛选验证后,共筛选出 OE2.6-1、OE2.6-2、OE2.6-6 这 3 个表达量最高的转基因株系,并对其进行不同浓度硝态氮处理。结果发现,在低浓度硝态氮胁迫下,过表达拟南芥株系

的株高、鲜质量、主根长、GS 活性、NR 活性、NiR 活性等氮效率主要评价指标均高于野生型。由此表明,在拟南芥中过表达 *MeNRT2.6* 基因能提高拟南芥在低浓度硝态氮胁迫下的氮素利用效率。在高浓度硝态氮处理条件下,与野生型相比,3 个过表达株系的主根长、株高、SPAD 值、NR 活性、NiR 活性均有所增加,但 GS 活性却降低,因此,在高浓度硝酸盐供应条件下,在拟南芥中异源表达 *MeNRT2.6* 基因是否能促进植株的氮素利用效率,仍需进一步验证。

作为陆生植株吸收的主要氮源之一^[24, 43],硝态氮对植物产量和品质具有重要作用^[44-45]。提高植物氮素吸收能力和氮素利用效率是解决当下氮源污染的有效途径。通过在拟南芥中过表达 *MeNRT2.6* 基因发现,该基因可能与植物氮素利用效率高度相关,但在木薯中是否具有同样功能以及相关作用机制仍不明晰,因此,拟通过木薯遗传转化体系获得过表达 *MeNRT2.6* 基因木薯株系,经筛选鉴定后,对该过表达株系进行氮效率评价,以期研发出该基因在木薯氮素利用效率方面的功能。

参考文献:

[1]

TAKATOSHI K, JUN I, TROU K, et al. Repression of nitrogen starvation responses by members of the Arabidopsis GARP-type transcription factor NIGT1/HRS1 subfamily[J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(4): 925-945.

[2]

ZHANG W F, DOU Z X, HE P, et al. New technologies reduce greenhouse gas emissions from nitrogenous fertilizer in China[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(21): 8375-8380.

[3]

张鹏, 杨俊, 周文智, 等. 能源木薯高淀粉抗逆分子育种研究进展与展望[J]. *生命科学*, 2014, 26(5): 465-473.

[4]

黄武, 胡新文, 毛帅, 等. 基于文献计量: 木薯近年研究热点和趋势分析[J]. *热带作物学报*, 2018, 39(12): 2521-2531.

[5]

JØRGENSEN K, BAK S, BUSK P K, et al. Cassava plants with a depleted cyanogenic glucoside content in leaves and tubers. Distribution of cyanogenic glucosides, their site of synthesis and transport, and blockage of the biosynthesis by RNA interference technology[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(1): 363-374.

[6]

EL-SHARKAWY M A. Cassava biology and physiology[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56(4): 481-501.

[7]

卢赛清, 雷开文, 韦丽君, 等. 广西木薯种植气候适宜性分析及高产栽培技术[J]. *农业与技术*, 2021, 41(24): 57-59.

[8]

黄巧义, 唐拴虎, 陈建生, 等. 木薯物质累积特征及其施肥效应[J]. *作物学报*, 2013, 39(1): 126-132.

[9]

ORSEL M, CHOPIN F, LELEU O, et al. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction[J]. *Plant Physiology*, 2006, 142(3): 1304-1317.

[10]

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(2): 886-896.
- [11] 欧英卓. 水稻苗期耐低氮材料鉴定及候选基因挖掘[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2024.
- [12] 刘冉冉. 盐地碱蓬高亲和硝酸盐转运蛋白基因 *SsNRT2.1* 和 *SsNRT2.5* 的功能研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2022.
- [13] YOU L L, WANG Y, ZHANG T T, et al. Genome-wide identification of nitrate transporter 2 (*NRT2*) gene family and functional analysis of *MeNRT2.2* in cassava (*Manihot esculenta* Crantz)[J]. *Gene*, 2022, 809: 146038. doi: 10.1016/j.gene.2021.146038.
- [14] ACI M M, LUPINI A, MAUCERI A, et al. New insights into N-utilization efficiency in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under N limiting condition[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 166: 634-644.
- [15] GELLI M, DUO Y C, KONDA A R, et al. Identification of differentially expressed genes between *Sorghum* genotypes with contrasting nitrogen stress tolerance by genome-wide transcriptional profiling[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 179. doi: 10.1186/1471-2164-15-179.
- [16] TONG J F, WALK T C, HAN P P, et al. Genome-wide identification and analysis of high-affinity nitrate transporter 2 (*NRT2*) family genes in rapeseed (*Brassica napus* L.) and their responses to various stresses[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 464. doi: 10.1186/s12870-020-02648-1.
- [17] SOUZA A F F, BUCHER C A, ARRUDA L N, et al. Knockdown of *OsNRT2.4* modulates root morphology and alters nitrogen metabolism in response to low nitrate availability in rice[J]. *Molecular Breeding*, 2022, 42(1): 5. doi: 10.1007/s11032-021-01273-6.
- [18] WEI J, ZHENG Y, FENG H M, et al. *OsNRT2.4* encodes a dual-affinity nitrate transporter and functions in nitrate-regulated root growth and nitrate distribution in rice[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(5): 1095-1107.
- [19] 巢成生, 王玉乾, 沈欣杰, 等. 甘蓝型油菜苗期氮高效吸收转运特征研究[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(6): 1172-1188.
- [20] 唐贤礼, 张月, 张盾, 等. 毛果杨基因 *PtNRT2.7* 的功能初步鉴定与分析[J]. *北京林业大学学报*, 2016, 38(8): 18-27.
- [21] 王娟, 陈皓宁, 石大川, 等. 花生高亲和硝酸盐转运蛋白基因 *AhNRT2.7a* 响应低氮胁迫的功能研究[J]. *中国农业科学*, 2022, 55(22): 4356-4372.
- [22] 魏嘉. 水稻双亲和硝酸盐转运蛋白基因 *OsNRT2.4* 的生物学功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [23] ZOU L P, QI D F, LI S X, et al. The cassava (*Manihot esculenta* Crantz)'s nitrate transporter *NPF4.5*, expressed in seedling roots, involved in nitrate flux and osmotic stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 194: 122-133.
- [24] WANG Y Y, CHENG Y H, CHEN K E, et al. Nitrate transport, signaling, and use efficiency[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2018, 69: 85-122.
- [25] 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 and Cell Physiology*, 2003, 44(3): 304-317.
- [26] TSAY Y F, CHIU C C, TSAI C B, et al. Nitrate transporters and peptide transporters[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(12): 2290-2300.
- [27] CERESO M, TILLARD P, FILLEUR S, et al. Major alterations of the regulation of root NO_3^- uptake are associated with the mutation of *Nrt2.1* and *Nrt2.2* genes in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(1): 262-271.
- [28] WANG T, LI M J, YANG J Z, et al. Brassinosteroid transcription factor BES1 modulates nitrate deficiency by promoting *NRT2.1* and *NRT2.2* transcription in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2023, 114(6): 1443-1457.
- [29] FILLEUR S, DANIEL-VEDELE F. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display[J]. *Planta*, 1999, 207(3): 461-469.
- [30] KOTUR Z, MACKENZIE N, RAMESH S, et al. Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* *NRT2* family members and their interactions with *AtNAR2.1*[J]. *New Phytologist*, 2012, 194(3): 724-731.
- [31] CHOPIN F, ORSEL M, DORBE M F, et al. The *Arabidopsis* *ATNRT2.7* nitrate transporter controls nitrate content in seeds[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(5): 1590-1602.
- [32] 梁桂红, 华营鹏, 宋海星, 等. CACTFTPPCA1(YACT)、Dof(AAAG)、MYB 可能参与甘蓝型油菜对氮胁迫的响应[J]. *植物营养与肥科学报*, 2020, 26(2): 338-353.
- [33] HIROSE T. Nitrogen use efficiency revisited[J]. *Oecologia*, 2011, 166(4): 863-867.
- [34] 于冬梅. 马铃薯氮效率基因型分类及其差异分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.
- [35] 牛静. 棉花氮高效利用的生理机制及施肥效应[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- [36] 杨雅楠. 大白菜耐低氮品种的筛选[D]. 昆明: 云南大学, 2020.
- [37] 康亮, 梁琼月, 姚一华, 等. 不同氮效率木薯品种根系形态、构型及氮吸收动力学特征[J]. *植物营养与肥科学报*, 2019, 25(11): 1920-1928.
- [38] 王改丽. 新型甘蓝型油菜氮高效种质的筛选及其氮高效机制的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [39] 魏海燕, 张洪程, 张胜飞, 等. 不同氮利用效率水稻基因型的根系形态与生理指标的研究[J]. *作物学报*, 2008, 34(3): 429-436.
- [40] 曹敏建, 衣莹, 佟占昌, 等. 耐低氮胁迫玉米的筛选与评价[J]. *玉米科学*, 2000, 8(4): 64-69.
- [41] 郭鑫. 木薯种质氮胁迫响应多样性评价及氮高效种质筛选[D]. 海口: 海南大学, 2013.
- [42] 叶利庭, 吕华军, 宋文静, 等. 不同氮效率水稻生育后期氮代谢酶活性的变化特征[J]. *土壤学报*, 2011, 48(1): 132-140.
- [43] LUDEWIG U, NEUHÄUSER B, DYNOWSKI M. Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants[J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(12): 2301-2308.
- [44] 孙菲菲, 李英, 侯喜林, 等. 硝态氮对不结球白菜产量与主要营养品质及硝酸盐含量的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2008, 31(2): 37-40.
- [45] 万春雁, 李金凤, 霍恒志, 等. 苗期氮素处理对草莓生长发育和产量的影响[J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2023, 51(8): 92-98.