

玉米硝酸盐转运蛋白 *ZmNRT1.1B* 基因遗传多样性分析

叶欣男^{1,2}, 郭嘉², 柳青², 刘洋², 尹悦佳², 李毅丹², 郝东云^{1,2*},
刘相国^{2*}

(1. 吉林农业大学农学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所/吉林省农业生物技术重点实验室, 长春 130033)

摘要:玉米 *ZmNRT1.1B* 基因编码的硝酸盐转运蛋白, 在根部硝酸盐的吸收及转运中发挥着重要作用。分析 *ZmNRT1.1B* 基因遗传多样性, 对于深入理解 *ZmNRT1.1B* 生物功能, 探索开发氮肥高效利用分子标记具有重要意义。本研究通过数据库发掘和编码区测序等方法对 507 份关联分析遗传群体和 60 份玉米自交系的 *ZmNRT1.1B* 基因编码区进行多态性分析, 研究表明, *ZmNRT1.1B* 基因大部分突变发生在 5'-UTR 区域和内含子区域, 编码区高度保守。在 1 788 bp 的编码序列中, 仅仅发现了有 29 个 SNP 位点和 1 个 InDel 位点; 29 个 SNP 位点中包含 23 个同义突变和 6 个非同义突变。根据编码区序列变异情况可将 60 份玉米自交系材料划分为 20 个单倍型, 根据 29 个 SNP 位点中的 6 个非同义突变和 1 个 InDel 位点, 又将编码区的核苷酸序列翻译成氨基酸序列划分成 8 个单倍型。同源建模结果表明, 在氨基酸序列 Asp286Ala 的突变和第 292 位的 Ala 的插入, 均导致蛋白质折叠发生改变, 进而改变了蛋白质的结构。

关键词:玉米; *ZmNRT1.1B* 基因; 单核苷酸多态性; 单倍型

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)06-0069-07

Genetic Diversity Analysis of Nitrate Transporter Gene *ZmNRT1.1B*

YE Xinnan^{1,2}, GUO Jia², LIU Qing², LIU Yang², YIN Yuejia², LI Yidan², HAO Dongyun^{1,2*}, LIU Xiangguo^{2*}

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. Institute of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences/Jilin Provincial Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Changchun 130033, China)

Abstract: Nitrate transport protein, *ZmNRT1.1B*, plays an important role in nitrate absorption and transport in maize root. The sequence polymorphism of *ZmNRT1.1B* is a key for understanding the biological function of *ZmNRT1.1B* and developing molecular markers for efficient utilization of nitrogen fertilizer. In this study, database mining and coding regions sequencing were used to analyze the polymorphisms of *ZmNRT1.1B* coding regions in 507 inbred lines from an association analysis genetic population and 60 maize inbred lines. The results showed that most of the mutant sites were identified in the 5'-UTR regions and intron regions of *ZmNRT1.1B*. The coding region of *ZmNRT1.1B* was highly conserved. Only 29 SNP sites and 1 InDel site were found in the coding sequence of 1,788 bp, of which 23 synonymous mutations and 6 non-synonymous mutations were found. According to the sequence variation of the coding regions or the amino acid sequences translated from the coding regions with non-synonymous mutations and the InDel site, 60 maize inbred lines were divided into 20 haplotypes or 8 haplotypes, respectively. The homologous modeling results showed that the mutation of Asp286Ala in amino acid sequence and the insertion of Ala at 292 could lead to the change of protein folding and change the structure of the protein.

Key word: Maize; *ZmNRT1.1B*; Single nucleotide polymorphism; Haplotype

收稿日期: 2021-11-06

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08003005); 吉林省自然科学基金项目(20190201290JC); 吉林省农业科学院创新工程研究生基金项目(e920705025)

作者简介: 叶欣男(1995-), 男, 在读硕士, 从事作物生物技术育种研究。

通讯作者: 郝东云, 男, 博士, 研究员, E-mail: dyhao@cjaas.com

刘相国, 男, 博士, 研究员, E-mail: lxgyj@cjaas.com

氮素(N)是植物三大重要营养元素之一,在植物生长发育中发挥重要的作用^[1-2]。土壤中存在无机氮(铵态氮和硝态氮等)和有机氮(尿素和氨基酸等)等多种形态氮源,其中硝态氮是最易被植物吸收的氮素^[3]。硝酸盐转运蛋白对于 NO_3^- 的吸收和分配至关重要,植物根系从土壤吸收 NO_3^- 、植物体内 NO_3^- 的贮藏运输和 NO_3^- 从老叶到新叶的再分配都需要硝酸盐转运蛋白来执行。目前已经鉴定 NO_3^- 转运蛋白家族有4个,分别是硝酸盐转运体1(NRT1)、硝酸盐转运体2(NRT2)、氯离子通道蛋白(CLC)、慢阴离子通道相关同系物(SLAC/SLAH)。NRT1家族主要由低亲和力硝酸盐转运蛋白构成,NRT2家族主要由高亲和力硝酸盐转运蛋白构成,CLC和SLAC/SLAH家族的成员主要促进硝酸盐在植物内部的运输。

拟南芥AtNRT1.1(AtNPF6.3或CHL1)是植物中第一个被鉴定的低亲和力硝酸盐转运蛋白^[4]。AtNRT1.1属于NPF家族成员,不仅参与从根部吸收硝酸盐,还在根部向地上部分转运硝酸盐中发挥重要作用^[5-6]。拟南芥目前已经报道53个NRT1家族成员。AtNRT1.1具有双亲活性,通过改变磷酸化来使AtNRT1.1活性低亲和力到高亲和力的转换^[7];AtNRT1.2除了是一种低亲和力硝酸盐转运蛋白外,还能运输脱落酸(ABA)^[8];AtNRT1.4主要负责在叶柄中储存 NO_3^- ^[9];AtNRT1.5参与将 NO_3^- 装载到木质部中^[10];AtNRT1.6主要负责将 NO_3^- 向胚的运输^[11];AtNRT1.7则是促进老叶中过量的 NO_3^- 向幼叶再分配^[12];AtNRT1.8在木质部薄壁细胞中表达,参与逆境胁迫反应^[13];AtNRT1.11和At-

NRT1.12参与 NO_3^- 从成熟叶片到幼嫩组织的再分配^[14]。Hu等^[15]首次在水稻中证实NRT基因家族具有重要的育种价值,过表达OsNRT1.1B基因显著提高水稻分蘖数4.8%~16.0%,有效穗数3.6%~11.8%,单株产量30.3%~33.4%。Fan等^[16]发现,过表达OsNRT1.1B基因不仅改变水稻产量构成因素,还显著提高水稻的N转运能力。Wang等^[17]研究证实过量表达OsNRT1.1A促进水稻氮素的吸收利用效率。

玉米是重要的粮食作物,增施氮肥可以有效促进玉米增产。然而玉米的氮肥利用率较低,仅有30%左右^[18],如何有效提高玉米氮肥利用效率一直是玉米育种研究中重要的科研课题。2017年Wen等^[19]首次报道*ZmNRT1.1*具有体外硝酸盐吸收功能。本课题组开展的养分高效利用转基因玉米新品种培育研究中,证实*ZmNRT1.1B*基因具有重要的商业化育种价值(数据未公开),但详细调控机制仍然未知。本研究通过数据库发掘、编码区测序等研究方法,开展玉米自交系群体*ZmNRT1.1B*基因多态性分析,探寻玉米自然群体中*ZmNRT1.1B*基因变异,为深入探索*ZmNRT1.1B*在自然群体中的生物学功能,开发功能性分子标记,创制氮高效玉米新品种提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本研究选取我国具有广泛代表性的60份玉米自交系,详见表1。

表1 供试玉米自交系系谱

序号	品系	来源	序号	品系	来源
1	B73	BSSS	31	TY6	TY30331-2-5-1-2-3-2
2	8902	Ye107×81162	32	B113	BS11(FR)C9
3	Dan340	Lv9×Wide Pod Corn	33	R08	American Hybrid P78641
4	HuangC	(HuangXiao162×Zi330/O2)×Tuxpenno	34	Ye52106	(Ye1075×Ye106)×AiJin525
5	Dan9046	Shen5003×Tie7922	35	Xun971	Landrace
6	Shen137	American Hybrid 6JK611	36	DE.EX	The University of Illinois, USA
7	K22	K11×Ye478	37	Yu374	Synthetic
8	K10	(Chang3×Shen5003)×Chang3	38	DH29	American Hybrid P78599
9	835b	U8112×Ye515	39	Zhong69	American Hybrid P78599
10	Si273	American Hybrid	40	Zheng32	American Single-cross 3382
11	7884-4Ht	78-6×H84	41	By804	BHO*
12	H21	HuangZaoSi×H84	42	SC55	The University of Illinois, USA
13	LK11	Mo17×Zi330	43	JING24	Unknown
14	Mo17	187-2×C103	44	PH6WC	Unknown
15	HYS	(HuangZaoSi×YeJiHong)×HuangZaoSi	45	HB	Huojiabaimaya

续表 1

序号	品系	来源	序号	品系	来源
16	Yu87-1	American Hybrid	46	shen5003	American Single-cross 3147
17	Mo113	Unknown	47	Ji63	(127-32×Tie84)×(Wei24×Wei20)
18	TY10	TY30331-2-8-1-1-3-2	48	LX9801	Xi502×H21
19	BT1	8085×Thai Hybrid	49	XI502	Dan340×HuangZaoSi
20	Qi319	American Hybrid P78599	50	4F1	Improved from Mo17 by radiation
21	Gy237	AIHO	51	Ji853	(HuangZaoSi×Zi330)×Zi330
22	Yan414	HuangZaoSi	52	TY4	TY30331-2-4-2-2-2-2
23	Sy999	Syn.D.O	53	8723	Unknown
24	W138	Unknown	54	PH09B	Unknown
25	CF3	Unknown	55	D34	Unknown
26	Dong237	Synthetic	56	F8276	Unknown
27	Gy462	AIHO	57	P014	Unknown
28	Zong3	Synthetic	58	YFH	Unknown
29	M165	Unknown	59	KX	Unknown
30	ZZ01	American Hybrid P78641	60	KWS49	Unknown

1.2 DNA 提取

对 60 份自交系在 5 叶期取新鲜叶尖 5 cm 处叶片材料,采用液氮研磨法预处理样品,CTAB 法提取基因组 DNA^[20],1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,Nano Drop2000c 微量分光光度计测定 DNA 样品的浓度和质量,置于-20℃冰箱储存备用。

1.3 PCR 扩增及 DNA 测序

根据 MaizeGDB (<http://www.maizegdb.org/>) 上已经公开的 B73 v4 序列进行引物设计,PCR 扩增片段共 2 段,分别是第一外显子到第三外显子之间约 1 400 bp 和第四外显子约 1 300 bp。其中,扩增第一外显子到第三外显子之间的引物为 F1: 5'-GCAGCAGCAAGCATCGTTC-3', R1: 5'-CTGCA TTCCTTGCTGTGGG-3';扩增第四外显子的引物为 F2: 5'-GTTCTGGACCACGCG-3', R2: 5'-TTTAG

CCTTTGAATACTTGGCAT-3',具体位置如图 1 所示。PCR 扩增总反应体系为 50 μL, 2×Taq Plus Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司 25 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, DNA 模板(100 ng/μL)1 μL, ddH₂O 23 μL。PCR 反应程序为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。PCR 产物经由 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,切取目的片段扩增条带,并使用 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)试剂盒进行胶回收和纯化。胶回收产物利用 pEASY-Blunt Zero Cloning Kit (北京全式金生物技术有限公司)进行连接转化,挑取阳性单菌落,送至(库美生物科技有限公司)测序。



F1: 扩增第一外显子到第三外显子之间序列上游引物;R1: 扩增第一外显子到第三外显子之间序列下游引物;F2: 扩增第四外显子上游引物;R2: 扩增第四外显子下游引物

图 1 引物位置

1.4 生物信息学分析

利用 ZEAMAP (<http://www.ZEAMAP.com>) 上 Variations 板块^[20]中 SNP 和 InDel 两个选项对玉米 *ZmNRT1.1B* 基因在 507 份自交系群体中进行多态性分析,获得对应的 SNP 和 InDel 结果。通过 PlantCARE ([<http://www.plantcare.html/>\) 查找启动子元件,分析启动子上的突变位点对启动子功能元件的影响。](http://bioinformatics.psb.ugent.be/webt-</p>
</div>
<div data-bbox=)

利用 NCBI BLASTn 功能,对测序获得 *ZmNRT1.1B* 基因序列进行比对分析,去除内含子,获得 60 份玉米自交系的 4 个外显子序列,拼接外显子产生完整的 CDS 编码区序列。通过 BioEdit 软

件^[21]中的 Clustal W 模块^[22]进行比对,分析位点变异。序列分析采用 DNAsp 软件进行^[23],利用 π 和 θ 计算 *ZmNRT1.1B* 基因 CDS 序列的核苷酸多态性;采用 Tajima's D^[24]对玉米 *ZmNRT1.1B* 基因 CDS 序列进行中性测验。

1.5 蛋白质建模

将分析单倍型得到的不同的玉米 *ZmNRT1.1B* 蛋白质氨基酸序列输入 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)中,对其进行建模并比较一些突变点的结构域的变化^[25-29]。

2 结果与分析

2.1 玉米 *ZmNRT1.1B* 基因序列多样性分析

ZEAMAP 上已公开的 507 份群体自交系的重测序结果分析表明,玉米 *ZmNRT1.1B* 基因仅在 5'-UTR、内含子和 3'-UTR 中存在 SNP 位点和 InDel 位点(表 2),编码区(CDS)较为保守。根据多态形式可将 5'-UTR 分为 2 个单倍型,3'-UTR 分为 4 个单倍型。

表 2 玉米 *ZmNRT1.1B* 基因的多态性位点

染色体	位点	突变类型	多态形式	位置
1	94941009	SNP	T/C	5'-UTR
1	94942732	InDel	A/AGT	intern
1	94942931	SNP	A/G	intern
1	94943481	InDel	AC/A	intern
1	94944943	InDel	AGGGGG/AGGG	3'-UTR
1	94944945	SNP	G/A	3'-UTR

由表 3 可知,玉米 *ZmNRT1.1B* 基因的 5'-UTR 区的 74 位点处有一个 T/C 的 SNP 位点。Plant-CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)上对该区域启动子元件分析结果表

表 3 5'-UTR 区启动子元件

作用元件	序列	位点	功能
DRE core	GCCGAC	+32	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ABRE	CGCACGTGTC	-133	
STRE	AGGGG	-54	
CAAT-box	CAAT	-109	short function
Undefined motif sequence		+74	
Unnamed 4	CTCC	-86	
Unnamed 4	CTCC	+97	

注:“+”为 DNA 的正链,“-”为 DNA 的负链,选取 5'-UTR 区第一个碱基 G(起始密码子 ATG 上游 149 bp 处)作为分析起始原点

明该位点处存在一个未定义的 motif 序列,在生物体中起到一个短效作用(short function)。该位点的突变可能会导致玉米 *ZmNRT1.1B* 基因在不同自交系中表达量改变,表明 *ZmNRT1.1B* 可能通过非编码调控区域变异,影响表达水平的微调,进而影响玉米硝酸盐转运能力。

2.2 *ZmNRT1.1B* 基因编码区测序与基因型分型

为进一步验证玉米自然群体中 *ZmNRT1.1B* 基因的编码区域序列是否保守,本研究根据 MaizeGDB 上公开的 B73 v4 序列设计外显子扩增引物,对 60 份玉米自交系进行 PCR 扩增,测序获得全部 60 份玉米自交系 1 788 bp 的完整 *ZmNRT1.1B* 基因的编码区域序列。结果表明,60 个玉米自交系中共鉴定出 29 个 SNP 位点和 1 个 InDel 位点(表 4)。

表 4 玉米 *ZmNRT1.1B* 基因 CDS 序列的多态性位点

位点	多态类型	频率	密码子变化	氨基酸变异
75	T/C	83.3/16.7	CCT/CCC	n(P/P)
78	T/C	63.3/36.7	GCT/GCC	n(A/A)
96	T/C	98.3/1.7	GGT/GGC	n(G/G)
120	A/C	81.7/18.3	ATA/ATC	n(I/I)
246	C/G	80/20	GGC/GGG	n(G/G)
249	T/C	63.3/36.7	GCT/GCC	n(A/A)
303	T/C	98.3/1.7	CGT/CGC	n(R/R)
327	T/C	90/10	ACT/ACC	n(T/T)
399	C/T	51.6/48.3	TGC/TGT	n(C/C)
462	G/A	70/30	CTG/CTA	n(L/L)
729	C/A	76.7/23.3	GGC/GGA	n(G/G)
857	A/C	93.3/6.7	GAC/GCC	D/A
865-867	del/GCG	96.7/3.3	del/GCG	del/A
870	C/G	98.3/1.7	GCC/GCG	n(A/A)
1140	C/G	95/5	GCC/GCG	n(A/A)
1239	G/C	60/40	CTG/CTC	n(L/L)
1327	G/A	95/5	GGC/AGC	G/S
1355	G/A	93.3/6.7	CGC/CAC	R/H
1368	G/A	95/5	GTG/GTA	n(L/L)
1376	G/C	90/10	GGC/GCC	G/A
1383	G/C	78.3/21.7	GGG/GGC	n(G/G)
1392	C/T	91.7/8.3	CTC/CTT	n(L/L)
1488	C/T	91.7/8.3	CCC/CCT	n(P/P)
1584	C/A	88.3/11.7	GTC/GTA	n(V/V)
1620	C/T	98.3/1.6	GAC/GAT	n(D/D)
1638	G/C	73.3/26.7	AGG/AGC	R/S
1701	C/T	88.3/11.7	CGC/TGC	R/C
1707	C/T	88.3/11.7	GCC/GCT	n(A/A)
1761	C/A	81.7/18.33	GCC/GCA	n(A/A)
1773	T/G	88.3/11.7	TCT/TCG	n(S/S)

注:氨基酸变异中 n 指氨基酸同义突变

在29个SNP位点中仅有6个SNP改变了编码的氨基酸,其他23个SNP均为同义突变。

为检验该基因CDS序列在供试群体中是否偏离中性进化,本研究对CDS序列进行

Tajima's D 测验,结果发现CDS序列的估计值没有达到显著水平(表5),表明在供试的玉米群体中,*ZmNRT1.1B* 基因没有经历明显的人工选择。

表5 玉米 *ZmNRT1.1B* 基因的CDS序列变异参数

序列长度 (bp)	多态性位 点(个)	变异频率 ^a	SNP数目 (个)	SNP频率 ^b	InDel数目 (个)	InDel平均 长度(bp)	InDel频率 ^c	π	θ	Tajima's D
1 788	32	55.875	29	61.66	1	3	1 788	0.003 86	0.003 48	0.355 52

注: a. 变异频率=序列长度/多态性位点数, b. SNP频率=序列长度/SNP数目, c. InDel频率=序列长度/InDel数目

2.3 玉米 *ZmNRT1.1B* 基因的单倍型

本研究获得的玉米 *ZmNRT1.1B* 基因的CDS序列中包含29个SNP和1个InDel,这些变异位点将该基因CDS序列划分成20种单倍型(表6)。其中^cHap6和^cHap14两种单倍型分布在11个自交系,所占频率最高;^cHap2和^cHap4两种单倍型分布在5个自交系中,携带这4种单倍型的自交系占了总供试材料的一半;此外还有6种稀有单倍型,仅分布在1个自交系中。此外,JING24(43)、

PH6WC(44)、8723(53)、PH09B(54)、D34(55)、F8276(56)、P014(57)、YFH(58)、KX(59)和KWS49(60)不存在于公共数据库中。其中PH6WC和F8276这两个自交系不同于公共数据库中自交系的单倍型,分别作为^cHap17和^cHap20两个稀有单倍型存在(表6),具体单倍型位点差异比对如图2所示。

表6 60个玉米自交系 *ZmNRT1.1B* 基因的单倍型分析

编码区单倍型	自交系数	氨基酸单倍型	自交系
^c Hap1	2	^a Hap1	1,60
^c Hap2	5	^a Hap1	2,8,16,22,26
^c Hap3	2	^a Hap2	3,39
^c Hap4	5	^a Hap1	4,24,54,55,59
^c Hap5	3	^a Hap1	5,11,48
^c Hap6	11	^a Hap1	6,10,15,17,20, 31,38,41,42,47, 53
^c Hap7	3	^a Hap3	7,27,35
^c Hap8	2	^a Hap1	9,13
^c Hap9	1	^a Hap4	12
^c Hap10	1	^a Hap1	14
^c Hap11	2	^a Hap2	18,51
^c Hap12	1	^a Hap2	19
^c Hap13	2	^a Hap5	21,30
^c Hap14	11	^a Hap1	23,25,28,32,33, 34,36,37,40,45, 46
^c Hap15	1	^a Hap6	29
^c Hap16	2	^a Hap5	43,52
^c Hap17	1	^a Hap7	44
^c Hap18	2	^a Hap8	49,58
^c Hap19	2	^a Hap4	50,57
^c Hap20	1	^a Hap1	56



图2 玉米 *ZmNRT1.1B* 基因20个单倍型的变异位点对

2.4 玉米 *ZmNRT1.1B* 基因不同单倍型编码蛋白结构功能域分析

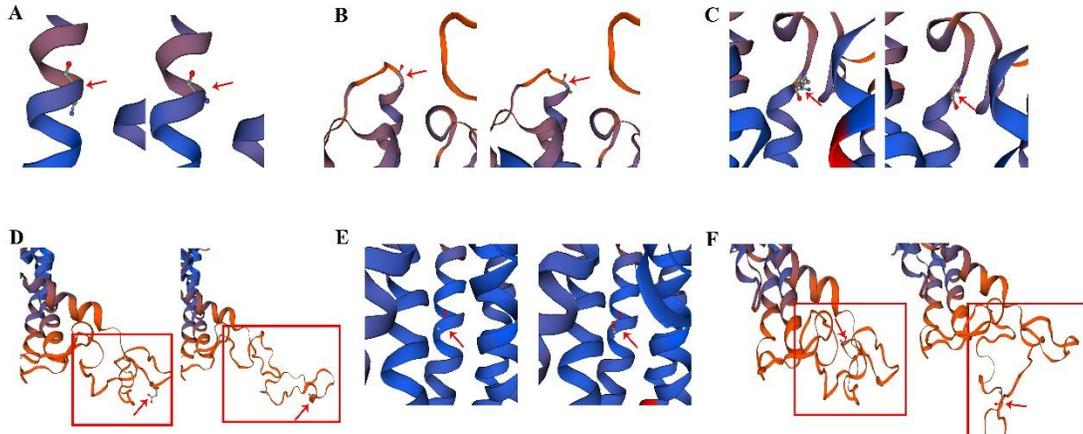
研究发现,*ZmNRT1.1B* 编码区产生的29个SNP中,有23个为同义突变位点,其余的6个为非同义突变位点,等位基因频率均大于0.05。*ZmNRT1.1B* 编码区还存在1个InDel位点,产生6个氨基酸位点的改变和1个氨基酸的插入。将鉴定的全部 *ZmNRT1.1B* 编码核苷酸序列翻译成氨基酸序列,序列比对结果表明共计产生了8种不同的 *ZmNRT1.1B* 氨基酸序列(表6)。单倍型^cHap1、^cHap2、^cHap4、^cHap5、^cHap6、^cHap8、^cHap10、^cHap14和^cHap20编码同一种类型的 *ZmNRT1.1B* 氨基酸序列,有41个玉米自交系属于该类型,所占频率最高。^aHap6和^aHap两种单倍型为稀有 *ZmNRT1.1B* 氨基酸序列,仅存在1个自交系中(表6)。

根据不同单倍型编码氨基酸序列,以B73的氨基酸序列为对照(^aHap1),可以看出除^aHap3外,

所有单倍型都存在 Arg545Ser 突变,这也是区分^aHap3 和^aHap6 的关键;其他的单倍型区分主要是^aHap2 发生 Arg451His 的突变,^aHap5 发生 Asp286Ala 的突变,^aHap7 发生 Gly442Ser 的突变,^aHap8 则是在 292 处有一个 Ala 的插入。

从蛋白同源结构建模结果可知,发生突变位

点最多的 Arg545Ser 是亲水氨基酸突变为另一种亲水氨基酸,虽然氨基酸发生了改变,但并未改变蛋白质的空间结构(图 3);^aHap5 中出现的 Asp286Ala 突变是亲水氨基酸突变为疏水氨基酸,致使蛋白质折叠发生改变;在第 292 位的 Ala 的插入导致该处蛋白质折叠发生变化。



A: 单倍型^aHap1 和^aHap2 蛋白结构比较(左为^aHap1, 右为^aHap2, Arg451 位点); B: 单倍型^aHap1 和^aHap3/^aHap6 蛋白结构比较(左为^aHap1, 右为^aHap3/^aHap6, Gly458 位点); C: 单倍型^aHap1 和^aHap4/^aHap6 蛋白结构比较(左为^aHap1, 右为^aHap4/^aHap6, Arg545 位点); D: 单倍型^aHap1 和^aHap5 蛋白结构比较(左为^aHap1, 右为^aHap5, Asp286 位点); E: 单倍型^aHap1 和^aHap7 蛋白结构比较(左为^aHap1, 右为^aHap7, Gly442 位点); F: 单倍型^aHap1 和^aHap8 蛋白结构比较(左为^aHap1, 右为^aHap8, Ala292 位点)。箭头指示氨基酸变异位点, 方框展示的是氨基酸突变后导致蛋白折叠发生变化的区域

图3 玉米 *ZmNRT1.1B* 基因不同单倍型编码蛋白结构比较

3 结论与讨论

丰富的遗传多样性是作物遗传改良的基础^[30-31], 分析特定基因序列的遗传多样性可探究基因在不同种群中的演化进程。玉米 *ZmNRT1.1B* 基因作为最先发现的玉米 NRT1 家族基因之一, 在 NO₃⁻ 被根部吸收过程中发挥至关重要的作用。

本研究首先利用公共数据库对 507 份玉米自交系群体开展了 *ZmNRT1.1B* 基因的遗传多样性生物信息学分析, 研究发现 *ZmNRT1.1B* 基因突变大多发生在 5'-UTR 区和非编码区域, 编码区非常保守, 预示 *ZmNRT1.1B* 基因高度保守, 在自然进化中较少受到人工选择。

在生物信息学分析的基础上, 本研究进一步克隆了 60 份玉米自交系中 *ZmNRT1.1B* 编码序列, 一代 Sanger 测序和序列多态性分析结果表明 *ZmNRT1.1B* 编码区域高度保守, 但在少数自交系中发现单个核苷酸替换(SNP)、核苷酸的插入和缺失(InDel)。研究总计鉴定 23 个同义突变、6 个非同义突变和 1 个氨基酸的插入, 6 个非同义突变和 1 个氨基酸的插入导致核苷酸翻译出的氨基酸发

生改变, 其中单倍型^aHap5 中的 Asp286Ala 突变是亲水氨基酸突变为疏水氨基酸, 致使蛋白质折叠发生改变, 单倍型^aHap8 中 1 个氨基酸的插入导致氨基酸序列 292 处插入一个 Ala, 同样使得蛋白质折叠发生改变, 从而改变 *ZmNRT1.1B* 蛋白质的结构, 这些携带包含非同义突变的单倍型的自交系为以后进一步研究玉米 *ZmNRT1.1B* 基因功能提供更多的种质资源。

研究表明, 硝酸盐转运蛋白编码基因的遗传多样性是影响植物氮肥高效利用的关键。依据高产氮下产量系数和耐低氮胁迫指数把 27 份玉米自交系材料分为 4 种类型, 即高产氮高效型, 高产氮低效型、低产氮高效型和低产氮低效型^[32]。通过比较分析, 发现本研究所选的 60 份玉米自交系中, 6 份自交系定义了氮效率利用类型。HuangC(^aHap1)、Mo17(^aHap1) 和 PH6WC(^aHap7) 属于高产氮高效型, Ji835(^aHap2) 属于高产氮低效型, B73(^aHap1) 和 Qi319(^aHap1) 属于低产氮高效型。该研究结果表明, 不同玉米自交系编码区单倍型之间氮利用效率存在差异。有趣的是, 发现含有^aHap1 的玉米自交系虽然存在高产型和低产

型,但均为氮高效型,预示着 *ZmNRT1.1B* 的 *Hap1 单倍型中重要氨基酸的突变可能在调控氮素利用效率方面发挥更重要的作用。但由于目前的数据有限,仍需进一步深入研究。

综上,本研究对玉米中硝酸盐转运蛋白 *ZmNRT1.1B* 基因多态性进行了系统性的分析,证实 *ZmNRT1.1B* 编码序列高度保守。研究鉴定了多个新的 *ZmNRT1.1B* 单倍型,发现了携带氨基酸突变的玉米新材料,为深入研究 *ZmNRT1.1B* 基因功能,解析分子调控机制提供了数据基础和试验材料。

参考文献:

- [1] Novoa R, Loomis R S. Nitrogen and plant production [J]. *Plant and Soil*, 1981, 58(1-3): 177-204.
- [2] 于雷,邱菊,赵丽影,等.氮素对玉米生长及生理特性的影响[J]. *吉林农业科学*, 2011, 36(2): 36-39.
- [3] Crawford N M, Glass A D M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plant [J]. *Trends in Plant Science*, 1998, 3(10): 389-395.
- [4] Tsay Y F, Schroeder J I, Feldmann K A, et al. The herbicide sensitivity gene *CHL1* of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter [J]. *Cell*, 1993, 72(5): 705-713.
- [5] Leran S, Munos S, Brachet C, et al. Arabidopsis NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 1984-1987.
- [6] Li H, Hu B, Chu C. Nitrogen use efficiency in crops: lessons from Arabidopsis and rice [J]. *Journal of experimental botany*, 2017, 68(10): 2477-2488.
- [7] Liu K H, Tsay Y F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter *CHL1* by phosphorylation [J]. *The EMBO journal*, 2003, 22(5): 1005-1013.
- [8] Kanno Y, Kamiya Y, Seo M. Nitrate does not compete with abscisic acid as a substrate of AtNPF4.6/NRT1.2/AT1 in Arabidopsis [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(12): e26624.
- [9] Chiu C C, Lin C S, Hsia A P, et al. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1: 4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development [J]. *Plant Cell Physiology*, 2004, 45(9): 1139-1148.
- [10] Lin S H, Kuo H F, Canivenc G, et al. Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(9): 2514-2528.
- [11] Almagro A, Lin S H, Tsay Y F. Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(12): 3289-3299.
- [12] Fan S C, Lin C S, Hsu P K, et al. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(9): 2750-2761.
- [13] Li J Y, Fu Y L, Pike S M, et al. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(5): 1633-1646.
- [14] Hsu P K, Tsay Y F. Two phloem nitrate transporters, NRT1.11 and NRT1.12, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth [J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 844-856.
- [15] Hu B, Wang W, Ou S J, et al. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies [J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(7): 834-838.
- [16] Fan X, Tang Z, Tan Y, et al. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(26): 7118-7123.
- [17] 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, 30(3): 638-651.
- [18] 李梦瑶,王永,吉凡,等.吉林省主要类型农田土壤中玉米产量和氮肥利用率的研究[J]. *东北农业科学*, 2016, 41(4): 53-57.
- [19] Wen Z, Tyerman S D, Dechorgnat, et al. Maize NPF6 proteins are homologs of Arabidopsis *CHL1* that are selective for both nitrate and chloride [J]. *Plant Cell*, 2017, 29(10): 2581-2596.
- [20] Gui S, Yang L, Li J, et al. zeamap, a comprehensive database adapted to the maize multi-omics era [J]. *iScience*, 2020, 23(6): 101241.
- [21] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 41(41): 95-98.
- [22] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [23] Rozas J. DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 537: 337-350.
- [24] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, 123(3): 585-595.
- [25] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [26] Bienert S, Waterhouse A, de Beer T A P, et al. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality [J]. *Nucleic Acids Research*. 2017, 45(D1): D313-D319.
- [27] Guex N, Peitsch M C, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(S1): S162-S173.
- [28] Studer G, Rempfer C, Waterhouse A M, et al. QMEAND is Co-distance constraints applied on model quality estimation [J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(8): 1765-1771.
- [29] Bertoni M, Kiefer F, Biasini M, et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10480.
- [30] Walbot V. 10 reasons to be tantalized by the B73 maize genome [J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(11): e1000723.
- [31] 沈琰,王颖,张东杰,等.黑龙江省和吉林省谷子品种遗传多样性分析[J]. *东北农业科学*, 2016, 41(3): 8-13.
- [32] 崔文芳,高聚林,王志刚,等.玉米自交系氮效率基因型差异分析[J]. *玉米科学*, 2013, 21(3): 6-12.

(责任编辑:范杰英)