

文章编号: 1674-7054(2019)02-0111-08

木薯 *MeNRT2.5* 基因的克隆及表达分析

任 宁 陈秀珍 夏幽泉 白雪杨 江行玉 周 扬

(海南大学 热带农林学院 / 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室 海口 570228)

摘 要: 木薯具有高产、耐旱、耐贫瘠等特点, 为了解其耐贫瘠的作用机理, 提高木薯在贫瘠土壤中对氮素的利用率, 以 30 d 龄的“华南 8 号”组培苗为实验材料, 采用同源克隆技术获得 1 个高亲和性硝酸根转运蛋白基因 *NRT2*。生物信息学分析结果表明, 该基因开放阅读框全长 1 479 bp, 编码 492 个氨基酸, 命名为 *MeNRT2.5*。*MeNRT2.5* 蛋白有 10 个跨膜区域, 与橡胶树、油桐树、可可树等物种的 *NRT2.5* 蛋白具有较高的同源性, 其氨基酸序列相似性分别为 94%、89.84%、87.40%。半质量 RT-PCR 结果表明, *MeNRT2.5* 基因在根、茎、叶、花等各个器官均有表达, 在成熟木薯植株的根中和组培苗的叶中表达量较高。实时荧光定量 RT-PCR 分析表明, *MeNRT2.5* 在低浓度 NO_3^- ($0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理后, 其在根中的表达量在 6 h 时达到峰值; 高浓度 NO_3^- ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理后, 其表达量在根茎叶中均没有明显变化, 即该基因的表达被高浓度 NO_3^- 所抑制。该研究结果为进一步分析 *MeNRT2.5* 在木薯中的功能验证奠定理论基础。

关键词: 木薯; 高亲和性硝酸根转运蛋白; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.02.003

木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 原产于美洲热带, 是世界第六大粮食作物 (小麦、水稻、玉米、马铃薯、大麦), 其具有适应性强、耐旱、耐贫瘠等特点, 但要获得高产还需要施加一定的氮肥^[1]。氮是构成生物体的大量元素之一, 在生物体的物质和能量代谢活动中发挥重要作用^[2]。在农业种植中, 农民为获得高产, 常常施加大量氮肥, 国内平均氮利用率只有 30% ~ 40%^[3]。过量的氮肥随地表径流引起农田渗漏, 造成水体环境和农业面源污染^[4]。而大多数植物的主要氮源是硝酸盐^[5]。因此, 研究木薯对 NO_3^- 的吸收转运、积累机制, 对于提高木薯氮利用率, 改善生态环境, 保证食品安全和人口粮食问题具有重要的理论和实际意义。在高等植物中已发现 2 种硝酸盐转运系统: 当外界 NO_3^- 浓度大于 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 采用低亲和硝酸盐转运系统 (low-affinity transport system, LATS) 吸收 NO_3^- ; 当外界 NO_3^- 浓度低于 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 则采用高亲和硝酸盐转运系统 (high-affinity transport system, HATS) 吸收 NO_3^- ^[6-8]。根系中的 NO_3^- 吸收转运是由硝酸根转运蛋白 NRT 实现的^[9]。两种系统对应的 NO_3^- 转运蛋白家族分别为低亲和性 NO_3^- 转运蛋白 NRT1 和高亲和性 NO_3^- 转运蛋白 NRT2^[10-11]。NRT2 属于硝酸盐-亚硝酸盐转运体家族 (Nitrate-nitrite porter, NNP), 该家族属于 MFS (Major facilitator superfamily, MFS) 超家族成员之一^[12]。NRT2 基因一般编码 450 ~ 600 个氨基酸, 具有 12 个跨膜结构域, 这些跨膜区分为 2 组, 每组 6 个跨膜区, 中间由 1 个较大的亲水环连接^[13]。目前关于 NRT2 基因的研究主要集中于模式植物拟南芥和粮食作物中, 最早分离获得的植物 NRT2 基因是大麦 *HvNRT2.1* 和 *HvNRT2.2*^[14]。之后, 又从水稻中分离出 4 个 NRT2 基因^[15-17], 拟南芥中分离到 7 个 NRT2^[18], 玉米^[19]、大豆^[20] 和小麦^[21] 中也都克隆到 NRT2 基因。

收稿日期: 2018-03-16

修回日期: 2019-03-19

基金项目: 国家自然科学基金 (31660253); 海南大学科研团队项目 (hdkytg201706); 海南省重大科技计划项目 (HNGDhs201502); 海南大学科研启动项目 (KYQD(ZR)1845)

作者简介: 任宁 (1993-), 女, 海南大学热带农林学院 2016 级硕士研究生, E-mail: renning_hu@163.com

通信作者: 周扬 (1988-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 植物抗逆分子生物学, E-mail: zhouyang@hainanu.edu.cn

AtNRT2.5 基因主要在叶脉以及根毛区细胞表达^[22]。Todd 等人发现,拟南芥 *AtNRT2.5* 可能与氮磷的相互作用有关^[23]。冯素花^[24]等研究表明,茶树 *NRT2.5* 基因在茶树不同组织中均有表达,在嫩芽和茎中的表达量较低,在成熟叶和根中表达量较高。平邑甜茶 *MhNRT2.5* 主要在叶片表达,且受 NO_3^- 的诱导^[25]。水稻的 *OsNRT2.1*、*OsNRT2.2* 和 *OsNRT2.4* 基因都较明显地受低浓度 NO_3^- 诱导^[26-28]。胡春吉等人发现,木薯 *MeNRT2.1* 基因在根中特异性表达,且原生质体瞬时表达发现 *MeNRT2.1* 蛋白定位在细胞膜上^[29]。除此之外,关于木薯的硝酸根转运蛋白 *NRT2* 基因家族的研究尚未报道。从木薯中克隆得到 *NRT2.5* 基因全长序列,并对其核苷酸序列和组织表达情况进行分析,为该基因的进一步应用和木薯吸收转运 NO_3^- 机制的深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及处理 选用2年生木薯成熟植株的根、茎、大叶、小叶、花、块根和1月龄木薯组培苗的根、茎、叶为实验材料。选择在培养箱培养(光:暗=16 h:8 h,光强 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,温度 28°C 相对湿度 60%) 30 d 后生长状态基本一致的“华南8号”木薯组培苗,并将组培苗放在不含氮源的阿夫道宁^[30]培养液中预培养5 d,每天更换培养液,根部遮光通氧以防根部腐烂,促使木薯组培苗植株体内的硝酸根消耗。将用阿夫道宁培养液预培养后的木薯组培苗转到浓度分别为 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KNO_3 培养液中培养,分别在0、3、6、9、12、24 h 各时间点各取3株木薯苗的根、茎、叶混合,用滤纸吸干水分,迅速置于液氮中, -80°C 冰箱存放,用于提取 RNA。

1.2 菌种、载体和试剂 大肠杆菌感受态(*E. coli*) DH5 α 购自全式金(TransGen Biotech, CD-201-01); pMD19-T vector (TaKaRa, Code: 6013)、DNA 聚合酶 $2 \times \text{PCR Solution Prime STAR HS}$ (Premix) (TaKaRa, R040A) 和反转录试剂盒 [PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), DRR047A] 购自宝生物工程(大连)有限公司; 普通 Green Taq Mix 酶(P131-AA) 购自 Vazyme 公司; 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(RNAPrep Pure Plant Kit, DP441) 购自天根生化有限责任公司; 小提质粒 Plasmid DNA Mini-prep Kit (Cat RTP2102-02) 购自北京中科瑞泰生物科技有限公司; PCR 纯化试剂盒 Cycle-Pure Kit (D6492-01) 购自 OMEGA 公司。

1.3 木薯 *MeNRT2.5* 基因的克隆 参照说明书,采用总 RNA 提取试剂盒提取木薯总 RNA,并用 $w = 1.2\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测完整性。参照说明书,用 PrimeScript RT reagent kit 将提取的 RNA 反转录成 cDNA。参照 GeneBank 收录的拟南芥 *AtNRT2* 蛋白序列,从木薯基因组数据库(<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) 中进行 Blastp 检索,获得木薯 *NRT2* 的氨基酸序列和基因序列。采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,序列为 *MeNRT2.5*-F: 5'-ATGGAAGTGGAAGCTGCTGG-3'; *MeNRT2.5*-R: 5'-CTAAGCTCTTCTGCTCTTTCA-3',引物由上海生物工程有限公司合成。扩增程序为 94°C 5 min, 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 90 s, 共 35 个循环, 72°C 10 min。反应结束后,将 PCR 产物于 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳。目的条带纯化后与 pMD19-T vector (TaKaRa, Code: 6013) 进行连接,采用热激法将连接产物转入大肠杆菌感受态 DH5 α (TransGen Biotech, CD-201-01),挑取阳性克隆送往上海生工测序。

1.4 *MeNRT2.5* 蛋白的生物信息学分析 利用 ProtParam 在线软件分析 *MeNRT2.5* 蛋白的理化性质。SOPMA 软件预测蛋白质的二级结构。通过 TMHMM 在线软件对木薯 *MeNRT2.5* 基因编码的蛋白进行跨膜区预测。通过 NCBI 网站的 BlastP 对 *MeNRT2.5* 蛋白与其他高等植物 *NRT2* 蛋白进行同源性比较; 利用 MEGA 7.0 软件,以邻位相近法(Neighbor-Joining) 构建进化树。

1.5 *MeNRT2.5* 基因的表达分析 在提取实验材料不同组织的总 RNA 后,以反转录得到的 cDNA 为模板,进行半定量 RT-PCR。目的基因引物为 *MeNRT2.5*-semi-F (5'-TGCGAGCATTTCACCTGCTTT-3') 和 *MeNRT2.5*-semi-R (5'-GCCTCCTGAAGTTCCCATCT-3')。内标基因引物为 Actin-F (5'-GCCTCCCAAGG-TAGCTTTCA-3') 和 Actin-R (5'-GGTTAATGCAGGGCTCCACT-3')^[31]。用 Green Taq Mix 酶(Vazyme, P131-

AA) 扩增 扩增体系参照说明书。PCR 程序为预变性 94 °C 5 min, 变性 94 °C 30 s, 退火 58 °C 30 s, 延伸 72 °C 1 min, 28 个循环, 72 °C 10 min。用 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳。结果用于研究 *MeNRT2.5* 基因在不同组织的表达量。

为了研究 *MeNRT2.5* 基因在不同浓度硝酸盐胁迫下的表达模式, 利用实时荧光定量 qRT-PCR 的方法检测 *MeNRT2.5* 基因在 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 处理下的表达模式。荧光定量引物为 *MeNRT2.5*-qRT-F (5'-GCTGATTATGCCGCTTGTGTTTG-3') 和 *MeNRT2.5*-qRT-R (5'-GCAGCCTCCTGAAGTTC-CCATCT-3')。内标基因引物为 *Actin*-F (5'-GCCTCCCAAGGTAGCTTTCA-3') 和 *Actin*-R (5'-GGTTAATG-CAGGGCTCCACT-3')^[31]。采用 ABI 7500 Real-time PCR System 进行定量分析, 按照 NOVA 公司的 Taq SYBR Green qPCR Premix (code: EG15135R2S) 说明书进行。实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析 $\Delta\Delta C_t = \text{Treat}(C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{内参基因}}}) - \text{CK}(C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{内参基因}}})$ ^[32]。

2 结果与分析

2.1 *MeNRT2.5* 基因的克隆 根据 NCBI 公布的拟南芥硝酸根转运蛋白 AtNRT2 序列, 在木薯基因组数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) 中进行比对, 获得 1 个 *NRT* 基因。进化分析结果(图 1)表明, 该蛋白与已报道的橡胶树(*Hevea brasiliensis*) HbNRT2.5 蛋白同源性最高(94%), 与桐油树(*Jatropha curcas*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、可可树(*Theobroma cacao*)、毛茛(*Populus trichocarpa*)、碧桃(*Prunus persica*) 等的 NRT2.5 蛋白同源性分别达到 89.84%、87.40%、85.95%、86.38%、83.27%, 推测获得的木薯 NRT 蛋白功能与其他 NRT2.5 有相似功能, 因此命名为 *MeNRT2.5*。以木薯 cDNA 为模板扩增 *MeNRT2.5* 基因, 电泳结果(图 2)显示获得 1 条 1 479 bp 的单一一条带。经过连接 T 载体、筛选阳性克隆, 送往公司测序, 证明获得的目的基因片段正确, 将测序正确的样品保存备用。

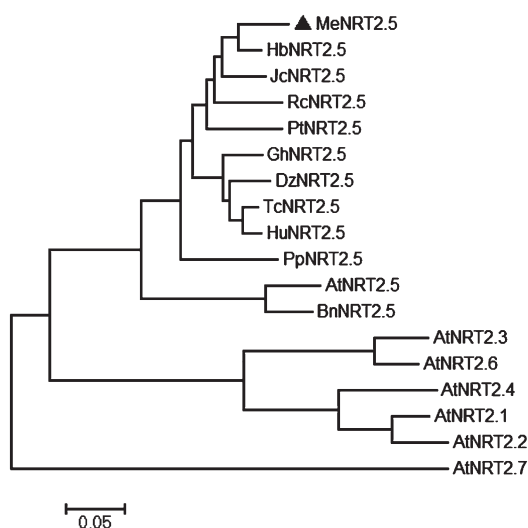


图 1 不同物种 NRT2 氨基酸序列的进化树分析
Fig.1 Phylogenetic tree analysis of NRT2 protein sequences from various plant species.

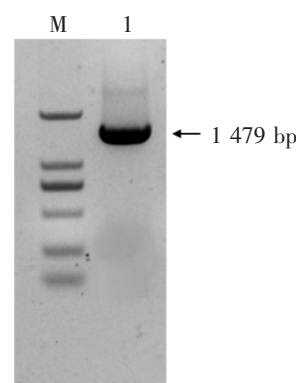


图 2 *MeNRT2.5* 基因的克隆
M: DL2000 marker; 1: *MeNRT2.5* 基因的扩增产物
Fig.2 Cloning of the *MeNRT2.5* gene
M: DL2000 marker; 1: PCR product of *MeNRT2.5* gene

2.2 *MeNRT2.5* 蛋白的序列分析 ProtParam 在线软件分析显示, *MeNRT2.5* 基因编码的蛋白属于稳定蛋白, 其相对分子质量为 53 250, 理论等电点为 9.15, 不稳定系数为 39.89, 脂肪系数为 95.61, 亲水性系数为 0.48, 化学式为 $\text{C}_{2446}\text{H}_{3773}\text{N}_{623}\text{O}_{657}\text{S}_{26}$ 。*MeNRT2.5* 蛋白的氨基酸组成包括 30 个酸性氨基酸残基 (Asp + Glu) 和 46 个碱性氨基酸残基 (Arg + His + Lys), 其中 Gly (G) 氨基酸所占比例最高为 10.6%, His (H) 所占比例最低为 1.0%, 具体氨基酸组成见表 1。

通过 TMHMM 软件对木薯 *MeNRT2.5* 蛋白进行跨膜区预测,结果(图4)表明,该蛋白含有 10 个跨膜区域,*MeNRT2.5* 蛋白氨基酸 N-末端和 C-末端都位于膜内。

2.3 *MeNRT2.5* 基因的表达特性

2.3.1 不同部位 *MeNRT2.5* 的表达分析 采用半定量 RT-PCR 技术检测 *MeNRT2.5* 基因在不同部位中的表达量。结果(图5)表明 *MeNRT2.5* 基因在根、茎、叶、花中均有表达,但不同组织中的表达量有差异。在成熟植株中,根的表达量最高,老叶和块根中的表达量最少。在组培苗中,根、茎、叶中表达量都较低,但相对来说,在组培苗中,叶中表达量相对较高(图5)。

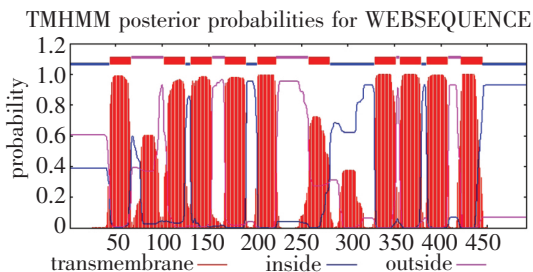


图4 *MeNRT2.5* 蛋白的跨膜分析

Fig.4 Transmembrane analysis of the *MeNRT2.5* protein

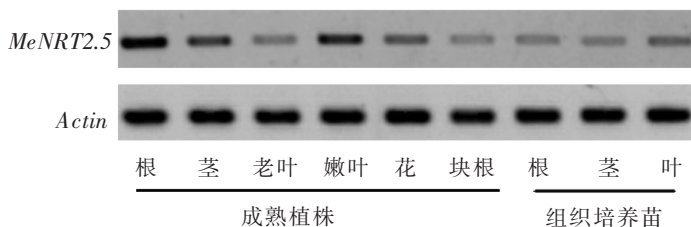


图5 *MeNRT2.5* 基因的组织表达分析

Fig.5 Expression patterns of the *MeNRT2.5* in cassava tissues

2.3.2 不同硝酸盐处理下 *MeNRT2.5* 基因的表达分析

采用实时荧光定量 PCR 技术研究 *MeNRT2.5* 基因在根、茎、叶中的表达模式。结果表明,在 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 处理下(图6A),*MeNRT2.5* 基因在根中的表达量逐渐升高,在 6 h 达到最高值,与 0 h 相比增高了约 6 倍;在 9 h 时表达量又开始降低,此后逐渐降低恢复到正常水平。在茎中,3 h 时 *MeNRT2.5* 基因的表达量达到峰值,但 6 h 表达量下降,随后在 9 h 时略微升高,12 h 时表达量又达到峰值,随后在 24 h 时表达量又略微下降。叶中 *MeNRT2.5* 基因呈现上调表达,在处理 6 h 表达量达到最大值,约为起始表达量的 3 倍,在 9 ~ 24 h 表达量又一直下降,在 24 h 时表达量近乎检测不出。在 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 处理下(图6B),*MeNRT2.5* 基因在根中的表达量有微弱的增加,但变化不明显,茎和叶中的表达量都没有受到显著影响。

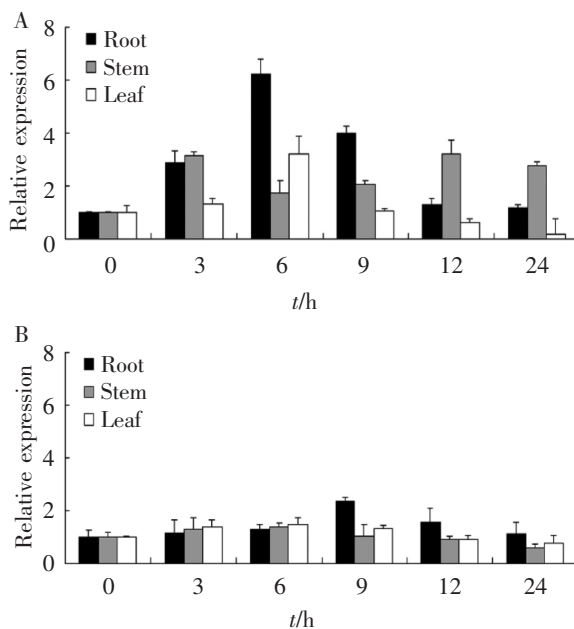


图6 *MeNRT2.5* 在不同处理下的表达模式

A: $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 处理; B: $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 处理

Fig. 6 Expression patterns of *MeNRT2.5* gene under different KNO_3 treatments

A: $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ treatment; B: $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ treatment

3 讨论

本实验通过 PCR 技术首次获得 1 个木薯 NO_3^- 转运蛋白家族 *NRT2* 基因,据生物信息学分析,其 ORF 为 1 479 bp,编码 492 个氨基酸,具有 10 个跨膜结构域,符合 *NRT2* 基因家族的共同特征^[12-13]。经过 BlastP 比对结果和进化树分析结果表明,木薯 *NRT2* 基因与橡胶树、油桐树、蓖麻等的 *NRT2.5* 基因具有较高的同源性,在进化上亲缘关系较近,且与其他植物中报道的 *NRT2.5* 基因具有相似的表达模式^[22-25],该

基因可能是木薯的 *MeNRT2.5* 基因。

LINA 等^[33]的研究结果表明, *AtNRT2.5* 蛋白在拟南芥茎皮质区、拟南芥根毛区的皮质和成熟叶片的叶脉中表达。本实验半定量 RT-PCR 结果表明, *MeNRT2.5* 基因在根、茎、叶、花中都有不同程度的表达, 在成熟植株的根部和嫩叶中表达量较高; 这与拟南芥中 *AtNRT2.5* 基因^[33]和茶树 *NRT2.5* 基因^[24-25]的表达情况基本一致, 但也有差异, 推测是因为基因在不同物种中的表达差异性所致。

实时荧光定量 qRT-PCR 结果表明, 低浓度硝态氮 ($0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理下, 木薯 *MeNRT2.5* 基因在根中较短时间内可达到峰值 (图 6A)。*AtNRT2.1* 具有 NO_3^- 感受器或者信号传感器的功能^[34]。孔敏^[35]研究的白菜 *BnNRT2* 基因在 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NO}_3^-$ 处理 30 min 后, *BcNRT2* 的表达量迅速上升, 表明其可能是 NO_3^- 感受器, 但是其在感受 NO_3^- 中的作用仍需证明。推测木薯 *MeNRT2.5* 基因同 *AtNRT2.1* 和 *BnNRT2* 基因一样, 是 NO_3^- 感受器, 但还需要进一步实验证明。

ORSEL^[36]和 MAYA^[37]等研究表明, *AtNRT2.5* 基因的表达受到高浓度 NO_3^- 的抑制, 在供应 NO_3^- 几个小时后, 其在根中的表达量仅为原来的 25%。本研究中, 高浓度硝态氮 ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理下, 木薯 *MeNRT2.5* 基因的表达量变化亦不明显, 在处理 24 h 时, 茎中表达量为原来 50%, 这说明 *MeNRT2.5* 的表达可能受到高浓度 NO_3^- 的抑制, 这与 ORSEL^[36]和 MAYA^[37]在拟南芥中研究的结果一致。

目前, 研究者虽然不断发现不同物种中 *NRT2* 基因新成员, 但是在木薯中该基因家族成员数量有多少, 分别如何定位, 具有什么功能等, 有待深入研究。此外, ZHOU^[38]和 TONG^[39]等研究表明, 部分高亲和硝酸根转运蛋白独自并不具有 NO_3^- 转运功能, 需要依赖于 NAR2 蛋白的辅助。KOTUR^[40]等人证明, *AtNRT2.5* 和拟南芥硝酸盐转运体伴侣蛋白 (Nitrate transporter accessory protein, *AtNAR2.1*) 形成 1 个相对分子质量 150×10^3 的复合物, 在氮饥饿处理的野生型拟南芥的根中发挥作用。因此, 木薯 *MeNRT2.5* 蛋白吸收转运 NO_3^- 是否也需要木薯 NAR2.1 蛋白的辅助, 两者在质膜上是如何发挥作用的还需要进一步研究。

本研究成功克隆出木薯 *MeNRT2.5* 基因, 丰富了 *NRT2* 蛋白家族的物种来源多样性, 并对其表达模式进行初步分析, 为深入了解木薯对 NO_3^- 吸收转运和耐贫瘠机制提供了理论依据, 并为进一步建立低氮高效的农业种植方法提供理论参考。

参考文献:

- [1] 黄洁, 李开绵, 叶剑秋, 等. 中国木薯产业化发展研究与对策 [J]. 中国农业通报, 2006, 22(5): 421-426.
- [2] 李建勇, 龚继明. 植物硝酸根信号感受与传导途径 [J]. 植物生理学报, 2011, 47: 111-118.
- [3] 朱兆良. 农田中氮肥的损失与对策 [J]. 土壤与环境, 2000, 9(1): 1-6.
- [4] 郭敏, 韩鹏飞. 农业面源污染的成因及控制对策 [J]. 河北农业科学, 2009, 13(4): 93-96.
- [5] CRAWFORD N M, FORDE B G. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition [J]. American Society of Plants Biologists, 2002: e0011.
- [6] FORDE B G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1465(12): 219-235.
- [7] WILLIAMS L E, MILLER A J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001, 52(1): 659-688.
- [8] CRAWFORD N M, GLASS A D M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants [J]. Trends in Plant Science, 1998, 3(10): 389.
- [9] CHAPMAN N, MILLER T. Nitrate transporters and root architecture // GEISLER M, VENEMA K. Transporters and pumps in plant signaling [M]. Berlin: Springer, 2011: 165-190.
- [10] LEE R B, CLARKSON D T. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. Compartmental analysis from measurements of ^{13}N efflux [J]. The EMBO Journal, 1986(5): 1753-1767.
- [11] TSAY Y F, CHU C C, TSAI C B, et al. Nitrate transporters and peptide transporters [J]. FEBS Letters, 2001, 581: 2290-2300.

- [12] PAO S S , PAULSEN I T , SAIER M H. Major facilitator superfamily [J]. Microbiological and Molecular Biology Review ,1998 ,62 (1) : 1 – 34.
- [13] GLAVAN A , FERNANDEZ E. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters [J]. Cellular and Molecular Life Sciences 2001 ,58: 225 – 233.
- [14] TRUEMAN L J , RICHARDSON A , FORDE B G. Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Gene ,1996 ,175 (1/2) : 223 – 231.
- [15] YAN M , FAN X R , FENG H M , et al. Rice *OsNAR2.1* intersects with *OsNRT2.1* , *OsNRT2.2* and *OsNRT2.3* a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges [J]. Plant Cell and Environment ,2011 ,34(8) : 1360 – 1372.
- [16] XU G , FAN X , MILLER A J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency [J]. Annual Review of Plant Biology ,2012 ,63 (1) : 153 – 182.
- [17] TANG Z , FAN X R , LI Q , et al. Knock down of a rice stellar nitrate transporter alters long distance translocation but not root influx [J]. Plant Physiology ,2012 ,160(4) : 2052 – 2063.
- [18] CRAWFORD N M , GLASS A D M. Molecular and physiological aspects of nitrate in plants [J]. Trends in Plant Science , 1998 ,3(10) : 389 – 395.
- [19] QUAGGIOTTI S , RUPERTI B , BORSA P , et al. Expression of a putative high-affinity NO_3^- transporter and of an H^+ -ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability [J]. Journal of Experimental Botany ,2003 ,54: 1023 – 1031.
- [20] AMARASINGHE B H , DE BRUXELLES G L , BRADDON M , et al. Regulation of *Gmnr2* expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*) [J]. Planta ,1998 ,206 (1) : 44 – 52.
- [21] 赵学强 , 李玉京 , 刘建中 , 等. 小麦 NO_3^- 转运蛋白基因 *TaNRT2.3* 的克隆和表达分析 [J]. 植物学报 ,2004 ,46 (3) : 347 – 354.
- [22] NAZOA P , VIDMAR J J , TRANBARGER T J , et al. Regulation of the nitrate transporter gene *AtNRT2.1* in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate , amino acids and developmental stage [J]. Plant Molecular Biology ,2003 ,52: 689 – 703.
- [23] TODD C D , ZENG P , HUETE A M P , et al. Transcripts of MYB-like genes respond to phosphorous and nitrogen deprivation in *Arabidopsis* [J]. Planta ,2004 ,219: 1003 – 1009.
- [24] 冯素花 , 王丽鸳 , 陈常颂 等. 茶树硝酸根转运蛋白基因 *NRT2.5* 的克隆及表达分析 [J]. 茶业科学 ,2014 ,34(4) : 364 – 370.
- [25] 王新亮. 果树根系硝态氮信号响应关键基因的克隆与功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学 ,2012.
- [26] CAI C , ZHAO X Q , ZHU Y G , et al. Regulation of the high-affinity nitrate transport system in wheat roots by exogenous abscisic acid and glutamine [J]. Journal of Integrative Plant Biology ,2007 (49) : 1719 – 1725.
- [27] ARAKI R , HASEGAWA H. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction [J]. Breeding Science ,2006 ,56: 295 – 302.
- [28] 缪其松. 水稻硝转运蛋白基因 *OsNRT1.1a* 和 *OsNRT1.1b* 的功能研究 [D]. 南京: 南京农业大学 ,2011.
- [29] 胡春吉 , 邹良平 , 彭明. 木薯 *MeNRT2.1* 基因的克隆及表达分析 [J]. 热带作物学报 ,2016 ,37(1) : 117 – 124.
- [30] 金玲. 小白菜水培营养液配方筛选 [J]. 河南农业科学 ,2007(9) : 82 – 85.
- [31] MO C , WAN S , XIA X , et al. Expression patterns and identified protein-protein interactions suggest that cassava CBL-CIPK signal networks function in response to abiotic stresses [J]. Frontiers in Plant Science ,2018 ,9: 269.
- [32] KIVAK K J , SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods ,2001 ,25(4) : 402 – 408.
- [33] LINA L , TAKATOSHI K , ANA-BELEN F B , et al. The *Arabidopsis* nitrate transporter *NRT2.5* plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants [J]. The Plant Journal ,2014 ,80: 230 – 241.
- [34] LITTLE D Y , RAO H , OLIVA S , et al. The putative high-affinity nitrate transporter *NRT2.1* represses lateral root initiation in response to nutritional cues [J]. Proceedings of the National Academy of Science of United States of America ,2005 ,102: 13693 – 13698.
- [35] 孔敏 , 杨学东 , 侯喜林 等. 白菜 *NRT2* 基因的克隆及表达模式分析 [J]. 园艺学报 ,2011 ,38(12) : 2309 – 2316.
- [36] ORSEL M , KRAPP A , DANIEL V. F. Analysis of the *NRT2* nitrate transporter family in *Arabidopsis*: Structure and gene ex-

- pression [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 886–896.
- [37] MAYA K, GUILHEM D, WAFAA R, et al. The *NRT2.5* and *NRT2.6* genes are involved in growth promotion of *Arabidopsis* by the plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 [J]. *New Phytologist*, 2013, 198: 514–524.
- [38] ZHOU J J, FERNÁNDEZ E, GALVÁN A, et al. A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products [J]. *FEBS Letter*, 2000, 466(2/3): 225–227.
- [39] TONG Y P, ZHOU J J, LI Z S, et al. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley [J]. *The Plant Journal*, 2005, 41(3): 442–450.
- [40] KOTUR Z, GLASS A D M. A 150 kDa plasma membrane complex of *AtNRT2.5* and *AtNAR2.1* is the major contributor to constitutive high-affinity nitrate influx in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2015, 38: 1490–1502.

Cloning and Expression Analysis of *MeNRT2.5* Gene in Cassava

REN Ning, CHEN Xiuzhen, XIA Youquan, BAI Xueyang, JIANG Xingyu, ZHOU Yang

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is characteristic of high yield, drought tolerance and poor soil tolerance. To probe into the molecular basis for tolerance of poor soils and enhance the utilization rate of nitrogen in cassava, two years old mature plants and 1 month-old tissue cultured plants of cassava cultivar “Huanan 8” were collected and cultured for 30 days in a medium as the experimental material, from which a high-affinity nitrate transporter gene *NRT2* was isolated by using homologous cloning technique. Sequence analysis revealed that the open reading frame of this gene called *MeNRT2.5* is 1 479 bp and encodes 492 amino acids. Bioinformatics analyses showed that the *MeNRT2.5* protein had 10 transmembrane regions, and had a high homology with the *NRT2.5* protein of *Hevea brasiliensis*, *Jatropha curcas* and *Theobroma cacao*, with its amino acid sequences being 94%, 89.84% and 87.4% in similarity, respectively. Semi-Quantitative real-time PCR analysis showed that the *MeNRT2.5* gene was expressed in root, stem, leaf, flower and other organs, with its expression being higher in the roots of mature cassava plants and in the leaves of tissue cultured plants. Quantitative real-time PCR analysis showed that transcript of the *MeNRT2.5* in root had a peak expression at 6h under the treatment with low concentration NO_3^- ($0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) but its expression did not change significantly in the root, stem and leaf after the treatment with high concentration of NO_3^- ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), indicating the transcript of the *MeNRT2.5* gene is inhibited by high concentrations of NO_3^- . All these results provide a theoretical foundation for further analysis of the functional verification of the *MeNRT2.5* gene in cassava.

Keywords: Cassava; high affinity nitrate transporter; gene cloning; expression analysis

(责任编辑: 叶 静)