

狗尾草生物量增大突变体的转录组分析及氮素代谢相关基因挖掘

张丽丽^{1,2}, 赵海旭^{1,2}, 胡 帅^{1,2}, 霍姗姗^{1,2}, 夏启玉^{1,2}, 郭安平^{1,2}, 赵 辉^{1,2*}

1. 中国热带农业科学院三亚研究院/海南省南繁生物安全与分子育种重点实验室, 海南三亚 572024; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101

摘 要: 生物量大小是植物进化适应和产量的关键因素, 获得高产作物品种一直是作物育种的基本要求。本研究在对狗尾草 ME34 的组织培养过程中, 发现 1 株生物量变大的突变体植株 *Mu*, 其性状可以稳定遗传给下一代。通过对狗尾草表型观察和幼苗、成苗的农艺性状统计分析, 发现狗尾草突变体幼苗的生物量 (鲜重和干重) 及成苗的株高均显著高于狗尾草野生型植株, 狗尾草突变体成苗的穗长和种子长度也显著长于狗尾草野生型植株, 且均达极显著水平。同时, 对 ME34 和 *Mu* 的叶和茎进行转录组测序, 并对部分基因进行荧光定量 PCR 验证。差异表达基因分析发现, 氮素代谢和调控相关的差异表达基因占差异基因总数的 20% 左右。GO 功能和 KEGG 富集分析同样发现, 生物量大小与氮素的代谢、调控有着密切的关系。利用 DEGseq 方法分析差异基因的变化, 获得了参与氮素吸收、运输、同化和再利用的相关基因, 如硝酸盐转运蛋白 NRT、铵转运蛋白 AMT、硝酸还原酶 NR、亚硝酸还原酶 NiR、谷氨酸合成酶 GOGAT、NLP 家族转录因子以及丝氨酸苏氨酸蛋白激酶等。本研究为谷子等作物的育种工作提供重要分子依据和基础。

关键词: 狗尾草; 生物量; 转录组测序; 氮素利用效率

中图分类号: Q319 文献标志码: A

Transcriptome Analysis and Nitrogen Metabolism Related Gene Mining of a *Setaria viridis* Mutant with Increased Biomass

ZHANG Lili^{1,2}, ZHAO Haixu^{1,2}, HU Shuai^{1,2}, HUO Shanshan^{1,2}, XIA Qiyu^{1,2}, GUO Anping^{1,2}, ZHAO Hui^{1,2*}

1. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Key Laboratory for Biosafety Monitoring and Molecular Breeding in Off-season Reproduction Regions, Sanya, Hainan 572024, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: Biomass is a key factor in plant evolutionary adaptation and yield, and obtaining high-yield crop varieties is always a basic requirement for crop breeding. In this study, a mutant *Mu* with increased biomass was discovered during the tissue culture of *Setaria viridis* ME34, and the trait can be stably inherited to the next generation. Through the observation of the phenotype of *S. viridis* and statistical analysis of the agronomic traits of seedlings and adults, it was found that the biomass (fresh and dry weight) of the mutant seedlings and the adult plant height of *S. viridis* mutant was significantly higher than that of the wild-type plants, and the spike length and seed length were also significantly longer than those of the *S. viridis* wild-type plants, reaching a highly significant level. Transcriptome sequencing was performed on the leaves and stems of ME34 and *Mu*, and some genes were validated by RT-PCR. Differential expression gene analysis revealed that the genes related to nitrogen metabolism and regulation accounted for about 20% of the total differential genes. GO functional and KEGG enrichment analysis also revealed a close relationship between biomass and nitrogen metabolism and regulation. The DEGseq method was used to analyze the changes in the differentially ex-

收稿日期 2024-09-24; 接受日期 2024-11-19

基金项目 海南省院士创新平台科研专项 (No. YSPTZX202102); 三亚崖州湾科技城科技专项 (No. SKJC-2022-PTDX-030); 海南省自然科学基金项目 (No. 323MS086)。

作者简介 张丽丽 (1984—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 植物分子遗传学。*通信作者 (Corresponding author): 赵 辉 (ZHAO Hui), E-mail: zhaohui@itbb.org.cn。

pressed genes, and some related genes involved in nitrogen absorption, transport, assimilation, and reuse were obtained, such as nitrate transporter NRT, ammonium transporter AMT, nitrate reductase NR, nitrite reductase NiR, glutamate synthase GOGAT, NLP family transcription factors, and serine threonine protein kinase. Through the above research, important molecular basis and foundation are provided for the breeding work of crops such as foxtail millet.

Keywords: *Setaria viridis*; biomass; transcriptome sequencing; nitrogen utilization efficiency

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.04.008

狗尾草 (*Setaria viridis*) 属单子叶植物纲禾本科黍亚科, 是重要粮食作物谷子 (*S. italica*) 的野生近缘种。谷子是单子叶植物禾本科狗尾草属植物, 二者核型基本相同, 带型相近, 基因组序列几乎一致^[1], 因此狗尾草也是研究谷子基因的重要模型。与谷子相比, 狗尾草具有生长周期短 (1.5~2 个月)、植株矮小、易于种植 (尤其是室内培养箱大量种植)、能产生大量自交系种子等优点。因此, 研究狗尾草对 C4 植物如谷子、玉米、高粱、甘蔗等, 尤其是对同属的谷子具有重要的借鉴作用, 为快速挖掘谷子优良基因奠定基础。

氮素是植物生长和发育的重要营养元素, 是限制作物产量和品质的关键因素^[2]。随着全球人口对粮食日益增长的需求, 氮肥在农业生产中的投入也在逐年增加, 然而, 投入的氮肥只有不到一半被作物吸收, 剩余的则以一氧化二氮的形式排放到大气中或以硝酸盐的形式排到地下, 造成一系列严重的环境问题, 因此, 提高农作物自身的氮素利用效率 (nitrogen use efficiency, NUE) 显得更为重要^[3]。提高 NUE 可有效提高作物产量、减少氮肥需求、减轻环境污染、实现粮食安全和确保农业可持续发展。

本课题组在对狗尾草 ME34 组织培养过程中发现了 1 株生物量变大的突变体 *Mu*, 其株高、穗长及籽粒大小均显著增加, 并且该性状能够稳定遗传。生物量对于植物的生长发育和最终产量都具有重要影响。通常植物的生物量越大, 意味着其进行光合作用的能力越强, 生长更为旺盛, 能量转化效率也相应提高, 从而有可能获得更高的产量。因此, 在农作物生产过程中, 农民经常关注农作物的生物量, 通过采取合理的栽培管理措施来增加农作物的生物量, 以期达到提高产量的目的。其中, 籽粒大小是植物进化适应和种子产量的关键因素^[4-7], 大种子的幼苗被认为在胁迫条件下具有更强的生存能力, 而小种子的植物物种则被认为具有更好的繁殖后代的能力^[8]。本研究利用转录组测序, 对狗尾草野生型 ME34 和狗尾

草生物量变大的突变体材料 *Mu* 的叶和茎分别进行转录组测序, 分析突变体材料与野生型材料相比所引起的基因变化, 挖掘与植物生物量大小相关的基因资源, 尤其是与氮素代谢和调控相关的差异基因, 从而为下一步谷子的育种工作提供一定的分子线索和基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 以狗尾草野生型 ME34 品系 (本实验室保存) 和狗尾草野生型 ME34 的突变体 *Mu* (中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供) 为植物材料, 筛选与狗尾草生物量变大的性状相关基因。

1.1.2 试剂耗材 使用 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Kit) 检测 total RNA 的浓度、RIN 值、28S/18S 和片段大小; 使用紫外分光光度计 NanoDropTM 检测植物样本的纯度; 转录组测序仪器采用 DNBSEQ-T7。

1.2 方法

1.2.1 狗尾草的培养 选取经休眠处理的狗尾草 ME34 和突变体 *Mu*, 干燥其成熟种子, 用无菌水清洗多次后播种于放有 3 层滤纸并用无菌水完全浸湿的培养皿中, 每皿培养基约放置 20 粒种子, 于 24 °C 光/暗培养 (12 000 lx, 16 h/8 h, 50%~60% 湿度), 7 d 后分别对狗尾草 ME34 和 *Mu* 的叶和茎冻样 0.5 g, 以供提取 RNA。同时, 对在培养皿里生长 7 d 的 ME34 和 *Mu* 幼苗 (完整植株) 直接称量, 测量鲜质量, 然后将狗尾草幼苗置于 60 °C 烘箱, 24 h 后称量干质量。

将生长 7 d 的幼苗转移至盆中, 于 30 °C 光培养/22 °C 暗培养 (12 000 lx, 16 h/8 h, 50%~60% 湿度) 45 d 后, 测量成苗的株高和穗长, 60 d 后测量收获的种子长度。

1.2.2 文库构建及转录组分析 狗尾草 ME34、*Mu* 叶和茎的 RNA 提取, 转录组的文库构建及基础的生物信息学分析均由深圳华大基因股份有限

公司完成。本项目使用 DNBSEQ 平台完成转录组的测序。转录组差异基因的筛选标准为 Fold Change ≥ 2 和 $Q<0.001$ 。

1.2.3 转录组及农艺性状数据统计分析 分别取 30 株 ME34 和 *Mu* 植株幼苗进行总生物量统计(鲜质量和干质量)。对 ME34 和 *Mu* 的成苗进行株高、穗长和种子长度测量，采用 Excel 2016 软件进行数据分析。利用 DPS 数据处理系统对试验数据进行统计、差异显著性检验和相关性分析。

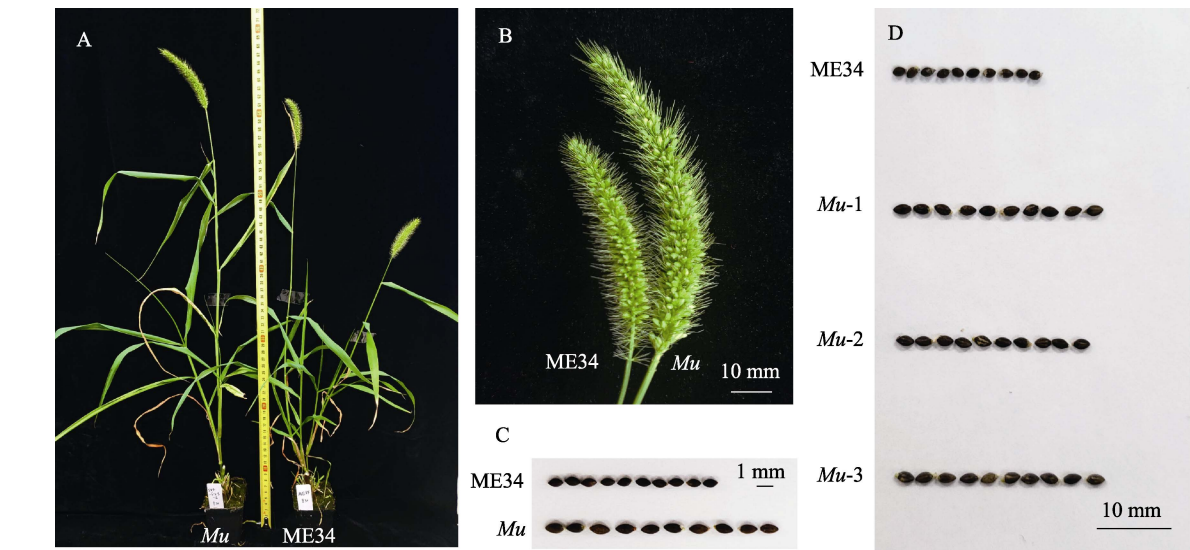
1.2.4 转录组荧光定量验证 将转录组测序时提取的狗尾草 ME34、*Mu* 的叶和茎的总 RNA 通过反转录试剂盒合成 cDNA。以反转录产物为模板，以狗尾草 ME34 看家基因 *actin* (登录号：Sevir.9 G114100,) 为内参，对转录组部分基因进行荧光定量 PCR。荧光定量 PCR 程序为：95 ℃ 预变性 3 min；95 ℃ 变性 15 s，60 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 35 s，共 40 个循环。引物序列为 Actin-F：

CTTCCAGCCATCTTTTCATT；Actin-R：CCAGA CTCGTCGTACTCAG。

2 结果与分析

2.1 表型观察及农艺性状的统计分析

通过对狗尾草野生型 ME34 和突变体 *Mu* 成苗的表型观察及农艺性状进行统计分析发现，相较于野生型，狗尾草突变体 *Mu* 的株高更高，生物量更大，突变体株高增加了 21.36%，并且达到极显著差异 ($P=0.003<0.01$)；相较于野生型，狗尾草突变体的穗长更长，增加了 41.79%，并且达到极显著差异 ($P=0<0.01$)；突变体 M_0 代植株的种子与野生型相比更大更长，突变体籽粒长度增加了 36.50%，并且达到极显著差异 ($P=0.0007<0.01$)；突变体 M_1 代植株的种子与野生型相比延续了上一代的性状，种子依然更大更长 (图 1，图 2)。



A: ME34 和 *Mu* 植株表型图；B: 穗子表型图；C: ME34 和 *Mu* 植株 M_0 代种子表型；D: ME34 植株的种子表型，*Mu*-1、*Mu*-2 和 *Mu*-3 为狗尾草突变体植株 M_1 代种子表型。
A: The phenotype of the mutant and wild-type ME34 of *S. viridis*; B: The phenotypes of spikes of the mutant and wild-type ME34; C: *Mu* represents the M_0 seed phenotype of the *S. viridis* mutant, while ME34 represents the seed phenotype of the wild-type plant of *S. viridis*; D: ME34 represents the seed phenotype of wild-type of *S. viridis*, while *Mu*-1, *Mu*-2 and *Mu*-3 represent the M_1 generation seed phenotypes of *S. viridis* mutant.

图 1 狗尾草突变体表型观察
Fig. 1 Phenotype observation of *S. viridis* mutant

对生长 7 d 的狗尾草野生型 ME34 和突变体 *Mu* (共 30 株) 的生物量进行统计分析发现，相较于野生型，突变体鲜重增加 51.53%，并且达到极显著差异 ($P=0.0001<0.01$)；突变体干重增加 57.00%，并且达到极显著差异 ($P=0<0.01$) (图 2)。

2.2 狗尾草样本转录组测序数据质量分析

本研究共检测了 12 个样品，样品比对基因组的平均比率为 93.37%，比对基因集的平均比率为 83.80% (表 1)。预测的新基因为 923 个，共检测到表达的基因数为 26 041，其中已知的基因为 25 131 个，预测的新基因为 910 个。测序的原

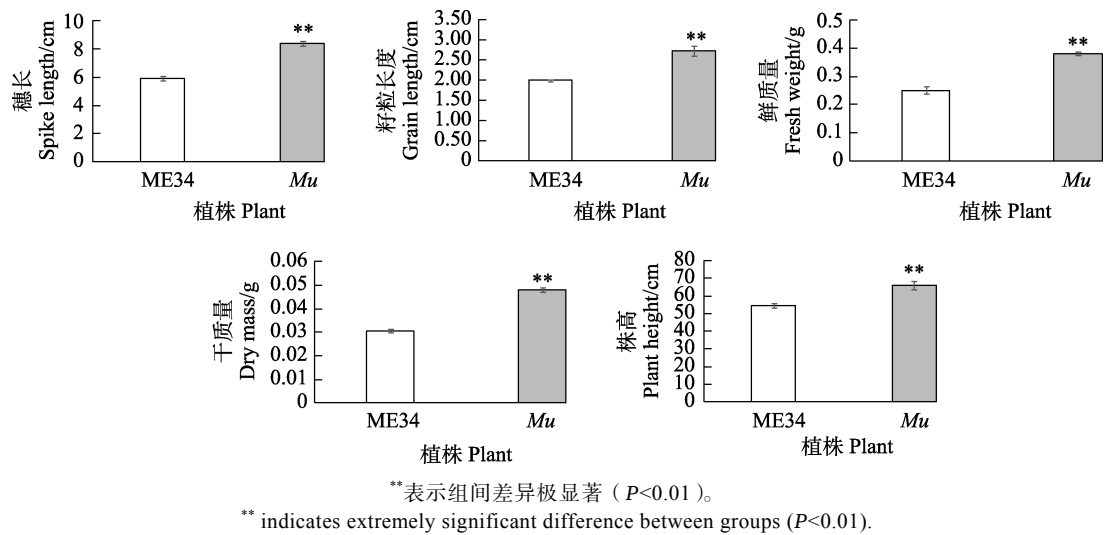


图 2 狗尾草突变体农艺性状统计分析

Fig. 2 Statistical analysis of agronomic traits of *S. viridis* mutant

表 1 RNA-seq 的通量和质量检测
Tab. 1 Throughput and quality detection of RNA-seq

植株类型 Plant type	组织 Tissue	编号 No.	过滤前的 reads 数 Total raw reads/Mb	过滤后的 reads 数 Total clean reads/Mb	过滤后的 碱基总数 Total clean bases/Gb	碱基识别 准确率 Clean reads Q20/%	碱基识别 准确率 Clean Reads Q30/%	过滤后的 reads 比例 Clean reads ratio/%	比对上参考基因组 的 clean reads 比例 Total mapping ratio/%	唯一比对上参考基因 组某一位置的 clean reads 比例 Uniquely mapping ratio/%
Mu	茎	M7d_2_1	45.44	44.59	6.69	98.41	94.65	98.13	93.58	73.61
	茎	M7d_2_2	43.69	43.00	6.45	98.28	94.31	98.43	94.17	73.63
	茎	M7d_2_3	45.48	44.17	6.63	98.53	95.10	97.12	94.55	74.53
	叶	M7d_3_1	45.44	44.63	6.69	98.35	94.37	98.21	94.13	73.35
	叶	M7d_3_2	41.89	41.14	6.17	98.15	93.91	98.21	94.12	72.67
	叶	M7d_3_3	43.69	43.00	6.45	98.37	94.43	98.42	94.79	74.05
ME34	茎	S7d_2_1	47.36	44.68	6.70	98.14	93.91	94.32	91.64	71.61
	茎	S7d_2_2	43.69	42.69	6.40	97.88	92.97	97.71	91.21	70.77
	茎	S7d_2_3	43.69	42.63	6.39	97.69	92.39	97.57	92.47	70.63
	叶	S7d_3_1	43.32	42.35	6.35	97.87	93.00	97.76	93.17	71.16
	叶	S7d_3_2	43.69	42.78	6.42	98.00	93.31	97.91	93.23	71.91
	叶	S7d_3_3	45.45	44.33	6.65	98.23	94.21	97.54	93.41	71.96

始数据经过过滤及测序质量控制, 12 个样本中的 Q20 (表示碱基识别错误的概率为 1%) 所占比例均大于 97%, Q30 (表示碱基识别错误的概率为 0.1%) 所占比例均大于 92%, 以上结果表明测序数据质量可靠, 可用于后续分析。

2.3 转录组基因差异表达分析

在狗尾草野生型 ME34 和狗尾草突变体 *Mu* 的叶转录组差异分析中, 共发现 3167 个差异基因, 其中上调基因 1893 个, 下调基因 1274 个; 在狗尾草野生型 ME34 和狗尾草突变体 *Mu* 茎的转录组差异分析中, 共发现 4667 个差异基因, 其中上调基因 2157 个, 下调基因 2510 个 (图 3)。

在狗尾草野生型 ME34 和狗尾草突变体 *Mu* 的叶和茎的交叉转录组差异分析中发现 1737 个共同差异表达的基因。

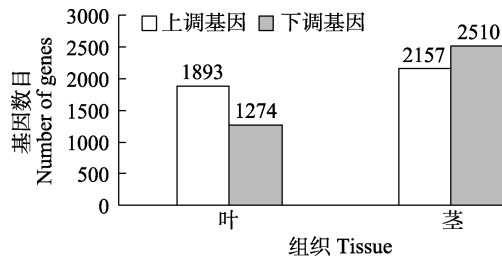


图 3 狗尾草转录组差异基因统计

Fig. 3 Statistics of differentially expressed genes in transcriptome of the *S. viridis*

2.4 转录组差异表达基因 GO (gene gntology) 功能富集分析

GO 富集分析通常依据细胞组分、分子功能和生物过程这 3 个方向进行分类，图 4 为狗尾草野生型叶片和突变体叶片（ME34-leaf vs *Mu*-leaf）转录组差异基因的 GO 功能富集分析的前十名。在细胞组成的分类中，差异基因主要集中在膜的固有成分、膜的组成部分等部位；在分子功能分

类中，差异基因主要集中在 ADP 结合、腺苷核糖核苷酸结合等功能；在生物过程分类中，差异基因主要集中在吡啶烷基胺生物合成过程、色氨酸生物合成过程、β-葡聚糖生物合成过程、植物型原代细胞壁生物合成以及纤维素生物合成过程等生物过程。在狗尾草野生型茎和突变体茎（ME34-stem vs *Mu*-stem）的转录组差异基因的 GO 功能富集分析如图 5 所示，在细胞组成分类中，

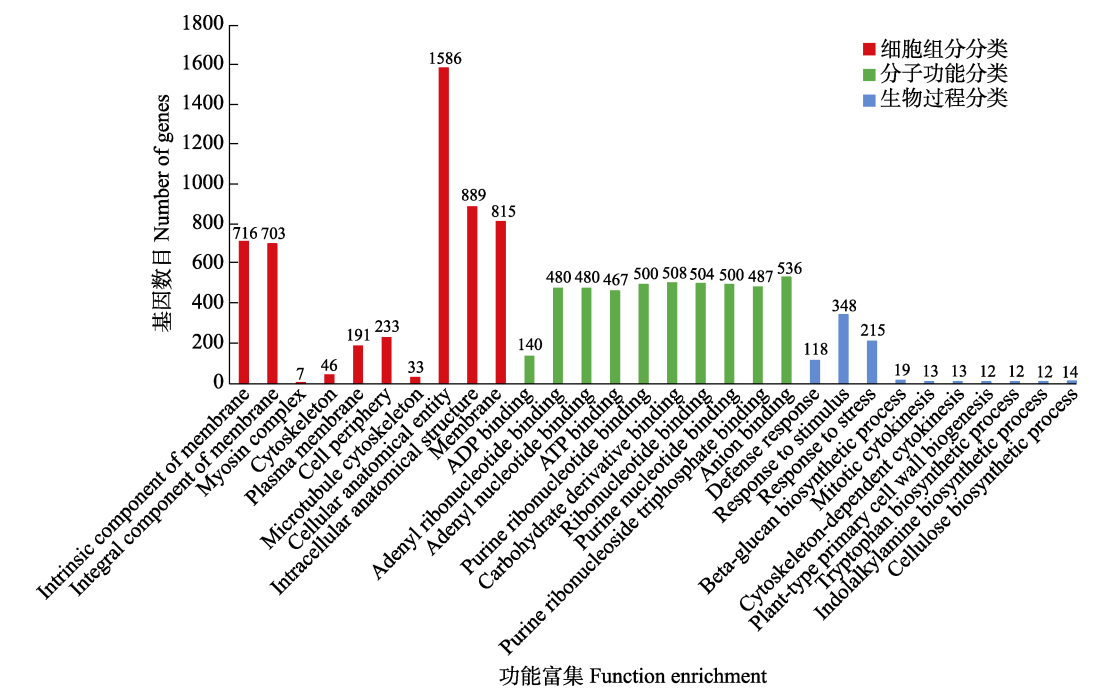


图 4 ME34-leaf vs *Mu*-leaf 的差异表达基因 GO 富集分析
Fig. 4 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in ME34-leaf vs *Mu*-leaf group

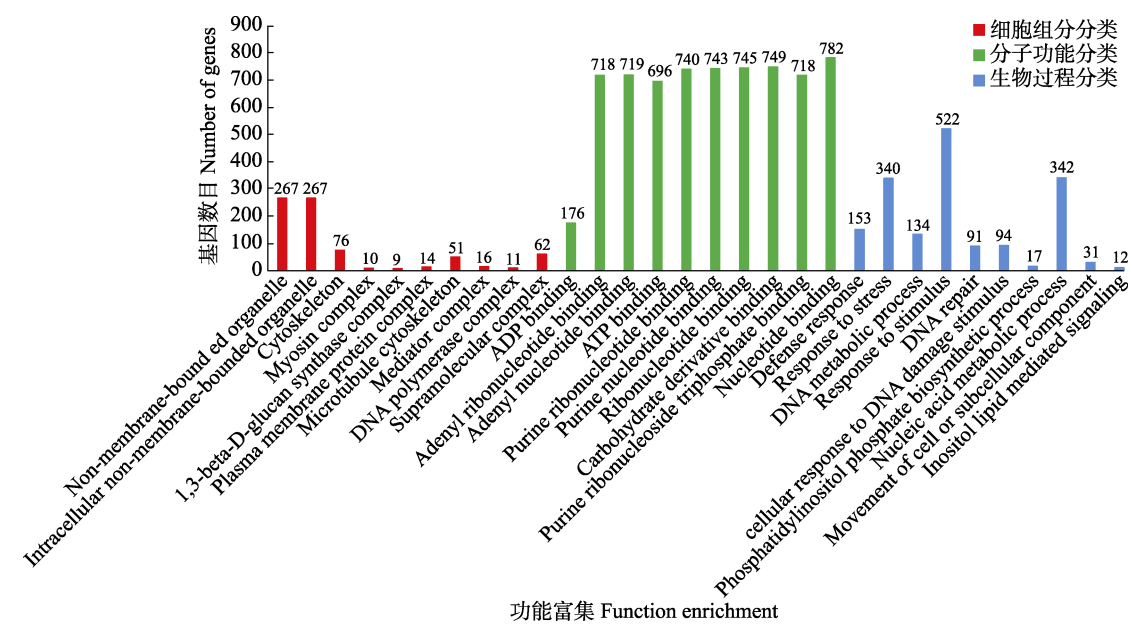


图 5 ME34-stem vs *Mu*-stem 的差异表达基因 GO 富集分析
Fig. 5 GO enrichment analysis of differentially expressed genes in ME34-stem vs *Mu*-stem group

差异基因主要集中在非膜结合细胞器、细胞内非膜结合细胞器等部位；在分子功能分类中，差异基因主要集中在 ADP 结合、腺苷核糖核苷酸结合等功能；在生物过程分类中，差异基因主要集中在防御反应、对压力的反应等生物过程。

2.5 转录组差异表达基因 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路分析

通过 KEGG 富集分析发现，在 ME34-leaf vs Mu-leaf 差异表达基因显著富集的前 20 个通路中，包含参与细胞过程、环境信息过程、遗传信息过

程和新陈代谢过程，如 ABC 转运蛋白和植物激素信号转导，黄曲霉毒素生物合成，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成以及油菜素内酯生物合成等（图 6）。在 ME34-stem vs Mu-stem 差异表达基因显著富集的前 20 个通路中，包括 ABC 转运蛋白，磷脂酰肌醇信号系统，植物激素信号转导，MAPK 信号通路——植物、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成，肌醇磷酸盐代谢，烟酸和烟酰胺代谢，不饱和脂肪酸的生物合成及 β -丙氨酸代谢等（图 7）。

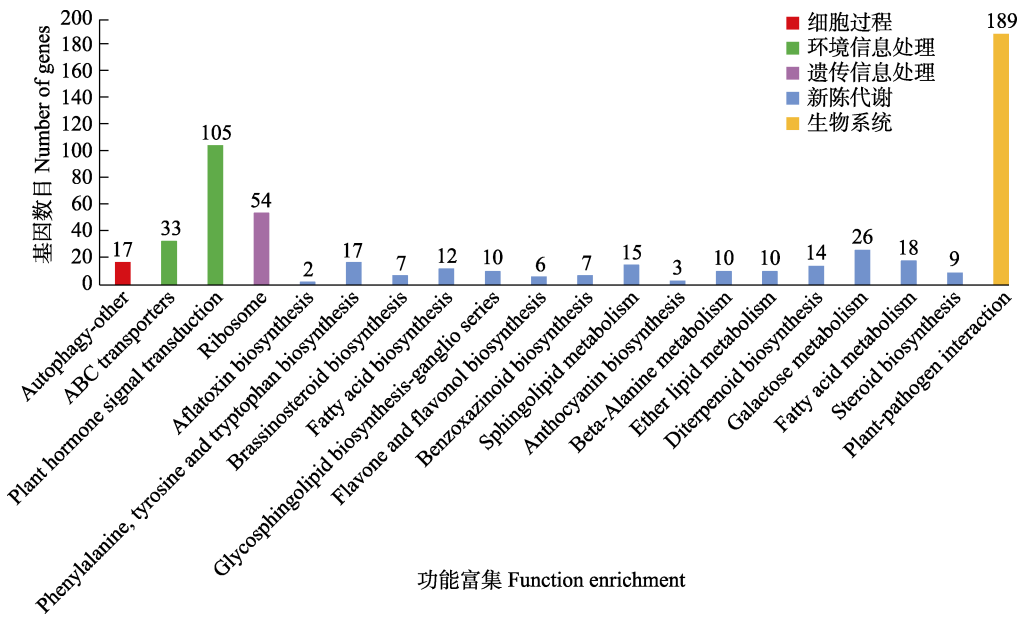


图 6 ME34-leaf vs Mu-leaf 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of ME34-leaf vs Mu-leaf differentially expressed genes

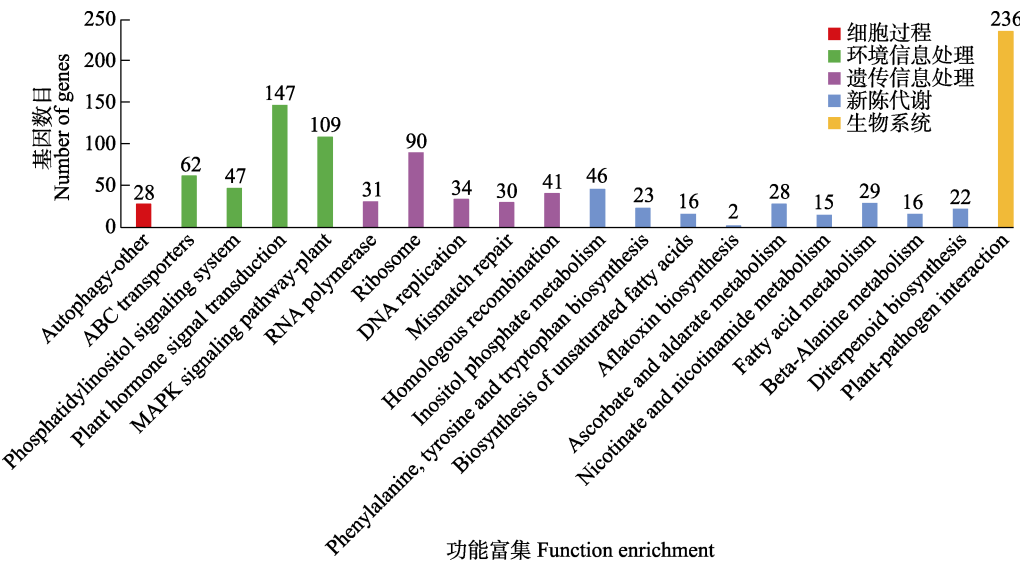


图 7 ME34-stem vs Mu-stem 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment analysis of ME34-stem vs Mu-stem differentially expressed genes

2.6 与氮素代谢和调控相关差异表达基因的统计、热图分析及荧光定量 RCR 验证

与氮素代谢和调控相关差异表达基因的统计结果显示, ME34-leaf vs *Mu*-leaf 转录组中共发现 18 个与氮素代谢和调控相关的 GO 分类, 去除重复的基因后, 共富集到 621 个差异基因, 占叶片转录组中差异基因总数的 19.61%, 其中上调基因 396 个, 下调基因 225 个 (表 2)。ME34-stem vs *Mu*-stem 转录组中共发现 21 个与氮素代谢和调控相关的 GO 分类, 去除重复的基因后, 共富集到 1048 个差异基因, 占茎转录组中差异基因总数的 22.46%, 其中上调基因 430 个, 下调基因 618 个。叶片和茎的转录组中与氮素代谢和调控相关的共同差异表达基因 331 个, 占 2 个转录组中共同差异表达基因总数的 19.06% (表 3)。

通过基因注释, GO 功能富集和 KEGG 通路

表 2 ME34-leaf vs *Mu*-leaf 转录组中与氮素代谢和调控相关差异表达基因的统计

Tab. 2 Statistics of differentially expressed genes related to nitrogen metabolism and regulation in transcriptome of ME34-leaf vs *Mu*-leaf

序号 No.	GO 分类 GO classification	基因数目 Number of genes
1	nitrogen compound metabolic process	414
2	organonitrogen compound metabolic process	287
3	cellular nitrogen compound metabolic process	242
4	regulation of nitrogen compound metabolic process	163
5	organonitrogen compound biosynthetic process	118
6	cellular nitrogen compound biosynthetic process	109
7	nitrogen compound transport	61
8	organonitrogen compound catabolic process	52
9	positive regulation of nitrogen compound metabolic process	48
10	cellular nitrogen compound catabolic process	19
11	negative regulation of nitrogen compound metabolic process	19
12	response to nitrogen compound	13
13	response to organonitrogen compound	9
14	reactive nitrogen species metabolic process	3
15	nitrogen cycle metabolic process	3
16	cellular response to nitrogen compound	3
17	cellular response to nitrogen levels	3
18	cellular response to reactive nitrogen species	2

表 3 ME34-stem vs *Mu*-stem 转录组中与氮素代谢和调控相关差异表达基因的统计

Tab. 3 Statistics of differentially expressed genes related to nitrogen metabolism and regulation in transcriptome of ME34-stem vs *Mu*-stem

序号 No.	GO 分类 GO classification	基因数目 Number of genes
1	nitrogen compound metabolic process	716
2	cellular nitrogen compound metabolic process	497
3	organonitrogen compound metabolic process	393
4	regulation of nitrogen compound metabolic process	262
5	cellular nitrogen compound biosynthetic process	203
6	organonitrogen compound biosynthetic process	169
7	nitrogen compound transport	135
8	organonitrogen compound catabolic process	77
9	positive regulation of nitrogen compound metabolic process	74
10	cellular nitrogen compound catabolic process	41
11	negative regulation of nitrogen compound metabolic process	37
12	response to nitrogen compound	16
13	response to organonitrogen compound	10
14	cellular response to nitrogen compound	5
15	cellular response to nitrogen levels	5
16	cellular response to organonitrogen compound	3
17	cellular response to nitrogen starvation	3
18	cellular response to reactive nitrogen species	2
19	reactive nitrogen species metabolic process	2
20	nitrogen utilization	2
21	nitrogen cycle metabolic process	2

分析得到的与氮素代谢、调控最为直接相关的差异基因制成热图 (图 8)。ME34-leaf vs *Mu*-leaf 转录组中共筛选到 28 个差异基因, 其中上调基因 24 个, 下调基因 4 个。ME34-stem vs *Mu*-stem 转录组中共筛选到 32 个差异基因, 其中上调基因 16 个, 下调基因 16 个。在 2 个组织中共筛选出 10 个与氮素代谢、调控共同直接相关的差异基因, 其中上调基因 7 个, 下调基因 3 个 (表 4), 且这 10 个基因在 2 个组织中表达模式相似。

从上述制成热图的 2 个转录组基因中各选 6 个基因进行荧光定量 PCR 验证 (图 9), 以检验转录组数据的可靠性。对比图 8 和图 9 中的基因表达情况可知, 基因的表达趋势一致。说明转录组数据真实可靠。

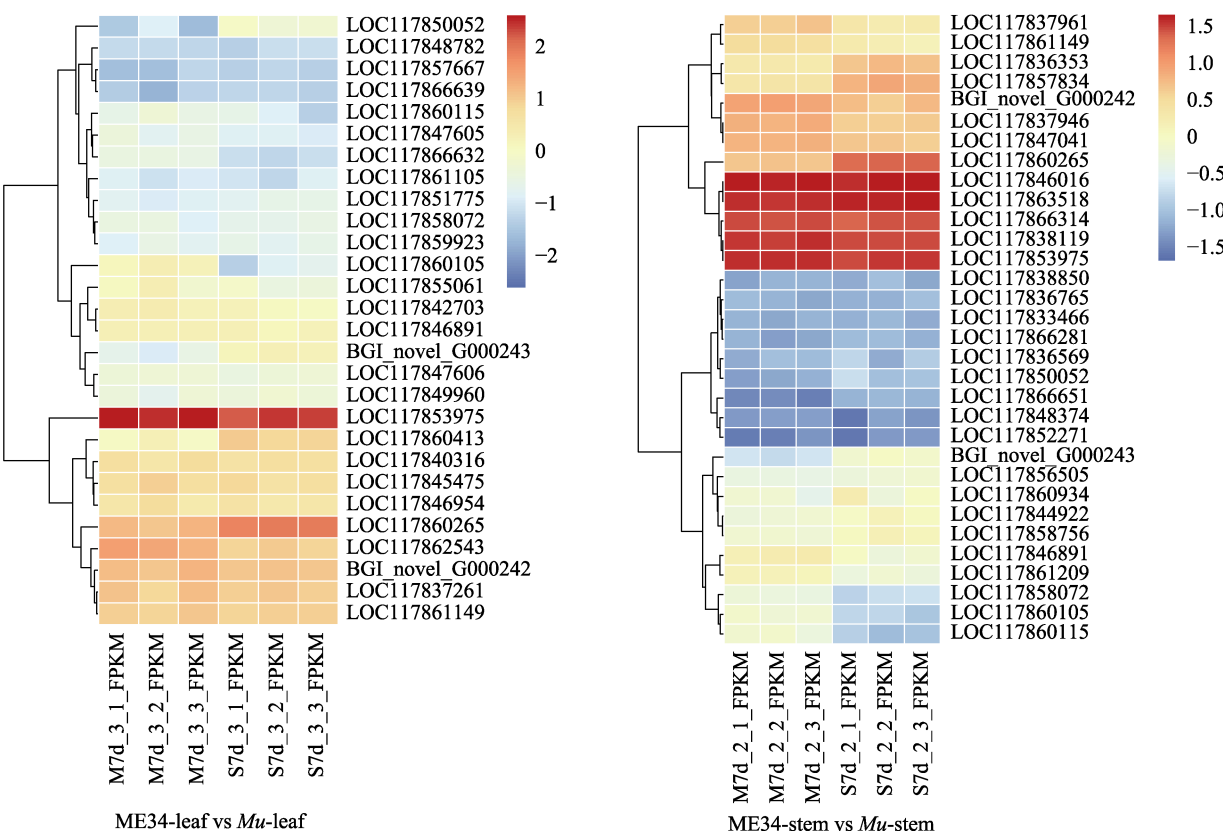


图 8 ME34-leaf vs Mu-leaf 和 ME34-stem vs Mu-stem 转录组中氮素代谢和调控相关差异基因热图分析

Fig. 8 Heat map analysis of differentially expressed genes related to nitrogen metabolism and regulation in transcripts of ME34-leaf vs Mu-leaf and ME34-stem vs Mu-stem

表 4 ME34-leaf vs Mu-leaf 和 ME34-stem vs Mu-stem 转录组中与氮素代谢和调控相关共同差异表达基因的统计

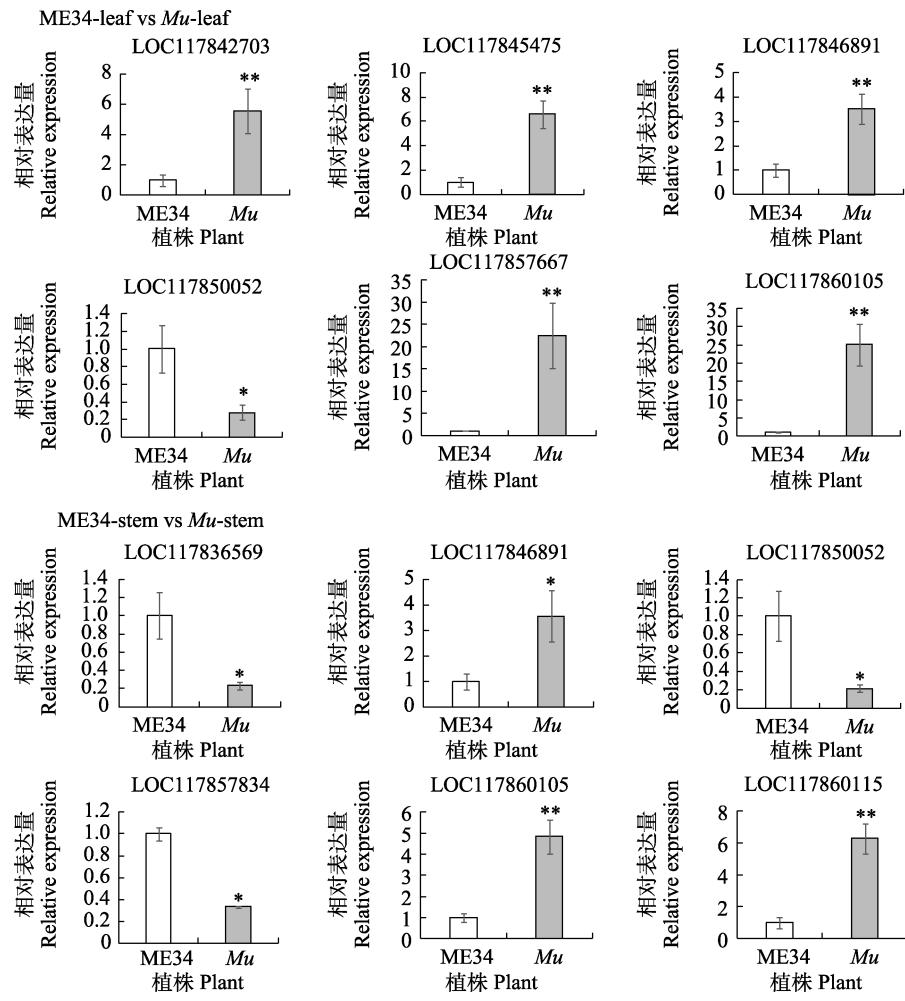
Tab. 4 Statistical analysis of common differentially expressed genes related to nitrogen metabolism and regulation in transcripts of ME34-leaf vs Mu-leaf and ME34-stem vs Mu-stem

基因登录号 Gene accession No.	叶片转录组差异 基因倍数 log ₂ Ratio	茎转录组差异 基因倍数 log ₂ Ratio	基因注释 Gene description
LOC117860115	3.21	2.23	Partner protein of NRT2, Activator for NRT2, High-affinity nitrate transport
LOC117858072	1.73	1.16	co-factor for nitrate, reductase and xanthine dehydrogenase 7
LOC117860105	5.32	1.91	Partner protein of NRT2, Activator for NRT2, High-affinity nitrate transport
LOC117846891	1.41	1.21	Low-affinity nitrate transporter, Root-to-shoot nitrate transport, Vascular bundle development
LOC117853975	1.08	1.30	Similar to Nitrate-induced NOI protein-like protein
LOC117861149	1.07	1.09	Similar to carbonic anhydrase
BGI_novel_G000242	1.14	1.28	5'-AMP-activated protein kinase, regulatory beta subunit
BGI_novel_G000243	-1.42	-2.55	5'-AMP-activated protein kinase, regulatory beta subunit
LOC117860265	-1.11	-1.36	Determination of the grain yield, Modulation of nitrogen utilization
LOC117850052	-1.56	-2.68	Serine/threonine protein kinase-related domain containing protein

3 讨论

本课题组在狗尾草野生型 ME34 的组织培养中发现了 1 株株高、穗长和种子长度均显著高于野生型的突变体 Mu 材料，生长 1 周的突变体狗尾草的生物量显著高于野生型狗尾草。为了挖掘

和生物量变大性状相关的目标基因，分别对野生型狗尾草 ME34 和突变体狗尾草 Mu 叶和茎的转录组进行分析，发现无论是叶片的转录组还是茎的转录组，与氮素代谢、调控相关的差异表达基因占总的差异基因总数的 20%左右，推测与氮素



*表示组间差异显著 ($P<0.05$); **表示组间差异极显著 ($P<0.01$)。
* indicates significant difference between groups ($P<0.05$); ** indicates extremely significant difference between groups ($P<0.01$).

图 9 ME34-leaf vs *Mu*-leaf 和 ME34-stem vs *Mu*-stem 转录组中氮素代谢和调控相关差异基因荧光定量 PCR 验证
Fig. 9 RT-PCR validation of nitrogen metabolism and regulation related differential genes in transcriptomes of ME34-leaf vs *Mu*-leaf and ME34-stem vs *Mu*-stem

的代谢、调控相关基因对狗尾草生物量的大小至关重要。

通过转录组学的叶片 GO 功能富集分析中的生物过程分类发现，有一半以上的生物过程，如吡啶烷基胺生物合成过程、色氨酸生物合成过程、 β -葡聚糖生物合成过程、植物型原代细胞壁生物合成以及纤维素生物合成过程都直接或者间接与氮素的代谢有密切关系。叶片和茎的 KEGG 富集分析中，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成，烟酸和烟酰胺代谢，黄曲霉毒素生物合成，油菜素内酯生物合成以及 β -丙氨酸代谢等新陈代谢过程均与氮素的代谢有着密不可分的关系。通过转录组中与氮素代谢、调控相关的 GO 分类及基因注释，结合 GO 功能富集和 KEGG 通路分析，得到与氮素代谢、调控最为直接相关的差异基因。

NUE 是一个涉及遗传和环境因素的复杂性状，且主要受到氮素吸收、运输、同化和再利用效率这几个因素的影响^[9]。植物对氮素的吸收转运根据土壤中氮源的不同，主要分为以下 3 种形式：酰胺态氮、硝态氮和铵态氮的吸收转运。硝酸盐的吸收和同化已成为影响作物氮利用率的重要因素^[10]。通过分析转录组的差异基因发现，在叶片转录组中，硝酸盐转运蛋白（nitrate transporter, NRT）基因，比如 LOC117860105、LOC117860115、LOC117866632、LOC117842703、LOC117846891、LOC117845475、LOC117857667 和 LOC117866639 全部上调表达。在茎转录组中，硝酸盐转运蛋白基因，如 LOC117860105、LOC117860115 和 LOC117846891 上调表达，LOC117836569、LOC117866281、LOC117852271、

和 LOC117866651 下调表达。硝态氮是植物从土壤中吸收和利用氮源的主要形式,其吸收和转运主要由 NPF (nitrate transport /peptide transport family) 基因家族成员完成。谷子 *SiNPF4.12* 基因协同调控了谷子氮素吸收利用和根系与籽粒的生长发育,有塑应用于作物氮高效高产育种^[11]。近年来,硝酸盐转运蛋白基因作为一个重要的家族已被用于作物育种,以提高氮素利用率^[12-18], *OsNRT1.1A* (*OsNPF6.3*) 是硝酸盐转运蛋白家族的成员,参与调节氮的利用和开花,为同时实现高产和早熟提供了目标, *OsNRT1.1A* 不仅可以上调硝酸盐和铵等氮利用相关基因的表达,还可以调控开花相关基因。与野生型相比, *osnrt1.1a* 突变体表现出氮利用率降低和开花延迟,相比之下, *osnrt1.1a* 在水稻中的过表达大大提高了氮利用效率 (nitrogen use efficiency, NUE) 和粮食产量,成熟时间也显著缩短^[19]。在玉米中对氮供应响应最强的基因是 *ZmNRT2.1* 和 *ZmNRT2.2*, 氮饥饿处理后,其在根部的表达增加了 10 倍以上。然而,在恢复氮供应 24 h 后,其表达恢复到对照水平^[20]。高粱的水培试验表明^[21],在氮饥饿条件下, *NRT2.2*、*NRT2.3*、*NRT3.1*、*NRT4.3*、*NRT4.4* 和 *NRT6.3* 在氮耐受和氮敏感基因型中的表达均上调。并且,与氮敏感基因型相比,氮耐受基因型中硝酸盐转运蛋白基因 *NRT2.4*、*NRT3.1* 和 *NRT4.5* 的转录本更丰富。由此推测这 3 个硝酸盐转运蛋白基因的过表达可能会提高氮敏感基因型对氮饥饿的耐受性,从而提高高粱氮素利用效率。在番茄中, *LeNRT2.3* 介导低浓度硝酸盐的转运, *LeNRT2.3* 的过表达可以增加番茄根系对 NO_3^- 的吸收以及 NO_3^- 从根到茎的运输,从而增加生物量和果实重量^[22]。TANG 等^[23]通过全基因组关联分析,鉴定出硝酸盐转运蛋白 *OsNPF6.1HapB* 的优势单倍型,氮转运蛋白 *OsNPF6.1HapB* 由转录因子 *OsNAC42* 反式调节,通过激活水稻对硝酸盐的吸收来提高 NUE。

铵态氮在土壤中主要以 NH_4^+ 的形式存在,铵转运蛋白 (AMT) 在铵 (NH_4^+) 的吸收和转运中起着至关重要的作用^[24]。在叶片转录组中,铵转运蛋白 (ammonium transporter, AMT), 如 LOC117846954、LOC117840316 和 LOC117862543 全部上调表达。铵可以被铵转运蛋白 (AMT) 吸收^[25-27], *OsAMT1;1* 在低和高 NH_4^+ 条件下会显著促进对 NH_4^+ 的吸收,在次优和最佳氮条件下提高

了种子产量^[28-29]。木薯 *MeAMT1* 基因转化拟南芥后在缺铵反应中比野生型植物生长更好,表明 *MeAMT1* 在低铵反应中起着重要作用,该研究为在其他植物中高效利用氮提供了基础^[30]。木薯 *MeAMT2* (*MeAMT2.3*、*MeAMT2.5* 和 *MeAMT2.6*) 在缺铵条件下表达上调。互补实验表明,用 *MeAMT2.3*、*MeAMT2.5* 或 *MeAMT2.6* 转化的酵母突变株 *TM31019b* 在缺铵条件下比未转化的酵母细胞生长更好,这表明 *MeAMT2.3*、*MeAMT2.5* 和 *MeAMT2.6* 可能是木薯缺铵反应的主要因素,该研究为进一步研究木薯氮素高效利用提供了依据^[31]。甘蔗 *ScAMT1.1* 与水稻 *AMT1.1* 具有 91.57% 的同源性,甘蔗 *ScAMT1.1* 在水稻中稳定过表达后,在低氮处理下, *ScAMT1.1* 过表达转基因水稻的株高和鲜重分别比野生型高 36.48% 和 51.55%。转基因植物中铵同化关键酶 GS 和 GDH 的活性以及铵同化关键基因 (包括 *GS1.1*、*GS1.2*、*GDH*、*Fd-GOGAT* 和 *NADH-GOGAT2*) 的表达水平均显著高于野生型。在盆栽试验中,转基因水稻的粒数和单株产量分别比野生型高 6.44% 和 9.52%。甘蔗 *ScAMT1.1* 在低氮肥条件下具有提高铵同化能力和转基因水稻产量的潜力,该研究为改良氮利用率高的甘蔗品种提供了重要的功能基因^[32]。增强铵的吸收和再活化将为未来提高作物氮利用率提供一种有前景的策略。

氮素在进行同化时,硝酸根离子在胞质中通过硝酸还原酶 (nitrate reductase, NR) 还原成亚硝酸根离子,然后再通过亚硝酸还原酶 (nitrite reductase, NiR) 还原成铵根离子,最后经过 GS/GOGAT (谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶, glutamine synthetase / glutamate synthase) 循环合成谷氨酸后被植物生长所利用。在叶片转录组中, NADPH 依赖性硝酸还原酶 (NR) LOC117860413 下调表达。在茎转录组中亚硝酸还原酶 LOC117866314 上调表达,在叶片转录组中,还有参与氮素同化过程的基因 LOC117847605 和 LOC117847606 全部上调表达。在茎转录组中,谷氨酸合成酶基因 LOC117857834 和 LOC117848374 下调表达。籼稻和粳稻亚种在硝酸盐同化能力和 NUE 方面存在差异,GAO 等^[33]发现这种差异的主要成分是由编码 NADH/NADPH 依赖性硝酸还原酶 (NR) 的基因 *OsNR2* 的等位基因变异引起的,籼稻 *OsNR2* 表现出更大的 NR 活性,籼稻 *OsNR2* 还可以通过与编码硝酸盐转运蛋白的基因

OsNRT1.1B 相互作用促进硝酸盐的摄取, 这些特性使籼稻 *OsNR2* 能够提高有效分蘖数、籽粒产量和 NUE。在籼稻品种中, 过表达 *OsNADH-GOGAT* 基因可使籽粒重量增加^[34]。*OsNADH-GOGAT2* 的突变会导致了水稻小穗数和生产力的显著降低, 证明了 *OsNADH-GOGAT2* 在叶片向种子再动员中的协调作用^[35]。在茎的转录组中发现 2 个 NLP (NIN-LIKE PROTEIN) 家族转录因子 LOC117836353 和 LOC117844922, 全部下调表达。YU 等^[36]通过 GWAS 的方法在水稻中鉴定了一种与 NUE 相关的 NLP4 蛋白, 发现 *OsNLP4* 可以反式高度激活编码亚硝酸还原酶的关键氮同化基因 *OsNiR*, *OsNLP4-OsNiR* 通过增强氮同化和 NUE, 来最终增加水稻的有效分蘖数和产量。

氮再活化利用是氮利用效率的关键组成部分。硝酸盐转运蛋白 *NRT1.7* 负责将源叶中储存的过量硝酸盐运输到韧皮部, 并促进硝酸盐分配到库叶, 在氮饥饿条件下, *nrt1.7* 突变体表现出生长迟缓, 表明 *nrt1.7* 介导的储存硝酸盐的源库再动员对于维持植物的生长非常重要^[37]。增强源库硝酸盐再活化是提高氮素利用率和作物产量的新策略。

此外, 在叶片和茎的转录组中, 都有一个丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 LOC117850052 下调表达。在植物中, 氮素是影响植物生长和发育的关键营养元素之一, 而丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在植物对氮素的响应和利用中发挥着重要作用。熊延教授团队的研究揭示了 TOR (target of rapamycin) 蛋白激酶在植物氮素营养中的作用机制, TOR 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在植物中, 无机氮 (如硝酸根与铵根) 和有机氮 (如谷氨酰胺等氨基酸) 以彼此相互独立的信号方式激活 ROP2-TOR 信号通路, 从而调控茎尖生长和发育的分子机制, 这一发现为理解植物如何感知和响应氮素营养提供了新的视角, 同时也揭示了丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶在氮素利用率中的关键作用^[38]。

综上所述, 获得高产、高氮利用效率的作物品种一直是作物育种的一项艰巨任务。提高氮利用效率的过程包括氮吸收、氮从根到茎的运输、氮同化和氮再分配, 每一步都是提高氮利用率不可或缺的。本研究通过一个狗尾草生物量变大突变体的转录组分析, 挖掘了与狗尾草氮素代谢和调控等可能与生物量大小相关的基因, 如硝酸盐

转运蛋白 *NRT*、铵转运蛋白 *AMT*、硝酸还原酶 *NR*、亚硝酸还原酶 *NiR*、谷氨酸合成酶 *GOGAT*、*NLP* 家族转录因子以及丝氨酸苏氨酸蛋白激酶等与 NUE 密切相关的基因, 为下一步谷子及同属的作物育种提供理论基础与科学依据。

参考文献

- [1] PERCIFIELD R, HAWKINS J, PONTAROLI A C, ESTEP M, FENG L, VAUGHN J, GRIMWOOD J, JENKINS J, BARRY K, LINDQUIST E, HELLSTEN U, DESHPANDE S, WANG X W, WU X M, MITROS T, TRIPLETT J, YANG X H, YE C Y, MAURO-HERRERA M, WANG L, LI P H, SHARMA M, SHARMA R, RONALD P C, PANAUD O, KELLOGG E A, BRUTNELL T P, DOUST A N, TUSKAN G A, ROKHSAR D, DEVOS K M. Reference genome sequence of the model plant *Setaria*[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(6): 555-561.
- [2] GUO J H, LIU X J, ZHANG Y, SHEN J L, HAN W X, ZHANG W F, CHRISTIE P, GOULDING K W T, VITOUSEK P M, ZHANG F S. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. *Science*, 2010, 327 (5968): 1008-1010.
- [3] MULVANEY R L, KHAN S A, ELLSWORTH T R. Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2009, 38(6): 2295-2314.
- [4] MOLES A T, ACKERLY D D, WEBB C O, TWEDDLE J C, DICKIE J B, WESTOBY M. A brief history of seed size[J]. *Science*, 2005, 307(5709): 576-580.
- [5] GEGAS V C, NAZARI A, GRIFITHS S, SIMMONDS J, FISH L, ORFORD S, SAYERS L, DOONAN J H, SNAPE J W. A genetic framework for grain size and shape variation in wheat[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(4): 1046-1056.
- [6] LINKIES A, GRAEBER K, KNIGHT C, LEUBNER-METZGER G. The evolution of seeds[J]. *The New Phytologist*, 2010, 186(4): 817-831.
- [7] LI N, LI Y H. Signaling pathways of seed size control in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, 33: 23-32.
- [8] JIANG S, JIN X M, LIU Z B, XU R, HOU C C, ZHANG F X, FAN C M, WU H L, CHEN T Y, SHI J H, HU Z M, WANG G D, TENG S, LI L G, LI Y H. Natural variation in *SSW1* coordinates seed growth and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis*[J]. *Cell Reports*, 2024, 43(5): 114150.
- [9] XU G H, FAN X R, MILLER A J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63: 153-182.
- [10] HOU M M, YU M, LI Z Q, AI Z Y, CHEN J G. Molecular

- regulatory networks for improving nitrogen use efficiency in rice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 9040.
- [11] 程金金. 谷子 *SiNPF4.12* 基因在氮素吸收和生长发育过程的功能解析[D]. 晋中: 山西农业大学, 2023.
- CHENG J J. Functional analysis of *SiNPF4.12* gene in nitrogen uptake and growth and development in foxtail millet [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2023.
- [12] ZHANG Z H, CHU C C. Nitrogen-use divergence between Indica and Japonica rice: variation at nitrate assimilation[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(1): 6-7.
- [13] HE X, QU B Y, LI W J, ZHAO X Q, TENG W, MA W Y, REN Y Z, LI B, LI Z S, TONG Y P. The nitrate-inducible NAC transcription factor TaNAC2-5A controls nitrate response and increases wheat yield[J]. *Plant Physiology*, 2015, 169(3): 1991-2005.
- [14] CHEN J G, FAN X R, QIAN K Y, ZHANG Y, SONG M Q, LIU Y, XU G H, FAN X R. *pOsNAR2.1*: *OsNAR2.1* expression enhances nitrogen uptake efficiency and grain yield in transgenic rice plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(10): 1273-1283.
- [15] CHEN J G, LIU X Q, LIU S H, FAN X R, ZHAO L M, SONG M Q, FAN X R, XU G H. Co-overexpression of *OsNAR2.1* and *OsNRT2.3a* increased agronomic nitrogen use efficiency in transgenic rice plants[J]. *Frontiers Plant Science*, 2020, 11: 1245.
- [16] CHEN J G, QI T T, HU Z, FAN X R, ZHU L L, IQBAL M F, YIN X M, XU G H, FAN X R. *OsNAR2.1* Positively regulates drought tolerance and grain yield under drought stress conditions in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 197.
- [17] CHEN J G, ZHANG Y, TAN Y W, ZHANG M, ZHU L L, XU G H, FAN X R. Agronomic nitrogen-use efficiency of rice can be increased by driving *OsNRT2.1* expression with the *OsNAR2.1* promoter[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(8): 1705-1715.
- [18] FENG H M, LI B, ZHI Y, CHEN J G, LI R, XIA X D, XU G H, FAN X R. Overexpression of the nitrate transporter, *OsNRT2.3b*, improves rice phosphorus uptake and translocation[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(8): 1287-1296.
- [19] WANG W, HU B, YUAN D Y, LIU Y Q, CHE R H, HU Y C, OU S J, LIU Y X, ZHANG Z H, WANG H R, LI H, JIANG Z M, ZHANG Z L, GAO X K, QIU Y H, MENG X B, LIU Y X, BAI Y, LIANG Y, WANG Y Q, ZHANG L H, LI L G, SODMERGEN, JING H C, LI J Y, CHU C C. Expression of the nitrate transporter gene *OsNRT1.1A/OsNPF6.3* confers high yield and early maturation in rice[J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(3): 638-651.
- [20] DECHORGNAT J, FRANCIS K L, DHUGGA K S, RAFALSKI J A, TYERMAN S D, KAISER B N. Tissue and nitrogen-linked expression profiles of ammonium and nitrate transporters in maize[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 206.
- [21] YANG G D, ZHOU Y F, HUANG R D, LIN F, HU Z Y, HAO Z Y, LIANG C B, WANG Q, MENG X X, DONG L D. Identification of differentially expressed genes of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] seedlings under nitrogen stress by RNA-SEQ[J]. *Applied Ecology and Environmental Research*, 2019, 17(5): 11525-11536.
- [22] FU Y L, YI H Y, BAO J, GONG J M. *LeNRT2.3* functions in nitrate acquisition and long-distance transport in tomato[J]. *FEBS Letters*, 2015, 589(10): 1072-1079.
- [23] TANG W J, YE J, YAO X M, ZHAO P Z, XUAN W, TIAN Y L, ZHANG Y Y, XU S, AN H Z, CHEN G M, YU J, WU W, GE Y W, LIU X L, LI J, ZHANG H Z, ZHAO Y Q, YANG B, JIANG X Z, PENG C, ZHOU C, TERZAGHI W, WANG C M, WAN J M. Genome-wide associated study identifies *NAC42*-activated nitrate transporter conferring high nitrogen use efficiency in rice[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5279.
- [24] LOQUÉ D, VON WIRÉN N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(401): 1293-1305.
- [25] GLASS A D, BRITTO D T, KAISER B N, KINGHORN J R, KRONZUCKER H J, KUMAR A, OKAMOTO M, RAWAT S, SIDDIQI M Y, UNKLES S E, VIDMAR J J. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(370): 855-864.
- [26] SONODA Y, IKEDA A, SAIKI S, WIRÉN N V, YAMAYA T, YAMAGUCHI J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice[J]. *Plant Cell Physiology*, 2003, 44(7): 726-734.
- [27] GUO S, KALDENHOFF R, UEHLEIN N, SATTELMACHER B, BRUECK H. Relationship between water and nitrogen uptake in nitrate-and ammonium-supplied *Phaseolus vulgaris* L. plants[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2007, 170(1): 73-80.
- [28] RANATHUNGE K, EL-KEREAMY A, GIDDA S, BI Y M, ROTHSTEIN S J. *AMT1;1* transgenic rice plants with enhanced NH_4^+ permeability show superior growth and higher yield under optimal and suboptimal NH_4^+ conditions[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(4): 965-979.
- [29] LI T Y, LIAO K, XU X F, GAO Y, WANG Z Y, ZHU X F, JIA B L, XUAN Y H. Wheat ammonium transporter (AMT) gene family: diversity and possible role in host-pathogen interaction with stem rust[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1637.

- [30] XIA Y Q, LIU Y D, ZHANG T T, WANG Y, JIANG X Y, ZHOU Y. Genome-wide identification and expression analysis of ammonium transporter 1 (AMT1) gene family in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and functional analysis of *MeAMT1;1* in transgenic *Arabidopsis*[J]. 3 Biotech, 2022, 12(1): 4.
- [31] XIA J Z, WANG Y, ZHANG T T, PAN C C, JI Y Y, ZHOU Y, JIANG X Y. Genome-wide identification, expression profiling, and functional analysis of ammonium transporter 2 (AMT2) gene family in cassava (*Manihot esculenta* crantz)[J]. Frontiers in Genetics, 2023, 14: 1145735.
- [32] GAO S W, YANG Y Y, GUO J L, ZHANG X, FENG M X, SU Y C, QUE Y X, XU L P. Ectopic expression of sugarcane *ScAMT1.1* has the potential to improve ammonium assimilation and grain yield in transgenic rice under low nitrogen stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1595.
- [33] GAO Z Y, WANG Y F, CHEN G, ZHANG A P, YANG S L, SHANG L G, WANG D Y, RUAN B P, LIU C L, JIANG H Z, DONG G J, ZHU L, HU J, ZHANG G H, ZENG D L, GUO L B, XU G H, TENG S, HARBERD N P, QIAN Q. The indica nitrate reductase gene *OsNR2* allele enhances rice yield potential and nitrogen use efficiency[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 5207.
- [34] YAMAYA T, OBARA M, NAKAJIMA H, SASAKI S, HAYAKAWA T, SATO T. Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(370): 917-925.
- [35] TAMURA W, KOJIMA S, TOYOKAWA A, WATANABE H, TABUCHI-KOBAYASHI M, HAYAKAWA T, YAMAYA T. Disruption of a novel NADH-Glutamate Synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2011, 2: 57.
- [36] YU J, XUAN W, TIAN Y L, FAN L, SUN J, TANG W J, CHEN G M, WANG B X, LIU Y, WU W, LIU X L, JIANG X Z, ZHOU C, DAI Z Y, XU D Y, WANG C M, WAN J M. Enhanced OsNLP4-OsNiR cascade confers nitrogen use efficiency by promoting tiller number in rice[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(1): 167-176.
- [37] CHEN K E, CHEN H Y, TSENG C S, TSAY Y F. Improving nitrogen use efficiency by manipulating nitrate remobilization in plants[J]. Nature Plants, 2020, 6(9): 1126-1135.
- [38] LIU Y L, DUAN X L, ZHAO X D, DING W L, WANG Y W, XIONG Y. Diverse nitrogen signals activate convergent ROP2-TOR signaling in *Arabidopsis*[J]. Developmental Cell, 2021, 56(9): 1283-1295.