

钱 瑜, 察倩倩, 孔 敏, 等. 植物 *NRT2* 家族的分子进化[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 45-54.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.007

植物 *NRT2* 家族的分子进化

钱 瑜¹, 察倩倩², 孔 敏¹, 刘照坤³, 李 英¹, 侯喜林¹, 刘同坤¹

(1. 南京农业大学园艺学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095; 3. 苏州市蔬菜研究所, 江苏 苏州 215008)

摘要: 为了研究硝酸盐转运子 *NRT2* 家族在植物中的进化关系, 综合利用共线性信息和序列相似性信息, 从 8 种已经进行过全基因组测序的物种(大白菜、大豆、杨树、葡萄、玉米、水稻、高粱、二穗短柄草)中, 搜索拟南芥 *NRT2* 的同源基因。通过分析发现, 这些基因序列基本都具有 *MFS* 超家族的 *NNP* 家族基因的典型特征。但单、双子叶植物之间, *NRT2* 的基因结构存在着较大的差异。系统发育重建结果表明, *NRT2* 基因家族的成员主要是在单、双子叶植物分歧后进化产生的; 同时, 不同植物的 *NRT2* 基因又具有不同的进化模式。大白菜 *NRT2* 家族经历了基因组三倍化事件及基因片段丢失。因此, 拟南芥和大白菜的 *NRT2* 家族有较为密切的进化关系, 进化分析为利用已有的拟南芥 *NRT2* 研究结果进一步在大白菜中开展 *NRT2* 的功能研究提供了参考线索。

关键词: *NRT2*; 共线性; 序列分析; 进化

中图分类号: S601 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)01-0045-10

Molecular evolution of *NRT2* gene family in plant

QIAN Yu¹, CHA Qian-qian², KONG Min¹, LIU Zhao-kun³, LI Ying¹, HOU Xi-lin¹, LIU Tong-kun¹

(1. College of Horticulture/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Suzhou Institute of Vegetable Science, Suzhou 215008, China)

Abstract: In order to study the evolutionary relationship of *NRT2* family of nitrate transporters in plants, synteny analysis approach and sequence similarity were used to identify putative orthologues of *Arabidopsis NRT2* genes in other eight fully sequenced genomes (Chinese cabbage, soybean, western poplar, grape vine, maize, rice, sorghum, and purple false brome). Sequence analysis reveals that these sequences belong to the nitrate/nitrite porter (*NNP*) family of the major facilitator superfamily (*MFS*). However, there is significant difference in the *NRT2* gene structure between monocots and dicots. Phylogenetic tree analysis showed that, most members of the *NRT2* family developed primarily following the divergence of the monocots and dicots. Simultaneously, the evolution models of *NRT2* in different kinds of plants varied. *NRT2* family of Chinese cabbage (*Brassica rapa*) generated the genome triplication and gene loss. Therefore, the *NRT2* family in Chi-

nese cabbage has a relatively close evolutionary relationship with that of *Arabidopsis*.

Key words: *NRT2*; synteny; sequence analysis; evolution

收稿日期: 2014-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301782); 江苏省自然科学基金项目(BK20130673); 中国博士后基金项目(2014M550294); 南京农业大学青年科技创新基金项目(KJ2013015)

作者简介: 钱 瑜(1989-), 女, 江苏苏州人, 硕士研究生, 主要从事不结球白菜相关研究。(E-mail)pei_1224@126.com

通讯作者: 刘同坤, (Tel)025-84395332; (E-mail)liutk@njau.edu.cn

植物氮利用率(Nitrogen use efficiency, NUE)是由植物需求和植物对氮的吸收效率决定的。氮供给

影响植株叶片的膨胀率和大小,并且影响植株的总叶片数^[1],这些都会影响植物对光照的吸收能力,从而影响植物生产力,对叶菜类作物而言,更是如此。硝酸盐(NO_3^-)是大多数植物最主要的氮源。为了提高 NO_3^- 利用率,必须对 NO_3^- 从土壤到植物和在植物内转运有更为完整的认知。提高 NO_3^- 吸收能力和植物氮利用率的重要一步就是要先鉴定负责 NO_3^- 转运的转运子的特征,之后通过传统育种或者基因工程操作来提高 NO_3^- 吸收特性。

NRT2 家族是高亲和硝酸盐转运子,包括 NO_3^- 诱导型和组成型表达的成员^[2]。最具有代表性的成员是 *AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.2*,它们在 1 号染色体上位于相邻的位置,并且似乎编码类似功能的蛋白质^[3]。*AtNRT2.1* 对 NO_3^- 的流入似乎更为重要,并且在根的皮层和表皮中表达^[4]。然而,*AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.2* 二者都可以由 NO_3^- 供给到 NO_3^- 缺乏的植株中诱导^[5],并且二者是相互补偿的,当其中一个表达下降时,另一个的表达就上升^[3]。*AtNRT2.3* 在根部和嫩叶(主要是嫩叶)中的表达呈周期性的上升下降^[5-6]。*AtNRT2.4* 主要在根部表达,当暴露于 NO_3^- 环境中时表达量下降^[5-6],其在侧根的表皮和靠近嫩叶的韧皮部内表达,在 NO_3^- 根部吸收和韧皮部运输中均起重要的转运作用^[7]。*AtNRT2.5* 在根部和嫩叶(主要是根部)中表达,并且其表达受到 NO_3^- 供给的抑制^[5-6]。当植株处于 NO_3^- 环境中时,*AtNRT2.6* 在根部和嫩叶(主要是根部)中的相对表达没有改变^[5-6]。*AtNRT2.7* 主要在种子中表达,具有 NO_3^- 贮藏的作用^[4]。

本研究的目的是认识单、双子叶植物间硝酸盐转运子的区别,并为通过已知功能的模式植物基因来研究其他物种的基因功能提供理论基础和研究方向。

1 材料与方法

1.1 序列的获得

选择拟南芥^[7]、大白菜^[8]、大豆^[9]、葡萄^[10]、杨树^[11]、水稻^[12]、玉米^[13]、高粱^[14]、二穗短柄草^[15]等 9 种已经完成全基因组测序的物种(表 1),分析 *NRT2* 基因家族的进化。使用已经测序的基因组是为了确保完整性,也可为以后利用已知信息在其他物种中研究硝酸盐转运子提供有益的

探索。

以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *NRT2* 家族基因 *AtNRT2.1* (AT1G08090)、*AtNRT2.2* (AT1G08100)、*AtNRT2.3* (AT5G60780)、*AtNRT2.4* (AT5G60770)、*AtNRT2.5* (AT1G12940)、*AtNRT2.6* (AT3G45060)、*AtNRT2.7* (AT5G14570) 为基础,利用植物基因组复制数据库(Plant genome duplication database, PGDD; <http://chibba.agtec.uga.edu/duplication>),通过共线性搜索从大白菜(*Brassica rapa*)、大豆(*Glycine max*)、杨树(*Populus trichocarpa*)、葡萄(*Vitis vinifera*) 基因组中获得共线性同源序列。以玉米(*Zea mays*) *NRT2* 家族基因 *ZmNRT2.1* (GRMZM2G010280)、*ZmNRT2.3* (GRMZM2G163866)、*ZmNRT2.5* (GRMZM2G455124) 为基础,利用 PGDD,通过共线性搜索从二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、水稻(*Oryza sativa*)、高粱(*Sorghum bicolor*) 基因组中获得共线性同源序列。最后,使用 BLASTP 工具补充未被共线性搜索发现的同源序列。

1.2 共线性分析

基因共线性(Synteny or colinearity)是指染色体通过基因复制或者物种分化分开后,原先在该祖先染色体上的基因仍旧保留在该染色体上,或者原先在该染色体上的基因分散到其他染色体上,但是基因仍处于相对稳定的位置。基因共线性分析参考了 Phytozome (<http://www.phytozome.net>) 和 PGDD 给出的相关基因的信息,将获得的信息利用 Cytoscape (Version 2.8.2) 作图。

1.3 进化树分析

进化树重建使用基因的氨基酸序列。从 Phytozome (<http://www.phytozome.net>) 下载序列,将获得的核苷酸序列输入 MEGA5 (Molecular evolutionary genetics analysis) 中,将序列进行翻译、比对,人工调整明显不合理的比对,删除比较差的氨基酸残基。将剩下的序列构建系统进化树进行分析。推断进化关系使用的是 Neighbor-Joining 法^[16],最优进化树的分支长度总和为 4.39699594,进化树分支长度的标尺与用来指示系统树进化距离的单位是一致的。计算进化距离使用的 Poisson 校正法^[17],以每个位点氨基酸替换数为单位。进化树分析包含了 49 条氨基酸序列。每个序列对中的所有模糊位点都被去除了,最终的数据集里有 667 个位点。进化分析在 MEGA5 中进行^[18]。

表 1 本研究所用的 9 种植物基因组数据库
Table 1 Database of 9 plant genomes used in this study

物种名称	通用名	版本号	数据库
<i>Arabidopsis thaliana</i>	拟南芥	TAIR 9.0 (Jun 2009)	TAIR
<i>Brassica rapa</i>	大白菜	Version 1.1	BRAD
<i>Glycine max</i>	大豆	Release 1 (Dec 2008)	JGI
<i>Populus trichocarpa</i>	杨树	JGI 2.0 (Feb 2010)	JGI
<i>Vitis vinifera</i>	葡萄	Genoscope (Aug 2007)	Genoscope
<i>Brachypodium distachyon</i>	二穗短柄草	Phytozome v6.0	JGI
<i>Oryza sativa</i>	水稻	RAP 2.0 (Nov 2007)	RAP
<i>Sorghum bicolor</i>	高粱	Sbi 1.4 (Dec 2007)	JGI
<i>Zea mays</i>	玉米	Release 5a (Nov 2010)	AGI

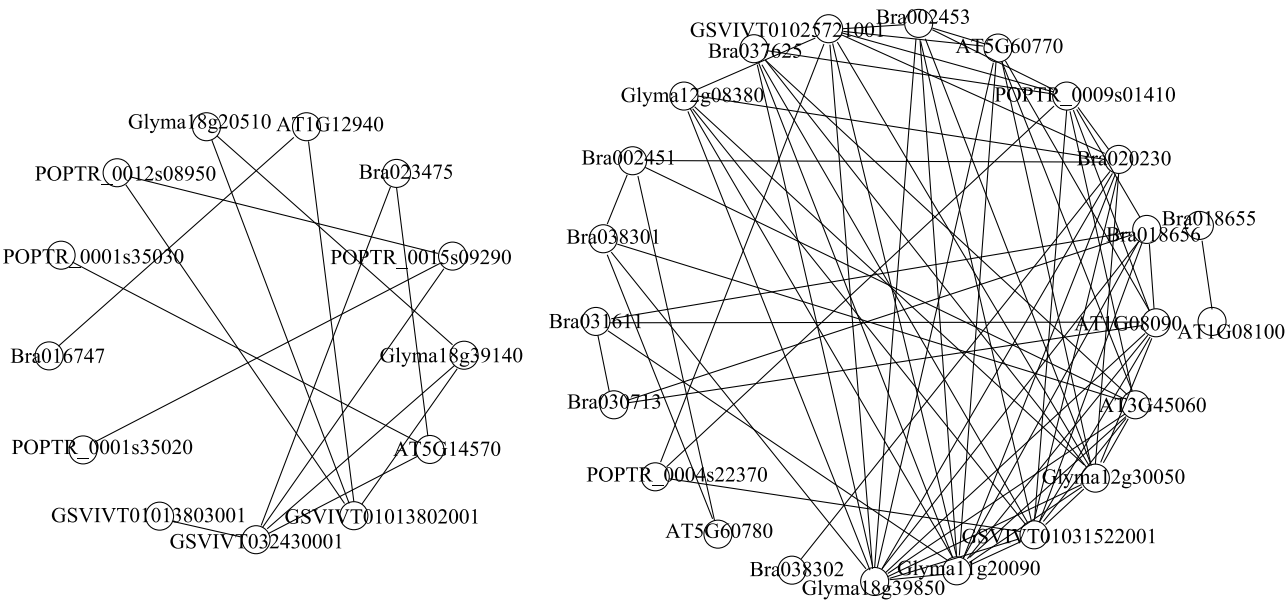
2 结果与分析

2.1 序列收集结果及分析

为了鉴定 *NRT2* 家族同源基因,使用全基因组序列信息进行共线性分析,结果见图 1 和图 2。序列收集结果见表 2,包含了 9 个物种的 48 条序列。在拟南芥中,*NRT2* 家族的 7 个基因内部间的序列相似度比 *NRT1* 家族的要高。利用拟南芥的 7 条序列,通过共线性分析,在大白菜中发现 12 条序列,在

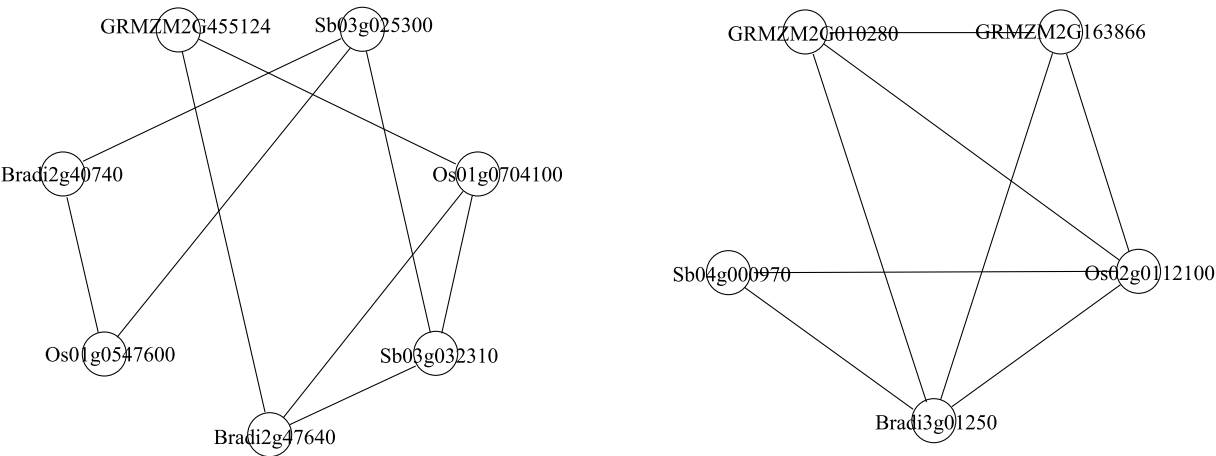
大豆中发现 6 条序列,在葡萄中发现 5 条序列,在杨树中发现 6 条序列。利用玉米的 3 条序列,通过共线性分析,在二穗短柄草中发现 3 条序列,在水稻中发现 3 条序列,在高粱中发现 3 条序列。

利用 BLASTP 对序列进行了补充,大白菜 2 条,二穗短柄草 4 条,玉米 1 条,水稻 1 条,高粱 2 条。将所有的序列通过 cDNA 和 NCBI 的 CDD 数据库搜索确认,剔除假基因(表 2),还有共计 49 条序列,进行下一步的分析。



顶点代表基因,顶点间的连线代表基因间的共线性关系,序列来自拟南芥(AT)、大白菜(Bra)、大豆(Gly)、杨树(POP)、葡萄(GSV)。

图 1 5 种双子叶植物的 *NRT2* 序列共线性分析结果
Fig. 1 Result of synteny analysis of *NRT2* sequence in five dicots species



顶点代表基因,顶点间的连线代表基因间的共线性关系,序列来自二穗短柄草(Bradi)、水稻(Os)、高粱(Sb)、玉米(GRMZM)。

图 2 4 种单子叶植物的 *NRT2* 序列共线性分析结果
Fig.2 Result of synteny analysis of *NRT2* sequence in four monocots species

表 2 利用同线性鉴定的 9 个物种 *NRT2* 家族基因序列
Table 2 *NRT2* family sequences identified by synteny analyses in nine species

物种名称	通用名	<i>NRT2</i> 家族基因及其同源基因
<i>Arabidopsis thaliana</i>	拟南芥	AT1G08090、AT1G08100、AT5G60780、AT5G60770、AT3G45060、AT1G12940、AT5G14570
<i>Brassica rapa</i>	大白菜	Bra002451、Bra002453、Bra016747、Bra018655、Bra018656、Bra020230、Bra023475、Bra030713、Bra031610、Bra031611、Bra037625、Bra037626、Bra038301、Bra038302
<i>Glycine max</i>	大豆	Glyma08g39140、Glyma11g20090、Glyma12g08380*、Glyma12g30050、Glyma13g39850、Glyma18g20510
<i>Populus trichocarpa</i>	杨树	POPTR_0001s35020*、POPTR_0001s35030*、POPTR_0004s22370*、POPTR_0009s01410、POPTR_0012s08950、POPTR_0015s09290
<i>Vitis vinifera</i>	葡萄	GSVIVT01013802001*、GSVIVT01013803001*、GSVIVT01025721001、GSVIVT01031522001*、GSVIVT01032430001*
<i>Brachypodium distachyon</i>	二穗短柄草	Bradi3g01250、Bradi3g01270、Bradi3g01280、Bradi3g01290、Bradi2g26210*、Bradi2g47640、Bradi2g40740
<i>Oryza sativa</i>	水稻	Os01g0547600、Os01g0704100、Os02g0112100、Os02g0112600
<i>Sorghum bicolor</i>	高粱	Sb03g025300、Sb03g032310、Sb04g000970、Sb04g000990、Sb04g001000
<i>Zea mays</i>	玉米	GRMZM2G010280、GRMZM2G010251、GRMZM2G163866、GRMZM2G455124

* 代表假基因,由 cDNA 和 NCBI 的 CDD 数据库搜索确认^[19]。

NRT2 属于 MFS 超家族 (Major facilitator super-family) 的 NNP 家族 (Nitrate/Nitrite porter family), 其典型特征为具有 12 个跨膜结构域, 在第 2 和第 3 个跨膜螺旋结构之间有一个广泛的 MFS 序列 (G-x-x-x-D-x-x-G-x-R)^[20], 在第 5 个跨膜螺旋结构上有一个 NNP 标志序列 (G-W/L-G-N-M/A-G)^[21]。对筛选后获得的 49 条核苷酸序列转化为氨基酸序列比对后, 发现 49 条序列基本都符合上述特征 (图 3)。

对 *NRT2* 基因结构的分析结果表明, 双子叶植物的 *NRT2* 基因都具有相对复杂的结构, 基本都包

含有内含子和外显子, 而单子叶植物的 *NRT2* 基因基本都不含有内含子 (表 3)。单、双子叶植物之间这一明显的基因结构差异, 暗示了 *NRT2* 基因家族成员的一次古老的分歧。

2.2 进化树分析

进化树 (图 4) 中, 分支 a、b、c 衍生的基因都包含单、双子叶植物, 因此结点 A 代表祖先 *NRT2* 基因经历了三倍化复制事件, 这正和单、双子叶分歧前的全基因组三倍化复制事件 (γ) 对应^[10,22-23]。复制产生的 3 个拷贝各自又经历了不同的进化模式。

表 3 9 个物种中获得的 *NRT2* 基因的总结Table 3 Summary of *NRT2* genes in nine species

物 种	标号	索引号 (ID)	外显子-内含子	氨基酸数量
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	AtNRT2. 1	AT1G08090	3-2	530
	AtNRT2. 2	AT1G08100	3-2	522
	AtNRT2. 3	AT5G60780	3-2	539
	AtNRT2. 4	AT5G60770	4-3	527
	AtNRT2. 6	AT3G45060	2-1	542
	AtNRT2. 5	AT1G12940	3-2	502
	AtNRT2. 7	AT5G14570	2-1	493
大白菜 (<i>Brassica rapa</i>)	BrNRT2. 1A	Bra031610	3-2	529
	BrNRT2. 1B	Bra018656	4-3	487
	BrNRT2. 1C	Bra018655	4-3	501
	BrNRT2. 1D	Bra030713	3-2	530
	BrNRT2. 2	Bra031611	3-2	506
	BrNRT2. 3A	Bra002451	3-2	536
	BrNRT2. 3B	Bra020230	4-3	488
	BrNRT2. 4	Bra002453	4-3	527
	BrNRT2. 6A	Bra037625	2-1	541
	BrNRT2. 6B	Bra038302	2-1	538
	BrNRT2-like1	Bra037626	4-3	546
	BrNRT2-like2	Bra038301	4-3	543
	BrNRT2. 5	Bra016747	7-6	575
	BrNRT2. 7	Bra023475	2-1	484
大豆 (<i>Glycine max</i>)	GmNRT2. 4A	Glyma11g20090	3-2	530
	GmNRT2. 4B	Glyma12g30050	3-2	530
	GmNRT2. 4C	Glyma13g39850	3-2	530
	GmNRT2. 5A	Glyma08g39140	2-1	508
	GmNRT2. 5B	Glyma18g20510	2-1	510
葡萄 (<i>Vitis vinifera</i>)	VvNRT2. 4	GSVIVT01025721001	4-3	485
杨树 (<i>Populus trichocarpa</i>)	PtNRT2. 4	POPTR_0009s01410	3-2	469
	PtNRT2. 5A	POPTR_0012s08950	1-0	384
	PtNRT2. 5B	POPTR_0015s09290	2-1	508
二穗短柄草 (<i>Brachypodium distachyon</i>)	BdNRT2. 2	Bradi3g01250	1-0	509
	BdNRT2. 1	Bradi3g01270	1-0	498
	BdNRT2. 2	Bradi3g01280	1-0	509
	BdNRT2. 3	Bradi3g01290	1-0	503
	BdNRT2. 5	Bradi2g47640	1-0	515
	BdNRT2. 7	Bradi2g40740	2-1	468
玉米 (<i>Zea mays</i>)	ZmNRT2. 1	GRMZM2G010280	1-0	524
	ZmNRT2. 2	GRMZM2G010251	1-0	524
	ZmNRT2. 3	GRMZM2G163866	1-0	522
	ZmNRT2. 5	GRMZM2G455124	1-0	520
水稻 (<i>Oryza sativa</i>)	OsNRT2. 1A	Os02g0112100	1-0	533
	OsNRT2. 1B	Os02g0112600	1-0	533
	OsNRT2. 5	Os01g0704100	1-0	486
	OsNRT2. 7	Os01g0547600	2-1	485
高粱 (<i>Sorghum bicolor</i>)	SbNRT2. 1	Sb04g000990	1-0	527
	SbNRT2. 2	Sb04g001000	1-0	527
	SbNRT2. 3	Sb04g000970	1-0	535
	SbNRT2. 5	Sb03g032310	1-0	515
	SbNRT2. 7	Sb03g025300	2-1	484

AT1G08090	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
AT1G08100	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
AT1G12940	----- GTACDLF GPR----- GWGNLG-----
AT3G45060	----- GAVCDLL GAR----- GWGDMG-----
AT5G14570	----- GPLC DLI GPR----- GWANVG-----
AT5G60770	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
AT5G60780	----- GAVCDLL GAR----- GWGDMG-----
Bra002451	----- GAVCDLL GAR----- GWGDMG-----
Bra002453	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Bra016747	----- GTACDLF GPR----- GWGNLG-----
Bra018655	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Bra018656	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Bra020230	----- GAVCDLL GAR----- GGGMG-----
Bra023475	----- GPLC DLI GPR----- GWANVG-----
Bra030713	----- GAVCDLL GPR----- GGGMG-----
Bra031610	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Bra031611	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Bra037625	----- GAVCDLL GAR----- GWGDMG-----
Bra037626	----- GAVCDLL GAR----- GWGDMG-----
Bra038301	----- GAVCDLL GAR----- GWGDMG-----
Bra038302	----- GAVCDLL GAR----- GWGDMG-----
Bradi2g40740	----- GPACDLL GPR----- GWANVG-----
Bradi2g47640	----- GTACDLV GPR----- GWGNLG-----
Bradi3g01250	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Bradi3g01270	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Bradi3g01280	----- GAVCDLL GPR----- GWGDMG-----
Bradi3g01290	----- GAVCDLL GPR----- GWGDMG-----
Glyma08g39140	----- GTACDLV GPR----- GWGNLG-----
Glyma11g20090	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Glyma12g30050	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Glyma13g39850	----- GAVCDMLGPR----- GWGNMG-----
Glyma18g20510	----- GTACDLV GPR----- GWGNLG-----
GRMZM2G010251	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
GRMZM2G010280	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
GRMZM2G163866	----- GAVCDLL GPR----- GWGDMG-----
GRMZM2G455124	----- GTACDLV GPR----- GWGNLG-----
GSVIVT01025721001	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Os01g0547600	----- GPACDLL GPR----- GWANVG-----
Os01g0704100	----- GTACDLV GPR----- GWGNLG-----
Os02g0112100	----- GAIC DMLGPR----- GWGNMG-----
Os02g0112600	----- GAIC DMLGPR----- GWGNMG-----
POPTR_0009s01410	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
POPTR_0012s08950	----- GTACDLF GPR----- GWGNLG-----
POPTR_0015s09290	----- GTACDLF GPR----- GWGNLG-----
Sb03g025300	----- GPACDLL GPR----- GWANVG-----
Sb03g032310	----- GTACDLV GPR----- GWGNLG-----
Sb04g000970	----- GAVCDLL GPR----- GWGDMG-----
Sb04g000990	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----
Sb04g001000	----- GAVCDLL GPR----- GWGNMG-----

左为 MFS 序列 (G-x-x-x-D-x-x-G-x-R), 右为 NNP 标志序列 (G-W/L-G-N-M/A-G)。基因来源见表 2。

图 3 单、双子叶植物中 *NRT* 氨基酸序列比对结果

Fig. 3 Multi-alignment of *NRT* amino acid sequences in monocots and dicots

分支 a 包含与 *AtNRT2.1* ~ *AtNRT2.4* 及 *AtNRT2.6* 同源的序列, 包含了较多的序列。分支 a 中, 单、双子叶植物经历分歧后, 各自又经历了差异

化的进化过程, 表明这些基因主要是在单、双子叶植物分歧后进化而来的。双子叶植物 *AtNRT2.1* ~ *AtNRT2.4* 及 *AtNRT2.6* 同源序列都具有较复杂的基

因结构,含有多个外显子,而单子叶植物的同源序列只有1个外显子,从基因结构角度证明了这种分歧是在单、双子叶植物分歧后产生的。*AtNRT2.1*与*AtNRT2.2*是2个相邻的反向基因,*AtNRT2.3*和*AtNRT2.4*是串联重复,*AtNRT2.6*与*AtNRT2.3*还有高达89%的序列相似度^[24]。这些可能与拟南芥进化过程中所经历的2次全基因组复制事件(β 和 α)有关。进化关系上较近,表明单子叶植物的*AtNRT2.1*~*AtNRT2.4*及*AtNRT2.6*同源序列可能与*AtNRT2.1*和*AtNRT2.2*有类似的功能,但是确认这些功能还需要恰当的功能分析。分支a中基因的外显子结构模式有1-0、2-1、3-2、4-3这4种模式(图5),3-2模式的序列最多。通过细致的序列比对发现,3-2模式序列的第2个外显子与2-1模式序列的第1个外显子尾部的序列相似度很高,2-1模式的序列可能是由3-2模式的序列中第1个内含子的丢失进化而来的。同样,4-3模式序列的第2个外显子与3-2模式序列的第1个外显子的尾部序列相似度也很高,4-3模式序列可能是由3-2模式序列中第1个外显子被撕裂加入了一段内含子序列进化而来的。单子叶植物的序列都是1-0模式,应该是由内含子完全丢失进化而来。

分支b包含与*NRT2.5*基因同源的序列。每种单子叶植物中都具有*NRT2.5*同源序列,而双子叶植物大豆和杨树中有2个拷贝,表明在进化过程中,一些物种中*NRT2.5*的功能可能得到了加强。单子叶植物*NRT2.5*同源序列的结构比较一致,而双子叶植物的*NRT2.5*同源序列结构有很大的差异。

分支c包含与*NRT2.7*基因同源的序列。除玉米外的单子叶植物中都具有*NRT2.7*同源基因,双子叶植物中只有大白菜有一个拷贝。这5个*NRT2.7*同源序列都具有类似的基因结构,都含有2个外显子。但是多个物种中*NRT2.7*同源序列的丢失,表明可能在一些物种中,该基因的功能正在丢失。

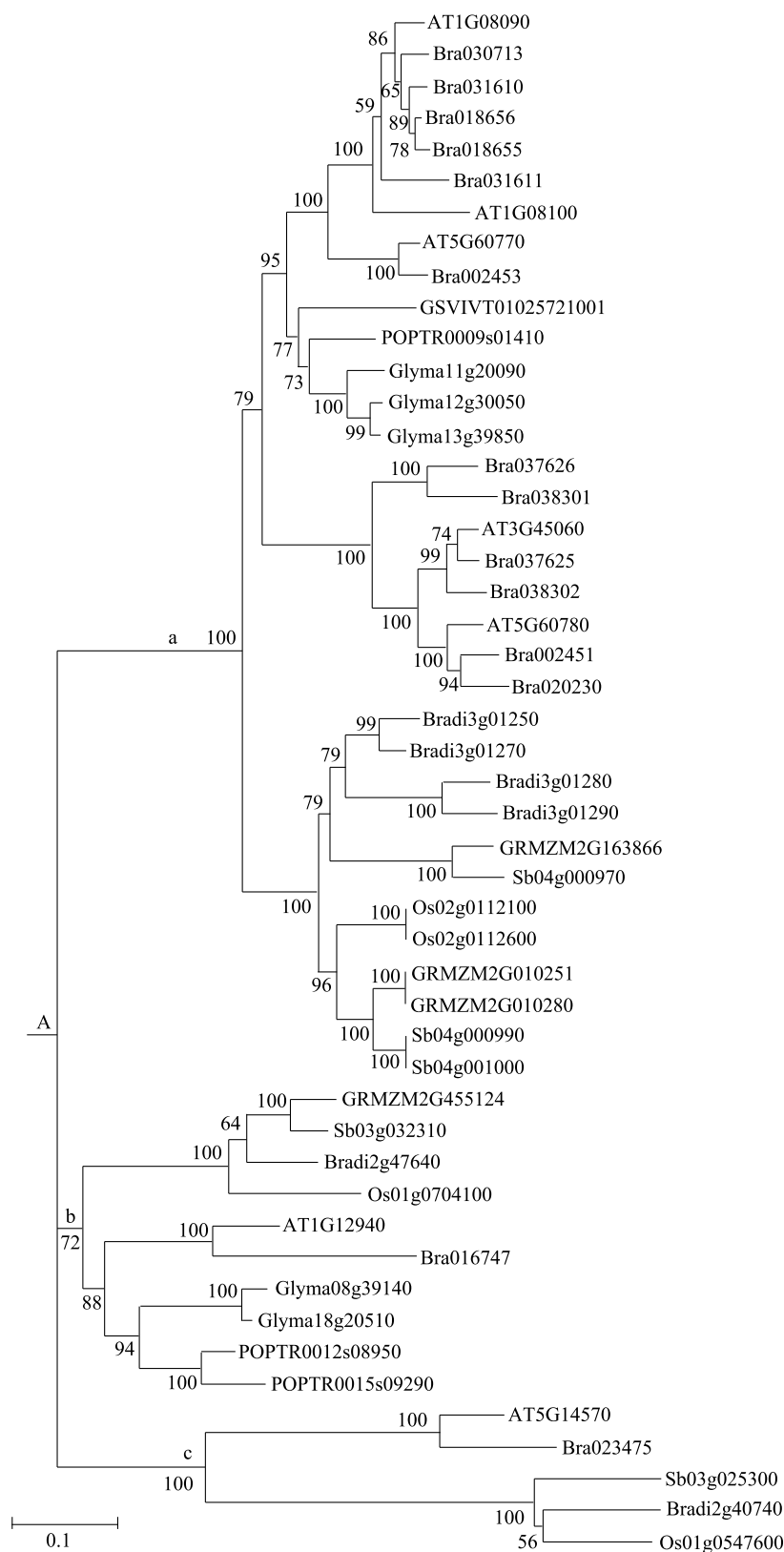
2.3 大白菜 *NRT2* 家族基因的分析

大白菜中共发现*NRT2*同源序列14条,比拟南芥多7条,其包含了多条串联重复序列(Bra002451和Bra002453, Bra018655和Bra018656, Bra031610和Bra031611, Bra037625和Bra037626, Bra038301和Bra038302)。这可能与大白菜进化过程中的基因组三倍化事件及三倍化事件中基因片段的丢失密

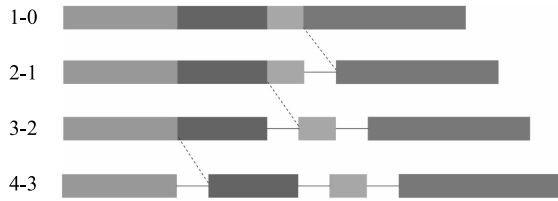
切相关^[8]。*AtNRT2.1*与*AtNRT2.2*是相邻的反向基因^[25],大白菜中*BrNRT2.1A*(Bra031610)与*BrNRT2.2*(Bra031610)有类似的关系。*AtNRT2.3*和*AtNRT2.4*是串联重复,大白菜中*BrNRT2.3A*(Bra002451)和*BrNRT2.4*(Bra002453)也是串联重复。进化树分析(图4)发现,大白菜*NRT2*基因类似序列与拟南芥*NRT2*基因基本都位于同一分支。这些都表明大白菜与拟南芥有着极密切的进化关系。大白菜*NRT2.1*类似序列有4条,可分为3支(Bra018655和Bra018656为串联复制,可能与后期的基因组进化有关)。*NRT2.6*和*NRT2.3*同源序列分别有2条,剩余的只有1条。还有2条*NRT2-like*序列(Bra037626和Bra038301)与*AtNRT2.3*和*AtNRT2.6*位于同一大分支,但没有与它们在同一小分支。通过大白菜基因组测序分析,我们认为其基因组经历了三倍化事件,而其*NRT2.1*同源序列的三倍化恰好符合这一观点。其他序列只有2条,或者只有1条的现象,可能与基因组三倍化过程中基因丢失片段的程度不同有关。2条*NRT2-like*的出现,首先可能有进化树的计算方法有关,*AtNRT2.1*和*AtNRT2.6*有89%的相似度,可能对周边序列进化关系的计算产生影响;此外,还可能是由于拟南芥基因组在几百万年的进化中,基因组产生了一些缺失而大白菜保留了这部分基因所造成的。

3 讨论

对几种典型的单、双子叶植物*NRT2*基因家族的研究结果显示,在基因结构上单、双子叶植物之间可能存在着明显的差异。由于单子叶植物的*NRT2*基因基本都没有内含子,这可能是跟随着单双子叶植物的分歧而发生的;也有可能是单子叶植物从原始的双子叶植物分歧后,早期的单子叶植物丢失了*NRT2*的内含子,而双子叶植物保留了内含子^[23]。然而,深入研究植物中*NRT2*基因家族的进化模式,仍然需要更多物种的基因组数据。*NRT2*家族是MFS超家族的一部分,因此,可以对这一超家族中其他的基因家族进行研究,探究它们在内外显子结构上是否有类似的现象。拟南芥*AtNRT2.7*的功能是装载 NO_3^- 进入种子中^[4],单、双子叶植物的*NRT2.7*基因具有非常相似的基因结构,表明在装载 NO_3^- 进入种子和胚胎的过程中,单、双子叶植物之间可能保留了类似的机制。确定植物的*NRT2*基

图 4 *NRT2* 家族的进化关系Fig. 4 Phylogenetic relationships of the *NRT2* family

外显子-内含子

图5 植物 *NRT2* 外显子进化模型Fig. 5 Evolution model of *NRT2* exon in plant

因之间是否有类似的功能,还是进化分歧导致了功能的变化,仍需要更深入的数据与试验分析。任何常见的蛋白质修饰或者序列区别的隔离产生的功能上的分歧分开了单、双子叶的 *NRT2s*,在指导使用生物技术方法,提高植物中 NO_3^- 转运能力方面,可提供重要的结构或功能信息。

大白菜 *NRT2* 同源序列与拟南芥有着较近的进化关系,表明大白菜中 *NRT2* 序列与拟南芥 *NRT2* 基因可能具有比较类似的功能。根据拟南芥中大白菜 *NRT* 的同源基因,我们对大白菜中 14 个 *NRT2* 的家族成员的表达进行分析,结果发现,9 个 (Bra031610、Bra018656、Bra018655、Bra030713、Bra031611、Bra037625、Bra038302、Bra037626、Bra038301) 属于诱导型表达,5 个 (Bra002451、Bra020230、Bra002453、Bra016747、Bra023475) 属于组成型表达。孔敏等^[26] 研究发现,白菜中拟南芥 *AtNRT2.1* 的同源基因 *BcNRT2* 受硝酸盐诱导,这与我们的分析 *BrNRT2.1A-D* 属于诱导型表达相一致,说明我们对大白菜中 14 个 *NRT2* 家族成员的表达分析是可信的。今后,在研究这些基因功能时,可以更为有效地参考与利用拟南芥 *NRT2* 基因的研究信息,为大白菜 *NRT2* 序列的功能验证提供相对简便的途径。不结球白菜与大白菜是近亲,同属芜菁的一种,大白菜已完成基因组测序^[8],参考其基因组信息,可以为不结球白菜等作物的研究提供参考信息。

对单、双子叶植物的 *NRT2* 基因家族的分析揭示了该基因家族的一些显著的差异,提出了关于植物中 *NRT2* 转运子的进化和拟南芥作为 NO_3^- 转运的模式作物的合适性等一些重要问题。本研究为未来研究植物中硝酸盐转运子和转运提供了一个框架,并且可能为通过 *NRT* 基因的遗传操纵来提高植

物氮利用率给出了指导性策略。

参考文献:

- [1] VOS J, VAN DER PUTTEN P E L. Effect of nitrogen supply on leaf growth, leaf nitrogen economy and photosynthetic capacity in potato[J]. Field Crops Research, 1998, 59(1): 63-72.
- [2] TSAY Y F, CHIU C C, TSAI C B, et al. Nitrate transporters and peptide transporters[J]. Febs Letters, 2007, 581(12): 2290-2300.
- [3] LI W, WANG Y, OKAMOTO M, et al. Dissection of the *AtNRT2.1*: *AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster[J]. Plant Physiology, 2007, 143(1): 425-433.
- [4] WIRTH J, CHOPIN F, SANTONI V, et al. Regulation of root nitrate uptake at the *NRT2.1* protein level in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(32): 23541-23552.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] KAUL S, KOO H L, JENKINS J, et al. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 2000, 408:796-815.
- [8] WANG X, WANG H, WANG J, et al. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa* [J]. Nature Genetics, 2011, 43(10): 1035-1039.
- [9] SCHMUTZ J, CANNON S B, SCHLUETER J, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. Nature, 2010, 463(7278): 178-183.
- [10] JAILLON O, AURY J M, NOEL B, et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiospermophyla [J]. Nature, 2007, 449: 463-465.
- [11] TUSKAN G A, DIFAZIO S, JANSSON S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) [J]. Science, 2006, 313(5793): 1596-1604.
- [12] MATSUMOTO T, WU J Z, KANAMORI H, et al. The map-based sequence of the rice genome [J]. Nature, 2005, 436:793-800.
- [13] SCHNABLE P S, WARE D, FULTON R S, et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics [J]. Science, 2009, 326(5956): 1112-1115.
- [14] PATERSON A H, BOWERS J E, BRUGGMANN R, et al. The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses [J]. Nature, 2009, 457(7229): 551-556.
- [15] VOGEL J P, GARVIN D F, MOCKLER T C, et al. Genome se-

- quencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* [J]. Nature, 2010, 463(7282): 763-768.
- [16] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [17] ZUCKERKANDL E, PAULING L. Evolutionary divergence and convergence in proteins[J]. Evolving Genes and Proteins, 1965, 97: 97-166.
- [18] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [19] MARCHLER-BAUER A, ANDERSON J B, CHITSAZ F, et al. CDD: specific functional annotation with the conserved domain database[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(suppl 1): 205-210.
- [20] FORDE B G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2000, 1465(1): 219-235.
- [21] JARGEAT P, REKANGALT D, VERNER M C, et al. Characterisation and expression analysis of a nitrate transporter and nitrite reductase genes, two members of a gene cluster for nitrate assimilation from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* [J]. Current Genetics, 2003, 43(3): 199-205.
- [22] TANG H, BOWERS J E, WANG X, et al. Synteny and collinearity in plant genomes[J]. Science, 2008, 320(5875): 486-488.
- [23] TANG H, WANG X, BOWERS J E, et al. Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps [J]. Genome Research, 2008, 18(12): 1944-1954.
- [24] PLETT D, TOUBIA J, GARNETT T, et al. Dichotomy in the NRT gene families of dicots and grass species [J]. PloS One, 2010, 5(12): e15289.
- [25] DANIEL-VEDELE F, FILLEUR S, CABOCHE M. Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation[J]. Current Opinion in Plant Biology, 1998, 1(3): 235-239.
- [26] 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.

(责任编辑:张震林)