

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220242

白桦 *BpAMT* 基因家族鉴定及表达模式分析

杨海昕, 刘晓莹, 詹亚光, 范桂枝*

(东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150036)

摘要: [目的] 鉴定白桦 *AMT* 基因家族成员, 分析 *AMT* 基因的表达模式。[方法] 本研究利用生物信息学方法鉴定了该家族成员并通过实时荧光定量技术分析其基因表达模式。[结果] 从白桦基因组中鉴定了 9 个 *AMT* 家族成员, 并将其分为 *AMT1* 和 *AMT2* 两个亚家族, 分别命名为 *BpAMT1.1~1.4* 和 *BpAMT2.1~2.5*; *BpAMTs* 氨基酸残基数为 384~522 个, 等电点为 4.61~8.16, 均定位于质膜与细胞器膜上; *BpAMT* 基因不均匀的分布在 5 条染色体上, 且成员间存在串联重复现象。*BpAMT* 基因的表达具有组织部位特异性, 呈现叶>根>茎趋势; 同时发现, 硝酸钾、氯化铵、茉莉酸甲酯、赤霉素、脱落酸、氯化镉、干旱、4 °C 和日变化等均可以影响 *BpAMT* 基因表达, 且不同处理下家族成员的响应程度存在差异。[结论] 从白桦中鉴定 9 个 *BpAMT* 基因, 聚类为两个亚家族, 在调节氮素吸收转运、响应激素信号及非生物胁迫中发挥不同的作用, 该研究结果为深入解析 *BpAMT* 基因在白桦生长发育和抵抗逆境中的功能奠定基础。

关键词: 白桦; *AMT*; 基因家族; 基因表达模式

中图分类号: S718

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2023)02-0133-11

氮素是植物生长发育过程中所必需的大量营养元素之一, 是核酸、蛋白质和叶绿素等大分子物质的重要组成成分^[1]。作为植物吸收无机氮素的低耗能方式, 铵态氮的吸收利用效率直接影响植物生长发育^[2], 吸收过量的铵对植物具有毒性, 其吸收和代谢受到严格的调控^[3]。

铵态氮的吸收主要由铵根转运蛋白 (Ammonium transporter, *AMT*) 调控, 它将铵根离子从细胞外转运到细胞内进而调节植株地上部分与地下部分的氮素平衡^[4]。随着测序技术和生物信息学的发展, 研究者发现, 基因 *AMT* 一般包括 *AMT1* 和 *AMT2* 两个亚家族, 亚家族成员之间具有相似的高级结构, 但其基因结构和成员数量不同^[5]。在基因结构上, *AMT1* 家族成员一般不含内含子, 多为高亲和转运体^[6]; *AMT2* 家族成员含多个内含子且位置和大小基本保守, 其亲和性没有明确规律; 在基因数

量上, *AMT* 家族成员一般在 6~16 个之间。在基因表达上, *AMT* 家族成员在根、茎和叶等的基因表达具有组织部位特异性, 同时也受病毒和害虫等生物以及氮素浓度、光照、植物激素和干旱等非生物因素的调控, 如水稻 (*Oryza sativa* L.) *OsAMT1.3* 在根系维管束和侧根原基中表达^[7], 百脉根 (*Lotus japonicas* Regel.) *LjAMT2.1* 主要在根瘤细胞的原生质膜上表达^[8], 柑橘 (*Citrus reticulata* Blanco.) *CitAMT1* 和棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) *GhAMT1.3* 在低氮的条件下表达量大幅度提高^[9-10], 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) *AtAMT1.1* 及 *AtAMT1.3* 的转录水平随日变化周期中光照强度的降低而下降^[11]。

在自然状态下, 土壤中的氮素受到限制或有效性降低都会限制植株的生长、影响植株对碳同化物质的分配格局以及抵抗胁迫的能力^[12]。白桦

收稿日期: 2022-05-11 修回日期: 2022-08-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32171829); 黑龙江省自然科学基金项目 (C2016005)

作者简介: 杨海昕, 硕士研究生, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: yhxshana@163.com

* 通讯作者: 范桂枝, 教授, 研究方向: 植物细胞工程。E-mail: gzf325@126.com

(*Betula platyphylla* Suk.) 是喜光耐寒的先锋树种, 它对土壤适应性强且生长速度较快^[13]。研究发现, 在一定浓度范围内随着供氮水平的增加, 白桦幼苗根系、茎和叶中全氮浓度提高, 其中, 无机氮比有机氮更易于其生物量的积累^[14]。*AMT* 作为氮代谢的关键基因之一, 其家族成员在白桦中的研究还未见报道, 尤其是其成员数量及功能还不清楚, 有关 *AMT* 基因在非生物胁迫条件下表达的研究文献有限。因此, 本研究以 10 年生白桦树、2 年生白桦盆栽苗及白桦悬浮细胞为试验材料, 基于最新公布的白桦基因组序列^[15], 筛选鉴定 *BpAMT* 家族成员, 初步解析 *BpAMT* 家族成员在不同组织、不同氮素条件、日变化周期以及不同激素和非生物胁迫处理后的表达模式, 该研究将为深入探究 *BpAMT* 家族成员的功能提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

白桦组培苗与悬浮细胞为实验室保存材料, 组培苗培养基为 WPM 培养基附加蔗糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与琼脂 $6.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 每 25~30 d 继代 1 次; 悬浮细胞培养基为 B5 培养基附加蔗糖 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、水解酪蛋白 $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、TDZ $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、6-BA $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 2,4-D $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 每 7 d 继代 1 次; 10 年生白桦树材料采集于东北林业大学主校区丹青楼前白桦林; 2 年生白桦盆栽苗培养于东北林业大学逸夫教学楼旁。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 利用拟南芥 *AtAMT1.1*

(CAA53473)、*AtAMT1.2* (AAD54639)、*AtAMT1.3* (AAD54638)、*AtAMT1.4* (CAB81458)、*AtAMT1.5* (NP_189072) 和 *AtAMT2.1* (NP_181363) 6 个 *AMT* 序列, 在白桦基因组数据中进行比对, 数据库网址为 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, 登录号为 PRJNA285437, 剔除重复序列后获得 *BpAMT* 候选基因, 进行保守结构域鉴定, 确定 *BpAMT* 家族成员并进行编号。通过在线分析软件 EXPASY 进行理化性质分析; 通过在线软件 WoLF PSORT 进行亚细胞定位预测; 使用 MEGAX 构建系统进化树, 构树方法选择 NJ 法; 使用 GSDS2.0 绘制基因结构, 使用在线 MEME 对白桦目标氨基酸序列进行比对, 并对保守区进行分析; 通过在线软件 MG2C 绘制基因在染色体上位置; 使用 TBtools 进行共线性分析; 运用 SPDEv2.0 确定启动子序列, plantcare 进行顺式作用元件功能预测, 导入 TBtools 进行可视化。

1.2.2 表达模式分析

1.2.2.1 组织部位表达模式分析

于 2021 年 7 月 15 日采集 2 年生白桦盆栽苗的根、茎和叶组织, 每次取材进行 3 次生物学重复, 测量不同组织下 *BpAMT* 基因表达情况, 采用改良的 CTAB 法提取总 RNA, 使用 Takara 公司 ScriptTM RT 试剂盒合成 cDNA。使用 Premier 5.0 设计定量引物 (表 1), 引物由生工生物工程上海股份有限公司合成, 以白桦微管蛋白基因 *BpTu* 为内参基因, 进行 qRT-PCR 分析基因表达模式, 目的基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 来表示。运用 IBM SPSS Statistics 23 软件对 *BpAMT* 基因表达进行统计及显著性差异分析。

表 1 所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

基因名称	qPCR-F(5'→3')	qPCR-R(5'→3')
<i>BpAMT1.1</i>	CACAGAACGCCCTACCATAAA	GGGTGCATGGTGGGAAATAAT
<i>BpAMT1.2</i>	CCGACCCGACAATCTCTTATT	CCTATTCTTGGGCCCTCTATG
<i>BpAMT1.3</i>	GTTTGGCTGGTACGGATTCA	GCACTCCATTGGCCGTAATA
<i>BpAMT1.4</i>	ACTGCGGTTACGACTTCATTAG	GCAAACATCCAAAGCATCCC
<i>BpAMT2.1</i>	CCGAAGAGCCTTGAGAATAGAG	GCGTTGTGCGCTTTGTTTAG
<i>BpAMT2.2</i>	CGACGAATCCACCTAACA	GGTGAAGGATCTCCACCATTA
<i>BpAMT2.3</i>	ACAGATTGTAGCGGCTTATT	CCTCATCCGACATGCGTAAA
<i>BpAMT2.4</i>	AGAGAGATGCAGACCGAAATG	CCTTGCAACTCCAAATGAC
<i>BpAMT2.5</i>	GCCATTCTCAACCCATCT	CCTGGACTGCACCAATTACA
<i>BpTu</i>	TCAACCGCCTTGCTCTCAGG	TGGCTCGAATGCACTGTTGG

1.2.2.2 不同氮素处理下表达模式分析 以含不同氮源的 B5 培养液处理白桦悬浮细胞, 设置对照 CK 组 (正常 B5 培养液), CK0 组 (CK 组去除 NH_4NO_3 试剂)、低浓度单一硝态氮组 (CK0 组添加 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$ 试剂)、高浓度单一硝态氮组 (CK0 组添加 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KNO}_3$ 试剂)、低浓度单一铵态氮组 (CK0 组添加 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ 试剂) 与高浓度单一铵态氮组 (CK0 组添加 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ 试剂) 为实验组, 分别培养白桦悬浮细胞, 每个处理进行 3 次生物学重复, 在 1 d 后取样测量不同处理下 *BpAMT* 基因表达量的变化情况, 并进行统计及显著性差异分析。

1.2.2.3 日变化表达模式分析 于 2020 年 8 月 3—4 日 1 个日周期内, 每隔 3 h 取样 1 次, 共 9 个时间点采集主校区丹青楼前 10 年生白桦树叶片, 每次取材进行 3 次生物学重复, 对不同时间下 *BpAMT* 基因表达量进行统计分析。

1.2.2.4 不同激素处理下表达模式分析 选择长势一致的白桦盆栽苗, 分别用 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯 (MeJA)、 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 赤霉素 (GA_3) 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱落酸 (ABA) 处理 24 h 后取样, 每次取材进行 3 次生物学重复, 测量不同激素处理下 *BpAMT* 基因表达量的变化情况。

1.2.2.5 不同非生物胁迫下表达模式分析 选择

长势一致的白桦盆栽苗, 分别用 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉 (CdCl_2)、10% (W/V) PEG6000 和 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境模拟重金属、干旱和低温胁迫, 处理 24 h 后取样, 每次取材进行 3 次生物学重复, 测量不同非生物胁迫下 *BpAMT* 基因表达量的变化情况。

2 结果与分析

2.1 *BpAMT* 家族成员鉴定及基本特征分析

从白桦基因组中筛选鉴定了 9 个 *BpAMT* 基因, 分别编号为 *BpAMT1.1*~*1.4*、*BpAMT2.1*~*2.5* (表 2)。对 *BpAMT* 蛋白理化性质分析表明: 氨基酸残基数范围为 384~522, 分子量范围为 41.64~57.46 kD, 蛋白质等电点范围为 4.61~8.16。*BpAMT* 蛋白亲水系数均为正值, 均为疏水性蛋白。此外, 亚细胞定位结果显示: *BpAMT* 主要定位于膜结构上, 多分布在叶绿体、质膜与内质网上, 这可能与 *BpAMT* 蛋白的跨膜转运功能有关。*BpAMT* 基因成功定位于第 3、5、8、13 和 14 条染色体上, 其中, 第 5 号染色体上分布基因最多, 有 3 个基因, 且均分布在染色体下端。第 8 号和 13 号染色体上基因分布最少, 均有 1 个基因。*BpAMT2.1* 和 *BpAMT2.2* 在第 14 号染色体上的位置接近, 并且二者的序列长度和基因结构相似, 可能是 *BpAMT* 中的串联复制基因。

表 2 *BpAMT* 基因家族特征分析

Table 2 Characteristics analysis of *BpAMT* family genes

基因名称 Gene name	氨基酸数目 AA	分子量/kD Molecular weight/ kD	等电点 PI	脂肪系数 Aliphatic index	亲水系数 GRAVY	亚细胞定位预测 Subcellular localization prediction	染色体定位 Gene localization
<i>BpAMT1.1</i>	499	53.60	6.59	89.82	0.405	质膜、细胞质	Chrom08
<i>BpAMT1.2</i>	507	53.79	6.44	87.85	0.396	叶绿体	Chrom05
<i>BpAMT1.3</i>	502	53.89	6.17	91.81	0.414	质膜、内质网	Chrom03
<i>BpAMT1.4</i>	384	41.64	4.61	97.53	0.517	质膜、叶绿体	Chrom13
<i>BpAMT2.1</i>	486	52.15	8.16	101.98	0.500	叶绿体	Chrom14
<i>BpAMT2.2</i>	454	48.96	6.65	101.89	0.534	叶绿体、细胞质	Chrom14
<i>BpAMT2.3</i>	480	52.11	6.30	102.42	0.486	叶绿体	Chrom03
<i>BpAMT2.4</i>	522	57.46	4.76	98.64	0.263	质膜、叶绿体	Chrom05
<i>BpAMT2.5</i>	471	51.42	7.67	99.83	0.435	质膜、细胞质	Chrom05

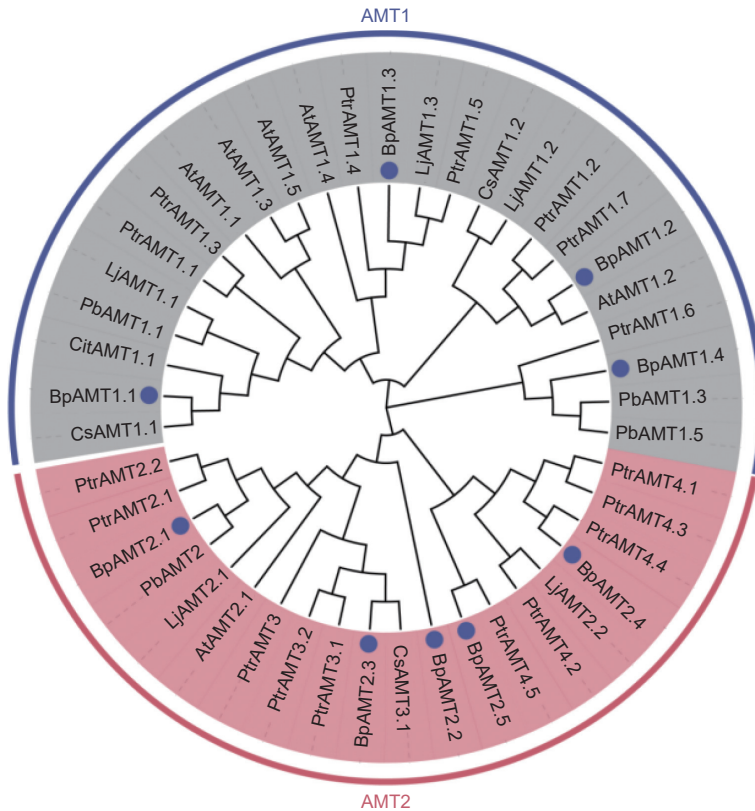
2.2 *BpAMT* 系统发育分析

如图 1 所示, 将白桦 *BpAMT* 与拟南芥、柑橘、百脉根、杨树 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)、茶树 (*Camellia sinensis* L.) 和杜梨 (*Pyrus*

betulifolia Bunge.) *AMT* 氨基酸序列构建进化树。结果显示: *BpAMT* 家族分为 *BpAMT1* 与 *BpAMT2* 两个进化支, 在 9 个 *BpAMT* 基因中, 其中 4 个属于 *BpAMT1* 亚家族, 5 个属于 *BpAMT2* 亚家族。

其中 *BpAMT1.4* 与 *BpAMT1* 亚家族中其余 3 名成员亲缘关系较远, 与杜梨 *PbAMT1.3*、*PbAMT1.5*

及杨树 *PtrAMT1.6* 聚类在一起。白桦 *BpAMT* 与杨树 *PtrAMT* 聚类最多, 亲缘关系较近。



注 /Notes: 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*): AtAMT1.1 (CAA53473), AtAMT1.2 (AAD54639), AtAMT1.3 (AAD54638), AtAMT1.4 (CAB81458), AtAMT1.5 (NP_189072), AtAMT2.1 (NP_181363); 杨树 (*Populus trichocarpa*): PtrAMT1.1 (XM_002314482), PtrAMT1.2 (XM_002325754), PtrAMT1.3(XM_002311667), PtrAMT1.4 (XM_002303068), PtrAMT1.5 (XM_002301801), PtrAMT1.6 (XM_002314070), PtrAMT2.1 (XM_002309115), PtrAMT2.2 (XM_002323564), PtrAMT3.1 (XM_002300186), PtrAMT4.1 (XM_002302048), PtrAMT4.2 (XM_002324235), PtrAMT4.3 (XM_002306767), PtrAMT4.4 (XM_002319034), PtrAMT4.5 (XM_002327682); 杜梨 (*Pyrus betulifolia*): PbAMT1.1 (KJ123648), PbAMT1.3 (KR870986), PbAMT1.5 (KR870987), PbAMT2 (KJ196081), PbAMT3 (KJ196083); 百脉根 (*Lotus japonicas*): LjAMT1.1 (AJ279059), LjAMT1.2 (AY135020), LjAMT1.3 (AJ575588), LjAMT2.1 (AF187962), LjAMT2.2 (FJ668388); 柑橘 (*Citrus reticulata*): CitAMT1.1 (DQ887678); 茶树 (*Camellia sinensis*): CsAMT1.1 (KU361592), CsAMT1.2 (KU361593), CsAMT3.1 (KP338998)

图 1 白桦与部分植物 AMT 蛋白系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic evolution of AMT proteins from some plants and *B.platyphylla*.

2.3 基因结构与保守基序分析

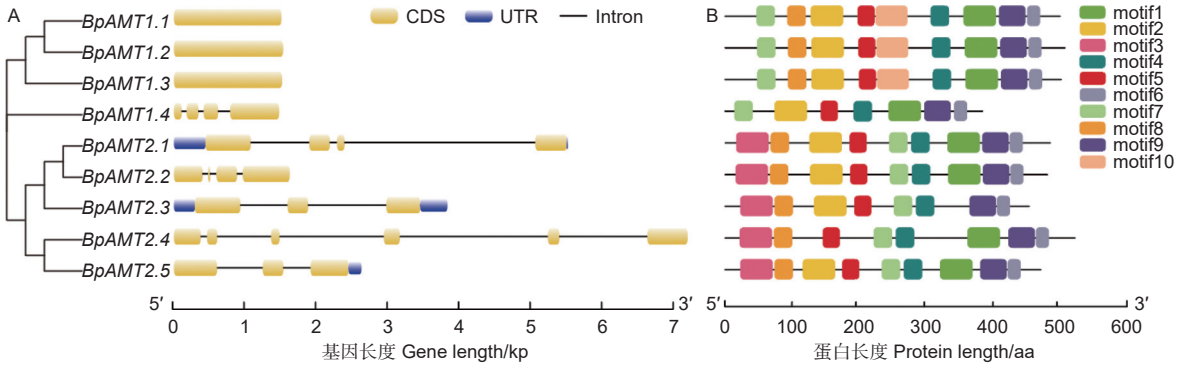
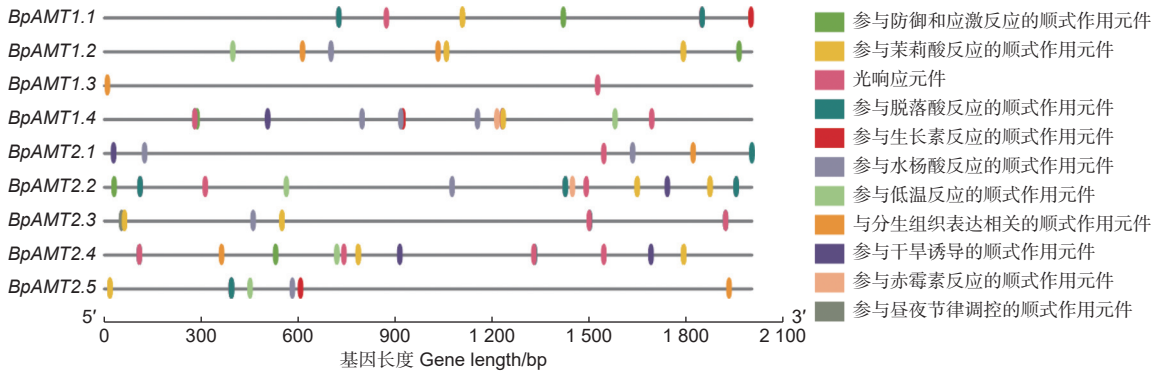
为了了解 *BpAMT* 基因的序列特征, 对其基因结构及保守基序进行分析。图 2A 表明: *BpAMT 1.1~1.3* 均含有一个 1 个外显子, 无内含子; *BpAMT 1.4* 含有 4 个外显子与 3 个内含子; *BpAMT2* 基因序列包含 3~6 个外显子与 3~5 个内含子, 且具有未翻译区结构。

BpAMTs 保守基序见图 2B, *BpAMT* 两个亚家族中均存在 motif 4、5、6、7、9 这 5 种保守基序。*BpAMT2* 亚家族成员氨基酸序列中含有特定识别基序 motif 3, 除 *BpAMT1.4* 外, *BpAMT1* 亚家族成员氨基酸序列中含有特定识别基序 motif

10, motif 7 在两个亚家族中都存在, 但是位置有很大差异, motif 7 在 *BpAMT1* 的 5' 端, 而在 *BpAMT2* 的中段。*BpAMT* 的保守性较高, 同一个亚家族的 *BpAMT* 蛋白 motif 分布较相似, 这些保守 motif 的存在保证了家族成员在转运铵盐中发挥稳定的作用。

2.4 顺式作用元件分析

提取 *BpAMT* 基因编码区上游 2 000 bp 的核苷酸序列, 根据 *BpAMT* 基因家族的性质, 去除一般性转录调控元件和功能未知元件, 图 3 表明: 发挥功能的元件主要分为 3 类: 逆境胁迫响应元件、光响应元件及植物激素响应元件, 从中选取了

图 2 *BpAMT* 基因结构与保守基序分析Fig. 2 Conserved motif and gene structure analyses of *BpAMT* genes图 3 *BpAMT* 启动子中的顺式作用元件分布Fig. 3 Distribution of cis-elements in *BpAMT* promoter regions

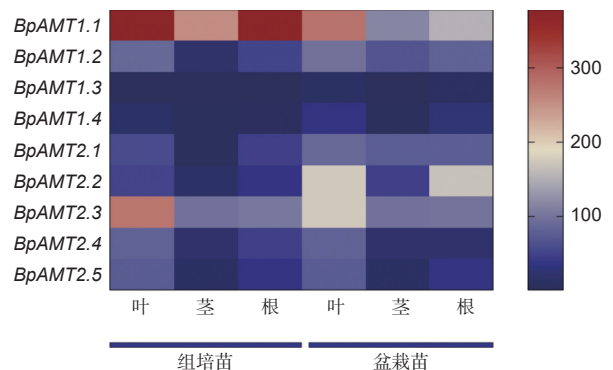
10 种重要的顺式元件进行可视化。

除 *BpAMT1.3* 外, 其余 *BpAMT* 启动子区具有 1~2 个逆境响应元件, 包括 TC-rich repeats 元件、响应干旱胁迫的 MYB 元件以及响应低温胁迫的 LTR 元件, 说明这些成员与逆境应答密切相关。*BpAMT* 启动子区的光反应元件主要为 G-box 元件, 除 *BpAMT1.2* 与 *BpAMT2.5* 不包含光反应元件外, 其余 *BpAMT* 启动子区具有 1~3 个光响应元件, *BpAMT2.3* 启动子区具有参与昼夜节律调控的元件。*BpAMT* 启动子区激素响应元件种类较多, 主要有参与脱落酸反应的 ARBE 元件、响应生长素的 TGA-box 元件、参与水杨酸反应相关的 TCA-motf 元件以及响应赤霉素的 TATC-box 元件, 表明 *BpAMT* 可能受到各种不同激素的调控。以上结果表明, *BpAMT* 可能与逆境应答、激素信号转导和生长发育过程密切相关。

2.5 *BpAMT* 的组织部位表达模式分析

如图 4 所示, *BpAMT* 家族基因在组培苗和盆栽幼苗根、茎和叶中的表达趋势相同, 均呈现叶>根>茎趋势, 其中, 在盆栽苗和组培苗茎和叶

部位 *BpAMT1.1* 的表达量最高, 分别为 153.05 和 377.41、267.88 和 253.06; 在盆栽苗和组培苗根、茎、叶中 *BpAMT1.3* 的表达量均最低, 分别为 9.35、2.14、1 和 1、12.18、2.19。

图 4 白桦叶、茎和根中 *BpAMT* 基因表达的 qRT-PCR 分析
Fig. 4 Expression analysis of *BpAMT* by qRT-PCR in leaves, stems and roots

2.6 不同氮素条件下 *BpAMT* 的表达模式分析

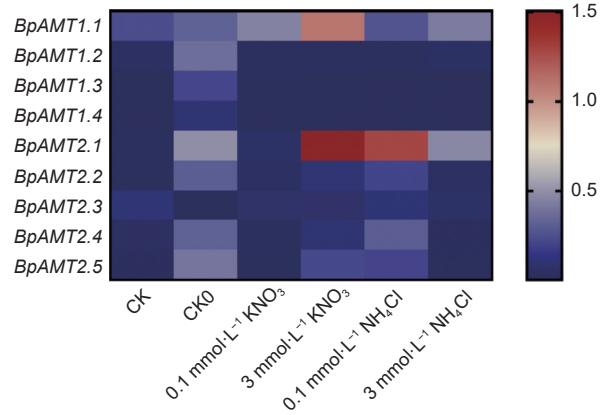
如图 5 所示, *BpAMT* 家族基因在硝态氮和铵态氮处理后的表达趋势不同。在去除培养基中无机氮

源 (CK0) 的条件下, 除 *BpAMT2.3* 之外的 *BpAMT* 表达量均呈上调趋势; 在 KNO_3 与 NH_4Cl 处理下, *BpAMT1.1* 和 *2.1* 表达量均呈上调趋势, 其余 *BpAMT* 在 KNO_3 处理下均呈下调趋势, 其余 *BpAMT1* 与 *BpAMT2* 在 NH_4Cl 处理下呈现相反的变化趋势, 其中, *BpAMT2.1* 表达量在 CK0、 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$ 与 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$ 处理下均呈上调趋势, 表达量分别为对照组的 19、58、50 和 18 倍。*BpAMT1.3* 和 *1.4* 的表达量在不同氮素条件下的表达都较低, 这可能与较大的基因家族有关系, 表明家族基因之间存在功能冗余。

2.7 *BpAMT* 的日变化表达模式分析

如图 6 所示, *BpAMT1.1*、*1.3*、*2.1*、*2.2* 和 *2.3* 表达量在 3:00—15:00 时段呈上升趋势, 在 18:00—0:00 时段呈下降趋势, *BpAMT1.4* 和 *2.4* 的日变化规律与之相反。不同基因表达量达峰值的时间不同, *BpAMT1.1* 和 *1.3* 表达量在 18:00 达到峰值, *BpAMT2.1*、*2.2* 和 *2.3* 表达量

在 15:00 达到峰值, *BpAMT1.4* 表达量在 00:00 达到峰值, *BpAMT2.4* 表达量在 3:00 达到峰值。



注/Notes: CK0: CK - NH_4NO_3 ; $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KNO}_3$: CK0 + $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KNO}_3$; $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KNO}_3$: CK0 + $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KNO}_3$; $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$: CK0 + $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$; $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$: CK0 + $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$

图 5 不同氮素处理下的 *BpAMT* 基因表达的 qRT-PCR 分析

Fig. 5 Expression analysis of *BpAMT* by qRT-PCR under different nitrogen treatment

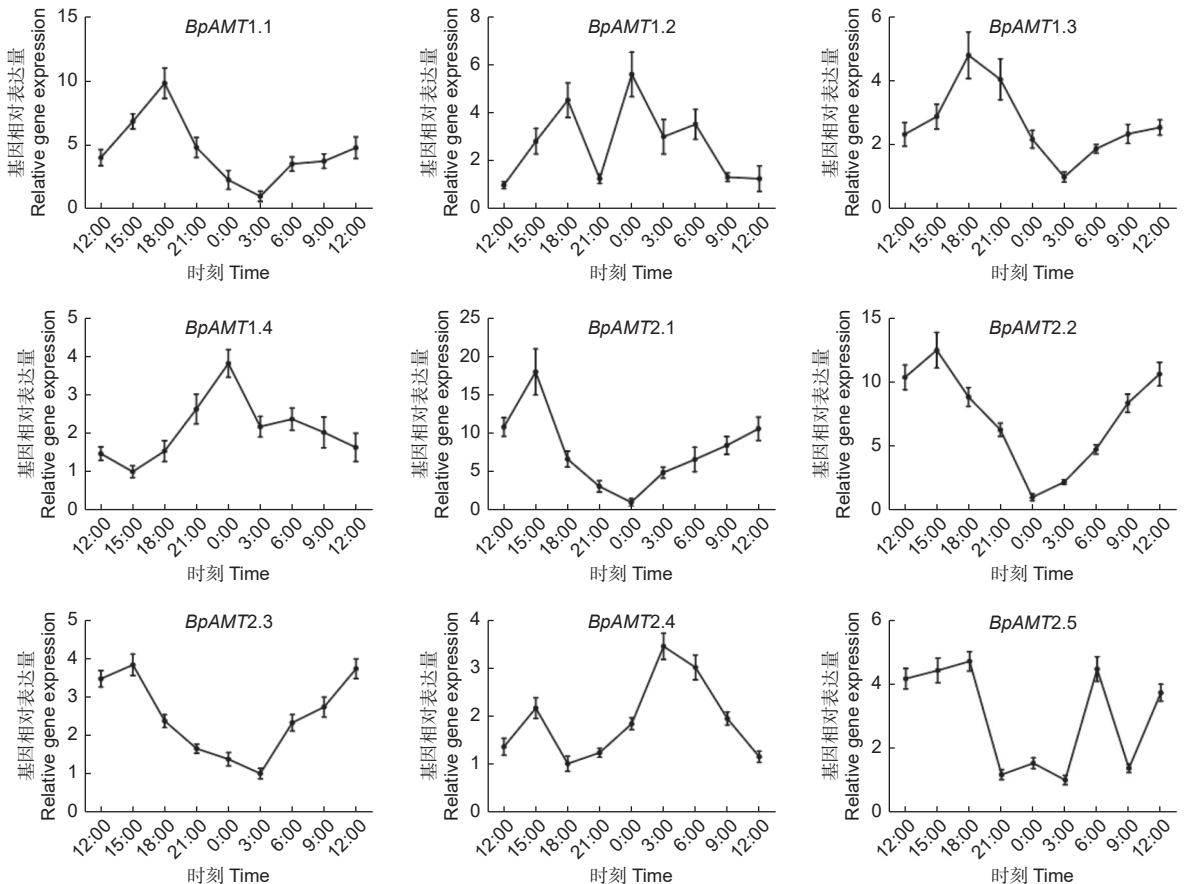


图 6 *BpAMT* 基因日变化表达的 qRT-PCR 分析

Fig. 6 Expression analysis of *BpAMT* daily variation by qRT-PCR

2.8 *BpAMT* 在激素处理下的表达模式分析

如图7所示, *BpAMT*s 在 MeJA、GA₃ 和 ABA 处理下呈现不同的表达特征。经 MeJA 处理后, 除 *BpAMT1.3* 和 *BpAMT2.1* 外, 其余 7 个 *BpAMT* 的表达量上调, 其中, *BpAMT1.4* 表达量在根部上调最明显, 为对照组的 4.18 倍, *BpAMT2.1* 表达量在根部下调最明显, 为对照组的 0.14 倍。经 ABA 处理后, *BpAMT1.1*、2.1、2.2 和 2.5 的表达量上调, 其余 5 个 *BpAMT* 的表达量下调, 其中, *BpAMT2.1* 表达量在叶片中上调最明显, 为对照组的 6.01 倍, *BpAMT1.3* 表达量在茎部

下调最明显, 为对照组的 0.18 倍。经 GA₃ 处理后, *BpAMT1.1*、2.2 和 2.4 的表达量上调, *BpAMT2.5* 的表达量下调, 其余 5 个 *BpAMT* 的表达量没有显著变化, 其中, *BpAMT2.2* 表达量在根部上调最明显, 为对照组的 6.17 倍, *BpAMT2.5* 表达量在叶片下调最明显, 为对照组的 0.41 倍。在 MeJA、GA₃ 和 ABA 处理下, *BpAMT1.1* 和 2.2 在叶、茎和根中均呈现上调表达趋势。以上结果表明, *BpAMT* 受多种激素的诱导表达, 但对不同激素的响应程度与响应部位存在差异。

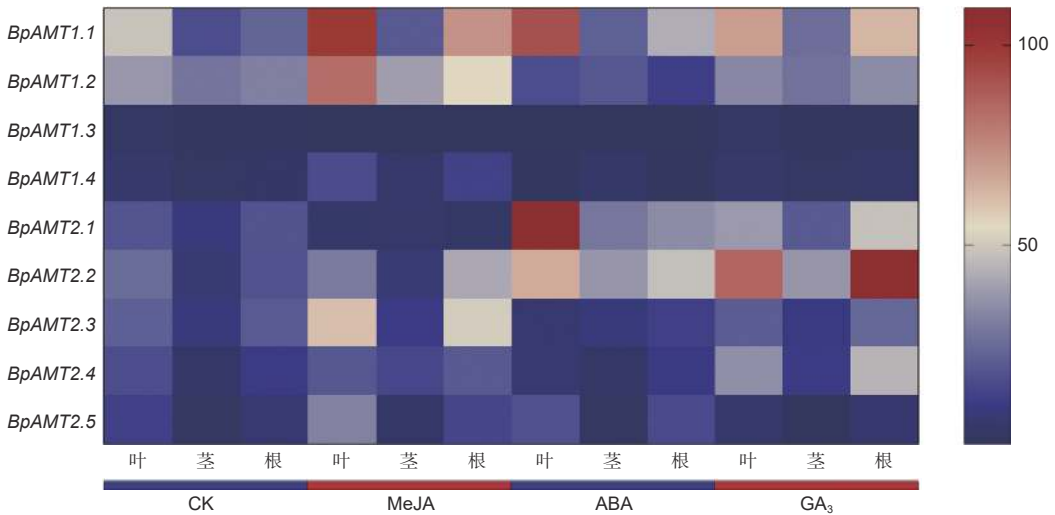


图7 激素处理下 *BpAMT* 基因表达的 qRT-PCR 分析

Fig. 7 Expression analysis of *BpAMT* by qRT-PCR under hormone treatment

2.9 *BpAMT* 在非生物胁迫下的表达模式分析

如图8所示, *BpAMT* 在低温、干旱和氯化镉处理下呈现不同的表达特征。经低温处理后, *BpAMT1.2*、1.4、2.2、2.4和 2.5 的表达量上调, *BpAMT1.1* 和 2.3 的表达量下调, 其中, *BpAMT2.4* 在茎部上调最明显, 为对照组的 12.25 倍, *BpAMT1.1* 在根中下调最明显, 为对照组 0.13 倍。经干旱处理后, *BpAMT1.1*、1.4、2.1 和 2.3 的表达量上调, *BpAMT1.2*、1.3、2.2 和 2.5 的表达量下调, 其中, *BpAMT1.4* 在茎部上调最明显, 为对照组的 9.97 倍, *BpAMT2.5* 在茎部下调最明显, 为对照组的 0.13 倍。经氯化镉处理后, *BpAMT2.1* 和 2.4 的表达量上调, *BpAMT2.2* 和 2.3 的表达量没有显著变化, 其余 *BpAMT* 的表达量下调, 其中, *BpAMT2.4* 的表达量在茎中上调最明显, 为对照组的 9.74 倍, *BpAMT1.3* 在茎中

下调最明显, 为对照组的 0.09 倍。在低温、干旱和氯化镉处理下, *BpAMT2.1* 在叶、茎和根 3 个组织部位中均呈现上调表达趋势。以上结果表明, *BpAMT*s 在不同非生物胁迫中的表达情况存在差异, 推测在逆境中发挥不同的作用。

3 讨论

铵是植物根系吸收的经济有效的一种氮素形式, AMT 介导的高亲和力铵跨质膜运输是植物根系吸收铵的主要途径^[16]。近年来, 有关植物吸收和转运铵态氮的分子机制有了较大突破, 特别是随着高通量测序技术的发展, 拟南芥、谷子 (*Setaria italica* Beauv.)、玉米 (*Zea mays* L.) 及甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.) 等植物的 AMT 遗传信息逐步被发掘^[17-20]。

白桦基因组数据的公布为系统解析 *BpAMT* 家

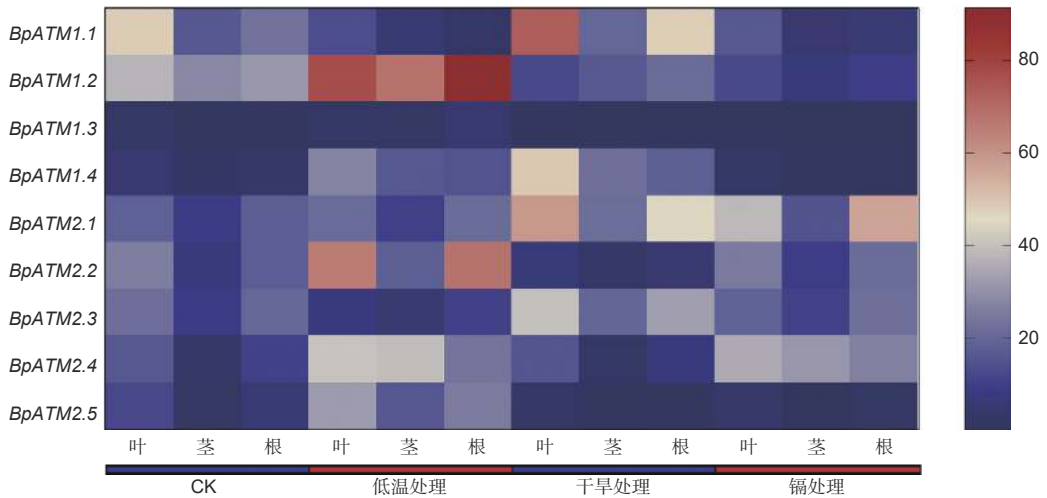


图 8 非生物胁迫下 *BpAMT* 基因表达的 qRT-PCR 分析

Fig. 8 Expression analysis of *BpAMT* by qRT-PCR under abiotic stress

族成员提供了可能。因此, 本论文基于白桦基因组和本研究室获得的转录组数据, 共筛选了 9 个具有完整 Ammonium-transp superfamily 结构域的 *BpAMTs*, 与已报道的植物 *AMT* 家族分为 *AMT1* 和 *AMT2* 两个亚家族一致, 9 个 *BpAMTs* 也分为两类, 其中, 4 个属于 *BpAMT1* 亚家族, 5 个属于 *BpAMT2* 亚家族。

BpAMT2 亚家族成员的氨基酸序列中均具有特定识别基序 motif 3, 保守基序的数量和位置相同, 其基因结构中外显子数目在 3~6 个之间, 这与葡萄 (*Vitis vinifera* L.)、水稻与百脉根等植物 *AMT2* 亚家族成员的报道一致^[21-23]; *BpAMT1* 亚家族成员 *BpAMT1.1*~*1.3* 的氨基酸序列中保守基序的数量和位置相同, 均含有特定识别基序 motif 10, 基因结构中不含内含子, 这也与大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 和杨树等植物中大多数 *AMT1* 基因不含内含子的报道一致^[24-25]。*BpAMT1.4* 基因结构中包含 3 个内含子, 其氨基酸序列中缺失 motif8 和 *BpAMT1* 亚家族特定识别序列 motif10, 但其它保守基序的数目和位置都与 *BpAMT1.1*~*1.3* 相同; 进化关系分析发现, *BpAMT1.4* 与 *BpAMT1.1*~*1.3* 定位在同一分支上, 故将其归类于 *BpAMT1* 亚家族。*BpAMT1.4* 氨基酸序列中缺失 motif 10 可能与其结构演化过程中内含子的获得有关, 同时推测其可能参与特殊的铵转运机制。

基因家族的进化过程中会出现基因复制、扩展、丢失和漂移等事件, *BpAMTs* 也出现了基因片

段复制事件, 且不均匀分布于 5 条染色体上。由此推测, 为了适应不同生境下的氮素种类及供给量, 白桦在进化过程中可能通过扩展 *BpAMT* 基因家族来适应环境。启动子顺式作用元件分析显示: *BpAMTs* 含有多个胁迫响应元件、激素响应以及光反应元件等, 表明 *BpAMTs* 基因潜在的重要功能。同一亚家族内成员含有的元件类型和数量也各不相同, 表明 *BpAMTs* 的表达调控方式具有一定的特异性。

植物 *AMT* 基因的表达具有组织特异性, 如拟南芥 *AtAMT1.1* 在根中表达最高, *AtAMT2.1* 在茎中表达最高, *AtAMT1.4* 在花粉中专一性表达^[26]。同样, 在 2 种白桦材料中对 *BpAMTs* 的组织部位表达模式进行了验证, 不同组织部位的 *BpAMTs* 表达趋势均为叶>根>茎。由此推测, *BpAMTs* 基因表达主要受叶片中系统氮态信号以及根系中局部铵态信号的控制。在响应光照的日变化中, 菜心 *BcAMTs* 基因表达量在 6: 00—12: 00 为上升趋势, 15: 00—00: 00 呈下降趋势, 在中午 12: 00 时表达量达到峰值^[27]。同样, *BpAMT1.1*、*1.3* 与 *BpAMT2.1*~*2.3* 的在同一日周期内的表达量也有相似的趋势, 而 *BpAMT1.4*、*BpAMT2.4* 日变化趋势与之相反, 表明在光照逐渐减少的情况下, 白桦通过提高 *BpAMT1.4*、*BpAMT2.4* 基因的表达, 维持植物夜间的铵根离子吸收。由此可见, *BpAMTs* 表达受日变化光周期的影响, 而铵根离子吸收速率是否具有日变化趋势还需进一步验证。

一般情况下, 缺氮或低氮条件对铵根离子的吸收有促进作用, 不同的氮源对铵根离子的吸收也有

影响,硝酸根作为氮代谢过程中氮元素吸收同化的源头,可以在酶促反应下合成铵根离子,作为铵根离子转运基因, *BpAMTs* 表达的规律性有待明确。*BpAMTs* 在不同氮素处理下呈现不同的表达特征。在缺氮条件下,除 *BpAMT2.3* 外,其余 *BpAMTs* 表达量均上升,这与柑橘^[9]、地钱 (*Marchantia polymorpha* L.)^[28] 及小麦^[29] 在缺氮后 *AMT* 基因表达趋势相似;在高浓度单一硝态氮为氮源的条件, *BpAMT2.1*、*1.1* 与 *2.5* 表达量显著提高,推测这可能与高浓度单一硝态氮对悬浮细胞产生了胁迫有关系,使之趋向于吸收耗能更低的铵根离子。

研究表明,氮素形态影响植物体内部分激素的合成和运输,同时通过外施激素也可以增加植物的氮素利用率^[30]。外源激素是影响 *AMT* 基因表达的重要因素, *MeJA* 和 *ABA* 处理杜梨后,发现 *PbAMT1.5* 的表达显著上调^[31]; *GA₃* 和 *NAA* 处理毛竹后,多个 *PeAMTs* 显著上调, *PeAMT4* 显著下调^[32]。*BpAMT* 对激素的响应存在差异, *BpAMT1.1*、*2.1*、*2.2*、*2.4* 和 *2.5* 对 *MeJA*、*GA₃* 和 *ABA* 处理均具有敏感性,其中, *BpAMT1.1* 和 *2.2* 在叶、茎和根中均呈现上调表达趋势,且在根部响应最强烈,推测白桦根部铵根离子的吸收过程与激素互相作用,共同调节白桦的根系发育。

非生物胁迫是影响植物铵根吸收转运的重要因素。干旱胁迫下楸子 (*Malus prunifolia* Borkh.) *MpAMT1.2* 和 *4.2* 的表达显著上调^[33];茶树在盐胁迫下 *CsAMT1.3b* 和 *3.1* 表达显著下调, *CsAMT1.1a*、*2.1a* 和 *3.3* 表达显著上调^[34]。*BpAMT* 对非生物胁迫的响应存在差异, *BpAMT1.1*、*1.2*、*2.1* 和 *2.5* 对低温、干旱和镉胁迫处理均具有敏感性,其中, *BpAMT2.1* 在叶、茎和根 3 个组织部位中均呈现上调表达趋势,且在茎部响应最强烈,可能由于胁迫处理改变了不同组织部位对铵态氮的利用度,打破了铵根离子在根与茎之间运输过程的动态平衡,导致 *BpAMT* 在茎部的表达改变。镉胁迫下的下调基因数量最多,可能因为 NH_4^+ 与 Cd^{2+} 同为阳离子,白桦通过抑制铵根离子的吸收降低植物对 Cd^{2+} 的吸收,对植物本身起保护作用。由此认为, *BpAMT* 基因可能通过在逆境环境中调节铵态氮的吸收与转运,从而保证氮代谢的稳定性。以上结果为白桦氮素吸收代谢与激素以及非生物逆境之间的互作研究提供了参考思路。

4 结论

从白桦基因组数据库中鉴定了 9 个 *BpAMT* 家族成员,定位到白桦 5 条染色体上,根据进化关系和结构特征分为 2 个亚家族。*BpAMT* 基因表达具有组织部位特异性,受日变化、不同氮素、激素和非生物胁迫等影响,其中, *BpAMT1.1* 与 *BpAMT2.1* 响应较强。以上结果为 *BpAMT* 家族成员的功能研究提供了有价值的信息和可靠的候选基因。

参考文献:

- [1] 张楠. 干旱及外施氮素对长春花生长及次生代谢的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [2] 王新磊, 吕新芳. 氮代谢参与植物逆境抵抗的作用机理研究进展[J]. 广西植物, 2020, 40(4): 583-591.
- [3] 李静, 张冰玉, 苏晓华, 等. 植物中的铵根及硝酸根转运蛋白研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2012, 36(4): 137-143.
- [4] 吕新芳, 于培, 邓文浩, 等. 大叶藻基因组铵根转运蛋白 *AMT* 的生物信息学特征[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(10): 4478-4485.
- [5] 丛郁, 杨顺瑛, 宋志忠, 等. 杜梨铵转运蛋白基因的克隆表达及在梨属植物中的 SNP 分析[J]. 西北植物学报, 2011, 31(10): 1942-1950.
- [6] HAO D L, ZHOU J Y, YANG S Y, et al. Function and regulation of ammonium transporters in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(10): 35-57.
- [7] ZHAO X P, YE X Z, SHI W M. Expression of *OsAMT1 (1.1-1.3)* in rice varieties differing in nitrogen accumulation[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2014, 61(5): 750-756.
- [8] SIMON-ROSIN U, WOOD C, UDVARDI M K. Molecular and cellular characterisation of *LjAMT2;1*, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51(1): 99-108.
- [9] GEMMA C, MIGUEL C, EDUARDO P M, et al. Ammonium transport and *CitAMT1* expression are regulated by N in Citrus plants[J]. Planta, 2009, 229(2): 331-342.
- [10] SUN Y C, SHENG S, FAN T F, et al. Molecular identification and functional characterization of *GhAMT1.3* in ammonium transport with a high affinity from cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Physiologia Plantarum, 2019, 167(2): 217-231.
- [11] GAZZARRINI, LEJAY, GOJON, et al. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots[J]. The Plant cell, 1999, 11(5): 937-947.
- [12] WALTERS M B, WILLIS J L, GOTTSCHALK K W. Seedling growth responses to light and mineral N form are predicted by

- species ecologies and can help explain tree diversity[J]. NRC Research Press, 2014, 44(11): 1356-1368.
- [13] 马学发, 孙志虎, 刘 彤, 等. 不同形态氮素比例对白桦幼苗生长影响的研究[J]. 森林工程, 2017, 33 (2): 1-4.
- [14] 李海霞, 张妍妍, 白 卉, 等. 供氮水平对白桦幼苗生物量、碳氮含量与储量的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45 (22): 156-159.
- [15] CHEN S, WANG Y C, YU L L, *et al.* Genome sequence and evolution of *Betula platyphylla*[J]. Horticulture research, 2021, 8(1): 496-507.
- [16] 孟 森. 林木细根氮素吸收动态及氮转运蛋白基因表达[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [17] YUAN L, LOQUÉ D, KOJIMA S, *et al.* The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of *AMT1*-type transporters[J]. The Plant Cell Online, 2007, 19(8): 2636-2652.
- [18] 张 洁, 叶 玲, 郭永正, 等. 谷子AMT基因家族的鉴定及生物信息学分析[J]. 山西农业科学, 2020, 48 (3): 283-290.
- [19] 李红梅, 韩国民. 玉米自交系B73铵转运蛋白基因家族分析[J]. 安庆师范大学学报(自然科学版), 2018, 24 (1): 73-77.
- [20] WU Z, GAO X, ZHANG N, *et al.* Genome-wide identification and transcriptional analysis of ammonium transporters in *Saccharum*[J]. Genomics, 2021, 113(4): 1671-1680.
- [21] 丛 郁, 杨顺璞, 宋志忠, 等. 葡萄AMT基因家族生物信息学分析[J]. 中国农学通报, 2011, 27 (25): 193-199.
- [22] 李 畅. 水稻铵转运蛋白基因OsAMT1.1和OsAMT2.1生物学功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [23] FRANCESCA S, ANNE M, ANNA R, *et al.* Functional characterization of an ammonium transporter gene from *Lotus japonicus*[J]. Gene, 2001, 270(1): 237-243.
- [24] 李 赢, 王 爽, 万 华, 等. 大麦AMT1基因家族的全基因组分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17 (11): 3461-3467.
- [25] WU X, YANG H, QU C, *et al.* Sequence and expression analysis of the *AMT* gene family in poplar[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6(1): 337-346.
- [26] YUAN L, GRAFF L, LOQUÉ D, *et al.* AtAMT1.4, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in *Arabidopsis*[J]. Plant & Cell Physiology, 2009, 50(1): 13-25.
- [27] 钟丽华. 铵态氮调控菜心氮素吸收的分子机制[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [28] GUO H, WANG N, MCDONALD T R, *et al.* MpAMT1.2 from *Marchantia polymorpha* is a high-affinity, plasma membrane ammonium transporter[J]. Plant & Cell Physiology, 2018, 59(5): 5-13.
- [29] IJATO T, PORRAS-MURILLO R, GANZ P, *et al.* Concentration dependent physiological and transcriptional adaptations of wheat seedlings to ammonium[J]. Physiologia Plantarum, 2021, 171(3): 328-342.
- [30] 李良勇, 崔国贤. 营养胁迫下植物内源激素变化研究进展[J]. 作物研究, 2002 (S1): 240-244.
- [31] LI H, HAN J L, CHANG Y H, *et al.* Gene characterization and transcription analysis of two new ammonium transporters in pear rootstock (*Pyrus betulaefolia*)[J]. Journal of Plant Research, 2016, 129(4): 737-748.
- [32] 李 真, 袁婷婷, 朱成磊, 等. 毛竹铵态氮转运蛋白的分子特征及基因表达模式[J]. 林业科学, 2021, 57 (7): 70-79.
- [33] HUANG L, LI M, ZHOU K, *et al.* Uptake and metabolism of ammonium and nitrate in response to drought stress in *Malus prunifolia*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 127(1): 185-193.
- [34] DUAN Y, ZHU X, SHEN J, *et al.* Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the amino acid permease gene family in tea plants (*Camellia sinensis*)[J]. Genomics, 2020, 112(4): 2866-2874.

Genome-wide Identification and Expression Analysis of *BpAMT* Gene Family in *Betula platyphylla*

YANG Hai-xin, LIU Xiao-ying, ZHAN Ya-guang, FAN Gui-zhi

(College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150036, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] To identify *AMT* gene family members in *Betula platyphylla* and analyze the expression pattern of *AMT* genes. [Method] Bioinformatics methods were used to identify the family genes and real-time fluorescence quantitative analysis of gene expression. [Result] 9 *AMT* genes were identified from the *B.platyphylla* genome and divided into two subfamilies, *AMT1* and *AMT2*, named *BpAMT1.1-1.4* and *BpAMT2.1-2.5*; These *BpAMT* proteins contained 384-522 amino acid residues with isoelectric points ranging from 4.61 to 8.16, and all of which were located on the plasma membrane and organelle membrane; The genes of *BpAMT* family were distributed on 5 chromosomes unevenly, and there were tandem duplication among the members. *BpAMTs*' expression patterns had specificity in different tissues, showing a leaf>root>stem trend; At the same time, KNO_3 , NH_4Cl , MeJA, GA_3 , ABA, CdCl_2 and diurnal variation could affect the expression of *BpAMT* gene, and the response of members differed under different treatments. [Conclusion] 9 *BpAMT* genes are identified and divided into two subfamilies. *BpAMT* gene plays an important role in regulating nitrogen uptake, transport and in response to hormone signals or abiotic stress. These results lay a foundation for further analysis of the function of *BpAMT* gene in growth and resistance to stress in *B.platyphylla*.

Keywords: *Betula platyphylla*; *AMT*; Gene family; Gene Expression

(责任编辑: 张 研)