

· 专题论坛 ·

硝酸盐转运蛋白NRT2在植物中的功能及分子机制研究进展

黄慧梅^{1†}, 高永康^{1†}, 台玉莹¹, 刘超¹, 曲德杰¹, 汤锐恒¹, 王幼宁^{2*}

¹华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; ²西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100

摘要 氮素作为植物生长发育所需的大量元素, 对植物生长发育及作物产量具有重要作用。施入氮肥是植物及作物的主要氮素来源。面对当下过度施肥造成面源污染加剧的现状, 提高作物氮素利用效率, 实现“减肥增产”的绿色增产增效模式, 是促进我国农业可持续发展及保障国家粮食安全的重要措施。当土壤氮匮乏时, 硝酸盐转运蛋白NRT2家族成员对根系吸收及转运硝酸盐至关重要, 其中NRT2.1在植物缺氮时主要负责根部的硝酸根吸收。该文重点总结了模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)及重要粮油作物中NRT2家族蛋白特别是NRT2.1的功能及调控机理研究进展, 旨在为后续挖掘NRT2在提高作物产量方面的潜力及分子调控机制研究提供重要依据。

关键词 氮素, 硝酸盐转运蛋白NRT2, 基因功能, 分子机制

黄慧梅, 高永康, 台玉莹, 刘超, 曲德杰, 汤锐恒, 王幼宁 (2023). 硝酸盐转运蛋白NRT2在植物中的功能及分子机制研究进展. 植物学报 58, 783–798.

氮元素是构成蛋白质和核酸的重要成分, 也是植物进行光合作用所需叶绿素的组分元素。作为植物生存所需的大量营养元素, 氮素是作物产量最主要的限制因子之一, 在作物生长适宜的时期追加氮肥是保证作物高产、稳产和优质的重要措施。重要粮油经济作物包括谷物类、油料和纤维作物等, 在营养和生殖生长期都需要大量的氮素(Leghari et al., 2016)。氮素供应充足与否对作物的生长发育至关重要, 特别是从营养生长向生殖生长的转换过程中, 由此改变作物的地上株型及地下根系构型(root system architecture, RSA), 影响产量及品质(Luo et al., 2020; Zhang et al., 2021)。在生产中, 农作物高产对工业氮肥的依赖度极高, 氮肥在全球粮食提质增产过程中贡献了重要力量(Luo et al., 2020)。然而, 持续增加甚至过量的氮肥投入非但未带来作物产量的相应增加, 反而引发了一系列不容忽视的环境污染问题。因此, 亟须通过优化氮肥管理措施及遗传学改良提升作物对氮素的吸收和利用效率, 推进农业绿色可持续发展(Fan et al., 2017)。

大多数陆生植物可以从土壤中直接吸收有机氮(包括氨基酸、小肽和蛋白质等含氮有机物)和无机氮(包括铵盐、硝酸盐和尿素)。在不同的生态条件及土壤环境下, 植物获取的氮素营养形式也各不相同(Näsholm et al., 2009; Wang et al., 2012)。硝态氮(NO_3^- -N)和铵态氮(NH_4^+ -N)是2种能被植物直接吸收利用的无机氮主要形态, 在农田生产中占据主导地位(李宝珍等, 2009; Fan et al., 2017)。其中, 硝态氮肥更适用于多种旱地作物。除了作为营养物质, NO_3^- 还是局部或者系统性调控植物基因表达、叶片伸长、根形态建成、开花诱导和种子休眠的信号因子(Hachiya and Sakakibara, 2017), 表明硝酸盐在介导植物生长发育及决定作物产量方面发挥重要作用。

植物及作物根系对 NO_3^- 的吸收是一个主动吸收过程。根据动力学特征, 可分为高亲和力转运系统(high-affinity nitrate transport system, HATS)和低亲和力转运系统(low-affinity nitrate transport system, LATS)。当外界硝酸根浓度较低($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)时, 植物依靠HATS吸收硝酸根, LATS则在外部硝酸根浓度大

收稿日期: 2022-06-28; 接受日期: 2022-10-24

基金项目: 湖北省自然科学基金(No.2022CFB172)和国家重点研发计划(No.2021YFF1000500)

† 共同第一作者

* 通讯作者。E-mail: youningwang@nwafu.edu.cn

于 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时发挥主要作用(Orsel et al., 2006)。HATS又可分为组成型(constitutive HATS, cHATS)和诱导型(inducible HATS, iHATS)。其中cHATS基因的表达不受 NO_3^- 影响;而iHATS相关基因受 NO_3^- 诱导后表达量迅速增高(Okamoto et al., 2003)。目前已鉴定到4个转运蛋白家族介导植物自土壤中吸收硝酸盐及其在体内的转运和再分配过程,主要包括硝酸盐转运体1/小肽转运体(nitrate transporter 1/peptide transporter family, NRT1/NPF)、硝酸盐转运体2家族(NRT2)、氯离子通道蛋白(CHLO-RIDE CHANNEL family, CLC)和慢阴离子通道蛋白(SLOWLY ACTIVATING ANION CHANNEL, SLAC) (Wang et al., 2012, 2018),其中NRT2家族主要在植物应答土壤氮匮乏时发挥作用。因此,充分解析低氮条件下NRT2家族成员的氮吸收及再分配机制对实现“减肥增产”的绿色增产增效模式具有重要研究价值和现实意义。近年来,除了在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中所取得的进展之外,研究者也在水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)及豆科牧草中鉴定到NRT2的同源蛋白。本文在总结不同物种特别是拟南芥及重要作物中鉴定的NRT2同源蛋白功能研究现状的基础上,重点综述了近年来NRT2家族蛋白转运活性的分子调控机制最新研究进展,展望了硝酸根转运蛋白NRT2的氮吸收及转运再分配活性调控机制的研究方向,并对挖掘NRT2在作物营养高效和高产方面的应用潜力提出了几点建议,旨在为作物养分高效及高产新品种培育提供参考。

1 NRT2的分类和结构特征

1.1 NRT2家族的分类

NRT2属于 NO_3^- - NO_2^- 共转运蛋白(NITRATE/NITRITE PORTER, NNP)家族,在结构上属于主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)。根据蛋白亲水性,NNP家族蛋白可分为3类:I型(Type I)为原核生物大肠杆菌(*Escherichia coli*)中的NARK蛋白,转运 NO_2^- ;II型(Type II)为真菌中的 NO_3^- 转运蛋白(如YNT1和CRNA),其中汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)中的YNT1转运 NO_3^- ,而构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中的CRNA可以转运 NO_3^- 和

NO_2^- ;III型(Type III)为藻类和高等植物中的NRT2家族蛋白(Forde, 2000)。根据有无保守的N端序列(不含跨膜域),Type III可细分为Type IIIa和Type IIIb,并且该N端序列在双子叶植物的NRT2家族中高度保守,然而PSORT预测结果显示N端序列的延伸与蛋白定位信号无关(Forde, 2000),其具体功能还需进一步解析。

1.2 高等植物NRT2家族蛋白的结构特征

NRT2蛋白结构的主要特点:(1)一般含有500–600个氨基酸残基,通常具有12个跨膜域(transmembrane helical segments, TMHs)。在结构上,可分为由第1–6个跨膜域组成的N端结构域(TM1–6)和第7–12个跨膜域组成的C端结构域(TM7–12),2个结构域在序列上缺乏相似性,但在蛋白结构上相互对称,它们之间由胞质环相连;(2)在第2–3个跨膜域之间含有1个特征序列为G-x-x-x-D-x-x-G-x-R的保守基序,即MFS序列;(3)在第5个跨膜域中含有保守的NNP序列,即A-G-W/L-G-N-M/A-G基序;(4)大多数Type IIIb蛋白在N端和C末端域含有潜在的蛋白激酶C识别基序(S/T-x-R/K) (Pao et al., 1998; Forde, 2000; 李纯等, 2018)。

2 NRT2在植物中的功能

首个NRT2成员是在真菌中发现的。1991年,Unkles等(1991)在构巢曲霉中首次鉴定到1个编码硝酸根转运蛋白的基因CRNA,通过Northern杂交证明CRNA的RNA水平受到 NO_3^- 的显著诱导。随后Quesada等(1994)在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中克隆并鉴定到与硝酸根吸收及同化相关的膜蛋白NAR2(NITRATE TRANSPORTER ACCESSORY PROTEIN 2)、NRT2.1(或NAR3)和NRT2.2(或NAR4),其中NRT2.1和NRT2.2被认为是CRNA的同源基因。之后证明,在莱茵衣藻中NRT2.1和NRT2.2具有高亲和硝酸盐转运活性,NRT2.1同时介导硝酸盐和亚硝酸盐的转运,而NRT2.2则特异介导硝酸盐的吸收(Galván et al., 1996)。1999年,在高等植物拟南芥中分离并克隆了第1个NRT2家族成员AtNRT2.1,研究表明其表达受低浓度硝酸盐($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KNO}_3$)诱导(Filleur and Daniel-Vedele, 1999)。之后,相继在拟

南芥和大麦(*Hordeum vulgare*)中发现NRT2.1和NRT2.2的表达水平不仅受到氮饥饿的显著诱导,还与根系中NO₃⁻的内流以及氮代谢产物密切相关(Lejay et al., 1999; Zhuo et al., 1999; Vidmar et al., 2000; Cerezo et al., 2001)。近20年,多个物种参考基因组序列的公布为系统研究NRT2家族基因在不同物种中的功能奠定了基础。

2.1 模式植物拟南芥中NRT2家族的功能

2.1.1 AtNRT2家族成员在硝酸根吸收和转运过程中的作用

迄今为止,在拟南芥中共鉴定到7个NRT2家族成员,其中AtNRT2.1、AtNRT2.2、AtNRT2.4和AtNRT2.5属于高亲和硝酸盐转运系统(Orsel et al., 2002; Wang et al., 2018) (表1)。根系是植物吸收营养物质的主要器官,AtNRT2家族中的AtNRT2.1、AtNRT2.2、AtNRT2.4和AtNRT2.5均在根中表达。研究发现,在1 mmol·L⁻¹ NO₃⁻处理下,相较于AtNRT2.1和AtNRT2.2受到NO₃⁻强烈诱导,AtNRT2.4在根中只有少量诱导,AtNRT2.5的表达则被NO₃⁻强烈抑制(Okamoto et al., 2003)。在严重氮饥饿条件下,AtNRT2.4被大量诱导表达,一旦外源供给氮素,其表达水平会迅速下降(Okamoto et al., 2003; Kiba et al., 2012)。基于NO₃⁻吸收的生理及表型实验证明,AtNRT2.1和AtNRT2.2在iHATS系统中发挥关键作用(Orsel et al., 2004)。进一步的遗传学实验表明,AtNRT2.1在iHATS中占主导作用,AtNRT2.2则起辅助吸收作用。在*Atnrt2.1/Atnrt2.2*双突变体中回补AtNRT2.1,其NO₃⁻吸收恢复至野生型水平,而当AtNRT2.1缺失后,回补AtNRT2.2只能部分补偿植株的生长缺陷(Li et al., 2007)。与AtNRT2.1和AtNRT2.2不同,AtNRT2.4和AtNRT2.5只有在极低浓度的NO₃⁻或严重氮饥饿条件下行使功能。在爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞中的实验结果显示,AtNRT2.4属于高亲和硝酸根转运蛋白,*Atnrt2.4*突变体在氮匮乏条件下氮吸收减少且地上部的氮含量也明显下降,在AtNRT2.1及AtNRT2.2双突变的基础上突变AtNRT2.4 (三重突变体)后,因根部硝酸根内流的减少对低氮下地上部的生物量产生更显著的影响(Kiba et al., 2012)。AtNRT2.5的表达同样受到氮饥饿诱导,在长期遭受氮胁迫处理时,AtNRT2.5在拟南芥地上部及地下部根系中均被诱导表达(Lezh-

neva et al., 2014)。AtNRT2.4和AtNRT2.5还在茎的维管组织中表达,其编码蛋白介导韧皮部NO₃⁻的装载(Kiba et al., 2012; Lezhneva et al., 2014),这表明AtNRT2.4和AtNRT2.5虽与AtNRT2.1及AtNRT2.2一样也介导根部的硝酸根吸收,但其也参与硝酸根自根部向地上各组织的转运,而且AtNRT2.5可能更多是在遭受氮饥饿的成年材料中发挥作用。

与其它NRT2定位于质膜不同,AtNRT2.7定位于液泡膜,在干种子中的表达量很高,并介导种子中NO₃⁻的积累(Chopin et al., 2007)。目前,关于AtNRT2.3的功能还未见报道,仅停留在不同组织及低浓度硝酸盐诱导的表达模式分析上,AtNRT2.3在根部的表达基本不受硝酸盐影响,而且AtNRT2.3在不同营养生长期的拟南芥材料中具有差异化组织表达特征(Okamoto et al., 2003),这在一定程度上暗示AtNRT2.3具有特殊功能。虽然AtNRT2.6未被检测到能够转运NO₃⁻,但是AtNRT2.6可能也与AtNRT2.1一样需要在伴侣蛋白的帮助下才具备硝酸根转运活性(Dechorgnat et al., 2012)。有意思的是,AtNRT2.6的转录受到高浓度硝酸盐和病原菌梨火疫病病菌(*Erwinia amylovora*)的显著诱导,并且其表达与活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累存在正相关,由此也导致AtNRT2.6缺失突变体*Atnrt2.6*中活性氧含量减少,同时表现出对梨火疫病病菌的攻击更加敏感,暗示AtNRT2.6可能介导植物对病原菌侵染的响应过程,但其通过转运硝酸根还是其它分子介导该过程尚不清楚(Dechorgnat et al., 2012)。

2.1.2 AtNRT2.1参与拟南芥根系形态建成及植物根系导水率

HATS基因的上调表达和根系构型的改变是植物应对土壤中氮匮乏时的两种适应策略,当外界氮浓度较低时,会显著促进植物侧根数目的增加及侧根的伸长以扩大获取氮素的根表面积(Zhang and Forde, 2000; Remans et al., 2006)。在植物根系对氮匮乏的综合响应中,硝酸盐转运系统与根系构型调控存在相互作用(Remans et al., 2006)。拟南芥根系构型在应答不同浓度氮匮乏时表现有所不同,当将拟南芥野生型Ws(Wassilewskija)从高氮(10 mmol·L⁻¹ NO₃⁻)转移至中度氮匮乏(1或0.5 mmol·L⁻¹ NO₃⁻)培养基时,可见其侧根数目明显增加,而当转至严重氮匮乏(0.1或

表1 拟南芥、水稻和玉米中NRT2成员的研究汇总

Table 1 Summary of identified NRT2 transporters in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* and *Zea mays*

基因名	位点	基因空间表达		低氮 响应	功能	参考文献
		组织定位	亚细胞定位			
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)						
<i>AtNRT2.1</i>	<i>AT1G08090</i>	主根	细胞膜	诱导	介导高亲和硝酸盐吸收	Orsel et al., 2004; Little et al., 2005; Li et al., 2007
<i>AtNRT2.2</i>	<i>AT1G08100</i>	根	细胞膜	诱导	介导高亲和硝酸盐吸收	Orsel et al., 2004; Li et al., 2007
<i>AtNRT2.3</i>	<i>AT5G60780</i>	根	—	无	—	Okamoto et al., 2003
<i>AtNRT2.4</i>	<i>AT5G60770</i>	主根、侧根及茎的韧皮部	细胞膜	诱导	在极低浓度硝酸盐下介导NO ₃ 吸收及转运	Kiba et al., 2012
<i>AtNRT2.5</i>	<i>AT1G12940</i>	主根和侧根的根毛区及韧皮部	细胞膜	抑制	氮饥饿下介导NO ₃ 吸收及转运	Okamoto et al., 2003; Lezhneva et al., 2014
<i>AtNRT2.6</i>	<i>AT3G45060</i>	在所有组织中均表达, 在根和叶中高表达	细胞膜	无	响应病原菌侵染	Dechorgnat et al., 2012
<i>AtNRT2.7</i>	<i>AT5G14570</i>	种子	液泡膜	无	种子胚中的NO ₃ 积累	Chopin et al., 2007
水稻(<i>Oryza sativa</i>)						
<i>OsNRT2.1</i>	<i>LOC_Os02g02190</i>	主根和侧根	细胞膜	诱导	介导高亲和硝酸盐吸收	Feng et al., 2011; Naz et al., 2019
<i>OsNRT2.2</i>	<i>LOC_Os02g02170</i>	主根和侧根	细胞膜	诱导	介导高亲和硝酸盐吸收	Feng et al., 2011
<i>OsNRT2.4</i>	<i>LOC_Os01g36720</i>	侧根原基基部和茎	细胞膜	诱导	双亲和硝酸盐转运, 介导硝酸盐从源到库的再分配	Feng et al., 2011; Wei et al., 2018
<i>OsNRT2.5/OsNRT2.3a</i>	<i>LOC_Os01g50820</i>	根部中柱木质部薄壁细胞	细胞膜	诱导	在极低浓度硝酸盐下介导NO ₃ 从根部向地上部的长距离运输	Tang et al., 2012
<i>OsNRT2.3b</i>	<i>LOC_Os01g50820</i>	茎和叶的韧皮部, 在根中有微弱表达	细胞膜	无	介导NO ₃ 转运, 感知韧皮部细胞的胞质pH值以平衡NO ₃ 和NH ₄ ⁺ 吸收	Feng et al., 2011; Tang et al., 2012; Fan et al., 2016; Feng et al., 2017
玉米(<i>Zea mays</i>)						
<i>ZmNRT2.1</i>	<i>GRMZM2G010280_P01</i>	根部皮层细胞	—	诱导	—	Trevisan et al., 2008
<i>ZmNRT2.2</i>	<i>GRMZM2G010251_P01</i>	皮层、中柱及侧根原基	—	诱导	—	Trevisan et al., 2008
<i>ZmNRT2.3</i>	<i>GRMZM2G163866_P01</i>	—	—	—	—	Plett et al., 2010
<i>ZmNRT2.5</i>	<i>GRMZM2G455124_P01</i>	在根、叶、穗轴、雄穗和苞叶中高表达	—	诱导	—	Fujita et al., 1995; Sabermanesh et al., 2017; Dechorgnat et al., 2019

0.05 mmol·L⁻¹ NO₃⁻)培养基中时, 侧根的平均长度显著增加(Remans et al., 2006)。研究发现, *AtNRT2.1*在根系对低氮胁迫的综合形态和生理响应中发挥至关重要的作用, 当拟南芥*Atnrt2.1-1*突变体在中度低氮条件下(0.5 mmol·L⁻¹ NO₃⁻)生长时, 与野生型表现不同的是其侧根数目无明显增加, 即*Atnrt2.1*突变导致缺氮时侧根减少, 但其侧根平均长度却显著增加,

表明*Atnrt2.1*突变体在中度缺氮的条件下表现出野生型拟南芥在极度氮匮乏时的根系构型, 这在一定程度上可以通过突变体中氮吸收活力减弱来解释, 同时也说明*AtNRT2.1*突变抑制氮匮乏下侧根发生并不依赖于根系的硝酸根吸收活力(Remans et al., 2006)。上述结果表明, *AtNRT2.1*在拟南芥响应外界氮水平时的根系构型改变过程中可能具有双重作用, 其一是作

为高亲和硝酸盐转运系统的重要转运蛋白间接调控 NO_3^- 依赖的RSA响应; 其二则是通过目前尚不明确的特定功能直接调控氮匮乏时侧根的发生(Remans et al., 2006)。

环境中碳氮比高会抑制侧根发生, Little等(2005)证实AtNRT2.1加强了这一抑制作用($132 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{NO}_3$), 而且可能不依赖于其吸收硝酸根的功能, 由此推测拟南芥中的NRT2.1可能作为硝酸根的传感器(sensor)或信号转导分子(transducer)协调根系应答营养信号之后的发育过程。尽管这一推测至今未被实验证明, 然而仍是对NRT2家族成员NRT2.1身份的一次创新性思考。

此外, 根系中硝酸盐的积累还与根系水分运输密切相关。当AtNRT2.1突变后, 根系的水分运输能力降低30%, 表明AtNRT2.1对根系导水率和质膜水通道蛋白活性具有调控作用。相关数据显示, AtNRT2.1对根系导水率的调控不依赖硝酸根(Li et al., 2016), 表明AtNRT2.1可能在提升植株抗旱性以及其它与根系导水率相关的生物学过程中发挥重要作用。

2.2 水稻中NRT2基因的功能

水稻根际的硝态氮浓度一般较低, 因此主要是高亲和硝酸盐系统中的转运蛋白介导水稻根部对硝态氮的吸收(陈景光等, 2016)。拟南芥AtNRT1.1被证明具有双亲合硝酸根转运活性(Tsay et al., 2007; Ho et al., 2009)。近年来, 对水稻中AtNRT1.1同源蛋白OsNRT-1.1B的研究取得了突破性进展, 不仅明确了OsNRT-1.1B的单个氨基酸变异是决定籼稻氮利用效率高于粳稻的重要因素之一, 而且发现OsNRT1.1B的突变还对籼稻根际微生物菌群结构产生重要影响。这些重要结果说明, OsNRT1.1B通过多种方式实现了对水稻氮利用效率的精细调控(Hu et al., 2015; Zhang et al., 2019; 王孝林和王二涛, 2019), 也暗示其它高亲和硝酸根转运蛋白可能也参与其中。

随着反向遗传学的发展, 在水稻中也鉴定到了具有保守高亲和硝酸盐转运功能的NRT2(表1)。目前已鉴定到4个NRT2基因(OsNRT2.1、OsNRT2.2、OsNRT2.3和OsNRT2.4), 其中OsNRT2.3因选择性剪接产生了OsNRT2.3a(也被命名为OsNRT2.5)和OsNRT2.3b两个转录本(Feng et al., 2011)。根中OsNRT2.1、OsNRT2.2、OsNRT2.3a和OsNRT2.4

的表达受到 NO_3^- 诱导, OsNRT2.3b的表达则对 NO_3^- 不敏感(Feng et al., 2011)。与拟南芥相似, 水稻中的OsNRT2.1和OsNRT2.2对 NO_3^- 的亲合力高于OsNRT-2.3和OsNRT2.4(Yan et al., 2011)。同样的, 水稻OsNRT2.1、OsNRT2.2及OsNRT2.3a与OsNAR2.1的相互作用对其各自发挥硝酸根转运蛋白活力, 吸收转运 NO_3^- 也是必需的(Yan et al., 2011; Feng et al., 2011; Liu et al., 2014)。

NRT2家族成员在水稻中的功能研究也取得了一系列进展。研究表明, 过表达OsNRT2.1使得水稻种子根、不定根和侧根总长度增加, 且在OsNRT2.1过表达植株中生长素转运蛋白基因OsPIN1a/b/c和OsPIN2的表达量也显著升高, 暗示OsNRT2.1可能通过调控生长素向根系的转运参与硝酸盐依赖的根系伸长过程(Naz et al., 2019), 但过量表达OsNRT-2.1并未增加 NO_3^- 的吸收速率(Katayama et al., 2009)。在水稻中利用Ubiquitin启动子过表达OsNRT-2.1, 尽管总分蘖数、生物量及总含氮量均显著提高, 但由于缺少伴侣蛋白OsNAR2.1的同步提高, 最终导致其由茎秆及叶向穗中的氮转运效率明显下降, 从而导致单株产量显著降低(陈景光等, 2016; Chen et al., 2016a), 这与Katayama等(2009)的报道相似, 也再次证明OsNRT2.1与其伴侣蛋白OsNAR2.1的结合对其发挥吸收硝酸盐功能的重要性(Feng et al., 2011)。有意思的是, 当以OsNAR2.1的启动子驱动OsNRT-2.1(pOsNAR2.1:OsNRT2.1)在水稻中过量表达时, 能显著促进转基因株系的生长, 提高氮素吸收效率及籽粒产量, 其农学氮素利用效率(agricultural nitrogen-use efficiency, ANUE)是野生型的128%(Chen et al., 2016a; 陈景光, 2017)。

与其它OsNRT2成员不同, 水稻OsNRT2.4在爪蟾卵母细胞体系中被证明具有双亲和硝酸盐转运活性, 其蛋白高亲和力和 K_M 值为 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 低亲和力和 K_M 值为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Wei et al., 2018)。据报道, OsNRT2.4参与调控侧根生长, 在水稻根中, OsNRT-2.4主要在侧根原基基部表达, 该基因敲除后显著降低了侧根数目和侧根长度。与OsNRT2.1类似, OsNRT-2.4对根系生长的调控被认为是通过其介导的硝酸盐转运功能来发挥作用(Wei et al., 2018)。在外界极低浓度 NO_3^- 条件下, OsNRT2.3a参与 NO_3^- 从根向地上部的长距离运输(Tang et al., 2012)。在水稻中同时过表

达OsNRT2.3a及其伴侣蛋白OsNAR2.1可显著提高水稻产量及氮素利用效率(Chen et al., 2020)。另一成员OsNRT2.3b在感知韧皮部细胞胞质pH值以平衡 NO_3^- 和 NH_4^+ 摄取中发挥关键作用(Fan et al., 2016)。过表达OsNRT2.3b对水稻生长、氮素利用效率及最终的籽粒产量均有所促进(陆海燕等, 2015; Fan et al., 2016), 说明水稻NRT2家族蛋白的硝酸根转运能力特殊且存在功能分化。

除了在 NO_3^- 吸收和转运以及调控根系生长发育中发挥作用, OsNRT2s的一些成员还通过协同其它营养元素的吸收增加水稻产量。例如, 在水稻中过表达OsNRT2.1能够显著促进水稻对锰的吸收, 在干湿交替栽培模式下OsNRT2.1的超量表达能够显著提高水稻产量(Luo et al., 2018); 过表达OsNRT2.3b则显著促进水稻对磷的吸收和积累, 并促进籽粒产量和秸秆生物量增加(Feng et al., 2017), 说明OsNRT2s通过协同其它大量或者微量元素的吸收来促进水稻生长, 进而提高产量。

2.3 玉米中NRT2基因的功能

在禾本科作物玉米中, 目前已鉴定到ZmNRT2.1、ZmNRT2.2、ZmNRT2.3和ZmNRT2.5共4个NRT2家族的硝酸根转运蛋白(Plett et al., 2010) (表1)。该家族中只有ZmNRT2.1和ZmNRT2.2两个基因亲缘关系较近, 氨基酸序列同源性达98%。ZmNRT2.1和ZmNRT2.2的转录水平在根部均受 NO_3^- 诱导, 原位杂交结果表明ZmNRT2.1特异性在皮层表达, 而ZmNRT2.2除分布于皮层, 还在中柱和侧根原基中表达(Trevisan et al., 2008), 并且玉米根系对 NO_3^- 吸收能力的增强与ZmNRT2.1和ZmNRT2.2转录水平的快速上调相对应(Sabermanesh et al., 2017)。ZmNRT2.5的表达仅在氮饥饿和低氮条件下被检测到, 并且受到氮饥饿(无氮)的强烈诱导, 在植株重新补充氮($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$)后, 根和茎中ZmNRT2.5的表达量均下调(Dechorgnat et al., 2019); 当玉米进入生殖生长期, ZmNRT2.5在根中的表达趋近于零, 反而在苞叶中表达量较高, 推测ZmNRT2.5可能在灌浆期籽粒氮分配中起重要作用(Fujita et al., 1995)。迄今为止, 关于ZmNRT2家族成员的相关研究基本都在转录水平, 还未见生理及遗传学实验验证ZmNRT2的 NO_3^- 转运活性以及亲和力。

2.4 NRT2家族成员在豆科牧草百脉根中的功能

正如非豆科植物通过改变根系构型应答低氮环境一样, 在长期演化过程中, 豆科植物应答环境氮匮乏时通过与土壤中的根瘤菌互作形成特化的侧生器官根瘤, 从而通过共生固氮(symbiotic nitrogen fixation, SNF)途径获取生存所需氮素营养。SNF不仅是全球氮循环的重要贡献者(Fowler et al., 2013), 也是可持续农业系统的重要组成部分, 减少了对化学氮肥的需求, 并由此降低了过度使用氮肥可能产生的污染。然而, 目前尚不清楚NRT2家族成员是否也如同其在低氮下根系构型可塑性形成中所发挥的作用一样参与豆科植物的根系结瘤固氮过程。

豆科植物的根系结瘤过程非常耗能, 一旦环境中氮素营养充足, 豆科植物会主动选择暂时终止根系结瘤。截至目前, 已报道的研究结果大多关注结瘤的“氮阻遏”机制, 而关于豆科植物如何感应外界氮水平进而精密地调控结瘤固氮的开启或关闭仍然是一个未解之谜。作为在氮匮乏条件下发挥主要功能的高亲和硝酸根转运系统也备受研究者关注。在既是豆科模式植物又是重要牧草的百脉根(*Lotus japonicus*)中的研究表明, NRT2家族成员参与高氮下的结瘤抑制过程。百脉根LjNRT2.1的功能缺失导致突变体的硝酸根吸收能力减弱, Ljnr2.1突变体在高氮下仍然保持结瘤, 说明在高氮下LjNRT2.1可能通过介导硝酸盐吸收和转运来抑制结瘤(Misawa et al., 2022)。Valkov等(2020)则发现百脉根中的另一个NRT2成员LjNRT2.4在低氧条件下调控硝酸盐维持根瘤活性方面发挥作用, Ljnr2.4突变体的根瘤中硝酸盐含量减少导致根瘤固氮酶活性明显下降, 同时在水培厌氧条件下植物也表现出重度氮匮乏表型, 地上部生物量较野生型显著降低。进一步的研究结果显示, LjNRT2.4缺失突变对根瘤中NO生物合成与积累也产生重要影响, 表明LjNRT2.4对百脉根的根瘤固氮具有促进作用(Valkov et al., 2020)。

我们总结了目前研究中已经明确功能的NRT2家族成员(图1)。在模式植物拟南芥中对NRT2家族成员在氮吸收及转运过程中的功能进行了系统研究, 所取得的成果对其它植物特别是作物中的研究具有指导和借鉴意义。此外, 目前也逐渐关注到NRT2蛋白因其保守的硝酸根转运功能可能影响其它生物学过程(包括植物的抗病反应等)。相比而言, 水稻中的研究

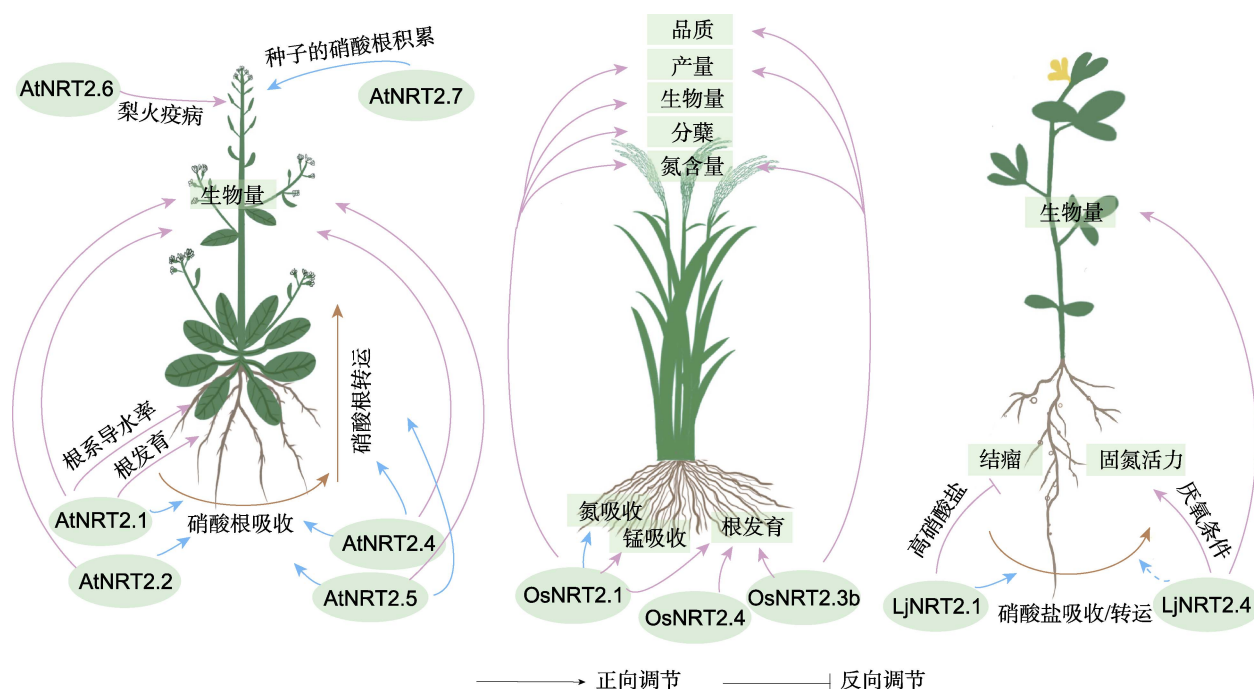


图1 NRT2家族蛋白对拟南芥、水稻和百脉根氮吸收与转运及其它生物学过程的调控作用

蓝色线条表示已经明确具有氮吸收及转运功能的NRT2家族成员; 棕色线条表示硝酸盐吸收及转运; 蓝色虚线代表功能尚不明确; 紫色线条指示目前在拟南芥、水稻及百脉根中NRT2蛋白参与调控的其它生物学过程。

Figure 1 The functions of NRT2 family proteins in nitrate uptake and allocation and their roles in other biological processes in *Arabidopsis*, rice, and lotus

Blue lines represent NRT2 family members identified as involved in nitrate uptake and allocation; brown lines indicate the uptake and allocation of NO_3^- ; the blue dotted line indicates the function is unknown; purple lines indicate the other biological functions of NRT2 proteins in *Arabidopsis*, rice, and lotus.

则是在分析NRT2同源蛋白保守功能的基础上, 更加关注NRT2在这一重要粮食作物的生长发育及产量品质相关性状上的贡献, 相关发现对水稻产量及品质提升具有重要意义。尽管在豆科植物百脉根中已经开始对NRT2蛋白功能进行探究, 但与对拟南芥及水稻的研究相比进展较为缓慢。

3 硝酸盐转运蛋白NRT2的分子调控机制

3.1 转录水平调控

施加硝酸盐会强烈影响植物基因的表达, 根据植物对硝酸盐的应答, 可分为初级硝酸盐反应(primary nitrate response, PNR)和系统信号转导。PNR中的硝酸盐感知系统为组成型表达, 它不需要蛋白质的从头合成, 其下游基因或蛋白能够在几分钟内迅速响应硝

酸盐信号(Ho et al., 2009; Medici and Krouk, 2014)。硝酸盐的系统信号转导则是植物通过感应体外或体内硝酸盐的状态及对氮的需求, 对地上-地下、细胞-细胞之间的氮信号进行交流和整合, 以调节硝酸盐吸收、同化、分配和植物发育(表2)。作为在根系吸收硝酸盐过程中起主要作用的AtNRT2.1, 其转录水平的调控备受关注。

3.1.1 初级硝酸盐反应中参与调控NRT2的转录因子

除了作为植物不可或缺的营养元素, 硝酸盐还作为信号分子激活下游基因的表达, 触发硝酸盐信号转导途径, 进而促进氮的高效利用(Scheible et al., 1997; Konishi and Yanagisawa, 2013)。在拟南芥中已经鉴定了一些包括编码硝酸盐转运蛋白NRT2.1及CHL1/NRT1.1在内的重要的PNR基因(Medici and Krouk,

表2 参与调控NRT2的转录因子

Table 2 Transcription factors involved in regulating NRT2

转录因子	转录因子蛋白家族	靶基因(NRT)	结合元件/位点	参考文献
初级硝酸盐信号途径				
NLP6	RWP-RK	NRT1.1/NPF6.3和NRT2.1	NRE	Konishi and Yanagisawa, 2013
NLP7	RWP-RK	NRT1.1/NPF6.3、NRT2.1和NRT2.2	NRE	Yu et al., 2016
LjNLP1	RWP-RK	LjNRT2.1	NRE	Marchise et al., 2013
NIGT1	NIGT	NRT2.1	GAATC	Maeda et al., 2018
TGA1/TGA4	bZIP	NRT2.1和NRT2.2	TGACG	Alvarez et al., 2014
LBD37/38/39	ASL/LBD	NRT2.1和NRT2.2	GCGGCG	Rubin et al., 2009
系统性硝酸盐信号通路				
TCP20	TCP	NRT1.1/NPF6.3和NRT2.1	GCCCR	Guan et al., 2014
HY5	bZIP	NRT2.1	C/G box	Chen et al., 2016b

2014), 其中包含编码转录因子NLPs (NIN-LIKE PROTEINS)以及LBD (LATERAL ORGAN BOUNDARY DOMAIN)等的基因。

在植物根系对硝酸盐的级联响应中, NLP6和NLP7是主要的转录调控因子(Konishi and Yanagisawa, 2013)。研究发现, 拟南芥NLP6活性被抑制导致NRT1.1和NRT2.1等基因下调表达(Konishi and Yanagisawa, 2013); 同样, 过表达NLP7也会导致一系列涉及硝酸盐转运(NRT1.1和NRT2.1)、氮同化(GS1、NIA1、NIA2和NIR1)以及氮信号通路(LBD37、LBD38、LBD39、ANR1和AFB3)相关基因上调表达(Yu et al., 2016)。Marchise等(2013)研究发现, NO₃⁻诱导NLP7从胞质向细胞核迁移并在核中积累, 利用在nlp7-1突变体背景下表达pNLP7:NLP7-GFP的材料, 施加NO₃⁻诱导10分钟后进行染色质免疫共沉淀, 通过染色质免疫共沉淀-芯片(ChIP-chip)技术高通量筛选到NLP7结合的靶基因851个, 其中包括AtNRT2.1和AtNRT2.2; 接着又通过定量ChIP-PCR, 以及在原生质体中利用pNRT2.1:LUC和p35S:NLP7共转进行瞬时反式激活实验, 充分验证了NLP7可以直接与NRT2.1的启动子区结合, 进而调控早期硝酸盐应答。相关研究结果表明, NLPs可以靶向NRT2.1调控其表达, 在NO₃⁻的早期响应过程中发挥重要作用。

在豆科植物的根系结瘤过程中, NRT2.1也被发现受到NLP家族转录因子的调控。研究人员发现在Ljnlp1突变体中, NO₃⁻对LjNRT2.1的诱导作用被显著抑制, 但是在Ljnlp4突变体中不受影响。反式激活实验发现, LjNLP1直接结合LjNRT2.1的启动子区以响

应硝酸盐水平, 说明LjNRT2.1和LjNLP1共同参与硝酸盐诱导的结瘤调控和NO₃⁻转运过程。进一步的研究表明, LjNLP4受NO₃⁻诱导的核定位特征依赖于LjNLP1-LjNRT2.1模块, 即LjNLP4作用于LjNLP1-LjNRT2.1的下游(Misawa et al., 2022)。因此, LjNRT2.1介导的结瘤调控机制可以通过以下模型(LjNLP1-LjNRT2.1-LjNLP4信号通路的模型)得以阐明: 硝酸盐(10 mmol·L⁻¹ KNO₃)激活LjNLP1, 从而诱导LjNRT2.1的表达, 促进根系对硝酸盐的吸收及转运, 而NO₃⁻的内流增强触发了LjNLP4的核定位, LjNLP4则诱导结瘤负调控因子LjCLE-RS2的表达。此外, LjNLP4还通过干扰百脉根中LjNIN (NODULE INCEPTION)的功能来抑制结瘤, 正调控基因的表达(Misawa et al., 2022)。上述结果表明, NLP家族转录因子对NRT家族成员特别是NRT2家族成员的靶向调控具有保守性。

近年来, 研究人员陆续鉴定到多个转录因子参与调控NRT2.1。其中, 负调控因子NIGT1 (NITRATE-INDUCIBLE GARP-type TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR 1)是一类由NO₃⁻诱导的转录抑制子。研究表明NIGT1.1可以在低氮胁迫下抑制NLP7驱动的AtNRT2.1表达的激活, 且通过凝胶迁移(EMSA)实验证明NIGT1.1可以直接结合AtNRT2.1的启动子区; 此外, 共转染实验结果显示, 与NIGT1.1属于同一支系的同源基因(包括NIGT1.2、NIGT1.3和NIGT1.4)均受NO₃⁻诱导, 并且在抑制硝酸盐依赖的AtNRT2.1表达激活中存在功能冗余(Maeda et al., 2018)。值得注意的是, 磷饥饿反应的主调控因子PHR1 (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1)可以直接激

活 *NIGT1s* 基因的表达, 导致硝酸盐的摄取减少 (Maeda et al., 2018), 表明磷饥饿可能通过 *PHR1-NIGT1-NRT2.1* 的转录级联影响硝酸根的吸收。相反, 属于 *bZIP* (BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER) 转录因子家族的 *TGA1* (TGACG MOTIF-BINDING FACTOR 1) 和 *TGA4* 则对 *NRT2* 家族基因发挥正向调控作用 (Alvarez et al., 2014)。在 *tag1/4* 双突变体中, NO_3^- 诱导的 *AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.2* 基因表达量显著降低; 同时, 在原生质体中过表达 *TGA1* 或 *TGA4*, *AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.2* 基因的表达量明显高于对照组, 表明 *TGA1* 和 *TGA4* 正向调控 *AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.2* 的表达 (Alvarez et al., 2014)。进一步通过 ChIP 和酵母单杂交实验证明, *TGA1* 可以直接结合 *AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.2* 的启动子区 (Alvarez et al., 2014)。反向遗传学研究证明, 侧生器官边界结构域蛋白 *LBD37/38/39* 也是调控硝酸盐应答反应中重要的转录因子, 并受 NO_3^- 强烈诱导。*LBD37/38/39* 的过表达可以抑制 *AtNRT2.1*、*AtNRT2.2* 以及氮同化相关基因的表达, 表明 *LBD* 的这 3 个成员在硝酸盐信号转导中起负调控作用 (Rubin et al., 2009), 但是目前尚未证实 *LBD* 是否能够直接靶向调控 *NRT2* 家族成员的表达。

3.1.2 系统性硝酸盐信号通路中 NRT2 也受到转录调控

NRT2.1 除了在初级硝酸盐反应中受上述转录因子的调控, 在硝酸盐介导的系统性信号通路中, *NRT2.1* 可能作为潜在的调控枢纽。研究表明, 拟南芥转录因子 *TCP20* (TEOSINATE BRANCHED 1/CYC-LOIDEA/PROLIFERATING CELL FACTOR 20) 调控低硝酸盐条件下拟南芥根部觅食的系统信号转导, 体内和体外的研究结果显示 *TCP20* 可以与 *AtNRT2.1*、*AtNRT1.1* 以及 *AtNIA1* (*NITRATE REDUCTASE NADH 1*, *NIA1*) 的启动子区直接结合 (Guan et al., 2014)。然而, 在 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3 培养基上生长 10 天后分别检测野生型和 *tcp20* 突变体中 *AtNRT2.1*、*AtNRT1.1* 和 *AtNIA1* 的表达, 发现突变体中的 *AtNRT1.1* 和 *AtNIA1* 表达水平显著下降, 但是 *AtNRT2.1* 的表达量与野生型 (WT) 无明显差异; 通过分根实验也证实无论低氮 ($0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3) 还是高氮 ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KNO_3), *AtNRT2.1* 的表达量不受 *TCP20* 突变的影响 (Guan et al., 2014)。因此, *TCP20* 与 *AtNRT2.1* 的遗传学关系和

转录调控机制还需深入研究。

众所周知, 根系对硝酸盐的吸收受植物体内氮饱和的系统性反馈抑制, 从而调整根系对氮的需求。目前, 普遍认为这一机制涉及由韧皮部从茎向根传递的长距离信号, 如氮同化产物谷氨酰胺对根系 NO_3^- 吸收系统的反馈抑制 (Cooper and Clarkson, 1989), 而 *NRT2.1* 被认为是这一反馈机制的主要调控靶点 (Widiez et al., 2011)。如图 2 所示, Widiez 等 (2011) 报道了 1 个编码拟南芥 RNA 聚合酶 II 复合体组分蛋白 (*AtIWS1*) INTERACT WITH SPT6 的基因 *HNI9* (*HIGH NITROGEN INSENSITIVE 9*), 在高氮处理下, *HNI9/AtIWS1* 在根中抑制 *AtNRT2.1* 的转录, 初步研究显示, 高氮抑制 *AtNRT2.1* 的转录与 *AtNRT2.1* 位点组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的三甲基化修饰 (H3K27me3) 有关, 而 *HNI9/AtIWS1* 特异性参与 H3K27me3 的沉积。相关研究结果为揭示 *NRT2.1* 受高氮抑制的分子机制提供了新思路。近年来, 研究人员发现拟南芥光响应转录因子 *HY5* (*ELONGATED HYPOCOTYL 5*) 可以从茎移动到根部, 并激活根部的 *HY5*, 从而激活 *AtNRT2.1* 的表达, 进而促进根中硝酸盐的吸收 (Chen et al., 2016b), 表明 *NRT2.1* 也可以接受来自地上部的信号因子。

3.2 蛋白水平调控 NRT2 的活性变化

上述研究表明, *AtNRT2.1* 转录水平的调控与硝酸盐的吸收及转运存在很强的相关性。然而, 当过表达 *AtNRT2.1* 时, 尽管 *AtNRT2.1* 转录本丰度积累, 但是植株 HATS 的活性在高氮下仍然受到抑制 (Laugier et al., 2012), 暗示 *NRT2.1* 蛋白水平变化与其 mRNA 水平并不平行 (Wirth et al., 2007)。大麦中的研究也发现, 在 NO_3^- 诱导过程中 *HvNRT2.1* 蛋白丰度的变化与 *HvNRT2.1* 转录本的积累或消减无明显关系 (Ishikawa et al., 2009), 表明 *NRT2.1* 受到翻译后水平的调控。

首先, *NRT2* 家族成员大多需要与伴侣蛋白 *NAR2* (nitrate-assimilation-related 2, *NAR2*, 或称 *NRT3*) 结合才能激活其高亲和转运活性。在莱茵衣藻 (Zhou et al., 2000)、大麦 (Tong et al., 2005)、拟南芥 (Orsel et al., 2006; Okamoto et al., 2006) 和水稻 (Yan et al., 2011) 等多个物种中已经证明 *NRT2.1* 蛋白转运功能的发挥依赖于其互作蛋白 *NAR2*。目前, 除了拟南芥 *AtNRT2.7* (Chopin et al., 2007; Kotur et al., 2012) 和

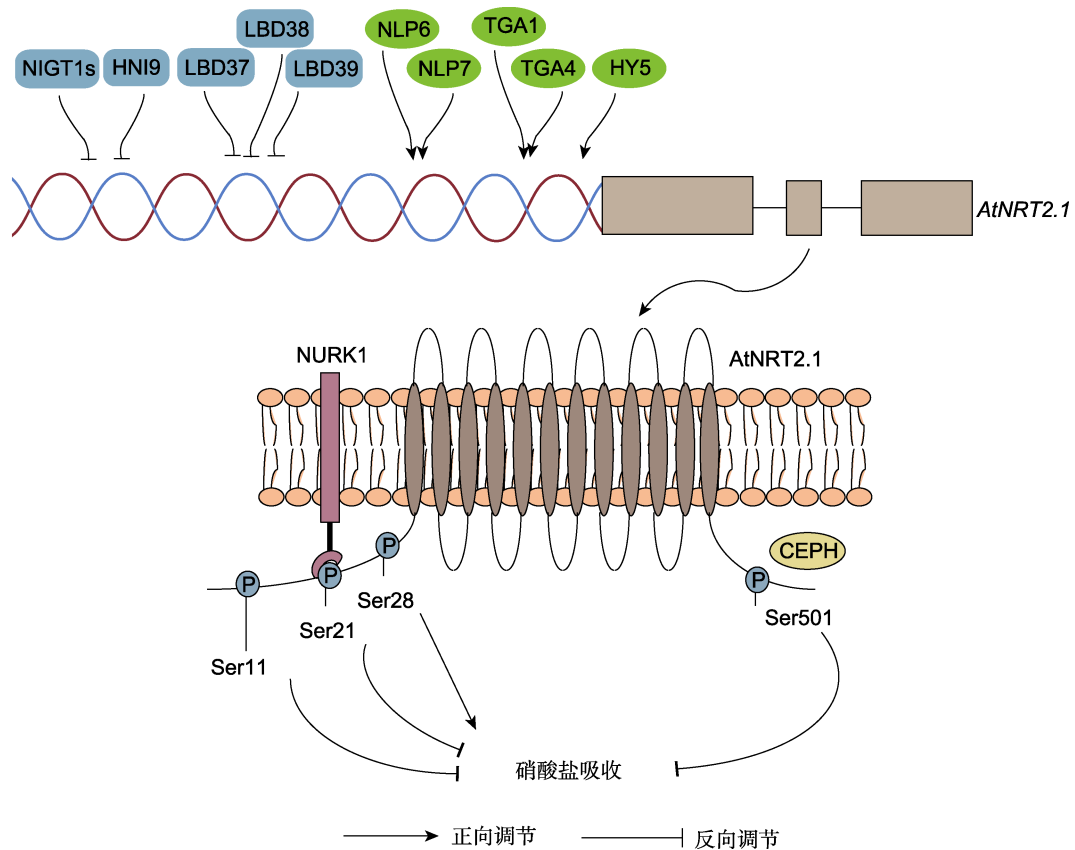


图2 拟南芥硝酸盐转运蛋白AtNRT2.1的分子调控机制总结

双螺旋表示AtNRT2.1的启动子区域,受到多个转录因子的直接调控。其中蓝色矩形代表转录抑制子,绿色椭圆形代表转录激活子。定位在质膜上的AtNRT2.1蛋白通过与NURK1激酶或CEPH磷酸酶的互作发生磷酸化或去磷酸化修饰。目前明确调控硝酸根吸收活性的磷酸化位点包括N端Ser11、Ser21、Ser28及C端Ser501。

Figure 2 A summary of the molecular regulatory mechanism of nitrate transporter AtNRT2.1 in Arabidopsis

The double stand represents the promoter region of AtNRT2.1. Several transcription factors are involved in repressing or activating the expression of AtNRT2.1. The blue rectangle and green ellipse indicate transcriptional repressor and activator, respectively. AtNRT2.1 is located in the plasma membrane and could interact with NURK1 kinase or CEPH phosphatase. Phosphorylation at N-terminal Ser11, Ser21, Ser28, and C-terminal Ser501 are critical for nitrate uptake activity of AtNRT2.1.

水稻OsNRT2.3b (Fan et al., 2016)被证明可以单独转运 NO_3^- 之外,各物种中鉴定到的NRT2蛋白转运能力都需要与NAR2互作。以拟南芥中处于核心位置的高亲和硝酸根吸收转运蛋白AtNRT2.1为例,发现其与伴侣蛋白AtNAR2.1存在互作,已证明这一定位于细胞质膜上的蛋白复合体是有活性的IHATS (Orsel et al., 2006; Yong et al., 2010)。综上所述,伴侣蛋白AtNAR2.1为AtNRT2家族蛋白所介导的硝酸根HATS功能发挥所必需。尽管如此,NAR2蛋白本身并不具备转运硝酸盐的能力,其确切的生物学功能尚不清楚。

其次,该领域的一些研究证明,拟南芥AtNRT-2.1蛋白的磷酸化和去磷酸化是调控其HATS活性的

重要机制,同时AtNRT2.1也是目前唯一被报道具有磷酸化修饰的NRT2家族成员(图2)。蛋白质磷酸化组学鉴定到拟南芥NRT2.1蛋白的N端和C端域(不包含跨膜域)存在磷酸化位点,如Ser11、Ser21、Ser28、Ser501和Thr521,不同位点的磷酸化水平随外界氮环境发生变化(Menz et al., 2016; Li et al., 2020; Jacquot et al., 2020)。低氮诱导拟南芥AtNRT2.1蛋白第28位丝氨酸残基(Ser28)磷酸化并使得蛋白的稳定性增强,通过将模拟磷酸化失活的NRT2.1^{S28A}以及组成型磷酸化状态的NRT2.1^{S28E}回补拟南芥Atnrt2.1突变体,发现Ser28位点失活突变导致其生长表型与Atnrt2.1突变体相似,而NRT2.1^{S28E}的地上部鲜重和

NO₃⁻吸收能力均恢复至野生型水平(Zou et al., 2020)。Li等(2020)同样证明AtNRT2.1蛋白Ser28的磷酸化促进NO₃⁻内流,与之相反,AtNRT2.1蛋白第11位丝氨酸残基(Ser11)磷酸化则起抑制作用,表明Ser28是一个NO₃⁻吸收的正调控位点,而Ser11是一个负调控位点。此外,另一个负调控位点AtNRT2.1蛋白第501位丝氨酸残基(Ser501)的磷酸化导致AtNRT2.1失活,从而减少NO₃⁻向根系的转运(Jacquot et al., 2020)。上述结果表明,在感应外界不同环境的刺激下,NRT2.1蛋白不同位点的磷酸化具有正向或负向调节NO₃⁻吸收的作用,说明在翻译后水平NRT2.1受到了非常精密且复杂的调控。

尽管有些磷酸化位点的功能已经明确,但对于NRT2.1磷酸化修饰的发生及其作用机制还知之甚少。研究表明,NRT2.1与NAR2蛋白的互作强度可能与NRT2.1蛋白的磷酸化修饰有关。Ishikawa等(2009)采用亲和免疫层析技术研究大麦HvNRT2.1和HvNAR2.3蛋白互作位点,结果表明HvNAR2.3的中心域与HvNRT2.1的C端(不包含跨膜域)直接互作,当HvNRT2.1的C端第463位丝氨酸残基(Ser463)突变为丙氨酸(S463A)后,显著降低了其与HvNAR2.3结合的能力。研究人员提出HvNRT2.1-HvNAR2.3复合物的形成或解离可能影响HvNRT2.1蛋白Ser463的磷酸化或去磷酸化,从而参与调控NRT2.1的HATS活性及其在质膜上的正确定位。

NRT2.1磷酸化与去磷酸化的发生机制也非常值得探究。Li等(2020)分析了拟南芥NO₃⁻饥饿以及再供给的磷酸化蛋白质组数据,确定硝酸盐吸收调节激酶(NITRATE UPTAKE REGULATOR KINASE 1, NURK1)(由AT5G49770编码)可以调控NRT2.1蛋白N端的磷酸化,并由此推测在NRT2.1的N端有一个控制其硝酸根转运活性的磷酸化开关:在低氮胁迫下,NRT2.1在S28处被磷酸化(激酶未知),提高其转运活性,并且与NAR2.1相互作用以稳定激活状态,此时定位于质膜上的NURK1第839位丝氨酸残基(S839)发生磷酸化并阻止其与NRT2.1互作,而第870位丝氨酸残基(S870)去磷酸化则抑制其激酶活性的发挥;当处于高氮环境中时,NRT2.1在S28处去磷酸化,NURK1与NRT2.1互作并磷酸化NRT2.1的S21位点,通过阻止NRT2.1与NAR2.1的相互作用来稳定NRT2.1的非活性状态。尽管目前尚未鉴定到能够磷

酸化NRT2.1第28位丝氨酸残基的激酶,然而S21与S28之间的磷酸化状态切换对于NRT2.1蛋白氮吸收活性的影响显而易见。由此可知,相关位点的去磷酸化修饰也非常值得研究,然而相关进展较为缓慢。Ohkubo等(2021)鉴定到在第501位丝氨酸残基去磷酸化修饰过程中发挥作用的1个2C类蛋白磷酸酶(PP2C-TYPE PROTEIN PHOSPHATASE, PP2C) CEPH (CEPD-INDUCED PHOSPHATASE),在氮匮乏时,CEPH通过直接去磷酸化NRT2.1的Ser501激活NRT2.1的HATS活性,从而促进NRT2.1对NO₃⁻的吸收。

综上所述,植物通过在蛋白水平巧妙地对NRT-2.1进行磷酸化-去磷酸化“开关”转换,精准且快速地调控外界氮环境变化时NO₃⁻的吸收速率。NRT2.1蛋白的N端和C端均存在多个磷酸化修饰位点,目前已证明第11、21、28及501位丝氨酸残基的磷酸化直接调控NRT2.1的硝酸根转运活性,而Ser28与Ser21的磷酸化修饰还影响NRT2.1与伴侣蛋白NAR2的互作强度,这均暗示NRT2.1的翻译后水平调控机制非常重要,有必要进行深入探究。

4 研究展望

在模式植物中对NRT2功能及机理研究的最终目标是将相关研究成果应用于作物生产中。提高养分资源吸收利用效率是实现作物“减肥增产”目标的关键。然而,如何既减少氮肥的施入量又能稳定甚至提高作物的产量一直是我国实现农业绿色发展道路上尚待解决的难题。硝酸根转运蛋白NRT2家族成员中既有在缺氮环境下介导氮吸收的“门户蛋白”,又有参与硝酸根在体内转运及再分配的重要蛋白,其研究价值和重要性不言而喻。

基于已有研究进展,建议从以下4方面关注NRT2家族蛋白研究。(1) 功能研究应重视不同作物中NRT2同源基因的进化特征及功能分化。对双子叶植物重要经济作物油菜(*Brassica napus*)及棉花(*Gossypium hirsutum*)中NRT2的功能及机制研究也需更多关注。同时,禾本科作物小麦、玉米和水稻的根系构型、地上株型及其它产量相关性状与双子叶植物有很大不同,建议重点关注NRT2在与氮素水平相关的产量相关性状中是否具有功能。结合功能研究,进一步分析NRT2家族基因在物种进化过程中的特征。

(2) 加强NRT2家族蛋白在豆科植物中的功能及机制研究。氮匮乏时, 豆科植物通过共生固氮途径实现部分氮素养分的“自我供给”。在亟须推进农业绿色可持续发展的今天, 作为在氮素不充足条件下促进植物获取氮素营养的NRT2家族蛋白, 很有可能在豆科植物中协同调控氮吸收利用及共生固氮过程。因此, 对豆科植物中的NRT2开展研究, 将不仅在豆科植物共生固氮及氮高效利用分子机理研究方面取得突破, 更可为在生产上实现豆科牧草苜蓿(*Medicago truncatula*)及粮油经济作物大豆(*Glycine max*)减肥前提下的高产奠定重要基础。(3) 重点关注NRT2家族蛋白的吸收转运活性在蛋白水平的调控机制。尽管目前NRT2.1被报道可以发生磷酸化修饰且存在多个磷酸化修饰位点, 更为特殊的是不同位点对其硝酸根转运活性作用甚至相反。在磷酸化修饰分子机制方面亟须解决的问题是鉴定到与NRT2.1互作的蛋白激酶及去磷酸化NRT2.1的磷酸酶, 同时要进一步通过多种技术体系和策略解析NAR2作为NRT2.1的伴侣蛋白调控硝酸盐吸收转运的分子机理。在鉴定过程中, 还应充分考虑机制的保守性和物种特异性, 在单子叶作物及重要的粮油经济作物大豆中, 可能存在更为特异的激酶和磷酸酶调控NRT2.1的硝酸盐转运活性。(4) 鉴定不同作物中NRT2家族基因的优异等位变异, 进而挖掘优异的遗传资源。利用遗传学手段挖掘不同作物种质资源中NRT2家族基因与氮高效、养分高效及高产相关的优异等位变异, 为重要作物的靶向精准改良提供遗传资源及分子标记, 从而使得通过分子辅助育种、转基因及基因编辑手段靶向作物养分高效及高产的育种策略成为可能。

参考文献

陈景光 (2017). OsNAR2.1参与水稻氮素利用的生物学功能及其机制研究. 博士论文. 南京: 南京农业大学. pp. 1–213.

陈景光, 张勇, 谭雅文, 徐国华, 范晓荣 (2016). 过量表达OsNRT2.1对水稻日本晴生长和氮素利用效率的影响. 分子植物育种 14, 1–9.

李宝珍, 范晓荣, 徐国华 (2009). 植物吸收利用铵态氮和硝态氮的分子调控. 植物生理学通讯 45, 80–88.

李纯, 孙春玉, 陈静, 林彦萍, 王义, 张美萍 (2018). 主要协同转运蛋白超家族的研究进展. 生物技术通报 34(8), 43–49.

陆海燕, 李胜元, 唐仲, 徐国华, 范晓荣 (2015). 超表达OsNRT2.3b促进水稻武育梗7号生长和提高籽粒产量. 分子植物育种 13, 497–504.

王孝林, 王二涛 (2019). 根际微生物促进水稻氮利用的机制. 植物学报 54, 285–287.

Alvarez JM, Riveras E, Vidal EA, Gras DE, Contreras-López O, Tamayo KP, Aceituno F, Gómez I, Ruffel S, Lejay L, Jordana X, Gutiérrez RA (2014). Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J* 80, 1–13.

Cerezo M, Tillard P, Filleur S, Muñoz S, Daniel-Vedele F, Gojon A (2001). Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with the mutation of *Nrt2.1* and *Nrt2.2* genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127, 262–271.

Chen JG, Liu XQ, Liu SH, Fan XR, Zhao LM, Song MQ, Fan XR, Xu GH (2020). Co-overexpression of OsNAR2.1 and OsNRT2.3a increased agronomic nitrogen use efficiency in transgenic rice plants. *Front Plant Sci* 11, 1245.

Chen JG, Zhang Y, Tan YW, Zhang M, Zhu LL, Xu GH, Fan XR (2016a). Agronomic nitrogen-use efficiency of rice can be increased by driving OsNRT2.1 expression with the OsNAR2.1 promoter. *Plant Biotech J* 14, 1705–1715.

Chen XB, Yao QF, Gao XH, Jiang CF, Harberd NP, Fu XD (2016b). Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition. *Curr Biol* 26, 640–646.

Chopin F, Orsel M, Dorbe MF, Chardon F, Truong HN, Miller AJ, Krapp A, Daniel-Vedele F (2007). The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell* 19, 1590–1602.

Cooper HD, Clarkson DT (1989). Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals—a possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient uptake. *J Exp Bot* 40, 753–762.

Dechorgnat J, Francis KL, Dhugga KS, Rafalski JA, Tyerman SD, Kaiser BN (2019). Tissue and nitrogen-linked expression profiles of ammonium and nitrate transporters in maize. *BMC Plant Biol* 19, 206.

Dechorgnat J, Patrit O, Krapp A, Fagard M, Daniel-Vedele F (2012). Characterization of the *Nrt2.6* gene in *Arabidopsis thaliana*: a link with plant response to biotic and abiotic stress. *PLoS One* 7, e42491.

Fan XR, Naz M, Fan XR, Xuan W, Miller AJ, Xu GH (2017). Plant nitrate transporters: from gene function to applica-

- tion. *J Exp Bot* **68**, 2463–2475.
- Fan XR, Tang Z, Tan YW, Zhang Y, Luo BB, Yang M, Lian XM, Shen QR, Miller AJ, Xu GH (2016). Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 7118–7123.
- Feng HM, Li B, Zhi Y, Chen JG, Li R, Xia XD, Xu GH, Fan XR (2017). Overexpression of the nitrate transporter, *OsNRT2.3b*, improves rice phosphorus uptake and translocation. *Plant Cell Rep* **36**, 1287–1296.
- Feng HM, Yan M, Fan XR, Li BZ, Shen QR, Miller AJ, Xu GH (2011). Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. *J Exp Bot* **62**, 2319–2332.
- Filleur S, Daniel-Vedele F (1999). Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* **207**, 461–469.
- Forde BG (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1465**, 219–235.
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, Vitousek P, Leach A, Bouwman AF, Butterbach-Bahl K, Dentener F, Stevenson D, Amann M, Voss M (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Phil Trans R Soc B* **368**, 20130164.
- Fujita K, Sato H, Sawada O, Sendo S (1995). Husk leaves contribution to dry matter and grain production as well as N distribution in flint corn (*Zea mays* L.) genotypes differing in husk leaf area. *Soil Sci Plant Nutr* **41**, 587–596.
- Galván A, Quesada A, Fernández E (1996). Nitrate and nitrite are transported by different specific transport systems and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **271**, 2088–2092.
- Guan PZ, Wang RC, Nacry P, Breton G, Kay SA, Pruneda-Paz JL, Davani A, Crawford NM (2014). Nitrate foraging by *Arabidopsis* roots is mediated by the transcription factor TCP20 through the systemic signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 15267–15272.
- Hachiya T, Sakakibara H (2017). Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *J Exp Bot* **68**, 2501–2512.
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**, 1184–1194.
- Hu B, Wang W, Ou SJ, Tang JY, Li H, Che RH, Zhang ZH, Chai XY, Wang HR, Wang YQ, Liang CZ, Liu LC, Piao ZZ, Deng QY, Deng K, Xu C, Liang Y, Zhang LH, Li LG, Chu CC (2015). Variation in *NRT1.1B* contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nat Genet* **47**, 834–838.
- Ishikawa S, Ito Y, Sato Y, Fukaya Y, Takahashi M, Morikawa H, Ohtake N, Ohyama T, Sueyoshi K (2009). Two-component high-affinity nitrate transport system in barley: membrane localization, protein expression in roots and a direct protein-protein interaction. *Plant Biotechnol* **26**, 197–205.
- Jacquot A, Chaput V, Mauries A, Li Z, Tillard P, Fizames C, Bonillo P, Bellegarde F, Laugier E, Santoni V, Hem S, Martin A, Gojon A, Schulze W, Lejay L (2020). NRT-2.1 C-terminus phosphorylation prevents root high affinity nitrate uptake activity in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **228**, 1038–1054.
- Katayama H, Mori M, Kawamura Y, Tanaka T, Mori M, Hasegawa H (2009). Production and characterization of transgenic rice plants carrying a high-affinity nitrate transporter gene (*OsNRT2.1*). *Breed Sci* **59**, 237–243.
- Kiba T, Feria-Bourrellier AB, Lafouge F, Lezhneva L, Boutet-Mercey S, Orsel M, Bréhaut V, Miller A, Daniel-Vedele F, Sakakibara H, Krapp A (2012). The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *Plant Cell* **24**, 245–258.
- Konishi M, Yanagisawa S (2013). *Arabidopsis* NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signaling. *Nat Commun* **4**, 1617.
- Kotur Z, Mackenzie N, Ramesh S, Tyerman SD, Kaiser BN, Glass ADM (2012). Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *New Phytol* **194**, 724–731.
- Laugier E, Bouguyon E, Mauriès A, Tillard P, Gojon A, Lejay L (2012). Regulation of high-affinity nitrate uptake in roots of *Arabidopsis* depends predominantly on post-transcriptional control of the NRT2.1/NAR2.1 transport system. *Plant Physiol* **158**, 1067–1078.
- Leghari SJ, Wahocho NA, Laghari GM, Laghari AH, Bhabhan GM, Talpur KH, Bhutto TA, Wahocho SA, Lashari AA (2016). Role of nitrogen for plant growth and development: a review. *Adv Environ Biol* **10**, 209–218.
- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive FD, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A (1999). Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. *Plant J* **18**, 509–519.
- Lezhneva L, Kiba T, Feria-Bourrellier AB, Lafouge F, Boutet-Mercey S, Zoufan P, Sakakibara H, Daniel-Vedele F, Krapp A (2014). The *Arabidopsis* nitrate trans-

- porter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *Plant J* **80**, 230–241.
- Li GW, Tillard P, Gojon A, Maurel C (2016). Dual regulation of root hydraulic conductivity and plasma membrane aquaporins by plant nitrate accumulation and high-affinity nitrate transporter NRT2.1. *Plant Cell Physiol* **57**, 733–742.
- Li WB, Wang Y, Okamoto M, Crawford NM, Siddiqi MY, Glass ADM (2007). Dissection of the *AtNRT2.1:AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol* **143**, 425–433.
- Li Z, Wu XN, Jaquot A, Lejay L, Schulze WX (2020). A phospho-switch in the N-terminus of NRT2.1 affects nitrate uptake by controlling the interaction of NRT2.1 with NAR2.1. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.01.08.898254>.
- Little DY, Rao HY, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13693–13698.
- Liu XQ, Huang DM, Tao JY, Miller AJ, Fan XR, Xu GH (2014). Identification and functional assay of the interaction motifs in the partner protein OsNAR2.1 of the two-component system for high-affinity nitrate transport. *New Phytol* **204**, 74–80.
- Luo BB, Chen JG, Zhu LL, Liu SH, Li B, Lu H, Ye GY, Xu GH, Fan XR (2018). Overexpression of a high-affinity nitrate transporter *OsNRT2.1* increases yield and manganese accumulation in rice under alternating wet and dry condition. *Front Plant Sci* **9**, 1192.
- Luo L, Zhang YL, Xu GH (2020). How does nitrogen shape plant architecture? *J Exp Bot* **71**, 4415–4427.
- Maeda Y, Konishi M, Kiba T, Sakuraba Y, Sawaki N, Kurai T, Ueda Y, Sakakibara H, Yanagisawa S (2018). A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signaling and incorporates phosphorus starvation signals in *Arabidopsis*. *Nat Commun* **9**, 1376.
- Marchive C, Roudier F, Castaings L, Bréhaut V, Blondet E, Colot V, Meyer C, Krapp A (2013). Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat Commun* **4**, 1713.
- Medici A, Krouk G (2014). The primary nitrate response: a multifaceted signaling pathway. *J Exp Bot* **65**, 5567–5576.
- Menz J, Li Z, Schulze WX, Ludewig U (2016). Early nitrogen-deprivation responses in *Arabidopsis* roots reveal distinct differences on transcriptome and (phospho-) proteome levels between nitrate and ammonium nutrition. *Plant J* **88**, 717–734.
- Misawa F, Ito M, Nosaki S, Nishida H, Watanabe M, Suzuki T, Miura K, Kawaguchi M, Suzuki T (2022). Nitrate transport via NRT2.1 mediates NIN-LIKE PROTEIN-dependent suppression of root nodulation in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **34**, 1844–1862.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol* **182**, 31–48.
- Naz M, Luo BB, Guo XY, Li B, Chen JG, Fan XR (2019). Overexpression of nitrate transporter *OsNRT2.1* enhances nitrate-dependent root elongation. *Genes* **10**, 290.
- Ohkubo Y, Kuwata K, Matsubayashi Y (2021). A type 2C protein phosphatase activates high-affinity nitrate uptake by dephosphorylating NRT2.1. *Nat Plants* **7**, 310–316.
- Okamoto M, Kumar A, Li WB, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM, Glass ADM (2006). High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiol* **140**, 1036–1046.
- Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM (2003). Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol* **44**, 304–317.
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller AJ (2006). Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol* **142**, 1304–1317.
- Orsel M, Eulenburg K, Krapp A, Daniel-Vedele F (2004). Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta* **219**, 714–721.
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F (2002). Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol* **129**, 886–896.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1–34.
- Plett D, Toubia J, Garnett T, Tester M, Kaiser BN, Bauermann U (2010). Dichotomy in the *NRT* gene families of dicots and grass species. *PLoS One* **5**, e15289.
- Quesada A, Galvan A, Fernandez E (1994). Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **5**, 407–419.
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Girin T, Tillard P, Lepetit M, Gojon A (2006). A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and phy-

- siological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **140**, 909–921.
- Rubin G, Tohge T, Matsuda F, Saito K, Scheible WR (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3567–3584.
- Sabermanesh K, Holtham LR, George J, Roessner U, Boughton BA, Heuer S, Tester M, Plett DC, Garnett TP (2017). Transition from a maternal to external nitrogen source in maize seedlings. *J Integr Plant Biol* **59**, 261–274.
- Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M, Stitt M (1997). Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* **9**, 783–798.
- Tang Z, Fan XR, Li Q, Feng HM, Miller AJ, Shen QR, Xu GH (2012). Knockdown of a rice stelar nitrate transporter alters long-distance translocation but not root influx. *Plant Physiol* **160**, 2052–2063.
- Tong YP, Zhou JJ, Li ZS, Miller AJ (2005). A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. *Plant J* **41**, 442–450.
- Trevisan S, Borsa P, Botton A, Varotto S, Malagoli M, Ruperti B, Quaggiotti S (2008). Expression of two maize putative nitrate transporters in response to nitrate and sugar availability. *Plant Biol* **10**, 462–475.
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* **581**, 2290–2300.
- Unkles SE, Hawker KL, Grieve C, Campbell EI, Montague P, Kinghorn JR (1991). *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 204–208.
- Valkov VT, Sol S, Rogato A, Chiurazzi M (2020). The functional characterization of *LjNRT2.4* indicates a novel, positive role of nitrate for an efficient nodule N₂-fixation activity. *New Phytol* **228**, 682–696.
- Vidmar JJ, Zhuo DG, Siddiqi MY, Glass ADM (2000). Isolation and characterization of *HvNRT2.3* and *HvNRT2.4*, cDNAs encoding high-affinity nitrate transporters from roots of barley. *Plant Physiol* **122**, 783–792.
- Wang YY, Cheng YH, Chen KE, Tsay YF (2018). Nitrate transport, signaling, and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol* **69**, 85–122.
- Wang YY, Hsu PK, Tsay YF (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci* **17**, 458–467.
- Wei J, Zheng Y, Feng HM, Qu HY, Fan XR, Yamaji N, Ma JF, Xu GH (2018). *OsNRT2.4* encodes a dual-affinity nitrate transporter and functions in nitrate-regulated root growth and nitrate distribution in rice. *J Exp Bot* **69**, 1095–1107.
- Widiez T, El Kafafi ES, Girin T, Berr A, Ruffel S, Krouk G, Vayssières A, Shen WH, Coruzzi GM, Gojon A, Lepetit M (2011). High nitrogen insensitive 9 (HNI9)-mediated systemic repression of root NO₃⁻ uptake is associated with changes in histone methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 13329–13334.
- Wirth J, Chopin F, Santoni V, Viennois G, Tillard P, Krapp A, Lejay L, Daniel-Vedele F, Gojon A (2007). Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **282**, 23541–23552.
- Yan M, Fan XR, Feng HM, Miller AJ, Shen QR, Xu GH (2011). Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. *Plant Cell Environ* **34**, 1360–1372.
- Yong ZH, Kotur Z, Glass ADM (2010). Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. *Plant J* **63**, 739–748.
- Yu LH, Wu J, Tang H, Yuan Y, Wang SM, Wang YP, Zhu QS, Li SG, Xiang CB (2016). Overexpression of *Arabidopsis NLP7* improves plant growth under both nitrogen-limiting and -sufficient conditions by enhancing nitrogen and carbon assimilation. *Sci Rep* **6**, 27795.
- Zhang HM, Forde BG (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J Exp Bot* **51**, 51–59.
- Zhang JY, Liu YX, Zhang N, Hu B, Jin T, Xu HR, Qin Y, Yan PX, Zhang XN, Guo XX, Hui J, Cao SY, Wang X, Wang C, Wang H, Qu BY, Fan GY, Yuan LX, Garrido-Oter R, Chu CC, Bai Y (2019). *NRT1.1B* is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nat Biotechnol* **37**, 676–684.
- Zhang SN, Zhang YY, Li KN, Yan M, Zhang JF, Yu M, Tang S, Wang LY, Qu HY, Luo L, Xuan W, Xu GH (2021). Nitrogen mediates flowering time and nitrogen use efficiency via floral regulators in rice. *Curr Biol* **31**, 671–683.
- Zhou JJ, Fernández E, Galván A, Miller AJ (2000). A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. *FEBS Lett* **466**, 225–227.
- Zhuo DG, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM (1999). Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter

(Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **17**, 563–568.

Zou X, Liu MY, Wu WH, Wang Y (2020). Phosphorylation at

Ser28 stabilizes the *Arabidopsis* nitrate transporter NRT-2.1 in response to nitrate limitation. *J Integr Plant Biol* **62**, 865–876.

Research Advances in Elucidating the Function and Molecular Mechanism of the Nitrate Transporter 2 (NRT2) Proteins in Plants

Huimei Huang^{1†}, Yongkang Gao^{1†}, Yuying Tai¹, Chao Liu¹, Dejie Qu¹,
Ruiheng Tang¹, Youning Wang^{2*}

¹National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

²College of Agronomy, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

Abstract Nitrogen, the essential macronutrient in plants, plays a critical role in regulating plant growth and development, especially for crops production. To gain high crop yield, a large amount N fertilizer is usually applied to the planting field. However, the excessive use of chemical fertilizers has aggravated the agricultural non-point source pollution (NSP). Increasing crop yield under reduced fertilizer consumption can be achieved by increasing nitrogen use efficiency (NUE), which is crucial for promoting sustainable agriculture and for achieving agriculture and food security. In response to nitrogen-deficiency condition under natural environments, high-affinity nitrate transporter 2 (NRT2) proteins have evolved in plants. Among them, NRT2.1 subfamily acts as the main component of nitrate uptake in roots under conditions of nitrate deficiency. Here we summarize the latest progresses of the function and molecular mechanism of the NRT2 proteins, particularly of the NRT2.1 subfamily in *Arabidopsis* and several important crops and discuss the future directions of NRT2 research. This review aims to provide an important basis for the subsequent exploration of the potential of NRT2 proteins in increasing crop yield and the underlying molecular mechanisms.

Key words nitrogen, Nitrate Transporter 2, gene function, molecular mechanism

Huang HM, Gao YK, Tai YY, Liu C, Qu DJ, Tang RH, Wang YN (2023). Research advances in elucidating the function and molecular mechanism of the nitrate transporter 2 (NRT2) proteins in plants. *Chin Bull Bot* **58**, 783–798.

† These authors contributed equally to this paper

* Author for correspondence. E-mail: youningwang@nwfau.edu.cn