2021, 34(5): 39-48
http://www.lykxyj.com

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.005.005

毛竹 NLP 转录因子鉴定及其响应氮素的表达模式

袁婷婷[1]，朱成磊[1]，李紫阳[1]，宋新章[2]，高志民[1*]

(1. 国际竹藤中心竹藤资源基因科学与基因产业化研究所，国家林业和草原局/北京市共建竹藤科学与技术重点实验室，北京 100102；2. 浙江农林大学，浙江 杭州 311300)

摘要: [**目的**] 鉴定毛竹中 NLP 家族成员，为深入研究毛竹 NLP 分子调控机制奠定基础。[**方法**] 采用生物信息学方法鉴定并系统分析毛竹 NLP 成员的分子特征，用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术检测毛竹 NLP 响应氮素的表达模式。[**结果**] 毛竹中鉴定出 10 个 NLP 成员 (PeNLP1～PeNLP10)，其蛋白长度为 714～963 aa，分子量为 77.41～105.08 kDa，理论等电点介于 5.36～6.25 之间；亚细胞定位预测结果表明，除 PeNLP9 定位于叶绿体外，其余成员均定位于细胞核内。系统进化分析表明：PeNLPs 分成 3 个组，各组成员分别为 4、2、4 个。*PeNLP*s 均包含 4 个内含子，不同成员内含子的大小和位置存在一定的差异；*PeNLP*s 内有共线性基因对 6 个，*PeNLP*s 和 *OsNLP*s 之间有共线性基因对 9 个，且它们的 *Ka* / *Ks* 均小于 1，说明其在进化上经历了纯化选择。组织特异性分析表明，有的 *PeNLP*s 呈组织特异性表达，有的则呈组成型表达。*PeNLP*s 受到氮饥饿诱导表达，在 1 h 内 *PeNLP1* 的表达量显著上调，其它 5 个 *PeNLP*s 则显著下调 ($p < 0.01$)；对氮饥饿 72 h 后的毛竹进行复氮处理，在 24 h 内所有 *PeNLP*s 的表达量均显著或极显著上调 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。[**结论**] 毛竹中 NLP 家族有 10 个成员，各成员的分子特征和组织表达特异性存在一定的差异，*PeNLP*s 的表达能够对氮饥饿作出快速响应，且在氮饥饿后复氮过程中显著上调表达，响应氮素的诱导。

关键词: 毛竹；NLP 转录因子；家族鉴定；氮素响应

中图分类号: S718.46　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1001-1498(2021)05-0039-10

氮素是植物生长发育必需的大量营养元素之一[1-2]。近些年，氮的利用效率倍受关注，涉及氮的吸收、运输与同化等方面，其中，氮的吸收转运已成为研究的热点。研究表明，RWP-PK 家族中的 NLP (NIN-like protein) 转录因子在响应氮饥饿、氮信号调节过程中处于中心地位[3]。NLP 家族成员都具有 RWP-RK 和 PB1 两个典型的结构域，RWP-RK 结构域具有与 DNA 结合的功能，PB1 结构域具有蛋白相互作用的功能[4]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 NLPs 与硝酸盐顺式作用元件 NRE (Nitrate-responsive elements) 结合调控硝酸盐响应相关基因的表达，进而影响拟南芥的生长发育[5]，如过表达拟南芥 *NLP7* 能够通过增强氮和碳的同化，促进植物生长[6]，NLP8 则对于硝酸盐促进种子萌发至关重要[7]。过表达 *OsNLP1* 促进水稻 (*Oryza sativa* L.) 生长，提高水稻氮素利用率和产量[8]。另外，在植物 Nitrate-CPK-NLP (硝酸盐-Ca^{2+}传感蛋白激酶-NLP) 信号通路中，NLPs 协调植物对硝酸盐信号的感知和对下游转录因子、转运蛋白、碳氮代谢过程的调控[9]，在氮饥饿、氮磷互作以及根系

收稿日期：2021-05-06　　修回日期：2021-06-28

基金项目：国家自然科学基金重点项目“毛竹快速生长和退笋发生的碳氮供应及机理研究”(31930075)；国家自然科学基金项目“竹笋速生期水通道蛋白调控水分运输的分子机制”(31971736)

* 通讯作者: 高志民。 E-mail：gaozhimin@icbr.ac.cn

生长过程中发挥着重要作用[10]。

随着测序技术的快速发展，已经对包括水稻[11]、拟南芥[7]、小麦 (*Triticum aestivum* L.) [12] 和玉米 (*Zea mays* L.) [13] 等多种植物中 NLPs 进行全基因组鉴定和功能研究。竹子作为禾本科 (Gramineae) 的特殊类群，尤其是木本竹，因其生长快、材性好，已成为缓解木材供给不足的重要替代材料。毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houz.) 林占我国竹林总面积的 72.96%[14]，是最具代表性的木本竹种。氮肥显著影响毛竹幼苗的生长[15]、笋的品质和产量及其叶片生理特性[16]，施用氮肥已成为竹林增产的重要手段。未施氮肥的情况下，氮沉降在很大程度上补充了土壤氮，提高了毛竹光合作用效率[17-18]、增加生物量、增强抗性[19]。然而，毛竹吸收转运氮的机制尚未见报道，其中，NLP 家族成员的调控作用更不清楚。本文以毛竹为研究对象，在全基因组水平系统分析 NLP 分子特征的基础上，研究在氮饥饿过程以及复氮后 *NLP* 基因的表达模式，以期为深入研究其功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料培养与处理

将毛竹种子播种于基质 (泥炭：蛭石 = 7：3) 中，置于 25℃ 的温室中培养，待实生苗生长至 2 个月时，选择株高和长势一致的植株，将种子去掉，根系用去离子水洗净，置于全营养液中培养 2 周，然后转入缺氮木村 B 营养液[20] 中进行氮饥饿处理，并于氮饥饿 72 h 后，用 6 mmol·L^{-1} 的硝酸盐 (KNO_3 和 KCl 配置而成) 进行复氮处理。分别于氮饥饿处理以及复氮处理 0、0.5、1、2、4、8、12 和 24 h 取植株的根系，用液氮处理后保存于 −80℃，用于 RNA 提取，进行定量 PCR (qPCR) 分析，氮饥饿 0 h 和 72 h 的植株分别作为对照，试验采用 3 次生物学重复。

1.2 毛竹 NLP 全基因组鉴定

分别从 Rice Genome Annotation Project (http://rice.plantbiology.msu.edu/) 和 Tair (https://www.arabidopsis.org/index.jsp) 数据库下载水稻和拟南芥的 NLP 转录因子的 CDS 和氨基酸序列[11,21]，作为诱饵序列在毛竹基因组数据库 BambooGDB (http://bamboo.bamboogdb.org/) 中进行 BlastP、BlastN (e-value = 1 e^{-10}) 比对，获取毛竹 *NLP* 的候选基因，对获得的候选序列在 PFAM 数据库 (http://pfam.xfam.org) 逐条进行蛋白保守结构域的鉴定和分析，仅保留具有编码完整保守结构域的序列，并进行基因命名。

1.3 毛竹 *NLP* 基因序列及其编码蛋白序列分析

使用 TBtools 工具绘制毛竹 *NLP* 的基因结构图；使用 ProtParam (http://web.expasy.org/prot-param/) 和 Plant-mPLoc 算法 (http://www.csbio.sjtu.edu.cn) 分析 *PeNLP*s 编码蛋白的基本理化特性及亚细胞定位；使用 MEME Version 5.1.0 (http://meme-suite.org/tools/meme) 分析毛竹 NLP 蛋白的保守基序。

1.4 毛竹 NLP 家族成员系统进化分析与功能预测

使用 MEGA 7.0 软件的 Clustal W 对毛竹、水稻、拟南芥、玉米、毛果杨 (*Populus trichocarpa* (Torr. & Gray))、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon* (L.) Beauv.) 和蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.) 的 NLP 蛋白序列[22] 进行同源比对分析，用邻接法 (Neighbor-joining method)、bootstrap 试验重复 1 000 次、其它参数设置为默认值构建系统进化树。

1.5 毛竹 *NLP* 的表达分析

利用本实验室的毛竹 26 个不同组织转录组测序 (RNA-Seq) 数据 (NCBI 的 SRA 号为：SRS1847073、SRS1847072、SRS1847071、SRS1847070、SRS1847069、SRS1847068、SRS1847067、SRS1847066、SRS1847065、SRS1847064、SRS1847063、SRS1847062、SRS1847061、SRS1847060、SRS1847059、SRS1847058、SRS1847057、SRS1847056、SRS1847055、SRS1847054、SRS1847053、SRS1847052、SRS1847051、SRS1847050、SRS1847049、SRS1847048) [23]，构建毛竹 *NLP* 基因的组织表达谱，以 Log_2(FPKM+1) 的值进行表达量热图绘制[24]。

根据毛竹 *NLP* 基因序列，使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异定量引物，由北京博迈德基因技术有限公司合成 (表 1)。用于 qPCR 分析的 cDNA 是由 1.1 节中经过氮饥饿以及复氮处理不同时间的毛竹根系，通过 TRIzol (Invitrogen) 法从中提取 RNA，用 Promega 反转录试剂盒合成 cDNA。qPCR 实验在 qTOWER2.2 系统上进行，体系参照 Roche Light Cycler® 480 SYBR Green I Master kit 试剂盒，程序为 95℃ 预变性 10 min；95℃ 变性 10 s，60℃ 解链 10 s，40 个循环。选择 *PeTIP41* 作为内参基因[25]，相对表达量的数据处理用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法[26]。

表 1　qPCR 所用引物

Table 1　Primers used in qPCR

引物名称 Primer name	序列 (5′-3′) Sequence (5′-3′)	引物名称 Primer name	序列 (5′-3′) Sequence (5′-3′)
PeNLP1-F	TCGGCATTGCTCAGGAAACT	PeNLP1-R	TTGACCAAAGGAACCACCAG
PeNLP2-F	AAGATTGATTTGGTGTCATCGG	PeNLP2-R	CCTGTCAGCAAGTAAGTTGTTCG
PeNLP3-F	AACTACACGAGTGGAGCAAAGC	PeNLP3-R	GATCATTCATCAACGAGAACAGC
PeNLP5-F	TAACGGACATTGGATCTTCGA	PeNLP5-R	CAAGGAGTCCAGCACTGCCTTCT
PeNLP8-F	GTTTGGCATTGCTCAGGGAA	PeNLP8-R	AGTTTGACCATAGGAACCACCA
PeNLP10-F	AGGCTGTCGTCGCGGCC	PeNLP10-R	TCCTTGAACAAGCAAGCGCTGT
PeTIP41-F	AAAATCATTGTAGGCCATTGTCG	PeTIP41-R	ACTAAATTAAGCCAGCGGGAGTG

2　结果与分析

2.1　毛竹 NLP 家族基因的鉴定

在毛竹新基因组数据[23]中共鉴定出 10 个编码完整 NLP 蛋白的基因，命名为 *PeNLP1*～*PeNLP10*。*PeNLP*s 的编码区长度为 2 145～2 892 bp，编码蛋白长度为 714～963 aa，分子量 (Molecular weight, MW) 为 77.41～105.08 kDa，理论等电点 (Theoretical isoelectric point, pI) 为 5.36～6.25，亚细胞定位预测除 PeNLP9 位于叶绿体外，其余成员均位于细胞核内（表 2）。

表 2　*PeNLP*s 编码蛋白的基本特征

Table 2　Basic characteristics of the proteins encoded by *PeNLP*s

基因 Gene	基因编号 Gene number	蛋白长度 Protein length/aa	分子量 MW /kDa	等电点 pI	亚细胞定位 Subcellular location	脂肪指数 Aliphatic index	亲水性值 GRAVY
PeNLP1	PH02Gene00833	901	100.00	5.36	细胞核 Nucleus	75.12	−0.386
PeNLP2	PH02Gene03190	943	102.70	5.98	细胞核 Nucleus	77.33	−0.359
PeNLP3	PH02Gene17818	963	105.08	5.72	细胞核 Nucleus	77.14	−0.373
PeNLP4	PH02Gene22439	949	103.26	5.78	细胞核 Nucleus	78.59	−0.301
PeNLP5	PH02Gene32426	841	92.43	6.25	细胞核 Nucleus	78.03	−0.409
PeNLP6	PH02Gene35538	843	92.68	6.16	细胞核 Nucleus	77.27	−0.395
PeNLP7	PH02Gene37611	875	97.04	6.23	细胞核 Nucleus	83.51	−0.344
PeNLP8	PH02Gene44417	931	103.57	6.15	细胞核 Nucleus	76.14	−0.384
PeNLP9	PH02Gene45890	714	77.41	6.03	叶绿体 Chloroplast	84.99	−0.169
PeNLP10	PH02Gene46788	936	102.18	5.60	细胞核 Nucleus	81.42	−0.254

2.2　*PeNLP*s 基因结构及其编码蛋白保守基序分析

基因结构分析发现，*PeNLP*s 均包含 4 个内含子，但不同基因内含子的大小和位置存在一定的差异。依据系统进化关系，*PeNLP*s 可分为 3 个组，同一个组内的基因成员具有相似的结构以及内含子长度和位置，如 II 组中 *PeNLP2* 和 *PeNLP3* 的基因结构高度相似，*PeNLP2* 的最短内含子和最长内含子分别为 134 bp 和 740 bp，*PeNLP3* 的最短内含子和最长内含子分别为 133 bp 和 730 bp，二者非常接近，组与组之间的基因结构差异明显 (图 1A)。

蛋白保守基序分析表明：PeNLPs 共有 20 个保守基序 (图 1B)，其中，Motif 1～Motif 7、Motif 9、Motif 12、Motif 13 为共有基序，Motif 19、Motif 14 和 Motif 16 分别为Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ组成员所特有。另外，Ⅰ组成员缺少 Motif 11，Ⅱ组成员缺少 Motif 8 和 Motif 17，Ⅲ组成员缺少 Motif 15、Motif 18 和 Motif 20。

2.3　PeNLPs 的进化分析

为了解不同物种间 NLP 的进化关系，预测 PeNLPs 的潜在功能，构建了基于毛竹、水稻、拟南芥、玉米、毛果杨、二穗短柄草和苜蓿 NLP 蛋白氨基酸序列的系统进化树。结果表明：60 个

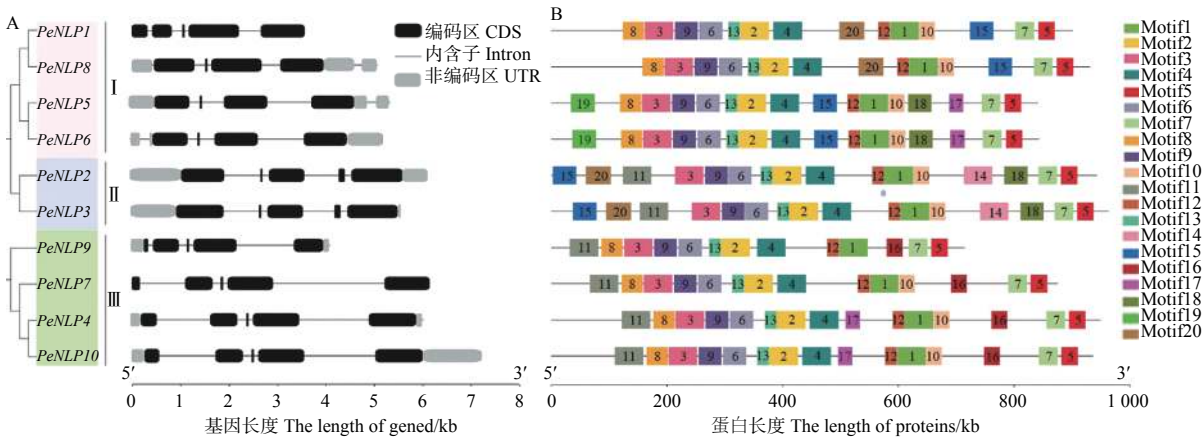
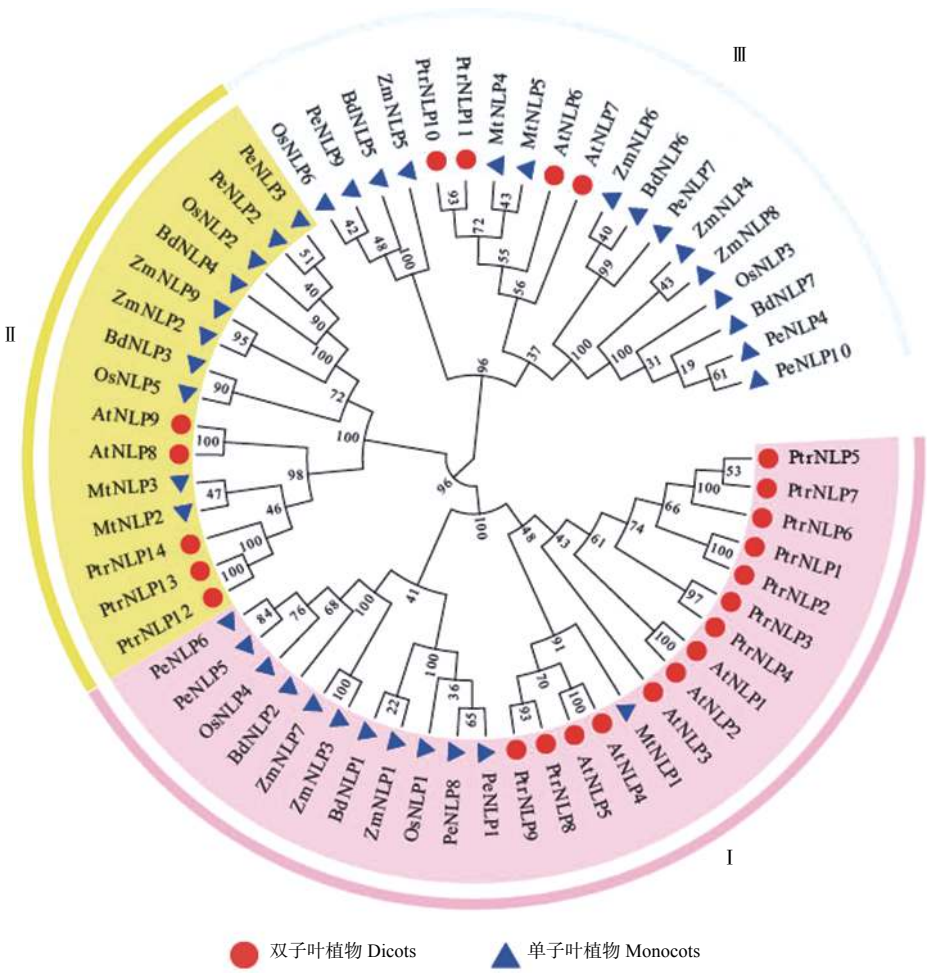


图 1 *PeNLP*s 基因结构 (A) 及其编码蛋白保守基序 (B) 分析

Fig. 1 Gene structure (A) and the conserved motifs (B) of the proteins encoded by *PeNLP*s

NLPs 分成了 3 个组（Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ），双子叶植物 NLPs 主要分布在Ⅰ组中，而单子叶植物 NLPs 则在 3 个组中均有分布 (图 2)，这与前人的研究一致[22]。PeNLPs 分布在Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ的成员个数分别



注：基于毛竹 (Pe)、水稻 (Os)、拟南芥 (At)、玉米 (Zm)、毛果杨 (Ptr)、二穗短柄草 (Bd)、蒺藜苜蓿 (Mt) 的 NLP 氨基酸序列构建的系统进化树。

Notes:Phylogenetic tree constructed by using the amino acid sequences of NLPs from *Ph. edulis* (Pe), *O. sativa* (Os), *A. thaliana* (At), *Z. mays* (Zm), and *P. trichocarpa* (Ptr), *B. distachyon* (Bd), *M. truncatula* (Mt).

图 2 NLP 家族成员的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of NLP family members

为 4、2、4 个，这和其它单子叶植物成员在 3 个组的个数分布情况相似。在每个组中，多数 PeNLPs 与水稻 NLPs 聚类在较近的分支，其次是二穗短柄草的 NLPs，这说明毛竹与水稻、二穗短柄草在进化上的亲缘关系较近，而与拟南芥、毛果杨等双子叶植物的亲缘关系较远。

共线性分析发现，9 个 *PeNLP*s 存在共线关系，并组成 6 个共线性基因对，即 *PeNLP1* 和 *PeNLP8*、*PeNLP2* 和 *PeNLP3*、*PeNLP4* 和 *PeNLP7*、*PeNLP4* 和 *PeNLP10*、*PeNLP5* 和 *PeNLP6*、*PeNLP7* 和 *PeNLP10* (图 3A)，且共线性基因的 *Ka*/*Ks* 均小于 1 (图 3B)，说明这些基因在进化中经历了纯化选择。此外，有 9 个 *PeNLP*s 与 5 个 *OsNLP*s 之间存在共线性，具有共线关系的 *PeNLP*s 数量多于 *OsNLP*s 数量，这可能与毛竹进化过程中发生过基因组加倍事件有关[27]。

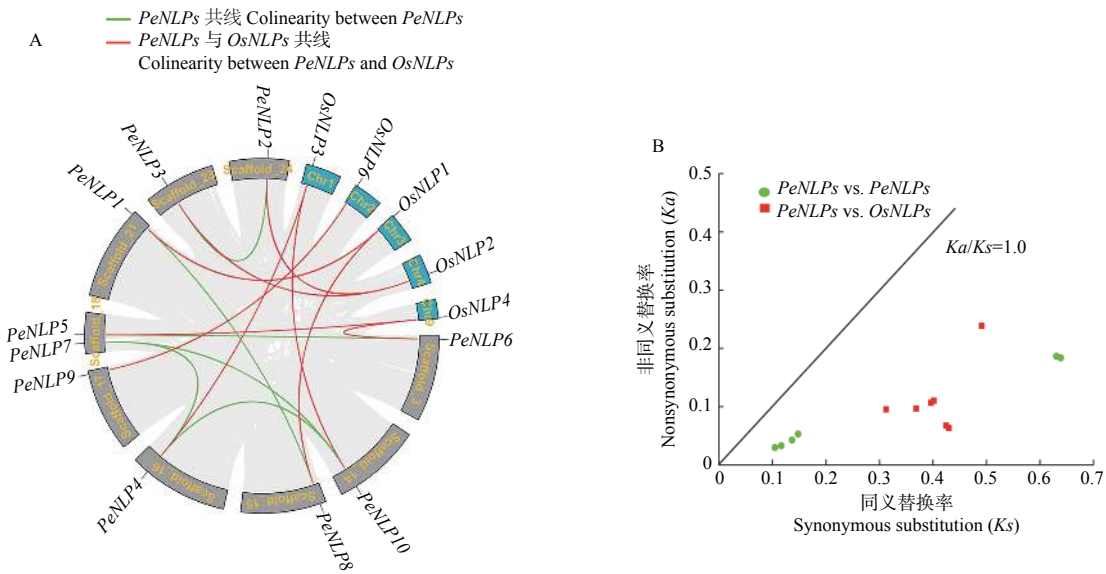


图 3　毛竹与水稻的 NLP 家族基因共线性分析

Fig. 3　Collinearity analysis of NLP family genes between *Ph. edulis* and *O. sativa*

2.4　*PeNLP*s 的组织特异性表达

利用毛竹转录组数据，对 *PeNLP*s 的组织表达特异性进行分析。结果表明：*PeNLP*s 部分成员的表达具有组织特异性 (图 4)，如 *PeNLP2* 在叶片、叶鞘和箨片中特异表达，*PeNLP5* 和 *PeNLP9* 分别在叶鞘和 0.1 cm 根中特异表达，推测它们是在特定的部位发挥功能；还有部分成员呈组成型表达，如 *PeNLP10* 在 26 个组织中均检测到表达，且在各个组织中的表达量变化不大，推测它在毛竹各个部位及各个部位的不同生长阶段均能发挥作用。然

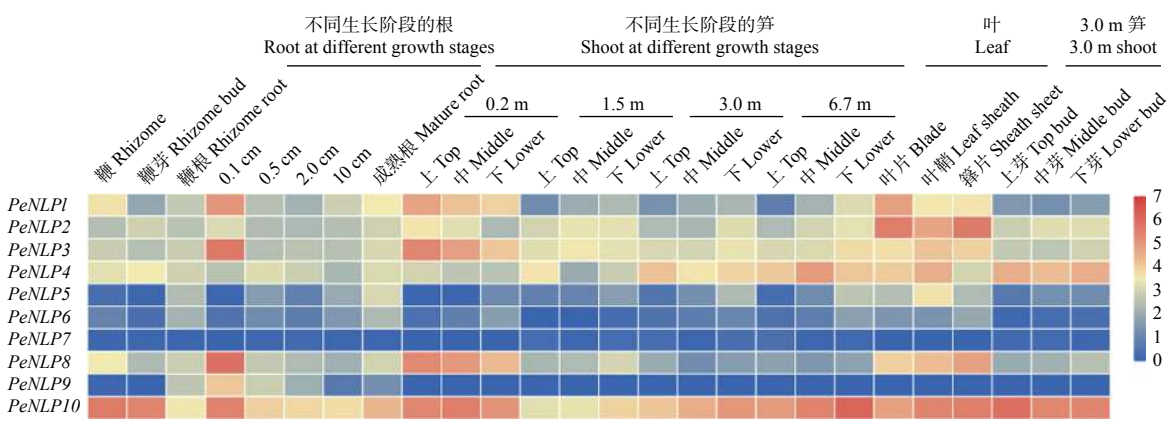


图 4　毛竹不同组织中 *PeNLP*s 的表达分析

Fig. 4　Expression analysis of *PeNLP*s in different tissues of moso bamboo

而，有些成员在 26 个组织中检测不到表达，如 *PeNLP6* 和 *PeNLP7*，推测它们可能为诱导表达型，或是存在功能冗余基因。

此外，*PeNLP*s 在同一组织的不同生长阶段的表达呈现一定的差异性。在根中，部分 *PeNLP*s 的表达呈现出在生长早期表达高于生长后期的规律，如 *PeNLP1*、*PeNLP3*、*PeNLP8* 在 0.1 cm 根中的表达量高于 0.5 cm、成熟根等其它生长阶段的根中的表达量，在 0.2 m 笋中的表达量高于 1.5、6.7 m 等其它高度的笋中的表达量，这可能是由于这 3 个成员主要在根和笋的生长早期发挥作用；但 *PeNLP4* 却呈相反的表达趋势，其在 3.0 m 和 6.7 m 笋中的表达量高于在 0.2 m 和 1.5 m 笋中的表达量。由此表明，这些 *PeNLP*s 可能在根或笋的不同生长阶段具有不同的调控作用。

2.5 氮饥饿及复氮过程中 *PeNLP*s 的表达模式

氮饥饿及复氮过程中 *PeNLP*s 的表达模式分析表明：在氮饥饿处理过程中，*PeNLP*s 的表达呈现不同程度的波动变化，这说明不同时间 *PeNLP*s 对氮饥饿的响应程度不同，且各个成员之间存在一定的差异 (图 5)。在施加氮饥饿 1 h 内，*PeNLP1* 的表达量迅速上升，且达到极显著水平，*PeNLP2*、*PeNLP3*、*PeNLP5*、*PeNLP8* 和 *PeNLP10* 则极显著下降 ($p < 0.01$)，表明 *PeNLP*s 对氮饥饿的响应均较迅速。随着氮饥饿的施加，在 1～24 h 过程中，*PeNLP1* 的表达为先下降、后上升、再下降，至氮饥饿 24 h 时的表达量与开始氮饥饿时 (0 h) 的表达量接近；*PeNLP2*、*PeNLP5* 和 *PeNLP10* 的表达为先上升、后下降、再上升，至氮饥饿 24 h 时，*PeNLP5* 极显著高于 0 h，*PeNLP2* 和 *PeNLP10* 则极显著低于 0 h ($p < 0.01$)；*PeNLP3* 和 *PeNLP8* 呈先上升、后下降、再上升、再下降、再上升的波动表达模式，至氮饥饿 24 h 时，*PeNLP3* 的表达极显著低于 0 h，*PeNLP8* 的表达极显著高于 0 h ($p < 0.01$)。由此推测，毛竹对氮饥饿过程的响应可能存在不同的信号通路，*PeNLP*s 各成员通过不同的表达来参与毛竹对氮饥饿的响应。

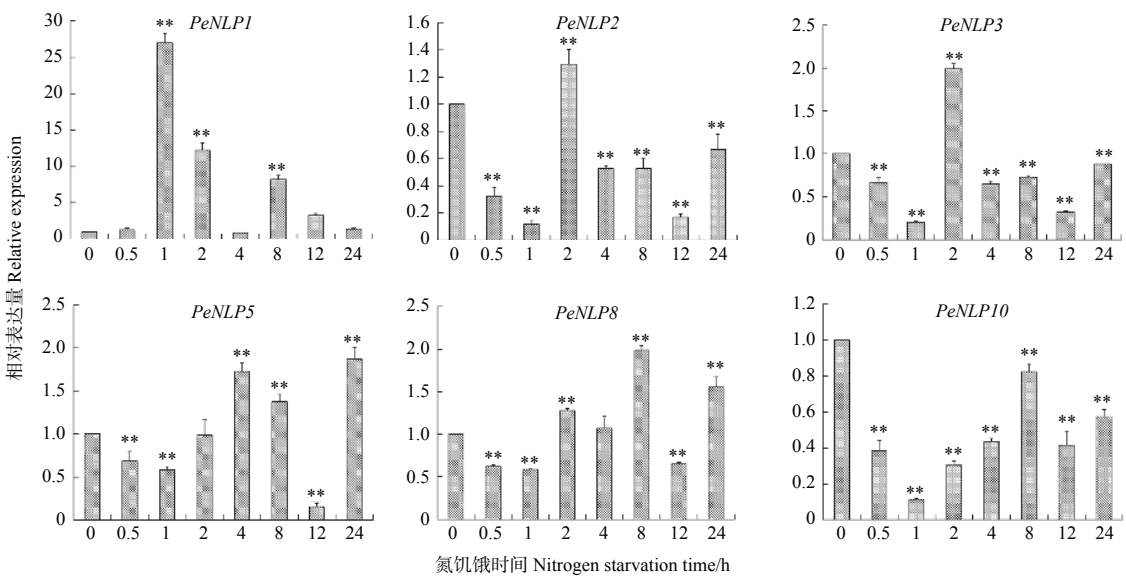


图 5 氮饥饿过程中 *PeNLP*s 的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *PeNLP*s during nitrogen starvation

对氮饥饿 72 h 后的毛竹进行复氮处理，在复氮过程中 *PeNLP*s 的表达量均显著或极显著上调 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)，说明复氮促进了 *PeNLP*s 的表达，但呈现不同的波动变化 (图 6)。如 *PeNLP1*、*PeNLP3*、*PeNLP8* 和 *PeNLP10* 呈现相似的变化趋势，即先上升、后下降，再上升、再下降；*PeNLP2* 和 *PeNLP5* 呈现相似的变化趋势，即先上升、后下降，再上升、再下降，再上升、后下降。*PeNLP1*、*PeNLP2*、*PeNLP3*、*PeNLP5* 和 *PeNLP10* 的表达量基本是在复氮处理后 12 h 达到峰值，在处理后 24 h 较 12 h 都显著下降，而 *PeNLP8* 则是在处理后 24 h 达到峰值，较处理后 12 h 显著上升，说明它们的表达可能存在昼夜节律，各个成员响应硝酸盐表达的波动差异，表明不同 *PeNLP*s 对硝酸盐的响应可能具

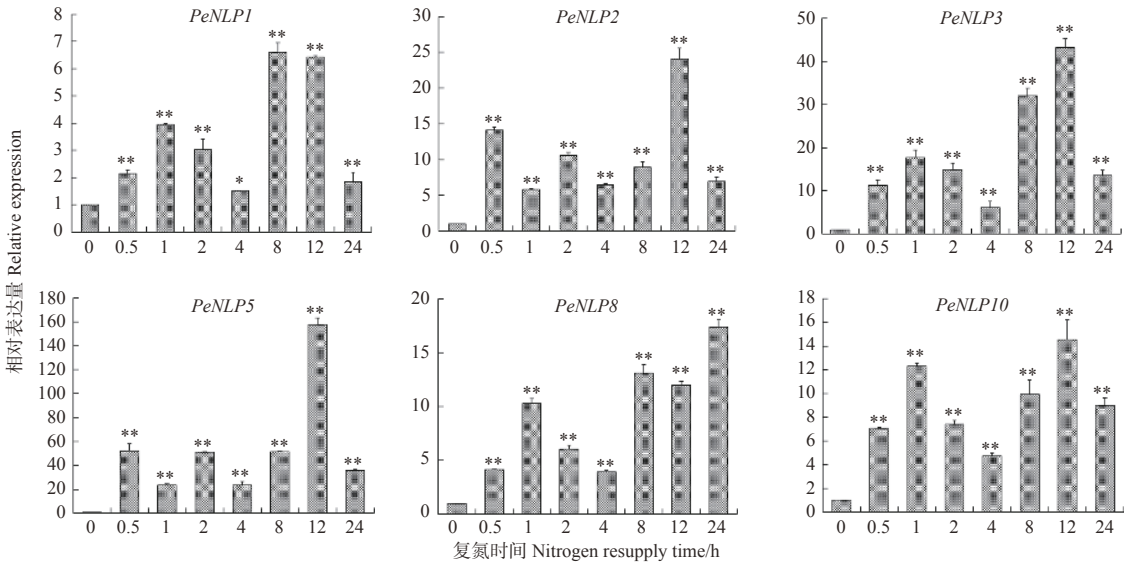


图 6　复氮过程中 *PeNLP*s 的表达分析

Fig. 6　Expression analysis of *PeNLP*s during nitrogen resupply

有不同的信号通路。

3　讨论

本研究基于毛竹新基因组数据，共鉴定到 10 个毛竹 *NLP* 基因家族成员，比水稻 (6 个)、玉米 (9 个)、二穗短柄草 (7 个) 和苜蓿 (5 个) 等单子叶植物中成员数量多，而少于双子叶植物毛果杨 (14 个) 中的成员，这可能与不同物种在进化过程中经历的基因组加倍或基因丢失有关[28]。亚细胞定位预测 10 个 PeNLPs 有 9 个定位在细胞核中，这符合转录因子的特性，而 PeNLP9 定位在叶绿体中，这可能是 NLP 家族的核穿梭现象[29]，与拟南芥、水稻 NLP 的核穿梭特征[20] 类似。系统进化分析表明，60 个 NLPs 分为 3 个组，各组成员功能相似但也出现了一定的功能分化，如 Ⅰ 组中拟南芥和水稻成员主要参与硝酸盐信号转导和氮素营养调控植物生长发育[30]，Ⅱ 组成员中 *AtNLP8* 呈组成型表达，当硝酸盐存在时，AtNLP8 可以直接结合到编码 ABA 分解代谢酶基因 *CYP707A2* 的启动子区，降低种子中 ABA 含量并促进种子萌发[7]；Ⅲ 组中成员个数相对较多，AtNLP6/7 能够结合硝酸盐响应基因 *ANR1*、*CIPK8* 的启动子，调控氮吸收、同化和信号转导过程[31]。虽然可以根据已知功能的同源蛋白预测 PeNLPs 的功能，但要对 PeNLPs 在氮素利用率 (NUE)中的作用给出明确的结论，尚有待于实验验证。

氮素利用效率受氮感知、吸收、转运、同化和再利用效率等因素的影响，其调控是一个复杂的网络，其中，NLP 转录因子是硝态氮吸收利用的核心转录因子[32]。拟南芥中 AtNLP6/7 通过感知硝酸盐信号后活性被诱导，进而结合到高亲和力硝酸盐转运基因蛋白 (NRT2.1)、亚硝酸还原酶 (NIR1) 等基因的启动子区和硝酸还原酶 (NIA1) 基因的 3′侧翼区的氮应答 DNA 元件 (NRE) 上[33]。AtNLP6/7 还可以和 TCP20 相互作用形成异源二聚体，正向调控氮同化及氮信号途径中的基因 *NRT1.1*、*NIA1* 和 *NIA2* 的表达，参与硝酸盐的同化和信号传递[34]，此外，NLPs 还能靶向 LBD37-39 和 NIGT1 两类转录因子基因，通过触发二级转录事件协同响应硝酸盐过程[35]。蒺藜苜蓿 MtNLP1 在细胞核中与 MtNIN 互作，阻碍 MtNIN 激活 *CRE1* 和 *NF-YA1*，进而抑制了根瘤菌感染以及节的形成[36]。另外，作为转录因子，NLP 也受到其它转录因子的调控，如拟南芥 AtNLP3 受到 bZIP1 的“非绑定”的调控方式来快速响应硝酸盐[37]。

NLPs 除与上游的转录因子互作、下游基因结合来参与调控响应硝酸盐外，还通过自身表达的变化来响应氮饥饿及复氮诱导过程。在毛竹根中 *PeNLP*s 的表达对氮饥饿作出快速反应，如在氮饥饿 1 h 时，*PeNLP1* 的表达量上升至对照的 30 倍，而 *PeNLP3* 的表达量则降低至对照的 0.2 倍，这与硝酸盐处理玉米时 *ZmNLP*s 的表达变化趋势相类似[38]。而在氮饥饿后复氮处理过程中，所有 *PeNLP*s 的表达均显著上调，说明硝酸盐诱导 *PeNLP*s 的表

达，这与前人在水稻、拟南芥和玉米等物种中的研究结果一致[39]。此外，依据拟南芥中的 NRE 元件以及水稻中鉴定的 NRE-like 元件，对 PeNLPs 的下游靶基因进行预测，结果表明：毛竹 NPF 家族的 *PeNPF2.4*、*PeNPF2.5*、*PeNPF2.7*、*PeNPF4.1*、*PeNPF4.6*、*PeNPF6.2*、*PeNPF6.5*、*PeNPF6.8* 和 *PeNPF8.19* 的启动子区有 TGACCC…N…AAGAG 序列[8,40]，推测它们可能是 PeNLPs 的靶基因，但还有待于进一步验证。目前，对于 NLPs 的认知主要是基于拟南芥、水稻和豆类[41] 等草本植物，而对于木本植物 NLPs 的功能验证鲜有报道，木本植物的生长需要大量的氮[42]，且多年生长处于复杂的环境中，它们可能比草本植物具有更加复杂的调控网络，在氮饥饿及复氮处理过程中，*PeNLP*s 表达的波动变化表明其参与调控的复杂性。因此，要揭示非草非木的竹子中 NLPs 的功能，尚需更广泛的深入研究。

4 结论

本研究从毛竹中鉴定出 10 个 NLP 家族成员 (PeNLP1~ PeNLP10)，依据蛋白序列差异它们可分成 3 个组，分别具有 4、2、4 个成员。*PeNLP*s 在毛竹各个组织的生长早期呈现高表达，这可能与各组织早期快速生长需要大量的氮素有关。氮素诱导 *PeNLP*s 的表达，在氮饥饿和复氮过程中呈现波动变化模式，表明毛竹对氮饥饿过程的响应可能存在不同的信号通路，*PeNLP*s 各成员通过不同的表达来参与毛竹对氮饥饿的响应。研究结果为深入探索 PeNLPs 的功能，解析其调控分子机制奠定了基础。

参考文献：

[1] 刘奇峰, 李卓蓉, 吴江婷, 等. 不同氮素供给水平对84K杨幼苗碳氮代谢的影响[J]. 林业科学研究, 2019, 32（6）：63-72.

[2] 徐思瑜, 陈圣贤, 陈雨清, 等. 氮添加对混栽杉木-楠木叶性状的影响[J]. 林业科学研究, 2020, 33（3）：184-192.

[3] Raddatz N, Morales de Los Ríos L, Lindahl M, *et al*. Coordinated transport of nitrate, potassium, and sodium[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 247.

[4] Guan P, Ripoll J J, Wang R, *et al*. Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(9): 2419-2424.

[5] Konishi M, Yanagisawa S. The role of protein-protein interactions mediated by the PB1 domain of NLP transcription factors in nitrate-inducible gene expression[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 90.

[6] Yu L H, Wu J, Tang H, *et al*. Overexpression of *Arabidopsis NLP7* improves plant growth under both nitrogen-limiting and -sufficient conditions by enhancing nitrogen and carbon assimilation[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 27795.

[7] Yan D, Easwaran V, Chau V, *et al*. NIN-like protein 8 is a master regulator of nitrate-promoted seed germination in *Arabidopsis*[J]. Nature Communications, 2016, 7: 13179.

[8] Alfatih A, Wu J, Zhang Z S, *et al*. Rice NIN-Like Protein 1 rapidly responds to nitrogen deficiency and improves yield and nitrogen use efficiency[J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(19): 6032-6042.

[9] Liu K H, Niu Y, Konishi M, *et al*. Discovery of Nitrate-CPK-NLP signaling in central nutrient-growth networks[J]. Nature, 2017, 545(7654): 311-316.

[10] Hu B, Jiang Z, Wang, W, *et al*. Nitrate-NRT1.1b-SPX4 cascade integrates nitrogen and phosphorus signaling networks in plants[J]. Nature Plants, 2019, 5(4): 401-413.

[11] Jagadhesan B, Sathee L, Meena H S, *et al*. Genome wide analysis of NLP transcription factors reveals their role in nitrogen stress tolerance of rice[J]. Scientific reports, 2020, 10(1): 9368.

[12] Kumar A, Batra R, Gahlaut V, *et al*. Genome-wide identification and characterization of gene family for RWP-RK transcription factors in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. PLoS ONE, 2018, 13(12): e0208409.

[13] Ge M, Wang Y, Liu Y, *et al*. The NIN-like protein 5 (ZmNLP5) transcription factor is involved in modulating the nitrogen response in maize[J]. The Plant Journal, 2020, 102(2): 353-368.

[14] 李玉敏, 冯鹏飞. 基于第九次全国森林资源清查的中国竹资源分析[J]. 世界竹藤通讯, 2019, 17（6）：45-48.

[15] Zou N, Huang L, Chen H, *et al*. Nitrogen form plays an important role in the growth of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) seedlings[J]. PeerJ, 2020, 8(6): e9938.

[16] 李静文, 刘晓颖, 李士坤, 等. 氮磷钾配比施肥对毛竹出笋及叶片生理特性的影响[J]. 西南农业学报, 2020, 33（12）：2885-2890.

[17] Wu Z Z, Ying Y Q, Zhang Y B, *et al*. Alleviation of drought stress in *Phyllostachys edulis* by N and P application[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 228.

[18] Li Q, Peng C, Zhang J, *et al*. Nitrogen addition decreases methane uptake caused by methanotroph and methanogen imbalances in a moso bamboo forest[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 5578.

[19] 陶晨悦, 邵珊璐, 史文辉, 等. 氮沉降对干旱胁迫下毛竹实生苗生物量和保护酶活性的影响[J]. 林业科学, 2019, 55（9）：31-40.

[20] Wu J, Zhang Z S, Xia J Q, *et al*. Rice NIN-Like Protein 4 plays a pivotal role in nitrogen use efficiency[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(3): 448-461.

[21] Konishi M, Yanagisawa S. *Arabidopsis* NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signaling[J]. Nature Communications, 2013, 4: 1617.

[22] Mu X, Luo J. Evolutionary analyses of NIN-like proteins in plants and their roles in nitrate signaling[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019, 76(19): 3753-3764.

[23] Zhao H, Gao Z, Wang L, *et al*. Chromosome-level reference genome and alternative splicing atlas of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. Gigascience, 2018, 7(10): 1-12.

[24] Knight V B, Serrano E E. Expression analysis of RNA sequencing data from human neural and glial cell lines depends on technical replication and normalization methods[J]. BMC Bioinformatics, 2018, 19(Supply 14): 412.

[25] Fan C, Ma J, Guo Q, *et al*. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56573.

[26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[27] Peng Z H, Lu Y, Li LB, *et al*. The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*)[J]. Nature Genetics, 2013, 45(4): 456-461.

[28] Lynch M, Conery J S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes[J]. Science, 2000, 290(5494): 1151-1155.

[29] Marchive C, Roudier F, Castaings L, *et al*. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants[J]. Nature Communications, 2013, 4: 1713.

[30] Wu Z, Liu H, Huang W, *et al*. Genome-wide identification, characterization, and regulation of RWP-RK gene family in the nitrogen-fixing clade[J]. Plants (Basel), 2020, 9(9): 1178.

[31] Konishi M, Yanagisawa S. Roles of the transcriptional regulation mediated by the nitrate-responsive *cis*-element in higher plants[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 411(4): 708-713.

[32] Xu G, Fan X, Miller A J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency[J]. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63: 153-182.

[33] Liu M, Chang W, Fan Y, *et al*. Genome-wide identification and characterization of *Nodule-Inception-Like Protein* (*NLP*) family genes in *Brassica napus*[J]. International Journal of Molecular Science, 2018, 19(8): 2270.

[34] Zhang T T, Kang H, Fu L L, *et al*. NIN-like protein 7 promotes nitrate-mediated lateral root development by activating transcription of Tryptophan Aminotransferase Related 2[J]. Plant Science, 2021, 303: 110771.

[35] Maeda Y, Konishi M, Kiba T, *et al*. A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signaling and incorporates phosphorus starvation signals in *Arabidopsis*[J]. Nature Communications, 2018, 9: 1376.

[36] Lin J S, Li X, Luo Z, *et al*. NIN interacts with NLPs to mediate nitrate inhibition of nodulation in *Medicago truncatula*[J]. Nature Plants, 2018, 4(11): 942-952.

[37] Para A, Li Y, Marshall-Colón A, *et al*. Hit-and-run transcriptional control by bZIP1 mediates rapid nutrient signaling in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(28): 10371-10376.

[38] Cao H, Qi S, Sun M, *et al*. Overexpression of the maize *zmnlp6* and *zmnlp8* can complement the Arabidopsis nitrate regulatory mutant *nlp7* by restoring nitrate signaling and assimilation[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1703.

[39] Wang M, Hasegawa T, Beier M, *et al*. Growth and nitrate reductase activity are impaired in rice *osnlp4* mutants supplied with nitrate[J]. Plant & Cell Physiology, 2021: 1-12.

[40] Konishi M, Yanagisawa S. Identification of a nitrate-responsive cis-element in the *Arabidopsis* NIR1 promoter defines the presence of multiple cis-regulatory elements for nitrogen response[J]. The Plant Journal, 2010, 63(2): 269-282.

[41] Suzuki W, Konishi M, Yanagisawa S. The evolutionary events necessary for the emergence of symbiotic nitrogen fixation in legumes may involve a loss of nitrate responsiveness of the NIN transcription factor[J]. Plant Signaling & Behavior, 2013, 8(10): e25975.

[42] Luo J, Zhou J, Li H, *et al*. Global poplar root and leaf transcriptomes reveal links between growth and stress responses under nitrogen starvation and excess[J]. Tree Physiology, 2015, 35(12): 1283-1302.

Identification of NLP Transcription Factors of *Phyllostachys edulis* and Their Expression Patterns in Response to Nitrogen

YUAN Ting-ting[1], *ZHU Cheng-lei*[1], *LI Zi-yang*[1], *SONG Xin-zhang*[2], *GAO Zhi-min*[1]

(1. Institute of Gene Science and Industrialization for Bamboo and Rattan Resources, International Centre for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration/Beijing for Bamboo & Rattan Science and Technology, Beijing 100102, China; 2. Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [**Objective**] To identify the NLP family members in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and lay a foundation for further study on the molecular regulation mechanism of these NLPs. [**Method**] The molecular characteristics of the NLP members in moso bamboo were identified and analyzed comprehensively by bioinformatics methods, and the expression patterns of the NLPs in response to nitrogen were detected by quantitative real-time PCR (qPCR). [**Result**] Ten NLP members (PeNLP1～PeNLP10) were identified from moso bamboo. The length of PeNLPs ranged from 714 aa to 963 aa, with the molecular weight of 77.41～105.08 kDa, and the theoretical isoelectric point ranged from 5.36 to 6.25. The prediction of subcellular localization showed that all PeNLPs were located in the nucleus except PeNLP9 in the chloroplast. Phylogenetic analysis showed that PeNLPs could be divided into 3 groups with 4, 2 and 4 members, respectively. All *PeNLP*s contained 4 introns, and there were some differences in the size and position of introns among different members. There were 6 collinear gene pairs in *PeNLP*s and 9 collinear gene pairs between *PeNLP*s and *OsNLP*s, and their *Ka*/*Ks* were all less than 1.0, indicating that they had undergone purification selection in evolution. Tissue specific analysis showed that some *PeNLP*s expressed in tissue-specific manner, while some *PeNLP*s expressed constitutively. The expression of *PeNLP*s was induced by nitrogen starvation, and that of *PeNLP1* was significantly up-regulated within 1 hour, while those of other 5 *PeNLP*s were significantly down-regulated ($p < 0.01$). After 72 hours of nitrogen starvation, the seedlings were resupplied with nitrogen, and the expression levels of all *PeNLP*s were significantly up-regulated ($p < 0.05$ or $p < 0.01$) within 24 hours. [**Conclusion**] There are 10 members of NLP family identified in moso bamboo. There are some differences in molecular characteristics and tissue expression specificity of each member. The expression of *PeNLP*s can respond to nitrogen starvation rapidly, and it is significantly up-regulated in the process of nitrogen resupply after nitrogen starvation.

Keywords: *Phyllostachys edulis*; NLP transcription factor; family identification; nitrogen response

（责任编辑：金立新）