

转录组分析揭示小麦硝酸盐转运蛋白 TaNPF6.2 整合激素通路调控小麦发育

郭诗涵^{1,2} 周佰慧^{2,3} 孔秀英² 张立超² 夏川² 倪志勇¹

(¹新疆农业大学生命科学学院极端环境生物生态适应与进化重点实验室, 830052, 新疆乌鲁木齐;

²中国农业科学院作物科学研究所/作物基因资源与育种全国重点实验室, 100081, 北京; ³安徽农业大学农学院, 230036, 安徽合肥)

摘要 硝酸盐转运蛋白是介导植物氮素吸收的特异性膜蛋白, 与氮素利用效率密切相关。本研究鉴定了小麦硝酸盐转运蛋白 *TaNPF6.2* 基因编辑 (KO) 株系的基因型。转录组比较发现, 野生型与 KO 株系之间存在 1981 个差异表达基因 (DEGs), GO 富集分析显示上述基因显著富集于酰基转移酶活性及脂肪酸生物合成等过程。内源激素检测表明, KO 株系中水杨酸和脱落酸的含量显著上升, 且其合成与信号转导相关基因的表达也同步上调。结果表明, *TaNPF6.2* 可能通过影响水杨酸和脱落酸介导的信号通路, 参与小麦硝酸盐信号的感知与转导。其功能缺失激活了逆境相关激素信号, 进而导致分蘖数、穗长和株高等农艺性状的变化。该研究为阐明小麦氮素响应机制和培育氮高效小麦品种提供了理论依据。

关键词 小麦; 硝酸盐转运蛋白; 转录组; 激素

氮素是蛋白质及 DNA 等大分子的必要组分, 是植物生长发育的关键营养元素^[1-7]。由于氮素对植物发育有显著影响, 氮肥在农业生产中的年投入量高达数万吨, 但作物的氮素吸收利用率低, 未被利用的氮素会逸散至大气或污染水体, 引发多种环境问题^[8-10]。解析氮响应的分子机制和培育氮高效作物品种是提升农业生产效率与保护生态环境的有效途径^[11-13]。

硝酸盐转运蛋白 (NPF) 作为介导氮素转运的特异性跨膜蛋白, 与氮素利用效率密切相关, 在禾谷类作物研究中备受关注^[14]。水稻中 NPF 的研究成果最为深入, *OsNPF2.2* 及 *OsNPF2.4* 均被证实严重影响硝酸盐从根部向地上部的运输, 在根系发育和维管束发育中起重要作用^[15-17]; 木质部表达的 *OsNPF7.9* 也负责调控硝酸盐向地上部的运输, 影响水稻生物量及产量^[18]; 水稻 *NRT1.1B* 蛋白不仅有增强硝酸盐吸收的作用, 还是脱落酸 (ABA) 在细胞膜上的受体, 其通过 *NRT1.1B-SPX4-NLP4* 模块实现氮信号和激素信号整合的机制已被详细解析^[19-20]。

在玉米基因组中, 共鉴定出 78 个 NPF、7 个硝酸盐转运蛋白 2 (*NRT2*) 和 2 个硝酸盐转运蛋白

3 (*NRT3*), 已对上述蛋白表达模式及功能进行了初步分析^[21]。玉米中的氮素利用关键基因 *ZmNRT1.1B* (*ZmNPF6.6*) 可以正调控硝酸盐的吸收并增加玉米产量, 具有重要的应用价值^[22]。另一主粮作物小麦基因组中的 NPF 家族也已被鉴定, 近年研究^[23-24]表明其家族成员多达 412 个, 且含有根、茎叶、籽粒和穗各种组织特异表达的基因, 暗示硝酸盐信号对小麦生长发育的全面影响以及硝酸盐调控在小麦中的复杂性。研究^[25]发现 *TaNPF6.2* 可以促进硝酸盐吸收, 超表达该基因可增加小麦根长、分蘖、株高和穗长, 而其基因编辑株系则表现为分蘖减少和穗长变短。虽然小麦 NPF 蛋白家族的成员数量众多, 但有关小麦 NPF 蛋白作用机制的研究却相对较少。

本研究将前期研究^[25]得到的 *TaNPF6.2* 基因编辑材料继续筛选分析, 确定其编辑后的基因型, 并对该材料进行转录组分析, 进一步探讨其下游调控基因及通路。已有研究^[20,26-28]表明某些拟南芥和水稻的硝酸盐家族成员可以直接运输 ABA 和生长素 (IAA), 整合激素信号感知硝酸盐信号, 因此, 本研究开展 *TaNPF6.2* 敲除材料不同内源激素含量的检测, 综合转录组及激素检测的结果, 分

作者简介: 郭诗涵, 主要从事小麦分蘖调控基因研究, E-mail: 2175891933@qq.com

夏川为通信作者, 主要从事小麦重要农艺性状基因挖掘研究, E-mail: xiachuan@caas.cn; 倪志勇为共同通信作者, 主要从事生态适应与进化研究, E-mail: nzy@xjau.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFF1000603); 中国农业科学院创新工程项目

收稿日期: 2025-12-19; 修回日期: 2026-02-11; 网络出版日期: 2026-05-21

析 *TaNPF6.2* 参与的激素调控通路，以期解析其硝酸盐信号影响小麦发育的分子机制。

1 材料与方法

1.1 小麦培养与样品采集

试验于 2024–2025 年在中国农业科学院作物科学研究所进行。以小麦品种 KN199 (WT) 为背景的 *TaNPF6.2* 基因编辑 T₃ 代株系 (KO^{*TaNPF6.2*}) 为试验材料。前期研究^[25]显示，田间正常氮及低氮不同区域不同施肥处理下，KO^{*TaNPF6.2*} 转基因植株的株高、分蘖数、穗长及穗粒数等农艺性状均低于亲本 KN199。将 T₃ 代稳定敲除株系 KO^{*TaNPF6.2*} 及 KN199

在人工气候室内培养，培养条件为 16 h/8 h (光/暗)、20 °C、湿度 55%。于 3 到 4 叶期分别取 1 片叶片液氮速冻后于 -80 °C 保存，用于 DNA 提取及基因型鉴定。3 叶期取分蘖节，设 3 个生物学重复，每个重复取 5~8 个分蘖节，液氮速冻后用于转录组测序。同期取分蘖芽液氮速冻后于 -80 °C 保存，用于基因表达量检测。3 叶 1 心期取分蘖节和 1~2 cm 的茎于液氮速冻，用于内源激素含量检测。

1.2 *TaNPF6.2* 敲除材料的基因型鉴定

采用 CTAB 法^[25]提取 DNA，利用基因组特异靶点两侧引物进行 PCR 扩增 (表 1)，将 PCR 产物送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。

表 1 *TaNPF6.2* 基因特异性扩增引物
Table 1 Specific primers for amplifying the *TaNPF6.2* gene

项目 Item	正向特异性扩增引物 Forward specific amplification primer (5'-3')	反向特异性扩增引物 Reverse specific amplification primer (5'-3')
A 基因组 A subgenome	GGCGCGCTTGAAAATTCTCT	CTGCTCGGTTTCCTCCTTT
B 基因组 B subgenome	TTCTCCTTTGCTTCCTCGGC	CCAAGACTCCTGACTCGCTC
D 基因组 D subgenome	CCCCATCTCAGCTACCAAC	CATGCCGATGATGGACAGGA

1.3 转录组测序与分析

将 KN199 及 KO^{*TaNPF6.2*} 的 6 个小麦分蘖节组织送至北京诺禾致源科技股份有限公司提取 RNA，使用 Agilent 2100 bioanalyzer 方法质控，文库构建后，Qubit 定量并稀释，Agilent 检测合格后用 qRT-PCR 定量 (>1.5 nmol)，确保质量。测序碱基正确识别率 (Q30) 为 99.90%，样本测序数据过滤情况中高质量有效测序数据 (82036334, 96.90%)、含 N 碱基 (228, 0.00%)、低质量序列 (90, 0.00%)、包含接头的序列 (2623160, 3.10%)。检查质控后的高质量有效测序数据用 HISAT2 软件比对 Fielder 参考基因组，获取定位信息。

利用 StringTie 进行新转录本组装，并对其进行 Pfam、GO 和 KEGG 等数据库注释。利用 DESeq2 软件，采用 DESeq 标准方法，以 $\log_2FC \geq 1$ 、 $P_{adj} \leq 0.05$ 为差异基因筛选标准。使用 clusterProfiler 软件进行差异基因集的 GO 功能和 KEGG 通路富集

分析。利用诺禾云平台 (<https://magic-plus.novogene.com/#/project/list>) 对筛选所得的差异基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。

1.4 植物内源激素含量

将 3 叶 1 心期的 KN199 及 KO^{*TaNPF6.2*} 分蘖节及茎秆样本送至江苏三黍生物科技有限公司，采用超高效液相色谱—串联高分辨 Orbitrap 质谱联用仪 (UHPLC-QE, Thermo, 美国)，负模式下检测标准品基本信息，测定二氢茉莉酸、吲哚乙酸、ABA、赤霉素、茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、顺 (+)-12-氧代—植物二烯酸和反式肉桂酸等 29 种激素类物质的含量。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

利用 TRIzol 试剂提取 RNA，通过 all in-one 5x RT Master Mix 反转录试剂盒 (北京艾可莘生物科技有限公司) 反转录为 cDNA，内参为小麦 *TaGAPDH*，检测引物见表 2，所用的荧光定量混液

表 2 qRT-PCR 引物序列
Table 2 qRT-PCR primer sequences

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
<i>TraesCS5B02G029300</i>	<i>NCED3</i>	TCCGCGCAGCCCCCTGGCCT	ACACGTAGGCCCGGCGTGCCT
<i>TraesCS5B02G075800</i>	<i>SnRK2</i>	ATTCGAAGTCATCGTTCTTCACT	CAACATCACGTAAAGGGTTACCC
<i>TraesFLD5B01G508800</i>	<i>PAL</i>	GCCGAGGCCATTGATATAC	ATCTGCATACGCGAACAC
<i>TraesFLD7B01G073800</i>	<i>PR-10</i>	CTGTTGAGGGAGAAGGCGG	CGATGAGGGTCGATTTCAC
<i>TraesCS6D02G196300</i>	<i>TaGAPDH</i>	CGATTCAGAGCAGCGTATTGTTG	AGTTGGTCGGGTCTCTCTAAATG

为 2×Fast qPCR Master Mixture (DN2058, 北京迪宁生物科技有限公司)。使用 BIO-RAD 荧光定量检测仪 (美国) 进行 qRT-PCR, 设置 3 个生物学重复, 3 个技术重复, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算。

2 结果与分析

2.1 *TaNPF6.2* 基因敲除材料的筛选及基因型鉴定

WT 背景下 *TaNPF6.2* 的 T₂ 代基因编辑材料

在株高、分蘖数及穗长等重要农艺性状上均低于野生型^[25]。通过 T₃ 的基因型鉴定及筛选获得了纯合稳定的 KO^{*TaNPF6.2*} 基因编辑材料, 测序显示 *TaNPF6.2-1A* 缺失 5 bp、*TaNPF6.2-1B* 缺失 2 bp、*TaNPF6.2-1D* 序列缺失 14 bp (图 1)。生物信息学分析表明, 野生型 *TaNPF6.2* 蛋白含有 11 个跨膜区域, 基因编辑后蛋白被显著截短, 仅保留 5 个跨膜结构, KO^{*TaNPF6.2*} 纯合株系中的完整 *TaNPF6.2* 蛋白

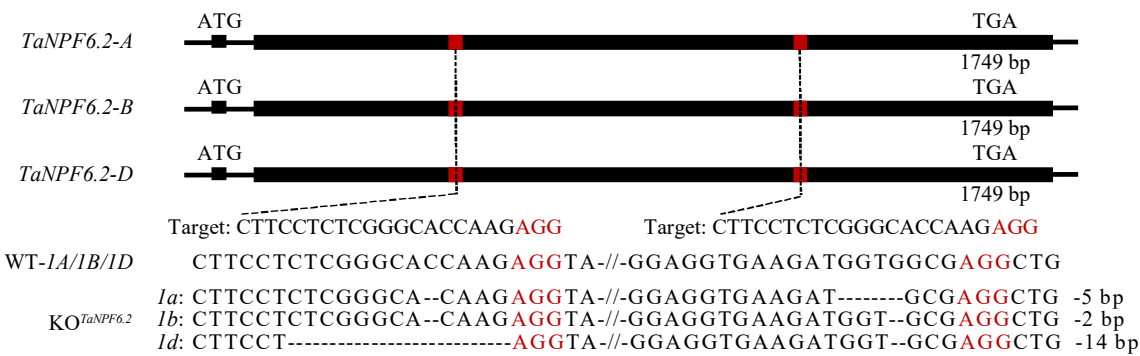


图 1 敲除材料 KO^{*TaNPF6.2*} 的基因型鉴定

Fig.1 Genotype identification of KO^{*TaNPF6.2*} lines

失活, T₃ 代纯合敲除材料 KO^{*TaNPF6.2*} 用于后续分析。

2.2 野生型及敲除材料转录组测序质量

为探究 *TaNPF6.2* 基因调控小麦发育中的分子机制, 对 WT 和 KO^{*TaNPF6.2*} (KO) 分蘖节样品进行转录组测序, 获得 6 个 cDNA 文库。原始数据过

滤后 reads 数在 78440374~84659812, 碱基数在 11.77~12.69 Gb, 测序错误率 0.01%, Q20>99.11%, Q30>96.19% (表 3)。样本间相关性分析显示生物学重复样品间 $R^2>0.92$, 符合 Encode 计划 $R^2>0.92$ 的标准, 样本质量合格。

表 3 测序数据质量统计

Table 3 Quality statistics of sequencing data

样本 Sample	文库 Library	原始读数 Raw reads	原始碱基数 Raw bases (Gb)	有效读数 Clean reads	有效碱基数 Clean bases (Gb)	错误率 Error rate (%)	Q20 值 Q20 value (%)	Q30 值 Q30 value (%)	GC 含量 GC content (%)
WT-1	FRAS250185109-1r	84631508	12.69	82192894	12.33	0.01	99.18	96.35	53.48
WT-2	FRAS250185110-1r	84659812	12.70	82036334	12.31	0.01	99.13	96.28	53.49
WT-3	FRAS250185111-1r	84415958	12.66	81516152	12.23	0.01	99.17	96.46	53.31
KO-1	FRAS250185112-1r	81627914	12.24	79531446	11.93	0.01	99.12	96.24	52.95
KO-2	FRAS250185113-1r	78440374	11.77	75364236	11.30	0.01	99.11	96.27	53.29
KO-3	FRAS250185114-1r	82075428	12.31	78843794	11.83	0.01	99.11	96.19	53.29

2.3 转录组差异表达基因 (DEGs) 分析

2.3.1 DEGs 提取及聚类 依据 $P_{adj}<0.05$ 、 $\log_2FC \geq 1$ 的标准, 对 WT 与 KO^{*TaNPF6.2*} 样本进行差异表达分析 (图 2a)。KO^{*TaNPF6.2*} 中显著上调基因 741 个, 显著下调基因 1240 个, 无差异基因 89 805 个。DEGs 总数 1981 个 (占转录组的 2.1%)。表达模式聚类热图 (图 2b) 显示样本间特异性表达情况, 样本聚类树表明生物学重复样本得到有效聚类。基因表达数据聚类被分为多个模块, 部分基因在 KO 组

呈一致的高或低表达趋势。

2.3.2 DEGs 的 GO 富集分析 对 WT 与 KO^{*TaNPF6.2*} 的 1981 个 DEGs 进行 GO 富集分析, 共富集到 184 个 GO 功能类别 (图 3), 分别为 87 个生物过程 (BP)、23 个细胞组成 (CC) 和 74 个分子功能 (MF), 占比分别为 47.3%、12.5%和 40.2%。BP、CC 和 MF 分别富集到 34、12 和 57 个基因。其中, GO 富集在细胞组成的功能类别占比最少, 富集在 BP 和 MF 的 GO 功能类别基因较多, 且下调基因

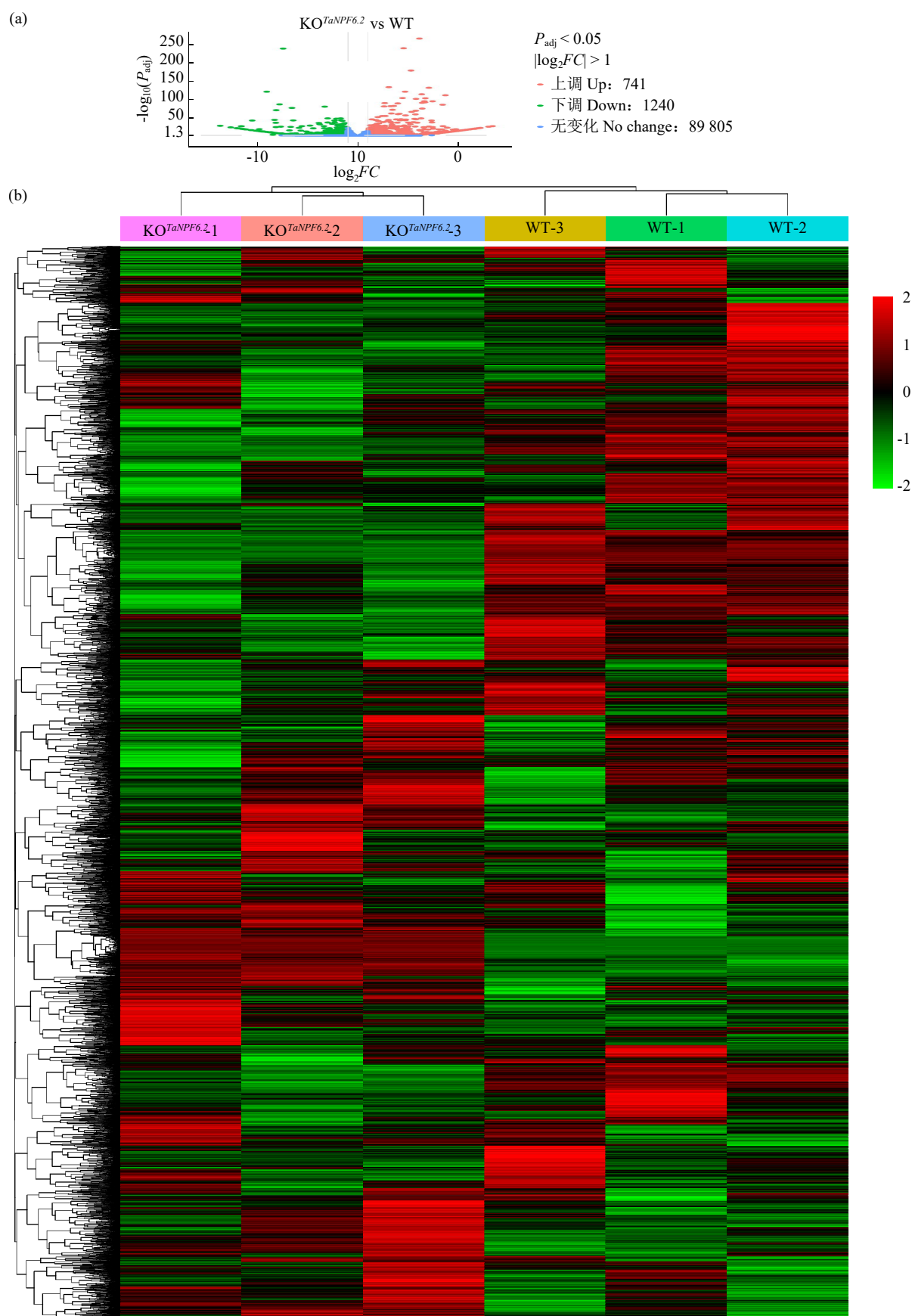


图 2 差异表达分析和 DEGs 聚类分析
Fig.2 Differential expression analysis and cluster analysis of DEGs

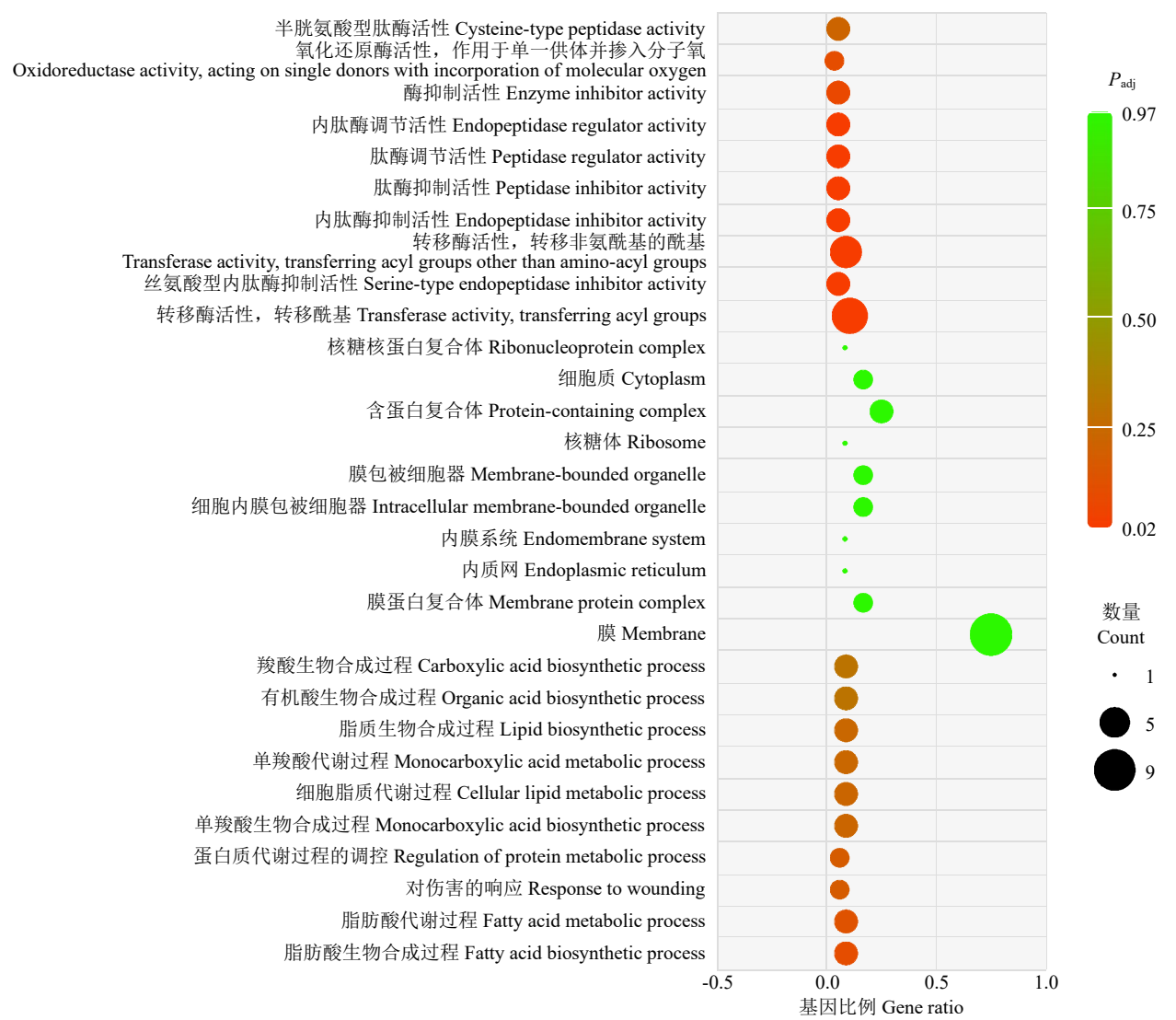


图 3 DEGs 的 GO 富集分析
Fig.3 GO enrichment analysis of DEGs

占比较多。BP 下调基因 355 个，上调基因 110 个；MF 的下调基因 170 个，上调基因 35 个，占比分别为 76.3%和 82.9%。经统计 DEGs 主要富集在 MF 的转移酶活性（转移酰基）（GO：0016746、GO：0016747）、肽酶抑制剂活性（GO：0004867、GO：0004866）、肽酶调节因子活性（GO：0061134、GO：0061135），以及 BP 中的脂肪酸生物合成（GO：0006633）过程（表 4）。结合 MF 层面的转移酶活性富集情况，酰基转移相关的代谢调控可能是 DEGs 发挥作用的主要功能。

表 4 差异基因 GO 富集分析

Table 4 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

类别 Category	GO 编号 GO code	描述 Description	P_{adj}	数量 Number
MF	0016746	转移酶活性（转移酰基）	0.0204451782464127	6
MF	0004867	丝氨酸型内肽酶抑制剂活性	0.0204451782464127	3
MF	0016747	转移酶活性（转移非氨酰基的酰基）	0.0204451782464127	5
BP	0006633	脂肪酸生物合成过程	0.1037956007872910	3
MF	0004866	内肽酶抑制剂活性	0.0226228547401966	3
MF	0030414	肽酶抑制剂活性	0.0226228547401966	3
MF	0061134	肽酶调节因子活性	0.0226228547401966	3
MF	0061135	内肽酶调节因子活性	0.0226228547401966	3

2.3.3 DEGs 的 KEGG 富集分析 利用 DEGs 进行 KEGG 富集分析 (图 4), 共富集到 100 个通路 512 个基因, 前 20 个显著通路 ($P_{adj}<0.05$) 中 DEGs 富集最多的为光合作用及代谢生物通路, 富集到 29

个基因且均为下调基因, 其次为脂肪酸延伸、半乳糖代谢和卟啉代谢通路。生物合成方面, 显著富集的通路为不饱和脂肪酸生物合成、角质、木栓质和蜡质生物合成及单萜类生物合成通路等。

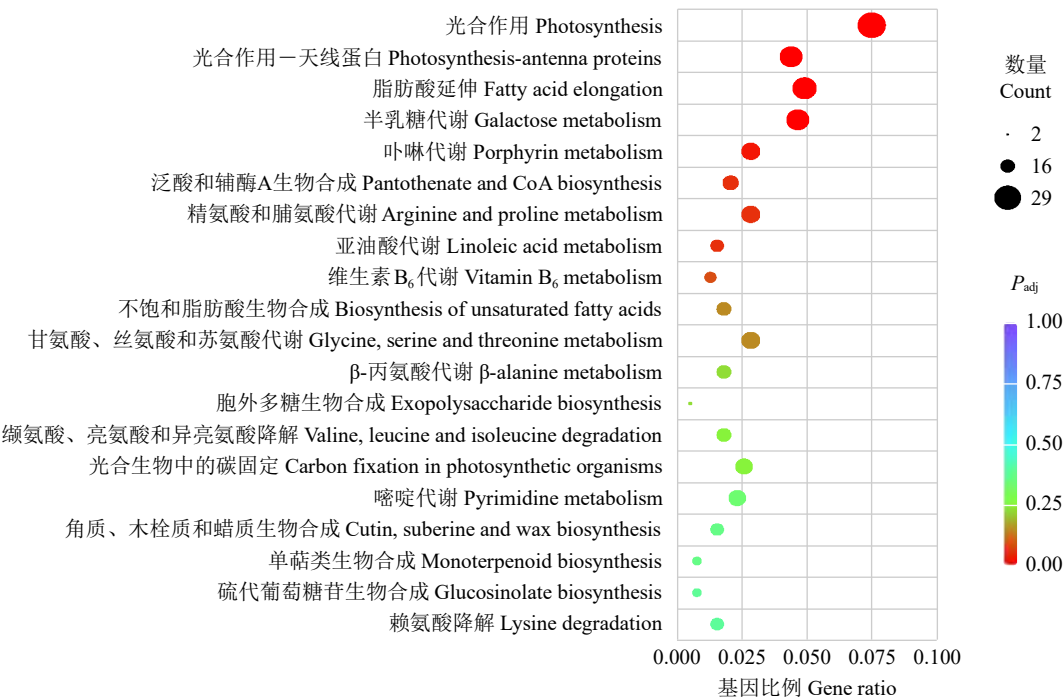


图 4 DEGs 的 KEGG 富集分析
Fig.4 KEGG enrichment analysis of DEGs

2.4 WT 和 KO^{TaNPF6.2} 的内源激素含量

由于某些 NPF 家族成员具有转运 ABA 及 IAA 的功能, 可调控植物逆境激素响应。因此选取 WT 和 KO^{TaNPF6.2} 苗期分蘖节与茎, 对其内源激素含量进行测定, 结果 (表 5) 显示, 在 KO^{TaNPF6.2} 敲除植株中, SA 及其衍生物 SA-2-O-β-G 含量显著升高, 为野生型的 2.2~3.5 倍。ABA 的含量在分蘖节及茎中均有所升高。IAA 衍生物 IAA-Glc, 在分蘖节中

含量降低、在茎中含量有所升高, IAA-Asp 也在 KO 植株中明显积累。JA 在 KO^{TaNPF6.2} 分蘖节中含量降低, 而在茎中升高, JA 合成前体顺 (+)-12-氧代-植物二烯酸含量升高。反式肉桂酸在 2 个组织的激素含量均有所降低, 激素测定结果表明, SA 变化最为明显, 表明 TaNPF6.2 可能通过调控 NPF 介导的激素运输与代谢, 影响 SA 和 JA 等逆境响应相关激素的积累与信号通路。

表 5 苗期内源激素含量测定
Table 5 Determination of endogenous hormone contents at the seedling stage

化合物 Compound	分蘖节 Crown node		茎 Culm	
	WT	KO ^{TaNPF6.2}	WT	KO ^{TaNPF6.2}
SA	122.98±4.27	332.79±4.27	98.90±3.62	276.30±4.53
SA-2-O-β-葡萄糖苷 SA-2-O-β-Glucoside	374.09±13.32	823.27±24.43	234.79±9.69	831.44±29.14
ABA	41.25±0.87	44.72±1.19	27.91±1.00	31.36±1.58
反式肉桂酸 Trans-cinnamic acid	23.50±0.44	22.21±0.55	24.73±0.55	20.90±0.09
IAA-葡萄糖酯 IAA-Glc	580.29±13.45	379.92±5.76	1138.49±28.71	1249.10±16.68
IAA-天冬氨酸 IAA-Asp	1366.40±40.37	1534.95±34.73	785.02±22.54	1009.47±27.95
JA	1.31±0.03	1.08±0.03	5.82±0.34	7.45±0.22
顺(+)-12-氧代-植物二烯酸 2-oxo-phytodienoic acid	69.38±3.51	86.77±2.37	304.57±2.35	355.81±10.36

2.5 TaNPF6.2 敲除材料 DEGs 的定量分析

基于以上结果，进行相关基因的 qRT-PCR 分析，结合转录组 DEGs 进一步检测验证 TaNPF6.2 调控的下游基因（图 5）。由于前期观察到小麦分蘖以及穗长的变化，因此取小麦的穗和 3 叶期的分蘖芽，定量分析关键基因的表达。与 ABA 合成相关的 9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶 3（NCED3）基因以及 ABA 信号转导核心激酶蔗糖非发酵相关蛋白激酶 2（SnRK2），在 KO^{TaNPF6.2} 中表达量显著增高。其中，NCED3 基因在敲除材料抽穗期穗的表达量为 WT 的 6.2 倍，在分蘖芽中为 WT 的 2.3 倍；SnRK2 基因在敲除材料抽穗期穗的表达量为 WT 的 1.6 倍，在分蘖芽中为 WT 的 1.5 倍。与 SA 生物合

成相关的苯丙氨酸解氨酶（PAL）基因以及与 SA 响应的病程相关基因病程相关蛋白 10（PRI0），在 KO^{TaNPF6.2} 中均呈明显上调表达。PAL 基因在敲除材料抽穗期穗和分蘖芽中的表达量分别为 WT 的 1.8 和 3.8 倍；PRI0 基因在敲除材料抽穗期穗和分蘖芽中的表达量分别约为 WT 的 1.5 和 2.3 倍。由于 TB1 基因可以显著影响小麦分蘖及花序发育，因此对小麦分蘖关键基因 TB1 的表达量进行检测，发现其在 KO^{TaNPF6.2} 材料穗中的表达量显著升高，在孕穗期为 WT 的 3.6 倍，抽穗期的表达量为 WT 的 3.5~5.3 倍，分蘖芽的表达量为 WT 的 2.0 倍。TaNPF6.2 可能通过调控逆境响应基因或重要转录因子感知并传递硝酸盐信号，影响小麦的发育。

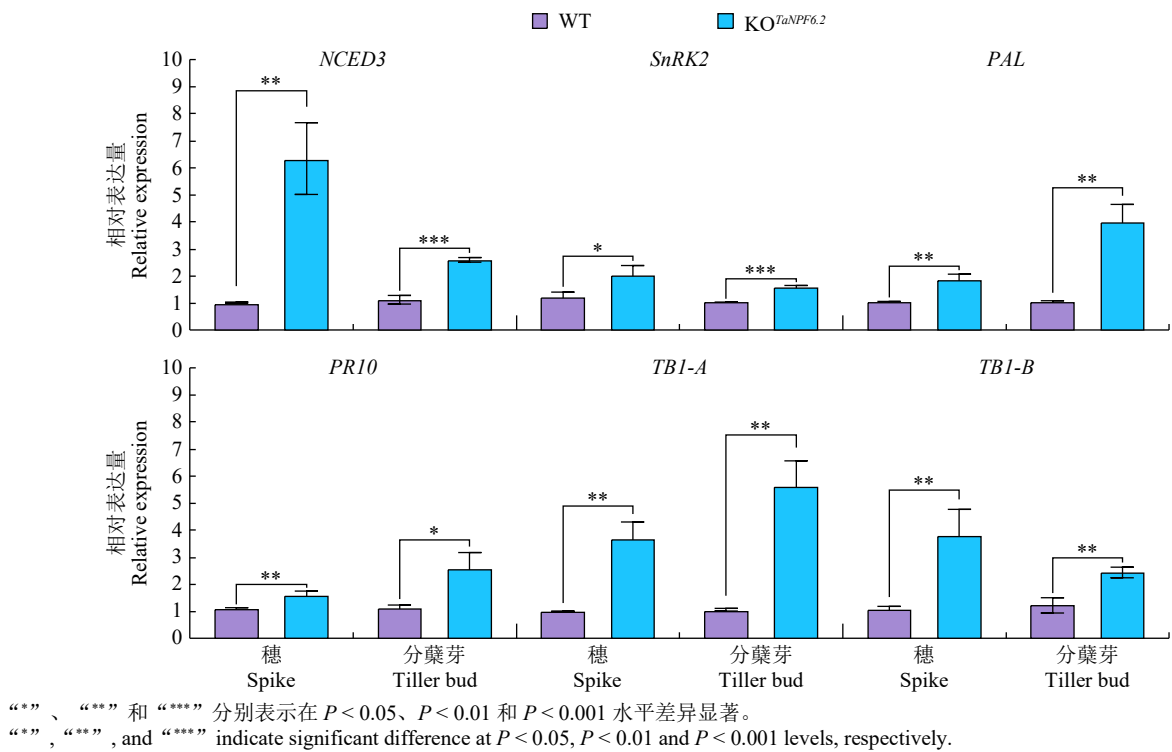


图 5 激素相关基因的 qRT-PCR 分析
Fig.5 qRT-PCR analysis of hormone-related genes

3 讨论

TaNPF6.2 基因编辑材料在株高、分蘖数、穗长和千粒重等关键农艺性状上均低于 WT，但其在氮素信号转导方面的作用，以及和其他 NPF 是否具有同样的功能等问题仍然未知。本研究确定了 TaNPF6.2 敲除材料的基因型，得到了纯合的蛋白不完整的稳定敲除材料。基因编辑株系中 TaNPF6.2 蛋白的 6 个功能结构域缺失导致其功能异常。

由于 NPF 家族成员数量庞大，因此成员之间的功能可能有重叠，且具有复杂的调控机制，虽然 TaNPF6.2 蛋白的缺失没有对植株形态造成大幅改变，但其下游调控的基因可能对植物发育有重要影响。转录组数据中 KO^{TaNPF6.2} 与 WT 间的 1981 个显著 DEGs 可能是其下游调控通路的关键节点，可以揭示敲除植株表型变化的分子基础。GO 功能富集分析为理解这些 DEGs 的功能提供了方向。在分子功能层面，显著富集于转移酶活性（尤其是酰基转

移相关)、肽酶抑制剂活性及肽酶调节因子活性, 酰基转移酶参与脂质代谢中多种生物分子的修饰与合成^[29], 近年来, 研究^[30]表明拟南芥和水稻中组蛋白乙酰转移酶可以介导组蛋白乙酰化, 调控株高及分枝, 可用于作物改良。而蛋白酶抑制与调节系统则广泛参与发育信号转导。在生物过程中, 脂肪酸生物合成过程的富集, 与 MF 同样指向脂质代谢相关途径, 脂质不仅是细胞膜的主要成分和能量储存形式, 同时脂类代谢也与氮饥饿密切相关^[31-32]。因此, *TaNPF6.2* 可能通过富集的脂类代谢基因, 影响硝酸盐信号响应。

KEGG 分析发现光合作用通路显著富集, 已知植物的碳氮代谢及平衡对其生长发育至关重要, 且部分 NPF 具有光响应的活性, *TaNPF6.2* 可能通过直接或间接调控光信号通路影响氮吸收同化^[33-35]。脂肪酸延伸、不饱和脂肪酸生物合成以及角质、木栓质和蜡质生物合成等 KEGG 的共同富集, 与 GO 富集的结果一致。

上述转录组结果源于人工可控环境下的分析。该环境避免了自然条件下温度、光照、水分及土壤氮素时空异质性等复杂因素的干扰, 有助于解析 *TaNPF6.2* 基因本身的功能及其核心调控网络。*TaNPF6.2* 介导的硝酸盐信号与激素通路的交叉对话, 在复杂田间条件下可能呈现出更为动态的调控模式。本研究中观察到的生长抑制表型, 在遭遇多种胁迫叠加的田间环境中, 其程度可能被放大或表现出不同特点。下一步深入研究需将相关遗传材料置于不同氮水平、不同生态区的田间环境中进行多年多点的表型鉴定及基因表达验证, 从而为培育广适性氮高效小麦品种提供可靠的理论依据。

此外, 内源激素测定与基因表达分析表明, *TaNPF6.2* 敲除显著影响多种激素的代谢与信号转导。分蘖节和茎中 SA 及其衍生物 SA-2-O- β -G 的积累, 伴随 *PAL* 和 *PR10* 基因的上调, 表明 SA 信号通路在硝酸盐信号响应中被激活^[36-37]。SA 作为重要的防御激素, 其积累可能与植株增强抗病性或胁迫耐受性相关, 但也可能抑制生长。同时, ABA 含量升高及 *NCED3* 和 *SnRK2* 基因的表达上调^[38-40], 表明 *TaNPF6.2* 参与调控 ABA 合成与信号转导。*TBI* 是已知对小麦分蘖、花序及节间发育有重要调控作用的转录因子^[41-43], 其显著上调也显示 *TaNPF6.2* 可能通过调控这些重要转录因子的表达影响小麦分

蘖及穗长。此外, IAA 相关代谢物 (如 IAA-Glc 和 IAA-Asp) 的变化表明, *TaNPF6.2* 可能通过调节 IAA 的分布与失活形式, 精细调控分蘖与茎秆发育。JA 及其前体 OPDA 在分蘖节与茎中的差异表达模式, 暗示激素的运输及分布也可能受到调控。这些互作网络共同介导了小麦在硝酸盐响应时的分子水平变化, 为 *TaNPF6.2* 硝酸盐响应交叉调控 SA 和 ABA 等激素信号通路提供了证据。氮素转运缺失可能触发逆境信号 (如增强应对胁迫的 SA 和 ABA 信号), 以及分蘖关键抑制因子 *TBI* 的显著上调, 共同构成了其下游信号网络的核心。这一变化, 从分子水平上解释了 *KO^{TaNPF6.2}* 植株分蘖数减少、穗长缩短等表型变化, 即硝酸盐转运功能的缺陷可能被植株解读为一种营养胁迫信号, 转而启动了以牺牲部分生长为代价的逆境适应程序。下一步可通过激素调控途径的基因和硝酸盐转运基因活性的双重调节, 探索氮高效吸收与生长潜力的平衡, 为氮高效小麦品种的选育提供理论依据。

4 结论

TaNPF6.2 作为硝酸盐信号响应的正向调控因子, 其功能缺失会通过激活 SA 和 ABA 等逆境激素信号通路, 并上调分蘖抑制因子 *TBI* 的表达, 最终对小麦的分蘖和穗部发育产生抑制作用。通过分子水平的检测揭示其整合氮转运、脂类代谢及激素信号通路共同调控小麦生长发育的机制, 为系统解析小麦氮素响应机制提供了理论依据。

参考文献

- [1] Fredes I, Moreno S, Díaz F P, et al. Nitrate signaling and the control of *Arabidopsis* growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2019, 47: 112-118.
- [2] 田纪春, 张忠义. 高蛋白和低蛋白小麦品种的氮素吸收和运转分配差异的研究. *作物学报*, 1994, 20(1): 76-83.
- [3] 轩红梅, 王永华, 魏利婷, 等. 小麦幼苗叶片中硝酸盐转运蛋白 NRT1 和 NRT2 家族基因对氮饥饿响应的表达分析. *麦类作物学报*, 2014, 34(8): 1019-1028.
- [4] 宋可欣, 王丽霞, 刘永霞, 等. 根际微生态环境中氮源转化及循环研究进展. *中国农学通报*, 2024, 40(21): 91-98.
- [5] 白文钦, 胡明瑜, 王春萍, 等. 氮素在植物中的利用综述. *江苏农业科学*, 2020, 48(4): 1-11.
- [6] 孙磊, 王弘, 李明月, 等. 氮磷钾肥施用量及施用时期对马铃薯干物质积累与分配的影响. *作物杂志*, 2014(1): 132-137.
- [7] 于泳, 黄瑞冬, 赵尚文, 等. 不同施氮水平对高粱子粒淀粉积累规律的影响. *作物杂志*, 2008(5): 20-24.
- [8] Li H, Hu B, Chu C C. Nitrogen use efficiency in crops: Lessons from *Arabidopsis* and rice. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(10): 2477-2488.

- [9] 金宏鑫, 裴占江, 李淑芹, 等. 污泥生物有机肥对大豆产量和氮磷吸收的影响. 作物杂志, 2012(1): 92-95.
- [10] 韦剑锋, 罗艺, 米超, 等. 应用 ^{15}N 标记对不同施氮方式甘蔗氮肥利用效率的研究. 作物杂志, 2012(1): 76-79.
- [11] Lamig L, Moreno S, Álvarez J M, et al. Molecular mechanisms underlying nitrate responses in plants. *Current Biology*, 2022, 32(9): 433-439.
- [12] 陈范骏, 米国华, 张福锁. 氮高效玉米新品种中农 99 的选育. 作物杂志, 2009(6): 103-104.
- [13] 陈颖, 周振翔, 周天阳, 等. 水稻氮高效吸收利用机制及栽培调控措施. 作物杂志, 2016(6): 26-32.
- [14] Schroeder J I, Delhaize E, Frommer W B, et al. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature*, 2013, 497(7447): 60-66.
- [15] Xia X D, Fan X R, Wei J, et al. Rice nitrate transporter OsNPF2.4 functions in low-affinity acquisition and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(1): 317-331.
- [16] Li Y G, Ouyang J, Wang Y Y, et al. Disruption of the rice nitrate transporter OsNPF2.2 hinders root-to-shoot nitrate transport and vascular development. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9635.
- [17] Wei J, Zheng Y, Feng H M, et al. *OsNRT2.4* encodes a dual-affinity nitrate transporter and functions in nitrate-regulated root growth and nitrate distribution in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(5): 1095-1107.
- [18] Guan Y, Liu D F, Qiu J, et al. The nitrate transporter OsNPF7.9 mediates nitrate allocation and the divergent nitrate use efficiency between *indica* and *japonica* rice. *Plant Physiology*, 2022, 189(1): 215-229.
- [19] Hu B, Wang W, Ou S J, et al. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nature Genetics*, 2015, 47(7): 834-838.
- [20] Ma X J, Wang W, Zhang J Y, et al. NRT1.1B acts as an abscisic acid receptor in integrating compound environmental cues for plants. *Cell*, 2025, 188(19): 5231-5248.
- [21] Jia L H, Hu D S, Wang J B, et al. Genome-wide identification and functional analysis of nitrate transporter genes (*NPF*, *NRT2* and *NRT3*) in maize. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(16): 12941.
- [22] Cao H R, Liu Z, Guo J, et al. *ZmNRT1.1B* (*ZmNPF6.6*) determines nitrogen use efficiency via regulation of nitrate transport and signalling in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 22(2): 316-329.
- [23] Buchner P, Hawkesford M J. Complex phylogeny and gene expression patterns of members of the NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family (NPF) in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(19): 5697-5710.
- [24] Kumar A, Sandhu N, Kumar P, et al. Genome-wide identification and in silico analysis of NPF, NRT2, CLC and SLAC1/SLAH nitrate transporters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 11227.
- [25] Wang H H, Liu Y Y, Wu L F, et al. *TaNPF6.2* improves agronomic traits via enhancing nitrogen uptake efficiency in wheat. *Journal of Genetics and Genomics*, 2025, 52(1): 120-123.
- [26] Krouk G, Lacombe B, Bielach A, et al. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental Cell*, 2010, 18(6): 927-937.
- [27] Kanno Y, Kamiya Y, Seo M. Nitrate does not compete with abscisic acid as a substrate of AtNPF4.6/NRT1.2/AIT1 in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 2013, 8(12): e26624.
- [28] Bouguyon E, Brun F, Meynard D, et al. Multiple mechanisms of nitrate sensing by *Arabidopsis* nitrate transceptor NRT1.1. *Nature Plants*, 2015, 1: 15015.
- [29] Jayawardhane K N, Singer S D, Weselake R J, et al. Plant sn-glycerol-3-phosphate acyltransferases: biocatalysts involved in the biosynthesis of intracellular and extracellular lipids. *Lipids*, 2018, 53(5): 469-480.
- [30] Wu C J, Yuan D Y, Liu Z Z, et al. Conserved and plant-specific histone acetyltransferase complexes cooperate to regulate gene transcription and plant development. *Nature Plants*, 2023, 9(3): 442-459.
- [31] Mugume Y, Ding G, Dueñas M E, et al. Complex changes in membrane lipids associated with the modification of autophagy in *Arabidopsis*. *Metabolites*, 2022, 12(2): 190.
- [32] Gaude N, Bréhélin C, Tischendorf G, et al. Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *The Plant Journal*, 2007, 49(4): 729-739.
- [33] Sathee L, R S, Barman D, et al. Nitrogen at the crossroads of light: integration of light signalling and plant nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 2025, 76(3): 803-818.
- [34] Liu H, Gao X, Fan W, et al. Optimizing carbon and nitrogen metabolism in plants: from fundamental principles to practical applications. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2025, 67(6): 1447-1466.
- [35] Persyn F, Smagghe W, Eeckhout D, et al. A nitrogen-specific interactome analysis sheds light on the role of the *SnRK1* and *TOR* kinases in plant nitrogen signaling. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2024, 23(10): 100842.
- [36] Zhu B, Zhang Y, Gao R, et al. Complete biosynthesis of salicylic acid from phenylalanine in plants. *Nature*, 2025, 645(8079): 218-227.
- [37] Hwang S H, Lee I A, Yie S W, et al. Identification of an *OsPRI0a* promoter region responsive to salicylic acid. *Planta*, 2008, 227(5): 1141-1150.
- [38] Virlovet L, Fromm M. Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. *New Phytologist*, 2015, 205(2): 596-607.
- [39] Tan W R, Zhang D W, Zhou H P, et al. Transcription factor HAT1 is a substrate of SnRK2.3 kinase and negatively regulates ABA synthesis and signaling in *Arabidopsis* responding to drought. *PLoS Genetics*, 2018, 14(4): e1007336.
- [40] Hsu P K, Takahashi Y, Munemasa S, et al. Abscisic acid-independent stomatal CO_2 signal transduction pathway and convergence of CO_2 and ABA signaling downstream of OST1 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(42): 9971-9980.
- [41] Dixon L E, Greenwood J R, Bencivenga S, et al. *TEOSINTE BRANCHED1* regulates inflorescence architecture and development in bread wheat (*Triticum aestivum*). *The Plant Cell*, 2018, 30(3): 563-581.
- [42] Dixon L E, Pasquariello M, Boden S A. *TEOSINTE BRANCHED1* regulates height and stem internode length in bread wheat. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(16): 4742-4750.
- [43] Lewis J M, Mackintosh C A, Shin S, et al. Overexpression of the maize *Teosinte Branched1* gene in wheat suppresses tiller development. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(7): 1217-1225.

Transcriptome Analysis Reveals Wheat Nitrate Transporter TaNPF6.2 Integrates Hormone Pathways to Regulate Development

Guo Shihan^{1,2}, Zhou Baihui^{2,3}, Kong Xiuying², Zhang Lichao², Xia Chuan², Ni Zhiyong¹

(¹Xinjiang Key Laboratory for Ecological Adaptation and Evolution of Extreme Environment Organisms, College of Life Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/State Key Laboratory of Crop Gene Resources and Breeding, Beijing 100081, China; ³School of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China)

Abstract Nitrate transporters are specific membrane proteins that mediate nitrogen uptake in plants and are closely related to nitrogen use efficiency. In this study, the genotypes of gene-edited knockout (KO) lines of the wheat nitrate transporter *TaNPF6.2* were identified. Transcriptome comparison revealed 1981 differentially expressed genes (DEGs) between the wild-type and KO lines, and GO enrichment analysis showed that these genes were significantly enriched in acyltransferase activity and fatty acid biosynthesis. Endogenous hormone detection indicated that the contents of salicylic acid and abscisic acid significantly increased in the KO lines, and the expression of genes related to their synthesis and signal transduction was also synchronously upregulated. These results suggested that *TaNPF6.2* may participate in the perception and transduction of nitrate signaling in wheat by affecting salicylic acid- and abscisic acid-mediated signaling pathways. Loss of *TaNPF6.2* function activated stress-related hormone signaling, thereby leading to changes in agronomic traits such as tiller number, spike length, and plant height. This study provided a theoretical basis for elucidating nitrogen response mechanisms and breeding nitrogen-efficient wheat varieties.

Key words Wheat; Nitrate transporter (NPF); Transcriptome; Hormone

欢迎订阅 2027 年《农业科技通讯》杂志

农业农村部主管，中国农业科学院主办，国家新闻广电总局认定的第一批学术期刊（2014）。刊号：ISSN1000-6400，CN11-2395/S，邮发代号：2-602，月刊，每月 17 日出版。单价：30.00 元，全年：360.00 元。全国各地邮局及本刊编辑部均可订阅。

本刊及时报道种植业研究成果，尤其是种子方面的新品种、新技术。侧重大田，兼顾园艺。是种植业者优选刊物。

主要栏目有专题论述、试验研究、经验交流、粮食作物、经济作物、蔬菜、果树、西甜瓜、林木花卉等。内容丰富翔实、信息量大、技术实用。

地址：100081，北京市海淀区中关村南大街 12 号《农业科技通讯》编辑部

电话：010-82109665、82109664、82106276

E-mail: tongxun@caas.cn

