

低氮处理对玉米早期发育胚乳中氨基酸水平和转录组的影响

潘玉昕^{1,2}, 赵 涵¹, 宁丽华¹

(¹江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所/江苏省农业生物学重点实验室, 南京 210014; ²南京农业大学农学院, 南京 210014)

摘要: 氮素是影响玉米生长发育、产量和籽粒品质形成所必需的营养元素。为挖掘早期发育的玉米胚乳响应低氮胁迫的关键基因, 揭示玉米胚乳抵御低氮胁迫的生理响应及分子机制, 本研究在低氮和足氮处理下, 对授粉后第6天的自交系B73玉米胚乳进行氨基酸含量、氨基酸衍生物含量分析和转录组测序。生理测定表明, 低氮胁迫下, 玉米胚乳中10种氨基酸或氨基酸衍生物含量升高, 其中苏氨酸、 β -氨基异丁酸、组氨酸、 β -丙氨酸、赖氨酸含量升高程度最大, 其升高范围介于71.1%~153.1%; 而其余21种氨基酸或氨基酸衍生物含量降低, 其中鸟氨酸、胱氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸、 α -氨基丁酸含量下降程度最大, 其下降程度范围介于51.6%~65.8%。转录组测序结果表明, 与足氮处理相比, 低氮胁迫下玉米胚乳中鉴定到3185个显著上调和2612个显著下调的差异表达基因。进一步检测到参与氮代谢途径和氨基酸代谢途径的差异表达基因分别为12和9个, *AP2/ERF-ERF*、*bZIP*、*WRKY*差异表达转录因子家族成员分别为20、10和21个。这些候选基因可能是玉米胚乳抵御低氮胁迫响应的重要基因资源, 其为玉米胚乳应答低氮胁迫的分子机制及耐低氮玉米新品种培育奠定基础。

关键词: 玉米; 低氮胁迫; 氨基酸及其氨基酸衍生物; 转录组测序; 氮代谢; 氨基酸代谢; 转录因子

Effects on Amino Acid Levels and Transcriptome in Early Developmental Endosperm of *Zea mays* L. under Low Nitrogen Stress Treatment

PAN Yuxin^{1,2}, ZHAO Han¹, NING Lihua¹

(¹Institute of Crop Germplasm and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Provincial Key Laboratory of Agrobiolgy, Nanjing 210014; ²College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014)

Abstract: Nitrogen is an essential nutrient element that affects the growth and development, yield and grain quality of maize (*Zea mays* L.). To explore the key genes of maize endosperm in early development in response to low nitrogen stress treatment and reveal the physiological responses and molecular mechanism of maize endosperm against low nitrogen stress, the amino acids content and amino acid derivatives analysis, as well as transcriptome sequencing were performed on inbred line B73 kernel treated by low nitrogen and full nitrogen on six days after pollination. Physiological measurement showed that the contents of 10 amino acids or amino acid derivatives increased under low nitrogen stress, and the contents of threonine, β -amino-isobutyric acid, histidine, β -alanine, and lysine increased the most, with the increase ranged from 71.1% to 153.1%. The contents of other 21 amino acids or amino acid derivatives decreased, and the contents of ornithine, cystine, asparagine, phenylalanine, and α -aminobutyric acid decreased the most, with the decrease varied from 51.6% to

收稿日期: 2023-11-01 网络出版日期: 2024-01-09

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20231101002>

第一作者研究方向为氮素对玉米籽粒发育的影响, E-mail: pyx18769276841@126.com

通信作者: 宁丽华, 研究方向为玉米遗传育种, E-mail: NLH_2015@126.com

基金项目: 国家自然科学基金(32372101); 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(JBGS [2021] 012); 江苏省农业生物学重点实验室重大自主科研项目(JKLA2021-ZD03)

Foundation projects: Natural Science Foundation of China (32372101); Open Competition Project for Seed Industry of Jiangsu Province (JBGS [2021] 012); Major Independent Research Project of Jiangsu Provincial Key Laboratory of Agrobiolgy Biology (JKLA2021-ZD03)

65.8%。Transcriptomic analysis showed that compared with sufficient nitrogen treatment, the 3,185 significantly up-regulated and 2,612 significantly down-regulated differentially expressed genes (DEGs) were identified in maize kernel under low nitrogen stress, respectively. In addition, a total of 12, 9, 20, 10, and 21 DEGs/differentially expressed transcription factors were detected in the nitrogen metabolism pathway, cyanoamino acid metabolism pathway, as well as *AP2/ERF-ERF*, *bZIP*, and *WRKY* transcription factor families, respectively. Therefore, these candidate genes may be important gene resources for maize endosperm response to low nitrogen stress, which may lay a foundation for the molecular mechanism of maize endosperm response to low nitrogen stress and develop low nitrogen tolerance maize varieties.

Key words: maize (*Zea mays* L.); low nitrogen stress; amino acid/amino acid derivative; transcriptome sequencing; nitrogen metabolism; cyanoamino acid metabolism; transcription factor

氮(N, nitrogen)是作物生长必不可少的大量元素之一^[1-2],其在调控作物正常生长发育、产量和品质中发挥着重要作用。作物对氮素的需求量大,而过量施用氮肥后通常会使氮肥损失高、利用率下降。据报道每年约有 1.2×10^8 吨的氮肥用于全球粮食生产,而其中50%~70%的氮肥未被作物吸收利用^[3-4],这导致土壤板结严重,生态环境恶化,不利于农业可持续发展^[5]。因此,减少氮肥施用,提高作物对氮素高效利用,实现作物绿色生产越来越受到关注^[6]。

玉米(*Zea mays* L.)是集粮食、饲料及工业原料为一体的多元作物,在保障国家粮食生产安全、促进畜牧业及工业发展中扮演着重要角色。据美国农业部统计,2019年全球玉米产量为 1.09×10^8 吨^[6],氮肥施用对稳定玉米生产至关重要。前期研究表明,花期和灌浆期低氮胁迫会抑制玉米植株生长^[7],雌穗发育不良,穗重、穗粒数、籽粒重和产量均显著下降^[8-11]。此外,还有研究表明,氮供应水平会显著影响玉米籽粒的品质,低氮处理下玉米籽粒的蛋白质、可溶性糖、淀粉含量下降,支链淀粉与直链淀粉比值和粗脂肪含量升高;而随着施氮量增加,玉米籽粒蛋白质和赖氨酸含量升高,而淀粉含量降低^[12-13]。孟瑶等^[14]研究还表明,随施氮量的增加玉米籽粒中调控淀粉合成的关键酶活性发生变化。由此可见,如何在低氮水平下维持玉米籽粒正常生长发育是我国农业绿色发展关键。

玉米籽粒由胚、胚乳和种皮组成。玉米胚乳在种子发育过程中持续存在^[15],是淀粉、氨基酸、蛋白质合成和储藏的主要场所。这些碳水化合物、氨基酸和蛋白质不仅在萌发过程中为玉米幼苗提供营养,调控玉米的生长发育和响应逆境胁迫等,同时还是人类重要的食物来源^[16]。前人研究发现玉米胚乳发育是从玉米授粉后完成双受精便开始,授粉后第0~3天玉米胚乳进行有丝分裂并形成多个游离

核,胚乳开始细胞化;授粉后第6天开始进入胚乳细胞分化增殖阶段,胚乳细胞将分化成4种类型:淀粉胚乳、糊粉层、基底传递层和胚周区^[17]。授粉后第16天左右胚乳结构基本定型,即玉米在此阶段完成了生殖库的建立^[15-18]。有相关研究表明,玉米灌浆时总可溶性糖和氨基酸进入胚乳的运输速率呈线性关系^[19]。因此,研究玉米胚乳发育的遗传调控机制对于提高玉米产量和品质具有重要意义。近年来转录组测序(RNA-Seq, RNA-sequencing)技术的迅速发展,在转录层面上为解析玉米种子发育的遗传调控机制提供了技术支撑。Xin等^[20]对Mo17与B73互交的籽粒(授粉后第0、3、5天)和胚乳(授粉后第7、10、15天)进行高通量转录组测序,共鉴定到290个印记基因在籽粒发育过程中发生显著变化。Li等^[21]分别对授粉后第8、10、12天的胚乳进行转录组分析,发现许多基因表达的时空程序与玉米早期籽粒和胚乳发育过程中399个转录因子基因的表达相关;随后将耦合激光捕获显微解剖和转录组测序技术相结合,全面分析了授粉后第8天玉米胚乳的5种主要细胞类型,以及胚胎和母体组织的转录模式,发现了1个由MRP-1激活的调节模块^[22]。赖锦盛团队对B73材料不同发育时期的胚、胚乳和籽粒进行取样,共计53份相关组织进行转录组测序分析,并建立了玉米种子发育的时空转录组图谱^[23];随后又对授粉后第6天的籽粒以4 h或6 h的间隔进行取样,共收集31个样本,并对其进行高时间分辨率的转录组分析^[24]。上述研究为正常施氮环境下玉米胚乳发育的分子调控机制研究提供重要的信息。

然而,目前关于低氮水平下玉米胚乳发育遗传机制研究非常有限。由于授粉后第6天的玉米胚乳开始进入胚乳细胞分化增殖阶段,对籽粒建成发挥重要作用。因此,本研究以低氮和足氮处理下授粉后第6天的玉米自交系B73的胚乳为试验材料,测

定玉米胚乳中氨基酸和氨基酸衍生物的积累变化,并利用转录组测序分析筛选和挖掘早期玉米胚乳发育中响应低氮胁迫的关键代谢通路和候选基因,从转录组水平揭示低氮胁迫对玉米胚乳基因表达的调控特征,为玉米低氮绿色生产提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

本研究以玉米自交系 B73 为供试材料,来源于江苏省农业科学院玉米种质创新团队自交保存。

1.2 试验处理

田间种植试验于 2022 年 4-8 月在江苏省农业科学院六合实验基地(32°12'N, 118°37'E)氮池进行。氮池土壤为低氮土壤,土壤氮含量仅为 0.76 g/kg,有效磷(P)为 26.5 mg/kg,有效钾(K)为 72.4 mg/kg,有机质为 12.8 g/kg。根据前期研究^[25],在玉米整个生育期中,足氮处理(SN, sufficient nitrogen treatment)的小区(1.5 m×2.0 m)施加(NH₄)₂SO₄为 240 kg/ha,氮肥施用分别在播前、8 叶期和 12 叶期施用,施用量分别为 70、100 和 70 kg/ha。低氮处理(DN, low nitrogen treatment)(1.5 m×2.0 m)小区施加(NH₄)₂SO₄为 60 kg/ha,缺氮处理氮肥在播前施用。在两种氮肥水平处理小区中磷肥和钾肥的施用量相同,均为基肥,施用 P₂O₅为 80 kg/ha、K₂O 为 80 kg/ha,12 叶期追施 P₂O₅为 55 kg/ha、K₂O 为 40 kg/ha。每种处理设置 3 个小区重复。待 B73 植株开花后,进行人工授粉,并记录授粉日期进行取样。

1.3 不同氮处理下玉米穗位叶、穗轴和胚乳部位氮积累量测定

在低氮和足氮处理下 2 个不同小区分别取长势一致的授粉第 6 天后的 B73 穗位叶、穗轴和胚乳,每个小区分别取 3 株各 2 g 等量混合成 1 个样品,每种氮处理取 3 次生物学重复。穗位叶、穗轴和胚乳样品 105 °C 烘箱中杀青 30 min,再 75 °C 烘干至恒重,研磨成粉末,过 60 目细筛。称取 50 mg 样品,利用凯氏定氮法测定样品总氮含量^[26]。

1.4 不同氮处理下玉米胚乳氨基酸及氨基酸衍生物含量测定

上述授粉后第 6 天玉米胚乳取样参考 Chen 等^[23]的方法,将每穗中部 5 行籽粒用手术刀取下,然后沿籽粒中部将种皮划开,用镊子将幼嫩胚乳挑出放入液氮中收集,3 个果穗幼嫩胚乳混合成 1 个样品,每种氮处理取 3 次生物学重复。每个样品取 50 mg 胚乳粉末,使用日本的全自动氨基酸分析仪 L-8800

(L-8800, Tokyo, Hitachi Instruments Engineering)测定玉米胚乳中各种氨基酸和氨基酸衍生物含量^[27]。每种氨基酸和氨基酸衍生物的标准品由 Sigma-Aldrich 公司提供。对两种氮水平处理下玉米穗位叶、穗轴和胚乳中氮积累量、胚乳氨基酸和氨基酸衍生物含量数据进行整理,采用 IBM SPSS 19.0 软件进行单因素方差(ANOVA)分析。

1.5 Illumina 转录组测序

分别对低氮和足氮水平处理下 2 个不同小区中长势一致授粉后第 6 天的 B73 果穗进行取样,每个小区取 3 穗。胚乳取样方法同 1.4,共计 6 个样品。委托安诺优达基因科技(北京)有限公司,利用 Illumina HiSeq 2000 测序平台进行转录组高通量测序分析。测序原始数据进行数据过滤,去除接头序列及低质量 Reads 获得高质量的 Clean reads。使用 Cufflinks^[28]方法,将每一样品 Clean reads 映射到参考玉米 *Zea_mays* B73_V4 基因组上^[29]。使用 DESeq 计算转录本的基因表达水平 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments)值^[30]。以 log₂|FC|>1 及 *q*-值<0.05 为标准筛选比较组中的差异表达基因(DEGs, differentially expressed genes)。对得到的差异表达基因进行 GO 富集分析(<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>)和 KEGG 代谢通路分析。采用 TBtools 软件绘制关键 KEGG 通路中差异表达基因的 FPKM 热图^[31]。

1.6 候选基因 qRT-PCR 分析

为验证转录组测序结果的可靠性,随机挑选参与氮代谢途径的 3 个差异表达基因、氨基氨基酸代谢途径的 2 个差异表达基因、淀粉和蔗糖代谢途径的 1 个差异表达基因及 4 个差异表达转录因子(1 个 *AP2/ERF-ERF*、1 个 *bZIP*、2 个 *WRKY*)进行 qRT-PCR 分析。首先用天根生化科技公司的植物总 RNA 提取试剂盒(DP452)提取低氮和足氮水平处理下 2 个不同小区中长势一致授粉后第 6 天的 B73 胚乳总 RNA,再将总 RNA 采用 cDNA 第一链合成试剂盒(TaKaRa)逆转录为 cDNA。采用 Primer 3.0 软件设计相应候选基因引物(表 1)。采用 SYBR qPCR Master Mix 进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 反应体系为:1.0 μL cDNA, 10.0 μL 2×SYBR qPCR Master Mix, 0.4 μL 引物, 8.6 μL ddH₂O。qRT-PCR 扩增程序为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 35 次循环。以玉米 *Zm00001d006438*(*ZmUPF1*; 正向引物序列为 5'-CACCCGGTTGGCTATGCTGTAC-3', 反向引物序列为 5'-TGTGCTCCACCAGAAGGC

TGAC-3')为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 定量法^[23]测定相应候选基因在两种氮水平处理下授粉后第6天的B73胚

乳中的相对表达量,并对相应这些候选基因的转录组数据及qRT-PCR数据进行皮尔逊相关性分析。

表1 用于qRT-PCR分析的10个候选基因信息及其引物序列

Table 1 Primers sequencing used for qRT-PCR analysis of ten candidate genes

基因ID Gene ID	编码蛋白 Encoded protein	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
Zm00001d002052	L-天冬酰胺酶/β-天冬氨酸胺酶 (ASRGL1)	GTGTCCGGCGTCTCCACCGTC	GATGAAGTAGCTGTTGTCCAC
Zm00001d046210	β-葡萄糖苷酶e (bglB)	CTGCTGTGGAAGCACGTCTC	TACTGGTCCGCAGCCACATC
Zm00001d033747	谷氨酰胺合成酶 (glnA)	ATGGCTCTGCTCTCCGACCTC	GTTCCACTTCGGAAGCTTGCT
Zm00001d028260	谷氨酰胺合成酶 (glnA)	ATGGCCAGCCTCACCGACCTC	GCTGGCTCGGGTCGGTGATG
Zm00001d011454	碳酸酐酶 (cynT)	TCCAGCGTCGTCGGTAGCCT	TCATACACCTCGGTCTTGAAC
Zm00001d010482	葡萄糖-6-磷酸异构酶 (PGI)	CACTGTCTTGCCCTCGACTC	CAAAGCAGACCCTCTGATTC
Zm00001d034457	bZIP转录因子	ATGCTCAAGCAGAAGCTGGAG	TTTGAAGTAGACTTCCAGTA
Zm00001d023332	WRKY转录因子	ATGCTCAAGCAGAAGCTGGAG	CTGGGGTACATGGCACCTTC
Zm00001d041740	WRKY转录因子	TCCTCGTTTCGCTGGCGCGTC	CCAGAGCCTGCTGGTGCGAC
Zm00001d020595	AP2/ERF-ERF转录因子	GAGGTTTGCCTTCGCCACCG	CTGATTCCCCTGTACTGGTTC

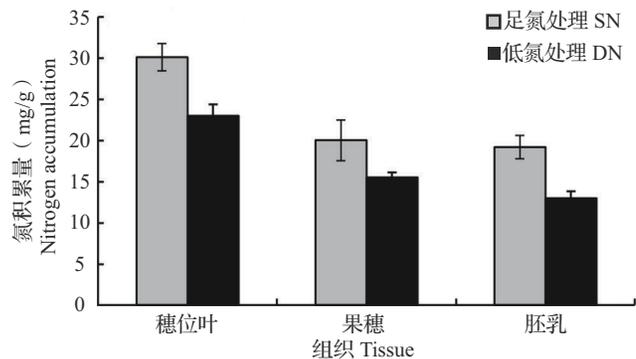
2 结果与分析

2.1 两种氮水平处理对玉米各组织氮积累量的影响

同一供氮处理下,玉米不同组织器官中氮积累量均表现为穗位叶>果穗>胚乳(图1)。说明玉米从土壤中吸收的氮素优先积累在穗位叶中,以维持叶片正常的生理功能。此外,与足氮处理相比,低氮处理下玉米穗位叶、果穗及胚乳中氮积累量均显著下降,其分别下降了23.6%、22.5%和32.4%。说明玉米叶片、果穗和胚乳均对低氮胁迫较为敏感,且胚乳中氮积累量下降程度最大,胚乳受低氮胁迫响应最为敏感。因此,研究低氮胁迫玉米早期胚乳的变化对玉米最终产量和品质形成具有重要意义。

2.2 两种氮水平处理对玉米胚乳氨基酸及氨基酸衍生物含量的影响

足氮处理下授粉后第6天的B73玉米胚乳中31种氨基酸及氨基酸衍生物含量均不尽相同,其介于2(β-氨基异丁酸)~6055(谷氨酰胺)μg/g,均值为515 μg/g,变异系数为217.6%(图2)。类似的是,低氮处理下授粉后第6天的B73玉米胚乳中这些氨基酸及氨基酸衍生物含量也不尽相同,其介于3(1-甲基-L-组氨酸)~3713(谷氨酰胺)μg/g,均值为367 μg/g,变异系数为194.0%(图2)。说明不同供氮处理对玉米胚乳中各种氨基酸及氨基酸衍生物含量的影



不同小写字母表示 $P < 0.05$ 水平差异显著;下同
SN: Sufficient nitrogen treatment; DN: Low nitrogen treatment;
Different lowercase letters indicated a significant difference
($P < 0.05$); The same as below

图1 两种氮水平处理下授粉后第6天玉米中各组织部位的氮积累量分析

Fig. 1 The nitrogen accumulation in various tissues of maize kernels at 6 days after pollination under two nitrogen treatments

响不同。进一步分析发现,低氮处理下授粉后第6天的B73玉米胚乳中10种氨基酸和氨基酸衍生物含量呈上升趋势,占测试氨基酸和氨基酸衍生物种类的32.3%,例如苏氨酸、β-氨基异丁酸、组氨酸和β-丙氨酸,其分别升高了153.1%、132.8%、113.4%、83.9%(图2);而授粉后第6天的B73胚乳中其余21种氨基酸和氨基酸衍生物含量在低氮处理下呈下降趋势,占测试氨基酸和氨基酸衍生物种类的67.7%,例如鸟氨酸、胱

氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸和 α -氨基丁酸,其分别降低了65.8%、59.7%、58.3%、55.1%和51.6%(图2)。说明低氮胁迫会抑制玉米胚乳中绝大多数种类氨

基酸和氨基酸衍生物的积累,低氮胁迫会促进少数种类氨基酸和氨基酸衍生物的积累。

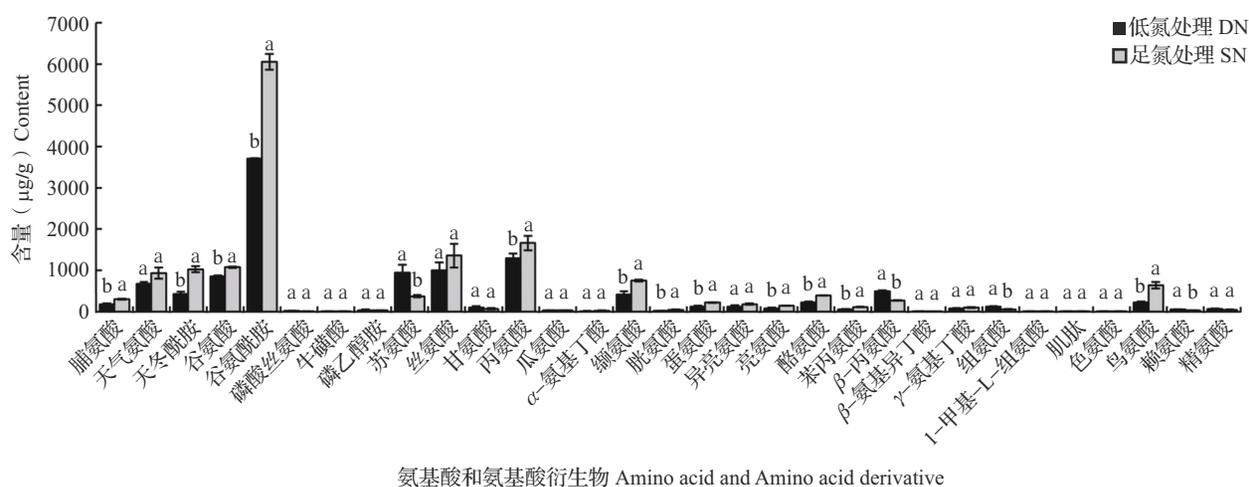


图2 两种氮水平处理下授粉后第6天玉米胚乳中31种氨基酸和氨基酸衍生物含量分析
Fig. 2 The contents of 31 amino acids and amino acid derivatives in maize endosperm at 6 days after pollination under two nitrogen treatments

2.3 两种氮水平处理下玉米胚乳转录组测序分析及差异表达基因鉴定

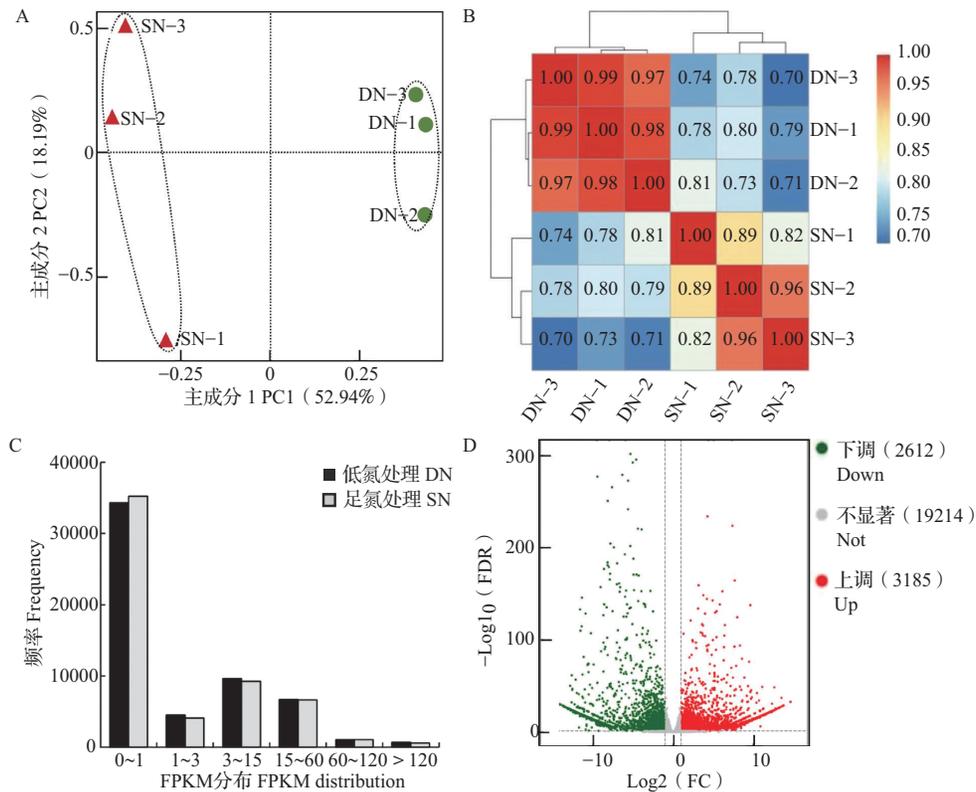
对低氮和足氮处理下授粉后第6天的B73玉米胚乳进行Illumina HiSeq 2000转录组测序。结果可知,低氮和足氮处理组过滤掉原始测序数据得到的平均Clean reads数分别为6663943800和6446564300,GC碱基百分比均在52%以上,Q20碱基百分比均在95%以上,Q30碱基百分比均在88%以上。说明转录组测序结果质量可靠。将Clean reads比对到玉米Zea mays B73_V4参考基因组,其比对率介于88.29%~96.40%。

进一步对转录本进行主成分分析,结果表明授粉后第6天的B73胚乳转录本可根据不同供氮处理明显分成2组(图3A),说明不同供氮处理下玉米胚乳中相应基因差异表达,进而调控了不同供氮水平下玉米胚乳表型及营养品质的积累。利用皮尔逊相关系数评估样品各个重复间的相关系数均高于0.8(图3B),说明测序数据的重复性较好,可用于后续生物信息学分析。根据每种氮处理下授粉后第6天的B73胚乳中基因的FPKM表达量水平(图3C),并以转录本中基因FPKM表达量大于0.01为标准,检测到共有25011个基因表达(图3D)。进一步以 $\log_2|FC|>1$ 及 q 值 <0.05 为差异表达基因的阈值,与足氮处理相比,低氮处理下授粉后第6天的B73胚乳中共识别到5797个差异表达基因,其中3185个基因显著上调表达,2612个基因显著下调表达,上

调基因数量明显多于下调基因数量(图3D),说明低氮胁迫会诱导多数基因显著上调表达。

2.4 低氮处理下玉米胚乳差异表达基因的GO和KEGG分析

为探究玉米胚乳低氮胁迫响应基因的功能,基于注释基因库对低氮处理下鉴定到的差异表达基因进行了GO和KEGG分析。结果表明,GO富集到细胞组分、分子功能和生物进程3大类49个分支中(图4A);其中富集到生物进程的差异表达基因有2626个参与细胞过程(Cellular process)、2429个参与代谢过程(Metabolic process)、1116个参与生物调节(Biological regulation)和1111个参与刺激反应(Response to stimulus)。将差异表达基因进行KEGG富集分析表明,排名前20的通路可分为3类,第1类代表细胞信号通路,包括30个差异表达基因参与的同源重组(Homologous recombination)和29个差异表达基因参与的错配修复(Mismatch repair);第2类主要涉及17个差异表达基因参与的昼夜节律(Circadian rhythm-plant)的生物周期节律调控;第3类代表生物合成与代谢途径,如12个差异表达基因参与的氮代谢过程(Nitrogen metabolism)、9个差异表达基因参与的氰基氨基酸代谢过程(Cyanoamine acid metabolism)、8个差异表达基因参与的组氨酸代谢(Histidine metabolism)过程、55个差异表达基因参与的苯丙氨酸生物合成(Phenylpropanoid biosynthesis)过程(图4B)。



A: 转录组数据的主成分分析; B: 样品基因表达量 Pearson 相关性分析; C: 样品基因表达 FPKM 分布; D: 样品差异表达基因火山图; -1, -2, -3 是三个不同重复; FDR: 错误发现率; FC: 差异倍数

A: Principal component analysis (PCA) of RNA-Sequencing data; B: Pearson correlation analysis of gene expression for all samples; C: FPKM distribution of gene expressions for all samples; D: Volcano plot of DEGs for all samples; -1, -2, and -3 are three different repetitions; FDR: False discovery rate; FC: Fold change

图3 两种氮水平处理下授粉后第6天玉米胚乳转录组数据分析

Fig. 3 RNA-Seq data analysis in maize endosperm at 6 days after pollination under two nitrogen treatments

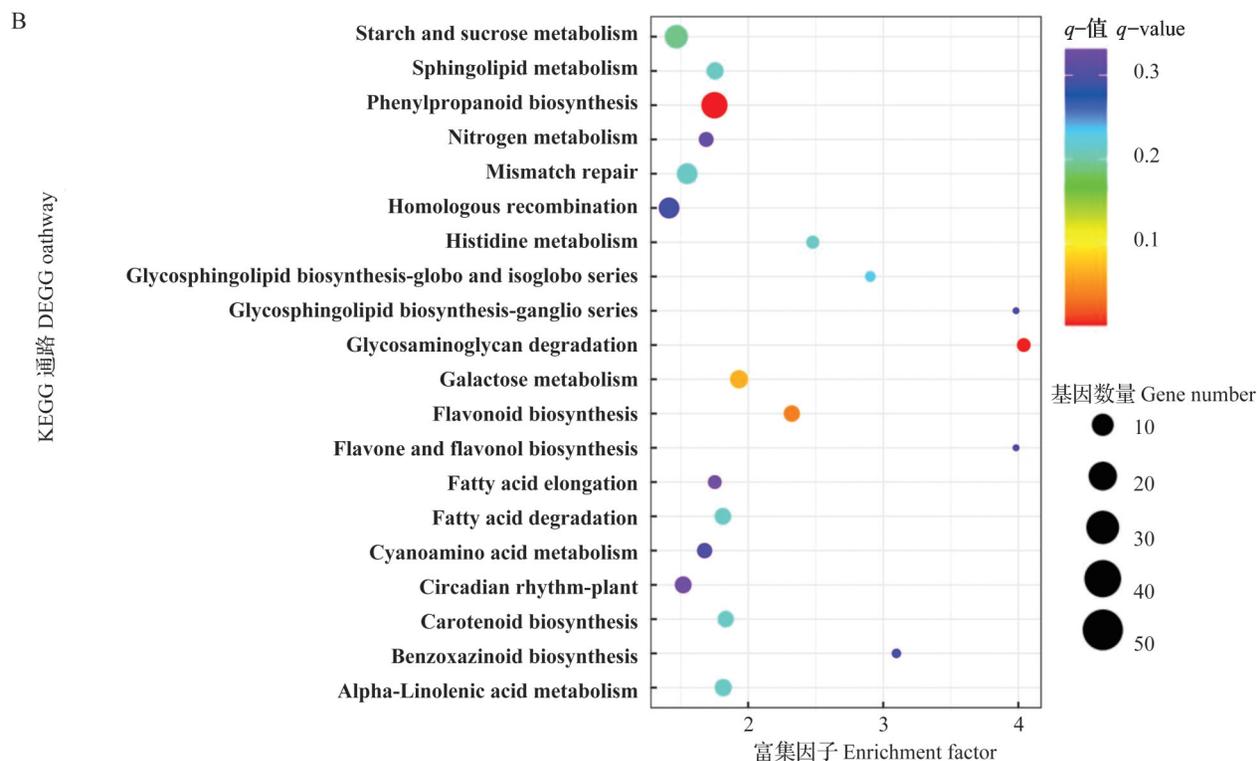
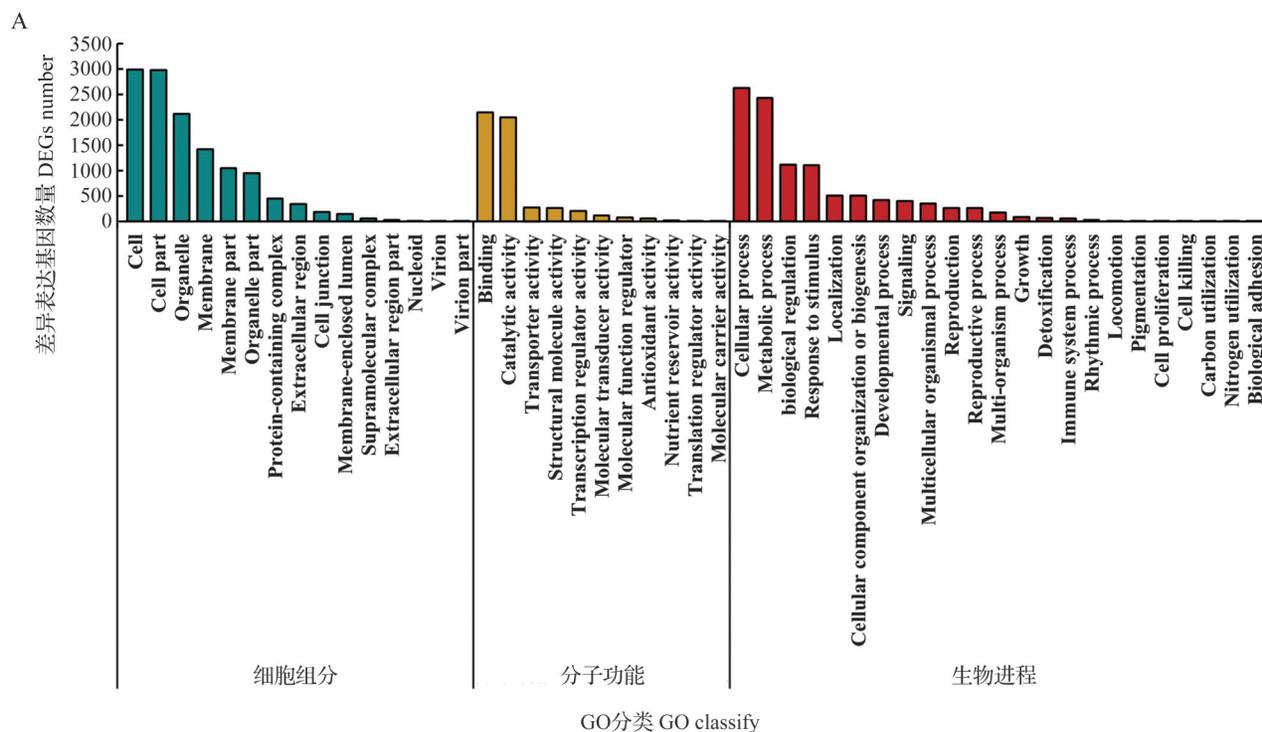
2.5 低氮处理下玉米胚乳氮代谢通路差异表达基因分析

氮代谢是植物体内最基础的代谢过程之一,主要参与氮素及氮素化合物的同化、转运和排出,对植物生长发育具有重要影响。与足氮处理相比,低氮处理下授粉后第6天的B73胚乳中鉴定到12个差异表达基因参与氮代谢途径,其中1个甲酰胺酶编码基因(Formamidase),即 *Zm00001d012706* 下降9.93倍;2个亚硝酸盐铁氧化还原酶编码基因(*nirA*),即 *Zm00001d018161*、*Zm00001d052164* 分别下调2.89和2.63倍;检测到4个碳酸酐酶编码基因(*cynT*),其中 *Zm00001d011454*、*Zm00001d044099*、*Zm00001d031778* 分别提高2.14、3.50、2.10倍, *Zm00001d003781* 下调2.75倍,其编码蛋白具有碳酸盐脱水酶活性(GO:0004089);1个NADP⁺谷氨酸脱氢酶编码基因(*gdhA*),即 *YM_newGene_8253* 上调9.62倍,2个谷氨酸合成酶编码基因(*GLT1*),即 *Zm00001d037175* 和 *Zm00001d038948* 分别下调6.95和1.26倍,2个谷氨酰胺合成酶编码基因(*glnA*),即 *Zm00001d033747*

上调1.55倍,而和 *Zm00001d028260* 下调3.20倍(图5)。

2.6 低氮处理下玉米胚乳氨基酸代谢通路差异表达基因分析

氨基酸是植物体内必需的生物活性分子,植物体内氨基酸会调控植物生长发育及抗逆响应等诸多方面。与足氮处理相比,低氮处理下授粉后第6天的B73胚乳中鉴定到9个差异表达基因参与氨基酸代谢途径,包括5个β-葡萄糖苷酶编码基因(*bgIB*),其中 *Zm00001d021119*、*Zm00001d024037*、*Zm00001d041776*、*Zm00001d041777* 分别上调1.44、1.36、3.46、4.23倍, *Zm00001d046210* 下调3.14倍;1个甲酰胺酶编码基因,即 *Zm00001d012706* 下调9.93倍;1个甘氨酸羟甲基转移酶编码基因(*glyA*),即 *YM_newGene_7173* 下调8.41倍;1个L-3-氰丙氨酸合成酶/半胱氨酸合成酶编码基因(*ATCYSC1*),即 *Zm00001d004413* 上调1.32倍;1个L-天冬酰胺酶/β-天冬氨酸胺酶编码基因(*ASRGL1*),即 *Zm00001d002052* 下调2.14倍(图6)。

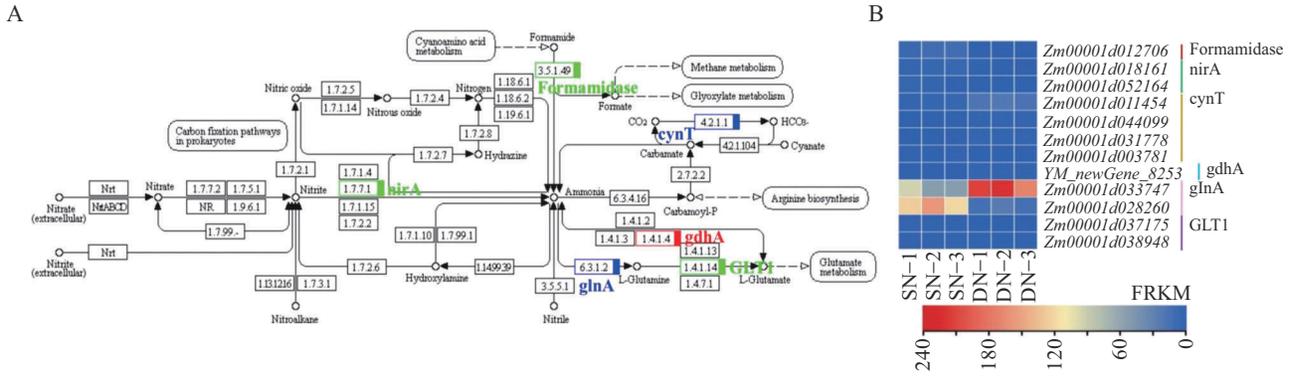


A: 差异表达基因的 GO 富集分析; B: 差异表达基因的 KEGG 通路分析

A: GO term enrichment analysis of differentially expressed genes; B: KEGG pathway analysis of differentially expressed genes

图 4 两种氮水平处理下授粉后第 6 天玉米胚乳差异表达基因的 GO 富集和 KEGG 通路分析

Fig. 4 GO term enrichment and KEGG pathway analyses of DEGs in maize endosperm at 6 days after pollination under two nitrogen treatments

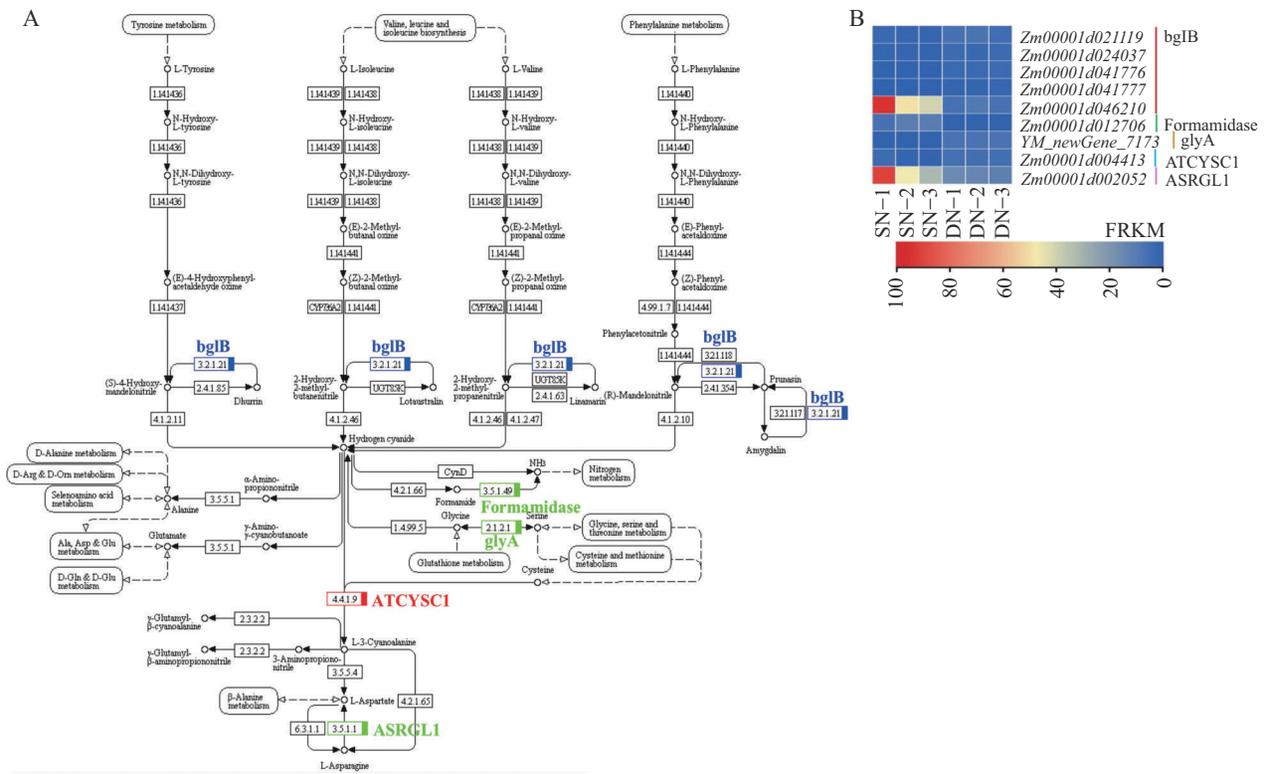


A: 氮代谢通路 (map00910); 圆圈表示其他分子化合物; 红色方框表示相应基因上调表达; 绿色方框表示相应基因下调表达; 蓝色方框表示相应基因上调或下调表达; 实心箭头表示化学反应; 虚线箭头表示简介反应; 下同; B: 氮代谢通路上相关差异表达基因的表达量

A: Nitrogen metabolism pathway (map00910); Circle indicated molecule; Red box indicated up-regulated genes; Green box indicated down-regulated genes; Blue box indicated up-regulated and down-regulated genes; Solid arrow indicated chemical reaction; Dotted arrow indicated indirect reaction; The same as below; B: Gene expression of DEGs involved in nitrogen metabolism pathway

图5 两种氮水平处理下授粉后第6天玉米胚乳氮代谢通路中差异表达基因挖掘

Fig. 5 Identification of DEGs for nitrogen metabolism pathway in maize endosperm at 6 days after pollination under two nitrogen treatments



A: 氨基酸代谢通路 (map00460); B: 氨基酸代谢通路上相关差异表达基因的基因表达量

A: Cyanoamino acid metabolism pathway (map00460); B: Gene expression of DEGs involved in cyanoamino acid metabolism pathway

图6 两种氮水平处理下授粉后第6天玉米胚乳氨基酸代谢通路中差异表达基因挖掘

Fig. 6 Identification of DEGs for cyanoamino acid metabolism pathway in maize endosperm at 6 days after pollination under different nitrogen treatments

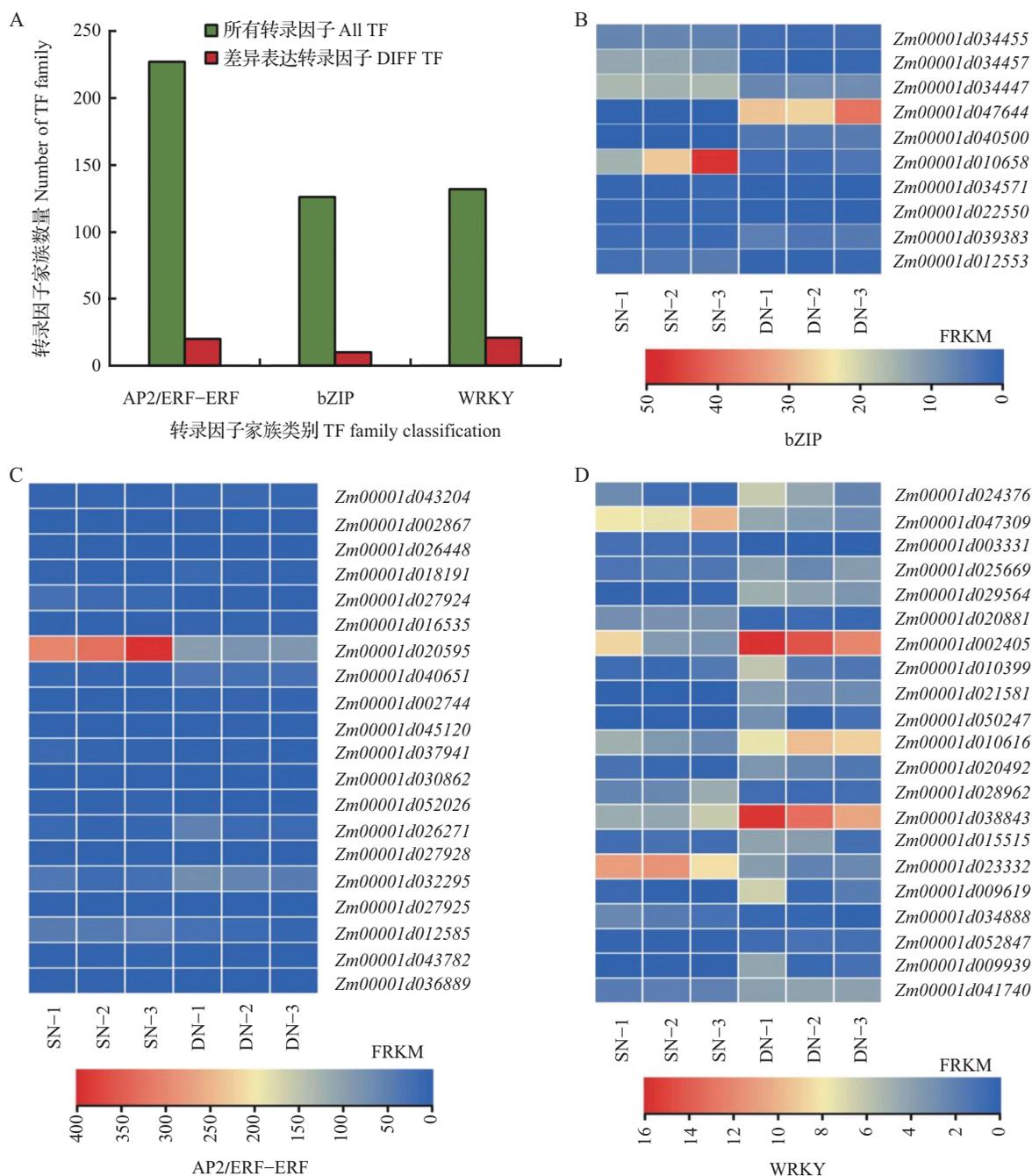
2.7 低氮处理下玉米胚乳差异表达转录因子分析

植物体内丰富的转录因子可通过激活或抑制目的基因表达,在植物调控生长发育及响应逆境胁迫反应中扮演着重要作用。与足氮处理相比,低氮

处理下 B73 胚乳中共检测到 20 个 AP2/ERF 差异表达转录因子,其中 10 个显著上调表达,上调 1.08~7.83 倍,10 个显著下调表达,下调 1.44~4.97 倍;10 个 bZIP 差异表达转录因子,其中 3 个显著上调表达,上

调 1.27~8.82 倍; 7 个显著下调表达, 下调 1.11~3.47 倍; 21 个 *WRKY* 差异表达转录因子, 其中 15 个显著上调表达, 上调 1.04~7.80 倍; 6 个显著下调表达, 下

调 1.30~4.02 倍, 这些转录因子差异表达可能与玉米胚乳响应氮水平有关(图 7)。



A: 3类转录因子家族基因统计; B: 差异表达 *bZIP* 转录因子基因的表达量; C: 差异表达 *AP2/ERF-ERF* 转录因子基因的表达量;

D: 差异表达 *WRKY* 转录因子基因的表达量

A: Statistics of three transcription factors (TFs) families; B: Expression levels of differentially expressed *bZIP* TF genes; C: Expression levels of differentially expressed *AP2/ERF-ERF* TF genes; D: Expression levels of differentially expressed *WRKY* TF genes

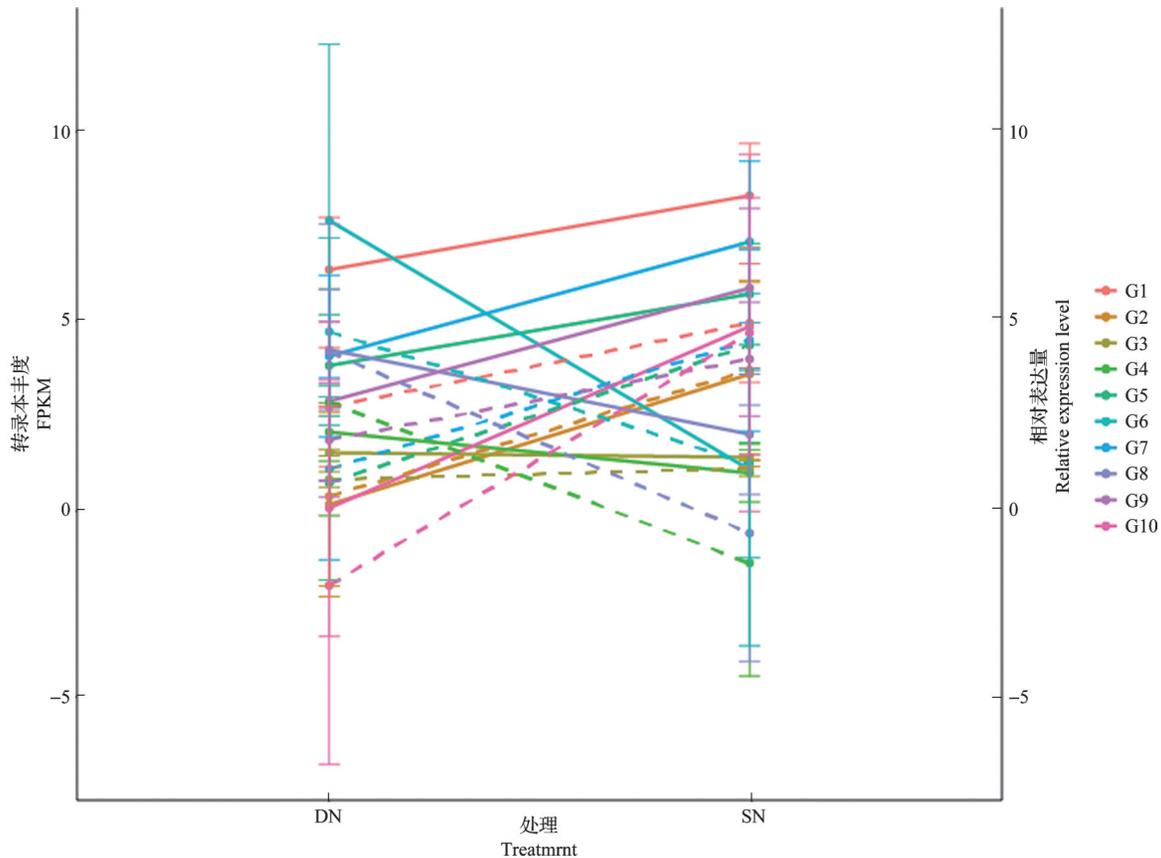
图 7 两种氮水平处理下授粉后第 6 天玉米胚乳中 3 类差异表达转录因子家族基因挖掘

Fig. 7 Identification of differentially expressed three transcription factors in maize endosperm at 6 days after pollination under two nitrogen treatments

2.8 候选基因 qRT-PCR 分析

为验证本研究转录组测序数据的可靠性,随机挑选了4个差异表达转录因子,包括 *Zm00001d020595* (*AP2/ERF-ERF*)、*Zm00001d034457* (*bZIP*)、*Zm00001d023332* (*WRKY*) 和 *Zm00001d041740* (*WRKY*); 2个氨基酸代谢途径差异表达基因,分别为 *Zm00001d002052* (*ASRGL1*)和 *Zm00001d046210* (*bglB*); 3个氮代谢途径差异表达基因,分别为

Zm00001d033747 (*glnA*)、*Zm00001d028260* (*glnA*)和 *Zm00001d011454* (*cynT*); 1个淀粉和蔗糖代谢途径差异表达基因,为 *Zm00001d010482* (*PGI*),对两种氮处理下授粉后第6天的B73胚乳进行qRT-PCR分析。结果表明,这些差异表达基因和差异表达转录因子的qRT-PCR相对表达量与其转录组分析的FPKM表达量结果高度一致(图8),说明本研究转录组测序结果可靠。



实线: FPKM; 虚线: qRT-PCR; G1: *Zm00001d020595*; G2: *Zm00001d034457*; G3: *Zm00001d023332*; G4: *Zm00001d041740*; G5: *Zm00001d002052*; G6: *Zm00001d033747*; G7: *Zm00001d028260*; G8: *Zm00001d011454*; G9: *Zm00001d046210*; G10: *Zm00001d010482*

Solid line: FPKM; Dotted line: qRT-PCR

图8 两种氮水平处理下授粉后第6天玉米胚乳差异表达基因的qRT-PCR与转录组分析比对

Fig. 8 qRT-PCR and transcriptome analysis of DEGs and in maize endosperm at 6 days after pollination under two nitrogen treatments

3 讨论

籽粒早期发育情况直接决定了玉米产量和品质形成,而氮素又是影响玉米籽粒发育的重要元素之一。挖掘早期发育的玉米胚乳响应低氮胁迫的关键基因,揭示玉米胚乳抵御低氮胁迫的生理响应及分子机制,并培育耐低氮能力的玉米新品种对于减少氮肥施用量、提高玉米产量和品质,最终对实现我国农业绿色生产具有重要意义。低氮胁迫时玉米形成了复杂的基因表达调控网络以抵御环境

压力带来的不利影响^[32]。本研究对低氮和足氮处理下授粉后第6天的B73玉米胚乳进行了转录组分析。与足氮处理相比,低氮处理下共鉴定到3185个显著上调差异表达基因,2612个显著下调差异表达基因。暗示这些差异表达基因在玉米胚乳响应低氮胁迫中起积极作用。进一步对这些差异表达基因的生物进程GO富集分析表明,细胞过程、代谢过程、生物调节和刺激反应起主要作用,其与这些差异表达基因的KEGG代谢通路分析结果相一致,即低氮处理下玉米胚乳中的差异表达基因显著富集

于基因的细胞信号、生物周期节律调控、生物合成与代谢等途径中,这为进一步挖掘玉米响应低氮胁迫的关键调控基因奠定了基础。

氮代谢能力是判断植物氨基酸与蛋白质合成、产量与品质形成的重要因素^[33]。植物氮代谢通路中,甲酰胺酶能催化甲酰胺转化为甲酸酯和氨,为植物提供氮源。缺磷处理下白羽扇豆(*Lupinus albus* L.)根中甲酰胺酶基因上调表达用于降解甲酰胺^[34],微生物中甲酰胺是组氨酸和氰化物的降解产物^[35]。本研究低氮处理下,授粉后第6天的B73玉米胚乳中1个甲酰胺酶基因 *Zm00001d012706* 显著下调表达;且生理分析还发现,低氮处理下授粉后第6天的B73玉米胚乳中组氨酸含量则升高了113.4%。推测甲酰胺酶在植物中不仅具有氰化物解毒作用^[36],还与组氨酸积累有关。亚硝酸盐铁氧化还原酶是植物氮代谢通路中的关键酶之一,其在光照、温度、氮水平刺激下可将亚硝酸盐催化还原为氨,产生的氨可直接利用并合成氨基酸^[33]。本研究发现,低氮处理显著抑制了B73玉米胚乳中 *Zm00001d018161* 和 *Zm00001d052164* 亚硝酸盐铁氧化还原酶基因表达,并通过一系列级联反应诱导玉米胚乳中精氨酸含量升高了42.7%。植物中存在大量的碳酸酐酶,其催化CO₂和HCO₃⁻的相互转化^[37]。之前相关研究已证实植物中的碳酸酐酶在干旱、高盐、高温、强光下普遍上调表达^[37],这与本研究结果相一致,结果显示检测到的3个和1个碳酸酐酶基因,其在低氮水平下的玉米胚乳中分别显著上调和下调表达。表明植物中碳酸酐酶是一种应激反应酶,其可能参与植物对各种逆境的响应。NADP⁺谷氨酸脱氢酶是氮代谢的中心酶,其能将氨转化为谷氨酰胺或将谷氨酸脱氨转化为 α -氧葡萄糖酸酯^[38]。Du等^[39]发现,低氮条件下,NADP⁺谷氨酸脱氢酶(*TrGDH*)转基因水稻(*Oryza sativa* L.)可通过促进氮同化来显著增大水稻的有效穗数、干重和单株粒重。本研究在低氮处理下检测到1个NADP⁺谷氨酸脱氢酶基因 *YM_newGene_8253* 在玉米胚乳中显著上调表达。谷氨酰胺合成酶是植物氮代谢通路中的另一关键酶,其关联氮素同化代谢与无机代谢,该酶活性强弱直接影响植物对氮的同化与循环^[33]。小麦中铵态氮通过谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合成酶途径被同化^[40],并转化成谷氨酰胺和谷氨酸,为植株有机氮化合物合成提供物质基础^[41]。植物中谷氨酸合成酶随供氮水平增加而升高^[42]。本研究低氮水平下玉米胚乳中2个谷氨酸合成酶基因

均显著下调表达,而2个谷氨酰胺合成酶基因,1个上调表达,另1个下调表达,且低氮胁迫下玉米胚乳中谷氨酸含量降低了20.7%。

授粉后第6天的玉米籽粒处于胚乳细胞分化增殖阶段,此阶段大量氨基酸不仅被用来合成籽粒建成相关酶,同时也是一些籽粒中重要碳氮化合物积累调控因子重要合成原料^[27]。因此,在低氮环境下胚乳中氨基酸含量发生显著变化不仅影响玉米籽粒早期正常发育,同时影响接下来的籽粒灌浆等过程。此外,氨基酸作为植物体内重要的生理活性物质,可通过改变其吸收、合成及降解代谢来减少植物受到的逆境胁迫的危害^[43]。前人采用蛋白组学测序揭示,玉米的抗旱性主要取决于淀粉和蔗糖代谢、萜类物质生物合成、氨基氨基酸代谢途径中的一些关键蛋白的差异积累^[44]。采用非靶向LC-MS代谢组学技术,重金属镉胁迫时芥菜(*Brassica juncea* (L.) Czern.)木质部汁液代谢谱分析表明,氨基酸生物合成和氨基氨基酸代谢中大部分差异代谢物均下调表达^[45]。采用RNA-Seq测序表明,野生大豆(*Glycine soja* Siebold & Zucc.)抵御低氮胁迫的关键代谢途径是增强根系中的氨基氨基酸、蛋氨酸和半胱氨酸代谢,其变化增强了叶片中的蛋氨酸、半胱氨酸和谷胱甘肽代谢^[46]。增氮处理下玉米籽粒中的各种氨基酸含量均有所升高,但不同类型玉米品种籽粒中各组分支氨基酸变化不同,例如高油15主要通过亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸含量的提高来增加氨基酸的水平,而掖单22依靠蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸含量来增强氨基酸积累^[47]。本研究低氮处理下,授粉后第6天的B73玉米胚乳中检测到9个差异表达基因参与氨基氨基酸代谢途径,即5个 β -葡糖苷酶差异表达基因、1个甲酰胺酶差异表达基因、1个甘氨酸羟甲基转移酶差异表达基因、1个L-3-氰丙氨酸合成酶/半胱氨酸合成酶差异表达基因和1个L-天冬酰胺酶/ β -天冬氨酸胺酶差异表达基因,这些基因差异表达使低氮处理下玉米胚乳中甘氨酸含量升高了42.7%,磷酸丝氨酸含量升高了11.5%,苏氨酸含量升高了153.1%,天冬酰胺含量下调了58.3%,天冬氨酸含量下调了27.2%。说明氨基氨基酸代谢途径是不同植物抵御各种逆境胁迫,特别是低氮胁迫的关键代谢通路。前人研究发现, γ -氨基丁酸能提高甜瓜(*Cucumis melo* L.)根系中硝酸还原酶活性,促进硝酸盐、Ca²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、K⁺的吸收,抑制Mn²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺的吸收^[48]。本研究低氮胁迫下玉米胚乳中 γ -氨基丁酸含量下降了24.6%。推测

玉米胚乳中 γ -氨基丁酸含量与胚乳中氮积累正相关。低氮胁迫下玉米幼苗的氮积累量显著下降,而其根系氮分配比例、氮素生理效率及脯氨酸含量显著升高^[49]。不同的是,本研究表明,低氮处理下玉米胚乳中脯氨酸含量下降了39.5%。这可能与低氮水平或玉米组织特异性有关。此外,低氮胁迫下玉米胚乳中其他种类氨基酸含量也会发生不同程度的变化,其可能也在玉米防御低氮胁迫应答中发挥重要功能,今后的研究中应深入探索这些氨基酸的作用机制。

以往研究已表明,不同类型的转录因子家族在植物响应低氮胁迫中发挥着重要作用^[46,50-53]。采用转录组测序表明,低氮水平下野生大豆叶片中*AP2/ERF-ERF*和*WRKY*转录因子均显著上调表达,其在野大豆抵御低氮胁迫过程中起调控作用^[46];小麦(*Triticum aestivum* L.)幼苗*TabZIP21*在缺氮胁迫时上调表达,推测其在小麦缺氮胁迫下被诱导表达,酵母单杂交点对点试验还筛选出该基因下游靶基因为*TaCLC-a-6AS-1*^[51]; *AP2-EREBP*转录因子在玉米突变体和野生型材料根系抵御低氮胁迫中发挥重要作用^[52]。4个烟草(*Nicotiana tabacum* L.)*NtWRKY65*转基因株系幼苗在低氮处理下,其干物质含量、根长、侧根数和总氮量均显著高于野生型材料,表现出明显的耐低氮能力^[53]。类似的是,本研究低氮处理下,授粉后第6天的B73玉米胚乳中检测到20个*AP2/ERF-ERF*、10个*bZIP*和21个*WRKY*差异表达转录因子,这些家族转录因子既有上调表达,也有下调表达,且这与前人的研究结果高度一致^[21-22]。表明这些转录因子在玉米响应低氮胁迫中其调控方式存在多样性。

总之,本研究对低氮处理下授粉后第6天的B73玉米胚乳进行了高通量转录组测序、31种氨基酸和氨基酸衍生物含量变化分析。低氮胁迫下玉米胚乳中10种氨基酸和氨基酸衍生物呈上升趋势,其余21种氨基酸和氨基酸衍生物呈下降趋势;初步揭示了响应低氮胁迫的基因调控特征,筛选得到其中差异表达的*AP2/ERF-ERF*、*bZIP*和*WRKY*转录因子及氮代谢、氨基氨基酸代谢通路中的差异表达基因。这些研究结果为玉米响应低氮胁迫的氨基酸生理功能奠定了基础,增加了对玉米胚乳早期发育响应低氮胁迫的认识。

参考文献

[1] Chen Q W, Mu X H, Chen F J, Yuan L, Mi G H. Dynamic

change of mineral nutrient content in different plant organs during the grain filling stage in maize grown under contrasting nitrogen supply. *European Journal of Agronomy*, 2016, 80: 137-153

- [2] The S V, Snyder R, Tegeder M. Targeting nitrogen metabolism and transport processes to improve plant nitrogen use efficiency. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 11:628366
- [3] Good A G, Shrawat A K, Muench D G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends in Plant Science*, 2004, 9(12):597-605
- [4] 葛敏,吕远大,张体付,周玲,林峰,赵涵. 玉米氮素敏感性差异自交系的表达谱分析. *作物学报*, 2016, 42(10):1487-1494
Ge M, Lv Y D, Zhang T F, Zhou L, Lin F, Zhao H. Global transcriptome analysis in high- and low-nitrogen responsive inbred lines of maize. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42(10): 1487-1494
- [5] Pandey A, Eldridge S M, Weatherley A, Willett I R, Myint A K, Oo A N, Ngwe K, Mang Z T, Chen D L. High fertilizer nitrogen input increases nitrogen mining in sandy paddy soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2023, 125:77-88
- [6] Liu Z, Hu C H, Wang Y N, Sha Y, Hao Z H, Chen F J, Yuan L X, Mi G H. Nitrogen allocation and remobilization contributing to low-nitrogen tolerance in stay-green maize. *Field Crop Research*, 2021, 263:108078
- [7] Kitonyo O M, Sadras V O, Zhou Y, Denton M D. Nitrogen supply and sink demand modulate the patterns of leaf senescence in maize. *Field Crop Research*, 2018, 225:92-103
- [8] Paponov I A, Engels C. Effect of nitrogen supply on leaf traits related to photosynthesis during grain filling in two maize genotypes with different N efficiency. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2003, 166(6):756-763
- [9] Laural E, Steven R, Matthijs T. The response of leaf photosynthesis and dry matter accumulation to nitrogen supply in an older and a newer maize hybrid. *Crop Science*, 2009, 48(2):656-665
- [10] DeBruin J L, Hemphill B, Schussler J R. Silk development and kernel set in maize as related to nitrogen stress. *Crop Science*, 58:2581-2592
- [11] Nasielski J, Earl H, Deen B. Which plant traits are most strongly related to post-silking nitrogen uptake in maize under water and/or nitrogen stress? *Journal of Plant Physiology*, 2020, 244:153059
- [12] 张学林,王群,赵亚丽,杨青华,李渤海. 施氮水平和收获时期对夏玉米产量和籽粒品质的影响. *应用生态学报*, 2010, 21(10):2565-2572
Zhang X L, Wang Q, Zhao Y L, Yang Q H, Li C H. Effects of nitrogen fertilization rate and harvest time on summer maize grain yield and its quality. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(10):2565-2572
- [13] 于宁宁,任佰朝,赵斌,刘鹏,张吉旺. 施氮量对夏玉米籽粒灌浆特性和营养品质的影响. *应用生态学报*, 2019, 30(11): 3771-3776

- Yu N N, Ren B C, Zhao B, Liu P, Zhang J W. Effects of nitrogen application rate on grain filling characteristics and nutritional quality of summer maize. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(11):3771-3776
- [14] 孟瑶,刘赵月,李晶,顾万荣,魏湜.施氮量对高密春玉米籽粒关键酶及产量品质的影响. *西南农业学报*, 2020, 33(6):1146-1152
- Meng Y, Liu Z Y, Li J, Gu W R, Wei S. Effects of nitrogen rate on grain yield and quality and key enzyme metabolism of spring maize under high density. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 33(6):1146-1152
- [15] Sabelli P A, Larkins B A. The development of endosperm in grasses. *Plant Physiology*, 2009, 149:14-26
- [16] Wang R F, Zhong Y T, Liu X T, Zhao C, Zhao J Y, Li M F, Hassan M U, Yang B, Li D D, Liu R Y, Li X X. Cis-regulation of the amino acid transporter genes *ZmAAP2* and *ZmLHT1* by *ZmPHR1* transcription factors in maize ear under phosphate limitation. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(10):3846-3863
- [17] Leroux B M, Goodyke A J, Schumacher K I, Abbott C P, Clore A M, Yadegari R, Larkins B A, Dannenhoffer J M. Maize early endosperm growth and development: From fertilization through cell type differentiation. *American Journal Botany*, 2014, 101(8):1259-1274
- [18] Dai D W, Ma Z Y, Song R T. Maize endosperm development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(4):613-627
- [19] Seebauer, J R, Singletary G W, Krumpelman P M, Ruffo M L, Below F E. Relationship of source and sink in determining kernel composition of maize. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(2):511-519
- [20] Xin M M, Yang R L, Li G S, Chen H, Laurie J, Ma C, Wang D F, Yao Y Y, Larkins B A, Sun Q X, Yadegari R, Wang X F, Ni Z F. Dynamic expression of imprinted genes associates with maternally controlled nutrient allocation during maize endosperm development. *Plant Cell*, 2013, 25(9):3212-3227
- [21] Li G S, Wang D F, Yang R L, Logan K, Chen H, Zhang S S, Skaggs M I, Lloyd A, Burnett W J, Laurie J D, Hunter B G, Dannenhoffer J M, Larkins B A, Drews G N, Wang X F, Yadegari R. Temporal patterns of gene expression in developing maize endosperm identified through transcriptome sequencing. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(21):7582-7587
- [22] Zhan J, Thakare D, Ma C, Lloyd A, Nixon N M, Arakaki A M, Burnett W J, Logan K O, Wang D, Wang X, Drews G N, Yadegari R. RNA sequencing of laser-capture micro dissected compartments of the maize kernel identifies regulatory modules associated with endosperm cell differentiation. *Plant Cell*, 2015, 27:513-531
- [23] Chen J, Zeng B, Zhang M, Xie S J, Wang G K, Hauck A, Lai J S. Dynamic transcriptome landscape of maize embryo and endosperm development. *Plant Physiology*, 2014, 166:252-264
- [24] Yi F, Gu W, Chen J, Song N, Gao X, Zhang X B, Zhou Y S, Ma X X, Song W B, Zhao H M, Esteban E, Pasha A, Provart N J, Lai J S. High temporal-resolution transcriptome landscape of early maize seed development. *Plant Cell*, 2019, 31(5):974-992
- [25] Ning L, Wang Y, Shi X, Zhou L, Ge M, Liang S, Wu Y, Zhang T, Zhao H. Nitrogen-dependent binding of the transcription factor PBF1 contributes to the balance of protein and carbohydrate storage in maize endosperm. *Plant Cell*, 2023, 35:409-434
- [26] 石习,宁丽华,葛敏,郭奇,赵涵.玉米氮状况相关生物标记物的筛选和应用. *中国农业科学*, 2022, 55(3):438-450
- Shi X, Ning L H, Ge M, Wu Q, Zhao H. Screening and application of biomarkers related to maize nitrogen status. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(3):438-450
- [27] Deng M, Li D Q, Luo J Y, Xiao Y J, Liu H J, Pan Q C, Zhang X H, Jin M L, Zhao M C, Yan J B. The genetic architecture of amino acids dissection by association and linkage analysis in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15:1250-1263
- [28] 贾思年,魏倩涵,苗蓉,彭云玲,刘允军.玉米愈伤组织形成的转录组分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(4):1151-1160
- Jia S N, Wei Q H, Miao R, Peng Y L, Liu Y J. Transcriptome analysis of maize embryonic calli. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(4):1151-1160
- [29] Jiao Y, Peluso P, Shi J, Liang T, Stitzer M C, Wang B, Campbell M S, Stein J C, Wei X, Chin C S, Guill K, Regulski M, Olson A, Gent J, Schneider K L, Wolfgruber T K, May M R, Springer N M, Antoniou E, McCombie R, Presting G G, McMullen M, Ross-Ibarra J, Dawe K, Hastie A, Rank D R, Ware D. Improved maize reference genome with single-molecule technologies. *Nature*, 2017, 546:524-527
- [30] Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley D R, Pimentel H, Salzberg S L, Rinn J L, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-Seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 2012, 7(3):562-578
- [31] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13(8):1194-1202
- [32] Liu Z H, Xie H L, Tian G W, Chen S J, Wang C L, Hu Y M, Tang J H. QTL mapping of nutrient components in maize kernels under low nitrogen conditions. *Plant Breeding*, 2008, 127(3):279-285
- [33] 田润.施氮量对不同马铃薯品种生长发育及氮代谢的影响. 哈尔滨:东北农业大学, 2016
- Tian X. N application effects on growth and nitrogen metabolism of different potato cultivars. Harbin: Dongbei Agricultural University, 2016
- [34] Rath M, Salas J, Parhy B, Norton R, Menakuru H, Sommerhalter M, Hatlstad G, Kwon J, Allan D L, Vance C P, Uhde-Stone C. Identification of genes induced in proteoid roots of white lupin under nitrogen and phosphorus deprivation, with functional characterization of a formamidase.

- Plant and Soil, 2010, 334:137-150
- [35] Kunz D, Wang C, Chen J. Alternative routes of enzymic cyanide metabolism in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Microbiology*, 1994, 140(7):1705-1712
- [36] Fraser J, Davis M, Hynes M. The formamidase gene of *Aspergillus nidulans* regulation by nitrogen metabolite repression and transcriptional interference by an overlapping upstream gene. *Genetics*, 2001, 157(1):119-131
- [37] Polishchuk O V. Stress-related changes in the expression and activity of plant carbonic anhydrases. *Planta*, 2021, 253(2):58
- [38] Tang D D, Jiao Z X, Zhang Q F, Liu M Y, Ruan J Y. Glutamate dehydrogenase isogenes CsGDHs cooperate with glutamine synthetase isogenes CsGSs to assimilate ammonium in tea plant (*Camellia sinensis* L.), *Plant Science*, 2021, 312: 111031
- [39] Du C Q, Lin J Z, Dong L A, Liu C, Tang D Y, Yan L, Chen M D, Liu S, Liu X M. Overexpression of an NADP(H)-dependent glutamate dehydrogenase gene, TrGDH, from *Trichurus* improves nitrogen assimilation, growth status and grain weight per plant in rice. *Breeding Science*, 2019, 69(3): 429-438
- [40] 王月福, 于振文. 氮素营养水平对冬小麦氮代谢关键酶活性变化和籽粒蛋白质含量的影响. *作物学报*, 2002, 28(6): 743-748
- Wang Y F, Yu Z W. Effect of nitrogen on the change of key enzyme activity during the nitrogen metabolism and kernel protein content in winter wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2002, 28(6):743-748
- [41] Melo P M, Lima L M, Santos I M, Carvalho H G, Cullimore J V. Expression of the plastid-located glutamine synthetase of medicago truncatule. Accumulation of the precursor in root nodules reveals an in vivo control at the level of protein import into plastids. *Plant Physiology*, 2003, 132(1):390-399
- [42] 滕祥勇. 甜菜谷氨酸合成酶(GOGAT)酶学特性及氮素对其酶活性的调控. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012
- Teng X Y. Enzymological characteristics of glutamate synthase and nitrogen regulation on the enzyme activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Harbin: Dongbei Agricultural University, 2012
- [43] 邢芳芳, 高明夫, 周传志, 徐春英, 范玲超. 氨基酸与植物抗逆性关系的研究进展. *黑龙江农业科学*, 2018 (3):150-154
- Xing F F, Gao M F, Zhou C Z, Xu C Y, Fan L C. Advances in the relationship between amino acid and plant stress resistance. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2018 (3) : 150-154
- [44] Yang Y T, Dong A Y, Zenda T S, Liu S T, Liu X Y, Wang Y F, Li J, Duan H J. DIA (Data independent acquisition) proteomic based study on maize filling-kernel stage drought stress-responsive proteins and metabolic pathways. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2020, 34(1): 1198-1214
- [45] Yang Z, Tan P P, Huang Z H, Sun Z Z, Liu Z X, Liu L L, Zeng C Z, Tong J H, Yan M L. Metabolic profiles in the xylem sap of *Brassica juncea* exposed to cadmium. *Physiologia Plantarum*, 2023, 175(2):e13886
- [46] 李明霞, 周际, 胡勇军, 韩德复, 郭继勋, 李淑英, 张涛, 石连旋. 低氮胁迫下栽培大豆和野大豆幼苗适应性转录组比较研究. *东北师大学报*, 2023, 55(2):116-125
- Li M X, Zhou J, Hu Y J, Han D F, Guo J X, Li S Y, Zhang T, Shi L X. Comparative study on the adaptable transcriptomics of cultivated and wild soybean seedling under low nitrogen stress. *Journal of Northeast Normal University*, 2023, 55(2) : 116-125
- [47] 张智猛, 戴良香, 胡昌浩, 董树亭, 王空军. 氮素对不同类型玉米籽粒氨基酸、蛋白质含量及其组分变化的影响. *西北植物学报*, 2005, 25(7):1415-1420
- Zhang Z M, Dai L X, Hu C H, Dong S T, Wang K J. Effect of nitrogen on amino acid and protein and protein component contents in the grains of different types of maize. *Acta Botanica Borealis-Occidentalia Sinica*, 2005, 25(7):1415-1420
- [48] 宋锁玲, 李敬蕊, 高洪波, 李青云, 杨丽文, 弓瑞娟. γ -氨基丁酸对低氧胁迫下甜瓜幼苗氮代谢及矿质元素含量的影响. *园艺学报*, 2012, 39(4):695-704
- Song S L, Li J R, Gao H B, Li Q Y, Yang L W, Gong R J. Effects of exogenous γ -aminobutyric acid on inorganic nitrogen metabolism and mineral elements contents of melon seedling under hypoxia stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(4) : 695-704
- [49] 李强, 罗岩宏, 龙文靖, 孔凡磊, 杨世民, 袁继超. 低氮胁迫对不同耐低氮性玉米品种苗期生长和生理特性的影响. *草业学报*, 2014, 23(4):204-212
- Li Q, Luo Y H, Long W J, Kong F L, Yang S M, Yuan J C. Effect of low nitrogen stress on different low nitrogen tolerance maize cultivars seedling stage growth and physiological characteristics. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23 (4) : 204-212
- [50] 朱振兴, 李丹, 陆晓春. 高粱缺氮特异诱导基因 *SbMYB-like* 克隆及功能分析. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(1):252-260
- Zhu Z X, Li D, Lu X C. Cloning and functional analysis of nitrogen deficiency induced gene *SbMYB-like* in sorghum. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(1):252-260
- [51] 窦威. 小麦转录因子 TabZIP21 响应低氮胁迫的功能研究. 郑州: 河南农业大学, 2023
- Dou W. Transcription factor TabZIP21 in response to nitrogen deficiency stress in wheat. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2023
- [52] He X J, Ma H X, Zhao X W, Nie S J, Li Y H, Zhang Z M, Shen Y O, Chen Q, Lu Y L, Lan H, Zhou S F, Gao S B, Pan G T, Lin H J. Comparative RNA-Seq analysis reveals that regulatory network of maize root development controls the expression of genes in response to N stress. *PLoS ONE*, 2016, 11(3):e0151697
- [53] 贾振宇. 烟草转录因子 NtWRKY65 在干旱和低氮胁迫中的功能研究. 郑州: 河南农业大学, 2022
- Jia Z Y. Function of tobacco transcription factor NtWRKY65 iunder drought and low nitrogen stress. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2022