

核桃铵态氮转运蛋白基因 *JrAMT2* 的功能分析

凡婷婷^{1,2}, 张佳琦², 刘会君², 王凤敏^{1,2}, 马宇航^{1,2}, 吴宇伟², 胡恒康²,
黄有军^{1,2}, 李岩², 王克涛², 黄坚钦², 张启香^{1,2}

(1. 浙江农林大学 浙江省森林芳香植物康养功能研究重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】研究高效利用氮素基因铵态氮转运蛋白基因 *JrAMT2*, 对核桃 *Juglans regia* 的品种改良、快速生长及产量形成有重要意义。【方法】以核桃 *JrAMT2* 过表达幼苗为实验材料, 对 *JrAMT2* 基因进行生物信息学分析。通过基因表达量和表型测定对核桃 *JrAMT2* 过表达植株生长发育、氮素吸收、叶绿素质量分数、叶绿素荧光进行理化分析。【结果】*JrAMT2* 基因在核桃 *JrAMT2* 过表达植株中稳定表达。与野生型相比, 核桃 *JrAMT2* 过表达株系的株高、节间长、生物量等生长参数显著提高 ($P < 0.05$), 核桃幼苗的株高、节间长增加, 最高可增加 68.2% 和 50.3%, 植株地上部分、地下部分生物量显著增加, 地上部分最高可增加 56.26% (鲜质量) 和 56.26% (干质量), 地下部分最高可增加 344.38% (鲜质量) 和 354.33% (干质量); 核桃 *JrAMT2* 过表达株系地下部分对铵态氮及硝态氮的吸收显著提高 ($P < 0.05$), 最高可提高 114.1% 和 70.3%, 其中 *JrAMT2* 基因介导了铵态氮从地下部分到地上部分的运输, 地上部分铵态氮质量分数显著增加 ($P < 0.05$), 最高可增加 59.1%; 核桃 *JrAMT2* 过表达植株叶绿体表面积与单层细胞表面积比率、叶绿素质量分数显著增加 ($P < 0.05$), 最高可增加 22.94% 和 74.3%; 对叶绿素荧光参数分析, 核桃 *JrAMT2* 过表达植株叶片放氧复活体活性、量子产额、电子传递效率均显著提高 ($P < 0.05$)。【结论】核桃 *JrAMT2* 基因在核桃幼苗生长发育、氮素吸收和光合作用中均有积极显著调控的作用, 为进一步研究核桃快速繁育提供一定的理论依据, 且为筛选优良品种奠定一定基础。图 9 表 2 参 41

关键词: 核桃; *JrAMT2*; 铵态氮转运蛋白; 过表达; 光合作用

中图分类号: S722.3; Q781 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2024)01-0079-13

Functional analysis of ammonium nitrogen transporter gene *JrAMT2* in *Juglans regia*

FAN Tingting^{1,2}, ZHANG Jiaqi², LIU Huijun², WANG Fengmin^{1,2}, MA Yuhang^{1,2}, WU Yuwei², HU Heng kang²,
HUANG Youjun^{1,2}, LI Yan², WANG Ketao², HUANG Jianqin², ZHANG Qixiang^{1,2}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Forest Aromatic Plants-based Healthcare Functions, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The objective is to study the efficient utilization of nitrogen genes and the ammonium nitrogen transporter protein *JrAMT2* gene, which is of great significance for variety improvement, rapid growth, and yield of *Juglans regia*. [Method] Using *J. regia* *JrAMT2* overexpression (OE) seedlings as experimental

收稿日期: 2023-05-10; 修回日期: 2023-09-19

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2021C02037); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2021C02066-12); 国家自然科学基金资助项目 (31971672, 32171815, 32101557); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY18C150002); 浙江农林大学校级学生科研训练项目 (S202210341173)

作者简介: 凡婷婷 (ORCID: 0009-0009-3643-6029), 从事果树分子生物学研究。E-mail: 1270804657@qq.com。通信作者: 张启香 (ORCID: 0000-0002-6657-5101), 教授, 博士生导师, 从事植物发育分子生物学研究。E-mail: qxzhang@zafu.edu.cn

materials, bioinformatics analysis was conducted on *JrAMT2* gene. The growth and development, nitrogen absorption, chlorophyll content, and chlorophyll fluorescence of *J. regia JrAMT2-OE* plants were analyzed through gene expression level and phenotype determination. [Result] Fluorescence detection, polymerase chain reaction, and fluorescence quantitative PCR were performed on *J. regia JrAMT2-OE* plants to verify that the *JrAMT2* gene is stably expressed in *J. regia JrAMT2-OE* plants. Compared with the wild type, the plant height, internode length, biomass and other growth parameters of *JrAMT2-OE* lines significantly increased, and the plant height and internode length of *J. regia* seedlings increased by 68.2% and 50.3%. The aboveground and underground biomass of *JrAMT2-OE* lines increased significantly, with a maximum increase of 56.26% (fresh weight) and 56.26% (dry weight) in the aboveground parts, and a maximum increase of 344.38% (fresh weight) and 354.33% (dry weight) in the underground parts. The uptake of ammonium nitrogen and nitrate nitrogen in the underground part of *J. regia JrAMT2-OE* significantly increased by 114.1% and 70.3% respectively. The *JrAMT2* gene mediated the transport of ammonium nitrogen from the underground part to the aboveground part, and the content of ammonium nitrogen in the aboveground part increased significantly, up to 59.1%. The ratio of chloroplast surface area to monolayer cell surface area and chlorophyll content of *JrAMT2-OE* increased significantly, with the highest increase of 22.94% and 74.3%. The analysis of chlorophyll fluorescence parameters showed that the activity, quantum yield and electron transfer efficiency of the oxygen-reactive body in the leaves of *J. regia JrAMT2-OE* plants significantly improved. [Conclusion] The *JrAMT2* gene of *J. regia* plays a significant role in the growth and development, nitrogen absorption and photosynthesis of *J. regia* seedlings. [Ch, 9 fig. 2 tab. 41 ref.]

Key words: *Juglans regia*; *JrAMT2*; ammonium nitrogen transporter protein; overexpression; photosynthesis

核桃 *Juglans regia* 为胡桃科 Juglandaceae 胡桃属 *Juglans* 植物^[1], 其种仁含油量高, 有“木本油料之王”的称号^[2]。同时, 核桃木材坚实, 是良好的硬木材料。作为重要的经济林树种, 核桃大多种植于土壤贫瘠的山坡沟坎, 不与粮争地^[3]。然而, 核桃树体高大, 与其他果树相比对矿质营养元素需求量较高, 大量元素与核桃产量和品质形成紧密相关^[4], 因此, 提高核桃树体对矿质元素的吸收能力对于提高核桃产量和品质至关重要^[5]。研究表明: 在核桃树各器官中种仁的氮素质量分数最高, 核桃树吸收累积的矿质营养元素中氮素被商品核桃(种仁、硬壳)携走的比例也最高, 叶片次之^[6]。可见, 氮素可能是提高核桃产量和品质的关键营养元素。然而, 过量施用氮肥会导致严重的环境问题, 因此, 提高氮素利用效率是提高核桃产量与品质的重中之重^[7]。

土壤中氮素主要分为无机氮和有机氮两大类, 植物根系能够吸收利用的主要是无机氮, 主要以硝态氮和铵态氮形式存在^[8-9]。植物根系对无机氮转运调节途径可分为2种, 即高亲和力(HATs)和低亲和力(LATs)的氮转运系统^[10], HATs在外部铵态氮(NH_4^+)、硝态氮(NO_3^-)浓度低于 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时介导吸收大部分的无机氮, 而LATs则是在 NH_4^+ 、 NO_3^- 浓度高于 0.5 或 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时介导吸收无机氮^[10]。植物对铵态氮和硝态氮的吸收主要由铵转运蛋白和硝酸转运蛋白介导。土壤中同时含有植物可吸收利用的硝态氮和铵态氮时, 由于植物吸收硝态氮需要先将其还原成铵态氮后才能进行同化利用, 消耗的能量更多, 所以植物对铵态氮表现出明显的偏好性, 而且当植物受盐胁迫及活性氧的伤害时, 铵态氮具有缓解作用, 因此, 介导植物对铵态氮吸收的铵转运蛋白在植物氮同化中起着重要作用^[11]。铵转运蛋白基因主要有两大类族, 分为AMT1和AMT2。在已知的铵转运蛋白中大部分AMT1家族的转运蛋白属于高亲和转运体^[12], 如拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中有6个编码铵转运蛋白被鉴定, 包括5个AMT1家族基因, 1个AMT2家族基因。AMT1家族基因中, *AtAMT1.1*和*AtAMT1.3*对拟南芥根系铵态氮吸收的贡献率最高, 为30%, *AtAMT1.2*、*AtAMT1.5*对拟南芥根系高亲和铵态氮吸收的贡献率略低于*AtAMT1.1*和*AtAMT1.3*^[13], *AtAMT1.4*在花粉中特异性表达^[14], 在水稻 *Oryza sativa* 铵转运蛋白基因家族中AMT1家族

有基因 3 个, 其中 *OsAMT1.1* 和 *OsAMT1.2* 为高亲和力转运体^[15]; 而 AMT2 家族以低亲和为主, 在拟南芥 AMT2 家族基因中 *AtAMT2.1* 在低亲和范围内适度促进拟南芥根系对铵态氮吸收, 主要在铵从根部到地上部运输中发挥作用^[16]。AMT2 型蛋白通常在植物的不同组织中包括根、芽和叶中都有表达, 如 *AtAMT2.1* 基因在拟南芥各器官中均有表达, 主要表达在拟南芥的维管束及上皮层^[17], 在拟南芥中 *AtAMT2.1* 与 *AtAMT1s* 之间还存在协同作用。此外, 毛果杨 *Populus trichocarpa* *PtAMT2.1* 主要在叶片中, *PtAMT2.2* 在叶柄中高表达。除此之外, 玉米 *Zea mays*^[18]、番茄 *Lycopersicon esculentum*^[19]、欧洲油菜 *Brassica napus*^[20] 等高等作物均鉴别出了 AMT 基因, 但到目前为止, 研究大多集中于高亲和的铵转运蛋白 AMT1 基因家族, 对低亲和的铵转运蛋白 AMT2 基因家族的研究较少。因此, 阐明 AMT2 的生物学功能和调控机制, 对于提高核桃自身的氮效率和提高肥料利用效率都具有重要意义。

本研究以核桃 *JrAMT2* 过表达株系为供试材料, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 及生理检测的方法鉴定 *JrAMT2* 基因在核桃植株体内的表达模式, 进一步对核桃 *JrAMT2* 基因进行生物学功能分析, 为核桃优良品种选育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

实验材料来自浙江农林大学省部共建亚热带森林培育国家重点实验室保存的核桃野生型 (WT) 以及课题组 2019 年获得的核桃 *JrAMT2* 过表达阳性植株^[21], 其中 *JrAMT2* 基因构建于 PCMBIA1300 植物表达载体, 载体抗性为卡那霉素 (kanmycin, Kan), 利用根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3103 菌株介导将构建好的 35S::*JrAMT2*::GFP 过表达载体转化到核桃野生型体细胞胚中, 植物筛选标记为潮霉素 (hygromycin, Hyg)。本研究所用核桃组培苗为野生型体胚和 *JrAMT2* 过表达阳性体胚经脱水萌发获得, 温室苗则由上述组培苗经生根、炼苗、驯化获得。

1.2 实验方法

1.2.1 生物信息分析运用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 网站在线分析 *JrAMT2* 蛋白质二级结构, 运用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 在线软件对 *JrAMT2* 蛋白进行跨膜结构域的预测, 通过 GSDS(<http://gsds.gao-lab.org/>) 软件在线分析 *JrAMT2* 基因结构。

1.2.2 植株的培养 同一 *JrAMT2* 过表达阳性体胚萌出的植株为 1 个株系, 选取 3 个核桃 *JrAMT2* 阳性株系, 命名为 *JrAMT2*-1、*JrAMT2*-2、*JrAMT2*-3, 每个株系继代培养至 50 株以上, 培养条件: 温度为 25 °C, 湿度为 75%~80%, 光照强度为 2~15 klx, 光照周期为 16 h 光照 8 h 黑暗, 培养基为 Driver&Kunivuki&McGranahan (DKW) 培养基。

采用 2 步生根法获得核桃驯化植株, 选取阳性体胚萌发后经 4 次继代培养的核桃组培苗作为实验材料。第 1 步进行根诱导, 5~8 cm 长的光生芽, 转移到补充有 10 mg·L⁻¹ 吲哚丁酸钾 (K-IBA) 的 DKW 固体培养基, 在黑暗中培养 7 d, 诱导根原基的发生; 第 2 步, 不定根诱导结束后将其转移到粗蛭石: DKW 培养基比例 (体积比) 为 3:2 的固体培养基中, 温度为 25 °C, 湿度为 75%~80%, 光照强度为 2~15 klx, 光照周期为 16 h 光照 8 h 黑暗, 培养时间为 21~28 d, 形成不定根, 获得核桃不同株系生根植株^[22]。

核桃苗不定根形成后取出用清水冲洗, 多菌灵浸泡, 移栽到泥炭:蛭石:珍珠岩比例 (体积比) 为 2:1:1 的混合土中, 将移栽驯化成活后获得的核桃再生植株在温度为 25 °C, 湿度为 75%~80%, 光照强度为 2~15 klx, 光照周期为 16 h 光照 8 h 黑暗的条件下培养^[23], 获得核桃不同株系温室植株。

1.2.3 核桃 *JrAMT2* 基因阳性鉴定 选用阳性体胚萌发后经 4 次继代培养的核桃组培苗进行绿色荧光蛋白 (GFP) 检测、PCR 及 RT-qPCR 验证, 引物见表 1。从再生植株顶芽开始向下截取 1.5 cm, 培养 14 d 后观察植株表型, 每个株系均 5 个生物学重复。选取植株顶芽、叶片、茎段混样提取 DNA 及 RNA。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火温度 30 s, 68 °C 延伸 2 min, 共 32 个循环; 68 °C 延伸 7 min, PCR 反应产物进行质量分数为 1.2% 琼脂糖凝胶电泳。使用 The iQ5 Real-Time PCR Detection System 仪器进行 RT-qPCR, 测定转基因植株中 *JrAMT2* 的相对表达量。反应程序为: 95

℃ 10 min; 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 31 s, 40 个循环; 95 ℃ 15 s; 60 ℃ 1 min; 95 ℃ 30 s; 60 ℃ 15 s。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算定量结果^[24]。

取核桃野生型及核桃 *JrAMT2* 过表达株系组培苗的根、茎、小叶, 根纵切、茎横切临时切片分别放置于体视荧光显微镜 (Carl Zeiss Stereo D13covery V12, Axio Cam MRc system) 在明场和蓝光 (488 nm) 激发条件下利用 ZEN lite 成像软件连续拍照^[25-26]。

1.2.4 生长参数、铵态氮和硝态氮测定 分别选取生长状态一致的核桃野生型与 3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系组培苗, 从顶尖向下剪取 1.5 cm 茎段, 含 2~4 片复叶, 培养 14 d, 每个株系均 5 个生物学重复, 测量株高及节间数。选取长势相同的核桃野生型及 *JrAMT2* 过表达植株采用 2 步生根法驯化, 移栽后用直尺测量统计不同株系生长 0、20、40 d 的株高、节间长、叶片长度及叶片宽度。

分别选取生长状态一致的核桃野生型与 3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系组培苗, 培养 14 d, 采用 2 步生根法获得核桃生根植株, 植株分为地上部分及地下部分 2 个部分, 清洗植株, 分别测定地上部分及地下部分鲜质量, 于 105 ℃ 下杀青, 80 ℃ 烘干至恒量, 称取干质量。使用苏州科铭生物技术有限公司的植物铵态氮 (ZATD-1-G) 和植物硝态氮 (ZXTD-1-G) 试剂盒测定地上部分及地下部分铵态氮和硝态氮质量分数, 每个株系均 5 个生物学重复。

1.2.5 植株叶绿体观察、叶绿素质量分数及叶绿素荧光测定 分别选取生长状态一致的核桃野生型与 3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系组培苗, 取顶尖向下第 2 节间处复叶。将该叶片置于 0.35 mol·L⁻¹ 氯化钠中研磨破碎至絮状, 取悬液于高倍光学显微镜下观察, 找到视野中单个完整的叶肉细胞, 观察细胞中的叶绿体, 使用 image J 软件计算叶绿体表面积与单层细胞表面积比率。每个株系均 5 个生物学重复。

采用丙酮浸取法测定叶绿素质量分数。分别取 0.1 g 核桃野生型与 3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系组培苗长势一致的叶片, 剪碎, 置于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 体积分数 80% 丙酮溶液, 于室温黑暗处浸提, 直至管内材料褪色变白, 以 80% 丙酮溶液为对照, 测定 663 和 646 nm 处吸光值, 每个株系均 5 个生物学重复。 $w_t = [(w_a + 8w_b) \times V_t \times (m_{FW} \times 1000)^{-1}]$, 叶绿素 a 质量分数 (w_a) = 20.3 × D(646), 叶绿素 b 质量分数 (w_b) = 8.04 × D(663)。其中: w_t 为叶绿素质量分数 (mg·g⁻¹), V_t 为提取液总体积 (mL), m_{FW} 为叶片鲜质量 (g), $D(646)$ 和 $D(663)$ 分别为 646 和 663 nm 处的吸光度。

叶绿素荧光测定使用 M-PEA (multi-function plant efficiency analyser) 多功能植物效率分析仪 (英国 Hansatech 公司) 测定。选取生长状态一致的核桃野生型与 3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系温室苗由上向下第 3 片叶片暗处理 30 min, 在饱和脉冲光 (5 000 μmol·m⁻²·s⁻¹) 下进行快速叶绿素荧光诱导动力学曲线 (OJIP 曲线) 的测定和绘制。参照 SCHANSKE 等^[27] 的方法分析叶绿素荧光诱导动力学参数 (JIP-test)。

1.2.6 数据分析 利用 SPSS 26 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和多重比较 (邓肯法), 显著性水平为 0.05。使用 GraphPad Prism 7.0 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 核桃 *JrAMT2* 基因生物信息学分析

核桃 *JrAMT2* 基因的全长为 1 464 bp, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA。经过美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 在线序列比对显示: 该基因的序列编码的氨基酸序列属于 Ammonium Transporter Family, 编码 487 个氨基酸 (图 1), 蛋白分子量为 52.458 kD, 预测分子式为 C₂₄₃₃H₃₇₁₅N₆₀₁O₆₄₆S₂₃, 含有 7 418 个原子, 理论等电点为 7.11, 不稳定指数为 35.61, 脂溶指数为 101.56, 亲水性平均值为 0.472。该段蛋白质中包含 20 种常见氨基酸: 亮氨酸质量分数最高, 达到 11.7%, 其次分别为甘氨酸 11.1%, 丙氨酸 10.9%, 缬氨酸 8.6%, 半胱氨酸质量分数最低, 仅为 1.0%。*JrAMT2* 蛋白中分别含有 29 个酸性氨基酸残基 (Asp+Glu) 和 29 个碱性氨基酸残基 (Arg+Lys) (表 2)。

表 1 引物

| Table 1 Primers | | |
|-------------------|------------------------|----|
| 引物 | 序列(5'→3') | 用途 |
| <i>Actin</i> -F | GCCGAACGGGAAATTGTC | 内参 |
| <i>Actin</i> -R | AGAGATGGCTGGAAGAGG | 内参 |
| <i>QJrAMT2</i> -F | AGCAAATGGGGTTCCAGGTT | 定量 |
| <i>QJrAMT2</i> -R | TGTCTCCCGCAGATAGAAGGTA | 定量 |
| <i>GFP</i> -F | ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA | 鉴定 |
| <i>GFP</i> -R | TTACTTGTACAGCTCGTCCA | 鉴定 |
| <i>JrAMT2</i> -F | CATGAATACCACCCGGCCTA | 鉴定 |

```

>Jr04_01370_p1
1 ATGAACACTA CGGTGGCCTA TGGAGCTGTA AGCCACGCCG TCCCACCATG GCTGAACAAG
61 MNTTVAYGAV SPAVPPWLNK GDNAWQMTAS TLVGIQSMPG LVILYASIVK KKWAVNSAFM
121 ALYAFAAVLI CWVLVCYRMA FGDQLLPFWG KGAPALGQKF LVNRAKIPES NHTRDGTYET
181 IEPFYPMATL VYFQFTFAAI TMILLAGSVL GRMNIKAWMA FVPLWLVSFY TVGAFSLWGG
241 GFLYHWGVID YSGGYVIHLS SGIAGFTAAY WVGPRKSDK ERFPPNNVLL MLAGAGLLWM
301 GWSGFNGGAP YAANIDASIA VLNTNICAAT SLLVWTSLDV VFFGKPSVIG AVQGMMTGLV
361 CITPGAGLVQ SWAAIVMGML SGSIPWVSMM VLHKKSTLLQ KVDDTLGVFH THAVAGLLGG
421 LLTGLFAEPE LCALILPLSN TRGAFYGGSG GKQFFKQLVA AMFVAGWNLY STLLLLGIR
481 LFIPLRMPDE DLAIGDDAVH GEEAYALWGD GEKYDPTKHG WNTSMYAQDI TVPSPYVADA
541 RGVTTINL*

```

图 1 *JrAMT2* 基因氨基酸序列Figure 1 Amino acid sequence of *JrAMT2* gene表 2 *JrAMT2* 基因氨基酸组成Table 2 Composition of *JrAMT2* amino acids

| 氨基酸 | 数量/个 | 占比/% | 氨基酸 | 数量/个 | 占比/% | 氨基酸 | 数量/个 | 占比/% |
|------|------|-------|------|------|-------|-------|------|------|
| 丙氨酸 | 53 | 10.90 | 组氨酸 | 9 | 1.80 | 苏氨酸 | 27 | 5.50 |
| 精氨酸 | 11 | 2.30 | 异亮氨酸 | 25 | 5.10 | 色氨酸 | 18 | 3.70 |
| 天冬酰胺 | 16 | 3.30 | 亮氨酸 | 57 | 11.70 | 酪氨酸 | 17 | 3.50 |
| 天冬氨酸 | 15 | 3.10 | 赖氨酸 | 18 | 3.70 | 缬氨酸 | 42 | 8.60 |
| 半胱氨酸 | 5 | 1.00 | 甲硫氨酸 | 18 | 3.70 | 吡咯赖氨酸 | 0 | 0.00 |
| 谷氨酰胺 | 11 | 2.30 | 苯丙氨酸 | 24 | 4.90 | 晒半胱氨酸 | 0 | 0.00 |
| 谷氨酸 | 14 | 2.90 | 脯氨酸 | 24 | 4.90 | | | |
| 甘氨酸 | 54 | 11.10 | 丝氨酸 | 29 | 6.00 | | | |

对核桃 *JrAMT2* 蛋白跨膜区的预测结果表明：该蛋白 N 端在膜外，C 端存在膜内，共含有 11 个跨膜螺旋，跨膜螺旋区段分别位于 24~46、59~81、129~151、158~180、195~214、227~244、254~276、288~310、314~333、346~368 和 398~420，推测 *JrAMT2* 属于跨膜蛋白，并在 N 端存在信号肽 (图 2A)。

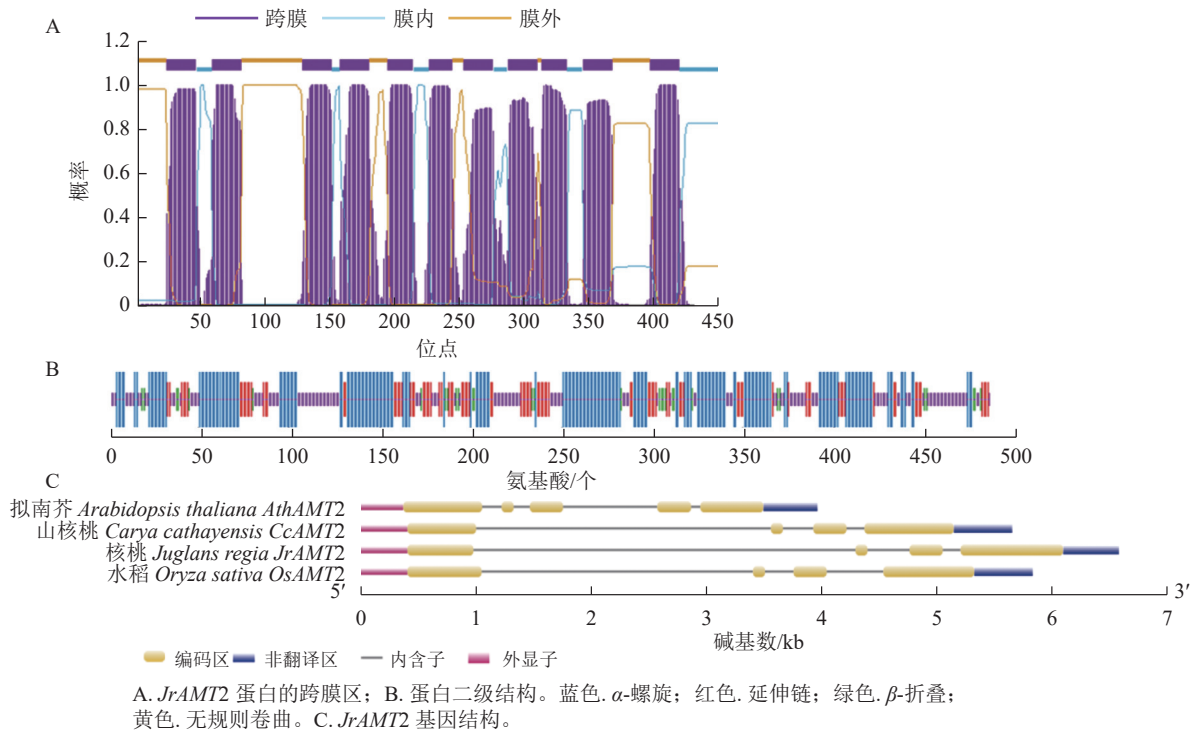
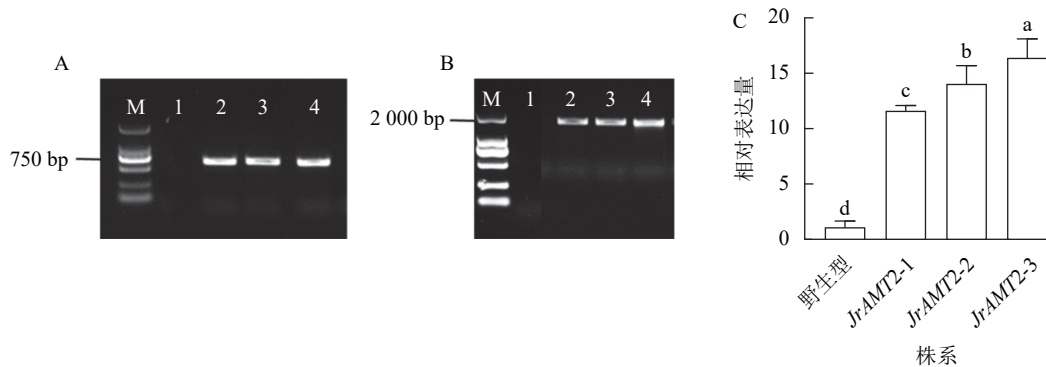
对 *JrAMT2* 蛋白二级结构的预测结果显示：*JrAMT2* 的氨基酸组成中有 4 种构象，其中 α -螺旋有 201 个氨基酸，占比 43.12%；延伸链有 93 个氨基酸，占比 19.10%； β -转角有 30 个氨基酸，占比 6.16%；无规则卷曲有 154 个氨基酸，占比 31.62%。*JrAMT2* 铵转运蛋白主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成 (图 2B)。

对 *JrAMT2* 基因结构的分析显示：*JrAMT2* 基因由 4 个外显子，3 个内含子组成。与拟南芥 *AtAMT2* 基因相比，拟南芥基因结构多了 1 个外显子和 1 个内含子，与山核桃 *Carya cathayensis* *CcAMT2* 基因^[28]、栓皮栎 *Quercus suber* *QsAMT2* 基因^[29] 相比，外显子和内含子数量相同，同源性较高 (图 2C)。

2.2 核桃 *JrAMT2* 过表达植株阳性验证

在成功构建 35S::*JrAMT2*::GFP 的过表达载体并通过农杆菌介导转化核桃体胚后，对同一无性系 *JrAMT2* 体胚经脱水萌发获得的再生植株进行阳性鉴定。利用 PCR 技术，以核桃 *JrAMT2* 过表达植株 3 个株系 (*JrAMT2*-1、*JrAMT2*-2 和 *JrAMT2*-3) DNA 为模板，进行外源 GFP 基因 (729 bp) 的 PCR 验证，检测到大小约为 750 bp 的电泳条带，与 GFP 基因大小符合 (图 3A)；进行目的基因 *JrAMT2* 加外源 GFP 基因全长 (2193 bp) 的 PCR 验证，检测到大小为 2000 bp 的电泳条带，与目的基因大小符合 (图 3B)；以核桃 *JrAMT2* 过表达植株 3 个株系的 cDNA 为模板，利用实时定量 PCR 技术对 *JrAMT2* 基因表达量进行检测，结果显示：核桃 *JrAMT2* 过表达植株 3 个株系 *JrAMT2* 基因相对表达量分别为野生型的 10.58、12.80 和 14.94 倍，显著上调 (图 3C)，表明核桃 *JrAMT2* 过表达植株中 *JrAMT2* 基因稳定表达。

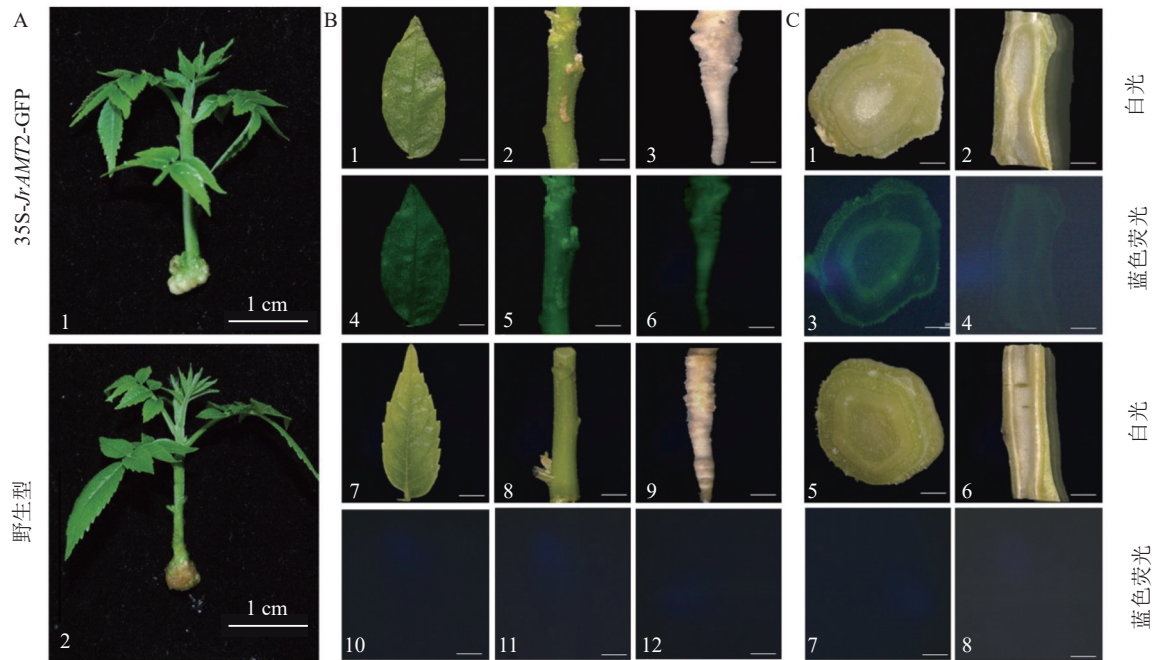
对获得的过表达株系进行 GFP 荧光阳性鉴定，分别将核桃过表达及野生型幼苗 (图 4A) 的小叶、茎、根置于荧光体视显微镜下在波长为 488 nm 蓝光激发下拍摄。结果显示：过表达植株的小叶、茎、根表面呈现均匀的绿色荧光，其中腋芽处荧光更明亮 (图 4B1~6)，野生型核桃幼苗的小叶、茎、根在荧光下拍摄无绿色荧光激发 (图 4B7~12)，说明 *JrAMT2* 蛋白在腋芽处积累。为进一步研究 *JrAMT2* 基因在

图2 核桃 *JrAMT2* 基因生物信息学分析Figure 2 Bioinformatics analysis of *JrAMT2* gene in *J. regia*图3 PCR 和 RT-qPCR 对核桃组培苗的 *JrAMT2* 基因的检测Figure 3 Detection of *JrAMT2* gene in *J. regia* tissue culture seedlings by PCR and qRT-PCR

核桃幼苗中的表达, 对过表达株系及野生型组培苗的茎段进行横切, 根进行纵切后, 进行 GFP 荧光检测, 结果显示: 核桃 *JrAMT2* 过表达植株茎段横切中呈现均匀的绿色荧光, 其中在维管组织中荧光更明亮, 野生型植株茎段横切面无绿色荧光(图 4B1~12); 核桃 *JrAMT2* 过表达植株根段纵切面中呈现均匀的绿色荧光, 且在维管组织中荧光更明亮, 野生型植株根段纵切面无绿色荧光(图 4C1~8)。表明 *JrAMT2* 基因在核桃幼苗的根和茎中均可稳定表达, 其中 *JrAMT2* 蛋白在根和茎的维管束组织中积累。

2.3 核桃 *JrAMT2* 基因的生物功能分析

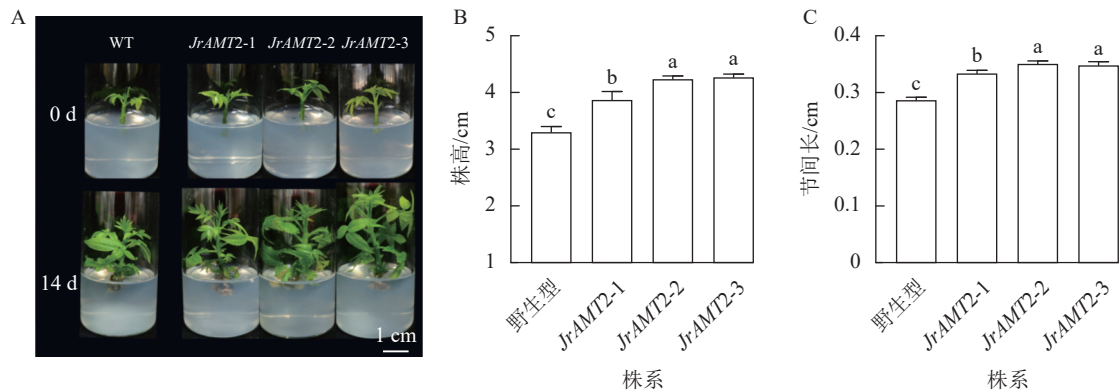
2.3.1 核桃 *JrAMT2* 过表达植株生长表型分析 为了进一步研究核桃 *JrAMT2* 基因的生物功能, 将 3 个 *JrAMT2* 过表达植株与野生型核桃植株培养 14 d。结果表明: 与野生型相比, 核桃 *JrAMT2* 过表达植株均生长旺盛, 株高显著增加, 节间显著增长 ($P < 0.05$, 图 5A)。3 个 *JrAMT2* 过表达株系株高分别为 3.87、4.23 和 4.12 cm, 节间长分别为 0.33、0.35 和 0.34 cm, 野生型植株株高为 3.30 cm, 节间长为 0.28 cm, 与野生型相比, 3 个 *JrAMT2* 过表达株系株高分别增加了 17.0%、28.0% 和 29.0% (图 5B), 节间长分别增加了 19.0%、25.0% 和 24.0% (图 5C)。综上所述, *JrAMT2* 过表达对核桃幼苗的生长有显著提高作用。



A. 组培苗。1. 核桃 *JrAMT2* 过表达植株；2. 核桃野生型植株。B. 组培苗外部荧光表达 (标尺: 2 mm)。1~3. 分别为 *JrAMT2* 过表达植株白光下小叶、茎、根外形；4~6. 分别为 *JrAMT2* 过表达阳性组培苗蓝色荧光下小叶、茎、根外形；7~9. 分别为野生型白光下小叶、茎、根外形；10~12. 分别为野生型蓝色荧光下小叶、茎、根外形。C. 组培苗显微结构荧光表达 (标尺: 500 μ m)。1~2. 分别为核桃 *JrAMT2* 过表达植株白光下茎横切面、根纵切面；3~4. 分别为 *JrAMT2* 过表达阳性植株蓝色荧光下茎横切面、根纵切面；5~6. 对照组培苗白光下茎横切面、根纵切面；7~8. 对照组培苗蓝色荧光下茎横切面、根纵切面。

图 4 铵态氮转运蛋白基因 *JrAMT2* 在核桃苗中稳定表达

Figure 4 Stable expression of ammonium nitrogen transfer protein gene *JrAMT2* in *J. regia*



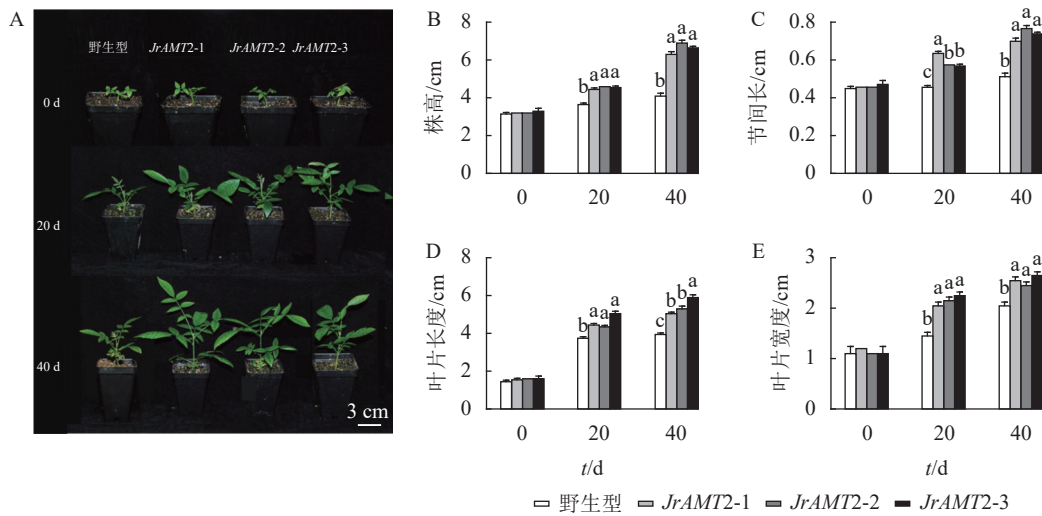
A. 对照植株与阳性植株在 0 和 14 d 的表型。B. 对照植株与阳性植株在 14 d 的株高。C. 对照植株与阳性植株在 14 d 的节间长。不同小写字母表示不同株系间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 5 核桃 *JrAMT2* 过表达离体培养植株表型分析

Figure 5 Phenotypic analysis of *J. regia JrAMT2* overexpression plant in vitro culture

对核桃 *JrAMT2* 过表达植株进一步驯化培养，成功获得核桃 *JrAMT2* 过表达温室苗。对其生长表型进行分析 (图 6A)，定植后培养 40 d，核桃 *JrAMT2* 过表达温室苗的株高、节间长、叶片长度、叶片宽度增加显著高于野生型 ($P < 0.05$)。培养至第 20 天时，与野生型相比，核桃 *JrAMT2* 过表达温室苗 3 个株系株高分别增加 21.9%、26.0% 和 24.6% (图 6B)，节间长分别增加 41.2%、27.7% 和 26.3% (图 6C)，叶片长度分别增加 18.7%、16% 和 30.7% (图 6D)，叶片宽度分别增加 41.3%、48.2% 和 55.1% (图 6E)；培养至第 40 天时，与野生型相比，*JrAMT2* 过表达温室苗 3 个株系株高分别增加 53.6%、68.2% 和 62.1%，节间长分别增加 37.2%、50.3% 和 44.8%，叶片长度分别增加了 27.8%、34.1% 和 49.3%，叶片宽度分别增加 24.3%、19.5% 和 29.2%。综上所述，核桃 *JrAMT2* 过表达温室苗与野生型相比，株高、节间长、叶片大小均显著增加，进一步证明 *JrAMT2* 基因过表达加快了核桃的生长速度。

2.3.2 核桃 *JrAMT2* 过表达植株对氮素吸收分析 为探究 *JrAMT2* 基因在核桃中是否存在差异表达，将



不同小写字母表示不同株系间差异显著 ($P < 0.05$)。

图6 核桃 *JrAMT2* 过表达阳性温室苗性状分析

Figure 6 Character analysis of *J. regia* *JrAMT2* overexpression positive greenhouse seedlings

核桃野生型及核桃 *JrAMT2* 过表达植株进行2步生根, 获得核桃 *JrAMT2* 过表达生根植株, 将其分为地上部分与地下部分。与野生型相比, 核桃 *JrAMT2* 过表达生根植株地下部分不定根生长旺盛(图7A)。对核桃 *JrAMT2* 过表达植株地上部分及地下部分差异分析, 分别提取3个核桃 *JrAMT2* 过表达株系生根植株地上部分及地下部分RNA, 利用实时定量PCR技术, 分析地上部分及地下部分 *JrAMT2* 基因表达的差异。结果表明: 3个 *JrAMT2* 过表达株系地上部分 *JrAMT2* 基因表达量分别是野生型的11.94、12.70和15.06倍, 地下部分 *JrAMT2* 基因表达量分别是野生型的19.07、23.34和24.00倍(图7B)。对核桃野生型及3个 *JrAMT2* 过表达株系地上部分及地下部分进行干质量和鲜质量测定。结果表明: 3个 *JrAMT2* 过表达株系地上部分鲜质量和干质量显著高于野生型 ($P < 0.05$), 与野生型相比, 鲜质量分别增加23.45%、33.67%和56.26%, 干质量分别增加23.45%、43.89%和56.26%; 3个 *JrAMT2* 过表达株系地下部分干质量和鲜质量显著高于野生型 ($P < 0.05$), 与野生型相比, 鲜质量分别增加222.65%、199.24%和344.38%, 干质量分别增加222.65%、199.24%和354.33%(图7C)。

基于核桃 *JrAMT2* 过表达植株表型变化, 本研究进一步测定核桃 *JrAMT2* 过表达植株对硝态氮及铵态氮吸收。结果表明: 与野生型相比, 核桃3个 *JrAMT2* 过表达株系地上部分及地下部分铵态氮质量分数显著增加 ($P < 0.05$), 地上部分分别增加59.1%、32.3%和55.1%, 地下部分分别增加68.1%、61.9%和114.1%(图7D); 核桃3个 *JrAMT2* 过表达株系地上部分硝态氮质量分数显著降低 ($P < 0.05$), 地下部分硝态氮质量分数显著增加 ($P < 0.05$), 地上部分分别降低10.1%、7.1%和13.6%, 地下部分分别增加63.5%、75.7%和70.3%(图7E)。综上所述, *JrAMT2* 基因主要作用于核桃地下部分, 且 *JrAMT2* 基因过表达促进植株地下部分对铵态氮和硝态氮的吸收, 并介导了铵态氮从地下部到地上部的运输。

2.3.3 核桃 *JrAMT2* 过表达植株叶绿素质量分数及叶绿素荧光特性分析 对核桃 *JrAMT2* 过表达植株叶色与叶片细胞叶绿体进行观察。核桃 *JrAMT2* 过表达植株叶色与野生型相比颜色较深(图8A), 在显微镜下观察3个核桃 *JrAMT2* 过表达株系及野生型叶绿体特征发现, 3个核桃 *JrAMT2* 过表达株系扩张的栅栏叶肉细胞中的叶绿体更致密(图8B)。进一步分析发现: 对3个阳性株系进行总叶绿素质量分数测定, 3个核桃 *JrAMT2* 过表达株系叶绿素质量分数显著高于野生型 ($P < 0.05$), 野生型总叶绿素质量分数为 $3.53 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 核桃 *JrAMT2* 过表达阳性植株3个株系总叶绿素质量分数分别为4.64、4.69和 $6.10 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 与野生型相比分别增加了32.6%、34.0%和74.3%(图8C); *JrAMT2* 过表达株系叶绿体表面积在单层细胞表面积的占比显著高于野生型 ($P < 0.05$), 野生型叶绿体表面积与单层细胞表面积的比率为0.56, 3个核桃 *JrAMT2* 过表达株系叶绿体表面积与单层细胞表面积的比值分别为0.67、0.68和0.69, 与野生型相比分别增加了19.41%、21.18%和22.94%(图8D)。综上所述, *JrAMT2* 基因过表达提高了叶绿体表面积与单层细胞表面积的比率及核桃叶肉细胞内叶绿素的积累。

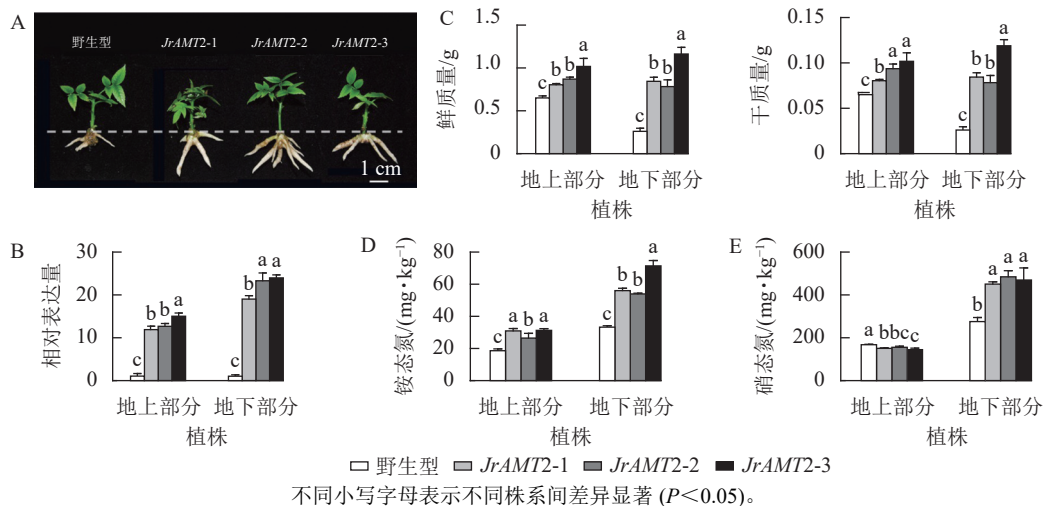


图 7 核桃 *JrAMT2* 过表达植株氮素吸收分析

Figure 7 Character analysis of the regenerated plants with expression of *JrAMT2* in *J. regia*

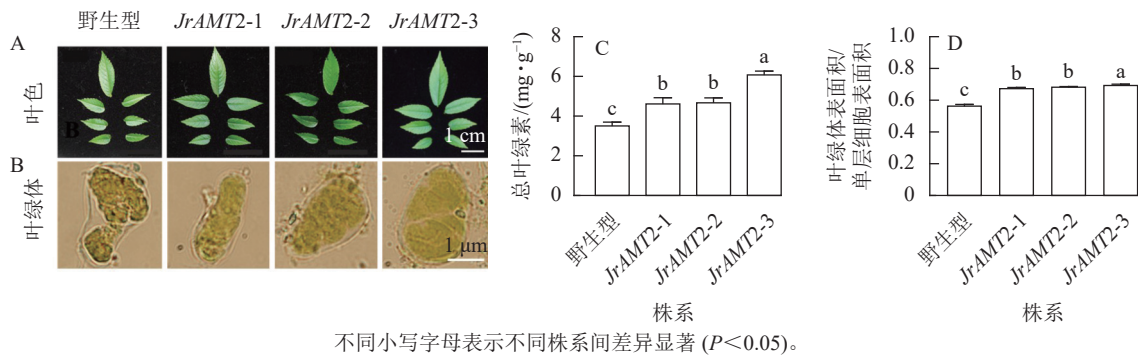
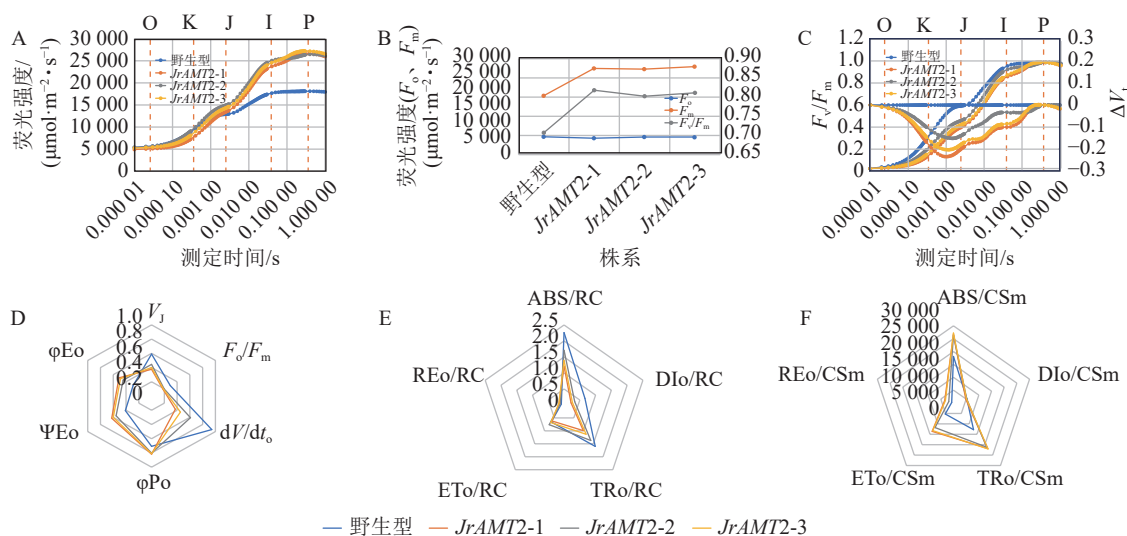


图 8 核桃 *JrAMT2* 过表达植株叶绿体及叶绿素质量分数分析

Figure 8 Analysis of chloroplast and chlorophyll content in *J. regia* with *JrAMT2* overexpression

对 3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系进行快速叶绿素荧光诱导动力学曲线测定。结果显示：与野生型相比，3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系的 O (F_0 点) 相、K 相降低，J 点、I 点、P (F_m) 及 J-P 点振幅均提高，OJIP 曲线较陡，表明 *JrAMT2* 基因一定程度上提高了叶片的活性 (图 9A)。与野生型相比，3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系暗适应后的最大荧光强度 (F_m)、最大量子产额 (F_v/F_m) 均提高， F_m 分别提高了 47.1%、45.9%、50.2%， F_v/F_m 分别提高了 15.6%、13.4%、14.7%，表明 *JrAMT2* 基因一定程度上提高了光系统 II (PS II) 的光化学效率 (图 9B)。计算归一化处理的 OJIP 曲线 (V_t) [$V_t = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$, F_t 为任意时刻 t 的荧光值]，并计算相对荧光差异 ΔV_t [$\Delta V_t = V_{t \text{ 处理}} - V_{t \text{ 对照}}$ ，用 ΔK 、 ΔJ 值分别显示在 300 μs 和 20 ms 处的 ΔV_t 值，表示放氧复活体的活性 (OEC)]。结果显示：与野生型相比，3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系 ΔK 、 ΔJ 值下降且 < 0 (图 9C)，表明 *JrAMT2* 基因一定程度上提升了核桃叶片 PS II 供体侧及受体侧电子传递效率及放氧复活体的活性。

用 JIP-test 参数对 OJIP 曲线进行定量分析，结果显示：核桃 3 个 *JrAMT2* 过表达株系在 $t=0$ 时的最大光化学效率 (ϕP_0)、反应中心捕获的光能用于 Q_A^- 下游电子传递的量子产量 (ΨE_0)、吸收的能量用于电子传递的量子产量 (ϕE_0) 上升，分别上升了 14.62%、44.59%、65.80%；在 J 点的相对可变荧光强度 (V_j)、最小荧光强度与最大荧光强度比值 (F_0/F_m)、反应中心关闭净速率 (dV/dt_0) 下降，分别下降了 31.03%、35.29%、49.34% (图 9D)，表明 *JrAMT2* 基因一定程度上提高了 PS 反应中心的量子比率及产额；对单位 PS 反应中心比活性参数分析，结果显示：与野生型相比，3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系在 $t=0$ 时的单位反应中心捕获的用于电子传递的能量 (ETo/RC)、在 $t=0$ 时的单位反应中心传递到电子链末端的能量 (REo/RC) 无明显变化，在 $t=0$ 时单位反应中心吸收的能量 (ABS/RC)、在 $t=0$ 时单位反应中心耗散的能量 (Dio/RC)、在 $t=0$ 时单位反应中心捕获的用于还原 QA 的能量 (TRo/RC) 显著下降，分别为



F_m 最大荧光强度; F_0/F_m 最大量子产额; ϕ_{Po} , $t=0$ 时的最大光化学效率; Ψ_{Eo} 用于 Q_A 下游电子传递的量子产额; ϕ_{Eo} 用于电子传递的量子产额; V_j 在J点的相对可变荧光强度; F_0/F_m 最小荧光强度与最大荧光强度比值; dV/dt_0 反应中心关闭净速率; ABS/RC、ETo/RC、REo/RC、DiIo/RC、TRo/RC分别指在 $t=0$ 时, 单位反应中心吸收的能量、捕获的用于电子传递的能量传递到电子链末端的能量、耗散的能量、捕获的用于还原QA的能量; DiIo/CSm、ABS/CSm、TRo/CSm、ETo/CSm、REo/CSm分别指在 $t=t_{FM}$ (暗适应后达到最大荧光强度时间点)时, 单位受光截面耗散的能量、吸收的能量、捕获的用于还原QA的能量、捕获的用于电子传递的能量、传递到电子链末端的能量。

图9 铵态氮转运蛋白 *JrAMT2* 基因表达对核桃叶绿素荧光的影响

Figure 9 Effect of ammonium nitrogen transporter *JrAMT2* gene on chlorophyll fluorescence of *J. regia*

36.43%、58.67%、27.22%，表明 *JrAMT2* 基因一定程度提高了核桃叶片反应中心活性和用于电子传递的能量份额，增强了电子传递能力 (图 9E)；对单位受光截面比活性参数分析，结果显示：与野生型相比，3 个核桃 *JrAMT2* 过表达株系在 $t=t_{FM}$ (暗适应后达到最大荧光强度时间点) 时的单位受光截面耗散的能量 (DiIo/CSm) 无明显变化，在 $t=t_{FM}$ 时单位受光截面吸收的能量 (ABS/CSm)、在 $t=t_{FM}$ 时单位受光截面捕获的用于还原 QA 的能量 (TRo/CSm)、在 $t=t_{FM}$ 时单位受光截面捕获的用于电子传递的能量 (ETo/CSm)、在 $t=t_{FM}$ 时单位受光截面传递到电子链末端的能量 (REo/CSm) 上升，分别上升了 47.79%、69.39%、145.10%、303.62% (图 9F)，表明 *JrAMT2* 基因一定程度提高核桃叶片单位受光截面的电子传递的份额及电子传递效率。综上所述，*JrAMT2* 基因过表达促进核桃的光合作用。

3 讨论

氮素作为植物生长发育必不可少的营养元素，是核酸、蛋白质、酶、叶绿素、植物激素等的重要组成部分^[30]。自然界中可供利用的氮素资源有限，作物高产就需要化肥的投入。中国的化肥投入总量逐渐升高，但化肥利用率很低，给自然环境带来极大的负担^[31-32]，因此合理使用化肥，提高作物对氮素的吸收效率是促进农业生态化发展的重要途径。铵转运蛋白基因 AMTs 是广泛存在于动物、植物、微生物中用于运输 NH_4^+ 的载体蛋白，从分子层面提高植物对氮素的利用具有重要意义。前人研究发现：在拟南芥中，氮饥饿能诱导 *AtAMT1.1*、*AtAMT2.1* 基因上调表达，并且 *AtAMT2* 基因的表达水平随着氮饥饿时间的延长而增加^[33-34]。在充足或高氮条件下，观察到拟南芥中 *AtAMT2.1* 及水稻根中 *OsAMT1.2* 基因表达水平仍上调^[35-36]，其中氮素形态对 AMT 基因转录水平的调控也取决于 AMT 基因个体和植物物种。

本研究对核桃 *JrAMT2* 过表达植株进行初步的功能验证，对 *JrAMT2* 基因进行生物信息学分析表明：*JrAMT2* 蛋白中含有 29 个酸性氨基酸残基 (Asp+Glu) 和 29 个碱性氨基酸残基 (Arg+Lys)。该蛋白 N 端在膜外，C 端存在膜内，共含有 11 个跨膜螺旋结构域，与李畅^[36] 预测的 *OsAMT2.1* 蛋白结构域特点相同，且与夏金泽等^[37] 研究的木薯 *Manihot esculenta* *MeAMT2.6* 基因的蛋白结构相似。AMT2 型蛋白通常在植物的各种组织中表达，包括根、芽和叶。前人研究发现：杜梨 *Pyrus betulifolia* *PbAMT2* 基因在所有器官中均有表达，但在根部表达最高^[38]。在拟南芥中发现：*AtAMT2.1* 基因主要在维管组织中表达，在芽中的表达高于根^[15]。本研究对核桃 *JrAMT2* 过表达植株进行绿色荧光观察发现：*JrAMT2* 蛋白在核桃苗整株均有表达，且在芽及根茎的维管束中荧光更明亮，说明与拟南芥相同，核桃 *JrAMT2* 蛋白

在所有器官中表达, 且主要在维管组织中表达。

在植物生长发育重要阶段充足的氮素营养供给可以促进其生长发育, 增加产量, 对植物外施氮素能增加植株株高及叶面积^[39]。本研究对核桃 *JrAMT2* 过表达植株生长性状分析发现: *JrAMT2* 基因在核桃中过表达对植株生长发育有调控作用, 主要表现在过表达植株株高、节间长显著增加。对过表达植株生根驯化结果显示: 过表达植株生物量显著增加, 根系发达。对核桃 *JrAMT2* 过表达植株移栽驯化, 定植后植株生长速率显著高于野生型, 主要表现在节间伸长快, 叶面积增加。*AMT2* 是具有铵吸收功能的铵转运蛋白, 且在维管组织表达, 暗示着该基因可能参与铵向木质部的装载, 介导铵在植物中的长距离运输。研究发现: 拟南芥 *AtAMT2.1* 除了对根吸收氮素有一定贡献外, 主要作用于 NH_4^+ 从根部到茎部的运输^[40]。本研究对核桃 *JrAMT2* 过表达植株地上部分和地下部分基因表达测定发现: 植株地下部分 *JrAMT2* 基因表达量显著高于地上部分, 且植株地下部分生物量的增加显著高于地上部分, 说明核桃 *JrAMT2* 基因主要在地下部分表达。对核桃 *JrAMT2* 过表达植株对铵态氮和硝态氮吸收测定结果表明: 核桃 *JrAMT2* 过表达植株地上部分仅对铵态氮的吸收显著上调, 地下部分对铵态氮与硝态氮的吸收均显著上调, 说明 *JrAMT2* 基因促进植株对铵态氮和硝态氮的吸收, 并介导了铵态氮从地下部分到地上部分的运输。氮素营养还会通过影响叶绿素合成和叶绿素荧光参数的变化来参与光能的利用和调控^[41]。有研究表明: 水稻 *OsAMT2.1* 基因敲除株系的光合特性与野生型相比出现下降趋势, 同样说明了 *AMT2* 基因对植物光合作用有调控作用^[36]。本研究对核桃 *JrAMT2* 过表达植株叶绿素质量分数及叶绿素荧光参数变化的测定结果显示: *JrAMT2* 基因显著提高了核桃的叶绿体表面积与单层细胞表面积比率、叶绿素质量分数及叶绿素荧光参数中叶片放氧复活体活性、量子产额、电子传递效率。

4 结论

JrAMT2 作为铵态氮转运基因, 促进核桃对铵态氮和硝态氮的吸收, 且介导铵态氮从根部到茎部的运输, 对核桃生长发育、光合作用等有积极作用, 对研究核桃高效利用氮素及良种的筛选有重要意义。

5 参考文献

- [1] 郑万钧. 中国树木志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1985: 23 – 76.
ZHENG Wanjun. *Chinese Tree Chronicles* [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1985: 23 – 76.
- [2] 冯连芬, 吕芳德, 张亚萍, 等. 我国核桃育种及其栽培技术研究进展[J]. 经济林研究, 2006, 24(2): 69 – 73.
FENG Lianfen, LÜ Fangde, ZHANG Yaping, et al. Literature review of researches on breeding and cultivation techniques of Chinese walnut [J]. *Non-wood Forest Research*, 2006, 24(2): 69 – 73.
- [3] 张志华, 裴东. 核桃学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
ZHANG Zhihua, PEI Dong. *Walnut Science* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2018.
- [4] 宫峥嵘, 王一峰, 王瀚, 等. 核桃矿质营养研究进展[J]. 林业科学, 2021, 57(1): 178 – 190.
GONG Zhengrong, WANG Yifeng, WANG Han, et al. Research progress on mineral nutrition of walnut [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2021, 57(1): 178 – 190.
- [5] 李忠新, 杨莉玲, 阿布力孜·巴斯提, 等. 中国核桃产业发展研究[J]. 中国农机化学报, 2013, 34(4): 23 – 28.
LI Zhongxin, YANG Liling, Abulizi Basiti, et al. Research on the development of walnut industry in China [J]. *Journal of Chinese Agricultural Mechanization*, 2013, 34(4): 23 – 28.
- [6] 梁智, 周勃, 邹耀湘. 核桃树体生物量构成及矿质营养元素累积特性研究[J]. 果树学报, 2012, 29(1): 139 – 142.
LIANG Zhi, ZHOU Bo, ZOU Yaoliang. Compositional analysis of biomass and accumulation properties of mineral elements in Walnut [J]. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(1): 139 – 142.
- [7] ROBERTSON G P, VITOUSEK P M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource [J]. *Annual Review of Environment and Resources*, 2009, 34(1): 97 – 125.
- [8] 闫小莉, 林智熠, 胡文佳, 等. 林木氮素吸收偏好性及其形成机制研究进展[J]. 世界林业研究, 2020, 33(5): 25 – 30.
YAN Xiaoli, LIN Zhiyi, HU Wenjia, et al. A review of nitrogen uptake preference of trees and its formation mechanism [J]. *World Forestry Research*, 2020, 33(5): 25 – 30.
- [9] ZHOU Mingxin, YAN Guoyong, XING Yajuan, et al. Nitrogen deposition and decreased precipitation does not change total

- nitrogen uptake in a temperate forest [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, **651**: 32 – 41.
- [10] NACRY P, BOUGUYOU E, GOJON A. Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource [J]. *Plant and Soil*, 2013, **370**(1/2): 1 – 29.
- [11] WANG Miaoyuan, SIDDIQI M Y, RUTH T J, *et al.* Ammonium uptake by rice roots (II. kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma) [J]. *Plant Physiology*, 1993, **103**: 1259 – 1267.
- [12] 骆媛媛, 柳参奎. 植物中铵转运蛋白的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, **28**(2): 373 – 379.
LUO Yuanyuan, LIU Shenkui. Research progress of ammonium transporters in plants [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2009, **28**(2): 373 – 379.
- [13] 李园枚, 傅明辉, 蒋丽花. 植物铵转运蛋白研究进展[J]. 广东农业科学, 2012, **39**(19): 142 – 145.
LI Yuanmei, FU Minghui, JIANG Lihua. Research progress on plant AMT [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, **39**(19): 142 – 145.
- [14] YUAN Lixing, LOQUÉ D, KOJIMA S. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters [J]. *The Plant Cell*, 2007, **19**(8): 2636 – 2652.
- [15] YUAN Lixing, GRAFF L, LOQUÉ D. AtAMT1;4, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in *Arabidopsis* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2009, **50**(1): 13 – 25.
- [16] GIEHL R F H, LAGINHA A M, DUAN Fengying, *et al.* A critical role of AMT2;1 in root-to-shoot translocation of ammonium in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2017, **10**(11): 1449 – 1460.
- [17] COUTURIER J, MONTANINI B, MARTIN F, *et al.* The expanded family of ammonium transporters in the perennial poplar plant [J]. *New Phytologist*, 2007, **174**(1): 137 – 150.
- [18] GU Riliang, DUAN Fengying, AN Xia, *et al.* Characterization of AMT-mediated high-affinity ammonium uptake in roots of maize (*Zea mays* L.) [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2013, **54**(9): 1515 – 1524.
- [19] MAYER M, DYNOWSKI M, LUDEWIG U. Ammonium ion transport by the AMT/Rh homologue LeAMT1;1 [J]. *The Biochemical Journal*, 2006, **396**(3): 431 – 437.
- [20] PEARSON J N, FINNEMANN J, SCHJOERRING J K. Regulation of the high-affinity ammonium transporter (BnAMT1;2) in the leaves of *Brassica napus* by nitrogen status [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, **49**(5): 483 – 490.
- [21] 刘会君. 核桃 *JrAMT* 基因的克隆与功能分析[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
LIU Huijun. *Cloning and Functional Analysis of Walnut JrAMT Gene* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2019.
- [22] 胡恒康, 江香梅, 张启香, 等. 碳源对山核桃体细胞胚发生和植株再生的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2011, **28**(6): 911 – 917.
HU Hengkang, JIANG Xiangmei, ZHANG Qixiang, *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carya cathayensis* embryos using different carbon source [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2011, **28**(6): 911 – 917.
- [23] ZHANG Qixiang, WALAWAGE S L, TRICOLI D M, *et al.* A red fluorescent protein (DsRED) from *Discosoma* sp. as a reporter for gene expression in walnut somatic embryos [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, **34**(5): 861 – 869.
- [24] 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*, 2011, **25**(4): 402 – 408.
- [25] 任飞, 张佳琦, 胡恒康, 等. 红色荧光蛋白基因 DsRED 在核桃植株再生过程中的表达稳定性[J]. 林业科学, 2020, **56**(12): 166 – 176.
REN Fei, ZHANG Jiaqi, HU Hengkang, *et al.* Expression stability of red fluorescent protein gene DsRED in the regeneration of walnut (*Juglans regia*) plant [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, **56**(12): 166 – 176.
- [26] 张志良, 瞿伟菁, 李小芳. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2009.
ZHANG Zhiliang, ZHAI Weijing, LI Xiaofang. *Experimental Guidance of Plant Physiology* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2009.
- [27] SCHANSKER G, SRIVASTAVA A, GOVINDJEE G. Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll a fluorescence rise (OJIP) in pea leaves [J]. *Functional Plant Biology*, 2003, **30**(7): 785 – 796.
- [28] CHEN Mengyun, ZHU Kaikai, XIE Junyi, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of *AMT* and *NRT* gene family in pecan (*Carya illinoensis*) seedlings revealed a preference for $\text{NH}_4^+\text{-N}$ [J/OL]. *International Journal of Molecular*

- Sciences*, 2022, **23**(21): 13314[2023-04-10]. doi: 10.3390/ijms232113314.
- [29] YANG Yanci, ZHOU Tao, DUAN Dong, *et al.* Comparative analysis of the complete chloroplast genomes of five *Quercus* species [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 959[2023-04-10]. doi: 10.3399/fpls.2016.00959.
- [30] 陆景陵. 植物营养学: 上册[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1994.
LU Jingling. *Plant Nutrition: Volume One* [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1994.
- [31] 栾江, 仇焕广, 井月, 等. 我国化肥施用量持续增长的原因分解及趋势预测[J]. *自然资源学报*, 2013, **28**(11): 1869 – 1878.
LUAN Jiang, QIU Huanguang, JING Yue, *et al.* Decomposition of factors contributed to the increase of China's chemical fertilizer use and projections for future fertilizer use in China [J]. *Journal of Natural Resources*, 2013, **28**(11): 1869 – 1878.
- [32] 李玉静, 冯雨晴, 赵园园, 等. 不同形态氮素吸收利用及其对植物生理代谢影响的综述[J]. 中国农业科技导报, 2023, **25**(2): 128 – 139.
LI Yujing, FENG Yuqing, ZHAO Yuanyuan, *et al.* Review of absorption and utilization of different nitrogen forms and their effects on plant physiological metabolism [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2023, **25**(2): 128 – 139.
- [33] LOQUÉ D, von WIRÉN N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, **55**(401): 1293 – 1305.
- [34] GARCIA-MATA C, LAMATTIA L. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells [J]. *Plant Physiology*, 2002, **128**(3): 790 – 792.
- [35] von WIRÉN N, GAZZARRINI S, GOJON A, *et al.* The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, **3**(3): 254 – 261.
- [36] 李畅. 水稻铵转运蛋白基因*OsAMT1.1*和*OsAMT2.1*生物学功能分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
LI Chang. *Function Analysis of Rice Ammonium Transporter Genes OsAMT1.1 and OsAMT2.1* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016.
- [37] 夏金泽, 刘银弟, 王太行, 等. 木薯铵转运蛋白基因*MeAMT2.6*的克隆及表达模式分析[J]. 分子植物育种, 2022, **20**(6): 1748 – 1754.
XIA Jinze, LIU Yindi, WANG Taihang, *et al.* Cloning and expression pattern analysis of the ammonium transporter gene *MeAMT2.6* from *Cassava* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, **20**(6): 1748 – 1754.
- [38] LI Hui, CHANG Youhong, LIN Jing. Two AMT2-type ammonium transporters from *Pyrus betulaefolia* demonstrate distinct expression characteristics [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, **34**: 707 – 719.
- [39] COOKE J E K, BROWN K A, WU R, *et al.* Gene expression associated with N-induced shifts in resource allocation in poplar [J]. *Plant Cell & Environment*, 2003, **26**(5): 757 – 770.
- [40] SUENAGA A, MORIYA K, SONODA Y, *et al.* Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2003, **44**(2): 206 – 211.
- [41] MONNEVEUX P, ZAIDI P H, SANCHEZ C. Population density and low nitrogen affects yield-associated traits in tropical maize [J]. *Crop Science*, 2005, **45**(2): 535 – 545.