Winter (2022) 12(40): 101-109
DOI: 10.30473/cb.2023.67299.1904
Received: 06 December 2022 Accepted: 5 March 2023

Crop Biotechnology Open Access

ORIGINAL ARTICLE

Investigating the expression of nitrate transporter genes in response to nitrogen deficiency level in *Arabidopsis*

Abbas Saidi[1*], Zohreh Hajibarat[2], Mohammad Reza Ghaffari[3], Mehrshad Zeinalabedini[4]

[1] Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
[2] Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
[3] Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Department of Systems and Synthetic Biology, Karaj, Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran.
[4] Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Department of Systems and Synthetic Biology, Karaj, Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran.

Correspondence
Abbas Saidi
Email: abbas.saidi@gmail.com

How to cite
Saidi1 A., Hajibarat, Z., Ghaffari, M.R. & Zeinalabedini, M. (2022). Investigating the expression of nitrate transporter genes in response to nitrogen deficiency level in Arabidopsis. *Crop Biotechnology*, 12(40), 109-109.

ABSTRACT

Nitrogen is one of the most important components of biomolecules, amino acids, nucleotides, proteins, chlorophyll, and many plant hormones, which are essential and necessary for plant growth and development. In the condition of nitrogen deficiency very different responses such as yield reduction, leaf chlorosis, plant growth and root structure formation appears in phenotypes of plants. In the last decade, to increase the amount of biomass and as a result the yield of plants, a wide use of nitrogen has attracted the attention of researchers. In this study, the expression analysis of seven nitrate transporter genes (NRT2) was investigated in *Arabidopsis* in response to nitrogen deficiency stress at 4 and 7 days after this stress. The expression analysis of *NRT2.3* and *NRT2.4* genes showed increased expression at 7 days after applying nitrogen deficiency stress. But all the genes did not show a significant increase in expression at 4 days after N stress application. *NRT2.4* gene showed a significant increase in 4 and 7 days after applying nitrogen stress compared to other genes. Overall, our results showed that increased nitrate transporter gene expression in leaves contributes to nitrogen uptake for plant growth and nitrogen accumulation in response to long-term low nitrogen stress. These findings can lead to a better understanding of the mechanism of low nitrogen tolerance and therefore the increase of other cultivars with nitrogen deficiency stresses.

KEYWORDS

Arabidopsis, Gene expression, Nitrate transporter, Low nitrogen,

© 2023, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

سال دوازدهم، شماره دوم، پیاپی چهلم، زمستان ۱۴۰۱ (۱۰۹-۱۰۱)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

DOI: 10.30473/cb.2023.67299.1904

نشریه علمی

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

بررسی بیان ژن‌های نیترات ترنسپورتر در پاسخ به سطح کمبود نیتروژن در گیاه آرابیدوپسیس

عباس سعیدی[1*]، زهره حاجی‌برات[2]، محمدرضا غفاری[3]، مهرشاد زین‌العابدینی[4]

[1]گروه زیست فناوری گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

[2]گروه زیست فناوری گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

[3]گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

[4]گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:
عباس سعیدی
رایانامه: abbas.saidi@gmail.com

چکیده

نیتروژن یکی از مهمترین اجزای بیومولکول‌ها، آمینواسیدها، نوکلئوتیدها، پروتئین‌ها، کلروفیل و بسیاری از هورمون‌های گیاهی است که اجزای ضروری و موردنیاز برای رشد و تکوین گیاه می‌باشد. در شرایط کمبود نیتروژن پاسخ‌های بسیار متفاوتی در فنوتیپ گیاهان نمایان می‌شود. از جمله این تغییرات می‌توان به کاهش عملکرد، کلروز برگ، رشد گیاه و تشکیل ساختار ریشه و غیره اشاره نمود. در دهه گذشته، برای افزایش میزان بیومس و در نتیجه عملکرد گیاهان استفاده وسیعی از نیتروژن مورد توجه محققان قرار گرفته است. در این مطالعه، آنالیز بیان هفت ژن نیترات ترنسپورتر (NRT2) در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن در ۴ و ۷ روز بعد از اعمال این تنش در گیاه آرابیدوپسیس بررسی شد. آنالیز بیان ژن‌های NRT2.3 و NRT2.4 افزایش بیان در ۷ روز بعد از اعمال تنش نیتروژن را نشان دادند. اما تمامی ژن‌ها در ۴ روز بعد از اعمال تنش نیتروژن افزایش بیان معنی داری نشان ندادند. ژن NRT2.4 در مقایسه با سایر ژن‌ها هم ۴ و هم ۷ روز بعد از اعمال تنش نیتروژن افزایش معنی داری نشان داد. در مجموع، نتایج ما نشان داد که افزایش بیان نیترات ترنسپورتر در برگ به جذب نیتروژن برای رشد گیاه و تجمع نیتروژن در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن طولانی‌مدت کمک می‌کند. این یافته‌ها ممکن است باعث درک بهتر مکانیسم تحمل کم نیتروژن و در نتیجه افزایش دیگر ارقام با تنش کمبود نیتروژن شود.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس، بیان ژن، ترنسپورترهای نیترات، کمبود نیتروژن.

استناد به این مقاله:

سعیدی، عباس، حاجی‌برات، زهره، غفاری، محمدرضا و زین‌العابدینی، مهرشاد (۱۴۰۱). بررسی بیان ژن‌های نیترات ترنسپورتر در پاسخ به سطح کمبود نیتروژن در گیاه آرابیدوپسیس. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی, ۱۲(۴۰), ۱۰۹-۱۰۱.

مقدمه

نیترات منبع ضروری نیتروژن برای رشد و متابولیسم گیاه است، اما، علاوه‌بر نقش آن به‌عنوان یک ماده مغذی، نیترات یک مولکول سیگنال است که در کنترل بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی، رشد گیاه و عملکرد محصول نقش دارد (Von Wittgenstein *et al*. 2014). جذب نیتروژن در سطح ریشه رشد و بهره‌وری گیاه را برای اکثر گیاهان تعیین می‌کند. نیتروژن را می‌توان در خاک به شکل نیترات، آمونیوم، اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و سایر مواد حاوی نیتروژن یافت کرد. در خاک‌های با هوادهی خوب، نیتریفیکاسیون سریع بوده و نیترات منبع اصلی نیتروژن است (Wang *et al*. 2018). نیترات به‌راحتی در محلول خاک حل می‌شود و منجر به تغییر سریع غلظت در مزارع زراعی می‌شود (Krapp *et al*. 2014). باتوجه به افزایش جمعیت جهان از ۵ میلیارد نفر به ۹ میلیارد نفر در ۵۰ سال گذشته، افزایش محصولات زراعی به مقدار زیادی کود نیتروژن احتیاج دارد. صرف‌نظر از این واقعیت که تولید نیتروژن یک فرایند انرژی‌زا است، کارایی مصرف نیتروژن در گیاهان، به‌طور عمومی به‌عنوان کارایی در استفاده نیتروژن از خاک می‌باشد (Alboresi *et al*. 2005). کارایی مصرف نیتروژن دارای دو مؤلفه اصلی بوده که به جذب و استفاده از نیتروژن اطلاق می‌شود. برای داشتن یک گیاه غنی از نیتروژن، هر دو اجزای جذب و مصرف نیتروژن ضروری می‌باشد. جذب نیتروژن به‌طور کلی توسط ترنسپورترهای نیترات و احتمالا به ساختار ریشه گیاه مرتبط می‌باشد. نیتروژن به‌طور عمده در قالب یون‌های نیترات ($NO3^-$) و آمونیوم ($NH4^+$)مورد مصرف گیاه قرار می‌گیرد. مطالعات فیزیولوژیکی وجود دو سیستم انتقال با میل بالا برای نیترات و یک سیستم انتقال برای آمونیوم در ریشه گیاهان عالی نشان داده است. بالعکس، در آرابیدوپسیس هفت عضو از خانواده NRT2 وجود دارد که سیستم انتقال با میل ترکیبی بالا برای نیترات را کدگذاری می‌کنند. در میان آن‌ها، یون‌های نیترات نه‌تنها به‌عنوان یک ماده مغذی بلکه به‌عنوان مولکول‌های سیگنال نیز عمل می‌کنند و باعث بیان بسیاری از ژن‌های مرتبط با انتقال نیتروژن و ژن‌های متابولیزه، مانند ترنسپورترهای نیترات (NRT1) و (NRT2)، نیترات ردوکتاز (NR)، نیتریت ردوکتاز (NiR)، گلوتامین سنتاز (GS) و گلوتامات سنتاز (GOGAT) می‌شود (Vidal *et al*. 2020). برای تأمین منابع نیتروژن، انتقال‌دهنده‌هایی با میل ترکیبی بالا NRT2 نقش مهمی در جذب نیتروژن دارند (Wang *et al*. 2007).

در شرایط مختلف محیطی، گیاهان باید نیترات را به‌طور مؤثر از خاک جذب‌نموده و بین اندام‌های منبع و مخزن توزیع کنند و هموستاز نیترات را در سطح سلولی تنظیم کنند. برای انجام این‌کار، گیاهان از ترکیبی از ترنسپورترها و کانال‌ها با طیف‌های متنوعی از تمایل و ویژگی استفاده می‌کنند. بیشتر مطالعات عملکردی این پروتئین‌ها روی آرابیدوپسیس تالیانا انجام شده است. غلظت خارجی نیترات، فتوسنتز از طریق قندها، وضعیت نیتروژن گیاه و احتمالاً سیگنال‌های رشدی به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مثبت یا منفی بیان ژن *NRT2* عمل می‌کنند (Filleur and Daniel-Vedele, 1999).

خانواده ژن NRT2 به خانواده اصلی تسهیل‌کننده اصلی (MFS) ناقلین تعلق دارد و برای اولین‌بار در گیاهان عالی (از جمله آرابیدوپسیس) براساس شناسایی ترنسپورترهای نیترات با میل ترکیبی بالا شناسایی شد. در گونه مدل آرابیدوپسیس، توالی‌یابی کامل ژنوم اهمیت خانواده‌های ژنی، هم ازنظر تعداد و هم ازنظر اندازه، برای سازماندهی و تکامل ژنوم‌ها را آشکار می‌کند (Glass, 2003). بسیاری از مطالعات نشان دادند که استفاده از تکنیک‌های آنالیز بیانی با هدف شناسایی ژن‌های مهم و درگیر در نیتروژن و دیگر مواد مغذی در گونه‌های مختلف گیاهی مطلوب می‌باشند. بنابراین، ما رابطه فیلوژنتیکی بین NRT2 را بررسی کردیم. هدف از این پژوهش بررسی بیان ژن‌های نیترات ترنسپورتر تحت تیمارهای مختلف تنش نیتروژن، در این مطالعه، در مرحله گیاهچه‌ای برای تجزیه بیان در شرایط کم نیتروژن دو نقطه زمانی (۴ و ۷ روز پس از مصرف نیتروژن) بررسی شد. این یافته‌ها ممکن است به درک بهتر مکانیسم تحمل کم نیتروژن کمک کند و درنتیجه منجر به انتخاب ژن‌های پاسخگو به نیتروژن با کارایی بالا شود.

مواد و روش‌ها

شرایط رشد گیاه

بذرهای گیاهان آرابیدوپسیس (اکوتیپ کلمبیا) به‌مدت ۳ تا ۵ روز در یک اتاق سرد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و مستقیماً روی محیط حاوی کوکوپیت و پرلیت مرطوب شده کشت شدند. برای مطالعه تنش کمبود نیتروژن، گیاهان ۵ هفته‌ای به‌مدت ۴ و ۷ روز به محلول حاوی نیتروژن کافی و کمبود نیتروژن منتقل شدند. pH محلول غذایی با $CaCO3$ در حدود ۶.۲ حفظ شد. محلول غذایی شامل: ۱ میلی‌مولار $KH2PO4$،

۰.۵ میلی‌مولار MgSO4، 0.25 میلی‌مولار CaSO4، 20 میکرومولار Fe-EDTA، 25 میکرومولار H3BO3، 2 میکرومولار ZnSO4، 2 میکرومولار MnSO4، 0.5 میکرومولار CuSO4 و ۰.۵ میکرومولار (NH4)6Mo7O24 و ۰.۵ میلی‌مولار NH4NO3 شد. برای شرایط نرمال از ۲ میلی‌مولار NH4NO3 استفاده شد (سایر مواد مغذی مانند قبل باقی ماندند). تمام آزمایشات با سه تکرار انجام گرفت.

استخراج RNA و الگوی بیانی

برای تهیه RNA اختصاصی برگ، به‌طور جداگانه از گیاهچه‌های ۵ هفته ای آرابیدوپسیس تحت تنش کمبود نیتروژن و شرایط نرمال جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری ۴ و ۷ روز پس از اعمال تیمار کمبود نیتروزن انجام شد. RNA کل از برگ در شرا یط تنش نیتروژن و نرمال با استفاده از کیت Plus-RNA (Sinaclone) بر اساس دستورالعمل سازنده استخراج شد. برای حذف آلودگی DNA ژنومی باقیمانده در نمونه‌های RNA، از DNase I(شرکت فرمنتاز) استفاده شد. خلوص و غلظت RNA توسط نانو دراپ تعیین و کیفیت آن با استفاده از آنالیز ژل آگارز ۱٪ تأیید شد. سپس سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNAانجام شد. سه تکرار برای آنالیز هر ژن انجام و از ژن اکتین به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. تمام آغازگرهای مورد استفاده در آنالیز بیان ژن در جدول ۱ فهرست شده‌اند. پرایمرها با استفاده از برنامه الیگو (Oligo) طراحی شدند و همچنین با استفاده از مقاله‌های چاپ‌شده تأیید شدند. بیان ژن‌ها با دستگاه ریل‌تایم با استفاده از سایبرگرین همان‌طور که در دستورالعمل‌های سازنده توضیح داده شده است، انجام شد. برای بیان نسبی ژن‌ها از طریق $2^{-\Delta\Delta CT}$ پس از نرمال‌سازی مقدار Ct برای ژن‌های نیترات ترنسپورتر در مقابل اکتین به‌عنوان ژن مرجع تعیین شد. آنالیز qRT-PCR برای تعیین پروفایل بیان هفت ژن AtNRT2.1، AtNRT2.2، AtNRT2.3، AtNRT2.4، AtNRT2.5، AtNRT2.6، AtNRT2.7 با استفاده از بافت‌های مختلف تحت تنش نیتروژن و نرمال انجام شد. همچنین بیان این ژن‌ها در مرحله گیاهچه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در رابطه با نقش‌های متمایز برای اعضای فردی خانواده AtNRT2 مورد بحث قرار می‌گیرد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. اختلاف میان مقادیر میانگین با استفاده از آزمون Duncan در سطح احتمال معنی‌داری ۰.۰۵ انجام شد. نمودارها با استفاده از (۲۰۱۶ Office (Excel ترسیم شد و مقادیر میانگین برای سه تکرار بررسی شد. برای نشان‌دادن بیان افتراقی ژن‌ها از heatmap و از نرم‌افزار TBtools استفاده شد.

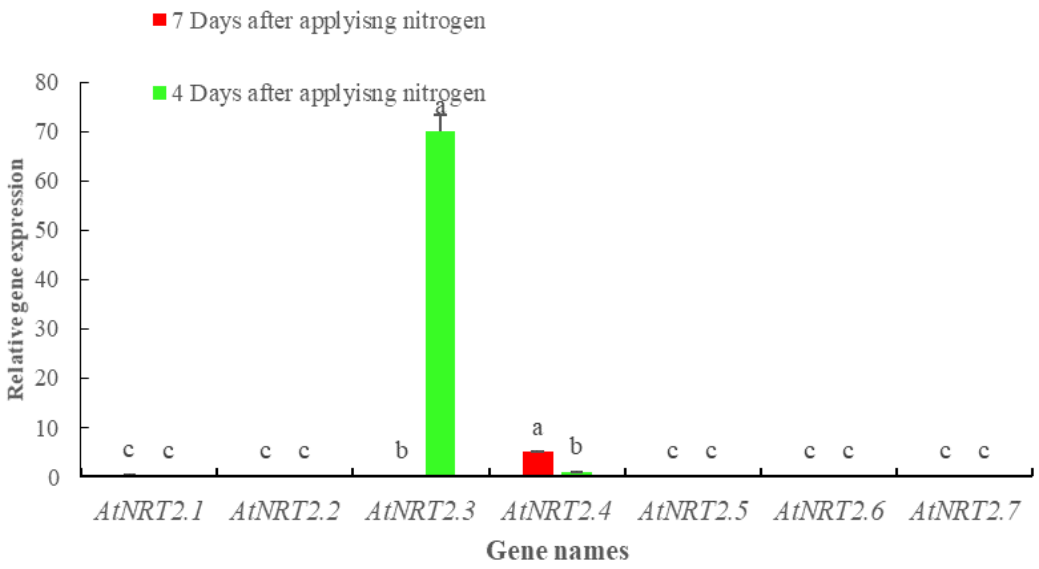
گیاهان نیتروژن را به‌عنوان منبع رشد، تولید زیست‌توده و توسعه جذب می‌کنند. نیتروژن عمدتاً به‌صورت نیترات جذب می‌شود که رایج‌ترین منبع نیتروژن موجود در گیاهان عالی است. علی‌رغم نقش اصلی ریشه گیاه در جذب و انتقال آب و مواد مغذی مانند نیترات، شواهد فراوانی مبنی بر همکاری اندام‌های هوایی گیاه یعنی برگ و ساقه در تولید محصولات فتوسنتزی و همچنین رشد ریشه در هنگام کمبود نیتروژن وجود دارد (Saidi et al., 2020). مطالعه حاضر، با استفاده از گیاهان در مرحله رویشی نشان داده شد که AtNRT2.4 عمدتاً در برگ بیان می‌شود. بررسی‌های قبلی نشان داده‌اند که این ژن تحت تیمار کمبود نیتروژن می‌تواند شاخص مفیدی برای ارزیابی تحمل یا حساسیت به کمبود نیتروژن در گیاهان باشد (Fandika *et al.* 2016; Rens *et al.* 2018 & Wang *et al.* 2018). اورسل و همکاران (۲۰۰۲) گزارش دادند که سطح بیان AtNRT2.3 در اندام هوایی بیشتر از ریشه در گیاهان رویشی بود. اکثر گیاهان از نیترات به‌عنوان منبع اصلی نیتروژن خود استفاده می‌کنند (Orsel *et al.* 2002).

جدول ۱. توالی‌های پرایمر مورد استفاده در این مطالعه
Table 1. Primer sequences used in this study.

نام پرایمر	توالی پرایمر
AtNRT2.1 F	GAGCTCTAGGCATCATCTCGG
AtNRT2.1 R	ACTGGATCTGTGGAAGGAGGC
AtNRT2.2 F	CAGGTGGAAACAGAGCTGCCATGG
AtNRT2.2 R	GGACCATAGATACAACGGCAGTGACGAG
AtNRT2.3F	TTCTCCAAGGTTTTCTGGTTTGCTG
AtNRT2.3R	TGTACCGATTGAGAAGAGCATCATTGCTAG
AtNRT2.4F	GCTGTGCTTTCCTCGTCATGCTCTCT
AtNRT2.4R	GCGATGACGTTATCGGTTGTGAGCTCT
AtNRT2.5F	GTTGATTCGTAATATGGGAGCCACCAA
AtNRT2.5R	ACCCGTCTCTCTCGTGTATGTCGATCC
AtNRT2.6F	TTCTCCAAGGTCTTTTGGTTCGCT
AtNRT2.6R	ACCTCGAGGAAGAGAAGAAAAGAAGTTGAGTAACT
AtNRT2.7F	GGAGTGAATCTGGAGGCGG
AtNRT2.7R	CCAGAGCGAGTTGACTCGT
AtActinF	CCCAAAAGCCAACAGAGAGA
AtActinR	CATCACCAGAGTCCAACACAAT

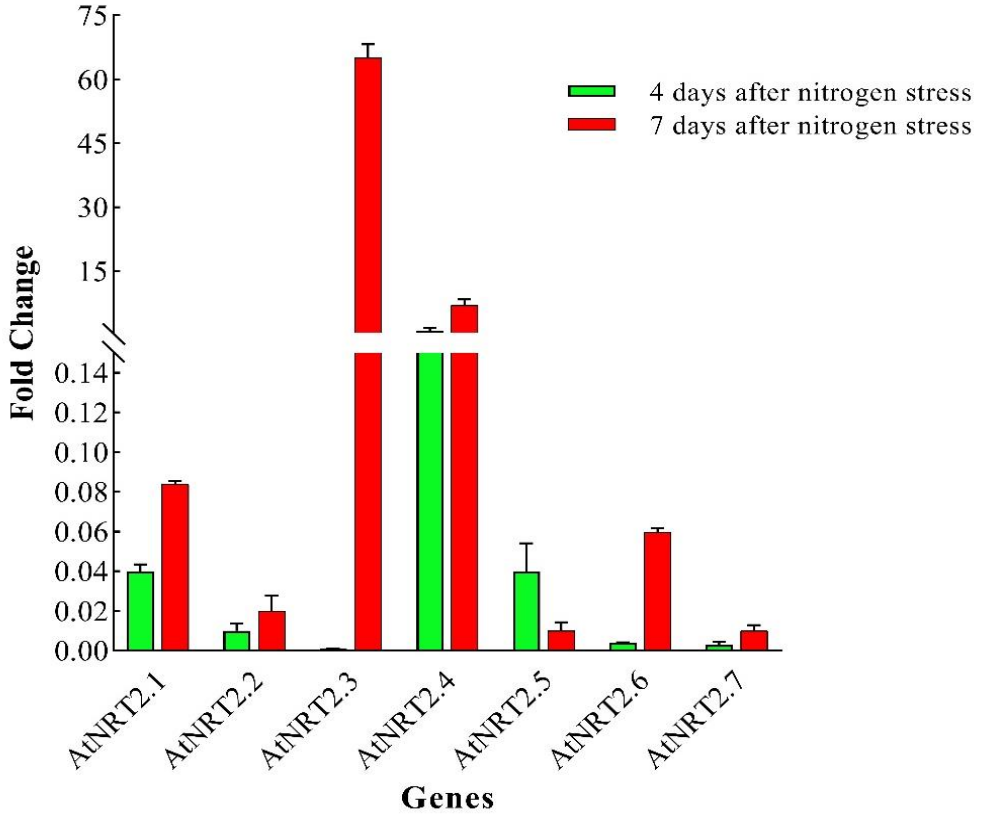
نتایج و بحث

در این مطالعه، آنالیز بیان هفت ژن نیترات ترنسپورتر (NRT2) در پاسخ به تنش کمبود نیتروژن در ۴ و ۷ روز بعد از اعمال تنش نیتروژن در گیاه آرابیدوپسیس انجام شد. آنالیز بیان ژن‌های نیترات ترنسپورتر در ۴ روز بعد از اعمال تنش افزایش بیان معنی داری نشان ندادند. تنها ژن NRT2.4 در ۴ روز بعد از اعمال تنش نیتروژن افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۱). در ۷ روز بعد از اعمال تنش نیتروژن، ژن‌های نیترات ترنسپورتر NRT2.3 و NRT2.4 افزایش معنی‌داری نشان دادند. ژن NRT2.4 هم در پاسخ کوتاه‌مدت و بلندمدت نیتروژن افزایش معنی‌داری در کمبود نیتروژن نشان داد. هفت عضو از خانواده NRT2 در آرابیدوپسیس به‌عنوان ناقل نیترات با میل ترکیبی بالا توصیف شده‌اند (Krap *et al.* 2014). بیان ZmNRT2.1 در ریشه ذرت پس از ۴ ساعت تیمار نیترات با افزایش نرخ جذب نیترات افزایش بیان نشان داد. در ذرت، آنالیز بیان چندین ژن NRT2 در پاسخ به نیترات نشان می‌دهد که ZmNRT2.1 و ZmNRT2.2 ژن‌های اصلی کنترل‌کننده جذب نیترات با میل ترکیبی بالا هستند (Garnett *et al.* 2013). یکی دیگر از ترنسپورترهای خانواده NRT2، NRT2.4، سهم مهمی در انتقال نیترات در ریشه و توزیع نیترات در برگ دارد (Lezhneva *et al.* 2014). در برنج، به نظر می‌رسد که بیان ژن‌های OsNRT2.3 توسط OsNAR2.1 تنظیم می‌شود که خود به‌صورت رونویسی توسط نیترات القا می‌شود (Yan *et al.* 2011). مطالعه قبلی نشان داد که OsNRT2.4 در رشد ریشه، مسیر متابولیک نیتروژن نقش دارد و احتمالاً عملکردهایی در انتقال نیترات از ریشه به اندام هوایی تحت دسترسی کم نیترات در برنج دارد (Ma *et al.* 2007). مطالعه‌ای نشان داد که در میان ژن‌های نیترات ترنسپورتر مورد مطالعه، NRT2.4 نشانگر بسیار خوبی برای پاسخ گرسنگی نیتروژن است (Safi *et al.* 2021). بیان NRT2.4 در طول کمبود طولانی‌مدت نیتروژن افزایش می‌یابد، درحالی‌که بیان NRT2.1 و NRT2.2 به‌طور موقت با کمبود نیتروژن افزایش می‌یابد (Zhang *et al.* 2021). پروتئین NRT2.4 نیز بر روی غشای پلاسمایی موضعی است و تصور می‌شود که در فعالیت انتقال نیترات در محدوده میل ترکیبی بسیار بالا هم در ریشه‌ها و هم در اندام‌های هوایی تحت گرسنگی نیتروژن نقش دارد (Miller *et al.* 2007). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که افزایش چشمگیر BnNRT2.4 در ریشه‌ها و به‌طور قابل‌توجهی در برگ‌ها، ساقه‌ها و پریکارپ گیاهان کلزا در پاسخ به کمبود نیتروژن افزایش یافت (Tong *et al.* 2020). نمودار Ct ژن‌های AtNRT در پاسخ به تنش در دو زمان ۴ و ۷ روز بعد از اعمال تنش نیتروژن در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۱. بیان ژنهای نیترات ترنسپورتر در پاسخ به ۴ و۷ روز بعد از اعمال تنش کمبود نیتروژن

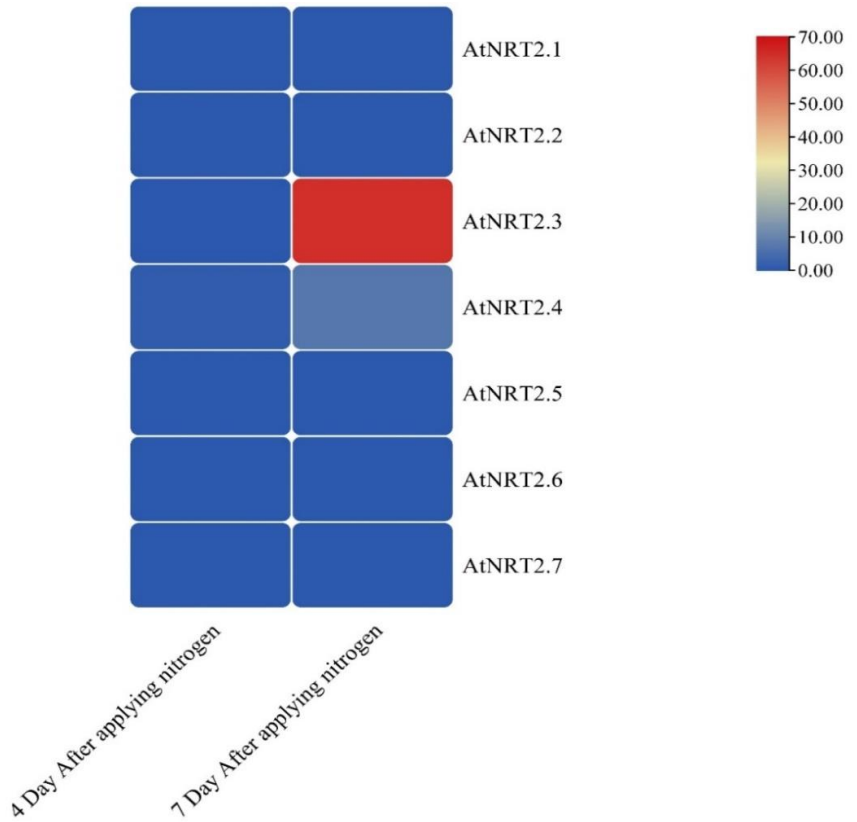
Figure 1. Expression of nitrate transporter genes in response to 4 (a) and 7 (b) days after applying nitrogen deficiency stress.



شکل ۲. نمودار Ct ژن‌های *AtNRT2* در دو زمان ۴ و ۷ روز بعد از اعمال تنش نیتروژن

Figure 2. Ct diagram of *AtNRT2* genes at 4 and 7 days after applying nitrogen stresses.

در مطالعه‌ای، سه ترنسپورتر NRT2 (NRT2.1، NRT2.2 و NRT2.4) به‌عنوان اجزای مولکولی جذب نیترات ریشه نشان داده شدند (Filleur et al. 2001). هر پنج پروتئین در سطح غشای پلاسمایی موضعی هستند و سهم نسبی آن‌ها در جذب نیترات به مرحله رشد و وضعیت نیتروژن گیاه بستگی دارد (Li *et al.* 2007). بیان NRT2.4 در طول کمبود طولانی‌مدت نیتروژن افزایش می‌یابد، درحالی‌که بیان NRT2.1 و NRT2.2 به‌طور موقت با کمبود نیتروژن افزایش می‌یابد. براساس مطالعه‌ای نشان داده شد که موقعیت ترنسپورتر اپیدرمی NRT2.4 امکان جذب نیترات در غلظت بسیار کم نیتروژن در خاک اطراف ریشه را ممکن می‌کند (Kiba *et al.* 2012). درحالی‌که جهش یافته‌های NRT2.4 هیچ فنوتیپ رشدی را تحت شرایط رشد نیتروژن کافی و محدودکننده نیتروژن نشان نمی‌دهند، جهش‌های NRT2.1، NRT2.2 و NRT2.4 زیست‌توده کمتری تحت کمبود نیتروژن تولید می‌کنند (Kiba *et al.* 2012). بنابراین، تأثیر متقابل این ناقلین مختلف در ریشه برای جذب کارآمد نیترات ضروری به‌نظر می‌رسد. به این‌ترتیب، ریشه با استفاده از خواص خاص و الگوهای بیان هر ناقل با محرک‌های مختلف سازگار می‌شود (Kiba *et al.* 2012). در بین ژن‌های نیترات ترنسپورتر، ژن‌های NRT2.3 و NRT2.4 افزایش بیان بالایی در تیمار ۷ روز بعد از اعمال کمبود نیتروزن نشان دادند. اما دیگر ژن‌های NRT2.1، NRT2.2، NRT2.5، NRT2.6 و NRT2.7 تغییر معنی‌داری نشان ندادند. در ۴ روز بعد از اعمال تنش، ژن‌های نیترات ترنسپورتر ۲.۴ (NRT2.4) افزایش بیان نشان دادند. درصورتی‌که سایر ژن‌ها افزایش یا تغییر بیان معنی‌داری نشان ندادند (شکل ۳). گیاهان مکانیسم‌های مختلفی را برای انطباق با کمبود نیتروژن ایجاد کرده‌اند. نیترات ترنسپورتر 2.4 (NRT2.4) یکی از هفت ژن خانواده NRT2 در آرابیدوپسیس است و بیان NRT2.4 تحت کمبود نیتروژن القا می‌شود (Kiba *et al.* 2012). NRT2.1 تشکیل ریشه جانبی شدیدا تحت‌تأثیر محیط قرار می‌گیرد. وضعیت و سیگنال‌های مواد مغذی به‌عنوان نیترات برای ساختار ریشه ضروری هستند. علاوه‌بر نقش آن در انتقال نیترات با میل ترکیبی بالا، NRT2.1 در شروع ریشه جانبی وابسته به نیترات نقش دارد.



شکل ۳. سطوح بیان AtNRT2 در آرابیدوپسیس تحت ۴ و ۷ روز پس از اعمال تنش نیتروژن. نقشه حرارتی الگوهای بیان ژن‌ها در کمبود نیتروژن.

Figure 3. AtNRT2 expression levels in Arabidopsis under 4 and 7 days after applying nitrogen stress. Heat map of gene expression patterns in nitrogen deficiency.

نتیجه‌گیری

نیتروژن یک درشت مغذی ضروری برای گیاهان است و در دسترس بودن آن یک عامل کلیدی برای رشد و بهره‌وری گیاه است. در این مطالعه، آنالیز بیانی ۷ ژن نیترات ترنسپورتر در ۴ و ۷ روز بعد از اعمال تنش کمبود نیتروژن بررسی شد. در میان ژن‌های مورد بررسی، ژن‌های *NRT2.3* و*NRT2.4* افزایش بیان بالایی در ۷ روز بعد از اعمال تنش مشاهده شد. همچنین ژن NRT2.4 در ۴ روز بعد از اعمال تنش افزایش بیان معنی‌داری نشان داد. نتایج ما نشان می‌دهد که این دو ژن پاسخ مناسبی به تنش‌های طولانی‌مدت نیتروژن نشان می‌دهند. جذب نیترات گیاهی یک ویژگی مهم است که باید برای بهبود عملکرد محصول و کارایی استفاده از نیتروژن درنظر گرفته شود. ما همچنین اهمیت هر ژن را براساس سطوح نسبی بیان ژن ارزیابی کردیم.

References

Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M. T., Bedu, M., Meyer, C., & Truong, H. N. (2005). Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, *28*(4), 500-512.

Fandika, I. R., Kemp, P. D., Millner, J. P., Horne, D., & Roskruge, N. (2016). Irrigation and nitrogen effects on tuber yield and water use efficiency of heritage and modern potato cultivars. *Agricultural Water Management*, *170*, 148-157.

Filleur, S., & Daniel-Vedele, F. (1999). Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from Arabidopsis thaliana by differential display. *Planta*, *207*, 461-469.

Filleur, S., Dorbe, M. F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A., & Daniel-Vedele, F. (2001). An Arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Letters*, *489*(2-3), 220-224.

Garnett, T., Conn, V., Plett, D., Conn, S., Zanghellini, J., Mackenzie, N., ... & Kaiser, B. N. (2013). The response of the maize nitrate transport system to nitrogen demand and supply across the lifecycle. *New Phytologist*, *198*(1), 82-94.

Glass, A. D. (2003). Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *22*(5), 453-470.

Kiba, T., Feria-Bourrellier, A. B., Lafouge, F., Lezhneva, L., Boutet-Mercey, S., Orsel, M., ... & Krapp, A. (2012). The Arabidopsis nitrate transporter NRT2. 4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *The Plant Cell*, *24*(1), 245-258.

Krapp, A., David, L. C., Chardin, C., Girin, T., Marmagne, A., Leprince, A. S., ... & Daniel-Vedele, F. (2014). Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *65*(3), 789-798.

Lezhneva, L., Kiba, T., Feria-Bourrellier, A. B., Lafouge, F., Boutet-Mercey, S., Zoufan, P., ... & Krapp, A. (2014). The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT 2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. *The Plant Journal*, *80*(2), 230-241.

Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N. M., Siddiqi, M. Y., & Glass, A. D. (2007). Dissection of the AtNRT2. 1: AtNRT2. 2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiology*, *143*(1), 425-433.

Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., ... & Yano, M. (2007). An efflux transporter of silicon in rice. *Nature*, *448*(7150), 209-212.

Miller, A. J., Fan, X., Orsel, M., Smith, S. J., & Wells, D. M. (2007). Nitrate transport and signaling. *Journal of Experimental Botany*, *58*(9), 2297-2306.

Orsel, M., Krapp, A., & Daniel-Vedele, F. (2002). Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant physiology*, *129*(2), 886-896.

Rens, L. R., Zotarelli, L., Rowland, D. L., & Morgan, K. T. (2018). Optimizing nitrogen fertilizer rates and time of application for potatoes under seepage irrigation. *Field Crops Research*, *215*, 49-58.

Safi, A., Medici, A., Szponarski, W., Martin, F., Clément-Vidal, A., Marshall-Colon, A., ... & Krouk, G. (2021). GARP transcription factors repress Arabidopsis nitrogen starvation response via ROS-dependent and-independent pathways. *Journal of Experimental Botany*, *72*(10), 3881-3901.

Saidi, A., Hajibarat, Z., & Hajibarat, Z. (2020). Transcriptome analysis of Phytophthora infestans and Colletotrichum coccodes in tomato to reveal resistance mechanisms. *Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol*, *28*, 39-51.

Tong, J., Walk, T. C., Han, P., Chen, L., Shen, X., Li, Y., ... & Qin, L. (2020). Genome-wide identification and analysis of high-affinity nitrate transporter 2 (NRT2) family genes in rapeseed (*Brassica napus* L.) and their responses to various stresses. *BMC Plant Biology*, *20*, 1-16.

Vidal, E. A., Alvarez, J. M., Araus, V., Riveras, E., Brooks, M. D., Krouk, G., ... & Gutiérrez, R. A. (2020). Nitrate in 2020: thirty years from transport to signaling networks. *The Plant Cell*, *32*(7), 2094-2119.

Von Wittgenstein, N. J., Le, C. H., Hawkins, B. J., & Ehlting, J. (2014). Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC Evolutionary Biology*, *14*(1), 1-17.

Wang, R., Xing, X., & Crawford, N. (2007). Nitrite acts as a transcriptome signal at micromolar concentrations in Arabidopsis roots. *Plant Physiology*, *145*(4), 1735-1745.

Wang, W., Hu, B., Yuan, D., Liu, Y., Che, R., Hu, Y., ... & Chu, C. (2018). Expression of the nitrate transporter gene OsNRT1. 1A/OsNPF6. 3 confers high yield and early maturation in rice. *The Plant Cell*, *30*(3), 638-651.

Yan, M., Fan, X., Feng, H., Miller, A. J., Shen, Q., & Xu, G. (2011). Rice OsNAR2. 1 interacts with OsNRT2. 1, OsNRT2. 2 and OsNRT2. 3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. *Plant, Cell & Environment*, *34*(8), 1360-1372.

Zhang, T. Q., Chen, Y., & Wang, J. W. (2021). A single-cell analysis of the Arabidopsis vegetative shoot apex. *Developmental Cell*, *56*(7), 1056-1074.