

谷丙转氨酶基因 *OsAlaAT4* 调控水稻氮素吸收和产量

王轶欣^{1,2} 林参³ 马刘洋² 陈龙² 奉保华² 倪深² 魏祥进² 贺记外^{1,*} 陈天晓^{2,*}

(¹湖南农业大学 农学院, 长沙 410128; ²中国水稻研究所 水稻生物育种国家重点实验室, 杭州 311401; ³江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所, 淮安 223001; *通信作者, email: hejiwai@hunau.edu.cn; chentianxiao@caas.cn)

Regulation of Nitrogen Uptake and Yield in Rice by the Alanine Aminotransferase Gene *OsAlaAT4*

WANG Yixin^{1,2}, LIN Shen³, MA Liuyang², CHEN Long², FENG Baohua², NI Shen², WEI Xiangjin², HE Jiwei^{1,*}, CHEN Tianxiao^{2,*}

(¹College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ²State Key Laboratory of Rice Biology and Breeding, China National Rice Research Institute, Hangzhou 311401, China; ³Huaiyin Institute of Agricultural Science in Xuhuai Area of Jiangsu Province, Huaian 223001, China;

*Corresponding author, email: hejiwai@hunau.edu.cn; chentianxiao@caas.cn)

Abstract: 【Objective】The investigation of *OsAlaAT4*-mediated nitrogen utilization, contributes to an insight into the rice nitrogen regulatory network and supports the breeding of high nitrogen use efficiency rice varieties 【Method】Based on the amino acid sequence of *OsAlaAT1*, homologous genes were searched in the NCBI database. A knockout vector was constructed and transformed into Nipponbare (NIP) callus via *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to obtain transgenic rice plants. Homozygous mutants were subsequently obtained. Wild-type Nipponbare (NIP) and mutant lines were grown in hydroponic systems at different nitrogen concentrations and in field trials to examine the relationship between *OsAlaAT4* and nitrogen uptake and utilization. 【Result】The homologous gene *OsAlaAT4* was identified, and the knockout vector was successfully constructed and introduced into Nipponbare (NIP), resulting in two homozygous mutant lines. Hydroponic experiments at different nitrogen concentrations showed that the plant height, dry weight, and fresh weight of the mutant lines were lower than those of the wild-type under the same treatment, while the root length of mutant lines was higher. Under 1/2 standard nitrogen (N1/2), 4 times standard nitrogen (N4), and 8 times standard nitrogen (N8) treatments, the total nitrogen content of the mutant lines (*alaat4-1* and *alaat4-2*) increased by 27.7%, 6.6%, 7.7% and 26.0%, 7.8%, 4.5%, respectively. The grain protein content of the mutant lines decreased by 3.0% and 3.3% under standard nitrogen conditions, respectively. Under low nitrogen field conditions, the plant height of the mutant lines was significantly lower than that of the wild-type. Compared to the wild-type, the nitrogen content in the leaves and stems of the two mutant lines increased by 12.1%, 13.5% and 14.4%, 6.9%, respectively, while the nitrogen content in the panicles decreased by 2.6% and 4.1%, and the yield decreased by 7.2% and 7.6%. Under high nitrogen field conditions, the number of tillers in the mutant lines was significantly higher than that of the wild-type. Compared to the wild-type, the nitrogen content in the leaves and stems of the mutant lines increased by 7.9%, 6.7% and 16.6%, 16.1%, respectively, while the nitrogen content in the panicles decreased by 4.9% and 4.5%, and the yield decreased by 6.5% and 5.4%. Under both low and high nitrogen conditions, the nitrogen use efficiency (NUE) of the mutant lines was lower than that of the wild-type. 【Conclusion】Knockout of *OsAlaAT4* resulted in increased nitrogen content in the leaves and stems of rice, but reduced nitrogen content in the panicles, protein content, and yield, resulting in reduced nitrogen use efficiency (NUE).

Key words: rice; nitrogen content; *OsAlaAT4*; nitrogen use efficiency; yield

摘要: 【目的】研究 *OsAlaAT4* 在调控水稻氮素利用中的功能, 有助于完善水稻氮调控网络, 同时为水稻高氮利用率提供理论依据。【方法】根据 *OsAlaAT1* 的氨基酸序列在 NCBI 数据库找同源基因, 构建敲除载体, 通过农杆菌介导的遗传转化方法转化日本晴愈伤组织, 从而获得水稻转基因植株并筛选纯合突变体, 将野生型日本晴与突变系通过不同氮浓度的水培试验和田间试验来验证 *OsAlaAT4* 与氮吸收利用相关。【结果】查找到同源基因 *OsAlaAT4*, 成功构建敲除载体并转入日本晴(NIP), 获得 2 个纯合突变系。不同氮浓度水培结果显示, 突变系株高、干质量和鲜质量低于相同处理的野生型, 根长大于相同处理的野生型, 在 1/2 倍标准氮(N_{1/2})、4 倍标准氮(N₄)、8 倍标准氮(N₈)处理下突变系 *alaat4-1* 和 *alaat4-2* 的整株氮含量分别提高了 27.7%、6.6%、7.7%和 26.0%、7.8%、

收稿日期: 2025-02-21; 修改稿收到日期: 2025-03-20。

基金项目: 农业生物育种国家科技重大专项(2023ZD04072); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ24C130007)。

4.5%。正常施氮条件下突变系籽粒的蛋白质含量分别降低了 3.0%和 3.3%。在低氮田条件下, 突变系的株高显著低于野生型。与野生型相比, 两个突变系的叶和茎氮含量分别提高了 12.1%、13.5%和 14.4%、6.9%, 穗部氮含量则分别降低了 2.6%和 4.1%, 产量分别降低了 7.2%和 7.6%; 高氮田条件下, 突变系的分蘖数显著高于野生型, 与野生型相比, 突变系的叶和茎氮含量分别提高了 7.9%、6.7%和 16.6%、16.1%, 穗部氮含量则降低了 4.9%、4.5%, 产量下降了 6.5%和 5.4%。无论低氮还是高氮处理下, 突变系的氮素利用率(NUE)均显著低于野生型。【结论】敲除 *OsAlaAT4* 导致水稻叶、茎中的氮含量增加, 但穗部氮含量、蛋白质含量和产量下降, 最终导致氮素利用率(NUE)下降。

关键词: 水稻; 氮含量; *OsAlaAT4*; 氮素利用率; 产量

氮素是限制水稻产量的重要营养因子^[1], 氮作为水稻生长发育过程中不可或缺的营养元素之一, 在水稻整个生命周期中起着至关重要的作用。氮是许多重要生物分子如蛋白质、核酸(DNA 和 RNA)和酶的主要组成部分, 这些分子是细胞分裂和生长的基础^[2]。在过去 50 年中, 水稻产量会受到土壤氮肥不足的限制^[3], 但过量使用氮肥又会造成环境污染^[4]。现阶段作物产量的增加大多由氮肥施用量的增加而引起, 我国水稻氮肥年投入 630 万 t, 占全球水稻氮肥消耗总量 1/3, 活性氮排放超过 169 万 t, 对空气质量和水体环境等造成的负面影响高达氮肥增产收益的 52%, 严重威胁环境安全和公众健康^[5]。然而作物的平均氮肥利用率(NUE, nitrogen use efficiency)为 40%~50%, 只有少量氮肥被吸收利用^[6], 大部分的氮肥被释放到大气或流失到水体中造成严重的环境污染, 如土壤酸化和水体富营养化等, 破坏生物多样性^[7]。因此, 提高作物氮素利用效率是实现低氮投入并高产的关键。然而植物的氮素利用是一个复杂性状, 由多个相关联的生物进程控制, 主要包括氮的同化、分配、吸收和转运^[8,9]。目前在水稻中已鉴定了一些氮高效利用相关基因, 并根据功能和特点主要分为四类: 硝酸盐转运 1/肽转运蛋白(nitrate transporter 1, NRT1/peptide transporter, PTR), 如 *OsNRT1.1A*^[10]、*OsNRT1.1B*^[11]等; 铵转运蛋白(ammonium transporter, AMT), 如 *OsAMT3.2*^[12]、*OsAMT1.1*^[13]等; 转录因子 NLP (NODULE INCEPTION (NIN)-like protein)家族, 如 *OsNLP4*^[14]等; 以及其他类型基因如 *OsGRF4*^[15]、*OsNGR5*^[16]、*OsGATA8*^[12]、*OsTCP19*^[17]等。尽管取得了这些进展, 但协调氮吸收和氮利用效率的分子机制仍不清楚, 这在一定程度上制约了提升水稻氮肥利用率相关育种工作的进程。因此, 挖掘水稻氮高效基因, 揭示其分子机制和遗传基础, 是提高水稻氮素利用率的重要目标之一。

谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, AlaAT/ALT)是一种磷酸吡哆醛依赖性酶, 广泛分布于多种植物组织与器官中。它不仅存在于叶、根和花中^[18], 也存在于其他组织, 如水果果肉^[19]以及水稻种子的

内胚乳^[20]。AlaAT 的分布多样性表明它可能在植物的生命周期中起重要作用。谷丙转氨酶通过可逆的反应催化丙氨酸(alanine, Ala)与 α -酮戊二酸生成谷氨酸和丙酮酸^[21]。谷丙转氨酶及其同源物在多种生物学过程中发挥重要作用, 比如植物过氧化物酶体中的乙醛酸转氨酶在光呼吸中发挥核心作用^[22], 在油菜中过表达大麦 *AlaAT* 基因可显著提高作物产量^[23]; 此外, 小麦 *TaAlaAT1* 还参与调控对条锈菌的防御反应^[24]。

本研究在水稻中鉴定到了一个谷丙转氨酶新基因 *OsAlaAT4*, *OsAlaAT4* 的突变影响谷丙转氨酶的活性, 进一步影响氮素向穗部运输, 导致籽粒蛋白质含量降低, 同时叶、茎的氮含量上升, 单株产量和氮利用效率降低。

1 材料与方法

1.1 试验材料来源与试验设计

1.1.1 试验材料

以粳稻品种日本晴为背景材料, 通过基因编辑得到 *OsAlaAT4* 的两个纯合突变体(*alaat4-1* 和 *alaat4-2*)。

1.1.2 进化树和保守结构域绘制

以基因 *OsAlaAT1*(LOC_Os10g25130)的氨基酸序列为模板, 利用 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)查找同源基因的氨基酸序列, 进一步用 MEGA7 构建系统进化树。*OsAlaAT* 家族的氨基酸序列利用 DNAMAN 9.0 对比。

1.1.3 *OsAlaAT4* 的基因编辑

利用在线 CRISPR-Cas9 sgRNA 设计工具 CRISPRdirect(<http://crispr.dbcls.jp/>)完成靶位点设计。输入 *OsAlaAT4* 的 CDS 序列, 选择设计(design), 网站给出多个前间隔序列临近基序(protospacer adjacent motif, PAM)附近的 20 个碱基序列。选择特异性高且编辑效率高的序列作为靶位点, 再通过水稻全基因组对比网站(<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/tools/blast>) BLAST 验证靶位点的特异性。

利用 CRISPR-Cas9 基因编辑的方法对 *OsAlaAT4* 基因进行敲除, 敲除载体使用植物 Cas9/gRNA 质粒构建试剂盒(Catalog. No.BGK032), 将构建好的质粒通过农杆菌介导遗传转化转入野生型植株日本晴, 遗传转化交由武汉艾迪晶公司完成。本研究所用引物见附表 1。

1.1.4 基因表达分析

以胚乳为材料, 对日本晴和突变系进行实时荧光定量分析(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)。采用 Trizol 法^[25]提取种子的总 RNA, 然后用 DNase I (TaKaRa, Recombinant DNase I, 2270A)消化总 RNA 中的基因组序列。用仅转录酶试剂盒(FSQ-101, TOYOBO, 日本大阪)反转录获得 cDNA, 稀释 3 倍后, 用 shishiyingguangding liangPCR 试剂盒(QPS-201, TOYOBO, 日本大阪)进行 RT-qPCR。以水稻 *OsActin*(*Os03g0718100*)作为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算相对表达量^[26]。引物信息见附表 1。

1.1.5 水培试验

水稻种子经 30% NaClO 振荡消毒 30 min 后用蒸馏水洗净, 30℃恒温箱暗培 2 d 催芽, 待种子露白后, 播入 96 孔水培盒, 每个株系播 48 株, 3 次重复。水培使用 Yoshida 水稻营养液, 氮素以 NH_4NO_3 为氮源, pH 调节至 5.5 左右。水培处理设计 4 种氮浓度处理方式: 无氮(N_0 , 0 mol/L)、1/2 倍标准氮($\text{N}_{1/2}$, 0.36 mol/L)、4 倍标准氮(N_4 , 2.88 mol/L)、8 倍标准氮(N_8 , 5.76 mol/L), 其余元素含量均相等。培养温度及光照时长为白天 30℃/12 h, 黑夜 24℃/12 h。水培 14 d 后调查相关性状并取样, 每 5 d 更换一次营养液。

1.1.6 大田试验

低氮田与高氮田试验于 2024 年在浙江省杭州市富阳区鹿山街道前山村进行, 试验材料为野生型日本晴及纯合突变体, 各种植 24 株, 3 次重复。试验田土壤基本理化特性如下: pH 值 6.88, 全氮、全磷、全钾含量分别为 1.77、0.78、25.87 g/kg。试验设两个施肥处理, 低氮田施尿素(含 N 46%) 75 kg/hm², 高氮田施尿素 180 kg/hm², 磷肥和钾肥用量相同, 过磷酸钙(含 P_2O_5 13.5%, 160 kg/hm²)作为磷肥, 使用氯化钾(含 K_2O 60%, 60 kg/hm²)为钾肥。其余农田管理同当地栽培管理措施一致。

1.2 农艺性状调查

1.2.1 植株形态指标测定

水培试验的苗高、根长用直尺测量。幼苗的鲜质量和干质量用千分之一电子天平测量。大田试验

中, 在水稻完熟期, 自水稻苗齐地面处至穗顶点测量株高。选取 10 株长势一致的植株混收后用于单株产量、粒型及粒重的测定。将收获的成熟种子置于 50℃的烘箱中烘至恒重后称重并计算单株产量, 利用万深 SC-G 自动考种仪(杭州万深检测科技有限公司)测定籽粒的粒长、粒宽及千粒重, 利用数显游标卡尺测量其粒厚。

1.2.2 植株氮含量、籽粒蛋白质含量的测定

在水稻不同生育期(分蘖盛期和完熟期)取回的植株按茎、叶、穗分样, 水培幼苗则全株测量, 经 105℃杀青 2 h, 80℃烘至恒重后称重。称重后的样品混匀粉碎, 采用 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 消化, 用凯氏定氮仪测定植株全氮含量。籽粒蛋白质含量用精米粉测量其含氮量, 并换算成蛋白质含量。

1.3 相关评价指标计算

氮吸收效率(Nitrogen uptake efficiency, NUpE)=地上部氮含量/总施氮量;

生理利用效率(Nitrogen utilization efficiency, NUE)=籽粒产量/地上部氮含量;

氮利用率(Nitrogen use efficiency, NUE)= $\text{NUpE} \times \text{NUE}$ 。

1.4 水稻氮代谢相关酶活性及产物含量的检测

取水培 14 d 的幼苗根部测定氮代谢酶活性及相关产物含量, 包括谷丙转氨酶(AlaAT)、谷氨酸合酶(GOGAT)、 α -酮戊二酸(α -kg); 分别采用谷丙转氨酶检测试剂盒(BC1555-100T/48S, Solarbio, 北京)、谷氨酸合酶检测试剂盒(BC0075-100T/96S, Solarbio, 北京)和 α -酮戊二酸检测试剂盒(G0861W, 格锐思计算苏州)测定。具体操作和酶活性及产物含量以试剂盒说明为主。

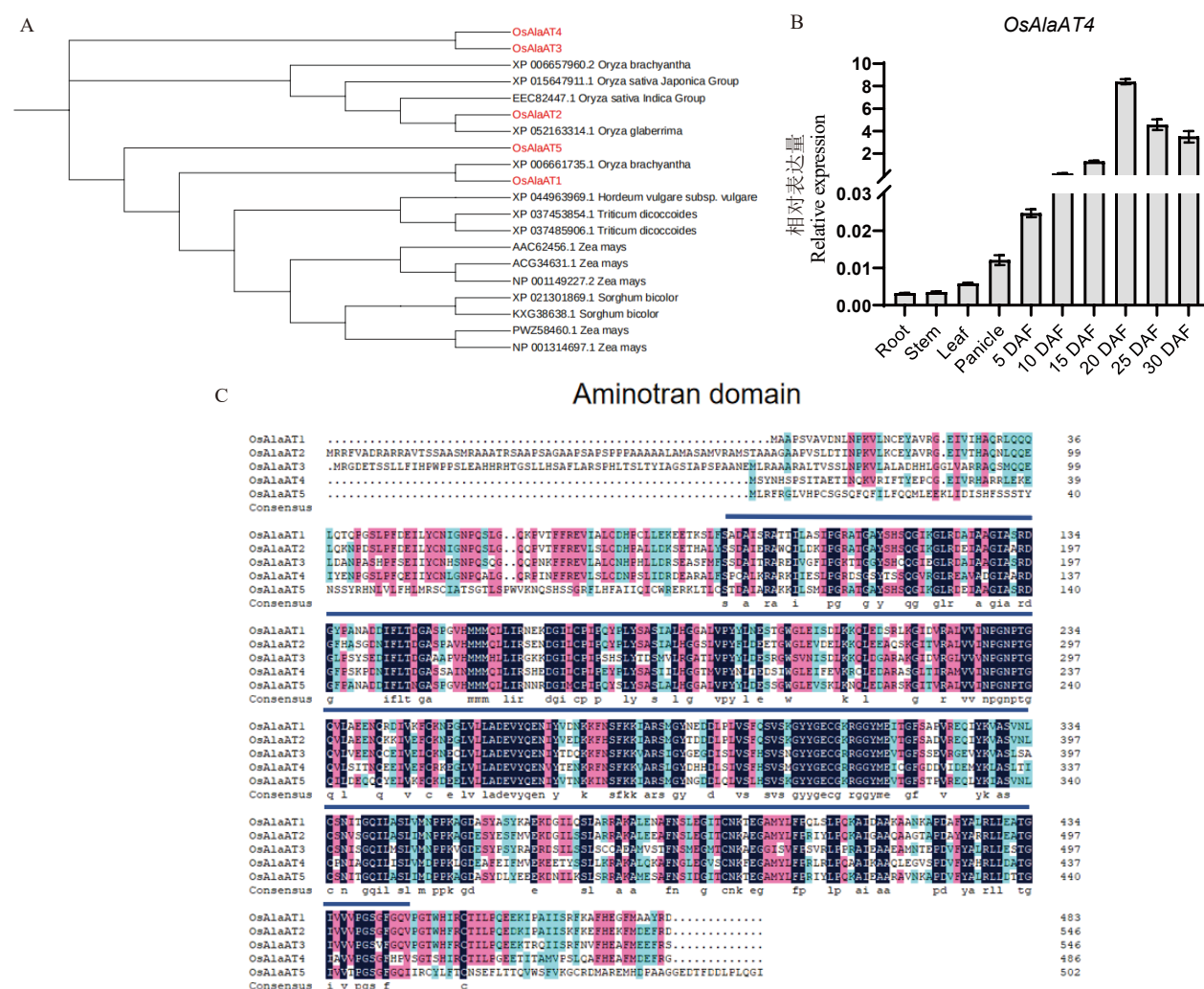
1.5 数据处理与统计分析

数据采用 Microsoft Excel 进行整理、分析, 利用 GraphPad Prism 9.0 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析

通过对已克隆基因 *OsAlaAT1*(LOC_Os10g25130)^[27]的氨基酸序列进行比对, 在水稻中查找到 4 个同源基因, 我们将其命名为 *OsAlaAT2*(LOC_Os07g42600)、*OsAlaAT3*(LOC_Os10g25140)、*OsAlaAT4*(LOC_Os09g26380)、*OsAlaAT5*(LOC_Os03g08530)(图 1-A)。水稻 *OsAlaAT4* 基因编码区序列全长 1461 bp, 共编码 486 个氨基酸。进一步对 *OsAlaAT4*(LOC_Os09g26380)进行组织表达量分



A: 进化树分析, 红色字体表示在水稻中的 *AlaAT* 家族基因; B: *OsAlaAT4* 不同组织部位的相对表达量; DAF: 受精后天数; C: 保守结构域分析, 蓝色线条下为保守氨基酸序列。

A, Phylogenetic tree analysis, with red font indicating the AlaAT family genes in rice; B, Relative expression levels of *OsAlaAT4* in different tissues; DAF, Days after fertilization; C, Conserved domain analysis, with conserved amino acid sequences under the blue lines.

图 1 进化树、表达量分析及保守结构域分析

Fig. 1. Phylogenetic tree, expression analysis, and conserved domain analysis

析,发现其主要在胚乳中特异性表达(图 1-B)。对 *OsAlaAT* 家族进行保守结构域分析,发现其保守序列共有 375 个氨基酸(图 1-C)。

2.2 *OsAlaAT4* 突变系的创制

利用农杆菌转化法将测序正确的重组载体转化水稻的愈伤组织，最终在日本晴背景下获得两种突变类型，一种是编码区第 75 位密码子处单碱基 A 缺失，导致在下游第 33 位密码子处翻译提前终止；另一种是编码区第 77 位密码子处单碱基 T 插入，导致该氨基酸由半胱氨酸(Cys)变为亮氨酸(Leu)并在下游第 159 位密码子处提前终止翻译(图 2-A, B)。对野生型和突变系进行 *OsAlaAT4* 表达量分析发现突变系表达量显著降低(图 2-C)。

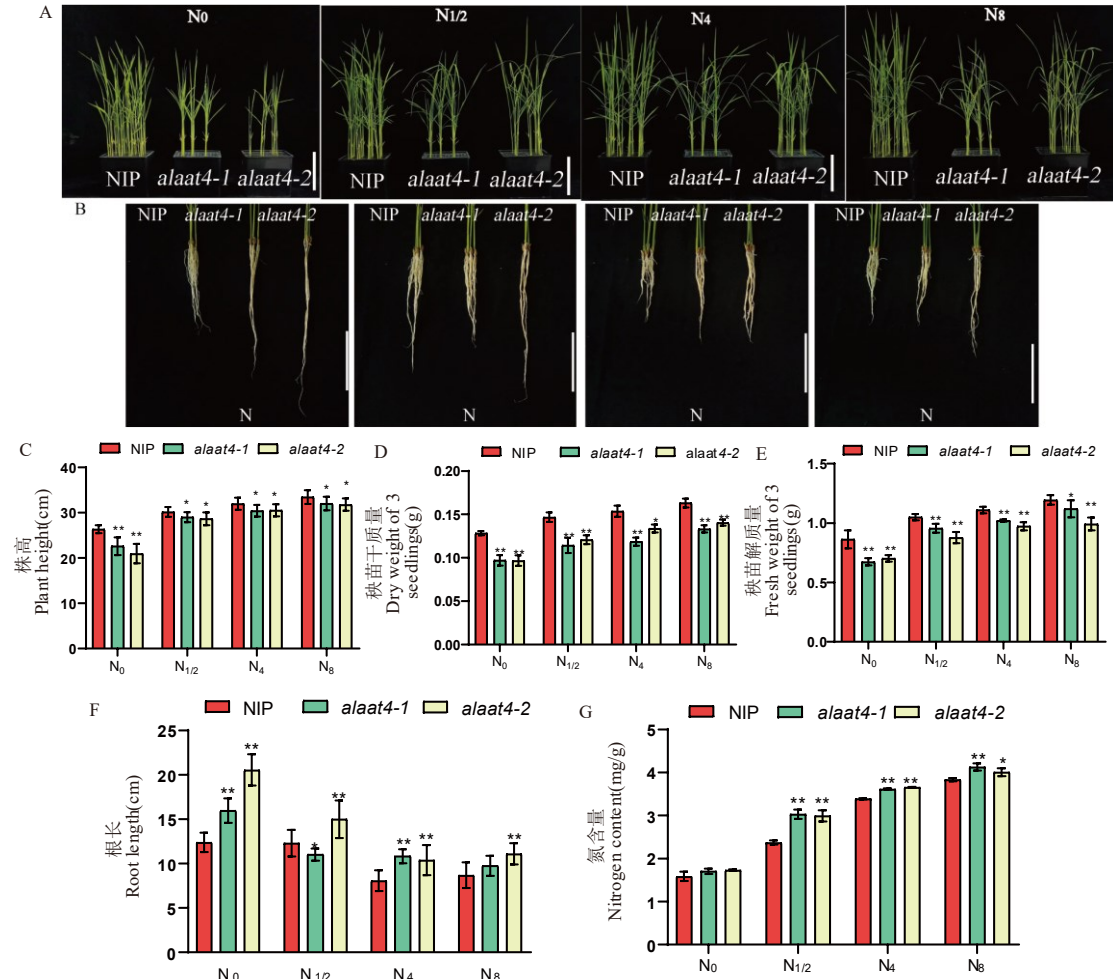
2.3 不同氮含量营养液对 *OsAlaAT4* 突变系表型和幼苗氮含量的影响

为了明确突变体是否对氮吸收有影响,收获纯合突变体种子后进行无氮(N_0)、1/2 倍标准氮($N_{1/2}$)、4 倍标准氮(N_4)、8 倍标准氮(N_8),四种不同浓度的氮梯度水培试验。结果显示,2 种突变系在不同氮浓度水培 14 d 后株高均显著低于相同处理的野生型(图 3-A, C),根长显著长于野生型(图 3-B, F),干质量和鲜质量显著低于野生型(图 3-D, E)。在 $N_{1/2}$ 、 N_4 和 N_8 条件下, *alaat4-1* 幼苗氮含量较野生型分别提高了 27.7%、6.6%和 7.7%, *alaat4-2* 分别提高了 26.0%、7.8%和 4.5%(图 3-G)。以上结果表明,水培条件下 *OsAlaAT4* 突变后幼苗地上部发育不良,



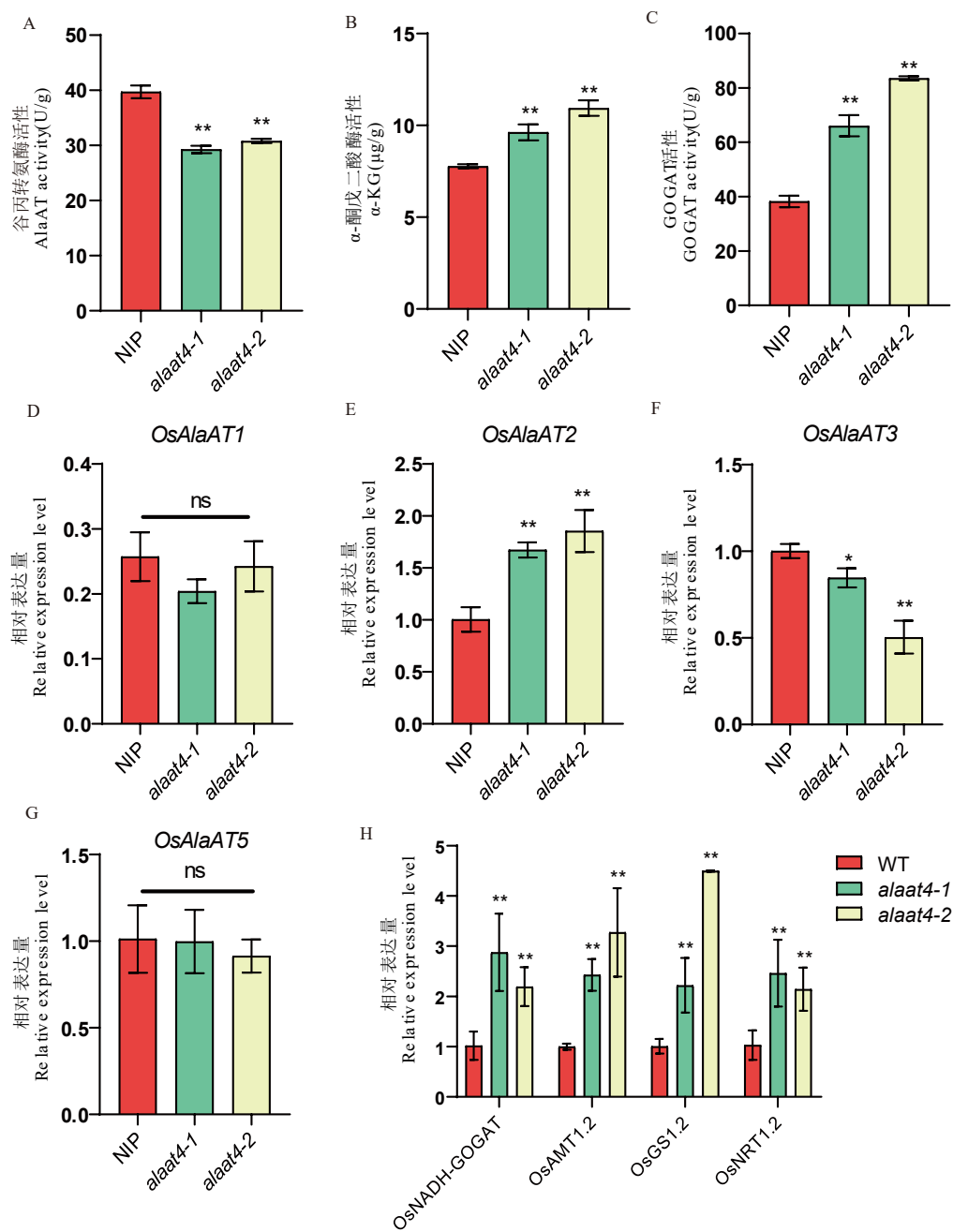
A: 2 个突变系的碱基类型, ---表示缺失的碱基序列, 红色字体表示插入的碱基; B: 2 个突变系的测序结果; C: 野生型与突变系 *OsAlaAT4* 表达量。
A, Base types of the two mutant lines, --- indicates the deleted base sequence, and red font indicates the inserted bases; B, Sequencing results of the two mutant lines; C, Expression levels of *OsAlaAT4* in the wild-type and mutant lines.

图 2 *OsAlaAT4* 的突变系鉴定
Fig. 2. Identification of *OsAlaAT4* mutant lines



A: 野生型和 *OsAlaAT4* 突变系水培 14 d 的地上部, 标尺=10 cm; B: 野生型和 *OsAlaAT4* 突变系水培 14 d 的根长, 标尺=10 cm; C: 野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的苗高; D: 野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的干质量; E: 野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的鲜质量; F: 野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的根长; G: 野生型和 *OsAlaAT4* 突变系氮含量。N₀: 无氮; N_{1/2}: 1/2 倍标准氮; N₄: 4 倍标准氮; N₈: 8 倍标准氮。
A, Above-ground part of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines after 14 days of hydroponic cultivation, bar=10 cm; B, Root length of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines after 14 days of hydroponic cultivation, bar=10 cm; C, Seedling height of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines; D, Dry weight of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines; E, Fresh weight of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines; F, Root length of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines; G, Nitrogen content of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines. N₀, No nitrogen; N_{1/2}, 1/2 standard nitrogen; N₄, 4 times standard nitrogen; N₈, 8 times standard nitrogen.

图 3 突变系幼苗表型及氮含量
Fig. 3. Phenotype and nitrogen content of mutant seedlings



A: 谷丙转氨酶活性; B: α -酮戊二酸酶活性; C: GOGAT 酶活性; D-G: 野生型与突变系中 *OsAlaAT1*、*OsAlaAT2*、*OsAlaAT3*、*OsAlaAT5* 的表达量; H 为野生型与突变系中氮转运相关基因的表达量。
A, Alanine aminotransferase (ALT) enzyme activity; B, α -Ketoglutarate enzyme activity; C, Glutamate synthase (GOGAT) enzyme activity; D-G, Expression levels of *OsAlaAT1*, *OsAlaAT2*, *OsAlaAT3*, *OsAlaAT5* in wild-type and mutant lines; H, Expression levels of nitrogen transport-related genes in wild-type and mutant lines.

图 4 关键酶活性及相关基因表达量测定

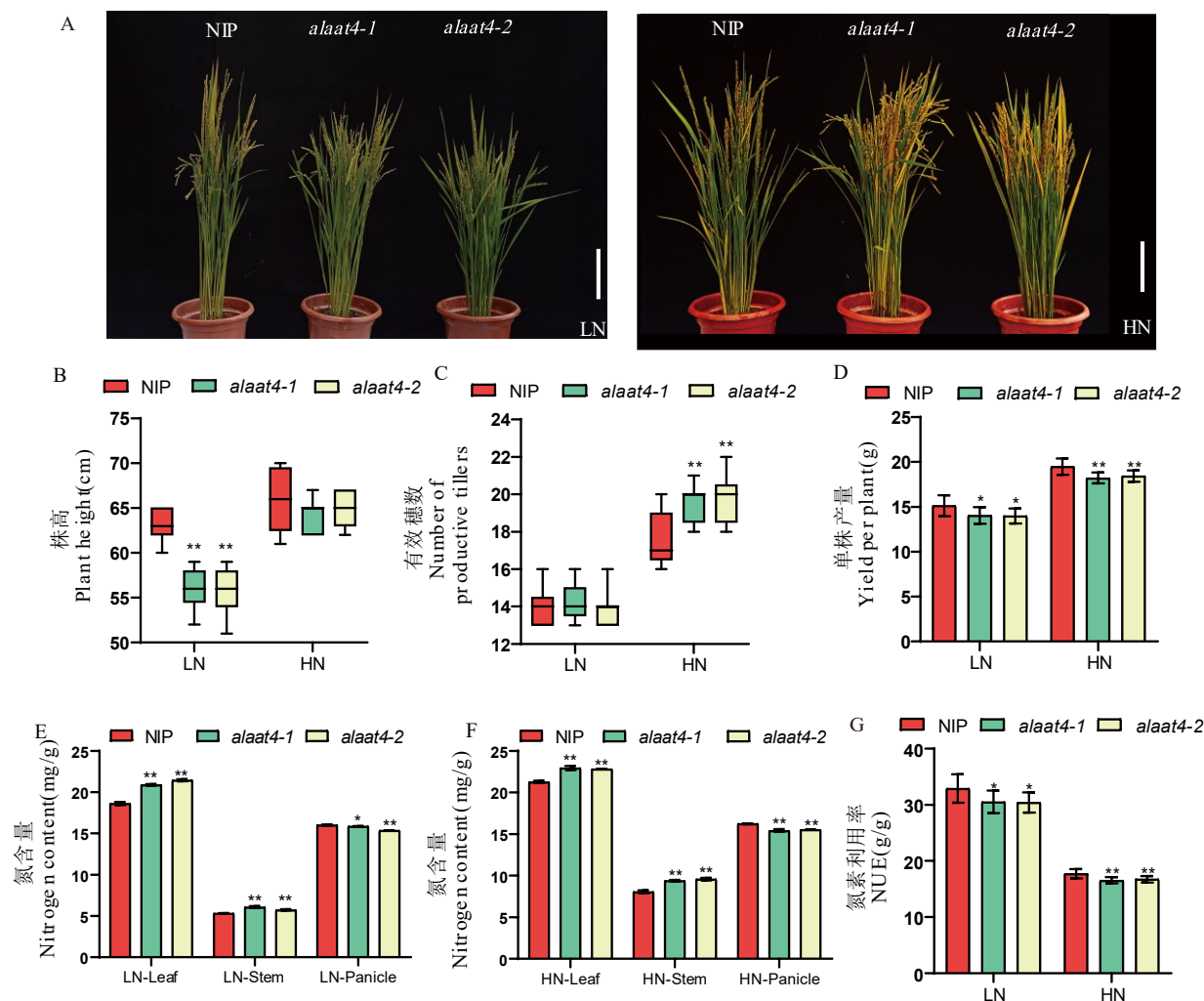
Fig. 4. Enzyme activity and related gene expression level measurement

株高、地上部鲜质量和干质量均显著低于野生型，而突变体植株氮含量显著高于野生型，表明突变体存在氮利用缺陷。

2.4 *OsAlaAT4* 突变系对氮同化酶酶活、 α -酮戊二酸含量及相关基因表达量的影响

取正常营养液水培的幼苗进行氮同化酶的酶活测定，结果表明，与野生型相比，突变系的谷丙

转氨酶(AlaAT)活性显著下降(图 4-A)。由于谷丙转氨酶活性下降，作为谷丙转氨酶底物之一的 α -酮戊二酸在突变体中大量积累(图 4-B)。当 α -酮戊二酸含量上升时，利用 α -酮戊二酸合成谷氨酸盐的谷氨酸合酶(GOGAT)活性也相应提高(图 4-C)。同源基因表达量分析表明，同一家族的 *OsAlaAT1*、*OsAlaAT5* 的表达未受到 *OsAlaAT4* 敲除的影响，但



A: 成熟期野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的表型; B: 野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的株高; C: 野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的分蘖数, $n=12$; D: 成熟期野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的单株产量; E: 低氮条件下野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的叶、茎和穗的氮含量; F: 高氮条件下野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的叶、茎和穗的氮含量; G: 野生型和 *OsAlaAT4* 突变系的氮素利用率。LN: 低氮; HN: 高氮。

A, Phenotype of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines at maturity; B, Plant height of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines; C, Number of tillers in wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines, $n=12$; D, Single-plant yield of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines at maturity; E, Nitrogen content in leaves, stems, and panicles of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines under low nitrogen conditions; F, Nitrogen content in leaves, stems, and panicles of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines under high nitrogen conditions; G, Nitrogen use efficiency (NUE) of wild-type and *OsAlaAT4* mutant lines. LN, Low nitrogen; HN, High nitrogen.

图 5 突变系田间表型、氮含量及产量

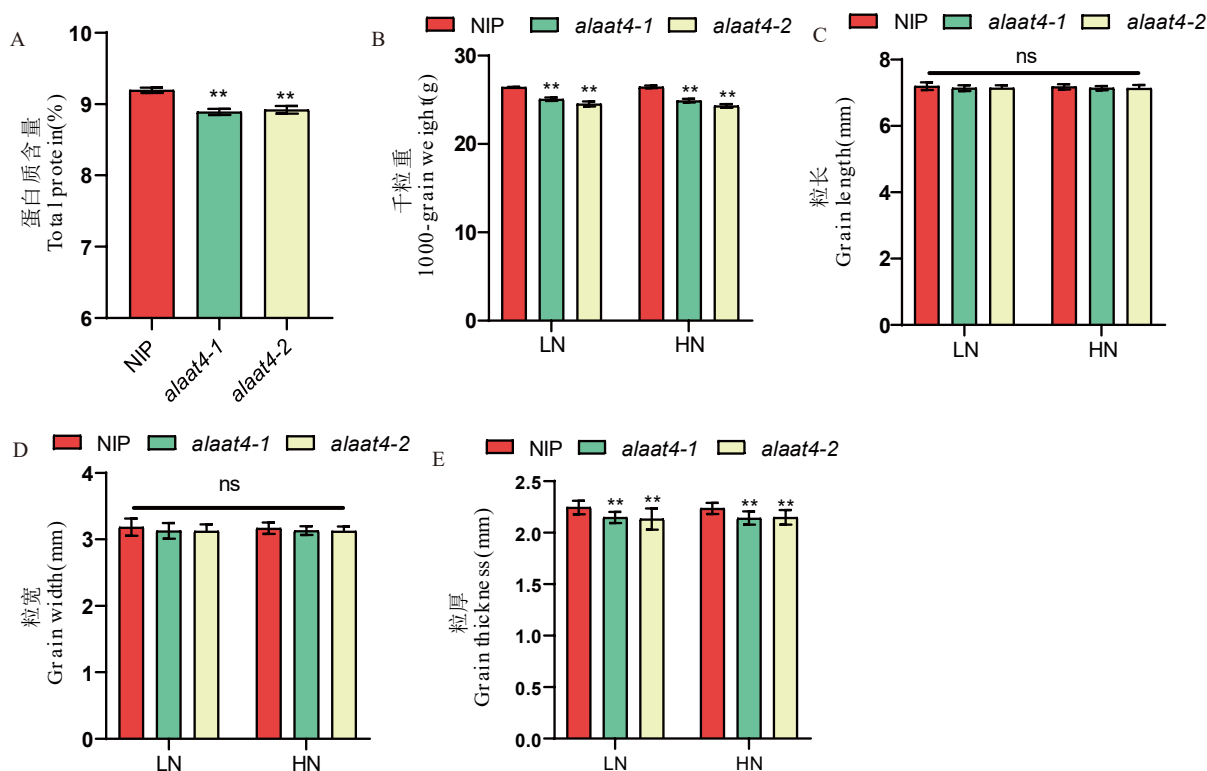
Fig. 5. Field phenotype, nitrogen content, and yield of mutant lines

OsAlaAT2 在 *alaat4* 突变体中的表达水平较野生型显著上升, *OsAlaAT3* 的表达水平显著下降(图 4-D~G)。突变体中氮转运相关基因 *OsNADH-GOGAT*、*OsAMT1.2*、*OsGS1.2* 和 *OsNRT1.2* 的表达水平较野生型均显著升高(图 4-H)。

2.5 *OsAlaAT4* 突变对主要农艺性状的影响

为了进一步验证 *OsAlaAT4* 突变对氮素吸收和转运的影响,本研究在低氮和高氮条件下对野生型和突变系进行株高、有效分蘖、氮含量和单株产量等农艺性状的考察(图 5-A)。结果表明,在低氮条件下突变系的株高显著低于野生型,而在高氮条件下则无显著差异(图 5-B);突变系分蘖数在低氮条件

下与野生型无显著差异,而在高氮条件下显著高于野生型(图 5-C)。对水稻完熟期的叶、茎和穗氮含量的测定表明,两种氮水平下,两个突变系的叶和茎部的氮含量均显著高于野生型。其中,在低氮条件下,叶片氮含量分别高出 12.1%和 13.5%,茎氮含量分别高出 14.4%和 6.9%,在高氮条件下,叶片氮含量分别高 7.9%和 6.7%,茎氮含量分别高 16.6%和 16.1%。而两个突变系穗部氮含量在低氮条件下较野生型分别下降 2.6%和 4.1%,高氮条件下穗部氮含量分别下降 4.9%和 4.5%(图 5-E, F)。进一步对单株产量进行考察,发现突变系的单株产量显著低于野生型,在低氮条件下分别降低了 7.2%和 7.6%,



A: 蛋白质含量; B: 千粒重; C-E: 粒长、粒宽、粒厚。

A, Protein content; B, Thousand-grain weight; C-E, Grain length, grain width, grain thickness.

图6 *OsAlaAT4* 突变对蛋白质和粒型的影响

Fig. 6. Impact of *OsAlaAT4* mutation on protein and grain shape

在高氮条件下分别降低了 6.5%和 5.4%(图 5-D), 最终, 无论在低氮还是高氮条件下, 突变系的氮素利用率均显著低于野生型(图 5-G)。对野生型和突变系进行粒长、粒宽、粒厚和千粒重考察, 结果发现突变系与野生型相比粒长和粒宽无显著差异, 粒厚显著下降, 导致突变系千粒重显著低于野生型(图 6-B~E)。对野生型和突变系种子的蛋白含量测定显示, 两个突变系的蛋白质含量均显著低于野生型, 分别降低了 3.0%和 3.3%(图 6-A)。以上结果表明, *OsAlaAT4* 突变系由叶和茎向穗部的氮转运存在明显缺陷, 导致氮元素在叶和茎中大量累积, 无法转化成籽粒产量, 造成突变体千粒重显著降低, 单株产量下降, 籽粒蛋白质含量减少以及氮素利用效率显著降低。

3 讨论

在植物中, *AlaAT* 参与多种代谢途径和逆境响应过程。有研究发现, 拟南芥中过表达 *AlaAT* 基因可以增加主根长度、侧根数目、叶面积并提高氮素利用率^[28]。此外, 有研究人员将大麦的 *AlaAT* 基因

在油菜中过表达后, 发现在低氮和最适氮肥条件下转基因油菜产量均提高 40%以上^[23]。Zhong 等^[29]和 Fang 等^[30]对水稻 *OsAlaAT1* 的功能研究表明, *OsAlaAT1* 突变后影响种子胚乳中淀粉的合成, 还影响水稻的碳氮代谢。本研究通过氨基酸序列比对, 在水稻中发现 4 个 *OsAlaAT1* 的同源基因 *OsAlaAT2-5*, 目前尚无关于这些基因参与水稻氮吸收利用的相关报道。我们进一步通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术创制 *OsAlaAT4* 的突变体, 功能研究发现 *OsAlaAT4* 突变后氮利用效率降低, 与 *OsAlaAT1* 突变体表现出相似的表现型。

苗期是水稻生长的重要阶段, 氮素含量对幼苗生长有重大影响。本研究中对野生型和突变系采用控制变量法来进行水培, 设置了无氮(N_0)、1/2 倍标准氮($N_{1/2}$)、4 倍标准氮(N_4)和 8 倍标准氮(N_8)四种不同氮浓度的水培试验。有研究表明, 水稻中低氮处理后的幼苗干质量显著低于野生型, 株高降低, 根长显著长于野生型^[31], 而本研究也有相似的情况出现, 突变系的地上部生长量显著下降。同时随着水培营养液的氮浓度上升, 野生型和突变系的根长呈现下降趋势, 可能是低氮胁迫提高了氮同化相关

的酶活, 促进根系伸长来增加氮吸收面积, 这与 Tian 等^[32]和姜苏育^[33]的结果一致。Fang 等^[30]对 *OsAlaAT1* 的研究表明, 随着营养液氮浓度的上升水稻幼苗的含氮量也逐步上升, 突变系的幼苗地上部氮含量显著高于相同处理的野生型, 这与本研究的结果一致。

本研究发现水稻成熟期叶、茎氮含量在 *OsAlaAT4* 突变后上升, 产量下降, 这与已克隆的 *OsAlaAT1* 的基因功能表现出相似的表型^[30]。有研究表明, 在早稻和晚稻中全氮含量高的处理其对应蛋白质含量也较高^[34], *OsAlaAT4* 在成熟期穗部的氮含量下降可能是导致其蛋白质含量下降的原因之一。GOGAT 作为氮同化的关键酶之一, 有研究表明 α -酮戊二酸可以提高 GOGAT 的酶活从而提高吸收氮素的能力^[35], 本研究中也出现了相似的结果, AlaAT 活性下降导致作为底物的 α -酮戊二酸含量上升, 导致 GOGAT 的酶活也上升。作为 AlaAT 家族的一员, *OsAlaAT4* 敲除突变体的谷丙转氨酶活性下降, 这与已发表的 *OsAlaAT1* 相同, 说明该基因正调控谷丙转氨酶活性。*OsAlaAT4* 的组织表达发现其主要在胚乳中表达, 而在根、茎、叶和穗部的表达量较低, 对敲除突变体进行直链淀粉含量的测定, 结果表明突变体的直链淀粉含量上升, 说明该基因会影响淀粉含量, 这与该基因在胚乳中高表达一致。同时对 *OsAlaAT1*、*OsAlaAT2*、*OsAlaAT3* 和 *OsAlaAT5* 进行表达量的测定发现其主要在根、穗和胚乳表达, 与 *OsAlaAT4* 的表达模式相近。而 *OsAlaAT4* 突变体中氮转运相关基因的高表达也说明该基因对氮转运有所影响, 这与 *OsAlaAT1* 的研究结果相似, 都表现出叶、茎高氮含量^[30]。

4 结论

本研究发现在水稻中敲除谷丙转氨酶基因 *OsAlaAT4*, 影响了氮素吸收和利用。水培条件下突变系幼苗株高、鲜重和干重较野生型显著下降, 植株氮含量上升, 谷丙转氨酶酶活下降, 其底物的 α -酮戊二酸含量上升并增强了 GOGAT 的酶活。在成熟期突变系叶、茎的氮含量上升, 穗部氮含量下降, 籽粒蛋白质含量下降, 由于千粒重和单株产量的下降导致最终氮素利用率(NUE)下降。

在线辅助性信息: 附表 1 请见《中国水稻科学》网站(<http://www.ricesci.cn>)

参考文献:

- [1] Tilman D, Cassman K G, Matson P A, Naylor R, Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices[J]. *Nature*, 2002, 418(6898): 671-677.
- [2] Fukushima A, Kusano M. A network perspective on nitrogen metabolism from model to crop plants using integrated 'omics' approaches[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(19): 5619-5630.
- [3] Wang Q, Nian J, Xie X, Yu H, Zhang J, Bai J, Dong G, Hu J, Bai B, Chen L, Xie Q, Feng J, Yang X, Peng J, Chen F, Qian Q, Li J, Zuo J. Genetic variations in ARE1 mediate grain yield by modulating nitrogen utilization in rice[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 735.
- [4] Chen X, Cui Z, Fan M, Vitousek P, Zhao M, Ma W, Wang Z, Zhang W, Yan X, Yang J, Deng X, Gao Q, Zhang Q, Guo S, Ren J, Li S, Ye Y, Wang Z, Huang J, Tang Q, Sun Y, Peng X, Zhang J, He M, Zhu Y, Xue J, Wang G, Wu L, An N, Wu L, Ma L, Zhang W, Zhang F. Producing more grain with lower environmental costs[J]. *Nature*, 2014, 514(7523): 486-489.
- [5] Cai S, Zhao X, Pittelkow C M, Fan M, Zhang X, Yan X. Optimal nitrogen rate strategy for sustainable rice production in China[J]. *Nature*, 2023, 615(7950): 73-79.
- [6] Raun W R, Solie J B, Johnson G V, Stone M L, Mullen R W, Freeman K W, Thomason W E, Lukina E V. Improving nitrogen use efficiency in cereal grain production with optical sensing and variable rate application[J]. *Agronomy Journal*, 2002, 94(4): 815-820.
- [7] Guo J H, Liu X J, Zhang Y, Shen J L, Han W X, Zhang W F, Christie P, Goulding K W T, Vitousek P M, Zhang F S. Significant acidification in major Chinese croplands[J]. *Science*, 2010, 327(5968): 1008-1010.
- [8] Kusano M, Fukushima A, Redestig H, Saito K. Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(4): 1439-1453.
- [9] Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: Challenges for sustainable and productive agriculture[J]. *Annals of Botany*, 2010, 105(7): 1141-1157.
- [10] Wang W, Hu B, Yuan D, Liu Y, Che R, Hu Y, Ou S, Liu Y, Zhang Z, Wang H, Li H, Jiang Z, Zhang Z, Gao X, Qiu Y, Meng X, Liu Y, Bai Y, Liang Y, Wang Y, Zhang L, Li L, Jing H, Li J, Chu C. Expression of the nitrate transporter gene *OsNRT1.1A/OsNPF6.3* confers high yield and early maturation in rice[J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(3): 638-651.
- [11] Hu B, Wang W, Ou S, Tang J, Li H, Che R, Zhang Z, Chai X, Wang H, Wang Y, Liang C, Liu L, Piao Z, Deng Q, Deng K, Xu C, Liang Y, Zhang L, Li L, Chu C. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(7): 834-838.
- [12] Wu W, Dong X, Chen G, Lin Z, Chi W, Tang W, Yu J, Wang S, Jiang X, Liu X, Wu Y, Wang C, Cheng X, Zhang W, Xuan W, Terzaghi W, Ronald P C, Wang H, Wang C, Wan J. The elite haplotype OsGATA8-H coordinates nitrogen uptake and productive tiller formation in rice[J]. *Nature Genetics*, 2024, 56(7): 1516-1526.
- [13] Kumar A, Silim S N, Okamoto M, Siddiqi M Y, Glass A D M. Differential expression of three members of the *AMT1* gene family encoding putative high-affinity NH_4^+

- transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2003, 26(6): 907-914.
- [14] Yu J, Xuan W, Tian Y, Fan L, Sun J, Tang W, Chen G, Wang B, Liu Y, Wu W, Liu X, Jiang X, Zhou C, Dai Z, Xu D, Wang C, Wan J. Enhanced OsNLP4-OsNiR cascade confers nitrogen use efficiency by promoting tiller number in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(1): 167-176.
- [15] Li S, Tian Y, Wu K, Ye Y, Yu J, Zhang J, Liu Q, Hu M, Li H, Tong Y, Harberd N P, Fu X. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture[J]. *Nature*, 2018, 560(7720): 595-600.
- [16] Wu K, Wang S, Song W, Zhang J, Wang Y, Liu Q, Yu J, Ye Y, Li S, Chen J, Zhao Y, Wang J, Wu X, Wang M, Zhang Y, Liu B, Wu Y, Harberd N P, Fu X. Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaaz2046.
- [17] Liu Y, Wang H, Jiang Z, Wang W, Xu R, Wang Q, Zhang Z, Li A, Liang Y, Ou S, Liu X, Cao S, Tong H, Wang Y, Zhou F, Liao H, Hu B, Chu C. Genomic basis of geographical adaptation to soil nitrogen in rice[J]. *Nature*, 2021, 590(7847): 600-605.
- [18] Igarashi D, Miwa T, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Ohsumi C. Identification of photorespiratory glutamate: Glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2003, 33(6): 975-987.
- [19] Rech J, Crouzet J. Partial purification and initial studies of the tomato l-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1974, 350(2): 392-399.
- [20] Kikuchi H, Hirose S, Toki S, Akama K, Takaiwa F. Molecular characterization of a gene for alanine aminotransferase from rice (*Oryza sativa*)[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39(1): 149-159.
- [21] Ricoult C, Echeverria L O, Cliquet J B, Limami A M. Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(12): 3079-3089.
- [22] Liepman A H, Olsen L J. Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate: Glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131(1): 215-227.
- [23] Good A G, Johnson S J, De Pauw M, Carroll R T, Savidov N, Vidmar J, Lu Z, Taylor G, Strocher V. Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2007, 85(3): 252-262.
- [24] 段迎辉, 郭军, 王淑娟. 小麦丙氨酸氨基转移酶基因 *TaAlaAT1* 的克隆及表达特征分析[J]. *植物病理学报*, 2009, 39(2): 139-146.
- Duan Y H, Guo J, Wang S J. Cloning and expression characteristics analysis of the wheat alanine aminotransferase gene *TaAlaAT1*[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2009, 39(2): 139-146. (in Chinese with English abstract)
- [25] 谢月兰, 崔欢, 王长龙. 水稻种子总 RNA 提取质量问题的探究[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(29): 37-46.
- Xie Y L, Cui H, Wang C L. Investigation on the quality issues of total RNA extraction from rice seeds[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(29): 37-46. (in Chinese with English abstract)
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [27] Yang J, Kim S R, Lee S K, Choi H, Jeon J S, An G. Alanine aminotransferase 1 (OsAlaAT1) plays an essential role in the regulation of starch storage in rice endosperm[J]. *Plant Science*, 2015, 240: 79-89.
- [28] McAllister C H, Good A G. Alanine aminotransferase variants conferring diverse NUE phenotypes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0121830.
- [29] Zhong M, Liu X, Liu F, Ren Y, Wang Y, Zhu J, Teng X, Duan E, Wang F, Zhang H, Wu M, Hao Y, Zhu X, Jing R, Guo X, Jiang L, Wang Y, Wan J. FLOURY ENDOSPERM12 encoding alanine aminotransferase 1 regulates carbon and nitrogen metabolism in rice[J]. *Journal of Plant Biology*, 2019, 62(1): 61-73.
- [30] Fang L, Ma L, Zhao S, Cao R, Jiao G, Hu P, Wei X. Alanine aminotransferase (OsAlaAT1) modulates nitrogen utilization, grain yield, and quality in rice[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2022, 49(5): 510-513.
- [31] 鲁丝琼. *OsNLP* 基因家族在水稻不同生育期表达分析研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2022.
- Lu S Q. Expression analysis of the *OsNLP* gene family in rice at different growth stages[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2022. (in Chinese with English abstract)
- [32] Tian Q, Chen F, Zhang F, Mi G. Possible involvement of cytokinin in nitrate-mediated root growth in maize[J]. *Plant and Soil*, 2005, 277(1): 185-196.
- [33] 姜苏育. 低氮营养对小麦幼苗根系生长与氮素吸收利用的影响及其生理机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- Jiang S Y. Effects of low nitrogen nutrition on root growth and nitrogen uptake and utilization in wheat seedlings and their physiological mechanisms[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018. (in Chinese with English abstract)
- [34] 谢桂先, 荣湘民, 刘强. 肥料不同配比对水稻产量与蛋白质含量的影响[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2004(5): 405-410.
- Xie G X, Rong X M, Liu Q. Effects of different fertilizer ratios on rice yield and protein content[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2004(5): 405-410. (in Chinese with English abstract)
- [35] 余文. 水稻 *OsHXX6* 克隆表达和催化特性研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2015.
- Yu W. Research on cloning, expression, and catalytic properties of rice *OsHXX6*[D]. Wuhan: Central China Normal University, 2015. (in Chinese with English abstract)