

密级:_____



中国科学院大学
University of Chinese Academy of Sciences

博士学位论文

水稻 *ABNORMAL CYTOKININ RESPONSE 1* 基因调控碳氮
平衡的分子机理与其分子演化的研究

作者姓名: _____ 杨晓璐

指导教师: _____ 左建儒 研究员

_____ 中国科学院遗传与发育生物学研究所

学位类别: _____ 理学博士

学科专业: _____ 遗传学

培养单位: _____ 中国科学院遗传与发育生物学研究所

二〇一五年十一月

申请博士学位论文

**水稻 *ABNORMAL CYTOKININ RESPONSE 1* 基因调控碳氮
平衡的分子机理与其分子演化的研究**

研 究 生：杨晓璐（2008 级）

导 师：左建儒（研究员）

专 业：遗传学

中国科学院遗传与发育生物学研究所

二〇一五年十一月

Fuctional Analysis of the Rice *ABNORMAL CYTOKININ*
***RESPONSE 1* Gene in the Regulation of Nitrogen-Carbon**
Balance and Its Molecular Evolution

By

Xiaolu Yang

A Thesis Submitted to

The University of Chinese Academy of Sciences

In partial fulfillment of the requirement

For the degree of

Doctor of Natural Science

Institute of Genetics and Developmental Biology

Chinese Academy of Sciences

November, 2015

独创性声明

本人郑重声明：所呈交的博士学位论文“水稻 *ABNORMAL CYTOKININ RESPONSE 1* 基因调控碳氮平衡的分子机理与其分子演化的研究”，是本人在导师的指导下独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经加以标注和致谢的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品/研究成果，也不包含为获得任何教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本论文研究做出重要贡献的其他个人和集体均已在论文中以明确方式标明并表示谢意。申请学位的论文与资料若有不实之处，本人愿承担一切责任。

学位论文作者（需亲笔）签名：杨晓琳

日期：2015年12月1日

水稻 *ABNORMAL CYTOKININ RESPONSE 1* 基因调控碳氮平衡的分子机理与其分子演化的研究

摘 要

氮是植物重要的营养元素之一。植物从环境中吸收的无机态氮通过谷氨酰胺合成酶 / 谷氨酸合酶循环 (glutamine synthetase/ glutamate synthase or glutamine: 2-oxoglutarate amidotransferase cycle, GS/GOGAT cycle) 同化为有机态氮的谷氨酰胺 (Gln) 和谷氨酸 (Glu), 继而进入各种生物合成途径被有机体利用。其中, GS 以 Glu 和 NH_4^+ 为底物合成 Gln, GOGAT 则催化氨基从 Gln 转移至 α -酮戊二酸 (2-oxoglutarate, 2-OG) 生成两分子 Glu。由于 GOGAT 催化的反应需要有机酸 2-OG 作为底物, 因此被认为是植物体内氮同化与碳循环的重要连接点。然而, GOGAT 调节碳氮代谢平衡的具体分子机制仍然不是十分清楚。

通过筛选水稻细胞分裂素反应异常突变体, 我们分离并鉴定了一个 *abnormal cytokinin response 1 (abc1)* 突变体。在正常生长条件下, *abc1-1* 突变体对细胞分裂素表现出微弱的不敏感, 而缺氮的生长条件可以增强 *abc1-1* 突变体对细胞分裂素的不敏感。田间生长的 *abc1-1* 突变体具有株高降低、分蘖数减少以及叶绿素含量降低等典型的缺氮症状, 而且其光合作用速率以及产量也均显著降低。分子遗传学和生物化学研究证明 *ABC1* 基因编码了一个具有生物学活性的依赖铁氧还蛋白的谷氨酸合酶 (ferridoxin-dependent glutamate synthase, Fd-GOGAT)。在弱等位突变体 *abc1-1* 中 Fd-GOGAT 的酶活显著降低, 而由 T-DNA 插入导致的强等位突变体 *abc1-2* 则具有更严重的缺氮症状并在苗期致死。通过代谢组学分析, 我们发现在 *abc1-1* 突变体中具有高 N/C 比的氨基酸含量显著升高, 同时三羧酸循环的中间产物也显著积累, 表明 *ABC1* 基因在调节氮代谢和碳氮平衡中发挥了重要的作用。

通过对不同亚洲栽培稻品种中 *ABC1* 基因的序列进行分析, 我们在 *ABC1* 基因的编码区发现了 5 个非同义的单核苷酸多态性位点 (single nucleotide polymorphisms, SNPs), 并根据这 5 个位点的变异将 *ABC1* 基因分为 3 类, 即粳稻品种的 *ABC1-ja* 类,

大部分（约 85%）籼稻品种的 *ABCI-in* 类，以及部分（比例 3%）籼稻品种携带的 *ABCI-in*^{V1302A} 类。另有部分籼稻品种（比例 11%）携带 *ABCI-ja* 类。通过对普通野生稻群体中 *ABCI* 基因的同源序列进行分析，我们发现不同类型的 *ABCI* 基因在普通野生稻中的分布比例与其在栽培稻中的分布比例是完全不同的，表明在粳稻和籼稻的演化过程中分别保留了 *ABCI-ja* 类和 *ABCI-in* 类基因，形成了现代栽培稻中 *ABCI* 基因在粳稻和籼稻两个亚种间的分型。

综上所述，我们证明水稻 *ABCI* 基因编码的 Fd-GOGAT 在氮代谢及碳氮平衡中发挥了重要的作用，并在亚洲栽培稻的演化过程中形成了明显的分型。

关键词：水稻，Fd-GOGAT，氮同化，代谢组，演化

**Functional Analysis of the Rice *ABNORMAL CYTOKININ RESPONSE 1*
Gene in the Regulation of Nitrogen-Carbon Balance and Its Molecular
Evolution**

ABSTRACT

Xiaolu Yang (Genetics)

Supervised by Professor Jianru Zuo

Nitrogen is one of the most essential nutrients for plant. In plants, the inorganic nitrogen absorbed from soil can be assimilated through the glutamine synthetase (GS)/ glutamine:2-oxoglutarate amidotransferase (GOGAT) (GS/GOGAT) cycle, and then be used in biosynthetic pathways. Whereas GS catalyzes the formation of glutamine (Gln) from glutamate (Glu) and ammonia, GOGAT, also named glutamate synthase, catalyzes the transfer of an amide group from Gln to 2-oxoglutarate (2-OG) to produce two molecules of Glu. Because the organic acid 2-OG is one of the substrates of GOGAT, the reaction catalyzed by GOGAT is considered as an important linker of nitrogen assimilation and carbon metabolism. However, the molecular mechanism of the regulatory role of GOGAT in the carbon-nitrogen balance is not well understood.

During the screening of the rice mutants with abnormal response to cytokinin, we isolated and characterized the *abnormal cytokinin response 1 (abc1)* mutant. Under normal growth condition, *abc1-1* shows a slightly reduced response to cytokinin; under the nitrogen deficient condition, *abc1-1* shows a more apparent phenotype in response to cytokinin. The *abc1-1* plants grown in soil displays a typical nitrogen-deficient syndrome, including dwarfs, pale green leaves and reduced tiller numbers, and the photosynthetic rate and the yield of the *abc1-1* mutant is decreased. Molecular genetic and biochemical studies

demonstrated that the *ABCI* gene encodes a functional ferredoxin-dependent glutamate synthase (Fd-GOGAT). The weak mutant allele *abc1-1* shows a significantly reduced Fd-GOGAT activity, while the T-DNA insertional mutant *abc1-2* displays more severe phenotype than *abc1-1*, and is lethal at the seedling stage. Metabolomics analysis revealed the accumulation of excessive amount of amino acids with high N/C ratio and several intermediates in the tricarboxylic acid cycle in *abc1-1*, suggesting that *ABCI* gene plays a critical role in regulating nitrogen assimilation and carbon-nitrogen balance in rice.

Through the analysis of the sequences of *ABCI* locus in rice cultivars, five non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in the *ABCI* coding sequences and characterized as 3 distinctive types of the *ABCI* gene. All *japonica* accessions carry the *ABCI-ja* type. More than 85% *indica* cultivars carry the *ABCI-in* type, and the remaining *indica* cultivars carry the *ABCI-ja* type or *ABCI-in*^{V1302A} type, which has a substitution in *ABCI-in*. However, these three types of *ABCI* in wild rice accessions show significantly different patterns compared with those cultivated rice, suggesting that *ABC-ja* and *ABCI-in* were independently maintained in the modern cultivated *japonica* and *indica* rice cultivars during domestication.

In summary, our results indicate that the rice Fd-GOGAT encoded by the *ABCI* gene plays a critical role in regulating nitrogen assimilation and carbon-nitrogen balance, and different types of the *ABCI* gene were independently selected in subspecies of *Oryza sativa* during domestication.

Key words: rice; Fd-GOGAT; nitrogen assimilation; metabolome; evolution

目 录

目 录	V
缩略词表	IX
图表索引	XIII
第一章 引言	1
1.1 植物氮同化概述	1
1.1.1 植物氮营养的功能	1
1.1.2 植物氮营养的来源	1
1.1.3 植物对氮的吸收和转运	2
1.1.4 植物对 NO_3^- 的还原	3
1.1.5 植物对 NH_4^+ 的同化	3
1.2 植物氮代谢与碳代谢相互依赖	7
1.2.1 植物碳代谢依赖于氮同化	7
1.2.2 植物氮同化依赖于碳同化	8
1.2.3 α -酮戊二酸是植物碳代谢和氮代谢的连接点	8
1.3 植物氮营养与细胞分裂素相互调控	10
1.3.1 细胞分裂素概述	10
1.3.2 植物氮营养与细胞分裂素相互调控	13
1.4 栽培稻的起源和演化	14
1.5 选题依据与研究意义	16
第二章 材料与方法	17
2.1 试验材料	17
2.1.1 植物材料	17
2.1.2 菌株	17
2.1.2 载体	17
2.1.3 酶、试剂、试剂盒和抗体	18

2.1.3.1 酶.....	18
2.1.3.2 药品及试剂.....	18
2.1.3.3 试剂盒.....	19
2.1.3.4 抗体.....	20
2.1.4 培养基.....	20
2.1.5 基本试剂和缓冲液配制.....	21
2.2 试验方法.....	22
2.2.1 植物生长条件.....	22
2.2.2 水稻基因组 DNA 的提取.....	22
2.2.3 常规 PCR 反应.....	23
2.2.4 植物总 RNA 的提取.....	24
2.2.5 反转录 PCR.....	24
2.2.6 定量反转录 PCR.....	24
2.2.7 遗传互补载体的构建.....	25
2.2.8 质粒提取及 DNA 片段回收.....	26
2.2.9 热激转化法.....	26
2.2.10 农杆菌电激感受态细胞的制备及电激转化法.....	26
2.2.11 水稻遗传转化.....	27
2.2.12 细胞分裂素敏感性分析.....	27
2.2.13 谷氨酸饲喂试验.....	28
2.2.14 叶绿素含量测定.....	28
2.2.15 光合作用速率的测定.....	29
2.2.16 植物总蛋白的提取.....	29
2.2.17 蛋白质浓度测定.....	29
2.2.18 蛋白免疫印迹分析.....	30
2.2.19 Fd-GOGAT 酶活分析.....	30
2.2.20 代谢组学分析.....	31
2.2.21 蛋白质三维结构的预测.....	32

2.2.22 核苷酸多样性分析	32
第三章 结果	33
3.1 水稻细胞分裂素反应异常突变体 <i>abc1-1</i> 的表型分析	33
3.1.1 <i>abc1-1</i> 突变体对细胞分裂素的敏感性降低	33
3.1.2 <i>abc1-1</i> 突变体的营养生长受到抑制	35
3.1.3 <i>abc1-1</i> 突变体的产量下降	37
3.2 <i>ABC1</i> 基因的分子克隆	39
3.2.1 <i>ABC1</i> 基因的图位克隆	39
3.2.2 <i>abc1</i> 突变体的等位分析	41
3.2.3 <i>abc1-1</i> 突变体的转基因互补	42
3.3 <i>ABC1</i> 基因的表达分析	43
3.4 <i>ABC1</i> 是一个具有生物学功能的 Fd-GOGAT	44
3.4.1 <i>abc1-1</i> 的突变不影响 <i>ABC1</i> 基因的表达和 <i>ABC1</i> 蛋白的积累	44
3.4.2 <i>abc1-1</i> 突变体中 <i>ABC1</i> /OsFd-GOGAT 的活性降低	45
3.5 <i>ABC1</i> /OsFd-GOGAT 蛋白的结构分析	48
3.5.1 <i>ABC1</i> /OsFd-GOGAT 是一个保守的蛋白	48
3.5.2 <i>ABC1</i> 蛋白的同源建模	50
3.6 <i>abc1-1</i> 突变体的氨基酸代谢和碳代谢异常	52
3.7 <i>ABC1</i> 基因的遗传多样性	57
3.7.1 亚洲栽培稻中 <i>ABC1</i> 基因的多样性	57
3.7.2 普通野生稻中 <i>ABC1</i> 基因的多样性	58
3.7.3 <i>ABC1</i> 基因在栽培稻的驯化中没有被人工选择	60
3.8 <i>ABC1</i> 基因的多样性不直接参与栽培稻亚种间对氮的差异反应	61
3.8.1 <i>ABC1</i> 蛋白中的差异氨基酸远离已知的活性中心	61
3.8.2 <i>ABC1-ja</i> 与 <i>ABC1-in</i> 的活性差异不显著	63
第四章 结论与讨论	67
4.1 <i>ABC1</i> 基因调控水稻体内氮代谢及碳氮平衡	67
4.2 <i>ABC1</i> 基因通过调控氮同化水平调控细胞分裂素反应	69

4.3 <i>ABC1</i> 基因在栽培稻群体中具有籼粳分型	70
4.4 工作展望	71
附录 A	73
附录 B	77
参考文献	79
作者简介	95
致 谢	97

缩略词表

2-OG	2-oxoglutarate; α -ketoglutaric acid
2OGMT	2-oxoglutarate/malate translocator
6-BA	6-benzyl adenine
ABC1	ABNOEMAL CYTOKININ RESPONSE 1
Acetyl-CoA	acetyl-coenzymeA
AMT	ammonium transporter
Arg, R	arginine
AS	asparagine sythetase
Asn	asparagine
Asp, D	aspartate
ATP	adenosine triphospat
BSA	albumin from bovine serum
Cit	citrate
CKX	cytokinin oxidase
CLC	chloride channel
CO ₂	carbon dioxide
CRE1	CYTOKININ RESPONS 1
Cys, C	cysteine
DJ	Dongjin
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTC	tricarboxylate transporter
DTT	DL-dithiothreitol
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
Fd	ferridoxin
Fd-GOGAT	ferridoxin-dependent glutamate synthase

FMN	flavin mononucleotide
Fum	fumaric acid
G6P	Glucose 6-phosphate
GC/MS	gas chromatograph-mass spectrometry
GDC	glycine decarboxylase
GDH	glutamate dehydrogenase
Gln	glutamine
Glu, E	glutamate
GOGAT	glutamine:2-oxoglutarate amidotransferase; glutamate synthase
GS	glutamine synthetase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
His, H	histidine
HPP	His-Pro-Pro domain
HKs	histidine kinases
HPs	histidine phosphotransfer proteins
IDH, ICDH	isocitrate dehydrogenase
Ile	isoleucine
iPRTP	isopentenyladenosine-5'-triphosphate
IPT	isopentenyl transferase
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalacto pyranoside
KT	kinetin
LB	Luria-Bertani medium
Leu	leucine
Lys, K	lysine
Mal	Malate
Met	methione
MS	Murashige & Skoog medium
N/C	nitrogen/carbon

NADH	coenzyme I reduced
NADH-GOGAT	NADH-dependent glutamate synthase
NADPH	coenzyme II reduced
NiR	nitrite reductase
NO	nitric oxide
NPB	Nipponbare
NPF	NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER
NR	nitrate reductase
NRT	nitrate transporters
Oxa	oxaloacetate
PDC	pyruvate decarboxylase complex
PEP	phosphoenol pyruvate
PEPC	phosphoenolpyruvate carboxylase
Phe	phenylalanine
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
Pro, P	proline
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
RHP	Rice HapMap Project
RRs	response regulators
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Ser	serine
ShikA	shikimic acid
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SPAD	Soil-plant analysis development
SSR	simple sequence repeats
SucA	succinic acid
Succinyl-CoA	Succinyl-coenzymeA

TCA	tricarboxylic acid
TCS	two component system
T-DNA	transferred DNA
Thr	threonine
TP	triosephosphate
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
Trp	tryptophan
Tyr	tyrosine

图表索引

图 1.1 植物体中依赖谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合酶循环的氮同化过程	4
图 1.2 植物细胞对氮的转运及同化过程示意图	6
图 1.3 植物细胞中碳代谢和氮代谢简图	9
图 1.4 细胞分裂素信号转导途径简图	12
图 1.5 亚洲栽培稻驯化的遗传及地理起源	15
图 3.1 <i>abc1-1</i> 突变体对细胞分裂素的敏感性降低	34
图 3.2 <i>abc1-1</i> 突变体的生长发育表型	36
图 3.3 <i>abc1-1</i> 突变体的产量相关性状	38
图 3.4 <i>ABC1</i> 基因的图位克隆	40
图 3.5 <i>abc1</i> 突变体的遗传等位分析	41
图 3.6 <i>abc1-1</i> 突变体的转基因拯救	42
图 3.7 <i>ABC1</i> 基因的表达模式分析	44
图 3.8 <i>abc1</i> 突变体中 <i>ABC1</i> 基因的表达水平及 <i>ABC1</i> 蛋白的积累情况	45
图 3.9 Fd-GOGAT 的酶活分析	46
图 3.10 谷氨酸饲喂试验	47
图 3.11 Fd-GOGAT 蛋白在不同物种中的系统进化树分析	49
图 3.12 <i>ABC1</i> 蛋白三维结构的预测	51
图 3.13 野生型植物及 <i>abc1-1</i> 突变体中重要碳氮代谢物的水平	53
图 3.14 野生型植物和 <i>abc1-1</i> 突变体中部分氨基酸的含量	55
图 3.15 野生型植物和 <i>abc1-1</i> 突变体中部分有机酸和糖类物质的含量	56
图 3.16 栽培稻中 <i>ABC1</i> 基因的单核苷酸多态性分析	58
图 3.17 <i>ABC1</i> 基因在栽培稻驯化过程中的演化	59
表 3.1 亚洲栽培稻和普通野生稻中 <i>ABC1</i> 基因的核苷酸多样性分析与中性测验	61
图 3.18 <i>ABC1</i> 蛋白中具有多样性的氨基酸残基的位置分析	62
图 3.19 <i>ABC1-ja</i> 基因染色体片段代换系的 Fd-GOGAT 活性分析	64

图 3.20 染色体片段代换系 VD100 和 VD125 的粒型分析	65
表 A1 遗传定位所用引物序列	73
表 A2 <i>ABCI</i> 基因编码区测序所用引物序列	74
表 A3 基因型鉴定所用引物序列	75
表 A4 载体构建所用引物序列	75
表 A5 qRT-PCR 所用引物序列	75
表 B1 40 个水稻品种中 <i>ABCI</i> 基因的 5 个非同义 SNPs 列表	77

第一章 引言

1.1 植物氮同化概述

1.1.1 植物氮营养的功能

氮是植物必需营养的元素之一，是植物体内许多重要有机化合物的组成成分。氮元素是主要生物大分子的基本骨架，包括氨基酸、蛋白质、核酸、叶绿素、激素等，因此它被认为是植物生长的主要限制因子(Crawford and Forde, 2002)。高等植物在低氮条件下生长会出现生长迟缓、植株矮小、叶色减淡、叶片由下部开始向上逐渐失绿等症状，同时也会影响花芽的形成及果实的发育，此外，禾本科植物缺氮还会出现分蘖减少、穗形变小、产量和品质下降等症状(Borrell et al., 2001; Borrell et al., 1998)。

1.1.2 植物氮营养的来源

植物从环境中获取氮营养的方式主要有两种：一是通过与固氮微生物共生形成根瘤进行固氮，这种方式主要存在于豆科植物和少数非豆科植物中；二是通过根系从土壤中获取氮元素，这种方式是非豆科植物氮营养的主要来源。土壤中的氮可以分为有机态氮和无机态氮两大类。其中，有机态氮主要来源于生物躯体的腐烂分解，然而这些物质可溶性较差，只有少数可溶性含氮有机物如氨基酸、酰胺、尿素等可以被植物吸收利用(Näsholm et al., 2009)。此外，一些植物也被证明可以直接吸收利用土壤中的蛋白质(Paungfoo-Lonhienne et al., 2008)。土壤中的无机态氮因其分子量小、可溶性好，利于被植物吸收利用，其中硝酸盐(NO_3^-)和铵盐(NH_4^+)是植物根系从土壤中吸收无机态氮的主要形式。通常认为大多数植物偏好以 NO_3^- 作为初级氮源(Crawford, 1995)，但植物对 NO_3^- 和 NH_4^+ 的偏好性与植物种类及生长环境有关，例如半水生植物水稻，由于特殊的生长环境，对 NH_4^+ 具有明显的偏好性(Freney et al., 1985; Kronzucker et al., 2000)。

1.1.3 植物对氮的吸收和转运

植物根系对土壤中氮的吸收的第一步是跨越根表皮和皮层细胞的主动运输(Krapp, 2015)。在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,至少有 4 个铵盐转运子(ammonium transporters, AMTs)和 6 个硝酸盐转运子(nitrate transporters, NRTs)参与根系对土壤中氮的吸收过程。AMTs 的基因表达模式、蛋白翻译后修饰和蛋白的亚细胞定位使其能够将土壤中的 NH_4^+ 从表皮直接运输到维管组织,并可以适应土壤中不同的 NH_4^+ 浓度(Wang et al., 2013; Yuan et al., 2013; Yuan et al., 2007)。而 NRTs 则可以根据其对 NO_3^- 的亲合性分为高亲和性和低亲和性两类,当植物处于低浓度氮的生长条件下,高亲和性 NRTs 起主要作用,而当植物处于高浓度氮的生长条件下,低亲和性 NRTs 起主要作用(Forde, 2000)。拟南芥 NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER 家族蛋白是一类对 NO_3^- 具有低亲和性的硝酸盐转运子(Krapp, 2015; L  ran et al., 2014),它的 53 个成员中只有 2 个成员参与了对高浓度 NO_3^- 的吸收,即 AtNPF6.2/NRT1.4 和 AtNPF6.3/NRT1.1。其中,AtNPF6.3/NRT1.1 是一个具有双重亲和性的硝酸盐转运子,它能够通过磷酸化改变自身对 NO_3^- 的亲合性以适应土壤中 NO_3^- 的浓度(Liu and Tsay, 2003)。此外,通过对蛋白结构的解析证明 AtNPF6.3/NRT1.1 不仅是 NO_3^- 的转运子,同时也是 NO_3^- 的传感受体(Parker and Newstead, 2014; Sun et al., 2014b)。相比之下,拟南芥 NITRATE TRANSPORTER 2 家族所包含的 7 个成员中,至少有 4 个在根系对土壤中低浓度 NO_3^- 的吸收作用中发挥作用,包括 AtNRT2.1、AtNRT2.2、AtNRT2.4 和 AtNRT2.5。其中 AtNRT2.1 是拟南芥在低氮条件下最主要的硝酸盐转运子,AtNRT2.1 功能缺失突变体在低氮条件下生长速率显著降低(Li et al., 2007)。近年来的研究表明,在水稻(*Oryza sativa*)、苜蓿(*Medicago truncatula*)等高等植物中存在与拟南芥类似或者组成更复杂的氮吸收系统(Pellizzaro et al., 2014; Tang et al., 2012; Xu et al., 2012)。

NO_3^- 被植物的根系吸收之后,一部分直接进入同化过程或储存在液泡中,另一部分则被转运至植物的地上部分(Krapp, 2015)。在拟南芥中,在中柱细胞中表达的低亲和性硝酸盐转运子 NPF7.3/NRT1.5 直接参与了根中 NO_3^- 向木质部导管转运的过程

(Lin et al., 2008)。植物根系吸收的 NO_3^- 向地上部分运输的过程主要依靠的是植物的蒸腾拉力，同时也需要在维管组织附近表达的硝酸盐转运子的辅助。拟南芥 NPF7.2/NRT1.8 和 NPF2.9/NRT1.9 主要在木质部薄壁细胞和伴胞细胞中表达，这两种低亲和性硝酸盐转运子在 NO_3^- 向地上部分的运输中发挥了作用(Li et al., 2010; Wang and Tsay, 2011)。然而，一些胁迫也会引起 NO_3^- 由地上部分向地下部分转移，以减少氮同化与光合作用的偶联，拟南芥 AtNPF7.2/NRT1.8 和 AtNPF7.3/NRT1.5 被证明在此过程中对 NO_3^- 的转运起到了重要作用(Zhang et al., 2014)。

1.1.4 植物对 NO_3^- 的还原

植物从土壤中吸收的 NH_4^+ 可以直接进入氮的同化过程，而 NO_3^- 则需要被还原为 NH_4^+ 才能进入氮同化过程。植物体内的 NO_3^- 首先在细胞质中被硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)还原为亚硝酸盐(NO_2^-)，而后进入叶绿体，进一步被亚硝酸还原酶(nitrite reductase, NiR)还原为 NH_4^+ (Lam et al., 1996)。近年来，研究发现植物体内 NO_2^- 由胞质向叶绿体的跨膜运输是由 HPP 家族的蛋白介导的，这类蛋白含有 4 个跨膜结构域和 1 个高度保守的 His-Pro-Pro 结构(Maeda et al., 2014)。由于植物对 NO_3^- 还原的两步反应需要消耗 NADPH 或铁氧还蛋白作为还原力，因此该过程受到了严格的代谢调控。

1.1.5 植物对 NH_4^+ 的同化

植物体内 NH_4^+ 的来源主要包括根系直接从土壤中吸收的 NH_4^+ 、由 NO_3^- 还原得到的 NH_4^+ 、光呼吸作用产生的 NH_4^+ 及氨基酸降解产生的 NH_4^+ 等。植物对这些 NH_4^+ 的同化主要是通过谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS; EC 6.3.1.2)和谷氨酸合酶(glutamate synthase or glutamine:2-oxoglutarate amidotransferase, GOGAT)组成的循环反应来完成的(Coruzzi, 2003; Masclaux-Daubresse et al., 2010; Xu et al., 2012)。

GS 催化一分子 NH_4^+ 与一分子谷氨酸(Glu)结合生成一分子谷氨酰胺(Gln) (图 1.1)。前人通过生物化学的方法在植物中分离到了两类 GS，分别是定位于细胞质中

的 GS1 和定位于叶绿体中的 GS2 (Guiz et al., 1979; Lam et al., 1996; Lea et al., 1990; Mann et al., 1979; Stasiewicz and Dunham, 1979)。其中, GS1 主要参与根中氮的初级同化(Miflin, 1974)以及维管束中氮的转运(Carvalho et al., 1992; Kamachi et al., 1992), 而 GS2 主要参与叶片中对光呼吸产生的 NH_4^+ 的再同化(Kendall et al., 1986)。

GOGAT 催化 Gln 的氨基转移到 α -酮戊二酸(2-oxoglutarate, 2-OG)上生成两分子的 Glu, 使 GS/GOGAT 循环净生成一分子的 Glu (图 1.1)。在植物中主要存在着两类 GOGAT, 依据它们的电子供体分别被命名为依赖铁氧还蛋白的谷氨酸合酶(ferredoxin-dependent glutamate synthase, Fd-GOGAT; EC 1.4.1.7)和依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的谷氨酸合酶(NADH-dependent glutamate synthase, NADH-GOGAT; EC 1.4.1.14) (Forde and Lea, 2007; Temple et al., 1998)。上述两类 GOGAT 均定位于质体中, 但具有不同的组织特异性和生化特征。Fd-GOGAT 在光合作用组织中具有较高的活性, 能够直接利用光能作为还原力, 而 NADH-GOGAT 主要存在于非光合作用的组织中, 主要从磷酸戊糖途径获得还原力(Bowsher et al., 2007; Forde and Lea, 2007; Lam et al., 1996)。Fd-GOGAT 在叶片中大量富集, 这与其在对光呼吸过程中产生氨的再同化中发挥的重要作用是一致的, 而 NADH-GOGAT 则主要在对根系吸收的氮的初级同化和植物体内含氮有机物降解产生的氨的再利用过程中发挥作用(Lam et al., 1996; Suzuki and Knaff, 2005)。

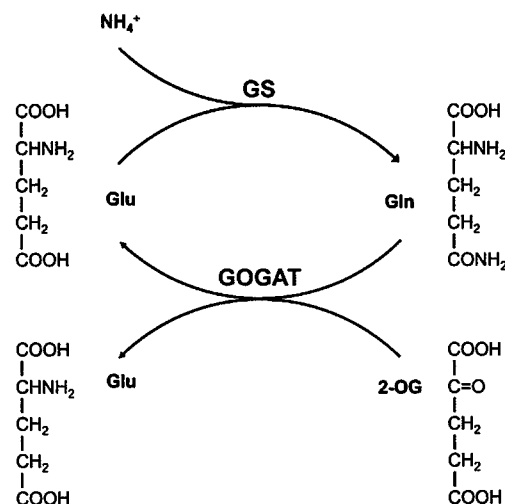


图 1.1 植物体中依赖谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合酶循环的氮同化过程。

植物体内的 NH_4^+ 在谷氨酰胺合成酶(GS)的催化下固定于一分子谷氨酸(Glu)上, 生成一分子谷氨

酰胺(Gln); 这一分子 Gln 继而在谷氨酸合酶(GOGAT)的催化下发生转氨基作用, 将氨基转移到一分子 α -酮戊二酸(2-OG)上, 生成两分子的 Glu, 其中一分子 Glu 作为 GS 的底物再次进入 GS/GOGAT 循环, 另一分子 Glu 用于其他氨基酸的生物合成等过程。在 GS/GOGAT 循环中, 净生成一分子的 Glu, 完成无机态氮到有机态氮的转化。

Figure 1.1 The assimilation of the ammonium by the glutamine synthetase/ glutamate synthase cycle in plants.

In plants, the ammonium is fixed onto a molecule of glutamate (Glu), which is catalyzed by the glutamine synthetase and generates a molecule of glutamine (Gln). The glutamate synthase (GOGAT) catalyzes the transfer of an amide group from Gln to 2-oxoglutarate (2-OG) to produce two molecules of Glu. One of the two molecules of Glu is back into the GS/GOGAT cycle as the substrate of GS and the other molecule of Glu is used in the biosynthesis of amino acids. The net output of the coupled reactions of GS/GOGAT cycle is one molecule of Glu, which accomplishes the convert from inorganic nitrogen to organic nitrogen.

在遗传学研究中, 人们已经分别从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、豌豆(*Pisum sativum*)和百脉根(*Lotus japonicas*)中分离到了 *Fd-GOGAT* 或 *GS2* 基因的突变体, 这些突变体通常具有生长迟缓和条件致死的表型(Blackwell et al., 1988a; Blackwell et al., 1988b; Coschigano et al., 1998; Kendall et al., 1986; Orea et al., 2002; Somerville and Ogren, 1980b; Wallsgrove et al., 1987)。拟南芥 *Fd-GOGAT* 基因的突变体 *glu1* 在正常条件下致死, 而在光呼吸被抑制的条件下可以成活, 但其叶绿素含量却显著降低, 表明 *Fd-GOGAT* 在叶片的氮同化过程中起到了重要的作用(Coschigano et al., 1998; Somerville and Ogren, 1980b)。

在植物中, 除了 GS/GOGAT 循环, 还有一些其他的酶也参与了植物的氮同化过程, 如天冬酰胺合成酶(asparagine synthetase, AS)、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)等。植物细胞胞质中 AS 可以催化 NH_4^+ 与一分子 Gln 结合生成一分子 Glu 和一分子天冬酰胺(Asn), 表明 AS 也可以将无机态的 NH_4^+ 作为底物参与氮同化过程。在某些条件下, 例如黑暗中, AS 可以补偿依赖 GS/GOGAT 的氮同化过程(Lam et al., 1994)。GDH 则可以催化 Glu 和 2-OG 间的相互转化, 在胁迫条件下 GDH 可以响应高浓度的 NH_4^+ 并将其转化为 Glu (Skopelitis et al., 2006), 然而近年来的研究

表明, 在植物细胞内, GDH 主要是通过降解 Glu 获得 2-OG, 为在低碳胁迫下生长的植物补充三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)所需要的碳骨架(Fontaine et al., 2012)。

综上所述, 植物对氮营养的获取主要包括对环境中无机态氮的吸收和转运、对 NO_3^- 的还原以及对 NH_4^+ 的同化三个过程 (图 1.2)。

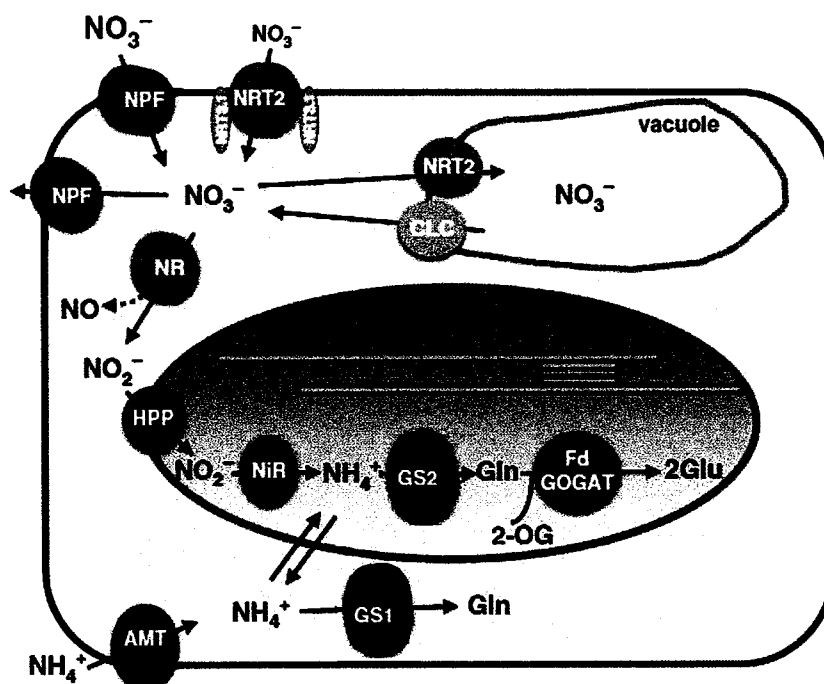


图 1.2 植物细胞对氮的转运及同化过程示意图(Krapp, 2015)。

土壤中的 NO_3^- 和 NH_4^+ 分别由根表皮细胞上特异的转运子吸收至植物体内。 NO_3^- 在细胞质中被硝酸还原酶还原为 NO_2^- , 该反应同时也可以产生一氧化氮(NO)。而后 NO_2^- 被 HPP 蛋白转运至叶绿体内并进一步被亚硝酸还原酶还原为 NH_4^+ 。 NH_4^+ 与谷氨酸结合进入 GS/GOGAT 循环。AMT, 铵盐转运子; CLC, 氯离子通道蛋白; HPP, 含有组氨酸-辅氨酸-辅氨酸结构的蛋白; Fd-GOGAT, 依赖铁氧还蛋白的谷氨酸合酶; GS, 谷氨酰胺合成酶; NiR, 亚硝酸还原酶; NPF, 硝酸盐/多态转运子家族; NR, 硝酸还原酶; NRT, 硝酸盐转运子。

Figure 1.2 Transport and assimilation of nitrogen in plants (Krapp, 2015).

Nitrate and ammonium are taken up by the root via specific transporters. Nitrate is reduced in the cytosol to nitrite by nitrate reductase. A side reaction of NR produces nitrogen oxide (NO). Nitrite is

then transported into the chloroplast by HPP transporters and reduced to ammonium by nitrite reductase. Ammonium is then incorporated into glutamate by the GS/GOGAT cycle. AMT, ammonium transporter; CLC, chloride channel; HPP, histidin-prolin-prolin containing protein; Fd-GOGAT, ferredoxin-dependent glutamate synthase; GS, glutamine synthetase; NiR, nitrite reductase; NPF, nitrate/peptide transporter family; NR, nitrate reductase; NRT, nitrate transporter.

1.2 植物氮代谢与碳代谢相互依赖

1.2.1 植物碳代谢依赖于氮同化

除了氮营养外,碳也是植物生长所必须的重要营养元素之一。植物能够通过光合作用将空气中的 CO_2 固定并用于碳水化合物的合成。早在 20 世纪 80 年代,人们就已经发现植物大部分的氮同化产物都被用于光合作用组织中叶绿素、蛋白以及酶等物质的生物合成(Evans, 1983; Zhu et al., 2008)。例如,光合作用中的关键酶 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO) 的含量约占 C_3 植物叶片中可溶性蛋白总量的 50%, 约占 C_4 植物叶片中可溶性蛋白总量的 30%左右(Feller et al., 2008; Parry et al., 2003), 而且在一定范围内植物的光合作用速率会随叶片中氮含量的增加而提高(Evans, 1983; Makino, 2011)。然而, 过量施用氮肥也会导致光合作用产物在光合器官中过量积累, 最终抑制光合作用。因此, 合理使用氮肥可以提高植物的光合作用速率, 从而提高作物产量(Makino, 2011; Nunes-Nesi et al., 2010)。

由于 RuBisCO 的双重活性, 在 C_3 植物中光合作用还有一个副反应, 即光呼吸作用。光呼吸是光合作用细胞在光照、高氧、低 CO_2 的条件下发生的以光合作用中间产物为底物进行的吸收氧、释放 CO_2 的过程。人们在对光呼吸的研究过程中发现在光呼吸过程中还存在一个氮循环, 并在循环过程中释放出大量 NH_4^+ (Keys et al., 1978)。过多的 NH_4^+ 的积累会对细胞产生毒害作用, 因此植物需要将光呼吸产生的 NH_4^+ 及时进行转化。定位于叶绿体的 GS2/Fd-GOGAT 循环是植物叶片中主要的氮同化系统, 其主要功能就是对光呼吸过程中产生的 NH_4^+ 进行再同化(Lam et al., 1996; Masclaux-Daubresse et al., 2010; Xu et al., 2012)。

此外, 转录组和代谢组研究表明, 植物碳代谢相关基因的表达水平以及碳代谢产物的水平也受到了植物的氮营养的精细调控(Bi et al., 2007; Krapp et al., 2011; Scheible et al., 2004)。综上所述, 植物体内的碳代谢极大地依赖于氮同化所提供的蛋白、酶、叶绿素等物质, 同时氮代谢在维持碳代谢的效率及稳定中也发挥了极其重要的作用。

1.2.2 植物氮同化依赖于碳同化

植物对无机氮的吸收、还原及同化过程包含了大量的酶促反应, 这些反应需要不断地消耗铁氧还蛋白、NADH/NADPH、ATP 等物质, 而这些物质主要来自碳代谢, 如光合作用、呼吸作用、磷酸戊糖途径等(Masclaux-Daubresse et al., 2010)。同时, 氨基酸的生物合成需要碳代谢提供 2-OG、草酰乙酸等有机酸类物质作为碳骨架(Lam et al., 1996)。 ^{14}C 同位素示踪试验表明, 氨基酸的生物合成中所需的碳骨架主要来自于 TCA 循环(Shinano et al., 1994)。对水稻的研究发现, 敲除编码磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)的基因 *Osppc4* 会导致植物体中有机酸含量的降低以及 TCA 循环水平的降低, 使氮的同化及氨基酸的合成受到了严重的影响(Masumoto et al., 2010), 验证了植物氮同化对 TCA 循环的依赖。此外, 对光呼吸的研究表明, 流经光呼吸氮循环的 NH_4^+ 约为植物从土壤中获取的 NH_4^+ 的 10 倍, 是植物有机氮的重要来源(Keys et al., 1978), 这也表明了植物氮同化过程是与碳代谢紧密偶联的。

1.2.3 α -酮戊二酸是植物碳代谢和氮代谢的连接点

α -酮戊二酸(2-OG)参与了植物细胞内的许多代谢反应, 包括 TCA 循环和氨基酸的生物合成等(Foyer et al., 2003; Lancien et al., 2000)。目前已知的 2-OG 的来源包括呼吸作用、TCA 循环中异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)催化的柠檬酸的氧化脱羧、谷氨酸脱氢酶催化的 Glu 的降解以及氨基转移酶催化的氨基酸的转氨基作用等(Lancien et al., 2000)。由于 2-OG 既是碳代谢中 TCA 循环重要的中间产物, 又是 GS/GOGAT 催化的 NH_4^+ 同化过程所必须的底物, 2-OG 通常被认为是植物体内碳代

谢与氮代谢的连接点（图 1.3）(Hodges, 2002)。此外，2-OG 直接调控了植物细胞中与糖或有机酸的流向及氧化还原势相关的酶的活性，如胞质中的丙酮酸激酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、线粒体中的柠檬酸合酶和交替氧化酶等，因此，有人推测 2-OG 可能在植物代谢中发挥了信号分子的作用(Hodges, 2002)。

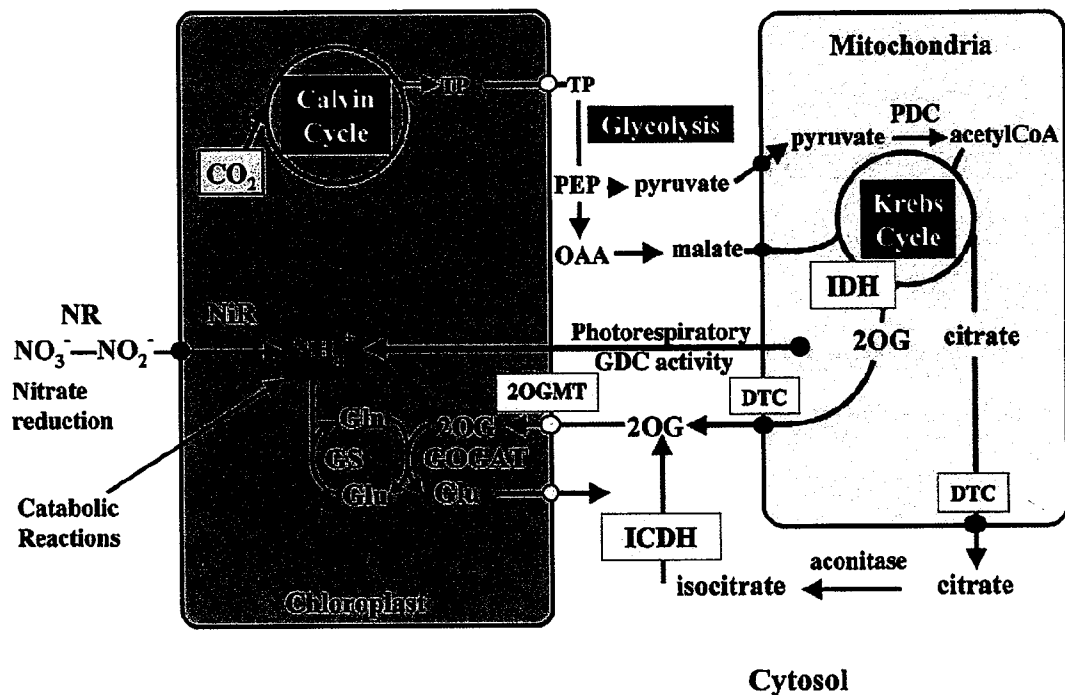


图 1.3 植物细胞中碳代谢和氮代谢简图(Hodges, 2002)。

植物氮代谢需要碳代谢提供 ATP、还原力、碳骨架等物质，这涉及了碳代谢中的许多在不同细胞中进行的代谢过程，包括光合作用、卡尔文循环、糖酵解、三羧酸循环等。在高等植物叶片中， NH_4^+ 的来源除了硝酸还原酶(NR)和亚硝酸还原酶(NiR)催化的 NO_3^- 的还原反应外，还有光呼吸过程中甘氨酸脱羧酶(GDC)催化的甘氨酸的脱羧反应以及氨基酸的降解。对 NH_4^+ 的同化是通过GS/GOGAT催化的循环反应完成的。其中，GOGAT催化的反应还需要2-OG作为碳骨架用于Glu的合成。2-OG主要来自异柠檬酸脱氢酶(IDH)催化的异柠檬酸的脱氢反应，包括线粒体TCA循环中IDH催化的2-OG的生成及细胞质中ICDH催化的2-OG的生成。2OGMT，2-OG转运子；DTC，二羧酸-三羧酸载体；PDC，丙酮酸脱羧酶复合体；PEP，磷酸烯醇式丙酮酸；TP，磷酸丙糖。

Figure 1.3 A simplified scheme showing C and N flow in plant cells (Hodges, 2002).

N metabolism is linked to C metabolism by the requirement of ATP, reductant and C-skeletons. This involves several major metabolic processes including photosynthesis, the Calvin cycle, glycolysis, and the Krebs cycle that are carried out in several different subcellular compartments. In higher plant leaves, ammonium is assimilated in the chloroplasts by the action of the GS/GOGAT pathway. Ammonium can be produced in the chloroplast by the action of the nitrite reductase (NiR), following the reduction of nitrate to nitrite in the cytosol by the nitrate reductase (NR), in the mitochondria by the action of the glycine decarboxylase (GDC) during photorespiration or in the plant cell during nitrogen recycling via catabolic reactions. For net glutamate production, the GOGAT requires C skeletons in the form of 2-oxoglutarate (2OG) that can be provided by the action of an isocitrate dehydrogenase. Two pathways involving a specific isocitrate dehydrogenase (IDH) and the Krebs cycle could be important. In one pathway, 2-oxoglutarate is synthesized in the mitochondria by the IDH and exported to the cytosol by a mitochondrial 2-oxoglutarate transporter (DTC). In the second pathway, citrate is exported from the mitochondria to the cytosol by a tricarboxylate transporter (DTC). 2OGMT, 2-oxoglutarate:malate translocator; DTC, dicarboxylate–tricarboxylate carrier; PDC, pyruvate decarboxylase complex; PEP, phosphoenol pyruvate; TP, triosephosphate.

1.3 植物氮营养与细胞分裂素相互调控

1.3.1 细胞分裂素概述

细胞分裂素是一类具有腺嘌呤环结构的物质，是经典植物激素之一。1955 年，Miller 等在鲑鱼精子 DNA 热压水解产物中发现了一种能够促进植物组培细胞分裂与分化的物质，并将这种物质命名为激动素(kinetin, KT) (Miller et al., 1955)。此后，人们又陆续发现和合成了一些具有类似生理功能的物质(Letham, 1963)，统称为细胞分裂素(cytokinins)。在随后的研究中，人们逐渐认识到细胞分裂素及其信号转导除了能够协同生长素(auxin)调控植物愈伤组织的分化(Letham, 1973)，还在调控顶端优势、分生组织发育、维管束的发育、叶片发育与衰老、雌配子发育、胚胎发育、种子发育与萌发等植物的生长发育过程中发挥着重要作用(Hwang et al., 2012; Werner and

Schmülling, 2009)。

细胞分裂素的生物合成主要有从头合成途径和 tRNA 分解途径两类, 而植物体内的细胞分裂素主要来自从头合成途径(Haberer and Kieber, 2002)。异戊烯基转移酶(isopentenyl transferase, IPT)催化完成的腺苷酸和二甲基丙烯基二磷酸向异戊烯基腺苷-5'-三磷酸(isopentenyladenosine-5'-triphosphate, iPRTP)的转化是细胞分裂素从头合成途径中的限速步骤(Taya et al., 1978)。在拟南芥中过量表达 *AtIPT4* 和 *AtIPT8/PGA22* 基因可以提高植物体内细胞分裂素的水平(Kakimoto, 2001; Sun et al., 2003)。而细胞分裂素在植物体内的动态平衡则主要是通过细胞分裂素氧化酶(cytokinin oxidase, CKX)催化的细胞分裂素的氧化分解来调节的(Houba-Hérin et al., 1999; Morris et al., 1999)。过量表达 *CKX* 基因会使植物体内细胞分裂素的水平降低, 从而导致细胞分裂素缺失表型的出现(Werner et al., 2003; Yang et al., 2003a; Yang et al., 2003b)。此外, 细胞分裂素嘌呤环或侧链上的修饰可以实现细胞分裂素在自由态和结合态之间的转化, 从而调节其活性(Mok and Mok, 2001)。

在植物体内, 细胞分裂素的信号转导是通过一种类似细菌体内的双元组分系统(two component system, TCS)完成的, 该系统由受体组氨酸激酶(histidine kinases, HKs)、磷酸转运蛋白(histidine phosphotransfer proteins, HPs)和反应调节因子(response regulators, RRs)三部分组成(图 1.4)(Hwang et al., 2012; Schaller et al., 2011; Werner and Schmülling, 2009)。在拟南芥中, 细胞分裂素受体 AHKs 与细胞分裂素结合后, 其激酶区内保守的 His 发生自磷酸化, 该磷酸基团立即被转移至信号接收区的 Asp 上。随后, 磷酸基团又被转移至胞质中的磷酸转运蛋白 AHPs 的一个保守的 His 上。磷酸化的 AHPs 进入细胞核后将磷酸基团传递到反应调节因子 ARR 上, 进而调节下游的细胞分裂素反应。拟南芥中存在两类 ARR, 其中 B 型 ARR 是一类 MYB 类转录因子, 磷酸化的 B 型 ARR 可以激活包括 A 型 ARR 在内的下游基因的表达, 是细胞分裂素信号途径中的正调控因子。A 型 ARR 是细胞分裂素信号途径中的负调节因子, 可以抑制 B 型 ARR 的活性, 从而形成了一种对细胞分裂素信号途径的负反馈调节机制(Hwang et al., 2012; Kakimoto, 2003; Punwani et al., 2010; Sheen, 2002)。在单子叶植物水稻中也存在类似的细胞分裂素的信号转导途径(Du et al., 2007; Schaller et al., 2007; Tsai et al., 2012)。

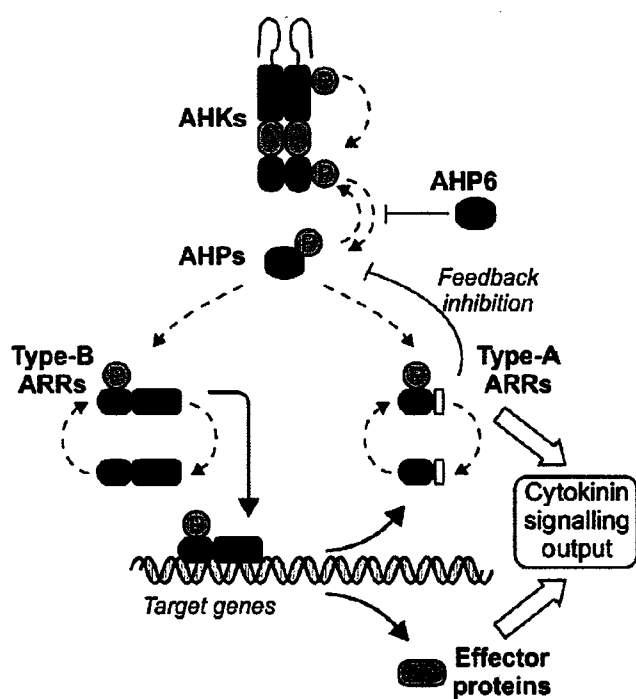


图 1.4 细胞分裂素信号转导途径简图(Werner and Schmülling, 2009)。

细胞分裂素与组氨酸激酶受体(AHKs)的结合会导致其激酶结构域中组氨酸的自磷酸化,从而激活了由双元组分系统构成的细胞分裂素的信号转导途径。磷酸基团随即被传递到信号接收区的天冬氨酸残基上,进而传递至磷酸转移蛋白(AHPs)一个保守的组氨酸残基上。磷酸化的 AHPs 进一步将信号传递至反应调节因子(ARRs)。AHP6 由于缺少保守的组氨酸残基不能与受体或反应调节因子结合。羧基末端具有 DNA 结合结构域的 B 型 ARR 是一类转录因子,可以调节下游包括 A 型 ARR 在内的基因的表达水平。A 型 ARR 可以抑制细胞分裂素的信号转导途径,从而形成负反馈调节。

Figure 1.4 Core steps of the cytokinin signalling pathway (Werner and Schmülling, 2009).

A histidine (H)/aspartate (D)-phosphorelay (indicated by dotted arrowed lines) through a two-component signaling cascade is initiated by the binding of biologically active cytokinin to a CHASE domain of histidine kinase receptors (AHKs) and autophosphorylation of a His-residue in the protein kinase domain (red). The phosphoryl group is transferred via the Asp-residue of the receptor receiver domain (green) to a conserved His of the histidine phosphotransfer proteins (AHPs). Non-activated CRE1/AHK4 possesses phosphatase activity that dephosphorylates AHPs. AHP6, lacking

the conserved His-residue, inhibits the phosphoryl transfer, presumably by interacting with activated receptors and/or response regulators. AHP proteins relay the signal to B-type or A-type response regulators (ARRs). B-type ARRs, which contain a C-terminal DNA-binding domain (turquoise), are transcription factors regulating expression of their target genes including A-type ARRs. One function of the A-type ARRs is to repress signalling in a negative feedback loop.

1.3.2 植物氮营养与细胞分裂素相互调控

在对细胞分裂素研究的过程中,人们发现外源施加细胞分裂素可以部分恢复低氮条件下车前草(*Plantago Major*)的生长缺陷(Kuiper, 1988),而植物的氮营养水平与植物体内细胞分裂素的水平也是紧密相关的(EI-D et al., 1979; Samuelson and Larsson, 1993; Singh et al., 1992; Wagner and Beck, 1993)。这些现象表明,植物的氮营养水平与细胞分裂素之间存在着相互调节的作用。在模式植物拟南芥中,共有 9 个基因编码细胞分裂素从头合成途径中的关键酶 IPT (Takei et al., 2001), 其中 *AtIPT3* 可以迅速的被外源 NO_3^- 诱导表达并引起细胞分裂素的积累,而 *AtIPT5* 则可以响应长时间的 NO_3^- 处理而诱导表达(Takei et al., 2004)。基因芯片分析显示 NO_3^- 诱导的 *AtIPT3* 的表达可能是由具有双重亲和性的传感受体 *AtNPF6.3/NRT1.1* 部分介导的(Kiba et al., 2011)。此外,部分 A 型 ARR 的表达水平也可以被不同的氮处理条件所诱导(Scheible et al., 2004; Taniguchi et al., 1998; Wang et al., 2003; Wang et al., 2004)。另一方面,细胞分裂素可以通过抑制根中 *NPF/NRT1* 和 *NRT2* 基因的表达调控植物对 NO_3^- 的吸收(Brenner et al., 2005; Kiba et al., 2011),而在拟南芥细胞分裂素受体双突变体 *cre1 ahk3* 中这种负调控作用明显减弱,在细胞分裂素负调控因子六突变体 *arr3,4,5,6,8,9* 中这种负调控作用则增强(Kiba et al., 2011)。此外,细胞分裂素对植物氮同化过程中的基因的表达水平也有不同水平的调控(Brenner et al., 2005; Lu et al., 1992; Sakakibara et al., 2006; Sutty et al., 1993)。综上所述,植物的氮营养水平可以调控体内细胞分裂素的水平,同时细胞分裂素信号可以与氮的吸收和同化过程相互作用,共同构成了调控植物生长发育的信号网络(Krouk et al., 2011; Sakakibara et al., 2006)。目前对氮营养与细胞分裂素交互调控的遗传基础与分子机制知之甚少。

1.4 栽培稻的起源和演化

水稻是人类最重要的粮食作物之一。世界上有两种栽培稻，分别为亚洲栽培稻(*Oryza sativa*)和非洲栽培稻(*Oryza glaberrima*)。亚洲栽培稻在全球范围内均被广泛的种植，在亚洲地区则更为集中，为全世界三分之一以上的人口提供了碳水化合物。而非洲栽培稻的分布并不广泛，仅局限于非洲西部地区，并由于产量较低正逐渐被亚洲栽培稻品种所替代(Khush, 1997)。

亚洲栽培稻起源于普通野生稻(*Oryza rufipogon*)，中国南方地区的人类在距今约9000年前开始种植普通野生稻并对其进行驯化(Cheng et al., 2003; Fuller et al., 2010; Khush, 1997)。早在一千多年前的汉代，人们就已经根据形态和习性将亚洲栽培稻分为了粳稻(*japonica*)和籼稻(*indica*)两类(Kovach et al., 2007)。粳稻主要分布于高纬度地区，种子圆而短，落粒性差，叶片窄而叶色深，茎秆较细却坚韧，分蘖能力较弱，具有较强的耐肥性和耐冷性；籼稻主要分布于低纬度地区，种子细而长，易落粒，叶片宽而叶色较浅，茎秆较粗但柔软，分蘖能力强，对肥料敏感，对高温、高湿和强光有较好的耐受性。二十世纪以来，分子生物学技术迅速发展，依赖分子标记技术，人们将亚洲栽培稻的群体结构进一步分解为5个生态群，包括籼稻(*indica*)，*aus*，热带粳稻(*tropical japonica*)，温带粳稻(*temperate japonica*)以及香稻(*aromatic*)，其中 *indica* 与 *aus* 在进化关系上较接近，而 *tropical japonica*、*temperate japonica* 和 *aromatic* 在进化关系上较接近(Garris et al., 2005)。但关于亚洲栽培稻的起源地及粳稻与籼稻是否是同一起源等问题一直存在争议。近十几年来，随着水稻全基因组序列的揭示以及全基因组测序技术的发展，人们获得了大量的普通野生稻与亚洲栽培稻的单倍型图谱(Huang et al., 2012; Huang et al., 2010; Zhao et al., 2015)，推动了对亚洲栽培稻的起源与驯化过程的研究。对普通野生稻与亚洲栽培稻全基因组数据的分析表明，亚洲栽培稻起源于中国南方的普通野生稻。人类祖先在广西的珠江流域对当地的野生稻进行漫长的人工选择，驯化出了粳稻的祖先品种，随后分别向南北扩散，向北扩散的一支进一步驯化称为粳稻，而向南扩散中的一支进入东南亚地区并与当地的野生稻发生杂交，经历第二次驯化后形成籼稻(图 1.5)(Huang et al., 2012)。

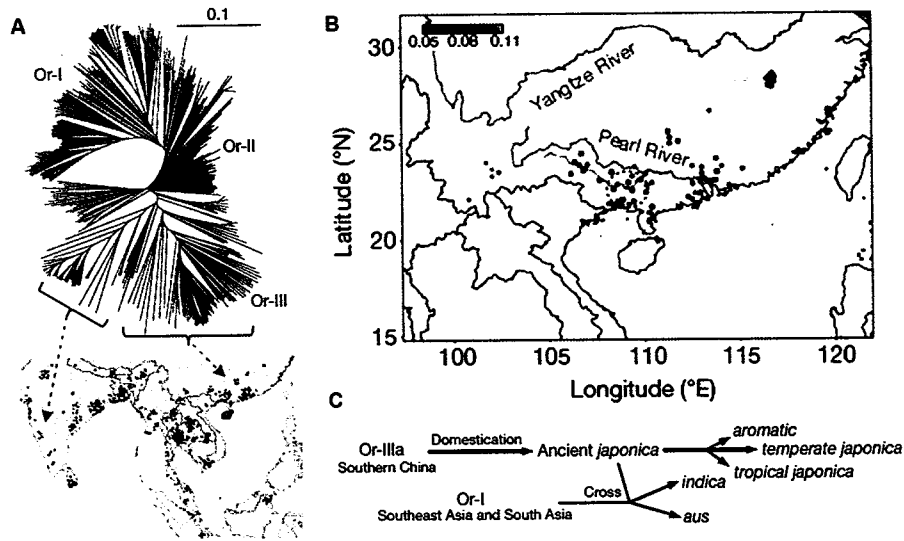


图 1.5 亚洲栽培稻驯化的遗传及地理起源(Huang et al., 2012)。

(A) 普通野生稻的分类及地理分布。根据 500 万个 SNPs 信息，普通野生稻可以分为 Or-I 类（红色）、Or-II 类（灰色）和 Or-III 类（蓝色），绝大部分中国南方的普通野生稻都属于 Or-III 类；

(B) 亚洲栽培稻的起源地及其附近普通野生稻的分布情况。图中蓝色圆点为普通野生稻的分布地点，其颜色的深浅程度代表该野生稻材料与亚洲栽培稻的遗传距离。

(C) 亚洲栽培稻的驯化过程。现代粳稻起源于中国南方的 Or-III 类普通野生稻，在向南扩散的过程中与东南亚及南亚地区的 Or-I 类野生稻发生杂交，在经过长时间的驯化形成了籼稻。

Figure 1.5 Genetic and geographic origins of rice domestication (Huang et al., 2012).

(A) Neighbour-joining tree and geographic origins of wild rice. *Oryza rufipogon* accessions, which was calculated from 5 million SNPs, identifies the three groups of Or-I (red), Or-II (grey) and Or-III (blue); accessions sampled from southern China mostly belong to the Or-III type;

(B) Geographic origins of *Oryza sativa* and the locations of *Oryza rufipogon* accessions. Phylogenetic positions of *Oryza rufipogon* accessions during domestication are indicated. Colour index represents the average of the genetic distance of *Oryza rufipogon* accessions to all cultivated rice accessions.

(C) Schematics of the origin of cultivated rice. *japonica* was first domesticated from Or-III in southern China, and was subsequently crossed to local wild rice in South East Asia and South Asia, thus generating indica after many cross-differentiation-selection cycles.

而非洲栽培稻起源于短舌野生稻(*Oryza barthii*), 其驯化过程大约起始于 3000 年前, 而且其驯化过程与亚洲栽培稻的驯化过程是完全独立的(Sweeney and McCouch, 2007)。通过对非洲栽培稻和短舌野生稻的群体进行大规模测序和群体基因组分析, 人们揭示了非洲栽培稻唯一的驯化中心为尼罗河流域, 此外, 对非洲栽培稻和短舌野生稻中与亚洲栽培稻在进化过程中经历人工选择的基因的同源基因的分析表明, 这些基因在非洲栽培稻的驯化过程中也经历了人工选择(Purugganan, 2014; Wang et al., 2014)。

1.5 选题依据与研究意义

氮不仅是植物重要的营养元素, 也参与调控了植物的其他代谢过程和信号转导通路, 是植物生长发育的重要限制因素。工业革命推动了化肥在农业生产中的广泛使用。虽然氮肥对提高作物产量的效果非常明显, 但植物对氮肥的利用效率非常有限(Frink et al., 1999), 多余的氮最终进入水体造成严重的环境污染(Guo et al., 2010; Robertson and Vitousek, 2009)。因此, 对植物氮同化过程进行深入研究是改善作物氮利用效率、确保环境可持续发展的有效手段。

水稻是重要的粮食作物。如何在降低经济和环境成本的同时满足人类对水稻产量日益增长的需求, 是科学家及育种家急需解决的问题。通过对水稻氮同化途径的研究, 越来越多的影响水稻氮同化效率的基因被克隆。此外, 粳稻品种和籼稻品种间对氮肥的敏感性往往存在差异, 通过遗传分析及基因组数据分析, 人们正在逐步解析其中的原因(Hu et al., 2015; Sun et al., 2014a), 而这将对分子育种具有重要的指导意义。

我们实验室在对水稻细胞分裂素反应异常突变体的筛选过程中, 获得了一个具有严重的氮营养缺乏症状的突变体。我们希望通过对这个突变体的研究能够为提高水稻氮同化效率提供新的思路。

第二章 材料与方法

2.1 试验材料

2.1.1 植物材料

本实验中所用的野生型水稻日本晴(Nipponbare, NPB)和 Dongjin (DJ)均为粳稻(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*), 9311、Nanjing-6 为籼稻(*Oryza sativa* L. ssp. *indica*), 由本实验室保存。*abc1-1* 突变体为日本晴背景。本研究中所用 *abc1-1* 突变体如没有特殊说明均为与日本晴回交的 BC₄F₃ 及其子代植物。*abc1-2* 突变体为 Dongjin 背景, 购买于韩国庆熙大学(Kyung Hee University, Republic of Korea)的水稻 T-DNA 插入突变体数据库(Rice T-DNA Insertion Sequence Database, http://cbi.khu.ac.kr/RISD_DB.html) (An et al., 2003)。染色体片段代换系 VD100 和 VD125, 为 BC₅F₂ 代植物, 由中国农科院水稻研究所钱前研究员提供。

2.1.2 菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株: DH5 α , 基因型为 F⁻ ϕ 80d *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *end* A1 *recA1* *hsdR17*(rk⁻, mk⁺) *supE44* λ *thi-1* *gyrA96* *relA1* *phoA*。

农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株: EHA105, 基因型为 C58 (rif^R) Ti pEHA105 (pTiBo542DT-DNA) (strep^R) Succinamopine (Hood et al., 1993)。

2.1.2 载体

克隆载体: pBlueScript SK (-) (Stratagene)

植物表达载体: pCAMBIA1300 (Hajdukiewicz et al., 1994)

2.1.3 酶、试剂、试剂盒和抗体

2.1.3.1 酶

Taq DNA 聚合酶：实验室自制；

KOD-Plus DNA 聚合酶：Toyobo Biochemicals, Japan；

DNA 限制性内切酶：New England Biolabs；

DNA T4 连接酶：Promega；

2.1.3.2 药品及试剂

MS (Murashige & Skoog)盐：PhytoTechnology Laboratories, Cat #: M519；

无氮 MS 盐：PhytoTechnology Laboratories, Cat #: M531；

L-谷氨酸(L-Glutamic acid)：BIODEE, Cat #: 1011-01；

L-谷氨酰胺(L-Glutamine)：BIODEE, Cat #:1012-01；

6-苄基腺嘌呤(6-benzyl adenine, 6-BA)：Sigma-Aldrich, Cat #: B3408；

琼脂粉(Agar)：Bacto™ Agar, Cat #: 21410；

胰蛋白胨(trypton)：OXOID, Cat #: LP0042；

酵母提取物(yeast extract)：OXOID, Cat #: LP0021；

羧苄青霉素(carbenicillin)：Sigma-Aldrich, Cat #: C-1389；

卡那霉素(kanamycin)：AMRESCO, Cat #: 0408；

潮霉素 B (hygromycin B)：Roche, Cat #: 10843555001；

二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)：Sigma-Aldrich, Cat #: D1435；

利福平(rifampicin)：Fluka, Cat #: C43H58N4O12；

异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalacto pyranoside, IPTG)：AMRESCO, Cat #: 0487；

苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)：AMRESCO, Cat #: 0754；

三羟甲基氨基甲烷[tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris]: AMRESCO, Cat #: 0497;

脱氧胆酸钠(sodium deoxycholate): AMRESCO, Cat #: 0613;

考马斯亮蓝 G250 染料: AMRESCO, Cat #: 0615;

二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT): Sigma-Aldrich, Cat #: 43815;

β -巯基乙醇(2-hydroxy-1-ethanethiol): AMRESCO, Cat #: 0482;

吐温 20 (polysorbate 20) : AMRESCO, Cat #: 0777;

十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS): Sigma-Aldrich, Cat #: L5750;

4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES]: AMRESCO, Cat #: 0511

α -酮戊二酸(α -ketoglutaric acid): Sigma-Aldrich, Cat #: K1128;

菠菜铁氧还蛋白[ferredoxin from *Spinacia oleracea* (spinach)]: Sigma-Aldrich, Cat #: F5875;

还原型辅酶 II 四钠盐(coenzyme II reduced form tetrasodium salt, NADPH- Na_4): Roche, Cat #: 10621706001;

10 $\times$ PCR 缓冲液: 天根生化科技(北京)有限公司;

脱氧核苷三磷酸混合物(dNTP mix): 北京拜尔迪生物技术有限公司;

多聚胸腺嘧啶[oligo (dT)]: 天根生化科技(北京)有限公司;

如无特殊说明, 其它试剂均为分析纯级化学药品。

2.1.3.3 试剂盒

琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒: 北京博迈德科技发展有限公司, Cat #: DR0102;

质粒小量快速提取试剂盒(离心柱型): 北京博迈德科技发展有限公司, Cat #: PL0202;

植物总 RNA 提取试剂盒: 天根生化科技(北京)有限公司, Cat #: DP432;

cDNA 第一条链合成试剂盒: 北京全式金生物技术有限公司, Cat #: AT301;

UltraSYBR Mixture (with ROX): 北京康为世纪生物科技有限公司, Cat #:

CW0956A;

免疫印迹显色试剂盒: Thermo Scientific, Cat #: 34096。

2.1.3.4 抗体

anti-Fd-GOGAT 抗体: Agrisera, Cat #: AS07242;

anti-HSP82 抗体: 北京华大蛋白质研发中心有限公司, Cat #: AbM51099-31-PU;

辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠 IgG: 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;

辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG: 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

2.1.4 培养基

LB 液体培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L NaCl;

LB 固体培养基: 10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L NaCl, 15 g/L 琼脂粉;

1/2 MS 固体培养基: 2.15 g/L MS 盐, 10 g/L 蔗糖, 8 g/L 琼脂粉, pH 5.9;

无氮 1/2 MS 固体培养基: 0.39 g/L 无氮 MS 盐, 10 g/L 蔗糖, 8 g/L 琼脂粉, pH 5.9;

水稻转化 N6-AS 培养基: 3.981 g/L N6 盐, 2 mg/L 2,4-D, 0.3 g/L 酪蛋白水解物, 30 g/L 蔗糖, 10 g/L 葡萄糖, 15 mg/L 乙酰丁香酮, 4 g/L 植物凝胶, pH 5.2;

水稻转化选择培养基: 3.981 g/L N6 盐, 2 mg/L 2,4-D, 0.5 g/L 酪蛋白水解物, 0.5 g/L L-脯氨酸, 30 g/L 蔗糖, 4 g/L 植物凝胶, 200 mg/L 羧苄青霉素, 200 mg/L 头孢霉素, 50 mg/L 潮霉素 B, pH 5.8;

水稻转化分化培养基: 4.4 g/L MS 盐, 30 g/L 蔗糖, 30 g/L 山梨醇, 2 g/L 酪蛋白水解物, 0.02 mg/L NAA, 2 mg/L 激动素, 4 g/L 植物凝胶, 50 mg/L 羧苄青霉素, 50 mg/L 潮霉素 B, pH 5.8;

水稻转化生根培养基: 2.2 g/L MS 盐, 0.5 g/L L-脯氨酸, 0.5 g/L 酪蛋白水解物, 30 g/L 蔗糖, 0.5 mg/L IBA, 4 g/L 植物凝胶, pH 5.8。

2.1.5 基本试剂和缓冲液配制

抗生素：羧苄青霉素(carbenicillin)、卡那霉素(kanamycin)、潮霉素 B (hygromycin B)或头孢霉素(cefotaxime)分别溶解于无菌去离子水中，而后用 0.45 μm 孔径的为空滤膜抽滤后分装并保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；利福平(rifampicin)溶解于二甲基亚砜(DMSO)，抽滤后分装并保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。如无特殊说明，上述抗生素工作液浓度均为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

100 mM IPTG：1.2 g 异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl thiogalactoside, IPTG)溶解于 50 mL 无菌去离子水，抽滤后分装并保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

20 mg/mL X-gal：1 g X-gal 溶于 50 mL 二甲基甲酰胺(dimethylformamide, DMF)，分装后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

100 mM PMSF：174 mg 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)溶解于 10 mL 异丙醇，分装后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

考马斯亮蓝 G250 溶液：100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶解于 50 mL 95%乙醇中，加入 100 mL 磷酸，搅拌均匀后用去离子水定容至 1 L，用滤纸过滤后，室温保存于棕色容量瓶中。

TBE 电泳缓冲液(20 $\times$)：108 g Tris，55 g 硼酸，40 mL EDTA (0.5M, pH 8.0)，搅拌均匀，去离子水定容至 1 L，常温保存。

SDS-PAGE 电泳缓冲液(5 $\times$)：72 g 甘氨酸，15 g Tris，5 g SDS，溶解于 500 mL 去离子水，搅拌均匀后定容至 1 L，室温保存。

SDS-PAGE 上样缓冲液(6 $\times$)：1.25 mL Tris-HCl (1 M, pH 6.8)，0.5 g SDS，2.5 mL 甘油，25 mg 溴酚蓝，去离子水定容至 5 mL，分装后室温保存。使用前加入 50 $\mu\text{L/mL}$ β -巯基乙醇。

Western blotting 转膜缓冲液：14.4 g 甘氨酸，3 g Tris，200 mL 甲醇，去离子水定容至 1 L，室温保存。

TBST 缓冲液：8.8 g NaCl，20 mL Tris-HCl (1M, pH 8.0)，1.0 mL Tween 20，去离子水定容至 1 L。

Western blotting Strip 缓冲液：15 g 甘氨酸，1 g SDS，溶解于 500 mL 去离子水，

浓盐酸调 pH 至 2.2, 去离子水定溶至 1 L, 室温保存。使用前加入 10 mL/L Tween 20。

植物基因组 DNA 提取液: 100 mL Tris-HCl (1M, pH 7.5), 7.312 g NaCl, 25 mL EDTA (0.5 M, pH 7.5), 2.5 g SDS, 搅拌均匀, 去离子水定溶至 500 mL, 常温保存。

植物总蛋白提取液: 0.303 g Tris 碱, 0.4383 g NaCl, 0.5 mL NP40, 0.25 g 脱氧胆酸钠, 0.05 g SDS, 溶解于 50 mL 去离子水, 浓盐酸调 pH 至 7.4。低温-4 °C 保存。

2.2 试验方法

2.2.1 植物生长条件

水稻田间种植: 水稻材料分别种植于北京市昌平区中国科学院遗传与发育生物学研究所农场、浙江省富阳市中国水稻研究所农场及海南省陵水县中国科学院遗传与发育生物学研究所南繁基地。水稻田间管理按照常规大田栽培方法进行。

水稻无菌培养: 水稻种子脱壳后, 在 75% 的乙醇溶液中浸泡约 5 分钟, 而后再用 30% 的次氯酸钠溶液消毒约 30 分钟, 最后用无菌水冲洗种子 6~8 次, 消毒后的种子播种于不同条件的固体培养基上, 置于 16 小时光照、8 小时黑暗、28 °C 条件下生长。

水稻水培培养: 水稻种子于 28 °C、黑暗条件下浸泡 2 天后, 均匀放置于培养架上, 培养容器中加入适量营养液, 转移至 16 小时光照、8 小时黑暗、28 °C 条件下, 每 2~3 天更换一次营养液, 保持液面刚好没过培养架。

2.2.2 水稻基因组 DNA 的提取

将适量水稻叶片放入 2 mL 离心管中, 加入 600 μ L 植物基因组 DNA 提取液(250 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl, pH7.5, 25 mM EDTA, pH8.0, 0.5% SDS)及一枚钢珠, 使用植物组织破碎仪破碎 3~5 分钟后, 65 °C 水浴 30 分钟。取出钢珠, 13000 rpm 离心 10 分钟, 将上清转移至新的 1.5 mL 离心管中, 加入等体积的异丙醇, 颠倒混匀后置于 -20 °C 约 30 分钟。13000 rpm 离心 10 分钟, 弃上清, 用 70% 乙醇冲洗 2 次, 室温干燥后溶于 100~200 μ L 去离子水, 保存于 -20 °C。

2.2.3 常规 PCR 反应

常规 PCR 反应用于遗传定位、突变体背景鉴定及转基因植物鉴定等，其反应体系为 20 μL 反应体系：

模板 DNA	2 μL
10 $\times$ PCR buffer	2 μL
10 mM dNTP	0.5 μL
10 μM 引物 1	1 μL
10 μM 引物 2	1 μL
Taq DNA 聚合酶	0.5 μL
超纯水	13 μL

扩增程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 分钟；35 个循环（94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 秒，56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 秒，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 分钟/kb）；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 分钟；4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

KOD-Plus DNA 聚合酶用于载体构建及基因组测序，其反应体系为 50 μL 反应体系：

模板 DNA	2 μL
10 $\times$ KOD DNA polymerase buffer	5 μL
2 mM dNTP	5 μL
25 mM MgSO_4	2 μL
10 μM 引物 1	2 μL
10 μM 引物 2	2 μL
KOD-Plus DNA polymerase	1 μL
超纯水	31 μL

扩增程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 分钟；30 个循环（94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 秒，56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 秒，68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 分钟/kb）；68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 分钟；4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

所用 PCR 仪型号为 Whatman Biometra T Gradient 96。所涉及的引物序列请见附录 A。

2.2.4 植物总 RNA 的提取

植物材料在液氮中磨碎，使用天根生化科技（北京）有限公司(TIANGEN)生产的 RNAPrep Plant Kit 提取植物总 RNA，具体操作步骤参考产品说明书。使用紫外分光光度计(ND-1000, Thermo)检测所提取 RNA 的浓度及质量，保存于-80 °C。

2.2.5 反转录 PCR

使用北京全式金生物技术有限公司(TransGen Biotech)生产的 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix kit 合成 cDNA 的第一条链。

反应体系为：

Total RNA	2 μ g
2 $\times$ TS Reaction Mix	10 μ L
TransScript RT Enzyme Mix	1 μ L
Oligo(dT)	1 μ L
RNase-free water	补齐至 20 μ L

反应程序为：42 °C 30 分钟；85 °C 5 分钟；4 °C 保存。

2.2.6 定量反转录 PCR

使用北京康维世纪生物科技有限公司(CWBIO)生产的 2 $\times$ UltraSYBR Mixture (With ROX)进行定量反转录 PCR(quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)。

反应体系为：

cDNA	1 μ L
10 mM 引物 1	0.5 μ L
10 mM 引物 2	0.5 μ L
2 $\times$ UltraSYBR Mixture	10 μ L

RNase-free water

8 μ L

反应程序为：95 °C 变性 10 分钟；35~40 个循环（95°C 变性 15 秒，60 °C 退火/延伸 1 分钟）；融解曲线分析 95 °C 15 秒，60 °C 1 分钟，95 °C 15 秒，60 °C 15 秒。所用仪器为 CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)。涉及的引物序列请见附录 A。

2.2.7 遗传互补载体的构建

以野生型水稻日本晴的基因组 DNA 为模板，利用引物 ABC1_Promoter F 和 ABC1_Exon1 R，通过 PCR 的方法获得了包含 ABC1 基因启动子区、5'-非翻译区和第一个外显子（核酸序列 1~249 位；以翻译起始密码子的第一个碱基为+1）的 DNA 片段。将这一片段通过限制性内切酶 *SacI* 和 *XmaI* 连接到 pBluescript-SK 载体上，得到 pABC1-promoter 质粒。

日本东北大学的 Toshihiko Hayakawa 教授为我们提供了一个 ABC1 基因的 cDNA 克隆 pOSFGGT52 (accession number: AB024716) (Hayakawa et al., 2003)，该克隆缺少 ABC1 基因的 5'-非翻译区及编码区的前 378 个碱基。我们以野生型水稻日本晴的 cDNA 为模板，利用引物 ABC1_Linker F 和 ABC1_Linker R，通过 PCR 的方法获得了核酸序列 114~544 位的 DNA 片段。通过限制性内切酶 *Bpu10I/EcoRI* 和 *EcoRI/SalI* 依次将上述 PCR 产物和 pOSFGGT52 的消化片段连接到 pABC1-promoter 质粒上，得到 pABC1 质粒。

通过限制性内切酶 *SalI/HinIII* 和 *SacI/SalI* 依次将终止序列 NOS 和 pABC1 质粒的消化产物连接到 pCAMBIA1300 载体上，得到 pCAMBIA1300-ABC1-NOS 质粒。

为了在 ABC1 基因羧基端融合一个 FLAG 标签，我们以水稻日本晴的基因组 DNA 为模板，利用引物 ABC1_Exon33 F 和 ABC1_Exon33 R，通过 PCR 的方法获得了 ABC1 基因最后一个外显子（不含终止子）的 DNA 片段，并通过限制性内切酶 *KpnI* 和 *BglII* 连接到 pBluescript-SK-FLAG 载体上，得到 pABC1-exon33-FLAG 质粒。进一步利用引物 T7 和 SK-tag R，通过 PCR 的方法得到 ABC1-exon33-FLAG 片段，并通过限制性内切酶 *KpnI/SalI*，将该片段置换 pCAMBIA1300-ABC1-NOS 上相应的片段，得到

pCAMBIA1300-ABC1-FLAG-NOS 质粒。

2.2.8 质粒提取及 DNA 片段回收

将转化得到的阳性单克隆接入 5 mL 含有抗生素的液体 LB 培养基中, 220 rpm、37 °C 条件下摇菌过夜, 收集菌体后用北京博迈德科技发展有限公司(Biomed)生产的质粒 DNA 提取试剂盒提取质粒, 所得质粒保存于-20 °C。

PCR 产物或限制性内切酶消化产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下切割目的条带后, 用北京博迈德科技发展有限公司(Biomed)生产的 DNA 回收试剂盒进行回收和纯化目的 DNA, 所得产物保存于-20 °C。

2.2.9 热激转化法

大肠杆菌热激感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司(TransGen Biotech)。

转化时, 将连接产物或质粒加入冰浴融化的感受态细胞, 轻柔混匀, 冰上放置 30 分钟, 42 °C 水浴热激 45 秒, 冰上放置 2~5 分钟, 加入 600 μ L 不含抗生素的 LB 液体培养基, 37 °C、200 rpm, 振荡培养 1 小时后, 将菌液均匀涂布于含有相应抗性的 LB 固体培养基上, 37 °C 倒置培养过夜。

2.2.10 农杆菌电激感受态细胞的制备及电激转化法

将保存于-80 °C 的农杆菌菌株 EHA105 在不含抗生素的 LB 固体培养基上划线, 28 °C 倒置培养过夜。挑取单菌落, 接种于 5 mL LB 液体培养基中, 28 °C、200 rpm, 振荡培养过夜。按 1:100~1:500 比例接菌液于 500 mL LB 液体培养基中, 28 °C、200 rpm, 振荡培养 8~10 小时至 OD₆₀₀ 达到 0.8 左右。将菌液置于离心瓶中, 4 °C, 4000 rpm 离心 10 分钟收集菌体。弃上清, 重悬于二分之一原体积预冷的无菌去离子水中, 4 °C, 4,000 rpm 离心 10 分钟, 收集菌体。重复上一步骤 2-3 次, 弃上清。最后用少量 10% 甘油重悬菌体, 分装于 1.5 mL 的离心管中, 每管 40 μ L, 液氮速冻, 保存于-80 °C 条

件下备用。

电激时, 取 40 μL 电激感受态细胞, 加入待转化质粒, 1.8 KV 电激转化后, 加入 600 μL 不含抗生素的 LB 液体培养基。28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm, 振荡培养 1 小时后, 将菌液均匀涂布于含有应抗性的 LB 固体培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养。

2.2.11 水稻遗传转化

水稻的遗传转化参考 Hiei 等的方法(Hiei et al., 1994)。水稻种子消毒后, 播种于 MS 固体培养基上, 7~10 天后进行继代, 去除芽和胚, 只保留愈伤组织。约 20 天后进行第二次继代, 选择生长状态良好的愈伤, 将其切成小块继续培养 7~10 天后进行农杆菌侵染。

用电击转化法将构建好的表达载体转入农杆菌 EHA105 菌株中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 2~3 天后, 挑取阳性单克隆接种于 5 mL 含有抗生素的 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、220 rpm 培养约 16 小时。将上述菌液以 2% 的比例转接至 20 mL 含有抗生素的 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、220 rpm 培养约 16 小时。待 OD_{600} 达到 1.0 左右时, 离心收集菌体并用等体积的 AAM 重悬, 再次离心后弃上清, 将菌体再次用 AAM 重悬并稀释至 OD_{600} 为 0.5 左右。将愈伤在上述侵染液中浸泡约 30 分钟, 其间轻轻摇晃 2~3 次。侵染完成后, 倒掉侵染液, 将愈伤铺于无菌滤纸上晾干。而后将侵染后的愈伤转移至 N6-AS 培养基上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下暗培养 3 天。将愈伤用含 500 mg/L 羧苄青霉素的无菌水清洗 3 次后, 转移至抗性筛选培养基, 约 2 周后, 挑选具有抗性的愈伤并转移至新鲜的抗性筛选培养基上, 进行第二次筛选。经过两轮筛选后, 具有抗性的愈伤被移至分化培养基, 至分化出幼苗后, 再转移至生根培养基, 培养数周后的组培苗移栽至田间。

2.2.12 细胞分裂素敏感性分析

水稻种子按前述方法消毒后, 在无菌水中浸泡 24 小时, 选择萌发一致的种子播种在含有 6-苄基腺嘌呤(6-benzyl adenine, 6-BA)浓度梯度(0, 1, 2.5, 5, 10 μM)的含氮或

不含氮的 1/2 MS 固体培养基上。在 16 小时光照、8 小时黑暗、28 °C 条件下生长 8 天后，测量主根长度及不定根数目，各处理至少测量 30 株植物，取平均值，并进行 Student's *t* test 统计分析。

2.2.13 谷氨酸饲喂试验

水稻种子于 28 °C、黑暗条件下浸泡 2 天后，均匀放置于培养架上，培养容器中加入适量不含氮的 1/2 MS 液体培养基(pH 5.8)，每 2~3 天更换一次营养液，使液面刚好没过培养架，在 16 小时光照、8 小时黑暗、28 °C 条件下生长。14 天后，在其中一部分植物的营养液中增加 3 mM 的谷氨酸，另一部分植物仍使用原营养液，每 2~3 天更换一次营养液。12 天后，对植物的株高及叶绿素含量进行测定，各处理至少测定 24 株植物，取平均值，并进行 Student's *t* test 统计分析。

2.2.14 叶绿素含量测定

叶绿素含量的测定参考 Lichtenthaler 的方法(Lichtenthaler, 1987)。新鲜植物材料称重后，放入研钵中，液氮研磨。将所有粉末转移至 15 mL 离心管中，加入 10 mL 无水乙醇，混匀，避光静置 3 小时。以无水乙醇为空白，对紫外/可见光分光光度计(BECKMAN COULTER DU800)进行调零设置，分别测定各样品在 649 nm 和 665 nm 波长下的吸光值，利用如下公式计算样品的叶绿素含量：

$$C_a = 13.95A_{665} - 6.88A_{649}$$

$$C_b = 24.96A_{649} - 7.32A_{665}$$

$$\text{叶绿素含量(mg/g FW)} = [(C_a + C_b) \times \text{提取液体积} \times \text{稀释倍数}] / \text{样品鲜重}$$

每次试验中，各材料至少取 3 个生物重复进行测定，取平均值，并进行 Student's *t* test 统计分析。

对于不方便取材的田间材料，使用 SPAD-502 叶绿素仪(Minolta, Osaka, Japan)对其叶绿素计值(Soil-plant analysis development, SPAD) (Maiti et al., 2004)进行测定。每个材料至少测定 30 株植物，取平均值，并进行 Student's *t* test 统计分析。

2.2.15 光合作用速率的测定

在水稻抽穗期,选择天气晴朗的上午 9:00~12:00,对状态良好的倒二叶中段进行光合作用速率的测定,所用仪器为 Li-6400 型便携式光合作用测定仪,配件为 6400-11 狭长叶室。仪器连接好后按照说明书进行预热、日常检查、校准及加载设置。调整叶室内光照强度为 $1500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, CO_2 浓度为 $400\ \mu\text{mol mol}^{-1}$,叶片温度控制在 $25\sim 28\ ^\circ\text{C}$,空气湿度控制在 $40\sim 60\%$ 。将叶片夹入叶室后,等待数据稳定,记录 Photo 值。

2.2.16 植物总蛋白的提取

将植物材料放入预冷的研钵中,加入液氮,充分研磨后转移至 1.5 mL 离心管中,加入适量植物蛋白提取液(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.25% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM PMSF),涡旋混匀后, $4\ ^\circ\text{C}$ 、13000 rpm 离心 10 分钟,将上清移至新的 1.5 mL 离心管中, $4\ ^\circ\text{C}$ 、13000 rpm 再次离心 10 分钟,上清即为获得的植物总蛋白,将其置于冰上备用。

2.2.17 蛋白质浓度测定

蛋白浓度的测定参考 Bradford 蛋白浓度测定法(Bradford, 1976)。配制 1 mg/mL 牛血清白蛋白(Albumin from bovine serum, BSA)溶液用于标准曲线测定。分别取 5 μL 、10 μL 、15 μL 和 20 μL 1 mg/mL BSA 及 5 μL 植物样品总蛋白提取物至不同离心管中,用 0.15 mM NaCl 补齐体积至 100 μL 。分别加入 0.9 mL 考马斯亮蓝 G250 染液,混匀后用紫外分光光度计(BECKMAN COULTER DU800)测定 595 nm 波长的 OD 吸光值。依据 BSA 样品测定的 OD_{595} 绘制标准曲线,线性回归得出蛋白浓度和 OD 值之间的关系,从而计算出样品总蛋白的浓度。

2.2.18 蛋白免疫印迹分析

蛋白免疫印迹分析参考 Feng 等的方法(Feng et al., 2013)。吸取所需植物总蛋白, 加入 $6 \times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 100°C 加热 10 分钟, 冷却后进行 SDS-PAGE 电泳。100 V 恒压电泳, 直到溴酚蓝跑至胶的底端, 结束电泳, 取下蛋白胶。将蛋白胶浸泡在转膜缓冲液 (0.19 M 甘氨酸, 24 mM Tris, 20% 甲醇) 中, 同时将与蛋白胶大小一致的 12 张滤纸和 1 张浸泡过甲醇的 PVDF 膜也浸泡于转膜缓冲液中。按先后顺序依次组装: 正极、6 层滤纸、PVDF 膜、蛋白胶、6 层滤纸、负极。300 mA 恒流 2 小时将蛋白样品至 PVDF 膜上。结束后将 PVDF 膜取下, 用 TBST 缓冲液漂洗 3 次后, 置于封闭缓冲液 (含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液) 中室温孵育 1 小时。用封闭缓冲液按 1:5000 比例稀释相应的第一抗体 (以下简称一抗), 室温孵育 1-2 小时。TBST 缓冲液漂洗 4 次, 每次 5 分钟。用封闭缓冲液按 1:50000 比例稀释第二抗体 (以下简称二抗, 辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗), 室温孵育 1 小时。TBST 缓冲液漂洗 4 次, 每次 5 分钟。用免疫印迹显色试剂盒显色, X 光片压片, 扫描取图。同一张 PVDF 膜用 strip buffer (15 g/L Glycine, 1 g/L SDS, pH 2.2, 10 mL/L Tween 20) 漂洗 30 分钟去除一抗后, 再用封闭缓冲液封闭, 重新加 anti-HSP82 抗体, 作为内参。

每次实验至少包含 3 次生物重复, 通过软件 NIH ImageJ (version 1.42q, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) 对免疫印迹条带进行定量分析, 并进行 Student's *t* test 统计分析。

2.2.19 Fd-GOGAT 酶活分析

水稻 Fd-GOGAT 酶活分析的方法修改自拟南芥 Fd-GOGAT 酶活分析的方法 (Jamai et al., 2009), 具体步骤如下。收集新鲜的 12 天左右的水稻幼苗的叶片, 剪碎后放入 4°C 预冷的研钵中, 在 4°C 条件下边研磨边加入提取缓冲液 (50 mM HEPES, pH 7.5, 15 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF), 每 1 g 新鲜植物材料约加入 1 mL 提取缓冲液。将充分研磨的植物材料收集到离心管中, 4°C 、13000 rpm

离心 10 分钟，将上清移至新的离心管中，重复 4 次。对得到的蛋白粗提物进行浓度测定，并将其稀释到 1 mg/mL，置于冰上。

酶活测定的反应体系总体积为 1 mL，包含 50 mM HEPES, pH 8.5, 1% (v/v) β -巯基乙醇, 3.65 mM Gln, 3 mM 2-OG, 0.2 mM NADPH, 4 mM 铁氧还蛋白和 0.2 mL 植物蛋白粗提物。以不含铁氧还蛋白的反应体系作为空白对照，用紫外/可见分光光度计(BECKMAN COULTER DU800)测定 30 °C 条件下，反应体系中 340 nm 波长处吸光值的时间变化曲线， A_{340} 反映的是反应体系中 NADPH 的消耗量。完整反应体系与不含铁氧还蛋白的反应体系中 NADPH 消耗速率的差值即为 Fd-GOGAT 的酶活。

每次实验至少包含 3 次生物重复，并进行 Student's *t* test 统计分析。

2.2.20 代谢组学分析

水稻种子于 28 °C、黑暗条件下浸泡 2 天后，播种于营养土中，置于玻璃温室中培养。收集 7 天、9 天、12 天、15 天和 18 天幼苗的地上部分，在液氮中充分研磨，将粉末收集于 2 mL 离心管中，冷冻干燥，每份样品称取 6 mg (干重) 用于成分分析。

样品制备的方法参考已发表的文献(Fiehn et al., 2000)，具体步骤如下。在分装好的样品中加入 1.5 mL 氯仿，涡旋混匀，37 °C 孵育 45 分钟。随后，再加入 1.5 mL 含有 25 mg/mL 核糖醇 (ribitol, 作为内参) 的 HPLC 级水，混匀后 37 °C 孵育 45 分钟，溶液发生分层。将 1 mL 水相上清转移至新的 1.5 mL 离心管中，4 °C、3000 g 离心 10 分钟后，冷冻干燥。干燥后的样品重悬于 50 μ L 含有 15 mg/mL 甲氧基胺盐酸盐 (methoxyaminehydrochloride) 的吡啶溶液中，短暂超声后，50 °C 孵育 1 小时。加入 50 μ L MSTFA 及 1% 的 TMCS 将样品衍生化，50 °C 孵育 1 小时。

取 1 μ L 制备好的样品，使用安捷伦 7890A-5975C 气相色谱/质谱联用系统(Agilent 7890A-5975C GC/MS system, Agilent Technologies, USA)进行分析。样品在 DB-5 MS 填充柱中(30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness)以分流模式按 10:1 的比例进行分离。载气 (99.9996% 氦气) 流速控制在 1.1 mL/min。柱箱起始温度为 60 °C，维持 1 分钟后，以 10 °C/min 的速率升高至 325 °C 并维持 10 分钟。进样口温度设置为 250 °C。以电子轰击模式(EI positive mode)对样品进行离子化。电子源及四级杆的温度分别设

置为 250 °C 和 150 °C。质谱扫描范围是 50~600 m/z。

2.2.21 蛋白质三维结构的预测

ABC1 蛋白三维结构的预测是以集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 的 Fd-GltS 蛋白的晶体结构(PDB ID: 1LLW) (van den Heuvel et al., 2002)为模板, 通过 SWISS-MODEL 在线服务器(<http://swissmodel.expasy.org>) (Arnold et al., 2006)完成的。

蛋白三维结构的分子模式图是通过 PyMOL 软件(<http://www.pymol.org/>)制作的。

2.2.22 核苷酸多样性分析

亚洲栽培稻及普通野生稻单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点信息来自 Rice HapMap Project (RHP, <http://202.127.18.221/cgi-bin/gbrowse/rhp3/>) (Huang et al., 2012; Huang et al., 2010)及 RiceVarMap (<http://ricevarmap.ncpgr.cn/>) (Zhao et al., 2015)。

核苷酸序列的比对分析是通过软件 ClustalX (<http://www.clustal.org/>)完成的。核苷酸多样性分析及 Tajima's *D* test 的计算是通过软件 DnaSP (version 5.10.01, <http://www.ub.edu/dnasp/>) (Librado and Rozas, 2009)完成的。

第三章 结果

3.1 水稻细胞分裂素反应异常突变体 *abc1-1* 的表型分析

3.1.1 *abc1-1* 突变体对细胞分裂素的敏感性降低

我们在前期工作中,拟利用水稻为模式系统,筛选鉴定细胞分裂素通路中的突变体,解析细胞分裂素调控水稻重要农艺性状的重要组分与分子机理。我们以粳稻品种日本晴(*Oryza sativa* L. ssp *japonica*, Nipponbare)为背景,利用甲基磺酸乙酯进行化学诱变,在 M₂ 群体中筛选对细胞分裂素反应异常的突变体,并将其命名为 *abnormal cytokinin response (abc)*, 其中一个代表性的突变体为 *abc1-1* (谢庆军、冯健等, 未发表)。高浓度的细胞分裂素可以抑制水稻不定根的发生及主根的伸长。在正常生长条件下, *abc1-1* 突变体表现出对细胞分裂素微弱的不敏感,细胞分裂素对其主根及不定根的抑制作用稍弱于野生型植物 (图 3.1A, B)。前人对模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的研究发现,氮饥饿可以负调控细胞分裂素的生物合成、转运及信号转导途径(Sakakibara et al., 2006; Sun et al., 2005; Takei et al., 2002; Takei et al., 2004)。因此,我们分析了 *abc1-1* 突变体在缺氮的生长条件下对细胞分裂素的响应。我们发现氮饥饿的生长条件可以增强 *abc1-1* 突变对细胞分裂素不敏感的表型 (图 3.1C, D), 表明 *ABC1* 基因可以响应植物的氮营养水平, 并正调控植物对细胞分裂素的反应。

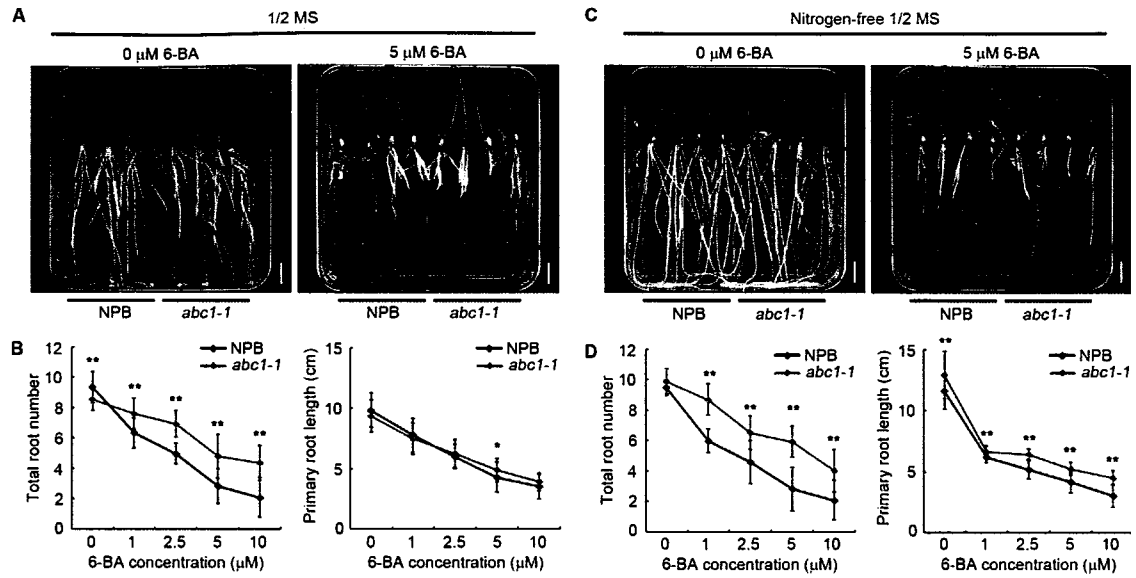


图 3.1 *abc1-1* 突变体对细胞分裂素的敏感性降低。

(A) 野生型(NPB)和突变体 *abc1-1* 在对照或含有 5 μM 6-苄基腺嘌呤(6-BA)的 1/2 MS 培养基上生长 8 天的幼苗。标尺为 1 cm。

(B) 在对照或含有 5 μM 6-BA 的 1/2 MS 培养基上生长 8 天的 NPB 和 *abc1-1* 突变体幼苗的根数及主根长度的统计分析($n = 30$)。

(C) 野生型(NPB)和突变体 *abc1-1* 在对照或含有 5 μM 6-BA 的无氮 1/2 MS 培养基上生长 8 天的幼苗。标尺为 1 cm。

(D) 在对照或含有 5 μM 6-BA 的无氮 1/2 MS 培养基上生长 8 天的 NPB 和 *abc1-1* 突变体幼苗的根数及主根长度的统计分析($n = 30$)。

(B)和(D)中的误差线为标准差；*和**分别表示差异显著($P < 0.05$)和差异极显著($P < 0.01$) (T 检验)。

Figure 3.1 Reduced cytokinin sensitivity in *abc1-1*.

(A) Eight-day-old wild-type (NPB) and *abc1-1* seedlings germinated and grown on 1/2 MS medium supplemented with or without 5 μM 6-benzyladenine (6-BA). Bar, 1 cm.

(B) Analysis of the total root number and the primary root length of NPB and *abc1-1* seedlings germinated and grown on 1/2 MS medium containing various concentrations of 6-BA as indicated ($n = 30$).

(C) Eight-day-old NPB and *abc1-1* seedlings germinated and grown on nitrogen-free 1/2 MS medium supplemented with or without 5 μ M 6-BA. Bar, 1 cm.

(D) Analysis of the total root number and the primary root length of NPB and *abc1-1* seedlings germinated and grown on nitrogen-free 1/2 MS medium containing various concentrations of 6-BA as indicated ($n = 30$).

Error bars in (B) and (D) indicate SD; * and ** indicate $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively (Student's *t*-test).

3.1.2 *abc1-1* 突变体的营养生长受到抑制

abc1-1 突变体在萌发早期没有明显的生长发育表型（图 3.2A, B）。通常在萌发后 11~13 天开始出现生长迟缓及黄化的表型（图 3.2C）。通过对不同时期的野生型植物和 *abc1-1* 突变体进行观察，我们发现 *abc1-1* 突变体的株高及分蘖数始终显著低于野生型植物，且这种表型在生长后期更加严重（图 3.2D, F, H 和 I）。此外，*abc1-1* 突变体的叶色较浅，其叶绿素含量也显著低于野生型植物（图 3.2E, G 和 J）。由于叶绿素在光合作用中对光信号的转导具有重要作用，*abc1-1* 突变体叶片中叶绿素含量的降低也导致了 *abc1-1* 突变体光合作用效率的降低（图 3.2K）。综上所述，*abc1-1* 突变体的在营养生长时期具有明显的生长发育缺陷。

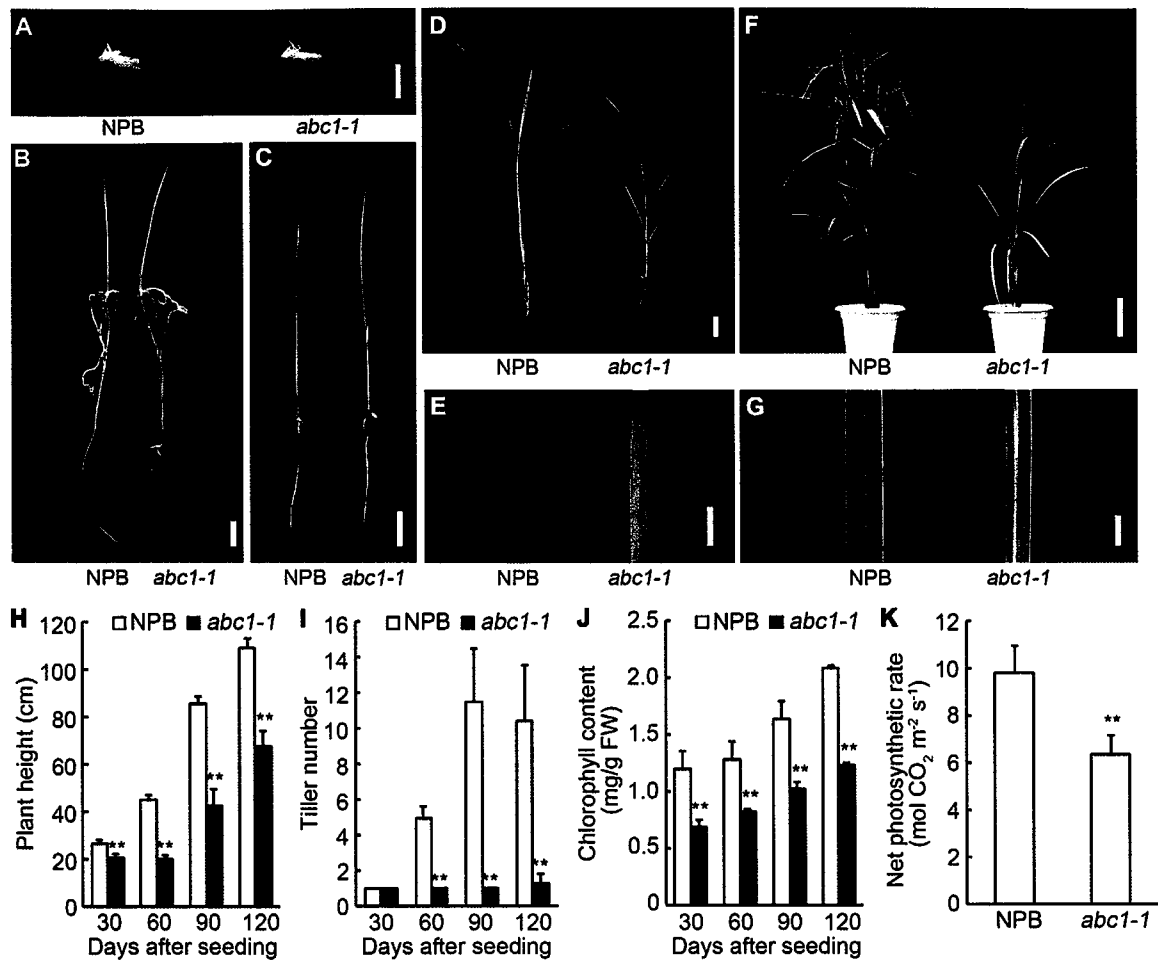


图 3.2 *abc1-1* 突变体的生长发育表型。

- (A) 野生型(NPB)和 *abc1-1* 突变体萌发 2 天的种子。标尺为 1 cm。
- (B) 水培生长 7 天的 NPB 和 *abc1-1* 突变体植株。标尺为 2 cm。
- (C) 田间生长 13 天的 NPB 和 *abc1-1* 突变体植株。标尺为 2 cm。
- (D) 田间生长 1 个月的 NPB 和 *abc1-1* 突变体植株。标尺为 2 cm。
- (E) 田间生长 1 个月的 NPB 和 *abc1-1* 突变体植株的顶端叶片。标尺为 1 cm。
- (F) 田间生长 4 个月的 NPB 和 *abc1-1* 突变体植株。标尺为 10 cm。
- (G) 田间生长 4 个月的 NPB 和 *abc1-1* 突变体植株的旗叶叶片。标尺为 1 cm。
- (H) 不同生长时期的 NPB 和 *abc1-1* 突变体的株高的统计分析($n = 20$)。
- (I) 不同生长时期的 NPB 和 *abc1-1* 突变体的分蘖数的统计分析($n = 20$)。
- (J) 不同生长时期的 NPB 和 *abc1-1* 突变体的叶绿素含量的统计分析($n = 3$)。

(K) NPB 和 *abc1-1* 突变体的光合作用速率的统计分析($n = 4$)。

(H)、(I)、(J)和(K)中的误差线为标准差；**表示差异极显著($P < 0.01$) (T 检验)。

Figure 3.2 The *abc1* mutant phenotype.

(A) Germinating seeds of wild-type (NPB) and *abc1-1*. The photograph was taken 2 days post germination. Bar, 1 cm.

(B) Seven-day-old seedlings of NPB and *abc1-1*. Bar, 2 cm.

(C) Thirteen-day-old seedlings of NPB and *abc1-1* grown in field. Bar, 2 cm.

(D) One-month-old seedlings of NPB and *abc1-1* grown in field. Bar, 2 cm.

(E) Top leaves derived from 1-month-old seedlings grown in field. Bar, 1 cm.

(F) Four-month-old plants of NPB and *abc1-1* grown in field. Bar, 10 cm.

(G) Flag leaves derived from 4-month-old plants grown in field. Bar, 1 cm.

(H) Quantitative analysis of the plant height of NPB and *abc1-1* plants ($n = 20$).

(I) Quantitative analysis of the tiller number of NPB and *abc1-1* plants ($n = 20$).

(J) Analysis of the chlorophyll contents in top leaves of NPB and *abc1-1* plants ($n = 3$).

(K) Analysis of the photosynthetic rate of NPB and *abc1-1* plants ($n = 4$)

Error bars in (H), (I), (J) and (K) indicate SD; ** indicate $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

3.1.3 *abc1-1* 突变体的产量下降

植物的营养器官可以为其他器官提供营养物质, 营养生长的缺陷通常会导致繁殖器官的缺陷。由于 *abc1-1* 突变体在自然条件下生长迟缓, 在北京($39^{\circ} 54' N$, $116^{\circ} 23' E$) 秋季降温前不能完成其生命周期, 因此, 我们在海南省陵水自治县($18^{\circ} 30' N$, $110^{\circ} 01' E$) 对 *abc1-1* 突变体的产量相关性状进行了分析。与野生型植物相比, *abc1-1* 突变体的穗形发生了改变, 其穗长较短且分枝数目减少, 特别是二次枝梗的数目显著减少 (图 3.3 A-D), 在结实率没有显著变化的同时 (图 3.3 E), *abc1-1* 突变体的穗粒数显著降低 (图 3.3 F)。与野生型植物的种子相比, *abc1-1* 突变体种子不仅胚乳颜色偏黄、浑浊 (图 3.3 G), 其千粒重也显著降低 (图 3.3 H)。综上所述, *abc1-1* 突变不仅影响了水稻的营养生长, 而且影响了生殖发育。

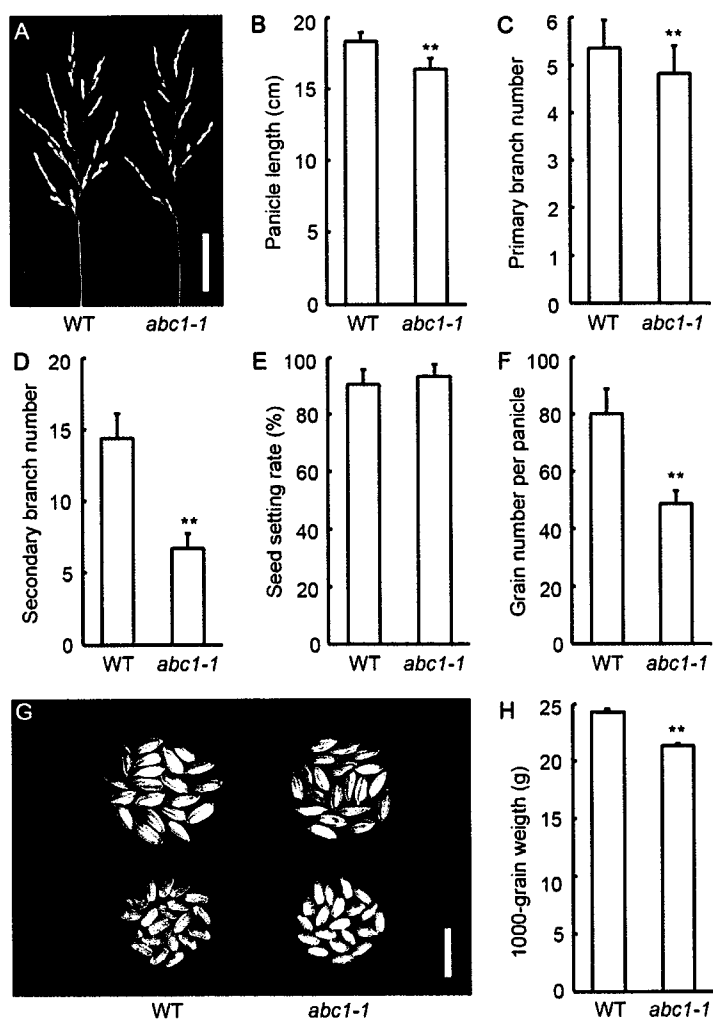


图 3.3 *abc1-1* 突变体的产量相关性状。

(A) NPB 和 *abc1-1* 突变体的穗部表型。标尺为 5 cm。

(B) NPB 和 *abc1-1* 突变体的穗长的统计分析($n = 20$)。

(C) NPB 和 *abc1-1* 突变体的一次枝梗数目的统计分析($n = 20$)。

(D) NPB 和 *abc1-1* 突变体的二次枝梗数目的统计分析($n = 20$)。

(E) NPB 和 *abc1-1* 突变体的结实率的统计分析($n = 20$)。

(F) NPB 和 *abc1-1* 突变体的穗粒数的统计分析($n = 20$)。

(G) NPB 和 *abc1-1* 突变体的种子。标尺为 1 cm。

(H) 对 NPB 和 *abc1-1* 突变体的千粒重的统计分析($n = 3$)。

(B)、(C)、(D)、(E)、(F)和(H)中的误差线为标准差；**表示差异极显著($P < 0.01$) (T 检验)。

Figure 3.3 The yield-related traits of the *abc1-1* mutant.

(A) Panicles of NPB and *abc1-1*. Bar, 5 cm.

(B) Quantitative analysis of the panicle length of NPB and *abc1-1* ($n = 20$).

(C) Quantitative analysis of the primary branch number of NPB and *abc1-1* ($n = 20$).

(D) Quantitative analysis of the secondary branch number of NPB and *abc1-1* ($n = 20$).

(E) Quantitative analysis of the seed setting rate of NPB and *abc1-1* ($n = 20$).

(F) Quantitative analysis of the grain number per panicle of NPB and *abc1-1* ($n = 20$).

(G) Seeds of NPB and *abc1-1*. Bar, 1 cm.

(H) Quantitative analysis of the 1000-grain weight of NPB and *abc1-1* ($n = 3$).

Error bars in (B), (C), (D), (E), (F) and (H) indicate SD; ** indicate $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

3.2 *ABC1* 基因的分子克隆

3.2.1 *ABC1* 基因的图位克隆

为了研究 *abc1-1* 突变的性质，我们将 *abc1-1* 突变体与野生型植物日本晴进行杂交，获得了 17 株 F_1 植物。所有 F_1 植物均表现为野生型表型。在 F_2 群体中，野生型和 *abc1-1* 突变体出现分离，其分离比约为 3:1 (NPB:*abc1-1* = 464:149; $\chi^2 = 0.16$)，表明 *abc1-1* 突变体的表型是由单一核基因的隐性突变造成的。

为了对 *ABC1* 基因进行遗传定位，我们将 *abc1-1* 突变体与籼稻品种 Nanjing-6 进行杂交并构建了 F_2 定位群体，选择群体中具有类似 *abc1-1* 突变体表型的单株用于遗传定位研究。利用已有及新开发的简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)分子标记将 *ABC1* 基因定位于 7 号染色体长臂末端分子标记 AM7 和 AM6 之间约 118 kilo base pairs (kb) 的区域内，该区域内共有 15 个具有功能注释的候选基因（图 3.4 A）。我们以 *abc1-1* 突变体基因组 DNA 为模板，通过 PCR 扩增测序的方法筛选可能发生突变的位点，发现 LOC_Os07g46460 的第 22 个外显子中发生了一个腺嘌呤(adenine, A)到鸟嘌呤(guanine, G)的核苷酸变化，导致其编码的第 1141 位氨基酸由赖氨酸(Lys, K)突变为谷氨酸(Glu, E)（图 3.4 B）。同时，这个腺嘌呤到鸟嘌呤的核苷酸变化形成了

一个可以被限制性内切酶 *Hpy*188I 识别的位点, 该位点可以用于 *abc1-1* 突变体的基因型鉴定。根据 Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)数据库的注释, LOC_Os07g46460 编码区长约 15.5 kb, 包含 33 个外显子 (图 3.4 B), 编码了一个假定的叶绿体定位的依赖铁氧还蛋白的谷氨酸合酶(ferredoxin-dependent glutamate synthase, Fd-GOGAT)的前体。

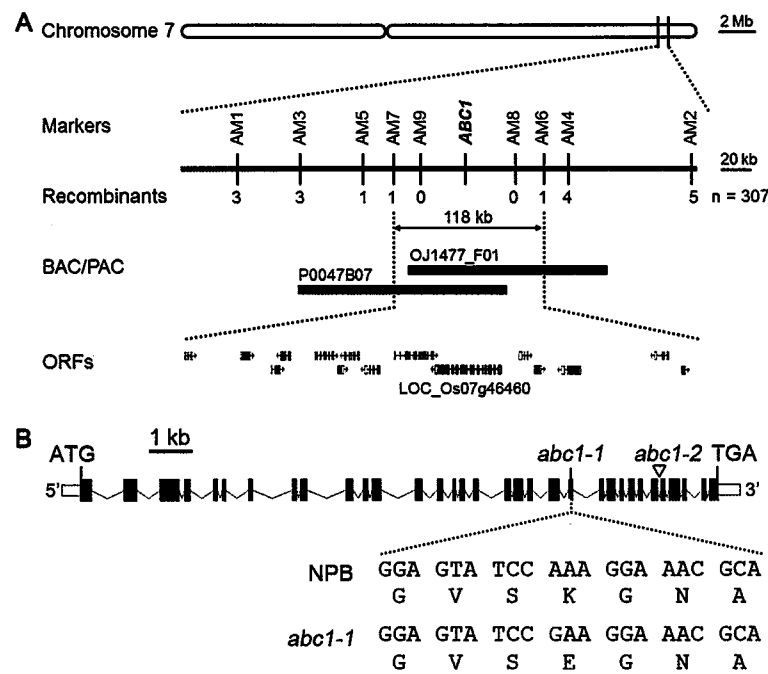


图 3.4 *ABC1* 基因的图位克隆。

(A) *ABC1* 基因在 7 号染色体上的精细定位。图中标注了各分子标记的位置及交换单株的数目。用于遗传定位的 F_2 单株共有 307 个。

(B) *ABC1* 基因的结构及 *abc1* 突变体的突变位点示意图。实心方块、空心方块和折线分别代表外显子、非翻译区和内含子。*abc1-1* 突变体在图中所指的位置发生了突变, 在基因结构模式图的下方表明可突变的核苷酸位点及其造成的氨基酸残基的变化。*abc1-2* 突变体在图中所指的位置含有一段 T-DNA。

Figure 3.4 Map-based cloning of the *ABC1* gene.

(A) Fine mapping of the *ABC1* locus on chromosome 7. The position of molecular markers and the number of recombinant F_2 individuals are indicated. Number of F_2 plants used for mapping is 307.

(B) The genome structure of the *ABC1* gene and the mutated sites in the *abc1* mutant alleles. The filled

boxes, open boxes, and lines indicate exons, untranslated regions and introns, respectively. The mutated nucleotide and amino acid residue of *abc1-1* are shown below of the genome structure. The *abc1-2* mutant allele contains a T-DNA insertion as indicated.

3.2.2 *abc1* 突变体的等位分析

基于以上遗传定位的信息，我们鉴定到了一个 LOC_Os07g46460 的 T-DNA 插入突变体 PFG_3A-01082.L，其 T-DNA 的插入位置在 LOC_Os07g46460 的第 28 个内含子上（图 3.4 B）。PFG_3A-01082.L 纯合植物具有比 *abc1-1* 更严重的生长发育表型，并在苗期致死（图 3.5 A）。*abc1-1* 突变体与 PFG_3A-01082.L 杂合植株杂交得到的 F₁ 单株中，约有一半表现出类似 *abc1-1* 突变体的表型(NPB: *abc1-1* = 15: 11; $\chi^2 = 0.61$)（图 3.5），表明 PFG_3A-01082.L 与 *abc1-1* 为遗传等位突变。因此，我们将 PFG_3A-01082.L 突变体命名为 *abc1-2*。

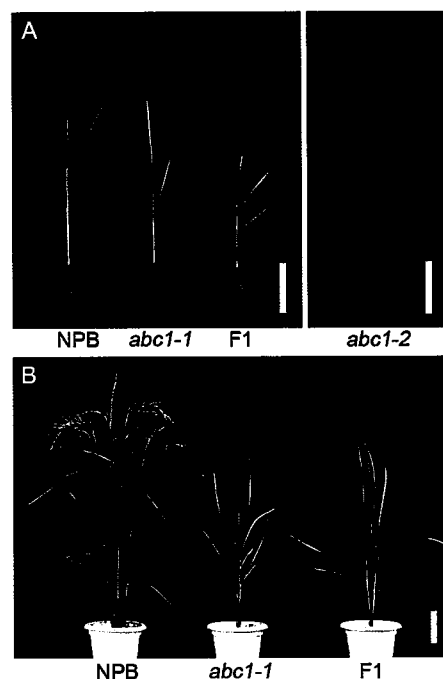


图 3.5 *abc1* 突变体的遗传等位分析。

(A) 田间生长 1 个月的 NPB、*abc1-1*、*abc1-2* 及 F₁ 植株。F₁ 为 *abc1-1* 纯合植株和 *abc1-2* 杂合植

株的杂交后代。标尺为 5 cm。

(B) 田间生长 4 个月的 NPB、*abc1-1* 及 F_1 植株。标尺为 10 cm。

Figure 3.5 Allelic analysis of *abc1* mutants.

(A) One-month-old seedlings grown in field with the indicated genotypes. F_1 : progeny derived from a cross between *abc1-1/-* and *abc1-2/+* plants. Bars = 5 cm.

(B) Four-month-old plants of grown in field with the indicated genotypes. Bar = 10 cm.

3.2.3 *abc1-1* 突变体的转基因互补

为了进一步验证 *abc1-1* 突变体的表型是由 LOC_Os07g46460 的突变造成的，我们构建了 LOC_Os07g46460 的编码序列与 FLAG 标签的融合基因，并置于其自身启动子的驱动。通过遗传转化将该融合基因导入 *abc1-1* 突变体中，我们发现该转基因能够完全恢复 *abc1-1* 株高、分蘖数和叶绿素降低等生长发育缺陷的表型（图 3.6）。

以上结果表明，*abc1-1* 突变体的表型是由于 LOC_Os07g46460 中的突变造成的，即该基因为 *ABC1*。

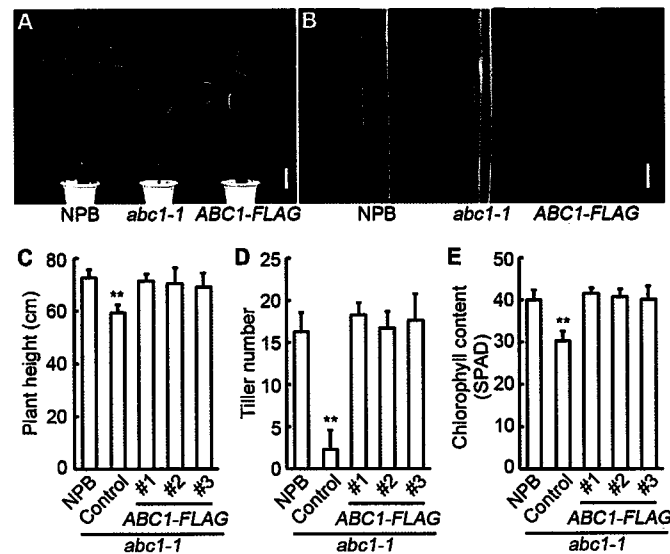


图 3.6 *abc1-1* 突变体的转基因拯救。

(A) 田间生长 4 个月的 NPB、*abc1-1* 突变体及携带 *ABC1-FLAG* 转基因的 *abc1-1* 突变体植物

(*abc1-1/ABC1-FLAG*)。标尺为 10 cm。

(B) 图(A)中相应植物的旗叶。标尺为 1 cm。

(C) NPB、*abc1-1* 突变体及 *abc1-1/ABC1-FLAG* 转基因植物的株高的统计分析($n = 30$)。图中编号为转基因植物的株系编号。

(D) NPB、*abc1-1* 突变体及 *abc1-1/ABC1-FLAG* 转基因植物的分蘖数的统计分析($n = 30$)。图中编号为转基因植物的株系编号。

(E) NPB、*abc1-1* 突变体及 *abc1-1/ABC1-FLAG* 转基因植物的叶绿素计值(SPAD)的统计分析($n = 30$)。图中编号为转基因植物的株系编号。

(C)、(D)和(E)中的误差线为标准差；**表示差异极显著($P < 0.01$) (T 检验)。

Figure 3.6 Molecular complementation of the *abc1-1* phenotype

(A) Four-month-old plants of NPB, *abc1-1* and *abc1-1* transgenic plants carrying an *ABC1-FLAG* transgene (*abc1-1/ABC1-FLAG*). Bar, 10 cm.

(B) Flag leaves derived from plants shown in panel (A). Bar, 1 cm.

(C) Quantitative analysis of the plant height of NPB, *abc1-1* and *abc1-1/ABC1-FLAG* transgenic plants ($n = 30$). Transgenic line numbers are given below the graph.

(D) Quantitative analysis of the tiller number of NPB, *abc1-1* and *abc1-1/ABC1-FLAG* transgenic plants ($n = 30$). Transgenic line numbers are given below the graph.

(E) Chlorophyll contents in top leaves of NPB, *abc1-1* and *abc1-1/ABC1-FLAG* transgenic plants ($n = 30$). Transgenic line numbers are given below the graph.

Error bars in (C), (D) and (E) indicate SD; ** indicate $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

3.3 *ABC1* 基因的表达分析

为了研究 *ABC1* 基因在水稻各组织器官中的表达模式，我们通过 qRT-PCR 的方法检测了 *ABC1* 基因在野生型水稻的幼苗、根、茎秆、茎节、叶鞘、叶片、穗等器官中的表达水平（图 3.7）。实验结果表明，*ABC1* 基因在叶片中的表达水平最高，在裸露的茎秆、叶鞘、已抽出的穗及幼苗等绿色器官中的表达水平也较高，而在根、茎节、未抽出的幼穗及黄化苗等不见光的器官中表达水平较低，这与 Fd-GOGAT 蛋白主要

是在植物光合组织中进行的氮同化过程中发挥作用是一致的。在对模式植物拟南芥的研究中,编码 *ABC1* 同源蛋白的 *GLU1* 基因的表达被证明是受光诱导的(Coschigano et al., 1998), 这与我们在水稻中看到的 *ABC1* 基因在绿色器官中表达水平较高也是一致的。

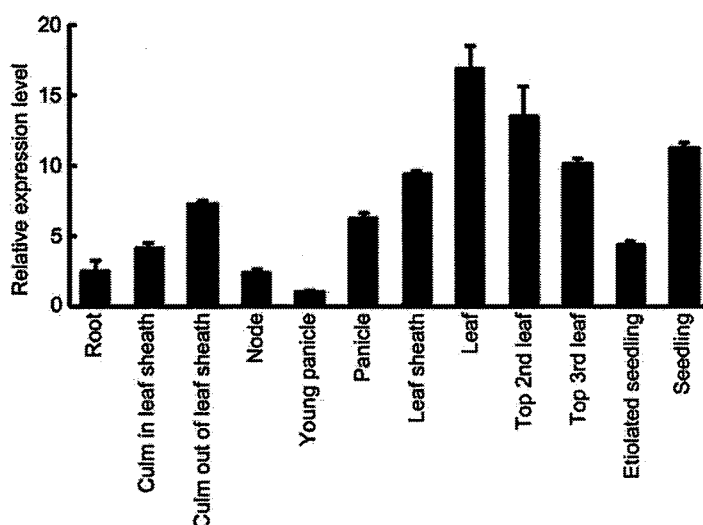


图 3.7 *ABC1* 基因的表达模式分析。

通过 qRT-PCR 的方法检测了 *ABC1* 基因野生型植物 NPB 不同组织器官中的表达水平。

Figure 3.7 Spatial expression pattern of the *ABC1* gene.

ABC1 expression pattern is determined by qRT-PCR. Total RNA are extracted from indicated tissues of wild type.

3.4 *ABC1* 是一个具有生物学功能的 Fd-GOGAT

3.4.1 *abc1-1* 的突变不影响 *ABC1* 基因的表达和 *ABC1* 蛋白的积累

为了在植物体内检测 *ABC1* 的酶活性, 我们首先检测了野生型植物和 *abc1-1* 和 *abc1-2* 突变体中 *ABC1* 基因的表达水平及 *ABC1* 蛋白的积累情况。通过 qRT-PCR 的检测方法, 我们发现 *abc1-1* 突变体中 *ABC1* 基因的表达水平没有受到影响, 而在 *abc1-2* 突变体中不能检测到 *ABC1* 基因的表达 (图 3.8A)。与之相一致的是, *abc1-1* 突变体

中 ABC1 蛋白的积累水平没有发生改变，而在 *abc1-2* 突变体中不能检测到 ABC1 蛋白（图 3.8 B）。以上结果表明，*abc1-1* 的突变不影响 *ABC1* 基因的表达或 ABC1 蛋白的积累。

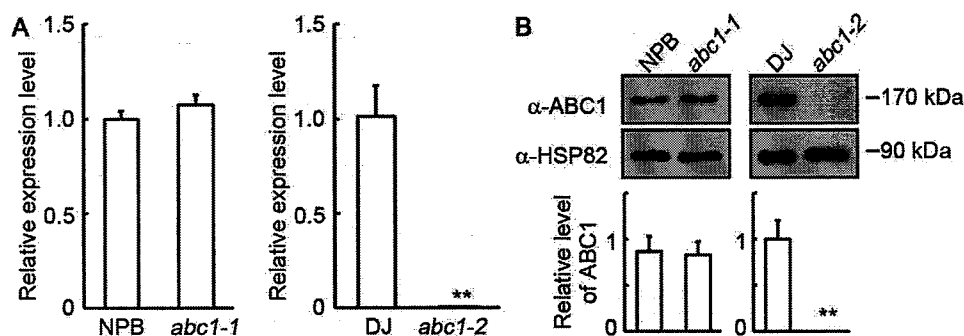


图 3.8 *abc1* 突变体中 *ABC1* 基因的表达水平及 ABC1 蛋白的积累情况。

(A) 通过 qRT-PCR 的方法对 12 日龄的 NPB、*abc1-1*、Dongjin (DJ) 和 *abc1-2* 叶片中 *ABC1* 基因的表达水平进行分析 ($n = 3$)。以野生型植物 (NPB 或 DJ) 叶片中 *ABC1* 基因的相对表达水平为 1.0。

(B) 通过蛋白免疫印迹杂交的方法对 12 日龄的 NPB、*abc1-1*、DJ 和 *abc1-2* 叶片中 ABC1 蛋白的积累水平分析。图片下方为对相对蛋白积累水平的统计分析 ($n = 3$)。

误差线为标准差；**表示差异极显著 ($P < 0.01$) (T 检验)。

Figure 3.8 The expression of *ABC1* and the accumulation of ABC1 protein in *abc1* mutants.

(A) Analysis of the expression level of *ABC1* in NPB, *abc1-1*, Dongjin (DJ) and *abc1-2* in leaves of 12-day-old seedlings by qRT-PCR ($n = 3$). The relative expression level of *ABC1* in wild type (NPB or DJ) is set as 1.0.

(B) Analysis of ABC1 protein levels in leaves of 12-day-old NPB and *abc1-1* seedlings by immunoblotting. Quantitative analysis of the relative level is presented below the blot ($n = 3$).

Error bars indicate SD; ** indicate $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

3.4.2 *abc1-1* 突变体中 ABC1/OsFd-GOGAT 的活性降低

ABC1 基因编码一个假定的 Fd-GOGAT 酶。在 GS/GOGAT 循环中，GOGAT 以 Gln 和 α -酮戊二酸(2-OG)为底物，生成两分子 Glu（详见“文献综述”以及图 3.9A）。

为了探索 ABC1 蛋白是否具有 Fd-GOGAT 酶活,我们分析比较了野生型植物和 *abc1-1* 突变体植物中 Fd-GOGAT 酶活。Fd-GOGAT 以 Fd 作为电子供体,催化氨基从 Gln 转移至 2-OG 生成两分子 Glu 的反应需要消耗 NADPH。通过检测 NADPH 在 340 nm 处的吸收峰值,计算 NADPH 的消耗量而测定 Fd-GOGAT 的酶活(Jamai et al., 2009)。我们发现野生型植物(NPB)叶片中 Fd-GOGAT 的活性约为 4.6 nM NADPH/min/mg total protein, 而 *abc1-1* 突变体叶片中 Fd-GOGAT 的活性约为 2.6 nM NADPH/min/mg total protein, 其活性降低了约 45% (图 3.9 B)。与这一结果相一致的是,我们发现在 *abc1-1* 突变体中 Fd-GOGAT 的底物 Gln 和 2-OG 的含量都显著升高,其中 Gln 的含量约为野生型植物的 232 倍, 2-OG 的含量约为野生型植物的 3.4 倍, 而 Glu 含量的变化幅度则较小 (图 3.9 C)。由于植物体内的 Glu 在氨基酸代谢中处于中心位置,并参与了包括碳代谢的众多代谢过程,因此植物体内 Glu 的水平通常是维持在平衡状态而不受植物状态的影响(Forde and Lea, 2007)。因此,我们推测 Glu 的绝对含量并不是造成 *abc1-1* 突变体表型的原因。上述实验结果表明, ABC1 是一个具有 Fd-GOGAT 酶活的蛋白。

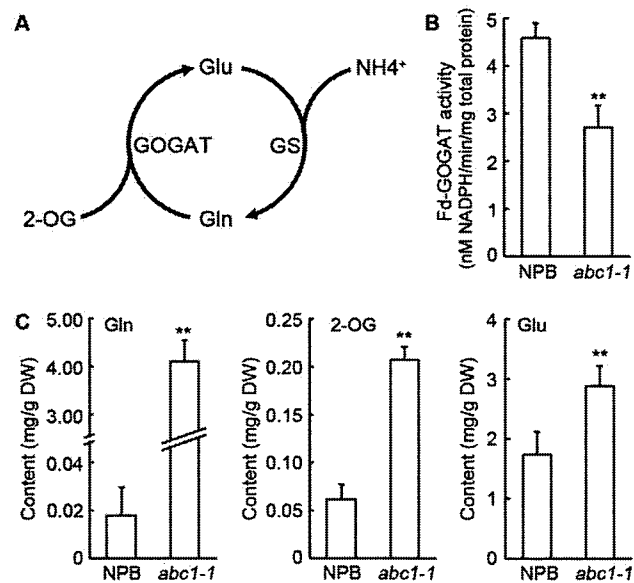


图 3.9 Fd-GOGAT 的酶活分析。

(A) GS/GOGAT 循环简图。2-OG, α -酮戊二酸; Gln, 谷氨酰胺; Glu, 谷氨酸; GOGAT, 谷氨酸合酶; GS, 谷氨酰胺合成酶。

(B) 12 日龄的 NPB 和 *abc1-1* 突变体叶片中 Fd-GOGAT 酶活的分析($n = 3$)。

(C) 15 日龄的 NPB 和 *abc1-1* 突变体叶片中谷氨酰胺、2-OG、及谷氨酸含量的分析($n = 3$)。

(B)和(C)中的误差线为标准差；**表示差异极显著($P < 0.01$) (T 检验)。

Figure 3.9 Functional characterization of the Fd-GOGAT activity.

(A) A simplified schematic map of the GS/GOGAT cycle. 2-OG, 2-oxoglutarate; Gln, glutamine; Glu, glutamate; GOGAT, glutamate synthase; GS, glutamine synthetase.

(B) Analysis of the Fd-GOGAT activity in leaves of 12-day-old NPB and *abc1-1* seedlings ($n = 3$).

(C) Contents of glutamine, 2-oxoglutarate and glutamate in leaves of 15-day-old NPB and *abc1-1* seedlings ($n = 3$).

Error bars in (B) and (C) indicate SD; ** indicate $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

为了研究 Fd-GOGAT 活性降低导致 *abc1-1* 突变体表型的原因，我们对野生型植物和 *abc1-1* 突变体进行了 Glu 饲喂试验，发现外源施加 Glu 可以部分地恢复 *abc1-1* 突变体株高和叶绿素的表型（图 3.10）。结合前面的实验结果，在 *abc1-1* 突变体中 Glu 的水平变化较小，而外源 Glu 却可以恢复 *abc1-1* 突变体的表型，我们推测 Glu 参与的代谢平衡而非 Glu 的绝对含量是造成 *abc1-1* 突变体表型的原因。

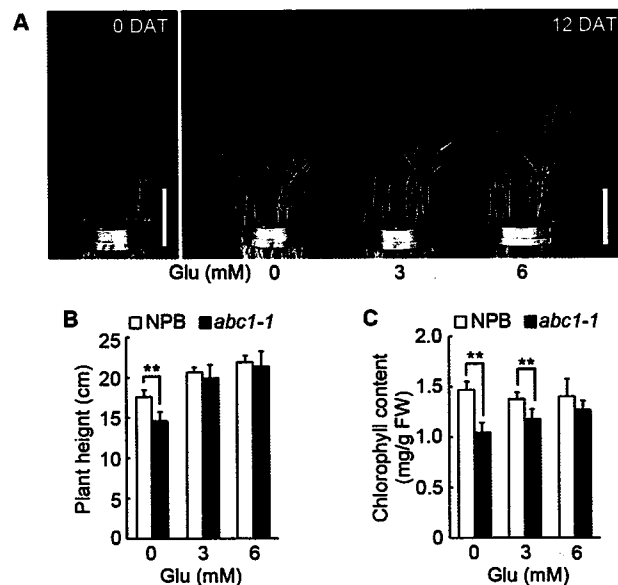


图 3.10 谷氨酸饲喂试验。

(A) 含有不同谷氨酸浓度的水培条件下生长的 NPB 和 *abc1-1* 突变体（分别位于每个培养容器的

左侧和右侧)。照片拍摄于谷氨酸处理前(0 DAT)及处理后第 12 天(12 DAT)。标尺为 5 cm。

(B) 图(A)中谷氨酸处理 12 天后对 NPB 和 *abc1-1* 突变体的株高的统计分析($n = 24$)。

(C) 图(A)中谷氨酸处理 12 天后对 NPB 和 *abc1-1* 突变体的叶绿素含量的统计分析($n = 24$)。

(B)和(C)中的误差线为标准差; **表示差异极显著($P < 0.01$) (T 检验)。

Figure 3.10 Glutamate feeding experiment.

(A) Hydroponic cultures of NPB and *abc1-1* seedlings (left and right sides of each sample, respectively) supplemented with various concentrations of Glu as indicated. Photographs were taken at day after treatment (DAT) of 0 and 12. Bar, 5 cm.

(B) Quantitative of the plant height of NPB and *abc1-1* seedlings at DAT12 shown in panel (A) ($n = 24$).

(C) Analysis of the chlorophyll content in NPB and *abc1-1* seedlings at DAT12 in panel (A) ($n = 24$).

Error bars in (B) and (C) indicate SD; ** indicate $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

3.5 ABC1/OsFd-GOGAT 蛋白的结构分析

3.5.1 ABC1/OsFd-GOGAT 是一个保守的蛋白

通过对不同物种的 Fd-GOGAT 蛋白序列进行比对, 发现从低等植物到高等植物中 Fd-GOGAT 蛋白都是保守的, 其序列的同源性均达到 60%以上, 而且水稻 ABC1 蛋白与其他高等植物的 Fd-GOGAT 蛋白的序列同源性可以达到 80%以上 (图 3.11)。进化树分析显示, Fd-GOGAT 蛋白可以分为低等植物和高等植物两类, 高等植物中的 Fd-GOGAT 又可以分为单子叶植物和双子叶植物两类, 且单子叶植物中的 Fd-GOGAT 又可以进一步分为 C3 植物和 C4 植物两类, 这表明 Fd-GOGAT 的进化过程是与植物在进化过程中对环境的适应性相一致的。

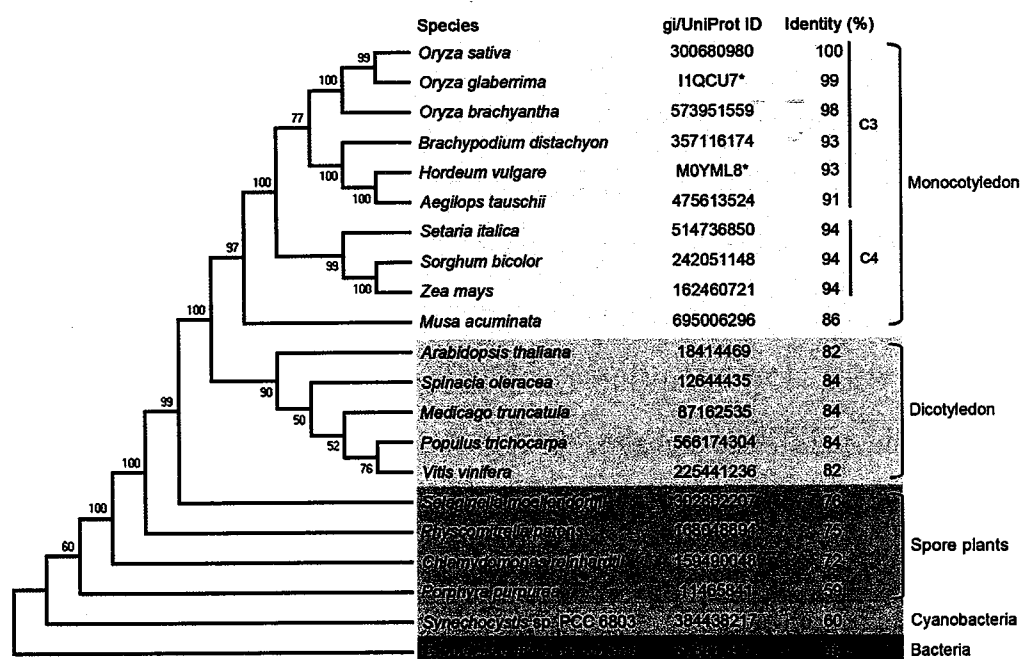


图 3.11 Fd-GOGAT 蛋白在不同物种中的系统进化树分析。

以最大简约法构建的水稻 ABC1/ OsFd-GOGAT 蛋白及不同物种中 ABC1 类似蛋白的的进化树。步长值设置为 1000 次重复以评估每一分枝的相对支持度，图中显示了 50%及以上的步长值。蛋白序列的登陆号或 UniProt ID (*)已给出。与水稻 ABC1 蛋白序列的相似性(%)也列于图中。*Oryza sativa*, 亚洲栽培稻; *Oryza glaberrima*, 非洲栽培稻; *Oryza brachyantha*, 短花药野生稻; *Brachypodium distachyon*, 小麦; *Hordeum vulgare*, 大麦; *Aegilops tauschii*, 节节麦; *Setaria italica*, 小米; *Sorghum bicolor*, 高粱; *Zea mays*, 玉米; *Musa acuminata*, 小果野蕉; *Arabidopsis thaliana*, 拟南芥; *Spinacia oleracea*, 菠菜; *Medicago truncatula*, 蒺藜苜蓿; *Populus trichocarpa*, 毛果杨; *Vitis vinifera*, 葡萄; *Selaginella moellendorffii*, 江南卷柏; *Physcomitrella patens*, 小立碗藓; *Chlamydomonas reinhardtii*, 莱茵衣藻; *Porphyra purpurea*, 紫菜; *Synechocystis sp. PCC6803*, 集胞藻 PCC6803; *Geobacillus thermoleovorans*, 喜热噬油芽胞杆菌。

Figure 3.11 Phylogenetic analysis of Fd-GOGAT proteins in various species.

The maximum parsimony phylogenetic tree of ABC1/OsFd-GOGAT and ABC1-like proteins in various species. Bootstrap values were estimated (with 1000 replicates) to assess the relative support for each branch. The bootstrap values of 50% and above are indicated on the tree. Accession numbers or UniProt ID (*) are shown. Identities (%) to *Oryza sativa* ABC1 sequence are list.

3.5.2 ABC1 蛋白的同源建模

为了研究 *abc1-1* 突变体中 Fd-GOGAT 酶活性降低可能的机制, 我们对 ABC1 蛋白进行了结构预测。蓝细菌集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 是一种低等的原核单细胞光合生物, 其 Fd-GOGAT 蛋白被命名为 Fd-GltS, 一级序列与水稻 ABC1 蛋白的同源性约为 60% (图 3.11)。对 Fd-GltS 的晶体结构的研究表明, Fd-GltS 蛋白由氨基转移酶结构域(amidotransferase domain)、中心结构域(central domain)、FMN 结合结构域(FMN-binding domain)和羧基末端结构域(C-terminal domain)四部分组成(van den Heuvel et al., 2002)。根据 Fd-GOGAT 蛋白的保守性, 其它物种中的 Fd-GOGAT 蛋白也是由这四个结构域组成的(Suzuki and Knaff, 2005; Vanoni et al., 2005)。此外, Fd-GOGAT 蛋白的前体在氨基末端通常包含一段信号肽, 使核编码的蛋白前体能够被转运到质体并被剪切为成熟蛋白(Coschigano et al., 1998; Hayakawa et al., 2003; Sakakibara et al., 1991; Suzuki and Rothstein, 1997)。我们以集胞藻 Fd-GltS 蛋白的晶体结构(PDB ID: 1LLW)为模板(van den Heuvel et al., 2002), 通过蛋白质三维结构预测网站 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>)对水稻 ABC1 蛋白的三维结构进行了预测。从整体上看, 预测的 ABC1 蛋白的三维结构与 Fd-GltS 的晶体结构非常相似, *abc1-1* 的突变位点也没有引起结构上显著的变化 (图 3.12A, B)。

对集胞藻的 Fd-GltS 蛋白晶体结构的研究已经揭示了对其活性具有重要影响的氨基酸位点及结构单元。Fd-GltS 的氨基转移酶结构域含有一个四层的 $\alpha/\beta/\beta/\alpha$ 的结构, 是典型的氨基端氨基转移酶结构域(N-terminal amidotransferase domain), 其活性中心是位于氨基端的 Cys-1, Cys-1 催化谷氨酰胺(Gln)的水解, 生成氨和一分子的谷氨酸(Glu), 氨通过结构域间的氨通道(ammonia channel)被转运至 FMN 结合结构域, 用于合成另一分子 Glu。氨基转移酶结构域的 Arg-31 可以与 Cys-1 形成氢键, FMN 结合结构域的 Glu-1013 可以与 Cys-1 形成盐桥, 它们以维持 Cys-1 在 Fd-GltS 蛋白中正确的空间位置。其中, Arg-31 与 Cys-1 间氢键的形成只有在酶与底物结合后, Loop31-39 及其前端的 α -螺旋的位置发生微小的改变后才能形成(van den Heuvel et al., 2002)。通过序列比对, 我们发现以上参与 Fd-GOGAT 酶活的重要氨基酸位点及结构单元在各

物种中均高度保守(图 3.12C, D), 这表明 Fd-GOGAT 的功能在各物种中也是保守的。从一级序列看, *abc1-1* 的突变位点 Lys-1141 位于 FMN 结合结构域中, 序列比对显示该位点在各物种中十分保守(图 3.12C, D), 暗示了其在维持 Fd-GOGAT 活性中的重要作用。从三维结构上看, Lys-1141 (等同于 Fd-GltS 的 Lys-1050) 则更接近于氨基转移酶的活性中心, 其 ϵ -NH₃⁺与 Loop 127-135 (等同于 Fd-GltS 的 Loop 31-39) 中的 Cys-130 (等同于 Fd-GltS 的 Cys-34) 非常接近。由于 Fd-GltS 的活性需要 Loop 31-39 的位置在 Fd-GltS 结合底物后发生微小的变化, 使 Cys-1 与 Arg-31 能够形成氢键(van den Heuvel et al., 2002)。因此, 我们推测在 *abc1-1* 突变体中, 带正电的 Lys-1141 突变为带负电的 Glu 时会影响 Loop 127-135 的位移, 最终导致酶活的降低。

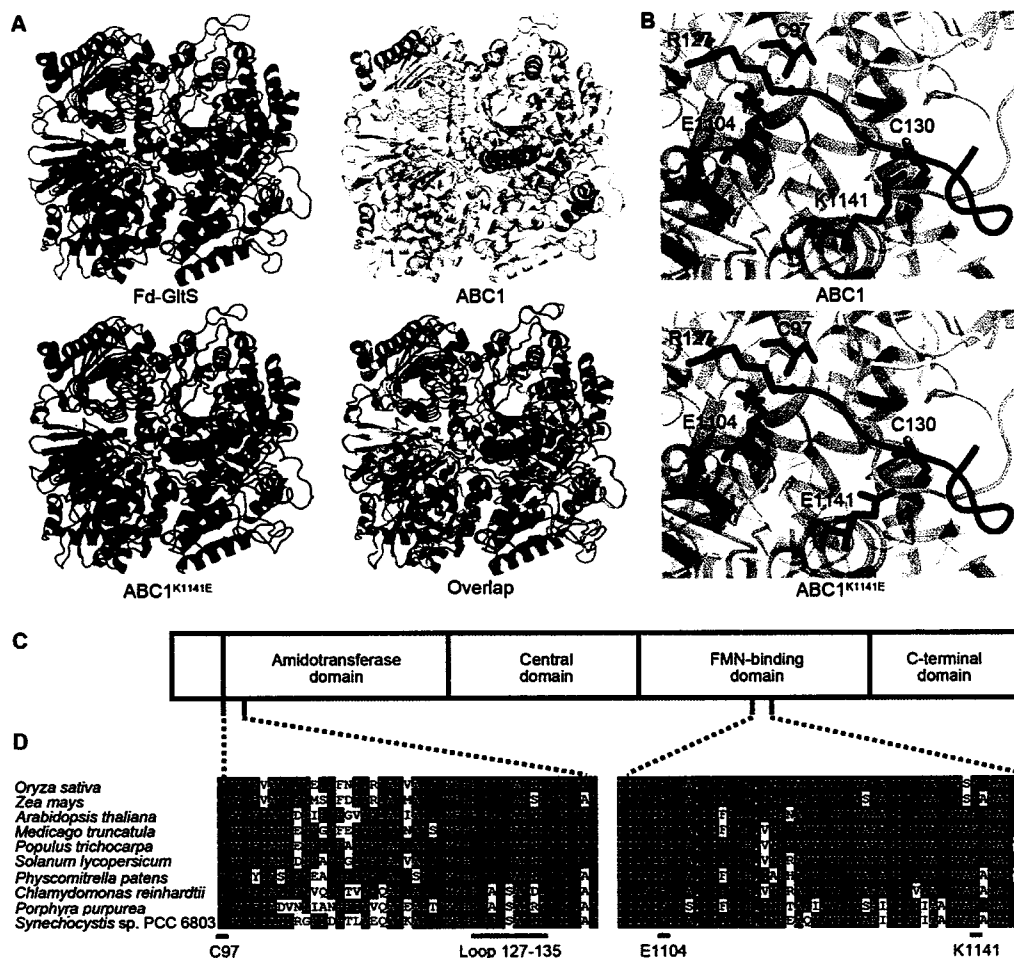


图 3.12 ABC1 蛋白三维结构的预测。

(A) 左上: 集胞藻 PCC6803 中解析的 Fd-GltS 蛋白的晶体结构(PDB ID: 1LLW); 右上: 以 Fd-GltS

蛋白的晶体结构为模板预测的野生型 *ABC1* 蛋白的三维结构；左下：以 Fd-GltS 蛋白的晶体结构为模板预测的 *abc1-1* 突变蛋白(*ABC1*^{K1141E})的三维结构；右下：以上蛋白三维结构的叠加图。

(B) *ABC1* 和 *ABC1*^{K1141E} 蛋白三维结构中谷氨酰胺酶活性中心的局部放大图。图中标注了氨基酸残基 C97、E1104、K1141 及 Loop127-135 (相当于 Fd-GltS 蛋白中的氨基酸残基 C1、E1013、K1050 及 Loop31-39)。蛋白的其他部分透明度设置为 80%。

(C) *ABC1* 类似蛋白的结构模式图。方框代表酶的各个结构域。

(D) 不同物种中 *ABC1* 类似蛋白谷氨酰胺酶活性中心的序列比对。红色表示已知的影响酶活的重要元件及 *abc1-1* 的突变位点。

Figure 3.12 Structure modeling of *ABC1* protein.

(A) The crystal structure of Fd-GltS from *Synechocystis* sp. PCC6803 (PDB ID: 1LLW) is shown (right top). Structure modeling of wide-type *ABC1* protein and the *abc1-1* mutant protein (*ABC1*^{K1141E}) are constructed using the structure of Fd-GltS as a training template.

(B) Enlarged view of glutaminase activity center of *ABC1* and *ABC1*^{K1141E}. Amino acid residues C97, E1104, K1141 and Loop127-135 (equivalent to C1, E1013, K1050 and Loop31-39 of Fd-GltS) are indicated. Other parts of the proteins are in 80% transparency.

(C) The structure features of *ABC1*-like proteins. Boxes represent the domains of the enzyme.

(D) Alignment of sequence involved in glutaminase activity center. Known elements important for enzyme activity and the mutant site in *abc1-1* are shown.

3.6 *abc1-1* 突变体的氨基酸代谢和碳代谢异常

Glu 和 Gln 是植物体内重要的有机氮供体，而 α -酮戊二酸(2-OG)是三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)中重要的中间产物。因此，由 GS/GOGAT 催化的循环反应是氮代谢和碳代谢的重要连接点(Hodges, 2002)。为了研究 *ABC1*/Fd-GOGAT 在碳氮代谢中的调控作用，我们通过气相色谱-质谱联用系统(gas chromatograph-mass spectrometry system, GC-MS)的方法对野生型和 *abc1-1* 突变体的幼苗进行了代谢组学分析。由于 *abc1-1* 突变体生长迟缓及叶绿素含量降低的表型在种子萌发后的第 11~13 天开始出现，我们选取了萌发后第 7、9、12、15 和 18 天的野生型和 *abc1-1* 突变体

的幼苗，收集其地上部分制备样品进行代谢组学分析。我们共鉴定并跟踪了 72 个不同的代谢组份，包括氨基酸、糖、有机酸、脂肪酸等。*abc1-1* 突变体中许多重要代谢途径的水平都发生了改变（图 3.13），暗示了 ABC1 对植物体内的各种基础代谢过程有着重要的意义。

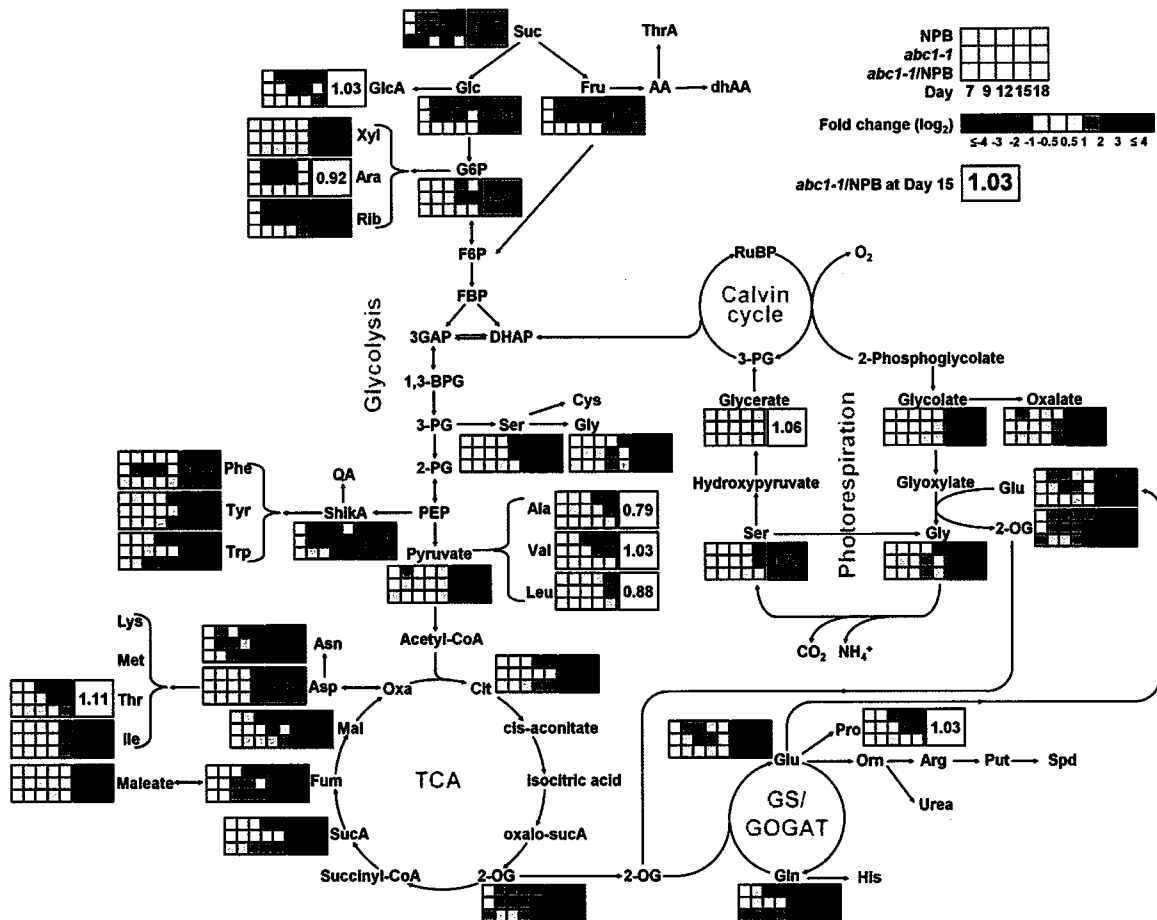


图 3.13 野生型植物及 *abc1-1* 突变体中重要碳氮代谢物的水平。

通过气相色谱质谱联用系统(GC/MS)对野生型(NPB)和 *abc1-1* 突变体碳代谢及氮代谢组分进行代谢组学分析。分别收集在营养土中生长 7 天、5 天、9 天、12 天和 15 天的 NPB 和 *abc1-1* 幼苗的地上部分用于代谢组学分析。各组分在不同时间点的含量相对于其生长 7 天时的含量的倍数变化以不同颜色在小方框中显示。数据来自 3 次独立试验的平均值。方框中的数字为生长 15 天时 *abc1-1*/NPB 的值，红色为含量显著升高，绿色为含量显著降低， $P < 0.01$ (Student's *t*-test)。TCA，三羧酸循环。

Figure 3.13 Metabolic profiling of key carbon and nitrogen metabolites in wild-type and *abc1-1* plants.

Metabolome analysis of carbon and nitrogen compounds in wild-type (NPB) and *abc1-1* plants by gas chromatograph-mass spectrometry (GC/MS). The aerial parts of NPB and *abc1-1* seedlings at the given time points were collected and used for metabolic profiling of major compounds in carbon and nitrogen metabolism. Fold changes of each compound compared with the level at day 7 are shown by different colors in the boxes. Data presented are mean values of three independent experiments. Boxed numbers indicate the *abc1-1*/NPB ratios with significant differences at $P < 0.01$ (Student's *t*-test). TCA, tricarboxylic acid cycle.

在我们鉴定到的 15 种氨基酸中，谷氨酰胺(Gln)和天冬酰胺(Asn)这两种具有高 N/C 比的氨基酸在 *abc1-1* 突变体中大量积累（图 3.14）。其中，Gln 作为 Fd-GOGAT 的底物之一，由于 Fd-GOGAT 酶活的降低，在 *abc1-1* 突变体中的积累水平达到野生型植物的 2.5~470 倍。而 Asn 在 *abc1-1* 突变体中的积累水平也达到了野生型植物的 3.3~15 倍，同时，Asn 的前体天冬氨酸(Asp)的水平则有所降低。此外，与野生型植物相比 *abc1-1* 突变体中色氨酸(Trp)的水平也显著升高，而它的前体莽草酸(shikimate)的水平则有所降低，表明 Fd-GOGAT 酶活的降低有可能通过影响莽草酸途径对次生代谢产生影响。然而 *abc1-1* 突变体中包括 Glu 在内的其他氨基酸的水平与野生型植物相比变化不明显（图 3.14）。

有机酸类物质是植物体内重要的碳骨架来源，本实验中我们共检测到了 29 种有机酸类物质，并对其中参与 TCA 循环及与其临近的代谢途径中的有机酸类物质含量的变化进行了分析。2-OG 是 TCA 循环的中间代谢产物之一，同时也是 ABC1/Fd-GOGAT 的底物之一。在 *abc1-1* 突变体中，2-OG 及其他 TCA 循环的中间产物的含量均显著增高，包括柠檬酸(citrate)、琥珀酸(succinate)、延胡索酸(fumarate)、苹果酸(malate)等（图 3.15A），表明 TCA 循环的水平直接受到了植物氮水平的调控。然而在我们检测的几个时间点上，与野生型植物相比，*abc1-1* 突变体中乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)的前体物质丙酮酸(pyruvate)的水平也没有明显改变（图 3.15A），而且乙醇酸途径的主要中间代谢产物的水平也没有明显改变。此外，我们检测到的 14 种糖

及糖的衍生物的水平也没有持续的变化（图 3.15B）。

以上结果表明，在 *abc1-1* 突变体中氨基酸代谢，特别是 Gln、Asn 和 Trp 的代谢，以及 TCA 循环均受到了严重影响，表明植物的氮同化过程是与 TCA 循环紧相连的，后者可以为前者提供化学反应需要的能量和氨基酸的生物合成所需要的碳骨架。

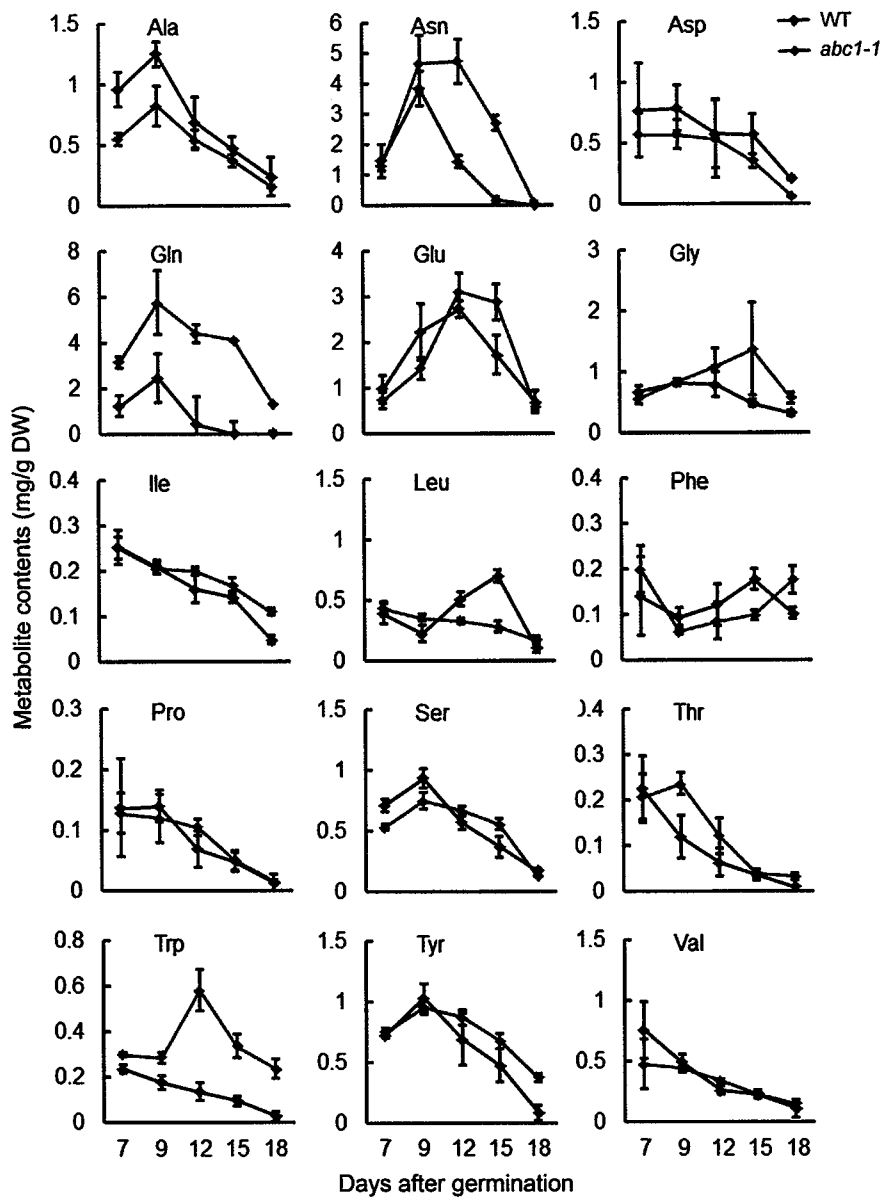
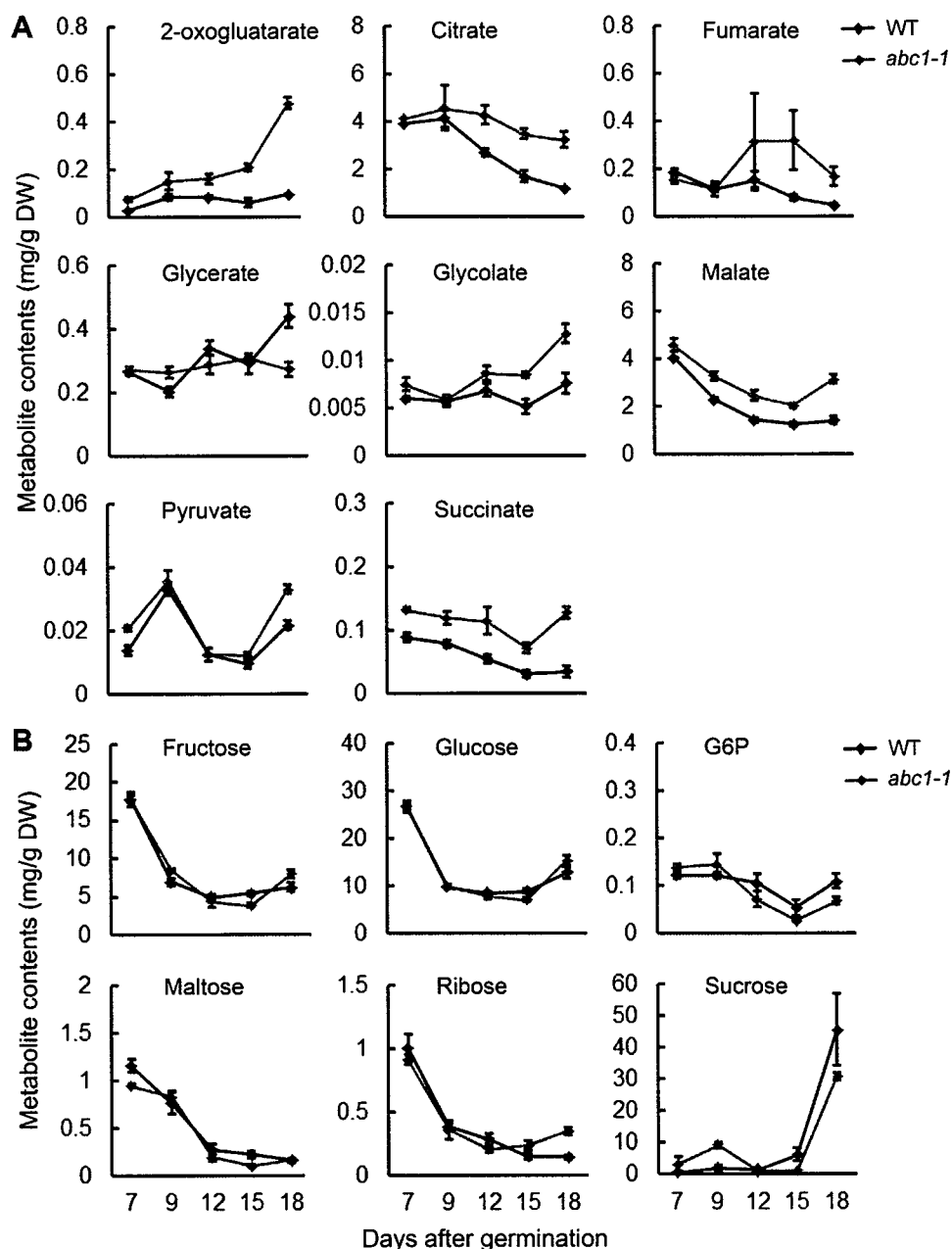


图 3.14 野生型植物和 *abc1-1* 突变体中部分氨基酸的含量。

NPB 和 *abc1-1* 突变体幼苗地上部分各氨基酸含量的分析。植物材料与图 3.13 相同。数据来自 3 次生物重复的平均值。误差线为标准差。

Figure 3.14 Contents of selected amino acids in wild-type and *abc1-1* plants.

Analysis of contents of amino acids in wild-type (NPB) and *abc1-1* plants (see Figure 3.12 for technical details). Data presented are mean values of three independent experiments. Error bars indicate SD.

**图 3.15** 野生型植物和 *abc1-1* 突变体中部分有机酸和糖类物质的含量。

NPB 和 *abc1-1* 突变体幼苗地上部分材料中部分有机酸(A)及糖类物质(B)含量的分析。植物材料与图 3.13 相同。数据来自 3 次生物重复的平均值。误差线为标准差。

Figure 3.15 Contents of selected organic acids and sugars in wild-type and *abc1-1* plants .

Analysis of contents of selected organic acids (A) and sugars (B) in wild-type (NPB) and *abc1-1* plants (see Figure 3.13 for technical details). Data presented are mean values of three independent experiments. Error bars indicate SD.

3.7 *ABC1* 基因的遗传多样性

3.7.1 亚洲栽培稻中 *ABC1* 基因的多样性

亚洲栽培稻主要可分为粳稻(*japonica*)和籼稻(*indica*)两个亚种。与粳稻品种相比, 籼稻品种通常在株高、分蘖数和生物量等方面表现出对氮肥更加敏感(Hu et al., 2015; Sun et al., 2014a; Ta and Ohira, 1981)。为了探索 *ABC1* 基因是否参与了粳稻和籼稻间对氮肥响应的差异, 我们对包括粳稻、籼稻和 *aus* 的 40 个品种的 *ABC1* 基因进行了测序。根据测序结果, 在 *ABC1* 基因中共找到 177 个单核苷酸多态性位点(Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), 其中 31 个位于编码序列, 5 个造成了氨基酸的变化。这 5 个非同义 SNPs 在粳稻品种和籼稻品种间存在显著差异, 可以根据这 5 个非同义 SNPs 将 *ABC1* 基因分为三大类, 即 *ABC1-ja* (Ile-765, Ile-1293, Ala-1302, Gln-1363, Val-1417)、*ABC1-in* (Val-765, Leu-1293, Val-1302, Pro-1363, Ile-1417)和类似于 *ABC1-in* 的 *ABC1-in*^{V1302A} (Val-765, Leu-1293, Ala-1302, Pro-1363, Ile-1417) (图 3.16A)。

为了深入研究 *ABC1* 基因在粳稻和籼稻中的分化, 我们在水稻 Rice HapMap Project (RHP) (Huang et al., 2012)和 RiceVarMap (Zhao et al., 2015)两个数据库中对 *ABC1* 基因进行搜索, 这两个数据库共包含 1,070 个栽培稻的序列信息, 其中包括粳稻品种 483 个、籼稻品种 520 个、*aus* 品种 67 个。所有粳稻品种和绝大多数(66/67) *aus* 品种的 *ABC1* 基因为 *ABC1-ja* 类。在籼稻品种中, 约 85% (444/520)为 *ABC1-in* 类, 而其它籼稻品种中主要为 *ABC1-ja* 类或 *ABC1-in*^{V1302A} 类 (图 3.16B)。以上结果表明, *ABC1* 基因在亚洲栽培稻的两个主要的亚种中发生了分型。

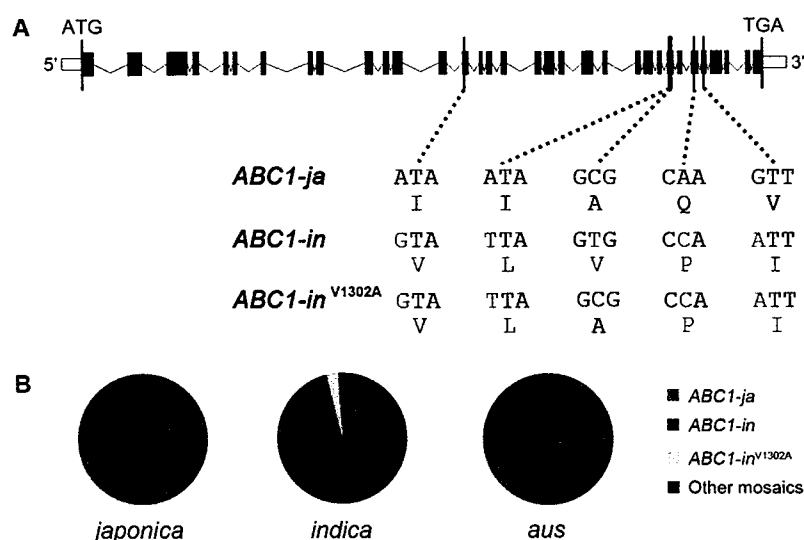


图 3.16 栽培稻中 *ABC1* 基因的单核苷酸多态性分析。

(A) *ABC1* 基因中的非同义单核苷酸多态性(SNPs)位点。*ABC1-ja* 分别代表粳稻中 *ABC1* 基因的类型，*ABC1-in* 代表绝大部分籼稻中 *ABC1* 基因的类型，*ABC1-in^{V1302A}* 代表籼稻中与 *ABC1-in* 类似但有 1 个氨基酸差别的 *ABC1* 基因的类型。

(B) 不同类型的 *ABC1* 基因在粳稻、籼稻和 *aus* 群体中的分布。

Figure 3.16 Analysis of single nucleotide polymorphisms in *ABC1* in cultivated rice.

(A) Non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *ABC1*. *ABC1-ja* and *ABC1-in* represent types of *ABC1* gene in all *japonica* cultivars and the majority of the *indica* cultivars, respectively, and *ABC1-in^{V1302A}* represents the type with a substitution in *ABC1-in*.

(B) Different type-pattern of the *ABC1* gene in *japonica*, *indica* and *aus* populations.

3.7.2 普通野生稻中 *ABC1* 基因的多样性

已有研究表明，粳稻起源于中国南方的 Or-IIIa 类普通野生稻(*Oryza rufipogon*)，人类通过人工选择逐渐将 Or-IIIa 类驯化为粳稻品种，而籼稻和 *aus* 品种则产生于粳稻祖先品种与 Or-I 类普通野生稻的杂交(Huang et al., 2012)。为了追溯 *ABC1* 基因的起源，我们在 RHP 数据库中对 *ABC1* 的同源基因进行了检索，发现 Or-IIIa 和 Or-I 类野生稻均含有不同比例的 *ABC1-ja* 类、*ABC1-in* 类和 *ABC1-in^{V1302A}* 类，其中

ABC1-in^{V1302A} 类在 Or-III 和 Or-I 类野生稻群体中的比例均最高，分别为 42% 和 47%，而 *ABC1-ja* 类在 Or-III 类野生稻和 *ABC1-in* 在 Or-I 类野生稻中的比例分别为 39% 和 46%，表明 *ABC1-in*^{V1302A} 类在栽培稻的演化过程中被淘汰，而 *ABC1-ja* 类和 *ABC1-in* 类的 *ABC1* 基因则分别在粳稻和籼稻的演化中被保留了下来（图 3.17）。

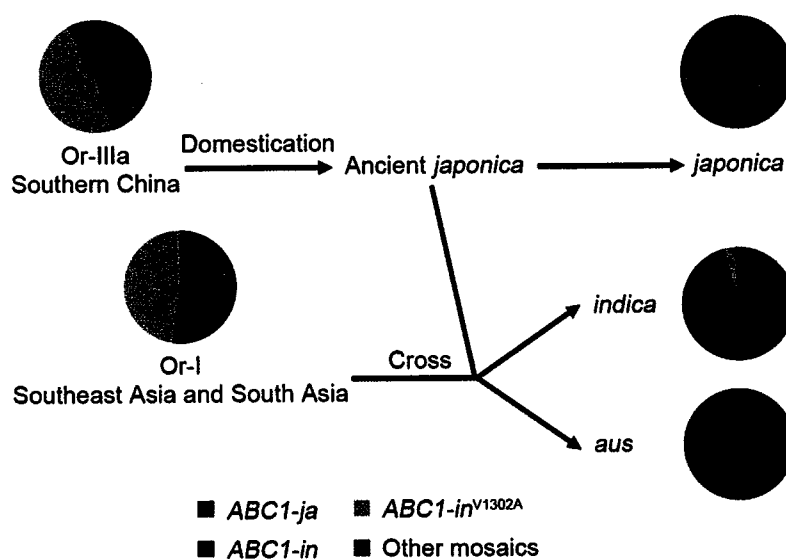


图 3.17 *ABC1* 基因在栽培稻驯化过程中的演化。

ABC1 基因的类型在 Or-IIIa 类野生稻、Or-I 类野生稻、粳稻、籼稻及 *aus* 中具有不同的分布比例。*ABC1-in*^{V1302A} 型的 *ABC1* 基因在 Or-IIIa 类野生稻和 Or-I 类野生稻群体中所占的比例均最高，而在粳稻、籼稻和 *aus* 群体中所占的比例大幅降低。*ABC1-ja* 和 *ABC1-in* 是现代栽培稻中 *ABC1* 基因的主要类型。表明在野生稻中所占比例最高的 *ABC1-in*^{V1302A} 型 *ABC1* 基因在栽培稻的驯化过程中被淘汰，而在现代粳稻和籼稻品种中分别保留了 *ABC-ja* 型和 *ABC1-in* 型的 *ABC1* 基因。

Figure 3.17 A proposed route of evolution of *ABC1* in the domestication of cultivated rice.

The type-pattern of the *ABC1* gene in Or-IIIa, Or-I, *japonica*, *indica* and *aus* groups are shown. The *ABC1-in*^{V1302A} has the highest frequency identified in both Or-IIIa and Or-I groups, and is largely eliminated in *japonica*, *indica* and *aus* groups. *ABC1-ja* and *ABC1-in* are the major types of the *ABC1* gene in modern cultivated rice, suggesting that the dominant *ABC1-in*^{V1302A} in wild rice ancestors were largely eliminated during the domestication. *ABC-ja* and *ABC1-in* were kept in the modern *japonica* and *indica* rice cultivars, respectively.

3.7.3 *ABC1* 基因在栽培稻的驯化中没有被人工选择

为了研究 *ABC1* 基因是否在栽培稻的驯化过程中经历了人工选择, 我们选取了 *ABC1* 基因中一段包含了 5 个非同义 SNPs 的 5.3 kb 区域进行了进化分析。根据 RHP 数据库中的 SNPs 信息, 我们选取了该数据库中中国境内的 69 个 Or-IIIa 类野生稻、142 个 Or-I 类野生稻、218 个粳稻品种及 368 个籼稻品种的序列进行整理和分析。通过 DnaSP 软件, 对粳稻、籼稻、Or-I 类野生稻、Or-IIIa 类野生稻、亚洲栽培稻 (由粳稻和籼稻构成) 和野生稻 (由 Or-I 类和 Or-IIIa 类构成) 群体中 *ABC1* 基因的片段进行了核苷酸多态性的分析及中性测验 (表 3.1)。发现栽培稻 *ABC1* 基因片段的核苷酸多态性与野生稻中 *ABC1* 同源基因的核苷酸多态性相似 ($\pi_{Or}/\pi_{Os} = 1.275$), 表明 *ABC1* 基因没有在栽培稻的驯化过程中被选择。我们又进一步将栽培稻分为粳稻与籼稻、将野生稻分为 Or-IIIa 类与 Or-I 类, 分别比较核苷酸多态性, 发现 *ABC1* 基因的片段在粳稻中没有 SNPs 位点, 核苷酸多态性 π_{ja} 为 0, 而在籼稻中该区段共含有 38 个 SNPs 位点, 核苷酸多态性 π_{in} 为 0.00140。在对亚洲栽培稻起源的研究中已经证明, 粳稻和籼稻全基因组的核苷酸多态性分别为 0.0006 和 0.0016 (Huang et al., 2012)。 *ABC1* 基因在粳稻和籼稻群体中的核苷酸多态性与全基因组的序列多态性都比较一致, 表明 *ABC1* 基因在粳稻和籼稻的驯化过程中很可能没有经历人工选择。此外, 我们对籼稻品种中 *ABC1* 基因这一区域的序列进行了中性测验, 发现其 Tajima's *D* 值为 1.24005 且 $P > 0.10$, 不能排除中性零假说, 群体中 *ABC1* 基因处于平衡状态, 没有经历选择。

表 3.1 亚洲栽培稻和普通野生稻中 *ABC1* 基因的核苷酸多样性分析与中性测验Table 3.1 Nucleotide diversity and Tajima's *D* test of *ABC1* in *Oryza sativa* and *Oryza rufipogon*

	N	H	π	θ_w	Tajima's <i>D</i>	
<i>indica</i>	368	11	0.00140	0.00096	1.24005	$P > 0.10$
<i>japonica</i>	218	1	0.00000	0.00000	-	
Or-I	142	8	0.00363	0.00178	3.20003	$P < 0.01$
Or-IIIa	69	19	0.00407	0.00189	3.91075	$P < 0.001$
<i>Oryza sativa</i> *	586	11	0.00309	0.00090	6.41626	$P < 0.001$
<i>Oryza rufipogon</i> **	211	21	0.00394	0.00147	4.92856	$P < 0.001$

N, 序列数目; H, 单倍型数目; π , 基于多态性位点总数计算的每个位点的任意两序列间平均核苷酸差异数; θ_w , 基于多态性位点总数计算的每对碱基的 Watterson 估计值。

* *indica* + *japonica*; ** Or-I + Or-IIIa.

N, total number of sequences; H, number of haplotypes; π , average number of pairwise nucleotide differences per site calculated based on the total number of polymorphic sites; θ_w , Watterson's estimator of per base pair calculated based on the total number of polymorphic sites.

* *indica* + *japonica*; ** Or-I + Or-IIIa.

3.8 *ABC1* 基因的多样性不直接参与栽培稻亚种间对氮的差异反应

3.8.1 *ABC1* 蛋白中的差异氨基酸远离已知的活性中心

为了研究栽培稻 *ABC1* 基因中 5 个非同义 SNP 造成的氨基酸的改变是否影响了 Fd-GOGAT 的活性。我们根据预测的 *ABC1* 蛋白三维结构分析了 5 个变化的氨基酸残基的空间位置。对集胞藻 Fd-GltS 蛋白晶体结构的研究揭示了 Fd-GOGAT 蛋白的两个活性中心、连接两个活性中心的氮通道以及其他与酶活性相关的重要元件(van den Heuvel et al., 2002)。然而, 我们发现 *ABC1* 蛋白中这 5 个在不同亚种间存在差异的氨基酸残基所处的空间位置均远离这些已知的酶活相关元件 (图 3.18A)。此外, 不同物种中 *ABC1* 同源蛋白的序列比对显示, 这 5 个在粳稻、籼稻中存在差异的氨基酸残

基在其他物种中也是不保守的（图 3.18B），表明这些位点的氨基酸残基是可以被替换的。因此，我们推测 *ABC1* 基因中这 5 个造成氨基酸变化的 SNP 最终对 *ABC1* 酶活产生影响的可能性较小。

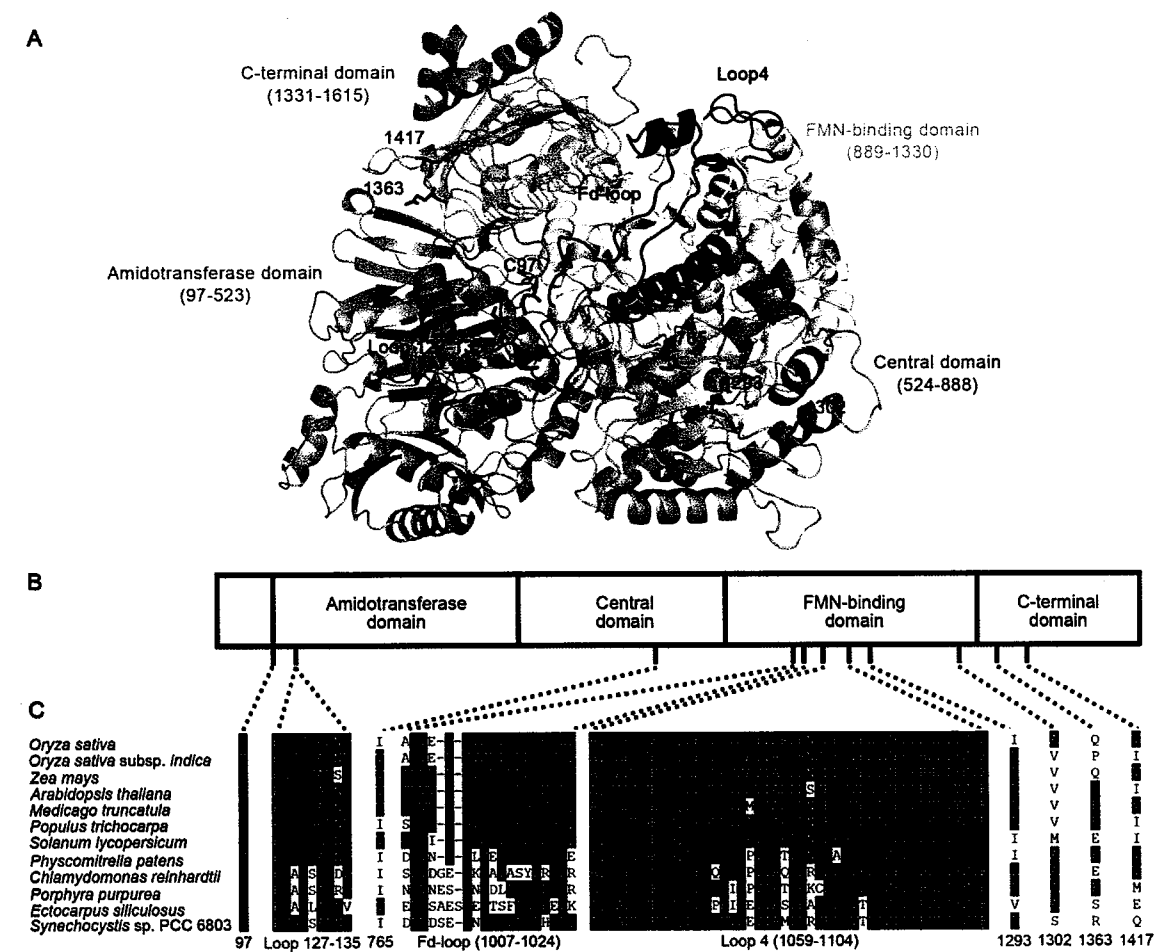


图 3.18 *ABC1* 蛋白中具有多样性的氨基酸残基的位置分析。

(A) 5 个具有多样性的氨基酸残基在 *ABC1* 蛋白的三位结构中所处的空间位置。*ABC1* 蛋白的三维结构是以集胞藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 中 Fd-GltS 蛋白的晶体结构(PDB ID: 1LLW)为模板模拟的。5 个具有多样性的氨基酸残基以红色标出，已知的参与酶活的元件以蓝色标出。蛋白的 4 个结构域分别以橙色、绿色、黄色和紫色区分，并将透明度设置为 60%。

(B) *ABC1* 蛋白的一级结构模式图。方框代表 *ABC1* 蛋白的各个结构域。

(C) 不同物种中 *ABC1* 类似蛋白的序列比对。红色表示在粳稻和籼稻中存在差异的位点，蓝色表示部分已知的影响酶活的元件。

Figure 3.18 Analysis of the position of the variational amino-acid residues in ABC1 protein.

- (A) The spatial locations of the 5 variational amino-acid residues in the predicted structure of ABC1. The structure of ABC1 is predicted based on the crystal structure of Fd-GltS in *Synechocystis* sp. PCC6803 (PDB ID: 1LLW). The 5 variational amino-acid residues and the known elements involved in the enzyme activity are shown in red and blue, respectively. The domains of the ABC1 are shown in orange, green, yellow and purple, and in 60% transparency.
- (B) The primary structure features of ABC1 protein. Boxes represent the domains of the enzyme.
- (C) Alignment of sequence involved in the enzyme activity and the variational amino-acid residues in different species. Known elements important for enzyme activity and the variational amino-acid residues are shown in blue and red, respectively.

3.8.2 *ABC1-ja* 与 *ABC1-in* 的活性差异不显著

为了检测携带 *ABC1-ja* 的品种与携带 *ABC1-in* 的品种间 Fd-GOGAT 的活性是否存在差异，我们通过回交构建了以籼稻品种 9311 为背景的染色体片段代换系 (Chromosome Segment Substitution Lines, CSSLs)。在 BC₅F₂ 群体中，我们筛选到两个含有 *ABC1-ja* 基因的纯合株系，分别为 VD100 和 VD125。其中，VD100 的代换片段约为 2.8 Mb，VD125 的代换片段约为 9.6 Mb (图 3.19A, B)。蛋白免疫印迹杂交检测表明，染色体片段代换系 VD100 和 VD125 中 ABC1 蛋白的积累水平与野生型植物 9311 基本一致 (图 3.19C)。Fd-GOGAT 酶活分析表明，染色体片段代换系 VD100 和 VD125 中 Fd-GOGAT 的活性与野生型植物 9311 相比差异不显著 (图 3.19D)，与我们之前的推测一致。以上结果表明，*ABC1* 基因虽然具有明显粳稻、籼稻间的分型，但可能没有直接参与水稻两个亚种间氮响应的差异。

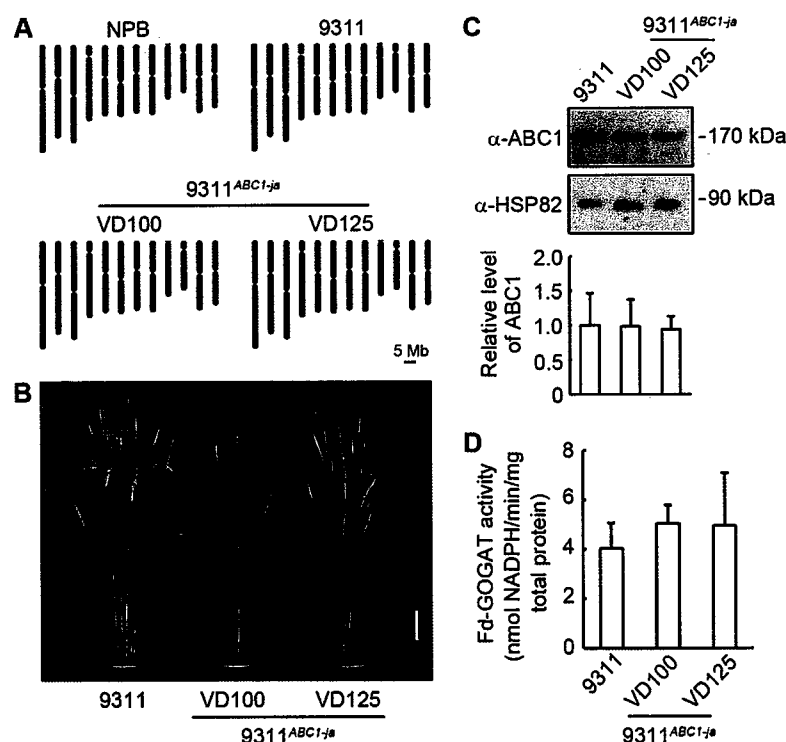


图 3.19 *ABC1-ja* 基因染色体片段代换系的 Fd-GOGAT 活性分析。

(A) 日本晴(NPB)、9311 及染色体片段代换系基因组结构示意图。VD100 和 VD125 为含有覆盖 *ABC1-ja* 位点的 NPB 染色体片段的纯合株系，代换片段分别为 2.8 Mb 和 9.6 Mb。蓝色代表来自 NPB 的部分，红色代表来自 9311 的部分。

(B) 田间生长 4 个月的 9311、VD100 和 VD125 植株。标尺为 10 cm。

(C) 通过蛋白免疫印迹杂交的方法对 12 日龄的野生型 9311、染色体片段代换系 VD100 和 VD125 叶片中 ABC1 蛋白的积累水平分析。图片下方为对相对蛋白积累水平的统计分析($n=3$)。误差线为标准差。统计分析表明差异不显著(T 检验)。

(D) 12 日龄的 9311、VD100 和 VD125 叶片中 Fd-GOGAT 酶活的分析($n=3$)。统计分析表明差异不显著(T 检验)。

Figure 3.19 Analysis of Fd-GOGAT activity in the CSSLs of 9311^{ABC1-ja}.

(A) Genomic structures of NPB, 9311 and the CSSLs. VD100 and VD125 are the homozygous lines containing *japonica*-derived fragments 2.8 Mb and 9.6 Mb, respectively, around the *ABC1* locus. Fragments from NPB are blue, and fragments from 9311 are red.

(B) Four-month-old plants of 9311, VD100 and VD125 grown in field. Bar, 10 cm.

(C) Analysis of ABC1 protein levels in leaves of 12-day-old wild-type 9311, CSSLs VD100 and VD125 seedlings by immunoblotting. Quantitative analysis of the relative level is presented below the blot ($n = 3$). Error bars indicate SD. No statistically significant difference is detected (Student's t -test).

(D) Analysis of the Fd-GOGAT activity in the leaves of 12-day-old 9311, VD100 and VD125 seedlings ($n = 3$). No statistically significant difference is detected (Student's t -test).

此外, 我发现 VD100 和 VD125 这两个含有 *ABC1-ja* 的染色体片段代换系的粒型发生了改变。与野生型 9311 的种子相比, VD100 和 VD125 种子的长度均显著降低, 粒宽和种子长宽比也发生了显著的变化 (图 3.20)。与这一结果一致, 我们注意到在 *ABC1* 基因 (位于 28.4 Mb) 下游有一个与粒长相关选择驯化区 (位于 28.8~29.0 Mb) (Huang et al., 2012)。

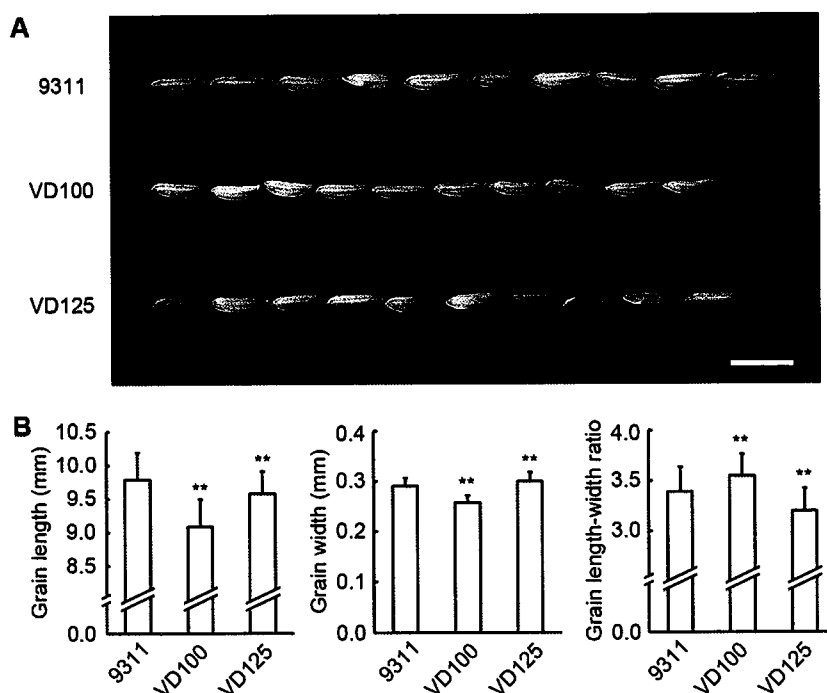


图 3.20 染色体片段代换系 VD100 和 VD125 的粒型分析。

(A) 9311 及染色体片段代换系 VD100、VD125 的种子。标尺为 10 cm。

(B) 对 9311、VD100 和 VD125 种子的长、宽及长宽比的统计分析($n = 100$)。误差线为标准差;

**表示差异极显著($P < 0.01$) (T 检验)。

Figure 3.19 Analysis of the grain shape of VD100 and VD125.

(A) Grains of 9311 and the CSSLs. VD100 and VD125. Bar, 1cm.

(B) Analysis of the grain length, the grain width and the ratio of grain length to width of 9311, VD100 and VD125 ($n = 100$). Error bars indicate SD; ** indicate $P < 0.01$ (Student's t -test).

第四章 结论与讨论

在对本课题的研究中,我们通过多种试验方法证明水稻 *ABC1* 基因编码了一个有生物学功能的依赖铁氧还蛋白的谷氨酸合酶(Fd-GOGAT), *ABC1* 蛋白在调节水稻氮代谢及碳氮代谢的平衡中发挥了重要的作用。通过 EMS 诱变获得的弱突变体 *abc1-1* 具有多种氮营养缺乏的症状,而由 T-DNA 插入导致的强突变体 *abc1-2* 则具有更加严重的表型并在苗期致死,表明 *ABC1* 基因对水稻植株的生长发育是非常重要的。与这一结果相一致的是,拟南芥和大麦的 *Fd-GOGAT* 基因的突变也会导致植物出现类似的生长发育表型及条件致死的现象(Kendall et al., 1986; Lea and Forde, 1994; Somerville and Ogren, 1980a)。

4.1 *ABC1* 基因调控水稻体内氮代谢及碳氮平衡

GS2/Fd-GOGAT 循环最主要的生理功能是与其它参与氮代谢及碳代谢的酶共同完成对光呼吸过程中产生的 NH_4^+ 的再同化(Lam et al., 1996; Potel et al., 2009)。早期对光呼吸中氮循环的研究表明,流经光呼吸氮循环的 NH_4^+ 约为植物从土壤中获取的 NH_4^+ 的 10 倍,是植物有机氮的重要来源(Keys et al., 1978)。在 *abc1-1* 突变体中, *ABC1*/Fd-GOGAT 的活性降低了约 45%,其底物 Gln 和 2-OG 的含量都发生了显著的积累,而产物 Glu 的水平变化则较小。Glu 相对稳定的水平可能与其在氨基酸代谢途径中所处的位置有关(Forde and Lea, 2007)。而且 *abc1-1* 突变体中 Fd-GOGAT 的活性也并非完全丧失,残存酶活性可能在维持 Glu 水平中也发挥了作用。与这一结果类似,在表达反义 RNA 下调 *Fd-GOGAT* 基因的表达使其活性降低至约 60% 的烟草中,底物 Gln 和 2-OG 的含量都发生了显著积累,而 Glu 的含量则相对稳定(Ferrario-Méry et al., 2000)。除 Fd-GOGAT 外,植物体中还存在另一类依赖于 NADH 的 GOGAT,即 NADH-GOGAT,与 Fd-GOGAT 不同,这类酶主要存在于非光合作用组织中参与植物对氮的初级同化(Bowsher et al., 2007; Forde and Lea, 2007; Lam et al., 1996)。*abc1-1* 突变体 Fd-GOGAT 的活性降低,而 NADH-GOGAT 则可以在一定程度上弥补氮同化的

缺陷。此外，除了 GS/GOGAT 循环，植物体内还有一些其他的酶也参与了植物的氮同化过程，如天冬酰胺合成酶(asparagine synthetase, AS)、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)等，这些酶在特定条件下也可以完成 NH_4^+ 到 Glu 的转化，补偿依赖 GS/GOGAT 的氮同化过程(Lam et al., 1994)。但这些酶并不参与光呼吸途径中的氮同化。同时，我们的工作表明，虽然 *abc1-1* 突变体体内 Glu 水平没有改变，但外源施加 Glu 仍然可以部分恢复其表型，表明 Glu 的含量并不是造成 *abc1-1* 突变体的原因，而是其参与的代谢的平衡。

由于 Fd-GOGAT 活性的降低，GS/GOGAT 循环受阻，Gln 在 *abc1-1* 突变体内大量积累，表明 *abc1-1* 突变体仍然可以完成无机态的 NH_4^+ 的固定，但转化为可被用于其他途径 Glu 的效率显著降低，大量的氮以氨基的形式储存于高 N/C 比的氨基酸 Gln 中。同时，另外一种高 N/C 比的氨基酸 Asn 的含量在 *abc1-1* 突变体中的水平与野生型植物相比也是持续升高的，且其前体 Asp 的含量则显著降低。而我们检测到的其他氨基酸的水平大都维持稳定。由于高 N/C 比的氨基酸通常被认为是植物体内有机氮的储存和运输形式(Lea et al., 2007)，*abc1-1* 突变体体内高 N/C 比氨基酸的积累可能反映了其体内较低的氮利用水平，更多的有机氮以储存或运输的形式存在于细胞内，而不能被有效的用于各中生物合成的过程。与这一结果相类似的是，在低氮条件下生长的拟南芥，其体内氨基酸的水平也会升高(Tschoep et al., 2009)。

TCA 循环是由一系列酶促反应组成的代谢途径，可以为生物体内的其他反应提供 ATP，同时也与其他代谢途径存在着非常广泛的联系(Sweetlove et al., 2010)。2-OG 是 TCA 循环的中间代谢产物之一，同时也是 TCA 循环与 GS/GOGAT 的直接连接点，同时也是植物体内的氮同化过程中重要的碳骨架(Hodges, 2002)。在 *abc1-1* 突变体中，2-OG 及其他 TCA 循环的中间代谢产物的水平与野生型植物相比发生了持续的积累，这些中间产物及其他有机酸类物质的积累很可能是由于 *abc1-1* 突变体中 2-OG 的积累引起的。此外，由于 *abc1-1* 突变体中 Fd-GOGAT 活性的降低，导致植物体内光呼吸过程中产生的 NH_4^+ 不能被及时同化而发生积累。而 *abc1-1* 突变体体内积累的有机酸类物质，特别是苹果酸(malate)，可以作为缓冲剂对体内过量的碱进行中和，以维持细胞正常的 pH 值(Scheible et al., 2004)。前人的研究表明，TCA 循环中的另一个重要的中间产物延胡索酸(fumarate)可以在淀粉合成途径受阻的情况下，以类似的方式代替淀粉作为光合作用的碳库(Chia et al., 2000)，*abc1-1* 突变体中延胡索酸的显著积累

暗示了其体内光合作用产物合成能力的降低。综上所述, *abc1-1* 突变体中 ABC1/Fd-GOGAT 活性的降低不仅影响了水稻的氮代谢水平, 也改变了碳代谢水平以及碳氮代谢的平衡, 而其中最直接的因素有可能是 *abc1-1* 突变体体内 Gln 和 2-OG 含量的积累。

4.2 *ABC1* 基因通过调控氮同化水平调控细胞分裂素反应

细胞分裂素可以和植物的氮营养水平相互作用, 共同调节植物的一系列生理和发育过程(Krouk et al., 2011; Sakakibara et al., 2006)。事实上, 植物体内的氮信号可以协同调控氮代谢、碳代谢以及细胞分裂素途径。而另一方面, 细胞分裂素也可以协同植物大量营养元素的代谢水平, 调控包括根发育在内的众多发育过程(Krouk et al., 2011; Rubio et al., 2009; Sakakibara et al., 2006)。因此, 在对细胞分裂素反应异常的突变体的筛选中获得氮同化突变体也并非意料之外。*abc1-1* 突变体在正常生长条件下对细胞分裂素的敏感程度弱于野生型植物, 而在缺氮的生长条件下, *abc1-1* 突变体对细胞分裂素的响应则更弱, 表明 *ABC1* 基因可以通过调控水稻的氮同化水平正调控根对细胞分裂素的响应。这与在双子叶植物拟南芥中发现的氮饥饿对细胞分裂素的生物合成及转运的负调控作用是一致的(Sakakibara et al., 2006; Sun et al., 2005; Takei et al., 2002; Takei et al., 2004)。*abc1-1* 突变体的氮同化水平降低, 对外源施加的细胞分裂素表现出不敏感, 表明 *abc1-1* 突变体的细胞分裂素信号转导受到了影响, 且 *ABC1* 基因或植物的氮同化水平能够正调控细胞分裂素的信号转导。而缺氮条件进一步降低了植物体内的氮营养水平, 减弱了 *abc1-1* 突变体对细胞分裂素的响应。基因表达分析的研究表明, 在拟南芥中部分细胞分裂素信号转导途径中的 A 型反应调节因子 *ARR* 的表达水平也可以被不同的氮处理条件所调控(Scheible et al., 2004; Taniguchi et al., 1998; Wang et al., 2003; Wang et al., 2004)。这暗示我们 *ABC1* 基因对细胞分裂素信号转导途径的调控可能是通过调控某些 *OsRR* 的表达水平完成的。

4.3 *ABC1* 基因在栽培稻群体中具有籼粳分型

氮营养水平是植物生长的主要限制因子,因此植物对根系吸收的无机氮的同化效率直接影响了植物的生长发育状况以及作物的产量构成(Lam et al., 1996; Lawlor et al., 1989; Xu et al., 2012)。亚洲栽培稻的两个主要的亚种通常表现对氮肥不同的敏感性,籼稻品种通常对氮肥反应敏感、迅速,使用氮肥后可以显著提高株高、分蘖数、叶绿素含量以及产量等,而粳稻品种对氮肥的反应则相对较弱(Hu et al., 2015; Sun et al., 2014a; Ta and Ohira, 1981)。对水稻硝酸盐转运子 *NRTB1.1* 基因的功能研究及进化分析表明,籼稻品种在驯化的过程中选择了对 NO_3^- 转运能力更高的 *NRTB1.1* 的基因类型,使籼稻品种具有了较强的 NO_3^- 的吸收能力,部分地解释了水稻亚种间对氮肥敏感性的差异(Hu et al., 2015)。通过对 *ABC1* 基因的核苷酸多态性进行分析,我们发现 *ABC1* 基因在粳稻和籼稻的演化过程中发生了明显的分型,粳稻品种保留了 *ABC1-ja* 类型的 *ABC1* 基因,而绝大多数籼稻则保留了 *ABC1-in* 类型的 *ABC1* 基因。然而,通过对染色体片段代换系的 Fd-GOGAT 活性分析,我们发现 *ABC1-ja* 和 *ABC1-in* 的活性差异并不显著。此外,对普通野生稻和亚洲栽培稻中 *ABC1* 基因的核苷酸多态性的分析表明, *ABC1* 基因并不是水稻驯化过程中人工选择的直接靶位点。表明 *ABC1* 基因的分型与水稻不同亚种间对氮肥敏感性的差异关系较小。对不同品种水稻基因组 SNP 数据的研究揭示,在水稻的驯化过程中,一些参与氮吸收与同化过程的基因经历了人工选择,包括硝酸转运子(NRT)、铵转运子(AMT)、亚硝酸还原酶(NiR)、谷氨酰胺合成酶(GS)等(Xie et al., 2015)。这些被证明在驯化中经历了选择的基因均位于 GOGAT 的上游,其催化的一系列反应都可以限制 GOGAT 催化的反应,因而对这些基因的筛选更容易进行,选择压力也更大,而 GOGAT 基因的演化则有可能在这一过程中被忽略。

对亚洲栽培稻的起源研究表明,亚洲栽培稻起源于中国广西省的珠江流域,人类选择当地的野生稻(Or-III)进行驯化,形成了粳稻的祖先品种,而籼稻起源于粳稻祖先品种与分布于南亚及东南亚的野生稻(Or-I)间的杂交(Huang et al., 2012)。核苷酸多态性研究发现,粳稻群体具有较低的遗传多样性,表明粳稻的驯化过程经历了很强的瓶颈效应,在 Or-III 类野生稻中真正作为粳稻祖先的个体数量是很有限的(Gao and Innan,

2008; Huang et al., 2012)。粳稻群体中的 *ABCI-ja* 很有可能就来自这些最早被驯化的 Or-III 类野生稻中的个体, 并一直保留形成单一的基因类型。相比而言, 籼稻基因组具有较高遗传多样性, 以及分布更广泛的祖先群体(Huang et al., 2012)。而水稻两个亚种的驯化过程各自独立(Civán et al., 2015), 籼稻在其驯化过程中最终由于某些原因在多数品种中保留了 *ABCI-in*, 而非 *ABCI-ja* 或 *ABCI-in*^{V1302A}。

4.4 工作展望

细胞分裂素与植物氮营养间存在着严格而精细的调控, 它们共同调控了一系列植物生长发育过程(Krouk et al., 2011; Sakakibara et al., 2006)。然而, 以往的研究主要是基于改变植物生长环境中的无机氮水平开展的, 因此 NO_3^- 通常被认为是信号分子连接了细胞分裂素途径及氮代谢(Krouk et al., 2011; Rubio et al., 2009; Sakakibara et al., 2006)。而 *abc1-1* 突变体是一个氮同化过程有缺陷的突变体, 其体内一些重要的氨基酸及有机酸类物质的含量发生了明显的变化, 同时 *abc1-1* 突变体对细胞分裂素敏感性也受到了影响, 是研究氮同化与细胞分裂素信号途径间相互作用的良好实验材料。

ABCI 基因编码的 Fd-GOGAT, 是水稻氮同化及碳氮平衡的重要调节因子。在栽培稻亚种间, *ABCI* 基因具有明显的分型现象, 但这种分型并没有使亚种间 Fd-GOGAT 的活性产生差异, 加之核酸多样性分析表明 *ABCI* 也不是人工选择的靶位点, 使得 *ABCI* 基因形成分型的原因更加令人不解。我们注意到在水稻基因组众多的选择驯化区中有一个与 *ABCI* 基因相邻, 且其对应的性状为水稻的粒长(Huang et al., 2012), 而这一性状是籼稻的特征之一。对 *ABCI* 基因与该选择驯化区的关联分析可以为寻找 *ABCI* 基因在籼稻群体中被保留的原因提供线索。

附录 A

表 A1 遗传定位所用引物序列

Table A1 Sequences of primers for genetice mapping

引物名称	序列 (5'-3')	用途
AM1 F	GATTATGCCATCAGGAGA	Mapping
AM1 R	TTAGACGGAGGCAAAGCA	Mapping
AM2 F	TGGAAGTTTCCTGGCGATAG	Mapping
AM2 R	TGGTTGGACTGAAAAGTCCC	Mapping
AM3 F	CATGTAAAACAGAGCGACCG	Mapping
AM3 R	TCTAAAGTACTAAACAGTGC	Mapping
AM4 F	AGAAGAAAATGGCTCGTAGA	Mapping
AM4 R	ATTAGAAGCTTGGAATGGAA	Mapping
AM5 F	ATTCGGTTGATAAGCAT	Mapping
AM5 R	TGACGTTTCAAAGATGAG	Mapping
AM6 F	AAAGTAATCATCTTTTGTG	Mapping
AM6 R	TACAACCTCTGTTCTAAAA	Mapping
AM7 F	TTACTATTCTGCAAACCAAA	Mapping
AM7 R	CGTCCTGTACCAAGTGACTA	Mapping
AM8 F	ACTTGCTGAAACGGTGATAC	Mapping
AM8 R	GTTGCTGGTAAATTGAGTTG	Mapping
AM9 F	TTACTATTCTGCAAACCAAA	Mapping
AM9 R	CGTCCTGTACCAAGTGACTA	Mapping

表 A2 *ABC1* 基因编码区测序所用引物序列Table A2 Sequences of primers for sequencing of *ABC1* coding sequences

引物名称	序列 (5'-3')	用途
ABC1_Seq1 F2	AAGGCAATCAAATCAGTTCA	Sequencing
ABC1_Seq1 R	AAATGCTCGGTAATGTGGG	Sequencing
ABC1_Seq2 F	ACAAATACAGGTGTCGGAATG	Sequencing
ABC1_Seq2 R2	ACTTCTGCCACTTCTTAGCA	Sequencing
ABC1_Seq3 F	ATCCATTACTTATGCTTCT	Sequencing
ABC1_Seq3 R	CTAATAACATTGTCACCGA	Sequencing
ABC1_Seq4 F	GTGATGGAAGGACAGTAGG	Sequencing
ABC1_Seq4 R	TAGGAGAACAGTAGGGGAG	Sequencing
ABC1_Seq5 F	CTCAGACTTTGTTCCATCG	Sequencing
ABC1_Seq5 R	AGCACAGGACTTGATAGGG	Sequencing
ABC1_Seq6 F	TTGTCCGATTTGTAGGTTA	Sequencing
ABC1_Seq6 R	ACTGGTGGATATTGAAAGA	Sequencing
ABC1_Seq34 F*	TCTGCTTTTAGATTACTTG	Sequencing
ABC1_Seq34 R2*	CAGCTTTGACATCTCAGGAT	Sequencing
ABC1_Seq35 F	CTTATGTACTCATGTGCAT	Sequencing
ABC1_Seq35 R	AATAGTTGAATAGCAGTAA	Sequencing
ABC1_Seq36 F*	CTTCAACGCAGATAGATTA	Sequencing
ABC1_Seq36 R*	CCAGTAGCTCCATACAGAC	Sequencing
ABC1_Seq36 R	TTAAAGGTTGGGTTTAGCA	Sequencing
ABC1_Seq37 F	AAATTGTGCCTGACCAGAT	Sequencing
ABC1_Seq37 R	TTAAAGGTTGGGTTTAGCT	Sequencing

* 引物可用于不同水稻品种中 *ABC1* 基因的 5 个非同义 SNP 的测序。

* Primers used in the sequencing of the 5 non-synonymous SNPs in rice cultivars.

表 A3 基因型鉴定所用引物序列

Table A3 Sequences of primers for genotyping

引物名称	序列 (5'-3')	用途
ABC1-CAPS F	GGCTGAGAAACTCCAAAC	Genotyping of <i>abc1-1</i>
ABC1-CAPS R	GTGGCATTTCATTAGCAAG	Genotyping of <i>abc1-1</i>
PFG_3A-01082 LP	CCGAGCATGCAACTAGACAG	Genotyping of <i>abc1-2</i>
PFG_3A-01083 RP	AAACCAGGACGAACGATGTC	Genotyping of <i>abc1-2</i>
pGA2715 LP	TCCACCATGTTGGGGATCCT	Genotyping of <i>abc1-2</i>

表 A4 载体构建所用引物序列

Table A4 Sequences of primers for constructs

引物名称	序列 (5'-3')	用途
ABC1_Exon1 R (<i>Xma</i> I)	CCCGGGCTTCTGCGCGGGCTTCTCCG	Constructs
ABC1_Exon33 F	CAGCGAGAAAGGTGCCAC	Constructs
ABC1_Exon33 R (<i>Bgl</i> II)	CAAGATCTCCCTTCGCCGATTGTAC	Constructs
ABC1_Linker F (<i>Bpu</i> 10I)	GGCGCGGAGGCTCAGGGCG	Constructs
ABC1_Linker R (<i>Eco</i> RI)	TAGAATTCTCGTCTTGTGGA	Constructs
ABC1_Promoter F (<i>Sac</i> I)	GAGCTCTGAATCCTGACACAACCT	Constructs
SK-tag R (<i>Sal</i> I)	AGGTCGACTCTAGAACTAGTGGATCCT	Constructs

表 A5 qRT-PCR 所用引物序列

Table A5 Sequences of primers for qRT-PCR

引物名称	序列 (5'-3')	用途
ABC1_qRT F	ATATCCGATGCGATTGAGAAT	qRT-PCR
ABC1_qRT R	CTTTCCCACATAATCGTTGGC	qRT-PCR
OsActin2_qRT F	TACAGTGTCTGGATAGGAGGGTC	Internal standard
OsActin2_qRT R	ACCAACAATCCCAAACAGAGTAG	Internal standard

附录 B

表 B1 40 个水稻品种中 *ABC1* 基因的 5 个非同义 SNPs 列表Table B1 The list of 5 non-synonymous SNPs of *ABC1* in all 40 selected rice cultivars

生态型	品种名称	SNP 位点在 <i>ABC1</i> 基因编码序列上的位置(bp)				
		2293	3877	3905	4088	4249
<i>japonica</i>	Azucena	A	A	C	A	G
	Dongjin	A	A	C	A	G
	Hwayoung	A	A	C	A	G
	IR66764-60-1-3	A	A	C	A	G
	Lemont	A	A	C	A	G
	巴利拉	A	A	C	A	G
	春江 06	A	A	C	A	G
	嘉禾 212	A	A	C	A	G
	京系 17	A	A	C	A	G
	空育 131	A	A	C	A	G
	辽星 5 号	A	A	C	A	G
	辽星 9 号	A	A	C	A	G
	秋风糯	A	A	C	A	G
	日本晴	A	A	C	A	G
	苏御糯	A	A	C	A	G
	秀水 11	A	A	C	A	G
<i>indica</i>	3037	G	T	T	C	A
	9311	G	T	T	C	A
	Baijiugu	G	T	T	C	A
	IR36	G	T	T	C	A
	IR64	G	T	T	C	A
	白米冬占	G	T	T	C	A

广四	G	T	T	C	A
桂 99	G	T	T	C	A
桂朝 2 号	G	T	T	C	A
龙特甫	G	T	T	C	A
密阳 46	G	T	T	C	A
明恢 63	G	T	T	C	A
南京 6 号	G	T	T	C	A
培矮 64	G	T	T	C	A
双科早	G	T	T	C	A
台中 1 号	G	T	T	C	A
特青	G	T	T	C	A
协青早	G	T	T	C	A
新银占	G	T	T	C	A
窄叶青 8 号	A	A	C	A	G
浙辐 802	G	T	T	C	A
珍汕 97	G	T	T	C	A
中香糯	G	T	T	C	A
<i>aus</i> Kasalath	A	A	C	A	G

* 以编码区第一个碱基为+1。

* The first nucleotide of the translation codon is referred to as +1.