



植物适应土壤氮素环境的基因选择：以水稻为例

宣伟, 徐国华*

南京农业大学资源与环境科学学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

摘要 在农业生产过程中, 施用无机氮肥是提高作物产量的基础, 但氮肥过量施加对生态系统和植物发育进程均会产生不利影响。因此, 提高作物氮素利用效率是农业可持续发展的关键。目前, 对重要粮食作物水稻(*Oryza sativa*)的氮高效研究取得了一系列重要进展, 并克隆到多个调控氮素吸收、转运和代谢的关键基因。然而, 在不断被人工选育的过程中, 水稻适应土壤不同氮素环境的遗传基础尚不清楚。近日, 中国科学院遗传与发育生物学研究所储成才团队通过评估全球不同生态地理区域的水稻种质资源, 以分蘖数对氮的响应(TRN)为指标进行全基因组关联分析, 鉴定到1个TRN关键负调控基因*OsTCP19*, 发现其启动子区1个29 bp的核苷酸插入缺失多态性(InDel)变异与品种间的TRN差异密切相关。*OsTCP19*通过抑制其下游分蘖促进基因*DLT*转录进而负调控TRN, 而*OsTCP19*自身的转录活性受氮响应因子*OsLBD*负调控。*OsTCP19*的不同等位变异在不同水稻品种中被差异选择并固定, 且与当地土壤含氮量显著相关, 是调控水稻氮素适应性的重要遗传基础。该研究揭示了水稻适应土壤氮素环境变化的分子遗传机制, 为水稻氮素高效利用育种提供了新的遗传资源。

关键词 水稻, 分蘖对氮的响应, 全基因组关联分析, 氮素利用效率, 地理适应性, *OsTCP19*, *OsLBD*, *DLT*

宣伟, 徐国华 (2021). 植物适应土壤氮素环境的基因选择: 以水稻为例. 植物学报 56, 1–5.

除水分、氧气及用于光合作用的二氧化碳外, 土壤提供的矿质营养元素亦是农作物生长发育所必需的物质基础。其中, 氮素作为植物蛋白质、核酸和叶绿素等关键生物分子的基本组成元素, 是植物需求最大的必需矿质营养元素。与其它主要来自土壤矿物风化过程的营养元素不同, 土壤中的氮素最初来自雷电触发的氮沉降和生物固氮过程, 因此其有限的供应量很难满足现代农作物高产的需求。人工化学合成氮的实现至今仅有100年, 但以氮肥为主的化学肥料的持续投入是近1个世纪世界粮食产量大幅提升进而满足迅速增长的人口需求的重要原因之一。农作物高产优质离不开氮肥, 但氮肥的过量生产和施用耗费大量能源, 导致生产成本大幅提高, 同时造成土壤酸化、水体富营养化和温室气体排放加剧等一系列环境问题(Guo et al., 2010; Stevens, 2019)。过量施用氮肥不仅降低作物氮素利用效率(nitrogen use efficiency, NUE), 而且造成倒伏、病虫害增加以及贪青晚熟等负面影响, 降低作物的产量及品质。因此, 提高作物

NUE对节约能源、降低生产成本和保护生态环境, 进而实现农业可持续绿色发展至关重要。

作物NUE是受多个生物学过程影响的复杂性状, 主要包括氮素的吸收、转运、同化和再利用, 以及作物后续的生长发育进程等。由于上述生物学过程同时受遗传因子和环境因素及其互作调控, 解析NUE相关的遗传基础及其调控网络变得尤为困难(Xu et al., 2012)。作为一类广泛种植的粮食作物, 水稻(*Oryza sativa*)具有漫长的驯化和育种历史。不同区域种植的水稻品种经过长期的人工选育, 逐渐适应了当地的地理环境(如不同的土壤肥力)。不同地理来源的水稻品种含有丰富的遗传变异, 从而决定了其对不同土壤肥力的地理适应性(图1)。因此, 解析不同水稻品种的生长发育和氮素代谢过程适应不同地理区域土壤肥力的遗传机制, 对提高水稻NUE具有重要的理论指导意义。

目前, 对植物NUE的研究主要基于以氮素吸收差异作为指标进行生理和遗传分析。需要指出的是, 根系对氮素的吸收是氮素利用的最初步骤, 而氮素的

收稿日期: 2020-12-25; 接受日期: 2020-12-29

基金项目: 国家自然科学基金(No.31930101)

* 通讯作者。E-mail: ghxu@njau.edu.cn

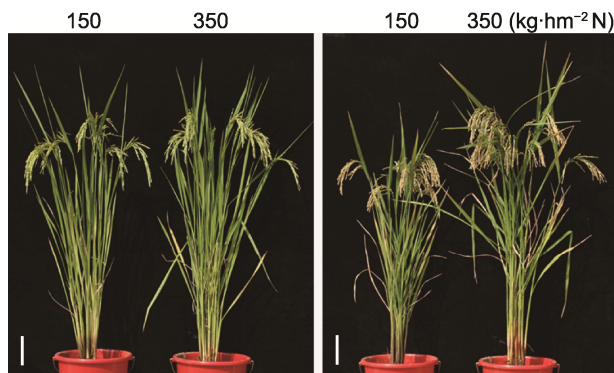


图1 不同地理来源的水稻地方品种对土壤氮水平的敏感性不同

左图示籼稻品种S23对土壤氮水平变化不敏感,右图示籼稻品种Y5对土壤氮水平变化敏感(徐国华实验室提供,骆乐拍摄)。Bars=10 cm

Figure 1 Rice landraces from different geographical regions show different sensitivity to soil nitrogen content

The *indica* rice variety S23 (left panel) and variety Y5 (right panel) are insensitive and sensitive to the change of soil nitrogen content, respectively (provided by Guohua Xu's lab and photographed by Le Luo). Bars=10 cm

转运和再分配亦会影响NUE。此外,田间不同氮肥水平下各种农艺性状或产量构成要素的变化也是衡量NUE的直接且可定量观测的指标。由于作物农艺性状不但受发育时期的影响,也受除氮素以外的多种遗传因子和环境因素的共同调控,这为NUE相关表型的鉴定增加了难度。

近日,中国科学院遗传与发育生物学研究所储成才团队在水稻氮高效研究方面取得重要突破,他们发现*OsTCP19*基因参与调控水稻对氮素的响应,并阐明了*OsTCP19*在水稻漫长的驯化过程中适应土壤氮素变化的分子机制(Liu et al., 2021)。

为了鉴定调控水稻氮素高效利用的关键因子,储成才团队收集了全球52个国家/地区种植于不同地理区域的110份水稻微核心种质材料(rice mini-core collection),并在低氮($50 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$)、中氮($150 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$)和高氮($300 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$) 3个施肥条件下评估这组水稻材料的氮素响应。他们通过分析包括分蘖数在内的8个重要农艺性状对氮的响应,发现水稻的分蘖性状对氮的响应(tillering response to nitrogen, TRN)最为敏感且在材料间存在较大变异,是进行全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)的理想指标。

在此基础上,他们以TRN为指标进行全基因组关联分析,在水稻6号染色体上鉴定到1个与TRN变异高度关联的候选区间;进一步分析该区间内的候选基因在不同氮素处理下的转录变化,发现TCP/TB1转录因子家族成员基因*OsTCP19* (LOC_Os06g12230)的转录水平不仅受外源氮素水平的负调控,而且与不同品种的TRN变化一致,因此推测该基因是控制TRN变异的遗传位点。*OsTCP19*过表达及RNA干扰、基因敲除植株的表型分析均表明*OsTCP19*是水稻TRN的负调控因子。

为了精确关联*OsTCP19*的基因变异与水稻不同种质材料的TRN差异,他们对*OsTCP19*的启动子和编码区序列重新测序,并利用新获得的自然变异位点和分蘖氮响应表型重新进行关联,发现*OsTCP19*基因存在多种核苷酸多态性变异,启动子区的1个29 bp的插入缺失多态性(insertion-deletion polymorphism, InDel)和4个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)变异可能是导致不同水稻品种TRN变异的关键原因。利用这些自然变异,他们将*OsTCP19*基因划分为2种单倍体型:*OsTCP19-H* (高TRN品种中携带)和*OsTCP19-L* (低TRN品种中携带)。通过分析2种单倍体型在水稻亚群中的分布频率,他们发现96.4%的水稻aus品种(主要生长在低氮环境中)携带*OsTCP19-H*单倍体型,而几乎所有粳稻品种和76.7%的籼稻品种携带*OsTCP19-L*单倍体型。以品种越光为受体构建的近等基因系材料NIL^{*OsTCP19-H*}也显示出较低的*OsTCP19*表达量和较高的TRN。此外,他们利用基因编辑技术对启动子区的InDel和SNP变异进行逐一突变,联合分析其对TRN的影响,证明启动子区29 bp的InDel变异是*OsTCP19*单倍体型功能分化的决定因素。

进一步研究表明,*OsTCP19*启动子区InDel的侧翼序列中存在2个高度保守的氮响应转录抑制子OsLBD (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN)的结合位点。高TRN品种携带的*OsTCP19-H*型基因启动子中,该InDel序列发生缺失突变,使OsLBD高效地结合在该InDel附近的结合位点上,从而对*OsTCP19*具有较强的转录抑制效应;低TRN品种携带的*OsTCP19-L*型基因启动子中,该InDel的插入突变干扰了OsLBD与*OsTCP19*基因启动子的结合,从而减弱了OsLBD的抑制效应。

为了挖掘OsTCP19的下游组分, 他们通过多重转录组分析, 发现调控油菜素内酯信号通路的分蘖促进基因*DLT*可能是OsTCP19的下游靶标基因。遗传和生化实验表明, OsTCP19可直接结合到*DLT*的启动子而负调控其表达, 进而实现对水稻分蘖发生的调控。因此, OsTCP19-DLT模块构成了氮素调控水稻分蘖的分子基础。

进一步通过遗传多样性分析, 他们发现OsTCP19-H单倍体型在种植于贫瘠土壤的水稻品种中大量富集, 而多数现代栽培品种中缺失这种等位变异类型。相关性分析表明, OsTCP19-H的单倍体型频率与不同稻田的土壤供氮水平呈负相关, 且野生稻中携带OsTCP19-H单倍体型的频率高达90%以上, 暗示OsTCP19-H增强了水稻对土壤供氮水平较低地区的地理适应性, 且在水稻驯化过程中于该区域得到保留。此外, 将OsTCP19-H单倍体型导入优良主栽品种(如空育131和秀水134)中, 可显著提高受体材料在低氮和中氮条件下的产量和NUE。

综上, 该项研究兼具重要的理论意义与应用价值。研究结果从遗传学角度解析了水稻适应不同地理区域土壤肥力的分子机制, 并揭示了一个新的OsLBD-OsTCP19-OsDLT信号通路在氮素调控水稻分蘖中的功能, 为水稻氮素高效分子育种提供了理论支持。同时, 研究发现的OsTCP19优异单倍体型也可用于提高水稻在较低氮素供应水平下的NUE和产量, 为水稻氮高效育种提供了新的遗传资源。

值得注意的是, 与其它矿质元素不同, 土壤中的氮素水平变化较为迅速且非常复杂, 在形态和数量上均存在很大的不确定性, 因此, OsTCP19的优异单倍体型是否能高效地利用不同形态的氮素值得期待。此外, 植物对土壤中氮素的响应和利用是一个极其复杂的生物学进程, 土壤处在植物与微生物互作的环境中, 土壤微生物在植物适应土壤氮水平的过程中发挥重要作用。例如, 水稻根系通过硝酸盐转运蛋白*NRT1.1B*调控具有氮转化能力的微生物, 从而改变根际微环境, 进而影响籼稻和粳稻的田间氮肥利用效率(Zhang et al., 2019)。水稻根系与土壤中真菌互作形成丛枝菌根, 促进水稻根系对氮的吸收, 但与低磷环境促进菌根形成不同, 过低的土壤氮素反而抑制菌根的形成(Wang et al., 2020)。目前尚不清楚这与菌根形成过程中不同区域土壤氮素环境有何关联。

近年来, 我国科学家在水稻氮素高效利用研究中取得了一系列令人瞩目的成就, 研究水平位居世界前列。目前已克隆并鉴定到多个有望显著提高产量和改善不同水稻品种氮素利用效率的基因, 包括*DEP1*、*NRT1.1B*、*OsNRT2.3b*、*GRF4*、*ARE1*、*NR2*、*NAC42-NPF6.1*、*NGR5*和*Nhd1* (Sun et al., 2014; Hu et al., 2015; Fan et al., 2016; Li et al., 2018; Wang et al., 2018; Gao et al., 2019; Tang et al., 2019; Wu et al., 2020; Zhang et al., 2020)。研究表明, *NGR5*、*NAC42-NPF6.1*和*NR2*参与调控水稻分蘖/穗数对氮的响应, 这些基因的优良等位变异均显著增加了低氮供给条件下的穗数, 说明水稻分蘖/穗数对氮的响应是研究水稻氮素高效利用的重要性状指标。此外, 研究也初步揭示这些基因在调控氮素高效利用过程中存在转录调控。例如, *NR2*与*NRT1.1B*基因表达具有正反馈相互作用(Gao et al., 2019); *GRF4*和*Nhd1*调控水稻氮素吸收及同化基因的表达(Li et al., 2018; Zhang et al., 2020)。但是具体的氮素响应基因互作网络还需要深入解析和构建, 这些重要基因是否能协同氮素高效利用也亟待进一步研究。

参考文献

- Fan XR, Tang Z, Tan YW, Zhang Y, Luo BB, Yang M, Lian XM, Shen QR, Miller AJ, Xu GH (2016). Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 7118–7123.
- Gao ZY, Wang YF, Chen G, Zhang AP, Yang SL, Shang LG, Wang DY, Ruan BP, Liu CL, Jiang HZ, Dong GJ, Zhu L, Hu J, Zhang GH, Zeng DL, Guo LB, Xu GH, Teng S, Harberd NP, Qian Q (2019). The *indica* nitrate reductase gene *OsNR2* allele enhances rice yield potential and nitrogen use efficiency. *Nat Commun* **10**, 5207.
- Guo JH, Liu XJ, Zhang Y, Shen JL, Han WX, Zhang WF, Christie P, Goulding KWT, Vitousek PM, Zhang FS (2010). Significant acidification in major Chinese croplands. *Science* **327**, 1008–1010.
- Hu B, Wang W, Ou SJ, Tang JY, Li H, Che RH, Zhang ZH, Chai XY, Wang HR, Wang YQ, Liang CZ, Liu LC, Piao ZZ, Deng QY, Deng K, Xu C, Liang Y, Zhang LH, Li LG, Chu CC (2015). Variation in *NRT1.1B* contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nat Genet* **47**, 834–838.
- Li S, Tian YH, Wu K, Ye YF, Yu JP, Zhang JQ, Liu Q, Hu

- MY, Li H, Tong YP, Harberd NP, Fu XD** (2018). Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture. *Nature* **560**, 595–600.
- Liu YQ, Wang HR, Jiang ZM, Wang W, Xu RN, Wang QH, Zhang ZH, Li AF, Liang Y, Ou SJ, Liu XJ, Cao SY, Tong HN, Wang YH, Zhou F, Liao H, Hu B, Chu CC** (2021). Genomic basis of geographical adaptation to soil nitrogen in rice. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03091-w>.
- Stevens CJ** (2019). Nitrogen in the environment. *Science* **363**, 578–580.
- Sun HY, Qian Q, Wu K, Luo JJ, Wang SS, Zhang CW, Ma YF, Liu Q, Huang XZ, Yuan QB, Han RX, Zhao M, Dong GJ, Guo LB, Zhu XD, Gou ZH, Wang W, Wu YJ, Lin HX, Fu XD** (2014). Heterotrimeric G protein regulate nitrogen-use efficiency in rice. *Nat Genet* **46**, 652–656.
- Tang WJ, Ye J, Yao XM, Zhao PZ, Xuan W, Tian YL, Zhang YY, Xu S, An HZ, Chen GM, Yu J, Wu W, Ge YW, Liu XL, Li J, Zhang HZ, Zhao YQ, Yang B, Jiang XZ, Peng C, Zhou C, Terzaghi W, Wang CM, Wan JM** (2019). Genome-wide associated study identifies NAC42-activated nitrate transporter conferring high nitrogen use efficiency in rice. *Nat Commun* **10**, 5279.
- Wang Q, Nian JQ, Xie XZ, Yu H, Zhang J, Bai JT, Dong GJ, Hu J, Bai B, Chen LC, Xie QJ, Feng J, Yang XL, Peng JL, Chen F, Qian Q, Li JY, Zuo J** (2018). Genetic variations in *ARE1* mediate grain yield by modulating nitrogen utilization in rice. *Nat Commun* **9**, 735.
- Wang SS, Chen AQ, Xie K, Yang XF, Luo ZZ, Chen JD, Zeng DC, Ren YH, Yang CF, Wang LX, Feng HM, López-Arredondo DL, Herrera-Estrella LR, Xu GH** (2020). Functional analysis of the OsNPF4.5 nitrate transporter reveals a conserved mycorrhizal pathway of nitrogen acquisition in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 16649–16659.
- Wu K, Wang SS, Song WZ, Zhang JQ, Wang Y, Liu Q, Yu JP, Ye YF, Li S, Chen JF, Zhao Y, Wang J, Wu XK, Wang MY, Zhang YJ, Liu BM, Wu YJ, Harberd NP, Fu XD** (2020). Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice. *Science* **367**, eaaz2046.
- Xu GH, Fan XR, Miller AJ** (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Ann Rev Plant Biol* **63**, 153–182.
- Zhang JY, Liu YX, Zhang N, Hu B, Jin T, Xu HR, Qin Y, Yan PX, Zhang XN, Guo XX, Hui J, Cao SY, Wang X, Wang C, Wang H, Qu BY, Fan GY, Yuan LX, Garrido-Oter R, Chu CC, Bai Y** (2019). *NRT1.1B* is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice. *Nat Biotechnol* **37**, 676–684.
- Zhang S, Zhang Y, Li K, Yan M, Zhang JF, Yu M, Tang S, Wang LY, Qu HY, Luo L, Xuan W, Xu GH** (2020). Nitrogen mediates flowering time and nitrogen use efficiency via floral regulators in rice. *Curr Biol* **31**, 1–13.

Genomic Basis of Rice Adaptation to Soil Nitrogen Status

Wei Xuan, Guohua Xu*

State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Resources and Environmental Sciences,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract Crop productivity relies heavily on inorganic nitrogen (N) fertilization, while excess application of N fertilizers results in detrimental effects on ecosystem and plant developmental process. Thus, the improvement of crop N use efficiency (NUE) is critical for the development of sustainable agriculture. Thus far, significant advances in understanding the regulation of NUE have been achieved in rice (*Oryza sativa*), one of the most important food crops. Several key transporter and regulatory genes involved in N uptake, translocation, and metabolism have been cloned and characterized in rice. However, the genetic mechanisms underlying the geographic adaptation of rice to the change of local soil N status remain elusive. Recently, a team led by Prof. Chengcai Chu, in Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, evaluated the responses to N supplies of rice germplasm resources collected from different eco-geographical regions worldwide. By performing genome-wide association study on rice tillering response to N (TRN), *OsTCP19* is identified as a repressor of TRN, and a 29 bp InDel polymorphism in its promoter determines TRN variations among the rice varieties. *OsTCP19* regulates TRN by inhibiting the transcription of *DLT*, a tiller-promoting gene, whilst the transcription of *OsTCP19* itself is controlled by a N responsive suppressor LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) protein. Notably, *OsTCP19* haplotypes were selected among rice germplasms and correlated with local soil N content. This study not only reveals the genetic basis of geographic adaptation of cultivated rice to the changes of soil N environment, but also provides novel genetic candidates for effective breeding of higher NUE rice cultivars.

Key words rice (*Oryza sativa*), tillering response to nitrogen, genome-wide association study, nitrogen use efficiency, geographic adaptation, *OsTCP19*, *OsLBD*, *DLT*

Xuan W, Xu GH (2021). Genomic basis of rice adaptation to soil nitrogen status. *Chin Bull Bot* 56, 1–5

* Author for correspondence. E-mail: ghxu@njau.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)