



植物遗传资源学报

Journal of Plant Genetic Resources

ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目: AT11 与 GS3 互作调控水稻耐碱性
作者: 陈昊, 于之雯, 王潇澈, 芦佳浩, 孙琪, 高继平, 徐铨, 张文忠
DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20250120001
网络首发日期: 2025-02-28
引用格式: 陈昊, 于之雯, 王潇澈, 芦佳浩, 孙琪, 高继平, 徐铨, 张文忠. AT11 与 GS3 互作调控水稻耐碱性[J/OL]. 植物遗传资源学报.
<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20250120001>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

AT11 与 GS3 互作调控水稻耐碱性

陈昊, 于之雯, 王潇澈, 芦佳浩, 孙琪, 高继平, 徐铨, 张文忠

(沈阳农业大学水稻研究所, 沈阳 110866)

摘要: 水稻是重要的粮食作物, 盐碱是造成水稻产量下降的主要非生物胁迫之一, 提高水稻品种的耐盐碱水平进而扩大种植面积是增加总产和确保粮食安全的重要举措。本研究在粳稻品种甬锦 (WT) 的 γ 射线诱导突变体库中筛选到一个耐碱性显著下降的突变体, 并通过图位克隆将目标基因定位在 11 号染色体 P2 和 P3 之间一段 87.7 kb 的区间内, 该区间内共有 9 个开放阅读框 (ORF), 序列比对发现突变体在 ORF9 的第三个外显子处有 4 个碱基的缺失, 造成基因翻译提前终止, 因此推测 ORF9 为耐碱性降低的候选基因, 并命名为 *Alkaline Tolerance 11* (*AT11*)。AT11 编码一个可能的多肽转运蛋白 (PTR, peptide transporter)。转基因实验发现 *AT11* 的 CRISPR/Cas9 敲除突变体耐碱性减弱, 而其过表达系耐碱性显著增强。*AT11* 在水稻各组织中均有表达, 在穗部表达量最高。酵母双杂交一对一验证试验和免疫共沉淀实验发现 AT11 可以与水稻异三聚体 G 蛋白 γ 亚基 GS3 互作。双分子荧光互补实验结果说明 AT11 与 GS3 在质膜上互作。转录组测序发现 WT 与 *AT11* 的 CRISPR/Cas9 敲除突变体中大量差异表达基因在色素结合、光合作用相关条目显著富集。在 PH=9.0 的大田条件下进行测产发现, *AT11* 过表达植株可以显著提高产量, 说明 *AT11* 能够提高水稻在盐碱地上的生产力, 具有潜在耐盐碱育种应用前景。

关键词: 水稻; 耐碱性; 产量; *AT11*; *GS3*

AT11 Regulates Alkaline Tolerance through the Interaction with GS3 in RICE

CHEN Hao, YU Zhiwen, WANG Xiaocheng, LU Jiahao, SUN Qi, GAO Jiping, XU Quan, ZHANG Wenzhong

(Rice Research Institute of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866)

Abstract: Rice is a significant staple crop, with salinity being a primary abiotic stress leading to reduced yields. Improving rice alkaline tolerance to expand cultivation areas is vital for boosting total production and securing food supply. In this study, a mutant with significantly reduced alkaline tolerance was identified from the γ -ray induced mutation library of the Geng/japonica rice variety Sasanishiki (WT). The target gene was located in an 87.7 kb region between P2 and P3 on chromosome 11, containing nine open reading frames (ORFs) through map-based cloning. Sequence comparison revealed a deletion of four bases in the third exon of ORF9 in the mutant, leading to premature termination of the gene. Therefore, ORF9 is hypothesized to be the candidate gene responsible for reduced alkaline tolerance and has been named *Alkaline Tolerance 11* (*AT11*). *AT11* encodes a putative peptide transporter (PTR). Transgenic experiments showed that CRISPR/Cas9 knockout lines of *AT11* weakens alkaline tolerance, whereas its overexpression significantly enhances alkaline tolerance. *AT11* is expressed in all tissues of rice, with the highest expression in the panicle. Yeast two-hybrid and Immunoprecipitation assays revealed that AT11 can interact with GS3, the heterotrimeric G-protein γ subunit in rice. Bimolecular fluorescence complementation experiments show that AT11 and GS3 interact on the plasma membrane. ¹Transcriptome sequencing revealed that the differentially expressed genes between WT and *AT11* knockout lines were significant enriched in pigment binding and photosynthesis. Yield testing under field conditions at pH 9.0 showed that overexpressing *AT11* significantly increases yield, demonstrating that *AT11* can enhance the productivity of rice on saline-alkaline soils, with potential salt alkaline resistance broad

第一作者研究方向为水稻高产高效优质栽培和分子育种, E-mail: chen hao128229@163.com

通信作者: 徐铨, 研究方向为水稻分子育种, E-mail: kobexu34@syau.edu.cn

张文忠, 研究方向为水稻高产高效优质栽培, E-mail: zwzhong1@syau.edu.cn

基金项目: 辽宁省“兴辽英才计划”项目 (XLYC2002073; XLYC2007169);

Foundation project: Liaoning Revitalization Talents Program, China (No. XLYC2002073; No. XLYC2007169)

breeding application prospects.

Key words: rice; alkaline tolerance; yield; *AT11*; *GS3*

气候变化对农业生产造成了负面影响，全球变暖限制了淡水资源的可用性。由于化学肥料的使用，不久的将来盐渍土在灌溉地区的面积将增加约 50%。因此土壤盐碱化可能成为影响植物生长和作物生产的全球性问题。利用这些盐渍土地进行作物生产是保障粮食安全的有效途径。因此培育更多耐盐碱作物是农业生产中亟待解决的问题。

根据联合国粮食及农业组织的研究，全球有超过 10 亿公顷的土地受到盐碱胁迫的影响 (<https://www.fao.org/3/i5199e/i5199e.pdf>)，盐碱胁迫根据土壤中阴离子的不同分为盐胁迫（以 NaCl 等中性盐为主）和碱胁迫（以 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 为主），二者均能对作物造成渗透胁迫和离子毒害，从而影响水稻的正常生长发育，但碱胁迫由于具有较高 pH 值，使水稻遭受盐分和高 pH 值双重损伤，伤害作用比盐胁迫更为严重和复杂，并且水稻应对两种胁迫的机制也存在差异^[1]。国内外有关水稻耐盐碱研究主要集中在盐胁迫，对碱胁迫下水稻体内反应机理和调节机制的研究相对较少，相关基因的克隆和功能分析更是鲜有报道。高碱度会提高细胞中过氧化氢 (H_2O_2) 的水平，并导致细胞蛋白质、脂质和 DNA 的氧化损伤，从而导致细胞凋亡^[2-4]。水孔蛋白 (Aquaporins) 是一种位于细胞膜上的蛋白质，在细胞膜上组成“孔道”，有助于水和其他小溶质在细胞膜上的双向运输。在植物中，水孔蛋白参与多种应激反应，其磷酸化在其转运活性中起着重要作用^[5-6]。近期研究表明水稻 G 蛋白 γ 亚基 *GS3* 可以通过调节水通道蛋白的磷酸化，以调节活性氧 (ROS) 水平，从而维持 H_2O_2 的稳态，进而调控水稻耐碱性^[7]。基于耐盐碱等位基因 *GS3* 改良的水稻、玉米、高粱和谷子均有效提高了约 20%~30% 的产量和生物量^[7]。此外，*ALT1* 编码 SNF2 家族染色质重塑 ATP 酶的一个核心亚基，通过防御氧化损伤，负调控水稻的耐碱性^[8]。*OsLOL5* 在碱胁迫条件下参与了氧化调控，通过激活活性氧的解毒途径提高水稻的耐碱性^[9]。*OsCu/Zn-SOD* 基因通过增强抗氧化防御系统参与调控水稻耐碱性^[10]。*OsPPa6* 编码重要的渗透调节因子，是增强水稻耐碱性所必需的基因，其突变体显著降低了净光合速率和气孔导度，从而降低了可溶性糖和脯氨酸含量，但显著提高了碱胁迫下突变体中 MDA、渗透势和 Na^+/K^+ 比值，降低了叶绿素含量^[11]。

本研究通过图位克隆成功鉴定到一个耐碱性的正调控基因 *AT11*，*AT11* 与已经克隆的水稻穗长基因 *Short panicle 1* (*SP1*) 互为等位基因^[12]，但尚未见其调控水稻耐碱性的报道。本研究发现 *AT11* 可以与水稻 G 蛋白 γ 亚基 *GS3* 互作调控水稻耐碱性，大田实验表明增加 *AT11* 的表达量可以有效提高水稻品种在盐碱地中的产量表现，本研究为支撑粮食安全中盐碱地综合利用战略提供了基因资源和种质资源。

1 材料与amp;方法

1.1 供试水稻材料及耐碱性鉴定

粳稻品种筐锦为野生型材料 (WT)，*M23* 为使用 γ 射线照射 WT 种子获得的突变体。用于表型评估的种子都是同一时间收获并在相同条件下储存的，在施加 75 mmol/L 混合碱胁迫处理 (NaHCO_3 : Na_2CO_3 摩尔比为 5:1) 14 天后，记录存活率作为表型数据。

1.2 基因定位及载体构建

将突变体 *M23* 与 WT 杂交，获得 F_1 植株， F_1 植株自交后获得 F_2 群体。比 WT、*M23*、 F_1 植株和 F_2 植

株的耐碱性进行遗传分析。为了保证双亲之间有足够的多态性，同时避免 F₂ 群体大量非目标性状分离，将 M23 与粳稻品种丰锦杂交构建 F₂ 定位群体。丰锦由笹锦和奥羽 239 杂交育成。单株胁迫下的苗长作为目标性状代表定位群体个体的耐盐性，进行连锁分析。用 CTAB 法提取水稻幼苗的叶片 DNA，Primer 5.0 设计定位引物。PCR 采用诺唯赞 2× Rapid Taq Master，PCR 反应体系：25 μL 2 × Rapid Taq Master Mix，上游引物 2 μL，下游引物 2 μL，DNA 模板 1 μL，ddH₂O 20 μL。PCR 扩增程序：95°C 3 min，（95°C 15 s，60°C 15 s，72°C 25 s）共 32 个循环，72°C 5 min。图位克隆将目标基因锁定在引物 P2 和 P3 之间一段 87.7 kb 的区间内。引物序列见表 1。

使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) 构建 *AT11* 和 *GS3* 的突变体。将 *AT11* 和 *GS3* 的 20 bp sgRNA 靶区插入具有 *BsaI* 位点的 pGREB32 载体中。通过 BP 和 LR 酶介导的 Invitrogen Gateway 系统的 35S 驱动，将 *AT11* 的全长 CDS 克隆到 pCAMBIA2300-35S-3×FLAG 载体中，构建过表达材料，通过农杆菌诱导获得转基因水稻幼苗。

表 1 引物列表

Table 1 List of primers

引物名称 Primer name	上游引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')	作用 Function
P1	GGCTGAATTATGGGTTTCAAATGC	AAATGAACTTATGTGAAAAAGTTGTCA	基因定位
P2	AAATGTAGCACTTCTCCCGAA	GAGCTCTCAATCATCTCGTTGCCGTTCC ATTGT	基因定位
P3	GTGCAACTTTGTTGTAAAGTGCA	AAGAAGACCCAATCCAATGGT	基因定位
P4	AGCACAAGATGTTCTAGCGGT	ATATCAGCACATGGGCCAGC	基因定位
P5	CCTTCAGACGGCGATGGC	AGTCCCATAGAATTAACAAGGCCT	基因定位
<i>Actin</i>	ACCATTGGTGCTGAGCGTTT	CGCAGCTTCCATTCTATGAA	RT-qPCR
<i>RT-AT11</i>	ACTACCCGCTGTCAAAGTCG	TCGACGAAGCCGAAGATGAG	RT-qPCR
<i>pCAMBIA2300-35S-AT11</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT AATGGATGTTGAGTCAAGCAAGG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTTGTGACCCATGTTGACCTCGTCA	过表达 Over-expression
<i>AT11-pBT3-N</i>	CCTGCAAGATGGATGTTGAGTCAAGCAAG	CCGCGTCAAGTACAGGATCCCAAGCAG	酵母双杂交试验
<i>GS3-GFP</i>	AGTCCGAGCTAGCTCTAGAATGGCAATGG CGGCGGCG	GCGGCCGCTGTACAGGATCCCAAGCAG GGGGGCAGCAAC	免疫共沉淀试验 Co-IP
<i>AT11-MYC</i>	GATTGAATGGCTCCGGTACATGGATGTTG AGTCAAGGCAAGGCC	CAGAGCTAGTTACAGGCGGTCAGTGA CCCATGTTGACCTCGTC	免疫共沉淀试验 Co-IP
<i>MIL2</i>	ACGACGACTGCCTCTCAAC	GAGGCGTAGCAAATGGTGAG	RT-qPCR
<i>OsABC14</i>	TTTACCTGGGCAAAGTTGG	TACGGTGCCTGACATGATT	RT-qPCR
<i>CTB4a</i>	CGCCGGATCATATGGCTACATC	CACGTCGCTCTTCTCCGTTA	RT-qPCR

1.3 RNA 的提取及 qRT-PCR

使用 FastPure Complex Tissue/Cell Total RNA Isolation Kit (Vazyme, Cat. RC113-01) 从孕穗期的水稻幼穗以及水稻根系中提取 RNA。用反转录试剂盒进行 cDNA 合成 (Thermo Fisher Scientific, Cat. 4374966) 并将获得的 cDNA 用于 qRT-PCR。Actin 用作内参, 使用 Fast SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Cat. 4385612) Biosystems QuantStudio 3 system (Thermo Fisher Scientific, USA) 测量基因表达量, 体系 20 μL , FastSYBR Mixture 10 μL , ROX 0.4 μL , 左右引物各 0.4 μL , ddH₂O 6.8 μL , 反转录产物 2 μL 。扩增程序: 95°C 3 min, (95°C 15 s, 60°C 15 s, 72°C 25 s) 共 32 个循环, 72°C 5 min, 溶解曲线分析程序: 95°C 下 15 s, 60°C 下 60 s, 95°C 下 15 s, 60°C 下 15 s。实验进行三次生物学重复和三次技术重复。

1.4 蛋白互作试验

酵母双杂交试验: 利用酵母双杂交系统 (Clontech) 筛选 *AT11* 的互作蛋白。将 *AT11* 的全长 CDS 克隆到载体 pBT3-N 中, 并将 *GS3* 的全长 CDS 克隆到载体 pPR3-N 中。将 pBT3-N-*AT11* 和 pPR3-N-*GS3* 转入到酵母感受态细胞 NMY51 (WEIDI, Cat. YC1040M) 中。在 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 培养基上培养生长。

双分子荧光互补试验 (BiFC): 利用 BP 和 LR 酶介导的 Invitrogen Gateway 系统将 *AT11* 和 *GS3* 的 CDS 克隆到载体 pEGOEP-35S 中, 构建 pEGOEP-35S-*AT11*-nYFP 和 pEGOEP-34S-*GS3*-cYFP。将构建的载体质粒转移到农杆菌菌株 (GV3101) 中, 培养 2 天后注射到本氏烟草叶中, 用共聚焦显微镜 (Zeiss, Cat. LSM780) 观察。

免疫共沉淀试验 (Co-IP): 将 *AT11* 和 *GS3* 的 CDS 分别克隆到 pBWA (V) H2STMV Ω -MYC 和 pAN580-GFP 载体中。将构建的载体质粒转化到农杆菌菌株 (GV3101) 中, 并注射到本氏烟草叶中。在液氮中研磨烟草叶并提取蛋白。提取的蛋白与抗体一起孵育, 然后与磁珠结合。离心并洗涤复合沉淀蛋白后收集上清液。通过 SDS-PAGE 分离蛋白质, 并用抗体进行检测。

1.5 转录组测序

待水稻植株长至 3 叶期时, 取样根部组织。利用 TRIzol 法提取 RNA, 并通过酶标仪检测 RNA 的浓度为 1000 ng· μL^{-1} , 且 OD 值介于 1.8 - 2.0, 设 3 个生物学重复。样品送至武汉万摩科技有限公司进行文库构建和测序。去除平均质量得分低于 Q20 的 Reads, 使用 DESeq2 软件包进行差异表达分析。使用线上工具 agriGO v2 进行 GO 注释和富集分析, 使用 clusterProfiler 软件包绘制 KEGG 通路富集图。

1.6 统计分析

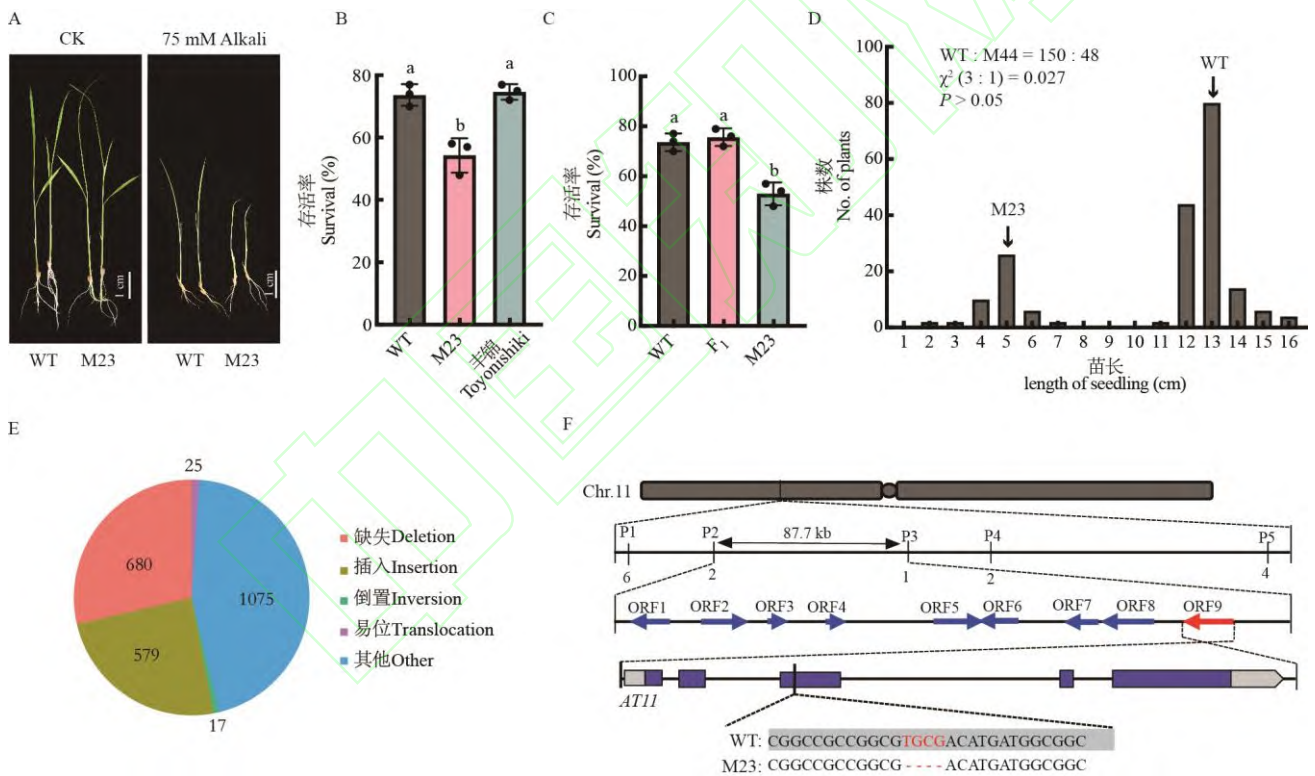
运用 Excel 汇总, 并利用数据分析中 *t* 检验, 双样本异方差假设进行显著性差异分析。使用 GraphPad 软件辅助进行数据作图和分析。

2 结果与分析

2.1 耐碱突变体筛选和候选基因 *AT11* 的图位克隆

为挖掘调控水稻耐碱性的新基因位点, 试验前期在典型粳稻品种筐锦 (WT) 遗传背景创制突变体库^[13]。从突变体库中随机选取 100 个突变系, 调查其苗期碱胁迫下的存活率。发现 *M23* 在碱胁迫下存活率为 54.33% \pm 5.51%, 显著低于 WT 在碱胁迫下存活率 73.77% \pm 3.51% (图 1A 和 1B)。将 *M23* 与 WT 杂交获得 F₁ 植

株, F₁ 植株自交后获得 F₂ 群体。碱胁迫下 F₁ 植株存活率与 WT 相似, 均显著高于 M23 (图 1C)。碱胁迫下 F₂ 群体耐碱性成典型 3:1 分离, 说明 M23 的耐碱性受隐性单基因调控 (图 1D)。为了保证双亲之间的多态性, 同时避免分离群体大量非目标性状分离, 实验选取日本粳稻品种丰锦为定位群体亲本, 丰锦由笹锦与奥羽 239 杂交育成, 其耐碱性与笹锦相似, 均显著高于 M23 (图 1B)。M23 与粳稻品种丰锦杂交获得 F₁ 植株, F₁ 植株自交获得包含 1344 个单株的定位群体。课题组前期构建了基于三代长度长测序的高质量粳稻泛基因组, 其中包括丰锦和笹锦^[14]。比对丰锦和笹锦的基因组发现, 虽然二者在表型和基因组上较为接近, 其基因组层面仍然存在丰富的多态性, 共监测到 2376 个结构性变异, 其中有 680 个结构性变异为大片段缺失, 579 个结构性变异为大片段插入 (图 1E)。实验基于这些大片段插入缺失设计引物进行连锁分析。通过连锁分析将目标基因锁定在 11 号染色体 P2 和 P3 之间一段 87.7 kb 的区间内。通过数据库比对, 该区间内共有 9 个开放阅读框 (ORF), 比对这 9 个 ORF 在笹锦与 M23 之间的序列差异发现, 双亲只有在 ORF9 上存在差异, 其中 M23 在 ORF9 的第三个外显子处有 4 个碱基的缺失 (图 1F)。这 4 个碱基的缺失造成基因提前终止, 因此我们推测 ORF9 为 M23 耐碱性降低的候选基因, 并命名为 *Alkaline Tolerance 11* (*AT11*)。AT11 编码一个可能的多肽转运蛋白 (peptide transporter, PTR), 与已报道的水稻穗长基因 *SP1* 互为等位基因, *SP1* 第三个外显子上的 31 bp 缺失引起短穗表型^[12], 但是其尚未见其调控水稻耐碱性的报道。



A: 野生型和 M23 突变体碱胁迫下表型; B: 野生型、M23 突变体和丰锦碱胁迫下存活率; C: 野生型和 F₁ 和 M23 碱胁迫下的存活率; D: M23 和丰锦杂交 F₂ 群体碱胁迫下的苗长分布; E: 野生型和丰锦之间的基因组结构性变异; F: 定位区间内 ORF 预测和序列比对; 不同小写字母表示 $P < 0.05$ 水平差异显著

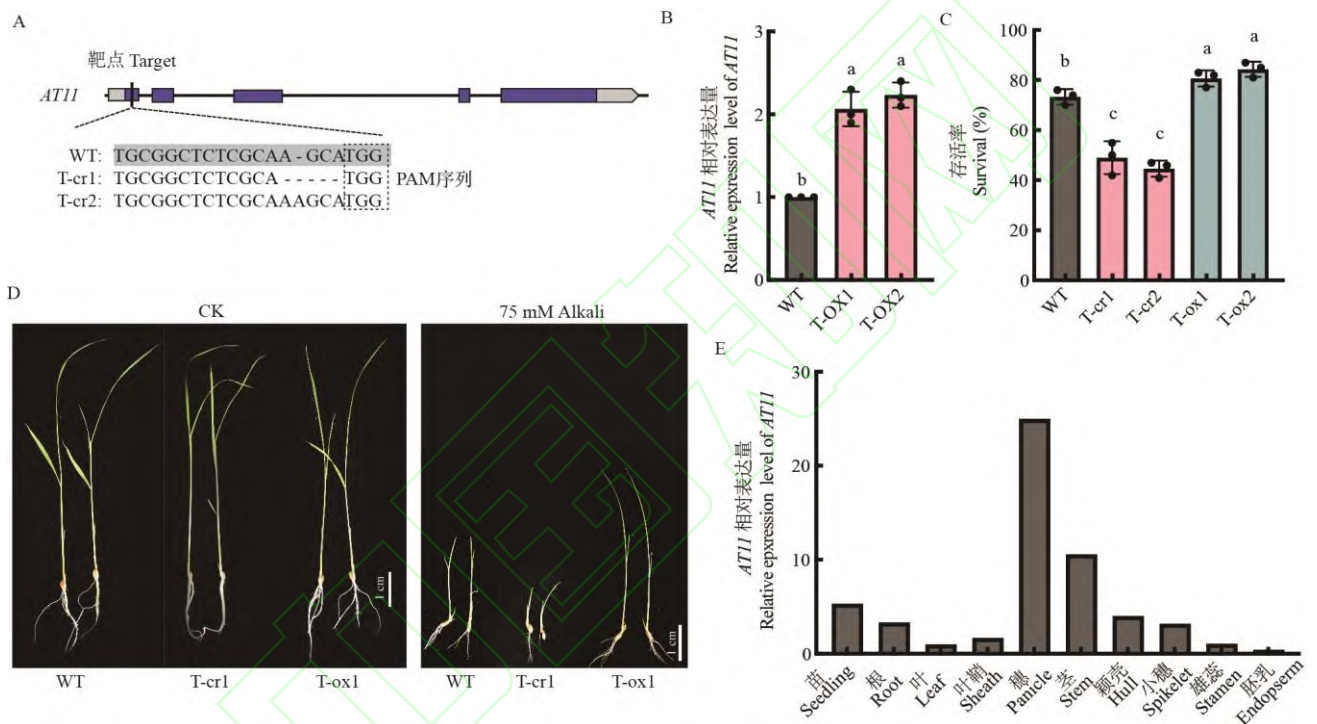
A: The phenotype of WT and M23 under alkaline stress; B: Statistical analysis of the relative survival rates of WT, M23 and Toyonishiki under alkaline stress; C: Statistical analysis of the relative survival rates of WT, F₁, and M23 under alkaline stress; D: The distribution of length of seedling of the F₂ population; E: The genome structure variation between WT and Toyonishiki; F: The sequence difference of ORFs in the candidate region; Different lowercase letters indicate significant differences in the level of $P < 0.05$

图 1 突变体表型和突变基因图位克隆

Fig.1 Phenotype of mutant and map-based cloning

2.2 *AT11* 转基因验证和表达模式分析

为了验证 *AT11* 为调控耐碱性的目标基因，实验应用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 *AT11* 的第一个外显子处设计靶点，在 WT 遗传背景下构建 *AT11* 基因敲除突变体。在 T₁ 代对转基因植株进行测序，鉴定到两个纯合突变系，较 WT 相比 *T-cr1* 缺失四个碱基，*T-cr2* 有一个碱基 A 的插入（图 2A）。实验同时构建了两个 *AT11* 过表达株系，过表达株系中 *AT11* 的表达量显著高于野生型（图 2B）。调查基因敲除株系和过表达株系的耐碱性发现，*AT11* 敲除株系 *T-cr1* 和 *T-cr2* 较野生型苗期碱胁迫下存活率显著下降，而过表达植株 *T-ox1* 和 *T-ox2* 碱胁迫下存活率显著提高（图 2C 和 2D）。综上所述，*AT11* 为参与耐碱性调控的目标基因。试验对 *AT11* 在水稻各组织的表达量进行测定，结果显示 *AT11* 在水稻各部分均有表达，其中在穗部表达量最高（图 2E）。



A: *AT11* 的 CRISPR/Cas9 基因敲除突变体构建; B: *AT11* 的过表达株系表达量检测; C: 野生型、*AT11* 敲除突变体和过表达株系碱胁迫下的存活率;

D: 野生型、*AT11* 敲除突变体和过表达株系碱胁迫下表型; E: *AT11* 在各组织中的表达量; 不同小写字母表示 $P < 0.05$ 水平差异显著

A: The gene editing of *AT11* using CRISPR/Cas9 gene editing technology; B: The relative expression level of *AT11* in WT and *AT11* overexpression lines; C: B: Statistical analysis of the relative survival rates of WT, *AT11* knockout lines, and *AT11* overexpression lines under alkaline stress; D: The phenotype of WT, *AT11* knockout lines, and *AT11* overexpression lines under alkaline stress; E: The expression pattern of *AT11*; Different lowercase letters indicate significant differences in the level of $P < 0.05$

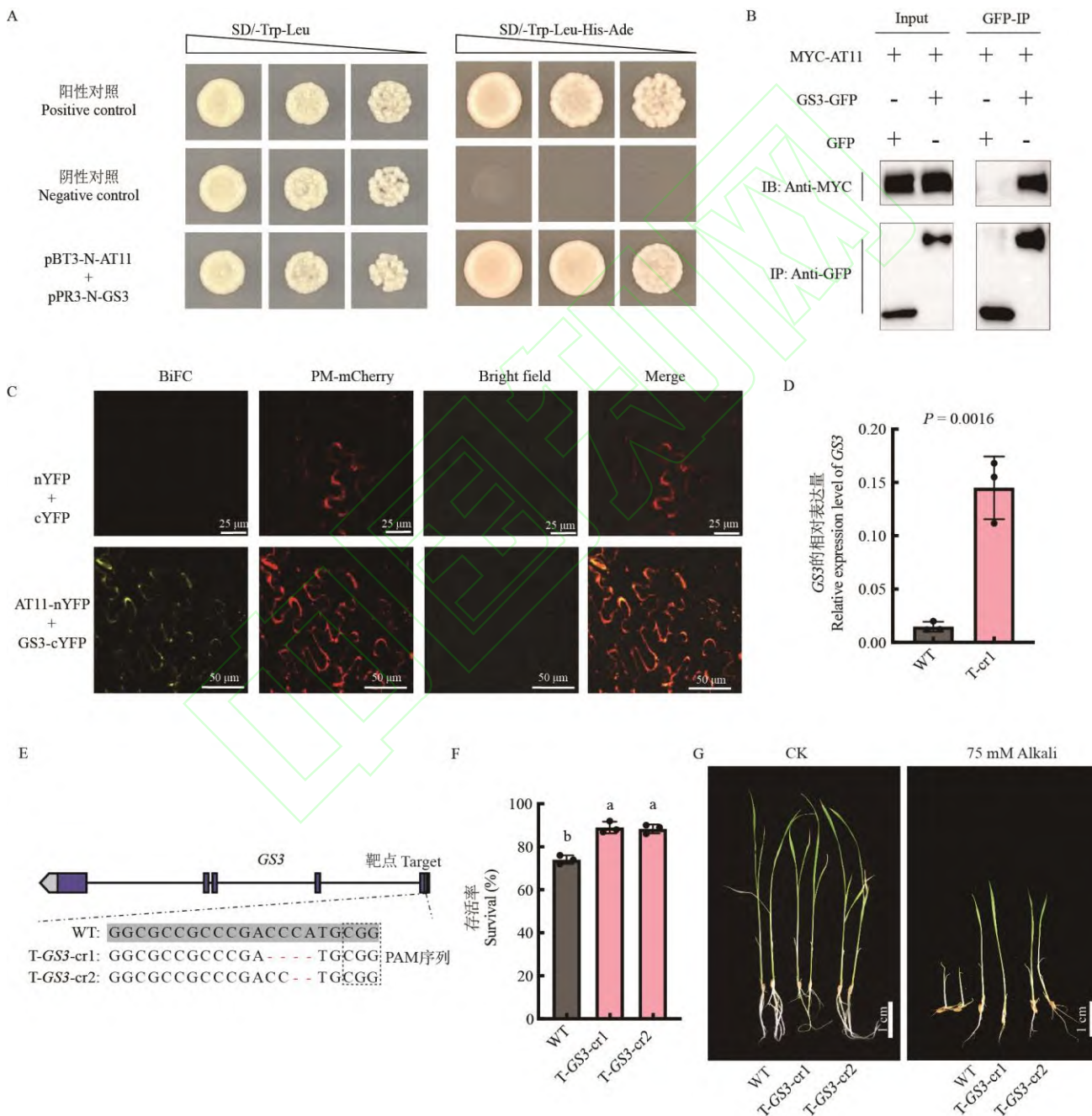
图 2 *AT11* 的转基因功能验证和表达模式分析

Fig. 2 Functional verification of *AT11* by transgenic experiments and expression pattern analysis

2.3 *AT11* 与 G 蛋白 γ 亚基 GS3 互作

为了进一步阐明 *AT11* 调控水稻耐碱性的分子机理，实验进行了酵母双杂交筛库实验，挖掘 *AT11* 的互作蛋白。实验共筛选到 28 个可能与 *AT11* 互作的蛋白，其中包含一个明星蛋白 G 蛋白 γ 亚基 GS3。为了进

一步验证 AT11 和 GS3 互作，实验进行了酵母双杂交（Y2H）一对一验证并证实互作（图 3A）。免疫共沉淀实验进一步验证 GS3 可以与 AT11 互作（图 3B）。双分子荧光互补（Bimolecular fluorescence complementation, BiFC）实验结果说明 AT11 与 GS3 在质膜上互作（图 3C）。GS3 为调控水稻粒形的主效基因^[15]，近期研究表明 GS3 还参与水稻耐热性调控^[16]。值得注意的是 GS3 和其同源基因 AT1 在水稻和高粱耐碱性调控中发挥重要作用^[7]。为了进一步验证 GS3 是否调控水稻的耐碱性，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，在 GS3 的第一个外显子处设计靶点，获得了两个纯合的 GS3 敲除突变系，其中 T-GS3-cr1 在靶点附近缺失 4 个碱基，T-GS3-cr2 缺失 2 个碱基（图 3E）。调查 GS3 敲除突变体的耐碱性发现，其苗期碱胁迫下存活率显著高于野生型（图 3F 和 3G）。综上所述，AT11 可能通过与 GS3 互作调控水稻耐碱性。



A: 酵母双杂交; B: 免疫共沉淀; C: 双分子荧光互补; D: 野生型和 *T-cr1* 中 GS3 的相对表达量; E: GS3 的 CRISPR/Cas9 基因敲除突变体构建; F: 野生型和 GS3 敲除突变体碱胁迫下的存活率; G: 野生型和 GS3 敲除突变体碱胁迫下的表型; 不同小写字母表示 $P < 0.05$ 水平差异显著

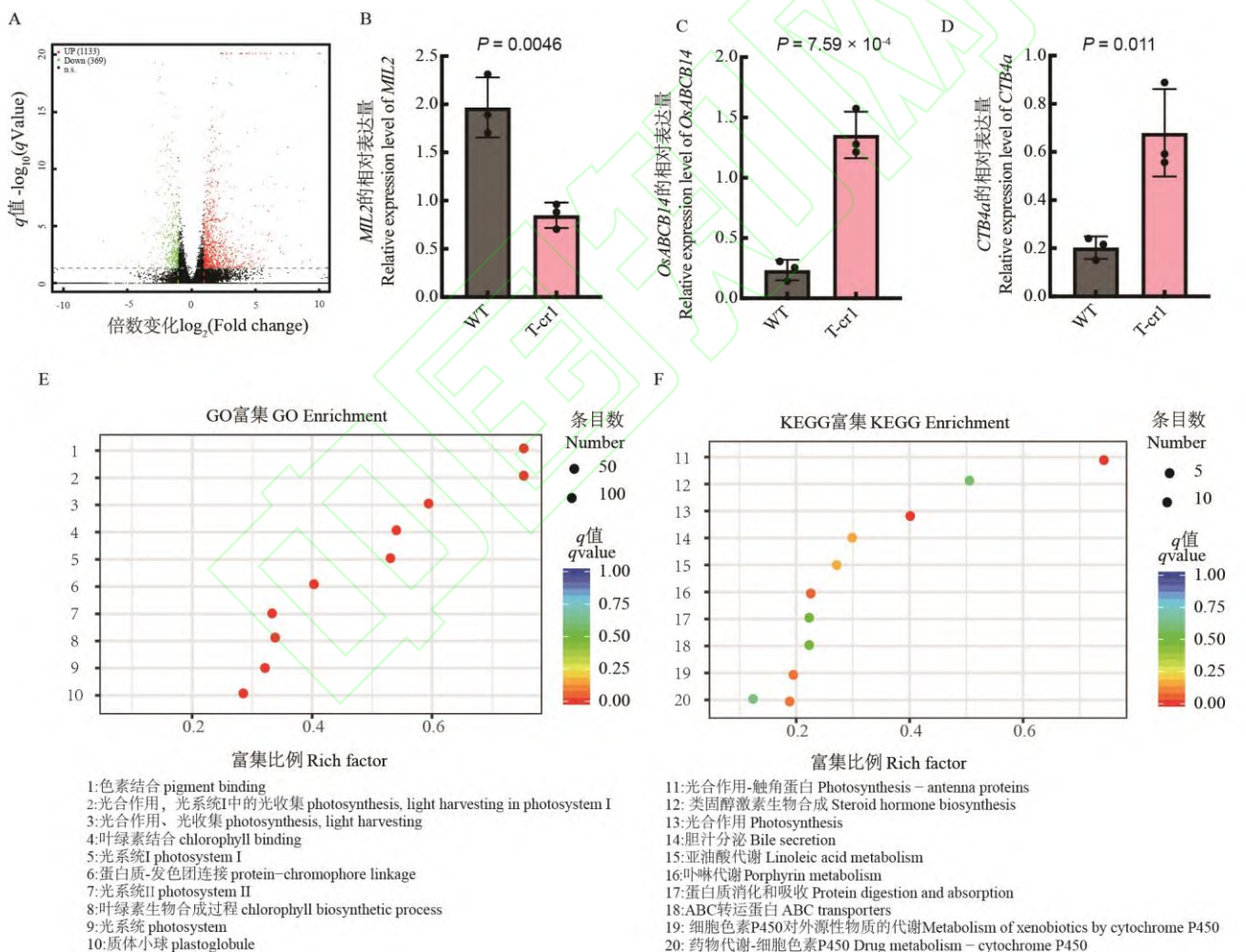
A: Yeast two-hybrid assay; B: Co-Immunoprecipitation assay; C: Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay; D: The relative expression level of *GS3* in WT and *T-cr1*; E: The gene editing of *GS3* using CRISPR/Cas9 gene editing technology; F: Statistical analysis of the relative survival rates of WT and *GS3* knockout mutants under alkaline stress; G: The phenotype of WT and *GS3* knockout mutants under alkaline stress; Different lowercase letters indicate significant differences in the level of $P < 0.05$

图 3 AT11 与 GS3 互作调控水稻耐碱性

Fig.3 AT11 regulates the alkaline tolerance through the interaction with GS3

2.4 AT11 的转录组分析

为了挖掘 *AT11* 调控的下游基因，在苗期提取野生型和 *AT11* 敲除突变体 *T-cr1* 的根部 RNA，进行转录组测序。转录组分析发现 *T-cr1* 中共有 1133 个基因表达显著上调，369 个基因表达显著下调（图 4A）。随机抽取 3 个基因进行 RT-qPCR 检测，结果显示与转录组测序结果吻合（图 4B-4D）。对差异表达基因进行 GO 富集分析，发现差异表达基因在色素结合、光合作用上显著富集（图 4E）。KEGG 通路分析显示，差异表达基因在光合作用、类固醇激素生物合成等通路富集（图 4F）。



A: 比较组表达差异火山图; B: *MIL2* 的相对表达量; C: *OsABC14* 的相对表达量; D: *CTB4a* 的相对表达量; E: GO 显著富集功能散点图; F: KEGG 显著富集功能散点图

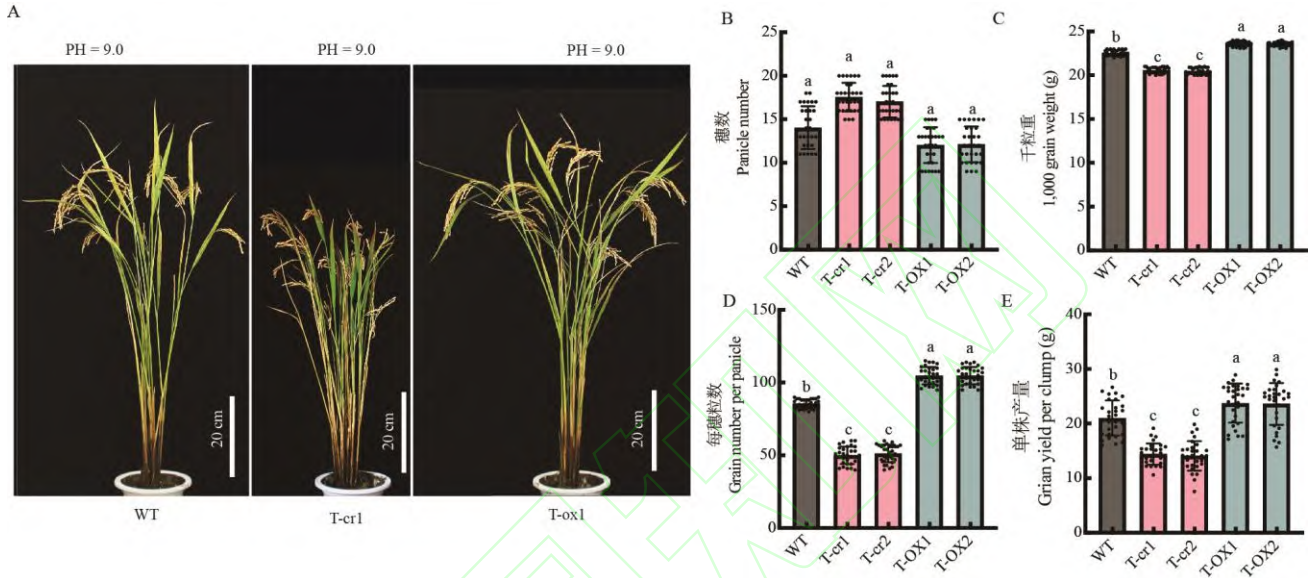
A: Volcano plots representing the fold change in DEGs; B: The relative expression level of *MIL2*; C: The relative expression level of *OsABC14*; D: The relative expression level of *CTB4a*; E: The top10 GO enrichment; F: The top 10 KEGG enrichment

图 4 AT11 的转录组分析

Fig.4 The RNA-seq of *AT11*

2.5 *AT11* 的大田功能验证

为了评估 *AT11* 在水稻盐碱地育种中的应用前景，实验选取辽宁省盐碱地利用研究所试验田进行大田栽培试验，试验田为滨海盐渍型土，PH 值 8.9-9.1。在成熟期调查野生型、*AT11* 敲除突变体 *T-cr1* 和 *AT11* 过表达株系 *T-ox1* 的产量构成因素，结果表明 *T-cr1* 较野生型穗数显著增加，千粒重和每穗粒数显著降低，单株产量下降 31.40%。而 *T-ox1* 较野生型穗数显著减少，但是千粒重和每穗粒数显著增加，单株产量增加 12.89%（图 5）。综上所述，提高 *AT11* 的表达量可以有效提高水稻品种在盐碱地上的产量表现。



A: 野生型、*AT11* 敲除突变体和过表达株系在盐渍土中表型; B: 野生型、*AT11* 敲除突变体和过表达株系在盐渍土中穗数; C: 野生型、*AT11* 敲除突变体和过表达株系在盐渍土中千粒重; D: 野生型、*AT11* 敲除突变体和过表达株系在盐渍土中每穗粒数; E: 野生型、*AT11* 敲除突变体和过表达株系在盐渍土中单株产量; 不同小写字母表示 $P < 0.05$ 水平差异显著

A: The phenotype of WT, *AT11* knockout lines, and *AT11* overexpression lines under alkaline field; B: The panicle number of WT, *AT11* knockout lines, and *AT11* overexpression lines under alkaline field; C: The 1,000 grain weight of WT, *AT11* knockout lines, and *AT11* overexpression lines under alkaline field; D: The grain number per panicle of WT, *AT11* knockout lines, and *AT11* overexpression lines under alkaline field; E: The Grain yield per clump of WT, *AT11* knockout lines, and *AT11* overexpression lines under alkaline field; Different lowercase letters indicate significant differences in the level of $P < 0.05$

图 5 野生型、*AT11* 敲除突变体和 *AT11* 过表达株系在 PH=9.0 大田产量表现

Fig.5 The yield performance of WT, *AT11* knockout lines, and *AT11* overexpression lines from the alkali field (PH=9.0)

3 讨论

本研究发现 *AT11* 为水稻耐碱性的负调控基因，*AT11* 属于植物 NPF (Nitrate transporter1/ Peptide transporter Family) 基因家族，该家族成员数量众多且功能多样化，除了作为硝态氮和寡肽转运蛋白外，还可以转运其它多种底物 (NO_3^- 、 Cl^- 、生长素、脱落酸、赤霉素、茉莉酸、硫代葡萄糖苷、砷酸二甲酯等)，参与多种生物与非生物胁迫响应^[17-18]。水稻基因组中共含有 93 个 NPF 家族基因，其中已经有 16 个基因的生物学功能被报道，其中 *OsNPF2.4*^[19]、*OsNPF5.16*^[20]、*OsNPF6.1*^[21]、*OsNPF6.3*^[22]、*OsNPF6.5*^[23]、*OsNPF7.1*^[24]、*OsNPF7.2*^[25]、*OsNPF7.4*^[24]和 *OsNPF7.7*^[26]参与 NO_3^- 吸收过程，且 *OsNPF5.16* 与已报道 *NPF7* 亚家族成员 *OsNPF7.1*、*OsNPF7.2*、*OsNPF7.3*、*OsNPF7.4* 和 *OsNPF7.7* 均参与水稻蘖芽的发育，并最终影响水稻分蘖。

OsNPF4 的敲除突变体穗发育严重受阻，穗长穗粒数显著降低，目前尚没有实验证据证明其是否参与 NO_3^- 吸收过程^[12]。

本研究发现 *AT11* 可以与 *GS3* 互作调控水稻耐碱性。*GS3* 为水稻异三聚体 G 蛋白 γ 亚基^[15]，异三聚体 G 蛋白在真核生物中具有保守性，包括 G 蛋白 α 亚基 ($G\alpha$)、 β 亚基 ($G\beta$) 和 γ 亚基 ($G\gamma$)，在生物整个生命周期中，它们在发展和环境相互作用中发挥多种功能^[27-28]。植物中存在大量功能各异的 G 蛋白 γ 亚基，这些亚基在信号感知、传导及下游效应器的调节中各有不同^[29]。近期研究表明植物中与 G 蛋白 γ 亚基是控制水稻、玉米、小麦、高粱和谷子禾等本科作物耐碱性的负调控关键因子，其通过影响水通道蛋白 *PIP2* 的磷酸化来调节 H_2O_2 的分布，进而维持 ROS 稳态和减轻碱胁迫对植物的伤害^[7]。本研究还进一步检验了 *AT11* 基因对水稻在盐碱地上产量的影响，在 $\text{PH}=9.0$ 的大田进行种植试验，发现过表达 *AT11* 可以有效提高水稻产量 12.89%。因此，阐明 *AT11* 参与调控水稻耐碱性的分子机理，将该基因用于分子设计耐盐碱作物的育种遗传改良中，将为解决全球粮食安全危机和以稻治碱^[30]及高效利用盐碱土地提供理论指导。前人研究发现 *AT11* 正调控穗长和穗粒数，本研究发现 *AT11* 正调控耐碱性，*GS3* 则是调控水稻粒形、耐热性和耐碱性的关键因子^[7, 12, 16, 31]。因此 *AT11* 与 *GS3* 互作调控产量、品质和抗性等多种重要农艺性状，筛选 *AT11* 和 *GS3* 的优异等位基因组合，将为培育高产、优质、高抗水稻品种提供理论基础和基因资源。

参考文献:

- [1] Javid M, Ford R, Nicolas M E. Tolerance responses of *Brassica juncea* to salinity, alkalinity and alkaline salinity. *Functional Plant Biology*, 2012, 39(8): 699-707
- [2] Sun X, Sun M, Jia B, Qin Z, Yang K, Chen C, Yu Q, Zhu Y. A *Glycine soja* methionine sulfoxide reductase B5a interacts with the Ca^{2+} /CAM-binding kinase GsCBRLK and activates ROS signaling under carbonate alkaline stress. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 2016, 86(6): 514-529
- [3] Zhang H, Liu X L, Zhang R X, Yuan H Y, Wang M M, Yang H Y, Ma H Y, Liu D, Jiang C J, Liang Z W. Root damage under alkaline stress is associated with reactive oxygen species accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1580
- [4] An M, Wang X, Chang D, Wang S, Hong D, Fan H, Wang K. Application of compound material alleviates saline and alkaline stress in cotton leaves through regulation of the transcriptome. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 462
- [5] Chen Q, Liu R, Wu Y, Wei S, Wang Q, Zheng Y, Xia R, Shang X, Yu F, Yang X, Liu L, Huang X, Wang Y, Xie Q. ERAD-related E2 and E3 enzymes modulate the drought response by regulating the stability of *PIP2* aquaporins. *The Plant Cell*, 2021, 33(8): 2883-2898
- [6] Rodrigues O, Reshetnyak G, Grondin A, Saijo Y, Leonhardt N, Maurel C, Verdoucq L. Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-triggered stomatal closure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(34): 9200-9205
- [7] Zhang H, Yu F, Xie P, Sun S, Qiao X, Tang S, Chen C, Yang S, Mei C, Yang D, Wu Y, Xia R, Li X, Lu J, Liu Y, Xie X, Ma D, Xu X, Liang Z, Feng Z, Huang X, Yu H, Liu G, Wang Y, Li J, Zhang Q, Chen C, Ouyang Y, Xie Q. A $G\gamma$ protein regulates alkaline sensitivity in crops. *Science*, 2023, 379: 8416
- [8] Guo M, Wang R, Wang J, Hua K, Wang Y, Liu X, Yao S. ALT1, a *Snf2* family chromatin remodeling ATPase, negatively regulates alkaline tolerance through enhanced defense against oxidative stress in rice. *PLoS ONE*, 2014, 9: 112515
- [9] Guan Q J, Ma H Y, Wang Z J, Wang Z Y, Bu Q Y, Liu S K. A rice LSD1-like-type ZFP gene *OsL5* enhances saline-alkaline tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*, yeast and rice. *BMC Genomics*, 2016, 17: 142
- [10] Guan Q, Liao X, He M, Li X, Wang Z, Ma H, Yu S, Liu S. Tolerance analysis of chloroplast *OsCu/Zn-SOD* overexpressing rice under NaCl and NaHCO_3 stress. *PLoS ONE*, 2017, 12: 0186052
- [11] Wang B, Xie G, Liu Z, He R, Han J, Huang S, Liu L, Cheng X. Mutagenesis reveals that the *OsPPa6* gene is required for enhancing the alkaline tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 759

- [12] Li S, Qian Q, Fu Z, Zeng D, Meng X, Kyojuka J, Maekawa M, Zhu X, Zhang J, Li J, Wang Y. Short panicle1 encodes a putative PTR family transporter and determines rice panicle size. *Plant Journal*, 2009, 58(4): 592-605
- [13] Sun Q, Yu Z, Wang X, Chen H, Lu J, Zhao C, Jiang L, Li F, Xu Q, Ma D. EARLY FLOWERING3-1 represses *Grain number, plant height, and heading date7* to promote *ABC1 REPRESSOR1* and regulate nitrogen uptake in rice. *Plant Physiology*, 2024, 196(3): 1857-1868
- [14] Wang Y, Li F, Zhang F, Wu L, Xu N, Sun Q, Chen H, Yu Z, Lu J, Jiang K, Wang X, Wen S, Zhou Y, Zhao H, Jiang Q, Wang J, Jia R, Sun J, Tang L, Xu H, Hu W, Xu Z, Chen W, Guo A, Xu Q. Time-ordering *japonica/geng* genomes analysis indicates the importance of large structural variants in rice breeding. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(1): 202-218
- [15] Mao H, Sun S, Yao J, Wang C, Yu S, Xu C, Li X, Zhang Q. Zhang. Linking differential domain functions of the GS3 protein to natural variation of grain size in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(45): 19579-19584
- [16] Kan Y, Mu X R, Zhang H, Gao J, Shan J X, Ye W W, Lin H X. *TT2* controls rice thermotolerance through SCT1-dependent alteration of wax biosynthesis. *Nature Plants*, 2022, 8(1): 53-67
- [17] 王化敦, 张鹏, 马鸿翔. 植物氮素吸收利用相关 NPF 基因家族研究进展. *植物营养与肥料学报*, 2022, 28: 1520-1534.
- Wang H D, Zhang P, Ma H X. Research advances on NPF gene families in plant nitrogen uptake and utilization. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*. 2022, 28: 1520-1534
- [18] L'éran S, Varala K, Boyer J C, Chiurazzi M, Crawford N, Daniel-Vedele F, David L, Dickstein R, Fernandez E, Forde B, Gassmann W, Geiger D, Gojon A, Gong J M, Halkier B A, Harris J M, Hedrich R, Limami A M, Rentsch D, Seo M, Tsay Y F, Zhang M, Coruzzi G, Lacombe B. A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(1): 5-9
- [19] Xia X, Fan X, Wei J, Feng H, Qu H, Xie D, Miller A J, Xu G. Rice nitrate transporter OsNPF2.4 functions in low-affinity acquisition and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(1): 317-331
- [20] Wang J, Wan R, Nie H, Xue S, Fang Z. *OsNPF5.16*, a nitrate transporter gene with natural variation, is essential for rice growth and yield. *ScienceDirect*, 2022, 10: 397-406
- [21] Tang W, Ye J, Yao X, Zhao P, Xuan W, Tian Y, Zhang Y, Xu S, An H, Chen G, Yu J, Wu W, Ge Y, Liu X, Li J, Zhang H, Zhao Y, Yang B, Jiang X, Peng C, Zhou C, Terzaghi W, Wang C, Wan J. Genome-wide associated study identifies NAC42-activated nitrate transporter conferring high nitrogen use efficiency in rice. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5279
- [22] Wang W, Hu B, Yuan D, Liu Y, Che R, Hu Y, Ou S, Liu Y, Zhang Z, Wang H, Li H, Jiang Z, Zhang Z, Gao X, Qiu Y, Meng X, Liu Y, Bai Y, Liang Y, Wang Y, Zhang L, Li L, Sodmergen, Jing H, Li J, Chu C. Expression of the nitrate transporter gene *OsNRT1.1A/OsNPF6.3* confers high yield and early maturation in rice. *The Plant Cell*, 2018, 30(3): 638-651
- [23] Hu B, Wang W, Ou S, Tang J, Li H, Che R, Zhang Z, Chai X, Wang H, Wang Y, Liang C, Liu L, Piao Z, Deng Q, Deng K, Xu C, Liang Y, Zhang L, Li L, Chu C. Variation in *NRT1.1B* contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nature Genetics*, 2015, 47(7): 834-838
- [24] Huang W, Nie H, Feng F, Wang J, Lu K, Fang Z. Altered expression of *OsNPF7.1* and *OsNPF7.4* differentially regulates tillering and grain yield in rice. *Plant science : An International Journal of Experimental Plant Biology*, 2019, 283: 23-31
- [25] Wang J, Lu K, Nie H, Zeng Q, Wu B, Qian J, Fang Z. Rice nitrate transporter *OsNPF7.2* positively regulates tiller number and grain yield. *Rice*, 2018, 11(1): 12
- [26] Huang W, Bai G, Wang J, Zhu W, Zeng Q, Lu K, Sun S, Fang Z. Two Splicing Variants of *OsNPF7.7* regulate shoot branching and nitrogen utilization efficiency in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 300
- [27] Xu H, Zhao M, Zhang Q, Xu Z, Xu Q. The *DENSE AND ERECT PANICLE 1 (DEP1)* gene offering the potential in the breeding of high-yielding rice. *Breeding Science*, 2016, 66(5): 659-667
- [28] 费澄, 徐正进, 徐铨. 植物异三聚体 G 蛋白调控系统研究进展. *科学通报*, 2016, 61(34): 3661-3671
- Fei C, Xu Z J, Xu Q. Heterotrimeric G protein signaling in plant (in Chinese). *China Science Press*, 2016, 61(34): 3661 - 3671

- [29] Xu Q, Zhao M, Wu K, Fu X, Liu Q. Emerging insights into heterotrimeric G protein signaling in plants. *Journal of Genetics and Genomics*, 2016, 43(8): 495-502
- [30] 李芳兰, 罗成科, 路旭平, 田蕾, 李培富. 水稻耐碱生理和遗传机制研究现状与展望. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(2): 283-292
- Li F L, Luo C K, Lu X P, Tian L, Li P F. Current status and prospect of research on physiology and genetic mechanism of alkali tolerance in rice. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(2): 283-292
- [31] Takano K N, Jiang H, Kubo T, Sweeney M, Matsumoto T, Kanamori H, Padhukasahasram B, Bustamante C, Yoshimura A, Doi K, McCouch S. Evolutionary history of *GS3*, a gene conferring grain length in rice. *Genetics*, 2009, 182(4): 1323-1334

