

• 农业生物技术 •

OsSTP1 介导蔗糖分配调控水稻氮响应

胡圣磊, 刘冬, 郭宝, 李虹烨, 朱启东, 张振华*

湖南农业大学 资源学院, 湖南 长沙 410128

胡圣磊, 刘冬, 郭宝, 李虹烨, 朱启东, 张振华. OsSTP1 介导蔗糖分配调控水稻氮响应[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3500-3514.

HU Shenglei, LIU Dong, GUO Bao, LI Hongye, ZHU Qidong, ZHANG Zhenhua. OsSTP1 mediates sucrose allocation to regulate rice responses to different nitrogen supply levels[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3500-3514.

摘要: 提高水稻氮肥的利用效率是增加产量的有效途径, 而维持碳氮平衡是促进水稻正常生长发育的保障。为探究蔗糖转运蛋白 OsSTP1 对水稻氮素吸收的影响, 本研究以野生型 TB309 为背景材料, 构建了蔗糖转运蛋白 *OsSTP1* 的过表达转基因株系 *OsSTP1-OE1*、*OsSTP1-OE2* 和突变体转基因株系 *osstp1-1*、*osstp1-2*。采用水培试验, 设置不供氮(free nitrogen, FN, 0 mg/L)、低氮(low nitrogen, LN, 10 mg/L)、正常氮(normal nitrogen, NN, 40 mg/L)和高氮(high nitrogen, HN, 80 mg/L)四个供氮水平, 研究各株系苗期对不同供氮水平的响应。结果发现, 相对于野生型和突变体, *OsSTP1* 过表达材料在低氮水平下, 生物量、根长、株高显著增加, 叶片可溶性糖含量显著降低, 而根部的可溶性糖含量显著增加。表明其叶片光合作用产生的可溶性糖通过韧皮部转运到根系中, 从而促进根系的生长来吸收更多的氮素促进地上部生物量增加。本研究证明水稻糖转运蛋白基因 *OsSTP1* 通过影响水稻碳水化合物在源库端的长距离运输来促进水稻的根系生长, 最终影响水稻对氮素的吸收与积累, 提高了水稻氮素利用率, 为氮肥减施提供了参考。

关键词: 水稻; *OsSTP1* 基因; 蔗糖; 氮素; 生物量

OsSTP1 mediates sucrose allocation to regulate rice responses to different nitrogen supply levels

HU Shenglei, LIU Dong, GUO Bao, LI Hongye, ZHU Qidong, ZHANG Zhenhua*

College of Resources, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: Improving the nitrogen use efficiency is an effective way to increase the yield of rice, and maintaining carbon-nitrogen balance is essential for the normal growth and development of

资助项目: 湖南省重点研发计划(2022NK2009)

This work was supported by the Key Research and Development Project of Hunan Province (2022NK2009).

*Corresponding author. E-mail: zhzh1468@163.com

Received: 2023-12-12; Accepted: 2024-04-10; Published online: 2024-05-21

rice. To investigate the impact of the sucrose transporter protein *OsSTP1* on nitrogen absorption in rice, in this study, we constructed transgenic lines overexpressing the sucrose transporter gene *OsSTP1* (*OsSTP1-OE1*, *OsSTP1-OE2*) and mutant transgenic lines (*osstp1-1*, *osstp1-2*) from the wild type TB309. Further, we conducted a hydroponic experiment with four nitrogen supply levels of free nitrogen (FN, 0 mg/L), low nitrogen (LN, 10 mg/L), normal nitrogen (NN, 40 mg/L), and high nitrogen (HN, 80 mg/L) to study the responses of each line to different nitrogen supply levels during the seedling stage. The results showed that compared with the wild type and mutant lines in the LN group, the *OsSTP1*-overexpressing lines exhibited significantly increased biomass, root length, and plant height, decreased soluble sugar content in the leaves, and increased soluble sugar content in the roots. The results indicate that the soluble sugars produced by leaf photosynthesis are transported to the roots through the phloem to promote root growth and nitrogen uptake, thus increasing the aboveground biomass. This study has identified that *OsSTP1* can affect the long-distance transport of carbohydrates from source to sink to promote root growth, ultimately influencing rice's absorption and accumulation of nitrogen, improving nitrogen use efficiency and providing reference for reducing nitrogen fertilizer application.

Keywords: rice; *OsSTP1*; sucrose; nitrogen; biomass

氮素(N)是植物生长必需的大量营养元素之一,是限制作物生长发育及产量形成的关键因子^[1-2]。氮肥施用促进了作物产量提高,然而作物氮素利用效率(nitrogen use efficiency, NUE)却随着氮肥施用水平的增加呈逐渐降低的趋势。氮肥过量施用不仅增加了生产成本,而且会引发水源污染、土壤酸化、大气层破坏等一系列环境问题,也限制作物产量的稳定增长^[3]。因此,减少氮肥施用量,提高作物的氮素利用效率已成为解决全球粮食安全、环境退化和气候恶化三重挑战的焦点研究课题^[4-6]。

植物单糖转运体(monosaccharide transporter, MST)介导一系列单糖,包括葡萄糖、果糖、麦芽糖、糖醇等的跨膜转运。自从绿藻中分离出首个单糖转运体基因以来,单子叶植物和双子叶植物中大量的 MST 同源基因已经陆续被成功克隆^[7]。拟南芥基因组中含有 53 个 MST 基因,根据蛋白序列特征分为 7 个亚家族:糖转运体(sugar transporter protein, STP),早期干旱胁迫响应类蛋白(early-responsive to dehydration

six-like, ERDL),液泡葡萄糖转运体(vacuolar glucose transporter, VGT),线性多元醇转运体(linear polyol transporters, formerly PLT),肌糖转运体(inositol or cyclic polyol transporters, INT),液泡膜单糖转运体(tonoplast monosaccharide transporters, TMT),质体葡萄糖转运体(plastidic glucose transporter, pGlucT)。大多数单糖转运体都具有 12 个跨膜的结构域,由位于第 6 螺旋和第 7 螺旋之间的 1 个细胞质环隔开^[8-9]。水稻基因组编码 64 个单糖转运体,也分属和拟南芥相似的 7 个亚家族,多具有转运功能的跨膜结构域。水稻 MST 家族中研究较多的为 STP 基因,目前已有 7 个 STP 基因被报道,分别是 *OsSTP1*、*OsSTP2*、*OsSTP3*、*OsSTP4*、*OsSTP5*、*OsSTP6* 和 *OsSTP15*^[10-12]。

碳同化与氮素吸收利用的过程紧密偶联,对作物生长发育和产量形成至关重要,作物碳-氮代谢协同是作物实现高产的基础^[13]。碳氮代谢产物在组织器官、细胞和源库之间的合理转运和分配既保证了各调控途径的协调,也促进

整个植株在感知外界环境信号上各部分间的正常交流^[14]。拟南芥及苹果中均已发现糖转运蛋白可通过调控糖转运及代谢影响植物的氮素利用率^[15-16]。目前已有研究表明硝态氮(NO_3^-)是土壤中氮素资源的主要形式,且可以被多数谷物类作物吸收^[17-18]。从发生过程来看,首先是根系将硝态氮从土壤吸收至体内将其同化为铵,再经过木质部导管转运至地上部^[19]。此外,源器官通过光合作用产生的碳水化合物会转运至根系、籽粒等库器官以维持其生长发育^[20]。蔗糖是源库间长距离运输的主要同化产物^[21-22],在生殖生长阶段,氮素缺乏会造成植物源器官中向籽粒转运的蔗糖量大幅度减少^[23],而在营养生长阶段,低氮胁迫早期地上部向根系转运的蔗糖量多于正常氮素水平,因此限制地上部生长,促进根系生长,从而导致根冠比增大^[24]。

本课题组前期研究表明,OsSTP1为蔗糖转运蛋白,其参与蔗糖的长距离运输^[25]。本研究通过分析水稻OsSTP1不同遗传材料在不同氮水平下幼苗光合特性、叶片和根系中碳水化合物含量动态变化和氮素利用效率差异等,以期为提高水稻氮素利用率积累有价值的信息。

1 材料与amp;方法

1.1 供试材料

供试材料为‘TB309’和以其为背景通过35S启动子构建的过表达材料(OsSTP1-OE1和OsSTP1-OE2)以及运用CRISPR-Cas9系统构建的突变体材料(osstp1-1和osstp1-2)。本研究使用的遗传材料均为T2代。

1.2 培养方法

水稻种子在水中泡至露白后,开始催芽。培养14d左右至三叶一心形态时移植到装有营养液的盆中,每盆种3株。水稻幼苗于室内温室,在白天27℃/夜间22℃、湿度60%–70%条

件下进行培养,除氮素以 Ca_2NO_3 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源设置不同浓度外,其他元素与国际水稻所营养液配方(Yoshidaetal)一致,每3d更换1次营养液,移苗后第一次使用1/2营养液,之后使用全量营养液,每天调pH值在5.5–5.7之间,每3d更换1次营养液。结合前人研究和本课题组前期在水稻苗期进行的不同氮水平实验,本研究设置了4种供氮处理,包括不供氮FN(0mg/L)、低氮LN(10mg/L)、中氮NN(40mg/L)和高氮HN(80mg/L),每个处理3次重复,每个重复2盆。培养60d后取样分析。

1.3 实时荧光定量PCR

水稻样本总RNA提取参考Trizol法进行^[26],以OsSTP1基因mRNA序列为模板设计特征引物,进行cDNA合成与基因qRT-PCR表达分析。反应体系共20μL(含1μL100ng/μLcDNA、10μLSYBRGreenqPCR SuperMix-UDG with ROX试剂和0.4μL浓度为10μmol/L的正、反向引物),使用实时荧光定量PCR仪(赛默飞世尔科技有限公司)应用生物系统进行实时荧光定量(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析。

1.4 植株可溶性糖和淀粉的测定

称量细粉约0.1g置于10mL离心管内,加入3mL80%乙醇,80℃水浴10min,冷却后3000×g离心10min,收集上清液于新的10mL离心管中;于残渣中再加入2mL80%乙醇,80℃水浴10min。重复抽提2次,合并3次上清至总体积6mL。上清液中加入适量活性炭,80℃水浴脱色30min,充分混匀后静置5min(或冷却后4℃过夜处理),8000×g离心15min。取1mL上清液于1.5mL离心管中。取200μL提取液加入到1.5mL离心管中,加入800μL蒽酮浓硫酸溶液,充分混匀,沸水浴10min,冷却后取200μL到酶标板中,在620nm下测

定吸光值。并根据已绘制的葡萄糖标准曲线计算样品可溶性糖含量。

待提取可溶性糖后剩余沉淀中的乙醇挥发干净,加入 5 mL 水煮沸 15 min,冷却后,加入 0.5 mL 的 9.2 mol/L 的高氯酸,最后加蒸馏水定容至 10 mL,混匀,3 000×g 离心 10 min,根据不同的淀粉浓度进行稀释,并与蒽酮硫酸反应,煮沸 10 min。取 200 μL 分装到酶标板 3 个孔中,蒽酮硫酸作为对照,于 620 nm 处测定吸光值。根据样品的 *OD* 值和葡萄糖标准曲线公式,计算每个样品淀粉含量。

1.5 植株蔗糖含量的测定

取 50 mL 具塞刻度比色管 10 支,分别加入 1 mL 不同质量浓度的标准蔗糖溶液,各加入 1.0 mL 2 mol/L NaOH,沸水浴 10 min,立即冷却,再加入 8 mL 1%间苯二酚及 25 mL 10 mol/L HCl 摇匀。70 °C 水浴反应 8 min,冷却至室温,用水定容至 50 mL。在 510 nm 处测定 *OD* 值,以空白调零。绘制成蔗糖质量浓度 *OD* 值曲线。

伤流液中蔗糖含量测定:取伤流液或可溶性糖上清液 1 mL,按上述步骤进行蔗糖含量的测定,读取 *OD* 值,从标准曲线得到伤流液蔗糖含量 *C*,然后再行计算样品中的蔗糖含量。蔗糖含量(mg/g)= $C \times 50 \times n \div m$,*n*:分取倍数(总溶液与测定吸取溶液比值),*m*:提取伤流液植株干重。

1.6 植株氮含量的测定

取样后,将表面的杂质擦拭干净。105 °C 杀青 30 min 后 65 °C 烘干,把烘干至恒重的地上部及根系组织研磨成粉末状。地上部和地下部分别取 0.4 g 和 0.1 g,置于 75 mL 三角瓶底部,加入 5 mL 浓硫酸充分摇匀分解过夜。每组做 3 个空白试验,即只加 5 mL 浓盐酸,每组做 2 个标样;第 2 天,分 2 次加入 4 mL H₂O₂,每次加完后摇匀,置于电热板上加热,温度为

270 °C;期间小心拿起消煮管晃动,若底部不再产生密集的小气泡,取下消煮管在通风橱晾凉,悬空再次加入 2 mL H₂O₂,反复直到溶液清亮,再次加入 2 mL H₂O₂,电热板温度由 270 °C 升至 320 °C 加热 10 min,即消煮完全。加去离子水定容至 75 mL,颠倒混匀。准确吸取消煮液 5 mL,放入蒸馏管,加入 10 mL 的 30% NaOH (过量),置于凯氏定氮仪中(上海丘禾仪器仪表有限公司)。准备 150 mL 三角瓶,用去离子水清洗干净,加入 10 mL 2%硼酸及 2-3 滴混合指示剂,置于冷凝管出口处,收集蒸馏出的 NH₃。用标准 H₂SO₄ 滴定馏出液,当液体颜色由蓝绿色变为紫红色时记录所用标准溶液的体积。氮浓度=($V-V_0$)× $C \times 0.014 \times n \div W$,*V*:滴定体积,*V*₀:空白体积,*C*:标准 H₂SO₄ 浓度,*n*:分取倍数,*W*:消煮质量。

1.7 植株 SPAD 值的测定及根系特征的测定

光照 3 h 后,采用 SPAD-502 仪测定完全展开叶土壤和植物分析仪开发(soil and plant analyzer development, SPAD)值。用尺子量根系的最长根长。

1.8 数据处理与分析

数据使用 Origin 8.5 和 GraphPad Prism 8 进行统计分析。差异显著性用数据处理系统(date processing system, DPS)进行检验。图表中数据表示为平均值±标准误($\bar{x} \pm s$),显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同材料在不同氮水平下光合作用、生物量和根系的形态特征

在 4 个氮水平处理下,OsSTP1 过表达材料总干重和根干重相较于野生型(wild type, WT)和 *osstp1* 突变体材料不同程度增加。在 LN 和 HN 处理下, *osstp1* 突变体材料总干重和根干重

相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料均不同程度降低($P<0.05$, 表 1)。在 4 个氮水平处理下, *OsSTP1* 过表达材料株高和根长相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料不同程度增加, *osstp1* 突变体材料株高和根长相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料不同程度降低($P<0.05$, 表 2)。在 LN 处理下, *OsSTP1* 过表达材料根冠比相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料不同程度降低($P<0.05$, 表 2)。在 4 个氮水平处理下, *OsSTP1* 过表达材料 SPAD 值相较于 WT 野生型

和 *osstp1* 突变体材料不同程度增加, *osstp1* 突变体材料 SPAD 值相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料不同程度降低($P<0.05$, 表 3)。不同氮处理下, *OsSTP1* 过表达材料长势均优于野生型, *OsSTP1* 突变体材料长势均劣于野生型(图 1)。

2.2 不同材料在不同氮水平下可溶性糖累积量的变化特征

在 FN、LN、HN 处理下, *OsSTP1* 过表达材料水稻叶片中可溶性糖含量相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料不同程度降低。在 4 个

表 1 不同材料在不同氮水平下的总干重、根干重

Table 1 Total dry weight, root dry weight of different materials at different nitrogen levels

	Rice lines	FN	LN	NN	HN
Total dry weight (g)	<i>OsSTP1OE2</i>	0.071±0.007gh	0.210±0.014bc	0.258±0.017a	0.201±0.009cd
	<i>OsSTP1OE1</i>	0.064±0.009ghi	0.199±0.017cd	0.245±0.019ab	0.199±0.026cd
	WT	0.064±0.007i	0.112±0.009f	0.181±0.013de	0.153±0.011e
	<i>osstp1-1</i>	0.038±0.003i	0.056±0.016hi	0.157±0.005e	0.098±0.023fg
	<i>osstp1-2</i>	0.038±0.009hi	0.067±0.021ghi	0.162±0.013e	0.092±0.012fg
Root dry weight (g)	<i>OsSTP1OE2</i>	0.021±0.003cdef	0.030±0.003ab	0.028±0.003bc	0.026±0.003bcde
	<i>OsSTP1OE1</i>	0.023±0.002bcde	0.030±0.001ab	0.038±0.008a	0.027±0.001bcd
	WT	0.023±0.001bcde	0.023±0.001bcde	0.028±0.001bc	0.021±0.002cdef
	<i>osstp1-1</i>	0.020±0.004def	0.021±0.002cdef	0.023±0.002bcde	0.022±0.003cdef
	<i>osstp1-2</i>	0.018±0.002ef	0.020±0.002cdef	0.025±0.003bcde	0.016±0.004f

Different letters indicate significant differences between different treatments of the different materials ($P<0.05$), $n=5$.

表 2 不同材料在不同氮水平下的株高、根长、根冠比

Table 2 Plant height, root length, and root-to-shoot ratio of different materials at different nitrogen levels

	Rice lines	FN	LN	NN	HN
Plant height (cm)	<i>OsSTP1OE2</i>	25.350±2.770gh	49.033±6.265a	48.250±3.372abc	42.083±4.128cde
	<i>OsSTP1OE1</i>	25.983±1.680gh	51.083±3.308ab	47.416±3.800abc	44.250±3.921abc
	WT	19.516±1.524gh	35.750±0.935ef	43.916±2.616bcd	41.000±3.847cde
	<i>osstp1-1</i>	18.983±2.289h	31.916±0.970fg	34.416±4.030ef	32.833±3.251fg
	<i>osstp1-2</i>	19.000±1.517h	30.583±1.828fg	38.250±4.263def	34.666±2.658ef
Root length (cm)	<i>OsSTP1OE2</i>	30.750±1.782a	23.833±2.483bc	20.666±1.402cd	18.333±1.538def
	<i>OsSTP1OE1</i>	31.766±1.492a	24.583±2.577b	19.000±2.073def	17.583±1.563def
	WT	20.666±1.033cd	20.250±0.822cde	16.500±1.483efg	13.500±1.095hij
	<i>osstp1-1</i>	15.416±2.131fgh	14.750±0.880ghi	12.500±1.183ijk	10.250±2.525k
	<i>osstp1-2</i>	16.750±1.636efg	15.666±1.941fgh	11.333±0.983jk	10.750±1.666k
Root shoot ratio	<i>OsSTP1OE2</i>	0.226±0.027def	0.213±0.005ghi	0.241±0.007def	0.205±0.009i
	<i>OsSTP1OE1</i>	0.246±0.029cde	0.227±0.02def	0.244±0.008def	0.214±0.012fgh
	WT	0.295±0.014ab	0.235±0.018def	0.251±0.008cde	0.206±0.007ghi
	<i>osstp1-1</i>	0.206±0.026hi	0.265±0.017bcd	0.221±0.006efg	0.240±0.018def
	<i>osstp1-2</i>	0.284±0.019bc	0.323±0.026a	0.259±0.013cde	0.242±0.01def

Different letters indicate significant differences between different treatments of the different materials ($P<0.05$), $n=5$.

表 3 不同材料在不同氮水平下的 SPAD 值

Table 3 SPAD values of different materials at different nitrogen levels

Rice lines	SPAD values			
	FN	LN	NN	HN
<i>OsSTP1OE2</i>	14.03±4.26g	35.98±2.57cde	39.58±1.58ab	37.74±2.29abc
<i>OsSTP1OE1</i>	13.24±2.46gh	35.92±2.68def	39.25±1.68a	38.87±3.54abc
WT	9.87±2.82hi	35.28±2.11def	36.86±3.16abc	35.02±2.84def
<i>osstp1-1</i>	10.33±3.09hi	34.26±2.48ef	37.45±1.88abc	35.74±3.45def
<i>osstp1-2</i>	8.95±2.27i	33.63±1.95f	36.52±3.44bcd	33.39±2.75f

Different letters indicate significant differences between different treatments of the different materials ($P < 0.05$), $n = 5$.

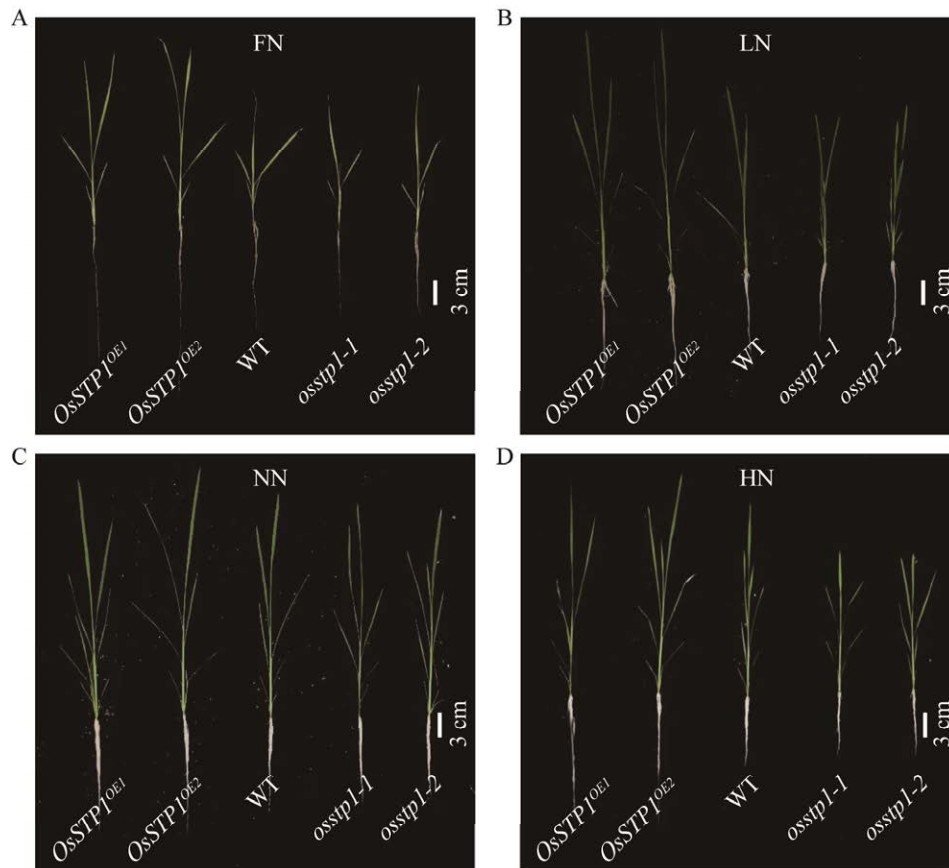


图 1 不同材料在不同氮水平下的形态特征 A: FN (不供氮)处理下表型. B: LN (低氮)处理下表型. C: NN (中氮)处理下表型. D: HN (高氮)处理下表型

Figure 1 Morphological characteristics of different materials at different nitrogen levels. A: FN (free nitrogen) treated phenotype. B: LN (low nitrogen) treated phenotype. C: NN (normal nitrogen) treated phenotype. D: HN (high nitrogen) treated phenotype.

氮水平处理下, *osstp1* 突变体材料后叶片中可溶性糖含量相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料显著升高($P < 0.05$, 图 2A)。在 LN、NN、HN 处理下, *OsSTP1* 过表达材料根系中可溶性

糖含量相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料显著升高, 在 FN、LN、HN 处理下, *osstp1* 突变体材料根系中可溶性糖含量相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达不同程度降低($P < 0.05$, 图 2B)。

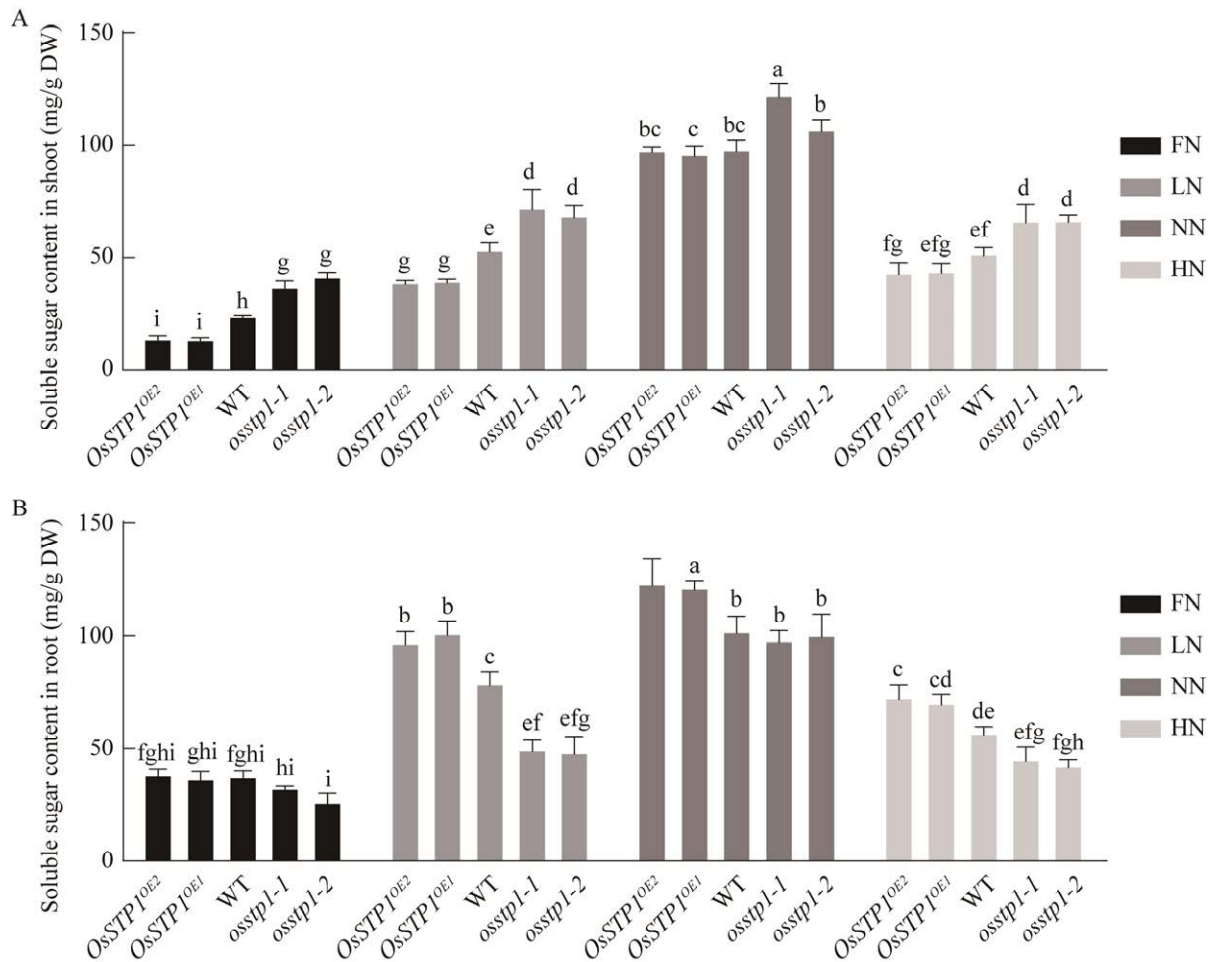


图2 不同材料在不同氮水平下可溶性糖积累量的变化 A: 叶片可溶性糖积累量. B: 根系可溶性糖积累量. FN: 不供氮; LN: 低氮; NN: 中氮; HN: 高氮. 柱子上不同字母表示不同材料不同处理之间存在显著性差异($P<0.05$), $n=5$

Figure 2 Changes of soluble sugar accumulation of different materials at different nitrogen levels. A: Soluble sugar accumulation in shoot. B: Soluble sugar accumulation in root. FN: Free nitrogen; LN: Low nitrogen; NN: Normal nitrogen; HN: High nitrogen. Different letters above bars indicate significant differences between different treatments of the different materials ($P<0.05$), $n=5$.

2.3 不同材料在不同氮水平下叶片和根系中淀粉积累量的变化

在LN和NN处理下, *OsSTP1* 过表达材料叶片中淀粉含量相较于野生型WT和*osstp1*突变体材料不同程度降低, *osstp1*突变体材料水稻叶片中淀粉含量相较于WT野生型和*OsSTP1*过表达材料不同程度升高($P<0.05$, 图3A)。在FN、LN、NN处理下, *OsSTP1*过表达材料根

系中淀粉含量相较于WT野生型和*osstp1*突变体材料不同程度升高, 在4个氮处理下, *osstp1*突变体材料根系中淀粉含量相较于*OsSTP1*过表达材料不同程度降低($P<0.05$, 图3B)。

2.4 不同材料在不同氮水平下叶片和根系中蔗糖积累量的变化

在LN、NN、HN处理下, *OsSTP1*过表达材料叶片中蔗糖含量相较于WT野生型和

osstp1 突变体材料不同程度降低, 在 NN 处理下, *osstp1* 突变体材料叶片中蔗糖含量相较于野生型材料上升, 在 LN、NN、HN 处理下, *osstp1* 突变体材料叶片中蔗糖含量相较于 *OsSTP1* 过表达材料不同程度上升 ($P < 0.05$, 图 4A)。在 LN、NN、HN 处理下, *OsSTP1* 过表达材料根系中蔗糖含量相较于野生型和 *osstp1* 突变体显著升高。在 LN 和 HN 处理下, *osstp1* 突变体材料根系中蔗糖含量相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过

表达材料下降 ($P < 0.05$, 图 4B)。

2.5 不同材料在不同氮水平下韧皮部伤流液中蔗糖累积量的变化

在 LN 和 NN 处理下, *OsSTP1* 过表达材料韧皮部伤流液蔗糖含量相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料不同程度上升。在 LN 和 NN 处理下, *osstp1* 突变体材料韧皮部伤流液蔗糖含量相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料不同程度下降 ($P < 0.05$, 表 4)。

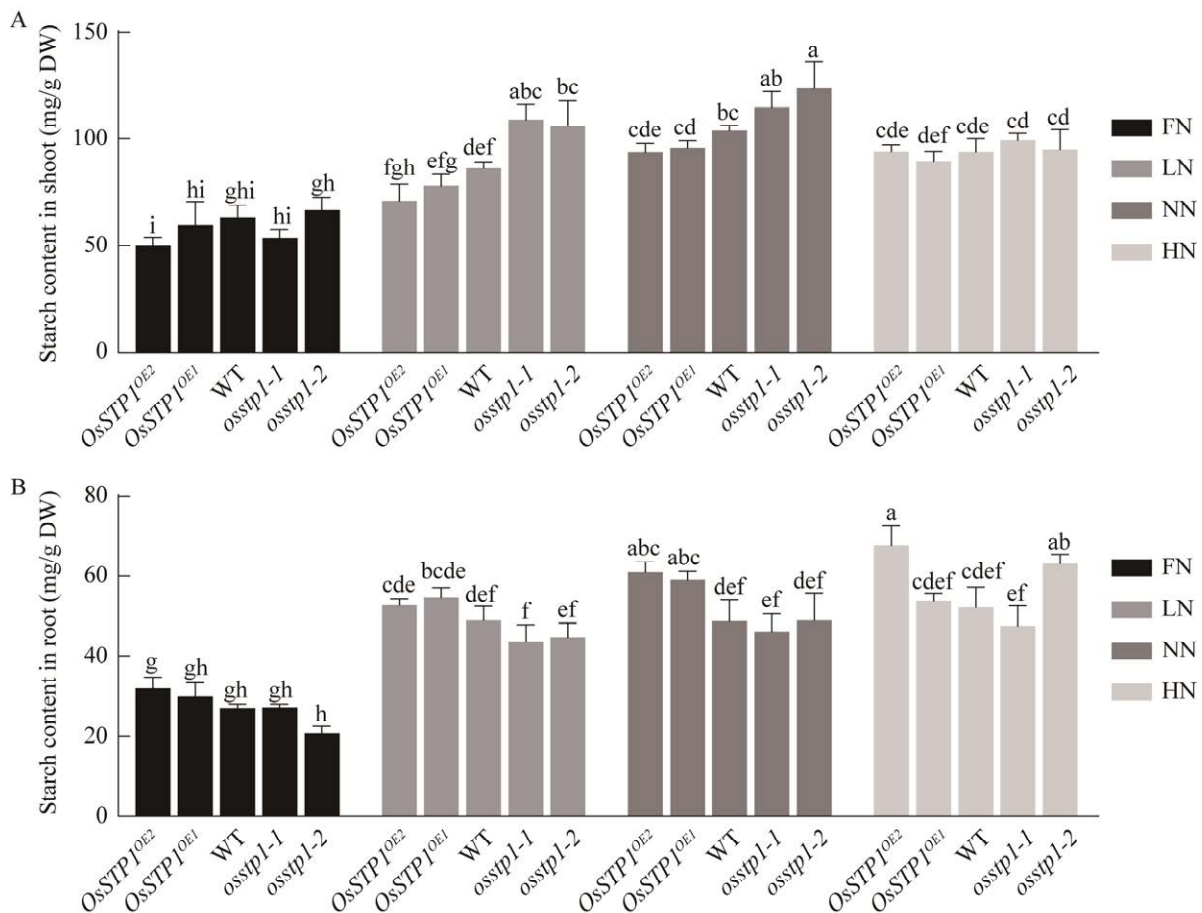


图 3 不同材料在不同氮水平下淀粉累积量的变化 A: 叶片淀粉累积量. B: 根系淀粉累积量. FN: 不供氮; LN: 低氮; NN: 中氮; HN: 高氮. 柱子上不同字母表示不同材料不同处理之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), $n=5$

Figure 3 Changes of starch accumulation of different materials at different nitrogen levels. A: Starch accumulation in shoot. B: Starch accumulation in root. FN: Free nitrogen; LN: Low nitrogen; NN: Normal nitrogen; HN: High nitrogen. Different letters above bars indicate significant differences between different treatments of the different materials ($P < 0.05$), $n=5$.

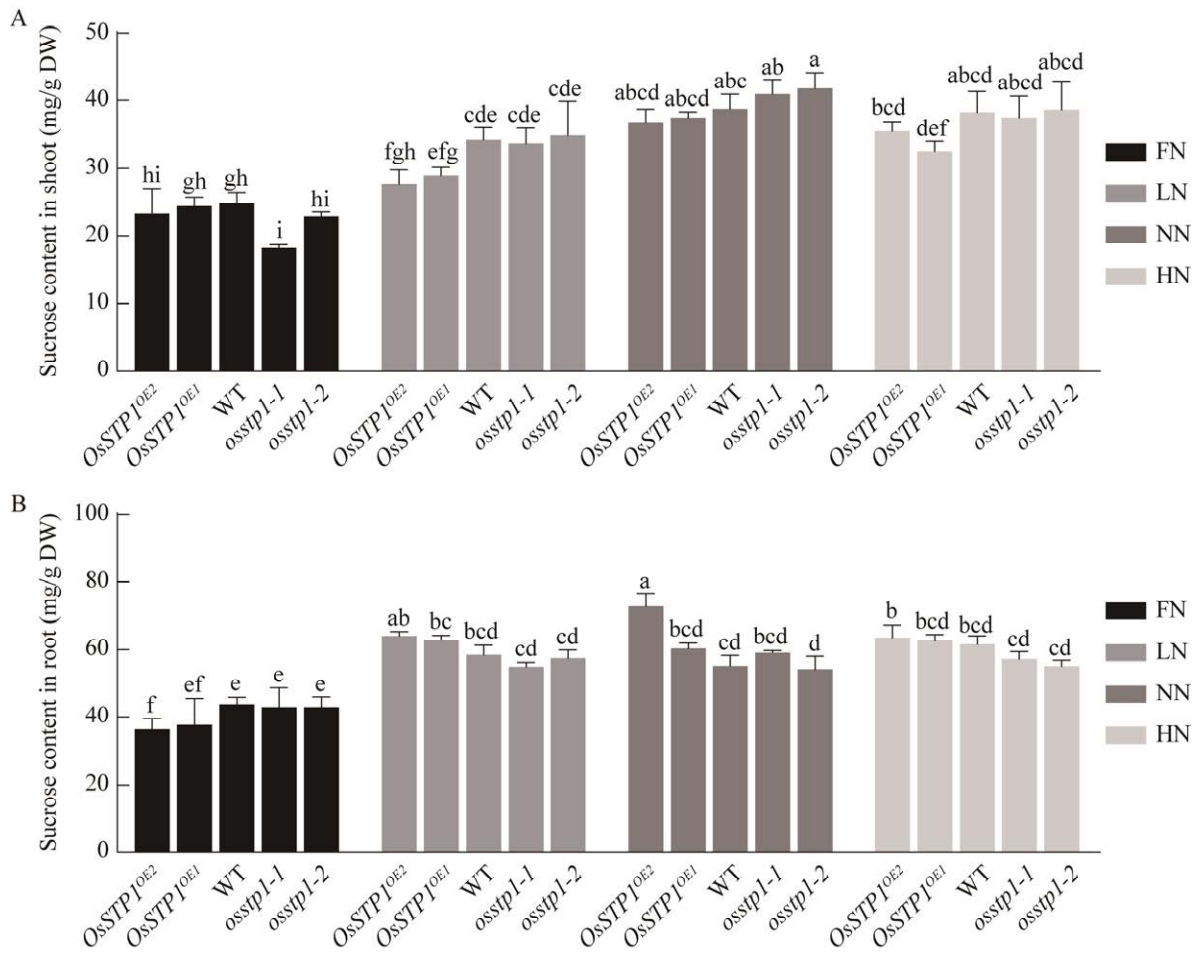


图4 不同材料在不同氮水平下蔗糖累积量的变化 A: 叶片蔗糖累积量. B: 根系蔗糖累积量. FN: 不供氮; LN: 低氮; NN: 中氮; HN: 高氮. 柱子上不同字母表示不同材料不同处理之间存在显著性差异 ($P < 0.05$), $n=5$

Figure 4 Changes of sucrose accumulation of different materials at different nitrogen levels. A: Sucrose accumulation in shoot. B: Sucrose accumulation in root. FN: Free nitrogen; LN: Low nitrogen; NN: Normal nitrogen; HN: High nitrogen. Different letters above bars indicate significant differences between different treatments of the different materials ($P < 0.05$), $n=5$.

表4 不同材料在不同氮水平下韧皮部伤流液中蔗糖含量的差异

Table 4 Difference of sucrose content in phloem bleeding fluid of different materials at different nitrogen levels

Rice lines	Sucrose content (mg/g)			
	FN	LN	NN	HN
OsSTP1 ^{OE2}	79.81±6.44a	66.01±2.74bcde	66.35±2.43bcde	68.81±1.65bcde
OsSTP1 ^{OE1}	69.34±1.03abcd	67.48±5.67bcde	64.65±1.34bcde	68.93±2.36bcde
WT	69.22±0.78abcd	61.84±3.14cde	65.29±2.54bcde	73.63±0.94ab
<i>osstp1-1</i>	72.63±0.5abc	59.73±0.88e	63.12±0.69bcde	69.20±0.73bcde
<i>osstp1-2</i>	69.03±0.97bcde	61.10±3.30de	62.77±0.36cde	66.75±3.46bcde

Different letters indicate significant differences between different treatments of the different materials ($P < 0.05$), $n=5$.

2.6 不同材料在不同氮水平下叶片蔗糖装载基因表达量的变化

在 LN 和 NN 水平下,叶片中 *OsSUT1* 的表达量在 *OsSTP1* 过表达材料中显著高于 WT 野生型,在 *osstp1* 突变体中表达量显著低于 WT 野生型材料(图 5A)。在 LN 水平下,叶片中 *OsSWEET14* 的表达量在 *OsSTP1* 过表达材料中显著高于 WT 野生型材料,在 *osstp1* 突变体叶片中表达量显著低于 WT 野生型材料,NN 和

HN 水平下无显著差异($P<0.05$, 图 5B)。

2.7 不同材料在不同氮水平下氮素累积量和氮素利用率的差异

在 LN 和 NN 处理下, *OsSTP1* 过表达材料叶片中氮素累积量相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料不同程度升高, *osstp1* 突变体材料叶片中氮素累积量相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料不同程度降低($P<0.05$, 图 6A)。4 个氮水平处理下 *OsSTP1* 过表达材料根系中的

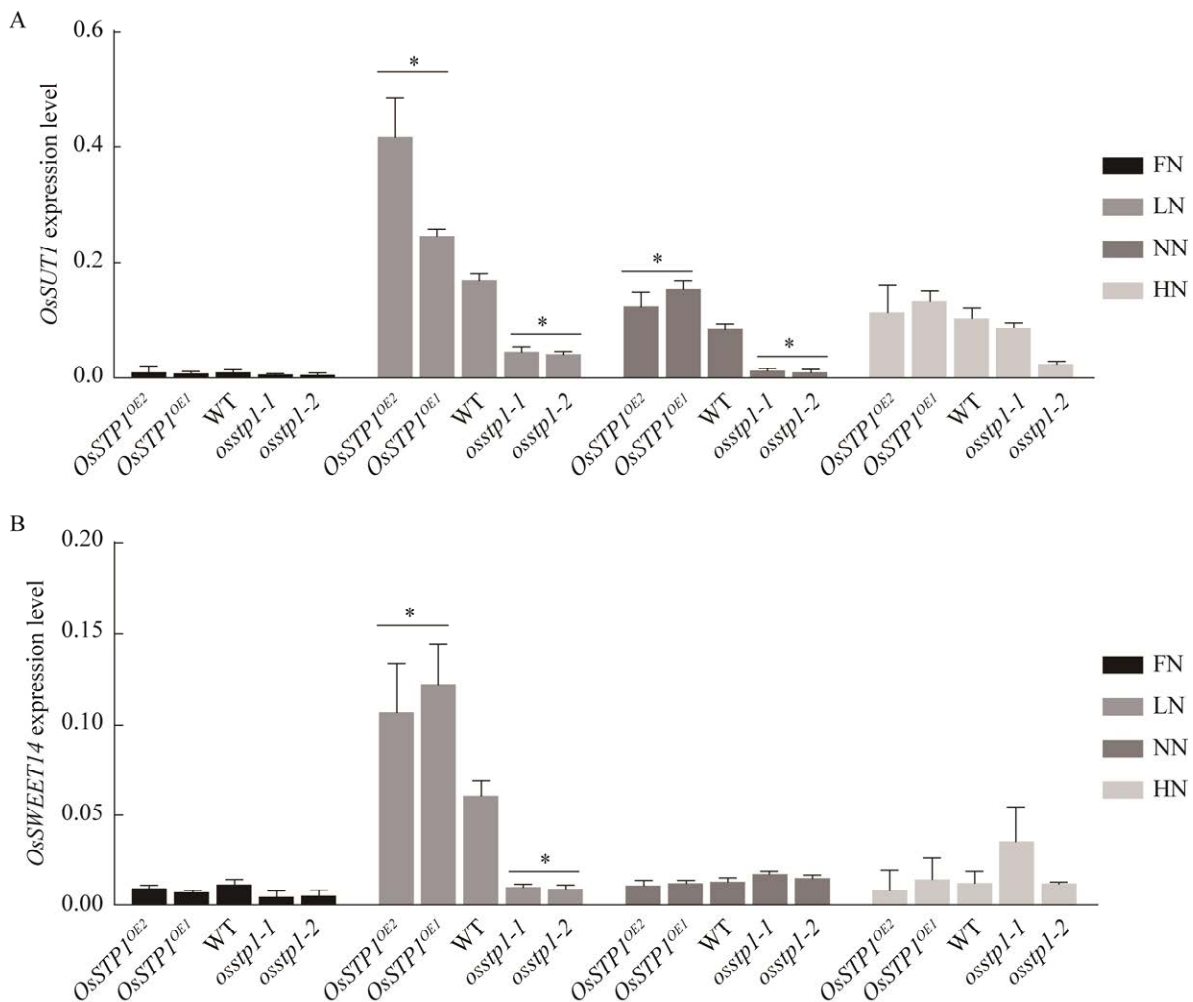


图 5 不同材料在不同氮水平下叶片蔗糖装载基因表达量的变化 A: *OsSUT1* 表达量. B: *OsSWEET14* 表达量. FN: 不供氮; LN: 低氮; NN: 中氮; HN: 高氮. *表示 $P<0.05$, $n=5$

Figure 5 The difference of sucrose loading genes expression levels of different materials at different nitrogen levels. A: Expression level of *OsSUT1*. B: Expression level of *OsSWEET14*. FN: Free nitrogen; LN: Low nitrogen; NN: Normal nitrogen; HN: High nitrogen. * indicates $P<0.05$, $n=5$.

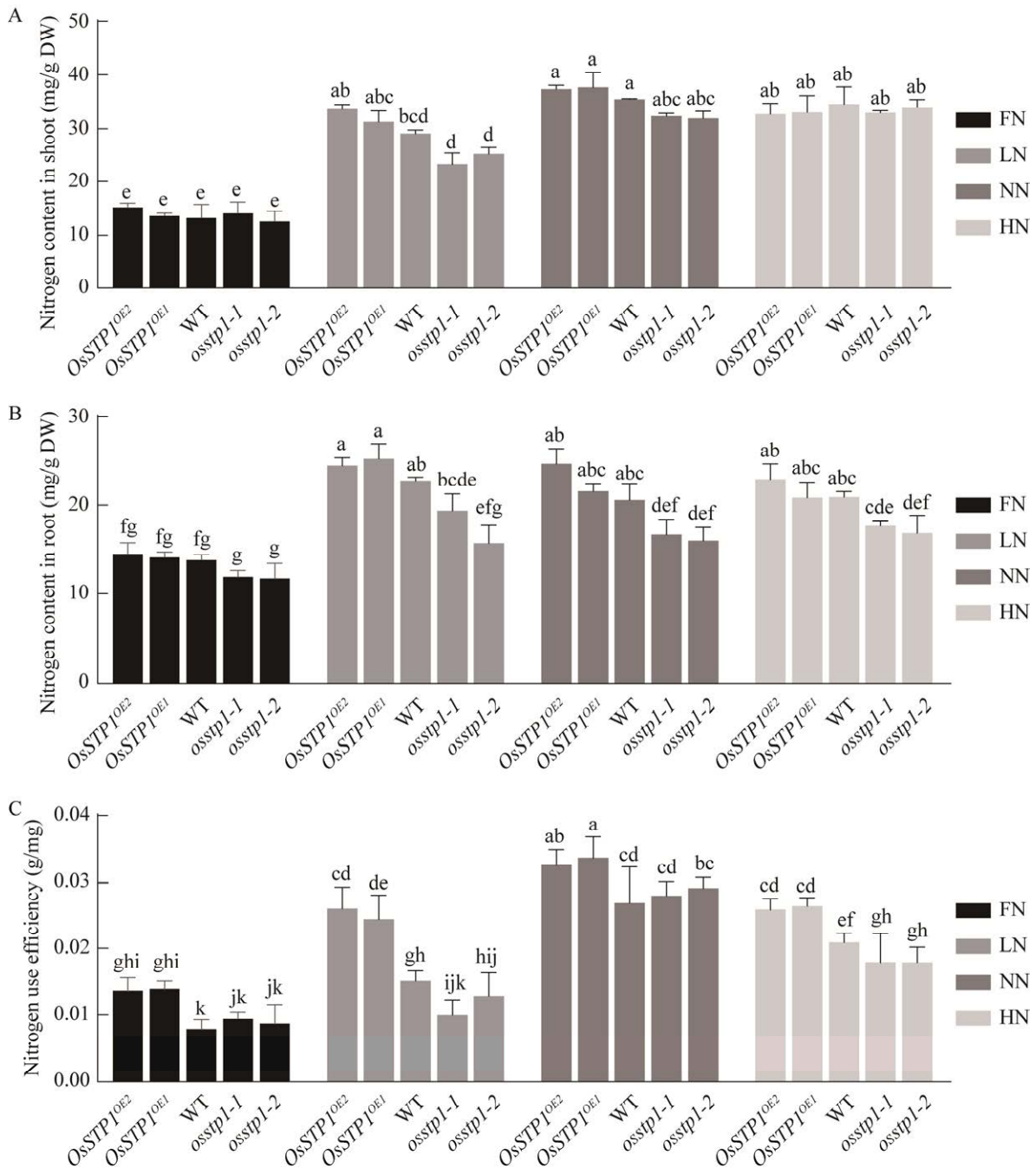


图 6 不同材料在不同氮水平下氮素积累量和氮素生理利用率的差异 A: 叶片氮素积累量. B: 根系氮素积累量. C: 氮素生理利用率. FN: 不供氮; LN: 低氮; NN: 中氮; HN: 高氮. 柱子上不同字母表示不同材料不同处理之间存在显著性差异($P < 0.05$), $n=5$

Figure 6 The difference of nitrogen accumulation and nitrogen physiological utilization efficiency of different materials at different nitrogen levels. A: Nitrogen accumulation in shoot. B: Nitrogen accumulation in root. C: Nitrogen physiological utilization efficiency. FN: Free nitrogen; LN: Low nitrogen; NN: Normal nitrogen; HN: High nitrogen. Different letters above bars indicate significant differences between different treatments of the different materials ($P < 0.05$), $n=5$.

氮素累积量相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料整体呈增加趋势, 4 个氮水平处理下 *osstp1* 突变体材料根系中氮素累积量相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料不同程度减少($P < 0.05$, 图 6B)。氮素生理利用率在 4 个氮水平处理下, *OsSTP1* 过表达材料相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料显著增加, 在 LN 和 HN 处理下, *osstp1* 突变体材料相较于野生型和 *OsSTP1* 过表达材料不同程度下降($P < 0.05$, 图 6C)。

3 讨论

3.1 过表达 *OsSTP1* 提高水稻氮素吸收和利用

氮素是植物根系、叶片、茎秆、花、籽粒等器官生长发育的重要调控因子, 氮素充足与否会对植物各组织或器官的生长发育、物质代谢及植株形态产生影响^[27]。本研究中, 在 LN 和 NN 处理下, *OsSTP1* 过表达材料叶片中氮含量相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料不同程度增加。*osstp1* 突变体材料叶片中氮含量相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料不同程度降低。同时, 在 4 个氮水平处理下, *OsSTP1* 过表达后株高显著增加。水稻苗期各处理间 SPAD 值无显著差异。但 *OsSTP1* 过表达后 SPAD 值相较于野生型均有升高的趋势。氮素是叶绿素及光合反应有关酶的重要成分, 当氮素匮乏时, 植物的叶片伸展速率迅速降低, 叶面积减小, 叶绿素合成受阻, 进而影响其光合速率和光合产物的形成^[28], 叶片衰老发生, 叶片表现出黄化现象^[29]。随着氮肥用量的增加, 叶面积指数和生物量呈递增的变化^[30-32]。本研究中, 在 4 个氮水平处理下, *OsSTP1* 过表达材料根长相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料均不同程度增加。*osstp1* 突变体材料根长相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料均不同程度降低。

在 FN 处理下, *OsSTP1* 过表达材料根冠比相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料显著降低, 在 LN 和 HN 处理下, *osstp1* 突变体材料根冠比相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料不同程度增加。氮素在植物根系生长、发育及形态建成, 特别是侧根发育过程中扮演重要角色, 而植物可以通过改变根冠比和根系构型来维持植物体内氮平衡。然而, 氮素对于根系具有双重作用, 在一定氮素浓度范围内, 根系的生物量、总根长、根表面积等性状随氮素水平的提高而增加, 从而增强了根系对氮素的吸收能力^[33], 而氮肥施用量过高则抑制根系生长^[34]。HN 处理下 5 种材料的氮素利用率相较于 NN 处理呈整体降低趋势, 由此可见, 如氮素供给不合理, 植物体内氮素吸收、同化以及转运等生理平衡会被打破, 从而影响植物的生长发育及产量的形成^[35]。综上, 在 4 个氮水平处理下过表达 *OsSTP1* 均不同程度提高水稻氮素的吸收和利用。

3.2 过表达 *OsSTP1* 促进水稻碳水化合物的分配

本研究中, 在 4 个氮水平处理下, *OsSTP1* 过表达材料根系中可溶性糖含量相较于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料不同程度升高, 在 FN、LN、HN 处理下, *osstp1* 突变体材料根系中可溶性糖含量相较于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料不同程度降低。叶片光合强度的增加, 或者库对同化产物需求的增加, 都能导致同化物从源到库转运速率的提高, 即源/库的增加都会在一定程度上改善流的状况。但源或库单方面的过度增加不一定有利于流的畅通, 即流的状况在很大程度上受源-库协调程度的影响, 协调的源-库可以减小同化物运输过程中的阻力, 提高同化物运输速度; 反之, 若源/库比过大, 则会降低维管束通畅程度, 增加同化物

运输的阻力,减小同化物的运输速度,另一方面,流的畅通状况也会影响源和库的活性。若水稻同化物运输受阻,同化物大量积聚在叶片中,则会大大降低叶片的同化能力^[36]。氮作为水稻生长过程中最重要的营养之一,氮的供应情况能够影响水稻植株源库流相关性状^[37]。当供氮量不足时(尤其是在营养生长期),叶面积指数下降过早,在籽粒灌浆时易产生源限制;当供氮量过大时,茎秆生物量过分增加,而籽粒产量增加有限,出现库限制(如穗粒数少)、库竟(如促进分蘖的形成)或源限制(如叶片形态发生变化,其长度、宽度和面积都明显增加,叶面积指数过高使植物叶片相互遮阴)等现象,随供氮水平提高,根冠比降低,促进禾谷类作物茎秆伸长,同时植株易倒伏,严重限制产量提高^[38]。综上所述,*OsSTP1* 过表达促进可溶性糖向根部的转运。

相较于野生型和突变体,*OsSTP1* 过表达后会导致地上部碳水化合物的减少,而地下部碳水化合物累积量增加,具体表现为可溶性糖、淀粉、蔗糖含量在不同部位的此消彼长,地下部根系中碳水化合物的累积保障根系的生长,地上部叶片光合作用产生的糖更多地通过韧皮部转运到地下部中以维持更好的根系形态。而*osstp1* 突变导致运输到根部的糖减少,影响根系的生长和发育。

4 结论

在 4 个氮水平下,与 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料相比,*OsSTP1* 过表达材料可将通过叶片光合作用产生的糖更多地转运到根系(地下部)中,从而使其具有相对于 WT 野生型和 *osstp1* 突变体材料更发达和更有活力的根系,发达的、有活力的根系可以从介质中吸收更多的氮素,并且从根系向地上部转运氮素的能力

更强。更多的氮素运输到地上部用于维持和促进地上部的生长,提高水稻氮素利用率。而 *osstp1* 突变体材料相对于 WT 野生型和 *OsSTP1* 过表达材料,表现出更小的根系和地上部生物量。因此,本研究明确了糖转运蛋白基因 *OsSTP* 过表达后能够提升水稻氮素利用率,为氮肥减施提供了参考。

REFERENCES

- [1] WANI SH, VIJAYAN R, CHOUDHARY M, KUMAR A, ZAID A, SINGH V, KUMAR P, YASIN JK. Nitrogen use efficiency (NUE): elucidated mechanisms, mapped genes and gene networks in maize (*Zea mays* L.)[J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2021, 27(12): 2875-2891.
- [2] BASHIR SS, SIDDIQI TO, KUMAR D, AHMAD A. Physio-biochemical, agronomical, and gene expression analysis reveals different responsive approach to low nitrogen in contrasting rice cultivars for nitrogen use efficiency[J]. *Molecular Biology Reports*, 2023, 50(2): 1575-1593.
- [3] 李佳佳, 徐翎清, 赵阳, 芮秀丽, 石俊婷, 刘大丽. 氮代谢参与植物低氮胁迫研究进展[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(27): 119-124.
LI JJ, XU LQ, ZHAO Y, RUI XL, SHI JT, LIU DL. Nitrogen metabolism involved in low nitrogen stress in plants: a review[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(27): 119-124 (in Chinese).
- [4] LYNCH JP. Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems[J]. *Annals of Botany*, 2013, 112(2): 347-357.
- [5] LANGHOLTZ M, DAVISON BH, JAGER HI, EATON L, BASKARAN LM, DAVIS M, BRANDT CC. Increased nitrogen use efficiency in crop production can provide economic and environmental benefits[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 758(3): 143602.
- [6] ZHANG X, DAVIDSON EA, MAUZERALL DL, SEARCHINGER TD, DUMAS P, SHEN Y. Managing nitrogen for sustainable development[J]. *Nature*, 2015, 528: 51-59.
- [7] DENG XL, AN BG, ZHONG H, YANG J, KONG WL, LI YS. A novel insight into functional divergence of

- the *MST* gene family in rice based on comprehensive expression patterns[J]. *Genes*, 2019, 10(3): 239.
- [8] JOHNSON DA, HILL JP, THOMAS MA. The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2006, 6: 64.
- [9] JOHNSON DA, THOMAS MA. The monosaccharide transporter gene family in *Arabidopsis* and rice: a history of duplications, adaptive evolution, and functional divergence[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(11): 2412-2423.
- [10] TOYOFUKU K, TAKEDA T, YAMAGUCHI J, KASAHARA M. Characterization and expression of rice monosaccharide transporter genes, *OsMST1-3*[J]. *Advance in Rice Genetics*, 2008, 409-411.
- [11] NGAMPANYA B, SOBOLEWSKA A, TAKEDA T, TOYOFUKU K, NARANGAJAVANA J, IKEDA A, YAMAGUCHI J. Characterization of rice functional monosaccharide transporter, *OsMST5*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, 67(3): 556-562.
- [12] WANG YQ, XIAO YG, ZHANG Y, CHAI CL, WEI G, WEI XL, XU HL, WANG M, OUWERKERK PBF, ZHU Z. Molecular cloning, functional characterization and expression analysis of a novel monosaccharide transporter gene *OsMST6* from rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Planta*, 2008, 228(4): 525-535.
- [13] WEI S, LI X, LU Z, ZHANG H, YE X, ZHOU Y, LI J, YAN Y, PEI H, DUAN F, WANG D, CHEN S, WANG P, ZHANG C, SHANG L, ZHOU Y, YAN P, ZHAO M, HUANG J, BOCK R, et al. A transcriptional regulator that boosts grain yields and shortens the growth duration of rice[J]. *Science*, 2022, 377 (6604).
- [14] GRIFFITHS CA, PAUL MJ, FOYER CH. Metabolite transport and associated sugar signalling systems underpinning source/sink interactions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2016, 1857(10): 1715-1725.
- [15] SCHOFIELD RA, BI YM, KANT S, ROTHSTEIN SJ. Over-expression of STP13, a hexose transporter, improves plant growth and nitrogen use in *Arabidopsis* thaliana seedlings[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2009, 32(3): 271-285.
- [16] TIAN X, ZOU H, XIAO Q, XIN H, ZHU L, LI Y, MA B, CUI N, RUAN Y-L, MA F, LI M. Uptake of glucose from the rhizosphere, mediated by apple MdHT1.2, regulates carbohydrate allocation[J]. *Plant Physiology* 2023, 193 (1): 410-425.
- [17] PAN JF, CUI KH, WEI D, HUANG JL, XIANG J, NIE LX. Relationships of non-structural carbohydrates accumulation and translocation with yield formation in rice recombinant inbred lines under two nitrogen levels[J]. *Physiologia Plantarum*, 2011, 141(4): 321-331.
- [18] 李姗, 沈成波. 调控作物硝态氮代谢和利用的研究进展[J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45(5): 848-855.
LI SHAN, SHEN CB. Research progress on regulation of nitrate metabolism and utilization in crops[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(5): 848-855 (in Chinese).
- [19] WANG H, XU ST, FAN YM, LIU NN, ZHAN W, LIU HJ, XIAO YJ, LI K, PAN QC, LI WQ, DENG M, LIU J, JIN M, YANG XH, LI JS, LI Q, YAN JB. Beyond pathways: genetic dissection of tocopherol content in maize kernels by combining linkage and association analyses[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(8): 1464-1475.
- [20] WEI MY, YUN F, LIU GS, SONG L. Response of photosynthetic characteristics and accumulation and distribution of assimilation products in tobacco to different light environments[J]. *The Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(1): 159-168.
- [21] 刘怡然, 吴正丹, 吴维泰, 杨朝彬, 陈才睿, 张凯. 甘薯蔗糖转运蛋白的功能分析[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(7): 2772-2793.
LIU YR, WU ZD, WU WT, YANG CB, CHEN CR, ZHANG K. Functional analysis on sucrose transporters in sweet potato[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(7): 2772-2793 (in Chinese).
- [22] NING P, YANG L, LI CJ, FRITSCHI FB. Post-silking carbon partitioning under nitrogen deficiency revealed sink limitation of grain yield in maize[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(7): 1707-1719.
- [23] SUN LL, SUI XL, LUCAS WJ, LI YX, FENG S, MA S, FAN JW, GAO LH, ZHANG ZX. Down-regulation of the sucrose transporter *CsSUT1* causes male sterility by altering carbohydrate supply[J]. *Plant Physiology*, 2019, 180(2): 986-997.
- [24] MCKINLEY BA, CASTO AL, ROONEY WL, MULLET JE. Developmental dynamics of stem starch

- accumulation in *Sorghum bicolor*[J]. Plant Direct, 2018, 2(8): e00074.
- [25] 张振华, 刘冬, 罗劲松. 水稻糖转运基因 *OsMST1* 及其糖转运体、应用和扩增引物: CN2202011371727.2.X[P]. 2022-02-25.
ZHANG ZH, LIU D, LUO JS. Gene *OsMST1* of rice sugar transporter and its sugar transporter, application and amplification primers: CN2202011371727.2.X[P]. 2022-02-25 (in Chinese).
- LUO JS, GU TY, YANG Y, ZHANG ZH. A non-secreted plant defensin AtPDF2.6 conferred cadmium tolerance via its chelation in *Arabidopsis*[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 100(4): 561-569.
- [27] HATFIELD JL, SAUER TJ, CRUSE RM. Soil: the forgotten piece of the water, food, energy nexus[J]. Advances in Agronomy, 2017, 143: 1-46.
- [28] CHEN QW, MU XH, CHEN FJ, YUAN LX, MI GH. Dynamic change of mineral nutrient content in different plant organs during the grain filling stage in maize grown under contrasting nitrogen supply[J]. European Journal of Agronomy, 2016, 80: 137-153.
- [29] LI XX, ZENG RS, LIAO H. Improving crop nutrient efficiency through root architecture modifications[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2016, 58(3): 193-202.
- [30] 睦晓蕾, 毛胜利, 王立浩, 李伟, 张宝玺, 张振贤. 辣椒幼苗叶片解剖特征及光合特性对弱光的响应[J]. 园艺学报, 2009, 36(2): 195-208.
SUI XL, MAO SL, WANG LH, LI W, ZHANG BX, ZHANG ZX. Response of anatomical structure and photosynthetic characteristics to low light in leaves of *Capsicum* seedlings[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2009, 36(2): 195-208 (in Chinese).
- [31] HAVÉ M, MARMAGNE A, CHARDON F, MASCLAUX-DAUBRESSE C. Nitrogen remobilization during leaf senescence: lessons from *Arabidopsis* to crops[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(10): 2513-2529.
- [32] ZHAO B, ATA-UL-KARIM ST, LIU ZD, NING DF, XIAO JF, LIU ZG, QIN AZ, NAN JQ, DUAN AW. Development of a critical nitrogen dilution curve based on leaf dry matter for summer maize[J]. Field Crops Research, 2017, 208: 60-68.
- [33] RUZICKA DR, HAUSMANN NT, BARRIOS-MASIAS FH, JACKSON LE, SCHACHTMAN DP. Transcriptomic and metabolic responses of mycorrhizal roots to nitrogen patches under field conditions[J]. Plant and Soil, 2012, 350(1): 145-162.
- [34] SAIZ-FERNÁNDEZ I, de DIEGO N, BRZOBOHATÝ B, MUÑOZ-RUEDA A, LACUESTA M. The imbalance between C and N metabolism during high nitrate supply inhibits photosynthesis and overall growth in maize (*Zea mays* L.)[J]. Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 2017, 120: 213-222.
- [35] KUMAR R, BISHOP E, BRIDGES WC, THARAYIL N, SEKHON RS. Sugar partitioning and source-sink interaction are key determinants of leaf senescence in maize[J]. Plant, Cell & Environment, 2019, 42(9): 2597-2611.
- [36] 徐秋生, 李卓吾. 亚种间杂交稻谷粒灌浆特性与籽粒充实度的研究[J]. 杂交水稻, 1994, 9(2): 26-29.
XU QS, LI ZW. Studies on the filling characteristics and the plumpness of grains in inter-subspecific hybrid rice[J]. Hybrid Rice, 1994, 9(2): 26-29 (in Chinese).
- [37] 刘光明, 赵灿, 蒋岩, 赵凌天, 廖平强, 王维领, 霍中洋. 施氮量对水稻源库协同衰老特征的影响[J]. 植物生理学报, 2022, 58(1): 173-185.
LIU GM, ZHAO C, JIANG Y, ZHAO LT, LIAO PQ, WANG WL, HUO ZY. Effects of nitrogen application on the synergistic senescence of rice source and sink[J]. Plant Physiology Journal, 2022, 58(1): 173-185.
- [38] 宋淑英. 供氮水平小麦/玉米幼苗生理特性对 CO₂ 浓度倍增的响应[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2010.
SONG SY. Responses of physiological characteristics of wheat/maize seedling to elevated CO₂ concentration[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A & F University, 2010 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)