

李素梅, 施卫明. RNAi 沉默水稻铵转运体 *OsAMT1* 表达的生长效应[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1201-1206.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.001

RNAi 沉默水稻铵转运体 *OsAMT1* 表达的生长效应

李素梅¹, 施卫明²

(1. 南京理工大学化工学院, 江苏 南京 210094; 2. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 中国科学院南京土壤研究所, 江苏南京 210008)

摘要: *OsAMT1* 是水稻中负责铵态氮高亲和吸收的基因家族, 包括 *OsAMT1;1* ~ *OsAMT1;3* 3 个基因, 已有的研究对其基因表达特征以及调控进行了大量的分析。*OsAMT1;1* 表达水平最高, *OsAMT1;2* 受氮水平诱导最为显著。因此, 本研究选取 *OsAMT1* 序列上高度同源的区域, 利用反向遗传学的 RNAi 技术构建再生 *OsAMT1* 家族 3 个基因共干扰沉默的转基因植株, 分析 *OsAMT1* 基因表达水平降低引起的植株生长和氮累积量的变化。结果表明, 依据 *OsAMT1* 同源序列构建的转基因水稻幼苗在低氮条件下基因的表达水平下降了 28% ~ 60%, 幼苗生长受到明显的抑制, 氮累积量也受到显著抑制, 说明 *OsAMT1* 在水稻的高亲和吸收铵态氮中占有重要地位。

关键词: *OsAMT1*; RNAi; 表达水平; 生物量; 氮累积量

中图分类号: Q786; Q945.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1201-06

The growth effect of rice by RNAi silencing ammonium transporter *OsAMT1*

LI Su-mei¹, SHI Wei-ming²

(1. School of Chemical Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, 210094, China; 2. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: *OsAMT1* is a gene family responsible for high affinity ammonium uptake of rice, including *OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* and *OsAMT1;3*, which has been extensively studied for its function, expression and regulation. *OsAMT1;1* was the biggest abundance gene in *OsAMT1* family and *OsAMT1;2* was the most significant induction gene to nitrogen starvation. Therefore, in this study, we selected the homology sequence of *OsAMT1* to construct the co-interfered transgenic plants through reverse genetics RNAi technology, subsequently analyzed the growth of transgenic plants caused by gene silencing. The results showed that the expression level of transgenic rice seedlings was decreased by 28% ~ 60% under low nitrogen condition, the growth of seedlings was inhibited by *OsAMT1* co-interfering, and the nitrogen accumulation was significantly inhibited, which indicated that *OsAMT1* played an important role in rice high-affinity ammonium uptake.

Key words: *OsAMT1*; RNAi; expression level; biomass; nitrogen accumulation

铵态氮是稻田中主要的氮素形态, 是水稻优先的氮源。*AMT* 是介导水稻高亲和吸收转运铵态氮的基因家族, 已有的研究结果表明水稻中至少存在 10 个

AMT 基因^[1], 被分成 *OsAMT1* ~ *OsAMT4* 共 4 个家族, *OsAMT1* 是其中之一, 由 *OsAMT1;1* ~ *OsAMT1;3* 3 个基因组成, 且在酵母和卵母细胞异源系统上证明是高亲和铵转运蛋白^[1-2]。模式植物拟南芥凭借其拥有大量的突变体库从反向遗传学角度证明了各个 *AtAMT1* 基因对拟南芥根吸收铵态氮的贡献, *AtAMT1;1* 和 *AtAMT1;3* 单个敲除的突变体在无氮预培养后对铵

收稿日期: 2017-05-22

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(30800702)

作者简介: 李素梅(1978-), 女, 安徽合肥人, 博士, 研究方向为氮素吸收转运机制。(E-mail) smli321@163.com

态氮的吸收均较野生型降低了 30% 左右,而 *AtAMT1;1* 和 *AtAMT1;3* 双敲除的突变体对铵态氮的吸收较野生型降低了 70%^[3]。*AMT1;1* 表达水平的降低不仅影响到氮的吸收转运,还降低了植物的免疫反应^[4]。在水稻上已报道的高亲和铵转运蛋白基因及候选基因的数量较拟南芥的多,那么具体各个基因对铵态氮吸收的贡献需要明确,但由于水稻的基因组较拟南芥大,目前 T-DNA 库没有得到饱和,再者 T-DNA 突变体的筛选需要大量的工作,因此在水稻上难以大规模的开展。为此,我们引用了反向遗传学研究中的 RNAi 技术开展对水稻 *AMT* 基因的研究。

OsAMTs 在水稻苗期的表达特征和调控已进行了详细的定量分析^[5],结果表明幼苗根中 *OsAMTs* 成员间有着明显不同的表达模式,预示着 *OsAMTs* 基因家族的各个基因在铵态氮的吸收中可能起着不同的作用。在水稻 *AMT* 家族中,*AMT1* 家族的 3 个基因 *OsAMT1;1* ~ *OsAMT1;3* 的研究最为深入^[6-8]。*OsAMT1;1* 在地上部和根中均有表达,表达水平在 *AMT* 家族中最高,占有 68% 的比例,且所占比例不随氮水平的变化显著变化;*OsAMT1;2* 和 *OsAMT1;3* 主要在根中表达,虽然在正常的氮水平下占有的比例不大,但 *OsAMT1;2* 对缺氮处理响应很快,表达量迅速提高^[5]。同源性比对分析发现 *OsAMT1;1* ~ *OsAMT1;3* 的氨基酸同源性达 86%,核苷酸序列同源性达 78%,尤其在 5' 端具有很高的序列保守性。因此,本研究选择 *OsAMT1* 3 个基因核苷酸同源性最高的序列采用 RNAi 技术构建 *OsAMT1* 家族基因共沉默的转基因水稻材料,开展水稻苗期 *OsAMT1* 基因的吸氮功能研究。

1 材料与方法

1.1 植物受体材料、质粒和菌株

RNAi 干扰所用的同源序列来源于水稻品种桂单 4 号的基因组,植物表达载体转化的受体是桂单 4 号。农杆菌菌株 EHA101、载有 *GUS* 基因的 pBI121 和载有 *HPT*、*NPT-II* 基因的双元载体质粒 pUbi,克隆所用的中间载体 pBluescript(SK+/-)均为本实验室保存。限制性内切酶和连接酶等均购自 NEB 公司。

1.2 *OsAMT1* 家族基因 RNAi 共干扰载体的构建

采用 DNAMAN 对 *OsAMT1* 家族的 *OsAMT1;1* ~

OsAMT1;3 的核苷酸序列进行比对分析,保守区最高的区域(93~262 bp)共 169 bp 的片段作为 *OsAMT1* 的 RNAi 干扰序列,植物表达载体构建的框架结构如图 1 所示,同源序列部分的引物相同,两端的酶切位点不同。以水稻桂单 4 号基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增获得 RNAi 干扰的同源序列结构,PCR 程序 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,25 个循环,72 °C 延伸 10 min,正向和反向序列带上不同的酶切位点分别克隆到中间载体与 *GUS* 全长片段连接,再将完整的结构克隆到水稻表达载体 pUbi 中构建如图 1 所示的载体结构。

1.3 水稻转化和植株再生

1 μg 的上述表达载体通过电转化转到根癌农杆菌 EHA101 的感受态细胞中,选择培养筛选后,提取单克隆根癌农杆菌的质粒 DNA 再次反转到大肠杆菌中进行质粒提取和酶切验证。已鉴定的含有表达载体的根癌农杆菌与水稻成熟胚诱导的愈伤组织进行共培养,潮霉素抗性筛选,再分化,移栽等获得转基因水稻植株。

1.4 T1 代转基因水稻幼苗培养和取样

不同愈伤组织分化再生获得的种子,分别在 1/2 MS 培养基上(0.5 mmol/L 硝态氮或 0.5 mmol/L 铵态氮作为唯一氮源)进行初筛,初筛的指标是观察生长情况和生物量。荧光定量 PCR 检测样品的前处理是水稻种子用 10% H₂O₂ 浸泡表面消毒 15 min,37 °C 浸种 24 h,30 °C 暗室发芽 5 d,待根长出 2 cm 左右时移植于尼龙网上,用改良的木村营养液(氮水平为 0.5 mmol/L NH₄NO₃,24.80 mg/L KH₂PO₄,65.90 mg/L MgSO₄,13.60 mg/L KCl,53.78 mg/L CaCl₂·2H₂O,5.56 mg/L FeSO₄·7H₂O,7.44 mg/L Na₂EDTA·2H₂O,2.860 μg/L H₃BO₃,1.810 μg/L MnCl₂·4H₂O,0.220 μg/L ZnSO₄·7H₂O,0.080 μg/L CuSO₄·5H₂O,0.012 μg/L Na₂MoO₄·2H₂O)进行培养,培养液 pH 值为 5.5,加硝化抑制剂二氰胺 5.89 mg/L,每 3 d 更换 1 次营养液,置于植物生长室培养 14 d,取根系样品液氮速冻后-80 °C 冰箱中保存待用。

1.5 RNA 提取和 cDNA 合成

取出保存的水稻样品在液氮中研磨成粉末状,用 Trizol 试剂盒(Invitrogen,USA),按照说明书提取总 RNA,提取得到的总 RNA 经紫外分光光度计测

得 OD_{260} 和 OD_{280} 值, OD_{260}/OD_{280} 介于 1.6~1.8, 取 50 μg 总 RNA 用 DNAase (RNAase free) 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min, 然后用苯酚: 氯仿: 异戊醇混合液(体积比为 25: 24: 1) 抽提 2 次, 上层水相中加入 2.5 倍体积的酒精和 1/10 体积的 3.5 mol/L NaOAc (pH 为 5.2), -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30~60 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 13 000 r/min 离心 10 min, 丢弃上清液, 沉淀用 70% 酒精洗涤 1 次, 风干, 加 DEPC 处理过的灭菌水溶解, 重新测定 OD_{260} 和 OD_{280} , OD_{260}/OD_{280} 和甲醛变性凝胶电泳综合判定提取的总 RNA 质量。确定 RNA 的纯度和完整性后, 取 5 μg 总 RNA, 以 OligodT 为引物, 用 Powerscript 逆转录酶 (Clontech, USA) 按照说明书合成第一链 cDNA, 将合成好的 cDNA 稀释至一定浓度, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 避免反复冻融 cDNA 降解。

1.6 荧光定量 PCR

通过预试验调整反应体系及程序, 获得目标基因与内参基因扩增效率基本一致的体系和程序进行荧光定量 PCR 扩增, 引物见表 1。体系 20.0 μl : 2 \times

qPCR Master Mix 10.0 μl , 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μl , 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μl , 模板 2.0 μl , 加灭菌水至 20.0 μl 。扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 45 次, 55 $^{\circ}\text{C}$ 单点检测信号。熔解程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 98 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 连续检测信号。每个反应获得的 Ct 值与看家基因 *actin* 的 Ct 相减计算出 ΔCt , 再以转基因株系中目标基因的 ΔCt 减去对照株系相应基因的 ΔCt , 计算获得该基因的 $\Delta\Delta Ct$, 以 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 计算基因的相对表达量。

1.7 植株生物量和氮累积量

采用方法 1.4 的方法, 将获得的转基因水稻株系 *amt1c* 和 *amt1g* 培养 14 d, 进行氮水平处理, 设置低氮 0.5 mmol/L 和高氮 5.0 mmol/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 2 个处理培养 10 d, 分别于 0 d、5 d、10 d 取样分析, 根系和地上部分 100 $^{\circ}\text{C}$ 高温杀青 30 min 后置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘至衡质量。根的全氮用 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 消煮, BU-CHI 定氮仪测定。

表 1 荧光定量 PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time fluorescence quantitative PCR

基因	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)	登录号
<i>OsAMT1;1</i>	正向: GTCATCTTCGGGTGGGTCAGCT	282	AF289477.1
	反向: TTCGCTGTGACGTCGTTGCTTC		
<i>OsAMT1;2</i>	正向: ATGGCGACGTGCTTGGACAG	232	AF289478.1
	反向: CGAACACGTTGCTGAGCATG		
<i>OsAMT1;3</i>	正向: GCAAGGAGTACGTGGACCAGA	180	AF289479.1
	反向: AGATGCGCAGCAATCCCAGCT		
<i>OsActin</i>	正向: CTTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA	197	AB047313.1
	反向: CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA		

2 结果与分析

2.1 *OsAMT1* 干扰 RNAi 载体的构建

以桂单 4 号水稻基因组 DNA 为模板, 特异性引物进行 PCR 扩增获得 RNAi 的正向反向同源序列, 分步亚克隆到含有 *GUS* 内含子的中间载体上, 再通过酶切连接构建成如图 1 所示的用于 *OsAMT1* 共干扰的 RNAi 结构, 期望形成具有发夹结构的双链 RNA 干扰水稻体内的目标基因使其部分沉默不表达。构建好的植物表达载体具有 Ubi 启动子和潮霉素筛选标记, 转化农杆菌 EHA101 获得携带目标结

构的农杆菌菌株用于后续转化。

2.2 转基因水稻植株的获得

携带表达载体的农杆菌 EHA101 用来感染水稻成熟胚分化的愈伤组织, 经过潮霉素多次筛选获得抗性愈伤组织, 每 21 d 更换 1 次相应阶段的培养基, 4 个月后逐渐分化出绿色的新叶, 挑出分化的幼苗转入生根培养基中, 14 d 后长出许多根, 打开培养基盖子加入少量水进行驯化, 让幼苗适应外界环境, 7 d 后移入盆中栽培 (图 2)。常规管理直到种子成熟, 进行编号, 5~6 个月后收获转基因种子 (T1 代), 作为后续研究的材料。

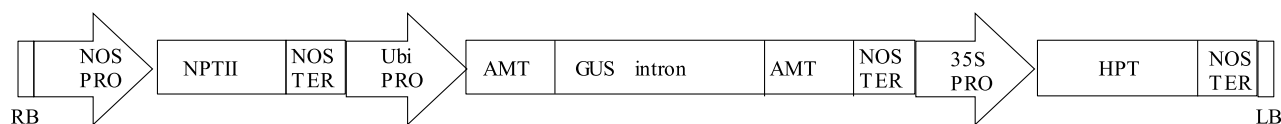


图1 AMT1 的 RNAi 载体结构

Fig.1 Schematic construct of the AMT1 RNAi



图2 转基因植株的培育过程

Fig.2 The breeding process of transgenic rice

2.3 RNAi 转基因植株幼苗的生长情况

获得的 T1 代不同转基因植株,在铵态氮或硝态氮作为唯一氮源下的生长表现不同,总体上不同的转基因植株在硝态氮源上生长受到的影响较小,各株系的生物量没有显著差异;而在铵态氮源上转基因植株生长受到限制,生物量较 CK 总体呈下降趋势,有的株系表现出显著差异(图 3)。综合考虑选择差异性显著的 *amt1c* 和 *amt1g* 2 个株系作为进一步研究的对象。

因植株生长受到限制,生物量较 CK 总体呈下降趋势,有的株系表现出显著差异(图 3)。综合考虑选择差异性显著的 *amt1c* 和 *amt1g* 2 个株系作为进一步研究的对象。

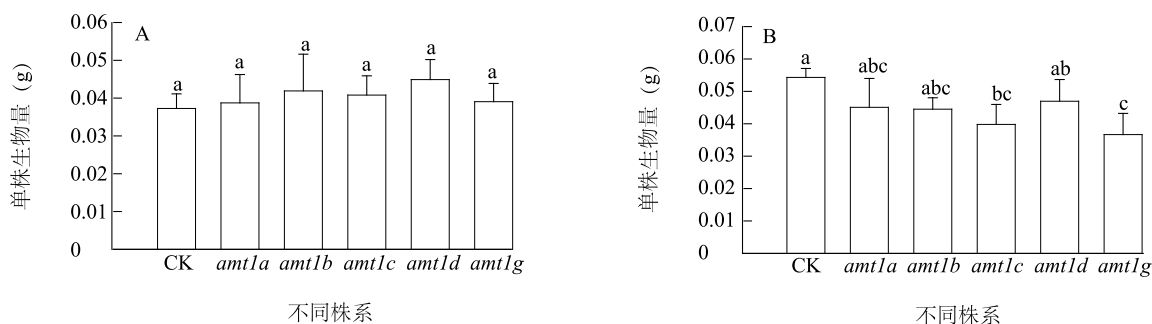
A: 0.50 mmol/L KNO₃; B: 0.25 mmol/L (NH₄)₂SO₄。

图3 转基因幼苗在不同氮源下的生长情况

Fig.3 Growth of transgenic seedlings under different nitrogen sources

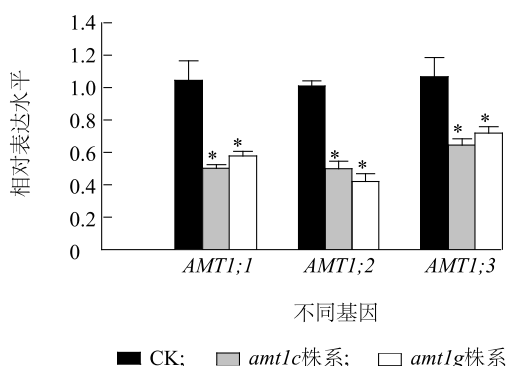
2.4 RNAi 转基因植株 *OsAMT1* 基因的表达量

RNAi 获得的 2 个独立转基因植株根系的 *OsAMT1*;1~*OsAMT1*;3 的表达水平较对照显著降低, *OsAMT1*;1 的表达水平降低了 43%~50%, *OsAMT1*;2 降低了 50%~60%, *OsAMT1*;3 降低了 28%~35% (图 4), 表明同源序列构建的 RNAi 可以实现对目

标同源基因的干扰沉默。

2.5 RNAi 干扰对水稻幼苗氮累积量的影响

RNAi 的转基因植株根系在低铵 (0.50 mmol/L) 环境下的生物量显著低于对照植株, 而在 5.0 mmol/L 铵态氮中生长与对照没有明显差异(图 5)。在低铵环境下处理 10 d, 0 d、5 d、10 d 动态取

图4 *OsAMT1* 家族基因的表达水平Fig.4 Expression level of *OsAMT1* family

样的根系生物量和氮累积量呈现类似的变化趋势,随着处理天数的增加转基因植株与对照的生物量和氮累积量均差异显著(图6),表明在低氮环境下高

亲和转运体的沉默不表达显著抑制了氮的吸收,影响了幼苗的生长。

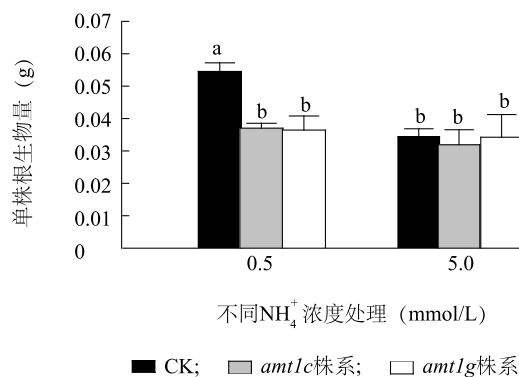


图5 不同氮水平下的根系生物量

Fig.5 Root biomass under different nitrogen treatments

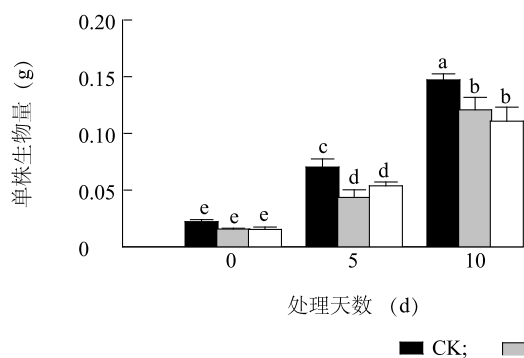


图6 低氮培养下幼苗的生物量和氮累积量

Fig.6 Biomass and nitrogen accumulation of rice seedling at low nitrogen treatment

3 讨论

RNAi 是一种新兴的基因阻断技术,目前已广泛应用于植物功能基因组研究和植物性状改良研究中。RNAi 技术是将载体表达的小的双链 RNA 导入真核生物细胞促使内源 RNA 降解,高效特异阻断体内特定基因的表达,诱使细胞表现出特定基因缺失表型,获得功能丧失或降低的突变体材料。随着水稻基因组测序工作的完成,大量全长 cDNAs 可获得,水稻基因的辨析工作正在进行着, RNAi 技术在植物营养、病虫害防治等方面的应用已经在各种作物中进行试验,均取得了较为理想的成果^[9-13]。同时对于那些分享一定的保守序列但又不属于同一家族的基因,利用其保守区构建 RNAi 干扰结构使其沉默是辨别基因功能的一种方法。早在 2005 年

Miki 等^[14]的试验中采用此方法研究水稻 *OsRac* 基因的功能,他们用 *OsRac* 基因家族中 2 个成员的高度保守序列抑制了这个家族所有基因的表达,这也充分说明了利用基因家族的保守区构建 RNAi 干扰结构沉默基因是可行的辨别基因功能的方法。本研究运用 RNAi 技术干扰水稻铵转运蛋白 *OsAMT1* 基因家族 *OsAMT1;1* ~ *OsAMT1;3* 3 个基因的表达,获得的干扰株系 *OsAMT1;1* ~ *OsAMT1;3* 的表达水平相较于对照显著下降,同源性高的 *OsAMT1;2* 的干扰效率最高,表达量降低了 50% ~ 60%。

拟南芥的 *AMT* 基因功能在突变体水平上已经进行了深入的研究,*AtAMT1;1* 的缺失突变体在正常培养条件下除了叶片形态改变外生长没有明显变化,但是在铵态氮作为氮源的情况植株生长受限甚至最后死亡^[15]; *AtAMT1;1* ~ *AtAMT1;3* 和 *AtAMT2*;

1 4个基因全缺失的突变体在铵态氮源下生长严重受阻^[16]。这些结果表明单基因的缺失或沉默表达可能由其他功能相近基因弥补,而多基因对植株生长的叠加效应尤其明显。水稻 *OsAMT1* 家族的3个基因的表达特征表明其在水稻苗期铵态氮的吸收转运中占有重要地位^[5],已有的研究对部分基因的过量表达进行了表征。过量表达 *OsAMT1;1* 可提高水稻对铵态氮的吸收转运,但是氮代谢途径不变致使过量铵态氮积累损害了植物的生长发育^[17];过量表达 *OsAMT1;3* 使得植株的碳氮代谢平衡受到破坏,影响植株的生长和产量^[18]。*OsAMT1;1* 和 *OsAMT1;3* 的过量表达植株均由于吸收和代谢不平衡从而影响水稻的生长。本研究运用反向遗传学手段 RNAi 技术定向干扰 *OsAMT1* 使其部分沉默不表达,分析转基因水稻幼苗的生长和氮累积情况,由于 *OsAMT1;1~OsAMT1;3* 表达水平的降低使得植株在低铵培养条件下吸收转运能力下降,获得不到足够的氮供其生长,植株生物量明显受到抑制,氮累积量也显著低于对照,而在足量氮水平下差异不显著。结合文献中报道的 *AMT1;1* 过量表达促进铵态氮的吸收转运引起植株氮累积的结论^[17],可以明确 *OsAMT1* 在水稻的氮素吸收转运中有着重要的作用,另一方面也验证了 *OsAMTs* 定量表达结果中 *OsAMT1;1~OsAMT1;3* 对氮的响应和调控较为敏感。然而,由于共性干扰的是具有同源序列的 *OsAMT1* 基因家族,由基因表达水平降低引起的植株生长效应与对应基因的联系还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] SONODA Y, IKEDA A, SAIKI S, et al. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice[J]. Plant and Cell Physiology, 2003, 44: 726-734.
- [2] YANG S, HAO D, CONG Y, et al. The rice *OsAMT1;1* is a proton-independent feedback regulated ammonium transporter [J]. Plant Cell Rep, 2015, 34(2): 321-330.
- [3] LOQUÉ D, YUAN L, KOJIMA S, et al. Additive contribution of *AMT1;1* and *AMT1;3* to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots [J]. The Plant Journal, 2006, 48: 522-534.
- [4] PASTOR V, GAMIR J, CAMANES G, et al. Disruption of the ammonium transporter *AMT1.1* alters basal defenses generating resistance against *Pseudomonas syringae* and *Plectosphaerella cucumerina* [J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 231-247.
- [5] LI S M, LI B Z, SHI W M. Expression patterns of nine ammonium transporters in rice in response to N status [J]. Pedosphere, 2012, 22(6): 860-869.
- [6] 赵首萍,赵学强,施卫明.不同铵硝比例对水稻铵吸收代谢基因表达的影响[J].土壤学报,2006,43(3):436-442.
- [7] 曹玉,李素梅,施卫明,等.水稻吸铵基因 *OsAMT1;2* 和 *OsAMT1;3* 在不同生育期中的表达量差异及其在酵母细胞中吸铵功能初析[J].土壤,2009,41(4):612-619.
- [8] RANATHUNGE K, EL-KEREAMY A, GIDDA S, et al. *AMT1;1* transgenic rice plants with enhanced NH_4^+ permeability show superior growth and higher yield under optimal and suboptimal NH_4^+ conditions [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(4): 965-979.
- [9] 杨玛丽,赵统敏,余文贵,等.转基因 RNAi 技术在番茄研究中的应用[J].江苏农业学报,2015,31(1):217-221.
- [10] WANG F, LI W, ZHU J, et al. Hairpin RNA targeting multiple viral genes confers strong resistance to rice black-streaked dwarf virus [J]. International Journal of Molecular Science, 2016, 17(5): 705.
- [11] KATOCH R, THAKUR N. Advances in RNA interference technology and its impact on nutritional improvement, disease and insect control in plants [J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 2013, 169(5): 1579-1605.
- [12] 周雅智,姜玲,黄勇. *BraSDG2* RNA 干扰载体的构建和拟南芥的遗传转化 [J]. 山东农业科学, 2016, 48(10): 7-11.
- [13] 弓雪,姜敏,齐欣,等.玉米 *ZmSUT4* 基因 RNAi 植物表达载体的构建 [J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 42-44.
- [14] MIKI D, ITOH R, SHIMAMOTO K. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice [J]. Plant Physiology, 2005, 138(4): 1903-1913.
- [15] KAISER B N, RAWAT S R, SIDDIQI M Y, et. Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA 'knockout' of the high-affinity NH_4^+ transporter *AtAMT1;1* [J]. Plant Physiology, 2002, 130: 1263-1275.
- [16] YUAN L, LOQUÉ D, KOJIMA S, et al. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of *AMT1*-type transporters [J]. Plant Cell, 2007, 19(8): 2636-2652.
- [17] HOQUE M S, MASLE J, UDVARDI M K, et al. Over-expression of the rice *OsAMT1-1* gene increases ammonium uptake and content, but impairs growth and development of plants under high ammonium nutrition [J]. Functional Plant Biology, 2006, 33: 153-163.
- [18] BAO A, LIANG Z, ZHAO Z, et al. Overexpressing of *OsAMT1-3*, a high affinity ammonium transporter gene, modifies rice growth and carbon-nitrogen metabolic status [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16: 9037-9063.

(责任编辑:陈海霞)