科学通报 2019 年 第 64 卷 第 25 期: 2633 ~ 2640
专题: 2018年度中国科学十大进展 进 展
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

提高农作物氮肥利用效率的关键基因发掘与应用

刘学英[1], 李姗[3], 吴昆[1], 刘倩[1], 高秀华[1], 傅向东[1,2*]

1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所/中国科学院种子创新研究院, 植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100101;
2. 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049;
3. 南京农业大学, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095

* 联系人, E-mail: xdfu@genetics.ac.cn

2019-05-12 收稿, 2019-07-08 修回, 2019-07-09 接受, 2019-08-26 网络版发表
国家自然科学基金(31830082, 31671765, 31771356)和中国科学院战略性先导科技专项(XDA08010101, XDB27010105)资助

摘要 在农业生产中, 大量施用氮肥是农作物增产的重要措施之一. 在长达半个多世纪的农作物育种史上一直占据主导地位的"绿色革命"半矮化品种具有耐高肥、抗倒伏和高产的优良特性, 但同时也存在氮肥利用效率(nitrogen use efficiency, NUE)低的局限性, 其高产量对于高水肥投入的依赖性很大. 因此, 为了提高农作物产量, 不得不大量施用氮肥. 但是, 持续大量的氮肥投入不仅增加了种植成本, 还导致了日益严重的环境污染问题. 面临粮食安全和生态安全的双重挑战, 协同提升农作物NUE和产量已成为可持续农业发展的唯一出路. 结合我国粮食安全和农业可持续发展的迫切需求, 本研究团队在植物生长发育与氮素代谢协同作用机制的研究以及氮肥高效利用的新种质培育方面取得了突破性进展. 这项研究为"少投入、多产出、保护环境"的农作物设计育种提供了理论依据和技术支撑. 本文简单介绍近年来NUE相关研究进展以及本研究团队在GRF4-DELLA分子模块协同调控农作物NUE和产量方面的新发现, 并对该领域的未来研究方向提出几点展望.

关键词 农作物, 绿色革命, 氮肥利用效率, 生长调节因子4(GRF4), 可持续农业

自20世纪60年代以来, 主要农作物产量潜力显著提升, 其中品种改良对于产量增加的贡献率达50%~60%. 尤其是, 以半矮秆小麦和水稻新品种培育为标志的"绿色革命"带来了全球粮食产量的大幅增长, 解决了全世界范围内人口快速增长引发的粮食危机. 40多年后, 植物分子生物学和基因组学的发展揭开了"绿色革命"的本质归于植物激素——赤霉素的生物学效应. 水稻"绿色革命"基因*SD1*编码赤霉素合成途径的关键酶GA20ox2, 小麦"绿色革命"基因*Rht1*编码赤霉素信号途径的负调控因子DELLA蛋白. 在正常情况下, 赤霉素通过降解DELLA蛋白来促进植物生长; *SD1*或*Rht1*基因突变后导致水稻和小麦体内DELLA蛋白高水平积累, 一方面抑制植物生长而降低株高, 另一方面减弱植物对氮素的响应, 使水稻和小麦在较高水肥条件下仍能保持其半矮化、抗倒伏特性. 这些优良特性, 使水稻和小麦半矮化品种得以在全世界范围内迅速推广与应用.

在农业生产中, 大量施肥是农作物增产的重要措施之一. 由于携带"绿色革命"基因的水稻和小麦品种的氮肥利用效率(nitrogen use efficiency, NUE)下降, 氮肥过量投入并未大幅提高产量, 反而导致经济效益和生态效益逐渐下滑. 目前, 土壤中的氮肥只有约35%能被植物吸收, 而很大一部分氮肥随着水土的流失而流进江河湖海, 抑或经过反硝化作用被排入大气, 这不仅浪费了资源和能源, 而且导致了土壤酸化、水体富营养化和温室效应等一系列生态环境问题, 严重威胁着

引用格式: 刘学英, 李姗, 吴昆, 等. 提高农作物氮肥利用效率的关键基因发掘与应用. 科学通报, 2019, 64: 2633–2640
Liu X Y, Li S, Wu K, et al. Sustainable crop yields from the coordinated modulation of plant growth and nitrogen metabolism (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 2633–2640, doi: 10.1360/TB-2019-0043

© 2019《中国科学》杂志社

人民健康和农业可持续发展. 面对粮食安全与生态安全的双重挑战, 如何在适当少施氮肥的同时提高作物产量已成为当今我国乃至世界亟待解决的重要问题.

氮素是植物生长发育所需的大量营养元素之一, 是植物体内蛋白质、核酸、磷脂和激素等含氮物质的重要组分. 氮素代谢作为植物基本代谢活动之一, 关系着植物的生物量、农作物产量和品质等. 对于大多数非豆科植物而言, 氮素代谢过程主要包括: 根部细胞膜定位的转运蛋白从土壤中吸收水溶性的硝态氮、铵态氮以及少量蛋白质、可溶性多肽和氨基酸等多种形态的氮素, 即吸收过程; 氮素在根和叶片中经系列酶促反应转变成谷氨酰胺、天冬酰胺、谷氨酸、天门冬氨酸等有机氮, 即同化过程; 以氨基酸为主的氮经由木质部被运至叶肉细胞储存或用于碳同化, 即转运和分配过程; 衰老组织器官中的蛋白质等含氮大分子降解成氨基酸等小分子含氮化合物被运至种子等新生组织器官中再利用, 即再分配和再利用过程. 除作为营养物质外, 氮素也作为一种信号分子参与调控植物生长发育等过程.

NUE是受多个基因和环境互作控制的复杂数量性状, 可分为氮素吸收效率(nitrogen uptake efficiency, NUpE)和氮素生理利用效率(nitrogen utilization efficiency, NUtE)[1,2]. 如何提高农作物的NUE是作物育种学、土壤化学、农业生态学、作物栽培与耕作学等农业科学研究中一直在不断探索的重要科学问题. 在农业生产中, 已通过发展多种高产高效养分管理技术(如氮肥总量控制、分期调控、水肥一体化技术、测土配方施肥等)以及研制新型肥料等来提高农作物NUE和产量. 近年来, 随着遗传学、分子生物学、基因组学等学科的快速发展, 科学家们逐渐认识到, 充分挖掘作物自身的潜力或者通过分子生物学手段调控特定基因的表达或功能, 培育氮肥高效利用的农作物新品种是实现农业可持续发展的有效途径. 为此, 科学家们在NUE相关基因挖掘、NUE的调控机制解析以及作物NUE遗传改良等方面作了大量的研究和尝试. 本文结合本团队的研究成果以及近年来科学家利用不同的基因和途径来提高植物尤其作物NUE和产量的研究进展进行综述.

1 氮素代谢基因的表达调控

氮素的吸收、转运、同化和再分配等过程受到多个基因和环境因子的共同控制, 而每一个过程的改变都能直接影响农作物的NUE. 近年来, 氮吸收与同化等相关基因被相继克隆, 这些基因在NUE调控方面的功能验证也取得了很大进展.

硝态氮(NO_3^-)和铵态氮(NH_4^+)是植物根系从土壤中吸收的两种主要矿质氮源. 在通气良好的旱田土壤中, 植物(如小麦)主要以NO_3^-为氮源; 而在淹水环境中, 植物(如水稻)主要吸收利用NH_4^+形式的氮源. 植物根系从土壤中吸收NO_3^-、植物体内NO_3^-转运及再分配均需要硝酸盐转运蛋白(nitrate transporters, NRTs)来执行. 编码NO_3^-转运蛋白的基因主要有*NRT1/NPF*和*NRT2*两家族, 分别负责高亲和与低亲和NO_3^-的转运. 水稻中*OsNRT1.1B*的表达受硝酸盐诱导, 高表达后可显著促进根系对NO_3^-的吸收, 增加株高、生物量和产量, 并提高籽粒中的氮积累[3]. 此外, OsNRT1.1B在感知外界硝酸盐信号后与磷酸信号抑制因子SPX4蛋白互作并促进其降解, 激活下游硝酸盐应答基因和磷应答基因的表达, 进而协同调控水稻氮-磷营养平衡[4]. *OsNRT1.1A*主要参与水稻细胞内硝酸盐与铵盐利用的调节, 过量表达*OsNRT1.1A*能提高水稻的产量和NUE[5]. OsNRT2.1主要参与在低氮条件下NO_3^-的吸收, 其转运NO_3^-的活性需OsNAR2.1的协助. *OsNRT2.1*基因在其自身启动子驱动下组成型表达会降低产量, 但在*OsNAR2.1*的启动子驱动下在根和茎中特异性高表达, 则能够明显增加水稻的NUE、生物量和谷物产量[6]. *OsNRT2.3*基因存在两种可变剪接形式的mRNA, 分别编码OsNRT2.3a和OsNRT2.3.b蛋白, 二者的基因表达位置和蛋白功能不同. 在低氮条件下, 敲除*OsNRT2.3a*后会显著降低水稻中NO_3^-从根部向地上部的运输, 其转运NO_3^-的功能发挥依赖于OsNAR2.1. 而*OsNRT2.3b*主要在水稻地上部高表达, 是一个pH敏感的NO_3^-转运蛋白, 其功能发挥不需要OsNAR2.1的协助; 过量表达*OsNRT2.3b*能够显著提高水稻的NUE和产量[7]. 另外, 编码硝酸盐/多肽转运蛋白(nitrate and peptide transporters family, NPF)的*OsPTR9* (*OsNPF8.20-2*)在过量表达后能促进侧根形成, 提高水稻NUE和产量[8]; *OsNPF7.3*和*OsNPF7.7*过量表达后均能够增加水稻分蘖数并提高NUE和产量[9,10].

水稻等淹水植物主要通过NH_4^+转运蛋白(ammonium transporters, AMT)从土壤中吸收NH_4^+. 水稻中有5个基因家族(*OsAMT1*~*OsAMT5*)编码NH_4^+转运蛋白, 其中*OsAMT1*, *OsAMT2*, *OsAMT3*均包含3个成员, *OsAMT4*只有一个成员, *OsAMT5*包含2个成员. 研究表

明, 过量表达*OsAMT1;1*能够增强水稻根系对NH_4^+的吸收, 在外界合适或较低浓度NH_4^+条件下, 促进水稻生长发育, 提高NUE和产量, 但在外界高浓度NH_4^+条件下, 则导致更明显的铵中毒表型[11]. 过量表达*OsAMT1;3*则会导致水稻体内碳氮平衡失调, 抑制植株生长发育, 进而导致产量下降[12]. 谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)OsGS1;2和NADH-GOGAT1主要负责水稻根部吸收的NH_4^+同化, 而GS2和Fd-GOGAT主要负责叶片中的NH_4^+同化. 多年来科学家们一直把GS视为提高作物NUE和产量的首选对象, 但研究结果却不尽相同. 例如, 过量表达*ZmGS1.3*可在低氮条件下增加玉米产量[13]; 过量表达*OsGS1;2*可在高氮条件下协同提高水稻的NUE和产量[14]; 过量表达*PvGS1*能够增加小麦籽粒的干重和氮含量[15]; 过量表达*HvGS1-1*能够同时提高大麦的NUE和产量[16]; 过量表达*TaGS2*能够促进小麦的氮吸收和氮向籽粒的转运, 进而增加小麦的产量[17]. 但也有研究表明, 过量表达*GS*后可能破坏了碳-氮代谢平衡而严重影响水稻生长并降低水稻产量[18]. 此外, NADH依赖的谷氨酸合成酶(NADH-GOGAT)、天冬酰胺合成酶(asparagine synthetase, ASN)、精氨酸酶(arginase, ARG)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, AlaAT)等也在氮素代谢和NUE调控方面具有重要作用[19~23].

这些研究表明, 通过提高氮吸收与同化途径的关键基因表达或关键酶活性来提高作物的NUE是颇具希望的研究策略, 但这些基因在促进植物生长发育的同时往往会伴随产生多种负效应而难以直接用于作物品种改良. 例如, 一般会伴随株高的增加而产生易倒伏的问题, 会延迟开花, 也会影响籽粒灌浆而造成减产等[24]. 因此, 通过改变氮吸收和同化基因的表达(或蛋白活性)能否从育种源头上提高半矮化高产农作物品种的NUE还有待更多的育种试验的验证.

2 氮代谢相关转录因子的表达调控

近年来, 研究发现, NAC, NLP, BTB, Dof, bZIP, MADS-box, LBD, MYB等转录因子家族成员以及调节基因参与调控氮素代谢, 其中一些转录因子在作物NUE改良和产量提升方面具有一定的应用潜力. *NAC2*编码禾本科植物特有的NAC(NAM, ATAF and CUC)转录因子. 小麦的TaNAC2-5A能正调控*TaNRT2.1*和*TaGS2*表达, 过表达后能促进小麦根的生长, 提高收获指数和产量[25]. NLP(NIN-LIKE protein)是一类调控氮诱导基因表达的关键转录因子[26], 它能够结合NO_3^-应答响应基因(如*AtNRT1.1*, *ANR1*, *CIPK8LBD37/38*等)的启动子并激活基因表达. 研究表明, 第三亚群钙离子依赖的蛋白激酶(Group III Calcium dependent protein kinase)能够感知硝酸盐诱导的钙离子浓度变化, 通过磷酸化激活NLP蛋白活性, 进而促进根系发育及叶片生长[27]. 过量表达*NLP7*能协同促进碳-氮代谢, 在不同氮素水平下促进拟南芥和烟草的生长发育[28]; NLP也能够促进豆科作物的结瘤和NUE[29,30]. *BT1/BT2*编码BTB(Bric-a-Brac/Tramtrack/Broad)家族蛋白, 基因表达既受NO_3^-的诱导, 也受转录因子NLP调控[31]. 在低氮条件下, *BT1/BT2*通过负调控*NRT2*基因的表达, 进而影响氮素吸收和NUE. 通过CRISPR/Cas9技术降低*BT1/BT2*的转录水平有望用于改良作物的产量和NUE[32]. Dof (DNA-binding with one finger)是植物特有的一类转录因子, 过表达玉米*ZmDof1*基因能够诱导磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因*PEPC*的表达, 通过调节碳-氮代谢促进水稻和拟南芥在低氮条件下的生长发育[33]. *OsDOF18*是*ZmDof1*在水稻中的同源基因, 它通过调控下游多个*AMT*基因和氮同化基因的表达, 调节NH_4^+的运输和氮分配, 进而影响NUE[34]. bZIP(basic leucine zipper)转录因子在氮信号传导途径、氮素代谢以及碳-氮代谢平衡维持中也发挥了重要作用, 如小麦TabZIP60负调控小麦生长和氮素利用, 降低该基因的表达能够促进*Ta-NADH-GOGAT*基因的表达, 进而提高小麦NUE并增加谷物产量[35].

氮肥能够促进水稻OsmiR393的表达, 下调OsmiR393的靶基因*OsAFB2*和*OsTB1*的表达; 相反, 过量表达OsmiR393能在不同氮水平下增加水稻的分蘖[36]. 水稻*DOF*基因*OsRDD1*是OsmiR166的靶基因, 过量表达*OsRDD1*能够诱导营养不足条件下NH_4^+, Na^+等离子和蔗糖运输相关基因的表达, 增强低氮胁迫应答响应, 并提高水稻产量[37]. 低氮胁迫会抑制miR169a的表达, 进而促进其靶基因NFYA转录因子家族基因的表达. 过量表达miR169能够下调其靶基因*TaNFYA-B1*的表达, 进而增加小麦对氮和磷的吸收[38,39]. 此外, miR167a, miR444a等也参与氮代谢的调控[40,41].

最近, Gaudinier等人[42]利用机器人和大数据分析技术一次从成百上千个基因中筛选转录因子, 将拟南芥中氮吸收和利用相关的基因组装成一个网络, 并通过计算预测了其中在氮代谢中起作用的关键基因. 此外, Varala等人[43]应用基于时间序列转录组数据的机器

学习方法来推断2174个氮响应基因的调控网络中转录因子与靶基因的互作关系，发现了作用于植物氮信号转导的顺式作用元件的时间级联，并鉴定了氮信号转导中已知的转录因子(NLP7/8, TGA1/4, NAC4, HRS1和LBD37/38/39)的时间关系以及另外146个新的转录因子. 这些研究和分析对于理解植物氮素吸收与利用的调节网络大有帮助，在此基础上确定一组氮代谢的关键基因, 并利用分子设计育种技术聚合这些基因, 将有可能培育出需要较少肥料或能够高效利用氮肥的农作物品种.

3 碳-氮代谢平衡调节

植物地上部通过光合作用固定碳源的过程与根系从土壤中摄取氮素的过程之间既相互促进、相互依赖, 又相互矛盾、相互制约, 以达到整体的协调与平衡, 进而维持植物的生长发育. 根系吸收的氮素是叶片光合作用的光反应和暗反应中一系列酶的重要组分，而叶片光合作用产物为氮代谢提供同化力ATP和NADPH以及碳骨架. 维持体内的碳-氮代谢平衡是植物正常生长发育所必需的，也是影响农作物NUE和产量的关键因素. 拟南芥光信号途径的bZIP转录因子HY5(ELONGATED HYPOCOTYL5)蛋白能够长距离移动, 通过协同调控根部硝态氮的吸收、根系生长发育、地上部光合固碳和光合产物向根系的运输，促进地上部和根系间远程碳-氮平衡，进而保证植物的正常生长发育[44]. *ARE1*编码叶绿体定位的膜蛋白，可能作为光合作用的负调控因子，通过调控光合还原势进而调控植物的NUE和产量. 水稻*are1*突变体可以部分抑制*Fd-GOGAT*基因突变导致的氮素缺乏综合征表型. *ARE1*基因的一个等位变异类型，导致其表达降低，能够提高水稻的NUE和产量[45]. *DEP1*基因编码植物G蛋白γ亚基，其优异等位变异*dep1-1*能够显著提高水稻产量[46]，目前该基因正被广泛应用在我国水稻育种实践中. *DEP1*基因的表达受氮肥诱导，功能缺失(loss-of-function)突变体*dep1-32*丧失了氮肥的应答响应，其植株高度、分蘖数目和穗粒数等在不同氮肥水平下的差异不显著. 虽然携带*dep1-1*的水稻其生长发育对不同施肥水平的响应不敏感，但是其氮素吸收率、GS酶活性和地上部氮含量显著提高，最终使水稻在适当减少施氮肥条件下获得更高的产量[47]. 因此，*dep1-1*是一个水稻氮肥高效利用的重要基因，在减少氮肥投入和提高水稻产量方面具有重要应用前景. 最新研究还表明，DEP1-Os-MADS1分子模块参与调控碳-氮代谢平衡, 进而影响水稻的产量和品质[48]. 此外，过量表达*dep1-1*能够增加茎鞘和叶片中的氮积累而减少碳积累，造成茎鞘和叶片中碳-氮不平衡，但能够同时增加籽粒中的氮和碳积累, 保持籽粒中碳-氮平衡[49].

本研究团队的最新研究发现植物生长调节因子GRF4(GROWTH-REGULATING FACTOR 4)是一个植物碳-氮代谢的正调控因子. GRF4与GIF1(GRF-interacting factors 1)蛋白互作形成一个转录激活复合体[50,51]，一方面通过直接结合多个氮素代谢相关基因的启动子并促进基因表达, 增加氮吸收、同化和转运; 另一方面, GRF4-GIF1复合体能够直接结合光合碳代谢相关基因的启动子并增强基因表达，进而促进光能转换、糖类物质转运代谢等，最终促进植物生长发育和生物量增加. 研究发现，赤霉素信号途径的DELLA蛋白与GRF4互作，并抑制GRF4-GIF1转录激活蛋白复合体的形成, 进而降低叶片光合碳固定能力和根系氮吸收能力. 相反，赤霉素则通过促进DELLA蛋白降解，增强GRF4转录激活活性，实现对植物叶片光合碳固定能力和根系氮吸收能力的协同调控，从而维持植物生长与碳-氮代谢平衡. 研究还发现了一个新型的优异等位基因*GRF4*^{ngr2}, 将其导入当前主栽高产水稻和小麦品种后不仅提高了NUE，同时还保持了品种优良的半矮化和高产特性，能够在适当减少施氮肥条件下获得更高的产量. GRF4新功能的发现不仅丰富了赤霉素调控植物生长发育和代谢的新知识，而且从分子水平揭示了“绿色革命”伴随农作物NUE低下这一问题的本质，并为携带“绿色革命”基因的农作物的NUE改良提供了明确方案[52]. 该研究发现为“少投入、多产出”的绿色高产高效农作物新品种培育提供了具有育种利用价值的新基因资源, 预示着一场新的“绿色革命”即将到来(图1).

4 结论与展望

氮肥是促进植物生长发育和作物产量提升的关键因素. 通过遗传改良和分子设计育种手段培育氮肥高效的作物新品种对保障粮食安全和农业可持续发展至关重要. 目前，随着基因组学、功能基因组学等学科的快速发展, 植物氮素代谢以及信号传导的分子机制和调控网络的研究进展很快, 但绝大多数研究仍集中在模式植物拟南芥中, 有关作物氮肥高效利用的分子机制研究还相对较少. 另外, 在众多已克隆和鉴定的基因中, 在作物NUE改良和产量提升方面具有一定育种应用价值和潜

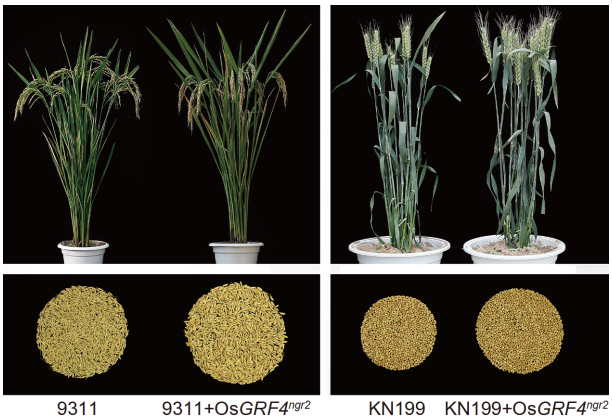


图 1 (网络版彩色)增加GRF4的丰度能够提高“绿色革命”水稻和小麦品种的产量且能够保持品种的半矮化优良特性

Figure 1 (Color online) Increased GRF4 abundance boosts grain yield of rice and wheat GRVs without increasing mature plant height

力的关键候选基因位点还很有限(例如, *AlaAT*, *OsNRT1.1B*, *OsNRT2.3b*, *DEP1*, *ARE1*, *OsGRF4*等), 因此, 如何在减少氮肥施用的同时实现作物产量的持续提升仍然任重而道远. 本研究团队将优异等位基因*GRF4*^{ngr2}应用于当前主栽高产水稻和小麦品种中不仅成功地实现了NUE的改良, 而且能够保持作物品种优良的半矮化和高产特性, 向着“少投入、多产出、保护环境”的可持续农业发展的育种目标迈出了重要一步.

作物NUE的遗传改良是一项系统工程. 影响氮吸收与同化、碳-氮代谢平衡、氮信号传导途径及其相互作用的其他营养信号和环境因子均可能直接或间接影响NUE. 未来研究方向: (1) 综合利用各种组学手段, 并结合生物信息学、计算生物学、人工智能等技术系统解析氮素代谢的遗传调控网络; (2) 充分利用野生资源、农家种、主栽品种等种质材料, 通过重测序、GWAS(genome-wide association studies)分析、QTL分析和图位克隆等方法系统挖掘氮肥高效利用的关键基因, 挖掘优异等位基因或者利用CRISPR/Cas9技术创制新的等位变异类型, 获得能协同提高作物产量和NUE的关键基因网络; (3) 利用时空特异启动子对关键基因进行组织特异性表达; 通过多基因聚合技术导入当前主栽品种中, 评价其生物学效应, 以培育产量性状与NUE协同改良的农作物新品种.

参考文献

1 Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, et al. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: Challenges for sustainable and productive agriculture. Ann Bot, 2010, 105: 1141–1157

2 Xu G, Fan X, Miller A J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. Annu Rev Plant Biol, 2012, 63: 153–182

3 Hu B, Wang W, Ou S, et al. Variation in *NRT1.1B* contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. Nat Genet, 2015, 47: 834–838

4 Hu B, Jiang Z, Wang W, et al. Nitrate-NRT1.1B-SPX4 cascade integrates nitrogen and phosphorus signalling networks in plants. Nat Plants, 2019, 5: 401–413

5 Wang W, Hu B, Yuan D, et al. Expression of the nitrate transporter gene *OsNRT1.1A/OsNPF6.3* confers high yield and early maturation in rice. Plant Cell, 2018, 30: 638–651

6 Chen J, Zhang Y, Tan Y, et al. Agronomic nitrogen-use efficiency of rice can be increased by driving *OsNRT2.1* expression with the *OsNAR2.1* promoter. Plant Biotechnol J, 2016, 14: 1705–1715

7 Fan X, Tang Z, Tan Y, et al. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113: 7118–7123

8 Fang Z, Xia K, Yang X, et al. Altered expression of the *PTR/NRT1* homologue *OsPTR9* affects nitrogen utilization efficiency, growth and grain yield in rice. Plant Biotechnol J, 2013, 11: 446–458

9 Fang Z, Bai G, Huang W, et al. The rice peptide transporter OsNPF7.3 is induced by organic nitrogen, and contributes to nitrogen allocation and grain yield. Front Plant Sci, 2017, 8: 1338

10 Huang W, Bai G, Wang J, et al. Two splicing variants of *OsNPF7.7* regulate shoot branching and nitrogen utilization efficiency in rice. Front Plant Sci, 2018, 9: 300

11 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 Exp Bot, 2014, 65: 965–979

12 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. Int J Mol Sci, 2015, 16: 9037–9063

13 Martin A, Lee J, Kichey T, et al. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. Plant Cell, 2006, 18: 3252–3274

14 Brauer E K, Rochon A, Bi Y M, et al. Reappraisal of nitrogen use efficiency in rice overexpressing glutamine synthetase1. Physiol Plant, 2011,

141: 361–372
15 Habash D Z, Massiah A J, Rong H L, et al. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. Ann Appl Biol, 2001, 138: 83–89
16 Gao Y, Thomas C B, Schjoerring J K. Cisgenic overexpression of cytosolic glutamine synthetase improves nitrogen utilization efficiency in barley and prevents grain protein decline under elevated CO_2. Plant Biotechnol J, 2018, 17: 1–13
17 Hu M, Zhao X, Liu Q, et al. Transgenic expression of plastidic glutamine synthetase increases nitrogen uptake and yield in wheat. Plant Biotechnol J, 2018, 16: 1858–1867
18 Bao A, Zhao Z, Ding G, et al. Accumulated expression level of cytosolic glutamine synthetase 1 gene (*OsGS1;1* or *OsGS1;2*) alter plant development and the carbon-nitrogen metabolic status in rice. PLoS One, 2014, 9: e95581
19 Yamaya T, Obara M, Nakajima H, et al. Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. J Exp Bot, 2002, 53: 917–925
20 Lam H M, Wong P, Chan H K, et al. Overexpression of the *ASN1* gene enhances nitrogen status in seeds of arabidopsis. Plant Physiol, 2003, 132: 926–935
21 Wong H K, Chan H K, Coruzzi G M, et al. Correlation of *ASN2* gene expression with ammonium metabolism in arabidopsis. Plant Physiol, 2004, 134: 332–338
22 Ma X, Cheng Z, Qin R, et al. *OsARG* encodes an arginase that plays critical roles in panicle development and grain production in rice. Plant J, 2013, 73: 190–200
23 Shrawat A K, Carroll R T, DePauw M, et al. Genetic engineering of improved nitrogen use efficiency in rice by the tissue-specific expression of *alanine aminotransferase*. Plant Biotech J, 2008, 6: 722–732
24 Li H, Hu B, Chu C. Nitrogen use efficiency in crops: Lessons from Arabidopsis and rice. J Exp Bot, 2017, 68: 2477–2488
25 He X, Qu B, Li W, et al. The nitrate-inducible NAC transcription factor TaNAC2-5A controls nitrate response and increases wheat yield. Plant Physiol, 2015, 169: 1991–2005
26 Konishi M, Yanagisawa S. Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. Nat Commun, 2013, 4: 1617
27 Liu K H, Niu Y, Konishi M, et al. Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks. Nature, 2017, 545: 311–316
28 Yu L H, Wu J, Tang H, et al. Overexpression of Arabidopsis *NLP7* improves plant growth under both nitrogen-limiting and -sufficient conditions by enhancing nitrogen and carbon assimilation. Sci Rep, 2016, 6: 27795
29 Nishida H, Tanaka S, Handa Y, et al. A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. Nat Commun, 2018, 9: 499
30 Lin J S, Li X, Luo Z, et al. NIN interacts with NLPs to mediate nitrate inhibition of nodulation in Medicago truncatula. Nat Plants, 2018, 4: 942–952
31 Sato T, Maekawa S, Konishi M, et al. Direct transcriptional activation of BT genes by NLP transcription factors is a key component of the nitrate response in Arabidopsis. Biochem BioPhys Res Commun, 2017, 483: 380–386
32 Araus V, Vidal E, Puelma T, et al. Members of *BTB* gene family of scaffold proteins suppress nitrate uptake and nitrogen use efficiency. Plant Physiol, 2016, 171: 1523–1532
33 Kurai T, Wakayama M, Abiko T, et al. Introduction of the ZmDof1 gene into rice enhances carbon and nitrogen assimilation under low-nitrogen conditions. Plant Biotech J, 2011, 9: 826–837
34 Wu Y, Yang W, Wei J, et al. Transcription factor OsDOF18 controls ammonium uptake by inducing ammonium transporters in rice roots. Mol Cells, 2017, 40: 178–185
35 Yang J, Wang M, Li W, et al. Reducing expression of a nitrate-responsive bZIP transcription factor increases grain yield and N use in wheat. Plant Biotech J, 2019, 17: 1823–1833
36 Li X, Xia K, Liang Z, et al. MicroRNA393 is involved in nitrogen-promoted rice tillering through regulation of auxin signal transduction in axillary buds. Sci Rep, 2016, 6: 32158
37 Iwamoto M, Tagiri A. MicroRNA-targeted transcription factor gene *RDD1* promotes nutrient ion uptake and accumulation in rice. Plant J, 2016, 85: 466–477
38 Zhao M, Ding H, Zhu J K, et al. Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. New Phytol, 2011, 190: 906–915
39 Qu B, He X, Wang J, et al. A wheat CCAAT box-binding transcription factor increases the grain yield of wheat with less fertilizer input. Plant Physiol, 2015, 167: 411–423
40 Gifford M L, Dean A, Gutierrez R A, et al. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 803–808
41 Yan Y, Wang H, Hamera S, et al. miR444a has multiple functions in the rice nitrate-signaling pathway. Plant J, 2014, 78: 44–55
42 Gaudinier A, Rodriguez-Medina J, Zhang L, et al. Transcriptional regulation of nitrogen-associated metabolism and growth. Nature, 2018, 563: 259–264

43 Varala K, Marshall-Colón A, Cirrone J, et al. Temporal transcriptional logic of dynamic regulatory networks underlying nitrogen signaling and use in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115: 6494–6499
44 Chen X, Yao Q, Gao X, et al. Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition. Curr Biol, 2016, 26: 640–646
45 Wang Q, Nian J, Xie X, et al. Genetic variations in *ARE1* mediate grain yield by modulating N utilization in rice. Nat Commun, 2018, 9: 735
46 Huang X, Qian Q, Liu Z, et al. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. Nat Genet, 2009, 41: 494–497
47 Sun H, Qian Q, Wu K, et al. Heterotrimeric G proteins regulate nitrogen-use efficiency in rice. Nat Genet, 2014, 46: 652–656
48 Liu Q, Han R, Wu K, et al. G-protein βγ subunits determine grain size through interaction with MADS-domain transcription factors in rice. Nat Commun, 2018, 9: 852
49 Zhao M, Zhao M, Gu S, et al. DEP1 is involved in regulating the carbon-nitrogen metabolic balance to affect grain yield and quality in rice (*Oriza sativa* L.). PLoS One, 2019, 14: e0213504
50 Duan P, Ni S, Wang J, et al. Regulation of *OsGRF4* by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. Nat Plants, 2015, 2: 15203
51 Li S, Gao F, Xie K, et al. The OsmiR396c-OsGRF4-OsGIF1 regulatory module determines grain size and yield in rice. Plant Biotechnol J, 2016, 14: 2134–2146
52 Li S, Tian Y, Wu K, et al. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture. Nature, 2018, 560: 595–600

Summary for “提高农作物氮肥利用效率的关键基因发掘与应用”

Sustainable crop yields from the coordinated modulation of plant growth and nitrogen metabolism

Xueying Liu[1], Shan Li[3], Kun Wu[1], Qian Liu[1], Xiuhua Gao[1] & Xiangdong Fu[1,2*]

[1] *State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Innovative Academy of Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*
[2] *College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;*
[3] *State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*
* Corresponding author, E-mail: xdfu@genetics.ac.cn

Over the past 50 years, the Green Revolution based on the adoption of semi-dwarf cereals was able to significantly improve grain yield. The green revolution varieties (GRVs) accumulate more growth-repressing DELLA proteins (DELLAs) owing to mutant alleles at the *Rht* (wheat) and *SD1* (rice) loci, which results in semi-dwarfism and GRV resistance to “lodging” under high levels of nitrogen (N) fertilization. However, GRV DELLAs accumulation confers reduced N-use efficiency (NUE). Achievement of high GRV yield requires excessive use of N fertilizer inputs that unsustainably damage the environment. Therefore, developing new breeding strategies to cut fertilizer use in high-yield cereal crops is an urgent global sustainable agriculture goal.

Recently, we showed that the rice GROWTH-REGULATING FACTOR 4 (GRF4) is a positive regulator of N-responsive plant growth and N assimilation, and GRF4 could counteract SLR1-mediated inhibition of N-metabolism. The further experiments demonstrated that homeostatic co-regulation of plant C-N ratio is conferred by balanced activities and physical interaction of GRF4 and the DELLAs. GRF4 promotes and integrates N assimilation, C fixation and plant growth, whilst DELLA inhibits them. Importantly, we showed that increased GRV GRF4 abundance alters the GRF4-DELLA balance to favour increased C and N assimilation without loss of yield-enhancing dwarfism, thus sustainably boosting dwarfism-conferred GRV yield-gains. Therefore, modulating coordination of plant growth and metabolism thus elevates NUE and yield, enabling strategic breeding for sustainably increased global food security, yet reducing environmentally degrading agricultural nitrogen use.

This minireview discusses the latest advances in the understanding of molecular mechanisms underlying the improvement of NUE. In addition, N sensing, signaling and responses are complicatedly regulated by various positive and negative components. Thus, identification of new components in the regulation of N metabolism and signaling using systems-wide approaches and the understanding of the cross-talk with other nutrient and phytohormone signaling will provide new strategies for future sustainable food security and a new green revolution.

crop, the Green Revolution, nitrogen use efficiency, GROWTH-REGULATING FACTOR 4, sustainable agriculture

doi: 10.1360/TB-2019-0043