

水稻铵转运蛋白基因 *OsAMT1;2* 的启动子分析^①李素梅¹, 施卫明^{2*}

(1 江苏省中国科学院植物研究所, 南京 210014; 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), 南京 210008)

摘要: AMT 是介导植物铵态氮高亲和吸收的跨膜蛋白, 已报道编码 AMT 蛋白的大部分基因的表达依赖外界氮水平和环境的调控, 但调控的机制目前尚不清楚。水稻的 *OsAMT1;2* 基因在氮缺乏条件下强烈诱导表达, 因此, 本研究从水稻基因组 DNA 中 PCR 克隆 *OsAMT1;2* 基因上游 1 940 bp 的启动子序列, 采用软件和试验分析 *OsAMT1;2* 启动子存在的顺式调控元件与外界氮调控的相关性。软件预测结果表明, 启动子区域内除含有 TATA-box 和 CAAT-box 外, 同时含有多种非生物胁迫、生物胁迫、激素响应和光响应相关的顺式作用元件, 如 Box-w1、MBS、MeJA、TATC 和 ERE 应答元件。将 *OsAMT1;2* 启动子的 5'端顺序删除获得 5 个不同缺失片段分别与 GUS 报告基因融合构成表达载体, 通过农杆菌介导转入水稻成熟胚诱导的愈伤组织中获得转基因水稻, T1 代植株水平上的 GUS 活性分析表明, 最短启动子片段(-211 bp)能够启动 GUS 表达, 但是 GUS 活性较低, 对缺氮效应也不显著; 中等长度启动子片段(-763 bp)的 GUS 活性提高, 受缺氮诱导显著, 且缺氮诱导不再随启动子长度增加而显著增强, 说明应答氮响应的顺式作用元件位于-211 bp 和-763 bp 之间, 非生物胁迫和激素相关的顺式作用元件多在这个区域内, 是否与氮的调控存在相关性有待后续进一步证明。

关键词: 铵转运蛋白 AMT; *OsAMT1;2* 启动子; 顺式作用元件; GUS 组织化学染色

中图分类号: Q786; Q945.12 **文献标识码:** A

一般说来在低温、淹渍及酸性土壤中, 由于硝化作用被抑制, 铵态氮成为植物的主要氮源。水稻是喜欢铵态氮的植物之一。植物根中铵态氮的高亲和吸收系统由跨膜蛋白 AMT 介导。拟南芥 *AtAMT1;1* 是首个从植物中分离的铵转运蛋白^[1], 截至目前已经从拟南芥、水稻(*Oryza sativa*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、百脉根(*Lotus japonicus*)、油菜(*Brassica campestris*)、山杨(*Populus tremula* subsp. *tremuloides*)、苜蓿(*Medicago truncatula*)、绿藻(*Chlamy domonas reinhardtii*)、小麦(*Triticum aestivum*)、大豆(*Glycine max*)、高粱(*Sorghum bicolor*)等植物中分离到 AMT 蛋白, 表明 AMT 蛋白广泛分布在单子叶和双子叶植物中, 但是不同的植物中 AMT 蛋白基因数目不同。水稻中至少存在 12 个 AMT 蛋白^[2-3], 被分成 5 个不等数量的基因家族 *OsAMT1* ~ *5*, *OsAMTs* 的表达调控已经有很多研究报道^[4-5], 其中 AMT1 家族的 3 个基因 *OsAMT1;1* ~ *1;3* 的研究最为深入, 包括异源体系的生物功能验证和基因的表达特征和调控。

早期的生理试验发现拟南芥根对铵态氮的吸收量与光照相关, 到暗周期突然下降, 而且吸收量与根中 AMT 的转录水平相关^[6], 暗周期期间补给蔗糖可提高 AMT 基因的转录水平^[7], 说明光周期影响 AMT 的表达。*OsAMT1;1* ~ *1;3* 的表达也受到光周期的影响^[8], 同时 *OsAMT1;1* ~ *1;3* 在根部和地上部均有表达, 但各自具有特异的组织表达特征, 并专一性的受氮水平调控。*OsAMT1;1*(AF289477)是水稻 AMT1 家族中表达水平最高的基因, 根中地上部均有同等表达, 受低氮诱导表达^[9]; *OsAMT1;2*(AF289478)主要在根部表达, 且低氮水平能强烈诱导其表达^[5,10]; *OsAMT1;3*(AF289479)主要在根中表达, 低氮抑制其表达。研究也发现 *OsAMT1;2* 不仅受氮水平调控, 随着幼苗的生长, 它的表达水平也迅速提高以适应水稻的生长^[10]。然而, AMT 基因的表达调控机制尚不清楚。启动子是调控基因表达的重要顺式作用元件, 在基因表达过程中起着重要作用, 而 *OsAMT1;2* 受氮水平的表达调控比较显著。因此本研究从软件预测和启动子对报告

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(30800702)资助。

* 通讯作者(wmshi@issas.ac.cn)

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

基因 GUS 活性两方面研究 *OsAMT1;2* 启动子的顺式作用元件与氮调控的应答区域之间存在的可能关系,以期探索 *OsAMT1;2* 对水稻铵态氮吸收转运的顺式调控元件,为探明基因的表达调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 *OsAMT1;2* 启动子区域序列分析

采用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[11]对 *OsAMT1;2* 启动子顺式作用元件进行预测分析。

1.2 水稻受体材料、载体和菌株

以苗期水培条件下氮高效品种桂单 4 号为 *OsAMT1;2* 启动子克隆的基因组 DNA 来源,同时以含有 2,4-D 的培养基诱导灭菌的桂单 4 号成熟种子,分取 3~4 周培养后分化出的愈伤组织作为后续启动子融合 GUS 转化体系的受体材料。载有 GUS 基因的 pBI121 作为表达载体,载体含有的 p35S 启动子与 *OsAMT1;2* 启动子序列进行替换。根癌农杆菌 EHA-101 介导不同缺失 *OsAMT1;2* 启动子片段表达载体去转染诱导出的水稻愈伤组织,进行组织培养获得不同的转基因植株。

1.3 *OsAMT1;2* 启动子克隆和不同长度片段表达载体构建

从 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中获得了 *OsAMT1;2* 所在基因组的序列,选取 ATG 前 1 939 bp 作为其启动子序列。根据 *OsAMT1;2* 启动子和 pBI121 载体的序列,利用 Primer 软件设计带有 HindIII 和 BamHI 酶切位点的特异引物 P1(ggcaagcttagcaag-caggttagca)和 P2(atggatccagccaagtgtggcaaggt),以水稻桂单 4 号基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增条件为 94 预变性 5 min, 94 变性 30 s, 58 退火 45 s, 72 延伸 2 min, 30 个循环, 72 延伸 10 min。PCR 产物用 10 g/kg 琼脂糖凝胶电泳分离后,切胶回收目的片段,连入克隆载体 pMD18 进行测序。根据软件预测的顺式作用元件所在位置逐一删除部分启动子序列获得不同缺失片段的 *OsAMT1;2* 启动子,克隆到 pBI121 中替代 p35S,构建不同缺失片段的 *OsAMT1;2* 启动子融合 GUS 的表达载体 pAMTx。

1.4 转基因水稻的组织培养和分子检测

含有不同缺失片段 *OsAMT1;2* 启动子的表达载体分别转化农杆菌 EHA101,筛选携带了表达载体的农杆菌与水稻愈伤组织共培养进行转染。与农杆菌共培养 3 d 的愈伤组织用无菌水洗去表面的菌体,在 500 mg/L 羧苄青霉素的选择压力下筛选培养转化子,

分化的独立的新生 T0 株系分别用 CTAB 方法提取叶片中的基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,设计 T-DNA 插入部分的 GUS 序列引物,以 pBI121 质粒为阳性对照,未转化的桂单 4 号为阴性对照,进行 PCR 检测。PCR 扩增程序为:94 预变性 5 min, 94 45 s, 52 1 min, 72 2 min, 30 个循环, 72 延伸 10 min, 预计所有的转基因植株和对照质粒均能够扩增出一个 1.9 kb 的条带,扩增后取 5 μ L 产物在 10 g/kg 的琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

1.5 T1 代转基因水稻植株不同氮水平的 GUS 活性组织染色和酶活分析

收获的不同缺失片段 *OsAMT1;2* 启动子的 T1 代水稻种子按照常规方式育种至根长 2 cm 时移植到尼龙网上,用改良的木村营养液(含 0.5 mmol/L NH_4NO_3 作为唯一氮源)进行培养,培养液 pH 5.5、加硝化抑制剂二氰胺 5.89 mg/L,每 3 d 更换一次营养液,置于植物生长室培养 2 周。2 周后进行氮水平处理,一半以 1 mmol/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 为氮源,一半不加氮源,其他条件相同,培养 3 d。取 0.1 g 根系提取可溶性蛋白按 Jefferson 等^[12]的方法测定 GUS 酶活,同时取启动子最长片段的转基因水稻根系进行 GUS 染色分析。

2 结果与分析

2.1 *OsAMT1;2* 启动子区域序列分析

OsAMT1;2 起始密码子 ATG 上游 1.9 kb 的序列预测分析结果显示,*OsAMT1;2* 启动子内除含有必需的核心元件 CAAT-box 和 TATA-box 外,还包含很多非生物和生物胁迫、激素以及光响应相关的元件(表 1)。非生物胁迫相关调控元件包括厌氧诱导的 ARE、干旱诱导的 MBS 和富含 TC 重复序列的胁迫响应顺式作用元件;生物胁迫相关调控元件包括真菌诱导的 Box-W1、胚乳表达的 GCN4 和 Skn-1、种子特异性调控的 RY-element 和生理周期调控的 circadian;激素相关的调控元件包括茉莉酸甲酯调控的 CGTCA 和 TGACG、乙烯响应的 ERE、赤霉素响应的 TATC box 和玉米素代谢调节的 O_2 -site;同时还发现了多个参与光响应的元件,G-box、GA、GATA、CATT、GT1、I-box、3-AF1、Box1、Box4、TCT、chs-CMA1a、chs-CMA3a 和 rbcS-CMA7a。通过对 *OsAMT1;2* 启动子的序列分析推测其可能是一个胁迫诱导型和光周期调控的启动子。

2.2 *OsAMT1;2* 启动子克隆与不同长度序列启动 GUS 的表达载体构建

以桂单 4 号水稻基因组 DNA 为模板用特异性引

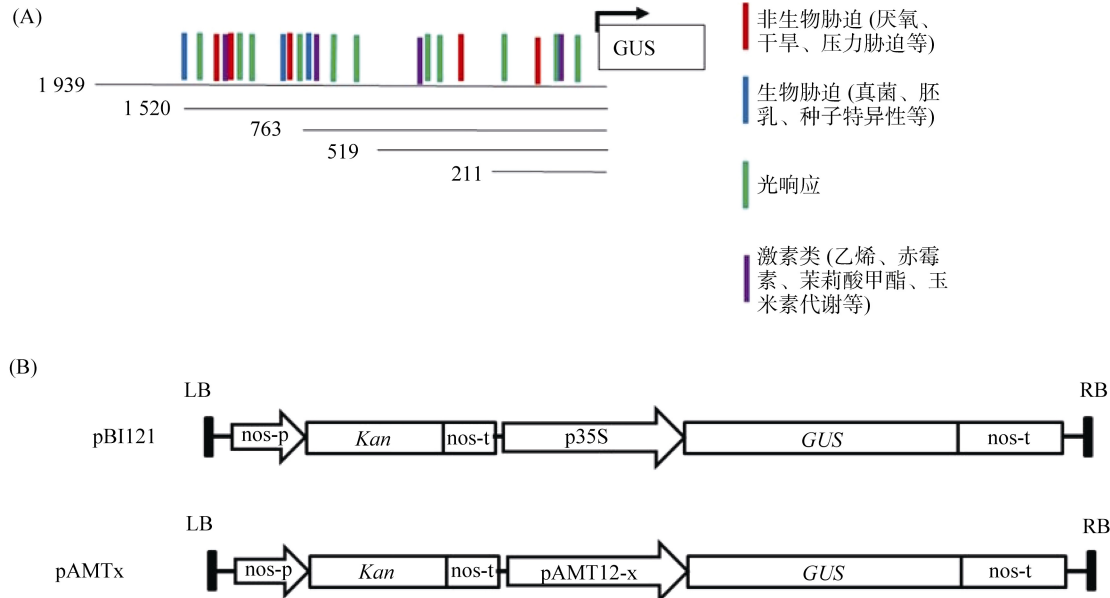
表 1 水稻 *OsAMT1;2* 启动子区包含的顺式调控元件
Table 1 Cis-acting elements in promoter of *OsAMT1;2*

元件	位置(bp)	功能	数量	元件	位置(bp)	功能	数量
ARE	-298; -1 032	厌氧诱导	2	G-box	-187; -686; -509; -1 459	光响应	4
MBS	-115; -776	干旱诱导	2	GA-motif	-562; -1 358	光响应	2
TC-rich repeats	-1 229	胁迫响应	1	GATA-motif	-1 340	光响应	1
Box-W1	-1 034	真菌诱导响应	1	CATT-motif	-545	光响应	1
RY-element	-797	种子特异性调控	1	GT1-motif	-1 128; -1 129	光响应	2
Skn-1 motif	-713; -1 372	胚乳表达	2	I-box	-1 325; 1 340	光响应	2
GCN4-motif	-710	胚乳表达	1	3-AF1 binding site	-44	光响应	1
circadian	-995; -1 099	生理周期控制	2	Box 4	-996	光响应	1
CGTCA-motif	-683	茉莉酸甲酯响应	1	Box I	-89	光响应	1
TGACG-motif	-683	茉莉酸甲酯响应	1	TCT-motif	-263; -1 233	光响应	2
ERE	-89	乙烯响应	1	chs-CMA1a	-329	光响应	1
O ₂ -site	-1 035	玉米素代谢调节	1	chs-CMA2a	-1 293	光响应	1
TATC-box	-279	赤霉素响应	1	rbcs-CMA7a	-911	光响应	1

物 PCR 扩增 *OsAMT1;2* 上游 1.9 kb 的启动子区域，所获得序列测序结果与 Genbank 进行比较分析，同源性达 98%，确认是 *OsAMT1;2* 的启动子序列。结合预测的顺式调控元件将 1.9 kb 按不同长度删除获得 5 个启动子序列(图 1A)，克隆到表达载体 pBI121 中替换 p35S(图 1B)，以此不同缺失片段的 *OsAMT1;2* 启动子分析报告基因 GUS 活性。

2.3 表达载体的农杆菌转化及其验证

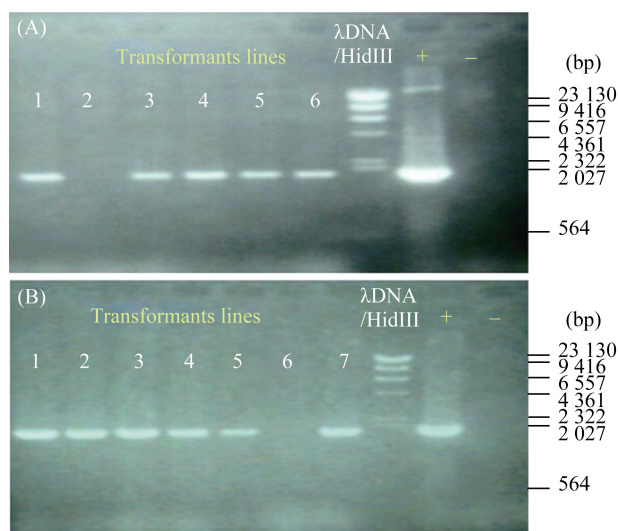
所有的 pAMTx 结构通过农杆菌 EHA101 介导转入诱导的水稻愈伤组织，组培过程中使用潮霉素进行多次筛选获得阳性愈伤组织，再分化和诱导培养至幼苗长出，取部分幼苗新叶提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定(图 2)，含有插入的 *GUS* 片段的幼苗移植到土壤中，常规施肥管理至开花结果，收获 T0 代种子作为



(A：不同长度的 *OsAMT1;2* 启动子序列，包含不同潜在的蛋白转录结合基序模块；B：pAMTx 表达载体的 T-DNA 区结构图，其中，LB 代表左边界序列，RB 代表右边界序列，*Kan* 代表卡那霉素筛选标记，*GUS* 代表 β 葡萄糖醛酸酶，*35S* 代表烟草花叶病毒 35S 启动子，*nos-t* 代表胭脂氨酸合成酶终止子，x 代表不同长度启动子。)

图 1 *OsAMT1;2* 启动子删除分析

Fig. 1 Deletion analysis of *OsAMT1;2* promoter

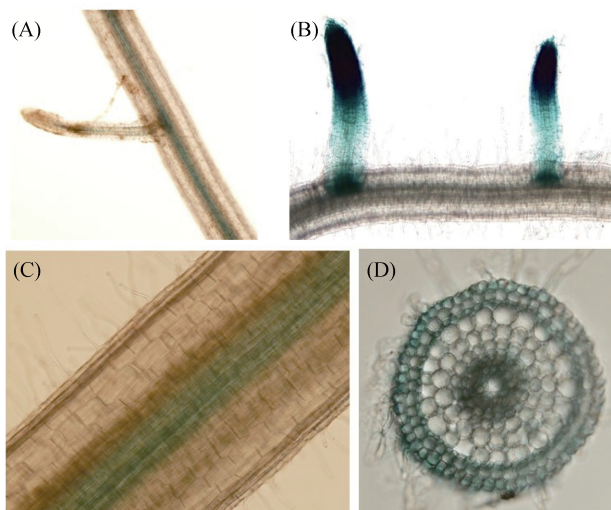


(图 A 中 1~6、图 B 中 1~7 为不同的转化株系；+ 阳性对照 pBI121；- 野生型植株基因组 DNA)

图 2 pAMTx 结构转化株系的基因组 DNA 的 PCR 鉴定
Fig. 2 PCR identifications of pAMTx different transformant lines

T1 的幼苗供 GUS 活性和酶活分析, 每个启动子结构片段至少保留 3 株独立的转基因株系。

2.4 转基因水稻株系的组织化学染色和酶活测定
构建的 *OsAMT1;2* 启动子表达载体转化获得的转基因株系, 在缺氮处理培养下观察报告基因表达情况。最长启动子转基因水稻根系的 GUS 染色发现在有氮供应时, 根系中报告基因在中柱表达, 根尖未见表达(图 3A), 经缺氮处理后, 报告基因的表达量显著上调, 尤其新生根的根尖表达量迅速提高(图 3B); 纵向压片和横切片的结果与整根染色效果相同

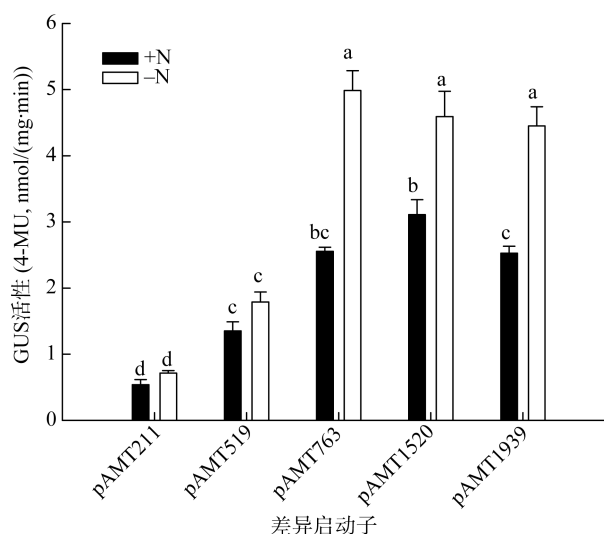


(图 A 和 C 为对照, 1 mmol/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 培养的幼苗根系; 图 B 和 D 缺氮处理培养 3 d 的幼苗根系)

图 3 pAMT1939 转基因水稻根系缺氮培养下组织化学染色分析

Fig. 3 Histochemical GUS array of pAMT1939 transgenic rice roots after nitrogen-deficiency

(图 3C、D)。氮处理下的 GUS 酶活测定表明最短的启动子序列(-211 bp)可以启动 GUS 的表达, 但是 GUS 活性较低, 且受缺氮调控也不显著, 当启动子长度达到 -763 bp 长度后启动的 GUS 酶活受到缺氮显著诱导表达, 同时发现在 763 ~ 1 939 bp 范围内启动的 GUS 酶活没有显著差异(图 4), 也就是说-763 bp 足够调控下游基因的表达。以上结果表明, *OsAMT1;2* 启动子为缺氮诱导的特异型启动子。在正常条件下, *OsAMT1;2* 启动子驱动下游基因集中在根系中柱表达, 对铵态氮的吸收贡献很小; 在缺氮条件下, *OsAMT1;2* 启动子明显增强下游基因在皮层和根尖的表达量, 从而增强植物对铵态氮的吸收。



(图中不同小写字母表示处理间差异在 $P < 0.05$ 水平显著)

图 4 转基因水稻根系缺氮培养下 GUS 酶活测定($n=3$)
Fig. 4 Fluorometric GUS assay of pAMTx after nitrogen-deficiency lines

3 讨论

铵态氮是植物重要的氮素营养, 过量吸收对细胞有毒害作用^[13-14], 因此铵态氮在根内的跨膜运输必须被精准控制^[15-17], 这个过程要求 AMT 的表达及转运活性在多个层面上被严格调控。外部铵态氮的有效性和植株体内氮素营养状况是影响 AMT 基因表达的主要因素^[4,18], 蔗糖、 CO_2 浓度、光周期、菌根共生系统对其 mRNA 水平的转录调节也有影响^[17]。在转录水平调控上, 不同家族成员之间的表达调控模式也不尽相同, 通过严谨的调控网络有效地调控铵态氮的吸收, 以适应外界环境的变化和自身生长的需求。分析发现 *OsAMT1;2* 启动子的顺式作用元件中存在一些非生物和生物调控元件、激素相关以及光响应调控元件(表 1), 说明 *OsAMT1;2* 的表达调控可

能与启动子中的这些顺式作用元件存在相关性。

氮素缺乏强烈诱导 *OsAMT1;2* 表达量的增加^[10], *OsAMT1;2* 启动的 GUS 活性再次证明了 *OsAMT1;2* 的缺氮诱导效应(图 4), 且诱导效应自-763 bp 后不再随启动子的长度增加有显著地增加, 而非生物胁迫和激素相关的顺式作用元件多分布在 -211 bp 和 -763 bp 区域内(图 1), 缺氮诱导可能与这些调控元件相关。因为根系适应缺氮或低氮条件会增加根系生物量以扩大吸收面积获取营养^[18], 茉莉酸甲酯调控的 CGTCA 和 TGACG、乙烯响应的 ERE 和赤霉素响应的 TATC-box 均是诱导细胞分裂生长的顺式调控元件, 诱导根系加速生长抵抗对环境氮源不足的防御。其次根系的快速增生寻找养分与干旱条件下植物具有更加发达的根系以寻找水分的目的一致, 这可能是 *OsAMT1;2* 启动子分别在 -115 bp 和 -776 bp 存在两个干旱诱导的 MBS 顺式作用元件的原因。AMT 受光周期影响的报道很多, 早前的研究发现光周期对 AMT 的调控是通过光合同化产物完成的^[4], 氧化磷酸戊糖代谢是糖信号控制 AMT 表达的可能途径^[20], 最新报道的 *OsAMT1;1* 的表达也受到光周期的调控^[9], 这与 *OsAMT1;2* 启动子中存在多个光响应的顺式作用元件相关。此外, 菌根共生系统可以影响多种植物中 AMT 家族基因的表达^[21-25]。 *OsAMT1;2* 的启动子中也存在真菌诱导元件, 或许也存在潜在的菌根共生的诱导表达作用。

AMT 基因在 mRNA 水平的表达调控除了与上述因素有关外, 还涉及到一些效应因子和转录因子, 如激酶 CIPK23 与 AtAMT1;1 和 AtAMT1;2 相互作用抑制铵态氮的吸收^[26], 转录因子 OsDOF18 诱导 AMT 的表达调控根系铵态氮吸收^[27]。AMT 在蛋白水平上也进行有效的调控, 拟南芥 AtAMT1;3 和 AtAMT1;1 的同源或异源多聚体的活性都受到 C 末端的调控^[28], AMT 蛋白 C 端磷酸化是 AMT 变构调节蛋白活性的机制, 可以通过磷酸化直接调控 AMT/Mep 蛋白的转运活性^[29]。

4 结论

通过软件预测和融合的报告基因 GUS 活性的结果表明, 水稻铵转运蛋白 *OsAMT1;2* 启动子区域内除了含有 TATA-box 和 CAAT-box 外, 同时含有多种非生物胁迫、生物胁迫、激素响应和光响应相关的顺式作用元件, 如 Box-w1、MBS、MeJA、TATC 和 ERE 应答元件。 *OsAMT1;2* 启动子的不同缺失片段启动的 GUS 活性分析指出, -211 bp 能够启动 GUS 表达,

但是 GUS 活性较低, 对缺氮效应也不显著, 而-763 bp 的 GUS 活性提高, 且受缺氮诱导显著, 同时发现自-763 开始缺氮诱导不再随启动子长度增加而显著增强, 说明应答氮响应的顺式作用元件位于 -211 bp 和-763 bp 之间, 可能与这个区域内存在的非生物胁迫和激素相关的顺式作用元件相关。

参考文献:

- [1] Ninnemann O, Jauniaux J C, Frommer W B. Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants[J]. EMBO Journal, 1994, 13: 3464-3471
- [2] Li B Z, Mike M, Li S M, et al. Molecular basis and regulation of ammonium transporter in rice[J]. Rice Science, 2009, 16: 314-322
- [3] 邓若磊, 谷俊涛, 路丈静, 等. 水稻铵转运蛋白基因 *OsAMT1;4* 和 *OsAMT5* 的特征分析、功能和表达[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2395-2402
- [4] 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
- [5] 曹玉, 李素梅, 施卫明, 等. 水稻吸铵基因 *OsAMT1;2* 和 *OsAMT3;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
- [6] Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, et al. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots[J]. Plant Cell, 1999, 11: 937-948
- [7] Lejay L, Gansel X, Cerezo M, et al. Regulation of root ion transporters by photosynthesis: Functional importance and relation with hexokinase[J]. Plant Cell, 2003, 15: 2218-2232
- [8] Kumar A, Silim S N, Okamoto M, et al. Differential expression of three members of the AMT1 gene family encoding putative high-affinity NH_4^+ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica[J]. Plant Cell and Environment, 2003, 26: 907-914
- [9] 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
- [10] 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
- [11] Lescot M, Déhais P, Moreau Y, et al. PlantCARE: A database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, Database Issue, 2002, 30(1): 325-327
- [12] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal, 1987, 6(13): 3901-3907

- [13] 邹娜, 李保海, 强晓敏, 等. 高铵胁迫对拟南芥根系向重性的影响及机制初探[J]. 土壤, 2013, 45(1): 166-171
- [14] 李青, 李保海, 施卫明. 高铵胁迫对拟南芥幼苗侧根生长的影响及机制探索[J]. 土壤, 2011, 43(3): 374-381
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Loque D, von Wiren N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55: 1293-1305
- [18] Sohlenkamp C, Wood C C, Roeb G W, et al. Characterization of *Arabidopsis AtAMT2*, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane[J]. *Plant Physiology*, 2002, 130: 1788-1796
- [19] Shi W M, Xu W F, Li S M, et al. Responses of two rice cultivars differing in seedling stage nitrogen use efficiency to growth under low-nitrogen conditions[J]. *Plant and Soil*, 2010, 326: 291-302
- [20] Lejay L, Wirth J, Pervent M, et al. Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146: 2036-2053
- [21] Hong J J, Park Y S, Bravo A, et al. Diversity of morphology and function in arbuscular mycorrhizal symbioses in *Brachypodium distachyon*[J]. *Planta*, 2012, 236: 851-865
- [22] Koegel S, Ait Lahmidi N, Arnould C, et al. The family of ammonium transporters (AMT) in *Sorghum bicolor*: Two AMT members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *New Phytologist*, 2013, 198: 853-865
- [23] Pérez-Tienda J, Corrêa A, Azcón-Aguilar C, et al. Transcriptional regulation of host NH_4^+ transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2014, 75: 1-8
- [24] Ruzicka D R, Hausmann N T, Barrios-Masias F H, et al. Transcriptomic and metabolic responses of mycorrhizal roots to nitrogen patches under field conditions[J]. *Plant and Soil*, 2012, 350: 145-162
- [25] Straub D, Ludewig U, Neuhäuser B. A nitrogen dependent switch in the high affinity ammonium transport in *Medicago truncatula*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 86: 485-494
- [26] Straub T, Ludewig U, Neuhäuser B. The kinase CIPK23 inhibits ammonium transport in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Cell*, 2017, 29(2): 409-422
- [27] Wu Y, Yang W, Wei J, et al. Transcription factor *OsDOF18* controls ammonium uptake by inducing ammonium transporters in rice roots[J]. *Molecules Cells*, 2017, 40(3): 178-185
- [28] Yuan L, Gu R, Xuan Y, et al. Allosteric regulation of transport activity by heterotrimerization of *Arabidopsis* ammonium transporter complexes in vivo[J]. *Plant Cell*, 2013, 25: 974-984
- [29] van den Berg B, Chembath A, Jefferies D, et al. Structural basis for Mep2 ammonium transporter activation by phosphorylation[J]. *Nature Communication*, 2016, 7: 11337

Promoter Analysis of Rice Ammonium Transporters *OsAMT1;2*

LI Sumei¹, SHI Weiming^{2*}

(1 *Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China*; 2 *State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China*)

Abstract: AMT is transmembrane protein mediated high-affinity ammonium uptake in plants. It has been reported that the expression of most genes encoding AMT protein depends on external nitrogen level and environmental condition, but the mechanism of expression regulation is unclear. The expression of *OsAMT1;2* was greatly induced by nitrogen-deficiency. Therefore, the sequence of *OsAMT1;2* promoter was cloned by using PCR from rice genome DNA and analyzed by using software and experimental analysis fusion GUS reporter gene. Software predicted results showed that the promoter region contained not only the TATA box and CAAT box, but also a variety of cis-elements of abiotic stress, biological stress, hormone and light response, such as Box-w1, MBS, MeJA, TATC and ERE. *OsAMT1;2* promoter was deleted along with 5' end to construct five different pAMT12-x-GUS expression vector, which subsequently were transformed into rice callus to establish different transgenic rice lines. The GUS activity of T1 generation plants showed that the shortest promoter fragment (–211 bp) could start the GUS expression, but GUS activity was low and the effect of nitrogen-deficiency was not significant. The GUS activity and inductive effect of nitrogen-deficiency significantly increased when –763 bp promoter fragment fusion with GUS, additionally the inductive effect no longer significantly enhanced with the increase of the promoter length. The cis-element of abiotic stress and hormones related lies between –211 bp and –763 bp, whether correlation between nitrogen regulation and cis-elements of abiotic stress and hormones remains to be further probed.

Key words: Ammonium transporter; *OsAMT1;2* promoter; Cis-acting elements; GUS activity