

## 植物吸收利用铵态氮和硝态氮的分子调控

李宝珍<sup>1,2</sup>, 范晓荣<sup>2</sup>, 徐国华<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008; <sup>2</sup>南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095

## Molecular Regulation for Uptake and Utilization of Ammonium and Nitrate in Plant

LI Bao-Zhen<sup>1,2</sup>, FAN Xiao-Rong<sup>2</sup>, XU Guo-Hua<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Nanjing Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; <sup>2</sup>College of Resource and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

提要: 本文介绍了植物吸收和利用  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_3^-$  的转运系统和相关基因的表达调控特征, 以及与氮还原、同化相关的酶及其调控基因的发现和功能的研究进展。

关键词: 铵; 硝; 转运; 还原同化; 调控表达

铵态氮(ammonium N,  $\text{NH}_4^+$ -N)和硝态氮(nitrate N,  $\text{NO}_3^-$ -N)作为植物吸收和利用的主要无机氮源, 对植物生长发育和作物的产量有着极为重要的影响。农业生产中, 为保证粮食产量, 氮肥的投入不断增加, 但其利用率却越来越低, 在一定程度上造成资源浪费, 并给环境造成极大的压力, 引起一系列的环境污染问题(朱兆良 2000)。因此, 如何提高氮肥的利用率, 充分发挥肥料的增产效应是急需解决的问题。随着植物营养研究的不断深入, 探究植物氮高效吸收、转运和储存的分子机制, 寻找提高植物氮素利用率的调控基因, 为从生物学途径改良植物对氮的吸收和利用提供了重要的科学依据。本文介绍植物吸收和转运  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  的分子调控机制以及氮还原同化相关的酶及其调控基因的研究进展。

### 1 植物对铵态氮的吸收和转运

**1.1 高亲和和低亲和铵转运系统** 植物根系对  $\text{NH}_4^+$  的吸收可分为高亲和力和转运系统(high affinity transporter, HATS)和低亲和力转运系统(low affinity transporter, LATS) (Glass 等 2002)。当外界  $\text{NH}_4^+$  离子浓度 ( $[\text{NH}_4^+]_{\text{ext}}$ ) 低于  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 主要是高亲和转运系统承担  $\text{NH}_4^+$  的吸收; 当  $[\text{NH}_4^+]_{\text{ext}}$  大于  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 低亲和转运系统才被激活(Wang 等 1993)。研究表明, 植物对  $\text{NH}_4^+$  的吸收属于不同铵转运蛋白家族的多个基因调控, 这些系统的亲和性

和功能的行使依赖于相应基因的在转录和/或翻译水平上的表达调控, 所以高亲和转运系统的动力学参数不仅在不同植物间相差很大, 而且对同一植物而言也受环境因素的影响(von Wiren 等 2000a)。**1.2 铵转运蛋白基因的克隆** 高等植物如水稻(Suenaga 等 2003)、番茄(Lauter 等 1996; von Wiren 等 2000b)、油菜(Pearson 等 2002)、白菜(D'Apuzzo 等 2004)、小麦等已鉴定了多个铵转运(ammonium transporter, AMT)基因(图 1)。几乎所有这些 AMT 家族的成员都有相似的拓扑学结构: 11个跨膜区, 其 N 端在质外体, C 端在细胞质内(Marini 和 Andre 2000)。AMT 的蛋白质序列和结构具有高度的保守性。有研究表明, 细菌氨转运蛋白 AmtB 的结构对吸收和利用氨起着关键的作用(Li 等 2006; Javelle 等 2008)。同样, 高等植物中铵转运蛋白晶体结构的变化及其相互作用, 亦是其铵吸收、转运或进行铵解毒作用的机制(Loque 等 2007)。Ludewig 等 (2003)研究番茄的铵转运蛋白基因 *LeAMT1.1* 表明, 在铵转运蛋白 C 端的高度保守的氨基酸突变后, *LeAMT1.1* 对铵的转运活性丧失, 推测 AMT 蛋白质

收稿 2008-08-06 修定 2008-12-08

资助 中国博士后科学基金(20070421031)、国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2005CB120903)和国家自然科学基金(30500309)。

\* 通讯作者(E-mail: ghxu@njau.edu.cn, Tel: 025-84396246)。

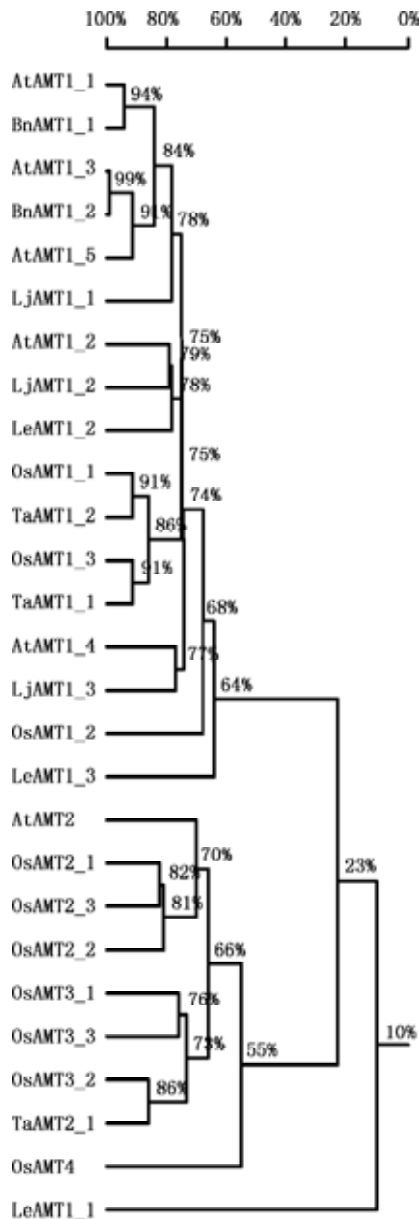


图1 高等植物铵转运蛋白的同源性分析  
氨基酸序列来自NCBI, 生物软件DNAMAN 6.0。

的结构特别是C端的保守序列调控着铵的吸收。2007年, Loque等和Neuhauser等分别利用拟南芥作为模式作物, 先后证明了AMT的C端高度保守氨基酸与其邻近的单体相互作用调控着铵的吸收, 这些氨基酸的突变引起AMT蛋白质的晶体构象的变化而使其转运铵的活性丧失, 但几个突变基因在酵母中共表达, 又因互补作用而恢复其转运铵的能力。

**1.3 铵的吸收和转运蛋白基因的表达调控** AMT表达的转录水平强烈受到氮营养状况的调控。拟南

芥缺氮3 d后, 根部*AtAMT1;1*和*AtAMT1;3*基因的表达量增强; 随着氮饥饿时间的增加, *AtAMT1;2*和*AtAMT2;1*的表达也趋向于增强(Loque和von Wiren 2004)。利用T-DNA插入的拟南芥铵转运蛋白的突变体研究表明, *AtAMT1;1*基因单突变导致高亲和 $\text{NH}_4^+$ 的内流(供 $\text{NH}_4^+$ 浓度小于 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )降低30% (Kaiser等2002); *AtAMT1;1*和*AtAMT1;3*基因双突变使得 $\text{NH}_4^+$ 的吸收相对于野生型下降约70% (Loque等2006), 表明在高亲和的条件下, *AtAMT1;1*和*AtAMT1;3*对 $\text{NH}_4^+$ 的吸收起非常重要的作用。*AtAMT1;1*的表达水平还可以表征拟南芥体内氮的营养状况, 并依赖于氮供应水平的转录后调控(Engineer和Kranz 2007; Yuan等2007)。在氮饥饿的条件下, *AtAMT1;1*在根系强烈表达, 氮充足供应时则在叶片强烈表达(Engineer和Kranz 2007)。昼夜变化和糖水平也影响*AtAMT1;2*和*AtAMT1;3*的表达水平, 而对*AtAMT1;1*影响小一些(Lejay等2003)。番茄在 $\text{NO}_3^-$ 和低 $\text{CO}_2$ 处理下, *LeAMT1;1*和*LeAMT1;3*在叶中表达量相对较高, 表明它们相应的蛋白有可能运输光呼吸产生的 $\text{NH}_3$ ; 而*LeAMT1;2*则是受 $\text{NH}_4^+$ 诱导在根系强烈表达, 加 $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NH}_4^+$ 和 $\text{NO}_3^-$ 混合)处理增强其表达。AMTs同源基因在水稻中表达不同于拟南芥和番茄。Sonoda等(2003a)研究发现氮饥饿3个星期的水稻再供氮 [ $0.15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ ] 2 h后, *OsAMT1;1*在 $\text{NH}_4^+$ 处理下增强表达; *OsAMT1;2*在 $\text{NH}_4^+$ 诱导下根部强烈表达; *OsAMT1;3*是低峰度表达, Norther印迹检测不到它的信号, 但用半定量PCR分析发现*OsAMT1;3*仅在根部表达, 且缺氮表达最强,  $\text{NH}_4^+$ 处理其次,  $\text{NO}_3^-$ 处理表达最弱(Li等2006)。Kumar等(2003)研究发现, 当水稻在 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{NH}_4^+$ 营养液中预处理后, 再转入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4^+$ 营养液中处理2 d后*OsAMT1;1*和*OsAMT1;2*的表达均明显增强, 其中*OsAMT1;2*的增加量是*OsAMT1;1*的50%, 但*OsAMT1;3*的变化不是很明显。进一步的研究表明, 这3个 $\text{NH}_4^+$ 转运蛋白的表达并不是受 $\text{NH}_4^+$ 本身供应状况的影响, 而是受谷氨酰胺的反馈调控(Sonoda等2003b)。油菜的铵转运蛋白基因*BnAMT1.2*在地上部表达, 它与叶片中GS2的活性有相同的调控趋势, 在叶部供铵时显著增加*BnAMT1.2*的表达(Pearson等2002), 而在叶部供应有机氮源谷氨酸或谷氨酰胺时表达受

抑制。

## 2 植物吸收和转运硝酸盐的分子机制

在通气良好的土壤上,  $\text{NO}_3^-$  是植物吸收的主要氮源。 $\text{NO}_3^-$  不仅是一种重要的营养物质, 还可以作为信号物质, 负反馈调控根系的生长(Stitt和Feil 1999; Mantelin和Touraine 2004)。最新的研究表明,  $\text{NO}_3^-$  也可以直接或通过对根尖谷氨酸的抑制作用来间接刺激主根的生长(Walch-Liu和Forde 2008)。

**2.1 高亲和和低亲和的硝酸盐转运系统**  $\text{NO}_3^-$  的吸收亦是受两个不同的系统调控的, 即高亲和力转运系统和低亲和力转运系统。当外界低  $\text{NO}_3^-$  浓度低于  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, HATS 对  $\text{NO}_3^-$  的内流起主要的调节, 当外界  $\text{NO}_3^-$  的浓度大于  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, LATS 就开始发挥作用了; HATS 又分为组成型(constitutive HATS, cHATS)和诱导型(inducible HATS, iHATS) (Crawford和Glass 1998)。

**2.2 硝酸盐转运蛋白基因的克隆和功能鉴定**  $\text{NO}_3^-$  的吸收通过硝酸盐转运蛋白(nitrate transporter, NRT), 即 NRT1 (低亲和)和 NRT2 (高亲和)家族的转运蛋白调控。目前为止, 在拟南芥中发现 NRT1 家族中至少有 50 多个成员, NRT2 家族中有 7 个成员(Okamoto等 2003), 水稻 NRT1 家族成员更多, 至少有 100 多个, NRT2 家族中发现有 6 个(Araki和Hasegawa 2006)。由于高亲和的 NRT2 在外界低  $\text{NO}_3^-$  浓度时对  $\text{NO}_3^-$  吸收有积极的作用, 故 NRT2 家族的成员是科研工作者研究的焦点。

NRT2 是  $\text{NO}_3^-$ - $\text{NO}_2^-$  共运蛋白(nitrate-nitrite porter, NNP)家族, 在原核生物和真核生物中均存在。该家族蛋白质在结构上归属于 17 个转运蛋白 MFS (major facilitator superfamily)成员之一(Forde 2000), 其特点是: (1)是位于原生质膜上的膜蛋白, 一般含有 500~600 氨基酸, 有 12 次跨膜, 且在蛋白质中部含有一个带电荷的亲水区域, 将跨膜域分为 6 个一组的左右两部分; (2)在第 2 和第 3 个跨膜域之间, 含有一个 D/N-R-X-G-R-R/K 保守序列; (3)在第 4 个跨膜域内部含有一个在氨基酸组成上为 I-X-X-R-X-X-X-G-X-X-X-G 保守序列; (4)在第 5 个跨膜域中, 含有保守氨基酸序列基元 [FYK]-x3-[ILQRK]-x-[GA]-x-[VASK]-x-[GASN]-[LIVFQ]-x1, 2-G-x-G-[NIM]-x-G-[GVTA] (Pao等 1998), 其拓扑结构中的 C 端、N 端以及亲水域的中心环均位于

胞质一侧。最早在低等植物衣藻中发现 3 个  $\text{NO}_3^-$  转运蛋白基因, 即 *CrNRT2;1*、*CrNRT2;2* 和 *CrNRT2;3*。但 *CrNRT2;1* 和 *CrNRT2;2* 不能转运  $\text{NO}_3^-$ , 还需要一个辅助蛋白 *CrNAR2* 的帮助才能转运  $\text{NO}_3^-$ , 即 *CrNRT2;1* 和 *CrNAR2* 两个蛋白一起或 *CrNRT2;2* 和 *CrNAR2* 两个蛋白一起工作才能转运  $\text{NO}_3^-$  (Forde 2000)。之后, 高等植物中也克隆到 *NRT2* 和 *NAR2* 基因, 例如大麦、大豆、烟草、拟南芥和水稻等作物(图 2) (Okamoto等 2003; Ryoichi和Hiroshi 2006; Vidmar等 2000; Yokoyama等 2001), 它们对  $\text{NO}_3^-$  的吸收转录调控是相当复杂的。

**2.3 硝的吸收和转运蛋白基因的表达调控** 环境因素和内部信号通过调控高亲和、低亲和的硝酸盐转运系统来控制  $\text{NO}_3^-$  的吸收(Crawford和Glass 1998; Forde 2000; Glass等 2002)。不同的植物或是同一植物的不同品种, 其对氮的利用能力是不一样的。Richard-Molard等(2008)研究拟南芥的两个品种('RIL282'和'432')发现, '432' 在  $\text{NO}_3^-$  饥饿的初期对  $\text{NO}_3^-$  更高吸收和储藏能力, 在氮供应变动的条件下, *AtNRT1.1*、*AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.4* 基因的表达更高, 是 'RIL282' 的 2~9 倍。

不同的氮营养调控着  $\text{NO}_3^-$  转运蛋白基因的表达从而影响着  $\text{NO}_3^-$  的吸收。在拟南芥中 *NRT2* 的 7 个成员在不同氮营养和其它环境因子调控下表达不一样。Okamoto等(2003)用  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$  处理拟南芥, 通过半定量 PCR 研究根系和地上部 *NRT1* 的 4 个成员(*AtNRT1.1~1.4*)和 *NRT2* 家族的 7 个成员(*AtNRT2.1~2.7*)的表达特性, 把它们化分为  $\text{NO}_3^-$  诱导、 $\text{NO}_3^-$  抑制和  $\text{NO}_3^-$  组成型基因。*AtNRT1.1*、*AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.2* 暴露在  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NO}_3^-$  3~12 h 后强烈被  $\text{NO}_3^-$  诱导, 之后又下降了; 相比较而言, *AtNRT2.4* 是中度受硝诱导了。*AtNRT2.5* 是  $\text{NO}_3^-$  抑制型的, 当暴露在  $\text{NO}_3^-$  的营养液时, 其表达在在地上部和地下部均强烈受到抑制。*AtNRT1.2*、*AtNRT1.4*、*AtNRT2.3*、*AtNRT2.6* 和 *AtNRT2.7* 受  $\text{NO}_3^-$  影响较小, 被化分为  $\text{NO}_3^-$  组成型基因。特别要指出的是, *AtNRT1.1* 是一个双亲和的  $\text{NO}_3^-$  转运基因, 组成性表达, 但  $\text{NO}_3^-$  营养中增强它的表达(Guo等 2001), 并可以扮演传感器的角色, 以致  $\text{NO}_3^-$  刺激侧根或主根的生长(Walch-Liu和Forde 2008)。*AtNRT2.1* 定位于根细胞的质膜上, 在高亲和硝转运系统中扮演主要角色, 它既可以把  $\text{NO}_3^-$  从根细胞吸

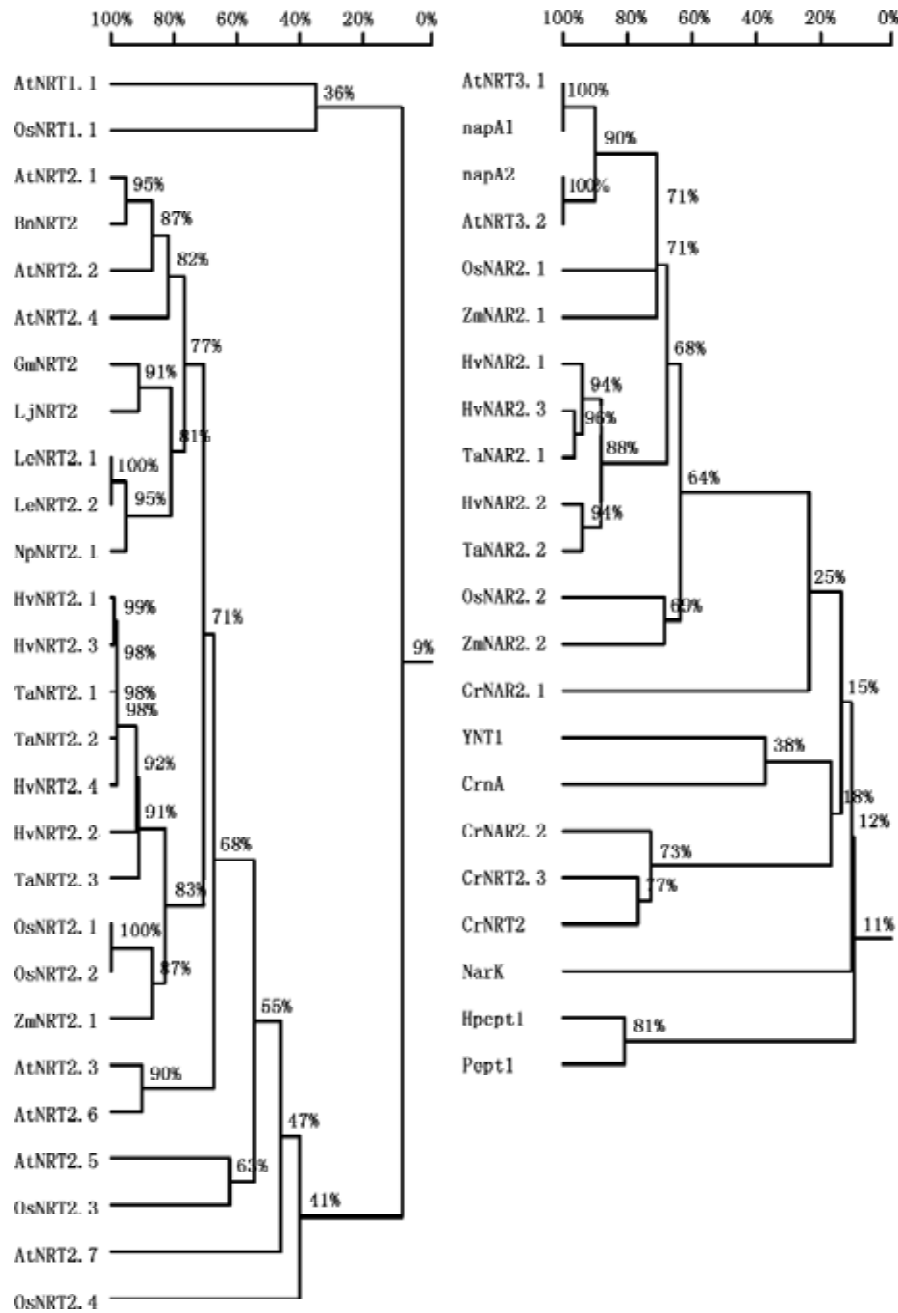


图2 高等植物和低等生物的硝酸盐转运蛋白家族的同源性分析  
氨基酸序列来自 NCBI; 生物软件 DNAMAN 6.0.

收转运至地上部和种子(Chopin等2007a),也影响根系构型的发展(Remans等2006)。因此, NRT2.1对根的生长发育方面类似于NRT1.1也具有双重的角色:一方面通过间接地吸收 $\text{NO}_3^-$ 来调控,另一方面在低 $\text{NO}_3^-$ 供应情况下直接调控侧根的生长,这与植物体内碳氮的比例相关(Desnos 2008);生长素也影响着 NRT2.1 基因的表达和氮素的吸收。Leblanc等(2008)研究油菜时发现, ACC刺激了根系的生长

和根毛的增多,但却降低 *BnNRT2.1* 的表达和氮素吸收。 *AtNRT2.7* 主要在再生器官和种子的夹果中表达,对种子中 $\text{NO}_3^-$ 的积累起着特殊的作用(Chopin等2007b)。另外, Okamoto等(2006)用 T-DNA 插入突变 *AtNRT3.1* 基因(它同源于衣藻的 *CrNAR2* 基因)的拟南芥突变体研究发现,  $\text{NO}_3^-$  营养处理下在 *Atnrt3.1* 的突变株中减弱 *AtNRT1.1* 和 *AtNRT2.1* 基因的转录水平,也降低了 $\text{NO}_3^-$ 的内流,说明 *AtNRT3.1*

对 *AtNRT1.1* 和 *AtNRT2.1* 转运  $\text{NO}_3^-$  时有辅助作用。Loque 等(2003)研究拟南芥 *NRT1;1* 和 *NiR* 的表达发现, 增加介质中  $\text{NO}_3^-$  含量, 降低了 *NRT1;1* 和 *NiR* 的转录水平; 另外在氮饥饿的植物中添加  $\text{NO}_2^-$ , *NRT1;1* 和 *NiR* 的转录水平强烈降低。施用  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  或氨基酸态氮, 植物中 *NRT2* 的转录水平下调了(Zhuo 等 1999)。在大麦中有 7~10 个高亲和  $\text{NO}_3^-$  转运蛋白 (*HvNRT2*), 目前已经分离到 4 个基因, 它们蛋白的分子量在 54~55 kDa 之间, 均是  $\text{NO}_3^-$  诱导型的, 有  $\text{NO}_3^-$ -N 供应的条件下, *HvNRT2* 基因的转录水平均增加。而且 *HvNRT2* 是后转录调控的, 在丝氨酸作为氮源的培养下, *HvNRT2* 转录水平和  $\text{NO}_3^-$  的内流分别降低了 97% 和 95%, 同时也降低 Glu 含量却增加了 Gln 的水平, 说明是 Gln 对 *HvNRT2* 表达起下调作用(Vidmar 等 2000)。水稻的 *OsNRT1* 基因仅仅是表现出低亲和性, 与 *AtNRT1.1* 双亲和性不一致, 而且是组成性表达(Lin 等 2000)。水稻也鉴定到 4 个 *NRT2* 和 2 个 *NAR2* 基因(Araki 和 Hasegawa

2006)。 *OsNRT2.1* 和 *OsNRT2.2* 的开放阅读框完全一致, 类似于拟南芥的 *AtNRT2.1* 和 *AtNRT2.2*、大麦的 *HvNRT2.1* 和 *HvNRT2.3*、番茄的 *LeNRT2.1* 和 *LeNRT2.2*, 而且与它们的同源性在 70%~90% (图 2)。Araki 和 Hasegawa (2006) 的研究表明, *OsNRT2.1* 是  $\text{NO}_3^-$  诱导表达, *OsNRT2.2* 是氮诱导表达, 缺氮均抑制它们在根系的表达; *OsNAR2.1* 被认为是 *OsNRT2.1* 基因的激活者, 它对 *NRT2* 基因转运  $\text{NO}_3^-$  起到辅助作用, 本身并不能起到转运的作用, 所以它与 *OsNRT2.1* 表达有一致的趋势。

### 3 植物氮的同化

N 的同化是指  $\text{NO}_3^-$  还原为  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NH}_4^+$  同化为各种氨基酸的过程(图 3), 在这个途径中,  $\text{NO}_3^-$  还原中的硝酸还原酶(NR)和亚硝酸还原酶(NiR), 以及  $\text{NH}_4^+$  同化的一系列酶促反应中的 2 个主要酶谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸合酶(GOGAT), 在氮的同化过程中起着重要的作用。在此我们主要对它们近年来的研究作一个简单的介绍。

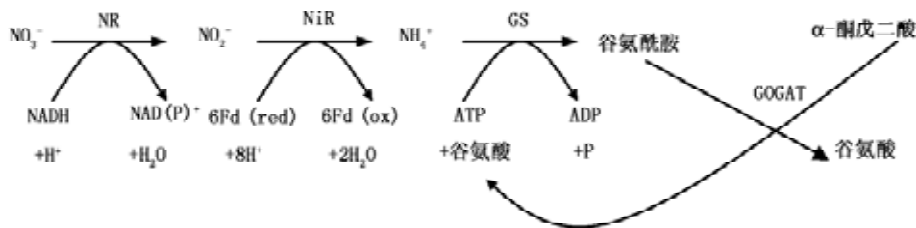


图 3 氮的同化过程

NR: 硝酸还原酶; NiR: 亚硝酸还原酶; GS: 谷氨酰胺合成酶; GOGAT: 谷氨酸合酶。

**3.1 硝酸盐的还原及其调控**  $\text{NO}_3^-$  通过 NR 还原成  $\text{NO}_2^-$  主要在细胞质中进行, 而  $\text{NO}_2^-$  的还原则在叶绿体中进行, 所以一般而言  $\text{NO}_3^-$  的同化力在叶片中是比较充足的(沈其荣等 2003)。

NR 受转录后调控, 光照下, 细胞酸化、二氧化碳以及蔗糖都会促使 NR 磷酸化状态 (无活性) 去磷酸化, 活化储备的这部分 NR 蛋白, 增加 NR 活力; 而在黑暗中, 细胞碱化、低二氧化碳条件都会促使有活性的 NR 磷酸化, 降低 NR 的活力(Kaiser 和 Huber 2001), 而糖信号转导途径中的重要蛋白激酶 SnRK1 通过磷酸化作用调节底物 NR 酶的活性(谢祝捷等 2002)。Fan 等(2006)发现: 外源谷氨酰胺 (Gln) 在 2 h 内显著降低了硝酸还原酶活化状态, 从而导致了细胞质  $\text{NO}_3^-$  增加; 此外, 在增  $\text{NH}_4^+$  的作用

下, 可以更大提高 NR 的活性(戴廷波等 2001)。NR 的半衰期很短, 仅为几小时, 所以细胞内 NR 的含量不仅决定于 NR 的合成速率, 还决定于 NR 的降解速率。光下 NR 的合成高于暗中,  $^{35}\text{S}$  标记的 NR 在暗中的降解速率快于在光下(Weiner 和 Kaiser 1999)。干旱条件下, NR 蛋白增加, 同时也积累了 mRNA 的量(Foyer 等 1998)。

高等植物中已发现有两类 NR 酶基因, 一个是 NADH 特异性诱导的基因 *Nia1*, 另一个为 NAD(P)H 为底物而表达的基因 *Nia2* (Yu 等 1998; Harris 等 2000)。Loque 等(2003)研究拟南芥表明, NR 的活性有可能直接影响 *Nia1* 基因的表达, 同时发现  $\text{NO}_2^-$  也强烈地抑制 *Nia1* 基因的转录水平, 这种影响是迅速的、特异的和可逆的。Loppes 等(1999)报道了

不同氮素形态(各种氨基酸和无机态氮)对 *Nia* 基因的表达的结果表明, 当培养基中存在  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的时候, *Nia* 基因启动子的报告基因表达很低, 但是当培养基中缺氮或供给硝态氮、亚硝酸盐、尿素、精氨酸和谷氨酰胺时, 该报告基因强烈表达。利用基因芯片的分析发现在低浓度 ( $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和高浓度 ( $5\sim 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 硝态氮处理中, 强烈诱导 *Nia* 基因表达 (Wang 等 2000), 且已经在 *Nia* 基因的上游发现了很多受光调控的基序, 比如在菠菜中发现硝酸还原酶基因 *Nia* 上游的 TAGATc, 它的结合因子是 NIT2 Zn-finger 蛋白 (Rastogi 等 1997); 衣藻 NR 的基因上游 cAAGGGTTCcAA 也是受光调控诱导表达 *Nia1* 基因的基序 (Navarro 等 2005)。

**3.2 铵的同化及其调控**  $\text{NH}_4^+$  同化中的 GS 有两种同工酶, 即分别定位于胞质和叶绿体的 GS1 和 GS2 (Ochs 等 1999; Tobin 和 Yamaya 2001), 分别执行不同的生理功能。位于叶绿体中的 GS2 的主要功能是把叶绿体和光呼吸再合成的  $\text{NH}_4^+$  合成为谷氨酰胺 (Gln), 而处在根中的 GS1 则主要是参与根部氮的合成, 但同时 GS2 也参与这一过程。

分子生物学的研究表明, 编码 GS 酶的基因包括细胞质中 *Gln1* 和叶绿体中 *Gln2* 基因, 它们有不同的表达模式 (Ochs 等 1999)。 *Gln1* 主要是在根表达, 不受光调控, *Gln2* 主要在地上部表达, 且受光调控 (Lam 等 1995)。水稻同功酶 GS1 包含两个基因: *OsGLN1;1* 和 *OsGLN1;2*, 它们在根中都有丰富的表达, 且在氮缺乏的条件下, *OsGLN1;1* 在皮层、外皮层和内皮层大量地积累, 而 *OsGLN1;2* 只是一些小细胞层中丰富表达; 且  $\text{NH}_4^+$  处理的条件下, *OsGLN1;1* 和 *OsGLN1;2* 在根系伸长区的中柱中也被诱导表达 (Ishiyama 等 2004)。最新的研究表明, 水稻的一个核蛋白 OsACR9 扮演着 Gln 传感器的角色, 调控着 Gln 响应与氮同化相关的基因 (Kudo 等 2008)。

*Gln1* 在所有的器官中都能检测到, 衰老的器官 *Gln1* 基因的表达更强, 且不同 *Gln1* 基因的时空分布也不同, 说明 GS1 的同工酶在氮的代谢中可能存在不同的生理角色 (Teixeira 等 2005)。水稻的 *Gln1;1* 对从衰老的器官再转运氮, 和 NADH-GOGAT1 对从发展的器官再利用氮分别起着关键的作用 (Tabuchi 等 2007)。另外, 采用 *GUS* 报告基因检测发现, *Fd-GOGAT* 的表达在烟草幼嫩叶片比

衰老叶片更高, 且主要定位于叶脉中, 说明它利用谷氨酸去合成和转运各种氨基酸方面起着重要的作用 (Masclaux-Daubresse 等 2006)。值得关注的是, GS 酶的活性和其基因的转录表达特性对氮肥的利用率密切相关 (Lea 和 Azevedo 2007)。用一个根特异性的启动子与大豆 GS 酶的一个基因 *Gln1;5* 融合过量表达的植株研究表明, 根系 GS 酶的活性增加, 且植株的生物量和氮含量也显著增加, 分别比野生型增加 17% 和 54% (Fei 等 2006)。GS 酶也是高效植物绿色组织中  $\text{NH}_4^+$  的解毒的关键因子 (Flores 等 2004)。Scarpeci 等 (2007) 在研究营养状态对即将成熟的小番茄 GS 水平调节作用时发现: 标准的营养状态下, *Gln2* 主要在绿色的果实中表达, 而在红色的果实中检测不到, 在高营养时, 红色的果实中 GS 的活性主要是决定于 *Gln1* 转录表达的增强, 这就可能为同化额外氮提供了条件。

#### 4 结语

采用分子生物学的手段, 已经克隆到多个铵、硝转运蛋白基因和与它们还原同化相关的基因, 并对其结构、功能和表达调控等方面进行了初步的研究。但不同作物和同一作物的氮吸收和利用中还有许多与氮的转运和同化相关的基因尚未被鉴定和认识, 且目前的研究多集中于模式植物拟南芥上, 故农作物的氮转运蛋白基因和氮还原同化相关的基因的鉴定, 表达和调控机制研究将是以后研究的重点。水稻作为中国乃至世界的主要粮食作物, 全基因组序列已经测序完成, 因此利用水稻作为模式作物去研究植物吸收和代谢相关基因结构功能特性和调控机制, 探究其可能参与的信号转导及与植物形态构型的关系, 更深入地理解作物吸收和利用氮素的机理, 将为从生物学的途径来改良品种, 提高作物的产量和氮肥的利用率奠定基础。

#### 参考文献

- 戴廷波, 曹卫星, 荆奇 (2001). 氮形态对不同小麦基因型氮素吸收和光合作用的影响. 应用生态学报, 12 (6): 849-852
- 沈其荣, 汤利, 徐阳春 (2003). 植物液泡中硝酸盐行为的研究概况. 土壤学报, 40 (3): 465-469
- 谢祝捷, 姜东, 戴廷波, 曹卫星 (2002). 植物的糖信号及其对碳氮代谢基因的调控. 植物生理学通讯, 38 (4): 399-405
- 朱兆良 (2000). 农田中氮肥的损失与对策. 土壤与环境, 9 (1): 1-6
- Araki R, Hasegawa H (2006). Expression of rice gene involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. Breed Sci, 56: 295-302

- Chopin F, Orsel M, Dorbe M-F, Chardon F, Truong HN, Miller AJ, Krapp A, Daniel-Vedele F (2007a). The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell*, 19: 1590~1602
- Chopin F, Wirth J, Dorbe M-F, Lejay L, Krapp A, Gojon A, Daniel-Vedele F (2007b). The *Arabidopsis* nitrate transporter AtNRT2.1 is targeted to the root plasma membrane. *Plant Physiol Biochem*, 45: 630~635
- Crawford NM, Glass ADM (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci*, 3: 389~395
- D'Apuzzo E, Rogato A, Simon-Rosin U, El Alaoui H, Barbulova A, Betti M, Dimou M, Katinakis P, Marquez A, Marini A-M et al (2004). Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential transcriptional regulation and spatial expression. *Plant Physiol*, 134: 1763~1774
- Desnos T (2008). Root branching responses to phosphate and nitrate. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 82~87
- Engineer CB, Kranz RG (2007). Reciprocal leaf and root expression of *AtAMT1.1* and root architectural changes in response to nitrogen starvation. *Plant Physiol*, 143: 236~250
- Fan XR, Gordon-Weeks R, Shen QR, Miller AJ (2006). Glutamine transport and feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. *J Exp Bot*, 57 (6): 1333~1340
- Fei H, Chaillou S, Hirel B, Polowick P, Mahon JD, Vessey JK (2006). Effects of the overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene (*GS15*) linked to organ-specific promoters on growth and nitrogen accumulation of pea plants supplied with ammonium. *Plant Physiol Biochem*, 44 (10): 543~550
- Flores P, Botella M A, Cerda A, Martinez V (2004). Influence of nitrate level on nitrate assimilation in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants under saline stress. *Canad J Bot*, 82: 207~213
- Forde BG (2000). Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1465: 219~235
- Foyer CH, Valadier MH, Migge A, Becker TW (1998). Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiol*, 117: 283~292
- Glass ADM, Britto DT, Kaiser BN, Kinghorn JR, Kronzucker HJ, Kumar A, Okamoto M, Rawat S, Siddiqi MY, Unkles SE et al (2002). The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J Exp Bot*, 53: 855~864
- Guo FQ, Wang R, Chen M, Crawford NM (2001). The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1* (CHL1) is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth. *Plant Cell*, 13: 1761~1777
- Harris N, Foster JM, Kumar A, Davies HV, Gebhardt G, Wray JL (2000). Two cDNAs representing alleles of the nitrate reductase gene of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree): sequence analysis, genomic organization and expression. *J Exp Bot*, 51 (347): 1017~1026
- Ishiyama K, Inoue E, Tabuchi M, Yamaya T, Takahashi H (2004). Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. *Plant Cell Physiol*, 45: 1640~1647
- Javelle A, Lupo D, Ripoche P, Fulford T, Merrick M, Winkler FK (2008). Substrate binding, deprotonation, and selectivity at the periplasmic entrance of the *Escherichia coli* ammonia channel AmtB. *Proc Natl Aca Sci USA*, 105: 5040~5045
- Kaiser BN, Rawat SR, Siddiqi MY, Masle J, Glass ADM (2002). Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA "knockout" of the high-affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter AtAMT1;1. *Plant Physiol*, 130: 1263~1275
- Kaiser WM, Huber SC (2001). Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot*, 52: 1981~1989
- Kudo T, Kawai A, Yamaya T, Hayakawa T (2008). Cellular distribution of ACT domain repeat protein 9, a nuclear localizing protein, in rice (*Oryza sativa*). *Physiol Plant*, 133 (2): 167~179
- Kumar A, Silim SN, Okamoto M, Siddiqi MY, Glass ADM (2003). Differential expression of three members of the *AMT1* gene family encoding putative high-affinity  $\text{NH}_4^+$  transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica. *Plant Cell Environ*, 26: 907~914
- Lam HM (1995). Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 887~898
- Lauter FR, Ninnemann O, Bucher M, Riesmeier JW, Frommer WB (1996). Preferential expression of an ammonium transporter and of two putative nitrate transporters in root hairs of tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 8139~8144
- Lea PJ, Azevedo RA (2007). Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. *Ann Appl Biol*, 151 (3): 269~275
- Leblanc A, Renault H, Lecourt J, Etienne P, Deleu C, Le Deunff E (2008). Elongation changes of exploratory and root hair systems induced by aminocyclopropane carboxylic acid and aminoethoxyvinylglycine affect nitrate uptake and *BnNrt2.1* and *BnNrt1.1* transporter gene expression in oilseed rape. *Plant Physiol*, 146: 1928~1940
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Muller C, Krapp A, von Wiren N, Daniel-Vedele F, Gojon A (2003). Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell*, 15: 2218~2232
- Li BZ, Xin WJ, Sun SB, Shen QR, Xu GH (2006). Physiological and

- molecular responses of nitrogen-starved rice plants to re-supply of different nitrogen sources. *Plant Soil*, 287: 145~159
- Li XD, Lupo D, Zheng L, Winkler F (2006). Structural and functional insights into the AmtB/Mep/Rh protein family. *Transfus Clin Biol*, 13: 65~69
- Lin CM, Koh S, Stacey G, Yu SM, Lin TY, Tsay YF (2000). Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice. *Plant Physiol*, 122: 379~388
- Loppes R, Radoux M, Ohresser MCP, Matagne RF (1999). Transcriptional regulation of the *Nia1* gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the *Nia1* promoter. *Plant Mol Biol*, 41: 701~711
- Loque D, Lalonde S, Looger LL, von Wiren N, Frommer WB (2007). A cytosolic *trans*-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature*, 446: 195~198
- Loque D, Tillard P, Gojon A, Lepetit M (2003). Gene expression of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter NRT1.1 and the nitrate reductase NIA1 is repressed in *Arabidopsis* roots by NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, the product of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction. *Plant Physiol*, 132: 958~967
- Loque D, von Wiren N (2004). Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J Exp Bot*, 55: 1293~1305
- Loque D, Yuan L, Kojima S, Gojon A, Wirth J, Gazzarrini S, Ishiyama K, Takahashi H, von Wiren N (2006). Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant J*, 48: 522~534
- Ludewig U, Wilken S, Wu B (2003). Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uniporters. *J Biol Chem*, 278: 45603~45610
- Mantelin S, Touraine B (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot*, 55 (394): 27~34
- Marini AM, Andre B (2000). *In vivo* N-glycosylation of the Mep2 high-affinity ammonium transporter of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an extracytosolic N-terminus. *Mol Microbiol*, 38: 552~564
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J, Valadier MH, Feraud M, Joulet T, Suzuki A (2006). Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol*, 140: 444~456
- Navarro MT, Mariscal V, Macias MI, Fernandez E, Galvan A (2005). *Chlamydomonas reinhardtii* strains expressing nitrate reductase under control of the cabII-1 promoter: isolation of chlorate resistant mutants and identification of new loci for nitrate assimilation. *Photosynth Res*, 83 (2): 151~161
- Neuhauser B, Dynowski M, Mayer M, Ludewig U (2007). Regulation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. *Plant Physiol*, 143 (4): 1651~1659
- Ochs G, Schock G, Trischler M, Kosemund K, Wild A (1999). Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus*. *Plant Mol Biol*, 39 (3): 395~405
- Okamoto M, Kumar A, Li W, Wang Y, Siddiqi MY, Crawford NM, Glass ADM (2006). High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiol*, 140: 1036~1046
- Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM (2003). Regulation of *NRT1* and *NRT2* gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. *Plant Cell Physiol*, 44: 304~317
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62 (1): 1~34
- Pearson JN, Finnemann J, Schjoerring JK (2002). Regulation of the high-affinity ammonium transporter (*BnAMT1;2*) in the leaves of *Brassica napus* by nitrogen status. *Plant Mol Biol*, 49: 483~490
- Rastogi R, Bate NJ, Sivasankar S, Rothstein SJ (1997). Footprinting of the spinach nitrite reductase gene promoter reveals the preservation of nitrate regulatory elements between fungi and higher plants. *Plant Mol Biol*, 34 (3): 465~476
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Girin T, Tillard P, Lepetit M, Gojon A (2006). A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 140: 909~921
- Richard-Molard C, Krapp A, Brun F, Ney B, Daniel-Vedele F, Chaillou S (2008). Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *J Exp Bot*, 59: 779~791
- Scarpeci TE, Marro ML, Bortolotti S, Boggio SB, Valle EM (2007). Plant nutritional status modulates glutamine synthetase levels in ripe tomatoes (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). *J Plant Physiol*, 164: 137~145
- Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, von Wiren N, Yamaya T, Yamaguchi J (2003a). Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1~1;3*) in rice. *Plant Cell Physiol*, 44: 726~734
- Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, Yamaya T, Yamaguchi J (2003b). Feedback regulation of the ammonium transporter gene family *AMT1* by glutamine in rice. *Plant Cell Physiol*, 44: 1396~1402



- Stitt M, Feil R (1999). Lateral root frequency decreases when nitrate accumulates in tobacco transformants with low nitrate reductase activity: consequences for the regulation of biomass partitioning between shoots and root. *Plant Soil*, 215: 143~153
- Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, Ikeda A, von Wiren N, Hayakawa T, Yamaguchi J, Yamaya T (2003). Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. *Plant Cell Physiol*, 44: 206~211
- Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T (2007). Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, 58: 2319~2327
- Teixeira J, Pereira S, Canovas F, Salema R (2005). Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *J Exp Bot*, 56: 663~671
- Tobin AK, Yamaya T (2001). Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *J Exp Bot*, 52 (356): 591~604
- Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Glass ADM (2000). Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiol*, 123: 307~318
- von Wiren N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB (2000a). The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr Opin Plant Biol*, 3: 254~261
- von Wiren N, Lauter F-R, Ninnemann O, Gillissen B, Walch-Liu P, Engels C, Jost W, Frommer WB (2000b). Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J*, 21 (2): 167~175
- Walch-Liu P, Forde BG (2008). Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *Plant J*, 54: 820~828
- Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Glass A (1993). Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of  $^{13}\text{NH}_4^+$  influx across the plasmalemma. *Plant Physiol*, 103: 1259~1267
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM (2000). Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell*, 12 (8): 1491~1509
- Weiner H, Kaiser WM (1999). 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Lett*, 455: 75~78
- Yokoyama T, Kodama N, Aoshima H, Izu H, Matsushita K, Yamada M (2001). Cloning of a cDNA for a constitutive NRT1 transporter from soybean and comparison of gene expression of soybean NRT1 transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1518: 79~86
- Yu X, Sukumaran S, Marton L (1998). Differential expression of the *Arabidopsis Nia1* and *Nia2* genes. Cytokinin-induced nitrate reductase activity is correlated with increased *Nia1* transcription and mRNA levels. *Plant Physiol*, 116 (3): 1091~1096
- Yuan L, Loque D, Ye F, Frommer WB, von Wiren N (2007). Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter *AtAMT1;1*. *Plant Physiol*, 143: 732~744
- Zhuo D, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass ADM (1999). Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 17: 563~568