

## 调控铝诱导根尖有机酸分泌的分子机制

范伟<sup>1,2</sup>, 娄和强<sup>2</sup>, 龚育龙<sup>2</sup>, 刘美雅<sup>2,3</sup>, 杨建立<sup>2</sup>, 郑绍建<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>云南农业大学资源与环境学院, 昆明650201; <sup>2</sup>浙江大学生命科学学院, 植物生理学与生物化学国家重点实验室, 杭州310058; <sup>3</sup>中国农业科学院茶叶研究所, 杭州310008

**摘要:** 铝诱导根尖有机酸分泌是大多数植物最主要的耐铝机制。本文主要综述了有机酸分泌过程中所涉及的包括有机酸转运蛋白、转运蛋白基因上游序列调节因子、基因拷贝数、转录因子、蛋白可逆磷酸化、有机酸合成与能量代谢等调控进程方面的研究进展, 并对未来的研究前景进行了展望。

**关键词:** 铝毒; 转运蛋白; 有机酸; 转录与翻译后调控; 代谢与能量

## Molecular Mechanisms Regulating Aluminum-Induced Secretion of Organic Acids in Root Apex

FAN Wei<sup>1,2</sup>, LOU He-Qiang<sup>2</sup>, GONG Yu-Long<sup>2</sup>, LIU Mei-Ya<sup>2,3</sup>, YANG Jian-Li<sup>2</sup>, ZHENG Shao-Jian<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; <sup>3</sup>Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China

**Abstract:** The most important aluminum resistant mechanism for a variety of plant species relies on aluminum-induced secretion of organic acids from root apex, the major target of Al toxicity. The recent progresses to understand the regulation processes leading to the ultimate secretion of organic acids, including transporters of organic acids, upstream sequence regulators of transporter gene, gene copy number, transcription factors, reversible protein phosphorylation, synthesis of organic acids and energy metabolism are summarized in this review and the prospects in this field are also proposed.

**Key words:** aluminum toxicity; transporter; organic acid; transcriptional and posttranslational regulation; metabolism and energy

据估计, 近50%的全球潜在耕地土壤呈酸性(von Uexküll和Mutert 1995; Bot等2000)。这其中, 高达60%的酸性土壤主要分布在热带亚热带发展中国家和地区, 在这些粮食生产安全最薄弱的地区, 铝(Al)毒害被认为是仅次于干旱胁迫之外影响作物生产的最主要非生物胁迫因子(von Uexküll和Mutert 1995)。土壤中的Al (主要指Al<sup>3+</sup>)能快速抑制根伸长, 破坏正常生理代谢功能, 限制根系对水分和矿质养分的吸收, 最终导致作物的减产减收。另一方面, 植物在长期适应酸Al环境胁迫中已进化出包括内部耐受和外部排斥两套机制来对抗Al毒(Taylor 1991; Kochian 1995)。其中, 通过诱导根尖有机酸分泌对Al进行外部整合的解毒机制被认为是大多数植物最主要的耐Al机制(Ma 2000)。Al胁迫下分泌的有机酸种类主要为苹果酸、草酸和柠檬酸, 三者对Al的整合能力依次为: 柠檬酸>草酸>苹果酸(Delhaize等1993; Zheng等

1998; Ma等2001)。根据时间响应关系, 可将Al诱导的有机酸分泌分为两类模式(Ma 2000)。模式I: 有机酸分泌与Al胁迫没有明显的时间间隔, 这类分泌模式以小麦(*Triticum aestivum*) (Delhaize等1993)和荞麦(*Fagopyrum esculentum*) (Zheng等2005)等为代表; 模式II: Al胁迫与有机酸分泌存在一定滞后期(通常是几小时), 这类分泌模式以决明(*Cassia tora*) (Ma等1997)、小黑麦(*Triticosecale*) (Ma等2000)和玉米(*Zea mays*) (Maron等2008)等为代表。Ma等(2001)推测造成这两种分泌模式的主要原因在于蛋白的重新合成是否是有机酸分泌所必需的, 这暗示存在复杂的控制系统来调节Al诱

收稿 2014-06-23 修定 2014-08-28

资助 国家重点基础研究发展计划(2014CB441000)、国家自然科学基金(31071849和31222049)、中央高校基本科研业务费。

\* 通讯作者(E-mail: sjzheng@zju.edu.cn; Tel: 0571-88206438)。

导的有机酸分泌,但是组成这一调控系统的关键因子仍不是很清楚。近年来,随着分子生物学技术的飞速发展,围绕有机酸分泌调控机制的研究已深入开展,并取得了丰富成果。为此,本文系统综述这方面的研究进展,并对该领域未来的研究作了进一步展望。

## 1 有机酸转运蛋白

生理学研究表明,Al激活的有机酸分泌是由阴离子通道和/或载体所介导的(Ryan等1995; Zheng等1998; Li等2000)。然而,对编码这些通道或载体基因的克隆却一直未取得成功。直到2004年,日本冈山大学的Sasaki等(2004)通过构建小麦近等基因系‘ET8’和‘ES8’的抑制差减文库,首次从小麦中克隆了Al激活的苹果酸转运子(aluminum-activated malate transporter, ALMT)基因*TaALMT1*,该基因组成型表达于小麦根尖中,且在耐性品种‘ET8’中的表达量高于敏感性品种‘ES8’。电生理研究显示,*TaALMT1*作为一个激活的配体和电压依赖的阴离子通道驱动苹果酸从根尖细胞质向质膜外分泌(Yamaguchi等2005; Piñeros等2008a)。之后,*TaALMT1*的同源基因被分别从油菜(*Brassica napus*)(*BnALMT1*和*BnALMT2*)、拟南芥(*Abrabidopsis thaliana*)(*AtALMT1*)、黑麦(*Secale cereale*)(*ScALMT1*)和大豆(*Glycine max*)(*GmALMT1*)等物种中克隆,同时证明了它们在耐Al性中所发挥的作用(Ligaba等2006; Hoekenga等2006; Fontecha等2007; Liang等2013)。然而,并不是所有的ALMT型转运子都介导Al激活的有机酸分泌。比如,玉米中的*ZmALMT1*在阴离子平衡和矿质营养中发挥作用,且蛋白活性不依赖于外界的Al浓度变化(Piñeros等2008b)。*ZmALMT2*作为玉米根中的阴离子转运子介导苹果酸的分泌和矿质养分的运输,但不赋予Al的耐性(Ligaba等2012)。3个拟南芥ALMT1型转运子基因分别在叶肉(*AtALMT9*)或保卫细胞(*AtALMT6*和*AtALMT12*)中表达,暗示它们主要在苹果酸介导的气孔关闭中发挥作用(Kovermann等2007; Meyer等2010, 2011)。此外,Kobayashi等(2013)发现,即便是介导Al激活苹果酸分泌的拟南芥*AtALMT1*,也能被其他信号分子如IAA、ABA、低pH、 $H_2O_2$ 以及*flg22*等所诱导,这表明*AtALMT1*在适应生物和非生物胁迫中涉及一个复杂的表达调控机制。

多种药物和毒性成分运出(multidrug and toxic compound extrusion, MATE)家族蛋白是细菌、真菌、植物和哺乳动物中广泛存在的一个功能分化多样的大家族。有证据显示, MATE家族蛋白能够转运多种底物,如类黄酮、花青素、尼古丁、柠檬酸以及 $Cd^{2+}$ 等(Omote等2006; Morita等2009; Yokosho等2010)。由于植物中的MATE蛋白能够转运柠檬酸,因此也在耐Al中扮演了重要的作用。2007年,来自日本冈山大学和美国康奈尔大学的两个实验室分别从大麦(*Hordeum vulgare*)(*HvAACT1*)和高粱(*Sorghum bicolor*)(*SbMATE*)中克隆得到了编码Al依赖的柠檬酸转运子基因(Furukawa等2007; Magalhaes等2007)。此后, MATE同源基因在拟南芥(*AtMATE*)、黑麦(*ScFRDL2*)、玉米(*ZmMATE1*和*ZmMATE2*)、水稻(*Oryza sativa*)(*OsFRDL4*)、饭豆(*Vigna umbellata*)(*VuMATE1*)和小麦(*TaMATE1B*)中被相继报道(Liu等2009; Yokosho等2010, 2011; Maron等2010; Yang等2011b; Tovkach等2013)。除了*HvAACT1*外,其他的MATE基因均受Al胁迫上调表达,表明存在转录调控机制。

对于上述已知的ALMT或MATE基因,不管是诱导表达还是组成型表达,共同的特征都是在耐性基因型品种中耐Al基因的表达量高于敏感性基因型品种,而基因的表达水平通常受到基因上游非编码区修饰、基因拷贝数以及转录因子等的调控。

## 2 转运蛋白基因上游序列调节因子

小麦*TaALMT1*编码的氨基酸在Al耐性和敏感性品种中均比较保守,但启动子区域却存在较高的多态性(Sasaki等2006; Ryan等2010)。Sasaki等(2006)通过比较69个不同小麦品种的*TaALMT1*发现,在小麦启动子区域共有8个不同的等位基因,其中,拥有2或3倍的线性重复的等位基因与基因表达量、苹果酸分泌以及植株耐Al性的增强高度相关。在转基因水稻中的启动子分析也证实,具有3倍线性重复的*TaALMT1*启动子等位基因比没有线性重复的启动子等位基因能显著提高报告基因的表达(Ryan等2010)。

Fujii等(2012)发现*HvAACT1*在耐Al大麦品种‘Murasakimochi’根尖中的高组成型表达与其基因在5'-UTR区域插入的1 023 bp片段有关,这种由于转座带来的片段插入不仅可以增强*HvAACT1*的转

录丰度, 同时还能改变*HvAACT1*在根中的定位。在Al敏感品种‘Morex’中(缺乏插入), *HvAACT1*主要在成熟根的中柱鞘中表达, 而极少在皮层和根尖表达, 这时*HvAACT1*主要介导根内木质部中铁的长距离运输; 相反, 在耐Al品种‘Murasakimochi’中(存在插入), *HvAACT1*的表达会延展至根尖所有组织, 这时*HvAACT1*主要通过介导柠檬酸的外排来减少Al的毒害。类似地, Tovkach等(2013)发现一个Sukula类转座元件与几个巴西小麦株系中*TaMATE1B*的高组成型表达密切相关, 在起始密码子ATG上游25 bp处插入的11.1 kb转座元件增强了*TaMATE1B*在耐性品种根尖中的表达, 从而显著增加了柠檬酸的分泌。此外, 高粱*SbMATE*上游微型反向重复转座元件(tourist-like miniature inverted repeat, MITE)的数量也被报道与*SbMATE*的表达水平存在较高的相关性(Magalhaes等2007)。

Chen等(2013)发现生长于酸性土壤中的绒毛草(*Holcus lanatus*)比生长于中性土壤中的绒毛草能分泌更多的苹果酸, 因而更加耐Al。其原因是介导苹果酸分泌的*HIALMT1*启动子区域在耐Al绒毛草中拥有更多的水稻Al resistance transcription factor 1 (ART1)类转录因子结合调控元件, 从而提高了Al胁迫下*HIALMT1*的表达, 而这种调控元件数量的变化在耐Al绒毛草中的进化仅仅只用了100多年。

### 3 转运蛋白基因拷贝数

最近, Maron等(2013)在不同基因型玉米品种中发现, 转运蛋白基因的拷贝数差异同样能够决定品种间的耐Al性差异。作者在比较Al耐性‘Al237’和敏感性‘L53’品种中*ZmMATE1*同柠檬酸分泌以及耐Al性间的关系时, 发现两个品种的耐Al性差异并非来自*ZmMATE1*所编码的氨基酸和蛋白结构的差异, 同时, 该基因在两个品种中的启动子序列也基本相同(99%的同源性), 最后证实两者的耐Al性差异源自*ZmMATE1*的拷贝数差异, ‘Al237’品种含有3个拷贝, 而‘L53’品种仅有1个拷贝, 高的基因拷贝数导致了高的基因表达丰度, 从而贡献了耐性品种中更多的柠檬酸分泌。

### 4 转录因子

转录因子作为一种反式作用因子, 广泛存在于各种不同的信号途径中参与对下游功能基因的调控, 因而在功能上表现为更加经济、全面和有

效。Iuchi等(2007)从拟南芥甲磺酸乙酯(ethyl methanesulfonate, EMS)诱变的突变库中分离到一个对低pH超敏感的突变体*sensitive to proton rhizotoxicity 1 (STOP1)*, 图位克隆显示*STOP1*编码一个C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>型锌指蛋白转录因子。有意思的是, *STOP1*突变体不仅对低pH敏感, 而且对Al胁迫也超敏感, 因为在这个突变体中*AtALMT1*几乎不表达。随后的研究显示, *AtMATE1*和*aluminium sensitive 3 (ALS3)*也受*STOP1*调控(Liu等2009; Sawaki等2009)。*AtALMT1*和*AtMATE1*分别介导苹果酸和柠檬酸的分泌, 而*ALS3*是一个半型ABC转运子家族基因, 参与细胞内Al的再分配(Larsen等2005)。虽然*AtMATE1*和*ALS3*的敲除株系表现出对Al敏感, 然而它们对植株的耐Al性贡献却远小于*AtALMT1* (Liu等2009; Sawaki等2009)。*STOP1*除调控上述基因外, 也参与对下游其他一系列质子和Al胁迫基因的表达调控(Sawaki等2009)。在这些基因中, *STOP2*作为*STOP1*唯一的直系同源基因位于*STOP1*下游且受其调控, 不同的是*STOP2*虽能像*STOP1*一样激活Al和质子耐性相关基因的表达, 但在功能上却仅赋予植株质子耐性而非Al耐性(Kobayashi等2014), 其他基因的功能则暂不清楚。综上可知, *STOP1*可能的功能是作为一个转录因子调控质子和Al胁迫/耐性基因的表达。然而到目前为止, 植物从最初对Al信号的感知到转录激活这一过程仍然是个谜。目前发表的数据显示, 虽然*STOP1*在转录水平不受Al诱导, 但*STOP1*在无Al情况下也调控*AtALMT1*和*AtMATE*基因的表达(Iuchi等2007; Sawaki等2009), 很可能*STOP1*只是调控下游耐Al基因的关键转录因子, 而Al诱导下游基因的表达则由这些转录因子来承担, 这些因子与*STOP1*相互协作共同来调控Al胁迫下耐Al基因的表达。此外, *STOP1*在调控下游基因表达之前很可能涉及一个翻译后的修饰。蛋白激酶抑制剂的使用已经间接证明拟南芥苹果酸的分泌涉及一个或多个磷酸化步骤(Kobayashi等2007)。因此, 有可能在应答Al胁迫时, 蛋白激酶先磷酸化*STOP1*使之被激活(Iuchi等2008), 激活的*STOP1*再去调控Al耐性基因以及其他质子和Al应答基因的转录。亦或许两个胁迫的信号途径最初来自于不同的受体, 但在下游受*STOP1*调控时这一途径发生了汇集和交叉。

由于STOP1提供了一种有效的机制去保护植物免受酸性土壤中两种主要胁迫因子(质子和Al)的毒害。因此,质子和Al耐性基因型的变异很可能是通过STOP1的等位变体(allelic variant)来协调的。有趣的是,这似乎又不可能,因为两个主要的质子耐性QTLs不同于已知的Al耐性QTLs (Kobayashi和Koyama 2002; Hoekenga等2003; Ikka等2007)。而且,对260份拟南芥种质资源的研究发现,Al耐性与质子耐性是不相关的(Ikka等2007)。这些结果显示,赋予质子和Al耐性的基因很可能是独立运作的,从而推翻了等位变体协调运作的可能。除此之外,虽然被STOP1调控的基因可以解释拟南芥大部分的Al耐性,但至少有两个基因是独立于STOP1调控范畴的,一个是位于液泡膜的ABC转运子家族成员ALS1,另一个是sensitive to Al rhizotoxicity 1 (*AtSTAR1*),该基因编码一个位于质膜上含ATP结合结构域的ABC转运子家族成员。这两个基因都能被Al诱导,且任一个基因功能的缺失都会导致对Al的超敏感(Larsen等2007; Huang等2010)。然而它们是如何贡献Al的耐性仍不清楚。

水稻作为小谷类作物中最耐Al的作物,其Al耐性比其他主要禾谷类作物,比如玉米、小麦、大麦和高粱高6~10倍(Famoso等2011)。然而由于Al激活水稻柠檬酸的分泌比同类的其他作物低,因此这种外排解毒机制并不能解释水稻的主要耐Al性,同时也表明水稻的耐Al性是一个多基因控制的复杂的数量性状。最近,48个Al耐性相关的QTLs被鉴定,这些位点解释了水稻中绝大部分耐Al性表型变异(Famoso等2011)。Yamaji等(2009)利用 $\gamma$ -射线诱变从水稻中鉴定了一个STOP1类的C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>型锌指蛋白转录因子基因ART1。与拟南芥STOP1相同的是,ART1在水稻根中组成型表达,且不受Al诱导;不同的是,ART1仅与Al耐性有关,而与质子耐性无关,且ART1在无Al时不太影响下游基因的表达,而在有Al存在时,耐Al基因在art1突变体背景下基本不被诱导(Iuchi等2007; Sawaki等2009; Yamaji等2009),这说明ART1可能只有在Al毒存在时才被招募到耐Al基因的启动子上进行作用,这一过程是否有磷酸化参与调控ART还需进一步验证。对art1突变体背景下的基因芯片研究显示,至少有31个分别参与水稻外部排斥和内部耐

受机制的下游基因受ART1调控(Yamaji等2009)。而且,它们中的绝大部分基因都包含有一到多个的ART1顺式调控作用元件[GGN(T/g/a/C)V(C/A/g)S(C/G)](Tsutsui等2011)。目前,部分基因的功能已被解析。在外部排斥方面,STAR1和STAR2分别编码ABC转运体的核苷酸结合域和跨膜区,两者以复合体的形式介导UDP-葡萄糖向细胞壁的转运,进而修饰细胞壁来进行Al的解毒(Huang等2009),而OsFRDL4则编码一个柠檬酸转运子介导柠檬酸的分泌以及对Al的外部螯合(Yokosho等2011)。在内部耐受方面,Nrat1编码一个自然抗性相关巨噬细胞蛋白(natural resistance-associated macrophage protein, NRAMP)家族的质膜Al特异转运子,负责Al从胞外向胞内的跨膜运输(Xia等2010),而OsALS1则编码一个定位于液泡膜的半型ABC转运子,负责Al在液泡中区隔化(Huang等2012)。ART1的鉴定支持了水稻中Al的耐性是多基因加积效应的见解。

## 5 蛋白可逆磷酸化

虽然在Al诱导有机酸分泌转运蛋白基因的克隆和鉴定上取得了一定的突破,但是关于Al胁迫信号转导途径仍不清楚,其中一条可能的信号途径为蛋白可逆磷酸化。磷酸化方面,Osawa和Matsumoto (2001)首先证实蛋白激酶广谱抑制剂K252a或Staurosporine可以有效抑制Al诱导的小麦根尖苹果酸分泌。之后,在拟南芥中的研究发现,用Al处理已用K252a或Staurosporine预处理的拟南芥可以显著降低AtALMT1基因的表达,而用K252a或Staurosporine处理已用Al预处理的拟南芥可以抑制苹果酸的分泌,但不减少基因的表达(AtALMT1转录已经完成),这表明Al诱导拟南芥苹果酸分泌的磷酸化作用发生在AtALMT1基因的转录水平和翻译后水平(Kobayashi等2007)。同样地,在饭豆中,Al诱导的柠檬酸分泌也被证实依赖于VuMATE1在转录水平和翻译后水平的磷酸化作用(Liu等2013)。Ligaba等(2009)提供的证据显示,小麦TaALMT1的活性受蛋白激酶C介导的磷酸化所调控,当把TaALMT1的384位丝氨酸转变为丙氨酸后,其活性受到抑制,且对蛋白激酶抑制剂和蛋白激酶C激活剂不敏感。去磷酸化方面,Kobayashi等(2007)报道称,蛋白磷酸酶抑制剂Calyculin A仅在

拟南芥*AtALMT1*基因的转录水平起抑制作用, 而不影响其翻译后蛋白介导的有机酸分泌, 暗示去磷酸化作用可能仅发生在基因的转录水平。上述结果明确了蛋白可逆磷酸化参与了Al诱导的有机酸分泌调控。然而, 究竟是何种磷酸化/去磷酸化酶参与此过程以及对其作用方式和位点分子与生化机制的解析, 还有待进一步研究。

## 6 代谢调控

Al诱导有机酸分泌直接相关的代谢调控主要包括有机酸的合成代谢以及通过呼吸作用产生的能量代谢两方面。在有机酸合成代谢上, 先前众多的研究显示, Al可以通过诱导三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)中相关酶活性的增强来增加体内有机酸的积累和分泌(Yang等2001; Ligaba等2004; Yang等2004; Xu等2010)。然而, 同样也有较多的研究表明, 体内有机酸合成代谢的增强与Al诱导的有机酸分泌无关(Hayes和Ma 2003; Yang等2008; Chen等2009)。转基因植物对于有机酸合成代谢是否贡献Al诱导的有机酸分泌提供了一些额外的证据。比如, 在烟草(*Nicotiana tabacum*)和木瓜(*Carica papaya*)中过表达绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)柠檬酸合酶(citrate synthase, CS)基因(de la Fuente等1997), 在苜蓿(*Medicago sativa*)中过表达苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)基因(Tesfaye等2001)以及在烟草中过表达冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*)丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate phosphate dikinase, PPK)基因(Trejo-Téllez等2010)都显示可以通过增强有机酸合成代谢来增加转基因植物的柠檬酸和/或苹果酸分泌量以及耐Al性。然而, Delhaize等(2001)同样将绿脓杆菌中的CS基因在烟草中过表达却得不到de la Fuente等(1997)的结果。作者发现尽管转基因株系中CS的蛋白水平远远大于de la Fuente等(1997)文献中报道的株系, 但却不能观察到任何柠檬酸积累或分泌增强的结果(Delhaize等2001)。综上所述, 有机酸合成代谢的增强是否与Al诱导的有机酸分泌以及耐Al性之间存在直接的关系, 仍存在较大争议, 这种争议也许来自于不同Al处理浓度、时间、生长条件以及植物种类间的差异。

在能量代谢上, 前期的生理学证据显示, 低温能够抑制有机酸的分泌, 间接暗示能量代谢与有

机酸的分泌有关(Li等2000; Osawa和Matsumoto 2001, 2002)。众所周知, 能量主要通过呼吸作用产生, 而植物呼吸作用主要依赖于糖酵解-TCA途径和磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)。Yamamoto等(2002)首先在烟草细胞和豌豆(*Pisum sativum*)中证实, Al胁迫会导致呼吸作用受抑制以及ATP的大量耗减。最近, 对饭豆低浓度和高浓度Al胁迫下差异表达基因的研究显示, Al会削弱饭豆糖酵解-TCA循环中相关基因的表达(Fan等2014), 而糖酵解途径被认为是耐性Al水稻品种中调控可利用能量产生所必需的(Wang等2014)。饭豆中, Al在抑制主呼吸途径的同时会加剧无氧呼吸的产生, 这会导致丙酮酸的过度消耗以及TCA循环受抑制。为了满足正常的能量需要, 一些交替代谢途径会被增强。比如, 通过增强脂肪酸 $\beta$ -氧化产生更多的乙酰辅酶A来补偿TCA循环; 通过上调丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, PEPCK)基因合成更多的磷酸烯醇式丙酮酸盐以增加丙酮酸的供应; 通过上调葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase, 6-PGDH)基因来增强PPP代谢途径(Fan等2014)。Ślaski等(1996)证实6-PGDH酶活性的上调仅仅发生在Al抗性小麦栽培种对Al的胁迫应答中, 而不发生在Al敏感栽培种中, 这为增强PPP途径与Al的抗性相关提供了直接的生理学证据。

## 7 质膜 $H^+$ -ATPase

质膜 $H^+$ -ATPase在一系列次级转运子的能耗和调控中扮演了重要的作用。电生理研究表明, 负责柠檬酸分泌的玉米ZmMATE1和饭豆VuA-MTE1很可能为 $Na^+$ 或 $H^+$ 反向转运子(Maron等2010; Yang等2011b)。因此, 质膜 $H^+$ -ATPase可能直接或间接参与了Al诱导的有机酸分泌。在两个大豆栽培种中, Al诱导的柠檬酸分泌与根中质膜 $H^+$ -ATPase活性相关, 酶活性的增加依赖于 $H^+$ -ATPase在转录水平和翻译后水平的调控, 且在耐性品种中要高于敏感性品种(Shen等2005)。在转基因拟南芥分析中, Al诱导柠檬酸分泌与 $H^+$ -ATPase活性之间的关系被进一步证实, 生长于含 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Al的MS培养基上的转基因植株能够分泌更多的柠檬酸(Shen等2005)。此外, 小麦中的研究也表明, Al诱导的苹果酸分泌伴随着质膜表面电势和 $H^+$ -ATPase

的激活(Ahn等2004)。最近, Chen (2013)在蚕豆(*Vicia faba*)中发现, Al胁迫能增强质膜H<sup>+</sup>-ATPase的表达以及与14-3-3蛋白的相互作用, 从而贡献高的H<sup>+</sup>-ATPase活性以及柠檬酸分泌。然而, 在两种不同草酸分泌能力的番茄(*Lycopersicon esculentum*)中, H<sup>+</sup>-ATPase活性被认为与Al诱导的草酸分泌无关(Yang等2011a)。在西葫芦(*Cucurbita pepo*) (Ahn等2001)和饭豆(Yang等2007)中, Al反而抑制了根中H<sup>+</sup>-ATPase的活性。

## 8 其他

研究证实, 外源添加Mg<sup>2+</sup>可以有效缓解植物Al毒害(Silva等2001; Yang等2007), 其可能的机制涉及Mg<sup>2+</sup>能够增强有机酸分泌、与Al竞争结合质膜离子通道和酶金属结合位点以及改善细胞质pH等几个方面(Silva等2001; Yang等2007; Bose等2011)。就增强有机酸分泌而言, Mg<sup>2+</sup>最有可能在激活有机酸代谢相关的酶以及调控H<sup>+</sup>-ATPase活性中扮演重要作用(Yang等2007; Bose等2011)。最近, 水稻中一个受ART1调控的编码Mg<sup>2+</sup>转运蛋白的基因*OsMGT1*被报道通过介导Mg<sup>2+</sup>的运输来缓解Al毒, 推测Mg<sup>2+</sup>有助于保护一些重要酶类的活性位点, 以防止Al离子的结合而丧失活性(Chen等2012)。另外, Yang等(2012)发现一氧化氮(nitric oxide, NO)供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)处理可以增加Al胁迫下酸柚(*Citrus grandis*)的苹果酸和柠檬酸分泌, 但不影响其在体内含量的积累。有报道称, NO可以调控K<sup>+</sup>和Ca<sup>2+</sup>离子通道(Casolo等2005; Sokolovski等2005)。因此, SNP对有机酸分泌的刺激是否是通过影响控制有机酸转运的阴离子通道来实现的值得进一步研究。

## 9 展望

综上所述, Al诱导有机酸分泌涉及基因、蛋白、代谢等多个层次的调控。特定层次的调控在不同物种中已取得了一定的进展, 但是对于特定物种在不同层次的调控仍缺乏系统研究。对于转运蛋白而言, 存在诱导表达和直接激活两大类机制。对于不同的物种为什么进化出这两类机制的原因还不清楚, 哪一类机制更适合植物适应酸Al环境也缺乏研究。本文对诱导表达机制已做了一些阐述, 但是对于激活机制仍不清楚。Furuich等(2010)通过点突变对小麦TaALMT1 Al依赖转运活

性的氨基酸残基进行了研究, 发现位于膜外C-末端的亲水结构域参与了TaALMT1的Al激活活性, 并在此结构域中鉴定了3个可能参与Al激活功能的氨基酸残基。然而, Ligaba等(2013)同样的研究却发现, 除C-末端外, N-末端也是Al激活所必需的结构域, 而且TaALMT1对Al的感应更可能与其蛋白结构的改变有关, 而非简单的氨基酸位点修饰。对于MATE蛋白而言, 是否存在同样的蛋白和结构水平上的调节机制, 仍需进一步研究。

拟南芥AtSTOP1对于*AtALMT1*的表达激活是至关重要的。然而最近, Ohyama等(2013)将烟草、黑杨(*Populus nigra*)、百脉根(*Lotus japonicus*)、茶树(*Camellia sinensis*)以及小立碗藓(*Physcomitrella patens*)中的STOP1类同源基因恢复到拟南芥*stop1*突变体中却发现, 除小立碗藓外, 其余所有物种的STOP1类同源基因均不能完全恢复突变体中*AtALMT1*的表达以及植株的耐Al性, 这表明AtSTOP1的结构对于*AtALMT1*的表达激活至关重要, 而这一结构在其他植物的STOP1类蛋白中又是不完全保守的。实际上, 所有STOP1类蛋白的锌指结构域是保守的, 但N-端和C-端的同源性则比较低。因此, 未来的研究应重点围绕不同STOP1类蛋白在序列、结构和功能上的差异来开展。

有机酸对于植物生长发育而言是一种有价值的碳源。作为TCA循环的中间产物, 有机酸在植物体新陈代谢中扮演了必需的作用。植物牺牲有机酸去对抗Al毒时本身就是一种能量消耗, 这种消耗会影响植物的生物产量。因此, Al激活根系有机酸分泌的精确调控不仅是作物耐Al所必需的, 同时也是Al胁迫下作物产量有效保障的根本。比如, 耐性高粱中Al激活的*SbMATE*特异定位于根尖之后1~3 mm的远端过渡区(distal transition zone, DTZ), 这个区域是细胞分化向细胞伸长发生的过渡区域, 也是Al毒的主要靶标区域, 如此精确的定位进化可以以最小的碳源损失来换取对Al损伤根细胞的最大保护(Sivaguru等2013)。除了诱导分泌外, 还必须存在反馈调节来防止有机酸的过度浪费, 如最近的研究表明, 拟南芥*AtWRKY46*与*AtALMT1*的表达呈负相关, 在*AtWRKY46*敲除突变体中, *AtALMT1*基因的表达、苹果酸分泌以及植株的耐Al性得到增强, 且这一过程独立于STOP1调控

途径之外, 酵母单杂交和ChIP-qPCR分析显示, *AtWRKY46*可以直接结合于*AtALMT1*启动子的W-boxes上, 负调控*AtALMT1*的表达(Ding等2013)。因此, 未来在通过生物工程手段提高作物耐Al性上可考虑启动子改造的策略。*AtALMT1*在根尖表达(Al毒的主要靶点), 而*AtMATE1*在成熟区表达(Liu等2009)。考虑到柠檬酸对Al的螯合能力强于苹果酸, 同时能把拟南芥解Al毒的部位从整根集中于根尖, Liu等(2012)通过启动子置换的策略, 利用*AtALMT1*启动子来驱动*AtMATE1*的表达, 发现这不仅显著增强了转基因植株的耐Al性, 同时也提高了碳源的利用效率。本课题组最近发现, 饭豆*VuMATE1*介导的Al激活根尖柠檬酸的分泌涉及*VuMATE1*蛋白的重新合成过程(Yang等2011b; Liu等2013)。进一步的研究显示, 这是由于*VuMATE1*启动子存在有未知的Al激活元件, 能在有Al条件下激活*VuMATE1*的表达(Liu等2013)。因此, 在今后的研究中, 通过挖掘和利用这类启动子来进行转基因育种研究, 对于阻止植物过多的碳源损耗来说是一种经济和有效的策略。

### 参考文献

- Ahn SJ, Rengel Z, Matsumoto H (2004). Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H<sup>+</sup>-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytol*, 162: 71~79
- Ahn SJ, Sivaguru M, Osawa H, Chung GC, Matsumoto H (2001). Aluminum inhibits the H<sup>+</sup>-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. *Plant Physiol*, 126: 1381~1390
- Bose J, Babourina O, Rengel Z (2011). Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. *J Exp Bot*, 62: 2251~2264
- Bot AJ, Nachtergale FO, Young A (2000). *World Soil Resources Report*. FAO, Rome, 111
- Casolo V, Petrusa E, Krajiňáková J, Macri F, Vianello A (2005). Involvement of the mitochondrial K<sub>ATP</sub><sup>+</sup> channel in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures. *J Exp Bot*, 56: 997~1006
- Chen LM (2013). Up-regulation and interaction of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and the 14-3-3 protein are involved in the regulation of citrate exudation from the broad bean (*Vicia faba* L.) under Al stress. *Plant Physiol Biochem*, 70: 504~511
- Chen LS, Tang N, Jiang HX, Yang LT, Li Q, Smith BR (2009). Changes in organic acid metabolism differ between roots and leaves of *Citrus grandis* in response to phosphorus and aluminum interactions. *J Plant Physiol*, 166: 2023~2034
- Chen ZC, Yamaji N, Motoyama R, Nagamura Y, Ma JF (2012). Up-regulation of a magnesium transporter gene *OsMGT1* is required for conferring aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol*, 159: 1624~1633
- Chen ZC, Yokosho K, Kashino M, Zhao FJ, Yamaji N, Ma JF (2013). Adaptation to acidic soil is achieved by increased numbers of cis-acting elements regulating *ALMT1* expression in *Holcus lanatus*. *Plant J*, 76: 10~23
- de la Fuente JM, Ramírez-Rodríguez V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L (1997). Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*, 276: 1566~1568
- Delhaize E, Craig S, Beaton CD, Bennet RJ, Jagdish VC, Randall PJ (1993). Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) (I. Uptake and distribution of aluminum in root apices). *Plant Physiol*, 103: 685~693
- Delhaize E, Hebb DM, Ryan PR (2001). Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol*, 125: 2059~2067
- Ding ZJ, Yan JY, Xu XY, Li GX, Zheng SJ (2013). WRKY46 functions as a transcriptional repressor of *ALMT1*, regulating aluminum-induced malate secretion in *Arabidopsis*. *Plant J*, 76: 825~835
- Famoso AN, Zhao K, Clark RT, Tung CW, Wright MH, Bustamante C, Kochian LV, McCouch SR (2011). Genetic architecture of aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through genome-wide association analysis and QTL mapping. *PLoS Genet*, 7: e1002221
- Fan W, Lou HQ, Gong YL, Liu MY, Wang ZQ, Yang JL, Zheng SJ (2014). Identification of early Al-responsive genes in rice bean (*Vigna umbellata*) roots provides new clues to molecular mechanisms of Al toxicity and tolerance. *Plant Cell Environ*, 37: 1586~1597
- Fontecha G, Silva-Navas J, Benito C, Mestres MA, Espino FJ, Hernandez-Riquer MV, Gallego FJ (2007). Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet*, 114: 249~260
- Fujii M, Yokosho K, Yamaji N, Saisho D, Yamane M, Takahashi H, Sato K, Nakazono M, Ma JF (2012). Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. *Nat Commun*, 3: 713
- Furuichi T, Sasaki T, Tsuchiya Y, Ryan PR, Delhaize E, Yamamoto Y (2010). An extracellular hydrophilic carboxy-terminal domain regulates the activity of TaALMT1, the aluminum-activated malate transport protein of wheat. *Plant J*, 64: 47~55
- Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K, Ma JF (2007). An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol*, 48: 1081~1091
- Hayes JE, Ma JF (2003). Al-induced efflux of organic acid anions is poorly associated with internal organic acid metabolism in triticale roots. *J Exp Bot*, 54: 1753~1759
- Hoekenga OA, Maron LG, Piñeros MA, Cañado GM, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan PR, Dong B, Delhaize E, Sasaki T et al (2006). *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 9738~9743

- Hoekenga OA, Vision TJ, Shaff JE, Monforte AJ, Lee GP, Howell SH, Kochian LV (2003). Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (Landsberg *erecta*×Columbia) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol*, 132: 936~948
- Huang CF, Yamaji N, Chen Z, Ma JF (2012). A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *Plant J*, 69: 857~867
- Huang CF, Yamaji N, Ma JF (2010). Knockout of a bacterial-type ATP-binding cassette transporter gene, *AtSTAR1*, results in increased aluminum sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 153: 1669~1677
- Huang CF, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, Ma JF (2009). A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*, 21: 655~667
- Ikka T, Kobayashi Y, Iuchi S, Sakurai N, Shibata D, Kobayashi M, Koyama H (2007). Natural variation of *Arabidopsis thaliana* reveals that aluminum resistance and proton resistance are controlled by different genetic factors. *Theor Appl Genet*, 115: 709~719
- Iuchi S, Kobayashi Y, Koyama H, Kobayashi M (2008). STOP1, a Cys<sub>2</sub>/His<sub>2</sub> type zinc-finger protein, plays critical role in acid soil tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav*, 3: 128~130
- Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, Ikka T, Hirayama T, Kobayashi M (2007). Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and co-regulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 9900~9905
- Kobayashi Y, Hoekenga OA, Itoh H, Nakashima M, Saito S, Shaff JE, Maron LG, Piñeros MA, Kochian LV, Koyama H (2007). Characterization of *AtALMT1* expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 145: 843~852
- Kobayashi Y, Kobayashi Y, Sugimoto M, Lakshmanan V, Iuchi S, Kobayashi M, Bais HP, Koyama H (2013). Characterization of the complex regulation of *AtALMT1* expression in response to phytohormones and other inducers. *Plant Physiol*, 162: 732~740
- Kobayashi Y, Koyama H (2002). QTL analysis of Al tolerance in recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 43: 1526~1533
- Kobayashi Y, Ohyama Y, Kobayashi Y, Ito H, Iuchi S, Fujita M, Zhao CR, Tanveer T, Ganesan M, Kobayashi M et al (2014). STOP2 activates transcription of several genes for Al- and low pH-tolerance that are regulated by STOP1 in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 7: 311~322
- Kochian LV (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 46: 237~260
- Kovermann P, Meyer S, Hörtensteiner S, Picco C, Scholz-Starke J, Ravera S, Lee Y, Martinoia E (2007). The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant J*, 52: 1169~1180
- Larsen PB, Cancel J, Rounds M, Ochoa V (2007). *Arabidopsis ALS1* encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta*, 225: 1447~1458
- Larsen PB, Geisler MJ, Jones CA, Williams KM, Cancel JD (2005). *ALS3* encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J*, 41: 353~363
- Li XF, Ma JF, Matsumoto H (2000). Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. *Plant Physiol*, 123: 1537~1544
- Liang C, Piñeros MA, Tian J, Yao Z, Sun L, Liu J, Shaff J, Coluccio A, Kochian LV, Liao H (2013). Low pH, aluminum, and phosphorus coordinately regulate malate exudation through *GmALMT1* to improve soybean adaptation to acid soils. *Plant Physiol*, 161: 1347~1361
- Ligaba A, Dreyer I, Margaryan A, Schneider DJ, Kochian L, Piñeros M (2013). Functional, structural and phylogenetic analysis of domains underlying the Al sensitivity of the aluminum-activated malate/anion transporter, TaALMT1. *Plant J*, 76: 766~780
- Ligaba A, Katsuhara M, Ryan PR, Shibasaka M, Matsumoto H (2006). The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiol*, 142: 1294~1303
- Ligaba A, Kochian L, Piñeros M (2009). Phosphorylation at S384 regulates the activity of the TaALMT1 malate transporter that underlies aluminum resistance in wheat. *Plant J*, 60: 411~423
- Ligaba A, Maron L, Shaff J, Kochian L, Piñeros M (2012). Maize *ZmALMT2* is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux. *Plant Cell Environ*, 35: 1185~1200
- Ligaba A, Shen H, Shibata K, Yamamoto Y, Tanakamaru S, Matsumoto H (2004). The role of phosphorus in aluminium-induced citrate and malate exudation from rape (*Brassica napus*). *Physiol Plant*, 120: 575~584
- Liu J, Luo X, Shaff J, Liang C, Jia X, Li Z, Magalhaes J, Kochian LV (2012). A promoter-swap strategy between the *AtALMT* and *AtMATE* genes increased *Arabidopsis* aluminum resistance and improved carbon-use efficiency for aluminum resistance. *Plant J*, 71: 327~337
- Liu J, Magalhaes JV, Shaff J, Kochian LV (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *Plant J*, 57: 389~399
- Liu MY, Chen WW, Xu JM, Fan W, Yang JL, Zheng SJ (2013). The role of *VuMATE1* expression in aluminium-inducible citrate secretion in rice bean (*Vigna umbellata*) roots. *J Exp Bot*, 64: 1795~1804
- Ma JF (2000). Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol*, 41: 383~390
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci*, 6: 273~278
- Ma JF, Taketa S, Yang ZM (2000). Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. *Plant Physiol*, 122: 687~694
- Ma JF, Zheng SJ, Matsumoto H (1997). Specific secretion of citric



- acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol*, 38: 1019~1025
- Magalhaes JV, Liu J, Guimaraes CT, Lana UG, Alves VM, Wang YH, Schaffert RE, Hoekenga OA, Piñeros MA, Shaff JE et al (2007). A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat Genet*, 39: 1156~1161
- Maron LG, Guimarães CT, Kirst M, Albert PS, Birchler JA, Bradbury PJ, Edward SB, Coluccio AE, Danilova TV, Kudrna D et al (2013). Aluminum tolerance in maize is associated with higher *MATE1* gene copy number. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 5241~5246
- Maron LG, Kirst M, Mao C, Milner MJ, Menossi M, Kochian LV (2008). Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. *New Phytol*, 179: 116~128
- Maron LG, Piñeros MA, Guimarães CT, Magalhaes JV, Pleiman J K, Mao C, Shaff J, Belicuas SNJ, Kochian LV (2010). Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *Plant J*, 61: 728~740
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KA, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R (2010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J*, 63: 1054~1062
- Meyer S, Scholz-Starke J, De Angeli A, Kovermann P, Burla B, Gambale F, Martinoia E (2011). Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation. *Plant J*, 67: 247~257
- Morita M, Shitan N, Sawada K, Van Montagu MC, Inzé D, Rischer H, Goossens A, Oksman-Caldentey KM, Moriyama Y, Yazaki K (2009). Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 2447~2452
- Ohyama Y, Ito H, Kobayashi Y, Ikka T, Morita A, Kobayashi M, Imai-zumi R, Aoki T, Komatsu K, Sakata Y et al (2013). Characterization of *AtSTOP1* orthologous genes in tobacco and other plant species. *Plant Physiol*, 162: 1937~1946
- Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y (2006). The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol Sci*, 27: 587~593
- Osawa H, Matsumoto H (2001). Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex. *Plant Physiol*, 126: 411~420
- Osawa H, Matsumoto H (2002). Aluminium triggers malate-independent potassium release via ion channels from the root apex in wheat. *Planta*, 215: 405~412
- Piñeros MA, Cançado GM, Kochian LV (2008a). Novel properties of the wheat aluminum tolerance organic acid transporter (TaALMT1) revealed by electrophysiological characterization in *Xenopus* oocytes: functional and structural implications. *Plant Physiol*, 147: 2131~2146
- Piñeros MA, Cançado GM, Maron LG, Lyi SM, Menossi M, Kochian LV (2008b). Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of *ZmALMT1*—an anion-selective transporter. *Plant J*, 53: 352~367
- Ryan PR, Delhaize E, Randall PJ (1995). Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta*, 196: 103~110
- Ryan PR, Raman H, Gupta S, Sasaki T, Yamamoto Y, Delhaize E (2010). The multiple origins of aluminium resistance in hexaploid wheat include *Aegilops tauschii* and more recent *cis* mutations to *TaALMT1*. *Plant J*, 64: 446~455
- Sasaki T, Ryan PR, Delhaize E, Hebb DM, Ogihara Y, Kawaura K, Kazuhiro N, Kojima T, Toyoda A, Matsumoto H et al (2006). Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* gene and its relationship to aluminum resistance. *Plant Cell Physiol*, 47: 1343~1354
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J*, 37: 645~653
- Sawaki Y, Iuchi S, Kobayashi Y, Kobayashi Y, Ikka T, Sakurai N, Fujita M, Shinozaki K, Shibata D, Kobayashi M (2009). STOP1 regulates multiple genes that protect *Arabidopsis* from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol*, 150: 281~294
- Shen H, He LF, Sasaki T, Yamamoto Y, Zheng SJ, Ligaba A, Yan XL, Ahn SJ, Yamaguchi M, Sasakawa H et al (2005). Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H<sup>+</sup>-AT-Pase. *Plant Physiol*, 138: 287~296
- Silva IR, Smyth TJ, Israel DW, Raper CD, Ruffy TW (2001). Magnesium ameliorates aluminum rhizotoxicity in soybean by increasing citric acid production and exudation by roots. *Plant Cell Physiol*, 42: 546~554
- Sivaguru M, Liu J, Kochian LV (2013). Targeted expression of Sb-MATE in the root distal transition zone is responsible for sorghum aluminum resistance. *Plant J*, 76: 297~307
- Ślaski JJ, Zhang G, Basu U, Stephens JL, Taylor GJ (1996). Aluminum resistance in wheat (*Triticum aestivum*) is associated with rapid, Al-induced changes in activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in root apices. *Physiol Plant*, 98: 477~484
- Sokolovski S, Hills A, Gay R, Garcia-Mata C, Lamattina L, Blatt MR (2005). Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca<sup>2+</sup> release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J*, 43: 520~529
- Taylor GJ (1991). Current views of the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. *Curr Top Plant Biochem Physiol*, 10: 57~93
- Tesfaye M, Temple SJ, Allan DL, Vance CP, Samac DA (2001). Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol*, 127: 1836~1844
- Tovkach A, Ryan PR, Richardson AE, Lewis DC, Rathjen TM, Ramesh S, Tyerman SD, Delhaize E (2013). Transposon-mediated alteration of *TaMATE1B* expression in wheat confers constitutive

- citrate efflux from root apices. *Plant Physiol*, 161: 880~892
- Trejo-Téllez LI, Stenzel R, Gómez-Merino FC, Schmitt JM (2010). Transgenic tobacco plants overexpressing pyruvate phosphate dikinase increase exudation of organic acids and decrease accumulation of aluminum in the roots. *Plant Soil*, 326: 187~198
- Tsutsui T, Yamaji N, Ma JF (2011). Identification of a *cis*-acting element of ART1, a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-type zinc-finger transcription factor for aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol*, 156: 925~931
- Von Uexküll HR, Mutert E (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil*, 171: 1~15
- Wang ZQ, Xu XY, Gong QQ, Xie C, Fan W, Yang JL, Lin QS, Zheng SJ (2014). Root proteome of rice studied by iTRAQ provides integrated insight into aluminum stress tolerance mechanisms in plants. *J Proteomics*, 98: 189~205
- Xia J, Yamaji N, Ma JF (2013). A plasma membrane-localized small peptide is involved in rice aluminum tolerance. *Plant J*, 76: 345~355
- Xu M, You J, Hou N, Zhang H, Chen G, Yang Z (2010). Mitochondrial enzymes and citrate transporter contribute to the aluminum-induced citrate secretion from soybean (*Glycine max*) roots. *Funct Plant Biol*, 37: 285~295
- Yamaguchi M, Sasaki T, Sivaguru M, Yamamoto Y, Osawa H, Ahn SJ, Matsumoto H (2005). Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1). *Plant Cell Physiol*, 46: 812~816
- Yamaji N, Huang CF, Nagao S, Yano M, Sato Y, Nagamura Y, Ma JF (2009). A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell*, 21: 3339~3349
- Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H (2002). Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol*, 128: 63~72
- Yang JL, You JF, Li YY, Wu P, Zheng SJ (2007). Magnesium enhances aluminum-induced citrate secretion in rice bean roots (*Vigna umbellata*) by restoring plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity. *Plant Cell Physiol*, 48: 66~73
- Yang JL, Zhang L, Zheng SJ (2008). Aluminum-activated oxalate secretion does not associate with internal content among some oxalate accumulators. *J Integr Plant Biol*, 50: 1103~1107
- Yang JL, Zhu XF, Peng YX, Zheng C, Ming F, Zheng SJ (2011a). Aluminum regulates oxalate secretion and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity independently in tomato roots. *Planta*, 234: 281~291
- Yang LT, Qi YP, Chen LS, Sang W, Lin XJ, Wu YL, Yang CJ (2012). Nitric oxide protects sour pummelo (*Citrus grandis*) seedlings against aluminum-induced inhibition of growth and photosynthesis. *Environ Exp Bot*, 82: 1~13
- Yang XY, Yang JL, Zhou Y, Pineros MA, Kochian LV, Li GX, Zheng SJ (2011b). A *de novo* synthesis citrate transporter, *Vigna umbellata* multidrug and toxic compound extrusion, implicates in Al-activated citrate efflux in rice bean (*Vigna umbellata*) root apex. *Plant Cell Environ*, 34: 2138~2148
- Yang ZM, Nian H, Sivaguru M, Tanakamaru S, Matsumoto H (2001). Characterization of aluminium-induced citrate secretion in aluminium-tolerant soybean (*Glycine max*) plants. *Physiol Plant*, 113: 64~71
- Yang ZM, Yang H, Wang J, Wang YS (2004). Aluminum regulation of citrate metabolism for Al-induced citrate efflux in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Sci*, 166: 1589~1594
- Yokosho K, Yamaji N, Ma JF (2010). Isolation and characterisation of two MATE genes in rye. *Funct Plant Biol*, 37: 296~303
- Yokosho K, Yamaji N, Ma JF (2011). An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J*, 68: 1061~1069
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H (1998). High aluminum resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol*, 117: 745~751
- Zheng SJ, Yang JL, He YF, Yu XH, Zhang L, You JF, Shen RF, Matsumoto H (2005). Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiol*, 138: 297~303