

植物氮素利用效率的研究进展

武姣娜¹, 魏晓东^{2,*}, 李霞², 张金飞¹, 谢寅峰^{1,*}

¹南京林业大学, 南方现代林业协同创新中心, 南京210037

²江苏省农业科学院粮食作物研究所, 江苏省优质水稻工程技术研究中心, 国家水稻改良中心南京分中心, 南京210014

摘要: 植物的氮素利用受个体遗传、基因调控、基因间相互作用以及信号分子调节等影响, 一直是科学探索的热点和重点。近年来, 随着基因工程和基因编辑技术的发展, 对提高植物氮素利用效率(NUE)的研究也由传统的针对植物本身转到基因工程方向。本文总结了植物氮素利用代谢过程以及利用基因工程技术提高植物NUE的最新成果, 着重介绍了磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)在维持碳氮代谢平衡和促进氮素利用中的作用, 并对今后的研究提出展望, 以期为提高作物氮素利用的研究提供新思路。

关键词: 氮素利用; 碳氮代谢; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)

氮素是植物营养中最重要的元素之一, 氮肥施用对作物产量的提高起着关键作用。中国的氮肥消耗量超过世界总氮肥量的三分之一, 是目前世界上氮肥施用量最大的国家(Li等2012)。虽然施用氮肥可提高作物产量, 但过量施用不仅使农业生产成本提高, 而且会引起环境污染以及生态环境恶化等问题(Ladha等2016; Bobbink等2010)。因此, 关于合理使用氮肥和提高植物氮素利用效率(nitrogen use efficiency, NUE)的研究具有重要的理论和现实意义。

植物的氮素利用一般分为吸收、转运和同化等过程。植物NUE主要是由硝酸盐或者铵盐转运蛋白和氮同化关键酶决定, 此外, 许多转录因子在氮素利用中也起关键调节作用。虽然研究者们已在不同植物中开展了一些工作以改进植物的NUE, 但其调控机制仍然不是十分清楚。近年来, 随着基因工程技术的不断发展, 利用基因工程技术对植物氮代谢相关酶基因的改良提高植物NUE一直是研究的热点。本文总结了植物氮素利用机制和利用基因工程改良植物氮素利用方面的研究进展, 旨在为提高植物NUE提供新的思路。

1 植物的氮素利用

1.1 氮素的吸收和转运

土壤中的氮素主要以有机态氮和无机态氮两种形式存在, 无机态氮即硝态氮(NO_3^- -N)和铵态氮(NH_4^+ -N)是植物从土壤中吸收氮素的主要形式。在氧气充足的土壤中, 无机氮的主要形式是 NO_3^- ;

在淹水湿地或酸性土壤中, 主要形式则是 NH_4^+ (Xu等2012)。不同植物所需的氮源形式不同, 由于水稻长期处于淹水环境中而主要吸收 NH_4^+ , 拟南芥则主要吸收 NO_3^- 。土壤中 NO_3^- 和 NH_4^+ 的浓度在较大范围($0.1\sim 10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)变动(Miller和Cramer 2005), 因此植物也进化形成了低亲和转运系统(low-affinity transport system, LATS)和高亲和转运系统(high-affinity transport system, HATS)来适应不同的土壤环境(Xu等2012)。

植物吸收氮素主要依赖于硝酸盐转运蛋白(nitrate transporter, NRT)和铵转运蛋白(ammonium transporter, AMT), 不同植物中存在的NRT和AMT也不同。在拟南芥中, NRT家族有4个成员: NPF(NRT1/PTR)、NRT2、氯通道家族(chloride channel family, CLC)和慢阴离子通道相关同系物(slow anion channel-associated homologues, SLAC/SLAH), 它们分别由53、7、7和5个成员组成。迄今为止, 这72个成员约有20个已被识别和表征。在NRT1家族中, 一些可以转运 NO_3^- 或二肽, 而另一些则转运生长素、脱落酸(abscisic acid, ABA)、茉莉酰异亮氨酸、赤霉素(gibberellin, GA)或硫代葡萄糖苷。目前已经证实, NPF6.3 (CHL1/NRT1.1)、NPF4.6 (NRT1.2)、NRT2.1、NRT2.2、NRT2.4和NRT2.5

收稿 2018-04-02 修订 2018-07-11

资助 国家自然科学基金(31600312)和江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

* 共同通讯作者: 魏晓东(44028791@qq.com)、谢寅峰(472045945@qq.com)。

参与从外部环境摄取 NO_3^- ; NPF2.7介导 NO_3^- 的跨膜转运; NPF2.3、NPF7.3 (NRT1.5)、NPF7.2 (NRT1.8)和NPF2.9 (NRT1.9)在调控根部至茎 NO_3^- 的运输过程中起重要作用; NRT2.4、NRT2.5、NPF1.1 (NRT1.11)、NPF1.2 (NRT1.12)和NPF2.13 (NRT1.7)在 NO_3^- 再吸收利用过程中发挥作用。在水稻中至少存在80个NPF (NRT1/PTR)、4个NRT2和2个NRT伴侣NAR2成员,但目前仅有少数NPF (NRT1/PTR)家族成员被确认。水稻中已鉴定出4个NRT2和2个NAR2,其中NRT2.1、NRT2.2、NRT2.4和NPF2.4参与 NO_3^- 吸收, NPF2.2、NRT2.3a和NPF2.4参与 NO_3^- 从根向地上部转运。

土壤中 NH_4^+ 是植物生长的另一重要氮源,尤其是在厌氧条件下,成为植物从土壤中吸收氮素的主要形式。拟南芥中AMT1.1、AMT1.2、AMT1.3和AMT1.5参与 NH_4^+ 的摄取, *AtAMT1.1*、*AtAMT1.2*和*AtAMT1.3*均在根中高度表达, *AtAMT1.1*和*AtAMT1.2*也可以在地上部表达,其在成熟叶中表达最高。水稻具有12个AMT (Suenaga等2003; Li等2009, 2012), AMT2和AMT3参与 NH_4^+ 的摄取, *OsAMT1.1*在根和地上部均可由 NH_4^+ 诱导表达,而*OsAMT1.2*仅由根中 NH_4^+ 诱导, *OsAMT1.3*则由根中缺氮诱导。环境中氮源浓度及形态、温度变化等因素也会影响植物体内 NH_4^+ 和 NO_3^- 转运蛋白的活性以及根系结构,从而影响根系对氮素的获取和吸收 (Garnett等2009; Harrison等2007)。

1.2 氮素的同化

氮的同化作用是指植物吸收环境中的 NO_3^- 或者 NH_4^+ 后再经过体内一系列反应,合成自身需要的氨基酸和蛋白质等含氮有机化合物的过程。在大多数植物中, NO_3^- 同化作用发生在茎中,所以,植物由根部吸收的 NO_3^- 被装载到木质部导管中向上运输 (Krapp 2015)。植物细胞吸收的 NO_3^- 需要经过胞质硝酸还原酶(nitrate reductase, NIA)和质体亚硝酸还原酶(nitrite reductase, NiR)催化反应还原成 NH_4^+ ,才能被进一步吸收利用。 NH_4^+ 通过谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)和谷氨酸合酶(glutamate synthase, GOGAT)等催化同化为谷氨酸(glutamic acid, Glu)。GS是氮同化和再活化的关键酶,有两种同工型——胞质GS1和质体GS2。胞质GS1负责根中的初级铵同化作用或蛋白质中铵的再同化,而GS2主要负责叶绿体中光呼吸作用产

生的铵的同化。水稻中有3个GS成员,其中*OsGS1.1*和*OsGS1.2*在所有器官中均表达,并且在根表的细胞层中显示出对铵供应的响应作用,而*OsGS1.3*则在小穗中表达并将铵同化到种子中。

除GS/GOGAT外,谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AspAT)和天冬酰胺合成酶(asparagine synthetase, AS)也在氮同化中发挥重要作用。AS催化谷氨酰胺(glutamine, Gln)和天冬氨酸形成天冬酰胺(asparagine, Asn)和Glu,所以,GS和AS在氮的初级代谢中起重要作用。植物在氮素同化转运中需要与其他代谢过程相互协调才能更好地促进植物生长,且氮素的同化和转运与信号分子调控密切相关。如 NO_3^- 还以信号形式参与氮的同化和相关代谢的调节,但是其信号调节的生理生化机制尚不明确 (Krapp 2015)。硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)的副反应产生氮氧化物(NO),作为一种调节植物发育和胁迫反应的信号分子在植物体内发挥重要作用 (Frunzillo等2015),也表明氮的吸收和同化受信号系统网络调控 (Huergo等2012),这些结果均显示出氮代谢的复杂性。

2 植物NUE

NUE作为指导农业生产以及作物生长适宜程度的综合生理、生态指标而被广泛应用。但因为研究目的和对象的不同,其含义和表达方式也有差异,植物营养学中常以“单位有效氮产生的籽粒产量和生物量”来衡量,而农学中常以“氮的投入与产出”来衡量。“氮素利用效率”和“氮肥利用效率”虽然常常被笼统称为NUE,但实际上二者有区别。前者是以土壤总氮供应作为研究对象,而后者则仅指施入氮肥的当季利用效率 (Ye等2007)。虽然关于植物氮素利用的评价指标很多,但迄今为止,国内尚未有统一的NUE指标。有研究表明,中国的主要作物氮肥利用率比较低,平均仅28.7% (闫湘等2008),而粮食作物的NUE目标在30%~50%比较适宜 (Li等2012),所以,提高氮素的利用率在农业生产和环境优化上均具有重大意义,也一直是研究者们探索的重点。

2.1 影响NUE的因素

有研究表明,影响NUE的重要因素是进入土壤的氮素总量过大 (Xu等2012),超出植物本身吸收

利用能力和土壤的承受能力,使部分氮素以地表径流和氨挥发的形式进入水体和空气中,引发环境污染等一系列问题(Ladha等2016)。此外,耕作方式、植物不同时期的需肥量、施肥的种类和根系活动都会影响NUE (Filleur和Daniel-Vedele 1999)。植物体内氮同化和NUE低的原因在很大程度上是由于碳氮代谢这两个过程紧密联系(Oliveira和Coruzzi 1999; Stitt等2002)。因此,氮代谢中任何一种酶的数量或活性改变,以及转录后的翻译和反馈调节所引起产物变化,都可能被碳代谢等其他机制的产物变化所掩盖,以维持植物体内的代谢平衡。

提高NUE的研究设想最初主要围绕两条途径来实施:(1)从施肥量、方法和种类入手,改善肥料特性,精准施肥;(2)从作物入手,挖掘作物新品种,提高对氮素的吸收和利用能力。近年来的研究发现,影响NUE的主要瓶颈是作物本身,即不同作物品种之间的总吸氮量、不同时期的氮的吸收以及氮转化和同化有明显的差异(Gabriel等2010; Teng等2017),因此,研究植物本身的氮素利用途径是提高植物NUE的关键。

2.2 不同植物NUE不同

不同类型植物NUE不同,这与植物本身的结构和功能有关。例如C₃和C₄植物,C₄植物在不同环境条件下的适应性不如C₃植物那样广泛。尽管如此,已有的研究表明,C₃和C₄植物的CO₂同化速率均与叶片氮含量呈很强的相关性。在高光强、低CO₂以及低氮条件下,C₄植物具有比C₃植物更高的光合速率、NUE和水分利用效率(Mitchell和Sheehy 2006)。有研究发现,C₄植物中CO₂浓缩机制增强了高光强下CO₂同化速率,从而提高了光合氮素利用效率(photosynthetic nitrogen use efficiency, PNU)和叶片水分利用率(leaf water use efficiency, LWUE) (Ghannoum等2011)。与C₃植物相比,C₄植物二氧化碳同化效率与叶片含氮量之间有很强相关性,这在很大程度上是由于可溶性蛋白在两类植物中的分配比例不同(Yamamoto等2015; Yin等2010)。与C₃植物相比,C₄植物有较高的光合、水分、NUE和较高的生物产量,因此对C₃植物进行类C₄的改造一直是科学研究的热点。

2.3 利用分子手段提高植物的NUE

随着分子生物学研究的深入,近年对提高植物氮素利用相关基因有了更深入的了解。研究人

员利用各种方法操纵涉及氮吸收、同化、代谢相关基因以及一些转录因子的表达,试图改善植物的NUE (表1)。在以NO₃⁻作为主要氮源的环境中,NPF8.9 (*OsNRT1*)过表达能显著提高水稻植株的生物量;NPF8.20 (*OsPTR9*)过表达能促进水稻侧根的形成,提高NH₄⁺的吸收和籽粒产量;*OsNPF7.3* (*OsPTR6*)的过表达能改善水稻的生长。系统发育分析表明,NRT1.1B在籼粳两亚种之间有差异,携带籼稻等位基因的粳稻品种与对照品种相比,显著提高了籽粒产量和NUE,在低氮条件下产量可以增加30.3%~33.4%,最近的研究表明,*OsNPF6.3* (*OsNRT1.1A*)在水稻中过表达可大大提高植株NUE和籽粒产量,生育期也显著缩短。在NRT2家族中,*OsNRT2.3b*可以改善水稻的生长、提高产量和NUE。在以NH₄⁺作为主要氮源的环境中,在氮限制条件下,*OsAMT1.1*过表达可以增加水稻NH₄⁺的吸收并提高产量。AMT1.1和AMT1.3可以在植物根部形成功能同源和异源三聚体,以调节铵的运输活性,从而提高植株NUE。

在水稻氮的同化过程中,*OsGS1.1*的过表达能显著增加其产量,*OsGS1.2*的过表达可以增加分蘖数,但在氮限制条件下并不能改善NUE;*OsGS2*的过表达可增强光呼吸和耐盐性,而*OsNADH-GOGAT*过表达则可以增强灌浆;*OsAlaAT*过表达增加分蘖数、产量和植株总氮含量。在拟南芥中,*AtASN1*和*AtASN2*的过表达分别增加了种子蛋白质含量和Asn含量,并在氮限制条件下还可增强幼苗对低氮的耐受性;*AtAspAT*的过表达增强叶片丙氨酸氨基转移酶活性,进而增加种子中氨基酸和蛋白质含量。

此外,许多调节性的转录因子也参与植物NUE的调节。在拟南芥或水稻中过表达玉米转录因子基因*Dof1* (*ZmDof1*)可以上调植株中与有机酸代谢相关基因的表达,从而增强氮同化作用并在低氮条件下促进植株生长。水稻中*OsRDD1*过表达可以增加营养物质的吸收和积累,进而增加产量。在拟南芥中,*AtANR1*和*AtAGL21*的过表达增加了籽粒长度和数量,而*AtAGL21*基因的沉默则导致在缺氮条件下,其通过影响生长素信号传导途径使侧根发育受损;*AtTGA4*的过表达能改善硝酸盐运输和同化酶活性;*AtNLP7*的过表达可通过改善碳氮代谢来促进植物生长。

表1 参与提高植物NUE的基因

Table 1 Genes for increasing NUE

类型	基因	宿主植物	功能	参考文献	
氮素的吸收转运	<i>OsNPF8.20 (OsPTR9)</i>	水稻	促进侧根形成, 增加NO ₃ ⁻ 吸收和产量	Fang等2013	
	<i>OsNPF7.3 (OsPTR6)</i>	水稻	促进水稻生长	Fan等2014	
	<i>OsNPF8.9 (OsNRT1)</i>	水稻	在水培条件下增加生物量	Fan等2015	
	<i>OsNPF6.5 (NRT1.1B)</i>	水稻	增加谷物产量和NUE	Hu等2015	
	<i>OsNRT2.1/NpNRT2.1</i>	水稻/马铃薯	增加NO ₃ ⁻ 的吸收, 提高NUE	Chen等2016; Fraisier等2000	
	<i>OsNRT2.3a</i>	水稻	增加NO ₃ ⁻ 的吸收	Fan等2016	
	<i>OsNRT2.3b</i>	水稻	促进生长, 增加产量和NUE	Fan等2016	
	<i>OsAMT1.1</i>	水稻	增加NH ₄ ⁺ 的吸收和产量	Hoque等2006; Ranathunge等2014	
	<i>OsAMT1.3/AtAMT1.3</i>	水稻/拟南芥	影响植物的碳氮代谢	Bao等2015	
	<i>OsNPF6.3 (OsNRT1.1A)</i>	水稻	提高水稻的产量和NUE	Wang等2018	
氮素的同化	<i>OsGS1;1</i>	水稻	增加作物产量	Cai等2009	
	<i>OsGS1;2</i>	水稻	增加可溶性蛋白和NUE	Cai等2009; Brauer等2011	
	<i>OsGS2</i>	水稻	增强光呼吸和耐盐性	Hoshida等2000	
	<i>OsNADH-GOGAT</i>	水稻	增强灌浆	Yamaya等2002	
	<i>AtASN1</i>	拟南芥	增强种子中蛋白质含量	Lam等2003	
	<i>AtASN2</i>	拟南芥	增加Gln含量	Igarashi等2009	
	<i>OsAspAT/NtAspAT</i>	水稻/烟草	增加叶片丙氨酸氨基转移酶活性和蛋白质含量	Sentoku等2000; Zhou等2009	
	<i>OsAlaAT</i>	水稻	增加分蘖数量、谷物产量和总氮含量	Beatty等2009	
	转录因子	<i>ZmDof1</i>	拟南芥/水稻	在低氮条件下增加氮同化和促进生长	Yanagisawa等2004; Kurai等2011
		<i>AtANR1</i>	拟南芥	增加籽粒的长度和数量	Gan等2012
<i>AtAGL21</i>		拟南芥	增加角果长度	Yu等2014	
<i>AtTGA4</i>		拟南芥	改善硝酸盐运输和同化酶活性	Zhong等2015	
<i>OsRDD1</i>		水稻	增加营养物质的积累和谷物产量	Iwamoto和Tagiri 2016	
<i>AtNLP7</i>		拟南芥	增强氮和碳同化来改善植物生长	Yu等2016	

根据Li等(2017)并略有修改。

3 氮素利用与碳代谢的关系

植物中的碳氮代谢是相互关联的, 氮的同化需要碳代谢提供能量和骨架。植物从外界吸收的氮源经过GS/GOGAT循环合成Glu和Gln, Glu可通过多种不同的氨基转移酶形成其他氨基酸(Andrews等2004), 因此, Glu在植物的氨基酸代谢中占据中心位置, 并在碳和氮同化途径中发挥中枢信号作用(Forde和Lea 2007)。植物氨基酸合成需要的碳骨架来源于糖酵解、光合作用、氧化磷酸戊糖途径及三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA), 因此, 氨基酸的合成将碳代谢与氮代谢紧密联系。近年来的研究表明, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC; EC 4.1.1.31)

不仅在C₄和CAM植物的光合作用中起重要作用, 而且在植物体内参与TCA循环, 促进氨基酸合成, 调节植物体内有机酸的合成和分配, 增强植物的碳骨架, 因此, PEPC在碳氮代谢的平衡中发挥重要作用(Masumoto和Gantt 2010; Doubnerová和Ryšlavá 2011)。

3.1 植物PEPC与碳氮代谢的关系

PEPC作为碳代谢的重要酶, 广泛分布于包括维管植物、藻类、蓝细菌和光合细菌在内的所有光合生物以及非光合细菌和原核生物中(Izui等2004), 但在动物和真菌中并不存在(O'Leary等2011)。植物中PEPC由一个小的基因家族编码, 存在几种*pepc*基因, 包括植物型*pepc*和细菌型*pepc* (Sullivan

等2004; Igawa等2010)。在拟南芥中存在3种植物型 $pepc$ 基因($Atppc1/2/3$)和1种细菌型基因($Atppc4$) (Sánchez和Cejudo 2003)。水稻中 $pepc$ 有5个植物型($Osppc1/2a/2b/3/4$)和1个细菌型($Osppc4$)基因。PEPC在光合组织和非光合组织的作用均有深入研究。在光合组织中, PEPC在 HCO_3^- 存在下催化PEP不可逆的 β -羧化作用而产生草酰乙酸(oxalacetic acid, OAA)。此外, 在 C_4 植物和景天科植物中, PEPC在光合作用中同化 CO_2 的作用已有广泛研究。在大多数 C_3 植物的非光合组织中, PEPC的主要功能是补充TCA中用于各种生物合成途径和氮同化消耗的中间体(Izui等2004)。

在水稻中, 位于叶绿体内的 $pepc$ 基因在铵同化过程中起重要作用。例如在叶绿体型 $pepc$ ($Ospc4$)基因沉默系中, 通过代谢物分析发现, Gln含量增加, α -酮戊二酸(α -ketoglutaric acid, 2-OG)含量减少。由于Gln和Glu分别是GOGAT的底物和产物, Gln含量增加表明GOGAT反应受到抑制, 作为GOGAT另一底物2-OG的含量下降也证明GOGAT受到抑制, 导致Asp含量下降, 氨基酸合成的关键酶AspAT活性受到抑制, 说明 $Osppc4$ 基因的沉默抑制 NH_4^+ 的同化, 并且通过消耗有机酸进一步影响氨基酸的转化合成。这也表明除了糖酵解外, 叶绿体型 $pepc$ 基因为水稻中有机酸的合成提供独特的途径(Masumoto和Gantt 2010)。蓝细菌 $pepc$ ($Svpepc$) 在拟南芥中的过表达也导致植株中总游离氨基酸含量增加(Chen等2004)。转 C_4 型 $pepc$ 基因水稻表现为碳代谢产物流入TCA循环和氨基酸生物合成的过程, 从而导致氮含量的显著增加和C/N比的显著下降(Shi等2015)。在豌豆中过表达棒状杆菌 $pepc$ 导致种子中许多种氨基酸的含量改变, 有机酸含量增加, 进而改变种子中C/N的分配, 提高植株NUE (Yamamoto等2015)。过表达 C_4 型 $pepc$ 基因的马铃薯体内的可溶性糖和淀粉向氨基酸和有机酸转变, 增强氮素同化, 同时提高了植株的NUE (Rademacher等2002)。在转玉米 $pepc$ 基因小麦中, 在低氮处理下, 植株中核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)基因表达上调, 酶含量及其羧化酶活性增加, 与TCA循环补偿途径相关基因也上调, 表明更多的碳骨架被分配到氮同化中。上述研究表明, $pepc$ 能够调节植物中碳氮代谢, 并且增加氨基酸和

有机酸含量, 从而提高植株的NUE。

3.2 植物 $pepc$ 突变体在低氮条件下的表现

氮素作为植物生长和产量形成的重要营养元素, 其缺乏可会导致植物叶片失绿, 从而减弱光合作用, 生长发育也受到限制, 表现为生育期缩短, 叶片衰老加速。增加氮素营养能提高水稻功能叶片的光合能力, 延缓光合功能的衰老和叶片的衰老。研究表明, 在低氮条件下, 与未转基因的野生型水稻相比, 过表达玉米 $pepc$ 基因($Zmpepc$)水稻在形态上显示出根长和剑叶面积均有所增加, 在光合性能方面表现出净光合速率(net photosynthetic rate)也显著提高, 并且光系统II (photosynthetic system II, PSII)的所有光化学效率指标均显著高于野生型, 具有更稳定的PSII结构。在低氮条件下, 转玉米 $pepc$ 基因水稻植株表现出更高的最大光化学效率(魏晓东等2013), 并且植株中氮代谢酶(如NR和GS)活性较野生型均有所提高(唐玉婷等2015)。过表达转玉米 $pepc$ 基因小麦, 在低氮条件下产量比野生型高6.1%, 千粒重也显著高于野生型约4.4% (Peng等2018)。在拟南芥中敲除 $pepc$ 会导致植株较野生型矮小和叶片颜色发黄, 幼苗的鲜重约为野生型幼苗的16%。此外, 突变体植物的开花和结实也受到影响, 不能完成其生命周期, 说明 $pepc$ 在植株抵御低氮胁迫中发挥重要作用(Shi等2015)。以上研究表明, 在低氮条件下, $pepc$ 基因对维持植物的光合性能、生长发育均具有重要作用, 从而提高植物的耐低氮能力。

4 结语

综上所述, 尽管植物氮素利用机制的研究已经取得了一些实质性进展, 但植物氮素利用是一个复杂的代谢过程, 包括多个代谢步骤, 并受网络信号途径调控。采用分子手段精准调控植物的NUE还存在一定难度, 需要更好地了解氮获取、运输、同化和信号转导涉及的关键组分的功能以及调控机制。分子生物学技术手段的飞速发展改造作物的NUE提供了可能途径: (1)整合利用蛋白质组学、转录组学、代谢组学等对作物氮素高效利用基因进行挖掘和鉴定; (2)利用基因编辑技术对目标基因进行改造; (3)利用氮素高效相关基因进行分子标记辅助育种, 筛选氮高效作物品种;

(4)对C₃作物进行类C₄改造,提高NUE。提高植物的氮素利用一直是植物营养学研究领域的热点,也是一个难点,由于其代谢过程复杂,表型鉴定困难,需要科学工作者的长期努力。

参考文献(References)

- Andrews M, Lea PJ, Raven JA, et al (2004). Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. *Ann Appl Biol*, 145: 25–40
- Bao A, Liang Z, Zhao Z, et al (2015). Overexpressing of *OsAMT1-3*, a high affinity ammonium transporter gene, modifies rice growth and carbon-nitrogen metabolic status. *Int J Mol Sci*, 16 (5): 9037–9063
- Beatty PH, Shrawat AK, Carroll RT, et al (2009). Transcriptome analysis of nitrogen-efficient rice over-expressing alanine aminotransferase. *Plant Biotechnol J*, 7 (6): 562–576
- Bobbink R, Hicks K, Galloway J, et al (2010). Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecol Appl*, 20 (1): 30–59
- Brauer EK, Rochon A, Bi YM, et al (2011). Reappraisal of nitrogen use efficiency in rice overexpressing *glutamine synthetase1*. *Physiol Plant*, 141 (4): 361–372
- Cai H, Zhou Y, Xiao J, et al (2009). Overexpressed *glutamine synthetase* gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. *Plant Cell Rep*, 28 (3): 527–537
- Chen JG, Zhang Y, Tan Y, et al (2016). Agronomic nitrogen-use efficiency of rice can be increased by driving *OsNRT2.1* expression with the *OsNAR2.1* promoter. *Plant Biotechnol J*, 14 (8): 1705–1715
- Chen LM, Li KZ, Miwa T, et al (2004). Overexpression of a cyanobacterial phosphoenolpyruvate carboxylase with diminished sensitivity to feedback inhibition in *Arabidopsis* changes amino acid metabolism. *Planta*, 219 (3): 440–449
- Doubnerová V, Ryšlavá H (2011). What can enzymes of C₄ photosynthesis do for C₃ plants under stress? *Plant Sci*, 180 (4): 575–583
- Fan X, Feng H, Tan Y, et al (2015). A putative 6-transmembrane nitrate transporter *OsNRT1.1b* plays a key role in rice under low nitrogen. *J Integr Plant Biol*, 58 (6): 590–599
- Fan X, Tang Z, Tan Y, et al (2016). Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (26): 7118–7123
- Fan X, Xie D, Chen J, et al (2014). Over-expression of *OsPTR6* in rice increased plant growth at different nitrogen supplies but decreased nitrogen use efficiency at high ammonium supply. *Plant Sci*, 227 (10): 1–11
- Fang Z, Xia K, Yang X, et al (2013). Altered expression of the *PTR/NRT1* homologue *OsPTR9* affects nitrogen utilization efficiency, growth and grain yield in rice. *Plant Biotechnol J*, 11: 446–458
- Filleur S, Daniel-Vedele F (1999). Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta*, 207 (3): 461–469
- Forde BG, Lea PJ (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *J Exp Bot*, 58 (9): 2339–2358
- Fraisier V, Gojon A, Tillard P, et al (2000). Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *Plant J*, 23 (4): 489–496
- Frunghillo L, Skelly MJ, Loake GJ, et al (2015). *S*-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nat Commun*, 5: 5401
- Gabriel Krouk, Nigel MC, Gloria MC, et al (2010). Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Curr Opin Plant Biol*, 13 (3): 265–272
- Gan Y, Bernreiter A, Filleur S, et al (2012). Overexpressing the *ANRT1* MADS-box gene in transgenic plants provides new insights into its role in the nitrate regulation of root development. *Plant Cell Physiol*, 53 (6): 1003–1016
- Garnett T, Conn V, Kaiser B (2009). Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. *Plant Cell Environ*, 32 (9): 1272–1283
- Ghannoum O, Evans JR, von Caemmerer S (2011). Nitrogen and water use efficiency of C₄ plants. In: Raghavendra AS, Sage RF (eds). *C₄ Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms* (vol 32). *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Dordrecht: Springer, 129–146
- Harrison KA, Bol R, Bardgett RD (2007). Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes. *Ecology*, 88 (4): 989–999
- Hoque MS, Masle J, Udvardi MK, et al (2006). Over-expression of the rice *OsAMT1-1* gene increases ammonium uptake and content, but impairs growth and development of plants under high ammonium nutrition. *Funct Plant Biol*, 33 (2): 153–163
- Hoshida H, Tanaka Y, Hibino T, et al (2000). Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol Biol*, 43 (1): 103–111
- Hu B, Wang W, Ou S, et al (2015). Variation in *NRT1.1B* contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nat Genet*, 47 (7): 834–838
- Huergo LF, Chandra G, Merrick M (2012). P_{II} signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev*, 37 (2): 251–283
- Igarashi D, Ishizaki T, Totsuka K (2009). ASN2 is a key enzyme in asparagine biosynthesis under ammonium suffi-

- cient conditions. *Plant Biotechnol*, 26 (1): 153–159
- Igawa T, Fujiwara M, Tanaka I, et al (2010). Characterization of bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase expressed in male gametophyte of higher plants. *BMC Plant Biol*, 10: 200
- Iwamoto M, Tagiri A (2016). MicroRNA-targeted transcription factor gene *RDD1* promotes nutrition uptake and accumulation in rice. *Plant J*, 85 (4): 466–477
- Izui K, Matsumura H, Furumoto T, et al (2004). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 69–84
- Krapp A (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr Opin Plant Biol*, 25: 115–122
- Kurai T, Wakayama M, Abiko T, et al (2011). Introduction of the *ZmDof1* gene into rice enhances carbon and nitrogen assimilation under low-nitrogen conditions. *Plant Biotechnol J*, 9: 826–837
- Ladha JK, Tirolpadre A, Reddy CK, et al (2016). Global nitrogen budgets in cereals: a 50-year assessment for maize, rice, and wheat production systems. *Sci Rep*, 6: 19355
- Lam HM, Wong P, Chan HK, et al (2003). Overexpression of the *ASN1* gene enhances nitrogen status in seeds of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 132 (2): 926–935
- Li B, Merrick M, Li SM, et al (2009). Molecular basis and regulation of ammonium transporter in rice. *Rice Sci*, 16 (4): 314–322
- Li H, Hu B, Chu C (2017). Nitrogen use efficiency in crops: lessons from *Arabidopsis* and rice. *J Exp Bot*, 68 (10): 2477–2488
- Li S, He P, Jin J (2012). Nitrogen use efficiency in grain production and the estimated nitrogen input/output balance in China agriculture. *J Sci Food Agric*, 93: 1191–1197
- Li SM, Li BZ, Shi WM (2012). Expression patterns of nine ammonium transporters in rice in response to N status. *Pedosphere*, 22 (6): 860–869
- Masumoto C, Gantt E (2010). Phosphoenolpyruvate carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (11): 5226–5231
- Miller AJ, Cramer MD (2005). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil*, 274 (2): 1–36
- Mitchell PL, Sheehy JE (2006). Supercharging rice photosynthesis to increase yield. *New Phytol*, 171 (4): 688–693
- O'Leary B, Park J, Plaxton WC (2011). The remarkable diversity of PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological function and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem J*, 436 (1): 15–34
- Oliveira IC, Coruzzi GM (1999). Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 121 (1): 301–309
- Peng C, Xu W, Hu L, et al (2018). Effects of the maize C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase (*ZmPEPC*) gene on nitrogen assimilation in transgenic wheat. *Plant Growth Regul*, 84 (1): 191–205
- Rademacher T, Häusler RE, Hirsch HJ, et al (2002). An engineered phosphoenolpyruvate carboxylase redirects carbon and nitrogen flow in transgenic potato plants. *Plant Mol Biol*, 32 (1): 25–39
- Ranathunge K, Elkereamy A, Gidda S, et al (2014). *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*, 65 (4): 965–979
- Sánchez R, Cejudo FJ (2003). Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 132 (2): 949–957
- Sentoku N, Taniguchi M, Sugiyama T, et al (2000). Analysis of the transgenic tobacco plants expressing *Panicum miliaceum* aspartate aminotransferase genes. *Plant Cell Rep*, 19 (6): 598–603
- Shi J, Yi K, Liu Y, et al (2015). Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Arabidopsis* leaves plays a crucial role in carbon and nitrogen metabolism. *Plant Physiol*, 167 (3): 671–681
- Stitt M, Müller C, Matt P, et al (2002). Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot*, 53 (370): 959–970
- Sullivan S, Jenkins GI, Nimmo HG (2004). Roots, cycles and leaves. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene family in soybean. *Plant Physiol*, 135 (4): 2078–2087
- Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, et al (2003). Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. *Plant Cell Physiol*, 44 (2): 206–211
- Tang YT, LI X, Lu W, et al (2015). Stable photosynthesis of C_4 -type *PEPC* transgenic rice induced by low nitrogen. *Acta Agric Boreali Sin*, 30 (4): 95–100 (in Chinese with English abstract) [唐玉婷, 李霞, 陆巍等(2015). 高表达转 C_4 型*PEPC*基因水稻在低氮下诱导碳氮酶稳定光合作用. *华北农学报*, 30 (4): 95–100]
- Teng W, He X, Tong Y (2017). Transgenic approaches for improving use efficiency of nitrogen, phosphorus and potassium in crops. *J Integr Agric*, 16 (12): 2657–2673
- Wang W, Hu B, Yuan D, et al (2018). Expression of the nitrate transporter gene *OsNRT1.1A/OsNPF6.3* confers high yield and early maturation in rice. *Plant Cell*, 30: 638–651
- Wei XD, Li X, Guo SW, et al (2013). Effects of nitrogen levels on PSII fluorescence characteristics in flag leaf of transgenic C_4 photosynthetic Rice. *Acta Agric Boreali Sin*, 28 (1): 193–200 (in Chinese with English abstract) [魏晓东, 李霞, 郭士伟等(2013). 氮素水平对转 C_4 光合

- 基因水稻花期剑叶PSII荧光特性的影响. 华北农学报, 28 (1): 193–200]
- Xu G, Fan X, Miller AJ (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annual Rev Plant Biol*, 63: 153–182
- Yamamoto N, Sasou A, Saito Y, et al (2015). Protein and gene expression characteristics of a rice phosphoenolpyruvate carboxylase *Osppc3*; its unique role for seed cell maturation. *J Cereal Sci*, 64: 100–108
- Yamaya T, Obara M, Nakajima H, et al (2002). Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *J Exp Bot*, 53 (370): 917–925
- Yan X, Jin JY, He Ping, et al (2008). Advances in research on fertilizer use efficiency. *Chin J Agric Sci*, 41 (2): 450–459 (in Chinese with English abstract) [闫湘, 金继运, 何萍等 (2008). 提高肥料利用率技术研究进展. *中国农业科学*, 41 (2): 450–459]
- Yanagisawa S, Akiyama A, Kisaka H, et al (2004). Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (20): 7833–7838
- Ye Q, Zhang H, Wei H, et al (2007). Effects of nitrogen fertilizer on nitrogen use efficiency and yield of rice under different soil conditions. *Front Agric China*, 1 (1): 30–36
- Yin YG, Tominaga T, Iijima Y, et al (2010). Metabolic alterations in organic acids and γ -aminobutyric acid in developing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. *Plant Cell Physiol*, 51 (8): 1300–1314
- Yu LH, Miao ZQ, Qi GF, et al (2014). MADS-box transcription factor AGL21 regulates lateral root development and responds to multiple external and physiological signals. *Mol Plant*, 7 (11): 1653–1669
- Yu LH, Wu J, Tang H, et al (2016). Overexpression of *Arabidopsis NLP7* improves plant growth under both nitrogen-limiting and sufficient conditions by enhancing nitrogen and carbon assimilation. *Sci Rep*, 6: 27795
- Zhong L, Chen D, Min D, et al (2015). AtTGA4, a bZIP transcription factor, confers drought resistance by enhancing nitrate transport and assimilation in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 457 (3): 433–439
- Zhou Y, Cai H, Xiao J, et al (2009). Over-expression of aspartate aminotransferase genes in rice resulted in altered nitrogen metabolism and increased amino acid content in seeds. *Theor Appl Genet*, 118 (7): 1381–1390

Research progress in nitrogen use efficiency in plants

WU Jiao-Na¹, WEI Xiao-Dong^{2*}, LI Xia², ZHANG Jin-Fei¹, XIE Yin-Feng^{1*}

¹Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

²Nanjing Branch of China National Center Rice Improvement, Jiangsu High Quality Rice R & D Center, Institute of Food Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract: Nitrogen nutrition is a complex process in plants and affected by individual inheritance, gene regulation, interaction between genes and signal molecular regulation, etc. In recent years, with the development of genetic engineering and gene editing technology, research approaches of how to improve plant nitrogen use efficiency (NUE) have transferred from focusing on plants' characteristic traditionally to using genetic engineering technology. This review summarizes the process of nitrogen utilization and metabolism in plants, and the latest advances in improving NUE by genetic engineering technology, especially the role of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in balancing carbon and nitrogen metabolism and improving NUE in plants. We hope to provide some new views on improving NUE in plants and make a prospect of future research direction.

Key words: nitrogen utilization; carbon-nitrogen metabolism; phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)

Received 2018-04-02 Accepted 2018-07-11

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31600312) and Jiangsu University Superiority Discipline Construction Project Support Project (PAPD).

*Co-corresponding authors: Wei XD (44028791@qq.com), Xie YF (472045945@qq.com).