

分类号_____

密级_____

UDC _____

编号_____

中国科学院研究生院 博士学位论文

植物 NO₃⁻再分配及其调控逆境响应的分子机理研究

李建勇

指导教师龚继明 研究员

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态所

申请学位级别博士 学科专业名称遗传学

论文提交日期2011 年 1 月 论文答辩日期2011 年 2 月

培养单位中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态所

学位授予单位中国科学院研究生院

答辩委员会主席林鸿宣

目录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
文献综述	
(一): 植物氮素吸收及代谢研究进展	
1 前言.....	6
2 氮的吸收.....	6
3 氮的代谢.....	12
4 氮的再分配.....	17
5 总结与展望.....	18
6 参考文献.....	19
(二): 植物硝酸根信号转导研究进展	
1 前言.....	28
2 硝酸根调控的基因表达.....	28
3 植物对硝酸根信号的感受.....	30
4 硝酸根信号调控的重要生理过程.....	31
5 总结与展望.....	36
6 参考文献.....	37

研究论文

第一章: *NRT1.8* 基因克隆及其对 Cd^{2+} 抗性调控的分子机理研究

1 引言.....	44
2 材料与方法.....	45
3 结果与分析.....	54
4 讨论.....	71
5 参考文献.....	73

第二章: 硝酸根再分配调控耐盐的分子机理研究

1 引言.....	76
2 材料与方法.....	76
3 结果与分析.....	78
4 讨论.....	86
5 参考文献.....	89

附件 1.....	90
-----------	----

附件 2.....	91
-----------	----

发表论文.....	92
-----------	----

致谢.....	93
---------	----

植物 NO_3^- 再分配及其调控逆境响应的分子机理研究

博士生: 李建勇(遗传学)

指导教师: 龚继明

摘要

硝酸根(NO_3^-)是大部分陆生植物主要的氮源, 它不仅是重要的营养物质, 而且还作为信号分子在调控植物的生长发育过程中发挥着重要作用。高等植物通过根系吸收的 NO_3^- , 除了小部分在根中储存或者直接代谢外, 大部分被长途转运到植物的地上部位进行同化。但是, 逆境条件会促使更多的 NO_3^- 留在根部, 对这个生理现象的生物学意义和调控机制的研究, 对于研究氮素利用效率与逆境互作具有重要的意义。

通过对拟南芥根的 Microarray 数据分析, 我们分离到一个受重金属镉 (Cadmium, Cd^{2+}) 强烈诱导的基因 *NRT1.8*。该基因属于 *NRT1* 家族, 与该家族中的一个已知功能的基因 *NRT1.5* 同源性最高。*NRT1.5* 主要负责向木质部中装载 NO_3^- , 并调控 NO_3^- 从地下到地上的长途转运。GUS 染色和原位杂交显示 *NRT1.8* 主要在维管组织的木质部薄壁细胞中表达, 亚细胞定位分析表明 *NRT1.8* 位于细胞质膜上。电生理和 NO_3^- 吸收实验分析显示该基因编码一个 pH 依赖的内向型 NO_3^- 低亲和转运蛋白。*NRT1.8* 基因突变后, 突变体伤流液中 NO_3^- 的含量显著增加。这些结果表明, *NRT1.8* 的基本功能是从木质部中卸载 NO_3^- 。

有意思的是, *NRT1.8* 是 NO_3^- 吸收代谢途径中唯一受 Cd^{2+} 强烈诱导表达的基因, 预示其在 NO_3^- 与 Cd^{2+} 互作中的关键作用。表型分析表明, *nrt1.8-1* 突变体相对于野生型表现出更强的 Cd^{2+} 敏感表型, 而且这种差异随着外源 NO_3^- 浓度增加而愈发显著; 与之对应的是, *nrt1.8-1* 突变体在茎中积累更多的 Cd^{2+} 。进一步的分析显示, Cd^{2+} 胁迫导致更多的 NO_3^- 被分配到野生型根中, 而 *NRT1.8* 功能缺失则破坏了这种 NO_3^- 的再分配。这些结果表明, *NRT1.8* 调控的 NO_3^- 再分配在植物

调控 Cd^{2+} 耐性机理中发挥了重要作用。

不仅如此，生物信息学分析显示 *NRT1.8* 还受其它多种逆境胁迫如盐胁迫、冷害和真菌侵染等强烈诱导表达，其中盐胁迫尤为显著。RT-PCR 和实时定量 RT-PCR 表明高浓度短时间或者低浓度长时间的盐胁迫都可以显著诱导 *NRT1.8* 的表达。突变体 *nrt1.8-1* 对盐胁迫更敏感，盐胁迫下突变体在茎中积累了更多的 Na^+ ，突变体根中 NO_3^- 的分配比例也发生和 Cd^{2+} 胁迫下类似的变化。在野生型中过表达 *NRT1.8* 可以显著提高植物对多种逆境的耐性。此外，我们发现 *NRT1.5* 在很多逆境处理诱导下的表达与 *NRT1.8* 呈现一种显著的反向相关性，*nrt1.5* 突变体对 Cd^{2+} 、 Na^+ 的抗性也显著高于野生型，预示 *NRT1.8* 和 *NRT1.5* 协同调控 NO_3^- 逆境条件下的再分配，并可能是植物逆境适应调控的一种通用机制。

关键词：拟南芥，木质部卸载， NO_3^- 转运蛋白，逆境， NO_3^- 再分配

**The molecular mechanism of nitrate allocation and its' role in stress tolerance in
*Arabidopsis***

Jian-Yong Li (Genetics)

Directed by Professor: Ji-Ming Gong

Abstract

Nitrate is the major nitrogen resource from soil for most plants. In addition to its nutritional effect, nitrate also serves as a signal molecule to regulate plant growth and development. Once uptake into plant roots, part of the nitrate will be stored or assimilated in the roots, while a major proportion will subject to long-distance transport to plant aerial parts, where its assimilation is coupled to photosynthesis. However, stress conditions including Cadmium (Cd^{2+}) tend to increase n nitrate allocation into plant roots. Elucidation of the underlying mechanisms and the physiological importance of this process will be of great importance to both nitrogen use efficiency and stress tolerance.

NRT1.8 was identified to be greatly up-regulated by Cd^{2+} stress using microarray analysis. BLAST search indicated that *NRT1.8* belongs to the *NRT1* family, and shares the highest identity with *NRT1.5* that functions in nitrate xylem loading. Histochemical analysis using promoter- β -glucuronidase fusions, as well as in situ hybridization, demonstrated that *NRT1.8* is expressed predominantly in xylem parenchyma cells within the vasculature. Subcellular localization analysis showed that *NRT1.8* was localized to the plasma membrane. Electrophysiological and nitrate uptake analyses showed that *NRT1.8* is a low-affinity, pH-dependent nitrate uptake transporter. Functional disruption of *NRT1.8* significantly increased the nitrate concentration in xylem sap. These data together suggest that *NRT1.8* functions to remove nitrate from xylem vessels. Interestingly, *NRT1.8* was the only nitrate assimilatory pathway gene that was strongly up-regulated by Cd^{2+} stress in roots, and *nrt1.8-1* mutant showed a nitrate concentration-dependent Cd^{2+} -sensitive phenotype. Further analyses showed that Cd^{2+} stress increases the proportion of nitrate allocated

**The molecular mechanism of nitrate allocation and its' role in stress tolerance in
*Arabidopsis***

Jian-Yong Li (Genetics)

Directed by Professor: Ji-Ming Gong

Abstract

Nitrate is the major nitrogen resource from soil for most plants. In addition to its nutritional effect, nitrate also serves as a signal molecule to regulate plant growth and development. Once uptake into plant roots, part of the nitrate will be stored or assimilated in the roots, while a major proportion will subject to long-distance transport to plant aerial parts, where its assimilation is coupled to photosynthesis. However, stress conditions including Cadmium (Cd^{2+}) tend to increase n nitrate allocation into plant roots. Elucidation of the underlying mechanisms and the physiological importance of this process will be of great importance to both nitrogen use efficiency and stress tolerance.

NRT1.8 was identified to be greatly up-regulated by Cd^{2+} stress using microarray analysis. BLAST search indicated that *NRT1.8* belongs to the *NRT1* family, and shares the highest identity with *NRT1.5* that functions in nitrate xylem loading. Histochemical analysis using promoter- β -glucuronidase fusions, as well as in situ hybridization, demonstrated that *NRT1.8* is expressed predominantly in xylem parenchyma cells within the vasculature. Subcellular localization analysis showed that *NRT1.8* was localized to the plasma membrane. Electrophysiological and nitrate uptake analyses showed that *NRT1.8* is a low-affinity, pH-dependent nitrate uptake transporter. Functional disruption of *NRT1.8* significantly increased the nitrate concentration in xylem sap. These data together suggest that *NRT1.8* functions to remove nitrate from xylem vessels. Interestingly, *NRT1.8* was the only nitrate assimilatory pathway gene that was strongly up-regulated by Cd^{2+} stress in roots, and *nrt1.8-1* mutant showed a nitrate concentration-dependent Cd^{2+} -sensitive phenotype. Further analyses showed that Cd^{2+} stress increases the proportion of nitrate allocated

to wild type roots, while the nitrate redistribution was disrupted in the *nrt1.8-1* mutant. These data suggests that NRT1.8-regulated nitrate distribution plays an important role in plant Cd²⁺ tolerance

Bioinformatic analysis further showed that in addition to Cd²⁺ stress, *NRT1.8* could be induced by multiple stresses including cold, *Pseudomonas syringae* and especially by sodium stress. Both RT-PCR and quantitative RT-PCR analyses demonstrated that *NRT1.8* expression was significantly up-regulated by either acute or chronic sodium treatment. The *nrt1.8-1* was more sensitive to salt stress and accumulated more Na⁺ in shoots compared to the WS wild type. HPLC analyses showed that the nitrate distribution between *nrt1.8-1* roots and shoots was also altered as was observed under the Cd²⁺ treatments. Overexpression of *NRT1.8* conferred increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. Consistently, our results further showed that *NRT1.5* was down-regulated by Na⁺ stress, and the *nrt1.5* mutant plants showed increased tolerance to Cd²⁺ and Na⁺. Taking together these experimental evidences, we concluded that nitrate redistribution regulated by NRT1.8 and NRT1.5 might be a universal mechanism to regulate stress tolerance in higher plants.

Key words: Arabidopsis, xylem unloading, nitrate transporter, stress, nitrate redistribution

文献综述

一：植物氮素吸收及代谢研究进展

氮(N)元素作为植物生长发育所必需的大量元素，在植物的生长发育过程中发挥了重要的，不可替代的作用。它不仅是植物体内蛋白质、核酸以及叶绿素的重要组成部分，也是植物体内多种酶的组成部分。植物对 N 素的感受、吸收、分配以及代谢调控是一个非常复杂的过程。本文总结了近年来高等植物 N 素吸收代谢机制的研究进展；并简单阐述了 N 元素在植物体内的再分配对于农作物氮高效利用的应用前景。

1：氮的吸收

早在 1898 年，科学家就在《Science》上撰文指出，N 可以作为植物的食物，可见氮对植物之重要性。N 元素在自然界中有多种存在形式，其中数量最多的是大气中的氮气，总量约 3.9×10^{15} 吨。虽然大气中的 N 素含量如此丰富，但是除了少数原核生物以及部分有固氮能力的植物，其它所有的生物都不能直接利用氮气。因此大部分植物主要通过从土壤中吸收 N 素来满足生长所需。植物吸收的 N 素主要分 2 类，即无机氮和有机氮，其中无机氮又分为硝态氮(NO_3^- -N)和铵态氮(NH_4^+ -N)；有机氮主要是氨基酸，以及蛋白质分解后的寡肽物质。下面分别从三个方面来介绍植物对 N 素的吸收。

1.1：硝酸根(NO_3^-)的吸收

NO_3^- 是带有负电荷的离子，理论上不能通过扩散作用自由穿过细胞膜，而是必须通过主动运输的方式，由氢离子泵(H^+ -ATPase)所造成氢离子浓度差异，通过特异的 NO_3^- 转运蛋白，实现 NO_3^- 的跨细胞膜转运。从 1993 年第一个 NO_3^- 转运蛋白被报道开始，现在已经在植物中鉴定出了 3 个与 NO_3^- 的吸收和转运以及动态平衡有关的家族。它们分别是含有 53 个成员的 *NRT1* 家族以及由 7 个成员组成的 *NRT2* 家族(Tsay et al., 2007)，另外还有一个 CLC(chloride channel family)家族，其中的 CLCa 定位于液泡膜上，可以调控液泡中的 NO_3^- 含量(De Angeli A et al., 2006)。它们之间相互合作，在植物对 NO_3^- 吸收，运输以及动态平衡中发挥了

重要作用。

植物通过长期的进化, 已经形成了一套高效的 NO_3^- 吸收转运系统, 分别是高亲和力转运系统(high-affinity transport system, HATS, $K_m < 1 \text{ mM}$)和低亲和力转运系统(low-affinity transport system, LATS, $K_m > 1 \text{ mM}$)。当外界 NO_3^- 浓度高时($> 1 \text{ mM}$), 植物主要利用低亲和力 NO_3^- 转运系统; 当外界 NO_3^- 浓度低($< 1 \text{ mM}$)时, 则利用高亲和力 NO_3^- 转运系统。LATS 的吸收速率高, HATS 的吸收速率低(Daniel-Vedele et al., 1998; Stitt, 1999)。高亲和力的 NO_3^- 转运蛋白主要位于 NRT2 家族中, 而低亲和力的 NO_3^- 转运蛋白则位于 NRT1 家族中。这种灵活的调控机制使得植物能够迅速响应外界 NO_3^- 的浓度变化, 更加高效的吸收 NO_3^- , 维持植物正常的 NO_3^- 供应。

在拟南芥 NRT1 家族中, 现在已经鉴定出 8 个 NO_3^- 运蛋白, 其它大部分基因是转运氨基酸和寡肽的膜蛋白。因此, NRT1 家族也称为 PTR (peptide transporters) 家族。PTR 普遍存在于动物、植物、酵母以及细菌中, 一般含 450-600 个氨基酸, 都有 12 个跨膜区。在植物 NRT1 的第 6、7 跨膜区之间, 有一个大的亲水环; 该亲水环在真菌中则位于第 7、8 跨膜区之间, 在动物的绝大多数成员中, 则位于第 9、10 跨膜区之间(Tsay et al., 2007)。在 8 个已经鉴定的 NO_3^- 转运蛋白中, 除了 CHL1 是具有双亲和力的转运蛋白外, 其它已知 NRT1 家族中的 7 个 NO_3^- 转运蛋白都是低亲和力转运蛋白(Liu et al., 1999)。CHL1(NRT1.1)和 NRT1.2 主要在根中表达, 负责从土壤中吸收 NO_3^- 。CHL1 是受外界 NO_3^- 诱导的, 而 NRT1.2 是不受 NO_3^- 诱导的。NRT1.4 主要在叶柄细胞的液泡膜上表达, 其功能是将 NO_3^- 储存到液泡当中储存起来, 表明叶柄在调控 NO_3^- 的分布上扮演重要角色(Chiu et al., 2004)。NRT1.5 主要在根部的木质部薄壁细胞表达, 主要功能是将 NO_3^- 装载到木质部, 使 NO_3^- 能够被运送到地上部分被植物所利用(Lin et al., 2008)。NRT1.6 主要在植物地上部分的生殖器官中表达, 当雌蕊授粉后, 其表达水平显著增加, 尤其是在种子和果荚的结合株柄处, 其主要功能是往发育中的种子装载 NO_3^- , 并研究表明 NO_3^- 在植物胚胎早期发育中发挥了重要功能(Almagro et al., 2008)。储存在叶片液泡中的 NO_3^- , 当叶片衰老时, 可被转送到嫩叶或其它需要 NO_3^- 的器官或组织中, NRT1.7 就是负责这项 NO_3^- 的再分配工作(Fan et al., 2009)。该研究结果首次证明植物体内的氮素也可以以无机态的形式从衰老的叶片中转移出

来重新利用。*NRT1.8* 主要在植物根部和成熟的种子中表达, 而且该基因在根部的表达受很多种逆境强烈诱导, 比如高盐, 重金属等等(Li et al., 2010)。我们的研究发现 *NRT1.8* 在逆境胁迫下, 通过调控 NO_3^- 在地分和地下部分之间的分配, 来增强植物对逆境的抗性(Li et al., 2010)。

植物中 *NRT2* 家族的研究进展落后于 *NRT1* 家族。第一个在真核生物中克隆到的 *NRT2* 基因是来自于真菌的 *crnA* 基因, 通过筛选抗硝酸盐的突变体而克隆得到的。用非洲爪蟾蛙卵表达系统对 *crnA* 的功能进行研究证明, *crnA* 具有双重转运机制(Unkles et al., 1991)。它可以感受外界的 NO_3^- 浓度变化, 采取质子耦合的主动转运方式或者是节省能量的被动转运机制。随后, 人们在单细胞绿藻又分离到两个 *crnA* 的同源基因 *CrNRT2.1* 和 *CrNRT2.2*。与 *crnA* 不同的是, 它们二者在单独存在的情况下都不能转运 NO_3^- , 必须和一个辅助蛋白 *CrNAR2* 结合在一起工作才能转运 NO_3^- (Quesada et al., 1994)。随后科研工作者陆续从大麦, 烟草, 大豆和拟南芥中克隆到 *NRT2* 家族同源基因(Unkles et al., 1991; Trueman et al., 1996; Amarasinghe et al., 1998; Filleur and Daniel-Vedele, 1999; Vidmar et al., 2000), 其中在拟南芥中有 7 个基因属于 *NRT2* 家族。*NRT2.1* 的研究最为深入, 它是通过基因差异表达技术克隆得到的, 和 *NRT2.2* 一起主要负责较低 NO_3^- 浓度情况下的 NO_3^- 吸收(Orsel et al., 2002)。它们的突变体 *nrt2.1* 和 *nrt2.2* 的 NO_3^- 吸收能力分别减少 50~72%和 19%左右, 表明 *NRT2.1* 在 NO_3^- 的吸收中占主导作用。但是在 *nrt2.1* 突变体中, *NRT2.2* 的表达提高了 3 倍以上, 植物以此来弥补 *NRT2.1* 突变后 NO_3^- 吸收能力的不足(Li et al., 2007)。与 *CrNRT2.1* 和 *CrNRT2.2* 类似, *NRT2.1* 发挥转运 NO_3^- 的功能也需要 *NAR2.1* 的协助, 它们只有形成复合体才能发挥转运功能。在 *NAR2.1* 突变体中, *NRT2.1* 的 NO_3^- 转运能力降低 90%左右(Okamoto et al., 2006; Orsel et al., 2006)。在拟南芥中有 2 个 *NAR2* 基因, 分别是 *NAR2.1* (*AtNRT3.1*, At5g50200) 和 *NAR2.2* (*AtNRT3.2*, At4g24720)(Okamoto et al., 2006)。它们和 *NRT1* 和 *NRT2* 家族基因都没有同源性, 在细菌和真菌中也没有发现它们的同源基因, 但是在绿藻、苔藓、和高等植物等绿色生物中均发现有 *NAR2* 基因。*NRT2.1*, *NRT2.2*, *NRT2.3*, *NRT2.4* 和 *NRT2.5* 都是受 NO_3^- 诱导的, 而 *NRT2.6* 和 *NRT2.7* 是组成型表达的。除了 *NRT2.3* 主要在地上部分表达, *NRT2.7* 主要在种子中表达外, 其它 5 个基因都主要在根部表达(Forde, 2000)。最新的研究发现,

9

(LATS)(Glass et al., 2002)。当外界 NH_4^+ 离子浓度低于 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 主要是高亲和转运系统发挥作用; 当 NH_4^+ 大于 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 低亲和转运系统才被激活诱导起来(Wang et al., 1993)。目前已经在水稻中发现了分属 5 个亚家族的 12 个 *AMT* 基因, 拟南芥中只发现了 6 个基因, 其中 5 个位于 *AMT1* 家族, 另外一个位于 *AMT2* 家族。它们蛋白质序列之间的同源性很高, 最低的都有 71% 左右, 最高的达到了 85%。对 NH_4^+ 吸收的动力学特性研究表明, 拟南芥中的 6 个 NH_4^+ 转运蛋白均属于高亲和性 NH_4^+ 转运蛋白。利用生理生化以及遗传分析, 尤其是 T-DNA 插入突变体和 RNAi 技术, 人们对拟南芥中的 6 个 *AMT* 基因的功能进行了研究, 它们之间的进化关系以及在各组织中的表达情况如下(图 2)。

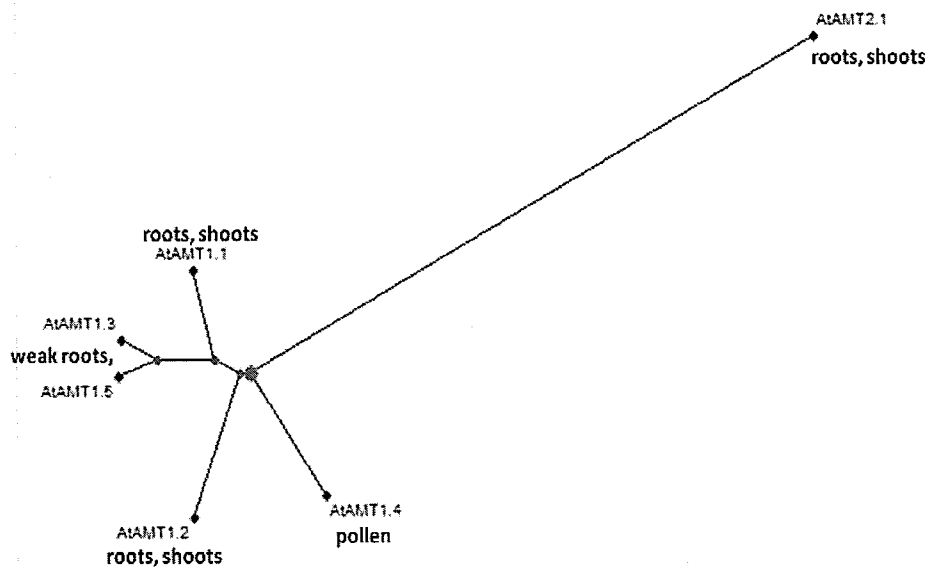


图 2: 拟南芥 NH_4^+ 转运蛋白的在各组织中的表达分布情况 (修改自 Ludwig 等, 2007)。

其中 *AMT1.1*, *AMT1.2*, *AMT1.3*, *AMT2.1* 在根部的表达较强(Gazzarrini et al., 1999; Birnbaum et al., 2003; Schmid et al., 2005), 它们都受缺氮诱导上调, 并且全部定位于细胞膜上。在拟南芥中, *AMT1.1* 和 *AMT1.3* 都在根表皮和皮层细胞上表达, 而 *AMT1.1* 在地上部分的表达也较强, 但是 *AMT1.3* 在地上部位表达较弱, 而且其表达具有典型的昼夜变化规律, 表明其在调控根部 C 和 N 之间的代谢平衡中发挥了一定作用(Kaiser et al., 2002)。植物缺氮的情况下, *amt1.1-1* 和 *amt1.3-1* 单突变体的 NH_4^+ 离子吸收能力与对照相比都减少了 30% 左右(Kaiser et al., 2002), 而在 *AMT1.1* 和 *AMT1.3* 基因的双突变中, NH_4^+ 的吸收相对于野生型下降约 70%(Loque et al., 2006)。另外, *AMT1.2* 基因突变后, 其突变体对 NH_4^+ 的吸收能

力也减少了 20%左右。因此, *AMT1.1*, *AMT1.2*, *AMT1.3* 这三个基因负责了拟南芥根 90%的 NH_4^+ 吸收(Yuan et al., 2007)。*AMT1.4* 主要在花粉细胞中特异表达, 在其它部位基本检测不到它的表达, 而且其整体的表达强度在 6 个 *AMT* 基因中是最低的。其突变体观察不到任何可见表型, 花粉发育也正常, 具体功能还有待进一步研究(Yuan et al., 2009)。*AMT1.5* 也定位于细胞膜上, 在根表皮和根毛都有表达, 表明其在负责根部吸收 NH_4^+ 进入细胞中发挥了一定功能。在正常供应氮素情况下, 其在根部的表达很低, 但是在 6 个拟南芥 *AMT* 基因中, *AMT1.5* 受缺氮诱导响应是最强。这 6 个基因不同的表达强度和模式在调控拟南芥的 NH_4^+ 吸收和分配中发挥了不同的作用, 但是它们之间是如何分工合作, 互相影响的, 都有待进一步研究。

1.3: 有机氮的吸收

关于植物是如何吸收和利用有机氮的, 其研究一直没有受到足够重视。主要原因是大部分植物都利用无机氮作为主要氮源, 而且传统的观点认为, 植物不能直接吸收和利用无机氮, 比如氨基酸或者蛋白质, 它们必须先分解为无机态氮之后, 才能被植物吸收利用。但是对于那些生长在北极苔原、北方森林及高山地带等常年低温地区的植物而言, 有机氮源才是它们可以利用的主要氮源。因为这些地方微生物活性低, 有机质矿化速率比较慢, 而且由于 pH 值较低, 其蛋白酶活性也很高, 其土壤有机质含量常高于无机态氮, 特别是氨基酸的含量, 大大高于无机氮的含量(Chapin et al., 1993; Nasholm et al., 1998, 2009)。因此, 生长在这些特定气候的植物, 在长期的进化过程中, 形成了可以直接吸收有机氮的能力。其实人们很早就观察并且意识到植物具有这种直接吸收有机氮的能力, 只是一直都没有找到直接的科学证据来证明这种理论。直到 1993 年, Chapin 首次发现无菌根的维管植物白毛羊胡子草可以直接吸收有机态的氨基酸, 而且其吸收的有机氮占其吸收总氮氮的比例高达 60%以上。在液体培养条件下, 使用有机氮培养与无机氮培养相比, 白毛羊胡子草可以积累更多的氮素和生物量(Chapin et al., 1993)。随后, Frommer 等(1993)通过酵母互补的方法首次从植物中克隆到氨基酸转运蛋白 AAP1。目前, 人们通过酵母互补, 电生理以及和生物信息学分析发现拟南芥中至少含有 5 个家族, 总共 67 个以上的氨基酸转运蛋白(Ortiz-Lopez et al., 2000;

Rentsch et al., 2007)。其中以氨基酸通透酶蛋白家族(AAPs)是研究得最为深入的无机氮转运蛋白(Frommer et al., 1993; Hsu et al., 1993; Fischer et al., 1995; Ortiz-Lopez et al., 2000)。该家族含有 8 个成员, 分别是 AAP1~8。AAP1 主要运输带中性的氨基酸, 并影响植物种子中的蛋白质合成和产量(Lee et al., 2007; Sanders et al., 2009)。AAP2 和 AAP4 主要运输脯氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸, AAP3 和 AAP5 主要运输精氨酸和赖氨酸等(Boorer and Fischer, 1997; Chen and Bush, 1997; Svennerstam et al., 2007)。AAP6 主要转运中性氨基酸和谷氨酸(Glutamate, Glu), 是一个高亲和力的氨基酸转运蛋白(Hunt et al., 2010)。AAP8 也是一个高亲和力的氨基酸转运蛋白, 主要转运 Glu 和天冬氨酸(Aspartic Acid, Asp); 负责往植物的胚乳中吸收氨基酸, 维持胚胎发育过程中对氨基酸的需求。其突变体 *aap8* 的植株的种子数量与野生型相比减少了 50%以上(Schmidt et al., 2007)。除了 AAP 家族外, LHT1 是研究得最为深入的氨基酸转运蛋白, 它是一个高亲和力的赖氨酸和组氨酸转运蛋白, 其主要在根表皮和叶肉细胞中表达, 在植物根系对氨基酸的吸收和叶肉细胞中的氨基酸利用中发挥了重要功能(Chen and Bush, 1997; Hirner et al., 2006)。研究表明, 植物对氨基酸的吸收与对无机氮的吸收类似, 也是一个主动吸收和耗能的过程。其能力受载体调节和并受 pH 和温度的影响, 吸收动力学符合米氏方程(Li and Bush, 1990, 1991)。

2: 氮的代谢

高等植物从土壤中吸收氮素后, 一部分被转入根细胞的液泡中储存起来, 另外一部分既可以在根系中同化为氨基酸和蛋白质, 也可以 NO_3^- 的形式通过木质部运往地上部进行同化(Crawford, 1995)。根中合成的氨基酸也可向地上部运输, 在叶片中再进一步被利用。在叶片中, NO_3^- 同样也可以作为氮源, 贮存在液泡中, 或同化为各种有机态氮, 提供植物生长所需。叶片中合成的氨基酸或者含氮有机物也可以通过韧皮部向地下部分输送, 维持根部的正常发育(Stitt, 1999)。由于 NH_4^+ 有毒性, 所以植物吸收 NH_4^+ 后, 大部分会在根系中直接利用, 而不会转运到地上部分。相比之下, NO_3^- 既可以在根系中代谢, 也可以转运到地上然后进行代谢, 整合到光合作用等重要生理过程中。 NO_3^- 在地上部分与地下部分的分配比例, 取决于植物的品种, 外部 NO_3^- 浓度, 温度, 光照强度等等 (Smirnoff and Stewart,

1985)。NO₃⁻的代谢途径如图 3:

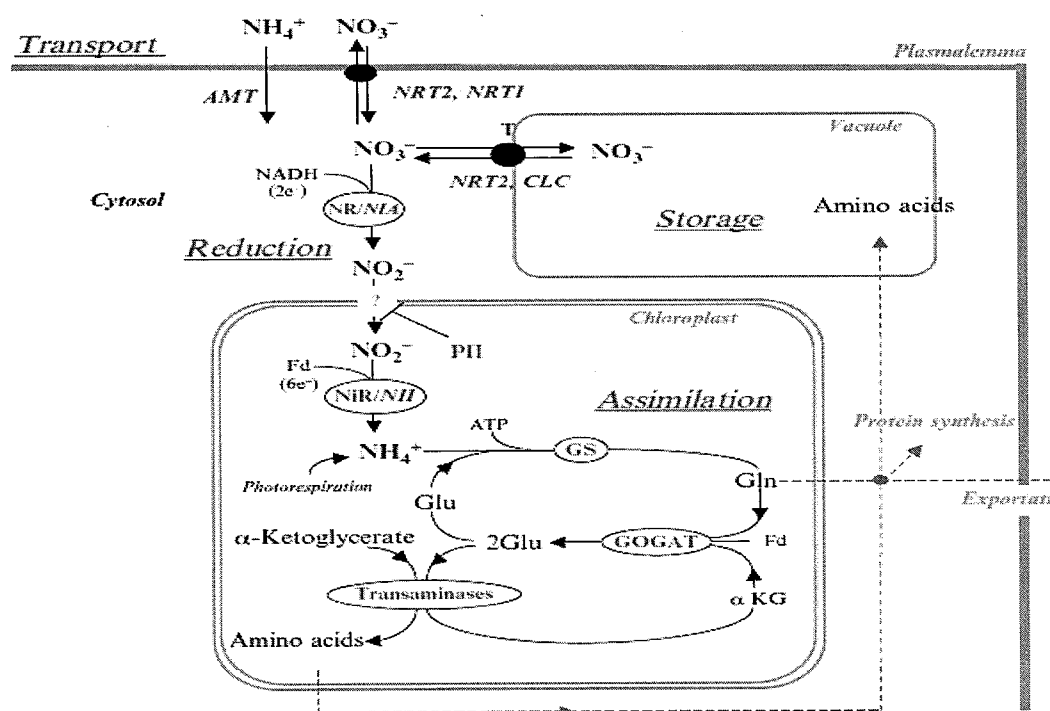


图 3: 氮素在植物细胞内的吸收, 储存以及代谢途径(引自 Hell 等, 2010)。

2.1: 氮的还原

早在 1957 年, 中国科学家首次在高等植物水稻幼苗中发现了硝酸还原酶(NR)的存在(Tang and Wu, 1957)。随后的研究表明, 可诱导的 NR 活性对于高等植物生长发育是必须的。它是催化氮同化的第一个酶, 是氮代谢的限速因子(Solomonson and Spehar, 1977), 可直接控制 NO₃⁻还原, 从而调节氮代谢速率, 并影响到光合作用和碳氮代谢的平衡。

筛选 NR 缺陷的突变体是研究 NR 功能的最好方法。Braaksma 等(1982)首次使用氯酸盐来筛选 NR 突变体, 其原理是 NR 可以催化氯酸盐产生毒性很强的次氯酸盐。如果突变体对次氯酸盐有一定的抗性, 这些突变体就可能在 NR 的合成过程或者酶活性本身有缺陷。通过这种方法, 最终从拟南芥中发现了两个 NR 同工酶基因, 分别是 *NIA1* 和 *NIA2*(Cheng et al., 1988, 1991; Wilkinson and Crawford, 1991), 它们在植物地上和地下部分都有表达, 主要定位于根的表皮和皮层细胞, 以及叶肉细胞的胞液中(Rufty et al., 1986; Vaughn and Campbell, 1988)。研究 *NIA1*

和 *NIA2* 的突变体发现, *NIA2* 在催化 NO_3^- 还原中发挥了主要作用, 其占全部 NO_3^- 还原酶活性的 90% 左右, *NIA1* 只占 10% (Wilkinson and Crawford, 1993)。NR 催化 NO_3^- 的产生的第一个产物是亚硝酸根(NO_2^-), 它对植物细胞是有毒害作用的 (Shimazaki et al., 1992)。为了避免细胞中积累过多的 NO_2^- , NR 的表达以及活性水平是受植物严格调控的 (Smirnoff and Stewart, 1985)。它与植物体内多种代谢过程和生理指标有关, 并通过调控 NR 基因转录和翻译后水平来控制植物的氮代谢过程 (Melzer et al., 1989; Yu et al., 1998; Loppes et al., 1999; Jonassen et al., 2009)。作为 NR 催化的唯一反应底物, NO_3^- 可以迅速诱导 NR 的表达, 另外, 光线也可以迅速调控 NR 的活性。野生型烟草从光照转入黑暗条件情况下, 其 NR 活性可以在 15 分钟内降低 35%。除此, 蔗糖, 激动素等也可以增加 NR 的表达量。而氮同化中的下游代谢产物, 比如 NH_4^+ 、Gln、Glu, 苹果酸等都可以通过反馈调节的方式抑制 NR 的表达 (Stitt, 1999; Stitt et al., 2002)。NR 酶的失活需要 2 个步骤, 例如在菠菜中首先是 543 位的丝氨酸(Ser)被磷酸化, 接着一个依赖 Mg^{2+} 的 14-3-3 蛋白结合到 NR 上, 并抑制其活性, 其活化和去活化过程受到碳代谢产物的调控 (Bachmann et al., 1996; Moorhead et al., 1996)。NR 只能在植物体内存在几个小时, 因此植物体内的 NR 活性不仅取决于 NR 的合成, NR 的降解速率也对其有很大影响。目前有关 NR 的降解研究不多, 其机制也不太清楚。一些研究表明, NR 的降解可能与其磷酸化以及与 14-3-3 蛋白的结合有关 (Weiner and Kaiser, 1999; Kaiser and Huber, 2001)。

NO_3^- 被还原为 NO_2^- 后, 就被转运到根细胞中的质体或者地上绿色组织中的叶绿体, 进一步被亚硝酸根还原酶(NIR)还原为 NH_4^+ 。NIR 是一个核基因编码蛋白, 它在细胞核中合成, 其蛋白前体含有 594 个氨基酸, 在其 N 末端有 32 个氨基酸的导肽, 切除导肽后、成熟的 NIR 被转运到叶绿体或质体中发挥催化功能 (Gupta and Beevers, 1987; Back et al., 1988)。NIR 也是黄素蛋白酶, 它能利用还原态铁氧还蛋白把电子转移给 NO_2^- , NADPH 或 NADH 仍然是电子供体, 使 NO_2^- 还原为 NH_4^+ 。迄今为止, 已经在玉米, 烟草、拟南芥、水稻、菜豆和甜菜等多种高等植物中克隆到了 *NIR* 基因 (Lahners et al., 1988; Matsui et al., 1990; Kronenberger et al., 1993; Vincentz et al., 1993; Tanaka et al., 1994; Terada et al., 1995; Schneider et al., 1999), 并且在它们中的拷贝数一般都是 1~2 个。

由于细胞中积累过量的 NO_2^- 对植物是有毒害作用的, 因此很难在植物中筛选到 *NIR* 的突变体。通过在烟草中运用反义 RNA 技术, 得到了 *NIR* 表达水平显著降低的突变体。当使用 NO_3^- 作为唯一氮源时, 突变体的发育明显迟缓, 叶片有明显的发黄现象; 但是在使用 NH_4^+ 为唯一氮源的时候, 突变体和野生型之间没有显著的差异(Vaucheret et al., 1992)。*NIR* 的调控也同 *NR* 类似, 其表达也在转录和翻译水平调控, 受 NO_3^- , 光线等诱导, 而受到其下游的代谢产物 Gln 以及部分氨基酸的抑制(Privalle et al., 1989; Suzuki et al., 1995; Crete et al., 1997)。

2.2: 氨基酸代谢

NO_3^- 分别经过 *NR* 和 *NIR* 的催化后, 被还原为 NH_4^+ 。 NH_4^+ 然后被转运至质体或叶绿体中, 经过 *GS/GOGAT* 循环参与到氨基酸和蛋白质的代谢过程中。整个过程主要有 4 种关键酶参与其中, 分别是谷氨酰胺合成酶(Glutamine Synthetase *GS*), 谷氨酸合成酶(Glutamate Synthase, *GOGAT*), 谷氨酸脱氢酶(Glutamate dehydrogenase, *GDH*)和天门酰胺合成酶(Asparagine Synthetase, *AS*) (Lam et al., 1996)。

GS 有两种同工酶, 即分别定位于细胞质的 *GS1* 和叶绿体的 *GS2*, 其中 *GS1* 主要在非光合细胞中, 比如根中的质体中表达。*GS1* 分别由四个同源基因 *GLN1.1*, *GLN1.2*, *GLN1.3* 和 *GLN1.4* 编码, 它们在根部的不同细胞类型中表达。其中 *GLN1.1* 和 *GLN1.4* 具有底物高亲合力性, 而 *GLN1.2*, *GLN1.3* 则是底物低亲合力的催化酶。*GLN1.1* 受缺氮诱导, 在 NH_4^+ 过量的情况下则受到抑制。*GLN1.4* 也受氮饥饿诱导, 但是其诱导水平要低于 *GLN1.1*。*GLN1.2* 受 NH_4^+ 诱导, 而 *GLN1.3* 的表达则受到高浓度 Glu 的抑制(Ishiyama et al., 2004)。*GS2* 则只由一个定位于叶绿体的基因编码。由于 *GS1* 和 *GS2* 的定位不同, 它们执行的生理功能也不尽相同。*GS1* 主要参与根部 NH_4^+ 的固定, 定位于植物维管系统中, 在植物衰老过程中表达增强, 通过把毒性较强的 NH_4^+ 催化转变为无毒的 Gln 形式, 使之便于储存和转运, 提高氮的利用效率(Kamachi et al., 1991, 1992)。*GS2* 的主要功能是把叶绿体和光呼吸过程中产生的 NH_4^+ 转化为 Gln(Taira et al., 2004), 其基因表达与光密切相关, 受到光敏色素的激活(Edwards and Coruzzi, 1989), 同时也受到组织状况、碳水化合物、氨基酸供应和光呼吸的影响。研究表明, *C3* 植物光呼吸中

释放出来的 NH_4^+ 量是本身 NO_3^- 代谢产生的 NH_4^+ 的 5-10 倍(Keys et al., 1978), 由此可见 GS2 在氮素的循环利用中也发挥了重要作用。

在植物中主要有 2 种形式的 GOGAT, 它们分别是利用铁氧还原蛋白 Fd(Ferredoxin)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)作为电子受体的 Fd-GOGAT 和 NADH-GOGAT。Fd-GOGAT 在 Glu 的合成中发挥重要功能, 占 GOGAT 活性的 95%。Fd-GOGAT 主要存在植物叶片的叶绿体中, 光诱导它的合成, 并参与了光合作和光呼吸过程(Sechley et al., 1992)。NADH-GOGAT 则主要在非光合组织中的质体中表达(Hell, et al., 2010)。

GDH 与 GOGAT 一样, 在植物中也有两种形式。一种定位于线粒体中, 并依赖于 NADH 的 GDH; 另一种是位于叶绿体中并依赖于 NADPH 的 GDH(Lea and D., 1972; Loulakakis and K.A., 1990)。GDH 存在多种植物组织中(Loyola-Vargas and de Jimenez ES, 1984; Cammaerts and Jacobs, 1985), 其活性受到黑暗和衰老等条件的调控, 在植物适应黑暗条件的生长中发挥了必要的作用(Miyashita and Allen, 2008)。GDH 在 NH_4^+ 的合成和再合成中起初始性作用, 并在 Glu 合成循环中起补充作用, 但是它在高等植物中的确切生理作用仍存在争议。最初人们认为 GDH 在线粒体中的主要作用是代谢掉过多的 NH_4^+ , 保护植物免受 NH_4^+ 的毒害(Yamaya and Oaks, 1987)。但是通过筛选大麦光呼吸突变体, 发现 GDH 在光呼吸过程中并没有发挥清除过多 NH_4^+ 的功能。

天冬酰胺(Asparagine, Asn)早在 2 个世纪前就已经从植物中分离出来, 但它在植物体内的合成机制最近才被阐明。其主要合成途径是通过 Gln, Asp 以及 ATP; 在 AS 的催化下, 合成 Asn、Glu、AMP 以及 1 分子焦磷酸(Richards and Schuster, 1992)。Asn 是许多植物, 尤其是豆科类植物的主要氮源再分配的转运形式, 占这些植物韧皮部伤流液中自由氨基酸 80% 以上。AS 活性受环境条件和代谢信号的调控: 当把植物从光下转移至暗环境时, 会导致 AS 活性升高和 Asn 含量增加, 据信其中光敏色素在起作用。

3: 氮的再分配

植物从土壤中吸收的氮源在经过同化和代谢等复杂过程后, 将以不同形式在植物各组织中贮存起来。其中成熟叶的氮素含量最高, 并主要以叶绿体中参与光

合作用的 Rubisco 蛋白形式存在, 约占叶片中可溶性总蛋白的 50%左右。植物在生殖生长阶段, 对于氮素的需求非常旺盛, 但由于根系吸收氮源的能力下降, 从土壤中吸收的氮源并不能满足植物生长所需。因此, 衰老叶片中的氮源必须被转移出来, 维持幼嫩组织和种子的生长和发育。植物在衰老过程中, 贮存在叶片中的氮素首先被蛋白酶降解成简单的含氮化合物, 然后转移到新生的叶片和种子中, 使这些处于发育过程中的组织器官可以获得足够的氮源(Martin et al., 2005; Diaz et al., 2008; Lemaitre et al., 2008)。研究表明, 在小麦和玉米的灌浆过程中, 叶片中的氮素再利用对于其产量的贡献高达 50%至 90%(Kichey 等., 2007)。由此可见, 氮素的重新再分配对于提高氮的利用效率以及农作物产量将起到至关重要的作用。

氮素到底以何种形式从植物衰老组织中转移出来? 目前的研究表明, 有机氮是氮素转移的主要形式。根据植物品种的不同, 氮素从衰老叶片中被转移出来的具体形式也不一样。在豌豆中, 氮素主要以 Asn 的形式从老叶中转移出来; 而禾谷类作物, 番茄和烟草则主要是 Gln。拟南芥叶片木质部主要的氨基酸是 Asn、Gln 和 Glu(Masclaux-Daubresse et al., 2010)。除了有机氮外, 无机氮 NO_3^- 是否也可以直接从老叶中转移到新生的叶片和组织中去, 这个问题一直没有确切答案。生理研究表明, 植物叶片液泡中贮存 NO_3^- 的能力与其抗氮饥饿水平成正比。另外, 大麦和玉米的 QTL 定位研究也表明, 其产量和种子中蛋白质含量和它们在营养生长阶段, 叶片中积累的 NO_3^- 含量、以及衰老过程中从叶片中转运出来的 NO_3^- 根含量成正相关(Hirel et al., 2001; Richard-Molard et al., 2008)。最近台湾 Tsay 的研究结果发现, 位于 *NRT1* 家族中的 *NRT1.7*, 其主要在衰老的叶片小脉韧皮部强烈表达。在植物衰老过程中, *NRT1.7* 可以把衰老的叶片中储藏的 NO_3^- 转运到生长旺盛, 对氮素需求高的器官或组织中去。而且, NO_3^- 从老叶中转运出去主要是通过韧皮部运输来完成的(Fan et al., 2009)。该研究首次通过实验证明, 无机氮也是植物氮素再分配、转移的一种重要形式, 在植物氮高效利用中可能发挥了重要作用。

4: 总结与展望

氮素在植物的生长和农业生产中发挥了重要的作用。因此, 氮素的吸收和利

用一直是科研研究的热点,并取得了一系列重要进展。例如植物根系中负责氮素吸收的大部分基因已经从拟南芥或其它物种中克隆,对它们的吸收机理也有较深入的了解。再例如氮代谢过程中的关键基因已经全部被分离鉴定,对它们的定位、表达以及调控方式也有一定了解;但是还有很多悬而未决的问题等待解决。

首先, NO_3^- 在细胞质中被还原为 NO_2^- 后,是如何被转运至叶绿体中的? 对于这个氮代谢中的重要生理过程,我们还知之甚少,负责其向叶绿体中转运的转运蛋白也一直没有分离鉴定。氮素在植物体内的长途转运和分配对维持植物的正常生长非常重要,在拟南芥中 *NRT1.5* 参与了 NO_3^- 从地下到地上的长途转运,但 NH_4^+ 是如何从地下运输到地上,其分子机理也不太了解。另外,还有很多负责氨基酸或有机氮吸收的转运蛋白没有鉴定出来,它们在植物的生长发育中有何作用,尤其是在提高蔬菜或者粮食营养品质上有何功能,这也是一个非常值得研究的方向。目前的研究的对象主要是模式植物拟南芥,怎样把研究的结果应用于一些重要农作物中相关基因的分子机理研究,这也是后面的研究方向之一。

其次,尽管氮吸收、代谢等过程中的诸多关键基因都已经被克隆,但对于这些基因的调节机制的理解还非常有限。比如 *NRT2.1* 和 *NRT2.2*, 作为植物负责吸收氮素的主要基因,它们的上游调控因子一直还没有找到。另外氮素的吸收和代谢不仅受其底物和下游含氮化合物的反馈调节,也受光合作用中碳代谢途径的强烈影响。因此,植物怎样调节体内的碳氮平衡,这是以后氮代谢研究的热点和难点问题。

最后,在氮素的研究方法和理念上,也有许多地方需要改进。我们不但要利用传统的遗传学,分子生物学技术;而且要利用最新的植物代谢组学、生物信息学、系统生物学、以及各种先进的质谱技术,把氮素的吸收、转运、代谢和分配整合到植物整体的生理代谢过程中去,从而更深入地了解氮素的在植物生长发育中的生理功能,为提高农作物氮素的利用效率,培育氮高效的农作物新品种,降低氮肥农业成本奠定坚实的基础。

参考文献

Almagro A, Lin SH, Tsay YF. 2008. Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter

- NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. *Plant Cell*. 20(12): 3289-3299.
- Amarasinghe BH, de Bruxelles GL, Braddon M, Onyeocha I, Forde BG, Udvardi MK. 1998. Regulation of GmNRT2 expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). *Planta*. 206(1): 44-52.
- Bachmann M, Huber JL, Liao PC, Gage DA, Huber SC. 1996. The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Lett*. 387(2-3): 127-131.
- Back E, Burkhardt W, Moyer M, Privalle L, Rothstein S. 1988. Isolation of cDNA clones coding for spinach nitrite reductase: complete sequence and nitrate induction. *Mol Gen Genet*. 212(1): 20-26.
- Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, et al. 2003. A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science*. 302(5652): 1956-1960.
- Bloom AJ, Sukrapanna SS, Warner RL. 1992. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol*. 99(4): 1294-1301.
- Boorer KJ, Fischer WN. 1997. Specificity and stoichiometry of the Arabidopsis H⁺/amino acid transporter AAP5. *J Biol Chem*. 272(20): 13040-13046.
- Cammaerts D, Jacobs M. 1985. A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of Arabidopsis thaliana. *Planta*. 163(4): 517-526.
- Chapin FS, Moilanen L, Kielland K. 1993. Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. 361(6408): 150-153.
- Chen L, Bush DR. 1997. LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in arabidopsis. *Plant Physiol*. 115(3): 1127-1134.
- Cheng CL, Acedo GN, Dewdney J, Goodman HM, Conkling MA. 1991. Differential expression of the two Arabidopsis nitrate reductase genes. *Plant Physiol*. 96(1): 275-279.
- Cheng CL, Dewdney J, Nam HG, den Boer BG, Goodman HM. 1988. A new locus (NIA 1) in Arabidopsis thaliana encoding nitrate reductase. *Embo J*. 7(11): 3309-3314.
- Chiu CC, Lin CS, Hsia AP, Su RC, Lin HL, Tsay YF. 2004. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant Cell Physiol*. 45(9): 1139-1148.
- Chopin F, Orsel M, Dorbe MF, et al. 2007. The Arabidopsis ATNRT2.7 nitrate transporter controls

- nitrate content in seeds. *Plant Cell*. 19(5): 1590-1602.
- Crete P, Caboche M, Meyer C. 1997. Nitrite reductase expression is regulated at the post-transcriptional level by the nitrogen source in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 11(4): 625-634.
- Daniel-Vedele F, Filleur S, Caboche M. 1998. Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Curr Opin Plant Biol*. 1(3): 235-239.
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, et al. 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*. 442(7105): 939-942.
- Diaz C, Lemaitre T, Christ A, et al. 2008. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in *Arabidopsis* under low nitrogen nutrition. *Plant Physiol*. 147(3): 1437-1449.
- Edwards JW, Coruzzi GM. 1989. Photorespiration and light act in concert to regulate the expression of the nuclear gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant Cell*. 1(2): 241-248.
- Fan SC, Lin CS, Hsu PK, Lin SH, Tsay YF. 2009. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *Plant Cell*. 21(9): 2750-2761.
- 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.
- Fischer WN, Kwart M, Hummel S, Frommer WB. 1995. Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*. 270(27): 16315-16320.
- Forde BG. 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1465(1-2): 219-235.
- Frommer WB, Hummel S, Riesmeier JW. 1993. Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(13): 5944-5948.
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von WN. 1999. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*. 11(5): 937-948.
- Glass AD, Britto DT, Kaiser BN, et al. 2002. The regulation of nitrate and ammonium transport

- systems in plants. *J Exp Bot.* 53(370): 855-864.
- Gupta SC, Beevers L. 1987. Regulation of nitrite reductase : cell-free translation and processing. *Plant Physiol.* 83(4): 750-754.
- Hell R, Mendel R, Daniel-Vedele F, Krapp A, Kaiser W. Cellular Biology of Nitrogen Metabolism and Signaling : 145-172.
- Hirel B, Bertin P, Quillere I, et al. 2001. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiol.* 125(3): 1258-1270.
- Hirner A, Ladwig F, Stransky H, et al. 2006. Arabidopsis LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *Plant Cell.* 18(8): 1931-1946.
- Hsu LC, Chiou TJ, Chen L, Bush DR. 1993. Cloning a plant amino acid transporter by functional complementation of a yeast amino acid transport mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(16): 7441-7445.
- Hunt E, Gattolin S, Newbury HJ, et al. 2010. A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the Arabidopsis sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *J Exp Bot.* 61(1): 55-64.
- Ishiyama K, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Obara M, Yamaya T, Takahashi H. 2004. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in Arabidopsis. *J Biol Chem.* 279(16): 16598-16605.
- Jonassen EM, Sandsmark BA, Lillo C. 2009. Unique status of NIA2 in nitrate assimilation: NIA2 expression is promoted by HY5/HYH and inhibited by PIF4. *Plant Signal Behav.* 4(11): 1084-1086.
- Kaiser BN, Rawat SR, Siddiqi MY, Masle J, Glass AD. 2002. Functional analysis of an Arabidopsis T-DNA "knockout" of the high-affinity NH_4^+ transporter AtAMT1;1. *Plant Physiol.* 130(3): 1263-1275.
- Kaiser WM, Huber SC. 2001. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot.* 52(363): 1981-1989.
- Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T, Ojima K. 1992. Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiol.* 99(4): 1481-1486.
- Kamachi K, Yamaya T, Mae T, Ojima K. 1991. A Role for Glutamine Synthetase in the Remobilization of Leaf Nitrogen during Natural Senescence in Rice Leaves. *Plant Physiol.*

96(2): 411-417.

- Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrove RM, Miflin BJ. 1978. Photorespiratory nitrogen cycle. 275(5682): 741-743.
- Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, Le Gouis J. 2007. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. *Field Crops Research*. 102(1): 22-32.
- Kronenberger J, Lepingle A, Caboche M, Vaucheret H. 1993. Cloning and expression of distinct nitrite reductases in tobacco leaves and roots. *Mol Gen Genet*. 236(2-3): 203-208.
- Lahnern K, Kramer V, Back E, Privalle L, Rothstein S. 1988. Molecular cloning of complementary DNA encoding maize nitrite reductase: molecular analysis and nitrate induction. *Plant Physiol*. 88(3): 741-746.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. 1996. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 47:569-593.
- Lea Pjt, D. A. 1972. Intracellular Location and Properties of Plant L-Glutamate Dehydrogenases. *Journal of Experimental Botany*. 23(2): 440-449.
- Lee YH, Foster J, Chen J, Voll LM, Weber AP, Tegeder M. 2007. AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. *Plant J*. 50(2): 305-319.
- Lemaitre T, Gaufichon L, Boutet-Mercey S, Christ A, Masclaux-Daubresse C. 2008. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. *Plant Cell Physiol*. 49(7): 1056-1065.
- Li JY, Fu YL, Pike SM, et al. 2010. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell*. 22(5): 1633-1646.
- Li W, Wang Y, Okamoto M, Crawford NM, Siddiqi MY, Glass AD. 2007. Dissection of the *AtNRT2.1:AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol*. 143(1): 425-433.
- Li ZC, Bush DR. 1990. DeltapH-Dependent Amino Acid Transport into Plasma Membrane Vesicles Isolated from Sugar Beet Leaves: I. Evidence for Carrier-Mediated, Electrogenic Flux through Multiple Transport Systems. *Plant Physiol*. 94(1): 268-277.
- Li ZC, Bush DR. 1991. DeltapH-Dependent Amino Acid Transport into Plasma Membrane

- Vesicles Isolated from Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Leaves: II. Evidence for Multiple Aliphatic, Neutral Amino Acid Symports. *Plant Physiol.* 96(4): 1338-1344.
- Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, et al. 2008. Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell.* 20(9): 2514-2528.
- Liu KH, Huang CY, Tsay YF. 1999. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell.* 11(5): 865-874.
- Loppes R, Radoux M, Ohresser MC, Matagne RF. 1999. Transcriptional regulation of the Nial gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nial promoter. *Plant Mol Biol.* 41(5): 701-711.
- Loque D, Yuan L, Kojima S, et al. 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(4): 522-534.
- Loulakakis CAR, K.A. 1990. Intracellular Localization and Properties of NADH-Glutamate Dehydrogenase from *Vitis vinifera* L.: Purification and Characterization of the Major Leaf Isoenzyme. *Journal of Experimental Botany.* 41(10): 1223-1230.
- Loyola-Vargas VM, de Jimenez ES. 1984. Differential role of glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism of maize tissues. *Plant Physiol.* 76(2): 536-540.
- Ludewig U, Wilken S, Wu B, et al. 2003. Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH_4^+ uniporters. *J Biol Chem.* 278(46): 45603-45610.
- Martin A, Belastegui-Macadam X, Quillere I, et al. 2005. Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness: agronomic, physiological and molecular aspects. *New Phytol.* 167(2): 483-492.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot.* 105(7): 1141-1157.
- Matsui J, Takeba G, Ida S. 1990. Molecular cloning and partial amino acid sequence of rice ferredoxin-nitrite reductase. *Agric Biol Chem.* 54(11): 3069-3071.
- Melzer J, Kleinhofs A, Warner R. 1989. Nitrate reductase regulation: Effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Molecular and General Genetics MGG.* 217(2): 341-346.

- Miyashita YG, Allen G. 2008. NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. *Journal of Experimental Botany*. 59(3): 667-680.
- Moorhead G, Douglas P, Morrice N, Scarabel M, Aitken A, MacKintosh C. 1996. Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Curr Biol*. 6(9): 1104-1113.
- Nasholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Hogberg M, Hogberg P. 1998. Boreal forest plants take up organic nitrogen. 392(6679): 914-916.
- Nasholm T, Kielland K, Ganeteg U. 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol*. 182(1): 31-48.
- Ninnemann O, Jauniaux JC, Frommer WB. 1994. Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *EMBO J*. 13(15): 3464-3471.
- Okamoto M, Kumar A, Li W, et al. 2006. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene *AtNRT3.1*. *Plant Physiol*. 140(3): 1036-1046.
- Orsel M, Chopin F, Leleu O, et al. 2006. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. Physiology and protein-protein interaction. *Plant Physiol*. 142(3): 1304-1317.
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F. 2002. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol*. 129(2): 886-896.
- Ortiz-Lopez A, Chang H, Bush DR. 2000. Amino acid transporters in plants. *Biochim Biophys Acta*. 1465(1-2): 275-280.
- Privalle LS, Lahners KN, Mullins MA, Rothstein S. 1989. Nitrate effects on nitrate reductase activity and nitrite reductase mRNA levels in maize suspension cultures. *Plant Physiol*. 90(3): 962-967.
- Quesada A, Galvan A, Fernandez E. 1994. Identification of nitrate transporter genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*. 5(3): 407-419.
- Rentsch D, Schmidt S, Tegeder M. 2007. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Lett*. 581(12): 2281-2289.
- 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(4): 779-791.
- Richards NG, Schuster SM. 1992. An alternative mechanism for the nitrogen transfer reaction in asparagine synthetase. *FEBS Lett.* 313(2): 98-102.
- Rufty TW, Thomas JF, Remmler JL, Campbell WH, Volk RJ. 1986. Intercellular localization of nitrate reductase in roots. *Plant Physiol.* 82(3): 675-680.
- Sanders A, Collier R, Trethrew A, Gould G, Sieker R, Tegeder M. 2009. AAP1 regulates import of amino acids into developing *Arabidopsis* embryos. *Plant J.* 59(4): 540-552.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, et al. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet.* 37(5): 501-506.
- Schmidt R, Stransky H, Koch W. 2007. The amino acid permease AAP8 is important for early seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 226(4): 805-813.
- Schneider K, Borchardt DC, Schafer-Pregl R, et al. 1999. PCR-based cloning and segregation analysis of functional gene homologues in *Beta vulgaris*. *Mol Gen Genet.* 262(3): 515-524.
- Sechley KA, Yamaya T, Oaks A. 1992. Compartmentation of Nitrogen Assimilation in Higher Plants. Academic Press. 85-163.
- Shimazaki K, Yu SW, Sakaki T, Tanaka K. 1992. Differences between Spinach and Kidney Bean-Plants in Terms of Sensitivity to Fumigation with NO₂. *Plant and Cell Physiology.* 33(3): 267-273.
- Smirnoff N, Stewart GR. 1985. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences : 133-140.
- Solomonson LP, Spehar AM. 1977. Model for the regulation of nitrate assimilation. 265(5592): 373-375.
- Stitt M. 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol.* 2(3): 178-186.
- Stitt M, Muller C, Matt P, et al. 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot.* 53(370): 959-70.
- Suzuki I, Sugiyama T, Omata T. 1995. Regulation of Nitrite Reductase Activity under CO₂ Limitation in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Physiol.* 107(3): 791-796.
- Svennerstam H, Ganeteg U, Bellini C, Nasholm T. 2007. Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the lysine histidine transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. *Plant Physiol.* 143(4): 1853-1860.

- Taira M, Valtersson U, Burkhardt B, Ludwig RA. 2004. Arabidopsis thaliana GLN2-encoded glutamine synthetase is dual targeted to leaf mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell*. 16(8): 2048-2058.
- Tanaka T, Ida S, Irifune K, Oeda K, Morikawa H. 1994. Nucleotide sequence of a gene for nitrite reductase from Arabidopsis thaliana. *DNA Seq*. 5(1): 57-61.
- Tang P, Wu H. 1957. Adaptive Formation of Nitrate Reductase in Rice Seedlings. 179(4574): 1355-1356.
- Terada Y, Aoki H, Tanaka T, Morikawa H, Ida S. 1995. Cloning and nucleotide sequence of a leaf ferredoxin-nitrite reductase cDNA of rice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 59(11): 2183-2185.
- Trueman LJ, Richardson A, Forde BG. 1996. Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of Chlamydomonas reinhardtii and Aspergillus nidulans. *Gene*. 175(1-2): 223-231.
- Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK. 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett*. 581(12): 2290-2300.
- Unkles SE, Hawker KL, Grieve C, Campbell EI, Montague P, Kinghorn JR. 1991. crnA encodes a nitrate transporter in Aspergillus nidulans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(1): 204-208.
- Vaucheret H, Kronenberger J, Lepingle A, Vilaine F, Boutin JP, Caboche M. 1992. Inhibition of tobacco nitrite reductase activity by expression of antisense RNA. *Plant J*. 2(4): 559-569.
- Vaughn KC, Campbell WH. 1988. Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol*. 88(4): 1354-1357.
- Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Glass AD. 2000. Isolation and characterization of HvNRT2.3 and HvNRT2.4, cDNAs encoding high-affinity nitrate transporters from roots of barley. *Plant Physiol*. 122(3): 783-792.
- Vincentz M, Moureaux T, Leydecker MT, Vaucheret H, Caboche M. 1993. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in Nicotiana plumbaginifolia leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J*. 3(2): 315-324.
- 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(4): 1259-1267.
- Weiner H, Kaiser WM. 1999. 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Lett*. 455(1-2): 75-78.
- Wilkinson JQ, Crawford NM. 1991. Identification of the Arabidopsis CHL3 gene as the nitrate

reductase structural gene NIA2. *Plant Cell*. 3(5): 461-471.

Wilkinson JQ, Crawford NM. 1993. Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Mol Gen Genet*. 239(1-2): 289-297.

Yamaya T, Oaks A. 1987. Synthesis of glutamate by mitochondria – An anaplerotic function for glutamate dehydrogenase. 70(4): 749-756.

Yu X, Sukumaran S, Mrton 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, Graff L, Loque D, et al. 2009. AtAMT1;4, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. 50(1): 13-25.

Yuan L, Loque D, Kojima S, et al. 2007. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *Plant Cell*. 19(8): 2636-2352.

二：植物硝酸根信号转导研究进展

氮是维持植物生长发育必须的营养元素。硝酸根作为土壤中主要的氮源，在土壤中的浓度随环境条件的改变呈宽幅波动(Crawford, 1995)。因此，植物进化出一系列的机制来主动调节其代谢及形态发育，以应对土壤中硝酸根浓度的剧烈变化(Stitt, 1999)。早在上世纪 50 年代，生理学证据业已表明硝酸根可以作为信号分子强烈诱导并增强硝酸还原酶(Nitrate Reductase, NR)的活性(Tang et al., 1957)。在随后的研究中，人们逐渐发现硝酸根作为信号分子，不仅能够诱导 NR 的表达，而且可以调控硝酸根转运蛋白和碳氮代谢等许多相关下游基因的 mRNA 水平(Coruzzi et al., 2001)。利用硝酸根代谢缺陷突变体及使用其它替代氮源(NH_4^+ 、Gln)的研究更区分出了硝酸根的营养功能和信号功能对植物生长发育所起的区别化作用 (Scheible et al., 1997; Walch-Liu et al., 2000; Wang et al., 2004; Alboresi et al., 2005)。但对于植物如何感知硝酸根信号，以及感受后的信号如何进一步调控植物体内的基因表达以及代谢等生理过程，来调节植物与环境的相互作用的分子机理研究，直到最近几年才取得了较大的突破，下面分别就以上提到的几个方面进展进行阐述。

1：硝酸根调控的基因表达

当植物感受到土壤中的硝酸根浓度变化时，会迅速调整一系列基因的表达来调节体内的代谢及生长发育(Vidal et al., 2008)。这些基因最显著的表达调控特征是迅速受到硝酸根的诱导表达，而且不依赖于蛋白质的从头(De novo)合成，因此被称为硝酸根初级响应基因，主要包括调控硝酸根吸收、还原以及磷酸戊糖途径和糖酵解途径相关的基因(Wang et al., 2000)。NR 基因是第一个被发现的硝酸根初级响应基因(Tang et al., 1957)，使用 10 到 50 mM 的硝酸根处理植物时，其体内的 mRNA 含量在几分钟内即发生显著增加(Melzer et al., 1989; Cheng et al., 1991; Gowri et al., 1992; Aslam et al., 1993)。而且，在添加蛋白质合成抑制剂后，硝酸根仍然能够迅速诱导 NR 的表达，表明硝酸根诱导 NR 的表达是独立于蛋白质从头合成的(Gowri et al., 1992)。除 NR 外，硝酸根转运蛋白基因(NRT)也是非

常重要的硝酸根初级响应基因,其典型代表是 *NRT2.1* 和 *NRT2.2*。当植物受到硝酸根饥饿时, *NRT2.1* 和 *NRT2.2* 的表达量会显著降低到不可检测的水平,但是一旦将植物转移至含硝酸根的培养基时,其表达在几分钟内即可被诱导起来(Forde 2000)。相对于硝酸根诱导的代谢变化等次级效应,硝酸根初级响应现象具有高度的稳定性,因此该过程中一些标志基因已经被广泛应用于研究硝酸根信号转导。

除了上述的初级响应基因, Wang 等(2003)通过系统分析经过硝酸根饥饿和短时间低浓度(250 μM NO_3^- /20 min)诱导处理的拟南芥转录组,发现几乎 10%的拟南芥基因表达受到了硝酸根的影响。在根中, 1176 个基因出现显著上调或下调,在茎中也有 183 个基因的表达发生显著的改变。除去之前发现的初级硝酸根响应基因外,还包括许多新的参与物质代谢或调控的基因,例如参与糖酵解途径的葡萄糖-6-磷酸异构酶以及磷酸甘油酸变位酶基因等,参与铁(Fe)转运和代谢基因(烟酰胺合成酶)、以及硫(S)元素吸收和还原的基因。这些结果表明矿物质硝酸根在植物基因表达中所能起到的核心调控作用(Wang et al., 2003)。

但是,硝酸根作为一个氮代谢的原初底物分子,它在同化为有机氮的过程中被还原为亚硝酸根、铵根、以及其它含氮的中间代谢产物,而这些代谢产物也可以作为信号分子调控基因的表达(Walch-Liu et al., 2006; Wang et al., 2007; Gutierrez et al., 2008)。因此最初并不能确定硝酸根初级响应过程到底是由硝酸根自身直接引发,还是下游代谢产物造成,多个实验室利用不同的硝酸根还原酶活力缺失物种对这个问题进行了研究。Scheible 等(1997)基于低 NR 活性烟草突变体进行的研究揭示,即使硝酸根不能被有效还原,也能调节烟草体内的碳氮代谢平衡过程,支持硝酸根作为信号分子起作用的假设。更为精细的分子证据来自拟南芥的研究, Wang 等(2004)获得了 NR 酶活缺失的拟南芥双突变体 *nia1/nia2*, 该突变体在以硝酸根为唯一氮源的培养基上无法正常生长。当该突变体和野生型同时接受硝酸根诱导处理时,有 595 个硝酸根初级响应基因在 *nia1/nia2* 突变体和野生型中的表达都发生了显著变化。这些基因涉及到能量合成、代谢,糖酵解和糖异生等重要的生理过程(Wang et al., 2004)。通过这些工作,硝酸根的信号分子功能得以从其营养功能以及下游代谢产物的信号功能中严格区分出来,为硝酸根信号转导研究奠定了坚实的基础。

2: 植物对硝酸根信号的感受

外界的硝酸根信号到底是如何被植物所感知? 这个问题一直是研究的难点。Redinbaugh 等(1991)提出了一个模型, 就是在植物中存在一个组成型表达的硝酸根响应途径, 该途径包括一个硝酸根受体和硝酸根初级响应基因转录激活的调控蛋白。关于该模型的研究进展较为缓慢, 尤其是在硝酸根初级响应基因转录激活调控蛋白上, 相关进展较少。

在硝酸根受体研究方面, 则在最近取得了突破性进展, 支持了 Redinbaugh 提出的模型。最早人们推测硝酸根受体位于细胞膜外侧, 主要证据就是小麦根系周围的硝酸根浓度变化可以显著调控硝酸根还原酶 *NR* 的表达, 而根系组织和细胞质中的硝酸根浓度却保持在一个相对稳定的水平(Sueyoshi et al., 1995)。在细菌中, 硝酸根的信号转导是主要通过 His-to-Asp 的磷酸化系统来实现的。它们通过一对跨膜的组氨酸激酶(NarQ, NarX)来感受外界环境中的硝酸根变化(Stewart, 1994)。植物中虽然也存在类似的 His-to-Asp 磷酸化系统, 但该系统主要是在植物的细胞分裂素和乙烯信号转导中发挥功能(Sueyoshi et al., 1995; Mok et al., 2001)。在酵母中存在一类特殊基因, 它们既是转运蛋白, 同时也可以感受到培养基中的主要营养元素浓度变化, 例如酵母中的铵根通透酶 Mep2p(ammonium permease)。该基因是一个高亲和力铵根转运蛋白, 同时它也是一个铵根受体, 可以感受到培养基中铵根浓度的变化, 以此调控酵母假菌丝分化的初始过程(Lorenz et al., 1998)。受此启发, 人们也猜测硝酸根受体是否可能就是某一个或几个硝酸根转运蛋白。其中 *CHL1(NRT1.1)* 和 *NRT2.1* 的可能性最大, 因为正向和反向遗传学研究证据皆表明它们的突变体存在一些不同于野生型的硝酸根信号转导特征, 例如硝酸根调控的根系发育和基因表达都发生了显著变化(Cerezo et al., 2001; Little et al., 2005; Remans et al., 2006)。基于这些确凿的证据, Tsay 实验室(2009)通过精密的实验设计和详实的数据, 证明了 *CHL1* 确实是一个硝酸根受体。在该研究中, 他们筛选到一个特殊的 *CHL1* 等位突变体 *chl1-9*, 该突变体蛋白丧失了转运硝酸根的能力, 但却保留了正常的硝酸根应答反应, 证明了 *CHL1* 转运硝酸根的功能和其作为硝酸根受体的功能是相互独立的。当植物处于较低的硝酸根浓度环境中时(硝酸根<1 mM), *CHL1* 可以激活类钙调磷酸酶 B 蛋白 CBL9, 激活后的 CBL9 通过某种未知机制和类钙调磷酸酶 B 互作蛋白激酶 CIPK23 结合

在一起形成蛋白复合体,并磷酸化 CHL1 蛋白第 101 位上的苏氨酸。一旦 CHL1 被磷酸化,它就会转变为高亲和力的硝酸根转运蛋白,从而促进植物在不利的条件下吸收更多的硝酸根。磷酸化后的 CHL1 同时使植物在低浓度硝酸根下保持较低水平的硝酸根初级反应。当外部环境中的硝酸根浓度大于 1 mM 时,CHL1 不能被 CBL9-CIPK23 复合体磷酸化,保持低亲和力的硝酸根转运能力,并激活而且增强植物在较高硝酸根浓度下的硝酸根初级反应。该过程需要另外一个类钙调磷酸酶 B 互作蛋白激酶 CIPK8 的协助。CIPK8 被一个未知的 CBL 蛋白激活,并可能在一个不同于 T101 的位点磷酸化 CHL1(图 1)(Liu et al., 1999; Liu et al., 2003; Ho et al., 2009; Vert et al., 2009)。

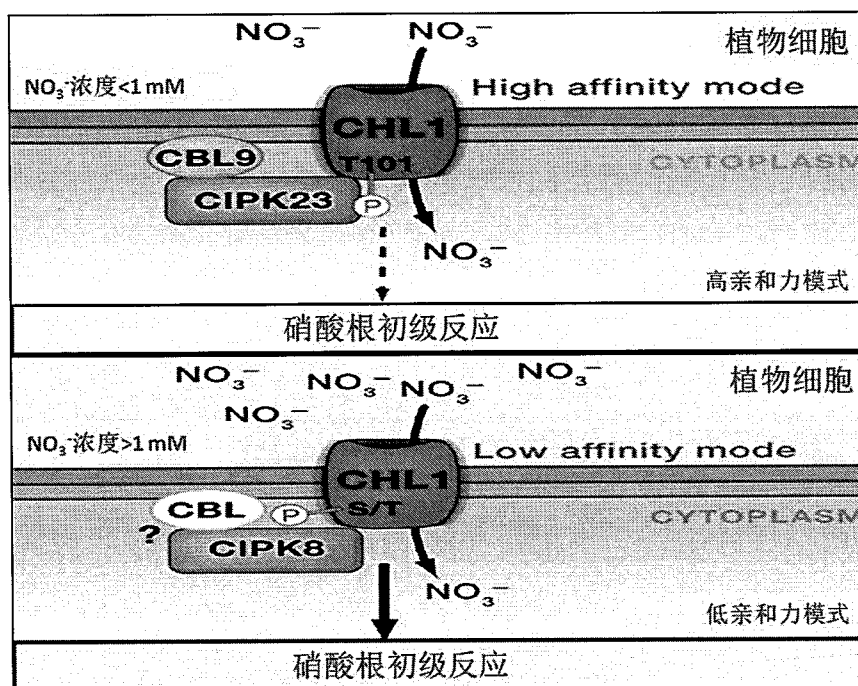


图 1 植物对环境硝酸根浓度的感受过程(修改自 Vert 等 2009)。

3: 硝酸根信号调控的重要生理过程

3.1 硝酸根信号与根系发育

硝酸根作为植物的主要氮源和重要的信号分子,对根系的发育起着重要的调控作用。增加拟南芥根系局部区域的硝酸根浓度,可以显著促进该区域侧根的生长,尤其是侧根的伸长(Zhang et al., 1998),而替代氮源如铵(Ammonium, NH₄⁺)、Gln 则没有类似的作用(Zhang et al., 1999)。在谷类作物中,硝酸根促进侧根伸长

的表型更为明显,其侧根的产生数量和长度都有显著的增加(Granato et al., 1989)。

硝酸根作为信号促进侧根伸长的分子调控机理研究的主要成就在于 *ANR1* 基因的克隆。该基因属于 MADS box 家族基因之一,受硝酸根诱导表达,编码一个转录因子蛋白。其突变体 S10 在局部硝酸根浓度高的地方没有出现类似促进侧根发育的表型(图 2)(Zhang et al., 1998)。由于硝酸根具有营养和信号分子的双重功能,为了鉴定到底是硝酸哪种功能在促进侧根发育中发挥了主要作用,作者鉴定了硝酸根还原酶双突变体 *nialnia2* 在局部高硝酸根浓度刺激下的侧根发育表型,结果发现其表型与野生型基本一致(Zhang et al., 1998)。揭示硝酸根刺激侧根发育的效应来自于其信号功能,但 *ANR1* 调控的直接下游蛋白迄今尚未找到。Remans 等(2006)的研究表明, *CHL1* 可能是 *ANR1* 的上游调控因子,因为 *chl1* 突变体在局部高浓度硝酸根区域没有出现侧根伸长的表型,与之相对应的是根尖中 *ANR1* 的表达也显著下调。因此一个可能的模型是 *CHL1* 在感受到局部高浓度的硝酸根信号后,然后把信号传导给 *ANR1*,促进 *ANR1* 的表达, *ANR1* 然后调控未知的下游基因,促进侧根的伸长。

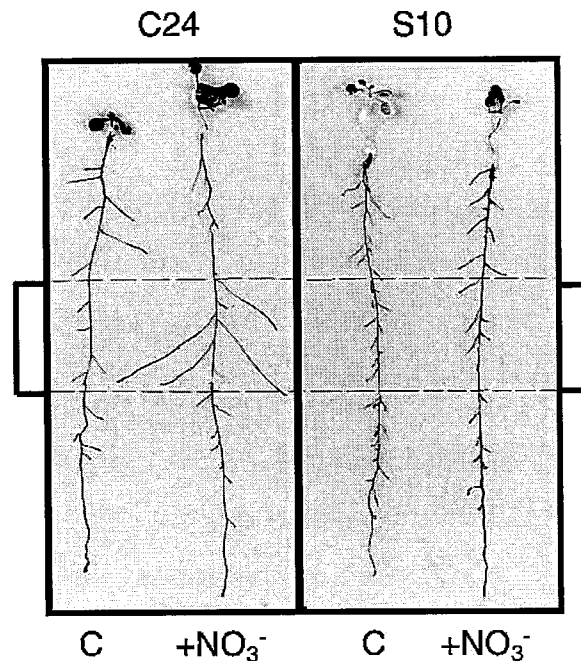


图 2 *ANR1* 调控局部高浓度硝酸根地区侧根的伸长(摘自 Zhang 和 Forde 1998)。

最近的研究则表明硝酸根信号与 *miR393* 以及生长素受体 *AFB3* 协同作用调控植物根的发育。植物感受硝酸根信号后, *AFB3* 的表达增强,使植物对生长素

的敏感性提高,随后一些对生长素敏感的基因的表达水平发生变化,导致植物主根伸长受抑制并诱导侧根的生长。但同时,硝酸根被根系吸收后代谢成为铵根、Glu 或者其它氮代谢产物。这些下游的代谢产物可以诱导 *miR393* 的表达上调,上调后的 *miR393* 则抑制 *AFB3* 的表达,使其表达水平回调(图 3)(Vidal et al., 2010)。该研究拓展了我们对硝酸根信号参与植物根系发育的认识,但 *CHL1* 以及 *ANR1* 是介入该表观调控途径,还是独立于该途径之外,仍有待于进一步的研究。

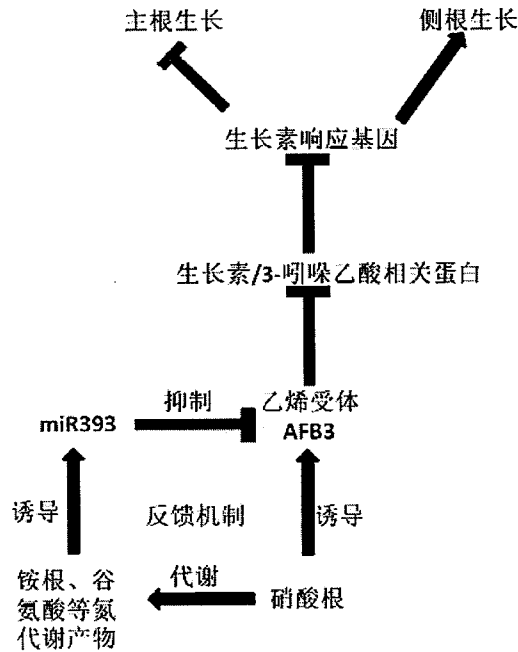


图 3 *miR393*/*AFB3* 在硝酸根调控下调节植物根系发育(修改自 Elena 等 2010)。

3.2 硝酸根信号与叶片发育

硝酸根信号调控的另外一个重要生理过程是叶片的发育。当营养缺乏的时候,植物会调整营养元素在地上部分和地下部分中的分配,以增加其在根中的比例,降低营养缺乏对根系发育的影响(Ericsson 1995),因此叶片的发育对于硝酸根营养状况较敏感。绿豆和烟草在硝酸根缺乏的土壤中生长时,叶片细胞的分裂速度和细胞大小都显著降低,叶片的面积也比其正常生长条件下小(Roggatz et al., 1999; Walch-Liu et al., 2000)。重新加入硝酸根可以使叶片的发育趋于正常;但是加入替代氮源铵根则不能恢复叶片的正常发育(McDonald et al., 1996; Walch-Liu et al., 2000)。先前的研究表明,植物在使用铵根时,木质部伤流液中的细胞分裂素浓度与使用硝酸根相比显著降低(Sattelmacher et al., 1978; Samuelson et al.,

1993)。揭示硝酸根很可能作为信号分子影响了细胞分裂素在根部的合成,并最终影响叶片的发育(图 4)。细胞分裂素可以迅速诱导很多基因的表达,这些基因主要属于 Type-A 家族(Urao et al., 2000)。在这些被诱导的基因中,有部分也受硝酸根的强烈诱导(Taniguchi et al., 1998),其中的 *ARR5* 基因主要在地上部的顶端分生组织表达,有可能通过整合硝酸根和细胞分裂素信号来调控叶片的发育(D'Agostino et al., 2000)。

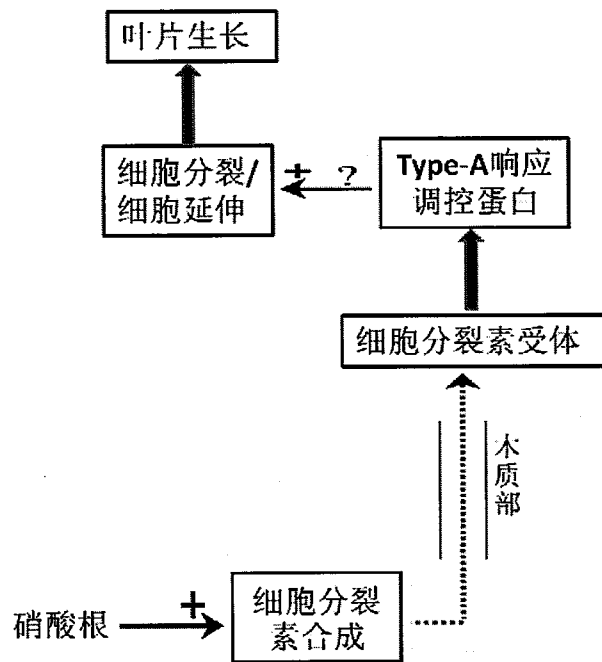


图 4 硝酸根长距离信号转导参与调控叶片发育的可能作用机理 (修改自 Forde 2002)。

3.3 硝酸根信号与种子休眠

种子休眠是植物在长期系统进化过程中获得的一种环境适应性特性。这种特性能够确保物种在恶劣的环境中存活,防止种子在不适宜的季节萌发。脱落酸(ABA)和赤霉素(GAs)是影响植物种子萌发和休眠的两个最主要因素(Finkelstein et al., 2008)。研究还发现使用外源硝酸根处理植物种子,可以打破休眠,促进种子萌发,而且这种硝酸根促进萌发的现象不依赖于硝酸根还原酶 *NR* 的活性(Hilhorst et al., 1988; Derkx et al., 1993),预示硝酸根可能作为信号分子来参与调控种子萌发。

Chopin 等(2007)发现拟南芥 *NRT2.7* 基因在种子中特异高表达,主要负责从细胞质向液泡中运输硝酸根。该基因突变后,突变体种子中硝酸根的含量会显著

降低,种子的休眠程度也增强。尽管突变体种子中的硝酸根含量显著降低,但是硝酸根在植物种子中占总氮的比例非常低,因此种子中的硝酸根通过营养功效调节种子休眠的效应应该非常微弱,更有可能是作为信号分子或者是渗透调节物质来参与调控种子的休眠。与该假设一致的是,使用硝酸根的下游代谢产物如 Gln,并不能减缓种子的休眠程度(Alboresi et al., 2005),这些证据表明硝酸根主要作为信号分子参与调控种子休眠。

关于硝酸根调控种子休眠和萌发的机理目前还不太清楚,但有一种较有影响力的推论,即外源或内源硝酸根信号很有可能是通过影响种子中 ABA、GAs 合成或代谢途径,从而可以调控种子的休眠状况。支持该推论的证据包括硝酸根在种子中的积累可以增加种子中 GAs 的合成,或者降低种子萌发过程中对 GAs 的需求等(Hilhorst et al., 1988; Alboresi et al., 2005);此外,硝酸根处理拟南芥休眠生态型 Cvi 的种子,可以增强种子中 ABA 的氧化代谢,抑制 ABA 的重新合成,使 ABA 的含量迅速降低,从而打破种子的休眠,促进萌发(Ali-Rachedi et al., 2004)。另外的研究则发现,外源添加硝酸根可以降低植物萌发过程中对光敏色素 A 的依赖,促进拟南芥 Ler 生态型种子的萌发(Batak et al., 2002)。

植物在生长过程中,经常会遇到土壤中氮素缺乏的情况。当植物感受到氮素缺乏状态后,会把这种信号传递给种子并减少种子中硝酸根的积累,以此来增加种子的休眠作用,避免种子在不适宜的情况下萌发。当土壤的氮素营养适宜的时候,又会通过与其它信号途径,如 ABA 和 GA 的相互作用来解除休眠,刺激种子萌发。因此硝酸根信号调控的种子休眠可能是植物在长期进化过程中形成的一种自我保护机制(Alboresi et al., 2005)。

3.4 硝酸根信号与逆境响应

逆境会影响植物吸收同化硝酸根的能力(Singh et al., 1988),但反过来硝酸根作为一种信号分子能否调节植物对逆境的响应?从逻辑上讲这种调节应该是存在的,但是相关的机理研究则少见报道。最早有关硝酸根调控植物抗逆的分子机理研究与 *CHL1* 有关,研究发现 *CHL1* 功能缺失后,突变体对干旱的抗性增强,主要是由于突变体保卫细胞在开放过程中硝酸根含量降低,所以不能产生硝酸根诱导的去极化,导致突变体的气孔开放度低于野生型,因此其失水速度低,抗旱

性增强(Guo et al., 2003)。但该研究提供的证据不足以支持硝酸根作为信号分子来参与调控植物抗旱,而更可能是作为一种渗透调节物质来调控气孔的开度。

最近, Li 等(2010)的研究则为硝酸根信号可能介入逆境响应调控提供了直接的分子证据。研究表明, 重金属胁迫将极大抑制硝酸根吸收代谢途径的酶活力(Hernandez et al., 1997; Chaffei et al., 2004), 但 Li 等(2010)在分析 Cd^{2+} 胁迫条件下的拟南芥基因转录组时, 发现 *NRT1.8* 受 Cd^{2+} 诱导, 是氮吸收代谢途径中唯一受 Cd^{2+} 强烈诱导表达的基因。进一步的分析表明该基因编码一个 pH 依赖的低亲和力硝酸根吸收蛋白, 其基本作用在于将木质部伤流液中的硝酸根跨膜转运到木质部薄壁细胞内, 从而调控硝酸根从根到茎的长途转运。在 Cd^{2+} 胁迫条件下, *NRT1.8* 在根部诱导表达, 导致更多的硝酸根分配到根中, 并提高植物对 Cd^{2+} 的抗性(Li et al., 2010)。与之相对应的是, 负责硝酸根木质部装载的 *NRT1.5* 基因在 Cd^{2+} 胁迫时表达量降低, 而且 *nrt1.5* 突变体表现出与 *nrt1.8* 突变体相反的表型(Lin et al., 2008; Li et al., 2010), 揭示 *NRT1.8* 与 *NRT1.5* 协同作用将硝酸根留在根中从而调控植物对 Cd^{2+} 的抗性。不仅如此, 这两个基因在多种逆境下表现出与 Cd^{2+} 胁迫类似的表达特征, 预示硝酸根向根部的再分配是植物应对逆境一种比较普遍的机制(未发表的数据)。鉴于参与再分配的硝酸根只占总氮的很小比例, 作者推测其作为营养成分起作用的可能性不大, 支持该推论的证据来自 *NRT1.8* 过表达植株体内多种硝酸根吸收代谢基因的组成型表达(Li et al., 2010)。更为直接的实验验证可能包括利用 NR 活力缺失突变体来进一步研究硝酸根再分配信号对基因表达的影响, 尤其是对一些初级响应基因的影响, 以及基于对 *NRT1.8* 基因更深入的作用机理解析。

4: 总结与展望

硝酸根作为信号分子的研究只有几十年的历史, 但是它在植物生长发育以及逆境反应等生理过程中的重要作用已经开始得到重视。尽管也取得了一些进展(Zhang et al., 1998; Ho et al., 2009), 但是还有很多基础的问题有待解决。比如, 我们已经知道 CHL1 是硝酸根受体, 那植物中是否还存在其它的硝酸根受体呢? 比如感受细胞质中硝酸根浓度变化的受体; 或者是位于特定组织部位感受硝酸根

在植物地下和地上部位分配比例变化的受体。此外,已经明确硝酸根信号可以调节许多基因的表达,这些基因分别参与了植物体内众多重要生理过程,比如硝酸根的吸收和代谢、氨基酸的代谢、光合作用、激素代谢以及信号转导等途经,并最终调控植物的生长发育(Wang et al., 2000, 2003, 2004; Gutierrez et al., 2007; Vidal et al., 2008)。但是这些基因响应硝酸根信号的分子反应与最终的生长发育改变表型之间,还存在巨大的空白有待进一步深入研究和阐明。

硝酸根信号转导研究的另一个挑战是,植物体内的很多代谢过程和信号转导都不是独立运作的,而是存在一个及其复杂的互作网络(Forde 2002; Vidal et al., 2008; Krouk et al., 2009)。因此硝酸根信号是如何和其它代谢途经和信号,比如激素分子,碳、硫、磷等营养元素整合在一起,从基因组整体水平上调控基因的表达,并最终影响植物的生长发育,这很可能是以后研究的一个热点和难点(Taniguchi et al., 1998; Prosser et al., 2001; Palenchar et al., 2004; Sakakibara et al., 2006; Wang et al., 2007)。通过系统生物学和生物信息学的研究,虽然也取得了部分进展,尤其是在碳氮信号互作研究上取得了一些成果,但离最终了解硝酸根信号转导在植物生长发育过程中的具体作用机理还有很多工作要做。随着科研手段的进一步提高,结合传统的分子生物学,生化以及最新的生物信息学等技术,相信在不久的将来会有更多重大的发现。这对于降低氮肥农业成本,提高农作物抗性以及产量,保持农业的可持续发展都将起到很好的促进作用。

参考文献

- Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C, Truong HN. (2005) Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 28:500-512
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M. (2004) Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of Arabidopsis thaliana. *Planta* 219:479-488
- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC. (1993) Comparative Induction of Nitrate and Nitrite Uptake and Reduction Systems by Ambient Nitrate and Nitrite in Intact Roots of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seedlings. *Plant Physiol* 102:811-819
- Batak I, Devi M, Gibal Z, Grubisic D, Poff KL, Konjevi R. (2002) The effects of potassium nitrate

- and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Science Research* :253-259
- Cerezo M, Tillard P, Filleur S, Munos S, Daniel-Vedele F, Gojon A. (2001) Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127:262-271
- Chaffei C, Pageau K, Suzuki A, Gouia H, Ghorbel MH, Masclaux-Daubresse C. (2004) Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol* 45:1681-1693
- Cheng CL, Acedo GN, Dewdney J, Goodman HM, Conkling MA. (1991) Differential expression of the two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol* 96:275-279
- Chopin F, Orsel M, Dorbe MF, Chardon F, Truong HN, Miller AJ, Krapp A, Daniel-Vedele F. (2007) The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *Plant Cell* 19:1590-1602
- Coruzzi G, Bush DR. (2001) Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiol* 125:61-64
- Crawford NM. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* 7:859-868
- D'Agostino IB, Deruere J, Kieber JJ. (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* 124:1706-1717
- Derkx MPM, Karssen CM. (1993) Variability in Light Gibberellin and Nitrate Requirement of *Arabidopsis-Thaliana* Seeds Due to Harvest Time and Conditions of Dry Storage. *Journal of Plant Physiology* 141:574-582
- Ericsson T. (1995) Growth and shoot: root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. *Plant and Soil* 168-169:205-214
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol* 59:387-415
- Forde BG. (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465:219-235
- Forde BG. (2002) Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu Rev Plant Biol* 53:203-224
- Gowri G, Kenis JD, Ingemarsson B, Redinbaugh MG, Campbell WH. (1992) Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of maize to environmental nitrate. *Plant Mol Biol* 18:55-64
- Granato TC, Raper CD Jr. (1989) Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate. *J Exp Bot* 40:263-275

- Guo FQ, Young J, Crawford NM. (2003) The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:107-117
- Gutierrez RA, Lejay LV, Dean A, Chiaromonte F, Shasha DE, Coruzzi GM. (2007) Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*. *Genome Biol* 8:R7
- Gutierrez RA, Stokes TL, Thum K, Xu X, Obertello M, Katari MS, Tanurdzic M, Dean A, Nero DC, McClung CR, et al.. (2008) Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4939-4944
- Hernandez LE, Garate A, CarpenaRuiz R. (1997) Effects of cadmium on the uptake, distribution and assimilation of nitrate in *Pisum sativum*. *Plant and Soil* 189:97-106
- Hilhorst HW, Karssen CM. (1988) Dual Effect of Light on the Gibberellin- and Nitrate-Stimulated Seed Germination of *Sisymbrium officinale* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 86:591-597
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF. (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138:1184-1194
- Krouk G, Tranchina D, Lejay L, Cruikshank AA, Shasha D, Coruzzi GM, Gutierrez RA. (2009) A systems approach uncovers restrictions for signal interactions regulating genome-wide responses to nutritional cues in *Arabidopsis*. *PLoS Comput Biol* 5:e1000326
- Little DY, Rao H, Oliva S, Daniel-Vedele F, Krapp A, Malamy JE. (2005) The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13693-13698
- Li JY, Fu YL, Pike SM, Bao J, Tian W, Zhang Y, Chen CZ, Zhang Y, Li HM, Huang J, et al. (2010) The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell*, 22:1633-1646
- Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, Lin CS, Lepetit M, Hsu PK, Tillard P, Lin HL, Wang YY, Tsai CB, et al. (2008) Mutation of the *Arabidopsis* NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell*, 20:2514-2528
- Liu KH, Huang CY, Tsay YF. (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell* 11:865-874
- Liu KH, Tsay YF. (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J* 22:1005-1013
- Lorenz MC, Heitman J. (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17:1236-1247

- McDonald AJS, Davies WJ, Callow JA. (1996) Keeping in Touch: Responses of the Whole Plant to Deficits in Water and Nitrogen Supply. 22:229-300
- Melzer J, Kleinhofs A, Warner R. (1989) Nitrate reductase regulation: Effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. Molecular and General Genetics MGG 217:341-346
- Mok DW, Mok MC. (2001) CYTOKININ METABOLISM AND ACTION. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 52:89-118
- Palenchar PM, Kouranov A, Lejay LV, Coruzzi GM. (2004) Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants. Genome Biol 5:R91
- Prosser IM, Purves JV, Saker LR, Clarkson DT. (2001) Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. J Exp Bot 52:113-121
- Redinbaugh MG, Campbell WH. (1991) Higher plant responses to environmental nitrate. Physiologia Plantarum 82:640-650
- Remans T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A. (2006) The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. Proc Natl Acad Sci U S A 103:19206-19211
- 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
- Roggatz U, McDonald AJS, Stadenberg I, Schurr U. (1999) Effects of nitrogen deprivation on cell division and expansion in leaves of Ricinus communis L. Plant, Cell & Environment 22:81-89
- Sakakibara H, Takei K, Hirose N. (2006) Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. Trends Plant Sci 11:440-448
- Samuelson ME, Larsson C. (1993) Nitrate regulation of zeatin riboside levels in barley roots: effects of inhibitors of N assimilation and comparison with ammonium. Plant Science 93:77-84
- Sattelmacher B, Marschner H. (1978) Nitrogen Nutrition and Cytokinin Activity in Solanum tuberosum. Physiologia Plantarum 42:185-189
- Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M, Stitt M. (1997) Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. Plant Cell 9:783-798
- Singh D, Srivastava H, Singh R. (1988) Nitrate assimilation in pea leaves in the presence of

- cadmium. *Water, Air, & Soil Pollution* 42:1-5
- Stewart V. (1994) Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66:37-45
- Stitt M. (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol* 2:178-186
- Sueyoshi K, Kleinhofs A, Warner RL. (1995) Expression of NADH-Specific and NAD(P)H-Bispecific Nitrate Reductase Genes in Response to Nitrate in Barley. *Plant Physiol* 107:1303-1311
- Tang P, Wu H. (1957) Adaptive Formation of Nitrate Reductase in Rice Seedlings. 179:1355-1356
- Taniguchi M, Kiba T, Sakakibara H, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T. (1998) Expression of Arabidopsis response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett* 429:259-262
- Urao T, Miyata S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2000) Possible His to Asp phosphorelay signaling in an Arabidopsis two-component system. *FEBS Lett* 478:227-232
- Vert G, Chory J. (2009) A toggle switch in plant nitrate uptake. *Cell* 138:1064-1066
- Vidal EA, Araus V, Lu C, Parry G, Green PJ, Coruzzi GM, Gutierrez RA. (2010) Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4477-4482
- Vidal EA, Gutierrez RA. (2008) A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis. *Curr Opin Plant Biol* 11:521-529
- Walch-Liu P, Liu LH, Remans T, Tester M, Forde BG. (2006) Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 47:1045-1057
- Walch-Liu P, Neumann G, Bangerth F, Engels C. (2000) Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *J Exp Bot* 51:227-237
- 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* 12:1491-1509
- Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM. (2003) Microarray analysis of the nitrate response in Arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol* 132:556-567
- Wang R, Tischner R, Gutierrez RA, Hoffman M, Xing X, Chen M, Coruzzi G, Crawford NM. (2004) Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of Arabidopsis. *Plant Physiol* 136:2512-2522
- Wang R, Xing X, Crawford N. (2007) Nitrite acts as a transcriptome signal at micromolar

concentrations in Arabidopsis roots. Plant Physiol 145:1735-1745

Zhang H, Forde BG. (1998) An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. Science 279:407-409

Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG. (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. Proc Natl Acad Sci U S A 96:6529-6534

研究论文

第一章 *NRT1.8* 基因克隆及其对 Cd^{2+} 抗性调控的分子机理研究

1 引言

土壤重金属污染不但会影响植物的生长发育, 进而影响农产品产量与品质, 而且可以通过食物链传递危害人类的生命健康(Salt, et al., 1998)。镉(Cadmium, Cd^{2+})被认为是环境中毒性和迁移性最强的重金属之一, 因此 Cd^{2+} 污染造成的危害也最大。研究 Cd^{2+} 转运及去毒化的分子机理对于植物修复和植物营养都有着重要的理论意义和应用价值。

硝酸根(NO_3^-)是陆生植物最重要的氮源。一般情况下, 植物吸收的 NO_3^- 进入根部后, 小部分会储存在液泡中或者在质体中进行同化, 大部分的 NO_3^- 则通过长途转运到植物的地上部位, 利用光合作用及碳代谢过程产生的能量、还原力和碳骨架进行同化, 因此具有能量进化优势, 成为大多数绿色植物普遍采用的一种氮同化机制(Smirnoff and Stewart, 1985)。在 Cd^{2+} 胁迫条件下, NO_3^- 的吸收同化受到严重抑制(di Toppi and Gabbriellini, 1999), 而且会促使更多的 NO_3^- 留在植物根部, 使得碳氮代谢解偶联(Hernandez, et al., 1997), 该现象对氮素利用以及 Cd^{2+} 胁迫调控的影响和生理学意义是什么? 其调控机制具体如何? 迄今尚缺乏这方面的具体研究和进展。

通过 Microarray 分析拟南芥 Cd^{2+} 胁迫条件下的转录组, 我们克隆到一个受 Cd^{2+} 强烈诱导的膜蛋白编码基因 *NRT1.8*。*NRT1.8* 属于 *NRT1/PTR* 基因家族, 是 NO_3^- 吸收同化途径中唯一受 Cd^{2+} 强烈诱导表达的基因, 预示该基因可能是氮营养与 Cd^{2+} 胁迫互作机制(Crosstalk)中的关键调控因子。*NRT1.8* 与 *NRT1* 家族中的 *NRT1.5* 同源性最高, 电生理分析表明该基因也编码一个 pH 依赖的低亲和力 NO_3^- 内向转运蛋白。深入的研究表明 *NRT1.8* 位于木质部薄壁细胞的细胞质膜, 基本功能是将木质部伤流液中的 NO_3^- 跨膜转运到木质部薄壁细胞, 从而实现 NO_3^- 的木质部卸载, 是 NO_3^- 由根向茎长途转运的关键调节步骤。在 Cd^{2+} 胁迫条件下, *NRT1.8* 在根部特异诱导表达导致更多的 NO_3^- 留存在根部, 重建 NO_3^- 的代谢, 并

实现植物对 Cd^{2+} 的分配和抗性调控。进一步的分析更发现 *NRT1.8* 介导的 NO_3^- 再分配可能在逆境耐性调控中作为一种普适机制存在。

2 材料和方法

2.1 植物材料

拟南芥野生型Ws、Col-0为本实验室所有, 突变体*nrt1.8-1*筛选自威斯康辛大学拟南芥基因敲除中心的ALPHA T-DNA 插入突变体库(Krysan et al., 1999), *nrt1.5-3*, *nrt1.5-4* T-DNA插入突变体订购于ABRC种子中心, 并由本实验室筛选鉴定而得。

2.2 菌种、质粒以及各种生化试剂

大肠杆菌(*E. coli*)菌株 DH5 α , 根癌农杆菌工程菌株 GV3101, 洋葱表皮细胞瞬时表达载体 pGreenII, 植物双元载体 pBI101-Hm2 等均由本实验室保存。pGEM®-T Easy Vector 载体, 限制性内切酶、反转录试剂盒、Taq 酶和连接酶购自 Promega 公司。RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司。PCR 引物均委托上海生物工程公司合成。MS 购自 PhytoTechnology Laboratories。肥料花无缺购自上海永通化工有限公司。

2.3 主要培养基

LB 培养基: 10 g 蛋白胨, 5 g 酵母浸膏, 10 g NaCl 溶于 1 L 的 Milli-Q(超纯水)水中, 使用 NaOH 调整 pH 值调为 7.0, 高压灭菌待用。

1/2MS 培养基: 2.2 g 固体 MS, 1 g MES, 0.8 g 蔗糖(根据目的添加与否), 溶于 1 L 的 Milli-Q(去离子)水中, 使用 KOH 调整 pH 值为 5.8, 高压灭菌待用。

1/4 Plant Nutrient Solution (PNS)液体培养基: 1 L 的 Milli-Q 水中依次加入以下浓度的母液, 使用 KOH 调整 pH 值为 5.8, 高压灭菌待用。

工作液配方

成份	体积/L
KNO_3	1.25 ml
KH_2PO_4	0.625 ml
MgSO_4	0.5 ml

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.5 ml
Fe-EDTA	0.625 ml
微量元素	0.25 ml

1) 母液-大量元素

成份	浓度
KNO_3	1 M
KH_2PO_4	1 M
MgSO_4	1 M
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1 M
Fe-Na-EDTA	0.02 M

2) 母液-微量元素

成份	浓度
H_3BO_3	70 mM
MnCl_2	14 mM
ZnSO_4	1 mM
NaMoO_4	0.2 mM
NaCl	10 mM
CoCl_2	0.01 mM
CuSO_4	0.5 mM

2.4 植物培养方法及条件

植物播种于3份蛭石、1/2份珍珠岩和2份黑土混合而成的人工土中。种植前，配置好的人工土在80℃的烘箱中烘2 h(小时)，然后混合1.2 g/L的花无缺营养液。水培植物培养液为1/4 X PNS，约4天换一次植物培养液。植物生长环境为相对湿度70%，恒温22-24℃，光照周期为16 h光照、8 h黑暗，光照强度80-200 $\mu\text{mol}/\text{M}^2/\text{S}$ 的人工气候室。

2.5 RNA 的提取

使用 Trizol 试剂提取 RNA，具体步骤如下：

- 1、将组织在液氮中研磨后，加入1 ml Trizol，混匀，室温放置5分钟(min)；
- 2、加入0.2 ml 氯仿，剧烈摇荡约15秒；
- 3、取上清，加0.5 ml异丙醇，室温放置10 min，12000 g离心10 min。
- 4、去上清，加入1 ml的75%乙醇，混匀，4℃下7500 g离心5 min。
- 5、小心弃去上清液，然后室温或真空干燥3~5 min，溶于DEPC水中待用。

2.6 RT-PCR

1.

{	总RNA	2~3 μg
	Oligo (dT ₁₈)	0.4 μg
	DEPC-treated H ₂ O	total 13 μl

75℃水浴5 min，冰上冷却；

2. 加入如下反应体系：

{	5×MMLV Buffer	5 μl
	dNTPs (25 mM)	5 μl
	RNase inhibitor (20-40 U)	1 μl
	MMLV-RT (200 U)	1 μl

3. 42℃水浴40 min，95℃水浴5 min，冰浴2 min，-20℃保存；
4. 将反转录得到的cDNA稀释2~5倍后作为待检测模板检验相关基因的表达。

2.7 质粒 DNA 的转化

2.7.1 感受态细胞的制备(CaCl_2 法)

- (1) 从LB平板上挑取新活化的DH5 α 单菌落，接种于3-5 ml LB液体培养基中，37℃下200-250 r/min振荡培养12 h左右，取1ml菌液接种于100 ml LB液体培养基中，37℃下200-250 r/min振荡培养2-3 h至OD₆₀₀为0.5左右；
- (2) 将培养液转入离心管中，冰上放置10 min，然后于4℃下3000 g离心10分钟；
- (3) 弃去上清，用预冷的0.05 mol/L的 CaCl_2 溶液10 ml轻轻悬浮细胞，冰上放

置 15-30 min 后, 4℃下 3000 g 离心 10 min;

(4) 弃去上清, 加入 4 ml 预冷含 15%甘油的 0.05 mol/L 的 CaCl_2 溶液, 轻轻悬浮细胞, 冰上放置 10 min, 分装成 200 μl /管, 贮存于-70℃。

2.8.2 质粒 DNA 的转化

(1) 感受态细胞置于冰上解冻, 加入质粒 DNA 溶液(浓度小于 50 ng, 体积小于 10 μl), 轻混, 冰上放置 30 min;

(2) 42℃水浴 90 秒(大肠杆菌)或 37℃水浴 5 min(农杆菌), 热击后迅速置于冰上冷却 3-5 min;

(3) 加入 1ml LB 液体培养基, 混匀后 37℃下 100 r/min 振荡培养 1 h;

(4) 菌液摇匀后取 100 μl 涂布于含抗生素的筛选平板上, 37℃培养 16-24 h。

2.9 农杆菌转化

2.9.1 根癌农杆菌感受态细胞的制备

(1) 挑取单菌落 GV3101 接种于 5 ml 含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 利福霉素的 YEB 液体培养基中, 28℃, 160~250 r/min 振荡过夜;

(2) 取 2 ml 菌液转入 50 ml LB 液体培养基中, 28℃, 160~250 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.3~0.4;

(3) 冰浴 30 min;

(4) 5000 rpm 离心 5 min, 去上清液;

(5) 加入 2 ml 20 mM 的 CaCl_2 重悬菌体;

(6) 制备好的感受态细胞 200 μl /管分装, 液氮中速冻后转入-70℃保存。

2.9.2 质粒转化农杆菌

(1) 取 2 μg 纯化的质粒 DNA, 加入 200 μl 感受态细胞中, 混匀; (

(2) 冰浴 5 min, 转入液氮冷冻 1 min, 迅速置 37℃水浴温育 5 min;

(3) 加入 800 μl YEB 液体培养基, 28℃, 100 r/min 预表达 4~5 h;

- (4) 将菌液均匀涂布于 YEB 固体选择培养基(含相应抗生素)平板中;
 (5) 28℃ 培养 1~2 天, 取单菌落扩繁后用碱法提取质粒, 进行限制酶切检测。

2.10 *NRT1.8* 启动子的克隆以及 *NRT1.8-pro-GUS* 表达载体的构建

根据TAIR上的*NRT1.8*基因组信息, 分别设计了两条扩增引物, 序列分别为:

proNRT1.8-L: 5'- TTAGATTGTTTCGATTCAGATTAGG-3'

ProNRT1.8-R: 5'- AGGATCCCATAGATTTCGATTGGTGTAGAGAT-3'

使用高保真的DNA聚合酶KOD-plus扩增启动子片段, 体系如下:

dd H ₂ O	25 μl
10×KOD Buffer	μl 5
2 mM dNTP	5 μl
25 mM MgSO ₄	4 μl
10 μM proNRT1.8-L	2.5 μl
10 μM proNRT1.8-R	2.5 μl
模板DNA	5 μl
1 u/μl KOD-plus	1 μl

PCR扩增条件为:

94℃, 3 min;

94℃, 1 min

58℃, 90 sec

68℃, 90 sec

} 35个循环

68℃, 10 min

PCR扩增后, 以1%的琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段, 连入pGEM®-T Easy Vector载体, 转化大肠杆菌, 挑取酶切、测序正确的质粒, 使用Hind III和BamH I双酶切, 电泳回收启动子片段, 然后把它连入含有融合GUS基因的pBI101-Hm2中, 构建*NRT1.8-pro-GUS*表达载体, 并使用冻融法转化农杆菌GV3101, 鉴定后待用。

2.11 转基因植物的获得

使用农杆菌介导的花序浸泡法把含有 *NRT1.8-pro-GUS* 的表达载体转入拟南芥野生型 Col-0 中(Clough and Bent, 1998)。转化后, 对收获的种子进行 Kan 抗性筛选, 在 T₂ 代进行黄色苗和绿色苗统计, 黄绿比为 3:1 的植株的种子单株收取,

在 T3 代进行黄色苗和绿色苗统计，全绿苗的植株即为单拷贝插入的 NRT1.8-pro-GUS 转基因苗。

2.12 GUS 染色分析

GUS 染色分析按照 Jefferson 等(1987)的方法进行。染色和切片具体步骤以及所用试剂如下：

1 固定和染色

1. 90%丙酮中置于冰上，用封口膜盖住，收集组织于瓶中；
2. 常温下预固定组织 20 min；
3. 在冰上用不含X-GLUC 的staining buffer 清洗材料；
4. 更换为预冷的含有X-GLUC溶液的染色buffer；
5. 在冰上浸透20 min以上，至组织沉到容器底部；
6. 37°C避光过夜；
7. 用浓度为20%，35%，50% 的乙醇在常温下30 min每个浓度依次脱水；
8. FAA固定30 min。

2 脱水

- A. 用浓度为 70%，80%，90%的乙醇在常温下依次脱水，30 min 每次，可低速摇动；
- B. 4°C，95%乙醇过夜；
- C. 用 100%的乙醇在常温下脱水 30 min 次，重复 2 次，可低速摇动。
- D. 25%X/75%E，50%X/50%E，75%X/25%E，100%X，100%X，100%X 常温下依次固定，每次 30 min，可低速摇动(X: Xylene , E: ethanol)。

3 包埋

- A. 用 50%的 Xylene 和 50%的石蜡 58°C 温育过夜；
- B. 更换石蜡 4-6 次，4-6 h 一次；
- C. 包埋组织，4°C 冷却半小时以上，修块后于 4°C 中保存。

4. 切片

烤片机温度设定为 42°C ，加水于载玻片上，组织切片厚度为 $7\text{--}8\ \mu\text{m}$ ，将切好的材料放到载玻片上，展片 $3\text{--}5\ \text{min}$ ，将水吸干，烤片机 42°C 上过夜。

5. 固定以及观察

A. 将带有组织的载玻片放入二甲苯 (Xylene) 中洗涤 $2\text{--}3$ 次， $10\ \text{min}$ 每次，低速摇动。用 100% 的乙醇后洗涤 2 次， $2\ \text{min}$ 每次，空气中干燥；

B. 加约 $30\ \mu\text{l}$ 的树脂，盖玻片封片，常温下让其在空气中干燥；

C. 在显微镜下观察切片。

溶液配置

Rinse 溶液

$0.2\ \%$ Triton X100

$50\ \text{mM}$ NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 缓冲液 $\text{pH}\ 7.2$ (配置方法见分子克隆指南)

$2\ \text{mM}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

$2\ \text{mM}$ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$

染色液

$0.2\ \%$ Triton X100

$50\ \text{mM}$ NaPO_4 $\text{pH}\ 7.2$

$2\ \text{mM}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

$2\ \text{mM}$ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$

$2\ \text{mM}$ X-Gluc(使用之前加入)

FAA

乙醇 50%

甲醛 3.7%

冰醋酸 5%

储备液

$100\ \text{mM}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

$100\ \text{mM}$ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$

100 mM	X-Gluc
500 mM	NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4
10%	Triton X100

2.13 原位杂交

拟南芥 Col-0 在 1/4 X PNS 平板上培养一周后,转移至完全没有 N 源的 1/4 X PNS 固体培养基中生长 3 天,在 0.2、2.2 和 6 mM KNO_3 的 1/4 X PNS 培养基上诱导 2 小时,取根作为原位杂交的材料。地高辛标记探针的合成以及原位杂交的具体方法参考(Long and Barton, 1998),脱水时间由 30 min 改到 5 min。长度为 390bp(983-1372)的 *NRT1.8* cDNA 作为杂交探针。

2.14: EGFP 融合蛋白表达载体的构建和*NRT1.8*亚细胞定位分析

扩增 *NRT1.8* 的 cDNA,将终止密码子突变,并引入 Kpn I 酶切位点,使其和 EGFP 融合,克隆入 p35S-pGreenII 载体中,构建融合蛋白表达载体 p35S-EGFP-pGreenII。用洋葱表皮细胞瞬时表达体系观察基因的亚细胞定位情况(PDS-1000/He; Bio-Rad),然后在共聚焦显微镜观察 EGFP 荧光的表达情况(Carl Zeiss; LSM 510 Meta)。转化拟南芥原生质体的提取以及 PEG 介导的质粒转化方法参考 Yoo 等(2007)。

2.15: *NRT1.8* 电生理分析

将 *NRT1.8* 克隆到 Oocyte 表达载体 pOO2 上(Ludewig, et al., 2002)并用 Mlu I 单酶切使质粒线性化。用 mMESSAGE-mMACHINE 试剂盒 (Ambion) 将线性化的质粒体外转录成 cRNA。爪蟾卵母细胞的提取和保存参考 Osawa 等(2006),并作以下调整:蛙卵取出后在酶解液中孵育 30~90 min,在当天或者第二天就可以注射 cRNA,注射量为 23~46 ng。注入 cRNA 后,把细胞置于含有抗生素的 N96 缓冲液中孵育 2 天,N96 配方如下(96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 , 5 mM HEPES, 2.5 mM sodium pyruvate, 100 mg/L streptomycin sulphate and 60 mg/L penicillin, pH 7.4)。使用膜片钳记录注入 cRNA 后蛙卵细胞产生的电流和

检测 *NRT1.8* 高低亲合力的实验方法参考 Huang 等(1999)。实验中使用稀释的硝酸作为 NO_3^- 的来源。

2.16 Northern 杂交和实时定量 PCR

拟南芥在 1/4 X PNS 液体培养基中培养四周, 然后使用不同浓度和时间的 Cd^{2+} 处理。茎和根、叶的总 RNA 使用 Trizol 试剂提取。Northern 杂交的探针使用 P^{32} 标记, 杂交的方法参考《分子克隆》。X-ray 光片放射自显影参考 Kodak 使用说明。RNA 的反转录与前面一样, PCR 反应在 PerkinElmer GeneAmp 9700 上进行。PCR 产物在 1% 的 Agra 上分离, 并使用 EB 染色观察基因表达情况。实时定量 PCR 在 Corbett Research 公司的 Rotor-Gene 3000 thermal cycler 上进行, 使用 SYBR Premix Ex-Taq (TaKaRa) 进行 PCR 反应, 反应程序参考说明书。

2.17 突变体 Cd^{2+} 敏感性分析

Ws 以及突变体 *nrt1.8-1* 以及互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8* 在 1/4 X PNS 固体培养基上生长 4-5 天至主根长度为 2 cm 左右, 然后分别挑取生长状态较一致的苗转移至含有不同浓度的 Cd^{2+} 和 NO_3^- 组合的 1/4 X PNS 固体培养基上去, 并标记移苗后根系的位置。放置人工气候箱继续培养 7-10 天, 统计在移苗后 3 种株系的主根伸长长度, 并拍照, 分析植物的生长情况。

2.18 突变体 Cd^{2+} 含量分析

Ws 以及突变体 *nrt1.8-1* 以及互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8* 在 1/4 X PNS 液体培养基中生长 4 周, 然后使用含有 20 μM Cd^{2+} 的 1/4 X PNS 液体培养基处理 3 天, 分别取茎和根, 用 Milli-Q 水和 25 mM CaCl_2 (pH4-5) 分别清洗 2 次, 每次 4 min, 80°C 烘过夜, 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)分析茎和根中的 Cd^{2+} 含量(Gong, et al., 2003)。

2.19 NO_3^- 含量的测定

Ws、突变体 *nrt1.8-1* 以及互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8* 在 1/4 X PNS 液体培养基中生长 4 周, 然后转移至含有 20 μM Cd^{2+} 的 1/4 X PNS 液体培养基中处理 3 天,

分别取它们的茎和根, 用 Milli-Q 水清洗 3 次, 每次 4 min。根据每份待测样品的鲜重, 按照每 30 $\mu\text{l}/\text{mg}$ 的比例, 加入 Milli-Q 水, 置于 100°C 的水浴锅中煮 20 min, 置于液氮中速冻, 放于 -80°C 冰箱中过夜。材料解冻后, 13200 rpm 离心 5 min, 吸取 100 μl 上清稀释至 1 ml, 使用有 22 μM 滤膜的过滤器过滤样品, 并使用 HPLC (Agilent 1200 series, PARTISIL 10 strong anion exchanger column (Whatman)) 测量 NO_3^- 浓度 (Chiu, et al., 2004)。

2.20 拟南芥木质部伤流液的收集以及离子含量检测

拟南芥在 $1/4 \times \text{PNS}$ 液体培养基中培养 4 周后, 然后使用 5 μM 的 Cd^{2+} 处理 3 天, 除去莲座叶, 并用刀片在莲座叶上方 1-2 cm 处割断主茎, 把植物置于密封环境保持湿度, 取 2 小时内的木质部伤流液 (Sunarpi, et al., 2005), 稀释 40 倍后使用前面的方法测量其中的 NO_3^- 或 Cd^{2+} 的浓度。

3 结果与分析

3.1 *NRT1.8* 基因的克隆

通过基因芯片技术比较 Col-0 在 Cd^{2+} 处理前后拟南芥转录组表达变化。结果找到一个预测为编码膜蛋白的基因, 该基因在所有膜蛋白编码基因中受 Cd^{2+} 诱导最强烈 (附件 1), Blast 分析显示该基因属于 NRT1 家族, 之前的研究结果显示该基因家族的功能主要是介导 NO_3^- 或者寡肽分子的吸收或者转运, 因此也称为 PTR (peptide transporters) 家族。

拟南芥中 NRT1 家族有 53 个成员。对 NRT1 家族进行进化树分析表明, 该基因和一个已知功能的基因 *NRT1.5* 同源性最高, 蛋白质一致性达到了 64% (图 1-A)。*NRT1.5* 是一个低亲和力的 NO_3^- 转运蛋白, 在 NO_3^- 从地下部分向地上部分的长途转运中发挥了重要功能。另外, 处于同一家族的 NRT1.6 和 NRT1.7 的功能也相继被报道, 因此我们把该基因命名为 *NRT1.8*。

鉴于 *NRT1.8* 与 *NRT1.5* 同源性最高, 我们首先测试了 *NRT1.8* 是否也受 NO_3^- 诱导。结果显示, 随着 NO_3^- 浓度的增加, *NRT1.8* 的表达强度显著增强 (图 1-B), 这

种对 NO_3^- 的响应模式与 *NRT1* 家族中 *CHL1*, *NRT1.5*, *NRT1.6*, *NRT1.7* 都比较相似。初步推测 *NRT1.8* 很有可能也是一个低亲合力的 NO_3^- 转运蛋白。

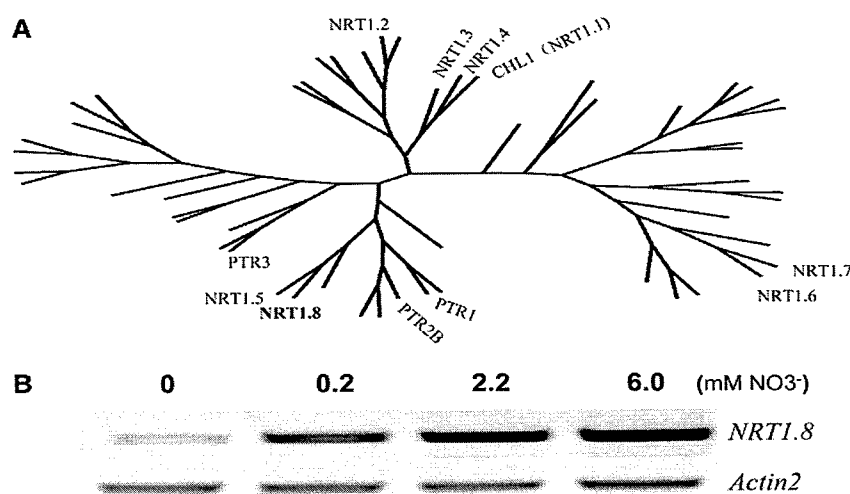


图1: *NRT1.8* 同源基因序列进化树构建以及在不同 NO_3^- 诱导下表达情况。

(A): *NRT1* 家族的 53 个基因参考(Tsay, et al., 2007), 从 TAIR 网站下载它们的蛋白质序列, 然后使用 ClustalX 1.83(Thompson, et al., 1997)进行序列比对(protein gap open penalty, 10; protein gap extension penalty, 0.2; delaydivergent sequences, 30%; use negativematrix, off; protein weight matrix, Gonnet series); 利用比对结果, 并使用 PhyloDraw(Choi, et al., 2000)构建系统进化树;

(B): RT-PCR分析*NRT1.8*基因在不同浓度 NO_3^- 诱导下的表达情况, 使用*Actin2*为内参, 分别使用20和30个循环PCR扩增*Actin2*和*NRT1.8*。

3.2 *NRT1.8* 亚细胞定位分析

根据MIPS上的EST数据库信息, 克隆出*NRT1.8*的全长CDS。该基因含有1770个碱基, 编码589个氨基酸。跨膜结构域预测软件TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)分析显示, *NRT1.8*基因有12个跨膜域。该预测结果与*NRT1*家族中的其它基因完全一致, 都是典型的膜转运蛋白结构(Tsay, et al., 2007)。但是具体是定位在细胞质膜, 还是其它内膜上, 还需要进一步实验证明。因此, 构建了35S:*NRT1.8*:EGFP/pGreenII的融合蛋白表达载体, 通过基因枪转化的方法在洋葱表皮细胞中进行了该载体的瞬时表达。结果显示, 在质壁分离后的洋葱表皮细胞膜上有非常明显的绿色荧光信号(图2-A, B), 而其

对照载体中, 荧光信号在细胞质、细胞核和细胞质膜上都有明显表达(图2-C, D)。为了进一步确认这一定位结果, 把上述融合蛋白载体在拟南芥原生质体中进行了瞬时表达。结果显示细胞质膜上有明显的荧光信号。综合以上结果, 可以确认NRT1.8是的一个典型的, 定位于细胞质膜的转运蛋白。

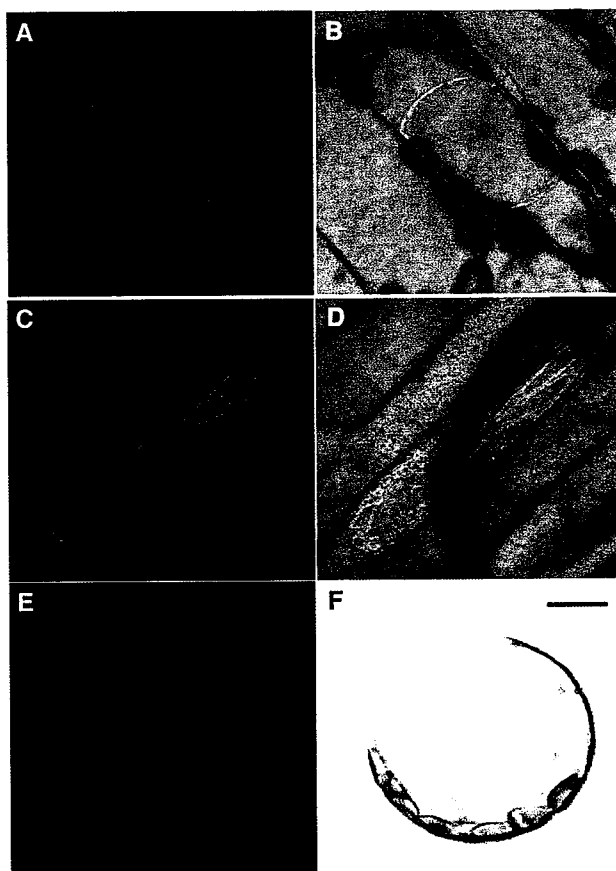


图 2: *NRT1.8* 的亚细胞定位分析。

(A) : 融合蛋白载体 *35S::NRT1.8::EGFP* 在黑背景下洋葱表皮细胞中的荧光。

(B) : 融合蛋白载体 *35S::NRT1.8::EGFP* 在白背景下洋葱表皮细胞中的荧光。

(C) : 对照载体 *35S::EGFP* 在黑背景下洋葱表皮细胞中的荧光

(D) : 对照载体 *35S::EGFP* 在白背景下洋葱表皮细胞中的荧光。

(E) : 融合蛋白表达载体 *35S::NRT1.8::EGFP* 在黑暗视野下, 其在拟南芥原生质体中的荧光表达情况。

(F) : 融合蛋白表达载体 *35S::NRT1.8::EGFP* 在亮视野下的图像。

Bars = 20 μM 。

3.3 *NRT1.8* 转运的底物特性分析

前面的研究结果表明NRT1.8是一个定位于细胞质膜上的转运蛋白, 但鉴于该家族基因可以编码 NO_3^- 或者寡肽转运蛋白, 例如(GSH)和螯合肽(PCs)等, 因此需要确认其转运底物。之前的研究结果显示, NRT1.5 与NRT1.8的同源性最高, NRT1.5是一个已知的低亲和力的 NO_3^- 转运蛋白(Lin, et al., 2008), 而NRT1.8也受高浓度的 NO_3^- 强烈诱导, 因此推测NRT1.8也很可能是一个低亲和力的 NO_3^- 转运蛋白。

电生理分析发现, 在没有注射(对照)NRT1.8 cRNA的细胞中, 外源 NO_3^- 诱导的电流很弱(图3-A), 而在注射了NRT1.8 cRNA的细胞中, 诱导的电流平均为-420 mA, 显著高于对照条件下的-20 mA(图3-B)。这一结果表明NRT1.8是一个 NO_3^-

转运蛋白。

为了进一步明确 *NRT1.8* 的电生理学特性, 我们分别检测了爪蟾卵母细胞在 $250\ \mu\text{M}$ 和 $10\ \text{mM}$ 浓度 HNO_3 缓冲液中的 NO_3^- 吸收。结果显示在 $250\ \mu\text{M}$ 的缓冲液中, 注射了 *NRT1.8* cRNA 的细胞中积累的 NO_3^- 与对照(注射水)相比, 并没有发生显著的变化; 而在 $10\ \text{mM}$ HNO_3 缓冲液中, 注射了 cRNA 的细胞中 NO_3^- 的浓度显著高于对照细胞中的浓度(图3-C)。该结果表明 *NRT1.8* 调控低亲和力的 NO_3^- 转运。

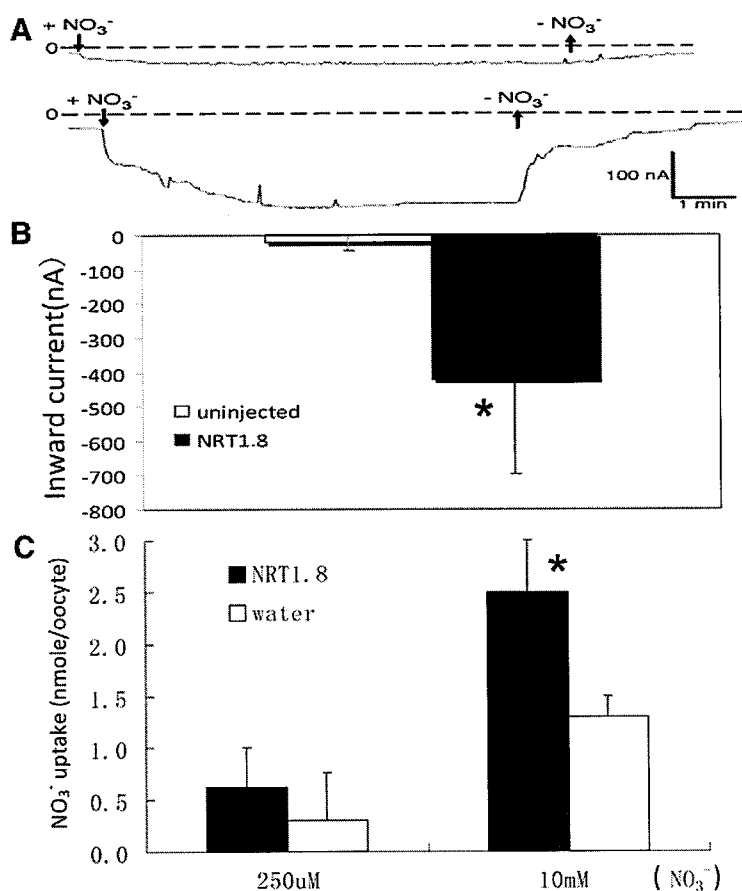


图 3. *NRT1.8* 是一个 NO_3^- 转运蛋白。

(A): 爪蟾卵母细胞在对照(未注射)和注射 *NRT1.8* cRNA, 在 pH 5.5 和电压 -40 mV 下的诱导电流情况。

(B): 对照和注射 *NRT1.8* cRNA 的爪蟾卵母细胞在 pH 5.5, $10\ \text{mM}$ 的 NO_3^- 的缓冲液中的电流诱导情况。

(C): 对照和注射 *NRT1.8* cRNA 的爪蟾卵母细胞在 $250\ \mu\text{M}$ 和 $10\ \text{mM}$ NO_3^- 缓冲液中的吸收 NO_3^- 能力分析。

前人的研究结果显示, *NRT1*家族中已知的 NO_3^- 转运蛋白在吸收 NO_3^- 过程中需要与质子偶联。为了验证*NRT1.8*是否也有相同的吸收机制, 我们分别检测了上述细胞在pH为5.5和7.4的缓冲液中的诱导电流和 NO_3^- 吸收情况。结果显示, 在pH为5.5情况下, 注射了*NRT1.8* cRNA的细胞中诱导电流强度显著高于pH为7.4的缓冲液中检测到的电流(图4-A), 其吸收 NO_3^- 的能力也显著高于后者(图4-B); 而未注射*NRT1.8* cRNA的细胞在2种pH情况下, 其诱导电流和吸收 NO_3^- 都没有显著差异(图4-A, B)。这些结果表明*NRT1.8*在转运底物过程中, 是与质子转运相偶联的, 具有典型的低亲和力 NO_3^- 转运蛋白的电生理学特征。

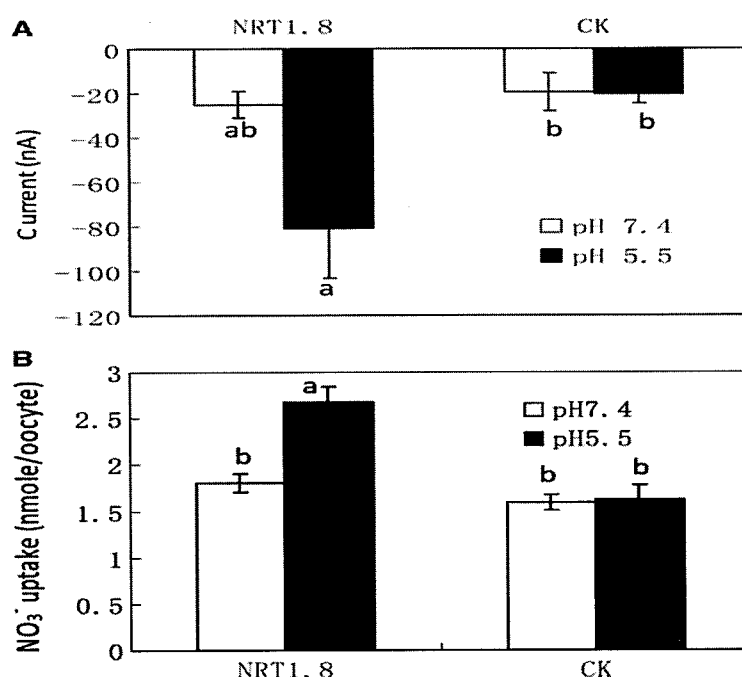


图4: *NRT1.8*转运 NO_3^- 为pH依赖的。

(A): 注射了*NRT1.8* cRNA和未注射的卵母细胞 (CK)在-20 mV电压下, 在pH为5.5和7.4, 含有5 mM HNO_3 的buffer中的电流诱导情况。每个统计有三次重复, 每次重复中使用4个卵母细胞。在注射了*NRT1.8*的细胞中, pH为5.5处理下产生的诱导电流在统计上的高于pH为7.4处理下产生的诱导电流, $P < 0.06$ 。

(B): 注射了*NRT1.8* cRNA和未注射的卵母细胞 (CK)在pH为5.5和7.4, 含有5 mM HNO_3 的buffer中孵卵3 h, 然后使用HPLC测量卵母细胞中的平均 NO_3^- 含量。n = 10, 每个重复中含有4个卵母细胞, 在注射了*NRT1.8*的细胞中, pH为5.5处理下吸收 NO_3^- 的能力显著高于pH为7.4处理下吸收 NO_3^- 的能力, $P < 0.001$ 。

NRT1.8 属于 *NRT1/PTR* 家族, 该家族中有些基因可以转运寡肽, 而该基因又受 Cd^{2+} 强烈诱导表达, 并且 Cd^{2+} 的常见螯合物 GSH 和 PCs 皆属于寡肽。为了进一步确认 *NRT1.8* 是否可以转运除 NO_3^- 之外的其它底物, 尤其是 Cd^{2+} 的螯合物 GSH 和 PCs, 以确定 *NRT1.8* 在 NO_3^- 与 Cd^{2+} 互作机理中的联系, 我们分析了 *NRT1.8* 的底物特异性。结果显示 GSH 并不能有效诱导注有 *NRT1.8* cRNA 的蛙卵细胞产生电流 (5-A, 下以及 5-B), 而 NO_3^- 可以显著的诱导电流的产生。在没有注射 cRNA 的细胞中, 二者皆不能诱导电流 (图 5-A, 上以及 5-B)。这些结果表明 *NRT1.8* 并不能转运 GSH, 也不可能诱导比 GSH 还大得多的 PCs。

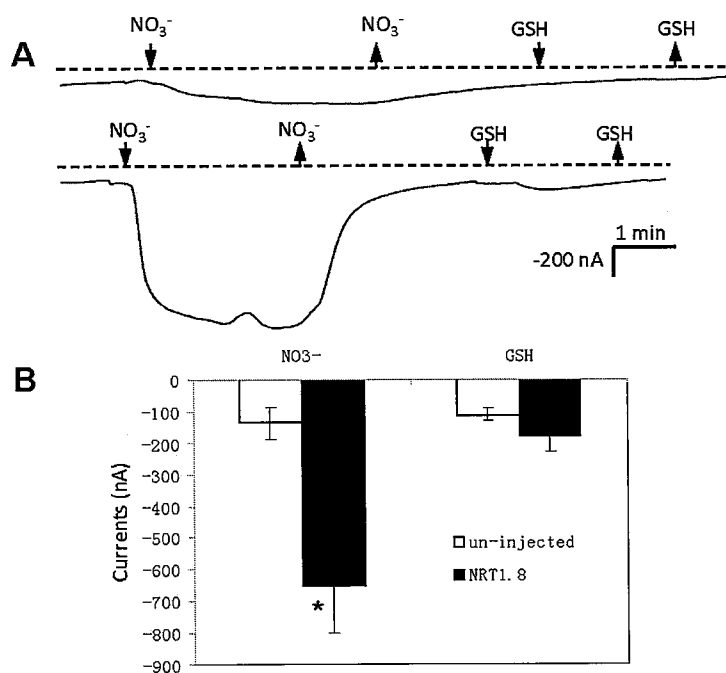


图5: *NRT1.8* 的底物转运特异性分析。

(A): 注射 *NRT1.8* cRNA 的爪蟾卵母细胞在使用 NO_3^- 和 GSH 吸收底物的诱导电流情况。

(B): 注射 *NRT1.8* cRNA 的爪蟾卵母细胞在使用 NO_3^- 和 GSH 吸收底物的诱导电流大小比较。

3.4 *NRT1.8* 基因的表达模式分析

为了明确 *NRT1.8* 基因的表达的时空特异性, 构建了 *NRT1.8p:GUS/pBI101-Hm2* 双元植物载体, 通过农杆菌介导的方法转入拟南芥野生型 Col-0 中, 以此来分析 *NRT1.8* 基因在拟南芥中的表达模式。GUS 染色的结

果表明, *NRT1.8* 基因主要在拟南芥的维管系统表达(图 6-A); 对幼苗的根部进行横切, 发现 *NRT1.8* 在中柱细胞中表达强烈(图 6-B); 纵切分析更清晰表明 *NRT1.8* 主要在木质部周围的薄壁细胞中表达(图 6-C, D)。这些结果预示 *NRT1.8* 很有可能在围绕木质部卸载或者装载的长途转运中发挥了功能。此外, 考虑到 GUS 组化分析经常发生由于渗漏导致的假阳性结果, 我们使用原位杂交对 *NRT1.8* 的表达作了进一步分析, 结果与 GUS 组化分析一致, 表明 *NRT1.8* 主要在木质部周围的薄壁细胞表达(图 6-E), 负对照中没有检测到任何杂交信号 (图 6-F)。这些结果的吻合表明我们 GUS 组化分析的精确度并证实了 *NRT1.8* 的表达部位。

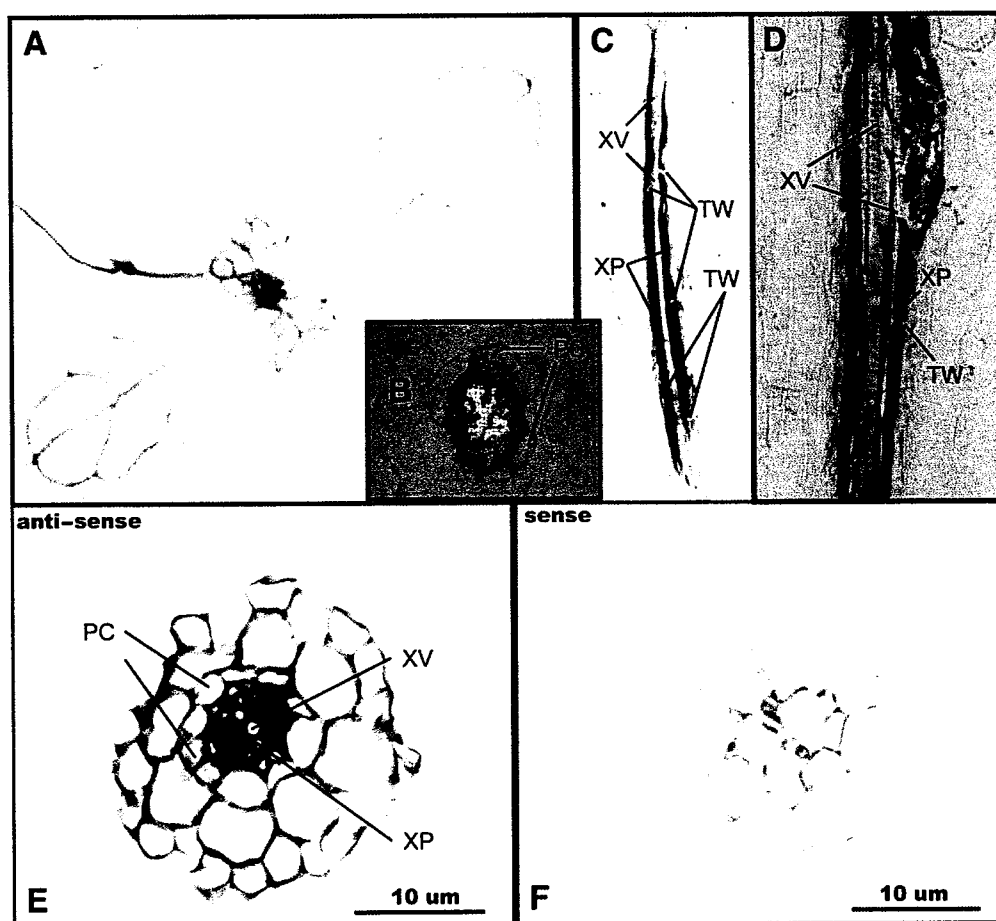


图6: *NRT1.8*的组织特异性表达分析。

(A) 到(D): *NRT1.8* 基因启动子在 *NRT1.8p:GUS* 转基因苗中的表达情况。

(A): 整株幼苗的GUS表达情况。

(B): 根部横切GUS表达情况。

(C) 和 (D): 幼苗根部纵切GUS的表达情况。

(E): 原位杂交使用反义探针时, *NRT1.8*在根部的表达情况。

(F): 原位杂交使用正义探针时的杂交信号。

PC, 中柱细胞; XV, 木质部; XP, 木质部薄壁组织; TW, 横向细胞壁。

3.5 *NRT1.8* 调控 NO_3^- 从木质部的卸载

通过前面一系列的分析, 明确了*NRT1.8*主要在木质部周围的薄壁细胞质膜上表达, 并且调控低亲和力的 NO_3^- 内向转运, 由此可以推测其作用应该是调控 NO_3^- 从木质部卸载。为了检验这个假设, 我们检测了*NRT1.8*的T-DNA插入突变体*nrt1.8-1*伤流液中 NO_3^- 的浓度, 结果显示, 其浓度显著高于对照野生型Ws(图7)。该结果表明,*NRT1.8*在从木质部中卸载 NO_3^- 到其周围的薄壁细胞过程中发挥了重要作用。

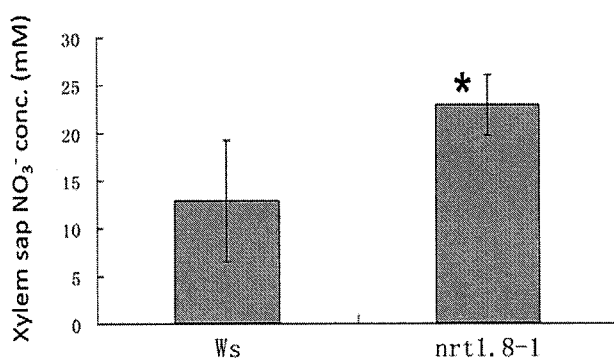


图7: Ws和突变体*nrt1.8-1*木质部伤流液中 NO_3^- 的含量分析。

3.6 *NRT1.8* 突变体的鉴定和表型初步观察

通过筛选威斯康辛大学的拟南芥突变体库, 我们获得了一个纯和的*NRT1.8*功能缺失突变体*nrt1.8-1* (图8-B), 该T-DNA插入到*NRT1.8*基因的第三个外显子上(图8-A), 导致了基因编码框的提前终止。

把*nrt1.8-1*和其野生型对照Ws种于人工气候室中, 我们发现除了突变体莲座叶叶片卷曲(图8-C), 抽薹时间提前3天左右, 除此外没有其它明显的可见表型, 突变体可以完成整个生命周期。

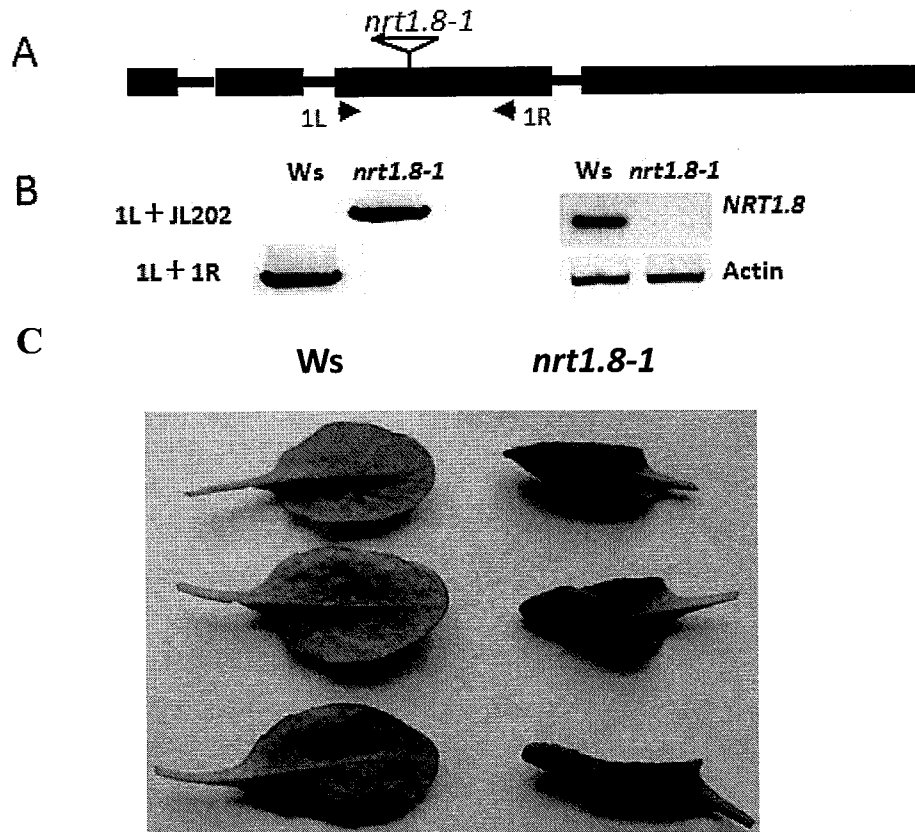


图8: *NRT1.8* 的结构和突变体的鉴定。

(A): *NRT1.8* 的基因结构以及突变体的插入位点。

(B): *NRT1.8* 突变体的PCR鉴定。

(C): *Ws* 和 *nrt1.8-1* 的莲座叶表型观察。

3.7 *NRT1.8* 在 Cd^{2+} 胁迫处理下的诱导表达情况

Microarray 分析显示 *NRT1.8* 受 Cd^{2+} 强烈诱导。为了验证并进一步细化 *NRT1.8* 受 Cd^{2+} 诱导表达的特征, 我们通过 Northern 杂交和 qRT-PCR 对 *NRT1.8* 在不同 Cd^{2+} 浓度和时间, 以及茎和根中的表达进行了深入分析。如(图 9)所示, 在没有 Cd^{2+} 处理或者 $40 \mu\text{M}$ 低浓度 Cd^{2+} 处理 6 h 的情况下, 根中几乎检测不到 *NRT1.8* 的表达; 但增加处理时间至 54 h, $40 \mu\text{M}$ 低浓度 Cd^{2+} 可以显著诱导 *NRT1.8* 的表达。而 $200 \mu\text{M}$ 高浓度 Cd^{2+} 在 6 h 即可显著诱导 *NRT1.8* 的表达。在茎中, *NRT1.8* 则表现出一个较低的组成型表达模式, 长时间(54 h)的 $40 \mu\text{M}$ 低浓度 Cd^{2+} 处理能够较明显诱导 *NRT1.8* 的表达, 而高浓度短时间($200 \mu\text{M}/6 \text{ h}$)处理对 *NRT1.8* 的表达没有明显影响, 估计是由于短时间处理中 Cd^{2+} 不能有效到达植物的地上部分。

进一步通过 qRT-PCR 的定量分析则表明, 正常情况下根中 *NRT1.8* mRNA 的表达水平只为 *Actin2* 的 7% 左右; 但是在使用 $20\ \mu\text{M}$ Cd^{2+} 处理后, 其表达水平随着处理时间的延长而显著增加, 处理 3 d 后, *NRT1.8* mRNA 的表达水平达到了 *Actin2* 的 13 倍左右(图 9-C)。与 Northern 结果类似, 使用 $200\ \mu\text{M}$ 高浓度 Cd^{2+} 处理, 在 6 h 内即可显著诱导 *NRT1.8* 的表达。在茎中, $20\ \mu\text{M}$ Cd^{2+} 处理 72 h 后, *NRT1.8* 的表达受到显著诱导, 但诱导强度显著低于根中。

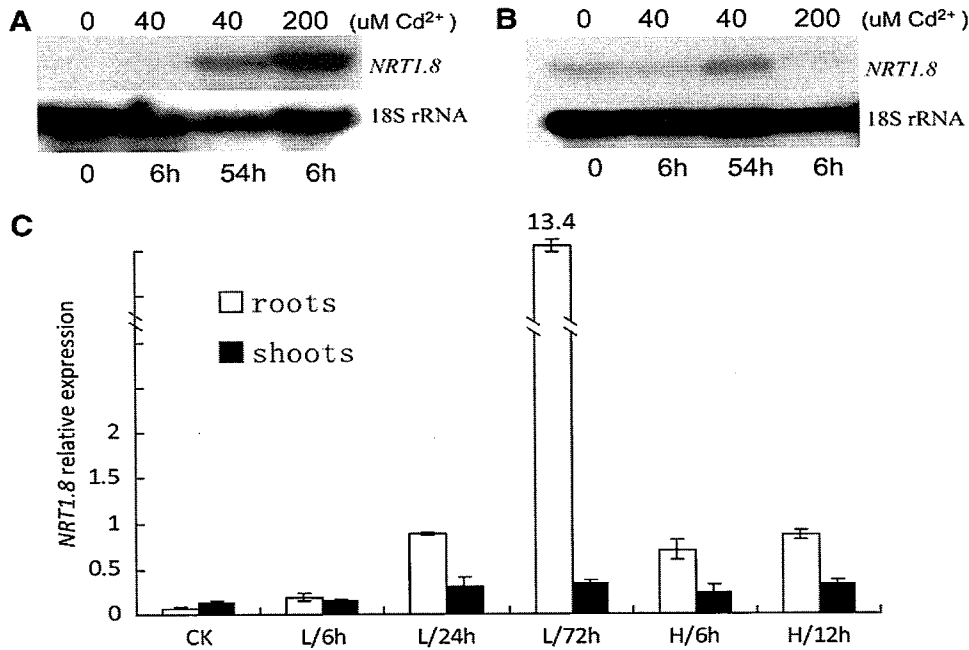


图 9: *NRT1.8* 在 Cd^{2+} 胁迫处理下的诱导表达情况。

(A)和 (B): Northern 杂交分析 *NRT1.8* 在不同 Cd^{2+} 浓度以及时间处理下的, 在根(roots, A)和茎(shoots, B)中的诱导表达情况, 使用 18S rRNA 作为对照。

(C): Real-Time PCR 分析 *NRT1.8* 在根(roots)和茎(shoots)中, 在不同 Cd^{2+} 浓度和处理时间下的诱导表达情况, 使用 *Actin2* 作为内参, *NRT1.8* 的表达水平被均一化到 *Actin2* 的表达量的倍数, 三次生物学重复, 表达值为 mean $\pm$ SD。

3.8 *NRT1.8* 突变体抗 Cd^{2+} 表型分析

前面的研究结果表明, *NRT1.8* 可以受 Cd^{2+} 强烈诱导, 但 *NRT1.8* 是一个 NO_3^- 转运蛋白。为了分析 *NRT1.8* 在 NO_3^- 与 Cd^{2+} 互作过程中可能的作用, 我们分析了 *nrt1.8-1* 突变体及其互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8* 在对照和含有 Cd^{2+} 的固体平板上的

生长情况。在正常(1/4 X PNS)固体培养基平板上, 它们的生长没有明显差别(图 10-A); 如果在培养基中加入 $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$, *Ws* 和 *NRT1.8/nrt1.8* 的根长稍大于 *nrt1.8-1*(图 10-B); 因为 *NRT1.8* 是一个低亲和力的 NO_3^- 转运蛋白, 我们尝试了不同的 NO_3^- 与 Cd^{2+} 浓度组合, 当在培养基中同时加入 25 mM NO_3^- 和 $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ 时, *Ws* 和 *NRT1.8/nrt1.8* 对 Cd^{2+} 的抗性显著高于 *nrt1.8-1*, *nrt1.8-1* 的根伸长值显著低于 *Ws* 和 *NRT1.8/nrt1.8* ($p < 0.001$), 地上部分则没有表现出显著的差异(图 10-C)。而单独用 25 mM NO_3^- 进行处理时, *Ws*、*NRT1.8/nrt1.8* 和 *nrt1.8-1* 之间的根伸长也没有明显差异(图 10-D, $p > 0.05$), 预示 *nrt1.8-1* 的表型是由于 NO_3^- 和 Cd^{2+} 的共同作用造成。

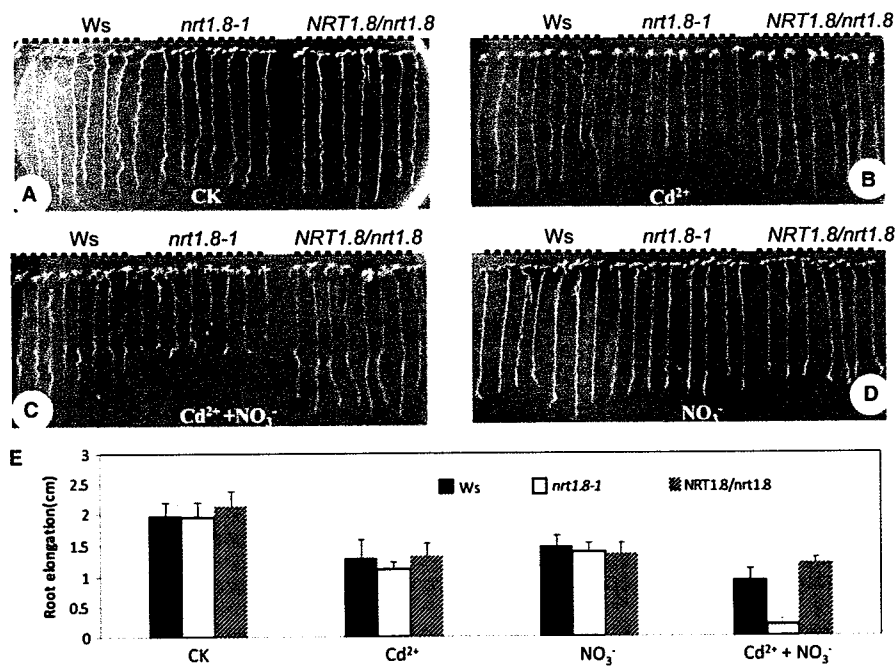


图 10: *NRT1.8* 突变体 Cd^{2+} 敏感性分析。

(A)-(D): *Ws* 和 *nrt1.8-1* 以及其 *NRT1.8/nrt1.8* 在正常 1/4X PNS 固体培养基平板培养条件(A)、或加入 $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ (B)、 25 mM NO_3^- 加 $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ (C)、或者 25 mM NO_3^- (D)下的生长观察以及 Cd^{2+} 抗性表型鉴定。

(E): *Ws* 和 *nrt1.8-1* 以及 *NRT1.8/nrt1.8* 在转移至对应(A)到(D)的处理条件下, 2 至 10 天后它们的根伸长长度统计。每个处理统计 7~8 颗苗, 纵坐标的值为平均值 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。

3.9 *NRT1.8* 基因调控 Cd^{2+} 在植物体内的分配

为了分析 *NRT1.8* 基因调节植物对 Cd^{2+} 抗性的原因, 我们检测了 *nrt1.8-1* 和

Ws, 以及 *NRT1.8/nrt1.8* 在 Cd^{2+} 胁迫下, Cd^{2+} 在它们茎和根中的分布情况。结果显示, 在茎中, *nrt1.8-1* 中 Cd^{2+} 的浓度显著高于 Ws 以及 *NRT1.8/nrt1.8*; 但是在根中则相反, Ws 以及 *NRT1.8/nrt1.8* 中 Cd^{2+} 的浓度显著高于 *nrt1.8-1* (图 11-A)。此外, 对 Ws、*NRT1.8/nrt1.8* 以及 *nrt1.8-1* 在 Cd^{2+} 胁迫下木质部伤流液中的 Cd^{2+} 浓度做了检测。结果显示 *nrt1.8-1* 伤流液中 Cd^{2+} 的含量显著高于野生型 Ws 和互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8* (图 11-B)。

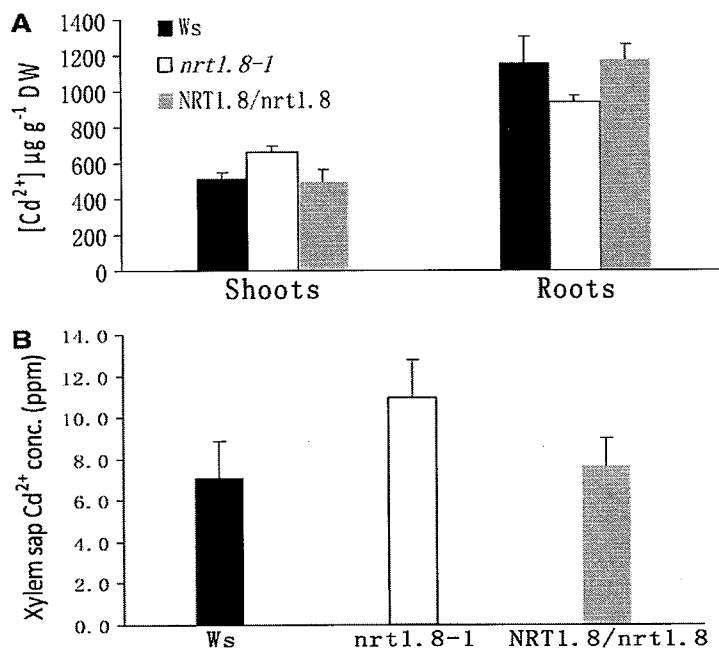


图 11: 植物中 Cd^{2+} 含量分析。

(A): Ws, *nrt1.8-1* 以及 *NRT1.8/nrt1.8* 在 Cd^{2+} 胁迫下, 茎(shoots)和根(Roots)中 Cd^{2+} 含量分析。

每个处理重复 3 次, Cd^{2+} 浓度为 $\text{mean} \pm \text{SD}$;

(B): Ws, *nrt1.8-1* 以及互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8* 在 Cd^{2+} 胁迫下, 木质部伤流液中 Cd^{2+} 含量分析。每个处理重复 3 次, Cd^{2+} 浓度为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。

3.10 *NRT1.8* 调控 Cd^{2+} 胁迫下 NO_3^- 在植物体内的分配

为了分析 *NRT1.8* 转运蛋白如何影响植物对 Cd^{2+} 的敏感性以及 Cd^{2+} 在植物体内的分布, 我们检测了 Ws 和 *nrt1.8-1* 以及其互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8* 在正常情况以及 Cd^{2+} 处理下, 根和茎中 NO_3^- 浓度的变化情况。结果显示, 在正常情况下(图 12-A), 三者在茎(shoots)和根(roots)中的绝对含量没有显著差异, 而且其对应的

根/茎比值分别是 0.38、0.37、0.36; Cd^{2+} 处理后, 它们在茎和根中的 NO_3^- 含量都显著降低, 而且有意思的是, 根/茎比值发生了显著而有差别的变化, *nrt1.8-1* 在 Cd^{2+} 处理后, 其比值与未处理的情况下相比显著降低($p < 0.05$), 而 *Ws* 和互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8* 则在处理后显著增加, 从未处理之前的 0.38 和 0.36 分别增加到 Cd^{2+} 处理后的 0.51 和 0.44($p < 0.05$) (图 12-B)。这个结果说明在 Cd^{2+} 胁迫下, *NRT1.8* 发挥了功能使得 *Ws* 的在根中分配了更多了 NO_3^- , 从而增强了 *Ws* 对 Cd^{2+} 的抗性。

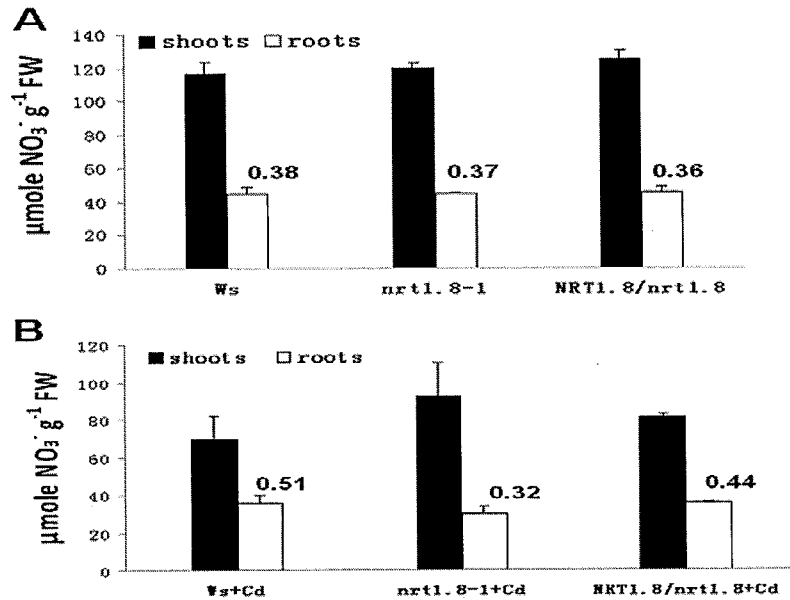


图 12: 突变体中 NO_3^- 分布情况。

(A)和(B): *Ws*, *nrt1.8-1* 以及互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8* 在正常条件下(A)和 Cd^{2+} 胁迫下(B), 茎(shoots)和根(roots)中的 NO_3^- 含量。每个处理重复三次, NO_3^- 浓度使用鲜重均一化, 为平均值 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。白色柱子上的数值表示根/茎的 NO_3^- 浓度比值。

3.11 *NRT1.5* 在 Cd^{2+} 胁迫下的表达情况分析

进化树分析显示 *NRT1.5* 与 *NRT1.8* 遗传距离最近(图 1-A), 而且二者的功能分别涉及到 NO_3^- 的木质部装载与卸载, Microarray 分析更表明 Cd^{2+} 胁迫在诱导 *NRT1.8* 的同时, 显著降低 *NRT1.5* 的表达。为了进一步分析它们在 Cd^{2+} 胁迫中可能的互作, 我们对 *NRT1.5* 在 Cd^{2+} 胁迫下的表达进行了分析。结果显示, 在正常情况下, *NRT1.5* 在根(roots)中的表达很高, 但是在叶(Leaves)和茎(Stems)中基

本检测不到表达(图 13-A), 在 $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$ 处理 6 h 后, *NRT1.5* 在根中的表达显著降低; 在叶和茎(Stems)中依然检测不到 *NRT1.5* 的表达。另外, 我们用不同的 Cd^{2+} 处理浓度和时间, 分析了 *NRT1.5* 在这些处理下, 在茎和根中的表达。结果显示(图 13-B), 在 $20 \mu\text{M Cd}^{2+}$ 低浓度处理下, 随着处理时间增加, *NRT1.5* 在根中的表达逐渐降低; 在 $200 \mu\text{M Cd}^{2+}$ 高浓度处理下, *NRT1.5* 的表达则显著降低到低于对照的水平。在茎中的表达变化则由于偏差较大而没有显著的变化, 估计是由于基因表达量太低导致。有意思的是, 通过分析数据库(<http://www.genevestigator.com>)的基因表达信息, 我们发现 *NRT1.5* 和 *NRT1.8* 在盐害、渗透胁迫、冷害、真菌病害等多种胁迫下, 它们的表达都呈现类似的反向调控关系(图 13-C)。

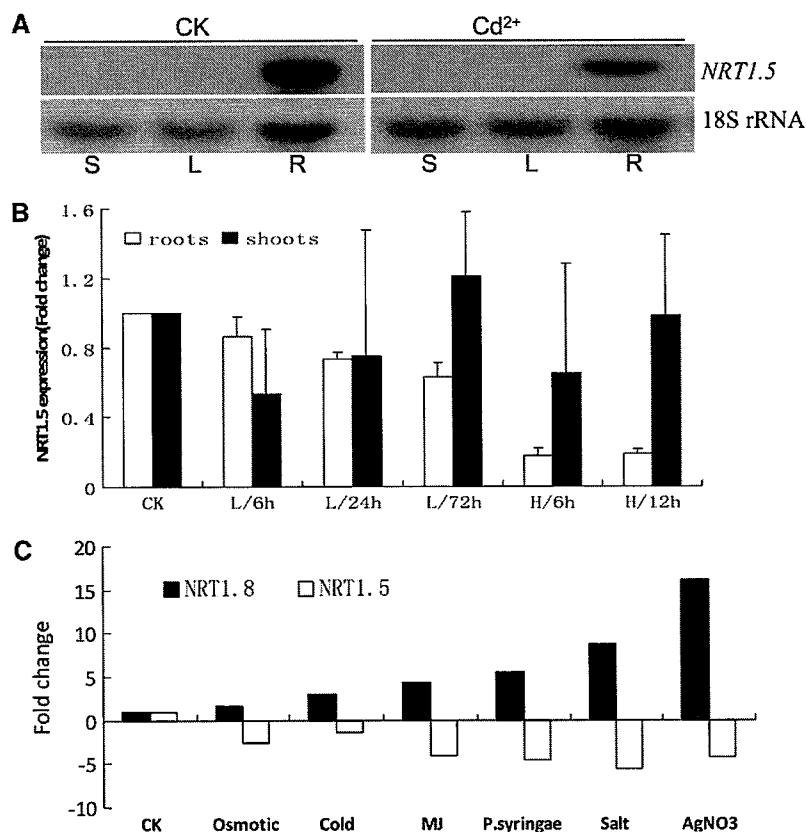


图 13: *NRT1.5* 在 Cd^{2+} 胁迫下的诱导情况。

(A): Northern 杂交分析 Col-0 在对照(CK)以及 Cd^{2+} 胁迫下, *NRT1.5* 在 S(茎), L(叶)以及 R(根)中的表达情况, 使用 18S rRNA 作为内参。

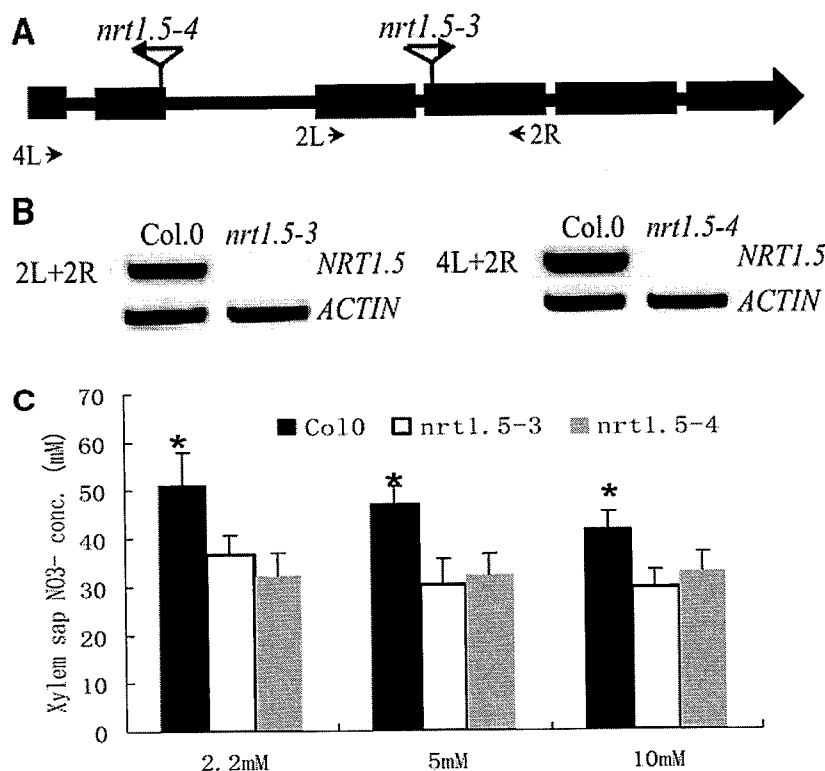
(B): qRT-PCR 分析 Col-0 在不同浓度和时间 Cd^{2+} 胁迫下, *NRT1.5* 在茎(shoots)和根(roots)中的表达情况。

(C): *NRT1.5* 和 *NRT1.8* 在不同逆境诱导下的表达情况(www.genevestigator.com)。

3.12 *NRT1.5* 突变体的 Cd^{2+} 敏感性分析

为了进一步弄清 *NRT1.8* 和 *NRT1.5* 在响应 Cd^{2+} 胁迫下行使的生理功能, 我们筛选获得了 *NRT1.5* 的两个功能缺失 T-DNA 纯和突变体 *nrt1.5-3*, *nrt1.5-4* (图 14-A, B), 并分析了其伤流液中的 NO_3^- 含量以及这两个突变体的 Cd^{2+} 敏感表型。

首先, 我们检测了不同浓度 NO_3^- 诱导下 2 个突变体木质部伤流液中的 NO_3^- 含量。结果显示, *nrt1.5-3* 和 *nrt1.5-4* 木质部伤流液中的含量都显著低于 Col-0 (图 14-C), 这个结果证实了前人关于 *NRT1.5* 基因的研究结果 (Lin, et al., 2008), 并提供了直接的实验证据表明 *NRT1.5* 确实负责木质部的 NO_3^- 装载。其次, 对 *NRT1.5* 突变体的 Cd^{2+} 耐性表型鉴定表明: 在对照条件下, 突变体和野生型的生长情况没有显著区别; 但是随着平板中 Cd^{2+} 浓度的增加, 突变体 *nrt1.5-3* 和 *nrt1.5-4* 的长势逐渐好于对照 Col-0。在 $50 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 平板上生长时, Col-0 的主根长度显著低于两个突变体 *nrt1.5-3* 和 *nrt1.5-4* (图 14-D, E) ($p < 0.01$), 这个结果表明 *NRT1.5* 功能缺失导致植物对 Cd^{2+} 的抗性增强, 进一步支持 *NRT1.8* 在 Cd^{2+} 耐性调控机制中的作用机理: 通过将 NO_3^- 留存在根部增强植物对 Cd^{2+} 的抗性。



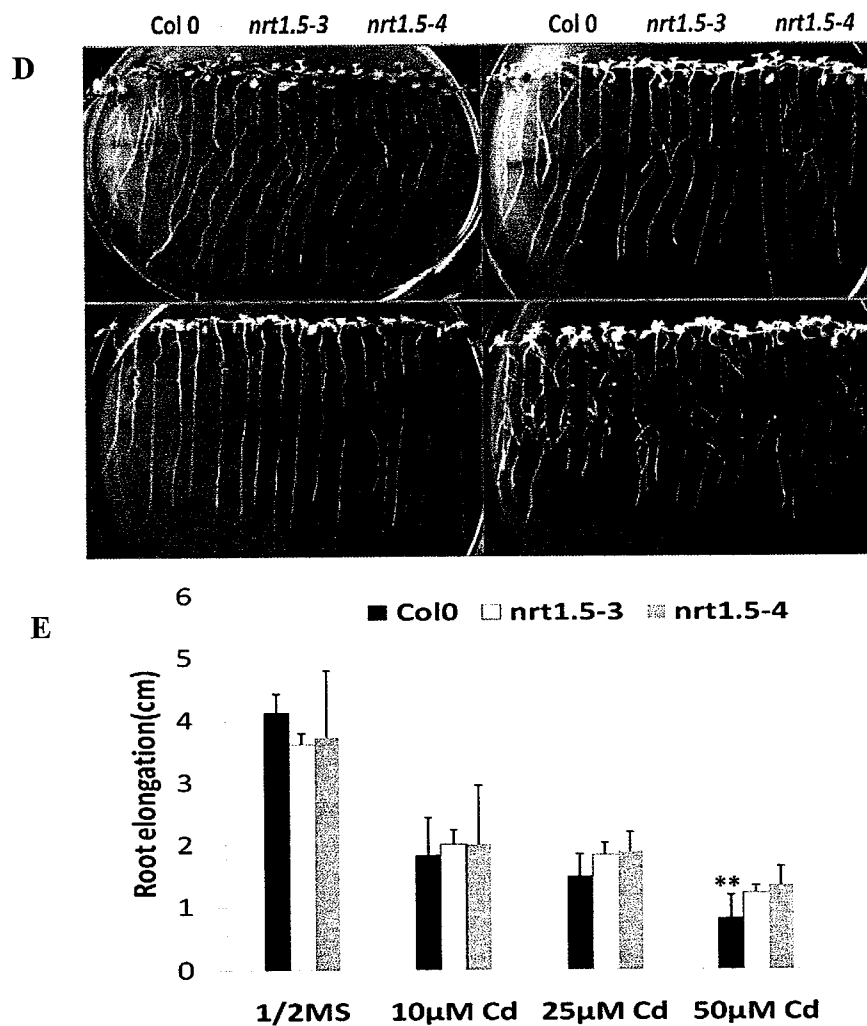


图 14 : *NRT1.5* 突变体 Cd^{2+} 敏感性分析。

- (A): *NRT1.5* 的基因结构和两个突变体 *nrt1.5-3*、*nrt1.5-4* 的 *T-DNA* 插入位点。
- (B): *nrt1.5-3*、*nrt1.5-4* 突变体的表达鉴定。
- (C): *nrt1.5-3*、*nrt1.5-4* 突变体和对照 Col-0 在不同 NO_3^- 诱导下, 木质部伤流液中 NO_3^- 含量分析。
- (D): *nrt1.5-3*、*nrt1.5-4* 突变体和对照 Col-0 在正常 1/2MS 固体平板培养条件、或加入 $10 \mu\text{M Cd}^{2+}$ 、 $25 \mu\text{M Cd}^{2+}$ 、 $50 \mu\text{M Cd}^{2+}$ 下的生长的 Cd^{2+} 抗性表型鉴定。
- (E): Col-0 和 *nrt1.5-3*、*nrt1.5-4* 在转移至对应 (D) 的处理条件下, 7~10 天后植物的根伸长分析。每个处理统计 6 颗苗, 纵坐标的值为平均值 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。

3.13 *NRT1.8* 影响 NO_3^- 代谢

基于 *NRT1.8* 和 *NRT1.5* 的功能分析表明 NO_3^- 再分配到根部能增强植物对 Cd^{2+} 的抗性并调节 Cd^{2+} 在植物体内的分配。为了探索其中的调节机理, 我们分析了氮代谢过程中几个主要代表性基因在 *NRT1.8* 过表达突变体中的表达情况。主要代表性基因包括 *NIA1*(编码硝酸根还原酶)、*NIR*(编码亚硝酸根还原酶), *GSR1*(编码细胞质 GS), 以及主要负责 NO_3^- 吸收的 *CHL1/NRT1.1* 基因。结果表明: 在正常培养 4 周的拟南芥叶(Leaf)和根(Root)中, 几乎检测不到 *NRT1.8* 的表达, 这与前面的 GUS 组化分析以及网上公布的芯片结果基本一致, 但在过表达突变体 OE-1 和 OE-18 中, 其在叶和根中都有明显的表达, 证明上述 2 个突变体的确是 *NRT1.8* 的过表达突变体(图 15A, B)。值得注意的是, 过表达突变体中在 *NIA1*、*NIR*、*GSR1* 的表达呈现组成型表达模式, 显著区别于野生型 Col-0 中的低表达(图 15C, D); 尤为有意思的是, 在 Cd^{2+} 胁迫处理时, 这些标志基因在根中的表达并没有随着 Cd^{2+} 胁迫而出现特别显著的下调, 在根中更是如此(图 15E, F)。这些结果预示 *NRT1.8* 的过量表达有助于维持氮代谢过程关键基因在 Cd^{2+} 胁迫条件下的表达量。

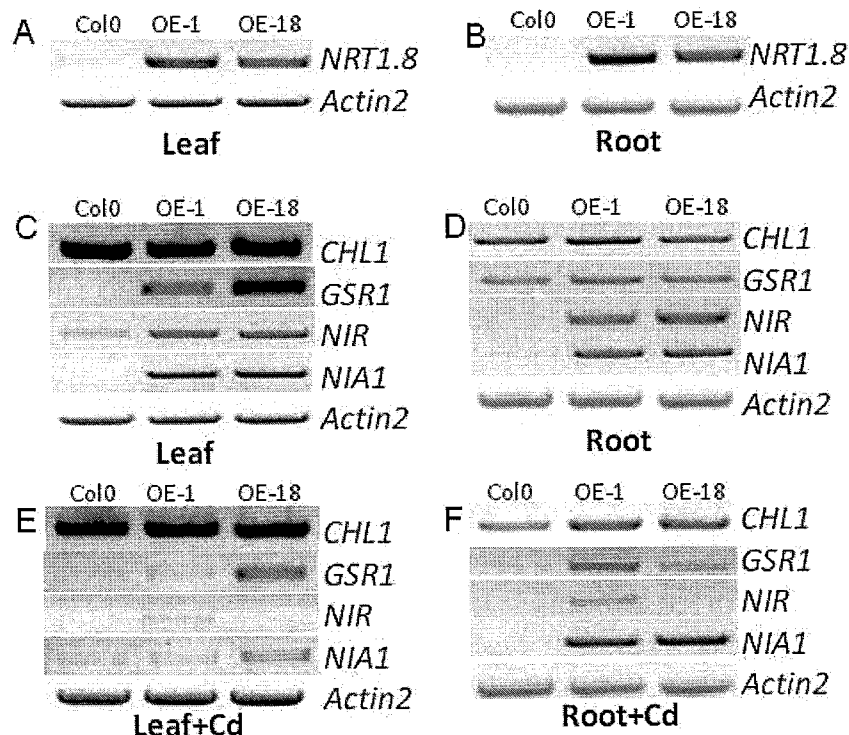


图 15: 氮代谢主要基因在过表达突变体中的表达情况。

(A): *NRT1.8* 在叶中, 在 Col-0, OE-1, OE-18 正常生长情况下的表达情况;

(B): *NRT1.8* 在根中, 在 Col-0, OE-1, OE-18 正常生长情况下的表达情况;

(C)和(D): *NIA1*、*NIR*、*GSRI*、*CHL1* 基因在正常培养时, 叶和根中的表达情况;

(E)和(F): *NIA1*、*NIR*、*GSRI*、*CHL1* 基因在 $20 \mu\text{M}$ Cd^{2+} 处理 3 d 后, 在叶和根中的表达情况, *Actin2* 作为内参。

4 讨论

重金属 Cd^{2+} 的去毒和耐性机理研究对于植物修复具有重要的意义, 因为理想的修复植物需要在地上部位积累大量的 Cd^{2+} , 而地上部位是植物光合作用和重要矿质元素氮同化等重要生理活动进行的主要场所。我们的研究建立了 Cd^{2+} 耐性与 NO_3^- 再分配之间的分子联系, 对于植物修复的应用和提高氮素利用效率都具有指导和借鉴意义。

通过基因芯片分析从拟南芥基因组中克隆到一个受重金属 Cd^{2+} 强烈诱导的基因 *NRT1.8/POT1*(附件 1), Blast 分析显示 *NRT1.8* 基因属于 NRT1 家族, 该家族一共有 53 个基因, 其中一部分编码转运寡肽的转运蛋白 (Tsai, et al., 2007), 因此也称为 PTR 或者 POT 家族。鉴于 Cd^{2+} 螯合物谷胱甘肽(GSH)和植物螯合肽(Phytochelatins, PCs)都是寡肽, 而先前的研究表明 PCs 在 Cd^{2+} 长途转运和去毒化机理中扮演着至关重要的作用(Gong et al., 2003), 我们最初推测 *NRT1.8* 可能是调控 PCs:Cd 复合物在地下合地上部位间分配的转运蛋白基因。电生理实验表明 *NRT1.8* 是一个低亲和力 NO_3^- 转运蛋白(图 3, 4, 5)。这个结果与我们的期望不一样, 分析有二种可能造成这种结果, 一是 Cd^{2+} 对于植物是一种非必须元素, 而且植物受到 Cd^{2+} 污染也只有近 200 年的历史。因此, 植物的基因组中还没有进化出 Cd^{2+} 特异的转运蛋白; 另外一种可能是, 我们芯片中使用的 Cd^{2+} 浓度太高($200 \mu\text{M}$), 自然界中很少存在如此高浓度的 Cd^{2+} 污染情况。如果植物中存在特异的 Cd^{2+} 转运蛋白, 但只受到低浓度的 Cd^{2+} 诱导, 使用我们的条件也没有办法把它们筛选出来。

NRT1.8 作为一个 NO_3^- 转运蛋白, 却受到 Cd^{2+} 的强烈诱导, 这其中的生理联系是什么? 通过对 *Ws* 和 *nrt1.8-1* 的 Cd^{2+} 敏感性进行了分析, 我们发现 *Ws* 对 Cd^{2+} 的抗性显著高于 *nrt1.8-1*, 而且只有在培养基中有高浓度 NO_3^- 的时候, 这种表型才最显著(图 10)。另外, 在 Cd^{2+} 胁迫下, *nrt1.8-1* 在地上部分积累更多的 Cd^{2+} (图

11)与之相对应的是, 突变体根部中 NO_3^- 的分配比例也显著低于对照 Ws(图 12)。为什么 NO_3^- 含量高的地方其 Cd^{2+} 含量也高? 这是一个非常有趣的现象。之前有报道指出, 受 Cd^{2+} 胁迫的芥菜木质部伤流液中, Cd^{2+} 主要是以与含氮的化合物形成配体的形式存在的(Salt, et al., 1995)。而且有些特殊的含氮化合物, 比如 GSH、PCs 等被发现在维管植物中可以与 Cd^{2+} 形成复合物(Gong, et al., 2003; Chen, et al., 2006; Li, et al., 2006; Mendoza-Cozatl, et al., 2008)。因此我们推测, NO_3^- 或者来自 NO_3^- 代谢产生的含氮分子可能影响 Cd^{2+} 在植物体内的分配, 以此来调节植物对 Cd^{2+} 的抗性。为了确认我们的推测, 进一步的研究可以通过代谢组学方法, 分析 Ws 和 *nrt1.8-1* 在正常培养和 Cd^{2+} 处理条件下, 根部、茎和伤流液中的各种有机(氨基酸, 蛋白质, 寡肽, 多肽等等)或者无机化合物的含量以及处理前后的变化, 以此来阐明 *NRT1.8* 是如何通过调控 NO_3^- 的分配以及相关代谢途径来影响植物对 Cd^{2+} 的抗性。

另一个有趣的现象是, 位于同一基因家族中、与 *NRT1.8* 的同源性最高的 *NRT1.5*, 在 Cd^{2+} 胁迫下的表达模式与 *NRT1.8* 完全相反, Cd^{2+} 处理可以显著抑制 *NRT1.5* 的表达水平(图 13)。而且, *NRT1.5* 突变体对 Cd^{2+} 的抗性更强(图 14)。*NRT1.5* 主要功能是把中柱鞘中的 NO_3^- 装载到木质部中, 然后被运送到地上部分。*NRT1.5* 突变后, 木质部中的 NO_3^- 含量显著降低(图 14), 因此突变体在根部可以积累更多的 NO_3^- (Lin, et al., 2008)。而 *NRT1.8* 主要在木质部周围的薄壁细胞中表达较强(图 2), 其主要功能是把木质部中的 NO_3^- 卸载到周围的薄壁细胞, 增加 NO_3^- 在植物地下的分配。除了在 Cd^{2+} 胁迫下, *NRT1.5* 和 *NRT1.8* 呈现相反的表达模式外, 在其它很多逆境下, 比如盐胁迫、低温以及真菌胁迫下也有类似的拮抗作用(图 13)。因此, 我们推测, 植物在逆境胁迫下, *NRT1.5* 和 *NRT1.8* 共同作用, 增加 NO_3^- 在植物根中分配, 以此来增强对逆境的抗性。之前 Hernandez 等(1997)的研究也表明, 豌豆在 Cd^{2+} 胁迫下, 会往根部分配更多的 NO_3^- 。作者对这一现象的解释是, Cd^{2+} 胁迫可以降低植物的蒸腾作用, 所以导致了更少的 NO_3^- 被转运到地上部分。我们的研究则表明, 除了蒸腾作用的因素外, Cd^{2+} 胁迫下 *NRT1.8* 的增强表达可能在促使更多的 NO_3^- 留在根部发挥了重要作用。因为在 Cd^{2+} 胁迫下, Ws 的根部可以保持较高的 NO_3^- 分配比例, 而突变体则不能保持较高的 NO_3^- 分配比例。另外, 在所有已知的氮代谢基因中, *NRT1.8* 是唯一受 Cd^{2+} 胁迫显著诱导

上调的基因(附表 1), 也表明了 *NRT1.8* 在植物响应 Cd^{2+} 胁迫过程中, 可能发挥了重要作用。

综合以上结果, 我们认为 *NRT1.8* 可能是调控植物逆境下的 NO_3^- 再分配的重要作用因子, 在植物对 Cd^{2+} 的抗性中发挥了重要作用。深入的研究应该分析 *nrt1.8-1* 在其它逆境情况下, 是否也有类似的表型和 NO_3^- 分配变化情况, 以此来进一步证明我们的观点。

参考文献

- Chen A, Komives EA, Schroeder JI. 2006. An improved grafting technique for mature Arabidopsis plants demonstrates long-distance shoot-to-root transport of phytochelatin in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 141(1): 108-120.
- Chiu CC, Lin CS, Hsia AP, Su RC, Lin HL, Tsay YF. 2004. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. *Plant Cell Physiol.* 45(9): 1139-1148.
- Choi JH, Jung HY, Kim HS, Cho HG. 2000. PhyloDraw: a phylogenetic tree drawing system. *Bioinformatics.* 16(11): 1056-1058.
- Clough SJ, Bent AF. 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16(6): 735-743.
- Forde BG. 2002. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu Rev Plant Biol.* 53: 203-224.
- Gong JM, Lee DA, Schroeder JI. 2003. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(17): 10118-10123.
- Hernandez LE, Garate A, CarpenaRuiz R. 1997. Effects of cadmium on the uptake, distribution and assimilation of nitrate in Pisum sativum. *Plant and Soil.* 189(1): 97-106.
- Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF. 1999. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell.* 11(8): 1381-1392.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6(13): 3901-3907.

- Krouk G, Crawford NM, Coruzzi GM, Tsay YF. 2010. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Curr Opin Plant Biol.* 13(3): 266-273.
- Krysan, P., Young, J., and Sussman, M. (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 11: 2283–2290.
- Li JY, Fu YL, Pike SM, et al. 2010. The *Arabidopsis* nitrate transporter *NRT1.8* functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell.* 22(5): 1633-1646.
- Li Y, Dankher OP, Carreira L, Smith AP, Meagher RB. 2006. The shoot-specific expression of gamma-glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. *Plant Physiol.* 141(1): 288-298.
- Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, et al.. 2008. Mutation of the *Arabidopsis* *NRT1.5* nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell.* 20(9): 2514-2528.
- Long JA, Barton MK. 1998. The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development.* 125(16): 3027-3035.
- Ludewig U, von WN, Frommer WB. 2002. Uniport of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter *LeAMT1;1*. *J Biol Chem.* 277(16): 13548-13555.
- Mendoza-Cozatl DG, Butko E, Springer F, et al.. 2008. Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J.* 54(2): 249-259.
- Osawa H, Stacey G, Gassmann W. 2006. *ScOPT1* and *AtOPT4* function as proton-coupled oligopeptide transporters with broad but distinct substrate specificities. *Biochem J.* 393(Pt 1): 267-275.
- Roenneberg T, Rehman J. 1996. Nitrate, a nonphotic signal for the circadian system. *FASEB J.* 10(12): 1443-1447.
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I. 1995. Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol.* 109(4): 1427-1433.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998. PHYTOREMEDIATION. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 49: 643-668.
- Sanita D, Gabbrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and*

Experimental Botany. 41(2): 105-130.

Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Muller-Rober B, Caboche M, Stitt M. 1997. Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. Plant Cell. 9(5): 783-798.

Smirnoff N, Stewart GR. 1985. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. Physiologia Plantarum. 64(2): 133-140.

Sunarpi, Horie T, Motoda J, et al.. 2005. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. Plant J. 44(6): 928-938.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25(24): 4876-4882.

Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK. 2007. Nitrate transporters and peptide transporters. FEBS Lett. 581(12): 2290-2300.

Yoo SD, Cho YH, Sheen J. 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. Nat Protoc. 2(7): 1565-1572.

第二章 硝酸根再分配调控耐盐的分子机理研究

1 引言

本实验室前期克隆并功能鉴定了一个受重金属 Cd^{2+} 强烈诱导的基因 *NRT1.8*, 该基因编码一个 NO_3^- 转运蛋白, 主要功能是在 Cd^{2+} 胁迫下, 与 *NRT1.5* 协同调控 NO_3^- 在植物地上和地下的分配, 以此调节植物对 Cd^{2+} 的抗性(Li, et al., 2010)。鉴于 *NRT1.8* 与 *NRT1.5* 在多种逆境条件下表现出与 Cd^{2+} 胁迫类似的表达调控特征, 我们想知道 *NRT1.8* 是否也影响植物对其它逆境的抗性, 是否也是通过类似的 NO_3^- 再分配机制来调控植物逆境响应。

研究表明 *NRT1.8* 除了受 Cd^{2+} 强烈诱导外, 盐胁迫对 *NRT1.8* 的诱导表达尤为显著, 而且在已知的 NO_3^- 转运蛋白编码基因中, *NRT1.8* 是唯一强烈受盐胁迫上调表达的基因; 表型分析表明 *nrt1.8-1* 突变体对盐胁迫的耐性显著低于野生型; 盐胁迫条件下 NO_3^- 的分配也表现出与 Cd^{2+} 胁迫时类似的规律。这些结果表明 *NRT1.8* 通过调节 NO_3^- 再分配在实现植物耐逆(耐盐、耐镉)过程中作为一种通用机制而存在。

2 材料和方法

2.1 植物材料

见第一章。

2.2 主要的生化试剂

见第一章。

2.3 基因芯片分析盐胁迫处理下 *NRT1* 家族中已知编码 NO_3^- 转运蛋白基因的表达情况

进入网站 <http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>, 在 Select experiment 中选择 AtGE Abiostress; 在 Select normalization 中选择绝对值; 在 Select gene 中输入 AGI 号, 可以同时输入多个基因, 中间用英文逗号隔开(如 At4g21680, At1g32450); 然后点击“run”按钮, 得到基因在不同胁迫情况下的表

达情况,通过比较它们在对照(非处理)和盐处理后的信号值,计算得出基因在盐胁迫下的诱导表达情况。

2.4 抗盐表型分析

对于 Ws、*nrt1.8-1* 以及 Col-0, OE-1, OE-18 的抗盐比较与第二章分析植物抗 Cd^{2+} 的方法基本相同,不同的是把培养基中的 Cd^{2+} 换成对应的 Na^+ 。对于 Col-0, *nrt1.5-3*, *nrt1.5-4* 的抗盐分析,首先把植物播种于 1/2MS 固体培养基上生长 4~5 天至主根长度为 2 cm 左右,然后挑取生长状态较一致的幼苗转移至含有不同浓度的 Na^+ 的 1/2MS 固体培养基中,并标记移苗后根系的位置。继续培养 7-10 天,统计移苗后, Col-0, *nrt1.5-3*, *nrt1.5-4* 的主根伸长长度,拍照并统计分析根系伸长情况。

2.5 莲座叶的失水率分析

突变体和野生型在 1/4 X PNS 中水培 4 周后,挑取生长良好的植物,转移至同一个培养盒中,分 2 组,对照组不使用高盐处理,处理组使用含有 200 mM Na^+ 的 1/4 X PNS 培养基处理 24 h,拍照后,分别称取对照组和处理组的莲座叶的重量。根据对照组的和处理组的平均莲座叶重量来计数失水率,失水率%=(处理前的平均重量-处理后的平均重量)*100%/处理前的平均重量,重复三次。

2.6 植物体内 Na^+ 含量分析

Ws 以及突变体 *nrt1.8-1* 以及互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8* 在 1/4 X PNS 液体培养基中生长 4 周,用含 50 mM Na^+ 的 1/4 X PNS 液体培养基处理 3 d,分别取茎(shoots)和根(roots),使用 Milli-Q 水清洗 3 次,每次 4 min, 80℃过夜,ICP-MS 分析茎和根中的 Na^+ 含量。

2.7 木质部伤流液的提取以及硝酸根的测量

见第一章。

3 结果与分析

3.1 盐胁迫可以显著诱导 *NRT1.8* 的表达

前面的研究结果显示 *NRT1.8* 受到 Cd^{2+} 强烈诱导, 为了确认 *NRT1.8* 除了受 Cd^{2+} 诱导之外, 是否还受到其它逆境条件的诱导, 对已公开芯片表达数据进行分析。发现 *NRT1.8* 可以受到多种逆境的诱导, 其中尤其受高盐胁迫的诱导较强, 而且在已知的 8 个 *NRT1* 家族中的 NO_3^- 转运蛋白中, *NRT1.8* 是唯一能够被高浓度 Na^+ 强烈诱导上调的基因, 而 *NRT1.5* 是在盐胁迫下唯一显著下调的基因(图 1-A)。为了进一步验证芯片结果, 使用 RT-PCR 检验了 *NRT1.8* 在 150 mM Na^+ 浓度下处理 3~12 h 下, 在根中的表达情况。结果显示, 随着处理时间的延长, *NRT1.8* 的表达水平也显著增加(图 1-B), *NRT1.5* 则随着处理时间的增加, 表达量显著降低。另外也通过 Real-time PCR 检验了 *NRT1.8* 在不同 Na^+ 浓度以及不同时间诱导下, 在根(root)和叶片(leaf)中的表达情况。结果显示, 50 mM Na^+ 都可以诱导 *NRT1.8* 在根中的表达, 而且随着处理时间的延长, 基因表达量逐渐增强, 4 d 后, *NRT1.8* 的表达水平可以提高 20 倍以上; 盐胁迫也可以诱导叶片中 *NRT1.8* 的表达, 但是诱导水平较低(图 1-C)。

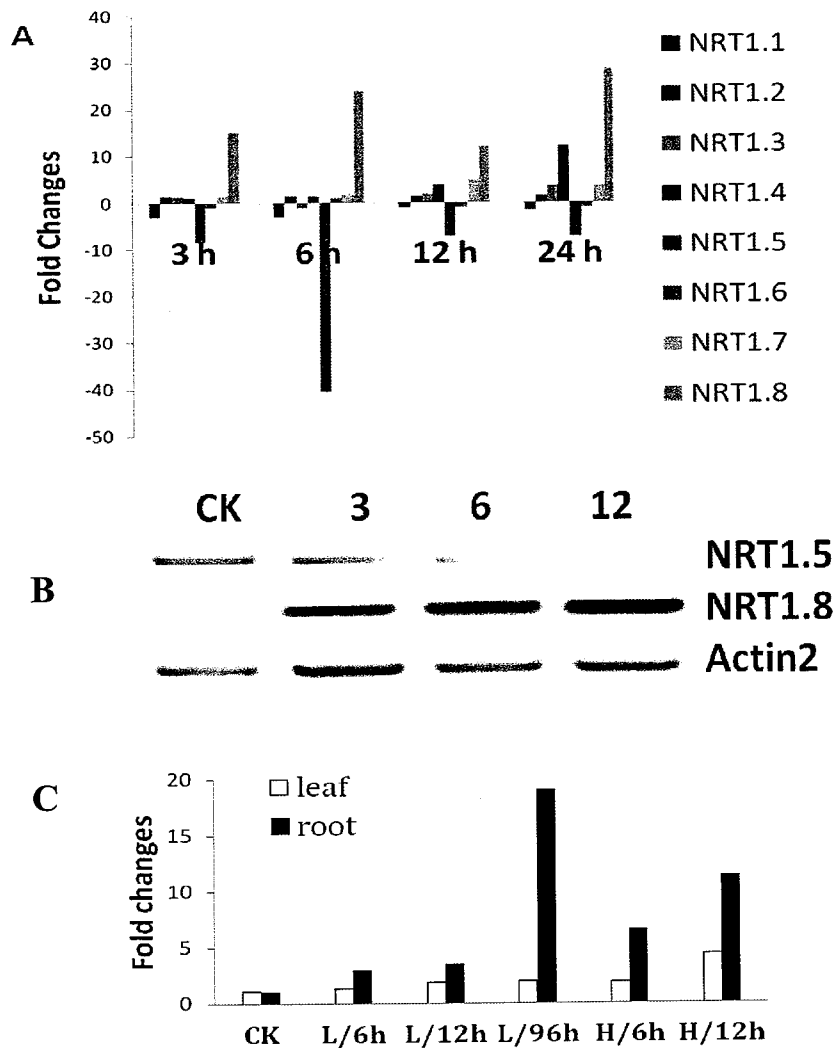
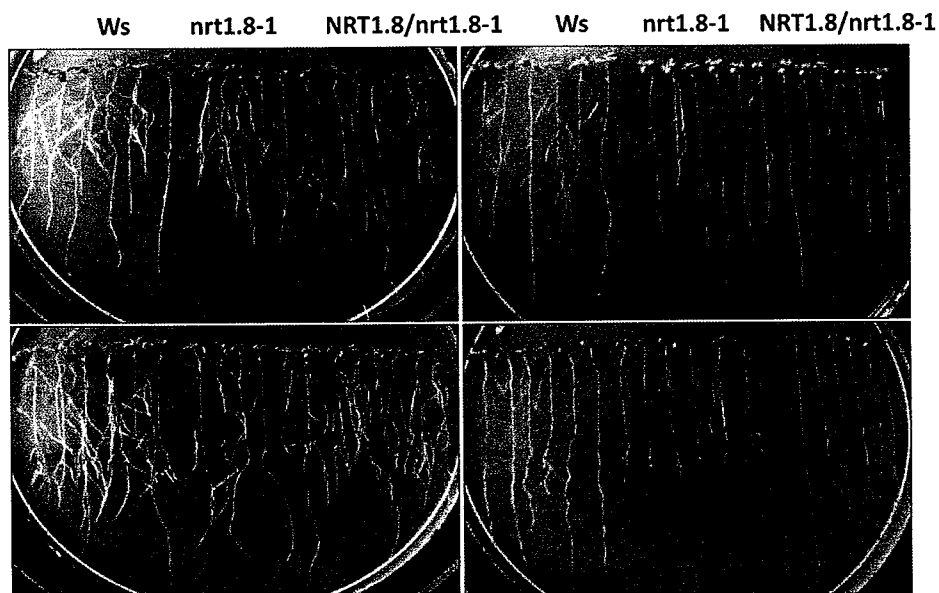


图 1: *NRT1.8* 基因在 NaCl 胁迫下的表达情况。

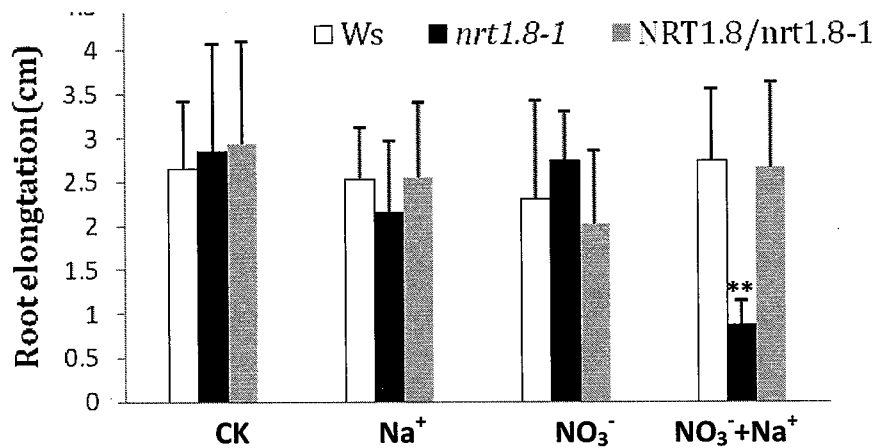
- (A): 网上芯片分析 *NRT1* 家族中已知的 8 个 NO_3^- 转运蛋白在 150 mM Na^+ 诱导不同时间下, 在拟南芥根(roots)中的表达情况;
- (B): RT-PCR 分析 *NRT1.8* 和 *NRT1.5* 基因在 150 mM Na^+ 诱导不同时间下, 在拟南芥根中的表达情况;
- (C): Real-Time PCR 分析 *NRT1.8* 在 50 mM Na^+ (L)和 150 mM Na^+ (H), 不同时间诱导下, 在根和叶中的诱导情况。

3.2 *NRT1.8* 突变体 *nrt1.8-1* 对盐胁迫更敏感

由于 *NRT1.8* 能够受到盐胁迫的强烈诱导, 因此我们首先检测了其突变体在盐胁迫下的抗性情况。结果如下, 在 1/4X PNS 培养基上的 Ws 和 *nrt1.8-1* 以及互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8-1*, 没有出现明显可见表型(图 2-A); 以 50 mM Na^+ 处理则可以观察到 Ws 和互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8-1* 的主根比 *nrt1.8-1* 稍长, 但是没有显著差异, $p>0.05$ (图 2-B); 以高浓度的 NO_3^- 处理后也没有出现显著差异(图 2-C) $p>0.05$; 用 50 mM Na^+ 和 50 mM NO_3^- 处理, 突变体 *nrt1.8-1* 的主根伸长值则显著低于 Ws 和互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8-1*, $p<0.001$ (图 2-D)。在 A, B, C, D 四种处理情况下的主根生长统计图见(图 2-E), 这个结果与前面这些株系在 Cd^{2+} 胁迫下的表型类似, 表明 *NRT1.8* 可能通过类似的机制调控植物对多种逆境的抗性。



E

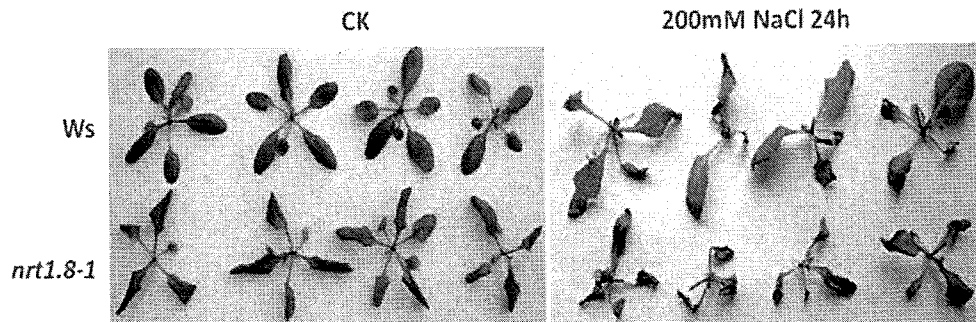
图 2: *NRT1.8* T-DNA 突变体幼苗耐盐性分析。

(A)-(D): Ws 和 *nrt1.8-1* 以及其互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8-1* 在正常 1/4 X PNS 固体平板培养条件(A)、或加入 50 mM Na⁺ (B)、25 mM NO₃⁻ (C)、或者 25 mM NO₃⁻+50 mM Na⁺ (D)下的生长观察以及 Na⁺抗性表型鉴定;

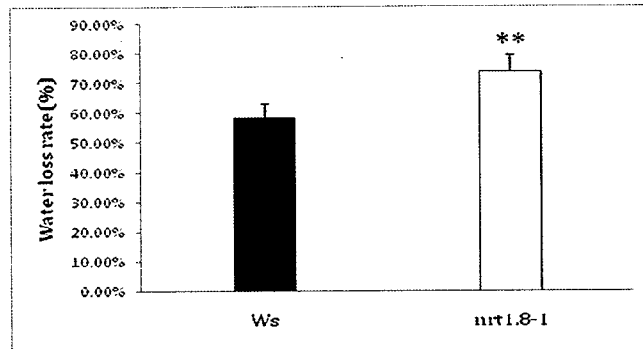
(E): Ws 和 *nrt1.8-1* 以及其互补突变体 *NRT1.8/nrt1.8-1* 在转移至对应(A)到(D)的处理条件下, 7 至 10 天后的根伸长分析。每个处理统计 6 颗苗, 纵坐标的值为平均值 mean ± SD。

对 Ws, *nrt1.8-1* 的幼苗在低浓度盐平板上的抗性分析, 结果表明 *NRT1.8* 影响植物对盐胁迫的抗性。为了进一步验证这一结果, 对 Ws, *nrt1.8-1* 成年植株在高浓度盐胁迫下的抗性表型进行了观察。结果显示, 在 24 h 的高盐胁迫下, Ws 和 *nrt1.8-1* 都出现严重的失水情况。但 Ws 的莲座叶都有 1-2 片失水较少, 而 *nrt1.8-1* 所有的莲座叶都出现严重的失水皱缩表型(图 3-A), 统计 Ws 和 *nrt1.8-1* 在高盐处理前后的莲座叶重量, 发现 Ws 的平均失水率显著低于 *nrt1.8-1* ($p < 0.001$)(表 3-B)。

A



B

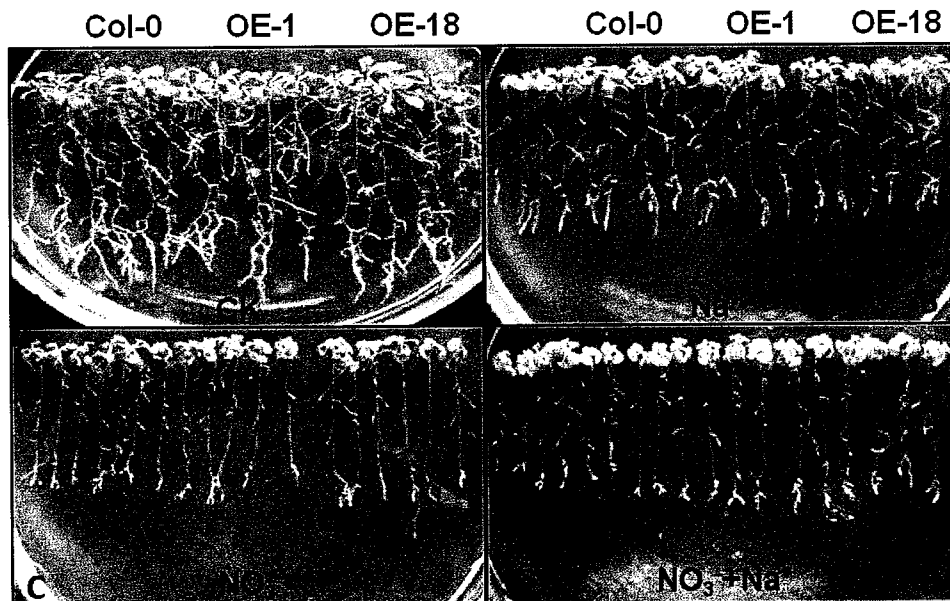
图 3: *NRT1.8* T-DNA 插入突变体成年苗耐盐性分析。

A: Ws 和 *nrt1.8-1* 在对照和 200 mM Na⁺ 处理 24 h 情况下的莲座叶表型。

B: Ws 和 *nrt1.8-1* 在 200 mM Na⁺ 处理 24 h 情况下的莲座叶失水率统计。

3.3 *NRT1.8* 过表达突变体对盐胁迫的抗性增强

NRT1.8 的缺失突变体对盐胁迫更敏感, 那么 *NRT1.8* 的过表达突变体是否对盐胁迫的抗性更强呢? 为了明确 *NRT1.8* 过表达突变体的抗盐表型, 将 *NRT1.8* 的过表达的两个株系突变体 OE-1、OE-18 以及对应的野生型 Col-0 进行了处理实验。结果显示, 植株在 1/4 X PNS 培养基上或者在含有 50 mM Na⁺ 的 1/4 X PNS 培养基上生长时, Col-0、OE-1、OE-18 之间没有显著区别(图 4-A,B)。只用 NO₃⁻ 处理时, Col-0、OE-1、OE-18 之间也没有显著差别(图 4-C); 但是用 25 mM NO₃⁻ 和 50 mM Na⁺ 同时进行处理时, OE-1、OE-18 根系的伸长值显著高于 Col-0(图 4-D)。



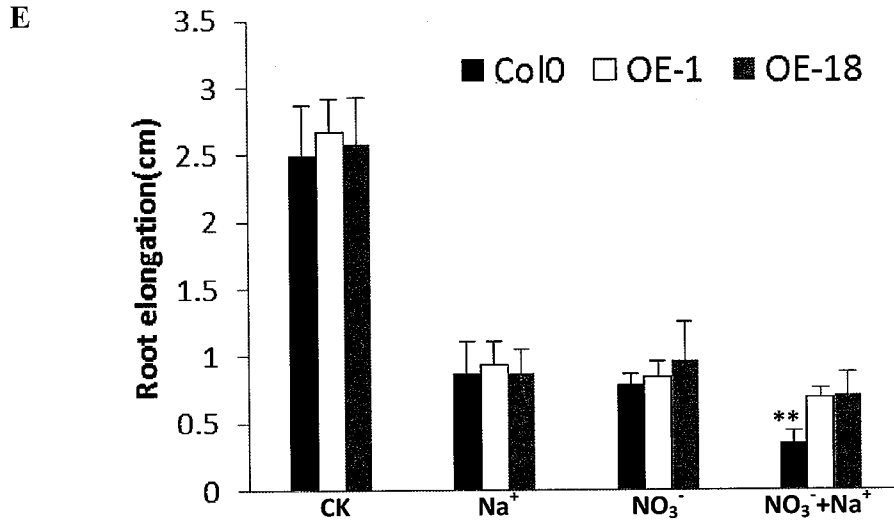
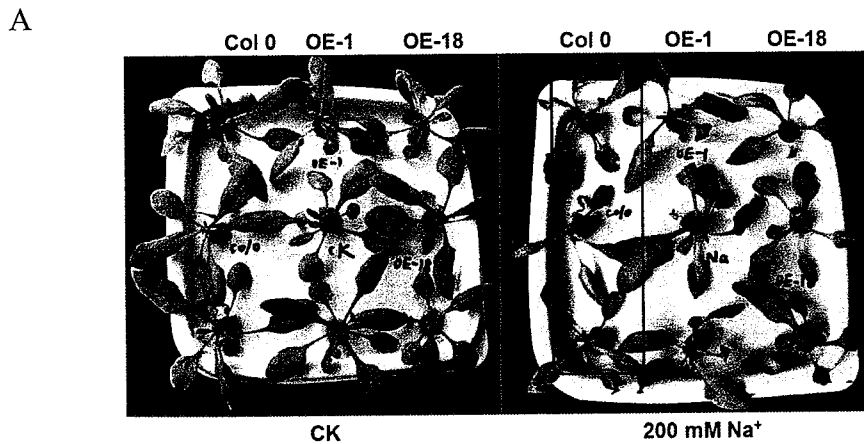


图 4: NRT1.8 过表达突变体幼苗耐盐性分析。

(A)-(D): Col-0 和 OE-1、OE-18 在正常 1/4X PNS 固体培养基平板培养条件(A)、或加入 50 mM Na⁺ (B)、25 mM NO₃⁻ (C)、或者同时加上 25 mM NO₃⁻和 50 mM Na⁺ (D)下的生长观察以及 Na⁺抗性表型鉴定。

(E): Col-0 和 OE-1、OE-18 在转移至对应(A)到(D)的处理条件下, 7 至 10 天后它们的根伸长长度统计。每个处理统计 6 颗苗, 纵坐标的值为平均值 mean ± SD。

为了验证过表达突变体的耐盐性状, 检测了过表达突变体在高浓度 Na⁺胁迫下的抗性情况。结果显示, 在对照(CK)情况下, 它们之间没有显著区别(图 5-A); 但是在高盐胁迫下, 过表达突变体 OE-1、OE-18 的长势明显好于对照 Col-0, 莲座叶的萎蔫程度较轻, 而 Col-0 几乎所有的叶子都出现明显的失水症状(图 5-A)。Col-0 的莲座叶失水率也显著高于 OE-1、OE-18(p<0.001)(图 5-B)。



B

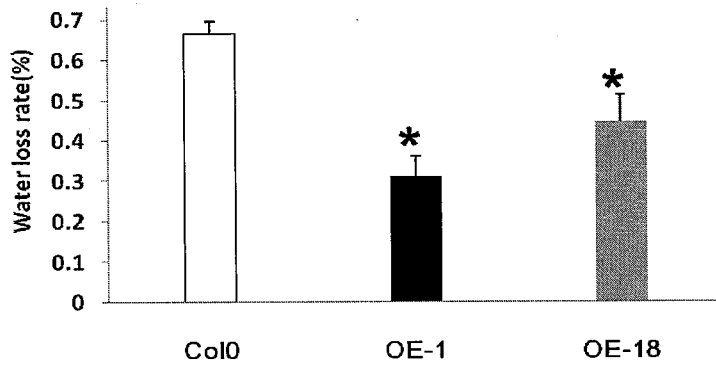


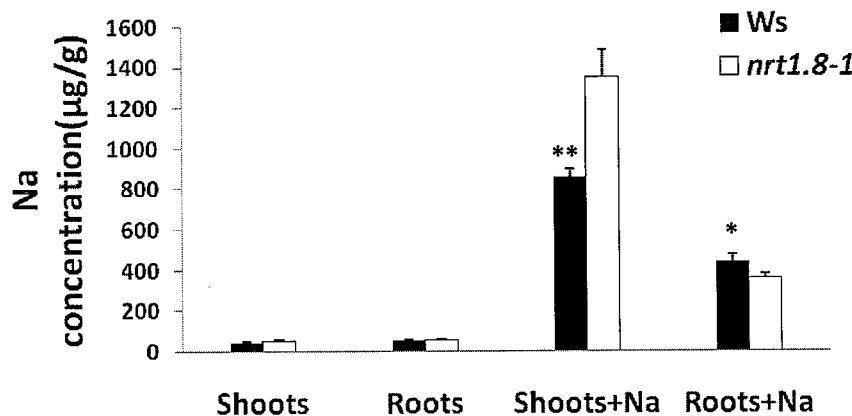
图 5: NRT1.8 过表达突变体耐盐性分析。

(A): Col-0 和 OE-1、OE-18 在 1/4 X PNS 液体培养基中培养四周后, 使用 1/4 X PNS 液体培养基或者含有 200 mM Na⁺ 的 1/4 X PNS 液体培养基处理 24 h 的表型。

(B): Col-0 和 OE-1、OE-18 以 200mM Na⁺ 处理 24 h 后统计莲座叶失水率。每个株系重复三次, 纵坐标的值为平均值 mean ± SD。

3.4 *nrt1.8-1* 突变体中 Na⁺分配异常

前期研究结果显示 Ws 对盐胁迫的抗性显著高于 *nrt1.8-1*。为了进一步阐明 *nrt1.8* 突变体的抗盐机理, 我们检测了 Ws 和 *nrt1.8-1* 在盐胁迫下, Na⁺在根和茎中的分布情况。结果表明, 在正常培养情况下, Ws 和 *nrt1.8-1* 的根和茎之间的 Na⁺含量, 都没有显著区别; 但是 50 mM Na⁺处理 3 d 后, Ws 中根中 Na⁺含量显著高于突变体 *nrt1.8-1*($p < 0.05$); 而在茎中 Ws 的 Na⁺含量则显著低于 *nrt1.8-1*, ($p < 0.001$) (图 6)。

图 6: 盐胁迫下 Na⁺在 Ws 和 *nrt1.8-1* 中的分布情况。

前期结果显示 *NRT1.8* 过表达突变体对盐胁迫的抗性高于 Col-0, 为了阐明其抗性增强的机理, 检测了 OE-1、OE-18 以及 Col-0, 在对照和盐胁迫情况下, 它们茎和根中的 Na^+ 含量。结果显示, 正常生长状况下 OE-1、OE-18 与其对照 Col-0 相比, 茎和根中 Na^+ 含量没有显著差异; 但是在 Na^+ 处理后, OE-1、OE-18 在根中的 Na^+ 含量显著高于 Col-0 ($p < 0.05$), 而在茎中, 则出现相反的分布情况, OE-1、OE-18 中的 Na^+ 含量显著低于 Col-0, ($p < 0.001$) (图 7-A)。在 Na^+ 处理情况下, Col-0 木质部伤流液中的 Na^+ 含量显著高于 OE-1 和 OE-18 ($p < 0.001$) (图 7-B)。表明过表达突变体在 Na^+ 胁迫下, 向地上部位转运的 Na^+ 低于 Col-0。

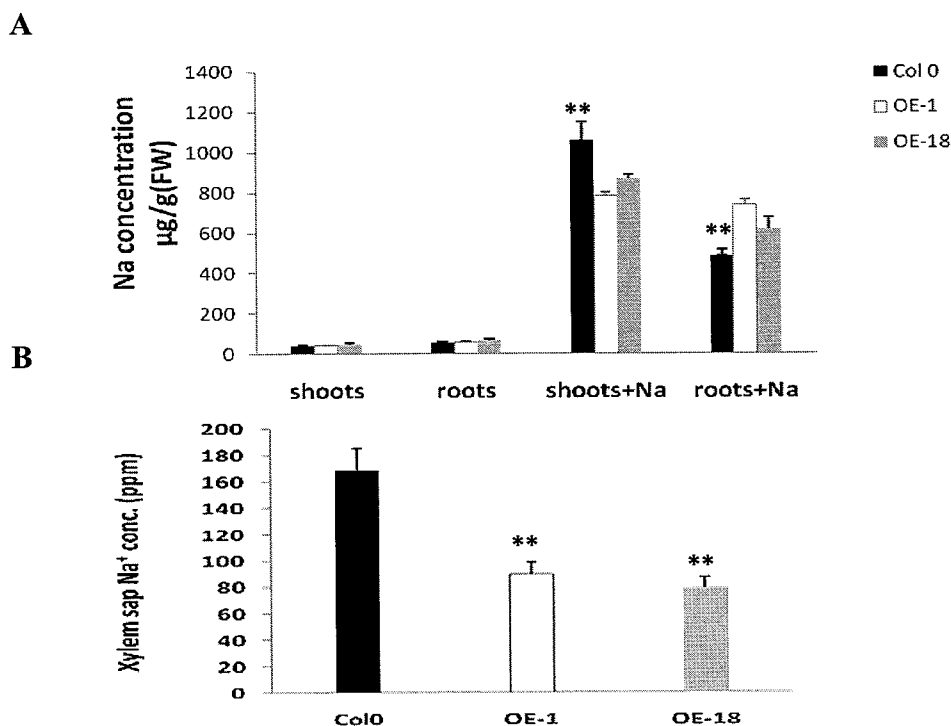


图 7: 盐胁迫下 Col-0 和 OE-1、OE-18 中 Na^+ 的分布情况。

(A): ICP-MS 分析 Col-0 和 OE-1、OE-18 在正常和盐胁迫下, 茎(shoots)和根(roots)中的 Na^+ 含量;

(B): Col-0 和 OE-1、OE-18 在 10 mM Na^+ 处理 24 h 后, 木质部伤流液中 Na^+ 含量。

3.5 *NRT1.8* 影响盐胁迫下 NO_3^- 在植物体内的分配

为了阐明 *NRT1.8* 作为 NO_3^- 转运蛋白影响植物的抗盐的机理, 我们检测了 *NRT1.8* 突变体在 Na^+ 胁迫前后, 根和茎中的 NO_3^- 含量以及比值。结果如下: 正常情况下, *Ws* 和 *nrt1.8-1* 中 NO_3^- 含量, 在茎和根中都没有显著区别; 在 Na^+ 处

理后在茎中, Ws 和 *nrt1.8-1* 中的 NO_3^- 还是没有显著区别; 但是在根中, Ws 中的 NO_3^- 含量显著高于 *nrt1.8-1* ($p < 0.001$) (图 8-A); 而且, 在对照(ck)情况下, Ws 和 *nrt1.8-1* 的根和茎中的 NO_3^- 浓度比值没有显著差异; 但是 Na^+ 处理后, Ws 中的根和茎的 NO_3^- 浓度比值显著高于 *nrt1.8-1* ($p < 0.05$) (图 8-B)。

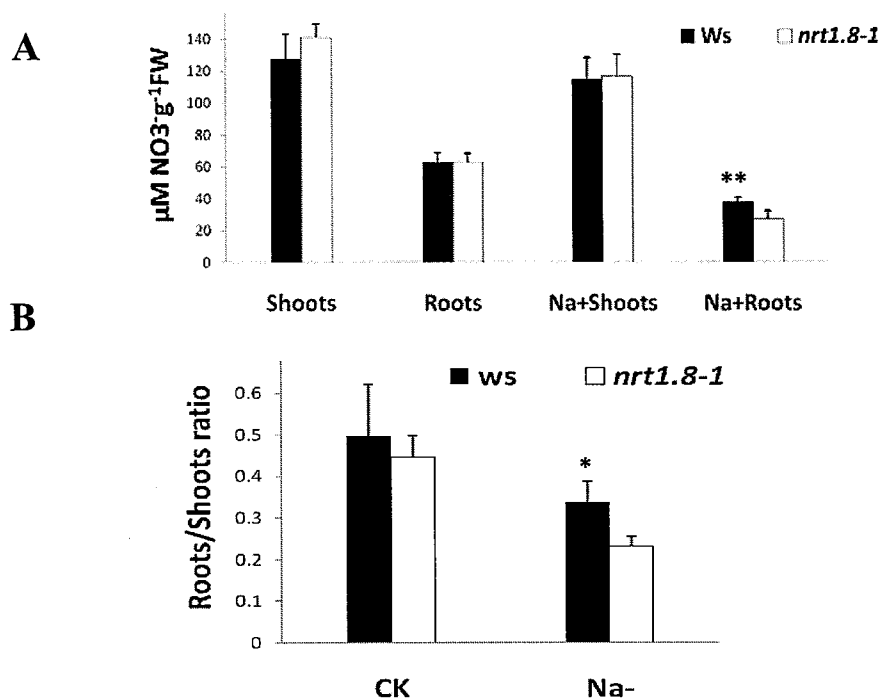


图 8: Ws 和 *nrt1.8-1* 在正常培养和盐胁迫下茎(shoots)和根(roots)中 NO_3^- 浓度以及在 Na^+ 处理前后 NO_3^- 在地上和地下部分中的分配情况。

(A): Ws 和 *nrt1.8-1* 在正常和盐胁迫下茎和根中 NO_3^- 浓度。

(B): Ws 和 *nrt1.8-1* 在正常和盐胁迫下根和茎中 NO_3^- 浓度的比值。

3.6 *NRT1.5* 耐盐表型分析

网上的数据库分析结果和我们前期的研究显示 *NRT1.5* 和 *NRT1.8* 在多种逆境胁迫下呈现明显的功能拮抗关系。Real-time PCR 结果也证实 *NRT1.5* 在盐胁迫下表达下调, 为了弄清 *NRT1.8* 和 *NRT1.5* 在响应盐胁迫下的生理关系, 我们分析了 *NRT1.5* 突变体对盐胁迫的抗性情况。结果显示: 在正常生长情况下以及 50 mM Na^+ 离子浓度的平板上, 植株生长没有显著区别(图 9-A); 但是当 Na^+ 离子浓度增加到 100 mM 的时候, *nrt1.5-3*、*nrt1.5-4* 的主根伸长值高于对照 Col-0 但没

有显著差异($p>0.05$), 而 Na^+ 离子浓度增加到 125 mM 的时候, *nrt1.5-3*、*nrt1.5-4* 突变体的主根伸长值显著好于 Col-0(图 9-A) ($p<0.001$) (图 9-B)。

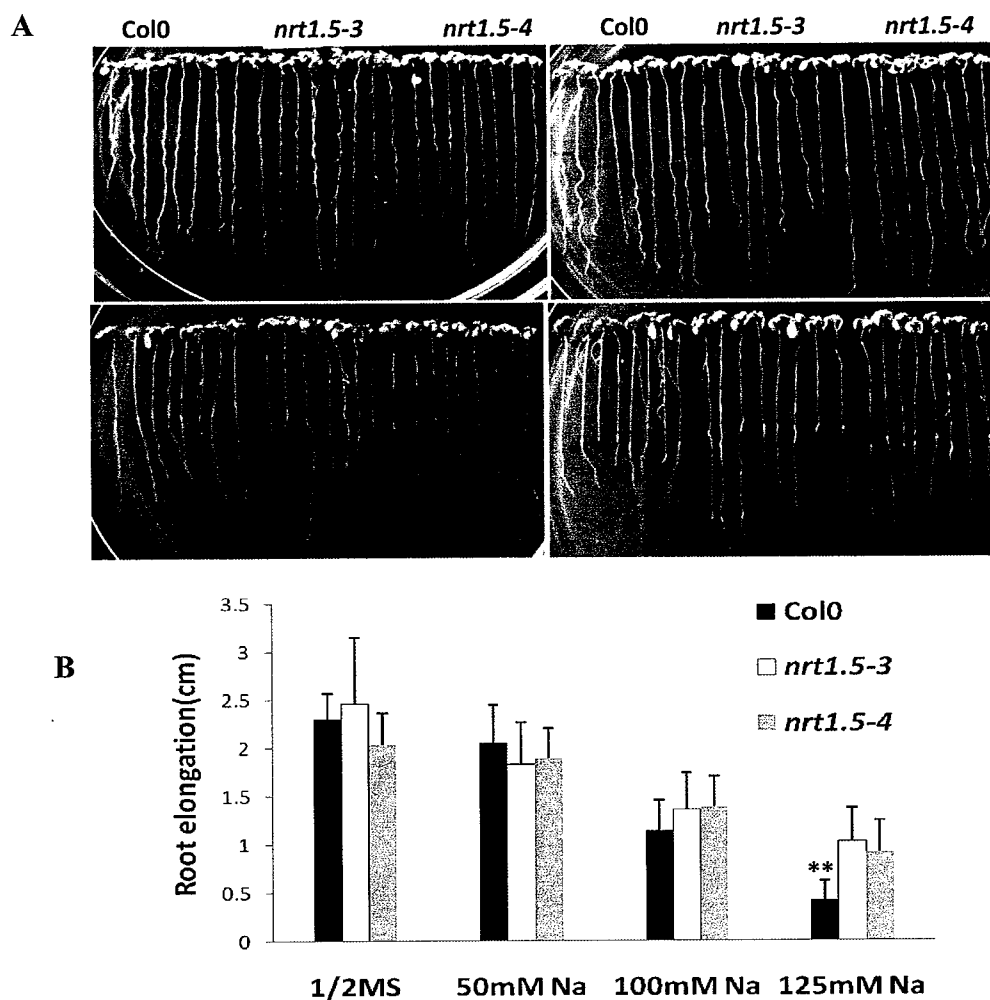


图 9: *NRT1.5* 突变体抗盐表型分析。

(A): Col-0 以及 *nrt1.5-3*、*nrt1.5-4* 在 1/2MS, 1/2MS+50 mM Na^+ , 1/2MS+100 mM Na^+ , 1/2MS+125 mM Na^+ 培养基下的生长情况。

(B): Col-0 和 *nrt1.5-3*、*nrt1.5-4* 处理 7-10 天后根伸长分析。每个处理统计 8 颗苗, 纵坐标的值为平均值 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 。

4 讨论

盐胁迫是造成农作物减产的主要限制因子之一(Zhu, 2002)。 NO_3^- 是植物的主要氮源和信号分子, 在植物的生长发育以及逆境响应过程中发挥了重要作用(Crawford, 1995; Stitt, 1999; Guo, et al., 2003; Krouk, et al., 2010)。在盐胁迫下, 植物如何通过调整氮代谢途径或者信号转导来响应植物盐胁迫过程, 其中的分子

机理还知之甚少。明确其作用的分子机理对于了解植物在逆境下如何利用 NO_3^- , 以及提高植物对盐胁迫的抗性将起到很大的帮助。

之前的研究结果显示 *NRT1.8* 受 Cd^{2+} 胁迫强烈诱导, 进一步的生物信息学分析表明, *NRT1.8* 除了受 Cd^{2+} 胁迫外, 还受多种逆境的诱导, 尤其受到高盐强烈诱导(图 1-A)。目前已经从含有 53 个基因的 *NRT1* 家族中鉴定出 8 个编码 NO_3^- 转运蛋白的基因(Tsay, et al., 2007), 其中与 *NRT1.8* 同源性最高的基因是 *NRT1.5*, 该基因在盐胁迫下表达情况与 *NRT1.8* 完全相反, 其表达水平在盐胁迫下显著下调。除 *NRT1.5* 和 *NRT1.8*, 以及 *NRT1.4* 在高浓度长时间盐胁迫处理下的表达量也有明显的上调外, 其它 5 个基因在高盐胁迫下表达量变化不显著(图 1-A)。这些结果表明, *NRT1.5* 和 *NRT1.8* 很有可能在植物响应盐胁迫过程中发挥了重要功能。

生理实验表明, *NRT1.8* 的突变体 *nrt1.8-1* 不论是在幼苗期还是成熟植株, 不论是在 50 mM NaCl 或者 150 mM NaCl 胁迫下, 其对盐胁迫的抗性都显著低于对应的野生型 Ws(图 2, 3)。*NRT1.8* 过表达突变体 OE-1、OE-18 在低盐胁迫下, 其根伸长显著高于对照 Col-0(图 4)。高盐胁迫下, 过表达突变体失水率也显著低于 Col-0(图 5)。以上结果表明, *NRT1.8* 可以影响植物抗盐性状。作为 NO_3^- 转运蛋白, *NRT1.8* 是如何影响植物的抗盐性? 为了弄清这一问题, 我们检测了 *NRT1.8* 的突变体和野生型在正常情况和盐胁迫情况下, Na^+ 在茎和根中的分配情况。当 Ws 和 *nrt1.8-1* 在正常培养情况下, 茎和根中的 Na^+ 浓度都没有显著区别; 但是在 Na^+ 处理后, Ws 的根中 Na^+ 含量显著高于 *nrt1.8-1*; 而在茎中的 Na^+ 含量则显著低于 *nrt1.8-1*(图 6)。我们也检测了 Col-0 和 OE-1、OE-18 在盐胁迫下, Na^+ 在植物体内的分布情况。结果显示, 在正常培养情况下, 茎和根之间的 Na^+ 没有显著区别; 但是 Na^+ 处理后, OE-1、OE-18 在茎中的含量显著低于 Col-0, 而在根的浓度显著高于 Col-0(图 7-A), 另外, 我们也检测了盐胁迫下 Col-0、OE-1、OE-18 木质部伤流液中的 Na^+ 含量, 结果发现, OE-1、OE-18 伤流液中的 Na^+ 含量显著低于 Col-0(图 7-B), 即表明 *NRT1.8* 过表达后, 更多的 Na^+ 留在了根部。以上结果表明, *NRT1.8* 可以通过调控 Na^+ 在茎和根中的分配来影响植物抗盐性。即在盐胁迫下, *NRT1.8* 增强表达, 然后以某种未知的方式把多的 Na^+ 留在根部, 减少 Na^+ 往茎的运输, 降低 Na^+ 对地上部分重要器官的伤害, 以此增强植物对盐

胁迫的抗性。*NRT1.8* 这种调控植物 Na^+ 抗性的特点与 *HKT1* 类似。*HKT1* 是一个 Na^+ 转运蛋白, 定位于细胞质膜上, 主要在木质部薄壁细胞中表达, 其突变体对盐胁迫敏感。在盐胁迫下, *HKT1* 可以把 Na^+ 从木质部中卸载到薄壁细胞中, 降低木质部中的 Na^+ 含量, 从而减少 Na^+ 在茎中的积累, 减轻 Na^+ 对植物的伤害 (Sunarpi et al., 2005)。

我们前期的研究结果显示, *NRT1.8* 可以调控 NO_3^- 在根和茎中的分配来影响植物对重金属 Cd^{2+} 的抗性 (Li, et al., 2010)。植物在响应盐胁迫情况下, *NRT1.8* 是否也发挥了类似的功能? 所以我们检测了 *NRT1.8* 的突变体和野生型在正常情况和高盐胁迫下, 根和茎中的 NO_3^- 含量以及根和茎的浓度比值。Ws 和 *nrt1.8-1* 在处理前, 根和茎的含量和比值都没有显著区别; 但是在高盐胁迫后, Ws 在根中的含量显著高于 *nrt1.8-1*, 而且 Ws 中的根和茎的浓度比值也显著高于 *nrt1.8-1* (图 9)。这些研究表明, 在盐胁迫下, 植物也是通过向根中分配更多的 NO_3^- 来提高植物对盐胁迫的抗性, 这一点与植物在 Cd^{2+} 胁迫下表现类似。

另外, 我们也分析 *NRT1.5* 的突变体在盐胁迫下的抗盐表型。结果显示其突变体 *nrt1.5-3*、*nrt1.5-4* 在 125 mM Na^+ 盐胁迫时, 抗性显著高于对照 Col-0 (图 9)。*NRT1.5* 主要负责把中柱鞘中的 NO_3^- 装载到木质部, 从而协助 NO_3^- 从地上到地下的长途转运, 其突变体在根系中积累了更多的 NO_3^- (Lin, et al., 2008)。前面的研究结果显示 *NRT1.8* 主要功能是把木质部中的 NO_3^- 卸载到薄壁细胞, 使更多的 NO_3^- 留在根, 增加 NO_3^- 在根中的分配 (Li, et al., 2010)。另外, 徐 (2006) 的研究表明, 植物在逆境情况下, *NRT1.4* 诱导表达上调, *NRT1.5* 下调, 这与前面的芯片结果一致 (图 1); 而且作者认为在逆境下 *NRT1.4* 和 *NRT1.5* 共同发挥作用, 导致根中积累更多的 NO_3^- , 以此增强植物对多种逆境的抗性。综合以上结果, 结合 *NRT1.8* 和 *NRT1.5* 的功能以及它们突变体在逆境下的表型, 我们认为, 在逆境情况下, 植物往根中积累更多的 NO_3^- , 可能是一种响应逆境的普遍的机制。并且, 根系中分配更多的 NO_3^- 可能作为一种响应逆境的信号, 并通过这种信号来调控相关的代谢途径, 以此增强对逆境的抗性。

附件 1 硝酸根吸收和代谢途径基因在 Cd^{2+} 胁迫下的表达情况Supplemental Table 1. Transcriptomic analysis of nitrate assimilation pathway under Cd^{2+} stress.

AGI Index/Alias	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	AGI Index /Alias	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
NRT1 family				At3g25280	2.31	1.23	1.1
At1g12110 (NRT1.1)	-1.98	-1.98	1.5	At1g27040	1.26	-1.28	1.1
At1g69850 (NRT1.2)	-1.16	-1.10	1.2	At5g62730	1.43	-1.42	1.1
At3g21670 (NRT1.3)	-2.88	-1.01	1.1	At5g19640	1.06	-9.20	1.7
At2g26690 (NRT1.4)	-1.77	-1.30	2.0	At3g54140	1.09	-1.50	-1.8
At1g32450 (NRT1.5)	-2.04	-1.37	-4.0	At5g01180	1.31	1.13	1.4
At1g27080 (NRT1.6)	1.29	-1.20	1.1	At1g62200	1.41	-1.09	1.2
At1g69870 (NRT1.7)	1.96	-1.32	1.2	At2g02020	-1.35	-1.48	1.1
At4g21680 (NRT1.8)	5.37	7.94	26.0	At2g02040	1.24	-1.02	1.3
At5g46050	-2.97	-2.30	-2.9	NRT2 family			
At5g46040	-2.01	-1.30	-3.5	At1g08090 (NRT2.1)	1.37	-1.04	1.1
At2g40460	-1.10	-2.92	-1.7	At1g08110 (NRT2.2)	1.88	1.32	1.4
At2g37900	-1.03	-2.04	-1.1	At5g60780 (NRT2.3)	-1.16	3.47	5.12
At3g53960	1.30	-1.98	-1.7	At5g60770 (NRT2.4)	1.00	1.14	1.4
At3g01350	-1.58	-3.30	-5.2	At1g12940 (NRT2.5)	-1.13	2.02	3.5
At5g14940	-1.83	-2.29	-2.8	At3g45060 (NRT2.6)	1.14	1.58	2.4
At1g72120	1.21	-1.36	-1.58	At5g14570 (NRT2.7)	1.04	1.46	2.2
At1g22550	-2.27	-2.04	-2.7	Nitrate/nitrite assimilatory genes			
At1g22570	-1.33	-1.68	-1.2	At1g77760(NIA1)	-3.41	-4.8	-2.27
At1g72130	1.07	-1.03	1.5	At1g37130(NIA2)	1.07	1.65	1.39
At1g72140	1.11	-2.10	-1.4	At2g15620(NiR)	-2.94	-3.49	-1.97
At1g22540	1.63	-1.13	-1.0	At5g40850	-2.37	-2.06	-1.48
At5g28470	8.41	-1.39	2.1	At4g05390	-1.40	1.1	-1.25
At1g69860	1.33	-1.57	1.5	At1g30510	-1.99	-1.14	-1.97
At1g18880	-1.14	-1.03	-1.4	At4g32360	-1.27	-1.45	-1.42
At5g62680	-1.55	-1.13	-1.7	At5g66190	-1.11	1.25	1.39
At3g47960	2.55	2.61	1.3	At1g20020	-2.31	1.06	1.67
At5g11570	-1.13	-2.55	-1.0	At5g66810	1.20	1.27	1.24
At3g16180	-1.85	-1.22	-1.5	At2g27510	-1.10	1.02	1.32
At1g52190	-4.30	-3.79	-1.4	At4g14890	-2.22	-4.38	-1.49
At1g68570	-1.97	-1.76	-1.3	At1g32550	1.26	-1.09	1.16
At3g45650	2.05	1.94	1.2	At5g07950	-1.02	-9.21	-1.40
At3g45710	-1.78	-1.98	-1.2	At1g10960	2.68	1.04	1.20
At3g45700	-13.40	-5.50	-3.41	At1g60950	-1.21	-1.99	-1.39
At3g45680	-2.18	-4.69	-1.06	At1g24280	-3.69	-2.34	-1.77
At3g45690	1.28	-1.26	1.2	At5g13110	-1.51	-1.06	1.09
At3g45720	-1.12	-1.42	1.3	At5g41670	-1.75	-1.06	-1.72
At2g38100	1.14	-1.05	1.4	At1g64190	-1.67	-1.47	-1.27
At5g13400	1.39	-1.11	1.2	At3g60750	-1.90	-1.51	-1.22
At1g33440	-1.01	-1.23	-1.1	At2g45290	-1.18	1.08	1.07
At1g59740	3.64	1.92	1.7	At5g13240	-1.09	1.27	1.21
At3g25260	1.02	-1.04	1.4	At1g12230	-1.28	-1.17	-1.45

附件 2：论文中用到的引物序列

内参引物

Rtime-actin-L: AGGTATCGCTGACCGTATGAG

Rtime-actin-R: CATCTGCTGGAATGTGCTGA

RT-Actin-L: CCCTGTTCTTCTTACCGAG

RT-Actin-R: CCACATCTGCTGGAATG

Real-Time PCR 引物

Rtime-NRT1.8-L: TCTTCATCTTCGCATACAGGCGGT

Rtime-NRT1.8-R: GCCATTATCGCAATCACAAGCCCA

突变体鉴定引物

NRT1.8-L : AGTTAGACAGTTTGAGGTTTGCACCTCAAG

NRT1.8-R: GTAGAATCTCTCCAAGTGTCTTTGTTGA

JL202: CATTTTATAATAACGCTGCGGACATCTAC

NRT1.8基因组扩增引物

NRT1.8 genome -L: GGATCCATGGATCAAAAAGTTAGACAGTT

NRT1.8 genome -R: ATTTAGCTCCTGACTCAGACTTC

NRT1.8 启动子扩增引物

NRT1.8 pro-L: TTAGATTGTTTCGATTCAGATTTAGG

NRT1.8 pro-R: AGGATCCCATAGATTCGATTTGGTGTAGAGAT

RT-PCR引物

NIA1-RT-L: GTAACGAGGGTTGAGGTGA

NIA1-RT-R : AGCCAGTGGTGATGAGTTC

NIR-RT-L: GAAAGCATCAGTATGGGAAG

NIR-RT-R: AGGGTTGACTCCGAAATAGT

GSR1-RT-L: TGGTGGTTCTGGAATGG

GSR1-RT-R: CCGTAAGCAGCAATGTGT

CHL-RT-L: ATCAGGAAGCGGGAGTTAC

CHL-RT-R : GCCAATGTGCTCAACAATAG

NRT1.8- RT-L: CTTTATCTACTGGTGCGTTATTGCT

NRT1.8- RT-R: ATAGAGATTCAACTCTTCATGGTGC