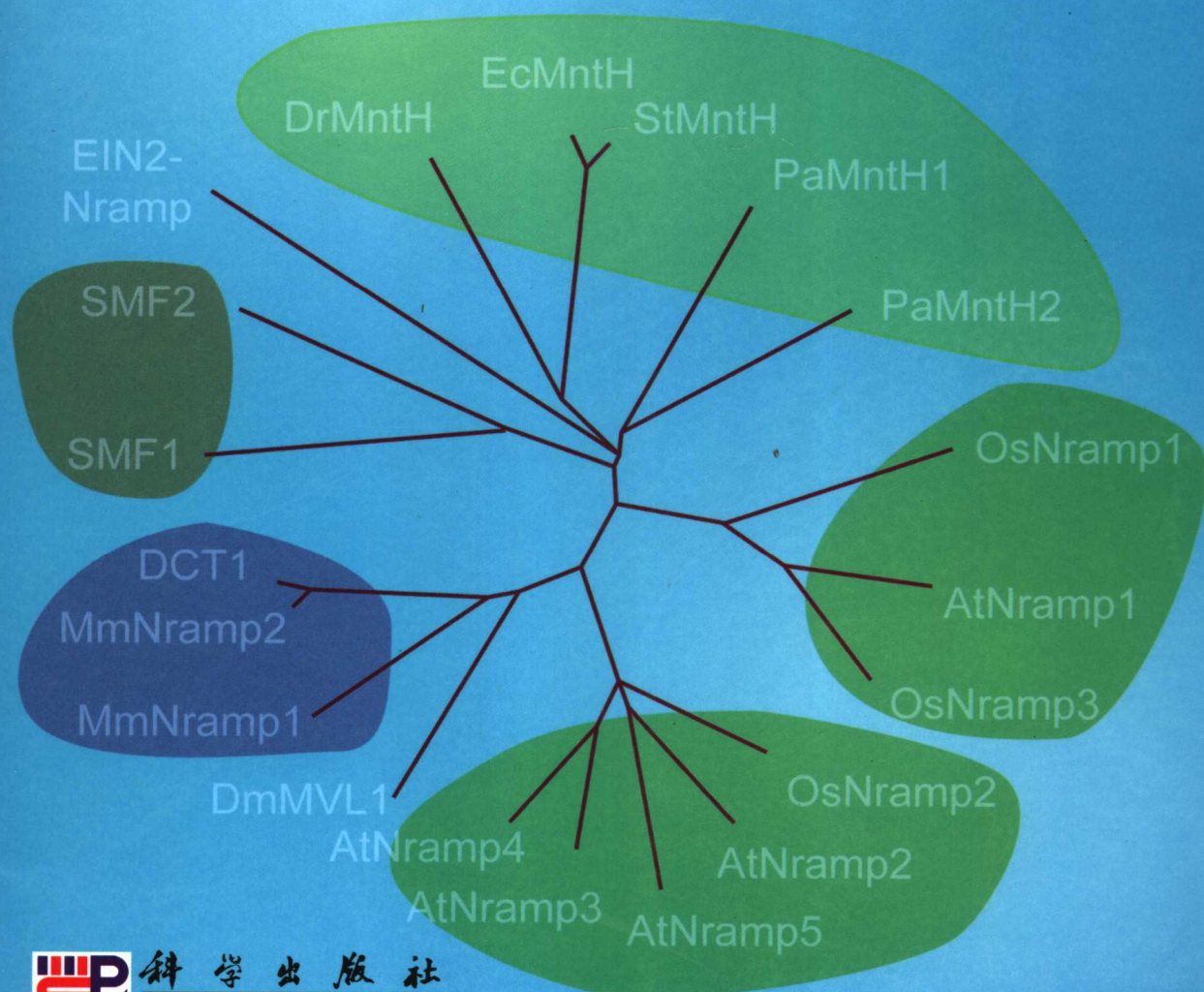


植物营养分子生物学 及信号转导

(第二版)

印莉萍 黄勤妮 吴平/主编



科学出版社
www.sciencep.com

植物营养分子生物学及信号转导

(第二版)

印莉萍 黄勤妮 吴 平 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书在第一版《植物营养分子生理学》的基础上,增加了2001年以后国内外重要研究成果和最新文献资料,较充分地反映了我国在本研究领域内前沿性研究和应用的水平。本书内容力求从分子水平和亚细胞水平上阐述营养元素的生理功能、植物应答缺素的机制、缺素信号转导与基因表达调控等问题。各方面的内容均有科学的论述和丰富的图表说明。全书各章依次为氮、磷、钾、铁、镁、锌、铜、锰、钠9种植物体必需元素,其中包括4种大量元素和5种微量元素。

本书可作为植物营养、环境保护、农林牧等专业研究生的教科书和科研工作者的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

植物营养分子生物学及信号转导/印莉萍,黄勤妮,吴平主编.—2版.—北京:科学出版社,2006

ISBN 7-03-016695-7

I. 植… II. ①印…②黄…③吴… III. 植物营养缺乏症-诱导-信息传输-研究 IV. Q945.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2005)第157211号

责任编辑:庞在堂 彭克里 席 慧/责任校对:钟 洋

责任印制:钱玉芬/封面设计:王 浩

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001年4月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2006年9月第 二 版 印张:23 1/4

2006年9月第二次印刷 字数:529 000

印数:2 501—5 000

定价:58.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

参与编写人员名单

(按姓氏笔画排序)

卫功宏
关丽英
张文娟
靳 飞

马 峰
李 鹏
张艳萍
路 静

马小娟
李高岩
郝 雪

王 丽
张 放
常正尧

第二版前言

本书第一版于2001年出版后,对读者有一定的参考价值,特别是对植物营养方面的研究者们。随着膜生理学、分子生物学、基因组学、蛋白质组学、代谢组学,特别是离子组学等方面的研究进展,人们应用新的分子生物学技术、膜片钳和微电极技术,使该领域迅速发展到了对营养贫瘠、耐盐、耐重金属毒害等植物胁迫反应的机制研究。营养元素的缺乏是否可以作为外界信号?如果是,受体又是何物?外界信号只有首先被植物体内的受体识别并跨膜转换、引发一系列的信号转导途径,最后做出相应的生理和生长发育反应。目前人们对植物营养作为信号的研究还刚刚起步,对于它们介导的信号转导途径还远未搞清楚。但是,本领域研究的势头很猛,每年对每一种营养元素的研究都有数十篇的文献发表,本书基于此而编著成。

在第一版书的基础上,我们趋利除弊,删除了大量基因序列型的数据资料,加入了首都师范大学植物营养功能基因组学研究室(印莉萍、黄勤妮)和浙江大学植物营养分子生物研究室(吴平)两个实验室四年来大量的科研成果,还采用了国家自然科学基金项目(30170552)、北京市自然科学基金项目(5982008, 5042004)和北京市教委科技发展基金项目(KM200410028015)的研究成果;同时汇集了国内外专家在植物营养元素转运调控机制及其信号转导的研究成果。除了氮、磷、钾、铁以外,我们还加入了锌、铜、锰、镁和钠/氢泵等内容。

本书的重新编写和出版是由黄勤妮、印莉萍申请并主持的首都师范大学研究生部的“植物营养分子生理学精品课”项目基金资助的。已故刘强教授在世时也给此书极大的关助和支持。

21世纪是高科技迅猛发展的时代,为使本书能够反映植物营养高科技领域的重要地位,我们做了反复的切磋与修改。鉴于我们的经验和水平所限,其中有错误和不当之处在所难免。为适应本学科领域的飞速发展,我们诚恳地希望继续得到读者、专家的宝贵建议和批评指正。

印莉萍 黄勤妮

2005年9月8日于北京

第一版前言

19 世纪后半叶，德国化学家李比希 (J. von Liebig) 提出的植物矿质营养学说导致了化学肥料工业的革命，致使整个 20 世纪全球作物产量增加了 50%。但是，一方面化学肥料的增产效率忽略了养分高效育种的发展，过度使用化学肥料也造成土壤本身肥效低下及环境污染；另一方面土壤养分贫瘠限制品种产量潜力实现的问题也日益突出。人口压力的增加，资源过度耗竭性开发由此引来的生态环境恶化，使上述问题成为 21 世纪植物营养学面临的挑战。

20 世纪植物营养学的发展以植物必需营养元素及生长有益元素的发现为标志。尽管在 1900 年前就发现了 6 种植物必需的元素——氮 (N)、磷 (P)、钾 (K)、钙 (Ca)、镁 (Mg)、硫 (S) 及微量元素铁 (Fe)，但已知的 7 种微量元素——锰 (Mn)、硼 (B)、锌 (Zn)、铜 (Cu)、钼 (Mo)、氯 (Cl) 与镍 (Ni) 的确定却用了 100 多年的时间 (1860~1987 年)。当然发现植物必需的营养元素的机会仍然存在，因为已有的发现仅是基于当时的分析水平。20 世纪中期，美国的 Emanuel Epstein 教授提出了植物矿质营养吸收动力学及遗传控制的系统理论，为现代植物营养学的发展做出了很大的贡献。植物营养学发展的另一个里程碑是基于植物生理学的植物营养学体系的建立，其中德国植物营养学家 Horst Marschner (1929~1996) 做出了不朽的贡献。他撰写的《高等动植物矿质营养》已成为应用最广泛的植物营养课程的教科书。

植物养分高效吸收利用的研究涉及诸多学科，包括植物营养学、土壤学、植物生理学、分子生物学。植物遗传育种学、植物栽培学与生态学等，从而促使植物营养学与其他学科渗透交叉。随着分子遗传学、分子生物学与生物技术的发展，以植物养分高效吸收利用分子生理机制与分子遗传机制为主要研究内容的植物营养遗传学与植物营养分子生理学成为过去 20 年迅速发展的学科。植物养分生理相关基因的克隆与表达调控研究也将是植物后基因组时代的重要研究领域之一。

通过对生长环境养分状况的适应性反应，植物提高养分吸收效率的途径主要为：①扩大根系吸收面积，即扩大植物可利用的土壤养分库；②活化根际养分使其成为植物的有效养分；③提高养分离子或分子跨膜吸收的能力。吸收养分在体内的代谢通过正负反馈调节影响养分吸收效率。吸收养分的利用效率（通常指养分的生理利用率）的定义可以依据研究目的不同而不同，但一般定义为一定量的养分产生较高的产量或在较低的养分浓度下能维持正常的生长代谢。目前我们所了解的植物养分吸收利用分子生理的机制主要来自对微生物突变体及模式植物拟南芥突变的研究。但在过去 10 年间，有关高等植物养分吸收分子生理、分子遗传、离子通道与养分转运体基因克隆与表达调控研究出现了大量的报道。随着植物养分吸收代谢生理机制研究及模式植物基因组研究计划的深入，植物营养分子生理学将是植物营养学理论发展最活跃的领域。本书作者在讲授研究生课程——植物营养分子生理学的基础上觉得有必要系统地整理已有的研究成果，出版有关植物营养分子生理学的参考书，供植物营养、植物生理、遗传育种及分子生物学等领域研究生与研究人员参考。考虑到本书的篇幅及自己的研究工作基础，本书仅涉及

植物最重要的大量必需元素氮 (N)、磷 (P)、钾 (K) 及微量元素铁 (Fe)。第一章由吴平 (浙江大学)、印莉萍 (首都师范大学)、胡彬 (浙江大学) 完成; 第二章由吴平、张立平 (浙江大学)、夏敏 (浙江大学) 完成; 第三章由张立平、吴平完成; 第四章由印莉萍、刘维仲 (山西师范大学) 完成。虽然本书的编写人员都是植物营养教学科研第一线的教师, 但在编写过程中差错和疏漏恐怕慎防不及, 敬请同行朋友批评指正, 以便有机会进一步完善这部教材。

作者在编写本书的过程中, 得到了张福锁教授、严小龙教授的帮助与鼓励。易可老师、陈清爽和郝海玲等同学对本书稿进行了校读工作, 在此一并致以衷心的感谢!

本书由国家重点基础研究发展规划项目 (973 项目) 和北京市自然科学基金共同资助出版。

吴 平

2000 年 7 月

目 录

第二版前言

第一版前言

第 1 章 植物无机氮转运系统和缺氮诱导的信号转导	1
引言	1
1 植物氮素吸收与同化代谢途径	2
1.1 植物氮素营养概述	2
1.2 根细胞中氮素吸收与同化	2
1.3 叶肉细胞中氮素吸收与同化	3
2 高等植物 NO_3^- 吸收转运系统	3
2.1 低亲和 NO_3^- 吸收转运系统	5
2.2 高亲和 NO_3^- 吸收转运系统	9
2.3 双亲和 NO_3^- 吸收转运系统及对生长素信号的应答	21
3 高等植物 NH_4^+ 吸收转运系统	26
3.1 NH_4^+ 的吸收	27
3.2 高等植物 NH_4^+ 转运体基因 <i>AMT</i> 及其表达调控	28
4 NO_3^- 的信号作用	31
4.1 NO_3^- 信号调节途径的研究系统	32
4.2 NO_3^- 信号诱导氮碳代谢转录本的变化	33
4.3 NO_3^- 作为信号诱导侧根发育	34
5 植物信号转导的双组分体系	37
5.1 植物双组分体系的组成	37
5.2 双组分信号体系的调控模式	39
5.3 双组分系统的复杂性	44
6 硝态氮调控植物根部分枝的双重途径	45
6.1 NO_3^- 的局部刺激效应	47
6.2 NO_3^- 的系统抑制效应	48
7 硝态氮调节信号转导的双途径	49
7.1 依赖于 NO_3^- 的局部信号转导途径	50
7.2 依赖于 NO_3^- 的远程信号转导途径	52
主要参考文献	54
第 2 章 植物应答低磷胁迫的机制及信号转导	58
引言	58
1 植物磷素营养的生理功能	58
1.1 磷的生理作用	58
1.2 植物磷效率的概念	60
1.3 低磷胁迫对磷效率的影响	61
1.4 菌根与非菌根植物提高根际磷利用率的策略	62

1.5	植物耐低磷胁迫性状的遗传特征	64
2	植物体内磷的稳定机制	67
2.1	细胞质中磷的稳定机制	68
2.2	叶片中磷的稳定机制	69
2.3	质外体中磷的稳定机制	69
2.4	缺磷植物通气组织的形成保证根尖的生长	69
3	植物缺磷响应机制	70
3.1	低磷胁迫可增加植物的根冠比	70
3.2	低磷胁迫可激活质膜磷酸转运体	71
3.3	磷的循环利用	80
3.4	低磷胁迫对光合作用及能量代谢的影响	86
3.5	低磷胁迫对呼吸作用的影响	89
3.6	低磷胁迫对氮代谢和次生物代谢的影响	93
3.7	低磷胁迫对内源激素的影响	94
4	缺磷信号的传递与调控	95
4.1	单细胞生物的磷胁迫反应	95
4.2	低磷胁迫下高等植物基因表达的调控	96
4.3	蛋白质磷酸化作用对磷缺乏反应的调控	100
4.4	低磷胁迫信号转导相关的研究	100
4.5	杀真菌剂亚磷酸盐	101
	主要参考文献	107
第3章	植物钾营养吸收转运机制及信号转导	110
	引言	110
1	钾的生理生化功能	110
1.1	钾与酶	110
1.2	钾与细胞伸长	111
1.3	钾与离子平衡	112
1.4	钾与内源激素	113
2	钾离子通道	114
2.1	K^+ 通道电压门控机制	114
2.2	植物内向整流 K^+ 通道 (K_{in}^+)	118
2.3	植物外向整流 K^+ 通道 (K_{out}^+)	124
2.4	其他钾通道蛋白	129
3	钾离子转运体	132
3.1	K^+ 转运体家族	133
3.2	低亲和钾离子转运体	135
3.3	高亲和钾离子转运体	136
4	植物钾营养高效利用与钾转运系统	145
4.1	HKT1 转运体与高亲和性的钾积累	145
4.2	HKT1 转运体与 K^+/Na^+ 交换	146
4.3	K^+ 通道在水稻中的过表达	147
5	多胺与钾离子	147
5.1	多胺与环境胁迫的关系	147

5.2	多胺与 K^+ 通道	149
5.3	多胺与信号转导	150
6	钾离子转运过程中的信号转导	150
6.1	ABA 诱导的 K^+ 流与气孔关闭	151
6.2	AtPP2CA 与 AKT2 K^+ 通道的相互作用	152
6.3	酪氨酸磷酸化与 Ca^{2+} 依赖的 K^+ 通道	154
	主要参考文献	157
第 4 章	植物对铁元素的吸收转运调控及其信号转导	161
	引言	161
1	植物应答缺铁胁迫的两种适应性机制	162
1.1	机制 I 植物应答缺铁胁迫的适应性机制	163
1.2	机制 II 植物应答缺铁胁迫的适应性机制	171
2	NRAMP 基因家族及膜泡运输与铁的吸收转运	180
2.1	内吞机制的提出与 NRAMP 基因家族	180
2.2	缺铁胁迫诱导的膜泡运输与铁的转运	185
2.3	机制 I 与机制 II 植物应答缺铁胁迫的“共享”机制	187
3	铁在植物体内的转运与再分配	188
3.1	尼克酰胺与铁在植物体内的分布和转运	188
3.2	植物地上部分铁的再利用与再分配	194
4	植物缺铁适应性反应的调控与信号转导	195
4.1	<i>frd3</i> 突变体的研究	195
4.2	植物缺铁适应性反应的调节部位与器官间的信号传递	198
4.3	植物体内的铁感应器	201
4.4	植物铁吸收、转运涉及的信号转导	202
4.5	植物铁吸收、转运的调控模式	205
5	结语与展望	208
	主要参考文献	209
第 5 章	植物镁元素营养的吸收转运机制与信号研究	215
	引言	215
1	镁的分子生理功能	215
1.1	镁在光合作用中的作用	215
1.2	Mg^{2+} 是核糖体合成的桥连成分	217
1.3	镁在基因组稳定性中的作用	217
1.4	镁是许多酶的组分及活性剂	218
1.5	镁与氮代谢	221
1.6	Mg^{2+} 与钙调素的作用	221
1.7	Mg^{2+} 对减轻铝毒害的作用	222
1.8	镁在抑制植物衰老中的作用	222
2	植物缺镁症状	222
2.1	缺镁的表现症状	222
2.2	缺镁的形态解剖症状	225
2.3	缺镁的生理生化症状	226

3	镁的吸收转运特点	231
4	高等植物中 Mg^{2+} 转运吸收的分子机制	233
4.1	拟南芥中 Mg^{2+}/H^{+} 交换体的克隆和特征分析	233
4.2	拟南芥中高亲和性的 Mg^{2+} 转运体 <i>AtMGT</i> 基因家族	238
5	高等植物镁元素信号研究	245
5.1	Mg^{2+} 对液泡两个通道的调控作用	245
5.2	Mg^{2+} 作为高等植物叶绿体 RNA 稳定性调控的信号	250
5.3	Mg^{2+} 作为逆境胁迫下的第二信使	254
	主要参考文献	255
第6章 锌铜锰分子生理学及基因表达调控		258
	引言	258
1	锌营养分子生理学及基因表达调控	258
1.1	锌的生理功能	258
1.2	真核生物锌转运体家族	259
1.3	酵母锌吸收转运及其调控	266
1.4	植物锌转运及其调控	272
2	铜营养的分子生理学及基因表达调控	277
2.1	铜的生理功能	277
2.2	重金属转运 ATPase-CPx-ATPase	278
2.3	酵母铜转运机制	284
2.4	植物铜吸收转运及乙烯信号途径的参与	285
2.5	衣藻的铜营养信号的遗传分析	289
2.6	植物铜素毒害及其抗性机制研究进展	290
3	锰的吸收机制及基因表达调控	294
3.1	锰的生理功能	294
3.2	锰与其他矿质元素的关系	295
3.3	酵母锰吸收转运及其调控	296
3.4	植物锰转运机制及其调控	300
3.5	锰胁迫对植物的影响	302
4	总结与展望	304
	主要参考文献	306
第7章 植物应答盐胁迫的调控机制及信号转导		310
	引言	310
1	Na^{+} 进出细胞质膜的运输系统	310
2	质膜 Na^{+}/H^{+} 逆向转运体与盐胁迫的 SOS 信号通路	312
2.1	拟南芥质膜上的 Na^{+}/H^{+} 逆向转运体 SOS1	312
2.2	盐胁迫的 SOS 信号通路	319
3	Na^{+} 外排的动力 P 型 ATPase	326
3.1	质膜 H^{+} -ATPase 的结构、功能和调节	326
3.2	质膜 H^{+} -ATPase 表达的组织特异性	327
3.3	环境对质膜 H^{+} -ATPase 表达的影响	329
4	液泡膜上的 Na^{+}/H^{+} 逆向转运体 NHX	329

4.1	拟南芥的 AtNHX	331
4.2	盐生植物北滨藜的液泡膜 AgNHX1	339
4.3	水稻和燕麦液泡膜上的 NHX1	341
4.4	NHX 的信号通路	342
5	Na ⁺ 的区域化动力 V 型 ATPase	348
5.1	耐盐植物松叶菊属冰叶日中花液泡内 H ⁺ -ATPase 的产生	348
5.2	盐地碱蓬液泡膜 H ⁺ -ATPase 在盐胁迫下表达	349
5.3	多胺对根液泡膜完整性的保护作用	349
5.4	液泡内高浓度的 Na ⁺ 的生理重要性	349
6	总结与展望	350
	主要参考文献	353

第 1 章 植物无机氮转运系统和缺氮诱导的信号转导

引言

硝态氮是植物的主要氮源，绝大多数有机氮均来源于硝态氮 (NO_3^-) 的同化。在水淹地以及还原性较强的土壤中， NH_4^+ 也可成为植物的主要无机氮素营养。如水稻具有主动与被动两种 NH_4^+ 吸收转运系统。主动吸收转运系统对 NH_4^+ 具有高亲和力，受低氮胁迫诱导。但水稻在淹水条件下对 NO_3^- 的吸收转运亲和力仍高于对 NH_4^+ 的亲和力。在米-曼 (Michaelis-Menten) 高亲和吸收转运系统运动力学方程描述浓度范围内，水稻吸收 NO_3^- 的 K_m 值为 $26\mu\text{mol/L}$ 左右，吸收 NH_4^+ 的 K_m 值为 $51\mu\text{mol/L}$ 左右。植物根系高亲和 NO_3^- 吸收系统使植物在低 NO_3^- ($10\mu\text{mol/L}$) 营养介质中能保持生长。根系吸收 1 个 NO_3^- 分子时协同吸收 2 个 H^+ ，维持 H^+ 梯度的 ATP 主要由线粒体呼吸作用提供。根系吸收的 NO_3^- 可暂时储藏在根细胞液泡内或随蒸腾流由木质部导管 (xylem vessel) 输送到地上部，也可在根细胞还原为 NH_4^+ ，进入谷氨酰胺 (glutamine) 与天冬酰胺 (asparagine) 合成反应 (图 1.1)。质子-ATP 酶为细胞吸收 NO_3^- 提供电化学势梯度 (Buchanan et al. 2000)。

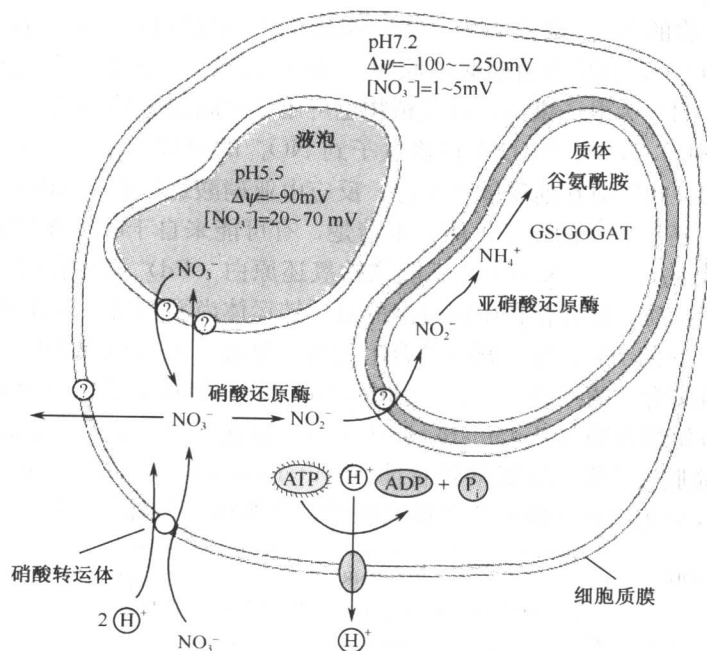


图 1.1 植物细胞 NO_3^- 同化，包括 NO_3^- 转运吸收和还原 (Buchanan et al. 2000)

1 植物氮素吸收与同化代谢途径

草本植物吸收 NO_3^- 的同化反应主要发生在叶肉细胞中，木本植物则主要发生在根表皮与皮层细胞中。根细胞中的 NO_3^- 同化反应场所主要为前质体和叶片细胞中的叶绿体。

1.1 植物氮素营养概述

氮是蛋白质、核酸、磷脂及其他植物生长发育所必需的有机氮化合物的构成成分，而这些物质是活细胞赖以生存的结构或功能组分，因此氮被称为生命的元素。氨基酸的合成对氮的需求量最大，因为它不仅是合成蛋白质的基础，而且还是其他许多化合物的前体。氮素也是核苷酸、辅酶和辅基 (NAD^+ 、 NADP^+ 、 FAD) 等的必需元件，同时也是叶绿素分子的结构成分。氮缺乏植株的特征是发生黄化 (缺绿症)，因为这些植株在氮匮乏的条件无法合成足量的叶绿素。另外，一些植物激素 (如生长素和细胞分裂素)、维生素分子含氮，或者由含氮的化合物衍生而来。植物可以合成各种含氮的次生代谢产物，其中最主要的是生物碱。尽管植物中黄酮类化合物和酚类化合物不含氮，但它们从苯丙氨酸衍生而来，这意味着它们的合成过程与氨基酸代谢紧密相连。

1.2 根细胞中氮素吸收与同化

木本植物吸收的 NO_3^- 经根表皮与皮层细胞进入同化反应。 NO_3^- 在细胞质中还原为亚硝酸根 (NO_2^-)，该反应由硝酸还原酶 (NR) 催化，大多数植物以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 为电子供体，有些植物也可用烟酰胺腺嘌呤磷酸二核苷酸 (NADPH) 作电子供体。NR 从 NADH 转移电子到 NO_3^- 的过程如图 1.2 所示。根细胞中 NO_2^- 还原为 NH_4^+ 的反应在前质体中进行，反应由亚硝酸还原酶 (NiR) 催化。在非绿色组织中， NO_2^- 还原所需的电子供体尚不清楚，有可能来自于呼吸作用产生的 NADH 或 NADPH。但 NADH 或 NADPH 不能像铁氧还原白 (Fd) 那样直接作为 NO_2^- 还原时的电子供体。目前，是否存在中间过渡的电子转运体尚不明确。在谷氨酰胺合成反应中， NO_2^- 还原产生的 NH_4^+ 与谷氨酸结合生成谷氨酰胺，该反应所需的 ATP 由线粒体提供；由谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 催化完成。谷氨酰胺与 α -酮戊二酸结合，在谷氨酸合酶 (glutamate synthetase) 催化下产生 2 个谷氨酸分子。谷氨酸合酶也称谷氨酰胺-酮戊二酸氨基转移酶 (glutamine-oxoglutarate amino transferase, GOGAT)。该反应需 2 分子的还原型铁氧还蛋白作为电子供体。GS 对 NH_4^+ 具高亲和

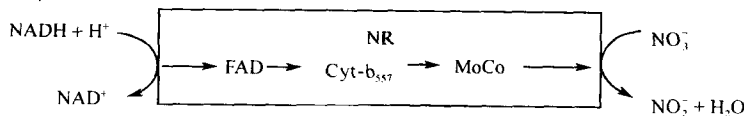


图 1.2 NR 从 NADH 转移电子到 NO_3^- 的过程 (吴平等 2001)

力 ($K_m \approx 5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$)，因此，由 NO_2^- 还原产生的 NH_4^+ 可完全进入氨基酸代谢 (莫良玉等 2001)。

1.3 叶肉细胞中氮素吸收与同化

叶肉细胞质中的 NO_3^- 还原反应与根细胞质中的反应相同，叶肉细胞中 NO_2^- 还原为 NH_4^+ ，在叶绿体中进行。以铁氧还蛋白 (ferredoxin, Fd) 为电子供体，亚硝酸还原酶从铁氧还蛋白转移电子到 NO_2^- 的过程如图 1.3 所示。

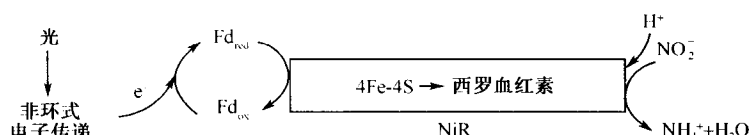


图 1.3 叶绿体中亚硝酸还原酶的催化作用示意图 (李合生等 2002)

NO_2^- 还可与碱基 (R-NH_2) 的氨基结合形成重氮基化合物，继而在产生 N_2 的同时释放乙醇伤害细胞。因此， NO_2^- 必须及时还原为 NH_4^+ 。

由光呼吸产生的 NH_4^+ 也被相同的同化过程固定。光呼吸从甘氨酸产生的 NH_4^+ 是由 NO_2^- 还原产生的 NH_4^+ 的 5~10 倍，因此叶片中合成的谷氨酰胺仅一小部分由 NO_2^- 还原提供 NH_4^+ 。谷氨酸的相似物除草剂——草丁膦 (glufosinate) 能限制谷氨酰胺合成，导致叶内 NH_3 积累中毒。叶片细胞中合成的谷氨酰胺在 GOGAT 催化下转化为 2 分子谷氨酸，反应由光系统 I 的还原态铁氧还蛋白为还原剂。GOGAT 活性受其底物类似物叠氮丝氨酸 (azaserine) 的抑制 (Adriana et al. 2000)。

NH_4^+ 同化反应需光合作用提供碳源，因此 NO_3^- 同化与 CO_2 同化应该是同步的。另一方面， NO_3^- 同化反应也须受到严格的调控，使产生的氨基酸不超过代谢要求。由于 NO_2^- 积累的毒害作用， NO_3^- 还原速率不应超过 NO_2^- 还原速率。叶片细胞中 NO_3^- 还原所需的 NADH 在黑暗条件下可由葡萄糖酵解产生，但 NO_2^- 还原及 NH_4^+ 同化依赖于光合作用提供电子及 ATP。在黑暗条件下， NO_3^- 还原反应必须停止，以避免 NO_2^- 的积累毒害。因此 NO_3^- 还原酶基因的表达调控对植物氮素营养吸收代谢具有关键作用。

2 高等植物 NO_3^- 吸收转运系统

NO_3^- 既作为营养，又作为信号，对植物的代谢和生长有重要的影响。植物已进化出一种感知 NO_3^- 的复杂机制，将其同化过程与光合作用和碳氮整体代谢相整合，使植物能够控制其生长速率、根部结构、C/N 比率、还原剂浓度及不同环境条件下离子和 pH 的平衡。根系吸收转运 NO_3^- 是大多数植物氮素营养代谢的第一步。应用大麦 (*Hordeum vulgare*)、玉米 (*Zea mays*) 和浮萍 (*Lemna minor*) 的研究表明，存在着 3 个主要的 NO_3^- 吸收转运体系：高亲和 NO_3^- 吸收转运系统 (high affinity nitrate transport system, HATS)、低亲和 NO_3^- 吸收转运系统 (low affinity nitrate transport

system, LATS) 和双亲和 NO_3^- 吸收转运系统 (dual-affinity nitrate transport system)。其中高亲和 NO_3^- 吸收转运系统又包括 NO_3^- 诱导性高亲和吸收转运系统 (inducible HAT system, iHATS) 和 NO_3^- 组成型高亲和吸收转运系统 (constitutive HAT system, cHATS)。并且近来分子生物学的研究证明低亲和 NO_3^- 吸收转运体系也存在组成型 (cLATS) 和诱导型 (iLATS) 之分。高亲和体系具有饱和性动力学特征, 其 K_m 值的变动范围为 $10 \sim 100 \mu\text{mol/L}$, 而低亲和体系则表现出线性、无饱和的动力学特征。它们吸收 NO_3^- 的 K_m 值一般在几个毫摩尔的浓度范围 (图 1.4)。

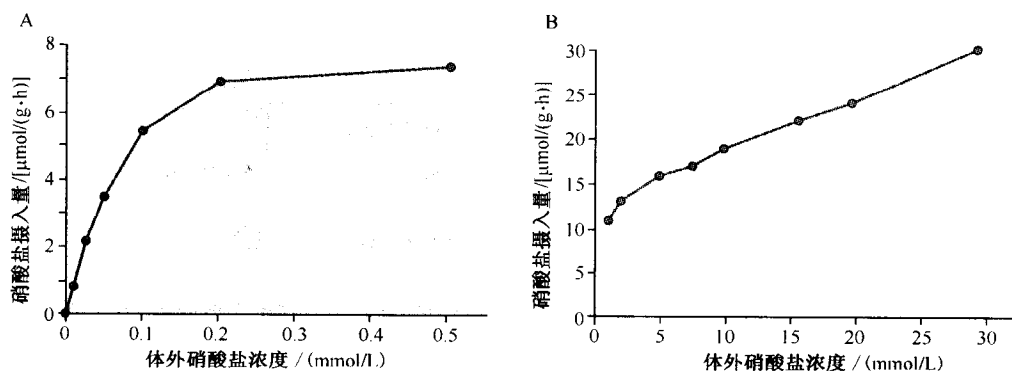


图 1.4 硝酸盐的吸收动力学

把硝酸盐的流入量作为大麦根外部硝酸盐浓度的函数。这里的大麦根已经经过了 0.1 mmol/L 硝酸盐的预处理以诱导吸收系统的活性。A. 高亲和力系统的硝酸盐吸收表现出米氏动力学特征; B. 低亲和力系统的硝酸盐吸收表现出非饱和的动力学特征

当生长介质 NO_3^- 浓度较低时, 根系吸收 NO_3^- 主要依赖于 HATS; 当生长介质 NO_3^- 浓度高于 1 mmol/L 时则主要依赖于 LATS。目前已鉴定了 3 个 NO_3^- 转运体基因家族: *NRT1*、*NRT2* 和 *NAR2*。*NRT2* 和 *NAR2* 家族的几个成员编码 iHATS 转运体, 对 *NAR2* 家族的研究工作促进了高等植物 *NRT2* 基因的克隆。自 Trueman 等 (1996) 在大麦中首先分离到高等植物的 *NRT2* 基因 *HvNRT2.1* (原名 *BCH1*) 和 *HvNRT2.2* (原名 *BCH2*) 后, 目前已在高等植物中分离到几十个 *NRT2* 基因。在同一物种中, 一般有多多个 *NRT2* 基因, 如在大麦中可能有 $7 \sim 10$ 个 *NRT2* 基因, 已克隆到其中 4 个; 在拟南芥中有 7 个 *NRT2* 基因。*NRT1* 家族所编码的 NO_3^- 转运体包括: NO_3^- /组氨酸双特异转运体 *BnNRT1.2* (Zhou et al. 1998)、双亲和转运体 *AtNRT1.1* (*CHL1*) (Tsay et al. 1993, Huang et al. 1996, Touraine et al. 1997, Wang et al. 1998, Liu et al. 1999, Guo et al. 2002)、低亲和转运体 *AtNRT1.2* (Huang et al. 1996)。与 *AtNRT1.1* 不同的是, *AtNRT1.2* 只是单一的 LATS 转运体, 并不具有高亲和力特性。此外 Munos 等 (2004) 通过拟南芥的 *chl1-5* 突变株转录模型的研究发现, *NRT1.1* 在调节 *NRT2.1* 和 NO_3^- HATS 的活性中起着意想不到的重要作用, 主要表现在: ① *NRT2.1* 受控于一需要 NO_3^- 的信号系统, 而不是氮代谢的反馈抑制作用; ② *NRT1.1* 起着更直接的信号作用, 并且它的转运活性产生一种未知信号, 这个信号需要氮代谢对 *NRT2.1* 的抑制作用。

2.1 低亲和 NO_3^- 吸收转运系统

低亲和 NO_3^- 转运体蛋白主要由 *NRT1* 家族编码, *NRT1* 家族中参与 NO_3^- 吸收和氨基酸代谢的基因包括: 烟草的 *NpNRT1.1* (AJ277084) 和 *NpNRT1.2* (AJ277085); 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 *AtNRT1.1* (L10357) 和 *AtNRT1.2* (AF073361); 大豆 (*Glycine max*) 的 *GmNRT1-1* (AB052784)、*GmNRT1-2* (AB052785)、*GmNRT1-3* (AB052786)、*GmNRT1-4* (AB052787)、*GmNRT1-5* (AB052788); 欧洲油菜 (*Brassica napus*) 的 *BnNRT1* (AJ278966); 水稻 (*Oryza sativa*) 的 *OsNRT1* (AF140606) (Muldin et al. 1995)。

高等植物低亲和 NO_3^- 转运体基因在拟南芥中研究得比较清楚。拟南芥基因组相对较小, 常用根瘤土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 带抗卡那霉素标记基因的 T-DNA 插入突变筛选突变体。Tsay 等 (1993) 就筛选到抗氯酸盐 *chl1* 突变体 (*chl1* 突变体经氯酸盐处理后缺乏叶绿素, 较易筛选)。氯酸盐是硝酸盐的同系物, 可通过硝酸盐转运体被吸收, 在植株体内还原为 ClO_2^- 对植株产生毒害作用。因此只有硝酸盐转运体突变体才能在氯酸盐介质中生长。用新筛选到的突变体与突变体 *chl1-1* 回交, 考察 F_1 代发现新筛选的突变体为 *chl1-1* 等位基因突变体。在 70 个 F_2 代个体中没有发现突变位点与抗卡那霉素标记基因之间的重组, 说明抗氯酸盐表型与抗卡那霉素表型一致, 因此确认该新筛选到的突变体是由 T-DNA 插入引起的突变体 (*CHL1-2::T-DNA*)。在突变体 *CHL1-2::T-DNA* 基因组文库中发现一些互相有重叠的 T-DNA 阳性杂交片段。通过 RFLP 分析, T-DNA 插入片段定位于 1 号染色体顶端 *CHL1-1* 位点处。用 T-DNA 插入点一端的序列为探针, 对由 γ 射线引起的另外 3 个突变体 (*chl1-3*、*chl1-4*、*chl1-5*) 与野生型基因组 *EcoRI* 酶切 DNA 片段进行 Southern 印迹分析, 在突变体 *chl1-5* 中缺失一个 8kb 的片段。因此, *chl1-5* 被认为是突变体 *CHL1-2::T-DNA*。根据 Southern 印迹分析结果, 从野生型基因组中分离了包括 T-DNA 插入点与 *CHL1* 基因在内的 11kb 的 *HindIII* 片段 (图 1.5)。突变体 *chl1* ~ *chl5* 的表型补偿试验表明转入 11kb 的 *HindIII* 片段的突变体对氯酸盐敏感, 证明 11kb 的 *HindIII* 片段带有 *CHL1* 基因。

从 11kb *HindIII* 片段中获得的一些覆盖 T-DNA 插入位点的 2kb 长度的 cDNA 克隆。比较 *CHL1* 基因的基因组 DNA 克隆序列与 cDNA 克隆序列, 发现克隆的 cDNA 片段至少包括 4 个内含子, 前 3 个有 94~185bp, 第 4 个有 1650bp, 推测有一编码 520 个氨基酸的蛋白质的可读框, 分子质量约为 65kDa。

根据 cDNA 推测的氨基酸序列与其他植物 NO_3^- 转运体基因的氨基酸序列无明显同源性。*CHL1* 编码蛋白 (*CHL1*) 还没有分离到, 但根据上述 cDNA 推测的氨基酸序列结构, 经亲水性 (hydropathy) 分析表明, *CHL1* 可能具有 12 个跨膜区域 (图 1.6)。

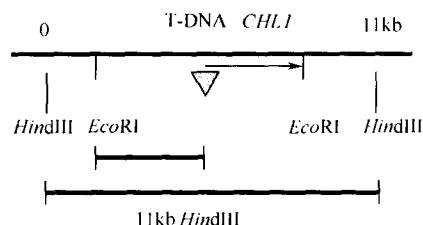


图 1.5 突变体 *CHL1-2::T-DNA*
T-DNA 插入点两端限制酶酶切位点 (Tsay et al. 1993)
横向箭头表示 *CHL1* 基因转录方向