

DOI: 10.13376/j.cbls/2016160

文章编号: 1004-0374(2016)10-1230-13



毛传澡, 浙江大学生命科学学院教授, 教育部新世纪人才。致力于水稻磷高效吸收利用的分子调控机制及养分高效根构型的分子机制研究, 承担“863”、“973”项目及转基因专项等项目。在 *PNAS*、*Plant Physiol*、*Plant J* 等期刊发表论文 30 多篇, 获得专利授权 4 项。

水稻养分利用功能基因组研究进展

刘 于¹, 毛传澡^{1*}, 储成才²

(1 浙江大学生命科学学院植物所, 浙江大学植物生理学与生物化学国家重点实验室, 杭州 310058;

2 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要: 随着功能基因组研究的深入, 水稻养分利用功能基因组研究已经取得了很大的进展。综述了水稻中我国主要研究的大量元素中的氮(N)、磷(P)、钾(K)、钙(Ca)及微量元素中的铁(Fe)、锌(Zn)等必需矿物质营养元素的吸收、分配利用及信号调控的功能基因及其分子调控机制的主要研究进展。

关键词: 养分; 吸收利用; 基因功能

中图分类号: Q945.1 **文献标志码:** A

Research progress on functional genomics of rice nutrient utilization

LIU Yu¹, MAO Chuan-Zao^{1*}, CHU Cheng-Cai²

(1 State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, Institute of Plant Sciences, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2 State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Genetics and

Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: With the development of functional genomics study, great progress has been made on the functional genomics of nutrient utilization in rice. This paper summarizes the main research progress on the functional genes and its molecular regulation mechanisms involved in the absorption, distribution, utilization and signal regulation in rice essential mineral nutrients, including nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, iron, zinc.

Key words: nutrient; acquisition and utilization; gene function

长期以来粮食增产很大程度上依赖水肥资源的大量投入, 而肥料的大量施用不但直接增加了农业成本, 并且, 大量化肥因未能被作物利用而进入环境, 导致农田土壤酸化、水体富营养化和大气氮沉降增加等严重的环境问题^[1]。因此, 提高作物养分资源利用效率, 保护生态环境, 是我国发展资源节

约型与环境友好型高产高效现代农业亟需解决的重

收稿日期: 2016-07-11

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0100700, 2016YFD0100900); 国家自然科学基金项目(31572187, 31400224); 浙江大学实验技术研究项目(SYB201608)

*通信作者: E-mail: mcz@zju.edu.cn

大问题。

植物生长所需要的营养元素可分为必需营养元素 (essential mineral element) 和有益营养元素 (beneficial element)。必需营养元素的界定主要依据以下标准: (1) 缺乏该元素, 植物不能完成其生活史; (2) 缺乏该元素植物会出现特有的缺素症状, 且必须施用该元素后才能恢复; (3) 该元素在植物营养中具有直接作用, 而不是改善土壤或生长介质中不利的微生物或化学条件^[2]。而有益元素则定义为有益于植物生长, 但不是必需或者是某些植物种类必需或特殊条件下必需的元素。据此, 植物必需营养元素有 17 种, 其中除碳 (C)、氢 (H) 和氧 (O) 外, 大量元素 6 种, 即氮 (N)、磷 (P)、硫 (S)、镁 (Mg)、钙 (Ca)、钾 (K)。微量元素 8 种, 即铁 (Fe)、锰 (Mn)、铜 (Cu)、锌 (Zn)、镍 (Ni)、钼 (Mo)、硼 (B) 和氯 (Cl)^[2]。在 17 种必需营养元素中除碳 (C)、氢 (H) 和氧 (O) 外, 其他的元素都是矿质元素。

土壤中, 绝大多数矿质营养元素以生物有效性较低的难溶形式存在, 不能被植物吸收利用, 只有可溶性的无机离子才能被植物根系直接吸收利用。植物主要通过根表皮细胞膜上的转运蛋白吸收这些可溶性的矿质离子。无机离子进入植物体后除参与正常的生理活动外, 多余的离子可以储存在液泡中以维持植物细胞内的离子平衡^[3]。通常情况下, 土壤中可溶性无机离子的含量较低, 并且容易受土壤酸碱度等多种因素的影响。因此, 在长期进化过程中, 植物形成了复杂而又精细的调控机制以应对土壤溶液中营养元素含量的变化。

随着功能基因组学研究的推进, 同时借助于模式植物拟南芥的研究, 人们在植物营养元素的吸收、转运、分配和再利用及其调控的分子遗传机制上已取得很大进展。在水稻中, 也有越来越多参与营养元素吸收、利用及调控的功能基因被克隆和鉴定出来, 对这些基因的功能解析可以帮助人们更深入地了解作物营养元素的吸收利用机制, 也为人类利用分子遗传手段改良作物养分吸收利用效率奠定基础。本文主要围绕水稻必需矿质元素中我国主要研究的大量元素中的氮 (N)、磷 (P)、钾 (K)、钙 (Ca) 及微量元素中的铁 (Fe)、锌 (Zn) 的功能基因组研究进展进行了概括与综述。

1 氮吸收利用功能基因组研究进展

氮 (N) 是植物需求量最大的营养元素。但土壤中可利用的氮源却非常有限, 除部分植物 (如豆科

植物) 可通过根瘤来固定大气中的氮以外, 其他植物需要通过吸收土壤中的含氮物质来维持基本的生命活动。在大多数土壤中, 硝态氮 (NO_3^-) 和铵态氮 (NH_4^+) 是作物吸收的主要氮素形式。

高等植物主要通过铵转运蛋白 (ammonium transporters, AMTs) 吸收土壤中的铵态氮。水稻中铵转运蛋白分为 5 个亚家族: OsAMT1~OsAMT5。OsAMT1、OsAMT2、OsAMT3 亚家族分别含有 3 个成员, OsAMT4 亚家族只有 1 个成员, OsAMT5 亚家族包含 2 个成员。研究发现 OsAMT1;1、OsAMT1;2、OsAMT2;1 和 OsAMT5;1 均具有转运铵态氮的能力^[4]。OsAMT1;1 在根中和地上部分均有表达, 表达受铵的诱导。OsAMT1;1 是一个低亲和铵转运体^[5], OsAMT1;1 过表达植株在高铵培养条件下表现出铵毒害症状, 而在缺铵和正常铵供给条件下, 过表达 OsAMT1;1 植株叶绿素、淀粉、糖含量及产量均显著高于野生型^[6]。OsAMT1;2 在根的中柱和表皮表达, 铵处理显著诱导其表达^[7]。OsAMT1;2 的表达受转录因子 IDD10 (indeterminate domain 10) 的直接调控, *idd10* 突变体主根表现为对铵超敏感^[8]。OsAMT1;3 是高亲和铵转运体, 增强表达该基因影响碳氮平衡, 进而影响植物生长。OsAMT2;1 表达不受铵和硝态氮的诱导。正常情况下 OsAMT1;1、1;2、1;3、3;3 表达量最高, OsAMT2;1 和 2;3 次之, OsAMT2;2、3;1 和 3;2 表达量最低。在氮饥饿时, OsAMT1;1、OsAMT1;2、OsAMT3 表达均上升, 只有 OsAMT1;3 表达下调, 且在恢复供氮后表达量上升, 其他基因在恢复供氮时对不同氮源会产生不同的响应, 如 OsAMT1;1 仅在硝酸盐补给时下调, OsAMT3;3 在补铵时下调^[9]。OsAMT1;1 在栽培稻中只有一个基因型。研究发现, 在从野生稻 (*O. rufipogon*) 向栽培稻驯化过程中, OsAMT1;1 基因及邻近区域核苷酸多态性显著降低, 暗示 OsAMT1;1 受到较强的人工选择^[10]。

植物对硝态氮吸收和转运主要通过硝酸盐转运蛋白 (nitrate transporters, NRTs) 来完成。在拟南芥中对硝酸盐吸收及转运机制已有较清楚的认识。NRTs 可分为 NRT1 和 NRT2 两个家族。NRT1 主要由低亲和力硝酸盐转运蛋白构成, 属于 PTR (peptide transporters) 家族, 有人也将 NRT1/PTR 家族命名为 NPF (NRT1/PTR family), 根据各成员进化关系 NRT1s 可分为 8 个亚家族 (NPF1~8)。拟南芥中已克隆鉴定了 12 个 NRT1 成员 (AtNRT1.1~1.12), 7 个 NRT2 成员 (AtNRT2.1~2.7), 其中 4 个成员已证

明与硝酸盐转运相关^[11]。水稻中也已经鉴定了多个 NRT1 家族成员, OsPTR 家族中 OsPTR6 具有转运二肽和三肽的能力^[12], 过表达 *OsPTR6* 转基因水稻表现出更高的氮积累和生物量^[13]。另一个 OsPTR 家族成员 *OsPTR9* 受外界氮源和昼夜节律调控, 过表达 *OsPTR9* 转基因水稻也表现出更高氮利用率和产量^[14], 但目前仍没有证明这两个蛋白具有转运硝酸盐能力。最近的研究结果表明, *NRT1.1B* 的一个碱基的自然变异是导致粳稻与籼稻间氮肥利用效率差异的重要原因。将籼稻型 *NRT1.1B* 导入粳稻品种, 在北京、上海、长沙三个试验点进行的田间实验表明, 含有籼稻型 *NRT1.1B* 的粳稻品种在一半施肥条件下, 与对照相比增产 30%~33%, 氮肥利用效率提高 30%, 在正常施氮条件下, 增产 8%~10%, 氮肥利用效率提高约 10%, 表明 *NRT1.1B* 在粳稻氮肥利用效率改良上具有重要应用价值^[15]。在水稻中目前已鉴定了 5 个 NRT2 家族成员。*OsNRT2.1* 和 *OsNRT2.2* 具有相同的编码区, 只是 5' 和 3' 非翻译区不同, 且与其他单子叶植物 *NRT2* 基因具有高度相似性; *OsNRT2.3* 和 *OsNRT2.4* 与拟南芥 *NRT2* 基因更相近。进一步研究发现, *OsNRT2.3* mRNA 具有 2 种不同的剪接形式, *OsNRT2.3a* 和 *OsNRT2.3b*。*OsNRT2.3a* 主要在根部表达且受硝酸盐诱导, 而 *OsNRT2.3b* 则主要在地上部表达^[16-17]。进一步研究证明 *OsNRT2.3a* 在根中柱特异性表达, 参与硝酸盐由根部至地上部转运^[18], 而 *OsNRT2.3b* 是一个 pH 值敏感的硝酸盐转运体, 在水稻中高表达 *OsNRT2.3b* 可提高水稻的 pH 缓冲能力, 提高对氮、磷和铁的吸收能力, 并提高籽粒产量和氮利用效率^[19]。另外, *OsNAR1* 通过与 *OsNRT2.1*、*OsNRT2.2* 及 *OsNRT2.3a* 互作参与硝酸盐的吸收^[16]。

拟南芥的 *CHL1* (*AtNRT1.1*) 在响应外界硝酸盐浓度变化的信号调控机制中起到关键的作用, 这个蛋白作为硝酸盐感受器参与硝酸盐的应答反应^[20]。水稻中硝酸盐的受体及其调控机制还有待鉴定。尽管在水稻中氮信号调控机制还不是很清楚, 但科学家也发现很多类型基因会影响作物的氮代谢过程, 如 *DEP1* (*dense and erect panicles 1*) 是一个控制水稻株型的关键基因, 编码植物 G 蛋白 γ 亚基。该基因功能获得性突变 *dep1* 可以促进细胞分裂, 使得穗枝梗数增加变密, 每穗籽粒数增多, 促进水稻增产^[21]。该基因能使水稻增产的一个原因是 *DEP1* 基因的不同等位变异对氮的响应 (包括植株高度和分蘖数等) 不同, 携带有 *dep1-1* 等位变异的水稻植株

氮吸收和同化能力增强, 收获指数和产量都有提高^[22]。研究发现, 编码 NAC 类转录激活因子基因 *OsNAP* (*Oryza sativa NAC-like, activated by apetala3/pistillata*) 是水稻中一个控制衰老的关键基因, 通过直接靶向与叶绿素降解、营养转运相关的基因 (如 *OsPOT*、*OsPTR2* 和 *OsPTR3* 等) 以及其他一些与衰老相关的基因正向调控叶片衰老。*OsNAP* 的过表达可以显著提高水稻籽粒的总氮含量, 而其 RNA 干涉植株延迟水稻叶片衰老以及延长灌浆期, 使水稻产量提高^[23]。*TONDI* (*tolerance of nitrogen deficiency 1*) 是一个耐低氮的 QTL (*quantitative trait locus*) 基因, 编码一个含 *thaumatin* 结构域的蛋白, 该蛋白定位于细胞质膜。在水稻中增强该基因表达的植株表现出明显的耐低氮能力。研究表明, 27.3% 的调查品种含该 QTL 位点, 而 72.7% 的调查品种则不含该位点, 表明该基因在育种中具有比较大的潜力^[24]。

2 磷吸收利用功能基因组研究进展

增施磷肥是当前提高作物产量的主要应对措施之一。但磷肥施入土壤后容易被固定, 不易被作物吸收, 造成磷肥当季利用效率低, 并导致水体富营养化等环境问题^[25]。同时, 磷矿又是不可再生资源。因此, 提高作物对磷肥的利用效率已成为当今农业发展亟需解决的重要问题。近年来, 国内外有关植物磷信号及磷吸收转运的功能基因及其分子机制研究有了很大进展。同时, 我国科学家在水稻磷养分信号及吸收转运的分子机制研究上也取得了一系列原创性进展, 多项研究成果甚至领先于模式作物拟南芥。

2.1 磷活化功能基因研究

土壤中磷 (P) 一般是以复合物形式存在, 植物不能直接吸收利用土壤中的有机磷, 只有有机磷被磷酸酯酶水解成无机磷后才能利用。缺磷时植物根部往往会分泌酸型磷酸酯酶到土壤中, 促进根际有机磷的吸收利用^[26]。水稻中共有 26 个紫色酸性磷酸酶 (PAP) 基因, 其中有 10 个受缺磷诱导。研究表明, 超表达 *OsPAP10a* 的转基因水稻能更好地利用培养液中的 ATP 作为磷源释放自身吸收的无机磷。在土培试验中, 超表达 *OsPAP10a* 的转基因水稻长势显著优于野生型植株, 抽穗提前并有更多的分蘖。而 *OsPAP10c* 超表达材料的根表面酸性磷酸酶活性比 *OsPAP10a* 超表达材料还高^[27-28]。

2.2 磷转运蛋白功能研究

无论是根从土壤中吸收磷, 还是植株体内磷的

转移都需要磷转运蛋白参与^[29-30]。目前已报道的具有磷转运活性的蛋白主要是磷酸盐转运体 PHT 家族、参与磷从根往地上部转运的 SPX-EXS 亚家族 PHO1 及其同源基因, 还有参与液泡磷转运的 SPX-MFS 亚家族基因如 VPT1 及 OsSPX-MFS3 等。

磷酸盐转运体 PHT (phosphate transporter, 在水稻中简称 PT) 属于主要协助运输蛋白超家族 (MFS) 的第九亚家族^[31]。根据氨基酸序列、亚细胞定位及功能差异, 已知磷酸盐转运体被分为 4 个亚家族: PHT1、PHT2、PHT3、PHT4^[32]。研究表明, PHT1 亚家族成员在磷酸盐转运中占据着十分关键的地位, 大部分 PHT1 家族成员都受缺磷诱导, 参与植物磷的吸收和转运。多数 PHT1 蛋白定位于植物的细胞质膜 (即细胞与胞外介质的界面), 直接参与植物体对土壤中磷酸盐的吸收^[29]。水稻基因组中有 13 个编码 PHT1 家族的基因 (*OsPT1~13*)^[33]。除 *OsPT1/3/5/7/12* 外, 其他 8 个 PHT1 家族成员都得到了详细的功能研究, 基本上都参与磷吸收或转运^[29]。*OsPT1* 和 *OsPT8* 在根和叶组成型表达, 在磷充足条件下吸收和转运外界的磷^[34-35]。*OsPT2*、*OsPT6*、*OsPT9* 和 *OsPT10* 受缺磷诱导, *OsPT2* 在根中柱表达, 参与无机磷吸收及从地下往地上部转运; *OsPT6* 在根的表皮、皮层和中柱组织表达; *OsPT9* 和 *OsPT10* 在根表皮和根毛表达, 参与吸收外界磷^[36-37]; *OsPT11* 和 *OsPT13* 参与丛枝菌根共生并受菌根诱导, 由 OsPHT1;11 吸收菌根供应的无机磷^[38]。

已有研究表明, 磷转运体受到一系列转录和翻译后水平的调控, 从而在不同磷环境下行使功能。在转录水平, *PT* 的表达受 OsPHR2 (水稻磷信号中心调控转录因子) 的调控。OsPHR2 通过结合到下游基因启动子的 P1BS 元件 (GNATATNC) 来调控下游基因表达^[39]。已经证明 OsPHR2 直接结合水稻磷酸盐转运体 *OsPT2*、*OsPT8* 的启动子, 从而调控它们的表达^[40-41]。*PT* 蛋白还受到一系列翻译水平的调控。OsPHF1 是磷转运体从内质网输出定位到质膜的辅助蛋白, 在调控 OsPTs 从内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 到质膜运输过程中发挥着重要作用^[42]。进一步研究表明, 水稻中的 *PT8* 受磷酸化调控, 磷酸化的 *PT8* 不能和 OsPHF1 互作^[43]。当外界磷水平较高时, *PT8* 蛋白受到的磷酸化修饰程度提高, 从而降低其在质膜上的积累; 而当外界磷水平较低时, *PT8* 蛋白磷酸化修饰程度降低, 从而增加其在质膜上的积累, 进而提高磷的吸收能力。浙江大学

吴平研究组发现, 将 *OsPT8* 的第 517 位丝氨酸突变成模拟磷酸化的天冬氨酸时可使 *OsPT8* 突变蛋白滞留在内质网中, 而如果将第 517 位丝氨酸突变成模拟非磷酸化的丙氨酸时, *OsPT8* 突变蛋白则更多地定位到质膜上, 从而促进磷从细胞外向细胞内吸收, 并基于此原理获得了改良磷吸收效率的基因工程水稻^[43]。进一步的研究鉴定了 *OsCK2 α 3/ β 3* 参与调控 *PT* 的磷酸化状态, *OsCK2* 会磷酸化 *OsPT8* 的 517 位的丝氨酸, *OsCK2* 包含 α 3 和 β 3 亚基, 以异源全酶形式参与 *OsPT* 的磷酸化过程, *OsCK2 α 3* 不受缺磷调控, 但 *OsCK2 β 3* 会受缺磷降解^[43]。*OsCK2* 和 *OsPHF1* 对 *OsPT* 的调控研究结果丰富了人们对磷转运体转录后调控机制的认识, 也为我们利用 *OsPHF1* 及 *OsPT* 改良作物磷吸收能力提供了科学依据。

水稻中 SPX-EXS 亚家族有 3 个成员。目前只知道 *OsPHO1;2* 和 *AtPHO1* 一样参与磷从根向地上部的转运^[44]。最新的研究表明, 同 *AtPHO1* 一样, *OsPHO1* 可能受到 *OsPHO2* 调控^[45]。液泡是植物细胞内一个重要的亚细胞器, 是许多离子 (包括磷) 的临时贮备仓库。最新的研究表明, SPX-MFS 家族基因具有磷转运功能, 参与液泡与细胞质间的磷转运^[46-47]。水稻中有 4 个 *OsSPX-MFSs* 基因, 已知 *OsSPX-MFS1~OsSPX-MFS3* 定位于液泡膜。已有研究表明, *OsSPX-MFS1* 和 *OsSPX-MFS3* 表达受缺磷抑制, *OsSPX-MFS2* 表达受缺磷诱导。*OsSPX-MFS1* 和 *OsSPX-MFS2* 都受到 miR827 的调控^[48]。最新研究表明, *OsSPX-MFS3* 是一个低亲和性液泡磷转运体, 负责将液泡中贮备的磷转运出来以让植物适应低磷环境^[47]。

2.3 磷信号调控机制研究

目前已经明确多个转录因子参与磷信号调控。*OsPHR2* 是水稻磷信号的中心调控转录因子, 在 *OsPHR2* 过表达株系中, *PSI* (phosphate starvation induced) 基因上调表达, 根长增加, 根冠比增加, 根毛增多, 从而导致叶片磷大量积累^[40]。*OsPHR2* 的同源基因 *OsPHR1* 和 *OsPHR3* 也参与调控植物缺磷响应^[49]。和 *OsPHR2* 增强表达表现出生长抑制不同, 增强表达 *OsPHR3* 的转基因株系能显著提高磷吸收量和产量^[49]。最近研究表明, *OsWRKY74* 参与调控磷饥饿响应, *OsWRKY74* 增强表达的转基因苗表现为提高磷的吸收、更大的根系和更大的生物量, 同时也表现出更高的铁积累, 表明 *OsWRKY74* 可能同时参与协同调控铁和磷的吸收^[50]。水稻中发

现 MYB 转录因子 OsMYB2P-1 参与调控磷饥饿响应及根构型^[51]。国际水稻所在水稻中鉴定了控制耐低磷 QTL (PUP1) 的基因 *PSTOL1*，该基因编码一个蛋白激酶，通过控制苗期发根速度，进而增强植物对低磷的耐受力^[52]，然而也有科学家认为 *PSTOL1* 是否耐低磷还有待进一步验证^[53]。另外，水稻 bHLH 转录因子 OsPTF1 也参与调控磷饥饿响应^[54]。*OsPTF1* 在叶中组成型表达，在根中受到缺磷诱导表达，*OsPTF1* 的过表达会上调一系列缺磷响应基因表达，且过表达植株能显著提高磷含量和生物量^[54]。

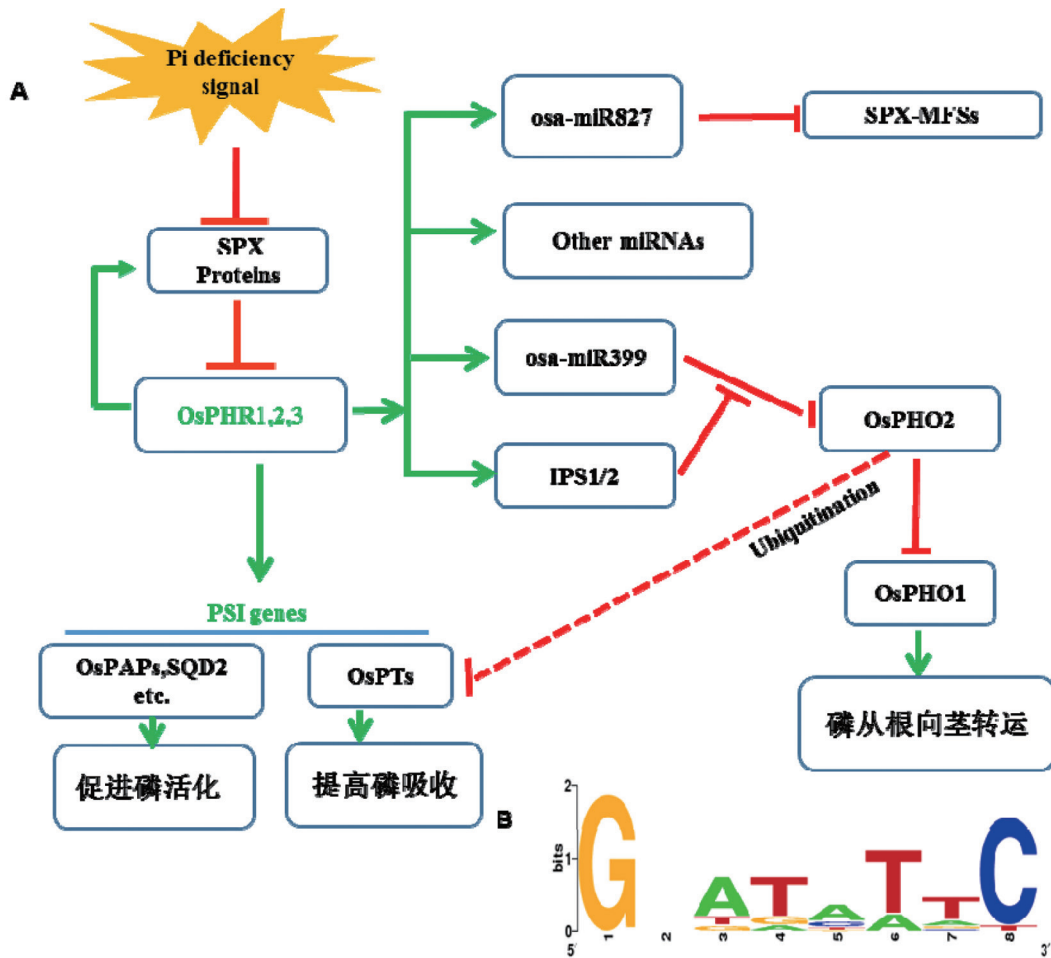
SPX 结构域蛋白也参与磷信号调控。SPX 结构域根据酵母蛋白 ScSyg1、ScPho81 和人类逆转录病毒受体蛋白 XPR1 共有一段同源蛋白序列命名。在水稻中有 15 个含有 SPX 结构域的蛋白。基于蛋白是否包含其他结构域，SPX 结构域蛋白可分为 4 个亚家族，分别是只包含 SPX 结构域的 SPX 亚家族 (Class 1)、包含 SPX 结构域和 EXS (ERD1/XPR1/SYG1) 结构域的 SPX-EXS 亚家族 (Class 2)、包含 SPX 结构域和 MFS (major facilitator superfamily) 结构域的 SPX-MFS 亚家族 (Class 3) 和包含 SPX 结构域和 RING (really interesting new gene finger domain) 结构域的 SPX-RING 亚家族 (Class 4)^[55-56]。这 4 个亚家族蛋白都涉及缺磷胁迫响应，其中 SPX 亚家族直接参与磷信号调控。水稻 SPX 亚家族包括 6 个 *OsSPXs* 基因。除 *OsSPX4* 外，其他基因都受缺磷诱导^[57]。研究表明，SPX 亚家族基因都参与负调控磷饥饿响应。OsSPX 蛋白是水稻感应低磷信号，调控磷信号网络中心调控因子 OsPHR2，从而调控植物磷饥饿响应的一个重要组件。OsSPX1~5 都参与负调控 OsPHR2 的功能^[57-61]。对 *OsSPX4* 的研究表明，正常磷浓度条件下，OsSPX4 主要定位于细胞质中，OsSPX4 与 OsPHR2 互作，阻止了 OsPHR2 进入细胞核，从而抑制了 OsPHR2 的功能。而在低磷条件下，OsSPX4 蛋白降解，解除对 OsPHR2 的抑制作用，OsPHR2 进入细胞核从而调控缺磷响应基因的表达^[58]。进一步研究明确了在高磷时 OsSPX1/2 通过与 OsPHR2 结合，从而抑制其与靶基因启动子顺式元件 P1BS 结合；而在低磷条件下，OsSPX1/2 与 OsPHR2 结合减弱，OsPHR2 能够优先结合到靶基因启动子上，从而调控一系列缺磷响应基因的表达^[61]。最新的研究解析了 SPX 结构域的晶体结构，表明 SPX 结构域可能是细胞内磷 (肌醇多磷酸) 的受体^[62]，但是否 SPX 蛋白就是无机

磷的直接受体还有待进一步研究确定。

研究表明非编码 RNA (non-coding RNA, 不编码蛋白质的 RNA) 也参与调控磷信号响应。水稻中微小 RNA (microRNA, miRNA) *OsmiR399* 受 OsPHR2 的正调控，受磷饥饿诱导^[40]。进一步研究证明 *OsPHO2* (phosphate 2) 是 *OsmiR399* 的下游靶基因^[63]。另外，水稻中 *OsmiR827* 也是缺磷诱导的，受 OsPHR2 的正调控。*OsmiR827* 的靶基因是 *OsSPX-MFS1* 和 *OsSPX-MFS2*^[48]。近年的研究发现，长链非编码 RNA (long non-coding RNA) 也在磷饥饿信号调控系统中起重要作用。水稻中 *IPS1* 和 *IPS2* 是参与磷饥饿响应途径的长链非编码 RNA^[64]。*IPS1* 通过一种称之为“靶标拟态”的机制来抑制 *miR399* 对靶基因 *PHO2* 的调控。*IPS1* 存在一段和 *miR399* 互补但又不是完全配对的长 23 nt 的序列，这使得 *IPS1* 能和 *miR399* 配对，从而抑制 *miR399* 和 *PHO2* 的结合并使 *PHO2* 不会被降解，由于 *IPS1* 和 *miR399* 不是完全配对，所以 *IPS1* 自身不会被降解，从而保证了它能抑制 *miR399* 对 *PHO2* 的降解^[64]。最近的研究又发现了另一种长链非编码 RNA——水稻 *OsPHO1;2* 的顺式天然反义转录本 cis-NAT (cis-natural antisense transcript) 也参与调控体内磷的平衡^[65]。

泛素 (ubiquitin) E2 结合酶 PHO2 也参与磷信号调控。水稻中泛素 E2 结合酶 *Ospho2* 突变体在高磷培养条件下表型与拟南芥类似，表现为磷中毒表型，并能模拟体内缺磷胁迫，诱导磷饥饿响应，如酸性磷酸酶活性和 RNA 酶活性的增加，细胞膜脂质成分改变等^[63]。通过筛选 *Ospho2* 抑制子突变体，也发现 *OsPHO1* 突变能减缓 *Ospho2* 的磷中毒表型，表明在水稻和拟南芥中 PHO2 对 PHO1 的调控途径是保守的^[45]。

综上所述，在水稻中磷饥饿信号途径已经得到较为细致的解析，其中我国科学家做出了很多原创性工作，在 SPX 亚家族的功能解析及磷转运体的磷酸化调控方面，水稻的研究甚至走在拟南芥前面。综合现有的研究结果，水稻磷信号调控的分子网络可以概括如下 (图 1)。OsPHR2 及其他 OsPHR 蛋白正调控一系列缺磷响应基因的表达，包括磷吸收相关转运体 PTs，促进有机磷转化为无机磷的基因如 *OsPAPs*、*OsSQD2*，以及磷信号调控相关基因如 *OsIPS1/2*、*OsmiR399*、*OsmiR827*、*OsSPXs* 等表达。OsSPX 蛋白则参与感受缺磷信号，负调控 OsPHR2 的功能，而 OsPHR2 又反馈调控 *OsSPX* 基因表达。*OsmiR399* 抑制 *OsPHO2* 的表达，而 *OsIPS1/2* 则抑



A, 磷饥饿信号调控网络。绿色代表正调控, 而红色平末端的线代表负调控, 虚线代表尚未证实的调控。B, PHR蛋白结合的P1BS元件。图在Wu等^[39]基础上修改而成。

图1 水稻磷信号调控网络

制 *OsmiR399* 对 *OsPHO2* 的抑制。*OsPHO2* 负调控 *OsPHO1* 蛋白, 进而调控磷的吸收和平衡。*OsmiR827* 负调控 *OsSPX-MFS1/2*。尽管在其他作物中尚很少研究磷信号的调控机制, 但水稻磷信号调控网络的阐明将为作物磷高效利用的分子改良和育种应用提供理论依据。

3 钾吸收利用的功能基因组研究进展

钾 (K) 是植物体内含量最丰富的一价阳离子, 约占植物总干重的 2%~10%。植物钾营养相关的功能基因研究主要集中于拟南芥, 已经初步阐明了钾转运体及钾离子通道, 以及信号调控途径^[66]。水稻钾吸收利用与调控分子机制的功能基因组研究虽起步稍晚, 但近几年进展迅速。

植物体内钾离子吸收系统主要包括钾离子转运蛋白和钾离子通道 2 大类。钾离子转运蛋白来源于

多个基因家族, 如 KUP/HAK/KT、HKT、NHX 和 CHX 等。KUP/HAK/KT 家族主要是编码一类与细菌 *KUP* 和真菌 *HAK1* 同源的基因。NHX 和 CHX 家族只有少数几个基因参与了钾离子 / 氢离子的逆向转运。在植物体内 HKT 基因家族中的大多数成员都参与了钠离子转运, 仅有少数几个参与了钠钾离子共转运^[11]。相较于钾离子转运蛋白功能的多样性, 钾离子通道则表现出很强的功能专一性。钾离子通道主要包括 Shaker 通道、TPK (tandem-pore K⁺) 通道和 Kir (K⁺ inward rectifier)-like 通道 3 类蛋白^[66]。水稻中有 27 个 *OsHAK* 基因家族成员。聚类分析可以把 *OsHAKs* 分为 Cluster I~IV 4 大类, 且不同类型 *OsHAKs* 的组织亚细胞定位也不尽相同, 说明这些基因可能在参与钾离子吸收转运及植物生长发育过程中执行不同的功能^[67]。研究表明, *OsHAK1* 受缺钾诱导, 在不同组织都有表达, 参与

钾的吸收和钠 / 钾平衡^[68]。OsHAK5 在水稻不同组织都有表达, 其中在根表皮、中柱、维管组织及叶肉细胞表达较高。OsHAK5 促进根从土壤中吸收钾, 同时也参与体内钾的分配转运^[69]。OsHAK21 是膜定位蛋白, 主要在木质部薄壁细胞及内皮层细胞表达, 参与调控钾的吸收及钠 / 钾平衡^[70]。OsAKT1 是水稻中最先被克隆的钾离子通道基因, 与拟南芥的 AKT1 高度同源, 属于 Shaker 类钾离子通道。osakt1 表现为降低钾吸收及低钾敏感的表型。体外实验证明, OsAKT1 是电压依赖的内向整流型钾离子通道, 并受到外源 Ca²⁺ 和 H⁺ 的调节^[71]。OsTPKa 和 OsTPKb 是水稻中 2 个与 AtTPK1 同源的基因 (序列一致性为 57%), 可能参与了不同组织钾离子稳态的维持^[72]。

目前水稻中关于钾信号调控机制研究较少。研究表明, OsCBL1 和 OsCIPK23 是 OsAKT1 的上游调控因子, OsCBL1-OsCIPK23 复合体调控 OsAKT1 的活性^[71]。

4 其他元素吸收利用功能基因组研究进展

当前的施肥措施中, 氮、磷、钾肥是 3 种主要成份。但其他大量元素钙、镁、硫及微量元素 (Fe、Mn、Cu、Zn、B、Mo、Cl、Ni) 也是作物必需元素, 在不同的土壤类型中也需要相应补充。因此, 相关的功能基因研究也逐渐得到重视。其中, 我国参与研究的主要有钙 (Ca)、铁 (Fe)、锌 (Zn) 等。

4.1 钙(Ca)

钙大量存在于土壤中, 在正常条件下, 土壤中的钙能够满足大部分作物的生长需求, 大田作物很少出现缺钙现象^[73]。因而, 人们也相对较少关注作物钙营养元素的吸收利用机制。植物细胞内存在精细的调节机制, 既能使细胞质中游离 Ca²⁺ 浓度迅速升高以响应环境变化, 又能使其维持基态条件下的低浓度, 这些精细的调节机制主要通过体内的 Ca²⁺ 转运系统来实现, 包括胞质 Ca²⁺ 外流系统, 即 Ca²⁺/H⁺ 反向转运蛋白和 Ca²⁺-ATPase 以及钙离子通道。Ca²⁺ 从细胞质运出主要由 Ca²⁺-ATPase 和 Ca²⁺/H⁺ 反向转运蛋白完成。而 Ca²⁺ 输入细胞质则主要通过离子通道途径进行^[74]。目前已经在水稻中鉴定了多个钙转运相关功能基因。水稻钾转运体 HKT 家族成员 OsHKT2;4 是一个钙离子通道。水稻 OsTPC1 是电压依赖型钙离子通道^[75]。而 Ca²⁺/H⁺ 反向转运蛋白 OsCAX1a 是一个液泡膜定位蛋白, 参与将 Ca²⁺ 转入液泡中, 调节钙离子平衡^[76]。另外,

该家族的其他 Ca²⁺/H⁺ 反向转运蛋白 OsCAX2~5 及 Ca²⁺-ATPases (OsACA4~7) 也得到分析鉴定, 参与 Ca²⁺ 的转运^[77]。研究表明, 膜定位的 OsMCA1 是一个机械敏感型的钙离子通道^[78]。而 OsCCX2 是一个钙交换蛋白, 参与 Ca²⁺、Na⁺、Li⁺、Fe²⁺、Zn²⁺ 和 Co²⁺ 等离子转运^[79]。

4.2 铁(Fe)

铁是植物必需的微量元素, 植物吸收利用铁元素的机制可划分为 2 类, 即机制 I 和机制 II。机制 I 植物主要包括双子叶植物和禾本科以外的单子叶植物, 机制 II 植物主要指禾本科植物。水稻不仅具有机制 II 植物特有的铁吸收系统, 也有机制 I 植物吸收铁的特征。正常条件下, 机制 I 植物通过 Fe³⁺ 还原酶将 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺, 然后通过质膜转运蛋白吸收。机制 I 植物主要利用 ZIP (ZRT/IRT-related protein) 家族中的 IRT 转运蛋白吸收土壤中的铁。水稻中主要利用 Fe²⁺ 转运蛋白 OsIRT1 和 OsIRT2 吸收 Fe²⁺^[80]。增强表达 OsIRT1 可以增加水稻中铁和锌的积累^[81]。具有机制 II 的禾本科植物主要通过根系分泌铁载体 (phytosiderophores, PS) 螯合根际中的 Fe³⁺, 然后在 YSL (YSL-like protein) 家族转运蛋白作用下将 Fe³⁺-PS 转运到植物体内。机制 II 植物根系能分泌大量铁载体, 如麦根酸 (mugineic acids, MAs) 到根际中^[11]。MAs 由 L- 蛋氨酸和尼克酰胺合成, 尼克酰胺氨基转移酶 (nicotianamine aminotransferase, NAAT) 是合成麦根酸的关键酶, 在水稻中过表达大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 尼克酰胺氨基转移酶基因 *HvNAAT-A* 和 *HvNAAT-B*, 能提高水稻根系麦根酸的分泌量和低铁条件下土壤中铁的有效性^[82]。OsNAAT1 是水稻中克隆到的尼克酰胺氨基转移酶基因, 铁胁迫时根和茎叶中 OsNAAT1 的表达量升高, 在根伴胞细胞和中柱鞘细胞中尤为明显^[83]。缺铁条件下, 水稻尼克酰胺合成酶基因 OsNAS1 (*Oryza sativa* nicotianamine synthase1) 和 OsNAS2 在水稻根和茎叶中表达水平升高, 而 OsNAS3 仅在根中表达量升高, 在叶片中表达却受到抑制。OsNAS1、OsNAS2 和 OsNAS3 都参与铁在水稻中的长距离转运^[84]。增强表达 OsNAS 家族基因能提高地上部的铁和锌含量^[85]。机制 II 植物主要由 YSL 转运蛋白吸收土壤中的铁。玉米 (*Zea mays*) YS1 是最早发现的 YSL 类膜转运蛋白, 负责吸收土壤中的 Fe-PS 复合物^[86]。水稻中有 18 个 YSL 基因。OsYSL2 (yellow stripe like2) 主要在根韧皮部表达, 参与长距离铁、锰的韧皮部运输及铁、锰向籽粒的转运^[87-88]。水稻

OsYSL15 主要在根表皮细胞中表达, 是 Fe^{3+} -脱氧麦根酸转运体, 缺铁条件下该基因表达上调, 负责从土壤中获取铁^[89-90]。*OsYSL16* 在根、叶、穗的维管组织表达, 参与体内铁的分配^[91]。*OsYSL18* 则参与生殖器官的铁分配及韧皮部转运^[92]。此外, 水稻中还存在 NRAMP (natural resistance associated macrophage protein) 转运系统。NRAMP 基因主要参与维持细胞内的金属离子平衡。水稻中有 7 个金属转运体 NRAMP 基因, 其中 *OsNRAMP1* 参与铁和镉的吸收, 表达量高的植株, 铁和镉的含量也较高^[93-94]。*OsNRAMP5* 是组成型表达的 Fe、Mn 吸收转运体, 同时也参与镉的吸收^[95-96]。此外, *OsFRDL1* 是一个柠檬酸转运体, 定位于中柱鞘细胞, 参与 Fe-柠檬酸复合体从根到地上部的有效转运^[97]。MIT (mitochondrial Fe transporter) 是线粒体铁转运体, 影响水稻的生长发育, *mit* 突变体铁积累, 但植株生长受抑制^[98]。

在水稻中目前已鉴定了多个参与铁吸收转运的转录因子。*OsIRO2* 是一个缺铁诱导的 bHLH 转录因子, 提高 *OsIRO2* 的表达量能提高植物地上部的铁含量, 增强植物在低铁环境下的耐受力, *OsIRO2* 不仅调控铁的吸收, 也调控铁向籽粒的分配^[99]。另外, *IDEF1* (IDE-binding factor 1) 能直接通过其组氨酸精氨酸重复及脯氨酸富集区结合 2 价金属离子 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 等, 感受并调控体内金属离子的平衡^[100]。研究表明, 生长素转运体 *OsABC14* 及生长素响应因子 *OsARF12*、*OsARF16* 也参与调控缺铁响应^[101-103]。另外, 受体样蛋白 *OsRMC* 也参与调控缺铁条件下铁的吸收和根伸长^[104]。上海植生所报道了 *OsVIT1* 和 *OsVIT2* 两个液泡转运蛋白, 能转运 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 及 Mn^{2+} , 其编码基因主要在旗叶叶片及叶鞘中表达, 主要功能在于调控 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 在旗叶液泡中的分隔容量, 从而调控这些营养元素在源和库间的分配^[105]。

4.3 锌(Zn)

植物吸收锌主要依赖 ZIP 家族转运蛋白系统。植物还可以通过其他转运蛋白吸收锌, 如 *OsIRT1* 可以增加水稻中铁和锌的积累^[81]。此外, 禾本科植物根系分泌的 PS 能螯合难溶性锌, 并通过根表皮细胞膜上的 YSL 转运蛋白吸收锌^[11]。在水稻中, 缺锌提高 *OsZIP4*、*OsZIP5* 和 *OsZIP8* 在根中的表达水平, 增加锌在根中的累积。*OsZIP4* 主要在根、茎韧皮部表达, 是一个锌转运体, 参与锌在植株体内的分配^[106-107]。*OsZIP5* 基因突变体地上部锌浓度

降低, 地下部升高, 增强表达该基因则导致对过量的锌超敏, 表明该基因参与体内锌的分配^[108]。*OsZIP8* 在根茎中都有表达, 受缺锌诱导, 是一个质膜定位的 Zn 转运体, 主要负责锌的吸收和分配^[109]。*OsMTP1* (metal tolerance protein1) 是液泡定位的锌转运蛋白, 它同时也能以较弱的亲和性转运 Co (钴)、Fe 和 Cd (镉)^[110]。*OsHMA2* 是一个将 Zn、Cd 从根向地上部转运的主要转运体^[111], 可能参与将 Zn 和 Cd 分配到幼嫩组织中^[112]。而增强表达 *OsNAS2* 能使种子中积累更高的 Zn。*OZT1* (*Oryza sativa* Zn transporter 1) 是一个 CDF (cation diffusion facilitator transporter) 家族的蛋白, 在不同组织都有表达, 受 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 等处理诱导, *OZT1* 定位于液泡膜, 参与转运 Zn、Cd 及其他重金属离子^[113]。另外, 过表达金属硫蛋白基因 *OsMT1a* 能提高锌在根中的积累^[114]。

综上所述, 水稻必需大量元素 N、P、K 的功能基因组已经有大量的研究, 特别是磷和氮的功能基因组研究方面已经阐明了初步的调控网络, 其中大部分的工作都是我国科学家完成的。但在 Ca、Mg、S 等大量元素的功能基因组研究方面, 特别是 Mg、S 的研究还很少。微量营养元素中除 Fe、Zn 之外, 相关的研究还不系统, 我国的研究也很少, 在此不再详细展开。

5 展望

作物的高产优质离不开充分和平衡的养分供应。随着人们对绿色作物的大量需求和可持续农业的需要, 我国科学家提出了“少打农药、少施化肥、节水抗旱、优质高产”的绿色超级稻目标, 而养分高效是绿色超级稻的主要内容。揭示作物对养分吸收利用的功能基因及其分子机制, 通过遗传改良提高其利用效率是作物养分利用功能基因组学的重要研究内容。尽管在我国水稻功能基因组项目的资助下, 在养分利用功能基因组方面已经取得重要而全面的进展, 但离完全阐明养分利用的分子调控机制还相差甚远。今后水稻养分利用功能基因组研究将从以下几个方面展开。

5.1 阐明完整的养分吸收利用及信号调控的分子网络

通过功能基因组研究明确作物是通过什么基因感知、如何感知土壤中的养分状况, 并将信息传递到各组织中调控一系列基因表达变化以及转运体的活性变化, 以让植物去适应外界的养分环境改变, 并最终设计出能根据植物自身养分状况优化养分吸

收利用水平的作物将是作物养分利用功能基因组研究的最终目标。因此，阐明参与养分吸收利用及信号转导的每一个基因，解析完整的养分信号调控途径将是今后养分利用功能基因组的重要研究内容之一。

5.2 发掘有重要育种价值的养分高效基因及其利用方式

虽然在水稻中氮、磷、钾及其他营养元素中都有多个转运体得到鉴定，为了阐明养分利用的功能基因组，还需继续挖掘各营养元素的全部转运体及其调控因子。另外，如何将这些转运体及重要调控基因应用于遗传育种中也需要研究探索，当前主要是通过增强表达及 RNA 干涉或突变体来研究这些转运体在各养分转运中的功能，但大部分转运体及调控基因增强表达虽能提高养分吸收能力，却无法最终提高产量。因此，通过 CRISPR/Cas9 等基因编辑技术来定点创制优良等位变异将是利用这些转运体及调控基因的一个有效途径。如水稻中将 PT8 中 S517 强制突变为 A 后，突变的 PT8 蛋白就会更多地定位到细胞质膜上，从而提高作物对磷的吸收能力，并且表现为高产^[39,43]。另外，通过基因组学技术手段挖掘自然优良等位变异，并运用于遗传育种将是一个直接有效的方法。针对水稻关键养分效率性状的遗传改良，挖掘可以直接进行育种应用的优良等位变异，明确其利用方式将是今后养分利用功能基因组研究的重要内容之一。

5.3 明确氮磷钾等养分之间的相互关系

目前有关养分利用的功能基因研究主要仍集中在单个营养元素吸收、转运、同化过程的作用机制和小网络的片段化研究，缺乏整体和系统分析。越来越多的证据表明，氮、磷、钾之间以及氮、磷、钾和其他大量和微量元素之间都存在相互调控的关系。明确养分信号调控途径之间是通过什么基因节点进行关联的将是明确如何协调这些养分之间协同高效的前提。另外，营养元素和有害元素（或者是对人或动物有害的元素）也存在一些共同的调控节点。提高养分吸收效率的同时如何避免有害元素积累需要首先阐明养分和有害元素间的互作节点基因。

5.4 发掘养分与生长发育及重要产量性状间互作的关键基因

养分是影响产量的重要因素，养分与器官发育间的相互作用是养分高效吸引及高产的基础。阐明养分与重要产量性状的相互关系及养分与根系发育及构型间的相互关系将会是今后的重要研究内容之一。

总之，今后养分利用功能基因组的研究将涉及多个方面。其中最核心的是阐明完整的养分吸收利用及信号调控的分子网络；挖掘有重要育种价值的养分高效基因及其利用方式。养分高效是绿色超级稻的主要内容，目前，以“绿色超级稻”项目、“水稻功能基因组”重大项目和国家其他项目的研究成果为基础的绿色超级稻的研究培育已经取得良好的进展和成果。水稻氮磷等养分功能基因组研究的成果和信息、我国丰富的水稻种质资源以及育种新技术的发展，将为有效培育绿色超级稻奠定良好基础，并最终实现水稻生产中“少打农药、少施化肥、节水抗旱、优质高产”的“绿色超级稻”目标。

[参 考 文 献]

- [1] Zhang F, Chen X, Vitousek P. Chinese agriculture: an experiment for the world. *Nature*, 2013, 497: 33-5
- [2] Marschner H. Mineral nutrition of higher plant [M]. 2th ed. London: Academic Press, Company Publishers, 1995
- [3] Maathuis FJ, Diatloff E. Roles and functions of plant mineral nutrients. *Methods Mol Biol*, 2013, 953: 1-21
- [4] Bu YY, Takano T, Nemoto K, et al. Research progress of ammonium transporter in rice plants. *Genomics Appl Biol*, 2011, 2: 19-23
- [5] Yang S, Hao D, Cong Y, et al. The rice *OsAMT1;1* is a proton-independent feedback regulated ammonium transporter. *Plant Cell Rep*, 2015, 34: 321-30
- [6] Ranathunge K, El-Kereamy A, Gidda S, et al. *AMT1;1* transgenic rice plants with enhanced NH_4^+ permeability show superior growth and higher yield under optimal and suboptimal NH_4^+ conditions. *J Exp Bot*, 2014, 65: 965-79
- [7] Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, et al. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 726-34
- [8] Xuan YH, Priatama RA, Huang J, et al. Indeterminate domain 10 regulates ammonium-mediated gene expression in rice roots. *New Phytol*, 2013, 197: 791-804
- [9] Li SM, Li BZ, Shi WM. Expression patterns of nine ammonium transporters in rice in response to N status. *Pedosphere*, 2012, 22: 860-9
- [10] Ding Z, Wang C, Chen S, et al. Diversity and selective sweep in the *OsAMT1;1* genomic region of rice. *BMC Evol Biol*, 2011, 11: 61
- [11] 王威, 张联合, 李华, 等. 水稻营养吸收和转运的分子机制研究进展. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45: 569-90
- [12] Ouyang J, Cai ZY, Xia KF, et al. Identification and analysis of eight peptide transporter homologs in rice. *Plant Sci*, 2010, 179: 374-82
- [13] Fan X, Xie D, Chen J, et al. Over-expression of *OsPTR6* in rice increased plant growth at different nitrogen supplies but decreased nitrogen use efficiency at high ammonium supply. *Plant Sci*, 2014, 227: 1-11
- [14] Fang Z, Xia K, Yang X, et al. Altered expression of the

- PTR/NRT1* homologue *OsPTR9* affects nitrogen utilization efficiency, growth and grain yield in rice. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11: 446-58
- [15] Hu B, Wang W, Ou S, et al. Variation in *NRT1.1B* contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nat Genet*, 2015, 47: 834-8
- [16] Yan M, Fan X, Feng H, et al. Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. *Plant Cell Environ*, 2011, 34: 1360-72
- [17] Feng H, Yan M, Fan X, et al. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. *J Exp Bot*, 2011, 62: 2319-32
- [18] Tang Z, Fan X, Li Q, et al. Knockdown of a rice stellar nitrate transporter alters long-distance translocation but not root influx. *Plant Physiol*, 2012, 160: 2052-63
- [19] Fan X, Tang Z, Tan Y, et al. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 7118-23
- [20] Ho CH, Lin SH, Hu HC, et al. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 2009, 138: 1184-94
- [21] Huang X, Qian Q, Liu Z, et al. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. *Nat Genet*, 2009, 41: 494-7
- [22] Sun H, Qian Q, Wu K, et al. Heterotrimeric G proteins regulate nitrogen-use efficiency in rice. *Nat Genet*, 2014, 46: 652-6
- [23] Liang C, Wang Y, Zhu Y, et al. OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 10013-8
- [24] Zhang Y, Tan L, Zhu Z, et al. *TOND1* confers tolerance to nitrogen deficiency in rice. *Plant J*, 2015, 81: 367-76
- [25] Conley DJ, Paerl HW, Howarth RW, et al. Ecology. Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science*, 2009, 323: 1014-5
- [26] Zhang Z, Liao H, Lucas WJ. Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56: 192-220
- [27] Tian J, Wang C, Zhang Q, et al. Overexpression of OsPAP10a, a root-associated acid phosphatase, increased extracellular organic phosphorus utilization in rice. *J Integr Plant Biol*, 2012, 54: 631-9
- [28] Zhang Q, Wang C, Tian J, et al. Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signalling. *Plant Biol (Stuttg)*, 2011, 13: 7-15
- [29] Gu M, Chen A, Sun S, et al. Complex regulation of plant phosphate transporters and the gap between molecular mechanisms and practical application: what are missing? *Mol Plant*, 2015, 9: 396-416
- [30] Lopez-Arredondo DL, Leyva-Gonzalez MA, Gonzalez-Morales SI, et al. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annu Rev Plant Biol*, 2014, 65: 95-123
- [31] Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 1-34
- [32] Rausch C, Bucher M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta*, 2002, 216: 23-37
- [33] Goff SA, Ricke D, Lan TH, et al. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 2002, 296: 92-100
- [34] Jia H, Ren H, Gu M, et al. The phosphate transporter gene *OsPht1;8* is involved in phosphate homeostasis in rice. *Plant Physiol*, 2011, 156: 1164-75
- [35] Sun SB, Gu MA, Cao Y, et al. A constitutive expressed phosphate transporter, OsPht1;1, modulates phosphate uptake and translocation in phosphate-replete rice. *Plant Physiol*, 2012, 159: 1571-81
- [36] Ai PH, Sun SB, Zhao JN, et al. Two rice phosphate transporters, OsPht1;2 and OsPht1;6, have different functions and kinetic properties in uptake and translocation. *Plant J*, 2009, 57: 798-809
- [37] Wang X, Wang Y, Pineros MA, et al. Phosphate transporters OsPHT1;9 and OsPHT1;10 are involved in phosphate uptake in rice. *Plant Cell Environ*, 2014, 37: 1159-70
- [38] Yang SY, Gronlund M, Jakobsen I, et al. Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the phosphate transporter1 gene family. *Plant Cell*, 2012, 24: 4236-51
- [39] Wu P, Shou H, Xu G, et al. Improvement of phosphorus efficiency in rice on the basis of understanding phosphate signaling and homeostasis. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16: 205-12
- [40] Zhou J, Jiao F, Wu Z, et al. *OsPHR2* is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiol*, 2008, 146: 1673-86
- [41] Liu F, Wang Z, Ren H, et al. OsSPX1 suppresses the function of OsPHR2 in the regulation of expression of *OsPT2* and phosphate homeostasis in shoots of rice. *Plant J*, 2010, 62: 508-17
- [42] Chen J, Liu Y, Ni J, et al. OsPHF1 regulates the plasma membrane localization of low- and high-affinity inorganic phosphate transporters and determines inorganic phosphate uptake and translocation in rice. *Plant Physiol*, 2011, 157: 269-78
- [43] Chen J, Wang Y, Wang F, et al. The rice CK2 kinase regulates trafficking of phosphate transporters in response to phosphate levels. *Plant Cell*, 2015, 27: 711-23
- [44] Secco D, Baumann A, Poirier Y. Characterization of the rice *PHO1* gene family reveals a key role for *OsPHO1;2* in phosphate homeostasis and the evolution of a distinct clade in dicotyledons. *Plant Physiol*, 2010, 152: 1693-704
- [45] Hu H, Wang W, Zhu Z, et al. GIPS: a software guide to sequencing-based direct gene cloning in forward genetics studies. *Plant Physiol*, 2016, 170: 1929-34
- [46] Liu J, Yang L, Luan M, et al. A vacuolar phosphate transporter essential for phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E6571-8
- [47] Wang C, Yue W, Ying Y, et al. Rice SPX-major facilitator superfamily3, a vacuolar phosphate efflux transporter, is involved in maintaining phosphate homeostasis in rice.

- Plant Physiol, 2015, 169: 2822-31
- [48] Wang C, Huang W, Ying Y, et al. Functional characterization of the rice SPX-MFS family reveals a key role of OsSPX-MFS1 in controlling phosphate homeostasis in leaves. *New Phytol*, 2012, 196: 139-48
- [49] Guo M, Ruan W, Li C, et al. Integrative comparison of the role of the PHOSPHATE RESPONSE1 subfamily in phosphate signaling and homeostasis in rice. *Plant Physiol*, 2015, 168: 1762-76
- [50] Dai X, Wang Y, Zhang WH. *OsWRKY74*, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice. *J Exp Bot*, 2015, 67: 947-60
- [51] Dai X, Wang Y, Yang A, et al. *OsMYB2P-1*, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in the regulation of phosphate-starvation responses and root architecture in rice. *Plant Physiol*, 2012, 159: 169-83
- [52] Gamuyao R, Chin JH, Pariasca-Tanaka J, et al. The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature*, 2012, 488: 535-9
- [53] Mukherjee A, Sarkar S, Chakraborty AS, et al. Phosphate acquisition efficiency and phosphate starvation tolerance locus (*PSTOLI*) in rice. *J Genet*, 2014, 93: 683-8
- [54] Yi K, Wu Z, Zhou J, et al. *OsPTF1*, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice. *Plant Physiol*, 2005, 138: 2087-96
- [55] Lin SI, Santi C, Jobet E, et al. Complex regulation of two target genes encoding SPX-MFS proteins by rice miR827 in response to phosphate starvation. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51: 2119-31
- [56] Secco D, Wang C, Arpat BA, et al. The emerging importance of the SPX domain-containing proteins in phosphate homeostasis. *New Phytol*, 2012, 193: 842-51
- [57] Wang Z, Hu H, Huang H, et al. Regulation of OsSPX1 and OsSPX3 on expression of *OsSPX* domain genes and Pi-starvation signaling in rice. *J Integr Plant Biol*, 2009, 51: 663-74
- [58] Lv Q, Zhong Y, Wang Y, et al. SPX4 negatively regulates phosphate signaling and homeostasis through its interaction with PHR2 in rice. *Plant Cell*, 2014, 26: 1586-97
- [59] Shi J, Hu H, Zhang K, et al. The paralogous *SPX3* and *SPX5* genes redundantly modulate Pi homeostasis in rice. *J Exp Bot*, 2014, 65: 859-70
- [60] Wang C, Ying S, Huang H, et al. Involvement of OsSPX1 in phosphate homeostasis in rice. *Plant J*, 2009, 57: 895-904
- [61] Wang Z, Ruan W, Shi J, et al. Rice SPX1 and SPX2 inhibit phosphate starvation responses through interacting with PHR2 in a phosphate-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 14953-8
- [62] Wild R, Gerasimaite R, Jung JY, et al. Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science*, 2016, 352: 986-90
- [63] Hu B, Zhu C, Li F, et al. *LEAF TIP NECROSIS1* plays a pivotal role in the regulation of multiple phosphate starvation responses in rice. *Plant Physiol*, 2011, 156: 1101-15
- [64] Hou XL, Wu P, Jiao FC, et al. Regulation of the expression of *OsIPS1* and *OsIPS2* in rice via systemic and local Pi signalling and hormones. *Plant Cell Environ*, 2005, 28: 353-64
- [65] Jabnونة M, Secco D, Lecampion C, et al. A rice *cis*-natural antisense RNA acts as a translational enhancer for its cognate mRNA and contributes to phosphate homeostasis and plant fitness. *Plant Cell*, 2013, 25: 4166-82
- [66] Wang Y, Wu WH. Potassium transport and signaling in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 451-76
- [67] Gupta M, Qiu X, Wang L, et al. KT/HAK/KUP potassium transporters gene family and their whole-life cycle expression profile in rice (*Oryza sativa*). *Mol Genet Genomics*, 2008, 280: 437-52
- [68] Chen G, Hu Q, Luo L, et al. Rice potassium transporter OsHAK1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges. *Plant Cell Environ*, 2015, 38: 2747-65
- [69] Yang T, Zhang S, Hu Y, et al. The role of a potassium transporter OsHAK5 in potassium acquisition and transport from roots to shoots in rice at low potassium supply levels. *Plant Physiol*, 2014, 166: 945-59
- [70] Shen Y, Shen L, Shen Z, et al. The potassium transporter OsHAK21 functions in the maintenance of ion homeostasis and tolerance to salt stress in rice. *Plant Cell Environ*, 2015, 38: 2766-79
- [71] Li J, Long Y, Qi GN, et al. The Os-AKT1 channel is critical for K⁺ uptake in rice roots and is modulated by the rice CBL1-CIPK23 complex. *Plant Cell*, 2014, 26: 3387-402
- [72] Isayenkov S, Isner JC, Maathuis FJ. Rice two-pore K⁺ channels are expressed in different types of vacuoles. *Plant Cell*, 2011, 23: 756-68
- [73] 任轶. 植物营养中钙的功能及其在土壤改良中的作用. *现代农业科技*, 2013, 12: 202
- [74] 周卫, 汪洪. 植物钙吸收、转运及代谢的生理和分子机制. *植物学通报*, 2007, 24: 762-78
- [75] Hashimoto K, Saito M, Matsuoka H, et al. Functional analysis of a rice putative voltage-dependent Ca²⁺ channel, OsTPC1, expressed in yeast cells lacking its homologous gene *CCH1*. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 496-500
- [76] Kamiya T, Akahori T, Ashikari M, et al. Expression of the vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger, OsCAX1a, in rice: cell and age specificity of expression, and enhancement by Ca²⁺. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 96-106
- [77] Yamada N, Theerawitaya C, Cha-Um S, et al. Expression and functional analysis of putative vacuolar Ca²⁺-transporters (CAXs and ACAs) in roots of salt tolerant and sensitive rice cultivars. *Protoplasma*, 2014, 251: 1067-75
- [78] Kurusu T, Nishikawa D, Yamazaki Y, et al. Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca²⁺ influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 11
- [79] Yadav AK, Shankar A, Jha SK, et al. A rice tonoplast calcium exchanger, OsCCX2 mediates Ca²⁺/cation transport in yeast. *Sci Rep*, 2015, 5: 17117
- [80] Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, et al. Rice plants take

- up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. *Plant J*, 2006, 45: 335-46
- [81] Lee S, An G. Over-expression of *OsIRT1* leads to increased iron and zinc accumulations in rice. *Plant Cell Environ*, 2009, 32: 408-16
- [82] Takahashi M, Nakanishi H, Kawasaki S, et al. Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 466-9
- [83] Cheng L, Wang F, Shou H, et al. Mutation in nicotianamine aminotransferase stimulated the Fe(II) acquisition system and led to iron accumulation in rice. *Plant Physiol*, 2007, 145: 1647-57
- [84] Inoue H, Higuchi K, Takahashi M, et al. Three rice nicotianamine synthase genes, *OsNAS1*, *OsNAS2*, and *OsNAS3* are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron. *Plant J*, 2003, 36: 366-81
- [85] Johnson AA, Kyriacou B, Callahan DL, et al. Constitutive overexpression of the *OsNAS* gene family reveals single-gene strategies for effective iron- and zinc-biofortification of rice endosperm. *PLoS One*, 2011, 6: e24476
- [86] Curie C, Cassin G, Couch D, et al. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot*, 2009, 103: 1-11
- [87] Koike S, Inoue H, Mizuno D, et al. OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *Plant J*, 2004, 39: 415-24
- [88] Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, et al. Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. *Plant J*, 2010, 62: 379-90
- [89] Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, et al. Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *J Biol Chem*, 2009, 284: 3470-9
- [90] Lee S, Chiecko JC, Kim SA, et al. Disruption of *OsYSL15* leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiol*, 2009, 150: 786-800
- [91] Lee S, Ryoo N, Jeon JS, et al. Activation of rice *Yellow Stripe1-Like 16* (*OsYSL16*) enhances iron efficiency. *Mol Cells*, 2012, 33: 117-26
- [92] Aoyama T, Kobayashi T, Takahashi M, et al. OsYSL18 is a rice iron(III)-deoxymugineic acid transporter specifically expressed in reproductive organs and phloem of lamina joints. *Plant Mol Biol*, 2009, 70: 681-92
- [93] Takahashi R, Ishimaru Y, Nakanishi H, et al. Role of the iron transporter OsNRAMP1 in cadmium uptake and accumulation in rice. *Plant Signal Behav*, 2011, 6: 1813-6
- [94] Takahashi R, Ishimaru Y, Senoura T, et al. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *J Exp Bot*, 2011, 62: 4843-50
- [95] Ishimaru Y, Bashir K, Nakanishi H, et al. OsNRAMP5, a major player for constitutive iron and manganese uptake in rice. *Plant Signal Behav*, 2012, 7: 763-6
- [96] Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, et al. Characterizing the role of rice NRAMP5 in manganese, iron and cadmium transport. *Sci Rep*, 2012, 2: 286
- [97] Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, et al. OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol*, 2009, 149: 297-305
- [98] Bashir K, Ishimaru Y, Shimo H, et al. The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nat Commun*, 2011, 2: 322
- [99] Ogo Y, Itai RN, Kobayashi T, et al. OsIRO2 is responsible for iron utilization in rice and improves growth and yield in calcareous soil. *Plant Mol Biol*, 2011, 75: 593-605
- [100] Kobayashi T, Itai RN, Aung MS, et al. The rice transcription factor IDEF1 directly binds to iron and other divalent metals for sensing cellular iron status. *Plant J*, 2012, 69: 81-91
- [101] Shen C, Yue R, Sun T, et al. OsARF16, a transcription factor regulating auxin redistribution, is required for iron deficiency response in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci*, 2015, 231: 148-58
- [102] Qi Y, Wang S, Shen C, et al. OsARF12, a transcription activator on auxin response gene, regulates root elongation and affects iron accumulation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol*, 2012, 193: 109-20
- [103] Xu Y, Zhang S, Guo H, et al. OsABCB14 functions in auxin transport and iron homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J*, 2014, 79: 106-17
- [104] Yang A, Li Y, Xu Y, et al. A receptor-like protein RMC is involved in regulation of iron acquisition in rice. *J Exp Bot*, 2013, 64: 5009-20
- [105] Zhang Y, Xu YH, Yi HY, et al. Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *Plant J*, 2012, 72: 400-10
- [106] Ishimaru Y, Suzuki M, Kobayashi T, et al. OsZIP4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. *J Exp Bot*, 2005, 56: 3207-14
- [107] Ishimaru Y, Masuda H, Suzuki M, et al. Overexpression of the OsZIP4 zinc transporter confers disarrangement of zinc distribution in rice plants. *J Exp Bot*, 2007, 58: 2909-15
- [108] Lee S, Jeong HJ, Kim SA, et al. OsZIP5 is a plasma membrane zinc transporter in rice. *Plant Mol Biol*, 2010, 73: 507-17
- [109] Lee S, Kim SA, Lee J, et al. Zinc deficiency-inducible OsZIP8 encodes a plasma membrane-localized zinc transporter in rice. *Mol Cells*, 2010, 29: 551-8
- [110] Menguer PK, Farthing E, Peaston KA, et al. Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1. *J Exp Bot*, 2013, 64: 2871-83
- [111] Satoh-Nagasawa N, Mori M, Nakazawa N, et al. Mutations in rice (*Oryza sativa*) heavy metal ATPase 2 (*OsHMA2*) restrict the translocation of zinc and cadmium. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 213-24
- [112] Yamaji N, Xia J, Mitani-Ueno N, et al. Preferential delivery of zinc to developing tissues in rice is mediated by P-type heavy metal ATPase OsHMA2. *Plant Physiol*, 2013, 162: 927-39

- [113] Lan HX, Wang ZF, Wang QH, et al. Characterization of a vacuolar zinc transporter OZT1 in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Biol Rep*, 2013, 40:1201-10
- [114] Yang Z, Wu Y, Li Y, et al. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol*, 2009, 70: 219-29