

DOI: 10.13376/j.cblls/2018128

文章编号: 1004-0374(2018)10-1060-12



储成才, 博士, 主要从事农作物产量性状的分子基础及作物品种的分子设计改良研究, 在水稻营养高效吸收利用、源-库互作的分子机制和作物分子设计育种等基础及应用基础研究领域做出了一系列原创性研究, 成功建立起“种质资源收集及创制—关键功能基因克隆及鉴定—作物品种的分子设计与改良”这一理论和应用紧密结合的研究体系, 对解决我国农业生产上存在的一些实际问题具有重要指导意义, 为新一代“绿色超级稻”改良提供了全新的思路。回国后已在 *Nat Genet*、*Nat Plants*、*Nat Commun*、*Trends Plant Sci*、*Genome Res*、*PNAS*、*Plant Cell* 等刊物发表论文 120 多篇; 申请专利 50 多项, 其中国际专利 8 项; 与育种单位合作培育水稻新品种 3 个, 其中秀水 114、秀水 134 累计推广面积已达 100 万 hm^2 。

植物氮高效利用研究进展和展望

蒋志敏, 王 威, 储成才*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101)

摘 要: 氮是影响植物生长发育的重要矿质营养元素, 也是叶绿体、核酸、蛋白质以及很多次生代谢产物的重要组成成分。增加氮肥施用是农作物增产的主要手段, 但同时也会带来土壤酸化、水体富营养化、农业生产成本增加等问题。提高氮肥利用效率 (nitrogen use efficiency, NUE) 是解决这一问题的主要途径。现就近年来植物中氮素吸收、转运、同化及氮信号转导的分子机制等研究进展进行概述, 以期作为作物氮高效利用的分子设计育种提供理论基础。

关键词: 水稻; 氮利用效率; 转运蛋白

中图分类号: Q945; S143.1 **文献标志码:** A

Towards understanding of nitrogen use efficiency in plants

JIANG Zhi-Min, WANG Wei, CHU Cheng-Cai*

(Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Nitrogen is an essential mineral element that affects plant growth and development, and is also the major component of chlorophyll, nucleic acids, protein and secondary metabolites. Nitrogen fertilizers are also the major driving force for improvement of crop yield. However, application of nitrogen fertilizers also leads to quite a number of problems, such as soil acidification, water eutrophication, and increased production cost. The best solution to these problems is improving nitrogen use efficiency (NUE) of crops. In the past three decades, tremendous progresses have been made on the understanding of nitrogen absorption, transportation, assimilation, and signaling. In this review, the progresses on these aspects are summarized and future perspectives on how to improve NUE of crops are discussed.

Key words: rice; nitrogen use efficiency; transporter

收稿日期: 2018-09-19

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)“绿色超级稻新品种选育”(2014AA10A602)

*通信作者: E-mail: ccchu@genetics.ac.cn

随着人口的迅速增长和生活水平的不断提高, 粮食需求呈刚性增长趋势。为了提高粮食作物产量以满足对粮食的需求, 20世纪50年代开始的第一次绿色革命, 主要通过选育矮秆植株、增加施肥量, 使得粮食产量获得大幅度提高^[1]。从20世纪60~90年代, 世界粮食产量增加2~3倍, 其中增施化肥对粮食增产起着至关重要的作用。

氮是植物需求量最大的矿质元素, 也是植物生长的关键限制因子。除了部分豆科植物能够通过根瘤菌固氮外, 绝大多数植物均需通过根从土壤中获取氮源。增施氮肥能够促进植物生长发育, 提高作物产量。然而, 现代农业生产的强化种植, 使得耕地土壤中可被直接吸收利用的氮源变得很有限。为了提高作物产量, 氮肥施用量逐年增加。据统计, 1980—2013年的30多年间, 我国农用氮肥施用折纯量增加了近1.6倍, 而粮食总产仅增加87%(中华人民共和国国家统计局, <http://data.stats.gov.cn/>)。可见, 我国大量的化肥投入并没有带来较高的粮食产出, 化肥利用率仅为30%左右, 即所谓的高肥低效现象。高肥低效现象除了增加农业生产成本, 还给农业的可持续发展和环境带来负面影响: 过量施肥超过了土地的承受能力, 造成土壤酸化, 最终导致土壤板结和退化; 过量的肥料流入江河湖海引起水体富营养化, 污染水资源。培育氮肥高效利用的农作物新品种是解决我国农业生产中环境与资源间矛盾的关键。为此, 针对水稻育种, 我国科学家提出了“绿色超级稻”的理念, 即在保证作物产量的前提下, 少打农药、少施化肥、节水抗旱, 保护环境^[1]。随着基因组技术的进步以及功能基因组学研究的推进, 植物氮吸收利用以及信号调控的分子遗传机制不断得到解析, 也为利用分子遗传手段改良农作物的氮肥利用效率奠定了理论和技术基础。本文结合相关领域的最新进展, 对植物中氮元素的吸收利用以及氮信号转导调控的分子遗传机制的研究进展做一系统性总结, 并对未来作物氮高效改良等提出一些前瞻性思考。

1 氮吸收与转运

植物主要通过根从土壤中吸收无机氮(包括硝酸盐、铵盐)和有机氮(包括氨基酸、多肽等)来维持植物正常的生长发育。其中, 硝态氮(NO_3^-)和铵态氮(NH_4^+)是植物从土壤中获取氮源的主要形式^[2]。针对不同的氮源, 植物进化出多种氮吸收转运系统。

在模式植物拟南芥中共鉴定到4类负责硝酸盐

转运的蛋白: NRT1s、NRT2s、CLC和SLAC/SLAHs。负责硝酸盐吸收(或转运)的主要是NRT1s和NRT2s, 根据它们转运硝酸盐的活性, 又将其分为低亲和性和高亲和性两类。NRT1主要由低亲和力硝酸盐转运蛋白构成, 属于PTR(peptide transporters)类, 所以, 又将NRT1/PTR命名为NPF(NRT1/PTR family)。拟南芥中共有53个NPF(NRT1/PTR)家族成员, 其中已有12个NRT1/PTR成员(*AtNRT1.1~1.12*)被证明与硝酸盐转运相关^[3]。*CHL1*(*AtNPF6.3*或*AtNRT1.1*)是植物中第一个被鉴定且目前已知最为重要的NPF家族成员, 其不仅具有从根部吸收及向地上部分转运硝酸盐的功能^[4-5], 还可作为硝酸盐的感受器, 参与硝酸盐的应答反应^[6]。此外, *CHL1*具有双亲活性(即兼具高亲和低亲活性), 而拟南芥大多数其他NRT1成员仅具有低亲活性^[7]。

水稻中共有93个NRT1/PTR成员, 然而, 该家族成员虽多, 却只有几个成员的功能得到鉴定^[8-10](图1)。*OsNRT1*(*OsNPF8.9*)是水稻中第一个被鉴定的低亲和硝酸盐转运蛋白, 主要在根的根毛、表皮等部位表达, 调控根部硝酸盐的吸收^[11]。*EST*表达分析发现, *OsNRT1.1*存在2种剪接形式, 为了区分不同剪接形式, 将*OsNRT1.1*命名为*OsNRT1.1a*^[12], 另一种剪接形式命名为*OsNRT1.1b*。*OsNRT1.1b*主要在根中表达, 编码具有六个跨膜结构域的蛋白, 其过量表达能够增强水稻在高、低氮条件下的氮吸收, 而*OsNRT1.1a*只在高氮条件下发挥作用^[12]。*OsNPF4.1*(*SPI*, *Short Panicle1*)编码一个假定的PTR类转运蛋白, 在幼穗枝梗的韧皮部表达, 调控穗子大小, 但没有检测到其底物转运活性^[13]。有意思的是, 过量表达*OsNPF7.3*(*OsPTR6*)可增强不同氮浓度下铵盐转运蛋白的表达及谷氨酰胺合成酶的活性, 从而促进水稻生长, 但降低了高铵条件下的氮利用效率^[14-15]。*OsNPF8.20*(*OsPTR9*)在转录水平上受外界环境中氮源及昼夜节律的调控, 过表达也可促进铵盐吸收、侧根形成, 进而达到增产的效果, T-DNA插入突变体或RNA干扰植株则表现出相反的结果^[16]。*OsNPF2.4*是一个pH依赖的、低亲和性硝酸盐转运蛋白, 主要在表皮、木质部薄壁细胞和韧皮部的伴胞中表达。在*osnfp2.4*突变体中, 硝酸盐吸收转运受到抑制, 并且严重影响了硝酸盐由老叶向根及新叶的再分配过程^[17]。*OsNPF2.2*也是一个低亲和性、pH依赖的硝酸盐转运蛋白, 主要在木质部周围的薄壁细胞中表达, 负责硝酸盐由根向地上部分的转运过程。*osnfp2.2*突变之后抑制硝

酸盐从木质部的卸载，致使植物生长发育迟缓、灌浆率下降^[18]。

与拟南芥 CHL1 同源的水稻基因有 3 个，根据其同源性高低分别将其命名为 *OsNRT1.1A* (*OsNPF6.3*)、*OsNRT1.1B* (*OsNPF6.5*) 和 *OsNRT1.1C* (*OsNPF6.4*)。 *OsNRT1.1A* 是一个位于液泡膜上的硝酸盐 / 多肽转运家族的成员，在转录水平上受铵盐诱导；过表达 *OsNRT1.1A* 能上调硝酸盐、铵盐等转运相关基因的表达，同时还可正调控开花相关基因的表达，在促进植物氮吸收利用的同时促进植物开花和作物提前成熟，克服了氮肥带来的“贪青晚熟”的现象^[19]。

亚洲栽培稻分为粳稻与籼稻两个主要亚种，它们在形态、发育与生理等方面表现出不同的特征。有意思的是，在硝酸盐吸收和转运方面籼粳亚种间存在很大差异，籼稻对硝酸盐的吸收转运效率高于粳稻。研究结果发现，*OsNRT1.1B* 在高氮和低氮条件下都具有硝酸盐转运活性，且籼稻中 *OsNRT1.1B* 的硝酸盐转运活性高于粳稻。在籼稻驯化过程中 *OsNRT1.1B* 经历了人工选择，导致籼粳间一个 SNP (980C>T) 位点的变异，这是引起籼粳间硝酸盐吸收效率存在差异的主要原因。将籼稻型 *OsNRT1.1B* 导入粳稻品种后，在氮肥减半的条件下，与对照相比产量增加 30%~33%，氮肥利用效率提高 30%；正常施肥条件下，增产 8%~15%，氮肥利用效率提高约 10%^[20]。

与 NRT1 不同，NRT2 的大多数成员具有高亲活性，主要在低硝酸盐浓度下调控植物对硝酸盐的吸收 (或转运) 过程。在拟南芥中，已克隆并鉴定到 7 个成员 (*AtNRT2.1*~*2.7*) 与硝酸盐转运相关。这个家族大多数成员不能单独转运硝酸盐，需在辅助蛋白 NAR2 (NRT3) 的协助下完成。在拟南芥中有 2 个 NAR2 成员^[10,21-22]，除了 *AtNRT2.7* 以外，其余的转运蛋白都需要在 *AtNAR2.1* 的协助下才能完成硝酸盐的吸收或转运^[23]。

水稻中共有 4 个 NRT2s 和 2 个 NAR2s，它们均属于高亲活性的硝酸盐转运蛋白^[24] (图 1)。NRT2 家族成员中 *OsNRT2.1*、*OsNRT2.2*、*OsNRT2.3a* 需要在 *OsNAR2.1* 的辅助下完成硝酸盐的吸收和转运，而 *OsNRT2.3b* 和 *OsNRT2.4* 是不依赖于 *OsNAR2* 的^[8-10,25]。 *OsNRT2.3a* 定位在质膜上，且主要在根木质部薄壁细胞中表达，负责根中硝酸盐装载和向地上部分的运输，对根中硝酸盐的吸收并无影响^[26]。在低氮条件下，*OsNRT2.3a* 干涉植株表现为植株发育迟缓。与野生型比，干涉植株根中硝酸盐和总氮

含量偏高，而在地上部分偏低，表明根中木质部硝酸盐装载能力减弱^[26]。 *OsNRT2.3* 的另一种短的剪接形式是 *OsNRT2.3b*，其编码的蛋白也定位在质膜上，主要在韧皮部表达。*OsNRT2.3b* 的胞质侧有一段调控基序，通过感知外界环境中的 pH 值来调控硝酸盐转运。*OsNRT2.3b* 的表达水平升高能增强植物的 pH 缓冲能力，从而促进氮、铁和磷的吸收。田间试验结果表明，与对照相比，过表达 *OsNRT2.3b* 的水稻植株产量和氮利用效率提高约 40%^[27]。

铵盐是植物获取氮源的另一种主要形式。植物吸收铵盐主要通过铵转运蛋白来完成。在拟南芥中有两类，5 个 AMT1 (*AMT1;1*~*AMT1;5*) 和 1 个 AMT2。根据其铵盐的亲性和不同，也可将其分为高亲和性转运蛋白和低亲和性转运蛋白，负责根中铵盐吸收的 AMT1 家族为高亲和性铵盐转运蛋白^[28]。在拟南芥中，4 个在根中表达量较高的铵转运蛋白 (*AtAMT1;1*、*AAmt1;2*、*AtAMT1;3* 和 *AtAMT1;5*) 负责铵盐的吸收。在氮不足的情况下，*atamt1;1* 突变体中铵盐转运活性降低约 30%~40%^[29]。*AtAMT1;1* 和 *AtAMT1;3* 可以形成同源或异源二聚体，以功能叠加的方式调控植物根中铵盐的转运，*atamt1;1* *atamt1;3* 双突变体对铵毒害类似物更加敏感^[30-31]。在高铵条件下，*AtAMT1;3* 蛋白聚集成簇，通过网格蛋白介导的内吞途径进入细胞质，从而减少植物对铵盐的吸收，避免铵毒害^[32]。*AtAMT1;2* 主要在根的皮层和内皮层表达，在 *atamt1;2-1* 和 *atamt1;2-2* 两个突变体根中铵盐的高亲和吸收率分别降低了 26% 和 18%^[33]。*AtAMT1;5* 在转录水平上受缺氮条件的诱导，在 *qko* 四突变体中 *AtAMT1;5* 表达量更高，说明植物中可能存在铵吸收的代偿机制 (或补偿途径)^[33]。*AMT1;4* 是一个位于质膜上的高亲和性铵盐转运蛋白，主要在花粉和花粉管中表达，可能参与调节花粉发育中的氮营养供给，但其突变并未影响花粉的功能^[34]。*AtAMT2;1* 在地上部分和根中都有表达，除了参与根中铵盐吸收外，主要负责铵盐从根向地上部分的转运^[35-36]。

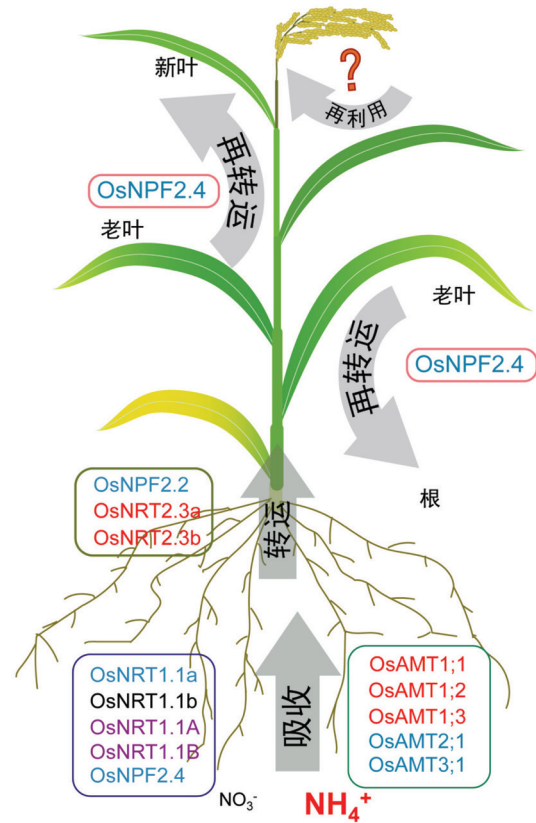
铵盐是水稻获取氮源的主要形式，但是铵盐的利用效率只有 30%~40%，其余大部分则易流失或挥发，造成严重的资源浪费^[37]。水稻中有 12 个铵盐转运蛋白，分为 5 类 *OsAMT1*~*OsAMT5* (图 1)。其中，*OsAMT1* 由 3 个不同的成员组成：*OsAMT1;1*、*OsAMT1;2* 和 *OsAMT1;3*。*OsAMT1;1* 在地上和地下部分组成型表达，*OsAMT1;2* 在根中特异性表达，两者都受铵盐诱导；*OsAMT1;3* 在根中特异性表达，

但受铵盐抑制^[38]。这3个基因表达水平与根中谷氨酰胺含量呈现相关性,与根中铵盐的含量无关。谷氨酰胺在调控 *OsAMT1* 转录方面与铵盐具有相同的功能,而谷氨酰胺合成酶抑制剂蛋氨酸亚砷胍(methionine sulfoximine)能够抑制铵盐对 *OsAMT1* 转录水平的调控,说明谷氨酰胺而非铵盐调控水稻内铵转运基因的表达^[38]。*OsAMT2.1* 在根和地上部组成型表达,且不受氮源调控,而 *OsAMT3.1* 表达水平相对较弱^[39]。近几年,科研人员也尝试通过过量表达不同的 *OsAMT* 基因来提高铵盐的转运效率,但是效果不佳。*OsAMT1;1* 过表达植株在适量铵或低铵条件下能够增强铵的渗透力并促进水稻生长、提高水稻产量;但在高浓度铵条件下,根中铵盐的积累影响了水稻的生长发育,导致生物量减少^[40-41]。而 *OsAMT1;3* 过表达植株则表现为氮吸收转运能力减弱,叶中碳、氮含量下降,同时伴随较高的 C/N 比例^[42]。在低氮条件下, *OsAMT1;3* 过表达植株侧根数目和根长增加,这说明 *OsAMT1.3* 在植物适应低氮环境中起重要作用^[43]。

2 氮同化

硝酸盐被吸收进入根后,首先被硝酸还原酶(nitrate reductase, NIA)还原成亚硝酸盐,亚硝酸盐进入质体后进一步被亚硝酸还原酶(nitrite reductase, NIR)还原成铵盐。硝酸还原酶是氮同化途径中第一个被鉴定的酶,直接影响氮利用效率,在农业生产上具有重要的作用。拟南芥中有两个硝酸还原酶基因——*AtNIA1* 和 *AtNIA2*。*AtNIA2* 是叶中硝酸还原酶的主要形式, *nia2* 突变体中硝酸还原酶活性降至野生型的 10%,仍能在以硝酸盐为唯一氮源条件下正常生长; *nial nia2* 只有 0.5% 的硝酸还原酶活性,在以硝酸盐为唯一氮源条件下生长较差^[44]。水稻基因组中有 3 个硝酸还原酶基因^[45-47],然而,针对每个硝酸还原酶基因的具体调控方式及其在氮代谢过程中的具体功能仍有待研究。

谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)是氮同化过程中的关键酶,与谷氨酸合酶(glutamate synthase, GOGAT)形成 GS-GOGAT 环,将铵盐转化成谷氨酰胺。根据其定位,植物中的谷氨酰胺合成酶可分为两类:胞质型 GS1 和质体型 GS2。拟南芥中有 5 个 GS1 蛋白(GS1;1~GS1;5,分别由 *GLN1;1*~*GLN1;5* 编码)和 1 个 GS2 (由 *GLN2* 编码)。GS1 又可根据其对底物的亲和性不同,分为高亲和型(GLN1;1 和 GLN1;4)和低亲和型(GLN1;2 和 GLN1;3)



OsNRT1.1a、*OsNRT1.1b*、*OsNRT1.1A*、*OsNRT1.1B* 及 *OsNPF2.4* 参与调控硝酸盐吸收; *OsNPF2.4* 还参与硝酸盐由老叶向新叶及根中的再转运; *OsNPF2.2*、*OsNRT2.3a*、*OsNRT2.3b* 负责硝酸盐由根部向地上部分转运; *OsAMT1;1*、*OsAMT1;2*、*OsAMT1;3*、*OsAMT2;1*、*OsAMT3;1* 主要参与调节铵盐吸收过程。红色字体代表高亲和性转运蛋白;蓝色字体代表低亲和性转运蛋白;紫色代表双亲和性转运蛋白;黑色字体代表亲和和活性不确定的转运蛋白。

图1 水稻中硝酸盐、铵盐转运蛋白的功能

两类。根中主要存在的谷氨酰胺合成酶是胞质型 GS1。*AtGLN1;1* 主要在根表面、根尖及根毛等部位表达, *AtGLN1;2* 在根的维管组织表达且受铵盐诱导, *AtGLN1;3* 主要在根成熟区内的维管组织表达, *AtGLN1;4* 在侧根发生基部特异表达,而 *AtGLN1;5* 的表达量极低,几乎检测不到^[48]。

水稻内有 3 类胞质型谷氨酰胺合成酶 GS1 (*OsGS1;1*、*OsGS1;2* 和 *OsGS1;3*)。 *OsGS1;1* 和 *OsGS1;2* 在各个组织器官中都有表达, *OsGS1;1* 在营养生长时期的叶片中表达量最高, *OsGS1;2* 在铵盐处理的幼苗根中表达量较高,而 *OsGS1;3* 则在穗中特异性表达。 *OsGS1;1* 和 *OsGS1;2* 为高亲和型谷氨酰胺合成酶,与拟南芥相对应的低亲和型合成酶(GS1;2 和 GS1;3)在水稻根中还没有检测到^[48-50]。 *OsGS1;1* 突变体生长发育迟缓,灌浆率低^[51]。 *OsGS1;2* 突

变之后分蘖数和穗数都明显降低，根中铵离子浓度高于野生型，这也进一步说明 OsGS1;2 在根部铵盐同化过程中发挥重要功能^[52]。在水稻中过量表达 *OsGS1;1* 和 *OsGS1;2* 后，产量和氨基酸总含量都低于野生型^[53]。将 *OsGS1;1* 和 *OsGS1;2* 共表达时，能够增强水稻幼苗对渗透胁迫和盐胁迫的响应；在干旱胁迫和盐胁迫条件下，水稻灌浆率分别达到 64.6% 和 58.2%，显著高于野生型 (35.7% 和 28.0%)，从而提高了胁迫条件下的水稻产量^[54]。在烟草叶片中过量表达豌豆的 *GSI*，过表达植株表现为光依赖型促进植物生长、增强光呼吸过程^[55]。玉米谷氨酰胺合成酶突变体 *gln1;3* 表现为籽粒数目减少，而 *gln1;4* 表现为籽粒变小，*gln1;3 gln1;4* 则表现为籽粒变小、籽粒数减少；而 *GLN1;3* 过量表达植株籽粒数增加 30%，表明玉米中谷氨酰胺合成酶基因 *GLN1;3* 和 *GLN1;4* 在调控籽粒大小和籽粒数方面发挥重要作用^[56]。

植物中的谷氨酸合酶根据其电子供体的特异性分为铁氧化还原蛋白依赖型 (Fd-GOGAT) 和 NADP 依赖型 (NADH-GOGAT) 两种形式^[57]。拟南芥中有 2 个 Fd-GOGAT (GLU1 和 GLU2) 和 1 个 NADH-GOGAT (GLT)。 *AtGLU1* 主要在叶中表达，在光呼吸和氮同化过程中起主要作用； *AtGLU2* 主要在根中表达，参与根中氮同化过程^[58]。 *AtGLT* 主要在根中表达，参与非光呼吸氮同化及谷氨酸合成过程^[57]。

水稻中也有 2 个 NADH-GOGAT (*OsGOGAT1* 和 *OsGOGAT2*) 和 1 个 Fd-GOGAT^[59]。 *OsGOGAT1* 突变后致使铵盐不能被正常同化，所以，在以铵盐为氮源培养条件下， *nadh-gogat1* 突变体的主根生长受到抑制，根中 NADH-GOGAT 的催化产物谷氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和丙氨酸的含量显著减少， NH_4^+ 浓度明显增加，同时，突变体分蘖数减少，导致产量降低^[60]。 *OsGOGAT2* 主要在叶片和叶鞘中表达，突变后穗上小穗数目减少，产量降低及生物量减少^[61]。绝大多数籼稻品种中 NADH-GOGAT 蛋白量少于粳稻品种，以籼稻品种为背景，将来自粳稻品种中的 *NADH-GOGAT* 在其自身启动子的驱动下过表达，粒重增加 80%，说明 NADH-GOGAT 在氮利用和灌浆方面起着重要作用^[62]。较弱的 *osfd-gogat* (即 *abnormal cytokinin response1* 或者 *abc1*) 等位突变体表现为叶片黄化、生长发育迟缓、植株矮小、分蘖数减少等氮缺乏症状以及过量氨基酸积累而引起 N/C 升高，T-DNA 插入突变体则表现为苗期致死，说明 *OsFd-GOGAT* 在调控植物生

长发育和 C/N 平衡过程中起着非常关键的作用^[63]。 *OsFd-GOGAT* 中 1 006 位亮氨酸突变为组氨酸后叶片中总 GOGAT 酶活降至 67%，弱光下叶片出现早衰表型，结实率下降，灌浆期、上三叶和倒一节中的氨基酸含量显著增加，说明 *OsFd-GOGAT* 可能参与叶片衰老过程中氮的再利用过程^[64]。 *OsARE1* 是 Fd-GOGAT 的抑制因子，定位在叶绿体中。 *OsARE1* 突变后能延缓衰老，水稻产量增加 10%~20%，并显著提高低氮条件下的氮利用效率。通过对 2 155 份水稻品种的基因组数据进行关联分析发现，18% 的籼稻 (*ind*) 品种和 48% 的秋稻 (*aus*) 品种中， *OsARE1* 启动子区域含有一个小的插入序列，导致 *ARE1* 表达量下降，从而提高了水稻产量^[65]。

3 氮信号途径

除了作为营养元素影响植物的生长发育之外，氮及其代谢产物还可以作为信号分子调控植物生长发育。由于植物吸收、微生物脱硝化作用 (denitrification) 及部分氮素的流失和挥发等影响，土壤中氮素浓度处于不断变化的状态^[66-67]。了解植物如何感知并快速响应土壤中氮素浓度变化来调节自身的代谢、生理变化及生长发育等过程，对于作物的氮利用效率改良具有重要意义。

拟南芥中，*CHL1* 不仅作为双亲性硝酸盐转运蛋白参与硝酸盐的吸收和转运，还可作为硝酸盐感受器感知外界硝酸盐浓度。 *CHL1* 对外界硝酸盐浓度的感知主要通过 T101 位点的磷酸化来实现。当外界环境中硝酸盐浓度较低时，T101 位点被磷酸化，*CHL1* 具有高亲活性，引发低水平初级硝酸盐响应；当外界硝酸盐浓度较高时，T101 位点被去磷酸化，*CHL1* 具有低亲活性，引发较高水平的初级硝酸盐响应^[68-69]。 *chl1-9* 是第 492 位脯氨酸被亮氨酸取代，导致 *chl1-9* 转运硝酸盐能力丧失，但仍具有感知硝酸盐信号能力，说明 *CHL1* 调控硝酸盐转运和信号转导是两个独立的过程。 *AtNRT2.1* 是目前鉴定的硝酸盐的另外一个感受器。植物侧根的形成不仅受到外界环境信号的影响，还受营养信号的调控。 *AtNRT2.1* 不仅参与低硝条件下硝酸盐的吸收，还影响依赖于硝酸盐的侧根发生 (lateral root initiation, LRI) 过程。在高蔗糖 / 低氮条件下筛选到侧根数目增加的突变体 *atnrt2.1*，说明 *NRT2.1* 抑制该条件下侧根形成的过程^[70]。 *atnrt2.1* 突变体内硝酸盐吸收减少，说明 *NRT2.1* 通过感知植物体内、外硝酸盐浓度来调节植物侧根发生^[71-72]。 *OsNRT1.1B* 是水稻

中 *CHL1* 的功能同源基因, 在 *osnrt1.1b* 突变体中硝酸盐诱导基因 *OsNIA1* 和 *OsNIA2* 的表达降低, 这说明 *OsNRT1.1B* 也可能作为硝酸盐的感受器调控硝酸盐响应过程^[20]。

已有研究结果显示, 铵盐能够引起基因表达、代谢及根系结构的变化, 这些过程不依赖铵盐的同化过程, 说明铵盐本身可能也可作为信号分子起作用^[73-76]。在高铵条件下, *AtAMT1;1* 的 T460 被 CIPK23 磷酸化, 使得其转运活性降低, 从而避免了铵毒害表型^[77]。无论是用铵盐同化产物谷氨酰胺处理, 还是 L-蛋氨酸磺酰亚胺 (L-methionine sulfoximide, MSX) 诱导增加细胞内铵盐浓度, 都不能诱导 *AtAMT1;1* 的 T460 位氨基酸磷酸化修饰, 说明 *AMT1;1* 通过感知外界环境中铵盐浓度来改变其自身磷酸化状态^[78]。因此, *AtAMT1;1* 被认为是铵盐 transceptor, 既可以负责铵盐的吸收转运, 又可以感知铵盐信号。在拟南芥 *AtAMT1s* 中, 尤其是在细胞质膜定位的高亲和性转运蛋白 *AtAMT1;1* 的 mRNA 和蛋白水平都受到铵盐抑制, 受氮饥饿诱导^[79]。在水稻中则相反, *OsAMT1;1* 和 *OsAMT1;2* 在转录水平上受铵诱导, 但是受氮饥饿抑制^[80]。这说明在拟南芥和水稻中存在不同的氮响应机制。

Ca^{2+} 作为第二信使, 广泛参与植物的信号转导过程。研究结果显示, Ca^{2+} 也参与植物体内硝酸盐的信号转导。用钙离子螯合剂 EGTA 或钙离子通道抑制剂 LaCl_3 处理离体的玉米和大麦叶片, 叶片中硝酸盐诱导的初级响应基因硝酸还原酶 (NR) 和亚硝酸还原酶 (NiR) 的表达受到抑制, 说明钙在硝酸盐响应过程中起着重要作用^[81-82]。用硝酸盐处理表达水母发光蛋白 (与钙离子结合发蓝光) 的转基因拟南芥植株, 发现硝酸盐处理后根中及地上部分细胞质中 Ca^{2+} 浓度升高, 而施加 EGTA 或者 LaCl_3 后可抑制这种响应^[83]。研究结果还表明, 硝酸盐处理后 1,4,5-三磷酸 (IP3) 浓度升高, 而用磷脂酶 C (PLC) 活性抑制剂 U73122 处理能够显著抑制硝酸盐对 Ca^{2+} 和 IP3 浓度的影响。在 *CHL1* 突变体 *chl1-5* 和 *chl1-9* 中, 硝酸盐对 Ca^{2+} 浓度、IP3 浓度及硝酸盐相应基因的调控都受到影响, 说明 *NRT1.1* 和 PLC 都参与硝酸盐信号途径^[83]。而最近的研究结果显示, 用 GCaMP6 钙离子生物感应器来分析拟南芥叶肉细胞原生质体内 Ca^{2+} 信号, 发现硝酸盐能够明显刺激细胞核和细胞质内钙信号的产生, 而 EGTA 处理后能够抑制硝酸盐引发的钙信号。用 Ca^{2+} 通道抑制剂 Gd^{3+} 和 La^{3+} 或钙调蛋白拮抗剂 W7 处理后, 硝酸盐

响应基因 *NiR*、*G6PD3*、*NFR2* 的表达量显著降低, 这也进一步说明了 Ca^{2+} 在硝酸盐信号转导途径中的重要作用。

细胞内 Ca^{2+} 浓度变化直接影响了蛋白质磷酸化状态, 通过调控信号通路中关键组分的磷酸化状态进而影响其活性。最近的一项研究成果填补了 Ca^{2+} 和硝酸盐信号之间的空缺。研究者通过胶内激酶活性分析 (*in-gel kinase assay*) 证明 Ca^{2+} 依赖蛋白激酶 (CPKs) 成员参与调控硝酸盐信号转导过程。用响应硝酸盐的 NIR-LUC 报告基因系统与 CPKac (组成型激活的 CPKs) 共表达时, 在低硝酸盐浓度下鉴定到第三亚族 CPKs 以功能冗余的方式参与调控硝酸盐信号转导过程。

此外, G 蛋白复合体也参与硝酸盐信号转导过程。G 蛋白复合体由 α 、 β 和 γ 三个亚基组成, 其中 γ 亚基 (DEP1) 最初被鉴定为一个影响水稻产量的位点。该基因的功能获得性突变体 *depl* 表现为分生组织活性增强, 结果导致花序节间变短、穗粒数增多, 从而使水稻产量增加^[84]。进一步研究发现, 不同的 *DEP1* 等位基因对氮素的响应不同。携带有显性等位基因 *depl-1* 的植株在营养生长阶段对氮素不敏感, 氮吸收和同化效率增加, 从而导致在中氮条件下收获指数和作物产量增加。DEP1 蛋白与 Ga (RGA1)、G β (RGB1) 相互作用, 降低 RGA1 活性或增强 RGB1 活性能够抑制氮素响应, 这说明 G 蛋白复合体参与植物对氮信号的感知过程^[85]。

4 转录因子在氮信号途径中的功能

氮的吸收、转运、同化过程及氮信号转导都涉及复杂的基因调控网络, 参与这些基因调控的转录因子也陆续被报道, 如 MADS-box、LBD、NLP、MYB、bZIP、NAC、BTB 以及 GRF 等基因家族成员均参与了氮信号途径的调控。

AtANR1 是一个编码 MADS-box 转录因子的基因, 参与调控侧根生长, 作用在 *CHL1* 的下游发挥功能^[86-87]。*AtAGL21* 也编码一个 MADS-box 转录因子, 主要在根中表达, 通过调控根中生长素的合成调控侧根的发育^[88]。在低氮条件下, *AtAGL21* 过表达植株表现为侧根数目和长度增加, 而 *atagl21* 突变体的侧根短而少^[88]。NLPs (NIN-like protein) 是硝酸盐信号通路中的正向调控因子。酵母单杂交结果显示, 拟南芥中 9 个 NLPs 都可以结合硝酸盐应答顺式作用元件 (nitrate-responsive *cis*-element, NRE), 说明这些转录因子都有可能参与氮信号的调控^[89]。

其中, NLP7 是硝酸盐信号途径中的核心转录因子, 其突变后硝酸盐对 *AtNRT2.1* 及 *AtNIA1* 的诱导受到抑制, 硝酸盐主要是通过调控 NLP7 在细胞核内的积累而影响其功能^[90]。NLP7 过量表达后能够增强氮的吸收利用、光合效率及碳同化效率, 促进植物生长发育^[91]。最近的研究表明, 硝酸盐通过调控 NLP7 蛋白的磷酸化水平发挥作用。作为硝酸盐信号通路中的第二信使, Ca^{2+} 介导硝酸盐对 NLP7 的磷酸化修饰。 Ca^{2+} 通道抑制剂 (Gd^{3+} 和 La^{3+} 或 W7) 减弱了硝酸盐对 NLP7 磷酸化修饰的影响及对硝酸盐相应基因的调控^[92]。硝酸盐激活 Ca^{2+} 信号后, CPKs 激酶将 NLP7 磷酸化, 使其由细胞质转入细胞核, 调控硝酸盐响应^[92]。*AtTCP20* (teosinte branched1/cycloidea/proliferating cell factor 20) 也是硝酸盐信号通路中的正向调控因子, 参与调控 100 多个硝酸盐响应基因的表达。EMSA 实验表明, TCP20 可以直接结合到 *NIA1*、*NRT2.1*、*NRT1.1* 的启动子上。*tcp20* 突变体中, 硝酸盐诱导侧根生长受到抑制^[93]。TCP20 和 NLP6、NLP7 相互作用形成异源二聚体, 正向调控氮同化及氮信号途径中的基因, 抑制细胞周期标志基因 *CYCB1;1*, 该研究首先建立了外界氮源和细胞增殖的联系^[94]。*AtNRG2* (nitrate regulatory gene 2) 也是硝酸盐响应的一个正调控因子, 其突变后硝酸盐诱导基因的表达受到抑制。*AtNRG2* 也可以与 NLP7 相互作用调控 *NRT1.1* 等部分硝酸盐响应基因的表达^[95]。此外, 在 NH_4^+ 存在的情况下, NLP7 还可以直接结合到 *NRT1.1* 的启动子上, 调控 NH_4^+ 条件下的硝酸盐信号响应^[96]。*AtTGAI* 和 *AtTG44* 在拟南芥根中受硝酸盐诱导, 通过直接调控 *NRT2.1*、*NRT2.2* 等基因的表达来影响硝酸盐对侧根形成的调控^[97]。最近的研究结果显示, GARP 类转录因子 NIGT1 在调控氮磷应答反应方面起着重要的作用。在高氮条件下, NIGT1 家族成员被 NLP7 激活表达, 通过直接抑制硝酸盐高亲和转运蛋白基因 *NRT2.1*、*NRT2.4* 和 *NRT2.5* 以及磷饥饿信号通路中的负调控因子 SPX 家族成员及 *PHO2* 的表达, 达到抑制硝酸盐应答反应并促进磷饥饿反应的目的, 从而调控植物体内的氮磷平衡^[98-100]。同时, 在高硝酸盐、无磷情况下, 磷饥饿通路中的正向调控因子 PHR1 也会诱导 *NRGT1* 的表达^[99]。bZIP 类转录因子 HY5 能够激活 *TPS1*、*SWEETs* 等基因的表达, 促进碳同化过程。与此同时, HY5 还可以通过韧皮部从地上移动到地下, 结合在自身启动子区域激活根中 *HY5* 的表达, 从而激活高亲和性硝酸

盐转运蛋白基因 *NRT2.1* 的表达, 促进氮的吸收, 维持植物整体的碳氮平衡^[101]。LBD (lateral organ boundary domain) 基因家族中的三个成员 *LBD37*、*LBD38* 和 *LBD39* 受到硝酸盐、铵盐和谷氨酰胺等氮源的诱导, 抑制硝酸盐吸收和同化相关基因的表达, 并使缺氮条件下花青素合成减少, 说明这 3 个 LBD 成员是硝酸盐信号负调控因子^[102]。

在水稻中, *Bric-a-Brac/Tramtrack/Broad* (BTB) 基因家族成员也参与调控植物氮利用效率。在低氮条件下, 过量表达 *BT2* 拟南芥植株的氮利用效率低于野生型; 与野生型相比, 在 *BT2* 及其同源基因 *BT1* 的双突变体 *bt1 bt2* 中, 硝酸盐转运蛋白基因 *NRT2.1* 和 *NRT2.4* 的表达量升高, 氮吸收效率升高 65%。在低氮条件下, 将水稻中同源基因 *OsBT* 突变后, 氮利用效率升高 20%, 表明 BT 基因家族成员作为氮吸收利用负向调控因子发挥作用, 可以作为改良作物中氮利用效率的靶标之一^[103]。水稻中 *NAC* (no apical meristem, *Arabidopsis* ATAF1/2, and cupshaped cotyledon 2) 类转录因子 *OsNAP* (*Oryza sativa* NAC-like, activated by *apetala3/pistillata*) 参与调控叶片衰老过程。*OsNAP* 通过直接调控叶绿素降解、营养再转运及其他与衰老相关基因的表达来正向调控叶片衰老过程。*OsNAP* 过量表达使籽粒中总氮含量明显升高, 剑叶中氮等营养元素的含量降低, 从而促进叶片衰老; 而其干涉植株中叶片衰老延缓, 灌浆期延长, 水稻产量提高, 这些结果说明 *OsNAP* 可以通过调控植物体内营养转运过程影响植物衰老^[104]。GRF (growth regulating factors) 类转录因子是一类参与调控植物器官大小的转录因子。水稻中 *miR396-OsGRF4-OsGIFs* 模块能够通过调控细胞大小和细胞数目, 进而影响水稻籽粒大小, 并在很大程度上提高了水稻产量^[105-106]。同时, *OsGRF4* 能够激活油菜素内酯诱导基因的表达, 而油菜素内酯信号通路中的负调控因子 *GSK2* 则与 *OsGRF4* 相互作用并抑制其转录激活活性, 从而综合调控水稻的籽粒大小和产量^[107]。*OsGRF4* 除了参与调控油菜素内酯信号途径下游的一条调控籽粒大小的特异性分支外, *OsGRF4* 还通过与 DELLA 蛋白 SLR1 互作参与对赤霉素信号通路的调控^[107]。水稻中 SLR1 与 *OsGRF4* 的相互作用, 一方面降低 *OsGRF4* 蛋白丰度, 另一方面干扰 *OsGRF4* 与 *OsGIF1* 相互作用, 从而负调了碳、氮吸收及同化相关基因的表达, 进而影响植物体内的碳氮代谢过程^[108]。

在氮信号转导途径中, 还发现有其他组分也参与对硝酸盐信号的调控。*CPSF30* 编码一个切割加尾特异因子 (cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF), 该蛋白具有两种剪接形式, 而其长链形式的转录本所编码的蛋白 CPSF30-L 对硝酸盐信号转导具有重要的调控作用。研究发现, 在 *cpsf30* 突变体背景下, 硝酸盐应答反应基因 *NIA1*、*NiR* 及 *NRT2.1* 的表达水平受到显著抑制, 而采用 *CPSF30-L* 互补 *cpsf30* 突变体则能恢复硝酸盐应答反应的缺陷。同时, 转录组分析也发现在 *cpsf30* 突变体背景下, 许多氮转运及同化相关基因的表达水平发生显著变化。进一步研究还发现, CPSF30-L 能够影响 *CHL1* mRNA 的 3'-UTR 的可变加尾, 从而影响 *CHL1* mRNA 的稳定性。以上结果均表明, CPSF30 在调控硝酸盐初级应答反应中具有重要作用^[109]。

5 展望

20 世纪 50 年代的第一次绿色革命通过引入矮秆 (或半矮秆) 基因显著改良了水稻以及小麦等作物在高水高肥条件下的产量。然而, 为了未来农业的可持续发展, 在继续保持农作物增产的同时, 还要节约资源, 保护环境, 因而亟待高产高效的绿色作物品种的培育及推广。为此, 无论是氮营养高效利用的生物学基础研究, 还是农作物氮高效的遗传改良以及新品种的应用推广, 都对未来作物的研究提出了更高的要求。目前, 植物氮的吸收利用及信号转导机制大多在模式植物拟南芥中开展, 随着技术的进步和水稻功能基因组学研究的进一步深入, 相信水稻等作物中氮的吸收利用机制将会很快取得突破, 从而为氮高效作物新品种的培育提供更好的理论支撑。目前, 植物氮高效基因的挖掘和解析仍有许多问题有待解决。

从营养学角度来说, 作物产量由营养元素的吸收、转运、同化、再转运和再利用等几个环节所决定 (图 1)。目前研究认为, 营养元素的转运蛋白是进行农作物养分高效利用遗传改良的重要靶点^[110]。然而, 植物中编码转运蛋白的基因多以多基因家族的形式存在。以硝酸盐 (或铵盐) 转运蛋白为例, 目前鉴定的多数硝酸盐 (或铵盐) 转运蛋白主要是负责根部氮素的吸收和转运, 对于植物地上部分的氮素分配及再利用的相关转运蛋白却知之甚少, 而地上部分则是氮素发挥其生物学功能并影响经济学产量最为重要的场所。为此, 鉴定和研究参与植物

氮素再转运及再利用相关的转运蛋白, 尤其是能促进源-库互作的相关转运蛋白功能, 并通过基因聚合育种促使植物协同高效地吸收和利用氮素, 对于农作物品种的氮高效遗传改良是十分必要的。

除了硝酸盐可以作为信号分子对植物的生长发育起调控作用外, 铵盐也被认为可以作为信号分子参与植物生长发育的调控。然而, 现在对于铵盐信号转导途径的研究几近空白。水稻作为一种喜铵作物, 对铵盐信号机制的深入解析有利于进一步改良水稻的氮利用效率。随着基因组学和系统生物学技术的发展, 在硝酸盐信号转导通路中, 陆续鉴定到多个转录因子, 如 TGA1/4、bZIP1、SPL9 等。然而, 对于这些转录因子的具体功能 (包括其组织表达和氮源的应答模式、调控的下游基因以及对植物发育的影响等) 却仍然未知。后续的氮信号的研究应着力利用多种组学技术深入阐明这些转录因子在氮信号转导过程中的互作关系。

植物的氮利用效率受到一系列复杂因素的影响, 如植物自身的生理水平、发育过程以及外界环境条件等, 并且其在物种 (或亚种) 间和不同植物组织中也具有显著差别。因此, 可利用全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS) 结合多种“组学”技术 (如表型组、蛋白质组、代谢组及微生物组等) 对覆盖作物遗传多样性的自然群体进行更广泛的调查, 深入挖掘在不同氮肥水平和不同氮源条件下控制氮肥利用效率的关键调控基因及优异等位变异, 以期为氮高效分子育种提供更多的候选基因位点, 定向改良特定的作物亚种或创制优异新品种。

[参 考 文 献]

- [1] Zhang Q. Strategies for developing Green Super Rice. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 16402-9
- [2] Xu G, Fan X, Miller AJ. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. Annu Rev Plant Biol, 2012, 63: 153-82
- [3] Wang YY, Cheng YH, Chen KE, et al. Nitrate transport, signaling, and use efficiency. Annu Rev Plant Biol, 2018, 69: 85-122
- [4] Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, et al. The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. Cell, 1993, 72: 705-13
- [5] Leran S, Munos S, Brachet C, et al. *Arabidopsis* NRT1.1 is a bidirectional transporter involved in root-to-shoot nitrate translocation. Mol Plant, 2013, 6: 1984-7
- [6] Liu KH, Tsay YF. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. EMBO J, 2003, 22: 1005-13
- [7] Li H, Hu B, Chu C. Nitrogen use efficiency in crops:

- lessons from *Arabidopsis* and rice. *J Exp Bot*, 2017, 68: 2477-88
- [8] Araki R, Hasegawa H. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. *Breed Sci*, 2006, 56: 295-302
- [9] Cai C, Wang JY, Zhu YG, et al. Gene structure and expression of the high-affinity nitrate transport system in rice roots. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50: 443-51
- [10] 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
- [11] Lin CM, Koh S, Stacey G, et al. Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice. *Plant Physiol*, 2000, 122: 379-88
- [12] Fan X, Feng H, Tan Y, et al. A putative 6-transmembrane nitrate transporter *OsNRT1.1b* plays a key role in rice under low nitrogen. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58: 590-9
- [13] Li S, Qian Q, Fu Z, et al. *Short panicle1* encodes a putative PTR family transporter and determines rice panicle size. *Plant J*, 2009, 58: 592-605
- [14] Ouyang J, Cai Z, Xia K, et al. Identification and analysis of eight peptide transporter homologs in rice. *Plant Sci*, 2010, 179: 374-82
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Xia X, Fan X, Wei J, et al. Rice nitrate transporter *OsNPF2.4* functions in low-affinity acquisition and long-distance transport. *J Exp Bot*, 2015, 66: 317-31
- [18] Li Y, Ouyang J, Wang YY, et al. Disruption of the rice nitrate transporter *OsNPF2.2* hinders root-to-shoot nitrate transport and vascular development. *Sci Rep*, 2015, 5: 9635
- [19] Wang W, Hu B, Yuan D, et al. Expression of the nitrate transporter gene *OsNRT1.1A/OsNPF6.3* confers high yield and early maturation in rice. *Plant Cell*, 2018, 30: 638-51
- [20] 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
- [21] Miller AJ, Fan X, Orsel M, et al. Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot*, 2007, 58: 2297-306
- [22] Wang YY, Hsu PK, Tsay YF. Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci*, 2012, 17: 458-67
- [23] Kotur Z, Mackenzie N, Ramesh S, et al. Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with *AtNAR2.1*. *New Phytol*, 2012, 194: 724-31
- [24] Fan XR, Naz M, Fan XR, et al. Plant nitrate transporters: from gene function to application. *J Exp Bot*, 2017, 68: 2463-75
- [25] 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
- [26] Tang Z, Fan X, Li Q, et al. Knockdown of a rice stelar nitrate transporter alters long-distance translocation but not root influx. *Plant Physiol*, 2012, 160: 2052-63
- [27] 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
- [28] Glass AD, Britto DT, Kaiser BN, et al. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *J Exp Bot*, 2002, 53: 855-64
- [29] Kaiser BN, Rawat SR, Siddiqi MY, et al. Functional analysis of an *Arabidopsis* T-DNA "knockout" of the high-affinity NH_4^+ transporter *AtAMT1;1*. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1263-75
- [30] Loque D, Yuan L, Kojima S, et al. Additive contribution of *AMT1;1* and *AMT1;3* to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant J*, 2006, 48: 522-34
- [31] Yuan L, Gu R, Xuan Y, et al. Allosteric regulation of transport activity by heterotrimerization of *Arabidopsis* ammonium transporter complexes *in vivo*. *Plant Cell*, 2013, 25: 974-84
- [32] Wang Q, Zhao Y, Luo W, et al. Single-particle analysis reveals shutoff control of the *Arabidopsis* ammonium transporter *AMT1;3* by clustering and internalization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 13204-9
- [33] Yuan L, Loque D, Kojima S, et al. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of *AMT1*-type transporters. *Plant Cell*, 2007, 19: 2636-52
- [34] Yuan L, Graff L, Loque D, et al. *AtAMT1;4*, a pollen-specific high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 13-25
- [35] Giehl RFH, Laginha AM, Duan F, et al. A critical role of *AMT2;1* in root-to-shoot translocation of ammonium in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2017, 10: 1449-60
- [36] Sohlenkamp C, Shelden M, Howitt S, et al. Characterization of *Arabidopsis* *AtAMT2*, a novel ammonium transporter in plants. *FEBS Lett*, 2000, 467: 273-8
- [37] Craswell E, Godwin D. The efficiency of nitrogen fertilizers applied to cereals grown in different climates. *Adv Plant Nutr*, 1984, 1: 1-56
- [38] Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, et al. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family *AMT1* by glutamine in rice. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 1396-402
- [39] Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, et al. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44: 206-11
- [40] Hoque MS, Masle J, Udvardi MK, et al. Over-expression of the rice *OsAMT1-1* gene increases ammonium uptake

- and content, but impairs growth and development of plants under high ammonium nutrition. *Funct Plant Biol*, 2006, 33: 153
- [41] 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
- [42] Bao AL, Liang ZJ, Zhao ZQ, et al. Overexpressing of *OsAMT1-3*, a high affinity ammonium transporter gene, modifies rice growth and carbon-nitrogen metabolic status. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 9037-63
- [43] Ferreira LM, de Souza VM, Tavares OCH, et al. *OsAMT1.3* expression alters rice ammonium uptake kinetics and root morphology. *Plant Biotechnol Rep*, 2015, 9: 221-9
- [44] Wilkinson JQ, Crawford NM. 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*, 1993, 239: 289-97
- [45] Hamat H. Molecular cloning and characterization of nitrate reductase genes in rice (*Oryza sativa L.*). *MARDI Res J (Malaysia)*, 1989, 17: 1-11
- [46] Hasegawa H, Katagiri T, Ida S, et al. Characterization of a rice (*Oryza sativa L.*) mutant deficient in the heme domain of nitrate reductase. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 6-9
- [47] Hasegawa H, Yatou O, Katagiri T, et al. Screening for nitrate reductase-deficient mutants in rice (*Oryza-Sativa L.*). *Breed Sci*, 1991, 41: 95-101
- [48] Ishiyama K, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, et al. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 2004, 279: 16598-605
- [49] Sakamoto A, Ogawa M, Masumura T, et al. Three cDNA sequences coding for glutamine synthetase polypeptides in *Oryza sativa L.* *Plant Mol Biol*, 1989, 13: 611-4
- [50] Kojima S, Kimura M, Nozaki Y, et al. Analysis of a promoter for the NADH-glutamate synthase gene in rice (*Oryza sativa*): cell type-specific expression in developing organs of transgenic rice plants. *Funct Plant Biol*, 2000, 27: 787-93
- [51] Tabuchi M, Sugiyama K, Ishiyama K, et al. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking *OsGS1;1*, a cytosolic glutamine synthetase1;1. *Plant J*, 2005, 42: 641-51
- [52] Funayama K, Kojima S, Tabuchi-Kobayashi M, et al. Cytosolic glutamine synthetase1;2 is responsible for the primary assimilation of ammonium in rice roots. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54: 934-43
- [53] Cai H, Zhou Y, Xiao J, et al. Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in rice. *Plant Cell Rep*, 2009, 28: 527-37
- [54] James D, Borphukan B, Fartyal D, et al. Concurrent overexpression of *OsGS1;1* and *OsGS2* genes in transgenic rice (*Oryza sativa L.*): impact on tolerance to abiotic stresses. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 786
- [55] Oliveira IC, Brears T, Knight TJ, et al. Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1170-80
- [56] Martin A, Lee J, Kichey T, et al. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell*, 2006, 18: 3252-74
- [57] Lancien M, Martin M, Hsieh MH, et al. *Arabidopsis glt1-T* mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *Plant J*, 2002, 29: 347-58
- [58] Coschigano KT, Melo-Oliveira R, Lim J, et al. *Arabidopsis gls* mutants and distinct Fd-GOGAT genes. Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *Plant Cell*, 1998, 10: 741-52
- [59] Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa L.*). *J Exp Bot*, 2007, 58: 2319-27
- [60] Tamura W, Hidaka Y, Tabuchi M, et al. Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants. *Amino Acids*, 2010, 39: 1003-12
- [61] Tamura W, Kojima S, Toyokawa A, et al. Disruption of a novel *NADH-glutamate synthase2* gene caused marked reduction in spikelet number of rice. *Front Plant Sci*, 2011, 2: 57
- [62] Yamaya T, Obara M, Nakajima H, et al. Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *J Exp Bot*, 2002, 53: 917-25
- [63] Yang X, Nian J, Xie Q, et al. Rice ferredoxin-dependent glutamate synthase regulates nitrogen-carbon metabolomes and is genetically differentiated between *japonica* and *indica* subspecies. *Mol Plant*, 2016, 9: 1520-34
- [64] Zeng DD, Qin R, Li M, et al. The ferredoxin-dependent glutamate synthase (*OsFd-GOGAT*) participates in leaf senescence and the nitrogen remobilization in rice. *Mol Genet Genomics*, 2017, 292: 385-95
- [65] Wang Q, Nian J, Xie X, et al. Genetic variations in *ARE1* mediate grain yield by modulating nitrogen utilization in rice. *Nat Commun*, 2018, 9: 735
- [66] Miller AJ, Cramer MD. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil*, 2005, 274: 1-36
- [67] Crawford NM, Glass ADM. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 389-95
- [68] Ho CH, Lin SH, Hu HC, et al. *CHL1* functions as a nitrate sensor in plants. *Cell*, 2009, 138: 1184-94
- [69] Bouguyon E, Brun F, Meynard D, et al. Multiple mechanisms of nitrate sensing by *Arabidopsis* nitrate transceptor *NRT1.1*. *Nat Plants*, 2015, 1: 15015
- [70] Malamy JE, Ryan KS. Environmental regulation of lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2001, 127: 899-909
- [71] Remans T, Nacry P, Pervent M, et al. 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*, 2006, 140: 909-21

- [72] Little DY, Rao H, Oliva S, et al. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 13693-8
- [73] Patterson K, Cakmak T, Cooper A, et al. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. *Plant Cell Environ*, 2010, 33: 1486-501
- [74] Lima JE, Kojima S, Takahashi H, et al. Ammonium triggers lateral root branching in *Arabidopsis* in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. *Plant Cell*, 2010, 22: 3621-33
- [75] Fernandez-Crespo E, Scalschi L, Llorens E, et al. NH_4^+ protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by activation of systemic acquired acclimation. *J Exp Bot*, 2015, 66: 6777-90
- [76] Li Q, Li BH, Kronzucker HJ, et al. Root growth inhibition by NH_4^+ in *Arabidopsis* is mediated by the root tip and is linked to NH_4^+ efflux and GMPase activity. *Plant Cell Environ*, 2010, 33: 1529-42
- [77] Loque D, Lalonde S, Looger LL, et al. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature*, 2007, 446: 195-8
- [78] Lanquar V, Loque D, Hormann F, et al. Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 3610-22
- [79] Yuan LX, Loque D, Kojima S, et al. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *Plant Cell*, 2007, 19: 2636-52
- [80] 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
- [81] Sakakibara H, Kobayashi K, Deji A, et al. Partial characterization of the signaling pathway for the nitrate-dependent expression of genes for nitrogen-assimilatory enzymes using detached maize leaves. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38: 837-43
- [82] Sueyoshi K, Mitsuyama T, Sugimoto T, et al. Effects of inhibitors for signaling components on the expression of the genes for nitrate reductase and nitrite reductase in excised barley leaves. *Soil Sci Plant Nutr*, 1999, 45: 1015-9
- [83] Riveras E, Alvarez JM, Vidal EA, et al. The calcium ion is a second messenger in the nitrate signaling pathway of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2015, 169: 1397-404
- [84] 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
- [85] Sun H, Qian Q, Wu K, et al. Heterotrimeric G proteins regulate nitrogen-use efficiency in rice. *Nat Genet*, 2014, 46: 652-6
- [86] Zhang H, Forde BG. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 1998, 279: 407-9
- [87] Remans T, Nacry P, Pervent M, et al. The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 19206-11
- [88] Yu LH, Miao ZQ, Qi GF, et al. MADS-Box transcription factor AGL21 regulates lateral root development and responds to multiple external and physiological signals. *Mol Plant*, 2014, 7: 1653-69
- [89] Konishi M, Yanagisawa S. *Arabidopsis* NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. *Nat Commun*, 2013, 4: 1617
- [90] Marchive C, Roudier F, Castaings L, et al. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat Commun*, 2013, 4: 1713
- [91] Yu LH, Wu J, Tang H, et al. Overexpression of *Arabidopsis* NLP7 improves plant growth under both nitrogen-limiting and -sufficient conditions by enhancing nitrogen and carbon assimilation. *Sci Rep*, 2016, 6: 27795
- [92] Liu KH, Niu Y, Konishi M, et al. Discovery of nitrate-CPK-NLP signalling in central nutrient-growth networks. *Nature*, 2017, 545: 311-6
- [93] Guan P, Wang R, Nacry P, et al. Nitrate foraging by *Arabidopsis* roots is mediated by the transcription factor TCP20 through the systemic signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 15267-72
- [94] Guan P, Ripoll JJ, Wang R, et al. Interacting TCP and NLP transcription factors control plant responses to nitrate availability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 2419-24
- [95] Xu N, Wang R, Zhao L, et al. The *Arabidopsis* NRG2 protein mediates nitrate signaling and interacts with and regulates key nitrate regulators. *Plant Cell*, 2016, 28: 485-504
- [96] Zhao L, Zhang W, Yang Y, et al. The *Arabidopsis* NLP7 gene regulates nitrate signaling via *NRT1.1*-dependent pathway in the presence of ammonium. *Sci Rep*, 2018, 8: 1487
- [97] Alvarez JM, Riveras E, Vidal EA, et al. Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J*, 2014, 80: 1-13
- [98] Maeda Y, Konishi M, Kiba T, et al. A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, 2018, 9: 1376
- [99] Kiba T, Inaba J, Kudo T, et al. Repression of nitrogen starvation responses by members of the *Arabidopsis* GARP-type transcription factor NIGT1/HRS1 subfamily. *Plant Cell*, 2018, 30: 925-45
- [100] Safi A, Medici A, Szponarski W, et al. HRS1/HHOs GARP transcription factors and reactive oxygen species are regulators of *Arabidopsis* nitrogen starvation response. *bioRxiv*, 2018, doi:10.1101/164277
- [101] Chen X, Yao Q, Gao X, et al. Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition. *Curr Biol*, 2016, 26: 640-6
- [102] Rubin G, Tohge T, Matsuda F, et al. Members of the *LBD*

- family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 3567-84
- [103] Araus V, Vidal EA, Puelma T, et al. Members of BTB gene family of scaffold proteins suppress nitrate uptake and nitrogen use efficiency. *Plant Physiol*, 2016, 171: 1523-32
- [104] 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
- [105] Hu J, Wang Y, Fang Y, et al. A rare allele of *GS2* enhances grain size and grain yield in rice. *Mol Plant*, 2015, 8: 1455-65
- [106] Duan P, Ni S, Wang J, et al. Regulation of *OsGRF4* by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. *Nat Plants*, 2015, 2: 15203
- [107] Che R, Tong H, Shi B, et al. Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nat Plants*, 2015, 2: 15195
- [108] Li S, Tian Y, Wu K, et al. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture. *Nature*, 2018, 560: 595-600
- [109] Li Z, Wang R, Gao Y, et al. The *Arabidopsis CPSF30-L* gene plays an essential role in nitrate signaling and regulates the nitrate transceptor gene *NRT1.1*. *New Phytol*, 2017, 216: 1205-22
- [110] Schroeder JI, Delhaize E, Frommer WB, et al. Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature*, 2013, 497: 60-6