

拟南芥硝酸调控基因研究进展

徐 娜

(济宁医学院生物科学学院,日照 276826)



徐娜,女,汉族,1985 年 8 月出生于山东淄博,2009 于山东农业大学发育生物学专业攻读硕士学位,硕士期间以第一作者在 *Plant Molecular Biology* (IF 4.15) 杂志发表论文。2011 年硕博连读进入山东农业大学植物学专业学习,2014 年取得博士学位,同年进入山东农业大学博士后流动站工作。工作期间于 2016 年在植物学期刊 *The Plant Cell* (IF 9.38) 杂志以第一作者身份发表论文。2015 年 9 月进入济宁医学院生物科学学院工作至今,现主要从事植物中硝态氮调控基因的研究,发现了植物中重要的硝态氮调控基因 NRG2,并对硝态氮调控网络进行了一定的解析,有较深入的

硝态氮调控基因的研究工作经历。

摘 要 氮素是植物生长发育所必需的重要营养成分,它参与植物生长中的许多生理过程,如促进根的生长、调节植物发育等。在植物中,有一个复杂的响应硝酸的系统,但是目前对于硝酸响应和调控机理的研究还很不充分,对参与在硝酸调控信号途径中基因的认识也还很不够。对硝酸调控基因研究,可以为我们解析硝酸信号调控网络提供参考,从而为进一步深入研究植物对硝酸高效利用的分子机理提供理论依据,因此,对硝酸调控基因的研究至关重要。

关键词 拟南芥;硝酸;硝酸调控

中图分类号:Q94-3 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2016)06-153-05

Nitrate regulatory genes in Arabidopsis

XU Na

(School of Biological Science, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Nitrate is an essential nutrient, which is involved in many adaptive responses of plants such as localized proliferation of roots. Nitrate could regulate the development of plants. A sophisticated gene network is thought to regulate the responses to nitrate in plants. However, our understanding of the regulatory mechanisms and genes involved in nitrate signaling in plants is incomplete. In the last few years, several nitrate regulatory genes functioning in the primary nitrate response have been characterized. Research for the nitrate regulatory genes will offer insights into the mechanism of nitrate regulation in plants. In addition, it will provide the important directions into the study of high nitrate uptake and utilization efficiency.

Keywords: Arabidopsis; Nitrate; Nitrate regulation

氮素是生物构成的最重要的基本元素之一,是激素、蛋白质等有机分子的基本组成元素^[1],在生物体内的物质和能量代谢活动中起到关键作用,是调节植物生长发育过程的必需营养元素。植物可

以吸收的氮素形式包括土壤中的 NH_4^+ 、 NO_3^- 和有机氮,其中以 NO_3^- 形式为主^[2]。长期以来,关于硝酸的研究主要集中于硝酸转运基因,发现了高亲和与低亲和硝酸转运基因家族。近几年以来则主要集中于硝酸调控基因的研究。

1 氮素是重要的生命元素

氮素是几乎所有生物体赖以生长的重要元素。氮素可直接或间接地影响光合作用效率,合理利用氮素营养可以明显提高植物的光合作用效率^[3]。氮素营养维持稳定可以延缓植物的衰老,并对植物体内抗氧化保护酶的活性有一定的促进作用。除此之外,氮素还可以通过影响水分生理的途径来调节植物氮素水平,从而间接影响植物的生长发育等^[4-6]。作为可以调控生态系统动态平衡的主要限制因子之一,氮素还影响着生物多样性和生态系统功能等多个方面^[7]。

氮素水平对植物的生长和发育的作用,可以体现在对植物水分生理上影响^[8-9],它与土壤中的水分相互作用可以使作物产量增加。在植物发育过程中,氮素和水分具有明显的正相关作用,从而使作物产量大幅提高^[10]。

在近些年的研究中,也深入开展了某些信号分子与氮素之间关系的研究。根据以往研究得知,植物的气孔调节过程也要受氮素调控,已经有研究发现,植物体内氮素营养与脱落酸(abscisic acid, ABA)含量呈正相关,即植物叶片中 ABA 的含量会受氮素含量的影响,因而氮素可以间接地维持植物的气孔开度,进而影响植物的光合速率^[11]。

2 硝酸调控基因的研究

之前对于硝酸的研究主要集中于硝酸转运基因。近年来,又陆续开展了对硝酸调控基因的研究。NRT1.1 和 NLP7 基因先后被证明是一个硝酸调控基因之后,又陆续发现了 CIPK8、CIPK23、LBD37、LBD38、LBD39、IWS1、NLP6 等硝酸调控基因,包括刚刚被发现的 NRG2 基因。

2.1 CIPK8 和 CIPK23 对硝酸调控的作用

CIPK8 和 CIPK23 是 CIPK 家族中的两个成员。这个家族主要是与它们的靶蛋白 CBL 形成一个复杂的蛋白网络来调控生物体内的各种生物过程^[12]。CIPK 家族在之前的研究中被发现,它的功能主要是通过调节膜上的 H^+ 的运输来响应植物的盐胁迫,可以响应依赖和不依赖于 ABA 的生物胁迫,以及调节植物体内的 K^+ 平衡等^[13-16]。

Tasy 等发现,拟南芥中的 CIPK8 基因参与了氮信号的初级反应,它可以受硝酸诱导,表达量在

硝酸处理下显著提高。另外,他还发现,CIPK8 在硝酸影响根的初级生长的信号通路中有调控作用。研究表明,CIPK8 有储存 K^+ 的作用,还具有响应硝酸的作用^[17-19]。

实验证明 NRT1.1、NRT2.1、NIA1、NIA2、NIR 等受 NO_3^- 诱导的基因在 CIPK8 突变体中受 NO_3^- 诱导的表达明显下降,说明 CIPK8 是一个正调控因子。进一步的研究发现,CIPK8 在硝酸初级响应的低亲和阶段有影响。另外它还可能参与了 NO_3^- 对初级根的生长的调控。

CIPK23 是 CIPK 家族中的另一个成员,与 CIPK8 不同的是,CIPK23 是一个负调控因子^[20-21]。CIPK23 被发现可以与 CHL1 互作,它通过使 CHL1 中第 101 个氨基酸——苏氨酸的磷酸化来维持 CHL1 在外界硝酸浓度低时的高亲和性^[22]。CIPK23 也是一个硝酸调控基因,进一步证明了 CIPK 家族在硝酸网络调控中的作用^[23]。

2.2 LBD 基因家族对硝酸调控的作用

研究证明,LBD 基因家族有响应 NO_3^- 的特性^[24]。LBD 家族在拟南芥中一共有 43 个成员^[24-25]。经研究发现, NO_3^- 可以强烈诱导 LBD37、LBD38 和 LBD39 基因的表达。转录组分析进一步证实了 LBD 在氮信号等方面的作用,研究检测了 NRT1.1、NRT2.1、NRT2.2、NRT2.5、NIA1、NIA2、GLNA、G6PD2 等受 NO_3^- 诱导的基因在突变体及过量表达系中的表达情况,结果发现,LBD 过量表达对上述 NO_3^- 诱导基因的表达有抑制作用。通过对突变体和过量表达系的表型观察得知,LBD 可以影响依赖于氮的植株的苗端的分支等。这些结果表明,LBD 是与氮信号有关的网络中的一个重要的分子组成^[26-27]。

2.3 IWS1 对硝酸调控的作用

拟南芥 IWS1 是 2011 年通过正向遗传学的方法发现的。之前已经有人用分根实验证明,IWS1 可以影响高氮条件下的 NRT2.1 活性的反馈抑制,后来的研究进一步证明这一过程是在根中发生的,在苗端无法发生。转录组分析实验表明,IWS1 调控了拟南芥根中上百个与氮响应有关的基因。IWS1 是一个核定位的蛋白,它能够抑制 NRT2.1 基因的启动子中顺式元件的活性。目前对于 IWS1 基因的认识,对于加深根部吸收硝酸的系统调控网络的学习有重要作用。

2.4 NLP 家族是一个重要的硝酸调控基因家族

在拟南芥中, NLPs 家族共有 9 个成员, 它们都有高度保守的 RWP-RK 结构域, 这个结构域已经被预测是 DNA 结合区域。另一个保守结构域是与 PB1 区域高度保守, 此区域可以发生蛋白相互作用, 并可以与 PB1 与形成二聚体^[28-29]。研究表明, NLP 家族蛋白可以结合硝酸响应顺式作用元件, 激活依赖于顺式作用元件的硝酸响应, 并且有结果表明, NLPs 是受硝酸信号的转录后的调控的。因此, 抑制 NLP 家族基因的功能会影响硝酸诱导基因的表达, 进而影响植物生长^[30-32]。

NLP7 是拟南芥 NLP 家族中第一个被研究的基因。转录组分析表明, NLP7 基因的突变体中, 很多硝酸响应基因的表达量下降, 突变体的表型与氮饥饿处理过的植株相似, 意味着 NLP7 基因对于硝酸调控有重要作用^[31, 33]。实验发现在 NLP7 突变体中, 硝酸的感应和积累都受到影响, 并且 NLP7 的突变体有抗干旱的特征。NLP7 主要表达在根中。

2.5 NRT1.1 对硝酸调控的重要作用

在目前有关硝酸的研究中, NRT1.1 (chl1) 是研究最多的基因, 也是最重要的基因。在拟南芥中的早期研究发现, 它是一个双亲和的运输子^[34]。它的两种功能的转化主要是通过第 101 个氨基酸(苏氨酸)的磷酸化来实现的。

正向和反向遗传学的研究发现, 在 NRT1.1 的突变体中, 多个与硝酸调控有关的方面都受到影响。例如硝酸调控的根的发育、基因表达等^[21, 35-37]。NRT1.1 不仅具有硝酸吸收活性, 还具有硝酸信号感应的功能。例如, NRT1.1 可以抑制 NRT2.1 的表达, 刺激 ANR1 调控的侧根生成, 抑制 L-谷氨酸盐诱导的根形态的建成等^[37-40]。对转录组的分析得知, 在 NRT1.1 的突变体根中, 超过 300 个基因的调控作用发生改变, 另外, 在 NRT1.1 的突变体中, NRT2.1 对于铵盐的高亲和转运的反应降低了^[37-38, 41]。最终在 2009 年, NRT1.1 被证明是一个硝酸的感应子^[22]。

2.6 NRG2 对硝酸调控的重要作用

在 2016 年发表在 *The Plant Cell* 中的文章中又对 NRG2 基因的功能进行了研究。研究利用了一个突变体筛选系统来筛选到了一个新的硝酸调控基因 NRG2。发现在 NRG2 基因的突变体中, 硝

酸诱导基因的诱导量显著低于野生型, 并且这种诱导的降低并不依赖于 NH_4^+ , 进一步通过转录组分析表明, NRG2 基因的突变影响了植株对硝酸的响应。该基因主要表达在根、叶以及维管系统的输导组织中, 并且是一个细胞核定位蛋白。在接下来的研究中又发现 nrg 2 突变体中的硝酸含量低于野生型, 且硝酸吸收和积累的速率低于野生型, 证明这个基因不但在硝酸调控方面起重要作用, 还影响了拟南芥对硝酸的吸收与积累。

研究发现 nrg 2 突变体中 NRT1.1 的表达受到抑制, 并且在 nrg 2 突变体中 NRT1.1 受硝酸诱导受到抑制, 说明 NRG2 基因可以调控 NRT1.1 基因的表达。研究又进一步发现 NRG2 与 NLP7 基因对于硝酸调控有叠加效应, 并且这两个基因存在蛋白水平上的相互作用。通过对这 3 个基因突变体转录组数据的分析可知, NRG2 基因位于 NRT1.1 基因的上游, 并且对 NRT1.1 基因进行调控, 而与 NLP7 基因则存在蛋白水平上的互相作用, NRG2 是一个非常重要的硝酸调控基因^[42]。

3 结语

提高植物对氮素的利用率可以提高作物产量, 提高收益比, 并且可以改变环境中氮素过量施加的现象, 改善生态环境, 有重要的经济意义和环境意义。提高对氮素的利用率其中一个重要环节就是深化对硝酸调控基因的研究, 加深对硝态氮信号调控网络的学习和认识, 因此, 对硝酸调控基因的学习和研究至关重要。本文总结了目前已知的硝酸调控基因, 由于已知的硝酸调控基因数量还很少, 所以对基因之间的关系的认识还很全面, 仅知 NRG2 基因可以调控 NRT1.1 基因, NRG2 可以和 NLP7 相互作用, NRT1.1 可以和 CIPK23 发生相互作用。因此, 寻找更多的硝酸调控基因, 对于我们对硝酸信号调控网络的学习和认识至关重要, 对将来硝酸调控基因的研究, 应加强硝酸调控基因的发现和基因间关系的研究。

参考文献:

- [1] Alvarez J M, Riveras E, Vidal E A, et al. Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots[J]. *Plant J*, 2014,

- 80(1):1-13. DOI:10.1111/tpj.12618.
- [2] Crawford N M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7):859-868. DOI: 10.1105/tpc.7.7.859.
- [3] Araya T, Miyamoto M, Wibowo J, et al. CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(5):2029-2034. DOI:10.1073/pnas.1319953111.
- [4] Chakrabarti M, Hunt A G. CPSF30 at the interface of alternative polyadenylation and cellular signaling in plants[J]. *Biomolecules*, 2015, 5(2):1151-1168. DOI: 10.3390/biom5021151.
- [5] Fernandez E, Galvan A. Nitrate assimilation in *Chlamydomonas*[J]. *Eukaryot Cell*, 2008, 7(4):555-559. DOI:10.1128/EC.00431-07.
- [6] Walch-Liu P, Ivanov I I, Filleur S, et al. Nitrogen regulation of root branching[J]. *Ann Bot*, 2006, 97(5):875-881. DOI:10.1093/aob/mcj601.
- [7] Chiba Y, Shimizu T, Miyakawa S, et al. Identification of *Arabidopsis thaliana* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones[J]. *J Plant Res*, 2015, 128(4):679-686. DOI: 10.1007/s10265-015-0710-2.
- [8] Wang R, Guegler K, Labrie S T, et al. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(8):1491-1509.
- [9] Armengaud P, Sulpice R, Miller A J, et al. Multilevel analysis of primary metabolism provides new insights into the role of Potassium nutrition for glycolysis and Nitrogen assimilation in *Arabidopsis* Roots[J]. *Plant Physiol*, 2009, 150(2):772-785. DOI: 10.1104/pp.108.133629.
- [10] 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[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(42):15267-15272. DOI:10.1073/pnas.1411375111.
- [11] 于显枫, 郭天文, 张仁陟, 等. 水氮互作对春小麦叶片气体交换和叶绿素荧光参数的作用机制[J]. *西北农业学报*, 2008, 17(3):117-123. DOI:10.3969/j.issn.1004-1389.2008.03.026.
- [12] Kolukisaoglu ü, Weinl S, Blazevic D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(1):43-58.
- [13] Batistic O, Kudla J. Integration and channeling of Calcium signaling through the CBL Calcium sensor/CIPK protein kinase network[J]. *Planta*, 2004, 219(6):915-924. DOI:10.1007/s00425-004-1333-3.
- [14] Xiang Y, Huang Y, Xiong L. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement[J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(3):1416-1428. DOI:10.1104/pp.107.101295.
- [15] Luan S. The CBL-CIPK network in plant Calcium signaling[J]. *Trends Plant Sci*, 2009, 14(1):37-42. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.005.
- [16] Weinl S, Kudla J. The CBL-CIPK Ca²⁺-decoding signaling network: function and perspectives[J]. *New Phytol*, 2009, 184(3):517-528.
- [17] Vert G, Chory J. A toggle Switch in plant nitrate uptake[J]. *Cell*, 2009, 138(6):1064-1066. DOI:10.1016/j.cell.2009.09.005.
- [18] Vidal E A, Tamayo K P, Gutierrez R A. gene networks for Nitrogen sensing, signaling, and response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2010, 2(6):683-693.
- [19] Gojon A, Krouk G, Perrine walker F, et al. nitrate transporter(s) in plants[J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(7):2299-2308.
- [20] Cheong Y H, Pandey G K, Grant J J, et al. Two calcineurin B-like Calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root Potassium uptake in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2007, 52(2):223-239. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03236.x.
- [21] Krouk G, Crawford N M, Coruzzi G M, et al. nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments[J]. *Current opinion in plant biology*, 2010a, 13(3):265-272.
- [22] Ho C H, Lin S H, Hu H C, et al. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants [J]. *Cell*, 2009, 138(1):1184-1194.
- [23] Cheong Y H, Pandey G K, Grant J J, et al. Two calcineurin B-like Calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root Potassium uptake in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2007, 52(2):223-239. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03236.x.
- [24] Scheible W R, Morcuende R, Czechowski T, et al. Genome-wide reprogramming of primary and secondary me-

- tabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to Nitrogen [J]. *Plant Physiol*, 2004, 136 (1): 2483-2499. DOI:10.1104/pp.104.047019.
- [25] Okushima Y, Fukaki H, Onoda M, et al. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2007, 19 (1): 118-130. DOI: 10.1105/tpc.106.047761.
- [26] Ditegou F A, Teale W D, Kochersperger P, et al. Mechanical induction of lateral root initiation in Arabidopsis thaliana [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105 (48): 18818-18823. DOI:10.1073/pnas.0807814105.
- [27] Feng Z, Zhu J, Du X, et al. Effects of three auxin-inducible LBD members on lateral root formation in Arabidopsis thaliana [J]. *Planta*, 2012, 236 (4): 1227-1237. DOI: 10.1007/s00425-012-1673-3.
- [28] Schauser L, Wieloch W, Stougaard J. Evolution of NIN-like proteins in arabidopsis, rice, and lotus japonicus [J]. *J Mol Evol*, 2005, 60 (2): 229-237.
- [29] Marsh J F, Rakocevic A, Mitra R M, et al. Medicago truncatula NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive Calcium/calmodulin-dependent protein kinase [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144 (1): 324-335. DOI: 10.1104/pp.106.093021.
- [30] Cavicchioli R, Chiang R C, Kalman L V, et al. Role of the periplasmic domain of the Escherichia coli NarX sensor-transmitter protein in nitrate-dependent signal transduction and gene regulation [J]. *Mol Microbiol*, 1996, 21 (5): 901-911.
- [31] Castaings L, Camargo A, Pocholle D, et al. The nodule inception-like protein 7 modulates nitrate sensing and metabolism in Arabidopsis [J]. *Plant J*, 2009, 57 (3): 426-435. DOI:10.1111/j.1365-313X.2008.03695.x.
- [32] Konishi M, Yanagisawa S. Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling [J]. *Nature communications*, 2013, 4: 1617.
- [33] Staats M, Van Baarlen P, Schouten A, et al. Functional analysis of NLP genes from botrytis elliptica [J]. *Mol Plant Pathol*, 2007, 8 (2): 209-214.
- [34] Krouk G, Tillard P, Gojon A. Regulation of the high-affinity NO₃-uptake system by NRT1.1-mediated NO₃-demand signaling in Arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142 (3): 1075-1086. DOI:10.1104/pp.106.087510.
- [35] Loqué D, Tillard P, Gojon A, et al. Gene expression of the NO₃-transporter NRT1.1 and the nitrate reductase NIA1 is repressed in Arabidopsis Roots by NO₂⁻, the product of NO₃-reduction [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132 (2): 958-967. DOI:10.1104/pp.102.018523.
- [36] Desnos T. Root branching responses to phosphate and nitrate [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11 (1): 82-87. DOI:10.1016/j.pbi.2007.10.003.
- [37] Walch-Liu P, Forde B G. Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture [J]. *Plant J*, 2008, 54 (5): 820-828. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03443.x.
- [38] Gan Y, Bernreiter A, Filleur S, et al. Overexpressing the ANR1 MADS-box gene in transgenic plants provides new insights into its role in the nitrate regulation of root development [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53 (6): 1003-1016. DOI:10.1093/pcp/pcs050.
- [39] Chiba Y, Shimizu T, Miyakawa S, et al. Identification of arabidopsis thaliana NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones [J]. *J Plant Res*, 2015, 128 (4): 679-686. DOI: 10.1007/s10265-015-0710-2.
- [40] 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 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (50): 19206-19211. DOI:10.1073/pnas.0605275103.
- [41] Krouk G, Lacombe B, Bielach A, et al. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants [J]. *Dev Cell*, 2010, 18 (6): 927-937. DOI:10.1016/j.devcel.2010.05.008.
- [42] Xu N, Wang R, Zhao L, et al. The arabidopsis NRG2 protein mediates nitrate signaling and interacts with and regulates key nitrate regulators [J]. *Plant Cell*, 2016, 28 (2): 485-504. DOI:10.1105/tpc.15.00567.

(收稿日期 2016-02-09)