

牛超,刘关君,曲春浦,等.谷氨酸合成酶基因及其在植物氮代谢中的调节作用综述[J].江苏农业科学,2018,46(9):10-16.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.003

谷氨酸合成酶基因及其在植物氮代谢中的调节作用综述

牛超¹,刘关君¹,曲春浦¹,冷雪¹,张国壁¹,杨成君²

(1.东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室,黑龙江哈尔滨 150040; 2.东北林业大学林学院,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:谷氨酸合成酶(GOGAT)是植物体内氮素同化与循环的关键酶。深入研究该酶的控制基因及其表达特性,对了解植物氮代谢调控机制并应用于农业生产具有重要意义。根据在高等植物 Fd-GOGAT 和 NADH-GOGAT 的生物化学和遗传学方面的研究进展,对其历史进程进行回顾和总结;从在植物中的定位、功能、表达特异性、转录水平调控以及对氮代谢的调控等方面介绍谷氨酸合成酶(GOGAT)分子生物学研究进展,并展望 GOGAT 基因在植物氮代谢中的调节作用,提高氮素利用率(NUE)等方面的应用前景。

关键词:谷氨酸合成酶;谷氨酰胺合成酶;Fd-GOGAT;NADH-GOGAT;谷氨酸;氮代谢

中图分类号: S311 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0010-06

氮素是植物生长发育所必需的基本营养元素^[1],在植物生长发育和形态建成中起着重要的作用^[2-3]。植物从外界环境中可直接吸收土壤中的铵态氮、硝态氮等无机氮以及尿素、氨基酸等有机氮,也可通过固氮菌对氮气(N₂)的固氮作用获得氮素营养^[4]。对于 NH₄⁺ 的获取有多种来源,一部分来自根通过细胞质膜上的专一性转运蛋白吸收的 NH₄⁺ 与 NO₃⁻,其中 NO₃⁻ 由体内细胞质硝酸还原酶(NR)还原为 NO₂⁻,再由质体中的亚硝酸还原酶(NiR)将进入质体的 NO₂⁻ 还原为 NH₄⁺;另一部分来自光呼吸、根瘤菌固氮作用、氨基酸代谢、类苯基丙烷代谢、衰老组织氮化合物转移再利用等多种途径^[5]。NH₄⁺ 进入氮同化途径后,首先 NH₄⁺ 和谷氨酸由谷氨酰胺合成酶(GS)催化形成谷氨酰胺,然后由谷氨酸合成酶(GOGAT)将谷氨酰胺和 α-酮戊二酸转变为 2 分子谷氨酸,其中一分子谷氨酸可作为 GS 的底物,而另一分子谷氨酸可用于合成蛋白质、核酸等含氮化合物。在同化 NH₄⁺ 时,GS 和 GOGAT 是同时起作用的,因而该途径被称为 GS/GOGAT 循环^[5]。GS/GOGAT 循环是无机氮转化为有机氮的第 1 步,也是目前为止所发现的无机氮转化有机氮的主导途径^[7]。

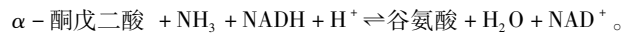
高等植物体内 95% 以上的 NH₄⁺ 通过 GS/GOGAT 循环同化,GOGAT 是该途径的限速酶^[8-9]。GS 与 GOGAT 在植物叶片、根瘤以及根中均有分布,但在不同器官中 GS/GOGAT 循环的作用不尽相同。在绿色组织中,GS/GOGAT 循环的主

要作用是同化光呼吸产生的 NH₄⁺ 以及硝酸盐在叶中还原产生的 NH₄⁺;在根瘤中主要同化根瘤菌固氮产生的 NH₄⁺,而在根中则是同化吸收到体内的 NH₄⁺ 及硝酸盐被吸收后在根中还原产生的 NH₄⁺。

提高 GS/GOGAT 循环的效率被认为是提高氮素利用率的一种有效途径^[10],因此对于 GS 和 GOGAT 基因的研究引起了许多学者的关注。因为 GOGAT 基因序列过长(cDNA 编码序列超过 6 kb)且不易操作,与 GS 相比^[11-12],GOGAT 基因功能的研究报道相对较少。近年来随着分子生物学技术的进步,对 GOGAT 基因的研究逐渐深入。本文主要总结和整理了近年来国内外 GOGAT 基因的研究成果,并对 GOGAT 在植物氮代谢中的作用及其调控机制进行详细的论述。

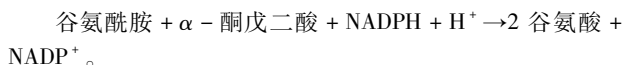
1 GOGAT 的发现

在 1970 年以前,多数学者认为谷氨酸脱氢酶(GDH)催化 α-酮戊二酸的可逆还原氨化反应,是活体中氨同化的主要途径^[13-14]。其反应方程式为:



反应式中 NADH 为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。

1970 年,Tempest 等报道在产气杆菌的无细胞制剂中检测到可以催化 α-酮戊二酸与谷氨酰胺还原形成 2 分子谷氨酸的酶,命名为谷氨酰胺-α-酮戊二酸氨基转移酶,别称谷氨酸合成酶,缩写为 GOGAT^[15]。其催化的反应方程式为:



反应式中 NADPH 为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。

而先前有关细菌氨同化的研究已证实 GS 催化的反应方程式为:



因此,GS 与 GOGAT 的结合产生了细菌氨同化的新途径,该途径并未涉及到 GDH^[17]。对 GS/GOGAT 循环在细菌中(特别是在低氮供应的条件)调控作用的研究已日趋成熟,

收稿日期:2017-11-06

基金项目:国家自然科学基金(编号:31570648);国家“863”计划(编号:2013AA102702);中央高校基本科研业务费专项资金(编号:DL13EA03-01)。

作者简介:牛超(1992—),男,黑龙江伊春人,硕士研究生,主要从事林木氮素营养分子生物学的研究。E-mail: niuchao1103@qq.com。

通信作者:杨成君,博士,副教授,主要从事资源学领域的研究。

E-mail: nyxycj@sina.com。

即使如此,是 GDH 还是 GS/GOGAT 循环主要参与氨同化过程仍然是一个有争议的话题。

研究表明,植物在叶绿体中将亚硝酸盐还原为氨基酸^[18-19]。然而,叶绿体中 GDH 的活性非常低^[20],而 GS 的活性较高^[21],因此推测 GOGAT 也可能存在于叶绿体中。用完整的豌豆叶绿体进行试验,证明 GOGAT 催化谷氨酰胺和 α -酮戊二酸形成谷氨酸^[9],该过程是以还原型铁氧还蛋白(Fd)作为电子供体,方式与 NiR 相似。几乎同时,Dougall 报道了在胡萝卜细胞基质中存在以 NAD(P)H 作为电子供体的 GOGAT^[22]。

起初,尚不清楚 NADH-GOGAT 和 Fd-GOGAT 酶活是否由同一酶蛋白催化。Suzuki 等研究表明,水稻根系和黄化叶的组织中可以用 NADH 和 Fd 作为电子供体检测 GOGAT 活性^[23]。然而,Suzuki 等从水稻绿叶中提取并纯化到相同性质 Fd-GOGAT 抗体的蛋白,其抗血清不与 NADH-GOGAT 交叉反应^[24]。根据免疫学研究,绿叶中的 Fd-GOGAT 和黄化叶组织中的 Fd-GOGAT 是密切相关的蛋白质;相反,根组织中的 Fd-GOGAT 是独特的蛋白质,因此 NADH-GOGAT 和 Fd-GOGAT 酶活不是由同一酶蛋白催化。光照生长和黄化的水稻叶片中 Fd-GOGAT 蛋白含量相同,但 Suzuki 等研究表明水稻叶和根中 Fd-GOGAT 具有相关但不相同的抗原成分^[25]。现已确认在一些高等植物中由 2 个不同基因编码 Fd-GOGAT,并在叶和根中差异表达^[26]。

2 GOGAT 在植物细胞中的分布及其功能

高等植物中,GOGAT 依据辅酶不同可分为 2 类,第 1 类是以 Fd 作辅酶,称为 Fd-GOGAT,主要存在于质体和叶绿体等绿色组织中,参与氮的初级吸收与光呼吸释放氨的再吸收;第 2 类是以 NADH 作辅酶,称为 NADH-GOGAT,主要存在于非绿色组织中,如根瘤、根、茎和细胞质等,参与吸收氨的同化以及固氮作用。2 种酶具有不同的分子量、分子结构、动力学特征及细胞定位,其依赖还原力的专一性和抗原性等方面也都不同,是 2 种不同的蛋白质,在植物中发挥的作用也不同。

2.1 Fd-GOGAT 的定位及功能

Fd-GOGAT 首先在豌豆叶的叶绿体中被发现^[9],光照豌豆叶绿体可以促使谷氨酰胺和 α -酮戊二酸发生反应,该反应依赖于光反应的放氧作用。进一步研究表明,该反应需要光合作用过程中光反应阶段生成的具有还原力的 Fd 作为电子供体,才能完成谷氨酸的合成反应,因此该反应特异地发生在叶绿体中。同时该反应对重氮丝氨酸(azaserine, GOGAT 抑制剂)敏感,而对蛋氨酸亚砷亚胺(methionine sulfoximine, GS 抑制剂)不敏感。光照叶绿体也能促使氨和 α -酮戊二酸参与反应,同样依赖于光反应的放氧作用^[27]。这一过程对蛋氨酸亚砷亚胺和重氮丝氨酸均敏感,可推测 GS 和 GOGAT 之间的耦合作用催化了该反应。

现已在高等植物叶片^[28]和低等植物藻类^[29]的叶绿体中检测到 Fd-GOGAT 的存在,Fd-GOGAT 可以占植物叶中总蛋白质的 1%^[30]。水稻中 Fd-GOGAT 具有 115 ku 的 2 个亚基^[25,31],而在其他植物中该酶多数是以单体的形式存在,分子量为 145~180 ku^[20,32]。使用免疫金抗体定位技术在番茄

的叶肉组织、木质部薄壁组织和表皮细胞的叶绿体基质中均检测到 Fd-GOGAT 相应的蛋白质^[33]。对玉米亚细胞定位及免疫荧光印迹(Western)分析表明,Fd-GOGAT 蛋白质主要位于维管束鞘的叶绿体中^[34],该结果与 1977 年 Harel 等进行酶活测定的结论一致^[35]。在水稻叶的叶肉组织中,Fd-GOGAT 蛋白质和酶活水平最高,在完全展开的成叶薄壁细胞中水平较低,并且在叶鞘和非绿色幼叶中水平更低^[36]。同样在大麦中 Fd-GOGAT 存在于叶肉组织和维管组织的叶绿体中^[37]。在大多数裸子植物(包括针叶树)的叶绿体中没有检测到 GS 的存在,然而已在松树的叶绿体中发现 GOGAT^[38],因此推测在裸子植物中氨同化可能发生在细胞质中。

Fd-GOGAT 也存在于非光合组织中,在水稻、玉米、豆类、大麦和豌豆等植物根的质体中均检测到 Fd-GOGAT 的存在^[37,39-40],其所需还原力的 Fd 可能是通过氧化磷酸成糖途径产生的^[41]。在水稻根中,Fd-GOGAT 酶活在根尖细胞中含量最高,随着根细胞的成熟而逐渐降低。在幼嫩组织中,Fd-GOGAT 酶活在所有细胞中均能检测到,但在较老组织中只有中柱中能检测到。

2.2 NADH-GOGAT 的定位及功能

以 NADH 作为电子供体的 GOGAT(NADH-GOGAT)主要存在于植物根中^[42]。现已从水稻悬浮培养细胞和根瘤中提取并纯化到 NADH-GOGAT,其单体的分子量为 196~200 ku^[20]。然而在细菌中该酶则是由 2 个不同亚基构成的异源二聚体。在绿叶中 NADH-GOGAT 的酶活与 Fd-GOGAT 相比要低得多^[20]。Yamaya 等研究表明,在水稻非绿色和正在发育的叶片中仍存在高水平的 NADH-GOGAT 蛋白质和酶活,而 Fd-GOGAT 则在完全展开的成熟绿色叶中占主导地位^[36]。组织免疫印迹分析表明,NADH-GOGAT 存在于水稻幼叶的维管薄壁组织细胞和维管束鞘细胞中;但在缺氮水稻根中,NADH-GOGAT 相应的蛋白质在中柱、顶端分生组织和次生根原基中均能检测到^[43]。

3 GOGAT 基因的表达

已有研究表明,叶绿体中的 Fd-GOGAT 主要负责光呼吸过程产生的氨的回收与利用。Fd-GOGAT 在受光调控的同时也受供氮条件的影响,例如大麦在光照条件下,供应硝态氮,叶中可检测到更高水平的 Fd-GOGAT mRNA、蛋白质和酶活^[44]。但不同物种或不同部位存在一定的表达差异,如在烟草叶片中,无论是通过抑制光呼吸还是抑制硝酸还原都会导致氨的减少,对 Fd-GOGAT 基因的表达、蛋白质含量和酶活都没有影响^[45]。

与绿色组织中表达的 Fd-GOGAT 相比,NADH-GOGAT 主要非光合作用组织及正在发育的叶片中表达,尤其在根部不同组织中会大量表达,且受氮素诱导明显^[13,46]。NADH-GOGAT 主要参与氮素固定、硝酸还原及直接吸收产生氨的同化作用^[47]。在水稻细胞培养物或根中,从缺氮状态转到供氮状态后,NADH-GOGAT mRNA 积累显著增加^[48]。在铵态氮处理的大豆幼苗根中,NADH-GOGAT mRNA 的表达量、蛋白质含量及酶活都显著增加^[49]。无论供应低氮还是高氮,水稻根瘤中 NADH-GOGAT 表达水平均较高,因此推测 NADH-GOGAT 可能在菌根氮吸收过程中发挥关键作用^[50]。

4 GOGAT 调控氮代谢

4.1 GOGAT 基因的调控

对于 GOGAT 基因的调控,可通过 mRNA、蛋白质及酶活等相关指标进行分析。在一些植物的子叶和叶中, *Fd-GOGAT* 受光的诱导,随着 mRNA 水平和蛋白质含量的增加,其酶活也大幅增加^[20]。在拟南芥中, *Fd-GOGAT1* mRNA 水平受光影响在短时间内(3 h)显著增加,并在 24 h 达到峰值,而 *Fd-GOGAT2* mRNA 水平受光的影响很小。黑暗处理对 *Fd-GOGAT1* mRNA 的诱导作用不明显,当施加适量的蔗糖后,可以部分替代光照对 *Fd-GOGAT1* mRNA 的诱导作用,但对 *Fd-GOGAT2* 无影响^[9],因此推测在拟南芥中 *Fd-GOGAT* mRNA 转录水平和酶活的诱导是光通过植物色素介导的。*Fd-GOGAT* 的酶活也受供氮情况的影响,这可能与光照有关^[20,51]。在光照条件下,大麦叶中检测到 *Fd-GOGAT* mRNA、蛋白质和酶活含量是正常条件下的 2 倍,如果再施加适量的硝态氮,可检测到更高水平的 *Fd-GOGAT* mRNA、蛋白质和酶活并且植株生长更加旺盛^[44]。然而,在未供氮的多数植物中其水平仍明显存在,如在烟草叶中,通过抑制光呼吸或硝态氮的还原降低了氮的含量,但 *Fd-GOGAT* mRNA、蛋白质和酶活水平均不受影响^[45]。在黑暗生长的大豆幼苗中,当供应 NH_4NO_3 时在根中可以检测到 *Fd-GOGAT* mRNA、蛋白质和酶活水平的升高,但对光照下生长的植物效果则不太明显。目前关于铵态氮或硝态氮对下胚轴/茎、子叶或叶中 *Fd-GOGAT* 酶活的主要作用仍然是争议的话题。在大豆中,当供应 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 时,根中的 *Fd-GOGAT* 酶活增加,而 mRNA 和蛋白质没有相应的增加^[49]。大多数情况下,在植物新叶的发育和生长过程中,伴随着光合作用和光呼吸的增强, *Fd-GOGAT* 酶活显著增加^[52]。在大麦中,随着新叶的发育, *Fd-GOGAT* mRNA、蛋白质和酶活含量有所增加,而后随着叶片的衰老而减少^[44]。Masclaux 等重新研究了烟草叶片发育和衰老时氮同化过程发生的代谢,发现在植物顶部的第 25 ~ 30 片叶中, *Fd-GOGAT* 蛋白质和酶活含量较高,但在老叶中明显降低,直到植物底部的后 9 片叶中其表达量几乎消失,这一现象可能与植物衰老有关^[53]。Rubisco(核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶)和叶绿体 GS2 的大小亚基显示出类似蛋白质数量上的减少,因为随着叶片的成熟须要合成更多的谷氨酰胺,而嫩叶须要生长,因此须要谷氨酸用于其他氨基酸的合成。相反,细胞质 GS1 和 NADH-GDH 随着叶片衰老而增加。目前已经在葡萄树的叶中证明了 *Fd-GOGAT* 的酶活有类似的变化^[54]。

对于 NADH-GOGAT 基因的调控,当水稻幼苗从氮饥饿状态转到供应 1 mmol/L 铵态氮中,根中 NADH-GOGAT 蛋白质和酶活水平在 1 d 内增加了 10 倍以上^[46]。在水稻细胞培养基或根中施以低至 50 $\mu\text{mol/L}$ 铵态氮后,在 12 h 内也可检测到 NADH-GOGAT mRNA 水平的增加^[48],并且推测谷氨酰胺可能作为其转录水平增加的信号。然而,大田软海绵酸是蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶的有效抑制剂,并且能诱导水稻细胞培养基中 NADH-GOGAT 的积累。因此,调控 NADH-GOGAT 基因表达信号的传递机制仍是争议的话题^[55]。进一步研究表明,光照或各种氮素处理下的大豆子叶或下胚轴/茎

中 NADH-GOGAT 酶活几乎没有影响。然而,在向氮饥饿的幼苗中加入适宜的铵态氮后,根中的酶活增加了近 14 倍。施加适量的氮源后也检测到 NADH-GOGAT mRNA 和蛋白质水平的小幅增加^[49]。

4.2 Fd-GOGAT 基因表达量的改变对氮代谢途径的影响

外界氮素的变化往往会对植物的基因表达产生难以预料的影响,进而干扰结论的准确性;因此,要确定 GOGAT 基因调控氮代谢,最直接的办法是在适合的氮素条件下提高和降低该基因的表达,观察相关产物和底物变化,同时检测其他相关基因的表达情况,从而分析 GOGAT 基因及其相关基因表达的相互关系。

4.2.1 过表达 *Fd-GOGAT* 基因 对于 *Fd-GOGAT* 基因的过表达,目前仅限于模式植物拟南芥中。Ishizaki 等研究了拟南芥过表达 *Fd-GOGAT* (GLU1),在控制 CO_2 浓度、光照度和 NO_3^- 浓度条件下改变 NH_4^+ 的摄入量,导致谷氨酸过量生成,进一步研究表明总氨基酸库也发生变化^[56]。在光呼吸条件下供应充足的 NH_4^+ 时天冬氨酸含量增加,谷氨酰胺和甘氨酸含量减少,但这种改变并不显著;在非光呼吸条件下,谷氨酸和其他氨基酸含量增加。结果表明,合成的谷氨酸被迅速转化成其他氨基酸,特别是天冬氨酸。

4.2.2 抑制表达 *Fd-GOGAT* 基因 对于 *Fd-GOGAT* 基因抑制表达的研究主要集中在近几年,2010 年, Kissen 等通过全基因组微阵列方法分析敲除 *Fd-GOGAT1* (GLU1; At5g04140) 的拟南芥 *glu1-2* 突变体叶和根中表达谱的研究^[57]。结果表明, *glu1-2* 突变体的表达谱显示在叶片中超过 5 500 个基因的表达发生变化,在根中近 700 个基因受显著影响。参与谷氨酸生物合成与转化的基因都发生变化,通过核磁共振(NMR)代谢组学分析表明氨基酸组成发生变化。在 *glu1-2* 突变体中谷氨酰胺水平升高且最为显著。对敲除 *Fd-GOGAT1/GLU1* 的突变体进行相关基因表达分析表明,其中受影响的有光合作用、光呼吸和叶绿素合成途径,结果显示在 *glu1-2* 叶中 *Fd-GOGAT1* 水平全面下调并且其表型一致呈轻微萎黄。*glu1-2* 表达谱揭示的另一方面是受多重应激反应,包括冷、热、干旱和氧化应激,参与类黄酮生物合成基因的表观量也发生变化。基因编码大多数应激相关的转录因子、细胞色素 P450 单加氧酶、谷胱甘肽 S-转移酶和 UDP-糖基转移酶在 *glu1-2* 突变体得到表达并受影响。这些结果表明 *Fd-GOGAT1* 的重要性,还间接证明在植物生长发育过程中谷氨酸起核心作用。2016 年, Yang 等报道编码水稻 *Fd-GOGAT* 的 *ABCI* (ABNORMAL CYTOKININ RESPONSE 1, 细胞分裂素反应异常 1) 基因的功能特性^[58]。突变等位基因的 *abc1-1* 突变体具有典型的缺氮综合症,而 T-DNA 插入的 *abc1-2* 突变体幼苗是致死型。代谢组学分析显示在 *abc1-1* 突变体中高氮碳比(谷氨酰胺和天冬酰胺)的氨基酸和 TCA 循环中几种中间产物过度积累,表明 *ABCI* 在氮同化和碳氮平衡中起关键作用。在 *ABCI* 编码区中鉴定了 5 个非同义单核苷酸的多态性,并被定义为 3 种不同的单倍型,其在粳稻和籼稻亚种之间有较高的、特异性的分化。结果表明 *ABCI/OsFd-GOGAT* 调节氮同化和碳氮平衡对植物生长和发育至关重要。2017 年, Zeng 等分离出名为 *gogat1* 的水稻早熟叶的衰老突变体,其在叶中 GOGAT 总酶活性降低

67%^[59]。gogat1 突变体在自然条件下表现出萎黄病,而在低光照条件下,叶片衰老程度较缓慢。gogat1 突变体表现出结实率的降低,而ogat1 突变体的籽粒蛋白质含量(GPC)显著高于野生型。同时,在灌浆期,上数3片叶和顶部节间的总氨基酸含量大幅增加。结果表明,*OsFd-GOGAT*可能参与叶片衰老过程中氮的再动员,并为提高水稻氮素利用效率提供潜在的途径。

4.3 *NADH-GOGAT* 基因表达量的改变对氮代谢途径的影响

4.3.1 过表达 *NADH-GOGAT* 基因 关于植物 *GOGAT* 基因过表达的研究较少,特别是 *NADH-GOGAT* 基因的过表达,研究者认为导致此结果的原因可能是 *NADH-GOGAT* 基因较长,在大部分植物中约 6~7 kb,不利于转基因。目前对于 *NADH-GOGAT* 基因过表达的研究,仅在烟草和水稻的文献中有报道。2001 年,Chichkova 等以 CaMV35S 作为启动子,将苜蓿 *NADH-GOGAT* 基因转化到烟草中,得到 3 个转化子(GOS10、GOS13 和 GOS19)^[60]。分子检测表明, *NADH-GOGAT* 在 *GOS* 转基因株系的叶和根中低水平表达,但在宿主烟草该基因的表达几乎检测不到。*GOS* 转基因株系根中 *NADH-GOGAT* 酶活较对照植株有所提高(约 15%~40%)。在温室生长的 *GOS* 转基因植株与对照植株相比,以 NO_3^- 或 NH_4^+ 作为唯一氮源时植株进入开花期,表现出地上部干质量和总碳氮含量均有所增加。因此推测,通过转基因增强 *NADH-GOGAT* 酶活,能使 *GOS* 转基因烟草具有较高同化氮的能力。2002 年,Yamaya 等采用免疫学方法分析表明^[61],水稻衰老器官再动员产生的谷氨酰胺,经由韧皮部运输至正在生长发育的器官中进行重新利用,*NADH-GOGAT* 参与了这一过程。在水稻中过表达 *NADH-GOGAT*,可使其粒重有所增加(最多为 80%),表明在水稻中 *NADH-GOGAT* 是提高氮素利用率和籽粒灌浆的关键酶。

4.3.2 抑制表达 *NADH-GOGAT* 基因 对 *NADH-GOGAT* 基因的抑制表达,目前在苜蓿、拟南芥和水稻等模式植物中有相关报道。2000 年,Schoenbeck 等利用 AAT-2(天冬氨酸转氨酶,根瘤中表达增强)启动子调控的反义 *NADH-GOGAT* 转基因苜蓿^[62]。其中 1 个转基因株系 *NADH-GOGAT* 酶活降低约 50%,相应的蛋白质和 mRNA 含量也有所降低。但该株系的细胞质基质 GS、Fd-GOGAT、AAT-2、AS(天冬氨酸合成酶)和 PEPC(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶)的转录丰度以及 GS、AAT 和 PEPC 酶活均不受影响。在根瘤共生条件下转反义 *NADH-GOGAT* 植株,即使共生固氮没有显著减少,也表现出适度的萎黄、生长迟缓以及含氮量降低等现象。但当供应适量的 NO_3^- 时缓解了萎黄现象,恢复增长以及含氮量。另外,转反义 *NADH-GOGAT* 植株雄性不育。这些数据表明, *NADH-GOGAT* 在共生固氮的同化和花的发育过程中起关键作用。

2002 年,Lancien 等在拟南芥 *NADH-GOGAT(glt1-T)* 敲除突变体中发发现, *NADH-GOGAT GLT1* mRNA 在根中的表达水平明显高于叶中^[63]。该表达模式与主要编码 *Fd-GOGAT GLU1* 基因形成对比, *GLU1* 在叶中表达最高并参与光呼吸。对不同器官特异性的表达模式表明 *NADH-GOGAT* 和 *Fd-GOGAT* 基因产物的生理作用是非冗余的。代

谢分析表明当抑制光呼吸(1% CO_2)时,同野生型相比, *glt1-T* 突变体在生长和谷氨酸生物合成中有特定的缺陷,即在这些条件下, *glt1-T* 突变体的生长量下降约 20%,谷氨酸含量也骤减 70%。2014 年,Konishi 等探究 *NADH-GOGAT* 在拟南芥根中氮同化的作用^[64]。对拟南芥供应铵态氮后,RT-PCR 和 Western 杂交分析表明在根中检测到 *NADH-GOGAT* 的积累。GUS 染色和免疫组织学分析表明 *NADH-GOGAT* 高度累积在非绿色组织的维管束、顶端分生组织、花粉、柱头和根中。通过 *NADH-GOGAT* 插入 T-DNA 的突变体研究表明,与正常 CO_2 条件下相比,其谷氨酸的合成和其株系的生物量积累均显著降低,因此推测 *NADH-GOGAT* 在拟南芥根的氮同化过程中具有重要作用。

水稻主要生长在厌氧环境中, NH_4^+ 是其优先选择的无机氮素。 NH_4^+ 的同化是通过 GS 和 *GOGAT* 发生的耦联反应进行的。在水稻中,已经鉴定了 4 个编码 *GOGAT* 的基因,分别为 *Fd-GOGAT1*、*Fd-GOGAT2*、*NADH-GOGAT1* 和 *NADH-GOGAT2*。 *OsNADH-GOGAT1* 主要在根尖、发育叶片和谷粒中表达, *OsNADH-GOGAT2* 主要在完全展开的叶片和叶鞘中表达。2010 年,Tamura 等通过反向遗传学方法分离出敲除缺失 *NADH-GOGAT1* 基因的突变体,研究表明,这种同工酶对幼苗期根中 NH_4^+ 的同化起着重要作用^[65]。2011 年,Tamura 等对缺失 *OsNADH-GOGAT2* 突变体进行研究^[66]。田间试验表明, *NADH-GOGAT1* 对有效分蘖数的增长也起到非常重要的作用。 *NADH-GOGAT2* 和 *Fd-GOGAT* 在突变体中的表达与野生型是相同的,这表明其他 *GOGAT* 是无法弥补缺少 *NADH-GOGAT1* 的功能。Lu 等用全基因组微阵列数据库分析水稻 *GOGAT* 基因的转录模式,探究 *GOGAT* 基因对水稻 *GOGAT* 共抑制植株碳氮代谢的影响^[67]。表达谱表明,水稻 *GOGAT* 基因家族成员在不同组织和器官中表达不同,说明它们在水稻体内扮演不同的角色。与野生型相比, *GOGAT* 共抑制植株的分蘖数、地上部干质量和产量明显降低。生理和生化研究表明,在 *GOGAT* 共抑制植株叶片中硝酸盐、多种游离氨基酸、叶绿素、糖、磷酸糖和吡啶核苷酸的含量明显降低,但叶片中游离 NH_4^+ 、 α -酮戊二酸、异柠檬酸的含量有所增加。因此 *GOGAT* 在碳氮代谢中发挥着重要作用,并且在水稻氮同化过程中是必不可少的。

2014 年,Yamaya 等通过反向遗传学方法分析水稻中 3 种细胞质基质 GS (*GS1;1*、*GS1;2* 和 *GS1;3*) 和 2 种 *NADH-GOGAT* (*NADH-GOGAT1* 和 *NADH-GOGAT2*) 同工酶的功能^[68]。 *OsGS1;2* 和 *OsNADH-GOGAT1* 主要在水稻根表层细胞中表达并受 NH_4^+ 影响。插入内源性逆转录转座子 *Tos17* 破坏 *OsGS1;2* 或 *OsNADH-GOGAT1* 基因,导致有效分蘖数的减少从而降低稻穗数。在敲除突变体中重新转入自身启动子调控下的 *OsGS1;2* 基因,可使稻穗数成功恢复到野生型水平。研究结果表明,水稻根系 NH_4^+ 同化过程中 *GS1;2* 和 *NADH-GOGAT1* 起主要作用。 *OsGS1;1* 和 *OsNADH-GOGAT2* 主要在成熟叶片维管组织中表达。在 *OsGS1;1* 突变体中稻穗的增长率和灌浆率急剧下降,而在缺失 *OsNADH-GOGAT2* 突变体中每穗粒数则明显减少。当 *OsGS1;1* 基因重新转入到 *OsGS1;1* 突变体后表型可恢复到近似野生型水平。因此,这 2 种 *NADH-GOGAT* 酶可能在自然衰老期间对氮素

再动员起重要作用,这些同工酶彼此之间不能弥补其缺失的功能。2014 年, Pérez - Tienda 等用 AM 真菌 (*Rhizophagus irregularis*) 侵染水稻,获得转基因株系并在 2 种氮素处理条件下检测其菌根中 *AMTs*、*GS* 和 *GOGAT* 基因表达情况。结果表明,AM 共生系统在低氮条件下 *OsAMT1; 1* 和 *OsAMT1; 3* 下调表达,在高氮条件上调表达。无论是高氮还是低氮条件 *OsAMT3; 1* 都有较强的上调表达。因此推测,在水稻根中 *OsAMT3; 1* 可能参与了菌根氮吸收途径,*OsGOGAT2* 在 AM 诱导的转运蛋白 *OsAMT3; 1* 供应 NH_4^+ 的过程中起重要同化作用^[50]。

5 展望

迄今为止,关于植物 *GOGAT* 基因的研究及其在植物氮代谢调控中的应用已经取得了一定进展,主要集中在模式植物和作物,但对木本植物的研究则较少。杨树是多年生落叶木本植物的代表植物,基因组背景清晰,包括转基因在内的相关分子生物学研究手段已经成熟;同时,杨树易于无性繁殖,可在短期内获得大量具有同一遗传背景的无性系材料,并对外界氮素条件的变化具有非常好的适应性,这是其他模式植物无法比拟的优势。但对于杨树,氮的吸收与同化机制的研究却鲜有报道。笔者所在课题组以杨树为试材,在研究 *GOGAT* 基因的同时对氮吸收及同化过程中相关基因表达的协调性进行分析,其结果在丰富植物氮吸收与利用相关理论的同时,也将揭示木本植物中氮吸收与利用的特有机制,为利用基因工程等手段提高木本植物的氮素利用率奠定有利的理论基础。

参考文献:

- [1] 陈雅君, 闫庆伟, 张璐, 等. 氮素与植物生长相关研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(4): 144 - 148.
- [2] 张华珍, 徐恒玉. 植物氮素同化过程中相关酶的研究进展[J]. 北方园艺, 2011(20): 180 - 183.
- [3] 安慧, 上官周平. 植物氮素循环过程及其根域调控机制[J]. 水土保持研究, 2006, 13(1): 83 - 85.
- [4] 钟开新, 王亚琴. 植物氮素吸收与转运的研究进展[J]. 广西植物, 2011, 31(3): 414 - 417.
- [5] 徐晓鹏, 傅向东, 廖红. 植物铵态氮同化及其调控机制的研究进展[J]. 植物学报, 2016, 51(2): 152 - 166.
- [6] 莫良玉, 吴良欢, 陶勤南. 高等植物 GS/GOGAT 循环研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2001, 7(2): 223 - 231.
- [7] Lea P J, Robinson S A, Stewart G R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagine[J]. Intermediary Nitrogen Metabolism, 1990, 62(1): 121 - 159.
- [8] Joy K W, Blackwell R D, Lea P J. Assimilation of nitrogen in mutants lacking enzymes of the glutamate synthase cycle[J]. Journal of Experimental Botany, 1992, 43(247): 139 - 145.
- [9] Lea P J, Mifflin B J. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants[J]. Nature, 1974, 251(5476): 614.
- [10] 吴巍, 赵军. 植物对氮素吸收利用的研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(13): 75 - 78.
- [11] 韩娜, 葛荣朝, 赵宝存, 等. 植物谷氨酰胺合成酶研究进展[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2004, 28(4): 407 - 410.
- [12] 李常健, 林清华. 高等植物中氮同化酶及其同工酶研究[J]. 湖
- 南科技学院学报, 2000(3): 20 - 22.
- [13] Lea P J, Mifflin B J. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2003, 41(6): 555 - 564.
- [14] 郑朝峰. 植物的谷氨酸合成酶[J]. 植物生理学报, 1986(3): 7 - 14.
- [15] Tempest D W, Meers J L, Brown C M. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route[J]. Biochemical Journal, 1970, 117(2): 405 - 407.
- [16] Meers J L, Tempest D W, Brown C M. Glutamine (amide): 2 - oxoglutarate amino transferase oxido - reductase (NADP): an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria[J]. J Gen Microbiol, 1970, 64(2): 187 - 194.
- [17] Brown C M, Macdonald - Brown D S, Meers J L. Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism[J]. Advances in Microbial Physiology, 1974, 11(1): 1 - 52.
- [18] Magalhaes A C, Neyra C A, Hageman R H. Nitrite assimilation and amino nitrogen synthesis in isolated spinach chloroplasts[J]. Plant Physiology, 1974, 53(3): 411 - 415.
- [19] Mifflin B J. Nitrite reduction in leaves: studies on isolated chloroplasts[J]. Planta, 1974, 116(3): 187 - 196.
- [20] Ireland R J, Lea P J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism[M]//Singh B K. Plant amino acids: biochemistry and biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1999: 49 - 109.
- [21] Mifflin B J. The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino acid biosynthesis in the plastids of root and leaves[J]. Plant Physiology, 1974, 54(4): 550 - 555.
- [22] Dougall D K. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1974, 58(3): 639 - 646.
- [23] Suzuki A, Jacquot J P, Gadal P. Glutamate synthase in rice roots. Studies on the electron donor specificity[J]. Phytochemistry, 1983, 22(7): 1543 - 1546.
- [24] Suzuki A, Vidal J, Gadal P. Glutamate synthase isoforms in rice[J]. Plant Physiology, 1982, 70(3): 827 - 832.
- [25] Suzuki A, Gadal P. Glutamate synthase from rice leaves[J]. Plant Physiology, 1982, 69(4): 848 - 852.
- [26] Coschigano K T, Melooliveira R, Lim J, et al. Arabidopsis gls mutants and distinct Fd - GOGAT genes: implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation[J]. Plant Cell, 1998, 10(5): 741 - 752.
- [27] Anderson J W, Walker D A. Ammonia assimilation and oxygen evolution by a reconstituted chloroplast system in the presence of 2 - oxoglutarate and glutamate[J]. Planta, 1983, 159(3): 247 - 253.
- [28] Wallsgrove R M, Lea P J, Mifflin B J. Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell[J]. Plant Physiology, 1979, 63(2): 232 - 236.
- [29] Cullimore J V, Sims A P. Occurrence of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Phytochemistry, 1981, 20(4): 597 - 600.
- [30] Marquez A J, Avila C, Forde B G, et al. Ferredoxin - glutamate synthase from barley leaves: rapid purification and partial characterisation [iron - sulphur]flavo protein, affinity chromatography

- [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 1988, 26(5): 645–650.
- [31] Suzuki A, Gadal P. Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and in other organisms[J]. Physiologie Vegetale, 1984, 22: 471–486.
- [32] Vidal J, Suzuki A, Gadal P, et al. Detection of the messenger RNA encoding for the ferredoxin – dependent glutamate synthase in maize leaf[J]. Plant Physiology, 1986, 80(4): 859–862.
- [33] Botella J R, Valpuesta V. Immunocytolocalization of Ferredoxin – GOGAT in the cells of green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentu*[J]. Plant Physiology, 1988, 87(1): 255–257.
- [34] Becker T W, Carrayol E, Hirel B. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase isoforms in maize leaves: localization, relative proportion and their role in ammonium assimilation or nitrogen transport[J]. Planta, 2000, 211(6): 800–806.
- [35] Harel E, Lea P J, Miflin B J. The localisation of enzymes of nitrogen assimilation in maize leaves and their activities during greening[J]. Planta, 1977, 134(2): 195–200.
- [36] Yamaya T, Hayakawa T, Tanasawa K, et al. Tissue distribution of glutamate synthase and glutamine synthetase in rice leaves: occurrence of NADH – dependent glutamate synthase protein and activity in the unexpanded, nongreen leaf blades [J]. Plant Physiology, 1992, 100(3): 1427–1432.
- [37] Tobin A K, Yamaya T. Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(356): 591–604.
- [38] Suárez M F, Avila C, Gallardo F, et al. Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(370): 891–904.
- [39] Emes M J, Fowler M W. The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots[J]. Planta, 1979, 144(3): 249–253.
- [40] Suzuki A, Oaks A. Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots[J]. Planta, 1981, 151(5): 457–461.
- [41] Bowsher C G, Boulton E L, Rose J, et al. Reductant for glutamate synthase in generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non – photosynthetic root plastids[J]. Plant Journal, 1992, 2(6): 893–898.
- [42] Miflin B J, Lea P J. Glutamine and asparagine as nitrogen donors for reductant – dependent glutamate synthesis in pea roots [J]. Biochemical Journal, 1975, 149(2): 403–409.
- [43] Hayakawa T, Hopkins L, Peat L J, et al. Quantitative intercellular localization of NADH – dependent glutamate synthase protein in different types of root cells in rice plants[J]. Plant Physiology, 1999, 119(2): 409–416.
- [44] Pajuelo P, Pajuelo E, Forde B G, et al. Regulation of the expression of ferredoxin – glutamate synthase in barley[J]. Planta, 1997, 203(4): 517–525.
- [45] Migge A, Carrayol E, Kunz C, et al. The expression of the tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase or ferredoxin – dependent glutamate synthase does not depend on the rate of nitrate reduction, and is unaffected by suppression of photorespiration[J]. Journal of Experimental Botany, 1997, 48(6): 1175–1184.
- [46] Yamaya T, Tanno H, Hirose N, et al. A supply of nitrogen causes increase in the level of NADH – dependent glutamate synthase protein and in the activity of the enzyme in roots of rice seedlings [J]. Plant & Cell Physiology, 1995, 36(7): 1197–1204.
- [47] Suzuki A, Knaff D B. Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism[J]. Photosynthesis Research, 2005, 83(2): 191–217.
- [48] Hirose N, Hayakawa T, Yamaya T. Inducible accumulation of mRNA for NADH – dependent glutamate synthase in rice roots in response to ammonium ions [J]. Plant & Cell Physiology, 1997, 38(11): 1295–1297.
- [49] Turano F J, Muhitch M J. Differential accumulation of ferredoxin – and NADH – dependent glutamate synthase activities, peptides, and transcripts in developing soybean seedlings in response to light, nitrogen, and nodulation[J]. Physiologia Plantarum, 1999, 107(4): 407–418.
- [50] Pérez – Tienda J, Corréa A, Azcón – Aguilar C, et al. Transcriptional regulation of host NH_4^+ transporters and GS/GOGAT pathway in arbuscular mycorrhizal rice roots[J]. Plant Physiol Biochem, 2014, 75(8): 1–8.
- [51] Suzuki A, Rothstein S. Structure and regulation of ferredoxin – dependent glutamate synthase from *Arabidopsis thaliana*. Cloning of cDNA expression in different tissues of wild – type and gltS mutant strains, and light induction[J]. European Journal of Biochemistry, 2010, 243(3): 708–718.
- [52] Emes M J, Tobin A K. Control of metabolism and development in higher plant plastids[J]. International Review of Cytology, 1993, 145(SI): 149–216.
- [53] Masclaux C, Valadier M H, Brugière N, et al. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence[J]. Planta, 2000, 211(4): 510–518.
- [54] Loulakakis K A, Primikrios N I, Nikolantonakis M A, et al. Immunocharacterization of *Vitis vinifera* L. ferredoxin – dependent glutamate synthase, and its spatial and temporal changes during leaf development[J]. Planta, 2002, 215(4): 630–638.
- [55] Hirose N, Yamaya T. Okadaic Acid mimics nitrogen – stimulated transcription of the NADH – glutamate synthase gene in rice cell cultures[J]. Plant Physiology, 1999, 121(3): 805–812.
- [56] Ishizaki T, Ohsumi C, Totsuka K, et al. Analysis of glutamate homeostasis by overexpression of *Fd – GOGAT* gene in *Arabidopsis thaliana*[J]. Amino Acids, 2010, 38(3): 943–950.
- [57] Kissen R, Winge P, Tran D H T, et al. Transcriptional profiling of an *Fd – GOGAT1/GLU1* mutant in *Arabidopsis thaliana* reveals a multiple stress response and extensive reprogramming of the transcriptome[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 190.
- [58] Yang X L, Nian J, Xie Q, et al. Rice ferredoxin – dependent glutamate synthase regulates nitrogen – carbon metabolomes and is genetically differentiated between *japonica* and *indica* subspecies [J]. Molecular Plant, 2016, 9(11): 1520–1534.
- [59] Zeng D D, Qin R, Li M, et al. The ferredoxin – dependent glutamate synthase (OsFd – GOGAT) participates in leaf senescence and the nitrogen remobilization in rice [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2017, 292(2): 385–395.
- [60] Chichkova S, Arellano J, Vance C P, et al. Transgenic tobacco plants that overexpress alfalfa NADH – glutamate synthase have higher carbon and nitrogen content[J]. Journal of Experimental Botany,

余丽梅, 宋超, 张聪, 等. 养殖水产品中磺胺类药物的检测方法 & 残留分析研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 16–22.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.004

养殖水产品中磺胺类药物的检测方法 及残留分析研究进展

余丽梅¹, 宋超^{2,3,4}, 张聪^{2,3,4}, 陈家长^{1,2,3,4}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081;

3. 农业部水产品质量安全环境因子风险评估实验室, 江苏无锡 214081; 4. 农业部长江下游渔业生态环境监测中心, 江苏无锡 214081)

摘要:磺胺类药物是一种新型的有机污染物, 对环境和人体健康都存在潜在的威胁, 因此其在养殖水产品中的残留情况日益受到关注。主要对水产品中磺胺类药物的来源、危害、检测方法以及在养殖水产品中的残留情况作简要综述, 并指出了需要进一步探究的方向, 对深入了解磺胺类药物在养殖水产品中的残留情况, 及时采取危害防治措施、保护人类健康和生态系统稳定都具有重要意义。

关键词:磺胺类药物; 水产品; 检测方法; 残留分析

中图分类号: X714 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0016-07

中国是水产养殖大国, 据中国统计年鉴报道, 2013 年我国水产品总产量达 6 172 万 t, 而人工养殖所占比例高达 92.4%^[1]。中国是抗菌药物生产和使用大国^[2]。抗菌药物在水产品养殖过程中主要用于多种细菌性疾病的预防和治疗、促进水生动物的生长和发育以及降低某些营养物质的需求量等^[3]。但抗菌药物在使用过程中常常出现乱用和滥用现象^[4], 导致污染问题严重。养殖废水中残留的抗菌药物可

能对水生环境造成污染^[5], 破坏水生环境的生态系统平衡性; 而水产品是与人类生活息息相关的食物之一, 抗菌药物药物的不合理使用导致水产品中药物残留, 能够直接或者间接地通过环境、食物链等对人体产生毒副作用, 引起细菌耐药性的增加、触发过敏反应等^[6], 从而对人类健康构成威胁。

磺胺类抗菌药物是一种具有基本官能团“对氨基苯磺酰胺”的一类药物的总称^[7], 也是应用得最多最早的一类人工合成的抗菌药物^[8]。它能够干扰大多数革兰氏阳性菌和阴性菌的生长繁殖, 对鱼类烂鳃病、细菌性竖鳞病、疖疮、弧菌病、肠炎赤鳍病、鞭毛虫病等也都有良好的防治效果^[9-10]; 并且性质稳定、高效、低毒、抗菌谱广、价格低廉, 因此在水产养殖中被广泛使用, 例如作为动物饲料添加剂、促生长剂^[11]、预防和治疗各种细菌性鱼病等, 对于降低水产品的发病率、改善水产品品质^[9]和提高经济效益方面均具有显著效果。

然而, 磺胺类抗菌药物不合理使用可能逐渐成为一种新型的有机污染物, 对环境和人体健康都存在潜在的威胁, 因此

收稿日期: 2016-12-16

基金项目: 国家水产品质量安全风险评估项目(编号: GJFP2016)。

作者简介: 余丽梅(1990—), 女, 湖北黄石人, 硕士研究生, 主要从事渔业生态环境和水产品质量安全方面的研究工作。E-mail: 1246809960@qq.com。

通信作者: 陈家长, 研究员, 硕士生导师, 主要研究渔业生态环境监测与保护、水产品质量安全控制技术、养殖环境修复、健康养殖、生态环境评价等。E-mail: chenjjz@ffrc.cn。

2001, 52(364): 2079–2087.

[61] Yamaya T, Obara M, Nakajima H, et al. Genetic manipulation and quantitative – trait loci mapping for nitrogen recycling in rice[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(370): 917–925.

[62] Schoenbeck M A, Temple S J, Trepp G B, et al. Decreased NADH glutamate synthase activity in nodules and flowers of alfalfa (*Medicago sativa* L.) transformed with an antisense glutamate synthase transgene. [J]. Journal of Experimental Botany, 2000, 51(342): 29–39.

[63] Lancien M, Martin M, Hsieh M H, et al. *Arabidopsis* glt1 – T mutant defines a role for NADH – GOGAT in the non – photorespiratory ammonium assimilatory pathway [J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2002, 29(3): 347–358.

[64] Konishi N, Ishiyama K, Matsuoka K, et al. NADH – dependent glutamate synthase plays a crucial role in assimilating ammonium in the *Arabidopsis* root[J]. Physiologia Plantarum, 2014, 9(8): 138 –

151.

[65] Tamura W, Hidaka Y, Tabuchi M, et al. Reverse genetics approach to characterize a function of NADH – glutamate synthase1 in rice plants[J]. Amino Acids, 2010, 39(4): 1003–1012.

[66] Tamura W, Kojima S, Toyokawa A, et al. Disruption of a novel NADH – glutamate synthase2 gene caused marked reduction in spikelet number of rice [J]. Frontiers in Plant Science, 2011, 2(12): 57.

[67] Lu Y E, Luo F, Yang M, et al. Suppression of glutamate synthase genes significantly affects carbon and nitrogen metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Science China Life Sciences, 2011, 54(7): 651–663.

[68] Yamaya T, Kusano M. Evidence supporting distinct functions of three cytosolic glutamine synthetases and two NADH – glutamate synthases in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(19): 5519–5525.