

水稻根系细胞膜质子泵在氮磷钾养分吸收中的作用

许飞云¹ 张茂星¹ 曾后清² 朱毅勇^{1,*}

(¹南京农业大学 资源与环境科学学院, 南京 210095; ²杭州师范大学 生命与环境科学学院, 杭州 310036; * 通讯联系人, E-mail: yiyong1973@njau.edu.cn)

Involvement of Plasma Membrane H⁺-ATPase in Uptake of Nitrogen, Phosphorus and Potassium by Rice Root

XU Fei-yun¹, ZHANG Mao-xing¹, ZENG Hou-qing², ZHU Yi-yong^{1,*}

(¹College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; * Corresponding author, E-mail: yiyong1973@njau.edu.cn)

XU Feiyun, ZHANG Maoxing, ZENG Houqing, et al. Involvement of plasma membrane H⁺-ATPase in uptake of nitrogen, phosphorus and potassium by rice root. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(1): 106-110.

Abstract: Rice is an important staple crop in China. The yield of rice is closely related to the uptake of plant nutrients. As the major essential elements, nitrogen, phosphorus and potassium, their transport across the plasma membrane is critical for the nutrient absorption efficiency. The plasma membrane H⁺-ATPase actively drives H⁺ outside the plant cells. Thus the proton gradient across the plasma membrane not only builds up the membrane potential but also forms the proton motive force for the transport of various nutrients. This review illustrates the mechanism of plasma membrane H⁺-ATPase of rice roots involved in the uptake of nitrogen, phosphate and potassium to provide more strategies for improving the nutrition use efficiency.

Key words: rice; nitrogen; phosphorus; potassium; PM H⁺-ATPase

许飞云, 张茂星, 曾后清, 等. 水稻根系细胞膜质子泵在氮磷钾养分吸收中的作用. *中国水稻科学*, 2016, 30(1): 106-110.

摘要: 水稻是我国最重要的粮食作物, 其产量的形成与养分的吸收密切相关。氮、磷、钾是植物最重要的三种营养元素, 它们在根系的吸收和转运直接影响养分的利用效率。植物细胞膜质子泵能够将细胞质中的 H⁺ 泵出细胞, 在细胞膜内外形成 H⁺ 浓度梯度, 建立膜电位, 并形成质子驱动力, 从而为各种养分离子的跨膜运输提供动力。本文综述了近年来关于水稻根系细胞膜质子泵在铵态氮、磷酸盐和钾离子吸收中的作用机理, 为水稻养分利用效率的提高提供理论依据。

关键词: 水稻; 氮; 磷; 钾; 细胞膜质子泵

中图分类号: Q945.12; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)01-0106-05

水稻是我国主要的粮食作物, 其产量的形成与养分的供应关系密切。氮、磷、钾是农业生产中最重要的三大营养元素和肥料来源。氮肥主要以铵态氮(NH₄⁺)为主^[1-2]。旱地土壤中硝化作用强烈, 因此, 大量的 NH₄⁺ 转化为硝态氮(NO₃⁻); 但是淹水土壤或者酸性较强的土壤中, 硝化作用受到抑制, 因此氮肥施用后 NH₄⁺ 大量积累。磷肥的溶解性一般都比较差, 即使是水溶性磷肥, 施入土壤后也很容易与土壤中的钙发生化学反应而沉淀, 或被土壤中的铁铝氧化物吸附, 因此, 磷肥的当季利用率较低^[3]。

虽然钾肥的有效性比较高, 但是钾肥的施用往往被忽视。在我国近三十多年的农业生产中, 由于片面追求高产而过量施肥, 已经导致了水体富营养化等严重的环境污染问题。因此, 如何合理施肥, 提高养分利用率是目前急需关注的问题。

由于植物养分的吸收都要通过根系细胞膜上相应的转运蛋白或离子通道, 因此, 了解养分跨膜运输的机制, 对于合理施肥具有重要的指导意义。铵在低浓度下主要通过细胞膜上的铵离子转运蛋白 AMT 运输^[4], 但是在高浓度下, 主要是以氨分子的

收稿日期: 2015-07-13; 修改稿收到日期: 2015-10-16。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471937); 教育部新世纪优秀人才资助项目(NCET-11-0672)。

形式通过一类 Amt/MEP/Rh 的水通道蛋白运输^[5]。硝酸盐与磷酸盐两种阴离子分别通过细胞膜上的硝转运蛋白和磷转运蛋白运输^[6]。钾的吸收通常是由钾离子通道进行,但在钾浓度极低的情况下主要通过钾转运蛋白进行运输^[7-8]。养分离子跨膜运输过程可以归纳为两大类:阳离子的吸收是顺着细胞膜内外的电势差进入细胞,因此不需要耗能;而阴离子的吸收则是逆着细胞膜内外的电势差,因此需要细胞膜质子泵提供质子驱动力,并且外界浓度越低需要的质子驱动力越大^[9]。

质子泵又叫细胞膜 H^+ -ATPase^[9-12],通过水解 ATP 产生能量将 H^+ 主动泵出细胞,在细胞膜内外形成了 H^+ 浓度梯度,从而建立了细胞膜电位,细胞外大量的 H^+ ,则形成质子驱动力,帮助养分离子运输进入细胞。它是由 100 kD 的单链氨基酸以单体或二聚体形式构成的^[13],现已发现,拟南芥中有 12 个质子泵基因^[11],烟草中有 9 个质子泵基因^[12],水稻中有 10 个质子泵基因^[11]。在外界环境发生改变时,质子泵活性会发生相应的改变。有关土壤养分元素发生变化对质子泵的影响也有不少报道。在给缺氮玉米再次供应硝态氮时^[14],会诱导根系质子泵活性提高,而缺磷时会诱导白羽扇豆排根的质子泵活性提高^[15],而钾的运输是依靠质子泵提供的膜电位进行吸收的^[16]。因此,根系细胞膜质子泵在氮、磷、钾营养元素的吸收中具有重要作用,在某种程度上直接调控了养分的跨膜运输^[10]。

1 水稻根系细胞膜质子泵与氮营养的关系

铵、硝是植物吸收的两种最主要的氮素形态。由于 NH_4^+ 的吸收只要依靠细胞膜电位就可以进入细胞,或者以不带电的 NH_3 进入细胞,因此,在运输过程中不需要耗能。而 NO_3^- 的吸收要依靠质子驱动力消耗能量,所以在铵、硝同时存在的情况下,根系会优先吸收铵。但是在单一的 NH_4^+ -N 营养下大多数植物都会发生铵中毒^[16-17]。铵中毒的原因很多,其中的一个重要因素就是 pH 失调:一方面根系大量吸收 NH_4^+ 造成根际酸化;另一方面铵在细胞中同化时也会产生 H^+ ^[18-19],而过多的 H^+ 会对细胞的生理活动带来负面影响。

水稻长期生活在淹水环境中,是一种典型的以 NH_4^+ 吸收为主的作物^[20],因而具有相应的适应机制。由于细胞膜 H^+ -ATPase 的一个重要生理功能

是维持植物细胞中 pH 平衡^[11],因此,在实验中发现作物根系细胞膜质子泵活性在铵态氮营养下要明显高于硝态氮营养^[21]。最早,科学家都认为质子泵的主要功能就是要将细胞中铵同化所产生的一部分氢离子排出,相比之下,硝态氮还原时消耗氢离子。我们的研究表明,在正常范围的铵浓度下,水稻根系在吸铵过程中导致根际的 pH 值降低,是其质子泵活性升高的主要原因^[22],而不是主要因为细胞中的氢需要排出体外所引起的。因为在用硝态氮培养水稻时,如果将根际 pH 值人为下调,也会导致其根系细胞膜质子泵活性升高,我们的研究表明这是水稻长期适应铵态氮营养下根际酸化的一种适应性。我们的研究也发现,质子泵活性提高主要是水稻根系中 5 个细胞膜 H^+ -ATPase 的同源基因表达量升高,并且其排出氢离子的能力也提高^[22]。由此可见,质子泵活性升高是植物耐铵的一个必要前提。对于不耐铵的植物而言,其质子泵活性不具有耐酸的适应性,在长期铵态氮营养下会导致质子泵活性受到抑制,并因此导致膜电位去极化,影响其他养分的吸收,最终导致根系与地上部分生长受到阻碍^[23]。因此,提高细胞膜质子泵的活性可以增强作物吸收利用铵态氮的能力。

对于水稻而言,当根系发育成熟后能够形成通气组织而分泌大量的氧气到根际中去,因此,在水稻根系表面上可能发生硝化作用而形成硝态氮,从而在根际形成大量铵与少量硝混合营养的根际环境。在吸收 NO_3^- 时,由于质子要陪伴其进入细胞,因此,质子泵活性不需要应对根际的酸化,其质子泵活性低于 NH_4^+ 培养下的水稻^[22],但是这并不意味着 NO_3^- 的吸收不需要质子泵的作用。研究表明,随着 NO_3^- 供应量的变化,水稻根系质子泵活性也随之改变^[24],这说明了水稻根系吸收 NO_3^- 是需要细胞膜 H^+ -ATPase 活性来提供质子驱动力的。因此,在铵硝混合营养下,由于铵的吸收促进了质子泵的活性,也会进一步促进水稻对 NO_3^- 的吸收。

2 水稻根系细胞膜质子泵与磷营养的关系

植物吸收磷营养的主要形式是磷酸一氢根 (HPO_4^{2-}) 或是磷酸二氢根 ($H_2PO_4^-$),需要结合 2~3 个 H^+ ,在质子驱动力的作用下,通过细胞膜磷转运蛋白进入植物细胞^[25],因此几乎所有的磷转运蛋白都是依靠细胞膜 H^+ -ATPase 作用后释放的

H^+ 结合磷酸根离子的形式运输磷营养^[26,27]。因此,在包括水稻在内的很多植物中,在缺磷的环境下质子泵活性会提高,并分泌大量的氢离子酸化根际^[23,28-29]。研究者可以观察到根际 pH 的降低可以促进植物对磷的吸收,其实质则是根系细胞膜质子泵活性的提高^[30]。虽然不同形态的氮对植物吸收磷均具有促进作用^[31,33];但是,研究发现 NH_4^+-N 比 NO_3^--N 培养下的水稻能够吸收更多的磷营养,并促进作物的生长^[34]。我们在 NH_4^+-N 营养液中添加抑制质子泵活性的钒酸盐后,水稻根系对磷的吸收速率降低;而在 NO_3^--N 营养液中添加促进质子泵活性的梭壳菌素后磷的吸收速率增加^[30]。这一结果表明,细胞膜 $H^+-ATPase$ 活性是导致磷素吸收差异的根本原因。

如图 1 所示,由于 NH_4^+-N 的吸收导致根际 pH 值下降,细胞膜 $H^+-ATPase$ 活性增强,根系周围的 $H_2PO_4^-$ 结合 H^+ ,通过磷转运蛋白的转运进入根系;而 NO_3^--N 的吸收是与质子驱动力相偶联的主动运输^[35],也要大量消耗根外的 H^+ ,与磷酸盐的吸收形成了一定程度上的竞争,导致磷的吸收减少。铵态氮营养下,水稻根系细胞膜质子泵活性升

高,促进了水稻对磷营养的吸收。

另外,由于土壤中有效磷的含量比较低,因此,植物会产生一些生理上的适应机制^[36]。其中,比较普遍的是大多数植物根系会分泌有机酸来活化土壤中的难溶性磷^[37]。在此过程中,为了维持细胞膜两侧的电荷平衡,根系质子泵活性提高释放出大量的 H^+ ,Zhang 等^[29]的研究表明,水稻根系细胞膜质子泵在缺磷情况下活性提高。而细胞膜 $H^+-ATPase$ 基因 *OsA8* 敲除后导致水稻对磷的吸收及转运能力显著降低^[38]。在其他作物中也发现,细胞膜 $H^+-ATPase$ 基因超表达的转基因拟南芥由于质子泵活性提高,明显促进了磷的吸收^[25],这说明了细胞膜 $H^+-ATPase$ 与磷的吸收之间存在密切的关系。

3 水稻根系细胞膜质子泵与钾营养的关系

植物根系钾营养的吸收与细胞膜质子泵关系的研究并不多。有研究表明,在缺钾情况下,植物细胞膜质子泵活性显著增强,通过泵出 H^+ 形成更大的质子驱动力,以 H^+ 与 K^+ 结合的形式运输 K^+ 到细胞中去,由于其正电荷增加,更容易进入细胞,从而使根系吸收更多的钾营养^[39-41]。

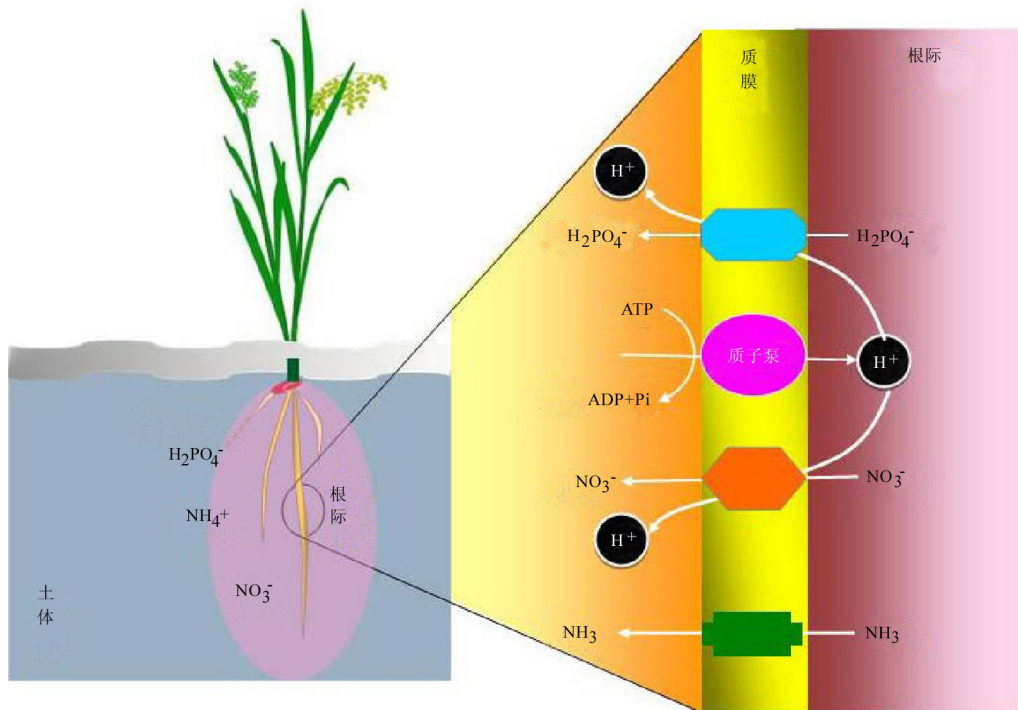


图 1 铵态氮营养通过影响质子泵活性来改变水稻根系对磷营养的吸收

Fig. 1. Effect of NH_4^+ and NO_3^- on the plasma membrane $H^+-ATPase$ of rice roots involved in the uptake of Pi.

另外,研究也发现, K^+ 本身也是质子泵工作时所必需的,因为在正常的钾浓度下,质子泵排出一个氢离子就需要细胞吸收一个钾离子,以维持细胞膜两侧的电荷平衡。因此,在铵态氮营养下,如果根系细胞吸收大量的铵离子会导致钾离子的吸收减少,并引发植物铵中毒。即使水稻这样的耐铵植物,在根际范围内如果铵的浓度超过 4mmol/L 也会导致其产生中毒症状。Konstantine 等^[42]发现, 10mmol/L NH_4^+ 配以 5mmol/L K^+ 处理,水稻幼苗生长最好,而低于这个钾浓度则产生铵中毒。我们通过其实验设计的浓度进行重复后发现,在高浓度的 NH_4^+ 培养的水稻中提高 K^+ 的浓度有助于缓解铵毒,并促进水稻的生长。这是因为,钾转运蛋白及钾通道也可以运输 NH_4^+ , 两种离子可以产生竞争关系^[43], 在高浓度 NH_4^+ 情况下添加钾可以增加铵、钾的竞争,缓解高铵对根系细胞膜质子泵的毒害作用;根系吸收 K^+ 产生的局部能量也可以帮助根系细胞膜质子泵外排 H^+ ^[44], 提高质子泵活性,增加质子驱动力,从而有效地减少高铵对植株造成的毒害作用。这对于水稻种植中应对铵中毒有极其重要的意义。

4 结论

植物细胞膜质子泵(H^+ -ATPase)是植物中的主宰酶(Master enzyme),在养分吸收过程中具有重要的作用,尤其是对于水稻吸收铵态氮具有重要的实际作用。因此,通过研究质子泵的变化规律,为生产中通过配施硝态氮肥或是增施钾肥来缓解铵态氮肥对水稻生长的影响,同时促进氮磷钾的同步吸收提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. 2nd edn. London: Academic Press, 1995, 231-254.
- [2] Falkengren-Grerup U, Mansson K F, Olsson M O. Uptake capacity of amino acids by ten grasses and forbs in relation to soil acidity and nitrogen availability. *Environ Exp Bot*, 2000, 44: 207-219.
- [3] Raghothama K G, Karthikeyan A S. Phosphate acquisition. *Plant Soil*, 2005, 274: 37-49.
- [4] Ludewig U, von Wiren N, Frommer W B. Uniport of NH_4^+ by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1; 1. *J Biol Chem*, 2002, 277: 13548-13555.
- [5] Shahram K, Joseph O, Jonathan, et al. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å. *Science*, 2004, 305: 1587-1594.
- [6] Raghothama K G. Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 665-693.
- [7] Fuchs I, Stölzle S, Ivashikina N, et al. Rice K^+ uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress. *Planta*, 2005, 221: 212-221.
- [8] Yao X, Horie T, Xue S, et al. Differential sodium and potassium transport selectivities of the rice OsHKT2;1 and OsHKT2;2 transporters in plant cells. *Plant Physiol*, 2010, 152: 341-355.
- [9] Serrano R. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1989, 40: 61-94.
- [10] Arango M, Gevaudant F, Oufattole M, et al. The plasma membrane proton pump ATPase: The significance of gene subfamilies. *Planta*, 2003, 216: 355-356.
- [11] Palmgren M G. Plant plasma membrane H^+ -ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 817-845.
- [12] Micheler B, Boutry M. The plasma membrane H^+ -ATPase: A highly regulated enzyme with multiple physiological functions. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1-6.
- [13] Sze H, Li X, Palmgren M G. Energization of plant cell membranes by H^+ -pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell Environ*, 1999, 11: 677-689.
- [14] Santi S, Locci G, Monte R, et al. Induction of nitrate uptake in maize roots: Expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H^+ -ATPase isoforms. *J Exp Bot*, 2003, 54(389): 1851-1864.
- [15] Yan F, Zhu Y, Caroline Muller, et al. Adaptation of H^+ -pumping and plasma membrane H^+ ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiol*, 2002, 129: 50-63.
- [16] Briskin D P. Plasma membrane H^+ -transporting ATPase: Role in potassium ion transport. *Physiol Plant*, 1986, 68(68): 159-163.
- [17] Britto D T, Glass A D M, Kronzucker H J, et al. Cytosolic concentrations and transmembrane fluxes of $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3^-$: An evaluation of recent proposals. *Plant Physiol*, 2001, 125: 523-526.
- [18] Wang M, Siddiqi M Y, Ruth T J, et al. Ammonium uptake by rice roots: II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma. *Plant Physiol*, 1993, 103: 1259-1267.
- [19] Schubert S, Yan F. Nitrate and ammonium nutrition of plants: Effects on acid/base balance and adaptation of root cell plasmalemma H^+ -ATPase. *Z Pflanzenernähr Bodenkd*, 1997, 160: 275-281.
- [20] Yamaya T, Oaks A. Metabolic regulation of ammonium uptake and assimilation // Amancio S, Stulen I (eds) Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants (Plant Ecophysiology Series) Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Pub-

- lisher, 2004; 35-64.
- [21] 狄廷均,朱毅勇,仇美华,等.水稻根系细胞膜 H^+ -ATPase 对铵硝营养的响应差异.中国水稻科学, 2007,21(4):360-366.
Di T J,Zhu Y Y,Qiu M H, et al.Response of plasma membrane H^+ -ATPase of rice root to ammonium and nitrate nutrition. *Chin J Rice Sci*, 2007, 21(4):360-366.(in Chinese with English abstract)
- [22] Zhu Y, Di T, Xu G, et al. Adaptation of plasma membrane H^+ -ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. *Plant Cell Environ*, 2009, 32:1428-1440.
- [23] Yan F, Schubert S, Mengel K. Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol*, 1992, 99: 415-421.
- [24] Garrido F, Rodrigo G, Carlos A, et al. Rice varieties tonoplast and plasma membrane H^+ -ATPase differential activities in response to nitrate pulses. *J Biol Sci*, 2008, 8(1): 107-112.
- [25] Smith S E, Smith F A, Jakobsen I. Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol*, 2003,133:16-20.
- [26] Schachtman D P, Reid R J, Ayling S M. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol*, 1998,116:447-453.
- [27] Preuss C P, Huang C Y, Tyerman S D. Proton-coupled high-affinity phosphate transport revealed from heterologous characterization in *Xenopus* of barley-root plasma membrane transporter, *HvPHT1*;1. *Plant, Cell Environ*, 2011,34:681-689.
- [28] Shen H, Chen J, Wang Z, et al. Root plasma membrane H^+ -ATPase is involved in the adaptation of soybean to phosphorus starvation. *J Exp Bot*, 2006, 57: 1353-1362.
- [29] Zhang R, Liu G, Wu N, et al. Adaptation of plasma membrane H^+ -ATPase and H^+ pump to P deficiency in rice roots. *Plant Soil*, 2011, 349: 3-11.
- [30] Zeng H, Liu G, Toshinori Kinoshita, et al. Stimulation of phosphorus uptake by ammonium nutrition involves plasma membrane H^+ ATPase in rice roots. *Plant Soil*, 2012, 357: 205-214.
- [31] Grunes D L. Effect of nitrogen on the availability of soil and fertilizer phosphorus to plants. *Adv Agron*, 1959, 11: 369-396.
- [32] Miller M H. Effect of nitrogen on phosphorus absorption by plants//Carson W.ed. The Plant Root and Its Environment. Charlottesville:Univ. Press of Virginia, 1974, 643-668.
- [33] Smith F W, Jackson W A. Nitrogen enhancement of phosphate transport in roots of *Zea mays* L: I. Effects of ammonium and nitrate pretreatment. *Plant Physiol*, 1987, 84:1314-1318.
- [34] Jing J, Rui Y, Zhang F, et al. Localized application of phosphorus and ammonium improves growth of maize seedlings by stimulating root proliferation and rhizosphere acidification. *Field Crops Res*, 2010, 119:355-364.
- [35] Crawford N M, Glass A D M.Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci*,1998, 3: 389-395.
- [36] Wu P, Ma L, Hou X, et al. Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiol*, 2003,132:1260-1271.
- [37] Raghothama K G, Karthikeyan A S. Phosphate acquisition. *Plant Soil*, 2005, 274:37-49.
- [38] Chang C, Hu Y, Sun S, et al. Proton pump *OsA8* is linked to phosphorus uptake and translocation in rice. *J Exper Bot*, 2008, 60: 557-565.
- [39] Maathuis F J M, Sanders D. Mechanism of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol Plant*,1996, 96:158-168.
- [40] Rodriguez-Navarro A. Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1469:1-30.
- [41] Alvarez-Pizarro J C, Gomes-Filho E, Prisco J T. NH_4^+ -stimulated low- K^+ uptake is associated with the induction of H^+ extrusion but the plasma membrane H^+ -ATPase in sorghum roots under K^+ deficiency. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 1617-1626.
- [42] Konstantine D, Balkos, Herbert J. Optimization of ammonium acquisition and metabolism by potassium in rice (*Oryza sativa* L. cv. IR-72). *Plant, Cell Environ*. 2010, 33: 23-34.
- [43] Floor ten Hoopen, Tracey A C, Pai Padas, et al. Competition between uptake of ammonium and potassium in barley and *Arabidopsis* roots; Molecular mechanisms and physiological consequences. *J Experi Bot*, 2010,61: 2303-2315.
- [44] Gajdanowicz P, Michard E, Sandmann M, et al. Potassium (K^+) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(2):864-869.