

· 评述 · 饲草生物学专辑

# 豆科饲草碳氮高效固定、转运和同化利用研究进展

孔照胜<sup>1,2</sup>, 杨文强<sup>2,3,4\*</sup>, 王柏臣<sup>2,3,4</sup>, 林荣呈<sup>3</sup>

<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101; <sup>2</sup>中国科学院种子创新研究院, 北京 100093; <sup>3</sup>中国科学院植物研究所光生物学重点实验室, 北京 100093; <sup>4</sup>中国科学院大学现代农业科学学院, 北京 100049

**摘要** 近年来, 我国对优质饲草的需求不断增长。提高各种饲草尤其是紫花苜蓿(*Medicago sativa*)的产量和品质是饲草生物学研究领域一项重要的科研和经济目标。光合作用固定二氧化碳是牧草生物量形成的基础; 氮素的吸收、固定、转运和同化则是影响牧草粗蛋白含量并决定其品质的重要生物学过程。这2个生物学过程互相依赖, 紧密关联。该文论述了紫花苜蓿碳氮高效固定、转运和同化利用的育种新思路, 并总结了国内外在二氧化碳的高效固定和转运以及氮素的固定、吸收、转运和同化等方面取得的最新研究进展, 以期饲草高生物量和高蛋白含量分子设计育种提供参考。

**关键词** 豆科饲草, 碳固定与光合作用, 氮素吸收与同化, 碳氮转运, 氮固定

孔照胜, 杨文强, 王柏臣, 林荣呈 (2022). 豆科饲草碳氮高效固定、转运和同化利用研究进展. 植物学报 57, 764–773.

## 1 饲草碳氮高效利用的基础生物学问题

随着经济发展和生活水平大幅提高, 我国居民对肉蛋奶等畜产品的需求量不断增加, 带动了饲料消费量日益增多。然而, 我国饲草的产量和品质远不能满足快速增长的市场需求, 很大程度上还依赖于进口。为解决供需矛盾, 提高饲草产量和品质的相关研究迫在眉睫。紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是种植面积最大的豆科饲草, 由于其具有固氮能力, 因此营养价值和粗蛋白含量高、氨基酸种类齐全, 是家畜口粮的必需组成部分(洪维曾, 2009)。但由于育种周期长、育种原始材料较少且育种技术单一, 我国苜蓿育种进展缓慢。当前, 我国苜蓿的产量和品质与国外优良品种相比仍相差甚远(张亮等, 2018)。加强苜蓿育种、提升紫花苜蓿的产量和品质是饲草生物学研究领域一项重要的科研和经济目标。

光合作用是饲草生物量(即饲草产量)形成的基础(Singer et al., 2018)。光反应形成的ATP和NADPH被用于同化空气中的CO<sub>2</sub>, 形成碳水化合物, 而这些碳水化合物被临时贮藏或被植物分配利用, 最终形成饲草生物量。研究表明, 提高光合固碳效率是增加作

物生物量和产量的有效手段(Zhu et al., 2010; Long et al., 2015; Ort et al., 2015)。因此, 开展饲草光能高效利用和碳素高效固定的分子机理研究是推动饲草产业快速发展的一项重要内容。研究内容涉及复杂的生物化学和生物物理过程, 需要在分子、细胞、组织及个体等多个层次上对饲草的光合作用开展深入研究, 为提高光合固碳效率提供理论支撑和基因资源。

氮素是生物体内一种重要的营养物质, 是氨基酸和核苷酸最基本的组成元素, 氮素的吸收和利用直接影响作物的生长和产量。植物所需的氮素大多通过根部无机氮的转运体从土壤中吸收, 而豆科植物除了从土壤中吸收无机氮外, 还可以通过共生根瘤菌直接将空气中的氮气还原成氨, 并进一步转化为含氮有机物, 以满足植物生命活动的需要。在全球生态系统中, 每年生物固氮量约为 $2 \times 10^8$  t (卢嘉锡等, 2000), 可向农业系统提供约 $5 \times 10^7$  t 氮素营养(Nag et al., 2020)。其中, 豆科植物与根瘤菌建立的互惠共生关系是自然界中固氮效率最高且固氮量最大的生物固氮系统(Ladha et al., 2022)。作为豆科植物, 苜蓿可与根瘤菌形成生物固氮体系, 将大气中的分子态氮转化为可供植物吸收利用的氮素。苜蓿的生物固氮能力除有利

收稿日期: 2022-07-17; 接受日期: 2022-10-09

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项(No.XDA26030105)

\* 通讯作者。E-mail: wqyang@ibcas.ac.cn

于自身的生长发育外, 对于维持草地生态系统中土壤-植物-动物之间的氮平衡也起着重要作用(洪维曾, 2009)。研究苜蓿高效固氮的分子机理不仅有利于提高苜蓿产量, 也有助于畜牧业的可持续发展和生态平衡, 实现生产和生态功能双赢。

光合作用和生物固氮2个基本生物学过程是决定苜蓿生物量及饲草品质的基础。它们之间相互依赖、紧密关联。氮代谢依赖于碳代谢提供的碳源和能量(Lalonde et al., 2004; Ayre, 2011; Udvardi and Poole, 2013), 而碳代谢又需要氮代谢提供酶蛋白和光合色素(Evans and Clarke, 2019), 二者需要共同的还原力、ATP和碳骨架。在苜蓿的多组织蛋白质组学分析中发现, 大量的硝酸盐、氨基酸及多肽等含氮化合物的转运蛋白以及糖转运蛋白存在明显的组织特异性, 暗示了苜蓿中存在复杂的碳氮转运机制(Benedito et al., 2010; Minogue et al., 2016)。加强碳素和氮素在叶、茎与根和根瘤系统之间的动态运输, 对提高光合作用效率和加强氮素的整合利用, 最终提高苜蓿产量至关重要。

因此, 改善豆科饲草的光合和固氮能力及非豆科饲草的光合和氮吸收能力, 在此基础上协调碳氮代谢之间的关系, 在提高碳氮固定效率的同时提升其转运和利用效率, 从而提高苜蓿等饲草产量是饲草碳氮高效利用的基础生物学问题。从这些问题入手, 利用遗传学和组学等多种手段, 发掘调控苜蓿高效固碳、固氮以及碳氮高效转运和利用的遗传区段和分子元件, 并进一步结合模式植物苜蓿已鉴定的关键调控网络, 解析苜蓿碳氮高效转运和利用的调控机制, 构建分子育种和设计育种技术体系, 选育碳素和氮素高效利用的优异育种材料将是未来工作的重点(图1)。

## 2 饲草碳氮高效利用研究进展

### 2.1 碳素高效固定

苜蓿等饲草的产量(即地上部生物量)首先取决于叶片的光合固碳能力。因此, 提高个体和群体的光合固碳能力是饲草增产的重要途径。从群体的角度出发, 提高饲草产量的主要途径是提高光能利用率。可采取的措施包括通过合理密植增加光合面积进而提高产量(冯银平等, 2020; 卢发光等, 2021); 通过间、套种其它饲草或作物提高复种指数, 增加收获面积, 延长单

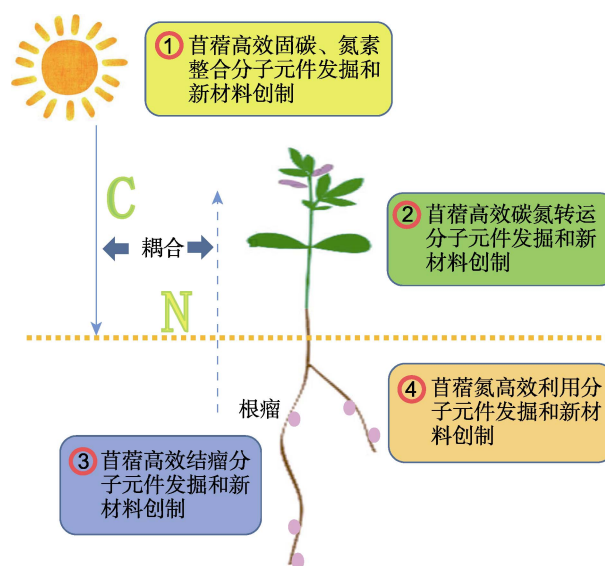


图1 紫花苜蓿碳氮高效固定、转运和同化利用的育种思路

Figure 1 Breeding ideas for efficient fixation, transport and assimilation of carbon and nitrogen in *Medicago sativa*

位土地面积上作物的光合时间(郭孝和刘太宇, 2005; 蔺芳等, 2019)。此外, 通过施肥(何树斌, 2012)、补充光照或人工增加外界空气中 $\text{CO}_2$ 浓度(丁莉等, 1996)也能在一定程度上提高光合固碳效率进而增加产量。

饲草多为 $\text{C}_3$ 植物, 光饱和强度较低, 仅为全光照的 $1/4-1/2$ , 且光呼吸明显,  $\text{CO}_2$ 补偿浓度高, 属低光效植物。因此就个体而言, 通过遗传育种手段筛选和培育光饱和点高、 $\text{CO}_2$ 补偿点低、光呼吸弱、净光合速率高的高光效品种是提高饲草产量的重要途径。具体来讲, 可从现有材料中筛选出光补偿点较低的个体植株或品系, 通过杂交育种培育新的高光效品种, 或通过诱变等方式对现有品种进行改造, 从中筛选出高光效材料。范润钧等(2010)从空间诱变的4个紫花苜蓿品种中筛选出13个变异植株, 其中11个株系分别表现出叶色变深、叶片增大、植株变高或多叶表型, 对它们进行深入研究可为紫花苜蓿的高光效育种提供有用的基因和种质资源。除常规育种和诱变育种方法外, 近年来转基因等现代生物技术也开始应用于饲草的高光效研究和育种工作(表1), 但相关研究还处于起步阶段。

光呼吸是在光照条件下, 植物的绿色细胞吸收 $\text{O}_2$ 并释放出 $\text{CO}_2$ 的过程。它是由于 $\text{C}_3$ 植物核酮糖1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Ribulose-1,5-bisphosphate

表1 应用于提高紫花苜蓿碳氮固定和同化效率的基因

Table 1 Genes associated with high efficiency fixation and assimilation of carbon and nitrogen in *Medicago sativa*

反应	基因名称	应用效果	参考文献
碳固定	玉米蔗糖磷酸合成酶基因( <i>SPS</i> )	净光合速率、固氮能力以及氮素同化效率均提高, 蛋白质含量和地上部生物量增加	Gebriel et al., 2015
	大肠杆菌羟基丙二酸半醛还原酶基因( <i>TSR</i> )	获得转基因植株	高永勇, 2018
	大肠杆菌乙醇酸脱氢酶亚基编码基因( <i>GLcD</i> )	获得转基因植株	高永勇, 2018
	大肠杆菌乙醇酸脱氢酶亚基编码基因( <i>GLcE</i> )	获得转基因植株	高永勇, 2018
	大肠杆菌乙醇酸脱氢酶亚基编码基因( <i>GLcF</i> )	获得转基因植株	高永勇, 2018
	玉米磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因( <i>PEPC</i> )	获得转基因植株	李玉帅, 2021
	紫花苜蓿光合和叶绿体发育负调控因子编码基因( <i>NRPC1/NRPC2</i> )	获得转基因植株	周倩, 2020
氮同化	大豆胞质谷氨酰胺合成酶基因( <i>GS1</i> )	净光合速率和生物量显著提高	Seeger et al., 2009

carboxylase/oxygenase, Rubisco)同时具有羧化和加氧2种特性引起的。光呼吸消耗了光合作用固定的碳素, 因此, 降低光呼吸一直是改良作物和增加产量的目标之一(Raines, 2006; Hagemann and Bauwe, 2016; Walker et al., 2016)。借助细菌中的乙醇酸代谢途径, Kebeish等(2007)在叶绿体中成功建立了1条光呼吸支路。表达光呼吸支路基因可以使拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)光合作用固定CO<sub>2</sub>和生物量积累显著增加。该方法在马铃薯(*Solanum tuberosum*) (Nölke et al., 2014)、亚麻荠(*Camelina sativa*) (Dalal et al., 2015)、水稻(*Oryza sativa*) (Shen et al., 2019)和烟草(*Nicotiana tabacum*) (South et al., 2019)中均得到验证。在饲草中, 分别将包含乙醛酸连接酶(glyoxylate carboligase, GCL)和羟基丙二酸半醛还原酶(tartronic semialdehyde reductase, TSR)编码基因的TG1载体和包含大肠杆菌乙醇酸脱氢酶(glycolate dehydrogenase) 3个亚基(GLcD、GLcE和GLcF)编码基因的DEF2载体共转化柱花草(*Stylosanthes* spp.)和紫花苜蓿, 并得到TG1和DEF2的共转化植株(高永勇, 2018)。但其增产效果尚未见报道。

CO<sub>2</sub>是光合作用的原料。空气中CO<sub>2</sub>的浓度较低, 约为0.03%。低浓度CO<sub>2</sub>很难满足光合作用的需要, 可以说饲草经常处于CO<sub>2</sub>“饥饿”状态。增加细胞中CO<sub>2</sub>浓度是提高光合效率的一条有效途径。但传统方法(如增加空气流动)利用空气中CO<sub>2</sub>浓度差所产生的扩散作用很难满足植物对CO<sub>2</sub>的需求。近年来, 模拟C<sub>4</sub>植物的CO<sub>2</sub>浓缩机制成为C<sub>3</sub>植物改良的方向之一。研究表明, 激活C<sub>3</sub>植物体内与C<sub>4</sub>途径相关酶的表达, 或者直接将C<sub>4</sub>植物相关基因转入C<sub>3</sub>植物体内均可有

效提高C<sub>3</sub>植物的光合效率, 并增加其产量(Takeuchi et al., 2000; Häusler et al., 2002; Fukayama et al., 2003; Ji et al., 2004; Yadav and Mishra, 2020)。C<sub>4</sub>植物的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC)与叶肉细胞胞质中的HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>亲和力较高, 目前已从玉米(*Zea mays*)、甘蔗(*Saccharum officinarum*)以及高粱(*Sorghum bicolor*)等多种C<sub>4</sub>植物中克隆出PEPC基因, 并且转入小麦(*Triticum aestivum*) (Qin et al., 2016)、水稻(李霞等, 2001)、油菜(*Brassica campestris*) (吴梅, 2011)、拟南芥(雷明月等, 2017; 李小博等, 2017)、大豆(*Glycine max*) (张艳等, 2015)、马铃薯和烟草(Häusler et al., 2001)等C<sub>3</sub>植物中, 但不同作物的效果有所不同。最近, 李玉帅(2021)利用根癌农杆菌介导法将玉米PEPC基因成功转入紫花苜蓿中, 获得转玉米PEPC基因紫花苜蓿植株。其转基因效果有待进一步观察。

蔗糖是光合作用的重要产物。玉米蔗糖生物合成的关键酶为蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate synthase, SPS), 转玉米SPS基因苜蓿芽和根的生长量均显著增加, 其净光合速率、固氮能力以及氮素同化效率均有所提升, 蛋白质含量和地上部生物量也远远高于未转化的对照植株(Gebriel et al., 2015)。这表明促进蔗糖的合成也是提高光合固碳效率和增加产量的一条有效途径。

除直接对光合相关蛋白进行遗传操作外, 从光合相关基因的表达调控入手也是一个很好的思路。以往研究表明, 拟南芥AtNRPCs (negative regulator of photosynthesis and chloroplast development in *Arabidopsis*)可以与叶绿体发育正调控转录因子AtGLK

(Golden2-like in *Arabidopsis*)相互作用, 负调控叶绿素合成和捕光系统所需基因的表达(金宝花, 2019)。*AtNRPC1*突变可以增加拟南芥叶片和角果中的叶绿素含量, 增强光合作用能力, 提高植株的生物量和产量。周倩(2020)研究表明, 蒺藜苜蓿(*M. truncatula*)中NPRCs同源基因具有相同的功能。对该基因进行操作有可能对苜蓿高光效育种以及提高苜蓿产量产生积极影响。据此, 周倩(2020)构建了紫花苜蓿*MsNRPC1*与*MsNRPC2*双基因敲除载体, 通过农杆菌介导法转化紫花苜蓿并得到转基因幼苗, 为后续紫花苜蓿高光效育种创制了遗传材料。

## 2.2 氮素的固定和同化

关于豆科饲草共生固氮的氮素固定、转化过程以及碳供应研究相对较少, 但是在豆科其它植物中已经取得了较大进展(图2)。豆科植物结瘤固氮的过程为: 豆科植物首先分泌类黄酮诱导根瘤菌合成结瘤因子; 结瘤因子被植物根毛细胞识别后引起一系列根毛反应(如诱导根毛弯曲、细菌侵入以及侵染线的形成、皮层细胞分裂以及根瘤原基开始形成); 根瘤菌从分支的侵染线中释放, 进入根瘤原基细胞中; 内化的细菌被宿主植物来源的膜包裹, 根瘤菌不断增殖、分化, 形成类菌体, 它是根瘤菌固氮的基本单位(Oldroyd and Downie, 2008; Roy et al., 2020)。类菌体可以在固氮酶的催化作用下消耗能量, 将大气中游离的分子态氮还原成氨, 提供植物生长发育所需氮素。

根瘤侵染细胞中类菌体固定得到的氨( $\text{NH}_3$ 或 $\text{NH}_4^+$ )通过共生体膜(symbiosome membrane)释放到胞质中, 之后通过谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)被同化为谷氨酰胺(glutamine, Gln)的酰胺基团(Smith and Atkins, 2002; Smith et al., 2002; Atkins and Smith, 2007)。在温带豆科植物(如豌豆(*Pisum sativum*)和蚕豆(*Vicia faba*))中, Gln和天冬酰胺(asparagine)是 $\text{N}_2$ 固定的主要产物, 而在大豆和菜豆(*Phaseolus vulgaris*)根瘤中, Gln与其它氨基酸一起进入线粒体和质体, 参与嘌呤的从头合成(Pélissier et al., 2004)。随后, 嘌呤在侵染细胞的胞质内被氧化生成尿酸, 通过共质体途径(Brown et al., 1995)进入非侵染细胞(uninfected cell, UC), 用于尿囊素合成, 尿囊素再生成尿囊酸(Todd et al., 2006; Werner and Witte, 2011)。这些酰胺是氮素从根瘤向茎部长距离运输的主要形式(Smith and Atkins, 2002)。通常酰胺被释放到非侵染细胞的细胞质中, 并向根瘤周围的维管系统移动, 最后通过与其相连的根维管系统传输到地上部(Masclaux-Daubresse et al., 2010)。

豆科植物与根瘤菌共生固氮是一个耗能的过程, 需要宿主植物提供大量能量和生长所需的各种营养, 能量主要以碳源的方式供给(Udvardi and Poole, 2013; Roy et al., 2020)。豆科植物叶片光合作用合成的有机物以蔗糖的形式通过韧皮部筛管经长距离转运到地下部, 用于分解供能或储存(Lalonde et al., 2004; Ayre, 2011; Udvardi and Poole, 2013)。根瘤

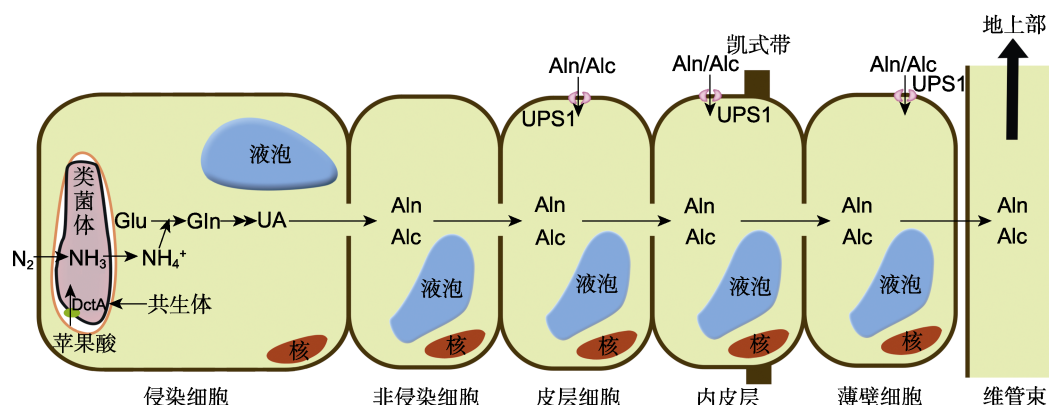


图2 根瘤中氮气固定、氮素同化及酰脲合成与运输模式

Glu: 谷氨酸; Gln: 谷氨酰胺; UA: 尿素; Aln: 尿囊素; Alc: 尿囊酸; UPS1: 酰脲透性酶1; DctA: 二羧酸转运蛋白

Figure 2 Schematic model of  $\text{N}_2$  fixation, nitrogen assimilation, and ureide synthesis and transport in nodules  
Glu: Glutamate; Gln: Glutamine; UA: Urea; Aln: Allantoin; Alc: Allantoic acid; UPS1: Ureide permease 1; DctA: Dicarboxylic acid transporter



就是利用这些有机物为根瘤菌提供能量,进行共生固氮。紫花苜蓿根瘤发育过程中,基于胞间连丝的共质体物质运输变得活跃(Complainville et al., 2003)。此外,蔗糖合酶也是根瘤高效固氮的必备条件(Baier et al., 2007; Horst et al., 2007)。研究表明,根瘤菌在宿主根瘤细胞中以二羧酸盐为主要碳源,为固氮提供所需能量(Mitsch et al., 2018)。但截至目前,相应的二羧酸盐转运载体尚未被发现。未来如能在这方面取得突破,将为培育品质更高的饲草新品种提供重要途径。

### 2.3 碳氮高效转运和氮素整合进入光合器官

碳氮化合物在源库器官之间的高效运输与分配伴随着能量传递与养分循环,是影响饲草产量与品质的重要因素。饲草碳运输是指其初级生产力以碳的形式向各器官运输,用于产物合成和呼吸作用,其可利用量主要由光合作用决定。碳运输调节机制的影响因素较为复杂,既受生理与环境因素的影响,又与植物自身的碳储存策略相关(Taiz et al., 2014)。目前,植物的碳平衡有3个著名的假说:功能平衡假说(functional equilibrium hypothesis)、源库关系假说(source-sink relationship hypothesis)和相关生长关系假说(allometric relationship hypothesis)。功能平衡假说推测植物在外界环境的影响下,通过自身调节改变碳同化量的运输与分配。例如,当根系缺少水分和养分时,光合产物会优先向下运输分配,而当光强减少或叶片组织受损时,会更多地向地上部运输。研究表明,草地生态系统中大气CO<sub>2</sub>含量增加导致碳分配更多地向地下运输(Ge et al., 2012)。源库关系假说认为同化物的分配运输遵循源、库、流三者动态平衡规律,还解析了器官功能转变影响同化物运输的机理。研究表明,当环境条件发生改变,源叶的同化物输出速度与库叶的同化物输入速度同时减缓时,土壤中的物质循环也发生改变(Ruehr et al., 2009)。相关生长关系假说可以很好地区分外界环境因子与个体发育对光合产物分配的影响,但其受到多种生态类型的制约(韩文轩和方精云, 2008)。也有研究证明,草原生态系统中可以由个体地上部-地下部关系推导各群落水平的关系(Yang et al., 2009)。

植物中的氮转运分为无机氮转运和有机氮转运,大量转运蛋白参与其中(图3)(Xu et al., 2012)。目前,

研究较深入的是硝酸盐转运蛋白NRT (nitrate transporter)和PTR (peptide transporter)家族(NPF)。为了适应土壤中的氮素含量变化,植物进化出硝态氮高亲和和运输效率系统与低亲和和运输效率系统。研究表明,拟南芥NRT1.7介导的硝酸盐源-库再利用对维持植物生长有重要意义,其启动子驱动MC4N转运蛋白的表达可以激活植物体内硝酸盐的再利用,促进生殖时期的源-库氮转运效率,同样的处理在水稻和烟草中也得到了相似的结果(Chen et al., 2020)。双子叶植物和饲草的NRT2基因在其系统发生树中存在明显的分离。这表明饲草NRT2基因的功能可能与拟南芥同源基因功能存在差异,有必要进一步确认饲草NRT2基因的功能(Plett et al., 2010)。另有研究发现,与拟南芥AtNPF6.3同源的离子转运蛋白MtNPF6.5在根系运输氯离子中起作用,其同源蛋白MtNPF6.7具有

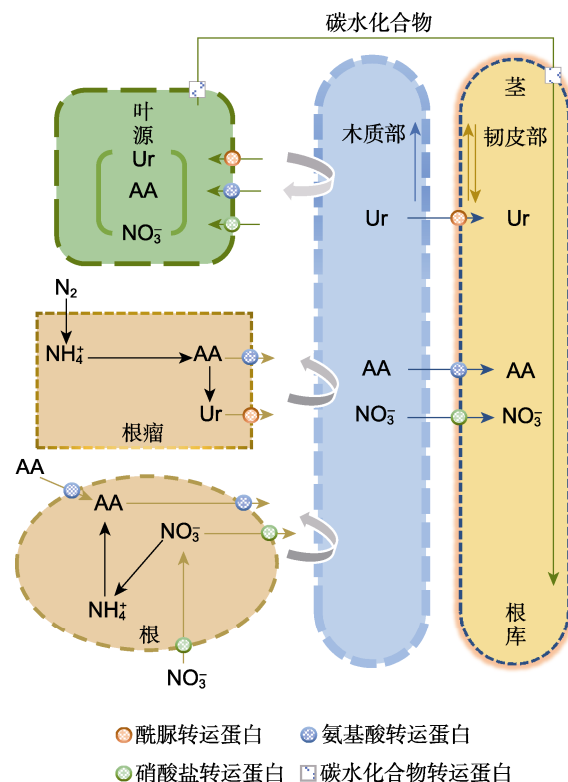


图3 氮素从根到叶的吸收分配及碳水化合物从源到库的转运体示意图

Ur: 酰脲; AA: 氨基酸; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 硝酸盐; N<sub>2</sub>: 氮气; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: 铵盐

Figure 3 Schematic diagram of transporters for nitrogen uptake and transport from roots to leaves and transport of carbohydrates from source to sink

Ur: Ureides; AA: Amino acids; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrate; N<sub>2</sub>: Nitrogen; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Ammonium

$\text{NO}_3^-$ 选择性。当环境缺少 $\text{NO}_3^-$ 时,通过MtNPF6.5进行氯离子转运;而当 $\text{NO}_3^-$ 含量恢复正常时,转录因子MtNLP1诱导MtNPF6.7表达,从而快速将吸收氯离子转变为吸收 $\text{NO}_3^-$ (Xiao et al., 2021)。在蒺藜苜蓿根瘤维管组织传递细胞中特异表达的硝酸盐转运体MtNPF7.6可根据体外硝酸盐浓度调节根瘤发育,以避免与宿主竞争氮源,从而促进硝酸盐的吸收(Wang et al., 2020)。

苜蓿中43%–64%的氮通过生物固氮获得(Heichel et al., 1981)。它们以酰胺类化合物或脲类化合物的形式被运输到地上部,再通过氨基转移反应将氮素用于氨基酸合成。根瘤固定的氮素被及时高效地转出利用,有利于进一步提高固氮效率,促进地上部的营养生长,进而提高产量(Carter and Tegeder, 2016)。酰胺从地下部到地上部的转运中,共质体途径被凯氏带(Casparian strip)阻断,因此需要质膜定位的酰胺透性酶(ureide permeases, UPS)介导酰胺的转运(Pélissier et al., 2004; Collier and Tegeder, 2012)。Pélissier等(2004)从菜豆根瘤中分离获得了一种假定的尿囊素转运体(PvUPS1),在根瘤维管系统的内皮层和韧皮部富集表达并发挥作用:(1) 装载酰胺进入共质体通路使其顺利通过凯氏带;(2) 将酰胺输入木质部薄壁细胞;(3) 在韧皮部装载酰胺;(4) 将酰胺从韧皮部转入外质体;(5) 将酰胺从木质部转移到韧皮部。在大豆根瘤中下调GmUPS1-1和GmUPS1-2的表达导致根瘤发育、固氮效率和根瘤代谢均受到负面影响(Collier and Tegeder, 2012)。而在大豆中过量表达PvUPS1可使氮素从根瘤到茎部的转运量显著增加,固氮效率和产量也得到大幅提升(Carter and Tegeder, 2016)。

从群体水平而言,氮素在不同冠层中的分配格局主要由消光系数和游离氮总量决定。在快速生长期,冠层顶部需要氮素的高效运输以供给光合蛋白,从而获得更多的光合产物,下层的氮素则随着生长中心的移动逐渐向上层转移(Anten et al., 1995)。此外,环境因素也会对碳氮运输和分配产生影响。高浓度 $\text{CO}_2$ 一方面可以加快源叶的碳固定速度、库叶碳输入量以及衰老叶片碳输出;另一方面使根系吸收的氮素存留更长时间,增加库叶的氮素输入量(宗毓铮, 2013)。

光合作用产生的碳骨架为将无机氮同化为氨基酸所必需(Lam et al., 1996)。氮素作为叶绿素、光合

电子传递及碳同化过程中各种酶的基本成分,对光合作用产生最直接且显著的影响。光合作用需要大量的氮,在 $\text{C}_3$ 植物叶肉细胞中与光合直接相关的氮素分配占整个细胞的54%(Evans and Clarke, 2019)。因此,氮素的同化利用在光合器官中尤为重要。在氮素同化过程中,硝酸还原酶、亚硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶起重要作用(武维华, 2003)。在苜蓿中过量表达大豆胞质谷氨酰胺合成酶GS1可使转基因植株的净光合速率和生物量得到显著提升(Seger et al., 2009)。这说明提高光合器官中的氮素同化效率同样有助于提升饲草的产量和品质。但目前针对饲草中氮素整合进入光合器官的研究较少,有待进一步加强。

### 3 研究展望

随着生活水平的提高,人们日常膳食结构发生明显变化,表现为主粮(口粮)消费减少,而对高蛋白和高营养肉蛋奶的需求持续增加。这使国家粮食安全态势发生变化,由单一的主粮安全转变为主粮与饲料粮安全并重。对粮食作物而言,生物量转变为籽粒的产量需要经历复杂的生物学过程,高生物量不等同于高产。然而,与粮食作物不同,饲草作物几乎全株可用,其生物量即为产量。植物地上部叶片的光合作用与地下部根系的养分吸收是植物生物量形成的物质基础,因此,提高光合作用效率和固氮效率将直接体现在饲草生物量上,是提高饲草产量的重要途径之一。

我国饲草基础生物学研究起步晚,远远滞后于农作物研究。但随着国家的重视和经费投入的增多,预期饲草光合作用与氮素利用的基础生物学研究将得到进一步加强,包括测定不同饲草作物对光能的吸收、传递和转化效率;探明不同生境条件下光能利用效率和光保护机制;解析 $\text{C}_3$ 和 $\text{C}_4$ 饲草的 $\text{CO}_2$ 固定机理及其遗传调控规律;揭示不同饲草的根系构型和养分吸收、转运和利用效率;阐明豆科饲草的固氮效率和调控机制等。通过上述研究,从光能转化、电子传递、光呼吸、碳固定、氮固定及其与环境适应等过程中寻找主要限制因子,挖掘光能高效利用与 $\text{CO}_2$ 和氮素高效固定及多分蘖/分枝等高生物量的分子元件和基因组模块,解析分子调控网络,发掘优异自然变异种质,开发元件并设计优异分子模块新资源。在此基

基础上构建饲草高光效、高固碳及高固氮分子育种理论体系,通过基因编辑、合成生物学和定向进化等现代生物技术手段,优化、改造光合作用和氮素利用的重要调控因子,提高个体和群体光能利用效率,培育碳氮高效固定的新型饲草作物。优化碳氮耦合效率,实现饲草体内各组织器官在时间和空间上的有效适配。同时,从藻类和其它植物中挖掘提高光能利用效率、CO<sub>2</sub>浓缩效率以及氮素固定效率的关键因子,应用于饲草分子设计和遗传改良,进而提高饲草的生物量和产量。

## 参考文献

- 丁莉,钟泽璞,李世仪,张崇浩,白克智,匡廷云 (1996). CO<sub>2</sub>倍增对紫花苜蓿碳、氮同化与分配的影响. 植物学报 **38**, 83–86.
- 范润钧,邓波,陈本建,柴小琴,张蕴薇 (2010). 航天搭载紫花苜蓿连续后代变异株系选育. 山西农业科学 **38**, 7–9, 64.
- 冯银平,沈海花,罗永开,徐龙超,刘上石,朱言坤,赵梦颖,邢爱军,方精云 (2020). 种植密度对苜蓿生长及生物量的影响. 植物生态学报 **44**, 248–256.
- 高永勇 (2018). 共转化光呼吸支路基因的转基因牧草研究. 硕士论文. 广州: 华南农业大学. pp. 1–57.
- 郭孝,刘太宇 (2005). 优良牧草与花生间作套种的研究. 中国农学通报 **21**, 149–152, 229.
- 韩文轩,方精云 (2008). 植物种群的自然稀疏规律—— $-3/2$  还是 $-4/3$ ? 北京大学学报(自然科学版) **44**, 661–668.
- 何树斌 (2012). 不同氮素和水分供应下紫花苜蓿碳同化和C/N响应机制研究. 博士论文. 兰州: 兰州大学. pp. 1–95.
- 洪绶曾 (2009). 苜蓿科学. 北京: 中国农业出版社. pp. 13–28.
- 金宝花 (2019). 拟南芥高光效基因*AtNRPC1*的生物学功能研究. 硕士论文. 金华: 浙江师范大学. pp. 1–79.
- 雷明月,许为钢,李小博,张庆琛,王会伟,张磊,方宇辉,李艳,李春鑫 (2017). 玉米C<sub>4</sub>光合酶基因导入对拟南芥光合特性及抗旱性的影响. 麦类作物学报 **37**, 108–115.
- 李霞,焦德茂,戴传超,王守海,吴爽,李成荃 (2001). 转育PEPC基因的杂交水稻的光合生理特性. 作物学报 **27**, 137–143.
- 李小博,许为钢,雷明月,张庆琛,王会伟,李艳,华夏,高崇 (2017). 转玉米C<sub>4</sub>光合途径*pepc*、*ppdk*、*nadp-me*基因拟南芥光合特性对强光胁迫的反应. 分子植物育种 **15**, 911–919.
- 李玉帅 (2021). 玉米PEPC基因在烟草和紫花苜蓿中的表达分析. 硕士论文. 新乡: 河南科技学院. pp. 1–105.
- 蒯芳,刘晓静,童长春,吴勇 (2019). 间作对不同类型饲料作物光能利用特征及生产能力的影响. 应用生态学报 **30**, 3452–3462.
- 卢发光,顾立峰,刘昱茜,任桢,施雨,徐振然,周桂生,卢海潼,王小山,张网定,任志强,朱广龙 (2021). 种植密度和施氮量互作对盐碱地紫花苜蓿生长性能和生理特性的影响. 草业科学 **38**, 1570–1578.
- 卢嘉锡,蔡启瑞,万惠霖,陈华癸,沈善炯,李季伦 (2000). 生物固氮: 全球的挑战和未来的需要. 科学新闻 (39), 6.
- 吴梅 (2011). C<sub>4</sub>型PEPC基因导入油菜的研究. 硕士论文. 合肥: 安徽农业大学. pp. 1–44.
- 武维华 (2003). 植物生理学. 北京: 科学出版社. pp. 105–111.
- 张亮,张红香,周道玮 (2018). 中国与国外饲草育种研究现状分析. 土壤与作物 **7**, 324–330.
- 张艳,满为群,南相日,李柱刚 (2015). 高粱C<sub>4</sub>型*pepc*基因转入大豆可改善大豆光合特性. 分子植物育种 **13**, 294–300.
- 周倩 (2020). *AtNRPCs*基因调控拟南芥光合效能及紫花苜蓿*MsNRPCs*的利用研究. 硕士论文. 金华: 浙江师范大学. pp. 1–71.
- 宗毓铮 (2013). 大气二氧化碳浓度升高对玉米幼苗碳氮资源分配的影响. 博士论文. 咸阳: 中国科学院研究生院(教育部水土保持与生态环境研究中心). pp. 1–93.
- Anten NPR, Schieving F, Werger MJA (1995). Patterns of light and nitrogen distribution in relation to whole canopy carbon gain in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> mono- and dicotyledonous species. *Oecologia* **101**, 504–513.
- Atkins CA, Smith PMC (2007). Translocation in legumes: assimilates, nutrients, and signaling molecules. *Plant Physiol* **144**, 550–561.
- Ayre BG (2011). Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. *Mol Plant* **4**, 377–394.
- Baier MC, Barsch A, Küster H, Hohnjec N (2007). Anti-sense repression of the *Medicago truncatula* nodule-enhanced sucrose synthase leads to a handicapped nitrogen fixation mirrored by specific alterations in the symbiotic transcriptome and metabolome. *Plant Physiol* **145**, 1600–1618.
- Benedito VA, Li HQ, Dai XB, Wandrey M, He J, Kaundal R, Torres-Jerez I, Gomez SK, Harrison MJ, Tang YH, Zhao PX, Udvardi MK (2010). Genomic inventory and transcriptional analysis of *Medicago truncatula* transporters. *Plant Physiol* **152**, 1716–1730.
- Brown SM, Oparka KJ, Sprent JI, Walsh KB (1995).

- Symplastic transport in soybean root nodules. *Soil Biol Biochem* **27**, 387–399.
- Carter AM, Tegeder M** (2016). Increasing nitrogen fixation and seed development in soybean requires complex adjustments of nodule nitrogen metabolism and partitioning processes. *Curr Biol* **26**, 2044–2051.
- Chen KE, Chen HY, Tseng CS, Tsay YF** (2020). Improving nitrogen use efficiency by manipulating nitrate remobilization in plants. *Nat Plants* **6**, 1126–1135.
- Collier R, Tegeder M** (2012). Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. *Plant J* **72**, 355–367.
- Complainville A, Brocard L, Roberts I, Dax E, Sever N, Sauer N, Kondorosi A, Wolf S, Oparka K, Crespi M** (2003). Nodule initiation involves the creation of a new symplasmic field in specific root cells of *Medicago* species. *Plant Cell* **15**, 2778–2791.
- Dalal J, Lopez H, Vasani NB, Hu ZH, Swift JE, Yalamanchili R, Dvora M, Lin XL, Xie DY, Qu RD, Sederoff HW** (2015). A photorespiratory bypass increases plant growth and seed yield in biofuel crop *Camelina sativa*. *Biotechnol Biofuels* **8**, 175.
- Evans JR, Clarke V** (2019). The nitrogen cost of photosynthesis. *J Exp Bot* **70**, 7–15.
- Fukayama H, Hatch MD, Tamai T, Tsuchida H, Sudoh S, Furbank RT, Miyao M** (2003). Activity regulation and physiological impacts of maize C<sub>4</sub>-specific phosphoenolpyruvate carboxylase overproduced in transgenic rice plants. *Photosynth Res* **77**, 227–239.
- Ge ZM, Zhou X, Kellomäki S, Biasi C, Wang KY, Peltola H, Martikainen PJ** (2012). Carbon assimilation and allocation (<sup>13</sup>C labeling) in a boreal perennial grass (*Phalaris arundinacea*) subjected to elevated temperature and CO<sub>2</sub> through a growing season. *Environ Exp Bot* **75**, 150–158.
- Gebriil S, Seger M, Villanueva FM, Ortega JL, Bagga S, Sengupta-Gopalan C** (2015). Transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) with increased sucrose phosphate synthase activity shows enhanced growth when grown under N<sub>2</sub>-fixing conditions. *Planta* **242**, 1009–1024.
- Hagemann M, Bauwe H** (2016). Photorespiration and the potential to improve photosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* **35**, 109–116.
- Häusler RE, Hirsch HJ, Kreuzaler F, Peterhänsel C** (2002). Overexpression of C<sub>4</sub>-cycle enzymes in transgenic C<sub>3</sub> plants: a biotechnological approach to improve C<sub>3</sub>-photosynthesis. *J Exp Bot* **53**, 591–607.
- Häusler RE, Rademacher T, Li J, Lipka V, Fischer KL, Schubert S, Kreuzaler F, Hirsch HJ** (2001). Single and double overexpression of C<sub>4</sub>-cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants. *J Exp Bot* **52**, 1785–1803.
- Heichel GH, Barnes DK, Vance CP** (1981). Nitrogen fixation of alfalfa in the seeding year. *Crop Sci* **21**, 330–335.
- Horst I, Welham T, Kelly S, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Parniske M, Wang TL** (2007). TILLING mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. *Plant Physiol* **144**, 806–820.
- Ji BH, Zhu SQ, Jiao DM** (2004). A limited photosynthetic C<sub>4</sub>-microcycle and its physiological function in transgenic rice plant expressing the maize PEPC gene. *Acta Bot Sin* **46**, 542–551.
- Kebeish R, Niessen M, Thiruveedhi K, Bari R, Hirsch HJ, Rosenkranz R, Stäbler N, Schönfeld B, Kreuzaler F, Peterhänsel C** (2007). Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* **25**, 593–599.
- Ladha JK, Peoples MB, Reddy PM, Biswas JC, Bennett A, Jat ML, Krupnik TJ** (2022). Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. *Field Crop Res* **283**, 108541.
- Lalonde S, Wipf D, Frommer WB** (2004). Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 341–372.
- Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM** (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**, 569–593.
- Long SP, Marshall-Colon A, Zhu XG** (2015). Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell* **161**, 56–66.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A** (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot* **105**, 1141–1157.
- Minogue CE, Marx H, Jayaraman D, Richards AL, Kwiecien NW, Sihapirani AF, Rajasekar S, Maeda J, Garcia K, Del Valle-Echevarria AR, Volkening J, Westphall MS, Roy S, Sussman MR, Ané JM, Coon JJ** (2016). A proteomic atlas of the legume, *M. truncatula*, and its nitrogen fixing endosymbiont, *S. meliloti*. *Nat*



- Biotechnol* **34**, 1198–1205.
- Mitsch MJ, diCenzo GC, Cowie A, Finan TM** (2018). Succinate transport is not essential for symbiotic nitrogen fixation by *Sinorhizobium meliloti* or *Rhizobium leguminosarum*. *Appl Environ Microbiol* **84**, e01561-17.
- Nag P, Shriti S, Das S** (2020). Microbiological strategies for enhancing biological nitrogen fixation in nonlegumes. *J Appl Microbiol* **129**, 186–198.
- Nölke G, Houdelet M, Kreuzaler F, Peterhänsel C, Schillberg S** (2014). The expression of a recombinant glycolate dehydrogenase polyprotein in potato (*Solanum tuberosum*) plastids strongly enhances photosynthesis and tuber yield. *Plant Biotechnol J* **12**, 734–742.
- Oldroyd GED, Downie JA** (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 519–546.
- Ort DR, Merchant SS, Alric J, Barkan A, Blankenship RE, Bock R, Croce R, Hanson MR, Hibberd JM, Long SP, Moore TA, Moroney J, Niyogi KK, Parry MAJ, Peralta-Yahya PP, Prince RC, Redding KE, Spalding MH, van Wijk KJ, Vermaas WFJ, von Caemmerer S, Weber APM, Yeates TO, Yuan JS, Zhu XG** (2015). Redesigning photosynthesis to sustainably meet global food and bio-energy demand. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 8529–8536.
- Pélissier HC, Frerich A, Desimone M, Schumacher K, Tegeder M** (2004). PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of French bean. *Plant Physiol* **134**, 664–675.
- Plett D, Toubia J, Garnett T, Tester M, Kaiser BN, Bau-mann U** (2010). Dichotomy in the *NRT* gene families of dicots and grass species. *PLoS One* **5**, e15289.
- Qin N, Xu WG, Hu L, Li Y, Wang HW, Qi XL, Fang YH, Hua X** (2016). Drought tolerance and proteomics studies of transgenic wheat containing the maize C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) gene. *Protoplasma* **253**, 1503–1512.
- Raines CA** (2006). Transgenic approaches to manipulate the environmental responses of the C<sub>3</sub> carbon fixation cycle. *Plant Cell Environ* **29**, 331–339.
- Roy S, Liu W, Nandety RS, Crook A, Mysore KS, Pislariu CI, Frugoli J, Dickstein R, Udvardi MK** (2020). Celebrating 20 years of genetic discoveries in legume nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **32**, 15–41.
- Ruehr NK, Offermann CA, Gessler A, Winkler JB, Ferrio JP, Buchmann N, Barnard RL** (2009). Drought effects on allocation of recent carbon: from beech leaves to soil CO<sub>2</sub> efflux. *New Phytol* **184**, 950–961.
- Seeger M, Ortega JL, Bagga S, Gopalan CS** (2009). Re-percussion of mesophyll-specific overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene in alfalfa (*Medicago sativa* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Sci* **176**, 119–129.
- Shen BR, Wang LM, Lin XL, Yao Z, Xu HW, Zhu CH, Teng HY, Cui LL, Liu EE, Zhang JJ, He ZH, Peng XX** (2019). Engineering a new chloroplastic photorespiratory bypass to increase photosynthetic efficiency and productivity in rice. *Mol Plant* **12**, 199–214.
- Singer SD, Hannoufa A, Acharya S** (2018). Molecular improvement of alfalfa for enhanced productivity and adaptability in a changing environment. *Plant Cell Environ* **41**, 1955–1971.
- Smith PMC, Atkins CA** (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol* **128**, 793–802.
- Smith PMC, Winter H, Storer PJ, Bussell JD, Schuller KA, Atkins CA** (2002). Effect of short-term N<sub>2</sub> deficiency on expression of the ureide pathway in cowpea root nodules. *Plant Physiol* **129**, 1216–1221.
- South PF, Cavanagh AP, Liu HW, Ort DR** (2019). Synthetic glycolate metabolism pathways stimulate crop growth and productivity in the field. *Science* **363**, eaat9077.
- Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A** (2014). *Plant Physiology and Development*, 6th edn. Sunderland: Sinauer Associates Incorporated. pp. 1–888.
- Takeuchi Y, Akagi H, Kamasawa N, Osumi M, Honda H** (2000). Aberrant chloroplasts in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme. *Planta* **211**, 265–274.
- Todd CD, Tipton PA, Blevins DG, Piedras P, Pineda M, Polacco JC** (2006). Update on ureide degradation in legumes. *J Exp Bot* **57**, 5–12.
- Udvardi M, Poole PS** (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 781–805.
- Walker BJ, Van Loocke A, Bernacchi CJ, Ort DR** (2016). The costs of photorespiration to food production now and in the future. *Annu Rev Plant Biol* **67**, 107–129.
- Wang Q, Huang YG, Ren ZJ, Zhang XX, Ren J, Su JQ, Zhang C, Tian J, Yu YJ, Gao GF, Li LG, Kong ZS** (2020). Transfer cells mediate nitrate uptake to control root nodule symbiosis. *Nat Plants* **6**, 800–808.
- Werner AK, Witte CP** (2011). The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. *Trends Plant Sci* **16**, 381–387.

- Xiao QY, Chen Y, Liu CW, Robson F, Roy S, Cheng XF, Wen JQ, Mysore K, Miller AJ, Murray JD (2021). Mt-NPF6.5 mediates chloride uptake and nitrate preference in *Medicago* roots. *EMBO J* **40**, e106847.
- Xu GH, Fan XR, Miller AJ (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 153–182.
- Yadav S, Mishra A (2020). Ectopic expression of  $C_4$  photosynthetic pathway genes improves carbon assimilation and alleviate stress tolerance for future climate change. *Physiol Mol Biol Plants* **26**, 195–209.
- Yang YH, Fang JY, Ji CJ, Han WX (2009). Above- and belowground biomass allocation in Tibetan grasslands. *J Veg Sci* **20**, 177–184.
- Zhu XG, Long SP, Ort DR (2010). Improving photosynthetic efficiency for greater yield. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 235–261.

## Research Progress in Efficient Fixation, Transport, Assimilation of Carbon and Nitrogen in Legume Forages

Zhaosheng Kong<sup>1,2</sup>, Wenqiang Yang<sup>2,3,4\*</sup>, Baichen Wang<sup>2,3,4</sup>, Rongcheng Lin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup>Innovative Academy of Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; <sup>3</sup>Key Laboratory of Photobiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; <sup>4</sup>College of Advanced Agricultural Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract** In China, the demand for high-quality forage is continuously increasing. Improving the yield and quality of various forages, especially alfalfa (*Medicago sativa*), has been an important scientific and economic goal for plant breeders. Fixation of carbon dioxide by photosynthesis is the basis for the formation of forage biomass. Nitrogen absorption, fixation, transport and assimilation are important biological processes that affect the crude protein content of forage and determine its quality. Both biological processes are interdependent to each other. Therefore, we propose the new breeding ideas for efficient fixation, transport and assimilation of carbon and nitrogen in alfalfa, and summarize the latest progress in efficient fixation and transport of carbon dioxide, nitrogen fixation and absorption, as well as nitrogen transport and assimilation in recent years, so as to shed some light on molecular design breeding for forage with high biomass and high protein content in the future.

**Key words** legume forage, carbon fixation and photosynthesis, nitrogen uptake and assimilation, carbon and nitrogen transportation, nitrogen fixation

Kong ZS, Yang WQ, Wang BC, Lin RC (2022). Research progress in efficient fixation, transport, assimilation of carbon and nitrogen in legume forages. *Chin Bull Bot* **57**, 764–773.

\* Author for correspondence. E-mail: wqyang@ibcas.ac.cn

(责任编辑: 白羽红)