



C₃和C₄植物的氮素利用机制

张璐^{1,2}, 何新华^{2,3*}

¹山西省农业科学院玉米研究所, 忻州 034000; ²西南大学资源环境学院, 重庆 400716; ³西澳大利亚大学植物生物学院, 珀斯 6009

摘要 提高植物的氮素利用效率(NUE)不仅有利于保障全球粮食安全, 也是实现农业可持续发展的重要途径。近半个世纪以来, 植物氮素利用机理研究已取得重要进展, 但NUE的调控机制仍不明确, NUE的提高仍然十分有限。高等植物集光合碳素同化和氮素同化于一体, 只有碳氮代谢相互协调, 才能维持植物体内的碳氮平衡, 保证植物正常生长发育。由于C₃和C₄植物的光合氮素利用率(PNUE)存在差异, 对氮素的利用效率也会存在差异。为了更有效地提高作物的NUE, 须更全面地了解C₃和C₄植物对氮素吸收、转运、同化和信号转导等关键因子的功能和调控机制。此外, 面对大气CO₂浓度增高和全球气候变暖条件下的植物碳氮同化及其机理的研究也不容忽视。该文综述了C₃和C₄植物氮素利用关键因子的差异及其调控机制, 并对提高C₃禾本科作物氮素利用效率的遗传改良途径进行了展望。

关键词 光合作用, 氮素代谢, 氮素利用效率, 调控机制, 遗传改良

张璐, 何新华 (2020). C₃和C₄植物的氮素利用机制. 植物学报 55, 228–239.

氮素是维持植物生长发育最主要的元素之一, 提高作物的氮素利用效率(nitrogen use efficiency, NUE)是保障粮食安全, 实现“资源节约和环境友好”的重要途径(徐晓鹏等, 2016)。根据叶片解剖结构、植物碳代谢方式以及生物化学代谢差异, Brown (1978)提出C₄比C₃植物氮素利用效率高的假说。20世纪80–90年代在室内人工控制条件下佐证了这一假说的正确性(Sage and Pearcy, 1987; Oaks, 1994; He et al., 1994; 何新华等, 1995)。除氮素利用效率在碳代谢上的差异外, NUE差异的关键在于氮代谢特征, 即氮素还原、同化酶类在细胞内发挥功能的位置以及对氮素吸收、还原、同化的机制不同。何新华等(1995)认为, C₃和C₄植物氮素利用效率差异由特殊基因控制, 是长期进化的结果。然而, 目前对C₃和C₄植物氮素利用效率差异机制的进展尚未见系统梳理。本文综述C₃和C₄植物对氮素利用效率的差异机制、成因及C₃作物氮素利用效率遗传改良技术, 旨在为合理利用氮素, 减少农业面源污染提供科学依据。

1 C₃和C₄植物氮素同化酶类的空间差异

C₄植物氮素还原同化酶的空间协同效应是C₄比C₃植

物氮素利用效率高的主要原因(图1A, B)。C₄植物在结构上区别于C₃植物的典型特征是拥有Kranz结构的维管束鞘细胞(巩玥等, 2014)。C₄植物既可以在叶肉细胞, 也可在维管束鞘细胞进行NH₄⁺的同化, 合成氨基酸和蛋白质(何新华等, 1995); 而C₃植物氮素还原只在叶肉细胞进行, 导致其NUE低。采用蛋白质组学研究玉米(*Zea mays*)叶肉细胞和维管束鞘细胞叶绿体(膜)上蛋白质表达差异, 结果表明, 在C₄植物中氮同化(如氨基酸合成)在叶肉和维管束鞘细胞之间是被分隔开的(Majeran and Wijk, 2009), 与氮吸收相关酶类主要存在于叶肉细胞的叶绿体中, 而淀粉合成相关酶类主要存在于维管束鞘细胞的叶绿体中(Majeran et al., 2005; Suzuki et al., 2007)。

在细胞解剖结构上, C₄植物叶脉间距普遍小于C₃植物, 叶脉密度高, 两叶脉间的叶肉细胞层数也较少(Langdale, 2011; Nelson, 2011)。C₄植物叶肉细胞延迟分化在叶片解剖结构和转录组中都很明显, 这与光合基因延迟表达、叶绿体的增殖和发育周期基因的表达差异有关。延迟分化的叶肉细胞能促进叶脉组织形成, 从而增加C₄植物的叶脉密度。叶肉和叶绿体分化延迟可能是构成型光形态发生COP9 (CONSTITU-

收稿日期: 2019-06-24; 接受日期: 2019-12-29

基金项目: 国家重点研发计划(No.2016YFD0200104)、国家自然科学基金(No.4111800096)、西南大学生物学研究中心“国家生物学双一流学科”建设和植物资源保护与种质创新重庆市重点实验室课题

* 通讯作者。E-mail: hexinhua@swu.edu.cn; xinhua.he@uwa.edu.au

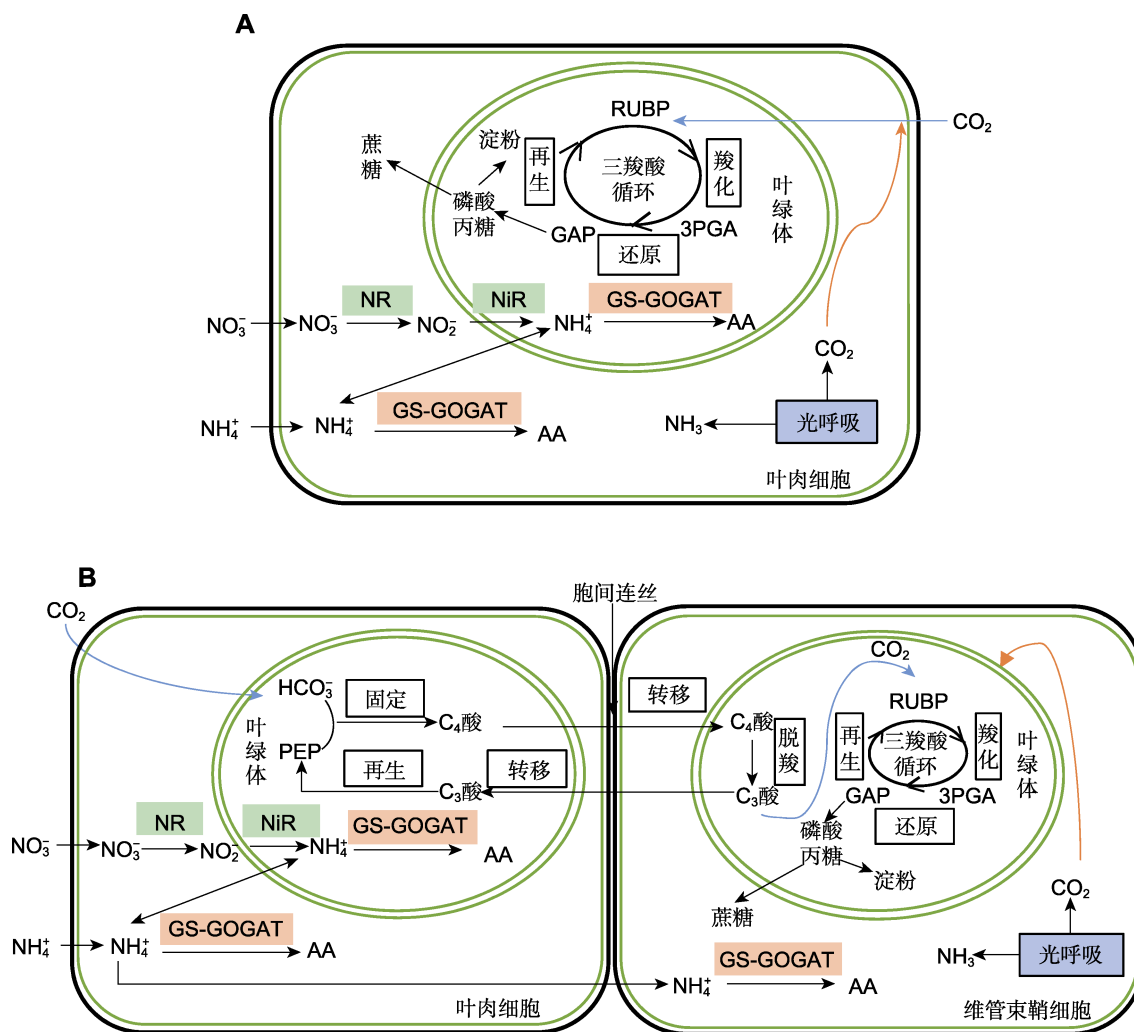


图1 C₃和C₄植物叶片碳同化和氮同化示意图

(A) C₃植物叶片碳同化和氮同化; (B) C₄植物叶片碳同化和氮同化。AA: 氨基酸; 3PGA: 3-磷酸甘油酸; GAP: 3-磷酸甘油醛; GS: 谷氨酰胺合成酶; GOGAT: 谷氨酸合成酶; NiR: 亚硝酸还原酶; NR: 硝酸还原酶; PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸; RUBP: 1,5-二磷酸核酮糖

Figure 1 A schematic graph of carbon and nitrogen assimilation in C₃ and C₄ plant leaves

(A) Carbon and nitrogen assimilation in leaves of C₃ plants; (B) Carbon and nitrogen assimilation in leaves of C₄ plants. AA: Amino acid; 3PGA: 3-phosphoglyceric acid; GAP: 3-phosphoglyceric aldehyde; GS: Glutamine synthetase; GOGAT: Glutamate synthase; NiR: Nitrite reductase; NR: Nitrate reductase; PEP: Phosphoenolpyruvic acid; RUBP: Ribulose-1,5-disphosphate

TIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9)信号受体表达延长的结果,从而延缓强光对植物形态建成的抑制效应(Külahoglu et al., 2014)。

随着人们对光合途径认识的不断深入,对C₃与C₄植物光合类型划分界限也越来越不明显。C₄途径的关键酶包括磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCase)、丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate orthophosphate dikinase, PDK)、NAD(P)-苹果酸酶(NAD(P) malic enzyme, NAD(P)-ME)、

NAD(P)-苹果酸脱氢酶(NAD(P)-malic dehydrogenase, NAD(P)-MDH)及碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)等。研究表明,C₄循环中所有酶促反应都存在于C₃植物中(Aubry et al., 2011),并且C₄循环酶的大部分基因能够在C₃叶片中表达(Christin et al., 2013; Bräutigam et al., 2014)。C₄光合作用中有3种类型的C₄酸脱羧酶,即需NADP的苹果酸酶(NADP-ME)、需NAD的苹果酸酶(NAD-ME)和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PE-

PCK) (Furbank, 2011)。

研究发现, 在没有Kranz结构的水生植物和2种藜科植物(*Binertia cycloptera*和*Suaeda glauca*)的叶肉细胞内进行C₄光合作用, 使这种C₃植物的C₃和C₄途径在同一细胞的微循环中实现, 即在同一细胞内利用细胞器和酶的严格分隔来有效模拟Kranz结构的空问分离, 发现PEPCase和Rubisco分别位于叶肉细胞的细胞质和叶绿体中(Voznesenskaya et al., 2002; Bowes, 2010)。与C₄植物相同, 在C₃植物所固定的CO₂中, 一部分是大气中的CO₂, 另一部分是PEPCase重新固定了呼吸作用释放的CO₂。例如, 小麦(*Triticum aestivum*)和水稻(*Oryza sativa*)光呼吸过程产生的CO₂约有10%被再固定重新利用(Busch et al., 2013)。罗璇等(2014)以4个小麦品种(C₃)和4个谷子(*Setaria italica*) (C₄)品种为材料, 比较其不同生育时期叶片的光合效率, 以及其叶片中C₄光合途径关键酶(MDH、NADP-ME、PEPC和PPDK)活性的差异, 结果表明, 在小麦和谷子的不同发育时期叶片中均可检测到PEPCase、PPDK、NAD(P)-ME和NAD(P)-MDH的活性, 且其酶活性与净光合速率变化趋势一致; 小麦的NADP-ME和PPDK活性、谷子的MDH、PEPC和PPDK活性各自与其净光合速率呈显著正相关。然而, C₄途径酶活性在植物不同器官间有较大差异。例如, 小麦叶片C₄途径酶活性相对较弱, 而穗中C₄途径酶PEPCase、NAD(P)-ME和NAD(P)-MDH的活性明显高于旗叶, 麦穗可将呼吸释放的CO₂重新固定(魏爱丽等, 2003)。由于酶是由活细胞产生并对其底物具有高度特异性和高度催化效能的含氮蛋白质, 上述光合CO₂同化关键酶类的空问差异, 与NO₃⁻还原同化和NH₄⁺同化相关酶类以及氨基酸和蛋白质合成相偶联, 从而造成C₃和C₄植物氮素同化酶类的分布和功能存在空问差异(图1A, B)。

2 C₃和C₄植物氮素吸收营养机制

C₄植物光合作用机制是被子植物长期适应环境进化而成(Sage et al., 2011)。与C₃光合机理相比, C₄光合作用进化出了复杂的叶片结构和生化适应机制(Christin and Osborne, 2014)。近7 500种C₄植物隶属于62个不同进化区系(Sage et al., 2011), 虽然C₄植物在数量上只占陆地植物的3%, 却完成了陆生植物

25%的光合作用(Edwards et al., 2010)。C₄植物光合优势在于其气孔数量多, CO₂补偿点低, 高温或高光照条件下较低的光呼吸(Li et al., 1999)以及高氮素利用效率(Brown, 1978; Sage and Percy, 1987; Oaks 1994; 何新华等, 1995)。例如, 莎草属(*Cyperus*)植物高NUE的原因在于其高效率的Rubisco光合酶(Sage et al., 1999)。C₄植物总Rubisco基因表达较C₃植物大幅下调, 导致Rubisco蛋白及Calvin-Benson循环酶含量减少(不包括将3-PGA还原为磷酸丙糖酶) (Wessinger et al., 1989)。

与C₃植物相比, C₄植物蛋白质合成相关基因的表达也相应较低(Bräutigam et al., 2011, 2014; Gowik et al., 2011)。Bräutigam和Gowik (2016)认为, 基因表达量降低和叶片蛋白质含量减少使一些C₄植物具有更高的氮素利用效率, 其原因是Rubisco在光合作用和氮素利用与平衡方面发挥重要作用(Spreitzer and Salvucci, 2002; Nowicka et al., 2018)。其一, 核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)的氧化反应生成3-磷酸甘油酸(3-PGA)和2-磷酸甘油酸(2-PG), 光呼吸将2个2-PGA分子循环为1个3-PGA分子, 因此有25%的有机碳以CO₂的形式流失(Sage et al., 2012; Betti et al., 2016; Hagemann and Bauwe, 2016)。在主要C₃作物(如小麦)中, 每3–4分子RuBP中就有1个被氧化为3-PGA和2-PG (Hagemann and Bauwe, 2016), 而2-PG是光合碳代谢酶抑制剂; C₄植物的Rubisco加氧酶活性较低, Rubisco羧化酶代谢循环具有高效率优势(Sage, 2001)。光呼吸需要大量的能量输入, 导致同化碳和氮分别以CO₂和NH₃形式流失(Peterhansel et al., 2013)。其二, 制约Rubisco缓慢的羧化反应, 其周转率常在1–10次·s⁻¹之间, 而其它中央代谢酶的周转频率在50–100次·s⁻¹之间(Bar-Even et al., 2011)。为了弥补Rubisco的低活性, C₃植物产生大量Rubisco, 占光合生物可溶性蛋白质的50% (Erb and Zarzycki, 2016)。而高光合效率所需的Rubisco更少, 通常C₄植物的Rubisco含量占可溶性蛋白总量的10%–25% (Carmo-Silva et al., 2015)。C₃植物对Rubisco的高氮投入会导致其氮素利用效率(生物产量与投入氮的比值)较低。因此, 提高Rubisco利用效率(RBUE)是C₃植物增强光合氮素利用效率的主要驱动因素(Hikosaka and Shigeno, 2009)。

C₃和C₄植物氮素利用率差异一方面在于结构决

定功能,另一方面是植物体维持自身碳氮平衡的结果。高等植物绿叶中的碳氮代谢相互作用且相互调节,C₄途径较C₃途径固定更多的CO₂,对氮素的需求必然相应增加,以维持碳氮平衡(何新华,1995)。因此高效的光合CO₂固定必然需求高效的NUE,否则碳氮比例失调,势必影响植物的生长发育。高等植物绿叶把光合碳素同化和氮素同化集于一体,只有碳素和氮素代谢相互匹配、相互协调,才能维持植物体内的碳氮平衡,保证植物的正常生长发育。

3 C₃和C₄植物对外源NO₃⁻的响应机制

除豆科植物之外,植物氮素来源主要有3方面:一是从土壤中吸收;二是重新吸收光呼吸产生的氨;三是摄取其它生物代谢产生的氨基酸和蛋白质(陈太钰,2012)。硝态氮和铵态氮是植物吸收利用的2种主要土

壤无机氮形态,硝态氮为陆地植物氮的主要来源,而铵态氮是水稻等厌氧条件下生长植物的重要氮素来源。提高植物氮素利用效率主要是提高植物的氮同化效率(何新华等,1995)。

研究表明(表1),在不同苗龄、不同外源NO₃⁻水平、不同NH₄⁺浓度、不同温度和基质条件下,C₄植物均表现出较高的NUE,C₄植物叶片NO₃⁻积累均低于C₃植物,C₃植物大麦(*Hordeum vulgare*)叶片硝酸还原酶活性(NR activity, NRA)随外源NO₃⁻水平增加幅度远大于C₄植物玉米(何新华和李启明,1994;何新华等,1995)。Jiang等(2002)比较了C₄禾本科植物狗牙草(*Cynodon dactylon*)和C₃禾本科植物早熟禾(*Poa pratensis*)、黑麦草(*Lolium perenne*)和牛尾草(*Festuca arundinacea*)的硝酸盐吸收和还原过程。结果表明,在0.5和5.0 mmol·L⁻¹硝酸盐处理下,C₄植物地上

表1 C₃与C₄植物中硝酸盐的同化

Table 1 NO₃⁻ assimilation in C₃ and C₄ plants

处理	实验结果	参考文献
不同外源NO ₃ ⁻ 水平下NO ₃ ⁻ 吸收累积(0、1、5和20 mmol·L ⁻¹ KNO ₃)	NO ₃ ⁻ 的吸收、叶片中NO ₃ ⁻ 的累积均为C ₃ 大麦>C ₄ 玉米 更有效地吸收利用NO ₃ ⁻ , C ₄ 玉米>C ₃ 大麦	Oaks, 1994; 何新华等, 1995
不同外源NO ₃ ⁻ 水平下的NRA(1、5和20 mmol·L ⁻¹ KNO ₃)	1 mmol·L ⁻¹ KNO ₃ 下的NRA: C ₄ 玉米>C ₃ 大麦 5和20 mmol·L ⁻¹ KNO ₃ 下的NRA: C ₃ 大麦>C ₄ 玉米 光照下NRA效率, C ₄ 玉米>C ₃ 大麦	Oaks, 1994
不同外源NO ₃ ⁻ 水平下NO ₃ ⁻ 吸收和还原(0.5和5.0 mmol·L ⁻¹ NaNO ₃)	C ₄ 植物狗牙草, C ₃ 植物早熟禾、黑麦草和牛尾草 0.5 mmol·L ⁻¹ 和5.0 mmol·L ⁻¹ NaNO ₃ 下NRA: C ₃ 植物>C ₄ 植物 0.5 mmol·L ⁻¹ NaNO ₃ 下NRA在根中比例: C ₄ 植物(62%)>C ₃ 植物(平均16%) 0.5 mmol·L ⁻¹ NaNO ₃ 下根占鲜重比例: C ₄ 植物(36%)>C ₃ 植物(平均27%)	Jiang et al., 2002
不同氮源联合作用(2 mmol·L ⁻¹ NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ 和NH ₄ NO ₃ , 320 mg·L ⁻¹ NH ₃)	不同氮源对NUE的影响: C ₃ 小麦NH ₄ NO ₃ >NO ₃ ⁻ >NH ₄ ⁺ , C ₄ 玉米NO ₃ ⁻ >NH ₄ NO ₃ >NH ₄ ⁺ ; NH ₃ 处理使小麦和玉米的NUE在不同氮源下均降低, 下降幅度为C ₃ 小麦(51%–61%)>C ₄ 玉米(31%–37%)	Yin and Raven, 1997, 1998
不同光照和外源蔗糖下NO ₃ ⁻ 吸收	C ₃ 大麦在光照下NO ₃ ⁻ 吸收比C ₄ 玉米高55%, 黑暗时比C ₄ 玉米高91%; 光照下1%外源蔗糖使作物对NO ₃ ⁻ 的吸收增加: C ₄ 玉米(70%)>C ₃ 大麦(31%), 黑暗中大麦和玉米均相应增加了38%	Sehtiya and Goyal, 2000
光下有无DCMU的NO ₃ ⁻ 还原	无DCMU时正常叶片NRE: C ₄ 玉米(93%)>C ₃ 大麦(60%) 有DCMU时正常叶片NRE: C ₄ 玉米(93%)>C ₃ 大麦(40%) 有DCMU时营养耗竭叶片NRE: C ₄ 玉米(58%)>C ₃ 大麦(0%) 无DCMU时叶片NRA: C ₃ 大麦>C ₄ 玉米 有DCMU时叶片NRA: 玉米较无DCMU时增加3倍, 对大麦无影响	Basra et al., 2002
¹⁵ N示踪量化根系对氮素的相对吸收利用(0和1.5 mmol·L ⁻¹ NH ₄ NO ₃)	生长叶的碳汇强度: C ₄ 大黍>C ₃ 早熟禾 对氮素的再利用能力: C ₄ 大黍>C ₃ 早熟禾 氮素相对吸收量: 分蘖和新叶(早熟禾>大黍); 根(大黍>早熟禾)	Santos et al., 2002
O ₃ 代谢及表达调控差异	<i>Eleocharis baldwinii</i> 两栖类水草(水生环境为C ₃ 模式, 陆生环境为C ₄ 模式) C ₄ 植物中硝酸盐、亚硝酸盐和2-酮戊二酸/苹果酸转运子上调表达	陈太钰, 2012

NRA: 硝酸还原酶活性; NUE: 氮素利用效率; NRE: 硝酸盐还原效率; DCMU: 二氯苯基二甲脒

NRA: Nitrate reductase activity; NUE: Nitrogen use efficiency; NRE: Nitrate reduction efficiency; DCMU: 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea

部的NRA均低于C₃植物, NUE均高于C₃植物。与5.0 mmol·L⁻¹硝酸盐处理相比, 0.5 mmol·L⁻¹硝酸盐下C₄植物地上部的NRA更低, 而NUE更高, C₄植物中根鲜重和总NRA的占比更大。因此, NUE取决于根系的总硝态氮还原能力(Jiang et al., 2002)。

NO₃⁻由胞质硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)还原为亚硝酸盐NO₂⁻, 亚硝酸还原酶(nitrite reductase, NiR)将NO₂⁻导入质体, 进一步还原为铵(NH₄⁺)。硝酸还原酶是高等陆生植物NO₃⁻同化步骤中的第1个酶, 也是整个氮同化过程的限速酶, 在植物氮代谢中处于关键地位。不同氮源(NO₃⁻、NH₄⁺、NH₄NO₃和NH₃)对C₃作物小麦和C₄作物玉米NUE的影响从大到小依次为: NH₄NO₃>NO₃⁻>NH₄⁺和NO₃⁻>NH₄NO₃>NH₄⁺。在以NO₃⁻为氮源时NH₃的利用率最高, NH₃熏蒸处理使小麦和玉米的NUE在不同氮源下均表现降低趋势, 且小麦的下降幅度(51%–61%)大于玉米(31%–37%)(Yin and Raven, 1998)。不论何种氮源, NH₃熏蒸处理的小麦和玉米根中有机碳的δ¹³C值均较低(表现较小负值), 这表明植物同化大气中的NH₃与碳代谢有关(Yin and Raven, 1998)。Santos等(2002)在砂培条件下以1.5 mmol·L⁻¹ ¹⁵NH₄¹⁵NO₃溶液脉冲标记C₃植物早熟禾和C₄植物大黍(*Panicum maximum*), 结果表明C₄植物生长叶的碳汇强度较C₃植物大; 停止外源氮供应时, C₃植物不再将氮素分配到分蘖中, 而C₄植物在分蘖、根和生长叶中的氮素分配保持不变。无论外源是否供氮, C₃植物根系通常不作为氮转运的来源; 而停止对C₄植物供应外源氮时, 其根系的表现与C₃植物相同, 持续供氮时其根系表现出氮源和氮汇的双重行为(Santos et al., 2002)。

硝酸盐同化过程中的第1个限速酶NR由光调节(Campbell, 1999; Appenroth et al., 2000)。当植物光呼吸被高浓度CO₂抑制后, 其硝酸盐吸收也受到显著抑制(Bloom, 2014)。研究表明, C₃植物大麦在光照时的NO₃⁻吸收比C₄植物玉米高55%, 在黑暗时比玉米高91%。上述结果表明, C₃植物比C₄植物具有内在在更高效的NO₃⁻吸收机制, 但C₄植物玉米幼苗对NO₃⁻吸收系统有较好的控制作用, 且通过对吸收系统的有效控制来补偿其低吸收速率(Sehtiya and Goyal, 2000)。因此, 虽然C₃植物对NO₃⁻吸收速率较C₄植物高, 但C₄植物能更有效利用氮素。陈太钰(2012)采用抑制差减杂交法(suppression subtractive hybridization, SSH)和

第2代测序技术, 比较分析了莎草属*Eleocharis baldwinii*两栖类水草在水生和陆生诱导下的代谢及表达调控差异。结果表明, 与C₃植物相比, C₄植物中硝酸盐、亚硝酸盐和2-酮戊二酸/苹果酸转运子(2-oxoglutarate/malate translocator 1, DiT1)均上调表达, 其生物学意义可能在于增加氮素的吸收。

4 大气CO₂浓度升高背景下C₃和C₄植物的氮素利用效率

全球大气CO₂浓度已从工业革命前的280 mmol·L⁻¹上升到2018年的410 mmol·L⁻¹, 预计将以每年1.0 mmol·L⁻¹的速度升高, 至2050年达550 mmol·L⁻¹ (IPCC, 2013; NASA, 2014)。在全球大气CO₂浓度升高和气候变暖的背景下, C₃与C₄植物在光合速率和光呼吸、有机碳分配和根际碳流、气孔运动及蒸腾作用、氮素利用率、植物生长发育及产量构成等方面均有不同响应(Patterson and Flint, 1980; 王修兰等, 1998)。一般而言, 在大气中CO₂浓度升高的条件下, C₃和C₄植物的氮素利用效率均有提高的趋势, 但由于C₄植物比C₃植物受大气CO₂浓度的影响小, C₃作物比C₄作物对高CO₂更为敏感(Oaks, 1994; 曾长立等, 2001; 谢晓金等, 2016)。

在正常生长条件下, 光呼吸损失的CO₂占植物固定CO₂总量的25% (Sage et al., 2012)。Walker等(2016)利用模型分析显示, 在未来大气CO₂浓度达到预测最高水平时, 植物光呼吸缺失下其光合速率可上调12%–55%。大气中CO₂浓度升高导致C₃植物光呼吸速率和NO₃⁻同化速率同时下降, 吸收的NO₃⁻不能及时被同化利用, 导致作物品质下降(Long et al., 2006; Bloom et al., 2010, 2014), 这也是植物在CO₂浓度升高的条件下生长速率增幅较低的原因(Bloom et al., 2012)。光合暗反应中, 光呼吸降低使ATP对NADPH的需求比例也降低。基质中CO₂的增加导致NADP/NADPH升高, 从而限制了NO₃⁻代谢的还原能力。在高浓度CO₂下, 当氮素供应不足时, C₃植物(小麦和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*))地上部分氮素含量的下降比氮素供应充足时更为显著(Bloom et al., 2010)。Zeng等(2011)在白天CO₂浓度为(374±21) mmol·L⁻¹和(568±39) mmol·L⁻¹, 夜间为(418±29) mmol·L⁻¹和(623±51) mmol·L⁻¹的农业FACE (free air CO₂ en-

richment)系统下研究CO₂升高对C₃植物水稻与C₄植物稗草(*Echinochloa crusgalli*)氮素利用的影响,发现其NUE增加,在有限氮素下高浓度CO₂使水稻比稗草具有更强的竞争优势。Reich等(2018)在长达20年的野外试验中发现, C₃和C₄植物在前12年对高浓度CO₂的反应与前人研究结果一致,在随后的8年里发生了意想不到的逆转。CO₂浓度升高背景下, C₄草地净氮矿化呈现随时间变化而逐渐增大的正响应,而C₃草地呈逐渐减小的负响应;生物量对CO₂升高的响应均与净氮矿化速率呈正相关。

在当前CO₂浓度条件下, C₄植物比C₃植物有更高的NUE (Brown, 1978; Taylor et al., 2010)。一般而言, 低浓度CO₂会降低C₃植物的光合速率, 使气孔导度和叶片氮浓度增加(Tissue et al., 1995; Ward et al., 1999; Ripley et al., 2013)。Pinto等(2014)研究了C₃和C₄植物在冰川CO₂浓度为180 mmol·L⁻¹及环境CO₂浓度为400 mmol·L⁻¹下的光合作用, 结果表明, 与C₃植物相比, 冰川较低CO₂浓度(180 mmol·L⁻¹)导致C₄植物的光合作用降低幅度较小, 气孔导度增加较大。C₃植物通过增加Rubisco活性来适应低浓度CO₂, C₄植物在低CO₂浓度下有较高的气孔导度, 但由于光合速率较高, C₄植物有较高的PNUE。Vogan和Sage (2012)研究了黄花菊属(*Flaveria*)、天芥菜属(*Heliotropium*)和蓬子草属(*Alternanthera*)中近缘C₃(2种)、C₃-C₄(9种)和C₄(3种)植物对低浓度CO₂的响应, 发现在380和180 mmol·L⁻¹ CO₂下, 昼/夜气温为37/29°C时, CO₂对任何一种植物的光合氮素利用率、Rubisco含量和电子传递均无显著影响。

5 C₃禾本科作物氮素利用效率的遗传改良

通过遗传或基因工程技术向C₃作物转入C₄作物高光合效率相关基因是提高作物产量和保障粮食安全的有效途径之一(Hibberd et al., 2008; Peterhansel et al., 2013)。利用基因工程和转基因技术提高Rubisco羧化酶反应效率(Ku et al., 1996, 1999; Tamoi and Shigeoka, 2005; Suzuki et al., 2009), 将C₄途径相关酶基因转入C₃植物, 通过超量表达C₄途径相关核心酶, 在C₃植物内建立类似C₄植物特性的CCM (CO₂ concentrating mechanism)单细胞循环等方面已进行

了大量研究(陈太钰, 2012; Ruan et al., 2012; Hagemann and Bauwe, 2016)。

5.1 高表达C₄植物光合作用关键酶

氮素的吸收、同化和再分配在一定程度上受光合速率的调节和控制(Zheng, 2009), 因此, 除非光合速率也提高, 否则NUE会趋于平稳。之前研究认为, 实现C₄高光效要具有Kranz结构(Sage and Monson, 1999), 但C₄植物Kranz结构并非C₄光合所必需(Voznesenskaya et al., 2001)。因此研究自然条件下植物光合途径的转变机制应侧重光合酶活性, 而不是Kranz结构的改变(图2)。

利用DNA重组改良C₃作物的技术体系已逐渐成熟。目前, 已从玉米和高粱(*Sorghum bicolor*)等C₄植物中克隆到与C₄光合相关的关键酶基因, 如NADP-ME、PCK、PEPC和PPDK, 且这些基因已成功转入水稻(Bandyopadhyay et al., 2007)和小麦(张庆琛等, 2010)等C₃作物中。将水稻Cab启动子控制的玉米NADP-ME cDNA转入水稻, 使得水稻叶片NADP-ME活性增加了30–70倍, 但NADP-ME蛋白量也随之

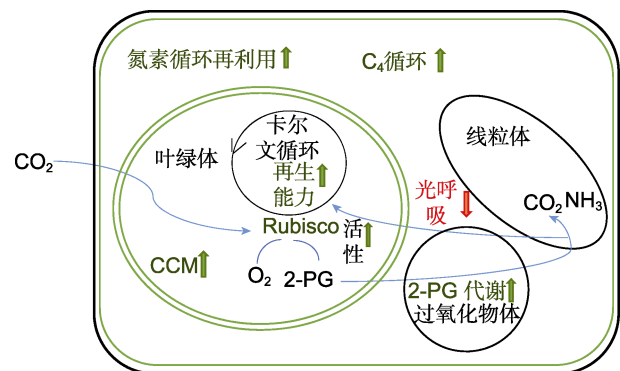


图2 提高C₃植物氮素利用率(NUE)的途径(改自Nowicka et al., 2018)

向上(绿色)和向下(红色)箭头分别表示需提高和限制的目标路径和酶活性。Rubisco: 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶; 2-PG: 磷酸乙醇酸; CCM: CO₂浓缩机制

Figure 2 Strategies for improving nitrogen use efficiency (NUE) of C₃ plants (modified from Nowicka et al., 2018) Pathways/enzymes for activation are marked in upwards arrows (green), while those for repression are marked in downwards arrow (red). Rubisco: Ribulose biphosphate carboxylase oxygenase; 2-PG: 2-phosphoglycolate; CCM: CO₂ concentrating mechanism

增加(Tsuchida et al., 2001)。转玉米PEPC基因的水稻PEPC活性远高于野生型水稻,与叶片光合速率和叶绿素均呈正相关(李霞等, 2008)。转入外源玉米PEPC基因的水稻植株含氮量显著增加,并在低氮条件下影响氨基酸的合成和有机酸含量,促进氮代谢和氮同化产物的积累和植株生长(陈冉冉, 2012)。转入碳相关基因,对水稻的氮代谢相关酶有显著影响,这为氮高效利用提供了新的思路(Yanagisawa et al., 2004; Kurai et al., 2011)。研究结果与Melzer和O'Leary (1987)提出的将PEPC基因转入C₃植物后可能存在代谢通路相一致,即PEPC催化PEP与CO₂反应形成草酰乙酸(oxaloacetic acid, OAA),一部分OAA经苹果酸脱氢酶(MDH)催化脱氢产生的苹果酸和OAA进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA),增强呼吸作用的同时为氨基酸合成提供丰富的有机酸和碳骨架;另一部分OAA经转氨酶作用形成天门冬氨酸。而PEPC催化CO₂与PEP反应生成的OAA进入TCA, OAA与苹果酸相互转化,及时补充合成氨基酸消耗的碳骨架,进而促进氨基酸的合成,提高氮素利用率(Ku et al., 1996; Miyao and Fukayama, 2003; Suzuki et al., 2006; Radchuk et al., 2007)。

5.2 其它改良途径及改良限制因素

除C₄核心酶CA、NADP-MDH、NADP-ME、PEPC和PPDK外, C₄途径还需要将草酸、苹果酸、三磷酸甘油酸和丙酮酸的代谢物转运体插入C₃植物内,以增加C₄循环中间体的运输能力,使卡尔文循环能够在维管束鞘细胞中有效运作(Weber and von Caemmerer, 2010)。由于C₃植物Rubisco具有高含量、低催化速率的特点,因此通过在植物体内低量表达外源高催化速率Rubisco既可以提高光合作用效率也可增加氮素利用率(Spreitzer and Salvucci, 2002; Whitney et al., 2011)。国际水稻联盟也在研究与Kranz解剖结构有关的基因(Wang et al., 2013),发现减少叶肉细胞光呼吸也是提高氮素利用率的途径之一(图2)。例如,降低叶肉细胞中的甘氨酸脱羧酶(Glycine decarboxylase complex, GDC)蛋白,并限制其在维管束鞘细胞中的积累,使甘氨酸脱羧完全发生在维管束鞘细胞中,类似于C₃-C₄中间体,从而维持较高的CO₂浓度以降低光呼吸(Monson and Rawsthorne, 2000)。Kajala等(2011)通过人工microRNAs技术下调

水稻中Rubisco小亚基(RbcS)和GDC-H亚基基因的表达,使叶肉细胞中Rubisco和甘氨酸脱羧酶(GDC)得到下调。通过对玉米的维管束鞘细胞和叶肉细胞进行蛋白质组学鉴定,发现在C₄代谢途径中过表达转运蛋白,如2-氧戊二酸/苹果酸转运体(OMT1)、二羧酸转运体1 (DiT1)、二羧酸转运体2 (DiT2)、PEP/磷酸盐转运蛋白(PPT1)、叶肉包膜蛋白(MEP)和三糖-磷酸盐转运体(TPT),转入水稻后均得到特异性表达(Karki et al., 2013)。对氮素循环再利用也是提高NUE的有效途径。例如,过表达自噬核心基因OsATG8b能够显著增强缺氮胁迫下转基因拟南芥叶片中的自噬活性,从而提高氮素再利用效率(甄晓溪等, 2019)。

光合作用是一个经过数十亿年演变而来的复杂代谢过程,在整个碳代谢过程中与氮代谢紧密联系,高度整合。光呼吸中间产物对硝酸盐同化等看似与光合作用无关的代谢过程也有影响(Betti et al., 2016)。要充分发挥C₄作物高光合效率及氮素利用潜力,提高C₃作物氮素利用率。此外,编码光合特性的基因通常和氮还原同化的基因同时存在于细胞核和质体基因组中,需要探索有效方法来同时转化这2个基因组(Ort et al., 2015),但目前谷物的质体转化尚未成功。即使成功导入和表达了这些基因,其产物也需要正确地折叠、运输,并组装成功能复合物,才能作用于特定部位,提高氮素利用效率。

6 结论

C₄植物比C₃植物具有更高的光合作用、水分利用效率和氮素利用效率,以及较低的光呼吸。C₃和C₄植物氮素利用效率存在差异。(1) C₃植物关键酶Rubisco的性质导致氮素利用效率较低。一方面, Rubisco的效率受到其复杂的催化机制和缓慢的羧化反应影响,降低了光合CO₂固定效率;另一方面, C₄植物中较高的类囊体成分可能提升RuBP的再生能力,提高了光合CO₂固定效率,从而使C₄植物具有较高的氮素利用效率。(2) Rubisco蛋白含量、Calvin-Benson循环酶含量、总Rubisco的表达以及蛋白质合成相关基因的表达在C₄植物中均较低,导致C₄植物具有更高的氮素利用率。(3) 氮代谢和光合作用相互依赖,高效的光合CO₂固定必然需要高效的氮素利用效率,以维持碳氮平衡。因此,可以通过提高植物的光合作用来间接提

高氮素利用效率。(4) C₃和C₄植物对外源NO₃⁻的响应不同,究其原因这是由于C₃植物比C₄植物具有更高效的NO₃⁻吸收机制,C₄植物对NO₃⁻吸收系统有较好的控制作用,且能通过对吸收系统的有效控制来补偿其低吸收速率。因此,虽然C₃植物对NO₃⁻吸收速率较C₄植物高,但C₄植物能更有效利用NO₃⁻,从而最终具备较高的氮素利用效率。(5) C₄植物氮还原同化酶类的空间分隔和分工相互协作、CO₂浓缩机制、更小的叶脉间距和更高的叶脉密度成为C₄植物比C₃植物有较高氮素利用效率的另一个原因。在大气中CO₂浓度升高的条件下,C₃和C₄植物的氮素利用效率均有改善和提高的趋势,但对高浓度CO₂的响应会因氮素或其它养分的不足而受到限制。

利用植物同化碳氮生理生化差异机制、基因工程和转基因技术,通过缩小叶片解剖结构差异、改变Rubisco含量和羧化效率、高表达C₄循环相关核心酶、调控氮素利用相关基因及降低光呼吸碳氮损失等途径对C₃禾本科作物氮素利用效率进行营养生理与分子遗传改良将是未来研究的重点。

参考文献

- 陈冉冉 (2012). 不同氮素水平对转玉米PEPC基因水稻碳、氮代谢的影响. 博士论文. 北京: 中国农业科学院. pp. 18–37.
- 陈太钰 (2012). C₃/C₄光合作用差异表达基因的鉴定与分析. 博士论文. 武汉: 华中农业大学. pp. 42–62.
- 巩玥, 陈海苗, 姜闯道, 石雷 (2014). 植物叶片解剖结构的量化及其在C₄植物高粱中的应用. 植物学报 **49**, 173–182.
- 何新华 (1995). C₃和C₄植物的比较营养学及其展望. 见: 张福锁主编. 土壤与植物营养研究新动态(第三卷). 北京: 中国农业出版社. pp. 270–279.
- 何新华, 安·奥克斯, 李明启 (1995). C₃和C₄禾本科作物的氮素利用效率. 植物学通报 **12**(3), 20–27.
- 何新华, 李明启 (1994). C₃和C₄植物的氮素利用效率. 云南植物研究 **16**, 93–94.
- 李霞, 王超, 陈晏, 孙志伟 (2008). PEPC酶活性作为水稻高光效育种筛选指标的研究. 江苏农业学报 **24**, 559–564.
- 罗璇, 郭彤, 胡银岗 (2014). 小麦和谷子C₄光合途径关键酶活性及其与光合和蒸腾的关系. 麦类作物学报 **34**, 1083–1091.
- 王修兰, 徐师华, 梁红 (1998). CO₂浓度增加对C₃、C₄作物生育和产量影响的实验研究. 中国农业科学 **31**, 55–61.
- 魏爱丽, 王志敏, 翟志席, 龚元石 (2003). 土壤干旱对小麦旗叶和穗器官C₄光合酶活性的影响. 中国农业科学 **36**, 508–512.
- 谢晓金, 李仁英, 张耀鸿, 刘璐, 申双和, 包云轩 (2016). CO₂浓度升高对水稻和玉米叶片光合生理特性的影响. 江苏农业科学 **44**(10), 120–123.
- 徐晓鹏, 傅向东, 廖红 (2016). 植物铵态氮同化及其调控机制的研究进展. 植物学报 **51**, 152–166.
- 曾长立, 王小明, 张福锁, 王兴仁 (2001). 浅析C₃植物和C₄植物对大气中CO₂浓度升高条件下的反应. 江汉大学学报 **18**(3), 6–14.
- 张庆琛, 许为钢, 胡琳, 李艳, 张磊, 齐学礼 (2010). 玉米C₄型全长pepc基因导入普通小麦的研究. 麦类作物学报 **30**, 194–197.
- 甄晓溪, 刘浩然, 李鑫, 徐凡, 张文忠 (2019). 异源过表达OsATG8b基因提高转基因拟南芥的氮/碳胁迫耐受性和产量. 植物学报 **54**, 23–36.
- Appenroth KJ, Meço R, Jourdan V, Lillo C (2000). Phytochrome and post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Sci* **159**, 51–56.
- Aubry S, Brown NJ, Hibberd JM (2011). The role of proteins in C₃ plants prior to their recruitment into the C₄ pathway. *J Exp Bot* **62**, 3049–3059.
- Bandyopadhyay A, Datta K, Zhang J, Yang W, Raychaudhuri S, Miyao M, Datta SK (2007). Enhanced photosynthesis rate in genetically engineered indica rice expressing pepc gene cloned from maize. *Plant Sci* **172**, 1204–1209.
- Bar-Even A, Noor E, Savir Y, Liebermeister W, Davidi D, Tawfik DS, Milo R (2011). The moderately efficient enzyme: evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. *Biochemistry* **50**, 4402–4410.
- Basra AS, Dhawan AK, Goyal SS (2002). Dcmu inhibits *in vivo* nitrate reduction in illuminated barley (C₃) leaves but not in maize (C₄): a new mechanism for the role of light? *Planta* **215**, 855–861.
- Betti M, Bauw H, Busch FA, Fernie AR, Keech O, Levey M, Ort Donald R, Parry Martin AJ, Sage R, Timm S, Walker B, Weber APM (2016). Manipulating photorespiration to increase plant productivity: recent advances and perspectives for crop improvement. *J Exp Bot* **67**, 2977–2988.
- Bloom AJ, Asensio JSR, Randall L, Rachmilevitch S, Cousins AB, Carlisle EA (2012). CO₂ enrichment inhibits

- shoot nitrate assimilation in C₃ but not C₄ plants and slows growth under nitrate in C₃ plants. *Ecology* **93**, 355–367.
- Bloom AJ, Burger M, Asensio JSR, Cousins AB** (2010). Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and *Arabidopsis*. *Science* **328**, 899–903.
- Bloom AJ, Burger M, Kimball BA, Pinter Jr JP** (2014). Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO₂ in field-grown wheat. *Nat Climate Change* **4**, 477–480.
- Bowes G** (2010). Single-cell C₄ photosynthesis in aquatic plants. In: Raghavendra AS, Sage RF, eds. C₄ Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms. Dordrecht: Springer. pp. 63–80.
- Bräutigam A, Gowik U** (2016). Photorespiration connects C₃ and C₄ photosynthesis. *J Exp Bot* **67**, 2953–2962.
- Bräutigam A, Kajala K, Wullenweber J, Sommer M, Gagneul D, Weber KL, Carr KM, Gowik U, Mass J, Lercher MJ, Westhoff P, Hibberd JM, Weber AP** (2011). An mRNA blueprint for C₄ photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C₃ and C₄ species. *Plant Physiol* **155**, 142–156.
- Bräutigam A, Schliesky S, Külahoglu C, Osborne CP, Weber APM** (2014). Towards an integrative model of C₄ photosynthetic subtypes: insights from comparative transcriptome analysis of NAD-ME, NADP-ME, and PEP-CK C₄ species. *J Exp Bot* **65**, 3579–3593.
- Brown RH** (1978). A difference in N use efficiency in C₃ and C₄ plants and its implications in adaptation and evolution. *Crop Sci* **18**, 93–98.
- Busch FA, Sage TL, Cousins AB, Sage RF** (2013). C₃ plants enhance rates of photosynthesis by reassimilating photorespired and respired CO₂. *Plant Cell Environ* **36**, 200–212.
- Campbell WH** (1999). Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 277–303.
- Carmo-Silva E, Scales JC, Madgwick PJ, Parry MAJ** (2015). Optimizing Rubisco and its regulation for greater resource use efficiency. *Plant Cell Environ* **38**, 1817–1832.
- Christin PA, Boxall SF, Gregory R, Edwards EJ, Hartwell J, Osborne CP** (2013). Parallel recruitment of multiple genes into C₄ photosynthesis. *Genome Biol Evol* **5**, 2174–2187.
- Christin PA, Osborne CP** (2014). The evolutionary ecology of C₄ plants. *New Phytol* **204**, 765–781.
- Edwards EJ, Osborne CP, Stromberg CAE, Smith SA, Bond WJ, Christin PA, Cousins AB, Duvall MR, Fox DL, Freckleton RP, Ghannoum O, Hartwell J, Huang Y, Janis CM, Keeley JE, Kellogg EA, Knapp AK, Leakey ADB, Nelson DM, Saarela JM, Sage RF, Sala OE, Salamin N, Still CJ, Tipple B** (2010). The origins of C₄ grasslands: integrating evolutionary and ecosystem science. *Science* **328**, 587–591.
- Erb TJ, Zarzycki J** (2016). Biochemical and synthetic biology approaches to improve photosynthetic CO₂-fixation. *Curr Opin Chem Biol* **34**, 72–79.
- Furbank RT** (2011). Evolution of the C₄ photosynthetic mechanism: are there really three C₄ acid decarboxylation types? *J Exp Bot* **62**, 3103–3108.
- Gowik U, Bräutigam A, Weber KL, Weber AP, Westhoff P** (2011). Evolution of C₄ photosynthesis in the genus flaveria: how many and which genes does it take to make C₄? *Plant Cell* **23**, 2087–2105.
- Hagemann M, Bauwe H** (2016). Photorespiration and the potential to improve photosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* **35**, 109–116.
- He XH, Oaks A, Li M** (1994). Nitrogen use efficiency in C₃ and C₄ plants. *Agro's Ann Rev Plant Physiol* **1**, 147–188.
- Hibberd JM, Sheehy JE, Langdale JA** (2008). Using C₄ photosynthesis to increase the yield of rice-rationale and feasibility. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 228–231.
- Hikosaka K, Shigeno A** (2009). the role of Rubisco and cell walls in the interspecific variation in photosynthetic capacity. *Oecologia* **160**, 443–451.
- IPCC** (2013). Climate change 2013: the physical science basis. In: Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor M, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM, eds. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 119–158.
- Jiang ZC, Hull RJ, Sullivan WM** (2002). Nitrate uptake and reduction in C₃ and C₄ grasses. *J Plant Nutr* **25**, 1303–1314.
- Kajala K, Covshoff S, Karki S, Woodfield H, Tolley BJ, Dionora MJA, Mogul RT, Mabilangan AE, Danila FR, Hibberd JM, Quick WP** (2011). Strategies for engineering a two-celled C₄ photosynthetic pathway into rice. *J Exp Bot* **62**, 3001–3010.
- Karki S, Rizal G, Quick WP** (2013). Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by inserting the C₄ pathway. *Rice* **6**, 28.
- Ku MSB, Agarie S, Nomura M, Fukayama H, Tsuchida H, Ono K, Hirose S, Toki S, Miyao M, Matsuoka M** (1999).

- High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nat Biotechnol* **17**, 76–80.
- Ku MSB, Kano-Murakami Y, Matsuoka M** (1996). Evolution and expression of C₄ photosynthesis genes. *Plant Physiol* **111**, 949–957.
- Külahoglu C, Denton AK, Sommer M, Maß J, Schliesky S, Wrobel TJ, Berckmans B, Gongora-Castillo E, Buell CR, Simon R, De Veylder L, Bräutigam A, Weber APM** (2014). Comparative transcriptome atlases reveal altered gene expression modules between two cleomaceae C₃ and C₄ plant species. *Plant Cell* **26**, 3243–3260.
- Kurai T, Wakayama M, Abiko T, Yanagisawa S, Aoki N, Ohsugi R** (2011). Introduction of the *ZmDof1* gene into rice enhances carbon and nitrogen assimilation under low-nitrogen conditions. *Plant Biotechnol J* **9**, 826–837.
- Langdale JA** (2011). C₄ cycles: past, present, and future research on C₄ photosynthesis. *Plant Cell* **23**, 3879–3892.
- Li MR, Wedin DA, Tieszen LL** (1999). C₃ and C₄ photosynthesis in *Cyperus* (Cyperaceae) in temperate eastern North America. *Can J Bot* **77**, 209–218.
- Long SP, Ainsworth EA, Leakey ADB, Nösberger J, Ort DR** (2006). Food for thought: lower-than-expected crop yield stimulation with rising CO₂ concentrations. *Science* **312**, 1918–1921.
- Majeran W, Cai Y, Sun Q, van Wijk KJ** (2005). Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell* **17**, 3111–3140.
- Majeran W, van Wijk KJ** (2009). Cell-type-specific differentiation of chloroplasts in C₄ plants. *Trends Plant Sci* **14**, 100–109.
- Melzer E, O'Leary MH** (1987). Anapleurotic CO₂ fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Plant Physiol* **84**, 58–60.
- Miyao M, Fukayama H** (2003). Metabolic consequences of overproduction of phosphoenolpyruvate carboxylase in C₃ plants. *Arch Biochem Biophys* **414**, 197–203.
- Monson RK, Rawsthorne S** (2000). CO₂ assimilation in C₃-C₄ intermediate plants. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S, eds. *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Dordrecht: Springer. pp. 533–550.
- NASA** (2014). Global climate change: vital signs of the planet, available at: <http://climate.nasa.gov/400ppmquotes>. 2018-12-30.
- Nelson T** (2011). The grass leaf developmental gradient as a platform for a systems understanding of the anatomical specialization of C₄ leaves. *J Exp Bot* **62**, 3039–3048.
- Nowicka B, Ciura J, Szymańska R, Kruk J** (2018). Improving photosynthesis, plant productivity and abiotic stress tolerance—current trends and future perspectives. *J Plant Physiol* **231**, 415–433.
- Oaks A** (1994). Efficiency of nitrogen utilization in C₃ and C₄ cereals. *Plant Physiol* **106**, 407–414.
- 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 WJF, 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.
- Patterson DT, Flint EP** (1980). Potential effects of global atmospheric CO₂ enrichment on the growth and competitiveness of C₃ and C₄ weed and crop plants. *Weed Sci* **28**, 71–75.
- Peterhansel C, Krause K, Braun HP, Espie GS, Fernie AR, Hanson DT, Keech O, Maurino VG, Mielewicz M, Sage RF** (2013). Engineering photorespiration: current state and future possibilities. *Plant Biol* **15**, 754–758.
- Pinto H, Sharwood RE, Tissue DT, Ghannoum O** (2014). Photosynthesis of C₃, C₃-C₄, and C₄ grasses at glacial CO₂. *J Exp Bot* **65**, 3669–3681.
- Radchuk R, Radchuk V, Götz KP, Weichert H, Richter A, Emery RJN, Weschke W, Weber H** (2007). Ectopic expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Vicia narbonensis* seeds: effects of improved nutrient status on seed maturation and transcriptional regulatory networks. *Plant J* **51**, 819–839.
- Reich PB, Hobbie SE, Lee TD, Pastore MA** (2018). Unexpected reversal of C₃ versus C₄ grass response to elevated CO₂ during a 20-year field experiment. *Science* **360**, 317–320.
- Ripley BS, Cunniff J, Osborne CP** (2013). Photosynthetic acclimation and resource use by the C₃ and C₄ subspecies of *Alloteropsis semialata* in low CO₂ atmospheres. *Global Change Biol* **19**, 900–910.
- Ruan CJ, Shao HB, dan Silva JAT** (2012). A critical review on the improvement of photosynthetic carbon assimilation in C₃ plants using genetic engineering. *Crit Rev Biotechnol* **32**, 1–21.
- Sage RF** (2001). C₄ plants. In: Levin S, ed. *Encyclopedia of Biodiversity*. London: Academic Press. pp. 575–598.
- Sage RF, Christin PA, Edwards EJ** (2011). The C₄ plant

- lineages of planet earth. *J Exp Bot* **62**, 3155–3169.
- Sage RF, Pearcy RW** (1987). The nitrogen use efficiency of C_3 and C_4 plants. I. Leaf nitrogen, growth, and biomass partitioning in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). *Plant Physiol* **84**, 954–958.
- Sage RF, Sage TL, Kocacinar F** (2012). Photorespiration and the evolution of C_4 photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 19–47.
- Sage RF, Wedin DA, Li MR** (1999). The biogeography of C_4 photosynthesis: patterns and controlling factors. In: Sage RF, Monson RK, eds. *C₄ Plant Biology*. San Diego: Academic Press. pp. 313–375.
- Santos PM, Thornton B, Corsi M** (2002). Nitrogen dynamics in the intact grasses *Poa trivialis* and *Panicum maximum* receiving contrasting supplies of nitrogen. *J Exp Bot* **53**, 2167–2176.
- Sehtiya HL, Goyal SS** (2000). Comparative uptake of nitrate by intact seedlings of C_3 (barley) and C_4 (corn) plants: effect of light and exogenously supplied sucrose. *Plant Soil* **227**, 185–190.
- Spreitzer RJ, Salvucci ME** (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 449–475.
- Suzuki S, Murai N, Kasaoka K, Hiyoshi T, Imaseki H, Burnell JN, Arai M** (2006). Carbon metabolism in transgenic rice plants that express phosphoenolpyruvate carboxylase and/or phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Plant Sci* **170**, 1010–1019.
- Suzuki Y, Miyamoto T, Yoshizawa R, Mae T, Makino A** (2009). Rubisco content and photosynthesis of leaves at different positions in transgenic rice with an overexpression of *RBCS*. *Plant Cell Environ* **32**, 417–427.
- Suzuki Y, Ohkubo M, Hatakeyama H, Ohashi K, Yoshizawa R, Kojima S, Hayakawa T, Yamaya T, Mae T, Makino A** (2007). Increased Rubisco content in transgenic rice transformed with the 'Sense' *rbcS* gene. *Plant Cell Physiol* **48**, 626–637.
- Tamoi M, Shigeoka S** (2005). Improvement of photosynthesis in higher plants. In: Omasa K, Nouchi I, De Kok LJ, eds. *Plant Responses to Air Pollution and Global Change*. Tokyo: Springer. pp. 141–147.
- Taylor SH, Hulme SP, Rees M, Ripley BS, Ian Woodward F, Osborne CP** (2010). Ecophysiological traits in C_3 and C_4 grasses: a phylogenetically controlled screening experiment. *New Phytol* **185**, 780–791.
- Tissue DT, Dippert JK, Thomas RB, Strain BR** (1995). Effects of low and elevated CO_2 on C_3 and C_4 annuals. *Oecologia* **101**, 21–28.
- Tsuchida H, Tamai T, Fukayama H, Agarie S, Nomura M, Onodera H, Ono K, Nishizawa Y, Lee BH, Hirose S, Toki S, Ku MSB, Matsuoka M, Miyao M** (2001). High level expression of C_4 -specific NADP-malic enzyme in leaves and impairment of photoautotrophic growth in a C_3 plant, rice. *Plant Cell Physiol* **42**, 138–145.
- Vogan PJ, Sage RF** (2012). Effects of low atmospheric CO_2 and elevated temperature during growth on the gas exchange responses of C_3 , C_3 - C_4 intermediate, and C_4 species from three evolutionary lineages of C_4 photosynthesis. *Oecologia* **169**, 341–352.
- Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Artyushcheva EG, Freitag H, Edwards GE** (2002). Proof of C_4 photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *Plant J* **31**, 649–662.
- Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Freitag H, Edwards GE** (2001). Kranz anatomy is not essential for terrestrial C_4 plant photosynthesis. *Nature* **414**, 543–546.
- Walker BJ, VanLoocke 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 P, Kelly S, Fouracre JP, Langdale JA** (2013). Genome-wide transcript analysis of early maize leaf development reveals gene cohorts associated with the differentiation of C_4 Kranz anatomy. *Plant J* **75**, 656–670.
- Ward JK, Tissue DT, Thomas BR, Strain BDR** (1999). Comparative responses of model C_3 and C_4 plants to drought in low and elevated CO_2 . *Global Change Biol* **5**, 857–867.
- Weber APM, von Caemmerer S** (2010). Plastid transport and metabolism of C_3 and C_4 plants-comparative analysis and possible biotechnological exploitation. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 256–264.
- Wessinger ME, Edwards GE, Ku MSB** (1989). Quantity and kinetic properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in C_3 , C_4 , and C_3 - C_4 intermediate species of *flaveria* (asteraceae). *Plant Cell Physiol* **30**, 665–671.
- Whitney SM, Sharwood RE, Orr D, White SJ, Alonso H, Galmés J** (2011). Isoleucine 309 acts as a C_4 catalytic switch that increases ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) carboxylation rate in *flaveria*. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 14688–14693.
- Yanagisawa S, Akiyama A, Kisaka H, Uchimiya H, Miwa T** (2004). Metabolic engineering with *dof1* transcription factor in plants: improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*

101, 7833–7838.

Yin ZH, Raven JA (1997). A comparison of the impacts of various nitrogen sources on acid-base balance in C₃ *Triticum aestivum* L. and C₄ *Zea mays* L. plants. *J Exp Bot* **48**, 315–324.

Yin ZH, Raven JA (1998). Influences of different nitrogen sources on nitrogen- and water-use efficiency, and carbon isotope discrimination, in C₃ *Triticum aestivum* L. and C₄

Zea mays L. plants. *Planta* **205**, 574–580.

Zeng Q, Liu B, Gilna B, Zhang YL, Zhu CW, Ma HL, Pang J, Chen GP, Zhu JG (2011). Elevated CO₂ effects on nutrient competition between a C₃ crop (*Oryza sativa* L.) and a C₄ weed (*Echinochloa crusgalli* L.). *Nutr Cycl Agroecosys* **89**, 93–104.

Zheng ZL (2009). Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. *Plant Signal Behav* **4**, 584–591.

Nitrogen Utilization Mechanism in C₃ and C₄ Plants

Lu Zhang^{1, 2}, Xinhua He^{2, 3*}

¹Maize Research Institute of Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Xinzhou 034000, China; ²College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China; ³School of Plant Biology, University of Western Australia, Perth 6009, Australia

Abstract Improving nitrogen use efficiency (NUE) of plants is not only an important approach to ensure global food security, but also to achieve sustainable agricultural development. In the past half century, great progress has been made in the study of nitrogen utilization mechanism, but the regulatory mechanism of NUE is not clear and the improvement of NUE is still extremely limited. Photosynthetic carbon assimilation and nitrogen assimilation are integrated in a plant, and only by coordinating carbon and nitrogen metabolism can the carbon/nitrogen balance be maintained and the normal growth and development of plants be regulated. Due to the differences in the photosynthetic nitrogen utilization rate (PNUE) between C₃ and C₄ plants, there will also be differences in the utilization efficiency of nitrogen. In order to improve crop NUE, it is necessary to understand the functions and regulatory mechanisms of key factors involved in nitrogen absorption, transport, assimilation and signal transduction of C₃ and C₄ plants. In addition, studies on carbon and nitrogen assimilation and their mechanisms under the conditions of increasing atmospheric CO₂ concentration and global warming should not be ignored. This paper reviews the differences of key factors on nitrogen use between C₃ and C₄ plants and the regulatory mechanisms, and proposes possible ways to improve NUE of C₃ crops by using genetic approaches.

Key words photosynthesis, nitrogen metabolism, nitrogen use efficiency, regulatory mechanisms, genetic improvement

Zhang L, He XH (2020). Nitrogen utilization mechanism in C₃ and C₄ plants. *Chin Bull Bot* **55**, 228–239.

* Author for correspondence. E-mail: hexinhua@swu.edu.cn; xinhua.he@uwa.edu.au

(责任编辑: 朱亚娜)