



论文

抑制表达谷氨酸合酶基因对水稻碳氮代谢的影响

卢永恩, 罗凤, 杨猛, 李香花, 练兴明*

华中农业大学生命科学技术学院, 作物遗传改良国家重点实验室, 国家植物基因研究中心(武汉), 武汉 430070

* 联系人, E-mail: xmlian@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2011-03-24; 接受日期: 2011-05-05

国家高技术研究发展计划(批准号: 2010AA101802)和转基因生物新品种培育科技重大专项任务课题(批准号: 2008ZX08001-005)资助项目

摘要 提高水稻的氮素利用率对农业生产极为重要, 水稻谷氨酸合酶(GOGAT, EC 1.4.1.14)被认为具有提高水稻氮素利用率的潜力, 但该酶在水稻中的功能以及其对碳氮代谢的影响一直未被系统的报道. 本研究以抑制表达谷氨酸合酶基因的转基因水稻为材料, 结合谷氨酸合酶基因家族全生育期表达谱数据, 研究该基因家族在水稻体内的功能及其对碳氮代谢的影响. 结果表明, 谷氨酸合酶家族基因成员的表达模式各不相同, 具有明显的组织和器官特异性, 表明其在体内行使着不同的功能. 与野生型相比, 抑制表达谷氨酸合酶基因的转基因植株的分蘖数、地上部干重以及单株产量显著下降. 同时, 转基因植株叶片中的硝酸盐、部分游离氨基酸、叶绿素、糖、糖磷酸以及吡啶核苷酸含量也显著降低, 但游离铵、 α -酮戊二酸以及异柠檬酸含量上升. 分析表明, 谷氨酸合酶在水稻的碳氮代谢过程中扮演着重要角色, 是水稻氮素高同化过程中必不可少的因子.

关键词
谷氨酸合酶
水稻
共抑制
碳氮代谢

氮素是水稻(*Oryza sativa*)生长发育过程中最重要的营养元素之一. 目前, 维持或提高全球水稻产量的主要方法是大量的施入氮肥. 然而, 氮肥的大量施入严重影响了生态环境, 带来了一系列的环境问题, 而提高作物的氮素利用率是解决这些问题的重要途径^[1]. 谷氨酰胺- α -酮戊二酸转氨酶(Glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase, GOGAT), 又名谷氨酸合酶(glutamate synthase), 与谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)一起, 是参与植物氮素初级吸收与再吸收过程的两种重要酶类. GS催化一分子的氨与一个分子的谷氨酸合成一个分子的谷氨酰胺, GOGAT则催化一分子的谷氨酰胺和一分子的 α -酮戊二酸(2-OG)形成两分子的谷氨酸. 这两个反应偶联在一起被称为GS/GOGAT循环. 通过GS/GOGAT循

环, 无机态的氮转变为有机氮. 高等植物中有两类GOGAT, NADH-GOGAT(EC 1.4.1.14)和Fd-GOGAT(EC 1.4.7.1), 它们分别以NADH和铁氧还蛋白(Fd)为辅酶. NADH-GOGAT定位于非光合组织如根的质体中, 而Fd-GOGAT则定位于叶绿体中^[2]. 在豆类植物的根瘤中, NADH-GOGAT主要负责吸收根瘤菌固定的氮, 而在非豆类植物中, NADH-GOGAT的功能主要是氮素的初吸收以及氨基酸代谢产生氮的再吸收. Fd-GOGAT的主要功能被认为是对植物光呼吸过程中释放的氨进行再吸收^[2]. 已经从多种植物如苜蓿(*Medicago sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻^[3]和大豆(*Glycine max*)^[4]中克隆到了NADH-GOGAT的cDNA, Fd-GOGAT的cDNA也相继从玉米(*Zea mays*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、大麦(*Hordeum*

vulgare)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)和拟南芥中克隆^[2]。

拟南芥有 2 个 Fd-GOGAT 基因(*AtGLU1* 和 *AtGLU2*)和一个 NADH-GOGAT 基因(*AtGLT1*)^[5,6]。*AtGLU1* 的主要功能是对光呼吸过程中产生的氨进行再吸收, 该基因功能已经在其突变体(*gls*)的研究中得到证明, *AtGLU1* 在叶片中可能具有氮素的初级吸收作用, 而 *AtGLU2* 则可能在根中发挥着氮素初级吸收的功能^[5]。*AtGLU1* 的 mRNA 在根系中的表达量高于叶片, 表明其主要的功能为吸收非光呼吸来源的氨并提供谷氨酸为植物生长发育需要^[6]。

通过在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 KOME(<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>) 进行检索发现, 水稻中含有两个 Fd-GOGAT 基因, *OsFd-GOGAT1* 主要在叶片表达^[7], 在根部也检测到了它的存在^[8,9]。*OsFd-GOGAT2* 可能在根部编码一个不同的 Fd-GOGAT 蛋白, 如 Suzuki 等人^[7]所述, 具有与叶片 Fd-GOGAT1 不同的免疫特性, *OsFd-GOGAT2* 在体内的功能仍然不清楚。水稻基因组中有两个 NADH-GOGAT 基因表达, *OsNADH-GOGAT1* mRNA 主要在正在发育的组织如未成熟叶片、发育早期的小穗以及根部表达^[10,11], 而 NADH-GOGAT 的酶活性在这些组织中也较高^[12-14]。在根系中, 通过添加铵根离子可以诱导 *OsNADH-GOGAT1* 转录和蛋白水平上升^[8,9,15,16]。对 *OsNADH-GOGAT2* 的研究表明, 其只在叶片和叶鞘转录表达^[11]。

GS/GOGAT 循环位于碳氮代谢的交叉点, 超量表达 NADH-GOGAT 和 GS 被认为具有提高氮素利用率的潜力^[1]。也因为这一目的, 许多研究都集中在 GS 基

因上, 对其进行超量表达, 有研究已经获得了较好的结果^[17]。而由于 GOGAT 基因较长, 对它进行研究的报道较少^[18,19], 关于 GOGAT 基因在植物体内是如何对碳氮代谢造成影响的, 一直没有较为系统的报道。

为了获得水稻 GOGAT 基因家族的更多信息, 首先利用水稻全基因组芯片数据对 4 个水稻 GOGAT 基因在 25 个组织和器官中的转录谱进行了分析, 然后利用 NADH-GOGAT 和 Fd-GOGAT 表达均被抑制的转基因水稻为材料, 系统的研究了 GOGAT 基因被抑制后对水稻碳氮代谢的影响。转录谱分析表明, 水稻 GOGAT 基因家族的表达具有组织和器官的特异性, 表明它们在体内执行着不同的功能。GOGAT 基因家族的抑制表达导致水稻分蘖数、地上部干重、单株产量显著下降, 其叶片中的硝酸根、部分游离氨基酸、叶绿素、糖、糖磷酸以及吡啶核苷酸等的含量较对照显著下降, 但叶片游离氨、2-OG 及异柠檬酸含量上升。分析表明, 谷氨酸合酶在水稻的碳氮代谢过程中扮演着重要角色, 对于水稻氮素的高效同化过程极为重要。对 GOGAT 基因的功能与这些影响效应之间的关系也在文中进行了阐述。

1 材料与方法

1.1 水稻 GOGAT 基因转录谱及进化树分析

水稻 GOGAT 家族基因在 3 个水稻品种(明恢 63、珍汕 97 和汕优 63)的 25 个不同组织和器官的转录谱数据来自于 CREP 网站数据库(<http://crep.ncpgr.cn>)。利用 GOGAT 的蛋白序列, 通过软件 ClustalX 1.83 和 MEGA4, 构建了 GOGAT 蛋白的系统进化树(图 1)。

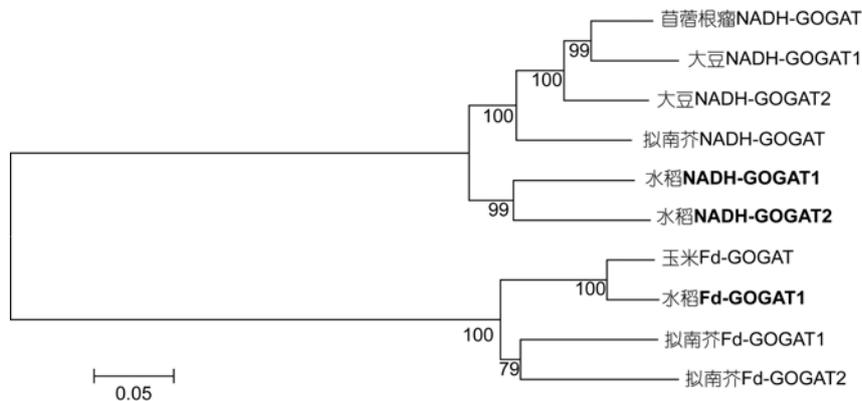


图 1 植物 GOGAT 蛋白进化树分析

蛋白序列通过 CLUSTAL X(1.83)进行多重排定, MEGA4 软件进行分析。分支上的数表示 Bootstrap 值

1.2 载体构建和水稻遗传转化

利用含有 *Nhe* I 接头的引物 Glt1F 和 Glt1R(表 1), 通过 PCR 扩增, 从日本晴 BAC 克隆(a0079a11)中获得了编码水稻 *OsNADH-GOGAT1* 的基因组片段. 通过酶切-连接的方法, 将该片段正向克隆到 pCAMBIA 1301S 载体的 CaMV 35S 启动子和 Nos polyA 终止子间的多克隆位点(MCS)上. 通过农杆菌介导的遗传转化方法, 将该嵌合片段转移到粳稻品种中花 11^[20]. 设计特异引物对转基因植株进行阳性检测, 正向引物 1301sF 根据 pCAMBIA 1301s 载体序列设计, 反向引物根据转入的 *OsNADH-GOGAT1* 片段序列设计(表 1).

1.3 植物材料的管理与取样

对于水培实验, 转基因植株和野生型中花 11 的种子经催芽后播种于沙盘中, 待幼苗于 2 叶 1 心时转移到 Yoshida^[21]培养液中进行培养, 营养液每周更换一次. 田间实验时, 各转基因家系、野生型和分离出的阴性家系根据随机区组设计进行栽培, 每个小区种植 30 株, 每个家系设 3 个重复. 田间管理如浇灌、除草及喷施农药等按照常规方法进行. 对于 real-time RT-PCR 以及酶活性检测的叶片和根系样品, 取自 5~6 叶期的水培植株, 代谢物测定的叶片样品取自田间移苗 38 天后的植株, 白天于 10:00~11:30 取样, 晚上于 22:00~24:00 取样.

1.4 Southern 杂交和 Northern 杂交分析

通过 CTAB 法提取 T₀ 代转基因植株的基因组 DNA, 取 5 μg 通过 *Hind*III 进行酶解, 酶解 DNA 转移到 Hybond N⁺ 尼龙膜上(Amersham, Buckinghamshire,

UK)进行 Southern 杂交分析. 根据操作手册, 利用 TriZol 试剂(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)提取叶片总 RNA, 取 15 μg 总 RNA 进行 Northern 杂交分析. 分子杂交参照 Sambrook 和 Russell^[22]方法进行, 用 ³²P 标记的 *OsNADH-GOGAT1* 特异编码区段为探针进行 Northern 杂交, ³²P 标记的 GUS 基因片段为探针进行 Southern 杂交(表 1), 通过放射性自显影技术进行检测.

1.5 酶活检测

从水培植株上取得的叶片和根样品立即放在冰上, 带回实验室检测. 精确称取 0.2 g 样品, 放入预冷的研钵中, 加入 1.5 mL 预冷的提取缓冲液, 添加少量石英砂在冰上研磨. 匀浆收集到一个 2.0 mL Eppendorf[®]离心管中, 4℃下 16000×g 离心 16 min, 上清液转移到新的离心管中进行酶活测定. 提取缓冲液组成如下: 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L benzamidine, 1 mmol/L ε-aminocaproic acid, 1 mmol/L PMSF 和 10 μmol/L leupeptin, PMSF 在提取前临时加入. 部分提取的粗酶液可添加甘油到 50%, 放入 -20℃ 保存. NADH-GOGAT 活性测定参照 Hecht 等人^[23]的方法进行, 丙氨酸转氨酶(AlaAT)、天冬氨酸转氨酶(AspAT)、果糖-1,6-二磷酸酯酶(FBPase)、葡萄糖激酶(GlcK)、果糖激酶(FruK)、NADP-葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)、NADP-异柠檬酸脱氢酶(NADP-ICDH)、莽草酸脱氢酶(ShikDH)以及磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEPC)的活性测定参照 Gibon 等人^[24]的方法进行, 在 340 nm 下进行检测. Fd-GOGAT 以及硝酸还原酶(NR)活性测定参照 Gibon 等人^[24]的方法进行, GS 活性测

表 1 研究中使用的引物

基因名称	引物名称	引物序列(5'→3')	引物作用
<i>OsNADH-GOGAT1</i>	Glt1F	GGTGGCTAG CGTACGGTCTAATGCTCGTCTTTGATGC	基因扩增
	Glt1R	CTCTGCTAGCGTGGTGACATTTACTCCTGATGGCCAAG	基因扩增
	Positive NA1	ACTGCAGACGTGGACAATCACT	阳性检测
	Nor-Glt1F	GGCTGCTCAGTACTGTGTTGAA	Northern 探针
	Nor-Glt1R	GTTCCCTTGCAAGCTTAGCAG	Northern 探针
<i>OsFd-GOGAT1</i>	Glu1F	TGTTGAGGGCACTGGAGATCATT	Real-time RT-PCR
	Glu1R	AATATAGGCAAGGCCACCCGTCAT	Real-time RT-PCR
<i>OsNADH-GOGAT2</i>	Re-Glt2F	CCTGTGCAAGGATGATGAAGGTGAAACC	Real-time RT-PCR
	Re-Glt2R	TGCATGGCCCTACTATCTTCGCATCA	Real-time RT-PCR
1301s vector	1301sF	CACACAGGAAACAGCTATGACC	阳性检测
<i>GUS</i>	GUSF	ACGACTCGTCCGTCCTGTAGAA	Southern 杂交探针
	GUSR	CGGTTTCGTTGGCAATACTCC	Southern 杂交探针

定参照 Migge 等人^[25]的方法进行. 亚硝酸还原酶(NiR)活性测定参照 Scheible 等人^[26]的方法进行, 谷氨酸脱氢酶(GDH)活性参照 Turano 等人^[27]的方法进行, NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH)活性测定参照 Jenner 等人^[28]的方法进行, 丙酮酸激酶活性(PK)测定参照 Borsani 等人^[29]的方法进行.

1.6 代谢物分析

叶片可溶性糖、糖磷酸以及有机酸提取参照 Schneiderei 等人^[30]的方法进行. 2-OG, 异柠檬酸、丙酮酸以及草酸(OAA)含量通过相应的酶促反应进行测定, 酶反应引起 NAD(H)或 NADP(H)含量变化, NAD(H)或 NADP(H)的含量变化又通过与 PES-MTT 偶联进行测定^[31]. 苹果酸含量参照 Novitskaya 等人^[32]方法进行测定, 糖磷酸含量参照 Gibon 等人^[31]的方法进行测定, 葡萄糖、果糖、蔗糖含量使用 Megazyme K-SUFRG 试剂盒进行测定, 吡啶核苷酸的提取测定参照 Gibon 和 Larher^[33]的方法进行.

叶片硝酸盐含量参照 Dutilleul 等人^[34]的方法进行测定. 游离铵使用 Megazyme K-AMIAR 试剂盒进行测定. 叶片游离氨基酸由 80%乙醇提取, 利用日立 L-8800 氨基酸检测仪进行测定. 叶片淀粉含量参照 Wang 等人^[35]的方法进行测定. 叶片可溶性糖含量利用蒽酮比色法进行测定^[36], 可溶性蛋白含量参照 Bradford^[37]的方法, 以 BSA 作为标准进行测定.

1.7 Real-time RT-PCR 检测

总 RNA 样品通过 RNase-free DNase I(Invitrogen)处理, 去除残存的基因组 DNA. 取处理的总 RNA 样品 3 μg , 利用 SuperScript II 反转录酶(Invitrogen)和 oligo dT(Promega, Madison, WI, USA)合成第一链 cDNA, 反转录产物稀释到 80 μL 待用. Real-time RT-PCR 引物通过 Primer Express 2.0 软件设计(表 1) real-time RT-PCR 反应在 ABI PRISM 7500 real-time PCR 仪(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)上进行, 反应体系为: 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq(Takara, Kyoto, Japan), 0.5 μL ROX Reference Dye II (Takara), 1.0 μL cDNA, 1.0 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 基因特异引物, 总体积 25 μL . 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 34 s, 40 个循环; 延伸期间收集信号. 水稻 *Actin* 基因作为内参, 引物 ActinF 和 ActinR 见表 1. 获得数据利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行数据分析^[38].

1.8 叶绿素含量和 Fv/Fm 测定

叶绿素通过 80%丙酮提取, 在 663 和 646 nm 下测定吸光度后计算浓度. 利用 FMS2 叶绿素荧光测定仪(Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK)参照 Werner 等人^[39]的方法测定 Fv/Fm.

1.9 统计分析

数据的差异显著性测验利用 SPSS 12.0 进行.

2 结果与分析

2.1 水稻 GOGAT 蛋白与转录谱分析

通过利用已知序列在 NCBI, KOME 和 TIGR 数据库进行搜索比对, 在水稻中获得了两个 Fd-GOGAT 基因和两个 NADH-GOGAT 基因, 其中 XM_479407 对应 *OsFd-GOGAT1*, AK110476 对应 *OsFd-GOGAT2*, AB008845 对应 *OsNADH-GOGAT1*, LOC_Os05g48200.1 对应 *OsNADH-GOGAT2*. 氨基酸序列对比表明, *OsNADH-GOGAT2* 与 *OsNADH-GOGAT1* 具有 80% 的相似性, *OsNADH-GOGAT1* 与 *OsFd-GOGAT1* 具有 43% 的相似性, *OsNADH-GOGAT2* 与 *OsFd-GOGAT1* 具有 42% 的相似性. 植物 GOGAT 蛋白的进化关系可参见图 1.

转录谱数据表明, 4 个 GOGAT 基因的转录表达模式与前人研究结果相似^[12-14], 但仍有些差别. 如 *OsNADH-GOGAT1* 除在根部高量表达外, 其再开花前 1 天的雄蕊中也高量表达, 但在胚乳中表达量并不高(图 2(A)), 表明其具有为雄蕊发育提供氮素营养或氨基酸的功能. *OsNADH-GOGAT2* 主要在叶片和叶鞘表达, 在授粉后 14 天和 21 天的胚乳中表达量也较高, 但在授粉后 7 天胚乳中表达量并不高(图 2(B)), 这在以往的研究中并未报道. 水稻 *NADH-GOGAT2* 可能也参与到了为种子的生长发育提供氮素或氨基酸的活动中. *OsFd-GOGAT1* 在多数组织中都表达, 但在叶片和叶鞘中表达量最高(图 2(C)), 表明该基因也具有对光呼吸释放氨的再吸收功能. *OsFd-GOGAT2* 在所有组织中表达量都很低, 且没有发现表达的特异性(数据未显示).

2.2 转基因植株的分子鉴定

通过农杆菌介导的遗传转化方法, 本研究共获

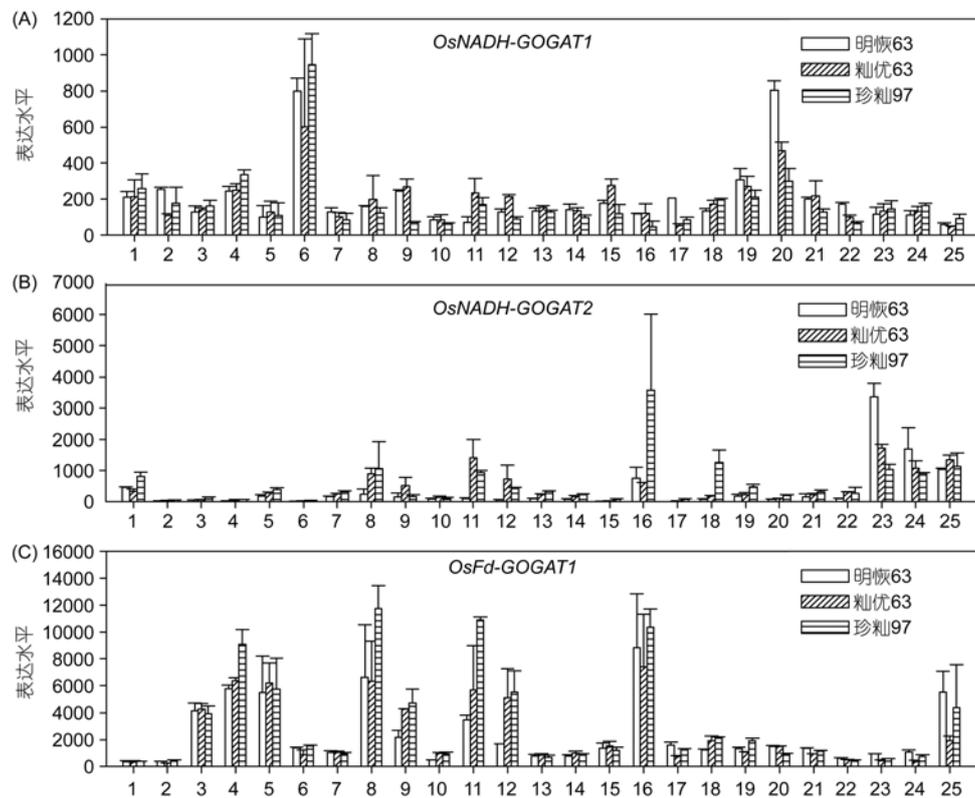


图2 水稻 NADH-GOGAT 基因在明恢 63、珍汕 97 和汕优 63 中的表达谱

X 轴代表水稻的不同组织和器官, Y 轴代表基因表达的信号值. 组织器官名称: 1, 吸水 72 h 种子; 2, 诱导 15 天的愈伤组织; 3, 播种后 3 天的幼苗; 4, 3 叶期幼苗; 5, 2 个分蘖期的幼苗茎叶; 6, 2 个分蘖期的根; 7, 二次原基分化时的幼穗花序; 8, 幼穗二次原基分化时的叶片; 9, 幼穗二次原基分化时的叶鞘; 10, 4~5 cm 的幼穗; 11, 4~5 cm 幼穗期的叶片; 12, 4~5 cm 幼穗期的叶鞘; 13, 雄蕊和雌蕊原基分化期的小穗; 14, 花粉母细胞形成期的小穗; 15, 抽穗期 5 天前的茎; 16, 抽穗期 5 天前的剑叶; 17, 抽穗期的茎; 18, 抽穗期的小穗; 19, 开花前 1 天的颖壳; 20, 开花前 1 天的雄蕊; 21, 授粉后 3 天的小穗; 22, 授粉后 7 天的胚乳; 23, 授粉后 14 天的胚乳; 24, 授粉后 21 天的胚乳; 25, 抽穗后 14 天的剑叶

得了 50 多个 T_0 代转基因植株, PCR 阳性检测表明, 大于 85% 的植株为阳性, 而其中约有三分之一的阳性植株具有表型变化. Northern 杂交结果表明, 所有具有表型变化的转基因植株均累积了降解的 *OsNADH-GOGAT1* mRNA, 导致了共抑制(图 3(A)), 而没有表型变化的植株则没有降解的 mRNA 积累. Northern 杂交的探针是针对 *OsNADH-GOGAT1* 序列特异设计的, 野生型和非共抑制植株没有获得杂交信号可能是由于该基因在叶片中表达量较低所致(图 2(A)). 共抑制株系有 NA1-4, NA1-5, NA1-7, NA1-8, NA1-11, NA1-17, NA1-20, NA1-40, NA1-50, NA1-68, NA1-72, NA1-75, NA1-81 和 NA1-95. Southern 杂交分析表明, 多数转基因植株为单拷贝(图 3(B)).

通过 real-time RT-PCR 方法, 对转基因植株和野生型植株中的 *OsNADH-GOGAT2* 以及 *OsFd-GOGAT1*

的转录本进行了检测. 结果表明, 转基因植株中的 *OsNADH-GOGAT2* 和 *OsFd-GOGAT1* 的表达也受到显著抑制(图 4), *OsNADH-GOGAT2* 的抑制更加显著, 其转录水平仅为野生型的 1/100-1/15.

2.3 共抑制导致表型变化及 NADH-GOGAT 酶活降低

水培条件下, 共抑制导致植株地上部干重、根干重以及根数量显著下降(图 5). 共抑制导致的表型变化在田间更加显著, 如更加矮小、黄化. 农艺性状包括分蘖数、株高、地上部干重、单株产量以及千粒重等显著下降(表 2 和图 3(C)). 经特异引物(表 1)PCR 检测表明, 表型变化与转入片段共分离.

通过对共抑制转基因植株和野生型植株的 NADH-GOGAT 酶活进行测定, 结果表明, 共抑制植

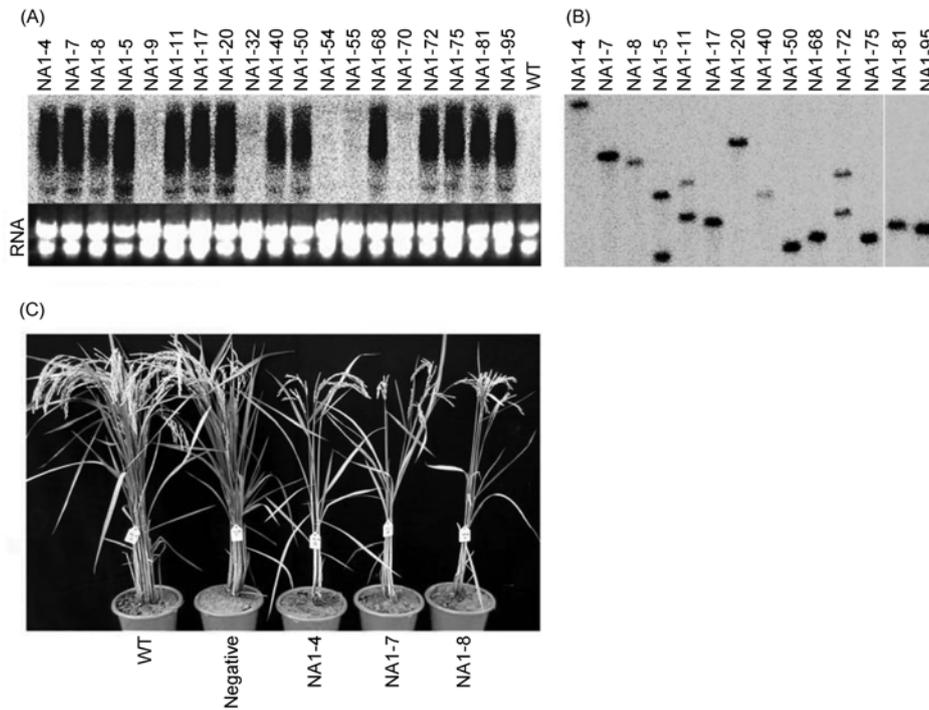


图3 转基因植株的表型及分子鉴定

(A) 转基因植株叶片中 *OsNADH-GOGAT1* 表达量的 Northern 杂交分析; (B) 转基因植株的 Southern 杂交检测(以 GUS 基因片段为探针); (C) 共抑制植株表型

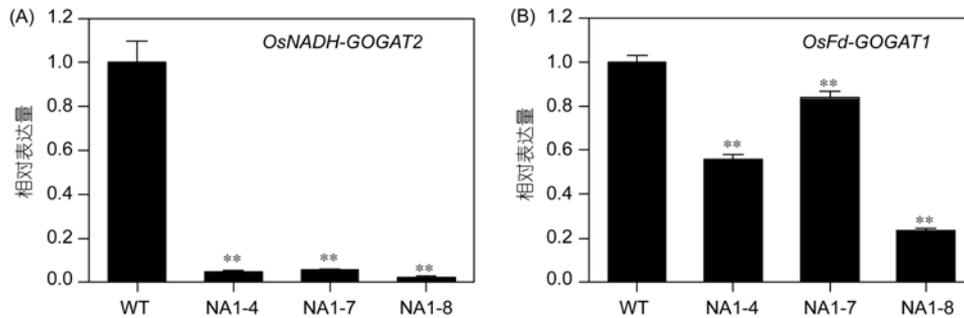


图4 植株中 *OsNADH-GOGAT2* 和 *OsFd-GOGAT1* 的表达水平

(A) 叶片中 *OsNADH-GOGAT2* 的相对表达水平; (B) 叶片中 *OsFd-GOGAT1* 的相对表达水平. 图中数据代表 3 次技术重复的 $\bar{x} \pm SE$. 星号代表经 *t* 测验检测与野生型(WT)差异显著, *为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$

株的 NADH-GOGAT 酶活显著降低(表 3). 与野生型相比, 共抑制植株叶片酶活降低 34.8%~70.8%, 根系降低更加显著, 达到 65%~87%.

2.4 共抑制导致部分碳氮代谢相关酶活发生变化

本研究也检测了部分其他碳氮代谢相关酶的活性. 结果表明, 只有叶片的 Fd-GOGAT、根部 G6PDH 和 ShikDH 呈现出一致的变化, NR 活性在叶片中增加

了 10.5%~64.2%, 而在根系中降低了 15.6%~74.2%. 与野生型相比, 叶片中 Fd-GOGAT 酶活降低了 27.3%~54.7%, 这与其转录水平降低相一致. 此外, 其他酶活性变化较小(表 3).

2.5 共抑制对代谢谱的影响

为了研究 *GOGAT* 抑制表达对氮素吸收与利用的影响, 本研究测定了一些含氮化合物的含量(图 6(A)~

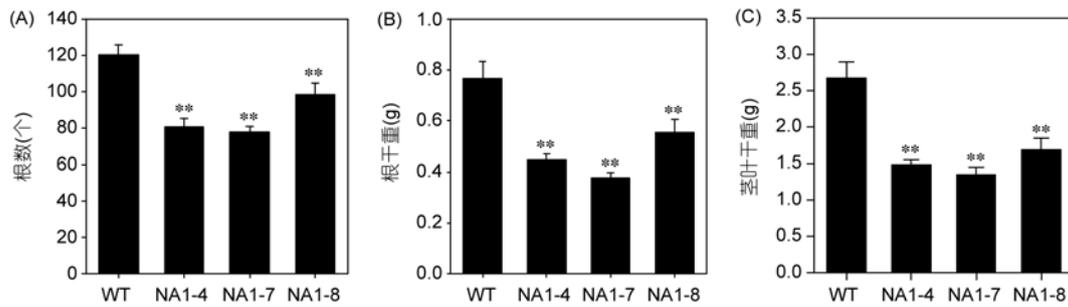


图5 水培条件下的表型变化

各指标于转入水培液后30天测定。(A) 水培苗根的数量;(B) 根干重;(C) 地上部干重. 图中数据代表至少7个植株的 $\bar{x} \pm SE$. 星号代表经 *t* 测验检测与野生型(WT)差异显著, *为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$

表2 共抑制植株与野生型植株的农艺性状比较

性状	WT	NA1-4	NA1-7	NA1-8
分蘖数	10.04±0.34	2.44±0.13**	2.52±0.15**	5.00±0.30**
株高(cm)	99.10±0.70	79.97±0.77**	81.86±0.73**	79.38±3.04**
地上部干重(g)	48.48±1.89	7.01±0.47**	7.40±0.42**	14.32±0.95**
单株产量(g)	27.77±1.14	4.17±0.24**	4.56±0.29**	7.63±0.49**
千粒重(g)	2.46±0.03	2.32±0.03**	2.35±0.04	2.28±0.03**

植株于成熟时采收, 每个数据代表至少10独立单株的 $\bar{x} \pm SE$, 星号代表经 *t* 测验检测与野生型(WT)差异显著, *为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$

表3 碳氮代谢相关酶活性变化

酶	叶片				根			
	WT	NA1-4	NA1-7	NA1-8	WT	NA1-4	NA1-7	NA1-8
NADH-GOGAT	157.7±17.7	32.9±3.2**	23.9±0.4**	53.9±21.6**	121.7±6.3	58.2±8.8**	68.6±7.9**	79.4±9.4**
Fd-GOGAT	111.8±17.1	64.9±18.0**	81.3±14.3	50.7±15.2*	-	-	-	-
NADP-MDH	291.1±67.1	295.8±55.1	260.9±35.8	288.7±67.1	-	-	-	-
GS	3298.0±217.7	3187.9±70.2	3467.5±171.3	2917.0±112.9	548.9±42.2	607.7±114.1	714.1±148.4	722.5±261.2
NR	191.0±5.8	276.1±5.8*	313.6±11.3*	211.1±31.4	150.3±9.0	84.7±2.3*	41.8±6.6**	71.2±10.3**
NiR	261.6±26.4	295.5±12.4	302.0±12.6	358.0±75.4	366.5±8.0	338.0±11.7	333.3±2.6	364.2±26.3
NAD-GDH	2039.7±24.0	2019.5±60.3	2149.7±22.5	1921.5±72.1	2969.6±101.0	3338.5±83.0*	2621.4±25.4	3143.2±121.1
NADP-GDH	193.0±5.4	191.4±12.6	155.5±20.6	158.7±19.4	459.4±18.8	555.2±24.7*	434.6±35.5	547.0±29.2
AlaAT	2781.1±141.6	2974.8±183.9	2943.3±230.5	2589.8±294.8	1285.6±57.3	1781.3±94.9*	1498.1±94.1	1169.7±88.4
AspAT	5578.6±188.0	5586.1±121.0	5219.8±163.7	5244.1±263.5	3106.1±106.0	3301.1±182.8	3011.0±106.7	2791.4±41.1
PEPCase	1503.4±155.9	884.5±201.7*	1104.5±116.3	1236.6±61.8	343.8±68.4	616.4±144.7*	315.4±35.9	367.0±32.6
NADP-ICDH	1076.6±129.0	1106.3±54.6	1066.3±29.3	1020.6±88.4	1165.1±54.7	1280.1±25.2	1171.7±19.4	1301.2±47.1*
PK	440.7±25.1	427.9±61.8	489.0±12.2	462.4±21.8	382.1±23.4	372.8±16.6	371.3±10.1	408.1±9.0
ShikDH	1508±57.5	1559±64.9	1547±48.0	1419±78.3	538.4±27.9	429.9±6.1*	389.5±11.2*	517.7±36.7
G6PDH	2768.7±199.9	2475.1±89.9	2408.4±28.4	2597.5±78.6	2267.9±86.7	2027.3±124.3	1747.0±188.9*	1841.8±82.4*
FruK	767.4±39.3	771.8±33.8	694.7±43.8	695.7±18.5	509.2±21.9	563.1±27.4	500.4±23.1	477.4±15.0
GlcK	462.4±21.8	375.8±21.0*	358.7±39.7*	384.6±11.2	719.9±34.1	749.3±55.7	677.1±32.8	640.5±13.0
FBPase	2707.5±174.8	2629.4±12.9	2691.8±103.8	2584.7±132.1	909.6±33.9	937.8±51.4	929.8±15.1	842.7±26.2

材料取自5~6叶期的水培苗, 每个家系取3株分别进行测定, 每株测定进行3次技术重复. 数值代表 $\bar{x} \pm SE$, 星号代表经 *t* 测验检测与野生型(WT)差异显著, *为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$. 酶活测定单位为: $\text{nmol g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$. -代表未测定

(D)). 结果表明, 与野生型相比, 共抑制植株的地上部总氮含量降低了20.9%~23.3%, 但种子中的总氮含量没有变化. 另外, 共抑制植株叶片硝酸盐含量也显

著降低, 降幅从19.8%到26.3%. 叶片中可溶性蛋白含量也有所降低, 但并不显著. 与硝酸盐含量变化相反, 共抑制植株叶片中的游离铵含量得到了累积.

叶片游离氨基酸含量也进行了测定(表 4). 与野生型比较, 共抑制植株中部分游离氨基酸, 如谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸以及丙氨酸等含量显著下降.

由于碳氮代谢在植物中紧密相关, 研究中对部分含碳化合物也进行了测定. 结果表明, 共抑制导致叶片葡萄糖、果糖以及可溶性糖含量显著降低, 但叶片的淀粉含量有所上升(图 7(A)~(E)). 共抑制植株中糖磷酸的含量极显著降低(图 7(F)), 葡萄糖-6-磷酸、果糖-6-磷酸和葡萄糖-1-磷酸含量分别下降 87.4%~

91.1%, 75.8%~91.6%和 50.7%~73.6%.

2-OG 不仅是 NADH-GOGAT 的底物, 同时也是谷氨酸和谷氨酰胺的碳骨架, 其在多数共抑制转基因家系中得到了累积. 异柠檬酸作为合成 2-OG 的前体, 其含量也显著增加. 除此之外, OAA、苹果酸以及丙酮酸在叶片中的含量也有所增加, 但在部分家系中并不显著(图 8).

吡啶核苷酸不仅是含氮化合物, 同时也是与体内氧化还原反应密切联系的一类物质. 与野生型植株

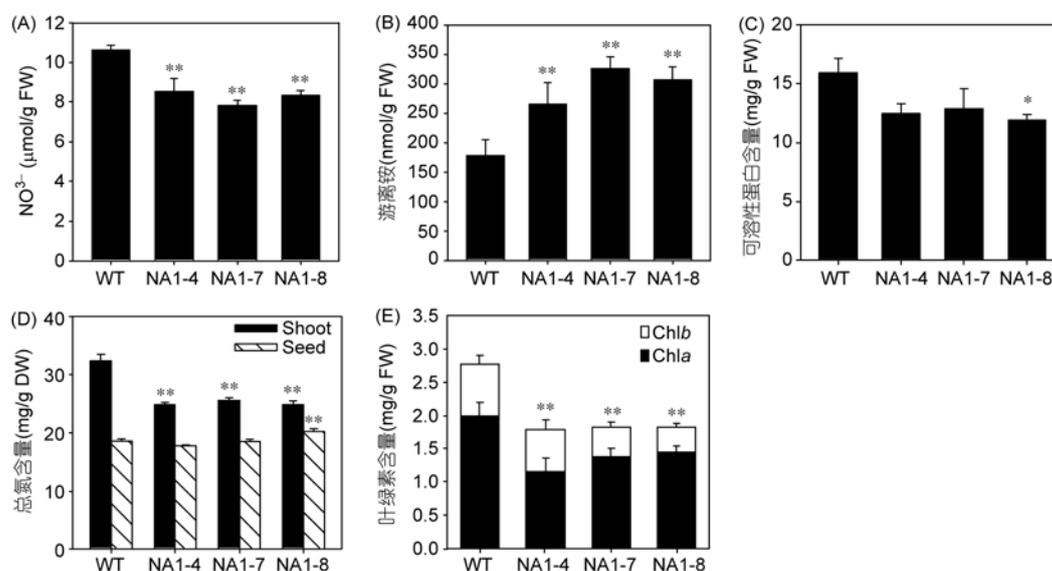


图 6 含氮化合物含量测定

剑叶中硝酸盐(A)、游离铵(B)、可溶性蛋白(C)和叶绿素(E)含量; 地上部和种子总氮含量(D). 每个数据代表 6 个独立单株的 $\bar{x} \pm SE$, 星号代表经 *t* 测验检测与野生型(WT)差异显著. *为 $P < 0.05$; **为 $P < 0.01$

表 4 叶片中游离氨基酸含量比较^{a)}

氨基酸(nmol g ⁻¹ FW)	WT	NA1-4	NA1-7	NA1-8
Asp	162.9±47.9	35.7±1.6*	10.6±3.8*	36.6±8.4*
Thr	11.9±6.7	20.1±0.7	16.0±1.5	13.2±1.3
Glu	1946.7±273.0	715.2±74.5*	511.0±23.9*	749.3±185.2*
Gly	270.9±57.1	89.9±16.6*	27.2±3.9*	145.3±20.2*
Ala	727.1±134.6	169.5±48.0*	13.1±2.3*	337.5±67.3*
Cys	88.6±14.3	56.1±2.6*	60.8±5.2*	68.2±8.8
Val	74.1±37.4	61.8±15.8	41.2±7.8	46.6±6.7
Leu	34.8±7.9	32.4±4.5	34.6±4.4	20.7±2.8
Tyr	71.2±6.6	50.4±2.1*	56.1±4.8	59.2±4.7
Phe	40.2±5.7	33.8±1.3	15.0±5.5*	33.9±0.6
Lys	12.9±3.3	11.0±3.7	4.2±0.8*	6.8±2.5
Arg	6.0±5.3	5.7±3.1	2.4±1.2	2.8±1.5

a) 样品取自田间定植后 38 天植株的剑叶, 每个数据代表 3 个独立单株的 $\bar{x} \pm SE$, 星号代表经 *t* 测验检测与野生型(WT)差异显著, *为 $P < 0.05$

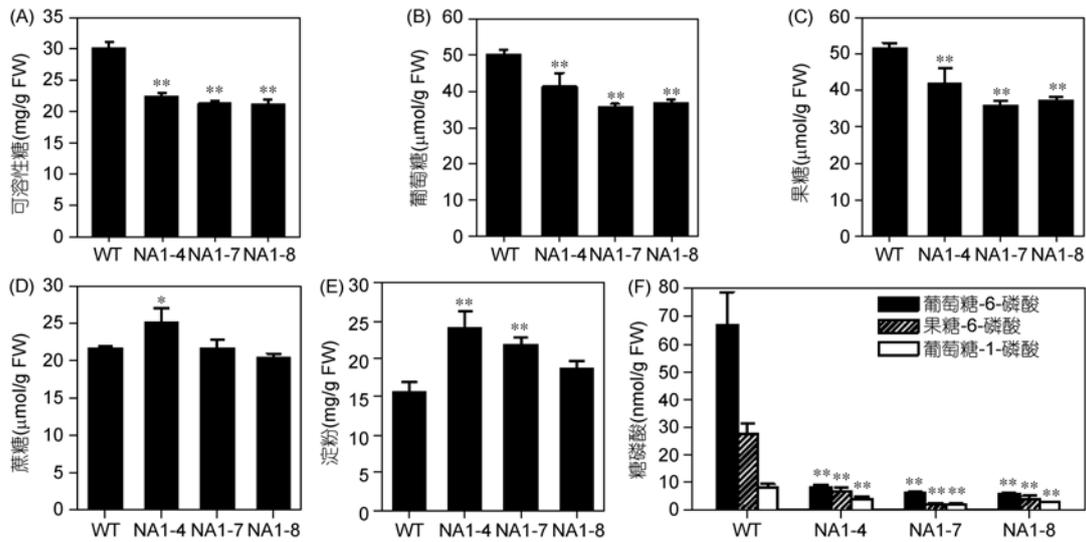


图7 糖和糖磷酸含量比较

样品取自田间植株剑叶. (A) 总可溶性糖; (B) 葡萄糖; (C) 果糖; (D) 蔗糖; (E) 淀粉; (F) 糖磷酸. 每个家系至少取3株分别进行测定, 星号代表经 *t* 测验检测与野生型(WT)差异显著, *为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$

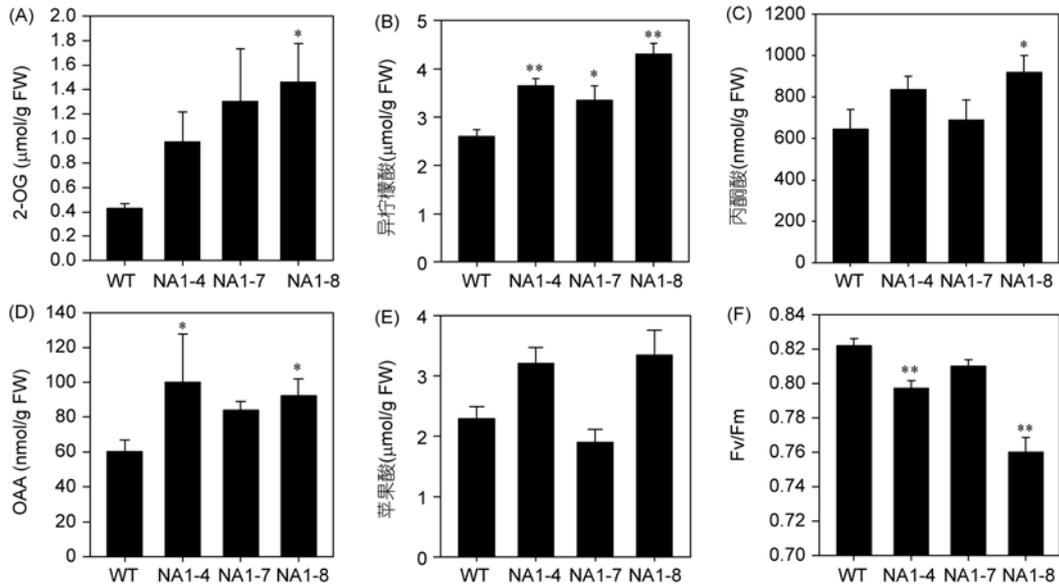


图8 有机酸含量及 Fv/Fm 比较

样品取自田间植株剑叶. (A) 2-OG; (B) 异柠檬酸; (C) 丙酮酸; (D) OAA; (E) 苹果酸; (F) 剑叶 Fv/Fm. 每个数据代表至少3个独立单株的 $\bar{x} \pm SE$, 星号代表经 *t* 测验检测与野生型(WT)差异显著, *为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$

比较, 共抑制植株内的四类吡啶核苷酸包括 NADH, NAD⁺, NADPH 以及 NADP⁺ 含量均显著下降. 而 NADP⁺ 与 NAD⁺ 是吡啶核苷酸的主要存在形式, 其降幅较 NADPH 和 NADH 大, 导致 NADP⁺/NADPH 和 NAD⁺/NADH 比值也显著降低, 而在夜晚尤为显著

(图 9(A)~(F)).

2.6 共抑制导致叶绿素含量以及 Fv/Fm 降低

与共抑制植株的黄花表型一致, 其叶绿素 a、叶绿素 b 以及总叶绿素含量均显著降低(图 6(E)). 同时,

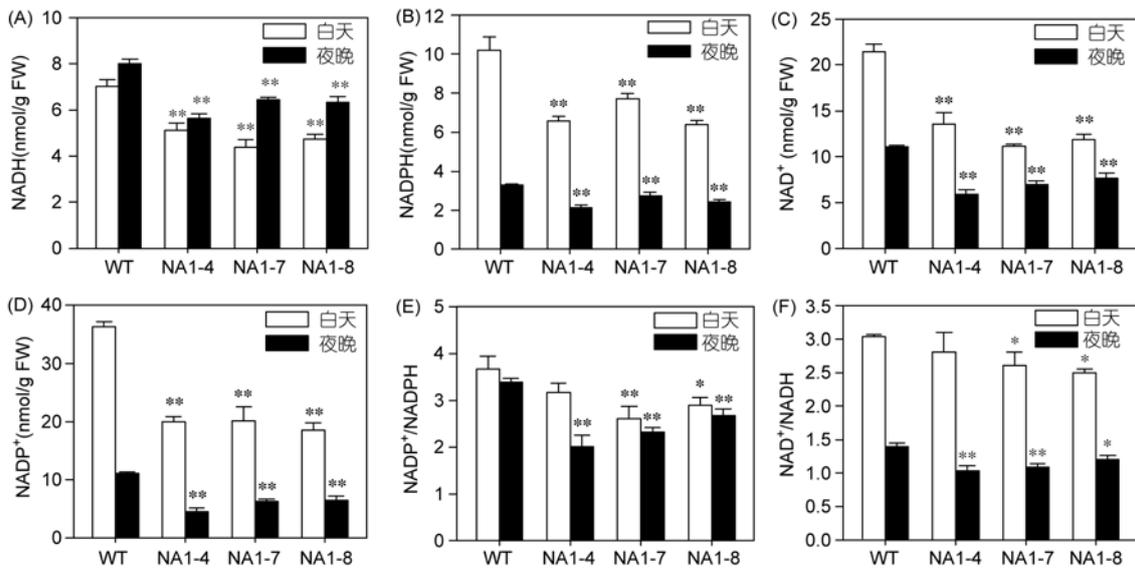


图9 吡啶核苷酸水平比较

样品取自田间植株剑叶。(A) NADH; (B) NADPH; (C) NAD⁺; (D) NADP⁺; (E) NADP⁺/NADPH; (F) NAD⁺/NADH. 每个数据代表至少6个独立单株的 $\bar{x} \pm SE$, 星号代表经 *t* 测验检测与野生型(WT)差异显著, *为 $P < 0.05$, **为 $P < 0.01$

与野生型比较, 其叶片 F_v/F_m 也显著下降(图 8(F)), 这均表明, 抑制 GOGAT 的表达导致植株光合作用能力的降低。

3 讨论

3.1 NADH-GOGATs 的抑制表达导致转基因植株表型变化

本研究中, 约有 1/3 的 T₀代转基因植株表现出极端的表型变化, 我们认为这是由于 *OsNADH-GOGATs* 的共抑制所导致。首先, Northern 杂交结果显示, 在表型变化的植株中检测到了明显的拖带现象(图 3(A)), 表明在这些植株中转入基因至少已经部分降解。其次, 由于转入基因与内源基因序列相同而无法区分, 未能得知内源 *OsNADH-GOGAT1* 转录本的表达情况, 但本研究检测了同家族的其他基因表达。结果表明, *OsNADH-GOGAT2* 和 *OsFd-GOGAT1* 的表达在表型变化植株中显著受到抑制。Kunz 等人^[40]认为, 序列间具有 60%~70%的相似性就可能翻译后水平沉默, 而 *OsNADH-GOGAT1* 和 *OsNADH-GOGAT2* 的 cDNA 序列具有 81%的相似性, 已经满足了这一条件。*OsNADH-GOGAT2* 表达受到显著抑制表明内源 *OsNADH-GOGAT1* 表达同样已经受到抑制。再次,

OsNADH-GOGAT1 主要在根部表达, 而 *OsNADH-GOGAT2* 主要在叶片和叶鞘表达, 表型变化植株的根部和叶片的 NADH-GOGAT 酶活性均极显著降低(表 3), 这表明 *OsNADH-GOGAT1* 和 *OsNADH-GOGAT2* 的表达均受到了显著抑制。第四, CaMV35S 启动子驱动下在水稻中正义表达部分 *OsNADH-GOGAT2* 片段也导致了共抑制现象, 共抑制植株表现出与本文类似的表型、酶活和代谢谱变化, 通过 real-time RT-PCR 检测表明, 所有内源 GOGAT 基因均受到显著抑制(未发表), 这从侧面说明本文表型变化植株中的内源 *OsNADH-GOGAT1* 也受到了显著抑制。

水稻体内可能存在一种对 *OsNADH-GOGATs* 表达的监测机制, 表达量一旦超过某个阈值则导致共抑制产生, 而 *OsNADH-GOGATs* 的阈值可能较低, 本研究中用 Northern 杂交方法进行检测, 看到表达差异时检测到的 *OsNADH-GOGATs* 的 mRNA 量已经超出了基因沉默阈值。Yamaya 等人^[19]利用粳稻 *NADH-GOGAT1* 本身启动子驱动 *NADH-GOGAT1* cDNA 在籼稻中表达时也发现了共抑制现象。另外, 在烟草中超量表达苜蓿 *NADH-GOGAT* cDNA 时, 超表达植株中 *NADH-GOGAT* mRNA 的累积量并不很高, 而且是通过 RT-PCR 方法检测得知的, 并非 Northern 杂交方法^[18]。其他氮同化基因研究中也发现了共抑制现象,

如 NR, NiR 和 GS^[41,42].

3.2 NADH-GOGAT 与氮代谢

NADH-GOGAT 可以通过调控谷氨酸和谷氨酰胺含量来影响氮代谢. 植物吸收的硝酸根通过 NR 和 NiR 还原为铵, 这些铵与植物直接吸收的铵通过 GS/NADH-GOGAT 循环转化为谷氨酸中的氮^[1], 而谷氨酸是合成其他氨基酸和其他含氮化合物的起始原料^[2]. 本研究中, 抑制 NADH-GOGAT 的表达首先导致叶片游离谷氨酸含量的显著降低(表 4), 其他氨基酸及含氮化合物如叶绿素、吡啶核苷酸等也显著下降(表 4, 图 6 和 9). 因此, 植株地上部总氮含量也显著下降(图 6(D)). 拟南芥 NADH-GOGAT 突变体 *gltI-T* 以及抑制表达 NADH-GOGAT 的转基因苜蓿植株中, 谷氨酸和总氮含量也显著下降^[6,43].

抑制 NADH-GOGAT 表达对氮代谢的影响可能也与其他氮代谢相关酶的变化有关. 同为无机氮, 叶片中硝酸盐含量下降, 而游离铵得到积累(图 6(A)和(B)), 这可能是由于叶片中 NR 活性增加导致, NR 活性增加促进了硝态氮向铵态氮的转变(表 3). 叶片铵态氮的累积还可能由于 Fd-GOGAT 活性的降低(表 3), 这导致光呼吸释放氮的再吸收效率降低. 共抑制植株中, 除 NADH-GOGAT, Fd-GOGAT 和 NR 活性与含氮化合物的含量变化相关外, 多数其他氮代谢相关酶类活性并未发生改变(表 3, 图 6), 酶活性的稳定可能有利于植物对于低氮环境的适应.

水稻中, GS1;2 被认为与 NADH-GOGAT1 偶联, 在根部负责对氮素的初级吸收^[11]. 本研究中, 共抑制植株的 GS 活性并没有发生明显改变(表 3). NADH-GOGAT1 的另一个功能被认为是与 GS1;1 偶联, 负责对转移的氮素重新利用, 以满足种子生长发育的需要^[11]. 不过, 在本研究中, 共抑制植株种子的总氮含量并没有发生显著变化(图 6(D)), 这可能是由于残余的酶活仍然能够满足种子发育对氮素需求, 也可能是由于种子可以通过其他代谢途径来获得氮源.

3.3 NADH-GOGAT 与碳代谢

GOGAT 可以通过 2-OG 对碳代谢产生影响. 作为一种碳骨架, 2-OG 通过 GOGAT 催化的反应整合进入谷氨酸, 同时, 2-OG 又是 TCA 循环中的代谢中产物, 由位于线粒体中的 NAD-IDH 或由位于胞质中的 NADP-ICDH 催化合成^[44]. 本研究中, GOGAT 的抑制

表达对碳代谢产生了影响, 直接的结果即为叶片中 2-OG 和异柠檬酸获得积累(图 8(A)和(B)). 2-OG 是 GOGAT 催化的底物, 而异柠檬酸是合成 2-OG 的前体, 由 NAD-IDH 和 NADP-ICDH 催化生成, NAD-IDH 和 NADP-ICDH 分别以 NAD⁺和 NADP⁺为辅酶. 2-OG 在共抑制植株中的累积表明, GOGAT 催化的反应是植物体内消耗 2-OG 的主要路径. 通过转运蛋白, 2-OG 可在亚细胞结构间进行穿梭转移^[45]. 因此, 局部的 2-OG 浓度变化可能会影响到细胞内其他 2-OG 代谢相关酶类如 TCA 循环相关酶类的变化. 这也可能是导致其他有机酸如 OAA 等增加的原因(图 8(C)-(E)).

共抑制植株叶片的可溶性糖含量和糖磷酸含量显著下降(图 7), 这可能是由于共抑制后叶绿素合成减少(图 6(E)), 从而光合性能降低多导致. 这进一步说明水稻体内碳氮代谢是紧密协调进行的.

3.4 NADH-GOGAT 与吡啶核苷酸水平

本研究中, 共抑制植株中 4 种吡啶核苷酸水平及其比值 NAD⁺/NADH 和 NADP⁺/NADPH 显著降低(图 9). 这表明, GOGAT 受到抑制后导致植株不能合成足够的有机氮, 包括吡啶核苷酸类含氮化合物. 由于 NADH-GOGAT 催化的反应需要 NADH 作为辅酶, 而 NADH-GOGAT 蛋白的减少导致 NADH 的消耗相应降低, NAD⁺相应得到积累, 从而可以部分解释 NAD⁺/NADH 上升的原因. NADH 可以由 NADH 激酶催化形成 NADPH, 而 NADH 激酶广泛存在于细胞质、叶绿体和线粒体中^[46], NADP⁺/NADPH 的变化可能部分归功于 NADH 激酶的作用. 另外, 一些脱氢酶如 NAD-IDH 和 NADP-ICDH, 它们催化相同的反应, 使用相同的底物, 却使用不同的吡啶核苷酸作为辅酶, 这也可能是导致 NADP⁺/NADPH 发生变化的原因之一.

吡啶核苷酸如 NAD(H)和 NADP(H), 不仅是含氮化合物, 而且是作为多种与能量代谢、生物合成有关的酶的辅酶存在, 它们与环境胁迫和生长发育过程中的信号传递紧密相关^[46]. 此外, 其他碳氮代谢相关的酶如 NR, NiR, GDH 和 AspAT 等在体内催化的反应也需要吡啶核苷酸的参与. 通过改变吡啶核苷酸的水平影响硝态氮的吸收以及导致碳氮代谢紊乱的研究在烟草 CMS 突变体中已经报道^[34]. 超量和抑制表达马铃薯线粒体 NADPH 脱氢酶的转基因烟草也导致了代谢谱的变化^[47]. 一般认为, NADH-GOGAT 定

位于质体^[3], NADH 水平的改变可以通过一些底物如 2-OG 和柠檬酸在胞质和不同细胞器间的穿梭对 TCA 循环的酶类产生影响^[45,48], 抑制线粒体酶类引起代

谢谱的变化在其他植物中也有报道^[49]. 本研究中, 引起共抑制植株碳氮代谢改变的原因之一可能就是吡啶核苷酸水平的变化.

参考文献

- 1 Andrews M, Lea P J, Raven J A, et al. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. *Ann Appl Biol*, 2004, 145: 25–40
- 2 Lam H M, Coschigano K T, Oliveira I C, et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, 47: 569–593
- 3 Goto S, Akagawa T, Kojima S, et al. Organization and structure of NADH-dependent glutamate synthase gene from rice plants. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1387: 298–308
- 4 Blanco L, Reddy P M, Silvente S, et al. Molecular cloning, characterization and regulation of two different NADH-glutamate synthase cDNAs in bean nodules. *Plant Cell Environ*, 2008, 31: 454–472
- 5 Coschigano K T, Melo-Oliveira R, Lim J, et al. Arabidopsis *gls* mutants and distinct Fd-GOGAT genes: implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *Plant Cell*, 1998, 10: 741–752
- 6 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. *Plant J*, 2002, 29: 347–358
- 7 Suzuki A, Vidal J, Gadal P. Glutamate synthase isoforms in rice: immunological studies of enzymes in green leaf, etiolated leaf, and root tissues. *Plant Physiol*, 1982, 70: 827–832
- 8 Ishiyama K, Hayakawa T, Yamaya T. Expression of NADH-dependent glutamate synthase protein in the epidermis and exodermis of rice roots in response to the supply of ammonium ions. *Planta*, 1998, 204: 288–294
- 9 Ishiyama K, Kojima S, Takahashi H, et al. Cell type distinct accumulations of mRNA and protein for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to the supply of NH_4^+ . *Plant Physiol Biochem*, 2003, 41: 643–647
- 10 Abiko T, Obara M, Ushioda A, et al. Localization of NAD-isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in rice roots: candidates for providing carbon skeletons to NADH-glutamate synthase. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46: 1724–1734
- 11 Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, 2007, 58: 2319–2327
- 12 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. *Plant Physiol*, 1992, 100: 1427–1432
- 13 Hayakawa T, Yamaya T, Mae T, et al. Changes in the content of two glutamate synthase proteins in spikelets of rice (*Oryza sativa*) plants during ripening. *Plant Physiol*, 1993, 101: 1257–1262
- 14 Hayakawa T, Nakamura T, Hattori F, et al. Cellular localization of NADH-dependent glutamate-synthase protein in vascular bundles of unexpanded leaf blades and young grains of rice plants. *Planta*, 1994, 193: 455–460
- 15 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. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 1197–1204
- 16 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. *Plant Physiol*, 1999, 119: 409–416
- 17 Good A G, Shrawat A K, Muench D G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? *Trends Plant Sci*, 2004, 9: 597–605
- 18 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 Exp Bot*, 2001, 52: 2079–2087
- 19 Yamaya T, Obara M, Nakajima H, et al. Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *J Exp Bot*, 2002, 53: 917–925
- 20 Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*, 1994, 6: 271–282
- 21 Yoshida S, Forno D, Cock J. Laboratory manual for physiological studies of rice. Manila, The Phillipines: Gomez International Rice Research Institute, 1976. 61–65
- 22 Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 1.31–1.119
- 23 Hecht U, Oelmüller R, Schmidt S, et al. Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin-dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta*, 1988, 175: 130–138

- 24 Gibon Y, Blaesing O E, Hannemann J, et al. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell*, 2004, 16: 3304–3325
- 25 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 Exp Bot*, 1997, 48: 1175–1181
- 26 Scheible W R, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, et al. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell*, 1997, 9: 783–798
- 27 Turano F J, Dashner R, Upadhyaya A, et al. Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings. *Plant Physiol*, 1996, 112: 1357–1364
- 28 Jenner H L, Winning B M, Millar A H, et al. NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiol*, 2001, 126: 1139–1149
- 29 Borsani J, Budde C O, Porrini L, et al. Carbon metabolism of peach fruit after harvest: changes in enzymes involved in organic acid and sugar level modifications. *J Exp Bot*, 2009, 60: 1823–1837
- 30 Schneidereit J, Häusler R E, Fiene G, et al. Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism. *Plant J*, 2006, 45: 206–224
- 31 Gibon Y, Vigeolas H, Tiessen A, et al. Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *Plant J*, 2002, 30: 221–235
- 32 Novitskaya L, Trevanion S J, Driscoll S, et al. How does photorespiration modulate leaf amino acid contents? A dual approach through modelling and metabolite analysis. *Plant Cell Environ*, 2002, 25: 821–835
- 33 Gibon Y, Larher F. Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium. *Anal Biochem*, 1997, 251: 153–157
- 34 Dutilleul C, Lelarge C, Prioul J L, et al. Mitochondria-driven changes in leaf NAD status exert a crucial influence on the control of nitrate assimilation and the integration of carbon and nitrogen metabolism. *Plant Physiol*, 2005, 139: 64–78
- 35 Wang F, Sanz A, Brenner M L, et al. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol*, 1993, 101: 321–327
- 36 Geigenberger P, Reimholz R, Geiger M, et al. Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit. *Planta*, 1997, 201: 502–518
- 37 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254
- 38 Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- 39 Werner T, Holst K, Pörs Y, et al. Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *J Exp Bot*, 2008, 59: 2659–2672
- 40 Kunz C, Schöb H, Leubner-Metzger G, et al. β -1,3-Glucanase and chitinase transgenes in hybrids show distinctive and independent patterns of posttranscriptional gene silencing. *Planta*, 2001, 212: 243–249
- 41 Oliveira I C, Brears T, Knight T J, et al. Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. relation to nitrogen, light, and photorespiration. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1170–1180
- 42 Palauqui J C, Vaucheret H. Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 9675–9680
- 43 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 Exp Bot*, 2000, 51: 29–39
- 44 Gálvez S, Roche O, Bismuth E, et al. Mitochondrial localization of a NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzyme by using the green fluorescent protein as a marker. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7813–7818
- 45 Weber A, Flügge U I. Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *J Exp Bot*, 2002, 53: 865–874
- 46 Noctor G, Queval G, Gakière B. NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J Exp Bot*, 2006, 57: 1603–1620
- 47 Liu Y J, Nunes-Nesi A, Wallström S V, et al. A redox-mediated modulation of stem bolting in transgenic *Nicotiana sylvestris* differentially expressing the external mitochondrial NADPH dehydrogenase. *Plant Physiol*, 2009, 150: 1248–1259
- 48 Popova T N, Pinheiro de, Carvalho M A. Citrate and isocitrate in plant metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1364: 307–325
- 49 Nunes-Nesi A, Carrari F, Gibon Y, et al. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *Plant J*, 2007, 50: 1093–1106