

盐生杜氏藻对硝酸盐的转运特性*

吴鹏 林家富 刘义 旷怡 张玲 乔代蓉 曹毅**

(四川大学生命科学学院微生物与代谢工程四川省重点实验室 成都 610065)

摘要 盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*) 是已知最耐盐的真核光合生物, 硝酸盐作为盐生杜氏藻氮源的主要来源, 影响盐生杜氏藻的生长代谢, 研究盐生杜氏藻对硝酸盐的转运吸收状况, 可为生长于高盐、低盐环境中作物吸收氮的研究提供理论基础. 以水杨酸法测定硝酸盐浓度, 设计相关实验, 结果发现盐生杜氏藻在低浓度的硝酸盐 (0.2 mmol/L) 溶液中对硝酸盐有吸收, 吸收效率随硝酸盐浓度的增大而提高; 当盐浓度为2 mol/L时其硝酸盐吸收效率最高, 说明一定的盐浓度能诱导盐生杜氏藻对硝酸盐的吸收; 经 NH_4^+ 预处理过的盐生杜氏藻, 在相同硝酸盐浓度下培养时其硝酸盐吸收效率比未经 NH_4^+ 预处理的低. 实验结果提示盐生杜氏藻存在高亲和性的硝酸盐转运蛋白. 图6 参17

关键词 盐生杜氏藻; 硝酸盐; 硝酸盐转运蛋白; 硝酸盐吸收率

CLC Q949.205

Transport Characteristics of Nitrate Up-taken by *Dunaliella salina**

WU Peng, LIN Jiafu, LIU Yi, KUANG Yi, ZHANG Ling, QIAO Dairong & CAO Yi**

(Microbiology and Metabolic Engineering Key Laboratory of Sichuan Province, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract *Dunaliella salina*, a unicellular green alga, known as one of the most salt-tolerant photosynthetic eukaryotic organisms, is capable to be adapted to an extremely wide range of salinities, from 0.1 to 5.5 mol/L NaCl. Nitrate is the main N source for *D. salina*, and influences its growth metabolism. This study can be useful for future studying nitrate metabolic pathway and regulation, and also provide theory basis for nitrate uptake by crops growing in the environment with high or low level of salinity. Salicylic acid colorimetry was used to measure nitrate concentrations in *D. salina* after its culture in the nitrate solutions. The results showed that at low concentration (0.2 mmol/L) of nitrate, *D. salina* could absorb nitrate, and the rate of nitrate uptake increased along with the increase of the nitrate concentration. *D. salina* achieved the highest rate of nitrate uptake when cultured in the solution with nitrate of 2 mol/L, which demonstrated that appropriate concentration of salt could induce *D. salina* to enhance its nitrate uptake. The rate of nitrate uptake of *D. salina* pretreated with NH_4^+ was lower than that of control. The results suggested the existence of the high affinity nitrate transporter protein in *D. salina*. Fig 6, Ref 17

Keywords *Dunaliella salina*; nitrate; nitrate transporter; rate of nitrate uptake

CLC Q949.205

当今世界人口不断增加, 而可耕地面积却不断减少, 提高土地的利用率, 使作物能高效吸收营养元素, 同时减少施肥对环境的污染, 成为全球共同关注的热点问题之一. 我国水土流失状况相当严重, 在部分地区还有进一步加重的趋势. 据统计, 1996年我国水土流失面积已达 $1.83 \times 10^6 \text{ km}^2$, 占国土总面积的19%; 仅南方红黄壤地区土壤侵蚀面积就达 $6.153 \times 10^5 \text{ km}^2$, 占该区土地总面积的1/4. 而截止到目前, 据不完全统计, 现在我国仍然有 $1.38 \times 10^6 \text{ km}^2$ 的水土流失面积. 土壤肥力下降十分明显, 我国耕地的有机质含量一般较低, 水田土壤大多在1%~3%, 而旱地土壤含量较水田低, 低于1%的就占31.2%; 我国大部分耕地土壤全氮都在0.2%以下, 其中山东、河北、河南、山西、新疆等5省(区)严重缺氮面积占其耕地总面积的一半以上. 氮素作为作物必需的营养元素之一, 同时也是作物从土壤中吸收最多的营养元素, 氮的代谢关系到

整个细胞及植物水平上碳的流动、蛋白的调节、离子和同化物的流动^[1]. 硝酸盐作为一种最常见的无机氮盐, 提供给生物体氮, 研究硝酸盐的代谢途径及机制有利于提高作物对硝酸盐的利用率, 减少氮浪费或丢失, 防止它引起的植被单一性、温室变暖、污染水源等环境问题; 并且提高生物在逆境下对氮的利用, 以维持生物的氮营养.

盐生杜氏藻 (*Dunaliella salina*, 简称盐藻) 是迄今发现的世界上最耐盐的单细胞真核绿藻, 在0.5~5.5 mol/L的NaCl环境下可以正常生长, 通过快速代谢合成甘油抵御高盐渗透胁迫^[2], 是世界各国普遍关注的耐盐模式生物. 硝酸盐转运蛋白是控制硝酸盐进入生物体内的关键膜蛋白. 在与盐藻亲缘关系非常接近的莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)^[3] 以及高等植物模式生物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[4] 中已经发现存在硝酸盐转运蛋白, 本实验室前期已从抗逆性极强的耐盐模式生物盐藻中克隆到了硝酸盐转运蛋白, 因此本实验通过测定不同硝酸盐浓度梯度、NaCl浓度下盐藻对硝酸盐的吸收, 以及 NH_4^+ 对于盐藻吸收硝酸盐的影响, 研究不同条件下盐藻吸收硝酸盐的差异, 为进一步研究盐藻硝酸盐转运蛋白的特性奠定基础, 有助于未来运用分子生物学手段改良植物品种, 提高作物对氮的吸收率, 减少土壤环境污染.

收稿日期: 2009-09-26 接收日期: 2009-11-30

*国家自然科学基金项目 (Nos. 30871321, 30771312, 30971817) 和国家重点基础研究发展计划 ("973" 计划, No. 2009CB125910) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30871321, 30771312, 30971817) and the National Key Basic Research & Development Program of China ("973" Program, No. 2009CB125910)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: caoyi_01@163.com)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 藻种 盐生杜氏藻 (*D. salina*, 简称盐藻), 由本实验室保存。

1.1.2 培养基 采用无氮盐藻培养基: 称取 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.23 g、 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 15.6 mg、KCl 74 mg、 $NaHCO_3$ 840 mg、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 44 mg、 $10 \times A_5$ solution 0.1 mL、Fe-citric 0.5 mL、NaCl 87.7 g, 加 ddH_2O 定容至 1 L, 用 NaOH 将 pH 值调至 7.5 [5]。

1.2 方法

1.2.1 盐藻的培养 将原种按 5% 的接种量接入盐藻培养基中, 按光照 16 h、黑暗 8 h, 25 °C 下培养。

1.2.2 标准曲线制作 采用水杨酸比色法测定硝酸盐浓度 [6]。吸取 0.5 mol/L 硝酸盐标准溶液 20、50、100、300、500、700 μL 分别放入 50 mL 容量瓶中, 用无氮盐藻培养基定容至刻度, 配成 0.2、0.5、1、3、5、7 mmol/L 硝态氮的系列标准溶液。吸取上述系列标准溶液 0.1 mL, 分别放入试管中, 以 0.1 mL 无氮培养基作空白。再分别加入 0.4 mL 的 5% 水杨酸-浓硫酸溶液, 摇匀, 在室温下放置 25 min 显色, 再加入 8% NaOH 溶液 9.5 mL, 摇匀冷却至室温。以空白作参比, 在 410 nm 波长下测定吸光度, 制作标准曲线。每次试验重复 3 次, 下同。

1.2.3 不同硝酸盐浓度下盐藻对硝酸盐的吸收测定 将盐藻接入硝酸盐浓度分别为 0.2、0.5、1、3、5 mmol/L 的盐藻培养基中。每隔 3 h 各取 0.5 mL 于 EP 管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 0.1 mL 上清, 显色后, 在 410 nm 下测定吸光度。根据标准曲线计算各盐浓度下硝酸盐的浓度变化。

1.2.4 不同 NaCl 浓度下盐藻对硝酸盐的吸收测定 分别配制以下培养基: 硝酸盐浓度为 0.2 mmol/L, NaCl 浓度梯度为 1、2、3、4 mol/L 的盐藻培养基; 硝酸盐浓度为 4.94 mmol/L, NaCl 浓度梯度为 1、2、3、4 mol/L 的盐藻培养基; 硝酸盐浓度为 10 mmol/L, NaCl 浓度梯度为 1、2、3、4 mol/L 的盐藻培养基。将盐藻分别接入上述培养基中, 培养 15 h 后, 各取 0.5 mL 于 EP 管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 0.1 mL 上清, 显色后, 在 410 nm 下测定吸光度。根据标准曲线计算各盐浓度下硝酸盐的浓度变化。

1.2.5 NH_4^+ 对盐藻吸收硝酸盐的影响 将盐藻接入 NaCl 浓度为 2 mol/L、含 10 mmol/L NH_4NO_3 的溶液中培养 12 h, 将培养后的盐藻分别转移至含 $NaNO_3$ 0.2 mmol/L、NaCl 2 mol/L 的培养基以及含 $NaNO_3$ 10 mmol/L、NaCl 2 mol/L 的培养基中, 继续培养 3 h 后, 分别取 0.5 mL 于 EP 管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 0.1 mL 上清, 显色后, 在 410 nm 下测定吸光度。

2 结果

2.1 盐藻对不同浓度硝酸盐的吸收

用不同浓度的硝酸盐系列标准液所测定的数据作标准曲线图 (图 1), 可以看出, 硝酸盐的浓度与吸光值呈线性关系, $R^2=0.9963$, 表明该方法可行有效。

为确定在不同硝酸盐浓度中显示吸收状况的 OD 值变化不同与盐藻本身吸收能力有关, 而与盐藻的初始浓度无关, 测定了各盐浓度下盐藻初始浓度所对应的 OD 值 (图 2)。在 660 nm 下测得不同硝酸盐浓度下接种盐藻的 OD 值, 差异不显著, 盐藻本身对此的影响可以忽略。

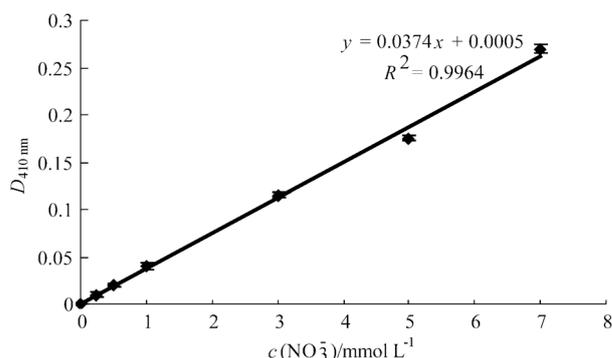


图1 硝酸盐标准曲线
Fig. 1 Standard curve of nitrate concentration

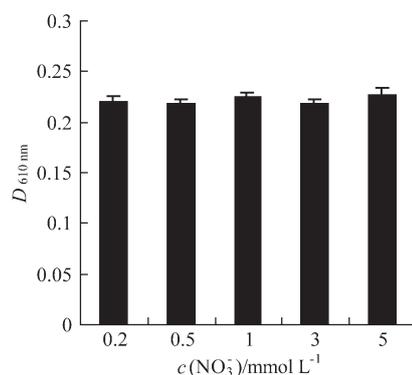


图2 不同硝酸盐浓度梯度下盐生杜氏藻的初始OD值
Fig. 2 Initial OD of *D. salina* in nitrate solutions with different concentrations

不同硝酸盐浓度下盐藻对硝酸盐吸收的变化情况如图 3。在各浓度下, 盐藻对硝酸盐的吸收在刚开始的 6 h 内较为迅速, 而后的吸收较为平稳缓慢, 溶液中的硝酸盐浓度总体呈明显下降趋势。盐藻在硝酸盐浓度很低 (0.2 mmol/L) 的情况下, 12 h 后无法检测出溶液上清里的硝酸盐, 说明硝酸盐已被吸收完全, 而后处于氮限制状态, 说明盐藻对硝酸盐的吸收属于主动吸收。

根据标准曲线, 换算出各盐浓度下的硝酸盐浓度变化, 再除以培养时间, 从而计算出盐藻在不同硝酸盐浓度下对硝酸盐的吸收效率 (图 4)。可以看出, 随着硝酸盐浓度的增大, 盐藻的吸收效率也随之增大, 但在硝酸盐浓度为 0.2 mmol/L 培养基中的吸收效率比 0.5 mmol/L 的高, 推测可能在 0.2 mmol/L 培养基中其吸收程度还未达到饱和状态, 正处于高速吸收状态。

2.2 不同盐浓度对盐藻吸收硝酸盐的影响

由 OD 值计算出盐藻在不同 NaCl 浓度下对硝酸盐的吸收率。对于在不同硝酸盐浓度中培养的盐藻, 受不同 NaCl 浓度的调控作用, 在硝酸盐浓度为 0.2 mmol/L 的培养基中, 盐藻对硝酸盐的吸收效率因 NaCl 浓度不同的变化不大; 硝酸盐浓度为 4.94 mmol/L 及 10 mmol/L 时, 当 NaCl 浓度由 1 mol/L 增加到 2 mol/L 时, 盐藻对硝酸盐的吸收率有所增加, 但当 NaCl 浓度达到 3 mol/L 时, 盐藻对硝酸盐的吸收效率又明显减少, 当 NaCl 浓度达到 4 mol/L 时, 盐藻对硝酸盐的吸收率反而进一步增加, 而且这种反差随着硝酸盐浓度的增加越发明显。

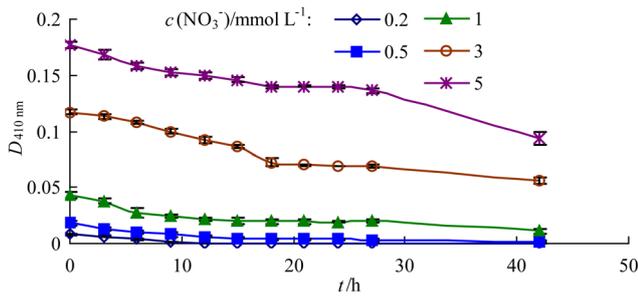


图3 不同硝酸盐浓度下培养盐生杜氏藻后的硝酸盐浓度变化
Fig. 3 Variation of nitrate concentrations after *D. salina* cultured in nitrate solutions with different concentration

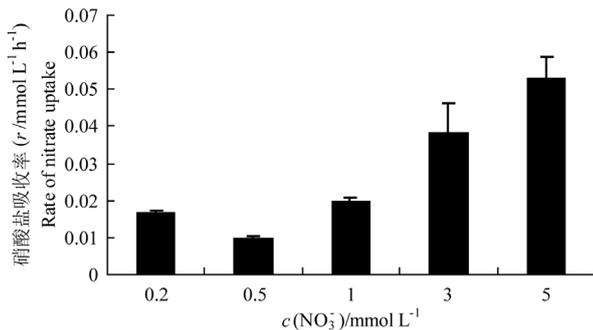


图4 不同硝酸盐浓度下盐生杜氏藻对硝酸盐的吸收效率
Fig. 4 Rates of nitrate uptake by *D. salina* in nitrate solutions with different concentrations

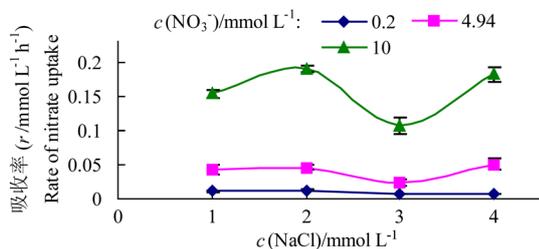


图5 不同NaCl浓度下盐生杜氏藻对硝酸盐的吸收率
Fig. 5 Effect of NaCl concentration on the rates of nitrate uptake by *D. salina*

2.3 NH₄⁺对盐藻吸收硝酸盐的影响

盐藻未经NH₄⁺预处理及经NH₄⁺预处理后对硝酸盐的吸收率变化如图6。可以看到,无论是在0.2 mmol/L浓度的硝酸盐还是10 mmol/L硝酸盐的培养基中,未经NH₄⁺处理的盐藻吸收率都要高于处理后的吸收,这一点同水浮莲^[7]及生菜^[8]中的情况一样,NH₄⁺的存在阻碍了硝酸盐的吸收。

3 讨论

3.1 盐藻对不同浓度硝酸盐吸收能力的比较

每种生物由于自身的生长情况对硝酸盐的吸收能力是不同的,研究不同硝酸盐浓度下盐藻对硝酸盐的吸收状况,可以从生理角度去认识盐藻高、低亲和性硝酸盐转运蛋白的功能特点。本实验结果显示,在一段时间内盐藻对硝酸盐的吸收非常缓慢,几乎为零(图3),据报道,烟草等植物对硝酸盐的吸收随其光周期而变化,呈现出昼夜变化^[9],根据盐藻吸收硝酸盐所对应的光照时间,分析盐藻停止吸收硝酸盐可能与其光周期有关,说明盐藻对硝酸盐的吸收同样可能存在

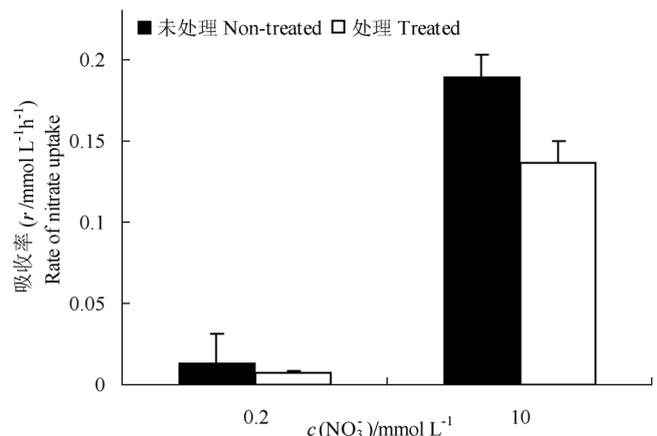


图6 NH₄⁺预处理前后盐生杜氏藻对硝酸盐的吸收率
Fig. 6 Effect of NH₄⁺ pretreatment on the rates of nitrate uptake by *D. Salina*

昼夜变化的规律^[10]。

盐藻随着硝酸盐浓度的增大,其吸收效率也随之增大。但在硝酸盐浓度为0.2 mmol/L培养基中,盐藻的吸收效率比0.5 mmol/L时的高,分析原因,可能是在盐藻中存在着同高等植物中相类似的硝酸盐吸收高亲和和吸收系统(HATS)与低亲和和吸收系统(LATS)^[11]: 1) 极低浓度的硝酸盐下,盐藻处于一种“氮饥饿”的状况,此时可能存在一种专门针对高亲和性硝酸盐转运蛋白基因的调控信号,使高亲和性的硝酸盐转运蛋白基因高度表达,快速获得硝酸盐以提供盐藻正常所需的氮营养元素。2) 当硝酸盐浓度为0.2 mmol/L时,起转运作用的是高亲和性的硝酸盐转运蛋白,当硝酸盐浓度大于0.5 mmol/L时,起作用的则主要是低亲和性的硝酸盐转运蛋白。

3.2 不同浓度NaCl对盐藻吸收硝酸盐的影响

盐藻是一种耐盐性很强的真核单细胞藻类,研究盐藻在不同NaCl浓度梯度下对硝酸盐的吸收状况有利于了解盐藻的硝酸盐吸收机制及其耐盐机制。为研究NaCl分别对盐中可能存在的高、低亲和性硝酸盐转运蛋白的作用,本实验将培养基中硝酸盐的浓度梯度设为: 0.2、4.94、10 mmol/L,其中0.2 mmol/L针对高亲和性硝酸盐转运蛋白基因(NRT2), 10 mmol/L针对低亲和性硝酸盐转运蛋白, 4.94 mmol/L为盐藻正常生长时的浓度作为对照。从图5可以看出,盐藻在不同浓度NaCl的调控作用下对硝酸盐的吸收效率的变化是基本一致的,说明NaCl对高、低亲和性硝酸盐转运蛋白的作用基本一致。当NaCl由1 mol/L提高到2 mol/L时,盐藻的硝酸盐吸收率有所增强,说明一定浓度的NaCl具有诱导盐藻吸收硝酸盐的作用。当NaCl浓度达到3 mol/L时,盐藻的硝酸盐吸收效率明显减少,说明盐藻虽然能耐受一定的盐浓度,但当NaCl浓度超出了其最佳的生长浓度后,高盐还是会影响到盐藻的生命活动,从而使其对硝酸盐的吸收效率下降。当NaCl的浓度达到4 mol/L时,盐藻的硝酸盐吸收率反而增加,这可能是由于高NaCl浓度严重威胁到了盐藻的生存,可能存在一种机制驱使盐藻对营养物质快速摄取,增强其对硝酸盐的吸收,加强代谢作用,从而抵抗这种胁迫的影响。

3.3 NH₄⁺对盐藻吸收硝酸盐的抑制作用

盐藻经NH₄⁺离子预处理后,移入硝酸盐浓度分别为0.2

mmol/L和10 mmol/L的培养基中,测得两者硝酸盐吸收效率都比未经 NH_4^+ 处理的盐藻的硝酸盐吸收效率低(图6),说明 NH_4^+ 离子的加入抑制了盐藻对硝酸盐的吸收. Vincent Fraiser等人对烟草NpNRT2.1基因表达调控进行了研究^[12],发现10 mmol/L的 NH_4NO_3 抑制了NpNRT2.1的表达,分析此抑制作用存在两种机制:1)长期抑制作用:作用机制是作用于NRT基因的表达,最新研究表明此长期抑制作用与 NH_4^+ 及其相关的代谢产物对NRT蛋白的合成及活性调控有关;2)短期抑制作用: NH_4^+ 直接抑制细胞膜上硝酸盐的吸收,因为大多数生物也存在着 NH_4^+ 的转运蛋白,在有 NH_4^+ 离子存在下,生物更易通过 NH_4^+ 转运蛋白直接获得 NH_4^+ 离子用于合成所需的氨基酸和蛋白质,而没有必要吸收硝酸盐后将它还原成 NH_4^+ 再合成氨基酸和蛋白质.另外也有研究表明细胞膜上的周边环境可能因 NH_4^+ 的存在发生了变化,例如膜电位的改变^[13]、膜极化程度的改变^[14]、膜结构的改变^[15]等,从而降低了载体对离子的运转速度.

4 结论与展望

盐生杜氏藻随着培养基中硝酸盐浓度的增大,其吸收效率也随之增大,这之前藻类的相关研究^[16-17]相类似.但在硝酸盐浓度为0.2 mmol/L培养基中的盐生杜氏藻的吸收效率比0.5 mmol/L时的高,分析这与盐生杜氏藻可能存在一种专门针对高亲和性的硝酸盐转运蛋白基因的调控信号有关,又或者存在这样一个机制,硝酸盐作为诱导因子对高亲和性的硝酸盐转运蛋白基因的诱导作用,高于对低亲和性的硝酸盐转运蛋白基因的诱导.盐生杜氏藻在不同浓度NaCl的调控作用下对硝酸盐吸收效率的变化趋势是基本一致的.另外 NH_4^+ 可能通过短期、长期作用机制抑制了盐生杜氏藻对高、低浓度硝酸盐的吸收.从实验结果可以推断,盐生杜氏藻确实存在硝酸盐转运蛋白,同时也应该存在着高等植物中普遍存在的硝酸盐吸收高亲和转运系统(HATS)与低亲和转运系统(LATS).

References

- Crawford NM. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, 1995, 7: 859-868
- Ben-Amotz A, Avron M. The role of glycerol in the osmotic regulation in the halophilic alga, *Dunaliella parva*. *Plant Physiol*, 1973, 51: 875-878
- Quesada A, Gómez I, Fernández E. Clustering of the nitrite reductase gene and a light-regulated gene with nitrate assimilation loci in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 1998, 206 (2): 259-65
- Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell*, 2000, 12 (8): 1491-509
- Pick U, Kami L, Avron M. Determination of ion content and ion fluxes in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol*, 1986, 81: 92-96
- Xie HW (谢红伟). Determination of nitrogen content in nitrate by salicylic acid colorimetry in water. *Guizhou Agric Sci* (贵州农业科学), 1999, 27 (3): 40-41
- Hu MH (胡绵好), Ao YS (奥岩松), Yang XE (杨肖娥). The kinetic of ammonium and nitrate uptake by water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *J Shanghai Jiaotong Univ Agric Sci* (上海交通大学学报农业科学版), 2008, 26 (2): 142-145
- Wang B (王波), Lai T (赖涛), Shen QR (沈其荣). Effects of NH_4^+ -N/ NO_3^- -N ratios on kinetics of nitrate uptake by two typical lettuce genotypes in hydroponics. *Plant Nutr & Fertil Sci* (植物营养与肥料学报), 2007, 13 (6): 1098-1104
- Crawford NM, Glass ADM. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 389-395
- Grant BR. The action of light on nitrate and nitrite assimilation by the marine chlorophyte, *Dunaliella tertiolecta* (Butcher). *J Gen Microbiol*, 1967, 48 (3): 379-389
- Lee RB, Clarkson DT. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. I. Compartmental analysis from measurements of ^{13}N efflux. *J Exp Bot*, 1986, 37: 1753-1767
- Fraiser V, Gojon A, Tillard P, Daniel-Vedele F. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana glauca*: Evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *Plant J*, 2000, 23 (4): 488-496
- Schubert S, Yan Y. Nitrate and ammonium nutrition of plants: Effects on acid/base balance and adaptation of root cell plasmalemma H^+ -ATPase. *Z Pflanzenernaehr Bodenkd*, 1996, 160 (2): 275-281
- Crawford NM, Glass ADM. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends Plant Sci*, 1998, 3 (10): 389-395
- Colmer TD, Bloom AJ. A comparison of NH_4^+ and NO_3^- net fluxes along roots of rice and maize. *Plant Cell & Environ*, 1998, 21: 240-246
- Lü JY (吕嘉扬), Wang DZ (王大志), Hong HS (洪华生), Huang BQ (黄邦钦). Comparative studies on nitrate reductase activity of *Thalassiosira weissflogii* and *Dunaliella salina* cultured in two nitrate concentrations. *J Jimei Univ Nat Sci* (集美大学学报自然科学版), 2004, 9 (1): 6-10
- Wang JH (王金花), Tang HJ (唐洪杰), Wang XL (王修林), Zhu CJ (祝陈坚). Effects of nitrate and phosphate on growth and nitrate reductase activity of *Prorocentrum donghaiense*. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, 14 (5): 620-623