學術論述

植物吸收無機氮源的調節與代謝差異

陳易新[1] 廖宇賡[2*]

（收件日期：民國111年12月5日、接受日期：民國112年4月20日）

【摘 要】硝酸態氮 (NO_3^-) 與銨態氮 (NH_4^+) 是植物主要可取得利用的無機氮源養分，這兩種氮源在植物根部各別仰賴具有專一性的NO_3^-轉運蛋白 (nitrate transporter, NRT) 與NH_4^+轉運蛋白 (ammonium transporter, AMT) 進行吸收。NRT與AMT分別隸屬於不同的蛋白家族，但皆以磷酸化作用來調節根部細胞中獲取這兩種無機氮源的過程。在代謝上，植物體對兩種無機氮源的耐受度不同，NO_3^-可儲存或運輸至其他器官代謝，NH_4^+則主要在根部代謝，雖然植物體對兩者有明顯代謝差異，卻也有部分代謝途徑相同，其中硝酸還原酶 (nitrate reductase, NR) 被認爲是影響植物對無機氮源利用的關鍵。本文回顧NO_3^-與NH_4^+轉運蛋白的調節機制、對無機氮源吸收與代謝的差異，並摘述土壤環境影響植物對不同氮源利用的偏好，以及近年來對喜銨植物 (ammonium-loving plant) 在形成特定氮源偏好上的新見解。

【關鍵詞】銨態氮、喜銨植物、硝酸態氮、硝酸還原酶、轉運蛋白。

[1] 國立嘉義大學森林暨自然資源學系研究生，600355 嘉義市學府路300號。
Graduate student, Department of Forestry and Natural Resources, National Chiayi University. No. 300, Syuefu Rd., Chiayi 600355, Taiwan, ROC.
[2*] 國立嘉義大學森林暨自然資源學系教授，600355 嘉義市學府路300號。通訊作者。
Department of Forestry and Natural Resources, National Chiayi University. No. 300, Syuefu Rd., Chiayi 600355, Taiwan, ROC.
Corresponding Author. E-mail: ykliao@mail.ncyu.edu.tw

Review article

THE REGULATION OF INORGANIC NITROGEN UPTAKE IN PLANTS AND THEIR DIFFERENTIAL METABOLISM

Yi-Shin Chen[1] Yue-Ken Liao[2*]

（Received: December 5, 2022; Accepted: April 20, 2023）

【Abstract】Nitrate (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+) are predominate inorganic nitrogen sources that plants take up as essential nutrient. The specific uptake of these nutrients by plant roots relies on the nitrate transporter (NRT) and ammonium transporter (AMT), respectively. NRT and AMT belong to two different protein families, and both rely on phosphorylation to manipulate the uptake of inorganic nitrogen (NO_3^- and NH_4^+) in root cells. As plant metabolism is taken into account, tolerance to the maximum of these nitrogen sources is different. NO_3^-, with less toxicity, is highly mobile and capable of being transported to other organs for storage or metabolism; while NH_4^+ is immediately metabolized in root cells. Although plants show significant differences in how they process these two nitrogen forms, part of their metabolic pathways is identical. Nitrate reductase (NR), for example, is known as a key enzyme in plants involved in inorganic nitrogen utilization. This review summarizes the mechanisms that regulate the functions of nitrogen transporters and the difference presented in their uptake and metabolism. The varied nitrogen preference in plants determined by the soil environment and the new insights into specific nitrogen preferences in ammonium-loving plants are briefly described.

【Key words】 Ammonium, Ammonium-loving plant, Nitrate, Nitrate reductase, Transporter.

I、前言

「氮」是構成生物體蛋白質、核酸及核苷酸等化合物的基本元素，也是植物賴以爲生的必須營養之一，農業上爲加速作物的生長與提高產量，通常會以人工施用氮肥的方式來達到目標，而施用種類可分爲有機鹽類與無機鹽類，其中又以無機鹽類的硝酸態氮 (NO_3^-) 與銨態氮 (NH_4^+) 爲植物主要吸收利用的氮源形式 (Ruan *et al*., 2007)。一般而言，植物是透過根部吸收土壤中微生物分解有機質所產生之氮源爲養分供應來源，而豆科 (Fabaceae)、赤楊屬 (*Alnus* Mill) 及木麻黃屬 (*Casuarina* L.) 等植物，則可與微生物共生形成根瘤 (nodules) 結構，由植物提供共生微生物所需的碳源，同時獲取根瘤中因固氮作用所產生的氮源，這是另一種取得氮的途徑。在土壤爲有氧的適宜環境下，土壤中微生物行分解作用時能快速的將各種不同型態的氮源轉化爲最基本的NO_3^-，因此NO_3^-是土壤中含量豐富的植物養分來源 (Miller and Cramer, 2004)。然而在酸性或缺氧等環境下，有機質無法順利分解，轉化NH_4^+成爲NO_3^-所需硝化細菌的活性下降，就會使土壤中NH_4^+累積致濃度上升 (Miller and Cramer, 2004)。植物爲適應這些相異的土壤環境，因此演化出不同氮源的吸收機制。早期認爲植物是透過滲透作用或主動運輸吸收氮源，隨著分子生物學日漸蓬勃發展，透過基因定位 (gene mapping) 及氮源同位素追蹤法，可以更精準的確定植物是依靠細胞膜上專一性轉運蛋白 (transporter) 來進行氮源的吸收，並利用基因剔除、基因轉殖等技術得到了驗證。不同形式的氮源雖需要相對應的轉運蛋白才能由植物吸收，卻也在植物體內有部分相同的代謝途徑。本文針對植物細胞膜上NO_3^-與NH_4^+轉運蛋白的調節運作、植物對無機氮源的吸收與代謝以及土壤環境如何影響植物對氮源吸收形成偏好進行文獻探討。

II、植物體中的無機氮源轉運蛋白

植物在吸收土壤中NO_3^-與NH_4^+時，是仰賴具專一性的NO_3^-轉運蛋白 (nitrate transporter, NRT) 與NH_4^+轉運蛋白 (ammonium transporter, AMT)，這兩種轉運蛋白依結構性與功能性的差異分別隸屬於不同的家族，早期曾透過模式物種阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) 以及酵母菌突變株進行相關的研究 (Ninnemann *et al*., 1994)。

(I) NO_3^-轉運蛋白 (NRT) 與其調節機制

在阿拉伯芥的研究中NRT已可成功辨識並被選殖，而這些轉運蛋白也被歸納分屬不同家族，其中最爲人知的就是Nitrate transporter 1 (NRT1) 與2 (NRT2) 家族，惟NRT1的歸屬在之後被重新整理及歸納，新的命名爲Nitrate transporter 1/Peptide transporter (NRT1/PTR) Family (NPF) (Leran *et al*., 2014)。經過整合，目前一共有53個NPF與7個NRT2蛋白被鑑定出來 (Zhang *et al*., 2020)，不過僅有部分具有轉運功能 (Williams and Miller, 2001)。這類型的轉運蛋白具有10~12個疏水性的跨膜結構域 (transmembrane domain, TMD)，這些TMD都是由胺基酸鏈所構成的α螺旋結構，胺

基酸鏈的N端位於細胞膜內側，C端則位於細胞膜內側或外側 (Forde, 2000)，靠TMD錨定在細胞膜上。NPF與NRT2在植物全株皆有表現，在根部的表現可確保該處具備吸收NO_3^-的能力，在其它部位的表現則可參與後續NO_3^-經由木質部、導管與韌皮部進行長距離運輸的過程，協助NO_3^-分布至所有植物器官、進行儲存或從老葉中回收其代謝物 (Chiu *et al*., 2004; Wang *et al*., 2014)。此外，NPF與NRT2亦會釋放分子信號去調節相關的基因，比如協助根部發育、葉片延展與調控開花時間等 (Ho and Tsay, 2010)。

爲了因應外在環境中NO_3^-濃度的變動，植物演化出了兩種親和力不同的NO_3^-轉運系統 (Forde, 2000)，分別爲低親和力轉運系統 (low-affinity transporter system, LATS) 與高親和力轉運系統 (high-affinity transporter system, HATS)。其中NPF大多屬於低親和力者，對於NO_3^-的敏感程度在濃度爲mM 的區段 (Steiner *et al*., 1995)，而高親和力者則多由NRT2所組成，敏感程度提高至μM 的範圍 (Sun and Zheng, 2015)。另有文獻提到，一些NRT2家族中的成員如NRT2.1與NRT2.2需要另一個基因產物協助以發揮其活性與功能，這個基因產物必須與NRT2轉運蛋白共同作用，NRT2才對NO_3^-具高親和力 (Forde, 2000; Orsel *et al*., 2006)，其結構相較於NRT2會簡單一些，僅由200個胺基酸所構成，且只有1個TMD (Tong *et al*., 2005)。這種協助NRT2轉運NO_3^-的蛋白被命名爲NRT3或NAR2，實際上其自身並沒有直接轉運NO_3^-的功能 (Okamoto *et al*., 2006)。

在所有的NRT中，NPF6.3 (早期又稱爲NRT1.1或CHL1) 是最早被分離出來並被大量研究的轉運蛋白 (Tsay *et al*., 1993)，這個轉運蛋白主要在成熟的根尖、皮層與內皮層細胞中表現 (Huang *et al*., 1999)。NPF6.3同時具有協助氣孔開啓 (Guo *et al*., 2003)、調節其他NRT的吸收 (Krouk *et al*., 2006) 與刺激根部發育的作用 (Remans *et al*., 2010)。除此之外，該轉運蛋白具有在高親和力與低親和力之間進行轉換的特性 (Liu *et al*., 1999)，而調節的機制則是透過磷酸化的方式完成。NPF6.3的胺基酸序列在第28與101處爲蘇胺酸 (threonine, Thr)，研究顯示101處的蘇胺酸殘基 (Thr101) 會與磷酸接合並提升NPF6.3的親和力，去磷酸化後則又恢復其低親和力 (Liu and Tsay, 2003)。NPF6.3除了改變親和力外亦具有釋放分子信號去調節相關基因啓動的作用。Ho and Tsay (2010) 的文獻回顧中描述了相關細節 (圖1)，當處於低濃度NO_3^-環境下，CIPK23蛋白激酶會促使NPF6.3在Thr101處被磷酸化。這時候植物要同化NO_3^-所需用到的相關蛋白質，會開始啓動基因表現以進行製造程序，此稱爲初級硝酸反應 (primary nitrate response)。因低濃度NO_3^-而被磷酸化的NPF6.3此時會誘導初級硝酸反應在一個低強度 (層次) 的情形下運作，並促使其他NRT的基因表現，這樣可增加細胞膜上轉運蛋白的數量來增加NO_3^-的吸收。當植物處於高濃度NO_3^-的環境時，則由CIPK8蛋白激酶將NPF6.3去磷酸化，同時誘導一個高強度運作的初級硝酸反應 (以便處理將會大量吸收進入植物體的NO_3^-)，這個反應同時會使NPF6.3釋放訊號去抑制NRT2.1的轉錄 (因爲NO_3^-大量存在，不再需要用到高親合力的NRT2.1)，也會促進MADS-box轉錄因

子ANR1的表現以刺激側根的生長。而當高強度的初級硝酸反應達一定程度後，此高強度反應會因LBD37/38/39轉錄訊號的調節而受到抑制。這種同時具有轉運與調節功能的蛋白又稱爲轉運感應器 (transceptor)，也是首次在高等植物上被證實有它的存在。

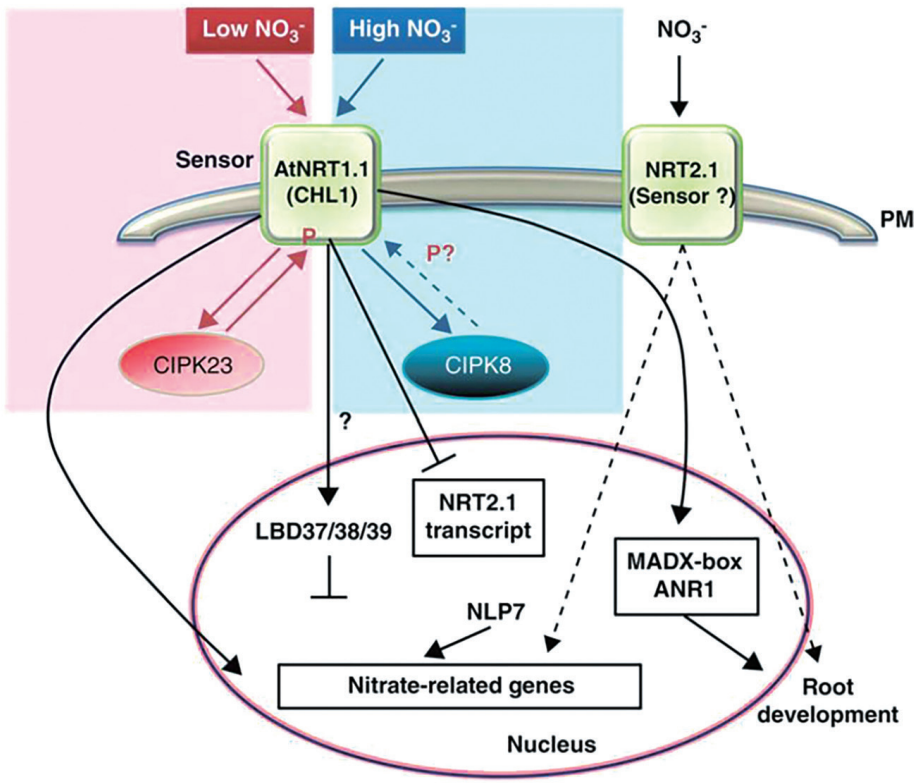

圖1 近期有關植物體對感知硝酸態氮 (NO_3^-) 與其訊號傳遞機制的研究進展 (Ho and Tsay, 2010)。**外界的NO_3^-離子被細胞質膜上的感測器偵測到，會藉此調節植物細胞中與NO_3^-吸收代謝有關的基因表現，也會影響根的生長。藉著改變NO_3^-感測器 (CHL) 上胺基酸排序101處 (T101)的磷酸化狀態，CHL可以在濃度由高到低大範圍間偵測到土壤中的NO_3^-。在低濃度範圍時CIPK23會將CHL1上T101處磷酸化，CIPK8、NLP7以及LBD37/38/39在初級硝酸反應中均為訊號傳遞者，CIPK8將訊號傳達至何處則尚待釐清。CHL1在促進根部發育之過程中，作用在轉錄因子MADS-box ANR1的上游區域。NRT2.1或是另一個可能存在的感測系統，會對NO_3^-做出反應。 (本圖中NRT1.1即為內文所述之NPF6.3)**

Fig. 1 Overview of recent advances in nitrate sensing and signaling mechanisms. External nitrate ions (NO_3^-) can be detected by sensors in the plasma membrane, and then regulate nitrate-related gene expression and root growth in plants. By changing the phosphorylation status of T101 residue, nitrate sensor CHL can detect a wide range of nitrate concentrations in soil. Under low nitrate conditions, CIPK23 phosphorylates CHL1 at T101. CIPK8, NLP7 and LBD37/38/39 are signaling components in the primary nitrate response. The target of CIPK8 remains to be identified. For root development, CHL1 acts upstream of MADS-box transcription factor ANR1. NRT2.1 or another nitrate sensing system may exist for nitrate response (Ho and Tsay, 2010). (the NRT1.1 in this figure refers to the NPF6.3 mentioned in the text)

NPF與NRT2蛋白家族皆隸屬於“主要協助轉運蛋白超家族” (major facilitator superfamily, MFS) 之下，此超蛋白家族典型的特徵就是利用錨定在細胞膜上的同平面二聚體結構來控制轉運通道於細胞膜內外雙向的開闔，並透過膜層上電化學梯度差來進行離子的運輸 (Pao *et al*., 1998)。在NO_3^-的主動運輸過程中，NRT爲依賴質子運作的轉運蛋白 (proton-dependent transporter)，以NPF6.3爲例，該轉運蛋白具有12個TMD，是由靠近N端之TMD1-TMD6與C端之TMD7-TMD12各自摺疊形成一個典型MFS褶板結構，由這兩個褶板再組成一個同平面的二聚體結構。在運輸NO_3^-的過程中需藉由細胞外的質子 (H^+) 與不同TMD上之胺基酸形成鹽橋，在整個過程中的不同階段，改變此二聚體在細胞膜上開合的方向 (朝外或朝內)，以達到讓NO_3^-通過的功能 (Parker and Newstead, 2014)。而在這項研究中提出的NO_3^-轉運模型，其過程如下：NPF6.3二聚體結構中會以屬於N端MFS褶板的TMD1-2 (圖2A深藍色棒狀，此棒狀圖形僅標示其爲TMD1，因其相對一端即爲TMD2而未標示，其餘棒狀結構標示法均相同) 以及C端MFS褶板的TMD7-8 (圖2A黃色棒狀) 構成一個離子通道，常態時兩個褶板朝向細胞膜外側的開口較大，使離子通道向外開啓。而褶板在朝細胞膜內側的部分，則在TMD4-5 (圖2A青色棒狀) 上胺基酸序列第164處的離胺酸 (lysine) (Lys164) 與C端TMD10-11 (圖2A橘色棒狀) 上胺基酸序列第476處的麩胺酸 (glutamate) (Glu476) 之間形成鹽橋，將通往細胞膜內側的離子通道封閉。當NPF6.3要轉運NO_3^-的時候，位於TMD7-8胺基酸序列第356處的組胺酸 (histidine) (His356) 成爲運輸關鍵，該胺基酸因爲來自細胞膜外側的H^+而質子化，並與進入通道的NO_3^-相互產生靜電吸引作用 (圖2B)，在此作用過程中，TMD10-11上的Glu476會與His356形成新的鹽橋，同時TMD1-2上ExxER模體 (motif) 也會與H^+結合，在此兩者的作用下將細胞膜上離子通道朝向外側的開口關閉 (圖2C)。此時原先建立在TMD1-2上Lys164與TMD10-11上Glu476之間，用來封閉內側開口的鹽橋斷裂，就使得通往細胞膜內側的離子通道開啓，NO_3^-與H^+便能順利被釋放至細胞內部完成轉運 (圖2D)。在此轉運過程中於TMD1-2上鄰近ExxER模體之Thr101，便是先前提及受CIPK23 蛋白激酶磷酸化後，可提升NPF6.3對NO_3^-親和力之位點 (圖2E)。

(II) 銨態氮轉運蛋白 (AMT) 與其調節機制

隨著阿拉伯芥的基因解序逐步完成，植物學家對AMT的認知也越顯完整，此類型的轉運蛋白透過系統樹分類法可分爲AMT1與AMT2兩個家族 (Loque and von Wiren, 2004; Weiner and Verlander, 2014)，總共有5個AMT1 (AtAMT1.1、AtAMT1.2、AtAMT1.3、AtAMT1.4與AtAMT1.5) 與1個AMT2 (AtAMT2.1) 在阿拉伯芥中被找到。事實上這些蛋白最早可能是源自於酵母細胞中的NH_4^+轉運蛋白MEP1與MEP2，此二蛋白可以有效的作爲NH_4^+轉運通道，促進酵母菌吸收NH_4^+。在Dubois and Grenson (1979) 的研究中，他們將酵母進行雙重突變，破壞了MEP1與MEP2的胺基酸序列，導致酵母在僅提供NH_4^+作爲營養來源的培

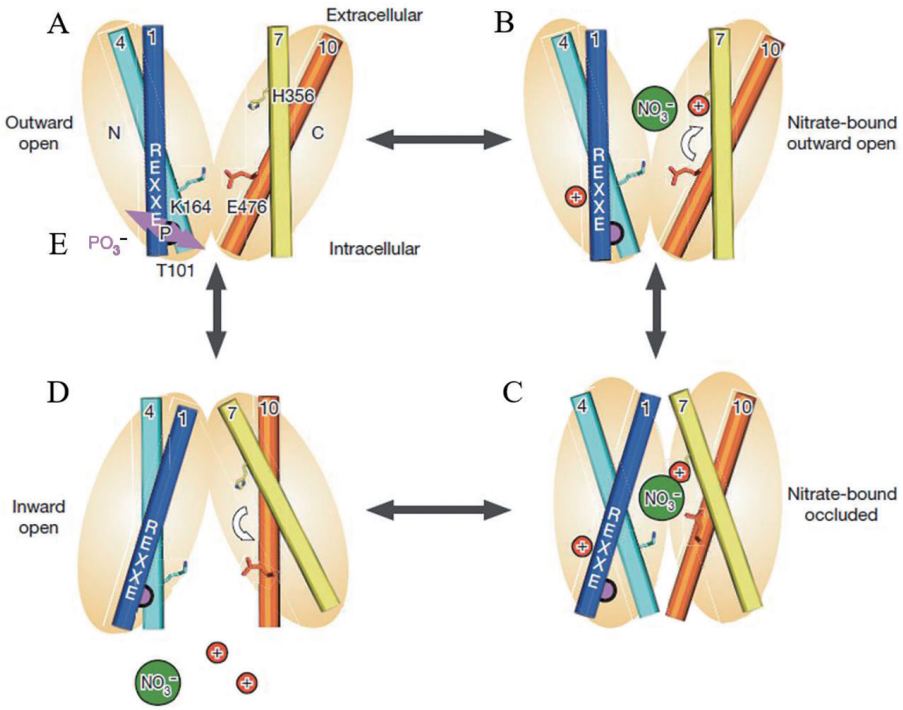

圖2 NO_3^-與質子同向運輸的交替轉運通道模型 (Parker and Newstead, 2014)。(A) 以TMD1-2 (深藍色棒狀) 以及TMD7-8 (黃色棒狀) 構成的細胞外離子通道正朝向細胞膜外側開啓，而以TMD4-5 (青色棒狀) 疊在TMD10-11 (橘色棒狀) 上所組成向內的細胞內離子通道為關閉的，並藉由Lys164 (位於TMD4) 與Glu476 (位於TMD10) 之間形成的鹽橋穩定此結構，此現象與細菌中的同源構造運作相似，(B) 在His356被質子化之後，進入通道的NO_3^-可與之鍵結並觸發細胞外離子通道的關閉，位於TMD1上的ExxER模體可能另有一處可被質子化的位置，(C) 當模型轉變成屏蔽狀態時，Glu476轉而與His356形成新的鹽橋，使得向內的細胞內離子通道上舊鹽橋斷裂，(D) 前述狀態會使通道內的NO_3^-及質子被釋放到細胞內部，(E) CIPK23將Thr101 (紫色球體) 磷酸化會使得N端呈集束狀的結構更具靈活性，從而提高了整個模型的轉運效率。

Fig. 2 Alternating access model for nitrate-proton symport (Parker and Newstead, 2014). (A) In the outward facing state the extracellular gate, constructed from TMD1–TMD2 (dark blue) and TMD7–TMD8 (yellow) is open and the intracellular gate, constructed from TMD4–TMD5 (cyan) packing against TMD10–TMD11 (orange) is closed and stabilized by a salt bridge between Lys 164 (TMD4) and Glu 476 (TMD10), similarly to the bacterial homologues. (B) Following protonation of His 356, nitrate is able to bind triggering closure of the extracellular gate. Additional sites of protonation exist possibly within the ExxER motif (TMD1). (C) Upon transition to the occluded state the intracellular gate salt bridge will break as a result of Glu 476 moving to form a new salt bridge with His 356. (D) This will result in the release of nitrate and protons into the interior of the cell. (E) Phosphorylation of Thr 101 (purple sphere) by CIPK23 results in increased flexibility within the N-terminal bundle, increasing the overall transport rate.

養基中生長不良。爲了印證AMT家族是否同樣具有轉運NH_4^+的能力，Ninnemann *et al*. (1994) 也將酵母進行雙重突變，並從阿拉伯芥上取材製成AMT1 cDNA，將其殖入雙重突變的酵母菌染色體中，結果顯示經由突變又再轉殖的酵母菌在僅添加NH_4^+的培養基中可以順利地恢復生長。將AMT1與MEP胺基酸序列進行分析比對亦顯示兩者有75%相似度 (Ninnemann *et al*., 1994; Yuan *et al*., 2007)。上述兩個結果明確的證實了AMT有轉運NH_4^+的能力。

AMT轉運蛋白具有11個TMD，每個TMD亦由胺基酸鏈構築成 α 螺旋，其N端位於細胞膜外側而C端則位於細胞膜內側 (de Michele *et al*., 2013)，並以此11個TMD構築成一個三聚體結構。AMT家族成員亦可分爲高親和力 (HAT) 與低親和力 (LAT) 兩種，高親和力者對NH_4^+的敏感濃度介於20 μM 至50 mM之間 (Sohlenkamp *et al*., 2002; Marschner, 2012)，而低親和力者的敏感濃度則大於50 mM (Marschner, 2012)，其中AMT1多爲高親和力而AMT2則爲低親和力。這兩個家族在植物中的分布也不同，Ninnemann *et al*. (1994) 之研究中以北方墨點法 (northern blot) 分析AMT1在阿拉伯芥的表現，得知該轉運蛋白主要於根部與葉部細胞膜上表現，在莖部與種子表現量相對較少。而在Yuan *et al*. (2007) 的研究則詳細區分了AMT家族成員在根部的位置，其中AtAMT1.1、AtAMT1.3與AtAMT1.5於根表皮細胞、根毛與皮層表現，爲根部與土壤接觸的最前緣，主要負責共質體運輸途徑 (symplasic pathway) 的運作，可將由外界吸收的NH_4^+在第一時間就移入細胞質內，並經由細胞間彼此相連的共質體網絡，直接送進根部中柱內的維管束。AtAMT1.2則位於皮層 (cortex) 與內皮層 (endodermis) 的細胞膜上，協助經由質外體運輸途徑 (apoplastic pathway) 的NH_4^+進入根部之後，在尚未遇到卡氏帶 (Casparian strup) 的阻擋之前，能改道進入細胞質中，以便穿越周鞘 (perucycle) 而最終也進到根的維管束運輸系統中。而透過AtAMT1.1、AtAMT1.2與AtAMT1.3三者的作用對NH_4^+的吸收，其占比已經達根部吸收NH_4^+總量的90%。另一方面，在AMT2家族中，AtAMT2.1在阿拉伯芥的全株皆有表現 (Sohlenkamp *et al*., 2002)。然而該蛋白相較AMT1家族而言僅具低親和力，Giehl *et al*. (2017)則指出AtAMT2.1有別於其他的AMT，其主要功能爲協助NH_4^+進行長距離運輸，且與AtAMT1.2及AtAMT1.3具有協同作用。

一般而言，植物對於NH_4^+的耐受度相較於NO_3^-要低，當植物吸收過多的NH_4^+易導致毒害發生，因此必須有一個完善的調節機制以避免植株陷入銨中毒的情形。Ho and Tsay (2010) 的文獻回顧中則表示，根部細胞在表現AMT的過程中，在基因轉錄以及轉錄後這兩個階段可以進行調節以有效的避免植物銨中毒。例如植物雖處於低濃度NH_4^+環境，但是當其吸收量到達一定程度後，因同化NH_4^+而形成的麩醯胺酸 (glutamine) 濃度也會上升，因而成爲一個控制訊號，抑制AtAMT1.1在轉錄階段的表現，以減少後續再持續吸收NH_4^+。而當氮源不足時，這項抑制作用則會被移除 (Gazzarrini *et al*., 1999; Loque *et al*., 2006)。在轉錄後的調控，則是在外界NH_4^+處於高

濃度的時候，此時AMT1.1與AMT1.2分別在胺基酸序列靠近C端排序460與472處的蘇胺酸殘基 (Thr460 與Thr472) 會被磷酸化，使得原先在細胞膜上AMT三聚體所形成的結構發生改變，於是用來結合NH_4^+的通道入口就協同封閉，可避免植物過度吸收NH_4^+，達到調節的效果 (Loque *et al*., 2007; Neuhauser *et al*., 2007; Ho and Tsay, 2010)。

在進行NH_4^+的轉運過程中，與NRT不同的是，AMT並不需要從細胞膜外側獲取額外的H^+來進行質子化作用以改變蛋白質構型，而是透過將NH_4^+去質子化爲氨(NH_3) 之後，使其得以順利經由AMT中的疏水性通道進入細胞內部 (Williamson *et al*., 2020)。Allen and Collinson (2020) 的研究中也說明了NH_4^+的轉運機制，在轉運過程中位於AMT胺基酸序列上第160處的天門冬胺酸 (aspartic acid, Asp) (Asp160) 是辨識NH_4^+的重要胺基酸 (圖3A)，當細胞膜外側的NH_4^+與Asp160結合時便能觸發轉運通道的開啓，NH_4^+進入通道之後，會去質子化成爲NH_3並經由通道中疏水性的部位通過細胞膜，另一方面去質子化解離後的H^+則會藉由AMT胺基酸序列上的His168以及His318之間所形成的化學鍵橋，接續傳遞至細胞膜內部 (圖3B)。當兩者都進入細胞之後，NH_3便會再次與H^+行質子化作用重新結合成NH_4^+，如此便完成了NH_4^+的轉運 (圖3C)。

III、植物對無機氮源吸收與代謝的差異及其影響土壤酸鹼環境

植物在吸收NO_3^-與NH_4^+時，除了需仰賴不同的專一性轉運蛋白之外，施用這兩種無機鹽類的化合物作爲肥料時，兩者在化學以及生理酸鹼性質的不同，也會使植物根部在吸收氮源的過程中對土壤的酸鹼值產生影響，若再加入生物及環境因子的影響，根圈土壤酸鹼條件的改變就更爲複雜。而在植物體內的代謝過程中，雖然NO_3^-與NH_4^+的代謝路徑有差異，前者需先經還原作用處理，但是經轉換成NH_4^+之後，則路徑相同，以下將逐一說明。

(I) 施用NO_3^-與NH_4^+化合物在化學以及生理酸鹼性質上的差異

NO_3^-與NH_4^+雖同爲無機鹽類，然而由於兩者的化合物在化學與生理酸鹼性質的不同，導致在施用這兩種氮源的肥料時，對土壤pH值的改變有所差異。在實驗室中常以硝酸鉀 (KNO_3)、硝酸鈣 ($Ca(NO_3)_2$) 及硝酸鈉 ($NaNO_3$) 等化合物作爲NO_3^-的供源。除了硝酸鉀以外，硝酸鈣與硝酸鈉水溶液呈鹼性，施用這類型的化合物直接的效果會使土壤pH值上升。常見的NH_4^+則可由硫酸銨 ($(NH_4)_2SO_4$)、氯化銨 (NH_4Cl) 及磷酸二氫銨 ($NH_4H_2PO_4$) 等提供，而這三者水溶液皆呈酸性，施用後則使土壤pH值下降。這是不考慮其它生物或環境因子，直接呈現施用NO_3^-與NH_4^+兩種不同氮源爲肥料時，在化學性質上的差異 (連深，1980；吳正宗，2005)。而硝酸銨 (NH_4NO_3) 這種可同時提供NO_3^-及NH_4^+之化合物，水溶液亦呈酸性。

(II) 吸收過程之差異

除了化學性質差異外，植物吸收此二種無機鹽類的過程也會不同。無機氮源的吸收過程會利用到耗能的主動運輸 (Mathilde and Anthony, 2011)，需藉由三磷

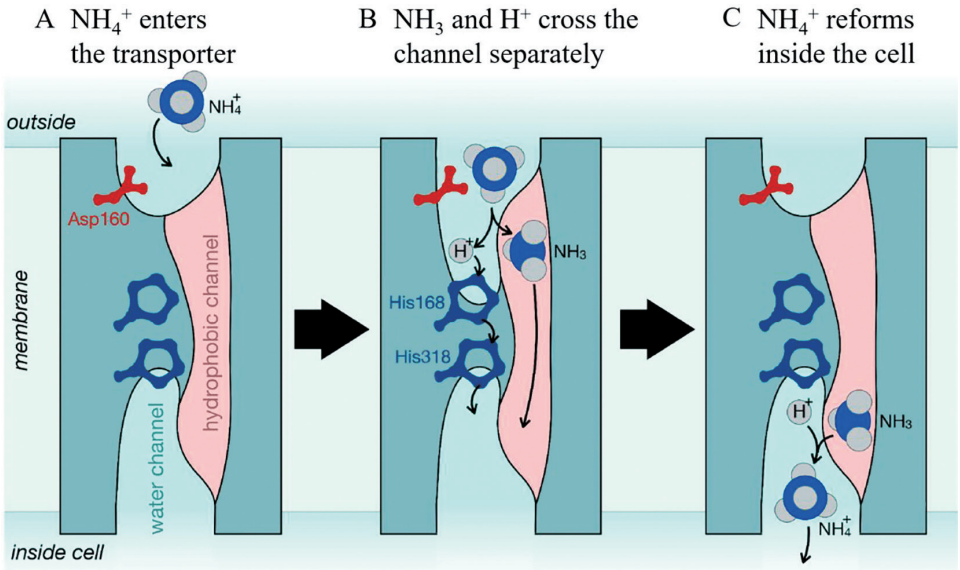

圖3 NH_4^+的轉運機制 (Allen and Collinson, 2020)。NH_4^+是許多生物體內重要之代謝物，但至今其如何運送進出細胞仍不清楚，Williamson *et al*. 證明NH_4^+會解離成NH_3與帶正電的H^+，然後個別的穿越細胞膜，之後再行結合。(A) NH_4^+轉運蛋白 (藍綠色) 跨越整個細胞膜 (灰色)，其兩端向充滿水的環境 (青色) 開啓，但是穿越其中心唯一的通道 (粉紅色) 具強烈的疏水性。進入朝向水環境端的通道入口處有一個空間對辨認NH_4^+具專一性，(B) NH_4^+首先鍵結到此專屬空間並十分接近胺基酸Asp160，這是觸發通道開啓所必須之過程，之後在專屬空間中NH_4^+會解離成NH_3與H^+，此時NH_3會經由疏水性的通道 (粉紅色) 穿越膜層，而H^+則藉由兩個組胺酸 (His168與His318) 之間形成的化學鍵橋通過膜層，(C) 一旦NH_3與H^+進入細胞，兩者即結合再形成NH_4^+。

Fig. 3 The mechanism of ammonium transporters. Ammonium is an important metabolite for many organisms. Until now, it was unclear how exactly ammonium is transported in and out of cells. Williamson *et al*. demonstrated that ammonium (NH_4^+) dissociates into ammonia gas (NH_3) and a positively charged hydrogen (H^+), which then traverse the cell membrane separately and re-join at the other end. (A) The ammonium transporter (teal) spans the whole membrane (grey). The two ends are open to the water-filled environment (cyan), but the only open passage through the centre is strongly water-repellent (pink). The entrance to the water channel has a pocket that specifically recognizes ammonium. (B) Ammonium binds into the pocket near the amino acid Asp160, which is essential to trigger the opening of the channel. The environment inside the pocket also allows ammonium to separate into NH_3 and H^+. NH_3 can now cross the membrane through the hydrophobic channel (pink), and H^+ crosses separately via the bridge formed of two copies of the amino acid histidine (His168 and His318). (C) Once inside the cell, NH_3 and H^+ recombine to make ammonium (NH_4^+) (Allen and Collinson, 2020).

酸腺苷酶 (ATPase) 分解細胞質中的三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 以產生能量，供H^+幫浦將H^+泵出細胞膜外，直到細胞膜內外酸鹼值差距形成電化學梯度時，可啓動膜蛋白促進吸收。吸收NO_3^-時需經過細胞膜上NRT的作用，將兩個H^+與NO_3^-一同運輸至細胞內，並利用H^+幫浦向外送出一個H^+，此時H^+呈現二進一出的動態循環，使得土壤中H^+濃度減少，pH值則逐漸上升 (Mathilde and Anthony, 2011)。然而當

植物體吸收NH_4^+時，H^+不會協同NH_4^+經由轉運蛋白或鉀離子 (K^+) 通道主動運輸進入植物體內，H^+幫浦卻會持續的將H^+運出細胞外 (Ninnemann *et al*., 1994)，造成土壤中H^+濃度提升致使土壤持續酸化 (Maynard and Barker, 1969)。

(Ⅲ) 植物吸收不同氮源對土壤酸鹼值的影響

但實際上在不同氮源的肥料施予土壤之後，土壤酸鹼值的改變除因前述兩種差異之外，最後還要考慮加入生物及土壤環境因子才能決定。有學者曾摘錄硝酸銨的例子，說明其施用在土壤之後改變土壤酸鹼值的不同情況。當硝酸銨所含之二種離子 (NO_3^-與NH_4^+) 解離，若土壤中沒有發生硝化作用 (土壤環境)，而NH_4^+被植物吸收 (生物因子)，則在吸收過程中H^+幫浦釋放出的H^+會使土壤酸化。但若發生硝化反應使NH_4^+氧化成NO_3^-並釋放H^+，此時若NO_3^-被植物吸收 (會釋放OH^-)，此H^+與OH^-中和則土壤就不會酸化 (譚增偉，2008)。此結果或可用前一段落所描述，植物吸收NO_3^-時，H^+二進一出的動態會使其在土壤中濃度減低，硝化反應產生之H^+適時補充，於是維持土壤不酸化。譚增偉 (2008) 又摘述NO_3^-沒有被植物吸收時的情況，若發生淋洗現象 (土壤環境) 將NO_3^-及鹼性陽離子洗出，則土壤酸化。因此不僅NO_3^-與NH_4^+化合物在自身酸鹼性之差異會影響土壤環境pH值，植物在吸收兩者時所發生的反應也會改變土壤酸鹼條件 (Kleinhenz, 1999)，使植物在吸收NO_3^-與NH_4^+的過程中有明顯區別 (Raven and Sprent, 1988)。

(IV) 代謝差異

在代謝過程中，NO_3^-經轉運後可選擇儲存於液泡作爲細胞的滲透壓調節劑 (van der Leij *et al*., 1998) 或於細胞質內經硝酸還原酶 (nitrate reductase, NR) 轉化爲亞硝酸態氮 (NO_2^-)，再進入質體內透過亞硝酸還原酶 (nitrite reductase, NiR) 轉化爲NH_4^+，此時才能併同直接經由AMT運輸進入植物體內的NH_4^+，透過麩胺酸合成酶循環 (glutamate synthase cycle) 轉化爲胺基酸。該循環機制是將NH_4^+與麩胺酸 (glutamate) 共同反應，在麩胺醯胺合成酶 (glutamine synthase, GS) 催化下合成麩胺醯胺 (glutamine)，在輸出部分麩胺醯胺後將剩餘者與酮基戊二酸 (α-ketoglutaric acid) 在麩胺酸合成酶 (glutamate synthase, GOGAT) 的反應下又轉爲麩胺酸，此時又可再與NH_4^+進行反應並不斷的循環 (Lancien *et al*., 2000)。此循環中輸出的麩胺醯胺則可轉化成其他胺基酸以製成蛋白質或通過木質部進行長距離運輸至葉、嫩芽或種子。

在代謝的能量消耗上，由於NO_3^-需先經還原作用才能形成NH_4^+，植物若直接吸收利用NH_4^+，相較NO_3^-而言可以省去17%還原反應所需的碳水化合物 (Gutschick, 1981)。然而植物對NH_4^+的耐受度較低，因此在許多研究中也觀察到使用NH_4^+作爲主要氮源時，植物爲了應付根部吸收過量NH_4^+而累積的情形，反而需要額外的能量來處理，因此增加對碳水化合物的需求使生長量降低 (Gerendas and Sattelmacher, 1995)。在這些代謝的過程中NR與GS 分別是第一個直接與NO_3^-或NH_4^+接觸作用的酵素，因此兩者的活性會直接影響植物對不同氮源的利用效率，遂有學者認爲NR與GS可能是決定植物偏好吸收何種氮源的關

鍵酵素 (Claussen and Lenz, 1999)。另一方面，由土壤中所吸收的NO_3^-與NH_4^+在植物體內的代謝位置也會因物種特性、環境因素以及土壤中氮源的濃度而異。如溫帶地區的松科 (Pinaceae) 與杜鵑花科 (Ericaceae) 植物，在土壤NO_3^-爲5 mM以下時是以根爲主要的代謝場所，當NO_3^-濃度提高至5 mM以上時，地上部枝條與葉片便會協同進行NO_3^-的代謝。而溫帶地區草本植物、熱帶以及亞熱帶物種 (無論生命週期形式爲何) 在土壤中NO_3^-濃度爲0.5-1 mM時是以根部進行NO_3^-之代謝，隨著土壤環境中NO_3^-濃度的上升，地上部枝條與葉片的重要性也隨之增加 (Andrews and Raven, 2022)。此外，導因於植物對NH_4^+的耐受性較低，透過主動運輸進入植物體內的NH_4^+則主要在植物根部就進行胺基酸的同化作用 (Stewart *et al*., 1987)。

IV、土壤環境對植物吸收無機氮源的影響

土壤中儲存何種有效型態的氮源被認爲是在時間與空間上影響植物演化方向與物種組成的重要因素，這樣的因素也使得不同物種間對吸收NO_3^-的能力與對NH_4^+的耐受度出現差異 (Koyama *et al*., 2013)。在生態系統中，當某區域土壤中主要氮源爲NO_3^-時，存活於當地的植物，其對NO_3^-的吸收與代謝能力會決定該物種對此類型氮源的利用效率 (Runge, 1983)。而NO_3^-被植物吸收後，必須先經還原作用再透過同化作用轉化成NH_4^+以作爲製成胺基酸的原料，其中還原作用的第一步驟必須仰賴NR才能進行，因此該還原酶被認爲是影響植物利用NO_3^-的關鍵 (Campbell, 1988)。在普遍爲偏鹼性、富含氧氣的土壤條件下，因爲硝化細菌作用旺盛，可以將土壤中的NH_4^+轉化爲NO_3^-，因此NO_3^-就成爲土壤中優勢的氮源，而適應於這種環境下的植物便演化出以吸收NO_3^-爲主要氮源的特性。其具有高強度的NR轉錄能力，同時植物體內的NR活性也會隨著根部吸收了NO_3^-而被激活。然而硝化細菌大多爲好氧且具酸敏感特質 (Paul and Clark, 1989)，因此當土壤爲酸性 (pH<4.5)、缺氧或淹水狀態時，這一類微生物的活性會受到抑制，無法有效的將NH_4^+轉化爲NO_3^-。此時土壤中NH_4^+開始累積並成爲主要氮源，在這樣的環境下另一批喜好NH_4^+的植物就成爲該類型棲地的主角。這些植物固有的NR轉錄能力異常的低落，即使是在添加充足的外源NO_3^-情況下亦是如此 (Koyama and Tokuchi, 2003)。在長期的演化之下，這類型植物對NO_3^-僅具有較低的代謝能力，轉而偏好以NH_4^+爲主要的氮源利用形式，其中杜鵑花科的物種就是典型的代表，並被賦予喜銨植物 (ammonium-loving plant) 的稱謂。在Colgrove Jr. (1956)、Greidanus *et al*. (1972) 以及Clark *et al*. (2003) 等人的研究中，將不同杜鵑花科物種施以不同NO_3^-：NH_4^+比例營養液的結果皆顯示，隨著NH_4^+比例的增加使植株生長量與與生長表現均有提升。然而有趣的是在Havill *et al*. (1974) 的研究中同樣以杜鵑花科植物歐石楠 (*Erica tetralix* L.) 與黑果越橘 (*Vaccinium myrtillus* L.) 作爲試驗材料，將其植株根部切除48 h後移至NO_3^-的處理中，觀察到這兩物種在

24 h內NR的活性均有明顯上升的趨勢，隨後逐漸下降。Douglas *et al*. (2017) 的研究中同樣以偏好NH_4^+的杜鵑花科植物進行研究，雖然已知透過植物體根部吸收NO_3^-無法有效提升受試植物葉片中NR的活性，然而若將植物根部切除又直接施用NO_3^-，此時植物體葉部NR的活性就會逐漸提升，並接續促進NO_3^-的利用效率。這種現象與前述Koyama and Tokuchi (2003) 所提杜鵑花科植物先天NR轉錄能力低落的結果有所出入。事實上，這種情形也不僅限於偏好NH_4^+的杜鵑花科植物，在長角豆 (*Ceratonia silique* L.) (Cruz *et al*., 1993) 與美國黑松 (*Pinus contorta* Douglas) (Min *et al*., 1999) 的研究中也同樣觀察到這些受試植物的根部存在運輸NO_3^-的障礙，使得根系完整的植株無法有效吸收NO_3^-並將其送至葉部，因而也無法激活葉部NR的活性。在Wang *et al*. (2012) 的研究中則觀察到這些喜銨植物對NO_3^-的運輸障礙，可能是因爲根部周鞘細胞中負責將NO_3^-經木質部長距離運輸至葉部的NPF7.3轉運蛋白在酸性環境下活性受到抑制有關。換言之，這些在原生環境長時間演化下對NH_4^+出現偏好性的喜銨植物，可能是導因於其根系對NO_3^-的運輸已存有限制，使葉部NR無法有效活化，故而棄NO_3^-不用轉而偏向吸收利用NH_4^+。

V、結語

植物根部在吸收NO_3^-與NH_4^+時是透過獨立運作的NRT與AMT進行，這兩類轉運蛋白的調節機制類似，皆以磷酸化的方式改變蛋白質的構型、親和力或調節分子信號以控制根系對無機氮源的轉運效率，避免過度吸收達到保護的效果。在代謝方面，NO_3^-必須先仰賴植物體內NR與NiR作用轉化爲NH_4^+，之後進入麩胺酸合成酶循環路徑，才能合成多種胺基酸供植物作進階的利用，因此NR能順利表現並可以被激活的植物，自然以吸收NO_3^-爲主要氮源，反之則傾向利用NH_4^+。換言之，植物對無機氮源的偏好可能是由NR的活性來決定。從演化的角度來看，過去喜銨植物的出現被認爲是受到土壤環境中主要是存在NH_4^+這種氮源所驅動的適應結果，使得該類物種葉部有NR活性低下的特性，無法有效代謝NO_3^-因此棄之而改吸收利用NH_4^+。然而近年研究認爲這類植物並非先天NR活性不足，而是根部器官存有對NO_3^-的運輸限制，以致植株體內NO_3^-的濃度無法升高到激活其他器官中NR的活性，因此無法利用NO_3^-。惟目前對如何形成這種運輸限制的原因仍眾說紛紜，植物根部器官對於無機氮源的運輸與代謝機制仍是值得我們研究的題材之一，深入了解其運作，有助於我們進一步掌握植物對氮源吸收與利用的機制，在培養特定植物時應如何施給氮肥也有了理論基礎。

VI、引用文獻

吳正宗 (2005) 認識化學肥料。臺南區農業改良場技術專刊 132: 24-62。

連深 (1980) 肥料之認識與檢定。109-113頁。林家棻(編輯) 作物需肥診斷技術。臺灣省農業試驗所，台北市。176頁。

譚增偉 (2008) 認識當前氮肥之酸鹼平衡與

其用量問題。農業試驗所技術服務 74: 19-24。

Allen, W. J. and I. Collinson (2020) Ammonium transporters: a molecular dual carriageway. Biochemistry and Chemical Biology 9: 1-3.

Andrews, M. and J. A. Raven (2022) Root or shoot nitrate assimilation in terrestrial vascular plants: does it matter? Plant and Soil 476: 30-62.

Boeckstaens, M., B. Andre and A. M. Marini (2007) The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 Kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium. Molecular Microbiology 64: 534-546.

Campbell, W. H. (1988) Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plant. Physiology Plantarum 74(1): 214-219.

Chiu, C. C., C. S. Lin, A. P. Hsia, R. C. Su, H. L. Lin and Y. F. Tsay (2004) Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. Plant Cell Physiology 45: 1139-1148.

Clark, M. B., H. A. Mills, C. D. Robacker and J. G. Latimer (2003) Influence of nitrate: ammonium ratios on growth and elemental concentration in two azalea cultivars. Journal of Plant Nutrition 26: 2503-2520.

Claussen, W. and F. Lenz (1999) Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. Plant and Soil 208: 90-102.

Colgrove, Jr, M. S. (1956) Growth of azalea A3 influenced by ammonium and nitrate nitrogen. Master's Degree Thesis, Department of Horticulture, Oregon State College, Corvallis, Oregon, USA. 66pp.

Cruz, C. M., S. H. Lips and M. A. Martins-Loucao (1993) Nitrogen assimilation and transport in carob plants. Physiologia Plantarum 89: 524-531.

de Michele, R., C. Ast, D. Loque, C. H. Ho, S. L. A. Andrade, V. Lanquar, G. Grossmann, S. Gehne, M. U. Kumke and W. B. Frommer (2013) Fluorescent sensors reporting the activity of ammonium transceptors in live cells. eLife 2: 00800-00822.

Douglas, S. A., W. D. Jhon and M. Anish (2017) Nitrogen-source preference in blueberry (*Vaccinium* sp.): enhance shoot nitrogen assimilation in response to direct supply of nitrate. Journal of Plant Physiology 216: 79-87.

Dubois, E. and M. Grenson (1979) Methylamine/ammonium uptake system in *Saocgaromyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. Molecular Genetics and Genomics 175(1): 67-76.

Forde, B. G. (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. Biochimica Biophysica Acta 1465: 219-235.

Gazzarrini, S., L. Lejay, A. Gojon, O.

Nimmemann, W. B. Frommer and N. von Wiren (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. Plant Cell 11: 937-948.

Gerendas, J., R. G. Ratcliffe and B. Sattelmacher (1995) The influence of nitrogen and potassium supply on the ammonium content of maize (*Zea mays* L.) leaves including a comparison of measurements made *in vivo* and *in vitro*. Plant and Soil 173: 11-20.

Giehl, R. F. H., A. M. Laginha, F. Duan, D. Rentsch, L. Yuan and N. von Wiren (2017) A critical role of AMT2;1 in root-to-shoot translocation of ammonium in *Arabidopsis*. Molecular Plant 10: 1449-1460.

Greidanus, T., L. A. Peterson, L. E. Schrader and M. N. Dana (1972) Essentiality of ammonium for cranberry nutrition. Journal of the American Society for Horticultural Science 97(2): 272-277.

Guo, F. Q., J. Young and N. M. Crawford (2003) The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contribute to drought susceptibility in *Arabidopsis*. Plant Cell 15: 107-117.

Gutschick, V. P. (1981) Evolved strategies in nitrogen acquisition by plants. The Naturalist 118: 607-637.

Havill, D. C., J. A. Lee and G. R. Stewart (1974) Nitrate utilization by species from acidic and calcareous soil. New Phytologist 73: 1221-1231.

Ho, C. H. and Y. F. Tsay (2010) Nitrate, ammonium, and potassium sensing and signaling. Current Opinion in Plant Biology 13: 604-610.

Huang, N. C., K. H. Liu, H. J. Lo and Y. F. Tsay (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. Plant Cell 11: 1381-1392.

Kleinhenz, V. (1999) Sulfur and Chloride in the Soil-Plant System. International Potash Institute, Basel. 99pp.

Koyama, L., M. Hirobe, K. Koba and N. Tokuchi (2013) Nitrate-use traits of understory plant as potential regulators of vegetation distribution on a slope in a Japanese cedar plantation. Plant and Soil 362(1-2): 119-134.

Koyama, L. and N. Tokuchi (2003) Effects of NO_3^- availability on NO_3^- use in seedlings of three woody shrub species. Tree Physiology 23(4): 281-288.

Krouk, G., P. Tillard and A. Gojon (2006) Regulation of the high-affinity NO_3^- uptake system by NRT1.1 mediated NO_3^- demand signaling in *Arabidopsis*. Plant Physiology 142: 1075-1086.

Lancien, M., P. Gadal and M. Hodges (2000) Enzyme redundancy and the important of 2-Oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. Plant Physiology 123: 817-824.

Leran, S., K. Varala, J. C. Boyer, M. Chiurazzi, N. Crawford, F. D. Vedele, L. David, R. Dickstein, E. Fernandez, B. Forde, W. Gassmann, D. Geiger, A. Gojon, J. M. Gong, B. A. Halkier, J. M. Harris, R. Hedrich, A. M. Limami, D. Rentsch, M. Seo, Y. F. Tsay, M. Y. Zhang, G. Coruzzi and B. Lacombe (2014) A unified nomenclature of nitrate transporter 1/peptide transporter family members in plant. Trends in Plant Science 19(1): 5-9.

Liu, K. H., C. Y. Huang and Y. F. Tsay (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases on nitrate uptake. Plant Cell 11: 865-871.

Liu, K. H. and Y. F. Tsay (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. European Molecular Biology Organization Journal 22(5): 1005-1013.

Loque, D., S. Lalonde, L. L. Looger, N. von Wiren and W. B. Frommer (2007) A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. Nature 446: 195-198.

Loque, D. and N. von Wiren (2004) Regulatory levels for the transporter ammonium in plant roots. Journal of Experimental Botany 55: 1293-1305.

Loque, D., L. Yuan, S. Kojima, A. Gojon, J. Wirth, S. Gazzarrini, K. Ishiyama, H. Takahashi and N. von Wiren (2006) Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient *Arabidopsis* roots. The Plant Journal 48: 522-534.

Lorenz, M. C. and J. Heitman (1998) The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. European Molecular Biology Organization Journal 17: 1236-1247.

Marschner, P. (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd ed. Academic Press, Cambridge. 672pp.

Mathilde, O. and J. M. Anthony (2011) Transport system for NO_3^- and NH_4^+. Annual Plant Review 42: 83-102.

Maynard, D. N. and A. V. Barker (1969) Studies on the tolerance of plant to ammonium nutrition. Journal of the American Society for Horticultural Science 94: 235-239.

Miller, A. J. and M. D. Cramer (2004) Root nitrogen acquisition and assimilation. Plant Soil 274: 1-36.

Min, X., M. Y. Siddiqi, R. D. Guy, A. D. M. Glass and H. J. Kronzuker (1999) A comparative study of fluxes and compartmentation of nitrate and ammonium in early-successional tree species. Plant Cell Environment 22: 821-830.

Neuhauser, B., M. Dynowski, M. Mayer and U. Ludewig (2007) Regulation of NH_4^+ transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails.

Plant Physiology 143: 1651-1659.

Ninnemann, O., J. C. Jauniaux and W. B. Frommer (1994) Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. European Molecular Biology Organization Journal 13(15): 3464-3471.

Okamoto, M., A. Kumar, W. Li, Y. Wang, M. Y. Siddiqi, N. M. Crawford and A. D. M. Glass (2006) High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-like gene AtNRT301. Plant Physiology 140: 1036-1046.

Orsel, M., F. Chopin, O. Leleu, S. J. Smith, A. Krapp, F. Daniel-Vedele and A. J. Miller (2006) Characterisation of a two component high affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*: physiology and protein-protein interaction. Plant Physiology 142: 1304-1317.

Pao, S. S., I. T. Paulsen and M. H. Saier, Jr. (1998) Major facilitator superfamily. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(1): 1-34.

Paul, E. A. and F. E. Clark (1989) Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego. 272pp.

Parker, J. L. and S. Newstead (2014) Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. Nature 507: 68-72.

Raven, J. A. and J. I. Sprent (1988) The role of long-distance transport in intracellular pH regulation in *Phaseolus vulgaris* grown with ammonium or nitrate as nitrogen source, or nodulated. Journal of Experimental Botany 39(5): 513-528.

Remans, T., P. Nacry, M. Pervent, S. Filleur, E. Diatloff, E. Mounier, P. Tillard, B. G. Forde and A. Gojin (2006) The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 19206-19211.

Ruan, J., J. Gerendas, R. Hardter and B. Sattelmacher (2007) Effect of nitrogen form and root-zone pH on growth and nitrogen uptake of tea (*Camellia sinensis*) plants. Annals of Botany 99: 301-310.

Runge, M. (1983) Physiology and ecology of nitrogen nutrition. pp. 163-200. In M. H. Zimmermann, ed. Encyclopedia of Plant Physiology. Springer-Verlag, Berlin. 557pp.

Sohlenkamp, C., C. C. Wood, G. W. Roeb and M. K. Udvardi (2003) Characterization of *Arabidopsis* AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. Plant Physiology 130: 1788-1796.

Steiner, H. Y., F. Naider and J. M. Becker (1995) The PTR family: a new group of peptide transporters. Molecular Microbiology 16: 825-834.

Stewart, G. R., N. Sumar and M. Patel (1987) Comparative aspects of inorganic nitrogen assimilation in higher plants. pp. 39-44. In W. R. Ullrich and P. J. Aparicio, eds.

Inorganic Nitrogen Metabolism. Springer-Verlag, Berlin. 296pp.

Sun, J. and N. Zheng (2015) Molecular mechanism underlying the plant NRT1.1 dual-affinity nitrate transporter. Frontiers in Physiology 386(6): 1-6.

Tong, Y., J. J. Zhou, Z. Li and A. J. Miller (2005) A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. Plant Journal 41: 442-450.

Tsay, Y. F., J. I. Schroeder, K. A. Feldmann and N. M. Crawford (1993) The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. Cell 72: 705-713.

van der Leij, M., S. J. Smith and A. J. Miller (1998) Remobilisation of vacuolar stored nitrate in barley root cells. Planta 205: 64-72.

van Nuland, A., P. Vandormael, M. Donaton, M. Alenquer, A. Lourenco, E. Quintino, M. Versele and J. M. Thevelein (2006) Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast. Molecular Microbiology 59: 1485-1505.

Wang, Y. Y., P. K. Hsu and Y. F. Tsay (2012) Uptake, allocation and signaling of nitrate. Trends in Plant Science 17(8): 458-467.

Wang, M., Q. Shen, G. Xu and S. Guo (2014) New insight into she strategy for nitrogen metabolism in plant cells. International Review of Cell and Molecular Biology 310: 1-37.

Weiner, D. and J. W. Verlander (2014) Ammonium transporter in the kidney by Rhesus glycoproteins. American Journal of Physiology-Renal Physiology 306: 1107-1120.

Williams, L. E. and A. J. Miller (2001) Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. Annual Review Physiology and Plant Molecular Biology 52: 659-688.

Williamson, G., G. Tamburrino, A. Bizior, M. Boeckstaems, G. D. Mirandela, M. G. Bage, A. Pislakov, C. M. Ives, E. Terras, P. A. Hoskisson, A. M. Marini, U. Zachariae and A. Javelle (2020) A two-lane mechanism for selective biological ammonium transporter. Biochemistry and Chemical Biology 9: 1-22.

Yuan, L., D. Loque, S. Kojima, S. Rauch, K. Ishiyama, E. Inoue, H. Takahashi and N. von Wiren (2007) The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. Plant Cell 19(8): 2636-2652.

Zhang, H., S. Li, M. Y. Shi, S. L. Wang, L. Shi, F. S. Xu and G. D. Ding (2020) Genome-wide systematic characterization of the NPF family genes and their transcriptional responses to multiple nutrient stresses in allotetraploid rapeseed. International Journal of Molecular Sciences 21(17): 5947-5968.