

氮素对水稻幼苗氮代谢相关酶活性及相关基因表达的影响

杨忠良, 刘海英, 刘 会, 徐振华, 陶永庆, 黄 翠

(黑龙江省农业科学院 五常水稻研究所, 黑龙江 哈尔滨 150229)

摘要:为明确氮素对不同蛋白质含量水稻幼苗的影响,用营养液培养的方法,对4个稻米蛋白质含量有差异的粳稻品种幼苗进行诱导处理,研究了水稻幼苗在 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KNO}_3$ 处理下,各品种水稻干物质积累的差异,以及硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)活性和NR基因(*OsNR1*)、GS基因(*OsGS1-1*)表达差异。结果表明:经 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KNO}_3$ 处理后各品种地上部和根干重均显著高于对照,叶片和根中硝态氮($\text{NO}_3\text{-N}$)和铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)含量显著高于对照,叶片中NR和GS活性显著高于对照;随着氮素处理时间的增加,*OsNR1*基因相对表达量增加,在处理2 h时达到最大值,而后呈随处理时间的增加呈下降的趋势;在氮素处理前期,*OsGS1-1*的表达量变化不大,而在处理8 h时,*OsGS1-1*基因的表达量显著增加,此时的基因相对表达量是处理前的1.2倍。

关键词: 水稻; 氮素水平; 硝酸还原酶; 谷氨酰胺合成酶; 基因表达

中图分类号: S511.062 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2017)10-0026-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.10.0026

氮素是植物体内蛋白质、核酸、叶绿素和一些激素等的重要组成部分,是限制作物生长和产量形成的首要因素^[1-3]。作物对氮素的吸收利用包括吸收、运输、同化及再转移等一系列过程。植物吸收的 NO_3 首先经过限速酶-硝酸还原酶(NR)还原为亚硝态氮 NO_2 ,再由亚硝酸还原酶(NiR)把亚硝酸盐还原为 NH_4^+ 加以利用^[4]。谷氨酰胺合成酶(GS)是氮同化过程的关键酶,它承担着氮代谢的中心作用^[5],参与多种氮代谢的调节^[6]。

近几年的相关研究表明,随着外源施氮量的增加,水稻体内无机氮含量增加,NR和GS等氮代谢中的关键酶的活性也随之增加,低氮能显著促进GS1的表达,低氮和中高氮能显著促进GS2的表达^[7]。NR或NiR基因的过表达可提高mRNA水平,也提高了植物对氮的吸收,但是参与调控并没有促进植物生长或提高产量^[8]。NR和GS活性和表达受到多种因素的影响,氮源、温度以及光照等都是主要的限制因素^[9-10]。王月福等^[6]人的研究表明纯氮对提高冬小麦叶片NR和GS的活性以及籽粒蛋白质含量有促进作用。朱方旭^[11]的研究表明氮素营养能够影响胞质型谷

氨酰胺合成酶和质体型谷氨酰胺合成酶基因表达水平。因此,为了能够更准确地揭示不同氮素水平对蛋白质含量不同品种水稻幼苗氮素积累、转运的影响以及对幼苗中NR、GS酶活性和NR(*OsNR1*)、GS(*OsGS1-1*)基因表达的影响,本试验采用水培方法,在营养条件可控的环境下,研究不同蛋白质含量水稻的品种对氮素的反应,以期生产上合理施用氮肥提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用4个稻米蛋白质含量有差异的粳稻品种作为供试材料,分别是东农423(蛋白质含量为8.05%)、藤系180(7.17%)、东农1725(9.57%)、东农1732(6.85%)。其中东农1725和东农1732是以东农423为母本、藤系180为父本配制的杂交后代中通过蛋白质含量连续定向选择育成的后代稳定品系。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 对供试材料进行水培处理,整个培养过程在光强为 $0\sim1\,200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,温度为 $20\sim28\text{ }^\circ\text{C}$ 的光照培养箱内进行。水稻幼苗长到三叶一心时,用去离子水冲洗幼苗以去除其中的硝酸盐,并且用不加 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 KNO_3 的木村B营养液平衡处理2 d。然后用含 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{KNO}_3$ ^[12]的营养液诱导处理,以含KCl的营养液为对照,设3次重复,处理按不同培

收稿日期:2017-08-18

基金项目:黑龙江省自然科学基金面上资助项目(C2015029);国家重点研发计划资助项目(2016YFD0300900)

第一作者简介:杨忠良(1973-),男,黑龙江省拜泉县人,硕士,高级农艺师,从事水稻栽培、育种研究。E-mail: yangzhongliang04@163.com。

养时间 0、1、2、4、8、12、24 h 分别取功能叶用于基因表达,12 h 取功能叶和根用于 NR、GS 酶活测定及($\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$)含量测定,样品于液氮中速冻后,迅速转移到-80℃超低温冰箱中备用。

1.2.2 测定项目及方法 生物量测定:水稻三叶一心时对各处理各取 10 棵,用去离子水冲净,将地上和地下部分分开,样品于 105℃杀青 30 min 后 80℃烘干至恒重,称量,计算平均单株水稻地上部和根的干重。

组织中硝态氮和铵态氮含量的测定:硝态氮浓度含量采用水杨酸-硫酸法^[13]测定;铵态氮含量采用水合茚三酮法^[14]测定。

组织中 NR、GS 活性的测定:酶活性的测定取约 0.4 g 的水稻叶片置于研钵,加入 4 mL pH 7.2 磷酸缓冲液后冰浴研磨匀浆,静置 30 min。4℃,4 000 r·min⁻¹下离心 5 min,上清液即为粗酶提取液。硝酸还原酶采用对氨基苯磺酸-α 萘

胺比色法^[15]。谷氨酰胺合成酶活性的测定参照吴良欢等^[16]的比色测定方法。

目的基因表达分析:水稻幼苗叶片 RNA 的提取采用 Trizol 法提取水稻幼苗叶片 RNA^[11],产物用于 RT-PCR 反转录合成 cDNA 第一链取各样本 RNA 2 μg,按 PrimeScriptTMRT Reagent Kit 试剂盒(TaKaRa 公司)方法操作。以反转录得到的 cDNA 为模板,利氮代谢酶特异引物进行扩增,以 Actin 为内参基因,引物序列见表 1。

PCR 扩增东农 423 幼苗 cDNA 为模板,反应体系为:DNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹)0.25 μL,10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μL, dNTPs (各 2.5 mmol·L⁻¹)2 μL, DNA 模版 1 μL,上游引物(10 μmol·L⁻¹)1 μL,下游引物(10 μM)1 μL;扩增程序:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,50~58℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,72℃总延伸 10 min 保温 16℃,30 个循环。

表 1 试验中所用的引物序列

Table 1 Primers used for RT-PCR amplification

引物名称 Primer name	基因 NCBI 登录号 Primer sequence number		引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	产物大小/bp Product length
OsNR1	AK102363	F	CGTGGTGGTACAAGCCAGAG	349
		R	GGCTGGGTGTTGTGCGACT	
OsGS1-1	AB037595	F	CGTCTGTCGGCATTCTCTG	429
		R	TCATGGAGGTGACGATGTAA	
Actin	NM_001057621.1	F	GGAGCGTGGTTACTCATTC	578
		R	CTCTTGGCTTAGCATTCTTG	

1.2.3 数据分析方法 采用 Excel 2003 软件进行数据处理和作图,利用 DPS 软件进行方差分析,比较不同处理间在 $P<0.05$ 的显著性水平。

2 结果与分析

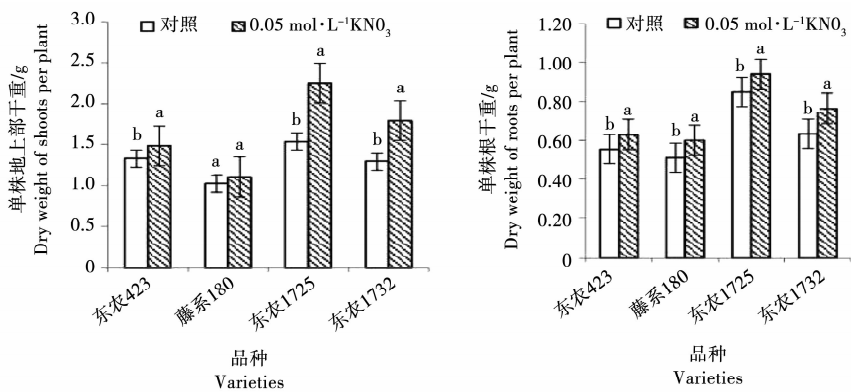
2.1 氮素对水稻生物量的影响

由图 1 可知,经 0.05 mol·L⁻¹KNO₃处理后,东农 423 和东农 1725 蛋白质含量的高品种,较对照而言,地上部干重显著增加;而蛋白质含量低的品种藤系 180 和东农 1732,地上部干重也有所增加,与对照相比,藤系 180 差异不显著,东农 1732 地上部干重增加显著。经 0.05 mol·L⁻¹KNO₃处理后,这 4 个品种根系的干重均显著上升,且达到显著水平。蛋白质含量高的品种,幼苗地上部和根系的干重均明显高于蛋白质含量低的品种。说明经 0.05 mol·L⁻¹KNO₃处理后蛋白质高含量的品种生物合成能力强于蛋白质含量低的品种。

2.2 氮素对水稻幼苗 NO₃-N 和 NH₄⁺-N 吸收和转运的影响

由图 2 可知,经 0.05 mol·L⁻¹KNO₃处理后,4 个品种叶片和根系的 NO₃-N 含量均显著上升,蛋白质含量高的品种东农 423 和东农 1725 的叶片中 NO₃-N 含量高于蛋白质含量低的品种藤系 180 和东农 1732,与对照相比,4 个品种叶片中的 NO₃-N 含量高于根系中 NO₃-N 含量。

由图 3 可知,经 0.05 mol·L⁻¹KNO₃处理后与对照相比,4 个品种叶片和根系的 NH₄⁺-N 含量均明显上升,但叶片中 NH₄⁺-N 含量显著高于对照叶片中 NH₄⁺-N 含量,0.05 mol·L⁻¹KNO₃处理后东农 423 根系中 NH₄⁺-N 含量显著高于对照根系中 NH₄⁺-N 含量,另外 3 个品种根系中 NH₄⁺-N 含量与对照处理下 NH₄⁺-N 含量差异不显著。



不同小写字母表示处理间差异达 0.05% 显著水平。下同。
Different lowercase letters mean significant difference among treatments at 0.05 levels. The same below.

图 1 氮素对不同品种水稻幼苗叶和根干物重的影响

Fig. 1 Effects of N on dry weight of shats and roots of different rice varieties

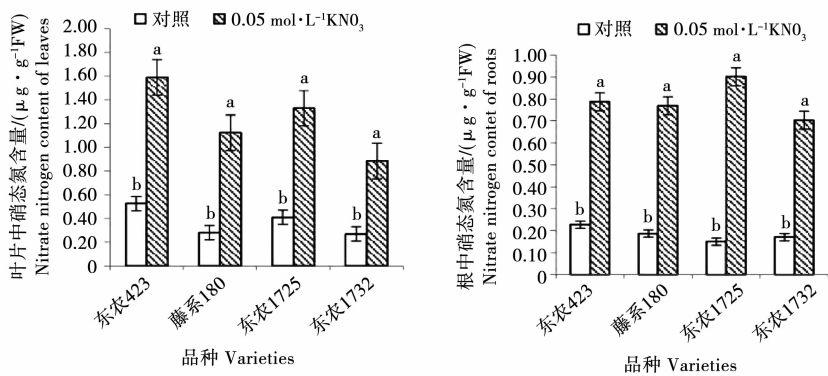


图 2 氮素对水稻幼苗叶和根中 NO₃-N 含量的影响

Fig. 2 Effects of N on nitrate nitrogen contents of rice leaves and roots

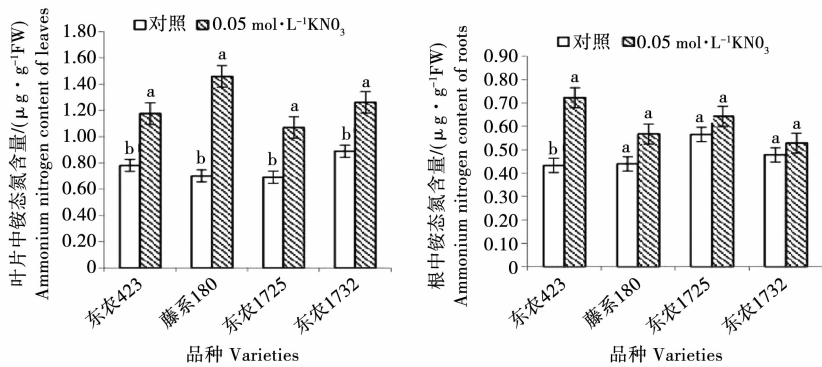


图 3 氮素对水稻幼苗叶和根中 NH₄⁺-N 含量的影响

Fig. 3 Effects of N on ammonium nitrogen contents of rice leaves and roots

2.3 氮素对水稻氮代谢相关酶活性的影响

经 0.05 mol·L⁻¹ KNO₃ 处理后,4 个品种的硝酸还原酶活性和谷氨酰胺酶活性均增加,差异达到显著水平。且蛋白质含量高的品种,幼苗硝酸

还原酶活性增加量均明显高于蛋白质含量低的品种,而谷氨酰胺酶活性在不同蛋白质含量品种中并未表现出规律性(见图 4)。

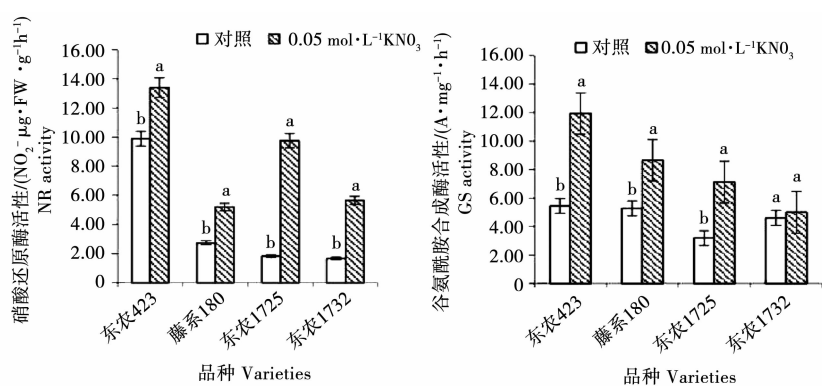


图4 氮素对水稻幼苗硝酸还原酶和谷氨酰胺酶活性的影响
Fig.4 Effects of N on NR and GS activity in leaves of rice seedling

2.4 氮素对水稻幼苗氮代谢关键酶基因表达的影响

经 0.05 mol·L⁻¹ KNO₃ 处理后,OsNR1 和 OsGs1-1 基因表达水平变化见图 5,随着氮素处理时间的增加,OsNR1 基因相对表达量增加,在处理 2 h 时达到最大值,而后随时间的增加呈下降的趋势;在氮素处理前期,OsGs1-1 表达量变化不大,而在处理 8 h 时,OsGs1-1 基因的表达量显著增加,此时的基因相对表达量是处理前的 1.2 倍。说明高氮条件下,OsNR1 和 OsGs1-1 均可被激活。

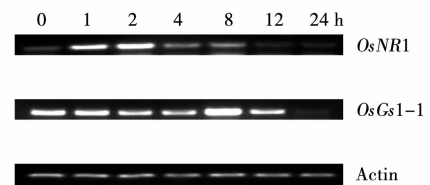


图5 氮素对东农 423 水稻幼苗叶片中 NR 和 GS 基因表达的影响
Fig.5 Effects of N on gene expression of NR and GS in leaves of rice seedling

3 讨论与结论

前人研究表明,硝态氮是大多数植物根系从土壤中吸收氮素的主要形态,是植物氮代谢的源头^[17],对硝态氮的利用速度反映着植株氮代谢的快慢。地上部是氮积累的主要器官,植株体内存在的硝态氮除了根部本身需要硝态氮参与蛋白质的合成外仍有一定数量的硝态氮是氮素在向地上部分转运途中逐步转化来的^[18]。王月福^[19]研究表明,适当提高氮素水平可以提高源器官氮素同化能力。也有研究表明,随 NO₃⁻ 浓度增加,草莓叶片及根系中硝态氮、铵态氮含量逐渐增加^[20];不施氮处理的玉米植株在不同时期硝态氮含量均低于各施氮处理^[21]。植株吸收的 NO₃⁻ 不仅可在

水稻根部还原,也可运至地上部在叶部还原^[22]。本试验结果中,随着外源氮水平的增加,4 个品种的水稻幼苗叶片和根系中 NO₃⁻-N、NH₄⁺-N 含量均明显上升,与对照相比各品种在高氮水平下的 NO₃⁻-N 含量差异达到显著水平。东农 423 根系中 NH₄⁺-N 含量显著高于对照根系中 NH₄⁺-N 含量,另外 3 个品种根系中 NH₄⁺-N 含量与对照差异不显著。NO₃⁻ 被细胞吸收后,在氮素同化途径中 NO₃⁻ 在硝酸还原酶的作用下还原为 NO₂⁻,再通过亚硝酸还原酶的作用生成 NH₄⁺。GS 催化 NH₄⁺ 的同化,是氮素同化过程的限速酶。NR 活性的变化随 NO₃⁻-N 比例的增加而增加^[23]。林振武^[24] 为 NR 是由底物 NO₃⁻ 诱导的酶,在水稻诱导 4 h, KNO₃ 浓度在 0~25 mmol·L⁻¹ 时,幼苗 NR 活性随浓度增高而迅速增长,50 mmol·L⁻¹ 后增长缓慢。GS 酶活性随着氮肥增加而上升,加快了无机氮的转化,在低氮处理条件下,两个品种间酶活性差异极显著,与不施氮处理相比,氮肥处理能明显增加水稻功能叶片氮代谢关键酶的活性。本试验结果表明,经 0.05 mol·L⁻¹ KNO₃ 处理后,4 个品种硝酸还原酶活性和谷氨酰胺酶活性均增加,差异达到显著水平,且蛋白质含量高的品种,幼苗硝酸还原酶和谷氨酰胺酶活性均高于蛋白质含量低的品种,与李豪哲^[25] 等研究结果一致。同时,经 0.05 mol·L⁻¹ KNO₃ 处理后,植株地上部(除藤系 180 外)和根系干物重均显著增加,且蛋白质含量高的品种,幼苗地上部和根系的干重均明显高于蛋白质含量低的品种,这与 NR 的活性变化规律一致的。

NR 基因的表达受到很多外界因子的调控^[26],NO₃⁻ 能诱导 NR 基因的表达,Melzer^[27] 研究认为,施用 N 肥可诱导 NR mRNA 的生成,在 40 min 后就能在根部、叶部检测到,2 h 以后根部量达最大,12 h 以后叶部量达最大。本试验结果

表明,随着氮素处理时间的增加,*OsNR1* 基因相对表达量增加,在处理 2 h 时达到最大值,而后随时间的增加呈下降的趋势。在不施氮处理下 *NR* 酶活性和表达都明显下降,*OsNR1* 基因在转录水平调节 *NR* 酶活性。外源氮对植物中 *GS* 基因表达是在转录后水平上进行调控,硝态氮、氨基酸和铵态氮都具有诱导部分植物中 *GS* 基因表达的作用。在 NO_3^- 处理下,随着 N 浓度的增加,*LeGs* 基因的表达式增高,但是随着处理时间的延长而降低^[28]。对豌豆,硝态氮处理 8 h 后,诱导根部 *GS* 活性增加了 2.5 倍^[29]。本试验结果表明,在氮素处理前期,*OsGs1-1* 表达量变化不大,而在处理 8 h 时,*OsGs1-1* 基因的表达量显著增加,此时的基因相对表达量是处理前的 1.2 倍,经 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 诱导后 *NR* 硝酸还原酶和谷氨酰胺酶活性增加与 *NR* 和 *GS* 基因表达量同样增加,说明氮素诱导促进 *NR*、*GS* 基因表达不仅在转录水平上,也体现在酶活性水平上。

综上所述,经 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 处理后,水稻幼苗通过提高 *NR* 和 *GS* 酶活性,增加了叶片和根系中氮含量,提高了水稻幼苗的氮素转运和同化,蛋白质含量高的品种叶片和根系氮含量和酶活性高于蛋白质含量低的品种;随着氮素处理时间的增加,水稻幼苗叶片、根系硝态氮、铵态氮积累量增加,导致叶片中 *OsNR1* 和 *OsGs1-1* 基因表达先增加后降低。

参考文献:

- [1] Kumar S, Narula A, Abdin MZ, et al. Enhancement in biomass and berberine concentration by neem cake and nitrogen(urea) and sulphur nutrients in *Tinospora cordifolia* Miers[J]. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 2004, 10: 243-251.
- [2] Zhou X J, Liang Y, Chen H, et al. Effects of rhizobia inoculation and nitrogen fertilization on photosynthetic physiology of soybean[J]. *Photosynthetica*, 2006, 44(4): 530-535.
- [3] Guo H L, Ma C M, Dong S K, et al. Absorption and utilization of different nitrogen sources during the growth of soybean plant[J]. *J. Nucl. Agric. Sci*, 2008, 22(3): 338-342.
- [4] Schrader, L E, Ritenour G L, Eilrich G L, et al. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants[J]. *Plant Physiol*, 1968(43): 930-940.
- [5] Mifflin B J, Habash D. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops[J]. *Exp. Bot*, 2002(53): 979-987.
- [6] 王月福, 于振文, 李尚霞, 等. 氮素营养水平对冬小麦氮代谢关键酶活性变化和籽粒蛋白质含量的影响[J]. *作物学报*, 2002, 28(6): 743-748.
- [7] 张国英. 不同氮素水平处理对水稻碳氮代谢关键酶 *GS* 和 *GDH* 活性及表达的影响[D]. 福建: 福建农林大学, 2012.
- [8] May Sandar Kyaing, 顾立江, 程红梅, 等. 植物中硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的作用[J]. *生物技术进展*, 2011, 1(3):

- 159-164.
- [9] 刘永华, 朱祝军, 魏国强, 等. 不同光强下氮素形态对番茄谷氨酰胺合成酶和光呼吸的影响[J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(6): 680-682.
- [10] 戴延波, 曹卫星, 孙传范, 等. 增敏营养对小麦光合作用及硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶的影响[J]. *应用生态学报*, 2003, 14(9): 1529-1532.
- [11] 朱方旭. 水稻碳氮代谢关键酶基因表达及产量和品质性状对氮素营养的响应[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- [12] 孙国荣, 朱鹏, 肖翊华, 等. 杂交水稻硝酸还原酶活性和 NO_3^- 含量昼夜变化规律的研究[J]. *武汉大学学报*, 1992(1): 91-97.
- [13] 赵世杰, 苍晶. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [14] 许维岸. 生物学综合实验指导[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2010.
- [15] 邹琦. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [16] 吴良欢, 蒋式洪, 陶亲南, 等. 植物转氨酶活性比色测定方法及其应用[J]. *土壤通报*, 1998, 29(3): 136-138.
- [17] 赵娜, 孙艳, 王德玉, 等. 外源褪黑素对高温胁迫条件下黄瓜幼苗氮代谢的影响[J]. *植物生理学报*, 2012, 48(6): 557-564.
- [18] 张晓果, 徐春梅, 陈松, 等. 氮利用效率差异水稻品种的根系铵离子吸收特性[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(22): 4428-4436.
- [19] 王月福, 姜东, 于振文, 等. 氮素水平对小麦籽粒产量和蛋白质含量的影响及其生理基础[J]. *中国农业科学*, 2003, 3(65): 513-520.
- [20] 韩宇睿, 王秀峰, 杨凤娟, 等. NO_3^- 胁迫对草莓幼苗光合特性和氮代谢的影响[J]. *应用生态学报*, 2015, 26(8): 2314-2320.
- [21] 王林学, 杨义, 刘帮银. 施氮量对玉米植株硝态氮含量及产量的影响[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(15): 6404-6406, 6468.
- [22] 封克, 汪晓丽, 陈平, 等. 水稻苗期不同时段 NO_3^- 吸收特点及其受 NH_4^+ 的影响[J]. *中国农业科学*, 2003, 3(63): 307-312.
- [23] 师进霖, 姜跃丽, 宋云华, 等. 氮素形态对黄瓜幼苗生长及氮代谢酶活性影响[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(22): 225-227.
- [24] 林振武, 汤玉玮. 水稻硝酸还原活力的调节[J]. *中国科学*, 1989(4): 379-385.
- [25] 李豪哲, 林振武, 汤玉玮, 等. 不同类型水稻幼苗硝酸还原酶的活力[J]. *实验生物学报*, 1981, 14(4): 407-409.
- [26] 曹云, 范晓荣, 孙淑斌, 等. 增敏营养对不同基因型水稻硝酸还原酶活性及其表达量的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2007, 13(1): 99-105.
- [27] Melzer J M, Kleinhofs A R, Warner L. Nitrate reductase regulation: Effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation[J]. *Mol. Gen. Genet*, 1989(217): 341-346.
- [28] 管闪青, 张屹东, 杨冬冬, 等. 甜瓜谷氨酰胺合成酶基因在不同氮素条件下的表达分析[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2007, 25(1): 2429.
- [29] 徐振华. 粳稻杂种后代氮代谢关键酶活性及相关基因转录表达和序列分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.