

不同铵硝比例对水稻铵吸收代谢基因表达的影响*

赵首萍^{1,2} 赵学强^{1,2} 施卫明^{1†}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008)

(2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 以水稻南光为材料, 研究了不同铵硝摩尔比例处理时, 水稻 NH_4^+ 吸收代谢基因的表达情况。结果表明: (1) 应用荧光定量 PCR 方法, 可以精确检测水稻氮素吸收代谢基因在不同铵硝处理间的表达量变化; (2) 从各基因的表达量上来看, 吸收基因中以 *OsAMT1.1* 表达量最高, 编码 GS 的基因中以 *OsGln1.1* 表达量最高, 编码 GOGAT 的基因中, *OsGlu* 表达量最高; (3) 总体来说, 不同铵硝处理对 NH_4^+ 吸收代谢基因的表达有显著影响, 吸收基因对不同铵硝比例的反应要比代谢基因更敏感; (4) 氮吸收基因中 *OsAMT4.1* 显著受到 NO_3^- 的抑制, NH_4^+ 的诱导。而 *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2*, *OsAMT1.3* 和 *OsNRT2* 在铵硝摩尔比例由 100:0 变为 50:50 过程中, 受到 NO_3^- 的显著抑制, 在铵硝摩尔比例由 50:50 变为 0:100 过程中 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT1.3* 受到 NO_3^- 的显著诱导, *OsAMT1.1* 和 *OsNRT2* 变化不显著; (5) 编码 GS 的基因 *OsGln1.1* 表达受 NO_3^- 诱导, 受 NH_4^+ 抑制。*OsGln2* 在铵硝摩尔比例由 100:0 变为 50:50 过程中, 受到 NO_3^- 增加的诱导, 同时, *OsGln1.2* 受到 NO_3^- 增加的显著抑制作用, 铵硝达到 50:50 以后, NO_3^- 比例的增加对 *OsGln1.2* 和 *OsGln2* 的表达没有显著影响; (6) 编码 GOGAT 的基因 *OsGln1* 和 *OsGlu* 在不同铵硝摩尔比例中的变化趋势一致: 铵硝比例由 100:0 变为 50:50 过程中没有显著变化, 铵硝比例 50:50 基础上表达量受到 NO_3^- 比例增加的显著抑制, 而 *OsGln2* 的表达受 NO_3^- 的显著抑制, NH_4^+ 的显著诱导。

关键词 水稻; 铵硝比例; 氮吸收代谢基因; 荧光定量 PCR

中图分类号 S501 文献标识码 A

虽然高等植物可以利用有机态的 N, 但根系主要吸收的氮源还是 NO_3^- 和 NH_4^+ 。水稻常被认为是喜铵作物, 对铵态氮的吸收多于硝态氮。但也有报道认为, 在以铵态氮或硝态氮单独作为氮源时, 水稻都能良好的生长, 而以二种形态同时供给时生长更好^[1-5]。关于铵硝吸收, 近年来也有很多研究^[6-9]。Herbert 等^[10]研究了铵硝吸收的相互作用, 他们发现质膜 NH_4^+ 的流入, 胞质 NH_4^+ 的积累以及 NH_4^+ 的代谢都受到 NO_3^- 的促进作用。即使在相同氮水平下, 同时供应两种形态氮时, 总氮的吸收以及氮向茎中的转运都高于单独施用 NH_4^+ 或 NO_3^- 的情况。尽管存在很多关于混合氮源改善长势的报道, 但是对于铵硝协同吸收的机制研究很少, 尤其是在分子基础方面目前还没有研究报道。水稻是典型的以吸收 NH_4^+ 为主的作物, 那么在水稻“硝促铵”这一过程中, NO_3^- 是否通过改变 NH_4^+ 离子转运蛋白基因 *Os-*

AMT 以及代谢基因的表达来促进 NH_4^+ 吸收的呢? 我们以粳稻品种南光为材料, 应用荧光定量 PCR 技术定量研究了 NH_4^+ 吸收代谢基因在不同铵硝比例培养条件下的表达变化规律, 为从基因结构角度解释 NO_3^- 、 NH_4^+ 协同吸收的机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 水稻预培养

水稻种子(粳稻南光)用 1% NaClO 浸泡表面消毒 30 min, 37℃ 黑暗浸种 24 h。发芽的种子转移到预先放在托盘内的纱网上, 托盘内放 1/2 木村 B 培养液^[11](氮水平为 0.5 mmol L⁻¹ NH_4NO_3 , 其他元素为木村 B 培养液的 1/2)进行预培养。

1.2 培养条件及管理

植株生长室温度: 25 ± 2℃, 相对湿度 75%, 光

* 国家自然科学基金重大项目(30390083)资助

† 通讯作者, E-mail: wmsi@issas.ac.cn, Tel: 025-86881566

作者简介: 赵首萍(1976~), 女, 博士研究生, 主要从事植物营养遗传研究

收稿日期: 2005-06-06; 收到修改稿日期: 2005-07-22

照: $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 昼夜循环: 光照 14 h/ 黑暗 10 h。苗龄 15 d 时, 选取长势一致的幼苗转移到容积为 18 L 的大托盘上培养。大托盘内营养液是氮水平为 $0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4\text{NO}_3$ 的木村 B 培养液, 除氮水平外, 其他元素同木村 B 培养液一致。每个大托盘为 18 L 营养液/ 24 个孔。培养液中加入硝化抑制剂二氰胺 5.89 mg L^{-1} 。每天早晚各调一次 pH 值到 5.5, 每天每个大托盘内加入新培养液 1 L, 每隔 3 d 换一次培养液。

1.3 处理

苗龄 28 d 时, 选取长势一致的水稻幼苗, 进行氮饥饿处理(氮水平为 0, 其他元素同木村 B 培养液一致) 48 h 后, 放入总氮水平为 1 mmol L^{-1} , 铵硝摩

尔比例分别为 100: 0 ($1 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+$), 50: 50 ($0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{NH}_4^+ + 0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{NO}_3^-$) 和 0: 100 ($1 \text{ mmol L}^{-1} \text{NO}_3^-$) 的 3 个处理的营养液中 ($\text{NH}_4^+ : (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NO}_3^- : \text{KNO}_3$) 培养, 每个处理 3 个重复。营养液其他元素含量同木村 B 培养液^[11] 一致。

1.4 取样和 cDNA 模板合成

不同铵硝比例处理后, 分别在 0 h 和 2 h 各取植株根一次, 样品经液氮冷冻后 -80°C 保存备用。用异硫氰酸胍法提取植株总 RNA, 用 powerscriptTM 逆转录酶按照说明书提供的操作步骤将 RNA 逆转录为 cDNA。以该 cDNA 为模板应用荧光定量 PCR 技术分析各基因表达量的变化。

表 1 扩增各基因所用的引物序列

Table 1 Sequence of specific primers for genes used in the RF-PCR analysis

基因名称 Gene	引物序列 Sequence of primers	
	Forward	Reverse
<i>OsAMT1.1</i>	5' - ctctt ctacggg ctcaag aag c- 3'	5' - caaatt tatga g tgaag atcgag a- 3'
<i>OsAMT1.2</i>	5' - gat ctacgg cgaat cggg cacgat - 3'	5' - tt cacat ctg tgaagg tgaag acg - 3'
<i>OsAMT1.3</i>	5' - t caaat cctacgg cccg cccgt ag- 3'	5' - g ccgaag atctgt ccaagt actcct - 3'
<i>OsAMT4.1</i>	5' - cgacag dt cgtct tggcc - 3'	5' - gtcgg cttt gga g cca egg- 3'
<i>OsActin</i>	5' - ctt catagg aatgga agctg g ggt a- 3'	5' - cgacca cettgat ctctat g cteta - 3'
<i>OsGln1.1</i>	5' - caate g ccaatg agaag c- 3'	5' - ctg ccttctg ctccgt ct- 3'
<i>OsGln1.2</i>	5' - ggttg gagg atcggg atag - 3'	5' - tca ccttgg g t gtag ca- 3'
<i>OsGln2</i>	5' - ac caagat atgctg aaga - 3'	5' - aac d gcaac cctcctt ca- 3'
<i>OsGlt1</i>	5' - ggag gga atcta acagg - 3'	5' - agt catcag ct tagt cag- 3'
<i>OsGlt2</i>	5' - agaca aacaatt tcctg ag- 3'	5' - ta aagggt cactt caacat - 3'
<i>OsGlu</i>	5' - a acagg cagc g aaaaag gt- 3'	5' - actcgt caaa d cgcca ca- 3'
<i>OsNRT2</i>	5' - cctcat cggct ctcct g- 3'	5' - agca ccaga g cccat cac- 3'

1.5 测定项目

按照各基因的 cDNA 序列设计特异引物, 应用荧光定量 PCR 技术分析不同处理植株根部 NH_4^+ 吸收转运蛋白基因 (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2*, *OsAMT1.3* 和 *OsAMT4.1*)、 NO_3^- 转运蛋白基因 (*OsNRT2*)、编码 GS 的基因 (*OsGln1.1*, *OsGln1.2* 和 *OsGln2*) 和编码 GOGAT 的基因 (*OsGlt1*, *OsGlt2* 和 *OsGlu*) 表达水平差异。

1.6 PCR 扩增引物

按照 NCBI/ GenBank 编号 *OsAMT1.1* (AF289477); *OsAMT1.2* (AF289478); *OsAMT1.3* (AF289479); *OsAMT4.1* (AC091811); *OsGln1.1* (AP004880); *OsGln1.2* (AC105364); *OsGln2* (AL662953); *OsGlt1* (AP004363); *OsGlt2* (AC104709); *OsGlu* (AP003833); *OsActin* (XM469569);

OsNRT2 (AB008519), 根据各基因的 cDNA 序列进行引物设计。引物由上海博亚生物技术有限公司合成, 纯度大于 99%; Taq^{TM} , MgCl₂ 和 dNTP 由宝 (TaKaRa) 生物工程 (大连) 有限公司提供; SYBR Green I 由 Cambrex Bioscience Rockland, Inc 提供。

2 结果与分析

2.1 铵吸收基因 *OsAMT* 以及硝吸收基因 *OsNRT* 在不同铵硝比例中的表达情况

OsAMT 是水稻中编码 NH_4^+ 转运蛋白的基因, 水稻基因组中有 10 个 *OsAMT* 基因, 根据同源性的不同分为四个系列: *OsAMT1* 三个, *OsAMT2* 三个,

O_sAMT3 三个以及一个 *O_sAMT4*^[12]。目前对水稻 *O_sAMT* 的研究大部分集中于 *O_sAMT1* 家族的三个基因的表达特征上^[13,14]。*O_sNRT2* 是水稻中的高亲和 NO_3^- 转运蛋白基因。在测定吸收基因的表达时,我们选定了 4 个 *O_sAMT* 基因和一个 *O_sNRT2* 基因进行定量分析。

由于吸收基因表达量很低,很难进行精确定量,在以往的研究中也只是应用半定量或 Northern 杂交技术进行半定量或定性分析^[13,14]。而这两种方法都

不能对基因表达量进行精确定量,因此也就限制了对基因表达规律的进一步研究。实时荧光定量 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出,该技术实现了对低拷贝基因表达量的快速、准确定量。与半定量、Northern 杂交以及基因芯片技术相比,实时荧光定量 PCR 技术精确性提高很多倍,可以精确到拷贝数的个数,并且可以同时大量样品的定量,而且省略了电泳这一步骤,使操作更简便。

表 2 氮吸收基因在不同铵硝比例下的表达量

Table 2 Expression level of N- absorbing genes in relation to different ammonium/ nitrate ratio in treatments ($\text{pmol} \times 10^{-11} \mu\text{g}^{-1}$ total RNA)

基因 Gene	1 mmol L ⁻¹ NH ₄ ⁺	0.5 mmol L ⁻¹ NH ₄ ⁺ + 0.5 mmol L ⁻¹ NO ₃ ⁻	1 mmol L ⁻¹ NO ₃ ⁻
<i>O_sAMT1.1</i>	2.832 ± 120 a A	2.520 ± 158 b A	2.240 ± 175 b A
<i>O_sAMT1.2</i>	25.35 ± 2.81 a C	7.17 ± 2.04 c C	16.77 ± 2.50 b C
<i>O_sAMT1.3</i>	375.8 ± 25.5 a B	298.6 ± 30.1 b B	426.2 ± 26.6 a B
<i>O_sAMT4.1</i>	79.35 ± 9.18 a C	41.44 ± 9.81 b C	18.20 ± 4.05 c C
<i>O_sNRT2</i>	99.84 ± 11.3 a C	60.29 ± 6.03 b C	75.54 ± 19.1 ab C

注:表中数据为 3 个重复的平均值 ± 标准差 SE,表中大小写不同字母表示同行不同处理差异显著性 ($p < 0.05$); 大写字母表示同列相同处理不同基因的表达量差异 ($p < 0.05$)。Note: Each value in the table was an average of three replicates. The difference in lowercase letters following the data in the same row indicates significant difference between the treatments at 5% level; and the difference in capital letters in the same column indicates significant difference between the genes at 1% level

表 2 的数据说明,在测定的所有吸氮基因中,表达量最高的是 *O_sAMT1.1*,显著高于其他 *O_sAMT* 基因以及 *O_sNRT2* 基因。而且即使是在纯硝培养下 NH_4^+ 吸收基因 *O_sAMT1.1* 的表达量也显著高于 *O_sNRT2*,在铵硝 50:50 的处理中也是如此。铵硝吸收基因的表达量比较结果说明,不论在怎样的铵硝比例下, NH_4^+ 吸收基因 *O_sAMT1.1* 的表达量始终显著高于其他 *O_sAMT* 和 *O_sNRT2*,因此推测 *O_sAMT1.1* 在水稻氮素吸收中可能起到最主要的作用。

吸收基因的表达有组成型和诱导型之分。从表 2 看,不同铵硝比例对氮吸收基因的表达有影响。前人研究^[13,14]中对于 *O_sAMT1.1* 是否为组成型表达没有定论,但已经证实 *O_sAMT1.3* 不是组成型表达的。我们实验发现 NH_4^+ 吸收基因 *O_sAMT1.1*, *O_sAMT1.2*, *O_sAMT1.3* 和 *O_sAMT4.1* 以及 NO_3^- 吸收基因 *O_sNRT2* 的表达都受到不同供氮形态的影响。*O_sAMT4.1* 的表达量随着溶液中 NO_3^- 的比例增加而降低,似乎表现出显著的受 NO_3^- 抑制、 NH_4^+ 诱导的特性, *O_sAMT1.1* 和 *O_sAMT4.1* 表现类似,不过 *O_sAMT1.1* 的表达量在铵硝 50:50 和纯硝处理间没有显著差异。*O_sAMT1.2* 的表达量变化没有明显的规律,在纯 NH_4^+ 处理时表达量最高,其次是 NO_3^- 处

理,表达量最低的是 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^- = 50:50$ 的处理。*O_sAMT1.2* 的表达量在 3 个不同铵硝比的处理中,纯 NH_4^+ 的表达量最高,似乎表现出 NH_4^+ 诱导的现象,但是在铵硝 50:50 处理时,其表达量反而显著低于纯 NO_3^- 处理时的表达量。编码硝酸盐转运蛋白的基因 *O_sNRT2* 在不同铵硝比例中的变化规律与 *O_sAMT1.2* 相似,都是在 NH_4^+ 中表达量最高, NO_3^- 中表达量次之,铵硝 50:50 处理表达量最低。不同的是 *O_sAMT1.2* 的表达量在不同处理间差异显著,而 *O_sNRT2* 表达量只是纯 NH_4^+ 处理显著高于铵硝 50:50 的处理。说明氮吸收基因受铵硝比例的影响与原培养液中的铵硝比例有关,在铵硝 100:0 的基础上, *O_sAMT1.1*, *O_sAMT1.2*, *O_sAMT1.3* 和 *O_sAMT4.1* 以及 NO_3^- 吸收基因 *O_sNRT2* 的表达受 NO_3^- 比例增加的显著抑制。当铵硝比例达到 50:50 以后, NO_3^- 的增加仍然显著抑制 *O_sAMT4.1* 的表达,但显著诱导 *O_sAMT1.2* 和 *O_sAMT1.3* 的表达,对 *O_sNRT2* 的表达也有微诱导效应。尽管前人^[13]对 *O_sAMT1.2* 的研究表明 *O_sAMT1.2* 的表达受到 NH_4^+ 诱导,但是前人研究中所使用的水稻品种以及处理方式都不同于本实验。前人单纯研究了氮水平的变化对基因表达的影响,我们的实验是在氮水平不变的前提下,来研究

不同铵硝比例对氮素吸收基因表达的影响。

2.2 GS 基因在不同铵硝处理下的表达情况

OsGln 是水稻中编码 GS 的基因。水稻中有 GS1 和 GS2 两种同工酶, GS1 主要存在于细胞质中, 参与 N 素的再转移过程; GS2 主要存在于质体中, 为绿色组织的主要 GS 形式, 主要参与同化光呼吸及硝酸盐还原产生的 NH_4^+ 。Ishiyama 等^[15]报道, 水稻中编

码 GS1 的基因有 3 个, 即 *OsGln1.1*、*OsGln1.2* 和 *OsGln1.3*, 并且指出, *OsGln1.3* 的表达很弱, 因此我们实验中也只检测了 *OsGln1.1* 和 *OsGln1.2* 的表达量。Ishiyama 等^[15]同时指出只有一个编码 GS2 的基因 *OsGln2* 的存在。在我们的实验条件下, 可以看出编码 GS 的基因中, *OsGln1.1* 的表达量在不同铵硝比例下都显著高于 *OsGln1.2* 和 *OsGln2*。

表 3 编码 GS 的基因 *OsGln* 在不同铵硝处理下的表达量

Table 3 Expression level of GS *OsGln* in relation to different ammonium-nitrate treatments ($\text{pmol} \times 10^{-11} \mu\text{g}^{-1}$ total RNA)

基因 Gene	1 mmol L ⁻¹ NH ₄ ⁺	0.5 mmol L ⁻¹ NH ₄ ⁺ + 0.5 mmol L ⁻¹ NO ₃ ⁻	1 mmol L ⁻¹ NO ₃ ⁻
<i>OsGln1.1</i>	2 292 ± 410 c A	4 141 ± 319 b A	6 428 ± 251 a A
<i>OsGln1.2</i>	636.4 ± 71.3 a B	486.3 ± 39.7 b B	486.6 ± 56.1 b B
<i>OsGln2</i>	59.32 ± 23.8 b C	86.08 ± 14.2 a C	93.90 ± 7.36 a C

注: 表中数据为 3 个重复的平均值 ± 标准差 SE, 表中小写不同字母表示同行不同处理差异显著性 ($p < 0.05$); 大写字母表示同列相同处理不同基因的表达量差异 ($p < 0.05$)。Note: Each value in the table was an average of three replicates. The difference in lowercase letters following the data in the same row indicates significant difference between the treatments at 5% level; and the difference in capital letters in the same column indicates significant difference between the genes at 5% level

不同铵硝处理对 *OsGln* 的表达有影响。首先 *OsGln1.1* 和 *OsGln2* 的变化趋势相同, 都是表达量随着培养液中 NO_3^- 的增加而增加, NH_4^+ 的增加而降低。二者的差异在于 *OsGln1.1* 的表达量随 NO_3^- 比例的增加而显著增加; 而 *OsGln2* 的表达量在铵硝比由 100:0 变为 50:50 后, 表达量显著增加, 之后 NO_3^- 比例的增加没有对表达量造成显著的影响。因此我们认为 *OsGln1.1* 和 *OsGln2* 的表达都是受 NO_3^- 的诱导, NH_4^+ 的抑制, 只是这两个基因受诱导或抑制的程度不同。*OsGln1.2* 的表达量在铵硝 100:0 变为 50:50 以后显著降低, 同 *OsGln2* 一样, 以后再增加 NO_3^- 的比例, 其表达量没有明显变化。因此我们认为 NO_3^- 的增加可能对 *OsGln1.2* 的表达具有负调节作用。

以上分析说明编码 GS 的基因 *OsGln1.1* 和 *Os-*

Gln2 的表达显著受到培养体系中 NO_3^- 增加的诱导, 并且这两个基因对不同铵硝比例的反应程度有差异, 而 *OsGln1.2* 受到 NO_3^- 的抑制作用。

2.3 GOGAT 基因在不同铵硝处理中的表达情况

高等植物中至少存在两种 GOGAT, 一种用 NADH 作为还原剂 (NADH-GOGAT), 另一种需要铁氧还蛋白 (Fd-GOGAT)^[16]。前者在非光合组织中占优势, 后者主要存在于光合组织中^[17]。通过对拟南芥^[18] 和大麦^[19] 叶绿体中的 Fd-GOGAT 的突变体研究发现 Fd-GOGAT 的主要功能是再利用由光呼吸作用释放的铵。在根中, Fd-GOGAT 主要存在于质体中^[20] 并且认为参与铵吸收^[21]。*OsGlt* 是水稻中编码 NADH-GOGAT 的基因, *OsGlu* 是编码 Fd-GOGAT 的基因, 因此我们检测了以下 3 个基因的表达量。从定量结果来看, 各个不同处理中, 3 个编码 GOGAT 的基因中 *OsGlu* 的表达量一直是最高的(表 4)。

表 4 编码 GOGAT 基因的 *OsGlt* 和 *OsGlu* 在不同铵硝处理下的表达

Table 4 Expression level of *OsGlt* and *OsGlu* of GOGAT gene in relation to different ammonium-nitrate treatments ($\text{pmol} \times 10^{-11} \mu\text{g}^{-1}$ total RNA)

基因 Gene	1 mmol L ⁻¹ NH ₄ ⁺	0.5 mmol L ⁻¹ NH ₄ ⁺ + 0.5 mmol L ⁻¹ NO ₃ ⁻	1 mmol L ⁻¹ NO ₃ ⁻
<i>OsGlt1</i>	9 139 ± 0 41 a C	10 15 ± 0.53 a B	1 219 ± 0.43 b B
<i>OsGlt2</i>	36.86 ± 0 93 a B	25.63 ± 0 82 b B	1 360 ± 0.51 c B
<i>OsGlu</i>	203.1 ± 12.8 a A	222.1 ± 13.4 a A	68 83 ± 17.7 b A

注: 表中数据为 3 个重复的平均值 ± 标准差 SE, 表中小写不同字母表示同行不同处理差异显著性 ($p < 0.05$); 大写字母表示同列相同处理不同基因的表达量差异 ($p < 0.05$)。Note: Each value in the table was an average of three replicates. The difference in lowercase letters following the data in the same row indicates significant difference between treatments at 5% level; and the difference in capital letters in the same column indicates the significant difference between genes at 5% level

编码 GOGAT 的这 3 个基因的表达受不同铵硝的影响, *OsGlt1* 和 *OsGlu* 的变化规律相同, 都是在铵硝 100: 0 变为 50: 50 后表达量没有显著变化, 当 NO_3^- 再增加到 0: 100 以后, 表达量显著降低。而 *OsGlt2* 的表达受 NO_3^- 的显著抑制, 三个基因的共同点是在铵硝 50: 50 基础上的 NO_3^- 增加阶段其表达都受到 NO_3^- 的显著抑制, 即完全供硝态氮抑制了这些基因的表达。

3 讨论

研究不同铵硝比例对氮素吸收代谢基因表达的影响目前在国内外还没有报道。在研究手段上, 定性或半定量的研究不能检测基因表达量的微小变化, 这可能是限制对低峰度表达的氮吸收代谢基因更深一步研究的一个方面。本研究成功地将荧光定量 PCR 方法应用于基因表达的研究中, 精确检测了氮素吸收代谢基因在不同铵硝比例中的表达变化规律。

从定量结果来看, 吸收基因中以 *OsAMT1.1* 表达量最高, 编码 GS 的基因中以 *OsGln1.1* 表达量最高, 编码 GOGAT 的基因中, *OsGlu* 表达量最高。

总的说来, 吸收基因对不同铵硝比例的反应要比代谢基因更敏感。而且, 在测定的 5 个吸收基因在铵硝 100: 0 基础上增加 NO_3^- 时都表现出显著的抑制现象, 其中 *OsAMT4.1* 在铵硝比例达到 50: 50 以后仍然显著受到 NO_3^- 的抑制, NH_4^+ 的诱导, 而 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT1.3* 一样先受到 NO_3^- 的抑制, 后受到 NO_3^- 的诱导, 并以铵硝 50: 50 处理为转折点, 而 *OsAMT1.1* 和 *OsNRT2* 则在铵硝 50: 50 以后, 表达量不受 NO_3^- 比例增加的显著影响。代谢基因中, 编码 GS 的基因和编码 GOGAT 的基因对不同铵硝比例的反应不同。编码 GS 的基因 *OsGln1.1* 表达受 NO_3^- 诱导, NH_4^+ 抑制。 *OsGln2* 在铵硝比例由 100: 0 变为 50: 50 过程中, 受到 NO_3^- 增加的显著诱导, 同时, *OsGln1.2* 受到 NO_3^- 增加的显著抑制作用; 铵硝达到 50: 50 以后, NO_3^- 比例的增加对 *OsGln1.2* 和 *OsGln2* 的表达没有显著影响。编码 GOGAT 的基因 *OsGlt2* 的表达显著受到 NO_3^- 的抑制, NH_4^+ 诱导, 而 *OsGlt1* 和 *OsGlu* 在不同铵硝比例中的变化趋势一致: 铵硝比例 50: 50 以前没有显著变化, 铵硝比例 50: 50 基础上表达量受到 NO_3^- 的显著抑制。

很多报道表明, 当两种氮源同时供应时, 植物长势及产量都会比单独供应 NH_4^+ 或 NO_3^- 有显著提

高^[22], 包括水稻^[4,5]。本研究结果中, 并不是所有的吸收代谢基因都表现出了受硝诱导的现象, 相反有些基因受 NO_3^- 的抑制, 而且这些基因受铵硝的影响与原培养体系中的铵硝比例有关。这说明, 水稻硝促铵吸收的现象并不一定都表现在吸收代谢基因的表达上, 而且本研究只测定了水稻的 4 个 *OsAMT* 基因, 只有 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT1.3* 在铵硝 50: 50 基础上表现出 NO_3^- 诱导的特性。虽然 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT1.3* 可能在 NO_3^- 促 NH_4^+ 吸收这一过程中起到主要的作用, 但是, 也不排除其他 *OsAMT* 基因起到更主要的作用, 这一点还有待于进一步的研究。在代谢基因上, 只有编码 GS 的基因 *OsGln1.1* 和 *OsGln2* 表现出 NO_3^- 诱导的现象, 关于 NO_3^- 促 NH_4^+ 吸收的分子机理还有待于进一步研究。

在检测的基因中, 除了对 NH_4^+ 和 NO_3^- 的反应特性不同以外, 各个基因受 NH_4^+ 和 NO_3^- 影响还与原培养体系中的铵硝比例有关。所测定的五个吸收基因对不同铵硝比例的反应以铵硝 50: 50 为分界点, 呈不同的变化, 只有 *OsAMT4.1* 变化保持一致。而代谢基因中编码 GS 的 *OsGln2* 只在铵硝由 100: 0 变为 50: 50 时受 NO_3^- 的显著诱导, 编码 GOGAT 的基因 *OsGlt1*、*OsGlt2* 和 *OsGlu* 都是在铵硝 50: 50 基础上受到 NO_3^- 比例增加的显著抑制。氮素吸收代谢基因这种不同的反应方式可能是植物适应土壤中不断变化的铵硝比例的机制之一。

本实验中仅检测了根中的吸收代谢基因表达量, 并没有分析地上部的基因表达量变化。对于吸收基因来说, 可能主要在根中起作用; 而代谢基因在地上部的表达可能也对根中的氮素吸收代谢有一定的影响, 可能根中有些基因的表达是地上部基因表达反馈的结果, 也可能是对不同铵硝比例的直接反应, 这一点还有待于研究。

4 结论

应用荧光定量 PCR 方法, 可以精确检测水稻氮素吸收代谢基因在不同铵硝处理间的表达量变化。从各基因的表达量上来看, 吸收基因中以 *OsAMT1.1* 表达量最高, 编码 GS 的基因中以 *OsGln1.1* 表达量最高, 编码 GOGAT 的基因中, *OsGlu* 表达量最高。

总体来说, 不同铵硝处理对氮素吸收代谢基因的表达有显著影响, 吸收基因对不同铵硝比例的反应要比代谢基因更敏感。

氮吸收基因中 *OsAMT4.1* 显著受到 NO_3^- 的抑制, NH_4^+ 的诱导; 而 *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2*, *OsAMT1.3* 和 *OsNRT2* 在铵硝摩尔比例由 100: 0 变为 50: 50 过程中, 受到 NO_3^- 的显著抑制, 在铵硝摩尔比例由 50: 50 变为 0: 100 过程中 *OsAMT1.2* 和 *OsAMT1.3* 受到 NO_3^- 的显著诱导, *OsAMT1.1* 和 *OsNRT2* 变化不显著。编码 GS 的基因 *OsGln1.1* 表达受 NO_3^- 诱导, NH_4^+ 抑制; *OsGln2* 在铵硝比例由 100: 0 变为 50: 50 过程中, 受到 NO_3^- 增加的显著诱导, 同时, *OsGln1.2* 则受到 NO_3^- 增加的显著抑制作用, 铵硝达到 50: 50 以后, NO_3^- 比例的增加对 *OsGln1.2* 和 *OsGln2* 的表达没有显著影响。编码 GOGAT 的基因 *OsGlt2* 的表达受 NO_3^- 的显著抑制, NH_4^+ 的显著诱导, *OsGlt1* 和 *OsGlu* 在不同铵硝比例中的变化趋势一致: 铵硝比例由 100: 0 变为 50: 50 过程中没有显著变化, 铵硝比例 50: 50 基础上表达量受到 NO_3^- 比例增加的显著抑制。

参考文献

- [1] 钱晓晴, 沈其荣, 徐国华. 配合施用 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 对旱作水稻生长与水分利用效率的影响. 土壤学报, 2003, 40(6): 895~ 900. Qian X Q, Shen Q R, Xu G H. Water utilization by rice growing in aerobic soil supplied with different ration of NH_4^+ and NO_3^- (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2003, 40(6): 895~ 900
- [2] 张亚丽, 董园园, 沈其荣, 等. 不同水稻品种对铵态氮和硝态氮吸收特性的研究. 土壤学报, 2004, 41(6): 918~ 923. Zhang Y L, Dong Y Y, Shen Q R, et al. Characteristics of NH_4^+ and NO_3^- uptake by rices of different genotypes (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(6): 918~ 923
- [3] 段英华, 张亚丽, 沈其荣. 水稻根际的硝化作用与水稻的硝态氮营养. 土壤学报, 2004, 41(5): 803~ 809. Duan Y H, Zhang Y L, Shen Q R. Nitrification in rice rhizosphere and the nitrate nutrition of rice (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2004, 41(5): 803~ 809
- [4] Ta T C, Ohira K. Effects of various environmental and medium conditions on the response of Indica and Japonica rice plants to ammonium and nitrate nitrogen. Soil Sci. Plant Nutr., 1981, 27: 347~ 355
- [5] Ta T C, Tsutsumi M, Kunihara K. Comparative study on the response of Indica and Japonica rice plants to ammonium and nitrate nitrogen. Soil Sci. Plant Nutr., 1981, 27: 83~ 92
- [6] 李振高, 俞慎, 吴胜春, 等. 不同氮肥对水稻根圈微生物生物量及硝化一反硝化细菌的影响. 土壤, 2003, 35(6): 490~ 494. Li Z G, Yu S, Wu S C, et al. Effect of different nitrogen fertilizers on the microbial biomass and the population of nitrifying-denitrifying bacteria in the rice rhizosphere (In Chinese). Soils, 2003, 35(6): 490~ 494
- [7] 金雪霞, 范晓晖, 蔡贵信, 等. 菜地土壤氮素矿化和硝化作用的特征. 土壤, 2004, 36(4): 382~ 386. Jin X X, Fan X H, Cai G X, et al. Characteristics of nitrogen mineralization and nitrification in vegetable garden soils (In Chinese). Soils, 2004, 36(4): 382~ 386
- [8] Wang Z H, Li S X. Effects of N forms and rates on vegetable growth and nitrate accumulation. Pedosphere, 2003, 13(4): 309~ 316
- [9] Dong C X, Shen Q R, Wang G. Tomato growth and organic acid changes in response to partial replacement of $\text{NO}_3^-\text{-N}$ by $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Pedosphere, 2004, 14(2): 159~ 164
- [10] Herbert J, Kronzucker M, Siddiqi Y, et al. Nitrate ammonium synergism in rice. I. A subcellular flux analysis. Plant Physiology, 1999, 119: 1 041~ 1 045
- [11] 薛应龙, 夏镇澳主编. 植物生理实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 60~ 63. Xue Y L, Xia Z A. eds. Laboratory Manual for Plant Physiology Study (In Chinese). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1985. 60~ 63
- [12] Suenaga A, Moriya K, Sonoda Y, et al. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. Plant Cell Physiol., 2003, 44(2): 206~ 211
- [13] Sonoda Y, Ikeda A, Saki S, et al. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OSAMT1; 1-1; 3*) in rice. Plant Cell Physiology, 2003, 44(7): 726~ 734
- [14] Kumar A, Silim S N, Okamoto M, et al. Differential expression of three members of the AMT1 gene family encoding putative high-affinity NH_4^+ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies Indica. Plant, Cell and Environment, 2003, 26: 907~ 914
- [15] Ishiyama K, Inoue E, Tabuchi M, et al. Biochemical background and compartmentalized function of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. Plant Cell Physiol., 2004, 45: 1 640~ 1 647
- [16] Lea P J, Robinson S A, Stewart G R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: Milin B J, Lea P J. eds. The Biochemistry of Plants, Vol 16: Intermediary Nitrogen Metabolism. San Diego, CA: Academic Press, 1990. 121~ 157
- [17] Matoh T, Takahashi E. Changes in the activities of ferredoxin and NADH glutamate synthetase during seedling development of peas. Planta, 1982, 154: 289~ 294
- [18] Somerville C R, Ogren W L. Inhibition of photosynthesis in Arabidopsis mutants lacking in leaf glutamate synthetase activity. Nature, 1980, 286: 257~ 259
- [19] Kendall A C, Wallsgrove R M, Hall N P, et al. Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare L.*) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthetase. Planta, 1986, 168: 316~ 323
- [20] Suzuki A, Gadal P, Oaks A. Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. Planta, 1981, 151: 457~ 461
- [21] Redinbaugh M G, Campbell W H. Glutamine synthetase and ferredoxin-dependent glutamate synthetase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. Evidence for an organ-specific response. Plant Physiol., 1993, 101: 1 249~ 1 255
- [22] Kronzucker H J, Siddiqi M Y, Glass A D M. Kinetics of NH_4^+ influx in spruce. Plant Physiol., 1996, 110: 73~ 77

INFLUENCE OF AMMONIUM/NITRATE RATIO IN TREATMENT ON EXPRESSION OF NITROGEN ABSORBING AND METABOLIZING GENES OF RICE

Zhao Shouping^{1,2} Zhao Xueqiang^{1,2} Shi Weiming^{1†}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

(2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract In order to clarify nitrogen uptake and metabolism of rice roots on a molecular basis, studies by means of quantitative real-time PCR were carried out on expression of nitrogen absorbing and metabolizing genes in relation to different ammonium/nitrate ratio in treatment. The results show that (1) in terms of expression level, *OsAMT1.1* among N absorbing genes, *OsGln1.1* among GS genes and *OsGlu* among COGAT genes was the highest; (2) Significant up-regulation by ammonium and down-regulation by nitrate were found in the expression of *OsAMT4.1*, in any treatment whereas significant nitrate-depressed expression for *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2*, *OsAMT1.3* and *OsNRT2* was observed when the ratio of ammonium to nitrate varied from 100:0 to 50:50, and significant nitrate-induced expression for *OsAMT1.2* and *OsAMT1.3* when the ratio of ammonium to nitrate varied from 50:50 to 0:100; (3) Among the genes coded as GS, *OsGln1.1* were significantly up-regulated by nitrate and down-regulated by ammonium, significant nitrate-induced expression for *OsGln2* and nitrate-depressed expression for *OsGln1.2* when the ratio of ammonium to nitrate varied from 100:0 to 50:50; (4) Among the genes coded as GOGAT, *OsGlt1* and *OsGlu* showed no significant variation in the process of the ratio of ammonium to nitrate varying from 100:0 to 50:50, but were significantly down-regulated with the ratio of ammonium to nitrate further varying from 50:50 to 0:100; significant up-regulation by ammonium and down-regulation by nitrate were found in the expression of *OsGlt2*; (5) In general, the regulation of expression of these genes by ammonium and nitrate depends on the ratio of ammonium to nitrate in the primary solution where the rice grew.

Key words Rice; Ammonium/nitrate ration; Gene in relation to N uptake and metabolism; Fluorescence real-time PCR