不同氮效率水稻生育后期氮代谢酶活性的变化特征*

叶利庭　吕华军　宋文静　图尔迪　沈其荣　张亚丽†
（南京农业大学资源与环境科学学院，南京　210095）

摘　要　以不同氮效率水稻基因型为供试材料，研究了两个供氮水平下水稻生育后期功能叶和茎秆的氮、可溶性蛋白浓度和氮转运量以及氮代谢关键酶的变化。结果表明：与对照相比，施氮处理能显著增加不同氮效率水稻功能叶和茎秆的氮、可溶性蛋白的浓度和氮转运量。在不同的施氮水平下，水稻从齐穗至成熟顶三叶的氮浓度降低了 60% ~67%；而茎秆氮在生育后期对籽粒氮的贡献取决于环境供氮水平，与对照相比施氮处理水稻从茎秆转运出的氮大幅提高，在不同的供氮水平下南光的叶片和茎秆氮转运量显著高于 Elio。与对照相比，施氮处理增加齐穗期时硝酸还原酶（NR）、谷氨酰胺合成酶（GS）、谷氨酸合成酶（GOGAT）和谷氨酸脱氢酶（GDH）的活性。随生育期的推进，四种氮代谢酶活性随之降低。南光的 NR 和 GS 酶活性显著高于 Elio，但 NR 活性受水稻生育期和环境供氮水平的影响较大；南光的 GOGAT 和 GDH 的活性显著低于 Elio。相关分析表明，NR 和 GS 活性与功能叶和茎秆的氮转运量呈显著正相关。这就意味着水稻生育后期功能叶和茎秆的 NR 和 GS 活性高，尤其是 GS 活性高是筛选水稻氮高效的重要指标。

关键词　水稻；氮效率；氮浓度；氮代谢酶活性
中图分类号　S511　　**文献标识码**　A

水稻是我国种植面积大、产量高和氮肥用量多的粮食作物之一。虽然我国稻谷单产与日本相当，但单位施氮量的产谷效率不足日本的 50%，说明水稻节氮潜力大[1]。不同基因型水稻吸收利用氮素的能力差异明显。Moll 等[2]将氮素利用效率定义为籽粒产量与土壤供氮水平之比，且将氮素利用效率分解为吸收效率和生理利用效率。在相同的供氮水平下，水稻的产量均高于其同一生育期的水稻平均产量时该水稻品种定义为氮高效品种[3]。选育氮高效水稻品种是提高水稻产量和减少环境污染的重要途径之一。水稻氮高效基因型的生理机制在 20 世纪 80 年代后期逐渐引起人们重视[3-4]。

已有的研究表明[5]，水稻在齐穗后籽粒所需要的氮素主要来自于营养器官的氮素向籽粒的转运，部分来于根系从土壤吸收的氮素。氮高效水稻生育后期从根系吸收的氮素和营养器官向籽粒转运的氮素均高于氮低效水稻；虽然不同氮效率水稻的氮浓度在齐穗时差异不明显，但成熟时氮高效水稻的氮浓度低于氮低效水稻[6-7]。禾本科作物生育后期叶片氮的再分配与氮代谢关键酶的活性关系密切[8-11]。硝酸还原酶（NR）、谷氨酰胺合成酶（GS）、谷氨酸合成酶（GOGAT）和谷氨酸脱氢酶（GDH）是高等植物氮吸收、同化和循环的主要酶系。NR 催化 NO_3^- 转化生成 NO_2^- 的过程，是作物吸收利用 NO_3^- 过程中的第一个酶，可以直接调节 NO_3^- 的还原，进而调节氮代谢。谷氨酰胺合成酶（GS）与谷氨酸合成酶（GOGAT）构成的循环是氨同化的主要途径。谷氨酸脱氢酶（GDH）催化一对可逆反应：α-酮戊二酸加氨生成谷氨酸和谷氨酸脱氨生成 α-酮戊二酸。宁书菊等[12]对水稻生育后期根系氮代谢生理活性进行了研究，发现根系 GS 和 GDH 活性的变化与可溶性蛋白、氨基酸的含量密切相关。Kichey 等[13]以小麦为供试材料的研究结果表明，只有 GS 活性与齐穗后的植株总氮、可溶性蛋白、氮转运量等呈显著正相关。GS 的活性可作为小麦和玉米氮高效的选择指标已被公认[13-14]。本研究以

* 国家自然科学基金项目（30771290 和 31071846）、国家大学生创新性实验计划（091030725）、中国博士后科学基金（20100471348）资助
† 通讯作者，Tel：025 - 84396228，E-mail：ylzhang@ njau. edu. cn
作者简介：叶利庭（1983—），男，硕士，主要从事水稻氮肥高效利用研究。E-mail：yeliting_1999@ 163. com
收稿日期：2009 - 06 - 06；收到修改稿日期：2009 - 12 - 14

氮高效南光和氮低效 Elio 为供试材料,通过测定水稻齐穗后功能叶片和茎的氮和可溶性蛋白浓度以及与此相关的酶类,来揭示水稻生育后期衰老过程中氮代谢变化、氮素的再分配和调节,对揭示水稻在齐穗后的生理机制和氮高效生理指标有重要意义。

1　材料与方法

1.1　试验材料

本试验采用氮高效水稻南光和氮低效水稻 Elio。其基本农学性状见表 1。

供试土壤为水稻土,采自南京农业大学江浦实验农场,土壤的农化性质:pH 为 7.3,有 - - + 机质含量 16.7 mg g^{-1},全氮为 0.90 mg g^{-1},速效磷、钾含量分别为 18.9 mg kg^{-1}和 80.9 mg kg^{-1}。

表 1　供试水稻的农学性状

Table 1　Agronomic characteristics of the rice cultivars used in the field experiment

品种 Cultivar	开花期 Anthesis (d)	生育期 Growth duration (d)	株高 Plant height (cm)
Elio	100	157	115
南光 Nanguang	113	163	119

1.2　试验方案

种子经 30% H_2O_2 消毒 30 min,催芽,然后播于盛土的育苗盘进行旱育秧。水稻三叶一心时移栽至盆钵中,每盆 3 穴(2 株 穴$^{-1}$),淹水培养,每钵装土 7 kg。试验设 2 个主处理,不施氮(CK)和施氮处理,N 0.1 g kg^{-1} $(NH_4)_2SO_4$,氮素分为 3 次施用,基肥(50%)和齐穗期前追施两次;各重复 4 次,一共 16 盆。所有处理土壤施加基肥 P_2O_5 0.1 g kg^{-1} ($Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$) 和 K_2O 0.15 g kg^{-1} (K_2SO_4),精心管理。分别于齐穗期、齐穗后 2 周、成熟期 3 个时期采集叶片和茎秆,从顶端往下开始分别编号叶片为 L1、L2、L3 和茎为 S1、S2、S3,其中 L1 相当于旗叶,S1 相当于旗叶上、下部茎秆,其他以此类推。

1.3　测定项目

1.3.1　氮浓度和氮转运量　　在水稻的齐穗期、齐穗后 2 周、成熟期采集的植株样品烘干至恒重,干样经粉碎后经 H_2SO_4-H_2O_2 消化后,用凯氏法蒸馏测定全氮含量。水稻各功能叶和茎秆的氮转运量为成熟期与齐穗期的氮积累量之差。

1.3.2　可溶性蛋白浓度　　可溶性蛋白的测定采用考马斯亮蓝法:样品吸取 1 ml 提取液,加 5 ml 考马斯亮蓝溶液摇匀放置 2 min,595 nm 比色。

1.3.3　硝酸还原酶(NR)活性　　剪取 0.5 g 左右材料,加 2.5 ml 提取缓冲液和少量石英砂于研钵中,冰浴研磨至匀浆后,将其转移至 10 ml 离心管中,20 000 r min^{-1}离心 20 min,上清液即为酶粗液。另取一个 10 ml 试管加入 1 ml KNO_3、0.6 ml NADH、0.4 ml 叶片酶粗提液,混匀后 25℃反应 30 min,立即加入 0.5 ml 磺胺和 0.5 ml α-萘胺,20 000 r min^{-1}离心 15 min,分光光度计测定其在 540 nm 处的吸光值。以 0.1 mol L^{-1}磷酸缓冲液(pH 7.4)代替 NADH 为对照。

1.3.4　谷氨酰胺合成酶(GS)活性　　剪取 1 g 左右材料,加入石英砂和磷酸缓冲液(pH 7.2,内含 0.5 mmol L^{-1} EDTA,50 mmol L^{-1} K_2SO_4),冰浴研磨成匀浆,20 000 r min^{-1}离心 20 min,上清液即为酶粗提液。吸取 0.6 ml 咪唑-HCl 溶液、0.4 ml 谷氨酸钠、0.4 ml ATP-Na、0.2 ml $MgSO_4$ 和 1.2 ml 酶粗提液,混合后在 25 ℃保温 5 min,加入 0.2 ml 羟胺,25 ℃反应 15 min 后立即加 0.8 ml 三氯乙酸三氯化铁盐酸混合液中止反应。20 000 r min^{-1}离心 10 min 后用分光光度计测定 540 nm 处的吸光值。将每 min 催化形成 1 mmol L^{-1}γ-谷氨酰基异羟肟酸与铁的化合物所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.3.5　谷氨酸合成酶(GOGAT)活性　　在 GS 测定的同时,测定 GOGAT 活性。反应混合液包括 0.4 ml 20 mmol L^{-1}的 L-谷氨酰胺,0.5 ml 20 mmol L^{-1}的 α-酮戊二酸,0.1 ml 10 mmol L^{-1}的 KCl,0.2 ml 3 mmol L^{-1}的 NADH 和 0.3 ml 酶液,总体积 3.0 ml,不足部分用 25 mmol L^{-1}的 Tris-HCl 缓冲液(pH7.6)补足(1.5 ml)。反应启动后,用 752 型紫外可见分光光度计于 340 nm 处每 30 s 测定一个消光值,连续测定 11 次取光密度稳定减小的一段来衡量酶活性。一个 GOGAT 活性单位定义为每 min 反应混合液于 30℃减少 1 μmol NADH 数表示[15]。活性均以每 h 每 g 鲜重材料多少个活性单位表示。

1.3.6　谷氨酸脱氢酶(GDH)活性　　在 GS 测定的同时,测定 GDH 活性。测定前先在准备好的试管中加入 2.6 ml 贮备液(115.4 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH8.0), 23.1 mmol L^{-1} α-酮戊二酸,231 mmol L^{-1} NH_4C1), 0.1 ml 30 mmol L^{-1} $CaC1_2$, 0.1 ml 6

mmol L^{-1} NADH, 0.1 ml 蒸馏水。加入 0.1 ml 酶液启动反应,并于 340 nm 处测定吸光值,每 30 s 测定一次,测定 8 次。

1.4 统计分析

相关数据的统计分析采用 EXCEL 2003 和 SPSS12.0 软件完成,差异显著性检验采用 ANOVA 法和 LSD 多重比较。

2 结果与分析

2.1 叶片和茎秆氮浓度

与对照相比,施氮处理的叶和茎秆氮浓度均显著增加(表 2)。在不同的生育期和施氮水平下,其氮浓度顺序为 L1 > L2 > L3 > S1 > S2 > S3。与齐穗期相比,随着生育期的推进茎和叶片的氮浓度降低,其降低幅度与施肥水平有关,例如对照处理水稻茎秆从齐穗至成熟的氮浓度有下降趋势,但差异不明显;而叶片氮浓度齐穗后 2 周已有明显下降,成熟时氮浓度与齐穗时相比 Elio 下降了 60%,而氮高效水稻南光下降了近 70%。在施氮条件下,茎秆氮浓度从齐穗至齐穗后 2 周下降明显,Elio 成熟时茎秆的氮浓度与齐穗时比降幅有 50% 左右,而南光的降幅竟高达 60% 左右。

表 2 水稻生育后期叶片和茎秆氮浓度

Table 2 Nitrogen concentrations in leaves and stems at late growth stages of rice(mg g^{-1})

N 水平 N rate	品种 Cultivar	时期 Stage	L1	L2	L3	S1	S2	S3
CK	Eilo	齐穗 Heading	19.0b	18.2b	16.4b	6.4gf	5.4fg	4.4fg
		齐穗后 2 周 2 weeks after heading	17.3c	16.6c	14.5c	6.0g	5.0g	4.0g
		成熟 Maturity	7.7e	7.5e	6.9f	5.5g	4.5g	3.5g
	南光 Nan-guang	齐穗 Heading	19.1b	18.3b	16.7b	7.4e	6.4e	5.4e
		齐穗后 2 周 2 weeks after heading	16.8c	16.4c	14.7c	6.4gf	5.4fg	4.4f
		成熟 maturity	6.5f	6.1f	6.0g	5.8g	4.8g	3.8g
N	Eilo	齐穗 Heading	23.0a	22.4a	21.4a	10.4c	9.4c	8.4c
		齐穗后 2 周 2 weeks after heading	21.7ab	20.8a	19.8a	8.3d	7.3d	6.3d
		成熟 Maturity	9.4d	9.1d	8.9d	6.0f	5.0g	4.0g
	南光 Nan-guang	齐穗 Heading	23.2a	22.5a	21.1a	14.6a	13.6a	12.6a
		齐穗后 2 周 2 weeks after heading	21.2ab	20.5a	19.1a	12.6b	11.6b	10.6b
		成熟 Maturity	8.1e	7.9e	8.0e	6.9ef	5.9ef	4.9ef

注:不同字母表明纵列处理差异显著 Note: Different letters indicate significant difference at $p < 0.05$ in the same column

2.2 叶片和茎秆可溶性蛋白浓度

从表 3 可看出,齐穗后随着生育期的推进各功能叶和茎秆的可溶性蛋白浓度随之下降。与对照相比,施氮处理增加了水稻营养器官的可溶性蛋白浓度。齐穗期氮高效水稻南光和氮低效水稻 Eilo 在各功能叶之间可溶性蛋白含量差异不显著,但是到了齐穗 2 周后 Eilo 的可溶性蛋白含量高于南光,且差异极显著。然而在茎秆中氮高效水稻南光可溶性蛋白含量高于氮低效水稻 Eilo,差异显著。

表 3　施氮处理对生育后期叶片和茎秆可溶性蛋白浓度的影响

Table 3　Soluble protein concentrations in leaves and stems at late growth stages of rice as affected by N application rate(mg g^{-1})

N 水平 N rate	品种 Cultivar	时期 Stage	L1	L2	L3	S1	S2	S3
CK	Eilo	齐穗 Heading	19.97b	19.29b	19.78a	6.17d	4.64e	2.67c
		齐穗后 2 周 2 weeks after heading	19.33b	15.92d	13.02c	4.36e	3.28f	1.93d
	南光 Nan-guang	齐穗 Heading	19.81b	20.69b	19.83a	9.33b	6.89c	5.88a
		齐穗后 2 周 2 weeks after heading	11.32d	12.03e	11.52d	7.75c	5.79d	3.49b
N	Eilo	齐穗 Heading	23.09a	24.42a	19.22a	6.74d	4.88e	3.62b
		齐穗后 2 周 2 weeks after heading	18.78c	17.83c	14.17b	4.47e	3.87f	2.07d
	南光 Nan-guang	齐穗 Heading	22.75a	24.71a	19.05a	10.26a	8.88a	6.32a
		齐穗后 2 周 2 weeks after heading	10.85d	14.85d	11.93d	7.81c	7.82b	6.14a

注:不同字母表明纵列处理差异显著 Note: Different letters indicate significant difference at $p < 0.05$ in the same column

2.3　叶片和茎秆的氮转运量

从表 4 可看出,与对照相比,施氮处理显著增加了叶片和茎秆的氮素转运量。其中叶片氮转运量的增幅约为 32%,而茎秆氮转运量的增幅约为 400%。不同氮效率水稻的叶片和茎秆氮转运量差异明显。在不同的施氮条件下南光不管是叶片还是茎秆的氮转运量均较 Elio 的高,差异呈显著水平。

表 4　施氮处理对叶片和茎秆氮转移量的影响

Table 4　Nitrogen translocation in leaves and stems as affected by N application rate(mg)

N 水平 N rate	品种 Cultivar	L1	L2	L3	S1	S2	S3
CK	Eilo	1.66d	1.93d	1.63c	0.27d	0.26d	0.27d
	南光 Nanguang	1.85c	2.20c	1.84b	0.44c	0.43c	0.45c
N	Eilo	2.13b	2.66b	2.40a	1.38b	1.32b	1.37b
	南光 Nanguang	2.37a	2.92a	2.52a	2.27a	2.15a	2.25a

注:不同字母表明纵列处理差异显著 Note: Different letters indicate significant difference at $p < 0.05$ in the same column

2.4　叶片和茎秆 NR 和 GS 的活性

由于在水稻的生育后期采用湿润管理,硝态氮是水稻在生育后期吸收氮素的主要形式之一,进入植物体须还原为铵态氮后才参与氨基酸与蛋白质的合成。NR 是催化硝态氮转化为铵态氮过程中的限速酶。图 1 为齐穗期和齐穗后 2 周施氮处理各功能叶和茎秆的硝酸还原酶活性。随着生育期的推进,齐穗后 2 周 NR 活性远小于齐穗期 NR 活性,降幅约在 55%,差异显著。在齐穗期时,与对照相比,施氮条件下水稻功能叶的 NR 活性均有提高,但不同氮水平对茎秆中 NR 活性的影响较小。水稻的叶片和茎秆的 NR 大小顺序为 L1 > L2 > L3 > S1 > S2 > S3。氮高效水稻南光倒 1 和倒 2 叶以及茎秆的 NR 活性在不施氮条件下均高于氮低效水稻 Elio,在施氮处理下不同氮效率水稻的茎叶的 NR 差异不明显。

GS 利用谷氨酸做底物,催化依赖 ATP 的铵同化反应,生成谷氨酰胺,是处于氮代谢中心的多功能酶[16]。从图 2 可看出施氮对齐穗期和齐穗后 2 周叶片和茎秆 GS 活性的影响。随着生育期的推进,与齐穗期相比,齐穗后 2 周谷 GS 活性有所下降,降幅在 4% ~25%。在齐穗期时,与对照相比,施氮条件下水稻各功能叶中 GS 的活性有所提高,而齐穗后 2 周施氮处理对水稻各功能叶中 GS 的活性影响不明显;与对照相比,不同的生育期施氮

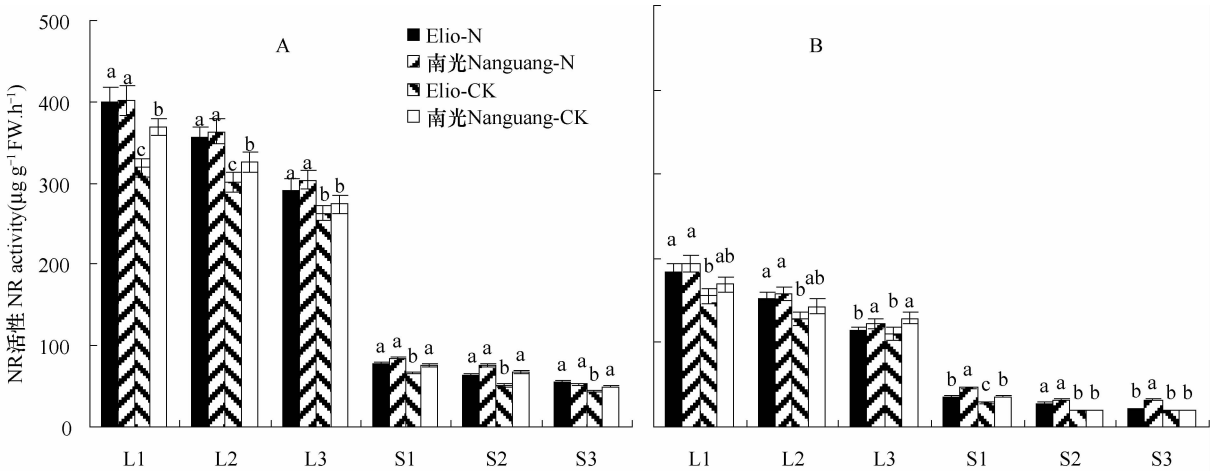

图 1 齐穗期(A)和齐穗后 2 周(B)叶片和茎秆硝酸还原酶活性(不同字母指相同叶片和茎秆不同处理在 5% 显著水平下的差异)

Fig. 1 Nitrate reductase(NR) activities in leaves and stems at the heading stage and 2 weeks after the stage (Different letters indicate the significant difference at $p < 0.05$ in the same leaf and stem)

处理对茎秆 GS 活性的影响不大。在齐穗期各功能叶中 GS 活性氮高效水稻南光与氮低效水稻 Eilo 差异不显著,但是到了齐穗后 2 周氮高效水稻南光高于氮低效水稻 Eilo,差异显著。然而无论在齐穗期还是齐穗后 2 周氮高效水稻南光茎秆中 GS 活性远高于氮低效水稻 Eilo,差异极显著。

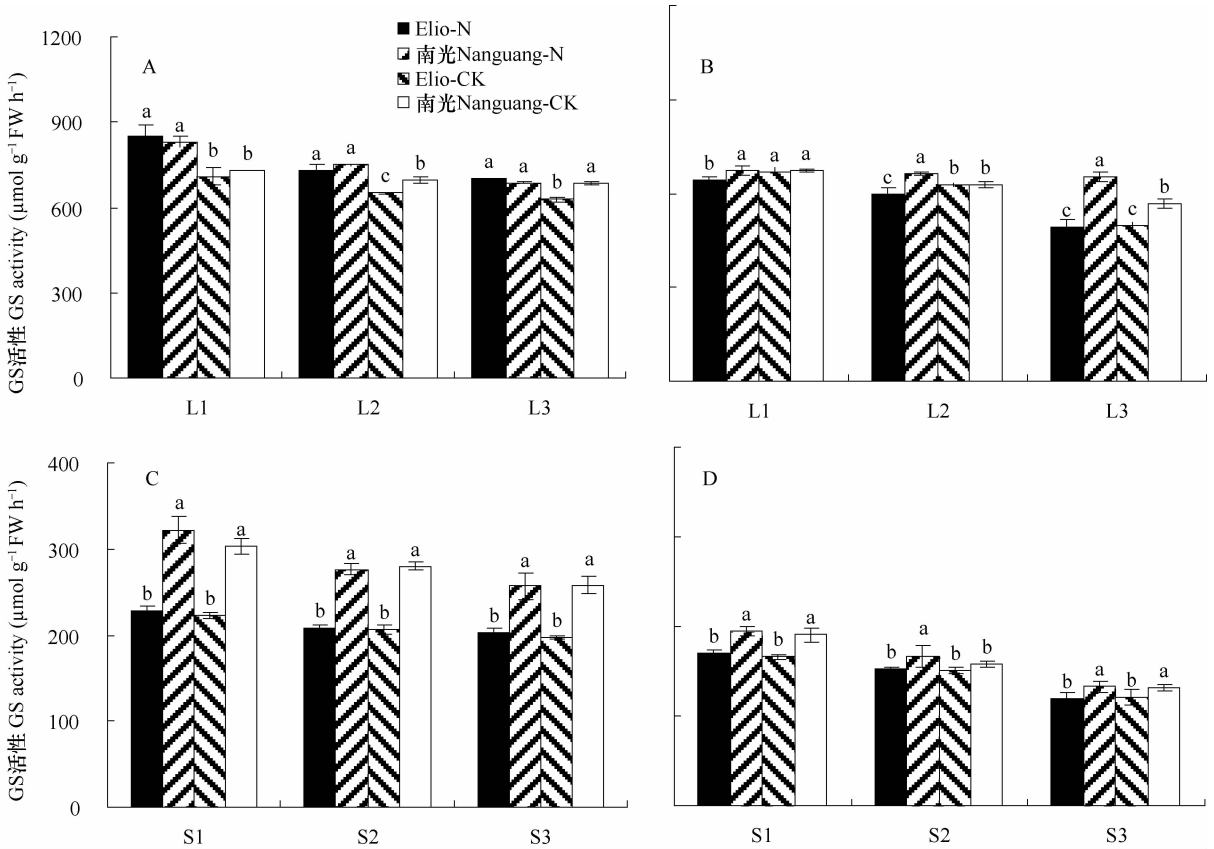

图 2 叶片齐穗期(A)和齐穗后 2 周(B)和茎秆齐穗期(C)和齐穗后 2 周(D)谷氨酰胺合成酶活性(不同字母指相同植物部位不同处理在 5% 显著水平下的差异)

Fig. 2 Glutamine synthetase(GS) activity in leaves at the heading stage (A) and 2 weeks after the stage (B), stems at the heading stage (C) and 2 weeks after the stage (D) (Different letters indicate significant difference at $p < 0.05$ in the same leaf or stem)

2.5　叶片和茎秆 GOGAT 和 GDH 的活性

从图 3 可看出齐穗期和齐穗后 2 周施氮处理对各功能叶和茎秆 GOGAT 活性的影响。随着生育期的推进,与齐穗期相比,齐穗后 2 周 GOGAT 活性有所上升,增幅在 1% ~25%。不同氮效率水稻的 GOGAT 活性差异明显,氮低效水稻 Elio 显著高于氮高效水稻南光。施肥显著提高氮低效水稻 Elio 功能叶的 GOGAT 活性,氮对南光功能叶的 GOGAT 活性没有影响。不同的施氮水平对水稻茎秆 GOGAT 活性的影响不大。

当作物遇到环境胁迫和在自然衰老过程中,尤其是在作物发育后期 GDH 对于催化 NH_4^+ 合成谷氨酸具有重要作用[16]。从图 4 可看出,施肥显著提高叶片中 GDH 活性,而对茎秆中 GDH 活性也有一定影响。在不同的氮水平下氮高效水稻南光各功能叶中 GDH 活性低于氮低效水稻 Elio-GDH 活性,且差异显著。随着生育期的推进齐穗后 2 周 GDH 活性较齐穗期有所下降,但差异并不显著。

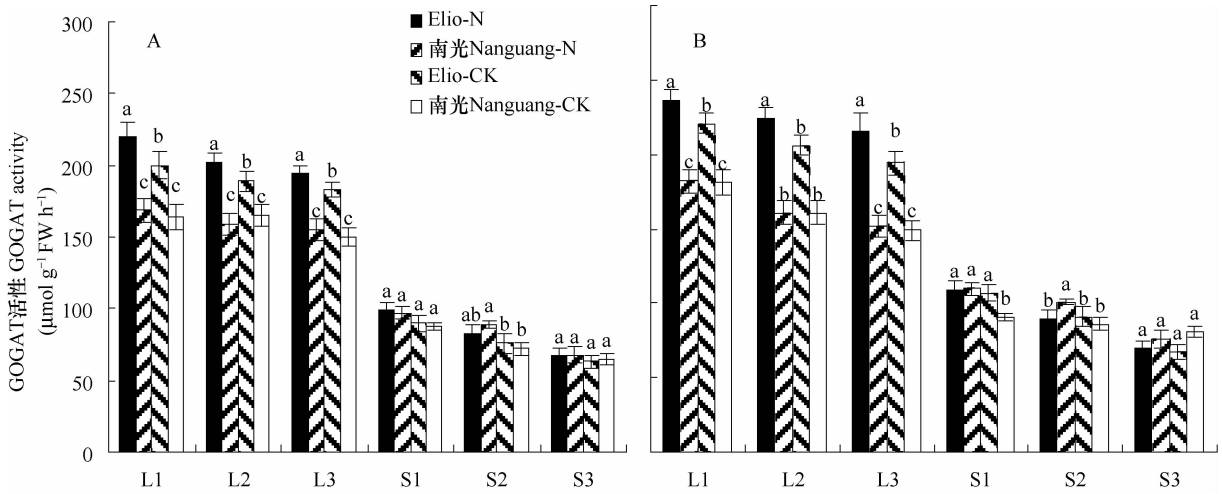

图 3　齐穗期(A)和齐穗后两周(B)叶片和茎秆谷氨酸合成酶活性的影响(不同字母指相同叶片和茎秆不同处理在 5% 显著水平下的差异)

Fig. 3　GOGAT activities in leaves and stems at the heading stage and 2 weeks after the stage (Different letters indicate the significant difference at $p < 0.05$ in the same leaves and stem)

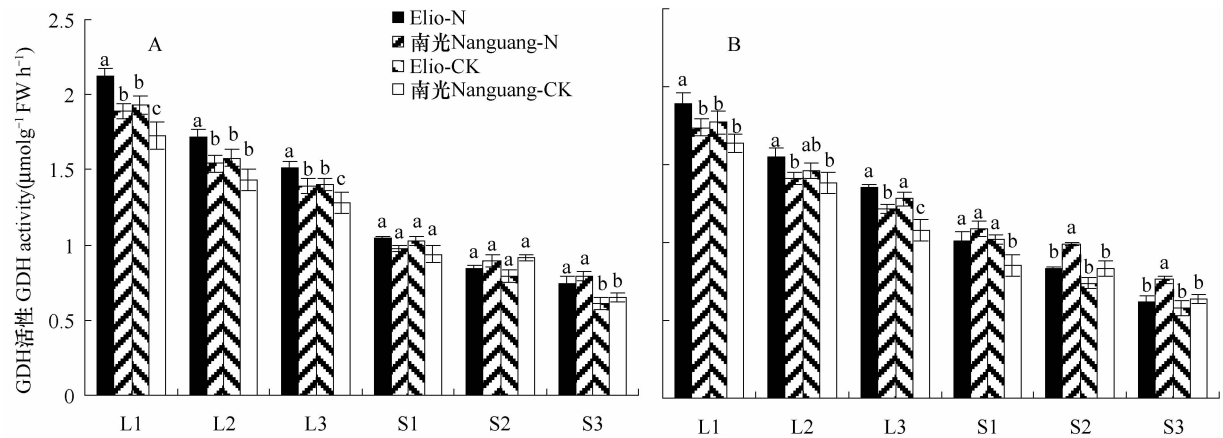

图 4　齐穗期(A)和齐穗后 2 周(B)叶片和茎秆谷氨酸脱氢酶活性的影响(不同字母指相同叶片和茎秆不同处理下在 5% 显著水平下的差异)

Fig. 4　GDH activities in leaves and stems at the heading stage and 2 weeks after the stage (different letters indicate the significant difference at $p < 0.05$ in the same leaves and stem)

2.6 氮代谢关键酶与氮转运量的相关性分析

由表 5 可知,在不同的生育期水稻茎叶的氮代谢酶活性与氮转运量的相关密切程度差异明显。无论是齐穗期还是齐穗后 2 周氮代谢酶 NR、GS 活性与氮转运量均呈显著正相关。而 GOGAT 和 GDH 酶活性无论在齐穗期还是在齐穗后 2 周均与氮转运量之间无显著相关关系。

表 5 氮代谢关键酶与氮转运量的相关性

Table 5 Coefficients of correlation between the activities of the key N metabolizing enzymes and N translocation

时期 Stage	NR 活性 NR activity	GS 活性 GS activity	GOGAT 活性 GOGAT activity	GDH 活性 GDH activity
齐穗 Heading	0.422*	0.432*	0.362	0.339
齐穗后 2 周 2 weeks after heading	0.424*	0.405*	0.317	0.371

注:$n=24$, * 代表显著水平为 $p<0.05$ Note: $n=24$; * is significant at $p<0.05$

3 讨 论

随着施氮量的增加,水稻在生育后期各功能叶片中的氮浓度和可溶性蛋白浓度明显提高,各功能叶和茎秆的氮转运量显著增加,这与前人的研究基本一致[17-18],且不同氮效率水稻差异明显。在本试验条件下,在两个氮水平下水稻从齐穗至成熟顶三叶的浓度降低了 60% ~67%,表明叶片氮素是供应籽粒所需氮素的主力军。而茎秆中的氮对籽粒氮的贡献受环境供氮水平的影响大,在不施氮时,南光茎的氮浓度从齐穗至成熟降低约 25%,Elio 茎的氮浓度降低约 17%;在施氮条件下,南光茎的氮浓度降低约 60%,Elio 茎的氮浓度降低约 47%,氮高效水稻茎秆的氮转运量显著高于氮低效水稻(表 4)。我们的试验结果还表明,南光茎秆中氮浓度和可溶性蛋白浓度高于 Elio,这可能与南光在齐穗后还能从土壤中吸取一定量的氮素有关[5];齐穗期时两个水稻品种叶片的可溶性蛋白浓度没有差异,齐穗后 2 周 Elio 叶片可溶性蛋白浓度要高于南光。陈晓飞[19]有过相似的报道,早衰的水稻品种功能叶齐穗后 2 周的可溶性蛋白浓度较其他的水稻品种要高,这可能是叶片的蛋白质降解然后向籽粒转运。Zhang 等[5]测定了不同氮效率水稻旗叶的净光合速率发现,南光旗叶的净光合速率要显著高于 Elio。这从侧面证明了 Elio 的功能叶衰老得更快。

水稻齐穗后以湿润管理为主,NO_3^- 和 NH_4^+ 是其生育后期主要的氮素营养。硝酸还原酶控制着将 NO_3^- 转化为 NH_4^+ 的过程[18],GS/GOGAT 构成的循环是植物体内 NH_4^+ 同化的主要途径,GS 对 NH_4^+ 有高的亲和力可避免氨积累造成对植株的伤害[20],而 GDH 在铵同化中起着补充 GS/GOGAT 循环的作用,当作物遇到环境胁迫和作物发育后期时发挥着重要作用[21]。Kichey 等[13]以小麦为供试材料的研究表明,GS 活性与齐穗后的植株总氮、可溶性蛋白、氮转运量等呈显著正相关。这是因为 GS 在籽粒灌浆的过程中参与了控制小麦氮状况的生理过程[22],所以 GS 可作为一个生理指标来指示小麦的氮状况,同时可作为筛选氮高效基因型的指标。对禾本科植物而言,正在衰老的叶片胞质 GS1 是一个与 N 移动有关的关键酶,与产量的关系密切;正在灌浆籽粒中的 GOGAT 与籽粒产量呈显著的正相关关系。选择在衰老的叶片中高的 GS 活性或者在灌浆的籽粒中高的 GOGAT 活性的植株能从营养器官转运获得高籽粒氮[23-24]。本试验条件下,齐穗后水稻叶片和茎秆的 NR、GS、GOGAT 和 GDH 活性随着施氮量、生育期、器官和水稻品种的不同而变异较大。与对照相比,施肥提高了齐穗时水稻的倒 1、2 叶的 NR 和 GS 活性,对茎秆和倒 3 叶的 NR 和 GS 活性影响不大;施肥对于齐穗后 2 周的 NR 和 GS 活性影响不明显。随着生育期的推进 NR 和 GS 活性随之下降,NR 的活性下降幅度约在 55%,差异显著,而 GS 的降幅在 4% ~25%。这从侧面反映了水稻齐穗后的根系活力下降,吸收氮的能力在下降;而 GS 酶同化的 NH_4^+ 可能主要来自于植株体内的氮循环。我们以前的试验结果表明[5],氮高效水稻齐穗后从土壤中吸收的氮素远大于氮低效水稻 Elio,故南光功能叶的 NR 较高。随生育期的推进根系活力下降,NR 的降幅明显。南光的 GS 活性显著高于 Elio,GS 活性的提高带动了氮代谢途径运转增强,促进了氨基酸的合成和转化。这点与 NR 活性一致,说明叶片 NR 对 NO_3^- 同化后需要 GS 对 NH_4^+ 进行转化。在施氮处理下,GOGAT 和 GDH 的活性有所增加,南光 GOGAT 和 GDH 的活性显著低于 Elio。由于 GDH 催化 α-酮戊二酸与氨合成氨基酸的一对可逆反应,并且可能在限制谷氨酸的代谢中起作用[25-26],其作用结果产生的 α-酮戊二酸为三羧酸循环提供碳骨架,在植物 C/N 较低时,其催化脱氨方向的反应,氨基酸脱氨产生碳骨架。水稻齐穗后,叶片和茎“源”器官的衰老,光合能力下降,氮素在

组织内积累合成新的蛋白质运往果实等“库”器官,因此氮高效水稻对此过程的调控更为有效。相关分析表明,在生育后期水稻功能叶片和茎秆的氮代谢酶活性与氮转运量的相关密切程度差异明显。无论是齐穗期还是齐穗后 2 周氮代谢酶 NR、GS 活性与氮转运量均呈显著正相关。而 GOGAT 和 GDH 活性无论在齐穗期还是在齐穗后 2 周均与氮转运量之间无显著相关关系。综上所述,水稻功能叶和茎秆的 NR、GS 活性高,尤其是 GS 活性高可能是筛选水稻氮高效的重要指标。

参 考 文 献

[1] Peng S B, Buresh R J, Huang J L, et al. Strategies for overcoming low agronomic nitrogen use efficiency in irrigated rice systems in China. Field Crops Res, 2006, 96(1):37—47

[2] Moll R H, Kamprath E J, Jackson W A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. Agronomy J, 1982, 74: 562—564

[3] Ladha J K, Kirk G J D, Bennett J, et al. Opportunities for increased nitrogen-use efficiency from improved lowland rice germplasm. Field Crop Res, 1998, 56: 41—71

[4] Koutroubas S D, Ntanos D A. Genotypic differences for grain yield and nitrogen utilization in Indica and Japonica rice under Mediterranean conditions. Field Crop Res, 2003, 83: 251—260

[5] Zhang Y L, Fan J B, Wang D S, et al. Genotypic differences in grain yield and physiological nitrogen use efficiency among rice cultivars. Pedosphere, 2009, 19(6): 681—691

[6] 张亚丽, 樊剑波, 段英华, 等. 不同基因型水稻氮效率的差异及评价. 土壤学报, 2008,45(2): 82—88. Zhang Y L, Fan J B, Duan Y H, et al. Variation of nitrogen use efficiency of rice different in genotype and its evaluation (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2008,45(2): 82—88

[7] 樊剑波, 张亚丽, 王东升, 等. 水稻氮利用效率基因型差异评价与氮高效机理研究进展. 南京农业大学学报, 2008, 31(2): 129—134. Fan J B, Zhang Y L, Wang D S, et al. Research progress on high nitrogen uptake and utilization by rice plants (In Chinese). Journal of Nanjing Agricultural University, 2008, 31(2):129—134

[8] 陈军文, 刘强, 荣湘民, 等. 不同栽培法对饲用稻氮代谢关键酶活性的影响. 湖南农业大学学报, 2005, 31(3): 238—241. Chen J W, Liu Q, Rong X M, et al. Effects of different cultivations on activities of nitrogen metabolisms key enzymes of fodder rice (In Chinese). Journal of Hunan Agricultural University, 2005, 31(3): 238—241

[9] 马冬云, 郭天财, 查菲娜, 等. 种植密度对两种穗型冬小麦旗叶氮代谢酶活性及籽粒蛋白质含量的影响. 作物学报, 2007, 33(3):514—517. Ma D Y, Guo T C, Cha F N, et al. Effects of planting density on activities of nitrogen metabolism enzymes in flag leaves and grain protein content in winter wheat with two spike types (In Chinese). Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(3): 514—517

[10] 王亮, 朱建国, 朱春梧, 等. 高浓度 CO_2 条件下水稻叶片氮含量下降与氮代谢关键酶活性的关系. 中国水稻科学, 2008, 22(5): 499—506. Wang L, Zhu J G, Zhu C W, et al. Relationship between decrease in nitrogen content and activities of key enzymes related to nitrogen metabolism in rice leaves under elevated CO_2 concentration (In Chinese). Chinese Journal of Rice Science, 2008, 22(5): 499—506

[11] 吴岳轩, 吴振球. 杂交水稻根系代谢活性与叶片衰老进程的相关研究. 杂交水稻, 1992, 5(6):36—39 Wu Y X, Wu Z Q. Study on the correlation between root metabolic activity and leaf senescing process of hybrid rice (In Chinese). Hybrid Rice, 1992, 5(6): 36—39

[12] 宁书菊, 窦慧娟, 陈晓飞, 等. 水稻生育后期根系氮代谢生理活性变化的研究. 中国生态农业学报, 2009, 17(3): 506—511. Ning S J, Dou H J, Chen X F, et al. Dynamics of nitrogen metabolism activity in rice root at the late development stage (In Chinese). Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17(3): 506—511

[13] Kickey T, Heumez E, Pocholle D, et al. Combined agronomic and physiological aspects of nitrogen management in wheat highlight a central role for glutamine synthetase. New Phytologist, 2006, 169(2): 265—278

[14] 刘辉, 赵竹青. 植物氮营养高效基因型筛选指标研究进展. 安徽农业科学, 2006, 34(14):3 265—3 267, 3 272. Liu H, Zhao Z Q. Research progress in the selecting standard of the plant genotype with nitrogen efficiency (In Chinese). Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34 (14):3 265—3 267, 3 272

[15] Lin C C, Kao C H. Disturbed ammonium assimilation is associated with growth inhibition of roots in rice seedlings caused by NaCl. Plant growth regulation, 1996, 18:233—238

[16] 莫良玉, 吴良欢, 陶勤南. 高等植物 GS/GOGAT 循环研究进展. 植物营养与肥料学报, 2001, 7(2): 223—231. Mo L Y, Wu L H, Tao Q N. Research advances on GS/GOGAT cycle in higher plants (In Chinese). Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2001, 7(2): 223—231

[17] 曹洪生, 黄丕生, 缪宝山, 等. 两种类型中粳稻吸氮分析及施肥技术研究. 苏州科技学院学报. 1992, 9(1): 35—41. Cao H S, Huang P S, Miu B S, et al. The analysis of nitrogen uptake and the study on fertilization technique in two types of Japonica rice (In Chinese). Journal of University of Science and Technology of Suzhou, 1992, 9(1): 35—41

[18] 江立庚, 戴廷波, 韦善清, 等. 南方水稻氮素吸收与利用效率的基因型差异及评价. 植物生态学报, 2003, 27(4): 466—471. Jiang L G, Dai T B, Wei S Q, et al. Genotypic differences and valuation in nitrogen uptake and utilization efficiency in rice (In Chinese). Acta Phytoecologica Sinica, 2003, 27(4): 466—471

[19] 陈晓飞. 水稻两优培九生育后期氮代谢和籽粒灌浆的生理机理研究. 福建农林大学, 2007. Chen X F. Mechanism of N metabolism and grain filling in rice at the late growth stage. Fujian Agriculture and forestry University ,2007

[20] 李合生. 现代植物生理学. 北京：高等教育出版社，2002：221—222. Li H S. Modern plant physiology (In Chinese). Beijing: Higher Education Press, 2002: 221— 222

[21] Kwinta J, Bielawski W. Glutamate dehydrogenase in higher plants. Acta Physiol Plant, 1998,20:453—463.

[22] Kickey T, Le Gouis J, Sangwan B, et al. Changes in the celluar and subcellular localization of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase during flag leaf senescence in wheat. Plant and Cell Physiology, 2005, 46: 964—974

[23] 陈军文. 不同栽培法对饲用稻氮代谢关键酶活性的影响. 湖南农业大学学报：自然科学版，2005，31(4)：238—241. Chen J W. Effects of different cultivations on activities of nitrogen metabolisms key enzymes of fodder rice (In Chinese). Journal of Hunan Agricultural University: Natural Science Edition, 2005, 31(4): 238—241

[24] Andrews M, Lea P J, Raven J, et al. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. Annual of Applied Biology, 2004, 145(1): 25—40

[25] El-Shorn H M, Abo-Kassem E M. Kinetic characterization of glutamate dehydrogenase of marrow cotyledons. Plant Science, 2001, 161: 1 047—1 053

[26] 王云华，王志强，张楚富，等. 硝态氮对黄瓜子叶谷氨酰胺合成酶和谷氨酸脱氢酶活性的影响. 武汉植物学研究，2004，22(6):534—538. Wang Y H, Wang Z Q, Zhang C F, et al. Effect of nitrate nitrogen on activities of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase during development of cucumber cotyledon (In Chinese). Journal of Wuhan Botanical Research, 2004, 22(6):534—538

VARIATION OF ACTIVITY OF N METABOLIZING ENZYMES IN RICE PLANTS DIFFERENT IN N USE EFFICIENCY AT THEIR LATE GROWTH STAGES

Ye Liting Lü Huajun Song Wenjing Tu Erdi Shen Qirong Zhang Yali†

(*College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing* 210095 ,*China*)

Abstract In rice the period of grain filling is characterized by transition of all vegetative organs from sink to source. A pot experiment was conducted to monitor variation of N and protein concentrations, N translocation and enzyme activities representative of nitrogen metabolism after the heading stage in different leaves and stem sections of two rice cultivars different in N use efficiency (NUE), high and low, treated with two levels of N fertilization. Compared with CK or Treatment N_0, N application increased N concentration, soluble protein concentration and N translocation in leaves and stems. Nitrogen concentration in functional leaves decreased by 60% ~67% from heading to maturity, regardless of N rates, which indicates that N in grains comes mainly from leaves. However, N contribution rate from stems to grain depends on environmental N supply. N and soluble protein concentration and N translocation in leaves and stems was lower in Nanguang than in Elio at the maturity stage. Compared with CK, N application increased the activities of four N enzymes. And the activities decreased with the plant growth. The NR and GS activities were higher in Nanguang than in Elio, while NR activity depends more on N rate and growth stage. The GOGAT and GDH activities were lower in Nanguang than in Elio. NR and GS activities were significantly correlated to N and soluble protein concentrations at the heading stage and 2 weeks after the heading. All these indicate that higher NR and GS activities especially the latter, may predict the N status of rice, high N translocation and high NUE in rice.

Key words Rice; N use efficiency; N concentration; Activities of N metabolizing enzymes