

不同氮素形态培养对枳橙幼苗硝酸还原酶活性及相关基因表达的影响

孙敏红^{1,2}, 卢晓鹏¹, 曹雄军¹, 李 静¹, 熊 江¹, 谢深喜^{1*}

(¹湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128; ²中南林业科技大学林学院, 长沙 410004)

摘 要:【目的】进一步探讨枳橙对氮素吸收利用机制, 为柑橘生产上提高氮素利用效率和科学施肥提供科学依据。【方法】以枳橙为材料, 采用水培方法, 在 Hoagland 配方的基础上进行调节, 研究了不同形态氮素对比枳橙幼苗硝酸还原酶(NR)活性变化及相关基因表达量的影响。【结果】幼苗叶片及根系 NR 活性均随着培养时间的延长而增加, 且叶片 NR 活性高于根系。其中 2 号($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=7:3$)和 3 号($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=5:5$)处理的叶片酶活最高; 1 号($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=10:0$)和 2 号($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=7:3$)处理根系的 NR 活性显著高于其他处理; 进一步研究 NR 相关基因表达情况表明: 3 个基因(*CiNia1*、*CiNia2*、*CiNia OA*)在不同处理的枳橙幼苗体内均有表达, 其中 *CiNia1* 和 *CiNia2* 分别是根系和叶片 NR 相关主效基因, 2 者均受到 NO_3^- 、 NH_4^+ 配比诱导, 且 3 号处理($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=5:5$)下表达量最高。【结论】枳橙幼苗硝态氮代谢的主要部位为叶片, 且 *CiNia2* 是主效基因, 通过调节铵硝比例可以促进其表达。

关键词: 枳橙; 硝态氮; 铵态氮; 硝酸还原酶

中图分类号: S666.4

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)04-0410-08

Effect of different forms of nitrogen on the activity of nitrate reductase and expression of the relative genes in *Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata*

SUN Minhong^{1,2}, LU Xiaopeng¹, CAO Xiongjun¹, LI Jing¹, XIONG Jiang¹, XIE Shenxi^{1*}

(¹Horticulture and Landscape College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China; ²Forestry College, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract:【Objective】*Citrus* is one of the main fruit trees in the world, and China is the biggest country in its production. There are a number of factors affecting growth and fruiting of *Citrus*. The nutrition deficiency can cause physiological disorder. Nitrogen is the most important element for *Citrus*. At present, seedling rootstocks are used for citrus production in China. The ability of absorption and transportation of inorganic nutrients varies with the species of rootstocks. Thus, it is necessary to investigate the ability of nitrogen absorption of the main rootstock. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. is a hybrid of trifoliata and sweet orange being widely used due to its anti-aging disease characteristic. NO_3^- and NH_4^+ are the two main forms of inorganic nitrogen used. The influence of the forms of nitrogen and the ratio of NO_3^- and NH_4^+ on *C. sinensis* (L.) Osbeck × *P. trifoliata* (L.) Raf. and the nitrogen metabolism mechanism remains unknown at present. Nitrate reductase (NR) plays an important role in the metabolism process of nitrogen. Therefore, this research aims to study the nitrate absorption ability and mechanism in *C. sinensis* (L.) Osbeck × *P. trifoliata* (L.) Raf. to provide a scientific basis for improving efficiency of nitrogen usage in citrus production. 【Methods】*C. sinensis* (L.) Osbeck × *P. trifoliata* (L.) Raf., were planted by hydroponic method with Hoagland nutrient solution. Five treatments were made as follows: No.1 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=$

收稿日期: 2016-10-10 接受日期: 2016-12-16

基金项目: 现代农业(柑橘)产业技术体系(CARS-027); 国家自然科学基金(31401824); 教育部高校博士点基金(20134320120006)

作者简介: 孙敏红, 女, 讲师, 研究方向为果树生理生态。Tel: 13973311219, E-mail: sunminhongcaddie@126.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: shenxixie@126.com

10:0), No.2($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=7:3$), No.3($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=5:5$), No.4($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=3:7$) and No.5($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=0:10$). The seedlings were planted in environmental chamber, and the culture medium for each treatment was added $7\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4$ in the nutrient solution to inhibit nitrate. The pH value of media was 6 or so, ventilation time was 15 min every 3 h. The seedlings were cultured for different times (0, 20, 40, 60, 80 d) with the solution adjustments, the effect of different ratio of nitrogen forms on the NR activity of the seedlings and the expression of the relative genes were studied.【Results】The NR activity of the leaves and the roots of the seedlings increased with the increase of cultivation time. The NR activity of the leaves was higher than that of the roots. The NR activity of the leaves under the treatments of No.2 and No.3 were higher than that under other treatments. While the NR activity of the roots under the treatments No.1 and No.2 were significantly higher than that under the other treatments; The NR activity of the leaves and the roots under the treatments of No.4 and No.5 increased firstly and then decreased. The highest value of the NR activities was found in the seedlings cultured for 60 d. The lowest value was found in the seedlings cultured for 80 d under No.5 treatment. The related NR genes were cloned in many plants besides orange. The Nia gens analysis showed that *CitNia1*, *CitNia2*, *CitNia OA* were all found in the seedlings under all treatments. The expression of *CitNia1* of the roots in the seedlings under all treatments were higher than that of the other two genes, inferring that it was might be the main NR gene in the roots. The expression of *CitNia2* of the leaves in the seedlings was higher than the other genes, and might be the major NR genes in the leaves. *CitNia1* and *CitNia2* were all induced by the different ratios of NO_3^- and NH_4^+ , and the highest expression of *CitNia1* and *CitNia2* was found when the ratio was 5:5 (treatment No.3). It indicated that the treatment 3 was suitable for nitrate absorption and metabolism in *Citrus*.【Conclusion】The main organ of nitrate metabolism in the seedlings of *C. sinensis* (L.) Osbeck $\times$ *P. trifoliata* (L.) Raf. was the leaf. *CitNia2* was the major gene in the leaves, its expression was affected by the regulation of the ratio of NO_3^- and NH_4^+ .

Key words: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck $\times$ *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.; Nitrate; Ammonium; Nitrate reductas

柑橘(*Citrus*)是世界上重要的果树之一,居各种水果之首,我国是世界柑橘生产第一大国且柑橘产业发展迅猛^[1-2]。虽然柑橘是我国南方的重要果树,但大多果园立地条件较差,缺素已成为其主要生理病害之一。氮素在植物生命活动中发挥着极其重要的作用,被称为“生命元素”^[3]。目前经济栽培的柑橘园中所采用的柑橘苗均是嫁接苗木,且不同砧木对无机养分吸收及转运能力也不尽相同,因此研究嫁接砧木对氮素的吸收和代谢能力在柑橘生产中有非常重要的意义。枳橙[*Citrus sinensis* (L.) Osb. $\times$ *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]是柑橘的主要砧木类型之一,它是枳与甜橙的杂交种,国内外主要推广的枳橙是‘卡里佐’(‘Carrizo’)和‘特洛亚’(‘Troyer’),皆是华盛顿脐橙和枳杂交而来。此砧木根系发达、耐寒抗旱、耐瘠薄、生长势较旺、较耐粗放管理,且具有抗柑橘衰退病等特性,近些年来被大力推广应用。

植物根系吸收的硝态氮首先在细胞质中由硝酸还原酶和亚硝酸还原酶还原成铵,后再被谷氨酸合成酶和谷氨酰胺合成酶同化成谷氨酸和谷氨酰胺,形成天冬氨酸和天冬酰胺,最后形成各种氨基酸和蛋白质用于植物生长发育^[4]。硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)既是氮素吸收、转运的诱导酶,也是限速酶,在氮素代谢过程中具有关键作用。不同氮素形态会引起氮代谢酶的活性变化^[5],而硝酸还原酶的活性决定了硝酸盐(无机氮)同化成有机氮化合物的速度,因此它与植物吸收利用氮素存在密切关系^[6],也可作为作物的营养指标之一^[7]。Nia 编码的NR是存在于胞质中的可溶性电子转运蛋白,目前Nia基因在菠菜^[8]、烟草^[9]、拟南芥^[10]、甜菜^[11]等植物上已被克隆。在柑橘甜橙二倍体基因组^[12]中也可以查找到多个硝酸还原酶相关基因,但对其功能验证,尤其是氮素形态对它们表达量影响的研究鲜有报道。笔者

通过用不同氮素形态处理枳橙幼苗,研究不同处理对幼苗体内硝酸还原酶活性的影响,并从分子生物学角度探讨氮素形态对硝酸还原酶相关基因表达量的影响,为研究柑橘砧木氮素代谢机制提供一定的理论依据,也对柑橘生产中氮肥的合理施用有重要的现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料及地点

幼苗培养和硝酸还原酶活性测定在中南林业科技大学林学院人工气候室和园艺实验室完成,硝酸还原酶相关基因定量表达试验在湖南农业大学柑橘改良中心进行。选用的‘卡里佐’枳橙种子由中国农业科学院柑橘研究所(重庆)提供,经 5% NaClO 和 75% 乙醇处理后,于垫有纱布的催芽盘中恒温催芽,露白后播于灭菌的蛭石基质中,待幼苗长到 5~7 枚新叶时,选取长势相似的植株移植于 75 L 放有 Hogland 营养液的黑色塑料箱中,选用黑色 KT 板(600 mm×500 mm)为定植板,每箱定植约 60 棵幼苗,以标准 Hogland 营养液进行适应性栽培 2 周后进行不同配方处理。人工气候室条件为:光照时数 14 h(光)/10 h(暗),光照强度 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;昼夜温度 22 ℃/18 ℃,相对湿度为 75%。

1.2 方法

1.2.1 试验设计及方法 每个处理在 Hoagland 配方的基础上进行调节,营养液中总氮含量 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,其中 NO_3^- 由 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 KNO_3 和 NH_4NO_3 提供, NH_4^+ 由 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 提供, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ P 由 K_2HPO_4 提供, $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ K^+ 由 KOH 或 KNO_3 提供, $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} 由 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 或 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 提供, $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 由 MgSO_4 提供。根据不同硝态氮和铵态氮浓度共设 5 个处理:处理 1 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=10:0$),处理 2 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=7:3$),处理 3 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=5:5$),处理 4 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=3:7$),处理 5 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=0:10$)。所有营养液中均添加硝化抑制剂 $7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 双氰胺($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_4$)抑制硝化作用,pH 值为 6.0 左右,每 3 h 通气 15 min。取培养 0、20、40、60 和 80 d 的枳橙幼苗,分离根系和叶片,用液氮速冻后立刻保存至 -80 ℃ 冰箱待用。

1.2.2 硝酸还原酶活性的测定 取培养不同时期的枳橙幼苗,将整株叶片和根系分离,各称取 0.5 g 新鲜样品,用离体法^[13]测定不同部位硝酸还原酶活

性。每个处理设 3 次重复。

1.2.3 硝酸还原酶相关基因定量表达 (1) 试验取材及引物设计。取不同处理培养 80 d 的枳橙幼苗,分离根系和叶片,并用液氮速冻后立刻保存至 -80 ℃ 冰箱待用。从甜橙基因组转录组找到已登录的序列,用 Beacon designer 设计引物后,送至 BIO-RAD 合成引物。详细基因引物序列见表 1。

表 1 相对定量表达特异引物序列

Table 1 Real-time quantitative PCR specific primer sequences

基因名称 Gene name	登录号 Accession number	引物序列 Primer sequence
<i>Actin-F</i>		CCAATTCTCTCTTGAACCTGTCCTT
<i>Actin-R</i>		TGACTGATGAGAAGTCCAGAAAG
<i>CitNia1-F</i>	Cs3g19060.1	GCTCAACATAAACTCAGTCATA
<i>CitNia1-R</i>		GGAATATGCGTAGCCTCT
<i>CitNIA 2-F</i>	orange1.1t00436.1	CACAACAAGGCAGAAGATT
<i>CitNIA 2-R</i>		CTATAAACGCATCGGTAACAT
<i>CitNIA OA-F</i>	Cs7g16410.2	AACCCAAATGACAAGACAA
<i>CitNIAOA-R</i>		GGCTGATTCAACACATAGTA

(2) 总 RNA 的提取。取新鲜试材(根或叶)100 mg 左右,迅速放入提前用液氮预冷好的 1.5 mL 无 RNAase 离心管中,并加入适量液氮迅速将材料研磨成粉状,采用 Takara RNAiso plus 试剂盒提取柑橘叶片、根系样品的总 RNA,方法参照试剂使用说明书。将提取好的总 RNA 采用 120 V, 10 min, 1% (ω) 琼脂糖凝胶电泳观察条带,100 bp 的 plus DNA Ladder 作对照,用 6×Loading buffer 上样,每个处理 3 次重复。提取的总 RNA 保存于 -80 ℃ 冰箱中。

(3) cDNA 的合成。将提取的总 RNA 进行去 DNA 处理后,用 cDNA 逆转录试剂盒 iScript cDNA Synthesis Kit (Takara 公司) 合成 cDNA。使用 Bio-RAD 定量 PCR 仪进行表达量分析,反应体系为 20 μL ,包括: Supermix (10.0 μL) + cDNA 模板 (1.0 μL) + ddH₂O (7.5 μL) + 上游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.75 μL) + 下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.75 μL); 所加目的基因引物序列见表 1,以 *Actin* 引物作为内参引物。荧光定量 PCR 扩增条件为: 95 ℃, 30 s → (95 ℃, 5 s → 58 ℃, 30 s) × 38 → 65 ℃, 5 s → 95 ℃, 5 s → 溶解曲线。同一基因每个处理设 3 次重复。

1.2.4 试验数据分析 使用 Excel 2007、Bio-Rad CFX-Manager (admin)、SPSS16.0 统计分析数据,用

Beacon designer 软件设计定量引物。

2 结果与分析

2.1 不同氮素形态对枳橙幼苗根系硝酸还原酶活性的影响

不同氮素形态处理对枳橙幼苗根系硝酸还原酶活性有显著影响,由表2中可知,不同处理的枳橙幼苗根系NR活性均随着培养时间的延长变化趋势不尽相同。其中1号($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=10:0$)、2号($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=7:3$)和3号($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=5:5$)处理NR活性随着培养时间的延长均持续增加,80 d达到最大值,此时1号处理显著高于3号处理,但与2号处理无显著差异;3号处理的NR活性虽低于全硝处理,但与2号处理无显著差异;4号($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=3:7$)、5号处理($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=0:10$)则表现为前期缓慢增加后期急剧下降,均在60 d时达到最大值,但均显著低于1、2、3号处理,80 d时4号、5号处理的NR活性极显著低于其他处理,但2者间无显著差异。这说明高浓度的 NO_3^- 营养对枳橙幼苗根系NR酶活性有一定的促进作用,且1号和2号处理影响最为显著;高浓度 NH_4^+ 处理(4号和5号)的NR在培养前期有一定的活性,60 d后急剧下降;这与高比例的铵态氮离子导致根系发生毒害作用进而致使植株生长减弱有关,且这种毒害现象从培养60 d后开始逐渐显现。

表2 枳橙根系硝酸还原酶活性
Table 2 The nitrate reductase activity of the roots of *C. sinensis* (L.) Osb.×*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.
($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)

处理 Treatment	时间 Time/d				
	0	20	40	60	80
1号 No. 1 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=10:0$	5.64±0.18	6.14±0.59 b	9.60±0.59 b	12.15±0.71 a	13.81±0.59 a
2号 No. 2 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=7:3$	5.64±0.18	8.61±0.59 a	9.16±0.59 bc	11.29±1.06 b	13.61±1.07 ab
3号 No. 3 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=5:5$	5.64±0.18	6.65±0.83 b	10.66±1.13 a	12.15±0.12 a	12.78±1.06 b
4号 No. 4 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=3:7$	5.64±0.18	6.45±0.36 b	8.65±0.08 c	9.12±0.59 c	2.79±0.48 c
5号 No. 5 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=0:10$	5.64±0.18	4.56±0.23 d	6.52±0.48 d	8.30±0.23 d	2.10±0.24 c

注:数据为3次重复的均值±标准差,不同小写字母表示在0.05水平上差异显著(LSD多重比较)。下同。

Note: The data are the average ±SD of three repeats after treating. The different small letters indicate significant difference at 0.05 level using LSD's multiple comparisons test. The same below.

2.2 不同氮素形态对枳橙幼苗叶片硝酸还原酶活性的影响

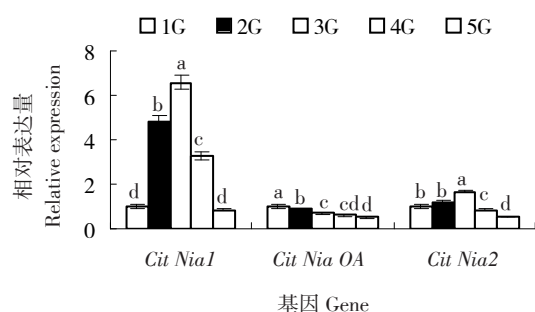
不同氮素形态对枳橙幼苗叶片NR活性变化的影响由表3可知,随着培养时间的延长,不同处理的幼苗叶片NR活性均呈现不同程度的增加。其中1号、2号和3号处理NR活性随着培养时间的延长持续增加,80 d达到最大值,此时2号、3号处理显著大于其他处理;4号和5号处理NR活性则表现为先增加后降低,均在60 d时达到最大值后下降,80 d时全铵处理最低。这说明较高浓度的 NO_3^- 营养对幼苗叶片NR酶活有一定的促进作用,又以2号和3号处理最为显著;较高浓度 NH_4^+ 处理(4号和5号)在培养期对NR有一定的促进作用,但60 d后活性下降,这与对根系的研究趋势相同,可能与高比例的 NH_4^+ 先导致根系发生毒害作用致使植株生长减弱有关,从而影响叶片NR活性,且毒害现象从培养60 d后开始逐渐显现。

表3 枳橙叶片硝酸还原酶活性
Table 3 The nitrate reductase activity of the leaves of *C. sinensis* (L.) Osb.×*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.
($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)

处理 Treatment	时间 Time/d				
	0	20	40	60	80
1号 No. 1 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=10:0$	5.70±0.21	4.56±0.24 c	6.37±0.35 c	10.66±0.59 c	20.77±0.25 b
2号 No. 2 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=7:3$	5.70±0.21	8.18±0.35 a	18.96±0.59 a	20.22±0.95 a	29.89±0.24 a
3号 No. 3 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=5:5$	5.70±0.21	8.22±0.24 a	10.19±0.47 b	17.35±1.06 b	29.81±0.59 a
4号 No. 4 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=3:7$	5.70±0.21	5.66±0.23 b	9.75±0.59 b	19.23±0.47 a	9.28±0.59 c
5号 No. 5 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=0:10$	5.70±0.21	5.03±0.24 c	9.88±0.47 b	16.83±0.59 b	6.11±0.24 d

2.3 不同氮素形态对枳橙根系 *CitNia1*、*CitNia2* 和 *CitNia OA* 相对表达量的影响

从图1可以看出,不同处理的枳橙幼苗根系中,硝酸还原酶相关的3个基因 *CitNia1*、*CitNia2*、*CitNia OA* 均有表达。其中 *CitNia1* 随着营养液中 NH_4^+ 比例的增加,表达量先增加后降低,3号处理的表达量最高,其次是2号和4号处理;该基因表达量在1号和5号处理之间无显著差异,但显著低于其他处理;*CitNia2* 表达量在各处理中的变化趋势同 *CitNia1* 基因基本相同,均是3号处理最高,其次是2号和1号处理,5号处理最低。这说明一定比例 NO_3^- 、 NH_4^+ 配施诱导了 *CitNia1*、*CitNia2* 在根系中的表达。



1G~5G. 处理 1~5 幼苗根系。

1G~5G. The plant root of treatment 1~5.

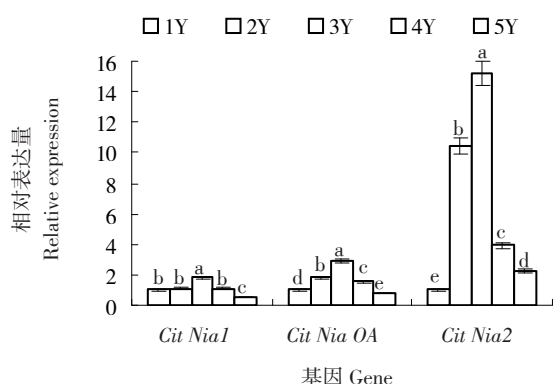
图1 不同氮素形态处理对枳橙根系 *CitNia1*、*CitNia2*、*CitNia OA* 的相对表达量的影响

Fig. 1 Effect of different nitrogen forms on the relative expression of *CitNia1*, *CitNia2*, *CitNia OA* in roots of *C. sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

CitNia OA 在各处理中的表达量随着 NH_4^+ 比例的增加略有降低, 5号全铵处理与4号处理之间无显著差异, 但显著低于1号, 2号和3号处理, 这说明 NH_4^+ 抑制该基因在枳橙根系中的表达。3个硝酸还原酶相关基因中, *CitNia1* 在幼苗根系中的表达量显著高于其他基因, 由此推断该基因主要受到氮素形态配比的调控。

2.4 不同氮素形态对枳橙叶片 *CitNia1*、*CitNia2* 和 *CitNiaOA* 相对表达量的影响

从图2可以看出, 不同处理的枳橙幼苗叶片中, 硝酸还原酶3个基因 *CitNia1*、*CitNia2*、*CitNia OA* 均



1Y~5Y. 处理 1~5 幼苗叶片。

1Y~5Y. The plant leaves of treatment 1~5.

图2 不同氮素形态处理对枳橙叶片 *CitNia1*、*CitNia2*、*CitNia OA* 的相对表达量的影响

Fig. 2 Effect of different nitrogen forms on the relative expression of *CitNia1*, *CitNia2*, *CitNia OA* in leaves of *C. sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.

有表达, 且表达趋势基本一致, 即随着营养液中 NH_4^+ 比例的增加, 基因表达量表现为先增加后降低的趋势。其中 *CitNia2* 在各处理中的表达量显著高于其他基因, 说明该基因主要受到铵硝比例诱导, 各处理排序为3号>2号>4号>5号>1号。*CitNia1* 基因也是3号处理表达量最高, 5号最低, 其他几个处理无显著差异。*CitNia OA* 表达量由高到低为: 3号>2号>4号>1号>5号处理, 这说明一定比例铵硝配施诱导了枳橙幼苗叶片硝酸还原酶相关基因 *CitNia1*、*CitNia2*、*CitNia OA* 的表达, 且3号处理下这3个基因的表达量均显著高于其他处理。

3 讨论

3.1 不同氮素形态对枳橙幼苗硝酸还原酶活性的影响

在植物体内, 硝酸还原酶(NR)主要存在于根系和叶片细胞的胞质中, 少部分存在于生物膜上, 如叶绿体外膜等^[14]。影响NR活性的因素有很多, 不同氮素形态处理会引起该酶活性的显著变化, 但研究结果不尽相同。在小麦^[15]、菠菜^[16]、水稻^[17]等植物上的研究表明, 2种氮素营养共存时的NR活性比单一 NO_3^- 营养高, 氮素代谢强, 其活性也随 NH_4^+ 比例的增加而降低。但 Gashaw 等^[18]研究认为, NH_4^+ 对NR活性既有促进又有抑制作用, 如陈煜等^[14]认为全硝营养显著增加大豆NR活性, 混合培养次之, 全铵最差; 而胡润芳等^[19]在大豆上的研究刚好相反, 即认为全铵培养对大豆叶片NR活性效果显著优于混合氮素处理和全硝培养。李宪利等^[20]研究表明, NO_3^- 能显著提高NR活性, 但高浓度的 NH_4^+ 对NR也无抑制作用。

本研究结果表明, 不同氮素形态对枳橙幼苗叶片和根系的NR活性影响显著, 2者变化趋势基本一致, 均表现为一定比例 NH_4^+ 的氮素营养对NR活性的促进效果优于单一态氮营养, 高浓度 NH_4^+ 处理(4号和5号)在培养前期对NR活性有一定的促进作用, 后期则产生抑制; 单一氮素营养中, 全硝处理NR活性显著大于全铵培养, 2号处理($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=5:5$)、3号处理($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=5:5$)叶片和根系NR活性均显著高于其他处理, 这与以往报道结果相似^[21]。

本研究还发现, 各处理后期叶片NR活性均高于根系, 这是因为大部分植物吸收的 NO_3^- 中, 90%是在叶片被还原和同化^[22]。因此根系中 NO_3^- 主要通过

木质部运输至叶片进行同化,虽然导致叶片硝酸盐含量增加,但同时叶片较高的NR活性又可有效地降低叶片硝酸盐积累。故高浓度的硝态氮施用并不会造成果树叶片硝酸盐积累。

3.2 不同氮素形态对枳橙幼苗硝酸还原酶相关基因表达量的影响

硝酸还原酶相关基因的表达受到众多因子的调控,如 NO_3^- ^[23]、谷氨酰胺^[24]、 NO_2^- ^[25]、碳代谢产物^[26]等。其中 NO_3^- 对NR的调控研究较多,如在拟南芥^[27]、玉米^[28]、油菜^[29]等中均认为 NO_3^- 能诱导植物硝酸还原酶的表达。曹云等^[30]在水稻上的研究认为混合氮素营养既增加NR活性又增强了NR基因的表达,促进水稻对 NO_3^- 的同化利用,进一步增加了氮素在植株叶片中的积累同化。

植物体内通常有多个硝酸还原酶基因。目前NR的相关基因主要有2个,即Nia1和Nia2,前者受NADH的特异性诱导表达,后者的表达以NAD(P)H为底物^[31]。不同的NR基因对植物硝酸还原酶活性的贡献率不一样。Wilkinson等^[32]研究表明,拟南芥的Nia1和Nia2对叶片硝酸还原酶活性的贡献率分别为10%和90%。本研究的定量分析检测也有相似的结果,在研究不同氮素形态处理对枳橙幼苗*CitNia1*、*CitNia2*、*CitNia OA*表达量的影响时发现,根系中*CitNia1*的表达量高于其他2个基因,说明在枳橙幼苗根系内,*CitNia1*可能是硝酸还原酶相关基因中的主效基因,且受到不同氮素形态配比调控。而叶片则表现为*CitNia2*的表达量高于其他2个基因,即叶片硝酸还原酶的主效基因为*CitNia2*。无论是叶片或是根系均表现为一定浓度铵硝配比溶液可以促进NR基因的表达,其中以3号处理($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+=5:5$)为最高。

近年来从分子水平上研究硝酸还原酶的调节机制已成为氮代谢研究中的热点。笔者研究了不同氮素形态处理下枳橙幼苗NR活性的变化特点,并通过对NR相关基因序列设计引物,进一步研究这些基因的表达特性,旨在了解枳橙NR调节表达机制,为后续通过基因工程手段增强柑橘NR活性研究打下基础。

4 结 论

枳橙幼苗根系硝酸还原酶活性显著高于叶片,说明硝态氮代谢的主要部位为叶片,对3个相关基

因的定量表达分析可知,*CitNia2*是叶片的主效基因,而*CitNia1*可能是根系硝酸还原酶相关基因中的主效基因,且都可通过调节铵硝比例促进其表达。

参考文献 References:

- [1] 王川. 中国柑橘生产与消费现状分析[J]. 农业展望, 2006, 2(1): 8-12.
WANG Chuan. Analysis of *Citrus* production and consumption in China[J]. Agricultural Outlook, 2006, 2(1): 8-12.
- [2] 廖伟, 李先信, 阳志慧, 卜汉文. 氮磷肥对柑橘的影响研究进展[J]. 湖南农业科学, 2010, 24(12): 34-35.
LIAO Wei, LI Xianxin, YANG Zhihui, BU Hanwen. The advanced on nitrogen and phosphate on *Citrus* effect[J]. Hunan Agricultural Science, 2010, 24(12): 34-35.
- [3] AMTMANN A, ARMENGAUD P. Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(3): 275-283.
- [4] 阳剑, 时亚文, 李宙伟, 陶优生, 唐启源. 水稻碳氮代谢研究进展[J]. 作物研究, 2011, 25(4): 383-387.
YANG Jian, SHI Yawen, LI Zhouwei, TAO Yousheng, TANG Qiyuan. Advances in carbon and nitrogen metabolism in rice[J]. Crop Research, 2011, 25(4): 383-387.
- [5] 王小纯, 熊淑萍, 马新明, 张娟娟, 王志强. 不同形态氮素对专用型小麦花后氮代谢关键酶活性及籽粒蛋白质含量的影响[J]. 生态学报, 2005, 25(4): 802-807.
WANG Xiaochun, XIONG Shuping, MA Xinming, ZHANG Juanjuan, WANG Zhiqiang. Effects of different nitrogen forms on key enzyme activity involved in nitrogen metabolism and grain protein content in speciality wheat cultivars[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(4): 802-807.
- [6] DALLING M J, BOLAND G, WILLSON J H. Relation between acid proteinase activity and redistribution of nitrogen during grain development in wheat [J]. Functional Plant Biology, 1976, 3(6): 721-730.
- [7] 张瑞珍, 张恩和, 孙长占. 不同基因型玉米品种氮素营养效率差异的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(2): 183-186.
ZHANG Ruizhen, ZHANG Enhe, SUN Changzhan. Study different genotype maize variety on diversity of nitrogen nutrition efficiency [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2003, 25(2): 183-186.
- [8] KUBO Y, OGURA N, NAKAGAWA H. Limited proteolysis of the nitratre ductase from spinach leaves[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 263(36): 19684-19689.
- [9] VAUCHERET H, VINCENTZ M, KRONENBERGER J, ROUZE P. Molecular cloning and characterization of the two homologous genes coding for nitrate reductase in tobacco[J]. Molecular & General Genetics Mgg, 1989, 216(1): 10-15.
- [10] CHENG C L, DEWDNEY J, NAM H G, BGDEN B, GOODMAN H M. A new locus (NIA1) in *Arabidopsis thaliana* encoding ni-

- trate reductase[J]. *Embo Journal*, 1988, 7(11): 3309–3314.
- [11] 丁广洲, 侯静, 陈丽, 马凤鸣, 陈连江. 甜菜 nia 基因的克隆及不同氮素形态诱导的差异表达[J]. *作物学报*, 2011, 37(11): 1949–1955.
- DING Guangzhou, HOU Jing, CHEN Li, MA Fengming, CHEN Lianjiang. Cloning of nia gene and its differential expression induced by different nitrogen forms in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2011, 37(11): 1949–1955.
- [12] XU Q, CHEN L L, RUAN X A, ZHU A. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*) [J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(1): 59–66.
- [13] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 125–127.
- LI Hesheng. Principles and techniques of plant physiology and biochemistry experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 125–127.
- [14] 陈煜, 朱保葛, 张敬. 不同氮源对大豆硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶活性及蛋白质含量的影响[J]. *大豆科学*, 2004, 23(2): 143–146.
- CHEN Yu, ZHU Baoge, ZHANG Jing. Effects of different nitrogens on activities of nitrate reductase, glutamine synthetase and seed protein contents in soybean cultivars[J]. *Soybean Science*, 2004, 23(2): 143–146.
- [15] 肖凯, 张树华, 邹定辉, 张荣铎. 不同形态氮素对小麦光合特性的影响[J]. *作物学报*, 2000, 26(1): 53–58.
- XIAO Kai, ZHANG Shuhua, ZOU Dinghui, ZHANG Rongxian. The effects of different nitrogen nutrition forms on photosynthetic characteristics in wheat leaves[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26(1): 53–58.
- [16] 汪建飞, 董彩霞, 谢越, 沈其荣. 铵硝比和磷素营养对菠菜生长、氮素吸收和相关酶活性的影响[J]. *土壤学报*, 2006, 46(6): 954–955.
- WANG Jianfei, DONG Caixia, XIE Yue, SHEN Qirong. Effects of NH_4^+ -N/ NO_3^- -N ratio and phosphorus levels on growth, nitrogen uptake and relevant enzymes activity of spinach (*Spinacia oleracea* L.) [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 46(6): 954–955.
- [17] 张新要, 刘卫群, 易建华, 李天福, 陈良存, 周文辉. 红壤、水稻土上不同氮素形态对比对烤烟碳氮代谢关键酶活性的影响[J]. *云南农业大学学报*, 2005, 20(2): 225–230.
- ZHANG Xinyao, LIU Weiqun, YI Jianhua, LI Tianfu, CHEN Liangcun, ZHOU Wenhui. Effects of different forms of nitrogen fertilizer on predominant enzymes of C and N metabolism in red and rice soils of flue-cured tobacco[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2005, 20(2): 225–230.
- [18] GASHAW L, MUGWIRA L M. Ammonium-N and nitrate-N effects on the growth and mineral compositions of triticale wheat and rye[J]. *Agronomy Journal*, 1981, 73(1): 47–51.
- [19] 胡润芳, 张广庆, 滕振勇, 林国强. 不同形态氮素对大豆硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶活性及蛋白质含量的影响[J]. *东北农业大学学报*, 2012, 43(1): 31–32.
- HU Runfang, ZHANG Guangqing, TENG Zhenyong, LIN Guoqiang. Effect of different nitrogens on activities of nitrate reductase, glutamine synthetase, and seed protein contents in soybean cultivars[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2012, 43(1): 31–32.
- [20] 李宪利, 高东升, 米瑞芙. 苹果植株硝酸还原酶(NR)研究初报[J]. *山东农业大学学报*, 1997, 28(1): 1–4.
- LI Xianli, GAO Dongsheng, MI Ruifu. Study of the nitrate reductase activity of apple trees in orchard [J]. *Journal of Shandong Agricultural University*, 1997, 28(1): 1–4.
- [21] 戴廷波, 曹卫星, 孙传范, 姜东, 荆奇. 增铵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.
- DAI Tingbo, CAO Weixing, SUN Chuanfan, JIANG Dong, JING Qi. Effect of enhanced ammonium nutrition on photosynthesis and nitrate reductase and glutamine synthetase activities of winter wheat[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(9): 1529–1532.
- [22] KAFKAFI U. Root temperature, concentration and the ratio $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ effect on plant development[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1990, 13(10): 1291–1306.
- [23] MUNZAROVA E, LORENZEN B, BRIXB H, VOJTISKOVA L, VOTRUBOVA O. Effect of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ availability on nitrate reductase activity and nitrogen accumulation in wetland helophytes *Phragmites australis* and *Glyceria maxima* [J]. *Environmental & Experimental Botany*, 2006, 55(1/2): 49–60.
- [24] VINCENTZ M, MOUREAUX T, VAUCHERET H, CABOCHE M. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites [J]. *Plant Journal*, 1993, 3(2): 315–324.
- [25] LOQUE D, TILLARD P, GOJON A, LEPETI M. Gene expression of the NO_3^- transporter NRT1.1 and the nitrate reductase NIA1 is repressed in *Arabidopsis* roots by NO_2^- , the product of NO_3^- reduction [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 958–967.
- [26] ZOU D H. Effects of elevated atmospheric CO_2 on growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in the economic brown seaweed, *Hizikia fusiforme* (Sargassaceae, Phaeophyta) [J]. *Aquaculture*, 2005, 250(3/4): 726–735.
- [27] WANG R, GUEGLER K, LABRIE S T, CRAWFORD N M. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(8): 1491–1509.
- [28] SIVASANKAR S, ROTHSTEIN S, OAKS A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings[J]. *Plant Physiology*, 1997, 114(2): 583–589.
- [29] CHEN B M, WANG Z H, LI S X, WANG G X. Effect of nitrate

- supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables[J]. Plant Science, 2004, 167(3): 635-643.
- [30] 曹云,范晓荣,孙淑斌,徐国华,沈其荣,狄廷君. 增硝营养对不同基因型水稻苗期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.
- CAO Yun, FAN Xiaorong, SUN Shubin, XU Guohua, SHEN Qirong, DI Tingjun. Effect of partial replacement of NH_4^+ by NO_3^- on nitrate reductase activity and their genetic expression patterns in rice[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2007, 13(1): 99-105.
- [31] LOPPE R, RADOUX M, OHRESSER M C P, MATAGNE R F. Transcriptional regulation of the NIA1 gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nia1 promoter[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 41(5): 701-711.
- [32] WILKINSON J Q, CRAWFORD N M. Identification and characterization of a chlorate resistant mutant of *Arabidopsis* with mutations in both Nia1 and Nia2 nitrate reductase structural genes[J]. Molecular & General Genetics Mgg, 1993, 239(1/2): 289-297.

·书 讯·

推介几本草莓研究论著

《草莓研究进展》(第五集)(张运涛,雷家军,王桂霞主编,中国农业出版社,2017年1月出版,单价200元)。这本文集共计106万余字,内容包括特邀报告(英汉对照)、资源与育种、生物技术、栽培生理、生产技术、宏观评述及国外最新研究动态等,内容丰富新颖,对高校、科研单位和技术部门的专业技术人员有重要参考价值。

第七届世界草莓大会译文集-11

《草莓的基本原理——生态与栽培技术》(张运涛,李新贤,雷家军等译校,中国农业出版社,2016年12月出版,单价100元)是由日本著名草莓专家森下昌三博士编著,本书共9章,23万余字,除介绍草莓的基本知识之外,还详细论述了日本草莓的育种历史和最新成就,介绍了日本促成栽培的关键技术及夏秋栽培品种的特性和栽培要点。森下昌三博士从事草莓研究30余年,在草莓育种和栽培方面颇有建树,这是一本很有价值的专著。

第七届世界草莓大会译文集-12

《草莓——历史,育种与生理》(张运涛,雷家军,常琳琳主译,中国农业出版社,2017年1月出版,单价200元)是由已故世界著名草莓专家乔治·达柔教授主编的草莓专著,本书

共计23章,47余万字,详细论述了凤梨草莓诞生的历史、草莓与宗教的关系,重点介绍了英国、美国、法国和德国等西方国家草莓育种的历史和成就。书中还配有大量彩图,这是一本草莓世界领域的经典著作。

第七届世界草莓大会系列译文集-13

《现代草莓生产技术》(张运涛,雷家军,钟传飞等主译,中国农业出版社,2017年1月出版,单价180元)是由美国佛罗里达大学诺尔曼·奇尔德斯教授组织48位草莓专家和生产者编写而成,全书53万字,共分八部分,第一部分介绍了美国草莓发展历史和草莓的基础知识;第二部分论述了草莓高垄地膜覆盖栽培的关键技术;第三部分介绍了草莓病、虫、草防控技术;第四部分和第五部分分别介绍了露地多年栽培和保护地草莓栽培技术;第六部分和第七部分分别论述了草莓采收和加工技术,自采果园的销售策略;第八部分介绍了墨西哥、南非、西班牙和地中海流域各国草莓的生产概况。

以上书目价格包含邮费,另每包加3元挂号费。邮购时请在备注栏标明书名。请注明联系电话以便核实! 邮购地址:河南省郑州市未来路南端中国农业科学院郑州果树研究所;收款人:杂志社,电话:0371-65330982。