果 树 学 报 2020,37(11):1676-1686
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20200327

‘砀山酥梨’黄化叶复绿过程中铁和氮的增益作用

贾 兵,郭国凌,余 桃,王友煜,叶振风,刘 莉,刘 普,衡 伟*

(安徽农业大学园艺学院,合肥 230036)

摘 要:【目的】探讨梨黄化叶片复绿过程中铁氮协同机制。**【方法】**以‘砀山酥梨’为试材,生长期喷施$FeSO_4$溶液,测定叶片总Chl、总Fe、Fe^{2+}和N含量,分析Fe、N代谢相关基因的表达量和N代谢相关酶活性。**【结果】**0.20% $FeSO_4$处理复绿最明显,但叶色仍不如正常叶片浓绿。复绿叶片中总Chl、总Fe、Fe^{2+}和N含量显著高于黄化叶片。0.20% $FeSO_4$处理复绿叶类囊体片层结构清晰,与正常叶片相比,仍有断裂片层。$FeSO_4$处理黄化叶片8 d和12 d,*FER1*、*FER2*、*FER3*、*FER4*、*FD1*和*FD2*相对表达量显著高于黄化叶片。0.10%、0.15%和、0.20% $FeSO_4$处理后4 d和8 d,*IRT*相对表达量显著高于黄化叶片。$FeSO_4$处理显著提高了黄化叶片中*NR*、*NiR*、*GLIE*和*NADH-GOGAT*相对表达量及其酶活性。**【结论】**外源$FeSO_4$促进了黄化叶片中铁的贮藏、还原与转运,也促进了氮的代谢。

关键词:‘砀山酥梨’;复绿;铁;氮;增益作用

中图分类号:S661.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2020)11-1676-11

Reinforced effect of iron and nitrogen in the process of chlorotic leaves re-greening of ‘Dangshansuli’ pear

JIA Bing, GUO Guoling, YU Tao, WANG Youyu, YE Zhenfeng, LIU Li, LIU Pu, HENG Wei*

(*School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China*)

Abstract:【Objective】China has the largest pear cultivation area in the world. In 2017, the total cultivated area was about 960 000 hm^2, and the total output was about 16.53 million tons, accounting for 69.1% and 68.4% of the total cultivated area and total output of the world, respectively. ‘Dangshansuli’ pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) is the largest cultivated variety of pear tree in China, and it was extensively cultivated in the largest region of continuous cultivation, The Old Yellow River Course Region, in Anhui province. In recent years, the phenomenon of iron-deficiency chlorosis in the local areas was carried out.【Methods】The chlorotic and normal sample trees of ‘Dangshansuli’ pear were used for the experiment in the Horticulture Farm of Dangshan County, Anhui province in May 2020, and the following treatments were carried out by using a powered backpack sprayer during the growth period with one non-sprayed tree left as a buffer between the treated trees: (1) CK, normal leaf (N) and chlorotic leaf (C) treated with distilled water; (2) T1, 0.05% $FeSO_4$ solution; (3) T2, 0.10% $FeSO_4$ solution; (4) T3, 0.15% $FeSO_4$ solution; (5) T4, 0.20% $FeSO_4$ solution. Three replicate experiments were adopted for each treatment, and each single experimental unit consisted of three replicate treestrees. All trees were relatively consistent in tree shape and vigor, spaced at 4 m×6 m, with seamless crops between the rows, training with the open center system, and the orchard was managed as usual. The retrieved green status was observed on the 4th, 8th and 12th day after treatments, the leaf samples were taken back to the laboratory and quickly frozen in liquid nitrogen and stored in the refrigerator at −80 ℃ for further analysis. The content of total Chlorophyll in the leaf was determined by 80% acetone extraction; the contents of total Fe and Fe^{2+} were respectively measured by the inductively coupled plasma-atomic emission spec-

收稿日期:2020-08-14 接受日期:2020-10-15

基金项目:梨树和桃树化肥减施增效关键技术与产品研发(2018YFD0201401);国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-28-14)

作者简介:贾兵,男,副教授,在读博士研究生,研究方向为果树栽培生理。Tel:0551-65786607, E-mail:jb1977@ahau.edu.cn

*通信作者 Author for correspondence. Tel:15856949929, E-mail:hengwei@ahau.edu.cn

tometry (ICP-AES) and the phenanthroline colorimetric method; the content of N was determined by micro-kjeldahl method; the chloroplast ultra structure was observed under electron microscope; the total RNA of leaf samples was extracted by the RNAprep Pure Plant Plus Kit (TIANGEN Biochemical Technology Co. Ltd., Beijing, P.R. of China), the cDNA was synthesized using a fluorescence reverse transcription kit (TaKaRa Biotechnology Co. Ltd., Dalian, P.R. of China) and the related genes expression of Fe and N metabolism was analyzed by qRT-PCR conducted on an AB StepOne RT-PCR cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); and the related enzymes activity of N metabolism was detected by the ultraviolet spectrophotometry colorimetry.【Results】The more retrieved green spots was formed with 0.05% and 0.10% $FeSO_4$, and the more retrieved green patches formed with 0.15% and 0.20% $FeSO_4$ on the 12th day, and the retrieved green effect of the 0.20% $FeSO_4$ was the most obvious, but the leave color was not as deeply green as the normal leaves. Compared to chlorotic leaves, $FeSO_4$ treatment significantly increased the contents of total Chl, total Fe, Fe^{2+} and N in retrieved green leaves, but the contents of total Chl and N were still significantly lower than those in normal leavesleaves. On the 12th day after treatment with 0.20% $FeSO_4$, the grana lamellae of thylakoid in the leaf were clearer than those of chlorotic leaves, but compared with the normal leaves there were still broken grana lamellae, the chlorotics leaves treated with $FeSO_4$ solution could recover green color to a certain extent, but not completely. The relative expression of *FER1*, *FER2*, *FER3* and *FER4* on the 8th and 12th day after $FeSO_4$ treatment was not only significantly higher than that in the chlorotic leaves, but also significantly higher than that in the normal leaves; the relative expression of *FD1* and *FD2* was also significantly higher than that in the chlorotic leaves. On the 4th and 8th day, the relative expression of *IRT* treated with 0.10%, 0.15% and 0.20% $FeSO_4$ was significantly higher than that in the chlorotic leaves. The relative expression of *NR*, *NIR*, *GLIE* and *NADH-GOGAT* genes with $FeSO_4$ treatment increased significantly than that with chlorotic leaves, and the relative enzymes activities were also significantly higher.【Conclusion】Therefore, the chlorotic leaves showed a certain degree of retrieved green color, but still could not completely retrieve green color after application of $FeSO_4$ in different concentrations. The exogenous $FeSO_4$ not only promoted the storage, reduction and transport of iron in chlorotic leaves, but also promoted the reduction of nitric acid and nitrite, to synthesize the glutamic acid and glutamine. The results revealed that iron and nitrogen had a certain synergistic effect in retrieved green process of the chlorotic leaves in ‘Dangshansuli’ pear.

Key words: ‘Dangshansuli’ pear; Retrieved green; Iron; Nitrogen; Reinforced effect

我国是世界上梨栽培面积最大的国家，2017年，我国梨树栽培总面积约96万hm^2，总产量约1 653万t，分别占世界总面积和总产量的69.1%和68.4%[1]。‘砀山酥梨’具有抗逆性强、产量高、耐粗放管理等优点，成为我国栽培面积最大的梨品种。黄河故道地区是我国梨主产区之一，其主栽品种‘砀山酥梨’缺铁黄化现象严重，制约着当地梨产业的进一步发展。

铁是植物生长发育过程中必需的微量元素，参与包括光合作用在内的许多新陈代谢反应，作为决定细胞色素结构-卟啉环合成途径中多种酶活性的主要影响因素，在呼吸和光合作用这两个细胞能量的主要来源过程中起着重要作用，影响着氮代谢、有机酸代谢、碳水化合物代谢及原生质性状等许多生理过程[2]。缺铁会导致光合电子传递受阻，光合作用以及叶绿体合成受阻，造成幼叶表现出典型的缺铁失绿症[3]。铁不是叶绿素的组成成分，但在其前体物质的合成以及功能完善中发挥着重要作用[4]。植物细胞内的铁多数均匀分布在类囊体膜上，并与叶绿素的含量具有很好的相关性，因此，植物缺铁时，类囊体易解体，叶绿素含量降低[5-6]。

氮是叶绿素的组成成分，缺氮会导致叶片快速衰老[7-8]，NO_3^-在被根系吸收以后，大部分通过蒸腾作用产生的蒸腾拉力被转运到叶片叶肉细胞中，在硝

酸还原酶的作用下被还原为NO_2^-，并进一步在亚硝酸还原酶的作用下被还原为NH_4^+，之后进入叶绿体，在谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶的作用下，NH_4^+被进一步同化为谷氨酰胺和谷氨酸[9-13]。

对‘南丰蜜橘’缺Fe、Mn和Zn处理后，除显著降低植株各部位Fe、Mn和Zn含量，对其他矿质元素的含量也有不同程度的影响[14]。‘砀山酥梨’不同黄化程度叶片中矿质元素的测定结果表明，缺铁黄化叶片中不仅Fe含量显著低于正常叶片，其N、P、K等元素含量也显著低于正常叶片[15]。外源Fe处理黄化叶片复绿过程中，叶绿素含量增加，N是叶绿素组成成分，理论上也应增加，Fe与N可能存在着协同作用。试验以‘砀山酥梨’叶片为试材，测定了正常叶片、黄化叶片及外源Fe处理黄化叶片中Fe、N含量，通过荧光定量PCR技术，分析了Fe、N代谢相关基因的表达量及N代谢相关酶活性，拟揭示‘砀山酥梨’黄化叶复绿过程中铁氮的协同作用的机理。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本试验于2020年5月，在安徽省砀山县园艺场进行，试验以正常、黄化‘砀山酥梨’(*Pyrus bretschneideri* Rehd.)梨树为材料，于其生长期（花后35 d）叶面喷施不同浓度的$FeSO_4$溶液。试验设4个处理T1（0.05% $FeSO_4$）、T2（0.10% $FeSO_4$）、T3（0.15% $FeSO_4$）和T4（0.20% $FeSO_4$），对照组为喷施清水的正常梨树叶片N（Normal）和喷施清水的黄化梨树叶片C（Chlorosis），单次试验处理为3株梨树，3次重复。分别于处理后4 d、8 d和12 d采取叶片样品，保存于−80℃中备用。

1.2 试验方法

1.2.1 *叶绿素含量的测定* 叶绿素含量的测定采用80%的丙酮浸提法。于663 nm及645 nm波长下，用752型分光光度计测定光密度值，计算叶绿素a（Chlorophyll a，Chla）和叶绿素b（Chlorophyll b，Chlb）的含量，其中Chla+Chlb为总叶绿素含量。

1.2.2 *叶绿体显微结构观察* 叶片样品放置于2.5%戊二醛溶液中，用真空泵抽气，以叶片刚沉落瓶底为宜，4 ℃下固定24 h；用0.1 mol·L^{-1} pH=7.0的磷酸缓冲液漂洗3次，每次15 min，1%锇酸固定1~2 h；用0.1 mol·L^{-1} pH=7.0的磷酸缓冲液漂洗3次，每次15 min，分别用50%、70%、90%和100%的乙醇进行逐级脱水；脱水后用Epon 812环氧树脂包埋；用LKB NOVE超薄切片机切片，厚度为70~90 nm；再用醋酸双氧铀-柠檬酸铅对超薄切片进行染色；最后在JEM-1230型透射电镜下观察并拍照[16]。

1.2.3 *矿质元素的测定* 测定叶片矿质元素含量前，以0.1%十二烷基磺酸钠溶液洗涤叶片，然后用自来水冲洗干净，再用无离子水冲洗3次[17]。叶片中总Fe含量的测定采用电感耦合等离子体原子发射光谱法[18]，Fe^{2+}含量的测定采用稀盐酸浸提法以及邻菲罗啉比色法[17,19]；N含量的测定采用凯氏定氮法（参照中华人民共和国林业行业标准，LY/T 1228−2005）；每处理30枚叶片，采用混样处理，设3次重复。

1.2.4 *酶活性的测定* 硝酸还原酶活性的测定参照高俊山等[20]的方法；亚硝酸盐还原酶活性的测定参照樊超等[21]方法；谷氨酸合酶活性的测定参照王新超等[22]的方法；谷氨酰胺合成酶活性的测定参照陈煜等[23]的方法。

1.2.5 *总RNA的提取及cDNA合成* RNA提取使用StarSpin Plant RNA Mini Kit试剂盒（Genstar，北京），cDNA合成采用M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit试剂盒（TaKaRa，大连）。

1.2.6 *实时荧光定量PCR* 从梨基因组数据库中以及NCBI查询获得Fe代谢及N代谢转导相关基因的全长序列，并根据获得的序列使用Premier 5.0软件设计实时荧光定量PCR引物（表1），内参为梨GAPDH基因。基因的表达量采用相对定量的方法，即$2^{-\Delta\Delta CT}$法[24]。

1.2.7 *数据分析* 数据运用单因素方差分析（ANOVA）的方法，以Duncan多重极差法进行各处理的平均值检验，并以Excel 2019、GraphPad Prism 8和SPSS 23软件（SPSS Inc.，Chicago，IL，USA）在$p \leqslant 0.05$的水平上计算最小显著性差异（LSD）值，分析各处理间的差异显著性。

2 结果与分析

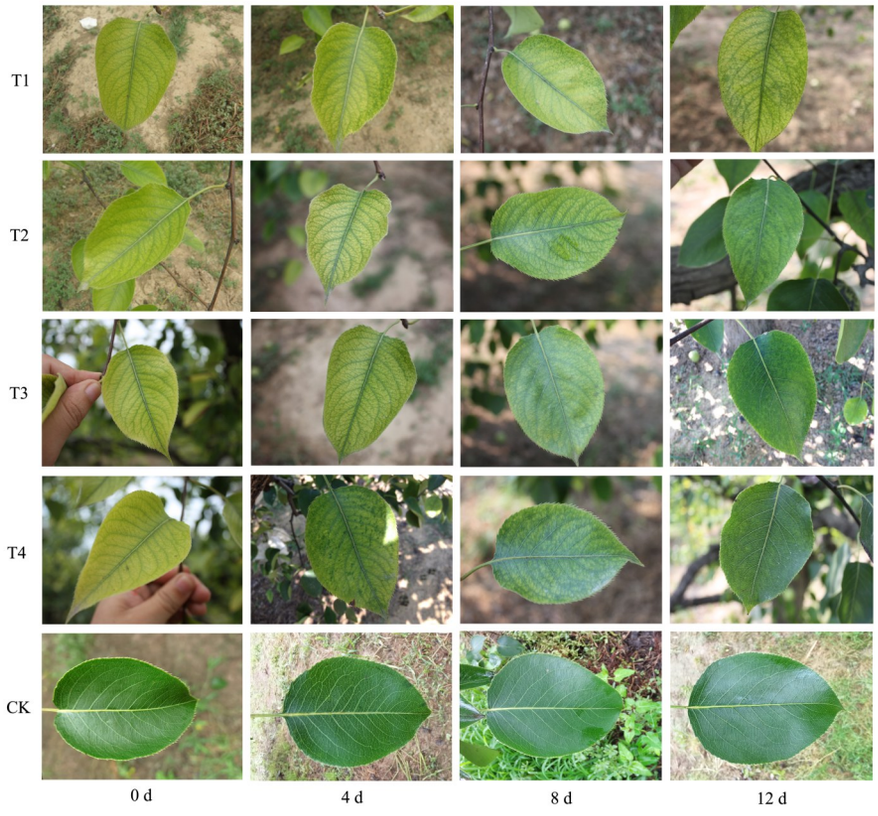
2.1 $FeSO_4$处理对黄化叶片复绿的效应

‘砀山酥梨’黄化植株喷施不同浓度的$FeSO_4$溶液，叶片复绿情况如图1所示，处理后4 d，0.20% $FeSO_4$处理复绿明显，脉间出现不均一复绿斑点，其他处理复绿不明显；处理后8 d，所有处理均出现不同程度的复绿，其中0.15% $FeSO_4$、0.20% $FeSO_4$处理

表 1　实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1　The primers for qRT-PCR

引物名称 Premier name	引物序列 Primers sequence（5′→3′）	引物名称 Premier name	引物序列 Primers sequence（5′→3′）
Fer1 F	CGTTGACCGGAGTCGTGTTCCAG	*FD3 F*	AGTATACAAGGTTAAACTGATT
Fer1 R	CATGTTCTCTTTCTTCCTCGCTTG	*FD3 R*	CGAGACACAAGTCAGCACAT
Fer2 F	GAGCAGGTGGAAGCAATCAAG	*IRT F*	CATGCACGTTTTGCCTGATT
Fer2 R	ACGCACCAGACAACATAACA	*IRT R*	TCCAGGGCTGGATTATCACC
Fer3 F	GATCACCCTCCTCCGCTCTGAGCTTCA	*NR F*	CCCAATTTACCAAGTGGCTCA
Fer3 R	TTATGGCGGCTTCGGGCTCG	*NR R*	CTCAGCACACTCTCCGTGATGAA
Fer4 F	TTATGGCGGCTTCGGGCTCG	*NiR F*	TCTGCAGAGTGGCATGGAC
Fer4 R	CCTAAACAGCTACAATCAG	*NiR R*	GTAAGCAAGATCGTTGATG
FD1 F	CCTGAGGACGTATACATTCTCGA	*GS F*	GTTCTGTCATTTGATCCCAAG
FD1 R	AGGTCAGCACAAATCCACCG	*GS R*	GAATGTGTTGATATCAGCTG
FD2 F	AGCAGATTGATGGTGGATTCGT	*GOGAT F*	GACCTGGTCGATTTTACGTCAC
FD2 R	CAACCTTATCCTGGAACAAACTAAA	*GOGAT R*	ACAATGTCCTTGAGCTCAATCT



T1. 0.05% $FeSO_4$; T2. 0.10% $FeSO_4$; T3. 0.15% $FeSO_4$; T4. 0.20% $FeSO_4$.

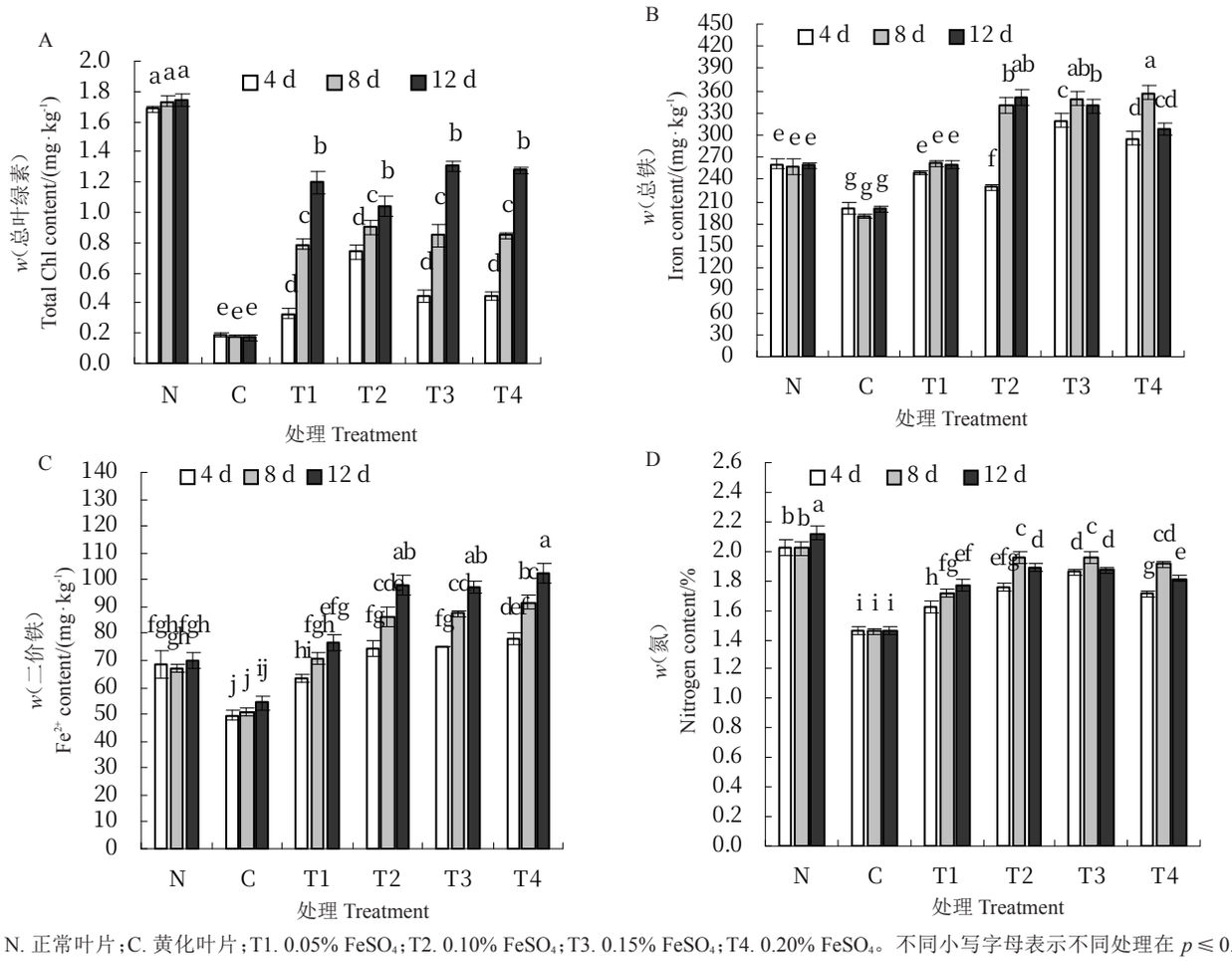
图 1　‘砀山酥梨’喷施 $FeSO_4$ 后黄化叶片的复绿情况

Fig. 1　Regreening performance of the chlorotic leaves treated by $FeSO_4$ solutions on ‘Dangshansuli’ pear

复绿斑点多，多处形成了复绿斑块；处理后 12 d，0.05% $FeSO_4$ 和 0.10% $FeSO_4$ 处理形成较多复绿斑点，0.15% $FeSO_4$ 和 0.20% $FeSO_4$ 处理形成复绿斑块，其中，0.20% $FeSO_4$ 黄化叶片复绿最明显，叶片大面积复绿，但叶身留有少量没有复绿的不规则黄色斑块，与正常叶片相比，叶色不够浓绿。

2.2　$FeSO_4$ 对黄化叶 Chl、Fe 和 N 含量的影响

‘砀山酥梨’叶片中 Chl、Fe、N 含量的测定结果如图 2 所示，清水处理黄化叶片中的总 Chl 含量显著低于清水处理正常叶片，不同浓度 $FeSO_4$ 处理，黄化叶片中总 Chl 含量均显著高于清水处理的黄化叶片，且处理后 4 d、8 d、12 d，总 Chl 含量逐渐升高，但



N. 正常叶片；C. 黄化叶片；T1. 0.05% $FeSO_4$；T2. 0.10% $FeSO_4$；T3. 0.15% $FeSO_4$；T4. 0.20% $FeSO_4$。不同小写字母表示不同处理在 $p \leqslant 0.05$ 水平的差异显著。下同。

N. Normal leaves; C. Chlorotic leaves; T1. 0.05% $FeSO_4$; T2. 0.10% $FeSO_4$; T3. 0.15% $FeSO_4$; T4. 0.20% $FeSO_4$. Different lowercases letters indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

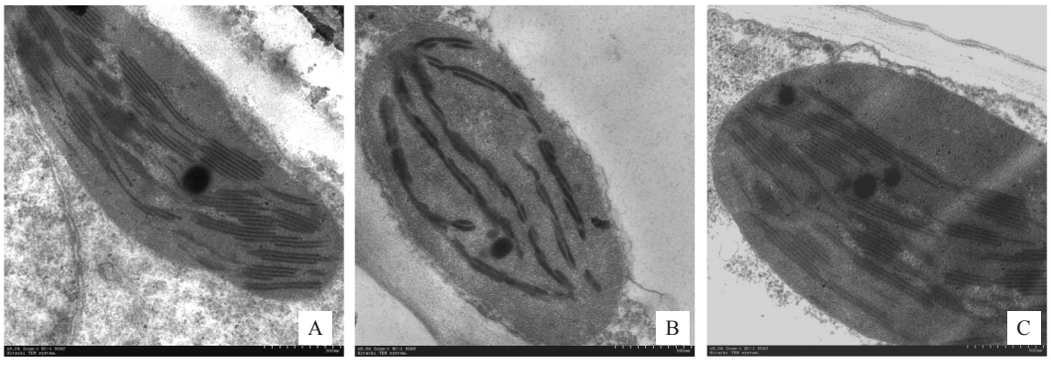
图 2 $FeSO_4$处理对叶片中叶绿素、铁和氮含量的影响

Fig. 2 The chlorophyll, iron and nitrogen content in leaf with the $FeSO_4$ solutions treatment

仍显著低于正常叶片中总Chl含量(图2-A)。清水处理黄化叶片中总Fe含量显著低于正常叶片，不同浓度$FeSO_4$处理，黄化叶片中总Fe含量均显著高于清水处理的黄化叶片。其中0.15% $FeSO_4$和0.20% $FeSO_4$处理各时期黄化叶片中Fe含量不仅显著高于清水处理黄化叶片，还显著高于正常叶片(图2-B)；清水处理黄化叶片中Fe^{2+}含量显著低于正常叶片，除0.05% $FeSO_4$处理外，其他处理黄化叶片中Fe^{2+}含量均显著高于清水处理的黄化叶片，且处理后4 d、8 d和12 d，Fe^{2+}含量逐渐升高，其中0.10% $FeSO_4$、0.15% $FeSO_4$和0.20% $FeSO_4$处理，8 d、12 d黄化叶片中Fe含量不仅显著高于清水处理黄化叶片，还显著高于正常叶片(图2-C)；清水处理黄化叶片中的N含量显著低于正常叶片，不同浓度$FeSO_4$处理，黄化叶片中的N含量均显著高于清水处理黄化叶片，但仍然显著低于正常叶片(图2-D)。因此，叶面喷施$FeSO_4$显著提高了黄化叶片中总Fe、Fe^{2+}、总Chl和N含量，其中0.10% $FeSO_4$、0.15% $FeSO_4$和0.20% $FeSO_4$处理，第8天和第12天黄化叶片中总Fe和Fe^{2+}含量还显著高于正常叶片，但总Chl和N含量仍未达到正常叶片水平。

2.3 $FeSO_4$处理对叶绿体超微结构的影响

叶片的电镜显微观察结果表明(图3)，正常叶片叶肉细胞叶绿体中，类囊体基粒呈片层状有序地排列，结构清晰可见(图3-A)，黄化叶片叶肉细胞类囊体基粒片层结构解体，呈片断状，模糊不清(图3-B)，0.20% $FeSO_4$处理后12 d的复绿叶片类囊体基粒片层结构较黄化叶片排列有序，断裂的片层明显少，较清晰(图3-C)，但与正常叶片相比，仍有断裂片层，片层结构不如正常叶片清晰。



A. 正常叶片中叶绿体片层结构电镜图；B. 黄化叶片中叶绿体片层结构电镜图；C. 0.20% $FeSO_4$ 处理后 12 d 叶片叶绿体片层结构电镜图。

A. The grana lamellae ultrastructure of chloroplast in normal leaves; B. The grana lamellae ultrastructure of chloroplast in chlorotic leaves leaf; C. The grana lamellae ultrastructure of chloroplast in chlorotic leaves treated with 0.20% $FeSO_4$ after 12 d.

图 3　$FeSO_4$ 处理对叶绿体超微结构的影响

Fig. 3　Effect of the $FeSO_4$ treatment on chloroplast ultrastructure

如上所述，不同外源 $FeSO_4$ 处理，黄化叶复绿效果观察表明，0.20% $FeSO_4$ 黄化叶片复绿最明显，但叶身仍留有少量没有复绿的不规则黄色斑块，与正常叶片相比，叶色不够浓绿；复绿叶中总 Chl 和 N 含量测定结果表明，尽管总 Chl 和 N 含量显著高于黄化叶片对照，但与仍显著低于正常叶片中总 Chl 和 N 含量。超微结构观察表明，0.20% $FeSO_4$ 处理能使黄化叶片叶绿体中类囊体部分基粒断裂片层重新连接，片层结构变得较清晰，但仍达不到正常叶片的清晰程度，说明不同浓度的 $FeSO_4$ 处理，黄化叶能呈现一定程度的复绿，但仍不能完全复绿。

2.4　$FeSO_4$ 对铁代谢相关基因表达的影响

外源 $FeSO_4$ 对‘砀山酥梨’叶片中 Fe 代谢相关基因的表达量的影响如图 4 所示，清水处理黄化叶片中铁贮藏蛋白基因 *FER2* 和 *FER4* 相对表达量显著低于正常叶片，*FER1* 和 *FER3* 相对表达量与正常叶片之间无显著性差异。外源 $FeSO_4$ 处理黄化叶片后 8 d 和 12 d 时，*FER1*、*FER2*、*FER3*、*FER4* 相对表达量不仅显著高于清水处理黄化叶片，还显著高于正常叶片（图 4-A~D）。因此，$FeSO_4$ 能诱导黄化叶片内铁贮藏蛋白基因 *FER1*、*FER2*、*FER3* 和 *FER4* 的表达。

清水处理黄化叶片中铁氧还蛋白基因 *FD1*、*FD2* 和 *FD3* 相对表达量显著低于正常叶片，外源 $FeSO_4$ 处理黄化叶片 8 d 和 12 d，*FD1* 和 *FD2* 相对表达量显著高于清水处理黄化叶片，除 0.05% $FeSO_4$ 处理外，*FD3* 相对表达量在 4 d 时显著高于清水处理黄化叶片（图 4-E~G）。因此，外源 $FeSO_4$ 能诱导 *FD1* 和 *FD2* 的表达，促进叶片内铁的还原。

清水处理黄化叶片中铁转运蛋白基因 *IRT* 相对表达量与正常叶无显著差异，0.10% $FeSO_4$、0.15% $FeSO_4$ 和 0.20% $FeSO_4$ 处理 *IRT* 相对表达量在 4 d 时迅速上升，后逐渐下降，且 4 d 和 8 d 时，其相对表达量显著高于清水处理黄化叶片（图 4-H）。因此，高浓度的外源 $FeSO_4$ 能迅速诱导 *IRT* 的表达，从而促进叶片内铁的转运。

2.5　$FeSO_4$ 对氮代谢相关基因表达及酶活性的影响

外源 $FeSO_4$ 对‘砀山酥梨’叶片中 N 代谢相关基因的表达量的影响如图 5 所示，黄化叶片中 *NiR*、*GLIE* 和 *NADH-GOGAT* 基因相对表达量均显著低于正常叶片（图 5-B~D），*NR* 基因相对表达量较正常叶片无明显差异（图 5-A）。外源 $FeSO_4$ 处理黄化叶片中 *NR*、*NiR*、*GLIE* 和 *NADH-GOGAT* 基因相对表达量均显著增加（图 5-A~D）。除 0.05% $FeSO_4$ 处理外，8 d、12 d 的 *NR*、*NiR* 基因相对表达量不仅显著高于清水处理的黄化叶片，还显著高于正常叶片（图 5-A~B）。

外源 $FeSO_4$ 对‘砀山酥梨’叶片中 N 代谢相关酶活性的影响如图 6 所示，黄化叶片中 NR、NiR、GS 和 GOGAT 活性均显著低于正常叶片，外源 $FeSO_4$ 处理后，黄化叶片中 NR、NiR、GS 和 GOGAT 活性均显著高于清水处理的黄化叶片，其中，外源 $FeSO_4$ 处理后，黄化叶片中 NR、GOGAT 活性是清水处理黄化叶片的 2 倍以上（图 6-A~D）。

因此，外源 $FeSO_4$ 提高了黄化叶片 N 代谢途径中 *NR*、*NiR*、*GS* 和 *GOGAT* 基因的表达量和相关酶的活性，促进了叶片中硝酸、亚硝酸的还原，最终转化

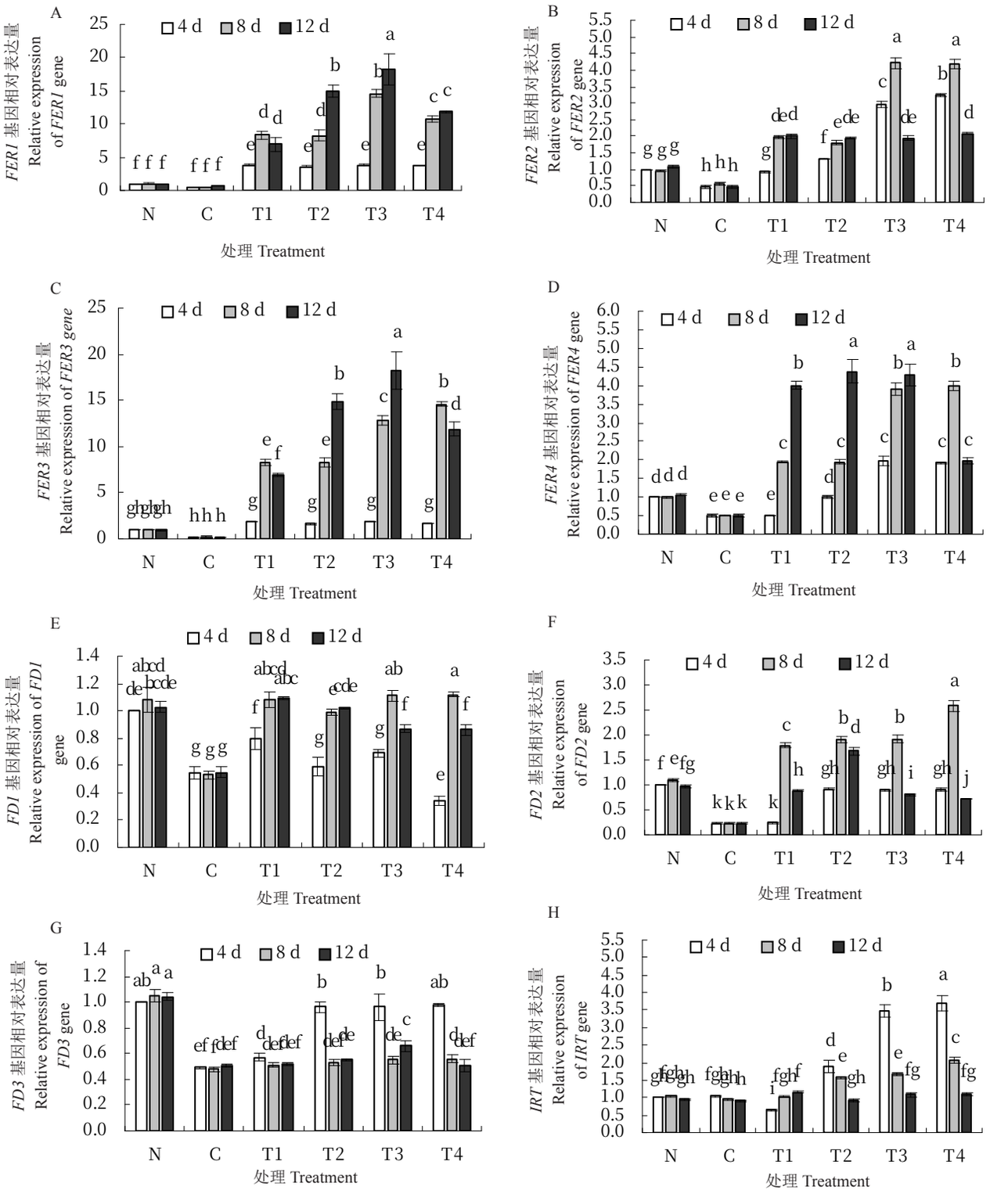


图 4 $FeSO_4$处理对铁代谢相关基因表达的影响

Fig. 4 Effects of the $FeSO_4$ treatment on the expression of the genes related to iron metabolism

为谷氨酸，进入氨基酸合成途径。

3 讨 论

果树在养分亏缺时，体内会调控各种离子之间的平衡关系，微量元素如锌、铜、镁、铁等的缺乏能引起对其他元素和水分吸收的效率降低[25]。‘南丰蜜橘’微量元素缺乏时，会引起其他矿质元素含量的变化，维持矿质元素之间的平衡关系[14]。‘砀山酥梨’缺

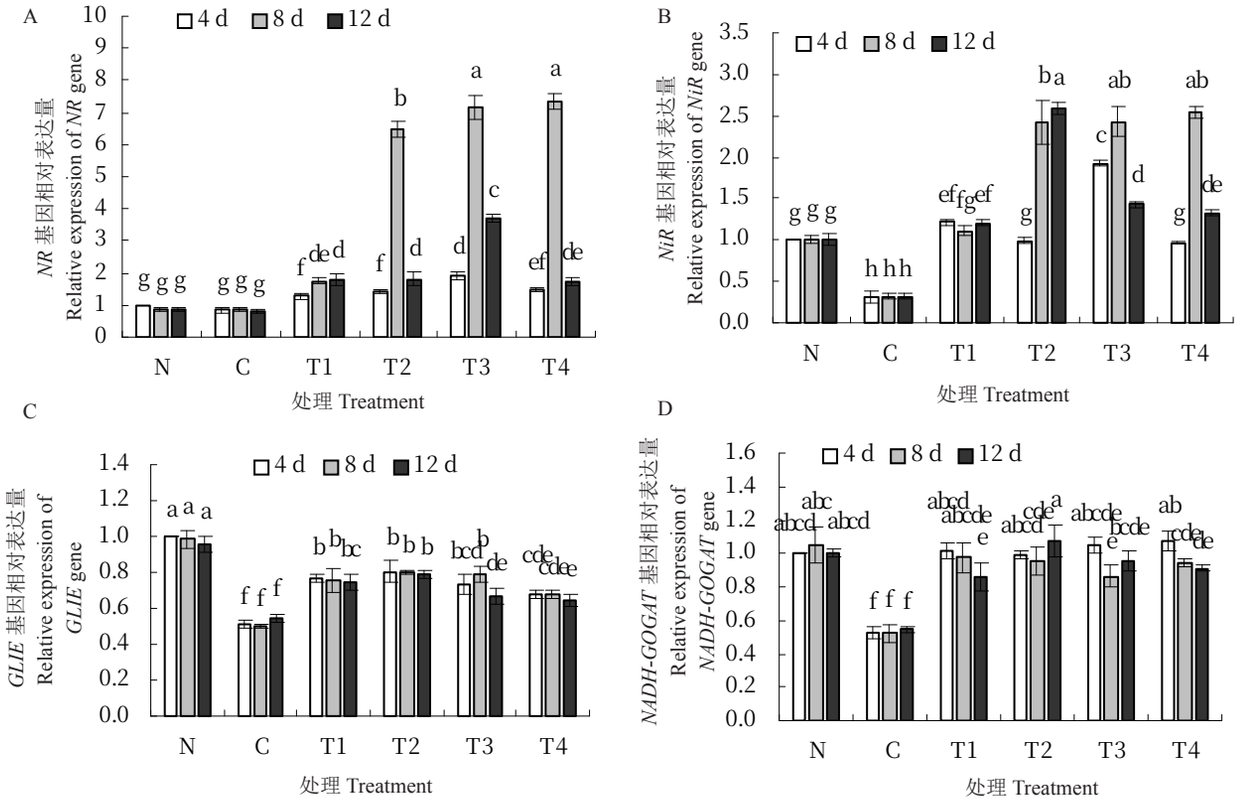


图 5　$FeSO_4$ 处理对氮代谢相关基因表达的影响

Fig. 5　Effects of the $FeSO_4$ treatment on the expression of the genes related to nitrogen metabolism

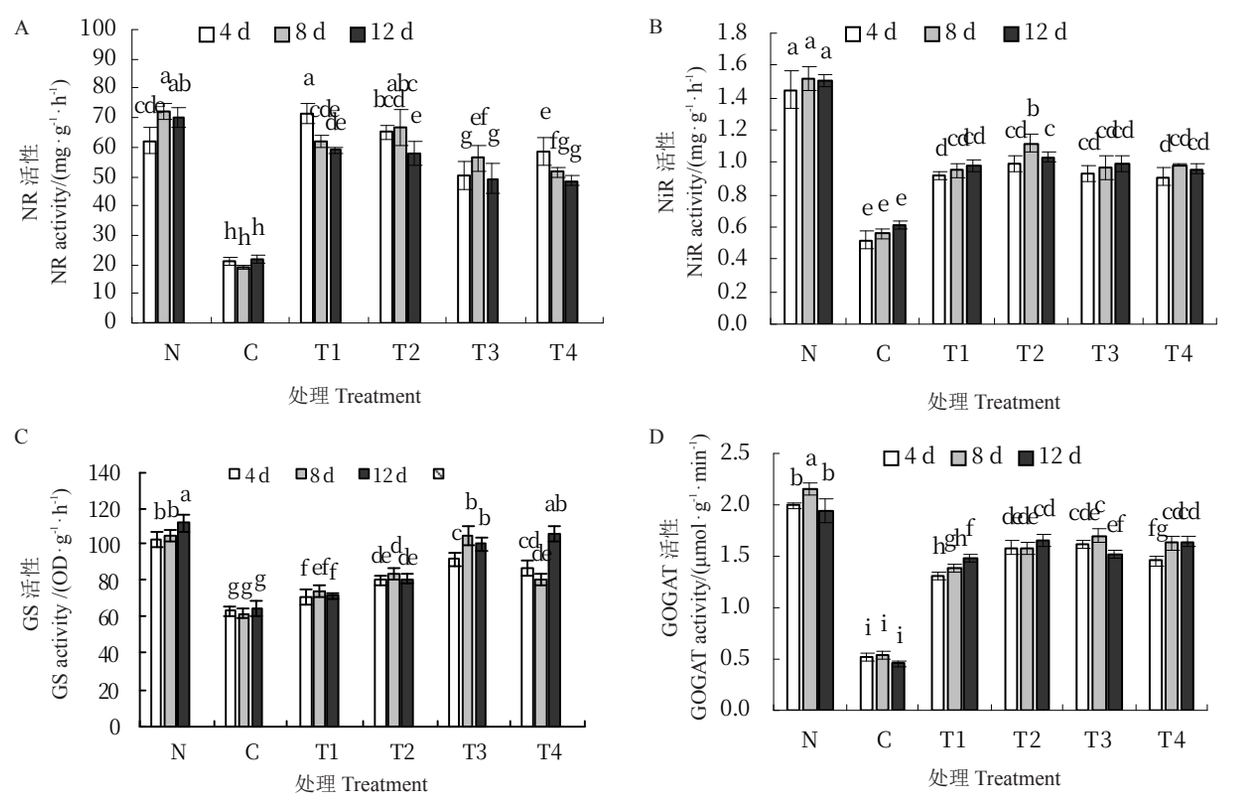


图 6　$FeSO_4$ 处理对氮代谢相关酶活性的影响

Fig. 6　Effects of the $FeSO_4$ treatment on the expression of enzyme activity related to nitrogen metabolism

铁黄化叶片中，不仅Fe含量显著低于正常叶片，其N、P、K等元素含量也显著低于正常叶片[15]。本试验中，‘砀山酥梨’黄化叶片中不仅Fe含量显著低于正常叶片，其N含量也显著低于正常叶片。外源$FeSO_4$处理一定时间后，黄化叶片均能出现复绿斑点或形成复绿斑块，黄化症状得到明显缓解，且黄化叶片复绿后，不仅Fe含量显著高于清水处理的黄化叶片，N含量也均显著高于清水处理的黄化叶片，说明外源Fe处理不仅能促进了黄化叶片对Fe的吸收，也促进了对N的吸收。

有研究表明一定浓度的Mn^{2+}和Zn^{2+}可以诱导柑橘 *FRO2*、*IRT1* 和 *NRAMP3* 等铁代谢相关基因的表达[26]。本试验中，外源$FeSO_4$处理黄化叶片后8 d和12 d时，*FER1*、*FER2*、*FER3* 和 *FER4* 相对表达量不仅显著高于黄化叶片，还显著高于正常叶片；外源$FeSO_4$处理黄化叶片8 d和12 d时，*FD1* 和 *FD2* 相对表达量也显著高于黄化叶片，除0.05% $FeSO_4$处理外，*FD3* 相对表达量在4 d时显著高于黄化叶片；0.10% $FeSO_4$、0.15% $FeSO_4$和0.20% $FeSO_4$处理 *IRT* 相对表达量在4 d时迅速上升，后逐渐下降，且在4 d和8 d时，其相对表达量显著高于清水处理黄化叶片。因此，一定浓度的外源$FeSO_4$能促进黄化叶片内铁的贮藏、还原与转运。

姚宇洁等[27]研究表明，缺Fe不仅显著降低了枳和枳橙两种柑橘砧木叶片中叶绿素的含量，同时也改变了其叶绿体的超微结构，片层结构模糊，叶绿体数增加，叶绿体长度、厚度与对照相比均显著降低。叶绿体是叶绿素合成所需的众多酶体蛋白质前体的修饰场所，叶绿素合成酶蛋白质前体N末端的一段转运肽，都必须跨越叶绿体的双层膜而被转运到叶绿体内进行加工、切除，从而形成成熟的酶蛋白质，参与调控叶绿素的合成[28]。本试验中，外源$FeSO_4$处理能使‘砀山酥梨’黄化叶片复绿，叶片的电镜显微观察也表明，0.20% $FeSO_4$处理使叶绿体中类囊体部分基粒断裂片层重新连接，片层结构变得较清晰，但仍达不到正常叶片的清晰程度，而随着$FeSO_4$浓度的增加，其黄化叶复绿效果不佳，部分黄化叶出现黑斑，甚至落叶（文中未展示），因此，缺铁黄化叶的最佳复绿浓度为0.20%左右，这也为实际生产上的梨树缺铁黄化矫正提供了科学依据。另一方面，复绿叶总Chl和N含量显著高于清水处理的黄化叶片，但仍显著低于清水处理正常叶片。说明不同浓度的$FeSO_4$处理，虽然会造成黄化叶片出现复绿，但受限于受损的叶绿体结构以及显著低于正常的总Chl和N含量，其叶绿素合成显著低于正常叶，造成其叶色较正常叶而言，仍不够浓绿。

缺铁胁迫会引起氮代谢所需的碳水化合物骨架明显减少，氨基酸等合成受到影响，并抑制NR的活性[29]。玉米缺铁时，体内NR活性也降低[30]。马宗桓等[31]研究发现，氮素通过诱导叶片 *GS* 和 *GOGAT* 基因的表达，从而调控氮代谢相关酶活性。冯卓等[32]发现，在低氮条件下，黄瓜 *GS* 基因表达量低，随着氮素的增加，*GS* 基因表达量增加。张翼飞[33]在甜菜上的研究表明，供氮能提高 *GOGAT* 基因表达量。缺氮会导致叶绿体的降解，氮的吸收和同化能力显著降低[34]。缺氮会影响氮同化和再活化相关酶活性，包括硝酸还原酶（NR）、亚硝酸还原酶（NiR）、谷氨酰胺合成酶（GS）和谷氨酸合酶（GOGAT）等，也直接影响叶绿体的稳定性[35]。在这些酶中NR是氮同化的主要限速酶[36]，GS 是氮同化和再活化的关键酶[37]。本试验中，外源Fe处理，黄化叶片中不仅Fe含量显著增加，N含量也显著增加，同时，氮代谢过程中 *NR*、*NiR*、*GLIE* 和 *NADH-GOGAT* 基因相对表达量均显著增加，除0.05% $FeSO_4$处理外，8 d和12 d时，*NR* 和 *NiR* 基因相对表达量不仅显著高于清水处理的黄化叶片，还显著高于正常叶片；同时，外源$FeSO_4$处理，黄化叶片中NR、NiR、GS和GOGAT酶活性均显著高于清水处理的黄化叶片。因此，外源$FeSO_4$处提理高了黄化叶片N代谢途径中 *NR*、*NiR*、*GS* 和 *GOGAT* 基因的表达量，造成NR、NiR、GS和GOGAT酶活性增强，促进了叶片中硝酸、亚硝酸的还原，最终转化为谷氨酸，进入氨基酸合成途径。与此同时，外源$FeSO_4$处理黄化叶中相关酶的活性的增强可能与叶内N含量的显著增加有关。

综上所述，铁胁迫抑制铁代谢的同时，也会影响氮代谢。一定浓度的外源$FeSO_4$能促进黄化叶片内铁的贮藏、还原与转运，同时也提高了黄化叶片N代谢途径中 *NR*、*NiR*、*GS* 和 *GOGAT* 基因的表达量和相关酶的活性，在‘砀山酥梨’黄化叶片复绿过程中，铁、氮存在一定的增益作用。

参考文献 References：

[1] 张绍铃，谢智华 . 我国梨产业发展现状、趋势、存在问题与对策建议[J]. 果树学报，2019，36(8)：1067-1072.
ZHANG Shaoling，XIE Zhihua. Current status，trends，main

problems and the suggestions on development of pear industry in China[J]. Journal of Fruit Science，2019，36(8): 1067-1072.

[2] 韩振海，沈隽 . 果树的缺铁失绿症：文献述评[J]. 园艺学报，1991，18(4)：323-328.
HAN Zhenhai，SHEN Jun. Iron chlorosis of fruit trees: Literature review[J]. Acta Horticulturae Sinica，1991，18(4): 323-328.

[3] 章艺，史锋，刘鹏，陈旭微 . 土壤中的铁及植物铁胁迫研究进展[J]. 浙江农业学报，2004，16(2)：60-64.
ZHANG Yi，SHI Feng，LIU Peng，CHEN Xuwei. Study progress on iron in soil and iron stress of plants[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis，2004，16(2): 60-64.

[4] 王平荣，张帆涛，高家旭，孙小秋，邓晓建 . 高等植物叶绿素生物合成的研究进展[J]. 西北植物学报，2009，29(3)：629-636.
WANG Pingrong，ZHANG Fantao，GAO Jiaxu，SUN Xiaoqiu，DENG Xiaojian. An overview of chlorophyll biosynthesis in higher plants[J]. Acta Botanica Boreali- Occidentalia Sinica，2009，29(3): 629-636.

[5] 刘泽军，赵越，殷文娟，覃伟铭，何天明 . 库尔勒香梨叶片中铁的含量表征及铁空间分布[J]. 天津农业科学，2014，20(8)：13-17.
LIU Zejun，ZHAO Yue，YIN Wenjuan，TANG Weiming，HE Tianming. Characterization of iron content in leaf of ‘Kuerlexiangli’ (*Pyrus Bretschneideri* Rehd.) and iron spatial distribution[J]. Tianjin Agriculture Sciences，2014，20(8): 13-17.

[6] ROBINSON N J，PROCTERr C M，CONNOLLY E L，GUERINOT M L. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils [J]. Nature，1999，397(6721): 694-697.

[7] MENG S，PENG J S，HE Y N，ZHANG G B，YI H Y，FU Y L，GONG J M. *Arabidopsis* NRT1.5 mediates the suppression of nitrate starvation-induced leaf senescence by modulating foliar potassium level[J]. Molecular Plant，2016，9(3): 461-470.

[8] ELOISA A，PURIFICATION C，PURIFICATION H. Induction of leaf senescence by low nitrogen nutrition in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants[J]. Physiologia Plantarum，2010，138 (3): 256-267.

[9] WEGENER L H，RASCHKE K. Ion channels in the xylem parenchyma of barley roots: A procedure to isolate protoplasts from this tissue and a patch-clamp exploration of salt passageways into xylem vessels[J]. Plant Physiology，1994，105(3): 799-813.

[10] CHEN B M，WANG Z H，LI S X，WANG G X，SONG H X，WANG X N. Effects 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.

[11] HORTENSTEINER S，FELLER U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence[J]. Journal of Experimental Botany，2002，53(370): 927-937.

[12] MAEDA S，KONISHI M，YANAGISAWA S，OMATA T. Nitrite transport activity of a novel HPP family protein conserved in cyanobacteria and chloroplasts[J]. Plant Cell Physiology，2014，55 (7): 1311-1324.

[13] PLETT D，BAUMANN U，SCHREIBER A W，HOLTHAM L，KALASHYAN E，Toubia J，NAU J，BEATTY M，RAFALSKI A，DHUGGA K S，TESTER M，GARNETT T，KAISER B N. Maize maintains growth in response to decreased nitrate supply through a highly dynamic and developmental stage-specific transcriptional response[J]. Plant Biotechnology Journal，2016，14 (1): 342-353.

[14] 周高峰，李碧娴，付燕玲，管冠，姚锋先，刘桂东 .‘南丰蜜橘’缺铁、锰、锌的症状及其光合特性和营养状况研究[J]. 园艺学报，2019，46(4)：691-700.
ZHOU Gaofeng，LI Bixian，FU Yanling，GUAN Guan，YAO Fengxian，LIU Guidong. Effects of iron，manganese and zinc deficiency on the symptom，photosynthetic characteristics and nutrient status of ‘Nanfeng’ Tangerine[J]. Acta Horticulturae Sinica，2019，46 (4): 691-700.

[15] 钟晨 . 铁胁迫对‘砀山酥梨’叶片矿质营养及相关基因表达的影响[D]. 合肥：安徽农业大学，2013.
ZHONG Chen. Effect of iron stress on mineral elements contents in leaves and related genes expression[D]. Hefei: Anhui Agricultural University，2013.

[16] 蔡祖国，徐小彪，赵一鹏，周会萍 . 猕猴桃茎尖超低温保存过程中超微结构观察[J]. 西北植物学报，2003，23(8)：1600-1604.
CAI Zuguo，XU Xiaobiao，ZHAO Yipeng，ZHOU Huiping. Ultrastructure of *in vitro* stem apex of Kiwi in cryopreservation[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica，2003，23(8): 1600-1604.

[17] 毛富春，张凤云，赵先贵，张克丽 . 美味猕猴桃叶片有效铁含量与黄叶病相关性研究[J]. 西北农业学报，2002，11(2)：54-56.
MAO Fuchun，ZHANG Fengyun，ZHAO Xiangui，ZHANG Keli. Relativity of active iron contents and chlorosis in the Kiwis leaf[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica，2002，11 (2): 54-56.

[18] 张莉，陈军，荆瑞俊 . 电感耦合等离子体—原子发射光谱法测定莲子芯中的 12 种元素含量[J]. 光谱实验室，2009，26(2)：316-319.
ZHANG Li，CHEN Jun，JING Ruijun. Determination of 12 elements in lotus seed core by ICP- AES[J]. Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory，2009，26(2): 316-319.

[19] 杨金凤，周晓康，呼丽萍，张悦萍 . 邻啡罗啉比色法测定土壤中有效铁的条件优化[J]. 土壤，2013，45(4)：718-721.
YANG Jinfeng，ZHOU Xiaokang，HU Liping，ZHANG Yueping. Optimizing conditions for soil available iron determination with method of phenanthroline colorimetry[J]. Soil，2013，45(4): 718-721.

[20] 高俊山，蔡永萍 . 植物生理学实验指导[M]. 北京：中国农业大学出版社，2018：15-17.
GAO Junshan，CAI Yongping. Plant physiology experiment guidance[M]. Beijing: China Agricultural University Press，2018:

15-17.

[21] 樊超，邱忠平，龚正君，海维燕，唐建，华建军 . 填埋场中亚硝酸还原酶测定条件的优化[J]. 环境工程学报，2012，6(10)：3747-3751.
FAN Chao，QIU Zhongping，GONG Zhengjun，HAI Weiyan，TANG Jian，HUA Jianjun. Optimization for determination condition of nitrite reductase in landfil[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering，2012，6(10): 3747-3751.

[22] 王新超，杨亚军，陈亮 . 茶树谷氨酸合酶的提取与活性测定[J]. 中国茶叶，2004，26(5)：10-11.
WANG Xinchao，YANG Yajun，CHEN Liang. Extraction and activity determination of glutamate synthetase from tea[J]. Chinese Tea，2004，26(5): 10-11.

[23] 陈煜，朱保葛，张敬，梁宗锁 . 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，2014，23(2)：143-146.
CHEN Yu，ZHU Baoge，ZHANG Jing，LIANG Zongsuo. Effect 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.

[24] YANG X. Analysis of the copy number of exogenous genes in transgenic cotton using real- time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle CT}$ method[J]. African Journal of Biotechnology，2012，1 (23): 6226-6233.

[25] MIKHA S A，SUKHDE S M. Interactions of nitrogen with other nutrients and water: effect on crop yield and quality，nutrient use efficiency，carbon sequestration，and environmental pollution[J]. Advances in Agronomy，2005，86(Pt2): 341-409.

[26] MARTINEZ-CUENCA M R，QUINONES A，IGLESIAS D J，FORNER-GINER M Á，PRIMO M E，LEGAZ F. Effects of high levels of zinc and manganese ions on Strategy I responses to iron deficiency in citrus[J]. Plant Soil，2013，373(1/2): 943-953.

[27] 姚宇洁，姜存仓 . 缺铁胁迫下枳橙实生苗矿质元素的改变及FTIR特征分析[J]. 中国南方果树，2016，45(6)：10-14.
YAO Yujie，JIANG Cuncang. Effect of Fe deficiency on the elements content in trifoliate orange rootstock and FTIR profiles [J]. South China Fruits，2016，45(6): 10-14.

[28] NAGATA N, TANAKA R, SATOH S, TANAKA A. Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of prochlorococcus species[J]. The Plant Cell, 2005，17(1): 233-240.

[29] POSSINGHAM J V. The effect of mineral nutrition on the content of free amino acids and amides in tomato olants[J]. Australian Journal of Biological Sciences，1956，9(4): 539-551.

[30] 邹春琴，李春俭，张福锁，毛达如 . 铁和不同形态氮素对玉米植株吸收矿质元素及其在体内分布的影响Ⅱ. 对铁、锰、铜、锌等营养元素的影响[J]. 植物营养与肥料学报，1996，2(3)：219-225.
ZOU Chunqin，LI Chunjian，ZHANG Fusuo，MAO Daru. Effects of iron and different forms of nitrogen on uptake and distribution of mineral elements in corn plants Ⅱ. On the Fe，Mn，Cu and Zn[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science，1996，2(3): 219-225.

[31] 马宗桓，陈佰鸿，毛娟，胡紫璟，李文芳 . 施氮时期对酿酒葡萄叶片氮代谢酶及相关基因表达的影响[J]. 西北植物学报，2018，38(2)：298-306.
MA Zonghuan，CHEN Baihong，MAO Juan，HU Zijing，LI Wenfang. Effect of nitrogen metabolism enzymes and related gene expression in leaves of *Vitis vinifera* during nitrogen application period[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica，2018，38 (2): 298-306.

[32] 冯卓，秦智伟，武涛，何红梅 . 黄瓜细胞质型谷氨酰胺合成酶基因的克隆及其在低氮条件下的表达[J]. 中国农业科学，2012，45(15)：3100-3107.
FENG Zhuo，QIN Zhiwei，WU Tao，HE Hongmei. Cloning and expression of cytosolic glutamine synthetase (GS1) in *Cucumis sativus* L. under low nitrogen conditions[J]. Scientia Agricultura Sinica，2012，45(15): 3100-3107.

[33] 张翼飞 . 施氮对甜菜氮素同化与碳代谢的调控机制研究[D]. 哈尔滨：东北农业大学，2013.
ZHANG Yifei. Study on regulation mechanism of nitrogen application on nitrogen assimilation and carbon metabolism in sugar beet[D]. Harbin: Northeast Agricultural University，2013.

[34] HAVE M，MARMAGNE A，CHARDON F，MASCLAUX-DAYBRESS C. Nitrogen remetobilisation during leaf senescence: lessons from *Arabidopsis* to crops[J]. Journal of Experimental Botany，2017，68(10): 2513-2529.

[35] MASCLAUX-DAUBRESS C，REISDORF-CREN M，PAGEAU K，LELANDAI M，GRANDJEAN O，KRONENBERGER J，VALADIER M H，FERAUD M，JOUGLET T，SUZUKI A. Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco[J]. Plant Physiology，2006，140(2): 444-456.

[36] XIA B X，SUN Z G，WANG L H，ZHOU Q，HUANG X H. Analysis of the combined effects of lanthanum and acid rain，and their mechanisms，on nitrate reductase transcription in plants [J]. Ecotoxicology and Environmental，2017，138(APR.): 170-178.

[37] LI H，HU B，CHU C C. Nitrogen use efficiency in crops: lessons from *Arabidopsis* and rice[J]. Journal of Experimental Botany，2017，68(10): 2477-2488.