

氮胁迫对水稻营养生长期氮代谢及相关基因表达量的影响

罗 凤 卢永恩 杨 猛 练兴明

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 通过对水稻品种日本晴进行 0、1 h 和 1、3、7 d 的缺氮胁迫, 以及缺氮 7 d 后, 恢复供氮生长 2 h 和 1 d, 研究氮素同化相关酶的基因表达及其活性的动态变化情况。结果表明: 缺氮胁迫下, 根部 NH_4^+ 、 NO_3^- 含量显著下降。短期缺氮胁迫下, 地上部 NR1、NR2、NiR2、GS2、Fd-GOGAT、GDH2、GDH3 以及根部 NR1、NR2、GDH4 的表达量均有增加; 随着缺氮胁迫时间延长, 上述基因的表达量均大幅下降。缺氮胁迫下, 植株 GS、Fd-GOGAT、地上部 NR 和根部 NADH-GOGAT 的活性下降, 地上部 NADPH-GDH 活性增加, 根部 NR、GDH 活性先增加后下降, 地上部 NiR 活性先下降后增加。植株缺氮 7 d 后, 恢复供氮生长 1 d 时, NR、NiR、GS、GOGAT、GDH 的基因表达量及活性基本趋于恢复正常水平, 部分基因表达量有所增加。

关键词 水稻; 氮胁迫; 基因表达; 氮代谢; 营养生长期

中图分类号 S 143.1; S 511.506.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)01-0016-07

氮是作物生长发育不可或缺的且需求量最大的矿质元素之一, 也是作物体内多种重要有机化合物的组分, 如蛋白质、核酸、酶等, 参与一系列生理生化反应, 涉及多种代谢途径^[1]。植物从土壤中吸收的主要是无机氮, 再通过氮代谢转化为有机氮供机体利用。高等植物氮代谢过程中, 无机氮经过硝酸还原酶(NR)、亚硝酸还原酶(NiR)、谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸合成酶(GOGAT)和谷氨酸脱氢酶(GDH)转化为有机氮, 如谷氨酸(Glu)或谷氨酰胺(Gln), 之后再参与各种氨基酸和蛋白质的生物合成^[2-3]。

水稻是我国的重要粮食作物, 近些年来, 在农业生产上人们通过施用大量化学肥料提高稻谷产量, 尤其是氮肥, 但是氮肥的吸收利用效率却在不断下降。练兴明等^[4]通过分析水稻幼苗中 10 422 个基因的表达, 发现共有 471 个受低氮处理影响, 包括参与光合作用、能量代谢、逆境反应等的基因。陈清爽等^[5]研究发现水稻中有 20 个基因在氮饥饿处理下的表达明显增强, 涉及多种代谢途径、信号转导及生长调控等过程。重金属镍、水分胁迫等逆境对氮代谢相关酶活性的影响已有报道^[6-7], 但是缺氮胁迫

下, 植株体内无机氮含量和氮代谢相关酶基因表达及其活性的动态变化情况以及三者间的关系却缺乏系统报道。本试验通过对日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)不同时间点的缺氮胁迫进行分析, 以为水稻氮高效分子研究提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

水稻粳稻品种为日本晴(*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)。将发芽后的日本晴种子播于湿沙中, 生长至 2 叶期时, 移栽到盛满营养液的塑料盒(30 L), 在武汉市夏季自然条件下生长, 每隔 3 d 更换 1 次营养液, 水培营养液配方参照 Yoshida 等^[8]方法。当植株生长到 5 至 6 叶期时, 对其分别进行 1 h 及 1、3、7 d 的缺氮胁迫, 以及缺氮胁迫 7 d 后, 恢复供氮生长 2 h 和 1 d。缺氮胁迫处理营养液中不加氮, 缺氮胁迫后恢复供氮处理时加入 1.44 mmol/L NH_4NO_3 , 复合氮源 NH_4NO_3 可提高植株氮的利用效率^[9]。所有材料于同一时间取样, 每个时间点随机取 3 株, 将其地上部和根部分开, 于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,

收稿日期: 2011-03-03

基金项目: 国家 863 项目(2010AA101802); 国家重点基础研究发展计划(2011CB100304)

罗 凤, 硕士研究生, 研究方向: 水稻氮营养分子生物学。E-mail: luofeng@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 练兴明, 博士, 副教授。研究方向: 水稻氮、磷营养高效吸收利用的遗传和分子生物学基础。E-mail: xmlian@mail.hzau.edu.cn

用于游离 NH_4^+ 、 NO_3^- 含量和游离 Asp、Glu 含量及基因表达量和酶活测定。

1.2 试验方法

1) 游离 NH_4^+ 含量的测定。用液氮将鲜样磨成粉末, 快速准确称量 0.2 g (下同), NH_4^+ 的提取、测定及标准曲线制作均参照 Jorg 等^[10] 方法进行。

2) 游离 NO_3^- 含量的测定。 NO_3^- 的提取采用 800 μL 0.1 mol/L HCl 冰上提取 2 h, 测定参照文献^[11] 方法进行, 其中以 KNO_3 溶液为参照制作标准曲线。

3) 游离天冬氨酸 (Asp)、谷氨酸 (Glu) 含量的测定。参照蔡红梅等^[2] 方法进行。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Real-time PCR primer sequence

基因名称 Gene name	登录号 Locus identifier	引物序列 Primer sequence (5'→3')
NR1	LOC_Os08g36500	CATCATGCTCGCTACATGCAGAA CGCGGTTGTCCTTGTAAATGGTAGT
NR2	LOC_Os02g53130	TGAAATGGCTCAAGCGCATCATCG ATGTACTCCGGCTTGTACCACCAA
NiR1	LOC_Os02g52730	TCGACGAACTTGGGATGGAGGTTT AGTCCCTCCTCGCCATTTCTTGT
NiR2	LOC_Os01g25484	TAATTGCGGTGTTGGCATTGCAGG AGTCCCTCCTCGCCATTTCTTGT
GS1;1	LOC_Os03g12290	GCCGTGATGTGTCAACGTTGGATT ATGACACTCGGTGAACAGGACAGA
GS1;2	LOC_Os02g50240	GTGCGTTTGGGTGCTCTTGTGTAA TGTGGAAAGGAGGACGATGATCCA
GS1;3	LOC_Os03g50490	TGTTCTCTGACGCTGGTGCTGTTA TGCAGGTGATGGCCTCATGAGAAA
GS2	LOC_Os04g56400	GGACAAATCGTTTGGCCGTGACAT TGACCAGGCATGACCTCTCCATTT
Fd-GOGAT	LOC_Os07g46460	ATGGTGCCAGTGCTATATGTCCGT GTTTCTTTGGGCTGCTCAATGGT
NADH-GOGAT1	LOC_Os01g48960	GCTGCTAAGCTTGCAAAGGAACCA ACGCTATTTGGATCCCGTAAGA
NADH-GOGAT2	LOC_Os05g48200	CCTGTGCAAGGATGATGAAGTGAAACC TGCATGGCCCTACTATCTTCGCATCA
GDH1	LOC_Os03g58040	TCCTGTCCAAGAAAGCGTTTCTCA TGCACATCTCCTTCACATCCCTGA
GDH2	LOC_Os04g45970	TAATGTTGGTTCATGGGCTGCACG AAAGCACCACCTCATTCTGTGC
GDH3	LOC_Os02g43470	AGGGAGTCATTGTGCTGCCAGATA TTTGGAGCTCCCTGTTACCTTCT
GDH4	LOC_Os01g37760	AACATCAAGGCTCAGCAAAGGAGC GATGCACAAGGAATGCAACGCTCA

4) RT-PCR 分析。采用 TransZol 试剂抽提样品 RNA, 反转录酶 SS III (Superscript III reverse transcriptase, Invitrogen) 进行反转录, RT-PCR 检测基因转录水平的表达量。RT-PCR 的引物设计及具体操作均参照蔡红梅等^[2] 方法进行, 引物序列见表 1。

5) 水稻氮素同化相关酶活性测定。酶液提取采用 1.5 mL 的提取液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 10 mmol/L MgCl_2 ; 1 mmol/L EDTA; 1 mmol/L 乙二醇二乙醚二胺四乙酸; 1 mmol/L 苯甲脒; 1 mmol/L 3-氨基己酸; 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF); 10 $\mu\text{mol/L}$ 亮抑酶肽), 冰上提取 1.5 h, 12 000 r/min 4 $^\circ\text{C}$ 离心 12 min, 吸上清 1.2 mL, 得到酶液用于测定硝酸还原酶 (NR)、亚硝酸还原酶 (NiR)、谷氨酰胺合成酶 (GS)、谷氨酸合成酶 (Fd-GOGAT、NADH-GOGAT)、谷氨酸脱氢酶 (NADPH-GDH、NADH-GDH) 的活性。NR、Fd-GOGAT、GS 的活性测定参照 Gibon 等^[12] 和 Migge 等^[13] 方法进行, NiR 活性测定参照 Scheible 等^[14] 方法进行, NADH-GOGAT 活性测定参照 Hecht 等^[15] 方法进行, 谷氨酸脱氢酶 (NADPH-GDH、NADH-GDH) 活性测定参照 Turano 等^[16] 方法进行。

1.3 数据分析

所有试验数据均以正常营养液生长为对照, 单因素方差分析进行显著性差异分析, RT-PCR 的数据按照 Kenneth 等^[17] 方法进行分析。

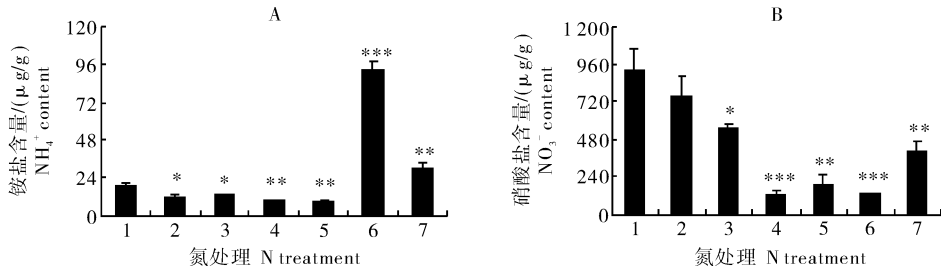
2 结果与分析

2.1 根部 NH_4^+ 和 NO_3^- 的含量

根部 NH_4^+ 、 NO_3^- 的含量随着缺氮时间的延长而逐渐降低, 缺氮胁迫 7 d 时, 其含量分别下降了 47.85% 和 79.80% (图 1)。植株缺氮胁迫 7 d 后, 恢复供氮生长 2 h 时, NH_4^+ 含量迅速上升, 约为对照的 5 倍 (图 1-A), 而 NO_3^- 含量持续下降, 恢复供氮生长 1 d 时, NO_3^- 的含量仅为对照的 43.26% (图 1-B)。

2.2 氮素同化相关酶的基因表达量

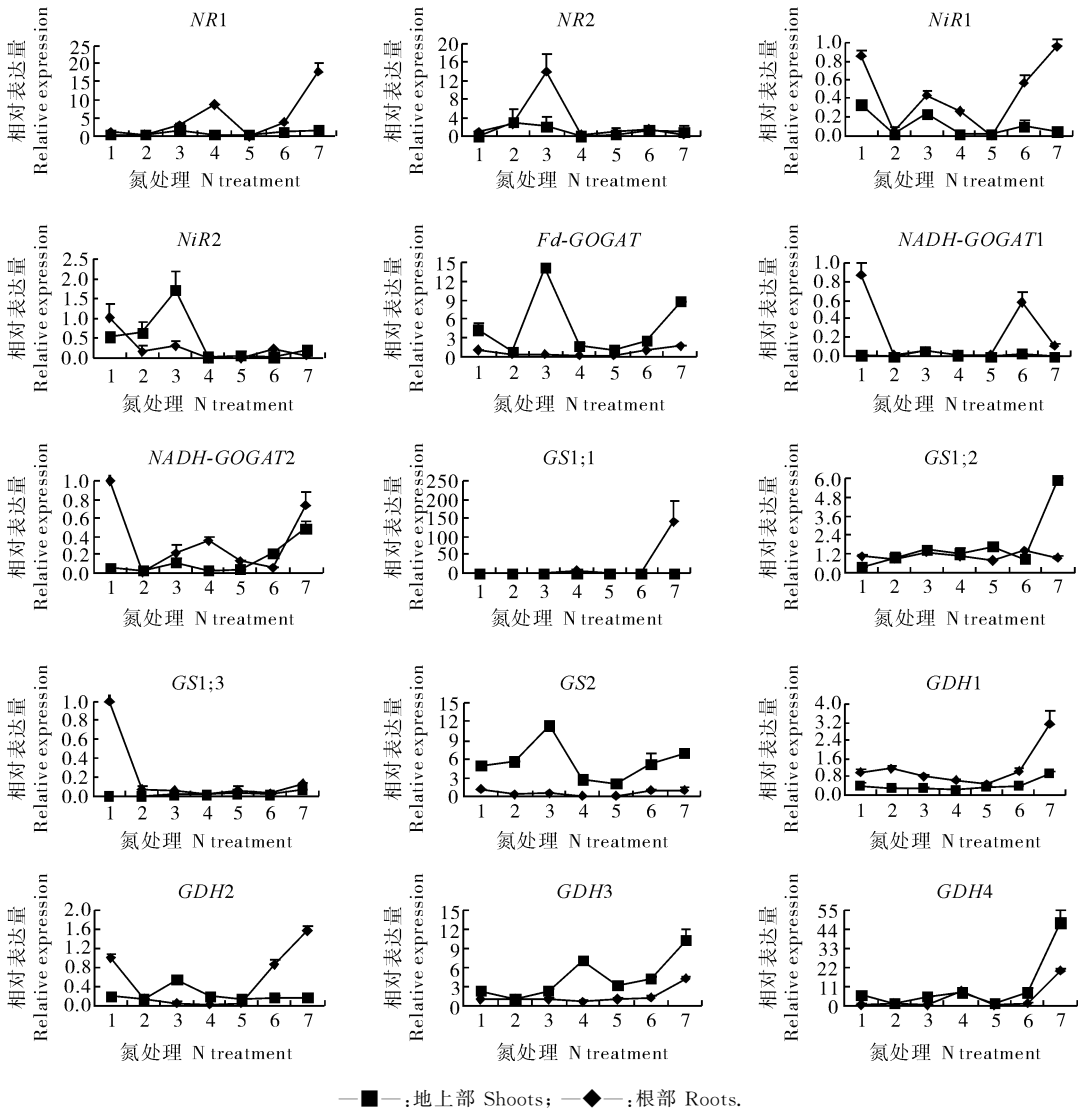
缺氮 1 h 时, 地上部 NR2 表达量达到峰值, 约为对照的 143 倍, 而根部 GS1;3, NADH-GOGAT1, NADH-GOGAT2 和地上部 Fd-GOGAT 基因表达量均大幅下降, 基本趋于不表达 (图 2)。缺氮胁迫 1 d 时, 地上部 NR1、NiR2、GS2、Fd-GOGAT、



1~7 表示缺氮胁迫 0 h、1 h、1 d、3 d、7 d 以及缺氮胁迫 7 d 后, 恢复供氮生长 2 h 和 1 d 1-7 indicate the time with N-absent stress for 0 h, 1 h, 1 d, 3 d, 7 d and re-supply N to plants for 2 h, 1 d after N-absent stress for 7 d; *, **, *** 分别表示 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ 水平上的显著性差异, 下同。The *, **, *** indicate significant differences at $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, respectively. The same as follows.

图 1 不同氮处理对水稻根部 NH_4^+ 和 NO_3^- 含量的影响

Fig. 1 Effects of different nitrogen treatments on NH_4^+ and NO_3^- contents in rice roots



—■—: 地上部 Shoots; —◆—: 根部 Roots.

图 2 不同氮处理对氮同化相关酶基因表达量的影响

Fig. 2 Effects of different nitrogen treatments on expression level of genes involved in nitrogen assimilation

GDH2 和根部 *NR2* 基因表达量达到峰值, 分别约为对照的 8、3、2、3、3、28 倍。缺氮胁迫 3 d 时, 地上部 *GDH3* 和根部 *NR1*、*GDH4* 基因表达量达到峰值, 分别约为对照的 3、8、8 倍。

在缺氮胁迫中 *GS1*、2、*GDH1* 和根部 *GDH3* 基因表达量变化甚小, 而 *NiR1* 和根部 *NiR2*、*GDH2* 基因表达量下降。

植株缺氮胁迫 7 d 后, 恢复供氮生长 1 d 时, 部分基因表达量基本趋于正常, 部分基因表达量上升, 其中地上部 *GS1*、2、*Fd-GOGAT*、*NADH-GOGAT2*、*GDH1*、*GDH3* 和 *GDH4* 基因表达量分别约为对照的 16、2、9、2、3、8 倍, 根部 *NR1*、*GS1*、1、*GDH1*、*GDH2*、*GDH3* 和 *GDH4* 基因表达量分别约为对照的 16、135、3、2、4、20 倍(图 2)。以上结果表明, 缺氮胁迫对氮素同化相关酶基因表达的影响

不尽相同, 即便是同一基因家族。

2.3 NR 和 NiR 活性

NR 是植物氮代谢的关键酶, 它催化 NO_3^- 还原为 NO_2^- 。NiR 则催化 NO_2^- 还原为 NH_4^+ 。由图 3 可知, 就地上部而言, 缺氮胁迫 1 d 后, NR 活性开始显著下降, NiR 活性开始随着缺氮时间的延长而逐渐提高; 当缺氮胁迫 7 d 时, 与对照相比, NR 活性下降了 84.46%, 而 NiR 提高了 26.16%。就根部而言, 缺氮胁迫 1 h 和 1 d, NR 活性与对照相比分别提高了 69.58% 和 81.42%; 而缺氮胁迫 3 d 后, NR 活性极显著下降; 当缺氮胁迫 7 d 时, NR 活性基本丧失; 而 NiR 活性基本不变。植株缺氮胁迫 7 d 后, 恢复供氮生长 1 d 时, 地上部及根部 NR 活性回升, 分别为对照的 81.55% 和 33.47%, 地上部 NiR 也趋于恢复正常, 为对照的 117.61%。

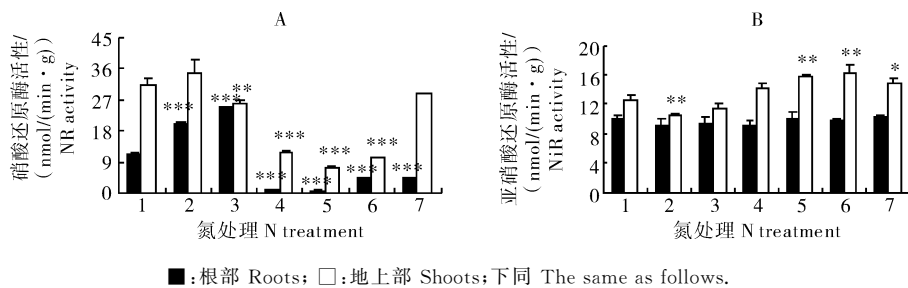


图 3 不同氮处理对 NR 和 NiR 活性的影响

Fig. 3 Effects of different nitrogen treatments on NR and NiR activity

2.4 GS、GOGAT 和 GDH 活性

缺氮胁迫下 GS、*Fd-GOGAT* 活性持续下降。缺氮胁迫 1 d 后, 根部 *NADH-GOGAT* 活性开始显著下降。当缺氮胁迫 7 d 时, 地上部及根部的 GS 活性分别比对照下降了 26.60%、45.66%(表 2), *Fd-GOGAT* 活性分别下降了 35.92%、73.26%, 根部 *NADH-GOGAT* 活性下降了 90.21%(表 2), 可见根部的 GS、*GOGAT* 活性下降幅度均大于地上部。

在缺氮胁迫下, 地上部 *NADPH-GDH* 活性增加, 尤其缺氮胁迫 1 h 时, 提高了 67.83%(表 2), *NADH-GDH* 活性变幅不大。根部 *NADPH-GDH* 和 *NADH-GDH* 的活性变化趋势一致, 在缺氮胁迫 1 h 时, 其活性分别提高了 16.16% 和 12.17%; 之后, 其活性随着缺氮胁迫时间延长而逐渐降低; 当缺氮胁迫 7 d 时, 其活性分别下降了 35.48% 和 49.59%(表 2)。

植株缺氮胁迫 7 d 后, 恢复供氮生长 1 d 时, 地

上和根部 GS 活性分别为对照的 83.42% 和 79.10%, *Fd-GOGAT* 分别为对照的 83.48% 和 61.05%, *NADPH-GDH* 分别为对照的 146.96% 和 74.77%。根部 *NADH-GOGAT* 和 *NADH-GDH* 的活性分别为对照的 58.61% 和 75.63%。结果表明, 植株缺氮胁迫 7 d 后恢复供氮生长 1 d 时, 上述氮代谢相关酶活性均趋于恢复正常。

2.5 游离 Glu 和 Asp 的含量

缺氮胁迫下, 植株地上部游离 Glu 含量变化很快, 在缺氮胁迫 1 h 时, 就明显降低, 而根部 Glu 含量的下降变化较慢, 在缺氮胁迫 3 d 后才明显降低。缺氮胁迫时间延长, 地上部 Asp 含量下降, 而根部 Asp 含量先略有上升, 之后持续下降。缺氮胁迫 7 d 时, 地上部及根部 Glu 含量分别为对照的 29.83% 和 29.60%, Asp 含量分别为对照的 21.85% 和 22.23%。植株在缺氮胁迫 7 d 后恢复供氮生长, Asp、Glu 含量均逐渐回升(图 4)。

表 2 不同氮处理对谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶及谷氨酸脱氢酶活性的影响¹⁾

Table 2 Effects of different nitrogen treatments on enzyme activity of GS, GOGAT and GDH

酶活性/(nmol/(min·g)) Enzyme activity	缺氮胁迫 0 h	缺氮胁迫 1 h	缺氮胁迫 1 d	缺氮胁迫 3 d	缺氮胁迫 7 d	缺氮胁迫 7 d 后, 恢复供氮 2 h	缺氮胁迫 7 d 后, 恢复供氮 1 d
	N-absent stress for 0 h	N-absent stress for 1 h	N-absent stress for 1 d	N-absent stress for 3 d	N-absent stress for 7 d	Reply N for 2 h after N-absent stress for 7 d	Reply N for 1 d after N-absent stress for 7 d
根部 GS 活性 GS activity in roots	751.7±	618.82±	495.63±	264.31±	408.48±	410.63±	594.61±
地上部 GS 活性 GS activity in shoots	618.82±	994.5±	1 032.15±	940.16±	914.34±	855.7±	1 039.15±
根部 Fd-GOGAT 活性 Fd-GOGAT activity in roots	448.34±	400.22±	316.08±	181.81±	119.86±	218.69±	273.73±
地上部 Fd-GOGAT 活性 Fd-GOGAT activity in shoots	2 251.47±	1 971.12±	1 894.47±	1 658.49±	1 442.68±	1 058.02±	1 879.49±
根部 NADH-GOGAT 活性 NADH-GOGAT activity in roots	315.25±	313.42±	174.95±	36.13±	29.96±	46.88±	184.78±
地上部 NADH-GOGAT 活性 NADH-GOGAT activity in shoots	16.58±	29.16±	12.12±	0.8±	-0.23±	-9.38±	10.52±
根部 NADPH-GDH 活性 NADPH-GDH activity in roots	240.26±	279.09±	255.1±	191.64±	155.02±	133.55±	179.64±
地上部 NADPH-GDH 活性 NADPH-GDH activity in shoots	50.83±	85.31±	54.81±	67.63±	78.23±	78.68±	74.7±
根部 NADH-GDH 活性 NADH-GDH activity in roots	1 023.25±	1 147.8±	983.23±	692.52±	515.79±	478.01±	773.84±
地上部 NADH-GDH 活性 NADH-GDH activity in shoots	384.2±	381.91±	348.52±	335.72±	367.96±	356.72±	375.66±

1)表中*,**,***分别表示 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ 水平上的显著性差异。The*,**,*** indicate significant differences at $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ respectively.

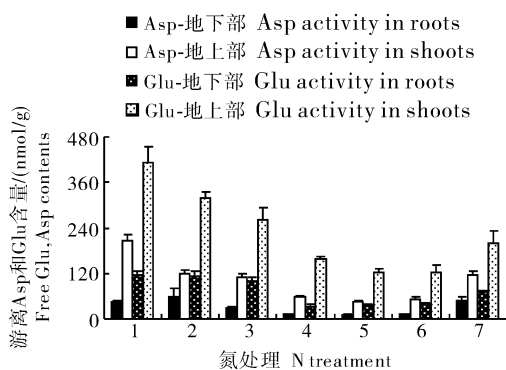


图 4 不同氮处理对游离 Glu 和 Asp 含量的影响
Fig. 4 Effects of different nitrogen treatments on Glu and Asp contents

3 讨论

水稻所利用的氮源来自土壤,且以土壤中 NH_4^+ 和 NO_3^- 为主。当缺氮胁迫 7 d 时,水培条件下根部 NO_3^- 含量的下降幅度远大于 NH_4^+ (图 1),原因可能是缺氮胁迫下,根部同化 NH_4^+ 的主要酶 GS、GOGAT 活性显著下降, NH_4^+ 同化能力下降;

而根部 NR 活性在缺氮 1 h、1 d 时,分别提高 69.58%和 81.42%, NO_3^- 硝化作用增强。缺氮胁迫 7 d 后,植株恢复供氮生长 2 h 时, NH_4^+ 含量大增(图 1-A), NO_3^- 含量反而持续下降(图 1-B),表明植株首先仅对 NH_4^+ 大量吸收,可能由于 NO_3^- 不能直接同化为有机氮,必须被还原为 NH_4^+ ,而此过程又耗能量,所以水稻大量吸收 NH_4^+ 快速有效地应对体内的氮饥饿状态。

短期缺氮胁迫下,部分氮素同化相关酶的基因表达量分别先后上升达到峰值,当缺氮胁迫 7 d 时,多数基因表达量大幅下降(图 2),表明氮素含量调节着基因转录水平的表达,并且对部分基因转录水平的调节有一个稍微滞后的过程。氮素同化相关酶活性在缺氮胁迫下呈现不同的下降趋势,其活性并没有因基因表达量的增加而增强,可能是基因的表达受到转录后水平的调节。植株游离 Glu 和 Asp 分别是谷氨酰胺族和天冬氨酸族氨基酸生物合成的关键物质,在缺氮胁迫 3 d 后,其含量均大幅下降(图 4)。当植株恢复供氮生长后,部分基因表达量

大幅增加,酶活性和游离 Glu 和 Asp 含量均趋于恢复正常。由此可知,由于氮素是核酸、氨基酸、酶蛋白的组成成分,短期缺氮胁迫下,即使基因表达量增加,可能因部分氨基酸不足,蛋白质翻译受阻,单位体积内酶含量减少,导致酶活性下降;当恢复供氮生长后,基因表达量上升,氨基酸含量充足,单位体积内酶含量增加,导致酶活性增强。

缺氮胁迫 7 d 时,地上部 NR、NADPH-GDH 以及根部 NR、GOGAT 的活性变幅较大,表明其对缺氮胁迫极为敏感。植株缺氮 7 d,后恢复供氮生长 1 d 时, NR、NiR、GS、GOGAT、GDH 的活性均趋于恢复正常,其中地上部 NR 和根部 NADH-GOGAT 的活性恢复最快,表明其对氮素较为敏感。

值得注意的是,氮素同化相关酶在缺氮胁迫下唯有 NR、NiR、GDH 活性有所增加。NR 是一种诱导酶,对环境条件十分敏感,NO₃⁻ 含量、CO₂ 浓度、光照等均会影响其活性^[18]。短时间的缺氮胁迫下,根部 NR 的基因表达量及活性上升,而较长时间的缺氮胁迫下, NR 的基因表达量及活性大幅下降(图 3-A)。可见,植株可通过感知 NO₃⁻ 含量变化,调节 NR 的基因表达及活性来应对短时间的缺氮胁迫,而 NiR 活性与 NR 没有直接联系^[19],在缺氮胁迫下,地上部 NiR 活性增加的原因不明,有待进一步探讨。

在重金属 Ni 处理下,小麦地上部 NADH-GDH 活性增加^[6],水分胁迫(水势 > 0.1 MPa)可导致水稻 GDH 活性显著提高^[7]。本试验结果也同样显示,缺氮胁迫下,地上部 NADPH-GDH 活性持续增加,而根部 NADPH-GDH 和 NADH-GDH 活性仅在缺氮胁迫 1 h 时,分别提高 16.16% 和 12.17% (表 2),原因可能是缺氮胁迫促进 GDH 催化 Glu 氧化而释放出 NH₄⁺ 的活性增强。也许正因为如此才导致地上部 GS、GOGAT 活性最大下降幅度远小于根部,可见植株在应对缺氮逆境时, GDH 有着极其重要的作用。

综上所述,在缺氮胁迫下,氮素同化相关酶的基因表达及其活性在植株地上部和根部呈现出不同的变化趋势,说明植物对氮的利用有着多个网络调控,如何让网络中的各个因素很好地协调起来,从而提高作物对氮的吸收利用效率,有待对氮代谢调节机制更进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 陆景陵. 植物营养学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 23-35.
- [2] 蔡红梅, 张启发, 练兴明, 等. 抑制表达谷氨酰胺合成酶基因对水稻氮代谢和生长发育的影响[J]. 科学通报, 2010, 55(10): 875-886.
- [3] REDINBAUGH M G, CAMPBELL W H. Nitrate regulation of the oxidative pentose phosphate pathway in maize root plastids: induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase activity, protein and transcript levels[J]. Plant Science, 1998, 134: 129-140.
- [4] 练兴明. 水稻氮胁迫基因表达谱研究及耐低氮特性数量性状分析[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2005.
- [5] 陈清爽, 易可, 黄帆, 等. 水稻缺氮诱导的基因克隆与表达谱分析[J]. 植物学报, 2003, 45(8): 974-980.
- [6] EWA G, MARIA S. Nickel-induced changes in nitrogen metabolism in wheat shoots[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166: 1034-1044.
- [7] 孙园园, 孙永健, 吴合洲, 等. 水分胁迫对水稻幼苗氮素同化酶及光合特性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(5): 1016-1022.
- [8] YOSHIDA S, FORNO D A, COOK J H, et al. Laboratory manual for physiological studies of rice[M]. 3rd ed. Manila: International Rice Research Institute, 1976.
- [9] 王巧兰, 吴礼树, 赵竹青, 等. 氮形态对水稻植株氮损失的影响[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 312-316.
- [10] JORG S, RAINER E H, GABI F, et al. Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism[J]. The Plant Journal, 2006, 45: 206-224.
- [11] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 123-124.
- [12] GIBON Y, BLAESING O E, HANNEMANN J, et al. A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness[J]. Plant Cell, 2004, 16: 3304-3325.
- [13] MIGGE A, CARRAYOL E, KUNZ C, et al. The expression of the tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase or ferredoxin-dependent glutamate synthase does not depend on the rate of nitrate reduction, and is unaffected by suppression of photorespiration[J]. J Exp Bot, 1997, 48: 1175-1181.
- [14] SCHEIBLE W R, GONZALEZ-FONTES A, LAUERER M, et al. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco[J]. Plant Cell, 1997, 9: 783-798.
- [15] HECHT U, OELMULLER R, SCHMIDT S, et al. Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH⁻ and

- ferredoxin-dependent glutamate synthases in the cotyledons of mustard seedlings[J]. *Planta*, 1988, 175: 130-138.
- [16] TURANO F J, DASHNER R, UPADHYAYA A, et al. Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings[J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 1357-1364.
- [17] KENNETH J, LIVA K, THOMAS D, et al. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [18] VARGAS M A, MAURINO S G, MALDONADO J M. Flavin-mediated photoinactivation of spinach leaf nitrate reductase involving superoxide radical and activating effect of hydrogen peroxide[J]. *J Photochem Photobiol Biol*, 1987, 1: 195-201.
- [19] FLYNN K J, FLYNN K. Release of nitrite by marine dinoflagellates: development of mathematical simulation[J]. *Marine Biology*, 1998, 130(3): 455-470.

Effects of nitrogen deficiency on nitrogen metabolism and expression of genes related during vegetative growth stage of rice

LUO Feng LU Yong-en YANG Meng LIAN Xing-ming

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and National Center of Plant Gene Research, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Nitrogen is one of essential nutrients for plant growth. Under the N deficiency at different time points, the dynamic changes of the expression of genes and activity of enzymes related to nitrogen assimilation in rice were investigated. The results showed that the concentrations of ammonium and nitrate significantly reduced under the N deficiency. Under the N deficiency for a short time, the expression level of genes including *NR1*, *NR2*, *NiR2*, *GS2*, *Fd-GOGAT*, *GDH2*, *GDH3* in the shoots as well as *NR1*, *NR2*, *GDH4* in the roots were up-regulated, and then their expression level decreased after a long time under the N deficiency. Along with the extension of time under the N deficiency, the *GS*, *Fd-GOGAT* activities in whole plants, *NR* activity in shoots and *NADH-GOGAT* activity in roots decreased while the *NADPH-GDH* activity in shoots increased. In roots the activities of *NR*, *GDH* increased at first and then decreased, while in shoots the *NiR* activity was just the opposite. Re-supplied N after 7 days of N deficiency, the transcriptional expression level and enzyme activities of *NR*, *NiR*, *GS*, *GOGAT*, *GDH* restored, and expression level of some genes increased as well.

Key words rice; nitrogen stress; gene expression; nitrogen metabolism; vegetative growth stage

(责任编辑:陆文昌)