第3卷 第3期
1997年9月

植物营养与肥料学报
PLANT NUTRITION AND FERTILIZER SCIENCE

Vol.3 No.3
Sep. 1997

水稻缺镍症状和生理研究

朱祝军　　J.Gerendas　B.Sattelmacher

（浙江农业大学园艺系，杭州 310029）　　（德国基尔大学植物营养研究所）

摘　要

采用溶液培养研究了以硝酸铵和尿素作为氮源时，缺镍对水稻植株的生长、脲酶和谷氨酰胺合成酶活性、植株中尿素态N和总氮含量的影响。结果表明，以硝酸铵作为氮源时，缺镍不影响植株的生长；但以尿素作为氮源时植株生长受到明显影响，植株生长停滞，叶片黄化，叶尖坏死干枯。缺镍植株中脲酶活性非常低，地上部仅为供镍植株的0.05%左右；谷氨酰胺合成酶活性除供应尿素氮缺镍植株较低以外，其它处理没有明显差异。缺镍植株中尿素态N含量明显高于供镍植株，特别是供应尿素态氮缺镍植株地上部尿素态N大量累积。供应尿素态氮缺镍植株含氮量明显低于其它处理。

关键词　缺镍　氮素形态　脲酶　谷氨酰胺合成酶　尿素　水稻

自从1975年发现Ni是普遍存在于高等植物中脲酶的成分以来[1]，Ni在植物体中的地位引起了广泛的兴趣和研究。Eskew等（1983）[2]发现缺Ni引起大豆叶尖端坏死，分析表明，叶尖尿素含量可达干重的2.5%。Krogmeier等（1991）[3]发现大豆叶面喷施尿素引起叶尖坏死，在缺Ni或喷施脲酶抑制剂的情况下坏死现象更加严重。研究表明，这不是铵的毒害，而是由于尿素积累引起的毒害作用。Brown等（1987）[4]的研究表明，大麦缺Ni影响种子的发育和成熟过程，种子发芽率明显受到影响，当种子含Ni量低于30ng/g干重时，种子失去活力。此外，缺Ni也影响豇豆、大麦和燕麦等植物的氮代谢[6~8]。因此，近年来一些科学家认为，镍可能是高等植物生长所必需的营养元素之一[2,4,5]。但由于研究条件的限制，对Ni的必需生理作用还了解较少。

水稻是我国的主要粮食作物，尿素是水稻田施用的最主要的氮肥。水稻缺Ni的研究在理论和生产上都具有重要意义。本实验采用溶液培养，研究水稻缺Ni的症状，缺Ni对水稻植株生长、脲酶和谷氨酰胺合成酶活性、植株尿素态N和总N含量的影响，以阐明水稻植株缺Ni的生理机制。

一、材料与方法

（一）试验处理

水稻种子消毒后用超纯去离子水反复冲洗，然后放在用稀HCl清洗过的湿滤纸中催芽，发芽后移栽到缺Ni的营养液中。营养液的组成(mol/L)：NH_4NO_3 3×10^{-3}；KH_2PO_4 2.5×10^{-4}；K_2SO_4 7.5×10^{-4}；$MgSO_4$ 5×10^{-4}；$CaCl_2$ 2×10^{-3}；FeEDTA 4.5×10^{-5}；$MnCl_2$ 2×10^{-6}；$CuCl_2$ 5×10^{-7}；$ZnCl_2$ 1×10^{-6}；H_3BO_3 9×10^{-6}；$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 1.4×10^{-8}。营养液所用水和大量元素原液都通过8-羟基喹啉(8-hydroxyquinoline)络合柱去除Ni。微量元素采用超纯试剂配制。聚乙烯塑料盆等植物栽培用具都用稀HCl浸泡清洗。每盆移入4棵发芽种子，共2 穴，每穴2

收稿日期：1996-10-08

株，放在用胶卷盒固定的纱网中，用稀HCl清洗过的黑色塑料珠固定植株。10天后，设处理：NH_4NO_3(-Ni)，尿素(-Ni)，NH_4NO_3(+Ni)，尿素(+Ni)，缺Ni处理重复5次，加Ni处理重复4次。尿素态N营养液以3×10^{-3}mol/L尿素代替NH_4NO_3，其它与NH_4NO_3营养液相同。加Ni处理供应5×10^{-7}mol/L $NiCl_2$。尿素态N营养液中加超级纯(Supra)$CaCO_3$作pH缓冲剂。每周2次取样测定营养液成分，根据测定结果补充营养液中耗竭的成分。

试验在德国基尔大学人工气候室中进行，昼夜温度25/20℃，光照强度350μ mol·cm^{-2}·s^{-1}，光照时间14小时。植株生长21天后收获，分成地上部和根系，称取0.5g鲜样测定脲酶和谷氨酰胺合成酶活性，其它样品冰冻干燥，称重。

(二)酶活性的测定

0.5g样品加5mL Tris-HCl(pH 7.5，含5mmol/L DTE)缓冲液，在冰浴中匀浆，15000r/min离心后，上清液测定谷氨酰胺合成酶和脲酶活性。

采用Magalhaes等[9]的方法测定谷氨酰胺合成酶的活性。

脲酶活性采用Zonia等[10]的方法测定。酶提取液与含有^{14}C-尿素的缓冲液(pH7.5)混合，通过测定$^{14}CO_2$的释放量测定脲酶对尿素的分解速率。

(三)植株中尿素态N和全N含量的测定

50mg冰冻干燥样品，加5mL水，放在沸水中提取5分钟，然后立即在冰浴中冷却，离心后上清液测定尿素态N含量。尿素态N含量用Kaplan[10]的方法测定。加脲酶使提取液中尿素分解成铵，用靛酚蓝比色法测定分解前后提取液中铵含量的变化。

植株样品用质谱仪直接测定全N含量。

二、试验结果

(一)Ni和不同形态氮素对水稻生长的影响

供应硝酸铵的水稻植株不管有无供应Ni生长都正常，没有明显差异。供应尿素的植株缺Ni时生长受到明显的影响，植株生长缓慢，后停滞，叶片黄化，叶尖坏死干枯，基本无分蘖。供应尿素的植株加Ni时虽然与供应硝酸铵的植株相比，生长较慢，但植株生长正常(图1)。在硝酸铵作

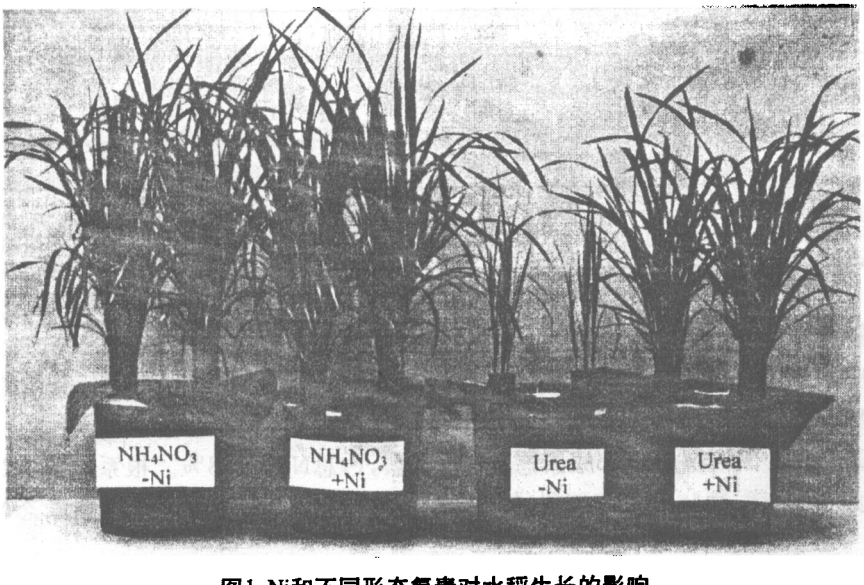

图1 Ni和不同形态氮素对水稻生长的影响

Fig.1 Effect of Ni and different nitrogen form on the growth of rice plants

为氮源时，缺Ni不影响植株的干物质积累。但以尿素作为氮源时，缺Ni明显影响植株的干物质积累，加Ni植株地上部的干物质积累是缺Ni植株的6.3倍，根系的干物质积累是缺Ni植株的2.2倍(表1)。

表 1 Ni和不同氮素形态对水稻植株干物质重量的影响 (g/pot)

Table 1 Effects of Ni and different nitrogen form on the dry weight of rice plants

器官 Organ	-Ni		+Ni	
	NH_4NO_3	$(NH_2)_2CO$	NH_4NO_3	$(NH_2)_2CO$
地上部	13.74±0.15a	1.19±0.10c	14.17±0.80a	7.56±0.09b
根 系	3.85±0.26a	1.14±0.10c	3.67±0.21a	2.47±0.19b
根冠比	0.279±0.018a	0.962±0.117c	0.259±0.009a	0.327±0.024b

(二)Ni和不同形态氮素对水稻植株脲酶和谷氨酰胺合成酶活性的影响

表2表明，在缺Ni情况下，无论是供应硝酸铵的植株还是供应尿素的植株，叶片和根系中的脲酶活性都非常低，叶片的脲酶活性仅为供Ni时的0.05%～0.06%，根系的脲酶活性大约为供Ni时的0.7%。谷氨酰胺合成酶活性除了供应尿素的植株缺Ni时较低以外，其它处理间没有明显差异。

表 2 Ni和不同氮素形态对水稻脲酶和谷氨酰胺合成酶活性的影响

Table 2 Effects of Ni and different nitrogen form on the activities of urease and glutamine synthetase in rice plants

器官 Organ	-Ni		+Ni	
	NH_4NO_3	$(NH_2)_2CO$	NH_4NO_3	$(NH_2)_2CO$
脲酶 Urease ($\mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$,FW)				
叶片	0.0027±0.0017	0.0033±0.0013	5.089±0.493	5.447±0.588
根系	0.0080±0.0008	0.0042±0.0027	1.032±0.347	0.535±0.082
谷氨酰胺合成酶 Glutamine synthetase ($\mu mol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$,FW)				
叶片	3.42±0.33	1.61±0.18	3.92±0.12	3.74±0.21
根系	0.42±0.03	0.24±0.02	0.43±0.03	0.38±0.08

(三)Ni和不同形态氮素对水稻植株总N和尿素态N含量的影响

除了供应尿素的缺Ni植株总N含量较低以外，其它处理植株总N含量没有明显的差异。无论是供应硝酸铵的植株还是供应尿素的植株，缺Ni植株地上部尿素态N含量明显高于供Ni植株，特别是供应尿素的缺Ni植株地上部尿素态N大量积累，占总N的22.8%。根系尿素态N含量低于地上部，与地上部一样，缺Ni植株高于供Ni植株，但尿素供应缺Ni植株根系中尿素态N的积累不明显(表3)。

表 3 Ni和不同氮素形态对水稻植株中总氮和尿素态N含量的影响

Table 3 Effects of Ni and different nitrogen form on the contents of total N and urea in rice plants

器官 Organ	-Ni		+Ni	
	NH_4NO_3	$(NH_2)_2CO$	NH_4NO_3	$(NH_2)_2CO$
	全N含量 Total-N (%)			
地上部	3.01±0.09	2.16±0.32	3.16±0.32	3.45±0.47
根系	1.68±0.14	0.61±0.03	1.73±0.12	1.65±0.17
	尿素态N含量 Urea-N (μ mol·g^{-1},DW)			
地上部	10.28±1.44	352±136	6.02±0.88	6.48±1.42
根系	4.62±2.64	10.18±1.60	2.80±1.52	5.46±1.28

三、讨 论

试验表明，以硝酸铵作为氮源时，缺Ni不影响植株的生长，只有在尿素作为氮源时，水稻植株生长才受到明显的影响。水稻植株缺Ni的症状与缺N较为相似：植株生长缓慢，后停滞，叶片黄化，叶尖坏死干枯，基本无分蘖。由于缺Ni时脲酶活性非常低，缺Ni植株不能利用尿素作为N源，引起植株中含N量降低，地上部尿素大量积累，达总N含量的22.8%。Krogmeier等[3]报道，大豆植株在缺Ni情况下喷尿素引起叶尖枯死，认为是由于尿素态N在叶片中积累所造成的毒害作用。本实验中地上部尿素态N的大量积累可能也对植株造成毒害作用。

脲酶催化尿素水解成铵和CO_2。在豆科、葫芦科和松科植物中，脲酶在种子蛋白中占有较高的比例，但在大部分植物营养器官中脲酶含量较低[10]。在种子发芽过程中，贮藏蛋白转化产生尿囊素或精氨酸，然后降解时产生尿素，尿素在脲酶作用下分解成铵和CO_2，参与氮代谢。在豆科植物中尿囊素是从根瘤转运到地上部的主要氮形态，转运到地上部的尿囊酸分解成尿素和乙醛酸[7]。因此，脲酶在种子发芽和豆科植物中具有重要作用。鸟氨酸循环普遍存在于高等植物中，在鸟氨酸代谢中精氨酸在精氨酸酶的作用下分解成尿素和鸟氨酸[7]。在本实验中，硝酸铵供应缺Ni水稻植株中尿素态N含量虽高于供Ni植株，但累积不明显。这可能是由于精氨酸通过另外途径代谢形成γ-胍基丁酸。这有待于植株氨基酸分析结果证实。

由于水稻种子中含有一定量的Ni，因此本试验植株并不完全缺Ni，事实上要100%缺Ni是不可能的。利用缺Ni种子作材料，研究硝酸铵作氮源时缺Ni对植株生长和氮代谢的影响，看起来是必要的。

参 考 文 献

1 Dixon NE, Blakeley RL, Zerner B. Jack beana urease (EC 3.5.1..5.3.). Ⅲ. The involvement of active site nickel ion in inhibition by b-mercaptoethanol and phosphoramidate, and fluoride. Can. J. Biochem., 1980, 588:481～488.

2 Eskew DL, Welch RM, Cary EE. Nickel: An essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. Science,

1983, 222:621～623.

3 Krogmeier MJ, McCarty GW, Shogren DR, Bremner JM. Effect of nickel deficiency in soybeans on the phytotoxicity of foliar-applied urea. Plant and Soil, 1991, 135:283～286.

4 Brown PH, Welch RM, Cary EE. Nickel: A Micronutrient essential for higher plants. Plant Physiol., 1987, 85:801～803.

5 Brown PH, Welch RM, Cary EE, Checkai RT. Beneficial effects of nickel on plant growth. J. Plant Nutr., 1987, 10(9～16):2125～2135.

6 Brown PH, Welch RM, Madison JT. Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid, and nitrogen levels in barley. Plant and Soil, 1990, 125:19～27.

7 Walker CD, Graham RD, Madison JT, Cary EE, Welch RM. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp). Plant Physiol., 1985, 79:474～479.

8 Welch RM. The biological significance of nickel. J. Plan Nutr., 1981, 3(1～4):345～356.

9 Magalhaes JR, Huber DM, Tsai CY. Influence of the form of nitrogen on ammonium, amino acids and N-assimilating enzyme activity in maize genotypes. J. Plant Nutr., 1995, 18(4):747～763.

10 Zonia LE, Stebbins NE, Pollacco JC. Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* Seeds. Plant Physiol., 1995, 107:1097～1103.

11 Kaplan A. The determination of urea, ammonia and urease. Methods in Biochemical Analysis, 1968, 311～324.

STUDY ON THE SYMPTOM AND PHYSIOLOGY OF Ni DEFICIENCY IN RICE PLANTS

Zhu Zhujun

(Department of Horticulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

J. Gerendas B. Sattelmacher

(Institute for plant nutrition, University of Kiel, 24118 Kiel, Germany)

Summary

The effects of Ni deficiency on growth, activities of urease and glutamine synthetase, the contents of urea and total N in rice plants were studied in solution culture when ammonium nitrate and urea as N sources. The results showed that the growth of rice plant was not affected by Ni deficiency when ammonium nitrate as N source, but largely inhibited when urea as N source. The activities of urease in the Ni deficiency plants were very low. The activities of glutamine synthetase were not influenced by the treatments except that its activity in the plants of urea(-Ni) was decreased. The urea contents were higher in the Ni deficiency plants, especially urea accumulated in the shoot of urea(-Ni) plants. The total N content was decreased in the plants of urea(-Ni) compared with other treatments.

Key words Ni deficiency Nitrogen form Urease Glutamine synthetase Urea Rice