

ACC 对不同氮效率油菜生长后期硝态氮再利用的调控机理

余 音¹, 卢 胜¹, 宋海星¹, 官春云², 陈柯豪¹, 张振华^{1,*}

(1 湖南农业大学资源环境学院/南方粮油作物协同创新中心/土壤肥料资源高效利用国家工程实验室/农田污染控制与农业资源利用湖南省重点实验室/植物营养湖南省普通高等学校重点实验室, 湖南长沙 410128;
2 国家油料改良中心湖南分中心, 湖南长沙 410128)

摘要:【目的】研究了进一步解析乙烯对油菜生长后期硝态氮(NO_3^-)再利用的影响, 揭示植株生长后期氮素再利用的生理机制。【方法】以氮高效油菜品种湘油 15 (27 号)与氮低效油菜品种 814 (6 号)为试验材料, 在 15 mmol/L 氮水平下, 每 7 天浇灌一次 50 mL 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid, 简称 ACC), 研究 ACC 对植物生长后期 (花期、收获期) 氮素再利用的影响及其与氮素利用效率 (NUE) 的关系。并用拟南芥野生型 (*col.0*) 和突变体 (*nrt1.5*) 材料作为验证, 分别于玻璃顶网室和 22℃ 恒温培养室进行砂培试验。【结果】ACC 处理显著抑制了油菜 *BnNRT1.5* 的表达, 且植株的衰老可以显著诱导 *BnNRT1.5* 的表达。相对于对照处理, ACC 处理植株韧皮部汁液 NO_3^- 的再转运能力显著降低, 导致下部叶 NO_3^- 含量显著升高, 中部叶 NO_3^- 含量显著下降, 上部叶 NO_3^- 含量无显著变化, 进而导致植株含氮量和籽粒含氮量显著提高, 以及以生物量和籽粒产量为基础的氮素利用效率 (NUE) 显著降低。由此推测, 油菜生长后期氮素的再利用能力受到 *NRT1.5* 基因的显著调控。拟南芥野生型和突变体材料的验证结果表明, 相对于拟南芥野生型 (*col.0*) 材料, 拟南芥 *nrt1.5* 植株生长后期相对于 *col.0* 有更多的 NO_3^- 累积在植株衰老叶片中, 更少的 NO_3^- 通过韧皮部转运到生长旺盛的新叶, 植物生长后期氮素从老叶向新叶转运的再利用能力显著降低。【结论】油菜生长后期氮素的再利用能力受到 ACC 的显著调控, 油菜和拟南芥 *NRT1.5* 基因表达量分别受到抑制或者发生基因突变时, 会导致植株韧皮部汁液 NO_3^- 再转运量减少, 更多 NO_3^- 累积在衰老叶片中而不能得以高效的再利用。因此, 调控油菜生长后期 *NRT1.5* 的表达, 提高油菜生长后期氮素的再转运和利用可以作为提高氮素利用效率的有效手段。

关键词: 油菜; *NRT1.5*; ACC; 氮素再利用; 氮素利用效率

Regulation mechanisms of NO_3^- re-utilization by ACC at later growth stages of *Brassica napus*

YU Yin¹, LU Sheng¹, SONG Hai-xing¹, GUAN Chun-yun², CHEN Ke-hao¹, ZHANG Zhen-hua^{1,*}

(1 College of Resources and Environmental Sciences, Hunan Agricultural University/Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops in China/National Engineering Laboratory of Soil and Fertilizer Resources Efficient Utilization/Hunan Provincial Key Laboratory of Farmland Pollution Control and Agricultural Resources Use/Hunan Provincial Key Laboratory of Plant Nutrition in Common University, Changsha, Hunan 410128, China;
2 National Center of Oilseed Crops Improvement, Hunan Branch, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract:【Objectives】The research will elucidate the regulation mechanisms of NO_3^- re-utilization by 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and reveal the physiological mechanisms of nitrogen (N) redistribution at later growth stage of *Brassica napus*. 【Methods】High N efficient variety Xiangyou15 (No.27) and low N efficient variety 814 (No.6) were cultured in sand under 15 mmol/L nitrogen condition. ACC (50 mL 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)

收稿日期: 2016-11-18 接受日期: 2017-02-28

基金项目: 湖南省自然科学基金青年基金 (2016JJ3069); 南方粮油作物协同创新中心; 国家自然科学基金项目 (31101596); 湖南省百人计划项目; 湖南农大 1515 人才项目资助。

作者简介: 余音 (1992—), 女, 湖南保靖县人, 硕士研究生, 主要从事植物营养生理研究。E-mail: 674404638@qq.com

* 通信作者 E-mail: zhzh1468@163.com

was irrigated every 7 days and the corresponding *Arabidopsis thaliana* wild type (*col.0*) and mutant plants (*nrt1.5*) under greenhouse and environmental chamber respectively, to investigate the regulation mechanisms of NO_3^- re-utilization and its relationship with nitrogen use efficiency (NUE) during the later growth stages. **[Results]** The relative expression of *BnNRT1.5* was significantly inhibited by ACC and senescence. Compared with the control treatment, NO_3^- distribution ability in phloem sap was decreased significantly, resulted in NO_3^- content of the lower leaves was increased significantly, NO_3^- content of middle leaves was decreased significantly, but there was no significant changes of NO_3^- content in upper leaves under ACC treatment, thus lead to the N content of plant tissues and seeds were increased significantly, and NUE based on biomass and seeds yield were decreased significantly. It was suggested that the N re-utilization capability is significant regulated by *NRT1.5* gene. Using *Arabidopsis thaliana* wild type (*col.0*) and mutant (*nrt1.5*) plants to further elucidate the above results, compared with the wild type (*col.0*), higher proportion of NO_3^- accumulated in the older leaves, lower proportion of NO_3^- redistributed from older leaves to new leaves through phloem sap in mutant *nrt1.5* plants during the later growth stage, redistribution ability of NO_3^- from older leaves to new leaves during senescence decreased significantly.

[Conclusions] N re-utilization efficiency was regulated by ACC significantly at the later growth stages of *Brassica napus*, redistribution contents of NO_3^- in phloem sap was decreased in *Arabidopsis* mutant (*nrt1.5*) or *Brassica napus* under ACC treatment, higher proportion of NO_3^- accumulated in older leaves and cannot be re-utilized efficiently at the later growth stages. Therefore, *NRT1.5* is an effective means to improve the crop NUE by increasing N redistribution and re-utilization during the later growth stage.

Key words: *Brassica napus*; *NRT1.5*; ACC; nitrogen re-utilization; nitrogen use efficiency

氮(N)是作物生长所必需的营养元素之一, 而生长后期氮素再利用是决定作物产量至关重要的因素之一^[1-2]。据统计, 目前油菜氮肥施用量已达200~300 kg/hm², 氮肥利用效率则不超过40%, 造成了大量资源浪费和严重的环境问题^[3]。硝态氮(NO_3^-)是旱地土壤中氮素的主要形态, 是作物的重要氮源, 高效利用从土壤中吸收的 NO_3^- 并且累积在体内是作物应对缺氮环境的重要保证^[4]。在蔬菜研究领域, NO_3^- 在叶片的累积和再利用一直是研究热点^[5-6], 但对经济作物有关的研究不多。

大量研究表明, 开花前植物体内贮存的氮向籽粒的重新分配要比开花后期吸收的氮对籽粒氮贡献更重要^[7], 在作物收获期籽粒中50%~90%的氮来自营养器官氮素再利用^[8]。 NO_3^- 的再利用与氮素利用效率密切相关, 开花后作物对氮素的吸收减少, 油菜角果和花中氮的累积主要靠内源氮的再转运, NO_3^- 再利用量高的植株氮素利用效率也高^[9-11]。 NO_3^- 再分配对植株器官发育乃至整个植株的代谢生理都能够产生重要影响。

植物生长后期氮素再转移主要由植株韧皮部来运输, *NRT1.7*基因的分离及其功能鉴定打破了无机氮不参与氮素再分配的传统理论, NO_3^- 可以通过叶片、根部韧皮部被直接转运^[12-14]。迄今共发现3个NRT家族成员参与 NO_3^- 韧皮部运输: *NRT1.7*、

NRT1.9、*NRT2.4*, 其中*AtNRT1.7*是叶片 NO_3^- 再分配的重要调节基因^[12], *AtNRT1.9*基因具有根部 NO_3^- 韧皮部装载的功能^[13], *AtNRT2.4*参与地上部韧皮部 NO_3^- 的运输过程^[14]。*AtNRT1.5*作为NRT1家族成员之一, 具有装载根部木质部 NO_3^- 的功能^[15]。近年研究发现, 拟南芥突变体*nrt1.5*中 NO_3^- 在根与茎中的分配比例发生变化, 有更多的 NO_3^- 留在了植物根部^[16-17]。乙烯是调控生长发育、成熟衰老的重要内源激素, 具有影响果实成熟及植物的衰老等多种功能^[18-19]。最近有研究表明, 乙烯对拟南芥*AtNRT1.5*的表达有影响, 在乙烯前体ACC的作用下*AtNRT1.5*表达量被抑制^[20]。随着拟南芥NRT家族基因的相继克隆, 越来越多 NO_3^- 转运蛋白的具体功能被鉴定, 但NRT家族基因的功能很少能在农作物生产实践中得到验证。通过前人的研究发现*NRT1.5*基因对 NO_3^- 的转运具有很强的调控能力, 因此猜想*NRT1.5*基因是否会对油菜生长后期叶片氮素营养的再利用起到一定的调控作用?

基于上述假设, 本文以氮高效品种湘油15(27号)与氮低效品种814(6号)为试验材料, 用不同基因型拟南芥(*col.0*、*nrt1.5*)材料作为验证, 分别进行盆栽试验, 研究 NO_3^- 转运蛋白*BnNRT1.5*对油菜生长后期 NO_3^- 累积和再利用的影响, 进一步明确*NRT1.5*在植物生长后期 NO_3^- 再利用过程中的作用,

为进一步揭示油菜生长后期氮素再利用的调控机理及其与 NUE 的关系提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

油菜试验于 2015~2016 年在湖南农业大学资源与环境试验基地的玻璃网室中进行, 通风效果较好, 与室外环境相通。供试油菜品种为本课题组经过大田试验筛选出的氮高效品种湘油 15(27 号)和氮低效品种 814(6 号), 其氮高效品种的氮素吸收与利用效率均高于氮低效品种。于 2015 年 10 月 5 日大田育苗, 11 月 10 日移栽, 用 32 cm × 23 cm × 24 cm 红色塑料桶培育, 每桶育一株, 以水和稀盐酸清洗干净的珍珠岩作基质, 进行砂培试验。在油菜不同生育期施用 Hoagland 完全营养液, 每 5 天浇灌一次营养液, 苗期、抽苔期、开花期、角果期浇灌量分别为 400、750、500 和 250 mL^[9]。营养液氮水平为 15 mmol/L。于花期初期(3 月初)开始浇灌 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid, ACC), 每 7 天浇灌一次, ACC 体积为 50 mL, 浓度为 100 μmol/L, 以浇灌等量清水作为对照处理(CK)。每个处理重复 3 次。

拟南芥试验于湖南农业大学资源环境学院温室中进行, 室内温度控制在 22 ℃, 光照强度为 80~200 mmol/(m²·s), 16 h 光照/8 h 黑暗。试验为砂培试验, 选取拟南芥野生型(*col.0*)和突变体(*nrt1.5-3*, 以 *col.0* 为背景的 *NRT1.5* 突变体)材料^[20]。育苗基质为蛭石:珍珠岩 = 3 : 1, 发芽一周后移栽, 采用 10 cm × 10 cm × 10 cm 塑料盒子培育(外壁用黑色塑料袋包裹避光), 以洗净的珍珠岩作基质, 每盒培育 8 株。每 5 天浇灌一次 1/4 Plant Nutrient Solution (PNS) 营养液^[20], 苗期、抽苔期、开花期、角果期浇灌体积分别为 100、150、100、50 mL。营养液氮水平均为 2.25 mmol/L, 每个突变体重复 4 次, 随机区组排列。

1.2 取样及测定方法

在油菜盛花期, 摘取 3 株下、中、上部(从下往上数第 1、3、6 叶位)各一片叶, 分别洗净、擦干、

剪碎并称取 1.00 g 样品, 用于不同叶位 NO₃⁻ 含量的测定, 重复 3 次; 剪取油菜的最下端两片(老叶)叶柄及从下往上数第 10、11 片(新叶)叶柄, 迅速将其平整面插入装有 15 mL 10 mmol/L 的 EDTA-Na₂ 溶液中, 黑暗中, 25 ℃ 恒温 5 小时, 收集韧皮部汁液^[21], 提取液用于油菜老叶和新叶的韧皮部汁液 NO₃⁻ 含量测定; 在油菜花期和角果初期分别取地上生长健壮部叶片混匀, 液氮速冻, 于 -80 ℃ 冰箱保存, 用于测定 *BnNRT1.5* 的表达量。收获期样品于 105 ℃ 下杀青, 60 ℃~70 ℃ 烘干、称重, 用于测定植株全氮, 重复 5 次。在拟南芥盛花期, 取 8 株莲座叶混合样、茎上叶混合样分别作为老叶、新叶, 剪碎后称取 0.500 g 用于测定鲜样 NO₃⁻ 的含量; 韧皮部汁液收集液体积为 1 mL, 收集方法同上; 在 80%~90% 角果变黄时收获, 杀青、烘干后称重, 用于测定全氮。

NO₃⁻ 含量用可见光分光光度计法测定^[22]; 全氮测定采用浓硫酸-双氧水消化^[23], 用 AA3 连续流动分析仪(型号: Auto Analyzer 3, 德国)测定^[24]; 提取叶片 RNA 并转换成 cDNA, 采用表 1 的目标基因和参考基因的引物序列进行 qPCR 扩增^[20], 测定 *BnNRT1.5* 的相对表达量。

计算公式^[25]:

籽粒产量为基础的氮素生理效率 = 粒子产量/植株全氮总量

生物产量为基础的氮素生理效率 = 生物产量/植株全氮总量

氮收获指数(NHI) = 粒子全氮/植株全氮总量

收获指数(HI) = 粒子产量/生物产量

变化率 = (处理值 - 对照值)/对照值 × 100%

1.3 数据分析与处理

试验所得数据用 Microsoft Excel 软件计算, 用 DPS 软件统计分析。

2 结果与分析

2.1 ACC 处理对油菜叶片及韧皮部汁液中 NO₃⁻ 含量及分配的影响

表 2 表明, 正常处理下, 花期两油菜品种叶片

表 1 油菜 qRT-PCR 的引物序列表

Table 1 Sequences of qRT-PCR primer for rape

基因号 Gene information	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
BnActin (AF111812)	GGTCGGGACCTCACTGATT	CAACCGAACCTCTCAGCTCC
BnNRT1.5 (EV220114)	CAATCTACTTGATCGCATTG	CCTGTAGGCTGAAGTTTCG

表 2 不同氮效率油菜花期不同叶位 NO_3^- 含量及比例Table 2 NO_3^- content and proportion in different leaves of different *B. napus* genotypes at flowering stage

品种 Genotype	处理 Treatment	下部叶 Lower leaf ($\mu\text{g/g}$)	中部叶 Middle leaf ($\mu\text{g/g}$)	上部叶 Upper leaf ($\mu\text{g/g}$)	下部叶/中部叶 Lower/middle leaf (%)	下部叶/上部叶 Lower/upper leaf (%)
6号	CK	88.68 ± 8.77 cB	328.77 ± 10.32 bA	442.85 ± 17.25 aA	26.64 D	19.92 C
No.6	ACC	253.44 ± 27.30 bA	147.56 ± 15.46 cB	500.10 ± 37.86 aA	161.45 B	51.13 B
	变化率 Change rate (%)	185.8	-95.6	12.9		
27号	CK	82.93 ± 2.02 bB	114.93 ± 39.296 aB	142.41 ± 25.87 aD	77.11 C	59.37 B
No.27	ACC	246.60 ± 53.50 aA	113.10 ± 32.006 bB	231.60 ± 41.50 aC	220.99 A	105.98 A
	变化率 Change rate (%)	197.4	-1.6	62.6		

注 (Note) : 数据后不同小写字母表示横排数据差异达 5% 显著水平 Values followed by different lowercase letters indicate the horizontal data significant differences at the 5% level. 不同大写字母表示竖排数据比较差异达 5% 显著水平 Values followed by different capital letters indicate the vertical data significant differences at the 5% level.

NO_3^- 含量由高到低为上部叶片 > 中部叶 > 下部叶, 6 号上部叶与中部叶 NO_3^- 含量都显著高于 27 号, 但是两品种下部衰老叶片的 NO_3^- 含量差异不显著。说明花期叶片 NO_3^- 主要集中在中、上部, 并且 6 号品种叶片 NO_3^- 含量总体高于 27 号。

ACC 处理之后, 6 号各部位叶片 NO_3^- 含量顺序变为上部叶 > 下部叶 > 中部叶, 27 号各部位叶片 NO_3^- 含量顺序变为下部叶 > 上部叶 > 中部叶。相对于对照, 两品种的下部叶片 NO_3^- 含量都极显著提高。植株叶片 NO_3^- 分配比例发生改变。6 号下部叶片 NO_3^- 含量与中部、上部叶片 NO_3^- 含量比值在对照植株中分别为 26.6% 和 19.9%, 处理后比例提高到 161.4% 和 51.1%。27 号下部叶与中部叶片、上部叶 NO_3^- 的比例为 77.1%、59.4%, 处理后比例提高到 221.0%、106.0%。6 号中部叶片 NO_3^- 含量显著降低, 27 号没有显著变化。油菜上部叶片 NO_3^- 含量相

对稳定。说明 ACC 处理影响了油菜叶片 NO_3^- 的分布, 对下部老叶叶片 NO_3^- 含量影响较大, 对幼嫩叶片 NO_3^- 的影响较小。

表 3 结果表明, 不同氮效率油菜花期 6 号叶片韧皮部 NO_3^- 含量比 27 号高。不同品种油菜韧皮部中 NO_3^- 含量不同, 但总趋势是新叶(上部叶) > 老叶(下部叶)。品种间叶片韧皮部 NO_3^- 含量比例不同。6 号老叶/新叶为 52.4%, 而 27 号老叶/新叶则为 79.6%, 导致品种间老叶/新叶比例差异极显著的原因主要是 6 号的新叶韧皮部汁液 NO_3^- 浓度较高。开花期 6 号、27 号老叶韧皮部 NO_3^- 量差异不显著。

ACC 处理之后, 6 号老叶、新叶韧皮部 NO_3^- 含量均显著降低, 老叶下降了 49.7%, 新叶下降了 40.39%; 27 号老叶韧皮部 NO_3^- 含量下降了 42.8%, 新叶含量无显著变化, 说明 ACC 影响油菜叶片韧皮部 NO_3^- 含量及其转运, 但不同油菜品种间的影响有

表 3 不同氮效率油菜花期老叶、新叶韧皮部汁液中 NO_3^- 含量及比例Table 3 NO_3^- content and proportion in phloem sap of the old leaves and new leaves in different *B. napus* genotypes

品种 Genotype	处理 Treatment	老叶 Old leaf ($\mu\text{g/mL}$)	新叶 New leaf ($\mu\text{g/mL}$)	老叶/新叶 Old/new leaf (%)
6号	CK	23.95 ± 1.43 bA	46.57 ± 9.34 aA	52.39 ± 7.45 B
No.6	ACC	12.05 ± 2.70 bB	27.76 ± 3.93 aB	43.08 ± 3.41 B
	变化率 Change rate (%)	-49.69	-40.39	
27号	CK	22.76 ± 3.22 bA	28.71 ± 1.43 aB	79.60 ± 13.43 A
No.27	ACC	13.24 ± 1.49 bB	28.78 ± 2.86 aB	45.97 ± 1.37 B
	变化率 Change rate (%)	-42.83	0.24	

注 (Note) : 数据后不同小写字母表示横排数据间差异达 5% 显著水平 Values followed by different lowercase letters indicate the horizontal data significant differences at the 5% level. 数据后不同大写字母表示竖排数据间差异达 5% 显著水平 Values followed by different capital letters indicate the vertical data significant differences at the 5% level.

差异。ACC 处理后, 6 号和 27 号韧皮部老叶/新叶 NO_3^- 含量比例, 分别从 52.4%、79.6% 下降到 43.1%、46.0%, 说明 ACC 处理对老叶韧皮部 NO_3^- 转运的影响要大于对新叶的影响。

2.2 ACC 处理对油菜产量及氮效率的影响

表 4 结果表明, 27 号生物产量、籽粒产量、籽粒含氮量、收获指数、氮收获指数和 NUE (生物

产量/植株全氮) 均显著高于 6 号品种, 植株含氮量和植株全氮差异并不显著。

不同品种油菜对 ACC 的响应存在差异。6 号品种 ACC 与 CK 相比, 生物产量、籽粒产量、NUE (生物产量/植株全氮)、NUE (籽粒产量/植株全氮) 显著降低, 但籽粒含氮量却显著提高; 27 号品种 ACC 与 CK 相比, ACC 植株全氮和收获指数显著提高, 虽然生物产量差异不显著, 但 NUE 显著低于 CK。

表 4 不同基因型油菜产量及氮效率的变化值

Table 4 The variation of seed yield and N use efficiency of different *B. napus* genotypes

品种 Genotype	处理 Treatment	生物产量 Biomass	籽粒产量 Seed yield	植株含氮量 N content of plant	籽粒含氮量 N content of seed	植株全氮 Total N of plant
		(g)	(g)	(mg/g, DW)	(mg/g, DW)	(g/plant)
6 号	CK	41.37 ± 1.35 b	7.42 ± 0.29 c	37.96 ± 2.65 a	45.54 ± 0.56 c	1.78 ± 0.11 b
No.6	ACC	33.26 ± 3.08 c	5.61 ± 0.09 d	38.39 ± 1.00 a	54.56 ± 0.70 a	1.90 ± 0.23 b
	变化率 Change rate(%)	-24.32	-32.32	1.15	16.53	6.53
27 号	CK	48.17 ± 1.85 a	8.64 ± 0.14 b	37.14 ± 1.02 a	50.52 ± 1.68 b	1.79 ± 0.15 b
No.27	ACC	48.47 ± 2.26 a	10.17 ± 0.06 a	37.98 ± 1.31 a	50.57 ± 0.79 b	2.15 ± 0.04 a
	变化率 Change rate(%)	0.12	15.1	2.25	0.1	20.25
品种 Genotype	处理 Treatment	籽粒全氮 Total N of seed	氮收获指数 NHI	收获指数 HI	生物产量/植株全氮 Biomass/N uptake amount	籽粒产量/植株全氮 Seed yield /N uptake amount
		(g/plant)				
6 号	CK	0.34 ± 0.01 c	0.19 ± 0.02 c	0.18 ± 0.006 c	27.95 ± 2.23 b	4.59 ± 0.01 ab
No.6	ACC	0.39 ± 0.08 bc	0.21 ± 0.02 bc	0.17 ± 0.004 c	24.02 ± 2.70 c	3.34 ± 0.34 c
	变化率 Change rate(%)	14.32	7.35	-5.88	-14.06	-27.23
27 号	CK	0.43 ± 0.04 ab	0.24 ± 0.02 ab	0.18 ± 0.004 b	30.03 ± 2.02 a	5.58 ± 0.25 a
No.27	ACC	0.51 ± 0.01 a	0.24 ± 0.02 a	0.21 ± 0.008 a	26.35 ± 0.90 bc	4.28 ± 0.84 bc
	变化率 Change rate(%)	16.42	2.24	15.29	-12.25	-23.3

注 (Note) : 同列数据后不同小写字母表示处理间差异达 5% 显著水平 Values followed by different lowercase letters indicate significant differences at the 5% level among treatments.

2.3 油菜 *BnNRT1.5* 基因表达量对 ACC 的响应

图 1 表明, ACC 处理之后, 27 号和 6 号在花期以及角果初期 *BnNRT1.5* 的表达量显著下降。说明 ACC 处理可以显著抑制油菜生长后期 *BnNRT1.5* 的表达。相对于盛花期, 角果初期 *BnNRT1.5* 的表达量显著升高, 表明衰老对于 *BnNRT1.5* 的表达有强烈诱导作用。

2.4 *AtNRT1.5* 对拟南芥叶片及韧皮部汁液中 NO_3^- 含量及分配的影响

表 5 表明, *col.0* 老叶中 NO_3^- 含量显著低于新叶, NO_3^- 含量老叶/新叶为 59.0%, 但在 *nrt1.5-3* 中却相反, 老叶中 NO_3^- 含量显著高于新叶, NO_3^- 含量

老叶/新叶为 153.1%。说明 *AtNRT1.5* 突变之后, NO_3^- 在拟南芥老叶中显著积累。

由表 6 看出, *AtNRT1.5* 突变导致拟南芥韧皮部汁液 NO_3^- 含量和分配改变。*col.0* 新叶韧皮部汁液 NO_3^- 含量为 45.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 显著高于其老叶中含量。*nrt1.5-3* 新叶韧皮部汁液 NO_3^- 含量为 59.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 显著低于其老叶中含量。与 *col.0* 相比, 突变体 *nrt1.5-3* 新叶韧皮部汁液 NO_3^- 含量下降 67.3%, 达到差异显著水平; 老叶韧皮部汁液 NO_3^- 含量下降 36.7%, 达到差异显著水平。*col.0* 韧皮部 NO_3^- 含量老叶/新叶比例为 45.6%, 而 *nrt1.5-3* 中比例高达 87.9%。说明 *AtNRT1.5* 突变影响植株韧皮部汁液中 NO_3^- 在库源之

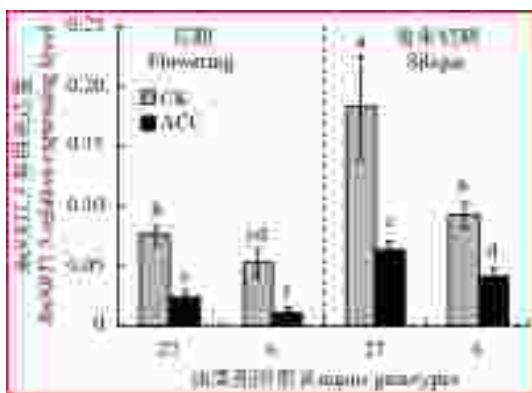


图 1 不同油菜基因型地上部 *BnNRT1.5* 相对表达量
Fig. 1 Relative expression of *BnNRT1.5* in shoot of *B. napus* genotypes

[注 (Note) : 方柱上不同字母表示处理间在 5% 水平差异显著
Different letters above bars mean significant differences among treatments at the 5% level.]

间的再运输, 老叶中 NO_3^- 通过韧皮部向新叶的转运减少, 这是导致突变体 *nrt1.5-3* 老叶 NO_3^- 显著积累的主要原因之一。

2.5 AtNRT1.5 对拟南芥产量及氮效率的影响

收获期产量及氮效率是评价植株生长情况的重要指标。从表 7 可知, 拟南芥植株 *nrt1.5-3* 含氮量、籽粒含氮量显著高于 *col.0*。*nrt1.5-3* 生物产量、籽粒产量、籽粒全氮、NUE (籽粒产量/植株全氮) 和 NUE

(生物产量/植株全氮) 均显著低于 *col.0*。可见, 拟南芥 *AtNRT1.5* 基因突变会导致植株的生物量、籽粒产量、收获指数、氮收获指数和 NUE 显著下降。

3 讨论

3.1 乙烯对不同氮效率油菜生长后期全氮和产量的影响

乙烯是重要的内源激素, 能调控植物的代谢, 同时乙烯作为一种信号分子, 参与植物的抗病、机械损伤及抗逆性反应, 影响果蔬的成熟与衰老, 调控植物代谢基因的表达^[26]。植物生长调节剂乙烯利通过释放乙烯起作用。ACC 作为乙烯合成的前体物质, 经过 ACS、ACO 等酶的催合成乙烯^[27], 因此, 外加 ACC 和乙烯利处理都可以被认为是添加乙烯处理。氮低效油菜 (6 号) 在乙烯处理下, 无论植株全氮还是籽粒全氮相对于对照没有显著变化, 但籽粒含氮量却提高了 16.5%; 在乙烯作用下, 氮高效油菜 (27 号) 籽粒全氮有增加的趋势但是没有达到显著差异, 植株全氮却显著提高 20.2% (表 4), 与喷施一定浓度乙烯利能提高花生籽粒全氮和冬小麦地上部全氮的结果相一致^[28-29]。可见, 乙烯显著影响植株全氮以及籽粒全氮, 但影响到底是正面还是负面还因作物基因型差异以及生育期不同而有所差异。

表 5 不同拟南芥老叶、新叶 NO_3^- 含量及比例

Table 5 NO_3^- content and proportion in old leaves and new leaves of two *A. thaliana* genotypes

基因型 Genotype	老叶 ($\mu\text{g/g}$) Old leaves	新叶 ($\mu\text{g/g}$) New leaves	老叶/新叶 (%) Old leaves /New leaves (%)
<i>col.0</i>	35.35 ± 2.17 bB	60.27 ± 7.46 aA	59.01 B
<i>nrt1.5-3</i>	59.07 ± 3.68 aA	39.37 ± 8.33 bB	153.07 A
变化率 Change rate(%)	67.10	-34.68	

注 (Note) : 数据后不同小写字母表示横排数据间差异达 5% 显著水平 Values followed by different lowercase letters indicate the horizontal data significant differences at the 5% level. 数据后不同大写字母表示竖排数据间差异达 5% 显著水平 Values followed by different capital letters indicate the vertical data significant differences at the 5% level.

表 6 不同拟南芥老叶、新叶韧皮部汁液 NO_3^- 含量及比例

Table 6 NO_3^- content and proportion in the phloem sap of old leaves and new leaves in two *Athaliana* genotypes

基因型 Genotype	老叶 ($\mu\text{g/mL}$) Old leaves	新叶 ($\mu\text{g/mL}$) New leaves	老叶/新叶 (%) Old leaves /new leaves
<i>col.0</i>	20.62 ± 0.79 bA	45.30 ± 2.65 aA	45.57 ± 1.65 B
<i>nrt1.5-3</i>	13.06 ± 1.69 bA	14.82 ± 1.03 bA	87.88 ± 5.17 A
变化率 Change rate (%)	-36.67	-67.28	

注 (Note) : 数据后不同小写字母表示横排数据间差异达 5% 显著水平 Values followed by different lowercase letters indicate the horizontal data significant differences at the 5% level. 数据后不同大写字母表示竖排数据间差异达 5% 显著水平 Values followed by different capital letters indicate the vertical data significant differences at the 5% level.

表 7 不同基因型拟南芥产量及氮效率的变化值

Table 7 The variation of yield and N use efficiency of different *Athaliana* genotypes

指标 Index	col.o	nrt1.5-3	变化率 Change rate (%)
生物产量 Biomass (g)	1214.18 ± 176.94 a	731 ± 80.53 b	-65.90
籽粒产量 Seed yield (g)	303 ± 37.45 a	135 ± 24.79 b	-123.08
植株含氮量 N content of plant (mg/g, DW)	24.76 ± 1.41 b	35.47 ± 1.72 a	30.19
籽粒含氮量 N content of seed (mg/g, DW)	34.50 ± 1.11 b	41.50 ± 15.3 a	16.87
植株全氮 Total N of plant (g/plant)	238.98 ± 14.91 a	230.70 ± 14.20 a	-3.59
籽粒全氮 Total N of seed (g/plant)	104.42 ± 10.90 a	56.15 ± 10.84 b	-85.96
氮收获指数 NHI	0.25 ± 0.01 a	0.18 ± 0.02 b	-35.87
收获指数 HI	0.33 ± 0.01 a	0.24 ± 0.02 b	-39.80
NUE (生物产量/植株全氮) Biomass/N uptake amount	5.06 ± 0.45 a	3.16 ± 0.19 b	-60.15
NUE (籽粒产量/植株全氮) Seed yield /N uptake amount	1.27 ± 0.10 a	0.58 ± 0.11 b	-115.34

注 (Note) : 数据后不同小写字母表示横排数据间差异达 5% 显著水平 Values followed by different lowercase letters indicate the horizontal data significant differences at the 5% level.

乙烯对提高作物产量方面的研究存在争议, 有研究者认为乙烯处理能提高作物的产量^[28], 有研究者认为乙烯对产量因子没有显著影响^[30], 也有研究者认为乙烯通过降低光合作用降低产量^[31]。氮低效油菜(6号)的研究发现, ACC 确实会使收获期油菜生物产量以及籽粒产量降低, 与程云清等用 ACC 处理大豆得到的结果一致, 可能与乙烯改变油菜叶片 NO₃⁻含量(表2), 降低 NO₃⁻再利用能力有关(表3)。但从 ACC 处理使氮高效油菜(27号)籽粒产量显著提高的研究结果(表4)来看, ACC 处理提高油菜籽粒产量的结果与葛建军乙烯提高花生产量的研究一致。作物收获指数是作物收获时经济产量与生物产量之比, 一定程度上反映了源器官光合产物转运到库器官的能力大小。6号、27号两油菜品种的收获指数为 0.18(表4)与杨兰等^[32]油菜收获指数为 0.14~0.17 的结果相近, 但低于宋海星等^[25]油菜收获指数为 0.23~0.26 的结果, 可能与培养条件差异有关。因此乙烯是否能提高作物全氮、产量以及收获指数与作物的基因型及培养条件有关。

3.2 NO₃⁻转运蛋白基因(NRT1.5)对氮效率的调控

作物拥有较高的氮素利用效率(NUE)是作物获得高产的重要保障, 氮效率高低由氮素吸收效率和利用效率共同决定, 作物生长后期由于根系吸收能力减弱, 不能很好地利用环境中的氮素, 所以植物生长后期提高氮素利用效率往往作为提高作物氮效率的重要手段。植物生长后期氮素转移主要以有机氮(如 Rubisco)和无机氮(NO₃⁻)的形式存在, 无机氮

(NO₃⁻)不但为植物的生长提供营养, 而且作为信号分子调控植物代谢过程^[32~33]。近年来国内外越来越多的学者关注植物 NO₃⁻的吸收转运过程以及 NO₃⁻代谢有关基因的研究, 与氮代谢有关转运蛋白与基因的研究或许将成为下一个提高 NUE 的研究重点与热点^[34~35]。有发现超表达烟草中与氮素吸收、同化有关的基因, 如 GS 基因能够提高植株的氮效率, 但也有研究发现即使超表达苜蓿 GS 基因却并未使其氮效率得到提高^[36~37]。NO₃⁻转运蛋白与 NO₃⁻的吸收、同化以及利用密切相关。目前, 已经克隆了 4 类 NO₃⁻转运蛋白基因家族, 主要包括 NRT1、NRT2、CLC 和 SLAC^[38]。NRT1.5 属于 NRT1 家族成员, 是一种低亲和双向转运蛋白, 它位于质膜中, 在靠近木质部的中柱鞘细胞中表达, 具有装载根部木质部 NO₃⁻的功能^[15]。近年研究发现, 当拟南芥受到 Cd²⁺胁迫时, AtNRT1.5 在根部的表达受抑制, 同时 AtNRT1.8 表达上调; 拟南芥突变体 nrt1.5 中更多的 NO₃⁻累积在根部, AtNRT1.5 缺失改变植物体 NO₃⁻在根与茎中的分配比例^[16~17]。乙烯处理后油菜 BnNRT1.5 的表达量显著降低(图1), 与前人用乙烯处理拟南芥, AtNRT1.5 表达量被抑制的研究结果一致^[17, 20]; 且角果期的抑制作用比花期的抑制强烈(图1), 可能与 AtNRT1.5 还受到衰老的诱导调控有关^[22]。

拟南芥的试验也证实了 NRT1.5 参与植物生长后期氮素再转运的猜想。拟南芥 AtNRT1.5 不仅参与 NO₃⁻在根与茎中的装载, 而且对拟南芥生长后期叶片中 NO₃⁻的累积和转运有重要意义。突变体 nrt1.5-3

衰老叶片中 NO_3^- 显著积累, 新叶 NO_3^- 含量显著下降(表 5), NO_3^- 转运受阻, 无论老叶还是新叶 *nrt1.5* 突变体韧皮部 NO_3^- 含量相对于对照都降低(表 6)。由于 NO_3^- 不能及时转运到其它生长旺盛部位, 造成突变体植株生物产量、籽粒产量, NUE 均显著低于野生型 *col.0*(表 7)。

4 结论

油菜生长后期氮素的再利用能力受到乙烯(100 $\mu\text{mol/L}$ ACC 处理)的显著调控, 油菜 *NRT1.5* 基因表达量受到抑制或者拟南芥 *NRT1.5* 基因发生突变时, 会导致植株韧皮部汁液 NO_3^- 再转运量减少, 新叶 NO_3^- 含量显著下降, 更多 NO_3^- 累积在衰老叶片中而不能得以高效的再利用, 进而影响油菜生长后期的生物产量以及氮素利用效率。因此, 调控 *NRT1.5* 的表达提高植株生长后期氮素的再转运和再利用可以作为提高植物 NUE 的有效手段。

参 考 文 献:

- [1] Gastal F, Lemaire G. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(370): 789–799.
- [2] Good A G, Shrawat A K, Muench D G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production?[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(12): 597–605.
- [3] 杨睿, 伍晓明, 安蓉, 等. 同基因型油菜氮素利用效率的差异及其与农艺性状和氮营养性状的关系[J]. *植物营养与肥料学报*, 2013, 19(3): 586–596.
Yang R, Wu X M, An R, et al. Differences of nitrogen use efficiency of rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes and their relations to agronomic and nitrogen characteristics[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2013, 19(3): 586–596.
- [4] 刘金鑫, 田秋英, 陈范骏, 米国华. 玉米硝酸盐累积及其在适应持续低氮胁迫中的作用[J]. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(3): 501–505.
Liu J X, Tian Q Y, Chen F J, Mi G H. Nitrate accumulation in maize and its role in adaptation to lasting low nitrogen environments[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2009, 15(3): 501–505.
- [5] 张英鹏, 徐旭军, 林咸永, 等. 氮素形态对菠菜可食部分硝酸盐和草酸累积的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2006, 12(2): 227–232.
Zhang Y P, Xu X J, Lin X Y, et al. Effects of nitrogen forms on nitrate and oxalate accumulation in edible parts of spinach[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer science*, 2006, 12(2): 227–232.
- [6] 都韶婷, 章永松. 增施 CO_2 降低小白菜硝酸盐积累的机理研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2010, 16(6): 1509–1514.
Du S T, Zhang Y S. Mechanisms of CO_2 enrichment-induced decrease of nitrate accumulation in Chinese cabbage (*Brassica chinensis* L.)[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2010, 16(6): 1509–1514.
- [7] Malagoli P, Laine P, Ourry A, et al. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest[J]. *Annals of Botany*, 2005, 95(7): 1187–1198.
- [8] Kichey T, Hirel B, Heumez E, Dubois F, Le Gouis J. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.) post anthesis nitrogen uptake and remobilization to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers[J]. *Field Crops Research*, 2007, 102(1): 22–32.
- [9] 杨兰, 荣湘民, 宋海星, 等. 生长调节剂对油菜产量及氮素利用效率的影响[J]. *湖南农业科学*, 2012, 33(05): 27–29.
Yang L, Rong X M, Song H X, et al. Effects of growth regulator on yield and nitrogen physiological efficiency of rape[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2012, 33(05): 27–29.
- [10] Zhang Z H, Song H X, Liu Q, Rong X M, et al. Study on differences of nitrogen efficiency and nitrogen response in different oilseed rape (*Brassica napus* L.) varieties[J]. *Asia Journal of Crop Science*, 2009, 1(2): 105–112.
- [11] Marschner H. Mineral nutrition in higher plants[J]. *Plant, Cell & Environment*, 1988, 11(2): 147–148.
- [12] Fan S C, Lin C S, Hsu P K, et al. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate[J]. *Plant Cell*, 2009, 21(9): 2750–2761.
- [13] Wang Y Y, Tsay Y F. *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.9 is important in phloem nitrate transport[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(5): 1945–1957.
- [14] Kiba T, Feriabourrellier A B, Lafouge F, et al. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.4 plays a double Role in roots and shoots of nitrogen-starved plants[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(1): 830–835.
- [15] Lin S H, Kuo H F, Canivenc G, et al. Mutation of the *Arabidopsis* NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(9): 2514–2528.
- [16] Zhang G B, Yi H Y, Gong J M. The *Arabidopsis* Ethylene/Jasmonic acid-NRT signaling module coordinates nitrate reallocation and the trade-off between growth and environmental adaptation[J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(10): 3984–3998.
- [17] Chen C Z, Lv X F, Li J Y, et al. *Arabidopsis* NRT1.5 is another essential component in the regulation of nitrate reallocation and stress tolerance[J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(4): 1582–1590.
- [18] 杨晓颖, 胡伟, 徐碧玉, 金志强. 乙烯与果实成熟关系的研究进展[J]. *热带农业科学*, 2008, 28(2): 70–75.
Yang X Y, Hu W, Xu B Y, Jin Z Q. Advances on the relationship between ethylene and fruit ripening[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2008, 28(2): 70–75.
- [19] Xie Q, Hu Z, Zhu Z, et al. Over expression of a novel MADS-box gene SIFYFL delays senescence, fruit ripening and abscission in tomato[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(7491): 4367.
- [20] Han Y L, Song H X, Yu Y, et al. Nitrogen use efficiency is mediated by vacuolar nitrate sequestration capacity in roots of *Brassica napus*[J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(3): 1684–1698.
- [21] King R W, Zeevaart J A. Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents[J]. *Plant Physiology*, 1974, 53(1): 96–103.

- [22] 李合生主编. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- Li H S. Plant physiology and biochemistry experiment principle and technology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- [23] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- Bao S D. Soil chemistry analysis [M]. Beijing: Agricultural Press Chinese, 2000.
- [24] 张英利, 许安民, 尚浩博, 马爱生. AA3型连续流动分析仪测定土壤和植物全氮的方法研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(10): 128–132.
- Zhang Y L, Xu A M, Shan H B, Ma A S. Determination study of total nitrogen in soil and plant by continuous flow analytical system[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture, 2006, 34(10): 128–132.
- [25] 宋海星, 彭建伟, 刘强, 等. 不同氮素生理效率油菜生育后期氮素再分配特性研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(6): 1858–1864.
- Song H X, Peng J W, Liu Q, et al. Nitrogen redistribution characteristics of oilseed rape varieties with different nitrogen physiological efficiency during later growing period[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(6): 1858–1864.
- [26] 穆师洋, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 乙烯的信号分子作用及其在采后果蔬生理代谢调控的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 375–378.
- Mu S Y, Hu W Z, Jing A L, et al. Research progress in the role of ACC as signal molecule and regulation of physiological metabolism in postharvest fruits and vegetables[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(3): 375–378.
- [27] 陈新建, 刘国顺, 陈占宽, 等. 乙烯生物合成途径及其相关基因工程的研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(1): 83–98.
- Chen X J, Liu G S, Chen Z K, et al. A review of the pathway of ACC biosynthesis and the relevant genetic engineering[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2002, 10(1): 83–98.
- [28] 葛建军, 朱林, 张国良, 等. 乙烯利对花生氮代谢和光合特性的影响[J]. 花生学报, 2008, 37(2): 22–27.
- Ge J J, Zhu L, Zhang G L, et al. Effects of ethephon on nitrogen metabolism and photosynthesis characters of peanut[J]. Journal of Peanut Science, 2008, 37(2): 22–27.
- [29] Van Sanford D A, 等. 乙烯利和氮在冬小麦中的应用[J]. 麦类作物学报, 1990, 6(6): 43–45.
- Van Sanford D A, et al. Application of ethephon and nitrogen in winter wheat[J]. Journal of Triticeae Crops, 1990, 6(6): 43–45.
- [30] 叶德练, 王玉斌, 周琳, 等. 乙烯利和氮肥对夏玉米氮素吸收与利用及产量的调控效应[J]. 作物学报, 2015, 41(11): 1701–1710.
- Ye D L, Wang Y B, Zhou L, et al. Effect of ethephon and nitrogen fertilizer on nitrogen uptake, nitrogen use efficiency and yield of summer maize[J]. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(11): 1701–1710.
- [31] 程云清, 赵桂兰, 刘剑锋, 等. 乙烯抑制剂AVG和促进剂ACC对大豆幼苗叶片光合特征的影响[J]. 浙江大学学报, 2010, 36(4): 419–426.
- [32] Chen X Q, Zhao G L, Liu J F, et al. Effects of ACC inhibitor and promoter on photosynthetic characteristics of soybean (*Glycine max*) seedling leaves[J]. Journal of Zhejiang University, 2010, 36(4): 419–426.
- [33] 张振华. 油菜体内氮素再分配与氮素生理效率的关系研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士论文, 2007.
- Zhang Z H, Studies on the relationship between the nitrogen distribution and the nitrogen physiological efficiency in oilseed rape [M]. Changsha: Master Dissertation of Hunan Agricultural Universally, 2007.
- [34] 李建勇, 龚继明. 植物硝酸根信号感受与传导途径[J]. 植物生理学报, 2011, 47(2): 111–118.
- Li J Y, Gong G M. Nitrate signal sensing and transduction in higher[J]. Plant Physiology Journal, 2011, 47(2): 111–118.
- [35] 张鹏, 张然然, 都韶婷. 植物体对硝态氮的吸收转运机制研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(3): 752–762.
- Zhang P, Zhang R R, Du S T. Research advances in nitrate uptake and transport in plants[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2015, 21(3): 752–762.
- [36] 付捷, 田慧, 高亚军. 分子生物学途径提高作物氮效率研究进展[J]. 中国土壤与肥料, 2013, (4): 1–5.
- Fu J, Tian H, Gao Y G. Advances in molecular biological approaches for improving nitrogen efficiency of crops[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2013, (4): 1–5.
- [37] Oliveira I C, Brears T, Knight T J, et al. Overexpression of cytosolic glutamine synthetase: relation to nitrogen, light and photorespiration[J]. Plant Physiology, 2002, 129(3): 1170–1180.
- [38] Ortega J L, Temple S J, Sengupta-Gopalan C. Constitutive overexpression of cytosolic glutamine synthetase (GS_1) gene in transgenic alfalfa demonstrates that GS_1 may be regulated at the level of RNA stability and protein turnover[J]. Plant Physiology, 2001, 126(1): 109–121.
- [39] Wang, Ya Y, Hsu, et al. Uptake, allocation and signaling of nitrate[J]. Trend in Plant Science, 2012, 17(8): 458–467.