

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

王小纯¹, 熊淑萍¹, 马新明^{1*}, 张娟娟¹, 王志强²

(1. 河南农业大学农学院, 郑州 450002; 2. 武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要:采用盆栽方法研究了氮素形态对不同专用型小麦开花后氮素同化关键酶活性及籽粒蛋白质含量的影响。结果表明:不同专用型小麦氮素同化关键酶硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶对氮素形态的反应不同。强筋小麦豫麦 34 施用酰胺态氮对旗叶硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶活性、籽粒谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶活性具有明显的促进作用,最终籽粒蛋白质含量较高;中筋小麦豫麦 49 在施用铵态氮时,3 种氮素同化关键酶活性均有较大增强,籽粒蛋白质含量最高;弱筋小麦豫麦 50 硝酸还原酶活性以铵态氮处理最高,而籽粒和旗叶谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶活性在酰胺态氮处理下明显增强,酰胺态氮对籽粒中蛋白质含量的增加具有明显的促进作用。相关性分析表明,籽粒蛋白质含量与旗叶 GS 活性和籽粒 GOGAT 活性呈显著或极显著正相关,与旗叶 NR 活性和 GS 活性、籽粒 GOGAT 活性相关性不显著。

关键词:氮素形态;专用小麦;硝酸还原酶;谷氨酰胺合成酶;谷氨酸合酶;蛋白质含量

Effects of different nitrogen forms on key enzyme activity involved in nitrogen metabolism and grain protein content in speciality wheat cultivars

WANG Xiao-Chun¹, XIONG Shu-Ping¹, MA Xin-Ming^{1*}, ZHANG Juan-Juan¹, WANG Zhi-Qiang²

(1. College of Agronomy He'nan Agricultural University, Zhengzhou 450002; 2. College of Life Sciences Wuhan University, Wuhan 430072).

Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(4): 802~807.

Abstract: In order to understand the effects of nitrogen form on key enzyme activity involved in nitrogen metabolism and grain protein content of speciality wheat cultivars, pot experiments were carried out at experimental station of Henan Agricultural University during 2000~2002. Soil containing 9.8 g/kg organic matter, 0.986 g/kg total N, 25.43 mg/kg olsen-p and 259 mg/kg $\text{NH}_4\text{OAc-K}$ was used in the experiments. 18kg of sieved soil was placed in each 30cm×40cm pot. Three cultivars were used in experiments including Yumai34 (a strong gluten cultivar), Yumai49 (medium gluten) and Yumai50 (weak gluten). Nitrogen forms studied were NO_3^- -N (NaNO_3), NH_4 -N (NH_4HCO_3) and CONH_4 -N (urea). Prior to sowing, 3.5 g N, 3.3 g K_2O and 2.9 g P_2O_5 per pot were applied and 1.6 g N was applied to each pot during the elongation stage. Seven plants from each pot were selected when plants had five leaves. The experiment was arranged in a completely random design with eight replications and all pots were managed in the same way.

The NR activity of flag leaves from main stems were measured at 10, 15, 20, 25 and 30 days after flowering using the method of living body. GS and GOGAT in grains and flag leaves were extracted in the 100mmol/L Tris-HCl (pH 7.6) extraction buffer containing 1.0mmol/L EDTA, 1.0mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 10mmol/L 2-mercaptoethanol, and were used for the assay of enzyme activity. The synthetase activity of GS in extracts was determined in a reaction mixture containing imidazole-muriatic acid buffer (0.25mol/L, pH 7.0) 0.6ml, glutamic acid-Na (0.30mol/L, pH 7.0) 0.4ml, ATP-Na (30

基金项目:河南省高校杰出科技人才创新工程基金资助项目(2002KJ CX05);教育部博士点基金资助项目(20040466003)

收稿日期:2004-03-04; **修订日期:**2005-03-08

作者简介:王小纯(1966~),女,河南博爱人,博士,副教授,主要从事分子生物学研究。

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: xinmingma@371.net

Foundation item: He'nan Innovation Project for University Prominent Research Talents (2002KJ CX05) and Found for Doctor's Degree Programs, Ministry of Education(20040466003)

Received date: 2004-03-04; **Accepted date:** 2005-03-08

Biography: WANG Xiao-Chun, Ph. D., Associate professor, mainly engaged in molecular.

mmol/L, pH 7.0) 0.4ml, MgSO_4 (0.5mol/L) 0.2ml and crude GS solution 1.2ml, after the mixture was incubated at 37℃ for 15min, the reaction was terminated by adding acidic FeCl_3 (2% (W/V) TCA and 3.5% (W/V) FeCl_3 in 2% HCl). Production of γ -glutamylhydroxamate was measured with a spectrophotometer at 540nm. One unit of GS activity was the enzyme catalyzing the formation of 1 μ mol γ -glutamylhydroxamate/min at 37℃, the whole GS activity was determined by the μ mol sum of γ -glutamylhydroxamate catalyzed by the whole enzyme per gram fresh material in 15min at present condition. The assay of GOGAT activity were carried out in reaction mixture containing L-Glutamine (20mmol/L) 0.4ml, α -ketoglutaric acid (20mmol/L) 0.5ml, KCL (10mmol/L) 0.1ml, NADH (3mmol/L) 0.2mL and crude enzyme solution 0.3ml, the total volume is 3.0ml by being added with Tris-HCl buffer (pH 7.6, 1.5ml). After reaction beginning, the amount of NADH was measured with 752 ultraviolet -spectrophotometer at 340nm, the OD value was noted per 30 seconds and eleven times continually, the enzyme activity was determined with the steadily decreasing segment of the OD value. One unit of GOGAT activity was the amount of the enzyme catalyzing the decrease of 1 μ mol NADH/min in the reaction mixture at 30℃. After being milled, the grain protein was deposited in water with 5% AcCl_3 at 90℃, and the protein content in grain were measured with the way of semimicro Kjeldahl.

The results showed that the key enzymes involved in nitrogen assimilation, NR, GS and GOGAT, responded differently to N forms due to the speciality wheat cultivars. The NR and GS in leaves, GS and GOGAT in grains of Yumai34 were promoted greatly by $\text{CONH}_4\text{-N}$, and the protein content in grains was highest at last. When $\text{NH}_4\text{-N}$ was applied to Yumai49, the activity of key enzymes involved in nitrogen assimilation were increased evidently, and the grains kept the highest protein content. Applied with $\text{NH}_4\text{-N}$, NR activity of Yumai50 was the highest, but the activities of GS and GOGAT in grains and leaves were increased by $\text{CONH}_4\text{-N}$ treatment, and applying $\text{CONH}_4\text{-N}$ could increase the grains protein content clearly. Grain protein content was closely related to GS activity in flag leaves and GOGAT activity in grains after flowering, but not to NR and GOGAT activity in flag leaves and GS activity in grains.

Key words: nitrogen forms; wheat cultivars with specialized end-uses; nitrate reductase; glutamine synthetase; glutamate synthase; protein content

文章编号:1000-0933(2005)04-0802-06 中图分类号:S143.1 文献标识码:A

氮素是影响植物生长发育及产量和品质的重要因素,关于植物对不同氮素形态的吸收、贮存、运输和同化过程的研究已有很多报道^[1,2]。以前研究认为,硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酸合酶(GOGAT)是氮素同化过程中的关键酶^[3], GS/GOGAT 偶联形成的循环是高等植物氮同化的主要途径,在无机氮转化为有机氮的过程中起关键作用^[4,5]。GS 活性受光、氮素形态、温度及器官与组织的影响^[6]。一些学者通过水培法研究了逆境条件下水稻等植物幼苗氮代谢关键酶活性的变化后指出,GS/GOGAT 途径是氮同化的主要途径,叶片酶活性比根系高,逆境使氮代谢酶活性降低^[6~10]。另有研究表明, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 处理后小麦幼苗根和叶的酶活性比 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 处理高,高浓度处理比低浓度处理酶活性高^[11~13]。旗叶是小麦体内氮贮存与同化的主要营养器官,对籽粒产量与品质的贡献最大^[14,15],近来,虽有关于氮素形态对小麦、水稻和甜菜等作物生长发育影响的报道^[12,13,15,18],但有关氮素形态对不同专用型小麦生育后期氮代谢关键酶活性和籽粒品质影响的研究报道极少。因此,作者于 2000~2002 年以强筋、中筋和弱筋小麦为材料,在盆栽条件下较系统地研究了氮素形态对不同专用型小麦花后氮素同化关键酶活性和籽粒蛋白质含量的影响,旨在为专用型小麦的优化栽培和合理的氮素运筹提供理论依据。

1 试验处理与设计

盆栽试验于 2000~2002 年连续两年在河南农业大学校内试验站进行。试验土壤的养分含量为:有机质 $0.98 \times 10^4 \text{mg/kg}$, 全氮 $9.86 \times 10^2 \text{mg/kg}$, 速效氮 72.47mg/kg , 速效磷 25.43mg/kg , 有效钾 $2.59 \times 10^2 \text{mg/kg}$ 。每盆装土 18kg (盆钵直径 30cm, 深 40cm), 装土前过筛。供试品种为:强筋小麦豫麦 34、中筋小麦豫麦 49 和弱筋小麦豫麦 50; 3 种氮素形态为 $\text{NO}_3\text{-N}$ (分析纯 NaNO_3)、 $\text{NH}_4\text{-N}$ (分析纯 NH_4HCO_3) 和 $\text{NH}_2\text{-N}$ (分析纯尿素), 每盆分别施纯氮 5.1g, K_2O 3.3g 和 P_2O_5 2.9g, P、K 肥于播种前一次性施入, N 肥按 7:3 的比例分别于播种前和拔节期施入。混肥前每盆施入总氮量 10% 的硝化抑制剂, 以保证氮素形态的相对稳定。试验于 10 月 15 日统一播种, 每盆播种 14 粒, 5 叶期定苗, 每盆定 7 株。定期灌水, 各处理保持一致的土壤相对含水量。共设 9 个处理, 完全随机排列, 重复 8 次 (3 次用于测定酶活性, 5 次用于品质测定)。

2 测定项目及方法

(1) 硝酸还原酶(NR) 于开花后 10、15、20、25、30d 的 9:00~10:00 取旗叶, 参照文献^[17]测定 NR 活性, 重复 3 次。

(2) 谷氨酰胺合成酶(GS) 在测定 NR 活性的同时, 分别取籽粒、旗叶片适量, 置于预冷的研钵中, 加入少许无菌石英砂,

研磨成细粉状后加入适量的 100mmol/L、pH7.6 的 Tris-HCl 缓冲液(含 1mmol/L MgCl₂、1mmol/L EDTA 和 10mmol/L 2-巯基乙醇)继续研磨匀浆,匀浆液于 13,000 r/min 离心 25min 后取上清,用于 GS 活性的测定。测定酶活性反应液组成如下:0.6ml 咪唑-盐酸缓冲液(0.25mol/L,pH7.0),0.4ml 谷氨酸钠溶液(0.30mol/L,pH7.0),0.4ml ATP-Na 溶液(30mmol/L,pH7.0),0.2ml MgSO₄ 溶液(0.5mol/L),酶酶粗液 1.2ml。反应液在 25℃水浴中保温 5 min 后,加入 0.2 ml 羟胺试剂开始反应,15 min 后立即加入 0.8 ml 酸性 FeCl₃ 试剂终止反应。混合液在 4000 r/min 离心 15 min,测定上清液在 540nm 处的光密度。一个 GS 活性单位定义为该反应条件下,在 15min 反应时间内催化形成 1μmolγ-谷氨酰异羟肟酸需要的酶量,总活性为:每克鲜样酶粗液在 15min 的反应时间内催化形成 γ-谷氨酰异羟肟酸的 μmol 数。

(3)谷氨酸合酶(GOGAT) 粗酶液的提取同 GS。反应混合液包括 0.4ml 20mmol/L 的 L-谷氨酰胺,0.5ml 20mmol/L 的 α-酮戊二酸,0.1ml 10mmol/L 的 KCl,0.2ml 3mmol/L NADH 和 0.3ml 酶液,总体积 3.0ml,不足部分用 25mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH7.6)补足(1.5ml)。反应启动后,用 752 紫外可见分光光度计于 340nm 处每 30s 测定 1 个消光值,连续测定 11 次,取光密度稳定减小的一段来衡量酶活性。一个 GOGAT 活性单位定义为在该反应条件下,每分钟反应混合液减少 1μmolNADH 为一个酶活性单位。

(4)蛋白质含量 籽粒风干制粉后,用 5%的三氯乙酸在 90℃水浴中沉淀蛋白质,然后用半微量凯氏定氮法测定蛋白氮含量,而后乘以蛋白质换算系数即为蛋白质含量^[17]。

3 结果与分析

3.1 氮素形态对不同专用小麦旗叶硝酸还原酶活性的影响

从表 1 可以看出,不同专用型小麦品种旗叶硝酸还原酶活性均在花后 15d 达最大值,然后呈逐渐降低趋势。但是不同专用型小麦品种对氮素形态的反应不同。强筋小麦豫麦 34 在酰胺态氮处理下,除开花后 25d 外,旗叶中硝酸还原酶活性均显著提高,铵态氮处理活性最低,硝态氮处理居中。中筋小麦豫麦 49 除开花后 25d 外,在铵态氮处理下旗叶硝酸还原酶活性最高,开花 25d 前以硝态氮处理最低,之后以酰胺态处理最低。弱筋小麦豫麦 50 在铵态氮处理下旗叶硝酸还原酶活性较另外两个处理显著增加(花后 25d 除外),另外两种氮素形态处理下旗叶硝酸还原酶活性表现趋势不一。

表 1 氮素形态对不同专用型小麦花后旗叶硝酸还原酶(NR)活性的影响
Table 1 Effects of N forms on NR activity in leaves of speciality wheat cultivars after flowering(μg/(g·h))

项目 Item		开花后天数 Days after flowering(d)				
		25	30	10	15	20
豫麦 34 Yumai34	硝态氮 N-NO ₃ ⁻	42.87a	138.36b	98.90b	33.12b	31.68b
	铵态氮 N-NH ₄ ⁺	33.72b	98.42c	55.99c	47.13a	29.43b
	酰胺态氮 N-NH ₂	43.54a	219.45a	119.3a	29.43b	65.63a
豫麦 49 Yumai49	硝态氮 N-NO ₃ ⁻	28.45b	226.31c	134.24b	42.71a	36.35b
	铵态氮 N-NH ₄ ⁺	45.11a	322.96a	160.83a	23.99b	55.26a
	酰胺态氮 N-NH ₂	40.64a	273.31b	154.87a	30.46b	30.98b
豫麦 50 Yumai50	硝态氮 N-NO ₃ ⁻	33.82c	222.96c	66.29b	28.11b	32.86c
	铵态氮 N-NH ₄ ⁺	69.95a	390.69a	163.30a	24.44b	57.49a
	酰胺态氮 N-NH ₂	49.71b	317.45b	55.55c	37.09a	50.35b

* 表中数据为 3 个测定值的平均值, a、b、c 指在 5%显著水平下的差异 Each value was the average of 3 measured data, a、b and c mean significant at 5% levels of probability; 下同 the same below

3.2 氮素形态对不同专用型小麦籽粒和旗叶谷氨酰胺合成酶活性的影响

不同专用型小麦籽粒和旗叶 GS 活性受不同氮素形态的影响较大(表 2),而且籽粒和旗叶 GS 活性变化趋势不尽相同。籽粒 GS 活性在开花后 10d 和 30d 时维持较高水平,开花后 15d 到 25d 内 GS 活性较低,而旗叶 GS 活性在开花以后持续增加,在开花后 25d 达到高峰,之后开始下降。不同专用小麦品种 GS 活性表现不同。强筋小麦豫麦 34 在花后 15d 前,铵态氮处理下籽粒 GS 活性最高,开花 20d 后,酰胺态氮处理下 GS 活性最高,硝态氮处理下酶活性一直最低,而旗叶 GS 活性始终以酰胺态氮处理最高,硝态氮处理最低,铵态氮处理居中,而且不同时期旗叶 GS 活性的差异均达到显著水平。中筋小麦豫麦 49 籽粒和旗叶 GS 活性均以铵态氮处理下最高,以酰胺态氮处理最低,硝态氮处理居中,旗叶 GS 活性在氨态氮处理下较另外两个处理显著增加。弱筋小麦豫麦 50 籽粒和旗叶 GS 活性均以酰胺态氮处理下最高,以铵态氮处理最低,硝态氮处理居中,且旗叶 GS 活性的差异均达到了显著水平。

3.3 氮素形态对不同专用型小麦籽粒和旗叶谷氨酸合酶活性的影响

从表 3 可知,籽粒和旗叶 GOGAT 活性在开花后均呈现在波动中下降的趋势,但下降过程有所不同。籽粒 GOGAT 活性在

花后 10d 开始下降,花后 20d 略有增加,之后再度减小,而旗叶 GOGAT 活性在开花后近于持续下降。就不同专用型品种而言,强筋小麦豫麦 34 在酰胺态氮处理下,籽粒和旗叶 GOGAT 活性最高,硝态氮处理下最低。中筋小麦豫麦 49 无论是籽粒还是旗叶 GOGAT 活性均以铵态氮处理最高,以酰胺态氮处理最低,旗叶间的差异均未达显著水平;弱筋小麦豫麦 50 在酰胺态氮处理下,籽粒和旗叶 GOGAT 活性均较显著增加,铵态氮处理下活性相对较低。

表 2 氮素形态对不同专用型小麦籽粒和旗叶谷氨酰胺合成酶(GS)活性的影响
Table 2 Effects of N form on GS activity in grains and leaves of speciality wheat cultivars after flowering

项目 Item		开花后天数 Days after flowering(d)									
		10		15		20		25		30	
		籽粒 Grains	旗叶 Flag leaves	籽粒 Grains	旗叶 Flag leaves	籽粒 Grains	旗叶 Flag leaves	籽粒 Grains	旗叶 Flag leaves	籽粒 Grains	旗叶 Flag leaves
品种 Cultivars	氮素形态 N forms										
	豫麦 34 Yumai 34										
	硝态氮 N-NO ₃	25.21b	252.36c	10.45a	331.40c	13.92a	367.45c	9.14a	424.35c	33.46c	345.74c
豫麦 34 Yumai 34	铵态氮 N-NH ₄	42.15a	267.56b	11.31a	348.78b	14.79a	384.82b	12.62a	518.16b	51.71b	367.45b
	酰胺态氮 N-NH ₂	31.29b	320.98a	10.45a	434.34a	16.09a	506.43a	13.49a	559.42a	68.21a	403.06a
豫麦 49 Yumai 49	硝态氮 N-NO ₃	24.78a	295.36b	10.45a	338.35b	16.09a	393.94b	14.79a	466.47b	30.42a	397.85b
	铵态氮 N-NH ₄	28.69a	325.76a	12.62a	429.99a	16.09a	446.06a	15.22a	533.36a	32.16a	458.22a
	酰胺态氮 N-NH ₂	24.78a	225.00c	7.41a	336.61b	15.66a	340.09c	14.35a	384.82c	29.56a	297.09c
豫麦 50 Yumai 50	硝态氮 N-NO ₃	26.51a	278.85b	8.71a	347.47b	23.91a	378.31b	18.26a	524.67b	35.64b	358.33b
	铵态氮 N-NH ₄	24.34a	264.08c	5.67a	317.94c	22.61a	353.99c	8.71b	391.77c	29.56b	337.92c
	酰胺态氮 N-NH ₂	28.25a	359.20a	8.71a	413.05a	25.21a	471.69a	18.70a	646.28a	42.15a	500.79a

表 3 氮素形态对不同专用型小麦籽粒和旗叶中谷氨酸合酶(GOGAT)活性的影响
Table 3 Effects of N form on GOGAT activity in grains and leaves of speciality wheat cultivars after flowering

项目 Item		开花后天数 Days after flowering(d)									
		10		15		20		25		30	
		籽粒 Grains	旗叶 Flag leaves	籽粒 Grains	旗叶 Flag leaves	籽粒 Grains	旗叶 Flag leaves	籽粒 Grains	旗叶 Flag leaves	籽粒 Grains	旗叶 Flag leaves
品种 Cultivars	氮素形态 N forms										
	豫麦 34 Yumai 34										
	硝态氮 N-NO ₃	29.65b	11.65a	19.06b	10.59b	26.47b	9.53b	15.88b	8.47a	12.71a	8.47a
豫麦 34 Yumai 34	铵态氮 N-NH ₄ ⁺	29.65b	12.71a	22.24ab	13.77ab	29.65ab	12.71ab	16.94b	10.59a	14.82a	10.59a
	酰胺态氮 N-NH ₂	34.94a	13.77a	26.47a	15.88a	31.77a	14.82a	22.24a	12.71a	15.88a	12.71a
豫麦 49 Yumai 49	硝态氮 N-NO ₃ ⁻	29.65ab	9.53a	23.30ab	8.47a	27.53a	9.53a	19.06b	7.41a	15.88ab	6.35a
	铵态氮 N-NH ₄	32.83a	10.59a	25.41a	11.65a	28.59a	10.59a	24.35a	8.47a	19.06a	7.41a
	酰胺态氮 N-NH ₂	25.41b	9.53a	20.12b	8.47a	22.24a	8.47a	19.06b	7.41a	12.71b	5.29a
豫麦 50 Yumai 50	硝态氮 N-NO ₃	30.71b	12.71a	25.41a	10.59a	28.59a	8.47a	19.06ab	6.35a	13.77ab	5.29a
	铵态氮 N-NH ₄ ⁺	28.59b	10.59a	19.06b	9.53a	23.30b	8.47a	14.82b	7.41a	11.65b	6.35a
	酰胺态氮 N-NH ₂	37.06a	13.77a	27.53a	12.71a	31.77a	9.53a	21.18a	8.47a	16.94a	7.41a

3.4 氮素形态对不同专用型小麦籽粒蛋白质含量的影响

从表 4 可以看出,强筋小麦豫麦 34 在 3 种不同氮素形态处理下,籽粒蛋白质含量表现不同,酰胺态氮处理下,蛋白质含量为 16.23%,分别比硝态氮肥和铵态氮肥处理提高了 18.90%和 17.78%,达显著水平,铵态氮肥和硝态氮肥处理下籽粒蛋白质含量分别为 13.78%和 13.65%,二者差异不显著。中筋小麦豫麦 49 在 3 种不同氮素形态处理下籽粒蛋白质含量大小顺序表现为:铵态氮处理(15.31%)>硝态氮处理(15.10%)>酰胺态氮处理(12.88%),铵态氮和硝态氮处理分别比酰胺态氮增加 18.87%和 17.24%,达显著水平,而硝态氮和铵态氮处理间差异不显著。弱筋小麦豫麦 50 在 3 种不同氮素形态处理下,籽粒中蛋白质含量差异均达到显著水平,酰胺态氮肥处理下,籽粒蛋白质含量最高,为 16.27%,分别比硝态氮处理和铵态氮处理增加了 12.99%和 57.66%,硝态氮处理比铵态氮增加了 39.54%。

3.5 籽粒蛋白质含量与各酶活性间的相关性分析

对籽粒蛋白质含量与花后各时期酶活性做相关分析(表 5),结果表明,小麦籽粒蛋白质含量与花后旗叶硝酸还原酶和

表 4 氮素形态对不同专用型小麦籽粒蛋白质含量的影响

Table 4 Effects of N forms on grain protein content in speciality wheat cultivars (%)			
品种 Cultivars	豫麦 34 Yumai 34	豫麦 49 Yumai 49	豫麦 50 Yumai 50
硝态氮 N-NO ₃ ⁻	13.65b	15.10a	14.40b
铵态氮 N-NH ₄ ⁺	13.78b	15.31a	10.32c
酰胺态氮 N-NH ₂	16.23a	12.88b	16.27a

GOGAT 活性的相关性不显著,与籽粒 GS 活性仅在花后 25d 有显著的相关关系。籽粒蛋白质含量与花后旗叶 GS 活性和籽粒 GOGAT 活性呈显著或极显著相关,说明旗叶 GS 和籽粒 GOGAT 两个酶在小麦籽粒蛋白质的形成过程中起着关键作用,籽粒蛋白质含量对这两个酶活性的依赖性最强。

表 5 籽粒蛋白质含量与花后各期酶活性的相关分析
Table 5 Correlation analysis of the grain protein content and enzyme activity after florescence

开花后天数 Days after florescence(d)	10	15	20	25	30
旗叶中硝酸还原酶 NR in leaves	0.5048	−0.2328	−0.3931	0.2488	0.1858
籽粒中谷氨酰胺合成酶 GS in grains	0.2232	0.6573	−0.0436	0.6759 *	0.4964
旗叶中谷氨酰胺合成酶 GS in leaves	0.7476 *	0.7772 *	0.8104 * *	0.8175 * *	0.6883 *
籽粒中谷氨酸合酶 GOGAT in grains	0.7530 *	0.8575 * *	0.8401 * *	0.7835 *	0.8018 * *
旗叶中谷氨酸合酶 GOGAT in leaves	0.4904	0.5344	0.4820	0.40524	0.3835

4 结语与讨论

氮素是小麦生长发育过程中需要量最大的营养元素之一,NR、GS 和 GOGAT 是植物氮素代谢的关键酶,特别是 GS 参与多种氮代谢的调节,是氮代谢中心的多功能酶^[14,18],小麦灌浆过程中这些酶的活性呈现有规律的变化,并具有一定的协同性,特别是在籽粒中,三者活性高度相关,说明 NR 活性的增加可以诱导 GS 和 GOGAT 活性的增加^[20]。本研究结果表明,小麦籽粒中 GS 活性在后期有大幅度的增加,其变化与 GOGAT 活性变化不同步,原因可能是,在小麦生育后期,随着功能叶片的衰老,叶片中 GS 活性明显降低(见表 2),叶片中氮的利用效率显著下降,于是更多的氮向籽粒运转,提高了籽粒中 GS 活性。

籽粒中 GS 和 GOGAT 活性变化动态与旗叶不同。花后 10d 是籽粒形成期,胚胎的形成、籽粒的灌浆以及相关酶的合成需要大量的氨基酸,因而氮代谢旺盛,GS 和 GOGAT 活性较高。籽粒形成后,进入灌浆盛期,碳水化合物快速积累,籽粒氮素代谢相对减弱,酶活性降低。籽粒灌浆后期,营养器官逐渐衰老,蛋白质等生物大分子开始降解,因而叶片中 NR、GS 和 GOGAT 活性降低。与此同时,籽粒中各种蛋白质的合成需要大量谷氨酰胺的供应,于是带动了籽粒中 GS 活性的增加。

本研究结果表明,籽粒蛋白质含量与开花后叶片中 GS 活性和籽粒中 GOGAT 活性呈现显著或极显著正相关,而与叶片中硝酸还原酶活性、籽粒中 GS 活性和叶片中 GOGAT 活性相关性不显著。原因在于:植物通过光呼吸氮循环同化固定的氮相当于原初氮固定量的 10 倍^[21],而这一过程是在叶绿体型 GS 的催化作用下完成的,所以谷氨酰胺主要是在叶绿体型 GS 的催化作用下依靠消耗光呼吸释放出来的氮而形成的,而谷氨酰胺是优先被转运的氨基酸^[19],谷氨酰胺转运进籽粒后,诱导了籽粒中谷氨酸合酶活性的增加,进而在籽粒中合成谷氨酸,进一步形成蛋白质,带动小麦籽粒中蛋白质含量的提高。

不同专用型小麦在不同形态氮素影响下籽粒中蛋白质含量明显不同,其直接原因是不同形态氮素影响了小麦的氮素利用率及氮收获指数,这在过去的研究中已有报道^[22]。不同专用型小麦对籽粒蛋白质含量的要求不同,要达到专用型小麦的优质专用,必须使籽粒蛋白质含量保持在一定的范围内。强筋型豫麦 34 属于面包专用小麦,对蛋白质含量要求较高,在施用酰胺态氮下,能满足其专用型的要求;中筋型豫麦 49 属于馒头、面条专用小麦,对蛋白质含量要求一般,为提高其营养品质,在施用铵态氮下比较理想;弱筋型豫麦 50 属于饼干专用小麦,对蛋白质含量的要求较低,虽然在施用酰胺态氮下蛋白质含量较高,但不能满足其专用型的要求,在施用铵态氮时,籽粒蛋白质含量较低,能够实现该品种的优质专用。因此,在实际生产中,要根据不同专用型小麦的品质要求,通过科学合理的氮肥运筹,实现良种、良法和专用。

References:

[1] Beusichem ML-VAN, Kirkby-EA, Baas-R . Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake,assimilation,and distribution of nutrients in ricinus communis. *Plant Physiology*,1988,**86**(3):914~921.

[2] Alloush GA, Bot J-Le, Sanders-FE, *et al.* Mineral nutrition of chickpea plants supplied with NO₃ or NH₄-N I . Ionic balance in relation to iron stress. *Journal of Plant Nutrition*, 1990,**13**(12):1575~1590.

[3] Lam H M, Coschigano K T, Oliveiva I C. The molecular genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Bio.* , 1996,**47**:569~593.

[4] Verma DPS. *Control of Gene Expression*. Boca Ratom: CRC Press, 1993. 425~479.

[5] Lea P J, Mifflin. Alternative route for nitrogen in higher plants. *Nature*, 1974, **251**: 614~616.

[6] Cren M, Hirel B. Glulamine synthetase in higher plant: Regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell PHysiol*, 1999, **40**:1187~1193.

[7] Lin Q H, Li C J, Peng J, *et al.* Effect of NaCl Stress on Glutamate Synthase and Glutamate Dehydrogenase of Rice Plants. *Jurnal of Wuhan Botanical Reasearch*, 2000, **18**(3):206~210.

- [8] Lin C C, Kao C H. Disturbed ammonium assimilation is associated with growth inhibition of root in rice seedlings caused by NaCl. *Plant growth Regulation*, 1996, **18**:233~238.
- [9] Chien H F, Lin C C, Wang J W, *et al.* Changes in ammonium ion content and glutamine synthetase activity in rice leaves caused by excess cadmium are a consequence of oxidative damage. *Plant Growth Regulation*, 2002, **36**(1):41~47.
- [10] Ochs G, Schoth G, Trischler M, *et al.* Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus*. *Plant Mol. Bio.*, 1999, **39**: 395~405.
- [11] Miranda-Ham ML, Loyola-Vargas VM. Ammonia assimilation in *Canavalia ensiformis* plants under water and salt stress. *Plant cell Physiol.*, 1998, **29**:747~753.
- [12] Chai X Q, Yin L P, Liu X L, *et al.* Influence of different concentrations of NO_3^- and NH_4^+ on the activity of glutamine synthetase and other relevant enzymes of nitrogen metabolism in wheat roots. *Acta Botanica Sinica*, 1996, **38**(10): 803~808.
- [13] Huang Q N, Yin L P, Chai X Q, *et al.* Influence of nitrogen sources on glutamine synthetase in wheat seedling. *Acta Botanica Sinica*, 1995, **37**(11):856~868.
- [14] Wang Y F, Yu Z W, Li S X, *et al.* Effect of nitriton on the change of key enzyme activity during the nitrogen metabolism and kernel protent in winter wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2002, **28**(6):743~748.
- [15] Li Z S, Lin Q H, Zhang C F, *et al.* Effect of different nitrogen sources on ammonia-assimilating enzymes of the roots in rice seedlings. *J. Wuhan Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 2000, **46**(6):729~732.
- [16] Jing Q, Cao W X, Dai T P. Advances in research on formation of wheat grain qualities and its regulation. *Ritical Crops*, 1999, **19**(4):46~50.
- [17] Li H S. *Principles and techniques of plant physiological biochemical experiment*. Beijing:Higher Education Press, 2000.
- [18] Li C F, Ma F M, Zhao Y, *et al.* Effects of Nitrogen Forms on Key Enzyme Activities and Related Products in Sugar and Nitrogen Metabolism of Sugar Beet (*Betavulgaris* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2003, **29**(1):128~132.
- [19] Yin L P, Cai X Q, Li D, *et al.* Changes of glutamine synthesis and proteolyase in different wheat speices during the leaves nature senescence. *Journal of Shanxi Teacher's University(Natural Science Edition)*, 1997, **11**(1):46~49.
- [20] Wang X Z, Cheng B S, Zhang G Z. Relationship between nitrogen forms and plant growth and its influence factors. *Journal of Shandong Agricultural university*, 1990, **21**(1):93~98.
- [21] Keys A J, Bird I F, Cornelius M J, *et al.* Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature*, 1978, **275**: 741~743.
- [22] Ma X M, Wang Z Q, Wang X C, *et al.* Effects of nitrogen forms on roots and N fertilizer efficiency of different wheat cultivars with specialized end-uses. *Chinese journal of applied ecology*, 2004, **15**(4):655~658.

参考文献:

- [7] 林清华,李常健,彭进,等. NaCl 对水稻谷氨酸合酶和谷氨酸脱氢酶的胁迫作用. 武汉植物学研究, 2000, **18**(3): 206~210.
- [12] 柴小清,印莉萍,刘祥林,等. 不同浓度的 NO_3^- 和 NH_4^+ 对小麦根谷氨酰胺合成酶及其相关酶的影响. 植物学报, 1996, **38**(10): 803~808.
- [13] 黄勤妮,印莉萍,柴晓清,等. 不同氮源对小麦幼苗谷氨酰胺合成酶的影响. 植物学报, 1995, **37**(11):856~868.
- [14] 王月福,于振文,李尚霞,等. 氮素营养水平对冬小麦氮代谢关键酶活性变化和籽粒蛋白质含量的影响. 作物学报, 2002, **28**(6):743~748.
- [15] 李泽松,林清华,张楚富,等. 不同氮源对水稻幼苗根氨同化酶的影响. 武汉大学学报(自然科学版), 2000, **46**(6):729~732.
- [16] 荆奇,曹卫星,戴廷波. 小麦籽粒品质形成及其调控研究进展. 麦类作物学报, 1999, **19**(4):46~50.
- [17] 李合生主编. 植物生理生化实验原理与技术(面向 21 世纪课程教材). 北京:高等教育出版社, 2000.
- [18] 李彩凤,马凤鸣,赵越,等. 氮素形态对甜菜氮糖代谢关键酶活性及相关产物的影响. 作物学报, 2003, **29**(1):128~132.
- [19] 印莉萍,柴小清,李丹,等. 不同小麦品种叶片衰老过程中谷氨酰胺合成酶和蛋白水解酶的活性变化. 山西师范大学学报(自然科学版), 1997, **11**(1):46~49.
- [20] 王宪泽,程炳嵩,张国珍. 氮素形态与作物生育的关系及其影响因子. 山东农业大学学报, 1990, **21**(1):93~98.
- [22] 马新明,王志强,王小纯,等. 氮素形态对不同专用型小麦根系及氮素利用率影响的研究. 应用生态学报, 2004, **15**(4):655~658.