

氮、钾水平对小麦籽粒蛋白质合成 关键酶活性的影响

戴廷波, 邹铁祥, 荆 奇, 姜 东, 曹卫星*

(南京农业大学农业部南方作物生理生态重点开放实验室, 南京 210095)

摘要:在大田栽培条件下,以蛋白质含量差异的两个冬小麦(*Triticum aestivum* L.)品种宁麦 9 号(低蛋白)和扬麦 10 号(中蛋白)为材料,研究了不同氮、钾施肥水平对小麦旗叶与籽粒中游离氨基酸含量、蛋白质合成关键酶活性和籽粒蛋白质含量的影响及其与开花期旗叶氮、钾营养的关系。结果表明,氮、钾施肥显著提高了小麦花后旗叶与籽粒中游离氨基酸和籽粒蛋白质含量、旗叶谷氨酰胺合成酶(GS)及籽粒 GS 和谷丙转氨酶(GPT)活性,其中氮肥的作用大于钾肥、氮钾肥配合达到最大,对扬麦 10 号的效应大于宁麦 9 号。开花期旗叶氮/钾比随施氮水平的增加呈二次曲线变化,随施钾水平的增加呈下降趋势。旗叶 GS 活性和成熟期籽粒蛋白质含量与氮/钾比均呈显著或极显著的二次曲线关系。因此,旗叶和籽粒中蛋白质合成关键酶活性受开花期旗叶氮/钾比的显著影响,是氮、钾素影响小麦籽粒蛋白质形成的重要生理原因。

关键词:冬小麦;蛋白质;关键酶活性;氮/钾比

文章编号:1000-0933(2009)09-4976-07 中图分类号:Q142,S512,S314 文献标识码:A

Effects of nitrogen and potassium fertilization on key regulation enzyme activities involved in grain protein formation in winter wheat

DAI Ting-Bo, ZOU Tie-Xiang, JING Qi, JIANG Dong, CAO Wei-Xing*

(Key Laboratory of Crop Physiology and Ecology in Southern China, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China
Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(9): 4976 ~ 4982.

Abstract: Field experiment was conducted in 2004 — 2005 using two winter wheat cultivars differing in grain protein content, Ningmai 9' (low protein) and Yangmai 10' (medium protein) in order to investigate the effects of N and K rates on key enzyme activities for protein formation in flag leaves and grains, grain protein contents, and their relationships with leaf N and K nutrition status at anthesis. The results showed that free amino acid contents and GS activities in flag leaves and grains, and GPT activity in grains all increased with nitrogen and potassium supply. Compared with potassium fertilization, the effects of N on free amino acid contents and relative enzyme activities for grain protein formation were greater than those of K, with largest effects from N K treatment, and greater with Yangmai 10' than with Ningmai 9'. The N/K ratio in flag leaves at anthesis showed quadratic curve with nitrogen supply, while decreased with potassium supply. Correlation analysis showed that the GS activity and grain protein content both had significant quadratic correlations with leaf N/K ratio at anthesis. The results suggested that the leaf N/K ratio at anthesis was the vital factor for affecting grain protein formation under different nitrogen and potassium supply.

Key Words: winter wheat; protein; key enzyme activity; N/K ratio

小麦籽粒蛋白质含量不仅受遗传特性的影响,还受氮肥等栽培措施的调控^[1]。施氮有利于提高小麦籽

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30871481)

收稿日期:2008-01-02; 修订日期:2009-05-18

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: caow@njau.edu.cn

粒蛋白质含量^[1],而钾肥对籽粒蛋白质形成的影响目前尚有争论,有报道认为施钾提高了籽粒蛋白质含量^[2],也有研究表明施钾对蛋白质含量的影响甚微^[3],这些结果与施氮水平密切相关^[1,2]。由于钾肥能促进小麦植株氮素吸收和籽粒蛋白质合成^[2],同时对光合作用及其产物向籽粒运转均有显著的促进作用^[4]。因此,协调植株氮、钾营养对于提高籽粒产量和品质显得尤为重要。游离氨基酸是即时同化氮和再分配氮的主要存在形式和运输方式^[5],其含量的高低受谷氨酰胺合成酶(GS)和谷丙转氨酶(GPT)的调控^[6,7],将氮素吸收、同化与蛋白质合成偶联起来,因而成为氮素供应和籽粒蛋白质合成的表征。有关氮、钾单施影响小麦籽粒蛋白质合成关键酶活性的研究已较为深入^[6,8],而氮钾肥料对小麦籽粒蛋白质合成的综合影响及其生理基础尚不清楚。为此,本文以两个蛋白质含量不同的冬小麦品种为材料,研究了不同氮、钾施肥水平对小麦旗叶和籽粒游离氨基酸含量、GS 和 GPT 活性的影响及其与籽粒蛋白质含量的关系,旨在揭示氮钾肥料综合调控小麦籽粒蛋白质形成的生理基础,为小麦籽粒品质调控提供理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2004 ~ 2005 年在江苏省农业科学研究院南京试验场进行,土壤为黄棕壤,0 ~ 20 cm 土层有机质含量 12.4 g kg⁻¹,全氮 1.2 g kg⁻¹,速效氮 84.3 mg kg⁻¹,速效磷 20.1 mg kg⁻¹,速效钾 81.5 mg kg⁻¹。试验为裂区设计,主区为氮肥水平处理,设 3 个施氮水平:0 (N0)、112.5 (N1)和 225 (N2) kg N hm⁻²,基追比为 7:3;裂区为钾肥水平处理,设 3 个施钾水平:0 (K0)、75 (K1)和 150 (K2) kg K₂O hm⁻²,基追比为 1:1。N、K 肥均于拔节期追施,播种前施 75 kg P₂O₅ hm⁻²作基肥。供试品种为宁麦 9 号(低蛋白)和扬麦 10 号(中蛋白)。小区面积均为 2 m × 3.5 m,3 次重复,基本苗为 1.8 × 10⁶ hm⁻²。田间管理按常规方法进行。

1.2 测定项目与方法

于开花期选择同一天开花、生长基本一致的穗挂牌,每隔 7d 取 1 次样,每小区随机取单茎 5 个,将穗和旗叶置于液氮中速冻 30 min,再移至 -40℃ 冰箱中保存,用于酶活性测定。另取单茎 20 个,分为旗叶和籽粒两部分,105℃ 杀青 45 min,70℃ 烘至恒重。样品采用 H₂SO₄-H₂O₂ 消煮,用凯氏定氮法测定全氮含量,籽粒蛋白质含量按全氮量的 5.7 倍换算。用火焰光度计测定旗叶含钾量。游离氨基酸用 80% 乙醇提取,用茚三酮比色法测定^[9]。

称 0.5 g 鲜重的旗叶或籽粒,剪碎并加 5 ml 提取液(pH7.6 Tris-HCl 100 mmol L⁻¹,MgCl₂ 1 mmol L⁻¹,EDTA 1 mmol L⁻¹,2-mercaptoethanol 10 mmol L⁻¹)研磨成匀浆,匀浆于 10 000 × g 离心 20 min,上清液用于酶活性测定,以上各步均在 4℃ 预冷条件下进行。GS 活性测定按黄维南的方法^[10]略加修改后进行,反应混合液在 37℃ 下孵育 15 min 后,加 0.1 g ml⁻¹的酸性 FeCl₃溶液(溶剂为 0.2% HCl)、24% TCA 试剂和体积分数 50% HCl 的混合液终止反应。用日本产 UV-2401 分光光度计测定 540 nm 时的 OD 值,以 37℃ 时 γ-glutamylhydroxamate 的形成量表示 GS 活性。GPT 活性按黄维南的方法^[10]进行。

数据采用 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 氮、钾水平对籽粒蛋白质含量的影响

氮、钾肥对两小麦品种籽粒蛋白质含量均有明显的提高效应,但在品种和施肥处理间差异较大(图 1)。在相同的氮肥水平下,扬麦 10 号施钾处理的籽粒蛋白质含量显著高于相应的 K0 处理,但两个施钾水平(K1、K2)间差异不显著;宁麦 9 号在 N0 和 N2 处理下施钾表现出相同的效应,但 N1 水平下不同钾处理间差异不显著。在相同的施钾水平下,氮肥显著提高了籽粒蛋白质含量。宁麦 9 号和扬麦 10 号施氮处理的平均籽粒蛋白质含量比 N0 处理提高了 14.0% 和 19.2%,施钾处理比 K0 处理分别提高了 4.7% 和 8.0%,表明氮肥对籽粒蛋白质含量的促进效应大于钾肥。在所有处理中,籽粒蛋白质含量,均以对照(N0K0)处理最低、高氮高钾(N2K2)处理最高,表明增施氮、钾肥对籽粒蛋白质含量有明显的正效应。与 N0K0 相比,扬麦 10 号各处理籽粒蛋白质含量增加了 15.8% ~ 41.0%,平均 29.4%,宁麦 9 号变幅在 3.0% ~ 26.6%,平均为 13.4%,表明

扬麦 10 号对氮钾肥的反应更敏感。

2.2 氮、钾水平对旗叶和籽粒游离氨基酸含量的影响

小麦花后旗叶游离氨基酸含量变化呈单峰曲线,并在 11~14 d 左右达到最大值(图 2)。与对照(N0K0)处理相比,氮、钾施肥均提高了旗叶游离氨基酸含量,且氮肥的作用大于钾肥,高氮高钾(N2K2)处理达到最大,两品种表现相同的趋势。品种间比较,扬麦 10 号各处理旗叶游离氨基酸含量均高于宁麦 9 号,且灌浆初期上升速率快、高峰期出现早且维持时间长,但开花 21 d 之后品种间差异减小。表明氮、钾施肥有利于旗叶游离氨基酸灌浆初期的合成和中、后期的输出,且对扬麦 10 号的促进效应大。

图 3 显示,小麦籽粒游离氨基酸含量开花后 7~14 d 维持在较高水平,花后 14~21 d 进入速降期,21 d 之后降幅趋缓。与对照(N0K0)处理相比,氮、钾施肥提高了籽粒游离氨基酸含量,且氮肥的作用更大,N2K2 处

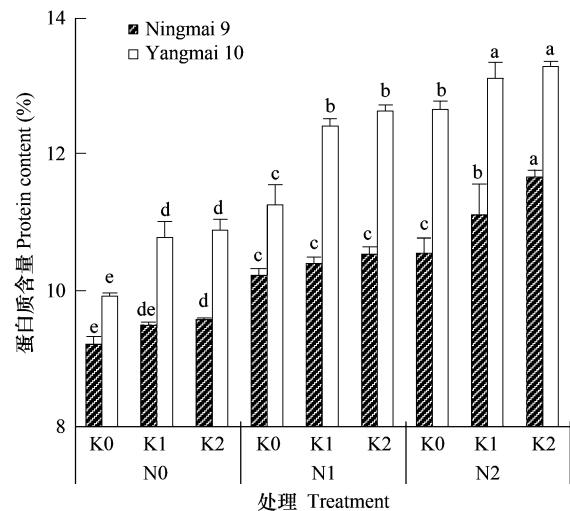


图 1 氮、钾水平对两小麦品种籽粒蛋白质含量的影响

Fig. 1 Effects of nitrogen and potassium fertilization on grain protein content in two wheat cultivars

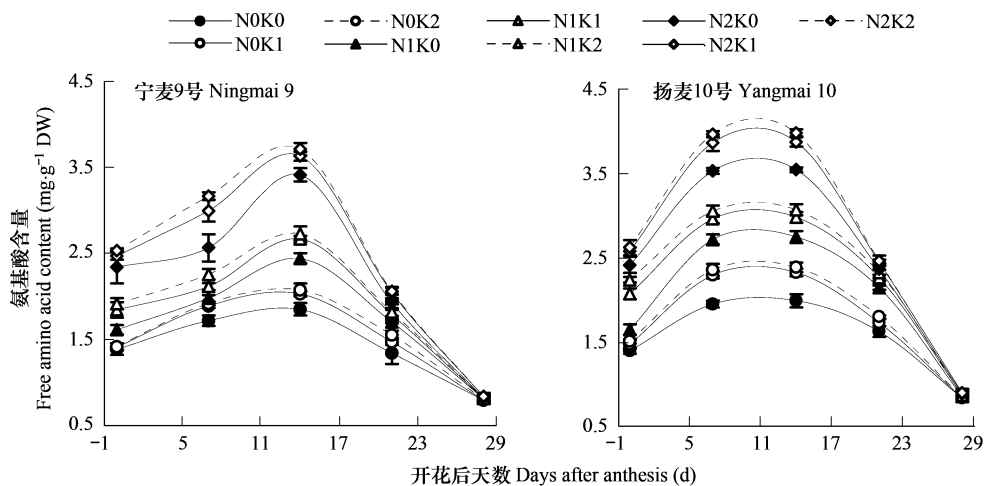


图 2 氮、钾水平对两小麦品种旗叶游离氨基酸含量的影响

Fig. 2 Effects of nitrogen and potassium fertilization on free amino acid contents in flag leaf of two wheat cultivars

理达到最大,花后 7~14 d 处理间差异最大,但随着灌浆进程的推进,处理间差异减小。扬麦 10 号各处理籽粒游离氨基酸含量均高于宁麦 9 号。表明氮、钾施肥有利于提高籽粒氨基酸的供应能力,扬麦 10 号籽粒氨基酸供应能力强于宁麦 9 号,花后 7~14 d 氨基酸供应的差异可能是成熟期籽粒蛋白质含量不同的主要原因之一。

2.3 氮、钾水平对旗叶 GS 和籽粒 GPT 活性的影响

旗叶 GS 活性在开花后 7 d 达到最大,7 d 之后呈缓慢下降趋势,14 d 之后进入速降期(图 4)。氮、钾施肥均提高了旗叶 GS 活性,氮肥的效应大于钾肥,施钾处理(K1、K2)间差异较小。扬麦 10 号各处理的 GS 活性均高于宁麦 9 号。表明氮、钾施肥有利于提高旗叶 GS 活性,且氮肥的作用强于钾肥,扬麦 10 号强于宁麦 9 号。

籽粒 GPT 活性随灌浆进程的推进呈先降后升趋势(图 5),其中花后 7~14 d 缓慢下降,14~21 d 进入速降期,21~28 d 略有回升。与不施氮钾肥的对照(N0K0)处理相比,增施氮、钾均显著提高了籽粒 GPT 活性,

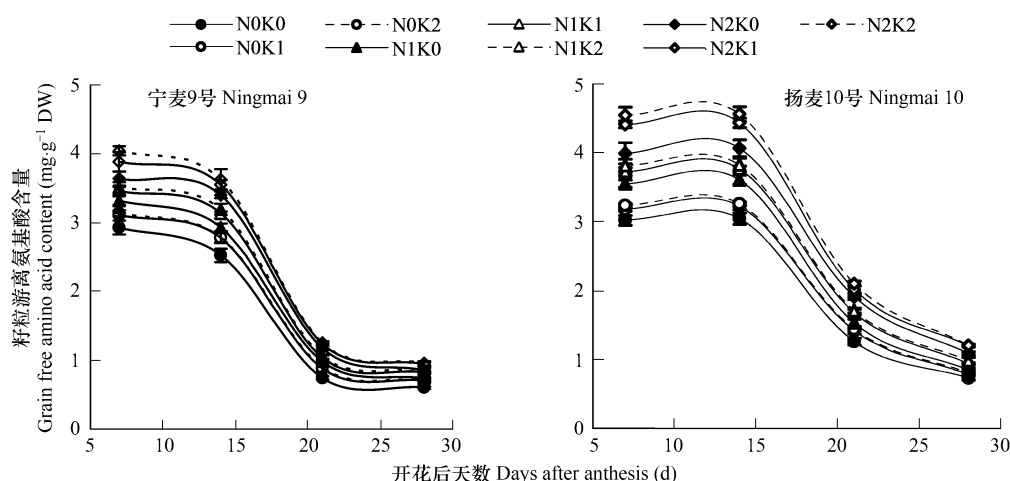


图3 氮、钾水平对两小麦品种籽粒游离氨基酸含量的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen and potassium fertilization on grain free amino acid contents in two wheat cultivars

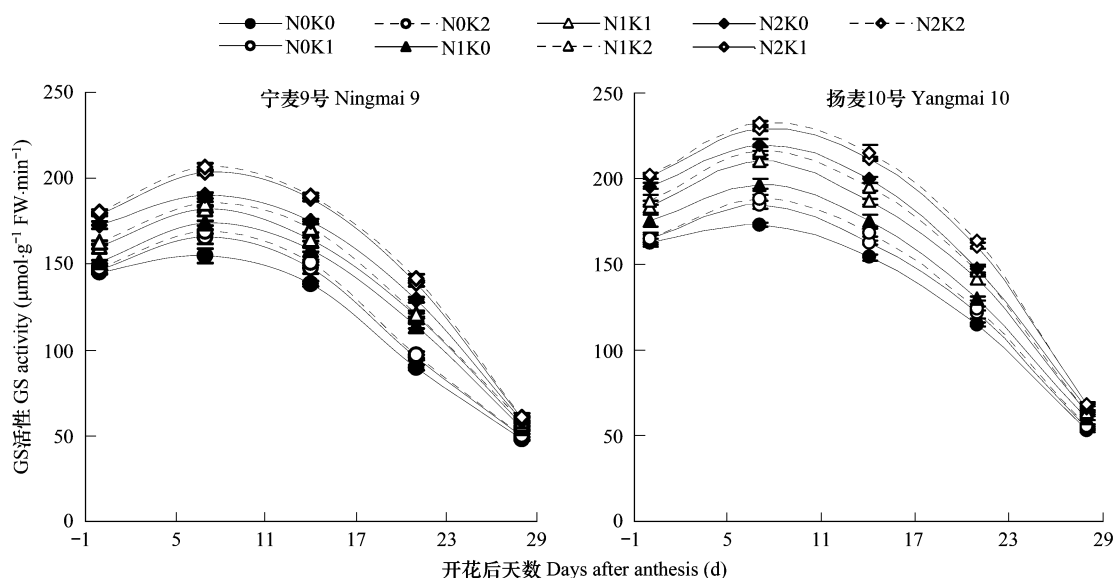


图4 氮、钾水平对两小麦品种旗叶 GS 活性的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen and potassium fertilization on flag leaf GS activity in two wheat cultivars

且氮肥的效应大于钾肥,施钾处理(K1、K2)间差异较小。品种间比较,扬麦10号各处理的GPT活性均高于宁麦9号。表明增施氮、钾肥有利于氮素同化。

2.4 开花期旗叶氮/钾比与旗叶GS活性和籽粒蛋白质含量的关系

开花期旗叶氮、钾含量均随施肥水平的提高而提高(图6),施氮提高了氮/钾比,而施钾降低了氮/钾比,其原因是施钾对开花期旗叶钾含量的影响(宁麦9号平均增幅为12.4%,扬麦10号为11.7%)大于氮含量(宁麦9号平均增幅为8.8%,扬麦10号为9.6%),且以高氮高钾(N2K2)处理的旗叶氮、钾含量最高。高氮(N2)处理提高旗叶氮含量的幅度是中氮(N1)的1.9倍,而对钾含量的提高幅度为中氮的4.4~9.0倍,因而开花期旗叶氮/钾比表现为N1 > N2 > N0。

旗叶是氮素同化的主要场所,其GS活性代表了蛋白质合成的原料供应能力。两品种小麦开花后14 d旗叶GS活性和成熟期籽粒蛋白质含量与开花期旗叶氮/钾比呈显著或极显著的二次曲线关系(图7)。表明在较高开花期旗叶氮钾营养的基础上,适度提高氮/钾比有利于提高两品种小麦旗叶GS活性和籽粒蛋白质含

量,但氮/钾比过大将降低旗叶 GS 活性,从而降低籽粒蛋白质含量。

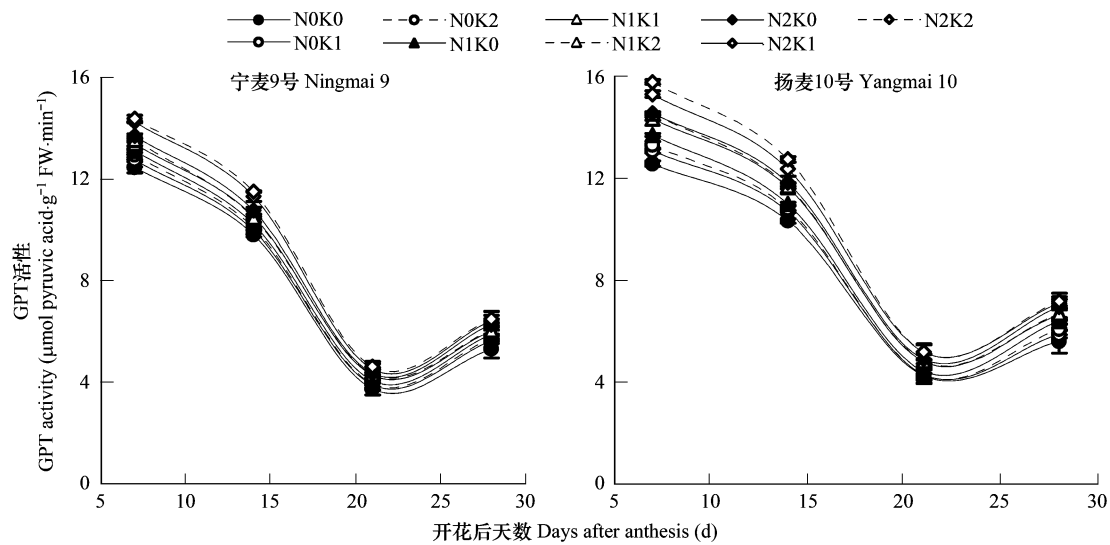


图5 氮、钾水平对两小麦品种籽粒 GPT 活性量的影响

Fig. 5 Effects of nitrogen and potassium fertilization on grain GPT activities in two wheat cultivars

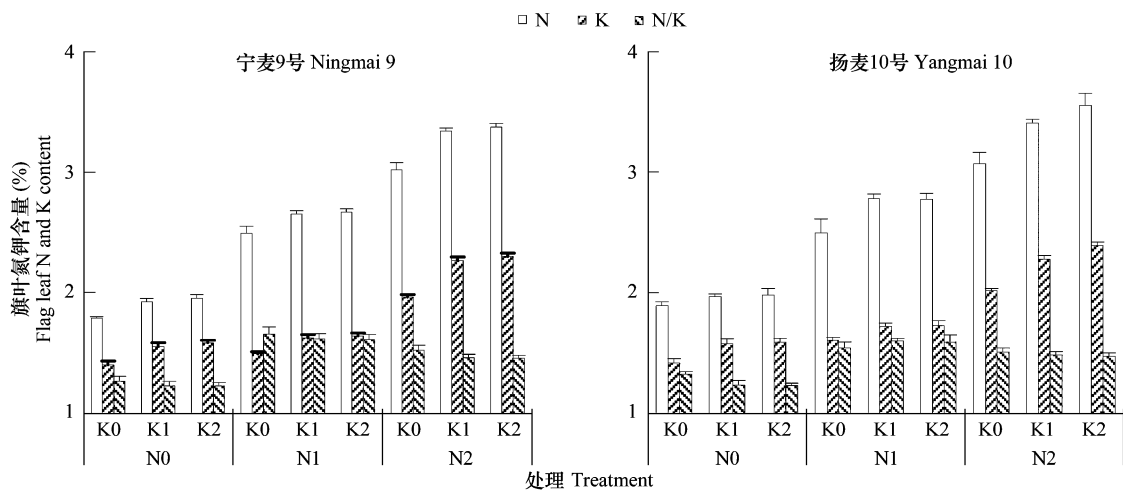


图6 氮、钾水平对两小麦品种开花期旗叶氮、钾含量及氮/钾比的影响

Fig. 6 Effects of N and K fertilization on leaf N and K contents and N/K ratio at anthesis in two wheat cultivars

3 讨论

小麦旗叶内游离氨基酸含量,灌浆前期上升、中后期下降,与王月福等人的结果^[11]基本一致,说明旗叶合成的氨基酸能够充分输入籽粒,是籽粒蛋白质的主要氮源。开花后 7~14 d 籽粒内游离氨基酸含量品种间表现相反,中蛋白品种扬麦 10 号缓慢上升,而低蛋白品种宁麦 9 号缓慢下降,14 d 之后二者均呈下降趋势,不同于王月福等人关于小麦籽粒内游离氨基酸含量花后持续下降的观点^[11],其原因可能与中蛋白品种扬麦 10 号旗叶 GS 活性强于低蛋白品种宁麦 9 号而提供更多氨基酸有关。氮钾肥配合显著提高了旗叶和籽粒中游离氨基酸含量,且游离氨基酸含量下降与籽粒蛋白质含量增加高度吻合,与前人在施氮影响小麦游离氨基酸含量方面的研究结果基本一致^[11]。说明氮钾肥配合显著促进了蛋白质合成的底物供应。

GS 和 GPT 在小麦灌浆期旗叶氨基酸合成与输出中起重要作用^[12,13],提高其活性有利于植株(尤其是籽粒)的氮素同化^[14]。旗叶和籽粒 GS 活性开花后均呈下降趋势,与前人在旗叶 GS 活性^[15]、施氮影响旗叶和

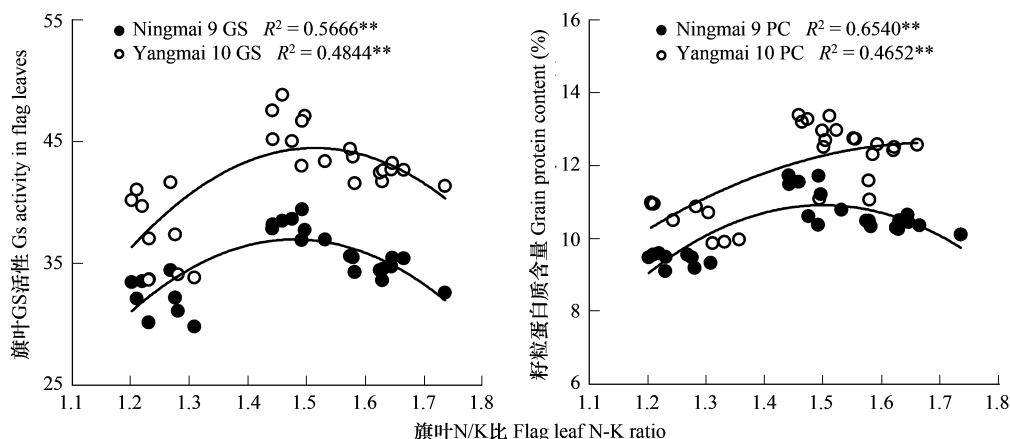


图7 开花期旗叶氮/钾比与两小麦品种旗叶GS活性(左)和成熟期籽粒蛋白质含量(右)的关系

Fig. 7 Relationships between leaf N-K ratio and GS activity in flag leaves (left) and grain protein content at maturity (right) in two wheat cultivars

籽粒GS活性等方面的研究结论^[16]基本吻合。本研究发现开花后21~28 d籽粒GPT小幅上升,据此推测,GPT活性的小幅回升能使含量较少的氨基酸得以转化生成,为灌浆后期籽粒蛋白质含量增加提供了原料平衡供应的酶学保障。但是,有盆栽研究认为开花后籽粒GPT活性呈持续下降趋势^[16]。籽粒GPT活性灌浆后期之所以出现截然相反的表现,可能是由于盆栽条件下生育后期衰老加速,导致籽粒GPT活性迅速降低。氮钾肥配合显著提高了开花后旗叶和籽粒GS与GPT活性,且GS与GPT活性与成熟期籽粒蛋白质含量呈极显著正相关,与前人在施氮影响小麦^[8,17]、施钾影响旗叶GS上的研究结果基本一致^[12]。但也有研究认为旗叶GS活性与籽粒蛋白质含量没有直接关系^[18]或不受氮素供应的显著影响^[18,19],这些不同可能是由于产量增加对蛋白质含量“稀释”程度差异造成的。

氮、钾施肥提高籽粒蛋白质含量的生理原因主要有3方面:一是适度提高开花期旗叶氮/钾比,有利于提高旗叶GS活性,从而增加游离氨基酸的合成和向籽粒供应^[12],最终提高籽粒蛋白质含量^[20];二是提高籽粒GS活性有利于光呼吸释放氮素的再同化^[6],进一步促进籽粒蛋白质的形成;三是提高GPT活性有利于蛋白质合成底物氨基酸的平衡供应,减少个别氨基酸不足对蛋白质合成的限制,提高籽粒蛋白质含量。较高的开花期旗叶氮、钾营养及适宜的氮/钾比显著提高蛋白质合成相关酶活性,是氮、钾施肥提高籽粒蛋白质含量的生理原因,基因型对氮钾营养和蛋白质合成关键酶活性影响的差异进一步增大了籽粒蛋白质含量的不同。在施氮较多的条件下适当增加钾肥投入,有利于实现高产优质的目标,对弱筋小麦增施钾肥是提高产量进而降低蛋白质含量的重要措施。

References:

- [1] Souza E J, Martin J M, Guttieri M J, *et al.* Influence of genotype, environment and nitrogen management on spring wheat quality. *Crop Science*, 2004, 44(2): 425–432.
- [2] Zou T X, Dai T B, Jiang D, *et al.* Potassium supply affected plant nitrogen accumulation and translocation and grain protein formation in winter wheat. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(4): 686–692.
- [3] Zhao G C. Effect of ex-root nutrition on wheat yield and quality. *Beijing Agricultural Sciences*, 1986, (6): 7–19.
- [4] Liang X S, Yu Z W. Effect of potassium application stage on photosynthetic characteristics of winter wheat flag leaves and on starch accumulation in wheat grains. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(8): 1349–1352.
- [5] Blumenthal C, Lee J W, Barlow E R, *et al.* Effects of nitrogen source and concentration on the free amino acid composition of developing wheat grains. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1990, 17(2): 199–206.
- [6] Mifflin B J, Habash D Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(370): 979–987.
- [7] Lea D J, Robinson S A, Stewart G R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagine. In: Mifflin B J, Lea P J eds. *The*

- Biochemistry of Plants. Vol 16. New York: Academic Press, 1990. 121—159.
- [8] Harper J E, Paulsen G M. Nitrogen assimilation and protein synthesis in wheat seedlings as affected by mineral nutrition. I. Macronutrients. *Plant Physiology*, 1969, 44: 69—74.
- [9] Zhu J, Cai W C. Common biosubstances chemical analyses methods. Beijing: Science Press, 1982. 15—16.
- [10] Huang W N. The assay methods of GS and GPT. In: The Institute of Plant Physiology of CAS and the Plant Physiology Society of Shanghai eds. *Guide on Modern Plant Physiology Experiments*. Beijing: Science Press, 1999. 154—158.
- [11] Wang Y F, Yu Z W, Li S X, *et al.* The effects of different fertilization level on grain protein and free amino acid content of organs above ground of different wheat variety. *Acta Botanica Boreal-Occidentalia Sinica*, 2003, 23(3): 417—421.
- [12] Tang X R, Guan C Y. Effects of K supply on activities of several enzymes in the oilseed rape and their relationships to the yield and quality. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2001, 17(3): 4—8.
- [13] Zhang C F, Peng S B, Bennett J. Glutamine synthetase and its isoforms in rice spikelets and rachis during grain development. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 156: 230—233.
- [14] Habash D Z, Massiah A J, Rong H L, *et al.* The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. *Annals of Applied Biology*, 2001, 138(7): 83—89.
- [15] Berger M G, Woo K C, Wong S C, *et al.* Nitrogen metabolism in senescent flag leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) in the light. *Plant Physiology*, 1985, 78: 779—783.
- [16] Xie Z J, Jiang D, Cao W X, *et al.* The effects of post-anthesis soil water status on the activities of key regulatory enzymes of grain starch and protein accumulation in wheat. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003, 29(4): 309—316.
- [17] Fan X M, Jiang D, Dai T B, *et al.* Effects of nitrogen rates on activities of key regulatory enzymes for grain starch and protein accumulation in wheat grown under drought and waterlogging from anthesis to maturity. *Scientia Agriculture Sinica*, 2005, 38(6): 1132—1141.
- [18] Jiang D, Dai T B, Jing Q, *et al.* Effects of long-term fertilization in fixed plots on cell membrane lipid peroxidation and GS activity in flag leaf of winter wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(12): 1232—1236.
- [19] Claussen W, Lenz F. Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant and Soil*, 1999, 208(1): 95—102.
- [20] Jenner C F, Ugalde T D, Aspinall D. The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. *Australian Journal. of Plant Physiology*, 1991, 18: 211—226.

参考文献:

- [2] 邹铁祥,戴廷波,姜东,等. 钾素水平对小麦氮素积累和运转及籽粒蛋白质形成的影响. *中国农业科学*, 2006, 39(4): 686~692.
- [3] 赵广才. 根外追肥对小麦籽粒产量和品质的影响. *北京农业科学*, 1986, (6): 17~19.
- [4] 梁晓芳,于振文. 施钾时期对冬小麦旗叶光合特性和籽粒淀粉积累的影响. *应用生态学报*, 2004, 15(8): 1349~1352.
- [9] 朱俭,蔡武城. 生物物质常用化学分析方法. 北京:中国科学技术出版社, 1982. 1~20.
- [10] 黄维南. GS 和 GPT 分析方法. *现代植物生理学实验指南*. 北京:科学出版社, 1999. 154~158.
- [11] 王月福,于振文,李尚霞,等. 不同施肥水平对不同品种小麦籽粒蛋白质和地上器官游离氨基酸含量的影响. *西北植物学报*, 2003, 23(3): 417~421.
- [12] 唐湘如,官春云. 施钾对油菜酶活性的影响及其与产量品质的关系. *中国农学通报*, 2001, 17(3): 4~8.
- [17] 范雪梅,姜东,戴廷波,等. 花后干旱和渍水下氮素供应对小麦籽粒蛋白质和淀粉积累关键调控酶活性的影响. *中国农业科学*, 2005, 38(6): 1132~1141.
- [18] 姜东,戴廷波,荆奇,等. 长期定位施肥对小麦旗叶膜脂过氧化作用及 GS 活性的影响. *作物学报*, 2004, 30(12): 1232~1236.