

DOI: 10.5846/stxb201310082415

崔秀秀, 张义贤. Ni 胁迫对不同基因型谷子幼苗生长及氮素代谢的影响. 生态学报, 2015, 35(10): 3244-3251.

Cui X X, Zhang Y X. Effect of Ni on the growth and nitrogen metabolism in foxtail millet seedlings of different genotypes. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(10): 3244-3251.

Ni 胁迫对不同基因型谷子幼苗生长及氮素代谢的影响

崔秀秀, 张义贤*

山西大学生命科学学院, 太原 030006

摘要: 采用盆栽土培法, 研究了不同浓度 Ni^{2+} (0、25、50、100、150、200 mg/kg) 对 4 种基因型谷子 (13-36、B-7、晋谷 51 号、晋谷 52 号) 幼苗生长, Ni^{2+} 富集与转运能力, 叶片中硝态氮、氨态氮、可溶性蛋白质、脯氨酸含量及氮代谢相关酶硝酸还原酶 (NR)、谷氨酰胺合成酶 (GS)、谷氨酸合酶 (GOGAT)、谷氨酸脱氢酶 (GDH) 活性的影响。结果表明: Ni^{2+} 胁迫下, 4 种基因型谷子幼苗的根长、苗长、生物量随 Ni^{2+} 浓度增加逐渐降低, 体内 Ni^{2+} 含量逐渐增加, 与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。在所试浓度范围内, 4 种基因型谷子幼苗叶片中的硝态氮含量、NR、GS、GOGAT 活性表现为低浓度 (25—50 mg/kg) 增高和高浓度 (50—200 mg/kg) 降低, 而 GDH 活性在 Ni^{2+} 浓度为 100 mg/kg 以上时下降, 氨态氮含量在 50—150 mg/kg 处理组中为对照的 1.14—3.02 倍。不同浓度 Ni^{2+} 处理后, 4 种基因型谷子幼苗叶片中的脯氨酸含量均有不同程度的提高, 而可溶性蛋白质含量呈明显下降趋势。实验结果证明, Ni^{2+} 胁迫抑制了谷子幼苗对硝态氮的吸收, 降低了叶片中 NR、GS、GOGAT 活性, 影响了氮的同化作用, 使谷子幼苗的氮素代谢发生紊乱, 不同基因型谷子对 Ni^{2+} 胁迫的毒性效应存在差异。4 种基因型谷子对 Ni^{2+} 的耐性顺序为 13-36 > B-7 > 晋谷 51 > 晋谷 52。

关键词: 谷子; Ni 胁迫; 生长响应; 氮素代谢

Effect of Ni on the growth and nitrogen metabolism in foxtail millet seedlings of different genotypes

CUI Xiuxiu, ZHANG Yixian*

College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Nowadays, soil pollution by Ni^{2+} is getting more severe in some place of China. Nickel (Ni) is an essential microelement of plants, however, large Ni^{2+} accumulation in crops leads to necrosis of plant leaf, lignification of stem and growth inhibition of root. The mechanisms of the Ni^{2+} toxicity are not well understood for nitrogen metabolism of higher plants. In this study, pot culture was conducted to investigate the effects of Ni^{2+} on the growth of roots and shoots, biomass, the uptake and accumulation of Ni^{2+} , the contents of nitrate nitrogen, ammonium nitrogen, free proline and soluble proteins, the nitrogen metabolism key enzymatic activities including nitrate reductase (NR), glutamine synthase (GS), glutamate synthase (GOGAT), glutamate dehydrogenase (GDH) in four genotypes (13-36, B-7, Jingu 51, Jingu 52) of foxtail millet (*Setaria italica* (L.) Beauv) seedlings from Shanxi, China. The foxtail millet seeds were cultured in incubators at 26°C for germination with no light, then planted in the pots spiked with five different Ni^{2+} concentration, namely 25, 50, 100, 150, 200 (mg/kg). The experimental results showed that with the rise of Ni^{2+} concentration the root length, shoot length and biomass declined and the accumulation of Ni^{2+} increased gradually, which formed a sharp contrast with the control group ($P < 0.05$). In the range of test Ni^{2+} concentration, the content of nitrate nitrogen, the activities of

基金项目: 国家农业产业技术体系专项基金项目 (nyeytx-13); 山西省自然科学基金项目 (2006011074)

收稿日期: 2013-10-08; **修订日期:** 2014-11-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhangyx@sxu.edu.cn

NR, GS, GOGAT of four genotypes of foxtail millet characterized by increasing at low concentration (25—50mg/kg) and declining at high concentration (50—200 mg/kg). The activities of NR, GS, GOGAT reached the peak values when exposed to 50mg/kg Ni^{2+} . The nitrate nitrogen contents and NR activities in 13-36 were higher than other three genotypes ($P<0.05$). The activities of GS and GOGAT in 13-36, B-7, Jingu51 were 1.69, 1.47, 1.19 and 2.84, 1.03, 3.17 times than those of control group in 50mg/kg Ni^{2+} exposure. However, The GDH activities decreased when the Ni^{2+} concentration higher than 100mg/kg. Ni^{2+} treatments increased the accumulation of ammonium nitrogen in range of 50 to 150 mg/kg in the leaves of four foxtail millet and were 1.14 to 3.02 times than control group. Besides these, with the increasing of Ni^{2+} concentration, the content of free proline increased, the soluble protein decreased. Synthesize the above results, we found that Ni^{2+} treatments impaired N assimilation in foxtail millet seedlings by restraining the absorption of nitrate nitrogen and inhibiting the activities of NR, GS and GOGAT, which lead to nitrogen metabolism disturbance. And the toxicity effect was different among different genotypes of foxtail millet. Further, Ni^{2+} stress inhibited the growth of foxtail millet. The tolerance order of four foxtail millets to Ni^{2+} was 13-36>B-7>Jingu51>Jingu52.

Key Words: foxtail millet (*Setaria italica* (L.) Beauv); Ni stress; growth response; nitrogen metabolism

镍(Ni)是一种广泛分布的重金属元素,由于现代工业的快速发展,采矿、冶炼、电镀等废弃物的产生,以及污泥和复合堆肥的使用,Ni已成为农业生态环境中的重要污染物^[1]。研究表明,Ni是植物生长的必需微量元素之一,微量的镍能够促进种子萌发和幼苗的生长,延缓植物衰老^[2]。镍还是脲酶的金属辅基,参与植物的氮素代谢,改善植物对氮素的利用率^[3]。但过量的镍能阻滞植物的生长,使植物叶片卷曲,黄化,甚至死亡,还会干扰植物体内正常的物质代谢^[4]。氮是植物生长发育中不可缺少的营养元素,氮素代谢也是植物重要的营养代谢之一^[5],氮素代谢会影响植物的代谢、资源分配及生长和发育^[6]。Ni胁迫可以通过抑制植物体内氮素代谢相关酶的活性,减少植物对氮的吸收与转运,引起氮代谢的变化^[7]。

谷子(*Setaria italica* (L.) Beauv)是一种起源于我国的特色禾谷类粮饲兼用作物,具有耐旱、耐瘠、营养丰富等特点,其蛋白质含量明显高于小麦、玉米和水稻等作物。在谷子生长发育和产量的形成中,需要吸收氮、磷、钾等多种营养元素,其中氮对谷子产量的作用最大^[8]。目前,国内外有关重金属胁迫对谷子毒性影响的研究已有一些报道,Rout等^[9]研究了 Ni^{2+} 对谷子愈伤组织生长及蛋白质合成的抑制效应。肖志华等^[10]研究了不同浓度 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 胁迫对谷子幼苗的叶绿素、可溶性蛋白质及DNA含量的影响。张义贤等^[11-12]研究了 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 胁迫对不同基因型谷子幼苗基因组DNA多态性的影响。张喜文等^[13]研究了谷子幼苗对土壤 Pb^{2+} 、 Cr^{3+} 的生长响应及吸收积累的差异性。而有关 Ni^{2+} 对谷子幼苗生长及氮素代谢的研究报道甚少。本实验采用盆栽土培法,研究了外源 Ni^{2+} 胁迫下4种基因型谷子幼苗生长、生物量、叶片中含氮物质、氮代谢关键酶活性的变化及 Ni^{2+} 吸收积累特性,以期了解镍污染对谷子幼苗生长发育的影响,探讨镍对谷子氮素代谢的毒害机制,比较不同基因型谷子幼苗对镍毒害的耐性差异,为重金属污染地区谷子的栽培管理及谷子品质改良提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以山西省农科院谷子研究所提供的13-36、B-7、晋谷51号、晋谷52号4种基因型谷子(*Setaria italica* (L.) Beauv)为试验材料。供试土壤为褐土,取自山西省农科院试验田0—20cm的表层土。土壤pH值为7.2,有机质含量为8.3g/kg,全氮含量为0.9mg/kg,速效P、K含量分别25.2、68.6 mg/kg,镍含量为12.52mg/kg,土壤含水量为31.2%。试验所用外源镍为 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)。

1.2 试验处理

Ni^{2+} 处理浓度的设置参照我国农田土壤环境质量标准^[14]中 Ni^{2+} 污染临界值,用 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 配制成25、

50、100、150、200mg/kg(以纯 Ni^{2+} 计)5 个 Ni^{2+} 浓度溶液,以去离子水作为对照。将配置好的 Ni^{2+} 溶液分别加入装有 2 kg 土壤的陶瓷盆中(20cm×20cm),充分混匀后放置 20d 备用。精选籽粒饱满、大小均匀的谷子种子,用 5% 的 NaClO 消毒 30min 后洗净,放置在 26℃ 培养箱中避光发芽。将萌发后的种子种于盆中,每盆 50 粒,在室内条件下培养 30d 后取样测试各指标,昼/夜温度为 27℃/20℃,湿度为 30%—50%,每天定时补充水分,以称重法确定失水量,每一处理设置 3 个重复。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 生物量及 Ni 含量的测定

将培养 30d 的谷子幼苗整株取出,用去离子水洗净,然后将根浸入 20mmol/L 的 EDTA- Na_2 溶液中交换 20min,以去除根系表面吸附的 Ni^{2+} ,再用去离子水洗净,吸水纸吸干表面水分,测量幼苗的根长、苗长(cm)。将谷子幼苗置于 70℃ 烘箱中烘干至恒重,随机选取 10 株幼苗,称生物量(mg)(以平均值计)。根系耐性指数(RTI)^[10]:

$$\text{RTI} = \text{各处理的根长}(\text{cm}) / \text{对照的根长}(\text{cm})$$

另将烘干的谷子幼苗分为地上、地下两部分,研磨,分别称取 0.1g,经 4:1 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ 消化,去离子水定容后用原子吸收分光光度计(SHIMADZU AA-6300 型)测定各样品中的 Ni^{2+} 含量(mg/kg)^[10]。

$$\text{富集系数} = \text{植株地上部的重金属含量}(\text{mg/kg}) / \text{土壤中重金属含量}(\text{mg/kg})$$

$$\text{转运系数} = \text{植株地上部的重金属含量}(\text{mg/kg}) / \text{根部的重金属含量}(\text{mg/kg})$$

1.3.2 氨态氮、硝态氮、可溶性蛋白质和游离脯氨酸含量的测定

选取谷子幼苗的新鲜叶片进行含氮物质的测定。其中,氨态氮含量的测定参照中国科学院上海植物生理研究所的方法^[15];硝态氮含量的测定采用硝基水杨酸比色法^[16],410nm 波长下测定吸光度;可溶性蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[16];游离脯氨酸含量的测定采用磺基水杨酸法^[16]。

1.3.3 酶的提取与活性测定

谷子幼苗培养 30d 后,从每处理组中随机剪取叶片 2g 进行酶液的提取。硝酸还原酶的提取与活性测定采用磺胺比色法^[16]。谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合酶、谷氨酸脱氢酶的提取与活性测定参照中国科学院上海植物生理研究所的方法^[15]。硝酸还原酶的活性以 1h 内还原 KNO_3 生成 NO_2^- 的微克数表示;谷氨酰胺合成酶的活性以 1h 内形成 1 μmol γ -谷氨酰基氧肟酸的酶量作为 1 个酶活性单位;谷氨酸合酶的活性以 30℃ 下每分钟反应液减少 1 μmol 的 NADH 所需的酶量定义为 1 个酶活性单位;谷氨酸脱氢酶的活性以反应系统中每分钟光吸收 0.001 的变化为酶活性单位,用 $\text{NADH} \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ 蛋白质表示活性。以上酶的提取与测定均在 4℃ 条件下完成,每个处理做 3 次重复。

1.4 数据处理

实验数据采用 Excel 进行计算,并用 SPSS 16.0 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 Ni^{2+} 胁迫对不同基因型谷子幼苗生长及生物量的影响

表 1 显示,与对照组相比,4 种基因型谷子幼苗的根长、苗长、生物量随 Ni^{2+} 处理浓度的增加逐渐下降,在 200mg/kg 时降至最低,与对照差异显著($P < 0.05$)。其中晋谷 52 受 Ni^{2+} 胁迫的影响最大,植株长度和生物量分别比对照下降了 34.2% 和 34.3%。在所试 Ni^{2+} 浓度范围内,4 种基因型谷子幼苗的根系耐性指数均小于对照组,表明 Ni^{2+} 胁迫对谷子幼苗的根系生长有明显抑制作用。13-36、B-7、晋谷 51、晋谷 52 对 Ni^{2+} 的平均耐性指数分别为 0.618、0.658、0.566、0.562,不同基因型之间差异显著($P < 0.05$),4 种基因型谷子对 Ni^{2+} 的耐性大小为 B-7>13-36>晋谷 51>晋谷 52。

2.2 Ni^{2+} 在不同基因型谷子幼苗体内的吸收积累与迁移

富集系数(BCF)和转运系数(TF)能够反映植物对土壤中重金属的吸收和转运能力^[17]。由表 2 可知,不

同浓度 Ni^{2+} 处理下, 4 种基因型谷子幼苗地上部、根部中 Ni^{2+} 含量随处理浓度的升高逐渐增加, 与对照差异显著 ($P<0.05$)。在所试 Ni^{2+} 处理浓度范围内, 幼苗根部的 Ni^{2+} 含量均明显高于地上部, 表明 Ni^{2+} 进入谷子幼苗体内主要积累在根部。从谷子幼苗对 Ni^{2+} 的富集能力看, 不同基因型间存在差异 ($P<0.05$), 4 种谷子对 Ni^{2+} 的富集能力为晋谷 51>13-36>B-7>晋谷 52。 Ni^{2+} 由根部向地上部的转运能力也存在差异, 4 种谷子的转运能力为 13-36>B-7>晋谷 51>晋谷 52。

表 1 Ni^{2+} 对不同基因型谷子幼苗生长及生物量的影响Table 1 Effects of the growth and biomass on different genotypes foxtail millet seedlings under Ni^{2+} stress

品种 Varieties	添加浓度/(mg/kg) Concentration	根长/mm Root length	苗长/mm Shoot length	生物量/mg Biomass	根系耐性指数 Root tolerance index
13-36	CK	91.1±0.06eB	93.0±3.44bA	438.12±0.02eA	1.00±0.00d
	25	90.5±0.15eD	77.1±4.57aA	418.63±0.81dA	0.99±0.16cC
	50	60.8±0.06dB	78.7±2.73aA	412.5±1.28cA	0.72±0.24cC
	100	49.4±0.31cB	81.0±2.42aA	403.72±3.19bA	0.59±0.36bA
	150	31.4±0.32bA	87.3±3.28abA	395.70±0.26aB	0.37±0.03aA
	200	28.0±1.15aA	85.8±3.54abA	395.96±0.44aC	0.33±0.08aA
B-7	CK	88.3±0.17fA	116.4±4.47bB	510.36±0.34fC	1.00±0.00d
	25	76.5±0.29eC	105.2±3.09aB	486.60±0.15eD	0.98±0.11dB
	50	83.9±0.50dD	110.5±6.69aB	476.43±0.29dD	0.87±0.15eD
	100	46.6±0.17cA	110.6±2.73aB	468.61±0.45cC	0.60±0.07cB
	150	37.9±0.23abB	115.6±3.64bB	456.09±0.06bD	0.48±0.03bB
	200	28.4±0.31aA	103.3±4.47aB	436.44±0.39aD	0.36±0.08aB
晋谷 51 号 Jingu 51	CK	88.8±0.37eA	96.9±4.84aA	512.78±0.26fD	1.00±0.00e
	25	57.9±0.21dA	100.0±2.07bB	451.43±0.25eC	0.65±0.27dA
	50	52.9±0.67cA	104.6±3.82bB	436.58±0.30dC	0.60±0.12cA
	100	52.3±0.17cC	105.2±2.72bB	432.84±0.22cB	0.59±0.06cA
	150	45.9±0.26bC	109.3±6.35bB	420.65±0.35bC	0.52±0.02bC
	200	40.3±0.35aB	113.3±4.88bB	363.79±1.90aB	0.45±0.08aD
晋谷 52 号 Jingu 52	CK	112.1±0.49eC	111.8±5.63aB	442.73±0.74fB	1.00±0.00e
	25	72.9±0.06dB	104.7±5.43aB	437.25±0.16eB	0.65±0.12dA
	50	72.9±1.10dB	104.4±4.77aB	432.43±0.17dB	0.65±0.03dB
	100	67.0±1.15cD	101.5±4.50aB	429.12±0.14cB	0.60±0.08bB
	150	56.4±0.21bD	109.5±5.15aB	343.43±0.13bA	0.50±0.02cC
	200	48.4±0.24aC	98.8±5.13aAB	290.87±0.13aA	0.43±0.07aC

同列相同基因型不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$); 相同浓度不同基因型不同大写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

表 2 Ni^{2+} 在不同基因型谷子幼苗体内的吸收、积累与迁移Table 2 The uptake, accumulation and transformation of Ni^{2+} in different genotypes foxtail millet Seedlings

品种 Varieties	添加浓度/(mg/kg) Concentration	地上部含量/(mg/kg) Leaf and stem	根部含量/(mg/kg) Root	富集系数 Bio-concentration factor	转运系数 Translocation factor
13-36	CK	40.58±2.01aB	92.17±3.13aC	3.24±0.57dC	0.44±0.27aA
	25	124.78±3.05bD	168.70±1.60bC	3.32±0.42dD	0.74±0.39dD
	50	139.68±7.08cD	225.30±1.97cC	1.93±0.49cB	0.62±0.73cC
	100	160.55±5.44dC	285.17±2.03dC	1.43±0.47bC	0.56±0.28bB
	150	213.63±3.92eD	336.32±1.08eB	1.31±0.57aD	0.64±0.35cC
	200	279.41±5.79fD	464.26±4.29fB	1.31±0.08aD	0.60±0.18cD
B-7	CK	38.25±8.39aB	75.26±6.31aA	3.06±0.36fB	0.51±0.82bC
	25	98.43±4.04bC	159.10±4.20bB	2.62±0.57eC	0.62±0.18dC
	50	120.80±4.65cB	196.33±5.02cB	1.93±0.38dB	0.62±0.15dC
	100	146.24±5.01dB	256.38±2.87dB	1.30±0.27cB	0.57±0.40cB
	150	178.42±2.19eB	348.90±2.41eC	1.10±0.57bB	0.51±0.13bB
	200	201.63±4.72fB	546.70±1.90fD	0.95±0.69aB	0.37±0.68aA

续表

品种 Varieties	添加浓度/(mg/kg) Concentration	地上部含量/(mg/kg) Leaf and stem	根部含量/(mg/kg) Root	富集系数 Bio-concentration factor	转运系数 Translocation factor
晋谷 51 号 Jingu 51	CK	36.98±7.13aA	76.88±0.88aA	2.95±0.25fA	0.48±0.19cB
	25	75.04±2.59bB	193.58±2.35bD	2.00±0.90dB	0.39±0.87aA
	50	138.29±1.98cC	267.20±2.33cD	2.21±0.68eC	0.52±0.52dB
	100	169.35±5.43dD	310.55±7.01dD	1.51±1.03cD	0.55±0.43eB
	150	186.12±3.18eC	369.70±5.10eD	1.15±0.42bC	0.50±0.34cB
	200	211.63±5.62fC	489.26±3.16fC	1.00±0.84aC	0.43±0.55bB
晋谷 52 号 Jingu 52	CK	41.17±2.77aC	86.39±5.18aB	3.29±1.91eC	0.48±0.76cB
	25	56.79±4.65bA	132.85±3.81bA	1.51±0.98dA	0.43±0.27aB
	50	78.31±3.88cA	175.30±0.95cA	1.25±0.28cA	0.45±0.46bA
	100	101.51±2.64dA	234.11±2.11dA	0.90±0.37bA	0.43±0.36aA
	150	119.35±5.65eA	249.51±3.43eA	0.73±0.18aA	0.48±0.78cA
	200	135.19±8.02fA	279.80±5.70fA	0.64±0.49aA	0.48±0.67cC

2.3 Ni²⁺胁迫对不同基因型谷子幼苗硝态氮、氨态氮、游离脯氨酸及可溶性蛋白质含量的影响

由表 3 可以看出,在低浓度(25—50 mg/kg) Ni²⁺ 处理组中,4 种基因型谷子幼苗叶片中硝态氮的含量逐渐上升,与对照相比差异显著($P<0.05$)。当 Ni²⁺ 处理浓度>50 mg/kg 时,4 种谷子叶片中硝态氮含量逐渐下降。4 种基因型谷子叶片中的硝态氮含量为 13-36>B-7>晋谷 51>晋谷 52。Ni²⁺ 处理下,4 种谷子幼苗叶片中氨态氮含量随处理浓度的升高先增加后减少,在 50—100 mg/kg 范围内为对照的 1.14—3.02 倍,且不同处理组间差异显著($P<0.05$),其中晋谷 52 叶片中氨态氮含量明显高于其他 3 种基因型。

表 3 Ni²⁺胁迫对不同基因型谷子幼苗硝态氮、氨态氮、游离脯氨酸和可溶性蛋白质含量的影响

Table 3 Effects of Ni²⁺ stress on contents of nitrate, ammonium, free proline and soluble proteins in different genotypes foxtail millet Seedlings

品种 Varieties	添加浓度/(mg/kg) Concentration	氨态氮/(μg/g) Nitrate	硝态氮/(μg/g) Ammonium	可溶性蛋白质/(μg/g) Soluble protein	脯氨酸/(μg/g) Proline
13-36	CK	338.66±0.73cC	927.44±0.56bD	81.13±0.35dD	9.88±1.31aA
	25	351.65±0.95dC	1198.72±0.56dD	79.31±1.13cdD	10.41±0.05abA
	50	381.16±0.55eC	1343.57±0.05eD	77.71±0.39bcD	11.75±0.10bB
	100	422.64±1.20fC	1199.68±0.04dD	76.12±0.96abD	16.13±0.20cC
	150	195.77±0.55bA	1072.32±0.68cD	76.16±1.47abD	22.11±0.05dC
	200	168.25±1.19aA	828.12±0.56aD	73.63±0.71aD	25.40±0.30dC
B-7	CK	423.92±0.27eD	568.42±0.56dC	62.45±0.48cB	12.44±0.05aB
	25	233.70±0.06aB	636.10±2.01eC	58.14±0.75cB	13.65±0.04bB
	50	249.35±0.04bB	677.87±0.03fC	56.24±0.81bcB	15.55±0.04cC
	100	292.02±1.42dA	518.19±0.06cB	53.23±2.67aB	15.77±0.14cB
	150	480.94±0.27fC	498.43±2.01bC	52.87±1.27abB	23.12±0.11dD
	200	264.23±1.52cC	434.95±0.07aB	51.35±0.25abB	56.57±0.11eD
晋谷 51 号 Jingu 51	CK	142.22±0.28aA	534.99±0.56bB	50.74±4.83bA	13.49±0.03aC
	25	331.02±0.27cC	628.86±0.55dD	49.12±4.39bA	14.90±0.03bC
	50	391.49±0.04eD	634.56±1.24eB	47.60±4.92aA	15.33±0.14cC
	100	373.99±1.00dB	558.93±0.56cC	43.98±2.59aA	16.19±0.03dB
	150	339.44±1.46fB	487.11±0.56bB	46.13±8.04aA	16.33±0.05dD
	200	198.02±0.97bB	463.57±0.09aC	42.84±4.14aA	19.32±0.06eB
晋谷 52 号 Jingu 52	CK	243.72±0.55dB	320.40±0.27aA	76.51±0.94cC	9.72±0.05aA
	25	134.38±0.82aA	344.26±0.06dA	73.27±1.26bC	10.51±0.05aA
	50	212.87±0.27bA	361.07±0.28fA	68.55±0.54aC	10.97±0.08aA
	100	736.01±1.09fD	356.03±0.28eA	72.53±0.80bC	13.93±0.03bA
	150	532.46±1.25eD	332.69±0.28cA	71.19±0.28bC	14.49±1.27bA
	200	157.14±0.27cA	328.73±0.74bA	70.71±0.55aC	14.76±0.10bA

4 种基因型谷子幼苗叶片中可溶性蛋白质含量随着 Ni^{2+} 处理浓度的增加逐渐下降, 当 Ni^{2+} 浓度达到 200 mg/kg 时降至最低, 分别比对照降低了 9.24%, 17.77%, 15.57%, 7.58%。13-36 和晋谷 52 叶片中可溶性蛋白质含量大于 B-7 和晋谷 51。 Ni^{2+} 胁迫下, 4 种基因型谷子幼苗叶片中的脯氨酸含量随处理浓度的逐渐增加, 与对照相比差异显著 ($P<0.05$), 且不同基因型之间存在差异 ($P<0.05$), 13-36 和 B-7 的脯氨酸含量显著高于晋谷 51 和晋谷 52。

2.4 Ni^{2+} 胁迫对不同基因型谷子幼苗 NR、GS、GOGAT、GDH 酶活性的影响

4 种基因型谷子幼苗叶片中的 NR 活性随着 Ni^{2+} 处理浓度的增加先升高后下降 (表 4), 在 100—150 mg/kg 时为对照的 1.02—1.54 倍, 不同基因型间差异显著 ($P<0.05$)。除晋谷 52 外, 其他谷子幼苗中 GS、GOGAT 活性均随 Ni^{2+} 处理浓度升高先升后降, 在 50mg/kg 时达到最大值, 分别为对照的 1.69、1.47、1.19 倍和 2.84、1.03、3.17 倍。 Ni^{2+} 胁迫下, 4 种谷子幼苗叶片中 GDH 活性在 100 mg/kg 时明显高于对照 ($P<0.05$), 此后逐渐下降。在 25—100 mg/kg 的 Ni^{2+} 处理范围内, 4 种谷子叶片中 GDH 的活性大小为 B-7>晋谷 51>晋谷 52>13-36。

表 4 Ni^{2+} 胁迫对不同基因型谷子幼苗 GOGAT、GS、NR、GDH 酶活性的影响

Table 4 Effects of Ni^{2+} stress on activities of GOGAT, GS, NR and GDH in different genotypes foxtail millet Seedlings

品种 Varieties	添加浓度 Concentration/ (mg/kg)	硝酸还原酶 Nitrate reductase/ ($\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	谷氨酰胺合成酶 Glutamine synthase/ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	谷氨酸合酶 Glutamate synthase/ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	谷氨酸脱氢酶 Glutamate dehydrogenase/ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
13-36	CK	11.79±0.09bB	299.91±0.47bD	11.73±0.02bB	218.02±5.03cA
	25	11.96±0.06aB	342.19±5.48cD	22.61±0.04cB	165.10±5.02bA
	50	12.08±0.05aB	506.34±0.95fD	33.26±0.22dC	243.48±0.04dA
	100	15.73±0.05bD	418.07±0.73eD	11.74±0.03bA	287.93±3.08eA
	150	18.14±0.07cD	374.38±0.37dD	11.08±0.22aAB	165.18±5.02aA
	200	12.11±0.05aB	257.83±0.78aD	11.09±0.21aA	148.09±5.03aA
B-7	CK	8.86±0.03dA	193.39±0.31cC	45.22±0.03dC	581.11±4.37eD
	25	8.16±0.01bA	241.15±0.54eC	22.61±0.01bC	450.12±5.81bD
	50	8.40±0.02cA	284.30±0.44fC	46.52±0.43eC	533.54±5.39cC
	100	8.91±0.04dA	215.03±0.45dC	33.26±0.22cC	896.97±0.20dD
	150	7.24±0.04aA	184.83±0.67bC	11.52±0.22aA	356.45±7.95aAB
	200	8.32±0.02cA	100.32±0.30aB	13.92±0.44aB	347.96±7.92aB
晋谷 51 号 Jingu 51	CK	14.02±0.09bD	131.60±0.50cB	10.57±0.11aA	543.24±0.031eC
	25	14.19±0.06cD	129.83±0.30bA	13.91±0.43bB	379.67±2.27aC
	50	13.84±0.05aC	156.01±0.28eC	33.47±0.03dC	605.43±0.66cD
	100	14.23±0.05cC	140.06±0.25dB	22.39±0.22cAB	791.61±3.89dC
	150	14.85±0.07eC	130.47±0.13bB	11.09±0.22aA	469.75±7.92bBC
	200	14.61±0.05dD	86.16±0.38aB	10.65±0.13aA	487.63±2.97bC
晋谷 52 号 Jingu 52	CK	13.90±0.02bC	104.75±0.65dA	34.79±0.44dC	431.45±3.04ceB
	25	13.86±0.03bC	62.35±0.89eB	11.31±0.12aB	353.41±0.44aB
	50	13.93±0.02bD	82.15±1.14aA	11.52±0.22abA	394.20±6.38aB
	100	14.14±0.10cB	88.07±0.20aA	22.82±0.22cB	498.45±5.33bB
	150	14.14±0.01cB	78.07±0.62cA	22.39±0.21cB	516.66±4.80cD
	200	13.68±0.03aC	57.15±0.55bA	11.52±0.22abA	531.33±2.26dD

3 讨论

大量研究证明, 重金属进入土壤后具有积累性和不可分解性的特征, 并参与土壤和生物体的循环过程。植物通过根系将重金属吸收进入根细胞内, 并通过细胞间的运输向地上部转移^[10]。本研究结果表明, 在所试

浓度(25—200mg/kg)范围内,4种基因型谷子幼苗体内的 Ni^{2+} 含量显著增加($P<0.05$),且根部含量远高于地上部。使谷子幼苗的生长受到明显抑制,根长、苗长显著低于对照,直接影响到生物量的生成。4种谷子幼苗的根系耐性指数均低于对照,富集系数和转运系数在不同基因型间存在明显的种内差异。表明 Ni^{2+} 虽然是植物生长的必需微量元素,但在较高浓度处理后对幼苗的生长可造成明显的抑制和毒害效应,此结果与其他学者在小麦、玉米、水稻等作物中的研究结果相一致^[17-19]。

在高等植物中,氮素的吸收、同化、利用是植物生长发育的一个重要生理代谢过程,植物吸收利用的氮素主要来自于土壤中的硝态氮(NO_3^-)和铵态氮(NH_4^+)^[20]。硝酸还原酶(NR)是植物吸收利用 NO_3^- 的第一个酶,NR可以直接调节 NO_3^- 的还原,从而调节氮代谢^[21]。植物根系体内 NO_3^- 的还原过程中,硝态氮的含量直接代表着NR的活性大小^[22]。本实验中,4种基因型谷子幼苗叶片中硝态氮含量、NR活性均表现为低浓度(0—50mg/kg)增加和高浓度(100—200mg/kg)下降趋势,且不同基因型间存在显著差异,表明高浓度的 Ni^{2+} 胁迫对谷子硝态氮的合成和NR活性具有明显的抑制作用,从而影响了谷子对硝态氮的吸收和利用。高浓度的 Ni^{2+} 引起谷子幼苗叶片中NR活性降低的原因可能是:NR是一种诱导酶,叶片中NR的存在对 NO_3^- 有一定的依赖性, Ni^{2+} 胁迫下NR活性的降低与 NO_3^- 含量减少相关^[23]。这与 Renata^[24]在两种叶菜中的研究结果相一致。

正常供氮情况下,植物主要通过谷氨酰胺合成酶-谷氨酸合成酶(GS-GOGAT)循环途径将体内的 NH_4^+ 同化为有机氮,为其他含氮有机物的合成提供前体^[25]。GS是处于氮代谢中心的多功能酶,能直接催化谷氨酸与 NH_4^+ 发生反应生成谷氨酰胺,其活性的提高可增强氮代谢的效率。GOGAT在氮同化过程中与GS具有协同作用,可催化谷氨酰胺生成谷氨酸,进一步合成其他酰胺、氨基酸和蛋白质^[5]。本实验证明,13-36、B-7、晋谷51在25—50mg/kg的 Ni^{2+} 处理条件下,叶片中的GS和GOGAT活性变大,表明在此浓度范围内 Ni^{2+} 对GS、GOGAT的活性有一定的刺激作用,这与 Mäck等^[26]在大麦中的研究结果相似。当浓度达到50mg/kg以上时,GS、GOGAT的活性下降,影响了氮的同化作用,导致谷子体内的氨态氮含量增加。而晋谷52的GS、GOGAT活性在所试浓度范围内均受到抑制,氨态氮的积累量远高于以上3种基因型,表明 Ni^{2+} 胁迫对不同基因型谷子氮同化作用的抑制程度不同。于方明^[27],王志强^[28]等在拟南芥,小麦的研究中表明,当植物细胞中氨浓度较高时,植物可以通过GDH途径补充谷氨酸库,缓解氨毒。本实验中,当 Ni^{2+} 浓度为100mg/kg时,谷子幼苗叶片中的GDH活性显著提高,氨态氮含量开始下降,证明GDH对缓解 NH_4^+ 的毒害起着重要作用。

在逆境胁迫下,植物体中游离脯氨酸的含量在一定程度上能够反映植物的抗逆性^[29]。Brugiere^[30]指出植物氮同化过程中,当氨态氮含量升高时,脯氨酸可作为 NH_4^+ 突然增多时的临时贮藏物质,来缓解氨毒。本实验中,在25—100mg/kg浓度范围内,谷子幼苗叶片中脯氨酸含量与氨态氮含量均增加,但当浓度大于100mg/kg时,脯氨酸含量增加,氨态氮含量有所下降,表明脯氨酸的大量积累对 NH_4^+ 毒害产生了缓解作用。

可溶性蛋白质是细胞基质及各种细胞器基质的主要组成成分,在细胞生理代谢过程中有重要的催化功能,其含量的变化在一定程度上能反映植物氮素代谢的情况^[21]。本实验结果显示,在50—200mg/kg Ni^{2+} 浓度范围内,4种基因型谷子幼苗叶片中的可溶性蛋白质含量均有下降,B-7和晋谷51的下降幅度大于13-36和晋谷52,此现象可能与氮素吸收同化过程中关键酶(NR、GS、GOGAT)活性下降有关,导致无机氮向氨基酸的转化受到抑制,从而使蛋白质的合成受到抑制。

4 结论

(1) Ni^{2+} 胁迫使4种基因型谷子幼苗体内的 Ni^{2+} 含量增加,抑制了谷子幼苗的生长,降低了生物量。4种基因型谷子对 Ni^{2+} 的耐性大小为13-36>B-7>晋谷51>晋谷52。

(2) 50 mg/kg 以上的 Ni^{2+} 处理后,4种谷子幼苗体内硝态氮的含量均有下降,氮素代谢过程中几种关键酶(NR、GS、GOGAT)活性受到抑制,使谷子幼苗体内氨态氮积累,造成谷子幼苗氮素代谢过程紊乱。这种影响具有基因型之间的差异。

(3) 在本实验条件下, Ni^{2+} 胁迫使谷子幼苗体内可溶性蛋白质含量下降, 脯氨酸含量增加, 且脯氨酸对氨毒害具有明显的缓解作用。

参考文献 (References):

- [1] 王夔. 生命科学中的微量元素(第二版). 北京: 中国计量出版社, 1996: 331-350.
- [2] 张秀玲, 宋光煜. 植物的镍素营养. 土壤肥料, 2004, (6): 33-36.
- [3] Dixon N E, Gazzola C, Blakeley R L, Zemer B. Jack bean urease (EC. 3. 5. 1. 5.). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. Journal of the American Chemical Society, 1975, 97(14): 4131-4133.
- [4] Pandey N, Sharma C P. Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. Plant Science, 2002, 163(4): 753-758.
- [5] 郭智, 原海燕, 陈留根, 奥岩松. 镉胁迫对龙葵幼苗氮代谢及其相关酶活性的影响. 生态环境学报, 2010, 19(5): 1087-1091.
- [6] 于方明, 李燕, 刘可慧, 李明顺, 邓华, 杨栋林, 邓华, 杨栋林, 周振明. Mn 对超富集植物短毛蓼和水蓼生长、Mn 吸收及氮素代谢的影响. 环境科学学报, 2011, 31(8): 1783-1789.
- [7] Mishra P, Dubey R S. Nickel and Al-excess inhibit nitrate reductase but upregulate activities of aminating glutamate dehydrogenase and aminotransferases in growing rice seedlings. Plant Growth Regulation, 2011, 64(3): 251-261.
- [8] 张喜文, 武钊. 谷子栽培生理. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1993: 1-15.
- [9] Rout G R, Samantaray S, Das P. In vitro selection and characterization of Ni-tolerant callus lines of *Setaria italica* L. Acta Physiologiae Plantarum, 1998, 20(3): 269-275.
- [10] 肖志华, 张义贤, 张喜文, 李萍. 外源铅、铜胁迫对不同基因型谷子幼苗生理生态特性的影响. 生态学报, 2012, 32(3): 889-897.
- [11] 张义贤, 付亚萍, 肖志华, 张喜文, 李萍. 铜胁迫对不同基因型谷子幼苗基因组 DNA 多态性的影响. 环境科学, 2013, 34(10): 4090-4095.
- [12] 张义贤, 付亚萍, 肖志华, 张喜文, 李萍. 铅胁迫对不同基因型谷子幼苗生理特性及基因组 DNA 多态性的影响. 农业环境科学学报, 2013, 32(3): 478-484.
- [13] 张喜文, 张义贤, 李萍, 肖志华, 杨磊. 谷子幼苗对土壤铅、铬的生长响应及吸收积累的差异性. 植物研究, 2011, 31(6): 739-743.
- [14] GB 15618—1995, 中华人民共和国国家标准, 土壤环境质量标准. 1995.
- [15] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999: 152-158.
- [16] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000: 184-217.
- [17] 黄锦孙, 韦东普, 郭雪雁, 马义兵. 田间土壤外源铜镍在小麦中的累积及其毒害研究. 环境科学, 2012, 33(4): 1369-1375.
- [18] 马贵. 镍胁迫对玉米萌发和早期生长的影响. 安徽农业科学, 2010, 38(32): 18029-18030.
- [19] 王海华, 康健, 蒋明义. 高浓度镍对水稻幼苗生长及酶活性的影响. 作物学报, 2001, 27(6): 953-957.
- [20] 莫良玉, 吴良欢, 陶勤南. 高等植物 GS/GOGAT 循环研究进展. 植物营养与肥料学报, 2001, 7(2): 223-231.
- [21] 于方明, 孙银萍, 刘华, 李燕, 李艺, 刘可慧, 李明顺. Mn、Zn 单一及复合污染对短毛蓼氮素代谢的影响. 农业环境科学学报, 2013, 32(3): 517-523.
- [22] 田华, 段美洋, 王兰. 植物硝酸还原酶功能的研究进展. 中国农学通报, 2009, 25(10): 96-99.
- [23] 刘丽, 甘志军, 王宪泽. 植物氮代谢硝酸还原酶水平调控机制的研究进展. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1355-1361.
- [24] Matraszek R. Nitrate reductase activity of two leafy vegetables as affected by nickel and different nitrogen forms. Acta Physiologiae Plantarum, 2008, 30(3): 361-370.
- [25] Zhang Y Y, Zhou N, Liu P. Effect of Cu stress on nitrogen metabolism of *Nicotiana glauca* L. seedling. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(12): 6779-6784.
- [26] Mäck G. Organ-specific changes in the activity and subunit composition of glutamine synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different level of NH_4^+ . Planta, 1995, 196(2): 231-238.
- [27] 于方明, 仇荣亮, 周小勇, 应蓉蓉, 汤叶涛, 赵璇, 胡鹏杰, 曾晓雯. 镉对超富集植物圆锥南芥氮素代谢的影响研究. 土壤学报, 2008, 45(3): 497-502.
- [28] 王志强, 王春丽, 林同保. 外源钙离子对小麦幼苗氮素代谢的影响. 生态学报, 2008, 28(8): 3662-3667.
- [29] Lin Y C, Kao C H. Proline accumulation induced by excess nickel in detached rice leaves. Biologia Plantarum, 2007, 51(2): 351-354.
- [30] Brugiere N, Dubois F, Limami A M, Lelamdais M, Poux Y, Sangwan R S, Hirel B. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. Plant Cell, 1999, 11(10): 1995-2012.