

信息与资料 **Information and Data****不同形态氮素对水稻叶中抗坏血酸氧化还原势和气孔运动的影响**刘拥海¹, 蒋林蓉², 俞乐¹, 彭新湘^{2,*}¹肇庆学院生物系, 广东肇庆 526061; ²华南农业大学生命科学院, 广州 510642**Influences of Different Forms of Nitrogen Nutrients on the Ascorbic Acid Redox Potential and Stomatal Movement of Rice (*Oryza sativa* L.) Leaves**LIU Yong-Hai¹, JIANG Lin-Rong², YU Le¹, PENG Xin-Xiang^{2,*}¹Department of Biology, Zhaoqing College, Zhaoqing, Guangdong 526061, China; ²College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

摘要: 硝态氮下培养的水稻叶中还原型抗坏血酸(AsA)含量明显高于氨态氮下的, 并随着培养时间进程而明显升高, 氨态氮下的随着时间进程呈稍有下降趋势; 硝态氮下氧化型AsA和总AsA含量虽高于氨态氮下的, 但在前2 d二者差异不明显, 至3 d时差异才显著。硝态氮下的AsA氧化还原势和气孔导度均显著高于氨态氮下的, 二者的变化趋势相似, 并呈现明显的平行关系。

关键词: 水稻; 抗坏血酸(AsA)氧化还原势; 气孔导度

硝态氮和氨态氮是高等植物的主要无机氮源, 植物一般通过根系从土壤中吸收氮素, 硝态氮吸收后需经还原成氨态氮时才能被植物利用。现在只有水稻等少数高等植物对以氨态氮为唯一氮源时的敏感性不大, 而大多数高等植物表现出铵毒害症状, 导致生长受抑(Magalhães 和 Huber 1989; 刘永华等 2004)。有研究表明, 内源硝态氮除了作为主要氮源外, 还可作为一种潜在的信号物质(Foyer 等 2003; 王玉琪等 2006)。另外, 有报道指出, 硝酸通过硝酸还原酶催化形成的亚硝酸有可能通过亚硝酸还原酶催化或非酶促反应产生一氧化氮(nitric oxide, NO)而可能影响植物叶的气孔运动(Bethke 等 2004; Guo 等 2003)。还有研究显示, 植物叶中抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)氧化还原势可能直接影响活性氧H₂O₂分子的积累与转化而调控其气孔运动(Schroeder 等 2001; Chen 等 2003)。气孔是植物与外界环境气体交换的门户, 其开放是植物的重要生命活动之一。迄今为止, 尚未见有研究硝态氮或氨态氮为唯一氮源时植物叶中气孔开放和AsA氧化还原势变化的报道。本文以水稻为材料, 在含不同氮素形态的木村B营养液培养3 d后, 分别测定叶中不同类型AsA含量以及叶片气孔导度的动态变化, 探讨不同形态氮素对水稻叶中AsA氧化还原

势和气孔运动的影响。

材料与方法

材料为水稻(*Oryza sativa* L.)品种‘湘中汕2号’, 由湖南省农业科学院水稻研究所提供。挑选饱满的水稻种子, 以0.1%的HgCl₂表面消毒10 min后, 用蒸馏水反复冲洗, 于28℃下以水浸种24 h后, 转入铺有2层湿润滤纸的培养皿中, 放在28℃恒温箱中催芽2~3 d, 期间注意保持湿润。根长约1 cm时, 点播于尼龙网上, 用木村B营养液在玻璃温室中培养(昼间28~32℃/夜间23~26℃, 自然光照, 湿度60%~80%)。水稻长至三叶期, 挑选长势一致的幼苗, 移栽到体积为4 L的培养盆中, 继续用木村B营养液(N为1.65 mmol·L⁻¹)培养5 d左右, 后转入100%氨态氮(将营养液中的氮素全部换成NH₄Cl或(NH₄)₂SO₄, N浓度为3 mmol·L⁻¹)营养液培养2 d后, 接着分别转入100%氨态氮或100%硝态氮(将营养液中的氮素全部换成KNO₃、Ca(NO₃)₂或NaNO₃, N浓度为3 mmol·L⁻¹)营养液中培养。每3 d换一次营养液,

收稿 2007-04-19 修定 2007-06-15

资助 国家自然科学基金(30270799)。

* 通讯作者(E-mail: xpeng@scau.edu.cn; Tel: 020-85282023)。

营养液的 pH 为 5.0), 分别于 0、1、2、3 d 随机取相同叶位的样品测定各种生理生化指标。

AsA 含量测定参考 Kampfenkel 等(1995)的 Fe^{3+} 还原法, 略作改进。取 0.1 g 水稻幼苗叶片, 加 1 mL 6% (W/V) 三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)于 4℃ 冰浴下研磨成匀浆, 转移至 1.5 mL 指形管中, 冷冻离心(15 000×g, 5 min)后, 取上清液用于测定。1 mL 反应体系中含 50 μL 上清液、150 μL 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液(PBS, pH 7.4)、50 μL H₂O、250 μL 10% TCA、200 μL 42% H₃PO₄、200 μL 4% 联吡啶、100 μL 3% FeCl₃, 混匀后放入 42℃ 水浴中保温 40 min, 测定波长 525 nm 处的吸光值。总 AsA 与还原型 AsA 的测定不同之处是在加 10% TCA 之前, 先加 50 μL 10 mmol·L⁻¹ 二硫苏糖醇(1,4-dithio-DL-threitol, DTT), 混匀后放入 42℃ 水浴中保温 15 min, 再加入 50 μL 0.5% 的 *N*-乙基顺丁烯二酰亚胺(*N*-ethylmaleimide, NEM), 混匀后于室温中放置 1 min。空白对照均用相同体积的 6% TCA 替代上清液。用同样方法制作标准曲线后, 计算总 AsA 和还原型 AsA 含量, 脱氢 AsA(即氧化型 AsA)含量即为二者之差。

水稻叶片的气孔导度用便携式光合测定仪(Li-6400, Li-Cor Inc, Incoln NE, USA)测定。测定于上午 9:00~11:00 进行, 测定时人工光源, 光量子通亮密度为 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 叶室温度(25±3)℃, 叶室气体流速为 500 mL·min⁻¹。叶室中充不含 CO₂ 的氮气, 重复测定 6 次。

用 Excel 2003 处理数据并作图, 用统计分析软件 SAS 6.12 进行方差分析。除非特别说明者外, 文中图表数据均为 3 次取样的平均值。

结果与讨论

1 不同形态氮素下水稻叶中不同类型 AsA 含量的变化

图 1~3 的结果显示, 不同形态氮素营养液培养的水稻叶中各类型 AsA 含量的变化有明显差异。硝态氮和氨态氮培养下的还原型 AsA 含量差异显著, 硝态氮下还原型 AsA 含量随着培养时间进程而明显升高, 氨态氮下的随着时间进程的变化不大, 总的来说, 呈稍有下降趋势, 至 3 d 时前者含量是后者的 2.7 倍(图 1)。氧化型 AsA 含量

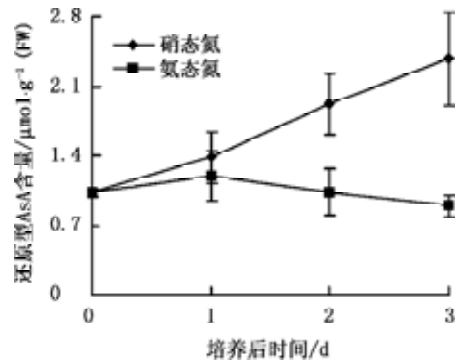


图 1 不同形态氮素下水稻叶中还原型 AsA 含量的变化

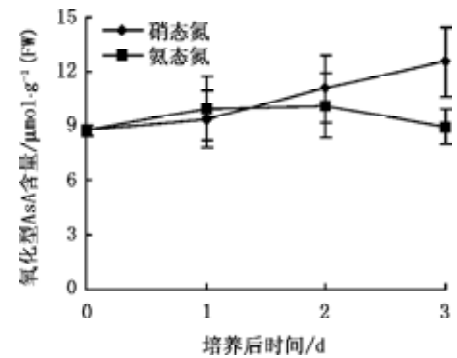


图 2 不同形态氮素下水稻叶中氧化型 AsA 含量的变化

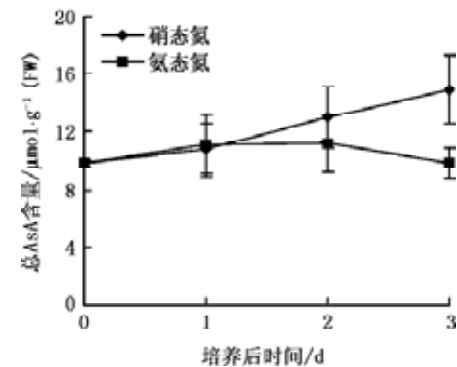


图 3 不同形态氮素下水稻叶中总 AsA 含量的变化

在硝态氮和氨态氮培养下的差异较小, 均随着培养时间进程有较小变化, 前者略有上升, 后者稍有下降, 前 2 d 二者差异较小, 至 3 d 时前者比后者高出近 40%, 差异显著(图 2)。硝态氮和氨态氮培养的总 AsA 含量变化趋势与氧化型 AsA 基本一致, 前者略有上升, 后者稍有下降, 前 2 d 二者差异较小, 至 3 d 时前者比后者高出约为 51%, 差异显著(图 3)。一般认为还原型 AsA 极易氧化生成单脱氢 AsA 自由基, 后者在单脱氢

AsA 还原酶作用下还原为还原型 AsA, 或者通过发生非酶歧化反应生成还原型 AsA 和脱氢 AsA 即氧化型 AsA, 而氧化型 AsA 通过 AsA- 谷胱甘肽代谢途径(Halliwell-Asada 循环)中脱氢 AsA 还原酶和谷胱甘肽还原酶等作用还原为还原型 AsA (Asada 1992)。根据这些说法, 可以认为硝态氮和氨态氮下培养的水稻叶中不同类型 AsA 的含量差异可以反映不同形态氮素培养下的水稻叶中 AsA 代谢的不同。

2 不同形态氮素下水稻叶中还原型 AsA/ 氧化型 AsA 比值的变化

图 4 表明, 硝态氮和氨态氮下培养的水稻叶中还原型 AsA/ 氧化型 AsA 比值变化差异显著: 硝态氮下的还原型 AsA/ 氧化型 AsA 的比值随着培养时间进程一直持续上升; 而氨态氮下培养的还原型 AsA/ 氧化型 AsA 的比值则基本上不变, 2 d 后甚至略有下降。一般来说, 还原型 AsA/ 氧化型 AsA 比值的大小代表叶片细胞中氧化还原势的高低, 二者比值变化的差异可以反映不同形态氮素下水稻叶中 AsA 氧化还原势的差异, 而维持较高 AsA 氧化还原势有助于提高植物的抗氧化能力。Chen 和 Gallie (2004) 的研究表明, H_2O_2 积累水平与 AsA 氧化还原势的高低呈明显负相关, 因此他们认为 AsA 可直接或间接通过 AsA 过氧化物酶的作用清除积累的 H_2O_2 。

3 不同形态氮素下水稻叶气孔导度的变化

图 5 表明, 硝态氮和氨态氮培养下的叶气孔导度变化差异显著: 硝态氮下的叶气孔导度随着培养时间的进程有较明显的增加, 而氨态氮下的气孔导度则随着时间进程大幅度下降。硝态氮下

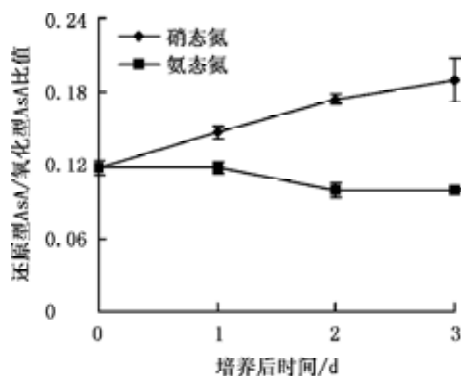


图 4 不同形态氮素下水稻叶中还原型 AsA/ 氧化型 AsA 比值的变化

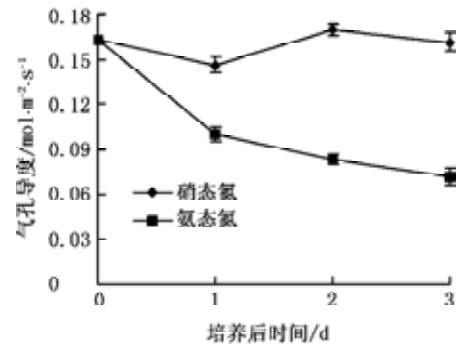


图 5 不同形态氮素下水稻叶气孔导度的变化

的 AsA 氧化还原势和气孔导度均显著高于氨态氮下的, 二者有相似的变化趋势, 并呈明显的平行关系。硝态氮下叶中 AsA 氧化还原势(即还原型 AsA/ 氧化型 AsA 的比值)在培养进程中持续上升, 与此对应的气孔导度也有较明显增加, 这表明硝态氮下叶气孔是持续开放的; 而氨态氮下叶中 AsA 氧化还原势在培养进程中基本上保持不变, 至 2 d 后还略有下降, 此时气孔导度大幅度下降, 这表明氨态氮下叶气孔是大量关闭的。

参考文献

- 刘永华, 朱祝军, 魏国强(2004). 不同光强下氮素形态对番茄谷氨酰胺合成酶和光呼吸的影响. 植物生理学通讯, 40 (6): 680~682
- 王玉琪, 张建军, 朱国辉, 彭新湘(2006). 不同形态氮素培养下水稻叶片中蛋白质差异表达. 植物生理与分子生物学学报, 32 (4): 403~410
- Asada K (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, 85: 235~241
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16: 332~341
- Chen Z, Gallie DR (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*, 16: 1143~1162
- Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR (2003). Increasing vitamin C content of plants through enhance ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 3525~3530
- Foyer CH, Parry M, Noctor G (2003). Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J Exp Bot*, 54: 585~593
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302: 100~103
- Kampfenkel K, Van Montagu M, Inze D (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal Biochem*, 225: 165~167
- Magalhães JR, Huber DM (1989). Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. *Fertil Res*, 21: 1~6
- Schroeder JI, Kwak JM, Allen GJ (2001). Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410: 327~330