根域限制对转色期‘巨玫瑰’葡萄氮水平和氮代谢关键酶基因表达的影响

虞秀明[1,2], 李节法[1], 王博[3], 王磊[1], 王世平[1,*]

[1]上海交通大学农业与生物学院, 上海200240; [2]上海市林业总站, 上海200072; [3]广西大学农学院, 广西南宁530004

摘要: 为探讨根域限制影响葡萄树氮代谢的分子机制, 以二年生‘巨玫瑰‘葡萄为试材, 研究根域限制对其转色期不同组织器官中氮水平和氮代谢关键酶基因(*NR*、*NiR*、*GS1-1*、*GS1-2*、*GS2*、*Fd-GOGAT*和*NADH-GOGAT*)转录水平的影响。结果表明, 根域限制导致转色期葡萄的新梢生长显著受到抑制, 但显著促进果实生长和果实品质的提高。根域限制导致(NO_2^-+NO_3^-)-N、NH_4^+-N和全氮含量在转色期叶片、叶柄和褐根中显著下降, 而在白根中却显著提高。根域限制栽培条件下叶柄、白根和褐根中的可溶性蛋白含量极显著高于对照。根域限制栽培条件下叶片和叶柄中的谷氨酰胺合成酶(GS)活性均显著低于对照, 白根和褐根中的GS活性却高于对照。根域限制下转色期叶片和叶柄(光合组织)中氮代谢关键酶基因的表达水平低于对照, 而根域限制却导致这些基因在白根中表达均上调, 尤其是白根和褐根中的*GS*基因。根域限制栽培条件下转色期NO_3^-还原和NH_4^+同化过程发生在葡萄地下部分(白根)内比例上升, 而在地上部分(叶片和叶柄)内进行的比例显著下降。根域限制导致葡萄叶片和叶柄中氮代谢关键酶基因表达显著下调是根域限制对新梢营养生长产生抑制效应的重要因素。

关键词: 根域限制; 葡萄; 氮代谢; 氮素水平; 基因表达

Effects of Root Restriction on Nitrogen Levels and Expression of Genes Involved in Nitrogen Metabolism in ‘Jumeigui’ Grapevines (*Vitis vinifera*×*V. labrusca*) at Veraison

YU Xiu-Ming[1,2], LI Jie-Fa[1], WANG Bo[3], WANG Lei[1], WANG Shi-Ping[1,*]

[1]School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; [2]Shanghai Forestry Station, Shanghai 200072, China; [3]Agricultural College, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the molecular mechanism of nitrogen metabolism in grapevines (*Vitis vinifera*×*V. labrusca*) in response to root restriction. The two-year-old ‘Jumeigui’ grape cultivars were used to study changes of nitrogen levels and the transcription of nitrogen metabolism enzyme genes in different organs under root restriction at veraison. The results showed that the shoot growth was significantly inhibited, whereas the berry growth and berry quality were enhanced under root restriction at veraison. The root restriction decreased the (NO_2^-+NO_3^-)-N, NH_4^+-N and total N contents in leaves, petioles and brown roots, while a significant increase was observed in root-restricted white roots. Moreover, soluble protein contents in petioles, white and brown roots were markedly enhanced under root restriction. The root restriction significantly reduced the GS activities in leaves and petioles, whereas GS activities were higher in root-restricted white and brown roots than the control. The root restriction also induced down regulation of expression of nitrogen metabolism relevant genes (*NR*, *NiR*, *GS1-1*, *GS1-2*, *GS2*, *Fd-GOGAT*, *NADH-GOGAT*) in leaves and petioles (photosynthetic tissues). However, the transcription levels of all these genes were enhanced in white roots in response to root restriction, especially *GS* gene in root-restricted white and brown roots. In summary, grapevines might enterprise their NO_3^- reduction and NH_4^+assimilation in white roots, in prejudice of the leaves and petioles, in response to root restriction at veraison, leading to less NO_3^- transported from roots and then assimilated in root-restricted leaves. The inhibition of vegetative growth in ‘Jumeigui’ grapevines under root restriction at veraison is closely associated with the down regulation of gene expression in nitrogen metabolism in leaves and petioles.

Key words: root restriction; grapevine (*Vitis vinifera*×*V. labrusca*); nitrogen metabolism; gene expression

---

收稿 2014-12-08 修定 2015-03-23

资助 国家自然科学基金(30871695)

* 通讯作者(E-mail: fruit@sjtu.edu.cn; Tel: 021-34205956)。

根域限制栽培技术是利用物理或生态的方法将果树根系限制在一定的容积内, 通过控制根系生长来调节地上部营养生长和果实生长发育的栽培模式(王世平等2002)。目前已在葡萄(Xie等2009; 卢彩玉等2011; Wang等2012a)、桃(Boland等2000; 石磊等2007)、苹果(Myers 1992)、柑橘(Yoneda等1995)和樱桃(Webster等1997)等多种果树上进行了根域限制栽培试验, 均证实了根域限制虽然抑制树体的营养生长, 但显著提高果实品质。

由于氮素(N)是影响植物生长发育的关键因子之一(Wang等2012b)。因此, 为探讨根域限制栽培条件下植物营养生长受到抑制的机理, 大量研究着眼于根域限制如何影响植物对氮素的吸收、储存、转运和代谢。然而, 目前关于根域限制栽培条件下植物对氮素吸收和同化的机理研究大多集中于植物生理层面。Yang等(2007)研究发现根域限制导致葡萄根系内NO_3^-高亲和转运系统(high-affinity transport system, HATS)对NO_3^-的亲和性显著下降, 根系对NO_3^-的净吸收量显著下降, 从而导致叶片和根系中NO_3^-含量显著低于对照。在番茄等其它植物中也发现根域限制栽培条件下植株体内的氮水平(硝态氮、铵态氮和全氮含量)显著下降(Bar-Tal等1995; Yu等2012)。Ronchi等(2006)通过分析根域限制栽培条件下咖啡植株叶片内的矿质元素含量, 研究发现根域限制对其营养生长和光合作用的抑制效应与叶片内氮素含量的急剧下降有关。另外, 还研究发现根域限制导致葡萄叶片和根系中氮代谢关键酶——硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)、亚硝酸还原酶(nitrite reductase, NiR)和谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)活性也均显著下降(Zhu等2006; Yu等2012)。然而蕴含于这些生理现象下的分子机制仍不清楚。

目前, 植物内氮代谢途径已基本清晰, 主要包括NO_3^-还原和NH_4^+同化, 即NR催化NO_3^-还原为NO_2^-, 之后在NiR的催化作用下生成NH_4^+。随后, GS催化NH_4^+与谷氨酸反应生成谷氨酰胺, 然后再经过谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT)的催化作用而生成谷氨酸(Andrews 1986)。GS/GOGAT途径是植物在正常生理代谢过程中同化NH_4^+的主要途径(Lea和Miflin 1974)。目前, 植物中较为公认的GS/GOGAT途径主要由GS1/NADH-GOGAT和GS2/Fd-GOGAT组成, 前者主要负责非光合组织(如根系)中的NH_4^+同化, 而后者主要负责光合组织(如叶片)中的NH_4^+同化(Suárez等2002)。目前, 一些葡萄氮代谢关键基因已被克隆, 如*NR*、*pGS1;1*、*pGS1;2*、*GS2*和*Fd-GOGAT*等(Loulakakis和Roubelakis-Angelakis 1996, 1997), 而且葡萄全基因组测序也已完成(Jaillon等2007), 这些均为从分子生物学水平研究根域限制对葡萄植株氮代谢的影响提供了条件。

转色期代表果实生长向果实成熟的过渡时期, 期间会发生很多果实发育相关的变化。在果实成熟期间, 有机氮会以释放NH_3的形式, 在各代谢物间转移, 并多次被再同化(Scarpeci等2007)。鉴于转色期是果实生长期间的关键时期, 本文以‘巨玫瑰’葡萄为试材, 借助荧光定量PCR技术, 研究根域限制对转色期葡萄营养器官中氮含量和氮代谢关键酶基因转录水平的影响, 以探明根域限制栽培条件下葡萄树体营养生长、树体内氮水平、氮代谢关键酶(GS)活性与氮素同化相关基因转录表达间的联系。

材料与方法

1 材料与处理

实验于2011年在广西南宁相思葡萄有限公司生产基地“仙境葡萄园”的塑料棚温室(22°52′N, 108°15′E)中进行, 以两年生‘巨玫瑰’葡萄(*Vitis vinifera* L.×*V. labrusca* L.)为试材。试验分两组: 根域限制(root restriction)和对照(control)。根域限制采用垄槽结合的栽培模式, 沟槽深40 cm, 宽110 cm。沟槽内铺设塑料膜, 在垄槽内栽植葡萄树, 基质为土和有机肥按1:1比例混合, 垄堆高出地面10 cm。对照处理将葡萄树栽植于含相同栽培基质的开放土地上, 垄堆高出地面10 cm。对照和根域限制处理均为南北行向, 株行距1.0 m×8.0 m。盛花期时采用25 mg·L^{-1}奇宝(主成分赤霉素GA_3, 美国雅培制药有限公司)进行保果处理, 2周后用25 mg·L^{-1}奇宝进行果实膨大处理。对照和根域限制的肥水管理措施一致。肥水管理参照Wang等(2001)的方法进行, 保证根域有充分的水分供给, 不受到水分胁迫。自盛花期起, 每周灌2次营养液, 每株每次灌1 L, 营养液组分为: 30 mg·L^{-1} NO_3^--N、20 mg·L^{-1}

NH_4^+-N、25 mg·L^{-1} P、50 mg·L^{-1} K、1.25 mg·L^{-1} Mg、0.25 mg·L^{-1} Fe、0.125 mg·L^{-1} Mn、0.125 mg·L^{-1} Zn、0.0625 mg·L^{-1} Cu、0.0625 mg·L^{-1} B、0.025 mg·L^{-1} Mo和100 mg·L^{-1} Ca。通过滴管系统对不同发育阶段的葡萄进行水分管理, 使葡萄的营养生长和生殖生长均衡良好。萌芽后至座果期当土壤水势低至–15.5 kPa时开始灌水; 座果期至转色期, 当土壤水势低至–3.1 kPa时开始灌水; 转色期至成熟期, 当土壤水势低至–15.5 kPa时开始灌水。灌水量以湿润根域土壤为准, 对照和根域限制栽培葡萄树每次的灌水量分别为12和6 L·株$^{-1}$。

2 方法

2.1 新梢生长指标测定

对照和根域限制栽培下的葡萄树各选6株, 每株随机选取3个新梢, 于转色期(花后74 d)测定新梢的长度、粗度和每片叶的纵径。使用EPSON Perfection V700 Photo Scanner (日本)扫描并计算得出单片叶的面积。建立单片叶的面积(Y, cm^2)和叶片纵径(X, cm)间的方程: $Y=0.6933X^2+5.5069X-15.1966$ ($R^2=0.9419$)。

2.2 果实生长指标和品质测定

根域限制和对照各随机选择8穗果, 每穗果选择不同部位(上、中、下部位)的3枚果粒(共24粒果), 于转色期测定果粒横径和单果重, 随后置于–20 ℃冰箱, 用于果实可溶性固形物(total soluble solids, TSS)含量和果皮花色苷含量的测定。

可溶性固形物含量的测定: 将每次采样的24粒果随机分成3份, 分别去除果皮后进行匀浆, 5 000 rpm离心10 min, 用糖度计测定上清液中的TSS含量, 重复3次。

花色苷的提取和测定: 参考李为福等(2012)的方法, 随机将24粒果实样品分成三等分。在每等分葡萄果粒赤道处用直径10 mm的打孔器均匀打取24片果皮称重。花色苷提取步骤如下: 将果皮加入含5 mL甲醇溶液(含1%甲酸)的试管中, 25 ℃避光条件下摇床振荡萃取30 min后, 4 ℃条件下12 500 rpm转速下进行16 min的离心, 用微量移液器吸取试管内的上层清液。将残渣进行4次重复提取, 合并所有上清液, 30 ℃旋转蒸发后, 用甲酸和乙醇的水溶液(甲酸:乙醇:水=1:5:44, V:V:V)复溶, 并定容至5 mL。采用pH示差法进行葡萄果皮中的花色苷含量(以矢车菊素-3-葡萄糖苷当量计算)的测定, 重复测定3次。花色苷含量[mg·g^{-1} (FW)]= $\Delta A\times D\times 449.2/(26\ 900\times m)$。$\Delta A$: 吸光值; D: 稀释倍数; 449.2: 矢车菊素-3-葡萄糖苷的相对分子质量; 26 900: 矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔消光系数; m: 果皮鲜重(g)。

2.3 采样

对照和根域限制栽培下的葡萄树各选12株。每个处理各选4株, 每株随机选取2个新梢进行采样, 以此作为1次重复, 共设置3个重复。于转色期(花后74 d)上午10:00采集第六节位叶片和叶柄, 白根(位于根尖附近的白色吸收根)和褐根(着生于白根附近的已木质化的褐色根系)。样品用超纯水洗净擦干后, 迅速冻于液氮, 随后置于−80 ℃冰箱储存用于后续分析。

2.4 (NO_3^-+NO_2^-)-N和NH_4^+-N含量的测定

参照Yu等(2012)的方法由全自动间断化学分析仪(SMARTCHEM^{TM}200)检测叶片、叶柄、白根和褐根中的(NO_3^-+NO_2^-)-N和NH_4^+-N含量。参考Quaggiotti等(2003)的方法, 分别称取叶片、白根和褐根的冻样, 用10 mL 10 mmol·L^{-1} HCl研磨至匀浆, 5 000 rpm离心5 min, 将上清液进行过滤, 滤液中再加入0.08 g活性炭, 振荡10 min使其充分脱色, 5 000 rpm离心5 min, 过滤后的滤液可用于(NO_3^-+NO_2^-)-N和NH_4^+-N含量测定。

2.5 全氮含量的测定

参考Zhu等(2006)的凯氏定氮法, 利用凯式定氮仪Kjeltec 2300 Analyzer (Unit FOSS Analytical AB, Sweden)分析叶片、叶柄、白根和褐根中的全氮含量。

2.6 谷氨酰胺合成酶活性及可溶性蛋白含量的测定

GS活性测定方法参考王学奎(2004)的方法, 略加修改。分别称取叶片、白根和褐根的冻样于预冷过的研钵中, 加入提取缓冲液(0.05 mol·L^{-1} Tris-HCl、2 mmol·L^{-1} $MgSO_4$、2 mmol·L^{-1}二硫苏糖醇、0.4 mol·L^{-1}蔗糖, pH 8.0), 冰浴研磨至匀浆, 4 ℃下15 000 rpm离心20 min, 取上清液(粗酶液)。1 600 μL反应液(0.1 mol·L^{-1} Tris-HCl、80 mmol·L^{-1} $MgSO_4$、20 mmol·L^{-1}谷氨酸钠、20 mmol·L^{-1}半胱氨酸、2 mmol·L^{-1} EGTA, pH 7.4), 加入700 μL粗酶液与700 μL 40 mmol·L^{-1} ATP溶液后混合均匀, 并

于37 ℃水浴20 min后, 加入1 mL显色剂(0.2 mol·L^{-1}三氯乙酸、0.37 mol·L^{-1} $FeCl_3$和0.6 mol·L^{-1} HCl), 摇匀并放置片刻后, 4 ℃下5 000 rpm离心10 min, 取上清液至玻璃比色皿中于540 nm波长处测吸光度。以加入1 600 μL不含盐酸羟胺的反应液为对照。以生成γ-谷氨酰基异羟肟酸的微摩尔数计算GS活性, 表示为μmol·mg^{-1} (蛋白)·h^{-1}。叶片、叶柄、白根和褐根中可溶性蛋白含量的测定参照Lowry等(1951)的考马斯亮蓝G-250染色法进行。

2.7 总RNA的提取、cDNA的合成和荧光定量PCR

利用天根公司的RNA plant plus reagent试剂盒提取葡萄叶片、叶柄、白根和褐根中的总RNA。以总RNA为模板, 利用Takara PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒反转录合成cDNA。根据GenBank中*NR*、*NiR*、*GS1-1*、*GS1-2*、*GS2*、*Fd-GOGAT*和*NADH-GOGAT*基因的全长序列, 利用Primer 3.0设计目的基因特异引物, 引物序列见表1, 引物由上海英骏公司合成。以cDNA为模板, 并以Reid等(2006)报道的适用于葡萄荧光定量PCR的*Actin*基因为内参, 利用合成的引物, 参考Takara SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒的使用步骤, 进行荧光定量PCR扩增检测目的基因的转录水平。反应程序如下: 95 ℃预热30 s, 95 ℃变性5 s, 60~65 ℃退火30 s, 72 ℃延伸20~30 s, 45个循环。采用Livak和Schmittgen (2001)的$2^{-\Delta\Delta CT}$法对荧光定量PCR扩增数据进行处理, 目的基因相对于内参基因的相对表达量通过计算$2^{-\Delta\Delta Ct}$值来确定。

表1 实时荧光定量PCR的引物序列

Table 1 Primer sequences of real-time quantitative PCR

基因名称	GenBank登录号	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
NR	JF796047	CCGTCATCACTACACCATGC	CTGGGTGTTGAGGGTCTCAT
NiR	XM002285172	GTTTGTGAAGGGGCAGATGT	CTAAGGCCCCCTTTCAGTTC
GS1-1	X94320	GGCTTGTGGGATTGTCTTGT	GAGGTGGCCTAACCAATACG
GS1-2	X94321	TGTTTGCCCTTGTATTTGAGG	CCAGGCCTTCAAATGTTGTT
GS2	XM002279461	ATAGAGGGGGATTGGAATGG	AACCTTTGCCTTGCTTCTCA
Fd-GOGAT	XM002267020	GAGAGGCCTCATTGAAGTCG	AGCAGAACGGCCACTTCTTA
NADH-GOGAT	XM002267829	CAAGCGCATACAGGAACTGA	AAACACCGAATCTCCCACTG
Actin	EC969944	CTTGCATCCCTCAGCACCTT	TCCTGTGGACAATGGATGGA

3 统计分析

每一数据为3个值的平均值, 表示为平均值±标准误。利用SAS软件(SAS Institute, Cary, North Carolina)进行*t*测验。显著性差异水平表示为* (P<0.05)和** (P<0.01)。

实验结果

1 根域限制对‘巨玫瑰’葡萄新梢生长的影响

如表2所示, 根域限制导致转色期葡萄新梢长度、粗度和叶面积均显著下降, 分别比对照下降17.8%、15.5%和38.2%。由此可见, 根域限制显著抑制转色期的新梢生长。

表2 根域限制对转色期‘巨玫瑰’葡萄新梢生长的影响

Table 2 Effect of root restriction on shoot growth of ‘Jumeigui’ grapevines at veraison

处理	新梢长度/cm	新梢粗度/mm	叶面积/cm^2·梢$^{-1}$
对照	114.7±2.4	10.3±0.21	4 768.32±211.98
根域限制	94.3±4.9*	8.7±0.13**	2 948.86±197.51**

*和**表示不同处理间在0.05和0.01水平差异显著。下表同此。

2 根域限制对葡萄果实生长和品质的影响

由表3可知, 根域限制导致转色期葡萄的果粒横径、单粒重、果实可溶性固形物含量和果皮花色苷总含量均显著提高, 分别比对照下降4.8%、19.9%、73.1%和5.8%。由此可见, 根域限制栽培条件下转色期葡萄果实生长量和果实品质均显著高于对照。

3 根域限制对葡萄(NO_3^-+NO_2^-)-N、NH_4^+-N、全氮和可溶性蛋白含量的影响

由表4可知, 根域限制导致转色期叶片、叶柄和褐根中的(NO_3^-+NO_2^-)-N含量均低于对照, 分别比对照下降了5.9%、63.3%和6.5%。然而, 根域限

表3 根域限制对转色期‘巨玫瑰’葡萄果实生长和品质的影响

Table 3 Effect of root restriction on berry growth and quality of ‘Jumeigui’ grapevines at veraison

处理	果粒横径/mm	单粒重/g	花色苷含量/mg·g^{-1} (FW)	可溶性固形物含量/°Brix
对照	21.02±0.2	4.82±0.3	0.078±0.01	11.30±0.4
根域限制	22.02±0.2**	5.78±0.1**	0.135±0.03*	11.95±0.2*

表4 根域限制对转色期‘巨玫瑰’葡萄(NO_2^-+NO_3^-)-N、NH_4^+-N、全氮和可溶性蛋白质含量的影响

Table 4 Effect of root restriction on contents of (NO_2^-+NO_3^-)-N, NH_4^+-N, total N and soluble protein in ‘Jumeigui’ grapevines at veraison

葡萄	(NO_2^-+NO_3^-)-N含量/ μg·g^{-1} (FW)		NH_4^+-N含量/ μg·g^{-1} (FW)		全氮含量/ % (DW)		可溶性蛋白质含量/ mg·g^{-1} (FW)	
	对照	根域限制	对照	根域限制	对照	根域限制	对照	根域限制
叶片	5.1±0.25	4.8±0.42*	58.6±2.07	47.3±3.57*	3.0±0.02	2.9±0.01**	0.62±0.01	0.61±0.02
叶柄	289.8±5.03	106.4±1.35**	29.0±1.82	21.2±0.40*	0.8±0.03	0.7±0.04*	0.51±0.04	0.86±0.06**
白根	515.1±0.20	572.3±15.03*	20.8±0.47	25.1±0.26**	2.7±0.02	3.3±0.01**	1.85±0.02	2.09±0.04**
褐根	203.8±7.77	190.5±13.94	21.1±1.70	9.3±0.06*	1.9±0.02	1.7±0.03**	3.56±0.05	4.46±0.06**

制却导致白根中的(NO_3^-+NO_2^-)-N含量显著高于对照, 比对照提高了11.1%。

根域限制栽培条件下转色期叶片、叶柄和褐根中的NH_4^+-N含量均显著低于对照, 分别比对照下降了19.3%、26.9%和55.9%。然而, 根域限制却导致白根中的NH_4^+-N含量显著高于对照, 比对照提高了20.7%。

与对照相比, 根域限制栽培条件下转色期叶片、叶柄和褐根中的全氮含量均显著降低, 分别比对照下降了3.3%、12.5%和10.5%。然而, 根域限制却导致白根中的全氮含量显著高于对照, 比对照提高了22.2%。

相反地, 根域限制却导致转色期叶柄、白根和褐根中的可溶性蛋白含量均显著高于对照, 分别比对照提高了68.6%、13.0%和25.3%。

4 根域限制对葡萄GS活性的影响

如图1所示, 根域限制栽培条件下转色期葡萄叶片和叶柄中的GS活性均显著低于对照, 分别比对照下降了12.6%和36.5%。然而, 根域限制却导致白根和褐根中的GS活性却高于对照, 尤其是白根中的GS活性比对照提高了11.0%。

5 根域限制对葡萄氮代谢关键酶基因转录水平的影响

如图2所示, *NR*、*NiR*、*GS1-1*、*GS1-2*和*GS2*基因的转录水平在叶片中较高, 比其它器官中的高出6~653倍, 然而在叶柄或褐根中的转录水平较低。*Fd-GOGAT*和*NADH-GOGAT*基因在褐根中具有较高的转录水平。

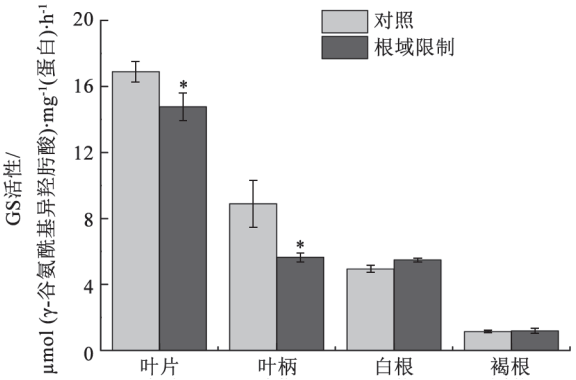

图1 根域限制对转色期‘巨玫瑰’葡萄GS活性的影响

Fig.1 Effect of root restriction on GS activities in ‘Jumeigui’ grapevines at veraison

*表示在0.05水平差异显著。

根域限制导致转色期叶片中*NR*、*GS1-1*、*GS2*和*Fd-GOGAT*基因表达下调, 其中*NR*、*GS1-1*和*Fd-GOGAT*基因的表达水平分别比对照下降了67.9%、31.9%和34.9%。

根域限制栽培条件下转色期叶柄中氮代谢关键酶基因(*NR*、*NiR*、*GS1-1*、*GS1-2*、*GS2*、*Fd-GOGAT*和*NADH-GOGAT*)的表达水平均大幅下降, 其转录水平分别比对照下降了92.6%、70.5%、51.4%、90.7%、89.5%、77.2%和43.9%。

相反地, 根域限制却导致转色期白根中氮代

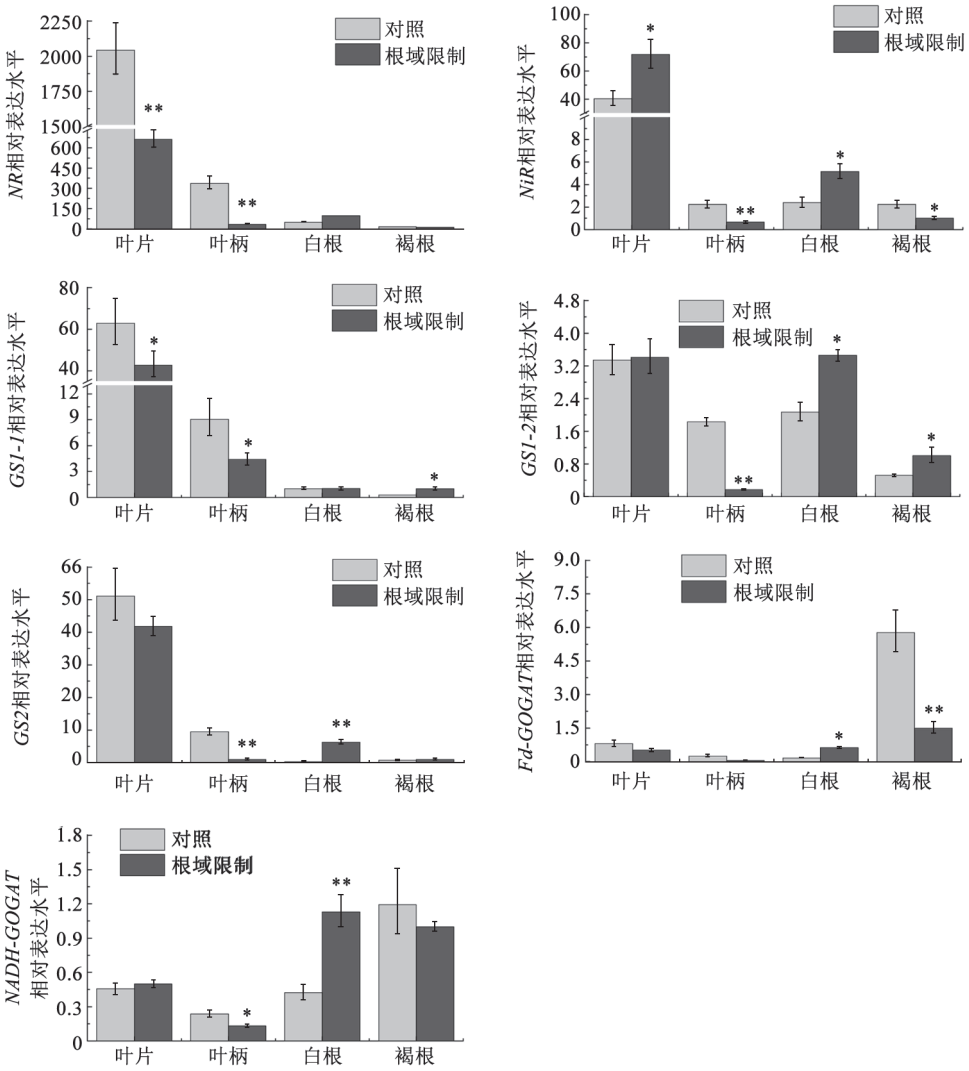

图2 根域限制对转色期‘巨玫瑰’葡萄氮代谢关键酶基因表达的影响

Fig.2 Effect of root restriction on expression of genes involved in nitrogen metabolism in ‘Jumeigui’ grapevines at veraison

*和**表示在0.05和0.01水平差异显著。

谢关键酶基因表达上调, 尤其是*NR*、*NiR*、*GS1-2*、*GS2*、*Fd-GOGAT*和*NADH-GOGAT*基因的表达水平分别比对照提高了1.20倍、1.16倍、67.0%、16.38倍、2.78倍和1.68倍。

另外, 根域限制也促使转色期褐根中*GS*基因家族成员均表达上调, *GS1-1*和*GS1-2*基因的表达水平比对照提高了2.43倍和92.5%。然而, 与对照相比, 其余4个基因却表达下调, 特别是*NR*、*NiR*和*Fd-GOGAT*基因的表达水平比对照下降了82.7%、55.2%和73.9%。

讨　论

根域限制作为一种有效调控葡萄树体生长和改善果实品质的栽培技术在葡萄栽培中得到了广泛应用。大量研究均表明根域限制会抑制葡萄树体地上部的营养生长, 却显著促进果实生长和改善葡萄的着色和糖分积累(王世平1998; Xie等2009; Zhu等2006; Wang等2012a; Yu等2012)。本文结果与前人的研究结论一致, 根域限制栽培条件下转色期‘巨玫瑰’葡萄的新梢和叶片生长均受到显著抑制(表2), 但果粒横径、果粒重、果皮花色苷含量和果实可溶性固形物含量均显著高于对照(表3)。

本文的研究结果表明, 尽管根域限制导致(NO_3^-+NO_2^-)-N、NH_4^+-N和全氮含量在白根中显著

提高了, 然而在叶片、叶柄和褐根中却仍低于对照条件下的氮素水平(表4)。鉴于白根是植物从外界吸收矿质元素的主要营养器官, 如氮素(潘瑞炽2004), 因此间接证明根域限制栽培条件下氮素从白根到叶片、叶柄和褐根等营养器官的转运能力显著下降, 这与王世平(1998)利用^{15}N示踪法研究根域限制栽培条件下'巨峰'葡萄氮素的吸收和转运规律的实验结论一致。由于硝态氮作为植物从外界吸收的主要无机态氮类型, 不仅是植物体内NO_3^-还原过程中的底物, 而且还参与对初级氮代谢关键基因表达的调控(Stitt 1999)。Baki等(2000)的研究认为, 玉米叶片中的硝态氮含量可能是调控*NR*转录水平的决定性因素。由此可见, 根域限制栽培条件下叶片和叶柄中氮代谢关键基因表达的下调可能与叶片中(NO_3^-+NO_2^-)-N含量显著低于对照有关(表4)。

植物体内可溶性蛋白含量会随胁迫类型和程度的不同而作出不同的响应(Yan等2005; 徐彩霞等2009; 陆晓民等2012)。Yan等(2005)通过对盐胁迫下水稻根系的蛋白质组学分析, 发现并鉴定得到10类对盐胁迫作出不同响应的蛋白质, 其中4种之前已被发现, 其它6种是新的蛋白质, 分别参与了植物碳、氮和能量代谢和活性氧清除等途径。陆晓民等(2012)研究发现, 黄瓜在低氧胁迫下, 其根系最先遭受低氧伤害, 为适应低氧逆境, 根系内一些厌氧蛋白的表达被诱导, 甚至产生新的蛋白。鉴于根域限制也是胁迫的一种(Shi等2008), 本实验中发现, 根域限制下转色期叶柄、白根和褐根中的可溶性蛋白含量均极显著高于对照(表4), 因此认为这可能与某些蛋白质的合成量增加和/或新的蛋白质的合成有关。但具体哪些蛋白的含量和表达发生了变化还需借助蛋白质组学等手段进一步分析。

目前, 有研究表明, 一些非生物胁迫会诱导植物体内参与氮代谢途径的关键酶呈现器官特异性响应特征。盐胁迫条件下, 番茄植株叶片的NR和GS活性显著下降; 然而, 盐胁迫却促进了根系NR和GS活性的提高(Debouba等2006)。Teixeira和Fidalgo (2009)研究表明, 土豆植株受到盐胁迫时, 叶片中NH_4^+同化受到抑制, 这主要归因于GS2在转录和蛋白质水平上的下调。然而, 盐胁迫却促进了根系中的NH_4^+同化, 这主要与*GS1*基因表达的上调有关。Teixeira和Pereira (2007)的研究发现, 干旱胁迫下土豆叶片中的GS活性的下降与叶片中*Stgsib*基因转录水平下降有关; 根系中的GS活性的下降与根系中*Stgsia*基因转录水平及GS1蛋白水平下降有关; 而块茎中GS活性的显著提高则主要归因于块茎中*Stgsia*基因转录水平和GS1蛋白水平的提高。相似地, 本文的研究也发现根域限制导致葡萄树体中氮代谢关键酶基因具有器官特异性表达特征。根域限制导致转色期'巨玫瑰'葡萄叶片和叶柄中氮代谢关键酶基因的表达水平显著下降; 相反地, 根域限制却导致白根中这些基因的表达上调, 而且根域限制栽培条件下褐根中*GS*基因(*GS1-1*、*GS1-2*和*GS2*)的表达水平也提高(图2)。相应地, 根域限制也导致叶片和叶柄中GS活性显著下降, 而白根和褐根中GS活性却高于对照(图1), 这与Yu等(2012)关于根域限制对'巨峰'葡萄GS活性影响的研究结论一致。推测认为, 根域限制栽培条件下转色期这些基因的器官特异性表达可能与'巨玫瑰'葡萄树体内NO_3^-还原和NH_4^+同化的主要场所发生改变有关, 即根域限制导致NO_3^-还原和NH_4^+同化过程发生在葡萄地下部分—白根内比例的上升, 然而, 这些代谢活动在地上部分—叶片和叶柄内进行的比例显著下降, 从而导致根域限制栽培条件下从白根转运至叶片和叶柄中进行同化作用的NO_3^-含量减少(表 4), 这可能与根域限制导致调控叶片和叶柄中参与地上部NO_3^-转运和叶片中NO_3^-动态平衡过程的*NRT1.1*和*NRT1.4*基因表达显著下调(尚未发表)有关。

综上所述, 根域限制对转色期'巨玫瑰'葡萄新梢营养生长的显著抑制效应(表2)与葡萄植株氮代谢效率下降有关, 而这又与根域限制栽培条件下光合组织(叶片和叶柄)中氮代谢关键酶基因(*NR*、*NiR*、*GS1-1*、*GS1-2*、*GS2*、*Fd-GOGAT*和*NADH-GOGAT*)表达的显著下调密切相关。

参考文献

李为福, 何建军, 谢兆森, 王成华, 刘爱玲, 张才喜, 王世平(2012). 外源脱落酸对巨玫瑰葡萄着色及浆果品质的影响. 中国南方果树, 41 (1): 22~26

卢彩玉, 郑小艳, 贾惠娟, 卢如国, 滕元文(2011). 根域限制对'巨玫瑰'葡萄果实可溶性糖含量及相关代谢酶活性的影响. 园艺学

报, 38 (5): 825~832

陆晓民, 孙锦, 郭世荣, 何立中(2012). 外源24-表油菜素内酯对低氧胁迫下黄瓜幼苗生长和可溶性蛋白表达的影响. 南京农业大学学报, 34 (6): 31~35

潘瑞炽(2004). 植物的矿质营养. 见: 潘瑞炽主编. 植物生理学. 第5版. 北京: 高等教育出版社, 39~45

石磊, 孙澜, 谢强, 王世平(2007). 根域限制对桃幼树生长和果实品质的影响. 中国南方果树, 36(5): 57~58

王世平, 张才喜, 罗菊花, 邵浩, 郭庆海, 朱丽娜(2002). 果树根域限制栽培研究进展. 果树学报, 19 (5): 298~301

王学奎(2004). 植物体内谷氨酰胺合成酶活力的测定. 见: 邹琦主编. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 125~126

徐彩霞, 赵忠, 陈明涛(2009). 水分胁迫对5个树种苗木根系部分生理指标的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 37 (8): 109~114

王世平(1998). 根域制限がブドウ樹の体内栄養、ホルモン条件に及ぼす影響と中国•寧夏での“巨峰”栽培への応用[博士论文]. 岡山: 岡山大学

Andrews M (1986). The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. Plant Cell Environ, 9: 511~519

Baki GK, Siefritz F, Man H-M, Weiner H, Kaldenhoff R, Kaiser WM (2000). Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. Plant Cell Environ, 23: 515~521

Bar-Tal A, Feigin A, Sheinfeld S, Rosenberg R, Sternbaum B, Rylski I, Pressman E (1995). Root restriction and N-NO_3, solution concentration effects on nutrient uptake, transpiration and dry matter production of tomato. Sci Hortic, 63: 195~208

Boland AM, Jerie PH, Michell PD, Goodwini, Connor DJ (2000). Long-term effects of restricted root volume and regulated deficit irrigation on peach. Growth and mineral nutrition. J Am Soc Hortic Sci, 125: 135~142

Debouba M, Gouia H, Suzuki A, Ghorbel MH (2006). NaCl stress effects on enzymes involved in nitrogen assimilation pathway in tomato “*Lycopersicon esculentum*” seedlings. J plant physiol, 163: 1247~1258

Jaillon O, Aury J, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature, 449: 463~467

Lea PJ, Miflin BJ (1974). Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature, 251: 614~616

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T))method. Methods, 25: 402~408

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (1996). Characterization of *Vitis vinifera* L. glutamine synthetase and molecular cloning of cDNAs for the cytosolic enzyme. Plant Mol Biol, 31: 983~992

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (1997). Molecular cloning and characterization of cDNAs coding for ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Vitis vinifera*. Physiol Plant, 101: 220~228

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265~275

Myers SC (1992). Root restriction of apple and peach with in-ground fabric containers. Acta Hortic, 322: 215~219

Quaggiotti S, Ruperti B, Borsa P, Destro T, Malagoli M (2003). Expression of a putative high-affinity NO_3^- transporter and of an H^+-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. J Exp Bot, 54: 1023~1031

Reid K E, Olsson N, Schlosser J, Peng F, Lund ST (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. BMC Plant Biol, 6: 27

Ronchi CP, Damatta FM, Batista KD, Moraes GABK, Loureiro ME, Ducatti C (2006). Growth and photosynthetic down-regulation in *Coffea arabica* in response to restricted root volume. Funct Plant Biol, 33: 1013~1023

Scarpeci TE, Marro ML, Bortolotti S, Boggio SB, Valle EM (2007). Plant nutritional status modulates glutamine synthetase levels in ripe tomatoes (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). J Plant Physiol, 164: 137~145

Shi K, Fu L, Dong D, Zhou Y, Yu J (2008). Decreased energy synthesis is partially compensated by a switch to sucrose synthase pathway of sucrose degradation in restricted root of tomato plants. Plant Physiol Bioch, 46: 1040~1044

Stitt M (1999). Nitrate regulation of metabolism and growth. Curr Opin Plant Biol, 2 (3): 178~186

Suárez MF, Avila C, Gallardo F, Cantón FR, García-Gutiérrez A, Claros MG, Cánovas FM (2002). Molecular and enzymatic analysis of ammonium assimilation in woody plants. J Exp Bot, 53: 891~904

Teixeira J, Fidalgo F (2009). Salt stress affects glutamine synthetase activity and mRNA accumulation on potato plants in an organ-dependent manner. Plant Physiol Bioch, 47: 807~813

Teixeira J, Pereira S (2007). High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. Environ Exp Bot, 60: 121~126

Wang B, He J, Duan C, Yu X, Zhu L, Xie Z, Zhang C, Xu W, Wang S (2012a). Root restriction affects anthocyanin accumulation and composition in berry skin of ‘Kyoho’ grape (*Vitis vinifer*a L.×*Vitis labrusca* L.) during ripening. Sci Hortic, 137: 20~28

Wang SP, Okamoto G, Hirano K, Lu J, Zhang C (2001). Effects of restricted rooting volume on vine growth and berry development of Kyoho grapevines. Am J Enol Viticult, 52: 248~253

Wang YY, Hsu PK, Tsay YF (2012b). Uptake, allocation and signaling of nitrate. Trends Plant Sci, 17: 458~467

Webster AD, Atkinson JC, Vaughan JS (1997). Controlling the shoot growth and cropping of sweet cherry trees using root pruning or root restriction techniques. Acta Hortic, 451: 643~649

Xie Z, Li B, Forney CF, Xu W, Wang S (2009). Changes in sugar content and relative enzyme activity in grape berry in response to root restriction. Sci Hortic, 123: 39~45

Yan S, Tang Z, Su W, Sun W (2005). Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. Proteomics, 5: 235~244

Yang T, Zhu L, Wang S, Gu W, Huang D, Xu W, Jiang A, Li S (2007). Nitrate uptake kinetics of grapevine under root restriction. Sci Hortic, 111: 358~364

Yoneda T, Oniwa G, Kuwahara M (1995). Effects of rooting-zone restriction on quality of fruit, yield, flower bud differentiation and water stress in Satsuma Mandarin. J Jpn Soc Hortic Sci, 63: 745~752

Yu X, Wang B, Zhang C, Xu W, He J, Zhu L, Wang S (2012). Effect of root restriction on nitrogen levels and glutamine synthetase activity in 'Kyoho' grapevines. Sci Hortic, 137: 156~163

Zhu L, Wang S, Yang T, Zhang C, Xu W (2006). Vine growth and nitrogen metabolism of ‘Fujiminori’ grapevines in response to root restriction. Sci Hortic, 107: 143~149