

大麦小孢子突变体与原始品种中碳氮代谢关键酶活性差异分析

徐红卫*, 王亦菲*, 刘成洪, 黄赛华, 方春燕, 何婷, 郭桂梅, 高润红, 陆瑞菊**, 黄剑华**

上海市农业科学院生物技术研究所, 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海201106

摘要: 为了探索大麦耐低氮的生理机制, 以诱变小孢子+氮胁迫培养获得的与原始品种氮素利用率差异显著的突变体('A1-97'和'A1-57')和原始对照品种'花30'为材料, 在盆钵栽培中进行了高低两种氮素水平处理, 分析了植株在苗期、灌浆期和成熟期的碳氮代谢关键酶活性。结果显示, 相比原始对照品种'花30', 2份突变体材料的碳氮代谢酶活性在灌浆期有更显著的差异, 表明灌浆期可能是研究耐低氮的关键时期; 低氮水平下, 灌浆期氮素利用率高的突变体'A1-97'硝酸还原酶活性和谷氨酰胺合成酶活性皆显著增强, 氮素利用率低的突变体'A1-57'硝酸还原酶活性显著降低, 谷氨酰胺合成酶活性差异不显著; 灌浆期和成熟期的突变体'A1-57'蔗糖磷酸化酶活性显著降低。由此推测, 突变体与原始品种间耐低氮性的差异可能与硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶和蔗糖磷酸化酶活性存在一定的联系。

关键词: 大麦; 氮素利用率差异突变体; 硝酸还原酶; 谷氨酰胺合成酶; 蔗糖磷酸化酶

氮素是植物体内必需且需求量最大的三大营养元素之一, 是维持生物体生命活动所必需物质的组成部分(Ma等1996)。施用氮肥可以提高作物产量, 但氮肥的大量使用不仅增加农业成本, 也造成了严重的环境污染(Sayer和Cassman 2013; 朱兆良和金继运2013)。选育耐低氮品种是从源头解决该问题的有效举措(裴雪霞等2007; 徐红卫等2013)。

利用小孢子-诱变氮胁迫培养技术可以快速获得耐低氮性提高的突变体材料(陆瑞菊等2014), 该技术在作物遗传改良上具有很大的优越性。在单套基因水平上获得的有益改良, 通过染色体加倍, 可以一次性完全纯合, 后代遗传稳定性高, 是直接用于育种和相关性状变异机理研究的理想材料(陆瑞菊等2014; 黄剑华2007)。

迄今为止, 国内外研究已证实碳氮代谢关键酶与氮素吸收利用积累, 以及产量品质密切相关(Xu等2016; Obara等2004)。硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)作为氮代谢的限速酶, 是氮同化过程中的第一个关键酶(叶全宝等2005)。谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶(glutamine synthetase/glutamate synthase, GS/GOGAT)是植物体内氮同化的主要途径(陈胜勇等2010)。蔗糖磷酸化酶(sucrose phosphorylase, SP)相比其他碳固定酶更能反映籽粒对同化物的需求程度(张玉平等2007)。ADPG焦磷酸化酶(ADPG-PPase)对控制淀粉的合成和积累作用最大(梁建生等1994)。

本实验室前期经过连续两年田间和温室表型(产量性状)筛选鉴定, 从源于大麦原始品种'花30'经小孢子-氮胁迫培养的200份加倍单倍体(double

haploid, DH)株系('拟近等基因系')中, 分别获得比原始品种'花30'氮素利用率更高和更低的2份突变体材料'A1-97'和'A1-57'。本研究以2份突变体和亲本为供试材料, 在2种不同供氮水平下对供试材料进行盆钵种植, 检测了供试材料在3个生长时期的碳氮代谢关键酶活性, 旨在寻找氮素利用率发生改变的生理生化基础, 为大麦耐低氮(氮高效)机理解析提供有价值的线索。

材料与方法

1 试验材料

供试材料为大麦(*Hordeum vulgare* L.)原始品种'花30', 以及从近两年的200份源于诱变-小孢子氮胁迫培养的大麦'花30' DH株系筛选获得的耐低氮性材料'A1-97'和氮敏感材料'A1-57', 分别由上海市农业科学院植物细胞工程研究室提供。

2 试验方法

2.1 盆钵种植

试验于2015年11月~2016年4月在上海市农业科学院华漕院区南门温室中完成。种子用1% NaClO消毒30 min后, 清水洗净, 浸泡6~8 h, 25°C催芽过夜, 然后选取露白一致的种子, 置于人工气候室发芽, 待幼苗期(心叶未展开)转移至4°C转冰箱处理7 d, 室内恢复半天后, 移栽进行盆钵试验(徐

收稿 2016-11-06 修定 2016-11-28

资助 上海市种业发展项目[沪农科种字(2015)第3号、沪农科种字(2016)第1-1号]和国家大麦青稞产业体系(CARS-05)。

* 共同第一作者。

** 共同通讯作者(E-mail: luruiju62@163.com; sw1@saas.sh.cn)。

红卫等2015)。每10 L塑料桶装土12.5 kg, 参考黄亿等(2014)方法, 按照拌土:草木灰:泥土=1:1:1等体积混复合肥N:P₂O₅:K₂O=25:13:7进行施基肥, 分为正常供氮(13 g)和低氮水平(6.5 g)。大麦生长期未加追肥, 病虫害防治同大田管理一致, 并确保正常水分供应。分别于苗期(两叶一心)、灌浆期(开花前期)和成熟期(籽粒成熟前期)上午10:00, 取不同供氮水平的倒二叶片, 置于液氮中速冻, 存于-80°C冰箱待用。

2.2 酶活性测定

2.2.1 NR、GS和GOGAT活性测定

称取约0.1 g倒二叶片, 分别加入1 mL硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酸合成酶(GOGAT)提取液, 冰浴研磨, 7 104×g, 4°C离心10 min, 上清即为粗酶提取液。按照分光光度法活性测定试剂盒(索莱宝, 北京)要求依次加入所需试剂, 分别于540 nm下测定NR的活性: $NR (U \cdot g \text{ mass}^{-1}) = 0.2 \times (\text{测定管OD值} - \text{对照管OD值}) / (\text{标准管OD值} - \text{空白管OD值}) / \text{样本鲜重}(g \cdot mL^{-1})$; 于540 nm下测定GS的活性, 其计算公式为 $GS (U \cdot g \text{ mass}^{-1}) = 19 \times \Delta A / \text{样本鲜重}(g \cdot mL^{-1})$; 于340 nm波长下测定GOGAT酶活性, 其计算公式为 $GOGAT (U \cdot g \text{ mass}^{-1}) = 354 \times \Delta A / \text{样本鲜重}(g \cdot mL^{-1})$ (徐红卫等2015)。

2.2.2 SP和ADPG-PPase活性测定

称取约0.1 g倒二叶片, 分别加入1 mL蔗糖磷酸化酶(SP)和ADPG焦磷酸化酶(ADPG-PPase)提取液, 进行冰浴匀浆, 8 880×g, 4°C离心10 min, 上清即为酶的提取液。按照试剂盒(索莱宝, 北京)依次加入所需试剂, 分别于340 nm波长下测定SP活性, 其计算公式为 $SP \text{活性}(U \cdot g \text{ mass}^{-1}) = 0.804 \times \Delta A / \text{样本鲜重}$; ADPG-PPase活性计算公式为 $ADPG-PPase \text{活性}(U \cdot g \text{ mass}^{-1}) = 2 813 \times \Delta A / \text{样本鲜重}$ 。

2.2.3 统计分析

采用Excel 2007和SPSS 21.0对3次重复试验得到的数据进行统计分析, 利用最小显著极差法进行 $P < 0.05$ 显著水平分析。

实验结果

1 NR、GS和GOGAT活性差异分析

相比原始品种‘花30’, ‘A1-97’在灌浆期NR活性无显著性差异, 而‘A1-57’在灌浆期NR活性显著减少(表1)。相比正常供氮, 在低氮水平下, 灌浆期的原始品种‘花30’的NR活性显著性减少37.5%, 氮素利用率高的‘A1-97’NR活性显著性增加了33.23%, 氮素利用率低的‘A1-57’的NR活性显著性减少了30.7%; 其他时期的NR活性无显著性差异。

相比原始品种‘花30’, ‘A1-97’在灌浆期GS活性显著增高, ‘A1-57’在成熟期GS活性显著降低(表2)。相比正常供氮, 在低氮条件下, ‘花30’灌浆期GS活性无显著性差异, 成熟期GS活性显著性增高50.2%; ‘A1-97’在灌浆期GS活性显著性增高40.27%; ‘A1-57’GS的活性各时期均无显著性差异。

相比原始品种‘花30’, ‘A1-97’在灌浆期GOGAT活性显著增加, 而‘A1-57’在灌浆期GOGAT活性显著降低(表3)。相比正常供氮, 在低氮水平下, 原始品种‘花30’、‘A1-97’和‘A1-57’的GOGAT活性在灌浆期皆显著减少, 幅度分别是36.69%、25.0%和31.0%。

2 SP和ADPG-PPase的活性差异分析

相比原始品种‘花30’, ‘A1-97’在灌浆期和成熟期SP活性皆显著增加, 而‘A1-57’在灌浆期和成熟期SP的活性皆显著减少(表4)。低氮条件下, 相比正常供氮, 原始品种‘花30’SP活性在灌浆期减少了

表1 两种氮素水平下3个生长时期的大麦NR活性差异

Table 1 Difference of NR activities in barley at three growing stages under two nitrogen levels

供试材料	NR活性/ $U \cdot g \text{ mass}^{-1}$					
	苗期		灌浆期		成熟期	
	正常供氮	低氮水平	正常供氮	低氮水平	正常供氮	低氮水平
‘花30’	7.86±1.58	7.05±1.28	16.24±3.25	10.16±3.03 ^a	4.61±0.83	5.05±0.91
‘A1-97’	7.44±1.90	7.16±1.46	14.06±1.81	18.73±2.75 ^a	4.84±0.97	4.67±0.94
‘A1-57’	7.94±1.70	7.34±1.17	12.16±2.43 ^A	8.43±1.69 ^{Aa}	4.76±0.96	4.72±0.85

A表示在同一时期同一氮水平, 突变体材料与‘花30’之间有显著性差异($P < 0.05$); a表示在同一时期, 同一材料在低氮水平与正常供氮之间有显著性差异。下表同此。

表2 两种氮素水平下3个生长时期的大麦GS活性差异

Table 2 Difference of GS activities for barelies at three growing stages under two nitrogen levels

供试材料	GS活性/U·g mass ⁻¹					
	苗期		灌浆期		成熟期	
	正常供氮	低氮水平	正常供氮	低氮水平	正常供氮	低氮水平
‘花30’	41.19±8.00	42.96±8.30	26.71±3.67	26.82±3.68	94.00±16.04	141.19±23.59 ^a
‘A1-97’	42.74±8.27	49.03±8.33	71.29±8.13 ^A	100.00±10.00 ^{Aa}	120.00±19.20	141.67±22.67
‘A1-57’	41.52±7.04	38.45±7.54	20.25±3.03	23.11±3.61	40.69±7.51 ^A	38.66±7.19 ^A

表3 两种氮素水平下3个生长时期的大麦GOGAT活性差异

Table 3 Difference of GOGAT activities for barely at three growing stages under two nitrogen levels

供试材料	GOGAT活性/U·g mass ⁻¹					
	苗期		灌浆期		成熟期	
	正常供氮	低氮水平	正常供氮	低氮水平	正常供氮	低氮水平
‘花30’	48.83±9.30	47.32±9.04	152.45±37.24	115.76±13.58 ^a	34.48±9.90	37.45±9.49
‘A1-97’	56.75±10.65	53.55±8.40	194.46±19.45 ^A	146.04±15.60 ^{Aa}	41.16±9.23	39.71±9.94
‘A1-57’	46.36±8.88	44.54±8.57	113.81±15.38 ^A	78.51±20.85 ^{Aa}	34.48±8.90	34.62±8.92

表4 两种氮素水平下3个生长时期的大麦SP活性差异

Table 4 Difference of SP activities for barely at three growing stages under two nitrogen levels

供试材料	SP活性/U·g mass ⁻¹					
	苗期		灌浆期		成熟期	
	正常供氮	低氮水平	正常供氮	低氮水平	正常供氮	低氮水平
‘花30’	2.54±0.51	3.27±0.55	69.71±12.55	45.00±7.10 ^a	28.10±4.22	38.10±5.71 ^a
‘A1-97’	3.35±0.47	1.79±0.46 ^a	87.11±12.96 ^A	60.12±11.70 ^{Aa}	59.08±7.86 ^A	52.60±6.89 ^A
‘A1-57’	2.89±0.68	2.75±0.45	17.83±2.21 ^A	16.71±2.01 ^A	16.92±5.04 ^A	21.02±3.65 ^A

35.45%，成熟期增加了35.59%；‘A1-97’在灌浆期的SP活性相比正常供氮减少了30.98%，‘A1-57’ SP活性各时期均无显著性差异。

相比原始品种‘花30’，‘A1-97’和‘A1-57’在灌浆期ADPG-PPase活性都显著减少(表5)。低氮条件下，相比正常供氮，原始品种‘花30’、‘A1-97’和

‘A1-57’在灌浆期ADPG-PPase活性分别显著增加32.89%、36.24%和53.13%。

讨 论

作物灌浆期是联系营养生长与生殖生长的关键枢纽时期，也是平衡产量与品质关系的重要支点

表5 两种氮素水平下3个生长时期的大麦ADPG-PPase活性差异

Table 5 Difference of ADPG-PPase activities for barely at three growing stages under two nitrogen levels

供试材料	ADPG-PPase活性/U·g mass ⁻¹					
	苗期		灌浆期		成熟期	
	正常供氮	低氮水平	正常供氮	低氮水平	正常供氮	低氮水平
‘花30’	2.89±0.82	2.82±0.80	6.02±1.26	8.00±1.16 ^a	3.83±0.74	3.82±0.74
‘A1-97’	2.52±0.73	2.79±0.80	3.67±0.90 ^A	5.00±1.05 ^{Aa}	3.15±0.59	3.56±0.68
‘A1-57’	2.92±0.83	2.03±0.61 ^a	3.03±0.72 ^A	4.64±0.85 ^{Aa}	2.28±0.50 ^A	2.75±0.50 ^A

(林伟伟2015)。籽粒灌浆所需的碳水化合物,主要来源与碳代谢酶密切相关的叶片中光合同化产物和抽穗开花前氮代谢酶相关的临时储存于茎鞘中的非结构性碳水化合物(non-structural carbohydrate, NSC) (Samonte等2001)。本文的研究结果表明,灌浆期相比苗期和成熟期,不同氮素利用率差异的突变体碳氮代谢酶活性更具有显著性差异。这可能是由于灌浆期正是氮素代谢旺盛的时期,不同氮素利用率的突变体材料库/源比可能存在差异,导致籽粒完成灌浆的速率和时间都会不同,并且对碳氮的吸收同化利用效率也不同。Yang等(2004)的研究表明,在灌浆期实现最大化提高物质运转效率为应对生物逆境,增加产量具有重要意义。

当作物遇到氮素胁迫时,与吸收积累相关的硝酸还原酶和同化分配相关的谷氨酰胺合成酶都起了关键作用。本文的研究结果表明,在灌浆期,低氮水平下,相比‘花30’和氮素利用率低的突变体材料,氮素利用率高的突变体硝酸还原酶活性和谷氨酰胺合成酶活性显著升高。曹云等(2006)的研究表明,氮代谢关键酶之间具有协同性,硝酸还原酶活性的增加可能诱导其他相关氮代谢酶活性增加。小孢子是一类高度分化型细胞,陆瑞菊等(2011)已证实了植株水平和小孢子水平耐低氮性状的一致性,所以在小孢子阶段经过诱变+氮胁迫培养后,不仅可能提高变异效率,获得优良耐低氮性状的突变体材料,而且可能使优良的耐低氮性状快速加倍稳定,来应对低氮胁迫。Xu等(2016)研究发现,编码硝酸还原酶的*HvNRI*基因和编码谷氨酰胺合成酶的*HvGS1*和*HvGS2*基因可能与耐低氮性状相关,为进一步对耐低氮突变体材料中硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶的分子调控机理研究提供了相关线索。

蔗糖是光合作用形成的第一个碳水化合物,是碳运输的主要形式,也是库代谢的基质。Farrar等(2000)的研究发现蔗糖磷酸化酶催化调节的蔗糖合成途径是叶片蔗糖合成主要途径。本文研究结果表明,在灌浆期,相比氮敏感突变体,‘花30’和氮素利用率高的突变体蔗糖磷酸化酶活性明显较高,原因可能是碳氮代谢相互依存,相互联系,引起蔗糖磷酸化酶的活性增强来加速蔗糖的转化,从而为氮代谢提供碳骨架和能量(张国英2012)。

氮素利用率高的突变体和‘花30’在生育后期酶活性较前期更旺,更有利于促进叶片中蔗糖向籽粒转运,进而促进籽粒中其他代谢物质的合成,增强其抗逆性。

在长期的诱变抗性育种实践中,获得的突变体材料常出现嵌合现象,隐性基因在当代不能表达。而利用小孢子辐射诱变结合氮胁迫培养的方法,不仅克服了以上缺陷,而且加速了纯合过程,可以快速得到稳定的耐低氮突变材料(陆瑞菊等2013; Germana 2011)。这些材料(‘拟近等基因系’),与原始亲本相比,遗传背景相似而有耐低氮性差异,为耐低氮生理生化和遗传调控研究提供了不可多得的试验材料。本研究的结果表明,突变体与原始品种的耐低氮性差异可能与硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶和蔗糖磷酸化酶活性存在一定的联系。这种差异是否可能受主效基因作用,作者将会从分子水平上对变异机制开展进一步的研究,发掘可能控制耐低氮性状的主效基因。

参考文献

- Cao Y, Fan XR, Sun SB, Xu GH, Shen QR, Di TJ (2007). Effect of partial replacement of NH_4^+ by NO_3^- on nitrate reductase activity and their genetic expression patterns in rice. *Plant Nutr Fert Sci*, 13 (1): 99–105 (in Chinese with English abstract) [曹云, 范晓荣, 孙淑斌, 徐国华, 沈其荣, 狄廷君(2007). 增硝营养对不同基因型水稻苗期硝酸还原酶活性及其表达量的影响. *植物营养与肥料学报*, 13 (1): 99–105]
- Chen SY, Li GK, Wang Y, He AR, Chen A, Yu XL (2010). The research progress of glutamine synthetase. *Chin Agric Bull*, 26 (22): 45–49 (in Chinese with English abstract) [陈胜勇, 李观康, 汪云, 何霏如, 陈傲, 余小丽(2010). 谷氨酰胺合成酶的研究进展. *中国农学通报*, 26 (22): 45–49]
- Farrar J, Pollock C, Gallagher J (2000). Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Sci*, 154: 1–11
- Germana MA (2011). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep*, 30 (5): 839–857
- Huang JH (2007). The application of microspore and anther culture techniques in crop genetic orientation improvement. *Crop Res*, (3): 167–169 (in Chinese) [黄剑华(2007). 小孢子和花药培养技术在作物定向遗传改良上的应用. *作物研究*, (3): 167–169]
- Huang Y, Li TX, Zhang XZ, Ji L (2014). Characteristics of dry matter production and nitrogen accumulation in barley genotypes with high nitrogen utilization efficiency. *Chin Appl Ecol*, 25 (7): 1971–1978 (in Chinese with English abstract) [黄亿, 李廷轩, 张锡洲, 戢林(2014). 氮高效利用基因型大麦的物质生产与氮素积累特性. *应用生态学报*, 25 (7): 1971–1978]
- Liang JS, Cao XZ, Xu S, Zhu QS, Song P (1994). Research on the re-

- relationship between rice grain bank and the starch accumulation. *Acta Agric Sin*, (06): 685–691 (in Chinese) [梁建生, 曹显祖, 徐生, 朱庆森, 宋平(1994). 水稻籽粒库强与其淀粉积累之间关系的研究. *作物学报*, (06): 685–691]
- Lin WW (2015). Analysis of carbohydrate metabolism and key genes expression in the leaf sheath of early senescence leaves (*esl*) rice mutant during grain filling stage [PhD Thesis]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese with English abstract) [林伟伟(2015). 早衰突变体水稻叶鞘在灌浆期的糖代谢及关键基因表达分析[博士学位论文]. 福州: 福建农林大学]
- Lu RJ, Chen ZW, He T, Wang YF, Du ZZ, Gao RH, Zou L, Huang JH, Chen PD (2011). Relationship on low nitrogen tolerance between the haploid cell and plant level in barley. *J Trit Crops*, 31 (2): 292–296 (in Chinese with English abstract) [陆瑞菊, 陈志伟, 何婷, 王亦菲, 杜志钊, 高润红, 邹磊, 黄剑华, 陈佩度(2011). 大麦单倍体细胞水平与植株水平耐低氮性的关系. *麦类作物学报*, 31 (2): 292–296]
- Lu RJ, Chen ZW, He T, Xu HW, Du ZZ, Gao RH, Wang YF, Zou L, Guo GM, Bu SM, et al (2013). Effects of chemical mutagen and ^{60}Co treatments on microspore culture of barley under low-nitrogen stress. *Plant Physiol J*, 49 (12): 1442–1446 (in Chinese with English abstract) [陆瑞菊, 陈志伟, 何婷, 徐红卫, 杜志钊, 高润红, 王亦菲, 邹磊, 郭桂梅, 卜姝明等(2013). 化学诱变剂和 ^{60}Co 处理对大麦小孢子低氮胁迫培养的影响. *植物生理学报*, 49 (12): 1442–1446]
- Lu RJ, Liu CH, He T, Chen ZW, Xu HW, Du ZZ, Gao RH, Wang YF, Zou L, Guo GM, et al (2014). The low nitrogen resistance performance in field on the DH strain derived from barley microspore mutation. *Acta Agric Nucl Sin*, 28 (3): 0412–0417 (in Chinese) [陆瑞菊, 刘成洪, 何婷, 陈志伟, 徐红卫, 杜志钊, 高润红, 王亦菲, 邹磊, 郭桂梅等(2014). 源于大麦小孢子诱变-氮胁迫培养的DH株系田间耐低氮性表现. *核农学报*, 28 (3): 0412–0417]
- Ma BL, Dwyer LM, Preston CM, Smith DL (1996). Distillation solution with and without indicator for nitrogen-15 measurement by optical emission spectrometry. *Commun Soil Sci Plant Anal*, 27: 2775–2782
- Obara M, Sato T, Sasaki S, Kashiba K, Nagano A, Nakamura I, Ebitani T, Yano M, Yamaya T (2004). Identification and characterization of a QTL on chromosome 2 for cytosolic glutamine synthetase content and panicle number in rice. *Theo Appl Genet*, 110: 1–11
- Pei XX, Wang JA, Dang JY, Zhang DY (2007). An approach to the screening index for low nitrogen tolerant wheat genotype. *Plant Nutr Fert Sci*, 13 (1): 93–98 (in Chinese with English abstract) [裴雪霞, 王姣爱, 党建友, 张定一(2007). 耐低氮小麦基因型筛选指标的研究. *植物营养与肥料学报*, 13 (1): 93–98]
- Samonte SOPB, Wilson LT, McClung AM, Tarpley L (2001). Seasonal dynamics of nonstructural carbohydrate partitioning in fifteen diverse rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Crop Sci*, 41: 902–909
- Sayer J, Cassman KG (2013). Agricultural innovation to protect the environment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 10 (21): 8345–8348
- Xu HW, Liu CH, Lu RJ, Guo GM, Chen ZW, He T, Gao RH, Li Y B, Huang JH (2016). The difference in responses to nitrogen deprivation and re-supply at seedling stage between two barley genotypes differing nitrogen use efficiency. *Plant Growth Regul*, 79 (1): 1–8
- Xu HW, Lu RJ, Liu CH, Guo GM, He T, Gao RH, Li YB, Hu HT, Hang SH, Fang CY, et al (2015). Evaluation of low nitrogen tolerance of homozygous population derived from F_1 microspore culture under nitrogen stress in barley. *J Trit Crops*, 35 (12): 1646–1652 (in Chinese with English abstract) [徐红卫, 陆瑞菊, 刘成洪, 郭桂梅, 何婷, 高润红, 李颖波, 胡翰彤, 黄赛华, 方春燕等(2015). 源于大麦 F_1 小孢子氮胁迫培养自交一代的耐低氮性评价. *麦类作物学报*, 35 (12): 1646–1652]
- Xu HW, Wang YF, Liu CH, Chen ZW, Du ZZ, Gao RH, Guo GM, He T, Zou L, Bu SM, et al (2013). The physiological responses of a nitrogen sensitive genotype to nitrogen starvation in barley seedlings. *Plant Physiol J*, 49 (11): 1197–1204 (in Chinese with English abstract) [徐红卫, 王亦菲, 刘成洪, 陈志伟, 杜志钊, 高润红, 郭桂梅, 何婷, 邹磊, 卜姝明等(2013). 大麦氮敏感基因型苗期对氮饥饿的生理响应. *植物生理学报*, 49 (11): 1197–1204]
- Yang JC, Zhang JH, Wang ZQ, Xu GW, Zhu QS (2004). Activities of key enzymes in sucrose-to starch conversion in wheat grains subjected to water deficit during grain filling. *Plant Physiol*, 135: 1621–1629
- Ye QB, Zhang HC, Dai QG, Li H, Huo ZY, Xu K, Tang J (2005). Effects of nitrogen amount applied and planting density on nitrate reductase activity of rice during middle-late growth stages. *Plant Physiol J*, 41 (1): 41–44 (in Chinese with English abstract) [叶全宝, 张洪程, 戴其根, 李华, 霍中洋, 许轲, 唐娟(2005). 施氮水平和栽插密度对水稻生育中后期硝酸还原酶活性的影响. *植物生理学通讯*, 41 (1): 41–44]
- Zhang GY (2012). Effect of different nitrogen levels treatment on activity and expression of key enzyme of carbon and nitrogen [PhD Thesis]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese with English abstract) [张国英(2012). 不同氮素水平处理对水稻碳氮代谢关键酶GS和GDH活性及表达的影响[学位论文]. 福州: 福建农林大学]
- Zhang YP, Liu Q, Rong XM, Peng JW (2007). The comparison of carbon metabolism of key enzyme activity among different rice varieties (combinations). *China Rice*, (4): 15–19 (in Chinese) [张玉平, 刘强, 荣湘民, 彭建伟(2007). 不同水稻品种(组合)碳代谢关键酶活性比较. *中国稻米*, (4): 15–19]
- Zhu ZL, Jin JY (2013). Fertilizer use and food security in china. *Plant Nutr Fert Sci*, 19 (2): 259–273 (in Chinese with English abstract) [朱兆良, 金继运(2013). 保障我国粮食安全的肥料问题. *植物营养与肥料学报*, 19 (2): 259–273]

Difference analysis in the activities of key enzymes involved in carbon and nitrogen metabolisms between the original cultivator of barley and mutants which are derived from microspore culture

XU Hong-Wei*, WANG Yi-Fei*, LIU Cheng-Hong, HUANG Sai-Hua, FANG Chun-Yan, HE Ting, GUO Gui-Mei, GAO Run-Hong, LU Rui-Ju**, HUANG Jian-Hua**

Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Biotech Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

Abstract: To explore the physiological mechanism of the low nitrogen tolerance in barley, we obtained two barley mutants ('A1-97' and 'A1-57') with different nitrogen use efficiencies (NUE) via mutagenesis and microspore culture. The activities of key enzymes involved in carbon and nitrogen metabolisms in the two mutants and the original barley cultivator 'Hua 30' were analyzed at different developmental stages under two nitrogen levels. The results showed that, compared with 'Hua 30', the activities of carbon and nitrogen metabolic enzymes in the two mutants varied most significantly at the filling stage, which indicated that the filling stage could be a key period for the study of low nitrogen tolerance. Under low nitrogen level, the activities of nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) in 'A1-97' (with a higher NUE) were significantly enhanced, whereas in 'A1-57' (with a lower NUE), the NR activity was significantly decreased and GS activity showed no significant difference at the filling stage. The activity of sucrose phosphorylase in 'A1-57' was significantly reduced at the filling and maturation stage. It is concluded that the difference in tolerance to low nitrogen between mutants and original cultivator may be related with NR, GS and sucrose phosphorylase activities.

Key words: barley; mutant with different nitrogen use efficiency; nitrate reductase; glutamine synthetase; sucrose phosphorylase

Received 2016-11-06 Accepted 2016-11-28

This work was supported by the Project from Shanghai Seed Industry Development [Shanghai Agricultural Science and Technology No. 2015(3) and No. 2016 (1-1)] and the Project from National Barley Industry Technology System (Grant No. CARS-05).

*Co-first author.

**Co-corresponding author (E-mail: luruiju62@163.com; sw1@saas.sh.cn).