

^{15}N 短时标记法鉴定烟草‘K326’和‘红花大金元’吸收 NO_3^- 和 NH_4^+ 的生理动力学特征

何明洁^{1,3}, 范腾飞³, 杨超², 陈益银², 李迪秦¹, 李常军^{2,*}, 刘来华^{1,3,*}

¹湖南农业大学农学院, 长沙410128; ²重庆烟草科学研究所, 重庆400715; ³中国农业大学资源与环境学院, 植物-土壤相互作用教育部重点实验室, 北京100193

摘要: 本文运用营养液培养方法、 ^{15}N 底物标记及同位素质谱测定技术等, 首先鉴定了两烟草(*Nicotiana tabacum*)品种(‘K326’和‘红花大金元’)吸收 NO_3^- 及 NH_4^+ 而不发生向地上部转移的最短时间, 继而对其吸收的系统组成进行了较精确的测定, 发现两品种吸收氮素至转移到地上部仅在数分钟之内; 根细胞吸收N至少有两类体系。在N浓度 $\leq 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 根系吸收途径具有酶促反应特征; 吸收 NO_3^- 的米氏常数(K_M)值(‘K326’: $84.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; ‘红花大金元’: $47.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)明显低于对 NH_4^+ 的 K_M 值(‘K326’: $93.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; ‘红花大金元’: $90.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); ‘红花大金元’较低的 K_M 值可能是该品种较‘K326’耐低N的生理原因之一。外界N浓度 $> 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 根系对N的吸收量与外界N浓度呈正相关; ‘K326’对 NO_3^- 的吸收速率是‘红花大金元’的2倍以上, 对 NH_4^+ 的吸收率则为‘红花大金元’的约2.4倍; ‘K326’对 NO_3^- 的吸收速率约为对 NH_4^+ 吸收的3.6倍, 而‘红花大金元’对 NO_3^- 的吸收速率约为对 NH_4^+ 吸收速率的1/2。本研究结果对探索烟草根系吸收氮素的相关分子机理提供了生理学依据。

关键词: 烟草; ‘K326’; ‘红花大金元’; ^{15}N 标记; 吸收动力学

‘K326’和‘红花大金元’(以下简称‘HD’)是我国烟草种植的主要品种, 分别占全国种植面积的28.9%和1.2% (张静等2008)。氮素作为植物所需的三大主要营养元素之一, 也是影响烟草生长发育和烟叶产量及品质的重要因素。然而, 据大田试验报道, ‘K326’和‘HD’对氮素的吸收利用效率存在较大的差异, 其中‘K326’被视为耐中高氮品种, 而‘HD’为耐低氮品种(李天福等1995; 杨铁钊等2001)。例如, 格盘漂浮育苗法研究表明, ‘K326’以 $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ 为唯一氮源时生长的生物量显著大于‘HD’, 而在以3和 $9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ 为唯一氮源时的结果则相反(杨铁钊等2001)。根据大量的田间施肥管理和栽培技术数据, 优质烟叶栽培规范技术对‘K326’的推荐施氮总量为 $120 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$, 而对‘HD’的推荐施氮总量为 $75 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ (张树堂2007; 端永明等2015)。虽然农田生态系统中存在多种形态的氮素如铵态氮(NH_4^+)、硝态氮(NO_3^-)、酰胺态氮($-\text{CONH}-$)等, 但‘K326’和‘HD’仍以吸收利用 NH_4^+ 和 NO_3^- 为主(杨志晓等2012); 而其根系对 NO_3^- 和 NH_4^+ 的吸收能力强弱的差别, 可能是导致‘K326’和‘HD’对两种氮源吸收利用效率差异的原因之一(李中民等2011)。

目前, 关于‘K326’和‘HD’根系对 NO_3^- 和 NH_4^+ 吸收的较精确的生理动力学机制仍未见有报道。以往的研究中, 李中民等(2011)通过测定烟草根系

长时间(4 h)对 NO_3^- 和 NH_4^+ 的吸收量来计算相应的米氏常数(Michaelis constant, K_M)与酶促反应最大速度(V_{max})值, 但是, 此数据结果不足以较精确地反映出根细胞对底物 NO_3^- 和 NH_4^+ 的跨膜吸收/转运的真实能力及生理动力学特征, 因为在如此长的吸收时间内, 根系吸收的部分氮素不仅能在根细胞中进行同化代谢, 而且所吸收的部分氮素及其代谢产物也将发生向地上部的长距离转运。因此, 采用短时间里底物标记测定法, 可以更精确地反映‘K326’和‘HD’根细胞吸收两种氮素离子的动力学特征及组成系统, 了解其吸收动力学特征参数(如 K_M 和 V_{max}), 是阐述两品种吸收利用氮素能力和效率差异的关键性要素之一, 这也将有助于深入探索和改良烟草根系有效吸收/转运氮素的分子生物学途径。为此, 本文运用营养液培养方法、 ^{15}N 底物标记技术、元素分析仪-同位素比值质谱仪(elemental analyzer-isotope ratio mass spectrometer, EA-IRMS)联用技术等首先鉴定了根系吸收氮素而不发生向地上转移的时间, 继而对其吸收 NO_3^- 和 NH_4^+ 的动力学特征和系统组成成分进行了精确的测定和计算。

收稿 2016-12-20 修定 2017-03-11

资助 中国烟草总公司重庆市公司科技计划基金(NY2014040-1070017)。

* 通讯作者(E-mail: hnbjpxy@163.com; LL1025@cau.edu.cn)。

材料与方法

1 材料与培养条件

供试烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种‘K326’和‘红花大金元’(‘HD’)由中国烟草总公司重庆市公司提供。采用容积3 L避光塑料罐(外壁长×宽×高=16 cm×13 cm×18 cm)营养液培养方法育苗。 ^{15}N 同位素标记的 ^{15}N -硝酸钾(K^{15}NO_3)和 ^{15}N -硫酸铵[($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$; ^{15}N 丰度为99.15%]购于上海化工研究院。本试验在中国农业大学资环学院顶置光源型人工气候室进行,室内光照强度 $450 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$,室温 27°C (昼)/ 22°C (夜),湿度60%。基于EA-IRMS联用技术(张媛媛等2012)分析测定 ^{15}N 含量,在中国农业大学资源环境学院植物营养系元素分析室进行。该实验室使用Finnigan MAT Delta plus XP型号质谱仪(美国Thermo Electron公司)。元素分析仪条件:炉温 1020°C ,柱温 70°C ,He流量为 $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,氧气注入流量为 $200 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,通气时间选为5 s。

2 营养液成分

完全营养液: K_2SO_4 $0.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 MgSO_4 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 MnSO_4 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 ZnSO_4 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 CuSO_4 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 Na_2MoO_4 $0.28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 H_3BO_3 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 FeSO_4 $90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$ $90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,用KOH调pH至6.2~6.3。

3 幼苗预培养

烟草种子表面消毒[先用70%的乙醇浸泡2 min,再换用含有1% $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$ (十二烷基硫酸钠, sodium dodecyl sulfate, SDS)与2% NaClO 的溶液浸泡15 min]后,用无菌水冲洗5次,置于以无菌水湿润的无菌海绵上发芽。种子萌发一周后,子叶全展开,根长不足1 cm;待幼苗开始露出两片真叶时(确保此时根系穿透海绵块),移苗至营养液培养罐,每罐3株,用1/10~1/3的完全营养液培养至两片真叶展开,继而用完全营养液培养烟株至8片全展叶,最后选取生长大小基本一致的植株,用 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 替代完全营养液中的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 对植物进行缺氮培养48 h。营养液每2 d更换一次,并以 $70 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 通气量进行气泵通气处理。

4 ^{15}N 短时间标记植株的处理

标记试验在2.3 L的圆柱形营养液培养罐中行

进。罐中先加入2 L无氮营养液(同“材料与方法”第3节中缺氮培养的营养液),对低于 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标记处理,加入100%相应处理浓度的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{NH}_4^+$; $500\sim 1\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标记处理,加入1/2的相应处理浓度的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{NH}_4^+$,再加入 NO_3^- 或 NH_4^+ 补足处理设计的浓度;大于 $1\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氮处理,则加入20%的相应处理浓度的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{NH}_4^+$,再加入 NO_3^- 或 NH_4^+ 补足处理浓度,以玻璃棒搅匀。于营养液培养罐中同时取出3株植株,将其根系全浸入标记处理液中,在给定的时间内取出根系、完成处理(即将根系全浸入2 L去离子水中轻微搅动,清洗共5次,每次20 s,以除去根表面可能吸附的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{NH}_4^+$ 。分别收取地上部和根系,在 65°C 烘箱中烘干72 h至样品重量恒定)。

5 质谱仪测定干样中 ^{15}N 含量

本试验所用质谱仪能测定植物干样中总N原子数以及 ^{15}N 与 ^{14}N 的原子数之比(以下简称 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$),根据待测样的重量计算出 ^{15}N 含量,因此须确保样品充分干燥。

使用元素分析室提供的可读性为 0.001 mg 的超微量天平称取 $4.000\sim 5.000 \text{ mg}$ 的干样,并用仪器专用锡箔舟包紧成直径约 0.5 cm 大小颗粒即待上机测定,读取结果(上机测定操作由分析室专职老师完成)。须注意的是,待测干样在该仪器中需先燃烧后测定 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$,因为取样量少,为确保取样均匀且能充分燃烧,样品应尽可能磨碎。本研究使用 65°C 烘箱干燥的研钵研磨样品,并磨至极细的粉末状。

6 ^{15}N 显著积累于根系而未转移至地上部的临界时间鉴定

供试幼苗按“材料与方法”第4节所述进行 ^{15}N 短时间标记,标记处理分4组进行,设计如下:

试验组一: ‘K326’- $^{15}\text{NO}_3^-$ 标记试验。设T1~T7共7个处理,具体为T1: 未添加 $^{15}\text{NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{NH}_4^+$; T2~T4: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 分别标记3、5、10 min; T5~T7: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 分别标记3、5、10 min。

试验组二: ‘K326’- $^{15}\text{NH}_4^+$ 标记试验。设T8~T11共4个处理,具体为T8和T9: $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $^{15}\text{NH}_4^+$ 分别标记2和10 min; T10和T11: $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $^{15}\text{NH}_4^+$ 分别标记2和10 min。

试验组三: ‘HD’- $^{15}\text{NO}_3^-$ 标记试验。设T12~T16共5个处理,具体为T12: 未添加 $^{15}\text{NO}_3^-/^{15}\text{NH}_4^+$;

T13和T14: $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 分别标记5和20 min; T15和T16: $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $^{15}\text{NO}_3^-$ 分别标记5和20 min。

试验组四: ‘HD’- $^{15}\text{NH}_4^+$ 标记试验。设T17~T20共4个处理, 具体为T17和T18: $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $^{15}\text{NH}_4^+$ 分别标记5和20 min; T19和T20: $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $^{15}\text{NH}_4^+$ 分别标记3和10 min。

分别测定根系和地上部 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, 计算3个重复处理样本的均值, 进行差异显著性统计学分析。

7 根系对 NO_3^- 和 NH_4^+ 的吸收动力学特征鉴定

供试幼苗按“材料与方法”第4节所述的方法进行不同浓度的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 和 $^{15}\text{NH}_4^+$ 标记处理, 基于临界时间鉴定结果分析(详见“实验结果”第1和2节)选定2 min作为标记处理时间, 浓度梯度的范围在 $0\sim 7 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内, 分4组试验, 设计处理的浓度梯度如下:

试验组一, ‘K326’- $^{15}\text{NO}_3^-$ 标记浓度: 2、5、10、20、35、50、80、100、250、500、1 000、3 000、5 000、7 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

试验组二, ‘K326’- $^{15}\text{NH}_4^+$ 标记浓度: 5、15、45、100、250、500、1 000、3 000、5 000、7 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

试验组三, ‘HD’- $^{15}\text{NO}_3^-$ 标记浓度: 2、5、10、20、35、50、80、100、250、500、1 000、3 000、5 000、7 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

试验组四, ‘HD’- $^{15}\text{NH}_4^+$ 标记浓度: 2、5、10、20、35、80、100、250、500、1 000、3 000、5 000、7 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

分别测定根系和地上部 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, 取均值拟合依赖于 $^{15}\text{NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{NH}_4^+$ 浓度梯度的吸收速率曲线。

8 数据处理与作图

利用Excel软件计算样品中 ^{15}N 的含量, SPSS软件进行数据统计学显著性差异分析, GraphPad Prism 5软件拟合动力曲线并计算相应的 K_M 和 V_{max} 值。

实验结果

1 烟草根系吸收 $^{15}\text{NO}_3^-$ 和 $^{15}\text{NH}_4^+$ 至地上部有明显 ^{15}N 累积仅需数分钟

本研究所用的质谱仪测 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 精确度可达到0.000 01%。基于SPSS软件单因素方差分析法的最小显著差数(least-significant difference, LSD)计算法, 可检验标记处理样品与未标记对照样品中

$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 平均数差异显著性($P<0.05$)。本研究分别测定了根系和地上部样品中的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, 而只计算了地上部样品中的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 的差异显著性, 分为a、b、c、d、e五个级别(如图1标注所示)。其中a表示与对照无差异, e表示与对照差异级别最大。根系样品中的 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 差异级别不再计算细分, 由图看出根系积累的 ^{15}N 含量远高于地上部的积累, 可被仪器显著而稳定地检测到。地上部差异级别为b及以上的则认为有 ^{15}N 的显著累积, 即烟草完成 ^{15}N 从根系向地上部的转运。按照同一品种对照原则, 标记处理T2~T11的对照为T1, 标记处理T13~T20的对照为T12。

由图1可知, 在本试验所设置的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 标记浓度下, ‘K326’和‘HD’根系吸收5 min后, 除‘HD’的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 标记浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 数据的齐性较差, 不能判断其是否有显著差异外, 其他处理均能检测出植株地上部有 ^{15}N 的明显积累, 由此推知, 缺氮2 d的‘K326’和‘HD’幼苗根系从接触外界 NO_3^- 到将其或其代谢产物转运至地上部所需要的时间应在5 min之内; 而当 $^{15}\text{NO}_3^-$ 为10或100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, ‘K326’根系吸收3 min, 未能明显检测出地上部有 ^{15}N 的积累增加, 由此推知缺氮2 d的‘K326’根系从接触外界 NO_3^- 到将其或其代谢产物转运至地上部所需要的时间可能在3 min左右或大于3 min。

基于(大田试验报道) ‘HD’品种的耐低氮特征, 在检测该品种根系吸收 NO_3^- 或 NH_4^+ 而可能不发生向地上部转移氮素的最短时间时, 本研究中设计了两个较低微摩尔级别的氮素浓度即5和50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标记浓度; 在 $^{15}\text{NO}_3^-$ 标记试验中, 鉴于所获得的大小一致的‘HD’植株数量有限, 在只能设置两个吸收时间点的情况下, 我们选取了相对‘K326’标记时间稍长的时间点即5和20 min。试验结果表明 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下标记5 min, 根系中检测到的 ^{15}N 含量仅约为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 而地上部的含量极低或难以明显检测到(图1); 即使在50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、20 min的吸收条件下, 地上部的 ^{15}N 含量也不到根中积累的10% (图1)。此结果为在下一步的根系吸收动力学试验中设置最低底物浓度以及合理的最短吸收时间提供了重要的生理学依据。

就根系对 NH_4^+ 的吸收而言, ‘K326’及‘HD’吸收的 NH_4^+ 或其代谢产物不发生向地上部转移所需

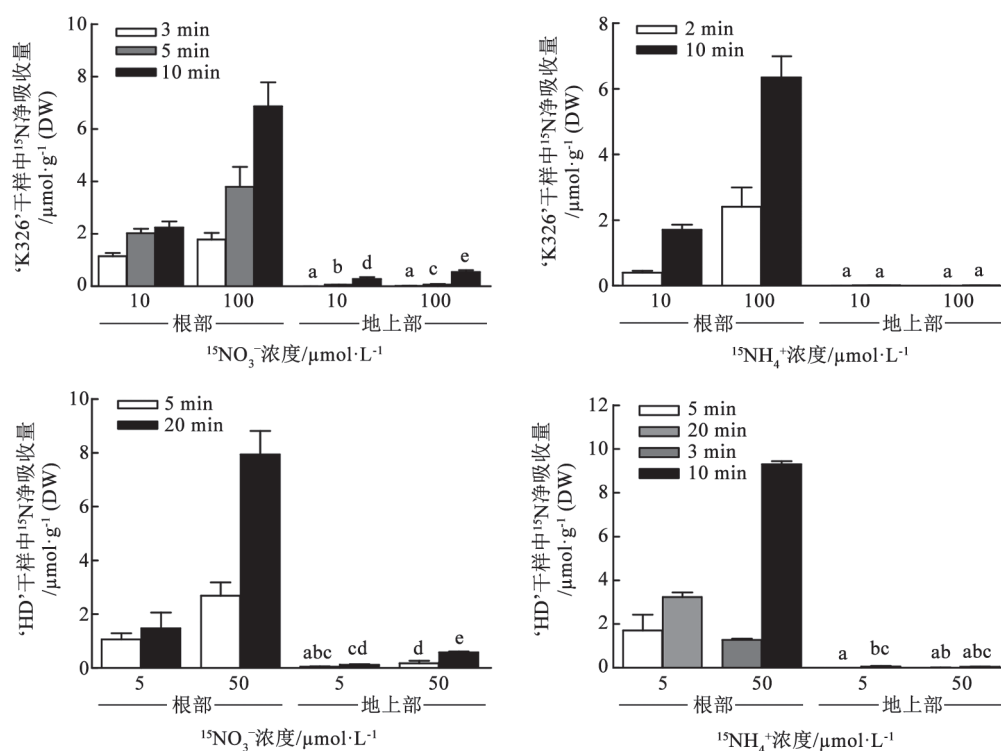
图1 ‘K326’及‘HD’烟草根系明显吸收积累 $^{15}\text{NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的最短时间的测定

Fig.1 Measurement of a minimum time required for the obvious detection of accumulation of $^{15}\text{NO}_3^-$ or $^{15}\text{NH}_4^+$ taken up by tobacco ‘K326’ and ‘HD’ roots

各柱形上用不同小写字母标识表示不同处理之间以及与未添加 ^{15}N 标记的空白组间差异显著($P < 0.05$)。

要的时间则稍长,如图1所示,在本试验的植物生长条件下,当 $^{15}\text{NH}_4^+$ 浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,‘K326’根系吸收10 min也未能检测出地上部有 ^{15}N 的明显积累,由此推知缺氮2 d的‘K326’植株从根系接触外界 NH_4^+ 到将其或其代谢产物运送至地上部所需的时间可能超过10 min。当 $^{15}\text{NH}_4^+$ 浓度低至 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,‘HD’根系吸收20 min,虽能检测出地上部有 ^{15}N 的明显积累,但与根部相比含量很低(不及根部的4%)。由此推知,缺氮2 d的‘HD’幼苗在20 min内将完成从根系接触 NH_4^+ 到将其或其代谢产物运送至地上部的过程。而当 $^{15}\text{NH}_4^+$ 为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,‘HD’根系吸收3或10 min,检测到地上部可能有 ^{15}N 积累,因此推测缺氮2 d的‘HD’幼苗根系从接触外界 NH_4^+ 到将其或其代谢产物运送至地上部可能在10 min之内。

此外,对‘K326’进行 $^{15}\text{NO}_3^-$ ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)标记吸收3 min (T2处理)或 $^{15}\text{NH}_4^+$ ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)标记吸收2 min (T8处理),以及对‘HD’分别进行 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

的 $^{15}\text{NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的标记吸收5 min (T17处理)、 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的标记吸收3 min (T19处理),结果发现在根系中均能检测到有 ^{15}N 的明显积累(图1)。这表明根细胞在2~5 min内吸收积累的 ^{15}N 能被所用仪器准确、稳定地检测,为在尽可能短的时间内完成吸收试验,并精确计算和鉴定根系吸收 NO_3^- 和 NH_4^+ 的生理动力学机理及其特征参数提供了可靠可行的研究方法依据。

综上,为了尽可能减小或避免被吸入的 NO_3^- 或 NH_4^+ 在根中的同化代谢以及向地上部的长距离运输,以至于影响较精确地鉴定根细胞对 NO_3^- 及 NH_4^+ 跨细胞质膜转运的机理及动力学参数,同时在保证短时和低浓度标记处理下不影响测定结果的准确性和稳定性情况下,本研究确定了使用2 min的 ^{15}N 标记吸收技术,设计、实施了取决于外界浓度梯度的吸收试验,以测定‘K326’及‘HD’根系对 NO_3^- 及 NH_4^+ 的生理动力学机理组成成分及其特征参数。

2 ‘K326’和‘HD’根系吸收 NO_3^- 或 NH_4^+ 至少具有两种不同的机理

鉴于 NO_3^- (或 NH_4^+)与 $^{15}\text{NO}_3^-$ (或 $^{15}\text{NH}_4^+$)的化学性质或活性相似/同, 植物细胞对同位素标记的同一底物的吸收没有选择性差, 吸收动力学特征十分相近, 因此由对 $^{15}\text{NO}_3^-$ 和 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的吸收动力学特征可推知, 与其他高等植物类似, 烟草(‘K326’与‘HD’)根系对 NO_3^- 和 NH_4^+ 的吸收机制也可能具有多种不同的系统或途径。根系吸收依赖于外界底物浓度梯度的生理动力学曲线如图2和3所示, 在外界 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 浓度 $\leq 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 缺氮2 d条件下, 两个烟草品种对 NO_3^- 和 NH_4^+ 的吸收曲线呈米氏酶动力学特征。此处 K_M 值表示当根系对养分或底物的吸收达到最大速率一半时所需要的底物浓度, K_M 值越小反映根系对营养吸收的亲和力越高。由图2可知, 两个品种烟草对 NO_3^- 吸收的 K_M 值(‘K326’: $84.46 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; ‘HD’: $47.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)均低于对 NH_4^+ 的 K_M 值(‘K326’: $93.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; ‘HD’: $90.43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 表明烟草根细胞对 NO_3^- 的亲和力更高, 通透性或转运/吸收能力更强, 这也可能是烟

草植物偏好硝态氮的原因之一。同时, 上述结果也反映了‘HD’对 NO_3^- 层面上‘HD’比‘K326’更耐受低N生长环境的原因之一。同时, 上述结果也反映了‘HD’对 NO_3^- 及 NH_4^+ 的亲和力均显著高于‘K326’, 这可能是生理学层面上‘HD’比‘K326’更耐受低N生长环境的原因之一。

如图3所示, 当外界 NO_3^- 或 NH_4^+ (以下简称 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$)浓度 $>1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, ‘K326’及‘HD’根系单位时间对 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 的吸收量随外界 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 的浓度升高而呈线性增加。在所测定的 NO_3^- 浓度范围($1\sim 7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)内, ‘K326’根系的吸收量均明显大于‘HD’的吸收量, 即‘K326’对 NO_3^- 的吸收速率是‘HD’的2倍以上。这反映了较高浓度 NO_3^- 条件下, ‘K326’对 NO_3^- 的吸收能力显著大于‘HD’, 且‘K326’对 NO_3^- 的吸收速率约为对 NH_4^+ 的3.6倍。结果表明在较高浓度的条件下, ‘K326’根细胞仍对 NO_3^- 具有较强的通透性, 这在生理学吸收机理层面上可能解释‘K326’耐中高度氮的生长特征。

在较高浓度 NH_4^+ ($>1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下, 两品种表现的吸收特征与吸收 NO_3^- 的情形相反, 即

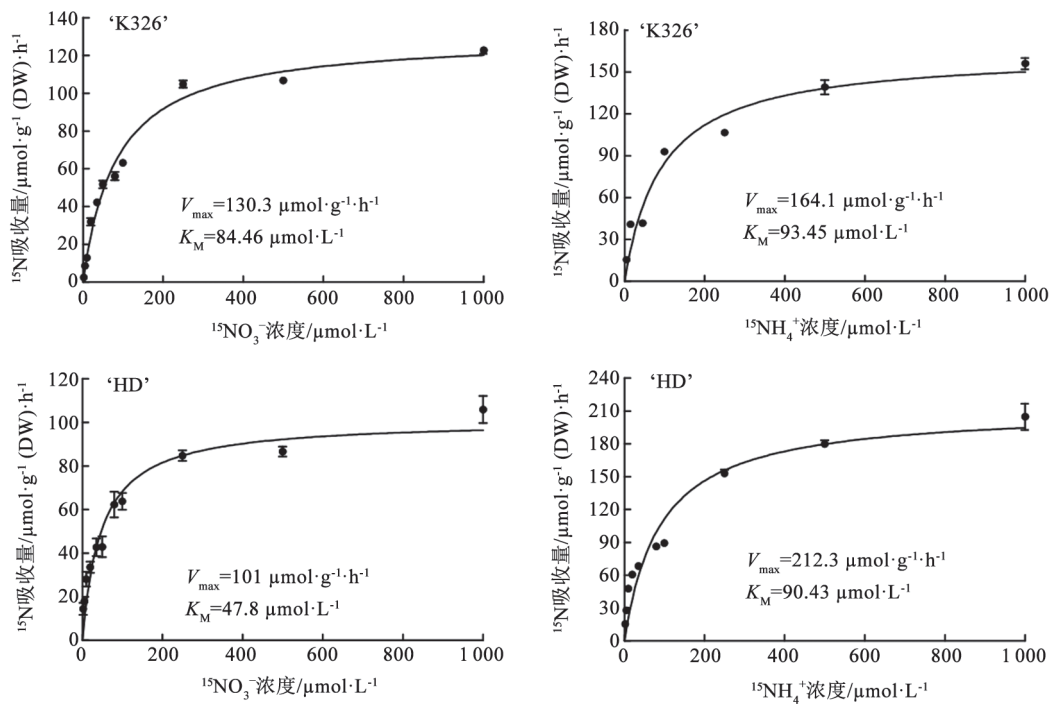
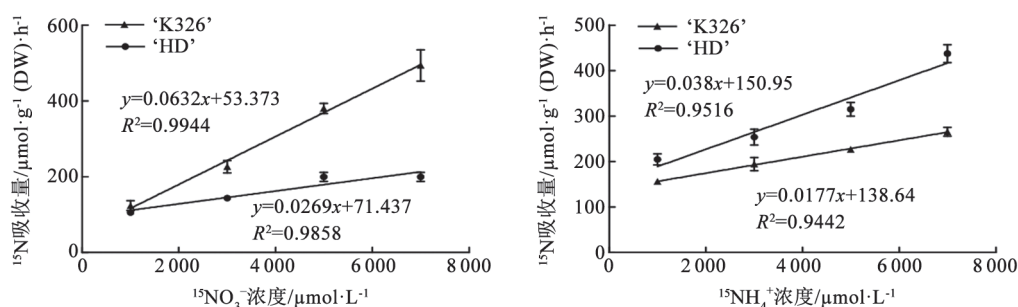


图2 依赖于外部浓度($\leq 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的烟草‘K326’及‘HD’根系对 $^{15}\text{NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的吸收

Fig.2 Concentration-dependent ($\leq 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) uptake of $^{15}\text{NO}_3^-$ or $^{15}\text{NH}_4^+$ by roots of tobacco ‘K326’ and ‘HD’

实际试验中底物浓度 $\geq 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ^{15}N 标记处理使用的是 $^{15}\text{NO}_3^-$ (或 $^{15}\text{NH}_4^+$)与 NO_3^- (或 NH_4^+)的混合物, 上图为将 NO_3^- (或 NH_4^+)换算成 $^{15}\text{NO}_3^-$ (或 $^{15}\text{NH}_4^+$)以后的计算结果, 图3同。

图3 依赖于外部浓度($>1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的烟草‘K326’及‘HD’根系对 $^{15}\text{NO}_3^-$ 或 $^{15}\text{NH}_4^+$ 的吸收Fig.3 Concentration-dependent ($>1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) uptake of $^{15}\text{NO}_3^-$ or $^{15}\text{NH}_4^+$ by roots of tobacco ‘K326’ and ‘HD’

‘HD’根系对 NH_4^+ 的吸收速率是‘K326’的2倍以上, ‘HD’对 NH_4^+ 的吸收速率甚至大于对 NO_3^- 的吸收速率(图3)。从植株长期生长累积氮素的效应看, 当以 NH_4^+ 为唯一氮源培养‘K326’和‘HD’时, 发现‘HD’比‘K326’的生物量低, 叶片深绿发暗, 根系发黑现象严重(数据未显示), 推测‘HD’植物体内(细胞)可能缺乏有效调控 NH_4^+ 同化代谢的机制或/及对胞质中的 NH_4^+ 进行胞内区间化的有效途径(如向液泡中的转移储存), 因此比吸收速率较小的‘K326’植株的中毒现象严重, 与此相关的生物学机理及调控规律有待进一步研究。

讨 论

1 NO_3^- 是烟草吸收的主要氮形态

鉴于‘K326’和‘HD’对 NO_3^- 吸收能力和速率均优于对 NH_4^+ 的吸收, 且其生长表现对外界较高浓度的 NH_4^+ 具有敏感性反应, 因此 NO_3^- 可能是烟草吸收的主要氮形态。已有的大田试验研究通常使用速效氮肥、复合肥或纯 NO_3^- , 所指的“耐中高氮”的直接有效N成分可能主要为 NO_3^- 。而在田间施肥中, 由于 NO_3^- 极易在土壤中通过淋洗、渗透、反硝化等途径损失, 这些N的损失约占烟草所施氮肥的30%, 当土壤结构不良时这些损失甚至会达到60%以上(袁仕豪等2008; 刘青丽等2009; Xu等2012)。基于本研究的结果, 为了提高烟草植物对氮素资源的利用效率, 生产上不仅需要考虑氮营养的配比, 更应加强研发更合理的土水管理体系和新的栽培技术以减小淋洗和反硝化作用导致的硝态氮损失。

此外, 优质烟叶不仅要考虑农艺性状, 也需考虑烟叶香气、经济效益等指标。例如, 已有研究表

明 NH_4^+ 有利于总糖含量的提高。介晓磊等(2007)对‘云烟85’的研究表明, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比为5:5或3:7时K/Cl与糖/碱比例适中, 烟叶的品质最好。因此生产实践中的施N方式还需以生产研究成果为直接理论依据, 并结合各综合效应和现有技术水平改进生产方式。

2 有效、准确评估(新)品种吸收 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 营养能力的生理学测试技术

早期的一些根系吸收氮素的研究中, 人们多趋于设计、选取长时间(如数小时)的 ^{15}N 标记吸收(李中民等2011), 这很难反映出烟草根细胞吸收/转运 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 的真实能力和生理学机制。许多的研究报道以及本课题的结果表明, 介导低浓度 NO_3^- 和 NH_4^+ 转运的蛋白或通透酶表现为典型的酶促反应特征, 而酶促反应受底物浓度及产物浓度的影响, 若被根细胞吸入的 NO_3^- 和 NH_4^+ 发生生长距离的转运以及氮代谢, 无疑将影响 K_M 和 V_{\max} 值的准确鉴定。

Kiyomiya等(2001)使用正电子示踪成像系统实时追踪技术, 发现水稻(*Oryza sativa*)根表面从开始接触 $^{13}\text{NH}_4^+$ 到根茎交界处出现 ^{13}N 信号仅需4 min, 因此我们在“材料与方法”第6节中设定了 $^{15}\text{NO}_3^-/^{15}\text{NH}_4^+$ 标记的吸收时间为2~20 min, 以检测烟草根系吸收氮素后向地上部不发生转移的可能性时间。

根据“实验结果”第1节的结果, 本研究选取了2 min作为“材料与方法”第7节的 ^{15}N 吸收标记时间, 以测定根系吸收 NO_3^- 和 NH_4^+ 的生理动力学机制。为了验证此吸收时间选取的合理性及试验操作过程的正确性, 我们分别在低浓度($0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和高浓度($7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理的样本中各随机选取了3个地上部的样本测定 ^{15}N 的含量, 结果证明地上部并

没有¹⁵N的明显积累(数据未显示)。此外,运用类似的技术精确鉴定根系吸收氮素如尿素的生理动力学机理,在水稻和玉米(*Zea mays*)中近期也有报道(Wang等2012; Liu等2015)。

本研究选取的¹⁵NO₃⁻/¹⁵NH₄⁺浓度从2至7 000 μmol·L⁻¹,符合农业生态系统中所报道的含量范围(Wang等1993; Miller等2007)。如“材料与方法”第4节所述,对大于500 μmol·L⁻¹的吸收实验处理,我们加入了相应总浓度比例的¹⁵N标记和非标记的NO₃⁻或NH₄⁺的混合物。如此处理,一方面保证了根系吸收的¹⁵N能够足以被仪器检测出,另一方面也尽可能减少了高浓度的¹⁵N因吸附于根表而容易造成洗脱不净所产生的试验误差。

综上,本研究所建立的技术体系以及所获得相关结果不仅准确可能,而且也能更接近地反映出烟草根细胞吸收NO₃⁻和NH₄⁺的真实生理学机理及其特征参数。

这些参数(如K_M和V_{max})可以推荐作为新品种选育中较快速、精确地评价品种有效吸收NO₃⁻/NH₄⁺营养能力的重要生理指标。

3 为分离、克隆NO₃⁻和NH₄⁺转运相关基因提供生理学依据

高等植物根系的NO₃⁻和NH₄⁺转运系统由高亲和力吸收系统(high affinity transport systems, HATS)、低亲和力吸收系统(low affinity transport systems, LATS)等多个系统组成,每个系统都有各自的特性,并由不同的转运蛋白构成,表现为具有不同的动力学特征常数(K_M和V_{max})和不同的调节反馈机制(Nacry等2013; O'Brien等2016)。在分子水平上,迄今已鉴定植物中参与NO₃⁻的吸收转运的蛋白包括NRT1、NRT2、CLC、ALMT、SLAC1五个家族蛋白,其中只有NRT1和NRT2家族的部分成员蛋白介导根系对NO₃⁻的吸收,且两个家族对NO₃⁻的亲合力有高低之分,这从分子水平上证实了植物不同NO₃⁻/NH₄⁺吸收系统由不同的转运蛋白组成的推测(Nacry等2013)。目前已鉴定根系中介导NH₄⁺吸收的转运蛋白属于AMT家族,其中AMT1.2在内胚层和皮层细胞质膜上介导NH₄⁺在根系中的转入与转出,对NH₄⁺的亲合力较低,其他已鉴定的AMT成员对NH₄⁺都具高亲和力(Quesada等1997)。

已有研究分离出皱叶烟草(*Nicotiana plum-*

baginifolia) *NpNRT2.1*基因,推测该基因编码具有高亲和力的NO₃⁻转运蛋白(Quesada等1997; Fraisier等2000);在皱叶烟草中分离出了与番茄(*Solanum lycopersicum*)低亲和力NO₃⁻转运蛋白LeNRT1.1及LeNRT1.2高度同源的基因,分别命名为*NpNRT1.1*与*NpNRT1.2* (Fraisier等2001);关于烟草AMT家族基因的研究仍未见报道,但是上述NO₃⁻转运蛋白的酶学特征(专一性、K_M和V_{max})仍有待进一步研究,从而验证其对NO₃⁻的亲合性及各成员对各不同系统的主导率。本试验鉴定出了两种基因型不同的烟草根系对NO₃⁻和NH₄⁺的亲合性和吸收能力,为分离、克隆和鉴定根细胞中执行NO₃⁻/NH₄⁺吸收功能的相关转运蛋白基因提供了生理学试验证据,也为深入研究根系中HATS与LATS的各成员吸收NO₃⁻和NH₄⁺的主导率和调控关系提供了的分子遗传基础信息。

本研究在生理学机理上证明了‘K326’和‘HD’根系中存在吸收NO₃⁻和NH₄⁺的HATS和LATS,故可推测存在支撑各系统存在的转运蛋白及其相应的编码基因。基于生物信息学同源基因搜索,本课题组近期已克隆获得了‘K326’中与拟南芥*AtNRT1.1*同源的长度分别为1 773、1 785、1 593和1 593 bp的4个烟草基因,以及与*AtAMT1.1*同源的长度为1 395和1 542 bp的两个基因(<https://solgenomics.net/>),并预测其编码的蛋白质具有10~12个跨膜结构域。对于这些烟草的AMT及NRT基因的分子生理学功能,课题组正开展相应的研究工作。

参考文献

- Duan YM, Zhang TJ, Xu XY, Yang LQ, Yang YH, Yang ZQ, Qian FC (2015). Study on affect of less pure nitrogen application on several traits of flue-cured tobacco. *J Kunming Univ*, 37 (3): 6–12 (in Chinese with English abstract) [端永明, 张廷金, 徐兴阳, 杨丽琼, 杨宇虹, 杨正权, 钱发聪(2015). 纯氮减施对烤烟几项性状的影响研究. *昆明学院学报*, 37 (3): 6–12]
- Fraisier V, Dorbe MF, Daniel-Vedele F (2001). Identification and expression analyses of two genes encoding putative low-affinity nitrate transporters from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol*, 45 (2): 181–190
- Fraisier V, Gojon A, Tillard P, Daniel-Vedele F (2000). Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. *Plant J*, 23 (4): 489–496
- Jie XL, Huang XD, Liu SL, Liu F, Hua DL (2007). Effect of different nitrogen forms on tobacco quality indices. *Chin J Soil Sci*, 38 (6):

- 1150–1153 (in Chinese with English abstract) [介晓磊, 黄向东, 刘世亮, 刘芳, 化党领(2007). 不同氮素供应对烟草品质指标的影响. 土壤通报, 38 (6): 1150–1153]
- Kiyomiya S, Nakanishi H, Uchida H, Tsuji A, Nishiyama S, Futat-subashi M, Tsukada H, Ishioka NS, Watanabe S, Ito T, et al (2001). Real time visualization of ^{15}N -translocation in rice under different environmental conditions using positron emitting tracer imaging system. *Plant Physiol*, 125 (4): 1743–1753
- Li T, Ran B, Chen P, Liu J (1995). Research of the tolerance characteristics to fertilizers of main Yunnan flue-cured tobacco cultivars. *Tobac Sci Technol*, (2): 32–34 (in Chinese) [李天福, 冉邦定, 陈萍, 刘敬业(1995). 云南烤烟主要栽培品种的耐肥特性研究. 烟草科技, (2): 32–34]
- Li Z, Yang T, Duan W, Liu Z (2011). Characterization at seedling stage of absorption kinetics to nitrate and ammonium by different genotype tobacco. *Jiangsu Agric Sci*, 39 (2): 155–157 (in Chinese) [李中民, 杨铁钊, 段旺军, 刘中伟(2011). 不同基因型烟草苗期对硝态氮和铵态氮吸收动力学特征研究. 江苏农业科学, 39 (2): 155–157]
- Liu GW, Sun AL, Li DQ, Athman A, Gilliham M, Liu LH (2015). Molecular identification and functional analysis of a maize (*Zea mays*) DUR3 homolog that transports urea with high affinity. *Planta*, 241 (4): 861–874
- Liu QL, Ren TZ, Li ZH, Zhang YG, Liu HB (2009). Nitrogen mineralization potential of major soil planting tobacco in China. *Plant Nutr Fert Sci*, 15 (6): 1266–1272 (in Chinese with English abstract) [刘青丽, 任天志, 李志宏, 张云贵, 刘宏斌(2009). 我国主要植烟土壤氮素矿化潜力研究. 植物营养与肥料学报, 15 (6): 1266–1272]
- Miller AJ, Fan X, Orsel M, Smith SJ, Wells DM (2007). Nitrate transport and signalling. *J Exp Bot*, 58 (9): 2297–2306
- Nacry P, Bouguyon E, Gojon A (2013). Nitrogen acquisition by roots: physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. *Plant Soil*, 370 (1): 1–29
- O’Brien JA, Vega A, Bouguyon E, Krouk G, Gojon A, Coruzzi C, Gutiérrez RA (2016). Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol Plant*, 9 (6): 837–856
- Quesada A, Krapp A, Trueman LJ, Daniel-Vedele F, Fernández E, Forde BG, Caboche M (1997). PCR-identification of a *Nicotiana glauca* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family. *Plant Mol Biol*, 34 (2): 265–274
- Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Glass ADM (1993). Ammonium uptake by rice roots. II. Kinetics of $^{15}\text{NH}_4^+$ Influx across the plasmalemma. *Plant Physiol*, 103 (4): 1249–1258
- Wang WH, Köhler B, Cao FQ, Liu GW, Gong YY, Sheng S, Song QC, Cheng XY, Garnett T, Okamoto M, et al (2012). Rice DUR3 mediates high-affinity urea transport and plays an effective role in improvement of urea acquisition and utilization when expressed in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 193 (2): 432–444
- Xu G, Fan X, Miller AJ (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol*, 63: 153–182
- Yang TZ, Lin CL, Ding YL, Xu ZC, Shu HY (2001). Study on response of different tobacco genotypes to nitrogen nutrition tobacco. *Tobacco Sci Technol*, (6): 32–35 (in Chinese with English abstract) [杨铁钊, 林彩丽, 丁永乐, 许自成, 舒海燕(2001). 不同基因型烟草对氮素营养响应的差异研究. 烟草科技, (6): 32–35]
- Yang ZX, Wang Y, Wang ZH, Shi YW, Li GX, Ren XL (2012). Research advance in nitrogen nutrition of flue-cured tobacco. *Acta Agric Jiangxi*, 24 (1): 72–76 (in Chinese with English abstract) [杨志晓, 王轶, 王志红, 史跃伟, 李光雄, 任学良(2012). 烤烟氮素营养研究进展. 江西农业学报, 24 (1): 72–76]
- Yuan SH, Yi JH, Pu WX, Han JF, Wang YF (2008). Nitrogen use efficiency of base fertilizer and top dressing in flue-cured tobacco in rainy regions. *Acta Agron Sin*, 34 (12): 2223–2227 (in Chinese with English abstract) [袁仕豪, 易建华, 蒲文宣, 韩锦峰, 汪耀富(2008). 多雨地区烤烟对基肥和追肥氮的利用率. 作物学报, 34 (12): 2223–2227]
- Zhang J, Zhao ZX, Li HG, Yang HW, Ding JL, Wen YQ (2008). Comparison of the physiological characters between flue-cured tobacco varieties HD and K326. *J Yunnan Agric Univ*, 23 (5): 599–602 (in Chinese with English abstract) [张静, 赵正雄, 李宏光, 杨焕文, 丁金玲, 温永琴(2008). 红花大金元和K326烟苗生育及其生理指标差异比较. 云南农业大学学报, 23 (5): 599–602]
- Zhang ST (2007). Explore the feature of quality of Honghuadajinyuan variety. *J Hunan Agric Univ-Nat Sci*, 33 (2): 170–173 (in Chinese with English abstract) [张树堂(2007). 红花大金元品种品质特征. 湖南农业大学学报(自然科学版), 33 (2): 170–173]
- Zhang YY, He XL, Sun SW, Zhu ZG (2012). A preliminary study on the determination of organic carbon stable isotope of marine sediment by element analyzer-isotope ratio mass spectrometer. *Rock Miner Anal*, 31 (4): 627–631 (in Chinese with English abstract) [张媛媛, 贺行良, 孙书文, 朱志刚(2012). 元素分析仪-同位素比值质谱仪测定海洋沉积物有机碳稳定同位素方法初探. 岩矿测试, 31 (4): 627–631]

Physiological characterization of NO_3^- and NH_4^+ uptake kinetics of tobacco ‘K326’ and ‘Honghuadajinyuan’ using a short-time ^{15}N -substrate labeling approach

HE Ming-Jie^{1,3}, FAN Teng-Fei³, YANG Chao², CHEN Yi-Yin², LI Di-Qin¹, LI Chang-Jun^{2*}, LIU Lai-Hua^{1,3,*}

¹College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ²Chongqing Tobacco Science Research Institute, Chongqing 400715, China; ³Key Laboratory of Plant-Soil Interactions, Ministry of Education / College of Resources and Environmental Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract: In this article, by using a nutrient-hydroponic culture method, ^{15}N -substrate labeling and mass spectrum-based element measurement techniques, we identified firstly a minimum time when N was not transported to upper parts of two tobacco (*Nicotiana tabacum*) varieties after their root uptake of NH_4^+ and NO_3^- , and subsequently characterized processes and components of N absorption by roots. Our data show that the time for the movement of N from its uptake by the roots to the upper parts of the two varieties happened within only several minutes, and that at least two different systems for the N uptake should exist in the tobacco roots. When external N concentrations were $\leq 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, the process of the root N-uptake displayed an enzymatic action property; K_M values [i.e. ‘K326’: $84.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; ‘Honghuadajinyuan’ (‘HD’): $47.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$] for NO_3^- absorbed by the roots were significantly lower than that for NH_4^+ (‘K326’: $93.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; ‘HD’: $90.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), suggesting that the lower K_M for NH_4^+ or NO_3^- uptake by ‘HD’ would be one of critical physiological factors for a better tolerance of ‘HD’ to low N than that of ‘K326’. As external $\text{N} > 1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, N acquisition by the roots was positively proportional to external N concentrations; the rate of NO_3^- uptake by ‘K326’ was more than 2-fold higher than that of by ‘HD’, and the rate of NH_4^+ uptake by ‘K326’ was 2.4-fold lower than that of by ‘HD’; the uptake rate of ‘K326’ for NO_3^- was 3.6-fold higher than for NH_4^+ , and ‘HD’ for NO_3^- was half as many as for NH_4^+ . Our results may provide physiological evidence for further exploration of molecular mechanisms of N uptake by the roots of tobacco plants.

Key words: tobacco; ‘K326’; ‘Honghuadajinyuan’; ^{15}N -labeling; absorption kinetics

Received 2016-12-20 Accepted 2017-03-11

This work was supported by Science and Technology Plan Foundation of China Tobacco Corporation (Chongqing Tobacco Company) (Grant No. NY20140401070017).

*Corresponding author (E-mail: hnbjpxy@163.com; LL1025@cau.edu.cn).