

烟叶氨气补偿点的品种间差异及其与氮素代谢的关系研究

段旺军^{1,3}, 杨铁钊^{2*}, 刘化冰², 张小全², 戴亚³, 李东亮³

(1 河南农业大学博士后科研流动站, 河南郑州 450002; 2 河南农业大学烟草学院, 河南郑州 450002;

3 川渝中烟工业公司技术研发中心, 四川成都 610066)

摘要: 为了研究不同成熟特性的烤烟品种叶片氨气补偿点及其差异, 利用质外体提取方法对 3 个烤烟品种 NC89、K326 和中烟 90 的叶片质外体铵浓度和 pH 值进行了测定, 并计算不同品种叶片的氨气补偿点 (25℃); 同时探讨了氨气补偿点与氮素代谢的关系。结果表明, 叶片氨气补偿点随着叶片成熟衰老进程的推进而呈上升趋势; 烟草叶片成熟衰老期氨气补偿点与谷氨酰胺合成酶活性关系密切。衰老速度快、叶片氮素状况 (总氮和可溶性蛋白) 低的品种谷氨酰胺合成酶活性下降幅度大, 氨气补偿点升幅大, 绝对值也高。因此, 衰老速度快、叶片氮素状况低的品种在叶片衰老期具有更大的氨挥发潜力。品种间氨气补偿点的差异与它们的氮素代谢特性有关。

关键词: 烟草; 氨气补偿点; 氮素代谢; 谷氨酰胺合成酶

中图分类号: S572.01

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2011)02-0419-06

Differences in NH_3 compensation point among tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.) cultivars and its relationship with nitrogen metabolism

DUAN Wang-jun^{1,3}, YANG Tie-zhao^{2*}, LIU Hua-bing², ZHANG Xiao-quan², DAI Ya³, LI Dong-liang³

(1 Station of Postdoctor, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2 College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

3 Research and Development Center, China Tobacco Chuanyu Industrial Corporation, Chengdu, Sichuan 610066, China)

Abstract: To investigate NH_3 compensation point (χ_s) and its differences in leaves of three flue-cured tobacco genotypes, foliar apoplastic NH_4^+ concentration and pH were measured by apoplast extraction technique, the χ_s (25℃) was calculated, and the activities of related enzymes and nitrogen parameters of leaves were also analyzed. In the leaves of the three cultivars, an increase in χ_s was observed in leaves during senescence. Compared with the leaves of slow-senescing cultivar, the leaves of the rapid-senescing tobacco cultivar with lower N status had a stronger decrease in glutamine synthetase activity (GS, EC 6.3.1.2) and a more substantial increase in χ_s . These results indicate that the cultivars with rapid senescence and low nitrogen content in leaves may have a high potential for NH_3 emission from senescing leaves into the atmosphere, and the difference in χ_s values is related with the N metabolism of the cultivars.

Key words: tobacco (*Nicotiana tabacum* L.); NH_3 compensation point; N metabolism; glutamine synthetase

氮素是影响烟叶产量和品质的重要营养元素, 不同烟草品种具有不同的氮素代谢和肥料利用特

性^[1-2]。植物与大气之间存在氨交流^[3-4]。作物生长过程中氮素可以 NH_3 的形态挥发损失, 以生长后

收稿日期: 2009-11-25 接受日期: 2010-11-23

基金项目: 国家烟草专卖局资助项目(200912417), 河南省烟草专卖局重点资助项目(HYKJ200817)。

作者简介: 段旺军(1974—), 男, 河南许昌人, 博士, 助理研究员, 主要从事烟草育种和原料研究。

Tel: 0371-63558030, E-mail: duanwj2008@163.com。

* 通讯作者 Tel: 0371-63558030, E-mail: yangtiezhao@126.com

期氮挥发最剧烈^[5],这是由于叶片衰老过程中蛋白质的水解导致叶片 NH_4^+ 的积累^[4],同时参与同化 NH_4^+ 的酶,如谷氨酰胺合成酶(GS, EC 6.3.1.2)活性下降,从而提高了氨气补偿点的缘故^[5]。在叶片质外体溶液中存在一定浓度的 NH_4^+ ,维持叶片质外体空气间隙一定浓度的气体 NH_3 ,这一浓度称为氨气补偿点(χ_s)^[6],它是调控植物和大气氨气交流方向和强度的主要参数,受环境状况、植物生长特性、发育阶段、植株氮素状况和 GS 活性的影响^[3]。Stutte 和 da Silva^[7]发现,水稻(*Oryza sativa* L.)品种间氮挥发存在显著差异,生育期短的品种挥发损失的氮素少于生育期中等的品种;徐阳春等^[8]认为,不同水稻品种间氮挥发量与地上部氮素积累量呈极显著负相关;Husted 等^[9]也指出,大麦(*Hordeum vulgare* L.)基因型中总氮含量低的品种在灌浆期氮挥发量大;Mattsson 和 Schjoerring^[10]研究表明,*Lolium perenne* 和 *Bromus erectus* 不同基因型的氮挥发量可相差 1 倍以上。但氮挥发在烟草品种间的差异尚未见报道。衰老代表了叶片发育的最终阶段,是氮素再转移再利用的关键时期,研究不同烟草品种叶片的氨气补偿点及其调控机理,对深入了解它们的氮素利用特性具有重要意义。

本试验利用质外体提取等手段,研究了烟草品种在成熟衰老期的氨气补偿点、相关酶活性和氮素参数,探索基因型间氨气补偿点差异的生理机制,以期筛选低氮挥发量、高氮素利用率的烤烟品种和揭示不同品种间烟叶品质的差异提供依据。

1 材料与试验方法

1.1 试验设计

盆栽试验在河南农业大学网室内进行。供试土壤为黄壤土,中等肥力,取自河南农业大学农场(郑州)。参试品种为 NC89、K326 和中烟 90(ZY90),成熟衰老速度为:NC89 < K326 < 中烟 90^[11]。2009 年 5 月 17 日将 7 叶龄的烟草幼苗移栽至装有 10 kg 土的塑料桶中,每桶种植 1 棵,每个品种 20 株,重复 6 次。各品种施肥量相同,N、P、K 的用量分别为 0.13、0.13、0.39 g/kg,肥料分 3 次施入,取样前一周全部施完。自然光照和温湿度,隔天浇水一次,常规管理,不打顶。从下数第 14 叶的叶芽长 1 cm,宽 0.5 cm 时作为第 1 d,第 20 d 开始,每隔 10 d 取一次样,分析质外体铵浓度、质外体 pH、谷氨酰胺合成酶和谷氨酸脱氢酶(GDH, EC 1.4.1.2)活性、叶片 NH_4^+ 浓度、总氮和可溶性蛋白含量。

1.2 酶活性及叶片铵、总氮和可溶性蛋白的测定

1.2.1 谷氨酰胺合成酶(GS)活性的测定 将 1.0 g 鲜样置于预冷的研钵中,加入少许无菌石英砂,加入 2.5 mL 的 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6,含 1 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L EDTA 和 10 mmol/L β -巯基乙醇)冰浴研磨成糊状,匀浆液于 12000 r/min 离心 20 min,上清液即为粗酶液。按 O'Neal 和 Joy^[11]的方法测定粗酶提取液 GS 活性。一个 GS 活性单位定义为每分钟于 37℃ 催化 1 nmol 的 γ -谷氨酰异羟肟酸的产生所需要的酶量。

1.2.2 谷氨酸脱氢酶(GDH)活性的测定 1.0 g 鲜样加入 3 mL 的 Tris-HCl 缓冲液研磨匀浆,于 15000 r/min 离心 20 min,上清液即为酶液。按 Turano 等^[12]的方法在 340 nm 比色测定 GDH 活性。以每分钟反应混合液于 30℃ 减少 1 nmol/L 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

1.2.3 叶片铵、总氮和可溶性蛋白的测定 分别采用改良的茚满三酮法、凯氏定氮法、考马斯亮蓝 G-250 法^[13]测定。

1.3 质外体提取

质外体提取按文献[14, 15]的方法进行。将新鲜叶片用去离子水洗净,并用滤纸吸干水分。称取 1.5 g 左右,放入 50 mL 注射器中,再加入 280 mmol/L 山梨醇溶液约 30 mL。堵住注射器出气口,用力抽气约 1 min,使山梨醇溶液渗入叶片质外体,紧接着用力压气约 1 min,本过程重复 10 次,直到叶片颜色变成深绿色,表面有大量小气泡时为止。取出叶片,吸干表面水,将叶片在 4℃ 下以 2000 × g 的速率离心 10 min,得到质外体提取液。本试验得到提取液的量在 50 到 100 μL 之间。在室温(20 ~ 25℃)进行渗透,从取叶到提取结束控制在 20 min 以内。

细胞质污染检验:采用苹果酸脱氢酶(EC 1.1.1.38)测定法检验提取出的质外体溶液纯度,即质外体受细胞质污染的程度^[14]。称取采集的叶片 0.5 g 左右剪碎,加入提取液(0.1 mol/L 的 TES, 2 mmol/L 的 DTT 和 0.2 mmol/L EDTA, pH = 7.5)研磨成匀浆(叶片与提取液质量比 1:5),在 4℃ 以下 10000 × g 离心 10 min,取上清液 100 μL 与质外体提取液 100 μL 分别加入 3 mL 比色介质(0.094 mmol/L NADH, 0.17 mmol/L 草酰乙酸, 0.05 mol/L M TES)在 340 nm 比色,比较两者苹果酸脱氢酶活力。若质外体溶液苹果酸脱氢酶活力与叶片苹果酸脱氢酶活力比值小于 3% 即合格,本试验测定值为

1.84%。

1.4 质外体铵浓度和 pH 值测定

用连续流动分析仪(Bran Luebbe AA3)测定质外体 NH_4^+ 浓度。根据样品浓度不同,选用 NH_4^+ 0.1 和 1.0 或 1.0 和 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的标准溶液(NH_4Cl 去离子水溶液)。去离子水为零标准。质外体 pH 值用微电极(Mettler Toledo, Inlab 423, Electroly, 9811)直接在微型离心管内测定。

1.5 氨气补偿点计算

参照文献[4, 5, 16]的方法。在质外体 pH 值范围内,当 $K_d < [\text{H}^+]_{\text{apo}}$ 时,可按下式计算氨气补偿点(χ_s , 浓度为 NH_3 nmol/mol, air):

$$\chi_s = \Gamma \times K_H \times K_d$$

式中: Γ 为 $[\text{NH}_4^+]_{\text{apo}}$ 和 $[\text{H}^+]_{\text{apo}}$ 之比,代表不依赖于温度的氨气交换潜力; K_H 和 K_d 是热力学常数,分别为 $10^{-1.76}$ mol/L 和 $10^{-9.25}$ mol/L (25 $^{\circ}\text{C}$)。但由于质外体中离子生理强度(physiological ionic strength)通常在 14 到 28 mmol/L 之间^[17-18],取 20 mmol/L,依照 Debye-Hückel 方程^[19] K_d 值调整为 $K'_d = 10^{-9.32}$ mol/L (25 $^{\circ}\text{C}$)。

试验数据经 Excel 软件整理、作图,用 SPSS 进行统计分析。

2 结果分析

2.1 叶片质外体铵浓度、pH 值和氨气补偿点的变化动态

氨补偿点的理论值是根据叶片质外体 NH_4^+ 浓度与质外体 pH 值计算得到的,因此,质外体 NH_4^+ 浓度与 pH 值对植物叶片氨挥发有重要影响。图 1 看出,3 个品种的质外体铵浓度、pH 值都随着叶片的衰老而升高,其中质外体铵浓度在第 60 d 达到高点后下降;而质外体 pH 值和氨气补偿点在第 40 d 天达到最高点后即下降。中烟 90 的质外体铵浓度和 pH 值上升的幅度大于 NC89 和 K326;而在衰老末期,即从第 60 d 到第 70 d,中烟 90 下降的幅度又大于 NC89 和 K326。在衰老期间质外体铵浓度和 pH 值大体上呈现 NC89 < K326 < 中烟 90。

图 1 还看出,氨气补偿点随着叶片的衰老而升高,3 个品种变化趋势相似。在第 20 d 的未衰老叶片中很低,小于 1 nmol/mol;至第 30 d 有所升高,其中 NC89 上升较快,达到 2.12 ± 0.05 nmol/mol;在第 40 d 大幅上升,上升幅度为 NC89 < K326 < 中烟 90;随后逐渐下降至衰老末期。NC89、K326 和中烟 90 的最大值分别为 6.93 ± 1.41 、 17.67 ± 2.92

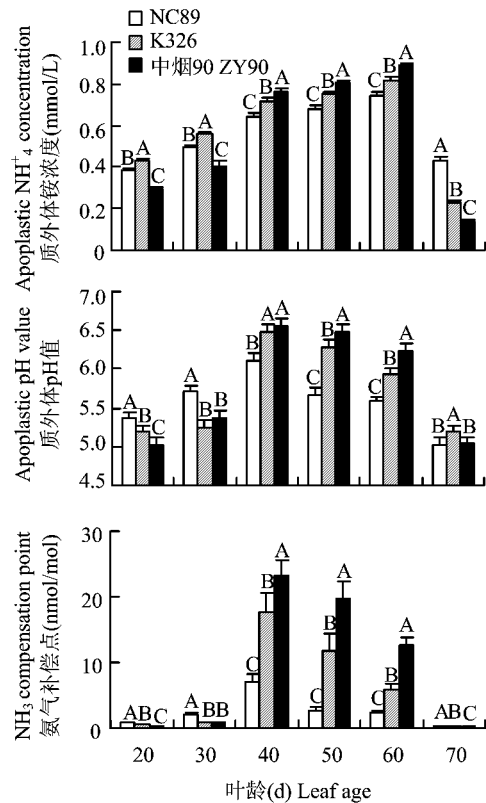


图 1 叶片质外体铵浓度、pH 值和氨气补偿点的变化
Fig. 1 Variations in apoplastic NH_4^+ concentration, pH and NH_3 compensation point of leaves

[注 (Note): 柱上不同字母表示差异达 1% 显著水平
Different letters above the bars mean significant at 1% level.]

和 23.14 ± 2.44 nmol/mol。从第 40 d 到第 60 d 是氨气补偿点的高峰阶段,3 个品种间差异达到极显著水平,表明中烟 90 和 K326 高峰阶段更加明显,具有更大的氨气挥发潜力。

2.2 叶片谷氨酰胺合成酶和谷氨酸脱氢酶活性的变化动态

谷氨酰胺合成酶(GS)是调控植物和大气氨气交流的关键酶^[20-21],在烟草叶片自然衰老过程中活性下降;谷氨酸脱氢酶(GDH)具有合成和脱氨的双重功能,在烟草叶片自然衰老过程中前者活性下降,后者活性升高^[22-23]。图 2 看出,3 个品种的 GS 或 GDH 在叶片成熟衰老过程中的变化趋势相似,只是活性大小和变化幅度有差异。生长至第 30 d, NC89、K326 和中烟 90 的叶片 GS 活性均达到高峰,分别为 136.35 ± 23.37 、 173.77 ± 16.81 和 228.60 ± 35.82 nmol/(mg · min), FW; 在第 40 d 大幅下降,分别减少至最大值的 71.29%、35.01% 和 10.14%; 到第 60 d 降至最低,第 70 d 又有所回升。从第 40 d 开始 GS 活性表现为: NC89

> K326 > 中烟 90, 且在第 40 d 到第 50 d 品种间的差异达到极显著水平; 但酶活性高峰(第 30 d)没有极显著差异。

氨气补偿点上升的幅度与 GS 酶活性下降幅度关系密切, 尤其第 40 d 表现明显。3 个品种的 GDH 活性在第 50 d 达到高峰, 分别为 213.21 ± 18.36 、 240.00 ± 22.34 和 261.93 ± 24.65 nmol/(mg · min), FW。随后开始大幅下降, 并且始终表现为 NC89 < K326 < 中烟 90; 但品种间在第 40 d 到第 50 d 的差异没有达到极显著水平。显然, GDH 与 GS 两种酶活性的变化趋势不同。

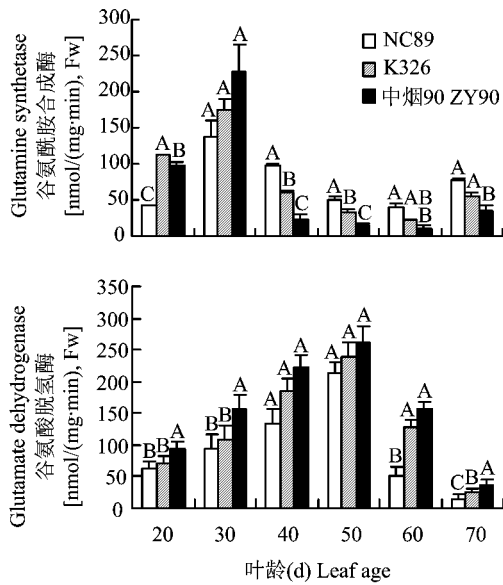


图 2 叶片谷氨酰胺合成酶和谷氨酸脱氢酶活性的变化
Fig. 2 Variations in the GS and GDH activities of tobacco leaves

[注(Notes): 柱上不同字母表示差异达 1% 显著水平
 Different letters above the bars mean significant at 1% level.]

2.3 叶片 NH₄⁺、总氮和可溶性蛋白含量的变化动态

植物体内的 NH₄⁺ 产生于硝酸还原、光呼吸、苯丙烷代谢、酰胺的降解和蛋白质代谢等过程中, 是一个核心中间体^[24], 又与质外体中的 NH₄⁺ 存在着直接交流。图 3 看出, 衰老开始之前随着 GS 的升高, 叶片 NH₄⁺ 浓度在第 30 d 出现了一个低点; 随着 GS 活性的下降, 它又开始升高至第 40 d, 然后再次下降。3 个品种的变化趋势相似, 但 NC89 和中烟 90 的变化幅度要大于 K326。NC89 和中烟 90 之间叶片 NH₄⁺ 浓度在第 30 d 到第 50 d 没有明显差异, 在第 60 d 差异极显著; 而二者与 K326 在第 20 d 和

第 40 d 差异极显著。

可溶性蛋白的主要成分是 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco), 特定叶龄的总氮和可溶性蛋白含量可以很好地反映作物氮素营养状况。叶片总氮和可溶性蛋白含量的变化趋势基本一致。3 个品种的氮素营养状况呈现 NC89 > K326 > 中烟 90 的趋势。总氮含量在整个测试期间差异达到极显著水平。总氮含量减少的最大百分率(第 40 到 70 d)分别为 NC89 40.40%、K326 59.48%、中烟 90 72.15%。除了 NC89 可溶性蛋白含量在衰老开始后有所下降外, 其它两个品种在衰老开始后并不立即下降, 而是继续小幅上升至第 40 d 才逐渐下降(图 3)。在第 20 d 到第 50 d, 中烟 90 与 NC89 和 K326 间的可溶性蛋白含量的差异达极显著水平, 但到衰老末期 3 个品种间差异较小。

尽管叶片衰老过程中 NH₄⁺ 的积累是蛋白质降解的结果^[22, 25], 但总氮和可溶性蛋白与叶片 NH₄⁺ 的变化并不完全一致, 而且品种间的差异显著性在各个时期也不相同。

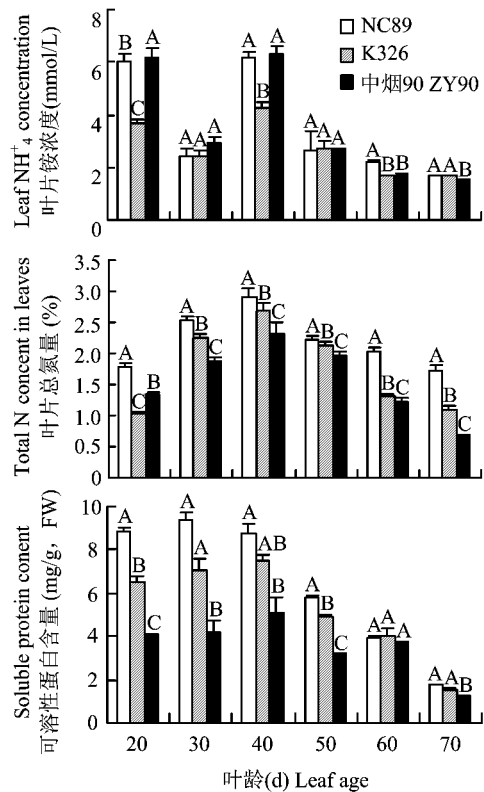


图 3 叶片氮素参数的变化
Fig. 3 Variations in the nitrogen parameters of tobacco leaves

[注(Notes): 柱上不同字母表示差异达 1% 显著水平
 Different letters above the bars mean significant at 1% level.]

3 讨论

本试验表明,在烟叶成熟衰老期氨气补偿点上升从而促进氨气挥发。3个烟草品种间氨气补偿点与叶片氮素状况(总氮和可溶性蛋白)呈负相关(图1,图3);与叶片衰老速度呈正相关,说明衰老叶片中氮素再转移再分配能力存在差异。衰老速度快的品种叶片中的氮素在衰老过程中再利用时,氨挥发损失的量大,总氮含量减少的百分率高。

烟草叶片GS活性在衰老过程中下降,3个品种间GS活性下降的幅度表现为NC89 < K326 < 中烟90,氨气补偿点上升的幅度与此相反。一些研究结果也表明,GS活性低的基因型氨挥发量比较高^[20, 26]。品种间GDH活性呈现NC89 < K326 < 中烟90的趋势。根据Tercé-Laforgue等^[27]的研究,当烟草叶片氮素再转移效率最高时,GDH基因的转录和酶活性非常低;而当氮素再转移受阻或叶片NH₄⁺积累时GDH活性受到高度诱导。但氨气补偿点与GDH变化趋势并不完全一致,这与GDH在叶片衰老过程中的作用是合成氨还是脱氨有关^[28-29],尚需进一步研究。

GS也是防止叶片NH₄⁺积累到有害浓度的关键酶^[30]。虽然在衰老开始后3个品种GS活性下降幅度呈现NC89 < K326 < 中烟90的趋势,且GS活性差异明显,但与NC89相比,叶片NH₄⁺浓度在中烟90与NC89之间差异不明显,K326叶片NH₄⁺浓度甚至小于NC89。表明作物可能存在某种相应的补偿机制来消除叶片NH₄⁺的积累或减少氮素损失^[31-32],同时也表明了通过质外体直接调控的氨气挥发是作物减少叶片氨害积累的一种重要途径。

参 考 文 献:

[1] 刘卫群,韩锦峰,史宏志,等. 数种烤烟品种中碳氮代谢与酶活性的研究[J]. 中国农业大学学报,1998,3(1):22-26.
Liu W Q, Han J F, Shi H Z *et al.* Relationship of carbon, nitrogen metabolism, enzyme activities and quality in flu-cured tobacco leaves[J]. J. China Agric. Univ., 1998, 3 (1): 22-26.

[2] 杨铁钊,林彩丽,丁永乐,等. 不同基因型烟草对氮素营养响应的差异研究[J]. 烟草科技,2001,157(6):32-35.
Yang T Z, Lin C L, Ding Y L *et al.* Study on response of different tobacco genotypes to nitrogen nutrition[J]. Tobacco Sci. Tech., 2001, 157 (6): 32-35.

[3] Sommer S G, Schjoerring J K, Denmead O T. Ammonia emission from mineral fertilizers and fertilized crops[J]. Adv. Agron., 2004, 82: 657-622.

[4] Herrmann B, Mattsson M, Jones S K *et al.* Vertical structure and

diurnal variability of ammonia exchange potential within an intensively managed grass canopy[J]. Biogeosciences, 2009, 6: 15-23.

[5] Massad R S, Loubet B, Tuzet A *et al.* Relationship between ammonia stomatal compensation point and nitrogen metabolism in arable crops: Current status of knowledge and potential modelling approaches[J]. Environ. Poll., 2008, 154: 390-403.

[6] Farquhar G D, Firth P M, Wetselaar R *et al.* On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment. Determination of the ammonia compensation point[J]. Plant Physiol., 1980, 66: 710-714.

[7] Stutte C A, da Silva P R F. Nitrogen volatilization from rice leaves I. Effects of genotype and air temperature[J]. Crop Sci., 1981, 21: 596-600.

[8] 徐阳春,吴小庆,郭世伟,等. 水稻生育后期地上部氨挥发与氮素利用效率的研究[J]. 植物营养与肥料学报,2008,14(2): 207-212.
Xu Y C, Wu X Q, Guo S W *et al.* Nitrogen use efficiency and ammonia volatilization from rice shoot in late growth stages[J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2008, 14 (2): 207-212.

[9] Husted S, Mattsson M, Schjoerring J K. Ammonia compensation points in two cultivars of *Hordeum vulgare* L. during vegetative and generative growth[J]. Plant Cell Environ., 1996, 19: 1299-1306.

[10] Mattsson M, Schjoerring J K. Dynamic and steady-state responses of inorganic nitrogen pools and NH₃ exchange in leaves of *Lolium perenne* and *Bromus erectus* to changes in root supply[J]. Plant Physiol., 2002, 128: 742-750.

[11] O'Neal D, Joy K W. Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima[J]. Arch. Biochem. Biophys., 1973, 159: 113-122.

[12] Turano F J, Dashner R, Upadhyaya A *et al.* Purification of mitochondrial glutamate dehydrogenase from dark-grown soybean seedlings[J]. Plant Physiol., 1996, 112: 1357-1364.

[13] 中国科学院上海植物生理研究所,上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999.
Institute of Plant Physiology, CAS, Shanghai Society of Plant Physiology. Experimental guideline of modern plant physiology [M]. Beijing: Science Press, 1999.

[14] Husted S, Schjoerring J K. Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L. [J]. Plant Physiol., 1995, 109: 1453-1460.

[15] Loubet B, Milford C, Hill P W *et al.* Seasonal variability of apoplastic NH₄⁺ and pH in an intensively managed grassland[J]. Plant Soil, 2002, 238: 97-110.

[16] Husted S, Schjoerring J K. Ammonia flux between oilseed rape plants and the atmosphere in response to changes in leaf temperature, light intensity and air humidity[J]. Plant Physiol., 1996, 112: 67-74.

[17] Cosgrove D J, Cleland R E. Solute in the free space of growing tissues[J]. Plant Physiol., 1983, 72: 326-331.

[18] Speer M, Kaiser W M. Ion relations of symplastic and apoplastic

- space in leaves from *Spinacia oleracea* L. and *Pisum sativum* L. under salinity[J]. *Plant Physiol.*, 1991, 97: 990–997.
- [19] Atkins P W. *Physical chemistry*[M]. Oxford: Oxford University Press, 1990.
- [20] Mattsson M, Häusler R E, Leegood R C *et al.* Leaf-atmosphere ammonia exchange in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase[J]. *Plant Physiol.*, 1997, 114: 1307–1312.
- [21] Schjoerring J K, Husted S, Mäck G *et al.* Physiological regulation of plant-atmosphere ammonia exchange [J]. *Plant Soil*, 2000, 221: 95–101.
- [22] Masclaux C, Valadier M H, Brugière N *et al.* Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence [J]. *Planta*, 2000, 211: 510–518.
- [23] Masclaux-Daubresse C, Valadier M H, Carrayol E *et al.* Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves[J]. *Plant Cell Environ.*, 2002, 25: 1451–1462.
- [24] Joy K W. Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon-nitrogen interface[J]. *Can. J. Bot.*, 1988, 66: 2103–2109.
- [25] Feller U, Fischer A. Nitrogen metabolism in senescing leaves [J]. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1994, 13: 241–273.
- [26] Husted S, Mattsson M, Möllers C *et al.* Photorespiratory NH_4^+ production in leaves of wild-type and glutamine synthetase 2 antisense oilseed rape[J]. *Plant Physiol.*, 2002, 130: 989–998.
- [27] Tercé-Laforgue T, Mäck G, Hirel B. New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants grown under different nitrogen regimes[J]. *Physiol. Plant.*, 2004, 120: 220–228.
- [28] Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K *et al.* Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco[J]. *Plant Physiol.*, 2006, 140: 444–456.
- [29] Skopelitis D S, Paranychianakis N V, Kouvarakis A *et al.* The isoenzyme 7 of tobacco NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase exhibits high deaminating and low aminating activities in vivo[J]. *Plant Physiol.*, 2007, 145: 1726–1734.
- [30] Schjoerring J K, Husted S, Mäck G *et al.* The regulation of ammonium translocation in plants[J]. *J. Exp. Bot.*, 2002, 53: 883–890.
- [31] Häusler R E, Bailey K J, Lea P J *et al.* Control of photosynthesis in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase and glutamate synthase III. Aspects of glyoxylate metabolism and effects of glyoxylate on the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase[J]. *Planta*, 1996, 200: 388–396.
- [32] Häusler R E, Blackwell R D, Lea P J *et al.* Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase I. Plant characteristics and changes in nitrate, ammonium and amino acids[J]. *Planta*, 1994, 194: 406–417.