

# 供氮水平对苹果砧木 ‘M9T337’ 幼苗生长和 GS、GOGAT、AS 基因表达的影响

侯 昕, 徐新翔, 贾志航, 于天武, 葛顺峰\*, 姜远茂\*

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

**摘 要:** 以水培条件下苹果砧木 ‘M9T337’ 幼苗为试材, 研究了低、适宜和高供氮水平下 (0.5、5 和 25 mmol · L<sup>-1</sup>) 谷氨酰胺合成酶 (GS)、谷氨酸合成酶 (GOGAT)、天冬酰胺合成酶 (AS) 基因表达的变化。结果表明, 在低氮处理下, 根系中 GS 基因表达量上升幅度明显高于 GOGAT 和 AS, 基本趋势是先上调表达后下调表达, 叶片中 3 个基因表达量基本趋于稳定, 低氮处理 1 d 时 GOGAT 基因在根系中几乎趋于不表达。随着氮素水平的提高, 根系中 GS 和 GOGAT 基因的表达呈先上调再下调表达的动态变化, 叶片中 GS 和 GOGAT 基因的表达量升高, AS 基因无显著变化, 高氮处理下, GS 和 GOGAT 的基因表达受到抑制, GOGAT 基因在根系中表达量极低, 但叶片表达量明显高于根系表达量。因此, AS 和 GS 参与苹果根系对低氮胁迫的响应, 适宜氮水平能够诱导氮代谢关键酶在氮代谢循环中发挥作用, 而高氮水平则抑制氮代谢关键酶的基因表达, 对植物氮代谢有负面影响。

**关键词:** 苹果; 砧木; 氮代谢; 供氮水平; 基因表达

**中图分类号:** S 661.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2019) 11-2239-10

## Effect of Nitrogen Supply Levels on Growth and Expression of Glutamine, Glutamate and Asparagine Synthase Genes of ‘M9T337’ Apple Rootstock

HOU Xin, XU Xinxiang, JIA Zhihang, YU Tianwu, GE Shunfeng\*, and JIANG Yuanmao\*

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** The gene expression characteristics of glutamine synthetase (GS), glutamate synthetase (GOGAT), asparagine synthetase (AS) of ‘M9T337’ apple seedlings at different nitrogen levels (0.5, 5 and 25 mmol · L<sup>-1</sup>) were analyzed in hydroponic conditions. The results showed that, under low nitrogen stress treatment, the increase of GS gene expression in the underground part was significantly higher than that of GOGAT and AS, and the basic trend was up-regulated first and down-regulated later, and the expression levels of three genes in the overground part basically tended to be stable, and the expression of GOGAT in the root system basically tended to be not expressed after 1 d of low nitrogen treatment. With the increase of nitrogen level, the expression of GS and GOGAT genes in roots was up-regulated and then

**收稿日期:** 2019-07-10; **修回日期:** 2019-08-19

**基金项目:** 国家重点研发计划项目 (2016YFD0201100); 国家自然科学基金项目 (31501713); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-27)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: geshunfeng210@126.com; ymjjiang@sdau.edu.cn)

down-regulated, the expression of *GS* and *GOGAT* genes in leaves increased, and there was no significant difference in the change of *AS*. Under high nitrogen treatment, the gene expression of *GS* and *GOGAT* was inhibited, and the expression of *GOGAT* is extremely low in the root system, but the expression level in the overground part was significantly higher than that in the underground part. So, the *AS* and *GS* are involved in the response of apple root system to low nitrogen stress, and appropriate nitrogen level can induce the nitrogen metabolism key enzymes play a role in nitrogen metabolism circulation; however, high nitrogen level can inhibit the gene expression of nitrogen metabolism key enzymes in nitrogen metabolism, which had a negative effect on nitrogen metabolism in plants.

**Keywords:** apple; rootstock; nitrogen metabolism; nitrogen supply level; gene expression

中国苹果的栽培面积、产量均居世界首位（陈学森等，2010；李晶等，2015）。随着苹果产业的快速发展，人们通过施用大量化学肥料来提高产量，其氮肥用量往往超过了树体需求量（葛顺峰，2014），氮肥的吸收利用效率在不断下降，施入土壤的氮素在果园中被果实带走的不足20%（彭福田等，2003）。氮素被称为“生命元素”，是苹果必需的矿质营养元素之一，是限制植物生长和产量形成的首要因素。氮素进入植物体后的代谢是一个相当重要的生理过程，它直接影响到作物的产量和品质（初建青等，2012）。因此，通过研究苹果不同供氮水平下氮代谢相关酶基因的表达水平，对于进一步提高氮素利用率，减少氮肥施用有重要应用价值。目前功能基因组学研究已经鉴定出一些与氮代谢分配相关的重要酶类（Buchanan et al., 2003; Guo et al., 2004; Masclaux-Daubresse et al., 2010），其中包括谷氨酰胺合成酶（*GS*）、天冬酰胺合成酶（*AS*）等关键酶（Masclaux-Daubresse et al., 2008）。有研究发现，不同作物品种、同一种作物不同器官组织中有关酶的活性对于施氮量、施用时间等均呈现不同的反应（刚爽等，2010；李庆余等，2010）。马宗桓等（2018）研究发现，不同施氮时期氮素通过诱导叶片 *GS*、*GOGAT* 基因的反应，从而调控叶片中氮素代谢酶活性增加，促进了氮素的积累。冯卓等（2012）在‘津研4号’黄瓜上利用 qRT-PCR 分析发现，在低氮条件下（供氮浓度 0、1、2 和 4 mmol · L<sup>-1</sup>），*GS* 基因下调表达，随着氮素的增加 *GS* 基因的表达量逐渐升高，而在高氮条件下（供氮浓度 9 和 11 mmol · L<sup>-1</sup>）*GS* 基因的表达同样受到抑制。张翼飞（2013）在甜菜上的研究表明，不同供氮水平处理对 *GOGAT* 的表达均有促进作用，且均显著的高于对照处理，但施氮过量反而限制 *GOGAT* 表达量的提高，不利于 *GOGAT* 表达水平的提升，120 kg · hm<sup>-2</sup> 为 *GOGAT* 表达量最高的氮素水平处理条件。王剑等（2016）以‘夏黑’葡萄为试材，通过叶面喷施 4 种不同浓度的氮肥发现，较低供氮水平（0.2%浓度）可以快速诱导 *AS* 的表达，适宜浓度（0.4%浓度）能够长时间使 *AS* 维持较高的表达水平。Muttucumaru 等（2014）通过马铃薯同位素标记发现，*AS* 基因参与氮素的同化。Nakano 等（2000）通过 Northern 杂交分析表明 *AS* 基因在同一水稻植株不同组织中的表达水平不同，在同一组织不同发育时期的表达水平也不同。初建青等（2012）利用 Vitis EST 数据库中 EST 序列片段结合 RT-PCR 方法克隆了与氮代谢相关的（*NR*）、亚硝酸还原酶（*NiR*）、谷氨酰胺合成酶（*GS*）、谷氨酸脱氢酶（*GDH*）和天冬酰胺合成酶（*AS*）的基因，发现以 0.3%和 0.5%浓度的尿素对 5 个基因的表达水平影响明显，5 个基因在幼叶的表达水平显著高于老叶，并且在不同时间段的表达水平也不一致。温明章等（2008）指出，在作物产量形成中氮素及其代谢起到中心作用。由此可见，研究氮代谢酶相关基因在氮代谢途径中的作用，对于进一步提高氮素利用率有重要价值。但以往的研究主要是在氮代谢酶系统进行单一的研究，且多数研究在一年生作物中进行。

苹果砧木为果树提供根系，根系作为苹果养分和水分的主要吸收器官，苹果通过根系来进行物

质交换, 通过适应土壤中氮素供应强度的变化, 协调根系与地上部的生长, 从而提高氮素利用率, 促进苹果生长。本试验中利用 qPCR 技术研究不同供氮水平下苹果砧木 ‘M9T337’ 幼苗体内 3 个氮素代谢关键酶基因 (*GS*、*GOGAT*、*AS*) 的表达情况, 为揭示氮素分配的机制, 提高氮分配效率和氮素利用率提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料与处理

采用苹果砧木 ‘M9T337’ 于 2018 年 4 月 18 日在山东农业大学园艺实验站进行水培试验。待黑色塑料钵栽植的幼苗长到 5 片真叶时 (高度 10 cm 左右) 定植到泡沫板上, 去掉子叶 (避免子叶中额外的营养供给)。试验采用全硝态氮 [ $\text{Ca} (^{15}\text{NO}_3)_2$ , 上海化工研究院生产, 丰度为 10.14%] 为唯一氮源。根据预试验中 (供氮浓度为 0、2.5、5、10 和 20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理后, 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理下苹果幼苗长势最好, 因此将适宜供氮浓度设为 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。试验设低氮、适宜氮和高氮 3 个供氮水平处理, 即 0.5、5 和 25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每盆加入营养液 7 L, 通过泡沫板上的小孔连接通气管和气泵, 正常通气 (30  $\text{min} \cdot \text{h}^{-1}$ ), 每个处理 21 株, 共 63 株。先用 1/2 浓度霍格兰营养液预培养 7 d 后更换为全浓度霍格兰营养液, 之后每隔 3 d 更换 1 次营养液, 每日定时通气。低氮处理下, 其它成分不变, 缺少的  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{K}^{+}$  分别用  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{K}_2\text{SO}_4$  补足。试验所用溶液均用蒸馏水配制, 用  $\text{H}_3\text{PO}_4$  或  $\text{NaOH}$  将营养液 pH 调至  $6.0 \pm 0.1$ , 每个处理均加硝化抑制剂双氰胺。

试验于处理 1、3、5、7、14 和 28 d 后对叶片和根系取样, 每个处理每次取 3 株, 每份 1 g, 将其放入液氮速冻, 之后在  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  下保存备用, 用于基因表达量的测定。

2018 年 5 月 16 日, 每个处理各选取 3 株长势一致的苹果幼苗的根系, 经清水冲洗后用投射扫描仪和根系分析软件进行根系长度、根系表面积、根尖数分析。将 9 株进行完根系形态指标分析的植株整株解析成地上部、地下部两部分, 放入牛皮纸信封  $105\text{ }^\circ\text{C}$  杀青 30 min,  $80\text{ }^\circ\text{C}$  烘干至恒重, 用万分之一电子天平称量干质量, 并计算根冠比。

### 1.2 RNA 提取与反转录

采用北京诺贝莱生物科技有限公司 RNA 试剂盒提取苹果叶片和根系的总 RNA, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性进行反转录, RNA 反转录使用 abm 反转录试剂盒 5X All-In-One RT MasterMix (with AccuRT Genomic DNA Removal Kit), 反转录体系为 20  $\mu\text{L}$ , 步骤为 RNA 模板 6  $\mu\text{L}$ , AccuRT Reaction Mix (4X) 2  $\mu\text{L}$  在  $42\text{ }^\circ\text{C}$  条件下反应 2 min, 然后加 AccuRT Reaction Stopper (5X) 2  $\mu\text{L}$ , 通过以上步骤可得到纯 RNA, 然后添加 5X All-In-One RT Master Mix 4  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  6  $\mu\text{L}$  补足反应体系 20  $\mu\text{L}$ , 然后  $25\text{ }^\circ\text{C}$  10 min,  $42\text{ }^\circ\text{C}$  15 min 及  $85\text{ }^\circ\text{C}$  5 min 即可得到 cDNA。

### 1.3 荧光定量 PCR

qPCR 定量检测使用的是 LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪 (Roche), qPCR 的反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 其中包括  $2 \times$  SYBR Green qPCR master mix 10  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (表 1) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  补足 20  $\mu\text{L}$  (Bestar<sup>®</sup> SYBR Green qPCR master mix)。

qPCR 条件为:  $95\text{ }^\circ\text{C}$  预变性 2 min, 然后以  $95\text{ }^\circ\text{C}$  变性 10 s,  $T_m$  退火 20 s,  $72\text{ }^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 进行 40 个循环, 反应结束后分析荧光值变化曲线以及熔解曲线。

表 1 引物序列  
 Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	序列 (5'-3') Sequence
<i>Actin</i>	F: TGGTGCATGGTTGGTATGG; R: CCGTGCTCAATGGGATACTT
<i>AS</i>	F: GCTGTGGTGAAGAGACTTATGA; R: GAATCAGCCAAATAGCGACAAG
<i>GOGAT</i>	F: TGGCTGCACTAGCATCATAAA; R: CCCATAATCCACACGGAATACA
<i>GS</i>	F: CTGTGGGCTGCTCGTTATATT; R: CATGGACTTGGTGCTGTAGTT

## 1.4 数据分析

每处理 3 个生物学重复, 每 1 个反应做 3 个复孔。将得到的 qPCR 数据, 通过比较  $C_T$  法 ( $\Delta\Delta C_T$ ) 计算基因表达量。

数据采用 Microsoft excel 2016 处理, 采用 SPSS 19.0 处理系统单因素试验统计分析方法进行显著性分析, 多重比较采用 LSD 法, 利用 Excel 2016 软件作图, 图表中数据为平均值  $\pm$  标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 供氮水平对 'M9T337' 苹果砧木幼苗根系生长形态的影响

由表 2 可以看出, 氮素水平对 'M9T337' 苹果砧木根冠的生长有明显的调节作用, 在 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> N 处理下根冠比分别为 5 和 25 mmol · L<sup>-1</sup> N 处理的 169%和 185%, 随着供氮水平的增加根冠比降低。0.5 mmol · L<sup>-1</sup> N 处理下的根系长度、根系总表面积、根尖数分别为 5 和 25 mmol · L<sup>-1</sup> N 处理下的 160%和 191%、139%和 155%、157%和 387%。可见低氮水平显著促进了根系生长, 而高氮水平则抑制根系的生长, 促进地上部生长。

表 2 不同供氮水平下 'M9T337' 苹果砧木幼苗根冠比和根系形态指标  
 Table 2 Shoot to root ratio and roots morphology index of 'M9T337' rootstocks seedlings under different nitrogen levels

N/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	干质量/(g · plant <sup>-1</sup> ) Dry mass			根冠比/% Root/shoot ratio	根系长/cm Root length	根系总表面积/cm <sup>2</sup> Root surface area	根尖数 Number of tips
	根系 Root	茎 Stem	叶片 Leaf				
0.5	1.70 ± 0.03 a	0.58 ± 0.03 c	1.62 ± 0.02 c	0.76 ± 0.01 a	2 516.92 ± 147.87 a	635.79 ± 13.20 a	2 515.67 ± 110.87 a
5	1.52 ± 0.03 b	0.94 ± 0.02 a	2.47 ± 0.06 a	0.45 ± 0.02 b	1 572.54 ± 56.26 b	456.09 ± 37.32 b	1 605.67 ± 95.89 b
25	1.25 ± 0.03 c	0.78 ± 0.02 b	2.23 ± 0.04 b	0.41 ± 0.01 c	1 320.26 ± 60.22 c	408.89 ± 24.30 b	650.33 ± 93.43 c

注: 同列数据后不同字母表示处理间差异达 5%显著水平。

Note: Values followed by different letters in a column indicate significant differences among the treatments at the 5% level.

### 2.2 供氮水平对 'M9T337' 苹果砧木幼苗谷氨酰胺合成酶基因表达的影响

由图 1 可见, 不同供氮水平处理 3 d 内, 叶片中 *GS* 表达量差异不显著。5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理呈先上调表达, 再下调表达的动态变化, 在 7 d 时出现峰值, 同一时期为 0.5 和 25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理的 1.8 倍和 13.5 倍; 而 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理趋于稳定; 25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理一直处于较低水平, 显著低于 0.5 和 5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理, 说明当氮素浓度继续升高, *GS* 基因的表达受到抑制。

根系中 *GS* 基因的表达量, 在 0.5 和 5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理中也呈先上调表达, 再下调表达的趋势, 但 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理下变幅大, 缺氮 7 d 时表达量明显升高, 5 和 25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理 5 d 后差异不显著, 且均显著低于 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理, 说明 *GS* 对低氮胁迫极其敏感; 25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理下显著

下降, 表明 *GS* 基因的表达受到抑制。

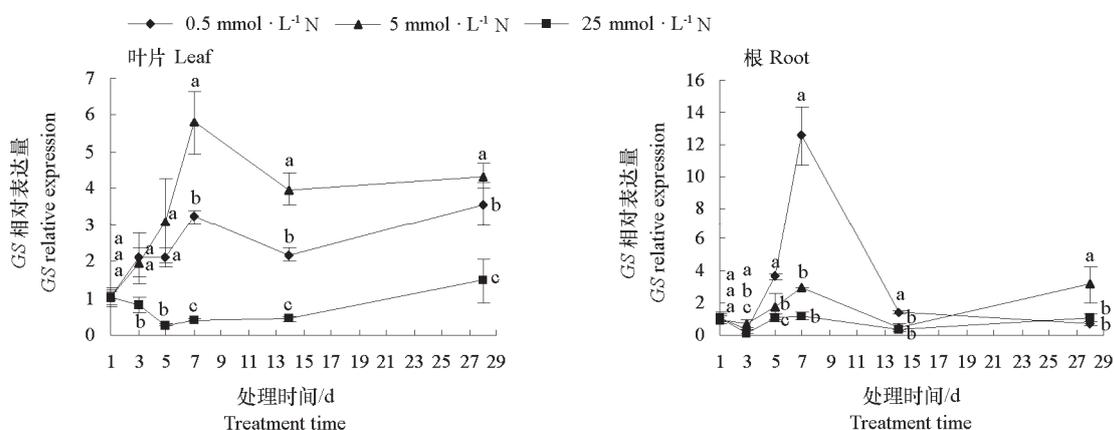


图 1 不同供氮水平下 ‘M9T337’ 苹果砧木幼苗叶片及根系的 *GS* 基因表达特性分析

同一时间不同小写字母表示不同处理间的差异显著。下同。

Fig. 1 Analysis of *GS* gene expression characteristics in leaves and roots of ‘M9T337’ rootstocks seedlings under different nitrogen supply levels

Different small letters on the line indicate significant differences among different treatments at the same time. The same below.

### 2.3 供氮水平对 ‘M9T337’ 苹果砧木幼苗谷氨酰胺合成酶基因表达的影响

如图 2 所示, 处理 1 d 时, 0.5、5 和 25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理间叶片中 *GOGAT* 表达量差异不显著, 处理 1 d 后不同氮素水平条件下, 5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理最高, 至处理第 28 天, 增幅达 118.3%, 25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理下表达量保持较低水平, 这说明一定氮浓度范围内, 随施用氮素水平的增加, 叶片中 *GOGAT* 表达量也增加, 但超过适宜水平, 施氮反而限制了 *GOGAT* 表达的提高。

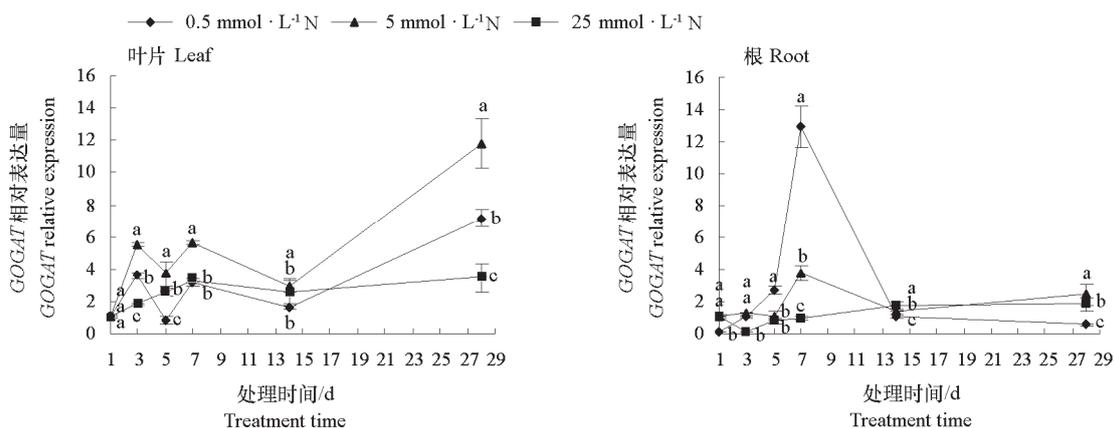


图 2 不同供氮水平下 ‘M9T337’ 苹果砧木幼苗叶片及根系的 *GOGAT* 基因表达特性分析

Fig. 2 Analysis of *GOGAT* gene expression characteristics in leaves and roots of ‘M9T337’ rootstocks seedlings under different nitrogen supply levels

根系中 *GOGAT* 表达量 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理 1 d 时, *GOGAT* 在苹果根系表达量极低, 随后呈上升趋势, 7 d 时达到峰值, 分别是 5 和 25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理的 3.44 倍和 14.4 倍, 随后下调表达。5 mmol · L<sup>-1</sup>

处理中, *GOGAT* 表达量有所提高, 7 d 后下降。25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理中一直保持较低水平, 可见高氮水平抑制 *GOGAT* 的表达。

## 2.4 供氮水平对 'M9T337' 苹果砧木幼苗天冬酰胺合成酶基因表达的影响

由图 3 可知, 除 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理 3 d 外, *AS* 在叶片的表达量均趋于稳定, 说明 *AS* 基因在苹果叶片中响应程度不高。但在 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理 *AS* 基因表达水平略高于其他处理, 说明随着供氮水平的提高, 叶片中 *AS* 基因的表达受到抑制。除处理 1 和 5 d 外, 叶片中 *AS* 表达量为 0.5 > 5 > 25 mmol · L<sup>-1</sup>, 各处理间差异达显著水平。

根系中 *AS* 基因在 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理下表达趋势为先下调表达, 再上调表达, 又下调表达的变化动态, 说明 *AS* 可能参与短期低氮条件下根系氮素的同化反应。处理 5 d 内, 0.5、5 和 25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理间根系中 *GS* 表达量差异不显著; 处理 5 ~ 14 d, 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理显著高于 5 和 25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理; 处理 14 d 以后, 5 mmol · L<sup>-1</sup> 处理表达量有所上升, 25 mmol · L<sup>-1</sup> 处理下 *AS* 基因表达水平明显受到抑制。低氮水平处理下根系 *AS* 的表达量到达峰值的时间 (7 d) 比叶片 (3 d) 晚, 上调幅度比叶片高。进一步说明 *AS* 基因在不同供氮水平、不同器官中表达水平不同。

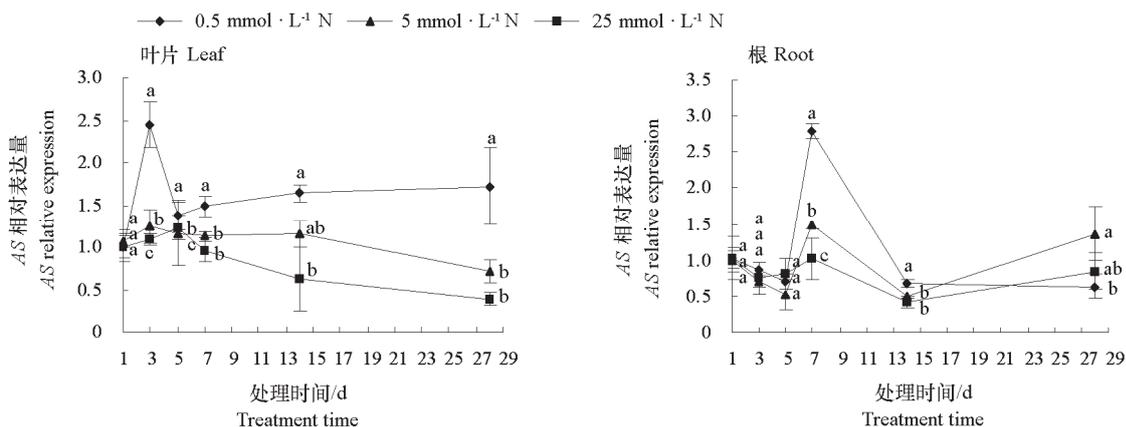


图 3 不同供氮水平下 'M9T337' 苹果砧木幼苗叶片及根系的 *AS* 基因表达特性分析  
Fig. 3 Analysis of *AS* gene expression characteristics in leaves and roots of 'M9T337' rootstocks seedlings under different nitrogen supply levels

## 3 讨论

### 3.1 供氮水平对 'M9T337' 苹果砧木幼苗根冠比和根系生长形态的影响

植物遇到养分供应强度的改变首先会调节根系的生长及生理学反应 (Forde, 2014)。缺氮导致根冠比升高是一个普遍存在的生理学现象。有研究表明, 在一定氮浓度范围内, 根冠比随浓度的提高而下降 (彭玲 等, 2018), 在水稻 (李洪亮 等, 2012)、菊花 (郭芸琿 等, 2017) 上均有报道。如果田间氮素胁迫水平不足以使玉米减产 20% 以上, 则增施氮肥虽然使地上部生物量增加, 但根质量下降 (Barber & Siberbush, 1984)。本试验研究表明, 在低氮条件下根冠比最高, 随着供氮水平的增加根冠比降低。

已有研究表明, 过量施氮抑制根系的生长 (王树起 等, 2009; 崔红艳 等, 2015), 本研究中

也发现过量施氮条件下, 苹果砧木 ‘M9T337’ 根系长度、根总表面积及根尖数相比适宜氮浓度降低了 16.0%、10.3% 和 59.5%, 不利于根系的生长。综上, 供氮水平对根系生长发育的影响表现在低氮水平下增加根冠比, 促进根系生长, 高氮水平下根系形态指标明显下降, 从而抑制根系生长。

### 3.2 供氮水平对 ‘M9T337’ 苹果砧木幼苗 *GS*、*GOGAT* 和 *AS* 基因表达的影响

*GS* 是植物氮代谢中心的关键酶, 催化无机氮转变为有机氮的第一步反应, 其基因表达的高低可反应氮素同化能力的强弱。李彩凤等 (2003)、赵越等 (2006) 在甜菜上的研究结果均表明通过提高氮素水平可以提高 *GS* 的活力。本研究结果显示, *GS* 在苹果叶片和根中的表达均显著受供氮水平的影响。在不同供氮水平处理下,  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理叶片中 *GS* 表达量最高, 在处理 7 d 时出现峰值, 说明 *GS* 是叶片进行氮同化的主要酶, 苹果通过调控酶的基因表达来调控氮代谢。综合比较  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理下叶片和根系 *GS* 表达水平可知, 叶片 *GS* 的表达量高于根系 *GS* 表达量, 并且上调表达幅度叶片也高于根系。这与陈志英 (2008) 在甜菜上的研究结果不同, 这说明 *GS* 在苹果叶片中参与氮素同化, 主要在叶片中起作用调节氮代谢。

高等植物体内, *GOGAT* 主要负责含氮化合物的转移运输, 在氮素转运和再利用过程中起重要作用。早期研究表明, 通过提高 *GOGAT* 基因的表达可以促进玉米籽粒灌浆 (Hirel et al., 2007), 增加碳氮积累和生物量 (Chichkova et al., 2001)。本研究中, 不同供氮水平对苹果叶片 *GOGAT* 的表达均有促进作用, 且在叶片中 *GOGAT* 基因表达的上升幅度显著高于 *GS* 和 *AS* 基因表达的上升幅度。在一定供氮水平范围内, 随供氮水平的增加 *GOGAT* 表达量也增加, 但超过适宜供氮水平, 施氮反而限制了 *GOGAT* 基因的表达。另外还发现其中  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  水平处理时叶片中 *GOGAT* 表达水平较高, 在处理 7 d 时出现峰值, *GOGAT* 和 *GS* 的表达趋势大体一致, 说明在苹果 *GS/GOGAT* 循环中, *GS* 和 *GOGAT* 同时起作用, 是苹果进行氮同化的主要酶。这与张华珍和徐恒玉 (2011) 的研究结果一致。

*AS* 是植物氮代谢中的关键酶, 在植物氮素同化与分配上发挥着重要作用, 其产物天冬酰胺 (Asn) 是植物体内有机氮运输和储存的主要形式之一。*AS* 在协调植物体蛋白合成的源库关系及提高氮素利用效率中具有明显作用。Miflin 和 Habash (2002) 研究发现, 小麦的 3 个 *AS* 基因表达水平都在低氮处理下上调。本研究表明, 与叶片相比, *AS* 基因在苹果根系的表达量最高, 但是在  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 7 d 之后根系中 *AS* 基因开始下调表达, 表达量明显下降, 这与王剑等 (2016) 的研究结果一致, 说明 *AS* 基因只参与短期低氮胁迫调控, *AS* 基因可能参与苹果根系氮素的同化反应, 可以显著提高苹果对低氮胁迫的耐性, 能在一定程度上克服或缓解供氮水平不足带来的影响, 有利于苹果在低氮条件下维持生长。在长期氮素供应不足的情况下, 从外界获取氮素营养才能从根本上解决氮素不足带来的影响。在不同氮素水平下, 苹果根系 *AS* 基因表达变化整体表现为单峰曲线变化, 均在  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 7 d 时达到峰值, 这可能是由于苹果根系逐渐分化需要较多的氮素营养, 从而促进 *AS* 基因在根系中的过量表达。

以上研究结果表明, 苹果体内氮素代谢关键酶在生长发育过程中, 其基因表达具有时空特异性。通过氮素代谢关键酶基因表达水平的不一致, 说明苹果氮代谢、分配与利用等过程受众多基因的影响。不同供氮水平对氮代谢关键酶基因表达具有促进或抑制作用, 适宜的供氮水平可以有效地促进氮代谢相关酶基因的表达, 促进氮的高效吸收、分配和利用。进一步说明可以通过基因转录调控角度, 调控苹果氮代谢关键酶基因的表达水平, 从而诱导相关酶在氮代谢中发挥作用。

## 4 结论

综上, 通过 3 个供氮水平处理对比发现, 低氮胁迫处理下苹果砧木 'M9T337' 幼苗根系 *AS* 和 *GS* 基因表达水平高于叶片, 说明 *AS* 和 *GS* 参与苹果根系对低氮胁迫的响应, 植株通过调节酶的基因表达来应对低氮胁迫, 低氮水平促进根系生长。适宜氮水平在同一时间段对 *GS*、*GOGAT* 基因的表达促进影响更为明显, 说明适当提高供氮水平能够诱导氮代谢关键酶在氮代谢循环中发挥作用。高氮水平处理下, 叶片中 *GOGAT* 基因表达水平高于根系, 说明高氮水平促进叶片生长, 但与适宜氮水平处理比较而言, 3 个酶基因的表达量呈下降趋势, 也进一步说明高氮水平下抑制氮代谢关键酶的基因表达, 对植物氮代谢有负面影响。

## References

- Barber S A, Silberbush M. 1984. Plant root morphology and nutrient uptake 1. Madison, Wisconsin: ASA special publication-American Society of Agronomy (USA): 65 - 87.
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D. 2003. The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 3 - 22.
- Chichkova S, Arellano J, Vance C P. 2001. Transgenic tobacco plants that overexpress alfalfa NADH-glutamate synthase have higher carbon and nitrogen content. *Journal of Experimental Botany*, 52 (364): 2079 - 2087.
- Chen Xue-sen, Han Ming-yu, Su Gui-lin, Liu Feng-zhi, Guo Guo-nan, Jiang Yuan-mao, Mao Zhi-quan, Peng Fu-tian, Shu Huai-rui. 2010. Discussion on today's world apple industry trends and the suggestions on sustainable and efficient development of apple industry in China. *Journal of Fruit Science*, 27 (4): 598 - 604. (in Chinese)
- 陈学森, 韩明玉, 苏桂林, 刘凤之, 过国南, 姜远茂, 毛志泉, 彭福田, 束怀瑞. 2010. 当今世界苹果产业发展趋势及我国苹果产业优质高效发展意见. *果树学报*, 27 (4): 598 - 604.
- Chen Zhi-ying. 2008. Study on the mechanism and regulation of nitrogen assimilation and sucrose metabolism of sugar beet [Ph. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 陈志英. 2008. 甜菜氮素同化与蔗糖代谢机理研究及其人工调控 [博士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Chu Jian-qing, Wang Wen-yan, Fang Jing-gui, Zhang Chun-hua, Zhang Yan-ping, Song Chang-nian. 2012. Effects of foliar applied urea on expression of genes related to nitrogen metabolism in Fujiminori grapevine. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 18 (2): 405 - 416. (in Chinese)
- 初建青, 王文艳, 房经贵, 张春华, 张彦平, 宋长年. 2012. 叶面喷施尿素对葡萄氮代谢相关基因表达的影响. *植物营养与肥料学报*, 18 (2): 405 - 416.
- Cui Hong-yan, Hu Fa-long, Fang Zi-sen, Ren Pan-rong, Niu Jun-yi. 2015. Effect of different nitrogen level on root morphology and nitrogen utilization of oil flax. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 37 (5): 694 - 701. (in Chinese)
- 崔红艳, 胡发龙, 方子森, 任盼荣, 牛俊义. 2015. 不同施氮水平对胡麻根系形态和氮素利用的影响. *中国油料作物学报*, 37 (5): 694 - 701.
- Feng Zhuo, Qin Zhi-wei, Wu Tao, He Hong-mei. 2012. Cloning and expression of cytosolic glutamine synthetase (*GSI*) in *Cucumis sativus* L. under low nitrogen conditions. *Scientia Agricultura Sinica*, 45 (15): 3100 - 3107. (in Chinese)
- 冯卓, 秦智伟, 武涛, 何红梅. 2012. 黄瓜细胞质型谷氨酰胺合成酶基因的克隆及其在低氮条件下的表达. *中国农业科学*, 45 (15): 3100 - 3107.
- Forde B G. 2014. Nitrogen signaling pathways shaping root system architecture: an update. *Current Opinion in Plant Biology*, 21 (10): 30 - 36.
- Gang Shuang, Wang Jing-guo, Yang Liang, Gao Yang, Zang Jia-xiang, Zhao Hong-wei. 2010. Effects of nitrogen level on key enzyme to nitrogen metabolism of rice in cold region. *Research of Agricultural Modernization*, 31 (2): 224 - 227. (in Chinese)
- 刚爽, 王敬国, 杨亮, 高扬, 臧家祥, 赵宏伟. 2010. 氮素用量对寒地水稻氮代谢关键酶活性的影响. *农业现代化研究*, 31 (2):

- 224 - 227.
- Ge Shun-feng. 2014. Effects of soil C/N ratio on nitrogen balance of plant-soil system in apple orchard [Ph. D. Dissertation]. Taian: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 葛顺峰. 2014. 苹果园土壤碳氮比对植株—土壤系统氮素平衡影响的研究 [博士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Guo Y, Cai Z, Gan S. 2004. Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Cell and Environment*, 27 (5): 521 - 549.
- Guo Yun-hui, Yu Yuan-yuan, Wen Li-zhu, Sun Cui-hui, Sun Xian-zhi, Wang Wen-li, Sun Xia, Zheng Cheng-shu. 2017. Molecular basis of the effects of nitrate signal on root morphological structure changes of chrysanthemum. *Scientia Agricultura Sinica*, 50 (9): 1684 - 1693. (in Chinese)
- 郭芸珵, 于媛媛, 温立柱, 孙翠慧, 孙宪芝, 王文莉, 孙霞, 郑成淑. 2017. 硝态氮影响菊花根系形态结构变化的分子基础. *中国农业科学*, 50 (9): 1684 - 1693.
- Hirel B, Le Gouis J, Ney B, Gallais A. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards amore central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *J Exp Bot*, 58 (9): 2369 - 2387.
- Li Cai-feng, Ma Feng-ming, Zhao Yue, Li Wen-hua. 2003. Effects of nitrogen forms on key enzyme activities and related products in sugar and nitrogen metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 29 (1): 128 - 132. (in Chinese)
- 李彩凤, 马凤鸣, 赵越, 李文华. 2003. 氮素形态对甜菜氮糖代谢关键酶活性及相关产物的影响. *作物学报*, 29 (1): 128 - 132.
- Li Hong-liang, Sun Yu-you, Qu Jin-ling, Wei Cai-qiang, Sun Guo-hong, Zhao Yun-tong, Chai Yong-shan. 2012. Influence of nitrogen leaves on morphological and physiological characteristics of root system in Japonica rice in Northeast China. *Chinese Journal of Rice Science*, 26 (6): 723 - 730. (in Chinese)
- 李洪亮, 孙玉友, 曲金玲, 魏才强, 孙国宏, 赵云彤, 柴永山. 2012. 施氮量对东北粳稻根系形态生理特征的影响. *中国水稻科学*, 26 (6): 723 - 730.
- Li Jing, Jiang Yuan-mao, Wei Jing, Cui Yan-qiu, Wei Shao-chong, Ren Yi-hua, Peng Ling, Ji Meng-meng, Xu Hai-gang. 2015. Effects of different N rates on growth and absorption, allocation and utilization of urea <sup>15</sup>N of young apple trees with different interstocks. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 21 (4): 1088 - 1094. (in Chinese)
- 李晶, 姜远茂, 魏靖, 崔艳秋, 魏绍冲, 任怡华, 彭玲, 季萌萌, 徐海港. 2015. 不同氮水平下不同中间砧苹果幼树的生长及氮吸收、利用、分配特性. *植物营养与肥料学报*, 21 (4): 1088 - 1094.
- Li Yu-qing, Xu Xin-juan, Gu Hai-long, Gao Hong-yan, Zhu Yi-yong, Dong Cai-xia, Shen Qi-rong. 2010. Effects of applying different nitrogen from on cherry tomato nitrogen metabolism during fruit development. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 21 (9): 2335 - 2341. (in Chinese)
- 李庆余, 徐新娟, 顾海龙, 高虹艳, 朱毅勇, 董彩霞, 沈其荣. 2010. 氮素形态对樱桃番茄果实发育中氮代谢的影响. *应用生态学报*, 21 (9): 2335 - 2341.
- Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Orsel M. 2008. Leaf nitrogen remobilization for plant development and grain filling. *Plant Biol*, 10 (1): 23 - 36.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot*, 105 (7): 1141 - 1157.
- Mifflin B J, Habash D Z. 2002. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of Experimental Botany*, 53 (370): 979 - 987.
- Muttucumar N, Keys A J, Parry M A, Powers S J, Halford N G. 2014. Photosynthetic as-similation of <sup>14</sup>C into amino acids in potato (*Solanum tuberosum*) and asparagine in the tubers. *Planta*, 239 (1): 161 - 170.
- Ma Zong-huan, Chen Bai-hong, Mao Juan, Hu Zi-jing, Li Wen-fang. 2018. Effect of nitrogen metabolism enzymes and related gene expression in leaves of *Vitis vinifera* during nitrogen application period. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 38 (2): 298 - 306. (in Chinese)
- 马宗桓, 陈佰鸿, 毛娟, 胡紫璟, 李文芳. 2018. 施氮时期对酿酒葡萄叶片氮代谢酶及相关基因表达的影响. *西北植物学报*, 38 (2): 298 - 306.
- Nakano K, Suzuki T, Hayakawa T, Yamaya T. 2000. Organ and cellular localization of asparagine synthetase in rice plants. *Plant Cell Physiol*, 41 (7): 874 - 880.

- Peng Fu-tian, Jiang Yuan-mao, Gu Man-ru, Shu Huai-ru. 2003. Advances in research on nitrogen nutrition of deciduous fruit crops. *Journal of Fruit Science*, 20 (1): 54 - 58. (in Chinese)  
彭福田, 姜远茂, 顾曼如, 束怀瑞. 2003. 落叶果树氮素营养研究进展. *果树学报*, 20 (1): 54 - 58.
- Peng Ling, Liu Jing-jing, Wang Fen, Ge Shun-feng, Jiang Yuan-mao. 2018. Effects of nitrate nitrogen supply on the growth, photosynthetic characteristics and  $^{15}\text{N}$  absorption, utilization of *Malus hupehensis* seedlings. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 29 (2): 522 - 530. (in Chinese)  
彭玲, 刘晶晶, 王芬, 葛顺峰, 姜远茂. 2018. 硝酸盐供应水平对平邑甜茶幼苗生长特性与  $^{15}\text{N}$  吸收、利用的影响. *应用生态学报*, 29 (2): 522 - 530.
- Wang Jian, Li Bing-ru, Li Xiao-peng, Zhu Xu-dong, Zhu Chuan-gen, Jia Hai-feng. 2016. Evaluation of N fertilizers effects based on the expression of n metabolic genes. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (1): 1 - 14. (in Chinese)  
王剑, 李炳锐, 李晓鹏, 朱旭东, 朱传根, 贾海锋. 2016. 利用葡萄糖代谢基因的表达评价不同氮肥肥效. *园艺学报*, 43 (1): 1 - 14.
- Wang Shu-qi, Han Xiao-zeng, Qiao Yun-fa, Yan Jun, Li Xiao-hui. 2009. Root morphology and nitrogen accumulation in soybean (*Glycine max* L.) under different nitrogen application levels. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 17 (6): 1069 - 1073. (in Chinese)  
王树起, 韩晓增, 乔云发, 严君, 李晓慧. 2009. 施氮对大豆根系形态和氮素吸收积累的影响. *中国生态农业学报*, 17 (6): 1069 - 1073.
- Wen Ming-zhang, Chen Yue, Gu Rui-sheng, Luo Jing, Du Sheng-ming. 2008. Basic research in plant science and the development of agriculture in China. *Chinese Bulletin of Botany*, 25 (6): 633 - 637. (in Chinese)  
温明章, 陈悦, 谷锐升, 罗晶, 杜生明. 2008. 谈中国植物科学基础研究与农业发展. *植物学通报*, 25 (6): 633 - 637.
- Zhang Hua-zhen, Xu Heng-yu. 2011. Research progress on the enzymes during plant nitrogen assimilation. *Northern Horticulture*, (20): 180 - 183. (in Chinese)  
张华珍, 徐恒玉. 2011. 植物氮素同化过程中相关酶的研究进展. *北方园艺*, (20): 180 - 183.
- Zhang Yi-fei. 2013. Study on regulation mechanism of nitrogen application on nitrogen assimilation and carbon metabolism in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) [Ph. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)  
张翼飞. 2013. 施氮对甜菜氮素同化与碳代谢的调控机制研究[博士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Zhao Yue, Ma Feng-ming, Zhang Duo-ying. 2006. Study on the absorption kinetics of different nitrogen in sugar beet. *Journal of Northeast Agricultural University*, 37 (3): 294 - 298. (in Chinese)  
赵越, 马凤鸣, 张多英. 2006. 甜菜对不同氮素吸收动力学的研究. *东北农业大学学报*, 37 (3): 294 - 298.