

水稻生育后期根系响应氮肥调控的蛋白作用机制分析*

张志兴^{1,2} 李忠² 李洲² 林文雄^{1,2**}

(1. 福建农林大学生命科学学院 福州 350002; 2. 福建农林大学农业生态研究所 福州 350002)

摘要 以大穗型水稻‘金恢 809’为试验材料, 设置前氮后移(施氮量的 30%作基肥, 30%作蘖肥, 30%作穗肥, 10%作粒肥)及传统氮肥(施氮量的 40%作基肥, 30%作蘖肥, 30%作穗肥)施用两种处理, 并采用双向电泳技术分析水稻生育后期根系对前氮后移调控的蛋白响应机制。通过构建的不同氮肥处理下水稻开花后 15 d 根系蛋白 2-DE 电泳图谱, 并结合 MALDI-TOF/MS 分析, 共成功鉴定到 57 个出现差异表达的蛋白, 其中 40 个在前氮后移处理下上调表达, 17 个下调表达。依据其蛋白功能可以归为 12 类, 主要涉及信号转导, 氮同化, 胁迫与防御, 糖酵解, 三羧酸循环, 氨基酸代谢、蛋白合成及折叠等代谢途径。研究发现水稻生育后期根系 GTP 结合的核蛋白、GDP 解离抑制因子、液泡型 H⁺-ATP 酶亚基 C 会响应氮肥的调控而出现表达变化, 并将信号传递到电压依赖性离子通道蛋白、液泡型 ATP 酶亚基 C 以及膜联蛋白 p35, 进而调节根系细胞间物质运输与信息的传递。本研究结果还表明, 前氮后移的施肥方式, 通过适当增加水稻生育后期氮肥的施用, 调节根系糖类转换、糖酵解及三羧酸循环相关蛋白的表达, 增加了根系 ATP 的供应; 通过增强根系中清除过氧化氢系统及防御相关蛋白的表达, 延缓了根系的衰老; 通过上调谷氨酸脱氢酶、天冬氨酸转氨酶和谷氨酰胺合成酶的表达丰度, 促进了根系对土壤中氮元素的吸收与转运。研究结果对于进一步明确水稻根系响应氮素调控的分子生态特性具有重要的理论与实际意义。

关键词 水稻 氮肥调控 生育后期 根系 蛋白

中图分类号: S511.01 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2015)11-1413-10

Effects of nitrogen management on protein expression of rice (*Oryza sativa* L.) root in the late growth stage*

ZHANG Zhixing^{1,2}, LI Zhong², LI Zhou², LIN Wenxiong^{1,2**}

(1. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2 Institute of Agro-ecology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract Application of nitrogen fertilizer is the most important agricultural measures in increasing paddy rice production. Recently, the postponed nitrogen application has developed as a modern cultivation measure, which not only is beneficial to the high yield formation, but also increases utilization efficiency of nitrogen fertilizer. However, the molecular basis of such adaptation remains unclear. In present study, the molecular mechanisms of rice ‘jinhui No.809’ (large-panicle type) root in response to the postponed nitrogen application were investigated. By keeping the total nitrogen supply constant and varying the early and late growth stage fertilizer application ratios, changes in the protein expressions of the rice root in late growth stage were determined. The two nitrogen fertilization treatments were traditional (NT) and postponed nitrogen application (NP). Using 2-DE and MALDI-TOF/MS, 57 proteins with 40 up-regulated and 17 down-regulated in response to NP treatment were successfully identified. According to the protein function, the identified proteins were classified into 12 categories,

* 国家自然科学基金项目(31401306)、福建省自然科学基金项目(2012J01075, 2013J01092)及福建农林大学杰出青年项目资助

** 通讯作者: 林文雄, 主要研究方向为作物生理与分子生态。E-mail: lwx@fafu.edu.cn

张志兴, 主要研究方向为作物生理与分子生态 E-mail: zhangzhixingfz@163.com

收稿日期: 2015-07-03 接受日期: 2015-09-29

* The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31401306), the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2012J01075 and No. 2013J01092) and the Program for the Excellent Young Teacher of Fujian Agriculture and Forestry University

** Corresponding author, lwx@fafu.edu.cn

Received Jul. 3, 2015; accepted Sep. 29, 2015

mainly including signal transduction, ammonia assimilation, stress and defense, glycolysis, tricarboxylic acid cycle, protein synthesis and folding, and amino acid metabolism. The results indicated that the signal proteins of GDP dissociation inhibitor protein and GTP-binding nuclear protein Ran-2 in rice root were responsive to the NP treatment, then transfer signal to the membrane protein, including voltage dependent anion selective channel protein, annexin p35 and vacuolar ATP synthase subunit C, leading to the changes of intercellular material transport and message transference. The protein abundance of glycolysis and tricarboxylic acid cycle related protein, including phosphoglycerate kinase, phosphoglucosmutase, 6-phosphofructokinase, UDP-glucose pyrophosphorylase, NADP-isocitrate dehydrogenase and aconitate hydratase were increased by the NP treatment, in turn, induced more ATP were generated for the root growth. The up-regulated antioxidative enzymes and defence related protein delayed the root senescence in the late growth stage. Moreover, glutamate dehydrogenase, glutamines synthetase root isozyme and aspartate aminotransferase, three of which were involved in the plant nitrogen metabolism, increased in abundance in the NP treatment, which were favorable for the nitrogen uptake and translocation. This study added new significant insights to our current understanding of the molecular ecology characteristic of rice root in response to nitrogen management.

Keywords Rice; Nitrogen management; Late growth stage; Root; Proteins

氮肥运筹方式是水稻(*Oryza sativa* L.)栽培调控中一种关键技术措施。中国氮肥消费量占世界氮肥总量的 30%，水稻生产所消耗的氮肥占世界水稻氮肥总消耗量的 37%^[1]。与其他主要产稻国相比，中国水稻生产氮肥施用量高且利用率低，氮肥利用率仅为 30%~35%^[2]。同时，不合理的氮肥施用，导致地下水污染和江河湖泊的富营养化，对农业生态系统以及人类的生活造成不利影响。近年来，随着水稻新品种的不断育成并大面积应用，尤其是许多具有高产潜力的大穗型水稻品种的育成，传统的水稻生育前期重施氮肥的栽培调控措施不仅不能促进水稻高产潜力的发挥，同时导致大量氮肥的浪费。传统的氮肥施用方式是将氮肥总量的 55%~85%作为基肥施用，但在此时水稻尚未形成庞大的根系且植株的生理需氮量较低，大量的氮素未能被根系有效吸收，致使氮肥利用率低下^[3-4]。有研究表明水稻生育前期的基肥和基肥的氮肥利用率较低，约 20%左右，穗肥利用率可达 45%~71%^[2]；同时前期重施氮肥又导致无效分蘖大量发生，成穗率低、群体郁蔽、病虫害猖獗^[5]，至生育后期，尤其是籽粒灌浆期，其氮肥供应不足，又导致源器官光合生产能力下降，供应籽粒灌浆的碳水化合物合成不足，造成籽粒尤其是弱势籽粒的灌浆结实差，限制了水稻高产潜力的发挥。在此背景下，如何改变传统的氮肥施用方式，更好地提高氮肥的利用效率，促进水稻高产潜力的发挥成为众多作物栽培学家关注的热点问题之一。

针对稻田氮肥利用率低的问题，钟旭华等^[5-6]建立的“三控”施肥技术，核心是通过氮肥的分阶段调控，适当增加幼穗分化(35%~40%)及抽穗期(5%~10%)氮肥施用量，从而实现水稻的高产稳产。张洪

程等^[7]提出了适合长江中下游单季稻地区的水稻氮肥精确后移施用模式。彭显龙等^[8-9]研究发现，通过前氮后移的实地氮肥管理可合理调控水稻的碳氮代谢，从而保证水稻具有适宜穗数，促进提早抽穗，利于形成大穗；同时能控制水稻抽穗前期干物质的积累，增加抽穗后期干物质和养分积累量。笔者前期以大穗型水稻为试验材料研究发现，在总施氮量不变的情况下，通过适当增加生育后期氮肥施用量(基肥：穗粒肥=6：4)的方式能够有效地促进弱势籽粒灌浆，进而有利于高产的形成^[10-13]。由此可见，前氮后移的施肥方式现已成为水稻高产高效的一项重要栽培调控措施。

众所周知，根系是作物从土壤中吸收养分的最重要营养器官。近些年来，作物的根层管理已逐渐成为作物栽培学研究中的热点问题，其核心是通过调控作物根系的生长，进而对地上部植株的生长进行调控。氮肥施入稻田后，并不能被水稻直接吸收，而是要进入土壤生态系统，经土壤微生物转换后，进而被水稻的根系吸收并转运至地上部植株。因此，要明确前氮后移促进水稻高产形成的机制，就必须探明根系对氮肥调控的响应机制。笔者前期运用差异蛋白组学技术分析了生育后期增加氮肥施用量对水稻灌浆期强弱势籽粒、叶片以及叶鞘的蛋白表达变化的影响，结果表明适当增加生育后期氮肥施用量，能有效提高氮肥利用效率，同时有利于增强弱势籽粒中信号转导、淀粉合成相关基因的表达，上调茎鞘中物质调运与能量代谢相关蛋白的表达量，促进了叶片抗逆相关蛋白的表达，延缓了叶片光合相关蛋白的降解，达到强源促流增库的目的^[11-13]。但目前为止，水稻生育后期根系对前氮后移响应的蛋白作用机制尚少见报道。本研究进一步运用差异

蛋白组学分析了水稻根系对氮肥调控方式的响应机制,从而与前期的研究结果相互补充,更加系统地认识水稻植株生长对氮肥的分子响应机制,同时可为水稻高产的根层管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2012 年 5—10 月在福建农林大学作物科学学院教学基地进行,以大穗型水稻品种‘金恢 809’为材料。土壤质地为沙壤土,含全氮 $1.72 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,碱解氮 $60.67 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,全磷 $0.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,有效磷 $30.45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,全钾 $1.53 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,速效钾 $206.48 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,有机质 $21.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,pH 5.7。田间插植规格为 $15 \text{ cm}\times 15 \text{ cm}$,每穴单本插。田间栽培管理除施氮条件外其他按常规高产栽培技术管理。按施纯氮 $225 \text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 量折算每区用量, N:P:K=1:0.5:0.8,并在相同的施氮量及其三要素比例下设置两个前后期施氮肥比例处理:前氮后移施氮肥(NP),即施氮量的 30%作基肥,30%作蘖肥,30%作穗肥,10%作粒肥;传统施氮肥(NT),即施氮量的 40%作基肥,30%作蘖肥,30%作穗肥。蘖肥于移栽后 7 d、穗肥于倒三叶期、粒肥于齐穗期施用。磷肥(P_2O_5)作基肥一次性施用,钾肥(K_2O)于分蘖期和穗分化期(倒三叶期)各施 50%。试验重复 3 次,共 6 个小区,每个小区均筑趋田埂,并用农膜隔水。

1.2 根系蛋白质样品制备

花后 15 d,于各小区非边行处随机取水稻 5 穴,每穴以植株为中心,采用铁锹取长 25 cm、宽 17 cm、深 20.0 cm 的土块,迅速用清水冲洗后剪取其根系,混合后分成 3 份,每份称取 2 g,置液氮中保存,用于蛋白质的提取。蛋白的提取方法参照张志兴等^[11]报道的水稻样品 TCA-丙酮沉淀法进行。按 Garrels^[14]的方法测定蛋白质溶液含量后,即可用于上样。

1.3 双向电泳(2-DE)及差异蛋白点分析

参照张志兴等^[11]的方法,等电聚焦(IEF)采用 18 cm 胶条。上样量为 $150 \mu\text{g}$ 。在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下,依次按 200 V、300 V、400 V、500 V、600 V、800 V 各 30 min,1 000 V 16 h,1 100 V 6 h 的电压梯度进行电泳。SDS-PAGE 凝胶规格为 $180 \text{ mm}\times 180 \text{ mm}\times 1.5 \text{ mm}$,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 5%。采用硝酸银染色。凝胶染色后使用 Image Scanner (GE Healthcare)扫描仪进行扫描,构建蛋白质表达图谱。采用 Imagemaster 5.0 (GE Healthcare)软件分析凝胶图谱。当 3 次重复蛋白胶上蛋白质点间的丰度值差异大于 1.5 时($P<0.05$),确定为差异蛋白点,并从胶上挖取,用于后续的蛋

白点分析。

1.4 蛋白质点胶内酶解及质谱分析

参照张志兴等^[11]的方法。挖取差异蛋白质点,在 1:1 的 $0.03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铁氰化钾和 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫代硫酸钠混合液中脱色; $57 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 溶液中还原 1 h, $0.055 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺溶液烷基化 1 h; 用 $12.5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 胰岛素酶缓冲液 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下水化 30 min,并在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下, $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液中酶切 14 h。分别用 $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵溶液、含 5%TFA 的 50%乙腈、100%乙腈萃取酶切产物。酶解后采用 Reflex III 型 MALDI-TOF 质谱仪(德国 BRUKER 公司)进行蛋白鉴定,质谱参数参照张志兴等^[11]的报道。质谱分析所得数据去除杂峰后,通过 Mascot 数据库进行肽质量指纹谱检索。数据库选用 NCBI,物种选 *Oryza sativa* (rice); 酶解所用的酶,选择 Trypsin; 最大未水解酶切位点数,选择 1; 固定修饰选择 Carbamidomethyl(C),可变修饰选择 Oxidation(M); 可接受的肽段分子量误差为 0.6 Da。

2 结果与分析

2.1 蛋白表达图谱构建及差异点分析

灌浆期是水稻产量形成的关键时期,该时期根系的生理代谢活动对叶片光合同化物质的合成及源库间物质的转运具有重要的调控机制。据此,本研究选取花后 15 d 前氮后移施肥方式(NP)以及传统施肥方式(NT)下的水稻根系样品,提取蛋白并进行双向电泳分析,3 次生物学重复,共构建了 6 张 2-DE 蛋白电泳图谱(图 1A)。通过软件分析,在等电点从 3~10 和分子量为 14~116 kD 的范围中,每块胶大概检测到 900 个点,当 3 次重复蛋白胶上蛋白点间的丰度值差异大于 1.5 时选为差异蛋白点,共检测到 67 个差异蛋白点(图 1B)。

2.2 蛋白功能鉴定及代谢途径分析

所选的 67 个差异蛋白点,经 MALDI-TOF-MS 分析后,成功鉴定 57 个(表 1)。由表 1 可知,多个蛋白点鉴定为同个蛋白,例如 spot45 和 spot60 都鉴定为葡萄糖磷酸变位酶,spot56 和 spot57 为丙酮酸脱羧酶,spot27 和 spot50 为甲基丙二酸半醛脱氢酶,这可能是由于蛋白翻译后修饰以及蛋白降解所引起的。本研究累计共鉴定到 51 个无重复的蛋白。进一步对上述蛋白进行代谢途径分析,依据其蛋白功能可以归为 12 类,分别为信号转导(3%)、膜蛋白(5%)、氮同化(7%)、胁迫与防御(14%)、糖酵解(16%)、三羧酸循环(5%)、电子传递及 ATP 合成(3%)、蛋白合成及折叠(11%)、氨基酸代谢(23%)、细胞骨架(2%)、

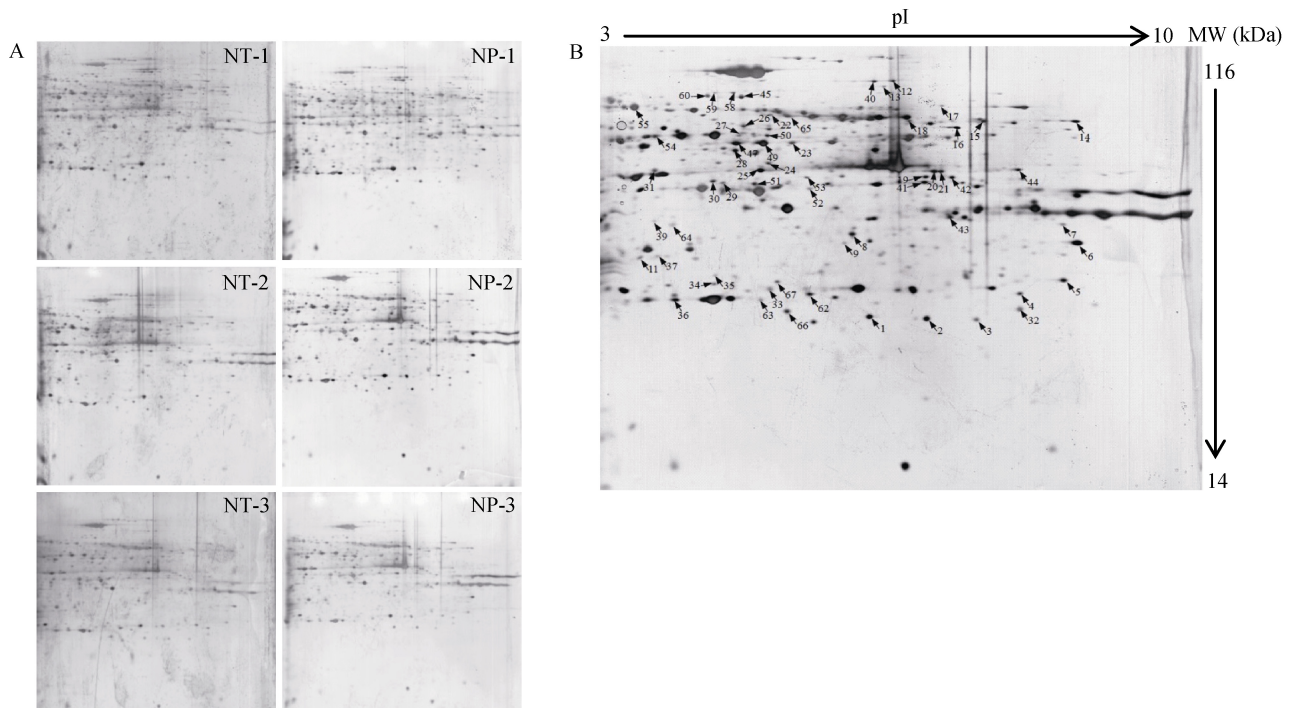


图 1 水稻根系蛋白 2-DE 图谱

Fig. 1 2-DE maps of rice root protein

A: 根系蛋白 2-DE 图, NT-(1~3)为传统氮肥施用下根系蛋白 3 次重复的 2-DE 图, NP-(1~3)为前氮后移处理下根系蛋白 3 次重复 2-DE 图; B: 前氮后移处理下差异蛋白点标注。Figure A is 2-DE maps of root protein, in which NT-1, NT-2 and NT-3 are three replications of conventional nitrogen application treatment; NP-1, NP-2 and NP-3 are three replications of postponed nitrogen application treatment. Figure B is 2-DE map of differentially expressed protein spots under postponed nitrogen application.

表 1 前氮后移处理下水稻根系差异蛋白点质谱鉴定结果

Table 1 MS results of differentially expressed proteins in rice roots under postponed nitrogen application

| 蛋白序号 Spots No. | 登录号 Accession No. | 蛋白名称 Protein name | 分子量 MW (kD) | 等电点 PI | 分值 Score | 变化趋势 Change tendence |
|---------------------------------|----------------------|--|----------------|-----------|-------------|----------------------------|
| 信号转导 Signal transduction | | | | | | |
| 28 | gi 115463933 | GDP 解离抑制蛋白 GDP dissociation inhibitor protein | 50.1 | 5.44 | 160 | ↑ |
| 32 | gi 115438482 | GTP 结合的核蛋白 Ran-2 GTP-binding nuclear protein Ran-2 | 25.3 | 6.38 | 46 | ↑ |
| 膜蛋白 Membrane protein | | | | | | |
| 5 | gi 115478779 | 电压依赖性离子通道蛋白 Voltage dependent anion selective channel protein | 29.2 | 7.07 | 123 | ↑ |
| 6 | gi 115448739 | 膜联蛋白 p35 Annexin p35 | 35.8 | 6.77 | 94 | ↑ |
| 24 | gi 29367377 | 液泡型 ATP 酶亚基 C Vacuolar ATP synthase subunit C | 46.1 | 6.01 | 175 | ↑ |
| 氨同化 Ammonia assimilation | | | | | | |
| 19 | gi 115455879 | 谷氨酸脱氢酶 Glutamate dehydrogenase | 44.6 | 6.15 | 119 | ↑ |
| 29 | gi 22748337 | 谷氨酰胺合成酶根同工酶 Glutamines synthetase root isozyme | 38.8 | 5.73 | 55 | ↑ |
| 41 | gi 115445217 | 天冬氨酸转氨酶 Aspartate aminotransferase | 48.5 | 8.09 | 75 | ↑ |
| 52 | gi 115449235 | 质体天冬氨酸转氨酶 Plastidic aspartate aminotransferase | 50.5 | 8.16 | 122 | ↑ |
| 胁迫与防御 Stress and defense | | | | | | |
| 3 | gi 115464739 | 1,4-苯醌还原酶 1,4-benzoquinone reductase | 21.6 | 6.30 | 65 | ↑ |
| 4 | gi 22758268 | 谷胱甘肽-S-转移酶 Glutathione S-transferase | 20.5 | 6.60 | 107 | ↑ |
| 7 | gi 115474137 | 蓖麻毒素 B 相关蛋白 Ricin B-related lectin domain containing protein | 39.0 | 6.81 | 94 | ↑ |
| 11 | gi 14150732 | 过敏应激蛋白 Hypersensitive-induced response protein | 31.5 | 5.22 | 131 | ↓ |
| 31 | gi 4760483 | 单脱水抗坏血酸还原酶 Monodehydroascorbate reductase | 43.0 | 5.36 | 89 | ↑ |
| 36 | gi 115452337 | 抗坏血酸过氧化物酶 L-ascorbate peroxidase | 27.3 | 5.42 | 43 | ↑ |
| 61 | gi 115476474 | 甜菜碱醛脱氢酶 Betaine aldehyde dehydrogenase | 55.4 | 5.36 | 72 | ↑ |
| 64 | gi 115474061 | 过氧化物酶 Peroxidase | 33.0 | 5.51 | 83 | ↑ |

续表

| 蛋白序号 Spots No. | 登录号 Accession No. | 蛋白名称 Protein name | 分子量 MW (kD) | 等电点 PI | 分值 Score | 变化趋势 Change tendence |
|--|----------------------|--|----------------|-----------|-------------|----------------------------|
| 糖酵解 Glycolysis | | | | | | |
| 54 | gi 780372 | 烯醇化酶 Enolase | 48.3 | 5.42 | 179 | ↓ |
| 25 | gi 115444481 | 磷酸甘油酸激酶 Phosphoglycerate kinase | 42.2 | 5.64 | 113 | ↑ |
| 45 | gi 115454931 | 葡萄糖磷酸变位酶 Phosphoglucomutase | 63.1 | 5.40 | 314 | ↑ |
| 60 | gi 115454931 | 葡萄糖磷酸变位酶 Phosphoglucomutase | 63.1 | 5.40 | 221 | ↑ |
| 18 | gi 115467370 | 磷酸果糖激酶 6-phosphofructokinase | 61.9 | 6.01 | 94 | ↑ |
| 47 | gi 88866516 | UDP 葡萄糖焦磷酸化酶 UDP-glucose pyrophosphorylase | 51.8 | 5.43 | 145 | ↑ |
| 14 | gi 639684 | 己糖磷酸异构酶 Phosphohexose isomerase | 62.7 | 6.80 | 117 | ↑ |
| 56 | gi 476286 | 丙酮酸脱羧酶 Pyruvate decarboxylase | 66.0 | 5.89 | 168 | ↓ |
| 57 | gi 23495286 | 丙酮酸脱羧酶 Pyruvate decarboxylase | 66.1 | 5.86 | 168 | ↓ |
| 三羧酸循环 Tricarboxylic acid cycle | | | | | | |
| 20 | gi 115438939 | 异柠檬酸脱氢酶 NADP-isocitrate dehydrogenase | 46.4 | 6.34 | 77 | ↑ |
| 58 | gi 115458044 | 异柠檬酸裂合酶 Isocitrate lyase family protein | 41.6 | 5.66 | 117 | ↓ |
| 51 | gi 75225211 | 顺乌头酸酶 Aconitate hydratase | 98.6 | 5.67 | 137 | ↑ |
| 电子传递及 ATP 合成 Electron transport and ATP synthesis | | | | | | |
| 16 | gi 115435028 | 线粒体加工肽酶 Mitochondrial processing peptidase | 54.1 | 6.65 | 128 | ↓ |
| 65 | gi 89280711 | ATP 酶 F0 亚基 ATP synthase F0 subunit 1 | 55.5 | 5.85 | 157 | ↑ |
| 蛋白合成及折叠 Protein synthesis and folding | | | | | | |
| 8 | gi 115439261 | 鸟嘌呤核苷酸结合亚基蛋白 Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein | 36.7 | 5.97 | 86 | ↑ |
| 33 | gi 115440617 | 20S 蛋白酶体 G 亚基 20S proteasome alpha subunit G | 27.5 | 5.75 | 96 | ↑ |
| 48 | gi 303844 | 真核起始因子 4A Eukaryotic initiation factor 4A | 47.2 | 5.29 | 201 | ↓ |
| 55 | gi 115466004 | 60 kDa 伴侣蛋白 60 kDa chaperonin | 64.3 | 5.60 | 78 | ↓ |
| 17 | gi 115468394 | T-复合体蛋白 T-complex protein 1 | 61.3 | 6.23 | 94 | ↑ |
| 23 | gi 3646373 | 可逆的糖基化多肽蛋白 Reversibly glycosylated polypeptide protein | 40.1 | 8.21 | 86 | ↓ |
| 氨基酸代谢 Amino acid metabolism | | | | | | |
| 12 | gi 108862990 | 5-甲基四氢三谷氨酸-同型半胱氨酸甲基转移酶 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase | 79.3 | 7.19 | 109 | ↑ |
| 40 | gi 115489652 | 乙烯响应甲硫氨酸合成酶 Ethylene-responsive methionine synthase | 84.9 | 5.93 | 113 | ↓ |
| 13 | gi 871494 | 苯丙氨酸氨裂解酶 Phenylalanine ammonia-lyase | 77.4 | 8.15 | 92 | ↑ |
| 46 | gi 108711743 | 亚甲基四氢叶酸还原酶 Methylenetetrahydrofolate reductase | 64.7 | 5.75 | 182 | ↑ |
| 44 | gi 21397263 | 磷酸丝氨酸氨基转移酶 Phosphoserine aminotransferase | 45.3 | 8.53 | 117 | ↑ |
| 39 | gi 115442595 | 半胱氨酸合酶 Cysteine synthase | 42.1 | 6.28 | 105 | ↓ |
| 43 | gi 115435934 | 异丙基苹果酸脱氢酶 3-isopropylmalate dehydrogenase | 40.0 | 7.10 | 69 | ↑ |
| 27 | gi 2895866 | 甲基丙二酸半醛脱氢酶 Methylmalonate semi-aldehyde dehydrogenase | 57.5 | 5.99 | 45 | ↓ |
| 50 | gi 2895866 | 甲基丙二酸半醛脱氢酶 Methylmalonate semi-aldehyde dehydrogenase | 57.5 | 5.99 | 39 | ↓ |
| 26 | gi 115438917 | 酮醇酸还原异构酶 Ketol-acid reductoisomerase | 60.0 | 5.73 | 86 | ↑ |
| 22 | gi 115438917 | 酮醇酸还原异构酶 Ketol-acid reductoisomerase | 60.0 | 5.73 | 127 | ↑ |
| 67 | gi 115456357 | 延胡索酰乙酰乙酸水解酶 Fumarylacetoacetate hydrolase family protein | 24.1 | 5.62 | 69 | ↓ |
| 53 | gi 115455133 | 异戊烯基二甲基烯丙基二磷酸合酶 Isopentenyl/dimethylallyl diphosphate synthase | 51.3 | 5.46 | 62 | ↓ |
| 细胞骨架 Cytoskeleton | | | | | | |
| 10 | gi 115459618 | Remorin (pp34) | 22.5 | 5.47 | 92 | ↓ |
| 脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism | | | | | | |
| 49 | gi 115489130 | ATP 柠檬酸裂合酶 ATP citrate lyase | 47.1 | 5.45 | 87 | ↑ |
| 未知蛋白 Unknown | | | | | | |
| 1 | gi 125527970 | 假定蛋白 Hypothetical protein OsI_04011 | 21.7 | 6.06 | 92 | ↑ |
| 2 | gi 125527970 | 假定蛋白 Hypothetical protein OsI_04011 | 21.7 | 6.06 | 104 | ↓ |
| 30 | gi 115456912 | 叶绿体 Toc64-2 蛋白 Chloroplast Toc64-2 | 46.4 | 5.49 | 54 | ↑ |
| 34 | gi 115444021 | 假定蛋白 Hypothetical protein | 27.4 | 6.55 | 122 | ↑ |
| 62 | gi 297610594 | Brn 相似蛋白 Brn1-like protein | 26.8 | 6.17 | 70 | ↑ |

“↑”表示蛋白在前氮后移处理下上调表达,“↓”表示蛋白在前氮后移处理下下调表达。下同。“↑” indicates up-regulation of proteins under postponed nitrogen application; “↓” indicates down-regulation of proteins under postponed nitrogen application. The same below.

脂肪酸代谢(2%)和未知蛋白(9%)。从蛋白表达丰度变化来看,水稻灌浆期根系响应前氮后移施肥处理而出现上调表达的蛋白点有 40 个,下调表达的蛋白

点有 17 个(图 2)。在此基础上,本研究构建了水稻生育后期根系响应前氮后移施肥调控的代谢网络图(图 3)。

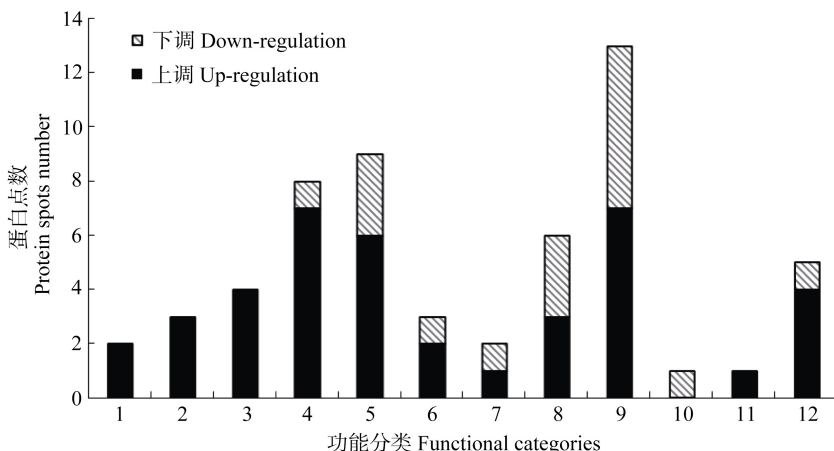


图 2 前氮后移处理下水稻根系差异蛋白功能归类

Fig. 2 Function classifications of differentially expressed proteins in rice roots under postponed nitrogen application

1: 信号转导; 2: 膜蛋白; 3: 氮同化; 4: 胁迫与防御; 5: 糖酵解; 6: 三羧酸循环; 7: 电子传递及 ATP 合成; 8: 蛋白合成及折叠; 9: 氨基酸代谢; 10: 细胞骨架; 11: 脂肪酸代谢; 12: 未知蛋白。1: signal transduction; 2: membrane protein; 3: ammonia assimilation; 4: stress and defense; 5: glycolysis; 6: tricarboxylic acid cycle; 7: electron transport and ATP synthesis; 8: protein synthesis and folding; 9: amino acid metabolism; 10: cytoskeleton; 11: fatty acid metabolism; 12: unknown.

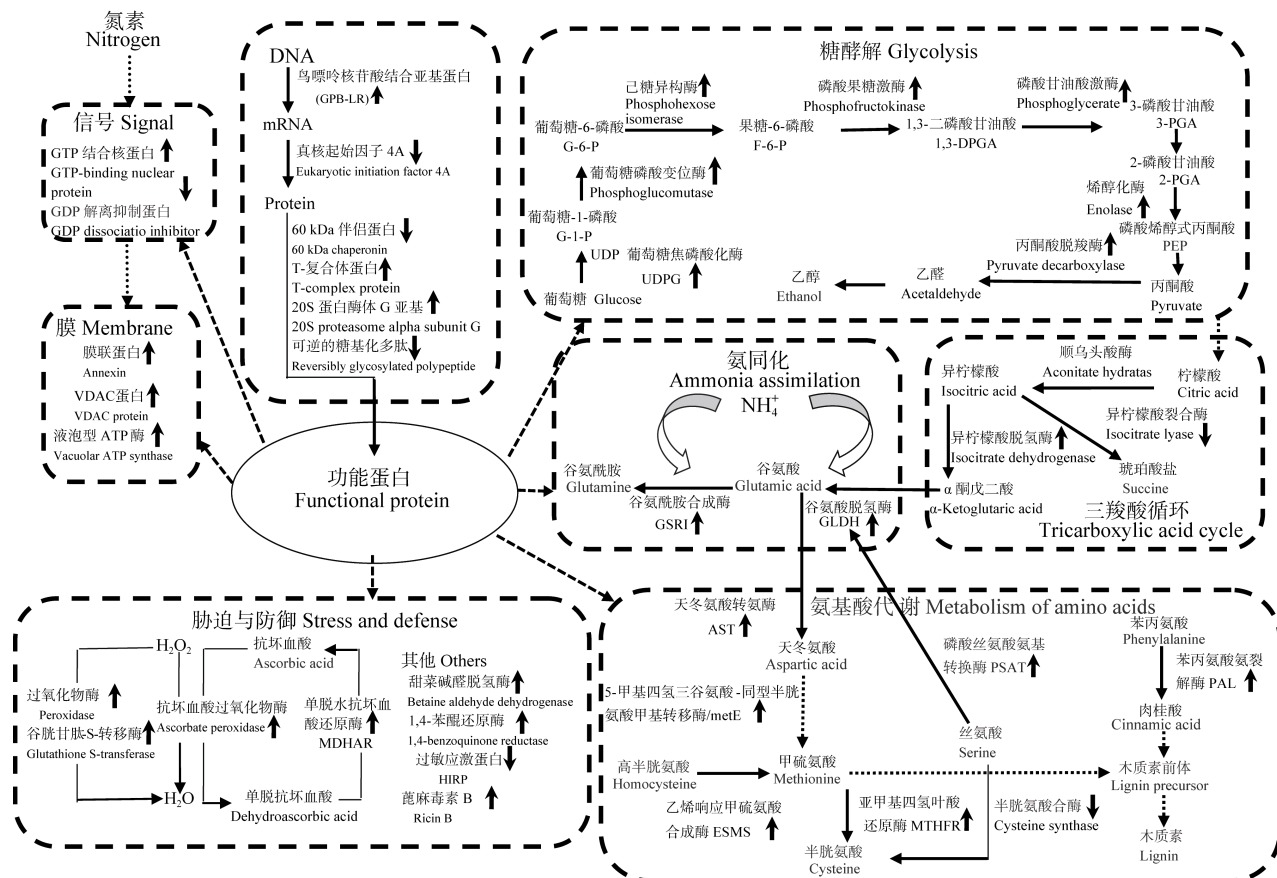


图 3 水稻根系响应氮肥调控的代谢途径

Fig. 3 Metabolism pathway of rice root in response to the nitrogen application

VDAC: voltage dependent anion selective channel protein; GPB-LR: guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein; MDHAR: monodehydroascorbate reductase; HIRP: hypersensitive-induced response protein; UDPG: UDP-glucose pyrophosphorylase; G-6-P: glucose 6-phosphate; G-1-P: glucose 1-phosphate; F-6-P: fructose-6-phosphate; 1,3-DPGA: 1,3-bisphosphoglycerate; 3-PGA: 3-phosphoglycerate; 2-PGA: 2-phosphoglycerate; PEP: phosphoenolpyruvate; GSRI: glutamines synthetase root isozyme; GLDH: glutamate dehydrogenase; AST: aspartate aminotransferase; metE: 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase; ESMS: ethylene-responsive methionine synthase; MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase; PSAT: phosphoserine aminotransferase; PAL: phenylalanine ammonia-lyase.

3 讨论

氮肥的合理施用对促进水稻高产, 提高氮肥利用效率, 保障农业生态环境安全均具有重要意义。前期研究表明, 适当的前氮后移施肥方式能有效促进叶片灌浆期正常的生理代谢^[10], 改善弱势籽粒灌浆^[11-12], 进而有利于水稻高产的形成, 同时能显著提高氮肥利用效率^[15]。根系是水稻吸收土壤氮并转运至植株体内的关键器官, 在水稻生育后期根系生长对籽粒灌浆至关重要。本研究通过比较蛋白组学技术, 在水稻生育后期的根系中鉴定到 57 个蛋白响应前氮后移施肥方式而出现显著的表达变化。通过蛋白功能及代谢途径分析可知, 适当的前氮后移增加了水稻生育后期氮素的供应, 会对根系中信号传导、氮同化、胁迫与防御、糖酵解、三羧酸循环、电子传递及 ATP 合成、蛋白合成及折叠以及氨基酸代谢等过程产生调节作用(图 3), 进而影响地上植株的生长。

本研究在根系鉴定到 2 个响应氮肥调控的信号转导相关蛋白: GTP 结合的核蛋白(Ran)和 GDP 解离抑制因子(GDI)。Ran 蛋白是植物小 G 蛋白家族的重要成员, 小 G 蛋白具有与 G 蛋白相似的功能, 能够将细胞外信号转导入细胞内, 从而调节相应的生理生化活动, 使细胞与生活环境相适应^[16]。GDI 在调控束缚核苷酸的状态和小 G 蛋白家族中的 Rab 蛋白的亚细胞定位起到非常重要的作用^[17]。Heo 等^[18]研究发现水稻 OsGDI3 能与 OsMAPK2 互作, 抑制 OsMAPK2 的磷酸化程度, 进而调节植物促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)所介导的 MAPK 级联途径。MAPK 位于整个信号级联途径的最下游, 其被激活后进入细胞核, 通过激活特定转录因子引起功能基因的表达, 或停留在细胞质中激活其他蛋白激酶, 最终引起植物细胞对内外刺激的生理生化反应^[19]。由此可见, 氮肥会通过改变根系 RNA2 以及 GDI 蛋白的表达量, 调节 MAPK 酶的磷酸化程度, 进而调控信号的放大程度或传递路径。根系在感应氮肥调控后将信号进一步传递到膜相关蛋白上。本研究鉴定到 3 个膜与转运相关蛋白, 分别是液泡型 H⁺-ATP 酶亚基 C、电压依赖性离子通道蛋白、膜联蛋白 p35。液泡型 H⁺-ATP 酶能够调节植物细胞内离子的平衡^[20]。电压依赖性离子通道蛋白在线粒体的物质运输和功能调控上具有重要作用^[21]。膜联蛋白具有离子通道功能, 能够调节细胞内 Ca²⁺和 K⁺的跨膜运输^[22]。由此可见, 氮素会通过调控根系中上述 3 个膜蛋白的表达变化, 进而调节根系细胞间物质运输

及信息的传递。

合理的氮肥运筹方式能够有效延缓水稻生育后期根系的衰老, 对维持根系的活力至关重要。前人的研究发现, 增加水稻生育后期氮素的供应能够提高根系的氧化能力^[23], 以及过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶的活性^[24], 从而调节体内的活性氧代谢平衡, 延缓根系衰老。本研究进一步通过差异蛋白组学的方法鉴定到 4 个清除过氧化氢(H₂O₂)及 4 个防御相关蛋白响应氮肥调控而出现表达变化。POD 通过催化酚类化合物、木质素前体及生长素等多种底物^[25-26], 谷胱甘肽-S-转移酶(GST)利用谷胱甘肽为底物^[27-28], 共同将 H₂O₂ 还原为 H₂O。抗坏血酸过氧化物酶(APX)会将抗坏血酸(AsA)氧化为单脱水抗坏血酸(MDA), 而单脱水抗坏血酸还原酶(MDAR)又进一步催化 MDA 还原为 AsA, 在此过程通过电子的传递将 H₂O₂ 还原为 H₂O。通过表达丰度分析可知, 后期增加氮素的供应能够增强上述 4 个清除 H₂O₂ 相关蛋白的表达量。与此同时, 根系中 1,4-苯醌还原酶和甜菜碱醛脱氢酶的蛋白表达量也响应后期氮素调控而出现上调表达的趋势。1,4-苯醌还原酶能够通过催化醌类物质及其他电子受体的双电子还原反应, 进而减轻植物的氧化胁迫伤害^[29-30]。甜菜碱醛脱氢酶(BADH)是渗透调节剂甜菜碱生物合成中的关键酶^[31], 而甜菜碱在逆境胁迫条件下稳定生物大分子结构和功能方面起到了重要的作用^[22]。此外, 植物的抗逆能力与膜蛋白的表达密切相关。植物细胞的存活能力在很大程度上取决于液泡型 H⁺-ATP 酶的活性^[20]。膜联蛋白不仅具有过氧化物酶活性, 同时在维持逆境胁迫下膜结构稳定性以及调控植物体内钙离子的传输起着重要的作用^[32]。已如上述, 水稻生育后期增加氮素的供应能够增强膜转运蛋白的表达, 这对于维持水稻生育后期根系细胞的活力至关重要。可见, 适当增加水稻生育后期氮素的供应能够增强根系膜转运蛋白、抗氧化及抗逆相关蛋白的表达, 加快清除根系中 H₂O₂, 保证了根系功能蛋白的活性, 有效延缓了根系的衰老, 延长根系的有效功能期, 这对维持水稻生育后期根系活力, 保障籽粒尤其是弱势籽粒的灌浆至关重要。

已如上述, 前氮后移的施肥方式能够有效提高氮素当季利用率、生理利用率以及施氮增产力^[10,33], 氮素的高效吸收主要在于根系对养分的吸收功能以及地上部物质的反馈作用。本研究通过差异蛋白组学策略在水稻根系鉴定到 3 个与根系氮素吸收及转

运相关的蛋白,分别是谷氨酸脱氢酶(GDH)、天冬氨酸转氨酶(AAT)和谷氨酰胺合成酶(GS)。前人的研究表明,水稻根系中氮代谢酶活性的高低,是提高水稻产量和氮肥利用效率的关键^[34]。水稻以吸收氨态氮为主,根吸收氨态氮后只能同化为氨基酸才能进一步转运到地上部植株中。植物体内氮同化一般有两途径:一是 NH_4^+ 与 α 酮戊二酸在 GDH 的作用下生成谷氨酸,并进一步在 AAT 催化下转化为天冬氨酸。另一条是 NH_4^+ 经过 GS/谷氨酸合成酶(GOGAT)合成谷氨酰胺。天冬氨酸和谷氨酰胺都是氮在植物体内的主要运输方式。本研究通过蛋白丰度分析,发现后期增加氮素的供应能够促进 GDH、AAT、GS 蛋白的表达,这有利于促进根系吸收的氮同化为天冬氨酸和谷氨酰胺,并转运至地上部植株,增加了水稻生育后期根系对土壤中氮元素的吸收,这或许是前氮后移处理下氮素利用率提高的一个重要生理机制。此外,水稻根系吸收氮素一旦被同化到谷氨酸盐和谷氨酰胺中,还可进一步通过不同的反应被转化为其他氨基酸,参与调节根系的生理代谢活动。例如在根系木质素生物合成的苯丙烷途径中,苯丙氨酸在苯丙氨酸氨裂解酶的催化下转化为肉桂酸。5-甲基四氢三谷氨酸-同型半胱氨酸甲基转移酶和乙烯响应甲硫氨酸合成酶参与甲硫氨酸的合成^[35-36],甲硫氨酸可进一步为木质素单体提供甲基。本研究结果表明,前氮后移处理能够促进上述 2 个木质素合成关键蛋白的表达量,进而促进水稻生育后期根系的木质素合成。木质素是细胞壁的主要成分之一,植物能够通过增加细胞壁的木质化程度防止细胞壁的塌陷^[37]。有研究表明植物在遇到外界不良环境干扰时与木质素合成有关酶的活性都呈上升趋势,可见前氮后移处理下根系旺盛的木质素代谢有利于延缓根系细胞的塌陷,对保持根系的正常细胞生理活动有重要作用。

本研究结果还表明,氮肥能够调节根系糖类与能量代谢(糖酵解、三羧酸循环途径)相关酶的表达。通过蛋白表达丰度的变化分析可知,增加氮素的供应能够增强糖酵解起始阶段 UDP 葡萄糖焦磷酸化酶、葡萄糖磷酸变位酶、己糖磷酸异构酶、磷酸果糖激酶的蛋白表达量,促进蔗糖向丙糖磷酸的转化。同时,糖酵解放能阶段的磷酸甘油酸激酶、烯醇化酶的蛋白表达丰度也会响应氮素调控而出现上调表达的趋势,有利于丙糖磷酸转化为丙酮酸,进而释放出更多的 ATP。然而,蔗糖经糖酵解途径形成丙酮酸仅有不到 25% 的能量被释放出来,而剩余

的能量储存于 4 分子的丙酮酸中,进一步经过三羧酸循环途径而释放出能量。本研究同时鉴定到 2 个三羧酸循环途径的限速酶异柠檬酸脱氢酶、顺乌头酸酶都响应前氮后移的施肥方式而出现上调表达趋势,可见氮素的增加同样有利于根系后期保持三羧酸循环的活性。此外,本研究鉴定到的参与 ATP 合成的 ATP 合酶 F0 亚基蛋白的表达量也响应后期氮素的调控而出现上调表达的趋势。由此可见,水稻生育后期适当增加氮素的供应,能增强生育后期根系糖酵解、三羧酸循环及 ATP 酶的活性,促进根系 ATP 的合成,有助于维持生育后期根系的正常生长。

4 结论

本研究结果表明,水稻根系对氮肥调控的响应是个复杂的生理生态过程,涉及大量的蛋白表达变化。前氮后移的施肥方式,在总施氮量不变的情况下,增加了生育后期氮素的供应,能够通过促进膜蛋白及抗逆相关蛋白的表达,有效延缓生育后期根系的衰老;通过提高能量代谢途径关键蛋白的表达量,产生更多的能量维持根系的正常生长;通过增强氮同化及氨基酸转运相关蛋白的表达,提高根系吸收及转运氮的效率,进而促进了水稻生育后期的灌浆结实,既提高了氮素利用效率,同时实现水稻高产稳产的目的。

参考文献

- [1] 彭少兵,黄见良,钟旭华,等. 提高中国稻田氮肥利用率的研究策略[J]. 中国农业科学, 2002, 35(9): 1095-1103
Peng S B, Huang J L, Zhong X H, et al. Research strategy in improving fertilizer-nitrogen use efficiency of irrigated rice in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(9): 1095-1103
- [2] 李庆远,朱兆良,于天仁. 中国农业持续发展中的肥料问题[M]. 南昌:江西科学技术出版社, 1998
Li Q K, Zhu Z L, Yu T R. *Fertilizer Issues in the Sustainable Development of China Agriculture*[M]. Nanchang: Jiangxi Science and Technology Press, 1998
- [3] 丁艳锋,刘胜环,王绍华,等. 氮素基、氮肥用量对水稻氮素吸收与利用的影响[J]. 作物学报, 2004, 30(8): 762-767
Ding Y F, Liu S H, Wang S H, et al. Effects of the amount of basic and tillering nitrogen applied on absorption and utilization of nitrogen in rice[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(8): 762-767
- [4] 郑永美,丁艳锋,王强盛,等. 起身肥对水稻分蘖和氮素吸收利用的影响[J]. 作物学报, 2008, 34(3): 513-519
Zheng Y M, Ding Y F, Wang Q S, et al. Effect of nitrogen applied before transplanting on tillering and nitrogen utilization in rice[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(3): 513-519
- [5] 钟旭华,黄农荣,郑海波,等. 水稻“三控”施肥技术规程[J].

- 广东农业科学, 2007(5): 13-15
- Zhong X H, Huang N R, Zheng H B, et al. Specification for the "Three Controls" nutrient management technology for irrigated rice[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2007(5): 13-15
- [6] 黄农荣, 钟旭华, 陈荣彬, 等. 水稻三控施肥技术示范效果及增产增效原因分析[J]. 中国稻米, 2009, 15(3): 54-56
- Huang N R, Zhong X H, Chen R B, et al. Demonstration of "three controls" nutrient management technology for rice and analysis on its yield and profit-increasing reasons[J]. China Rice, 2009, 15(3): 54-56
- [7] 张洪程, 吴桂成, 戴其根, 等. 水稻氮肥精确后移及其机制[J]. 作物学报, 2011, 37(10): 1837-1851
- Zhang H C, Wu G C, Dai Q G, et al. Precise postponing nitrogen application and its mechanism in rice[J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(10): 1837-1851
- [8] 彭显龙, 刘元英, 罗盛国, 等. 实地氮肥管理对寒地水稻干物质积累和产量的影响[J]. 中国农业科学, 2006, 39(11): 2286-2293
- Peng X L, Liu Y Y, Luo S G, et al. Effects of the site-specific nitrogen management on yield and dry matter accumulation of rice in cold areas of northeastern China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(11): 2286-2293
- [9] 彭显龙, 刘元英, 罗盛国, 等. 寒地稻田施氮状况与氮素调控对水稻投入和产出的影响[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(4): 467-472
- Peng X L, Liu Y Y, Luo S G, et al. Nitrogen application situation and effects of nitrogen management on cost and output of paddy field in cold area of Northeast China[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 38(4): 467-472
- [10] 张志兴. 不同氮肥比例对水稻强弱势籽粒灌浆影响的差异蛋白组学分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2009
- Zhang Z X. Differential proteomic analysis of the effect of different application proportions of nitrogen fertilizer on the superior and inferior grain filling in rice (*Oryza sativa* L.)[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2009
- [11] 张志兴, 陈军, 李忠, 等. 水稻籽粒灌浆过程中蛋白质表达特性及其对氮肥运筹的响应[J]. 生态学报, 2012, 32(10): 3209-3224
- Zhang Z X, Chen J, Li Z, et al. Protein expression characteristics and their response to nitrogen application during grain-filling stage of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(10): 3209-3224
- [12] Zhang Z X, Chen J, Li Z, et al. Differential proteomic expressions between superior and inferior spikelets of rice in response to varied nitrogen treatments[J]. Australian Journal of Crop Science, 2012, 6(2): 316-325
- [13] 张志兴, 李忠, 陈军, 等. 氮肥运筹对大穗型水稻品种金恢 809 灌浆期叶片蛋白质表达的影响[J]. 作物学报, 2011, 37(5): 842-854
- Zhang Z X, Li Z, Chen J, et al. Effects of nitrogen management on protein expression of flag leaves during grain-filling period in large panicle rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(5): 842-854
- [14] Garrels J I. Quantitative two-dimensional gel electrophoresis of proteins[J]. Methods in Enzymology, 1983, 100: 411-423
- [15] 陈军, 叶荣榕, 李程勋, 等. 不同氮肥运筹方式对水稻氮素利用率及产量的影响[J]. 福建农业学报, 2012, 27(7): 759-763
- Chen J, Ye R R, Li C X, et al. Effects of nitrogen fertilizer management on rice yield and nitrogen utilization efficiency[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2012, 27(7): 759-763
- [16] 张之为, 赵君, 樊明寿, 等. 植物小 G 蛋白的研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 622-628
- Zhang Z W, Zhao J, Fan M S, et al. Current progress on the small GTPase in plants[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2009, 29(3): 622-628
- [17] Shisheva A, Chinni S R, DeMarco C. General role of GDP dissociation inhibitor 2 in membrane release of Rab proteins: Modulations of its functional interactions by *in vitro* and *in vivo* structural modifications[J]. Biochemistry, 1999, 38(36): 11711-11721
- [18] Heo J B, Yi Y B, Bahk J D. Rice GDP dissociation inhibitor 3 inhibits OsMAPK2 activity through physical interaction[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 414(4): 814-819
- [19] 张振才, 梁燕, 李翠. 植物 MAPK 级联途径及其功能研究进展[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2014, 42(4): 207-214
- Zhang Z C, Liang Y, Li C. Review on plant MAPK cascades and their functions[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2014, 42(4): 207-214
- [20] 张玉红, 安志刚. 植物 V-H⁺-ATP 酶适应逆境的分子调控机理[J]. 草业科学, 2013, 30(2): 245-252
- Zhang Y H, An Z G. Molecular regulation mechanism of V-H⁺-ATPase adapt to environmental stress in plant[J]. Pratacultural Science, 2013, 30(2): 245-252
- [21] Bay D C, Court D A. Origami in the outer membrane: The transmembrane arrangement of mitochondrial porins[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2002, 80(5): 551-562
- [22] 何美敬, 穆国俊, 侯名语, 等. 植物膜蛋白的结构及功能研究进展[J]. 西北植物学报, 2013, 33(12): 2567-2574
- He M J, Mu G J, Hou M Y, et al. Advances in structure and function of plant annexins[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(12): 2567-2574
- [23] 褚光, 周群, 薛亚光, 等. 栽培模式对杂交粳稻常优 5 号根系形态生理性状和地上部生长的影响[J]. 作物学报, 2014, 40(7): 1245-1258
- Chu G, Zhou Q, Xue Y G, et al. Effects of cultivation patterns on root morph-physiological traits and aboveground development of japonica hybrid rice cultivar changyou 5[J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(7): 1245-1258
- [24] 郑圣先, 聂军, 戴平安, 等. 控释氮肥对杂交水稻生育后期根系形态生理特征和衰老的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2006, 12(2): 188-194
- Zheng S X, Nie J, Dai P A, et al. Effect of controlled release nitrogen fertilizer on the morphological and physiological characteristics and senescence of root system during late

- growth stages of hybrid rice[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2006, 12(2): 188–194
- [25] Kristensen B K, Bloch H, Rasmussen S K. Barley coleoptile peroxidases: Purification, molecular cloning, and induction by pathogens[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(2): 501–512
- [26] Passardi F, Penel C, Dunand C. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(11): 534–540
- [27] Edwards R, Dixon D P, Walbot V. Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5): 193–198
- [28] Dixon D P, Laphorn A, Edwards R. Plant glutathione transferases[J]. *Genome Biology*, 2002, 3(3): 3004.1–3004.10
- [29] Akileswaran L, Brock B J, Cereghino J L, et al. 1,4-Benzoquinone reductase from *Phanerochaete chrysosporium*: cDNA cloning and regulation of expression[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(2): 415–421
- [30] Beyer R E, Segura-Aguilar J, Di Bernardo S, et al. The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(6): 2528–2532
- [31] 刘振林, 戴思兰. 植物甜菜碱醛脱氢酶基因研究进展[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(3): 104–112
- Liu Z L, Dai S L. Studies on betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) gene in plants[J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition*, 2004, 32(3): 104–112
- [32] 李新梅, 孙丙耀, 谈建中. 甜菜碱与植物抗逆性关系的研究进展[J]. *农业科学研究*, 2006, 27(3): 66–70
- Li X M, Sun B Y, Tan J Z. Research progress on application of glycine betaine in plant stress resistance[J]. *Journal of Agricultural Sciences*, 2006, 27(3): 66–70
- [33] 郁燕, 彭显龙, 刘元英, 等. 前氮后移对寒地水稻根系吸收能力的影响[J]. *土壤*, 2011, 43(4): 548–553
- Yu Y, Peng X L, Liu Y Y, et al. Effects of N application at later stage on absorbability of rice root in cold area[J]. *Soils*, 2011, 43(4): 548–553
- [34] 董芙蓉. 不同氮效率基因型水稻氮代谢关键酶活性及其基因表达特征分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2010
- Dong F R. Analysis of activities and characterization of the gene expression of key nitrogen metabolism enzymes in rice genotype with different N use efficiency[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2010
- [35] Schomburg D, Stephan D. 5-Methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase[M]//Schomburg D, Stephan D. *Enzyme Handbook 11*. Berlin: Springer, 1996: 63–66
- [36] Eckermann C, Eichel J, Schröder J. Plant methionine synthase: New insights into properties and expression[J]. *Biological Chemistry*, 2000, 381(8): 695–703
- [37] Degenhardt B, Gimmler H. Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51(344): 595–603