

氮素形态对喜树叶片生长、叶绿素荧光参数及叶绿体相关基因表达的影响

卞赛男¹, 常鹏杰¹, 王宁杭¹, 刘志高¹, 张明如¹, 吴家胜², 申亚梅¹, 王小德¹

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 为探究适于喜树 *Camptotheca acuminata* 生长的最佳氮素水平和氮素形态, 采用盆栽法, 以 2 年生喜树实生苗为材料, 以分析纯硫酸铵 $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 、硝酸钾 (KNO_3) 为氮肥, 设置对照 (ck)、铵态氮 $(\text{NH}_4^+\text{-N})$ [$\text{T}_1(2.5 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1})$ 、 $\text{T}_2(5.0 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1})$ 、 $\text{T}_3(7.5 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1})$ 、 $\text{T}_4(10.0 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1})$] 和硝态氮 $(\text{NO}_3^-\text{-N})$ [$\text{W}_1(2.5 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1})$ 、 $\text{W}_2(5.0 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1})$ 、 $\text{W}_3(7.5 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1})$ 、 $\text{W}_4(10.0 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1})$] 处理, 研究不同水平铵态氮和硝态氮施肥对喜树生长生理特性、叶绿素荧光参数及光系统 II 核心复合体叶绿体相关基因 (*psbA*, *psbB*, *psbC* 和 *RbcL*) 表达的影响。结果表明: 从整个生育期看, 与 ck 相比, 合理增施 ($\text{T}_1\sim\text{T}_3$, $\text{W}_1\sim\text{W}_3$) 铵态氮和硝态氮显著促进了喜树的生长发育、叶绿素合成、叶绿素荧光特性及叶绿体相关基因的表达 ($P<0.05$)。本试验条件下, T_3 和 W_3 施肥处理效果最佳 ($P<0.05$), 且 W_3 优于 T_3 ($P<0.05$), 认为喜树属于喜硝植物; 高氮 T_4 和 W_4 处理下处理后期 (处理 60~105 d), 喜树叶片受到明显的光抑制 ($P<0.05$), 表明高氮不利于植物光合特性的提高。适当增加铵态氮和硝态氮可以显著促进喜树的生长和光合效率; 喜树在 $7.5 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1}$ 的铵态氮和硝态氮施氮量下生长效果最佳。图 3 表 4 参 35

关键词: 植物营养学; 喜树; 铵态氮; 硝态氮; 叶绿素荧光; 相关基因

中图分类号: S718.43; Q945.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2019)05-0908-09

Leaf growth, chlorophyll fluorescence characteristics, and expression of photosystem-related genes in *Camptotheca acuminata* with different N forms' fertilization

BIAN Sainan¹, CHANG Pengjie¹, WANG Ninghang¹, LIU Zhigao¹, ZHANG Mingru¹,
WU Jiasheng², SHEN Yamei¹, WANG Xiaode¹

(1. School of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To provide a theoretical basis for fertilizer cultivation of *Camptotheca acuminata* and to explore the optimum nitrogen (N) level and suitable N form for growth, two-year-old *C. acuminata* was used as the material with pure ammonium sulfate $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ and potassium nitrate (KNO_3) for fertilization by using pot-cultivated experiments. The control (ck-no fertilizer), and four different concentrations of both ammonium nitrogen $(\text{NH}_4^+\text{-N})$ [$\text{T}_1(2.5 \text{ g}\cdot\text{tree}^{-1})$, $\text{T}_2(5.0 \text{ g}\cdot\text{tree}^{-1})$, $\text{T}_3(7.5 \text{ g}\cdot\text{tree}^{-1})$, and $\text{T}_4(10.0 \text{ g}\cdot\text{tree}^{-1})$] and nitrate N $(\text{NO}_3^-\text{-N})$ [$\text{W}_1(2.5 \text{ g}\cdot\text{tree}^{-1})$, $\text{W}_2(5.0 \text{ g}\cdot\text{tree}^{-1})$, $\text{W}_3(7.5 \text{ g}\cdot\text{tree}^{-1})$, and $\text{W}_4(10.0 \text{ g}\cdot\text{tree}^{-1})$] were used. The effects of growth physiology, chlorophyll fluorescence parameters, and expression of PS II chloroplast-associated genes (*psbA*, *psbB*, *psbC*, and *RbcL*) were studied. Results showed that compared with no fertilizer, all *C. acuminata* plants with all ammonium N and nitrate N fertilization treatments promoted ($P<0.05$) growth, chlorophyll synthesis, chlorophyll

收稿日期: 2018-09-29; 修回日期: 2019-03-18

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2017YFD0600706)

作者简介: 卞赛男, 从事园林植物研究。E-mail: 2657045649@qq.com。通信作者: 王小德, 教授, 博士, 从事园林植物研究。E-mail: wxd65@zafu.edu.cn

fluorescence characteristics, and chloroplast-related gene expression. Both T₃ and W₃ fertilization treatments had the best effect ($P < 0.05$), W₃ was better than T₃ in the growth ($P < 0.05$) and *C. acuminata* can be considered as a nitrophilous plant Chlorophyll fluorescence was significantly inhibited ($P < 0.05$) with T₄ and W₄ treatments. Thus, excessive N fertilizer was not conducive to improvement of the photosynthetic ability in plants. The growth and photosynthetic efficiency of *C. acuminata* can be improved by increasing ammonium nitrogen and nitrate nitrogen. Both ammonium nitrogen and nitrate nitrogen had the best growth effect at 7.5 g·tree⁻¹. [Ch, 3 fig. 4 tab. 35 ref.]

Key words: plant nutrition; *Camptotheca acuminata*; ammonium nitrogen; nitrate nitrogen; chlorophyll fluorescence; relative genes

喜树 *Camptotheca acuminata* 是中国特有树种, 属于蓝果树科 Nyssaceae 喜树属 *Camptotheca* 植物, 因叶片含有抗癌物质喜树碱(camptothecin), 被认为是重要药用植物。施肥是高效培育喜树、增加叶片产量的重要措施之一^[1]。氮素是植物生长和产量形成的首要因素, 植物吸收氮素的形式主要有铵态氮(NH₄⁺-N)和硝态氮(NO₃⁻-N)。研究表明: 合理增施氮肥可以促进植物生长, 提升植物品质^[2]; 除了影响光合作用, 氮素还影响植物中抗氧化酶和膜脂过氧化物的生理代谢。过量氮肥会打破植物内活性氧代谢的平衡, 破坏膜系统结构^[3], 导致植物生理系统的紊乱, 影响植物类囊体数量和类囊体蛋白形成。*psbA*, *psbB* 和 *psbC* 是光系统 II 核心复合体(PS II)中重要的蛋白编码基因。卡尔文循环中, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(rubisco)是光合特性中碳同化的关键酶, 主要由大、小 2 个亚基组成, 在植物碳同化过程中具有重要作用, 影响植物的光合特性^[4]。不同植物在不同环境和生育期表现出对不同氮素形态吸收的显著性差异^[5-6]。三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum*^[7]和铁核桃 *Juglans sigillata*^[8]都表现出对 NO₃⁻-N 吸收的偏向性, 而水稻 *Oryza sativa* 的叶绿素荧光动力学参数在 2 种氮素营养下没有差异^[9]; 出现差异的原因可能与研究对象和条件都存在一定的相关性^[10], 但氮素形态对植物叶绿素荧光动力学过程及其参数的影响机制, 目前尚无明确定论。总的来说, 不同植物对氮素形态吸收具有偏向性, 而后者直接影响了植物生长和叶绿素荧光特性, 从而影响植物生长的产量和品质, 因此合适的氮肥水平及形态对植物生长具有重要意义。近年来, 关于氮肥对喜树生长的研究, 主要集中在氮肥处理的不同水平^[11], 而尚未采用不同氮素形态的不同水平对喜树进行处理研究。因此, 本研究以 2 年生喜树实生苗为实验材料, 采用不同水平的铵态氮和硝态氮施肥处理, 通过研究叶片生长、叶绿素荧光特性和叶绿体相关基因的表达, 来探究适于喜树生长的最佳氮素水平和氮素形态, 为喜树施肥栽培提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试验方法

于 2017 年 4 月 5 日选取无病虫害、生长健壮、规格基本一致的优质 2 年生喜树实生苗 270 株(江西九江森森绿化苗木公司), 栽植在直径 30.0 cm, 高 40.0 cm 的花盆中。栽植基质为 V(泥炭):V(珍珠岩):V(园土)=1:1:3, 填土(10.0±0.2) kg·盆⁻¹, 土壤 pH 值为 6.8, 土壤电导率(EC)为 0.305 mS·cm⁻¹, 水解氮为 86.6 mg·kg⁻¹, 速效磷为 3.2 mg·kg⁻¹, 速效钾为 94.6 mg·kg⁻¹。苗木于浙江农林大学平山试验基地(30°15'50.09"N, 119°42'54.67"E)缓苗 2 月, 缓苗期间正常浇水, 待全部成活后, 于 6 月 18 日搬于浙江农林大学温室内(30°15'30.39"N, 119°43'26.92"E)进行施肥处理。

试验以清水组为对照(ck), 铵态氮处理组使用硫酸铵[(NH₄)₂SO₄]施肥, 施氮量分别为 2.5(T₁), 5.0(T₂), 7.5(T₃)和 10.0(T₄) g·株⁻¹, 硝态氮处理组使用硝酸钾(KNO₃)施肥, 施氮量分别为 2.5(W₁), 5.0(W₂), 7.5(W₃)和 10.0(W₄) g·株⁻¹。所有盆栽苗均随机摆放, 叶片之间无重叠, 各盆配有直径 40.0 cm 的托盘, 防止养分流失, 每处理设置 10 株, 重复 3 次。试验从 6 月 18 日至 10 月 4 日, 隔 15 d 施肥 1 次。供试氮肥均为分析纯(AR99%), 购自国药(硫酸铵 CAS#: 7783-20-2, 硝酸钾 CAS: 7757-7)。施铵态肥时, 肥料中加入 7.0 μmol·L⁻¹ 二氰二氨(C₂H₄N₄, DCD)以抑制硝化反应, 于 0, 30, 60, 90, 105 d 测定相关数据。试验期间进行正常的管理。

1.2 测定项目和方法

叶长：分别于处理前后(0, 105 d)选第2轮叶的倒数第3, 4, 5片叶子, 用直尺测量苗木的叶长(测量3株, 取平均值), 从叶片与叶柄连接基部到叶片尖端, 精确到0.1 cm。叶面积：于处理前后(0, 105 d)选第2轮叶的倒数第3, 4, 5片叶子, 用方格纸测定苗木的叶面积(测量3株, 取平均值), 从叶片与叶柄连接基部到叶片尖端的整个范围, 精确到0.01 cm²。叶绿素a和叶绿素b：采集喜树顶端第5, 6片叶, 参照李合生^[12]乙醇浸提法测定叶绿素质量分数。叶绿素荧光参数：采用Li-6400便携式光合仪(LI-COR, Lincoln, 美国), 于晴天上午9:00-11:00测定植株上位叶(第2轮叶倒数3, 4片)叶绿素荧光参数。叶片暗适应30 min后测定初始荧光产量(F_0), 随后施加1次强闪光(6 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 脉冲时间0.7 s)测最大荧光产量(F_m), 然后在自然光下适应20 min, 待荧光基本稳定再测得稳态荧光产量(F_s), 最后给予1次强闪光, 获得光适应下的最大荧光产量(F_m') and 最小荧光(F_0')。各处理均3次重复。暗反应下PS II最大光化学效率 $F_v/F_m=(F_m-F_0)/F_m$, 光系统下PS II最大捕获效率 $F_v'/F_m'=(F_m'-F_0')/F_m'$, 光化学猝灭系数 $q_p=(F_m'-F_s)/(F_m'-F_0')$, 非光化学猝灭系数 $q_N=1-F_v'/F_m'$ ^[13]。测定叶绿素荧光参数时, 同时任选3株, 从各株顶端6~9片叶中任意采集3片, 放入液氮罐中带回实验室置于-80℃冰箱中保存, 用于测定光合酶基因的表达。叶绿体基因的表达：采用RNAperp Pure Plant Kit(TIANGEN, 北京)试剂提取喜树RNA; 参照 Reverse Transcriptase M-MLV (Takara, 大连)试剂说明书合成cDNA, 于-20℃储存备用。从美国国立生物技术信息中心(NCBI)上获得喜树叶绿体基因序列, 以 *Actin* 为内参基因, 用Primer Express software(Applied Bio systems)设计引物(表1)。反转录产物cDNA稀释10倍后, 用SYBR®Primix Ex Taq™试剂盒(Takara, 大连)进行实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR), 利用Light Cycler 480 II (Roche) 荧光定量仪器进行目的基因qRT-PCR表达分析, 反应体系为20.0 μL , 其中SYBR® Primix Ex Taq™ 荧光染料10.0 μL , cDNA模板2.0 μL , 上下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各0.8 μL , 双蒸水6.4 μL 。两步法PCR扩增标准程序：预变性95℃30 s; 聚合酶链式反应95℃5 s, 61℃30 s, 40个循环, 每个样品重复3次, 采用2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 算法分析结果。

表1 荧光定量PCR引物

Table 1 Primers sequence of target genes

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>psbA</i>	ACAGATTCGGTCAAGAGGAAGA	CAGTGAACCGATACCTACTACAG
<i>psbB</i>	GGAGGAATCGCTTCTCATCATAT	CGGACGCTAAGATGGAATAGAC
<i>psbC</i>	GTCAATTATGTCTCGCCTAGAAGT	GACCTACGAAGAAGAAGATCCTAA
<i>RbcL</i>	CTTGCCAGCATTCCGAGTAAC	GTTGTCCATGTACCAGTAGAAGATT
<i>Actin</i>	GGTACTCGTTCACAACAACCTGCTG	CTGTCCATCGGGCAACTCATAG

1.3 数据统计与分析

采用Excel 2007和SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。采用单因素(one-way ANOVA)和Duncan法进行方差分析和多重比较($\alpha=0.05$)。利用Origin 9.0软件作图。图表中数据为平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 氮素处理水平对喜树叶片生长的影响

表2显示：喜树生长至105 d, 叶长和叶面积均增加, 处理组叶长和叶面积均显著高于ck($P<0.05$)。随着氮素处理水平的提高, 叶长和叶面积均呈先上升后下降趋势。与其他处理相比, T₃和W₃叶长和叶面积最大, 叶长较ck(8.10±0.02) cm分别增加了32.3%和78.5%, 叶面积较ck(25.43±0.15) cm²依次增加了130.0%和242.0%; 且硝态氮处理水平下的叶长和叶面积均高于铵态氮, 说明硝态氮更有利于植物生长。

2.2 氮素处理水平对喜树叶片叶绿素质量分数的影响

2.2.1 铵态氮不同处理水平对喜树叶片叶绿素质量分数的影响 由表3可知：随生长时长, 植株叶片叶绿素质量分数总体升高, 除T₄外, 其他处理叶绿素质量分数60 d较30 d时有所下降, 90 d时又有所上升, 至105 d时达到最大值。相同生长时长下, 不同处理水平间差异较小。生长至105 d时, T₃叶绿素质量分数显著高于其余处理($P<0.05$), 较ck, T₁, T₂和T₄依次上升了35.2%, 17.2%, 23.8%和15.2%。

2.2.2 硝态氮不同处理水平对喜树叶片叶绿素质量分数的影响 表4表明：随处理时间的延长, 硝态氮处理下喜树叶片叶绿素质量分数变化显著; 但不同处理水平相比, 质量分数差异较小。处理30~60 d,

表 2 氮素处理水平对喜树叶长和叶面积的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of ammonium nitrogen and nitrate on leaf length of *Camptotheca acuminata*

处理	叶长/cm	叶面积/cm ²	处理	叶长/cm	叶面积/cm ²
ck	13.00 ± 0.12 Ad	58.83 ± 0.14 Ae	ck	13.00 ± 0.12 Ad	53.83 ± 0.14 Ae
T ₁	15.80 ± 0.12 Ac	79.07 ± 0.08 Bd	W ₁	19.20 ± 0.06 Ac	139.73 ± 0.24 Ad
T ₂	16.70 ± 0.03 Bb	98.93 ± 0.08 Bc	W ₂	20.80 ± 0.08 Ab	152.07 ± 0.35 Ab
T ₃	16.70 ± 0.03 Bb	124.03 ± 0.12 Ba	W ₃	23.20 ± 0.21 Aa	184.30 ± 0.05 Aa
T ₄	16.40 ± 0.05 Bb	116.37 ± 0.31 Bb	W ₄	20.50 ± 0.03 Ab	150.97 ± 0.12 Ac

说明: 不同小写字母表示同种氮素不同水平间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同种氮素相同水平下与 ck 差异显著 ($P < 0.05$)

表 3 不同铵态氮处理水平对喜树叶片叶绿素质量分数的影响

Table 3 Effects of different concentrations of ammonium nitrogen and nitrate on chlorophyll content in *C. acuminata*

处理	$w_{\text{叶绿素}}/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$				
	0 d	30 d	60 d	90 d	105 d
ck	1.61 ± 0.26 Da	1.90 ± 0.26 Db	2.80 ± 0.10 Cb	3.96 ± 0.22 Ba	4.38 ± 0.16 Ac
T ₁	1.63 ± 0.19 Da	4.54 ± 0.83 Aa	4.30 ± 0.08 Ca	3.72 ± 0.85 Ca	5.05 ± 0.12 ABb
T ₂	1.61 ± 0.09 Da	4.78 ± 0.49 Aa	4.36 ± 0.19 Ca	4.72 ± 0.39 Ca	5.14 ± 0.36 ABb
T ₃	1.67 ± 0.14 Da	5.25 ± 0.32 Ba	4.53 ± 0.17 Ca	4.80 ± 0.32 Ca	5.92 ± 0.11 Aa
T ₄	1.61 ± 0.11 Da	4.88 ± 0.11 Ba	4.39 ± 0.15 ABa	4.26 ± 0.23 ABa	4.78 ± 0.22 Ab

说明: 不同小写字母表示同种氮素不同水平间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同种氮素相同水平下与 ck 差异显著 ($P < 0.05$)

所有铵态氮处理下叶绿素质量分数均显著高于 ck, 各处理水平相比, W₃ 处理下叶绿素质量分数最高, 较 ck 和其他处理依次高出 73.9%, 44.5%, 10.2% 和 31.3%。处理 90~105 d, ck 和 W₁ 的叶绿素质量分数继续上升, W₂, W₃ 和 W₄ 先上升后下降, 105 d 时, W₁ 叶绿素质量分数高于其他处理, W₄ 最低。

表 4 不同硝态氮处理水平对喜树叶片叶绿素质量分数的影响

Table 4 Effects of different concentrations of ammonium nitrogen and nitrate on the chlorophyll content in *C. acuminata*

处理	$w_{\text{叶绿素}}/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$				
	0 d	30 d	60 d	90 d	105 d
ck	1.61 ± 0.17 Ca	1.90 ± 0.26 Ba	2.80 ± 0.10 ABc	4.38 ± 0.16 Ba	3.69 ± 0.22 Aab
W ₁	1.65 ± 0.24 Ca	2.97 ± 0.84 Ba	3.37 ± 0.16 Ab	4.39 ± 0.10 Aa	4.41 ± 0.13 ABa
W ₂	1.63 ± 0.12 Ba	3.84 ± 0.09 Aa	4.42 ± 0.38 Aab	3.68 ± 0.11 Abc	3.95 ± 0.11 Aa
W ₃	1.67 ± 0.19 Ca	3.89 ± 0.14 Aa	4.87 ± 0.23 Aa	3.15 ± 0.49 Ac	3.83 ± 0.29 Ba
W ₄	1.61 ± 0.11 Ba	3.45 ± 0.10 Aa	3.71 ± 0.28 Ab	3.22 ± 0.13 Ac	3.80 ± 0.35 Aa

说明: 不同小写字母表示同种氮素不同水平间差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示同种氮素相同水平下与 ck 差异显著 ($P < 0.05$)

2.3 氮素处理水平对喜树叶片叶绿素荧光参数的影响

2.3.1 铵态氮不同处理水平对喜树叶片叶绿素荧光参数的影响 由图 1 可知: 至 30 d, F_v/F_m , F_v'/F_m' 和 q_p 呈显著上升趋势 ($P < 0.05$), q_{NP} 呈下降趋势, T₄ 处理下 F_v/F_m , F_v'/F_m' 和 q_p 达到最大。到 60 d 时, T₂ 和 T₃ 处理下 F_v/F_m , F_v'/F_m' 和 q_p 达到最大值, 与 ck 相比, 依次提高了 1.4%, 9.2% 和 84.8%。60 d 时 T₃ 处理组各测试参数显著高于其他处理 ($P < 0.05$), T₄ 显著低于其他处理。处理 90~105 d, T₂, T₃ 和 T₄ 处理下 F_v/F_m , F_v'/F_m' 和 q_p 值呈下降趋势, T₁ 处理下 F_v/F_m 下降, F_v'/F_m' 和 q_p 值呈上升趋势, T₃ 依然高于其余处理。90 d 时, T₃ 处理下 q_{NP} 显著低于其他同类处理, 与 ck 相比下降了 12.9%; 105 d 时, T₄ 处理下 F_v/F_m , F_v'/F_m' 和 q_p 降到最小, 显著低于其他处理; 与 ck 相比, 依次下降了 11.1%, 3.3% 和 5.6%。

2.3.2 硝态氮不同处理水平对喜树叶片叶绿素荧光参数的影响 图 2 显示: 30 d 时, 不同硝态氮处理下 F_v/F_m , F_v'/F_m' 和 q_p 显著上升, q_{NP} 显著下降, 其中 W₄ 处理 F_v/F_m 和 F_v'/F_m' 达到最大值, 此后显著下降 ($P < 0.05$)。60 d 时, W₂ 和 W₃ 处理下 F_v/F_m , F_v'/F_m' 和 q_p 达到最大值, 与 ck 相比, 依次上升了 2.6%, 12.3% 和 115.8%; 此时 W₃ 处理下这 3 个参数值显著高于其他处理。处理 90~105 d, W₂, W₃ 和 W₄ 处理

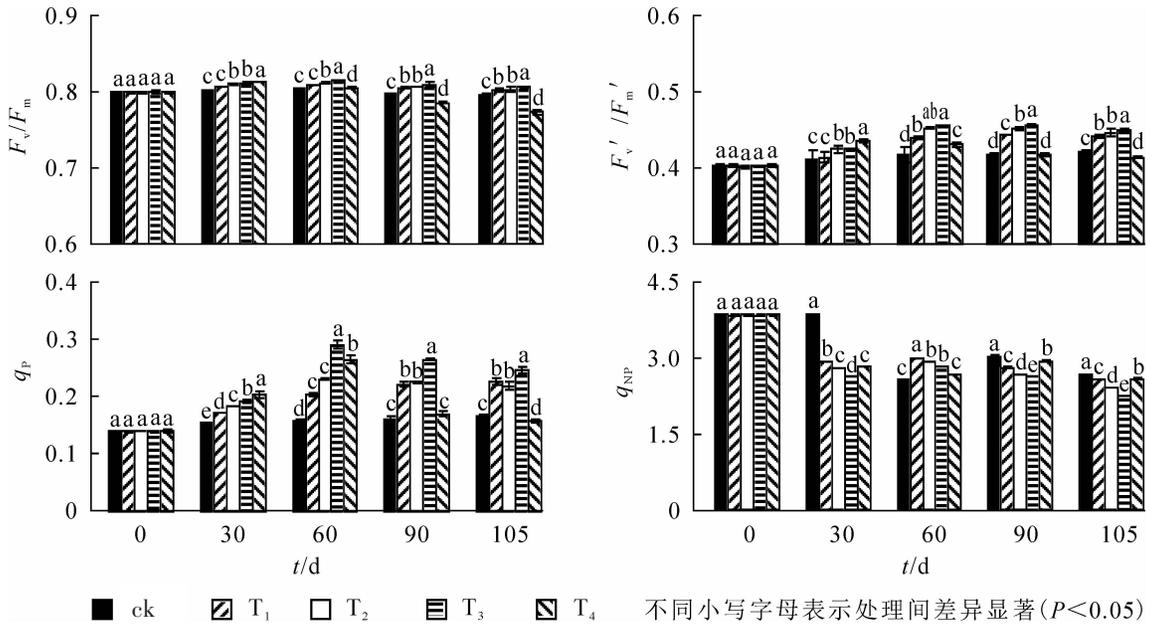


图1 铵态氮不同处理水平对喜树叶片叶绿素荧光参数的影响

Figure 1 Effects of different concentrations of ammonium nitrogen on chlorophyll fluorescence characteristics of *Camptotheca acuminata*. F_v/F_m , F_v'/F_m' and q_p values showed a downward trend; W_1 treatment F_v/F_m decreased, F_v'/F_m' and q_p values increased; W_3 treatment F_v'/F_m' and q_p values were still higher than other treatments, q_{NP} was significantly lower than other treatments, decreased 29.9% compared with ck. At 105 d, W_4 treatment F_v/F_m , F_v'/F_m' and q_p were significantly lower than other treatments, compared with ck, they decreased 11.1%, 3.3% and 5.6% respectively.

2.4 氮素形态和处理水平对喜树叶片核心复合体叶绿体基因和光合酶基因表达的影响

以不同处理在 0 d 时的表达量为 ck，增施氮肥对 PS II 蛋白编码基因 *psbA* (图 3A 和图 3B)，*psbB* (图 3C 和图 3D)，*psbC* (图 3E 和图 3F) 和光合酶基因 *RbcL* (图 3G 和图 3H) 表达的影响显著 ($P < 0.05$)。由图 3 可知：生长 30 d，所有基因表达量显著提高。处理 60 d 时， T_3 处理下 *psbA* 表达上调，其余处理下所有基因表达显著下调 ($P < 0.05$)， T_3 和 W_3 处理下 *psbA*，*psbC* 和 *RbcL* 表达量显著高于其他同类处理 ($P < 0.05$)，所有铵态氮处理 *psbB* 随处理水平的升高而升高， T_2 处理 *psbB* 表达量显著低于其他同类处理 ($P < 0.05$)；与 T_1 ， T_2 和 T_4 相比， T_3 处理 *psbA* 表达量上升了 76.3%，50.8% 和 55.6%，*psbC* 表达量上升了 15.8%，16.5% 和 52.5%，*RbcL* 表达量上升了 66.8%，34.4% 和 39.9%。与 W_1 ， W_2 和 W_4 相比， W_3

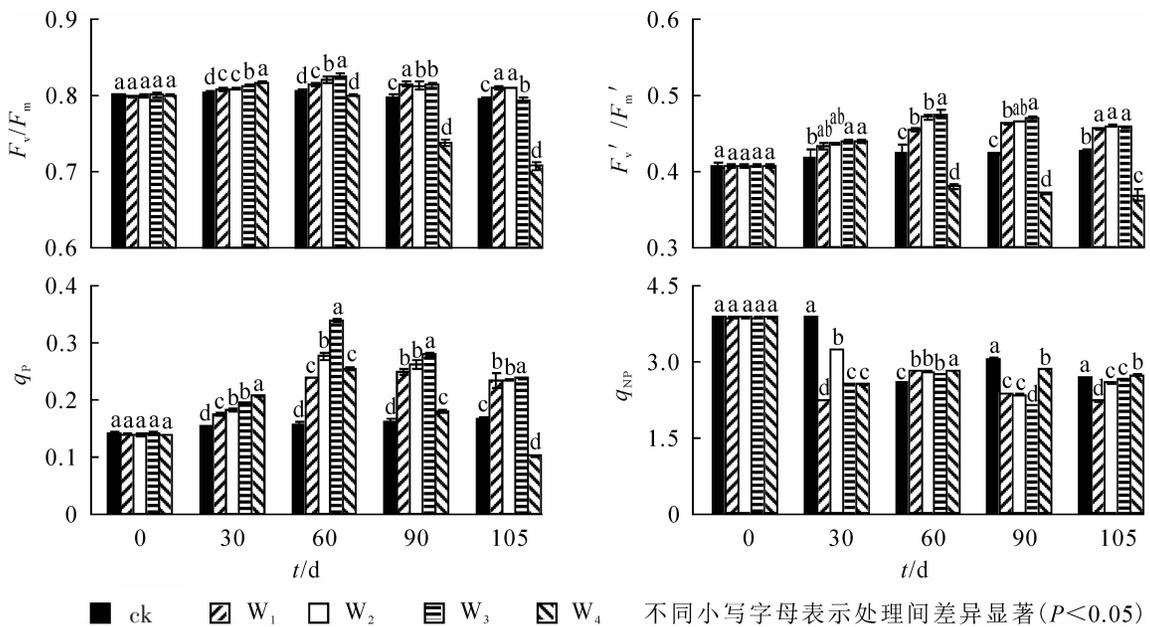


图2 铵态氮不同处理水平对喜树叶片叶绿素荧光参数的影响

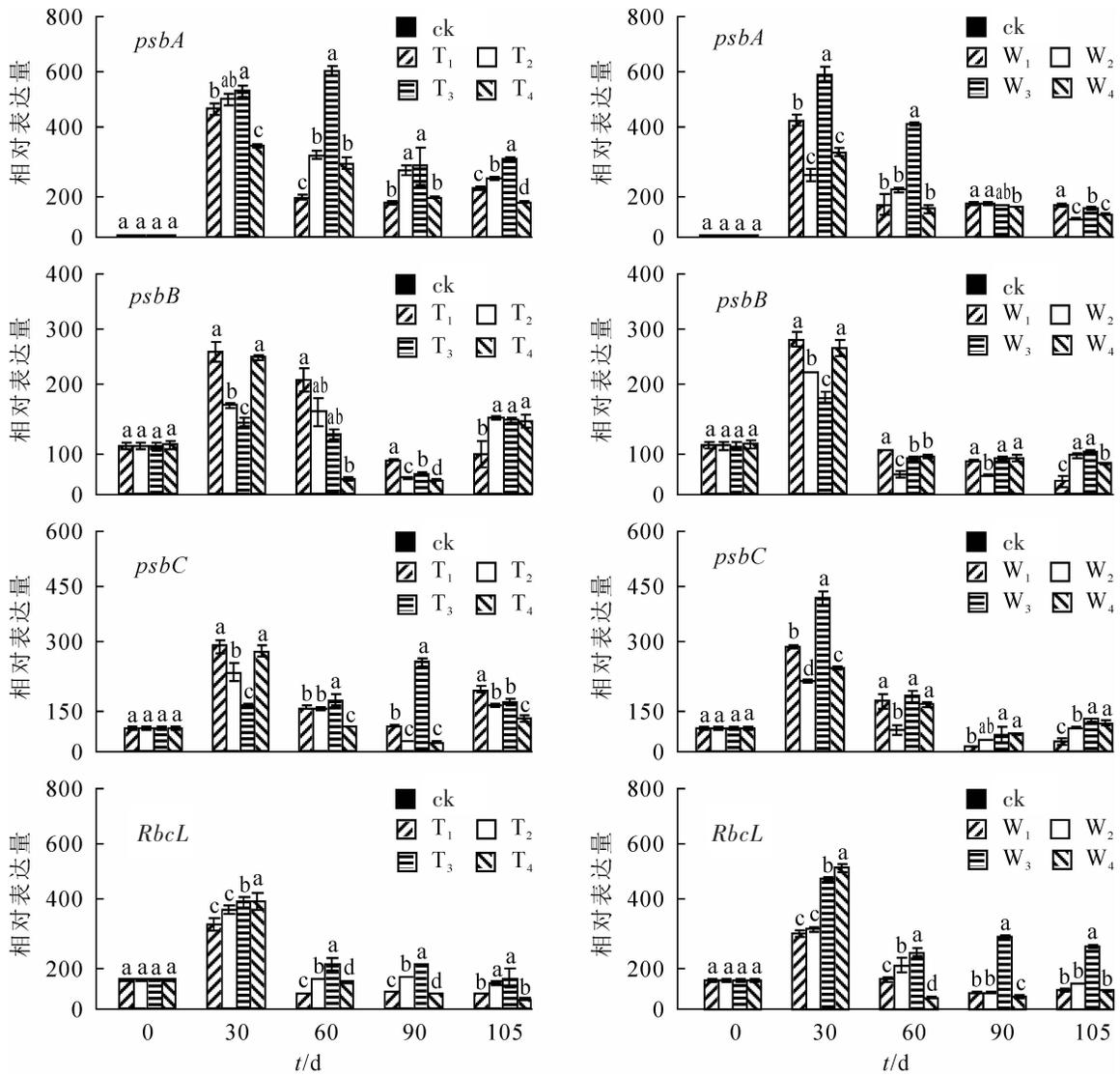
Figure 2 Effects of different concentrations of nitrate nitrogen on chlorophyll fluorescence characteristics of *C. acuminata*

处理 *psbA* 表达量上升了 71.9%，57.9%和 75.6%；*psbC* 表达量上升了 8.7%，61.7%和 15.4%；*RbcL* 表达量上升了 47.1%，22.3%和 79.1%，处理 90~105 d， T_3 和 W_3 也保持显著优势，90 d 时， T_3 较 T_1 ， T_2 和 T_4 依次增加了 88.9%，28.7%，379.1%， W_3 较 W_1 ， W_2 ， W_4 依次增加了 201.8%，52.3%和 45.5%。105 d 时， T_4 处理 *psbA* 和 *RbcL* 表达量显著低于其他同类水平处理，达到最小值。

3 讨论

植物不同生长过程对氮肥需求不同，在合理范围内增施氮肥，可以显著促进植物生长，提高植物的产量和品质^[14]。研究认为：与铵态氮相比，硝态氮具有更好的亲和力、氮转运和吸收效果^[15]。本研究发现：铵态氮和硝态氮均提高了喜树的叶面积和叶长生长量，以 T_3 和 W_3 优势最为明显；相比而言，硝态氮处理下喜树生长更优；随着氮素水平的继续提高，喜树叶长和叶面积显著下降，说明植物吸收利用氮素存在一定限度，过量添加不利于生物量的积累^[16]。

叶绿素参与光能的吸收传递及分配，是重要的光合色素；不同氮素形态对植物叶绿素合成及对光能吸收、传递、捕获和转换具有重要影响^[17]。研究表明：适量增加氮素可促进米老排 *Mytilaria laosensis*^[18] 和菘蓝 *Isatis indigotica*^[19] 叶绿素合成，提高光合效率。本研究发现：合理范围内(T_1 ~ T_3 ， W_1 ~ W_3)增施氮肥，喜树叶片叶绿素合成和光合效率显著提高，以 T_3 和 W_3 效果最佳。对油麦菜 *Lactuca sativa* var.



不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)

图 3 氮素形态和氮素水平对喜树叶绿体基因和光合酶基因表达的影响

Figure 3 Effects of different ammonium nitrogen and nitrate on the expression of chloroplast genes and photosynthetic enzyme genes in *C. acuminata*

longifolia^[20]和黄瓜 *Cucumis sativus*^[21]而言, 硝态氮处理下叶绿素相对含量和叶绿素荧光参数高于铵态氮处理; 本研究同样发现, 处理初期, 相同氮素水平下, 硝态氮处理组叶绿素质量分数和叶绿素荧光参数显著高于铵态氮, 这可能与植物对氮素形态的吸收代谢有关。李晓静等^[22]发现铵态氮以被动吸收为主, 扩散进入生物膜并破坏生物膜结构, 阻碍质子动力势的建立和碳同化物的形成; 而硝态氮以主动吸收为主, 进入生物膜并储存于液泡中, 对植物体内离子平衡、碳同化物的形成有利。RAAB 等^[23]研究发现: 高氮会造成叶绿素酶失活, 叶绿素分解, 光系统 II 遭到破坏, 光子传递受阻, 使植物发生光抑制现象; 如小麦 *Triticum aestivum* 在高氮处理下, 植物光合结构和功能受到伤害, 光合特性降低^[24]。本研究发现, 处理中后期(60~105 d)高氮水平下(T₄和 W₄), 喜树的叶绿素质量分数、叶绿素荧光特性显著下降。原因可能是高铵态氮造成铵离子在体内积累, 类囊体结构被破坏, 质子形成受阻, 形成氧化磷酸化, 破坏碳水化合物形成, 导致叶绿素合成受阻和植物光合特性降低^[25]; 高硝态氮处理破坏土壤理化性质, 造成喜树缺素症, 表现出对铁、镁等元素吸收的拮抗作用, 从而影响植物光合特性^[26]。不同氮素形态或水平对 q_{NP} 影响无显著规律, 其原因还需要进一步研究。

光系统 II (PS II) 由多亚基复合组成, 吸收外界光能并将激发能转移到反应中心; *psbA*, *psbB* 和 *psbC* 是编码 PS II 反应中心蛋白质基因, *RbcL* 基因编码核酮糖二磷酸羧化酶的大亚基。研究发现: 增施氮肥可以提高植物碳同化能力, 促进 *RbcL* 表达^[27]。以甜菜 *Beta vulgaris*^[28]为例, 铵态氮处理, 其叶片中 Rubisco 酶基因表达高于硝态氮处理。本研究中, 处理初期(30 d)不同氮素形态处理均促进了叶绿体基因的表达, 相同水平下硝态氮处理 *RbcL* 的表达高于铵态氮; 至中后期, T₁ 和 W₁ 处理下 *RbcL* 的表达显著高于其他同类处理, 说明适宜的铵态氮和硝态氮处理提高了植物的碳同化能力; 相比之下, 硝态氮较铵态氮更有利于提高喜树的碳同化能力, 进一步说明了喜树是喜硝植物^[29]。叶绿素荧光过程极其复杂, 受各种刺激调控, 植物碳同化和氮同化可能存在相应的竞争关系。本试验 60 d 时, 叶绿体基因表达下调, 可能原因是随着植物对长期环境变化的响应和适应, 相关叶绿体基因表达受到影响^[30-31]。环境胁迫造成 PS II 中的蛋白质破坏, 受蛋白编码基因刺激表达的影响, 受损的蛋白质不断被新合成的蛋白质替代。SHAO 等^[32]发现: 2.0 mg·L⁻¹ 氮处理下, 连苯三酚引起的铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 损害可通过 *psbA* 的刺激表达弥补。本实验中 *psbA*, *psbB* 和 *psbC* 在不同氮素水平处理下表达差异不显著, 可能是氮素刺激了 PS II 的蛋白质合成, 形成自我保护机制^[33]。高氮处理下, 植物光电子传递受阻、热耗散能力显著下降、碳同化能力下降, 发生了明显的光抑制现象^[34], 也会造成叶绿体基因的表达显著下调。高铵态氮下铵离子的积累破坏了类囊体蛋白, 降低了 Rubisco 酶活力, 而高硝态氮下, 植物对三价铁离子、二价镁离子的吸收下降, Rubisco 酶活力受损, 导致叶绿体基质中类囊体光驱电子的转移受阻, 从而影响质子中铁硫-氧化蛋白的还原^[35]。

4 参考文献

- [1] 于雪, 黄嘉鑫, 王玉波, 等. 氮肥对甜菜叶片叶绿素荧光动力学参数的影响[J]. 核农学报, 2014, **28**(10): 1918 - 1923.
YU Xue, HUANG Jiabin, WANG Yubo, *et al.* Effect of nitrogen on chlorophyll fluorescence of blade of sugar beet [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2014, **28**(10): 1918 - 1923.
- [2] 白钰, 唐晓清, 施晟璐, 等. 氮营养对菘蓝生长及活性成分积累的影响[J]. 核农学报, 2017, **31**(1): 169 - 178.
BAI Yu, TANG Xiaoqing, SHI Shenglu, *et al.* Effect of nitrogen nutrition on growth and accumulation of active ingredients in *Isatis indigotica* Fort. [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2017, **31**(1): 169 - 178.
- [3] 陆奇杰, 巢建国, 谷巍, 等. 不同氮素水平对茅苍术光合特性及生理指标的影响[J]. 植物生理学报, 2017, **53**(9): 1673 - 1679.
LU Qijie, CHAO Jianguo, GU Wei, *et al.* Effects of different nitrogen levels on photosynthetic characteristics and physiological indexes of *Atractylodes lancea* [J]. *Plant Physiol J*, 2017, **53**(9): 1673 - 1679.
- [4] LI Gang, CAMPBELL D A. Interactive effects of nitrogen and light on growth rates and RUBISCO content of small and large centric diatoms [J]. *Photosynth Res*, 2017, **131**(1): 93 - 103.
- [5] WANG Zhanghong, GUO Haiyan, SHEN Fei, *et al.* Biochar produced from oak sawdust by Lanthanum (La)-involved

- pyrolysis for adsorption of ammonium (NH_4^+), nitrate (NO_3^-), and phosphate (PO_4^{3-}) [J]. *Chemosphere*, 2015, **119**: 646 – 653.
- [6] QIN Shiyu, SUN Xuecheng, HU Chengxiao, *et al.* Effect of NO_3^- : NH_4^+ ratios on growth, root morphology and leaf metabolism of oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedlings [J]. *Acta Physiol Plant*, 2017, **39**(9): 198. doi: 10.1007/s11738-017-2491-9
- [7] 张强, 龙民慧, 宋运贤, 等. 不同氮形态对濒危药用植物三叶青叶片光合、能量分配和抗氧化酶活性的影响 [J]. *生态学杂志*, 2018, **37**(3): 877 – 883.
ZHANG Qiang, LONG Minhui, SONG Yunxian, *et al.* Effects of different nitrogen forms on photosynthesis, energy allocation and activities of antioxidant enzymes in the leaves of *Tetrastigma hemsleyanum* [J]. *Chin J Ecol*, 2018, **37**(3): 877 – 883.
- [8] 樊卫国, 葛慧敏, 吴素芳, 等. 不同形态氮素及其配比对铁核桃实生苗叶片光合特性和养分含量的影响 [J]. *果树学报*, 2013, **30**(3): 437 – 443.
FAN Weiguo, GE Huimin, WU Sufang, *et al.* Effects of different form nitrogen and ratios on the photosynthetic characteristics and nutrient contents in leaves of *Juglans sigillata* seedling [J]. *J Fruit Sci*, 2013, **30**(3): 437 – 443.
- [9] ZHOU Yanhong, ZHANG Yili, WANG Xuemin, *et al.* Effects of nitrogen form on growth, CO_2 assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2011, **12**(2): 126 – 134.
- [10] TSABARDUCAS V, CHATZISTATHIS T, THERIOS I, *et al.* How nitrogen form and concentration affect growth, nutrient accumulation and photosynthetic performance of *Olea europaea* L. (cv. ‘Kalamon’) [J]. *Sci Hortic*, 2017, **218**: 23 – 29.
- [11] 匡鹤凌, 汪贵斌, 曹福亮. 氮素对喜树光合作用、营养元素和喜树碱含量的影响 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2016, **40**(3): 15 – 20.
KUANG Heling, WANG Guibin, CAO Fuliang. Influence of nitrogen levels on photosynthesis, nutrient elements and camptothecin content of *Camptotheca acuminata* [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2016, **40**(3): 15 – 20.
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [13] DEMMIG-ADAMS B, ADAMS W, BARKER D H, *et al.* Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation [J]. *Physiol Plant*, 1996, **98**(2): 253 – 264.
- [14] 从夕汉, 施伏芝, 阮新民, 等. 氮肥水平对不同基因型水稻氮素利用率、产量和品质的影响 [J]. *应用生态学报*, 2017, **28**(4): 1219 – 1226.
CONG Xihan, SHI Fuzhi, RUAN Xinmin, *et al.* Effects of nitrogen fertilizer application rate on nitrogen use efficiency and grain yield and quality of different rice varieties [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2017, **28**(4): 1219 – 1226.
- [15] MIN X J, SIDDIQI M Y, GUY R D, *et al.* Induction of nitrate uptake and nitrate reductase activity in trembling aspen and lodgepole pine [J]. *Plant Cell Environ*, 1998, **21**: 1039 – 1046.
- [16] DU Enzai, LIU Xiuyuan, FANG Jingyun. Effects of nitrogen additions on biomass, stoichiometry and nutrient pools of moss *Rhytidium rugosum* in a boreal forest in Northeast China [J]. *Environ Pollut*, 2014, **188**: 166 – 171.
- [17] CENDRERO-MATEO M P, MORAN M S, PAPUGA S A, *et al.* Plant chlorophyll fluorescence: active and passive measurements at canopy and leaf scales with different nitrogen treatments [J]. *J Exp Bot*, 2016, **67**(1): 275 – 286.
- [18] 刘福妹, 劳庆祥, 庞圣江, 等. 不同氮素水平对米老排苗期生长和叶绿素荧光特性的影响 [J]. *西北林学院学报*, 2018, **33**(1): 62 – 67.
LIU Fumei, LAO Qingxiang, PANG Shengjiang, *et al.* Effects of nitrogen fertilization on growth performance and chlorophyll fluorescence parameters of *Mytilaria laosensis* seedlings [J]. *J Northwest For Univ*, 2018, **33**(1): 62 – 67.
- [19] 吕婷婷, 施晟璐, 唐晓清, 等. 氮素营养对不同产地菘蓝的干物质积累、根外形品质及光合作用的影响 [J]. *南京农业大学学报*, 2015, **38**(3): 395 – 401.
LÜ Tingting, SHI Shenglu, TANG Xiaoqing, *et al.* Effect of nitrogen nutrient on dry matter accumulation, apparent quality and photosynthesis of *Isatis indigotica* Fort. from different areas [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2015, **38**(3): 395 – 401.
- [20] 胡海非, 张巧柔, 吴卫东, 等. 氮素形态对油麦菜幼苗光合作用及其荧光特性的影响 [J]. *热带作物学报*, 2016, **37**(1): 7 – 14.

- HU Haifei, ZHANG Qiaorou, WU Weidong, *et al.* Effect of nitrogen forms on photosynthesis and fluorescence chlorophyll fluorescence characteristics of lettuce seedlings leaves [J]. *Chin J Trop Crop*, 2016, **37**(1): 7 – 14.
- [21] 伍松鹏, 张秀娟, 吴楚, 等. 不同氮素形态比例对黄瓜幼苗生长和光合特性的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, **34**(12): 2697, 2707.
- WU Songpeng, ZHANG Xiujuan, WU Chu, *et al.* Effects of different ratios of nitrogen forms on photosynthetic characteristics and growth of cucumber seedlings [J]. *J Anhui Agric Sci*, **34**(12): 2697, 2707.
- [22] 李晓静, 樊明寿. 氮素形态对茺荳光合作用和硝酸盐积累的影响[J]. 华北农学报, 2010, **25**(2): 221 – 223.
- LI Xiaojing, FAN Mingshou. Effect of nitrogen form on nitrate and photosynthesis in coriander [J]. *Acta Agric Boreal Sin*, 2010, **25**(2): 221 – 223.
- [23] RAAB T K, TERRY N. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. [J]. *Plant Physiology*, 1994, **105**(4): 1159 – 1166.
- [24] 吴晓丽, 李朝苏, 汤永禄, 等. 氮肥运筹对小麦产量、氮素利用效率和光能利用率的影响[J]. 应用生态学报, 2017, **28**(6): 1889 – 1898.
- WU Xiaoli, LI Chaosu, TANG Yonglu, *et al.* Effect of nitrogen management modes on grain yield, nitrogen use efficiency and light use efficiency of wheat [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2017, **28**(6): 1889 – 1898.
- [25] ROOSTA H R, ESTAJI A, NIKNAM F. Effect of iron, zinc and manganese shortage-induced change on photosynthetic pigments, some osmoregulators and chlorophyll fluorescence parameters in lettuce [J]. *Photosynthetica*, 2018, **56**(2): 606 – 615.
- [26] WANG Xiubo, WANG Lifang, SHANGGUAN Zhouping. Leaf gas exchange and fluorescence of two winter wheat varieties in response to drought stress and nitrogen supply [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(11): e0165733. doi: 10.1371/journal.pone.0165733.
- [27] WALSH K, JONES G J, DUNSTAN R H. Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid, total protein composition and growth of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Phytochemistry*, 1997, **44**(5): 817 – 824.
- [28] RAAB T K, TERRY N. Carbon, nitrogen and nutrient interactions in *Beta vulgaris* L. as influenced by nitrogen source, NO_3^- versus NH_4^+ [J]. *Plant Physiol*, 1995, **107**(2): 575 – 584.
- [29] IMAI K, SUZUKI Y, MAKINO A, *et al.* Effects of nitrogen nutrition on the relationships between the levels of *rbcS* and *rbcL* mRNAs and the amount of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesized in the eighth leaves of rice from emergence through senescence [J]. *Plant Cell Environ*, 2005, **28**(12): 1589 – 1600.
- [30] 陈贵. 不同氮素形态及水分胁迫对水稻氮素与光合生理的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- CHEN Gui. *Effects of Different Nitrogen Form and Water Stress on Nitrogen and Photosynthetic Physiology of Rice (Oryza sativa L.)* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.
- [31] 孙德智, 韩晓日, 彭靖, 等. 外源 NO 和水杨酸对盐胁迫下番茄幼苗光合机构的保护作用[J]. 应用与环境生物学报, 2018, **24**(3): 457 – 464.
- SUN Dezhi, HAN Xiaori, PENG Jing, *et al.* Protective effect of exogenous nitric oxide and salicylic acid on the photosynthetic apparatus of tomato seedling leaves under NaCl stress [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, **24**(3): 457 – 464.
- [32] SHAO Jihai, WU Zhongxing, YU Gongliang, *et al.* Allelopathic mechanism of pyrogallol to *Microcystis aeruginosa* PCC7806 (Cyanobacteria): from views of gene expression and antioxidant system [J]. *Chemosphere*, 2009, **75**(7): 924 – 928.
- [33] 张诚君, 王磊, 段书延, 等. ‘巨峰’葡萄盛花后弱光胁迫对叶片光合生理及光合酶基因表达的影响[J]. 园艺学报, 2017, **44**(8): 1450 – 1462.
- ZHANG Chengjun, WANG Lei, DUAN Shuyan, *et al.* Effect of low light stress on photosynthetic physiology and gene expression in ‘Khoyo’ grapevine after blooming [J]. *Acta Horti Sin*, 2017, **44**(8): 1450 – 1462.
- [34] LIU Ying, WANG Feng, CHEN Xiao, *et al.* Influence of coexisting spiramycin contaminant on the harm of *Microcystis aeruginosa* at different nitrogen levels [J]. *J Hazard Mater*, 2015, **285**: 517 – 524.
- [35] HAAKE V, ZRENNER R, SONNEWALD U, *et al.* A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants [J]. *Plant J*, 1998, **14**(2): 147 – 157.