



杨 善, 叶昌辉, 莫俊杰, 等. 不同磷肥水平对甘蔗脯氨酸合成积累及关键基因表达的效应[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(6): 68-75.

不同磷肥水平对甘蔗脯氨酸合成积累及 关键基因表达的效应

杨 善, 叶昌辉, 莫俊杰, 黄 兴, 杨杰文, 周鸿凯
(广东海洋大学 农学院, 广东 湛江 524088)

摘要:【目的】探索不同磷肥量对甘蔗脯氨酸的合成积累影响,以阐明磷肥对甘蔗脯氨酸合成积累及其耐旱性的作用效应。【方法】以甘蔗栽培种粤糖 55 为研究材料,用桶栽试验法,在正常水分和干旱胁迫条件下,测定 4 个磷肥施用水平的甘蔗植株内 *P5CS*、 δ -*OAT* 基因表达和酶活性、以及游离脯氨酸、叶绿素含量等生理生化指标。【结果和结论】无论是在正常供水条件下还是干旱胁迫下,甘蔗 *P5CS*、 δ -*OAT* 基因的表达及酶活性、游离脯氨酸含量均受到 N、P、K 配比的影响。当施用过磷酸钙为 $900\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时,正常水分条件下,*P5CS*、 δ -*OAT* 酶活性均处于较低的水平,植株游离脯氨酸含量最低;干旱胁迫下,*P5CS* 酶活性最高, δ -*OAT* 酶活性亦处于较高水平,植株游离脯氨酸含量增加到最大。基于本研究的结果,湛江砖红壤蔗地的最佳 N、P、K 肥搭配方案是尿素、过磷酸钙、氯化钾的用量分别为 918 、 900 、 $750\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。相关、偏相关及通径分析的结果表明,干旱胁迫下植株中 *P5CS* 对游离脯氨酸的合成积累贡献显著大于 δ -*OAT*;干旱胁迫下甘蔗合成积累游离脯氨酸的途径是以谷氨酸途径 ($\text{Glu}\rightarrow\text{Pro}$) 为主,鸟氨酸途径 ($\text{Orn}\rightarrow\text{Pro}$) 为辅。

关键词:甘蔗; 磷肥用量; 脯氨酸含量; *P5CS*; δ -*OAT*; 基因表达; 干旱胁迫
中图分类号:S566.1 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2015)06-0068-08

Effects of different phosphorus levels on proline biosynthesis and accumulation and key gene expression in sugarcane

YANG Shan, YE Changhui, MO Junjie, HUANG Xing, YANG Jiewen, ZHOU Hongkai
(College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract:【Objective】Different phosphorus(P) fertilizer rates were applied to clarify the effect of P fertilizer on proline biosynthesis and accumulation and drought-resistance in sugarcane. 【Method】Sugarcane variety YT-55 was used as the plant material for barrel experiment. Under the normal and drought conditions, four P levels were designed. The physiological and biochemical indexes such as the expressions of *P5CS* and δ -*OAT* genes, enzyme activities and the contents of free proline and chlorophyll were determined. 【Result and conclusion】The expressions of *P5CS* and δ -*OAT* genes, enzyme activities and the free proline content were affected by the ratios of N, P and K fertilizers under the normal and drought conditions. When the P level was $900\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$, both *P5CS* and δ -*OAT* activities were relatively low, and the free proline content was the lowest in the plants under the normal water condition. The *P5CS* activity was the highest; the δ -*OAT* activity was also at a high level; and the free proline content was up to the

收稿日期:2015-03-23 优先出版时间:2015-10-16
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20151016.1630.022.html>
作者简介:杨 善(1987—),男,硕士研究生,E-mail: 116168836@qq.com; 通信作者:周鸿凯(1962—),男,教授,E-mail: 897961801@qq.com
基金项目:国家自然科学基金(41073059);广东省科技计划项目(2013B020301005,2013B020301008,2010B020302008);广东省良种培育和引进专项(201201148)

maximum amount under drought stress. Based on the results, the optimum levels of N, P and K fertilizers are $918\text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ urea, $900\text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ calcium superphosphate and $750\text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ potassium chloride in Zhanjiang lateritic soil. The results of correlation, partial correlation and path analysis indicated that the *P5CS* was more effective than δ -*OAT* in free proline biosynthesis and accumulation of sugarcane under drought stress. The main pathway of free proline biosynthesis and accumulation is glutamic acid pathway (Glu→Pro) supplemented by ornithine pathway (Orn→Pro) under drought stress.

Key words: sugarcane; phosphorus application rate; proline content; δ -*OAT*; *P5CS*; gene expression; drought stress

我国蔗区主要分布在广西、广东、云南、海南等南方黄、红壤地区,90%以上的种植面积为缺乏灌溉的旱坡地.甘蔗 *Saccharum officinarum* L. 为禾本科甘蔗属植物,属 C4 作物,其对温度、水分要求较严格(年积温需 5 500 ℃ 以上、年降水量要求 800 mm 以上),从种苗发芽、发根、幼苗生长、分蘖、伸长、糖分积累到成熟,整个生育过程都要消耗大量水分^[1]. 因此,季节性干旱已成为限制我国甘蔗生产的首要环境因素,也成为了制约我国蔗糖生产的关键因素之一.

植物受到干旱、低温、高盐、重金属等胁迫下,会直接或间接地发生水分胁迫,为了适应逆境,植物体内会在短时间内迅速大量地合成和积累如脯氨酸(Pro)、甜菜碱等一系列渗透调节物质^[2]. 其中,脯氨酸是分布最广、水溶性最大的氨基酸,具有较强的水合能力.在高等植物中因脯氨酸代谢的初始底物不同其合成的途径也不尽相同,一般分为谷氨酸(Glu)途径^[3]和鸟氨酸(Orn)途径^[4],而每一个途径都受到关键酶的调节,它们的关键酶分别是 Δ^1 -吡咯琳-5-羧酸合成酶(*P5CS*)和 δ -鸟氨酸转氨酶(δ -*OAT*)^[5-6]. 脯氨酸合成积累途径在不同植物、不同生理条件以及不同组织器官中各不相同. Roossens 等^[7]研究不同生育期植物脯氨酸积累途径发现,幼小植株以 Orn 途径为主,成年植株以 Glu 途径为主,而在渗透胁迫条件下 2 条途径发挥同样重要的作用. 钱大文等^[8]的研究认为,NaCl 胁迫下海马齿植株内游离脯氨酸合成积累的 2 个途径均被启动和发生作用,并表现出以 Glu→Pro 途径为主、Orn→Pro 途径为辅. 黄诚梅等^[9]的研究表明,在 PEG 处理下甘蔗伸长期叶中脯氨酸生物合成中谷氨酸→脯氨酸途径比精氨酸→鸟氨酸→脯氨酸途径更占优势地位.

磷素(P)在植物体内的作用极为重要,参与生物膜、原生质和细胞核的构成,参与 ATP 等的能量代谢^[10]. 在正常水分条件下,P 对作物的生长发育、光合作用等生理过程具有显著作用^[11]. 在旱地施肥增

产技术应用中,P 肥的效果明显,P 能提高原生质胶体的水合度和细胞机构的充水度,使其维持胶体状态,并能增加原生质的黏度和弹性,因而增强了原生质抵抗脱水的能力^[12]. 赵海超等^[13]认为增施 P 肥可以促进根系生长、优化营养分配、提高根系活力、降低丙二醛含量、提高超氧化物歧化酶活性,从而提高马铃薯的抗旱性,但施 P 量过高会降低马铃薯的抗旱性. 前人有许多关于不同施肥量对甘蔗产量、生长性状的影响研究^[14-16],也有很多关于甘蔗脯氨酸积累的研究^[17-18],但是,针对干旱胁迫下,不同 P 肥施用量对甘蔗植株体内的脯氨酸合成积累关键基因 *P5CS*、 δ -*OAT* 表达和酶活性的变化,以及脯氨酸合成积累途径的研究鲜见报道. 本文以甘蔗品种粤糖 55 为研究材料,在正常水分生长和干旱胁迫条件下,测定 4 个 P 肥施用水平的甘蔗植株内 *P5CS*、 δ -*OAT* 基因表达和酶活性、以及游离脯氨酸含量等生理生化指标,以阐明 P 肥对甘蔗植株脯氨酸合成积累及抗旱性的作用效应,为甘蔗耐旱高效栽培提供理论参考.

1 材料与方法

1.1 材料

甘蔗品种为粤糖 55,粤西蔗区主栽品种之一.

1.2 试验方法

试验在广东海洋大学农业生物研究所进行. 桶栽试验:塑料桶高 50 cm、口径 40 cm,桶下端 10 cm 处的侧面开 4 个排水小孔,每桶装砖红壤土 25 kg,每桶种植 1 个双芽苗. 土壤肥力状况:pH 5.08,碱解氮 $152.12\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、速效钾 $158.56\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有效磷 $53.27\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有机质 $27.80\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. 在施用尿素 $918\text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和钾肥(KCl) $750\text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的水平上(为粤西蔗区通常施 N、K 肥水平),设置 4 个过磷酸钙施水平:0(CK)、900、1 800、2 700 $\text{kg} \cdot \text{hm}^{-2}$; 设置 2 个生长条件:1)土壤含水量 >18% 作为正常条件;2)土壤含水量 <8% 时(甘蔗出现枯萎)作为干

旱胁迫. 随机区组试验设计, 3 次重复.

2013 年 6 月 18 日开始种植, 按计划施肥量施用全量的磷肥、半量的氮肥和钾肥, 肥料与土壤充分混匀, 施肥在 20 ~ 30 cm 土层内, 齐苗后定苗, 每桶选留对称且健壮的 2 株甘蔗幼苗, 每隔 2 d 浇 1 次水, 保持土壤湿润; 于 2013 年 9 月 10 日追肥, 将计划施肥量的另一半氮肥和钾肥全部施入. 2013 年 11 月 30 日, 实测土壤含水量 (w) 为 $18.65\% \pm 0.32\%$ 时, 每桶取 1 株甘蔗苗进行测试分析, 采集其 -1 叶进行脯氨酸含量、 δ -OAT 酶活性、P5CS 酶活性的测定, 取心叶进行总 RNA 提取. 然后, 将试验桶栽甘蔗移入玻璃温室内, 停水管理 6 d 进行干旱胁迫处理, 当甘蔗叶片开始出现萎蔫时 [2013 年 12 月 6 日, 实测土壤含水量 (w) 为 $7.35\% \pm 0.27\%$] 按上述方法取样、测试分析.

1.3 试验指标的测定和引物设计

脯氨酸含量的测定按 Bates 等^[19]的方法; P5CS 提取方法依照 Kavi 等^[20]的方法, 其活性测定参照黄诚梅^[21]的方法以每分钟生成 $1 \mu\text{mol } \gamma$ -谷氨酰胺所需要的酶量为一个酶活性单位 (U); δ -OAT 的抽提按照 Delauney 等^[4]的方法, 其活性测定参照 Kim 等^[22]的方法进行, 以每小时生成 1 mmol P5C 所需要的酶量为一个酶活性单位 (U); 叶片色素含量提取采用乙醇-丙酮混合液浸泡法^[23]; 总引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 用 TaKaRa 宝生物公司的 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒, 操作步骤参照说明书; 仪器使用 Roche LightCycler® 2.0; 基因表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[24]进行分析, 以正常水分条件下的基因表达量定义为 1.

引物设计: 采用引物设计软件 Primer Premier 5.0, 按照 GenBank 中甘蔗 P5CS 基因的 cDNA 序列 (EU005373.2)、甘蔗 δ -OAT 基因的 cDNA 序列 (EF517495.1), 并根据 RT-qPCR 的引物设计原则进行设计, 最终筛选引物特异性好、没有引物二聚体的引物: 1) P5CS 的引物, F: 5'-GTGGGTGTTGAAG-GTCTC-3', R: 5'-AGGAAGTTCTTATGGGT-3'; 2) δ -OAT 的引物, F: 5'-GAGTTTAGGACCAGTTACAGAA-3', R: 5'-AAGCAGGAGATAGAGCGTCAT-3'. 其中, 内参基因引物则引用阙友雄等^[25]筛选的 25SrRNA 引物, F: 5'-GCAGCCAAGCGTTCATAGC-3', R: 5'-CCTATTGGTGGGTGAACAATCC-3'.

1.4 数据统计方法

应用统计分析软件 SAS10.3 在 PC 机上进行, 用 Duncan's 法测定不同磷肥施用处理间的生理指标的

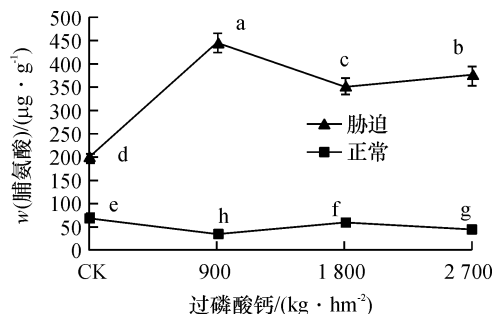
差异显著性.

2 结果与分析

2.1 不同磷肥水平甘蔗游离脯氨酸含量

如图 1 可知, 在正常情况下, 甘蔗体内游离脯氨酸的含量不高, 但不同处理间差异显著, 说明磷肥对脯氨酸含量的影响显著, 不施磷肥 (CK) 时, 脯氨酸含量最大, 而脯氨酸含量最小为施磷肥 $900 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的处理. 干旱胁迫时, 甘蔗植株体内游离脯氨酸含量大幅增加, 其中 CK 的脯氨酸含量最小, 且与其他水平差异显著; 施磷肥 $900 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时脯氨酸的含量最大, 且显著高于 1800 和 $2700 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 处理的脯氨酸含量.

在正常水平下, CK 的脯氨酸含量是施磷肥 $900 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 的 1.99 倍, 说明磷肥不足会影响甘蔗的正常生长, 出现磷胁迫, 使得脯氨酸的含量增加. 干旱胁迫时, 甘蔗体内脯氨酸的合成积累效应显著, 与正常水分时相比, 平均增幅为 $290.85 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; 磷肥水平 $900 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时, 脯氨酸的含量最高, 效应最明显, 为最佳施磷肥量.



图中凡是一个相同小写字母者, 表示差异不显著 (Duncan's 法, $P > 0.05$).

图 1 不同磷肥水平脯氨酸含量的变化

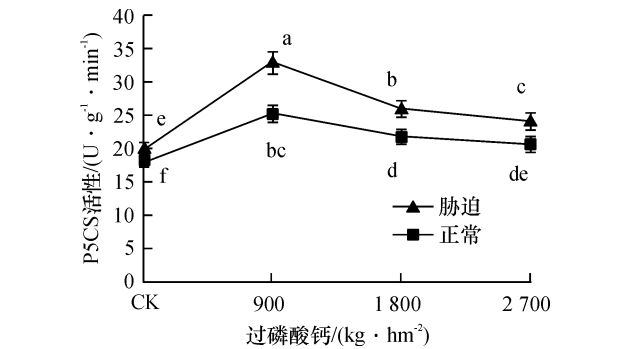
Fig. 1 The changes of proline contents at different phosphorus levels

2.2 不同磷肥水平甘蔗 P5CS 酶活性变化

P5CS 作为合成脯氨酸中谷氨酸合成途径的关键酶, 其活性变化将直接影响脯氨酸合成积累的效应. 从图 2 中可看出, 在正常水分或干旱胁迫下, 在 4 个磷肥处理间 P5CS 的活性变化趋势类似, 但在干旱胁迫下的 P5CS 活性明显增大, 尤其是在磷肥水平 $900 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 最为明显, 干旱胁迫时是正常水平时的 1.3 倍. P5CS 活性在不施磷肥时最低, 在磷肥水平 $900 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 时活性最高, 随后急剧下降.

正常水分情况下, 4 个磷肥水平的 P5CS 活性平均为 $21.3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 干旱胁迫时为 $25.63 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 平均变化幅度为 $4.33 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

这一结果表明,干旱胁迫下甘蔗 P5CS 活性显著地被激活,尤其是在磷肥水平 $900\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时.

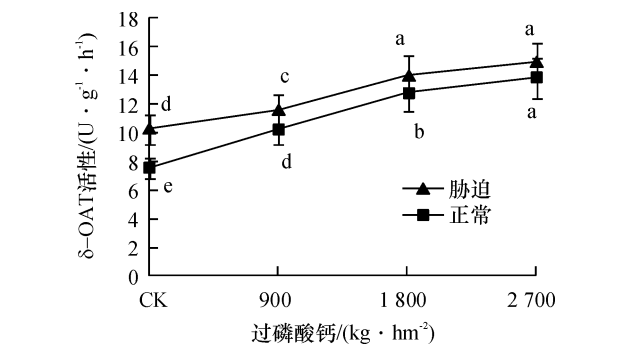


图中凡是有有一个相同小写字母者,表示差异不显著 (Duncan's 法, $P>0.05$).

图2 不同磷肥水平 P5CS 酶活性的变化
Fig. 2 The changes of P5CS enzyme activities at different phosphorus levels

2.3 不同磷肥水平甘蔗 δ -OAT 酶活性变化

从图3中可知,无论正常水分或者干旱胁迫下, δ -OAT 活性都是随磷肥施用量增加而增强. 除 $2700\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 处理外,不同磷肥水平下正常水分与干旱胁迫间的 δ -OAT 活性均有显著性差异. 说明干旱胁迫下,甘蔗植株 δ -OAT 活性有增强的趋势,其平均增幅为 $1.52\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.



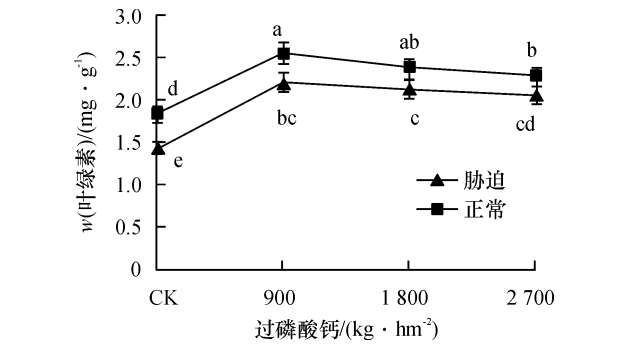
图中凡是有有一个相同小写字母者,表示差异不显著 Duncan's 法, $P>0.05$).

图3 不同磷肥水平 δ -OAT 酶活性的变化
Fig. 3 The changes of δ -OAT enzyme activities at different phosphorus levels

2.4 不同磷肥水平甘蔗叶绿素含量

从图4可知,在正常水分或干旱胁迫下,4个磷肥处理间叶绿素 (Chl) 含量变化趋势类似,但在干旱胁迫下的叶绿素含量明显降低,平均下降率为 13.3% . 表明在较为严重的干旱胁迫下,甘蔗叶片的叶绿素含量显著降低,进而影响甘蔗的光合作用能力. 但在正常水分或干旱胁迫下,4个磷肥处理间甘蔗叶片叶绿素含量均以 $900\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时最大. 表明在湛江砖红壤种植甘蔗时,过磷酸钙的施用量为 900

$\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 最有利于甘蔗叶片叶绿素的合成,从而促进甘蔗的光合作用.



图中凡是有有一个相同小写字母者,表示差异不显著 (Duncan's 法, $P>0.05$).

图4 不同磷肥水平叶片叶绿素含量的变化
Fig. 4 The changes of leaf chlorophyll contents at different phosphorus levels

2.5 生理指标间的相关性分析

2.5.1 简单相关和偏相关分析 从表1可知,正常供水情况下,脯氨酸含量 (Y) 与 δ -OAT 活性 (X_1)、P5CS 活性 (X_2)、叶绿素含量 (X_3) 之间均表现为负简单相关,且与 X_2 、 X_3 相关达极显著水平; X_2 与 X_3 之间呈极显著水平的正简单相关性. 偏相关结果表明, X_3 与 X_2 之间呈显著的正偏相关,其他指标间偏相关均未达显著水平.

表1 正常水分下生理指标间的简单和偏相关分析¹⁾
Tab. 1 Simple and partial correlation analyses of physiological parameters at the normal water level

参数	X_1	X_2	X_3	Y
X_1		-0.408 3	0.513 0	-0.239 8
X_2	0.260 1		0.638 1 *	-0.506 1
X_3	0.530 0	0.811 3 **		-0.129 1
Y	-0.419 3	-0.784 8 **	-0.746 3 **	

1) X_1 : δ -OAT 活性, X_2 : P5CS 活性, X_3 : 叶绿素含量, Y : 脯氨酸含量; 左下为简单相关系数, 当 $n=11$ 时, $r_{0.05}=0.553$, $r_{0.01}=0.684$; 右上为偏相关系数, 当 $n=11$ 时, $r_{0.05}=0.632$; $r_{0.01}=0.765$.

从表2可看出,干旱胁迫下, Y 与 X_1 、 X_2 、 X_3 之间均表现为正简单相关,除 X_1 与 X_2 、 X_1 与 Y 外,均达到显著或极显著水平. 偏相关分析结果表明, X_2 与 Y 达极显著正向偏相关, X_1 与 X_2 达极显著负向偏相关. 表明在干旱胁迫下, P5CS 的活性与脯氨酸含量间不仅具有极显著水平的简单相关性,还有极显著水平的偏相关性; 脯氨酸合成积累的2个关键酶 P5CS 和 δ -OAT 之间表现为极显著水平的负向偏相关.

表 2 干旱胁迫下个生理指标间的简单和偏相关性分析
Tab.2 Simple and partial correlation analyses of physiological parameters under drought stress

参数	X_1	X_2	X_3	Y
X_1		-0.805 7**	0.544 2	0.563 9
X_2	0.108 7		0.387 3	0.789 9**
X_3	0.565 6*	0.806 0**		0.200 5
Y	0.450 4	0.901 4**	0.914 3**	

1) X_1 : δ -OAT 活性, X_2 :P5CS 活性, X_3 :叶绿素含量, Y :脯氨酸含量;左下为简单相关系数,当 $n=11$ 时, $r_{0.05}=0.553$, $r_{0.01}=0.684$;右上为偏相关系数,当 $n=11$ 时, $r_{0.05}=0.632$; $r_{0.01}=0.765$.

2.5.2 通径分析 从表 3 中可知,正常水分条件下, X_1 、 X_2 、 X_3 对 Y 的直接通径系数均为负数,且仅有 X_2 对 Y 的直接通径系数达到显著水平. 剩余通径系数较大,为 0.328 9,说明在正常水分条件下,植株游离脯氨酸的合成积累受其他随机因素的影响较大.

表 3 正常水分下 X_1 、 X_2 和 X_3 对 Y 的通径分析¹⁾
Tab.3 The path analyses of X_1 , X_2 and X_3 to Y at the normal water level

参数	直接通径系数	通过 X_1	通过 X_2	通过 X_3	剩余通径系数
X_1	-0.177 8		-0.159 4	-0.082 1	0.328 9
X_2	-0.612 8*	-0.046 3		-0.125 6	
X_3	-0.154 9	-0.094 2	-0.497 2		

1) X_1 : δ -OAT 活性, X_2 :P5CS 活性, X_3 :叶绿素含量.

从表 4 可以发现,干旱胁迫下,在 3 个直接通径系数中,只有 X_2 对 Y 的直接通径系数达到了显著水平;同时,叶绿素含量通过 P5CS 活性对脯氨酸含量的间接通径系数也达到了显著水平;剩余通径系数仅有 0.059 3,说明在本研究条件下,随机因子对脯氨酸合成积累量的影响较小. 可见,在 δ -OAT 活性、P5CS 活性和叶绿素含量 3 个因素中,P5CS 活性对脯氨酸含量的直接和间接作用均最大,即在干旱胁迫下,甘蔗植株 P5CS 活性对其脯氨酸合成积累量的影响最为重要.

表 4 干旱胁迫下 X_1 、 X_2 和 X_3 对 Y 的通径分析¹⁾
Tab.4 The path analyses of X_1 , X_2 and X_3 to Y under drought stress

参数	直接通径系数	通过 X_1	通过 X_2	通过 X_3	剩余通径系数
X_1	0.286 8		0.081 9	0.081 7	0.059 3
X_2	0.753 8*	0.031 2		0.116 4	
X_3	0.144 4	0.162 2	0.607 6*		

1) X_1 : δ -OAT 活性, X_2 :P5CS 活性, X_3 :叶绿素含量.

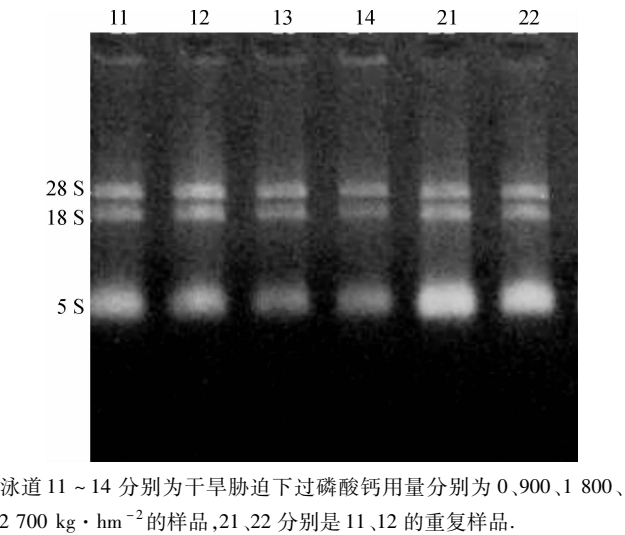
2.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 分析

2.6.1 总 RNA 提取结果验证及引物筛选 对提取的

<http://xuebao.scau.edu.cn>

总 RNA 经 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳检测,28S 和 18S 这 2 条带清晰完整,没有明显的拖尾现象(图 5),表明总 RNA 样品比较完整,没有明显降解. 紫外分光光度计法检测 RNA 浓度表明, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值在 1.8 ~ 1.9 之间,表明其 RNA 纯度与浓度达到合成 cDNA 第 1 链的要求.

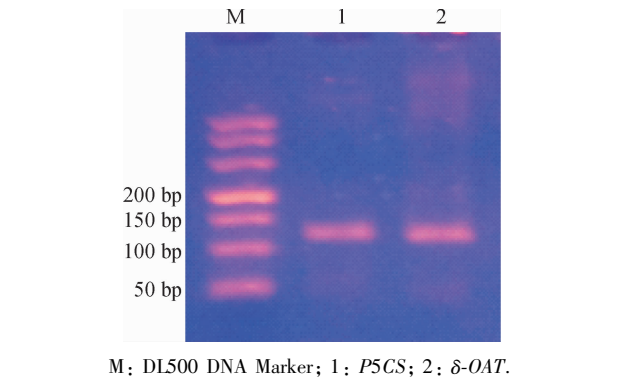
用上述 P5CS、 δ -OAT 的引物进行普通 PCR 扩增,并用 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳,得到的 PCR 产物条带单一,没有引物二聚体出现,片段大小符合荧光定量 PCR 的要求(图 6). 同时,回收 PCR 产物并送生工公司测序,通过 Blast 比对为目的基因片段. 可以做下一步的 RT-qPCR.



泳道 11 ~ 14 分别为干旱胁迫下过磷酸钙用量分别为 0、900、1 800、2 700 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 的样品,21、22 分别是 11、12 的重复样品.

图 5 叶片总 RNA 电泳图

Fig. 5 Electrophoresis of total RNA of leaves

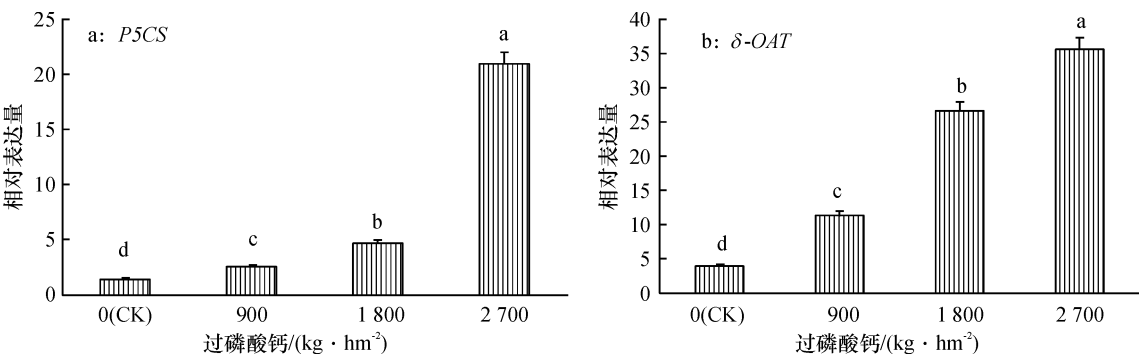


M: DL500 DNA Marker; 1: P5CS; 2: δ -OAT.

图 6 P5CS 和 δ -OAT 的 PCR 产物电泳图

Fig. 6 Electrophoresis of the PCR products of P5CS and δ -OAT

2.6.2 P5CS、 δ -OAT 的基因表达分析 从图 7 可知,随着施磷水平的增加,P5CS 和 δ -OAT 基因相对于正常水分条件下的表达量均呈现递增的趋势. 不施磷肥时,2 个基因的相对表达量都最小,分别为 1.48 和 4.03,而施磷水平 2 700 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 时,两者的基因相对表达量最大,分别为 20.96 和 35.89. 表明磷肥的施用量影响 P5CS、 δ -OAT 基因的表达.



各图中柱子上凡是有一个相同小写字母者,表示差异不显著 (Duncan's 法, $P>0.05$).

图7 干旱胁迫下甘蔗叶片中 *P5CS*、 δ -*OAT* 基因的相对表达量

Fig.7 Relative expressions of *P5CS* and δ -*OAT* genes in sugarcane leaves under drought stress

3 讨论与结论

3.1 不同磷肥施用水平对甘蔗脯氨酸合成积累效应

在固定施用尿素 918 kg · hm⁻²和钾肥 (KCl)750 kg · hm⁻²时,在水分供应正常的情况下,N、P、K 肥之间的配比合理(磷肥水平 900 kg · hm⁻²时)能使甘蔗植株正常生长,体内各项生理代谢平衡,细胞内没有产生渗透压,合成脯氨酸的 2 个关键酶 *P5CS* 和 δ -*OAT*活性较小,没有被显著激活,同时脯氨酸含量也处于低水平.随着磷肥施用量的增加,脯氨酸含量呈现先减少后增加的趋势,*P5CS* 酶活性呈现先增加后减少的趋势, δ -*OAT* 酶活性则呈现一直增加的趋势,说明脯氨酸合成的 2 个关键酶 *P5CS* 和 δ -*OAT* 的活性与脯氨酸含量的变化趋势不一致性.相关研究表明,除了脯氨酸的合成酶外,还有其他的一些酶如脯氨酸运输酶^[26]、谷氨酰胺合成酶^[27]等也参与了脯氨酸的积累过程.但是,当 N、P、K 肥之间的配比不合理时,即使水分供应正常,也致使甘蔗植株生长代谢异常,细胞内产生渗透胁迫,表现为游离脯氨酸含量显著增加,以抵抗由于 N、P、K 肥之间的配比不合理所产生的渗透压,保证甘蔗植株的正常生长.

干旱胁迫不同程度地激活了 *P5CS* 和 δ -*OAT* 基因的表达以及 *P5CS* 和 δ -*OAT* 酶活性,从而使得脯氨酸含量急剧增加,以缓解干旱胁迫所造成的细胞渗透压力,维持体内正常的生理代谢平衡,减少干旱胁迫带来的不利影响.同时磷肥的施用量对 *P5CS* 和 δ -*OAT*基因的表达、*P5CS* 和 δ -*OAT* 酶活性、脯氨酸含量有显著的影响.本研究中,当磷肥施用量大于 900 kg · hm⁻²时,脯氨酸含量和 *P5CS* 酶活性都呈现下降趋势,而 δ -*OAT* 酶活性则呈现一直增加的趋势, *P5CS*、 δ -*OAT* 基因的相对表达量也呈增长趋势.由此可推测磷素的增加有利于 *P5CS*、 δ -*OAT* 基因的表达,从而有利于 *P5CS* 和 δ -*OAT* 的合成,促使其活性的提

高,特别是 δ -*OAT* 基因对磷素的响应较为明显.但是 *P5CS* 基因的表达量与其对应酶的活性不一致,可能是由于基因从表达到成功翻译受到许多因子调控^[28],比如在蛋白质水平上存在钝化蛋白^[29]、相关降解酶对酶活性进行调控而产生差异.谭彩霞等^[30]认为小麦中 *GBSS* 基因的相对表达量与 *GBSS* 酶活性间相关不显著是由于 *GBSS* 基因属于转录后调控.这些相关的调控机理有待于进一步的探究.

在 N、K 肥施用量分别为 918、750 kg · hm⁻²水平时,无论是在正常水分条件下还是在干旱胁迫下,4 个过磷酸钙的施用水平间,甘蔗植株中 *P5CS* 和 δ -*OAT*基因的表达、*P5CS* 和 δ -*OAT* 酶活性以及游离脯氨酸的含量均有明显的差异,表明磷肥的施用量影响植物生理生化过程和植株体内的代谢平衡,从而影响植株生长发育.当过磷酸钙的施用水平为 900 kg · hm⁻²时,正常水分条件下,甘蔗植株脯氨酸含量最低,*P5CS* 与 δ -*OAT* 酶活性亦处于较低的水平;而在干旱胁迫下,甘蔗植株游离脯氨酸的含量最大, *P5CS* 活性最大, δ -*OAT* 酶活性也处于较高水平, *P5CS* 和 δ -*OAT*基因的相对表达量分别为 2.63 和 11.39.因此,本研究中的砖红壤基于甘蔗植株游离脯氨酸合成积累的最佳施肥方案是尿素、过磷酸钙、氯化钾的用量分别为 918、900、750 kg · hm⁻².

3.2 不同磷肥施用水平对甘蔗脯氨酸的合成积累途径的影响

高等植物体内脯氨酸的合成积累有谷氨酸 (Glu)途径和鸟氨酸 (Orn) 途径, *P5CS* 和 δ -*OAT* 酶分别是这 2 个途径的关键酶^[3-6,31-33].王丽媛等^[34]的研究认为通常在植物受到胁迫或氮素缺乏的情况下,脯氨酸的主要来源是谷氨酸合成途径;在氮素供应充足的情况下,脯氨酸合成的主要途径则是鸟氨酸途径.曹芳等^[35]研究发现胁迫条件下硝酸钾可以增加烟草叶片中的脯氨酸含量,PEG 胁迫下硝酸钾

能增强鸟氨酸代谢途径中 δ -OAT 酶活性. 由此表明, 大量的矿质元素可以影响植物脯氨酸的合成积累途径.

本研究在固定施用尿素 $918 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 和钾肥 (KCl) $750 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 水平时, 过磷酸钙设置 4 个施入水平, 在干旱胁迫下, 甘蔗植株体内的 P5CS、 δ -OAT 基因表达及其酶活性被不同程度地激活, 从而合成积累大量的脯氨酸, 这显然是谷氨酸途径 ($\text{Glu} \rightarrow \text{Pro}$) 和鸟氨酸途径 ($\text{Orn} \rightarrow \text{Pro}$) 共同作用的结果. 相关、偏相关分析表明, 在干旱胁迫下, 植株游离脯氨酸含量与 P5CS 酶活性的简单相关系数及偏相关系数均达到了极显著水平, 而 Pro 含量与 δ -OAT 酶活性间均未达到显著水平; 通径分析中 P5CS 酶活性对 Pro 含量的直接通径系数达到了显著水平, δ -OAT 酶活性对 Pro 含量的直接通径系数未达显著水平. 说明干旱胁迫下甘蔗植株中 P5CS 酶活性对游离脯氨酸的合成积累贡献最大, 此时甘蔗植株合成积累游离脯氨酸的途径是以谷氨酸途径 ($\text{Glu} \rightarrow \text{Pro}$) 为主, 鸟氨酸途径 ($\text{Orn} \rightarrow \text{Pro}$) 为辅. 这一结果与姜淑欣等^[36] 以小麦为材料、Choudhary 等^[37] 以水稻为材料、黄诚梅等^[9] 以甘蔗为材料的研究结果相似. 在正常水分条件下, 植株游离脯氨酸含量与 P5CS 和 δ -OAT 酶活性、叶绿素含量的简单相关、偏相关均呈负相关; 通径分析中也均为负向贡献; P5CS 酶活性与脯氨酸含量的简单相关系数、直接通径系数达到了显著水平, 偏相关系数的绝对值也较 δ -OAT 酶活性与脯氨酸含量间的大. 由此推测, 在正常供水情况下, P5CS 酶活性对植株游离脯氨酸的合成调节作用比较大. 此外, 通径分析中剩余通径系数较大, 为 0.328 9, 说明正常水分供应下, 甘蔗植株的游离脯氨酸合成积累还受到其他一些因素的调节, 推断应为降解途径的一些相关酶, 如脯氨酸降解酶的调节^[9,26].

参考文献:

- [1] 轻工业部甘蔗糖业科学研究所, 广东省农业科学院. 中国甘蔗栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1985: 225-228.
- [2] 焦蓉, 刘好宝, 刘贯山, 等. 论脯氨酸积累与植物抗渗透胁迫[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 216-221.
- [3] HU C A, DELAUNEY A J, VERMA D P S. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5- carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(19): 9354-9358.
- [4] DELAUNEY A J, HU C A, KISHOR P B, et al. Cloning of ornithine-aminotransferase cDNA from *Vigna acanitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis[J]. J Biol Chem, 1993, 268(25): 18673- 18678.
- [5] SZABADOS L, SAVOUR A. Proline: A multifunctional amino acid[J]. Trends Plant Sci, 2009, 15(2): 89-97.
- [6] LEHMANN S, FUNK D, SZABADOS L. Proline metabolism and transport in plant development [J]. Amino Acids, 2010, 39(4): 949-962.
- [7] ROOSENS N H C J, THU T T, ISKANDAR H M, et al. Isolation of ornithine- δ - aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 1998, 117(1): 263-271.
- [8] 钱大文, 周鸿凯, 江大可, 等. NaCl 胁迫下海马齿 (*Sesuvium portulacastrum* L.) 植株内游离脯氨酸的合成积累途径[J]. 中国野生植物资源, 2013, 32(3): 35-39.
- [9] 黄诚梅, 毕黎明, 杨丽涛, 等. 聚乙二醇胁迫对甘蔗伸长期间叶中脯氨酸积累及其代谢关键酶活性的影响[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1): 77-80.
- [10] 杨俊兴, 张彤, 吴冬秀. 磷素营养对植物抗旱性的影响[J]. 广东微量元素科学, 2003, 10(12): 13-19.
- [11] 李唯. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2012: 46-47.
- [12] 舒玉. 磷肥对草地早熟禾和黑麦草抗旱性的影响[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2008.
- [13] 赵海超, 龚学臣, 抗艳红, 等. 不同施磷量对马铃薯苗期抗旱性的影响[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(6): 3314-3316.
- [14] XU L, HUANG H R, YANG L T. Combined application of NPK on yield quality of sugarcane applied through SSDI [J]. Sugar Tech, 2010, 12(2): 104-107.
- [15] 刘永贤, 曾维宾, 熊柳梅, 等. 不同磷肥用量对桂中蔗区甘蔗生长性状与产量的影响[J]. 南方农业学报, 2012, 43(5): 634-636.
- [16] 许树宁, 方锋学, 唐仕云, 等. 不同施肥量对甘蔗产量和蔗糖分的影响[J]. 现代农业科技, 2012(19): 9-10.
- [17] 陈如凯, 张木清, 陆裔波. 干旱胁迫对甘蔗生理影响的研究[J]. 甘蔗, 1995, 2(1): 1-6.
- [18] 杨建波, 诸葛少军, 黎海涛, 等. 干旱胁迫对甘蔗生长生理的影响及品种抗旱性评价[J]. 南方农业学报, 2012, 43(8): 1114-1120.
- [19] BATES L S, WALDREN R P, TEARE I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies[J]. Plant Soil, 1973, 39(1): 205-207.
- [20] KAVI KISHOR P B, HONG Z L, MIAO G H, et al. Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants [J]. Plant Physiol, 1995, 108(4): 1387-1394.

[21] 黄诚梅. 甘蔗脯氨酸积累与 Δ^1 -吡咯啉-5-羧酸合成酶(ScP5CS)基因克隆及转化研究[D]. 南宁:广西大学, 2007:17-18.

[22] KIM H R, RHO H W, PARK J W, et al. Assay of ornithine aminotransferase with ninhydrin[J]. Analytical Biochem, 1994, 223(2):205-207.

[23] 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: 164-165.

[24] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[25] 阙友雄, 许莉萍, 徐景升, 等. 甘蔗基因表达定量PCR分析中内参基因的选择[J]. 热带作物学报, 2009, 30(3):274-278.

[26] IGARASHI Y, YOSHIBA Y, TAKESHITA T. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding proline transporter in rice[J]. Plant Cell Physiol, 2000, 41(6): 750-756.

[27] BRUGIEREA N, DUBOISB F, LIMAMIA A M. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production[J]. Plant Cell, 1999, 11(10): 1995-2012.

[28] 王庭璋, 胡望雄, 徐建红, 等. 植物基因组上游开放阅读框的挖掘方法及其翻译调控[J]. 中国农业科学, 2013, 46(16):3314-3323.

[29] 刘丽, 甘志军, 王宪泽. 植物氮代谢硝酸还原酶水平调控机制的研究进展[J]. 西北植物学报, 2004, 24(7):1355-1361.

[30] 谭彩霞, 郭静, 陈静, 等. 小麦籽粒淀粉合成酶基因表达与酶活性特征的研究[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(1):24-30.

[31] VOCTBERG G S, SHARP R E. Growth of the maize primary root at low water potential: 3: Role of increased proline deposition in osmotic adjustment [J]. Plant Physiol, 1991, 96(4):1125-1130.

[32] SCHWACKE R, GRALLATH S, BRCITKREUZ K E, et al. LeProT1, a transproter for proline, glycine betaine and γ -amino butyric acid in tomato pollen [J]. The Plant Cell, 1999, 11(3):377-391.

[33] ROSA P, ROSARIO A, JUAN M R. Evaluation of the role of genes encoding for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants[J]. Physiol Mol Plant P, 2004, 65(4):211-221.

[34] 王丽媛, 丁国华, 黎莉. 脯氨酸代谢的研究进展[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2010, 26(2):84-89.

[35] 曹芳, 魏永胜. 渗透胁迫下硝酸钾对烟草脯氨酸代谢途径的影响[J]. 西北农业学报, 2010, 19(9):144-148.

[36] 姜淑欣, 刘党校, 庞红喜, 等. PEG胁迫及复水对不同抗旱性小麦幼苗脯氨酸代谢关键酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2014, 34(8):1581-1587.

[37] CHOUDHARY N L, SAIRAM R K, TYAGI A. Expression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Indian J Biochem Bio, 2005, 42(6):366-370.

【责任编辑 周志红】

欢迎订阅 2016 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、研究简报、综述等,涵盖动物科学与兽医学、农学、园艺学、土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、农业工程与食品科学等学科。本刊附英文目次和英文摘要。读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部。

本刊为《中文核心期刊要目总览》综合性农业科学核心期刊,《中国科学引文数据库(CSCD)》、《中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)》及《中国学术期刊综合评价数据库》等来源期刊,并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内。为美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、《中国生物学文摘》及国内农业类文摘期刊等多家国内外著名文摘固定刊源。

本刊为双月刊,逢单月上旬出版,A4 幅面。定价 15.00 元/册,全年 90.00 元。自办发行,参加全国非邮发报刊联合征订发行,非邮发代号:6573。国内外公开发行人,欢迎订阅!

订阅款邮汇至:300381 天津市卫津南路李七庄邮局 9801 信箱,全国非邮发报刊联合征订服务部。