



# 低氮胁迫对不同青稞苗期生理特征影响和耐低氮性评价

安立昆<sup>1,2,3</sup>,姚有华<sup>1,2,3</sup>,姚晓华<sup>1,2,3</sup>,吴昆仑<sup>1,2,3</sup>

(1.青海大学农林科学院,西宁 810016;2.青海省青稞遗传育种重点实验室,西宁 810016;3.国家麦类改良中心青海青稞分中心,西宁 810016)

**摘要** 对8种青稞品种在低氮培养条件下苗期叶和根中的相关生理指标进行测定和分析,旨在明确适合耐低氮青稞筛选的重要生理指标,并对各青稞品种耐低氮能力进行了排序。结果表明:与正常培养条件相比,低氮条件下青稞各项生理指标出现了显著性差异。8种青稞中叶和根总氮、总蛋白、NR酶活性和叶绿素SPAD都出现下降,叶和根中脯氨酸、MDA、SOD、POD、GS酶活性出现上升,但不同品种中各项生理指标变化幅度不同。通过对各生理指标进行分析,发现根GS酶活性可以作为青稞耐低氮资源快速筛选的初级指标,渗透调节物和抗氧化酶活性在青稞耐低氮性中起着主要作用,可以作为耐低氮青稞筛选的重要指标。多指标综合分析结果表明各品种耐低氮能力排序分别为‘黄青1号’>‘肚里黄’>‘昆仑15’>‘二道眉白青稞’>‘特邬’>‘洛隆宗’>‘昆仑18’>‘康青3号’。本研究为进一步开展耐低氮青稞资源大规模筛选和品种选育提供参考。

**关键词** 青稞;低氮胁迫;苗期;生理指标

青稞(*Hordeum vulgare L. var. nudum* Hook. f.),是大麦的变种,是青藏高原历史最悠久栽培最广泛的作物。青稞富含纤维素、蛋白质、 $\beta$ -葡聚糖,是独具高原地方特色的保健食品,也是食品和饲料加工的重要原料,在青藏高原粮食安全和农业经济发展中占有重要的地位<sup>[1-3]</sup>。青藏高原是青稞的主要产区之一,青藏高原地区气候恶劣,在土壤贫瘠、干旱、低温、强紫外线等多种逆境环境中经过长期的进化和人工培育,产生了种类丰富的青稞资源<sup>[4]</sup>。

氮元素是作物最重要的营养元素之一,是作物生长发育过程中需求量最大的元素,直接影响作物的产量和品质<sup>[5]</sup>。在低氮条件下作物的耐低氮性与其产量紧密相关,很多研究表明作物对氮素的吸收和利用存在显著的基因型差异,作物对氮素的利用能力是可遗传性状<sup>[6-9]</sup>。筛选耐低氮作物品种是提高作物氮利用效率减少氮肥施用最有效途径之一<sup>[10]</sup>。苗期是进行作物耐低氮性研究的最佳时期之一,在苗期低氮条件下对不同作物

品种的农艺性状或生理特点进行测定,并进一步筛选耐低氮作物资源已经成为广泛采用的研究方法<sup>[11-12]</sup>。陈志伟等<sup>[12]</sup>分别采用正常供氮(2.0 mmol/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)和低氮(0.4 mmol/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)的改良Hoagland's溶液对6种不同基因型的大麦进行培养,并对耐低氮相关性状指标进行研究发现不同基因型大麦对低氮胁迫的耐受能力存在极显著的差异。张锡洲等<sup>[13]</sup>对16份野生大麦全生育期氮素吸收利用能力进行了研究,发现不同基因型野生大麦在同一低氮水平下其氮素的吸收利用存在显著差异。杨丽娜<sup>[14]</sup>采用苗期水培的方法以82份西藏野生大麦和16份栽培大麦为材料进行耐低氮品种筛选,发现不同大麦基因型的耐低氮能力具有显著差异,认为发达的根系是大麦耐低氮特性的关键,并筛选出5个耐低氮大麦品种。赵化田等<sup>[15]</sup>采用水培的方法对46份小麦苗期低氮胁迫下的农艺性状和生理特性进行研究,从中筛选出耐低氮小麦资源15份,并认为采用苗期水培的方法进行不同基因型作物

收稿日期:2022-03-17 修回日期:2022-06-10

基金项目:青海省农林科学院创新基金(2019-NKY-05);国家自然科学基金(32060423);国家大麦产业技术体系(CARS-05-01A-05)子课题。

第一作者:安立昆,男,助理研究员,主要从事青稞遗传育种研究。E-mail:anlikun@163.com

通信作者:吴昆仑,男,研究员,硕士生导师,主要从事青稞遗传育种研究。E-mail:wklqaf@163.com

耐低氮研究可以消除不同基因型间固有的生物学和遗传学特性差异,具有速度快,环境条件易控制等优点,能更充分地进行作物耐低氮能力的评价。主成分和隶属函数分析是作物耐低氮性评价中广泛采用的方法。黄兴东<sup>[16]</sup>对60个谷子品种在低氮条件下的农艺性状和生理指标进行了主成分和隶属函数分析,从中筛选出了2个耐低氮谷子品种。张楚<sup>[17]</sup>对低氮胁迫下9份苦荞品种苗期农艺性状和生理特征进行主成分和隶属函数分析,筛选出2个耐低氮苦荞品种,并认为优良的根构型和根系生理特性是苦荞耐低氮性的关键。

目前对大多数作物的耐低氮资源筛选和研究都有广泛而深入的报道,但关于青稞耐低氮资源筛选和生理研究的报道极少。本研究采用苗期水培方法,对低氮培养条件下不同青稞品种苗期生理特性进行研究,为筛选和培育耐低氮青稞品种,减少青稞生产中氮肥的使用奠定了重要的研究基础。

## 1 材料方法

### 1.1 试验材料

青稞品种‘康青3号’、‘昆仑15’、‘黄青1号’、‘肚里黄’、‘洛隆宗’、‘特邬’、‘二道眉白青稞’、‘昆仑18’由青海省青稞遗传育种重点实验室保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 青稞萌发和培养 选取饱满的青稞种子用84消毒液浸泡6 min后用清水冲洗5次,将种子放在铺有滤纸的培养皿中室温下进行萌发,5 d后选取长势一致的幼苗固定于泡沫板中,每个青稞品种20株幼苗,所有青稞品种放于同一黑色塑料盒(600 mm×500 mm×160 mm)中,共设置2盒。采用改良Hoagland's培养液(80 mg/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)进行培养。每个塑料盒20 L培养液。用空气泵24 h向培养液中通入空气,每3 d更换一次培养液,每天用1 mol/L KOH溶液稳定pH值为7.0。当幼苗生长至3叶期胚乳营养耗尽时,选其中的一盒改用(20 mg/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)改良Hoagland's培养液进行低氮培养。待青稞生长至5叶期时对生理指标进行测定。

1.2.2 测定指标与方法 生理指标测定:叶绿素SPAD值测定采用日本柯尼卡美能达SPAD-502Plus便携式叶绿素SPAD测定仪测定。选取待测青稞新鲜的叶片和根为样品,参照各参考文献和试剂盒说明书进行处理和测定。采用考马斯

亮蓝比色法测定植物可溶性蛋白含量;采用茚三酮比色法测定植物脯氨酸含量<sup>[18]</sup>;采用凯氏定氮法测定植物全氮含量。总蛋白(TP)、丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、谷氨酰胺合成酶(GS)、硝酸还原酶(NR)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司。采用美国赛默飞Multiskan FC酶标仪对各指标进行测定,所有指标均测定3次重复。

1.2.3 数据统计与分析 低氮培养条件下各青稞品种叶和根的总氮、总蛋白、NR酶活性、叶绿素SPAD值、脯氨酸、MDA、SOD、POD、CAT、GS活性的生理指标显著性、变异系数、相关性、主成分和隶属函数分析,参考文献[19-22]等进行计算和分析。利用Microsoft Excel 2019和SPSS 22.0分析处理数据。

耐低氮系数=低氮处理下测定值/正常处理下测定值

$$\text{变异系数} = \text{标准偏差}/\text{平均值} \times 100\%$$

$$\text{隶属函数: } \mu(X_j) = (X_j - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}), j = 1, 2, 3, \dots, N;$$

反隶属函数:  $\mu(X_j) = 1 - (X_j - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}), j = 1, 2, 3, \dots, N$ ;  $(X_j)$  表示第  $j$  个综合指标的隶属函数值;  $X_j$  表示第  $j$  个综合指标值;  $X_{\max}$  表示第  $j$  个综合指标的最大值;  $X_{\min}$  表示第  $j$  个综合指标的最小值。

$$\text{主成分分析: } w_j = p_j / \sum_{i=1}^n p_i$$

$j = 1, 2, 3, \dots, n$ ;  $w_j$  表示第  $j$  个综合指标在所有综合指标中的重要程度及权重;  $p_j$  为各品种第  $j$  个综合指标的贡献率。

## 2 结果与分析

### 2.1 低氮胁迫对不同青稞品种幼苗生理指标的影响

利用独立样本T检验比较不同处理方式(正常、低氮)下不同青稞品种中叶和根中总氮、总蛋白、脯氨酸、MDA、叶绿素SPAD、SOD、POD、CAT、NR、GS含量或酶活性变化情况。结果如表1所示,相较于正常培养条件下,低氮胁迫处理后所有青稞品种中叶和根中总氮、总蛋白、NR酶活性和叶绿素SPAD均出现显著下降( $P < 0.05$ )。另外,无论是叶还是根,青稞中脯氨酸、MDA、SOD、POD、CAT、GS含量或酶活性都出

现了显著上升( $P < 0.05$ )。计算各指标变异系数进一步比较不同处理方式下各指标的波动情况,结果发现叶绿素 SPAD、NR 活性和 GS 活性在正常和低氮两组间的变异程度相差较大,说明低氮胁迫下对青稞叶绿素 SPAD、NR 活性和 GS 活性影响较大。其余生理指标在正常和低氮两组间的变异程度基本无显著性差异。进一步比较不同生理指标的耐低氮系数变化情况,结果发现 NR、POD 和 GS 活性耐低氮指数变异系数较大,说明根 NR 活性、POD 和 GS 活性对低氮胁迫敏感。根 GS 活性耐低氮指数变异系数最大可以作为耐低氮指初级筛选指标(表 2)。

## 2.2 不同供氮水平下青稞资源主成分分析

利用相关性分析探索 19 个生理指标之间的内在联系,结果如表 3 所示。从组织类型角度分析发现,叶和根中的生理指标的相关性结果基本一致。19 个生理指标中有 19 对指标之间存在显著相关( $P < 0.05$ ),27 对呈极显著相关( $P < 0.01$ )。相关性结果说明这些生理指标之间在解释青稞耐低氮性信息时存在协同关系。因此,采用主成分分析对青稞品种耐低氮进行综合评价以提取公因子来对原始 19 个生理指标进行维度划分,进一步筛选能代表青稞耐低氮能力的关键生理指标。主成分分析结果显示特征值排名前三的主成分在解释样本间联系的累计贡献率达到 90.16%,说明可以利用提取的主成分表示原始数据的主要信息。其中第一主成分贡献率 71.99%,叶和根 MDA 含量的特征向量绝对值远高于其他指标,表明第一主成分主要由叶和根 MDA 构成,可以总结为细胞膜系统氧化损伤指标因子。第二主成分贡献率为 12.35%,主要由叶和根 SOD、POD、CAT 活性、总氮、叶绿素 SPAD 值构成,可以总结为细胞抗氧化酶活性因子。而变异系数分析中 POD 和叶绿素 SPAD 耐低氮指数变异系数也较大。第三主成分贡献率为 5.82%,同样由叶和根 SOD、POD、CAT 活性构成,同样可以总结为细胞抗氧化酶活性因子(表 4)。公因子提取结果也与相关性结果(表 3)结论基本一致:第一主成分 MDA 与同样被提取出来的第二主成分的几个指标之间存在较强的相关性;第二主成分:POD 和 SOD 酶活、总氮与 CAT、SOD 和 CAT、叶绿素和 CAT 之间存在相关性,说明这些指标在表征青稞的耐低氮能力中存在协同作用。主成分分析表示 MDA 和抗氧化

酶类活性在评价青稞耐低氮特性中起主导地位,可以作为评价青稞耐低氮能力的重要生理指标。

## 2.3 不同供氮水平下青稞生理指标的相关性和隶属函数分析值

根据综合得分值利用隶属函数计算隶属值,对 8 个青稞品系进行模糊隶属函数分析。结果如表 5 所示,隶属排名平均值越大,说明该品系耐低氮能力越强,具体排序为‘黄青 1 号’>‘肚里黄’>‘昆仑 15’>‘二道眉白青稞’>‘特邬’>‘洛隆宗’>‘昆仑 18’>‘康青 3 号’。本研究根据各品种隶属值对 8 种青稞的耐低氮能力进行评估,结果发现‘黄青 1 号’和‘肚里黄’隶属值大于 0.5,说明这两个品种对低氮有更强的耐受能力。‘昆仑 15’‘二道眉白青稞’‘特邬’‘洛隆宗’‘昆仑 18’和‘康青 3 号’的隶属值集中为 0.243~0.415,说明这 6 个品种对低氮相对敏感。

## 3 讨论

农作物对低氮的耐受机制是有一系列非常复杂的生理调控过程,不同基因型作物对低氮耐受机制各有差异。目前很多关于大麦和青稞耐低氮研究大多集中于对低氮条件下的农艺性状进行分析,并且通常选择植株相对于干质量作为大麦耐低氮筛选的重要农艺性状指标,关于大麦尤其是青稞中耐低氮筛选相关生理指标的报道极少<sup>[12,23-25]</sup>。本研究对 8 种青稞在低氮条件下植株叶片和根中的相关生理指标进行了测定和分析,各青稞品种在低氮处理下各生理指标都出现了明显差异,不同青稞品种对低氮的耐受性表现出了明显差异。

本研究中由于氮元素的缺乏青稞植株中蛋白质合成受到抑制,叶片和根中总氮、总蛋白、和叶绿素 SPAD 都有明显下降。由于低氮培养液中硝酸根的含量减少青稞叶片和根体内硝酸还原酶 NR 活性也出现明显下降。为了应对低氮对青稞造成的逆境胁迫,缓解低氮胁迫造成的组织细胞损伤、清除活性氧自由基、加强体内氮的吸收和转运,青稞叶和根中脯氨酸含量及 SOD、POD、GS 酶活性出现上升。低氮处理下青稞叶片和根中的 MDA 明显上升,说明青稞叶片和根的细胞膜系统受到了氧化损伤。为了应对低氮胁迫引起的活性氧的过量积累,低氮胁迫下青稞叶片和根的细胞中 SOD、POD、CAT 活性都有升高。植物体内的  $\text{NH}_4^+$  与谷氨酸结合由谷氨酰胺合酶催化形成

表 1 低氮胁迫对青稞苗期叶和根中的生理指标影响

Table 1 Effect of low nitrogen stress on physiological indexes at seedling stage

生理指标 Physical index	组织 Tissue	肚里黄 Dulihuang			特鄧 Tewu			昆仑15 Kunlun 15			康普3号 Kangpu 3			昆仑18 Kunlun 18			黄青1号 Huangqing 1			洛隆宗 Luolongzong			二道白背青 Erdomei white halless barley																							
		正常 Normal		低氮 Low nitrogen	正常 Normal		低氮 Low nitrogen	正常 Normal		低氮 Low nitrogen	正常 Normal		低氮 Low nitrogen	正常 Normal		低氮 Low nitrogen	正常 Normal		低氮 Low nitrogen	正常 Normal		低氮 Low nitrogen	正常 Normal		低氮 Low nitrogen																					
		叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶	叶 叶 叶																						
总氮/(g/kg) Total nitrogen	叶 叶 叶	47.46±2.05 a 41.38±3.00 b 46.54±0.96 a 40.96±1.49 b 13.32±1.00 a 41.88±0.50 a 50.92±1.71 a 37.11±1.35 b 39.31±0.90 a 34.84±2.01 a 47.06±0.38 a 43.03±3.22 a 41.70±1.63 a 30.75±2.11 b 41.45±0.83 a 38.70±0.62 a	叶 叶 叶	40.58±0.63 a 33.57±0.83 b 41.41±1.40 a 34.17±1.08 b 42.50±31.02 a 36.22±0.77 b 47.28±1.73 a 28.88±0.50 b 39.60±0.79 a 31.36±1.03 b 40.97±0.53 a 28.99±0.35 b 38.76±0.61 a 32.87±0.67 b 41.30±0.54 a 33.89±1.61 b	根 Root	8.93±0.57 a 6.23±0.23 b 9.06±0.38 a 6.21±0.12 b 5.14±0.23 a 7.15±0.23 a 5.42±0.24 a 5.10±0.33 b 6.49±0.26 a 4.90±0.38 b 5.60±0.45 a 4.74±0.29 a 7.26±0.72 a 4.86±0.50 b 5.59±0.61 a 4.96±0.29 a	叶 叶 叶	3.52±0.18 a 2.11±0.21 b 3.34±0.10 a 2.07±0.12 b 4.29±0.40 a 2.23±0.15 b 3.34±0.17 a 1.81±0.18 b 3.47±0.21 a 2.53±0.16 b 3.76±0.12 a 2.47±0.21 b 4.22±0.24 a 2.33±0.11 b 3.98±0.23 a 2.27±0.15 b	根 Root	0.18±0.03 a 0.38±0.05 b 0.26±0.06 a 0.47±0.15 b 0.29±0.03 a 0.44±0.03 b 0.2±0.02 a 0.30±0.02 a 0.28±0.04 a 0.46±0.02 a 0.39±0.017 a 0.36±0.017 a 0.27±0.04 a 0.41±0.05 a 0.15±0.04 a 0.24±0.03 a 0.17±0.03 a 0.25±0.02 a	叶 叶 叶	0.30±0.02 a 0.38±0.03 a 0.33±0.02 a 0.43±0.02 a 0.42±0.04 a 0.51±0.03 a 0.39±0.02 a 0.46±0.02 a 0.38±0.03 a 0.48±0.03 a 0.27±0.02 a 0.56±0.03 b 0.33±0.02 a 0.38±0.03 a 0.26±0.02 a 0.38±0.02 b	叶 叶 叶	4.08±0.23 a 5.18±0.16 b 4.35±0.18 a 5.70±0.11 b 5.34±0.12 a 6.16±0.42 b 3.33±0.06 a 4.11±0.10 b 3.84±0.06 a 3.92±0.07 a 3.52±0.11 a 6.18±0.07 b 4.00±0.03 a 4.51±0.15 a 3.67±0.20 a 4.19±0.06 b	根 Root	3.29±0.15 a 3.79±0.14 a 3.25±0.10 a 4.24±0.12 b 3.35±0.11 a 3.71±0.15 b 3.81±0.08 a 4.60±0.19 b 2.47±0.13 a 3.30±0.20 b 2.87±0.12 a 4.26±0.10 b 2.54±0.13 a 3.30±0.36 b 3.18±0.05 a 4.10±0.19 b	叶 叶 叶	4.63±0.91 a 16.43±1.10 b 43.07±0.64 a 21.27±0.99 b 43.83±1.00 a 25.63±0.66 b 49.57±1.05 a 17.00±0.62 b 47.67±0.90 a 17.83±0.50 b 51.43±0.81 a 18.23±0.60 b 64.46.70±0.92 a 16.90±0.26 b 44.67±1.11 a 15.73±0.97 b	叶 叶 叶	24.40±1.12 a 36.78±1.21 b 26.44±1.14 a 37.40±1.27 b 27.40±1.04 a 44.66±1.58 b 27.48±1.06 a 28.14±0.39 a 27.23±1.69 a 28.69±0.58 a 28.93±0.68 a 36.52±0.36 b 31.10±0.63 a 32.55±0.96 a 31.95±0.51 a 38.02±0.73 b	根 Root	34.45±1.20 a 37.89±0.77 b 36.29±0.50 a 41.03±0.66 b 28.95±0.65 a 35.54±1.05 b 31.01±0.48 a 33.75±1.00 b 28.76±0.88 a 42.31±0.60 b 31.73±0.82 a 37.59±0.90 a 32.92±1.26 a 29.04±0.62 b 31.72±1.21 a 38.71±0.89 b	叶 叶 叶	10.88±0.31 a 15.93±0.75 b 17.57±1.03 a 17.82±0.28 a 20.70±0.57 b 14.19.36±0.51 b 15.17±0.44 a 17.47±1.14 a 19.36±0.51 b 15.17±0.44 a 17.98±1.38 b 14.48±0.94 a 21.99±0.73 b 17.68±1.20 a 26.75±1.00 b	根 Root	11.04±0.45 a 16.07±0.64 b 12.33±0.85 a 16.51±0.73 b 10.88±0.63 a 17.48±0.68 b 9.28±0.81 a 13.45±0.49 b 8.55±0.15 a 19.06±0.72 b 13.07±0.34 a 13.44±0.66 b 15.91±0.38 a 15.94±0.52 a 13.63±0.26 a 15.40±0.63 b	叶 叶 叶	20.76±0.51 a 30.72±0.56 b 25.75±0.64 a 27.89±1.28 b 24.29±0.62 a 29.58±0.69 b 19.88±0.40 a 21.42±0.42 b 18.12±0.66 a 18.65±0.01 a 16.60±0.06 a 27.32±0.36 b 20.58±0.11 a 22.47±0.15 b 9.75±0.57 b 12.26±0.55 a 8.81±0.62 b	叶 叶 叶	12.03±0.44 a 18.83±0.56 b 15.53±1.22 a 9.49±0.14 b 15.29±0.62 a 11.68±0.28 b 14.44±0.61 a 8.41±0.11 b 11.02±0.67 a 7.51±0.17 b 12.39±0.15 a 9.44±0.17 b 12.09±0.43 b 8.96±0.42 a 5.55±0.71 b 11.50±1.03 a 7.72±0.58 b	根 Root	0.65±0.01 a 0.78±0.11 a 0.74±0.05 a 0.91±0.08 b 0.65±0.06 a 0.94±0.04 b 0.51±0.08 a 1.45±0.08 a 0.81±0.07 a 0.90±0.03 b 0.74±0.14 a 0.82±0.04 b 0.46±0.04 a 0.77±0.05 b 0.59±0.05 a 0.92±0.01 b	GS活性/(U/mg) GS activity	0.65±0.01 a 0.71±0.02 b 0.53±0.04 a 0.83±0.03 b 0.40±0.02 a 0.58±0.07 b 0.69±0.06 a 1.35±0.10 b 0.81±0.07 a 0.90±0.03 b 0.74±0.14 a 0.82±0.04 b 0.46±0.04 a 0.77±0.05 b 0.59±0.05 a 0.92±0.01 b	NR活性/(U/mg) NR activity	0.65±0.01 a 0.78±0.11 a 0.74±0.05 a 0.91±0.08 b 0.65±0.06 a 0.94±0.04 b 0.51±0.08 a 1.45±0.08 a 0.81±0.07 a 0.90±0.03 b 0.74±0.14 a 0.82±0.04 b 0.46±0.04 a 0.77±0.05 b 0.59±0.05 a 0.92±0.01 b	CAT活性/(U/mg) CAT activity	0.65±0.01 a 0.65 a 39.15±0.53 b 26.56±1.14 a 35.90±0.57 b 24.60±0.66 a 26.53±0.23 b 26.5±0.16 a 28.83±0.56 b 20.77±0.51 a 24.00±0.63 b 17.34±1.03 a 31.50±0.66 b 15.96±0.36 a 19.24±0.86 b 24.12±0.43 a 31.35±0.53 b	CAT活性/(U/mg) CAT activity	0.65±0.01 a 0.71±0.02 b 0.53±0.04 a 0.83±0.03 b 0.40±0.02 a 0.58±0.07 b 0.69±0.06 a 1.35±0.10 b 0.81±0.07 a 0.90±0.03 b 0.74±0.14 a 0.82±0.04 b 0.46±0.04 a 0.77±0.05 b 0.59±0.05 a 0.92±0.01 b	SPAD Chlorophyll SPAD	SOD活性/(U/mg) SOD activity	PPO活性/(U/mg) PPO activity	CAT活性/(U/mg) CAT activity	NR活性/(U/mg) NR activity	GS活性/(U/mg) GS activity

注：不同小写字母表示低氮处理和对照差异显著( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between low N treatment and control ( $P \leq 0.05$ ).

表 2 正常和低氮水平处理下青稞苗期生理指标间的变异  
Table 2 Variation coefficient of physiological indexes in leaves and roots of hulless barley at seedling stage under normal nitrogen and low nitrogen treatment

生理指标 Physical index	组织 Tissue	低氮 Low nitrogen		正常 Normal nitrogen		耐低氮系数 Low nitrogen tolerant coefficient		变异系数/% Coefficient of variation	
		变异 Variation		均值 Mean		变异 Variation			
		均值 Mean	变异 Variation	均值 Mean	变异 Variation	均值 Mean	变异 Variation		
总氮/(g/kg) Total nitrogen	叶 Leaf	38.60~52.87	43.76±3.79 a	28.36~45.36	38.58±4.23 b	0.73~0.97	0.86±0.087	叶叶 Leaf	
	根 Root	38.36~48.62	41.55±2.55 a	28.46~36.74	32.49±2.53 b	0.61~0.85	0.79±0.084	根 Root	
总蛋白/(mg/g) Total protein	叶 Leaf	4.89~9.48	7.31±1.35 a	4.36~6.97	5.27±0.62 b	0.61~0.89	0.73±0.09	叶叶 Leaf	
	根 Root	3.22~4.64	3.74±0.40 a	1.62~2.67	2.23±0.26 b	0.52~0.73	0.60±0.07	根 Root	
游离脯氨酸/(mg/g) Free proline	叶 Leaf	0.12~0.38	0.25±0.07 b	0.21~0.62	0.34±0.10 a	0.72~2.05	1.46±0.41	游离脯氨酸 Free proline	
	根 Root	0.24~0.46	0.34±0.06 b	0.35~0.58	0.45±0.06 a	1.17~2.04	1.36±0.29	根 Root	
MDA/(nmol/mg)	叶 Leaf	3.41~5.46	4.14±0.55 b	3.86~6.45	5.00±0.89 a	0.95~1.75	1.22±0.25	MDA	
	根 Root	2.35~3.86	3.09±0.43 b	3.12~4.82	3.99±0.41 a	1.11~1.56	1.30±0.15	根 Root	
叶绿素 SPAD Chlorophyl SPAD	叶 Leaf	42.60~52.30	46.44±2.86 a	14.90~25.70	18.63±3.13 b	0.34~0.58	0.40±0.09	叶绿素 SPAD Chlorophyl SPAD	
SOD活性/(U/mg) SOD activity	叶 Leaf	23.45~32.54	27.95±2.45 b	26.36~46.36	35.26±5.26 a	0.98~1.63	1.27±0.24	SOD活性 SOD activity	
	根 Root	20.36~36.78	30.58±4.18 b	28.68~42.88	36.98±4.01 a	1.09~1.47	1.22±0.13	根 Root	
POD活性/(U/mg) POD activity	叶 Leaf	10.64~18.88	15.55±2.27 b	14.65~27.68	19.94±3.24 a	1.10~1.52	1.29±0.18	POD活性 POD activity	
	根 Root	8.36~16.35	11.88±2.32 b	12.78~19.86	15.87±1.91 a	0.97~2.23	1.40±0.41	根 Root	
CAT活性/(U/mg) CAT activity	叶 Leaf	16.54~26.46	20.74±2.84 b	18.64~31.36	24.85±4.28 a	1.03~1.65	1.21±0.23	CAT活性 CAT activity	
	根 Root	15.66~27.64	22.36±3.78 b	18.34~39.46	29.56±6.00 a	1.08~1.82	1.34±0.28	根 Root	
NR活性/(U/mg) NR activity	叶 Leaf	9.34~16.78	12.80±2.08 a	7.32~11.89	9.86±1.59 b	0.58~1.31	0.79±0.23	NR活性 NR activity	
	根 Root	8.65~13.74	11.33±1.56 a	4.97~11.88	8.61±2.04 b	0.57~1.27	0.77±0.23	根 Root	
GS活性/(U/mg) GS activity	叶 Leaf	0.38~0.89	0.60±0.14 b	0.52~1.45	0.86±0.22 a	1.10~1.96	1.45±0.30	GS活性 GS activity	
	根 Root	0.42~0.86	0.68±0.11 b	0.67~1.66	0.95±0.22 a	1.11~2.85	1.45±0.58	根 Root	

表 3 青稞苗期不同生理指标相对值之间的相关性分析  
 Table 3 Correlation coefficients among low nitrogen stress coefficients of physiological indexes in leaves and roots of hulless barely at seedling stage

注：“\*”表示显著相关( $P<0.05$ )，“\*\*”表示极显著相关( $P<0.01$ )。

表 4 低氮处理下青稞苗期叶和根生理指标主成分分析

**Table 4** Principal component analysis of physiological indexes in leaves and roots of hulless

### barely at seedling stage under low nitrogen treatment

生理指标 Physical index	组织 Tissue	因子 1 Factor1	因子 2 Factor 2	因子 3 Factor3
总氮 Total nitrogen	叶 Leaf	-0.003 192 676	0.048 202 253	-0.011 645 513
	根 Root	-0.004 759 99	0.019 196 828	0.024 312 563
总蛋白 Total protein	叶 Leaf	-0.000 290 243	0.002 382 088	-0.003 268 916
	根 Root	-0.000 116 097	-0.000 140 123	0.000 612 922
游离脯氨酸 Free proline	叶 Leaf	0	0	0
	根 Root	0	0	0
MDA	叶 Leaf	0.000 058 049	0.000 980 86	0.002 655 994
	根 Root	0.000 058 049	0.000 280 246	-0.000 408 615
叶绿素 SPAD Chlorophyl SPAD	叶 Leaf	-0.040 169 673	0.034 610 339	0.066 399 857
	根 Root	0.004 005 358	0.021 018 424	0.173 048 243
SOD 活性 SOD activity	叶 Leaf	0.003 482 920	0.032 788 742	-0.099 497 632
	根 Root	0.001 567 314	-0.010 789 458	0.024 312 563
POD 活性 POD activity	叶 Leaf	0.001 160 973	-0.004 904 299	0.017 774 731
	根 Root	0.001 857 557	0.029 846 163	0.057 614 645
CAT 活性 CAT activity	叶 Leaf	0.004 934 136	0.074 685 468	-0.041 882 987
	根 Root	-0.000 638 535	0.007 426 510	0.011 441 206
NR 活性 NR activity	叶 Leaf	-0.000 580 487	0.004 904 299	-0.007 967 983
	根 Root	0	0	-0.000 204 307
GS 活性 GS activity	叶 Leaf	0	0	0
	根 Root	0	0	0
累计贡献率/% Cumulative contribution rate		71.99	84.34	90.16

表 5 低氮条件下青稞苗期叶和根中生理指标隶属函数分析

**Table 5** Membership function analysis of physiological indexes in leaves and roots of hullless barley at seedling stage under low nitrogen treatment

品种 Cultivar	组织 Tissue	肚里黄 Dulihuang	特邬 Tewu	昆仑 15 Kunlun 15	康青 3 号 Kangqing 3	昆仑 18 Kunlun 18	黄青 1 号 Huangqing 1	洛隆宗 Luolongzong	二道眉白青稞 Erdaomei white hulless barley
总氮 Total nitrogen	叶 Leaf	0.39	0.42	0.54	0.00	0.43	1.00	0.02	0.56
	根 Root	0.90	0.89	1.00	0.00	0.75	0.40	0.99	0.87
总蛋白 Total protein	叶 Leaf	0.16	0.14	0.20	0.00	0.26	1.00	0.11	0.49
	根 Root	0.38	0.47	0.00	0.10	1.00	0.65	0.16	0.24
游离脯氨酸 Free proline	叶 Leaf	1.00	0.77	0.54	0.17	0.00	0.53	0.57	0.44
	根 Root	0.10	0.16	0.04	0.00	0.10	1.00	0.00	0.37
MDA	叶 Leaf	0.40	0.45	0.25	0.00	0.09	1.00	0.22	0.14
	根 Root	0.47	0.67	0.41	0.54	0.00	0.90	1.00	0.65
叶绿素 SPAD Chlorophyl SPAD	叶 Leaf	0.10	0.62	1.00	0.00	0.13	0.05	0.08	0.04
SOD 活性 SOD activity	叶 Leaf	0.81	0.67	1.00	0.00	0.12	0.58	0.11	0.33
	根 Root	0.03	0.11	0.36	0.00	1.00	0.25	0.65	0.35
POD 活性 POD activity	叶 Leaf	0.81	0.00	0.14	0.48	0.01	0.20	1.00	0.99
	根 Root	0.62	0.71	0.50	0.62	0.00	1.00	0.98	0.87
CAT 活性 CAT activity	叶 Leaf	0.73	0.09	0.31	0.08	0.00	1.00	0.10	0.02
	根 Root	0.88	0.51	0.19	0.14	0.00	1.00	0.36	0.46
NR 活性 NR activity	叶 Leaf	0.57	0.05	0.33	0.00	0.18	1.00	0.37	0.25
	根 Root	0.39	0.08	0.34	0.50	0.00	1.00	0.09	0.18
GS 活性 GS activity	叶 Leaf	0.75	0.41	0.55	1.00	0.88	1.00	0.31	0.40
	根 Root	0.05	0.07	0.20	1.00	0.05	0.17	0.05	0.00
均值 Mean		0.502	0.384	0.415	0.243	0.263	0.723	0.377	0.403
排序 Ranking		2	5	3	8	7	1	6	4

谷氨酰胺,将无机氮转化为有机氮供植物体利用。为了提高氮元素的同化和利用,低氮胁迫下青稞叶片和根中 GS 活性明显升高。脯氨酸具有调控细胞渗透压、清除活性氧、维持蛋白结构和细胞膜系统的稳定性。为了应对低氮胁迫,青稞叶片和根中的脯氨酸含量明显升高。蒋春姬等<sup>[26]</sup>采用苗期水培的方法对 40 种花生品种在低氮培养条件下农艺性状和生理指标进行研究,对变异系数、主成分和隶属函数进行综合分析发现叶片黄化程度和叶绿素 SPAD 值可以更为直观地反映出花生品种的耐低氮性,可以作为花生耐低氮性的初级筛选指标,氮累积量、氮利用率、氮含量、氮利用指数及根冠比可以作为进一步的筛选指标,并筛选出耐低氮花生品种 2 个。张楚等<sup>[22]</sup>采用变异系数、主成分和隶属函数分析方法对低氮培养条件下 25 个苦荞品种苗期农艺性状和生理指标进行研究,认为株高、茎粗、叶面积、根冠比、叶绿素含量、最大荧光参数  $F_m$ 、根系 SOD 活力及氮利用效率 8 个指标可以作为苦荞苗期耐低氮性鉴定的指标。罗延宏<sup>[27]</sup>采用变异系数、主成分和隶属函数分析方法对 51 个玉米品种低氮培养下苗期农艺性状和生理特点进行研究筛选出 5 个耐低氮性强的玉米品种,并认为玉米植株中较高的 POD 活力、游离脯氨酸和可溶性糖含量是玉米耐低氮能力强的重要生理指标。本研究认为青稞叶片和根中 MDA 含量和抗氧化酶类活性是评价青稞耐低氮能力的重要生理指标。低氮胁迫下青稞细胞应对活性氧对膜系统的损伤能力是青稞耐低氮生理中最关键的特征。同时抗氧化酶类也是综合性抗逆物质,在应对其他胁迫如干旱、盐碱、高低温中都发挥着重要作用,说明耐低氮胁迫和应对其它胁迫的抗性生理有共通之处。青稞中对各种逆境抗性强的品种对低氮胁迫也会具有较强的抗性。本研究对低氮条件下 8 种青稞资源的相关生理指标进行测定和分析,明确了与青稞耐低氮密切相关的生理指标,对其耐低氮能力做出了综合性评价。为更大规模快速耐低氮青稞种质资源筛选和品种培育提供了参考,为青稞耐低氮品种培育奠定了一定的基础。

#### 参考文献 Reference:

- [1] 吴昆仑,陈丽华,迟德钊.不同生态区青稞品种变异的 SSR 鉴定[J].浙江农业学报,2011,23(3):475-478.
- WU K L,CHEN L H,CHI D ZH. Identification of variation of hulless barley in different ecological regions by SSR markers[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2011, 23 (3):475-478.
- [2] 姚晓华,张志斌. HVA1 基因的同源克隆及其转基因植物耐逆性研究进展[J]. 广东农业科学,2011,38(14):129-131,137.
- YAO X H,ZHANG ZH B. Research on stress tolerance of HVA1 gene and transgenic plants[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*,2011,38(14):129-131,137.
- [3] 张 帅,吴昆仑,姚晓华,等.不同粒色青稞营养品质与抗氧化活性物质差异性分析[J].青海大学学报(自然科学版),2017,35(2):19-27.
- ZHANG SH,WU K L,YAO X H,*et al*. Difference analysis of nutritional quality and antioxidant activity material in different grain color of hulless barleys[J]. *Journal of Qinghai University(Natural Science)*,2017,35(2):19-27.
- [4] 徐金青.青藏高原青稞的驯化起源及基因组选择印迹发掘[D].北京:中国科学院大学, 2018.
- XU J Q. Domestication origin of highland barley on the qinghai-tibet plateau and excavation of genome selective imprinting[D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences University,2018.
- [5] 徐志远,秦智伟,周秀艳.氮肥利用研究现状及培育耐低氮胁迫蔬菜品种的探讨[J].东北农业大学学报,2007,38(5):706-710.
- XU ZH Y,QIN ZH W,ZHOU X Y. Discussion on nitrogenous fertilizer using and breeding nitrogen stress tolerant vegetables[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*,2007,38(5):706-710.
- [6] MOLL R H,KAMPRATH E J,JACKSON W A. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization 1 [J]. *Agronomy Journal*, 1982, 74(3):562-564.
- [7] YOSHIE M, MINEKO K, TAKATOSHI K, *et al*. A NIGT1-centred transcriptional cascade regulates nitrate signalling and incorporates phosphorus starvation signals in *Arabidopsis* [J]. *Nature Communications*, 2018, 9 (1): 1376.
- [8] 全晓艳.西藏野生大麦低氮耐性机理研究[D].杭州:浙江大学,2016.
- QUAN X Y. Study on the mechanism of low nitrogen tolerance of wild barley in Tibet[D]. Hangzhou: Zhejiang University,2016.
- [9] SINGH U,LADHA J K,CASTILLO E G,*et al*. Genotypic variation in nitrogen use efficiency in medium- and long-duration rice[J]. *Field Crops Research*,1998,58(1):35-53.
- [10] 任海红,刘学义,李贵全.大豆耐低磷胁迫研究进展[J].分子植物育种,2008,6(2):316-322.
- REN H H,LIU X Y,LI G Q. Advances of soybean tolerant to low phosphorus stress[J]. *Molecular Plant Breeding*,2008,6(2):316-322.
- [11] 李 强.氮肥对不同氮效率玉米品种氮素吸收利用及产量形成的影响[D].四川雅安:四川农业大学,2014.
- LI Q. Effects of nitrogen fertilizer on nitrogen uptake and

- utilization and yield formation of maize varieties with different nitrogen efficiencies[D]. Ya'an Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2014.
- [12] 陈志伟, 陆瑞菊, 姜琪, 等. 一种耐低氮大麦的筛选方法: CN310112, CN201810021569.4[P]: 20180622.
- CHEN ZH W, LU R J, JIANG Q, et al. A screening method for low nitrogen tolerance barley: CN310112, CN2018100 21569.4[P]: 20180622.
- [13] 张锡洲, 阳显斌, 李廷轩, 等. 野生大麦氮素吸收利用的基因型差异[J]. 核农学报, 2011, 25(6): 1261-1267.
- ZHANG X ZH, YANG X B, LI T X, et al. Genotype difference in nitrogen uptake and utilization of wild barley [J]. *Journal of Nuclear Agronomy*, 2011, 25(6): 1261-1267.
- [14] 杨丽娜. 西藏野生大麦与栽培大麦氮利用效率的基因型差异研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- YANG L N. Genotypic differences in nitrogen use efficiency between wild barley and cultivated barley in Tibet[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [15] 赵化田, 王瑞芳, 许云峰, 等. 小麦苗期耐低氮基因型的筛选与评价[J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(5): 1199-1204.
- ZHAO H T, WANG R F, XU Y F, et al. Screening and evaluating low nitrogen tolerant wheat genotype at seedling stage[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2011, 19(5): 1199-1204.
- [16] 黄兴东. 谷子耐低氮胁迫品种资源的筛选与鉴定[D]. 山西太谷: 山西农业大学, 2019.
- HUANG X D. Screening and identification of millet cultivars with tolerance to low nitrogen stress[D]. Taigu Shanxi: Shanxi Agricultural University, 2019.
- [17] 张楚. 苦荞耐低氮基因型的筛选及其生理机制的初步研究[D]. 山西临汾: 山西师范大学, 2018.
- ZHANG CH. Screening of low nitrogen tolerance genotypes of buckwheat and preliminary research on its physiological mechanism[D]. Linfen Shanxi: Shanxi Normal University, 2018.
- [18] 王学奎. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- WANG X K. Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006.
- [19] 吕立军. 大葱苗期耐低氮低磷品种筛选及评价指标研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- LÜ L J. Screening and evaluation indexes of green onion cultivars with tolerance to low nitrogen and phosphorus at seedling stage[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.
- [20] 王春萍, 李怡斐, 张世才, 等. 102份辣椒种质资源苗期耐低氮性综合评价[J]. 分子植物育种, 2021, 21(4): 1330-1338.
- WANG CH P, LI Y F, ZHANG SH C, et al. Comprehensive evaluation on low nitrogen tolerance of 102 pepper germplasm resources at seedling stage [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 21(4): 1330-1338.
- [21] 李洁. 150份青稞种质资源成株期耐旱性鉴定[J]. 西北农业学报, 2022, 31(2): 1-11.
- LI J. Identification of drought tolerance in 150 highland barley germplasm resources at adult stage[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2022, 31(2): 1-11.
- [22] 张楚, 张永清, 路之娟, 等. 低氮胁迫对不同苦荞品种苗期生长和根系生理特征的影响[J]. 西北植物学报, 2017, 37(7): 1331-1339.
- ZHANG CH, ZHANG Y Q, LU ZH J, et al. Effect of low nitrogen stress on the seedling growth and root physiological traits of fagopyrum tataricum cultivars with different low-N treatments[J]. *Northwest Botany*, 2017, 37(7): 1331-1339.
- [23] 强欣. 大麦不同氮利用效率品种筛选及GS基因的生物信息学分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
- QIANG X. Screening of barley varieties with different nitrogen use efficiency and bioinformatics analysis of GS gene[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2015.
- [24] QUAN X, ZENG J, YE L, et al. Transcriptome profiling analysis for two Tibetan wild barley genotypes in response to low nitrogen[J]. *Bmc Plant Biology*, 2016, 16(1): 30.
- [25] LI NA Y, HONGLIANG H, BO Z, XIAOLI J, FEIBO W, GUOPING Z. Genotypic variations of N use efficiency in Tibetan wild and cultivated barleys[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2013, 40(2): 155-164.
- [26] 蒋春姬, 郭佩, 王晓光, 等. 花生氮高效品种资源的苗期筛选研究[J]. 花生学报, 2020, 49(3): 6.
- JIANG CH J, GUO P, WANG X G, et al. Screening of peanut varieties with different nitrogen efficiency at seedling stage[J]. *Journal of Peanut Science*, 2020, 49(3): 6.
- [27] 罗延宏. 玉米苗期耐低氮品种的筛选及其生理机制的初步研究[D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2012.
- LUO Y H. Screening of low-nitrogen-tolerant varieties of maize in seedling stage and preliminary research on its physiological mechanism[D]. Ya'an Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2012.

## Effect of Low Nitrogen Stress on Physiological Characteristics of Different Barley Seedlings and Evaluation of Low Nitrogen Tolerance

AN Likun<sup>1,2,3</sup>, YAO Youhua<sup>1,2,3</sup>, YAO Xiaohua<sup>1,2,3</sup> and WU Kunlun<sup>1,2,3</sup>

(1. Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. Qinghai Key Laboratory of Hulless Barley Genetics and Breeding, Xining 810016, China;

3. Qinghai Subcenter of National Hulless Barley Improvement, Xining 810016, China)

**Abstract** In this study, we measured and analyzed relevant physiological indicators in the leaves and roots of 8 hulless barley varieties at the seedling stage under low nitrogen culture conditions to clarify the important physiological indicators suitable for the screening of low nitrogen tolerant hulless barley varieties. The results showed that there were significant differences in the physiological indexes of hulless barley under low nitrogen conditions compared with normal culture conditions. Total nitrogen, total protein, NR enzyme activity and chlorophyll SPAD decreased in leaves and roots of the 8 barley species, while proline, MDA, SOD, POD and GS enzyme activities increased in leaves and roots, but the magnitude of changes in each physiological index varied among varieties. The analysis of each physiological index revealed that root GS enzyme activity can be used as a primary index for rapid screening of low nitrogen tolerant resources in hulless barley, and osmoregulators and antioxidant enzyme activities play a major role in low nitrogen tolerance in hulless barley and can be used as important indexes for the screening of low nitrogen tolerant hulless barley. The results of multi-indicator analysis showed that the low nitrogen tolerance of each variety was ranked as ‘Huangqing 1’>‘Duli Huang’>‘Kunlun 15’>‘Erdaomei white hulless barley’>‘Tewu’>‘Luolongzong’>‘Kunlun’>‘Kangqing 3’. In conclusion, this study analyzed the relevant physiological indexes of hulless barley under low nitrogen conditions and clarified the important physiological indexes for the screening of low nitrogen tolerant hulless barley. These findings provide some references for further large-scale screening of low nitrogen tolerant hulless barley resources and variety selection and breeding.

**Key words** Hulless barley(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.); Low nitrogen stress; Seedling stage; Physiological parameters

**Received** 2022-03-17

**Returned** 2022-06-10

**Foundation item** Innovation Fund of Qinghai Academy of Agricultural and Forestry Sciences (No. 2019-NKY-05); National Natural Science Foundation of China (No. 32060423); China Agriculture Research System (No. CARS-05-01A-05).

**First author** AN Likun, male, assistant research fellow. Research area: breeding and cultivation of hulless barley. E-mail: anlikun@163.com

**Corresponding author** WU Kunlun, male, research fellow, master supervisor. Research area: genetic breeding of hulless barley. E-mail: wklqaaf@163.com

(责任编辑:成 敏 Responsible editor:CHENG Min)