

不同基因型大豆 NADH-GOGAT 活性动态规律研究

刘业丽¹, 栾怀海¹, 何琳¹, 刘春燕¹, 蒋洪蔚¹, 韩雪¹, 胡国华^{1,2}, 刘丽君²

(1. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150090; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以垦丰9号、东农46、东农42、黑农35、秣食豆和野生大豆为材料, 研究不同基因型大豆全生育期的 NADH-GOGAT 活性变化规律。结果表明:随着生育期的推进, 不同基因型大豆叶片 NADH-GOGAT 的活性变化存在差异, 野生大豆、半野生大豆呈单峰曲线, 其他品种呈降-升-降趋势; 茎秆 NADH-GOGAT 活性变化趋势基本一致, 均呈单峰曲线; 根瘤 NADH-GOGAT 活性变化东农46呈双峰曲线, 其他品种呈单峰曲线; 荚皮 NADH-GOGAT 活性各品种均呈下降趋势。不同器官 NADH-GOGAT 活性表现为叶片>根瘤>茎秆>根>荚皮。R4期叶片与茎秆中的 GOGAT 的活性与籽粒蛋白质含量呈极显著正相关。

关键词:大豆; 基因型; NADH-GOGAT; 活性

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2014)02-0199-04

NADH-GOGAT Activities in Different Genotypes Soybean

LIU Ye-li¹, LUAN Huai-hai¹, HE Lin¹, LIU Chun-yan¹, JIANG Hong-wei¹, HAN Xue¹, HU Guo-hua^{1,2}, LIU Li-jun²

(1. Crop Research and Breeding Center of Land-Reclamation, Harbin 150090, China; 2. Agronomy College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Six varieties including Heinong 35, Dongnong 42, Dongnong 46, Kenfeng 9, *G. gracilis* and *G. soja* were tested by means of pots experiments to study the dynamics of NADH-GOGAT activities in different genotypes soybean. The results indicated that during the whole growth stage, the dynamics of NADH-GOGAT activities in the leaves presented a drop-rise-drop tendency in *G. gracilis* and *G. soja*, the other varieties had a single-peak curve; in stems it showed a single-peak curve; activities in roots of the tested varieties except Heinong 35 and Dongnong 42 showed a single-peak curve; in the nodules of Dongnong 46 appeared a double-peak curve, but the other varieties had a single-peak curve; in pod decreased gradually with development. The gradation of GOGAT activities in different organs was leaf > nodules > stem > root > pod shed. The NADH-GOGAT activities in leaves and stems were significant positively correlated with the protein content in seeds at R4.

Key words: Soybean; Genotype; NADH-GOGAT; Activity

氮的同化过程中有两种重要的酶参与催化作用, 即谷氨酰胺合成酶(GS)与谷氨酸合酶(GOGAT), 其中谷氨酸合酶是限速酶。谷氨酸合酶催化一分子谷氨酰胺和一分子 α -酮戊二酸形成两分子谷氨酸, 完成氮的初级同化过程。谷氨酸合酶有3种形式, 分别以铁氧还蛋白、NADH和NADPH为电子供体^[1-3]。NAD(P)H-GOGAT在微生物和植物中广泛存在, 主要参与氮类化合物的转移运输^[4]。在豆科植物的根瘤中, NADH-GOGAT参与根瘤菌所固定的氮的同化。 NH_4^+ 和 NO_3^- 可提高NADH-GOGAT活性^[5-6]。在此前氮代谢规律的研究中大多将GOGAT酶活性作为主要的测定指标^[7]。现以不同基因型大豆为材料研究NADH-GOGAT酶活性变化规律及其与籽粒蛋白质含量的关系, 旨在为相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以高油大豆品种垦丰9号(KF9)、东农46(DN46); 高蛋白大豆品种东农42(DN42)、黑农35(HN35); 秣食豆(半野生型大豆, MSD)和野生大豆(WS)为材料。东农42和东农46由东北农业大学大豆研究所提供, 垦丰9号、黑农35、秣食豆由黑龙江省农业科学院大豆研究所提供, 野生大豆由东北农业大学大豆栽培生理实验室采集。

1.2 试验设计

采用盆栽处理。每盆保苗3株, 随机区组排列, 20次重复。分别于苗期(V4)、始花期(R1)、盛花期(R2)、初荚期(R4)、盛荚期(R5)、鼓粒期(R6)及完熟期(R8)取样。晴天上午8:30~10:00采集功能

收稿日期: 2013-09-14

第一作者简介: 刘业丽(1981-), 女, 助理研究员, 主要从事大豆育种研究。E-mail: 13936196261@163.com。

通讯作者: 刘丽君(1971-), 女, 副教授, 主要从事大豆生理研究。E-mail: kaoyanyouji@163.com。

叶片(倒二叶或倒三叶)、茎秆(倒数第三节)、根尖和根瘤,立即用液氮冷冻处理测定酶活性。于成熟期收获大豆籽粒采用半微量凯氏定氮法测定蛋白质含量。

1.3 NADH-GOGAT 的活性测定

NADH-GOGAT 活性测定参照郑朝峰等^[8]的方法略有修改。

1.3.1 离子交换柱的制备 层析柱为自制的玻璃柱,即在内径 2 cm 的滴管上接小漏斗。柱底用少许纱布作塞子,将处理好的强碱性阴离子交换树脂注入层析柱中(柱高 15 cm)。商品树脂用 60℃ 蒸馏水洗 7~8 次以除去水溶性杂质及细小颗粒,抽干后依次用 0.5 mol·L⁻¹ NaOH 处理 1 h,蒸馏水洗至中性;0.5 mol·L⁻¹ HCl 处理 1 h,蒸馏水洗至中性;1 mol·L⁻¹ 醋酸钠处理 3 h(60℃);再用 1 mol·L⁻¹ 醋酸洗至流出液中无 Cl⁻ 为止(用 1% AgNO₃ 检验);最后用水洗至中性备用。不同高度的树脂对 NADH-GOGAT 活性有影响,当树脂高度为 4,5 和 6 cm 时 NADH-GOGAT 活性分别为 0.520,0.632 和 0.527 μmol·g⁻¹ FW·min⁻¹,所以确定树脂高度为 5 cm。

1.3.2 NADH-GOGAT 活性测定 将 1 g 左右的样品放于预冷的研钵中,用 8 mL 咪唑-盐酸(0.05 mol·L⁻¹)研磨均匀,取 4 mL 于 4℃ 下 12 000 g 离心 10 min,取上清液用于 NADH-GOGAT 酶活力测定。

依次取 L-谷氨酰胺(50 mmol·L⁻¹)、α-酮戊二酸(50 mmol·L⁻¹)、NADH(0.02 mmol·L⁻¹)各 0.2 mL,置于 30℃ 水浴保温 5 min,加入 0.2 mL 粗酶液,最后加 0.2 mL 预保温过的碳酸钠+亚硫酸钠(20 mmol·L⁻¹)起始反应。以不加 L-谷氨酰胺(以 0.2 mL 50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液代替)为对照混合液于 30℃ 水浴保温 10 min 后,于沸水浴加热 1.5 min,再剧烈摇动以终止反应,然后 4 000 g 离心 10 min 后取上清液及 2 mL 清洗离心管的蒸馏水全部上离子交换柱。等样品全部进入柱后,用 10 mL 蒸馏水,4 mL 0.3 mol·L⁻¹ 醋酸依次洗柱,洗脱液丢弃。最后用 2 mL 0.3 mol·L⁻¹ 的醋酸洗脱液吸附在柱子上的谷氨酸,收集全部 2 mL 洗脱液,直接加 4 mL 茚三酮试剂(0.5% 茚三酮,1.13% CdCl₂·2.5H₂O,95% 乙醇,9.1% 的冰醋酸),混匀后于 80℃ 水浴保温 10 min 立即取出,用冰水浴冷却后测定 506 nm 的消光系数。

1.4 数据分析

采用 Excel 2003 进行数据处理和作图,采用 SAS 8.2 进行方差分析和相关分析。

2 结果与分析

2.1 不同基因型大豆 NADH-GOGAT 活性动态

2.1.1 叶片 如图 1 所示,不同基因型大豆叶片 NADH-GOGAT 活性变化趋势不一致,秣食豆和野生大豆呈单峰曲线,峰值出现在 R2 期;其他品种呈降-升-降的趋势,黑农 35 和东农 42 在 R4 期最高,东农 46 和垦丰 9 号在 R5 期最高。苗期各品种叶片 NADH-GOGAT 活性差异较大。黑农 35 的 NADH-GOGAT 活性 R4~R6 期一直维持在较高水平。

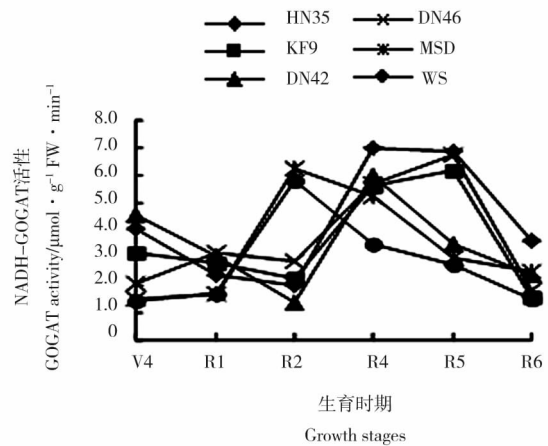


图 1 叶片 NADH-GOGAT 活性动态

Fig. 1 Dynamics of NADH-GOGAT activity in leaves

2.1.2 茎秆 如图 2 所示,各品种茎秆中 NADH-GOGAT 活性变化趋势基本一致,均呈单峰曲线。黑农 35、东农 42、东农 46、垦丰 9 号的峰值都出现在 R4 期,秣食豆和野生大豆峰值出现在 R2 期。野生大豆和秣食豆茎秆中 NADH-GOGAT 活性较其他栽培品种低,但在苗期至始花期各品种差异不大。

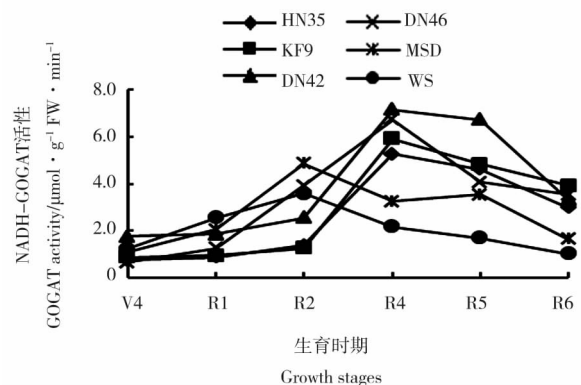


图 2 茎秆 NADH-GOGAT 活性动态

Fig. 2 Dynamics of NADH-GOGAT activity in stems

2.1.3 根系 如图 3 所示,黑农 35 和东农 42 根系 NADH-GOGAT 活性变化呈双峰曲线,峰值在 R1 期和 R4 期;其他品种呈单峰曲线,野生大豆峰值在 R1 期,秣食豆峰值在 R2 期,其他品种峰值在 R4 期。

秣食豆和野生大豆峰值出现比其他栽培大豆早。野生大豆根系不发达,R2 期后 NADH-GOGAT 活性明显低于其他品种。

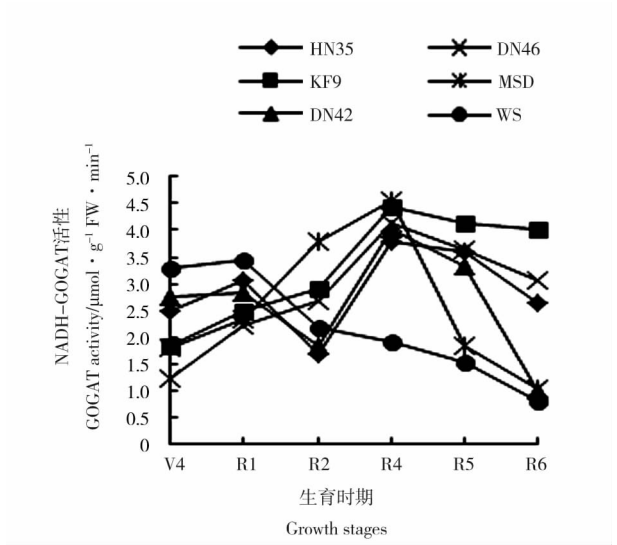


图3 根系 NADH-GOGAT 活性动态
Fig. 3 Dynamics of NADH-GOGAT activity in roots

2.1.4 根瘤 如图 4 所示,除东农 46 外其他品种均呈单峰曲线的变化趋势,峰值在 R4 期;东农 46 双峰曲线的变化趋势峰值分别在 R2 和 R5 期。

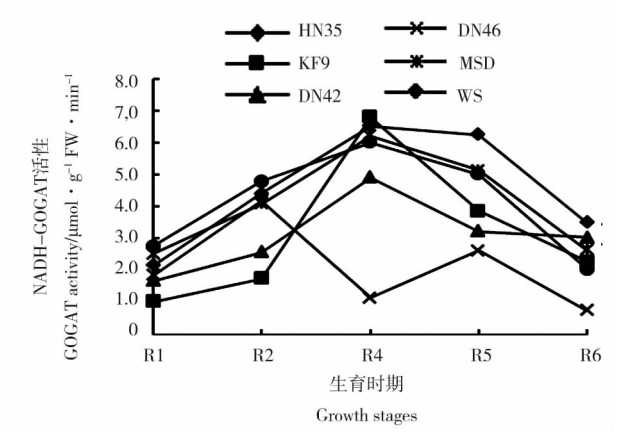


图4 根瘤 NADH-GOGAT 活性动态
Fig. 4 Dynamics of NADH-GOGAT activity in nodules

野生大豆根瘤的质 NADH-GOGAT 活性较高,这可能与其籽粒高蛋白含量有关。

2.1.5 荚皮 如图 5 所示,各品种荚皮 NADH-GOGAT 活性变化趋势基本一致,均表现为下降趋势,东农 42 和黑农 35 下降较缓,黑农 35 荚皮 NADH-GOGAT 活性明显高于其他品种;垦丰 9 号和东农 46 在 R5 期前下降较缓,R5 期后下降较快。黑农 35、东农 42、秣食豆和野生大豆表现则相反,自 R5 期开始下降速度明显减慢。

同时,从图 1 ~ 图 5 不难发现,不同器官 NADH-GOGAT 活性差异不大,总趋势排序为:叶片 > 根瘤 > 茎秆 > 根 > 荚皮。

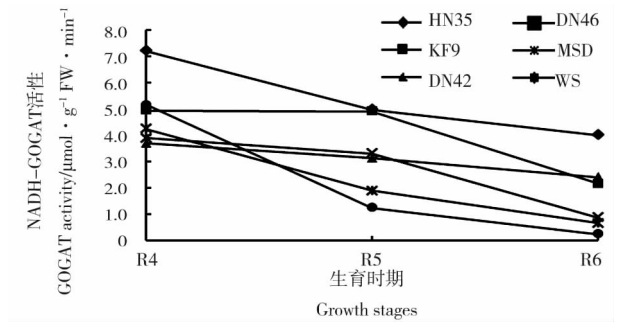


图5 荚皮 NADH-GOGAT 活性动态
Fig. 5 Dynamics of NADH-GOGAT activity in pod sheds

2.2 NADH-GOGAT 活性与籽粒蛋白质含量的相关分析

如表 1 所示,叶片 NADH-GOGAT 活性 V4、R4 和 R6 期均与籽粒蛋白质含量呈现极显著正相关,而 R2 期达到极显著负相关;茎秆 NADH-GOGAT 活性 R4 和 R1 期与籽粒蛋白质含量呈极显著正相关关系,R2 期极显著负相关;根系 NADH-GOGAT 活性 V4 期和 R1 期与籽粒蛋白质含量呈极显著正相关,而 R2 期为极显著负相关;各时期根瘤中 NADH-GOGAT 活性与籽粒蛋白质含量均未达到显著水平;荚皮中 NADH-GOGAT 的活性 R5 期与籽粒蛋白质含量呈显著正相关,R6 期相关性达到极显著水平。

表 1 NADH-GOGAT 活性与籽粒蛋白质含量相关性分析

Table 1 The correlation of NADH-GOGAT activity and protein content in seeds

NADH-GOGAT	V4	R1	R2	R4	R5	R6
叶片 Leaves	0.8658 **	0.6131 *	-0.8428 **	0.8223 **	0.4243	0.8312 **
茎秆 Stems	0.1753	-0.4453	-0.6488 *	0.7194 **	0.1589	0.4773
根系 Roots	0.6958 **	0.7852 **	-0.9957 **	0.0025	0.4614	0.1415
根瘤 Nodules	-	-0.2482	-0.0264	-0.1276	-0.0245	0.2899
荚皮 Pod sheds	-	-	-	0.3788	0.5767 *	0.7791 **

* 和 ** 分别指相关系数分别达到 0.05 和 0.01 显著水平。
* and ** indicate the significance at 0.05 and 0.01 level, respectively.

3 讨 论

本研究在不同基因型大豆的叶片、茎秆、根、根瘤和荚皮中均检测到谷氨酸合酶活性。同时发现各营养器官间 NADH-GOGAT 活性差异较小。NADH-GOGAT 活力高峰期与种子氮素积累的最活跃时期相一致,因此 GOGAT 活性高低可说明氮代谢及蛋白质合成能力的强弱^[9]。高蛋白品种最高 NADH-GOGAT 活性的出现早于高油品种,这可能是由于高蛋白含量大豆籽粒对氮素有更高的需求。叶片 NADH-GOGAT 活性野生大豆和半野生大豆峰值出现得比栽培大豆早,这可能是由于野生大豆和半野生大豆的生育期较栽培大豆长,导致叶片 NADH-GOGAT 活性峰值出现的时间不同。叶片中 NADH-GOGAT 的活性除 R5 期外,其他各时期的活性均与籽粒蛋白质含量达到显著相关水平。这与王小纯等^[5]研究结果不相同,可能是与大豆籽粒蛋白质含量比小麦高有关。R4 期叶片与茎秆中的 NADH-GOGAT 的活性与籽粒蛋白质含量呈极显著正相关,而荚皮中 NADH-GOGAT 的活性 R5 期与籽粒蛋白质含量呈显著正相关。这是由于谷氨酰胺是优先被转运的氨基酸,谷氨酰胺转运进荚皮后,诱导了荚皮中谷氨酸合酶活性的增加,进而在籽粒中合成谷氨酸,进一步形成蛋白质。这种正相关关系表明可以通过提高 R4 期 NADH-GOGAT 的活性来提高籽粒蛋白质含量。

参考文献

- [1] 莫良玉,吴良欢,陶勤南. 高等植物 GS/GOGAT 循环研究进展[J]. 植物营养与肥料学报,2001,7(2):223-231. (Mo L Y, Wu L H, Tao Q N. Research advances on GS/GOGAT cycle in higher plants[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science,2001,7(2)223-231.)
- [2] 李常健. 高等植物中氨同化酶及其同工酶研究[J]. 零陵师范高等专科学校学报,2000,21(3):20-22. (Li C J. Study on ammonium-assimilating enzymes and isozymes in higher plants[J]. Journal of Lingling Teachers' College,2000,21(3):20-22.)
- [3] Lea P J, Robinson S A, Stewart G R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate, and asparagine[M]//Miflin B J, Lea P J. The biochemistry of plants. New York: Academic, 1990: 121-159.
- [4] 郑朝峰. 植物的谷氨酸合酶[J]. 植物生理学通讯,1986(3):5-12. (Zheng C F. Glutamate synthase in plant[J]. Plant Physiology Communications,1986(3):5-12.)
- [5] Lea P J, Blackwell R D, Joy K W. Ammonia assimilation in higher plants[M]//Meng K, Pilbeam D J. Nitrogen metabolism of plants. New York: Oxford University Press, 1992: 153-186.
- [6] Hecht U, Delmüller R, Schmidt S, et al. Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH and ferredoxin-dependent Glutamate synthase in the cotyledons of mustard seedlings[J]. Planta, 1988, 175: 130-138.
- [7] 刘丽君, 孙聪姝, 刘艳, 等. 氮肥对大豆结瘤及叶片氮素积累的影响[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(2): 133-137. (Liu L J, Sun C S, Liu Y, et al. Effects of nitrogen on nodule-forming and nitrogen concentration in soybean leaves[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2005, 36(2): 133-137.)
- [8] 郑朝峰, 林振武. 谷氨酸合酶活力的快速测定[J]. 植物生理学通讯, 1985(4): 43-46. (Zheng C F, Lin Z W. Rapid determination of glutamate synthase[J]. Plant Physiology Communications, 1985(4): 43-46.)
- [9] 师素云, 薛启汉, 练兴明, 等. 玉米与大豆氮代谢关键酶活性比较[J]. 江苏农业学报, 2000, 16(3): 191-192. (Shi S Y, Xue Q H, Lian X M, et al. Comparison of activities of key enzymes during nitrogen metabolism in maize and soybean[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2000, 16(3): 191-192.)
- [10] 王小纯, 熊淑萍, 马新明, 等. 不同形态氮素对专用型小麦花后氮代谢关键酶活性及籽粒蛋白质含量的影响[J]. 生态学报, 2005, 25(4): 802-807. (Wang X C, Xiong S P, Ma X M, et al. Effects of different nitrogen forms on key enzyme activity involved in nitrogen metabolism and grain protein content in speciality wheat cultivars[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(4): 802-807.)
- [11] 何欢乐, 蔡润, 潘俊松, 等. 盐胁迫对黄瓜种子萌发特性的影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2005, 23(2): 149-152, 162. (He H L, Cai R, Pan J S, et al. Effect of NaCl stress on germination characteristics of cucumber[J]. Journal of Shanghai JiaoTong University(Agriculture Science), 2005, 23(2): 149-152, 162.)
- [12] 陈年来, 马国军, 张玉鑫, 等. 甜瓜种子萌发和幼苗生长对 NaCl 胁迫的响应[J]. 中国沙漠, 2006, 26(5): 814-819. (Chen N L, Ma G J, Zhang Y X, et al. Responses of seed germination and seedling growth of muskmelon to NaCl stress[J]. Journal of Desert Research, 2006, 26(5): 814-819.)
- [13] Ajmal K, Darrell J W. Ecophysiology of high salinity tolerant plant[M]. America: Springer, 2006: 1-9.
- [14] Ungar I A. Influence of salinity on seed germination in succulent halophytes[J]. Ecology, 1973, 43(4): 761-763.
- [15] 常萌蕾, 余素芹. 特效植物营养素对芥菜型油菜的增产效果及表观遗传效应[J]. 广东农业科学, 2008(10): 14-17, 20. (Chang M L, Yu S Q. Yield increasing effect and epigenetic effect of SPNE on *Brassica juncea* Czern. et Coss[J]. Guangdong Agricultural Science, 2008(10): 14-17, 20.)
- [16] 闫先喜, 马小杰, 邢树平, 等. 盐胁迫对大麦种子细胞膜透性的影响[J]. 植物学报, 1995, 12(增刊): 53-54. (Yan X X, Ma X J, Xing S P, et al. Effect of salt stress on the membrane permeability of barley seeds[J]. Chinese Bulletin of Botany, 1995, 12(S): 53-54.)
- [17] Benech A R L, Sanchez R A, Forcella F. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil[J]. Field Crops Research, 2000, 67: 105-122.
- [18] 孙小芳, 郑青松, 刘友良, 等. NaCl 胁迫对棉花种子萌发和幼苗生长的伤害[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 27(9): 22-25. (Sun X F, Zheng Q S, Liu Y L, et al. Salinity injury to germination and growth of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) at emergence and seedling growth[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2000, 27(9): 22-25.)
- [19] 谢德意, 王惠萍, 王付欣, 等. 盐胁迫对棉花种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 种子, 2000(3): 10-12. (Xie D Y, Wang H P, Wang F X, et al. Effects of cotton seeds germination and seedling growth under salt stress[J]. Seed, 2000(3): 10-12.)

(上接第 198 页)