

不同氮源对大豆硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶活性及蛋白质含量的影响^{*}

陈 煜^{1, 2} 朱保葛^{1 * *} 张 敬¹ 梁宗锁²

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101;

2. 西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100)

摘要 利用硝态氮($\text{NO}_3^- - \text{N}$)、铵态氮($\text{NH}_4^+ - \text{N}$)及混合态氮对 4 个栽培大豆品种结荚期植株进行诱导处理, 研究不同氮源对叶片硝酸还原酶(NR)、谷氨酰胺合成酶(GS)活性以及子粒蛋白质含量的影响。结果表明, $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 增加 4 个品种 NR 活性效果最好, 其次是混合态氮, 而 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的效果较差。从 4 个品种叶片的 GS 活性看, 混合态氮和 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的处理效果好, 而 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 的效果差; 三种氮源处理 4 个基因型的子粒蛋白质含量都有不同程度的增加, 增加的顺序与提高 NR 活性的顺序相同。说明施用三种氮肥能增加大豆品种子粒的蛋白质含量, 而以施用硝酸钾的效果最佳。相关分析表明, 大豆叶片 NR 活性与子粒蛋白质含量之间呈极显著正相关($r=0.663^{**}$), 可以把结荚期叶片的硝酸还原酶活性作为选择高蛋白大豆材料的参考指标之一。

关键词 大豆; 硝酸还原酶; 谷氨酰胺合成酶; 蛋白质含量

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2004)02-0143-04

众所周知, 大豆等豆科植物虽然能通过固氮途径利用环境中的氮, 但 NO_3^- 的同化则是其主要获氮途径^[17]。硝酸还原酶(Nitrate reductase, NR)是 NO_3^- 同化步骤中的第一个酶, 也是整个同化过程的限速酶, 在植物氮素代谢过程中起关键作用^[9, 15]。植物吸收利用环境中的 NO_3^- , 需经过两个同化反应步骤: 首先由 NR 把 NO_3^- 还原为亚硝态氮(NO_2^-), 然后再由亚硝酸还原酶把 NO_2^- 还原为 NH_4^+ , 才能进一步掺入氨基酸及蛋白质的合成^[15]。氮的初始同化发生在 GS/GOGAT(谷氨酸合成酶)循环中, 它承担着氮代谢的中心作用^[16], 而谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)是处于氮代谢中心的多功能酶, 参与多种氮代谢的调节^[7]。一些学者研究认为追施外源氮素能够提高植物叶片 NR 和 GS 的活性^[2, 4]。王月福等^[7]报道纯氮对提高冬小麦叶片 NR 和 GS 的活性以及子粒蛋白质含量有促进作用。柴小清等^[4]研究发现 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和

$\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 能够显著提高小麦 GS 及 NR 的活性, 而对大豆的这两种酶活性及子粒蛋白质含量有何影响迄今罕见报道。本研究通过对结荚期大豆植株施用 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 及混合态氮, 分析不同形态氮对大豆 NR 和 GS 活性及子粒蛋白质含量的影响, 为大豆优质育种和科学栽培提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用中国科学院遗传发育所培育的 4 个栽培大豆品种科新 3 号(KX3)、特大粒(TDL)、8904 和 9103, 种植于本所试验场, 分别用硝酸钾 KNO_3 、硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和硝酸铵 NH_4NO_3 溶液(浓度均为 100mmol/L)对结荚期植株进行灌根处理, 以水处理为对照, 设三次重复, 每处理随机选 5 株挂牌标记, 诱导 48h, 每株各取一片展开功能叶混合(约 2g)迅

* 收稿日期: 2003-11-03

基金项目: 本工作得到国家“863”计划项目(2001AA241061-4, 2002AA207007, 2002AA211051), “973”项目(2002CB111301)和中国科学院知识创新项目(KSCX2-1-01-10)的部分资助。

作者简介: 陈煜(1977-), 女, 硕士研究生, 主要从事大豆生理生化研究。

* * 通讯作者 bgzhu@genetics.ac.cn

速过液氮冷冻, 放 -80°C 冰柜保存备用。

1.2 方法

1.2.1 NR活性的测定

称取 0.5g 大豆叶片, 加 5ml HEPES 提取液 (20mmol/L HEPES, 5mmol/L EDTA, 5mmol/L 半胱氨酸, pH7.5), 冰浴研磨成匀浆。4 $^{\circ}\text{C}$ 下 3000rpm 离心 15min, 上清液即酶的粗提液用于 NR 活性的测定, 具体测定方法参照文献^[1]。

1.2.2 GS活性的测定

称取 0.5g 大豆叶片, 加 3ml 提取缓冲液 (0.05 mol/L Tris, 2mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2mmol/L DTT, 0.4mol/L 蔗糖), 冰浴研磨成匀浆。4 $^{\circ}\text{C}$ 下 14000rpm 离心 20min, 上清液即为酶的粗提液用于 GS 活性的测定, 具体方法参照文献^[5]。

1.2.3 子粒蛋白质含量测定

收获挂牌单株子粒, 利用 FOSS-1255 型近红外谷物品质分析仪测定每处理 5 株子粒的蛋白质含量, 统计分析其平均值。

2 结果与分析

2.1 叶片硝酸还原酶(NR)活性分析

不同氮源诱导处理 4 个大豆基因型的 NR 活性变化 (三次重复平均值), 结果见图 1。

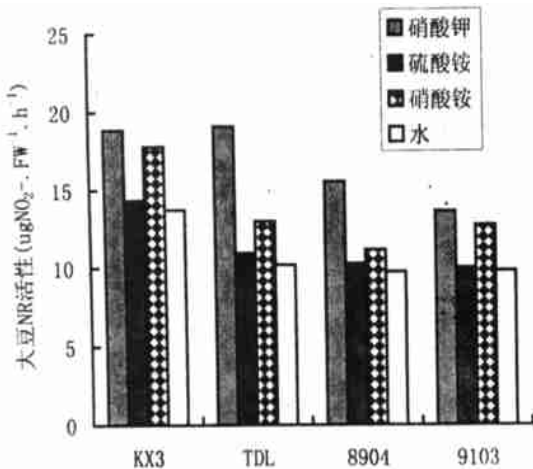


图 1 不同氮源处理大豆叶片 NR 的活性

Fig. 1 Activities of NR in leaves of soybean genotypes induced with different nitrogens

从图 1 可以看出, 不同氮源处理不同大豆基因型的 NR 活性具有明显差异。KNO₃ 诱导 4 个品种的 NR 活性均最高, 明显高于水处理组; (NH₄)₂SO₄ 处理时, 4 个基因型的 NR 活性都较低, 均与 CK 组接近; NH₄NO₃ 诱导处理 4 个基因型的 NR 活性介

于前两种 N 源之间, 而对 KX3 的效果较好。表明 NO₃⁻-N 诱导能明显提高 4 个大豆品种的 NR 活性, 其次是混合态氮, 而 NH₄⁺-N 的效果较差。

2.2 叶片谷氨酰胺合成酶(GS)活性分析

将 4 个大豆基因型在不同氮源诱导下的 GS 活性 (三次重复平均值) 绘制成图 2。

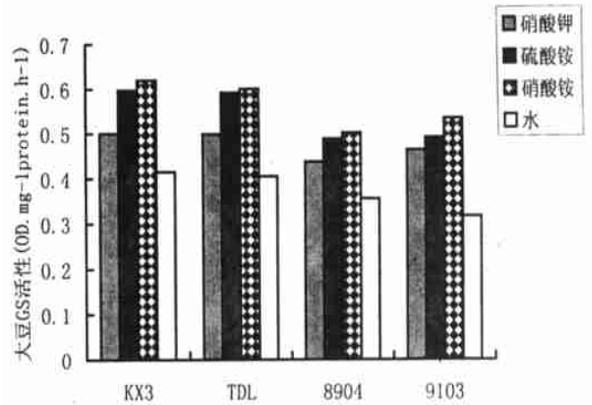


图 2 不同氮源诱导大豆叶片 GS 的活性

Fig. 2 Activities of GS in leaves of soybean genotypes induced with different nitrogens

从图 2 结果显示, 三种氮源诱导均能提高 4 个大豆基因型的 GS 活性 (均高于 CK 组), 4 个品种 GS 活性的增加趋势完全一致。但是不同氮源处理的效果是不同的, 混合态氮和 NH₄⁺-N 诱导的 GS 活性较高, 而 NO₃⁻-N 处理的活性较低。

2.3 子粒蛋白质含量分析

三种 N 源和水处理 4 个大豆基因型的子粒蛋白质含量 (三次重复平均值), 见图 3。

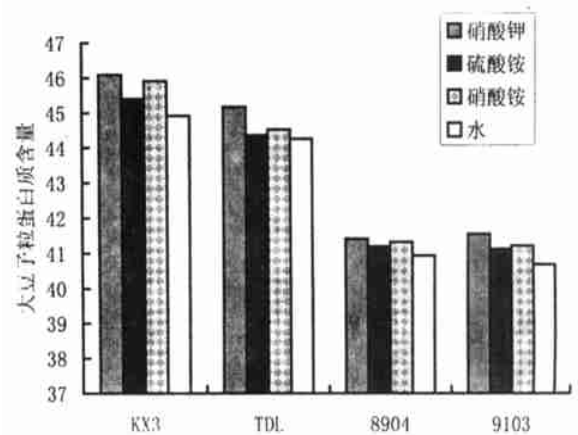


图 3 不同氮源处理大豆品种子粒的蛋白质含量

Fig. 3 Seed protein contents of soybean genotypes induced with different states of nitrogens

从图 3 得知, 在不同氮源诱导下, 4 个大豆品种的蛋白质含量均有不同程度的增加, 同一品种的不同氮源处理, 子粒蛋白质含量均是 KNO₃ > NH₄NO₃

$>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{H}_2\text{O}(\text{CK})$, 三种 N 源处理所增加的蛋白含量均未达到显著水平。此外, 以三重复平均值为基本单位的相关分析表明, NR 活性与蛋白质含量呈极显著正相关, 相关系数为 $r=0.663^{**}$ 。

3 讨论

本研究表明, 硝态氮处理 4 个大豆基因型的 NR 活性明显高于另两种氮源处理, 可能与 NO_3^- 是 NR 的底物和诱导剂有关, 而 NH_4^+-N 处理效果差可能是 NH_4^+ 作为 NO_3^- 两步还原反应的终产物所产生的反馈抑制作用所致。而混合态氮诱导的 NR 活性低于 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 诱导, 如同封克等^[8]分析的那样, 当 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 与 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 同时存在时, NH_4^+ 会抑制 NO_3^- 的跨膜吸收, 或者影响叶片 NR 活性而造成体内 NO_3^- 积累, 产生反馈抑制作用。

不同形态 N 素对植物体内的 GS 活性有不同影响。一些人^[12]认为 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 对高等植物及蕨类的 GS 活性有促进作用, 本研究认为, 不同氮源均能提高大豆 GS 活性, 而 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 的处理效果更为明显。因为 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 是 GS 的底物, 可以促进 GS 活性的提高。而混合态氮处理大豆 GS 活性比 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 高, 或许是由于 NR 的存在使得 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 间接地促进 GS 活性的提高^[9]。

在植物 NR 活性与蛋白质含量的关系方面, 国内外学者进行过许多研究, 结论很不一致。李豪哲^[2]等提出把大豆叶片 NR 活性作为蛋白质育种的生化指标。Hageman^[14]等以玉米为材料研究表明, 叶片 NR 活力与蛋白质含量之间存在显著的正向相关性, 也主张将 NR 活力作为蛋白质含量的生化指标。许多学者报道了燕麦^[11]、南瓜^[13]和大麦^[10]等植物的蛋白质含量和 NR 活性通常具有重要的相关性。但是, 也有一些人^[17]研究认为 NR 活性与蛋白质含量相关不显著, 朱长甫^[3]等研究认为大豆子粒蛋白质与叶片 NR 活性呈显著负相关。本研究显示, NR 活性与蛋白质含量呈极显著正相关, 与李豪哲等人的结果相同。因此我们认为, 可以把大豆结荚期功能叶片的硝酸还原酶活性作为选择高蛋白材料的参考指标之一。

参考文献

1 陈薇, 张德颐. 植物组织中硝酸还原酶的提取、测定和纯化[J]. 植物生理学通讯, 1980(4): 45—49.

2 李豪哲. 大豆叶片硝酸还原酶活力的研究[J]. 植物生理学通讯, 1986(4): 30—32.

3 朱长甫, 苗以农, 杨文杰, 等. 大豆种子蛋白质含量与固氮酶活性和硝酸还原酶活性的关系[J]. 中国油料, 1992(2): 45—47.

4 柴小清, 印莉萍, 刘祥林, 等. 不同浓度的 NO_3^- 和 NH_4^+ 对小麦根谷氨酰胺合成酶及其相关酶的影响[J]. 植物学报, 1996, 38(10): 803—808.

5 赵世杰等主编《植物生理学实验指导》[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002.

6 张宏纪, 马凤鸣, 李文华, 等. 不同形态氮素对甜菜谷氨酰胺合成酶的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2001(6): 7—10.

7 王月福, 于振文, 李尚霞, 等. 氮素营养水平对冬小麦氮代谢关键酶活性变化和子粒蛋白质含量的影响[J]. 作物学报, 2002, 28(6): 743—748.

8 封克, 汪小丽, 陈平, 等. 水稻苗期不同时段 NO_3^- 吸收特点及其受 NH_4^+ 的影响[J]. 中国农业科学, 2003, 36(3): 307—312.

9 Alling M J, Boland G, Wilson J H. Relation between acid proteinase activity and redistribution of nitrogen during grain development in wheat[J]. Plant Physiol, 1976, 3: 721—730.

10 D. A. Somers, T. M. Kuo, A. Kleinhofs, et al. Synthesis and degradation of barley nitrate reductase[J]. Plant Physiol, 1983, (72): 949—952.

11 Jee Young oh, R. L. Wamer, A. Kleinhofs. Effect of nitrate reductase deficiency upon growth. Yield and protein in Barley[J]. Crop Science, 1982: 487—490.

12 Marwaha R S, Juliano B O. Aspects of nitrogen metabolism in the rice seedling[J]. Plant Physiol, 1976 57: 923—927.

13 Ranall. Langendorfer, Michelle T. Watters, et al. Metabolite control of squash nitrate reductase[J]. Plant Science, 57(1988): 119—125.

14 R. H. Hageman. Nitrate reductase activity in corn seedling as affected by light and nitrate content of nutrient media[J]. Plant Physiol, 1960(35): 700—708.

15 Schrader L. E., G. L. Ritenour, G. L. Elrich, et al. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants[J]. Plant Physiol, 1968(43): 930—940.

16 Vema D P S. Control of plant Gene expression[J]. Boca Raton. CRC Press, 1993: 443—458.

17 W. H. Campbell, Smarrelli. Nitrate reductase biochemistry and regulation, in: C. A. Neyra(Ed)[J]. Biochemical Basis of Plant Breeding. CRC Press, 1986: 1—45.

**EFFECTS OF DIFFERENT NITROGENS ON ACTIVITIES OF NITRATE
REDUCTASE, GLUTAMINE SYNTHETASE AND SEED PROTEIN
CONTENTS IN SOYBEAN CULTIVARS**

Chen Yu^{1,2} Zhu Baoge^{1* * *} Zhang Jing¹ Liang Zongsuo²

(1. *Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101; 2. College of Life Sciences, Northwest Sci—Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, 712100*)

Abstract Effects of different nitrogens($\text{NO}_3^- - \text{N}$, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, $\text{NO}_3^- - \text{NH}_4^+$) on nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase(GS) activities, and seed protein contents of soybean cultivars during pod-bearing period were investigated. The experimental results indicated that NR activities of leaves in four soybean genotypes treated by $\text{NO}_3^- - \text{N}$ were obviously enhanced. However, NR activities of these genotypes treated by $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ were the lowest in three kinds of nitrogens. GS activities induced by $\text{NO}_3^- - \text{NH}_4^+$ and $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ were remarkably increased. Seed protein contents of four genotypes induced by three kinds of nitrogens were higher than those done by H_2O (CK). The correlation between leaf NR activity and seed protein content was extremely significant ($r = 0.633^*$). Hence it is suggested that high NR activity in soybean leaves should be one of biochemical index for selecting soybean germplasms with seed high protein.

Key words Soybean; Nitrate reductase; Glutamine synthetase; Seed protein content