

播期对调控菜用大豆籽粒蔗糖形成关键酶活力的影响

李彦生¹, 杜明², 刘长锴^{1,3}, 张秋英¹, 刘晓冰¹

(1. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所/黑土区农业生态重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 黑龙江省农垦科学院 水稻研究所, 黑龙江 佳木斯 154007; 3. 东北农业大学 资源与环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:播期早晚直接影响菜用大豆的产量和品质。在大田条件下于2010年以中科毛豆1号为材料,分4个播期(5月3日、5月15日、5月27日和6月8日)进行预试验,2011年则种植可溶性糖含量不同的3个菜用大豆品种(系)进行重复试验,分析了播期对鲜食期菜用大豆籽粒蔗糖磷酸合成酶(SPS)、蔗糖合成酶(SS)、酸性转化酶(AI) 和中性转化酶(NI) 活力的影响。结果表明:不同基因型菜用大豆鲜食期籽粒中 SPS、SS 活力对不同播期处理的响应相似,均随着播期的推迟显著降低,5月3日播期比推迟的播期的 SPS 活力高出 10.8% ~ 27.7%,而 SS 活力高出 4.8% ~ 17.4%。AI 活力对播期响应不明显,而 NI 活力也有所下降,但下降幅度较低。晚播导致蔗糖磷酸合成酶、蔗糖合成酶、中性转化酶和酸性转化酶活性平衡的改变,可能是导致菜用大豆籽粒蔗糖含量下降的内在原因。

关键词:蔗糖磷酸合成酶;菜用大豆;晚播

中图分类号: S643.7 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2015.04.0606

Planting Date Affects Key Enzymes Activities Involved in Seed Sucrose Accumulation of Vegetable Soybean

LI Yan-sheng¹, DU Ming², LIU Chang-kai^{1,3}, ZHANG Qiu-ying¹, LIU Xiao-bing¹

(1. Key Laboratory of Mollisol Agroecology/Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China; 2. Rice Research Institute, Heilongjiang Academy of Land Reclamation Sciences, Jiamusi 154007, China; 3. College of Resources and Environment, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Planting dates influence fresh pod yield and quality in vegetable soybean. Preliminary test was conducted in 2010 which vegetable soybean CAS 1 was grown at 4 planting dates (May 3, May 15, May 27 and Jun 8) in field condition. And then three vegetable soybean cultivars with different soluble sugar contents were grown at 4 planting dates in field condition in 2011. The activities of sucrose phosphate synthase (SPS), sucrose phosphate synthase (SPS), acid invertase (AI) and neutral invertase (NI) from fresh green seeds harvested at the R6 stage were analyzed. Similar responses of SPS and SS activities in different cultivars were observed to planting dates. With the delayed planting, the activities of the two enzymes were significantly reduced. The SPS activities in the early planting date of May 3 were 10.8%-27.7% greater than late plantings, while the SS activities were 4.8%-17.4% greater. The change of AI activities by delayed planting was not obvious. NI activities were also reduced by delayed planting but with less extent. The alteration in the balance of SPS, SS, AI and NI by delayed planting might be the inherent physiological mechanism responsible for the reduction of sucrose accumulation in vegetable soybean.

Keywords: Sucrose phosphate synthase; Vegetable soybean; Delayed planting

播期是影响菜用大豆产量和品质的重要农艺措施。杨加银和徐海风认为播期对菜用大豆鲜荚产量的影响要大于密度,江苏地区最佳播期应选在6月25日左右^[1]。菜用大豆推迟播期后鲜荚产量平均降低 34.4 ~ 54.9 kg·hm⁻²,产量的下降主要与菜用大豆标准荚数(二粒荚和三粒荚)的显著降低相关^[2]。一般而言,推迟播期后大豆的营养生长期和生殖生长期均会不同程度缩短,从而引起单位面积荚数和籽粒数的下降最终使产量降低^[3-5]。尽管

适当的晚播可避开黑龙江春季干旱的影响,同时调整鲜荚上市的时间,提高经济价值^[6]。但是,晚播只能作为一种补救的权宜之计,生产上不应大力提倡,研究表明,晚播在降低鲜荚产量的同时,还会导致菜用大豆蔗糖含量显著下降,鲜食期籽粒蔗糖含量早播较晚播处理高出 8.3% ~ 43.6%^[7-9]。

研究认为与蔗糖代谢有关的酶主要有3类,即转化酶(invertase, Inv)、蔗糖合成酶(sucrose synthase, SS) 和蔗糖磷酸合成酶(sucrose phosphate syn-

收稿日期: 2014-08-15
基金项目: 国家自然科学基金(41471241); 黑龙江省重点基金(ZD201307)。
第一作者简介: 李彦生(1983-),男,博士,助理研究员,主要从事作物生理生态学研究。E-mail: liyansheng@iga.ac.cn。
通讯作者: 张秋英(1962-),女,研究员,主要从事大豆栽培生理育种研究。E-mail: zhangqiuying@iga.ac.cn。

thase, SPS)^[10]。SS 对蔗糖既有合成作用又有分解作用,以分解为主;Inv 催化蔗糖分解为单糖;SPS 催化蔗糖的合成,是蔗糖进入各种代谢途径所必需的关键酶之一,其活力大小直接影响光合产物在淀粉与蔗糖之间的分配,SPS 活力越高,蔗糖积累得越多^[11]。从理论上讲,AI 和 SPS 活性的增加,可能是 SS 活性降低的补偿。SS 分解蔗糖产生的果糖和葡萄糖,调节一些启动子或者转录因子的活性,SS 活性的下降,可导致六碳糖含量的下降,进而影响启动纤维发育相关基因的表达^[11-12]。因此,通过 Inv、SS 抑制或促进蔗糖水解均会使植株的正常生长发育机制受到不同程度的影响。研究发现,菜用大豆籽粒中蔗糖的含量并非受某一种酶绝对调控,SPS 与 SS + AI + NI 活性做差所得的净活性与籽粒中蔗糖的积累显著正相关^[13]。然而,不同播期条件下菜用大豆采食期籽粒中调节蔗糖合成关键酶活性是否具有差异,目前还鲜有报道。本研究旨在探讨播期对调控菜用大豆蔗糖积累的关键酶活力的影响,为菜用大豆优质高产技术措施的制定提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验地点

试验于 2010 和 2011 年在中国科学院东北地理与农业生态研究所哈尔滨试验场内进行(45°73'N, 126°61'E, 海拔 128 m)。该地区气候属中温带大陆性季风气候,冬季寒冷干燥,夏季温热多雨,全年降水量 500 ~ 600 mm,无霜期为 120 ~ 130 d,有效积温 2 400 ~ 2 500℃,全年日照时间为 2 600 ~ 2 800 h。供试土壤为典型的黑土,pH6.6,有机质为 29 g·kg⁻¹,全氮为 2.3 mg·kg⁻¹,全磷 1.3 mg·kg⁻¹,全钾 18.9 mg·kg⁻¹,碱解氮为 167 mg·kg⁻¹,速效磷 21.8 mg·kg⁻¹,速效钾 195 mg·kg⁻¹。

1.2 试验材料

在 2010 年进行预备试验,选取了中科毛豆 1 号作为试验品种材料,2011 年试验则选取了蔗糖含量不同的 3 个菜用大豆品种(系):台 292、中科毛豆 1 号和品系 121,可溶性糖含量分别为 83.7、97.4 和 119.8 mg·g⁻¹;试验采取小区随机区组,3 次重复,5 行区,5 m 行长,行距 70 cm,株距 5 cm。共分 4 个播期,分别为 5 月 3 日、5 月 15 日、5 月 27 日和 6 月 8 日,开花时对植株进行挂牌,在菜用大豆鲜食期进行取样^[2],每小区随机取样 20 株,然后选取植株中上部位的鲜荚,用手将鲜籽粒剥出用于相关酶活力的测定。鉴于酶活力普遍存在日变化差异,每次取

样时期都固定在上午 9:00 ~ 10:00。

1.3 酶活力的测定方法

1.3.1 酶液的提取 称取鲜籽粒 0.5 g,用 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl(pH7.0)缓冲液(含 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂、2 mmol·L⁻¹ EDTA、2% 乙二醇、20 mmol·L⁻¹ 巯基乙醇)10 mL 冰浴上快速研磨匀浆,单层尼龙布过滤,滤液于 10 000 r·min⁻¹,4℃ 离心 30 min,取 1 mL 上清液过 Sephadex G-25(5 mL)柱除去小分子物质,收集洗脱液进行酶活力测定。

1.3.2 反应缓冲液 含 50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl、10 mmol·L⁻¹ MgCl₂、2 mmol·L⁻¹ EDTA、2% 乙二醇、20 mmol·L⁻¹ 巯基乙醇。此外,蔗糖合成酶反应缓冲液 pH7.0,含 100 mmol·L⁻¹ 蔗糖和 50 mmol·L⁻¹ 尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)反应底物;蔗糖磷酸合成酶反应缓冲液 pH7.0,含 10 mmol·L⁻¹ 6-磷酸果糖(F6P)和 3 mmol·L⁻¹ UDPG 反应底物;酸性转化酶 pH4.5,含 100 mmol·L⁻¹ 蔗糖反应底物;中性转化酶 pH7.2,含 100 mmol·L⁻¹ 蔗糖反应底物。

1.3.3 酶促反应过程 取 0.3 mL 反应缓冲液,加入待测酶液 0.2 mL,在 37℃ 水浴中反应 20 min,在沸水浴保温 4 min,流水冷却,再加入 0.7 mL 30% HCl 及 0.2 mL 用 95% 乙醇配置的浓度为 0.1% 的间苯二酚试剂,摇匀后 80℃ 水浴 10 min,冷却后于 480 nm 比色测定蔗糖含量,所有酶活性均用计算反应体系中的蔗糖分解或合成速率来表示。

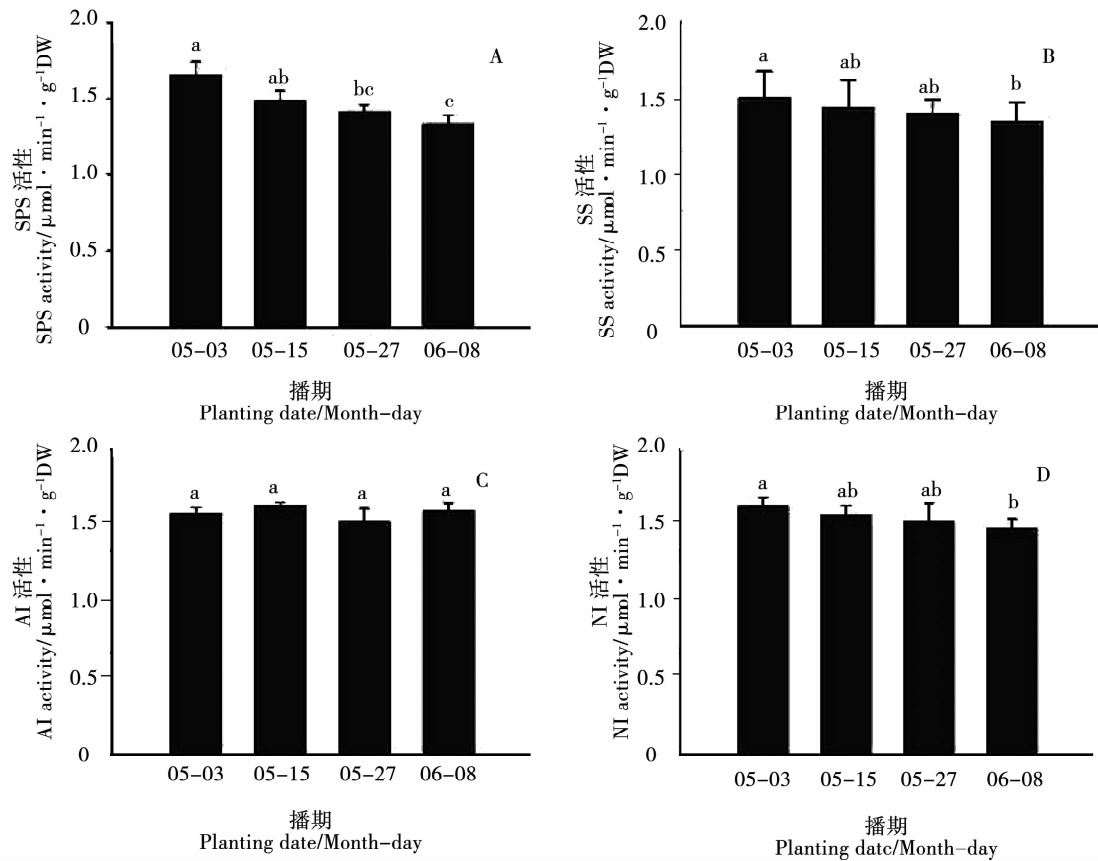
1.4 数据分析

用 Excel 2010 和 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,Sigma Plot 10.0 作图。

2 结果与分析

2.1 蔗糖磷酸合成酶

菜用大豆鲜食期籽粒中蔗糖磷酸合成酶(SPS)活力明显受到推迟播期的影响(图 1-A,图 2)。不同播期下菜用大豆鲜食期籽粒中 SPS 活力具有差异,2010 年预试验中,中科毛豆 1 号第一播期鲜食期籽粒中 SPS 活力最高,为 1.65 μmol·min⁻¹·g⁻¹ DW,同第二播期、第三播期和第四播期相比分别高出 11.5%、17.3% 和 24.2%。在 2011 年的试验中,3 个菜用大豆品种鲜食期籽粒中 SPS 活力对推迟播期的响应表现出相似的结果,均表现为随播期推迟 SPS 活力随之下落,尤其以第三播期和第四播期表现明显。中科毛豆 1 号、台 292 和品系 121 第一播期鲜食期籽粒中 SPS 活力分别比第三和第四播期高 16.3% 和 20.4%, 10.0% 和 10.8%, 27.7% 和 26.8%。



不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$),下同。
Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level, the same below.

图 1 不同播期对中科毛豆 1 号鲜粒 SPS、SS、AI 和 NI 活性的影响(2010)
Fig. 1 Effect of planting date on SPS, SS, AI and NI activities in vegetable soybean fresh seed of CAS 1 in 2010

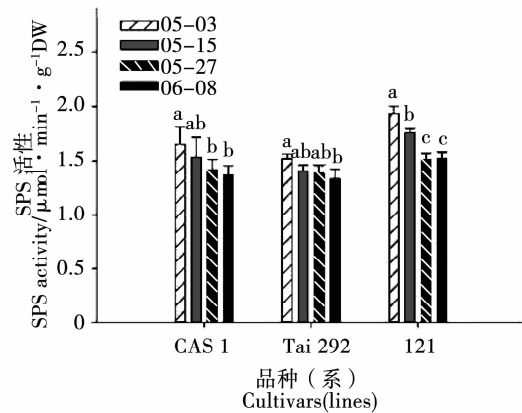


图 2 蔗糖磷酸合成酶对播期的响应
Fig. 2 Response of SPS activities to planting date

2.2 蔗糖合成酶

菜用大豆鲜食期籽粒中蔗糖合成酶(SS)活力对播期的响应也较大(图 1-B,图 3)。在 2010 年预试验中,中科毛豆 1 号鲜食期籽粒中 SS 活力最高值出现在第一播期,为 $0.38 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{DW}$,同第二播期、第三播期和第四播期相比分别高 4.8%、8.0% 和 11.7%。2011 年试验中,中科毛豆 1 号和品系 121 鲜食期籽粒中 SS 活力表现出随播期推迟

而下降的现象。中科毛豆 1 号第一播期鲜食期籽粒中 SS 活力为 $0.41 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{DW}$,比第二播期、第三播期和第四播期分别高 6.5%、8.2% 和 12.7%;品系 121 第一播期鲜食期籽粒中 SS 活力则分别比第二播期、第三播期和第四播期高 5.8%、8.4% 和 17.4%。虽然台 292 鲜食期籽粒中 SS 活力最高值也出现在第一播期,但是不同播期之间并未发现显著($P > 0.05$)差异。

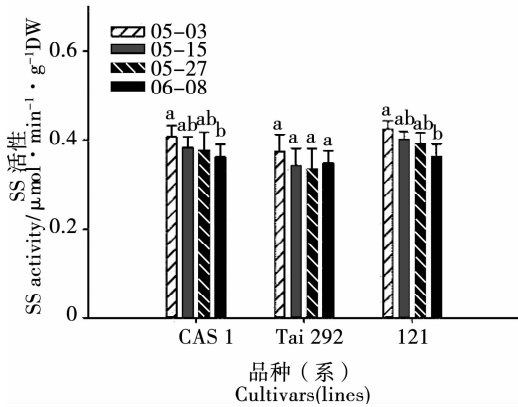


图 3 蔗糖合成酶对播期的响应
Fig. 3 Response of SS activities to planting date

2.3 转化酶

酸性转化酶(AI)对播期推迟的响应并不明显。从图 1-C 中可以发现,不同播期下中科毛豆 1 号鲜食期籽粒中 AI 活力并无明显差异。而在 2011 年试验中也发现了类似的结果(图 4),中科毛豆 1 号、台 292 和品系 121 鲜食期籽粒中 AI 活力并未受到播期推迟的影响,不同播期之间未发现显著($P > 0.05$)差异。

菜用大豆鲜食期籽粒中性转化酶(NI)活力则表现为随播期推迟而降低(图 1-D,图 5)。在 2010 年预试验中,中科毛豆 1 号鲜食期籽粒中 NI 活力最高值出现在第一播期,为 $0.097 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$,同第二播期、第三播期和第四播期相比分别高 3.4%、6.2% 和 9.7%。在 2011 年试验中,不同菜用大豆品种也表现出类似的现象。中科毛豆 1 号、台 292 和品系 121 鲜食期籽粒中 NI 活力最高值都出现在第一播期,分别为 0.100, 0.118 和 0.133 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$;比第二播期、第三播期和第四播期分别高 4.6%、8.4% 和 11.7%;18.9%、24.6% 和 30.6%;9.9%、25.5% 和 34.8%。

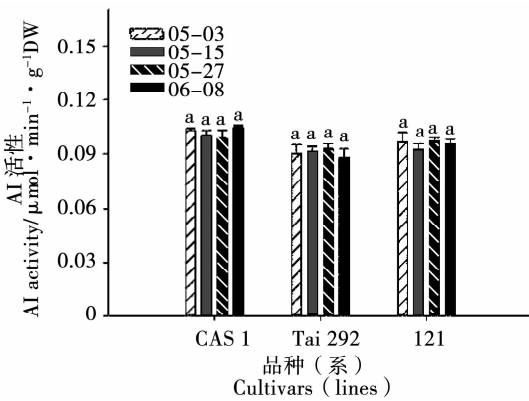


图 4 酸性转化酶对播期的响应

Fig. 4 Response of AI activities to planting date

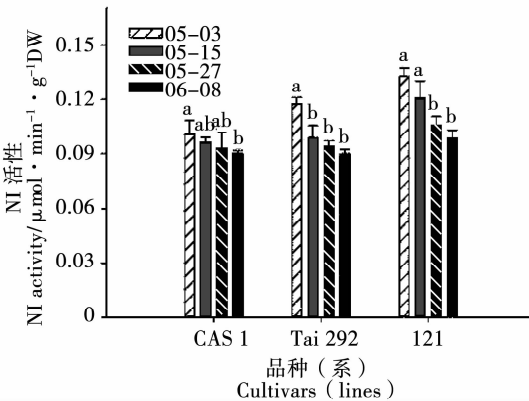


图 5 中性转化酶对播期的响应

Fig. 5 Response of NI activities to planting date

3 结论与讨论

菜用大豆籽粒蔗糖含量的高低是评价菜用大豆甜度的重要指标,直接影响菜用大豆的食用品质和消费者的喜爱程度^[14-15]。我们前期的研究发现,不同品种的菜用大豆鲜食期籽粒中蔗糖含量尽管存在差异,但对推迟播期的响应相似,籽粒中蔗糖含量均表现为随播期推迟而降低,播期早鲜食期籽粒的蔗糖含量比其它晚些播种的蔗糖含量高8.3%~83.3%,但 5 月 27 日和 6 月 8 日播期蔗糖含量差异不明显^[9]。本研究为晚播导致蔗糖含量下降的现象提供了基础数据和理论阐述。主要原因是晚播导致蔗糖磷酸合成酶、蔗糖合成酶、中性转化酶和酸性转化酶活性平衡的改变,尤其显著降低前两种酶活性,播期越迟,降低的幅度越大。即晚播降低蔗糖的含量的内在原因是由于蔗糖磷酸合成酶、蔗糖合成酶这两种酶活性降低而致。因为菜用大豆籽粒中蔗糖的含量并非受某一种酶绝对调控,SPS 与 SS + AI + NI 活性做差所得净活性与籽粒中蔗糖的积累显著正相关^[13,16]。

蔗糖是由葡萄糖和果糖在一定条件下受蔗糖合成酶和蔗糖磷酸合成酶催化形成,同时也可以发生逆向反应分解为葡萄糖和果糖^[17]。蔗糖磷酸合成酶(SPS)在蔗糖代谢中的作用主要表现在 SPS 影响源强和库强,调节光合产物在蔗糖和淀粉的分配,参与细胞分化与纤维细胞壁合成^[18]。研究发现,子叶是籽粒中蔗糖代谢的主要场所,只有 SPS 活性与子叶和胚轴的蔗糖含量达到显著正相关关系,并且 SPS 活性的高峰期(R6.2)也是各组织蔗糖积累的高峰期(R6.2),而 R6.2 期正处于菜用大豆鲜荚的采摘期,较高的 SPS 酶活性有利于菜用大豆食用品质的提高,说明籽粒中蔗糖的积累是在 SPS 催化下完成的^[13]。Huber 和 Huber^[19]也曾指出蔗糖磷酸合成酶(SPS)活力与蔗糖积累呈正相关,SPS 的活力直接影响光合产物在淀粉与蔗糖之间的分配。Fisher 和 Wang^[20]曾指出,SS 可能是蔗糖合成途径中的一个重要控制点,它的活力反映蔗糖生物合成途径的能力。在 SS 活性较高时,籽粒中蔗糖分解速度加快,虽然不利于蔗糖的积累却加大了源库两端蔗糖的梯度差,从而促进蔗糖向籽粒中运输的速度^[13]。

因此,推迟播期后,菜用大豆籽粒中蔗糖的卸载和再合成能力下降,源端供给能力不足。由于蔗糖是主要的光合产物,任何导致光合作用能力下降的措施都会引起库中蔗糖供给量的降低^[6]。Pedersen 和 Lauer^[4]发现,晚播条件下大豆的叶面积指

数会下降约 6% 左右,这会导致晚播菜用大豆光合能力的降低。当然,晚播条件下,在缩短菜用大豆生育期的同时,籽粒形成时的温度差异也可能是重要的外界环境因素。因为推迟播期后大豆生长过程中的环境因子随之改变,籽粒中不同的化学成分的积累也会受到影响。如已有研究表明,普通大豆在籽粒形成期经历高温往往会导致籽粒中脂肪含量的降低^[21],大豆籽粒中蛋白质的含量与生殖生长期的高温密切相关^[22],在 R6 ~ R7 期间较高的温度有利于籽粒中蛋白质含量的增加,而在 R5 ~ R6 期间高温反而会降低大豆籽粒中蛋白质的积累能力^[23]。尽管如此,晚播加快生育进程,减少同化产物供应,导致籽粒蔗糖合成的关键酶 SPS 和 SS 活性降低是其内在生理的原因。

参考文献

[1] 杨加银,徐海风. 播期、密度对菜用大豆鲜荚产量及性状的影响[J]. 大豆科学,2006,25(2):185-187. (Yang J Y, Xu H F. Effect of sowing dates and plant densities on fresh pod yield and agronomic characters of vegetable soybean[J]. Soybean Science, 2006, 25(2): 185-187.)

[2] Zhang Q Y, Gao Q L, Herbert S J. Influence of sowing date on phenological stages, seed growth and marketable yield of four vegetable soybean cultivars in Northeastern USA [J]. African Journal of Agriculture Research, 2010, 5: 2556-2562.

[3] De Bruin J L, Pedersen P. Soybean seed yield response to planting date and seeding rate in the upper Midwest[J]. Agronomy Journal, 2008, 100: 696-703.

[4] Pedersen P, Lauer J G. Soybean growth and development in various management systems and planting dates[J]. Crop Science, 2004, 44: 508-515.

[5] Duppong L M, Harlene H V. Yield and quality of vegetable soybean cultivars for production in North Dakota[J]. Horttechnology, 2005, 15(4):896-900.

[6] Lemoine R. Sucrose transporters in plants: update on function and structure[J]. Bba-Biomembranes, 2000, 1465: 246-262.

[7] Bellaloui N, Reddy K N, Gillen A M, et al. Influence of planting date on seed protein, oil, sugars, minerals, and nitrogen metabolism in soybean under irrigated and non-irrigated environments [J]. American Journal of Plant Science, 2011, 2: 702-715.

[8] 张秋英,李彦生,李艳华,等. 晚播对菜用大豆根系、干物质积累及鲜食产量的影响[J]. 大豆科学,2009,28(4):623-627. (Zhang Q Y, Li Y S, Li Y H, et al. Influence of late sowing on root, dry matter accumulation and fresh yield in vegetable soybean [J]. Soybean Science, 2009,28(4):623-627.)

[9] 李彦生. 菜用大豆食用品质形成及调控研究[D]. 北京:中国科学院大学,2013. (Li Y S. Formation and regulation of edible quality in vegetable soybean (*Glycine Max* L. Merr.) [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2013.)

[10] Hubbard N L, Pharr D M, Huber S C. Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species[J]. Plant Physiology, 1991, 82: 191-196.

[11] 陈俊伟,张上隆,张良诚. 果实中糖的运输、代谢与积累及其调控[J]. 植物生理与分子生物学学报,2004(1):1-10. (Chen J W, Zhang S L, Zhang L C. Sugar transport, metabolism, accumulation and their regulation in fruits[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology,2004(1):1-10.)

[12] Ishimaru K, Hirotsu N, Kashiwagi T, et al. Overexpression of a maize SPS gene improves yield characters of potato under field conditions[J]. Plant Production Science, 2008, 11: 104-107.

[13] 李彦生,南海洋,张秋英,等. 菜用大豆籽粒不同部位蔗糖积累及关键酶活性研究[J]. 作物学报,2013,39(11): 2099-2105. (Li Y S, Nan H Y, Zhang Q Y, et al. Sucrose accumulation and key enzyme activities in different parts of seed in vegetable soybean [J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(11): 2099-2105.)

[14] Masuda R. Quality requirement and improvement of vegetable soybean [M]//Vegetable Soybean: research needs for production and quality improvement. Asian Vegetable Research Development Center,1991:92-103.

[15] Tsou S C S, Hong T L. Research in vegetable soybean quality in Taiwan [M]//Shanmugasundaram S. Vegetable Soybean: research needs for production and quality improvement. Asian Vegetable Research Development Center,1991:103-108.

[16] Sturm A. Invertases primary structure, functions and roles in plant development and sucrose partitioning[J]. Plant Physiology, 1999, 121(1):1-7.

[17] 武维华. 植物生理学[M]. 北京:科学出版社,2002. (Wu W H. Plant physiology [M]. Beijing: Science Press, 2002.)

[18] 刘凌霄,沈法富,卢合全,等. 蔗糖代谢中蔗糖磷酸合成酶 (SPS)的研究进展[J]. 分子植物育种, 2005(2):275-281. (Liu L X, Shen F F, Lu H Q, et al. Research advance on sucrose phosphate synthase in sucrose metabolism [J]. Molecular Plant Breeding, 2005(2):275-281.)

[19] Huber S C, Huber J L. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves[J]. Plant Physiology, 1992, 99(4): 1275-1278.

[20] Fisher D B, Wang N. Sucrose concentration gradients along the post phloem transport pathway in the maternal tissues of developing wheat grains[J]. Plant Physiology, 1995, 109: 587-592.

[21] Rotundo J L, Westgate M E. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition[J]. Field Crops Research, 2009, 110:147-156.

[22] Dornbos D L, Mullen R E. Soybean seed protein and oil contents and fatty-acid composition adjustments by drought and temperature [J]. Journal of American Oil Chemists Society, 1992, 69: 228-231.

[23] Mishra V, Cherkauer K A. Retrospective droughts in the crop growing season: Implications to corn and soybean yield in the Mid-western United States[J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2010, 150: 1030-1045.