



外源 α -酮戊二酸对低氮下大豆氮同化和产量性状的影响

官逸¹, 高杰², 王华美¹, 梁昌志¹, 李婉婷¹, 温博文³, 于高波^{3*}, 张玉先^{1,4*}

(1. 黑龙江八一农垦大学 农学院/农业农村部大豆机械化生产重点实验室, 黑龙江 大庆 163319; 2. 内蒙古自治区农牧业技术推广中心, 内蒙古 呼和浩特市 010011; 3. 黑龙江八一农垦大学 园艺园林学院, 黑龙江 大庆 163319; 4. 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为了探索能够增强大豆植株自身的氮同化作用的外源试剂, 实现在减少氮肥施用量的同时不影响大豆生长及产量形成, 从而保持土壤的可持续利用, 以 α -酮戊二酸为外源试剂, 采用砂培的方式模拟低氮条件种植大豆, 待其生长至 V3 期进行叶面喷施处理, 探究低氮条件下施用 α -酮戊二酸对大豆生长发育、氮素同化能力及产量的影响。结果表明: α -酮戊二酸处理有效地诱导了低氮下大豆植株的氮同化基因的表达, 同时在低氮条件下进行 α -酮戊二酸处理也可显著提高 GS 和 GOGAT 酶活性, 增加植株体内氮同化产物, 如铵态氮、硝态氮含量以及酰脲的含量。在低氮条件下, α -酮戊二酸处理显著增加了低氮水平下大豆植株的单株荚数、单株粒数和单株粒重, 相比于未经过 α -酮戊二酸处理的大豆植株分别提高了 12.38%、9.52% 和 14.72%。因此, 外源施用 α -酮戊二酸可以促进低氮条件下大豆植株的氮代谢过程, 提高低氮下大豆的产量相关指标。

关键词: 大豆; 低氮; α -酮戊二酸; 氮同化; 产量

Effects of Exogenous α -ketoglutaric Acid on Nitrogen Assimilation and Yield Character of Soybean under Low Nitrogen Conditions

GONG Yi¹, JIE Gao², WANG Huamei¹, LIANG Changzhi¹, LI Wanting¹, WEN Bowen³, YU Gaobo^{3*}, ZHANG Yuxian^{1,4*}

(1. College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University/Key Laboratory for Mechanized Soybean Production, Daqing 163319, China; 2. Inner Mongolia Technology Promotion Center of Agricultural & Animal Husbandry, Hohhot 010011, China; 3. College of Horticulture and Gardening, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 4. National Engineering and Technology Research Center for Cereal Crops, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to explore the exogenous reagents that can enhance the nitrogen assimilation of soybean plants, the application of nitrogen fertilizer can be reduced without affecting the growth and yield formation of soybean, so as to maintain the sustainable use of soil, in this study, α -ketoglutaric acid was used as an external reagent to plant soybean under low nitrogen conditions by sand culture, to investigate the effects of α -ketoglutaric acid on growth, nitrogen assimilation and yield of soybean under low nitrogen conditions. The results showed that α -ketoglutaric acid treatment effectively induced the expression of N-assimilating genes in soybean plants under low-N conditions, and α -ketoglutaric acid treatment also significantly increased the activities of GS and GOGAT enzymes in soybean plants under low-N conditions, increased the content of nitrogen assimilation products in plant, such as ammonium nitrogen, nitrate nitrogen and acyl urea. Under low nitrogen conditions, α -ketoglutaric acid treatment significantly increased pods number per plant, seeds number per plant and seeds weight per plant under low nitrogen levels, compared with soybean plants without α -ketoglutaric acid treatment, it increased by 12.38%, 9.52% and 14.72% respectively. Thus, exogenous application of α -ketoglutaric acid can promote nitrogen metabolism in soybean plants under low-N conditions and increase soybean yield indicators under low-N conditions.

Keywords: soybean; low nitrogen; α -ketoglutaric acid; nitrogen assimilation; yield

氮作为植物生长发育必需的营养元素之一, 直接或间接参与多种生理生化过程, 调控作物产量。为满足作物生长与发育的需要, 国家统计局 2023 年调查报告指出, 我国 2022 年年均氮肥(折纯)消耗量高达 1.7×10^7 t^[1], 过量氮肥的施用不仅会对大气造成污染, 还会导致土壤矿质营养失调、土壤酸化、土壤板结等, 不利于土地的可持续利用^[2]。因此, 在不影响作物产量的情况下, 减少农业生产中

的化肥施用总量, 提高作物化肥利用率成为亟待解决的问题。

大豆(*Glycine max* L.)是我国重要的粮食作物之一, 广泛栽培于世界各地。作为植物蛋白需求的主要来源, 大豆单位光合作用的需氮量在所有粮食作物中最高^[3]。缺氮会降低大豆的光合作用, 抑制氨基酸和蛋白质的合成, 干扰大豆正常的碳氮代谢。氮素供应不足还会影响植株形态, 降低大豆叶

收稿日期: 2024-09-23

基金项目: 黑龙江省“揭榜挂帅”科技攻关项目(2021ZXJ05B02); 财政部和农业农村部, 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-04-PS18)。

第一作者: 官逸, 女, 硕士研究生, 主要从事作物逆境生理生态研究。E-mail: yiyigong@163.com。

通讯作者: 张玉先, 男, 博士, 教授, 主要从事大豆高产栽培技术研究。E-mail: zyx-lxy@126.com;

于高波, 女, 博士, 教授, 主要从事大豆逆境生理及分子研究。E-mail: yugaobo81@163.com。

面积,改变根长和根系体积,进而影响大豆的产量形成。大豆获取氮素的主要方式有两种:根瘤固氮和外界氮肥的施用,然而根瘤固氮远远不能满足其对氮素的需求,而氮肥的过量施用又不利于土地的可持续利用,如何实现大豆生产减氮不减产这一问题还有待于探究。

大豆植株对氮素的利用效率与其氮代谢过程密不可分, α -酮戊二酸(α -ketoglutaric acid,KG)是一种有机碳源物质,能够被植物直接吸收进入三羧酸循环,在氮代谢过程中发挥着重要的作用^[4]。植物氮代谢包括对 NO_3^- 吸收和对 NH_4^+ 的同化,植物从土壤中吸收 NO_3^- ,在细胞质中经硝酸还原酶 NR 还原为 NO_2^- ,然后在叶绿体中经亚硝酸还原酶 NiR 还原为 NH_4^+ ,这个过程被称为 NO_3^- 同化。 NH_4^+ 同化途径有两条,一条是 NH_4^+ 经 GS/GOGAT 途径转变为氨基酸, NH_4^+ 首先与谷氨酸(Glu)在谷氨酰胺合成酶(GS)的催化作用下合成谷氨酰胺 Gln,然后 Gln 和 α -酮戊二酸在谷氨酸合酶(GOGAT)的催化作用下形成两分子 Glu。其中,一分子 Glu 用于合成其他氨基酸和酰胺,形成可被植物直接利用的氮素化合物,另一分子则作为原料再次进入 GS/GOGAT 循环中。另一条 NH_4^+ 同化途径是直接由谷氨酸脱氢酶(GDH)催化 NH_4^+ 和 α -酮戊二酸缩合形成 Glu^[5]。

关于外源施用 α -酮戊二酸调控植物氮代谢的相关研究主要集中在水稻、小麦等作物,其可通过提高水稻体内氨同化酶的活性,促进铵吸收与同化能力的提升,进而调节植物氮代谢^[6,7]。外源 α -酮戊二酸也可显著提高低氮胁迫下小麦 NR、GS 等氮代谢酶活性,促进小麦氮代谢,进而增加干物质积累量^[8]。在盐、干旱等胁迫下,外施一定量 α -酮戊二酸不仅能够提高该胁迫下植物的氮代谢能力,还能够增加叶片中叶绿素的含量,提高光合性能,促进含碳化合物向其他器官的转运以提高植株的抗逆性^[4]。但目前针对外源 α -酮戊二酸是否可调控具有根瘤固氮作用的豆科作物的氮代谢尚不清楚。

因此,本研究针对外源 α -酮戊二酸对低氮条件下大豆植株氮代谢的调控作用开展研究,分析叶面喷施 α -酮戊二酸缓解大豆低氮响应的最佳浓度,以期揭示 α -酮戊二酸对低氮条件下大豆氮素积累及产量的调控效应。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆为低氮敏感型大豆品种黑农 62,供试试剂 α -酮戊二酸购自上海阿拉丁试剂有限公司。

1.2 试验设计

试验于 2023 年在黑龙江省大庆市国家杂粮工程技术研究中心试验基地进行,盆栽选用直径 30 cm、高 33 cm 的塑料桶,桶底均钻有 3 个小孔,铺有防止根系长出桶外的纱网。播种前选取籽粒饱满、大小均匀、色泽统一的黑农 62 大豆种子,每桶播种 6 粒,待对生真叶完全展开后进行间苗,保留长势一致的 3 株大豆幼苗,进行后续试验。

为确定叶面喷施 α -酮戊二酸的最佳浓度,以 1/2 Hoagland 营养液中含有 $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氮浓度作为对照氮处理(CK),1/10 对照氮素浓度($0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)Hoagland 营养液作为低氮处理(LN)^[9]。设置叶面喷施浓度为 $2.5, 5.0, 7.5$ 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -酮戊二酸 4 个处理。于大豆 Vc 期分别进行对照氮处理和低氮处理,待大豆生长至 V1 期分别叶面喷施 4 种不同浓度 α -酮戊二酸,共计 6 个处理:(1) CK;(2) LN + $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -酮戊二酸(LN + $\alpha-0$);(3) LN + $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -酮戊二酸(LN + $\alpha-2.5$);(4) LN + $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -酮戊二酸(LN + $\alpha-5.0$);(5) LN + $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -酮戊二酸(LN + $\alpha-7.5$);(6) LN + $10.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -酮戊二酸(LN + $\alpha-10.0$)。于 α -酮戊二酸处理后第 6 天进行取样,每个处理设 3 次重复,测定 α -酮戊二酸处理后第 6 天的氮素同化关键酶活性等指标,分析并筛选出 α -酮戊二酸处理的最佳浓度。

为探究叶面喷施 α -酮戊二酸对大豆氮代谢和产量相关性状的影响,采取盆栽砂培方式进行全生育期试验。采取上述试验筛选出的最佳浓度 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -酮戊二酸于大豆 V3 期进行叶面喷施,分别设 $7.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照氮浓度(CK)、 $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 低氮浓度(LN)、 $0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 零氮(0N)处理,并设置各氮浓度下不喷施 α -酮戊二酸及喷施 $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ α -酮戊二酸处理。共 6 个处理:(1) CK;(2) CK + α -酮戊二酸(CK + α);(3) LN;(4) LN + α -酮戊二酸(LN + α);(5) 0N;(6) 0N + α -

酮戊二酸(ON + α)。处理后第 6、12、18 天分别取样,用于形态、生理指标测定。采收时每个处理选取 10 株具有代表性的植株,分别测定单株荚数、单株粒数、单株粒重和百粒重。

于 V3 期对大豆叶片喷施最适浓度 α -酮戊二酸。为了探索 α -酮戊二酸对大豆植株形态建成的影响,处理后第 6、12、18 天取样,通过测定其生长参数(株高、茎粗、根长和叶面积),明确 α -酮戊二酸对低氮下大豆植株的生长及形态建成的影响。为了探究 α -酮戊二酸对缺氮条件下大豆植株氮同化能力的影响,在处理后的第 12 天测定氮代谢过程中的 4 个氮同化关键酶 NR、GS、GOGAT 和 GDH 的活性,并对大豆叶片中氮代谢关键基因硝酸还原酶编码基因 NR2、亚硝酸还原酶编码基因 NiR、谷氨酰胺合成酶编码基因 *GS1 β* 、谷氨酸合成酶编码基因 GOGAT、铵转运蛋白编码基因 *AMT1* 和氨基酸渗透酶编码基因 *GmAAP6a* 的表达量进行测定。为了探究 α -酮戊二酸对低氮大豆植株氮同化产物的影响,在 α -酮戊二酸处理后第 12 天进行测定大豆叶片中硝态氮和铵态氮的含量。为了探究 α -酮戊二酸对低氮下大豆固氮能力的影响,在 α -酮戊二酸处理后第 12 天测定大豆的根瘤数量、根瘤干重等形态指标,并测定大豆植株地上部分和地下部分的酰胺含量。每个处理均 3 次生物学重复。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 植株生长参数 采用常规方法测量大豆株高、根长和茎粗^[10];利用叶面积仪(Yaxin-1241)测定单株总叶面积,并记录相应参数。

1.3.2 植株氮同化关键酶活性 在 α -酮戊二酸处理后 12 d 取各处理植株的倒二叶(完全展开的三出复叶)样品,用于氮同化关键酶活性的测定。根据 Wu 等^[11]的方法测定硝酸还原酶(NR)和谷氨酰胺合成酶(GS)活性,根据 Du 等^[12]的方法测定谷氨酸合成酶(GOGAT)活性,根据 Fawole 等^[13]的方法测定谷氨酸脱氢酶(GDH)活性。

1.3.3 植株氮代谢关键基因表达量 将冷冻的 50 ~ 100 mg 功能性叶片和根尖样品在液氮下研磨成粉末,并使用 Axygen 试剂盒(AxyPrep,美国)提取总 RNA。然后,用 takara 试剂盒[PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)]对 5 μ L 每个样品的总 RNA 进行反转录。使用 Premier 5.0 设计基因特异性引物(表 1)。将 cDNA 稀释 10 倍后进行 qRT-PCR,反应体系 10 μ L;5 μ L TB Green Premix Ex *Taq* II;3 μ L 蒸馏水;0.5 μ L PCR 正向引物;0.5 μ L PCR 反向引物;1 μ L cDNA。使用 CFX96 实时 PCR 检测系统(Takara),采用两步 PCR 法,具体条件如下:95 $^{\circ}$ C 下预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 次循环。以 *Actin* 基因(ID: Glyma18g52780)作为内参,使用软件 Bio-Rad iQ5 进行数据处理。

表 1 特异引物的相关信息
Table 1 Information about specific primers

引物名称 Primer name	基因序列号 Gene ID	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
NR2-F	Glyma.06G109200v4	GTATTCGGTGTTGGGAGAAAG
NR2-R	Glyma.06G109200v4	CACACTTGCCACGTTTCACCTC
NiR-F	Glyma.02G132100v4	AACCCCGCCATGTCAAACCTT
NiR-R	Glyma.02G132100v4	TTGCAGGCATGTAAGCCAGA
GS1 β -F	Glyma.11G215500v4	GCTTTTCTTAGTAGATTGGTCTC
GS1 β -R	Glyma.11G215500v4	TAACAATCGGAAAACGAGGGA
GOGAT-F	Glyma.04G236900v4	ACACTCTCATCTTCTCTCTCTCTCTCTCG
GOGAT-R	Glyma.04G236900v4	CGTTGTGAGGGAAGGGAATG
GmAAP6a-F	Glyma.04G209100v4	TCCATTGGGCTTGGCCTTTCCA
GmAAP6a-R	Glyma.04G209100v4	CCGTTCCCGAAACTCCACCCC
Actin-F	Glyma.20G082450v4	CTTCAGGCATTACAGAGACAA
Actin-R	Glyma.20G082450v4	TAGAACCACCGATCCAGACAC
AMT1-F	Glyma.06G109200v4	ATGTCTGCAACGGGCTGTTA
AMT1-R	Glyma.06G109200v4	TGCACGCTATCAGAACCACT

1.3.4 植株氮代谢相关物质含量 参考 Ferrario-Méry 等^[14]方法进行叶片取样,105 ℃杀青 30 min 后,于 80 ℃烘干至恒重,按照 García-Robledo 等^[15]的描述测定硝态氮含量,用苯酚次氯酸盐法^[16]测定铵态氮含量。用 Brilliant Blue G-250 测定可溶性蛋白含量,用茚三酮比色法^[17]测定游离氨基酸含量。用凯氏定氮法^[18]测定植物地上部分和地下部分中总氮的含量。将 105 ℃干燥的成熟样品研磨成粉末。称取样品至 0.2 g,用 H₂SO₄和 H₂O₂消煮,然后用蒸馏水定容至 50 mL,最后用凯氏定氮测定仪(华焯 KDN-103F)测定氮含量。

1.3.5 根瘤数量、干重及植株酰脲含量 采用计数法统计大豆根瘤数量^[10],将摘下的新鲜根瘤在105 ℃下杀青 0.5 h,再将烘箱调至(80 ℃)烘干约 2 d 至恒重,用万分之一天平测定根瘤的干重。根据徐志伟等^[19]的方法测定大豆植株地上部分和地下部分酰脲含量。

1.3.6 产量相关性状 采收时每个处理选取 10 株具有代表性的植株,分别测定单株荚数、单株粒数、

单株粒重和百粒重^[20]。

1.4 数据分析

利用 Excel 2016 进行数据分析,采用 SPSS 20.0 软件对各处理间显著性进行分析,利用 GraphPad Prim 9.5.0 软件绘制图表。

2 结果与分析

2.1 外源 α -酮戊二酸缓解大豆幼苗低氮耐受性的最佳浓度筛选

在低氮条件下于 V1 期分别进行不同浓度 α -酮戊二酸叶面喷施,如图 1 所示,与对照相比,低氮处理后大豆幼苗的株高、根体积和叶面积受到明显抑制, α -酮戊二酸处理后,幼苗生长受到低氮条件的抑制得到了不同程度的缓解,特别是 2.5 和 5.0 mmol·L⁻¹ α -酮戊二酸处理对低氮下大豆幼苗叶面积、根体积和根瘤数的缓解效果最好。因此,在低氮条件下,外源喷施 α -酮戊二酸对幼苗的生长有一定的促进作用,且浓度为 2.5 和 5.0 mmol·L⁻¹ α -酮戊二酸对其形态建成的促进效果最佳。

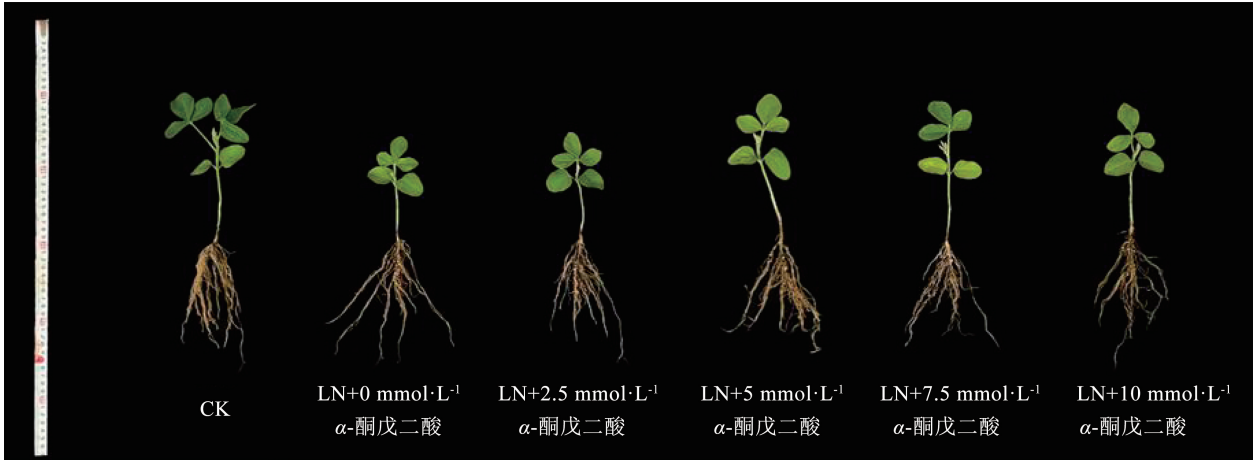
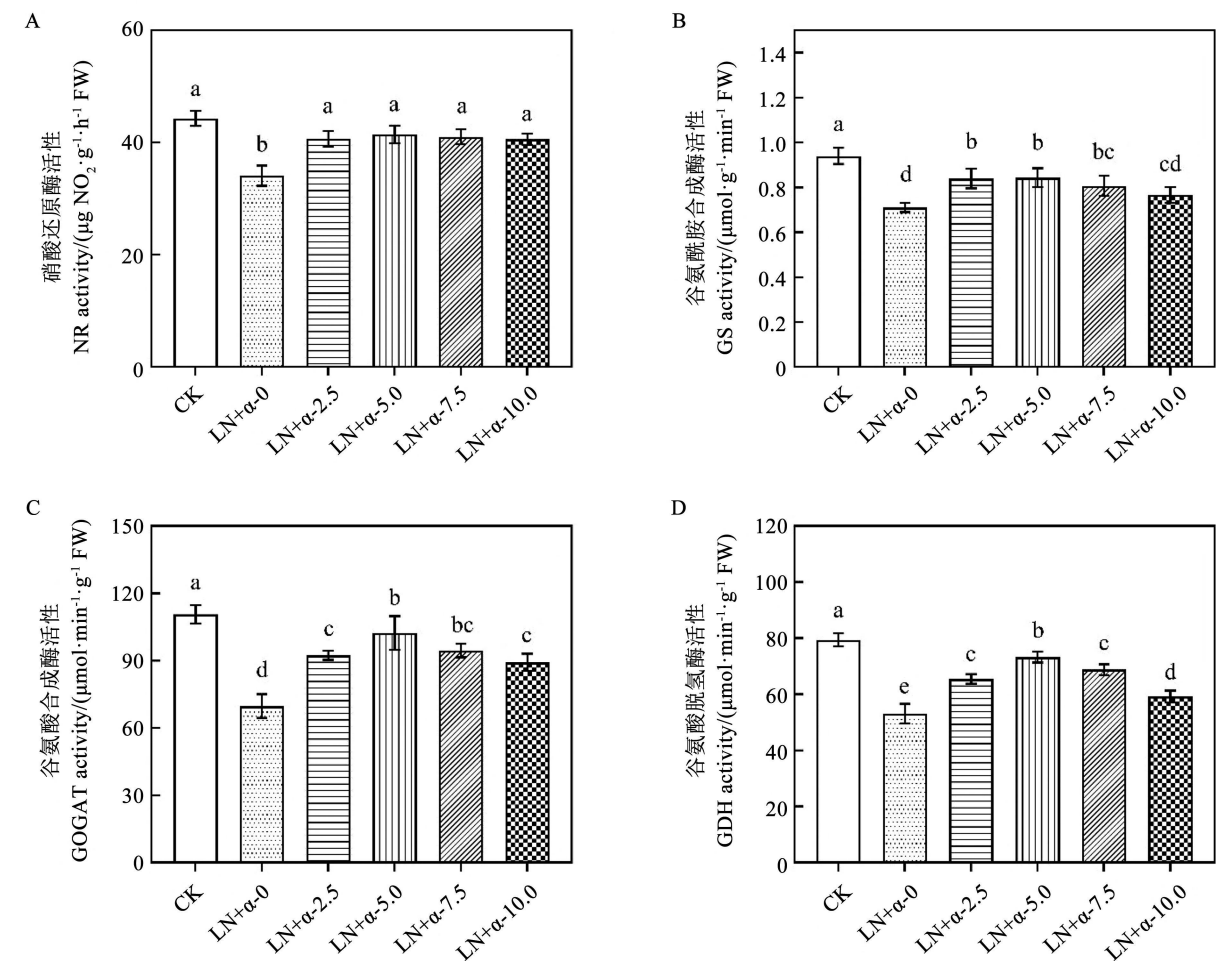


图 1 外源 α -酮戊二酸对低氮水平下大豆苗期生长的影响

Fig. 1 Effects of exogenous α -ketoglutarate on soybean seedling growth at low nitrogen levels

如图 2 所示,低氮处理后,调控大豆氮同化的 4 个关键酶(硝酸还原酶 NR、谷氨酰胺合成酶 GS、谷氨酸合成酶 GOGAT 和谷氨酸脱氢酶 GDH)活性显著下降。低氮条件下施用 α -酮戊二酸提高了大豆幼苗 NR 和 GS 的活性,但不同浓度 α -酮戊二酸处理对 NR 和 GS 活性的影响无显著差异。GOGAT 和

GDH 的酶活性在低氮下显著减弱,其中低氮下 5.0 mmol·L⁻¹的 α -酮戊二酸处理对 GOGAT 和 GDH 活性的增强效果最为显著,相比于低氮未喷施 α -酮戊二酸的大豆植株分别提高了 46.79% 和 38.06%。因此,本研究选用浓度为 5.0 mmol·L⁻¹的 α -酮戊二酸为缓解大豆幼苗低氮胁迫的最佳浓度。



注: A~D 分别代表硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶和谷氨酸脱氢酶活性。不同字母表示处理间达到显著差异 ($P < 0.05$), 下同。

Note: A-D represent nitrate reductase, glutamine synthetase, glutamate synthetase and glutamate dehydrogenase activities, respectively. Different letters indicated significant differences between treatments ($P < 0.05$), the same below.

图2 外源 α-酮戊二酸对低氮水平下大豆苗期氮素同化酶活性的影响

Fig.2 Effects of exogenous α-ketoglutarate on nitrogen assimilation enzyme activity in soybean seedlings at low nitrogen levels

2.2 外源 α-酮戊二酸处理对低氮下大豆形态建成的影响

如表 2 所示,于 V3 期对大豆植株叶片喷施 5.0 mmol·L⁻¹ α-酮戊二酸处理后第 6、12、18 天,与 CK 相比,低氮和零氮抑制了大豆植株的生长。进行 α-酮戊二酸处理 6 d 后,正常氮条件下,处理后的大豆植株茎粗和单株总叶面积显著提升,其中单株总叶面积相比对照增加了 34.6%;低氮条件下,α-酮戊二酸处理后同样显著提升了单株总叶面积,相比未使用 α-酮戊二酸处理的植株增加了 17.4%。

α-酮戊二酸处理 12 d 后,在零氮条件下,处理后的大豆植株茎粗相比未处理的植株茎粗增加了 13.9%。α-酮戊二酸处理 18 d 后,正常氮条件下,α-酮戊二酸处理后植株的茎粗和单株总叶面积显著增加,相比于对照分别增加了 12.2% 和 7.0%;零氮条件下 α-酮戊二酸处理后植株的茎粗和单株总叶面积同样显著增加,相比于未经过 α-酮戊二酸处理的大豆植株分别增加了 15.7% 和 7.2%。结果表明,外源 α-酮戊二酸可以缓解缺氮(低氮和零氮)对大豆植株茎粗和叶面积的抑制作用。

表 2 V3 期喷施 α -酮戊二酸对不同施氮水平下大豆形态指标的影响

Table 2 Effects of α -ketoglutaric acid spraying in stage V3 on soybean morphology indexes at different levels of nitrogen application

处理后天数	处理	株高	茎粗	根长	单株总叶面积
Days after treatment/d	Treatment	Plant height/cm	Stem diameter/cm	Root length/cm	Total leaf area/cm ²
6	CK	14.22 \pm 0.44 ab	4.88 \pm 0.57 b	19.04 \pm 0.54 a	16.20 \pm 0.06 c
	CK + α	15.01 \pm 0.77 a	5.01 \pm 0.22 a	18.93 \pm 0.17 a	21.80 \pm 0.03 a
	LN	13.10 \pm 1.50 ab	3.94 \pm 0.17 cd	17.17 \pm 0.92 a	16.10 \pm 0.08 c
	LN + α	13.86 \pm 1.07 ab	4.26 \pm 0.26 c	17.41 \pm 0.78 a	18.90 \pm 0.02 b
	0N	12.29 \pm 1.04 b	3.58 \pm 0.42 d	14.77 \pm 0.47 a	15.40 \pm 0.04 c
	0N + α	13.33 \pm 1.45 ab	4.05 \pm 0.11 cd	15.18 \pm 1.05 a	16.00 \pm 0.07 c
12	CK	20.29 \pm 0.66 ab	5.95 \pm 0.37 a	19.30 \pm 1.10 a	37.80 \pm 0.33 a
	CK + α	21.62 \pm 0.70 a	6.26 \pm 0.35 a	19.82 \pm 1.88 a	40.00 \pm 0.14 a
	LN	19.20 \pm 1.63 ab	4.80 \pm 0.21 bc	18.11 \pm 0.39 a	26.80 \pm 0.21 b
	LN + α	19.83 \pm 1.37 ab	5.21 \pm 0.12 b	18.52 \pm 1.27 a	29.40 \pm 0.15 b
	0N	18.12 \pm 1.20 b	4.58 \pm 0.03 c	15.54 \pm 1.39 b	20.80 \pm 0.20 c
	0N + α	19.30 \pm 1.57 ab	5.22 \pm 0.40 b	15.71 \pm 1.25 b	22.00 \pm 0.27 c
18	CK	30.43 \pm 1.31 ab	7.93 \pm 0.33 b	21.60 \pm 3.30 a	65.00 \pm 1.68 b
	CK + α	31.82 \pm 0.91 a	8.90 \pm 0.67 a	22.36 \pm 1.05 a	69.58 \pm 0.76 a
	LN	28.96 \pm 2.31 ab	6.79 \pm 0.54 cd	20.94 \pm 1.09 ab	55.93 \pm 1.13 cd
	LN + α	29.49 \pm 1.83 ab	7.51 \pm 0.20 bc	21.25 \pm 0.72 a	58.62 \pm 2.41 c
	0N	27.50 \pm 1.35 b	6.35 \pm 0.15 d	17.64 \pm 0.24 c	50.70 \pm 1.76 e
	0N + α	29.23 \pm 1.96 ab	7.35 \pm 0.48 bc	18.26 \pm 1.18 bc	54.34 \pm 1.18 d

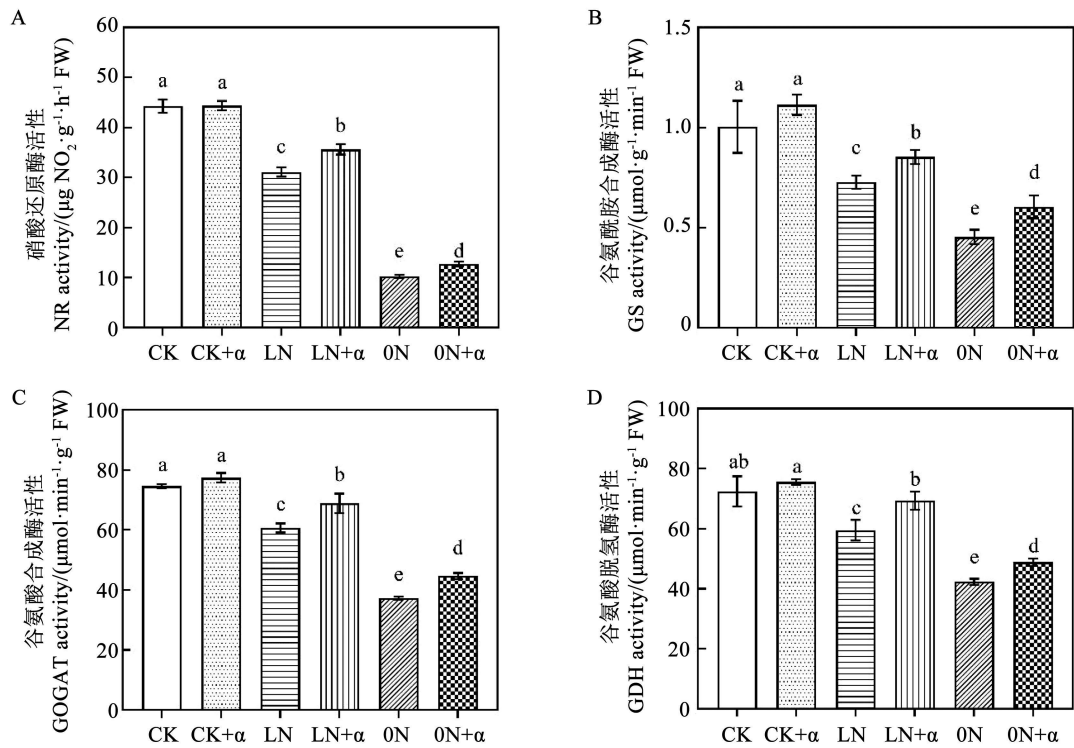
注：不同字母表示处理间达到显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters meant significant difference among treatments at 0.05 level.

2.3 外源 α -酮戊二酸处理对低氮下大豆氮素同化能力的影响

如图 3 所示,与 CK 相比,低氮处理后调节植物氮同化关键酶硝酸还原酶 (NR)、谷氨酰胺合成酶 (GS)、谷氨酸合成酶 (GOGAT) 和谷氨酸脱氢酶 (GDH) 活性均被抑制,且酶活性随着氮浓度的减少逐渐降低。缺氮条件下,经过 α -酮戊二酸处理后的大豆植株 NR 活性显著提高,尤其是在低氮条件下, α -酮戊二酸处理后的大豆植株 NR 活性相比于未处理植株 NR 活性增强了 14.6%。在缺氮的情况下进

行 α -酮戊二酸处理可显著提高 GS 和 GOGAT 的酶活性,尤其是在零氮条件下, α -酮戊二酸处理后其活性相比于零氮未进行任何处理的大豆植株分别提高了 33.3% 和 20.1%。此外,活性在缺氮水平下也同样受到了抑制,而外源 α -酮戊二酸处理可有效缓解缺氮对其的抑制作用,且在低氮条件下对其缓解效果最好,相比于低氮下未进行外源试剂处理的大豆植株 GDH 酶活性提高了 16.5%。结果表明外源 α -酮戊二酸处理可以有效缓解缺氮对大豆氮同化关键酶的抑制作用。



注: A ~ D 分别代表硝酸还原酶、谷氨酰胺合成酶、谷氨酸合成酶和谷氨酸脱氢酶活性。

Note: A-D represent nitrate reductase, glutamine synthetase, glutamate synthetase and glutamate dehydrogenase activities, respectively.

图 3 外源 α -酮戊二酸对低氮水平下大豆氮素同化酶活性的影响

Fig. 3 Effects of exogenous α -ketoglutarate on nitrogen assimilation enzyme activity of soybean under low nitrogen level

对大豆叶片中氮代谢关键基因表达量测定结果如图 4 所示,与 CK 相比,低氮和零氮均会抑制 *NR2*、*NiR*、*GSI* β 和 *GOGAT* 基因的表达,其中低氮和零氮对 *NR2*、*NiR* 的影响最大。相比于低氮未经过 α -酮戊二酸处理的大豆植株, α -酮戊二酸处理有效地诱导了低氮下大豆植株的 *NR2*、*NiR*、*GSI* β 和 *GOGAT* 基因的表达,其中 α -酮戊二酸处理对 *GSI* β

基因表达的诱导作用最为明显,表达量提高了 69.5%。零氮条件下各基因表达量的趋势与低氮条件下相似。此外, α -酮戊二酸处理还促进了铵转运蛋白的编码基因 *AMT1* 和氨基酸通透酶蛋白编码基因 *GmAAP6a* 在低氮条件下的表达。结果表明外源 α -酮戊二酸处理通过提高缺氮条件下氮同化相关基因的表达,并增强关键酶活性,促进植株的氮同化。

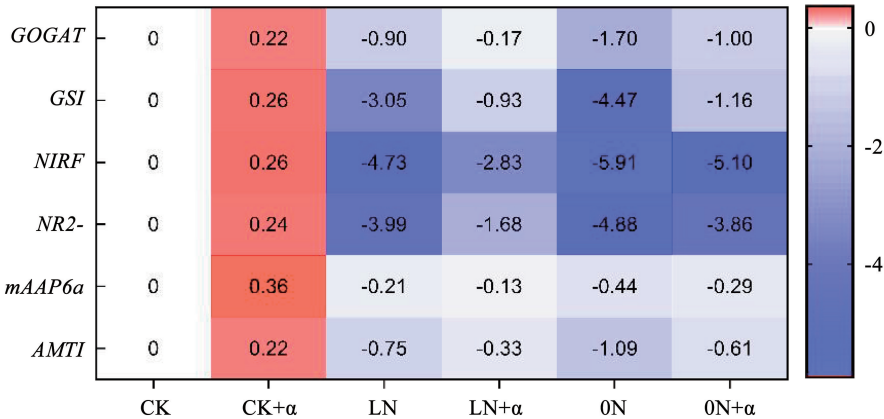


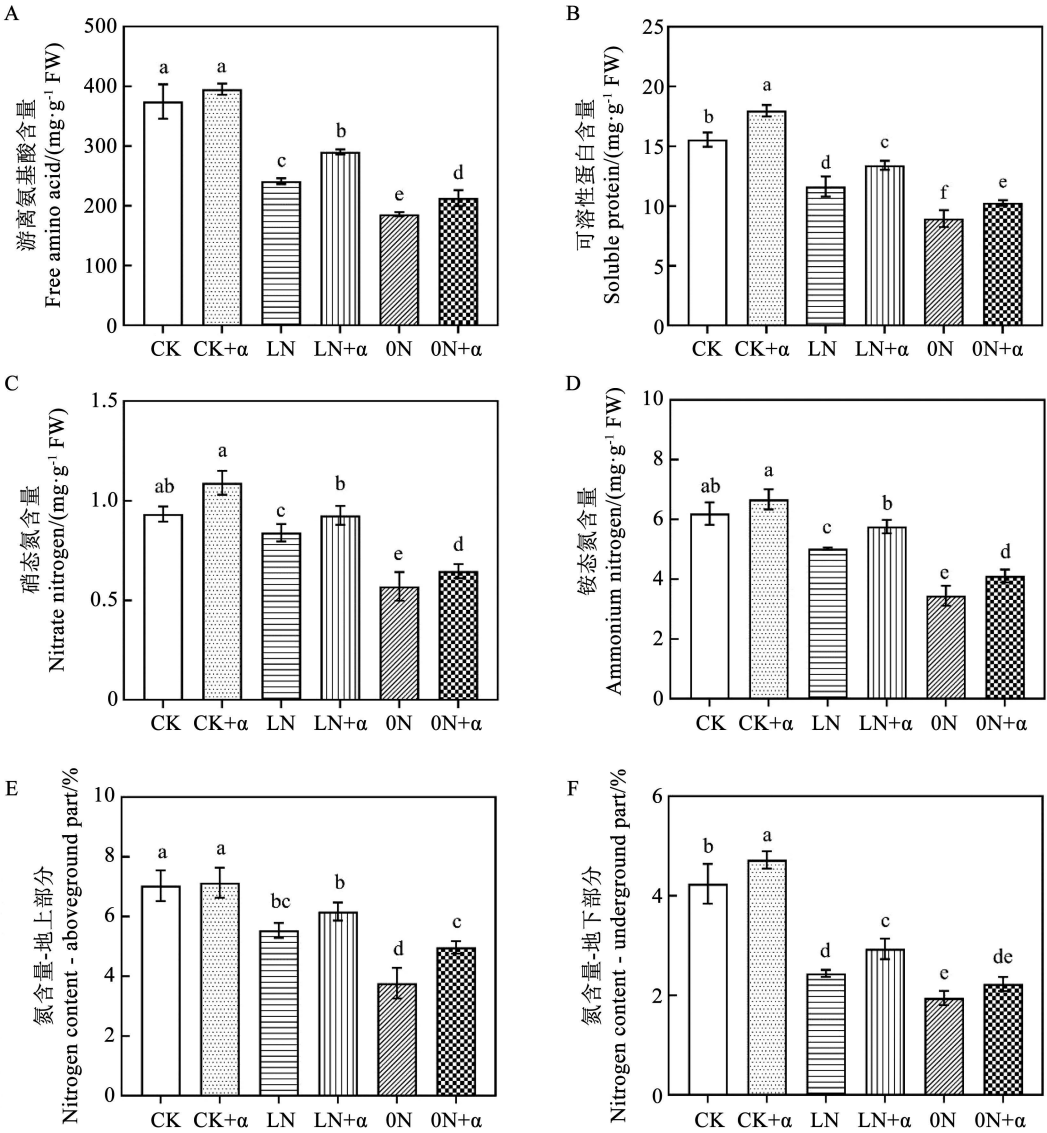
图 4 外源 α -酮戊二酸对低氮下大豆氮代谢基因表达量的影响

Fig. 4 Effects of exogenous α -ketoglutaric acid on expression of nitrogen metabolism genes in soybean under low nitrogen condition

2.4 外源 α -酮戊二酸处理对低氮下大豆氮同化产物的影响

对大豆叶片中硝态氮和铵态氮的测定含量的结果表明,氮素供应不足时,叶片中硝态氮含量、铵态氮含量显著降低(图 5A 和 B)。在低氮条件下,相比于未经过 α -酮戊二酸处理的大豆植株, α -酮戊二酸处理使植株叶片中硝态氮和铵态氮的含量显著增加,分别增加了 10.2% 和 14.7%。在零氮条件下,经过 α -酮戊二酸处理后大豆植株叶片中硝态氮、铵态氮的含量分别增加了 13.4% 和 19.2%。氮素供应不足时会抑制氮同化过程,降低游离氨基酸

和可溶性蛋白的含量,低氮条件下,外源 α -酮戊二酸处理使大豆叶片中可溶性蛋白和游离氨基酸含量显著增加,相比于未处理的植株分别增加了 15.3% 和 20.4% (图 5C 和 D)。植物体内氮含量可以作为判断植物氮代谢是否活跃的重要指标,低氮条件下,施用 α -酮戊二酸后大豆植株的地下部分全氮含量显著增加,且相比于未进行 α -酮戊二酸处理的植株提升了 11.5%。零氮条件下,施用 α -酮戊二酸后大豆植株的地上部分全氮含量显著增加,且相比于未进行 α -酮戊二酸处理的植株提升了 31.9% (图 5E 和 F)。



注:A ~ D 分别代表游离氨基酸、可溶性蛋白、硝态氮和铵态氮含量;E ~ F 分别代表地下部分和地上部分氮含量。
Note: A-D represent the content of free amino acids, soluble proteins, nitrate nitrogen, and ammonium nitrogen, respectively; E-F represent the ammonium nitrogen content of underground and aboveground, respectively.

图 5 外源 α -酮戊二酸对低氮下大豆氮同化产物的影响

Fig. 5 Effects of exogenous α -ketoglutarate on nitrogen metabolites of soybean seedlings under low nitrogen

2.5 外源 α -酮戊二酸对低氮下大豆固氮能力的影响

由图 6 和图 7 可知,与对照相比,低氮和零氮条件下,大豆根瘤明显增多,在氮处理浓度相同时, α -酮戊二酸处理后的植株根瘤数、根瘤干重相比于未处理的大豆植株显著提高,尤其是在低氮下,单株根瘤干重提升了 44.3%。在低氮条件下, α -酮戊二酸处理后大豆植株地上部分和地下部分的酰脲含

量显著提高,相比于未经过 α -酮戊二酸处理的大豆植株分别上升 24.8% 和 20.3%。在零氮条件下, α -酮戊二酸处理后大豆植株地上部分和地下部分的酰脲含量同样显著升高,相比于未经过 α -酮戊二酸处理的大豆植株分别上升 12.3% 和 18.7%。结果表明,外源施用 α -酮戊二酸促进低氮水平下大豆植株的根瘤形成,使根瘤数目增多,大豆的固氮能力增强。

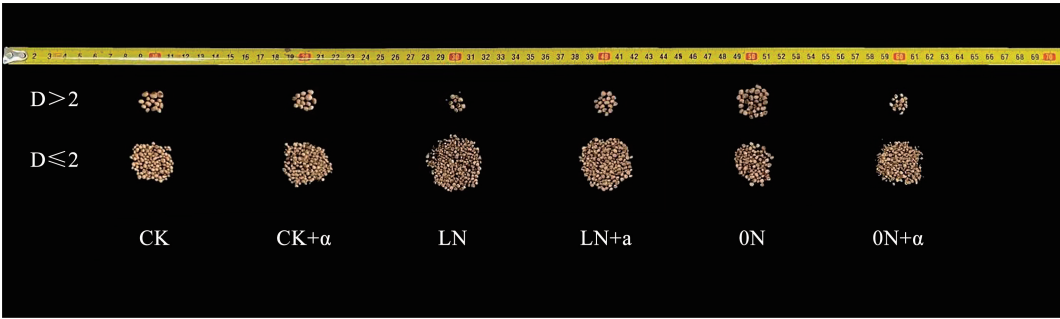
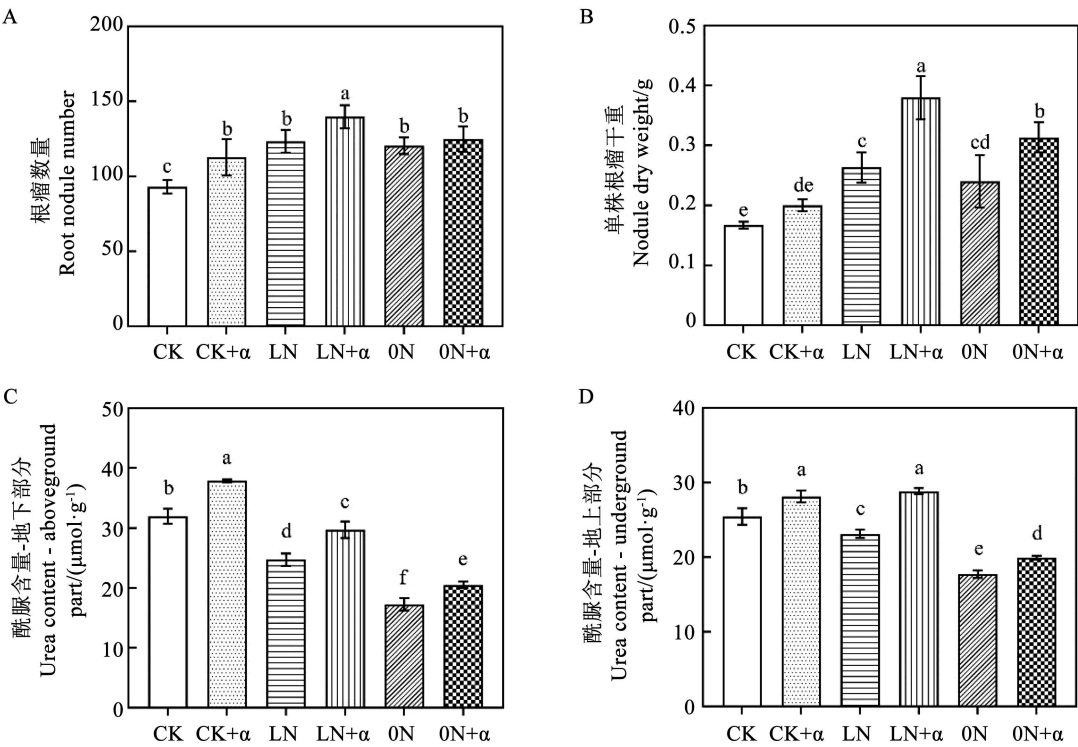


图 6 外源 α -酮戊二酸对低氮水平下大豆根瘤数的影响
Fig.6 Effects of exogenous α -ketoglutaric acid on nodule number of soybean under low nitrogen level



注:A 和 B 分别代表单株根瘤干重和根瘤数量;C 和 D 分别代表地下部分酰脲和地上部分酰脲含量。

Note: A and B represent the dry weight and number of root nodules per plant, respectively; C and D represent the content of underground and aboveground urea, respectively.

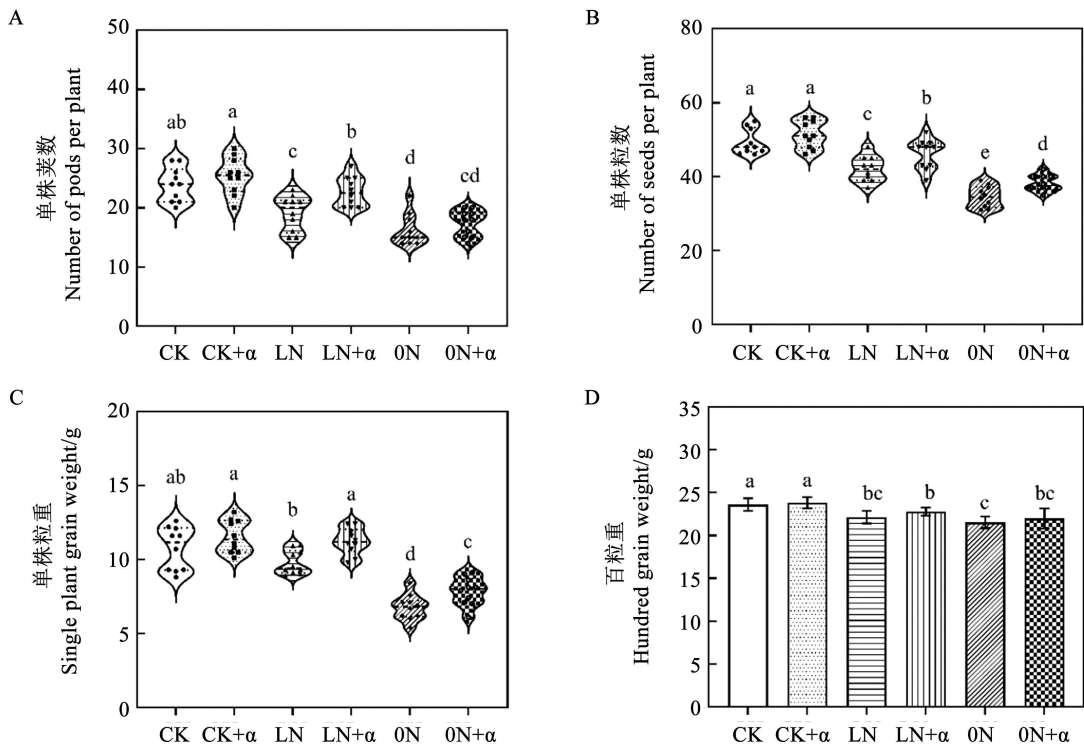
图 7 外源 α -酮戊二酸对低氮水平下大豆固氮能力的影响

Fig.7 Effects of exogenous α -ketoglutarate on nodule growth and nitrogenase activity of soybean under low nitrogen level

2.6 外源 α -酮戊二酸对低氮下大豆产量相关性状的影响

如图 8 所示,氮素供应不足影响大豆产量相关性状,与对照相比,零氮对单株荚数、单株粒数、单株粒重和百粒重的抑制作用明显大于正常氮处理,对缺氮大豆植株进行 α -酮戊二酸处理可缓解氮供应不足对大豆产量的负面影响。在低氮条件下, α -酮戊二酸处理显著增加了低氮水平下大豆植株的

单株荚数、单株粒数和单株粒重,相比于未经过 α -酮戊二酸处理的大豆植株分别提高了 12.38%、9.52% 和 14.72%。大豆植株单株荚数、单株粒数、单株粒重和百粒重均随着氮浓度的减少而逐渐降低,而在低氮条件下 α -酮戊二酸处理使单株荚数、单株粒数和单株粒重显著提高。结果表明外源 α -酮戊二酸可缓解低氮对其产量相关性状的抑制作用。



注:A~D 分别代表单株荚数、单株粒数、单株粒重和百粒重。

Note: A-D represent the pods number per plant, the seeds number per plant, the seeds weight per plant and the 100-seed weight respectively.

图 8 外源 α -酮戊二酸对低氮下大豆产量相关性状的影响

Fig. 8 Effects of exogenous α -ketoglutarate on soybean yield under low nitrogen level

3 讨论

氮代谢是植物中最基本的物质代谢之一,包括各种氮化合物在植物中的转化和利用,当植物接收缺氮信号时,氮代谢受到抑制^[3]。硝酸还原酶(NR)作为植物氮代谢的关键酶,也是一种氧化还原酶,可催化硝酸离子还原成亚硝酸离子,其活性的高低可以反映大豆氮代谢的情况。本研究发现缺氮抑制了大豆 NR 活性,这是由于缺氮条件下硝酸还原酶底物供应不足限制了硝酸盐吸收的能力, α -酮戊二酸处理缓解了缺氮对其活性的抑制作用,这可能由于 α -酮戊二酸是三羧酸循环的重要中间物,是调节碳-氮平衡的一种重要信号分子^[21],当大

豆植株接收到缺氮信号时, α -酮戊二酸诱导了硝酸还原酶编码基因 *NR2* 的表达,并提高 NR 活性,进而促进了亚硝酸还原酶编码基因 *NiR* 的表达,激活了亚硝酸还原酶活性,促进硝酸盐亚硝化的过程,生成的亚硝酸盐被催化转化为铵。前人的研究也表明外源 α -酮戊二酸对水稻体内氮代谢有关的酶,如 NR、NIR、GS 都有调节作用,增强了铵吸收与同化^[22]。

高等植物氮素同化作用主要是通过 GS/GOGAT 循环来完成的,其中 GS 是 GS/GOGAT 循环中的关键酶,催化谷氨酸转化为谷氨酰胺^[23]。本研究中低氮和零氮条件下, α -酮戊二酸处理后 GS 活性显著提高,GS 活性的提高可促进氮代谢运转能力

的增强,进一步促进氨基酸的合成和转化^[24]。也有研究表明, α -酮戊二酸还可作为一种效应物,与 GS 结合,从而增强水稻 GS 的活性^[25]。本研究中低氮和零氮条件下, α -酮戊二酸处理通过提高 GS 活性,进而促进大豆植株氮代谢的过程。

还有研究表明, α -酮戊二酸可促进氨基酸的合成、提高硝酸盐的同化速率以及有机酸的代谢强度^[26]。本研究中,与对照相比低氮条件下硝态氮含量显著降低,原因可能是营养液中缺氮直接抑制植物对硝态氮的吸收和利用。而 α -酮戊二酸增强了低氮条件下大豆体内硝态氮的吸收与利用,本研究发现 α -酮戊二酸处理提高了调控铵转运蛋白编码基因 *AMT1* 和氨基酸渗透酶编码基因 *GmAAP6a* 的表达量,进而促进大豆对硝酸盐的吸收和铵的同化过程。

此外,大豆作为典型的豆科作物,根瘤固氮是其获取氮素的一种独特途径,在缺氮条件下喷施 α -酮戊二酸可为根瘤的形成提供丰富的碳源和必需氨基酸,进而促进了大豆根瘤的发育,根瘤发育的加强进一步增强了大豆对铵的同化。而大豆固氮能力与根瘤大小、根瘤数目密切相关,低氮条件下, α -酮戊二酸通过增加大豆植株的根瘤数目、根瘤干重提高了低氮下大豆的固氮能力,增加了地上部分与地下部分中的酰胺含量。

总体而言,零氮和低氮处理均会抑制大豆氮代谢,降低生物产量。在缺氮水平下,V3 期施用 α -酮戊二酸可以促进大豆植株对硝酸盐的吸收和铵的同化,还通过促进根瘤生长,提高了总固氮能力,为氮同化提供了更多的底物,从而促进了氨基酸的合成和运输,促进植株生长及干物质积累,促进植株生长,进而增加低氮下大豆的单株荚数与单株粒数,促进单株粒重的增加,进而提高了低氮下大豆的产量。

4 结论

低氮显著抑制了大豆氮代谢能力,降低大豆产量。而施用 α -酮戊二酸促进了低氮下大豆根瘤的形成及干物质积累,总固氮能力也随 α -酮戊二酸的施用而提高。 α -酮戊二酸还可通过诱导功能叶片氮代谢相关基因 (*NR2*、*NiR*、*GS1 β* 、*GOGAT* 和 *GmAAP6a*) 的表达并使氮代谢关键酶 (*NR*、*GS*、*GOGAT* 和 *GDH*) 的活性增强,从而提高植株体内总氮含量,提高植株对缺氮的耐受性,进而增加了大豆植株的单株荚数和单株粒数,提高单株粒重和百粒重。

参考文献

[1] 国家统计局. 中国统计年鉴 2023 [M]. 北京: 中国统计出版社, 2023.
Translation of the national bureau of statistics. China statistical yearbook 2023 [M]. Beijing: China Statistics Press, 2023.

[2] 郝雯悦, 王西娜, 王月梅, 等. 小麦过量施肥的危害及化肥减施途径 [J]. 现代农业科技, 2022 (24): 40-44, 48.
HAO W Y, WANG X N, WANG Y M, et al. Harm of excessive fertilization on wheat and ways of reducing fertilizer application [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2022 (24): 40-44, 48.

[3] WANG H, REN C, CAO L, et al. Exogenous melatonin modulates physiological response to nitrogen and improves yield in nitrogen-deficient soybean (*Glycine max* L. merr.) [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 865758.

[4] 吴雨露, 扈嘉鑫, 陈宇熙, 等. 外施 α -酮戊二酸对盐胁迫下海滨锦葵生长、碳氮磷养分积累及其计量关系的影响 [J]. 中国农业科技导报, 2023, 25 (7): 170-177.
WU Y L, HU J X, CHEN Y X, et al. Effects of external application of α -ketoglutarate on growth, carbon, nitrogen and phosphorus accumulation and their stoichiometric relationships in *Kosteletzkyia virginica* under salt stress [J]. Journal of Agricultural Science and Technology of China, 2023, 25 (7): 170-177.

[5] 王新磊, 吕新芳. 氮代谢参与植物逆境抵抗的作用机理研究进展 [J]. 广西植物, 2020, 40 (4): 583-591.
WANG X L, LÜ X F. Research progress on mechanism of nitrogen metabolism involved in plant stress resistance [J]. Guihaia, 2020, 40 (4): 583-591.

[6] AN Y, OU J, WANG Z, et al. Regulation of carbon and nitrogen metabolisms in rice roots by 2-oxoglutarate at the level of hexokinase [J]. Physiologia Plantarum, 2007, 129 (2): 296-306.

[7] 朱维琴, 吴良欢, 陶勤南. 氮营养对于干旱逆境下水稻体内可溶性渗透调节物质的影响 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2003, 29 (5): 479-484.
ZHU W Q, WU L H, TAO Q N. Effects of nitrogen nutrition on soluble osmotica in rice plants in response to drought stress [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2003, 29 (5): 479-484.

[8] 孙倩. 外源 α -酮戊二酸对低水氮胁迫下小麦氮代谢及产量性状的影响 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2014.
SUN Q. Effects of exogenous α -ketoglutarate on nitrogen metabolism and yield traits of wheat under low water and nitrogen stress [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2014.

[9] WANG H, GUO R, HU Y, et al. Carbon-nitrogen metabolic responses and adaptive strategies to low-nitrogen stress in *Glycine soja* [J]. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2019, 47 (4): 1215-1223.

[10] LI M, XU J, WANG X, et al. Photosynthetic characteristics and metabolic analyses of two soybean genotypes revealed adaptive strategies to low-nitrogen stress [J]. Journal of Plant Physiology, 2018, 229: 132-141.

[11] WU X, JIA Q, JI S, et al. Gamma-aminobutyric acid (GABA) alleviates salt damage in tomato by modulating Na⁺ uptake, the GAD gene, amino acid synthesis and reactive oxygen species metabolism[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 465.

[12] DU Y, ZHAO Q, CHEN L, et al. Effect of drought stress at reproductive stages on growth and nitrogen metabolism in soybean [J]. Agronomy, 2020, 10(2): 302.

[13] FAWOLE M O, BOULTER D. Purification and properties of glutamate dehydrogenase from *Vigna unguiculata* (L.) walp [J]. Planta, 1977, 134(2): 97-102.

[14] FERRARIO-MÉRY S, VALADIER M H, FOYER C H. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA [J]. Plant Physiology, 1998, 117(1): 293-302.

[15] GARCÍA-ROBLEDO E, CORZO A, PAPASPYROU S. A fast and direct spectrophotometric method for the sequential determination of nitrate and nitrite at low concentrations in small volumes[J]. Marine Chemistry, 2014, 162: 30-36.

[16] ENOT D P, DRAPER J. Statistical measures for validating plant genotype similarity assessments following multivariate analysis of metabolome fingerprint data [J]. Metabolomics, 2007, 3(3): 349-355.

[17] 张明才,李召虎,田晓莉,等. 植物生长调节剂 SHK-6 对大豆叶片氮素代谢的调控效应[J]. 大豆科学,2004,23(1):15-20.
ZHANG M C, LI Z H, TIAN X L, et al. Effect of plant growth regulator SHK-6 on nitrogen metabolism of soybean leaf [J]. Soybean Science, 2004, 23(1): 15-20.

[18] SUN J, JIN L, LI R, et al. Effects of different forms and proportions of nitrogen on the growth, photosynthetic characteristics, and carbon and nitrogen metabolism in tomato[J]. Plants, 2023, 12(24): 4175.

[19] 徐伟,刘生,游翔,等. 过表达 *GmATG8c* 基因提高大豆的低氮耐受性和产量[J]. 植物生理学报, 2017, 53(2): 241-247.
XU W, LIU S, YOU X, et al. Overexpression of *GmATG8c* gene enhances tolerance to low nitrogen and increases yield in soybean [J]. China Industrial Economics, 2017, 53(2): 241-247.

[20] 王华美. 不同氮水平下外源褪黑素对大豆生长及氮同化能力的影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2021.
WANG H M. The effect of exogenous melatonin on soybean growth and nitrogen assimilation ability under different nitrogen levels [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural Reclamation University, 2021.)

[21] GÁLVEZ S, LANCIEN M, HODGES M. Are isocitrate dehydrogenases and 2-oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis? [J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(12): 484-490.

[22] 崔德杰,高静,宋宏伟. 施用硅钾肥对冬小麦抗旱性的影响[J]. 土壤肥料, 2000(4): 27-29.
CUI D J, GAO J, SONG H W. Influence of application silicon-potassium on drought resistant of winter wheat [J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2000(4): 27-29.

[23] YIN H, YANG F, HE X, et al. Advances in the functional study of glutamine synthetase in plant abiotic stress tolerance response [J]. The Crop Journal, 2022, 10(4): 917-923.

[24] 山仑,张岁歧. 氮素营养对春小麦抗旱适应性及水分利用的影响[J]. 水土保持研究, 1995(1): 31-35, 55.
SHAN L, ZHANG S Q. Effects of nitrogen nutrition on drought resistance adaptability and water use of spring wheat[J]. Research of Soil and Water Conservation, 1995(1): 31-35, 55.

[25] CREN M, HIREL B. Glutamine synthetase in higher plants regulation of gene and protein expression from the organ to the cell[J]. Plant and Cell Physiology, 1999, 40(12): 1187-1193.

[26] 康俊梅,杨青川,樊变成. 干旱对苜蓿叶片可溶性蛋白的影响[J]. 草地学报, 2005, 13(3): 199-202.
KANG J M, YANG Q C, FAN F C. Effects of drought stress on induced protein in the different drought resistance alfalfa leaf[J]. Acta Agrestia Sinica, 2005, 13(3): 199-202.

协 办 单 位

中国作物学会大豆专业委员会
东北农业大学大豆研究所
吉林省农业科学院大豆研究所
南京农业大学大豆研究所
辽宁省农业科学院作物研究所
河北省农林科学院粮油作物研究所