

子叶供氮对不同基因型大豆种子组分的影响

周瑞莲¹, 赵哈林², 杨树德¹, Westgate E Mark³

(¹鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025, 中国; ²中国科学院兰州分院寒区旱区工程研究所, 兰州 730000, 中国;

³美国衣阿华州立大学农学系, Ames, IA 50010, USA)

摘要: 【目的】本研究通过种子快速生长期对 3 个不同基因型大豆 (Evans-低蛋白品种; PI132.217-高蛋白稳定品种; Proto-高蛋白品种) 供氮以了解供氮是否能提高种子蛋白质含量并改变种子组分, 为大豆合理施氮和育种提供参考。【方法】采用液体组培法, 即在植株开花后第 18 天, 采集体积相同的种子, 将子叶培养在含氮量不同的营养液中 (0、37、75 和 150 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺)。在植株开花后的第 24、30、36 和 42 天以及在液体组培的第 6、12、18 和 24 天, 分别收集种子和子叶测定干重 (DW) 和种子组分。【结果】供氮条件下种子鲜重 (FW) 和干重的积累速率明显比在植株上快。与植株上种子相比, Evans 和 Proto 在供给 37 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺时种子生长迅速, 蛋白质-N 积累量较高; 供氮量超过 75 mmol·L⁻¹ 种子中积累较多的非蛋白-N, 脂肪积累量下降。PI132.217 在供氮条件下种子生长速率和蛋白质含量均未增加, 供氮量超过 37 mmol·L⁻¹ 种子脂肪和淀粉含量下降。3 个基因型大豆植株供氮能力存在差异, PI132.217 植株供氮能力较高 (约 40 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺), 而 Evans 和 Proto 植株供氮力较低 (约 20 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺), 所以种子生长和蛋白质积累对供氮反应敏感。【结论】由于大豆植株供氮量不足, 所以供氮可明显使低蛋白质品种种子蛋白质含量提高, 但过量供氮可能因种子细胞中 C 源不足和 N 利用率低而限制种子生长和蛋白质积累。不同基因型品种在供氮量和氮利用率上存在遗传差异, 通过遗传育种进行基因改良, 提高种子的供氮能力和氮代谢能力可能是提高大豆种子蛋白质含量的重要途径。

关键词: 基因型; 种子组分; 氨基氮供氮; 组培; 大豆

Response of Seed Composition of Soybean Genotypes to Over-Supplying Amino N

ZHOU Rui-lian¹, ZHAO Ha-lin², YANG Shu-de¹, Westgate E Mark³

(¹College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, Shandong, China; ²Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Science, Lanzhou 730000, China; ³Agronomy Dept, Iowa State University, Ames, IA 50010, USA)

Abstract: 【Objective】 This study was to test whether amino-N supply during rapid seed filling could stimulate seed protein accumulation without a negative impact on the accumulation of other valuable seed components. 【Method】 The seeds of three genotypes (Evans, PI132.217, and Proto) with various seeds protein contents were grown under optimal conditions in a growth chamber until 18 days after flowering. Then the seeds collected from plant in the middle node of plant, the cotyledons were cultured in liquid medium with different concentrations of glutamine (0, 37, 75, 150 mmol·L⁻¹). The seed and cotyledon were harvested respectively in the day after flower (DAF) of 24, 30, 36 and 42 *in vivo* and 6 d, 12 d, 18 d and 24 d *in vitro*. 【Result】 The accumulated rate of cotyledon FW and DW *in vitro* was more rapidly than those in plant. Under supplying amino-N at 37 mmol·L⁻¹ or over, Evans and Proto cotyledons grew more rapidly and accumulated more protein N. At amino-N concentration above 75 mmol·L⁻¹, Evans and Proto accumulated more non-protein-N, decreased oil accumulation. But there was no response to supplying amino-N in PI132.217 cotyledons. While supplying amino N at 37 mmol·L⁻¹ glutamine decreased oil and starch accumulation. There

收稿日期: 2007-12-25; 接受日期: 2008-03-05

基金项目: 鲁东大学校基金, 中科院方向性项目 (KZCX2-YW-431)

作者简介: 周瑞莲 (1958-), 女, 河南济源人, 教授, 博士, 研究方向为牧草抗逆生理, 作物生理, 植物抗逆分子生态, 极端环境植物生理生态。
Tel: 0535-6654098; E-mail: zhourl@hotmail.com

was a difference in supplying N for seed development in planta among three genetic lines of soybean. In planta, Evans and Proto can not provide seeds with demanded N, they were very sensitive to supplying N. But PI132.217 can get enough demanded N from planta, it was not response to supplying N. 【Conclusion】 Increasing N supply from the plant could lead to a modest increase in seed protein content in low protein genotypes. Then, over supplying N will negatively impact on metabolism of available C into oil and starch. Because there is a genetic difference in N-supplying and N utilization in genetic lines of soybean, genetic breeding may be a good way for improving N-supplying and ability of N metabolism to enhance protein content of seed.

Key words: Genotypes; Seed composition; Amino-N supply; Tissue culture; Soybean

0 引言

【研究意义】大豆是现代人类健康生活中高品质食用蛋白和食用油的来源之一。大豆中蛋白质和脂肪含量决定大豆种子的市场价格。因此, 培育高蛋白质和高脂肪含量的大豆将有助于满足市场和现代人类生活的需求^[1,2]。一些研究表明, 种子蛋白质含量与种子产量和脂肪积累呈负相关^[3-5]。由于目前对大豆种子组分调控生理机理尚欠了解, 使得用常规育种法培育高产高蛋白大豆品种的工作举步维艰^[6,7]。因此, 揭示大豆种子组分的调控机理和供氮在调节种子组分中的作用以及在未来制定新的大豆育种策略上具有重要意义。【前人研究进展】Sinclair 等^[8]曾经提出假设: 发育过程中大豆种子需氮量可能超过植株的供给量。一些研究也证明高效氮固定与种子高蛋白含量相关^[7,9]。这些研究表明给“一般”和“中等”蛋白质含量的大豆品种种子供给 30 mmol·L⁻¹ NH₄NO₃, 可使种子蛋白质含量分别提高 28% 和 15%。在种子组分与供氮关系研究中, 液体组培因可人为控制供氮量而成为研究种子蛋白质含量与供氮和碳量关系的有效方法^[10,11]。Pipolo 等^[11]报道, 供氮浓度从 20 mmol·L⁻¹ 到 80 mmol·L⁻¹ 可使干重 (DW) 积累速率从每天积累 7.2 g 提高到 8.3 g, 蛋白质含量从 294 mg·g⁻¹ DW 提高到 445 mg·g⁻¹ DW。Hayati 等^[10]的研究也指出: 即使祛除了植株对氮同化力的影响, 不同基因型品种在蛋白质积累量上也存在差异。影响大豆种子品质和价值的另外一个因子是其在发育晚期种子中积累的一些寡聚糖, 如蔗糖、棉子糖和水苏糖^[12-14]。棉子糖和水苏糖可引起鼓胀病是对动物有害的成分, 它的积累与脂肪积累呈正相关, 与蛋白质积累呈负相关^[14]。【本研究切入点】尽管这些研究结果表明, 供氮可改变大豆种子组分, 但人们仍不清楚限制植株大豆种子蛋白质和脂肪积累的原因是来自植株的供氮能力还是大豆种子本身的氮利用率, 以及供氮是否可提高寡聚糖含量, 降低大豆食用价值。【拟解决的关键问题】本研究拟通过

液体组培法控制供氮量了解供氮对 3 个基因型大豆种子组分的影响。通过比较在相同控制环境条件下, 液体组培中子叶和植株上种子的生长和种子组分, 了解植株的供氮能力和大豆种子本身的氮利用率。

1 材料与方法

1.1 植物材料的培养

研究于 2002~2004 年在美国衣阿华州立大学农学系进行。3 个供试大豆品种 (*Glycine max* (L.) Merrill.) 分别是: Evans-低蛋白品种 (蛋白质含量 37%)、PI132.217-高蛋白稳定型品种 (蛋白质含量 42%)、Proto-高蛋白品种 (蛋白质含量 42%)。将供试品种种植在装有土壤 (包含有蛭石, 石灰石和少量硫酸铁) 的桶里 (20-L)。每桶 2 株, 每个基因型 5 桶, 每个生长箱 15 桶。3 个生长箱的昼夜温度均设定为 27°C/20°C, 14 h 光照, 光强度为 650 μmol·m⁻²·s⁻¹。每星期施肥 1 次 Peters 专业肥料 (W.R.Grace & Co., Fogelsville, PA), 施肥量为 0.4 g/桶, 每天浇水。

1.2 标记豆荚

在植株生长的早期祛除侧枝并标记主茎上第 4~6 节上第 1 朵花, 开花后第 18 天 (此时种子大约 5 mm 长), 将这些节上大小相同的豆荚再进行标记以确保不同时期所取的种子处于相同发育期。开花后第 18 天一次性采收大量被标记的豆荚用于组培, 剩余标记的豆荚则仍留在植株上继续生长, 将与组培的子叶同步每隔 6 d 采收 1 次种子 (18、24、30、36、42 d, 成熟), 测定种子 FW 和 DW 及种子组分。

1.3 植株上种子的收集方法

每次随机从植株主茎上采收标记的豆荚, 约 20 个, 然后从每个豆荚中取一粒种子 (共 20 粒) 用于 FW, DW 分析, 其余的种子立即用液氮固定, -80 °C 冷藏用于种子组分分析。分析时去除种皮, 子叶用冻干机冻干, 研磨后用于脂肪、蛋白质、淀粉和寡聚糖分析。

1.4 组培条件

按 Obendorf^[13]报道的方法配制液体组培营养液。在超净工作台上将开花后 18 d 收集的豆荚立即用 20% 次氯酸钠杀菌 15 min，再用 70% 乙醇浸泡 20 min，然后用重蒸水冲洗 3 遍。用消毒的镊子将种子从豆荚中取出，去除种皮。每个种子中一片子叶用于液体组培，放到含有 20 ml 营养液的 125 ml 的三角瓶中，每瓶放 4 片子叶；另一片子叶用于测定 FW，DW。三角瓶放在生长箱内摇床上，速度为 100 r/min，箱内光照强度为 $650 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ，光照时间为 14 h，温度为 $27^\circ\text{C}/20^\circ\text{C}$ 。每 3 d 更换 1 次营养液，去除污染的样品。

1.5 组培子叶的收获

分别在组培生长的第 6、12、18、24 天（相当于在植物上开花后生长的第 24、30、36 和 42 天）收获子叶。每次将不同供氮水平处理的 5 瓶中随机抽取一瓶用于 FW 和 DW 测定分析，其余 4 瓶中的子叶用水冲洗干净后，立刻用液氮保存，然后用冻干机将其冻干，研磨后样品用于脂肪、蛋白质、淀粉和寡聚糖分析。

1.6 脂肪、蛋白质、淀粉和糖分的测定

取 100 mg 研磨的大豆样品用乙烷抽提法测定脂肪含量。用 TCA ($120 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 将脱脂样品中蛋白质氮和非蛋白质氮分开，然后用微量凯氏定氮法测定含氮量。取 25 mg 脱脂样品用酶解法分析葡萄糖含量^[15]，

乘以 0.9 为淀粉含量。用薄层层析法分析蔗糖、棉子糖、水苏糖含量，用 85 : 25 : 50 : 70 (v/v) $\text{CH}_3\text{CN} : \text{EtOAc} : 1\text{-PrOH} : \text{H}_2\text{O}$ 展层剂展开^[16]。

2 结果与分析

2.1 供氮与子叶生长

无供氮条件下子叶生长很慢，FW 和 DW 积累量最低（图 1）。随供氮 Evans 和 Proto 子叶生长加速，FW 和 DW 积累量超过同生育期植株上种子；在供给 $37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺时子叶 FW 达到最高；在供给 $75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺时 DW 获得最大；在高于 $75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 供氮下 3 个品种的子叶生长速率不再增加。研究显示供氮可明显加速种子的生长和干物质积累，这一结果与早期的一些研究一致^[10,11,17-19]。但是不同品种获得最高 FW 的需氮量和对供氮反应的敏感性不同。PI132.217 需要 $75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺供给种子，FW 达到最大。低蛋白质品种 Evans 对供氮反应极为敏感，高蛋白质品种 Proto 相对较迟缓，蛋白质稳定品种 PI132.217 在供氮条件下子叶生长速率和植株上种子相同。例如，在 $37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺组培中生长 24 d 的子叶与植株上处于相同生育期的种子相比（均生长 42 d），Evans 子叶生长量比植株上的种子高出

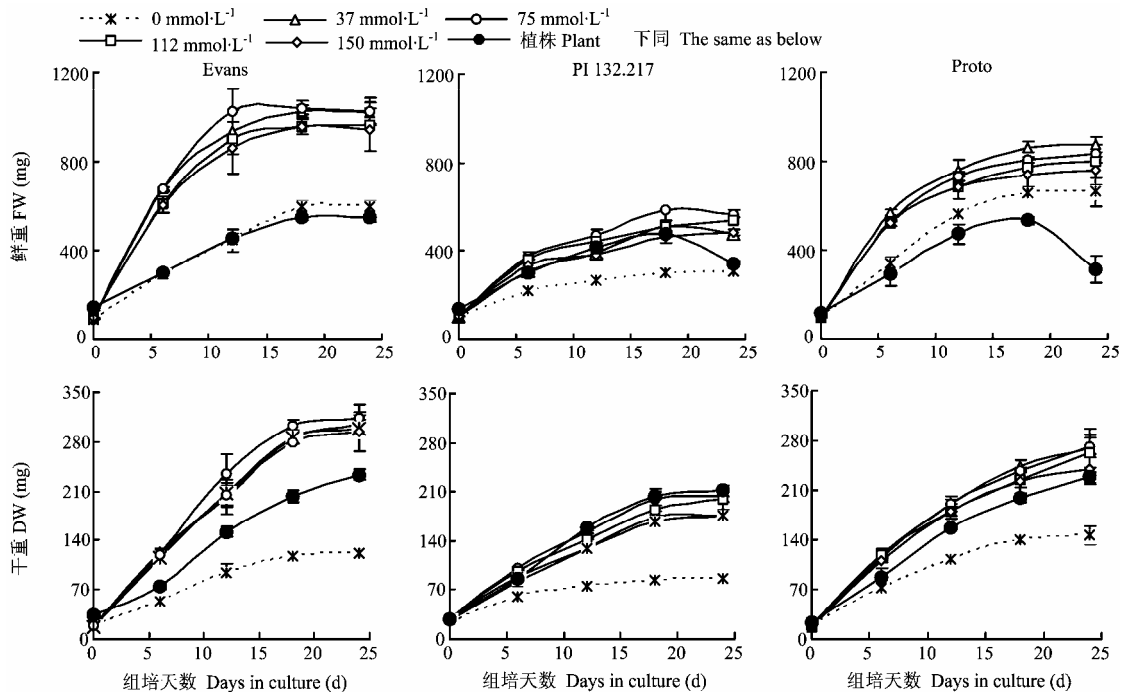


图 1 不同浓度氨基态氮供应条件下 3 个基因型大豆子叶发育过程中 FW 和 DW 变化

Fig. 1 Changes in embryo fresh weight (FW), dry weight (DW) in genotype soybeans during development in planta and *in vitro*

102%, Proto 高出 62%, 在供氮 $75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺, PI132.217 仅高出 6%。

2.2 供氮与种子蛋白质-N 和非蛋白-N 的积累

本研究测定了供氮条件下种子中蛋白质-N 和非蛋白-N 含量, 以期了解子叶吸收和代谢氮的能力。为了能清晰表述出供氮对种子生长和对其蛋白质积累的不同作用, 不同供氮处理下种子蛋白质含量采用两种表示方法, 即百分比含量和单个子叶中蛋白质含量。百分比含量可以表述出供氮与种子氮同化的关系, 单个子叶中蛋白质含量可以揭示种子蛋白质积累和种子生长的关系。结果表明在无供氮条件下子叶中无蛋白质积累, 随着组培供氮水平的提高子叶蛋白质百分比含量增加(图 2)。Evans 和 Proto 在供给 $37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺时子叶蛋白质百分比含量高于植株上种子蛋白质含量。当供氮水平超过 $75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 则子叶蛋白质百分比含量不再提高。不同基因型品种蛋白质含量对供氮反应不同, 植株上种子蛋白质百分比含量比 Proto (高蛋白质品种) 低的 Evans (低蛋白质品种) 在供给 $37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺时, 其蛋白质百分比含量明显提高并达到或超过了 Proto。这表明低蛋白质品种 Evans 对高浓度供氮反应要比高蛋白质品种 Proto 敏感。而蛋白质稳定型品种 PI 132.217 在任何供氮水平下, 子叶蛋白质百分比含量均没有明显变化。该结果表明在

种子发育期给低蛋白质品种提供过量的氮即可提高它们的种子蛋白质含量, 使它们进入高蛋白质品系中。

随着供氮浓度的进一步提高, 子叶蛋白质百分比含量不再增加, 而单个子叶蛋白质含量仍在提高, 其积累模式和 DW 积累模式相同(图 2, 图 3)。这表明单个种子蛋白质积累的提高与种子生长速率增加有关。也许供氮的直接作用可能是促进细胞体积的增加和碳积累为蛋白质合成创造条件。

随着发育植株上种子非蛋白-N 含量下降, 在接近成熟时含量最低(图 3), 种子中非蛋白-N 含量大约相当于供给 $37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺时子叶中非蛋白-N 含量。而随着供氮和供氮浓度的提高, 子叶中非蛋白-N 百分比含量大幅度增加(此时蛋白质百分比含量不再提高)。例如分别在 75 、 112 和 $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺中生长 42 d (组培 24 d) 的子叶中非蛋白-N 百分比含量分别比同期植株上种子高出约 4 倍、9 倍和 12 倍。同样, 单个子叶中非蛋白-N 总含量也随着供氮浓度提高而大幅度增加, 并大大超过了植株上种子的非蛋白-N 含量(图 3)。值得注意的是在供氮条件下子叶蛋白质百分比含量和单个子叶蛋白质含量相对稳定不变的 PI 132.217, 却表现出和其它两个基因型一样大量积累氮。这一结果表明, 不同基因型大豆种子均具有很强的吸收和储存氮的能力。

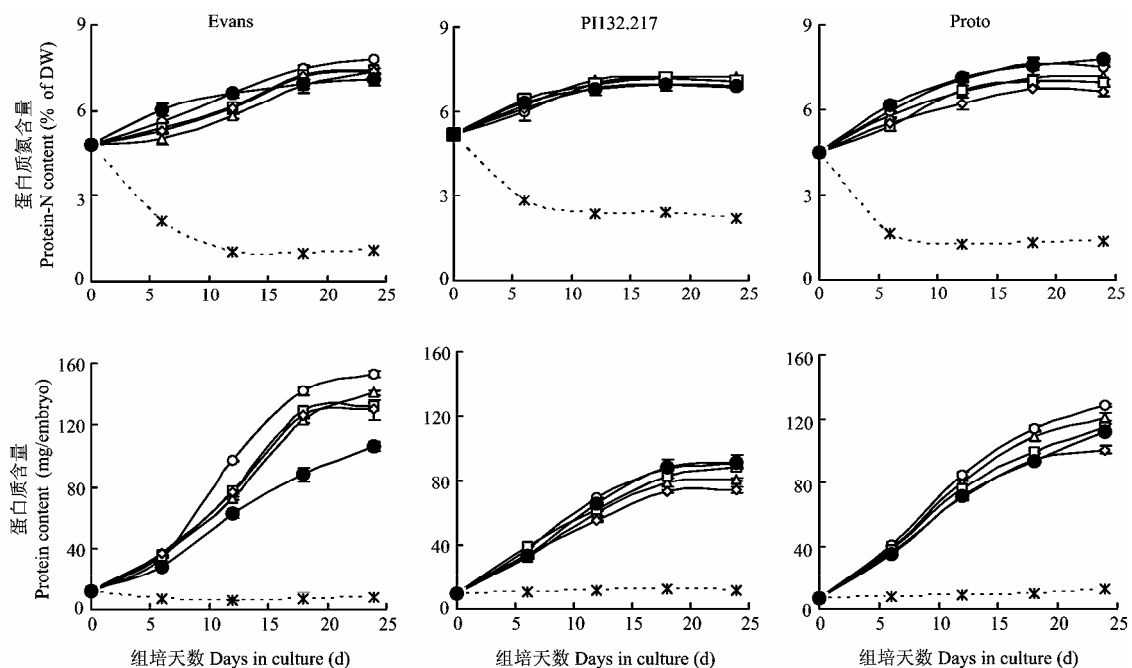


图 2 不同浓度氨基氮供应条件下 3 个基因型大豆子叶蛋白质含量的变化

Fig. 2 Changes in protein content in genotype soybeans under supplying with glutamine in vitro and no N supplying in planta

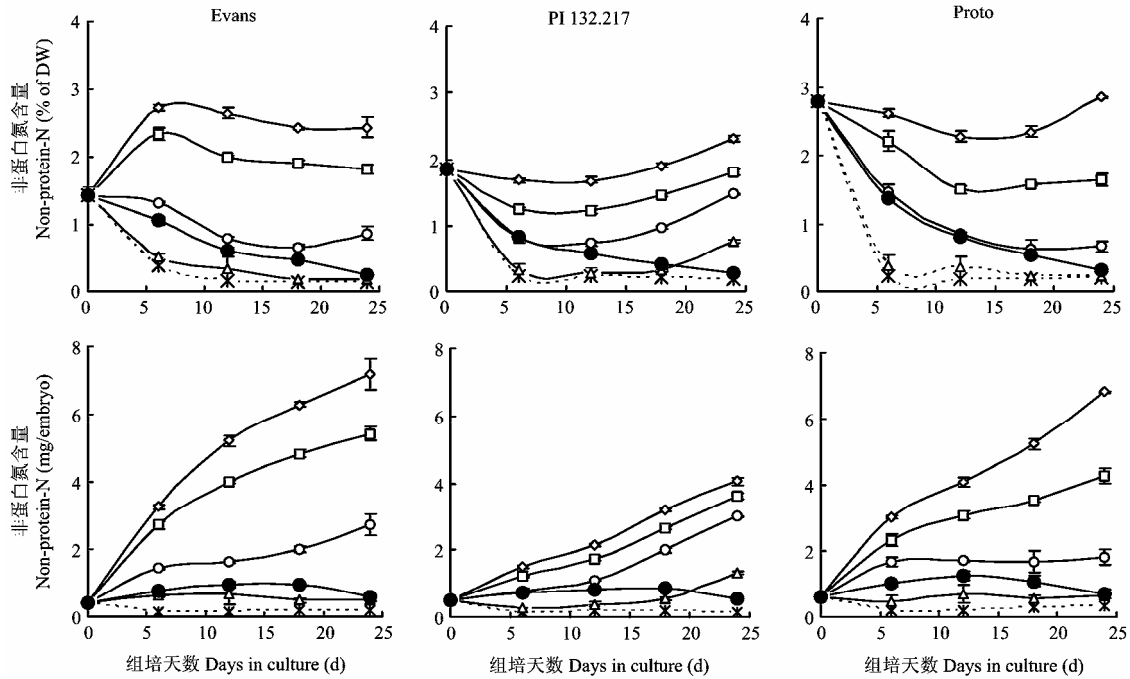


图 3 不同浓度氨基氮供应条件下 3 个基因型大豆子叶非蛋白氮含量的变化

Fig. 3 Changes in embryo of protein content in genotype soybeans under supplying with glutamine *in vitro* and no N supplying in planta

2.3 供氮与种子脂肪积累

不同基因型大豆种子脂肪积累模式不同。低蛋白品种 Evans 随种子生长脂肪百分比含量增加，成熟时含量最高（图 4-A）。相反，高蛋白质品种 Proto 和 PI132.217 在开花 24~30 d（相当于组培 6~12 d）之前，种子脂肪百分比含量达到最高，然后趋于稳定。在供氮条件下大豆种子脂肪积累模式发生改变。在无供氮时子叶脂肪百分比含量较高，当供氮浓度超过 $75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，随着子叶生长脂肪百分比含量不再增加而趋于下降，其下降幅度随着供氮浓度的增加而加大。Hayati^[10]也发现在低浓度供氮组培中生长 14~21 d 的子叶中脂肪含量最高。研究显示随着供氮浓度的提高，种子中蛋白质代谢加速，碳的需要量增大，使大量碳参与蛋白质的合成而抑制了脂肪的合成。

植株上随着种子生长种子中脂肪积累量不断增加（图 4-B）。在无供氮条件下，子叶脂肪百分比含量较高，但单个子叶中脂肪积累量较低。生长在 $37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺中的 Evans 和 Proto 单个子叶脂肪含量呈上升趋势，总积累量最高（mg/子叶），几乎和植株上种子的相同。当供氮浓度超过 $37 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时子叶脂肪积累量急剧下降，浓度超过 $112 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，Proto 子叶中脂肪的积累量甚至低于无供氮的并且不再积累脂

肪。这表明单个种子脂肪含量的增加依赖于种子的快速生长，当供氮量不足时虽然蛋白质代谢受抑制，淀粉中的碳可用于脂肪合成，但因种子生长速率低下生产的碳素有限而抑制种子脂肪的积累，因此一定量的供氮可通过促进种子生长而增加种子脂肪积累量。

2.4 供氮与种子淀粉的消耗

随发育植株上种子淀粉百分比含量呈下降趋势（图 5）。在供氮条件下这种下降速度随供氮水平的提高而加快并下降时间提前。供氮加速子叶淀粉百分比含量快速下降反映了代谢碳的消耗，说明供氮提高了细胞碳代谢。过量供氮条件下子叶 DW 不增加的部分原因可能是细胞中碳量不足所致。这表明子叶细胞中的碳和氮平衡对大豆种子获得最大的 DW 是十分重要的。

植株上种子随着发育淀粉含量增加并在开花后 36 d (Evans 和 PI 132.217) 或 30 d (Proto) 达到最高，然后急剧下降并达到极低水平。淀粉含量的下降表明种子碳代谢的加速和其他物质合成对碳的消耗。随着供氮浓度的提高，子叶中淀粉下降提前，积累量减少，同时子叶中蛋白质含量却快速增高（图 2）。这表明供氮加速了细胞内的碳代谢并驱使更多的碳参与了蛋白质合成。

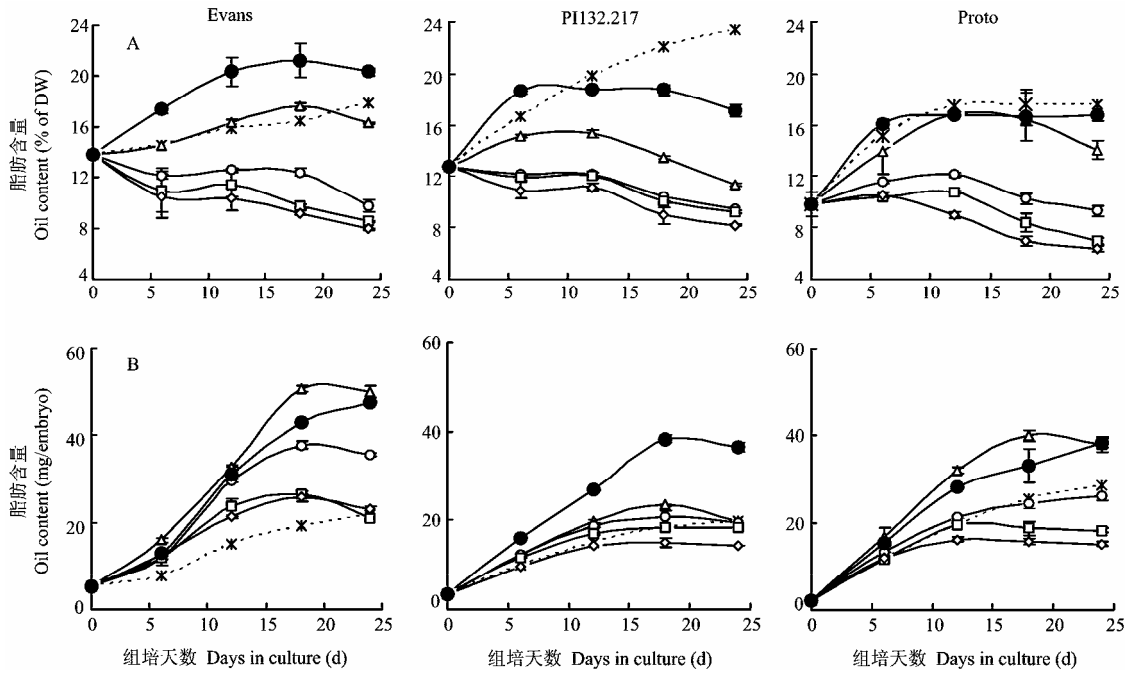


图 4 不同浓度氨基氮供应条件下不同基因型大豆子叶脂肪含量的变化

Fig. 4 Changes in embryo of oil content in genotype soybeans under supplying with glutamine *in vitro* and no N supplying in planta

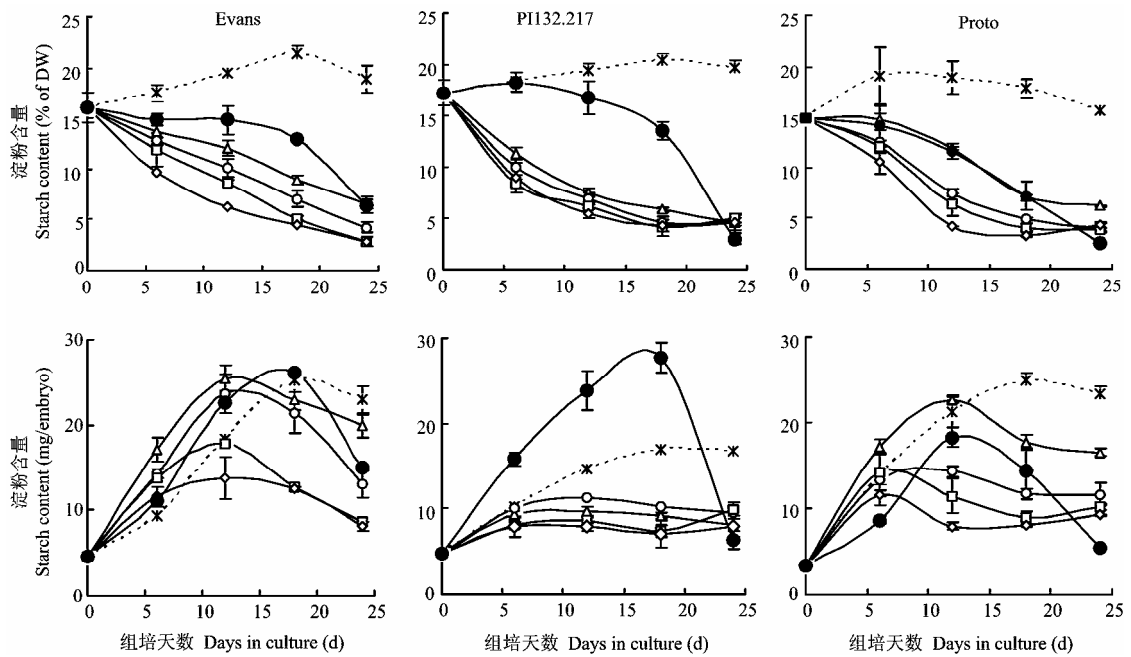


图 5 不同浓度氨基氮供应条件下不同基因型大豆子叶淀粉含量的变化

Fig. 5 Changes in embryo of starch content in genotype soybeans under supplying with glutamine *in vitro* and no N supplying in planta

2.5 供氮与寡聚糖的积累

成熟种子中约有 99% 的糖是蔗糖、棉籽糖和水苏糖^[13,20,21]。本研究中植株上种子和供氮生长 18 d (相当于在植株开花 36 d) 的子叶, 其蔗糖含量比其它两种糖含量高很多(表)。无供氮时子叶只积累蔗糖, 很少有寡聚糖积累。在不同浓度供氮条件下子叶中蔗

糖含量基本相同, 而棉籽糖和水苏糖则分别在 37 mmol·L⁻¹ 和 75 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺时含量达到最高。供氮条件下 3 个品种在寡聚糖积累上表现不同, 低蛋白质品种 Evans 的寡聚糖积累对供氮反应比高蛋白质品种 Proto 和 PI132.217 要敏感。

表 不同浓度氨基氮供应条件下生长 18 d 不同基因型大豆子叶寡聚糖含量的变化

Table Soluble sugar content of cotyledons cultured *in vitro* and in planta 18 DAF cotyledons were cultured for 18 days at different glutamine concentrations

| 项目 Item | 供氮浓度 N concentration (mmol·L ⁻¹) | Evans (%) | 基因型 Genetype PI 132.217 (%) | Proto (%) |
|---------------|---|--------------|--------------------------------|--------------|
| 蔗糖 Sucrose | 植株 Plant | 2.13±0.12 | 4.39±0.07 | 3.36±0.24 |
| | 0 | 7.46±0.32 | 4.80±0.25 | 7.00±0.34 |
| | 37 | 3.34±0.21 | 3.12±0.15 | 3.21±0.23 |
| | 75 | 3.22±0.23 | 3.35±0.19 | 2.87±0.14 |
| | 112 | 3.43±0.14 | 3.30±0.25 | 2.90±0.12 |
| | 150 | 3.14±0.18 | 3.18±0.23 | 3.00±0.26 |
| 棉籽糖 Raffinose | 植株 Plant | 0.15±0.08 | 0.99±0.05 | 1.13±0.15 |
| | 0 | 0.00±0.00 | 0.65±0.07 | 0.49±0.01 |
| | 37 | 0.46±0.03 | 1.22±0.12 | 0.89±0.12 |
| | 75 | 1.15±0.12 | 1.38±0.13 | 1.11±0.09 |
| | 112 | 1.46±0.08 | 0.98±0.04 | 1.10±0.12 |
| | 150 | 1.45±0.11 | 0.98±0.02 | 1.07±0.06 |
| 水苏糖 Stachyose | 植株 Plant | 1.31±0.14 | 2.33±0.05 | 2.40±0.06 |
| | 0 | 0.00±0.00 | 2.06±0.12 | 0.01±0.00 |
| | 37 | 1.67±0.15 | 2.66±0.27 | 2.45±0.16 |
| | 75 | 3.39±0.27 | 2.32±0.07 | 3.00±0.06 |
| | 112 | 3.16±0.09 | 1.74±0.11 | 2.80±0.03 |
| | 150 | 2.39±0.15 | 1.40±0.09 | 2.72±0.09 |

3 讨论

Hayati 等^[10]曾假设大豆种子在蛋白质积累上的遗传差异在组培中会表现出来。为了清楚地了解供氮促进种子快速生长和蛋白质积累的原因本文以供氮浓度为横坐标, 不同供氮水平下子叶 DW 或蛋白质含量为纵坐标做曲线, 再在该曲线上找到植株上种子最大 DW 和蛋白质含量所对应的供氮浓度, 并假设为植株的供氮量。而供氮条件下子叶获得最大 DW 和蛋白质含量所对应的供氮浓度为种子的需氮量。结果发现, Evans 和 Proto 植株的供氮量约为 20~25 mmol·L⁻¹ 和 25~30 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺, 需氮量为 40 mmol·L⁻¹ 谷氨酰胺。Evans 植株供氮量比其需氮量低 50%~30%, Proto 的低 37%~20%。为此供氮弥补了植株供氮不足, 所以 Evans 和 Proto 在供氮条件下, 种子生长迅速, 蛋白质积累增多。尤其是低蛋白品种 Evans 在供氮条件下, 种子蛋白质含量几乎超过高蛋白质品种。

PI132.217 植株的供氮量(75 mmol·L⁻¹)与其需氮量(75 mmol·L⁻¹)相似, 植株的供氮能力能满足其最高生长和蛋白质合成的需要, 所以对供氮反应不敏感。Nakasathien^[7]也曾发现低蛋白质品系的大豆在供氮条件下, 蛋白质含量增加并达到高蛋白质品系的蛋白质含量。并认为低蛋白质品种大豆在氮量充足条件下体内有合成较多蛋白质的生化潜力。这说明植株供氮量的不足可能是限制低蛋白大豆品种种子生长和蛋白质合成的主要原因。而不同基因型大豆植株供氮能力可能是受遗传基因所控制并与其种子蛋白质积累量相关。另外, 供氮条件下 3 个基因型大豆子叶均无限条地吸收和积累氮(图 3), 而蛋白质含量没有明显增加。这说明大豆吸收氮能力很强, 氮利用率较低。通过育种提高植株供氮水平和种子氮代谢能力及氮利用率, 不仅可提高大豆种子产量和蛋白质含量, 而且可提高农业施肥功效。该结果还表明在生产实践中摸清不同大豆品种需氮量和供氮能力, 根据品种需氮量合

理施肥才可达到施肥增产的目的。

研究表明, 无氮供应条件下种子中脂肪和淀粉(%)含量较高(图4, 图5), 蛋白质(图2)和棉籽糖和水苏糖(%)含量非常低(表1)。在供氮条件下, 种子中淀粉含量(%)随生长而下降, 且下降幅度随供氮浓度的增加而增大, 此时, 种子中脂肪含量(%)具有相同的下降趋势, 两者成正相关; 种子中蛋白质含量却一直伴随着淀粉含量快速下降而增加, 两者呈负相关。这表明供氮调控着种子细胞内的碳分配。随着种子中大量氮素的积累, 细胞内碳素趋向于蛋白质的合成, 碳量的进一步不足(图5)可能引起部分脂肪中碳素释放引起脂肪含量下降(图4)。同时供氮条件下棉籽糖和水苏糖含量增加(Evans)(表1)。可见供氮明显改变种子组分使种子蛋白质和寡聚糖含量增加, 脂肪含量下降。过量供氮种子生长和蛋白质积累受抑, 其原因可能有两个: 一是供氮加速氮代谢使大量碳参与了蛋白质的合成使细胞中碳素不足, 二是大量吸收积累的氮引起的氮毒害。因此, 适量供氮调节细胞中碳和氮平衡对提高大豆生长速率和蛋白质含量均很重要。

4 结 论

3个基因型大豆植株供氮能力存在差异, Evans(低蛋白品种)和Proto(高蛋白品种)植株供氮力较低, 所以种子生长和蛋白质积累对供氮反应敏感, PI132.217的供氮力较强, 所以对供氮反应不敏感。供氮条件下, 伴随淀粉含量快速下降, 脂肪含量(%)下降, 蛋白质含量(%)上升, 棉籽糖和水苏糖含量增加。通过一定量的施氮可以弥补植株供氮量的不足改善种子组分。通过遗传育种进行基因改良提高种子的供氮能力和氮代谢能力可能是提高大豆种子蛋白质含量的重要途径。

References

- [1] Susan T. Investing checkoff dollars. *Soybean Review*, 2002, 3(5): 20-21.
- [2] 冷建田, 陈应志, 王 英, 吴存祥. 中国不同地区大豆育成品种的特点分析及品种选育方向的探讨. *大豆科学*, 2007, 26(3): 293-299.
Leng J T, Chen Y Z, Wang Y, Wu C X. Character analysis of newly-developed soybean varieties and breeding objectives in different regions of China. *Soybean Science*, 2007, 26(3): 293-299. (in Chinese)
- [3] 刘中奇, 李志刚, 谭崑崑. 不同大豆品种籽粒体积、含水量、脂肪和蛋白质积累动态分析. *大豆科学*, 2007, 26(2): 194-197.
Liu Z Q, Li Z G, Tan W W. Dynamic analysis of accumulation of volume, water content, fat and protein of different soybean seeds. *Soybean Science*, 2007, 26(2): 194-197. (in Chinese)
- [4] 刘小冰, 王光华, 金 剑, 杨恕平, 李燕华. 大豆籽粒蛋白质与脂肪积累方式研究. *生态农业研究*, 1997, 69: 481-486.
Liu X B, Wang G G, Jing J, Yang S P, Li Y H. Accumulation patterns of grain protein and fat during reproductive development of soybean. *Acids Agroecology Journal*, 1997, 69: 481-486. (in Chinese)
- [5] 王月福, 于振文, 李尚霞, 余松烈. 施氮量对小麦籽粒蛋白质组分含量及加工品质的影响. *中国农业科学*, 2002, 35: 1071-1078.
Wang Y F, Yu Z W, Li S X, Yu S L. Effects of nitrogen application, amount on content of protein components and processing quality of wheat grain. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35: 1071-1078. (in Chinese)
- [6] Cober E R, Voldeng H D. Developing high protein, high-yield soybean population and lines. *Crop Science*, 2000, 40: 39-42.
- [7] Nakasathien S, Israel D W, Wilson R F, Kwanyuen P. Regulation of seed protein concentration in soybean by supra-optimal nitrogen supply. *Crop Science*, 2000, 40: 1277-1284.
- [8] Sinclair T R, deWit C T. Analysis of the carbon and nitrogen limitation to soybean yield. *Agronomy Journal*, 1976, 68: 319-324.
- [9] Purcell L C, King C A, Ball R A. Soybean cultivar differences in ureides and the relationship to drought tolerant nitrogen fixation and manganese nutrition. *Crop Science*, 2000, 40: 1062-1070.
- [10] Hayati R, Egli D B, Crafts-Brandner S J. Independence of nitrogen supply and seed growth in soybean: studies using an *in vitro* culture system. *Journal of Experimental Botany*, 1996, 47: 33-40.
- [11] Pipolo A E, Sinclair T R, Camara G. Protein and oil concentration of soybean seed cultured *in vitro* using nutrient solutions of differing glutamine concentration. *Annales Applied Biology*, 2004, 144: 223-227.
- [12] Horbowicz M, Obendorf R L. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols-review and survey. *Seed Science Research*, 1994, 4: 385-405.
- [13] Obendorf R L, Horbowicz M, Dickerman A M, Brenac P, Smith M E. Soluble oligosaccharides and galactosyl cyclitols in maturing soybean seeds in planta and *in vitro*. *Crop Science*, 1998, 38: 78-84.
- [14] Hymowitz T, Collins F I, Panczner J, Walker W M. Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agronomy Journal*, 1971, 64: 613-615.
- [15] Fox J D, Robyt J F. Miniaturization of three carbohydrates analyses using microsample plate reader. *Analytical Biochemistry*, 1991, 195:

- 93-96.
- [16] Yoon S H, Robyt J F. Bacillus macerans cyclomaltodextrin glucanotransferase transglycosylation reactions with different molar ratios of D-glucose and cyclomaltohexaose. *Carbohydrate Research*, 2002, 337: 2245-2254.
- [17] Hsu F C, Obendorf R L. Compositional analysis of *in vitro* matured soybean seeds. *Plant Science Letter*, 1982, 27: 129-135.
- [18] Obendorf R L, Timpo E E, Byrne M C, VanToai T, Rytko G T, Hsu F C, Anderson B G. Soya bean seed growth and maturation *in vitro* without pods. *Annals of Botany*, 1984, 53: 853-863.
- [19] Saravitz C H, Raper C D. Responses to sucrose and glutamine by soybean embryos grown *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 1995, 93: 799-805.
- [20] Lowell C A, Kuo T M. Oligosaccharide metabolism and accumulation in developing soybean seeds. *Crop Science*, 1989, 29: 459-465.
- [21] Kuo T M, Van Middlesworth J F, Wolf W J. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1988, 36: 32-36.

(责任编辑 吴晓丽, 郭银巧)