

酸性磷酸酶参与大豆子叶磷转运和利用

梁翠月, 廖红, 严小龙, 田江*

华南农业大学根系生物学研究中心, 广州 510642

摘要: 本文以磷效率不同的两个大豆品种为材料, 研究大豆幼苗期子叶酸性磷酸酶活性和同工酶谱对外源磷有效性的响应, 及其参与子叶磷高效转运和利用的过程。结果表明: 在幼苗生长前期, 子叶酸性磷酸酶活性及其同工酶谱组成变化明显, 而且不受外源磷有效性的调控; 在幼苗生长的前8天, 子叶全磷含量随着酸性磷酸酶的活性增加而显著降低, 而且磷高效大豆品种比磷低效大豆品种具有较高的酸性磷酸酶活性和植株全磷含量。以上结果说明在大豆幼苗生长前期, 由于大粒种子不仅具有较高的磷含量, 而且具有较高子叶酸性磷酸酶活性, 促进子叶有机磷的水解和转运是磷高效大豆品种适应低磷胁迫的生理机制之一。

关键词: 大豆; 子叶; 磷转运; 酸性磷酸酶; 同工酶谱

Involvement of Acid Phosphatase in Phosphorus Mobilization and Utilization in Cotyledons of Soybean (*Glycine max* L.)

LIANG Cui-Yue, LIAO Hong, YAN Xiao-Long, TIAN Jiang*

Root Biology Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.

Abstract: Acid phosphatase (APase) activity and isoforms, as well as their involvement of phosphorus (P) remobilization were investigated in the cotyledons of two soybean cultivars contrasting in P efficiency at the early stage of plant growth at two P levels. Our results showed: APase activity and isoforms in cotyledons varied significantly at the early plant growth stage, which were independent of P availability in the growth medium; phosphorus content in cotyledons was decreased with the increase of APase activity during first 8 d of plant growth. Furthermore, the P-efficient cultivar exhibited higher APase activity and total P content in plants. All the results together suggests that enhanced P remobilization from bigger seeds to the other parts of seedlings resulted from higher APase activity in cotyledons might be one of physiological mechanisms of P-efficient plant adaptation to low P conditions.

Key words: soybean; cotyledons; phosphorus remobilization; acid phosphatase; isoforms

磷是植物生长发育所必需的大量元素之一。但是, 由于磷易被土壤固定而难以被植物直接吸收和利用, 土壤有效磷的缺乏已成为限制作物生长的主要障碍因子之一(Raghothama 1999; Vance 等 2003)。为了提高对土壤潜在磷库的吸收和利用, 植物形成了一系列形态、生理和分子的适应机制。其中, 酸性磷酸酶直接参与了磷的代谢运转过程, 对植物适应低磷胁迫具有重要作用(Duff 等 1994)。酸性磷酸酶是一种能水解磷酸单酯键的水解酶类, 根据底物的特异性, 酸性磷酸酶可以进一步分为非底物特异性酶和底物特异性酶(如植酸酶)。大豆、西红柿、马铃薯、拟南芥等植物酸性磷酸酶活性在低磷条件下普遍提高(del Pozo等 1999; Bozzo 等 2002; Kaida 等 2003; Zimmermann

等 2004)。植物胞内和胞外酸性磷酸酶活性的增加对植株体内和土壤中有有机磷的利用有着重要作用。最近研究表明, 超量表达 *MtPAP1* 和 *AtPAP15* 可以分别提高转基因拟南芥和大豆对外界有机磷的利用能力(Xiao 等 2006; Wang 等 2009)。豆科作物种子中的磷主要以有机磷的形态存在, 包括植酸磷、核酸磷和磷脂等, 只有通过子叶中的特异和非特异的酸性磷酸酶水解成无机形态的磷($H_2PO_4^-$ 或 HPO_4^{2-}) 才能被作物进一步的转运和利用(Hegeman 和 Grabau 2001)。但是, 以往研究主要侧重从子叶萌

收稿 2010-10-12 修定 2010-11-03

资助 教育部博士点教师基金(20094404120022)。

* 通讯作者(E-mail: jtian@scau.edu.cn; Tel: 020-85280156)。

发到衰老过程中植酸酶对子叶中磷的利用,但对于其他的酸性磷酸酶对子叶磷的利用,尤其是子叶酸性磷酸酶同工酶谱变化的研究甚少。前期对308个大豆基因型磷效率和根形态构型田间评价结果表明具有浅根形态构型的‘BX10’大豆品种比具有深根形态构型的‘L2’大豆品种具有较高的磷效率(Zhao等2004)。因此,本文以‘BX10’和‘L2’大豆品种为材料,不仅研究幼苗生长前期子叶酸性磷酸酶活性及其同工酶谱的动态变化及其对外界磷有效性的响应,而且探讨了酸性磷酸酶参与子叶磷高效转运和利用的过程是磷高效大豆品种适应低磷胁迫的生理机制之一。

材料与方法

实验材料为磷效率差异较大的两个大豆(*Glycine max* L.)品种。其中‘BX10’为磷高效的大粒型品种(百粒重为14.9 g),‘L2’为磷低效的小粒型品种(百粒重为9.9 g)。大豆种子在3% (V/V)的 H_2O_2 中表面消毒1 min,然后在用1/4Hoagland溶液润湿的发芽纸上萌发。本试验设两个磷水平,即高磷($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和低磷($0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),温度为25 °C,黑暗培养。种子萌发6 d后,选取生长一致的小苗移入相应磷浓度的1/2Hoagland溶液中进行营养液培养。在种子萌发2、4、6、8、10和12 d分别收获大豆子叶和植株其他部分进行分析。收获植物材料在75 °C烘干到恒重后测定干重,植株全磷含量的测定参照Murphy和Riley(1962)的方法。

分别收取不同处理条件下的新鲜大豆子叶,称取0.2 g,置于预冷的研钵中,加入少量液氮研磨至粉末,然后加入预冷1.2 mL提取缓冲液($45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH 5.0)继续研磨。提取液在4 °C, $12\ 000\times g$ 的条件下,离心30 min。上清液用于可溶性蛋白含量、植酸酶活性、酸性磷酸酶活性及其同工酶的检测。酶溶液蛋白质含量以牛血清蛋白为标准蛋白质,按Bradford(1976)的方法测定。植酸酶的活性测定参照Ullah和Gibson(1998)的方法。取50 μL 上清液,加入到450 μL 含有2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 植酸钠(Sigma, 美国)的醋酸-醋酸钠缓冲液($45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4.5)中,在50 °C条件下,反应30 min,测定反应液中可溶磷含量。酸性磷

酸酶活性及其同工酶的检测参照Tian等(2003)的方法。在同工酶检测中,等蛋白量的子叶提取物(2、4和6 d的蛋白上样量约为7 μg ; 8、10和12 d的蛋白上样量约为3 μg),用薄层等电聚焦系统(Bio-Rad, 美国)进行电泳,两性电解质的pH为3~10,电泳1.5 h,电压为450 V。电泳结束后在含有Fast Black K salt (Sigma, 美国)和 β -naphthyl acid phosphate (Sigma, 美国)的溶液中染色至出现明显的酸性磷酸酶同工酶带为止。

每次实验至少重复4次,结果用SAS6.1软件进行统计分析。文中的数据是平均值 \pm SE。

实验结果

1 大豆子叶和幼苗前期的生长变化

在幼苗生长前期,大豆子叶干重不断减少,植株干重(不包括子叶)不断增加。外界磷有效性对其生长趋势没有显著的影响,但磷效率不同的供试大豆材料具有明显的差异(图1)。磷高效品种‘BX10’的子叶干重显著高于磷低效的‘L2’($P<0.05$)。

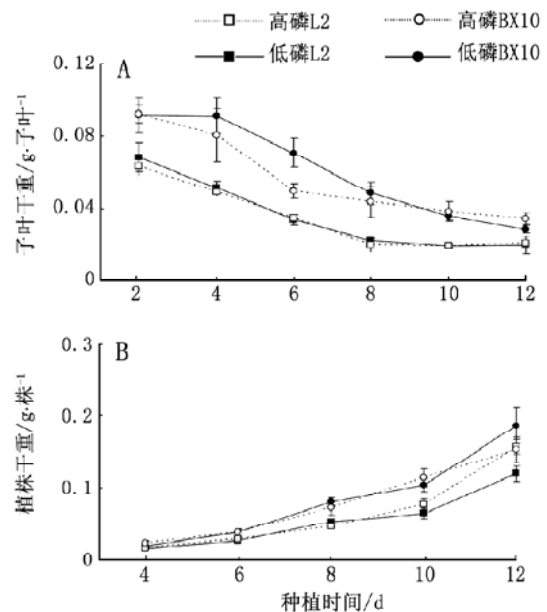


图1 外源磷对幼苗前期大豆子叶及其植株生长的影响
Fig.1 Growth of soybean cotyledons and plants affected by P availability at the early stage of plant growth

高磷L2: 磷低效品种‘L2’高磷($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养; 低磷L2: 磷低效品种‘L2’低磷($0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养; 高磷BX10: 磷高效品种‘BX10’高磷($500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养; 低磷BX10: 磷高效品种‘BX10’低磷($0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)培养, 下同。A: 子叶干重; B: 植株干重。

但是到第 12 天, 品种间的差异不显著(图 1-A)。与此相反, ‘BX10’ 和 ‘L2’ 的植株干重从第 6 天开始显著增加($P<0.05$), 到第 12 天, 植株的干重比第 4 天增加了 7 倍左右。并且从第 8 天开始, 磷高效品种 ‘BX10’ 的植株干重显著高于磷低效的 ‘L2’ (图 1-B)。

2 大豆子叶和植株全磷含量的动态变化

大豆子叶和植株全磷含量与干重变化趋势相同, 即在大豆幼苗生长前期, 子叶全磷含量不断减少, 植株全磷含量(不包括子叶)不断增加(图 2-B)。但外界磷有效性对不同时期大豆子叶(图 2-A)和植株(图 2-B)全磷含量的影响不同。在幼苗生长第 8 天, 外界磷有效性对大豆子叶和植株全磷含量的影响不显著。但是在第 8 天以后, ‘BX10’ 子叶全磷含量在高磷处理下显著增加($P<0.05$), 而 ‘L2’ 没有明显变化。说明此时高磷处理下, 磷高效品种 ‘BX10’ 根部吸收的磷有部分转运到子叶, 但是 ‘L2’ 吸收的磷没有向子叶转运(图 2-A)。第 12 天, 植株全磷含量在高、低磷处理间才表现出显著差异($P<0.05$), 说明在大豆幼苗生长前期, 植株生长所需的磷主要依靠子叶内部磷转运而来。

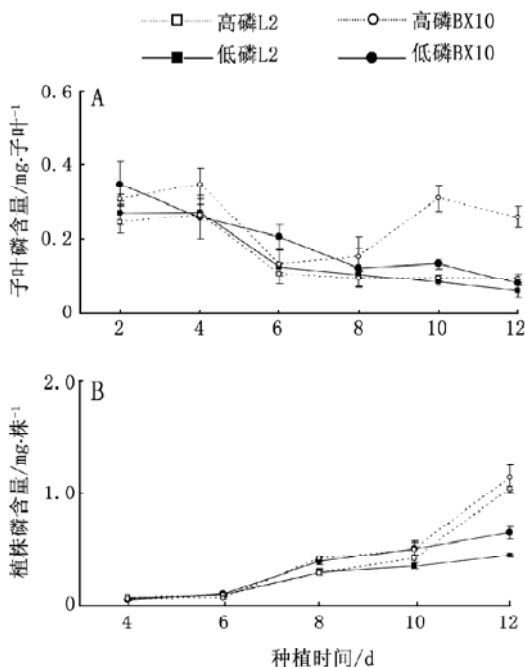


图 2 不同磷浓度对大豆子叶及其植株全磷含量的影响
Fig.2 Effects of P availability on total P content of soybean cotyledons and plants

A: 子叶磷含量; B: 植株全磷含量。

3 子叶酸性磷酸酶和植酸酶活性变化

在幼苗生长前期, 子叶酸性磷酸酶活性呈现先增加后减弱的趋势(图 3-A)。在第 6 天, 子叶酸性磷酸酶的活性达到最大值。并且 ‘BX10’ 的酸性磷酸酶活性显著高于 ‘L2’ ($P<0.05$)。随后, 酸性磷酸酶活性逐渐降低。在高低磷的处理条件下, 酸性磷酸酶的活性没有差别, 说明外界磷有效性对子叶酸性磷酸酶活性没有调控作用。这与大豆叶部酸性磷酸酶活性变化不同, 低磷处理显著提高了叶部酸性磷酸酶的活性(Tian 等 2003)。

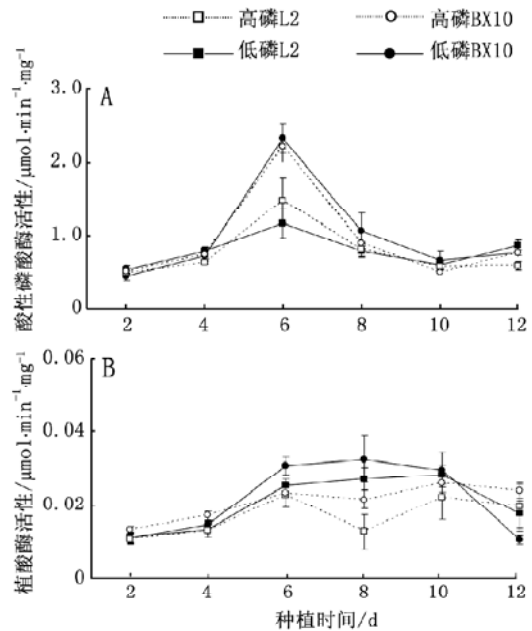


图 3 子叶酸性磷酸酶和植酸酶活性的变化

Fig.3 Dynamics of APase activity and phytase activity in soybean cotyledons

A: 酸性磷酸酶活性; B: 植酸酶活性。

与酸性磷酸酶活性变化趋势相似, 子叶植酸酶活性在第 6 天达到最大值, 然后平缓减少(图 3-B)。但是, 与酸性磷酸酶活性不同的是, 在第 8 天, 低磷胁迫显著提高了植酸酶的活性。但是, 品种间差异不明显。

4 子叶可溶性蛋白含量变化

随着大豆幼苗的生长, 子叶可溶性蛋白的含量显著降低, 而且可溶蛋白的变化趋势不受外源磷有效性的调控, 两个大豆品种间的差异也不显著(图 4)。种子萌发第 2 天时, 大豆子叶可溶性蛋白平均含量

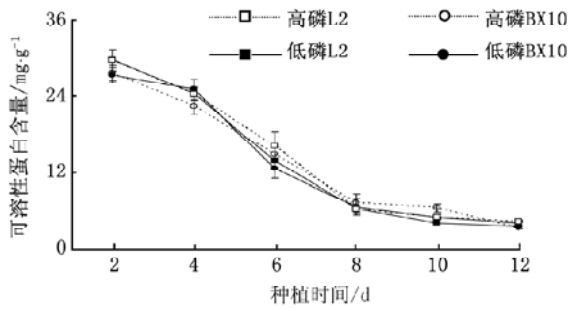


图4 子叶可溶性蛋白的变化

Fig.4 Changes of soluble protein in soybean cotyledons at different days of growth

为 $28.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 在幼苗生长第6天和第8天, 其子叶可溶性蛋白含量平均分别降低了50%和77%, 但是从第8天到第12天子叶可溶性蛋白含量的变化不显著。

5 子叶酸性磷酸酶同工酶谱的变化

利用薄层等电聚焦系统, 进一步研究子叶酸性磷酸酶同工酶谱的变化。子叶酸性磷酸酶同工酶在不同生长时间, 其表达谱具有明显的差异(图5)。在子叶生长第2天, 一共检测到2条明显的酸性磷酸酶同工酶带, 而且在第4天, 这2条酸性磷酸酶同工酶带的活性都显著加强。但是, 在第6天, 其

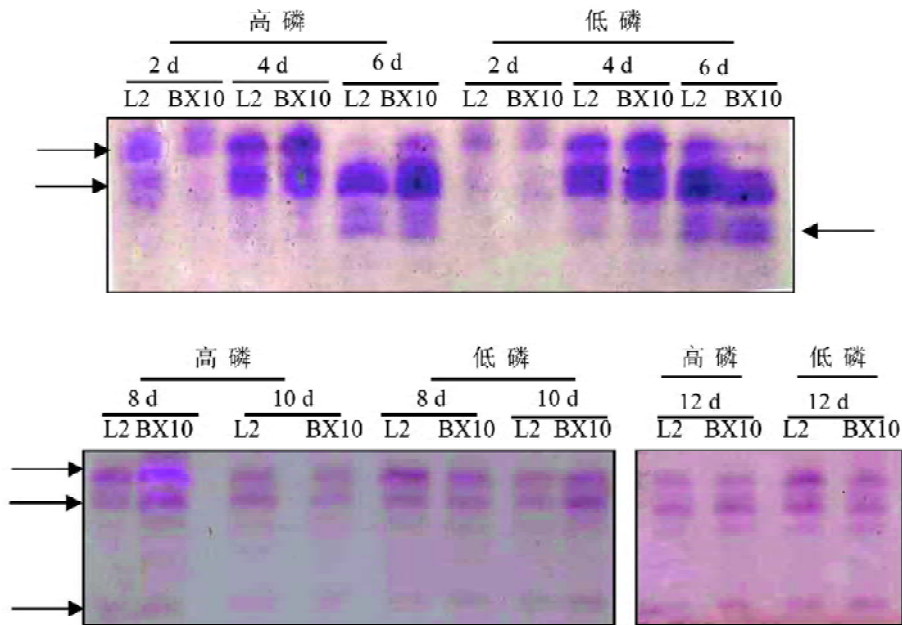


图5 大豆子叶酸性磷酸酶同工酶谱的检测

Fig.5 Detection of APase isoforms in cotyledons of soybean

中一条酸性磷酸酶同工酶带活性显著减弱, 而出现了另一条新的同工酶带。在第8、10和12天, 酸性磷酸酶的同工酶谱变化不明显, 至少检测到3条酸性磷酸酶同工酶带, 但活性均较弱。

讨 论

在种子萌发过程中, 种子储藏物质(如糖类、蛋白质、植酸等)在一系列水解酶的催化作用下形成的营养物质为幼苗的生长提供了必需的物质基础。因此, 种子中储藏物质的数量、种类及其种

子水解这些营养储藏物质的能力, 对植株幼苗的前期生长和发育起着关键的作用(Hedley 2000)。子叶是大豆种子中储藏营养物质的主要部位, 而子叶中60%~80%的磷是以植酸磷的形式存在(Raboy等1984), 在种子萌发过程中这部分磷的水解和利用依赖于植酸酶及其他酸性磷酸酶活性的提高。虽然, 大豆子叶在萌发第6天酸性磷酸酶活性和植酸酶活性达到最大值(图3), 但是酸性磷酸酶的活性增加的倍数高于植酸酶活性的增加, 说明植酸酶活性的增加只是导致酸性磷酸酶活性增加的部分原因(图

3)。同时子叶全磷含量显著减少和幼苗全磷含量显著增加(图2), 说明了植酸酶和其他酸性磷酸酶活性的共同增加促进了大豆子叶中有机磷的水解和转运。我们前期研究结果表明, 磷高效的大豆品种适应低磷土壤的机制之一是幼苗前期能够迅速建立良好的根形态构型, 促进根系在土壤表层的分布和对磷的吸收(Ao 等 2010)。在菜豆的研究中也发现, 种子的大小与磷效率有密切的关系, 主要是由于大粒种子含有丰富的磷及其他储藏物质, 其水解释放的营养物质可以促进菜豆根系早期的生长, 加强菜豆对低磷土壤的适应性(Yan 等 1995; Liao 和 Yan 1999)。所以, 幼苗生长前期, 子叶中较高的酸性磷酸酶活性, 可以加速子叶有机磷的水解和转运, 形成良好的根形态构型, 从而促进磷高效大豆品种根系对外源磷的吸收和利用, 这可能是磷高效品种适应低磷胁迫的生理机制之一。

在低磷胁迫下, 植物酸性磷酸酶活性的增加主要是通过原有酸性磷酸酶同工酶的活性加强或者是由于合成新的酸性磷酸酶同工酶。在菜豆的研究中发现, 叶部和根部酸性磷酸酶活性的提高是由于合成了新酸性磷酸酶同工酶 PvPAP3 (Yan 等 2001; Liang 等 2010)。我们前期的研究结果表明低磷胁迫下大豆叶部酸性磷酸酶活性的增加主要是由于原有酸性磷酸酶同工酶活性加强而导致(Tian 等 2003)。在子叶生长前 6 天, 随着可溶性蛋白的显著减少(图4), 子叶酸性磷酸酶活性和植酸酶活性显著提高(图3), 说明子叶酸性磷酸酶活性的增加可能是原有酸性磷酸酶的加强或者是诱导形成新的酸性磷酸酶同工酶。通过比较子叶在不同生长时期的酸性磷酸酶同工酶谱发现, 在子叶生长第 4 天 2 条酸性磷酸酶同工酶带活性比第 2 天明显加强, 说明在第 4 天酸性磷酸酶活性的增加主要是由于原有同工酶的活性加强。但是, 在第 6 天, 在子叶中新合成了一条新的酸性磷酸酶同工酶带, 说明在第 6 天酸性磷酸酶活性增加主要是由于诱导合成该条同工酶(图 3 和图 5)。而且, 此时子叶全磷含量显著降低, 说明该条新合成的酸性磷酸酶同工酶可能与子叶内部磷的水解和运转密切相关。这与 Hegeman 和 Grabau (2001) 的研究结果相符, 他们发现在大豆子叶萌发过程中, 编码酸性磷酸酶的基因 *Gmphy* 的表达逐渐增加, 该基因编码的蛋白是否是此酸性磷

酸酶同工酶有待进一步的研究。

总之, 以上结果说明在大豆子叶中磷的水解和转运与子叶酸性磷酸酶的活性提高有关, 大豆幼苗期前期, 子叶诱导新合成的酸性磷酸酶同工酶是导致酸性磷酸酶活性提高的主要原因。而且较高的酸性磷酸酶活性促进了子叶磷的水解和转运, 为植株生长提供足够的磷源, 利于磷高效大豆品种迅速建立良好的根形态构型以适应低磷胁迫。

参考文献

- Ao JH, Fu JB, Tian J, Yan XL, Liao H (2010). Genetic variability for root morph-architecture traits and root growth dynamics as related to phosphorus efficiency in soybean. *Funct Plant Biol*, 37: 304~312
- Bozzo GG, Raghothama KG, Plaxton WC (2002). Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *Eur J Biochem*, 269: 6278~6286
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248~254
- del Pozo JC, Allona I, Rubio V, Leyva A, Pena ADL, Aragoncillo C, Paz-Ares J (1999). A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilising/oxidative stress conditions. *Plant J*, 19: 579~589
- Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC (1994). The role of acid phosphatases in plant P metabolism. *Physiol Plantarum*, 90: 791~800
- Hedley CL (2000). *Carbohydrates in Grain Legume Seeds: Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics*. Wallingford: CABI Publishing, 11~15
- Hegeman CE, Grabau EA (2001). A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expression in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiol*, 126: 1598~1608
- Kaida R, Sage-Ono K, Kamada H, Okuyama H, Syono K, Kaneko TS (2003). Isolation and characterization of four cell wall purple acid phosphatase genes from tobacco cells. *BBA-Gene Struct Expr*, 1625: 134~140
- Liang CY, Tian J, Lam HM, Lim BL, Yan XL, Liao H (2010). Biochemical and molecular characterization of PvPAP3, a novel purple acid phosphatase isolated from common bean enhancing extracellular ATP utilization. *Plant Physiol*, 152: 854~865
- Liao H, Yan XL (1999). Seed size is closely related to P use efficiency and photosynthetic P use efficiency in common bean. *J Plant Nutr*, 22: 877~888
- Murphy J, Riley J (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta*, 27: 31~36

- Raboy V, Dickinson DB, Below FE (1984). Variation in seed total phosphorus, phytic acid, zinc, calcium, magnesium, and protein among lines of *Glycine max* and *Glycine soja*. *Crop Sci*, 24: 431~434
- Raghothama KG (1999). Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50: 665~693
- Tian J, Liao H, Wang XR, Yan XL (2003). Phosphorus starvation-induced expression of leaf acid phosphatase isoforms in soybean. *Acta Bot Sin*, 45: 1037~1042
- Ullah AHJ, Gibson DM (1988). Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch Biochem Biophys*, 260: 503~513
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol*, 157: 423~447
- Wang XR, Wang YX, Tian J, Lim BL, Yan XL, Liao H (2009). Overexpressing *AtPAP15* enhances phosphorus efficiency in soybean. *Plant Physiol*, 151: 233~240
- Xiao K, Katagi H, Harrison M, Wang ZY (2006). Improved phosphorus acquisition and biomass production in *Arabidopsis* by transgenic expression of a purple acid phosphatase gene from *M. truncatula*. *Plant Sci*, 170: 191~202
- Yan XL, Liao H, Trull MC, Beebe SE, Lynch JP (2001). Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low P availability in common bean. *Plant Physiol*, 125: 1901~1911
- Yan XL, Lynch JP, Beebe SE (1995). P efficiency in common bean genotypes in contrasting soil types. I. Vegetative response. *Crop Sci*, 35: 1086~1093
- Zhao J, Fu JB, Liao H, He Y, Nian H, Hu YM, Qiu LJ, Dong YS, Yan XL (2004). Characterization of root architecture in an applied core collection for phosphorus efficiency of soybean germplasm. *Chine Sci Bull*, 49: 1611~1620
- Zimmermann P, Regierer B, Kossmann J, Frossard E, Amrhein N, Bucher M (2004). Differential expression of three purple acid phosphatases from potato. *Plant Biol*, 6: 519~528