

大豆酸性磷酸酶活性变化及磷高效基因型的筛选与相关分析

刘 渊 李喜焕 张彩英

(河北农业大学 农学院, 华北作物种质资源研究与利用重点实验室, 河北 保定 071001)

摘要: 分析不同磷处理下的大豆幼叶、根尖酸性磷酸酶活性与植株磷利用率间的相关性, 提供能够快速准确筛选磷高效利用大豆基因型的生化指标; 在3种不同磷处理水平下, 测定并比较12个大豆品种的幼叶、根尖酸性磷酸酶活性以及植株磷利用率; 检测2 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理下的159份大豆品种根尖酸性磷酸酶活性。2 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理下, 根尖酸性磷酸酶活性与磷利用率间存在极显著正相关($r > r_{0.05}$), 并从供试171份材料中筛选出6个磷高效大豆基因型; 低磷条件下, 大豆根尖酸性磷酸酶活性可作为磷高效基因型筛选的重要生化指标。

关键词: 大豆; 酸性磷酸酶活性; 磷利用率; 磷高效品种

中图分类号: S143 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)03-0145-07

Relativity Analysis between Acid Phosphatase Activity and Screening Genotypic Variation in P Efficiency of Soybean

LIU Yuan, LI Xi-huan, ZHANG Cai-ying

(North China Key Laboratory of Crop Germplasm Resources, College of Agronomy,
Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: Study the relationships between the shoot or root acid phosphatase activity (APA) and phosphorus utilization ratio under different phosphorus treatments, to provide a basis for screening P efficiency varieties in soybean. Under three different P supply levels, the soybean shoot and root acid phosphatase activities and P utilization ratio of 12 genotypes were determined and contrasted. The root acid phosphatase activities of 159 genotypes were also detected under 2 $\mu\text{mol/L}$ P concentration. The results showed that soybean root acid phosphatase activity was positively correlated with P utilization ratio significantly ($r > r_{0.01}$) under 2 $\mu\text{mol/L}$ P concentration. Six phosphorus efficiency varieties were screened out from 171 experimental genotypes. Under low phosphorus concentration, soybean root acid phosphatase activity could be used as an important biochemistry index to screen P efficient genotype.

Key words: Soybean; Acid phosphatase activity (APA); P utilization ratio; P efficient varieties

磷是植物生长、发育所必须的一种营养元素, 但土壤中的有效磷含量往往较低, 不能满足植物正常生长需求。在农业生产中, 磷缺乏问题可以通过施用化肥的方法来解决。施用化肥不但会增加农业成本, 还可能会带来环境问题。培育磷高效率品种, 提高作物自身吸收利用磷元素的能力, 是一种既经济又环保的途径。酸性磷酸酶(AP)普遍存在于植物体内, 这类酶可催化分解磷酸单脂等含磷有机化合物并释放出无机磷(Pi)。同时, 分泌酸性磷酸酶到

根际附近, 分解土壤中有有机磷释放无机磷离子被植物吸收利用^[1]。磷胁迫下, 酸性磷酸酶基因的蛋白表达增强, 诱导其他代谢的副通路形成, 酸性磷酸酶活性与土壤中有有机磷的有效性的关系在世界上引起广泛关注。在玉米^[2-3]、花生^[4]、小麦^[5]、甜菜^[6]等作物中均有酸性磷酸酶活性显著提高的相关结果。植物磷利用率受到多种因素的影响, 酸性磷酸酶活性能否作为评价磷利用率的生理生化指标则是近年来学者研究的热点。Helal等^[7]研究表明, 在缺磷条

收稿日期: 2013-03-21

基金项目: 国家转基因重大专项(2009ZX08004-004B); 国家自然科学基金项目(31071441); 河北省自然科学基金项目(C2010000749)

作者简介: 刘 渊(1978-), 女, 河北邯郸人, 助理研究员, 在读博士, 主要从事作物育种目标性状遗传与改良研究。

通讯作者: 张彩英(1960-), 女, 河北深泽人, 研究员, 主要从事大豆遗传育种与分子生物学研究。

件下植物对有机磷的利用能力明显提高,主要是缺磷诱导了植物根系的酸性磷酸酶活性显著提高,从而促进了有机磷的转化。建议将根系分泌酸性磷酸酶活性的高低作为筛选磷高效型植物的一个重要指标。并且丁洪等^[8]也认为,酸性磷酸酶可作为耐低磷条件下筛选磷高效品种资源的一项重要生化指标。McLachlan 等^[9]发现,根系酸性磷酸酶活性与生物学产量和磷累积量呈极显著负相关。Yan 等^[10]的结果表明,叶片酸性磷酸酶活性与其磷吸收效率和利用效率的相关性均不显著,不能依靠叶片酸性磷酸酶活性作为评价植物磷效率高低的指标。目前较多的研究仅停留在少数作物上,植物体内及根系分泌的酸性磷酸酶活性与磷利用率的关系仍不清楚,是否作为评价磷利用率的指标需要进一步的研究。在不同磷胁迫下,寻找大豆幼叶或根尖的酸性磷酸酶活性变化与磷利用率的相关性,从而作为筛选磷高效品种的重要生理生化指标,并且成为筛选磷高效群体验证酸性磷酸酶功能标记的表型值的基础。

1 材料和方法

1.1 试验时间、地点

本试验于 2011 年在河北农业大学华北作物种

质资源研究与利用重点实验室进行,砂培与水培均在该实验室的人工光照培养室进行。

1.2 试验材料

不同磷处理的供试大豆品种 12 个,以及 2 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理的 159 份供试材料均由河北农业大学作物遗传育种专业大豆课题组提供。

1.2.1 试验材料培养条件 供试材料的水培和沙培保持 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗时间 12 h,光照时间为 12 h,水培保持 29 $^{\circ}\text{C}$ /20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 培养方法 选取颜色、大小基本一致的供试品种种子,用 1% 次氯酸钠浸泡消毒 20 min,去离子水冲洗 1 min,无次氯酸钠气味;培养皿用 10% H_2O_2 浸泡 10 min。去离子水浸种约 12 h 后,将种子洗净平铺于培养皿滤纸上,0.5 mmol/L CaSO_4 催芽保持 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗约 24 h,不定时喷水以保持一定湿度。

将发根的种子播于湿润石英砂中,平均 2 d 浇灌去离子水,保持石英砂湿润。7 d 后,幼苗移栽至 40 L 的白色塑料培养盒内,3 个磷处理为 0, 2, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ (表 1),每个处理设 3 个重复,调整 pH 值 5.8~6.0,温度 29 $^{\circ}\text{C}$ /20 $^{\circ}\text{C}$,湿度 48% /83%,光照 12 h,平均 2 d 换一次营养液,20 d 后收获苗期植株。

表 1 不同磷处理下营养成分的配比

Tab.1 Application amount of nutrient component under different P treatment

营养液成分 Nutrient component	配制浓度 Compound concentration	使用量/g Application amount		
		Application amount		
		1 000 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理 1 000 $\mu\text{mol/L}$ P treatment	2 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理 2 $\mu\text{mol/L}$ P treatment	0 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理 0 $\mu\text{mol/L}$ P treatment
KNO_3	1.5 mmol/L	6.067	6.067	6.067
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1.2 mmol/L	7.876	7.876	7.876
NH_4NO_3	0.4 mmol/L	1.280	1.28	1.28
MgSO_4	0.5 mmol/L	2.407	2.407	2.407
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.3 mmol/L	1.586	1.586	1.586
MgCl_2	25 $\mu\text{mol/L}$	0.095	0.095	0.095
$\text{Fe-EDTA}(\text{Na})$	5 $\mu\text{mol/L}$	0.044	0.044	0.044
MnSO_4	1.5 $\mu\text{mol/L}$	0.010	0.010	0.010
ZnSO_4	1.5 $\mu\text{mol/L}$	0.017	0.017	0.017
CuSO_4	0.5 $\mu\text{mol/L}$	0.003	0.003	0.003
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.15 $\mu\text{mol/L}$	0.007	0.007	0.007
NaB_4O_7	0.5 $\mu\text{mol/L}$	0.004	0.004	0.004
KH_2PO_4	1 000 $\mu\text{mol/L}$	5.440	0	0
	2 $\mu\text{mol/L}$	0	0.011	0
K_2SO_4	0.5 mmol/L	0	0	3.490

1.3 试验方法

1.3.1 酸性磷酸酶(APA)活性的测定^[11] 取新鲜幼叶、根尖称约 0.2 g 放入冰冻研钵内,加入液氮迅速碾磨至糊状。匀浆倒入 1.5 mL 离心管,加入 1.2

mL 的 0.1 mol/L 缓冲液(1 mol/L 冰醋酸溶液 28.82 mL 和 0.3 mol/L 醋酸钠溶液 273.3 mL, pH 值 4.0)混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。4 $^{\circ}\text{C}$ 在冰冻离心机 14 000 r/min 离心 30 min。取 10 μL 上清液,加入

490 μL 酶反应液(0.1 mol/L 缓冲液和0.25 mmol/L 硝基苯磷酸二钠($p\text{-NPP}$)溶液)黑暗反应 30 min, 加入 0.2 mL 的 2 mol/L NaOH 溶液终止酶促反应。

吸取 100 μL 加入酶标板检测孔内,设空白对照, $p\text{-NP}$ 标准浓度(0.005 0.01 0.015 0.02 0.025 $\mu\text{mol/L}$),在 405 nm 波长下由酶标仪测定吸光值。

1.3.2 可溶性蛋白含量的测定^[12] 采用考马斯亮兰 G-250 法测定。吸取 1.3.1 中上清液 0.5 mL,加水稀释到 1 mL,加 5 mL 考马斯亮兰 G-250 溶液摇匀,静置 5 min,在 595 nm 波长下比色测定。以牛血清蛋白作为蛋白质标准(BSA: 0, 20, 60, 100, 140, 180, 200 $\mu\text{g/mL}$)。

酶活性以单位时间内单位可溶性蛋白质内酸性磷酸酶水解对硝基苯磷酸二钠($p\text{-NPP}$)生成对硝基苯酚($p\text{-NP}$)的量($\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{min})$)表示。

1.3.3 植株全磷含量的测定 将供试大豆品种按

照培养方法同 1.2.2,第 21 天将植株取出,用钼黄比色法^[13]测定植株全磷含量。通过植株全磷含量换算磷利用率。

1.3.4 统计分析 将原始数据进行标准化或归一化处理,Excel 计算不同处理下幼叶和根尖相对性状的平均值、标准差及变异系数,用 SPSS V17.0 版软件进行方差分析和相关性检验。

2 结果与分析

2.1 不同磷处理对幼叶和根尖的酸性磷酸酶活性的影响

经 0, 2, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 培养液的 3 个磷浓度处理后,测定的供试品种的酶活性和可溶性蛋白含量 OD 值,根据标准曲线确定其酶活和可溶性蛋白含量,设定 3 个重复,分别对每项磷处理下不同基因型品种的幼叶或根尖酶活进行方差分析和 t 测验。

表 2 不同磷处理下幼叶和根尖的 12 个大豆基因型酸性磷酸酶活性值

Tab.2 Shoot and root acid phosphatase activities of 12 soybean genotype cultivars

编号 Serial number	大豆基因型品种 Soybean genotype cultivar	under different P level treatments $\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{min})$					
		1 000 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理 1 000 $\mu\text{mol/L}$ P concentration		2 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理 2 $\mu\text{mol/L}$ P concentration		0 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理 0 $\mu\text{mol/L}$ P concentration	
		幼叶酶活 Shoot AP activity	根尖酶活 Root AP activity	幼叶酶活 Shoot AP activity	根尖酶活 Root AP activity	幼叶酶活 Shoot AP activity	根尖酶活 Root AP activity
1	牛毛黄 Ni $\mu\text{mol/Laohuang}$	0.009 8Hh	0.020 1Cc	0.017 8FGgh	0.007 5Bb	0.012 0Gg	0.001 7Hi
2	德豆 99-16 Dedou99-16	0.018 4Gg	0.003 8Gg	0.031 9Bb	0.002 4FGg	0.003 2Jj	0.002 3Hi
3	邯 6197 Han6197	0.009 7Hh	0.007 1Fg	0.017 3Gh	0.003 6DEef	0.011 6Gg	0.001 9Hi
4	冀豆 18 Jidou18	0.032 0 Ee	0.003 2Gh	0.005 6Ij	0.000 6Hh	0.019 0Ee	0.023 8Bb
5	bn102	0.009 5Hh	0.132 1Aa	0.013 1Hi	0.001 4GHh	0.006 9Ii	0.016 9Cd
6	石 76368 Shi 76368	0.040 2Cc	0.021 7Bb	0.023 3De	0.004 8Ccd	0.025 7Dd	0.013 6De
7	石 H570 Shi H570	0.038 9Dd	0.016 6Dd	0.042 5Aa	0.020 2Aa	0.040 3Bb	0.018 0Cc
8	五星 2 号 Wuxing No. 2	0.039 1CDd	0.008 7Ef	0.031 0Bc	0.019 5Aa	0.015 4Ff	0.005 3Gh
9	五星 3 号 Wuxing No. 3	0.050 6Aa	0.001 0Hi	0.025 4Cd	0.020 0Aa	0.0098Hh	0.008 6Fg
10	徐豆 10 号 Xudou No. 10	0.019 8Ff	0.009 7Ee	0.012 4Hi	0.005 0Cc	0.030 4Cc	0.011 9Ef
11	郑 92116 Zheng 92116	0.041 5Bb	0.006 3Fg	0.019 6Ef	0.002 8EFfg	0.044 2Aa	0.046 1Aa
12	中黄 35 Zhonghuang 35	0.039 5CDcd	0.001 4Hi	0.018 5EFg	0.004 0CDde	0.012 4Gg	0.002 6Hi
t 检验 t test		0.76		6.73**		2.36*	

注: ** . 表示 t 检验 0.01 水平的显著性 $t_{0.05(10)} = 2.23$ $t_{0.01(10)} = 3.17$; 不同大(小)写字母表示 0.01(0.05) 水平的差异显著性。表 3 同。

Note: ** . Means significant difference of t -test at 0.01 level $t_{0.05(21)} = 2.23$ $t_{0.01(21)} = 3.17$; Different capital (small) letters are significant at 0.01 (0.05) level. The same symbol is used for other tables. The same as Tab. 3.

有上述结果显示,通过对不同大豆基因型品种,3 个磷水平处理之间幼叶或根尖的酸性磷酸酶活性进行方差分析($P < P_{0.01}$),存在极显著差异,故表明对表 2 中的 12 个大豆基因型品种来说,幼叶或根尖分别在 3 种磷处理(1 000 2 0 $\mu\text{mol/L}$)中酸性磷酸酶活性值均可作为一项生理生化指标作进一步分析。

同时,根据表 2 数据纵向比较,分析不同大豆基因型品种对幼叶和根尖的酸性磷酸酶活性的影响。不同磷处理下,12 个大豆基因型品种之间幼叶或根尖的酸性磷酸酶活性差异极显著($P < P_{0.01}$)。经成

对数据的 t 检验得出:在 0 $\mu\text{mol/L}$ (无磷)处理下,幼叶和根尖之间的酸性磷酸酶活性存在显著差异($t > t_{0.05}$),在 2 $\mu\text{mol/L}$ (低磷)处理下,幼叶和根尖之间的酸性磷酸酶活性指标差异达到极显著水平($t > t_{0.01}$)。因此不同磷水平处理下的幼叶、根尖的酸性磷酸酶活性值可以与磷利用率进行相关分析。

2.2 不同磷处理对幼叶和根尖的磷吸收率、磷利用率的影响

在不同磷水平处理下,对不同大豆基因型品种的磷吸收率、磷利用率进行方差分析,详细情况见表 3。

表3 不同磷处理下12个大豆基因型品种的全磷含量和磷利用率

Tab.3 Total phosphorus content and ratio of P utilization in 12 soybean genotype under different P level treatments

编号 Serial number	大豆基因型品种 Soybean genotype cultivar	1000 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理 1000 $\mu\text{mol/L}$ P concentration		2 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理 2 $\mu\text{mol/L}$ P concentration		0 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理 0 $\mu\text{mol/L}$ P concentration	
		全磷含量/% Total P content	磷利用率/% P utilization ratio	全磷含量/% Total P content	磷利用率/% P utilization ratio	全磷含量/% Total P content	磷利用率/% P utilization ratio
1	牛毛黄 Ni $\mu\text{mol/L}$ /Laohuang	1.025 4Kk	97.522 9Aa	0.423 0li	236.406 6Dd	0.804 2Ee	124.347 2Hh
2	德豆 99-16 Dedou 99-16	1.888 5li	52.952 1Dd	0.611 9Ee	163.425 4Hh	1.042 0Aa	95.969 3Li
3	邯 6197 Han 6197	1.026 2Kk	97.446 9Bb	0.646 9Cc	154.583 4Jj	0.415 3Li	240.789 8Aa
4	冀豆 18 Jidou 18	2.564 7Gg	38.990 9Ff	0.752 5Bb	132.884 8Kk	0.797 2Ff	125.439 0Gg
5	bn102	1.035 9Jj	96.534 4Cc	0.620 9Dd	161.062 8li	0.603 1Jj	165.810 0Cc
6	石 76368 Shi 76368	3.439 7Cc	29.072 3Jj	0.792 Aa	126.262 6Li	0.639 9li	156.274 4Dd
7	石 H570 Shi H570	3.657 1Bb	27.344 1Kk	0.201 4Kk	496.524 3Aa	0.811 7Dd	123.198 2li
8	五星 2 号 Wuxing No. 2	3.340 4Ee	29.936 5Hh	0.284 4Jj	351.635 7Cc	0.687 1Hh	145.539 2Ee
9	五星 3 号 Wuxing No. 3	3.991 9Aa	25.050 7Li	0.202 4Kk	494.071 1Bb	0.720 3Gg	138.831 0Ff
10	徐豆 10 号 Xudou No. 10	1.903 0Hh	52.548 6Ee	0.483 8Gg	206.685 0Ff	1.001 7Bb	99.830 3Kk
11	郑 92116 Zheng 92116	3.376 1Dd	29.620 0li	0.594 5Ff	168.212 4Gg	0.823 4Cc	121.447 7Jj
12	中黄 35 Zhonghuang 35	2.931 8Ff	34.108 7Gg	0.466 4Hh	214.392 0Ee	0.426 6Kk	234.411 6Bb
<i>t</i> 测验 <i>t</i> test		5.53 **		6.30 **		10.86 **	

由表3分析可知3种磷水平处理下,不同大豆基因型品种的全磷含量、磷利用率均存在极显著差异($P < P_{0.01}$);不同大豆基因型品种在3个磷水平处理下全磷含量和磷利用率之间的*t*测验($t > t_{0.01}$)表明不同磷处理下,12个大豆基因型品种的全磷含量和磷利用率间存在极显著差异;由此推断出应当对不同磷处理下的全磷含量和磷利用率分别进行相关分析。

2.3 不同磷处理下大豆基因型品种幼叶或根尖酸性磷酸酶活性与全磷含量之间的相关性分析

根据表2中不同磷处理下大豆基因型品种幼叶和根尖酸性磷酸酶活性值与表3中不同磷处理下大豆基因型品种全磷含量进行相关分析,2 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理下,不同大豆基因型品种幼叶酸性磷酸酶活性值与全磷含量相关分析 $r_1 = -0.59$,根尖酸性磷酸酶活性值与全磷含量比较的 $r_2 = -0.89$, $r_1 < r_{0.05}$,0 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理下,不同大豆基因型品种幼叶酸性磷酸酶活性值与全磷含量比较的 $r = 0.26$,根尖酸性磷酸酶活性值与全磷含量比较的 $r = 0.23$, $r < r_{0.05}$;结论是在2 $\mu\text{mol/L}$ 和0 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理下,不同大豆基因型品种幼叶或根尖的酸性磷酸酶活性值与全磷含量之间不具有显著的正相关性。

1 000 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理下,幼叶酸性磷酸酶活性值与全磷含量比较 $r_1 = 0.98$,根尖酸性磷酸酶活性值与全磷含量比较 $r_2 = -0.43$, $r_1 > r_{0.01}$, $r_2 < r_{0.05}$,幼叶酸性磷酸酶活性值与不同大豆基因型品种的全磷含量呈极显著正相关($y = 75.316x + 0.357$, $r^2 = 0.9812$)。

2.4 不同磷处理下大豆基因型品种幼叶或根尖酸性磷酸酶活性与磷利用率之间的相关性分析

根据表2中不同磷处理下大豆基因型品种幼叶和根尖酸性磷酸酶活性值与表3中不同磷处理下大豆基因型品种磷利用率进行相关分析,1 000 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理下,幼叶、根尖酸性磷酸酶活性值与磷利用率比较 $r_1 = -0.94$, $r_2 = 0.52$, $|r_1| > r_{0.01}$, $r_2 < r_{0.05}$;0 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理下,幼叶、根尖酸性磷酸酶活性值与磷利用率比较的 $r_1 = -0.31$, $r_2 = -0.33$, $r < r_{0.05}$,结论是经高磷(1 000 $\mu\text{mol/L}$)或无磷(0 $\mu\text{mol/L}$)处理后,幼叶或根尖酸性磷酸酶活性值与磷利用率之间不具有显著的正相关性。

2 $\mu\text{mol/L}$ 磷处理下,幼叶、根尖酸性磷酸酶活性值与磷利用率之间比较 $r_1 = 0.66$, $r_2 = 0.95$, $r_{0.01} = 0.76$, $r_1 > r_{0.05}$, $r_2 > r_{0.01}$,根尖酸性磷酸酶活性值与磷利用率之间具有极显著正相关($y = 16.579x + 115.35$, $R^2 = 0.9024$)。

2.5 低磷(2 $\mu\text{mol/L}$)处理下大豆栽培品种根尖酸性磷酸酶活性差异及磷高效基因型筛选

从表4、5中可以看出,低磷(2 $\mu\text{mol/L}$)处理的159份大豆栽培材料根尖酸性磷酸酶活性的方差分析的结果显示($P < P_{0.05}$, $P > P_{0.01}$),表明159份大豆品种间差异显著。结合表4中159份大豆供试材料的测定数据,利用2.4所做出的酸性磷酸酶活性与磷利用率的正相关的分析结果,进一步推算出159份供试材料的磷利用率。同时,根据均方推算出159份供试材料根尖酸性磷酸酶活性平均值为0.012,和表2、3中12份大豆供试材料的酸性磷酸

酶活性及磷效率,显示其相关性分析(图 1) 比较后 丰 15、山宁 11 号、石 H570、五星 3 号、五星 2 号。
获得 6 个磷高效大豆品种,分别是中作 075241、垦

表 4 低磷(2 $\mu\text{mol/L}$) 处理的大豆栽培品种根尖酸性磷酸酶活性值

Tab.4 Root acid phosphatase activities of 159 soybean cultivars under 2 $\mu\text{mol/L}$ P concentration treatment $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{min})$

编号 Serial number	大豆品种 Soybean varieties	2 $\mu\text{mol/L}$ 磷 处理根尖酶活 2 $\mu\text{mol/L}$ P concentration root APA activity	编号 Serial number	大豆品种 Soybean varieties	2 $\mu\text{mol/L}$ 磷 处理根尖酶活 2 $\mu\text{mol/L}$ P concentration root APA activity	编号 Serial number	大豆品种 Soybean varieties	2 $\mu\text{mol/L}$ 磷 处理根尖酶活 2 $\mu\text{mol/L}$ P concentration root APA activity
1	06B15	0.001 2	55	冀 10B7	0.001 0	109	新大豆 2 号	0.001 3
2	06B3	0.000 6	56	冀 NF37	0.001 8	110	许 98-7	0.003 8
3	06B9	0.000 7	57	冀 NF58	0.003 7	111	许 99016	0.003 0
4	06S61-63	0.001 3	58	冀豆 11	0.004 1	112	易豆 04-6-2	0.002 1
5	08B6	0.011 4	59	冀豆 12	0.001 0	113	豫豆 25	0.003 4
6	08kf1	0.002 6	60	冀豆 13	0.003 2	114	豫豆 29	0.002 8
7	09B7	0.000 5	61	冀豆 15	0.000 9	115	扎兰特旗	0.002 3
8	09B8	0.002 5	62	冀豆 16	0.001 4	116	浙 98014	0.002 9
9	10B15	0.001 8	63	冀豆 17	0.002 4	117	郑 196	0.001 5
10	10B8	0.002 2	64	冀豆 19	0.003 6	118	郑 3074	0.003 4
11	AGS330	0.000 8	65	冀豆 20	0.001 2	119	中豆 32	0.001 3
12	JN9843-02-36	0.000 4	66	冀豆 3	0.004 2	120	中黄 15	0.001 8
13	K05-36	0.003 4	67	冀豆 7 号	0.002 3	121	中黄 16	0.001 8
14	K06-47	0.002 7	68	交 03-9	0.003 3	122	中黄 20	0.002 6
15	K070-2	0.003 0	69	晋大 78	0.002 3	123	中黄 25	0.001 1
16	SFG04626	0.001 1	70	晋豆 25	0.002 3	124	中黄 28	0.002 0
17	SN 早黄 2 号	0.003 3	71	晋豆 34	0.005 0	125	中黄 2 号	0.001 2
18	SU-3L	0.001 2	72	晋豆 40	0.002 5	126	中黄 30	0.001 5
19	安豆 4197	0.003 1	73	晋遗 46	0.001 7	127	中黄 37	0.003 7
20	沧豆 11	0.002 6	74	晋遗 55	0.003 1	128	中黄 39	0.003 8
21	沧豆 12	0.001 9	75	开豆 16	0.002 1	129	中黄 40	0.003 9
22	沧豆 56	0.002 2	76	开育 10 号	0.002 1	130	中黄 41	0.001 2
23	春绿 60	0.001 3	77	抗线 2 号	0.001 3	131	中黄 43	0.006 7
24	东豆 99-11	0.001 1	78	科丰 12	0.003 2	132	中黄 44	0.002 3
25	东农 52	0.002 3	79	垦丰 15	0.031 7	133	中黄 46	0.001 8
26	汾 9877-10	0.000 8	80	辽豆 14	0.001 7	134	中黄 6 号	0.001 6
27	汾豆 56	0.000 9	81	鲁 697-43-1	0.002 2	135	中科 7412	0.001 3
28	汾豆 60	0.003 3	82	鲁豆 11	0.003 7	136	中品 03-5368	0.001 7
29	阜 9765	0.001 7	83	鲁冠豆 1 号	0.004 0	137	中作 017020	0.002 5
30	冠豆 6 号	0.003 2	84	鲁黄 1 号	0.001 8	138	中作 02-958	0.001 6
31	邯 4324	0.001 0	85	濮豆 206	0.003 6	139	中作 036052	0.000 6
32	邯 5408 春	0.002 6	86	齐黄 30	0.001 0	140	中作 045287	0.005 2
33	邯 601	0.002 3	87	齐黄 31	0.004 9	141	中作 04-717	0.001 3
34	邯 6013	0.001 2	88	齐黄 32	0.001 0	142	中作 05-15	0.001 7
35	邯 6147	0.002 6	89	齐黄 34	0.003 6	143	中作 056171	0.003 0
36	邯 7005	0.001 0	90	山宁 11 号	0.022 8	144	中作 05-675	0.007 3
37	邯 7058	0.000 9	91	山宁 16 号	0.001 5	145	中作 06725	0.001 7
38	邯 7248	0.003 1	92	商豆 14	0.003 7	146	中作 06-875	0.004 0
39	邯 8070	0.003 3	93	石 718	0.001 9	147	中作 07-22	0.001 7
40	邯豆 5 号	0.001 5	94	石 H013	0.002 1	148	中作 075241	0.078 9
41	邯豆 7 号	0.001 4	95	石豆 101	0.001 2	149	中作 J4032	0.001 1
42	荷 01-7-1	0.000 6	96	石豆 411	0.001 1	150	中作 J5050	0.003 0
43	荷豆 12 号	0.009 2	97	石豆 413	0.001 9	151	中作 J5054	0.000 8
44	荷豆 14	0.004 1	98	石豆 4 号	0.003 8	152	中作 J6012	0.001 7
45	黑农 35	0.001 3	99	石豆 502	0.001 4	153	中作 J7008	0.014 4
46	化诱 542	0.002 8	100	石豆 5 号	0.001 5	154	中作 J7018	0.001 3
47	吉育 99	0.001 3	101	潍科 928	0.008 0	155	中作 J8023	0.002 1
48	济 4103	0.000 3	102	绥农 29	0.002 8	156	中作 J8024	0.001 9
49	济 5075	0.002 1	103	铁 01092-4	0.002 9	157	中作 J8035	0.004 6
50	冀 0689	0.001 0	104	铁丰三号	0.000 6	158	周豆 18	0.002 1
51	冀 09B2	0.001 8	105	皖豆 24	0.001 7	159	驻豆 11	0.012 0
52	冀 09B5	0.009 0	106	维豆 267	0.001 7			
53	冀 10B12	0.002 3	107	五星 1 号	0.001 2			
54	冀 10B5	0.003 3	108	五星 4 号	0.001 8			

表 5 低磷 (2 $\mu\text{mol/L}$) 处理 159 份供试大豆品种根尖酸性磷酸酶活性的方差分析

Tab. 5 The ANOVA of root acid phosphatase activities of 159 soybean varieties under 2 $\mu\text{mol/L}$ P concentration treatment

变异来源 Source of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
品种间 Intervarietal	0.023 0	158	0.000 1	1.303 0	0.024 8
处理内 Intreatment	0.035 5	318	0.000 1		
总变异 Total variation	0.058 4	476			

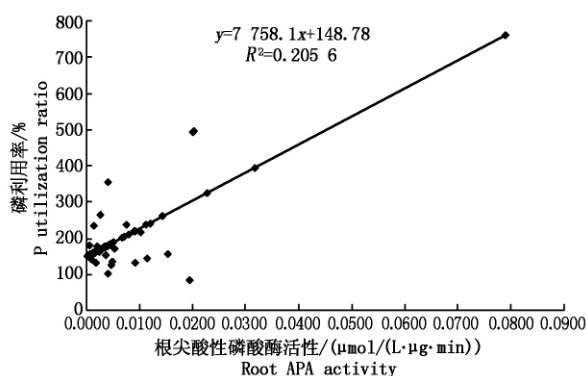


图 1 低磷 (2 $\mu\text{mol/L}$) 处理的 159 份大豆供试材料根尖酸性磷酸酶活性与磷利用率的相关性

Fig. 1 The correlation between root acid phosphatase activities and P utilization ratio of 159 soybean varieties under 2 $\mu\text{mol/L}$ P concentration treatment

3 结论与讨论

3.1 针对大豆根尖而非根围酸性磷酸酶活性的研究需要说明的问题

根据 Furlani 等^[14] 研究可知,在低磷处理下,磷高效基因型显示较低的酸性磷酸酶(AP) 活性,却反映出比磷低效基因型更好的自身养分条件。分析得知,许多大豆基因型的酸性磷酸酶(AP) 不能被根系分泌到土壤中。因此,AP 活性与磷吸收、磷利用均无相关性。此项研究只针对低磷处理下的根尖分泌酸性磷酸酶(AP) 活性进行研究,由于磷胁迫下大豆酸性磷酸酶分泌到根围附近的极少,从而得出根尖分泌的 AP 活性与磷吸收、磷利用无相关性。考虑到其无相关性意义不大,而且对根系分泌物测定存在困难,故未进行根围附近的 AP 活性的分析,但是根据大豆植物根系具有很少或没有分泌渗出物或酸组织液,在磷有限的条件下,依靠其他代谢诱导磷活动增加产量的研究基础^[15],可以对大豆根围分泌的 AP 活性忽略不计。

3.2 前人研究结果存在的问题

近年来研究得知,拟南芥、番茄、木豆等 APA 系统的基因和蛋白质具有完全独立的特性^[16],拟南芥 *AtAcp5* 和番茄 *Leps2* 的酸性磷酸酶基因主要与内部磷的活化机制相关^[17-18],在低磷条件下,对外部磷浓度的植物分子反应严格控制,判断出 AP 活性与磷吸收、磷利用无关^[19]。由于酸性磷酸酶存在一个

基因家族,其个别基因或非主效基因,或涉及非种属植物的研究,应考虑其差异性^[20];同时不同处理条件和设计方案,也会影响最后的结果。

McLachlan 等^[9,11] 表明根系酸性磷酸酶活性与磷吸收呈极显著负相关。此研究的试验材料为小麦,其试验所设的磷处理浓度与本研究相同,结果基本一致。而 Yan 等^[10] 认为,叶片酸性磷酸酶活性与其磷吸收效率和利用效率的相关性均不显著。仅选取了 2 个磷高效(AP 活性低) 和磷低效(AP 活性高) 菜豆基因型品种作为父母本,并对其杂交后代群体进行检测,因研究对象和研究方式存在局限性,故需做进一步验证。

Zhang 等^[21] 研究结果,低磷条件下,研究不同基因型 AP 活性对磷利用率的影响中,得出根系分泌的 AP 活性与磷利用率无关;叶片的 AP 活性参与磷活化机制作用,加强了磷利用率,叶片的 AP 活性与磷利用率相关。低磷条件下,其根系分泌 AP 活性与磷效率无关已得到前人证明,同时叶片的 AP 活性与磷利用率相关,但是得到前人否定。

在不同时期,AP 活性与光合作用效率(即光照程度) 不相关^[22],本试验直接在培养室进行;综合以前研究存在的不同问题,结合试验中可能存在的特殊情况,尽可能设置严格的磷水平处理,筛选存在显著性差异的基因型,分别对幼叶和根尖的 AP 活性、全磷含量、磷利用率进行多方面分析。

3.3 本研究取得的重要结果和需要说明的问题

本研究结合相关试验,设定了 1 000 $\mu\text{mol/L}$ (高磷)、2 $\mu\text{mol/L}$ (低磷)、0 $\mu\text{mol/L}$ (无磷) 3 个磷处理,并且对不同处理下大豆基因型品种的幼叶和根尖中酸性磷酸酶活性、全磷含量、磷利用率进行分析和比较,得到了特定条件下指标的相关性。

1 000 $\mu\text{mol/L}$ (高磷) 处理下,不同大豆基因型品种幼叶的酸性磷酸酶活性值与全磷含量呈极显著正相关($r > r_{0.01}$)。由此表明,在高磷状态下生长时,大豆基因型品种苗期幼叶的酸性磷酸酶活性值越高,其单位干物质质量的磷吸收量越多^[23]。可能是在磷素充足的情况下,体内的磷含量主要来源于体外对磷的吸收,体内磷含量增加,即磷吸收加强,刺激体内一系列生理和生化反应,及其复杂的代谢过程,诱导幼叶中

酸性磷酸酶基因充分参与内部磷的活化,使得幼叶中酸性磷酸酶活性也相应升高,反之亦然^[24]。

2 $\mu\text{mol/L}$ (低磷) 处理下,不同大豆基因型品种根尖的酸性磷酸酶活性值与磷利用率存在极显著正相关($r > r_{0.01}$)。可推断出根尖酸性磷酸酶活性值越大,其基因型的磷利用率越高。一般在低磷条件下,酸性磷酸酶、RNA 酶等基因的蛋白表达加强,其活性迅速提高,诱导体内代谢副通路形成^[25],最大程度有效利用体内磷,尤其是根尖中酸性磷酸酶在磷吸收利用方面较为敏感,微量的磷元素都可以被根尖中的酸性磷酸酶完全转化利用。

幼叶或根尖对 12 个大豆基因型品种间以及对 3 个磷水平处理间酸性磷酸酶(AP) 活性分析比较,存在极显著差异;对不同磷处理下幼叶和根尖进行成对 t 测验,仍然存在显著差异性。在此基础上获得,高磷处理下,不同大豆基因型品种幼叶的酸性磷酸酶活性值与磷吸收率呈极显著正相关($r > r_{0.01}$);低磷处理下,不同大豆基因型品种根尖的酸性磷酸酶活性值与磷利用率呈极显著正相关($r > r_{0.01}$)。根尖的酸性磷酸酶(AP) 活性能够作为筛选磷高效基因型品种的重要生理生化指标,利用此结论,进一步在低磷条件下,对供试的 159 个大豆品种进行鉴定和筛选,发现 6 个磷高效基因型品种(中作 075241、垦丰 15、山宁 11 号、石 H570、五星 3 号、五星 2 号)。此外,根尖的酸性磷酸酶活性还可以作为检验磷高效基因的表型值,用于分子辅助育种,缩短育种周期,减少群体筛选时工作量,提高大豆产量。

参考文献:

- [1] 黄宇,张海伟,徐芳森.植物酸性磷酸酶的研究进展[J].华中农业大学学报,2008,27(1):148-154.
- [2] 樊明寿,徐冰,王艳.缺磷条件下玉米根系酸性磷酸酶活性的变化[J].中国农业科技导报,2001,3(3):33-36.
- [3] Song J Y, Shawn M K. Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation[J]. Plant and Soil, 2001, 237: 109-115.
- [4] 魏志强,史衍玺,孔凡美.缺磷胁迫对花生磷酸酶活性的影响[J].中国油料作物学报,2002,24(3):44-46.
- [5] 孙海国,张福锁.缺磷条件下的小麦根系酸性磷酸酶活性研究[J].应用生态学报,2002,13(3):379-381.
- [6] 周建朝,韩晓日,奚红光.磷营养水平对不同基因型甜菜根磷酸酶活性的效应.植物营养与肥料学报,2006,12(2):233-239.
- [7] Helal H M. Varietal difference in root s phosphatase activity as related to the utilization of organic phosphorus [M]//BASSAM N. Genetic aspect s of plant mineral nutrition. Net herlands: Kluwer Academic Publishers, 1990.
- [8] 丁洪,李生秀,郭庆元,等.酸性磷酸酶活性与大豆耐低磷能力的相关研究[J].植物营养与肥料学报,1997,3(2):123-127.
- [9] McLachlan K D. Acid phosphatase activity of intact root sand phosphorus nutrition in plants. 2 Variations among wheat roots [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1980, 31(3):441-448.
- [10] Yan X L, Liao H, Trull M C, et al. Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean [J]. Plant Physiology, 2001, 125: 1901-1911.
- [11] McLachlan K D, Elliott D E, Marco D G D, et al. Leaf acid phosphatase isozymes in the diagnosis of phosphorus status in field-grown wheat [J]. Aust J Agric Res, 1987, 38: 1-13.
- [12] Jungk A, Barber S A. Plant age and the phosphorus uptake characteristics of trimmed and untrimmed corn root systems [J]. Plant Soil, 1975, 42: 227-239.
- [13] 赵世杰,刘华山,董新纯,等.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业出版社,1998:69-71.
- [14] Furlani A M C, Machado C T T. Variabilidade e heranca da eficiencia na absorcao e utilizacao de nutrientes em ambientes marginais, em germoplasma de soja, trigo, arrozemilho [J]. Topicos em ciencia do solo, 2002, 2: 337-391.
- [15] Hocking P J, Randall P J. Better growth and phosphorus nutrition of sorghum and wheat following organic acid secreting crops [J]. Developments in Plant and Soil Sciences, 2002, 92: 548-549.
- [16] Xiu R W, Ying X W, Jiang T, et al. Over expressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean [J]. Plant Physiology, 2009, 151: 233-240.
- [17] Huet T, Wei Q Q, Brendena H, et al. Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 And AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase Isozymes secreted by phosphate-starved *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell and Environment, 2010, 33: 1789-1803.
- [18] Hui F ZH, Wei Q Q, Xu ZH L, et al. Expression patterns of purple acid phosphatase genes in Arabidopsis organs and functional analysis of AtPAP23 predominantly transcribed in flower [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59: 581-594.
- [19] Vance C P, Uhde-stone C, Allan D L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non-renewable resource [J]. New Phytologist, 2003, 157: 423-447.
- [20] Giuseppe D, Claus K M, Preben B M, et al. Cloning and characterization of purple acid phosphatase phytases from wheat, barley, maize, and rice [J]. Plant Physiology, 2011, 156: 1087-1100.
- [21] Zhang H W, Huang Y, Ye X SH, et al. Analysis of the contribution of acid phosphatase to P efficiency in *Brassica napus* under low phosphorus conditions [J]. Science China, 2010, 53(6):709-717.
- [22] Hadjiivanova C, Tzvetkova N. Acid phosphatase activity in sun-exposed and shade beech (*Fagus sylvatica*) leaves [J]. General and Applied Plant Physiology, 2010, 36(1-2):24-27.
- [23] Djary M. K, Jean T. G, Betty M. F, et al. Biochemical characterization of two non-specific acid phosphatases from Cucurbitaceae (*Lagenaria siceraria*) edible seeds exhibiting phytase activity [J]. Journal of Animal & Plant Sciences, 2010, 7(3):860-875.
- [24] Kenjior T, Yuji M, Masashi U, et al. Occurrent of acid-phosphatase inhibitors in soybeans [J]. Biosci Biotech Biochem, 1997, 61(2):387-388.
- [25] Mariusz O, Bronislawa M, Wieslaw W. Plant purple acid phosphatases-genes structures and biological function [J]. Acta Biochimica Polonica, 2003, 50(4):1245-1256.