

研究报告

Research Report

## 光照和不同氮素对水葫芦谷氨酰胺合成酶活性的影响

傅明辉\* 陈肖丽 严国花

广东工业大学, 轻工化工学院, 广州, 510006

\* 通讯作者, mhfgud@126.com

**摘要** 谷氨酰胺合成酶(GS)是水葫芦氮代谢过程中一个关键酶,其活性受外界条件的影响。本研究探讨了光照和不同氮素对水葫芦根和叶 GS 活性的影响。研究发现,铵态氮和硝态氮抑制水葫芦根部 GS 活性,但却促进叶部 GS 活性。光照强度增加抑制根部 GS 活性,但对叶部 GS 活性影响不大。研究结果为揭示外来植物水葫芦快速入侵的机理,进一步开发和利用水葫芦进行水体修复提供理论基础。

**关键词** 水葫芦, 谷氨酰胺合成酶, 光照, 氮素

## Effect of Light and Different Forms of Nitrogen on the Activity of Glutamine Synthetase in Water Hyacinth (*Echhornia crassipes*)

Fu Minghui\* Chen Xiaoli Yan Guohua

College of Light Industry, Gunagdong University of Technology, Guangzhou, 510006

\* Corresponding author, mhfgud@126.com

DOI: 10.13417/j.gab.034.000635

**Abstract** Glutamine synthetase (GS) plays a key role in nitrogen metabolism in water hyacinth (*Echhornia crassipes*). Its activity is influenced by environmental factors. This study investigated the effect of light intensity and different forms of nitrogen on the activity of GS in water hyacinth. It was found that ammonium and nitrate nitrogen inhibited the activity of GS in root, but promoted that of shoot. Light intensity could inhibit the activity of GS in root, but had no influence on that of shoot. The results can provide the theory foundation for explanation the mechanism of quick invasion from alien plants and further development and utilization of water hyacinth (*Echhornia crassipes*) in phytoremediation of polluted water.

**Keywords** Water hyacinth (*Echhornia crassipes*), Glutamine synthetase, Light, Nitrogen

水葫芦(*Echhornia crassipes* Sloms)又称凤眼莲或凤眼蓝,原产于南美的多年生水生植物,属于雨久花科,凤眼莲属。60年代被引入我国后,由于其繁殖很快,在我国很多地方尤其长江以南迅速蔓延(洪春来等, 2005)。水葫芦的疯长,会破坏水体生态平衡,但适量的水葫芦可以用来高效地去除富营养化水体中的氮和磷,吸收污染水体中各种重金属及其它有毒化合物,所以水葫芦已被用于富营养化的湖泊(濮培民, 1993)和河道(孙文浩等, 1989)、工业废水(de Casabianca et al., 1995)及养殖废水(袁桂良和刘鹰, 2001)等的修复处理。

在高等植物氮同化过程中谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)是一个关键酶,它在 ATP 存在

下,催化氨与谷氨酸(Glu)合成谷氨酰胺(Gln),而谷氨酸合成酶(glutamate synthetase, GOGAT)则催化谷Gln与 $\alpha$ -酮戊二酸生成两分子Glu, Gln和Glu是植物体内各种含氮生物大分子物质合成时氮素的主要供体(韩娜等, 2004; 丁邦琴和李铁军, 2013)。所以,GS是高等植物氮代谢过程中的关键酶,与植物的产量和品质(Fuentes et al., 2001)、植物对氮素的吸收利用效率(Sun et al., 2005)以及植物的抗逆性(Rana et al., 2008)都密切相关。

水葫芦的快速生长与其能高效利用水体中的氮素密切相关。水体中的无机氮有铵态和硝态两种形式,应对水体中不同浓度的铵态氮和硝态氮以及不同的外在环境条件如光照等,水葫芦在生理上会产

基金项目:本研究由国家自然科学基金(21177029)资助

生相应的适应性改变(李卫国和王建波, 2007)。本研究探讨了光照和不同形式的氮素对水葫芦谷氨酰胺合成酶活性的影响, 研究结果为揭示外来植物水葫芦快速入侵的机理提供理论基础, 进一步开发和利用水葫芦进行水体修复提供理论依据。

## 1 结果与分析

### 1.1 不同氮素条件下水葫芦根部的GS活性

不同氮素形态下水葫芦根部的GS活性如图1所示。在清水处理下, 处理2 h时和4 h时的GS活性, 与处理前相比略低, 但无显著差异, 处理6 h时GS活性比处理前显著性高。在氯化铵处理下, 处理2 h时和4 h时的GS活性都比处理前GS显著降低, 处理6 h时GS活性恢复到处理前水平。在硝酸钾处理下, 随着处理时间, GS活性先显著减少, 然后恢复, 最后又显著减少。以上说明硝酸钾和氯化铵都可以抑制GS活性, 硝酸钾的抑制作用比氯化铵更快速。

### 1.2 不同氮素条件下水葫芦叶的GS活性

不同氮素条件下水葫芦叶部的GS活性如图2所示。在清水处理下, 处理2 h时、4 h时和6 h时与处理前GS活性没有显著差异。在氯化铵处理下, 处理2 h时, GS活性明显高于处理前, 处理4 h和6 h后酶活又恢复到处理前的水平。在硝酸钾处理下, 酶活与处理前相比没有显著变化, 但处理2 h和6 h的酶活与处理4 h的酶活有显著差异, 只在处理4 h时, GS活性略高于处理前, 但无显著差异。以上说明了氯化铵和硝酸钾都能促进水葫芦叶中的谷氨酰胺酶活性, 氯化铵有比较显著的促进作用。

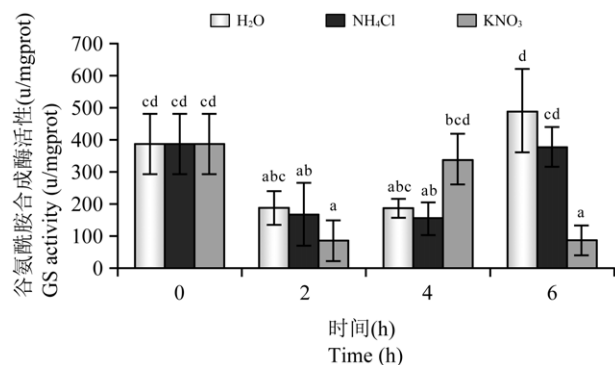


图1 不同形态氮素水葫芦根部的GS活性

注: 同组数据中相同字母说明无显著性差异, 下同

Figure 1 GS activities under different nitrogen in root of *Echinochloa crassipes*

Note: There is no significant difference between each other when there is the same letter in the same group, below is the same

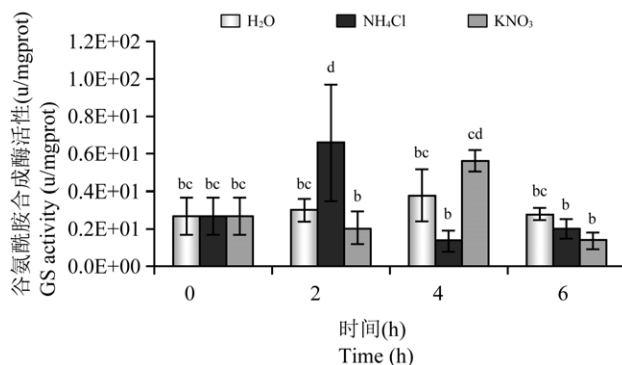


图2 不同形态氮素水葫芦叶中的GS活性

Figure 2 GS activities under different nitrogen in leaf of *Echinochloa crassipes*

### 1.3 不同光照条件下水葫芦根部GS活性

不同光照条件下水葫芦根部GS活性如图3所示。随着光照强度的增加及光照时间的增加, 谷氨酰胺合成酶活性的抑制作用越来越明显。3 200 Lx的光强下, 作用1~3 d, 谷氨酰胺酶活性虽有减少, 但不明显, 数据无显著差异, 4 800 Lx的光强下, 作用1 d, 酶活没显著差异, 但作用2 d和3 d, 酶活性都显著降低。6 400 Lx的光强下, 作用1~3 d, 酶活性都显著降低。

### 1.4 不同光照条件下水葫芦叶部GS活性

不同光照条件下水葫芦叶部GS活性如图4所示。虽然经过光照培养后, 酶活性有稍许增加, 但变化不显著, 没有明显的统计学意义。

## 2 讨论

高等植物中, 氮最初同化作用是通过GS/GOGAT循环发生的, 这个循环在植物氮代谢中无机氮转化为有机氮中起着中心作用。外源的无机氮如果是硝态氮, 则必须先通过硝酸还原酶(NR)和亚硝酸还原

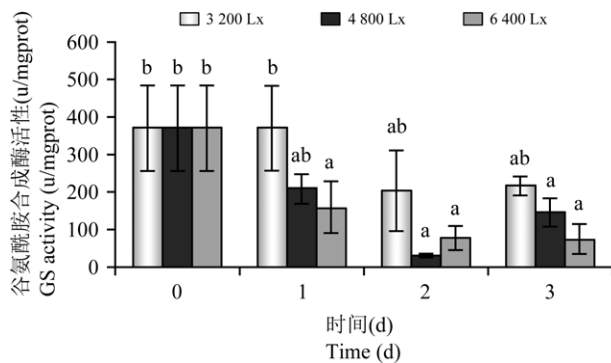


图3 不同光照条件下水葫芦根部的GS活性

Figure 3 GS activities under different nitrogen in root of *Echinochloa crassipes*

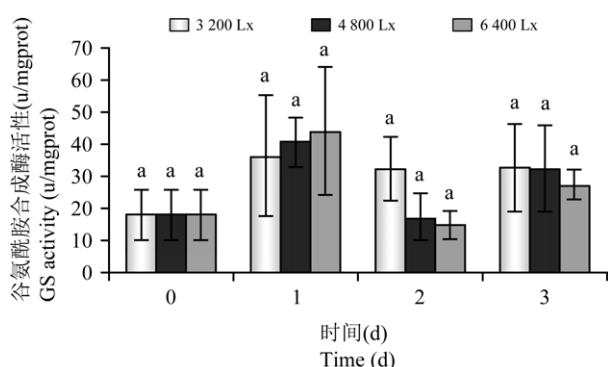


图4 不同光照条件下水葫芦叶部的GS活性

Figure 4 GS activities under different nitrogen in leaf of *Echhornia crassipes*

酶(NiR)把 $\text{NO}_3^-$ 还原为 $\text{NH}_4^+$ ,因此在这一过程中的GS、GOGAT、NR和NiR等起着非常重要的作用(Santos and Salema, 1992)。

外源氮对高等植物谷氨酰胺合成酶的影响因植物种类、组织器官、环境的差异以及氮源的不同而有别(李泽松等, 2000)。多数研究证实了铵态氮和硝态氮均能促进高等植物根部和叶片谷氨酰胺合成酶活性(Mäck and Tischner, 1990; Ota et al., 1990; 黄勤妮等, 1995; Raab and Terry, 1995; 李泽松等, 2000; 张宏纪等, 2001; 胡润芳等, 2012), 但不同形式的氮源对不同种类的植物促进的程度有所不同。黄勤妮等(1995)的研究证实了当以 $\text{NH}_4^+$ 作为唯一氮源时,小麦幼苗根部谷氨酰胺合成酶和叶胞质谷氨酰胺合成酶活性要比以 $\text{NO}_3^-$ 作为唯一氮源时高。以萝卜叶为材料的实验说明,以5 mmol/L  $\text{NH}_4^+$ 和1 mmol/L  $\text{NO}_3^-$ 为氮源(5:1混合)比单以 $\text{NH}_4^+$ 作为氮源显示出高得多的GS活性(Ota et al., 1990)。胡润芳等(2012)的研究证实了铵态氮和硝态氮均能促使大豆的功能叶片中谷氨酰胺合成酶的活性提高,铵态氮增高低蛋白大豆品种GS活性效果较好,混合态氮增加高蛋白大豆品种GS活性效果较好。Mäck和Tischner(1990)的研究表明,铵态氮对甜菜主根及侧根的GS活性增加尤为突出。Raab和Terry(1995)发现糖甜菜块根和叶片中的GS活性,在铵态氮作用下比硝态氮作用下分别提高3.5倍与1.7倍。张宏纪等(2001)的实验同样证实了铵态氮对促进水培甜菜块根GS活性的效果要明显好于硝态氮。我们的实验也证实了硝态氮和铵态氮均能促进水葫芦叶中谷氨酰胺合成酶活性,且铵态氮的效果更好些。这主要是由于 $\text{NO}_3^-$ 需要经过亚硝酸还原酶和硝酸还原酶的作用还原为 $\text{NH}_4^+$ 后,才能在GS作用在参与到无机氮转化为有机氮的过程中,因此 $\text{NO}_3^-$ 的同化需要消耗更多的能量(Kyaing et al., 2011)。但我们的实验却发现硝态氮

和铵态氮对水葫芦根部谷氨酰胺合成酶活性有抑制作用。这点与上述甜菜块根的研究结果是相反的。这可能与植物不同种类有关,甜菜的块根具有积累作用,在块根组织中可以积累较多的蛋白和糖类,因此氮素能够促进根部GS的活性,而水葫芦是一种水生植物,在水生环境中,高浓度铵可能使植物根部产生铵盐毒害症状,而抑制了根部的GS活性,这点与Tischner和Lorenzen(1980)报道的小球藻的GS活性被铵态氮和硝态氮抑制的结果是一致的。但水葫芦在富营养化水体中具有比较强的适应能力,因此,这种抑制作用随时间延长逐渐减弱,到6h后,GS活性恢复到处理前的水平。李卫国等(2008)报道,水葫芦长时间处于混合态氮的富营养化水体中,根部GS活性反而会得到促进。混合态氮一方面减弱单一铵的毒害作用,另一方面长时间的作用能使植物酶活产生适应性改变。

氮代谢与碳代谢之间是相互关联的,GS不仅在氮代谢中起着关键的作用,也在蛋白质和氨基酸的合成与分解以及植物的呼吸作用之间起着重要的纽带作用(李德红等, 1998)。此外,由于硝酸还原酶是光诱导酶,光照强度的增加能提高硝酸还原酶活性,间接地增强GS的活性。植物体内GS存在多个同工酶,一般认为叶绿体GS随光照强度增加而增强,而胞质GS活性不随光照强度改变而变化(Magalhaes and Huber, 1991)。刘晓明等(2008)的实验证实了光照能增强番茄叶中GS活性。彭进等(2001)的研究证实了水稻非光合组织如根中GS的活性受到光照影响,但不是光照强度,推测可能是由于某些光谱相互作用所产生的未知因素造成的。我们的实验发现水葫芦根部GS活性随光照强度和光照时间的增加而被抑制,水葫芦叶中的GS活性不受光照强度的影响,这点与以往报道的植物不大一样。是否水葫芦体内存在某些GS,其活性或其表达受光抑制,使根部显现出GS活性受光抑制,叶部由于叶绿体GS受光照促进,因此叶部总的GS活性不受光照强度的影响。这点假设仍需要进一步深入研究。

### 3 材料与方法

#### 3.1 实验材料

实验中所用水葫芦均采自广州市大学城广东工业大学校区西区池塘。

#### 3.2 试剂

蛋白含量检测试剂盒和谷氨酰胺合成酶试剂

盒,购自南京建成生物工程研究。

预培养液:0.25 mmol/L  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 mmol/L  $\text{KNO}_3$ , 0.1 mmol/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。

提取缓冲液:0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 内含 2 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$ , 2 mmol/L DTT, 0.4 mol/L 蔗糖。

### 3.3 方法

#### 3.3.1 预培养

采来的水葫芦用自来水清洗根部,自来水培养 3 d 后,换用预培养液培养 15 d,3 d 换一次培养液。培养条件:28℃、自然光照。

#### 3.3.2 不同条件下培养

##### 3.3.2.1 不同氮素条件下培养

预培养后,分别转移到含 1.8 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、1.8 mmol/L  $\text{KNO}_3$  和蒸馏水中培养,培养条件:28℃、自然光照。转移后分别在培养 0 h、2 h、4 h、6 h 后取根或茎样本 2 g,用于测定。

##### 3.3.2.2 不同光照条件下培养

预培养后,分成 3 组,继续在预培养液中培养,光照培养条件分别为:3 200 Lx、4 800 Lx 和 6 400 Lx,光照周期 16/8 h,培养温度 28℃。分别在培养 0 d、1 d、2 d、3 d 后取根或茎样本 2 g,用于测定。

#### 3.3.3 样品处理

2 g 根或叶中加入 5 mL 预冷的提取缓冲液,冰浴中匀浆,匀浆液静置 30 min 后,用两层纱布过滤匀浆液,收集滤液,加入提取缓冲液定容至 10 mL,12 000×g 离心 20 min。取上清液作为粗酶提取液。上述提取过程均于 4℃ 下进行。

#### 3.3.4 活性测定

用考马斯亮蓝染色的方法测定提取液的蛋白质浓度,利用谷氨酰胺合成酶能够催化羟胺和谷氨酰胺生成 T-谷氨酰氧肟酸和氧,再通过显色反应定量谷氨酰氧肟酸,从而得出谷氨酰胺合成酶活性。

#### 3.3.5 数据处理

每个反应重复 3 次,实验结果按平均值±标准差记录。各组数据均值之间的差异显著性用 SPSS 13.0 中的单因素方差分析中的 S-N-K 分析, $p < 0.05$  时存在显著性差异。

### 作者贡献

傅明辉完成实验的设计、数据的处理及论文的整体构思和撰写;陈肖丽和严国花完成全部实验过

程,文献的查阅及下载。全体作者均为论文的成稿贡献了时间和精力。

### 致谢

本研究得到国家自然科学基金(21177029)的资助,实验过程得到了广东工业大学 2014 届本科生高原、赖小勤等的帮助,在此表示感谢!

### 参考文献

- de Casabianca M.L., Laugier T., and Posada F., 1995, Pertoliferous wastewater treatment with water hyacinth: experimental statement, *Waste Management*, 15(8): 651-655
- Ding B.Q., and Li T.J., 2013, Differential gene expression of the high glu tamine producing strain of a rthrobacter globiformis in the different  $\text{NH}_4^+$  concentration, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 32(1): 41-45 (丁邦琴,李铁军,2013,谷氨酰胺高产菌株在不同  $\text{NH}_4^+$  浓度下的基因差异表达,基因组学与应用生物学,32(1): 41-45)
- Fuentes S.I., Allen D.J., Ortiz-Lopez A., and Hernández G., 2001, Overexpression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations, *J. Exp. Bot.*, 52(358): 1071-1081
- Han N., Ge R.C., Zhao B.C., Shen Y.Z., and Huang Z.J., 2004, Research development of the glutamine synthetase in plants, *Hebei Shifan Daxue Xuebao (Journal of Hebei Normal University)*, 28(4): 407-410 (韩娜,葛荣朝,赵宝存,沈银柱,黄占景,2004,植物谷氨酰胺合成酶研究进展,河北师范大学学报,28(4): 407-410)
- Hong C.L., Wei Y.Z., Jia Y.B., Yang X.E., and Weng H.X., 2005, The advances of water hyacinth for control and overall utilization studies, *Keji Tongbao (Bulletin of Science and Technology)*, 21(4): 491-496 (洪春来,魏幼璋,贾彦博,杨肖娥,翁焕新,2005,水葫芦防治及综合利用的研究进展,科技通报,21(4): 491-496)
- Hu R.F., Zhang G.Q., Teng Z.Y., and Lin G.Q., 2012, Effect of different nitrogens on activities of nitrate reductase, glutamine synthetase, and seed protein contents in soybean cultivars, *Dongbei Nongye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Agricultural University)*, 43(1): 31-35 (胡润芳,张广庆,滕振勇,林国强,2012,不同形态氮素对大豆硝酸还原酶和谷氨酰胺合成酶活性及蛋白质含量的影响,东北农业大学学报,43(1): 31-35)
- Huang Q.N., Yin L.P., Chai X.Q., Liu X.L., Hong J.M., and Zhao W.P., 1995, Influence of nitrogen sources on glutamine synthetase in wheat seedling, *Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Sinica)*, 37(11): 856-862 (黄勤妮,印莉萍,柴晓清,刘祥林,洪

- 剑明, 赵微平, 1995, 不同氮源对小麦幼苗谷氨酰胺合成酶的影响, 植物学报, 37(11): 856-862)
- Kyaing M.S., Gu L.J., and Cheng H.M., 2011, The role of nitrate reductase and nitrite reductase in plant, Shengwu Jishu Jinzhan (Current Biotechnology), 1(3): 159-164 (Kyaing M. S., 顾立江, 程红梅, 2011, 植物中硝酸还原酶和亚硝酸还原酶的作用, 生物技术进展, 1(3): 159-164)
- Li D.H., Deng J.M., and Xing D., 1998, Effects of different lights on UBE and GS activity of rice seedlings, Shengming Kexue Yanjiu (Life Science Research), 2(2): 109-112 (李德红, 邓江明, 刑达, 1998, 光质对水稻幼苗超弱发光和谷氨酰胺合成酶活性的影响, 生命科学研究, 2(2): 109-112)
- Li W.G., Gong H.M., and Chang T.J., 2008, Effects of nitrogen form on growth and physiological responses of an aquatic plant *Eichhornia crassipes*, Nongye Huanjing Kexue Xuebao (Journal of Agro-Environment Science), 27(4): 1545-1549 (李卫国, 龚红梅, 常天俊, 2008, 富营养化条件下凤眼莲不同氮素形态的生理响应, 农业环境科学学报, 27(4): 1545-1549)
- Li W.G., and Wang J.B., 2007, Effect of light and nitrate on growth and physiological characteristics of invasive plant *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, Wuhan Daxue Xuebao (Lixueban) (Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)), 53(4): 457-462 (李卫国, 王建波, 2007, 光照和氮素对外来植物凤眼莲生长和生理特性的影响, 武汉大学学报(理学版), 53(4): 457-462)
- Li Z.S., Lin Q.H., Zhang C.F., Peng J., and Wei G.W., 2000, Effect of different nitrogen sources on ammonia-assimilating enzymes of the roots in rice seedlings, Wuhan Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban) (Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)), 46(6): 729-732 (李泽松, 林清华, 张楚富, 彭进, 魏国威, 2000, 不同氮源对水稻幼苗根氨同化酶的影响, 武汉大学学报(自然科学版), 46(6): 729-732)
- Liu X.M., Yang Y.J., and Li T.L., 2008, Effects of low light intensity on nitrogen metabolism and relative enzymes activity in tomato, Beifang Yuanyi (Northern Horticulture), (5): 1-5 (刘晓明, 杨延杰, 李天来, 2008, 光强对番茄氮素代谢及相关酶活性的影响, 北方园艺, (5): 1-5)
- Mäck G., and Tischner R., 1990, Glutamine synthetase oligomers and isoforms in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.), Planta, 181(1): 10-17
- Magalhaes J.R., and Huber D.M., 1991, Response of ammonium assimilation enzymes to nitrogen form treatments in different plant species, Journal of Plant Nutrition, 14(2): 175-185
- Ota K., and Yamamoto Y., 1990, Effects of different nitrogen sources on glutamine synthetase and ferredoxin dependent glutamate synthase activities and on free amino acid composition in radish plants, Soil Science and Plant Nutrition, 36(4): 645-652
- Peng J., Li Z.S., Lin Q.H., Zhang C.F., Peng S.B., and Bennett J., 2001, Effect of light on expression of glutamine synthetase isozymes in non-photosynthetic tissues of rice plants, Wuhan Zhiwuxue Yanjiu (Journal of Wuhan Botanical Research), 19(1): 31-34 (彭进, 李泽松, 林清华, 张楚富, Peng S.B., Bennett J., 2001, 光对水稻非光合组织谷氨酰胺合成酶同工酶表达的影响, 武汉植物学研究, 19(1): 31-34)
- Pu P.M., 1993, An experimental study on the physio-ecological engineering for improving Taihu lake water quality in water source area of Marshan drinking water plant, Hupo Kexue (Journal of Lake Sciences), 5(2): 171-180 (濮培民, 1993, 改善太湖马山水厂水源区水质的物理-生态工程实验研究, 湖泊科学, 5(2): 171-180)
- Raab T.K., and Terry N., 1995, Carbon, nitrogen, and nutrient interactions in *Beta Vulgaris* L. as influenced by nitrogen source,  $\text{NO}_3^-$  versus  $\text{NH}_4^+$ , Plant Physiology, 107(2): 575-585
- Rana N.K., Mohanpuria P., and Yadav S.K., 2008, Expression of tea cytosolic glutamine synthetase is tissue-specific and induced by cadmium and salt stress, Biologia Plantarum, 52(2): 361-364
- Santos I., and Salema R., 1992, Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchoe lateritia* Engl., Plant Science, 84(2): 145-152
- Sun H., Huang Q.M., and Su J., 2005, Highly effective expression of glutamine synthetase genes GS1 and GS2 in transgenic rice plants increases nitrogen-deficiency tolerance, Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 31(5): 492-498
- Sun W.H., Yu Z.W., and Yu S.W., 1989, The harness of an eutrophic water body by water-hyacinth, Huanjing Kexue Xuebao (Acta Scientiae Circumstantiae), 9(2): 187-195 (孙文浩, 俞子文, 余叔文, 1989, 城市富营养化水域的生物治理和凤眼莲抑制藻类生长的机理, 环境科学学报, 9(2): 187-195)
- Tischner R., and Lorenzen H., 1980, Changes in the enzyme pattern in synchronous *Chlorella sorokiniana* caused by different nitrogen sources, Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 100(4): 333-341
- Yuan G.L., and Liu Y., 2001, Static purification of water-hyacinth on wastewater from intensive raising Chinese-turtle, Nongye Huanjing Boahu (Agro-environmental Protection), 20(5): 322-325 (袁桂良, 刘鹰, 2001, 凤眼莲对集约化甲鱼养殖污水的静态净化研究, 农业环境保护, 20(5): 322-325)
- Zhang H.J., Ma F.M., Li W.H., and Yan G.P., 2001, Effect of different nitrogen forms on glutamine synthetase activities in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), Heilongjiang Nongye Kexue (Heilongjiang Agricultural Science), (6): 7-10 (张宏纪, 马凤鸣, 李文华, 闫桂平, 2001, 不同形态氮素对甜菜谷氨酰胺合成酶活性的影响, 黑龙江农业科学, (6): 7-10)