

„Zbornik radova”, Sveska 28, 1996.

Originalni naučni rad – Original scientific paper

***PATH – KOEFICIJENT ANALIZA MEĐUZAVISNOSTI AKTIVNOSTI ENZIMA
METABOLIZMA AZOTA NA PRINOS ZRNA I SADRŽAJ RASTVORLJIVIH
PROTEINA SOJE***

***Miladinović, J., Malenčić, Đ., Hrustić Milica, Gašić Olga, Popović, M.,
Verešbaranji, I.¹***

IZVOD

Tokom 1995. godine obavljena su poljska i laboratorijska istraživanja sa ciljem utvrđivanja međuzavisnosti aktivnosti enzima metabolizma azota na prinos zrna i sadržaj rastvorljivih proteina soje. Aktivnosti sva tri ispitivana enzima (NG, NR i GDH) bila su u negativnoj korelaciji sa prinosom zrna, i u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem rastvorljivih proteina. Path – koeficijent analiza pokazala je da je direktan efekat aktivnosti NG pozitivan u odnosu na oba ispitivana svojstva, dok su direktni efekti NR i GDH negativni. Dobijeni rezultati pokazali su da aktivnost NG ima primarnu ulogu u procesima metabolizma azota u biljkama soje.

KLJUČNE REČI: soja, nitrogenaza, nitrat–reduktaza, glutamat–dehidrogenaza, path – koeficijent analiza.

Uvod

Azot je jedan od osnovnih makroelemenata u ishrani gajenih biljaka i faktor njihovog prinosa. Ulazi u sastav aminokiselina, proteina, nukleotida, nukleinskih kiselina, koenzima, vitamina, pigmenata, alkaloida i drugih jedinjenja. Za potrebe metabolizma, biljke obezbeđuju azot iz zemljišta (jonski oblici – NO_2^- , NO_3^- i NH_4^+), iz atmosfere, hidrolizata proteina i dr. Značaj nitrita u ishrani biljaka je neznatan a značaj nitrata i amonijaka je porednak i zavisi od uslova sredine i starosti biljke. Sa energetske strane, NH_4^+ predstavlja pogodniji izvor azota, obzirom da ga biljke mogu direktno ugrađivati u jedinjenja.

¹ Dipl. inž. Jegor Miladinović, dr Milica Hrustić, viši naučni saradnik, dr Ištvan Verešbaranji, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad; mr Đorđe Malenčić, dr Olga Gašić, red. prof., dr Milan Popović, vanr. prof., Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Asimilacija i metabolizam azota u biljkama regulisani su uz pomoć više enzima, od kojih su najvažniji nitrat-reduktaza (NiR, EC 1.6.6.1-3), nitrit-reduktaza (NR, EC 1.6.6.4), glutamin-sintetaza (GS, EC 6.3.1.2), glutamat-sintaza (GOGAT, EC 1.4.7.1), glutamat-dehidrogenaza (GDH, EC 1.4.1.2-4) kao i biljne aminotransferaze. U simbiotskoj azotofiksaciji, u kvrčicama korena biljaka iz familije Fabaceae, ključnu ulogu u asimilaciji azota ima enzim nitrogenaza (NG, EC 1.18.2.1).

Asimilacija NO_3^- u biljkama katalizovana je pomoću NR i NiR, sukcesivnom redukcijom do NH_4^+ . Aktivnost ovih enzima (Gašić, 1984) je indikator obezbeđenosti biljaka azotom i biohemijski kriterijum za selekciju vrsta bogatih proteinima, jer je utvrđena pozitivna korelacija između aktivnosti NR i sadržaja proteina u listovima. Aktivnost NR je indukovana koncentracijom NO_3^- u podlozi i dobar je pokazatelj za kontrolu đubrenja azotnim đubrivima (Bergareche and Simon, 1988).

Reakcije asimilacije NH_4^+ katalizovane su enzimima GS, GOGAT i GDH. U zavisnosti od enzima asimilacije NH_4^+ , razlikuju se dva puta primarne asimilacije azota: GS/GOGAT-put i GDH-put. Smatra se da je u uslovima niske koncentracije NH_4^+ u ćeliji aktivan GS/GOGAT-put, a u uslovima visoke koncentracije NH_4^+ aktivira se GDH-put (Popović, 1987).

Soja (*Glycine max* (L.) Merr.) spada u grupu leguminoznih biljaka, sposobnih da usvajaju azot iz atmosfere, i uz pomoć simbiotskih mikroorganizama (*Bradyrhizobium*), ugrađuju u aminokiseline i proteine. Pored azotofiksacije, u biljkama soje prisutni su u manjoj meri i ostali putevi asimilacije azota.

Cilj našeg istraživanja bio je da ustanovimo razlike u aktivnostima različitih enzima asimilacije azota (NG, NR i GDH) u soji, kao i međuzavisnost aktivnosti ovih enzima i sadržaja rastvorljivih proteina i prinosa zrna.

Materijal i metod rada

Istraživanja su obavljena tokom 1995. godine na oglednim poljima Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Rimskim Šančevima i biohemijskoj laboratoriji Instituta za hemiju PMF – a u Novom Sadu. Istraživanja su obuhvatila četiri novopriзнate sorte soje (Ranka, Panonka, Balkan i Vojvodanka) stvorene u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Ogled je postavljen po šemi komplet randomiziranog blok dizajna u četiri ponavljanja, sa veličinom osnovne parcelice od 10 m², odnosno 4 reda dužine 5 m, sa međurednim rastojanjem 0,5 m. Setva je obavljena 15. IV 1995. godine, a žetva je obavljena kad bi usev dostizao punu zrelost. Prinos je preračunavan u kg/ha i svoden na 14 % vlage. Biljni materijal za ispitivanje aktivnosti enzima sakupljan je u fazi R1 (Fehr and Caviness, 1977.) kada je aktivnost enzima asimilacije azota bila maksimalna. Ekstrakt enzima pripremljen je homogenizacijom 1 g uzorka svežih listova u 10 ml ekstrakcionog medijuma (imidazolski pufer pH=7,2).

Aktivnost NG u rizosferi određena je na osnovu redukcije acetilena, na gasnom hromatografu 7600 A Hewlett-Packard (Hardy et al., 1968). Korenov sistem biljaka inkubiran je sa 10% acetilenom na 28° 24 h. Koncentracija nastalog etilena u uzorku gasa izračunata je iz površine pika preko kalibracione krive.

Aktivnost NADH-zavisne NR određena je *in vitro* na osnovu koncentracije nitrita računata iz apsorbcije nitrit-kompleksa. Promena apsorbcije očitana je spektrofotometrijski na 540 nm (Guerrero, 1982).

Aktivnost GDH određena je na osnovu smanjenja apsorbcije na 340 nm usled oksidacije NADH. Aktivnost je računata na osnovu razlike u koncentraciji NADH u prisustvu i odsustvu amonijum-acetata (Coombs and Hall, 1982).

Sadržaj rastvorljivih proteina određen je na osnovu reakcije tirozinskih i cisteinskih ostataka proteina sa folin - fenolnim reagensom. Apsoorbancija nastalog kompleksa merena je spektrofotometrijski na 500 nm (Lowry et al, 1951).

Dobijeni rezultati statistički su obrađeni metodom Path koeficijent analize, koji omogućava proučavanje direktnog i indirektnog uticaja kao i proporcije zajedničkog delovanja (determinacije) nezavisno promenljivih ($x_1, x_2 \dots x_k$) na zavisno promenljivu (y) (Li, 1977). U ovim istraživanjima ispitivan je uticaj aktivnosti NG (x_1), NR (x_2) i GDH (x_3) na prinos zrna soje (y_1) i sadržaj rastvorljivih proteina (y_2).

Rezultati i diskusija

Rezultati istraživanja prikazani su u tabeli 1.

Tab. 1. Prosečne vrednosti aktivnosti enzima metabolizma azota, sadržaja rastvorljivih proteina i prinosa zrna - Average values of nitrogen metabolism enzymes activities, soluble proteins content, and seed yield

	NG ($\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{g}$ s. kvrž. h)	NR ($\mu\text{M NO}_2^- /$ g sv. m. h)	GDH ($\mu\text{M NADH}$ /g sv.m.h)	rastvorljivi proteini (mg prot./ g sv. m.)	prinos (kg/ha)
Ranka	583,40	0,85	19,14	27,57	6227
Panonka	396,42	0,18	30,48	23,57	5996
Balkan	401,78	0,55	6,64	21,25	6578
Vojvodanka	418,75	0,16	14,85	25,08	7114

Istraživanjem aktivnosti enzima asimilacije i metabolizma azota u različitim sortama soje ustanovljene su značajne razlike. Sorte Ranka imala je najveću aktivnost NG i NR, što je direktno uticalo na povećani sadržaj rastvorljivih proteina, obzirom da su ovi enzimi od ključnog značaja u prevodenju azota u NH_4^+ oblik koji se ugrađuje u proteine tokom njihove biosinteze. Niži prinos kod ove sorte ukazuje na negativnu korelaciju između aktivnosti enzima asimilacije azota i produkcije proteina, s jedne strane, te ostvarenog prinosa, što se slaže sa navodima iz literature (Leffel, 1988; Holbrook et al., 1989). Sorte Panonka, Balkan i Vojvodanka imale su nižu aktivnost NG i NR (izuzev sorte Balkan) i niži sadržaj rastvorljivih proteina u odnosu na sortu Ranka. Prinos zrna kretao se na

približno jednakom nivou, osim kod sorte Vojvodanka gde je bio veći. Iz dobijenih rezultata za enzim GDH vidi se da je kod svih sorti soje bio prisutan GDH – put asimilacije azota što ukazuje na dobru obezbeđenost ispitivanih sorti NH_4^+ , nastalim kako dejstvom NG, tako i aktivnošću NR. Aktivnost GDH bila je najniža kod sorte Balkan gde je zabeležen i najmanji prinos proteina.

Na osnovu prikazanih rezultata, metodom Path koeficijent analize je proučavana međuzavisnost ispitivanih svojstava

Metod Path koeficijent analize zahteva da se najpre izračunaju sve korelacije između zavisno promenljive i nezavisno promenljivih ($r_{y1}, r_{y2} \dots r_{yk}$), kao i između nezavisno promenljivih ($r_{12}, r_{13} \dots r_{k-1,k}$). Ovi korelacioni koeficijenti prikazani su u tabelama 2 i 4.

Tab. 2. Koeficijenti korelacije između aktivnosti ispitivanih enzima metabolizma azota i prinosa zrna – Correlation coefficients between nitrogen metabolism enzymes activities and seed yield

Enzimi	1	2	3	y
1. NG	1,000	0,799**	0,028	-0,217
2. NR		1,000	-0,280	-0,256
3. GDH			1,000	-0,349
y. prinos				1,000

Signifikantno na nivou 0,05 (*) i 0,01 (**)

Koeficijenti korelacije pokazuju da između aktivnosti metabolizma azota i prinosa nema značajne međuzavisnosti. Svi koeficijenti korelacije su nesigifikantno negativni, što bi moglo navesti na zaključak da aktivnost enzima metabolizma azota nema uticaj na prinos. Međutim, raščlanjivanjem ukupnih uticaja aktivnosti enzima metabolizma azota na prinos, dobija se drugačija slika (tabela 3).

Tab. 3. Path koeficijent analize za prinos zrna – Path coefficient analysis for seed yield

DIREKTNI EFEKTI	INDIREKTNI EFEKTI	
$P_{y1} = 0,3498$	$r_{12}; P_{y2} = -0,5514^*$	$r_{13}; P_{y3} = -0,0155$
$P_{y2} = -0,6901^*$	$r_{21}; P_{y1} = 0,2795$	$r_{23}; P_{y3} = 0,1546$
$P_{y3} = -0,552$	$r_{31}; P_{y1} = 0,0098$	$r_{32}; P_{y2} = 0,1932$
$R^2_{y123} = 0,2934$		

Signifikantno na nivou 0,05 (*) i 0,01 (**)

Uočen je sigifikantno negativan direktan efekat NR na prinos zrna, uz istovremeni sigifikantno negativni indirektni uticaj NG preko NR. Direktan efekat NG na prinos bio je pozitivan. Obzirom da soja prirada grupi biljaka sa sposobnošću azotofiksacije, kod kojih aktivnost enzima NG ima dominantnu ulogu u

snabdevanju biljaka azotom, čini se da bi prinos zrna bio i veći ukoliko bi se aktivnost NG povećala. Kako je NR inducibilan enzim koji direktno zavisi od koncentracije NO_3^- u podlozi, smanjena koncentracija ovih jona u zemljištu smanjila bi aktivnost NR u biljci, a kako je poznat inhibitorni efekat NO_3^- na nodulaciju korenovog sistema soje (Harper, 1989), ovo bi moglo objasniti signifikantno negativan efekat NR na prinos zrna. Direktni efekat GDH na prinos zrna bio je negativan mada ne i signifikantan.

Koeficijenti korelacije između aktivnosti enzima metabolizma azota i sadržaja rastvorljivih proteina prikazani su u tabeli 4. Ustanovljena je signifikantna pozitivna korelacija između aktivnosti NG i sadržaja rastvorljivih proteina što je i očekivano s obzirom na značaj ovog enzima u asimilaciji azota kod soje i njegovu dalju inkorporaciju u proteine. Aktivnost druga dva enzima je takođe u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem rastvorljivih proteina, premda nisu signifikantne.

Tab. 4. Koeficijenti korelacije između aktivnosti ispitivanih enzima metabolizma azota i sadržaja rastvorljivih proteina – Correlation coefficients between nitrogen metabolism enzymes activities and soluble protein content

Enzimi	1	2	3	y
1. NG	1,000	0,799**	0,028	0,674**
2. NR		1,000	-0,280	0,270
3. GDH			1,000	0,226
y. prinos				1,000

Signifikantno na nivou 0,05 (*) i 0,01 (**)

Međutim, path koeficijent analiza pokazuje da direktni pozitivan efekat na sadržaj rastvorljivih proteina ima samo aktivnost NG (tabela 5).

Tab. 5. Path koeficijent analize za sadržaj rastvorljivih proteina – Path coefficient analysis for soluble protein content

DIREKTNI EFEKTI	INDIREKTNI EFEKTI	
$P_{y1} = 1,2836^{**}$	$r_{12}; P_{y2} = -0,6089$	$r_{13}; P_{y3} = -0,0007$
$P_{y2} = -0,7621^{**}$	$r_{21}; P_{y1} = 1,0256^{**}$	$r_{23}; P_{y3} = 0,0065$
$P_{y3} = -0,0233$	$r_{31}; P_{y1} = 0,0359^*$	$r_{32}; P_{y2} = 0,2134^*$
$R^2_{y123} = 0,6541$		

Signifikantno na nivou 0,05 (*) i 0,01 (**)

Iako u ispitivanim sortama soje postoje aktivnosti enzima NR i GDH, njihov direktni efekat na biosintezu rastvorljivih proteina je bio negativan. Enzim NR katalizovao je reakciju primarne asimilacije NO_3^- usvojenih iz zemljišta, dok je enzim GDH katalizovao reakciju nastanka aminokiseline glutamata, početnog jedinjenja u biosintezi proteina. Njihova aktivnost, iako prisutna, bila je od

sekundarnog značaja za biosintezu rastvorljivih proteina jer se najveća količina NH_4^+ jona esencijalnih za biosintezu proteina ipak stvarala enzimskom aktivnošću NG.

ZAKLJUČAK

Na osnovu iznetog može se zaključiti sledeće:

– Ustanovljene su negativne korelacije između prinosa zrna i aktivnosti sva tri ispitivana enzima metabolizma azota;

– Sadržaj rastvorljivih proteina je u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću sva tri ispitivana enzima;

– Direktan efekat aktivnosti NG na oba ispitivana svojstva bio je pozitivan.

Aktivnost enzima NG je od najvećeg značaja za biljke soje, ne samo u pogledu prinosa proteina, već, u perspektivi, i za prinos zrna. Dalja istraživanja međuzavisnosti aktivnosti enzima asimilacije i metabolizma azota u zrnu soje na sadržaj ukupnih proteina, daće potpuniju sliku ovog problema. Rezultati ovih ispitivanja mogli bi se, takođe, primeniti i u selekciji soje sa aspekta odabiranja onih linija koje poseduju veću aktivnost NG, sa ciljem postizanja većih prinosa zrna i povećanog sadržaja proteina.

LITERATURA

- Bergareche, C. and Simon, E. (1988): Nitrate Reductase Activity and Nitrate Content Under Two Forms and Three Levels of Nitrogen Nutrition in *Lolium perenne* L. *J. Plant Physiol.* 132, 28–33.
- Coombs, J. and Hall, D.O. (1982): Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis. Pergamon Press, Oxford, 118–141.
- Fehr, W. R. and Caviness, C. E. (1977): Stages of Soybean Development. Special Report 80, Iowa State University, Ames, Iowa.
- Gašić, O. (1984): Enzimology of Nitrogen Assimilation in Plants. *Period. Biol.* 86, 2, 145–152.
- Guerrero, G.M. (1982): Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis. Pergamon Press, Oxford, 124–130.
- Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K., and Burns, R.C. (1968): *Plant Physiol.* 43, 1185–1207.
- Harper, J. E. (1989) : Nitrogen Metabolism Mutants of Soybean. IV Conferencia Mundial de Investigacion en Soja. 5–9. Marzo 1989, Buenos Aires, Argentina, 212–216.
- Holbrook, C. C., Burton, J. W. and Carter, T. E. (1989): Evaluation of Recurrent Restricted Index Selection for Increasing Yield While Holding Seed Protein Constant in Soybean. *Crop Sci.* 29:324–329.
- Leffel, R. C. (1988): High Protein Lines and Chemical Constituent Pricing in Soybean. *J. Prod. Agric.*, No. 2, 1: 111–115.
- Li, C. C. (1977): Path Analysis – A Primer. The Boxwood Press, Pacific Groove.

- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with Folin – phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.
- Popović, M. (1987): Proučavanje aktivnosti nekih enzima metabolizma azota u različitim inbred linijama kukuruza i suncokreta, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno–matematički fakultet.

PATH COEFFICIENT ANALYSIS OF INTERRELATIONSHIP BETWEEN NITROGEN METABOLISM ENZYMES ACTIVITIES ON SEED YIELD AND SOLUBLE PROTEIN CONTENT IN SOYBEANS

Miladinović, J., Malenčić, Đ., Hrustić, Milica, Gašić Olga, Popović, M., Verešbaranji, I.

Faculty of Agriculture, Novi Sad
Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

SUMMARY

During 1995, field and laboratory investigations have been provided in order to establish interrelationship between nitrogen metabolism enzymes activities on seed yield and soluble protein content in soybeans. Activities of all three enzymes investigated were in negative correlation with seed yield, and in positive correlation with soluble protein content. Path-coefficient analysis showed direct effect of NG activity to be positive on both investigated traits, since direct effects of NR and GDH were negative. The results of investigations showed that NG activity has primary role in nitrogen metabolism in soybean plants.

KEY WORDS: soybean, NG, NR, GDH, path coefficient analysis.