

杨树苗木叶硝酸还原酶活力的初步研究*

刘雅荣 王世绩 周国璋 苏梦云

(中国林业科学研究院林业研究所) (中国林业科学研究院亚热带林业研究所)

关键词 杨树; 硝酸还原酶

硝酸还原酶是植物体内氮素代谢的关键酶。植物从外界环境中吸收的硝酸盐需要经过一系列酶促反应才能转化成氨基酸和蛋白质,以供生长需要。硝酸还原酶是这个代谢过程中的第一个酶,也是个限速酶,其活力的高低与植物同化 NO_3^- -N的能力和速度有直接关系。汤玉玮等的研究发现,硝酸还原酶活力与作物的耐肥性呈负相关^[1],并在综述国内外有关研究文献中指出,该酶可以做为作物育种和营养诊断的生化指标^[2]。

在园艺和林木栽培方面,国内外研究者也开展了一些有关硝酸还原酶的研究工作^[8-12]。周国璋等对杉木的研究结果表明,硝酸还原酶活力与杉木生长速度有密切关系^[4]。

杨树是一个对氮肥反应十分敏感的速生树种。其无性系种类繁多,生长差异很大,是研究硝酸还原酶活力与生长相关性的理想材料。本课题研究的目的在于探讨利用硝酸还原酶及其它有关生理生化指标,作为杨树育种与营养诊断指标的可能性。本文仅报道有关硝酸还原酶试验的初步结果。

一、材料和方法

以温室内水培和苗圃地插条繁殖的一年生苗木为材料。品种有I-69杨 *Populus deltoides* Bartr. cv. "Lux" (ex, I-69/55); 北京杨 *P. nigra* var. *italica* × *P. cathayana* Rehd; 美小杨 *P. nigra* var. *italica* × *P. simonii* Carr; 小黑杨 *P. simonii* Carr × *P. nigra* L.; 合作杨 *P. × Opera* Hsü; 群众杨 *P. × popularis* Hsü 和小叶杨 *P. simonii* Carr。

本试验参照陈薇、张德颐 and 苏梦云、周国璋的方法^[3,4]进行。当苗木具有十个以上叶片时,开始进行硝酸还原酶活力的测定。采集叶样后立即带回试验室,将叶柄插入水中,在水中剪去叶柄基部,用塑料薄膜罩起,在黑暗条件下保湿、平衡4小时,再用25mM KNO_3 溶液浸泡,于2000—3000Lx的日光灯下诱导12小时,进行测定。首先将叶片洗净,擦干,除掉顶部、基部及主脉。称取叶样0.1g,剪成0.5—1.0cm²小块,放到50ml烧杯底部,盖上一层稍大于烧杯底的尼龙网,上面压一个玻璃试剂瓶塞。加入含0.1M KNO_3 、3%正丙醇的0.1M、pH7.5磷酸缓冲液的反应液5ml,反复抽真空,在温度25℃左右、黑暗条件下保温1小时。经180转/分振荡2分钟^[6],吸取1ml反应液,加入1%(W/V)磺胺和0.2%α-茶胺各0.5ml,混合摇匀,静止15分钟后,用721型分光光度计在540nm处测光密度。从标准曲线

本文于1987年12月11日收到。

*刘启实同志参加部分试验工作。

查得 NO_2^- 含量，以 $\text{NO}_2^- \mu\text{M}/\text{h}/\text{g}$ (鲜重)表示酶活力。

二、结果分析

(一) 不同叶顺序和叶龄对硝酸还原酶活力的影响

1. 叶的顺序 晴天上午9时，以顶部展开叶为始，依次向下取样，测定在水培条件下生长的苗木不同叶顺序的叶硝酸还原酶活力。测定前，叶片未经 KNO_3 诱导，试验结果见图1。

由图1看出，刚刚展开的幼叶(叶顺序1)的酶活力很低，随着叶顺序的增加，酶活力逐渐升高，以发育成熟而又未老化的功能叶的硝酸还原酶活力最高(叶顺序7—9)。

2. 叶龄 以北京杨为例(表1)，在田间生长的苗木，叶龄5天硝酸还原酶活力最低，仅 $3.35 \mu\text{mol NO}_2^-/\text{g}\cdot\text{h}$ ，叶龄39天酶活力最高，达 $6.91 \mu\text{mol NO}_2^-/\text{g}\cdot\text{h}$ ，85天以上的叶龄叶酶活力下降到 $3.80 \mu\text{mol NO}_2^-/\text{g}\cdot\text{h}$ 。以上试验结果可作为今后研究硝酸还原酶取样的依据。

表1 北京杨不同叶龄叶的硝酸还原酶活力

| | | ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{g}\cdot\text{h}$) | | | |
|-------|--|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| 叶龄(天) | | 5 | 39 | 85 | 110 |
| 活 力* | | | | | |
| 北 京 杨 | | 3.35 ± 0.54 | 6.91 ± 0.55 | 3.82 ± 0.33 | 3.88 ± 0.29 |

* 数值为三次重复的平均值。

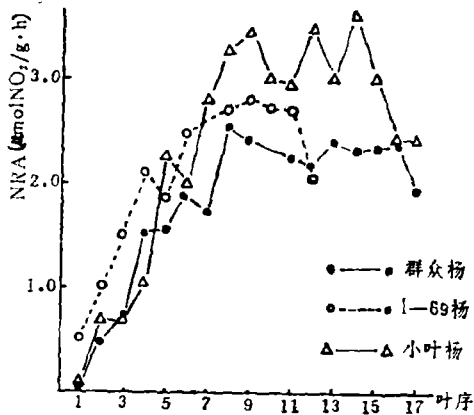


图1 不同叶顺序的叶硝酸还原酶活力

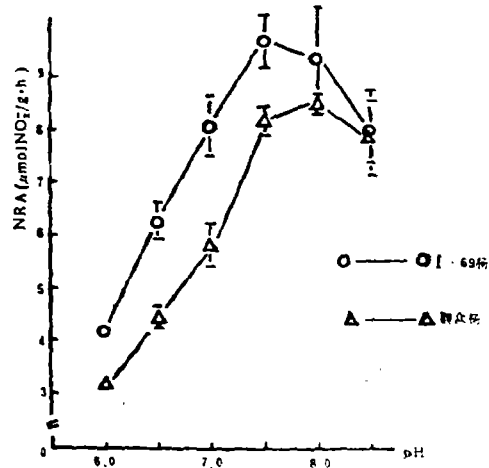


图2 不同pH值反应液中I-69杨、群众杨叶硝酸还原酶活力

(二) pH值对硝酸还原酶活力的影响

pH值影响酶的稳定性。过高或过低于最适pH值时，都会钝化或破坏酶的活力。许多研究者的试验证明，硝酸还原酶反应的最适pH值为7.4^[3]。本试验结果表明(图2)，I-69杨和群众杨反应液最适pH值为7.5—8.0。

(三) 不同器官的硝酸还原酶活力比较

据文献报道,硝酸盐的同化或硝酸还原作用存在于许多植物的根部组织中^[12]。Hewitt指出^[9],硝酸还原酶位于叶绿体外,由细胞质核蛋白体合成。我们的试验结果表明,田间苗木未经KNO₃诱导,杨树叶片、叶柄以及茎的皮部组织中均有硝酸还原酶存在。以合作杨为例(图3),硝酸还原酶活力以苗干上部叶最高,达1.185μmol NO₂⁻/g·h,中部叶次之,1.037μmol NO₂⁻/g·h,下部叶最低,为0.545μmol NO₂⁻/g·h。但是,在叶柄和茎的皮部组织中,硝酸还原酶活力的分布趋势则相反,上部的酶活力最低,分别为0.382、0.688μmol NO₂⁻/g·h,中部次之,达0.515、0.783μmol NO₂⁻/g·h,下部最高,达0.672、0.856μmol NO₂⁻/g·h。叶片硝酸还原酶总活力占苗木地上部分总活力的67.6—69.3%,茎的皮部组织占总活力的26.6—28.5%,叶柄占总活力的4.1—5.7%。

(四) 硝酸还原酶活力的季节变化

从6月3日至9月26日,在田间生长的条件下,测定了几种苗木的生长节律和叶片硝酸还原酶活力。试验结果表明(图4),硝酸还原酶活力的季节变化趋势与苗木生长速度的变化同步进行。除群众杨以外,均以7月16日的酶活力最高,此时正值苗木生长速度最快的时期,8月25日生长速度下降,酶活力亦降低,9月26日苗木顶芽封闭,停止了高生长,此时酶活力降至最低点。

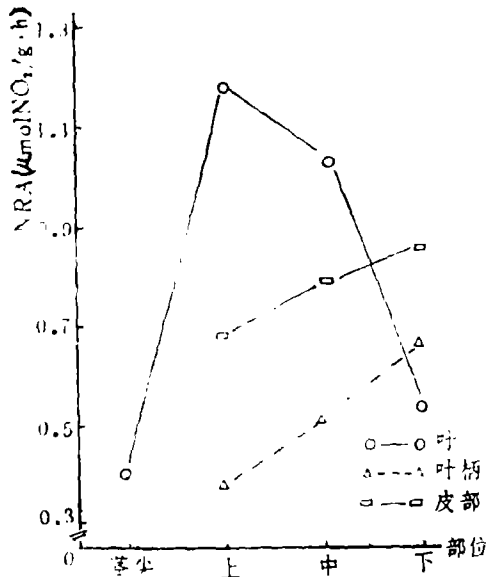


图3 合作杨不同器官中的硝酸还原酶活力

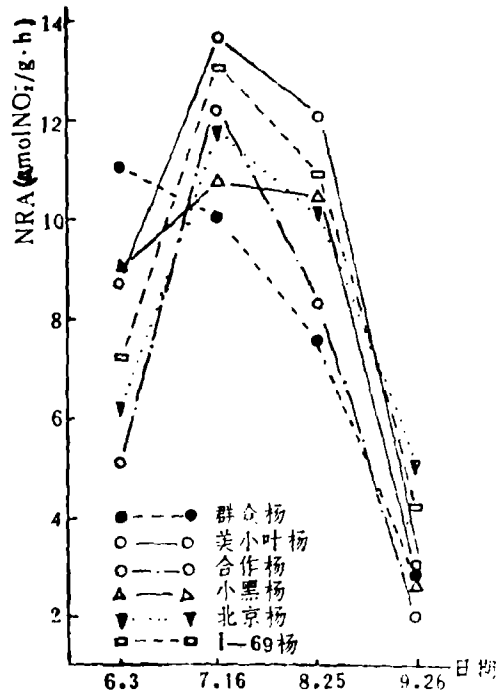


图4 不同杨树苗木叶硝酸还原酶活力的季节变化

三、讨 论

酶是由基因决定的,具有遗传性,直接影响植物体的生长和发育。因此,研究硝酸还原酶与林木营养体生长的相关性和作为新品种遗传性状早期测定的生化指标,是一个很有吸引力的想法。但是,据已有的文献资料报道,不同学者之所以得出不一致的、甚至完全相反的结论^[1,2],可能与生物产量的形成,遗传潜势和多种环境因子的控制有关。因此,单纯利用一个酶活力作为指标,未免过于简单化了。我们的初步试验结果表明,硝酸还原酶广泛分布在一年生杨树苗木的地上部分。用体内法测得不同组织硝酸还原酶活性,以叶活性最高,占地上部分总活性67.6—69.3%,而功能叶活性比老叶、幼叶高,在整个生长季节中,7月分活性最高,9月末活性降低。由于在田间条件下,不同杨树无性系或同一无性系内的不同个体,其硝酸还原酶活力的变异较大,试验重复性较差,有待于今后改进测定方法和控制苗木的培养条件。如将硝酸还原酶活力与整个氮素代谢水平联系起来分析,可能更有助于达到预期的目标,这也是我们下一步需要继续探索的课题。

参 考 文 献

- [1] 汤玉玮等, 1985, 硝酸还原酶活力与作物耐肥性的相关性及其在生化育种上应用的探讨, 中国农业科学, (6), 39—45。
- [2] 汤玉玮等, 1985, 硝酸还原酶在农业上应用的研究动态, 农业科技动态(141): 1—5。
- [3] 陈薇、张德颐, 1980, 植物组织中硝酸还原酶的提取、测定和纯化, 植物生理学通讯, (4): 45—49。
- [4] 苏梦云、周国璋, 1986, 树木组织中硝酸还原酶测定方法, 林业科技通讯, (7): 25—27。
- [5] 周国璋等, 1985, 不同生长速率的杉木硝酸还原酶活力比较, 林业科技通讯, (2): 6—8。
- [6] 周树、郑相穆, 1985, 硝酸还原酶体内分析方法的探讨, 植物生理学通讯, (1): 47—49。
- [7] J. 邦纳, 1984, 植物生物化学, 科学出版社, 437—438。
- [8] 阚文靖, 1986, 油茶硝酸还原酶初步研究, 经济林研究, 4(2): 63—65。
- [9] Pokhriyal, T. C. and Raturi, A. S., 1985, A study of nitrate reductase activity in the *populus deltoides* leaves, Indian Forester, 111(2): 82—89。
- [10] Pizelle, G. and Thiery, G., 1986, Reduction of nitrate in the perennial tissues of aerial parts of *Alnus glutinosa*, Physiol. Plantarum, 68(3): 347—352。
- [11] Wingsle, G., 1987, Induction of nitrate reductase in needles of Scots pine seedlings by NO_x and NO_3^- , Physiol. Plantarum, 70(3): 399—403。
- [12] Loyola-Vargas, V. W., 1986, Changes in the activity of the enzymes involved in nitrogen metabolism in *Catharanthus roseus* depending on different nitrogen sources, Can. J. Bot., 64(9): 2052—2056。
- [13] Rufty, T. W., 1986, Intercellular localization of nitrate reductase in roots, Plant Physiol., 82: 675—680。

A PRELIMINARY STUDY ON NITRATE REDUCTASE IN THE LEAVES OF POPLAR

Liu Yarong Wang Shiji

(The Research Institute of Forestry CAF)

Zhou Guozhang Su Menyun

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

Abstract

Nitrate reductase activity of several poplar clones were studied under the controlled condition both in greenhouse and field in 1986—1987. Nitrate reductase activity was minimum in the young leaves, while maximum in the mature but no senescence leaves. Studied on two poplar clones indicated: optimum pH value of NR reaction solution was 7.5 or 8.0. There are nitrate reductase in the leaves, leaf stalks and barks. The highest NRA appeared in leaves of upper shoot up to $1.185\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g}\cdot\text{h}$, the lowest in the basement: $0.545\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g}\cdot\text{h}$ and with the moderation appeared in the middle ($1.037\mu\text{mol NO}_2^-/\text{g}\cdot\text{h}$) In contrast, the minimum value of NRA appeared in the upper leaf stalks and barks, smaller in the middle and the maximum appeared in the lowest. The NRA of leaves contained 67.6—69.3% of total NRA of aerial parts of plants, while barks and leaf stalks contained only 26.6—28.5%, and 4.1—5.7% respectively. The activity of nitrate reductase changes with the growth rhythm in the seasons.

Key words: poplar; nitrate reductase