

文章编号: 1001-1498(2000) 02-0141-06

# 桉木叶片中 NO 与硝酸盐还原系统 关系的研究

苏梦云, 吴祖洪

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳 311400)

**摘要:** 在桉木生长期间, 叶片中的一氧化氮(NO)含量和一氧化氮合成酶(NOS)活力随生长而变化, 即生长初期水平较低, 以后逐渐升高, 生长高峰期达到最高值, 随后在叶片开始衰老时下降。硝酸还原酶(NR)和谷氨酰胺合成酶(GS)的活力变化与 NOS 活力的变化类似, 但 NR 活力高峰出现比 NOS 早, 而 GS 活力高峰期在 NOS 之后。用 NO 处理, 叶片中 NO 含量和 NOS 活力都有所增加, 但 NR 活力只在幼苗中表现增加, 而在离体枝条的叶片中则下降。在 NO 处理时供给枝条  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$  溶液, 可明显提高叶片中的 NR 活力。如只用  $\text{KNO}_3$  溶液诱导处理, 除 NR 活力增加外, 也能提高叶片中的 NO 含量和 NOS 活力。这表明 NO 和 NOS 与 NR、硝酸盐还原系统有一定联系。

**关键词:** 桉木; 一氧化氮(NO); 一氧化氮合成酶(NOS); 硝酸还原酶(NR);

中图分类号: S718.43

文献标识码: A

一氧化氮(NO)是大气污染的成分之一, 常以氮氧复合物的形式( $\text{NO}_x + \text{NO}$ )出现。它与臭氧和二氧化硫等气体污染物一样, 对生物体具有明显的伤害作用。近年来, 在动物和医学方面的研究发现, NO 具有奇妙的二重性。它一方面作为活性氮自由基具有细胞毒性, 干扰鸟氨酸循环<sup>[1]</sup>; 另一方面它是一种气体信使分子, 能传导神经递质<sup>[2,3]</sup>、调节行为和保持长时记忆<sup>[4,5]</sup>。因此对 NO 的研究成为国内外生化研究的热点之一。

在植物的研究上初步表明, NO 在生长发育中也具有二重性。其既有伤害作用的一面, 又具有利于生长的一面。Leshem 等<sup>[7]</sup>研究指出, 低浓度的 NO 能促进豌豆(*Pisum sativum* Linn.) 叶圆片的生长, 而高浓度的 NO 则抑制生长。NO 与乙烯也有密切关系<sup>[6]</sup>。

硝酸盐还原系统是植物氮素同化的重要还原系统。硝酸还原酶(NR)是氮素同化的关键酶, 与树木的生长呈正相关<sup>[8]</sup>。NO 与 NR 的氮素同化系统有何关系, 尚不清楚。本文以非豆科固氮树种——四川桉木(*Alnus cremastogyne* Burkill)为材料, 研究 NO 在桉木中的形成和变化及其与硝酸盐还原系统的关系, 以期从硝酸盐还原方面阐明 NO 在树木中的生理作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

以四川桉木幼苗(6个月龄)和幼树(1年生和2年生)作材料。

收稿日期: 1999-08-23

基金项目: 浙江省自然科学基金项目“一氧化氮与植物氮代谢及信号传导酶之间关系的研究”(编号: 397273)的部分内容

作者简介: 苏梦云(1942-), 女, 福建莆田人, 副研究员。

NO 变化规律的分析测定采用 1 年生幼树, 在 5 ~ 10 月分别取其顶部成龄叶片(顶起第 3 片)进行 NO 含量和有关酶活力的测定。每月取 1 次样, 每个测定项目取 6 株树的叶片, 分单株制样、测定。对不同叶龄叶片的比较测定, 按叶片不同着生部位取样测定。

NO 处理试验采用 2 年生幼树和幼苗。在生长旺盛期(7 月份)取幼树的带叶小枝插入盛有水或  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$  溶液的细口瓶中, 置于透明的反应室( $36 \text{ dm}^3$ )内。试验前抽去反应室内气体, 同时充入经过焦性没食子酸和亚硫酸氢钠双重过滤的空气, 以降低反应室气体中的氧分压。试验材料经过不同浓度的 NO 和不同时间处理后, 取顶部成龄叶片进行分析测定, 每个处理 10 个小枝。以幼苗试验时, 直接将土杯苗置于反应室内, 每个处理 5 株苗, 取成龄叶片(鲜样)进行分析测定。

## 1.2 试验方法

1.2.1 NO 发生方法 按照 Leshem 和 Haramaty 方法<sup>[7]</sup>, 即根据化学反应式  $2\text{KNO}_2 + 2\text{KI} + 2\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{NO} + \text{I}_2 + 2\text{K}_2\text{SO}_4$ , 先制备 A 液( $0.1 \text{ mol KI} + 0.1 \text{ mol H}_2\text{SO}_4$ )和 B 液( $50 \mu\text{mol KNO}_2$ ), 试验时将 B 液注入 A 液进行反应。反应完全产生的 NO 摩尔数等同于反应 B 液的  $\text{KNO}_2$  摩尔数。

1.2.2 NO 含量测定 采用亚硝酸盐法, 利用磺酰胺和萘乙二胺显色, 在波长  $520 \text{ nm}$  下测定光密度。

1.2.3 NO 合成酶(NOS)活力测定 采用精氨酸氧化法, 以精氨酸作底物, NADPH 作辅酶, 测定产生的 NO。酶活力以  $\mu\text{mol NO} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  表示。

1.2.4 硝酸还原酶(NR)活力测定 按文献[9]方法。测定前不进行诱导处理。

1.2.5 谷氨酰胺合成酶(GS)活力测定 基本按黄维南方法<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 桉木不同叶片中的 NO 含量和 NOS 活力比较

在桉木不同发育程度的叶片中都可以检测到 NO 含量和 NOS 活力, 而且表现出明显的差异。在刚展开的叶芽中 NO 含量甚微; 随着叶片的生长, NO 的浓度明显提高; 成龄叶中略有下降, 到叶片开始角质化时明显减少。NOS 活力的变化趋势为幼嫩叶片中较低, 成龄叶片中较高, 而角质化叶片中明显下降(表 1)。从表 1 可以看出, 在不同叶片中 NO 的变化趋势基本与 NR 活力的变化趋势相同, 均在生长活跃的幼叶中水平较高。

表 1 桉木不同叶片中 NO 含量和 NOS、NR 活力的比较

叶片类型	NO/ ( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )	NOS/ ( $\text{nmol NO} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	NR/ ( $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	叶片形态特征
芽 叶	微量	351	0.79	黄绿色, 长 × 宽 $3.0 \text{ cm} \times 2.0 \text{ cm}$
幼叶(1)	145	355	1.23	黄绿色, 长 × 宽 $6.0 \text{ cm} \times 3.5 \text{ cm}$
幼叶(2)	133	558	1.20	浅绿色, 长 × 宽 $9.0 \text{ cm} \times 5.5 \text{ cm}$
成龄叶(1)	100	606	0.60	绿色, 长 × 宽 $9.5 \text{ cm} \times 5.5 \text{ cm}$
成龄叶(2)	125	770	0.34	绿色, 长 × 宽 $11.0 \text{ cm} \times 8.0 \text{ cm}$
角质化叶	72	498	0.29	深绿色, 长 × 宽 $10.0 \text{ cm} \times 5.5 \text{ cm}$

## 2.2 桉木生长期 NO 含量和 NOS 及 NR 活力的变化

桉木在浙江富阳地区的生长期一般在 4~11 月,以后叶片便逐渐黄化脱落。在幼树(1 年生)的成龄叶中的 NO 含量从 5~7 月不断增加,以后则迅速下降(图 1)。在生长旺盛期(7 月)叶片中的 NO 含量最高,为  $3.3 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ ,比生长初期的(5 月)叶片中的 NO 含量增加 2.3 倍。这表明 NO 在桉木生长过程中起一定的作用。可能适当的 NO 浓度有利于桉木的生长。

在桉木生长期 NOS 活力变化趋势与 NO 的变化相同,均以生长旺盛期(7 月)的水平最高。在生长旺盛期叶片中的 NOS 活力为  $2.4 \mu\text{mol NO} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,比生长初期增加了 1.1 倍。从 7 月下旬开始,由于高温干旱,桉木生长受到明显的影响,酶活力难以测定。到 9 月中旬生长有所恢复,但 NOS 活力仍相当低(图 2)。这也表明 NOS 对内源 NO 水平有一定的调节作用。

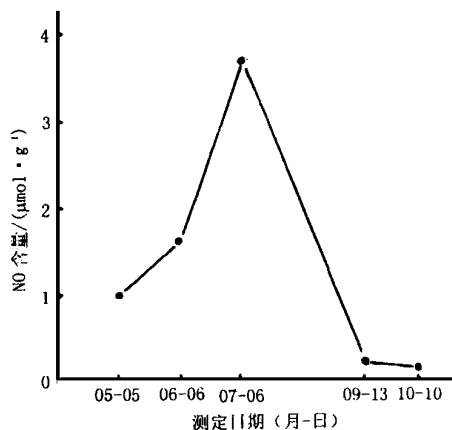


图 1 桉木叶片中 NO 含量的变化

从图 2 还可以看出, NR 活力在生长初期(5 月)很低,但到 6 月份增加了 7.6 倍,7 月份仍保持较高的活力,随后逐渐降低。作为硝酸盐还原系统后续的  $\text{NH}_4^+$  同化酶——谷氨酰胺合成酶(GS)活力也是从生长初期逐渐增加,其活力高峰出现在 9 月中旬,至 10 月份又下降到生长初期的水平。这表明 NR、GS 和 NOS 3 种酶在桉木生长过程中都起着一定的作用。

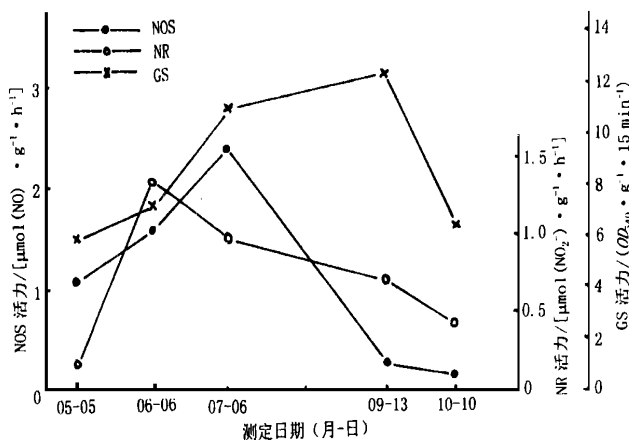


图 2 桉木生长期 NOS、NR 和 GS 活力变化

从图 2 还可以看出, NR 活力在生长初期(5 月)很低,但到 6 月份增加了 7.6 倍,7 月份仍保持较高的活力,随后逐渐降低。作为硝酸盐还原系统后续的  $\text{NH}_4^+$  同化酶——谷氨酰胺合成酶(GS)活力也是从生长初期逐渐增加,其活力高峰出现在 9 月中旬,至 10 月份又下降到生长初期的水平。这表明 NR、GS 和 NOS 3 种酶在桉木生长过程中都起着一定的作用。

## 2.3 NO 处理对 NOS 和 NR 活力的影响

以  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  NO 处理幼苗和幼树(2 年生)的枝条对叶片内源的 NO 含量和 NOS 及 NR 的活力产生不同的影响(图 3)。处理 5 min, NO 含量和 NOS、NR 活力都有所提高,随后 NO 基本保持这一水平。NOS 和 NR 活力的变化在幼苗和离体枝条中有所不同。在幼苗中,用

NO 处理 10 min 以后 NOS 和 NR 活力都表现出缓慢的增加趋势;而在离体枝条的叶片中, NOS 和 NR 活力在处理 10 min 以后基本呈下降趋势。这表明低浓度 NO 短时间处理能提高 NR 活力,有利于生长。

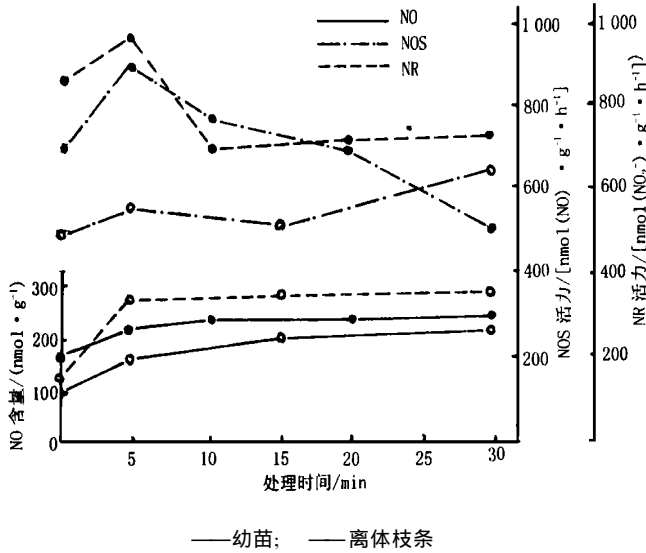


图 3 NO 不同处理时间对 NOS 和 NR 活力的影响

用更低浓度(5~30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) NO 处理 10 min, 均能提高离体枝条叶片中的 NO 含量, 以 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的 NO 处理的效果最显著; 在 5~30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NO 处理时, NOS 活力均有显著增加; NR 活力仅在 5~10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NO 浓度下表现增加, NO 浓度高于 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理 10 min 时, NR 活力下降(图 4)。低浓度 NO 短时间处理能提高柃木叶片中 NR 和 NOS 活力这一现象, 反映出 NO 可能起着某种信息传导或诱导因子的作用。

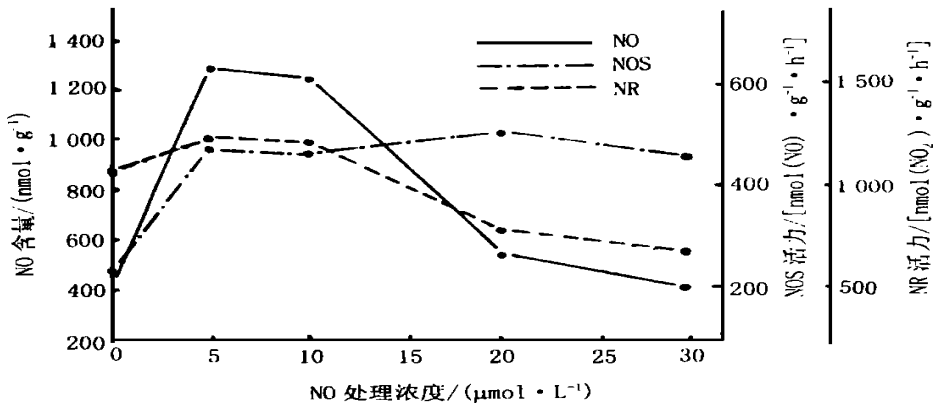


图 4 不同浓度 NO 处理对 NOS 和 NR 活力的影响

## 2.4 硝酸盐诱导处理对 NO 和 NOS 的影响

用  $\text{KNO}_3$  溶液处理, 不仅提高了叶片中的 NR 活力, 且提高了 NOS 和 NO 的水平。用 10

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NO 处理 30 min, 叶片中 NO 浓度有所增加, 但 NOS 活力并未增加, 而 NR 活力则明显下降(表 2)。

表 2  $\text{KNO}_3$  处理对桉木叶片中 NO 和 NOS 活力的影响

处 理	NR/ ( $\text{nmol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	NOS/ ( $\text{nmol NO} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	NO/ ( $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ )
CK	448	516	35
$\text{KN O}_3(0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	638	669	66
$\text{NO}(10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	262	521	60
$\text{NO} + \text{KNO}_3$	563	591	85

在用 NO 处理的同时供给  $\text{KNO}_3$ , 不仅提高了 NR 活力, 而且也使 NOS 和 NO 水平明显提高。这表明 NR 活力的提高对叶片内 NO 和 NOS 的水平也有一定的调节作用。叶片保持高 NR 活力的生理状态较能适应外源 NO 的影响。

### 3 讨 论

植物体内的 NO 是由 NOS 在 NADPH 的参与下, 使精氨酸氧化成瓜氨酸时而产生的<sup>[7]</sup>。在硝酸盐还原过程中也产生 NO, 但很快被继续还原<sup>[13]</sup>。通常在植物体内 NO 的含量很低, 当植物受到大气中  $\text{NO}_x$  污染或进行 NO 胁迫时, 生长受到抑制, 主要是植物体内的 NO 浓度迅速增加, 引起组织和器官的伤害。桉木用低浓度( $5 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) NO 进行短时间处理( $5 \sim 10 \text{ min}$ ) 对生长有利。这与 NO 增加豌豆叶圆片生长的结果一致<sup>[7]</sup>。桉木生长旺盛期叶片中含有较高的 NO 和 NOS 活力表明, 在其体内保持适当的 NO 浓度对生长是有益的。

NR 在硝酸盐还原系统中起关键作用。NR 把硝酸盐逐步还原成  $\text{NH}_4^+$  ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NH}_4^+$ ), 而 GS 又把  $\text{NH}_4^+$  同化为谷氨酰胺并参与氨基酸循环<sup>[13]</sup>, 所以 NR 活力与树木生长呈正相关<sup>[8]</sup>。较高浓度的 NO 处理或处理时间过长, 使叶片中 NR 活力受到明显抑制甚至引起伤害。但在 NO 处理时用  $\text{KNO}_3$  诱导 NR 活力, 也能提高 NOS 活力和内源 NO 浓度, 表明桉木在正常的生长中需要维持适当的 NO 浓度和 NR 活力。NO 对 NR 活力有一定的调节作用, 而 NR 活力的变化对 NOS 和 NO 的水平也产生影响。在植物硝酸盐还原系统中, NO 与亚硝酸还原酶还原的产物形式相同, 所以 NO 对 NR 的调节不是参与还原系统, 很可能是起着一种诱导信号的作用。

### 参考文献:

- [1] Feldman P L, Griffith O W, Stuehr D J. The surprising life of nitric oxide [J]. Chem Eng News, 1993, 71: 26 ~ 38.
- [2] Snyder S H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters [J]. Science, 1992, 257: 494 ~ 496.
- [3] Madison D V. Pass the nitric oxide [J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1993, 90: 4329 ~ 4331.
- [4] Fin C, De Cunha C, Bromberg C, et al. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes [J]. Neurobiol Learn Memory, 1995, 113 ~ 115.
- [5] Anderson K E, Wagner Y. Physiology of penile erection [J]. Physiol Rev, 1995, 75: 191 ~ 236.
- [6] Leshem Y Y, Rapaport D, Frimer A A, et al. Buckminsterfullerene ( $\text{C}_{60}$  carbon allotope) inhibits ethylene evolution from 1-aminocyclopropane-carboxylic acid (ACC)-treated shoots of pea (*Pisum sativum*), broadbean (*Vicia faba*) and flowers of carnation (*Dianthus caryophyllus*) [J]. Ann Bot, 1993, 72: 457 ~ 461.

- [ 7 ] Leshem Y Y, Haramaty E. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. Foliage [ J ]. J Plant Physiol, 1996, 148: 258 ~ 263.
- [ 8 ] 周国璋, 苏梦云. 杉木硝酸还原酶活力、氮素贮藏与其生长的关系[ J ]. 林业科学研究, 1993, 6( 2 ): 141 ~ 147.
- [ 9 ] 苏梦云, 周国璋. 树木硝酸还原酶活力测定方法[ J ]. 林业科技通讯, 1986, ( 7 ): 25 ~ 27.
- [ 10 ] 薛应龙. 植物生理学实验手册[ M ]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 223 ~ 225.
- [ 11 ] Anderson L S, Mansfield T A. The effect of nitric oxide pollution on growth of tomato [ J ]. Environ Pollut, 1979, 20: 113 ~ 121.
- [ 12 ] Neighbour E A, Pearson M, Mehlhorn H. Purafil filtration prevents the development of ozone-induced frost injury: a potential role for nitric oxide [ J ]. Atmos Environ, 1990, 24 A : 711 ~ 715.
- [ 13 ] 汤玉玮, 林振武. 硝酸还原酶活力与作物耐肥性的相关及其在生化育种上应用的探讨[ J ]. 中国农业科学, 1985, ( 6 ): 39 ~ 45.

## Study on Relationship between Nitric Oxide and Nitrate Reduction in Leaf of *Alnus cremastogyne*

SU Meng-yun, WU Zhu-hong

(The Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

**Abstract:** The nitric oxide (NO) content and nitric oxide synthase (NOS) activity in seedlings varied with the growing period of *Alnus cremastogyne*. In the initial stage, NO content and NOS activity were low. They gradually raised until the peak of the growth. When leaf began aged, the NO content and NOS activity turned to low level. The changes of nitrate reductase (NR) and glutamine synthase (GS) activities in growing period were similar to the NOS, but the maximum activity of NR appeared earlier than that of NOS. The former was in June and the latter was in July. GS maximum activity appeared in September. When leavies were directly exposed to NO ( $5 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), NO content and NOS activity appeared obvious increase. NR activity in seedling leaf (in vivo) raised, and in young tree leaf (in vitro) reduced. Treated with NO the nitrate reductase (NR) activity in branch 's leaf cultivated in  $\text{KNO}_3$  solution ( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) obviously raised. If branch were directly cultivated in  $\text{KNO}_3$  solution, NO content and NOS activity appeared increase except for NR activity. The results showed that there exist relationship between the level of NO and NOS, and growing of *A. cremastogyne*. NO related to nitrate reduction.

**Key words:** *Alnus cremastogyne*; nitric oxide(NO); nitric oxide synthase(NOS); nitrate reductase(NR)