

# 聊红国槐叶片硝酸还原酶活性测定方法的研究

邱艳昌<sup>1</sup>, 段祖安<sup>2</sup>, 李道强<sup>1</sup>, 强薇<sup>2</sup>

(1. 聊城大学 山东 聊城 252021; 2. 山东农业大学 林学院 山东 泰安 271000)

**摘要:**以聊红国槐(*Sephora japonica* Liao hong)为试验材料,探讨体内法测定其叶片硝酸还原酶活性的若干问题,分析比较了硝酸盐诱导,2,4—二硝基苯酚,三氯乙酸及煮沸等因素对硝酸还原酶活性测定结果的影响,以寻求体内法测定聊红国槐叶片硝酸还原酶活性的最佳条件。试验表明:体内法是一种操作简便可靠测定聊红国槐叶片硝酸还原酶活性的方法,这为进一步研究国槐的氮代谢奠定生物学基础。

**关键词:**聊红国槐; 硝酸还原酶; 体内法

**中图分类号:** Q 94-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)08-0120-03

在植物生长发育过程中,完成植物生长发育周期所需要的各种营养元素,缺一不可,各种元素相互作用相互协调,才能使植物生长健壮,达到人们预期生长的效果。在大量和微量元素中,氮素是植物生长发育的主要元素。氮元素只能以硝态氮、铵态氮和氨基态氮3种形

式被植物吸收利用<sup>[1]</sup>。氮元素主要以硝酸盐的形态被植物吸收<sup>[2]</sup>。进入植物体内的硝态氮,在硝酸还原酶(NR)的作用下还原为氨,氨与蛋白质中的炭原子结合,形成氨基酸和酰胺,参与蛋白质、核酸和含氮次生代谢物的物合成,供生长代谢需要,硝酸还原酶(NR)是催化硝态氮转化为氨的关键酶和限速酶<sup>[3]</sup>,它作用于 $\text{NO}_3^-$ 还原于 $\text{NO}_2^-$ , $\text{NO}_3^- + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ ,产生的 $\text{NO}_2^-$ 可以从组织内渗透到外界溶液中,并积累在溶液中,测定反应溶液中 $\text{NO}_2^-$ 的含量的高低,即表明酶活性的大小。硝酸还原酶活性(NR)高低与作物的氮素利

**第一作者简介:**邱艳昌(1954),男,硕士,副教授,主要从事园林研究及园艺教学工作。

**通讯作者:**李道强。E-mail: lidaoqiang@lcu.edu.cn.

**收稿日期:**2008-02-10

[14] 黄炜玲,罗红艺,林赛君,等.不同保鲜剂对百合切花衰老的影响[J].植物生理学通讯,2006,42(6):1113.

[15] 李金枝,罗红艺,景红娟,等.预处理及低温贮藏对麝香百合切花的保鲜作用[J].华中师范大学学报(自然科学版),2004,38(2):490.

[16] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2003.

[17] 易朝辉,任传忠,王宇,等.水杨酸对菊花花瓣生理和花期的影响[J].安徽农业科学,2006,34(17):4225-4226.

[18] 卜芸华,曹广芝.不同配方的保鲜剂对瓶插切花延缓衰老的效果研究[J].河南大学学报(自然科学版),2000,30(1):68-70.

[19] 张华,熊运海.切花衰老与保鲜技术研究综述[J].江西农业大学学报,2000,22(3):455-460.

[20] 熊元,孙锐锋,王文华.保鲜剂对非洲菊切花瓶插时间的影响[J].贵州农业科学,2001,29(6):30-31.

[21] 沈成国.植物衰老生理与分子生物学[M].1版.北京:中国农业出版社,2001:172-173.

## Salicylic Acid and 6-BA Effects in Shelf-life Improvement of *Gerbera jamesonii* Cut Flowers

FAN Mei-hua, WANG Jian-xin, SHI Ge, SHI Li-na, LI Ruo-fan

(Marine Science Technology, College of Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Guangdong 316004, China)

**Abstract:** The effects of shelf-life-enhancing liquid agents of SA and 6-BA on the shelf life, and water balance and petal membrane permeability, POD activity, proline content of the cut flowers of *Gerbera jamesonii* were studied. The results indicated that SA could take place of 8-hydroxyquinoline as shelf-life-enhancing liquid agents, and the treatments with 20~70 mg/L 6-BA could prolong the vase-holding time, increase the fresh weight, the diameter and petal length, their water-retaining capacity, reduce the membrane permeability and proline content, increase POD activity. Among the seven types of treatments, the T1 type (2% sucrose + 50 mg/L salicylic acid + 20 mg/L 6-BA) was the best.

**Key words:** *Gerbera jamesonii*; Cut flower; Preservation freshness; Salicylic acid; 6-BA

用效率有密切关系。在植物代谢的研究中, 硝酸还原酶活性是研究重点之一。目前, 报道硝酸还原酶活性的测定方法主要有体外法<sup>[3]</sup>和体内法<sup>[4]</sup>, 但有关聊红国槐氮代谢中硝酸还原酶活性测定的方法还未见报道。为此探讨用体内法测定聊红国槐叶片硝酸还原酶活性的最佳条件, 为进一步研究聊红国槐的氮素代谢奠定基础<sup>[5-9]</sup>。

1 材料和方法

以 1 a 生聊红国槐枝条为材料, 摘取全株成熟叶片测定硝酸还原酶, 每个处理重复 3 次。

1.1 试验材料的 KNO<sub>3</sub> 诱导处理

硝酸还原酶是一种诱导酶, KNO<sub>3</sub> 溶液诱导可以提高材料中的硝酸还原酶活性<sup>[6-15]</sup>。该试验进行了 KNO<sub>3</sub> 溶液诱导处理。将聊红国槐当年枝条用蒸馏水洗净后, 插入 100 mmol/L KNO<sub>3</sub> 的溶液中进行诱导处理(为防止水分蒸发, 将枝条用透明薄膜包被), 处理时间为 24、36 和 48 h, 每天的光、暗周期各 12 h。并与未进行诱导处理的当年生苗进行比较。

1.2 硝酸还原酶活性测定

参照周树等<sup>[9]</sup>的体内测定法, 测定聊红国槐叶片硝酸还原酶。从聊红国槐当年生枝条上取下叶片, 用蒸馏水洗净、吸干, 用直径为 1 cm 的打孔器打成多个圆片, 随机取 50 个叶圆片准确称重, 置于 50 mL 三角烧瓶中, 加入 10 mL 含 0.2 mol/L KNO<sub>3</sub> 的磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.5), 空白试验的磷酸缓冲液中不含 KNO<sub>3</sub>。将三角烧瓶放入真空干燥器中抽气, 反复数次, 使叶片完全沉于液面下, 取出三角烧瓶置于 30℃温箱中, 暗保温 30 min, 保温结束后取 1 mL 反应液于试管中, 加入 2 mL 1% 磺胺溶液、2 mL 0.2% 1-萘胺溶液, 30℃下静放 30 min, 用 TU-1810 型分光光度于 520 nm 波长下比色 NR 以 1 g 鲜重材料每小时催化生成 NO<sub>2</sub> 的微摩尔数表示<sup>[8]</sup>。在上述基本流程基础上, 处理如下。①2, 4-二硝基苯酚(DNP)处理: 根据加入 DNP 能够提高 NR 测定值的报道<sup>[7]</sup>, 分别在抽气前和抽气后向三角烧瓶中加入 2 mL(1 mmol/L)的 DNP, 以阻止 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 被进一步还原, 比较抽气前和抽气后加入 DNP 对 NR 的影响。②1, 6-二磷酸果糖处理: 在抽气前向三角烧瓶中加入 2 mL 2.5 mmol/L 的 1, 6-二磷酸果糖溶液, 为硝酸还原酶的诱导合成提供能量<sup>[9]</sup>。③三氯乙酸(TCA)处理: 暗保温结束后, 加入 0.5 mL 三氯乙酸(1%), 使酶钝化。④暗保温处理: 分别保温 20、30、40 min。⑤煮沸处理: 为使暗保温产生的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 彻底从叶片组织中渗出来, 将暗保温 30 min 后的反应液分别煮沸 5、8、11、14 min, 并与未煮沸的进行比较<sup>[10-12]</sup>。

2 结果与分析

2.1 硝酸盐诱导对 NR 的影响

从图 1 可以看出, 经过诱导的聊红国槐枝条叶片中 NR 明显高于未经诱导处理的。但诱导 36 h 和 48 h 的 NR 差异不显著。一般情况下, 用 100 mmol/L 的 KNO<sub>3</sub> 溶液, 对聊红国槐幼苗诱导 48 h 即可得到较好的结果, 可以提高 NR 的测定值及试验的重现性和可比性。

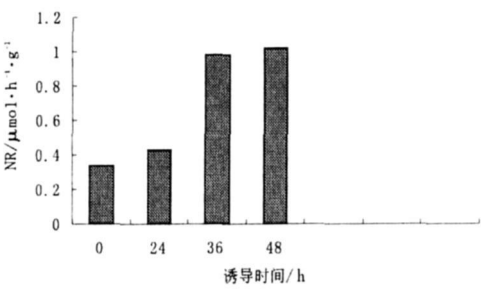


图 1 诱导时间对聊红国槐 NR 的影响

注: 数据为平均值±标准误(n=3), 误差线上相同字母表示差异不显著(p=0.05)。

2.2 DNP 处理对 NRA 的影响

比较表 1 中 A 和 B 的数据可以看出, 在抽气前加入 DNP 比抽气后加入的 NR 高, 二者差异显著, 原因可能在于: 抽气前加入 DNP 阻止了反应液内的 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 在抽气过程中被亚硝酸还原酶进一步还原, 因此在抽气前加入 DNP, 有利于 NR 的测定。

表 1 不同处理方法对聊红国槐叶片中 NR 的影响

处理	1, 6-二磷酸果糖	DNP		TCA	煮沸	NR / (μmol · L <sup>-1</sup> )
		抽气前	抽气后			
A	+	+		+	+	1.340±0.02
B	+	-		+	+	1.082±0.05
C	-	+		+	+	1.045±0.06
D	+	+		-	+	1.363±0.03

2.3 1, 6-二磷酸果糖处理对 NR 的影响

比较表 1 中 A 和 C 的数据还可以看出, 加入 1, 6-二磷酸果糖的比未加的 NR 高, 二者差异显著。有报道认为<sup>[8]</sup>, 加入的 1, 6-二磷酸果糖能为硝酸盐同化提供更多的还原力, 保证反应体系所需要的能量。

2.4 三氯乙酸处理对 NR 的影响

将表 1 中 A 和 D 两数据相比较可以看出, 是否加入 TCA 对 NR 的测定结果几乎没有影响。TCA 的作用在于使酶钝化而终止反应。煮沸使所有蛋白质彻底失活, 两者作用相互掩盖, 影响不显著。

2.5 暗保温时间对 NR 的影响

从图 2 可以看出, 在 30 min 以内, NR 与暗保温时间几乎呈线性关系, 超过 30 min 则 NR 趋于平稳。周国章等报道了 NR 在暗保温 30~40 min 内的变化<sup>[4]</sup>, 35 min 时 NRA 最高, 40 min 时略有下降<sup>[9]</sup>, 从试验的结果看, 对于聊红国槐枝条叶片的 NR 测定, 选择 30 min 的暗保温时间比较适合。

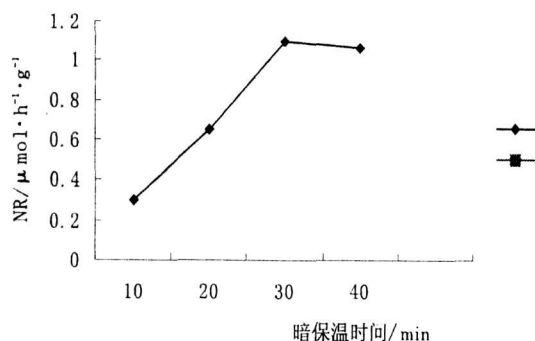


图2 暗保温时间对NR的影响

## 2.6 煮沸时间对NR的影响

从图3可以看出,煮沸处理能显著提高聊红国槐叶片的NR,且随着煮沸时间的延长,NR也逐渐增高,煮沸10 min时NR最高,继续煮沸,NR则无明显变化。这说明煮沸处理可以使在暗保温过程中产生的 $\text{NO}_2^-$ 更彻底地从叶片组织中渗出来。有关研究也认为<sup>[7,11]</sup>,体内法测定NR的数据稳定性与 $\text{NO}_3^-$ 能否充分进入叶片, $\text{NO}_2^-$ 是否充分渗出有一定的相关性,因而测定聊红国槐幼苗叶片的NR时,在暗保温结束后进行煮沸处理是十分必要的。

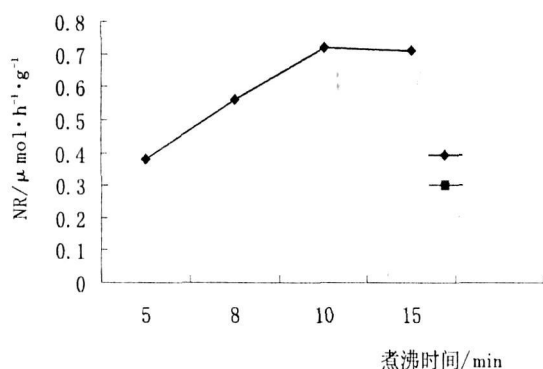


图3 煮沸时间对聊红国槐的影响

## 3 结论

### Determination Method of Nitrate Reductase Activity in the Leaves of *Sephora japonica* Liahong

QIU Yan-chang<sup>1</sup>, DUAN Zu-an<sup>1</sup>, LI Dao-qiang<sup>1</sup>, QIAN G wei<sup>2</sup>

(1. Liaocheng University, Liaocheng Shandong 252021, China 2. Forestry College Shandong Agriculture University, Tai'an Shandong 271000, China)

**Abstract:** By using leaves of *Sephora japonica* Liao hong as experimental materials, the determination of the nitrate reductase activity in the leaves of *Sephora japonica* Liao hong was discussed by in vivo method. The effects of several main factors of in vivo method such as nitrate induction, 2,4-D-dinitrophenol 3-chloroacetic acid boiling etc. On the determination of the NR were compared and analyzed. The experimental showed: the vivo method was reliable and easy to determine the NR in the leaves of *Sephora japonica* Liao hong.

**Key words:** *Sephora japonica* Liahong; Nitrate reductase; Vivo method

用体内法测定聊红国槐叶片NR时,一般情况下首先要将材料用100 mmol/L的 $\text{KNO}_3$ 溶液诱导36 h,在抽气前加入适量的DNP及1,6-二磷酸果糖溶液,暗保温结束后,需要煮沸10 min以上,该方法操作相对简便。

### 参考文献

- [1] 李德全,赵会杰.植物生理学[M].北京:中国农业出版社,1999.
  - [2] 闫桂琴,张俊彦,李秀梅.濒危植物胡桐种群叶绿素和硝酸还原酶活性的研究[J].西北植物学报,2004(6): 1047-1051.
  - [3] 林振武,孙惠珍.硝酸还原酶活力的体外测定[J].植物生理学通讯,1985(3): 33-35.
  - [4] 周国章,苏梦云.杉木硝酸还原酶的初步研究[J].林业科学,1998(2): 157-161.
  - [5] 孙世芹,阎秀峰.喜树叶片硝酸还原酶活性的测定方法[J].东北林业大学学报,2004(3): 83-84.
  - [6] 蒋君红.竹子硝酸还原酶的初步研究[J].广西林业科学,2001(1): 29-45.
  - [7] 洪法水,董振吉,周谋文.水分胁迫下 $\text{Ca}^{2+}$ 、PEG预处理对小麦幼苗硝酸还原酶活性的影响[J].淮北煤师院学报(自然科学版),1995(4): 51-53.
  - [8] 段素梅,黄义德,杨安中.钼酸铵拌种对大豆苗期生长及硝酸还原酶活性的影响[J].安徽农学通报,2005(5): 22-23.
  - [9] 周树,郑相穆.硝酸还原酶体内分析方法探讨[J].植物生理学通讯,1985(1): 47-49.
  - [10] 朱建雯,杨文英,哈里旦,等. $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 胁迫对鞑靼滨藜氮同化作用的影响[J].干旱区研究,1997(4): 30-33.
  - [11] 刘勋.氮肥与磷钾肥配施对空心菜产量及硝酸盐含量的影响试验[J].广西农学报,2004(1): 10-11.
  - [12] 王立克,洪法水.钼浸种处理对苜蓿各生育期硝酸还原酶活性及营养成分的影响[J].草业科学,1996,13(5): 48-49,55.
  - [13] 段素梅,杨安中,黄义德.大豆钼营养研究进展[J].大豆通报,2006(3): 40-43.
  - [14] 张明才,李召虎,田晓莉,等.植物生长调节剂SHK-6对大豆叶片氮素代谢的调控效应[J].大豆科学,2004(1): 96-100.
  - [15] 罗红艺.光合碳同化中的两个重要酶RuBP羧化酶和PEP羧化酶[J].高等函授学报(自然科学版),1999(3): 49-51.
- (背景资料:2006年8月3日,“聊红槐”新品种选育科研成果通过山东省科技厅省级鉴定.鉴定委员会认为“聊红槐”是具有自主知识产权的新品种,创新性和应用性明显.该课题组已向国家林业局植物新品种保护办公室提交植物新品种权请求书并于2007年2月28日通过审核,授予“聊红槐”植物新品种权证书。)