

苹果叶片硝酸还原酶活性测定体系的优化研究

王学颖^{1,2}, 韩士里^{1,3}, 郭守华¹

(1. 河北科技师范学院 生命科技学院, 河北 昌黎 066600; 2. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025;

3. 华中师范大学 生命科学院, 湖北 武汉 430079)

摘要:以 10 a 生红富士苹果叶片为材料, 用标准曲线法研究了 pH、温度、叶龄对硝酸还原酶活性的影响, 并测定了该酶的日活性曲线; 同时研究了光照及抑制剂对测定结果的影响。结果表明: 苹果叶片硝酸还原酶的最适 pH 和温度分别为 7.6 和 30℃; 壮叶的活性极显著地高于其它叶龄; 日活性曲线呈双峰形态; 无光条件下保温的酶活极显著地高于见光的酶活; 保温后加入抑制剂三氯乙酸的酶活显著低于不加的酶活。

关键词: 苹果叶片; 硝酸还原酶; 影响因素; 测定条件控制

中图分类号: Q 94—331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)06—0052—04

铵态氮和硝态氮是植物吸收氮素的 2 种主要形态^[1]。硝酸还原酶(Nitrate Reductase, NR)是植物利用硝态氮(NO₃⁻)的关键酶^[2,3], 其活性与利用硝态氮的能力密切相关。作为植物体内重要的诱导酶, 其合成受到底物 NO₃⁻ 的诱导, 而活性则受到底物浓度、光、温度、

pH、无机盐、水分等环境因素的影响^[4]。因此, 硝酸还原酶活性(Nitrate Reductase Activity, NRA)研究是植物氮代谢的研究重点之一。

苹果树是我国北方最主要的栽培果树之一, 目前国内关于其硝酸还原酶的研究主要在 NRA 的器官分布、动态变化、与 N 素营养的关系及品种差异^[5]等方面。关于苹果叶片硝酸还原酶活性的影响因素及测定体系的优化还未见报道。试验以 10 a 生红富士苹果叶片为材料, 研究 pH、温度、光照、叶龄及不同时段对 NRA 活性的影响, 以期了解苹果叶片中 NRA 的最适条件并对苹果树施肥提供一定的指导作用^[6,7]。

第一作者简介: 王学颖(1985-), 女, 在读硕士, 现从事海洋经济动物发育生物学研究工作。

通讯作者: 郭守华(1951-), 女, 河北抚宁人, 副教授, 现从事植物生理生化教学与研究工作。E-mail: ggshua@126.com。

收稿日期: 2009—12—20

Effects of Different Cow Dung Composts on Development of Ornamental Sunflower

JINZ Zhu-li¹, WANG Shun-li², LIU Ke-feng², WANG Hong-li¹, YANG Dong¹, SUN Jun-li¹

(1. College of Landscape Architecture, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206; 2. College of Urban and Rural Development, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Abstract: This thesis mainly studied the effects of cow dung composts as base fertilizers used in ornamental sunflower. According to measuring growth and development indexes of ornamental sunflower, such as plant height, basal stem, leaf area, chlorophyll content, flower stalk, dry weight of inflorescence, shoot and root, fertilizer efficiency of cow dung composting on ornamental sunflower was detected. The results showed: compared with the chemical fertilizer, the fertilizer efficiency of cow dung composting fertilizers was better on ornamental sunflower at the same nutrient content levels; the technology of cow dung composting influenced efficiency of organic fertilizer to play. The optimum conditions of cow dung composting were that straw addition was 7.5%; ventilation time was 10 min; water content was 60%; self-prepared microbial agent or straw addition was 5%; ventilation time was 30 min; water content was 50%; self-prepared microbial agent, in which way not only the contaminations of the cow dung composting could be reduced, but also the cow dung composting could be turned to high-quality fertilizers.

Key words: cow dung compost; ornamental sunflowers; fertilizer efficiency

1 材料与方法

1.1 试验材料

2008年7~8月,从园林试验站10 a生盛果期红富士苹果树上(树势中庸,生长健壮,无病虫害)选取叶片。

1.2 试验方法

1.2.1 pH对NRA的影响 试验分2个阶段进行。第1阶段pH设6.0、6.5、7.0、7.5、8.0梯度,每个梯度3次重复;确定出最适pH后进行第2阶段试验,pH设7.4、7.5、7.6、7.7、7.8梯度,每个pH 3次重复;通过第2轮试验确定出最适pH。2个阶段试验均在同一时间段采集同龄叶片,在室温30℃下进行。

1.2.2 温度对NRA的影响 在最适pH(7.6)下分2阶段进行。第1阶段温度设为15、20、25、30、35℃,每个温度3次重复。确定出最适温以后进行第2阶段的试验,温度设为26、28、30、32、34℃,每个温度3次重复。最终确定出NRA的最适温。

1.2.3 叶龄对NRA的影响 从枝条的顶端到基部,刚能看出叶片锥形的定为新叶,相当于最大叶面积的1/3的定为嫩叶,已达到最大叶面积的成熟叶片称为壮叶,在成熟叶片上有1~3个失绿斑点的称为老叶。以下皆用新叶、嫩叶、壮叶及老叶表示。在最适pH和最适温下,分别测定不同龄叶片的NR活性。每叶龄3次重复。

1.2.4 苹果叶片NRA的日变化 选择无云晴天,从早晨7:00~19:00,每隔2 h采样1次测定NR活性,每时段3次重复,在最适pH和最适温下,确定出NRA的日变化曲线。

1.2.5 测定过程中光照与否对NRA的影响 设无光、直射光、散射光3个处理,每处理3次重复。在最适pH和最适温下测定NR活性,确定试验过程中光照对测定结果的影响。

1.2.6 抑制剂对于NRA的影响 分保温后作用液中立即加入和不加30%TCA(三氯乙酸)2个处理,均设3次重复。在最适pH、最适温度、避光条件下,测定TCA对试验结果的影响。然后从0时(第1次显色时间)开始,每隔10 min分别取样显色,观察显色液的稳定性。

1.3 数据统计

NRA测定采用标准曲线法,用对氨基苯磺酸和 α -萘胺为显色剂,以1 g鲜样在1 h内催化产生 μgNO_2^- 数表示酶的活性。采用DPS分析软件的LSR法进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 pH值对苹果叶片NRA的影响

第1轮试验结果显示,pH 7.5时酶活性最大(图1),该结果对pH 6.5、7.0、8.0显著,对pH 6.0极显著,推测最适pH应在7~8之间、7.5左右;第2轮结果显

示pH 7.6时酶活性最强(图2),且该结果对pH 7.7显著,对pH 7.4、7.5、7.8极显著。说明红富士苹果叶片NRA的最适pH为7.6。pH 7.4、7.5、7.7、7.8时的酶活分别相当于最适pH的23.4%、42.7%、64.5%、34.2%,这说明较低的pH对活性的抑制更为明显。

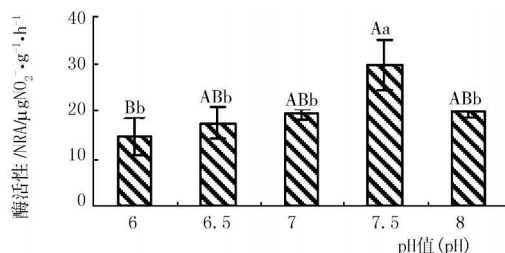


图1 pH值对苹果叶片NRA的影响(第1轮试验)

Fig.1 Effects of pH on NRA in apple leaves(the first)

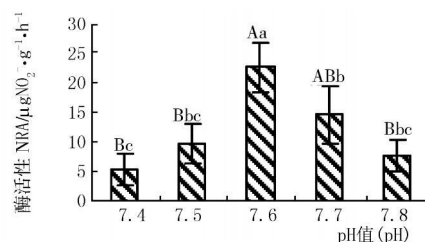


图2 pH值对苹果叶片NRA的影响(第2轮试验)

Fig.2 Effects of pH on NRA in apple leaves(the second)

注:数值为3次重复的均值(n=3) 图中小写字母代表LSR 5%,大写字母代表LSR 1%。以下皆同。

Note: the data is mean(n=3), letters in small and in capital standing for LSR 5% and LSR 1% respectively. The same as below.

2.2 温度对苹果叶片NRA的影响

第1轮试验结果表明,30℃时酶活性最高(图3)。统计分析显示该结果对25℃显著,对其余温度极显著;推测最适温应在25~35℃、30℃左右;第2轮试验缩小温差以后,仍然是30℃时酶活性最高(图4),统计分析显示该结果仍对25℃显著,对其余温度极显著。第2轮试验结果表明红富士苹果叶片NR的最适温度为30℃。26、28、32、34℃下的酶活分别相当于最适温下酶活的45.9%、59.9%、64.6%和24.5%。说明NRA对于温度十分敏感。

2.3 叶龄对苹果叶片NRA的影响

由图5可见,壮叶极显著地高于新叶,显著地高于嫩叶和老叶。老叶、嫩叶、新叶的NR活性分别相当于壮叶的64.9%、52.2%和30.6%。这一结果说明,叶片NR活性受到叶片的光合能力或者碳水化合物含量的影响。

2.4 苹果叶片NRA的日变化

结果表明,NRA的日变化为双峰曲线(图6),分别在11:00和15:00出现2个峰值,其中11:00的峰值明

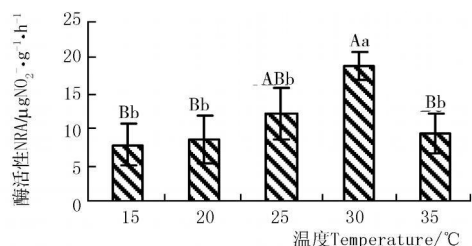


图3 温度对苹果叶片 NRA 的影响(第1轮试验)

Fig.3 Effects of temperature on NRA in apple leaves(the first)

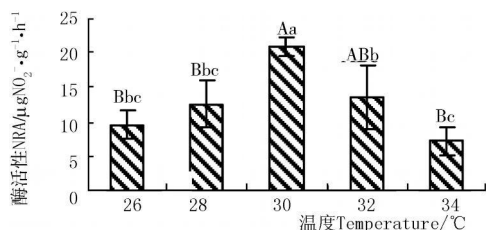


图4 温度对苹果叶片 NRA 的影响(第2轮试验)

Fig.4 Effects of temperature on NRA in apple leaves(the second)

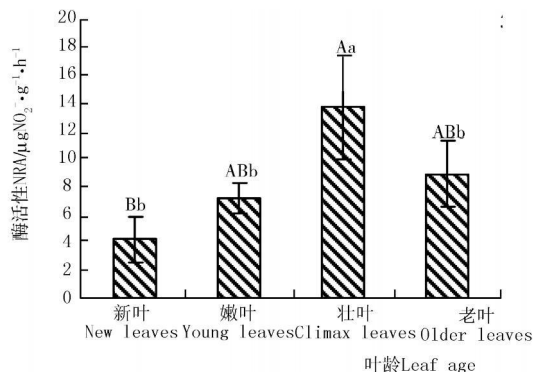


图5 叶龄对苹果叶片 NRA 的影响

Fig.5 The effects of leaf age on NRA in apple leaves

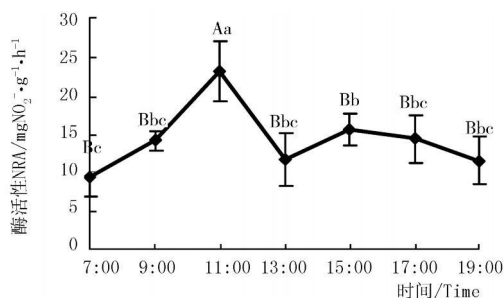


图6 不同时间点 NRA 的变化

Fig.6 The changes of NRA in apple leaves during the day

显。在7:00~19:00其它时间段的NR活性分别相当于该峰值的40.5%、61.1%、50.1%、67.1%、62.0%和

49.9%。曲线在13:00出现低谷,即NRA表现出“午休”现象。

统计分析表明,11:00的酶活水平与其它各点差异均达到极显著水平,07:00与15:00差异达到显著水平。昌黎地区7~8月份11:00气温一般在20~25℃,13:00气温一般低于30℃,说明NRA的日变化是由光照强度主导的结果。

2.5 测定过程的光照条件对 NRA 的影响

不同光照条件下的 NRA 如图7所示,无光条件下酶活性极显著地高于直射光及散射光,后者酶活分别相当于前者的58.5%和49.8%。说明反应体系严格避光是十分必要的。但散射光与直射光下的差异不显著,这可能是由于这2种光的强度都能够支持光合链的有效运转。

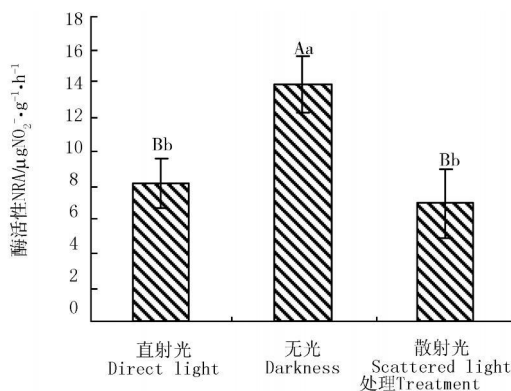


图7 测定过程的光照条件对苹果叶片 NRA 的影响

Fig.7 The effects of illumination on NRA of apple leaves in the determination process

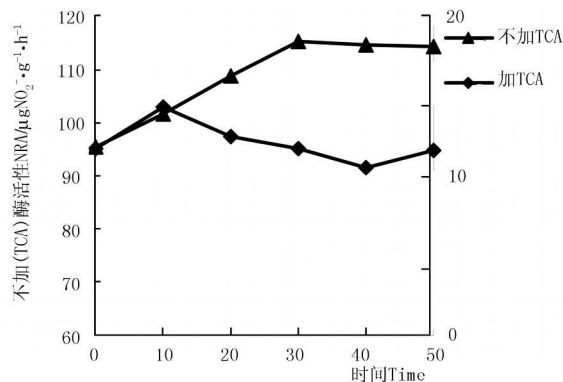


图8 TCA 对苹果叶片 NRA 的影响

Fig.8 Effects of whether or not adding TCA determination NRA of reaction media in different time)

2.6 抑制剂对测定结果的影响

NR活性是以单位时间单位鲜重生成NO₂⁻的μg数表示的。因此反应过程的准确计时十分必要。对于作用液加TCA的处理,在每隔10min分段取作用液显

色中,在 50 min 内,酶活曲线相对平稳,各时间段酶活之间均未达到显著差异(图 8),这说明 TCA 对 NR 活性的抑制十分成功。而作用液中不加 TCA 的处理在 0~30 min 内,随着时间的延长,酶活性水平几乎呈线性上升,30 min 后可能是由于底物耗尽才基本稳定。且 30 min 时与 0、10 min 时均达到显著差异,30 min 以后差异不显著。比较图 8 的 2 条曲线,在看出 TCA 作用的同时,也能发现二者 0 时的测定值差异很大,这似乎很不合理,因为 2 个值应该十分接近才对。分析试验过程可以发现,正是由于没有加入抑制剂,使得无 TCA 的显色液在保温过程中甚至在比色过程中一直在升高,这种差异恰恰可以说明及时加入 TCA 的必要性。

3 结论与讨论

苹果叶片中 NRA 作用的最适 pH 7.6,说明中性偏碱的环境有利于苹果叶片 NR 发挥活性;最适温度 30℃,说明仲夏阶段苹果叶片能够很好地利用土壤中的硝态氮,而在温度低于 25℃或高于 35℃时其利用能力可能下降。

幼嫩叶片 NRA 低,可能源于有机营养主要用于叶面积扩大,硝酸还原的能量不足;而各种代谢都处于最佳状态的壮叶,能够提供足够的还原力,所以有利于硝酸盐的还原;而老叶的光合能力尚可满足自身硝酸还原的需求。这一特征与叶龄对光合作用的影响高度一致,也与崔杰等人在甜菜上的研究结果相同^[8]。

NRA 的产物 NO_2^- ^[9] 可被亚硝酸还原酶(NiR)利用光合链末端的电子进一步还原为氨(NH_3),从而影响到 NR 活性的正确考量。由于在无光条件下保温可以阻抑 NiR 的活性,所以避光是十分必要的。

The Measurement System Optimization Study on the Nitrate Reductase Activity of Apple Leaf

WANG Xue-ying^{1,2}, HAN Shi-li^{1,3}, GUO Shou-hua¹

(1. College of Life Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli, Hebei 066600; 2. Fishery College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524025; 3. College of Life Science, Huazhong Normal University, Wuhan, Hubei 430079)

Abstract: With ten years old fuji apple leaves as test material. Determined with standard curve method, the effects of pH, temperature, leaf age, daily variation, the illumination and the protein denaturant on the nitrate reductase of the apple leaves were studied in the present paper. It was found that the optimum pH and temperature were 7.6 and 30℃, respectively. On the different ages of the leaves, the climax leaf enzymatic activity was extremely obviously higher than others. Enzymatic activity daily variation appeared bimodal curve. On the experimental condition, the enzyme activity heat preservation in the darkness was extremely remarkable higher than under the light, suggesting that in the determination process evades the light strictly was necessity. When added the trichloroacetic acid(TCA) after heat preservation, the enzyme activity was extremely lower than that non-added. In conclusion, adding trichloroacetic acid rapidly was essential to control the reaction time. The result had a certain significance to the scientific fertilization on apple trees.

Key words: apple leaf; nitrate reductase; influencing factor; determination conditions control

三氯乙酸(TCA)作为蛋白质沉淀剂^[10],其作用在于使酶钝化而终止反应^[11-12],常用于限时反应中终止酶的活性。尤其在样品数量大,试验时间长的情况下,如果不能严格控制时间,势必会导致误差增大,使试验结果失去可信性。

参考文献

- [1] 和阳 王兴东.不同氮素形态对蓝莓叶片矿质元素含量的影响[J].北方园艺 2009(9): 58-59.
- [2] Campbell W H. Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants[J]. *Physiol Plant* 1988(74): 214-219.
- [3] 刘丽 甘志军,王宪泽.植物氮代谢硝酸还原酶水平调控机制的研究进展[J].西北植物学报, 2004, 24(7): 1355-1361.
- [4] 陆嘉陵,何文竹,陈薇,等.硝酸还原酶研究II. 6-BA 和光对小麦硝酸还原酶诱导的影响[J].植物生理学报 1983 9(1): 41-49.
- [5] 李宪利,高东升,米瑞英.苹果植株硝酸还原酶(NR)研究初报[J].山东农业大学学报, 1997, 28(1): 1-4.
- [6] Lee H J, Titus Is. Nitrogen accumulation and nitrate reductase activity in MM. 106 apple trees as affected by nitrate supply [J]. *Hort Sci* 1992 67: 273-281.
- [7] 汤玉玮,林振武,陈敬祥.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[J].中国农业科学, 1985(6): 39-45.
- [8] 崔杰 曲文章.甜菜硝酸还原酶活性的研究[J].China Academic Journal Electronic Publishing House 1997; 6-9.
- [9] Crawford N M, Arst N H J. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants [J]. *Annu Rev Genet* 1993 27: 115-146.
- [10] 上海植物生理生态研究所.植物生理学实验指南[M].北京:科技出版社, 1999: 33-35.
- [11] 邱艳昌,段祖安,李道强,等.聊红国槐叶片硝酸还原酶活性测定方法的研究[J].北方园艺, 2008(8): 120-122.
- [12] 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, 32(3): 83-84.