

硝酸还原酶活力与作物耐肥性的研究

II、籼、粳稻对硝态氮的吸收和同化

林振武 郑朝峰 吴少伯 王玉琴 汤玉玮

(中国科学院上海植物生理研究所)

提 要

本文以籼(原丰早)、粳(京引127)稻为材料,研究了它们对 NO_3^- 的吸收和同化 NO_3^- 为氨基酸过程中有关酶的活力。结果指出:1)籼稻幼苗根对外液 NO_3^- 的吸收能力高于粳稻;2)籼稻叶片把 NO_3^- 同化为 NH_4^+ 的硝酸还原酶(NR)和亚硝酸还原酶(NiR)活力都高于粳稻;3)在进一步同化 NH_4^+ (无机态氮)为氨基酸(有机态氮)的谷氨酸脱氢酶(GDH)和谷氨酰胺合成酶(GS)/谷氨酸合酶(GOGAT)两条途径中,籼稻叶片的GDH、GS和GOGAT活力都高于粳稻。这些结果说明了耐肥性弱的籼稻对 NO_3^- 的吸收同化能力高于耐肥性强的粳稻,也就是说籼稻比粳稻对氮肥的反应更敏感。籼、粳稻的这种差异可能也存在于其他不同耐肥性的作物品种间。这就以作物内在的氮素代谢基础说明了作物品种对氮肥反应的差异原因,即作物耐肥性的生理基础。还应指出在作物对 NO_3^- 吸收同化的诸因素中硝酸还原酶起着主要的和关键的作用。

硝酸还原酶(NADH:NR.E.C.1.6.6.1)是植物体内硝酸盐同化的关键酶,在体内的氮素代谢中起着重要作用。因此它与作物的耐肥性(即作物对氮肥的反应)有密切的关系。从已报道的水稻、小麦、玉米的NR活力分析可充分看出这一点(2)。本文选用耐肥性弱的籼稻(原丰早)和耐肥性强的粳稻(京引127)为材料,分析它们对 NO_3^- 的吸收和体内同化硝态氮为氨基酸的途径中有关酶活力,进一步从籼、粳稻对硝态氮吸收利用的能力,说明了它们对外界氮肥反应不同的内在原因。

材 料 与 方 法

水稻(*Oryza Sativa* L.)种子在25℃自来水中浸泡3天,露白后排在尼龙网上,在盛满自来水的搪瓷盘内生长。培养温度25℃±2℃,每日光照时间12小时,光强1500勒克斯。

取6天龄的幼苗,经蒸馏水漂洗数次后放入1 mM CaSO_4 溶液中。照光通气24小时后,再用蒸馏水漂洗并吸干,以60株幼苗为一组在40ml一定浓度的 KNO_3 溶液中进行吸

本文1984年3月22日收到。

收。吸收量用溶液中 NO_3^- 减少量表示。 NO_3^- 的测定按Cataldo等方法,样品经水杨酸浓硫酸试剂和碱性溶液作用后,在721分光光度计上读 A_{410} 。

取7天龄的幼苗叶片,于 -15°C 冰冻1小时后,进行以下酶活的测定。酶的提取都在 4°C 中进行。

1. NR的提取测定如前所述〔6〕。

2. 亚硝酸还原酶(NiR, E.C. 1.7.7.1.)的提取同硝酸还原酶。酶活力测定参照Ramirez等〔4〕和Rao等〔11〕方法:酶反应混合液含1.5ml 0.1M磷酸钾缓冲液(pH7.5), 0.1ml 0.005M NaNO_2 , 0.1ml甲基紫精(4mg/ml), 0.2ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (25mg/ml,溶于0.29M NaHCO_3 鲜配)和0.1ml酶液。反应以加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 为开始, 25°C 下保温30分钟。为了终止反应取0.1ml酶反应混合液加1.9ml蒸馏水激烈震荡,直至兰色消失,再加入0.5ml 1%磺酰胺和0.5ml 0.02%萘乙酰胺显色。10分钟后在721分光光度计上读 A_{540} ,酶活力以 $\mu\text{M NO}_2^-/30\text{分}/\text{克鲜重}$ 表示。

3. 谷氨酸脱氢酶(GDH E.C.1.4.1.3)活力测定按Lea和Thurman (1972)方法〔10〕。10克叶片加15ml提取液(0.05M磷酸钾缓冲液pH7.5,含EDTA- Na_2 0.01M DTT 1mM)匀浆,匀浆液经三层纱布过滤后离心4,000转/分15分,上清液加Triton $\times-100$ (最终浓度0.15%)置冰浴30分钟后离心23,000克20分,上清液作酶活测定。酶反应在Tris-HCl 0.15M pH8.4, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1M, α -酮戊二酸0.012M, NADH 0.01mM中进行,酶活力用 $\Delta A_{340}/\text{分}/\text{ml酶液}$ 表示。

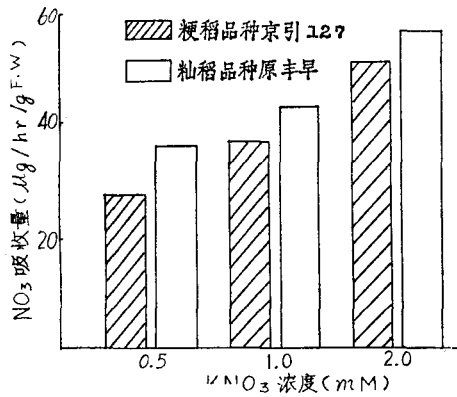
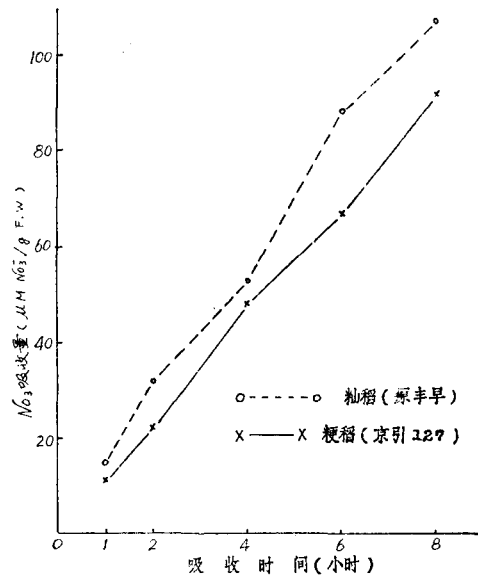
4. 谷氨酰胺合成酶(GS, E.C.6.3.1.2)提取测定参照Rhodes等〔13〕和Sabulka和Lisa方法。2克叶片加8ml提取液(50mM Tris-HCl pH7.66, 1mM MgCl_2 , 1mM EDTA, 1mM DTT)匀浆。匀浆液经两层纱布过滤后,滤液在15,000克下离心20分钟,取上清液测酶活。酶反应系统为45mM HEPES pH6.5, 60mM谷氨酰胺, 0.05mM ADP, 35mM NH_2OHHCl , 4mM MnCl_2 , 10mM NaHASO_4 。酶反应在 25°C 下进行20分钟,然后加1ml反应终止液(10% FeCl_3 :24%TCA:6NHCl=4:1:0.5:6.5)显色后,在721分光光度计上读 A_{540} 。

5. 谷氨酸合酶(Glutamate Synthase缩写GDGAT E.C.1.4.7.1) NADH-GDGAT用50mM Tris-HCl提取(pH7.5,含0.15M DTT, 1mM EDTA- Na_2), 20,000克离心15分,上清液用于酶活测定〔8〕。反应系统含:5mM HEPES, pH7.5, 1mM EDTA, 15 μM α -酮戊二酸, 15 μM 谷酰胺, 0.25 μM NADH。在751分光光度计上测 A_{430} 的减少。Fd(铁氧还素)-GDGAT用100mM磷酸缓冲液提取(pH7.5,含1mM EDTA- Na_2 和14mM巯基乙醇)。反应液含10mM谷酰胺, 10mM α -酮戊二酸, 0.2 μM de Fd和12.5mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 和 NaHCO_3 。用华东化工学院201 \times 8粉末型强碱性阴离子交换树脂分离产物中的谷氨酸,茚三酮法定量。

结果与讨论

一、籼、粳稻幼苗根对 NO_3^- 的吸收

图1表明7天龄的水稻根在不同浓度(0.5, 1.0和2.0mM)的 NO_3^- 溶液中,籼稻对 NO_3^- 的吸收量比粳稻高一些。从同一浓度(1.0mM) KNO_3 溶液里水稻对 NO_3^- 的吸收时

图1 籼粳稻幼苗根对NO₃吸收的比较图2 籼、粳稻幼苗根吸收NO₃的时间进程
苗龄: 7天KNO₃浓度(1.0mM)

间进程看, 籼稻始终高于粳稻, 且随着时间的延长, 有加大差异的趋势(图2)。

小麦、玉米品种间NO₃吸收的差异已有报道(7), 这种差异与体内NR活力和还原氮积累有关。但有人在4个NR活力有差异的玉米杂交种中没有发现根部吸收NO₃的差异(12)。我们的结果指出籼稻对NO₃的吸收能力高于粳稻, 这与它们之间NR活力差异是一致的。但是籼粳稻NR活力的差异并不是由于它们对NO₃吸收的差异造成的, 因为在离体叶片漂浮于KNO₃溶液或真空渗入诱导条件下二者NR活力差异与根部诱导下的情况是相似的。

二、籼、粳稻叶片中硝酸还原酶(NR)、亚硝酸还原酶(NiR)的活力

当NO₃⁻进入植物体内后首先经NR作用还原为NO₂⁻, 再经NiR作用还原为NH₄⁺后, 才能进一步参加氨基酸的合成。NR和NiR都可由NO₃⁻的诱导而产生, NiR活力一般要比NR高得多, 因而体内测不出NO₂⁻的积累。如图3所示, 在诱导条件下NR和NiR活力随苗龄的变化趋势是一致的, 都是5天龄最高。在任一苗龄下, 籼稻的NR和NiR活力都比粳稻高, 这就指出了籼稻把NO₃⁻同化为NH₄⁺的能力高于粳稻。

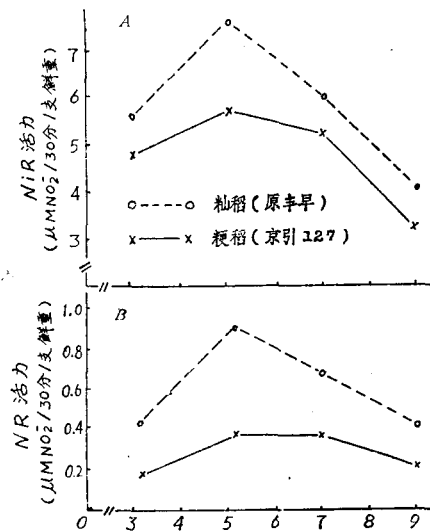


图3 籼、粳稻幼苗的亚硝酸还原酶活力(A)和硝酸还原酶活力(B)的变化动态

三、籼、粳稻叶片中同化无机氮为氨基酸的有关酶活力。

植物的NH₄⁺除由NO₃⁻还原生成外, 还可直接从外界环境中吸收, 但前者是主要

的来源。无机氮合成氨基酸的重要场所是叶片，主要有以下两条途径：谷氨酸脱氢酶（GDH）和谷氨酰胺合成酶（GS）/谷氨酸合成酶（GDGAT）途径。下面是对籼、粳稻体内这两条途径中有关酶活力的分析结果。

1. GDH活力

GDH催化如下反应： α -酮戊二酸 + NH_4^+ $\xrightleftharpoons[\text{NAD}^+]{\text{GDH}}$ 谷氨酸 + H_2O 。表1指出在测定系统中，

GDH活力依赖于底物 α -酮戊二酸和还原力NADH的存在。图4中随反应时间加长，反应系统中 A_{340} 迅速下降（即NADH迅速减少），反映了酶活力的增长。图5则表明了酶量与酶活力之间的关系。这些结果说明了水稻叶片中GDH活力的存在，这是体内由 NH_4^+ 合成谷氨酸的途径之一。从表2可以看出经50mM KNO_3 溶液诱导的水稻叶片中，籼稻GDH活力比粳稻高得多。

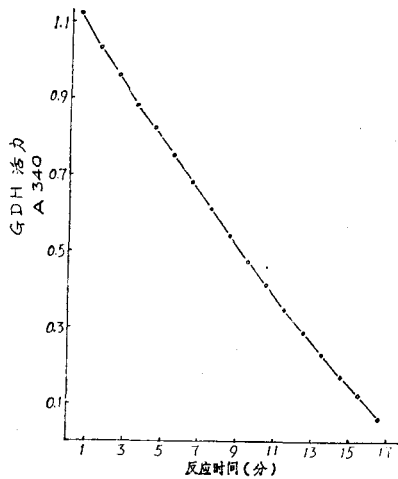


图4 谷氨酸脱氢酶反应时间与活力的关系（水稻品种京引127）

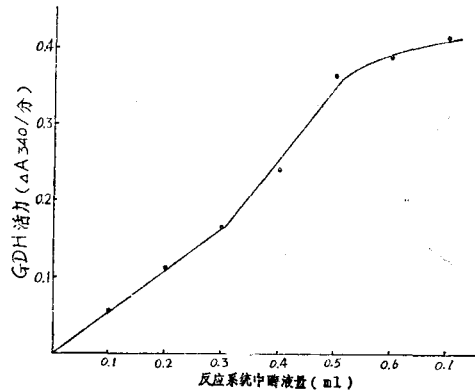
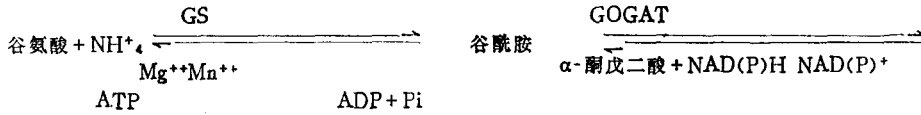


图5 谷氨酸脱氢酶浓度与其活力的关系（水稻品种京引127）

表1 水稻叶片谷氨酸脱氢酶活力的测定系统水稻品种：京引127

酶反应系统	酶活力(ΔA_{340} /分/ml酶液)
Tris-Hcl Buffer + 0.2ml 酶液	0
Tris-Hcl Buffer + 0.2ml 酶液 + 0.1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0
Tris-Hcl Buffer + 0.2ml 酶液 + 0.1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.01mM NADH	0.05
Tris-Hcl Buffer + 0.2ml 酶液 + 0.1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0.01mM NADH + 0.012M α -酮戊二酸	0.325

2. GS、GOGAT活力 过去一般认为植物和微生物同化氮的机制一样，是通过GDH途径合成氨基酸，但自Lea和Milfin (1974) (8)发现GS/GOGAT途径以来，改变了人们的这一看法。已有充分证据证明GS/GOGAT是植物同化氮的主要途径(14,16,17)。这两个酶催化如下反应：



二谷氨酸, 在这一途径中GDGAT起着关键作用。它在体内有两种同工酶, 一种是依赖于铁氧还素(Fd)的GOGAT, 另一种是依赖于还原辅酶I(NADH)的GOGAT, 在叶片中前者是主要的。

从表3可以看出经50mM KNO₃诱导下籼稻的GS活力比粳稻明显地高约30%。籼

表2 籼、粳稻叶片谷氨酸脱氢酶活力的比较

品 种	耐肥性	酶活力 (ΔA ₃₄₀ /分/ml酶液)
籼稻(原丰早)	弱	0.733
粳稻(京引127)	强	0.350

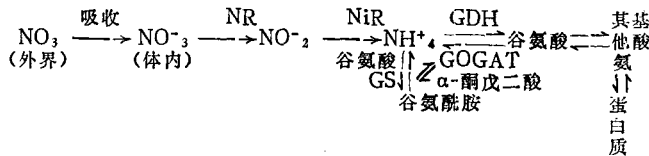
表3 诱导条件下籼、粳稻叶片谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶活力的比较

品 种	GS 活力 (A ₅₄₀ /分/ml酶液)	GOGAT 活力	
		NADH-GOGAT活力 (ΔA ₃₄₀ /分/ml酶液)	Fd-GOGAT活力 (μmoleGlu/分/克鲜重)
籼稻(原丰早)	0.27	0.89	1.22
粳稻(京引127)	0.21	0.66	0.88
籼稻/粳稻	1.29	1.35	1.39

稻的Fd-GOGAT和NADH-GOGAT活力比粳稻分别高39%和35%。由于GS和GOGAT不是NO₃的诱导酶, 因而在水中(即非诱导条件下)二者也有明显差异(表4)。

从上面水稻叶片将无机氮同化为氨基酸的两条途径中有关酶活分析结果看, 籼稻都比粳稻高, 这与它们对NO₃的吸收和NO₃还原为NH₄⁺的NR、NiR活力差异是完全一致的。

植物体对外界NO₃的吸收同化过程是:



本文的结果表明了籼稻叶片对NO₃的吸收和同化活力都高于粳稻。特别是这一过程中的NR、GDH、和GS这三个关键酶活力的差异都很明显, 而NR尤为敏感。这就说明了籼稻对外界氮肥的吸收同化能力强, 因而表现为对氮肥的反应敏感, 而粳稻则较差。这种情况可能也存在于其他不同耐肥性的作物品种间。作物的耐肥性是指作物对氮肥的反应特性(2)。以前我们根据对不同耐肥性的水稻、小麦、玉米的NR活力分析结果和NR在氮素同化中的关键地位曾提出: 耐肥性弱的品种NR活力高, 其对NO₃的吸收同化能力可能强, 因而表现为对氮肥反应敏感; 而耐肥性强的品种则反之(2、6)。本文在过

表4 非诱导条件下籼、粳稻叶片谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合酶活力的比较

品 种	GS活力	GOGAT活力
籼 稻 (原丰早)	0.29(A ₅₄₀ /分/ml酶液)	1.03(ΔA ₃₄₀ /分/ml酶液)
粳 稻 (京引127)	0.25(A ₅₄₀ /分/ml酶液)	0.77(ΔA ₃₄₀ /分/ml酶液)
籼稻/粳稻	1.1 6	1.34

去对品种间NR活力分析的基础上,以籼、粳稻为代表对其 NO_3^- 的吸收和 NO_3^- 同化为氨基酸的整个过程进行了分析,进一步证明了我们以前的观点。

日本的石冢喜明和田中明以及松尾孝岭^[3]都曾对作物耐肥性作过详述。他们以籼、粳稻为例,从株高、茎数、穗数穗重和生长等形态特征以及体内可溶性氮、全氮和淀粉含量等方面进行了一些比较,找出不同耐肥性品种的某些差异,但尚未触及耐肥性的本质。本文通过对植株的 NO_3^- 吸收同化过程的分析,从氮素代谢的角度讨论了这一问题,解释了作物品种对外界氮肥反应的差异原因和生理基础。当然作物耐肥性的问题是较复杂的,还需要从碳氮代谢的平衡以及生长发育的表现特征来进一步探讨。这对于开展作物的生化育种和科学施肥都有重要意义。

参考文献

- [1] 李家喆、林振武、汤玉玮, 1981. 不同类型的水稻幼苗的硝酸还原酶活力, 实验生物学报 14: 407~409.
- [2] 林振武、陈敬祥、汤玉玮、李家喆, 1983. 硝酸还原酶活力与作物耐肥性的研究 I、不同耐肥性的水稻、小麦、玉米的硝酸还原酶活力, 中国农业科学 1983(3): 37~43.
- [3] 郑朝峰、林振武, 1985. 谷氨酸合成酶活力的快速测定, 植物生理学通讯 1985(4): 42~46.
- [4] 石冢喜明, 田中明, 1963. 水稻の栄養生理. 东京·书肆株式会社, 养贤堂发行.
- [5] 松尾孝岭监修, 1974. 育种手册, 第一分册——育种原理. 葛扣麟、俞鸿斌、赵庆华、顾德发译, 高铸九、颜昌敬校. 上海科学技术出版社, 1983年2月.
- [6] Caltaldo, D. A., M. Haroon, L. E. Schrader, and V. L. Youngs, 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue. Commun. Soil Sci. and Plant Anal. 6: 71~80.
- [7] Chevalier, P., L. E. Schrader, 1977. Genotypic difference in nitrate absorption and partitioning of N among plant parts in maize. Crop Sci. 17: 897~901.
- [8] Lea, P. J. and Mifflin, B. J., 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature 251: 614~616.
- [9] Lea, P. J. and B. J. Mifflin, 1979. The assimilation of ammonium nitrogen by chlorophyllous tissue. In "Nitrogen Assimilation of Plants", pp. 475~487. Acad. Press, London New York San Francisco.
- [10] Lea, P. J. and D. A. Thurman, 1972. Intracellular location and properties of plant L-glutamate dehydrogenases. J. Exp. Bot. 23: 440~449.
- [11] Rao, L. V. M., V. K. Razasekhar, S. K. Sopory and S. Guha-Mukherjee, 1981. Photochrome regulation of nitrite reductase—a chloroplast enzyme in etiolated maize leaves. Plant Cell Physiol., 22: 577~582.
- [12] Reed, A. J. and R. H. Hageman, 1980. Relationship between NO_3^- -uptake, flux and reduction and the accumulation of reduced nitrogen in maize (*Zea mays* L.). Plant Physiol., 66: 1179~1185.
- [13] Rhodes, D., G. A. Rendon and G. R. Stewart, 1975. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L.. Planta, 125: 201~211.

STUDIES ON NITRATE REDUCTASE ACTIVITY AND NITROGEN RESPONSE IN CROP PLANTS II. THE UPTAKE AND ASSIMILATION OF NITRATE IN INDICA AND JAPONICA RICE

Lin Zhenwu, Zheng Chaofeng, Wu Shaobo, Wang Yuqin
and Tang Yuwei

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica)

ABSTRACT

The ability of uptake and assimilation of nitrate in Indica and Japonica rice (*Oryza sativa* L.) have been compared. The results showed that: 1). The rate of nitrate uptake by root in Indica rice was higher than that in Japonica rice. 2). The activities of nitrate reductase and nitrite reductase, which catalyze the reduction of NO_3^- to NH_4^+ , were higher in Indica rice than in Japonica rice. 3). In the two pathways of the incorporation of ammonia into amino acid: glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase/glutamate synthase, the activities of all enzymes in Indica rice were higher than that in Japonica rice. From above data it was concluded that Indica rice had higher ability of uptake and assimilation of nitrate than that of Japonica rice. Thus the former is more sensitive to nitrogen fertilizer than the later is, that is, the former is suitable for lower level of nitrogen fertilizer, while the later is suitable for higher level of nitrogen fertilizer. This report elucidated why the crop cultivars have different response to nitrogen fertilizer from the point of view of nitrogen assimilation.