

大豆硝酸还原酶活力与硝态氮含量的关系*

朱长甫 苗以农
(东北师范大学生物系)

提 要

大豆植株主茎硝酸盐含量从基部向上逐渐增加,营养生长期和开花盛期,近幼生茎下段茎节间硝态氮含量较高,结荚期以后幼生茎段硝态氮含量较高。大豆品种间硝态氮含量和硝酸还原酶活力有明显的差异。吉林 20 号硝态氮含量和硝酸还原酶活力较高,而大白眉较低。大豆品种间内源基质硝酸还原酶活力差异和外源基质硝酸还原酶活力差异结果是一致的。内源基质硝酸还原酶活力和外源基质硝酸还原酶活力都与幼生茎段硝态氮含量呈显著正相关。

关键词 大豆;硝酸还原酶;硝态氮

硝酸还原酶(NR)是植物体内硝酸盐同化过程中的限速酶,NR 是由底物诱导的,它所催化的 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ 反应是 NO_3^- 同化为 NH_3 的限速步骤^[16],因此它在植物氮代谢中处于关键位置。硝酸还原酶活力可以作为品种选育和营养诊断的生理生化指标^[1]。由于其测定受许多条件如光和温度等限制和影响,因此,我们如果能够找出一个具有快速、准确、受外界环境条件影响小的能够代替硝酸还原酶活力的生化指标,那么就可为我们监测植物氮素营养和品种选育提供方便的选择手段。关于大豆品种间 NR 活力的比较研究曾有不少报道^[2,3]。本文报道大豆植株硝态氮含量的分布及大豆品种间在硝态氮含量和 NR 活力的差异;并讨论了硝态氮含量和 NR 活力的关系。

材 料 和 方 法

供试大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 有小金黄 1 号、大白眉、早丰 1 号、阿姆索 (Amsoy)、吉林 20 号和铁丰 18 号。于 1987 年 4 月 24 日播于东北师范大学校园试验田,行距 60cm,株距 10cm,每个品种占小区面积为 $3 \times 10\text{m}^2$,田间管理同一般农田。试验田土壤中含有有机质为 2.64%,全氮为 0.122%。于大豆不同生育期(按 Fehr 等的描述^[9]),每隔 10 天左右晴天采样,每一品种掘取 8 株,在子叶节剪断,分成许多段:(1)幼生茎段(包括叶柄),即着生最上面一片完全展开叶的节以上的主茎和腋枝;(2)第一节间,即子叶节与初生叶节之间的茎段;(3)长成茎段,即所剩茎和叶柄,每两个节间又分成一段。将取样在 80℃ 烘箱中

*“七·五”大豆攻关课题。本文于 1988 年 10 月 24 日收到。This paper was received on Oct. 24, 1988.

烘干 48 小时,磨成粉状,用于分析硝态氮含量。

硝酸盐含量的测定 取 0.1~0.5g 烘干粉碎的样品,加入 10ml 去离子水,于 50℃ 水浴锅中萃取 1 小时,混匀后,台式 80-1 型离心机 3,000rpm 离心 15min,取上清液置于 20ml 具塞试管中贮存。取 0.2ml 上述提取液,按 Cataldo 等(1975)的方法^[6]测定硝酸盐含量。

硝酸还原酶活力的体内测定 利用内源基质和外源基质的体内分析法^[4,10,11],测定硝酸还原酶力。每隔 10 天左右晴天上午 8 时半取样测定两次,取其平均值。采取植株最上部完全展开的叶片,每个品种取 8 株上面的全展叶,叶片连叶柄插入水槽内,立即带回实验室。将叶片洗净,吸取多余水分,剪成 5mm² 的小方块混合均匀,称 0.2~0.5g,6 份。各装入体积为 50ml 的锥形瓶中,瓶中盛有 10ml 反应介质,反应介质有 pH7.5 的 0.1M 磷酸盐缓冲液和 1% 异丙醇^[8,17],当利用外源基质时还包含 100mMKNO₃。硝酸还原酶活力按方昭希等提供的方法测定^[4]。

结 果 和 讨 论

一、大豆主茎不同生育时期硝态氮的分布

幼生茎段硝态氮含量在不同生育时期不一样,在营养生长前期较高,随生育进程逐渐下降(表 1),与 Patterson 等(1983)研究结果一致^[14]。

大豆不同茎节间硝态氮含量各异。营养生长期(V)和开花盛期(R₂),硝态氮含量从基部向上逐渐增加,在近幼生茎段下段茎节间硝态氮含量较高,而幼生茎段硝态氮含量较低

(见图)。结荚期(R₃)以后硝态氮含量由基部向顶端逐渐增加,幼生茎段硝态氮含量较高。大豆是一种营养生长和生殖生长并存期较长的植物,开花期为两种生长激烈竞争养分时期,约持续 4 周左右,直至营养生长终止^[5]。根部吸收的 NO₃⁻在地上部(主要是叶片)被还原为氨进一步合成蛋白质,首先用于营养生长形态建成^[13];营养生长终止以后,形态建成所需蛋白质量减少,故 NO₃-N 在幼茎段积累,在幼茎段 NO₃-N 含量出现高峰。

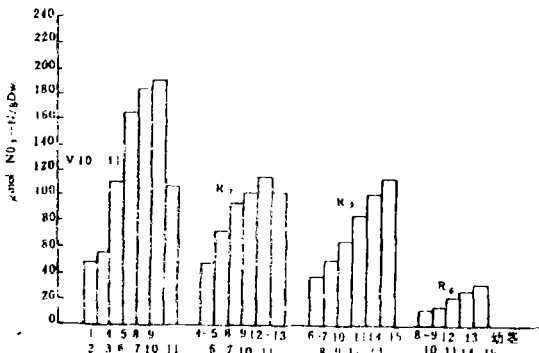


图 1 大豆植株硝酸盐的分布(六个品种平均值)

Fig. 1 Distribution of nitrate in soybean plants
(means of 6 soybean cultivars)

二、大豆品种间幼生茎段硝态氮含量的比较

供试六个大豆品种幼生茎段硝态氮含量总平均值为 209.23μmol/gDW, 品种间变异系数为 21.26%。品种间硝态氮含量有明显差异,其中吉林 20 号硝态氮含量最高达 289.25μmol/gDW,而大白眉幼茎段硝态氮含量最低为 164.66μmol/gDW(表 1)。

表 1 大豆不同品种幼生茎段硝态氮含量的变异性
Table 1 The variation of nitrate-N in young stem-part
of different soybean cultivars (nmol NO₃-N/gDW)

| 发育时期 品 Developmental stage 种 Cultivar | V ₄ | V ₅ | V ₆ | V ₈₋₉ | V ₁₀₋₁₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | 平均 Mean |
|--|----------------|----------------|----------------|------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|
| 小金黄 1 号 Xiaojinhuang 1 | 677.82 | 367.49 | 263.96 | 240.47 | 143.97 | 105.36 | 140.58 | 65.83 | 38.89 | 29.93 | 207.43 |
| 大白眉 Dabaimei | 564.33 | 259.86 | 268.18 | 215.71 | 80.92 | 99.45 | 87.59 | 26.02 | 23.20 | 21.33 | 164.66 |
| 早丰 1 号 Zhaofeng 1 | 630.42 | 434.14 | 305.08 | 173.71 | 106.26 | 54.62 | 85.71 | 57.41 | 43.10 | 41.08 | 193.15 |
| 阿姆索 Amsoy | 589.23 | 424.27 | 285.24 | 131.91 | 82.44 | 51.42 | 96.18 | 46.66 | 30.84 | 33.35 | 177.15 |
| 吉林 20 号 Jilin 20 | 1014.11 | 459.02 | 482.39 | 219.46 | 119.48 | 179.73 | 157.12 | 153.83 | 70.39 | 36.98 | 288.25 |
| 铁丰 18 号 Tiefeng 18 | 803.84 | 401.01 | 276.80 | 259.58 | 113.88 | 120.82 | 110.34 | 66.46 | 48.98 | 35.74 | 223.75 |
| 平均 Mean | 713.29 | 390.97 | 313.61 | 206.81 | 107.83 | 101.90 | 112.92 | 69.37 | 42.57 | 32.95 | 209.23 |
| C. V. % | | | | | | | | | | | 21.26 |

三、大豆品种间硝酸还原酶活力的比较

1. 内源基质硝酸还原酶活力 供试六个大豆品种内源基质硝酸还原酶活力总平均值为 2225.30nmolNO₂⁻/g 鲜重.30min,品种间变异系数为 30.32%。其中吉林 20 号内源基质硝酸还原酶活力较高为 3178.92nmol NO₂⁻/g 鲜重.min,而大白眉内源基质硝酸还原酶活力则较低为 1346.35nmol NO₂⁻/g 鲜重.30min(表 2)。

由表 2 可以看出,内源基质硝酸还原酶活力仅在营养生长前期有,营养生长后期和生殖生长期测不出来。硝酸还原酶的体内测定,并在反应液中不加 NO₃⁻,这时的硝酸还原酶活力可视为原位硝酸还原酶(NRinsitu)还原速率^[6,15],因为这种硝酸还原酶活力依赖于内源的 NO₃⁻及还原物。营养生长后期和生殖生长期能测出外源基质 NR 活力(外加 NO₃⁻),测不出内源基质 NR 活力(不加 NO₃⁻),可以认为 NO₃⁻含量是限制叶片内源基质 NR 活力的主要因素。在开花期和鼓粒期,由根系向叶片供应的 NO₃⁻N 是大豆叶片 NR 活力的主要限制因素,在此时期,NR 水平和还原剂不是限制叶片 NR 活力的因素^[12]。

2. 外源基质硝酸还原酶活力 由表 3 可以看出,供试六个大豆品种外源基质 NR 活力总平均值为 6024.25nmolNO₂⁻/g 鲜重.30min,品种间变异系数为 20.70%。其中吉林 20 号和铁丰 18 号外源基质 NR 活力较高,分别为 7605.05 和 7102.91nmolNO₂⁻/g 鲜重.30min;而大白眉外源基质 NR 活力较低为 4105.35nmolNO₂⁻/g 鲜重.30min。由此可见,

外源基质 NR 活力在品种间的差异和内源基质 NR 活力差异结果是一致的,只是 NR 活力的大小不同。

表 2 大豆不同品种内源基质 NR 活力的变异性

Table 2 The variation of NR activity with endogenous substrate
in different soybean cultivars (nmol NO₂/gFW. 30min)

| 发育时期 品 Developmental 种 stage Cultivar | V ₅ | V ₆ | V ₇ | V ₈₋₉ | V ₁₁ .R | 平 均 Mean |
|--|----------------|----------------|----------------|------------------|--------------------|-------------|
| 小金黄 1 号 Xiaojinhuang 1 | 3121.38 | 1580.32 | 515.73 | 1364.76 | 0 | 1645.53 |
| 大白眉 Dabumei | 2506.38 | 1036.10 | 1423.52 | 419.41 | 0 | 1346.35 |
| 早丰 1 号 Zhaofen 1 | 2357.50 | 1069.45 | 4563.19 | 933.32 | 0 | 2230.87 |
| 阿姆索 Amsoy | 2845.96 | 352.88 | 5068.85 | 600.22 | 0 | 2216.98 |
| 吉林 20 号 Jilin 20 | 2655.80 | 4537.84 | 4371.52 | 1150.51 | 0 | 3178.92 |
| 铁丰 18 号 Tiefeng 18 | 4140.67 | 902.68 | 4116.00 | 1773.30 | 0 | 2733.16 |
| 平 均 Mean | 2937.95 | 1579.86 | 3343.14 | 1040.25 | 0 | 2225.30 |
| C. V. % | | | | | | 30.32 |

表 3 大豆不同品种外源基质 NR 活力的变异性

Table 3 The variation of NR activity with exogenous substrate in
different soybean cultivars (nmol NO₂/gFW. 30min)

| 发育时期 品 Developmental 种 stage Cultivar | V ₅ | V ₆ | V ₇ | V ₈₋₉ | V ₁₀₋₁₁ | R ₁ | R ₂₋₃ | R ₅₋₆ | 平 均 Mean |
|--|----------------|----------------|----------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|------------------|-------------|
| 小金黄 1 号 Xiaojinhuang 1 | 9708.09 | 13783.16 | 7789.52 | 5641.75 | 3498.71 | 1310.18 | 1634.23 | 999.21 | 5545.61 |
| 大白眉 Dabumei | 9121.20 | 7956.63 | 7036.20 | 3167.26 | 2478.91 | 637.39 | 1418.24 | 827.00 | 4105.35 |

| | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 早丰 1 号 Zhao Feng 1 | 10777.83 | 9044.32 | 10599.02 | 5933.25 | 3351.04 | 2256.28 | 2345.23 | 502.62 | 5601.20 |
| 阿姆索 Amsug | 10928.93 | 10897.74 | 10820.26 | 4384.33 | 3260.93 | 8628.43 | 4354.23 | 1208.16 | 6185.35 |
| 吉林 20 号 Jilin 20 | 10242.32 | 13304.69 | 16543.80 | 6334.37 | 5562.39 | 3381.00 | 4420.28 | 1051.51 | 7605.05 |
| 铁丰 18 号 Tiefeng 18 | 9589.54 | 1354.56 | 12202.54 | 5548.58 | 8027.22 | 3393.29 | 3523.01 | 1384.51 | 7102.91 |
| 平 均 Mean | 10061.32 | 11356.85 | 10831.89 | 5168.26 | 4363.20 | 2467.76 | 2949.20 | 995.50 | 6024.25 |
| C. V. % | | | | | | | | | 20.70 |

四、NR 活力与幼茎段硝态氮含量间的相关性

内源基质 NR 活力与外源基质 NR 活力间呈极显著正相关, $r=0.9544^{**}$, 且内源基质 NR 活力和外源基质 NR 活力都与幼茎段 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 含量呈显著正相关, r 值分别为 0.8269^{**} 和 0.8298^{**} , 这样看来, 叶片 NR 活力在品种间的差异与幼茎段 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 含量差异是一致的。这就启示我们可利用幼生茎段硝态氮含量来作为评价大豆叶片 NR 活力的一个简便易行的生理指标。

参 考 文 献

- [1] 汤玉玮、林振武、陈敬祥: 1985, 中国农业科学, 第六期, 39—44 页。
- [2] 许守民: 1987, 吉林农业科学, 第 3 期, 89—93 页。
- [3] 李豪吉: 1986, 植物生理学通讯, 第 4 期, 30—32 页。
- [4] 方昭希等: 1979, 植物生理学报, 5(2): 123—128。
- [5] 杉原进: 1979, 农业科学 12 期 1—4 页(国外农学—大豆 1982 年第一期、孟庆喜译)。
- [6] Anderws M. 1986, Plant Cell Environ., 9: 511—516。
- [7] Cataldo D. A., Harsoon M., Schrader L. E. and Youngs V. L.: 1975, Commun. Soil Sci. and Plant Analysis, 6 (1): 71—79。
- [8] Dykstra G. F. 1974, Plant Physiol., 53: 632—634。
- [9] Fehr W. R., Caviness C. E., Burmood D. T. and Pennington J. S.: 1971, Crop Sci., 11: 929—939。
- [10] Hageman R. H. and Hucklesby D. P. 1971, In "Methods in Enzymology", 23: 491—503, Anthony San Pietro (ed.), Academic Press, New York。
- [11] Jaworski E. G. 1971, Biochem. Biophys. Res. Commun., 43: 1274—1279。
- [12] Nelson—Schreiber R. M. and Schweitzer L. E. 1986, Plant Physiol., 80: 454—458。
- [13] Ohyaama T. 1984, Plant Nutr., 30: 219—229。
- [14] Patterson T. G. and LaRue T. A. 1983, Crop Sci., 23: 825—831。
- [15] Radin j. w., Sell C. R. and Jordan W. R. 1975, Crop Sci., 15: 710—713。
- [16] Schrader L. E., Ritenour G. L. and Hageman R. H. 1968, Plant Physiol., 43: 938—940。
- [17] Scott D. B. and Noyra C. A. 1979, Can. J. Bot., 57: 764—768。

RELATION OF NITRATE REDUCTASE ACTIVITY TO NITRATE CONTENT IN SOYBEAN

Zhu Changfu Miao Yinong

(Biology Department, Northeast Normal University)

Abstract

Nitrate contents in main stem of soybeans gradually increased from the base to the shoot apex. Nitrate content peak appeared in stem internodes which was closet to young stem — parts during vegetative and flowering stage, but nitrate content peak appeared in young stem parts after early pod setting stage. There were cultivar specific difference in nitrate content and nitrate reductase (NR) activity in vivo. The nitrate content of Jilin 20 was highest while the nitrate content of Dabaimai was lowest among cultivars. The cultivars which had higher nitrate content exhibited higher NR activity. The NR activity difference in soybean cultivars were consistent whether with endogenous substrate or with exogenous substrate. A significantly positive correlation between nitrate contents in young stem parts and the NR activities whether with endogenous substrate or with exogenous substrate were observed.

Key words Soybean; Nitrate Reductase (NR); Nitrate—N