水稻黄化叶片硝酸还原酶活性的暗诱导

林建明　　林振武　　汤玉玮

（中国科学院上海植物生理研究所）

在植物体内，NO_3^- 还原为 NO_2^- 的反应是由硝酸还原酶（NADH:NR，EC1.6.6.1）所催化的。NR 是诱导酶，在高等植物中，它的活性产生除需要底物诱导外[1]，还依赖于光的作用[2]。在黄化叶片中不能诱导产生 NR 活性，但如果在诱导液中加入葡萄糖，则可以诱导出 NR 活性来[3]。过去认为这可能与体内能量水平有关[4]。我们在水稻黄化叶片中发现，只要含 NO_3^- 的诱导液的 pH 低于 5 就能在暗中诱导产生高的NR活性，而不需要外加葡萄糖，并且，植物激素 6-BA(6-苄基腺嘌呤)和 ABA（脱落酸)对低 pH 的这一诱导作用都表现明显的促进。

材料和方法

水稻（珍汕 97B）种子经浸种萌发后排在尼龙网上，以自来水在暗中培养，培养温度为 25±2℃。上网前经漂白粉表面消毒。取 13 日龄幼苗的第三叶片于诱导液中，经真空渗入 3 分钟后在暗中保温 12 小时。诱导液为 0.1*M* 磷酸缓冲液，含 20m*M* KNO_3，如需要则在诱导液中加入 6-BA 或 ABA，用 H_3PO_4 或 NaOH 调至 pH3.0。操作均在暗绿光下进行。NR 的提取及活性测定方法同前[5]。

结果与讨论

图 1 表明，在诱导液的 pH 高于 5 时，即使加入 KNO_3 也不能使黄化叶片在暗中产生 NR 活性(或仅有很低的活性)。但是，在 pH 低于 5 的条件下，NR 活性便能被诱导产生，并且在一定范围内，随着 pH 的下降，NR 活性提高，最适 pH 为 3.0。在低于 pH3 的情况下，NR 活性明显下降，这可能是由于过低 pH 使植物组织受到了损伤所引起的。

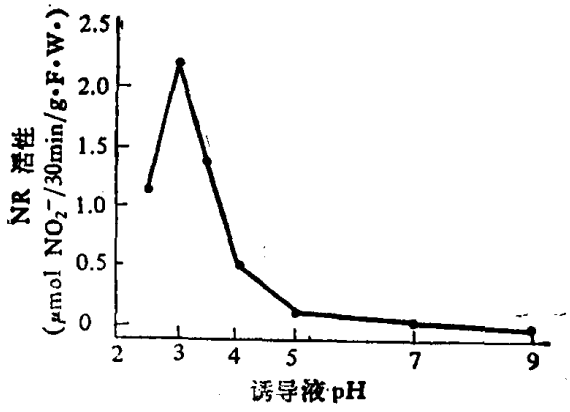


图 1　不同 pH对 NR 活性诱导的影响

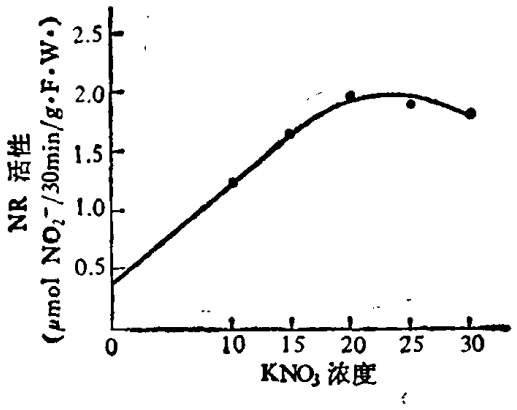


图 2　KNO_3 浓度对 NR 活性的影响

本文 1984 年 10 月 4 日收到。

NR 是一种诱导酶，酶活性受底物浓度影响很大．低 pH 对黄化叶片 NR 活性诱导的作用随诱导物浓度增加而增大，至 20m*M* 左右达到最大(图 2)．图 1 和图 2 说明，低 pH 条件和诱导物的同时存在才能诱导产生 NR 活性．在 pH 高于 5 的情况下，诱导物加入与否都诱导不出 NR 活性．

依赖于低 pH 的 NR 活性诱导需要一定的时间，如图 3 所示，酸处理 2 小时后 NR 活性才开始出现，从处理 4 小时以后到 12 小时以前，NR 活性几乎呈直线上升．目前，对于 NR 的诱导机理有两种意见[6]：(1)酶蛋白的重新合成；(2)酶前体的活化．从酸诱导 NR 活性有 2 小时滞后期来看，NR 活性的产生很可能经历了包括蛋白质合成在内的一系列复杂的生化过程，即使在酸诱导以前就已存在 NR 前体的话，酸的作用也不是对 NR 前体的简单活化．这从蛋白质合成抑制剂(环已酰亚胺)和有活性 NR 合成抑制剂(钨酸钠)对低 pH 诱导作用的完全抑制以及低 pH 促进 ^{3}H-氨基酸在体内掺入 NR 等试验结果中得到进一步证实[7]．

那么，低 pH 条件在 NR 诱导中的作用是否通过影响 KNO_3 的吸收而产生的呢？为此，我们进行了如下试验：即让材料经 KNO_3 预处理后转到不含 KNO_3 的磷酸缓冲液中保温 12 小时，结果表明，NR 活性的高低仍与磷酸缓冲液的 pH 密切相关(表 1)．这说明，低 pH 在 NR 诱导中的作用不在于(至少不完全在于)通过影响 KNO_3 的吸收．

表 1　pH 对 KNO_3 预处理的水稻叶片 NR 活性的诱导作用

预　处　理	诱导 pH	NR 活性 ($nmd.NO_2^-/30min/S.F.W$)	%
0.1*M* 磷酸缓冲液 (pH7.0)			
+50m*M*KNO_3	3.0	895	100
+50m*M*KNO_3	3.5	273.5	30.6
+50m*M*KNO_3	7.0	45	5.0
−KNO_3	3.0	150	16.8

水稻叶片预处理 12 小时后用蒸馏水洗净，转入不含 KNO_3 的 0.1*M* 磷酸缓冲液中诱导 12 小时．

有关植物激素对 NR 活性影响已有不少报道，一般认为 6-BA 促进而 ABA 则抑制 NR 活性[8]．但是，也有一些报道指出，ABA 能促进 NR 活性[9,10]．这些实验都是在非酸诱导条件下进行的．我们的结果表明，在酸诱导条件下，6-BA 和 ABA 都能促进 NR 活性，而且 ABA 的作用强于 6-BA (图 4)

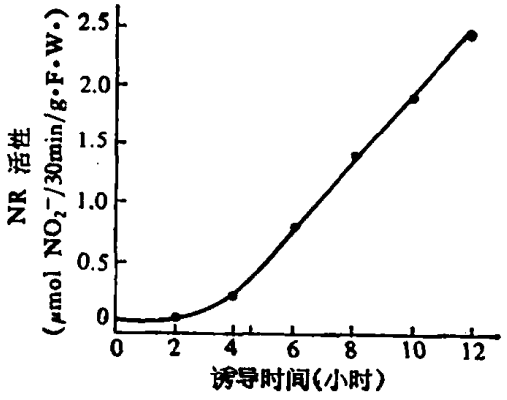


图 3　低 pH 对 NR 活性诱导作用的时间曲线

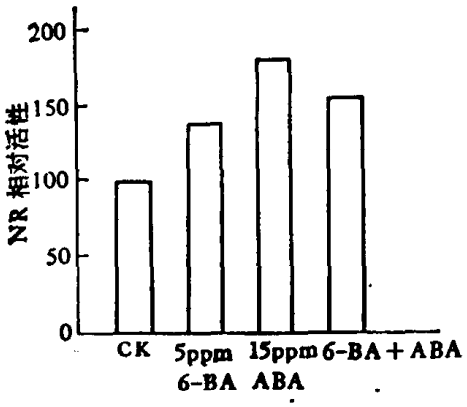


图 4　6-BA 和 ABA 对NR 活性的促进作用

1975 年 Knypl 和 Ferguson 曾报道过 pH 对 NR 诱导的影响[11]，他们以有机酸和某些含氮化合物作为诱导物，发现黄化的黄瓜子叶在光下能诱导产生NR活性，同时 NR 活性明显受诱导液 pH 的影响(最适 pH 为 3.0)。但是，他们对于在暗中能否诱导产生 NR 活性则没有报道。他们的结果还指出，当以硝酸盐作为诱导物时，诱导液的 pH 对 NR 活性没有明显的影响。显然，我们的结果与他们的有很大差别。本文关于低 pH 对 NR 活形的诱导及植物激素在这一过程中的作用值得进一步研究，这对于揭示 NR 的诱导形成和活性调节机制是有一定价值的。

参 考 文 献

[1] Tang, P. S. and Wu, H. Y., *Nature*, **179**(1957), 1355—1356.
[2] Candela, M. J. et al., *Plant Physiol.*, **32**(1957), 180—288.
[3] Travis, R. L. and Key, J. L., *Plant Physiol.*, **48**(1971), 617—620.
[4] 陆嘉陵等，植物生理学报，**9**(1983)，41—49.
[5] 林振武等，科学通报，**28**(1983)，15：945—947.
[6] Guerrero, M. G. et al., *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**(1981), 169—204.
[7] 林建明，中国科学院上海植物生理研究所研究生毕业论文，1984.
[8] Knypl, J. S., in *Nitrogen Assimilation of Plants* (Eds. Hewitt, E. J. and Cutting, C. V.), Academic, London, 1979, 541—556.
[9] Sankhla, N. and Huber, W., *Z. Pflanzenphysiol.*, **76**(1975), 467—470.
[10] Palmer, C. E., *Plant Cell Physiol.*, **23**(1982), 301—308.
[11] Knypl, J. S. and Ferguson, A. R., *Z. Pflanzenphysiol.*, **74**(1975), 434—439.