

渗透胁迫对小麦幼苗硝酸还原酶 钝化蛋白的影响*

何平¹ 文樹基² 汪沛洪²

(1 华南农业大学农业生物系, 广州, 510642; 2 西北农业大学植物生化研究室)

摘要 渗透胁迫下郑引一号(干旱敏感品种)幼苗硝酸还原酶(NR)活性下降的速率比陕合六号(抗旱品种)的快。小麦幼苗中含有NR钝化蛋白部分I和部分II, 其中部分II对NR的钝化活性大于部分I; 随着渗透胁迫的加剧, 陕合六号与郑引一号的NR钝化蛋白部分I的钝化活性减小百分率相近, 郑引一号的NR钝化蛋白部分II的钝化活性上升百分率则快于陕合六号的, 因而, 在渗透胁迫下, 郑引一号的总NR钝化蛋白活性比陕合六号的高。

关键词 硝酸还原酶; 硝酸还原酶的钝化蛋白; 渗透胁迫; 小麦

中图分类号 Q554.9

植物在渗透胁迫下, 体内物质代谢产生一系列变化, 许多酶活性改变, NR就是其中受影响最严重的酶之一, NR对渗透胁迫极为敏感, 当外界环境水势稍有下降时, NR活性就立即降低(张殿忠等, 1988; Larsson et al, 1989)。

NR是植物氮代谢中一种非常重要的酶, 其活性一直在迅速地变化着, 这意味着在植物体内存在着有效的生物体自动调节途径(Aslam et al, 1976)。人们已从水稻幼苗(Yamaya et al, 1978)、大豆叶片(Jolly et al, 1978)、小麦叶片(何文竹等, 1982)等材料中分离出NR钝化蛋白。虽然关于钝化蛋白对NR活性的钝化作用方式众说不一, 但NR钝化蛋白无疑是NR活性调控机制中的一个重要方面。本文在前人工作的基础上, 探求渗透胁迫不同强度对干旱敏感品种小麦幼苗硝酸还原酶钝化蛋白的影响, 为作物抗旱机理提供一些科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料的培养

小麦(*Triticum aestivum*)种子(郑引一号 Zhengyin NO.1和陕合六号 Shanhe NO.6)用0.1% HgCl₂浸泡10 min后, 用蒸馏水冲洗数遍, 再在水中浸泡3 h, 然后平铺在垫有粗滤纸的培养皿中于(28±2)℃温箱中催芽48 h, 精选出发芽一致的种子置于尼龙网上, 先用自来水培养3 d, 后用完全Hoagland营养液培养, 培养温度为25℃左右, 光照10 h/d, 光强8 000~10 000 lx。

1.2 试验方法

1995-06-02收稿

*国家自然科学基金资助项目

1.2.1 胁迫处理 待幼苗第 3 片叶子完全展开后, 将幼苗根系用滤纸吸干, 浸入 Hoagland 营养液配制的 -1.0 mPa 聚乙二醇 6 000(PEG6000) 溶液中, 以正常 Hoagland 营养液作为对照, 胁迫 24、48、72 h 分别达到轻度、中度、严重程度时(赵会贤等, 1992), 取第 3 片完全展开叶作为测试样品。

1.2.2 NR 提取及其活性的测定 取小麦第 3 片完全展开叶, 剪成约 1 cm 长的小段。称取 1 g 放在研钵中, 冰冻 30 min, 加入 pH8.5 的 250 mmol/L 磷酸缓冲液(内含 5 mmol/L EDTA 和 5 mmol/L 半胱氨酸), 研磨成匀浆, 4 000 r/min, 离心 10 min, 上清液即酶的粗提液。提取过程在 $0\sim4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行。NR 活性测定参照陈薇等(1980)的方法。

1.2.3 NR 钝化蛋白分离与纯化 等幼苗第 3 片叶子完全展开后进行胁迫处理, 取其叶片 30 g, 放入 pH7.5、25 mmol/L 磷酸缓冲液 300 mL(含 5 mmol/L EDTA 和 5 mmol/L 半胱氨酸), 组织捣碎机捣碎。经 4 000 r/min 离心后得上清液, 30%~45% 饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级分离, 沉淀溶于 30 mL 提取缓冲液中, 通过已用 25 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.5, 含 5 mmol/L EDTA)平衡的 Sephadex G-100 柱(2 cm $\times$ 90 cm), 并以平衡液洗脱, 流速 90 mL/h, 5 mL 一管, 分管收集。将蛋白峰值最高的 7 管一起冷藏。如用于钝化测定时, 均将其蛋白含量稀释至 0.5 g/L, 冷藏待用(何文竹等, 1982)。蛋白含量测定用 Folin-酚法。

1.2.4 NR 钝化蛋白之钝化活力测定 含 NR 的粗提液 0.7 mL 加上钝化蛋白 1 mL, 在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下(在此温度下 NR 自然失活较小, 而钝化蛋白对 NR 的钝化作用又较易发挥)放置 1 h, 然后分别加入 0.1 mL NADH 溶液(2 g/L)和 1.2 mL 含 1 mol/L 硝酸钾的磷酸缓冲液(pH7.5)。置于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保温 30 min, 随即加入 1 mL 1% 对氨基苯磺酸和 1 mL 0.2% α -萘胺。放置 1 h 后, 用分光光度计测定其 A_{540} 值。对照是将钝化蛋白 1 mL 改为 1 mL 蒸馏水, 其余成分相同。以 NR 和钝化蛋白在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下预保温 1 h 后, NR 活力丧失 1% 为一个钝化活力单位。

1.2.5 可溶性蛋白质测定 采用 Folin-酚法(汪沛洪, 1985)。

2 结果与分析

2.1 渗透胁迫对不同品种小麦幼苗 NR 活性的影响

从表 1 中可以看出, NR 对渗透胁迫极为敏感, 当外界环境水势下降时, NR 活性就立即降低。在 24 h 短时胁迫时, 陕合六号与郑引一号的酶活性分别占对照的 72.0% 和 57.6%, 故短时渗透胁迫对郑引一号 NR 活性影响比陕合六号的大, 这说明陕合六号抗渗透胁迫性较强。在延长胁迫时间后, 两品种 NR 活性降低百分率接近。

表 1 渗透胁迫对小麦幼苗叶的 NR 活性影响

品 种	处 理	NR 活性/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		
		24 h	48 h	72 h
陕合六号	对照	126.03	124.83	127.02
	PEG 处理	90.74	68.17	29.26
	处理占对照 %	72.0	54.6	23.0
郑引一号	对照	130.12	128.41	129.72
	PEG 处理	75.26	66.88	33.08
	处理占对照 %	57.6	52.1	25.5

2.2 NR 钝化蛋白部分 I 和部分 II 对 NR 的钝化作用

通过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级分离和 Sephadex G-100 柱纯化后, 主要分为两个峰, 即 NR 钝化

蛋白部分 I 和部分 II ,其部分 I 和部分 II 均对 NR 表现钝化活性。由表 2 可见,钝化蛋白部分 II 的钝化活性明显高于部分 I,同样体积的钝化蛋白部分 I 的钝化活性只有部分 II 的 2/3 左右。

2.3 渗透胁迫对不同小麦品种叶片 NR 钝化蛋白的影响

由表 3 所示结果看出,随着渗透胁迫的加剧,陕合六号与郑引一号的钝化蛋白部分I蛋白含量不断降低,而钝化蛋白部

分 II 的蛋白含量则不断上升。在严重胁迫(72h)时,陕合六号与郑引一号钝化蛋白部分 I 的蛋白含量减少百分比分别为 32.5%、29.1%,百分比减少量较小;它们的钝化蛋白部分 II 的蛋白含量增加百分比分别为 88.1%、124.4%,百分比增加量较大,且郑引一号的钝化蛋白部分 II 的百分比增加远大于陕合六号的。表 4 所列的钝化活性进一步证明上述同样的趋势,即随着渗透胁迫

表 2 NR 钝化蛋白部分 I 及部分 II 对郑引一号 NR 的钝化作用

预处理	预处理后 NR 活力 A540	NR 活力丧失 /%
NR + 磷酸缓冲液	0.618	—
NR + 钝化蛋白部分 I	0.384	37.9
NR + 钝化蛋白部分 II	0.291	52.9

表 3 渗透胁迫对小麦叶片 NR 钝化蛋白部分 I 与部分 II 蛋白含量的影响

品 种	胁迫时 间/h	NR 钝化蛋白部分 I		NR 钝化蛋白部分 II	
		蛋白质含量	蛋白质含量	蛋白质含量	蛋白质含量
		A 500	减少 / %	A 500	增加 / %
陕合六号	0	3.02	—	0.42	—
	24	2.38	21.2	0.51	21.4
	48	2.12	29.8	0.65	54.8
	72	2.04	32.5	0.79	88.1
郑引一号	0	2.47	—	0.41	—
	24	2.16	12.6	0.59	43.9
	48	1.84	25.5	0.71	73.2
	72	1.75	29.1	0.92	124.4

表 4 渗透胁迫对小麦叶片中 NR 钝化蛋白部分 I 与部分 II 钝化活力的影响

品 种	胁迫时 间/h	处 理	预处理后 NR 活力		预处理后 NR 活力		
			NR 活力	丧失 / %	NR 活力	丧失 / %	
			A 540		A 540		
陕合六号	0	NR+ 磷酸缓冲液	0.592	—	NR+ 磷酸缓冲液	0.592	—
	24	NR+ 钝化蛋白部分 I	0.357	39.7	NR+ 钝化蛋白部分 II	0.310	47.6
	48	NR+ 钝化蛋白部分 I	0.392	33.8	NR+ 钝化蛋白部分 II	0.289	51.2
	72	NR+ 钝化蛋白部分 I	0.412	30.4	NR+ 钝化蛋白部分 II	0.189	68.1
郑引一号	0	NR+ 磷酸缓冲液	0.620	—	NR+ 磷酸缓冲液	0.620	—
	24	NR+ 钝化蛋白部分 I	0.391	36.9	NR+ 钝化蛋白部分 II	0.314	49.4
	48	NR+ 钝化蛋白部分 I	0.422	31.9	NR+ 钝化蛋白部分 II	0.205	66.9
	72	NR+ 钝化蛋白部分 I	0.435	29.8	NR+ 钝化蛋白部分 II	0.066	89.4

加剧, 陕合六号与郑引一号钝化蛋白部分 I 的钝化活性(NR 活力丧失)都有所降低, 降低速率较小; 它们的钝化蛋白部分 II 的钝化活性则增加, 增加速率较大, 且郑引一号的钝化蛋白部分 II 增加速率大于陕合六号。

3 讨论

硝酸还原酶对渗透胁迫极为敏感, 当外界环境水势稍有下降时, NR 活性就立即降低, 这与张殿忠等(1988)、Larsson 等(1989)的结果相同。

小麦幼苗中含有 NR 钝化蛋白部分 I 和部分 II, 其中部分 II 对 NR 的钝化活性大于部分 I (何文竹等, 1982)。随着渗透胁迫时间的延长, 陕合六号与郑引一号的 NR 钝化蛋白部分 I 蛋白含量及其钝化活性不断降低, 降低的百分率较小, 而且两品种间差异不大; 陕合六号与郑引一号的钝化蛋白部分 II 的蛋白含量及其钝化活性则不断增加, 增加的百分率较高, 而且郑引一号钝化蛋白部分 II 的蛋白含量及钝化活性的增加速率大于陕合六号。因而, 在渗透胁迫下, 郑引一号的总 NR 钝化蛋白的活性比陕合六号高。这一结果支持了短时胁迫对干旱敏感品种郑引一号 NR 活性影响比抗旱品种陕合六号大的结论。

对不同品种小麦叶片中 NR 钝化蛋白在渗透胁迫下的动态变化进行了初步研究。结果表明, 尽管小麦叶片中 NR 钝化蛋白部分 I 的蛋白含量是部分 II 的 6 ~ 7 倍, 但其钝化活力仅为 NR 钝化蛋白部分 II 的 1/4 ~ 1/2, 所以, 同样蛋白含量的部分 II, 其钝化活力是部分 I 的 10 ~ 20 倍。根据其它作物 NR 钝化蛋白的研究结果推测, NR 钝化蛋白部分 I 可能是结合型抑制剂, 在小麦中对 NR 活性起可逆的微调作用, 部分 II 则可能是专一的蛋白酶型抑制剂, 起不可逆的粗调作用(何文竹等, 1982)。抗旱品种陕合六号 NR 钝化蛋白部分 I 的含量高于干旱敏感品种郑引一号, 可认为抗旱品种中 NR 钝化蛋白对 NR 调节的精度相对提高。

参考文献

- 何文竹, 赵文思, 汤玉玮. 1982. 硝酸还原酶的研究 I. 小麦叶片硝酸还原酶—钝化蛋白的分离和特性. 植物生理学报, 8(1): 59 ~ 66
- 陈薇, 张德颐. 1980. 植物组织中硝酸还原酶的提取、测定和纯化. 植物生理学通讯, (4): 45 ~ 49
- 赵会贤, 汪沛洪. 1992. 水分胁迫对小麦幼苗保护酶体系的影响及其与抗旱性的关系. 西北农业大学学报, 20 (1): 28 ~ 33
- 张殿忠, 汪沛洪. 1988. 水分胁迫时氮素对小麦叶片氮代谢的影响. 西北农业大学学报, 16(4): 15 ~ 21
- 汪沛洪主编. 1985. 基础生物化学实验指导. 西安: 陕西科技出版社, 64 ~ 66
- Aslam M, Oaks A. 1976. Comparative studies on the induction and inactivation of nitrate reductase in corn roots and leaves. *Plant Physiol*, 57: 572 ~ 576
- Jolly S O, Tolbert N E. 1978. NADH—nitrate reductase inhibitor from soybean leaves. *Plant Physiol*, 62: 197 ~ 203
- Larsson C M, Whitford P N. 1989. Influence of osmotic stress on nitrate reductase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) and the role of abscisic acid. *J Expt Bot*, 40(220): 1265 ~ 1271
- Yamaya T, Ohira K. 1978. Reversible inactivation of nitrate reductase by its inactivating factor from rice cells in suspension culture. *Plant Cell Physiol*, 19: 1085 ~ 1089

EFFECT OF OSMOTIC STRESS ON NITRATE REDUCTASE – INACTIVATING PROTEIN OF WHEAT SEEDLINGS

He Ping¹ Wen Shuji² Wang Peihong²

(1 Dept. of Agr. Biology, South China Agr. Univ, Guangzhou, 510642;

2 Lab. of Plant Biochemistry, Northwestern Agr. Univ.)

Abstract

Under osmotic stress, nitrate reductase activity of wheat seedlings (Zhengyin No. 1, drought – sensitive wheat cultivar) decreased more rapidly than that of Shanhe NO. 6(drought – resistant wheat cultivar) did. These two cultivar seedlings contained NR – inactivating protein part I and part II, and the inactivation ability of part II was stronger than that of part I. With osmotic stress, the activity of NR – inactivating protein part I decreased in similar degree in Shanhe No.6 and Zhengyin No.1, while the activity of NR – inactivating protein part II in Zhengyin No.1 increased more rapidly than that of Shanhe No.6. Thus, the total content of NR – inactivating protein in Zhengyin No.1 was higher than that of Shanhe No.6.

Key words nitrate reductase; NR – inactivating protein; osmotic stress; wheat