

文章编号: 1001-411X(2001)03-0037-03

光/暗转换对小麦幼苗硝酸还原酶活性的影响

余让才¹, 范燕萍², 李明启¹

(1 华南农业大学生物技术学院; 2 华南农业大学园艺系, 广东 广州 510642)

摘要: 用小麦幼苗为材料研究了光/暗转换对植物硝酸还原酶活性(NRA)的影响. 研究表明, 光在很大程度上调控小麦幼苗硝酸还原酶的活性. 一经暗处理, 小麦幼苗体内 NRA 在 10 min 内显著下降, 恢复光照处理后 NRA 又很快上升. 暗处理幼苗与光处理幼苗硝酸还原酶活性有明显差异, 尤其在测定时间为 2 min 时差异最大. 暗处理后植株硝酸还原酶对 Mg^{2+} 抑制的敏感性增强. 短时间暗处理可引起 NRA 的快速下降, 而随后给予光照 NRA 又能快速提高. 研究结果说明暗处理后该酶的调节特性发生变化.

关键词: 硝酸还原酶; 光/暗调控; 小麦

中图分类号: Q945

文献标识码: A

高等植物硝酸还原酶(NR, nitrate reductase, EC 1.6.6.1)是植物氮代谢的关键酶和限速酶. 它是底物诱导酶, 同时也受到光的调控^[1]. 通常在有 NO_3^- 存在时, 在黑暗下植物也有硝酸还原酶活性(NRA, nitrate reductase activity), 但活性很低; 一经照光, 硝酸还原酶活性大大提高^[1]. 光照可通过加强植物对硝酸盐的吸收而提高 NRA^[2]. 光对植物 NRA 的快速调控, 对维持植物正常的生理代谢具有重要的意义^[3].

植物硝酸还原酶的调控包括该酶基因的表达、蛋白的合成和降解及短期的活化/非活化(activation/inactivation)机制. 光和硝酸盐可以诱导 NR 基因的表达、酶蛋白和辅酶的合成及全酶的装配^[4-9].

近年的研究表明, 在光/暗转换过程中可以快速、可逆地因 NR 蛋白的磷酸化/脱磷酸化机制而调控菠菜叶片 NRA^[7]. 而在小麦^[8]、玉米^[9]及菠菜^[10]上认为 NRA 的调控是因 NR 蛋白的氧化状态决定其活性; NR 在氧化态时活性高; 而在还原态时活性低.

至今, 大多数的研究工作主要是以菠菜为研究材料进行的^[7]. 本文以小麦为研究材料, 研究长期及短期光/暗处理对植物硝酸还原酶活性的影响以及 Mg^{2+} 浓度与该酶活性之间的关系, 旨在进一步了解该酶的调节特性.

1 材料与方法

小麦(*Triticum aestivum* L.) 种子经 1 g/L 升汞消毒 10 min 后, 充分洗净, 浸种 8~10 h, 催芽 1 d, 待胚

根长出后, 播种于尼龙网上, 用 0.1 mmol/L $CaSO_4$ 溶液培养, 黑暗处理至 5 日龄. 光处理前用 50 mmol/L KNO_3 处理 12 h, 随后进行光处理.

硝酸还原酶活性(NRA, nitrate reductase activity)测定参照前文^[2]的方法进行. 称取材料 1 g, 加入提取液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.3, 含 10 mmol/L 半胱氨酸)2 mL, 研磨, 离心 10 000 r/min 5 min, 上清液即为粗酶提液. 上述过程在 0~4 °C 下完成. 反应液含: 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 mmol/L NADH, 5 mmol/L KNO_3 , 10 mmol/L EDTA (加 $MgCl_2$ 测定 NRA 时, 不加 EDTA). 取 50 μ L 酶液加入 450 μ L 反应液, 混匀, 在 30 °C 下反应 5 min. 反应完毕, 立即用 50 μ L 1 mol/L 醋酸锌终止反应. 加入 350 μ L 10 g/L 磺胺及 350 μ L 0.2 g/L α -萘乙胺, 显色 30 min 后离心, 上清液在 540 nm 处比色.

2 结果与分析

2.1 长期及短期黑暗处理对植物硝酸还原酶活性的影响

从图 1 中看出, 光处理 30 h 后经黑暗处理, NRA 下降. 暗处理 1.5 h 后, 蓝光处理幼苗的 NRA 只有黑暗处理前的 46%, 而相应红光处理材料的只有 30%; 黑暗处理 2 d 后, NRA 很低, 蓝光处理幼苗的 NRA 只有黑暗处理前的 9.5%, 而红光处理材料为 9%. 黑暗处理后 2 d 重新照光 2 h, NRA 只有小幅度的上升. 在整个试验中, 蓝光处理幼苗的 NRA 均强于红光处理材料.

收稿日期: 2001-03-13

作者简介: 余让才(1963-), 男, 副教授, 博士.

基金项目: 广东省科委人才基金资助项目(974203)

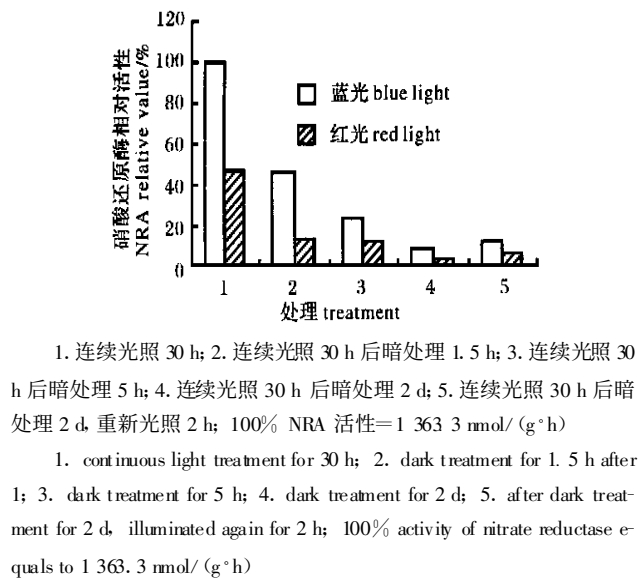


图 1 暗处理对硝酸还原酶活性的影响

Fig. 1 Effect of dark treatment on the activity of nitrate reductase

2.2 光/暗处理对体外NO₃⁻还原动态的影响

对黄化小麦幼苗进行 2 种处理: 1) 光处理, 即光照 24 h; 2) 短时黑暗处理, 即蓝光处理 23.5 h 后, 转移到黑暗中处理 30 min, 比较光处理材料与短时黑暗处理材料 NR 对 NO₃⁻ 还原动态反应的变化. 图 2 可看出, 光处理小麦 NO₂⁻ 形成速率在测定时间内基本是呈直线变化, 在 2 min 时 NO₂⁻ 形成速率为 428.7 nmol/(g·h), 而当小麦材料暗处理 30 min 后, 可以看到在 NO₃⁻ 的还原反应中有一滞后期, NO₂⁻ 形成速率在最初的 2 min 内比较低, 但随反应的进行, 该反应速率逐渐加快. 在本研究中, NRA 的光/暗差异在测定时间为 2 min 时最大, 暗处理幼苗的 NRA 只有相应光处理幼苗的 37.5%, 而测定时间为 10 min 时, 暗处理幼苗的 NRA 为相应光处理幼苗的 66%.

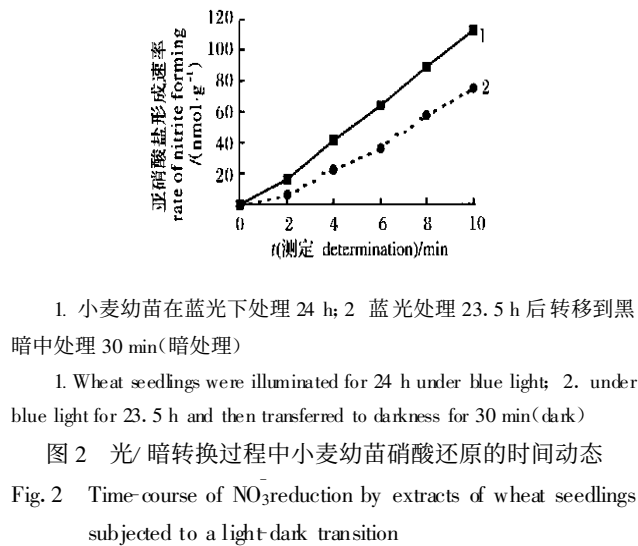


图 2 光/暗转换过程中小麦幼苗硝酸还原的时间动态

Fig. 2 Time-course of NO₃⁻ reduction by extracts of wheat seedlings subjected to a light-dark transition

2.3 短时黑暗处理对植物硝酸还原酶活性的影响

由于光/暗转换处理对 NRA 的影响在测定时间

为 2 min 时比较明显, 因而 NRA 的测定以 2 min 为准, 研究短时间光/暗处理对 NRA 的影响. 从图 3 中可看出, 短时的黑暗处理对 NRA 的影响很大, 暗处理后, NRA 直线下降, 如黑暗处理 30 min 后, NRA 只有照光处理的 40%; 随后进行光照处理, NRA 又很快上升, 照光后 30 min 可基本上恢复到暗处理前的水平.

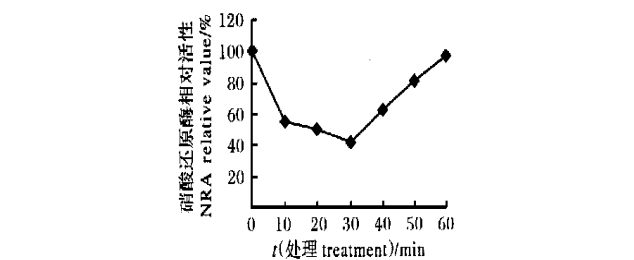


图 3 光/暗/光处理对小麦幼苗硝酸还原酶活性的影响

Fig. 3 Change of extractable nitrate reductase activity from wheat seedlings in response to a light-dark-light transition

2.4 Mg²⁺ 浓度对硝酸还原酶活性的影响

在反应液中添加不同浓度的 Mg²⁺, 研究了连续光照及光照后再暗处理 30 min 小麦幼苗 NRA 与 Mg²⁺ 的关系. 酶活性测定时间为 2 min. 从表 1 中可看出, Mg²⁺ 对 NRA 具有抑制作用, 但对光及暗处理材料 NRA 的抑制率不同. 反应液中 Mg²⁺ 浓度为 10 mmol/L 时, 光处理小麦 NRA 为对照(即不加 Mg²⁺) 的 69.2%; 而暗处理 30 min 后小麦的 NRA 却只有对照的 21.7%.

表 1 反应液中镁离子浓度对硝酸还原酶活性的影响

Tab. 1 Effect of Mg²⁺ concentration in assay medium on the initial activity of nitrate reductase

反应液镁离子浓度 Mg ²⁺ concentration in the assay medium /(mmol·L ⁻¹)	硝酸还原酶活性	
	NR activity ¹⁾ /(nmol·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	
	光处理小麦 light treatment	暗处理小麦 dark treatment
0(CK)	784.2 (100.0)	361.9 (100.0)
0.5	748.0 (95.4)	271.5 (75.0)
5.0	585.1 (74.6)	90.5 (25.0)
10.0	542.9 (69.2)	78.4 (21.7)

1) 括号内数据为与 CK 之比(%)

3 讨论

从本研究结果看, 长期黑暗处理及短期黑暗处理均影响到 NRA, 短时暗处理可能影响到植物体内

NR 的状态, 以至对 Mg^{2+} 的反应有所改变.

光从基因转录、翻译及硝酸还原酶蛋白的修饰几个方面影响该酶的活性. 长期黑暗处理后, NRA 下降, 并进一步随黑暗处理时间的延长而降低. 暗处理 2 d 后, 重新照光 2 h, 但 NRA 增加不大. 这说明长期暗处理已使 NR 蛋白量下降到较低的水平. 短时间的 光/暗转换对 NRA 调节的研究结果说明光在蛋白质水平上调节 NRA, 且这种调节是可逆的.

暗处理小麦 NRA 在体外测定体系中有一定程度的上升, 说明在反应体系中可能具有激活因暗处理而钝化 NR 的物质存在. Lillo^[1] 认为植物体内 NADH 的瞬时缺乏可使 NR 活性降低. 由此, 笔者推论可能是反应液中的 NADH 使因暗处理而钝化的 NRA 重新上升.

NR 是一种光调节酶, 同时还受到许多环境因子的影响及内部因子的调节. 测定时酶反应时间的长短、反应液的组成等均对测定结果有很大的影响. 如前所述, 在体外测定时, 若酶反应时间为 2 min, 黑暗处理小麦的 NRA 只有光处理的 37.5%; 而若以酶反应 10 min 时计算, 则为 66%. 而在以往的研究中, 酶反应时间常采用 30 min^[11], 因而该测定结果在多大程度上反映了植物活体内的 NRA 真实水平可能还需进一步的研究. 许多研究者都试图找出 NRA 与植物生长速率、蛋白质含量及最终产量之间的相关性, 但研究结果往往不太理想^[12, 13]. 怎样分析测定 NRA 以反应出植物体内的真实水平及与产量和产量构成因素之间的关系还有待研究.

参考文献:

[1] LILLO C. Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants[J]. *Physiol Plant*, 1994, 90: 616—620.
[2] 余让才, 范燕萍, 李明启. 蓝光对黄化小麦幼苗吸收及

硝酸还原酶活性的影响[J]. *华南农业大学学报*, 1996, 17(3): 70—74.
[3] 余让才, 李明启, 范燕萍. 高等植物硝酸还原酶的光调控[J]. *植物生理学通讯*, 1997, (1): 61—65.
[4] SOLOMONSON L P, BARBER M J. Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1990, 41: 225—253.
[5] CRAWFORD N M. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 859—868.
[6] CABELLO P, de la HABA P, GONZALEZ-FONTES A, et al. Induction of nitrate reductase, nitrite reductase, and glutamine synthetase isoforms in sunflower cotyledons as affected by nitrate, light, and plastid integrity[J]. *Protoplasma*, 1998, 201: 1—7.
[7] KAISER W M, HUBER S C. Posttranslational regulation of nitrate in leaves in higher plants[J]. *Plant Physiol*, 1994, 106: 817—821.
[8] ARYAN A P, BATT R G, WALLACE W. Reversible inactivation by NADH and the occurrence of partially inactive enzyme in the wheat leaf[J]. *Plant Physiol*, 1983, 71: 1 071—1 077.
[9] ECHEVARRIA C, MAURINO S G, MALDONADO J M. Reversible inactivation of maize leaf nitrate reductase[J]. *Phytochemistry*, 1984, 23: 2 155—2 158.
[10] MAURINO S G, VARGAS M A, APARICIO P J, et al. Blue-light reactivation of spinach nitrate reductase inactivated by acetylene or cyanide. Effects of flavins and oxygen[J]. *Physiol Plant*, 1983, 57: 411—416.
[11] 陈 薇, 张得颐. 植物组织中 NR 的提取、测定和纯化[J]. *植物生理学通讯*, 1980, (4): 45—49.
[12] 张福锁. 环境胁迫与植物营养[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. 284.
[13] OAKS A. Efficiency of nitrogen utilization in C₃ and C₄ cereals[J]. *Plant Physiol*, 1994, 106: 407—414.

Light/Dark Modulation of Wheat Leaf Nitrate Reductase

YU Rang-cai¹, FAN Yan-ping², LI Ming-qi¹

(1. College of Biotechnology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China;
2. Dept. of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642 China)

Abstract: Nitrate reductase (NR, EC 1.6.6.1) activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves changed rapidly and reversibly during light/dark transitions. Darkness decreased and light increased the activity of nitrate reductase. NR extracted from leaves in dark showed more sensitive to inhibition by Mg^{2+} than that from lighted leaves. The NR from darkened leaves and lighted leaves showed marked different in the time-course of nitrate reduction. These results indicated that the darkness treatment could change the modulation characteristics of nitrate reductase.

Key words: nitrate reductase; light/dark modulation; wheat

【责任编辑 柴 焰】