

不同大豆品种硝酸还原酶活性的研究

许守民

(东北师范大学生物系)

摘 要

测定了9个大豆品种硝酸还原酶(NR)活性及叶片可溶性蛋白、种子蛋白含量。田间生长大豆的叶片在扩展最大时的NR活性最高,一天中NR活性呈明显的昼高夜低的变化,但夜间仍维持一定的活性。不同大豆品种间NR活性存在显著差异,其活性大小依次为野生大豆>半栽培>老品种>新品种的大豆。不同节位的叶片NR活性以单叶和第1—2节位的复叶为高,其次为5—6节位。在整个生育期内,苗期(V₂—V₄)NR活性最高,盛花期(R₂)出现一个峰而呈双峰曲线。在鼓粒期又有一个小峰。不同器官中以叶片的活性最高,其次为子叶、茎、根。V₂—V₄期的叶片NR活性与叶片可溶性蛋白和种子蛋白含量呈显著正相关。NR活性的早期测定可能为种质育种的筛选提供一简捷手段。

前 言

硝酸还原酶(NR)是植物氮代谢中的一个重要的酶,主要存在于作物的叶片组织中,在同化利用土壤中的硝酸盐的代谢中起关键作用。多年来许多学者在不同作物上进行了NR活性及有关方面的研究,认为NR活性可以作为作物品种选育和营养诊断的生理生化指标。

大豆是一种氮代谢强烈的作物,NR活性对大豆的氮代谢起着重要作用。Hatam(1976)报道,从土壤中吸收的N中,86%是以NO₃⁻的形式吸收的,而这些NO₃⁻最终要经过NR的还原才能被利用。

这说明大豆的NR活性的高低直接影响到土壤中无机N的利用率。国外已对大豆NR活性及有关问题进行了广泛研究,但国内这方面的报道极少,尤其利用活体测定法进行大豆NR研究还无人报道,对NR活性是否可以作为大豆育种的选择及N素营养的生理指标还有必要做系统而深入的探讨。

本文通过测定9个不同大豆品种的NR活性并追循其季节变化和不同器官的NR活性,找出其内在规律及品种间的差异,探讨与叶片可溶性蛋白含量和种子蛋白含量间的关系。

材 料 与 方 法

供试大豆品种为野生大豆、秣食豆、满仓金、大白眉、小金黄、早丰1号、铁丰18、吉林20、Amsoy,于1986年4月26日播种于东北师大校园实验田中,每个品种植于2.4×10米的试验方中,行距60cm,株距10cm,土壤肥力中下等,整个生长期灭虫两次。NR活性测定:于上午9时将大豆叶片连叶柄以水槽插入法携回室内,洗净叶片并吸去叶上水分。取5个以上叶片于相同部位切取同等面积的叶块并切成0.3mm的方块,充分混匀,取其中0.2—0.5克样品(根据活性大小)放入大试管中,加入9ml反应液(100mM KNO₃于0.1M的磷酸缓冲液中pH7.5),然后加入1ml 5%正丁醇或正丙醇,每个样品重复3

次。另取一份以9 ml磷酸缓冲液和1 ml 5%的正丁醇或正丙醇为空白对照。试管入真空干燥器中反复抽气3次，直至叶片不上浮。置于25℃暗中保温30分钟，取出后充分振荡3分钟。准确吸取反应液1 ml，加入0.5 ml磺胺（1% (W/V)于3N盐酸中），0.5 ml 萘基乙烯二胺（0.02% (W/V)于水中），摇匀后放置15分钟后于721型分光光度计*于540 nm波长下测定光密度，以空白对照为0，从标准曲线中找出相应NO₂含量，并折算成NR活性（ $\mu\text{MNO}_2^-/\text{g鲜重}\cdot\text{小时}$ ）。叶片可溶性蛋白的测定：叶片干粉过100目筛子，于60℃下干燥9小时，准确称取50 mg于试管中，稀碱溶液提取四次，定容，按李琳(1980)方法进行蛋白质含量测定。种子蛋白质含量按改良双缩脲法^[13]测定。

结 果 与 讨 论

大豆叶片不同生育期的NR活性及昼夜变化测定叶片不同发育时期NR活性和长成叶NR的昼夜变化（图1、图2）表明：在叶片发育早期，NR活性不断上升，在叶片达到最大面积后达到高峰并维持7—10天，然后迅速下降。

NR活性呈明显的昼夜变化，测定了V₃—V₄期的单叶，1—2节位复叶的NR活性昼夜变化表明（图2）：日间NR活性随日照的升高而升高，在上午9时以后达到高峰并维持到下午16时后才迅速下降。在夜间NR活性降低，但仍然维持在一定的水平。这说明虽

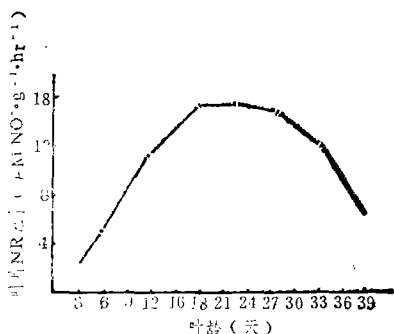


图1 大豆叶片不同发育时期NR活性的变化

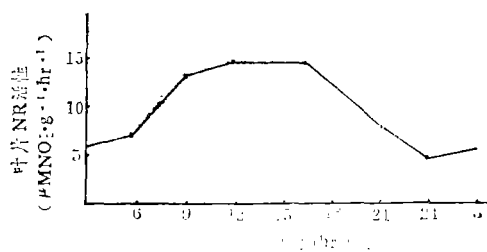


图2 大豆叶片NR活性的日变化

然光照是NR活性的必要条件，但光合产物对NR的夜间维持起了重要的作用，它可以经夜间的呼吸作用为硝酸盐的还原提供还原剂。另外，NR随叶龄的变化及昼夜变化的规律可以为测定其活性提供取材的时间参考。

NR活性的季节变化和节位差异：从图3、图4中可以看出NR的季节变化和节位变化，不同品种大豆的NR活性高峰均在播种后30—45天之间（V₂—V₄期），以后下降，而在盛花期（R₂）又出现第二个高峰，然后又下降。但在鼓粒期仍有相当的活性。这对土壤中硝酸盐的充分利用是很有意义的。大豆不同节位的叶片NR活性也有很大差异（图4）：单

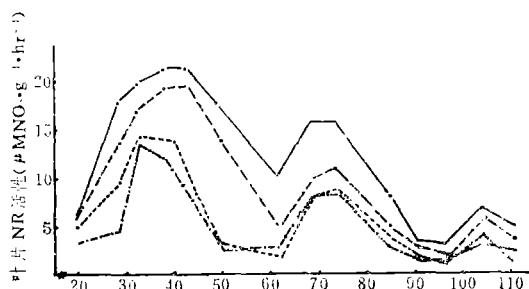


图3 不同大豆品种NR的季节活性变化

* 721分光光度计经751型分光光度计做系列标定。

叶，1—2节位复叶的活性最高。这也说明了大豆在苗期对土壤中硝酸盐的同化是很活跃的，对于大豆在早期的植株形态建成提供了所需的N源。另外，农业生产中“启动氮”的施用与苗期NR的活性高峰也可能解释“启动氮”对大豆的增产作用。

大豆不同器官的NR活性：分别测定了4个大豆品种在V₃—V₄期不同器官的NR活性（表1）证明，整株大豆中单叶的NR活性最高，占全株NR活性的77—89%，子叶次之

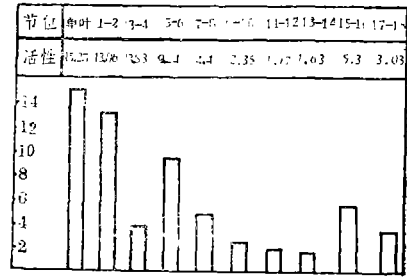


图4 大豆不同节位叶片NR活性的变化

表1 大豆不同品种不同器官的NR活性差异

品 种	活 性 单 位	$\mu\text{MNO}_2^-/\text{克鲜重} \cdot \text{小时}$	$\mu\text{MNO}_2^-/\text{分米}^2 \cdot \text{小时}$	$\mu\text{MNO}_2^-/\text{株}$	活 性 比 例 (%)
铁 丰 18	叶	3.30200	4.5180	1.20200	77.9680
	子 叶			0.12265	7.9560
	茎	0.23350		0.21760	14.0760
Amsoy	叶	2.46213	3.5615	0.62690	81.3740
	子 叶			0.09842	13.0300
	茎	0.08486		0.04270	5.5960
辽 宁 3 号	叶	2.67280	3.8100	0.72480	87.1260
	子 叶			0.05890	7.0800
	茎	0.05620		0.04820	5.7940
大 白 眉	叶	3.73200	4.9080	1.42470	89.8100
	子 叶			1.09900	6.2420
	茎	0.06440		0.06270	3.9523
铁 丰 18	根			0.00630	
Amsoy				0.00360	
辽 宁 3 号				0.00540	
大 白 眉				0.00210	

(6—13%)，茎所占的比例较小(4—14.08%)，根的活力最低。Beavers(1969)曾指出，大豆的硝酸还原几乎只发生在叶中。现在看来其它器官也同样有NR活性，品种间也存在差异，各器官NR活性占整株的比例也不同，这可能是由品种自身的硝酸盐同化的分配机制不同所致。另外由于茎占整株的比例很大，推测在以后的生长过程中茎还会对硝酸盐还原起更大的作用。

不同品种大豆NR活性的差异表现在野生大豆>40—50年代老品种(秣食豆)>50—60年代品种(小金黄、大白眉、早丰1号)>70年代以后新品种(铁丰18, 吉林20)和美国高产品种Amsoy。变异系数为13.5—52.01%，见表2。

不同节位的NR活性与叶片可溶性蛋白含量也呈正相关，但与V₅以前的单叶，1—2节位复叶及3—4节位复叶的关系更密切($r_1 = 0.8871^{**}$, $r_2 = 0.7188^*$, $r_3 = 0.7495^{**}$)。

表2 大豆不同节位NR活性与叶片可溶性蛋白、种子蛋白含量的关系

节位 Node 项目 品种	单叶		1—2		3—4		5—6		7—8		9—10	
	NR	SPr	NR	SPr	NR	SPr	NR	SPr	NR	SPr	NR	SPr
铁丰18	13.81	1.88	10.19	1.58	2.03	1.95	5.58	1.56	4.40	1.470	2.43	
吉林20	11.99	1.79	9.95	1.62	4.04	2.02	5.69	1.68	2.72	1.830	1.41	
Amsoy	13.69		10.01	1.99	2.62	1.75	12.21	1.78	3.43	1.390	1.09	
小金黄1	15.10	1.98	13.97	2.04	2.46	1.68	7.55	1.61	6.53	1.765	2.89	
大白眉	14.83	1.69	15.79	1.91	2.17	1.94	6.88		3.15	1.840	1.89	
早丰1号	12.27	1.575	13.53	1.75	2.80	1.96	8.96	1.84	5.82	1.760	2.57	
满仓金	16.69	1.96	20.82	1.995	3.56	2.08	9.45	1.90	4.37		2.69	
秣食豆	17.64		17.94	2.06	6.63	2.16	9.41	2.07	5.94		2.22	
野生豆	19.67	2.02	21.07	2.27	9.84	2.22	15.49		5.04	1.944	2.70	
C·V(%)	38.05		49.13		28.91		33.49		20.44			
r	**0.8871		0.7188		0.7495**		0.5621		0.1472			

节位 Node 项目 品种	11—12		13—14		15—16		17—18		季节总平均		种子蛋白 (%)
	NR	SPr	NR	SPr	NR	SPr	NR	SPr	季节 NR	V ₂ —V ₄ NR	
铁丰18	2.31		3.24	1.78	3.88	1.88	2.81		5.07	12.00	38.03
吉林20	1.78		2.02	1.84	2.38	1.70	1.24		4.32	10.97	38.21
Amsoy	0.92		1.61	1.74	2.67	1.58	2.63		5.09	11.85	38.65
小金黄1	2.01		1.49	1.54	2.75		1.89		5.66	14.54	40.28
大白眉	2.19		2.44		2.98		1.68		6.33	15.31	42.85
早丰1号	1.98		1.69	1.51	8.40	2.08	2.75		5.66	12.90	39.06
满仓金	2.77		3.02		5.47		3.01		7.43	18.76	41.97
秣食豆	2.43		2.67		6.08		3.05		7.40	17.79	41.81
野生豆	2.67		3.03	2.09	6.49	1.58	4.05		9.01	20.37	44.09
C·V(%)			13.50		46.61				16.37 37.4		
r			0.7319*		0.5508				0.9103** 0.9201**		

SPr—叶片可溶性蛋白含量(%) Leaf Soluble Protein content(%)

*, **—分别为5%和1%显著水平。

同时以不同大豆品种全生育期总NR活性的平均值及V₂—V₄期的单叶和1—2复叶的NR平均值与种子蛋白质含量进行的相关性分析表明：它们的相关系数分别为r=0.9103和r=0.9201，均为极显著(0.01)水平。这些结果说明了大豆NR参与硝酸盐代谢与种蛋白质含量具有内在的联系。

Takuji(1983)以碗豆做的实验表明：根吸收的NO₃⁻能迅速积累于叶中并在其中迅速合成蛋白质，做为蛋白质的暂时贮存形式，随后再分解输送到荚和子粒中。NR的活性对这种蛋白质的合成及最终子粒中蛋白质的积累起着重要作用。另有报道：NO₃⁻和N₂一样均能很好地用于子粒生产，尤其是开花以后NO₃⁻往子粒的转移率最高(77%)，盛

花期以后施 NO_3^- 氮对产量有重要作用。我们所测的NR活性与叶片可溶性蛋白和种子蛋白的相关结果也证明了上述论点。所以，NR活性的高低可以决定收获种子蛋白质含量的高低。NR活性还具有品种特性，如果将NR活性（尤其在苗期的单叶和1—2复叶）做为育种中优良种质的选择生理指标，会具有快速，准确，节约时间的优点，而且可以做到早期鉴定，值得进一步完善和应用。

（参考文献略）

THE STUDY ON NITRATE REDUCTASE ACTIVITY OF DIFFERENT SOYBEAN CULTIVARS

Xu Shoumin

(The Biology Department of Northeast Normal University)

ABSTRACT

The Nitrate Reductase (NR), leaf soluble protein and seed protein content of nine soybean cultivars (*Glycine max* (L.) Merr) have been measured. The leaf NR activity of field growth soybean is high in daytime and low in the night, but preserve a certain level during the night. There's a difference in NR activity between soybean cultivars. The Order of NR activity is wild soybean > semi-wild soybean > old soybean cultivars > new soybean cultivars. Among different soybean plant nodes, the simple and trifoliolate on 1-2 nodes are highest in NR activity, next is the leaf on 5-6 nodes. The NR activity appears two peaks during growth period: the highest one is on seedling (V_2 - V_4) and another on full blooming stage (R_2). A small peak was found on seedfilling stage. In different soybean organs, the leaf NR activity is highest and then the cotyledon, stem, and root. The leaf NR activity during V_2 - V_4 stages has a marked positive correlation with leaf soluble protein and seed protein content. The early measurement of NR may give us a simple and quick method in soybean breeding selection.