

硝酸还原酶与生化育种

——全国学术交流会论文摘要汇编

(1982—1986)

中国科学院上海植物生理研究所

1986.8.

前 言

氮素在植物营养中占有重要地位，在1960年我们就将其列入学科规划。之后进行了一系列的研究。随着工作的深入，必然触及氮同化的限速酶——硝酸还原酶。1964年硝酸还原酶的体外诱导就是一个较好的工作。十年内乱期间，该研究被迫中断，到1977年才重新开始。近十年来在过去工作的基础上，我们研究室展开了多方面的研究，在①植物激素和其它因子的作用方式、②酶的纯化和特性、③酶活力的调节、④ NO_3^- 的诱导机理、⑤酶的基因表达、⑥酶的应用研究等方面都有深入的工作，跟上了国际同行的步伐，有些方面是领先的。硝酸还原酶与生化育种的研究就是其中一项。

生化育种是美国 Hageman 教授 60 年代在“农学进展”上倡导的、以生化指标进行筛选的育种方法。1973 年他们首先提出把硝酸还原酶活力作为作物籽粒产量和蛋白质含量的指标，引起了各国学者的极大兴趣和广泛研究。但是至今尚无定论，在应用上的尝试也是不成功的。看来把产量这一复杂因素所决定的性状用单一的硝酸还原酶为指标是不够的，要与其他指标相结合。对此目前仍处于探索阶段。

与 Hageman 等的工作不同，我们把硝酸还原酶首先与作物耐肥性联系起来。这一工作是从 1981 年开始的。在对水稻品种酶活力的分析中发现二者呈负相关后，立即组织力量，扩大分析作物种类和品种数量，并成立全国协作组，开展和推动硝酸还原酶与生化育种的研究。五年来在大家的共同努力下，已在水稻、小麦、玉米、大麦、小黑麦、棉花、油菜、烟草、大豆以及林木中证实了硝酸还原酶与作物耐肥性负相关规律的普遍意义，应用上的尝试也取得了满意的结果，基本理论方面也有深入的研究。总之，本工作进展迅速，在理论和应用两个方面都取得很大成果，同国际水平相比是处于领先地位的。这是遗传、育种、生理、生化等多学科的通力合作，理论和实践的密切联系的社会主义大协作的结果。

最近，在第四次全国协作组会议上我们回顾总结了前段的工作，决定将协作组第一—四次学术交流会议论文摘要汇编成册，以便交流情况，推动硝酸还原酶与生化育种研究的进一步开展。

汤玉玮 林振武 陈敬祥

1986年8月

目 录

前言

综述

(17) 硝酸还原酶在农业上应用的研究动态.....汤玉玮等 (1)

(17) 硝酸还原酶活力与作物耐肥性的相关性及其在生化育种上应用
(81) 的探讨.....汤玉玮等 (6)

应用与应用基础

(12) 不同耐肥性的水稻、玉米、小麦硝酸还原酶活力.....林振武、李豪喆等 (12)

(12) 不同类型水稻幼苗硝酸还原酶的活力.....李豪喆等 (14)

(8) 硝酸还原酶活力与水稻耐肥性的分析.....陆定志、林振武等 (16)

(12) 北方梗稻演变过程中硝酸还原酶活力与品种性状之间的关系
.....李豪喆、林振武等 (18)

(12) 硝酸还原酶活力与早稻不同品种耐肥性的探讨.....詹重慈等 (19)

(12) 水稻硝酸还原酶活力与耐肥性相关性探讨.....林贻滋等 (20)

(12) 赤霉素对水稻硝酸还原酶活力的影响.....陆定志等 (21)

(12) 不同氮素用量对杂交水稻当优 3 号硝酸还原酶活性动态的影响.....郑相穆等 (22)

(12) 水稻生长发育过程中叶片硝酸还原酶活力变化.....李豪喆 (23)

(12) 籼稻品种硝酸还原酶活力与产量及其主要性能的关系.....蔡国海等 (23)

(12) “硝酸还原酶活力与作物耐肥性的负相关性”在麦类育种中应
用的初步研究.....陈敬祥、徐沛然等 (24)

(12) 小麦幼苗硝酸还原酶活力与品种耐肥性及硝态氮含量的关系.....黄明勤等 (26)

(12) 小麦各生育期硝酸还原酶的活性及其与作物耐肥性的关系.....郑相穆 (27)

(12) 小麦优良品种选育中硝酸还原酶活力与农艺性状相关性的初步研究
.....陈敬祥、邱卓英 (29)

(12) 小麦硝酸还原酶及亚硝酸还原酶活力变化动态的研究.....张世英等 (30)

(12) 不同类型冬麦品种硝酸还原酶活性测定简结.....中国农科院作物所生理室 (31)

(12) 不同氮素水平对非灌溉区小麦叶片中 NR 活性和蛋白质含量的影响
及其与籽粒产量的关系.....汪沛洪等 (33)

(12) 氮肥对小麦硝酸还原酶活力的影响.....唐银凤等 (34)

(12) 硝酸还原酶活性与小麦氮素代谢关系的研究初报.....幸亨泰等 (35)

(12) 小麦硝酸还原酶活力与全氮和叶绿素含量的关系.....詹重慈等 (36)

(12) 水分胁迫对植物体硝酸还原酶活性的影响.....杨素铀等 (36)

水分胁迫对不同小麦品种硝酸还原酶活性的影响	汪沛洪等 (37)
水分胁迫对不同类型小麦幼苗 NRA 的效应研究	幸亨泰等 (38)
水分胁迫时氮素对小麦叶片硝酸还原酶活性的影响	张殿忠等 (39)
小麦耐湿性与硝酸还原酶相关性的研究	周美兰 (40)
玉米幼苗硝酸还原酶活力与品种耐肥性的关系	黄明勤、陈敬祥等 (41)
硝酸还原酶在玉米高产品种选育中的作用	陈敬祥、姜承光 (42)
棉花硝酸还原酶活力与硝态氮含量的关系	李文才等 (43)
棉花不同品种的硝酸还原酶活力	李文才、林振武等 (44)
光肥因子对棉花硝酸还原酶活力的影响	方建平等 (45)
棉花子叶龄期对硝酸还原酶活力的影响	方建平 (47)
田间条件下不同棉花品种苗期硝酸还原酶的活力	杨国栋等 (48)
硝酸还原酶活力与棉株营养生长关系的研究	许德威等 (49)
大豆叶片的硝酸还原酶活力	李豪喆 (51)
油菜硝酸还原酶与硝态氮含量关系的初探	田廷亮等 (51)
不同品种芝麻、油菜幼苗中硝酸还原酶的活力	杨稳年、杨旺英 (53)
不同生长速率的杉木硝酸还原酶活力比较	周国璋等 (54)
混配复合肥料的施用对山楂硝酸还原酶活力的影响	詹重慈等 (55)
黄瓜的硝酸还原酶活力与培育壮苗的生理效应	詹重慈等 (56)
不同类型烟草幼苗硝酸还原酶活力	李豪喆等 (57)
大麦硝酸还原酶活力与品种耐肥性的负相关性及其诱导特点	孙惠珍、赵壇芳等 (57)
啤酒大麦幼苗硝酸还原酶活力与品种的千粒重、蛋白质含量相关性 的初步分析	陈敬祥、汪丽泉、金逸民等 (59)
谷子硝酸还原酶活力的初步分析	陈敬祥等 (59)
作物品种的硝酸还原酶活力与三磷酸腺苷 (ATP) 含量的关系	陈敬祥等 (60)
春化对油菜幼苗硝酸还原酶活性的调节	凌俊等 (61)
理论研究	
硝酸还原酶的活力与 ATP 的形成	林振武等 (63)
粳、梗稻对硝态氮的吸收和同化	林振武等 (65)
水稻硝酸还原酶的纯化和特性	林振武等 (67)
水稻黄化叶片硝酸还原酶活性的暗诱导	林建明等 (69)
硝酸还原酶专一 mRNA 体外翻译产物的分析	林振武等 (70)
水稻体内硝酸还原酶活力的调节方式	林振武等 (71)
水稻硝酸还原酶合成的调节	林振武等 (72)
分析技术研究	
植物组织中硝酸还原酶的提取、测定及纯化	陈薇等 (75)

硝酸还原酶活力的体外测定·····	林振武等 (76)
醋酸锌和甲硫吩嗪反应后处理改进 NR 活力测定·····	郑朝峰等 (78)
植物硝酸还原酶的体内测定法·····	郑相穆等 (79)
硝酸还原酶体内分析方法的探讨 I ·····	周 树等 (80)
硝酸还原酶体内分析方法的探讨 II ·····	郑相穆 (81)
关于林木硝酸还原酶活力体外测定的研究·····	周国璋、林振武等 (82)
植物组织中硝酸还原酶活力的测定方法·····	协作组测定技术座谈会 (83)

附录

“硝酸还原酶与作物耐肥性”学术交流座谈会纪要 (1982) ·····	(86)
“硝酸还原酶与作物耐肥性的相关性研究”第二次学术交流会议 纪要 (1983) ·····	(87)
第三次硝酸还原酶与生化育种会议纪要 (1984) ·····	(88)
“硝酸还原酶与生化育种”第四次全国学术交流会议纪要 (1986) ·····	(89)
作物品种 NRA 分析技术交流会简报 (1984) ·····	(90)
硝酸还原酶在林木良种早期鉴定中应用前景座谈会纪要 (1985) ·····	(91)
“全国硝酸还原酶与生化育种协作组”领导小组成员名单·····	(93)
“全国硝酸还原酶与生化育种协作组”成员名单·····	(93)

综 述

硝酸还原酶在农业上应用的研究动态

汤玉玮 林振武

中国科学院上海植物生理研究所

硝酸还原酶(NR)是植物体内代谢的一个重要的酶,它具有以下特点:(1)是植物中显著的诱导酶之一,该酶可以诱变得到突变体,为基因表达的研究提供了丰富的材料;(2)酶结构复杂,由亚基组成,含有不同组分酶,其活性易受各种内外因素的影响,是蛋白质分子基础研究的好对象;(3)是氮素代谢的关键酶,对其他代谢也有重要影响,在研究植物的代谢途径及调控中占有重要地位,特别是它与氮素代谢的密切关系,引起了农学家们的极大兴趣。

硝酸还原酶自五十年代初(1952年在红色链孢菌中,1953年在高等植物中,Evans, H 和 Nasson, A)被发现,至今已有三十年了。回顾 NR 研究的这三十年历史,大体经过了以下四个阶段:(1)五十年代发现、证实及诱导特性的初步研究;(2)六十年代的研究多集中于外界因素对酶活力的调节,如植物激素、光、温度、底物等;(3)自1975年 Solmonson 建立了酶的纯化方法以来,开始了酶的分子基础方面的研究,如酶的纯化和特性,酶的活化与纯化,酶的合成与降解等;(4)最近几年开始研究酶的基因表达,主要是研究酶的诱导机制,酶的突变体的筛选和基因产物分析等。硝酸还原酶的应用研究开始于1973年 Hageman 教授的工作,目前正广泛而深入地进行着。

由于硝酸还原酶具有以上特点,因此吸引了很多科学家的注意,已从生理、生化、遗传和农学等方面进行了不少工作,硝酸还原酶成了植物体内被充分研究的少数几个酶之一。现在每年都有大量这方面的文献报导,仅从《植物生理年评》的评论文章统计,1964年德国 Kessler, 1969年美国 Beevers 和 Hageman, 1975年英国 Hewitt, 1981年西班牙 Guerrero 等,17年间就先后发表了4篇, NR 研究的广泛程度和进展速度确实是令人瞩目的。

以下就硝酸还原酶在农业上应用的研究动态作一简介。

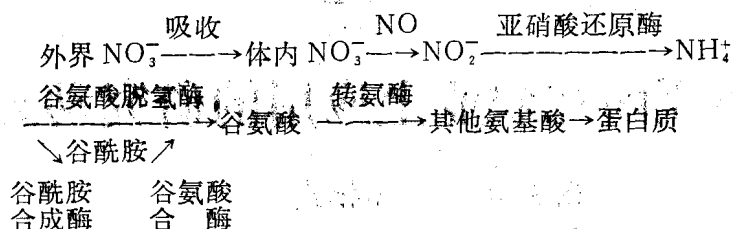
转录

翻译

一、根据 分子生物学的中心法则“复制 DNA $\xrightarrow{\quad}$ RNA $\xrightarrow{\quad}$ 蛋白质(酶) $\rightarrow$ 代谢 $\rightarrow$ 生长发育”告诉我们:酶是由遗传物质决定的,具有遗传特性,它通过催化体内的生化反应来决定体内代谢的方向和速度,影响生物的生长发育。因此,对植物体内一

些关键酶的研究完全可能在农业生产中发挥作用。当前开展的作物育种和营养诊断的生化指标研讨就是很好的例证。

NR 是植物体内氮素代谢的关键酶。众所周知,除固氮植物外,植物吸收利用的无机氮有 NH_4^+ 和 NO_3^- 两种形态(主要是后者), NO_3^- 进入体内的同化过程是:



NR 是这一过程的第一个酶,也是个限速酶,其活力高低关系到整个 NO_3^- 同化水平。NR 不仅在氮素代谢中具有关键地位,而且对其他代谢如光合、呼吸、碳代谢等都有重要影响。在农业生产中培育耐肥高产品种和增施氮肥是增产的主要措施,这些措施都是通过调节植物体内氮素代谢来影响整个代谢水平而得以实现增产目的的。因此 NR 的应用研究引起了农学工作者的极大注意和重视。

二、酶活力与氮含量、籽粒产量、蛋白质含量相关性的研究 从已有的报导看, NR 活力与体内可溶性 N、总 N 呈正相关,许多研究者从不同植物中证实了这一点。在此仅介绍最近发表的两项工作,一是指标间的关系,二是在育种中的应用。Klusak (1984) 以 12 个春大麦的地上部为材料,在田间种植情况下研究了培养生长期 NR 活力、 NO_3^- -N、 MH_4^+ -N、总 N、可溶性糖以及生理产量之间的关系,结果指出 NR 活力与 NO_3^- -N、总 N 呈正相关,与可溶性糖呈负相关。印度 Desai (1983) 报导,田间生长的 10 日龄小麦植株的 NR 活力,可作为具潜在 N 肥利用能力的品系的快速筛选指标。根据酶活力与小麦植株总谷粒蛋白质呈正相关和与谷粒碳水化合物呈负相关的关系, NR 活力又可作为品种营养含量的筛选指标。

NR 活力与作物产量和蛋白质含量相关性的研究,开始于 1973 年美国伊里诺斯大学农学院 Hageman 教授及其同事。他们在小麦、玉米上的试验结果指出,酶活力与作物籽粒产量和蛋白质含量呈正相关,由此指出了 NR 活力可作为育种中籽粒产量和蛋白质含量筛选的生化指标。这一新的设想立即引起人们的极大兴趣,美、英、苏和澳大利亚、印度、荷兰、南斯拉夫等国学者先后对玉米、大麦、小麦、高粱、棉花、牧草等多种农作物进行了研究,最近在林木(茶叶、椰子、胡椒、可可等)和蔬菜(苋、番茄、土豆等)方面也有一些报导。有的支持 Hageman 观点,有的不支持,有的甚至得出相反的结论。英国诺丁汉大学农学院 Whitting 及其同事的工作值得作以介绍。他们在剪股颖属上进行了不少工作,仅 1979 和 1982 年就有两篇博士论文通过答辩。他们试图研究剪股颖属不同种的分布与 NR 活力之间的关系,发现不同种间酶活力有很大的不同。来自地势高、瘠薄地区的 *A. tenuis* 表现高的 NR 活力,而来自地势低、肥沃地区的 *A. Stolonifera* 表现低的 NR 活力,但是从它们的生产力来看,却与酶活力的高低恰恰相反。为研究这一负相关的原因,他们以这两种剪股颖为材料进一步观察了整个生长期中不同

温度、底物供应和光照对其 NR 活力的影响。结果指出在生长前期和低 NO_3^- 水平下,不同种间 NR 活力差异表现以上趋势,但在高温、高 NO_3^- 水平下则相反。可见田间环境条件变化,如温度、密度、光照等,都可对不同种剪股颖的 NR 活力产生不同的影响。同时环境因子也会影响酶的同化产物是直接贮藏于蛋白质,还是用于生长。因此 NR 活力虽然总是与植株 N 正相关,但与生长却有时正相关,有时不相关,甚至负相关,要确定它与生产力的关系是极其困难的。这就是 1983 年他们得出的结论,显然他们从生态观点出发强调了外界环境因子的作用。

关于 NR 活力与作物籽粒产量和蛋白质形成的相关性问题的研究,我们认为 NR 活力在这方面具有重要作用是毫无疑问的。但产量是由许多因素综合作用的结果,只用一个酶活力作为指标过于简单,应与其他因素结合起来考虑才对。这是这一研究没有得出一致结论的根本原因,因此对 Hageman 的观点需要加以补充。近几年来有人正试图在这方面加以研究,如澳大利亚 Dalling (1975) 就考虑到营养体 N 向谷粒 N 的转移效率问题,如不考虑这一因素,则 NR 活力与谷粒 N 并无相关性。他把所分析的小麦品种按其转移效率分为大于和小于 30% 这两类后,在每一类品种中 NR 活力与谷粒 N 表现了很好的正相关。印度 Nadu (1982) 又把 NR 活力与蛋白质酶活力结合起来分析,指出莧叶的蛋白酶与籽粒蛋白质水平显著正相关,与籽粒产量无明显相关,而叶片 NR 总活力与籽粒产量正相关。

三、酶活力与作物耐肥性的相关性研究 我们从 NR 在氮素代谢中的地位联想到它可能与作物耐肥性有密切关系,几年来的试验结果表明, NR 活力与作物耐肥性呈负相关,即耐肥性强的品种 NR 活力低,耐肥性弱的品种 NR 活力高。这一研究最初是从 1981 年对籼、粳稻 NR 活力对比开始的,所测的 12 个籼稻品种酶活力明显比 15 个粳稻品种高(约高 2—5 倍),而粳稻比籼稻耐肥。对 8 个粳稻和 3 个籼稻品种 NR 活力的分析,进一步肯定了它与耐肥性的负相关关系,以上结果 1982 年在玉米、小麦中也得到了证实。我们的工作得到了兄弟单位的热情支持,1982 年底召开了第一次有关学术交流会并成立了协作组,至去年第二次学术交流会止,已先后在上百个小麦品种, 80 个水稻品种, 50 个玉米杂交种, 12 个棉花品种, 5 个小黑麦品种中得到证实,看来这是一个普遍规律。从今年第三次学术交流会的材料看,除继续对以上几种作物进行分析外,又增加了油菜、烟草、芝麻等作物以及林木。该项研究已开始应用于作物育种,如对水稻品系、小麦品系的耐肥性预测以及小麦、玉米区试品种的耐肥性比较等。

为了阐明 NR 活力与作物耐肥性相关的内在代谢基础,我们以籼、粳稻为材料,研究了酶活力与 NO_3^- 同化的关系。结果表明,籼稻中 NR 活力高, NO_3^- 的吸收,催化 NO_3^- 还原为 NH_4^+ 的亚硝酸还原酶活力,以及同化氨为氨基酸的 GDH、GS/GOGAT 两条途径的有关酶活力都高;而粳稻中 NR 活力低,它的 NO_3^- 吸收和以上 NO_3^- 同化过程中有关酶活力都低,也就是说,耐肥性弱的籼稻对外界 NO_3^- 的吸收同化能力比耐肥性强的粳稻高,即耐肥性弱的品种对氮肥反应更敏感,适宜于低肥水平下种植。另外, NR 活力对其他代谢的影响在不同作物品种中也反映了出来,我们的试验结果表明, NR 活力能促进 ATP 的形成。既然不同作物品种中 NR 活力不同,那么它的 ATP 水

平是否也有差异？从对小麦、玉米和水稻的品种分析中发现其 ATP 水平与酶活力呈正的相关趋势。因此耐肥性弱的品种 NR 活力高， NO_3^- 同化能力强，能量代谢水平高，这与它们在田间表现生长快，对肥料反应敏感，易引起 C—N 失调等特点是相吻合的。耐肥性强的品种则正好相反。

作物的生化育种是美国 Hageman 教授等，1967 年在《农学进展》杂志上提出的。他们把生化育种分为两类：一是直接测定体内某些生化分子的含量，二是分析体内控制代谢的关键酶。生化育种主要是指后者。从近几年的研究实践看，要开展这方面的工作，首先要确定与作物性状相关的生化指标。这是一个相当困难的工作，指标找不准，应用中必然会出问题。在分子生物学飞速发展的今天，这一问题经过努力是可以解决的。生化育种是作物育种中方向性的变革，它可以大大丰富育种内容，提高育种效率，缩短育种年限，减轻育种工作量，这对改变目前传统的经验型育种有重大意义，也是实现育种工作现代化、科学化的重要方面。

四、酶活力作为营养诊断指标的探讨 农业上施肥指标的研究与育种指标一样，也开始由外部形态的直观判断到寻找一生理指标，如叶绿素含量， NO_3^- 态 N 含量等。近几年有不少学者提出以代谢中的关键酶作为生化指标的方法并开始了初步研究。在氮肥施用，国内外的生产实践中都存在以下问题：一方面随 N 用量增加，产量上升；另一方面因施 N 过多和方法不当而出现肥害，导致产量下降、土壤破坏、环境污染，因此科学施肥的问题急待解决。近几年来关于以土壤和植物中 NO_3^- 含量为诊断指标的工作都有一些报导。我们在棉花上三年试验的结果都证明叶片 NR 活力与叶柄 NO_3^- —N 含量呈互相关，而且酶活力对外界环境条件的反应，比 NO_3^- 含量更敏感。江苏农科院现代化所在小麦上也得到类似结果。Chatterjee 等（1981）指出大麦的 NR 活力与 NO_3^- 浓度在叶片和叶鞘中都呈正相关，Jung（1980）研究了不同条件下的大麦、向日葵叶片，Mishra 等（1983）研究了在不同 N 肥形态下的玉米幼苗以及 Oosterhuis（1983）在研究田间生长的棉花中，Biswas（1980）在大麦和小麦的 N 素管理研究中，都认为 NR 活力是植株 N 水平的标志。Lee 等（1978）还报导过非固氮植物的生长速度和 NR 活力正相关。由此我们认为 NR 活力提供了比 NO_3^- -N 浓度更方便、更敏感、更可靠的植株 N 状况的标志。这是因为：（1）NR 活力代表了氮素同化水平，而 NO_3^- -N 仅表示累积水平；（2）NR 活力对外界条件反应敏感；（3）NR 对其他代谢有重要影响。Johnson 在麦类作物中，对 NO_3^- 含量和 NR 活力比较后也持这种观点。

五、园艺林木方面硝酸还原酶的研究情况 这方面研究是最近几年才开始的。1980 年锡兰的 Wichermasinghe 等对茶叶 10 个无性系枝条顶芽 NR 活力分析结果指出，除 1 个中产品系酶活力过高外，其它 9 个品系的 NR 活力与茶叶产量相关。他们认为这可作为快速淘汰低产无性系的方法。印度 Shivashankar 和 Ramadson（1983）指出，椰子叶片的 NR 活力从最幼的第 1 叶到 16 叶是增加的，16 叶以后下降。他们选用第 14 叶为材料，发现可诱导的酶活力与年产量正相关（ $r=0.685$ ）。此外 Achhiedely 等（1983）在胡椒上，Valpuesta 等（1982）在齐墩果上，Balasirinha（1982）在可可上都对 NR 进行了一些研究。

在蔬菜方面,印度 Kapoor (1982) 发现,土豆不同品种间 NR 活力存在显著差异,叶片 NR 水平不仅与叶片无机 N、蛋白质、游离氨基酸呈显著正相关,而且与块茎中蛋白质 N 含量也是平行的。Gosselin (1984) 观察了 5 个温度 (12, 18, 24, 30, 36°C), 5 个氮素水平 (0.25, 7.5, 22.5, 67.5) 对番茄的 NR 活力, N 含量和生长发育的影响,结果提出高温高氮下发育不全的花和枝叶 N 含量增加,但番茄产量减少,高温下根的 NR 活力下降。另外,对苋菜、菜豆、豌豆、蚕豆等都有些研究报导。

在林木方面,中国林科院亚热带林业研究所最近发现, NR 活力与速生林生产速度呈正相关;这对加速林木育种有重要意义。

六、环境因子对酶活力的影响 许多环境因子,如底物水平、光、植物激素、PH 值、温度等等,对 NR 活力都有影响。过去这方面已有不少研究,近几年陆续还有一些报导。在这里仅介绍与我们工作有关的几篇文献。

(1) 水分胁迫下 NR 活力的变化,这是逆境生理中的一个问题。印度 Sharma 和 Garg (1984) 指出,正常情况下小麦旗叶 NR 活力低于第 2 叶,水分胁迫时高于第 2 叶,胁迫解除后酶活力又恢复到正常情况。Chandra 等 (1983) 对比了 C_3 植物 (豌豆) 和 C_4 植物 (高粱) 在水分胁迫下的表现,观察到高粱的 NR 活力减弱比豌豆更明显。台湾有两名学者在研究大豆根瘤的 NR 活力时看到,大豆细胞的酶活力在水分胁迫时受到抑制,而细菌中酶活力在水分轻度亏缺时增加,亏缺严重时才下降。Balasinha (1982) 报导,当干旱时,在田间种植的可可植株中水分含量、叶绿素含量和 NR 活力都降低,脯氨酸含量增加,而在灌溉条件下则不发生以上变化。以上结果都仅仅是对水分胁迫下植物组织 NR 活力的一般描述。

(2) 与体内分析法有关的问题。NR 活力易受外界环境条件的影响,这是植物组织 NR 活力体内分析的最大困难,特别是田间栽培的植物更是如此。Lillo (1983) 用不同方法分析了大麦叶片酶活力的日变化,观察到早晨低,从第 1 小时光照后迅速增加,天黑后迅速下降的规律。下降时用体外法与体内法测定结果是有差异的,另外还看到体外法与无氧体内法测定的酶活力差别不大,而与有氧体内法差别很大。进一步对体内法在有氧和无氧条件下测定的 NR 活力作以比较,表明无氧条件下要高 2—25 倍,在酶活力低的情况下差别较大。Chopra (1983) 对体内分析的最适温度的研究结果指出,最适温度因作物和不同生长季节而异,大豆、豇豆、向日葵和高粱为 40°C;玉米为 45°C, bajra 为 50°C,高于最适温度则酶活力下降。对同一种作物来讲,最适温度因其生长季节不同而不同,如绿豆作秋季作物时为 50°C,作雨季作物时降为 30°C。以上研究对我们运用体内法分析 NR 活力有一定参考价值。

七、与固氮酶活力的关系 植物中氮素的还原有两条途径:一是固氮酶把大气中 N_2 还原为 NH_4^+ ,二是 NR 把 NO_3^- 还原为 NO_2^- ,再由亚硝酸还原酶为 NH_4^+ 。固氮酶和 NR 的结构都很复杂,它们都是人们研究的重点。在固氮植物中,这两种酶同时存在,相互消长,是研究二者调节机理的好系统。近几年来这方面的研究刚开始,但已引起人们的注意;NR 研究在农业生产中使产量增加的第一个成功例子就是来自这方面的研究。巴西 Neyra (1977) 根据菜豆叶片 NR 活力在开花后最高,而此时根瘤固 N 酶

活力迅速下降的规律,于开花期施氮 40 公斤/顷,显著提高了叶片 NR 活力,使产量几乎加倍。Hanter (1983) 的试验结果指出, NR 活力在大豆根中与 NO_3^- 供应有关,而在根瘤中却不随 NO_3^- 施用而增加,表明根瘤不是 NO_3^- 还原的场所。

从 NR 在植物体内 NO_3^- 同化中的地位和氮肥在农业生产中的作用来看,把硝酸还原酶的研究应用到生产实际中去的方向是正确的,目前已在育种和栽培方面有了一些研究,也取得了一定结果,随着工作的深入,它终将对农业生产起某种指导作用。综括当前 NR 的研究可以看出以下几点趋势:

(1) 研究范围在扩大,已从农作物扩大到果、林、蔬菜,从蔬菜的生长特点及其被利用部位看, NR 的应用研究很有前途。

(2) 酶活力作为植物育种和营养诊断的生化指标的研究正处在不断积累资料和积极进行应用的阶段。酶活力与作物耐肥性的研究从基本理论到实践应用都出现了可喜的苗头。

(3) 从 N 素代谢调节看, NR 与固氮酶的关系是研究氮还原的重要课题,值得深入下去。

(4) NR 的基因及其活性调节正在以突变体为材料进行研究,这一研究最终可使我们通过遗传工程技术改变 NR 活力从而调节植物的代谢。

《农业科技动态》1985, 141, 1—5

硝酸还原酶活力与作物耐肥性的相关性及其在生化育种上应用的探讨

汤玉玮 林振武 陈敬祥

中国科学院上海植物生理研究所

1962 年制定学科规划时,我们提取进行氮素代谢的研究。由于工作的深入就必然联系到氮素代谢的关键酶——硝酸还原酶。1964 年我们在非细胞系统用 NO_3^- 可诱导生成硝酸还原酶。这在当时国际上是领先的。这一工作中断十几年后,于 1977 年我们又继续硝酸还原酶方面的研究。开始是从植物激素主要是细胞分裂素对硝酸还原酶作用机理入手的,以后开展了多方面的研究,可简单归纳如下:一、硝酸还原酶的合成,我们的结果说明酶的合成分两步,先形成酶前体,这不需要 NO_3^- 的存在,然后是 NO_3^- 依赖的酶蛋白的活化。二、硝酸还原酶的提取、纯化和特性方面的研究。三、硝酸还原酶钝化蛋白的研究。从植物组织分离得到两个钝化蛋白,一个分子量较少,具水解酶活力,另一个分子量较大,能与酶竞争还原辅酶 I。四、硝酸还原酶的研究在农业上的应

用,主要是生化育种和施肥指标方面的探讨。

以下主要介绍硝酸还原酶活力与作物耐肥性的相关性以及在生化育种方面的应用研究成果。

硝酸还原酶活力与作物耐肥性的相关性

硝酸还原酶是 NO_3 同化步骤的第一个酶,也是整个同化过程,有时还是蛋白质合成的限速酶,在植物氮素代谢中处关键的地位。同时它对其他代谢,如光合作用、碳素代谢和能量代谢中都有重要影响。从硝酸还原酶在植物氮素代谢中的关键地位使我们联想到它可能与作物耐肥性有密切的关系。现在的工作已充分证明二者呈负相关。这一规律的发现是从对籼粳稻硝酸还原酶活力的对比开始的。一般讲粳稻比籼稻耐肥,我们分析的 12 个籼稻品种(广陆矮 5 号、原丰早、竹选 13 号、竹菲 10 号、竹菲 18 号、二九青、早 II—26、莲塘早、芜湖七一早、464、青秆黄、竹广等)的硝酸还原酶活力是 1.174—1.752(酶活力单位是 $\mu\text{moles NO}_2^-/30\text{分/克鲜重}$,下同),而 15 个粳稻品种(联鉴 55 号、联鉴 58 号、6366、沪选 19、79—66、矮粳、农虎 6 号、东光、北斗、吉粳 60、7946、双丰 8 号、滨旭、秋光、京引 127 等)的酶活力为 0.354—0.826,二者相差 2—5 倍,这初步表明了耐肥性强的品种硝酸还原酶活力低,耐肥性弱的品种硝酸还原酶活力高。

进一步对籼、粳稻以及现在生产上推广的籼粳交水稻内部品种间硝酸还原酶活力的分析也说明了它与作物耐肥性的负相关关系(表 1)。从北方粳稻三十年代到八十年代

表 1 籼粳稻品种 NR 活力与耐肥性的关系

品 种 来 源	耐 肥 性					
	强		中		弱	
	品种	NR 活力	品种	NR 活力	品种	NR 活力
吉林省延边地区农科所(粳稻)	京引127	0.102	双丰8号	0.669	北 斗	0.755
	秋 光	0.437	7946	0.674	东光2号	0.791
	滨 旭	0.526	吉粳60	0.708		
浙江省农科院(籼粳交稻)	矮粳23	0.61	矮皮糯	0.69	科京226	0.78
上海市农科院(籼稻)	广陆矮4号	1.112	原丰早	1.322	二 九 青	1.499

NR 活力单位: $\mu\text{moles NO}_2^-/30\text{分/克鲜重}$ (下同)。

的半个世纪品种演变的历史看,品种的耐肥性不断增强,而硝酸还原酶活力则呈现由高向低的变化趋势。对江浙一带粳稻的地方品种硝酸还原酶活力的分析结果也可看出,来源于低洼肥沃地区的青稻类明显低于来源于高燥瘠薄地区的白稻类。

至今我们已分析了约 80 个水稻品种,100 多个小麦品种、50 多个玉米杂交种、4

个小黑麦品种和 12 个棉花品种，结果都表明硝酸还原酶活力与作物耐肥性呈负相关。最近华中师范学院在油菜上、中国林业科学院亚林所在杉木上、延边地区农科所在烟草上也有类似研究结果。看来这是高等植物中的一个普遍规律。

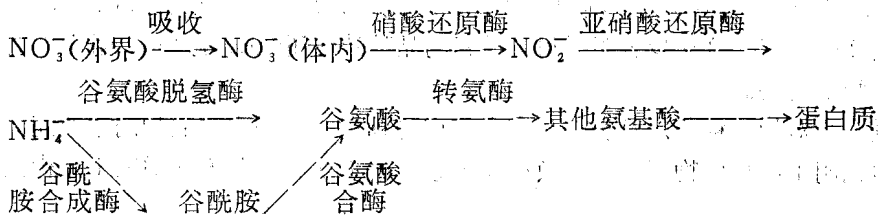
硝酸还原酶活力与作物耐肥性相关的生理生化基础

一、硝酸还原酶活力是品种的遗传特性

硝酸还原酶受植物体内许多因素的调节。我们的试验结果表明，作物幼苗的硝酸还原酶活力因苗龄不同而不同，在水培情况下稻、麦、玉米的酶活力都是 5 天龄最高，3 天、7 天次之，苗龄过大则因衰老而下降。硝酸还原酶活力还随底物 KNO_3 诱导浓度的增加和诱导时间的延长而增强，但在以上不同情况下品种间的差异趋势却是不变的，即耐肥性弱的品种硝酸还原酶活力总是比耐肥性强的品种高。这就证明了作物品种间酶活力的差异是其遗传特性的反映。

二、硝酸还原酶活力与 NO_3^- 的吸收同化

作物对外界 NO_3^- 的吸收同化途径是：



为了研究不同耐肥性品种对 NO_3^- 吸收同化的能力，我们选用水稻中的原丰早(籼)和京引 127(粳)，小麦中的华麦 4 号和扬麦 1 号为材料（原丰早的耐肥性弱于京引 127，华麦 4 号的耐肥性弱于扬麦 1 号），对它们的 NO_3^- 吸收和 NO_3^- 同化为谷氨酸的 5 个酶活力进行了分析。结果表明：（1）耐肥性弱的稻麦品种对外界 NO_3^- 的吸收速度和吸收量都高于耐肥性强的品种；（2）耐肥性弱的品种催化 NO_3^- 还原为 NH_4^+ 的硝酸还原酶和亚硝酸还原酶活力都高于耐肥性强的品种；（3）在 NH_4^+ 进一步同化为氨基酸的两条途径中，耐肥性弱的品种所有酶活都高于耐肥性强的品种。这说明了耐肥性弱的品种 NO_3^- 的吸收同化能力强、速度快，因而它表现对氮肥反应敏感，生长也较快。还应指出在这些步骤中硝酸还原酶活力不仅与其他酶活力表现一致，而且是其中最敏感的一步，也就是说它是限速酶。以上问题的研究触及到了耐肥性的本质，阐明了硝酸还原酶活力与作物耐肥性相关的内在联系。

三、硝酸还原酶活力与 ATP 含量

硝酸还原酶不仅在植物体内氮素代谢中起着关键作用，对其他代谢途径也有重要影响。在小麦、水稻、玉米中我们发现硝酸还原酶活力能提高体内 ATP 水平。在水稻上的试验结果指出，随着底物 KNO_3 的诱导浓度增加和诱导时间延长，硝酸还原酶活力不断增高，同时体内 ATP 含量也随之增高。那么 ATP 的这种变化是否由硝酸还原酶活力的变化引起的呢？用不同诱导物进行的试验结果表明：（1）50 mM KCl 不能诱

导硝酸还原酶, 它对 ATP 含量也无明显影响。而 50 mM NaNO_3 对酶活力和 ATP 的影响与 50 mM KNO_3 是相同的。这指出 ATP 的增加与 K^+ 无关, 而是由于 NO_3^- 的存在。(2) 钨能与钼竞争参与酶蛋白中而使酶蛋白不表现酶活力。在 KNO_3 和钨酸钠 (Na_2WO_4) 存在下, KNO_3 对体内 ATP 含量无明显影响。这进一步说明了 KNO_3 促进 ATP 的增加是通过硝酸还原酶活力, 而不是 NO_3^- 的直接作用结果。

由此可见, 硝酸还原酶对 ATP 水平有促进作用。二者的这种关系在不同品种中也表现出来。从水稻、小麦、玉米的初步分析结果可以看出硝酸还原酶活力高的品种 ATP 含量也高, 而硝酸还原酶活力低的品种 ATP 含量亦低。也就是说不耐肥的品种硝酸还原酶活力高, 体内 ATP 含量也高, 而耐肥的品种硝酸还原酶活力低, 体内 ATP 含量也低。

四、硝酸还原酶活力的调节

为了深入了解植物体内的硝酸还原酶活力的调节方式, 以阐明作物品种间硝酸还原酶活力差异原因, 为人类有目的地改造植物提供根据, 我们选用酶活力差异较大的籼稻(原丰早)和粳稻(京引 127), 对这一问题进行了研究。

植物体内硝酸还原酶活力水平可能通过以下机制进行调节: (1) 底物供应, 主要是 NO_3^- 的吸收和输送; (2) 酶的性质; (3) 酶的合成与降解; (4) 酶蛋白合成后的活化和钝化。

(一) 底物供应: 在根部吸收, 叶片漂浮和真空渗入等不同诱导方式下, 籼粳稻的硝酸还原酶活力变化表明虽然同一品种在不同诱导方式下酶活力的增长略有差异, 但籼粳稻之间的差异是不受影响的。由于在离体叶片漂浮, 特别是真空渗入诱导下排除了根部对 NO_3^- 吸收和输送能力差异的影响, 这说明了籼粳稻体内硝酸还原酶活力的差异不是由于根部吸收能力差异造成的。

(二) 硝酸还原酶的性质: 用 Blue Dextran-Sepharose 4B 亲和层析的方法对籼粳稻硝酸还原酶进行了纯化, 纯化倍数为 850 倍。纯化后的酶蛋白是电泳纯, 在 Sephadex G200 柱层析中是一个峰。对籼粳稻硝酸还原酶性质的对比结果指出: (1) 全酶分子量和亚基分子量相同, 分别为 330 Kd 和 57 Kd, 酶蛋白由 6 个相同亚基组成。(2) 酶活的 pH 范围是 6.5—8.5, 最适为 7.5。(3) 酶对底物 NO_3^- 和 NADH 的 K_m 值相同, 分别是 3.3×10^{-4} M 和 2.9×10^{-5} M。(4) 酶蛋白的免疫学反应相同。(5) 酶的体外稳定性相同。从以上 5 个方面的分析结果可以看出, 籼粳稻的硝酸还原酶的性质无差异, 它们的酶蛋白是相同的。

(三) 硝酸还原酶的纯化: 硝酸还原酶是一个极不稳定的酶, 受许多内外因素的调节。近几年来关于体内的活化—钝化系统调节有不少研究。我们对籼粳稻部分纯化(酶的粗提液经 0—40% 饱和硫酸铵沉淀部分)和纯化的酶活力体外衰减速率的对比结果指出, 在部分纯化的酶液中籼稻的酶活力衰减速率比粳稻慢, 而钝化的酶中二者无差异, 这表明在部分纯化的酶液中, 籼粳稻内酶活力的钝化调节有差异, 结果使籼稻的酶活力比粳稻衰减得慢。但是这种差异很小(约 20%), 在开始 1 小时内几乎没有差异, 然而它们的酶活力差异在 0.5 小时内测定相差则可达 3 倍之多(表 1)。可见二者酶活力

的差异的主要原因不在此。

(四) 硝酸还原酶的诱导合成: 为分析硝酸还原酶在诱导条件下的合成速度, 我们在叶片诱导的同时, 喂给 ^3H -氨基酸, 10 小时后对叶片中的酶蛋白进行纯化, 测定掺入到蛋白质中去的 ^3H -氨基酸的量, 以此表示硝酸还原酶的合成量。结果指出, 具高酶活力的籼稻的硝酸还原酶合成比低酶活力的粳稻高 40—50%。虽然用这种纯化方法酶的回收率为 20%, 这一结果尚不能精确表示籼粳稻硝酸还原酶合成的差异, 但由此可以推断籼稻在诱导条件下酶的合成要比粳稻高得多。

综上所述, 籼粳稻硝酸还原酶活力差异与酶性质无关, 不受根部吸收差异的影响, 主要受体内酶的纯化系统和酶蛋白的诱导合成、特别是后者的调节。造成酶蛋白合成差异的原因可能是酶的翻译或它的 mRNA 转录速度不同造成的, 也可能是由于它们的遗传信息量就有差异。深入的研究正在进行中。

硝酸还原酶活力与作物耐肥性相关性在育种中的应用

根据硝酸还原酶活力与作物耐肥性的相关性, 我们提出硝酸还原酶活力可作为作物耐肥性的生化指标应用到作物育种中去。近三年来我们与农业科研单位对这方面的应用进行了探讨, 结果是令人鼓舞的。

鲁麦 3 号是山东省聊城地区新育成的中肥小麦品种, 它的硝酸还原酶活力为 0.211, 低于泰山 1 号, 所以比泰山 1 号耐肥。这与他们连续 3 年的田间试验结果完全相符, 其耐肥性高产性均优于泰山 1 号, 现已准备推广这个品种以取代泰山 1 号。对杭州市农科

表 2 北方冬麦区区试品种不同肥组的 NR 活力分析

黄 淮 冬 麦 区				北 部 冬 麦 区		
	品 种	NR 活力	耐 肥 性	品 种	NR 活力	耐 肥 性
高 肥 组	徐州 2926	0.070	强于对照	津农 7537	0.012	强于对照
	宝丰	0.095	强于对照	太原 110	0.047	强于对照
	7536/3×27	0.110	强于对照	农大 139 (对照)	0.053	
	郑引 1 号(对照)	0.475				
中 肥 组	79-5112	0.178	强于对照	丰抗 13	0.086	强于对照
	石 74531	0.310	强于对照	东方红 3 号(对照)	0.134	
	泰山 1 号(对照)	0.338				
旱 地 组	平阳 7538 30	0.170	弱于对照	庆丰 1 号	0.039	弱于对照
	渭麦 4 号	0.150	弱于对照	农大 6086	0.198	弱于对照
	北京 10 号(对照)	0.088		晋麦 5 号(对照)	0.020	

所选育的钱江 1 号小麦新品种的硝酸还原酶活力分析结果是比对照的浙麦 1 号低 (钱江 1 号为 0.318, 浙麦 1 号为 0.761), 田间试验结果和示范结果也证明钱江 1 号耐肥性

强于浙麦1号。有趣的是这两个品种株高皆属中秆,在这种情况下酶活力与耐肥性相关在育种中就更有价值。

我们还对杭州市农科所鉴定圃中的4个水稻品系进行了测定,其中糯选9,81鉴09和81鉴17等3个品系的酶活力为0.71-0.36,比较接近,而81鉴73的酶活力为0.85,明显高于以上3个品系。根据酶活力可以预测81鉴73的耐肥性较前3者弱得多,这与田间观察的情况十分吻合。可见硝酸还原酶活力的分析用于新品系耐肥性预测是可行的。

我们还配合北方冬麦区区域试验,对有关参试品种的硝酸还原酶活力进行了分析,结果如表2。从高肥组和中肥组看,入选的品种酶活力都低于对照种,它们的耐肥性丰产性都强于对照种,从旱地组看,参试品种的硝酸还原酶活力都高于对照,其耐肥性也差于对照,说明目前旱地并不需要耐肥的品种。

结 语

三年来的研究工作证明了硝酸还原酶活力可以作为作物耐肥性的生化指标应用到育种中去,这是生化育种领域的一个新倡议。关于生化育种,美国 Hageman 教授在1967年《农学进展》上有过叙述,可分为两类:一是直接分析体内生化分子含量如脂类、氨基酸和蛋白质等;二是以控制体内代谢的关键酶为某些特性的指标。1973年他们又根据在小麦、玉米上的试验结果提出把硝酸还原酶活力作为籽粒产量和蛋白质含量的生化指标,引起了美、英、苏、澳大利亚、印度、荷兰、意大利等许多国家研究者的极大兴趣和广泛研究,接着在玉米、小麦、水稻、高粱、大麦、棉花、马铃薯、茶叶等作物上都有报导,结果是有人支持,有人反对,至今尚无定论。我们认为把硝酸还原酶活力与产量联系起来太简单化了,因为产量是由许多因素综合作用的结果,而硝酸还原酶只是其中一环。把硝酸还原酶活力与作物耐肥性联系起来较为直接,二者的相关性密切,应用到育种中去也是可行的。

生化育种是作物育种技术中带有方向性的变革,这对于改变目前育种中的经验性有着重要意义。如果我们通过研究能把作物其他性状如抗病虫、抗旱、抵寒冷、丰产、优质等的生化指标逐步找出来,使选择指标数量化、精确化、简单化,就可大大提高育种科学水平和工作效率,为农业现代化作出新贡献。

《中国农业科学》1985. (6): 39-45.

应用和应用基础研究

不同耐肥性的水稻、玉米、小麦硝酸 还原酶活力

林振武 陈敬祥 汤玉玮

中国科学院上海植物生理研究所

李豪喆

吉林省延边地区农科所

本文在以前工作的基础上,对来自不同地区的 27 个籼、粳稻品种, 26 个小麦品种和 5 个玉米杂交种作了进一步分析,对耐肥性不同的品种间 NR 活力差异原因进行了初步探讨,并讨论了 NR 在农业生产中的应用问题。

一、水稻、小麦、玉米幼苗 NR 活力与品种耐肥性的相关性

一般是粳稻比籼稻耐肥。我们以前测定的 12 个籼稻品种的 NR 活力是 15 个粳稻品种的 2—5 倍多。这表明耐肥性强的品种 NR 活力低,而耐肥性弱的品种 NR 活力高。进一步对籼、粳稻内部品种间幼苗 NR 活力的分析,更说明了 NR 活力与作物耐肥性的负相关关系。

表 1 中上方的 18 个小麦品种,耐肥性强的 6 个品种 NR 活力是 $0.266-0.307 \mu\text{MNO}_2^-/30\text{分/克鲜重}$,耐肥性中等的 5 个品种是 $0.348-0.537 \mu\text{MNO}_2^-/30\text{分/克鲜重}$,耐肥性弱的 7 个品种是 $0.590-0.708 \mu\text{MNO}_2^-/30\text{分/克鲜重}$ 。表 2 中下方的 8 个小麦品种,它们的 NR 活力与耐肥性也呈负相关。值得指出的是:(1) 502 是昌潍地区农科所中肥组的高产品系,其 NR 活力已可划为高肥组,这与他们近年来的田间肥料试验结果相吻合;(2) 来自昌潍、烟台的“济南 13”、“烟农 15”的种子中,同一品种的幼苗其 NR 活力是相同的。

表 2 中下方的 2 个玉米杂交种 A_4 比 A_7 耐肥,而 A_4 的 NR 活力也低于 A_7 。表 2 中上方的 3 个玉米杂交种,其耐肥性的划分是根据我国东南协作区玉米杂交种田间统一试验的结果,它们的 NR 活力高低正好与其耐性强弱呈负相关。

二、不同条件下耐肥性强弱品种的 NR 活力比较

为了进一步观察耐肥性不同的品种的 NR 活力在不同条件下的变化,我们选用水稻中耐肥性强的粳稻和耐肥性弱的籼稻;小麦中耐肥性强的“扬麦 1 号”和耐肥性弱的