

磷胁迫对豇豆幼苗硝酸还原酶活性和硝态氮含量的影响

齐炳林, 曹翠玲, 王 菲, 雷忠萍, 赵倩茹, 李 君

(西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 采用水培试验法, 研究了低磷胁迫对 3 个豇豆品种叶片和根系中硝酸还原酶活性、硝态氮及蛋白质含量的影响。结果表明: 磷胁迫下根系硝态氮含量呈现先上升后下降趋势, 叶片硝态氮含量则呈下降趋势; 同时, 磷胁迫下不同品种豇豆根系的可溶性蛋白含量均高于对照, 且随胁迫时间的延长而呈下降趋势, 相反叶片可溶性蛋白在磷胁迫下含量低于对照; 低磷胁迫严重影响豇豆生物量积累; 低磷胁迫对根系生长的抑制明显小于地上部, 与对照相比根冠比显著增加; 磷胁迫下豇豆根系和叶片硝酸还原酶活性呈下降趋势。

关键词: 低磷; 豇豆幼苗; 硝酸还原酶; 硝态氮; 可溶性蛋白

中图分类号: S643.401 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2010)01-0147-05

磷在植物体内有着重要的生理作用, 它既是细胞核、磷脂、腺三磷等重要有机化合物的组成之一, 又参与碳水化合物、含氮化合物、脂肪等物质的代谢作用^[1,2]。另外磷在能量代谢以及氧化还原反应中有其独特的关键作用, 这些作用主要是通过 ATP、NADH 以及 NADPH 等来实现^[3]。氮素代谢是植物体内除了碳素代谢以外的最主要代谢。众所周知氮素代谢的关键酶——硝酸还原酶(Nitrate reductase, NR)是诱导酶, 它影响着植物体内的总氮和蛋白质水平; NR 催化的硝酸还原过程, 需要以 NADH 或 NADPH 为电子供体, 同时还需要消耗 ATP^[4], 而磷是 NADHP 和 ATP 的重要组成元素, ATP 是生命活动能量的直接来源, 因此磷对氮素代谢有较大的影响。

目前关于磷对氮代谢影响的研究鲜有报道, 而且研究材料多数都是关于大豆的研究报道^[5-7]。有关 NR 活性和硝态氮含量的研究报道较多, 但多是在大田试验中研究磷肥配施对作物植株氮代谢的影响^[8,9]。本试验研究了磷胁迫对不同品种豇豆硝酸还原酶活性、硝态氮含量及可溶性蛋白含量的影响, 以期磷与氮的代谢关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选用 3 个豇豆(*Vigna unguiculata* W. ssp. *sesquipedalis* (L.) Verd.) 品种为材料, 其代号、名称和来源见表 1。

表 1 材料名称、来源及处理
Table 1 Name, source and treatments of materials

代号 Code	名称 Name	来源 Source	处理代号 Code of treatments	
			正常供磷 Normal for phosphorus	低磷处理 Treatments of phosphorus deficiency
A	宁豇三号 Ningjiang No. 3	杨凌种子站 Yangling Seed Station	A(+)	A(-)
B	比优 10 号 Biyou No. 10	杨凌种子站 Yangling Seed Station	B(+)	B(-)
C	扬豇 40 Yangjiang 40	杨凌种子站 Yangling Seed Station	C(+)	C(-)

1.2 材料培养

试验于 2007 年 3~5 月在西北农林科技大学北校区(34°29'N, 108°07'E)玻璃温室进行。选取大小基本一致的种子放入体积分数为 10% H₂O₂ 中浸泡 30 min 表面消毒, 用清水洗净, 置于用饱和 CaSO₄ 溶

液浸泡过的纱布上催芽。待种子露白后, 播入用 CaSO₄ 溶液浸泡过的石英砂中。

播种后 7~8 d 左右, 第 1 对真叶充分展开时, 取生长一致的植株, 去掉子叶, 洗净根系后移入 5 L 通气的 Hoagland 营养液(1/2 强度)中, 每盆栽种 10

收稿日期: 2009-05-25

作者简介: 齐炳林(1984—), 男, 山东寿光市人, 在读硕士研究生, 主要从事植物营养生理研究。

通讯作者: 曹翠玲(1960—), 女, 陕西眉县人, 博士, 教授, 主要从事植物养分和水分生理研究。

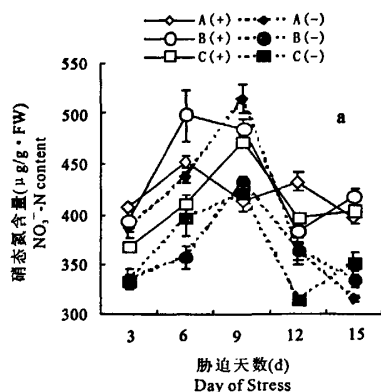
株;在 1/2 强度营养液中培养 1 周后,将其分为两组,一组转入 Hoagland 完全营养液(正常供磷,1.0 mmol/L)中培养,另一组转入 Hoagland 低磷(0.001 mmol/L)营养液中培养(亏缺的钾用 K_2SO_4 补充),两组营养液中的氮素相同,均为 15 mmol/L。每处理重复 5 次。营养液的 pH 为 6.0,营养液每隔 5 天更换 1 次,用气泵每天通气 3~5 h。培养期间,低磷胁迫的第 3 天开始采样测定生理指标,之后每隔 3 天采一次样,共采样 5 次。每次采样,每盆取 2 株,最后取 3 株测定植株生物量。

1.3 测定指标

1.3.1 生长测定 每次每处理取样 3 株,测定植株的鲜重、干重。干重为鲜样在 80℃ 下烘干至恒重,根冠比为根系干重/地上部干重。

1.3.2 硝酸还原酶活性(NRA)测定 采用磺胺比色法测定^[10]。

1.3.3 硝态氮含量测定 采用水杨酸比色法测定硝酸盐($NO_3^- - N$)的含量^[11]。



1.3.4 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定^[10]。

1.3.5 磷含量测定 称取 0.2 g 干样,先用 10ml HNO_3 、1ml $HClO_4$ 消煮,定容后取 1 ml 用钼黄法在 460 nm 处测定 OD 值。

2 结果与分析

2.1 低磷胁迫对豇豆幼苗硝态氮含量的影响

低磷胁迫影响了各品种豇豆幼苗根系和叶片中硝态氮的含量(图 1)。低磷胁迫下豇豆各品种幼苗根系和叶片硝态氮含量均呈先升后降趋势;且根系硝态氮含量高于叶片硝态氮含量。低磷胁迫后 3 d,根系中硝态氮含量变化是,品种 A 硝态氮含量最高,B 和 C 几乎相同,胁迫 9 d 后,3 个品种根系中的硝态氮含量均达最大值,且品种 A 高于对照水平,B 和 C 品种均低于对照水平;胁迫 12 d 以后,低磷胁迫下根系硝态氮含量均低于对照水平。

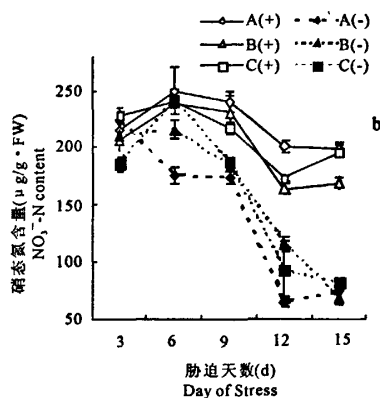


图 1 磷胁迫对根系(a)和叶片(b)硝态氮含量的影响

Fig.1 Influence of phosphorus stress on $NO_3^- - N$ content in the root(a) and leaf(b)

低磷胁迫 3 d 后,3 品种叶片硝态氮含量由高到低为 $A > B > C$ 。胁迫 6 d 后,C 品种叶中硝态氮含量最大,且与对照相同;A、B 品种叶中硝态氮含量均低于对照;胁迫 9 d、12 d 和 15 d 后,叶片硝态氮含量均低于对照水平。

2.2 低磷胁迫对豇豆幼苗硝酸还原酶活性的影响

低磷胁迫下豇豆各品种幼苗根系和叶片硝酸还原酶活性(NRA)均呈下降趋势(图 2)。在磷胁迫 6 d 以前,豇豆各品种幼苗 NRA 下降幅度较小,但 6 d 后,下降幅度明显增大。供磷条件下,豇豆各品种根系和叶片 NRA 在培养过程中均随植株的发育而呈上升趋势。低磷胁迫条件下豇豆各品种根系和叶片

NRA 在培养过程中而呈下降趋势。

低磷胁迫后 3 d,根系中 NRA 为 $A > C > B$ 。胁迫 6 d 后,3 个品种根系中的 NRA 均低于对照水平。低磷胁迫后 3 d,叶片中 NRA 的变化是,品种 C 的 NRA 最高,A 和 B 相差不大。胁迫 6 d 及以后的胁迫中,3 品种叶 NRA 均低于对照水平。

2.3 低磷胁迫对豇豆幼苗可溶性蛋白含量的影响

低磷胁迫下豇豆各品种幼苗根系和叶片可溶性蛋白含量均呈下降趋势(图 3)。叶片可溶性蛋白含量高于根系。低磷胁迫后 3 d,根系中可溶性蛋白含量为 $C > B > A$ 。低磷胁迫下根系可溶性蛋白含量高于同时期对照水平。

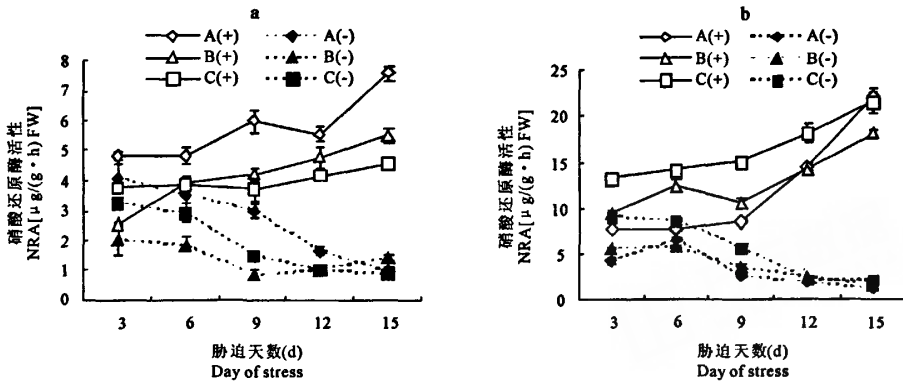


图 2 磷胁迫对根系(a)和叶片(b)硝酸还原酶活性的影响

Fig.2 Influence of phosphorus stress on NR activity in the root(a) and leaf(b)

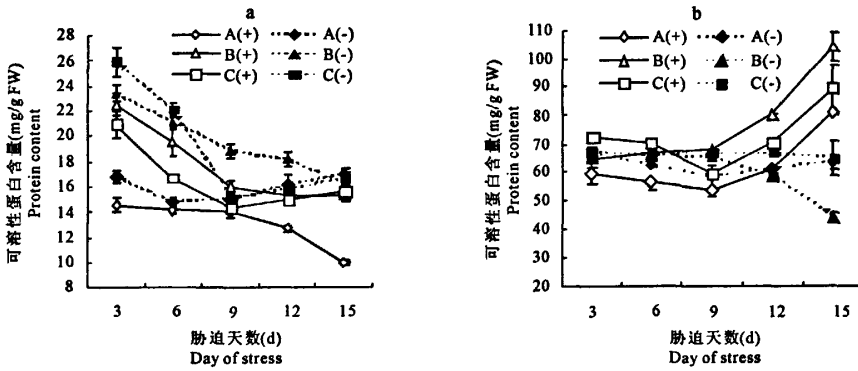


图 3 磷胁迫对根系(a)及叶片(b)可溶性蛋白含量的影响

Fig.3 Influence of phosphorus stress on the soluble protein content in root(a) and leaf(b)

低磷胁迫后,品种 A 和 C 叶片中可溶性蛋白含量的变化趋于平缓,而品种 B 在 9 d 后明显下降。低磷胁迫 9 d 后,各品种叶片中可溶性蛋白含量均低于对照水平。随发育天数的延续,对照叶片中可溶性蛋白含量呈上升趋势。

2.4 磷胁迫对豇豆幼苗磷素含量的影响

图 4 可知,在低磷胁迫下,根系和叶片中的磷含量明显减少,并始终处于较低水平。根系磷含量高于最嫩完全展开叶中的磷含量。

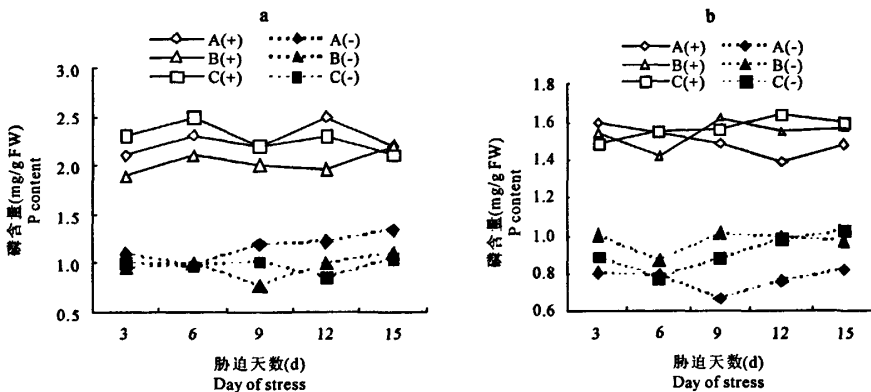


图 4 磷胁迫对根系(a)及叶片(b)磷含量的影响

Fig.4 Influence of phosphorus stress on the P content in root(a) and leaf(b)

2.5 磷胁迫对豇豆幼苗干重和根冠比的影响

干物质积累量是植物生理生化代谢的最终表现形式。试验表明,地上部干重在磷胁迫 6 d 后均低于对照且与对照水平达到极显著差异,但根系干重在磷胁迫 6 d 时均略高于对照,胁迫 9 d 后才低于对照水平,且与对照达到极显著差异;随着磷胁迫时间

的延长,地上部和根系的干物质累积量均呈下降趋势。同一胁迫时间段,根系下降幅度均小于地上干重的下降幅度,因此磷胁迫 6 d 及其后胁迫中,根冠比均显著增加,与对照均达到极显著差异。说明磷胁迫对地上部的影响大于对根系的影响。

表 2 磷胁迫对豇豆幼苗生物量的影响

Table 2 Influence of phosphorus stress on the biomass of 3 varieties cowpeas seedlings

采样时间(d) Time	品种 Varieties	根系干重(g/株) Dry weight of root(g/plant)		地上部干重(g/株) Dry weight of shoot (g/plant)		根冠比 Ratio of root to shoot(R/S)	
		+ P(CK)	- P	+ P(CK)	- P	+ P(CK)	- P
3	A	0.033	0.030	0.117	0.103	0.28	0.29
	B	0.037	0.040	0.130	0.103	0.28	0.39*
	C	0.033	0.037	0.110	0.113	0.30	0.32
6	A	0.070	0.073(104)	0.220	0.103** (47)	0.32	0.71**
	B	0.073	0.087(119)	0.160	0.130* (81)	0.40	0.67**
	C	0.060	0.070(117)	0.287	0.150** (52)	0.21	0.47**
9	A	0.153	0.117** (76)	0.320	0.177** (55)	0.48	0.66**
	B	0.140	0.163* (116)	0.287	0.183** (64)	0.49	0.89**
	C	0.140	0.087* (62)	0.340	0.140** (41)	0.41	0.61**
12	A	0.223	0.16** (72)	0.367	0.207** (56)	0.61	0.77**
	B	0.227	0.173** (76)	0.403	0.210** (52)	0.56	0.83**
	C	0.187	0.13** (70)	0.377	0.187** (50)	0.49	0.69**
15	A	0.297	0.207** (70)	0.473	0.240** (51)	0.63	0.86**
	B	0.310	0.227** (73)	0.587	0.280** (48)	0.53	0.81**
	C	0.207	0.173** (84)	0.607	0.253** (42)	0.34	0.68**

注: * 为 t 检验达到显著水平。** 为 t 检验达到极显著水平。括号内为相对值(以对照为 100% 计算)。

Note: * means t test is significantly different at $P = 0.05$ level, while ** means t test is significantly different at $P = 0.01$ level. The date in the brackets was the relative value.

3 讨 论

硝酸盐是高等植物生长所必需的营养成分,硝酸盐的同化是无机氮素转化为有机氮素的主要途径。根系对 NO_3^- 运输是植物氮素同化的第一步^[12]。有研究表明,植物对硝态氮的吸收既有主动吸收也有被动吸收,并以主动吸收为主^[13]。本试验结果表明,在低磷胁迫下,豇豆三品种硝态氮含量最终降低(图 1)。这可能是因为磷作为能量载体 ATP 的主要组成成分,在缺磷条件下,磷参与和调节线粒体的电子传递链和氧化磷酸化、叶绿体的能量传递和光合磷酸化过程减弱,能量不足制约了根系对 NO_3^- 的吸收,因此导致硝态氮含量降低。

硝酸还原酶(NR)作为植物体内 NO_3^- 还原最重要的调节酶和限速酶,其活性大小决定 NO_3^- 利用效率。同时 NO_3^- 作为硝酸还原酶底物又对其活性有

反馈作用。本试验结果显示:缺磷胁迫处理下,根系和叶片硝酸还原酶活性降低幅度较大(图 2)。可能是缺磷条件下,由于磷素供给不足,导致作为 NR 合成所必需的组成成分之一——磷,在一定程度上抑制了 NR 的合成;同时 NR 作为一种诱导酶,底物 NO_3^- 的减少是导致其活性降低的又一重要因素。

植物在逆境条件下能够在短期内采取一系列自我保护机制来维持正常生长。在本试验中,磷胁迫初期根系可溶性蛋白含量的增加可能就是植株在自我保护机制下,保证了硝酸还原酶活性的暂时稳定和对 NO_3^- 的吸收,因此硝酸还原酶催化 NO_3^- 还原成 NO_2^- 的反应能正常进行, NO_3^- 再被还原成氨,氨用于形成各种氨基酸,参与了正常蛋白质和逆境蛋白质的合成代谢。随着植株生长,植株对磷需求量增加,但 NO_3^- 吸收量却明显降低,同时硝酸还原酶活性降低, NO_3^- 还原成 NO_2^- 的反应受到影响,蛋白

质合成反应的原料不足,最后导致可溶性蛋白质含量降低。

植物生物量的增加有赖于大量营养元素的吸收利用,植物营养生长往往受抑于氮的亏缺,因而为了满足植物的生长要求,加强氮素吸收至关重要。因此, NO_3^- 还原速率成为植物生长发育和蛋白质合成的限制因子^[14]。综合分析磷不足对氮素代谢的影响,较长时间磷不足,植株就会对 NO_3^- 吸收减少,硝酸还原酶活性降低,影响了植株对氮的同化,直接导致蛋白含量的降低,植株生长受到抑制。低磷胁迫对植株地上部的生长抑制要比根部大得多,根系生物量在低磷条件下相对增加,主要是在磷不足时,根系首先满足自己的需要;但磷不足时根系的绝对生长量并不大于对照处理。

许多植物在适应缺磷胁迫时,会为根系生长提供更多有机物以增大根系吸收磷的表面积和能力。本试验记录也是如此:低磷胁迫6 d后,豇豆各品种根冠比迅速增加。作为反映干物质在地上和地下分配情况的指标,根冠比的提高意味着有较多的根系用以吸收磷等营养元素。这与 Halsted 和 Lynch^[15]发现缺磷胁迫下 C_3 植物的根冠比升幅较大的结果一致。

参考文献:

- [1] 凌俊,汤玉玮,施教耐.油菜叶片硝酸还原酶同工酶的纯化与特性[J].植物生理学报,1994,20(1):31—38.
- [2] 李豪喆.大豆叶片硝酸还原酶活力的研究[J].植物生理学通讯,1986,(4):30—32.
- [3] 汪建飞,董彩霞,谢越,等.铵硝比和磷素营养对菠菜生长、氮素吸收和相关酶活性的影响[J].土壤学报,2006,43(6):954—960.
- [4] 陆景陵.植物营养学(第2版)[M].北京:中国农业出版社,2003:26—27.
- [5] 蔡柏岩,葛青萍,祖伟.施磷水平对不同基因型大豆品种硝酸还原酶活性影响[J].大豆科学,2007,26(3):359—362.
- [6] 林春华,黄亮华,陈永泉,等.缺氮、磷、钾、钙对芥蓝硝酸盐积累、硝酸还原酶和过氧化物酶活性的影响[J].华南农业大学学报,1998,19(4):55—58.
- [7] 蔡柏岩,葛青萍,祖伟.施磷水平对不同基因型大豆叶片及子粒可溶性蛋白含量的影响[J].植物营养与肥料科学,2007,13(6):1185—1188.
- [8] 秦鱼生,涂仕华,孙锡发.不同氮、钾水平对萝卜产量和硝酸盐含量的影响[J].西南农业学报,2003,(16):113—115.
- [9] 卢善玲,周根梯.施肥对蔬菜中硝酸盐含量的影响[J].上海环境科学,1988,7(9):19—21.
- [10] 高俊凤.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2006:61—63.
- [11] 文树基.基础生物化学试验指导[M].西安:陕西科学技术出版社,1994:147—149.
- [12] Ward M R, Tischner R, Huffaker R C. Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of barley seedlings [J]. Plant Physiol, 1988, 88:1141—1145.
- [13] Hirsch W R. Transport of nitrate and ammonium through plant membranes[C]//Mengel K, Pilbeam D J. Nitrogen Metabolism of Plants. Oxford: Clarendon Press, 1992:121—137.
- [14] 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.
- [15] Halsted M, Lynch J. Phosphorus responses of C_3 and C_4 species. Journal of Experimental Botany, 1996, 47(297):497—505.

Influence of low phosphorus on nitrate reductive activity and NO_3^- - N content in cowpea seedling

QI Bing-lin, CAO Cui-ling, WANG Fei, LEI Zhong-ping, ZHAO Qian-ru, LI Jun

(College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Influence of low phosphorus stress on NO_3^- - N content, NRA activity and protein content of roots and leaves in the three cowpea varieties was studied with the hydroponics experiment. The results showed that NO_3^- - N content of root increased at first, then declined and NO_3^- - N content of leaf declined under the low phosphorus stress conditions. At the same time, root soluble protein content of different varieties of cowpea was higher than the control level under the phosphorus stress, and declined with the stress time. In contrast, leaf soluble protein content was declined. Biomass accumulation in cowpea was seriously impacted in low-phosphorus stress conditions. Inhibition of root growth was smaller than shoot, and compared with the control, root top ratio increased under low phosphorus stress. NRA activity of roots and leaves in cowpea declined, and that of the control increased.

Keywords: low phosphorus; cowpea seedling; NRA; NO_3^- - N; soluble protein