

液。以上过程均在 25°C 下进行。然后将收集的样品置 -37°C 1 小时后测定 NR 活性。

(二) NR 的提取和活性测定

NR 的提取方法参照前文^[2]。将样品剪成小块,放在预冷的研钵中,每份样品加入少量石英砂及 2ml 提取缓冲液(25ml 磷酸缓冲液, pH7.5, 含 5mmol/l 乙二胺四乙酸二钠和 5mmol/l 半胱氨酸盐酸盐)后,立即磨成匀浆。匀浆经三层纱布过滤,滤液用台式离心机以 2500g/分离心 10 分钟,得到的上清液即酶的粗提液。提取在 4°C 下进行。NR 的活性测定采用陈薇等^[4]的方法。反应混合液含有酶液 0.2ml, KNO₃ 30mmol/l, NADH 0.8mmol/l, 加入 0.1mol/l 磷酸缓冲液 (pH7.5) 使最终体积为 1ml。反应混合液置 25°C 保温 30 分钟。并立即加入 0.5ml 氨基苯磺酰胺 [1% (W/V), 溶于 3mol/l HCl 中] 和 0.5ml 萘基乙烯二胺 [0.02% (W/V), 溶于水], 15 分钟后在台式离心机上离心 2500g/分 10 分钟,清液在分光光度计上测 540nm 光吸收。以不加 NADH 的作为空白对照。

结果与讨论

(一) 激素平衡对 NR 诱导的影响

激素对植物的生理过程起着重要的调控作用^[5]。在氮代谢的关键酶硝酸还原酶的诱导过程中,细胞分裂素起了重要的作用。我们观察了外源施用各类激素对 NR 诱导的影响(表 1),看到在五类激素中,只有细胞分裂素(6-BA)对 NR 的诱导起强烈的促进作用。乙烯利无明显作用。而生长素、赤霉素和脱落酸均有一定抑制作用,尤以脱落酸的抑制作用最为强烈。通常认为生长素、赤霉素和细胞分裂素三者的作用似乎是促进发生、生长、分化的程序加速发展,它们都能促进植物细胞蛋白质的合成^[6]。但是,它们对 NR 诱导的影响却不相同,这提示了 6-BA 的作用不是由于简单地加强了细胞的转录或翻译能力,而可能有其特殊的作用途径。

6-BA 是一种人工合成的细胞分裂素类物质,植物细胞内并无合成。我们以细胞内天然发生的细胞分裂素类物质玉米素处理小麦叶片,得到与 6-BA 相似的结果(图 1)。这说明植物细胞内的 NR 诱导确实是受内源细胞分裂素类物质控制的。

在莴苣种子的发芽后,黄化叶片转绿等多种生理效应中,已观察到生长抑制激素脱落

表 1 各类激素对 NR 诱导的影响
Table 1 The effects of phytohormone on NR induction

处 理 Treatment	NR 活 性 NR activity ($\mu\text{molNO}_2^-/\text{gfr. wt}/30\text{min}$)	相 对 活 性 Relative activity (%)
CK	139.5	100
BA	332.8	238.6
IAA	92.0	66.0
Eth	134.5	96.4
GA ₃	102.0	73.1
ABA	80.0	57.4

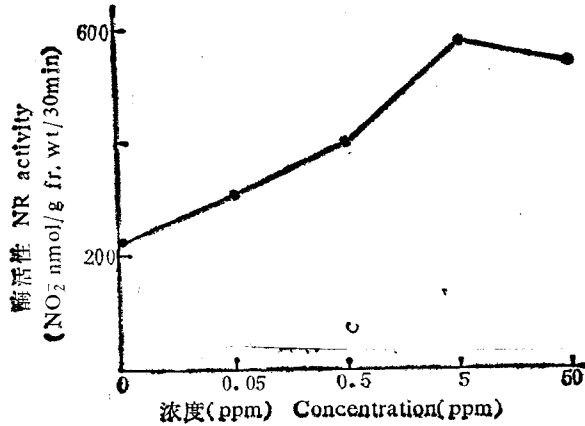


图 1 玉米素浓度对 NR 诱导的影响
Fig. 1 The effect of different concentration of zeatin on NR induction

酸对细胞分裂素的拮抗作用^[10]。脱落酸可抑制 NR 的诱导，且能抵消 6-BA 对酶诱导的促进作用(图 2)。在 5ppm 脱落酸和 5ppm 6-BA 同时应用时，诱导产生的酶活性低于无激素处理的对照。

根据 6-BA 对黄瓜子叶 NR 诱导的促进作用，Knypl (1973)^[8]曾提出 NR 的底物诱导是由细胞分裂素控制的设想。而上述结果使我们设想，植株的内源激素平衡，是控制 NR 底物诱导的重要因子，而细胞分裂素和脱落酸的相对含量，可能起了重要的作用。

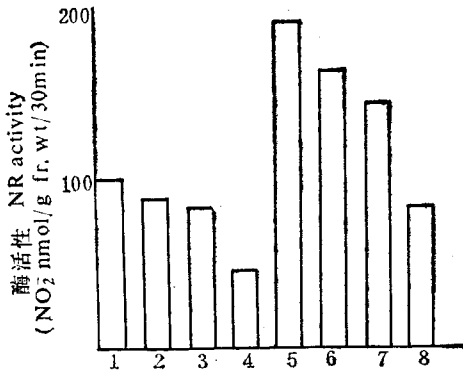


图 2 6-BA 和 ABA 对 NR 诱导的影响
Fig. 2 The effect of 6-BA and ABA on NR induction 1. CK 2. 0.05ppm ABA 3. 0.5ppm ABA 4. 5ppm ABA 5. 5ppm 6-BA 6. 5ppm 6-BA + 0.05ppm ABA 7. 5ppm 6-BA + 0.5ppm ABA 8. 5ppm 6-BA + 5ppm ABA

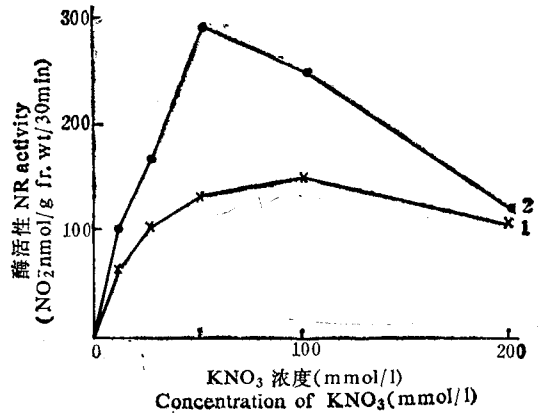


图 3 在不同 KNO₃ 浓度下，6-BA 对 NR 诱导的促进作用
1. 对照 2. +6-BA
Fig. 3 Accelerative effect of 6-BA on NR induction in the presence of different concentration of KNO₃
1. Control 2. +6-BA

(二) 6-BA 的促进作用依赖于 NR 的诱导过程

Kende 等(1972)^[7]指出 BA 能独立地诱导麦仙翁胚的 NR 活性，他们的观察得到了以藜叶片为材料的实验结果的支持。而 Parkash (1972)^[9] 和我们的结果(1983)^[11]都表

明,细胞分裂素并不能单独诱导 NR 活性,只是在 NO_3^- 存在下,细胞分裂素能增强 NO_3^- 的诱导作用。因而认为“6-BA 促进 NR 活性是通过 NO_3^- 的间接作用”。我们观察了不同 KNO_3 浓度下 6-BA 对 NR 诱导的影响(图 3)。结果表明,在不同的 KNO_3 浓度下,诱导产生的 NR 活性也不同,而 6-BA 对 NR 活性的促进作用又与 NO_3^- 的诱导作用密切相关。无 NO_3^- 存在时, NR 不能产生,6-BA 也无诱导作用。适宜浓度的 NO_3^- (50mmol/l) 诱导较高酶活性,这时 6-BA 的促进效应也最强烈。在更高 NO_3^- 浓度下,可能是由于 NR 催化反应的产物 NO_2^- 在细胞内积累,阻抑了 NR 的诱导,而造成了 NO_3^- 诱导效应的下降,这时,6-BA 的促进作用也下降。

光是黄化叶片 NR 底物诱导的必要因子^[4]。在黑暗中, NO_3^- 只能诱导黄化叶片产生很低的酶活性。同时,6-BA 对 NR 诱导的促进作用也很弱(图 4)。

上述结果表明,6-BA 的促进作用不仅与 NO_3^- 的存在有关,还与 NO_3^- 诱导 NR 的必要条件(光)有关。即依赖于植物细胞内 NR 的诱导过程。只有在 NO_3^- 对 NR 的诱导得以进行时,6-BA 才能强化其诱导过程。

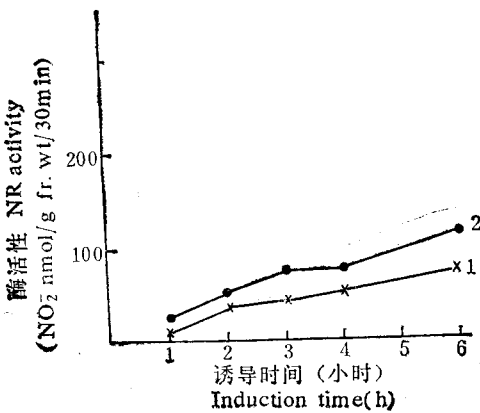


图 4 6-BA 对 NR 暗诱导的影响
1.对照 2.+ABA

Fig. 4 The effect of 6-BA on NR induction in the dark

1. Control 2. + ABA

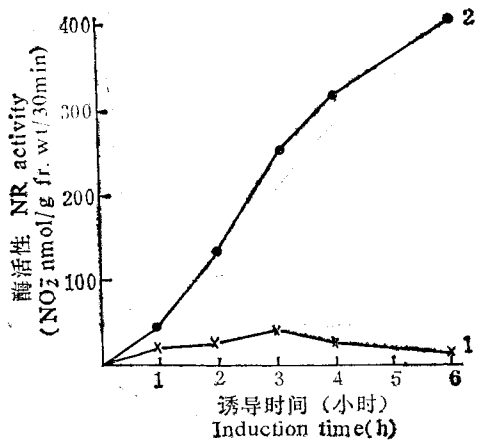


图 5 环己酰亚胺对 NR 诱导的影响
1.对照 2.+环己酰亚胺

Fig. 5 The effect of cycloheximide on NR induction

1. Control 2. + Cycloheximide on induction

(三) 环己酰亚胺对 NR 诱导的影响

硝酸还原酶的诱导速度通常较快,这现象使一些作者设想在细胞内存在着 NR 的前体^[5]。我们以蛋白合成抑制剂环己酰亚胺来影响 NR 的诱导, NO_3^- 能很快诱导叶片产生 NR 活性,但环己酰亚胺几乎完全抑制 NO_3^- 对 NR 的诱导作用(图 5)。处理后 1 小时,已可看出环己酰亚胺对诱导的抑制作用;处理后 2 小时,抑制作用极为明显。这表明即使在 1—2 小时那么短的诱导时间内, NR 活性还是主要来源于酶蛋白的新合成,而不是由于非活性前体的活化。

细胞分裂素对 NR 诱导的促进主要是由于它促进了酶蛋白的合成^[4]。而本文的结果表明,细胞分裂素的作用依赖于酶的诱导过程,而在较短的时间内诱导过程本身仍是酶蛋

白的新合成过程,所以,这些结果是对以上结论的支持。

参 考 文 献

- [1] 陆嘉陵、何文竹、陈薇、张韵华、汤玉玮, 1983: 硝酸还原酶的研究 II、6-BA 和光对小麦硝酸还原酶诱导的影响。植物生理学报, 9: 41—49。
- [2] 陆嘉陵、张韵华、张德颀、汤玉玮, 1984: 硝酸还原酶的研究 IV. NADH 对小麦硝酸还原酶的钝化作用。植物生理学报, 10: 201—207。
- [3] 王玉琴、张德颀, 1985: 不同温度对硝酸盐和 6-BA 诱导硝酸还原酶活性的影响。上海农学院学报 3: 233—239。
- [4] 陈薇、张德颀, 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。
- [5] 辽宁铁岭农学院《植物激素》翻译小组译(增田芳雄、胜见允行、今关英雅著), 1976: 植物激素。科学出版社, 北京。
- [6] Borris, H., 1967: Untersuchungen über die steuerung der enzymaktivität in pflanzlichen embryonen durch cytokinin. *Wiss. Z. Univ. Rostock* (Math. Naturwiss. Reihe), 16: 629—639.
- [7] Kende, H. and T-C. Shen, 1972: Nitrate reductase in *Agrostemma githago*: Comparison of the inductive effect of nitrate and cytokinin. *Biochem. Biophys. Acta*, 286: 118—125.
- [8] Knypl, J. S., 1973: Synergistic induction of nitrate reductase activity by nitrate and benzylaminopurine in detached cucumber cotyledons. *Z. Pflanzenphysiol.*, 70: 1—11.
- [9] Parkash, V., 1972: Synergism between cytokinins and nitrate in induction of nitrate reductase activity in fenugreek cotyledons. *Planta*, 102: 372—373.
- [10] Sankhla, N. and D. Sankhla., 1968: Reversal of (±) abscisic II induced inhibition of lettuce seed germination and seedling growth by kinetin. *Physiol. Plant.*, 21: 190—195.
- [11] Lu J.-L., Jian Z.-Y., Chang T.-Y. and Tang Y.-W., 1985: There was a specific binding protein of cytokinin in cotton ovary. In "Abstracts of the 12th International Conference on Plant Growth Substances" (M. Bopp et al eds) Heidelberg, F. R. G. P. 55.

THE ACCELERATIVE EFFECTS OF CYTOKININ ON NITRATE REDUCTASE INDUCTION

Lu Jia-ling, Jian Zhi-ying and Tang Yu-wei
(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica)

Abstract

Cytokinin stimulates the induction of nitrate reductase (EC 1.6.6.1, NR) ABT inhibites the induction of NR and counteracts the effect of 6-benzyladenine (6-BA) on the induction of NR. 6-BA alone could not induce NR activity and the effect of 6-BA became stranger when appropriate concentration of NO_3^- induced higher NR activity. In the dark a little NR activity was induced by NO_3^- in etiolated leaves and the effect of 6-BA was very weak at the same condition. Cycloheximide depresses the induction of NR by NO_3^- . These results showed that the accelerative effects of cytokinin on NR induction was a indirect action depending on NR inducing process rather than on the presence of NO_3^- alone.

Key words Phytohormone; Nitrate reductase; Induction; Wheat