

文章编号:1674-7054(2010)04-0327-04

热带海草海菖蒲不同组织中硝酸还原酶活力的研究

王小兵^{1,2}, 白 洋¹, 黄 勃^{2,3}

(1. 海南大学 热带资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228; 2. 海南大学 材料与化工学院, 海南 海口 570228; 3. 海南大学 海洋学院, 海南 海口 570228)

摘 要: 利用活体法研究了海南陵水新村湾热带海草海菖蒲不同组织中硝酸还原酶活力以及酶促反应条件因子 pH、温度和 KNO₃ 浓度对酶活力的影响; pH 设 3 个水平(7, 8, 9), 温度(20 ~ 40 ℃)和 KNO₃ (50 ~ 250 mmol · L⁻¹) 浓度各 5 个水平。研究表明: 酶促反应温度和 KNO₃ 浓度对酶活力有显著影响, 而 pH 对酶活力没有影响; 海菖蒲的最佳酶促反应条件为: 100 mmol · L⁻¹ KNO₃, 0.5 mmol · L⁻¹ Na-EDTA、磷酸缓冲液(pH = 8.0)、10 mmol · L⁻¹ 葡萄糖和 *w* = 0.5% 的正丙醇; 温度为 30 ℃。在最佳酶促反应条件下, 海菖蒲叶、根和茎的鲜质量组织中硝酸还原酶活力大小分别为: 1.01, 0.08, 0.001 μmol · g⁻¹ · h⁻¹。

关键词: 海草; 海菖蒲; 硝酸还原酶; 活体法
中图分类号: Q 178.53 **文献标志码:** A

海草是海洋中广泛分布的一种真正的高等被子植物,不但能通过叶片吸收、同化海水中硝酸盐,而且能通过根吸收、同化底质中硝酸盐^[1]。全球共有海草 12 属 50 多种,其中 20 多种^[2]分布在南中国海。硝酸还原酶是植物硝酸盐同化作用中的一种限制性酶,其酶活力与植物同化硝酸盐的速率成正比,常被作为衡量植物吸收、同化硝酸盐速率的生化指标。因此,对海草体内硝酸还原酶进行研究,了解硝酸盐的吸收和同化过程,并进一步应用于海洋环境的生态修复均具有重要意义。到目前为止,国内外对海洋植物硝酸还原酶的研究大多集中在海藻的研究上,如: *Ulva rigida*^[3-4], *Laminaria saccharina*^[5], *Laminaria digitata*^[6], *Fucus gardneri*^[7], *Gracilaria tenuistipitata*^[8], *Gracilaria chilensis*^[9-10] 和 *Ulva lactuca*^[11] 等,而对海草硝酸还原酶的研究却很少,国内没有相关的研究报道,国外也仅报道了 3 种海草,如 *Halophila stipulacea*^[12], *Zostera marina*^[1-13], *Zostera noltii*^[14]。海菖蒲(*Enhalus acoroides*)是一种大型海草,我国主要分布在南海,特别是海南岛周边海域。笔者对海菖蒲不同组织的硝酸还原酶活力进行了基础性研究,旨在为海菖蒲的保护、利用和其他相关研究提供参考。

1 材料与方法

- 1.1 材料来源和样品处理 海菖蒲样品取自海南陵水新村湾(18°24'42"N , 109°57'58"E),用清洁海水清除样品上的海泥和附生植物,分装入样品瓶,液氮冷冻保鲜,送回实验室。实验前,用高温消毒的海水再一次清洗样品组织,用滤纸吸干表面的水分,分根、茎、叶 3 部分,切成长度约为 0.1 cm 的片段,待用。
- 1.2 硝酸还原酶活力的测定 硝酸还原酶活力采用活体法测定,主要参考文献[1, 3, 14]的方法,并对其中的酶促反应条件进行了优化。取 1 个 20 mL 的小烧瓶装入 10 mL 的酶促反应液,往烧瓶充入 2 min 的氮气,把称重好的样品(0.5 g)放入瓶中,抽成真空,再充氮气 2 min(抽真空到充氮气的过程重复 2 次),立刻密封,在暗黑条件下,水浴保温 2 h,然后,从中取反应液 1 mL 放入 1 支干净试管,加入 1 mL *w* =

收稿日期: 2010-09-28
基金项目: 海南省科技重点项目(080137)
作者简介: 王小兵(1979-),湖南衡阳人,海南大学热带资源教育部重点实验室实验师,硕士。
通信作者: 黄勃,教授,主要从事海洋生物资源保护与利用研究。E-mail: huangbohbl@163.com

0.1% ($c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液配制) 的磺胺溶液、1 mL $w = 5\%$ ($c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液配制) 的萘基乙烯胺溶液和 2 mL 去离子水, 摇匀, 水浴保温 30 min, $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 取上清液 540 nm 比色测定。硝酸还原酶活力用 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (样品为鲜质量) 表示。每种组织设 5 个重复实验。酶促反应液包括: KNO_3 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na-EDTA、磷酸缓冲液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$)、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 $w = 0.5\%$ 的正丙醇。溶液用去离子水配制。

1.3 最佳酶促反应条件的确定 为了确定海菖蒲硝酸还原酶酶促反应的最佳条件, 选取对酶活力影响最大的 3 个因子, 即: pH、温度和 KNO_3 浓度进行试验, 其中 pH 设 3 个水平 (7, 8, 9), 其余 2 个因子分别设 5 个水平 (t : $20 \sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$; KON_3 : $50 \sim 250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。酶促反应的基本条件为: $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na-EDTA、磷酸缓冲液 ($\text{pH} = 7.0$)、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 $w = 0.5\%$ 的正丙醇; t : $22 \text{ }^\circ\text{C}$ (自然海区水温)。首先确定 pH 水平, 然后在此基础上确定其他 2 个因子的水平。海菖蒲不同组织的硝酸还原酶活力在确定的最佳条件下测定。实验数据用 SPSS11.0 统计软件分析。

2 结 果

从图 1 可以看出, 在 $\text{pH} = 8$ 时, 硝酸还原酶表现出了最大活力 ($\text{NR} = 0.60 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), 在 $\text{pH} = 7$ 或 9 时, 硝酸还原酶活力 ($\text{NR} = 0.57$ 和 $0.58 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) 稍低于 $\text{pH} = 8$ 时的水平, 但方差分析表明三者间无显著差异 ($P > 0.05$)。

酶促反应温度对硝酸还原酶活力的影响非常明显 (图 2), 在 $20 \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$ 的范围内, 随着温度的上升硝酸还原酶活力也呈增加趋势, 在 $t = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ 时, 出现最大酶活力 ($0.84 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), 以后随着温度的进一步增加, 酶活力开始下降, 最小酶活力出现在 $t = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ 的测试水平 ($0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), 明显低于其他测试浓度 ($P < 0.05$)。

图 3 显示了在最适 pH 和温度条件下, 酶促反应液中 KON_3 的浓度对硝酸还原酶活力的影响。在所有被测试浓度水平, 硝酸还原酶活力都保持了较高水平; 当 KON_3 浓度 $< 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 酶活力和 KON_3 浓度之间呈现了明显的正相关, 酶活力峰值出现在 KON_3 浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ($1.08 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); 当 KON_3 浓度大于 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, KON_3 浓度的增加并未对酶活力产生明显影响 ($P > 0.05$)。

在最佳酶促反应条件下 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KNO}_3$ 、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na-EDTA、磷酸缓冲液 ($\text{pH} = 8.0$)、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖和 $w = 0.5\%$ 的正丙醇; t : $30 \text{ }^\circ\text{C}$), 海菖蒲叶、根和茎组织中硝酸还原酶活力大小分别为: 1.01 , 0.08 和 $0.001 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (图 4)。

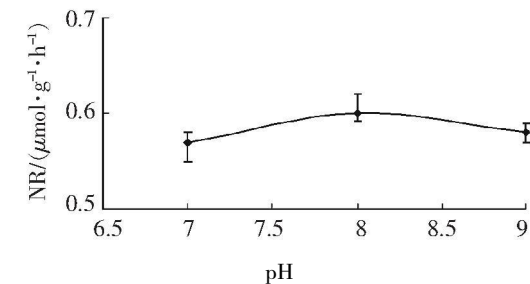


图 1 测定液 pH 对硝酸还原酶活力的影响

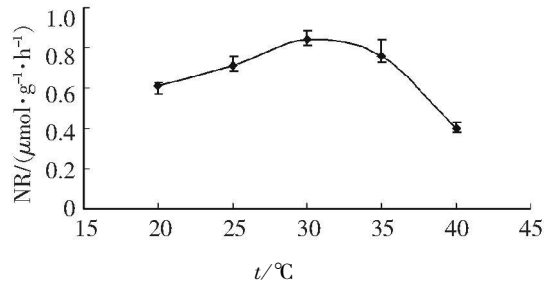


图 2 测定温度对硝酸还原酶活力的影响

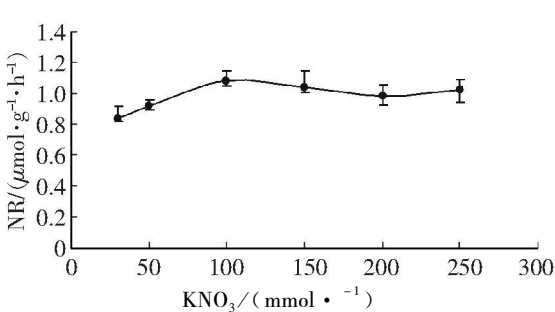


图 3 测定液 KON_3 浓度对硝酸还原酶活力的影响

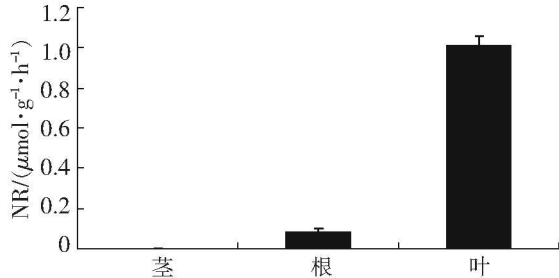


图 4 海菖蒲叶、根和茎组织中硝酸还原酶活力

3 讨 论

研究植物硝酸还原酶活力的方法有2种,即离体法(In vitro assay)和活体法(In vivo assay),这2种方法已被广泛应用到对海洋藻类硝酸还原酶活力的研究中^[15]。然而,对海草而言,离体法并不适用^[13],一是因为离体法在测定硝酸还原酶活力时,其结果明显受酶提取条件的影响,而酶的提取条件具有种的特异性,大大增加了测定的复杂性;二是前人发现用该法对几种海草的硝酸还原酶活力的测定结果偏低,且实验结果的可重复性差;因此,在海草硝酸还原酶活力的研究中多数采用的是活体法。

在硝酸酶还原酶测定过程中,对于不同的植物而言,其最佳酶促反应条件存在差异性,只有在最佳酶促反应条件下,才能测定出植物硝酸还原酶最大酶活力,反应其对硝酸盐的真实吸收、同化能力。先前对影响海草硝酸还原酶活力的酶促反应条件因子研究较多的是pH、温度和KNO₃浓度。Roth等^[1]对*Z. marina*硝酸还原酶最佳酶促反应条件进行了研究,在室温条件下(22℃),其最佳酶促反应所需KNO₃浓度为60 mmol·L⁻¹,pH=7.0和*w*=0.5%正丙醇。Doddema等^[12]对*H. stipulacea*和Alexandre等^[14]对*Z. noltii*的研究,揭示这2种海草硝酸还原酶活力对酶促反应中的pH变化不敏感,而温度的变化会使*Z. noltii*硝酸还原酶活力发生显著波动,其最大酶活力出现在20~35℃的范围内。在本实验中,pH对酶活力的影响与前人研究大致相同,虽然在pH=8时表现出最大酶活力(图1),但与其他测试水平相比并无显著差异($P>0.05$);硝酸还原酶活力对酶促反应温度非常敏感(图2),在20~30℃的范围内,随着温度的上升酶活力也快速增加,在*t*=30℃时,出现最大酶活力,以后随着温度的进一步增加,酶活力开始下降,最小酶活力出现在*t*=40℃的测试水平,明显低于其他测试浓度($P<0.05$);另外,酶活力的大小也依赖酶促反应液中KNO₃浓度水平,当KNO₃浓度小于100 mmol·L⁻¹时,海菖蒲硝酸还原酶活力与KNO₃浓度成正相关,而当KNO₃大于100 mmol·L⁻¹时,KNO₃浓度的增加对酶活力无显著影响($P>0.05$),酶活力的峰值出现在KNO₃浓度为100 mmol·L⁻¹左右(图3)。因此,海菖蒲硝酸还原酶酶促反应最佳的KNO₃浓度为100 mmol·L⁻¹,pH=8.0,*t*=30℃。

对陆生植物而言,硝酸盐是首要的氮源,但硝酸盐首先必须被还原成为氨盐才能被利用,而且大量研究表明,陆生植物的根对硝酸盐的吸收经常受到限制。因此,大多数陆生植物叶片内的硝酸还原酶活性比其他组织高,如小麦叶片中硝酸还原酶活力为5 μmol·g⁻¹·h⁻¹^[17],大豆叶片则高达10~22 μmol·g⁻¹·h⁻¹^[18]。与之相比,水生植物既能通过根吸收底基的硝酸盐,也能通过叶片从水体中吸收硝酸盐,在多数情况下,底基中可以直接被植物利用的氨盐浓度水平较高,基本上能满足植物生长对氮的需求。即使这样,研究水生植物不同组织中硝酸还原酶的活力大小也是必要的,因为它不仅能反映该植物对硝酸盐吸收、同化的潜在能力,也能揭示其生境中的硝酸盐浓度水平,为物种的保护、利用提供理论依据。对海草不同组织中硝酸还原酶活力的研究始于20世纪80年代。在已研究过的3个海草种类中,*H. stipulacea*所有组织硝酸还原酶活力均小于10 nmol·g⁻¹·h⁻¹,根中的硝酸还原酶几乎可以忽略不计^[12]; *Z. marina*叶中硝酸还原酶活力为600 nmol·g⁻¹·h⁻¹,根为50 nmol·g⁻¹·h⁻¹^[1]; *Z. noltii*叶中硝酸还原酶活力最高达4 μmol·g⁻¹·h⁻¹,而根只有0.2 μmol·g⁻¹·h⁻¹(样品为干质量)^[14];本研究中,*E. acoroides*中硝酸还原酶活力依次为叶>根>茎(叶、根、茎分别为:1.01,0.08,0.001 μmol·g⁻¹·h⁻¹)。尽管从上述这些研究中无法准确比较它们之间硝酸还原酶活力的高低(因为测定条件和测定方法不同),但可以得出一个共同的结论:在同种海草中,硝酸还原酶活力叶>根>茎,海草氮源的主要提供者为底基氨盐,而硝酸盐作为补充形式主要是通过叶片从海水中获取,海草的根和茎对硝酸盐几乎没有吸收作用,特别是茎。

参考文献:

- [1] ROTH N, PREGNALL A. Nitrate reductase activity in *Zostera marina* [J]. Mar Biol, 1988, 99: 457-463.
- [2] HEMMING M A, DUARTE C M. Seagrass Ecology [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2000: 82-87, 147-151.
- [3] CORZO A, NIELL F X. Determination of nitrate reductase activity in *Ulva rigida* C. *gardh* by the in situ method [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1991, 146: 181-191.
- [4] CORZO A, NIELL F X. Nitrate reductase activity and in vivo nitrate-reduction rate in *Ulva rigida* illuminated by blue light

- [J]. Marine Biology, 1994, 20: 17–23.
- [5] DAVISON I R, DAVISON J O. The effect of growth and temperature on enzyme activities in the brown alga *Laminaria saccharina*[J]. Br. Phycol. J., 1987, 22: 77–87.
- [6] DAVISON I R, STUART W D P. Regulation of growth in *Laminaria digitata*; use of in vivo nitrate reductase activities as an indicator of nitrogen limitation in the field populations of *Laminaria* spp[J]. Mar. Biol. (Berl.), 1984, 84: 207–217.
- [7] HURD C L, BERTGES J A, OSBORNE J, et al. An in vitro nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for *Fucus gardneri* (Phaeophyta) [J]. J. Phycol., 1995, 31: 835–843.
- [8] LOPES P F, OLIVEIRA M C, COLEPICOLO P. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red algae *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) [J]. J. Phycol., 1997, 33: 225–231.
- [9] CHOW F, OLIVEIRA M C, PEDERSE N M. In vitro assay and light regulation of nitrate reductase in red alga *Gracilaria chilensis*[J]. J. Plant Physiol., 2004, 161: 769–776.
- [10] CHOW F. Rapid and slow modulation of nitrate reductase activity in the red macroalga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta): influence of different nitrogen sources[J]. J. Appl. Phycol., 2008, 20: 775–782.
- [11] TEICHBERG M, HEVNER L R, FOX S. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity, internal N pools, and growth of *Ulva lactuca*: responses to long and short-term N supply[J]. Mar. Biol., 1997, 151: 1249–1259.
- [12] DODDEMA H, HOWARI M. In vivo nitrate reductase activity in the seagrass *Halophila stipulacea* from the Gulf of Aqaba (Jordan) [J]. Bot. Mar., 1983, 26: 307–312.
- [13] TOUCHETTE B W, BURKHOLDER J M. Nitrate reductase activity in a submersed marine angiosperm: controlling influences of environmental and physiological factors [J]. Plant Physiol. Biochem., 2001, 39(7/8): 583–593.
- [14] ALEXANDRE A, SILVA J, SANTOS R. Maximum nitrate reductase activity of the seagrass *Zostera noltii* (Hornem.) varies along its vertical distribution [J]. Exp. Mar. Biol. Ecol., 2004, 307: 127–135.
- [15] HURD C L, BERTGES J A, OSBORNE J. An in vitro nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for *Fucus gardneri* (Phaeophyta) [J]. J. Phycol., 1995, 31: 835–843.
- [16] TOUCHETTE B W, BURKHOLDER J M. Review of nitrogen and phosphorus metabolism in seagrass [J]. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 2000, 250: 127–135.
- [17] BAER G R, COLLET G F. In vivo determination of parameters of nitrate utilization in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings grown with low concentration of nitrate in the nutrient solution [J]. Plant Physiol., 1981, 68: 1237–1243.
- [18] HARPER J E. Effect of chlorate, nitrogen source, and light on chlorate toxicity and nitrate reductase activity in soybean leaves [J]. Physiol. Plant., 1981, 53: 505–510.

Studies on Nitrate Reductase Activity in Different Tissue of *Enhalus acoroides*

WANG Xiao-bing^{1,2}, BAI Yang¹, HUANG Bo^{2,3}

(1. Tropical Bioresources of Education Department Laboratory, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. College of Material Science and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China;

3. Ocean College, Hainan University, Haikou, 570228, China)

Abstract: An in vivo method was used to determine the Nitrate reductase (NR) activity in the different tissue from *Enhalus acoroides* in the Xincun Bay of Hainan Island. The effects of pH of the assay media (7, 8 and 9), temperature (5 °C steps, from 20 to 40 °C) and KNO₃ concentrations (50 mmol · L⁻¹ steps, from 50 to 250 mmol · L⁻¹) on leaf NR activity were tested. The results indicated that both assay temperature and KNO₃ concentration had a significant effect on NR activity, but pH not; the optimal assay medium contained 100 mmol · L⁻¹ KNO₃, 0.5 mmol · L⁻¹ Na-EDTA, phosphate buffer (pH = 8.0), 10 mmol · L⁻¹ glucose, 0.5% (v:v) 1-propanol, and at 30 °C. NR activity in leaves was 1.01 μmol · g⁻¹ · h⁻¹, 0.08 μmol · g⁻¹ · h⁻¹ in roots and 0.001 μmol · g⁻¹ · h⁻¹ in shoots under the optimal assay medium conditions.

Key words: seagrass; *Enhalus acoroides*; nitrate reductase; in vivo method