

玉米缺锌酶学诊断的初步探讨

曹秀华 李树真 王 健

(西北农学院土壤农化系)

一、前言

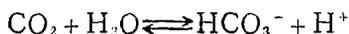
近年来,国内外对微量元素的研究越来越引起人们的重视。在一些地区微肥的施用,特别是锌肥的施用日益广泛。但是,施用锌肥的效果却不是普遍的。因此,就需要对土壤和植物进行锌营养诊断。土壤有效锌的诊断方法,有比较成功的DTPA—原子吸收光谱法。而植物锌的营养诊断,特别是要做到预测预报,只通过化学分析,以植物锌含量为指标是困难的。目前,已有不少人在研究玉米、水稻锌营养的酶学诊断方法。酶学诊断方法的理论依据是:某些金属离子对特种酶的活性具有调节作用。因此,通过植株酶活性的测定,可以更快地得出潜伏性缺素的可靠指标⁽¹⁾⁽²⁾。酶学诊断潜伏性缺锌的方法有两种,其理论根据为:

(一) 植株体内锌含量对RNA(核糖核酸)酶活性的影响

Price等人1972年指出:锌缺乏使细胞内的RNA和核糖含量显著下降⁽³⁾。现已证明,叶片含锌量与体内RNA酶呈负相关。缺锌引起植株体内RNA酶的活性显著增强,因而体内蛋白质的合成受到抑制。锌不足也影响色氨酸的形成,从而影响到吲哚乙酸的生成。因此,缺锌时,植株矮小,蛋白质含量少、产量下降。所以测定RNA酶活性可以反映作物是否缺锌,作到预测预报。

(二) 植株体内含锌量对碳酸酐酶活性的影响

锌是碳酸酐酶的成分。Wood和Sibly1952年就指出,碳酸酐酶的活性与植物体内锌含量有平行关系。该酶主要分布于叶绿体内,催化CO₂的水合反应:



其结果可促使CO₂经过细胞液相向叶绿体扩散(Hatch等),对于光合作用具有重要意义(Graham和Reed)。叶片中的碳酸酐酶能分解HCO₃⁻释放出CO₂,改变溶液中的酸度。因此,测定酶作用后溶液的PH或释放出的CO₂量,就能了解此酶活性的强弱,从而判断植株是否缺锌⁽²⁾。Dwivedi选用溴百里酚兰指示剂,来指示碳酸酐酶的活性强弱。该指示剂变色范围为PH6.2—7.6,PH值低于此范围为黄色,高于此范围为兰色,所以可以通过对碳酸酐酶作用于混合液后指示剂颜色变化的观察,来判断植株是否缺锌。此法也称潜伏性缺锌的快速组织测定法。

由于测定植株叶片中的RNA酶活性和碳酸酐酶活性,可以反映作物是否缺锌,所

以比较正常植株和缺锌植株体内酶活性的差异,就可诊断植株缺锌的程度,而且即使在植株外形尚未出现症状的情况下,也可即时诊断,做到予测预报。更加科学、准确地为合理施用锌肥提供可靠的依据。

基于上述理论,本试验的目的就在于通过玉米幼苗盆栽试验,研究玉米叶片含锌量与RNA酶活性及碳酸酐酶活性的关系,并结合植株外形观察,探讨玉米缺锌的酶学诊断指标。

二、试验材料与方法

供试土壤采自西北农学院农一站大田的母质层。其农化性状见表一:

表一: 供试土壤农化性状

PH	碳酸钙 (%)	有效锌 (ppm)	有机质 (%)	全氮 (%)	碱解氮 (ppm)	有效磷 (ppm)
8.30	9.40	0.23	0.46	0.020	33.40	5.00

PH测定: 电位法。碳酸钙含量测定: 气量法。

有效锌测定: DTPA浸提, 原子吸收光谱法。

有机质测定: 重铬酸钾—硫酸氧化法。

全氮测定: 半微量开氏法。

碱解氮测定: 扩散法。

有效磷测定: 0.5M碳酸氢钠浸提, 钼锑抗显色。

供试玉米品种: 陕单九号。本试验分为不施锌 (Zn_0) 和施锌16ppm (Zn_{16}) 两个处理。随机排列, 重复4次。肥底: 尿素每盆施0.8044克。磷肥(磷酸二氢钾)每盆施0.5753克。采用12×15Cm米氏盆, 每盆装土1.5公斤, 每盆播种6粒, 留苗3株。四月九日播种, 十五日出苗, 二十一日定苗。出苗后分为: 十五天、三十天、四十五天三个生育期, 各生育期分别随机取植株鲜叶, 测定RNA酶活性、碳酸酐酶活性及含锌量。玉米生长四十五天, 六月一日收获, 在70℃下烘干称重。

酶学诊断方法:

(一) RNA酶活性的测定:

将所采玉米植株鲜叶于冰箱0—4℃下切成碎片, 均匀混合, 放入研钵内, 逐渐加蒸馏水30ml, 研至均浆(此过程应在0—4℃下进行)。然后, 将均浆转移至60ml离心管中, 按3000转/分的速度离心20分钟, 准确吸取上层酶液1ml, 注入已装有0.1% RNA溶液1ml (PH5.0, 0.1M醋酸缓冲溶液配制) 的10ml离心管中, 于29℃下保温培养1小时。再以3000转/分的速度离心20分钟, 分析溶液中的磷含量。同时, 分别吸取酶液和0.1%RNA溶液各1ml, 放入10ml离心管中, 混合后, 离心, 测定其中游离磷量。两者相减, 即为RNA酶分解RNA所释放出来的磷。测定磷的方法选用氯化亚锡还原钼兰比色法。另取同样酶液2ml, 用H₂SO₄—H₂O₂消解, 靛酚兰比色法定氮, 乘以0.25换算成蛋白质含量。

RNA酶活性以每5000 μ g蛋白质、每小时RNA酶分解RNA释放的磷(P) ppm数表示。

(二) 碳酸酐酶活性的测定

将所采回的玉米鲜叶(不同植株的采样部位应相同),在低于25 $^{\circ}$ C的温度下,切成小于1Cm的碎片,混合均匀,用吸水纸吸取叶面水分,称取200mg,置于已先注入10ml 0.2M半胱氨酸溶液的培养皿中。将培养皿放入冰箱并保持温度在0—4 $^{\circ}$ C,摇动片刻,立即将以上溶液同叶片移入试管中,该试管中预先装有0.2M磷酸缓冲液(PH6.8)4ml,0.2MNaHCO₃溶液4ml,0.002%溴百里酚兰乙醇溶液0.2ml,摇动20秒后,再置于0—4 $^{\circ}$ C的冰箱中培养240秒,然后观察指示剂颜色的变化,由淡兰色(PH6.8)转变为黄绿色表示缺锌;由淡兰色转变为绿黄色表示锌足量。此外,还测定碳酸酐酶作用后混合液的PH(电位法),以表示碳酸酐酶的活性。

(三) 植株叶片含锌量的测定

干灰化盐酸溶解,原子吸收光谱法测定。

三、试验结果与讨论

试验结果见表二、表三。

表二: 施锌对玉米各生育期叶片RNA酶活性和碳酸酐酶活性以及含锌量的影响

项 目	处 理 (ppm)	生育期 I (出苗15天)	生育期 II (出苗30天)	生育期 III (出苗45天)
RNA酶活性 (Pppm / 5000 μ g / 蛋白质 / 小时)	0	72.56	75.41	90.61
	16	49.63	37.37	38.00
	均值差	22.93**	38.04**	52.61**
	$t_{0.01} \times Sd$	15.75	11.91	9.45
含 锌 量 (ppm)	0	11.07	43.09	41.71
	16	62.00	65.15	67.59
	均值差	17.94	22.06	25.88
	$t_{0.01} \times Sd$	25.53	24.17	26.71
碳酸酐酶活性 (PH)	0	7.43	7.60	7.39
	16	7.30	7.58	7.36

注: Sd表示均数标准差。

1. 从表二可以看出,随着生育期的延长,Zn₀处理与Zn₁₆处理的玉米叶片的RNA酶活性差异和含锌量的差异越来越大。经t检验,各生育期中,玉米叶片RNA酶活性差异均达极显著水平,而叶片含锌量却没有达到显著水平。这说明玉米叶片的RNA酶活性对锌营养状况反应极为灵敏。而且,在苗期15天内,随着玉米的生长,RNA酶活性

越来越能反映玉米锌营养状况。并且玉米叶片含锌量与RNA酶活性存在着密切的负相关 ($Y = -0.7777^{**}$)，而玉米叶片含锌量与生物学产量具有密切的正相关 ($Y = 0.9173^{**}$)。因此，用RNA酶活性诊断玉米锌营养丰缺的方法是可行的。对于生育期Ⅱ以后，RNA酶活性差异情况，有待进一步研究。

表三：碳酸酐酶的显色反应与生物学产量的关系

项 目		处 理		Zn ₁₆	
		Zn ₀	Zn ₁₆	Zn ₀	Zn ₁₆
快速组织测定 的显色反应	生育期Ⅰ	黄绿色	缺锌	绿黄色	锌足量
	生育期Ⅱ	黄绿色	缺锌	绿黄色	锌足量
	生育期Ⅲ	黄绿色	缺锌	绿黄色	锌足量
生物学产量 (克/盆)		4.71		19.92	
		实差值15.21 ^{**} ($t_{0.01} \times Sd = 4.99$)			

2.从表二看出：在生育期Ⅲ时，Zn₀处理和Zn₁₆处理的植株叶片RNA酶活性差异及含锌量差异最大。Zn₀处理酶活性增加到90.61Pppm/5000μg蛋白质/小时，Zn₁₆处理的酶活性只有38.00Pppm/5000μg蛋白质/小时，相差52.61Pppm/5000μg蛋白质/小时。根据我们对各生育期玉米植株的外形观察，也得到该生育期Zn₀处理植株缺锌症状极为明显。玉米生长45天内，其缺锌症状的变化过程是：在生育期Ⅰ时，虽然Zn₀处理的玉米植株已有轻微的矮化现象，但没有出现玉米缺锌特有的白条干叶病症状。生育期Ⅰ以后，植株逐渐出现了白条干叶病症状，叶片靠主脉的下表皮失绿部分呈透明膜状。生育期Ⅱ过后，白条干叶病症状越来越严重，失绿的白干条遍布整个叶片，并且新叶以及植株生长点也开始发黄。玉米生长40天左右，整个叶片枯死。上述症状变化过程足以说明玉米生长40天左右时，是受锌影响最严重的时期。

3.Zn₀处理和Zn₁₆处理间生物学产量经t检验达到极显著差异（见表三）。在表二所列结果中，可知生育期Ⅰ时，Zn₀处理的植株叶片RNA酶活性为72.56Pppm/5000μg蛋白质/小时，Zn₁₆处理的植株叶片RNA酶活性为49.63Pppm/5000μg蛋白质/小时，两者差异极显著，但在该生育期，Zn₀处理的玉米植株还尚未出现缺锌症状，说明玉米此时是处在潜伏性缺锌时期。因此，我们初步认为，RNA酶的活性值范围：50—75 Pppm/5000μg蛋白质/小时是玉米植株潜伏性缺锌的诊断范围，可以作为预报玉米苗期缺锌的参考。RNA酶活性值低于此范围则不缺锌，高于此范围则植株外形出现明显的缺锌症状。

4.从表二可看出：PH随叶片含锌量的增加而有下降的趋势。在生育期Ⅰ时，两处理间的PH差值最大，说明在植株外形尚未出现缺锌症状时，已潜伏着锌的不足。从各生育期碳酸酐酶快速组织测定法的显色反应看（见表三），凡是Zn₀处理的植株的显色反应均为黄绿色，表示缺锌。而Zn₁₆处理的植株的显色反应均为绿黄色，表示锌足量。

这种颜色的变化,以生育期Ⅱ和生育期Ⅲ最为明显。而此时也正是缺锌症状由不明显到明显。因此,碳酸酐酶活性的诊断与植株外形观察以及RNA酶活性的诊断结果是一致的。但碳酸酐酶活性的诊断,特别是快速组织测定法更为简便,有利于大田应用。

四、结 论

根据本试验所得结果,我们认为,RNA酶活性的测定,可以作为玉米潜伏性缺锌的诊断方法。并初步将RNA酶活性50—75Pppm/5000 μ g蛋白质/小时作为预报玉米苗期缺锌的参考。碳酸酐酶作为玉米潜伏性缺锌的快速组织测定法是可行的。

参 考 资 料

- (1) 《农业科技译丛》1980年4期 湖南农学院 湖南农科院编。
- (2) 《植物营养的酶学诊断》(交流资料)浙江农业大学孙羲编。
- (3) 《土壤与植物营养》第一集 中国科学技术情报研究所重庆分所编。
- (4) 《土壤农化分析》南京农学院主编。
- (5) 《农业化学分析》西北农学院农化组编
- (6) 《植物生理》北京农业大学主编。