Aktywność reduktazy azotanowej w zdrowych i zakażonych wirusem X liściach tytoniu

Nitrate reductase activity in healthy and virus X infected tobacco leaves

EDWARD POJNAR

Zasadniczym pożywieniem azotowym dla organizmów roślinnych są związki mineralne w postaci jonu amonowego i azotanowego. Jon amonowy jest bezpośrednio wbudoawny w α -ketokwasy i wprowadzany w cykl przemian azotowych rośliny. Jon azotanowy ulega najpierw redukcji do amoniaku (Nowotny 1964). Według Mayera i Schultze'go (1894) redukcja azotanu do amoniaku przebiega w następujący sposób:

Pierwszy etap redukcji azotanu do azotynu katalizuje enzym reduktaza azotanowa, działający w obecności molibdenu, jako czynnego aktywatora. Jest rzeczą charakterystyczną, że rośliny gromadzić mogą w pewnych warunkach znaczne ilości azotanu, podczas gdy azotyn ulega nagromadzeniu w roślinie tylko w wyjątkowych wypadkach. I tak na przykład rośliny przy niedostatku molibdenu gromadzą duże ilości azotanu, który ulega redukcji do azotynu w przeciągu zaledwie kilku godzin, po dostarczeniu roślinom molibdenu (Hageman, Cresswell i Hewitt 1962; Hewitt, Huckleby i Betts 1968). Z pośrednich związków procesu redukcji azotanu do amoniaku — hydroksylamina jest najbardziej kontrowersyjna. Wprawdzie obecność hydroksylaminy w tkankach roślin wyższych stwierdza wielu autorów (Hewitt, Huckleby i Betts 1968), ale Wood (1953) w krytycznym résumé konkluduje, że hydroksylamina jest wysoce toksyczna i nie może być obecna w znacznych ilościach w roślinie. Według Hewitta, Huckleby i Bettsa (1968) redukcja azotanu do amoniaku jest niezależna od hydroksylaminy, ale hydroksylamina przypuszczalnie pełni specjalną rolę czynnika regulującego metabolizm rośliny.

Zakażenie wirusowe rośliny powoduje zaburzenia w zachodzących procesach życiowych rośliny zarówno z powodu powstawania w komórkach roślinnych obcej substancji, jak i reakcji protoplastu (a tym samym

całego organizmu roślinnego) na inwazję obcego czynnika (Kozłowska 1960).

Wykazanie, w jakim stopniu zakażenie tytoniu wirusem X odbija się na pierwszym etapie syntezy azotowej w roślinie, a w szczególności na aktywności reduktazy azotanowej, jest celem niniejszej pracy.

MATERIAŁ I METODYKA

Doświadczenia prowadzono na roślinach tytoniu *Nicotiana tabacum* var. 'White Burley', zdrowych i zakażonych szczepem S wirusa X (Salaman 1938).

Ekstrakcji enzymów z liści tytoniu dokonywano, podobnie jak Sanderson i Cocking (1964), rozcierając materiał roślinny w oziębionym do -10°C moździerzu. Jak wynika bowiem z doświadczeń Candella, Fishera i Hewitta (1957), prowadzonych na roślinach pomidora, ten sposób ekstrakcji daje podobny efekt jak rozcieranie materiału roślinnego przy użyciu urządzeń zmechanizowanych. Środowisko ekstrakcyjne dla materiału roślinnego stanowił oziębiony bufor fosforanowy o pH 7,0 z dodatkiem 2×10^{-3} m cysteiny. Stosowano na jedną część wagową rośliny 4 części buforu fosforanowego. Roztarty materiał rośliny wirowano przez 20 minut przy 3000 obr./min., w temperaturze $0-4^{\circ}\text{C}$, a zebrany płyn znad osadu stanowił surowy materiał enzymatyczny.

Aktywność reduktazy azotanowej oznaczano mierząc nagromadzony azotyn po reakcji. Inkubację tlenową prowadzono w otwartych probówkach, które podgrzewano przez 30 minut na łaźni wodnej w temperaturze 28°C .

Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiał się następująco:

0,5 ml 0,1 m buforu fosforanowego o pH 7,0

0,1 ml 0,1 m NaNO_3

0,1 ml 2 mg/ml NADH

0,2 ml surowego enzymatycznego preparatu.

Dodatek enzymatycznego preparatu do kompletnej mieszaniny reakcyjnej rozpoczynał inkubację. Probówki z mieszaniną reakcyjną bez zredukowanego dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego stanowiły kontrole. W tego rodzaju kontroli nie stwierdzano obecności aktywnego enzymu, podobnie jak i w kontrolach z preparatami enzymatycznymi, gotowanymi przez 3 minuty na wrzącej łaźni wodnej.

Inkubację zatrzymywano dodając do probówek z mieszaniną reakcyjną: 0,2 ml 1 m octanu cynku oraz 5 ml 90% etanolu. Po wymieszaniu zawartości probówek i odwirowaniu przez 5 minut przy 3 200 obr./min., w płynie nad osadem oznaczano zawartość NO_2 . W tym celu do 2,0 ml

płyну znad osadu dodawano 1 ml 1% sulfanilamidu w 1 n HCl i 1,0 ml 0,01% dwuchlorowodoru N-1-naftyłu-etyleno-dwuaminy. Następnie po starannym wymieszaniu pozostawiano próbki na 30 minut w spokoju, po czym oznaczano NO_2 na „Specolu” prod. C. Zeissa, Jena, przy długości fali 540 m μ , posługując się standardową krzywą dla NO_2 .

Aktywność enzymatyczną wyrażano w m μ molach wytworzonego azotynu/mg białka, w ciągu 1 godziny.

Białko w preparatach enzymatycznych oznaczano metodą Lowry i in. (1951).

WYNIKI

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że na aktywność reduktazy azotanowej wywiera wpływ: 1) ilość cysteiny w buforze ekstrakcyjnym, 2) pH buforu, 3) poziom azotanów w pożywce, 4) wiek liści.

Ad 1. Ustalono optymalne stężenie chlorowodoru cysteiny w buforze ekstrakcyjnym dla reduktazy azotanowej z liści tytoniu wynosi 2×10^{-3} m (ryc. 1).

Ryc. 1. Wpływ ilości chlorowodoru cysteiny w buforze fosforanowym na aktywność reduktazy azotanowej z liści tytoniu

Effect of cysteine HCl quantity in phosphate buffer on nitrate reductase activity from leaves of *Nicotiana tabacum*

Ad 2. Aktywność reduktazy azotanowej zmienia się w zależności od pH buforu fosforanowego, sporządzonego według przepisu Colowicka i K a p l a n a (1955). Reduktaza azotanowa z liści tytoniu wykazuje najwyższą aktywność w buforze fosforanowym o pH 7,0 (ryc. 2).

Ad 3. Aktywność reduktazy azotanowej jest nieznaczna w roślinach hodowanych na glebie, w której zawartość azotanów jest mała. Jak wynika z tabeli 1, po kilkudniowym podlewaniu roślin pożywką Long Ash-

Tabela 1 — Table 1

Wpływ żywienia azotowego i wieku liści
na aktywność reduktazy azotanowej
The effect of nitrate feeding and age of leaves
on the activity of nitrate reductase

Liście Leaves	(Aktywność (mμ mole NO ₂ /mg białka/godz.) Activity (mμ moles NO ₂ accumulated /mg drotein/h)		
	O*	3*	5*
6	7.8	96.1	113.0
5	18.4	107.1	127.2
4	7.5	58.6	53.9
3	2.1	1.6	1.7
2	0.8	1.0	1.1
1	0.5	0.3	0.2

* Liczba dni, w których rośliny podlewano azotanową pożywką Long Ashton

* Number of days in which the plants watered with Long Ashton nutrient solution

ton (Hewitt 1952), w której ilość azotanów została podwojona (tab. 2), aktywność tego enzymu wyraźnie wzrasta, w stosunkowo krótkim czasie, po podlaniu podwójnie azotanową pożywką.

Tabela 2 — Table 2

Skład podwójnie azotanowej pożywki Long Ashton
(Hewitt 1952)

Long Ashton nutrient solution in which the nitrate had
been doubled (Hewitt 1952)

Nr No.	Składniki Components	g/l	ml roztworu podstawo- wego/l ml of base solution/l
1	KNO ₃	202	2
2	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	427	4
3	MgSO ₄ 7H ₂ O	184	2
4	NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	208	1
5	MNSO ₄ 4H ₂ O	4,46	0,5
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,50	
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,58	
	H ₃ BO ₃	3,72	
	(NH ₄)MoO ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,07	
6	Fe(C ₆ H ₅ O ₇)	49	0,5

Ryc. 2. Wpływ pH buforu fosforanowego na aktywność reduktazy azotanowej z liści tytoniu
Effect of pH of phosphate buffer on nitrate reductase activity from leaves of *Nicotiana tabacum*

Ad 4. Znaczne różnice w aktywności reduktazy azotanowej obserwowano w ekstraktach enzymów z poszczególnych liści, różniących się wiekiem. Najbardziej aktywne były ekstrakty z liści młodych oraz z liści będących w pełni rozwoju (np. liść piąty z roślin w stadium sześciu liści). Natomiast ślady aktywności enzymatycznej wykazują liście starsze (tab. 1).

Opierając się na podanych wyżej danych, w których aktywność reduktazy azotanowej jest najwyższa, w badaniach nad wpływem zakażenia wirusem X na aktywność reduktazy azotanowej w liściach tytoniu brano liście zdrowe i zawirusowane o najwyższej aktywności, to jest liście piąte z roślin w stadium sześciu liści. Stężenie chlorowodoru cysteiny w buforze ekstrakcyjnym wynosiło 2×10^{-3} m, a pH buforu fosforanowego 7,0. Doświadczenia prowadzono w dwóch seriach; w pierwszej badano aktywność reduktazy azotanowej w całych liściach szczepionych wirusem X i w kontrolnych zdrowych liściach, pochodzących z roślin będących w tym samym stadium rozwojowym co rośliny szczepione wirusem X. W drugiej serii brano do badań połówki piątego liścia, szczepione i nie szczepione wirusem X. Liście po inokulacji pozostawiano na roślinach.

Dla wyeliminowania ewentualnego wpływu zranienia na aktywność reduktazy azotanowej, pocierano całe liście lub nie szczepione połówki liścia taką samą ilością karborundu, jaką stosowano szczepiąc liście wirusem X.

W wypadku, gdy zakażano wirusem X cały liść rośliny tytoniu, obserwowano w początkowej fazie zakażenia (gdy objawy zewnętrzne nie były jeszcze widoczne, ale zaistniałe zakażenie można było stwierdzić roślinami testowymi) wzrost aktywności reduktazy azotanowej w porównaniu z liśćmi roślin zdrowych (ryc. 3). Z chwilą pojawienia się nie-

Ryc. 3. Aktywność reduktazy azotanowej w szczepionych (1) i nie szczepionych (2) wirusem X liściach tytoniu

Rośliny podlewano podwójnie azotanową pożywką Long Ashton

Podlewano podwójnie azotanową pożywką Long Ashton (Hewitt 1952)

Nitrate reductase activity in *Nicotiana tabacum* leaves. Plants inoculated (1) and uninoculated (2) by virus X

Nutrient: Long Ashton solution in which the nitrate was doubled

Ryc. 4. Aktywność reduktazy azotanowej połówek liści szczepionych (1) i nie szczepionych (2) wirusem X

Rośliny podlewano pożywką, w której ilość azotu nie została podwojona

Nitrate reductase activity in halves of *Nicotiana tabacum* leaves. Plants inoculated (1) and uninoculated (2) by virus X

Solution with doubled nitrate was not used

znacznych plam nekrotycznych na zakażonych liściach tytoniu — aktywność reduktazy azotanowej spada w porównaniu ze zdrowymi kontrolnymi liśćmi. W miarę stopniowego powiększania się plam nekrotycznych,

obserwuje się dalszy spadek aktywności reduktazy azotanowej w liściach zakażonych.

W doświadczeniach prowadzonych na połówkach liści kontrolę stanowił nie liść zdrowy drugiej rośliny, będącej w tym samym stadium rozwojowym, ale nie szczepiona połówka tego samego liścia. Ponadto jedne rośliny tytoniu rosły na ziemi kompostowej, nie zasilanej pożywką, a drugie podlewane były podwójnie azotanową pożywką Long Ashton. Aktywność reduktazy azotanowej badano codziennie przez osiem dni, w połówkach liści szczepionych jak i nie szczepionych wirusem X. W roślinach, które nie były podlewane podwójną azotanową pożywką Long Ashton aktywność reduktazy azotanowej w pierwszym dniu po szczepieniu jest prawie taka sama zarówno w połówce szczepionej, jak i nie szczepionej, natomiast w drugim dniu wyraźnie wzrasta w połówce zakażonej. W trzecim dniu, w którym pojawiają się już czasem słabe objawy zakażenia lokalnego wirusem X, aktywność w obu połówkach się wyrównuje i od czwartego dnia zaczyna się obniżać. Spadek aktywności reduktazy azotanowej jest jednak znacznie silniejszy w zakażonych połówkach liści (ryc. 4).

W wypadku, gdy rośliny podlewano podwójnie azotanową pożywką

Ryc. 5. Aktywność reduktazy azotanowej połówek liści szczepionych (1) i nie szczepionych (2) wirusem X

Rośliny podlewano podwójnie azotanową pożywką Long Ashton

Nitrate reductase activity in halves of *Nicotiana tabacum* leaves. Plants inoculated and uninoculated by virus X

Nutrient: Long Ashton solution in which nitrate was doubled

Long Ashton, różnice w aktywności reduktazy azotanowej, między szczepionymi połówkami liśćmi i nie szczepionymi — zaznaczały się wyraźniej i to zaraz w pierwszym dniu po zakażeniu i utrzymywały się przez drugi i trzeci dzień (ryc. 5). W czwartym dniu, kiedy objawy nekrotyczne były już wyraźnie widoczne, następował spadek aktywności reduktazy azotanowej, a różnice w aktywności między połówką szczepioną i nie szczepioną były znacznie większe niż w doświadczeniach, w których rośliny nie podlewano podwójnie azotanową pożywką Long Ashton.

DYSKUSJA

Optymalne stężenie cysteiny w buforze ekstrakcyjnym dla reduktazy azotanowej z liści tytoniu waha się w granicach od 2×10^{-3} do 3×10^{-3} m. Cysteina zabezpiecza reduktazę azotanową przed inaktywacją przez polifenolową oksydazę (Pojnar i Cocking 1964).

Optymalne pH dla reduktazy azotanowej z liści tytoniu wynosi pH 7,0, i jest bardzo zbliżone do ustalonych optymalnych wartości dla reduktazy z innych roślin wyższych jak na przykład z liści dyni — pH 7,5 (Cresswell 1961), z liści kalafiora — pH 7,2 (Cadella, Fisher i Hewitt 1957), z liści pomidora — pH 6,5 (Pojnar i Cocking 1964), czy z soi — pH 6,0 (Ewans i Nason 1953).

Aktywność reduktazy azotanowej w roślinach uzależniona jest od obecności azotanów w podłożu. Czy mamy tu do czynienia ze zwiększaniem się ilości enzymu w tych warunkach, czy też występujący tu „rezerwowowy” enzym ulega aktywowaniu, na to pytanie nie można dać jeszcze ścisłej odpowiedzi (Maksimow 1951).

Aktywność reduktazy azotanowej jest niska w starszych liściach. Przypuszcza się, że zachodzi tu przemieszczenie się enzymu z liści starzejących się do liści młodych albo w liściach starszych enzym ulega stopniowej inaktywacji.

Zakażenie wirusem X liści tytoniu odbija się wyraźnie na pierwszym etapie syntezy azotowej w roślinie, w czasie której zachodzi redukcja azotanu do azotynu. Wydaje się, że obserwowany wzrost zawartości wolnych aminokwasów w zakażonych wirusem X liściach tytoniu, w piątym dniu po zakażeniu (Pojnar 1962) oraz w siódmym dniu (Kozłowska i Komusiński 1958) jest związany z wzrostem aktywności reduktazy azotanowej, dzięki której nowe ilości azotanów włączane są w cykl przemian azotowych rośliny.

Aktywność reduktazy azotanowej podnosi się w pierwszym albo drugim dniu po szczepieniu w zakażonych wirusem X liściach tytoniu. Zaistniały wzrost aktywności reduktazy azotanowej utrzymuje się przez

około 3 dni, po czym spada dość szybko z chwilą pojawienia się plam nekrotycznych na zakażonych liściach. W miarę pojawiania się coraz większej ilości plam nekrotycznych, obserwuje się dalszy spadek aktywności reduktazy azotanowej w liściach zakażonych, co niewątpliwie wiąże się z osłabionym przebiegiem syntezy w roślinie, w związku z zamieraniem komórek roślinnych.

W doświadczeniu z całymi liśćmi, aktywność reduktazy azotanowej w liściach zdrowych, nie szczepionych, stanowiących kontrolę, utrzymuje się w piątym, jak i dalszych dniach, licząc od momentu szczepienia roślin, na tym samym dość wysokim poziomie. Tymczasem w doświadczeniach, w których szczepiono połowę liścia, obserwuje się w czwartym dniu i następnych dniach spadek aktywności reduktazy azotanowej zarówno w szczepionej, jak i w nie szczepionej połowce liścia. To obniżenie aktywności reduktazy azotanowej spowodowane jest rozprzestrzenianiem się infekcji wirusowej na nie szczepioną połowę liścia.

STRESZCZENIE

Aktywność reduktazy azotanowej w liściach tytoniu *Nicotiana tabacum* var. 'White Burley' maleje z wiekiem liści. W wypadku zakażenia roślin tytoniu wirusem X aktywność reduktazy azotanowej wyraźnie wzrasta w pierwszych dniach w zainfekowanych miejscach, a z chwilą pojawienia się plam nekrotycznych aktywność reduktazy azotanowej obniża się dość szybko. Intensywniejsze żywienie azotanowe roślin — przyczynia się do wcześniejszego wzrostu aktywności reduktazy azotanowej w liściach zakażonych wirusem X.

Katedra Botaniki WSR,
Kraków, al. Mickiewicza 21

(Wpłynęło 2.5.1969 r.)

SUMMARY

Nitrate reductase activity in the leaves of *Nicotiana tabacum* var. 'White Burley' decreases with the age of the leaves.

When tobacco plants are infected by virus X, nitrate reductase activity increases very significantly in the infected centres, during the first days of infection, and when local lesions appear on the leaves, nitrate reductase activity decreases rapidly. A more intensive nitrate feeding causes an early increase of the activity of nitrate reductase in the leaves infected by virus X.

LITERATURA

Candella M. I., Fisher E. G., Hewitt I. J., 1957, Molybdenum as plant nutrient. X. Some factors affecting the activity of nitrate reductase in cauliflower plants grown with different nitrogen sources and molybdenum levels in sand cultures, *Plant Physiol.*, 32: 280—288.

- Colowick S. P., Kaplan N. O., Preparation of buffers for use in enzyme studies, w: *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., Nowy Jork, 1955.
- Cresswell C. F., 1961, An investigation into the nitrate, nitrite and hydroxylamine metabolism in higher plants, Ph. D. Thesis, University of Bristol, Anglia.
- Evans H. J., Nason A., 1953, Pyridine nucleotide nitrate reductase from extracts of higher plants, *Plant Physiol.* 28: 233—254.
- Hageman R. H., Cresswell C. F., Hewitt E. J., 1962, Reduction of nitrate, nitrite and hydroxylamine to ammonia by enzymes from higher plants, *Nature* 193: 247—250.
- Hewitt E. J., 1952, Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition, Tech. Comm. No. 22 of the Commonwealth Bur. of Hort. and Plantation Crops., East Malling, Maidstone, Kent.
- Hewitt E. J., Hucklesby D. P., Betts G. F., 1968, Nitrate and hydroxylamine in inorganic nitrogen metabolism with reference principally to higher plants, w *Recent Aspect of Nitrogen Metabolism in Plants*, Academic Press, London 1968.
- Kozłowska A., Komusiński W., 1958, The change of free amino-N and total N in potato X virus infected and non infected tobacco seedlings during their development, *Acta Biologica Cracoviensia* 1: 115—121.
- Kozłowska A., *Wirusy roślinne w Wirusologii ogólnej*, PWN, Warszawa 1960.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr H. L., Randall R. J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265—275.
- Maksimow M., 1950, *Fizjologia roślin*, PWRiL, Warszawa.
- Mayer V., Schulze E., 1894, *Ber.* 17: 1554.
- Nowotny F., 1964, *Zarys biochemii dynamicznej*, PWN, Warszawa.
- Pojnar E., 1962, Changes occurring in free amino-acid composition of healthy and virus X-infected tobacco leaves, *Acta Biologica Cracoviensia* 5: 171—179.
- Pojnar E., Cocking E. C., 1964, The effect of cysteine on nitrate and nitrite reductases from tomato leaves, *Biochem. J.* 91: 29.
- Salaman R. N., 1938, The potato virus X, its strains and reactions, *Phil. Trans., Londyn* 229: 137.
- Sanderson G. W., Cocking E. C., 1964, Enzymic assimilation of nitrate in tomato plants. I. Reduction of nitrate to nitrite, *Plant Physiol.* 39: 416—422.
- Wood J. G., 1953, *A. Rev. Plant Physiol.* 4: 1.