

# 应用酸性磷酸酶进行番茄磷素诊断

林启美\*

黄德明

(北京市农林科学院土壤肥料研究所, 北京 100031)

## 摘 要

本文旨在探索用叶片中酸性磷酸酶活性 (APA) 进行番茄磷素诊断。

研究发现: 叶饼法 (6 叶饼或12叶饼) 三个反应时间 (15、30和60分钟) 所测出的功能叶片的APA与叶片的磷含量 (P%)、全株 (不包括根系) 的 P 含量 (P%) 及植株干重都呈极显著负相关 ( $P < 0.01$ )。匀浆法只有15分钟所测定的功能叶片APA与它们呈极显著负相关 ( $P < 0.01$ )。此法比起测定植株体内磷的含量要快速简单得多, 平均每15分钟测定一个样, 很适用于生产实践。但由于APA不但受P营养状况、株龄及环境因子的影响, 而且受测定条件的控制, 要建立一个定量的实用的APA指标还相当艰难。

**关键词** 番茄 酸性磷酸酶 叶饼法 匀浆法

酸性磷酸酶是植物体内比较重要的酶类之一, 在碳水化合物转化及蛋白质的合成中起着重要的作用, 与土壤有机磷的分解利用及植株体内磷的再利用有密切关系 [6]。大量研究表明: 番茄、黄瓜、小麦和玉米等许多作物, 只有当磷供给不足时, 植株的叶片、根, 甚至全株的APA都显著提高, 其他元素缺乏或中毒对APA没有显著影响 [3, 4]。所增加的酶活性主要在易损坏的组织上 [1, 6, 10]。小麦 [9] 的以及黄瓜 [2]、番茄 [5] 的叶片或根的APA与其吸收磷量都呈很好的相关性, 并且用简单的叶饼法测定叶片的APA, 也能指示番茄植株P的营养状况 [7]。但 Ellioff, G. C. 和 Lauchli, A. (1986) [8] 发现叶饼法只适用于严重缺磷的情况。但是他们的酶活性测定方法各异, McLachlan, K. D. 在20℃恒温下, 培养反应液60分钟; Besford, R. T. 在30℃下培养15分钟; 况且此酶促反应明显存在三个不同的阶段。为此, 测定不同反应时间的APA, 及其与生物量因子的相关性研究是非常必要的, 以便寻找出测定APA的最佳反应时间及方法。

## 材料和方法

### 一、供试材料和培养试验

供试作物为番茄佳粉2号。

培养试验: 基质为过2 mm筛、稀硫酸洗过的炉灰渣(pH约为6.5)。盆钵为不透水的铁搪瓷盆(直径15cm, 高15cm)。磷用量每盆分别施0.04、0.08、0.15、0.25、0.35克磷,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 为磷源, 通过浇水一次施入。 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 每盆用1.5克,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ 每盆用2.0克, 分三次通过浇水施入, 浇自来水。2片真叶时移栽, 每盆3株。6~7片真叶时取样, 3株为一个样, 测定功能叶的APA和磷含量, 并计植株干重。

## 二、酶活性分析方法

### 1. 叶饼法

鲜叶用蒸馏水洗净吸干后, 用打孔器(直径6 mm)取6个叶饼或12个叶饼, 立即放入含5 ml pH5.8、浓度为50mmol的醋酸-醋酸钠缓冲溶液和5 ml 5 mmol对硝基苯磷酸二钠溶液的培养皿中, 在30℃恒温培养箱中保持15、30、60分钟, 加入1 ml 1 mol NaOH溶液终止反应, 405nm下比色。同时做空白对照, 即在加入叶饼前加碱液。

### 2. 匀浆法

取一定量的鲜叶洗净吸干后, 加入10ml缓冲溶液, 用玻璃组织研磨器研成匀浆状, 室温下离心(4000转/分)10分钟, 取适当稀释的上清液1 ml, 测定APA(测法同上)。

## 结果与讨论

从APA的绝对值看(图1), 无论植株缺磷与否, 反应时间越长, 三种方法所测的APA值越大。匀浆法是叶饼法的100倍以上, 6叶饼法是12叶饼法的2倍以上。酶促反应速度的变化也与此相似(表1)。从不同反应时间的反应速度变化来看, 15和30分钟时反应速度很

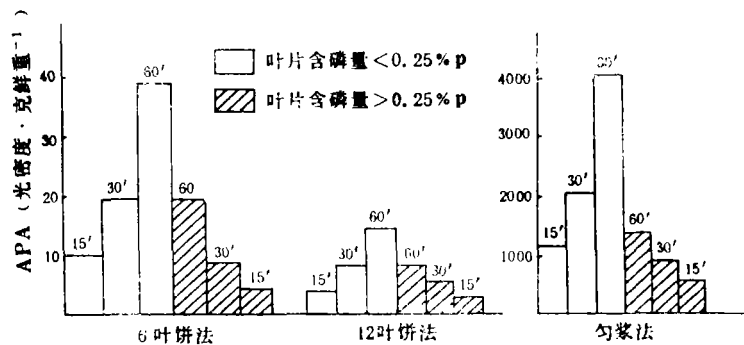


图1 不同测定方法和反应时间的APA(均值)

接近, 亦即30分钟内酶促反应几乎匀速进行, 60分钟时才降下来。当用叶饼法测定APA时, 反应速度的降低幅度(比起15分钟时测定的酶活性)缺磷叶片比不缺磷叶片要大。例外的是6叶饼法测定不缺磷叶片的酶活性时, 60分钟时反应速度反而升高。匀浆法与此相反, 不缺磷叶片的酶促反应速度降低比缺磷叶片要大。再从15~30分钟和30~60分钟酶活性增加速度来看, 匀浆法比叶饼法要大。6叶饼法比12叶饼法大。但三种方法测定缺磷叶片的酶活性

表1 不同测定APA方法和时间的酶促反应速度

项 目		6 叶 饼 法		12 叶 饼 法		匀 浆 法	
		- P	+ P [a]	- P	+ P	- P	+ P
反应速度(光密度·克鲜重 <sup>-1</sup> 分 <sup>-1</sup> )	15'	0.72	0.26	0.25	0.15	65.88	22.21
	30'	0.67	0.24	0.24	0.14	65.90	21.34
	60'	0.61	0.28	0.22	0.14	61.54	16.55
APA增加速度	15~30'	0.627	0.211	0.217	0.128	65.917	20.483
	30~60'	0.542	0.331	0.205	0.133	57.190	11.762
速度降低的百分率	15~60'	15%	7.7%(+)[b]	12%	6.6%	6.6%	25.5%

[a] - P: 叶片含P量<0.25% + P: 叶片含P量>0.25% [b] (+): 速度增加的百分率

时, 其速度增大的趋势相同, 即15~30分钟大于30~60分钟。不缺磷叶片的情况则相反, 叶饼法30~60分钟的APA增大速度大于15~30分钟的APA增大速度; 匀浆法15~30分钟的APA增大速度大于30~60分钟时APA的增大速度。究其造成这些差异的原因, 首先是由于匀浆法所测定的是整个叶片的酶活性, 而叶饼法测定APA时, 酶促反应主要在叶饼的边缘和表皮细胞组织中进行。所以无论缺磷与否, APA的绝对值、酶促反应速度等, 匀浆法都比叶饼法要大。并且由于其酶量大, 30分钟内反应几乎匀速进行, 缺磷叶片更明显; 60分钟时反应速度才降下来。用叶饼法测定APA时, 由于不缺磷叶片有胞内酶参与反应, 所以60分钟时酶促反应速度降低慢于缺磷叶片, 6叶饼法甚至提高; 30~60分钟的APA增大速度也大于15~30分钟时APA的增大速度。而缺磷叶片由于胞外酶活性高, 反应速度变化很慢。12叶饼法由于叶饼量增大, 虽然酶总量增多, 但浓度相对降低。故单位鲜重的酶活性及反应速度都比6叶饼法要低, 并且变化也很小。

Bieleski, R. L. 等发现磷不足时, 植株体内的APA成倍增加。从我们的研究结果来看(图2),  $APA - P / APA + P$  的比值匀浆法为3~4, 60分钟时最大, 15和30分钟较接近。6叶饼法为2~3, 30分钟时最大, 但与15分钟时的比值差异很小, 60分钟时由于不缺磷叶片有胞内酶参与反应, 酶促反应速度升高,  $APA - P / APA + P$  的比值降低。12叶饼法的  $APA - P / APA + P$  为1~2, 三个反应时间的比值很接近。从营养诊断的角度来看,  $APA - P / APA + P$  的比值越大, 越有利于区别植株磷的丰缺状态, 此法亦越敏感。由此可见, 匀浆法比叶饼法要好, 其中6叶饼法优于12叶饼法; 匀浆法以60分钟最好, 叶饼法15或30分钟皆可。

从功能叶的APA与其磷含量(P%)、全株磷含量(P%)或干重的相关性来看(表2),

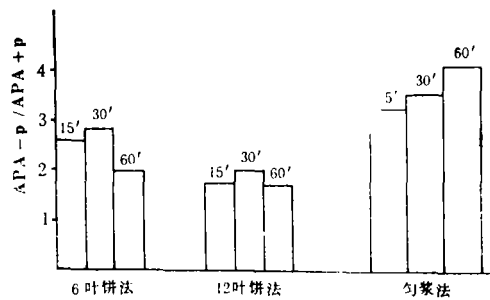


图2 不同测定方法和反应时间的  $APA - P / APA + P$

表2 APA与叶片含P量(P%) 全株含P量(P%) 及干重的相关系数

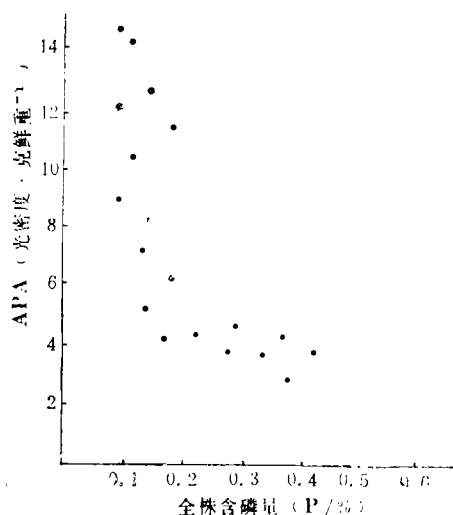
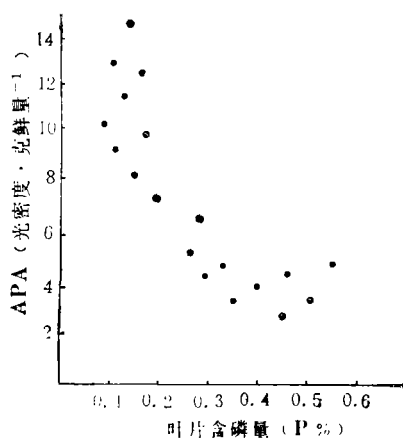
项 目	6 叶 饼 法			12 叶 饼 法			匀 浆 法		
	15'	30'	60'	15'	30'	60'	15'	30'	60'
叶片含磷量(P%)	-0.7152	-0.7204	-0.7571	-0.7239	-0.7237	-0.7046	-0.7043	-0.6333	-0.5681
植株含磷量(P%)	-0.7065	-0.7123	-0.7279	-0.7025	-0.7219	-0.6393	-0.6918	-0.5913	-0.5513
植株干重	-0.6832	-0.6843	-0.6823	-0.6857	-0.6839	-0.6823	-0.6932	-0.5789	-0.5498

P &lt; 0.01 r = 0.6787

P &lt; 0.05 r = 0.4438

叶饼法的相关性都达到极显著水平, 12叶饼法略好于6叶饼法。匀浆法只有15分钟时所测的APA与它们呈极显著负相关, 30和60分钟只达到显著水平。这似乎与上述的结果相矛盾, 其原因是12叶饼法所测的 $\text{APA} - \text{P} / \text{APA} + \text{P}$ 较小, 但叶饼增多, 代表性提高, 相关性也相应提高。而匀浆法由于胞内酶参与反应(尤其反应时间长时), 从而夸大了缺磷所增加的酶活性, 这样就降低了相关系数。由此也说明缺磷时, 酶活性主要在质膜外, 测定活组织细胞膜外的酶活性完全可以反映植株磷的营养状况。

从图3和图4可以看出, 叶片含磷量低于0.25%时, APA值直线上升, 说明此时酶对叶片磷含量的变化极为敏感, 这正符合营养诊断的目的。此时APA值分别为: 6叶饼: 4.5 (15分钟)、8.5 (30分钟) 和17 (60分钟) 光密度·克鲜重<sup>-1</sup>; 12叶饼为2.5、4.7、8.2; 匀浆法为400、950和1800。全株含磷量 < 0.2%时, APA直线上升, 植株干重则直线下降。

图3 叶片APA与叶片含磷量的关系  
(6叶饼15分钟)图4 叶片APA与全株含磷量的关系  
(6叶饼15分钟)

## 小 结

目前医学上已广泛应用测定体液的酶活性进行疾病的诊断。植物的酶学诊断起步较晚,无论是研究酶的种类,还是分析方法和手段都大大落后于医学。我国目前尚无人涉足于此领域。国外也仅近十年来才有些报道,但测定酶活性大都用低温高速离心分离酶液,这显然不适用于生产。虽然有人直接测定活组织的酶活性,但与生物量因子的相关研究较少。从我们的研究结果来看,直接测定活组织的酶活性(即叶饼法)与植株含磷量等的相关性很好,并且用室温下常规离心(4000转/分)分离酶粗液测定APA,也能很好地指示植株磷的营养状况,且更适用于生产。但由于缺乏田间校验,并且还有许多问题,如不同品种,不同栽培条件,采样时间以及测定APA条件等等,尚有待深入探索。

## 参 考 文 献

- [1] Bielecki, R. L., Johnson, P. N.: The external location of phosphatase activity in phosphorus-deficiency *Spirodela oligirrhiza*, *Austr. J. Biol. Sci.*, 1972 (25): 707—720
- [2] Besford, R. T.: A phosphatase as a potential indicator of the P status of the glass-house cucumber (*cucumis sativas*), *J. Sci. Ed. Agric.*, 1973 (29): 87—91
- [3] Besford, R. T.: Nutrient imbalance in tomato plants acid phosphatase activity in the leaves, *J. Sci. Ed. Agric.*, 1979 (30): 275—280
- [4] Besford, R. T.: Phosphorus nutrition and acid phosphatase activity in the leaves of seven plant species, *J. Sci. Ed. Agric.*, 1979 (30): 281—285
- [5] Besford, R. T.: Quantitative aspects of leaf acid phosphatase activity and the P status of tomato plants, *Ann. Bot.*, 1979 (44): 153—161
- [6] Besford, R. T., Syred, A. D.: Effect of phosphorus nutrition on the cellular distribution of acid phosphatase in the leaves of *lyopersicon esculentan*, *L. Ann. Bot.*, 1979 (43): 431—435
- [7] Besford, R. T., A rapid tissue test for diagnosing phosphorus deficiency in the tomato plant, *Ann. Bot.*, 1980 (45): 225—227
- [8] Elliot, G. C., Lauchli Andre: Evaluation of an acid phosphatase assay for detection of phosphorus deficiency in leaves of maize, *J. Plant Nutri.*, 9 (11) 1986: 1469—1477
- [9] McLachlan, K. D.: Leaf acid phosphatase activity and the P status of field-grown wheat, *Austr. J. Agric. Res.*, 1982 (33): 435—454
- [10] Reid, M. S., Bielecki, R. L.: Changes in phosphatase activity in P-deficiency *spirodela*, *Planta*, 1970 (94): 273—281

## Evaluation of an Acid Phosphatase Assay for Detection of Phosphorus Deficiency in Tomato Leaves

Lin Qimei    Huang Deming

*(Soil and Fertilizer Institute, Beijing Academy of Agriculture and Forest Sciences, Beijing 100081)*

### Abstract

Leaf acid phosphatase activity (APA) is used to diagnose P deficiency in tomato leaves. Results showed that there were significant negative correlations ( $P < 0.01$ ) between the enzyme activity tested with the leaf disc methods and the P concentration in the leaves or whole plants or the dry weight of tomato. Very significant negative correlation ( $P < 0.01$ ) was found in the 15 minutes reaction time with the homogenised leaves method between the enzyme activity and the other 3 elements mentioned above. The assay of the enzyme either with the leaf disc method or with the homogenised leaves method is simple and rapid. Therefore, it can be used to detect P deficiency in the tomato plant. APA is not only affected by P status, plant age and environment, but also by PNPP, pH, temperature and reaction time. So there are many problems to be solved before setting up a critical value for the enzyme activity.

**Key words:** Tomato; Acid phosphatase; Leaf disc method; Homogenised leaves method