

短日照对浮萍植物中过氧化物酶 和硝酸还原酶活性的影响*

罗定泽 赵佐成[†]

(四川师范大学生物系, 成都 610066)

([†]中国科学院成都生物研究所, 成都 610015)

提 要

短日照处理引起 *Lemna minor* 的两个日长反应不同的品系, 以及 *Lemna paucicostata* 6746 中硝酸还原酶的体外活性下降。在 *L. minor* G1 和 *L. paucicostata* 6746 两个短日品系中, 短日照导致过氧化物酶活性和抗坏血酸含量水平增高。其抗坏血酸含量水平与过氧化物酶的活性水平具有平行增长关系。对日长不敏感的品系 *L. minor* G2 中过氧化物酶活性在短日下呈现强烈起伏和随后的衰减。其抗坏血酸含量水平在同期表现连续下降。对两个 *L. minor* 品系中过氧化物酶同工酶的比较表明, 在不敏感品系中缺乏迁移最快的阴离子酶带, 而同一酶带存在于短日照品系中, 并呈现明显的被诱导变化。

关键词 浮萍属, 硝酸还原酶, 过氧化物酶, 抗坏血酸

浮萍科植物是一类水生被子植物, 多年来被用于植物开花生理学研究。有关浮萍开花动力学的早期研究曾表明, 环境中氮源种类强烈地影响光、蔗糖、钙及磷酸离子、金属螯合剂及铜离子等因素对植物开花反应的作用方式。近二十年以来的工作进一步显示了氮代谢系统的控制对浮萍植物花诱导的重要性。田中治等人认为, Cu^{2+} 等巯基抑制剂、铁氰化物以及缺钼所引起的 *L. paucicostata* 6746 不依赖日长的开花, 是由于抑制了植物中硝酸还原酶(NR)和氮同化的结果。由于环境缺氮或添加铁氰化物的花诱导中明显存在一临界期, 表现与临界光周期的作用模式相似, 因而推测植物氮代谢受阻超过一临界期, 亦是光周期诱导开花的部分原因^[1,2]。但是, 对于 NR 的调节是否涉及浮萍的光周期开花过程, 尚无直接证据。关于浮萍中氮同化系统的控制涉及花诱导的可能方式, 亦无更多了解。一般认为^[3]植物花原基的分化涉及多种生物化学与生理学系统的综合控制, 在各类调节因子以及植物的遗传构成之间, 存在复杂的相互作用。早期研究已表明, 在高等植物中硝酸还原酶 NR 与过氧化物酶(PRX)之间存在密切关系: 或者认为 PRX 具有 NR 活性^[4], 或者认为 PRX 是一种 NR 的钝化因子^[5]。本工作以 *L. paucicostata* 6746 为对照材

* 本工作承蒙武汉大学肖翊华教授和华中师范大学杨学荣教授提出宝贵意见, 谨此致谢。

1991年3月29日收到。

料,采用 *L. minor* L. 中两个对短日反应类型不同的品系,试图比较研究短日照对不同日长反应的浮萍中 NR 和 PRX 活性的影响,以考察被诱导浮萍中涉及花原基分化的植物氮代谢调节的可能方式。

1 材料和方法

1.1 三个供试浮萍材料 *L. paucicostata* 6746* 系一典型的短日浮萍。*L. minor* G1 和 *L. minor* G2 系两个在成都地区采集、鉴定的浮萍品系。其中 *L. minor* G1 表现为短日植物,*L. minor* G2 则不对任何光周期程式反应,表现对短日照完全不敏感。贮备植物采用含 1% 蔗糖的 1/2 H 无菌培养基(表 1),在连续光下培养。实验从 1 个 3-叶体群体开始。每 1 个 3-叶体群体从 10d 龄的贮备培养,转入含 60ml M 培养基(表 1)的培养瓶中,置于 22±1℃,12W/m² 的连续光下生长 7d,再以短日(8L—16D)处理 6d。对各处理条件均设置四组培养,全部实验重复两次。

表 1 1/2H 培养基和 M 培养基的成分(mmol/L)

Tab. 1 The composition of 1/2H and M media¹

	1/2 H medium ²	M medium ³
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.75	5.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	2.0
KNO ₃	—	15.0
NH ₄ NO ₃	1.25	—
KH ₂ PO ₄	—	5.0
K ₂ HPO ₄	1.15	—
FeCl ₃ ·6H ₂ O	—	0.02
Tartaric acid	—	0.02
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.045	—
EDTA	0.85	—
KOH	1.8	—
H ₃ BO ₃	0.115	0.046
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.045	0.018
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.115	0.00077
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05	0.0005
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0016	0.0003
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.00035	—

^① M 培养基的 pH 值在消毒之前调至 4.6; ^② Hutner S H. In Growth and Differentiation in Plants. Loomis W.E.Ed. 417—447. Iowa State College Press, Ames, 1953; ^③ Hillman W S. Amer. J. Bot. 1961 48: 413.

* 系日本东京大学农学部山口五十磨博士赠送。

1.2 浮萍生长和开花的测定 从实验开始, 每间隔 1d 做一次叶状体计数, 凡直径大于 0.5mm 者均予计人。实验结束时镜检开花叶状体数目。以开花的叶状体数除以总叶状体数, 再乘以 100, 定义为开花百分率(FL%)。对全部花期的花均予计人。

1.3 酶活性和抗坏血酸含量的测定 在短日处理前 1d 和处理开始后, 定时取样分析。NR 体外活性按田中治的方法, 仅将匀浆介质改为 20mmol/L HEPES 提取液, 并含 EDTA 和半胱氨酸各 5mmol/L, pH7.5。NR 活性以 $A_{540}/10\text{mg}$ 鲜重表示。PRX 的制备采用 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液, 含抗坏血酸和半胱氨酸各 6mmol/L, pH6.8。样品经 4°C 下匀浆, 离心后取上清液, 以愈伤木酚法测定 PRX 活性。以聚丙烯酰胺凝胶电泳分析阴离子过氧化物酶同工酶, 酶带用岛津 CS-920 型 TLC 扫描仪以 460nm 波长扫描记录。抗坏血酸(ASA)以 2% 草酸溶液在 2°C 下提取, 经 10,000r/min 离心 10min, 取上清液以 2,6-二氯酚靛酚法测定含量。

2 结果

2.1 短日照对浮萍生长和开花的影响 图 1 显示, 在实验期内供试浮萍均呈对数生长状

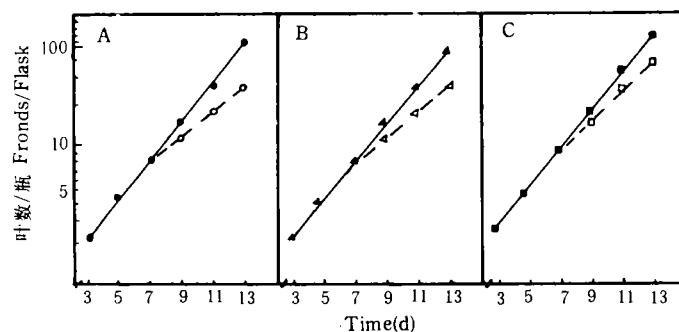


图 1 浮萍培养的生长速率。以 1 个 3-叶体群体开始转入连续光照, $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 含 1% 蔗糖的无菌 M 培养基生长 (实线), 7d 后大部分植物移入同温度的短日照下生长(虚线)。所示结果系 4 次统计平均值。

Fig.1 Growth rate of duckweed cultures. A. *Lemna paucicostata* 6746 B. *L. minor* G1 C. *L. minor* G2. Each 3-frond colony was aseptically inoculated on M medium containing 1% sucrose and grown at $22 \pm 1^\circ\text{C}$. After 7 days continuous illumination (solid line), most cultures were switched to short-day treatment (broken line) at the same temperature. The results represent four replicates.

表 2 三个浮萍属植物在 M 培养基, $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 和短日照下生长 6d 后的开花反应

Tab.2 Flowering response of three Lemna cultures on M sucrose

medium under SD(16L-8D) at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ for 6d.

种名 Strain	开花率 Flowering rate% \pm S.E	每瓶植物体数 No. of fronds per flask \pm S.E
<i>L. paucicostata</i> 6746	56.9 ± 2.7	83.6 ± 5.8
<i>L. minor</i> G1	51.9 ± 5.9	74.4 ± 6.3
<i>L. minor</i> G2	0	134.0 ± 9.0

注: 开花百分率(FL%)统计值来自三组以上培养瓶, 各组按随机取样统计 100 个叶状体。所示结果系平均值 \pm 平均值的标准差。

The flowering rate (%) was derived from at least three cultures, with 100 random samples of fronds for each culture.

态。但在短日下较之在连续光下呈现一较低的增殖速率。图 1 中 A、B 和 C 三个品系的叶状体生长量,当转入短日照生长 6d,分别较之连续光下的同龄材料减少 49.9, 49.4 和 35.0%。在实验结束时, *Lemna paucicostata* 6746(图 1, A) 和 *L. minor* G1(图 1, B) 的开花百分率(FL%)数值相近,且均超过 50%(表 2),但在 *L. minor* G2 中未发现开花。

2.2 短日照引起浮萍的 NR 活性水平降低 如表 3 所示,从连续光下转入短日 1d,引起两个被诱导浮萍中 NR 活性下降,而引起 *L. minor* G2 中 NR 活性上升。但随短日处理天数增加,三个供试品系中 NR 活性都连续下降,大约至第 4d 呈现最低值。在连续光照射下未发现三个供试品系中 NR 活性的明显衰减(本文未列出连续光照下 NR 活性的全部数据),如图 2 所示,连续光照可阻止短日浮萍 *L. minor* G1 中 NR 活性水平的下迭。

表 3 短日照对三个浮萍属植物的硝酸还原酶体外活性的影响

Tab.3 Effect of short-day treatments on *in vitro* activity of nitrate reductase in three *Lemna* species.

短日照处理 (d) Days of SD treatment	NR activity ($A_{540} / 10\text{mg fr wt}$)		
	<i>L. paucicostata</i> 6746	<i>L. minor</i> G1	<i>L. minor</i> G2
0	0.516 ± 0.079	0.427 ± 0.073	0.328 ± 0.022
1	0.425 ± 0.083	0.375 ± 0.027	0.393 ± 0.121
2	0.409 ± 0.091	0.244 ± 0.127	0.296 ± 0.042
3	0.371 ± 0.074	0.183 ± 0.113	0.212 ± 0.055
4	0.229 ± 0.011	0.161 ± 0.006	0.127 ± 0.043
5	0.270 ± 0.049	0.179 ± 0.032	0.275 ± 0.066
6	0.384 ± 0.137	0.159 ± 0.092	

注: 植物在连续光照下无菌培养基上生长 7d,然后转入短日照处理。在短日照处理前一天和处理开始后各天,测定硝酸还原酶的体外活性。实验重复两次,表中所示结果系平均值 ± 平均值的标准差。

Cultures were grown aseptically on M-sucrose medium under continuous illumination for 7 days. Thereafter the cultures were switched to short-day (16L-8D) treatment. *In vitro* activity of nitrate reductase was determined one day before and each day after short-day treatment. The results are presented as mean ± standard error of mean.

2.3 短日浮萍中 PRX 活性被短日诱导增高 短日照对 PRX 活性的影响在供试浮萍中表现不同:两个短日浮萍(图 3, A、B)进入短日照后,其 PRX 活性水平稳定上升。而 *L. minor* G2(图 3, C)经短日照处理 1d,酶活性增强 3.7 倍,再随短日照处理天数增加,PRX 活性则连续下降。图 4 显示,在短日浮萍 *L. minor* G1 中,PRX 在连续光照下则缺乏短日照所引起的活性的稳定上升。

2.4 抗坏血酸含量与 PRX 活性的变化平行 图 3 显示,在 2—3 个短日诱导下,两个短日浮萍中 ASA 含量水平连续增高。植物组织中 ASA 含量水平与 PRX 活性水平呈平行增长关系(图 3, A、B)。但不敏感浮萍 *L. minor* G2 表现与上述两个短日浮萍相反:组织内 ASA 含量在整个短日照处理期内呈连续下降趋势(图 3, C)。

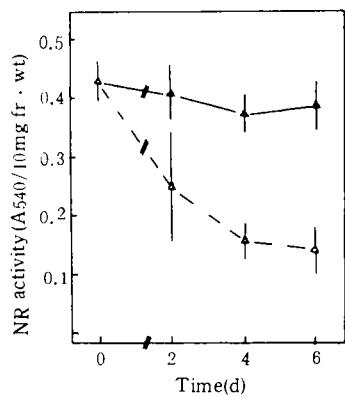


图 2 *L. minor* G1 的同龄植物中硝酸还原酶(NR)活性在短日照与在连续光照下变化的比较。虚线示短日照(16L—8D)下, 实线示连续光照下的变化。

Fig.2. Comparison of in vitro activities of NR in fronds of *L. minor* G1 of the same age between short-day and continuous illumination treatments. Broked line: under short-day (16L—8D). Solid line: under continuous illumination. For culture conditions see Table 3.

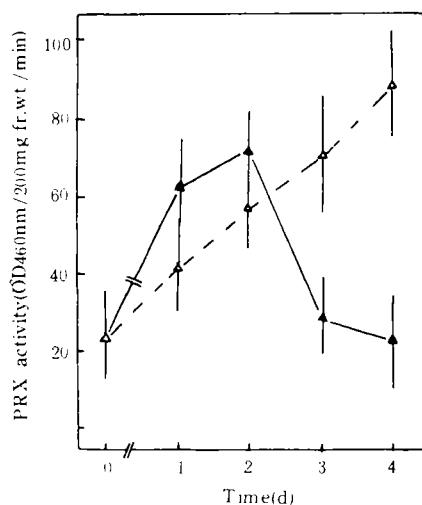


图 4 *L. minor* G1 的同龄植物中过氧化物酶(PRX)活性在短日照与在连续光照下变化的比较。虚线示短日照(16L—8D)下, 实线示连续光照下的变化。

Fig.4 Comparison of peroxidase (PRX) activities in fronds of *L. minor* G1 of the same age between short-day and continuous illumination treatments. Solid line: continuous illumination. Broked line: short-day (16L—8D). For culture conditions see Table 3.

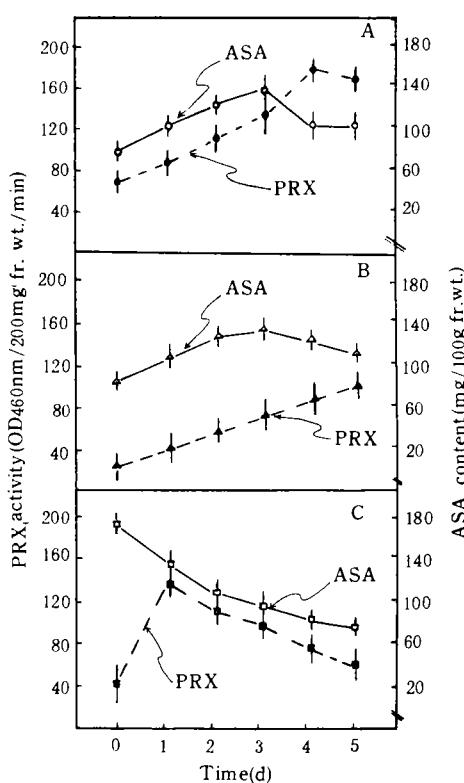


图 3 三个浮萍属植物从连续光照转入短日照后过氧化物酶(PRX)活性和抗坏血酸(ASA)含量的变化。

Fig.3 Changes in peroxidase activity and content of ascorbic acid in three *Lemna* cultures after switching from continuous illumination to short-day (SD). A. *L. paucicostata* 6746 B. *L. minor* G1 C. *L. minor* G2. For culture conditions see Table 3.

2.5 短日照引起浮萍的 PRX 同工酶变化显示种内差异 *L. minor G1* 在连续光照下具有一条迁移最快的酶带 ($R_f = 0.115$), 但经两个短日诱导, 这一快带消失 (图 5, B)。在 *L. minor G2* 中则缺乏这一条快迁移酶带 (图 5, C), 以及其被短日诱导的变化。转入短日照处理 2d, *L. minor G2* 中出现一条迁移最慢的酶带 ($R_f = 0.915$)。*L. minor G1* 与 *L. paucicostata 6746* 之间, PRX 电泳类型显示较大差异 (图 5, A, B), 但后者亦因短日诱导而减少一条快迁移组酶带 ($R_f = 0.35$) (图 5, A)。

图 6 显示, 短日品系 *L. minor G1* 在连续光照下, 未发生上述快带衰减的变化。

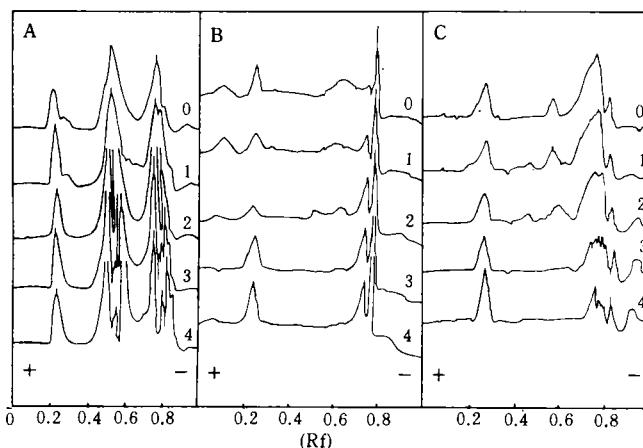


图 5 三个浮萍属植物从连续光照转移到短日照后过氧化物酶的变化。采用阴离子缓冲系统的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以薄层色谱 (TLC) 扫描仪在 460nm 波长扫描。各品系在短日照处理 0—4d 取样, 测定结果分别标记为 0—4。

Fig.5 Peroxidase isoenzyme changes in three *Lemna* species after switching from continuous illumination to short-day (16L-8D). A. *Lemna paucicostata 6746* B. *L. minor G1*. C. *L. minor G2*. Polyacrylamide gel electrophoresis with anionic buffer system. Scan with TLC at 460 nm. Sampling for each strain was made on days 0—4 of short-day treatment, and designated as series 0—4, respectively. For culture conditions see Table 3.

3 讨论

3.1 短日照对 NR 活性的影响 浮萍植物中氮素同化受阻无论对于光周期开花, 还是非光周期开花, 都可能是共同涉及的早期过程。本实验中短日照引起浮萍的 NR 活性水平降低, 显示短日诱导开花可能包括供试植物中氮同化的抑制过程。据长暗期中浮萍花诱导动力学研究^[6]表明, 分生组织中叶状体原基诱导向花原基诱导的转变, 可导致叶状体生长速率的下降, 但花芽诱导所涉及的各个相继过程中, 都可能发生原基的退化。因而植物早期的诱导转变并不必然导致浮萍花原基形成。本实验中无论对于短日品系与非短日品系, 短日照均引起叶状体生长速率 (图 1) 和 NR 活性水平 (表 3) 的下降, 这表明 NR 活性

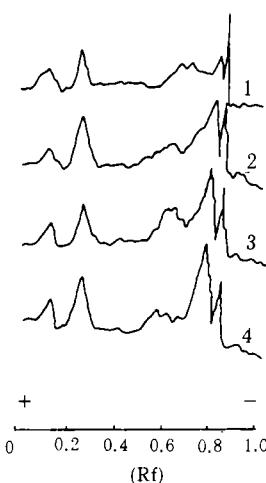


图 6 *L. minor G1* 中过氧化物酶同工酶在连续光照下的变化。从连续光照处理 1—4 天取样、分析结果分别标记为 1—4 (参见图 5, B)。

Fig.6 Peroxidase isoenzyme changes in *Lemna minor G1* under continuous illumination. Sampling was made on days 1—4 of continuous illumination treatment, and designated as series 1—4, respectively (cf. Fig.5, B). For scanning see Fig.5.

的抑制和营养生长速率的下跌尚不足构成供试浮萍开花的充分条件。

3.2 短日照对 PRX 活性的影响 从连续光照转入短日照之后, 短日浮萍中 PRX 活性连续稳定上升(图 3, A、B), 而非短日品系中出现 PRX 活性剧烈起伏和随后的连续下降(图 3,C)。这一结果表明, 短日诱导开花除涉及 NO_3^- 盐还原能力下降而外, 还需要一个 PRX 活性稳定上升的过程。早期研究^[7]曾报道, NR 在暗期钝化与类似 PRX 的蛋白质因子活化有关。但对于短日诱导下浮萍 NR 活性水平下降是否涉及 NR 与 PRX 之间的相互作用, 尚待进一步研究。

PRX 是一种选择性分泌酶系。两个供试短日浮萍的快阴离子酶带活性都表现被诱导减弱和消失的变化(图 5, A、B)。这一结果可能与 PRX 同工酶的伤诱导^[8]类似, 涉及到特异同工酶成员跨膜运输和与细胞壁结合的变化。而供试的非短日品系 *L. minor* G2 中则缺乏上述对短日照敏感的快同工酶成员(图 5, C), 显示出明显的种内差异。迄今, SH 基结合剂和铁氰化物等 NR 抑制剂对 *L. paucicostata* 6746 的开花诱导效应尚未在其它浮萍品系发现。当 M 培养基中氮素不足时, SH 基结合剂虽然可以抑制 *L. paucicostata* 6746 中 NR 活性, 但无法引起不依赖日长的开花。这表明花芽分化涉及一个复杂的氮同化调节系统。如果 PRX 的变化涉及到植物的氮素同化, 其同工酶成员组织定位与功能的多样性则可以适应植物花诱导期间代谢系统在更精细水平上的调节需要。

3.3 在短日照下抗坏血酸含量的变化 在浮萍实验系统中, 迄今尚未发现内源激素水平变化与光周期开花之间存在必然相关。早期研究^[9]曾表明, 外源 ASA 可诱导 *L. paucicostata* 6746 不依赖日长的开花。本实验的两个短日浮萍中内源 ASA 含量水平被短日照诱导增高(图 3, A、B), 而非短日品系被转入短日照后, 其内源 ASA 含量连续下跌(图 3,C)。这表明 ASA 可能涉及浮萍植物中一个限制花芽分化的氧化-还原过程。

多年来的研究表明, 浮萍的花诱导中存在植物氮代谢系统与光周期、化学诱导因子之间复杂的相互作用。水杨酸及苯甲酸类似物可诱导浮萍不依赖日长开花, 或改变植物光周期反应中计时机制, 但上述酚类物质的花诱导模式通常表现受环境中氮源种类和氮素水平所修饰^[10, 11]。抗坏血酸(ASA)是植物中一种生长物质, 亦可作为植物组织中 PRX 的电子供体。而本实验两个被诱导浮萍中 ASA 含量水平与 PRX 活性水平之间具有平行增长关系(图 3, A、B)。由此可推测, 浮萍花诱导涉及的氮同化控制的可能方式, 不但包括 NR 与 / 或 PRX 的以 NO_3^- 盐为底物的催化活性被短日条件抑制, 也可能包括组织中依赖 ASA 水平的 PRX 的催化活性的提高。

参 考 文 献

- [1] Tanaka O et al. Flower induction by suppression of nitrate assimilation in *Lemna paucicostata* 6746. *Plant Cell Physiol.*, 1986, **27**: 127—133.
- [2] Tanaka O et al. Flower induction by daily 17-h culture on nitrogen-free medium in *Lemna paucicostata* 6746. *Plant Cell Physiol.*, 1987, **28**: 1453—1457.
- [3] Bernier G. The control of floral evocation and morphogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1988, **39**: 175—219.

- [4] Ivanova N N et al. Nitrate reduction by higher plant peroxidase. *FEBS Lett.* 1973, **31**: 229—232.
- [5] Kadam S S et al. Inhibitor of nitrate reductase in the roots of rice seedlings and its effect on the enzyme activity in the presence of NADH. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1974, **350**: 162—170.
- [6] Mori H. Effect of red light pulse on induction and production of flower in a short-day duckweed, *Lemna paucicostata* 6746, in darkness. *Plant Cell Physiol.*, 1979, **20**: 623—630.
- [7] Sherrard J H et al. In vitro stability of nitrate reductase from wheat leaves. *Plant Physiol.*, 1979, **64**: 640—645.
- [8] Birecka H et al. Cell wall and protoplast isoperoxidase in relation to injury, indoleacetic acid, and ethylene effects. *Plant Physiol.*, 1974, **53**: 569—574.
- [9] Kandeler R. The effect of ascorbic acid, NADH, NADPH on flowering of *Lemna perpusilla* 6746 in continuous light. *Z. Pflanzenphysiol.*, 1971, **64**: 278—283.
- [10] Fujioka S, Yamaguchi I et al. The influence of nicotinic acid and plant hormones on flowering in *Lemna*. *Plant Cell Physiol.*, 1986, **27**: 109—116.
- [11] Takimoto A et al. A comparative study on the short-day and the benzoic acid-induced flowering in *Lemna paucicostata*. *Plant Cell Physiol.*, 1987, **28**: 503—508.

EFFECTS OF SHORT-DAY TREATMENTS ON PEROXIDASE AND NITRATE REDUCTASE ACTIVITIES IN *LEMNA* SPECIES

Luo Dingze Zhao Zuocheng[†]

(Biology Department, Sichuan Normal University, Chengdu 610066)

([†] Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu 610015)

Abstract

Short-day (SD) treatments caused a decrease in the in vitro activities of the nitrate reductase in two strains of *Lemna minor* that differ in photoperiodic behaviours and in *L. paucicostata* 6746. SD treatment resulted in a steady increase in peroxidase activity and ascorbic acid content in two strains of *L. minor* G1 and *L. paucicostata* 6746 with short-day responses. The content of ascorbic acid increases in parallel to the rise in the activity level of peroxidase. Under SD, the photoperiodically insensitive strain *L. minor* G2 exhibited intense fluctuations and a subsequent decline in peroxidase activity; the content of ascorbic acid in this strain showed a continuous decrease during the same period. Comparison of peroxidase isoenzyme between the two *L. minor* strains indicated that the fast-moving anionic band was absent in the insensitive strain. The same enzyme band in the strain with a short-day response displayed an induced decrease in activity.

Key words *Lemna*, Nitrate reductase, Peroxidase, Ascorbic acid