

光周期诱导对红小豆不同叶龄叶片生理生化特性的影响

尹宝重¹, 张月辰¹, 陶佩君¹, 尹淑丽², 邓小鹏¹, 郭程瑾¹

(1. 河北农业大学 农学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省生物研究所, 河北 石家庄 050021)

摘要:通过光周期诱导的方法, 对中晚熟红小豆品种冀红 4 号红小豆不同叶龄叶片进行处理, 结果表明: 所有叶龄(LF)处理下硝酸还原酶(NR)活性基本高于自然光(CK)处理而低于连续短日照(SD)处理; 随着叶龄增大, 各处理游离氨基酸总量均呈下降趋势, 但光周期诱导可提高游离氨基酸含量, 不同叶龄表现有所差异, 与 SD 处理交替上升; 诱导可降低可溶性糖的含量, 并连续诱导出现累积效应; 2LF 是光周期诱导可溶性蛋白变化最敏感的时期, 从这个时期起单个叶龄诱导可降低可溶性蛋白含量, 但连续诱导却可提高; LF 处理下类胡萝卜素总体含量高于另 2 个处理, 而 LF 处理下叶绿素含量仅在 3 叶龄前高于 CK, 随后出现下降趋势。

关键词:红小豆; 叶龄; 叶片; 光周期; 生理生化

中图分类号:S521.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2008)02-0025-05

Effects of the Photoperiodic Inducing on Physiological and Biochemical Characteristics in Different Leaves Ages of Adzuki Bean

YIN Bao - zhong¹, ZHANG Yue - chen¹, TAO Pei - jun¹, YIN Shu - li²,
DENG Xiao - peng¹, GUO Cheng - jin¹

(1. College of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

2. Institute of Biology Hebei, Shijiazhuang 050021, China)

Abstract: This research take late - maturing variety adzuki bean Jihong - 4 as the experiment material, with the photoperiodic induced in different leaf ages treatment, the results showed that the activity of NR (nitrate reductase) under LF (leaf age) treatment was higher than CK (natural light) treatment on the whole, and was lower than SD (continuous short daylength) treatment; The content of the dissociation amino acid under these three treatments showed a descend trend along with the leaf ages accretion, but the photoperiodic inducing could be increasing the content of dissociation amino acid, different leaf ages leaves showed some difference, and alternating rise with SD treatment; Photoperiodic inducing could reduce the content of soluble sugar, and continuous inducement showed a accumulation effects; 2LF treatment was the most sensitivity stage for soluble protein under photoperiodic inducing, from this stage, each leaf inducement can be reducing the content soluble protein, but the continuous inducement treatment reducing rising it. The content of Car (carotenoid) was higher than the other two treatments on the whole, but the content of Chl (chlorophyll) of LF treatment only higher than the CK treatment before 3LF, and reduce subsequently.

Key words: Adzuki bean; Leaf ages; Leaves; Photoperiod; Physiological and biochemical

开花是植物有性生殖的重要一步^[1], 是植物从营养生长向生殖生长发育的枢纽^[2], 因此, 如何有效控制开花, 调控花在时间和空间上的分布成为作物

高产及相关生命科学研究的重要一步。光周期是决定植物开花时间的关键因子之一^[3], 而叶片是感受光周期诱导的主要部位^[4], 作为植物感受光周期的

收稿日期: 2007 - 11 - 28

基金项目: 河北省科技攻关项目 (038201790D)

作者简介: 尹宝重 (1981 -), 男, 河北沧州人, 助教, 主要从事作物栽培生理与农业气象研究。

通讯作者: 张月辰 (1964 -), 男, 河北沧州人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事红小豆栽培生理研究。

源头器官,叶片内生理指标的变化与成花有重要的关系,并直接或间接的影响着植物后期的生长发育。植物在感受各种环境信号后产生许多与植物成花有关的物质,这些物质被称为成花生理信号^[5],这些信号由光敏素系统感受,而且这种物质可以被植物韧皮部运输^[6]。对光周期诱导响应敏感的物质首先是含氮化合物,一些研究表明,蛋白质水解是成花诱导的最初条件^[7],韩天富等^[8]的试验结果表明,光周期也可在开花前后引起大豆叶片蛋白质组分发生变化。虽然目前尚不能确定何种蛋白与发育有直接关系,但这一结果说明,光周期调控大豆发育进程的作用与某些蛋白质的合成有关。许多研究表明光周期诱导后叶片碳水化合物响应也是非常敏感的,屠乃美等^[9]的研究表明在长日照条件下,水稻茎鞘总糖(淀粉+可溶性糖)含量增加,尤以16 h处理者最为明显;可溶糖含量亦趋于增加,但增加幅度不如总糖明显;尹淑丽^[10]的研究结果显示光周期诱导对可溶性糖影响不明显。红小豆(*Phaseolus angularis*)是典型的短日照作物,对光照反应非常敏感,关于其不同叶龄光周期诱导影响成花时叶片发生的生理变化未见报道。本研究采用不同叶龄红小豆进行光周期诱导,测定其叶片内部分生理指标的变化,为相关作物成花机理的研究提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试验于2006年在河北农业大学植物标本园进行,土质为壤土,肥力较均匀,前茬为小麦。供试材料为河北省粮油作物研究所选育的中晚熟红小豆品种冀红4号红小豆。

1.2 叶龄与处理时期的界定

OLF处理:对生真叶破土至真叶展平;1LF处理:真叶展平至第一片复叶展平;2LF处理:第一片复叶展平至第二片复叶展平;3LF处理:第二片复叶展平至第三片复叶展平;4LF处理:第四片复叶展平至第五片复叶展平;SD:OLF至4LF连续处于12 h短日照诱导下;CK:一直生长于自然光下。

1.3 试验设计、处理及计算方法

小区面积为4 m × 1 m,每个处理设5个重复。每日19:00遮光,次日7:00解除遮光处理,形成12 h日照长度,分别对5个不同叶龄红小豆进行光周期处理,以CK和SD为对照。处理完毕后均在自然光下生长至成熟,真叶破土开始摘取各处理叶龄叶片进行生理指标测定,每次测定叶片均为相同叶龄,包括该叶龄被光周期诱导(LF)、生长在自然光下

(CK)、连续光周期诱导(SD)。取样时间为每叶龄处理完毕的次日上午8:00,各种指标的测定均设5个重复。

遮光处理采用油毡完全遮盖,油毡的厚度为2 mm,遮光后整个小区处于封闭状态,光照强度接近于零。

1.4 样品的提取和测定方法

1.4.1 叶片内游离氨基酸总量的测定 取混合样品0.5 g,用10%的乙酸溶液研磨提取,提取液转入离心管,在8 000 r/min离心后取一定量的上清液,加酸性茚三酮显色,在595 nm下比色。按参考文献[11]方法测定氨基酸的含量。

1.4.2 NR活性测定 取混合样品0.5 g,加5 mL HEPES提取液冰浴研磨成匀浆。4 × 3 000 r/min离心15 min,上清液用磺胺比色法测定NR的活性^[12]。

1.4.3 叶片可溶性糖的测定 取混合样品0.5 g,用80%乙醇溶液研磨提取,用蒽酮比色法测定可溶性糖的含量^[13]。

1.4.4 叶绿素和类胡萝卜素的测定 取混合样品0.1 g,放入试管,加入10 mL 95%乙醇遮光提取^[14]。

1.4.5 可溶性蛋白含量的测定 取混合样品0.1 g,用蒸馏水研磨提取,4 000 g离心后,考马斯亮蓝G-250法测定^[15]。

2 结果与分析

2.1 不同叶龄光周期诱导下游离氨基酸总量变化

不同叶龄光周期诱导对叶片游离氨基酸总量的影响(图1),通过对图1观察发现,3LF前CK处理都低于其他2个处理,4LF后略高;对生长在LF和SD处理下的进行比较发现,2LF和4LF时LF高于SD处理,2,3LF时SD处理含量要高;对生长在LF处理下的游离氨基酸总量高低次序依次为:OLF > 1LF > 3LF > 2LF > 4LF;峰值出现在OLF时,含量达到799.3 μg/g。3个处理下的含量总体随叶龄增大呈降低趋势。

2.2 不同叶龄光周期诱导下硝酸还原酶活性变化

不同叶龄光周期诱导对叶片硝酸还原酶活性的影响(图2),通过对图2进行分析可知,生长在SD处理下的植株除在3LF稍低于LF处理外,其他时间都要高于其他2个处理。对LF和CK处理植株进行比较发现,LF处理下的活性一直高于CK处理。对生长在LF处理而言,NR活性依次为:OLF > 3LF > 1LF > 4LF > 2LF;峰值在OLF处理后出现,顺序为4LF,3LF,CK依次减小。

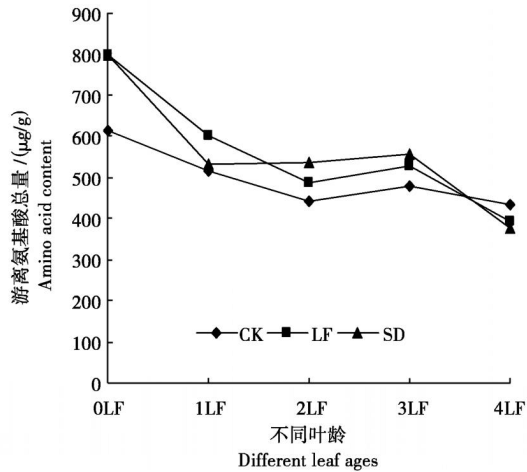


图1 光周期诱导下游离氨基酸总量变化
Fig.1 Effects of total content of amino acid induced by photoperiod

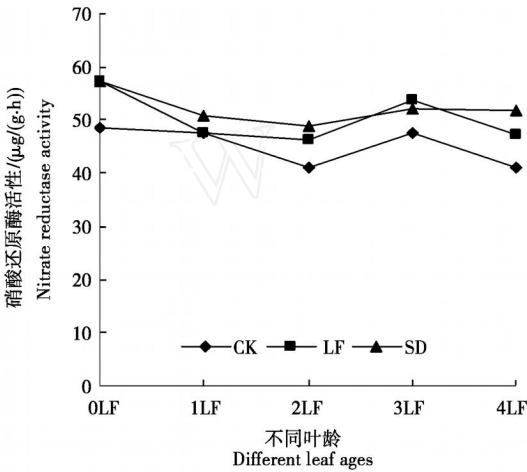


图2 光周期诱导下硝酸还原酶活性变化
Fig.2 Effects of nitrate reductase activity induced by photoperiod

2.3 不同叶龄光周期诱导下可溶性糖含量变化

不同叶龄光周期诱导对叶片可溶性糖含量的影响(图3),通过对图3进行分析可知,0LF时CK处理明显低于其他2个处理,之后1LF,2LF,SD,LF处理一直呈下降趋势,这时CK处理超过其他2个处理;在2LF~3LF之间有一个跃变,3个处理均急剧增高,增长幅度依次为CK>LF>SD,之后大幅度下降;对LF处理下的各个叶龄植株可溶性糖进行分析发现:3LF>0LF>4LF>1LF>2LF,峰值出现在3LF,含量高达0.427 mg/g。

2.4 不同叶龄光周期诱导下可溶性蛋白含量变化

不同叶龄光周期诱导对叶片可溶性蛋白含量的影响(图4),通过对图4分析可知,LF处理和CK处理在3LF时差距比较明显,LF明显高于CK,其他叶龄含量差距不明显;对SD处理进行分析发现,除1LF稍低外,其他叶龄均高于其他2个处理;对生长在LF处理下各个叶龄的可溶性蛋白进行比较可以

看出:2LF>0LF>3LF>1LF>4LF,峰值出现在2LF,含量高达25.0 mg/g。

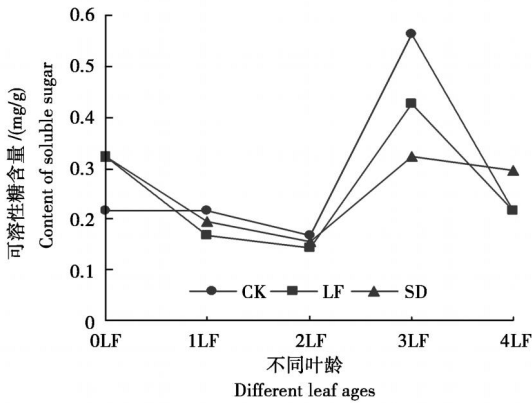


图3 光周期诱导下可溶性糖含量的变化
Fig.3 Effects of content of soluble sugar induced by photoperiod

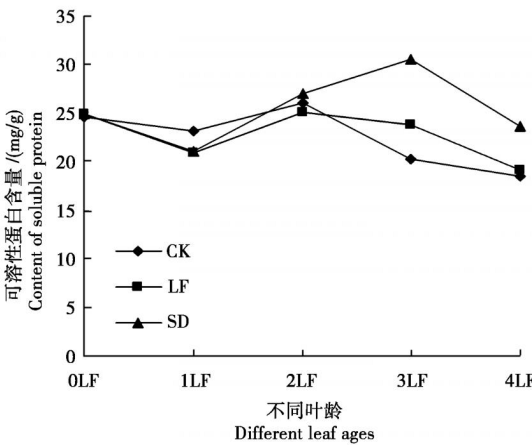


图4 光周期诱导下可溶性蛋白含量的变化
Fig.4 Effects of content of soluble protein induced by photoperiod

表1 不同叶龄光周期诱导下
叶绿素和类胡萝卜素含量的变化

Tab.1 The change of chlorophyll and carotenoid content at different leaf ages at photoperiod		mg/g				
观测项目	不同处理	0LF	1LF	2LF	3LF	4LF
Car	SD	57.13	73.06	68.05	65.61	49.45
	LF	57.13	77.47	76.93	74.50	63.85
	CK	67.83	37.38	69.93	64.08	63.35
Chla/ Chlb	SD	3.95	3.43	3.81	3.63	4.64
	LF	3.95	3.36	3.61	3.75	4.06
	CK	2.88	1.75	3.80	3.99	4.00
Chla + Chlb	SD	17.69	23.25	21.17	20.64	14.97
	LF	17.69	24.91	24.20	19.76	19.63
	CK	22.89	15.84	21.77	19.76	19.82

2.5 不同叶龄光周期诱导下叶绿素和类胡萝卜素含量的变化

不同叶龄光周期诱导对叶片叶绿素(Chl)和类胡萝卜素(Car)含量的影响(表1),通过对表1分析可知,植株内类胡萝卜素除0LF处理稍低于CK处

理外,其他叶龄要明显高于另 2 个处理。SD 和 LF 都是先高后低,在 1LF 达到最大,SD 处理在 1LF 有 1 个较低峰。植株内 Chla/Chlb 比值在 2LF 前差距比较明显,CK 处理明显低于另 2 个处理,并且在 1 叶龄时有 1 个较低峰,2LF 后均呈缓慢上升趋势,差距不明显;对 Chla + Chlb 分析发现:0LF 时 CK 处理高于另 2 个处理,之后迅速降低,在 1 叶龄时出现 1 个较低峰,而 SD 和 LF 处理却上升达到各自的最高峰,其中 LF 处理的含量达到 24.91 mg/g,为 3 个处理最高,之后呈下降趋势。

3 讨论

自 20 世纪 20 年代初发现光周期后^[16],人们便逐渐意识到在植物的光周期现象中叶片是感受光的主要器官^[4],并且从叶片(包括胚芽鞘)中分离得到了感受光/暗变化的色素蛋白分子 - 光敏素(Phytochrome)^[17],现已知光敏色素是叶片中接受光周期信号、调节育性转换的光受体,并光敏色素 A 和光敏色素 B 都参与光周期的感受^[18,19]。后来前苏联科学家柴拉轩提出了成花刺激物(*Floral stimulus or florigen*)的概念。由于叶片在感受光周期过程中这种特殊的地位,人们始终认为在诱导植物开花的光周期条件下,叶片一定会产生决定开花与否的物质^[20]。

3.1 光周期诱导对红小豆叶片含氮化合物的影响

高等植物为维持自身正常的生长发育,必须准确调节自身氮代谢的平衡,因此观测光周期诱导对植物叶片含氮化合物的影响是反映叶片生理功能的可靠指标。蛋白质是生命现象的主要体现者,硝酸还原酶是植物氮代谢中重要的调节酶和限速酶^[21],也是调节氨基酸的关键性酶,而氨基酸又是合成蛋白质的前身^[22],所以衡量植物体内含氮化合物的水平是很有意义的。

前人在关于光对植物叶片含氮化合物影响做了很多工作:中科院植物所康彬等^[23]在 2000 年的研究证实长日照和短日照诱导水稻后,叶片蛋白质产生了差异。李娅莉^[24]和尹淑丽^[25]分别对山茶花和红小豆进行光周期诱导,结果均说明光周期诱导对叶片中可溶性蛋白含量没有影响;袁娟等^[26]在研究中也提出短日诱导可提高扁豆叶片中游离氨基酸总量;余让才^[27]提出光可能通过光合产物提高植物 NR - mRNA 的水平,但持续光照后期植物 NR - mRNA 水平的下降显示在植物体内还有降低 NR - mRNA 的机制。这可能与某些含氮化合物的积累有关。Stiles 和 Davies 的研究也发现经 16 h 暗期诱导的牵

牛子叶的蛋白质组分发生了差异。

本研究表明,光周期诱导对叶片含氮化合物含量有一定影响,各叶龄差异表现不同:光周期诱导可降低叶片可溶性蛋白含量,并连续诱导有累积效应,各叶龄相比较,3LF 时是含量差距最大的时期,这时光周期诱导对叶片可溶性蛋白含量影响最大;研究支持了余让才等关于 NR 活性在光照早期较高,随后降低的说法;早期的光周期诱导可提高红小豆叶片中游离氨基酸总量,并提高硝酸还原酶活性,但随着叶龄增大,各处理均呈下降趋势,这说明游离氨基酸和硝酸还原酶可能作为某种信号参与了早期光周期对植物的诱导,这种信号直接或间接作用加速了花的起始。

3.2 光周期诱导对红小豆叶片含碳化合物的影响

Sachs 和 Hackett 在 1983 年提出成花诱导的营养物分配学说,该学说认为在成花诱导条件下,不论什么环境因子都是通过改变植物体内的源/库关系,从而使茎尖获得比非诱导条件下更有利的同化物供应。这就是说碳水化合物在成花转变中有重要的作用。植物组织中可溶性糖的多少,能够感应出植物光合作用的强弱,直接影响植物生长发育^[28]。蔗糖作为植物中最常见的碳水化合物,在成花过程中可能不是作为能量供应,而是作为一种信号物质发挥作用^[29]。Bernier^[30]认为蔗糖可能作为信号因子启动分生组织中与成花有关的某些关键步骤。王占朝^[31]的研究表明遮光处理使火鹤叶片中可溶性糖的含量有所增高,而其他研究则表明对薏苡和山茶花叶片的则没有影响^[32]。本研究表明前期的光周期诱导可提高叶片中可溶性糖的含量,而 3LF 以后却又可降低,并且连续短日照可显著降低,其中 3LF 时期是差异最明显的时期,随后急剧降低。

光周期诱导早期红小豆叶片中出现了较高的 C/N 比,关于光周期诱导可促使红小豆提早成花的原因,是否和诱导前期较高的 C/N 比,从而使茎尖生长点获得了更有力的同化物供应,改变了茎尖分生组织对成花信号方式或者浓度的反应的敏感性^[29]有关,其内在关系有待于进一步探讨。

3.3 光周期诱导对红小豆叶片部分色素的影响

在叶片的生活周期中,叶绿素含量和组成上具有明确的消长过程,叶绿素的消长规律反映了叶片的生理活性变化^[33]。叶绿素含量与光合速率有一定的关系。单叶叶绿素总量的差异反映了各叶位叶片光合能力和分工的不同^[34],一般以离生殖器官最近的叶片的叶绿素含量最高^[31]。群体中植株下部近根叶片的光照不足,叶片的叶绿素降解速率加快,

叶片枯黄的时间提前。王占朝的研究表明遮光处理使火鹤叶片叶绿素含量增加,李娅莉和尹淑丽分别对山茶花和红小豆则进行光周期诱导,结果均说明光周期诱导对叶片叶绿素含量没有影响。本研究表明光周期诱导对红小豆叶片色素含量影响不明显。

4 展望

光周期对植物开花时间的控制是一个非常复杂的过程,这一过程涉及到植物感知不同的光照进而区分日照长短,植物体内的生物钟反应以及光信号与生物钟信号的整合等^[35]。花器官的发育和分化是高等植物由营养生长转向生殖生长、实现世代交替的关键环节^[36],因此对高等植物开花生理的研究越来越为人们所重视。对于叶片感受光周期诱导后生理信号应答,我们做了很多工作,而对于光周期诱导早期事件,如生理信号对于成花是被动还是主动,信号应答方式等知之甚少,这也为我们下一步工作指明了方向。

参考文献:

- [1] 白素兰,孙敬三. 光温外界信号、植株状态与成花决定[J]. 植物学通报,1999,16(4):381 - 386.
- [2] 杨 斐. 植物成花的分子调控研究进展[J]. 热带农业科学,2004,24(5):73 - 78.
- [3] 陈 晓,李思远,吴连成,等. 光周期影响植物花时的分子机制[J]. 西北植物学报,2006,26(7):1490 - 1499.
- [4] Knott J E. Effect of a localized photoperiod on spinach. Proceedings of the American[J]. Horticultural Society,1934,31:152 - 164.
- [5] Bernier G,Havelange A Houssa C, et al. Physiological signals that induce flowering[J]. Plant Cell,1993,5:1147 - 1155.
- [6] O Neill S D. The photoperiodic control of flowering progress toward understanding the mechanism of induction[J]. Photochemistry and Photobiology,1992,56(5):789 - 801.
- [7] Sheey R E,Gammer M,Haitt W R. Reduction of PG activity in tomato fruit by antisense RNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1988,85:8805 - 8809.
- [8] 韩天富,王金陵. 开花前后的光周期处理对大豆叶片蛋白质组分的影响[J]. 大豆科学,1995,14(2):95 - 100.
- [9] 屠乃美,官春云. 光周期对稻源库关系的影响[J]. 作物学报,1999,25(5):596 - 601.
- [10] 李曙轩. 几种豆类作物的光周期反应[J]. 作物学报,1963,3(2):251 - 260.
- [11] Read M S. Minimization of variation in the reponse to different protein of the coomassie Blue G-dye binding assay to protein[J]. Anal Biochem,1981,116:53 - 64.
- [12] 赵世杰. 叶绿体色素的定量测定[M]. 邹 琦. 植物生理学试验指导. 北京:中国农业出版社,2000:72 - 75.
- [13] 陈 薇,张德颐. 植物组织中硝酸还原酶的提取、测定和纯化[J]. 植物生理学通讯,1980(4):45 - 49.
- [14] 白宝璋,靳占忠,李存东,等. 植物生理学(下:实验教程)[M]. 北京:中国农业出版社,1996:61 - 62.
- [15] 李绍军,龚月桦,王俊儒,等. 关于茛三酮法测定脯氨酸含量中脯氨酸与茛三酮反应之探讨[J]. 植物生理学通讯,2005,4(3):365 - 367.
- [16] Garner W W,Allard H A. Further studies in photoperiodism, the response of the plant to relative length of day and night[J]. J Agric Res,1923,23(2):871 - 920.
- [17] Chory J,Chatterjee M,Cook R K, et al. From seed germination to flowering, light, controls plant development via the pigment phytochrome[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93:12066 - 12071.
- [18] Johnson E,Bradley M,Harbexd N P, et al. Photoresponses of light grown phyA mutants of Arabidopsis[J]. Plant Physiol,1994,105:141 - 149.
- [19] Childs K L,Miller F R,Cordonnier - Pratt M M, et al. The sorghum photoperiod sensitivity gene, Ma3, encodes a phytochrome B[J]. Plant Physiol,1997,113:611 - 619.
- [20] 白书农,谭克辉. 对光敏水稻研究的回顾与反思:植物光周期现象中叶片信息对茎端的形态建成事件有专一性吗? [J]. 科学通报,2001,46(9):788 - 792.
- [21] 刘 丽,甘志军,王宪泽. 植物氮代谢硝酸还原酶水平调控机制的研究进展[J]. 西北植物学报,2004,24(7):1355 - 1361.
- [22] 张鼎华,王德水,邱 燕. 毛竹硝酸还原酶活性的初步研究[J]. 福建林业科技,2003,30(2):22 - 27.
- [23] 康 彬,童 哲,匡廷云. 水稻叶片中一种受光敏色素调控的光周期诱导蛋白[J]. 科学通报,2000(45)9:955 - 959.
- [24] 李娅莉. 不同光周期对山茶花成花影响的研究[D]. 雅安:四川农业大学,2005.
- [25] 尹淑丽. 苗期不同日照长度对红小豆开花、形态、生理及产量的影响[D]. 保定:河北农业大学,2006.
- [26] 袁 娟,武天龙,陈 典. 光周期对扁豆内源激素及游离氨基酸含量的影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2004,22(3):215 - 217.
- [27] 余让才,范燕萍,李明启. 高等植物硝酸还原酶的光调控[J]. 植物生理学通讯,1997,33(1):61 - 65.
- [28] 赵增煜. 常用农业科学实验法[M]. 北京:中国农业出版社,1986:115 - 116.
- [29] 孟繁静. 植物花发育的分子生物学[M]. 北京:中国农业出版社,1998:86 - 92.
- [30] Bernier G. The control of floral evolution, morphogenesis[J]. Ann Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol,1988,39:119 - 175.
- [31] 王占朝. 火鹤花期调控技术研究[D]. 保定:河北农业大学,2003.
- [32] 姚凤娟. 光周期和播种期对薏苡生长发育及其产量的影响[D]. 雅安:四川农业大学,2005.
- [33] 郑丕尧,蒋中怀,王经武. 夏播“京早7号”玉米叶片叶绿素含量的消长变化规律的研究[J]. 华中农业大学学报,1988,3(1):21 - 27.
- [34] 梁振兴,李雁鸣. 冬小麦生长期叶片叶绿素含量变化的消长变化[J]. 北京农业大学学报,1992,1(增刊):16 - 20.
- [35] 刘玉平,李建平,兰素缺,等. 光周期迟钝基因对小麦农艺性状的影响[J]. 华北农学报,2001,16(4):59 - 64.
- [36] 余叔文,汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 第2版. 北京:科学出版社,2003:546.