

赵 昭, 史慧娟, 肖国华, 等. 浮萍休眠体形成过程中的淀粉积累[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(22): 315–318.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.22.073

浮萍休眠体形成过程中的淀粉积累

赵 昭¹, 史慧娟², 张 楠¹, 肖国华³, 刘存歧¹, 金 磊¹

(1. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002; 2. 河北大学博物馆, 河北保定 071002;

3. 河北省海洋与水产科学研究院, 河北秦皇岛 066200)

摘要:以紫萍 NJ016 为对象, 研究浮萍休眠体形成过程中叶状体、休眠体中的淀粉、叶绿素含量及 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase)、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶活性变化情况。结果表明, 浮萍休眠体形成初期, AGPase 活性先明显增加后逐渐下降, 较未经脱落酸处理的叶状体其活性下降 99.8%; 浮萍休眠体形成过程中, α 、 β -淀粉酶活性受到不同程度抑制, α 、 β -淀粉酶活性与淀粉含量呈极显著负相关 ($P < 0.01$), 叶绿素 a (Chl a)、叶绿素 b (Chl b) 含量下降明显, 叶绿素 a/叶绿素 b 值呈增加趋势。因此, 浮萍休眠体形成过程中, 主要是通过抑制淀粉的降解进行淀粉积累。

关键词:浮萍; 休眠体; 酶活性; 淀粉; 生长速度; 叶绿素; 脱落酸

中图分类号: Q945; S184 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)22-0315-04

浮萍在世界上主要有多根紫萍属 (*Spirodela*)、少根紫萍属 (*Landoltia*)、浮萍属 (*Lemna*)、扁平无根萍属 (*Wolffiella*)、芜萍属 (*Wolffia*) 5 属 40 种^[1], 而在我国主要有 3 属 7 种^[2], 是一种世界广泛分布、在人工湿地建设较好的水生植物^[3], 主要生活在静止或流动缓慢的淡水中, 能够降解污染物, 吸收氮磷、降解重金属^[4]。浮萍是一种形态高度退化的高等被子植物, 仅有叶状体和根, 其中叶状体是浮萍进行光合作用的主要器官, 而休眠体是浮萍在生长周期过程中重要的生命阶段, 体积小、没有气孔、细胞壁厚、淀粉含量高^[5], 在形态学上与叶状体有很大不同, 能够使浮萍抵御外界的恶劣环境^[6]。在自然环境中, 浮萍大多数种类能够在夏季末期产生一种休眠体, 并沉降到水体底部不再生长, 当经过寒冷的冬天刺激及春天温度升高时, 其能够浮上水面并利用储藏的淀粉发芽而生长成叶状体^[7]。在实验室环境中, 低温、脱落酸 (ABA) 及 N、S、P 等营养元素的缺乏也能诱导浮萍形成休眠体^[6]。浮萍又是一种潜在的能源植物, 生长速度快, 每 2~3 d 可实现生物量翻倍^[8], 最高的生长速度可达到干质量 12.4 g/(m²·d), 而浮萍在不同的生长环境下淀粉含量差异较大, 可占到干质量的 3%~75%^[5,9]。浮萍可经发酵产生乙醇, 产量达到 6.42 × 10³ L/hm², 比同等条件下玉米生产的乙醇产量高 50%^[10], 与玉米、甘薯等传统能源植物相比, 浮萍还可以净化猪场污水和重金属污染的水体, 不会占用大量耕地, 不会造成粮食危机^[2,11]。

目前, 有关植物淀粉合成和降解途径的研究较多, 而有关浮萍在形成休眠体过程中淀粉的积累机制研究相对较少。有研究表明, 植物叶片通过光合作用产生暂时性淀粉, 并通过降

解产生蔗糖, 提供淀粉合成的原材料; 蔗糖在蔗糖合成酶的作用下分解为果糖、UDP-葡萄糖, 进一步形成 6-磷酸葡萄糖或 1-磷酸葡萄糖; 6-磷酸葡萄糖在 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶 (ADP-glucose pyrophosphorylase, AGPase) 的作用下形成葡聚糖链, 在淀粉合成酶和淀粉分支酶的作用下形成直链淀粉和支链淀粉, AGPase 是淀粉合成的限速酶^[12], 其活性受到抑制将导致淀粉合成途径部分和全部终止, 其活性或表达量的升高将会促进淀粉的合成^[13-14]。淀粉的分解途径主要是在 α 、 β -淀粉酶和糖化酶的作用下, 水解直链淀粉和支链淀粉形成葡萄糖^[15]。本试验采用 ABA 诱导紫萍 (*S. polyrrhiza*) 形成休眠体, 研究其淀粉合成和降解途径相关酶的活性及叶绿素含量变化, 以揭示浮萍休眠体形成过程中影响淀粉含量变化的因素, 为其进一步开发利用奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 休眠体与叶状体的获得

紫萍 NJ016 取自四川大学荷花池, 1% NaClO 处理 60~90 s, 无菌水清洗 2~3 次; 转移到无菌营养液中, 使用 Wang 等描述的方法^[5]诱导紫萍形成休眠体并进行收集; 无菌条件下, 将休眠体培养在含 100 mL 霍格兰氏 (Hoagland's) 营养液的 250 mL 鄂伦麦尔 (Erlenmeyer) 三角瓶中, 置于温度为 (25 ± 1) °C、光照度为 7 000 lx、光—暗周期为 16 h—8 h 的温室中培养 7 d, 即得由休眠体产生的第 1 代大小相同的叶状体。

1.2 试验处理

将叶状体在无菌条件下转接到含 1% 蔗糖、pH 值为 5.8 的 Hoagland's 营养液中, 置于温度为 (25 ± 1) °C、光照度为 7 000 lx、光—暗周期为 16 h—8 h 的温室中培养 3 d, 加入 1 μmol/L ABA, 分别收集 ABA 处理前 (0 d) 及 ABA 处理 1、2、3、5 d 时的叶状体。ABA 处理 7 d 时, 可从叶状体中分离收集到休眠体。

1.3 测定内容与方法

1.3.1 淀粉含量 将干燥叶状体或休眠体进行研磨, 取干粉

收稿日期: 2017-06-06

基金项目: 河北省教育厅自筹基金 (编号: 16273609)。

作者简介: 赵 昭 (1986—), 男, 河南新乡人, 博士, 讲师, 从事浮萍生物能源研究。Tel: (0312) 5079364; E-mail: zhaozhao2005001@163.com。

通信作者: 刘存歧, 博士, 教授, 从事水体污染控制与治理研究。Tel: (0312) 5079364; E-mail: liucunqi@sina.com。

0.3 g, 加入 3 mL 6 mol/L HCl, 沸水浴处理 2 h, 用 6 mol/L HCl 或 6 mol/L KOH 调节 pH 值到 7.0 ± 0.5 ; 加入 200 μL $\text{Pb}(\text{COOH})_2$ 沉淀蛋白, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 高效液相色谱法 (HPLC 法) 测定葡萄糖含量, 计算淀粉含量, 公式^[16]为:

$$\text{淀粉含量} = \text{葡萄糖含量} \times 0.909.$$

1.3.2 叶绿素含量 称取叶状体或休眠体鲜质量 1 g, 加入丙酮、乙醇配比为 1:1 的反应液萃取 72 h, 酶标仪上分别测定波长为 663、645 nm 的吸光度, 叶绿素浓度按照张宪政的方法^[17]计算。

1.3.3 AGPase 酶活性和 α 、 β -淀粉酶活性

1.3.3.1 粗酶液的提取^[18] 称取叶状体或休眠体鲜质量 0.5 g, 加入 pH 值为 7.5, 含 100 mmol/L HEPES - NaOH、8 mmol/L MgCl_2 、2 mmol/L EDTA、12.5% 甘油 (体积分数)、10 mg/L PVP - 40、50 mmol/L 2-巯基乙醇的提取液 5 mL, 研钵中研磨; 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。所有操作步骤均在冰上进行。

1.3.3.2 AGPase 酶和 α 、 β -淀粉酶活性的测定 采用分光光度计法^[19]测定 AGPase 酶和 α 、 β -淀粉酶的活性。测定 AGPase 酶活性时, 取 20 μL 粗酶液, 加入 110 μL pH 值为 7.4, 含 100 mmol/L HEPES - NaOH、1.2 mmol/L ADPG、3 mmol/L PPi 、5 mmol/L MgCl_2 、4 mmol/L DTT 的反应液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min 后沸水浴 30 s 终止反应, 10 000 r/min 离心 10 min; 取上清液 100 μL , 加入 5.2 μL 含 5.76 mmol/L NADP、0.08 U P - gucomutase (磷酸葡萄糖变位酶)、0.07 U G6P - 脱氢酶的比色液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min; 以 20 μL 煮沸的酶粗液作为对照, 测定波长为 340 nm 的吸光度。AGPase 活性单位定义为 U, 1 U 代表单位质量 (1 mg) 的酶在波长 340 nm 处 1 min 反应液的吸光度值增加 0.01。

测定 α 、 β -淀粉酶活性时, 首先制作麦芽糖标准曲线: 麦芽糖溶液与 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 沸水浴反应 5 min, 冷却, 测定波长为 520 nm 处的吸光度, 并建立以吸光度为纵坐标、麦芽糖含量为横坐标的回归方程。其次, 测定总淀粉酶活性: 取 10 mL 试管 2 支, 分别加入各 1 mL 的粗酶液、柠檬酸缓冲液; 分别加入 4 mL 0.4 mol/L NaOH, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 后各加入 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 1% 可溶性淀粉 2 mL, 水浴 5 min, 在含粗酶液的试管中加入 4 mL 0.4 mol/L NaOH 终止酶反应; 取 10 mL 刻度试管 3 支, 分别加入蒸馏水、粗酶液处理液、柠檬酸缓冲液处理液 2 mL; 每管加入 3,5-二硝基水杨酸溶液 2 mL, 沸水浴准确煮沸 5 min; 取出冷却, 加入 10 mL 蒸馏水, 摇匀, 波长 525 nm 处测定吸光度; 根据标准曲线计算出麦芽糖浓度、总淀粉酶活性。最后, 测定 α 、 β -淀粉酶活性: 粗酶液 70 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 min, 再按照总淀粉酶活性的测定方法测得 α -淀粉酶活性, 则得 β -淀粉酶活性 = 总淀粉酶活性 - α -淀粉酶活性。1 个 α 、 β -淀粉酶活性单位定义为单位质量 (1 mg) 的酶 1 min 催化底物所释放 1 nmol 麦芽糖。

1.3.4 蛋白含量 按照 Appenroth 等的方法^[20]测定。将粗酶液稀释 10 倍; 取稀释的酶液 1 mL, 加入 5 mL 考马斯亮兰 G-250 溶液, 充分摇匀, 静置 2 min, 测定波长 595 nm 处的吸光度, 根据以牛血清蛋白为标准制定的标准曲线计算蛋白含量。

1.4 数据分析

采用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计分析; 采用 Origin 8.0 软件进行作图; 采用单因素方差分析或 t 检验法对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 浮萍休眠体形成过程中淀粉含量及生长速度的变化

试验结果表明, 浮萍休眠体呈暗绿色, 边缘较厚。由图 1 可见, ABA 处理 0~1 d 即浮萍休眠体形成前期, 叶状体数量由 32 个增加到 50 个, 生长迅速; ABA 处理 1~2 d, 浮萍叶状体数目略有增加, 到 57 个, 生长速度增加趋缓; ABA 处理 3~7 d, 浮萍的叶状体数量减少, 叶状体繁殖受到一定抑制。由图 2 可见, ABA 处理 0~3 d, 浮萍叶状体淀粉含量由 20.9% 缓慢增加到 26.5%; ABA 处理 3~5 d, 浮萍叶状体出现较为快速的淀粉积累, 淀粉含量由 26.5% 增加到 36.7%; ABA 处理 7 d 即形成休眠体时, 休眠体中的淀粉含量迅速达到 65.0%。由此可见, 浮萍在休眠体形成过程中, 浮萍的生长受到抑制, 对糖类的利用降低, 从而将更多的糖储存起来, 淀粉积累是休眠体形成过程中最明显的特征。

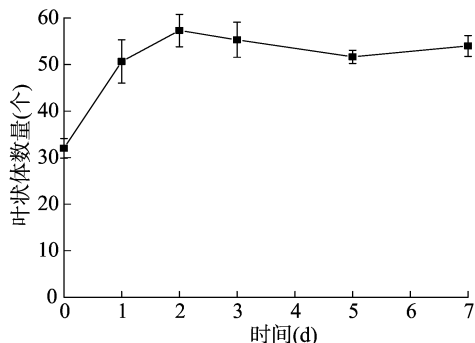


图1 浮萍休眠体形成过程中叶状体数量的变化情况

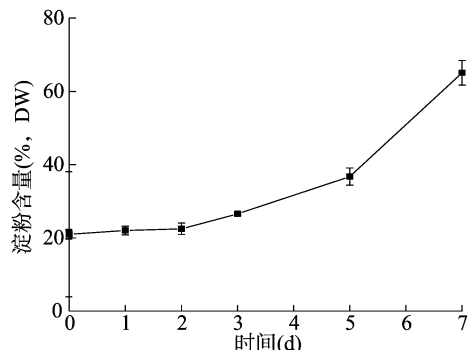


图2 浮萍休眠体形成过程中淀粉含量的变化情况

2.2 浮萍休眠体形成过程中叶绿素含量的变化

光合色素含量高低对浮萍光合作用强弱、淀粉积累多少具有重要的作用。由图 3、图 4 可见, 在浮萍休眠体形成过程中, 叶状体光合色素叶绿素 a (chl a)、叶绿素 b (chl b) 含量呈下降趋势, 与叶绿素 a 含量相比, 叶绿素 b 含量下降程度相对更大, 叶绿素 a、叶绿素 b 比值呈上升趋势; ABA 处理 0~2 d 即浮萍休眠体形成前期, chl a 含量基本保持不变, 而 chl b 含量明显下降; ABA 处理 2~5 d, 浮萍叶状体中的 chl a、chl b 含量均下降较快; 浮萍休眠体 (ABA 处理 7 d) 时的光合色素含量明显低于叶状体中的含量。

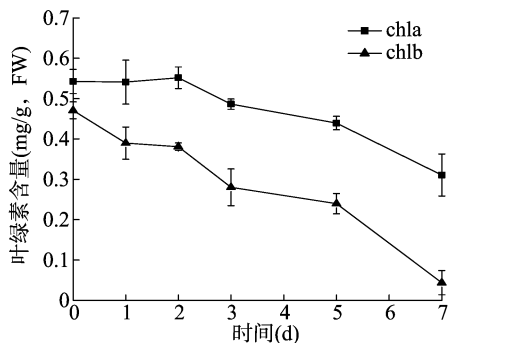


图3 浮萍休眠体形成过程中叶绿素含量的变化情况

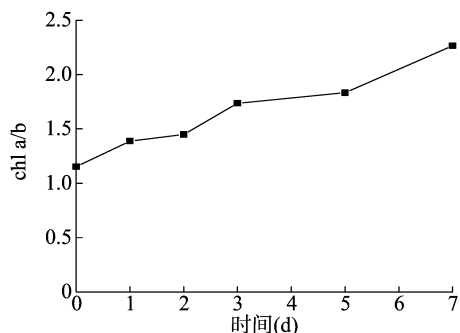


图4 浮萍休眠体形成过程中叶绿素 a、叶绿素 b 比值的变化情况

2.3 浮萍休眠体形成过程中 AGPase 活性的变化

AGPase 是淀粉合成的关键酶和限速酶,能催化 ATP 和葡萄糖合成 ADP + 葡萄糖,而 ADP + 葡萄糖又是合成直链淀粉和支链淀粉的底物。由图 5 可见,ABA 处理 0 ~ 2 d,浮萍

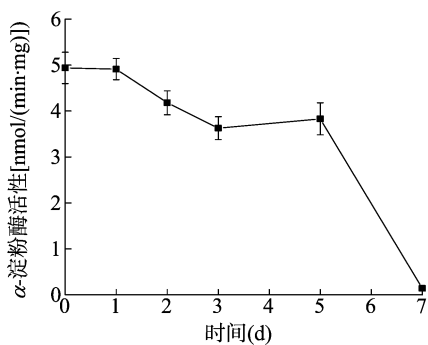


图6 浮萍休眠体形成过程中α、β-淀粉酶活性的变化情况

2.5 淀粉含量与 AGPase、α-淀粉酶、β-淀粉酶活性的相关性分析

由表 1 可见,在浮萍休眠体形成过程中,淀粉含量与 AGPase 活性呈不显著负相关,与 α、β-淀粉酶活性呈极显著负相关 ($P < 0.01$),相关系数分别为 -0.965、-0.888;α-淀粉酶活性和 β-淀粉酶活性呈不显著正相关。

3 结论与讨论

本试验通过 ABA 诱导紫萍叶状体形成休眠体,研究此过程中叶状体、休眠体中淀粉、叶绿素含量及 ADP + 葡萄糖焦磷酸化酶 (AGPase)、α-淀粉酶、β-淀粉酶的活性变化情况。结果发现,在浮萍形成休眠体过程中,叶状体的生长繁殖受到一定的抑制,其淀粉含量有所增加,这可能是由于浮萍叶状体生长速率的降低导致对糖类的利用降低,从而将更多的糖储

存起来,进而导致淀粉的积累,AGPase 活性在 ABA 处理 2 d 时有大幅度的增加,增幅达 71.8%,但在休眠体时明显下降,较未经 ABA 处理的叶状体其活性下降 99.8%,与 Wang 等的

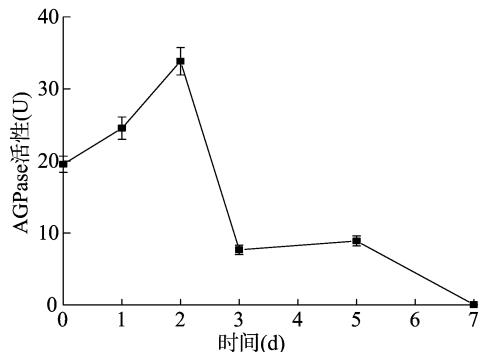


图5 浮萍休眠体形成过程中 AGPase 活性的变化情况

2.4 浮萍休眠体形成过程中 α、β-淀粉酶活性的变化

α、β-淀粉酶是淀粉水解的关键酶,并能将直链葡聚糖水解成麦芽糖。由图 6 可见,在浮萍休眠体形成过程中,α、β-淀粉酶活性整体呈下降趋势;与初始叶状体即未用 ABA 处理相比,ABA 处理 5 d 时叶状体 α、β-淀粉酶活性分别下降 22.4%、46.0%;ABA 处理 0 ~ 1 d 即休眠体形成前期,α-淀粉酶活性基本保持不变,而 β-淀粉酶活性有明显增加;与叶状体相比,浮萍休眠体中的 α、β-淀粉酶活性明显低于叶状体,α、β-淀粉酶活性均受到不同程度的抑制。

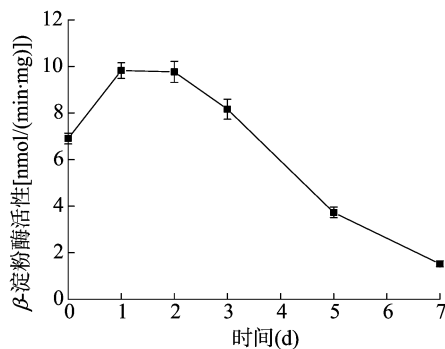


表 1 浮萍休眠体形成过程中淀粉含量与 AGPase、α-淀粉酶、β-淀粉酶活性的相关性分析

指标	相关系数			
	淀粉含量	AGPase 活性	α-淀粉酶活性	β-淀粉酶活性
淀粉含量	1.000			
AGPase 活性	-0.760	1.000		
α-淀粉酶活性	-0.965 **	0.717	1.000	
β-淀粉酶活性	-0.888 **	0.825 *	0.779	1.000

注: *、** 分别代表两因素之间显著 ($P < 0.05$)、极显著相关 ($P < 0.01$)。

存起来,进而导致淀粉的积累,AGPase 活性在 ABA 处理 2 d 时有大幅度的增加,增幅达 71.8%,但在休眠体时明显下降,较未经 ABA 处理的叶状体其活性下降 99.8%,与 Wang 等的

研究结论^[5]相吻合;淀粉酶 α 、 β -淀粉酶的活性整体呈下降趋势。通过相关性分析结果表明,在浮萍休眠体形成过程中,淀粉含量与淀粉酶活性高度相关,淀粉含量与 α 、 β -淀粉酶的相关系数分别高达-0.965、-0.888,达到极显著负相关水平($P < 0.01$),淀粉含量与AGPase活性的相关性未达到显著水平。因此,浮萍休眠体主要通过抑制淀粉的降解来积累淀粉。

休眠体是浮萍生命周期中的一个重要阶段,是浮萍储存淀粉、抵御外界恶劣环境的一个重要器官,显微镜下可观察到其带有细微的根。浮萍休眠体相当于陆生植物的种子,不同之处在于浮萍休眠体的形成是无性繁殖,而植物种子的形成主要通过有性繁殖。浮萍休眠体的形成主要受2个因素的影响:一种是激素,另一种是营养元素尤其是磷元素的缺乏。浮萍在经过冬眠之后,在合适的温度和光照条件下,细胞内的碳水化合物会发生变化,并从2个分生侧囊中生长出新的叶状体。ABA是一种重要的植物激素,在植物逆境胁迫和调节植物种子休眠中发挥着重要的作用,能够使植物更好地适应恶劣环境,同时,ABA在植物体内对糖类、淀粉的合成和运输也发挥着重要的作用。有研究表明,少根紫萍在磷缺乏形成休眠体过程中,其淀粉含量可以达到75%^[21],相当于谷类玉米、高粱、小麦种子的淀粉量^[22];大米悬浮培养的细胞中,ABA能上调AGPase基因的表达,而在种子萌发过程中,ABA会抑制GA诱导的 α -淀粉酶基因表达和 β -淀粉酶活性^[15];低浓度(1 $\mu\text{mol/L}$) ABA能够提高淀粉的合成,而高浓度(100 $\mu\text{mol/L}$) ABA反而会降低淀粉含量^[23]。ABA对淀粉的合成发挥着重要的作用,有关浮萍叶状体或休眠体中的淀粉与ABA含量的相关性还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Verma R, Suthar S. Utility of duckweeds as source of biomass energy: a review[J]. *Bioenergy Research*, 2015, 8(4): 1589-1597.
- [2] 韩玉洁, 杨琳, 赵玲, 等. 浮萍植物在水体净化中的研究及展望[J]. *生物学通报*, 2016, 51(6): 4-7.
- [3] Tao X, Fang Y, Xiao Y, et al. Comparative transcriptome analysis to investigate the high starch accumulation of duckweed (*Landoltia punctata*) under nutrient starvation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 72-87.
- [4] 梁雪, 贺锋, 徐栋, 等. 人工湿地植物的功能与选择[J]. *水生态学杂志*, 2012, 33(1): 131-138.
- [5] Wang W Q, Messing J. Analysis of ADP-glucose pyrophosphorylase expression during turion formation induced by abscisic acid in *Spirodela polyrhiza* (greater duckweed) [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 5-19.
- [6] Ley K L, Appenroth K J. carbohydrate metabolism as a possible physiological modulator of dormancy in turions of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden[J]. *Plant Science*, 1997, 129(1): 1-7.
- [7] Appenroth K J, Nickel G. Turion formation in *Spirodela polyrhiza*: the environmental signals that induce the developmental process in nature [J]. *Physiologia Plantarum*, 2010, 138(3): 312-320.
- [8] Chang S M, Yang C C, Sung S C. The cultivation and the nutritional value of *Lemnaceae* [J]. *Bulletin Chi Kan*, 1977(24): 19-30.
- [9] Cheng J J, Stomp A M. Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed [J]. *Clean - Soil Air Water*, 2010, 37(1): 17-26.
- [10] Xu J, Cui W, Cheng J J, et al. Production of high-starch duckweed and its conversion to bioethanol [J]. *Biosystems Engineering*, 2011, 110(2): 67-72.
- [11] Cui W, Cheng J J. Growing duckweed for biofuel production: a review [J]. *Plant Biology*, 2015, 17(S1): 16-23.
- [12] Sakulsingharoj C, Choi S B, Hwang S K, et al. Engineering starch biosynthesis for increasing rice seed weight: the role of the cytoplasmic ADP-glucose pyrophosphorylase [J]. *Plant Science*, 2004, 167(6): 1323-1333.
- [13] Tsai C Y, Nelson O E. Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity [J]. *Science*, 1966, 151(3708): 341-343.
- [14] Kang G Z, Liu G Q, Peng X Q, et al. Increasing the starch content and grain weight of common wheat by overexpression of the cytosolic AGPase large subunit gene [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 73(6): 93-98.
- [15] Chen H J, Wang S J. Abscisic acid enhances starch degradation and sugar transport in rice upper leaf sheaths at the post-heading stage [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34(4): 1493-1500.
- [16] Zhang L, Zhao H, Gan M Z, et al. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4573-4579.
- [17] 张宪政. 作物生理研究法 [M]. 北京: 农业出版社, 1992.
- [18] Zhao Z, Shi H J, Wang M L, et al. Effect of nitrogen and phosphorus deficiency on transcriptional regulation of genes encoding key enzymes of starch metabolism in duckweed (*Landoltia punctata*) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 86(5): 72-81.
- [19] Nakamura Y, Yuki K, Park S Y, et al. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains [J]. *Plant & Cell Physiology*, 1989, 30(6): 833-839.
- [20] Appenroth K J, Augsten H, Liebermann B, et al. Effects of light quality on amino acid composition of proteins in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. using a specially modified bradford method [J]. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*, 1982, 177(3): 251-258.
- [21] Reid M S, Bielecki R L. Response of *spirodela oligorrhiza* to phosphorus deficiency [J]. *Plant Physiology*, 1970, 46(4): 609-613.
- [22] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 627-642.
- [23] Akihiro T, Mizuno K, Fujimura T. Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(6): 937-946.