

## 光强对木本植物叶绿体中活性氧产生的调控作用

李美茹 曾纪晴 王以柔 刘鸿先 林植芳

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

**摘要:** 将亚热带自然林的乔木荷树、蕙蒴和灌木九节、罗伞幼苗栽种于3种不同光强下, 分析叶片中的LOX、XOD、MAO活性和分离叶绿体中和活性氧 $O_2^-$ 、 $OH\cdot$ 和 $H_2O_2$ 的产生速率差别的结果表明: 全自然光下生长的叶片中LOX和XOD活性最高, 降低光强则2个酶的活性下降。叶绿体中的3种活性氧的产生随光强变化的趋势与LOX及XOD活性变化相似。这反映高的LOX和XOD活性是高光强下叶片中出现较高活性氧水平的原因之一。供试灌木的LOX和XOD活性低于乔木, 但其活性及活性氧形成速率对光强变化的敏感性高于乔木。

**关键词:** 木本植物; 光强; 活性氧; 脂氧合酶; 黄嘌呤氧化酶

**中图分类号:** Q945

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-3395(2001)03-0256-06

## THE REGULATION OF LIGHT INTENSITY IN ACTIVE OXYGEN PRODUCTION OF CHLOROPLASTS IN WOODY PLANTS

LI Mei-ru ZENG Ji-qing WANG Yi-rou LIU Hong-xian LIN Zhi-fang

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** The seedlings of two tree species (*Schima superba* and *Castanopsis fissa*) and two shrub species (*Psychotria rubra* and *Ardisia quinquegona*) from a subtropical natural forest were grown in pots under 100%, 36% and 16% natural light. The difference in activities of lipoxxygenase (LOX), xanthine oxidase (XOD) and monoamine oxidase (MAO) in leaves and the production rates of three active oxygen species ( $O_2^-$ ,  $OH\cdot$ ,  $H_2O_2$ ) in chloroplasts were compared. Leaves grown under 100% sun light showed highest activities of LOX and XOD. The changing trends of  $O_2^-$ ,  $OH\cdot$  and  $H_2O_2$  in chloroplasts responding to light intensity were significant and similar to that of LOX and XOD activities. High activities of LOX and XOD might be one of the causes of high active oxygen level in leaves that were adapted to high light intensity. The tested understory shrub plants showed lower LOX and XOD activities than the canopy tree species, but the response of enzyme activity and active oxygen production to the change of light intensity was more sensitive than tree species.

**Key word:** Woody plants; Light intensity; Active oxygen; Lipoxxygenase; Xanthine oxidase

太阳光是植物生命活动的能源, 调控着植物的生长发育和生理功能。光照不足或过量都对植

**收稿日期:** 2000-04-10

**基金项目:** 中国科学院重点基金(KZ925-J1)资助项目。

**缩写:** LOX: 脂氧合酶 Lipoxxygenase; XOD: 黄嘌呤氧化酶 Xanthine oxidase; MAO: 单胺氧化酶 Monoamine oxidase;  $O_2^-$ : 超氧阴离子 Superoxide anion;  $OH\cdot$ : 羟自由基 Hydroxide radical; APX: 抗坏血酸过氧化物酶 Ascorbate peroxidase; GAO: 乙醇酸氧化酶 Glycollate oxidase; DPPH: 2-苯基-苦基苯肼 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

物的结构与功能造成不利的影 响。近年来对光合作用与相关的氧代谢研究已证明光合作用机构中未被利用的过量光能是导致体内活性氧大量形成, 出现内部氧化逆境的重要原因<sup>[1]</sup>。光也是影响和调节植物抗氧化能力的重要因子<sup>[2]</sup>。彭长连等报告光照强度可调控木本植物叶片对外源稳定性有机自由基DPPH·的清除能力<sup>[3]</sup>。我们对细胞保护酶SOD和APX活性的研究也证明其受到光强的影响(待发表)。然而, 光强是否影响一些在其催化反应过程中形成活性氧的酶类活性? 至今尚未见报道。而关于植物在逆境下加速活性氧产生的研究, 大多以叶片为分析材料, 对于长期适应于不同光强的叶片中的叶绿体尤其是自然林植物的叶绿体中活性氧的产生、积累状况对光强响应的直接测定工作甚少。为了深入揭示光因子介入细胞活性氧代谢的机制, 了解自然林中不同生活型植物的光强适应性差别, 本文以生长于3种光强下的阳生乔木和耐阴灌木为试验材料, 研究了与活性氧形成有关的脂氧合酶(LOX)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、单胺氧化酶(MAO)的活性和叶绿体中主要的活性氧品种 $O_2^-$ 、 $OH\cdot$ 和 $H_2O_2$ 水平的变化。

## 1 材料和方法

**植物材料及光强处理** 乔木树种荷木(*Schima superba* Gardn & Champ)、黧蒴(*Castanopsis fissa* R. & W.), 灌木树种九节(*Psychotria rubra* Lour. Poir)、罗伞(*Ardisia quinqueгона* Bl.)的幼苗采自广东鼎湖山自然保护区常绿阔叶林下。盆栽, 每盆1株, 在三种光强下即100%自然光以及用网眼塑料黑布遮荫使光强达自然光的36%和16%下生长。全自然光在8月份生长季中的中午达 $1\ 605\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (以LCP-4光合仪测定)。每种光强下栽种30盆苗, 8个月后, 收集植物上部3-4位成熟叶片为分析材料。

**脂氧合酶(LOX)活性** 叶片用50 mmol/L  $K_2HPO_4$ 缓冲液(pH 7.5, 含0.5% Triton X-100)提取,  $10\ 000\times g$ 离心15 min, 上清液作粗酶液。底物亚油酸的配制参照Grossman和Zakut的方法<sup>[4]</sup>, 酶活性测定按Surry<sup>[5]</sup>的分光光度法测定反应产物共轭二烯在234 nm吸收的增加, 以 $\Delta A_{234\text{nm}}\ \text{g}^{-1}\ \text{FW}\ \text{min}^{-1}$ 表示活性大小。

**黄嘌呤氧化酶(XOD)活性** 酶液制备同LOX。以次黄嘌呤为底物, 参考Greenlee和Handler的方法<sup>[6]</sup>, 但反应系统含磷酸缓冲液(pH 7.6, 30 mmol/L), EDTA  $60\ \mu\text{mol/L}$ , 次黄嘌呤 $49\ \mu\text{mol/L}$ 。加酶液启动的反应, 300 nm测定产物尿酸吸收的增加, 以 $\Delta A_{300\text{nm}}\ \text{g}^{-1}\ \text{FW}\ \text{min}^{-1}$ 表示活性大小。

**单胺氧化酶(MAO)活性** 酶液制备同上。参照Wojtczak等的测定方法<sup>[7]</sup>, 略作修改。底物为Kynuzamine, 反应系统含 $20\ \mu\text{mol/L}$ 磷酸缓冲液(pH 7.4),  $MgCl_2\ 6\ \text{mmol/L}$ , 琥珀酸 $5\ \text{mmol/L}$ 和适量的酶液。双波329 nm和338 nm测定, 以 $\Delta A_{338-329\text{nm}}\ \text{g}^{-1}\ \text{FW}\ \text{min}^{-1}$ 代表酶活大小。

**叶绿体的分离** 参照叶济宇和赵海英的方法<sup>[8]</sup>。10 g叶片加60 ml提取介质, 捣碎后6层纱布过滤,  $400\times g$ 离心2 min, 收集叶绿体重悬浮于2.5 ml悬浮液中, Avnon法测叶绿体含量。

**$O_2^-$ 产生速率的测定** 用 $NO_2^-$ -羟胺-对氨基苯磺酸法<sup>[9]</sup>。

**$OH\cdot$ 生成量的测定** 参照Babbs和Gale的方法<sup>[10]</sup>。

**$H_2O_2$ 产生速率的测定** 叶绿体提取液0.1 ml, 磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.0) 1.7 ml, 于不同时间记录240 nm吸收的变化, 以 $\mu\text{mol}\ H_2O_2\ \text{mg}^{-1}\ \text{Chl}\ (2\text{h})^{-1}$ 表示 $H_2O_2$ 产生速率。

上述主要生化试剂为Sigma产品, 分光光度计为Backman Du-7型。

## 2 实验结果

### 2.1 光强对LOX、XOD和MAO活性的影响

LOX催化不饱和脂肪酸氧化反应产生脂质过氧化产物的过程中可形成多种活性氧和自由基<sup>[11,12]</sup>。我们对几种木本植物叶片LOX活性的分析结果(表1)可见,在100%自然光下生长的叶片中LOX活性最高,弱光下活性下降。36%自然光下,乔木荷树和黛菊叶片的LOX活性约为全自然光的70%-97%,在灌木九节和罗伞叶片中约为45%左右。16%自然光下的LOX活性则大多只略低于36%自然光者。从LOX活性水平看来,处于相同的光环境中的乔木种的活性明显高于灌木种。然而提高光强使灌木种LOX活性上升的幅度更大。

表1 光强对叶片LOX活性( $\Delta A_{234\text{nm}} \text{g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ )的影响

Table 1 Effects of light intensity on LOX activity ( $\Delta A_{234\text{nm}} \text{g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ ) in leaves

生活型 Life form	种名 Species	相对光强 Relative light intensity		
		100%	36%	16%
乔木 Tree	荷树 <i>Schima superba</i>	2.8612±0.0463	2.0169±0.0465	2.0917±0.010
	黛菊 <i>Castanopsis fissa</i>	3.3068±0.0066	3.2080±0.0320	3.1998±0.0191
灌木 Shrub	九节 <i>Psychotria rubra</i>	1.2760±0.0011	0.5900±0.0100	0.3348±0.0008
	罗伞 <i>Ardisia quinquegona</i>	1.0334±0.0058	0.4738±0.0006	0.5567±0.0108

XOD催化黄嘌呤氧化酶生成尿酸和超氧自由基 $\text{O}_2^-$ 及羟自由基 $\text{OH}\cdot$ 。黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统已成为常规使用的活性氧发生源。考察XOD活性的变化可在一定程度上了解体内活性氧形成的状况。表2是对4种木本植物在3种光强下生长的叶片中XOD活性测定的结果。XOD活性随光强不同而变化的趋势与LOX近似,即乔木植物的XOD活性比灌木植物高,100%自然光下XOD活性最高,36%自然光下下降至全自然光下的36%-54%,16%自然光下的活性继续降至约21%-46%。这表明供试植物的XOD活性也受叶面光强的影响,高光强可提高XOD活性。

表2 光强对叶片中XOD活性( $\Delta A_{300\text{nm}} \text{g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ )的影响

Table 2 Effects of light intensity on XOD activity ( $\Delta A_{300\text{nm}} \text{g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ ) in leaves

生活型 Life form	种名 Species	相对光强 Relative light intensity		
		100%	36%	16%
乔木 Tree	荷树 <i>Schima superba</i>	0.3100±0.0003	0.1400±0.0001	0.0700±0.0001
	黛菊 <i>Castanopsis fissa</i>	3.7400±0.0041	1.4400±0.0002	1.1000±0.0002
灌木 Shrub	九节 <i>Psychotria rubra</i>	0.1040±0.0003	0.0560±0.0	0.0480±0.0006
	罗伞 <i>Ardisia quinquegona</i>	0.1120±0.0004	0.0400±0.0002	0.0240±0.0

表3 光强对叶片中MAO活性( $\Delta A_{338-329\text{nm}} \text{g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ )的影响

Table 3 Effects of light intensity on MAO activity ( $\Delta A_{338-329\text{nm}} \text{g}^{-1} \text{FW min}^{-1}$ ) in leaves

生活型 Life form	种名 Species	相对光强 Relative light intensity		
		100%	36%	16%
乔木 Tree	荷树 <i>Schima superba</i>	21.2800±0.0595	22.8100±0.0250	24.5800±0.2752
	黛菊 <i>Castanopsis fissa</i>	6.0240±0.0025	9.5760±0.0316	9.1280±0.0082
灌木 Shrub	九节 <i>Psychotria rubra</i>	0.1940±0.0015	0.4790±0.0014	0.5350±0.0016
	罗伞 <i>Ardisia quinquegona</i>	4.1680±0.0191	6.3600±0.2092	6.4800±0.0110

MAO催化不同类型单胺的氧化,同时产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[13]</sup>。动物和医学方面对MAO有不少研究,而植物中MAO的研究鲜有报道。本文初步测定的结果(表3)表明,MAO活性在遮荫条件下有所增强,似乎受到高光的一定程度的抑制,这显然与LOX和XOD活性的变化明显不同,原因尚不清楚。

### 2.2 光强对O<sub>2</sub><sup>-</sup>、OH·和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>产生速率的影响

图1A可见,不同生长光强对4种木本植物叶绿体中O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率有明显的影响,提高光强可刺激O<sub>2</sub><sup>-</sup>的形成和积累,弱光下形成较少的O<sub>2</sub><sup>-</sup>。乔木和灌木叶绿体中O<sub>2</sub><sup>-</sup>的形成速率对光强变化的响应表现了不同的敏感性。在16%自然光下,乔木种的O<sub>2</sub><sup>-</sup>形成速率比全自然光降低了57%(荷树)和25%(黎蒴),灌木九节和罗伞则分别降低了80%和75%,对光强变化的敏感性更高。

叶绿体中OH·形成的水平和叶片生长光强的关系(图1B)与O<sub>2</sub><sup>-</sup>的变化规律一致,同样在100%自然光下最高,随光强减弱而降低(除个别数据外),只是乔木和灌木种之间的差别相对小些。与100%自然光相比,16%光使乔木种叶绿体的OH·平均降低26%,灌木种平均降低51%。将不同光强下OH·与O<sub>2</sub><sup>-</sup>的相对变化作线性回归分析,两者呈正相关性,r=0.9496。

叶绿体中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的形成速率也与光强有关,荷树和罗伞的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平因光强不同而有明显的变化,弱光下生长的叶片叶绿体形成的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显著减少(图1C)。

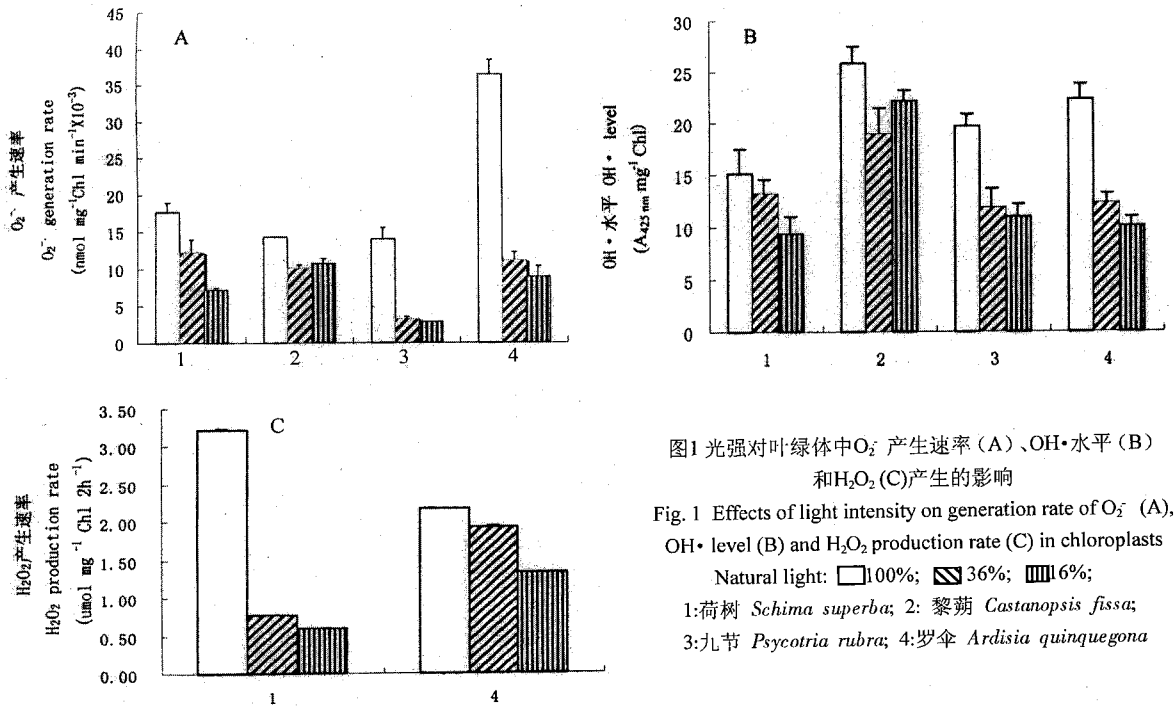


图1 光强对叶绿体中O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率(A)、OH·水平(B)和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(C)产生的影响

Fig. 1 Effects of light intensity on generation rate of O<sub>2</sub><sup>-</sup> (A), OH· level (B) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production rate (C) in chloroplasts  
Natural light: □100%; ▨36%; ▨6%;  
1:荷树 *Schima superba*; 2:黎蒴 *Castanopsis fissa*;  
3:九节 *Psycotria rubra*; 4:罗伞 *Ardisia quinquegona*

### 3 讨论

叶绿体和线粒体是植物细胞中产生活性氧的主要场所,当光合电子传递和呼吸电子传递以O<sub>2</sub>为电子受体产生O<sub>2</sub><sup>-</sup>的单电子还原时即可形成O<sub>2</sub><sup>-</sup>,并由于O<sub>2</sub><sup>-</sup>的歧化反应或Fenton反应而衍生了

$H_2O_2$ 和 $OH\cdot$ <sup>[14]</sup>。 $O_2^-$  还可通过LOX和XOD等的酶促反应过程中产生<sup>[11]</sup>。而 $H_2O_2$ 也可由乙醇酸氧化酶(GAO)、胺氧化酶(如MAO)和氨基酸氧化酶等的氧化反应形成<sup>[15]</sup>。4种天然林植物在全自然光下生长,叶片的LOX和XOD活性皆比弱光下显著增强(表1,2),与林植芳等报告同样的植物在全自然光下生长时的高GAO活性<sup>[16]</sup>相一致,表明这些参与活性氧形成的酶类活性可能直接或间接地受到光的调节,从而成为强光下的叶片具有较高的活性氧水平的原因之一。对叶绿体中几种活性氧水平的进一步分析(图1),证实了不同光强下活性氧产生速率的变化与LOX和XOD活性变化规律相似。Salin曾指出强光和高 $O_2$ 浓度下,叶绿体中的氧自由基可能显著增加<sup>[4]</sup>,我们的结果为此推论提供了实验证据。本文中,不同光强下 $OH\cdot$ 与 $O_2^-$ 形成的相对比例之间的密切正相关性更显示了 $O_2^-$ 在叶绿体响应于光强度变化中的核心调控作用,即 $OH\cdot$ 的水平主要取决于 $O_2^-$ 的多寡。

光和 $O_2$ 是叶绿体产生活性氧的必要条件,照光叶绿体中 $O_2$ 浓度高于空气中的 $O_2$ 浓度,且 $O_2$ 对叶绿体PSI还原侧的还原型铁氧还蛋白有很强的亲和力,因此,叶绿体中的 $O_2$ 浓度不是限制活性氧形成的因子<sup>[17]</sup>。本文的弱光处理在通风条件良好的遮荫大棚中进行,全自然光和16%自然光叶片的叶温约相差2℃,故温差也不是影响所检测酶类和活性氧的主要因子。可见,光强的不同才是影响活性氧代谢的主要因子。自然光下高水平的活性氧可能是其对高的光合电子流速率和过剩光能<sup>[18]</sup>的响应以及叶绿体中与活性氧的形成有关的LOX活性增强的综合结果。弱光下较低的LOX、XOD活性和相应较低的活性氧水平,降低了细胞内产生氧化逆境的可能性。因此,不同光强下几种木本植物活性氧形成能力的变化是光对活性氧代谢调节的表现。全自然光下生长的两种林下灌木叶绿体的 $O_2^-$ 和 $OH\cdot$ 比16%自然光(此光强略高于自然林下光强5%–8%),平均增高了3.08倍和0.99倍,而两种乔木的 $O_2^-$ 和 $OH\cdot$ 仅增高0.89和0.38倍(图1A,B)。这反映不同生活型(乔木,灌木)和不同生态性(阳生性或耐阴性)植物的活性氧代谢对光环境变化响应特性的差别,群落下层灌木对光强变化比乔木更敏感。在自然光下灌木植物较高的活性氧水平与较低的抗氧化能力<sup>[19]</sup>相一致,表明耐阴性植物在高光下的代谢调节能力较低。

## 参考文献:

- [1] Foyer C H, Lelandais M, Kunert K J. Photooxidative stress in plants [J]. *Physiol Plant*, 1994, 92: 696–717.
- [2] Miskza N P, Fatma T, Singhal G. Development of antioxidative defense system of wheat seedlings in response to high light [J]. *Physiol Plant*, 1995, 95: 77–82.
- [3] 彭长连, 林植芳, 林桂珠. 光对4种木本植物叶片清除有机自由基能力的影响 [J]. *植物学报*, 2000, 42 (4): 393–398.
- [4] Grossmen S, Zakut R. Determination of the activity of lipoxygenase [J]. *Method Biochem Anal*, 1978, 25: 303–326.
- [5] Surrey K. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity [J]. *Plant Physiol*, 1964, 39: 65–70.
- [6] Greenlee L, Handler P. Xanthine oxidase. VI. Influence of pH on substrate specificity [J]. *J Biochem*, 1964, 239: 1090–1095.
- [7] Wojtczak A B, Brdiczka D, Wojtczak L. Is monoamine oxidase activity in the outer mitochondrial membrane influenced by the mitochondrial respiratory rate? [J] *Biochem Biophys Acta*, 1995, 1229: 249–255.
- [8] 叶济宇, 赵海英. 完整叶绿体的快速制备及其完整率的测定 [J]. *植物生理学通讯*, 1982, (1): 59–61.
- [9] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系 [J]. *植物生理学通讯*, 1990, (6): 55–57.
- [10] Babbs C F, Gale M J. Colorimetric assay for methanesulfinic acid in biological samples [J]. *Anal Biochem*, 1987, 163: 67–73.
- [11] Lynch D V, Thompson J E. Lipoxygenase-mediated production superoxide anion in senescing plant tissue [J]. *FEBS Lett*, 1982, 173: 251–254.
- [12] Siedow J N. Plant lipoxygenase: structure and function [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, 42: 145–188.
- [13] 戴堯人, 倪逸声. 单胺氧化酶与衰老 [J]. *生物科学动态*, 1986, 3: 14–22.

- [14] Salin M L. Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast [J]. *Physiol Plant*, 1988, 72: 681-689.
- [15] Talor H, Talor C W. *Metalolism of Amino Acids and Amines* [M]. New York and London: Academic Press, 1971, Vol. XIIB, 597-605.
- [16] Lin Z F, Peng C L, Sun Z J, et al. Effect of light intensity on the partitioning of photosynthetic electron transport to photorespiration in four subtropical forest plants [J]. *Sci China (Ser C)*, 2000, 43: 347-354.
- [17] Asada K. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues [A]. In: Foyer C H, Mullineaux P M. *Causes of Photooxidative Stress and Ameliorization of Defense Systems in Plants* [M]. Boca Raton Ann Arboz, London, Tokyo: CRC Press, 1994, 78-104.
- [18] 林植芳, 彭长连, 林桂珠. 光氧化作用引起几种亚热带木本植物膜损伤和PSII失活 [J]. *植物学报*, 1999, 41: 871-879.

---

## 《中国南方果树》和《柑桔与亚热带果树信息》2002 年征订启事

《中国南方果树》是由中国农业科学院柑桔研究所主办的专业性期刊, 报道内容分三大板块: 一是柑桔类果树, 二是荔枝、龙眼、香蕉、芒果、杨梅、枇杷等其他常绿果树, 三是梨、桃、苹果、葡萄、李等落叶果树。对落叶果树, 突出在南方温暖湿润气候条件下与北方不同的栽培管理、病虫害防治特点及适宜发展的品种。双月刊。每期定价 4.00 元, 全年 24.00 元。各地邮局办理订阅, 邮发代号: 78-13。漏订者可直接与本编辑部联系, 常年办理邮购。编辑部地址: 重庆北碚歇马中国农业科学院柑桔研究所内; 邮编: 400712; 联系电话: (023) 68242146; 传真: (023) 68242912。

《柑桔与亚热带果树信息》是由中国农业科学院柑桔研究所主办。报道分析与南方果业(包括常绿果树和落叶果树)有关的科技、经济、政策信息, 注重信息报道“快、全、便、准”。信息主要来源: 一是从国内外数百种杂志、报纸中精选, 二是分布于各地的数百名通讯员的稿件, 三是特约专家撰文, 四是业内外人士的自由来稿。主要栏目: “专家论坛”、“区域果业”、“市场分析”、“果乡短波”、“产销快讯”、“优新品种”、“实用技术·柑桔”、“实用技术·常绿果树”、“实用技术·落叶果树”、“病虫害防治”等。月刊, 每期定价 3 元, 全年共 36 元。各地邮局均可办理订阅, 邮发代号: 78-10。另外, 可随时向中国南方果树信息中心邮购, 汇款地址: 重庆市北碚区歇马镇中国农业科学院柑桔研究所, 邮编: 400712。电话: (023) 68242903、68242146。