

32-38

大豆萌发过程的活性氧代谢

傅爱根 王爱国[√] 罗广华

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

Q945.34
Q949.751.9

摘要 本文研究了大豆萌发过程中活性氧的产生与清除, 并探讨了光因子在活性氧代谢中的作用。大豆呼吸强度、 O_2 产生速率及 H_2O_2 水平都在吸水后第四天达到高峰, 然后下降, 三者的变化趋势同步。SOD、POD 及 APX 的活性随萌发过程而逐渐增强, 最后趋于平稳。SOD 同工酶谱中分别于萌发的第二、第三天各出现一条新的酶带。CAT 在萌发的初期猛增 50 倍左右, 之后趋于稳定。在三种清除 H_2O_2 的酶 (CAT、POD、APX) 中, CAT 清除 H_2O_2 的能力远远高于 POD 与 APX, CAT 可能是大豆萌发过程中最主要的 H_2O_2 清除酶。光萌发时呼吸强度低于暗中萌发, 但 O_2 产生速率与 H_2O_2 水平高于暗萌发, 光萌发时 O_2 的产生占总耗氧量的 1.1-2.7%, 而暗中萌发为 0.9-1.3%。光条件下 SOD、APX 活性明显高于暗中萌发, 而 POD 与 CAT 则在光和暗条件下相差不大。

关键词 大豆种子; 活性氧; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶 代谢

ACTIVE OXYGEN METABOLISM IN SOYBEAN DURING GERMINATION

Fu Aigen Wang Aiguo Luo Guanghua

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Abstract The generation of active oxygen and the activities of active oxygen scavenging enzymes as well as the effect of light on active oxygen metabolism were studied in soybean during germination. The O_2 uptake, the rate of O_2 production, and the level of H_2O_2 in imbibed seeds all increased at the beginning of germination, but all decreased after 4 days of imbibition. Gradual increases in activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) were observed at the early stage of germination, then the activities of SOD, POD, and APX tended to be in a certain level with little alteration. A new band of SOD isoenzyme presented respectively on the 2nd and 3rd day of seed imbibition. There was about a 50-fold increase in catalase (CAT) activity at the early stage of germination, and then turned stable. Among the three H_2O_2 -scavenging enzymes (CAT, POD and APX), the capacity of CAT for scavenging H_2O_2 was much higher than those of POD and APX. So it seems that CAT is the most important H_2O_2

本文为国家自然科学基金资助项目

1996-09-09 收稿; 1997-07-08 修回

缩写: O_2^- —超氧化物阴离子自由基; SOD—超氧化物歧化酶; POD—过氧化物酶; APX—抗坏血酸过氧化物酶;

CAT—过氧化氢酶

scavenging enzyme during germination. Although the O_2 uptake of seeds germinating under light was lower than that in the dark, the rate of O_2^- production and the H_2O_2 level under light were higher than those in the dark. The ratio of O_2^- production to total O_2 uptake was 1.1–2.7% in seeds germinated under light, while this ratio was 0.9–1.3% in the dark. The activities of SOD and APX under light were higher than those in the dark, but the activities of POD and CAT had no distinct difference under light and dark.

Key words Soybean seed; Active oxygen; Superoxide dismutase; Catalase

植物衰老过程中的生理现象以及逆境胁迫对植物的伤害作用都与活性氧的产生和清除能力密切相关,因此,当前植物活性氧代谢的研究大都与植物逆境生理或植物衰老生理联系在一起^[1,2]。活性氧是植物氧代谢过程中的必然中间产物,它对于植物生命也不是绝对有害或无用的产物。植物的很多生理过程需要活性氧的参与,对于植物细胞的某些过程来说,活性氧是十分重要的甚至是必不可少的。现有不少资料表明^[1-4]活性氧在信息传导、杀灭病原体、细胞壁形成、乙烯合成、启动基因表达、过剩能量耗散等生理过程皆有重要的生理作用。

种子萌发是一个十分复杂的生理过程。种子从吸水开始,细胞内部便发生一系列生理生化变化,如细胞器、大分子及酶系统的活化或重新合成,贮藏物质的转化与转移,植物激素的合成与活化等。这其中的很多生理过程已被人们广泛研究,但在种子萌发过程中的活性氧代谢方面,人们关注很少,鲜见报道。种子萌发时物质和能量代谢旺盛,呼吸作用也必十分强烈。呼吸作用是植物活性氧的来源之一,从理论上推测,种子萌发过程的活性氧代谢应该极为活跃。 H_2O_2 与种子萌发有很大关系, H_2O_2 处理可促进种子的萌发^[5]。过氧化氢酶与种子活力有一定相关性,有人以过氧化氢酶活性作为种子活力的指标^[6]。1966年Major^[7]提出了解除休眠的磷酸戊糖途径(PP途径)假说,认为PP途径的增强是打破休眠的关键,凡能促进PP途径的控速步骤(NADPH的再氧化)的因子,均有打破休眠、促进萌发的作用。硫脲、 NO_2^- 、羟胺等对种子萌发有促进作用,Hendricks和Taylorson^[8]认为这些因子能不可逆地抑制CAT酶活性,故 H_2O_2 的分解只有通过POD以及吡啶核苷酸苯醌还原酶(PNQR)与醌的氧化相连接,以促进NADPH的再氧化,从而激活PP途径。这种假说必须有二个前提:1.种子萌发时有大量的 H_2O_2 产生;2. H_2O_2 主要由CAT分解。

本文中,我们测量了种子萌发时 O_2^- 和产生速率与 H_2O_2 水平,以及活性氧清除酶SOD、CAT、POD、APX的活性变化,以探讨种子萌发过程中活性氧的生理作用机制及种子萌发过程中活性氧代谢的模式。

1 材料与方 法

市售大豆(*Glycine max*)种子于温室中沙基培养,一组为暗生长,一组光照培养(光强为 $24 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)。分别取吸水萌发1、2、3、4、5、6 d后的幼苗为材料,去种皮待用。

O_2^- 吸收 瓦氏呼吸计法,以 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{FW}$ 为单位。

O_2^- 产生速率 王爱国方法^[9],1 g左右样品用1 ml磷酸缓冲液(pH7.8, 50 mmol/L)匀浆,0.1 ml 10 mmol/L NH_2HCl 反应20 min,加17%对氨基苯磺酸1 ml和7 mmol/L α -萘胺1 ml显色1 min,以2 ml乙醚萃取一次,取水相,再用3 ml正丁醇萃取,将正丁醇相于

530 nm 比色, 用 NaNO_2 作标准曲线, 从标准曲线上求出 O_2^- 浓度, 再换算成 O_2^- 的产生速率, 单位为 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{FW}$ 。

H_2O_2 含量 TiCl_4 法^[10]: 1 g 组织用 2 ml 冷丙酮提取, 取 1 ml 冷丙酮液加 0.1 ml 20% TiCl_4 的浓 HCl 液反应 1 min, 用 0.2 ml 17 mol/L 氨水沉淀, 沉淀用丙酮悬浮洗涤 5 次, 最后溶于 3 ml 2 mol/L 的 H_2SO_4 中, 测 A_{410} , 标准曲线用 H_2O_2 重复, 空白用冷丙酮重复。

SOD 活性测定 NBT 法^[11], 以抑制 NBT 光化还原 50% 为一个酶单位。

CAT 活性测定 1 ml 反应液含: 磷酸缓冲液 (pH7.8) 50 mmol/L 和 H_2O_2 5 mmol/L, 加入适量酶液反应 5 min, 用 2 ml 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。用 TiCl_4 法测定剩余的 H_2O_2 , 用 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示 CAT 的活性。

POD 活性测定 愈创木酚法, 3 ml 反应液含: 磷酸缓冲液 (pH6.0) 0.2 mol/L、 H_2O_2 5 mmol/L、愈创木酚 5 mmol/L, 加适量酶液反应 5 min, 测 A_{470} ($E=26.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 将 A_{470} 换算成浓度, 最后以 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示 POD 活性。

APX 活性测定 3 ml 反应液含磷酸缓冲液 50 mmol/L (pH7.8)、抗坏血酸 0.05 mmol/L、 H_2O_2 0.1 mmol/L 及 EDTA 0.1 mmol/L, 加入适量酶液测 A_{265} ($E=15 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 以 $\mu\text{mol/L H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示 APX 活性^[12]。

2 实验结果

2.1 大豆萌发过程中活性氧的产生

2.1.1 呼吸强度的变化

种子在萌发时发生的一系列生理生化变化大都是需能反应, 因此种子萌发的开始都表现为呼吸代谢的加强, 大豆种子也不例外(图 1)。随着萌发的推进, 种子呼吸强度逐渐增强, 第 4 天达到高峰, 随后由于贮藏物质消耗以及生理变化剧烈程度的下降, 呼吸速率有所降低。

从图 1 中可见, 暗萌发的呼吸速率高于光下萌发, 这可能是因为暗中生长更旺盛, 光因子有抑制幼苗生长的作用。

2.1.2 O_2^- 的产生速率

O_2^- 是 O_2 的单电子还原产物, 它是生物体内最初产生的活性氧。从图 2 可知, 大豆在萌发开始的 1-4 d 内, O_2^- 产生速率逐渐上升, 在第 4 天达到高峰, 之后稍有降低, 这种变化趋势

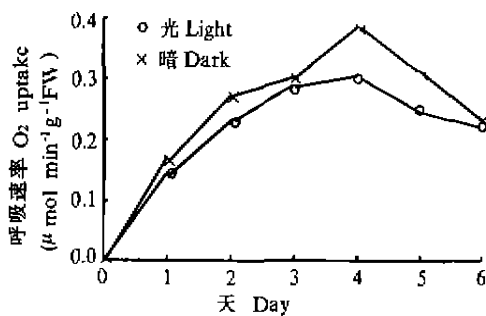


图 1 大豆萌发过程中的呼吸速率
Fig. 1 O_2 uptake in soybean seeds during germination

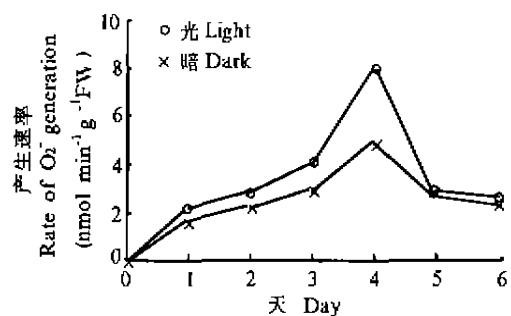


图 2 大豆萌发过程的 O_2^- 产生速率
Fig. 2 The rate of O_2^- generation in soybean seeds during germination

与呼吸速率的变化相似。罗广华认为 O_2^- 的产生与 O_2 吸收呈密切的正相关^[13]。本实验进一步证实了这一结论。虽然大豆在暗中萌发的呼吸强度高于光下萌发的呼吸强度,但暗中萌发时 O_2^- 产生速率却低于光照下种子萌发时的 O_2^- 产生速率。从 O_2^- 产生速率(图2)和呼吸速率(图1)可见,光照下种子萌发时 O_2^- 的产生占总耗氧量比例的 1.1–2.7%,而暗中萌发则为 0.9–1.3%。这说明光在大豆萌发时促进了 O_2^- 的产生。

2.1.3 H_2O_2 水平的变化

植物细胞内的 H_2O_2 主要由 O_2^- 歧化而形成。图3展示大豆种子萌发过程中 H_2O_2 水平的变化。可以看出,萌发过程大豆 H_2O_2 水平的变化趋势与 O_2 吸收、 O_2^- 的产生相一致,都是先上升后下降,三者之间密切相关。光下种子萌发的 H_2O_2 水平高于暗萌发种子的 H_2O_2 水平,光对萌发时大豆的 H_2O_2 积累有一定的促进作用。Patterson^[10]测定了很多植物叶片中 H_2O_2 水平是在 0.1–0.6 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ 之间,本实验大豆萌发时的 H_2O_2 水平明显高于这个数值,可见,萌发时大豆的 H_2O_2 积累是较强的。

2.2 大豆萌发过程中活性氧清除酶的变化

2.2.1 超氧化物歧化酶

SOD 是生物体内专一清除 O_2^- 的酶,它在活性氧清除系统中占有十分重要的位置。从图4中可以看出,在暗中萌发的初期,大豆 SOD 的活性逐渐增强,活性上升约 2 倍之后变化不太明显,基本稳定在一个水平上。光下萌发的大豆 SOD 活性明显高于暗中萌发的 SOD 活性。

图5为萌发过程中大豆 SOD 同工酶谱(分为 a、b、c 三组)。在整个萌发过程中, b 组酶没

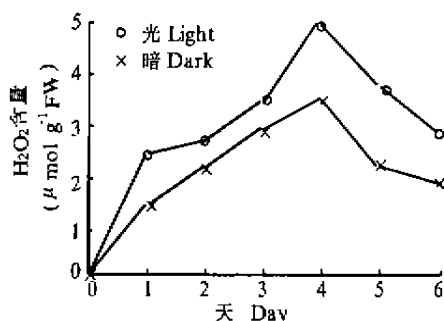


图3 大豆萌发过程中的 H_2O_2 含量
Fig. 3 H_2O_2 content in soybean seeds during germination

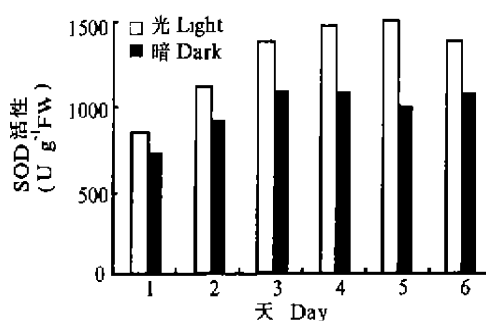


图4 大豆萌发过程的 SOD 活性变化
Fig. 4 SOD activity in soybean seeds during germination

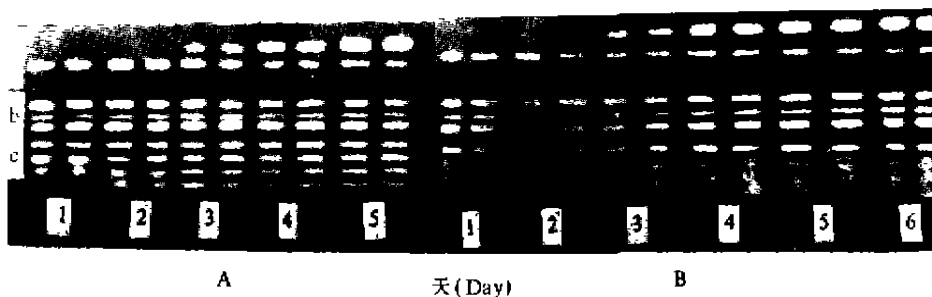


图5 大豆在光(A)和暗(B)萌发过程中 SOD 同工酶谱
Fig. 5 SOD zymogram in soybean seeds during germination under light (A) and in darkness (B)

有太大变化, 表现十分稳定, a 组酶在萌发的第 3 天出现一条迁移率最大的新 SOD 酶带, 随着萌发过程的推进, 这一新 SOD 酶带的活性越来越强。c 组酶在萌发的第 2 天就出现一条新的 SOD 酶带。光下萌发与暗中萌发的 SOD 酶谱的变化趋势相同, 光下 SOD 酶谱与暗中 SOD 酶谱差异在于 c 组酶: 光下的酶带清晰、明显, 而暗中萌发的带模糊不清。

2.2.2 过氧化氢酶、过氧化物酶及抗坏血酸过氧化物酶

过氧化氢酶是植物体内以 H_2O_2 为底物的酶, 分解 H_2O_2 为 O_2 和水, 它对细胞内的 H_2O_2 分解有重要作用。从图 6 可知, 大豆种子吸水后第 1 天的 CAT 活性很低, 但之后迅猛上升, 吸水萌发的第 3 天的 CAT 活性是萌发第 1 天的 50 倍以上, 猛增之后, 其变化出现平台效应, 保持在一个比较稳定的水平上。我们研究了萌发过程中的 CAT 酶谱, 但没有发现 CAT 类型的变化(资料略)。光下发育与暗中发育的大豆在 CAT 活性变化上没有太大的差异, 光对 CAT 活性影响不大。

过氧化物酶也是植物体内 H_2O_2 的清除酶, 它和 CAT 不同的是需要 H_2O_2 之外的另一个底物。在萌发的初期, 大豆 POD 活性逐渐增加, 在活性上升 2.5 倍以后变化趋于缓慢, 保持一个相对稳定的水平。在萌发初期, 光下发育的 POD 略高, 但后来则与暗中生长时的 POD 相差无几。

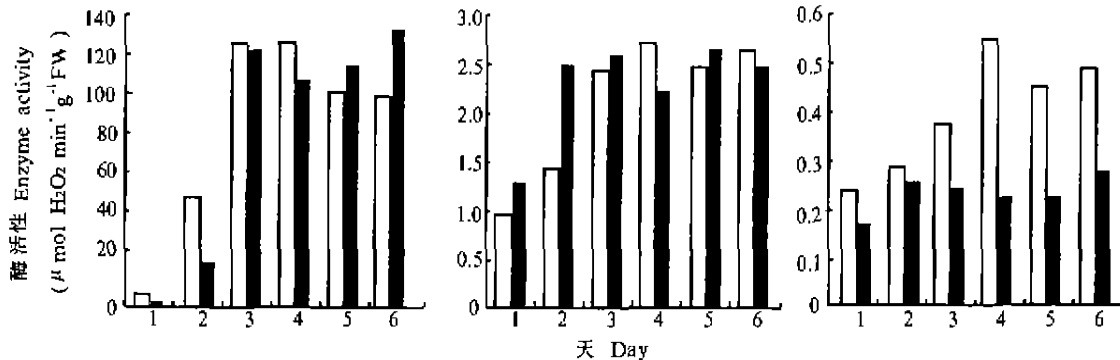


图 6 大豆萌发过程中的 CAT、POD 和 APX 活性变化

Fig. 6 CAT, POD and APX activities in soybean seeds during germination

抗坏血酸过氧化物酶是以抗坏血酸为底物清除 H_2O_2 的酶, 在叶绿体中, 人们没有发现过氧化氢酶的存在。Nakano 和 Asada^[14] 认为 APX 是叶绿体中清除 H_2O_2 的关键酶, 它在保护叶绿体免受活性氧伤害的作用中有十分重要的意义, 因此它受到越来越多的关注。在萌发过程的开始, 光下萌发和暗中萌发的大豆 APX 活性都呈现上升趋势, 但后来暗中萌发的大豆 APX 活性不再上升, 而光下萌发大豆的 APX 持续增长, 并于第 4 天出现最高的水平。可见, 光对大豆萌发过程中的 APX 活性有明显的促进作用。

3 讨论

在植物细胞内, 线粒体的呼吸电子传递链的电子漏以及叶绿体光合电子传递链的电子漏是超氧化物阴离子自由基 (O_2^-) 的主要来源。在黑暗中萌发的大豆叶绿体发育受阻, H_2O_2 和 O_2^- 的形成主要来自于线粒体的电子漏。黑暗萌发时 O_2^- 的产生占总 O_2 吸收的 0.9—1.3%, 这跟 Puntanlo 的实验结果相一致^[13]。但这并不是植物体内真正的 O_2^- 产生速率, 植物细胞中 O_2^- 产生

部位的附近,一般都有SOD的分布, O_2^- 一旦形成,SOD能很快将它歧化成 H_2O_2 。因此实验中得到的 O_2^- 产生速率只是细胞内 O_2^- 产生速率与 O_2^- 清除速率的差值,真正的 O_2^- 速率肯定高于这个数值。Nohl^[15]认为约有20%左右的 O_2^- 可逃脱SOD的歧化作用。

光下萌发的大豆呼吸强度低于暗中萌发,可能是光因子抑制了大豆的生长速度。从外观上看,暗中萌发的大豆生长速度高于光下萌发,呼吸作用更强烈一些,但光下萌发的大豆 O_2^- 产生速率及 H_2O_2 水平皆高于暗中萌发的,光促进了植物活性氧的产生,其原因有三个方面:1.加大呼吸作用过程中电子漏的比率,加剧线粒体中 O_2^- 的产生;2.促进大豆叶绿体的发育,使活性氧的形成多一个重要来源;3.促进细胞中过氧化物酶、乙醛酸循环体、某些酶反应等(除线粒体和叶绿体)的活性氧的产生,其中第二方面的作用可能是最重要的。

植物体内SOD活性与 O_2^- 产生速率有很大的相关性,大豆萌发过程中,在 O_2^- 产生速率及 H_2O_2 水平上升的同时,SOD活性也逐渐增加,SOD活性受到 O_2^- 产生速率的诱导,这种内源SOD活性的上升反映了植物自身的一种保护机制: O_2^- 吸收的猛增带来了 O_2^- 上升, O_2^- 水平的上升诱导了SOD活性上升,而这种增加的SOD活性使 O_2^- 限制在一定水平内,使 O_2^- 不至对植物本身造成伤害。一般认为 O_2^- 是在基因表达的水平上影响了SOD活性,那么这里存在着两种情况:1.使原有的基因表达得到加强;2.启动新的基因表达。从大豆萌发过程的SOD酶谱来看, O_2^- 可能既促进了新的SOD基因表达,又使原有基因的表达得到加强,光下萌发与暗中萌发的大豆SOD同工酶谱的差异在于c组酶,罗广华认为这组酶与叶绿体的发育密切相关^[16],本文支持这一观点。

H_2O_2 由SOD歧化 O_2^- 而形成, H_2O_2 的清除则由CAT、POD、APX等承担。从三种酶清除 H_2O_2 的能力来看,CAT清除 H_2O_2 的能力远远高于POD和APX,可以说,在整个萌发期间,大豆 H_2O_2 的清除工作主要由CAT承担,但 H_2O_2 在细胞中的主要来源为线粒体和叶绿体,它们不含CAT或CAT酶活性很小,那么,CAT是怎样清除 H_2O_2 的呢?Nohl^[15]认为 H_2O_2 对生物膜有很好的透性,它可以十分方便地穿过线粒体膜及叶绿体膜而进入细胞质,从而被CAT清除。Salin^[17]认为叶绿体中的各种酶对 H_2O_2 十分敏感,若 H_2O_2 不及时被清除则会损伤叶绿体,APX是叶绿体中清除 H_2O_2 的关键酶。但APX在萌发过程中活性远远低于CAT,可以说,萌发时APX对细胞中整个 H_2O_2 的清除作用不大。过氧化物酶在大豆萌发中活性也不高,罗广华证明^[16]:萌发期间,大豆过氧化物酶主要存在于种皮中,这种组织特异性定位的生理意义还有待进一步探讨。

打破休眠的PP途径假说至今还没有直接的证据。我们的实验说明:相对于植物的其它部位,植物在萌发过程中的 H_2O_2 水平是相当高的,而且有迹象表明CAT是 H_2O_2 的主要清除酶。如果那些抑制CAT活性的物质抑制过氧化物酶的活性,那么在CAT受抑制时 H_2O_2 的分解可能要由过氧化物酶承担,从而促进NADPH的再氧化,推动PP途径的进行。在一定程度上,本文支持休眠解除的PP途径假说。

参考文献

- 1 Bowler C et al. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol*, 1992, 43, 83-116

- 2 Foyer C H et al. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants *Plant Cell and Environment*, 1994, 17:501-523
- 3 Methy M C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*, 1994, 105:467-472
- 4 柯德森等. 氧自由基与乙烯形成的关系. *植物生理学通讯*, 1995, 31(6):447-450
- 5 张东向. H_2O_2 对水稻和玉米种子萌发的影响. *植物生理学通讯*, 1996, 32(2):115-117
- 6 傅家瑞. 种子生理. 北京: 科学出版社, 1985, 344-345
- 7 傅家瑞. 种子生理. 北京: 科学出版社, 1985, 194-199
- 8 Hendricks S B, Taylorson R B. Promotion of seed germination by nitrate, nitrite, hydroxylamine, and ammonium salts. *Plant Physiol*, 1974, 54:304-309
- 9 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. *植物生理学通讯*, 1990, 29(6):55-57
- 10 Patterson Bram et al. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using titanium (IV). *Analytical Biochemistry*, 1984, 139:487-492
- 11 王爱国等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. *植物生理学报*, 1983, 9(1):77-83
- 12 Puntarulo S et al. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiol*, 1988, 86:626-630
- 13 罗广华等. 几种外源因子对大豆幼苗 SOD 活性的影响. *植物生理学报*, 1990, 16(3):239-244
- 14 Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22(5):867-880
- 15 Nohl H, Hegner D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur J Biochem*, 1978, 82:563
- 16 罗广华等. 大豆和花生种子超氧化物歧化酶的同工酶研究. *植物生理学报*, 1984, 10(2):175-179
- 17 Salin M L. Chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. *Free Rad Res Comms*, 1991, 12-13:851-858