

大豆初生幼苗多胺氧化酶活性的细胞化学定位

覃广泉, 何生根*, 王明祖, 林启彬

(仲恺农业技术学院, 广州 510225)

摘要: 对大豆(*Glycine max* (L.) Merrill) “垦农 4 号”萌发种子和初生幼苗中的多胺氧化酶 (polyamine oxidase, PAO, EC 1.4.3.6) 的活性和分布进行了研究。结果表明, PAO 活性仅在种子萌发起始后 (吸胀后 24 h) 才检测到, 然后随着种子萌发进程, PAO 活性快速升高。但是, 在萌发种子 (吸胀后 72 h) 和初生幼苗 (吸胀后 120 h) 中, PAO 活性在各器官中的分布有明显差异。在萌发种子中, PAO 活性在胚根最高 ($5.17 \pm 0.91 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$), 胚轴次之, 胚芽再次之, 子叶活性最低 ($0.12 \pm 0.03 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$); 在初生幼苗中, PAO 活性在下胚轴中最高 ($5.47 \pm 0.66 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$), 幼根次之, 顶芽再次之, 子叶最低 ($0.10 \pm 0.03 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$)。这种差异对种子萌发和幼苗形态建成有积极意义。运用细胞化学定位在透射电镜下观察初生幼苗 PAO 在各部位的分布, 发现 PAO 主要定位在顶芽细胞的液泡膜上、子叶细胞的细胞壁及其外侧表面、下胚轴细胞的细胞壁及其表面, 且 PAO 与细胞壁表面结合较紧; 根细胞的细胞壁、细胞间隙、细胞膜、液膜上均有分布, 但以液泡膜分布居多。本研究结果进一步证实了 PAO 在细胞壁和细胞间隙有着较广泛的分布。首次报道 PAO 在细胞膜和液泡膜上有分布。

关键词: 大豆; 多胺氧化酶; 幼苗; 细胞化学定位

中图分类号: Q946.54

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)04-0327-06

Activity and Cytochemical Localization of Polyamine Oxidase in Soybean Seedlings during Early Growth

QIN Guang-quan, HE Sheng-gen*, WANG Ming-zu, LIN Qi-bin

(Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Activity and cytochemical localization of polyamine oxidase (PAO, EC 1.4.3.4) were studied in the young seedlings of Kennong 4 of *Glycine max* (L.) Merrill. PAO activity was undetected in the seeds until 24 h after imbibition, and increased during seed germination. However, the activity in various organs was significantly different in distribution between the germinating seeds (after 72 h of imbibition) and the young seedlings (after 120 h of imbibition). In the germinating seeds, PAO had the highest activity in radicles ($5.17 \pm 0.91 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$), followed by embryonal axis, embryonic bud, and lowest in cotyledons ($0.12 \pm 0.03 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$). In the young seedlings, PAO showed the maximum activity in hypocotyls ($5.47 \pm 0.66 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$), followed by juvenile root, apical bud, and lowest in cotyledons ($0.10 \pm 0.03 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$). The differences of PAO activity in distribution presumably had positive effects on seed germination as well as seedling morphogenesis. PAO localization was determined in various parts of the young seedlings by using a cytochemical technique and transmission electron microscope. PAO was present mainly on vacuole membrane in apical bud cells, cell wall of both cotyledons and hypocotyls as well as on its surface. In hypocotyls, PAO closely attached to the surface of cell wall, while in root cells, it appeared in cell wall, intercellular space, on cell membrane, and especially on vacuole membrane. The results confirmed that PAO

收稿日期: 2006-05-17 接受日期: 2006-06-09

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (001425); 广东省教育厅优秀人才培养基金项目 (Q02041) 资助

* 通讯作者 Corresponding author

widely spread in cell wall and intercellular space. Moreover, to the author's best knowledge, PAO was found on cell membrane and vacuole membrane for the first time.

Key words: Soybean (*Glycine max*); Polyamine oxidase; Seedlings; Cytochemical localization

多胺 (polyamines, PAs) 是生物体代谢过程中产生的具有较高生物活性的低分子量脂肪族含氮碱, 常见的有腐胺 (putrescine)、尸胺 (cadaverine)、亚精胺 (spermidine) 和精胺 (spermine) 等^[1]。二十世纪 60 年代美国耶鲁大学的 Galston 研究小组率先开展植物 PAs 的生理效应研究, 迄今国内外已有不少研究结果证实多胺与植物的生长发育有着密切的关系, 认为 PAs 是一类新型的植物生长调节物质, 但对其确切的生理功能和作用机制目前仍不清楚^[1-4]。

值得注意的是, 一些研究者报告种子萌发和幼苗形态建成过程存在着活跃的多胺氧化代谢过程, 具体表现在催化 PAs 降解的关键酶—多胺氧化酶 (polyamine oxidase, PAO) 活性在此阶段有着非常明显的变化^[5-7]。在吸胀而未萌发的水稻 (*Oryza sativa* L.)^[8]、小扁豆 (*Lens culinaris* Medic.)^[9]、豇豆 (*Vigna unguiculata* L.)^[10] 和花生 (*Arachis hypogaea* L.)^[11] 等种子中缺乏 PAO 活性, 萌发起始后 PAO 活性即出现并随着幼苗的形态建成过程快速提高, 达到峰值后又逐渐下降。关于种子萌发过程中多胺氧化代谢的生理功能, 目前尚无明确的结论, 归纳起来, 主要有 4 个方面: (1) 催化 PAs 氧化降解, 调节种子萌发过程中细胞 PAs 水平^[1,5,6]; (2) 催化 PAs 氧化时产生的 H₂O₂ 参与细胞壁建成^[12-14]; (3) 动用种子中贮存的 PAs 作为种子萌发和幼苗生长阶段的氮源和碳架, 即: PAs 经 PAO 氧化代谢转变成 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid), 后者可进一步转变成琥珀酸和丙氨酸^[3,6,15]; (4) 催化 PAs 氧化时产生的 H₂O₂ 和氨基醛抵御病原微生物^[3,16]。

种子萌发和幼苗形态发生是植物个体发育的重要阶段, 前人虽然对该过程中多胺氧化代谢进行了一些研究, 但目前还仅限于极少数的植物种类, 而且不同植物种子萌发过程中 PAO 的时空特点存在较大差异^[11]。对此阶段 PAO 生理功能的认识还基本上处于推测阶段, 缺乏令人信服的证据。另外, 大豆是世界上栽培面积最大的食用豆类作物, 也是我国一种重要的经济作物。本试验拟研究其种子萌发和早期生长阶段 PAO 活性的时空特点, 并首次运

用酶组织化学法对其初生幼苗中的 PAO 进行了细胞化学定位, 旨在为阐明该酶在种子萌发生长过程中的时空规律和生理功能提供参考。

1 材料和方法

试验材料 所用材料为当年收获的“垦农 4 号”大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill), 由黑龙江八一农垦大学提供。

种子萌发 将大豆种子 (每组 30 粒, 3 个重复) 用 1% (W/W) 的 NaClO 消毒 15 min, 蒸馏水冲洗 5 次, 浸泡 12 h, 然后置于蒸馏水润湿的滤纸上, 在光照培养箱中萌发, 温度 28±1℃, 8 h 光照 (90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), 以胚根突破种皮约为 5 mm 作为萌发标准。

种子和幼苗各部位 PAO 的提取 按照何生根等^[10]的方法并略作修改, 在大豆种子吸胀 (吸胀时间为 12 h) 和吸胀后 72 h 取胚芽、子叶、胚轴和胚根, 吸胀后 120 h 取顶芽、子叶、胚轴和根等部位, 各称取一定量, 按 1 g (FW): 5 的比例加入磷酸缓冲液 (PBS, 0.1 mol/L, pH7.0), 冰浴条件下充分研磨, 用 4 层脱脂纱布过滤, 取滤液离心 (10 000×g, 20 min, 4℃), 上清液为 PAO 粗提液, 置于冰浴中保存备用。

PAO 活性测定 按照 Angelini 等^[12]的方法并略作修改, 反应混合液含 1.2 ml PBS (0.1 mol/L, pH7.0), 0.2 ml 愈创木酚 (25 mmol/L), 0.2 ml 过氧化物酶溶液 (500 $\mu\text{g L}^{-1}$) 及 0.2 ml 酶提取液 (测定子叶时为 0.5 ml 酶提取液)。混合液在 30℃水浴中保温 5 min, 加入 0.2 ml 腐胺 (Put, 10 mmol/L) 启动反应, 并用 Beckman DU640 UV 分光光度计连续测定波长 470 nm 处光密度值的变化, 以 0.01 $\Delta\text{OD}_{470}\text{min}^{-1}$ 为 1 个酶活力单位 (U)。

PAO 细胞化学定位 参照 Maini 等^[17]的方法, 按以下步骤操作: 1) 取萌发 5 d 的大豆初生幼苗, 用刀片切取顶芽、子叶、胚轴和根立即放入 4% 戊二醛中固定 24 h; 2) 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗涤 5 次, 每次 20 min; 3) 洗涤后孵育 30–60 min (孵育液组成: 10 mmol/L CeCl₃ (氯化铯) 2 ml,

10 mmol/L 腐胺 2 ml, 0.1 mol/L pH7.0 磷酸缓冲液 1 ml, 设置对照不加腐胺, 内含磷酸缓冲液 3 ml); 4) 用磷酸缓冲液(同上)洗涤 2 次, 每次 15 min; 5) 用 1% 钨酸固定 3 h; 6) 再洗涤 1 h, 每次 10 min; 7) 系列酒精脱水, 环氧丙烷过渡, Epon812 包埋过夜; 8) LKB 11800 pyramitome 修片, Reichert Ultracut 超薄切片; 9) 醋酸双氧铀与柠檬酸铅双染, JEM1010 透射电镜观察拍照。

2 结果和分析

2.1 大豆种子萌发生长过程中 PAO 活性的变化

吸胀而未萌发的种子测不到 PAO 活性, 直到萌发起始(胚根突破种皮)后才开始检测到 PAO 活性。分别测定萌发种子(吸胀后 72 h)和初生幼苗(吸胀后 120 h)各部位的 PAO 活性表明(表 1): 在萌发种子中, PAO 活性在胚根最高 ($5.17 \pm 0.91 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$), 胚轴次之, 胚芽再次之, 子叶活性最低 ($0.12 \pm 0.03 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$); 在初生幼苗中, PAO 活性在胚轴中最高 ($5.47 \pm 0.66 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$), 根次之, 顶芽再次之, 子叶最低 ($0.10 \pm 0.03 \text{ U g}^{-1}\text{FW}$)。

表 1 大豆萌发种子(吸胀后 72 h)和初生幼苗(吸胀后 120 h)中 PAO 的活性

Table 1 PAO activities in germinating seeds (72 h after imbibition) and in young seedlings (120 h after imbibition) of soybean

萌发种子 Germinating seeds		幼苗 Young seedlings	
部位 Plant parts	PAO ($\text{U g}^{-1}\text{FW}$)	部位 Plant parts	PAO ($\text{U g}^{-1}\text{FW}$)
胚芽 Embryonic buds	0.48 ± 0.16	顶芽 Apical buds	0.71 ± 0.25
子叶 Cotyledons	0.12 ± 0.03	子叶 Cotyledons	0.10 ± 0.03
下胚轴 Hypocotyls	3.42 ± 0.59	下胚轴 Hypocotyls	5.47 ± 0.66
胚根 Radicls	5.17 ± 0.91	根 Roots	4.69 ± 0.53

n=3

2.2 大豆初生幼苗 PAO 的细胞化学定位

电镜观察大豆初生幼苗(吸胀后 120 h)各部位 PAO 的细胞定位表明: 在顶芽细胞中, 钨沉淀在液泡膜上分布明显(图版 I: 1, 2), 即 PAO 主要定位在液泡膜上; 在子叶细胞中, PAO 主要定位在细胞壁及其外侧表面(图版 I: 3, 4); 在下胚轴细胞中, PAO 也是定位在细胞壁及其外侧表面(图版 I: 5, 6),

但钨沉淀紧贴在细胞壁表面, 且沉淀颗粒较粗即下胚轴细胞中的 PAO 与细胞壁表面结合较紧, 活性也高; 在根细胞中, 钨沉淀在细胞壁、细胞间隙、细胞膜、液泡膜均有分布, 但以液泡膜上最为明显(图版 I: 7, 8), 即 PAO 在根细胞中分布较广, 但以液泡膜分布居多。

3 讨论

已有研究显示, PAO 在种子萌发后出现并随着幼苗的形态建成而快速升高^[8-11]。本试验用大豆为材料, 吸胀未萌发的大豆无 PAO 活性, 直至萌发起始后才检测到活性, 这与所报道的其它植物 PAO 活性的发生规律是一致的。本试验还表明, 在种子萌发阶段(吸胀后 72 h), PAO 活性主要分布在胚根和胚轴, 尤以胚根为最高(表 1)。但随着萌发的进行, 大豆初生幼苗(吸胀后 120 h)胚轴 PAO 活性上升最高, 其次是根, 顶芽 PAO 活性也略有上升, 但子叶的 PAO 活性变化不大, 一直很低(表 1)。在大豆萌发阶段(吸胀后 72 h), 胚根 PAO 活性最高, 我们认为这种分布对种子萌发和幼苗形态建成有积极意义。在萌发之初, 胚根最早出现 PAO 活性, PAO 可催化多胺生成 H_2O_2 , 而 H_2O_2 参与细胞壁木质化过程^[12-14], 有利于胚根扎入土中。随着萌发过程的进行, 胚轴中 PAO 活性显著升高, 胚轴木质化加快, 从而有利于胚轴出土。

研究 PAO 在植物组织和细胞中的定位有助于探讨该酶的生理功能。从已有文献报道来看, PAO 在细胞壁有着广泛的分布。Kaur-Sawhney 等^[18]报道, 燕麦(*Avena sativa* L.) 幼叶 PAO 活性随着纤维素酶对细胞壁的溶解而失去活性, 并随着细胞壁再生而恢复活性并逐渐提高。Angelini 等^[19]研究表明, 鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.) 胚轴 PAO 主要存在于经历木质化或胞壁硬化的组织中, 如木质部、厚壁组织和表皮。Slocum 和 Furey^[20]研究豌豆(*Pisum sativum* L.) 上胚轴和根中 PAO 的亚细胞分布时发现, 根中 PAO 主要定位于皮层细胞壁的胞间层(middle lamella)部分, 上胚轴 PAO 的活性则与维管组织细胞密切相关。在本试验中, 我们采用氯化钨法分别对大豆初生幼苗(吸胀后 120 h)的顶芽、子叶、下胚轴和根部的 PAO 进行细胞化学定位(图版 I), 在下胚轴细胞和子叶细胞中, PAO 主要定位在

细胞壁及其外侧,其中,下胚轴细胞壁外侧的 PAO 与细胞壁表面结合紧密,活性也高,而子叶细胞壁外侧的 PAO 则是松散地分布在细胞壁的表面附近;在顶芽细胞中,PAO 主要定位在液泡膜上;在根细胞中,PAO 在细胞壁、细胞间隙、细胞膜、液泡膜均有分布,但以液泡膜分布居多。迄今,关于植物 PAO 液泡膜上的分布和定位尚未见文献报道。关于细胞壁上 PAO 的生理功能,一些学者认为:胞壁质外体在生理上需要较高的 H_2O_2 产生,以驱动过氧化物酶(POD)催化的胞壁多聚体酚类残基的氧化交联和木质化的形成,而经 PAO 催化产生的 H_2O_2 可作为 POD 的底物,参与木质素的合成,有助于细胞壁硬化和幼苗出土^[12-14],另外还可能参与伤口愈合和抵抗病原体侵入过程^[16];至于液泡膜上 PAO 的生理功能目前尚不清楚,笔者推测可能与其多胺底物往往贮于液泡^[1,3,21]有关。Matilla^[6]曾提出,经由 PAO 催化的多胺氧化代谢途径可动用种子中丰富的 PAs 作为种子萌发和幼苗生长阶段的氮源和碳源,即:PAs 经 PAO 氧化代谢转变成 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid),后者可进一步转变成琥珀酸和丙氨酸。

Frebort 等^[22]用特异抗体的组织免疫法发现,黑曲霉(*Aspergillus niger*) AKU3302 的 AO (amine oxidase, 胺氧化酶)定位于细胞壁内部而非外层表面,并且观察到细胞内分泌泡结构也有 AO 存在。他们指出可能存在两种形式的 AO 蛋白,无活性的 AO-II 存在于细胞内,而有活性的 AO-I 是定位在质外体包括细胞间隙。无活性的 AO-II 可能是 PAO 错误折叠的前体,有氧时在细胞内自动生成并获得低水平的活性。令人感兴趣的是,组织化学定位的试验结果显示大豆子叶细胞液泡膜上有较丰富的 PAO 存在,但我们实际测得子叶的 PAO 活性却极低,这是否意味着子叶细胞液泡膜上的大量 PAO 也是一种无活性或低活性的 PAO 前体或原酶形式呢?另外,Cona 等^[14]研究表明,玉米(*Zea mays* L.)中胚轴表皮 PAO 基因的表达受光的促进,是一个依赖光敏素转录激发子所介导的过程。可见,PAO 的细胞定位在不同的生理条件下也会存在差异。我们认为,这种 PAO 活性分布的时空差异在一定程度上显示出 PAO 生理功能的复杂性。

致谢 在 PAO 细胞化学定位及电镜观察中得到了中国科学院华南植物园徐信兰同志的指导和帮助,在此深表感谢。

参考文献

- [1] Smith T A. Polyamines [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1985, 36:117-143.
- [2] Walden R, Corderiro A, Tiburcio A F. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113:1009-1013.
- [3] Bouchereau A, Aziz A, Larher F, et al. Polyamines and environmental challenges: recent development [J]. *Plant Sci*, 1999, 140: 103-125.
- [4] He S G, Joyce D, Wang M Z. Characterization of polyamine oxidase from the aquatic nitrogen-fixing fern *Azolla imbricata* [J]. *Plant Sci*, 2005, 169:185-190.
- [5] He S G(何生根), Huang X L(黄学林), Fu J R(傅家瑞). Polyamine oxidase in plants [J]. *Plant Physiol Commun(植物生理学通讯)*, 1998, 34:214-219.(in Chinese)
- [6] Matilla A J. Polyamine and germination [J]. *Seed Sci Res*, 1996, 6: 81-93.
- [7] Wang Y(王颖), He S G(何生根), Wu C L(伍春莲). Polyamine metabolism during seed germination [J]. *Seeds(种子)*, 2003, 2:53-56.(in Chinese)
- [8] Mukhopadhyay A, Choudhuri M M, Sen K, et al. Changes in polyamines and related enzymes with loss of viability in rice seeds [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22:1547-1551.
- [9] Angelini R, Federico R, Mancinelli A. Phytochrome-mediated control of diamine oxidase level in the epicotyl of etiolated lentil (*Lens culinaris* Medicus) seedlings [J]. *Plant Physiol*, 1988, 88: 1207-1209.
- [10] He S G(何生根), Huang X L(黄学林), Fu J R(傅家瑞). Change of polyamine oxidase activity during cowpea seed germination and its influencing factors [J]. *Acta Hort Sin(园艺学报)*, 2002, 29: 153-157.(in Chinese)
- [11] Wang Y(王颖), He S G(何生根), Wu C L(伍春莲), et al. Distribution of polyamine oxidase activity in germinating seeds and seedlings of two peanut cultivars [J]. *J Zhongkai Univ Agri Techn(仲恺农业技术学院学报)*, 2004, 2:28-31.(in Chinese)
- [12] Angelini R, Manes F, Federico R, et al. Spatial and functional correlation between diamine oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems [J]. *Planta*, 1990, 182:89-96.
- [13] Laurenxi M, Rea G, Federico R, et al. De-etiolation causes a phytochrome-mediated increase of polyamine oxidase expression in outer tissues of the maize mesocotyl: a role in the photomodulation of growth and cell wall differentiation [J]. *Planta*, 1999, 208:146-154.
- [14] Cona A, Cenci F, Cervelli M, et al. Polyamine oxidase, a hydrogen peroxide-producing enzyme, is up-regulated by light and down-regulated by auxin in the outer tissues of the maize mesocotyl [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131:803-813.
- [15] Scoccianti V, Torrigiani P, Bagni N. Putrescine oxidation in microbodies of *Helianthus tuberosus* tuber [J]. *Plant Physiol*

Biochem, 1993, 31:567-571.

- [16] Walters D R. Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism [J]. *New Phytol*, 2003, 159:109-115.
- [17] Maini L, Carraro L M, Torrigiani P, et al. Cytochemical localization of diamine oxidase in *Helianthus tuberosus* developing tubers [J]. *J Plant Phytol*, 1995, 146:375-378.
- [18] Kaur-Sawhney R, Flores H E, Galston A, et al. Polyamine oxidase in oat leaves: a cell wall-localized enzyme [J]. *Plant Phytol*, 1981, 68:494-498.
- [19] Anglini R, Federico R L. Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall [J]. *J Plant Physiol*, 1991, 97:778-785.
- [20] Slocum R D, Furey M J. Electro-microscopical cytochemical localization of diamine oxidase and polyamine oxidase in pea and maize tissue [J]. *Planta*, 1990, 183:443-450.
- [21] Pistocchi R, Keller F, Bagni N et al. Transport and subcellular localization of polyamines in carrot protoplasts and vacuoles [J]. *Plant Physiol*, 1988, 87:514-518.
- [22] Frebort I, Tanaka S, Matsushita K et al. Cellular localization and metabolic function of *n*-butylamine induced amine oxidases in the fungus *Aspergillus niger* AKU 3302 [J]. *Arch Microbiol*, 2000, 173:358-365.

图版说明

图版 I

CM: 细胞膜; CW: 细胞壁; IS: 细胞间隙; V: 液泡; VM: 液泡膜。

1. 对照, 顶芽细胞; Bar = 200 nm

2. 顶芽细胞液泡膜的 PAO 分布; Bar = 200 nm

3. 对照, 子叶细胞壁及细胞间隙; Bar = 200 nm

4. 子叶细胞壁及细胞间隙的 PAO 分布; Bar = 200 nm

5. 对照, 下胚轴细胞壁及细胞间隙; Bar = 200 nm

6. 下胚轴细胞壁及细胞间隙的 PAO 分布; Bar = 200 nm

7. 对照, 根细胞壁及细胞间隙; Bar = 200 nm

8. 根细胞壁、细胞间隙、细胞膜、液泡膜上 PAO 的分布。Bar = 500 nm

Explanation of plate

Plate I

CM: Cell membrane; CW: Cell wall; IS: Intercellular space; V: Vacuole; VM: Vacuole membrane.

1. Control, apical bud cell; Bar = 200 nm

2. Distribution of polyamine oxidase in vacuole membrane of apical bud cell; Bar = 200 nm

3. Control, cell wall and intercellular space of cotyledon cells; Bar = 200 nm

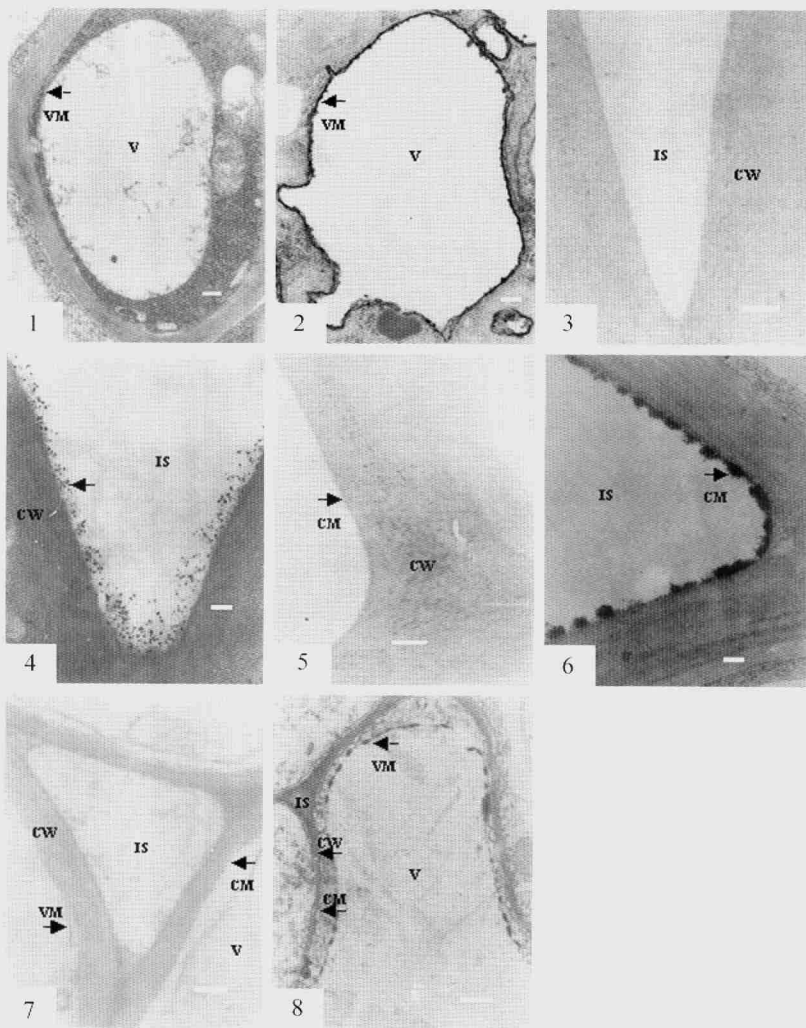
4. Distribution of polyamine oxidase in cell wall and intercellular space of cotyledon cells; Bar = 200 nm

5. Control, cell wall and intercellular space of hypocotyl cells; Bar = 200 nm

6. Distribution of polyamine oxidase in cell wall and intercellular space of hypocotyl cells; Bar = 200 nm

7. Control, cell wall and intercellular space of root cells; Bar = 200 nm

8. Distribution of polyamine oxidase in cell wall, in intercellular space, on cell membrane and on vacuole membrane of root cells. Bar = 500 nm



覃广泉等: 图版 I