

豇豆种子萌发过程中多胺氧化酶活性的变化及其影响因素

何生根¹ 黄学林² 傅家瑞²

(¹ 仲恺农业技术学院, 广州 510225; ² 中山大学生命科学院, 广州 510275)

摘 要: 吸胀而未萌发的豇豆 (*Vigna unguiculata* L.) 种子检测不到多胺氧化酶 (PAO) 活性, 直至萌发开始 (吸胀后 36 h) 才在胚芽、子叶和胚轴测到 PAO 活性, 此后各部分的 PAO 活性以不同速度增加, 而胚根一直没能检测到 PAO 活性。蛋白质合成抑制剂环己酰亚胺 (CHM) 吸胀处理可显著抑制萌发种子胚芽和子叶的 PAO 活性, 同时强烈抑制种子的萌发; 核酸合成抑制剂放线菌素 D 处理对豇豆胚芽和子叶的 PAO 活性以及种子萌发的影响则远不及 CHM 处理。豇豆种子在黑暗条件下萌发, 胚芽和子叶的 PAO 活性都明显高于光下。适宜浓度的腐胺和 CuCl_2 吸胀处理也可提高胚芽和子叶的 PAO 活性。

关键词: 豇豆; 多胺; 多胺氧化酶; 种子萌发; Cu^{2+}

中图分类号: S 643.4; Q 945 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 02-0153-05

种子萌发过程中多胺 (polyamines, PAs) 的水平及其合成酶的变化受到不少研究者的重视^[1]。近十年来, 人们十分重视种子萌发阶段催化 PAs 降解的关键酶——多胺氧化酶 (polyamine oxidase, PAO) 的研究^[2~5]。已有的研究结果表明, PAO 在豌豆、扁豆和菜豆等豆类蔬菜的种子萌发阶段异常活跃。一些研究者根据 PAO 活性主要集中在豌豆和扁豆等幼苗木质化程度最高的下胚轴基部的分布特点, 认为 PAO 可能参与种子萌发阶段的细胞壁木质化^[2,3,6]而涉及幼苗出土成苗过程。但 Scoccianti 等^[7]研究表明, PAO 活性在菜豆幼苗中的分布与上述植物完全不同, 其 PAO 活性绝大部分集中在幼苗的初生叶和子叶, 而下胚轴反而检测不到 PAO 活性。笔者最近的研究结果也表明 PAO 活性在豇豆初生幼苗中的分布特点与菜豆类似^[8]。本文拟进一步分析豇豆种子萌发过程中 PAO 活性的变化特点及影响因素, 籍此探索该酶与种子萌发之间的关系, 并为生产上提高豇豆以及其它种子萌发质量提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料处理

豇豆 (*Vigna unguiculata* L.) 品种为‘金丰 1 号’, 购于广东省种子公司。

1.1.1 种子萌发处理 取饱满健康、大小一致的种子用 1% 次氯酸钠溶液表面消毒, 用无菌水冲洗 3 次, 室温下吸胀 6 h 后播种在铺有滤纸的培养皿 (\varnothing 30 cm) 中, 置于 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光 16 h/暗 8 h, 光强 $90 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ 的培养箱萌发。萌发期间添加适量蒸馏水以保持滤纸湿润。

1.1.2 光照和黑暗处理 将消毒后种子播于铺有滤纸的培养皿内, 加无菌水至浸没种子, 然后放入 28 $^\circ\text{C}$ 培养箱吸胀 6 h 后倾去多余水分, 分别在连续黑暗 (简称为黑暗处理) 和 16 h 光照 ($90 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) / 8 h 黑暗 (简称为光照处理) 两种条件下萌发。每处理设 3 皿, 每皿播豇豆种子 50 粒。在种子吸胀后 144 h 剥取胚芽和子叶备用。

1.1.3 药剂吸胀处理 处理方法基本同上, 仅在种子吸胀阶段进行如下处理: (1) 分别在 50 mg/L Act-D (核酸合成抑制剂放线菌素) 和 20 mg/L CHM (蛋白质合成抑制剂环己酰亚胺) 溶液中吸胀

收稿日期: 2001 - 05 - 17; 修回日期: 2001 - 11 - 26

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (001425)

(以蒸馏水作为对照); (2) 将种子分别在不同浓度的 Put (腐胺) 溶液中吸胀; (3) 将种子在不同浓度 CuCl_2 溶液中吸胀。吸胀处理 6 h 后, 倾去多余溶液继续在暗中萌发。在种子吸胀后 144 h 统计处理 (1) 的发芽率, 同时取 (1) ~ (3) 处理的萌发种子剥取胚芽和子叶备用。

1.2 测定方法

豇豆种子萌发阶段各部分 PAO 的提取和活性测定参照文献 [8] 的方法。在豇豆种子吸胀后取种子按胚芽、胚轴、子叶和胚根分成 4 个部分, 各称取 0.5 g 分别加入 10 mL 磷酸缓冲液 (0.1 mol/L, pH 7.0) 研磨成匀浆, 4 层脱脂纱布过滤, 取滤液于 10 000 \times g 离心 20 min (4[°]), 上清液即为 PAO 提取液, 置于冰浴中保存备用。PAO 活性测定的反应混合液含 2 mL PBS (0.1 mol/L, pH 7.0)、0.2 mL 愈创木酚 (25 mmol/L)、0.1 mL 过氧化物酶溶液 (1 mg/mL) 及 0.2 mL PAO 提取液。混合液于 30[°] 水浴预保温 2 min 后分别加入 0.1 mL Put (20 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 $\text{OD}_{470}/\text{min}$ 为 1 个酶活力单位 (U)。蛋白质含量测定按文献 [9] 的方法, BSA 为标准蛋白质。

2 结果与分析

2.1 豇豆种子萌发过程中 PAO 活性的变化

如图 1 所示, 吸胀而未萌发的豇豆种子 (吸胀后 0 ~ 24 h) 测不到 PAO 活性, 直至吸胀后 36 h 才在胚芽、子叶和胚轴测到较低的 PAO 活性, 此后胚芽和子叶两部分的 PAO 活性迅速增加, 而胚轴的 PAO 活性增加却很缓慢, 至吸胀后 96 h, 胚芽 PAO 活性的增幅开始趋缓, 并于吸胀后 144 h 达到高峰。胚轴和子叶的 PAO 活性分别在吸胀后 96 h 和 120 h 即开始下降, 而胚根中则一直未能测到 PAO 活性。

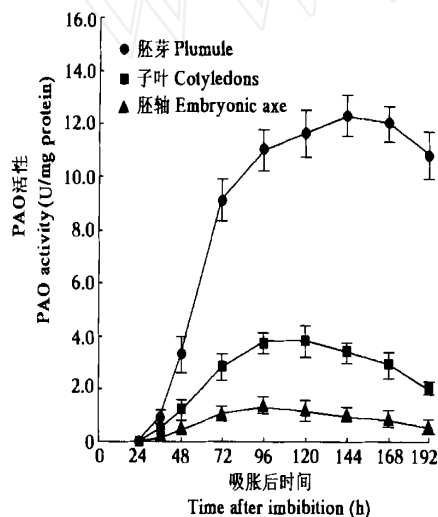


图 1 豇豆种子萌发过程中 PAO 活性的变化

Fig. 1 Change of the PAO activity during the cowpea seed germination

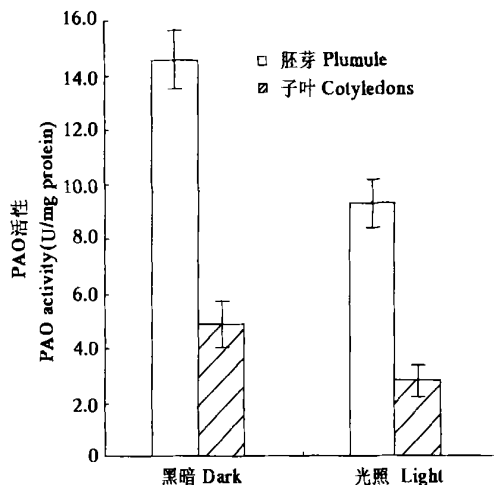


图 2 光照和黑暗处理对豇豆萌发种子胚芽和子叶 PAO 活性的影响

Fig. 2 Effects of light and dark treatment on the PAO activity in plumule and cotyledons of the cowpea germinating seeds

2.2 光照和黑暗处理对豇豆萌发种子 PAO 活性的影响

黑暗与光照两种萌发条件下, 豇豆萌发种子的胚芽和子叶中均以暗萌发条件下的 PAO 活性高 (图 2)。

2.3 Act-D 和 CHM 处理对豇豆种子 PAO 活性和发芽率的影响

Act-D 和 CHM 处理对豇豆种子发芽率和萌发种子 PAO 活性的抑制程度不同 (表 1)。Act-D 处理对种子萌发的影响较小 (抑制率为 27.6%), 而 CHM 则强烈抑制萌发 (抑制率为 90.6%), 并且 Act-D

处理萌发种子胚芽和子叶的 PAO 活性高于 CHM 处理。

表 1 Act-D 和 CHM 吸胀处理对豇豆种子发芽率及其胚芽和子叶 PAO 活性的影响

Table 1 Effects of Act-D and CHM treatment on the germination percentage and the PAO activity in the plumule and cotyledons of cowpea seeds

处 理 Treatment	种子发芽率 Seed germination (%)	PAO 活性 PAO activity ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}$)	
		胚 芽 Plumule	子 叶 Cotyledons
对 照 Control	100	14.8 ± 0.5 (100 %)	4.8 ± 0.2 (100 %)
Act-D (50 mg/L)	72.4 ± 2.2	10.5 ± 0.4 (70.9 %)	3.2 ± 0.3 (66.7 %)
CHM (20 mg/L)	9.4 ± 0.6	1.9 ± 0.2 (12.8 %)	0.7 ± 0.1 (14.6 %)

2.4 Put 处理对豇豆萌发种子 PAO 活性的影响

经不同浓度 Put 吸胀处理后豇豆萌发种子胚芽和子叶的 PAO 活性变化见图 3，较低浓度的 Put (0.1 和 0.5 mmol/L) 处理胚芽和子叶的 PAO 活性高于较高浓度的 Put (1.0 和 2.0 mmol/L) 处理。

2.5 CuCl_2 处理对豇豆萌发种子 PAO 活性的影响

CuCl_2 吸胀处理对豇豆萌发种子 PAO 活性的效应与其浓度有关 (图 4)，10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuCl_2 对胚芽和子叶的 PAO 活性都有一定的促进作用，而 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuCl_2 则对二者的 PAO 活性表现出抑制效应，其他浓度对该酶活性影响不明显。

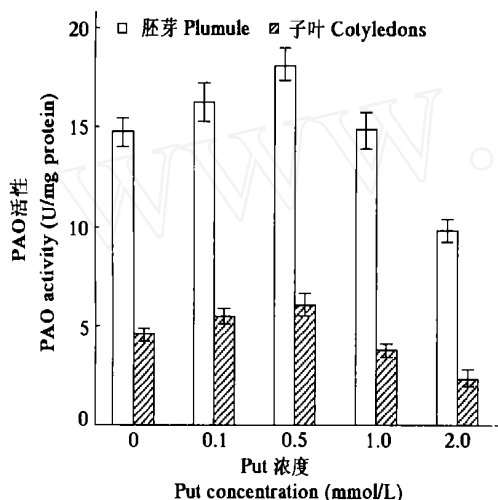


图 3 Put 处理对豇豆萌发种子胚芽和子叶 PAO 活性的影响
Fig. 3 Effects of Put treatment on the PAO activity in plumule and cotyledons of the cowpea germinating seeds

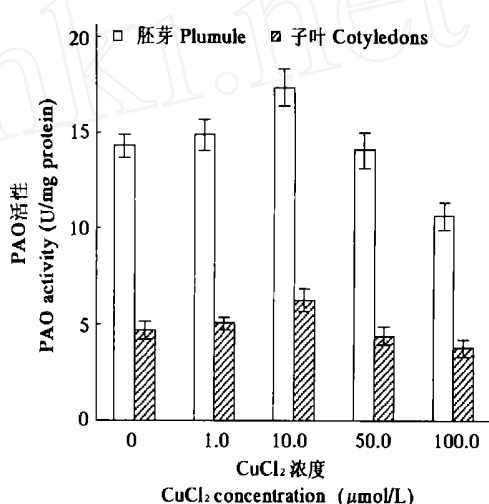


图 4 CuCl_2 处理对豇豆萌发种子胚芽和子叶 PAO 活性的影响
Fig. 4 Effects of CuCl_2 treatment on the PAO activity in plumule and cotyledons of the cowpea germinating seeds

3 讨论

3.1 豇豆种子萌发过程中 PAO 活性的变化特点

已有的研究表明，PAO 活性在一些豆科植物的种子萌发阶段会发生显著的变化，吸胀而未萌发的豌豆、扁豆、绿豆和花生种子无 PAO 活性，PAO 活性仅在萌发开始后才出现并随着萌发进程逐渐增加^[2,3,10]。本试验以豇豆为材料所得的结果与此相似，表明豇豆种胚的 PAO 活性是在种子萌发过程中逐渐形成的。另外，豇豆萌发种子的 PAO 活性一直都是胚芽高于子叶，这与已报道的豌豆、扁豆、花生等植物 PAO 活性主要集中在萌发种子的胚轴或幼苗的木质化程度较高的下胚轴不同。一些研究者曾基于上述植物的 PAO 分布特点提出，该酶催化 PAs 氧化的产物 H_2O_2 ，可能参与种子萌发过程的木质化和细胞壁硬化^[2,6,10]。但我们根据豇豆种胚中 PAO 分布与变化特点认为，豇豆 PAO 的生理功能可能主要不在于此，从子叶中具有不低的 PAO 活性这一现象来看，动用种子中贮备的 PAs 作为

种子萌发和幼苗生长初期的氮源很可能是此酶的重要功能之一^[1]。

本研究显示 CHM 处理对豇豆种子萌发的抑制效应和对胚芽、子叶 PAO 活性的抑制作用均比 Act-D 强得多 (表 1)。这一方面说明豇豆种胚中 PAO 的 mRNA 很可能在种子发育过程中已合成并贮于成熟种子中, 萌发时 PAO 活性的出现主要是由于这些 mRNA 转译合成了 PAO 的结果; 另一方面还表明豇豆种胚中的 PAO 活性与种子萌发之间有着密切的关系, 我们已证实花生胚轴中的多胺氧化酶是花生种子萌发的相关蛋白之一^[10]。

3.2 豇豆种子萌发过程中 PAO 活性变化的影响因素

本研究表明黑暗条件下豇豆种子胚芽和子叶中的 PAO 活性均高, 说明黑暗更有利于该酶活性的表达。这与豌豆^[2]、扁豆^[11]和花生^[10]等材料所得研究结果一致。已有研究表明, 小麦和扁豆幼苗的 PAO 活性形成与功能可能涉及到光敏素的介导^[5,11]。

Angelini 等^[11]研究表明扁豆幼苗中的 PAO 活性受其底物 Put 诱导, 本研究表明, 0.1 和 0.5 mmol/L 的 Put 处理可促进胚芽和子叶 PAO 活性的提高。但高浓度的 Put (1.0 和 2.0 mmol/L) 处理反而会抑制胚芽和子叶的 PAO 活性, 这是否与高浓度 Put 的直接毒害作用或者是过多 Put 氧化而产生并累积大量的氨基醛、H₂O₂ 及某些自由基导致细胞损伤有关^[12], 尚需进一步证实。

Rossi 等^[13]曾报告 CuSO₄ 吸胀处理扁豆种子可提高萌发阶段 PAO 活性, 但不影响萌发种子 PAO 酶蛋白的合成。我们前期的工作证实豇豆 PAO 是一种含 Cu²⁺ 的 PAO, 且 Cu²⁺ 为该酶活性所必需^[14]。本试验用 CuCl₂ 吸胀处理豇豆种子的结果表明, 10 μmol/L 的 CuCl₂ 对萌发种子胚芽和子叶的 PAO 活性表达有一定的促进作用, 对于 100 μmol/L 的 CuCl₂ 对种胚 PAO 活性所表现出的抑制效应, 很可能与 Cu²⁺ 的直接毒害作用有关。

参考文献:

- 1 Matilla A J. Polyamines and germination. *Seed Sci. Res.*, 1996, 6: 81~93
- 2 Federico R, Angelini R. Distribution of polyamines and their related catabolic enzyme in etiolated and light-grown leguminosae seedlings. *Planta*, 1988, 173: 317~321
- 3 Choudhary A, Singh R P. Distribution of Cu²⁺-diamine oxidase during ontogeny of seedlings of *Vigna radiata* cultivars. *Biologia-Plantarum*, 1998, 40 (3): 449~452
- 4 何生根, 黄学林, 傅家瑞. 植物的多胺氧化酶. *植物生理学通讯*, 1998, 34 (3): 214~219
- 5 Laurenzi 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. *Planta*, 1999, 208: 146~154
- 6 Angelini R, Federico R. Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J. Plant Physiol.*, 1991, 97 (2): 778~785
- 7 Scoccianti V, Torrigiani P, Bagni N. Distribution of diamine oxidase and polyamine pattern in bean and seedlings at different stages of germination. *Physiol. Plant.*, 1990, 80: 515~519
- 8 何生根, 黄学林, 傅家瑞, 等. 两种豇豆萌发种子和幼苗中多胺氧化酶活性的分布特点. *仲恺农业技术学院学报*, 2000, 13 (3): 1~5
- 9 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248~254
- 10 何生根, 黄学林, 傅家瑞. 花生种子萌发过程中胚轴多胺氧化酶活性变化. *植物学通报*, 1998, 15 (5): 63~65
- 11 Angelini R, Federico R, Mancinelli A. Phytochrome-mediated control of diamine oxidase level in the epicotyl of etiolated lentil (*Lens culinaris* Medicus) seedlings. *Plant Physiol.*, 1988, 88: 1207~1209
- 12 DiTomaso M J, Shaff J E, Kochian L V. Putrescine-induced wounding and its effects on membrane integrity and ion transport processes in roots of intact corn seedlings. *Plant Physiol.*, 1989, 90: 988~995
- 13 Rossi A, Maccarrone M, Buganza M, et al. Exogenously added copper does not increase the production of copper lentil seedlings. *Cene*, 1995, 154: 167~170
- 14 He S G, Huang X L, Fu J R. Molecular properties of polyamine oxidase from cowpea primary leaves. *Acta Phytophysiol Sin.*, 2001, 27 (5): 425~430

Change of Polyamine Oxidase Activity during Cowpea Seed Germination and Its Influencing Factors

He Shenggen¹, Huang Xuelin², and Fu Jiarui²

(¹ Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China; ² The School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract : No PAO activity was detected in ungerminated cowpea (*Vigna unguiculata* L.) seeds (from 0 to 24 h after imbibition), but it could be detected in the plumule, cotyledons and embryonic axis of the germinating seeds whose radicles were just visible (36 h after imbibition). The PAO activities in these three parts increased at different rates during germination, while no PAO could be detected in radicle at all times. Soaking with Act-D only inhibited the seed germination by 27.6%, but CHM could inhibit the germination by 90.6%. Moreover, the inhibitions of the PAO activity in the plumule and cotyledons by Act-D were just 29.1% and 33.3%, and those by CHM were up to 87.2% and 85.4% respectively. Light had a remarkable inhibitory effect on the PAO activity in plumule and cotyledons. Soaking with putrecine (0.1 and 0.5 mmol/L) or CuCl₂ (10 μmol/L) for 6 h could enhance the activity of PAO.

Key words : Cowpea (*Vigna unguiculata* L.); Polyamine; Polyamine oxidase; Seed germination; Cu²⁺

新书推荐

《中国花卉病虫害原色图鉴》 吕佩珂等主编

该图鉴共有彩版 208 页, 彩色生态照片 1664 幅, 病原墨线和电镜扫描图片 171 幅, 文字 137 万, 含花卉病虫害 1608 种, 其中病害 1321 种, 虫害 287 种, 分上下两册。上册包括草本花卉、木本花卉、仙人掌与多浆类花卉病害 903 种, 彩色照片 896 幅, 彩版 112 页, 文字 68 万。下册重点介绍 115 种鲜切花和草坪草病害 418 种, 花木害虫 287 种, 文字 69 万, 含彩色生态照片 768 幅。该图鉴图文并茂、内容新颖、实用性强, 是我国第一部花卉病虫害识别与防治大全, 是观赏植物植保重要工具书。



《花卉资源原色图谱》 金波主编

本书以彩色照片为主体, 展现花卉婀娜的姿态和绚丽的色彩。以植物学分类的科属排列, 以种为单元, 介绍其中名、别名、学名、科属、产地与习性、形态特征、繁殖栽培和应用等内容。全书囊括 142 个科的 699 种植物, 千余幅彩图, 包含部分野生植物资源, 内容丰富, 可供花卉园艺科研工作者、技术员、有关大专院校师生及广大花卉爱好者参阅。

本书科学性较强, 彩图清晰、艳丽、逼真, 文字简练流畅, 深入浅出。既是工具书, 又具可读性, 兼有观赏功能, 全彩印精装, 为近年来国内少有的广谱性花卉原色图谱。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。