

大豆脂肪氧化酶同工酶缺失体的 苗期叶片超弱发光研究*

徐文英 · 傅翠真 丁安林

(中国农业科学院 100081)

苏 震 马玉琴 张仲纶

(中国科学院生物物理所 100101)

摘 要

本实验通过测定大豆脂氧酶同工酶缺失体在苗期子叶和真叶的超弱发光变化,研究脂氧酶缺失体类型与叶片超弱发光强度的关系,试图使用苗期叶片等活性材料直接进行同工酶缺失体鉴定成为可能。

关键词 大豆;脂氧酶;同工酶缺失体;超弱发光

一、前言

大豆中存在约占总蛋白含量1%的脂肪氧化酶(Lipoxygenase,简称Lox),能催化空气中氧对不饱和脂肪酸的氧化作用,产生过氧化物,最后生成醛、酮等具有异味的物质。80年代初美国鉴定出Lox有3种同工酶类型,并且选育出Century这一品种的1x1、1x2、1x3、1x1.3和1x2.3一整套等位基因系^[1,4,5,6]。脂肪氧化酶在酶促脂肪酸的氧化过程中,伴生游离基和过氧化氢物,是植物产生活性氧的途径之一。方允中等认为,脂质过氧化过程中产生单线态氧(1O_2),超弱发光主要来自于生物体内 1O_2 转变为基态氧(3O_2)的反应^[2]。

鉴于植物超弱发光与脂质过氧化作用有关,通过测定大豆脂氧酶缺失体在苗期子叶和真叶的超弱发光变化,研究缺失体类型和叶片超弱发光的关系,试图用苗期叶片直接鉴

* 本文于1994年9月15日收到。

This paper was received on Sep. 15, 1994.

定脂氧酶缺失体成为可能,这也是超弱发光在农业上应用的尝试。

二、材料与方 法

1. 材料

引进美国 Century 与该品种等位基因系 Lox1、Lox2、Lox3、Lox1.3、Lox2.3 以及科丰 6 号、鲁豆 4 号,中作广鉴 12 三个普通大豆品种(或品系),均由中国农科院作物所提供。每个品种或品系随机抽取 100 粒种子,种在蛭石钵中,发芽条件分为光照和完全避光(在暗室中)两种。3 天后开始测量子叶的发光,6 天后开始测量真叶的发光,每隔 1—2 天测 1 次。测量时真叶和子叶从苗上直接采摘,尽快进行测量。

2. 测量方法

将发芽大豆的子叶和真叶分别剪下,子叶表面朝上,铺满测量窗,真叶随机铺满。测量时间 500 秒,得到发光动力学曲线,所得的测量数据形式如图 1。其中 a 为光照条件下大豆叶片的测量曲线,其中前 200 秒为叶片的延迟发光,呈准指数下降;200 秒以后发光值变化近似一条直线,是所测的超弱发光值。曲线 b 是避光条件下叶片的测量曲线,为一直线,有波动。

3. 智能化微弱发光测量仪

由中国科学院生物物理所与科龙公司联合研制,灵敏度为 10^{-12} A,标准差小于 0.8%^[3]。

4. 数据处理

用最小二乘法对叶片的延迟发光部分进行曲线模拟。

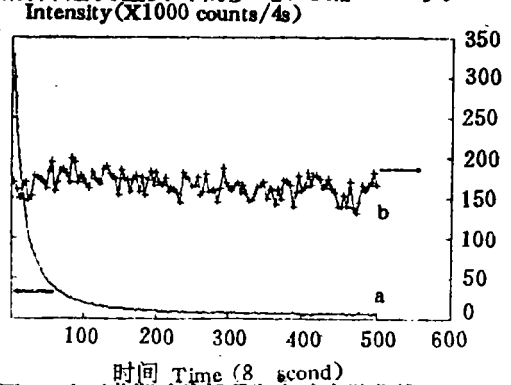


图 1 大豆苗期叶片超弱发光动力学曲线

a:光照条件 b:暗室条件

Fig. 1 Luminescence kinetic curve
of soybean seedling leaves
a: in light b: in dark

三、结果与讨论

1. 脂氧酶缺失体与普通大豆叶片超弱发光强度差异

图 2 是光照条件下不同品种大豆子叶超弱发光强度随时间变化的曲线,取发光动力学曲线中后 200 秒的积分值。实线代表 3 个普通大豆品种,虚线代表两种缺失体,曲线 a 是缺失体 Lox2,曲线 b 是缺失体 Lox2.3。从图中看出,每个品种发光强度随时间变化是有差异的,同一时间,缺失体子叶的发光强度都比普通大豆子叶高,而且双缺失体(曲线 b)比单缺失体(曲线 a)的高。

图 3 是在暗室中生长的大豆真叶超弱发光强度随时间变化的曲线。取测量值中后 300 秒的积分值。采用和图 2 相同的图式表示品种间差异。结果表明:同一时间真叶发光强度,缺失体都比普通大豆低;双缺失体(曲线 a)比单缺失体(曲线 b)的高。

以上结果表明,不同品种间苗期叶片超弱发光的差异与脂氧酶的基因型有关,由于不

同品种苗期脂氧酶活性的差异,导致叶片上的脂质过氧化水平不同,使得在超弱发光强度上有所体现,期望以此作为鉴别脂氧酶同工酶缺失体的指标。

2. 不同脂氧酶缺失体类型叶片超弱发光强度差异

表1是几种脂氧酶缺失体苗期第8天和第10天所测发光强度的比值,取光照条件,发光动力学曲线后200秒的积分值。从子叶的比值来看,双缺失体大于单缺失体,而且与缺失体 Lox1 比值大于缺失体 Lox2 相应,缺失体 Lox1.3 比值大于缺失体 Lox2.3,具有一致性。从真叶的比值上也可以看到这种一致性,即缺失体 Lox2 真叶比值大于缺失体 Lox1,缺失体 Lox2.3 真叶比值相应也大于缺失体 Lox1.3。另外,无论是子叶还是真叶,缺失体 Lox3 的比值都是最低的。该比值的推算有助于对各缺失体进行鉴别。

3. 同一品种子叶和真叶超弱发光强度的差异

以科丰6号和缺失体 Lox2.3 为例,图4和图5分别是它们的子叶(曲线a)和真叶(曲线b)的发光强度随时间变化的曲线。取光照条件下发光动力学曲线的后200秒积分。可以看到同一时间子叶的值大于真叶的,并且缺失体与普通大豆的表现是一致的。可认为这是脂氧酶在不同器官活性不同的结果,同时,子叶是苗期养分的来源,有充足的底物进行脂质过氧化,而真叶此时是刚刚生长,其脂类物质的水平较子叶的必然为低,由此脂质过氧化水平也低,致使其发光强度较低。

表1 不同缺失体类型苗期叶片第8天和第10天发光强度比值

Table 1 Ratio of luminescence intensity of different mutant Lox soybean seedling leaves in 8th & 10th day

类型	子叶比值	真叶比值
缺失体 Lox1	1.38	1.50
缺失体 Lox2	1.13	1.81
缺失体 Lox3	1.04	1.35
缺失体 Lox1.3	1.91	1.75
缺失体 Lox2.3	1.68	1.94

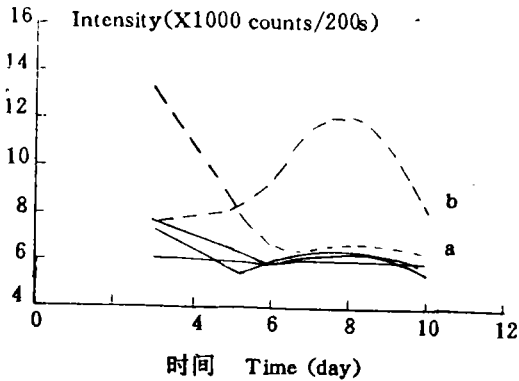


图2 苗期子叶超弱发光强度变化曲线

a: 缺失体 Lox2 b: 缺失体 Lox2.3

Fig. 2 Change of luminescence intensity of soybean seedling cotyledons
a: mutant Lox2 b: mutant Lox2.3

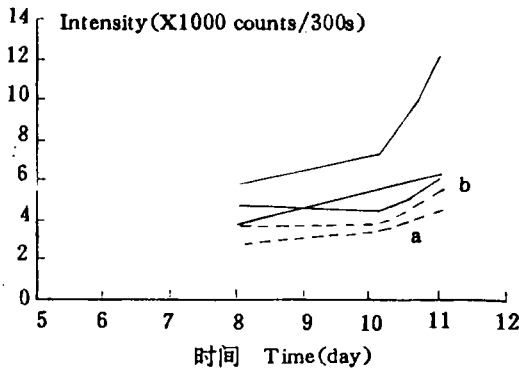


图3 苗期真叶超弱发光强度变化曲线

a: 缺失体 Lox2 b: 缺失体 Lox2.3

Fig. 3 Change of luminescence intensity of soybean seedling leaves
a: mutant Lox2 b: mutant Lox2.3

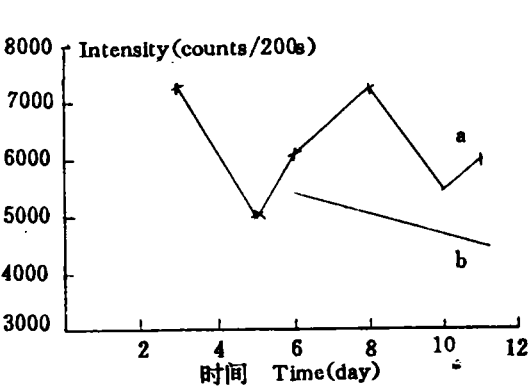


图 4 科丰 6 号苗期叶片
超弱发光强度变化曲线
a: 子叶 b: 真叶
Fig. 4 Change of luminescence
intensity of N6 seedling leaves
a: cotyledon b: leaf

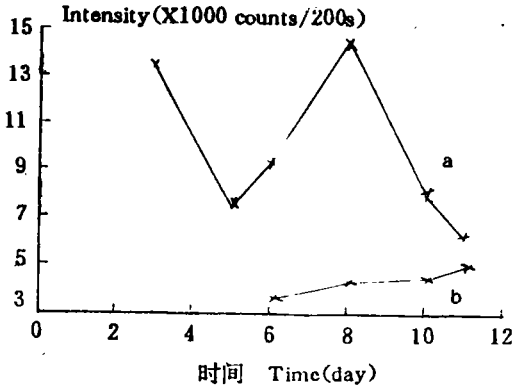


图 5 缺失体 Lox2.3 苗期叶片
超弱发光强度变化曲线
a: 子叶 b: 真叶
Fig. 5 Change of luminescence intensity
of mutant Lox2.3 seedling leaves
a: cotyledon b: leaf

4. 苗期子叶的光致延迟发光曲线随时间变化的趋势

随着时间的延长,子叶由于失水、衰老,它的发光动力学曲线的延迟发光部分也在延长,到 200 秒以后才趋于稳定。以科丰 6 号和缺失体 Lox2.3 为例,发芽 3 天至 10 天所测的结果用幂函数和指数函数分别模拟,得到前期延迟发光以幂函数形式(近似呈双曲线)下降,后期则以指数形式下降。苗期第 8 天是个转折点,这以前和双曲函数弥合较好,以后和指数函数弥合较好,这一点从它们的相关系数随时间变化曲线上可以看出(见图 6)。这时子叶还不衰老,但从超弱发光上已经表现出来。这一段发光曲线实际上为叶绿素的滞后荧光,故它的变化就反应了叶片光合系统的活性。缺失体与普通大豆品种,变化是同步的。

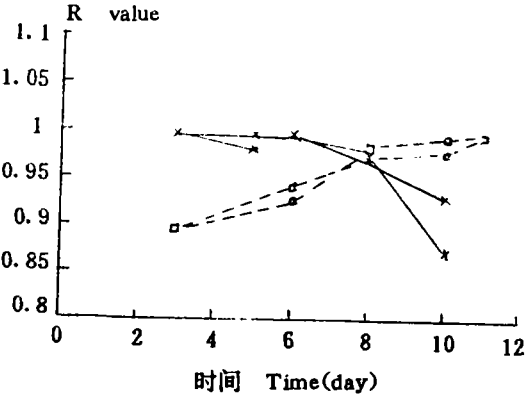


图 6 子叶苗期光致延迟发光拟合的相关系数随时间的变化
实线:幂函数拟合 虚线:指数函数拟合

Fig. 6 Change of relative coefficient of luminescence kinetic curve of soybean seedling cotyledons
real line: by power-function dotted line: by exponential function

参考文献

- [1] 丁安林等,作物学报,1994,Vol. 20, No. 3; 373—374
- [2] 方允中,郑荣梁,沈文梅主编,自由基生命科学进展,1993,3,原子能出版社
- [3] 马斌,马玉琴,苏震等,科学通报,1992,(24),2270—2272
- [4] Axelrod, B. et al., 1981, Meth. Enzymol, 71: 441—451
- [5] Christopher, J. P. et al., 1970, Biochim. Biophys. Acta., 198: 12—19
- [6] Christopher, J. P. et al., 1970, Biochim. Biophys. Acta., 284: 54—62
- [7] Y Kondo, Y Kawai et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1993, 1170(3): 301—306

**STUDY OF CHEMILUMINESCENCE OF SOYBEAN LIPOXYENASE
ISOENZYME MUTANTS ON SEEDLING LEAVES**

Xu Wenying Fu Chuizhen Ding Anlin

(*Chinese Academy of Agricultural Sciences*, 100081)

Su Zhen Ma Yuqin Zhang Zhonglun

(*Chinese Academy of Science, Beijing*, 100101)

Abstract

This experiment measured the soybean seedling cotyledons and leaves in different isoenzyme mutant types by a chemiluminescence (CL) assay system. Research data reflects the relationship between CL and Lox types. Discussion is shown here on the physiological change during the growth period of cotyledons. We consider that this CL assay system may be possible to be used to analyse and appraise the different soybean Lox types directly with active plant material.

Key words Soybean; Lipxygenase; Isoenzyme mutants; Chemiluminescence; Lox; mutants