

花生种子活力、ATPase及H⁺分泌初探*

黄丽萍 傅家瑞

(生物学系)

摘 要

线粒体结合ATPase及质膜和液泡膜结合ATPase活性随花生种子吸胀的起始逐渐增加,酶活性与种子活力有正相关性。以萌发一周的花生下胚轴为实验材料,线粒体ATPase,质膜ATPase和液泡膜ATPase的反应最适pH均为9。在pH6~10范围内随pH的升高H⁺分泌增多。膜ATP酶为二环己烷亚胺抑制,而为KCl激活;NaN₃特异地抑制线粒体ATP酶,而NaVO₃专一地抑制质膜ATP酶,但两者对液泡膜ATP酶均无效。Mg²⁺、K⁺激活ATPase,也刺激H⁺分泌。质膜ATPase抑制剂NaVO₃对H⁺分泌作用不大,而线粒体ATPase抑制剂NaN₃及解偶联剂DNP均显著抑制H⁺分泌。CoI刺激H⁺分泌而CoII抑制H⁺分泌,似乎线粒体ATP产量对H⁺分泌更重要。

关键词 种子活力, ATPase, H⁺分泌。

细胞中各种结构的ATPase活性的表现与否及强弱标志着这部位生理功能的状态^[1]。ATPase与能量代谢相偶联,因此与光合作用、物质吸收和运输^[2]、生长发育、抗旱性、抗杀虫剂等^[3]都有密切关系。本文以花生种子为材料,初步探索了种子萌动过程中活力与ATPase活性的关系,ATPase的一些特性及其与H⁺分泌的相关性。

1 材料和方法

实验材料为花生种子“粤油116”,由广东省农科院经济作物研究所提供。

1.1 不同活力种子的取得

高活力种子:当年收的种子发芽率为98%,活力指数(简易)为2.03。中等活力种子:贮藏一年后的种子,发芽率89%,活力指数0.81。低活力种子:贮藏2年的种子,发芽率75%,活力指数0.43。极低活力种子:市场购买陈种,发芽率68%,活力指标0.30。

1.2 种子含水量、发芽率及活力指数的测定

称取一定重量的种子放入烘箱,在105℃下烘至恒重,计算其水分含量。采用直立玻板法测定发芽率及活力指数。3天后记录种子的发芽率,测定胚根和下胚轴的长度。

活力指数(简易) = 发芽率 × 生长势(以幼根及下胚轴长度表示)。

1.3 分析材料的准备

选取大小均匀的花生种子50粒,放在垫有两张滤纸的培养皿中,加入蒸馏水50ml,

本文1990年9月3日收到

● 国家自然科学基金资助课题

于25℃下分别吸水0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24h, 取出种子洗净, 剥出胚轴用于测定ATPase活性(提取方法一)。

花生种子的萌发在萌发网上进行, 25℃下萌发一周, 气泵泵气, 取胚轴进行ATPase性质测定(提取方法二)和H⁺分泌实验。

1.4 膜ATPase的测定^[4~6]

称取花生胚轴1克, 按焦新之等(1981)^[4]、王延之等(1987)^[5]及Wang等(1985)^[6]所用的方法提取膜ATP酶用钼蓝法测定ATP酶活性。膜制剂蛋白含量按李琳等(1980)介绍的考马斯亮蓝G-250染色法测定^[7]。

1.5 H⁺分泌的测定

将萌发7天的花生胚轴取出, 用切片机切成3mm切段后, 在0.2mmol/L无水CaSO₄中通氮清洗4h后, 分为10个切段一组, 吸干其表面水分并称重。用pHS-3C型酸度计测量H⁺分泌, 将材料加入到10ml pH6.60的1mmol/L Mes-Tris缓冲液中, 通氮气并加一水饱和装置, 用玻璃电极测pH变化, 随时用经标定的0.0200N NaOH滴定, 维持pH6.60左右, 连续30min, 将加入的NaOH量折算成H⁺分泌量。

2 实验结果

2.1 萌发早期胚轴细胞内ATPase的活性变化

2.1.1 线粒体ATPase活性变化 干种子的胚轴细胞线粒体膜ATPase活性很低, 吸水后活性提高。图1显示, 不同活力胚轴在吸胀过程中酶活性变化情况不同(图1A)。活力越高的种子吸胀初期胚轴ATPase活性增加越迅速, 且持续上升时期较长(峰值在18h), 活力高的胚轴酶活性也高。

2.1.2 质膜及液泡膜ATPase活性变化

干种子胚轴质膜及液泡膜ATPase活性亦较低, 吸胀后酶活性上升, 且不论干种子抑或吸胀一定时间后的种子, 活力越高的胚轴, 酶活性也越高(图1B)。吸胀过程中质膜及液泡膜ATPase活性变化曲线类似于线粒体ATPase活性变化曲线, 只是高活力胚轴质膜及液泡膜的ATPase活性峰值提早出现(吸胀4h), 且峰值较线粒体ATPase峰值高2倍多。

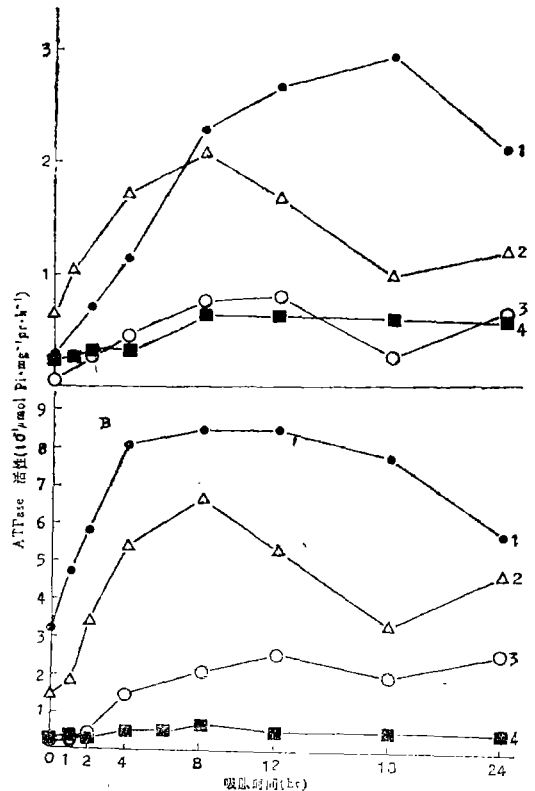


图1 萌发早期不同活力胚轴膜ATPase活性的变化
Fig.1 The Changes of membrane ATPase activity in embryonic axes of various vigour during early germination

A. 线粒体ATPase活性
B. 质膜及液泡膜ATPase活性
1. 高活力, 2. 中等活力, 3. 低活力, 4. 极低活力

2.3 线粒体、质膜和液泡膜ATPase的性质

分别以萌发一周的胚根、胚轴为材料测定各种ATPase活性, 结果表明, 质膜ATPase和液泡膜ATPase主要存在于下胚轴中, 胚根中的活性很低, 难以测出。线粒体膜ATP酶活性在胚根与下胚轴中相差不大。

多次实验表明, 干种子及吸胀种子的胚轴线粒体、质膜和液泡膜3种ATP酶反应的最适pH值均为9。以吸胀12h种子的胚轴和萌发3天及6天的花生下胚轴为材料, 提取ATP酶进行测定, 证明3种ATPase的最适反应pH值均为9(图2, 3, 4)。可见花生种子从萌发12h至6天期间, ATP酶的最适pH均为9。其中, 质膜ATPase受pH影响活性变化幅度较大, 线粒体和液泡膜ATPase的变化幅度较小。

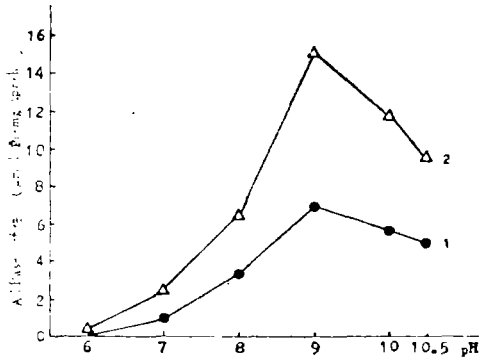


图2 吸胀12h胚轴ATPase反应最适pH
Fig.2 The optimum pH of ATPase in peanut embryonic axes imbibing for 12h
1. 线粒体ATPase, 2. 质膜ATPase

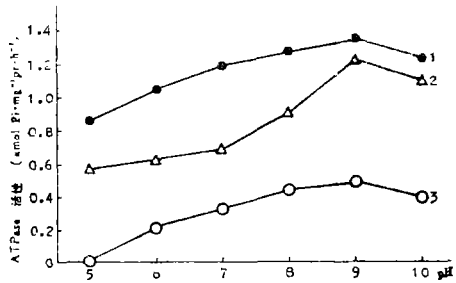


图3 萌发3天的种子下胚轴ATPase反应最适pH
Fig.3 The optimum pH of ATPase in hypocotyl of peanut seed germinating for 3 days
1. 线粒体ATPase, 2. 质膜ATPase, 3. 液泡膜ATPase

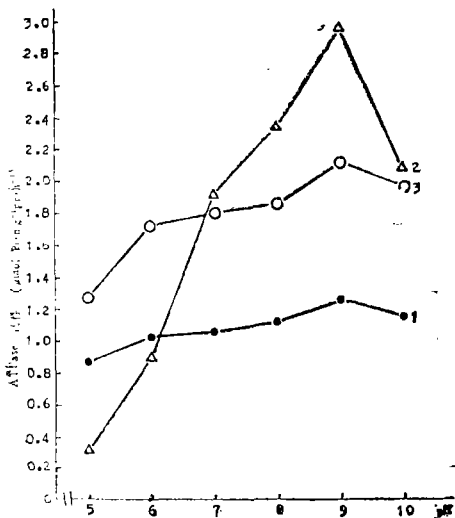


图4 萌发6天种子下胚轴ATPase反应最适pH
Fig.4 The optimum pH of ATPase in hypocotyl of peanut seed germinating for 6 days
1. 线粒体ATPase, 2. 质膜ATPase, 3. 液泡膜ATPase

10 μ mol/L二环己烷亚胺(DCCD)对线粒体、质膜和液泡膜ATP酶均有明显的抑制作用,而50mmol/L的KCl则对3种ATPase均有不同程度的激活作用。0.5mmol/L NaN₃特异地抑制线粒体ATPase, 0.1mmol/L NaVO₃则专一抑制质膜ATPase, 而液泡膜ATPase似乎对此2种抑制剂都不敏感(图5)。

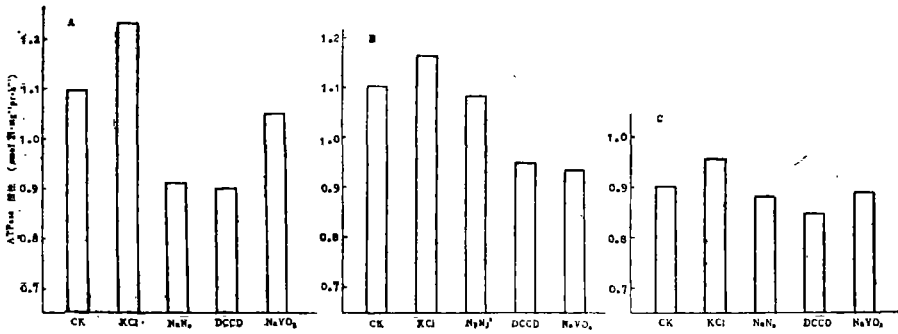


图5 四种化学物质对膜ATP的作用

Fig.5 Effect of four chemicals on membrane ATPase

A. 线粒体ATPase, B. 质膜ATPase, C. 液泡膜ATPase

2.3 H⁺分泌与ATPase

干种子胚轴及吸胀18h以内的胚轴H⁺分泌未测出。吸胀24h后的胚轴可检测出其H⁺分泌,但分泌量较少。萌发7天左右的花生种子,其下胚轴H⁺分泌大大增多,以此作为探讨H⁺分泌的材料比较理想。

pH值对H⁺分泌影响很大,随pH增加H⁺分泌迅速增高,pH 9~10之间H⁺分泌量几呈直线增加(图6)。

在含1mmol/L Mg⁺⁺和10mmol/L K⁺的缓冲液中,胚轴H⁺分泌都增多(图7),

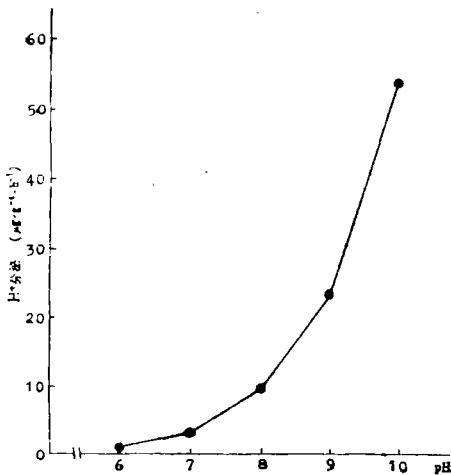


图6 pH对H⁺分泌的影响

Fig.6 The effect of pH on H⁺ extrusion

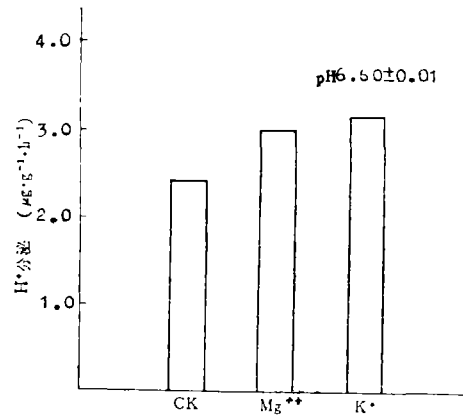


图7 K⁺ (10mmol/L), Mg⁺⁺ (1mmol/L)对H⁺分泌的影响

Fig.7 The effect of K⁺ and Mg⁺⁺ on H⁺ extrusion

表明 Mg^{++} 和 K^+ 具有促进 H^+ 分泌的作用。线粒体ATPase抑制剂 NaN_3 对 H^+ 分泌起明显的抑制作用,且随浓度增高抑制作用加强(图8A)。质膜ATPase抑制剂 $NaVO_3$ 对 H^+ 分泌作用不明显(图8B)。

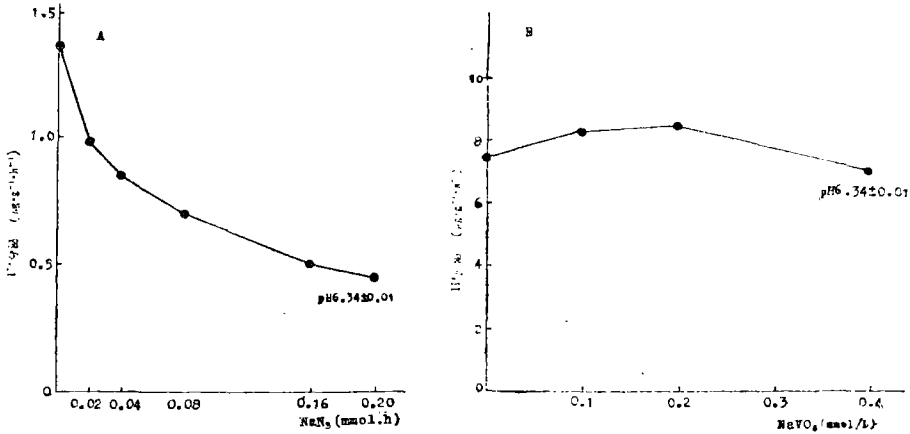


图8 不同抑制剂对 H^+ 分泌的影响

Fig.8 Effect of various inhibitors on H^+ extrusion A. NaN_3 , B. $NaVO_3$

呼吸解偶联剂DNP对 H^+ 分泌起抑制作用,且随浓度增大抑制作用加强;呼吸抑制剂KCN低浓度0.1mmol/L对 H^+ 分泌不起作用,高浓度0.4mmol/L则稍为抑制 H^+ 分泌(图9)。

CoI ($NADH_2$)对 H^+ 分泌起促进作用,在0~0.4mmol/L浓度内浓度越高,促进作用越大;而 $CoII$ ($NADPH_2$)则对 H^+ 分泌有抑制作用,浓度越高,抑制效应也越大(图10)。

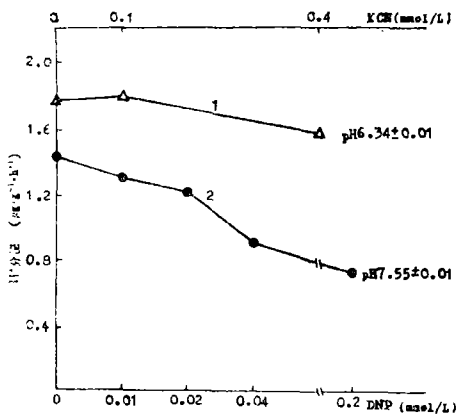


图9 KCN和DNP对 H^+ 分泌的影响
Fig.9 Effect of KCN and DNP on H^+ extrusion
1. KCN, 2. DNP

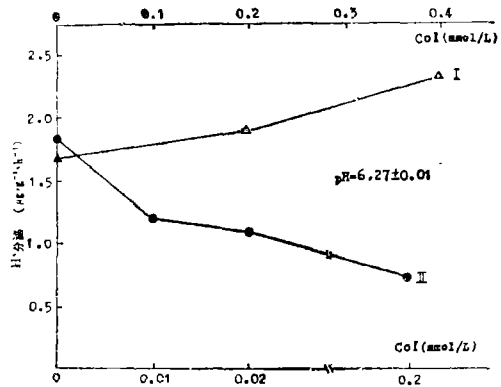


图10 还原型 CoI 和 $CoII$ 对 H^+ 分泌的影响
Fig.10 Effect of reduced CoI and $CoII$ on H^+ extrusion

3 讨论

细胞中各种结构的ATPase活性的表现与否及强弱标志着这部位生理功能的状态^[1]。从花生种子萌发早期几种膜结合ATPase的变化情况,发现干花生胚轴线粒体ATPase及质膜和液泡膜的ATPase活性很低,吸胀后逐渐增加(图1),表明线粒体、质膜和液泡膜在吸胀过程中由不完整转变到完整的过程。Bewley认为膜结合酶活性的变化可能反映膜功能的变换。我们的结果是膜结合ATPase活性与种子活力成正相关,吸胀初期活力越高的种子其胚轴ATPase活性的增加越迅速,这大概与劣变种子在吸胀过程中的膜修复能力相关。

纯化的质膜ATPase对ATP特异,需要Mg⁺⁺并被单价阳离子进一步活化^[9],本实验表明K⁺对这3种ATPase均有激活作用。质膜ATPase的专一性抑制剂是钒酸盐^[10],NaN₃则特异地抑制线粒体ATPase^[9],DCCD是与叶绿体和细菌型ATPase的质子通道反应^[10],线粒体ATPase比液泡膜^[9]和质膜ATPase^[9]对DCCD更敏感。本实验测定结果与这些报道基本一致。

据报道,不同植物线粒体、质膜和液泡膜ATPase最适pH有所不同,如水稻根的ATPase分别为8,5,7;燕麦根的ATPase分别为8,6,6^[1]。我们分离提取了花生下胚轴的线粒体、质膜和液泡膜,多次测定结果表明这3种膜结合ATPase的最适pH均为9,且不随萌发天数增多而有所改变,这也许是由于花生的嗜碱性所致。

近20年来积累了许多资料,肯定了质膜ATPase的电致氢离子泵功能^[9]。最近又发现质膜上的氧化还原体系也与H⁺分泌相关联^[12],有实验表明两过程是截然分开的^[18],认为H⁺-ATPase是负责H⁺分泌的主要机制,质膜氧化还原活动只是使膜电势去极化和活化H⁺-ATPase。

我们以花生下胚轴为材料,初步探索了H⁺分泌与ATPase的相关性。结果表明,对ATPase必需的Mg⁺⁺和激活ATPase的K⁺刺激H⁺分泌;线粒体ATPase抑制剂NaN₃显著抑制花生下胚轴的H⁺分泌,而质膜ATPase抑制剂Na₂VO₃在很高浓度下才对H⁺分泌有些微抑制。呼吸解偶联剂DNP对H⁺分泌有很大抑制效应,而呼吸抑制剂KCN的作用不大。我们的实验似乎可以说明线粒体ATP的产量与H⁺分泌有很大关系。外源NADH加速H⁺的净流出^[14],表明NADH用作质膜氧化还原系统某种最初组分的电子供体。本实验也表明CoI刺激H⁺分泌,而CoII则抑制H⁺分泌。质膜氢离子-ATPase与质膜氧化还原体系究竟在H⁺分泌中起什么作用,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 郑国辑.植物学报,1985,27:26~32
- 2 Gilder J. Planta, 1973, 110:189~204
- 3 李扬瑞.植物生理学通讯,1987,(6):20~21
- 4 焦新之等.实验生物学报,1981,15:411~420
- 5 王延之等.武汉大学学报,1987,(1):101~106

1)李维琳.水稻及燕麦根线粒体、质膜和液泡膜ATPase的比较研究.硕士论文,1988

- 6 Wang Y et al. J Biol Chem, 1985; 260 : 10434~10443
- 7 李琳等. 植物生理学通讯, 1980, (6) : 52~55
- 8 Bewley J D et al. Seeds—Physiology of Development and Germination. Plenum Press, New York and London, 1985 : 101~139
- 9 O' Neill S D et al. Plant Physiol, 1983;72 : 837~846
- 10 Nelson N et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74 : 2375~2378
- 11 Cocucci M et al. Plant Sci Lett, 1980, 17 : 391—400
- 12 Lin W. Plant Physiol, 1984, 74 : 219~222
- 13 Marre M T et al. Plant Physiol, 1988, 87 : 25~29
- 14 Lin P P C et al. Plant Physiol, 1984, 76 : 366~371

Preliminary Studies on Vigour, ATPase and H⁺ Extrusion of Peanut Seeds

Huang Liping* Fu Jiarui

Abstract

Accompanying the imbibition, the activity of mitochondrial ATPase and plasma, -tonoplast membrane-ATPase increased. Seed vigour was positively correlated to the activity of membrane bound ATPase. The results we gained indicated that the optimum pH of mitochondrial ATPase, plasma membrane ATPase and tonoplast membrane ATPase from embryonic axes were all pH9. Activities of mitochondrial, plasma and tonoplast membrane ATPase were inhibited conspicuously by dicyclohexylcarbodiimide (DCCI), while they were accelerated by KCl. NaN₃ is a special inhibitor of mitochondrial ATPase activity and NaVO₃ is also a particular inhibitor of plasmamembrane ATPase activity, but both of them have almost no inhibitory effect on tonoplast-membrane ATPase activity. H⁺ extrusion increased with the rise of pH in pH6-9, Mg²⁺ and K⁺ stimulated the H⁺ net efflux; it was hardly to see the effect of the special inhibitor of plasma membrane ATPase--NaVO₃ on H⁺ efflux, while the mitochondrial ATPase inhibitor--NaN₃ and the uncoupling factor DNP inhibited the H⁺ extrusion strongly; CoI activated the H⁺ extrusion and CoII had repressed effect on the H⁺ efflux. These results seemed to suggest that the ATP production of mitochondria may play an important role in the H⁺ extrusion.

Keywords vigour of seed, ATPase, H⁺ extrusion

*Department of Biology