

## 草酸氧化酶在水稻胚芽鞘衰老中的作用

张建军, 赖宇雄, 刘娥娥\*, 彭新湘

华南农业大学生命科学学院分子植物生理研究室, 广州 510642

**摘要:** 草酸氧化酶(OxO)催化草酸氧化产生CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 其在植物发育及防御过程中可能具有重要作用。本文以水稻品种‘湘糯1号’(‘Xiangnuo 1’)为材料, 对胚芽鞘中的OxO及其生理功能进行了研究。结果表明, 胚芽鞘中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量在其衰老时增加; OxO活性在浸种后96 h时较低, 之后也迅速增加, 在240 h达到最高; 而可溶性蛋白、O<sub>2</sub><sup>-</sup>和草酸含量以及过氧化氢酶(CAT)活性则随着胚芽鞘的衰老迅速降低。由于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能够诱导细胞死亡, 推测OxO可能通过降解草酸产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>参与胚芽鞘的衰老。

**关键词:** 草酸氧化酶; 胚芽鞘; 衰老; 水稻

## Function of Oxalate Oxidase (OxO) during Coleoptile Senescence in Rice (*Oryza sativa* L.)

ZHANG Jian-Jun, LAI Yu-Xiong, LIU E-E\*, PENG Xin-Xiang

Laboratory of Molecular Plant Physiology, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** Oxalate oxidase (OxO; EC1.2.3.4) catalyzes oxidation of oxalate and yields CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It may play important roles in plant growth and defense. In this study, OxO activity, oxalate content and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production were detected during senescence of coleoptiles in the rice (*Oryza sativa*) ‘Xiangnuo 1’ to analysis the possible functions of OxO in senescence of coleoptiles. The results showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was enhanced with the senescence of coleoptiles. OxO activity was very low at 96 h after imbibition, and then increased significantly and with a maximum at 240 h. Conversely, the levels of soluble protein, oxalate, O<sub>2</sub><sup>-</sup> and catalase (CAT) activity in coleoptiles were the highest at 96 h, and then decreased. It suggested that OxO might be involved in the senescence of coleoptiles in rice by catalyzing the oxidation of oxalate.

**Key words:** oxalate oxidase; coleoptile; senescence; rice

草酸氧化酶(oxalate oxidase, OxO; EC1.2.3.4)催化草酸氧化产生CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 是萌发素(germin)家族的成员。而萌发素是小麦萌发早期合成的蛋白, 1993年, Lane等(1993)发现萌发素具有OxO活性, 推测其降解草酸产生的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可能参与细胞壁组分的交联。1998年, Caliskan和Cuming(1998)发现在小麦(*Triticum aestivum*)种子萌发过程中, OxO总是位于胚根鞘、胚芽鞘、盾片和维管束这些生长受限制的组织, 认为OxO降解草酸产生的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可能通过参与细胞壁组分的交联来终止细胞生长。后来, Lane(2000)观察到小麦胚中萌发素的表达总是与包被组织和分化末期的维管组织有联系, 于是推测OxO在程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD)中具有一定的作用。此外, 研究还发现黑麦草(*Lolium perenne*)的叶片受到伤害和叶鞘衰老都可诱

导OxO的表达(Le Deunff等2004); 铝可诱导大麦(*Hordeum vulgare*)根中OxO活性增加(Tamas等2004), OxO产生的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可能参与铝诱导的大麦根边缘细胞的死亡(Tamas等2005); 白粉病诱导的OxO可能是过敏反应中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的一个来源, 其可能在调节过敏反应中具有重要作用(Zhou等1998)。现已有不少直接的证据表明OxO在抵抗病原菌入侵中具有一定的作用(Donaldson等2001; Hu等2003; Dong等2008), 而且Hu等(2003)发现过量表达OxO的植株中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和水杨酸(salicylic acid, SA)的含量

收稿 2010-07-01 修定 2010-09-14

资助 广东省博士启动基金(05300955)和广东省自然科学基金项目(8151064201000060)。

\* 通讯作者(E-mail: eeliu70@163.com; Tel: 020-85280194)。

及防御基因的转录皆提高。但目前对 OxO 确切的功能仍不清楚(Lou 和 Baldwin 2006)。

在禾本科植物中, 胚芽鞘不但能够保护真叶抵抗土壤压力和其他物理胁迫, 还能够为正在发育的组织提供营养物质, 它是水稻萌发后第一个衰老的器官。我们在实验过程中发现, 水稻萌发时, OxO 活性随着胚芽鞘的衰老而提高。由于 OxO 降解草酸产生  $H_2O_2$ , 同时引起  $Ca^{2+}$  的释放(Lane 等 1993); 而  $H_2O_2$  能够诱发 PCD (Dat 等 2003; Yoda 等 2006),  $Ca^{2+}$  则是 PCD 过程信号途径中的成员(Pennel 和 Lamb 1997)。于是我们推测水稻萌发过程中胚芽鞘中的 OxO 可能通过降解草酸参与了胚芽鞘衰老, 本文对此进行了探讨。

## 材料与amp;方法

### 1 材料培养

先用 5% 次氯酸钠对水稻(*Oryza sativa* L.)品种‘湘糯 1 号’(‘Xiangnuo 1’)的种子消毒 10 min, 接着用自来水冲洗 3~5 次, 然后浸种, 10 h 后取出, 转入垫有湿润滤纸的培养皿中, 置于 28 °C 恒温培养箱暗培养至浸种后的 96、144、192、240、288 h 分别取样测定。其中  $H_2O_2$  和  $O_2^-$  的原位检测每次所取胚芽鞘至少为 5 个, 其他指标的测定每次取样重复为 3 个; 用于草酸测定的样品每份为 0.2 g, 其他约为 0.1 g。

### 2 方法

**2.1  $H_2O_2$  和  $O_2^-$  的原位检测**  $H_2O_2$  的分析参考 Thordal-Christensen 等(1997)的方法。将不同发育时期的水稻胚芽鞘浸泡在 0.5 mg·mL<sup>-1</sup> 的 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)溶液(pH 3.8)中, 室温下放置, 直到褐红色出现。 $O_2^-$  的检测参考 May 等(1996)的方法。将不同发育时期的胚芽鞘置于氯化硝基四氮唑蓝(nitrotetrazolium blue chloride, NBT)染色液(含 0.5% NBT、10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和 10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 乙二胺四乙酸的 10 mmol·L<sup>-1</sup> pH 7.8 磷酸缓冲液)中, 室温下放置至颜色出现。

**2.2 可溶性蛋白及酶的提取和测定** OxO 的提取以 40 mmol·L<sup>-1</sup> pH 3.5 的琥珀酸缓冲液作为提取液, 按

1:6 (W/V) 的比例加入研磨, 于 4 °C 下 14 300×g 离心 15 min, 分别收集上清液和沉淀, 用于测定 OxO 活性。可溶性蛋白和过氧化氢酶(catalase, CAT)用 50 mmol·L<sup>-1</sup> pH 7.8 磷酸缓冲液提取, 按 1:10 (W/V) 的比例加入研磨, 然后于 4 °C 下 14 300×g 离心 15 min, 收集上清液用于测定蛋白含量及 CAT 活性。

OxO 活性测定参考 Zhang 等(1996)的方法。1 mL 反应液中含 0.8 mL 显色液, 5 U 辣根过氧化物酶(peroxidase, POD), 1.6  $\mu$ mol 草酸, 用草酸启动反应, 对照的反应液中不加草酸。以每分钟每克干重材料降解草酸产生  $H_2O_2$  的微摩尔数表示酶活性大小。配制显色液时, 先配制含 75% (V/V) 乙醇的 50 mmol·L<sup>-1</sup> 琥珀酸缓冲液(pH 3.8), 临反应前取需要量的上述缓冲液, 加入显色剂 4-氨基氮替吡啶(终浓度 100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>)和 N,N-二甲基苯胺(0.25  $\mu$ L·mL<sup>-1</sup>)。可溶性蛋白含量测定参考 Bradford (1976)的方法。CAT 活性测定参考 Chance 和 Maehly (1955)的方法。取适量酶液加入含 0.06%  $H_2O_2$  的 50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸缓冲液(pH 7.0)中, 在 240 nm 处测定吸光值的变化。定义在测定条件下每分钟吸光值下降 0.01 所需的酶量为 1 U。

**2.3 草酸含量的测定** 草酸的提取和测定参考 Liu 等(2009)的方法。取 0.2 g 胚芽鞘, 加 0.4 mL 0.5 mol·L<sup>-1</sup> HCl 和少量石英砂充分研磨, 将匀浆液倒入 10 mL 刻度试管中, 然后用 0.4 mL 0.5 mol·L<sup>-1</sup> HCl 和 0.5 mL 的蒸馏水冲洗研钵, 其溶液并入试管中。沸水浴加热 20 min, 中间摇动几次, 冷却后加入蒸馏水定容至 5 mL, 静置过夜。次日, 将匀浆液混匀后取 0.7 mL 于 4 °C 下离心(13 400×g) 10 min, 取上清液 0.5 mL, 准确加入 2 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 16  $\mu$ L, 混匀后即可用于草酸含量测定。

测定草酸(1 mL 反应体系)时, 先向试管中加入 0.02 U 的 OxO (约 30 mg 酶制剂干粉), 再加入 0.11 mL 蒸馏水, 然后加入 0.8 mL 显色液, 40  $\mu$ L POD (50 U·mL<sup>-1</sup>), 最后加上述草酸提取液 50  $\mu$ L 启动反应, 室温下反应 90 min, 13 400×g 离心 5 min 后在 555 nm 处测定吸光值。对照的反应液中以蒸馏水代替草酸提取液。配制显色液时, 先配制含 75% (V/V) 乙醇的 125 mmol·L<sup>-1</sup> 琥珀酸缓冲液(pH 4.0), 临

反应之前取需要量的上述缓冲液, 加入显色剂4-氨基氨基替吡啶(终浓度  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )和 *N,N*-二甲基苯胺( $0.25 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

## 实验结果

### 1 水稻种子萌发过程中胚芽鞘形态和可溶性蛋白含量的变化

水稻胚芽鞘是水稻种子萌发过程中最先衰老的器官。浸种后 96 h 时, 胚芽鞘呈淡黄色, 此时可溶性蛋白含量较高, 为  $80.04 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (DW); 随着萌发进程的推进, 胚芽鞘逐渐变褐, 可溶性蛋白含量迅速降低; 192 h 时, 胚芽鞘出现衰老症状, 其中的可溶性蛋白含量已降至  $24.21 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  (DW) (图 1); 288 h 时, 胚芽鞘不但呈褐色而且干枯, 似乎完全死亡。

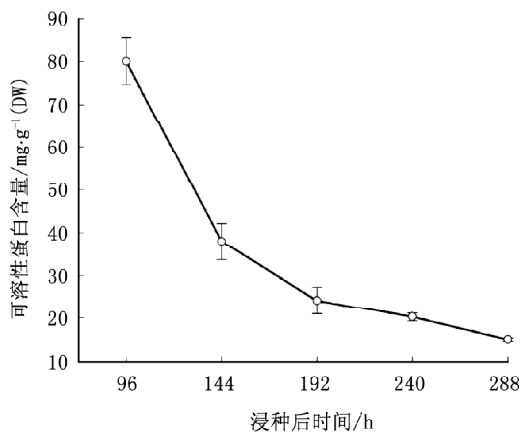


图 1 浸种后不同时间水稻胚芽鞘中的可溶性蛋白含量  
Fig.1 Soluble protein content in rice coleoptiles at different time after imbibition

### 2 水稻种子萌发过程中胚芽鞘中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{O}_2^-$ 的变化

DAB染色法能够定性和半定量地反映植物组织中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的水平, 是一种比较直观和简洁的检验方法。因此, 我们采用 DAB 染色法分析水稻种子萌发过程中胚芽鞘中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的变化。浸种后 96 h 的胚芽鞘, 经 DAB 染色 2 h 仍呈淡黄色, 但在 192、240 和 288 h 的胚芽鞘上, 可观察到明显的褐红色物质 (图 2-A), 说明此时胚芽鞘中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的含量明显高于 96 h。而 NBT 染色结果则是浸种后 96 h 胚芽鞘的颜色最深, 之后则降低 (图 2-B), 即胚芽鞘中 $\text{O}_2^-$

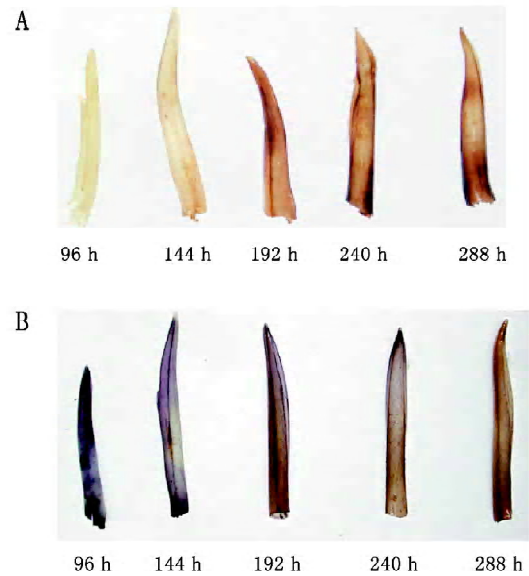


图 2 DAB 和 NBT 染色法检测水稻胚芽鞘中的  $\text{H}_2\text{O}_2$  (A) 和  $\text{O}_2^-$  (B)

Fig.2 Detection of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (A) and  $\text{O}_2^-$  (B) in rice coleoptiles by staining with DAB and NBT

的含量随着发育进程的推进而降低。

### 3 水稻种子萌发过程中胚芽鞘中的 OxO 活性及草酸含量的变化

分别于水稻浸种后 96、144、192、240 和 288 h 时取样。用  $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 3.5 的琥珀酸缓冲液作为提取液, 在上清液中未检测到 OxO 活性, OxO 活性只存在于沉淀中。胚芽鞘中的 OxO 活性在 96 h 时, 相对较低, 之后迅速升高, 在浸种后 240 h 达到最高, 然后随着胚芽鞘的衰老又有所降低 (图 3)。而胚芽鞘中的草酸含量则随着幼苗的生长迅速降低, 在浸种后 96 h 时, 其草酸含量是 288 h 的 5.7 倍 (图 3)。

### 4 水稻种子萌发过程中胚芽鞘中的 CAT 活性

CAT 是植物体内清除  $\text{H}_2\text{O}_2$  的关键酶, 那么胚芽鞘中 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量的增加是否与其有关? 于是分别在浸种后 96、144、192、240、288 h 测定水稻胚芽鞘中 CAT 的活性。结果显示: 随着幼苗的生长, 胚芽鞘中的 CAT 活性迅速降低; 在浸种后 192 h 时, 胚芽鞘中的 CAT 活性已经很低; 288 h 时, 其活性几乎为 0 (图 4)。

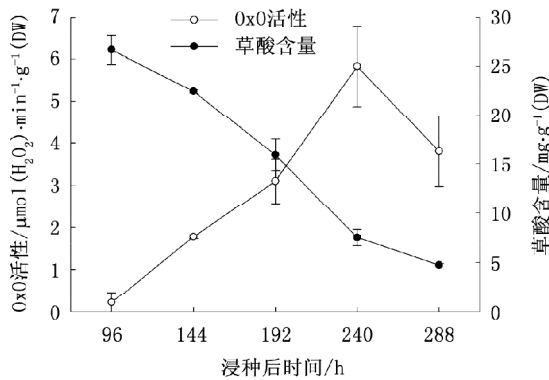


图3 浸种后不同时间水稻胚芽鞘中的OxO活性和草酸含量  
Fig. 3 OxO activity and oxalate content in rice coleoptiles at different time after imbibition

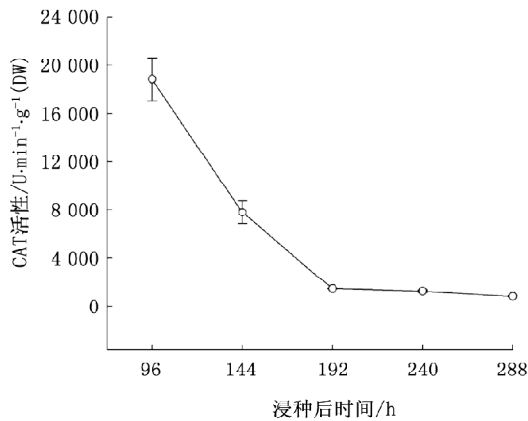


图4 浸种后不同时间水稻胚芽鞘中的CAT活性  
Fig. 4 CAT activity in rice coleoptiles at different time after imbibition

## 讨 论

水稻胚芽鞘是水稻萌发后第一个衰老的器官,它快速从有生命的状态过渡到衰老(Kawai和Uchimiya 2000),本文的结果也证实了这一点。从浸种后96 h开始,胚芽鞘中的可溶性蛋白含量迅速下降;192 h时,胚芽鞘中可溶性蛋白含量是96 h的0.19倍,此时胚芽鞘在形态上也呈现出衰老症状,说明已有部分组织衰老死亡;288 h时,胚芽鞘似乎完全死亡。

Leshem (1988)认为衰老是一个氧化的过程,其中包括活性氧的过量产生,而 $\text{H}_2\text{O}_2$ 能够与超氧自由基反应形成羟基自由基,羟基自由基可启动膜脂过

氧化和破坏蛋白质(Halliwell 1987)。于是我们分别采用DAB和NBT组织染色法对浸种后不同时期胚芽鞘中的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{O}_2^-$ 水平进行了分析,结果表明 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的含量随着胚芽鞘的衰老而升高,而 $\text{O}_2^-$ 则相反。同样, Davoine等(2001)在黑麦草叶鞘衰老过程中也观察到,越是衰老的叶鞘, $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量越高,而 $\text{O}_2^-$ 的变化则相反。由此推测 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可能在胚芽鞘衰老过程中具有重要作用。

在植物中, $\text{H}_2\text{O}_2$ 主要来源于Mehler反应和光呼吸中的乙醇酸氧化酶,此外,POD、NADPH氧化酶和OxO也可产生相当量的 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,而CAT是植物体内清除 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的关键酶。由于本实验的材料是在遮光条件下培养的,因此胚芽鞘衰老过程中产生的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 很可能来源于POD、NADPH氧化酶或OxO。研究表明,越是衰老的黑麦草叶鞘,其OxO活性和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量越高,高水平的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可能主要来源于草酸(Davoine等2001)。此外,有报道显示,G-OxO(germin-oxalate oxidase)可能参与谷物表面结构的PCD(Lane 2000);OxO产生的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可能参与铝诱导的大麦根边缘细胞的死亡(Tamas等2005);在表达高水平OxO的转基因植株叶片中可观察到过敏反应类症状(Hu等2003);草酸则能够诱导植物细胞的PCD(Errakhi等2008)。于是本研究进一步分析了不同发育时期水稻幼苗胚芽鞘中的CAT、OxO活性和草酸含量,结果显示,胚芽鞘中的OxO活性和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 含量随着胚芽鞘的衰老而升高,而CAT活性和草酸含量则迅速降低,因此推测胚芽鞘衰老过程中产生的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可能来源于草酸,OxO很可能通过降解草酸产生 $\text{H}_2\text{O}_2$ 参与胚芽鞘的衰老,而CAT活性的迅速降低对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的积累也起了重要作用。

## 参考文献

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248~254
- Caliskan M, Cuming AC (1998). Spatial specificity of  $\text{H}_2\text{O}_2$ -generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination. *Plant J*, 15: 165~171
- Chance B, Maehly AC (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol*, 2: 746~755
- Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, Van De Cotte B, Langebartels C, Kangasjarvi J, Inze D, Van Breusegem F (2003). Changes in

- hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J*, 33: 621~632
- Davoine C, Le Deunff E, Ledger N, Avice JC, Billard JP, Dumas B, Huault C (2001). Specific and constitutive expression of oxalate oxidase during the ageing of leaf sheaths of ryegrass stubble. *Plant Cell Environ*, 24: 1033~1043
- Donaldson PA, Anderson T, Lane BG, Davidson AL, Simmonds DH (2001). Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 59: 297~307
- Dong X, Ji R, Guo X, Foster SJ, Chen H, Dong C, Liu Y, Hu Q, Liu S (2008). Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Planta*, 228: 331~340
- Errakhi R, Meimoun P, Lehner A, Vidal G, Briand J, Corbineau F, Rona J, Bouteau F (2008). Anion channel activity is necessary to induce ethylene synthesis and programmed cell death in response to oxalic acid. *J Exp Bot*, 59: 3121~3129
- Halliwell B (1987). Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidation protection in chloroplasts. *Chem Phys Lipids*, 44: 327~340
- Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O, Lu G (2003). Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol*, 133: 170~181
- Kawai M, Uchimiya H (2000). Coleoptile senescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Ann Bot*, 86: 405~414
- Lane BG (2000). Oxalate oxidases and differentiating surface structure in wheat: germin. *Biochem J*, 349: 309~321
- Lane BG, Dunwell JM, Ray JA, Schmitt MR, Cuming AC (1993). Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J Biol Chem*, 268: 12239~12242
- Le Deunff E, Davoine C, Le Dantec C, Billard JP, Huault C (2004). Oxidative burst and expression of *germin/oxo* genes during wounding of ryegrass leaf blades: comparison with senescence of leaf sheaths. *Plant J*, 38: 421~431
- Leshem YY (1988). Plant senescence processes and free radicals. *Free Rad Biol Med*, 5: 39~49
- Liu EE, Luo W, Zhou H, Peng XX (2009). Determination of oxalate in plant tissues with oxalate oxidase prepared from wheat. *Biol Plant*, 53: 129~132
- Lou YG, Baldwin IT (2006). Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuate* improves performance of native herbivores. *Plant Physiol*, 140: 1126~1136
- May MJ, Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1996). Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the *Cf*-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol*, 110: 1367~1379
- Pennell RI, Lamb C (1997). Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 9: 1157~1168
- Tamas L, Budikova S, Huttova J, Mistrik I, Simonovicova M, Siroka B (2005). Aluminium-induced cell death of barley root border cells is correlated with peroxidase- and oxalate oxidase-mediated hydrogen peroxide production. *Plant Cell Rep*, 24: 189~194
- Tamas L, Simonovicova M, Huttova J, Mistrik I (2004). Elevated oxalate oxidase activity is correlated with Al-induced plasma membrane injury and root growth inhibition in young barley roots. *Acta Physiol Plant*, 26: 85~93
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J*, 11: 1187~1194
- Yoda H, Hiroi Y, Sano H (2006). Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol*, 142: 193~206
- Zhang Z, Yang J, Collinge DB, Thordal-Christensen H (1996). Ethanol increases sensitivity of oxalate oxidase assay and facilitates direct activity staining in SDS gels. *Plant Mol Biol Rep*, 14: 266~272
- Zhou FS, Zhang ZG, Gregersen PL, Mikkelsen JD, Neergaard ED, Collinge DB, Thordal-Christensen H (1998). Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol*, 117: 33~41