

细胞色素氧化酶活力及线粒体膜脂 脂肪酸组分与玉米抗冷性的关系

郭定成

裴英杰

王金胜

(山西农业大学, 太谷)

(山西省农业科学院, 太原)

(山西农业大学, 太谷)

摘 要

细胞色素氧化酶活化转折点温度与玉米芽期抗冷性密切相关, 是反映植物抗冷性的一个较好指标, 其统计数据可用于玉米芽期抗冷级别的划分。线粒体膜脂脂肪酸不饱和指数和亚油酸/棕榈酸也可作为玉米芽期抗冷性指标。膜脂不饱和脂肪酸的摩尔百分含量是否可作为玉米芽期抗冷性的指标, 有待于进一步的研究。玉米芽期抗冷性潜力很小。

关键词 玉米 抗冷级别 细胞色素氧化酶 活化能转折点温度 线粒体膜脂

冷害是农业生产中严重的自然灾害, 现在人们通过多种途径探索植物抗冷性的指标和鉴定植物抗冷性的方法。细胞色素氧化酶 (EC 1、9、3、1) 是线粒体膜上重要的酶之一, 现已知该酶有两种活化能不同的构象, 该酶的构象和活力受膜脂物理状态的影响。Maeshima^[1]观察到抗冷与不抗冷植物的细胞色素氧化酶活化能转折点处温度存在明显差异。但迄今关于细胞色素氧化酶活力与植物品种抗冷性的关系以及用酶活化能转折点和线粒体膜脂脂肪酸组分来划分植物抗冷性级别的资料还未见报道。为此, 我们以玉米为材料, 对其线粒体细胞色素氧化酶活力和线粒体膜脂脂肪酸组分与玉米抗冷性的关系进行了一些探索。

材料和方法

玉米品种芽期抗冷级别的鉴定: 按芽期低温筛选法进行^[2]。

材料的培养: 玉米种子用 0.2% 氯化汞消毒 6—8 分钟, 冲洗干净。清水浸泡 24 个小时, 恒温箱中 30℃ 黑暗发芽 3—4 天, 黄化幼苗长到 1—2 cm 即可用于测定。

线粒体的提取: 按中国科学院生物物理研究所三室二组的方法进行。线粒体悬浮于 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 中用于酶活力的测定; 若用于线粒体膜脂的提取, 则将线粒体悬浮于少量异丙醇中。

细胞色素氧化酶活力的测定: 按 P. C. Кривченкова 法^[3]进行。酶活力用对氨基二甲 N—二甲基苯胺氧化的纳摩尔 (nmol) 数/分钟·毫克蛋白来表示。

线粒体膜脂的提取及其脂肪酸组分的测定: 线粒体膜脂的提取按苏维埃^[4]法进行。膜脂脂肪酸组分的测定由山西省粮油研究所测试中心用气相色谱法完成。

玉米黄化幼苗的低温处理: 将玉米黄化幼苗于 7—8℃ 在恒温箱中处理 36 个小时, 然后

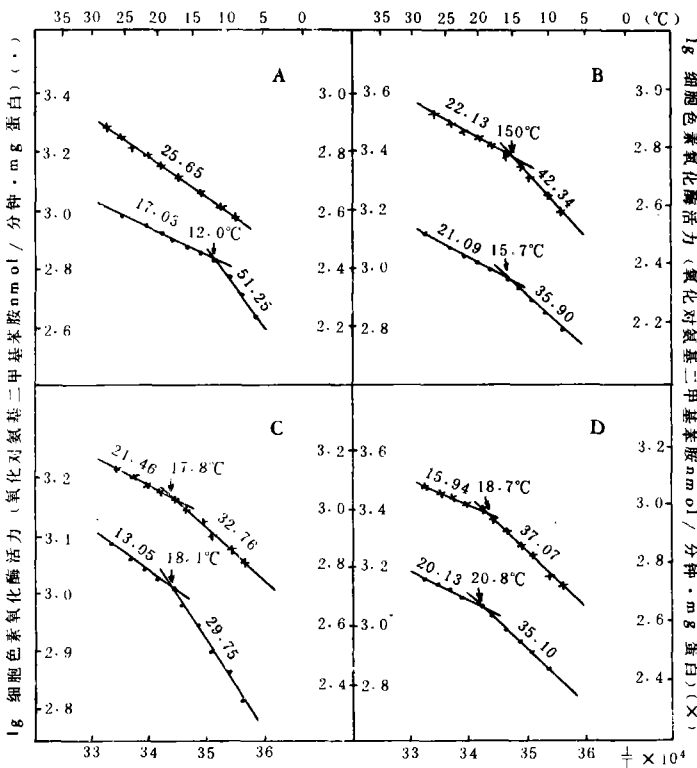
测定其细胞色素氧化酶活力。对照为不经低温直接测定酶活力。

蛋白质含量的测定：用考马斯亮兰 G—250 法^[5]进行。

结 果

一、不同玉米品种的抗冷级别以及各品种细胞色素氧化酶活化能折点温度与抗冷级别的关系

我们用低温筛选法对 39 个玉米品种的芽期抗冷级别进行了鉴定；并且对这些品种的线粒体细胞色素氧化酶活力在 5—30℃ 升温程序条件下进行了测定，绘出了各品种的 Arrhenius 图，从图中确定了酶活化能的折点温度，并计算出了酶的活化能值。每个级别中，两个品种的线粒体细胞色素氧化酶活化能的变化用 Arrhenius 图表示的结果见图 1。从图中可知，经鉴定为一级品种的红玉米 299 的线粒体细胞色素氧化酶活力的 Arrhenius 曲线为一条直线，说明酶活化能在实验温度范围内没发生变化。其余品种酶活力的 Arrhenius 曲线为折线，并且折点以下线段的斜率大于折点以上线段的斜率，说明在实验程序条件下，酶发生了从高活化能向低活化能的转折，Arrhenius 曲线折点处温度，则是酶活化能的折点温度。同时从图中可知，从一级到四级，品种的酶活化能折点温度依次升高。



A 为一级品种：红玉米 299 (X)，
凤城百合 256 (•)。
B 为二级品种：土黄玉米 182 (X)，
象牙白 229 (•)。
C 为三级品种：大红袍 444 (X)，
小黄玉米 004 (•)。
D 为四级品种：二半软玉米 440 (X)，
白玉米 244 (•)。
曲线上数据如为酶的活化能，单位为
KJ/mol

图 1 玉米品种线粒体细胞色素氧化酶活力的 Arrhenius 图

从全部 39 个品种的分级情况，酶活化能折点温度及其活化能的变化看出，所试品种抗冷性不一，分布于一到四级。所试品种中，除红玉米 299 外，其余品种酶的活化能都有一个转

折, 其折点温度从 10°C 到 22.3°C 高低不一。

我们对各级别品种酶活化能折点温度进行了统计处理 (表 1)。从这些统计数据可知, 酶活化能折点温度与抗冷级别在极显著水平上相关。各级别酶活化能折点温度平均数间差异是极显著的, 并且各级别酶活化能折点温度的平均数与抗冷级别间的相关性也是极显著的。

表 1 酶活化能折点温度的统计处理

级 别	酶活化能折 点温度范围 ($^{\circ}\text{C}$)	\bar{X}	S	\bar{X} 差异的 显著性测验 (t)	\bar{X} 与级别的 相关性 (γ)	各品种酶活化能 折点温度与级别的 相关性 (γ)
一	14.5 以下	12.56	1.64	6.131 *	0.994 **	0.930 **
二	15.0—16.2	15.78	0.36			
三	16.4—18.1	17.50	0.51			
四	18.7—22.3	20.06	1.26			

二、不同品种线粒体膜脂脂肪酸组分的差异与芽期抗冷级别的关系

我们对分属四个级别的四个品种线粒体膜脂脂肪酸组分进行了分析, 其结果见表 2。从表中数据可知。各品种的脂肪酸组成相同, 主要为棕榈酸 (16:0)、硬脂酸 (18:0)、油酸 (18:1)、亚油酸 (18:2)、亚麻酸 (18:3)。各品种中各组分的配比也有相同规律, 各组分含量顺序为: 亚油酸 > 棕榈酸 > 亚麻酸 > 油酸 > 硬脂酸。各品种脂肪酸组分的差异主要表现在这些组分的精细配比上。三个指标都与品种抗冷性相关, 但不饱和脂肪酸摩尔百分量二级与三级品种间差异不大。

表 2 玉米品种线粒体膜脂脂肪酸组分

级 别	品 种	脂肪酸组分 (mol %)					指 标		
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	IUFA	不饱和脂肪酸 (mol %)	18:2 / 16:0
一	小白玉米 265	26.8	0.9	1.7	60.2	10.1	152.4	72.0	2.246
二	金皇后 201	28.4	0.7	1.6	60.4	8.5	147.9	70.5	2.127
三	大红袍 444	28.8	0.9	2.6	58.4	9.0	146.4	70.0	2.028
四	黄玉米 333	31.4	0.4	1.4	61.8	4.7	139.1	67.9	1.968

注: IUFA 不饱和指数 [(18:1) mol % + (18:2) mol % × 2 + (18:3) mol % × 3 + (16:1) mol %]

三、低温处理后不同品种线粒体细胞色素氧化酶活化能折点温度的变化

我们采用抗冷性各不相同的四个玉米品种, 对其黄化幼苗进行了低温处理。处理及其对照的酶活化能变化用 Arrhenius 图表示的结果见图 2。经过对酶活化能折点温度的方差分析, 可知处理和对照间酶活化能折点温度的差异不显著 (表 3), 而品种间的差异是极显著的。

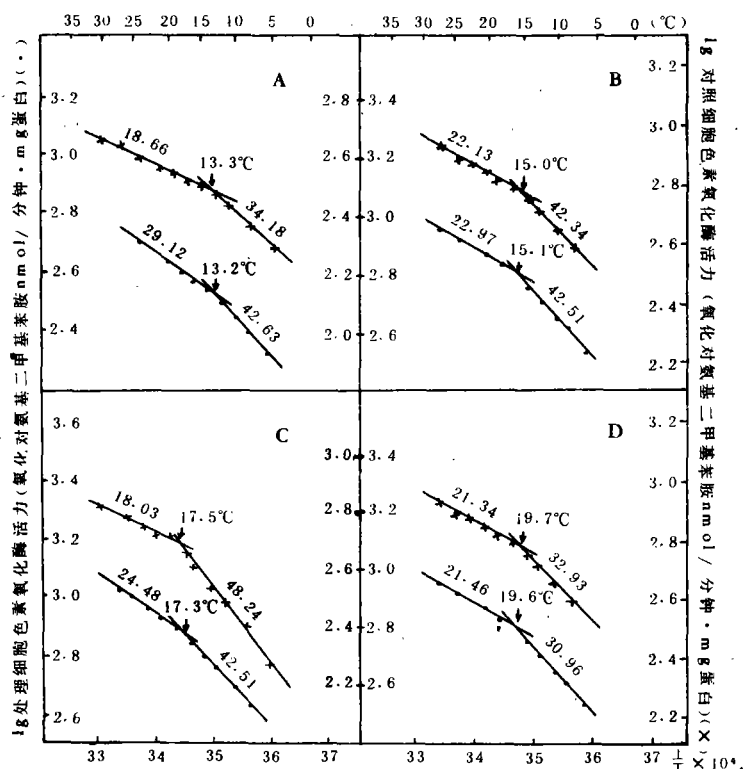


图 2 低温处理玉米品种线粒体细胞色素氧化酶活力的 Arrhenius 图

A 为一级品种：中单 2 号；B 为二级品种：土黄玉米 182。C 为三级品种：小洋玉米；D 为四级品种：华农 2 号。各图中曲线上为对照 (X)，曲线下为处理 (•)。曲线上面数据为酶的活化能，单位 KJ/mol

表 3 低温处理酶活化能折点温度的方差分析

级别	一	二	三	四	方差分析	
品 种	中单 2 号	土黄玉米 182	小洋玉米	华农 2 号	处理间	级别间
处理	13.2℃	15.1℃	17.3℃	19.6℃	0.60	1839.1 **
对照	13.3℃	15.0℃	17.5℃	19.7℃		

讨 论

我们对 39 个玉米品种进行了抗冷性鉴定, 结果, 这些品种分布于 1—4 级, 说明玉米芽期抗冷性因品种而异。通过对全部品种线粒体细胞色素氧化酶活力的测定, 发现除红玉米 209 外, 其余品种酶的活化能在实验温度范围均出现了突变, 说明玉米线粒体细胞色素氧化酶易受低温的抑制。从对酶活化能折点温度统计处理的结果可知, 酶活化能折点温度与品种抗冷级别相关性极显著, 所以我们认为线粒体细胞色素氧化酶活化能折点温度是反映植物抗冷性的一个较好指标。从统计结果可知, 各级别酶活化能折点温度平均数间的差异是极显著的, 平均数与抗冷级别的相关性也是极显著的。所以我们建议酶活化能折点温度可用于玉

米芽期抗冷级别的划分: 据统计数据, 其分级标准为 14.2°C 以下为一级, $15.78 \pm 0.36^{\circ}\text{C}$ 为二级, $17.5 \pm 0.51^{\circ}\text{C}$ 为三级, $20.06 \pm 1.26^{\circ}\text{C}$ 为四级。由于无五级材料, 所以五级的标准不能定出。若酶活化能折点温度处于两级别温度范围之间, 则该品种属于两级间的过渡品种。这种方法比目前通用的栽培试验测定法简单、可靠并有较严密的理论基础。

许多学者认为, 膜中高含量的不饱和脂肪酸可以维持膜在低温下的液晶态, 使膜上的功能蛋白具有高活力, 从而保持了膜的正常功能, 使植物有较大的抗冷性。膜脂脂肪酸不饱和指数表示脂肪酸的不饱和程度, 这个指标已在一些植物上被用作抗冷性的指标。虽然这方面存在有相反的实验结果, 但从我们的实验结果看, 不饱和指数与玉米芽期抗冷级别密切相关。所以我们认为, 不饱和指数的大小从一个方面体现了膜流动性的 大小和植物抗冷性的大小。这个指标至少可以在一些植物(如玉米、水稻等)和一些细胞器上(如线粒体)作为膜流动性和植物抗冷性的一项指标。从脂肪酸组分的分析结果看, 玉米幼苗线粒体膜脂的脂肪酸主要为亚油酸和棕榈酸, 二者之和占脂肪酸总量的88%左右。我们推断这两种脂肪酸之比是影响膜流动性的主要因素之一。从实验结果可知, 亚油酸/棕榈酸与玉米抗冷级别密切相关, 所以这个指标可用于玉米芽期抗冷性的研究。但由于实验中所用样品较少, 还不能进行统计处理使之成为一项可靠指标, 用来划分玉米芽期的抗冷级别。有待于进一步研究。

我们试将膜脂不饱和脂肪酸的摩尔百分量用于玉米抗冷性的研究。结果表明, 不同抗冷级别玉米品种间不饱和脂肪酸摩尔百分量是出现了差异, 但二级与三级间差别很小, 只有0.5%, 所以这个指标是否可用于玉米芽期抗冷性的研究, 有待于进一步研究。

不少实验证明, 当环境温度下降时, 一些越冬植物不饱和脂肪酸含量要增加, 但关于其它植物的资料不多。Barkawski^[6]对棉花幼苗进行低温(6°C)处理后, 发现线粒体膜脂脂肪酸组分处理与对照差别很小。我们的实验得到了类似的结果。玉米幼苗经低温处理后, 其线粒体细胞色素氧化酶活化能折点温度与对照差异不显著, 说明低温处理后, 膜脂组分和膜流动性无明显改变, 玉米芽期潜力很小。

参 考 文 献

- [1] Maeshima, M., et al: Effect of temperature on the activity and stability of plant cytochrome C oxidase. *Agric. Biol. Chem.*, 1980, 44: 2351—2356
- [2] 赵玉田等: 玉米抗冷性鉴定方法及指标的研究《作物品种资源》, 1983, 3 : 31—33
- [3] B. H. 奥列霍维 (袁积厚等译): 《现代生物化学方法》, 北京, 人民教育出版社, 1980: 39—42
- [4] 苏维埃等: 植物类脂及其脂肪酸的分析技术。《植物生理通讯》, 1980, 3 : 54—60
- [5] 李琳、焦新之: 应用蛋白染色剂考马斯亮兰 G--250 测定蛋白质的方法。《植物生理通讯》, 1980, 6 : 52—55。
- [6] Bartkawski, E. J.: Chill-induced changes in organelle membrane fatty acids. In J. M., Lyons & Raison, J. K. (eds.), *Low Temperature Stress in Crop Plants*, 1979, pp. 431—435. Academic Press, New York

Cytochrome Oxidase Activity and Fatty Acid Composition in Mitochondrial Membrane Lipids in Relation to Chilling - Resistance of Maize

Guo Dingcheng

(*Shanxi Agriculture University, Taigu*)

Pei Yingjie

(*Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Taiyuan*)

Wang Jinsheng

(*Shanxi Agriculture University, Taigu*)

Abstract

The transition temperature at which activation energy (E_a) changed for cytochrome oxidase was closely correlation with chilling-resistant level of maize varieties. This indicated that the transition temperature of E_a changed for the enzyme was a better biochemical index which reflected maize resistant ability to chilling injury. Their statistical data can be used to differentiate chilling-resistant level of maize in shoot period. The index of unsaturation fatty acid and palmitoleic acid/linoleic acid in mitochondrial membrane lipids can be used as biochemical index of chilling-resistance in some plants. The molecular percent of unsaturation fatty acids in the membrane lipids was not sure whether it can be used as biochemical index of chilling-resistance. The potenciality of chilling-resistance in maize in shoot period was very small.

Key words: Chilling-resistant level; Maize; Cytochrome oxidase; Transition temperature of activation energy; Mitochondrial membrane lipids