

光照及缺氧對水稻幼苗發育及觸媒酶 活性之影響

Effect of Light and Anaerobic Condition on the Morphogenesis and The Catalase Activity of Rice Seedlings

陳 國 樑 童 武 夫
摘 要

水稻幼苗的生長發育及觸媒酶活性受光照及缺氧條件影響之情形作了初步之觀察研究。光照對上胚軸的生長並沒有顯著的影響，但在光照及缺氧條件同時存在下則對生長之抑制作用相當明顯。表示此兩種環境因子有相互的加強作用。觸媒酶活性隨著幼苗之生長而增高，二者具有相當高的正相關。缺氧條件對酶活性有明顯的抑制作用，尤其是台中 3 號幼苗缺氧下的酶活性特別低，顯示此品種對缺氧條件之抵抗力比台中 65 號差。台中 3 號酶抽取液可分離五條異構酶帶，根據其酶帶數目及活性比例分佈顯示其為兩類酶次體所組成。向陽極移動快速之酶次體為受光照所誘導者。台中 65 號酶抽取液只含四條異構酶帶，其分子結構，活性比例分佈以及對缺氧條件之抵抗性等都有加以討論。

緒 言

過氧化氫為細胞基本代謝之初級產物，它的過量堆積將引起細胞中毒。觸媒酶 (catalase) 負責催化分解過氧化氫成氧和水，在細胞內擔負有保護性作用，為任何生物機體所必需。故此酶分佈極廣，從低等微生物一直到高等動植物都有其踪跡 (10)。在細胞內觸媒酶常與許多由黃素蛋白 (flavoprotein) 所構成的氧化酶 (oxidase) 有連鎖作用，因為過氧化氫就是這些氧化酶的反應副產物，因此觸媒酶可視為細胞新陳代謝活性之指標 (12)。Hendricks 及 Taylorson 曾報導有關種子突破休眠之觀察 (5, 6)；他們認為突破休眠可能是加強磷酸五碳糖徑路 (Pentose-phosphate pathway) 之進行所致，而細胞內觸媒酶活性之增高可抑制磷酸五碳糖徑路之進行而影響到種子之萌芽。致於觸媒酶的異構酶系統 (Isozyme system) 在高等植物也被廣泛地調查 (11, 12)。其中只以玉米被研究得較為

詳細；在玉米的孢子體 (Sporophyte) 發育過程中觸媒酶活性由兩對基因 Ct_1 及 Ct_2 所控制。 Ct_1 基因所傳譯之異構酶在種子形成過程就已出現，但其單位活性較低。到種子萌芽後 Ct_1 異構酶遂漸由活性高的 Ct_2 異構酶所取代，以適應幼苗發育期間高活性的新陳代謝。水稻為我國主要栽培作物之一，向來被廣泛採用為應用農業研究之對象，而利用於生理生化研究方面較不普遍。一般栽培稻種多不具休眠性或具短休眠期且萌芽時對缺氧之抵抗力比其他作物高。這些特殊性狀在植物的發育過程必具有其生理意義。本文就以水稻幼苗發育為研究對象，觸媒酶活性及其異構酶為代謝活性之觀察指標，初步地探討光照，缺氧等環境因素對水稻幼苗發育之影響。

材料與方法

一、材料來源及處理

栽培稻種：台中 65 號 (Taichung 65)，台中

秧 3 號 (*Taichung San 3*) 由中央研究院植物所及農業試驗所提供。種子先經 5% 次氯酸鈉消毒處理五分鐘後以自來水，蒸餾水依序沖洗再置入錐形瓶內濾紙上，於 30°C 定溫箱內發芽生長。光照組之光源為兩支 20W 日光燈，其強度為 2,000 Lux。黑暗組則先以錫箔紙包緊再置入定溫箱中的厚紙盒中。缺氧組則每瓶加蒸餾水 100 毫升使水高為 3 公分。為避免黴菌生長至少隔天得換水一次。幼苗之長度是以上胚軸最長的分蘗為準。

二、酶的抽取及觸媒酶活性之測定

將組織剪碎後加入 0.063M 磷酸鉀緩衝液，pH 7.0 使其總重量為 3.0 克。在磨鉢中研磨至呈漿液狀後，於 10,000 rpm 之速度，溫度 4°C 下離心 30 分鐘。取其上清液即為酶抽取液。觸媒酶活性之測定是根據 *Chance* 及 *Maehly* (2) 之方法；以 3.0 毫升內含 0.075% 過氧化氫之 0.063M 磷酸鉀緩衝液 pH 7.0 為反應混合液。當加入 0.05 到 0.1 毫升酶抽取液後在波長 240 nm 下測定其吸光度降低之速度，取每分鐘吸光度下降 0.01 為一酶活性單位 (U)。

三、蛋白質含量之測定及異構酶之分離

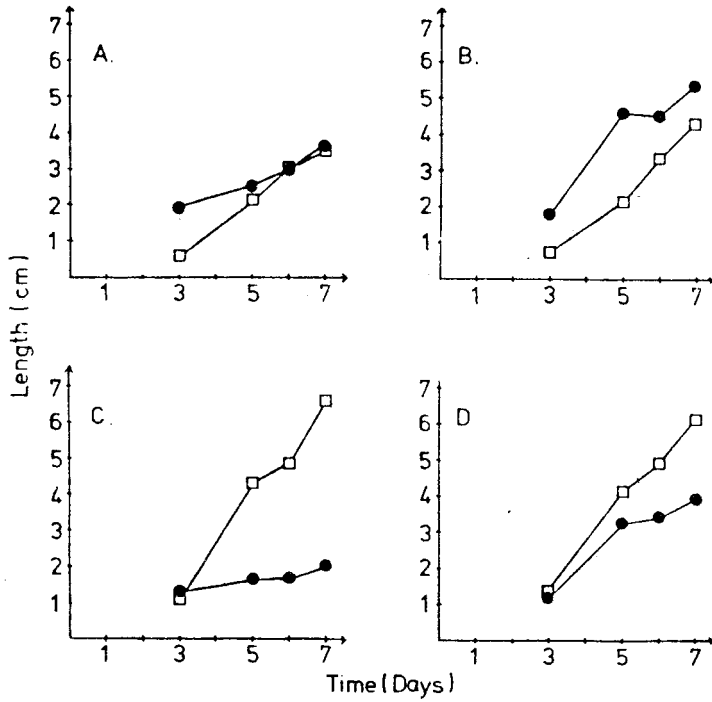
可溶性蛋白質含量之測定是依 *Lowry* 等氏 (8) 之方法以 *Folin-ciocalten* 試劑呈色之，再於波長 660 nm 測其吸光度。標準曲線是以 *Bovine Serum Albumin* 為之。異構酶之分離採用 *Davis* 之非連續性電泳法 (*Disc electrophoresis*) (4)。因觸媒酶之分子較大而改用 5% 取代 7% *acryamide* 表現較佳分離效果。電泳時之電流強度為每管 0.004 安培，時間為 3 小時。電泳後之膠條以 0.03% 過氧化氫溶液作用十分鐘再以蒸餾水清洗，最後加入含 $K_3[Fe(CN)_6]$ 及 $FeCl_3$ 各 1% 之混合溶液染色之。染色膠條在蒸餾水清洗後在波長 610 nm 下畫出異構酶之活性強度及相關位置。

實驗結果

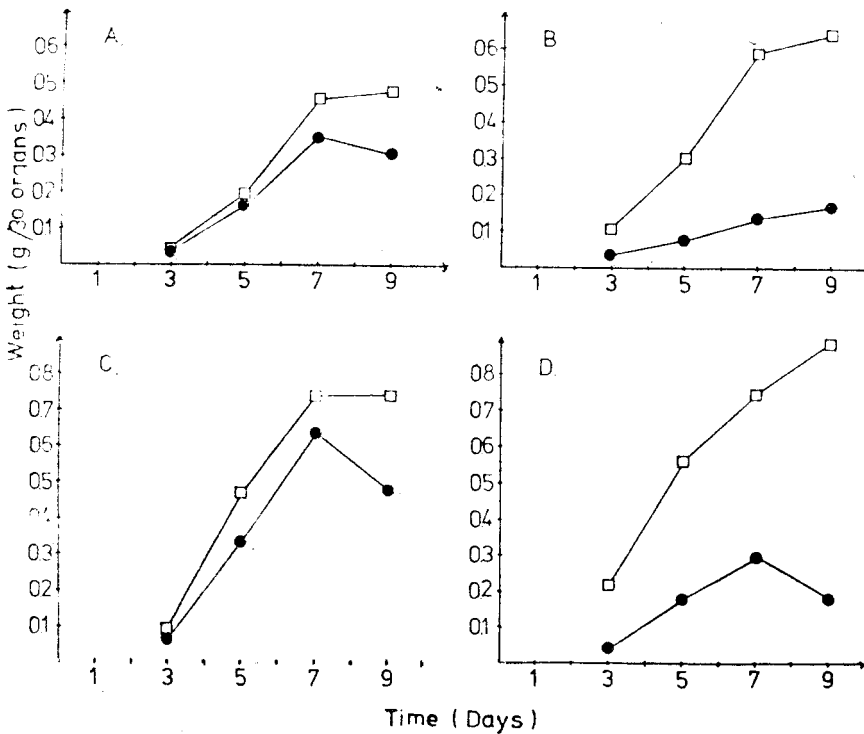
水稻幼苗之生長發育顯然地受到生長環境的影響；台中 65 號幼苗 (圖 1-A, 1-B)，光照對上胚軸的生長有抑制現象。在缺氧狀態下萌芽第三，四天上胚軸的生長快是以芽鞘生長為主，顯示缺氧及黑暗條件下能促進芽鞘的生長，此時芽鞘細長中空且鮮重低 (參照圖 2-B) 是由於初葉受到嚴重抑

制所致。對台中秧 3 號幼苗 (圖 1-C, 1-D) 來說，光照不影響上胚軸的生長，但在缺氧條件下光照就表現有強烈的抑制作用。台中秧 3 號種子在缺氧下萌發快，浸水 24 小時就可達 40% 之萌發率。萌芽後光照就有效地抑制整個上胚軸的生長，一直到第七天還不能突出水面。黑暗組則中空芽鞘生長較快，但初葉受抑制的情形並不如台中 65 號幼苗嚴重。缺氧光照下台中 65 號幼苗第三天即可轉綠，而台中秧 3 號則要到第五天，可見缺氧條件並不抑制上胚軸的綠化。圖 2 為幼苗鮮重之變化情形；黑暗組幼苗之鮮重較高可能是細胞增長快而增加了細胞的吸水量所致。光照生長之幼苗缺氧條件對鮮重的增加稍有抑制 (圖 2-A, 2-C) 但不如黑暗缺氧下的幼苗那樣低。後者之偏低是因初葉受到嚴重抑制的結果。幼苗上胚軸可溶性蛋白質含量可受光照來促進但不甚顯著 (圖 3)。但在缺氧下不論光照與否可溶性蛋白質含量偏低，尤以台中秧 3 號為甚。上胚軸組織可溶性蛋白質的來源是由胚乳中的貯存蛋白質被分解成氨基酸再輸送到上胚軸來合成蛋白。在此過程中不論是氨基酸的輸送或蛋白質的新合成都需要能量，而這些能量則是以呼吸作用為主要來源。光照缺氧下雖有綠化現象但光合系統之發育不完整是可以預料，以致缺氧下光照及黑暗幼苗可溶性蛋白質含量並沒有差別，但以台中秧 3 號幼苗可溶性蛋白含量最低。綜上觀之，光照及缺氧對幼苗生長發育之影響可歸納如下：①對上胚軸的生長，鮮重的變化光照與缺氧條件同時存在時有加強抑制效應，雖然此加強效應之機制目前還不清楚。②在缺氧下品種的不同有顯著的反應差異，由可溶性蛋白質含量及觸媒酶活性 (圖 4) 顯示台中秧 3 號對缺氧條件較為敏感。

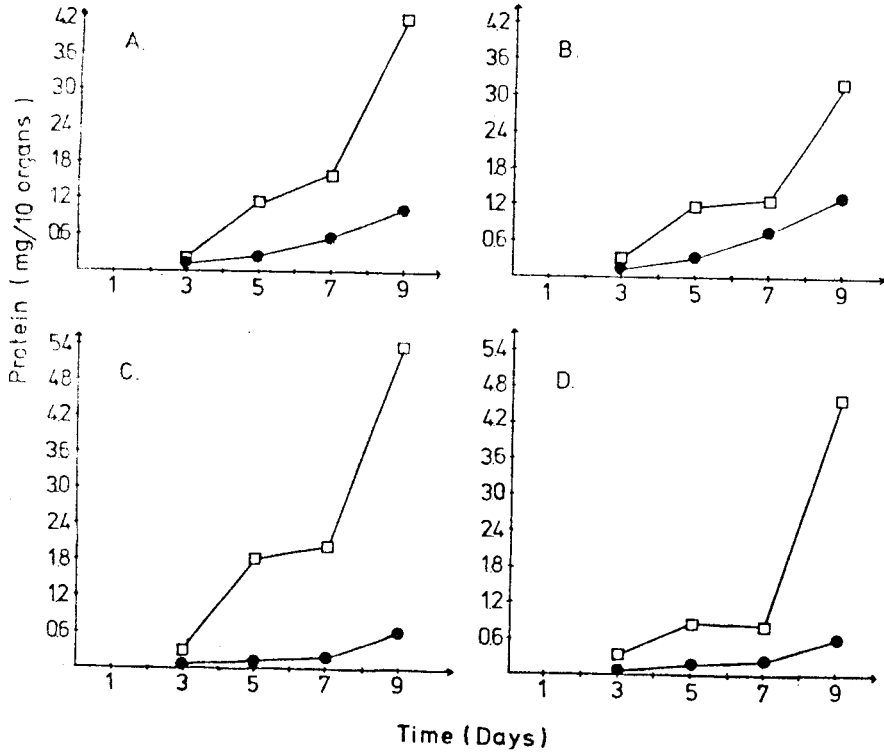
觸媒酶活性在萌芽初期很低，但隨著幼苗的生長而增強。在正常條件下比較光照與黑暗中生長之幼苗顯示光照對酶活性有輕微地抑制作用，此與上胚軸生長之鮮重差異相當類似 (參考圖 2)。水稻為三碳植物，當光合系統能發揮其功能時必有一定程度光呼吸作用之參與，也就是說必然有新生成的觸媒酶於微體 (*peroxisome*) 中協助光呼吸徑路的進行。雖然如此，黑暗生長的幼苗却含較高酶活性的事實表示幼苗之代謝途徑中生物氧化作用 (*Biological oxidation*) 特別旺盛所致。



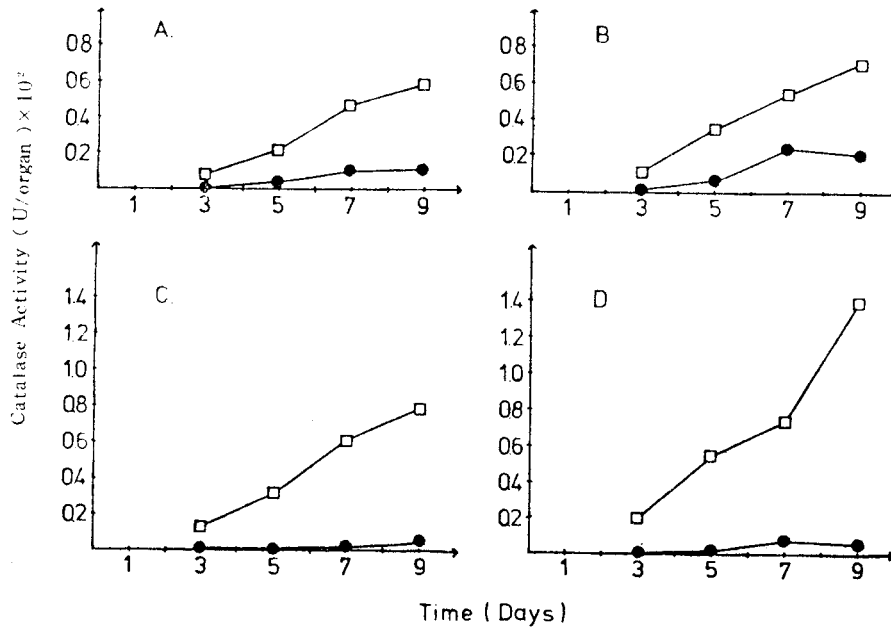
圖一 水稻幼苗發育期間上胚軸之生長：A及B為台中 65 號，C及D為台中 3 號，A及C為連續光照下，B及D為黑暗中生長之幼苗。□—□表正常生長條件，●—●表缺氧條件。



圖二 水稻幼苗發育期間鮮重量的變化：A及B為台中 65 號，C及D為台中 3 號，A及C為連續光照下，B及D為黑暗中生長之幼苗。□—□表正常生長條件，●—●表缺氧條件。



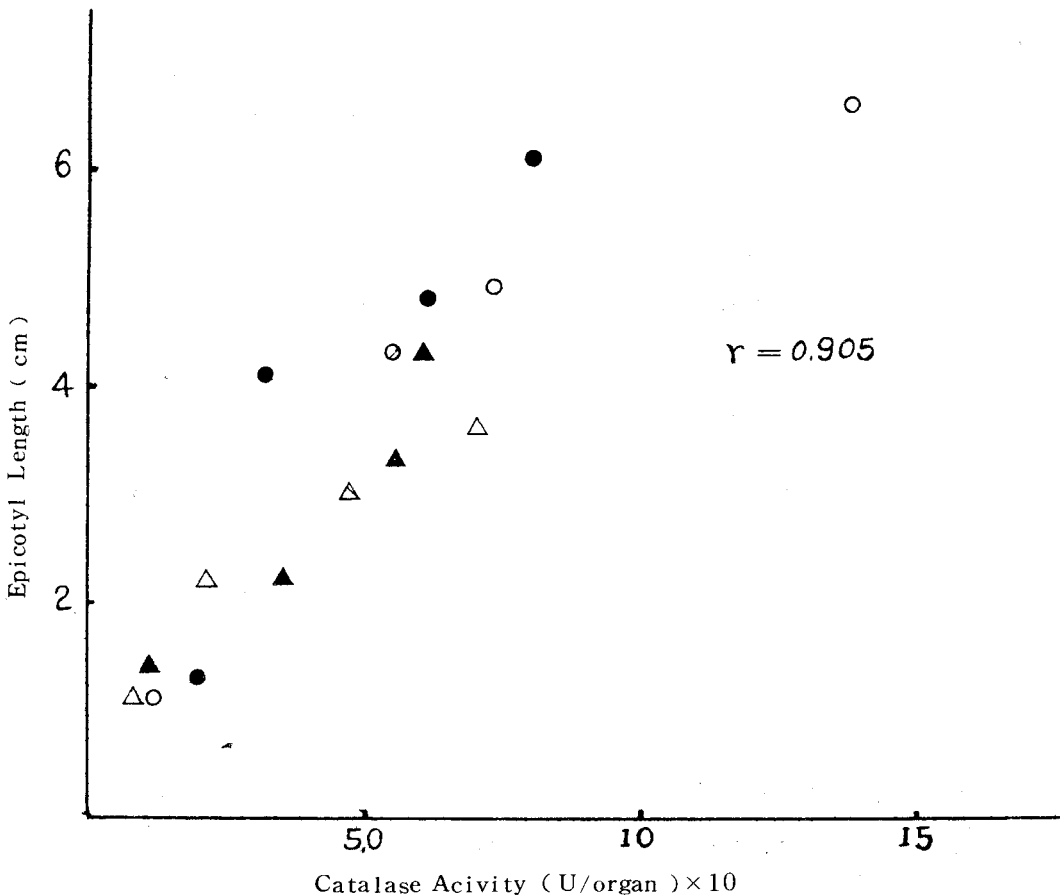
圖三 水稻幼苗發育期間可溶性蛋白含量的變化：A 及 B 為台中 65 號，C 及 D 為台中 3 號，A 及 C 為連續光照下，B 及 D 為黑暗中生長之幼苗。□—□表正常生長條件，●—●表缺氧條件。



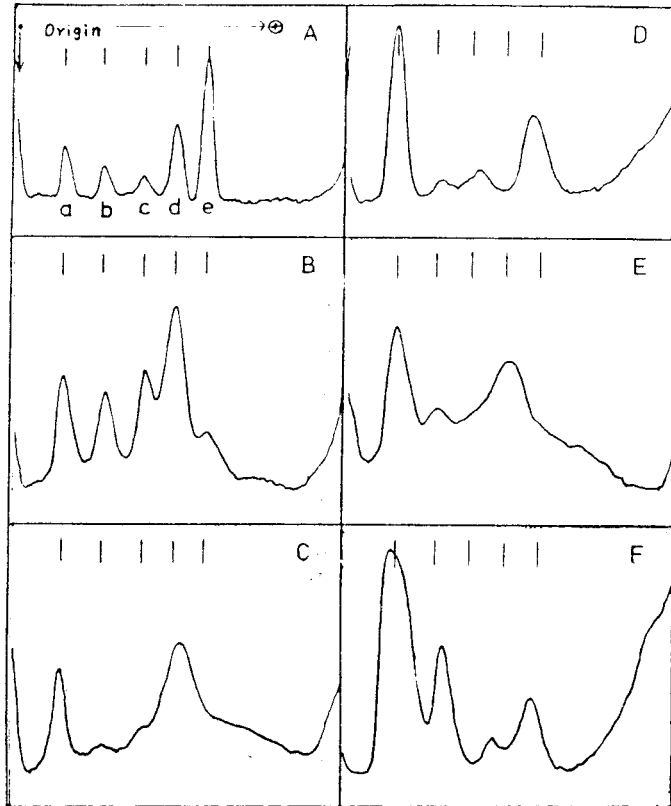
圖四 水稻幼苗發育期間觸媒酶活性的變化：A 及 B 為台中 65 號，C 及 D 為台中 3 號，A 及 C 為連續光照下，B 及 D 為黑暗中生長之幼苗。□—□表正常生長條件，●—●表缺氧條件。

缺氧條件對酶活性有很明顯地抑制作用。以觸媒酶之生理功能來看是很容易明瞭的；在細胞進行新陳代謝過程中觸媒酶與許多由黃素蛋白所構成的氧化酶有連鎖作用，缺氧下使得氧化作用難以進行，因此觸媒酶也就因受質之缺乏而受到抑制。不同品種間酶活性亦有差別。台中秈3號的酶活性比台中65號來得高，外形上台中秈3號上胚軸也長得較快，顯示觸媒酶活性與生長發育有密切相關。在不缺氧的環境下不論照光或黑暗，幼苗的生長與酶活性有相當高的相關性 (*Correlation*)；台中秈3號及台中65號生長與酶活性之 r 值分別為0.88及0.94。如果不分品種之差別則 r 值為0.904 (圖五)。可見觸媒酶活性為幼苗生長之良好指標。但在缺氧條件下台中秈3號上胚軸的酶活性受到嚴重

地抑制，表現了其對缺氧之高度敏感性。除了觀察酶總活性之消長情形外，我們也進一步地探討其異構酶在此幼苗生長發育過程之變化 (圖六)。由正常條件下生長九天之台中秈3號幼苗抽取液可清楚地觀察到 a 至 e 等五條異構酶帶 (圖六A)；其中以向陽極移動性高之酶帶 e 活性最高。但在早期之幼苗如三天照光者 (圖六C) 或生長在黑暗七天者 (圖六D)，只能分辨出四條異構酶帶。其第四酶帶之位置相當於圖六A之 d ， e 二酶帶之間，其原因可能是向陽極移動性高異構酶之分子構造不穩定而容易聚集在一起難以分離所致。光照處理不但使向陽極移動性高之異構酶活性增高，也影響其酶分子構造之穩定性，導致有良好之分離效果。缺氧條件下 (圖六E) 因酶活性太低雖然重覆多次嘗試仍



圖五 水稻上胚軸長度及觸媒酶活性之相關；○，●分別表光照，黑暗之台中秈3號，△，▲則表光照及黑暗之台中65號幼苗， r 為相關係數。



圖六 水稻幼苗發育期間觸媒酶異構酶變化的情形：A、B、C分別為台中秈3號，正常情況，光照下生長9天、7天及3天。D為台中秈3號正常情況，黑暗中生長7天，E為台中秈3號，缺氧狀況，光照下生長7天，F為台中65號正常情況光照下生長7天。異構酶帶順序分別以a、b、c、d、e表示，即e為向陽極移動最快者。直線指示A圖中各異構酶帶位置。

未能獲得較佳之分離結果。然而由異構酶的活性比例來看在黑暗中生長（圖六D）及缺氧下（圖六E）其向陽極移動性低之酶帶a活性較高，換言之即移動性高之酶帶活性偏低。不同品種之幼苗其異構酶之表現有出乎意外之差別；台中65號上胚軸抽取液只能分離出四條異構酶帶（圖六F）。其各酶帶位置與台中秈3號酶帶相比較完全缺乏相吻合者。此種酶帶位置之全部不符合決非人為之誤差或單純地由於酶分子構造不穩定如圖六C，六D所示所致，而且其向陽極移動性最低之異構酶帶活性比例極高。這些差異性顯示二品種間觸媒酶在遺傳背景及分子構造基礎上的分歧性。綜上觀之，台中秈3號向陽極移動性高之酶帶是受光照之誘導，且與幼苗之生

長發育有密切關聯性。而向陽極移動慢之酶帶a可能在種子未發芽前就已存在，且較不受生長及光照之影響。台中65號向陽極移動性最低之酶帶活性偏高，是否因這酶帶的顯著性而表現其酶的總活性對缺氧條件抑制之抵抗性則有待進一步的澄清。

討 論

植物對光照有絕對的依賴性；光照不僅供給植物的能源，也支配了植物的生長發育(1)。水稻幼苗上胚軸及中胚軸(*mesocotyl*)部份對光照較為敏感。*Pjon*及*Furuya*(9)證明水稻芽鞘生長受到植物色原的控制。芽鞘的生長受光照抑制，而初葉的生長則受促進，以致光照幼苗初葉較早突破芽鞘

而出。但若以整個上胚軸為觀察基準則光照的影響力並不顯著。只當光照及缺氧條件同時存在時對上胚軸的生長才有較明顯的抑制作用表現。顯示光照對初葉生長之促進以及芽鞘生長之抑制是必需要有氧氣的供給。在黑暗及缺氧情況下芽鞘生長受到促進，可能與芽鞘組織植物激素含量有關。幼苗之生長發育與觸媒酶活性有密切相關。酶活性隨着幼苗的生長而增高，顯示了新陳代謝活性的加強為生長發育的必要條件。在光照下生長之幼苗當光合作用系統建立之後，就必定會有光呼吸作用的參與。光呼吸過程中乙醇酸氧化酶（*glycolate oxidase*）之氧化副產物即過氧化氫需要觸媒酶的協助以代謝之，故二酶共同存在於細胞微體中（13）。然而對水稻幼苗觸媒酶活性之觀察，發現黑暗生長幼苗上胚軸酶活性比光照幼苗者稍高。導致這種結果的可能原因是①黑暗生長之幼苗以細胞增長為主，分化能力不顯著，且以分解貯藏養分為主以供所需能量，因此在基本代謝系統中加強了氧化還原功能，觸媒酶活性也因此而加強。②在此發育階段光照幼苗的光合作用能力薄弱，光呼吸的進行也不顯著，以致光呼吸徑路中參與的觸媒酶缺乏明顯地增強。③黑暗生長之幼苗有交替氧化酶（*alternate oxidase*）被誘導形成之可能（7），而需要觸媒酶參與作用，因此酶活性被增強。

玉米子葉（*scutellum*）中觸媒酶的研究報告中指出；異構酶是由兩類基因 Ct_1 及 Ct_2 來控制，而出現五條異構酶帶。隨著幼苗的發育由這兩類基因直接控制之酶次體（*enzyme subunit*）有明顯地消長差異性即 Ct_1 酶次體漸減而 Ct_2 酶次體漸增（12）。台中秈3號上胚軸的觸媒酶亦有類似的傾向；隨著光照幼苗之生長發育向陽極移動性高之異構酶 e 活性增強，而黑暗幼苗之 e 酶帶活性不顯著，可見此 e 酶帶是受光照所誘導。至於異構酶帶活性比例的變化是因酶分子的反應率（*turnover number*）改變或是酶分子數量增減則目前的證據不足以斷論之。在同時期光照下台中65號幼苗酶活性比台中秈低，可能就是因為其向陽極移動性低之酶帶顯著的緣故，同時這也可能是台中65號幼苗在缺氧條件下抵抗力較高的緣由。向陽極移動性低之異構酶顯然對缺氧或黑暗條件有較強的抵抗力。有關觸媒酶的研究報告指出其具有4個酶次體，分子

量為232,000（4）。台中秈3號上胚軸的異構酶與玉米子葉的異構酶相當類似；即五條異構酶帶 a, b, c, d, e 之分子結構分別為 $4x, 3x1y, 2x2y, 1x3y, 4y$ 。就是由各異構酶帶的活性比例來說（圖六A）亦符合這樣的推斷。幼苗發育初期 e 酶帶並不顯著，但隨後光照的處理而增強其活性，暗示此 Y 次體的增強與穩定跟光照有密切關係。在台中65號上胚軸的酶抽取液只能分離四條異構酶帶。根據各酶帶之相對位置及活性比例分佈，顯示此觸媒酶可能是由三個酶次體所構成，即其分子結構分別為 $3A, 2A:B, 1A2B, 3B$ 。然而到目前為止仍罕有含三次體之觸媒酶被發現，因此這種推論的可靠性仍需尋求更多直接證據的支持。

參考文獻

1. 童武夫：植物色原（*Phytochrome*）對酶調節之功能，生物科學第十二期廿七至卅八頁，民國六十七年二月。
2. Chance, B., and A.C. Maehly, 1955. Assay of Catalase and Peroxidase. In *Methods in Enzymology*. S.P. Colowick, and N.O. Kaplan, Eds. Acad. Press, New York, P. 764
3. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis I. Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121:404-427
4. Dennis, W. D., and M.K. Irving, 1972. Protein subunits: A table (Rev. Ed.). *Ann. of Biochem. and Biophys.* 149:1-14.
5. Hendricks, S. B., and R. B. Taylorson, 1974. Promotion of seed germination by Nitrate, Hydroxylamine, and Ammonium Salts. *Plant physiol.* 54:304-309
6. Hendricks, S. B., and R. B. Taylorson, 1975. Breaking of Seed dormancy by Catalase inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72(1):306-309
7. Ikuma, H., 1972. Electron transport in plant respiration. *Ann. Rev. Plant physiol.* 23:430-432

8. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. S. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
9. Pjon, C. J., and M. Furuya, 1967. phytochrome action in *Oryza sativa* L. I. Growth responses of etiolated coleoptiles to red, far-red and blue light. *Plant and cell physiol.* 8:709-718
10. Scandalios, J. G., E. H. Liu, and M. A. Campeau, 1972. The effects of intragenic and intergenic complementation on catalase structure and function in Maize: A Molecular approach to heterosis. *Arch. Biochem, Biophys.* 153:695-705
11. Scandalios, J. G., 1974. Isozyme in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25:225-258
12. Scandalios, J. G., 1975. Differential gene expression and biochemical properties of catalase isozymes in Maize. Isozyme III, *Developmental Biology.* Acad, Press, San Francisco. 213-238
13. Tolbert, N. E., 1971. Microbodies-Peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 22:45-69

Abstract

The effect of light and the anaerobic condition on the basis of morphogenesis of rice seedlings was investigated. The length of epicotyl was not affected significantly by light, but the inhibition become dominant when the seedlings was treated simulteniously by light and anaerobic condition. It was indicated that both factors had the synergy effect on the growth of seedling. Catalase activity increased with the growth of seedlings. The enzyme activity and the length of epicotyl showed very high positive correlation. Catalase activity was inhibited effectively by the anaerobic condition, especially in the seedlings of Taichung San 3 which appeared more sensitivity. Enzyme extracted from the epicotyl of Taichung San 3 could be separated into five isozymes. According to the number of isozymes and the distribution of the enzyme activity, it was concluded that the molecular nature of the enzyme should be tetrameric constitution which was derivated from two type of subunits. The subunit which showed higher mobility to the anode was induced by light. Unexpectively only four isozymes was observed from the extract of Taichung 65 epicotyls. The molecular constitution, activity of the isozymes and the resistance to the anaerobic condition were discussed.