

水分胁迫下离体烟叶中 脂氧合酶活性与脱落酸积累的关系*

官长荣¹⁾ 李艳梅²⁾ 张莉¹⁾

(¹⁾河南农业大学农学院, 郑州 450002; (²⁾中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 采用河南农业大学设计的电热式温湿度自控烤烟箱, 研究了水分胁迫离体烟叶中脂氧合酶(LOX)活性与脱落酸(ABA)积累的关系。结果表明, 水分胁迫下 ABA 积累的同时, LOX 活性也上升, 二者相关性达 5% 的显著水平; LOX 专一抑制剂去甲二氢菊木酸(NDGA)在抑制 LOX 活性的同时也阻断了 ABA 的积累; 无细胞体系加入 LOX 可直接引起 ABA 的积累。这表明 LOX 很可能是生物合成及胁迫诱导 ABA 积累的一个关键酶。

关键词 烟叶; 脂氧合酶; 脱落酸; 水分胁迫; 离体细胞

中图分类号 Q 945.78; S 572

大量研究表明, 脱落酸(abscisic acid, ABA)是一种重要的逆境信号物质, 在水分胁迫或盐胁迫下, ABA 含量升高, 植物通过 ABA 的信息传递可有效地调整水分关系, 使植物对环境胁迫做出积极、主动的反应^[1]。ABA 作为逆境信号的基础, 在胁迫条件下的植物组织中快速而大量的积累^[2]。胁迫积累 ABA 的现象虽早已被发现, 但至今不清楚胁迫是如何诱导 ABA 积累的, 或者说 ABA 信号是如何起源的。近年来越来越多的证据表明, ABA 合成的关键是 9-顺式-新黄质的氧化裂解^[3,4]。遗憾的是催化这一步骤的关键酶至今未纯化和鉴定, 分子生物学研究表明, 编码该基因和细菌的一种二氧合酶基因有很大的相似性^[5]。脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)是催化不饱和脂肪酸双键加氧断裂的二氧合酶^[6], 不饱和脂肪酸的加氧断裂在性质上和 9-顺式-新黄质的氧化裂解反应非常相似。尽管如此, 至今, 尚没有直接证据表明该酶是否是脂氧合酶, 胁迫诱导 ABA 积累是一个复杂的信号传导过程, 但无论结果如何最终还是靠对 ABA 合成中的关键酶的调控来实现。研究表明, 水分胁迫条件下可导致脂氧合酶活性升高^[7], 因此探讨水分胁迫下 ABA 的积累和脂氧合酶活性的关系是一个非常有意义的问题。本研究以离体烟叶为材料, 检测水分胁迫下 ABA 含量与脂氧合酶活性动态变化的关系及 LOX 抑制剂

的效应, 并采用无细胞体系直接观察外源 LOX 对 ABA 合成的影响。为脂氧合酶在 ABA 合成及胁迫诱导 ABA 积累中的作用提供直接证据。

1 材料与方法

1) 材料。试验于 2000~2001 年进行, 试验地设在河南省许昌县将官池乡秋湖村, 供试品种为 NC89, 烟叶生长发育正常, 成熟时采摘中部第 10~11 片叶, 挂置在电热式温湿自控烤烟箱中备试。

2) 胁迫处理。将装有烟叶的烤烟箱加热到 35℃ 恒温, 并打开通风窗胁迫失水至 10%、20%、30%、40%, 取出洗净, 剪取烟叶主脉两侧的中间部分, 加入 LOX 提取液^[7]和 ABA 提取液^[8], 冰浴中研磨提取。

3) NDGA(去甲二氢菊木酸)处理。将离体烟叶分别浸在浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0 mmol/L 的 NDGA 溶液中, 2 h 后取出洗净, 提取 LOX 和 ABA。

4) 无细胞体系试验。材料为刚采摘的成熟鲜烟叶, 无细胞提取物的制备参照 Cowan Richardson^[9]及 Lee 和 Milborw 的方法^[10]并稍加改进^[11]。称鲜样 0.5 g 于 -20℃ 的冰箱中冻结, 按 1:1.5(w:v) 加入 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.5)(内含 0.6% 的聚乙烯吡咯烷酮), 10 mol/L MgCl₂, 35

收稿日期: 2002-09-29

* 国家烟草专卖局资助项目(981022)

官长荣, 男, 1948 年生, 教授。工作单位: 河南农业大学农学院, 郑州 450002

mmol/L 山梨醇, 苯甲磺酰氟和 EDTA 各 1 mmol/L, 水浴中研成匀浆过双层尼龙布, 滤液以 120 000 r/min 离心 20 min, 上清液测 LOX 和 ABA; 然后再调节浓度至 3~5 mg/ml, 分装备用。取无细胞提取物加入浮浴液使体系中含 35 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.5), 加入 100 μ mol/L ATP, 再加入 1 μ mol/L 高锰酸钾及 NAD、NADPH 各 20 μ mol/L, 加入大豆 LOX 20~100 ml/L, 37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h, 煮沸 5 min 终止反应, 再以 120 000 r/min 离心 20 min, 取上清液测 ABA 含量。

5) LOX 活性测定。采用许向群的方法稍加改进^[7]。加入聚乙烯吡咯烷酮排除干扰。

6) ABA 放射免疫测定。采用 Quarrie 的方法^[8]。

试验所用试剂购自上海化工和保信公司, 均为

分析纯。所有测定项目均重复 3 次, 图中数据为平均值。

2 结果与分析

2.1 水分胁迫下 ABA 含量和 LOX 活性的变化

从图 1、图 2 可见, 随着水分胁迫的加剧, 离体烟叶中 ABA 的积累量和 LOX 的活性都急剧增加, 当水分散失 40% 时 ABA 的积累量几乎达到对照的 4 倍, LOX 活性的增加量也在对照的 3 倍以上, 且两者在胁迫过程中变化趋势一致。进一步的相关分析表明, 水分胁迫过程中离体烟叶 ABA 积累量与 LOX 活性的相关性达 5% 的显著水平 ($r=0.952^*$), 且均与失水率呈极显著的相关关系, 相关系数分别为 0.976**、0.981**。

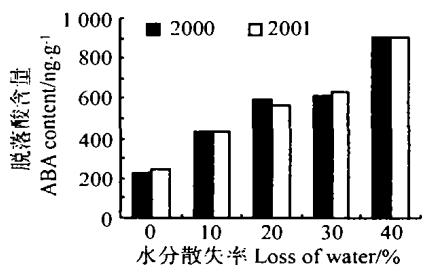


图 1 水分胁迫下烟叶中 ABA 含量变化

Fig. 1 Effect of water stress on ABA content

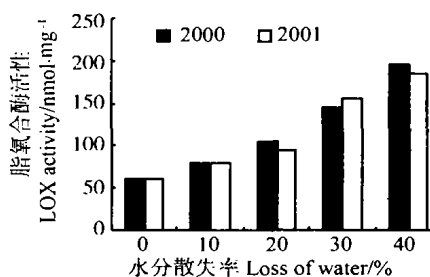


图 2 水分胁迫下 LOX 活性的变化

Fig. 2 Effect of water stress on LOX activity

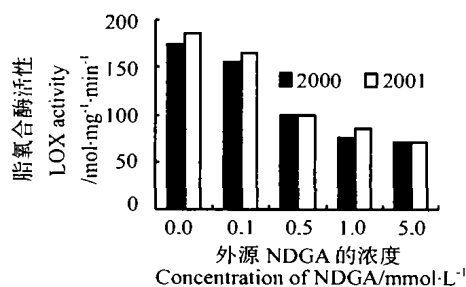


图 3 外源 EDGA 对 LOX 活性的影响

Fig. 3 Effect of NDGA on LOX activity

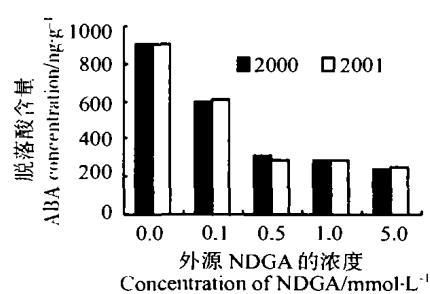


图 4 外源 EDGA 对 ABA 的影响

Fig. 4 Effect of NDGA on ABA content

2.2 LOX 活性抑制剂 NDGA 对水分胁迫下 ABA 含量和 LOX 活性的影响

LOX 是一种含非血红素铁的二氧合酶, NDGA 通过还原 7 种铁原子改变 LOX 的氧化状态^[12]使 LOX 活性受抑制。外源 NDGA 能明显抑制水分胁迫引起的 LOX 活性的升高, 同时 ABA 积累也被抑制, 两者有相同的变化趋势, 且相关性达 1% 的极显著水平 ($r=0.961^{**}$)。由图 3、图 4 可以看出, 在

NDGA 浓度 0.1 mmol/L 到 5.0 mmol/L 范围内, 抑制程度随浓度的增加而增强, 以 0.1 mmol/L~0.5 mmol/L 范围内时, LOX 活性下降幅度最大, ABA 含量也在这个浓度变化中以最大的幅度下降。

2.3 无细胞体系中外源 LOX 对 ABA 合成的影响

为了进一步验证 LOX 对 ABA 合成的作用, 我们研究了外源 LOX 效果。试验结果表明, 水分胁迫下离体烟叶 ABA 含量随着 LOX 的加入而逐步

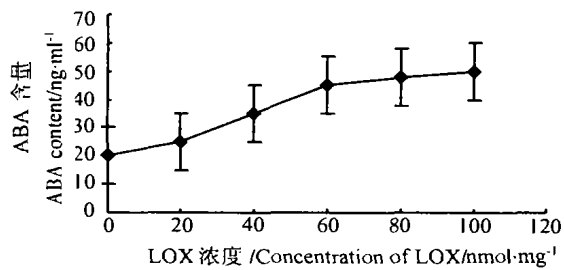


图 5 外源 LOX 对 ABA 形成的影响

Fig. 5 Relationship between the concentration of exogenous LOX and ABA biosynthesis in the cell-free system of tobacco leaf

升高,且 LOX 与 ABA 之间存在显著的相关关系,相关系数为 0.973^{*}。从图 5 可见,在 LOX 为 60 nmol/mg 以上时,ABA 含量逐步减少的趋势已经缓和。这与单一的酶促反应曲线相似。ABA 合成是一个由许多酶催化的过程,此研究结果表明,LOX 是 ABA 生物合成途径中的一个限速酶。

3 讨 论

利用同位素示踪和 ABA 合成突变体研究表明^[3,4],ABA 生物合成的较直接的前体是黄质醛,黄质醛能很快转化为 ABA。植物组织无论处于胁迫或非胁迫状态,由黄质醛到 ABA 都不是限速步骤;但是,由黄质醛的直接前体到黄质醛却是一个限速步骤,因此,该步骤成为 ABA 合成的关键步骤。黄质醛由 40C 的类胡萝卜素裂解而来,该 40C 的类胡萝卜素是新黄质^[9],其双键可在光氧化、自由基氧化和酶促氧化下断裂,LOX 主要作用在于催化双键的氧化合解^[6]并能促进黄质醛的形成^[13],而新黄质的裂解明显受到多种 LOX 抑制剂的抑制^[9,14]。可见,LOX 的作用可能发生在 ABA 合成的关键步骤。

近来发现一种不能裂解的类胡萝卜素而导致 ABA 亏缺的突变体^[15],其重组蛋白与细菌二氧合酶有同源性,能催化 9-顺-环化类胡萝卜素的裂解,并且其 mRNA 的表达能被水分胁迫所诱导^[16]。LOX 本身是一种二氧合酶^[6],因此,尽管不能肯定 VP14(催化 9-顺式-新黄质的氧化裂解的酶)是否是脂氧合酶,但他们的功能具有相似性,不难推论出 LOX 与 ABA 合成可能具有密切的关系。即 LOX 或其同功酶基因的突变可能导致 ABA 的亏缺,LOX 可能是 ABA 合成的关键酶。这些仅是间接证据,本试验加入外源 LOX 直接增加了 ABA 含量,水分胁迫不仅改变了内源 LOX 活性也改变了内源

ABA 浓度,这为 LOX 作为 ABA 合成的关键酶,提供了更为直接的证据。

转录和翻译抑制剂可以阻断水分胁迫诱导 ABA 积累^[17]。说明胁迫诱导 ABA 积累过程是一个从环境胁迫信号的感知、传导到细胞内信号传递、再到基因启动并最终到 ABA 生物合成调控等的一系列复杂信息传递过程。因此直接寻找 ABA 生物合成途径中胁迫响应的酶,再结合分子生物学技术来探讨上游信号是一种可行的思路。本研究不仅表明 LOX 在 ABA 合成中起关键作用,同时也说明水分胁迫下 ABA 积累有可能是通过脂氧合酶引起的。值得注意的是催化 9-顺式-黄质醛裂解的酶虽然在性质上与脂氧合酶非常相似,但可能有其特殊的生化特性和底物专一性。因此,只有对该酶进行分离纯化和鉴定并直接检测才能得出非常肯定的结论,这将是下一步研究的内容。

参 考 文 献

- Davies W J, Zhang J. Root signals and the regulation of growth and development of plant in drying oil. *Annu Rev Plant Physiol Mol Boil*, 1999, 42: 55~76
- Writ S T C, Hiron R W R. (+)-Abscisic acid, the growth inhibitor induced in detached wheat leaves by a period of wilting. *Nature*, 1969, 224: 719~720
- Mrlit S, Giraudit J. Genetic analysis of abscisic acid signal transduction. *Plant Physiol*, 1997, 114: 751~757
- Party A D. Abscisic acid metabolism. *Meth Plant Biochem*, 1993, 9: 381~402
- Tan B C, Schwartz S H, Gage D A, et al. Specific oxidative cleavage of carotenoid by VP14 of maize. *Science*, 1997, 276: 1872~1874
- Siedow J N. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1991, 42: 145~148
- Xu X Q, Zou Q. Effect of drought on lipoxygenase activity, ethylene and ethylene production in leaves of soybean plants. *Acta Bot Sin*, 1993, 35: 31~37
- Quarrie S A, Whitford P N, Appleford N E J. A monoclonal antibody to abscisic acid in crude leaf. *Planta*, 1988, 173: 330~339
- Cowan A K, Richardson G. Carotenoidgenetic and abscisic acid biosynthesizing activity in a cell-free system. *Physiol Plant*, 1997, 99: 371~378
- Lee H S, Millborw B V. Endogenous biosynthetic precursor of (+)-abscisic acid IV. Biosynthesis of ABA[Hn] carotenoids by a cell-free system from avocado. *Aust J Plant Physiol*, 1997, 24: 715~726
- Edli L, Pscaulini S, Antinoli M. Photoinhibition and oxidative

- stress: effect on xanthophyll cycle, scavenger enzyme and abscisic acid content in tobacco. *Plant Physiol*, 1988, 151: 421~428
- 12 Loveys B R, van Dijk H M. Improve extraction of jasniate from plant tissue. *Aust plant physiol*, 1988, 15: 421~427
- 13 Parry A D, Horgan R. Carotenoid metabolism and the biosynthesis of abscisic acid. *Phytochemistry*, 1991, 30: 815~82
- 14 Creelman R A, Bell R A, Mullet J E. Involvement of lipoxygenase-like enzyme in abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol*, 1992, 99: 1258~1260
- 15 Schwartz S H, Tan B C. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1997, 94: 12235~12240
- 16 Bell E. Lipoxygenase gene expression is modulate in plant by water deficit, wounding and methyl jasmonate. *Mol Gene Genet*, 1991, 230: 456~462
- 17 Zvartt J A D, Creel Mon R A. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Mol Boil*, 1988, 39: 439~413

Relationship between LOX Activity and ABA Accumulation in Tobacco Leave under Water Stress

Gong Changrong¹⁾ Li Yanmei²⁾ Zhang Li¹⁾

¹⁾ Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

²⁾ Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China)

Abstract The relationship between LOX activity and ABA accumulation was studied in the tobacco leave. The results showed that LOX activity and ABA content increased simultaneously while losing water, the correlation coefficient of LOX activity with ABA accumulation was significant at 5% level; NDGA, an inhibitor of LOX, inhibited simultaneously the activity of LOX and enhancement of ABA level under the stress. Likewise adding LOX to tobacco cell-free system led to the increase of ABA content. The results indicated that LOX may be a key enzyme in ABA biosynthesis under water stress.

Key words tobacco leave, LOX, ABA, water stress, cell-free system

(责任编辑:张志钰)