

水分胁迫下离体烟叶中脂氧合酶活性、水杨酸与茉莉酸积累的关系

官长荣¹, 李艳梅², 杨立均³

(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; ³ 河南省驻马店烟草分公司, 驻马店 463000)

摘要: 采用河南农业大学设计的电热式温湿度自控烤烟箱, 研究水分胁迫下离体烟叶中脂氧合酶活性、水杨酸(SA)与茉莉酸(JA)积累的关系。结果表明, 水分胁迫下茉莉酸积累的同时, 脂氧合酶(LOX)活性也上升, 两者呈极显著正相关; 去加愈创木酸(NDGA)是 LOX 专一抑制剂, 在抑制 LOX 活性的同时也阻断了水分胁迫下茉莉酸的积累; 无细胞体系加入 LOX 可直接引起茉莉酸的积累。这表明 LOX 很可能是 JA 生物合成及胁迫诱导 JA 积累的一种关键酶, 水杨酸抑制茉莉酸积累。

关键词: 烟叶; 脂氧合酶; 茉莉酸; 水杨酸; 水分胁迫; 离体细胞

Relationship Between LOX Activity and SA and JA Accumulations in Tobacco Leave Under Water Stress

GONG Chang-rong¹, LI Yan-mei², YANG Li-jun³

(¹ College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002;

² Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204;

³ Tobacco Company of Zhumadian, Zhumadian 463000)

Abstract: The relationship between LOX(lipoxygenase)activity and SA(salicylic acid) and JA(jasmonic acid) accumulation in tobacco leaves was studied. The results showed that LOX activity and JA content increased simultaneously along with lost of water; NDGA, a specific inhibitor of LOX, inhibited simultaneously both the activity of LOX and the enhancement of JA level under water stress. Likewise adding LOX to tobacco cell-free system led to the increase of JA content. The result suggested that LOX may be a key enzyme in JA biosynthesis under water stress. SA inhibited the enhancement of JA level under water stress.

Key words: Tobacco leave; LOX; JA; SA; Water stress; Cell-free system

茉莉酸(jasmonic acid, JA)是脂肪酸的衍生物。JA 作为一类植物激素已得到国际学术界的公认^[1], 具有诱导植物防御基因的表达, 诱导多种次生代谢物的合成, 抑制光合作用, 促进呼吸作用、气孔关闭、叶片衰老脱落以及果实成熟等广泛的生理功能^[2]。还有研究表明, JA 是水分胁迫中一种重要的逆境信号物质, 水分胁迫或盐胁迫下, 植物通过 JA 的信息传递可有效地调整水分关系, 使植物对环境胁迫作出积极、主动的反应, JA 作为逆境信号的基础物质,

植物组织会在胁迫条件下快速而大量积累^[3]。但至今不清楚胁迫是如何诱导 JA 积累的, 或者说 JA 信号是如何起源的。因此, 探讨水分胁迫下 JA 积累和脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)活性的关系是非常有意义的。本试验以离体烟叶为材料, 检测水分胁迫下 JA 含量与 LOX 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、水杨酸(salicylic acid, SA)对 JA 形成的影响。为 LOX 在 JA 合成及胁迫诱导 JA 积累中的作

收稿日期: 2002-07-07

基金项目: 国家烟草专卖局资助项目(982022)

作者简介: 官长荣 (1948-), 男, 河南荥阳人, 教授, 主要从事烟草科研和教学工作。Tel: 0371-3978833; Fax: 0371-3558380; E-mail: gcr20021001@yahoo.com.cn

用及 SA 与 JA 积累的关系提供直接证据。

1 材料与方 法

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,达到成熟时采摘备试。

1.1 胁迫处理

采回的离体烟叶放在烤箱中,打开通风窗胁迫失水 10%、20%、30% 和 40%,取出,加入 LOX 和 JA、SA 提取液,冰浴中研磨提取。

1.2 NDGA 处理

将离体烟叶分别浸在浓度为 0.1、0.5、1 和 5 mmol·L⁻¹ 的 NDGA(去加愈创木酸)溶液中,2 h 后取出洗净并提取 LOX、SA 和 JA。

1.3 无细胞体系试验

无细胞提取物的制备参照 Cowan Richardson^[4]方法,并稍加改进。称鲜样 0.5 g 于 -20℃ 的冰箱中冻结,按 1:1.5 加入 50 ml 磷酸钾缓冲液(pH 7.5)(内含 0.6% 聚乙烯吡咯烷酮)10 mol·L⁻¹、Mg-Cl₂ mmol·L⁻¹ 山梨醇及苯甲磺酰氯和 EDTA 1 mmol·L⁻¹ 在水浴中研成匀浆,过双层尼龙布,滤液以 12 000 r/min 离心 20 min,调节浓度为 3~5 mg·ml⁻¹,分装备用。

1.4 脂氧合酶活性测定

采用 Xu 等^[5]的方法并加改进。称样 0.5 g 加入 100 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.0)在冰浴中研磨,12 000 r/min 离心 20 min,以亚油酸作底物,用无水乙醇做终止反应,测 234NMD 的光增收值。依据吸光系数将消光值转化为产物共轭双烯物浓度。LOX 活性用 nmol·mg⁻¹ protein·min⁻¹ 表示。

1.5 JA 含量测定

参照 Meyer 等^[6]的方法并稍加改进。

1.5.1 取样 将成熟的离体烟叶放在温湿自控的烤烟箱里胁迫失水,并每隔 12 h 取样一次用于 JA 含量的测定。

1.5.2 JA 的提取 取 5 g 新鲜叶片加 1 ml 80% 预冷的乙醇,研磨后的匀浆以 10 000 r/min 离心 5 min,残渣用预冷的乙醇再提 1 次,残提液在 -20℃ 的冰箱中放置 1 h,再以 10 000 r/min 离心 5 min 后,合并上清液经旋转真空干燥仪浓缩至原体积的 1/10,加重蒸水 4 ml,然后加入偏磷酸至终浓度为 2%,用 2 ml 乙酸乙酯抽提 3 次,用 N₂ 吹干即得 JA 粗样。

1.5.3 JA 的分离纯化 参照 Knofel 等^[7]的方法。

取硅胶板(20 cm×20 cm),按硅胶(GF254):0.5% 羧甲基纤维米纳=1:2 混配,加料厚度 0.5 mm。JA 用 4 ml 95% 的乙醇洗脱,并在预先以 110℃ 活化 30 min 的硅胶上点样,以分析纯 JA 为标准。层析液为甲苯:二氧六环:乙酸=90:25:4。层析完毕后自然晾干,在紫外光下检查并标出 JA 的位置(R=0.48)然后在相应位点处刮下样品 JA,用 95% 的乙醇洗脱,用 N₂ 吹干,即为纯化样品。

1.5.4 JA 的 HPLC 分析 JA 样品溶解于 400 μl 流相(含 45% 甲醇和 0.25% 磷酸缓冲液)。HPLC 仪器型号为岛津 LC-3A,C-18 柱(Q 4.0 mm×250 mm),控制温度为 40℃,流速为 0.6 ml·min⁻¹,用 RF-510 荧光检测器,激发波长为 310 nm,发射波长为 415 nm,JA 的发射光谱分析的激发波长为 310 nm,扫描波长为 380~480 nm,扫描速度为 10 nm·min⁻¹;JA 的紫外吸收光谱分析时扫描波长 290~350 nm,扫描速度为 10 nm·min⁻¹。

2 结果与分析

2.1 水分胁迫下 JA 含量和 LOX 活性的变化

试验结果表明,在水分胁迫下 JA 含量和 LOX 活性均增加,当水分散失 40% 时 JA 含量为对照的 4 倍。LOX 活性的增加幅度不及 JA,但它们的变化趋势一致,且相关性达 1% 极显著水平($r = 0.990^{**}$)(图 1,图 2)。

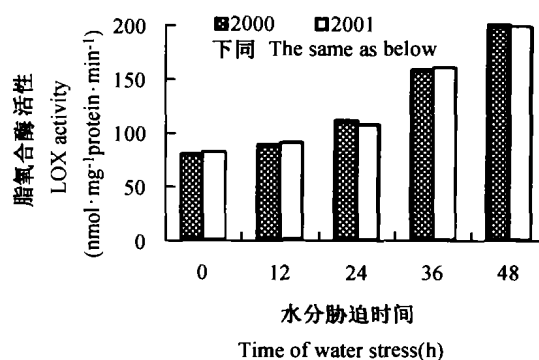


图 1 水分胁迫下烟叶 LOX 活性变化

Fig. 1 Effect of water stress on LOX content

2.2 LOX 活性抑制剂对水分胁迫下 JA 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 通过还原铁原子改变 LOX 的氧化状态^[8]使 LOX 活性受抑制。从图 3 可见,0.1 mmol 以上的 NDGA 明显抑制了水分胁迫引起的 LOX 活性的升高,同时

也抑制 JA 积累,抑制程度随浓度的增加而增强。比较各浓度效应,NDGA 由 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 升至 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,LOX 活性下降幅度最大,JA 含量也在这个浓度变化中以最大的幅度下降(图 4)。相关分析表明,LOX 与 JA 呈极显著的正相关($r = 0.985^{**}$),LOX 和 JA 也分别与 NDGA 有较高的负相关($r = -0.686, r = -0.674$)。

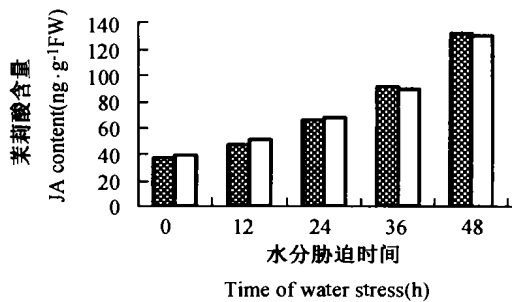


图 2 水分胁迫下 JA 含量变化

Fig. 2 Effect of water stress on JA content in tobacco leave

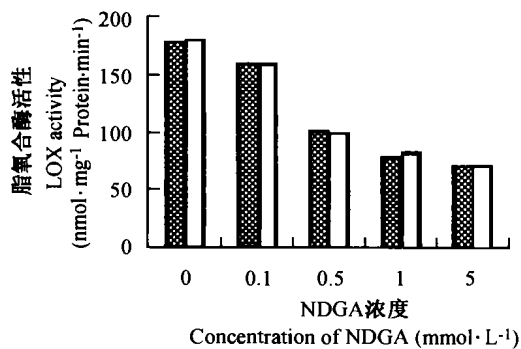


图 3 NDGA 对 LOX 的影响

Fig. 3 Concentration of NDGA on LOX activity

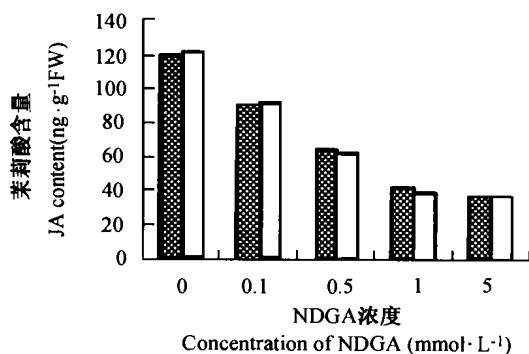


图 4 NDGA 对 JA 积累的影响

Fig. 4 Effect of NDGA on JA content

2.3 无细胞体系中外源 LOX 对 JA 合成的影响

为了进一步验证 LOX 对 JA 合成的作用,笔者研究了外源 LOX 的效果。据测定结果,JA 含量随着 LOX 的加入而逐步升高,且 LOX 与 JA 之间存在极显著的相关关系,相关系数为 0.973^{**} 。但 LOX 浓度在 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时,JA 含量变化趋缓(图 5)。这与单一的酶促反应曲线相似。JA 合成是一个由许多酶催化的过程,而这个结果表明,LOX 是 JA 生物合成途径中的一个限速酶。

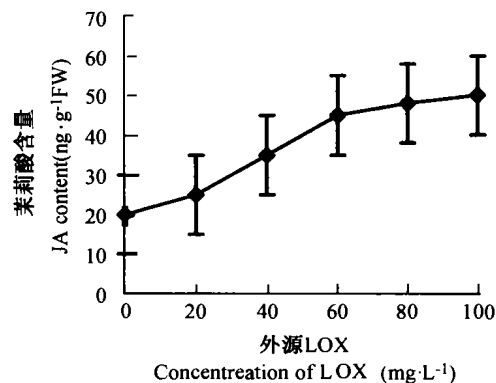


图 5 外源 LOX 对烟叶 JA 形成的影响

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

2.4 SA 对水分胁迫下 JA 积累的影响

对测定结果的相关分析表明,外源 SA 的浓度与 JA 积累的量呈 5% 显著相关水平,相关系数为 -0.949^{*} 。表明外源 SA 抑制 JA 的积累,抑制程度随 SA 浓度的升高而加强(图 6)。比较各浓度效应,SA 在 $0.1 \sim 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,JA 含量下降幅度最大。

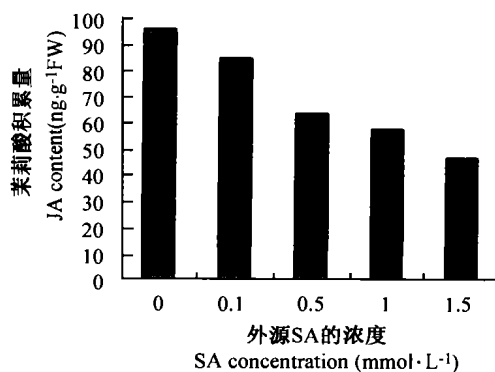


图 6 外源 SA 对烟叶 JA 积累的影响

Fig. 6 Relationship between the concentration of exogenous SA and JA biosynthesis in the cell-free system of tobacco leave

3 讨论

JA 积累是水分胁迫的一个重要信号。近年来越来越多的证据表明,JA 合成的最前体物是 α -亚麻酸,它在 LOX 的作用下,氧化成 13(s) 氢过氧亚麻酸,然后在氢过氧化酶的作用下形成 12,13-环氧亚麻酸,经过结构重排,环化为 12-氧植物二烯酸,进一步经过还原形成 JA^[9]。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,该编码基因和细菌的一种二氧合酶基因有很大的相似性^[10]。LOX 是催化不饱和脂肪酸双键加氧断裂的二氧合酶^[11]。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 LOX。胁迫诱导 JA 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 JA 合成中关键酶的调控来实现。植物组织无论处于胁迫或非胁迫状态,由环亚麻酸形成的 JA 都不是限速步骤;但是,由黄质醛的直接前体物亚麻酸形成环亚麻酸,却是一个限速步骤。因此,该步骤成为 JA 合成的关键步骤^[9]。环亚麻酸由 40 碳的类胡萝卜素裂解而来,该 40 碳的类胡萝卜素是黄质醛新质^[8],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裂解,并能促进环亚麻酸的形成,而黄质醛新质的裂解明显受到多种 LOX 抑制剂的抑制^[10]。因此,LOX 的作用可能发生在 JA 合成的关键环节。

近来发现一种不能裂解的类胡萝卜素能导致 JA 亏缺的突变体,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 mRNA 的表达能被水分胁迫所诱导,LOX 本身是一种二氧合酶^[10],因此,尽管不能肯定 RP1(催化 9-顺-环化类胡萝卜素裂解的酶)是 LOX,但其功能具有相似性,不难推论出 LOX 与 JA 合成有关,即 LOX 或其同工酶基因的突变可能导致 JA 的亏缺,LOX 可能是 JA 合成的关键酶。以上仅是间接证据,本试验加入外源 LOX 能直接增加 JA 含量,水分胁迫不仅改变了内源 LOX 活性也改变了内源 JA 浓度,这就为 LOX 是 JA 合成的关键酶提供了更为直接的证据。笔者还研究了 SA 与 JA 积累的关系,结果表明 SA 抑制 JA 的积累。

转录和翻译抑制剂可以阻断水分胁迫诱导 JA 积累^[6]。说明胁迫诱导 JA 积累过程是由环境胁迫信号的感知,转导为胞内信号传递,再经基因启动并

最终出现 JA 生物合成调控等一系列复杂的信息传递过程。因此,直接寻找 JA 生物合成途径中胁迫应答的酶,再结合分子生物学技术探讨上游信号,是一种可行的思路。本试验不仅表明 LOX 在 JA 合成中起关键作用,同时也说明水分胁迫下 JA 积累有可能是通过脂氧合酶引起的。但这一反应有其特殊的升华特性和底物专一性。因此,只有对该酶进行分离纯化和鉴定并直接检测,才能得出肯定的结论,这也有待进一步研究。

References

- [1] Staswick P E. Plant hormones. In: Davies P J(ed). *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, (2nd ed). Dordrecht: Kluwer Academic Pub. 1995:179-187.
- [2] 刘 新,张蜀秋.茉莉酸类在仿信号传导中的作用机制. *植物生理学通讯* 2000, 36(1):76-81.
Liu X, Zhang S Q. Functional mechanisms of jasmonic acid and its derivatives in wound signal transduction pathways. *Plant Physiology Communication*, 2000, 36(1):76-81. (in Chinese)
- [3] McConn M, Creelman R A, Bell E, Mullet J E, Browse J. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proceedings of National Academy Science, USA*, 1997, 94:5 473-5 477.
- [4] Cowan A K, Gotthardt R. Crotonoidgenetic and jasmonate biosynthesizing activity in a cell-free system. *Physiology of Plant*, 1997, 99:371-378.
- [5] Xu X Q, Zou Q. Effect of drought on lipoxygenase activity, ethylene and ethylene production in leaves of soybean plants. *Acta Botanica Sinica*, 1993, 35:31-37.
- [6] Meyer A, Miersch Q, Buttner C, Dathe W, Sembdner G. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J. Plant Growth Regulation*, 1984, 3:1-8.
- [7] Knofel H D, Bruckner C, Kramell R. Radioimmunoassay for the natural plant growth regulator — jasmonic acid. *Biochemistry Physiology Pflanzen*, 1990, 186:387-394.
- [8] Quarrie S A, Whitford P N, Appleford N E J. A monoclonal Antibody to abscisic acid in crude leave. *Planta*, 1988, 173:330-339.
- [9] 吴劲松,种 康.茉莉酸类作用的分子生物学研究. *植物学通报*. 2002, 19(2):164-170.
Wu J S, Chong K. The molecular biology research on the action of jasmonates. *Chinese Bulletin of Botany*, 2002, 19(2):164-170. (in Chinese)
- [10] Sembdner G, Parthier B. The biochemistry and the physiological and molecular action of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology Molecular Biology*, 1993, 44:569-589.
- [11] Siedow J N. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 1991, 42:145-148.

(责任编辑 卞海军)