

盐胁迫下大麦幼苗多胺与脯氨酸合成竞争前体 L-Arg^{*}

赵福庚 孙 诚 刘友良^{**} 章文华

(南京农业大学农业部作物生长调控重点实验室, 江苏南京 210095)

提 要 200 mmol/L NaCl 处理结合¹⁴C-Arg 叶面饲喂 6 日龄大麦幼苗, 以 L-Arg (精氨酸) 为前体合成的 Pro (脯氨酸) 和 PA s (多胺) 含量显著上升。处理同时在心叶中滴加 ADC (精氨酸脱羧酶) 抑制剂 D-Arg, 游离 Pro 放射性明显上升, 滴加精氨酸酶和鸟氨酸氨基转移酶抑制剂 L-Lys, 则游离 Put (腐胺) 和 PA s 总放射性明显上升。在心叶中滴加 Put, 游离 Pro 放射性明显提高, 而滴加 Pro 则游离 Put 和 PA s 总放射性不同程度上升。心叶滴加谷氨酰胺转移酶抑制剂邻菲咯啉, 造成 PA s 总放射性下降, 但游离 Put 放射性明显上升, 从而促进了 Pro 放射性的提高。上述结果表明大麦幼苗中 PA s 和 Pro 的合成竞争共同前体 L-Arg。

关键词 盐胁迫; 脯氨酸; 多胺; L-Arg; 大麦幼苗

The Biosyntheses of Polyamines and Proline Competed for Precursor L-Arginine in Barley Seedlings under Salt Stress^{*}

ZHAO Fu-Geng SUN Cheng LU You-Liang^{**} ZHANG Wen-Hua

(Nanjing Agricultural University, Key laboratory of Crop Growth Regulation, Ministry of Agricultural, Nanjing 210095, China)

Abstract Six-day old barley seedlings were put under salt stress of NaCl 200 mmol/L and ¹⁴C-Arg was spreaded on leaves. The result showed that contents of proline (Pro) and polyamines (PA s) biosynthesized from L-arginine (L-Arg) increased remarkably. In addition, with arginine decarboxylase (ADC) inhibitor D-Arg dropping into spindle leaves, the radioactivity of free Pro raised dramatically, but that of free Put and total PA s increased sharply when arginase and ornithine aminotransferase (OAT) inhibitor L-Lys was dropped. Dropping putrescine (Put) into spindle leaves results in increment of free Pro obviously, while dropping Pro, the radioactivities of free Put and total PA s increased at various extent. When treated with transglutaminase (TGase) inhibitor O-phenanthroline at the same way, it led a decrease in total PA s radioactivity and an increase in free Put radioactivity, and promoted the radioactivity of Pro. These suggested that the competition for the same precursor L-Arg existed in the biosyntheses of Pro and PA s under salt stress.

Key words Salt stress; Proline; Polyamines; Arginine; Barley seedlings

* 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 30070455)

** 通讯联系人

收稿日期: 2000-03-15, 接受日期: 2000-07-16

Received on: 2000-03-15, Accepted on: 2000-07-16

盐胁迫下细胞内正常代谢受到干扰, 使之趋向积累渗透溶质, 特别是 Pro 和 Put 的生物合成被明显激活^[1, 2]。已证明 Pro 在植物细胞适应胁迫过程中起到重要作用^[3, 4], 而 Put 含量上升的意义尚有争议^[5, 6]。植物体内 Pro 的合成存在两条途径, 根据起始氨基酸分别命名为 Glu (谷氨酸) 途径和 Orn (鸟氨酸) 途径。Orn 途径以种子内贮藏蛋白水解释放的 L-Arg 为合成前体, 在精氨酸酶催化下生成 Orn, 进一步在 OAT (鸟氨酸氨基转移酶) 作用下转化成 GSA (谷氨酰半醛), 后者自发环化生成 P5C (吡咯啉-5-羧酸), P5C 在 P5CR (吡咯啉-5-羧酸还原酶) 催化下生成 Pro。Glu 途径关键酶为 P5CS (吡咯啉-5-羧酸合成酶), 催化 Glu 合成 GSA, 后者转化途径同 Orn 途径。Put 的合成也存在两条途径, 以 Arg 或 Orn 作为合成前体。已证明盐胁迫下大麦幼苗 Put 的合成主要以 Arg 为前体, 反应的关键酶为 ADC^[7]。Put 还可进一步生成 Spd (亚精胺)、Spm (精胺) 等, 这些游离多胺也可在 TGase (谷氨酰胺转移酶) 催化下与生物大分子共价结合转变成结合态^[8, 9] (图 1)。盐胁迫下游离 Pro 和 Put 含量迅速上升, 二者合成时是否存在底物竞争关系, 迄今了解很少。本文以耐盐的作物大麦鉴 4 为材料, 以 ¹⁴C-Arg 作为叶面饲喂底物, 结合两条合成途径的抑制剂和代谢产物进行处理, 以探明二者合成的相互关系, 为通过人为控制一条途径而调节另一途径的终产物积累, 进而提高作物耐盐性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 幼苗培养、盐处理和同位素饲喂

选用本实验室筛选的耐盐能力强的大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 鉴 4。幼苗培养方法见章文华等^[8]。幼苗生长第 6 天 (一叶一心) 时用含 200 mmol/L NaCl 的 1/2 强度 Hoagland 溶液培养, 同时以未加 NaCl 为对照。对 NaCl 处理和对照幼苗第一叶片均匀定量涂抹 1 mmol/L Arg + 7.4 × 10⁵ Bq/ml ¹⁴C-Arg。设 NaCl + ¹⁴C-Arg 处理和 NaCl + ¹⁴C-Arg 同时心叶分别滴加 1 mmol/L D-Arg, 20 mmol/L L-Lys, 0.1 mmol/L Put, 10 mmol/L Pro 和 4 mmol/L 邻菲咯啉处理。每一处理均设 3 次重复。参考赵福庚等^[7]方法处理 8h 后剪去涂抹叶片, 7d 后剪取未涂抹叶片和根系进行测定。

1.2 放射性氨基酸和多胺测定

参照赵福庚等^[7]方法进行放射性 Arg、Pro、游离 Put 和各种不同形态多胺的提取、分离和测定, 放射强度用 Bq/gFW 表示。用甲醇-氯仿-水 (12:5:3) 提取总氨基酸后于 60 °C 下蒸发至干, 溶于闪烁液中, 于 Beckman LS-9800 液闪测定仪上测氨基酸总放射强度。

1.3 放射性蛋白质测定

柠檬酸缓冲液 (pH5) 提取可溶性蛋白质, 5000 × g 离心后沉淀用 1 mmol/L NaOH 于 90 °C 下水解 20 min, 上清液含难溶性蛋白。向两种上清液内加三氯乙酸至终浓度 10%, 离心后沉淀于 40 °C 下干燥, 用数滴 20% (w/v) Na₂CO₃ 溶液溶解沉淀后加闪烁液, 上闪烁仪测定放射强度, 放射性强用 Bq/gFW 表示。

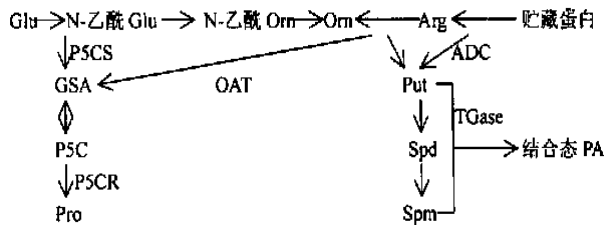


图 1 植物体内脯氨酸与多胺的合成代谢
Fig 1 The biosynthesis of Pro and PAs in plants

2 结果与分析

2.1 NaCl 处理对大麦苗体同位素吸收和转移的影响

200 mmol/L NaCl 处理结合¹⁴C-Arg 作为叶面饲喂底物时, 大麦叶片内各种氨基酸、可溶性和难溶性蛋白的总放射强度仅下降 1.5%, 苗体内总放射强度下降 2.7%。说明 NaCl 处理对大麦幼苗叶片同位素的吸收能力没有明显影响。此外, 以¹⁴C-Arg 作为饲喂底物, 大麦幼苗根系内总放射强度明显低于叶片, 约为叶片总放射强度的 47%, NaCl 处理后根系内总放射强度下降 5%, 说明 NaCl 处理对大麦幼苗苗体运输同位素也没有明显影响。

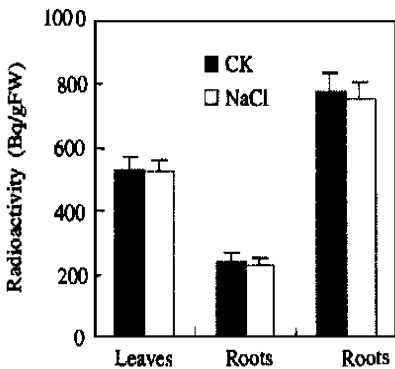


图 2 NaCl 处理对大麦苗体内氨基酸和蛋白质总放射性的影响

Fig. 2 Effects of NaCl stress on total radioactivity of amino acids and proteins in barley seedlings

2.2 NaCl 处理对大麦幼苗¹⁴C-Arg 向 Pro 和多胺转化的影响

200 mmol/L NaCl 处理 6 日龄大麦幼苗 7d, 叶片内 Pro 放射性比对照提高 2.1 倍, Arg 向 Pro 的转化率 (Pro 放射性/(Arg 放射性+ Pro 放射性)) 提高 2.9 倍。根系内 Pro 放射性提高 0.6 倍, Arg 向 Pro 的转化率提高 1.7 倍。叶片内游离 Put 放射性比对照提高 0.7 倍, Arg 向游离 Put 的转化率 (Put 放射性/(Arg 放射性+ Put 放射性)) 提高 1.9 倍, 含结合态多胺在内的多胺总放射性与对照相比提高 0.3 倍, Arg 向多胺的转化率提高 1.2 倍。根系内游离 Put 放射性比对照提高 2.0 倍, Arg 向游离 Put 的转化率提高 4.1 倍。多胺总放射性比对照提高 0.6 倍, Arg 向多胺的转化率提高 1.4 倍 (图 3, 4)。

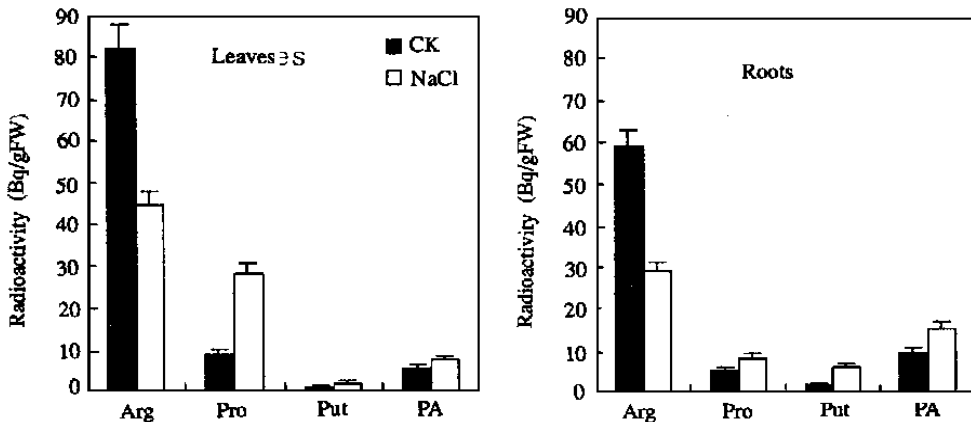


图 3 NaCl 处理下 Pro 和多胺放射性的变化

Fig. 3 Changes of proline and polyamines radioactivity in barley seedlings under NaCl stress

2.3 多胺和 Pro 合成抑制剂对大麦幼苗盐诱导¹⁴C-Arg 向多胺和 Pro 转化的影响

心叶滴加 ADC 抑制剂 1 mmol/L D-Arg, 使盐胁迫下叶片游离 Put 放射性下降 57%, 多胺总放射性下降 38%, 而叶片内 Pro 放射性提高 28%。使盐处理根系内游离 Put 放射性下降 49%, 多胺总放射性下降 37%, 而造成根系内 Pro 放射性提高 64%。L-Lys 是精氨酸酶和鸟

氨酸氨基转移酶竞争性抑制剂^[11], 心叶滴加 20 mmol/L L-Lys, 可使盐处理大麦幼苗叶片游离 Pro 放射性下降 43%, 而造成游离 Put 放射性上升 32%, 各种多胺总放射性下降 18%。使盐处理根系游离 Pro 放射性下降 38%, 而造成游离 Put 放射性上升 53%, 各种多胺总放射性上升 22%。心叶滴加 TGase 抑制剂 4 mmol/L 邻菲咯啉, 使盐处理幼苗叶片多胺总放射性下降 37%, 游离 Put 放射性则上升 27%, 而造成 Pro 放射性上升 23%。使盐处理幼苗根系多胺总放射性下降 31%, 游离 Put 放射性则上升 26%, 而造成 Pro 放射性上升 60% (图 5)。

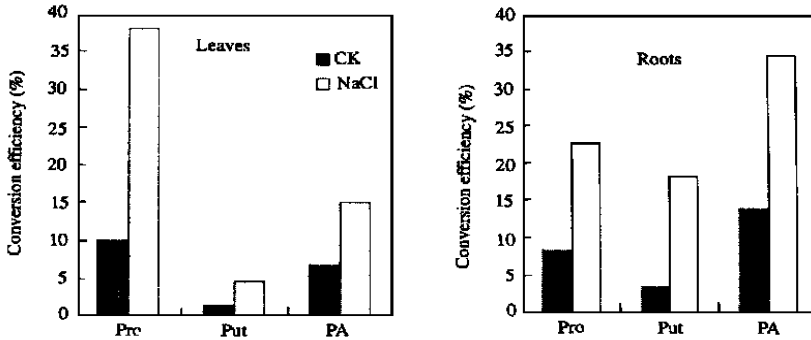


图 4 NaCl 处理下 Arg 向 Pro 和多胺转化率的变化

Fig. 4 Changes of conversion efficiency of arginine to proline and polyamines in barley seedlings under NaCl stress

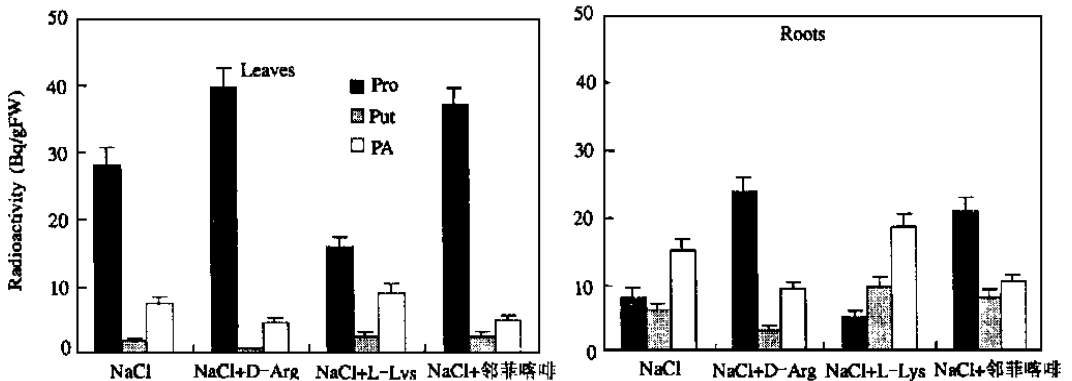


图 5 多胺和 Pro 合成抑制剂对盐胁迫下大麦幼苗 Arg 向多胺和 Pro 转化的影响

Fig. 5 Effects of polyamines and proline biosynthesis inhibitors on the changes of arginine to polyamines and proline in barley seedlings under salt stress

2.4 外施 Pro 和 Put 对大麦幼苗盐诱导¹⁴C-Arg 向多胺和 Pro 转化的影响

心叶滴加 10 mmol/L Pro, 可使盐处理大麦幼苗叶片 Pro 放射性下降 14%, 而造成游离 Put 放射性上升 32%, 多胺总放射性上升 21%。使盐处理根系 Pro 放射性下降 12%, 而造成游离 Put 放射性上升 20%, 多胺总放射性上升 9%。滴加 0.1 mmol/L Put, 可使盐处理叶片游离 Put 放射性下降 28%, 多胺总放射性下降 22%, 而造成 Pro 放射性上升 15%。使根系游离 Put 放射性下降 23%, 多胺总放射性下降 17%, 而造成 Pro 放射性上升 58% (图 6)。

3 讨论

盐胁迫促进了大麦幼苗叶片内 Arg 向游离 Pro 和 Put 的转化, 但向 Pro 的转化率明显高

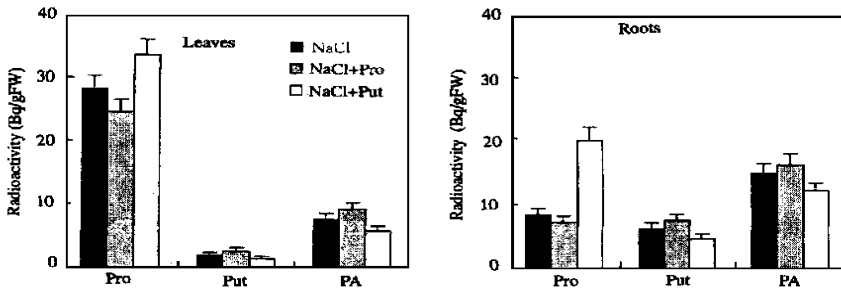


图6 外施Pro和Put对盐胁迫下大麦幼苗Arg向多胺和Pro转化的影响

Fig 6 Effects of proline and putrescine application on the changes of arginine to polyamines and proline in barley seedlings under salt stress

于向游离Put的转化率;根系内则相反,Arg向Put的转化率明显高于向Pro的转化率(图3,4)。说明盐胁迫促进Arg向Pro和PA的转化存在器官差异性,叶片内以积累Pro为主,根系内主要积累PA。大麦为耐盐的淡土作物,其耐盐机理在于阻止根系吸收的 Na^+ 、 Cl^- 向地上部运输,使其积累在根系液泡内^[12],叶片内Pro积累量明显高于根系,可见盐胁迫下Pro积累的意义不仅是渗透调节作用。

盐胁迫下Arg向Pro和PA两个方向转化率除存在器官差异性外,在同一器官内是否存在对前体Arg的竞争关系,迄今尚未有直接证据。我们在以前的工作中以 ^{14}C -Glu作为饲喂底物间接证明大麦苗体内PA与Pro的合成可能竞争前体Arg^[7]。本实验中外施Arg向PA转化途径的抑制剂D-Arg,可促进Pro合成,外施Arg向Pro转化途径的抑制剂L-Lys则促进PA合成(图5)。说明Pro和PA的合成存在对Arg的竞争,Arg转化的一条途径受阻时,则向另一条途径的转化增多。

外施Pro造成Arg向PA转化的明显增多(图6),反之外施Put,则Arg向Pro的转化明显上升。而外施TGase抑制剂,导致内源游离Put积累,同样可促进Arg向Pro的转化。这种终产物对分支代谢中各自合成途径的反馈抑制,造成前体向另一合成方向的转化,进一步说明PA和Pro的合成竞争前体Arg。了解二者的竞争关系以及盐胁迫下Pro和PA积累的意义,对通过人为控制一条途径而调节另一途径的最终产物积累,进而提高作物耐盐性具有重要意义。

参 考 文 献

- Friedman R, A Altman. *Physiol Plant*, 1989, 76: 295~ 302
- Roosens NH, TT Thu. *Plant Physiol*, 1998, 117: 263~ 271
- Yoshida Y, T Kiyosue. *Plant Cell Physiol*, 1997, 83: 1095~ 1102
- 刘友良,汪良驹.见:余叔文,汤章成主编.植物生理与分子生物学.北京:科学出版社,1998,752~ 769
- Songstad DD, DR Duncan, JM Windham. *Journal of Experimental Botany*, 1990, 41: 289~ 294
- Krishna R, KA Bhagwat. *Plant Physiol*, 1989, 91: 500~ 504
- 赵福庚,刘友良.植物生理学报,2000,26(4): 343~ 349
- Serafini-Fracassini D, S DelDuca. *Phytochem*, 1995, 40: 355~ 365
- 赵福庚,刘友良.植物生理学通讯,2000,36(1): 1~ 6
- 章文华,刘友良.植物学报,1993,35: 435~ 440
- Arthur JLC. In: Alton M ed. *Methods in Enzymology*, New York: Academic Press, 1985, 76~ 79
- 刘友良,章文华,丁念诚.见:中国大麦文集第三集,南昌:江西科学技术出版社,1993,209~ 213