

苯丙氨酸处理对拟南芥酪氨酸降解途径的影响

雷雨婷¹, 汤睿¹, 任春梅^{1,2*}

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.作物基因工程湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘要:以拟南芥野生型 Col-0(CK)和酪氨酸降解途径缺陷突变体 *sscd1* 为试验材料, 观察统计了 4 种浓度 (0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L) 苯丙氨酸处理下种子萌发和幼苗生长情况, 分析了苯丙氨酸对酪氨酸降解途径中关键基因 *HGO*、*MAAI* 和 *SSCD1* 表达的影响。结果发现: 0.5、1.0、2.0 mmol/L 苯丙氨酸处理能够抑制拟南芥种子的萌发和根的生长, 对突变体 *sscd1* 的抑制程度高于野生型对照; 0.1、0.5 mmol/L 苯丙氨酸促进幼苗地上部分的生长, 1.0、2.0 mmol/L 苯丙氨酸抑制地上部生长, 其中对突变体 *sscd1* 的抑制作用更为显著; qRT-PCR 分析发现, 苯丙氨酸处理能显著上调野生型中 *HGO* 基因的表达以及酪氨酸降解途径缺陷突变体 *sscd1* 中 *HGO* 和 *MAAI* 基因的表达, 表明苯丙氨酸能上调拟南芥酪氨酸降解途径。

关键词: 拟南芥; 苯丙氨酸; *sscd1* 突变体; 酪氨酸降解途径

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)04-0365-04

Effects of phenylalanine on tyrosine degradation pathway in *Arabidopsis thaliana* seedlings

LEI Yuting¹, TANG Rui¹, REN Chunmei^{1,2*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: We used *Arabidopsis thaliana* wild-type Col-0 (CK) and tyrosine pathway-deficient mutant *sscd1* as experimental materials, observed the seeds germination and seedling growth which treated with four concentrations of phenylalanine (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L), and analyzed the expression of key genes *HGO*, *MAAI* and *SSCD1* in tyrosine degradation pathway. The results showed that: 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L phenylalanine could inhibit the germination and root length of *Arabidopsis* seedlings, and the inhibitory effect on the mutant *sscd1* was higher than that of the wild type. The growth of aboveground parts of seedlings was promoted under 0.1, 0.5 mmol/L phenylalanine and inhibited under 1, 2.0 mmol/L phenylalanine, the inhibition of mutant *sscd1* was more seriously. QRT-PCR found that the expression of *HGO* in wild type and gene expression of *MAAI* and *HGO* in tyrosine pathway-deficient mutant *sscd1* was significantly up-regulated. The above results showed that phenylalanine promoted the tyrosine degradation pathway in plants.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; phenylalanine; *sscd1* mutant; tyrosine degradation pathway

苯丙氨酸(phenylalanine)是具有生理活性的芳香族氨基酸^[1]。在哺乳动物中, 苯丙氨酸主要在肝脏等组织中代谢成酪氨酸^[2], 参与酪氨酸降解途径, 但在植物中苯丙氨酸是否参与酪氨酸降解途径尚不清楚。

HAN 等^[3]在拟南芥中分离得到酪氨酸降解缺陷突变体 *sscd1*, 此突变体在长日照下正常生长, 与野生型 Col-0 没有任何区别; 但在短日照条件下(8 h 光照/16 h 黑暗)出现细胞死亡。基因定位发现, 这种死亡现象是由于其编码的延胡索乙酰乙酸酶

收稿日期: 2017-12-11

修回日期: 2018-01-23

基金项目: 国家 973 计划前期研究专项(2014CB160308)

作者简介: 雷雨婷(1993—), 女, 湖南津市人, 硕士研究生, 主要从事植物分子遗传学研究, 1985694202@qq.com; *通信作者, 任春梅, 博士, 教授, 主要从事植物分子遗传学研究, rencm66@163.com

(fumarylacetoacetate hydrolase, FAH)基因的突变导致酪氨酸降解途径的中断,从而形成有毒的中间代谢产物的积累^[4]。为了解苯丙氨酸对植物酪氨酸降解途径的影响,笔者以拟南芥突变体 *sscd1* 为材料,野生型 Col-0 为对照,用 4 种不同浓度苯丙氨酸处理,观察统计拟南芥种子萌发率及幼苗根长和鲜质量的变化,并采用分子生物学的方法分析酪氨酸降解途径关键基因 *HGO*、*MAAI* 和 *SSCD1* 的表达情况。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型 Columbia (Col-0)、*sscd1* 突变体,由作物基因工程湖南省重点实验室植物信号传导课题组提供。

MS 购自美国 Sigma; 苯丙氨酸购自上海 Aladdin—阿拉丁试剂(上海)有限公司;琼脂粉和蔗糖购自北京国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥的培养

将拟南芥 Col-0 及 *sscd1* 突变体种子在消毒液(20%Bleach + 0.1% Triton 100)中浸泡 10 min,用无菌水清洗 4~5 遍,将其悬浮于 0.1%琼脂溶液中。分别铺种在 4 种含不同浓度(0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L)苯丙氨酸的 MS 固体培养基上,每个浓度铺种 100 粒,重复 3 次;4℃下春化处理 3 d,然后放置于长日照(16 h 光照/8 h 黑暗)的人工气候箱生长,培养温度(22±2)℃,光照度 80~120 lx,相对湿度 65%。

1.2.2 萌发和生长指标的测定

拟南芥种子长日照下生长 2 d,统计直接铺种在含不同浓度苯丙氨酸的 MS 固体培养基上的拟南芥种子萌发率,萌发以种子露出白色胚芽为标准。

拟南芥种子长日照下生长 10 d 后,每个样本随机选择 15 株幼苗,吸干水分,用天平称取其培养基以上部位的鲜质量,每个样品重复 3 次。

将培养皿垂直放置,继续生长 10 d 后,每个样本随机选取 30 株幼苗,将其平铺于另一空白培养基中,拍照后使用 Digimazer 来测量和计算幼苗的根长度。每个样品重复 3 次。

1.2.3 植株 RNA 的提取与 qRT-PCR 分析

将直接铺种在 MS 培养基中生长 7 d 的幼苗,移至添加有 2 mmol/L 苯丙氨酸的培养基中,长日照下继续生长 5 d,获得拟南芥野生型及 *sscd1* 突变体幼苗莲座叶。采用 Trizol 法提取总 RNA。

采用罗氏 SYBRqPCR Mix 荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR。反应体系 10 μL,包含: SYBRGreen Master 5 μL,上、下游引物各 0.4 μL, cDNA 模板 200 ng, ddH₂O 补足至 10 μL。反应程序为: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火延伸 60 s, 共 40 个循环。以 *ACTIN2* 作为内参基因, PCR 引物由深圳华大基因公司合成。序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR		
基因名称		引物序列(5'-3')
<i>ACTIN2</i>	F	AGCACTTGCACCAAGCAGCATG
	R	ACGATTCTGACCTGCCTCATC
<i>HGO</i>	F	GGAGATTGATTTCGTTGATGGGTT
	R	GCGGAGTCTTTCATTCCTGTGTIA
<i>MAAI</i>	F	GCTGGACTCTGCTACTGCGA
	R	AGGGCGATACGGACACGATG
<i>SSCD1</i>	F	GACTCGCACTTCCCTATCCAG
	R	GACCATCGAAAAGCCAGCT

1.2.4 数据处理

采用 SPSS 19.0 进行数据分析;采用 ANOVA 进行单因素分析,用 LSD 法对各组数据进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 苯丙氨酸对突变体 *sscd1* 种子萌发的影响

从表 2 可以看出,添加外源苯丙氨酸浓度为 0.1 mmol/L 时,突变体 *sscd1* 萌发率为 99.5%。苯丙氨酸浓度升至 0.5 mmol/L 时,种子萌发受到轻微抑制,突变体 *sscd1* 的萌发率稍低于野生型对照,但无显著差异。当苯丙氨酸浓度为 1.0 mmol/L 时,拟南芥种子萌发受到明显抑制,突变体 *sscd1* 的萌发率降至 73%,显著低于野生型对照。随着苯丙氨酸

表 2 不同浓度苯丙氨酸处理下拟南芥种子的萌发率

Table 2 Effect of phenylalanine on <i>Arabidopsis</i> seed germination		
浓度/ (mmol·L ⁻¹)	萌发率/%	
	Col-0	<i>sscd1</i>
0.0	(99.0±1)a	(99.1±0.76)a
0.1	(100.0±0)a	(99.5±0.58)a
0.5	(97.7±0.58)ab	(95.07±0.40)b
1.0	(82.0±2)c	(73±2.52)d
2.0	(61.0±2.75)e	(48.5±1.32)f

同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

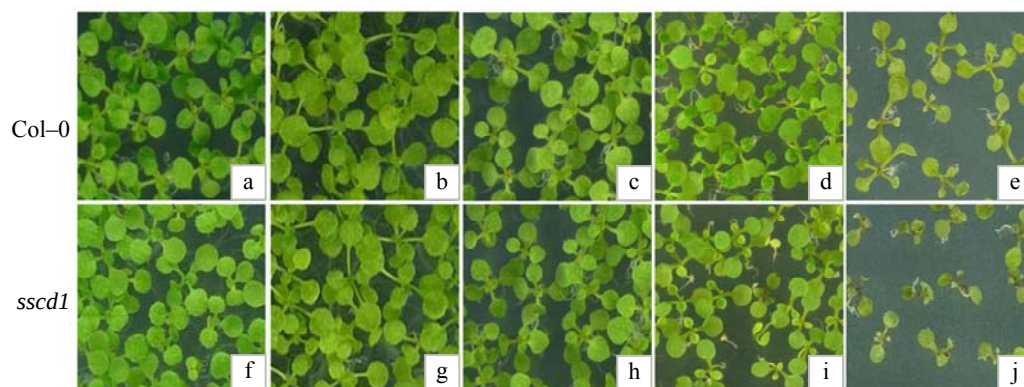
浓度的升高(2.0 mmol/L),种子萌发受到的抑制程度加深,突变体 *sscd1* 的萌发率降为 48.5%,与野生型对照的萌发率差异显著。说明苯丙氨酸对拟南芥种子的萌发影响有剂量依赖性,且在一定浓度范围内随着苯丙氨酸浓度的升高,突变体 *sscd1* 的萌发率相对于野生型显著降低。

2.2 苯丙氨酸对 *sscd1* 幼苗生长的影响

用 4 种不同浓度苯丙氨酸处理拟南芥幼苗,结

果(图 1)发现:当苯丙氨酸浓度为 0.1 mmol/L 时,突变体 *sscd1* 幼苗植株与野生型对照无明显差别;随着苯丙氨酸浓度的增加(0.5、1 mmol/L),拟南芥幼苗生长受到抑制,突变体 *sscd1* 幼苗表型略小于野生型 Col-0 幼苗;当苯丙氨酸浓度为 2.0 mmol/L 时,幼苗生长受到的抑制程度加大,突变体 *sscd1* 幼苗叶片向下蜷缩,表型明显小于野生型 Col-0 幼苗。

为进一步了解外源苯丙氨酸处理对拟南芥幼



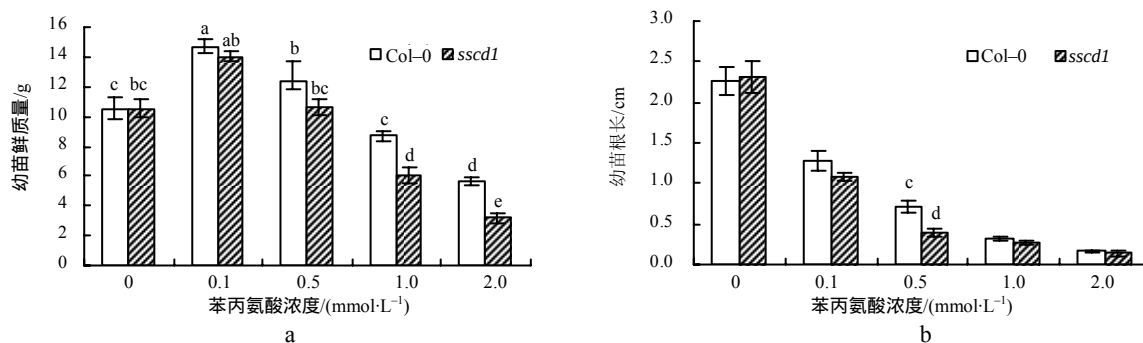
a、b、c、d、e 分别表示苯丙氨酸浓度为 0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L 时拟南芥野生型 Col-0 的表型; f、g、h、i、j 分别表示苯丙氨酸浓度为 0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L 时拟南芥突变体 *sscd1* 的表型。

图 1 不同浓度苯丙氨酸处理下拟南芥幼苗的生长情况

Fig.1 Growth of *Arabidopsis* seedlings treated with different concentrations of phenylalanine

苗生长的影响,笔者对其鲜质量和根长进行了统计。从鲜质量结果(图 2-a)发现,苯丙氨酸浓度为 0.1、0.5 mmol/L 时,突变体 *sscd1* 幼苗鲜质量均小于野生型对照,但与野生型 Col-0 幼苗差异无统计学意义;随着苯丙氨酸浓度升高(1.0、2.0 mmol/L),幼苗鲜质量的增长受到抑制,突变体 *sscd1* 幼苗所

受抑制程度更为明显,均显著低于野生型对照。根长统计结果(图 2-b)显示,随着外源苯丙氨酸浓度的增加,拟南芥幼苗根长始终呈现递减趋势。其中,突变体 *sscd1* 的根长的增长相比野生型受抑制程度更深,当苯丙氨酸浓度为 0.5 mmol/L 时,差异达到显著水平。



a 不同浓度苯丙氨酸处理下拟南芥的幼苗鲜质量;b 不同浓度苯丙氨酸处理下拟南芥的幼苗根长;不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图 2 不同浓度苯丙氨酸处理下拟南芥幼苗的鲜质量和根长

Fig.2 Quality and root length of *Arabidopsis thaliana* seedlings treated with different concentrations of phenylalanine

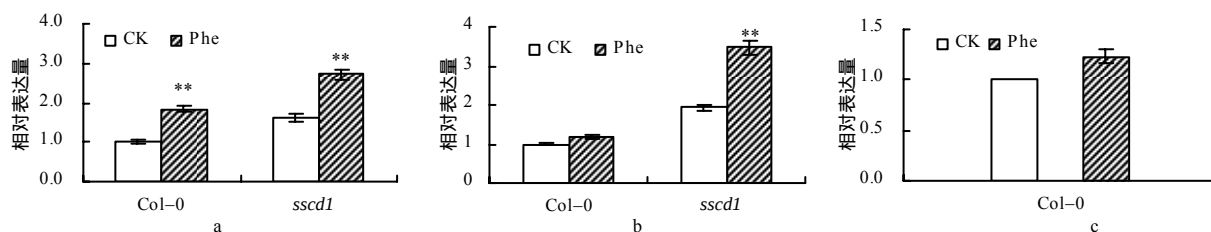
2.3 苯丙氨酸对 *HGO*、*MAAI* 和 *SSCD1* 表达的影响

对野生型 Col-0 和 *sscd1* 突变体幼苗进行 qRT-PCR 分析,以没有添加苯丙氨酸的幼苗为对

照。结果发现,在野生型中,苯丙氨酸处理下 *HGO* 基因表达与对照相比极显著增加,苯丙氨酸处理下 *MAAI* 和 *SSCD1* 基因有微弱增加。在突变体中,苯丙氨酸处理下 *HGO*、*MAAI* 基因表达相对于对照极

显著增加,其中 *HGO* 增加 1.7 倍(图 3-a), *MAAI* 增加 1.9 倍(图 3-b)。而 *sscd1* 突变体中 *SSCD1* 基因

是自身突变,所以未统计其表达量。



a *HGO* 基因检测结果; b *MAAI* 基因检测结果; c *SSCD1* 基因检测结果。CK 为空白对照组; Phe 为添加 2.0 mmol/L 苯丙氨酸组。***表示在 0.01 水平下差异显著。

图 3 外源苯丙氨酸处理下酪氨酸降解途径关键基因的相对表达量

Fig.3 Relative expression of key genes in tyrosine degradation pathway under the treatment of exogenous phenylalanine

3 结论与讨论

将编码拟南芥尿黑酸 1,2 双加氧酶(*HGO*), 马来酰乙酰乙酸异构酶(*MAAI*)和延胡索酰乙酰乙酸酶(*FAH*)的互补 DNA 导入大肠杆菌中进行表达,发现能在体外将尿黑酸(*HGA*)降解为乙酰乙酸(acetoacetate)和延胡索酸(fumarate)^[5],表明酪氨酸降解途径可能存在于植物中。本课题组前期研究发现,编码拟南芥酪氨酸降解途径最后一步酶 *FAH* 的基因 *SSCD1* 突变后可引起拟南芥在短日照下自然死亡^[6],同时用添加琥珀酰丙酮的方式处理野生型 Col-0 幼苗,发现短日照下能够模拟 *sscd1* 突变体幼苗的死亡表型^[7],说明其死亡是中间代谢产物琥珀酰丙酮积累所致。本试验中,长日照下 *sscd1* 突变体幼苗正常生长,但在一定苯丙氨酸(0.5~2.0 mmol/L)的处理下,拟南芥种子的萌发和生长均受到抑制,其抑制程度与苯丙氨酸浓度呈正相关,说明苯丙氨酸促进了酪氨酸降解途径;其中 *sscd1* 突变体幼苗相比野生型 Col-0 对照抑制作用更明显。这可能是 *SSCD1* 突变后酪氨酸降解途径异常,中间代谢产物积累所致,但这些中间代谢产物的积累水平可能非常低,不足以破坏细胞和组织。

HGO、*MAAI* 和 *SSCD1* 是编码酪氨酸降解途径第 3~5 步酶的基因^[8],在酪氨酸降解途径中发挥着关键性的作用。在拟南芥野生型中,高浓度(2.0 mmol/L)苯丙氨酸处理后 *HGO* 基因表达量显著上调, *MAAI* 和 *SSCD1* 基因有微弱上调。表达量的上调进一步说明了苯丙氨酸参与并促进了酪氨酸降解代谢途径。高浓度苯丙氨酸下, *sscd1* 突变体相比野生型在萌发和生长上受抑制现象更为明显,而

sscd1 突变体中 *HGO* 和 *MAAI* 的基因表达均显著上调,进一步验证了 *sscd1* 突变体受抑制的加深是由其降解途径中断后有毒中间代谢产物积累所致。

参考文献:

- [1] 李冰. L-苯丙氨酸的合成技术研究进展[J]. 食品工程, 2009(3): 9-12.
- [2] LERNER A B. On the metabolism of phenylalanine and tyrosine[J]. Journal of Biological Chemistry, 1949, 181(1): 281-294.
- [3] HAN C, REN C, ZHI T, et al. Disruption of fumarylacetoacetate hydrolase causes spontaneous cell death under short-day condition in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2013, 162(4): 1956-1964.
- [4] STLOUIS M, TANGUAY R M. Mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene causing hereditary tyrosinemia type I: overview[J]. Human Mutation, 1997, 9(4): 291-299.
- [5] DIXON D P, EDWARDS R. Enzymes of tyrosine catabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Science An International Journal of Experimental Plant Biology, 2006, 171(3): 360-366.
- [6] ZHI T T, ZHOU Z, HUANG Y, et al. Sugar suppresses cell death caused by disruption of fumarylacetoacetate hydrolase in *Arabidopsis*[J]. Planta, 2016, 244(3): 557-571.
- [7] 支添添. 拟南芥 *sscd1* 突变体细胞死亡机理的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [8] GROMPE M, AL-DHALMY M, FINEGOLD M, et al. Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice[J]. Genes & Development, 1994, 7(12A): 2298-2307.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 雷东阳