

双低油菜品系含油量与发育种子中 PEPc 酶 和 PAL 酶活性的相关分析

王树源, 陈健美, 戚维聪, 田琳琳, 管荣展*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

摘要: 以 10 个含油量不同的双低油菜品系为材料,测定了发育种子中磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPc) 和苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性动态变化,以及成熟种子的油脂含量,分析了 PEPc 和 PAL 酶活性与含油量之间的关系。结果表明:PEPc 酶与含油量之间始终存在不显著正相关,说明 PEPc 酶活性高低对含油量高低有一定作用,但并不是油菜种子油脂合成过程中的关键酶;PAL 酶与含油量之间始终存在不显著的负相关,授粉后 32 d,两者之间负相关性最高,但该相关性并不显著。

关键词: 油菜; 含油量; 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶; 苯丙氨酸解氨酶

中图分类号: Q946; S565.403

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)06-0650-05

Analysis of the Correlations Among the Activities of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Phenylalanine Ammonia-lyase in Developing Seeds with Seed Oil Contents in Different Canola Lines

WANG Shu-Yuan, CHEN Jian-Mei, QI Wei-Cong, TIAN Lin-Lin, GUAN Rong-Zhan*

(National Key Lab of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: 10 canola lines with different seed oil percentages were used to evaluate dynamics of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPc) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activities in developing seeds and seed oil content, and to analyze the correlations among the activities of PEPc and PAL in developing seeds with seed oil content. Results are as follows: In seed developing process, no significant positive correlations of seed PEPc activities with oil content was found, indicating that seed PEPc activity didn't play important role in the lipids accumulation and seed PEPc was not the key enzyme in the lipids accumulation; no significant negative correlations of seed PAL activities with seed oil content was found, the correlations of seed PAL activities with oil content was the highest at 32 days after pollination but not significant at 0.05 level.

Key words: *Brassica napus*; Oil content; Phosphoenolpyruvate carboxylase; Phenylalanine ammonia-lyase

油菜种子中的油脂合成是一个十分复杂的生化过程,涉及到众多的酶和基因。在油菜油脂积累的生理生化研究中,科学家们往往通过增加底物、调控转录因子、过量表达基因等方式来提高或降低油脂合成中关键酶活性,从而提高油菜籽的含油量^[1-3]。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPc; EC4.1.1.31) 催化磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)、 HCO_3^- β -氧化产生草酰乙酸盐 (oxaloacetate) 和单磷酸 (Pi) 的不可逆反应^[4]。在脂肪酸合成过程中,蔗糖通过糖酵解途径

生成磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP),在 PEPc 和细胞质中苹果酸脱氢酶的藕联作用下,PEP 被转化为苹果酸,进而被转运到叶绿体中,为合成脂肪酸提供必需的碳源和还原力 (NADPH)^[5]。前人的研究表明,PEPc 酶和脂肪酸合成联系紧密^[4,6,7]。转基因结果显示:组成型表达 *PEPc* 反义基因,可使大豆和油菜中油脂含量得到一定程度的提高^[7]。

苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL; EC4.3.1.5) 是苯丙烷类代谢的关键酶和限速

收稿日期:2008-12-29,修回日期:2009-02-23。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)项目(2006CB101600)资助。

作者简介:王树源(1984-),男,安徽省芜湖市人,硕士研究生,主要从事油菜遗传育种研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: guanrz@njau.edu.cn)。

酶^[8-10],催化 L-苯丙氨酸脱氨生成反式肉桂酸,为多种酚类及类黄酮终产物提供前体物质,是连接初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶,在植物的生长发育、抗病、抗逆反应中起着极其重要的作用。水稻中的转基因结果^[11]显示: PAL 正义基因的转入,增强了 PAL 酶活性,同时提高了过氧化物酶的活性,并且可以增强植株的抗病性。油菜中的研究认为, PAL 功能复杂,参与体内多种物质代谢:一方面 PAL 通过参与苯丙烷类途径、类黄酮途径、酚类物质途径、花色素途径等次生物质代谢过程,参与植物体内色素合成^[12];另一方面 PAL 活性的高低通过介导苯丙氨酸的脱氨作用,影响蛋白质合成^[8]。由于 PAL 酶活性在调节植物体内多种物质的合成方面起到重要作用,因此 PAL 酶很可能参与调节了体内物质的分配,从而可能对体内油脂的积累造成影响。前人只是在黄籽油菜与黑籽油菜的对比研究中,发现黄籽油菜存在 PAL 酶活性较低,而含油量较高^[12]。目前还没有报道明确不同含油量油菜品系中 PAL 酶活性与含油量之间的具体关系。

本研究选用 10 个不同含油量的油菜品系,通过测定不同发育时间的种子中 PEPc 和 PAL 酶活性变化,并分析酶活性与含油量高低之间的关系,为最终阐明 PEPc 和 PAL 对含油量的影响机制提供了新的信息。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的 10 个油菜品系均为甘蓝型双低油菜品系。将南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室 1500 份双低纯合品系(含油量变化区间为 30~54%),按照含油量高低,分为 5 个级别:低(30~35%)、中低(35~38%)、中(38~42.5%)、中高(42.5~47%)、高(47%以上)。在各含油量级别下等概率抽样,各级别抽取 2 个品系,得到: NJ7385 和 NJ7431(低含油量)、NJ7349 和 NJ7372(中低含油量)、NJ7405 和 NJ7365(中含油量)、NJ7676 和 NJ7677(中高含油量)、NJ8953 和 NJ7708(高含油量) 10 份材料,供本实验使用。

1.2 实验方法

1.2.1 取样 为保证不同品系的材料具有可比性,采用开花期人工授粉方法,并且标记授粉时间。授粉后第 18 d 开始第一次取样,以后每隔 7 d 取样 1 次,直到种子成熟(授粉后第 46 d),共取样 5 次。

截取所取材料主花序中间部位,储藏在超低温冰箱中,供酶活性和其它指标的测定。

1.2.2 PEPc 酶活性测定 参考 Khaled Sebei^[13]的方法,并作适当修改优化。取 250 mg 种子,加入 1 mL 100 mmol/L Tris-HCl 提取缓冲液(pH 值为 8.0,内含 5% 甘油,3.5 mmol/L MgCl₂,1% 巯基乙醇),在已预冷的研钵中研磨。匀浆液 4℃ 离心(13000 r/min)15 min。取上清液备用。反应液为: 50 mmol/L Tris-HCl,内含 10U MDH,0.14 mmol/L NADH,10 mmol/L MgCl₂,12 mmol/L NaHCO₃,10 mmol/L DTT,0.25 mmol/L EDTA,pH 值为 7.8。混匀后,在 27℃ 中预热 30 min。体系中加入 4 mmol/L 的 PEP 以启动反应。测定波长在 340 nm 处的 OD 值。酶活性测定重复 3 次,酶活性单位以 nmol·min⁻¹·g⁻¹ 鲜重表示。

1.2.3 PAL 酶活性测定 根据何钟佩^[14]的方法:取 0.5 g 种子,加入 5 mmol·L⁻¹ pH 值为 8.8 的巯基乙醇硼酸缓冲液于预先冷却的研钵中研磨成匀浆,离心,上清液为酶液。反应液为:1 mL 酶液,2 mL 巯基乙醇硼酸缓冲液,1 mL 0.02 mol/L L-苯丙氨酸(对照为 3 mL 巯基乙醇硼酸缓冲液,无苯丙氨酸),30℃ 保温 30 min,用 6 mol/L HCl 终止反应。在 290 nm 下测定 OD 值。OD 值以每 30 min 改变 0.01 为 1 个酶活力单位(U)。酶活性测定重复 3 次。酶活性单位以 U/g 鲜重表示。

1.2.4 含油量测定 种子含油量用国标 GB2906-1982 的方法进行测定。

1.2.5 数据分析 试验数据用 SAS9.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 品系的含油量差异

授粉后第 46 d,各品系种子均发育成熟。收获种子含油量测定结果见表 1。含油量高低分布范围在 33.1%~48.9% 之间。方差分析表明,所选材料含油量差异显著($F=16.98, P<0.05$);各个品系含油量差异较大,且各品系的含油量与往年相当,所选品系的遗传是稳定的,可用于进一步分析含油量与 PEPc 和 PAL 酶活性的关系。

2.2 种胚 PEPc 活性与含油量的相关性

测定 10 个品系授粉后 18、25、32、39、46 d 的种胚 PEPc 活性,结果表明 PEPc 活性都呈单峰态变化(见表 2)。各品系 PEPc 活性在授粉后 39 d 达到峰值。PEPc 酶活性在达到峰值后,活性开始回落,在

表 1 10 个双低油菜品系种子含油量
Table 1 Seed oil content of 10 canola lines

品系 Line	NJ 7385	NJ 7431	NJ 7349	NJ 7372	NJ 7365	NJ 7405	NJ 7676	NJ 7677	NJ 7708	NJ 8953
种子含油量 Oil content of seed(%)	33.1d	34.4d	38.5c	39.8bc	40.2bc	40.3bc	41.7bc	42.6b	47.7a	48.9a

注:不同字母代表显著性差异结果($P < 0.05$)。

Note: Different letters show significant difference at level of $P < 0.05$.

表 2 10 个双低品系的发育种子中 PEPc 活性
Table 2 PEPc activities in developing seeds of 10 canola lines with different oil percentages

品系 Line	授粉后不同天数的 PEPc 酶活性 PEPc activities at different days after pollination ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)				
	18 d	25 d	32 d	39 d	46 d
NJ7385	$7.0 \pm 1.67\text{e}$	$25.0 \pm 3.14\text{cd}$	$54.4 \pm 5.81\text{abc}$	$70.1 \pm 8.60\text{de}$	$20.5 \pm 2.60\text{b}$
NJ7431	$16.6 \pm 2.79\text{cd}$	$39.5 \pm 5.86\text{a}$	$57.0 \pm 5.77\text{ab}$	$83.3 \pm 9.42\text{bcde}$	$36.1 \pm 3.94\text{a}$
NJ7349	$16.9 \pm 2.35\text{cd}$	$26.6 \pm 3.91\text{cd}$	$56.1 \pm 6.30\text{ab}$	$75.5 \pm 7.53\text{ede}$	$25.5 \pm 3.61\text{b}$
NJ7372	$21.5 \pm 3.24\text{b}$	$38.3 \pm 4.40\text{ab}$	$50.5 \pm 6.59\text{abc}$	$113.7 \pm 12.85\text{a}$	$26.2 \pm 2.28\text{b}$
NJ7365	$16.7 \pm 1.94\text{cd}$	$23.4 \pm 3.21\text{d}$	$43.6 \pm 5.38\text{c}$	$68.3 \pm 6.86\text{e}$	$23.7 \pm 3.27\text{b}$
NJ7405	$27.5 \pm 3.60\text{a}$	$35.8 \pm 4.96\text{ab}$	$46.0 \pm 5.19\text{bc}$	$86.8 \pm 9.39\text{bcd}$	$35.1 \pm 4.05\text{a}$
NJ7676	$13.4 \pm 2.20\text{d}$	$30.7 \pm 4.21\text{bcd}$	$57.1 \pm 7.37\text{ab}$	$73.6 \pm 7.58\text{cde}$	$33.9 \pm 3.60\text{a}$
NJ7677	$18.9 \pm 1.26\text{bc}$	$32.5 \pm 4.52\text{abc}$	$62.4 \pm 6.70\text{a}$	$85.9 \pm 8.71\text{bcde}$	$35.4 \pm 4.51\text{a}$
NJ7708	$18.2 \pm 2.92\text{bc}$	$37.6 \pm 3.85\text{ab}$	$60.6 \pm 7.48\text{a}$	$100.6 \pm 11.72\text{ab}$	$39.9 \pm 4.31\text{a}$
NJ8953	$12.4 \pm 1.59\text{d}$	$31.8 \pm 3.36\text{abc}$	$57.9 \pm 7.01\text{ab}$	$90.7 \pm 11.31\text{bc}$	$21.5 \pm 2.72\text{b}$

注:数值为 mean $\pm$ SD; 不同字母代表显著性差异结果($P < 0.05$),下同。

Note: Different letters show significant difference at level of $P < 0.05$. Letters in following tables are the same to this table.

授粉后 46 d 时,种子已经发育成熟,此时种子中 PEPc 仍然具有一定的活性。

比较不同品系在进行相同天数的授粉后的 PEPc 酶活性,结果表明各个品系的酶活性差异都是显著的($F = 13.97, P < 0.05$)。对 10 个品系 PEPc 活性与其含油量之间进行相关性分析(见表 3),结果表明:PEPc 酶活性与收获种子的含油量之间始终存在不显著的正相关,说明 PEPc 酶活性对油脂积累起到了一定的调节作用;授粉后 18 d 到 39 d,发育种子中 PEPc 活性与成熟种子含油量之间的相关性呈现逐步紧密的趋势,说明此阶段 PEPc 酶活性的增长促使了苹果酸的不断增多,苹果酸的增长进一步为脂肪酸合成提供了更加充沛的碳源和 NADPH,从而对油脂积累的影响程度逐渐加大;授粉 39 d 后,

随着 PEPc 酶活性的回落,由其催化生成的碳源和 NADPH 开始减少,因而 PEPc 对油脂积累的贡献程度减弱,两者之间的相关性也降低。

2.3 种胚 PAL 活性与含油量的相关性

测定 10 个品系授粉后 18、25、32、39、46 d 的种胚 PAL 活性,结果表明 PAL 活性都呈单峰态变化(见表 4)。各品系 PAL 活性在授粉后 32 d 达到峰值。PAL 酶活性达到峰值后,活性逐渐回落,在授粉后 46 d 时,种子已经发育成熟,此时种子中 PAL 活性较低。

比较不同品系在进行相同天数的授粉后的 PAL 酶活性,结果表明各个品系的酶活性差异都是显著的($F = 17.97, P < 0.05$)。对 10 个品系 PAL 活性与其含油量之间进行相关性分析(见表 5),结果表明:从授粉后 18 d 到 46 d, PAL 酶活性与收获种子的含油量之间始终存在不显著的负相关,这意味着 PAL 酶活性的高低可能对体内油脂积累起到了一定程度的负向调节作用;授粉后 32 d, PAL 酶活性正处于峰值,其与收获种子的含油量之间负相关性也最高: $r = -0.5505^+$ ($P < 0.1$),说明此时 PAL 活性对含油量的影响程度最大。

表 3 10 个双低品系发育种子中 PEPc 酶活性与含油量的相关性

Table 3 Correlation coefficients of PEPc activities in developing seeds with oil percentages in mature seeds of 10 canola lines

授粉后天数 (d) Days after pollination	18	25	32	39	46
相关系数 Correlation coefficient	0.1629	0.1988	0.3031	0.4270	0.1945

表 4 10 个双低品系的发育种子中 PAL 活性
Table 4 PAL activities in developing seeds of 10 canola lines with different oil percentages

品系 Line	授粉后不同天数的 PAL 酶活性 PAL activities at different days after pollination (U/g FW)				
	18 d	25 d	32 d	39 d	46 d
NJ7385	18.4 ± 2.07b	38.2 ± 4.77abc	96.8 ± 12.41a	48.4 ± 5.46a	25.5 ± 4.86ab
NJ7431	10.5 ± 1.98cde	31.5 ± 3.08bcd	62.1 ± 8.42d	42.7 ± 6.23ab	13.1 ± 3.29d
NJ7349	24.7 ± 2.88a	44.9 ± 6.32a	87.1 ± 10.96ab	31.3 ± 2.49cd	17.4 ± 2.33cd
NJ7372	18.6 ± 3.57b	38.7 ± 4.29abc	92.5 ± 12.46ab	46.4 ± 5.13ab	28.7 ± 3.25a
NJ7365	12.0 ± 1.72cd	45.7 ± 5.50a	65.1 ± 6.97cd	38.5 ± 5.37bc	24.9 ± 3.44ab
NJ7405	14.0 ± 2.17c	38.1 ± 4.88abc	79.8 ± 9.26bc	42.8 ± 4.97ab	15.9 ± 2.68cd
NJ7676	19.4 ± 2.55b	30.0 ± 3.24cd	64.6 ± 7.37cd	25.8 ± 3.34d	17.4 ± 2.72cd
NJ7677	9.4 ± 1.18de	31.2 ± 4.06bcd	52.5 ± 5.96d	39.0 ± 4.56abc	12.9 ± 2.35d
NJ7708	20.8 ± 3.31ab	39.6 ± 4.32ab	57.5 ± 7.28d	32.0 ± 4.34cd	21.3 ± 3.13bc
NJ8953	7.2 ± 1.03e	28.1 ± 4.28d	64.5 ± 7.70cd	42.7 ± 6.53ab	13.5 ± 1.96d

表 5 10 个品系发育种子中 PAL 酶活性与含油量的相关性
Table 5 Correlation coefficients of PAL activities in developing seeds with oil percentages in mature seeds of 10 canola lines

授粉后天数 (d) Days after pollination	18	25	32	39	46
相关系数 Correlation coefficient	-0.1945	-0.2571	-0.5505 ⁺	-0.3639	-0.2429

注: + 表示 10% 水平显著。

Note: + denotes significant at 0.10 level.

3 讨论

前人在蓖麻等油料作物种子发育过程中,发现随着油脂积累速率的增加或减少,PEPc 存在相同的变化趋势^[4,15],据此学者们认为 PEPc 活性与油脂积累可能关系密切。按照同样的实验思路和推理,油菜 PEPc 的活性也因为与油脂积累速率的同步性,而被认为与油脂积累关系密切^[13]。但是,基于油脂积累速率与酶活性协同变化趋势的研究结果,并不能够解释不同品种含油量之间的差异。本实验中,授粉后 18~39 d,PEPc 酶活性与种子含油量之间始终存在一定程度的不显著正相关,说明了 PEPc 酶活性对种子含油量高低可能具有一定的作用,但是 PEPc 并不是决定含油量高低的关键酶。

油菜植株母体中,PEPc 通过与苹果酸脱氢酶的藕联,转化 PEP 生成苹果酸,而苹果酸供应的充沛程度,进一步影响了脂肪酸合成所需碳源和 NADPH 的生成,从而影响含油量的高低;不同活性的 PEPc 可以导致不同程度的碳源供应以及 NADPH 生成,从而一定程度上影响了品系含油量的高低^[5,13]。种子中含油量的高低可能更多的取决于母体的基因

型,与发育种子中的 PEPc 活性关系并不大。

油菜中 PAL 是莽草酸途径和花色素途径中的关键酶,它与植物色素、植物纤维化和蛋白质合成等多种代谢过程有关^[9]。本实验中,授粉后 32 d,PAL 活性与种子含油量负相关性最高,说明此时 PAL 活性高低对含油量可能具有重要影响。这可能是因为:PAL 参与调节了体内多种物质的分配活动。其活性高,可以促进体内多种物质的生成,而体内其它物质的增长,必然会与油脂的合成竞争碳源,这在一定程度上制约了油脂的积累。除此之外,由 PAL 催化生成的大量次生代谢物质虽然在植物体正常生长发育方面起到重要的调节作用^[16],然而这些次生代谢物质的生成是否也会对油脂的积累起到一定的限制作用,目前还不清楚。PAL 与含油量之间具体的互作机制还需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] Ohlrogge J B. Regulation of fatty acid synthesis[J]. *Plant Physiol*, 1997, 48: 109-136.
- [2] Rosalind A C, Lewin T M, Deborah M M. Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis[J]. *Ann Rev Nutr*, 2000, 20: 77-103.
- [3] Howard G D, Anthony J K. Enhancing plant seed oils for human nutrition [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147: 962-968.
- [4] Sangwan R S, Singh N, Plaxton W C. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and concentration in the endosperm of developing and germinating castor oilseeds [J]. *Plant Physiol*, 1992, 99: 445-449.
- [5] Aivalakis G, Dimou M, Flemetakis E, Plati F, Katinakis P, Drosopoulos J B. Immunolocalization of carbonic anhydrase and phosphoenolpyruvate carboxylase in developing seeds of *Medicago sativa*

- va [J]. *Plant Physiol*, 2004, 42: 181 – 186.
- [6] Singal H R, Sheron J S, Singh R. Photosynthetic carbon fixation characteristic of fruiting structures of *Brassica napus* L. [J]. *Plant Physiol*, 1987, 83: 1043 – 1047.
- [7] 赵桂兰, 陈锦清, 尹爱萍, 等. 获得转反义 PEP 基因超高油大豆新材料[J]. 分子植物育种, 2005(6): 792 – 796.
- [8] 王莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500 – 508.
- [9] Wu J, Lin L. Ultrasound-induced stress responses of *Panax ginseng* cells; enzymatic browning and phenolics production[J]. *Bio-technol Progr*, 2002, 18(4): 862 – 866.
- [10] Pan H Y, Wang Y G, Zhang Y G, et al. Phenylalanine ammonia lyase functions as a switch directly controlling the accumulation of calycosin and calycosin-7-O- β -D-glucoside in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* plants[J]. *J Exp Bot*, 2008, 59: 3027 – 3037.
- [11] 黎军英, 郭泽建, 张炳欣. 转 PAL 基因水稻抗稻瘟病性和过氧化物酶活性的研究[J]. 中国水稻科学, 2004, 18(4): 303 – 308.
- [12] 王汉中, 刘后利. 甘蓝型油菜黄籽和黑籽皮壳中花色素、多酚、苯丙烯酸含量和 PAL 酶活性的变异[J]. 华中农业大学学报, 1996, 15(6): 509 – 513.
- [13] Khaled S, Zeineb O, Habib K, et al. Evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase activity and lipid content during seed maturation of two spring rapeseed cultivars (*Brassica napus* L.) [J]. *Plant Biology and Pathology*, 2006, 719 – 725.
- [14] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993: 30 – 31.
- [15] Botha F C, Dennis D T. Phosphoglyceromutase activity and concentration in the endosperm of developing and germinating *Ricinus communis* seeds[J]. *Can J Bot*, 1986, 65: 1908 – 1912.
- [16] Cunha D A. Purification, characterization and induction of L-phenylalanine ammonia lyase in *Phaseolus vulgaris* [J]. *Eur J Biochem*, 1988, 178(1): 243 – 248.