

D-氨基酸抑制植物生长的现象

赵大华^{1,2}, 杨 靖¹, 李友勇¹

(1. 河南科技学院 生物技术系, 河南 新乡 453003; 2. 华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要: 丙氨酸、丝氨酸、缬氨酸和蛋氨酸 4 种氨基酸的 L- 和 D- 异构体对小麦胚试管植株生长影响的试验结果表明, 丙氨酸和丝氨酸的 D- 异构体在 3 mmol/L 以上浓度强烈抑制试管植株生长, L- 异构体不抑制或轻的多, 这是少见的 D- 氨基酸抑制植物生长的现象。把在丙氨酸、丝氨酸处理中生长 4 d 的已经受到抑制的植株再转入无氨基酸培养基后, 植株可恢复生长, 这显示 D- 丙氨酸和 D- 丝氨酸的抑制作用可能有反馈机制存在。D- 氨基酸的这些作用在筛选植物生长延缓剂、离体植物遗传标记等方面有重要价值。

关键词: D- 氨基酸; 丙氨酸; 丝氨酸; 反馈抑制; 离体小麦胚

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 7091(2007)02- 0060- 04

The Inhibition of D-amino Acid on Plant Growth

ZHAO Da-hua^{1,2}, YANG Jing¹, LI You-yong¹

(1. Department of Biotechnology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China;

2. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The effect of L- and D- isomer of four kinds of amino acids (Alanine, Serine, Methionine and Valine) with different concentration on seedlings of wheat embryos *in vitro* was studied. The results showed that D- isomers of Alanine and Serine could strongly inhibit seedling growth when their concentration reached to 3 mmol/L, but their L- isomers had much less or no effect. It belongs to a rare phenomenon that the D- amino acids inhibit plant growth. When the seedlings enduring four-day inhibition by D- alanine and D- serine were transferred into the medium containing no amino acid, their growth recovered again. This suggested that there might exist a feedback mechanism for the D- amino acid inhibiting effect, which was of great importance to screen plant growth retardants and plant genetic markers *in vitro*.

Key words: D- amino acid; Alanine; Serine; Feedback inhibition; Wheat embryos *in vitro*

蛋白质中的氨基酸有 20 种, 除甘氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸 4 种氨基酸外, 大部分氨基酸合成代谢都有反馈抑制机制^[1], 即, 终产物抑制合成过程中相对独立的有能量消耗的第一酶^[2]。不少研究者常常根据这一原理, 来筛选微生物和植物的抗氨基酸突变体^[3,4]。我们在植物氨基酸抗性筛选中发现, 在培养基中加入一定浓度外源氨基酸, 其中的大部分, 包括 10 种必需氨基酸和 4 种非必需氨基酸^[5], 都可抑制试管植株生长, 浓度增高, 抑制作用增强, 这与已有报道中有关反馈抑制现象的结果一致。另外, 我们还观察到一个特殊现象, 即, 较高浓度的 L- 丙氨酸并不抑制植株生长, 但它的 D- 型异构体, 在较低浓度时即有抑制生长的作用。这一现象

引起了我们的注意。因为根据已有的研究, 已经发现 L- 丙氨酸没有反馈抑制^[1], 我们的试验也证明 L- 丙氨酸确不抑制生长, 但其 D- 异构体强烈抑制生长, 一定有它的生理生化机制。因此, 这是一个少见的胁迫现象。还有丝氨酸, 过去的研究认为 L- 丝氨酸有反馈抑制机制^[1], 试验中也发现它能抑制植株生长, 只是相对较轻, 但 D- 丝氨酸比 L- 丝氨酸的抑制作用要强得多。为了进一步摸清 D- 氨基酸对植物的生理作用, 我们就丙氨酸、丝氨酸各自的 2 种异构体, 为了比较, 另选已知有反馈抑制机制的蛋氨酸和缬氨酸各自的 L- 型异构体以及 D- 型异构体, 对试管小麦植株生长的影响进行了探讨。

收稿日期: 2006- 07- 10

基金项目: 河南省自然科学基金项目(0511031100); 河南省教育厅自然科学基金基础研究项目(200510467019)

作者简介: 赵大华(1979-), 女, 河南周口人, 在读硕士, 研究生, 主要从事草业生物技术与育种研究

通讯作者: 李友勇(1955-), 男, 河南济源人, 教授, 硕士, 主要从事植物生物技术教学与研究工作。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为普通小麦(*Triticum aestivum* L.), 品种为郑农 16。氨基酸试剂购自中国医药集团上海化学试剂公司。其中 L- 丙氨酸、D- 丙氨酸、L- 蛋氨酸是中国医药集团上海化学试剂公司产品; D- 蛋氨酸是上海伯奥生物科技有限公司产品, L- 缬氨酸是成都科龙化工厂产品, D- 缬氨酸是进口英国产品, L- 丝氨酸和 D- 丝氨酸是进口美国新泽西产品。

1.2 方法

小麦种子经无菌处理(75% 乙醇 1 min, 0. 1% HgCl₂ 7 min 无菌水冲洗 4 次) 后浸泡 24 h, 按常规无菌接种方法, 将胚接种在培养基上, 每个处理接 12 个试管, 每管 3 粒胚, 重复 3 次。

培养基中丙氨酸和丝氨酸浓度设 1, 3, 5, 7, 9 mmol/L 5 个浓度, 抑制作用强的 D- 丙氨酸设 1, 3, 5 mmol/L。L- 蛋氨酸和 L- 缬氨酸的胁迫作用比较清楚^[5], 因此包括 D- 蛋氨酸和 D- 缬氨酸, 分别设 1, 3, 5, 7 mmol/L 4 个浓度。培养基以 N₆ 培养基为基本成分, 附加 0. 1 mg/L IBA, 3% 蔗糖, 0. 7% 琼脂, pH 值为 5. 8。该成分同时是对照培养基(CK)。材料的培养温度为 22~ 25 ℃, 湿度 75% 左右, 光照度 1 000~ 1 400 lx, 光照时间 12 h/d。

试验还设计了一个抑制植株生长恢复试验。其基本原理为, 反馈抑制有一个非常重要的特征是抑

制的可逆性, 即, 若一个氨基酸具有反馈抑制特性, 那么, 当细胞内该氨基酸产物过剩, 它便会抑制合成途径某些关键酶使合成减缓; 若终产物被消耗, 反馈抑制作用解除, 合成重新加快。细胞内的这种调节是一个非常精细的过程。若终产物在体内持续处于高浓度, 与该氨基酸代谢有关的途径则长时间处于抑制状态, 这时的个体就会受到不同程度的生长抑制, 这应该是氨基酸抑制植株生长的机制^[6]。为了了解 D- 丙氨酸的抑制机制, 我们可以把生长抑制的植株再转入没有氨基酸的培养基中, 此时植株不再从培养基中摄取外源氨基酸, 理论上, 体内该氨基酸在自我消耗后浓度将下降, 生化代谢过程也应恢复正常, 生长抑制的现象应解除, 表现出生长恢复。试验将在 3 mmol/L D- 丝氨酸、5 mmol/L D- 丙氨酸和 5 mmol/L L- 缬氨酸中生长 4 d 的植株, 此时其植株被抑制已经显现, 再转入对照培养基中, 观察生长结果。

2 结果与分析

2.1 生长抑制现象

试验中观察到, 接种后 3 d, 对照和处理的植株生长反应显示出差异, 7 d 后的差异更显著, 时间延长, 差异增大。培养 14 d 后的对照植株叶片已达试管顶部并弯曲下来, 因此, 本试验使用接种后 14~ 15 d 的生长结果。各处理取样 10 株, 分别测量株高(分蘖节至叶尖长度) 和根长, 二者的总长度统计在表 1 中。

表 1 4 种氨基酸 8 种异构体不同浓度处理对小麦胚试管植株生长量的影响($\bar{x} \pm s$, cm)

Tab. 1 Growth increment of embryo seedlings of wheat *in vitro* treated by 8 kinds isomers of 4 kinds of amino acids

氨基酸 Amino acids	异构体 Isomer	氨基酸浓度/(mmol/L) Concentration of amino acids					
		0(CK)	1	3	5	7	9
丙氨酸 Alanine	L-	26. 3 ± 4. 9 a	— —	24. 5 ± 3. 7 a	26. 6 ± 4. 1 a	24. 6 ± 3. 9 a	25. 1 ± 4. 2 a
	D-	26. 3 ± 4. 9 a	15. 2 ± 4. 6 b	6. 3 ± 2. 2 c	4. 1 ± 1. 4 c	— —	— —
丝氨酸 Serine	L-	28. 6 ± 2. 1 a	17. 8 ± 3. 5 b	17. 0 ± 4. 7 bc	14. 2 ± 3. 2 c	10. 1 ± 5. 0 d	2. 7 ± 2. 4 e
	D-	28. 6 ± 2. 1 a	10. 5 ± 3. 9 b	3. 9 ± 0. 9 c	2. 4 ± 0. 4 c	2. 2 ± 0. 6 cd	1. 4 ± 0. 7 d
蛋氨酸 Methionine	L-	20. 9 ± 3. 3 b	23. 9 ± 3. 6 a	14. 0 ± 4. 1 c	9. 6 ± 4. 1 d	5. 3 ± 1. 7 e	— —
	D-	20. 9 ± 3. 3 a	20. 5 ± 3. 9 a	21. 5 ± 333. 5 a	17. 5 ± 4. 1 ab	15. 5 ± 3. 7 b	— —
缬氨酸 Valine	L-	26. 3 ± 4. 9 a	25. 2 ± 4. 0 a	4. 0 ± 1. 3 b	3. 4 ± 1. 2 b	2. 2 ± 0. 4 b	— —
	D-	26. 3 ± 4. 9 a	25. 4 ± 4. 2 a	23. 5 ± 2. 2 a	24. 2 ± 3. 8 a	12. 7 ± 1. 6 b	— —

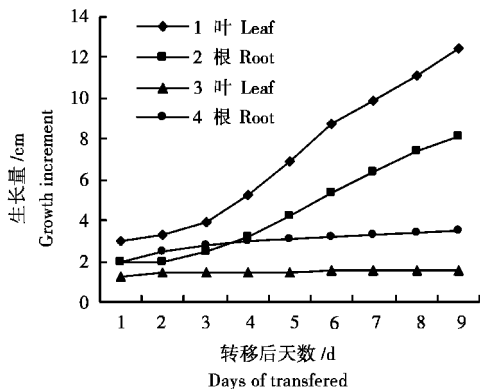
注: ①差异显著性检验是 LSR_{0.05}; ②L- 蛋氨酸的多重比较以数值最大的 1 mmol/L 的均数为起始值
Note: ①Test of different significance was LSR_{0.05}; ②Multiple comparison of mean of L- methionine began from the mean of 1 mmol/L concentration due to its value the biggest one

从表 1 可看出:

(1) 蛋氨酸和缬氨酸 L- 异构体有明显抑制生长作用, 它们的 D- 异构体在 5 mmol/L 时无抑制作用, 在 7 mmol/L 以上才显出轻微抑制作用; (2) 丙氨酸则正相反, L- 异构体 7 mmol/L 以下不具抑制生长作用, 9 mmol/L 时仅表现出轻微的抑制作用, 而 D- 异构体在 1 mmol/L 时即显示出抑制, 在 3 mmol/L 及以上浓度强烈抑制生长。 (3) 丝氨酸的 L- 异构体有较轻的抑制作用, 但 D- 型异构体是与 D- 丙氨酸和 L- 缬氨酸一样的强抑制作用类型。

2.2 生长恢复结果

当把 5 mmol/L L- 缬氨酸处理的植株转到 CK, 2 d 后才开始恢复生长, 8~ 9 d 后仍保持生长, 而在原培养基中的植株生长早已停止 (图 1)。3 mmol/L D- 丝氨酸和 5 mmol/L D- 丙氨酸抑制的植株转移到 CK 后, 观察到 1 d 即逐渐恢复生长, 3 d 后叶片达正常生长水平 (图 2, 3)。D- 丙氨酸对根系抑制比叶片重, 因此恢复较慢, 该结果有力地说明 D- 丙氨酸和 D- 丝氨酸抑制试管植株生长是可恢复的。



1, 2 示叶和根的生长恢复, 3, 4 持续胁迫, 下同
1, 2 indicate the growth of leaf and root has restored, but 3, 4 in stress, the same as below

图 1 L- 缬氨酸抑制的植株的生长恢复
Fig 1 Growth restoration of seedling inhibited by L-valine

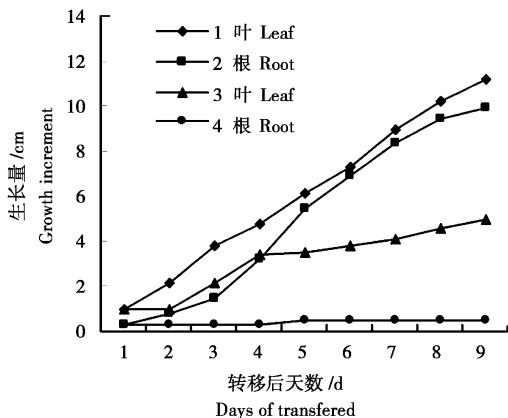


图 2 D- 丝氨酸抑制的植株的生长恢复
Fig 2 Growth restoration of seedling inhibited by D-serine

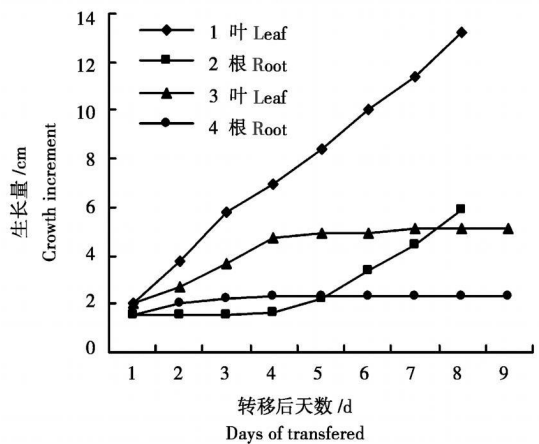


图 3 D- 丙氨酸抑制的植株的生长恢复
Fig 3 Growth restoration of seedling inhibited by D-alanine

3 讨论

关于 D- 氨基酸对植物生长的影响和作用, 目前已有的报道较少, 仅 Oskar 等^[7] 曾发现 D- 丙氨酸对拟南芥有“毒”。本研究中的蛋氨酸和缬氨酸, 还有脯氨酸^[8]、苏氨酸等的 D- 异构体在 5 mmol/L 浓度对植物没有任何抑制生长作用, 7 mmol/L 以上浓度才有轻微抑制作用。丙氨酸和丝氨酸是特例, 其 D- 异构体对试管植株有强烈的抑制作用, 1 mmol/L 时即显示出抑制, 生长差异已达显著水平, 3 mmol/L 时根完全抑制。但其 L- 异构体在 7 mmol/L 浓度几乎没有抑制作用, 二者相比, 对生长影响的差异十分明显。丝氨酸的 L- 和 D- 异构体都具有抑制作用, 但 D- 异构体的抑制作用要强的多。这说明这些 D- 氨基酸在植物中确有特殊的生理作用。

关于 D- 氨基酸抑制植物生长的机制, 目前人们对其认识尚少。Oskar 等^[7] 的研究认为, 在植物中, L- 氨基酸的消耗途径有 2 个, 一个是进入蛋白质, 一个是与糖转换。L- 丙氨酸脱氨形成丙酮酸, D- 丙氨酸的脱氨在植物中一般不能进行, 因为植物中缺乏 D- 丙氨酸氧化酶, 因此 D- 丙氨酸的积累能引起“中毒”。Oskar 等^[7] 还认为 D- 丙氨酸抑制拟南芥生长可能是蛋白质合成中 D- 丙氨酸竞争性抑制。本试验结果表明, D- 丙氨酸和 D- 丝氨酸在小麦中的抑制有反馈调节机制因素。这有 2 个理由, 一是 D- 丙氨酸和 D- 丝氨酸对植株根、叶生长抑制的发生时间 (1~ 3 d 即表现)、反应的浓度范围 (1~ 7 mmol/L)、抑制程度 (属强抑制型), 均和 L- 异构体抑制生长的氨基酸的表现一致, 如本文中的 L- 缬氨酸和 L- 蛋氨酸的抑制和 L- 缬氨酸的恢复, 该 2 种氨基酸具有反馈调节机制。L- 缬氨酸反馈调节乙酰乳酸合酶, 蛋

氨酸反馈抑制同型丝氨酸转酰胺酶(homoserine kinase), 调节胱硫醚- γ -合酶(CgS)^[9]; 二是生长抑制是可恢复的, 这是酶作用反馈抑制的一种典型表现。在结果中还看到, 恢复生长在脱离胁迫环境 1~ 2 d 后表现, 这在解除抑制, 代谢恢复, 开始细胞分裂, 表现出生长的时间顺序上也是对应的。因此我们推断, D-丙氨酸和 D-丝氨酸, 其生长抑制的作用机制与多数 L-型氨基酸一样, 存在反馈抑制原理, 处理的植株代谢失调后生长暂时停止, 脱离高浓度抑制环境后生长恢复。至于这 2 种氨基酸的抑制作用的酶学机制和作用受体, 尚在继续研究中。

对植物产生胁迫作用的因子有很多, 有生物的, 也有非生物的。近些年研究表明, 氨基酸及类似物也是植物的胁迫因子^[10]。外源 D-氨基酸抑制植物生长的现象说明部分 D-氨基酸是植物的胁迫因子。D-氨基酸在植物体内一般来说是微量的, 这种作用如果应用的好的话, 在筛选植物生长延缓剂、离体植物遗传标记等方面有重要价值。

参考文献:

[1] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学(下册)[M]. 第 3 版.

北京: 高等教育出版社, 2002: 340- 550.

- [2] 盛祖嘉. 微生物遗传学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 436- 445.
- [3] 徐云远, 贾敬芬. 苜蓿抗乙硫氨酸愈伤组织的筛选和特性[J]. 植物生理学报, 2001, 27(1): 493- 54.
- [4] 刘进平, 郑成木. 体外选择与体细胞无性系变异在抗病育种中的作用[J]. 遗传, 2002, 24(5): 617- 630.
- [5] 李友勇, 刘金枝, 陈利. 离体小麦胚胎对 10 种必需氨基酸的生长反应[J]. 生物技术, 2004, 14(5): 84- 85.
- [6] 曹必好, 雷建军. 离体筛选甘蓝抗性变异系及其生化特性研究[J]. 华北农学报, 2001, 16(2): 62- 66.
- [7] Oskar E, Magnus H, Torgny N. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plant[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(4): 455- 458.
- [8] 李友勇, 孙海丽, 罗 姍. 氨基酸 L- 和 D- 异构体对离体小麦胚植株的影响[J]. 生物技术通报, 2006(1): 73- 77.
- [9] Hese H, Kreft O, Maimann S, *et al.* Approaches towards understanding methionine biosynthesis in higher plants [J]. Amino acids, 2001(20): 281- 289.
- [10] 李友勇, 姬玉梅, 杨 靖. 丝氨酸和脯氨酸离体诱导小麦超早抽穗无性变异研究[J]. 华北农学报, 2004, 19(1): 60- 62.