

脂氧合酶在果实成熟衰老及抗伤病中的作用

Effect of Lipoxygenase in Ripening and Senescing of Fruits and Resisting Wound and Diseases

马崇坚

Ma Chongjian

(广东省韶关学院英东生物工程学院 广东韶关 512005)

(Yingdong Coll. of Bioengineering, Shaoguan Univ., Shaoguan, Guangdong, 512005, China)

摘要 脂氧合酶(LOX)能催化多元不饱和脂肪酸发生过氧化作用。LOX对果实细胞的衰老有促进作用,能加速植物果实的成熟和组织的衰老进程。LOX能使植物在受到伤害及病虫害时构建起防御体系,抵御侵染。

关键词 脂氧合酶 果实成熟与衰老 伤病抵抗

中图分类号 Q554

Abstract Lipoxygenase could catalyzed polyunsaturated fatty acid (PUFA) oxygenation, which could promote the senescing of organizations and fruits, and accelerate the process of the ripening of fruits and senescing of organization. LOX would drive the recovery systems to resist the invasion of the wound and diseases.

Key words Lipoxygenase, ripening and senescing of fruit, resisting wound and diseases

脂氧合酶(lipoxygenase, LOX),又叫脂肪氧化酶、胡萝卜素氧化酶、加氧酶或氧合酶,系统命名为linoleate: oxygen oxidoreductase,即亚油酸氧化还原酶,是一种含非血红素铁的蛋白质,专一催化具有顺,顺1,4-二戊烯结构的多元不饱和脂肪酸加氧反应,生成具有共轭双键的过氧化氢物。植物中普遍存在LOX,但不同植物或同一植物的不同器官间存在差异,如成熟果实中的LOX含量高于未成熟果实的;随着叶的发育LOX活力呈下降趋势^[1,2]。LOX的活性中心为色氨酸残基,还有少数LOX以酪氨酸、天冬氨酸或巯基为活性中心^[1]。LOX发生作用的常见基质为亚油酸、甲基亚油酸、亚麻酸及花生四烯酸等游离的多元不饱和脂肪酸,几乎所有的LOX都是抗氰化物^[1]。近年来众多研究表明,LOX在植物生长发育、成熟衰老及抵御机械创伤和病虫害侵染等胁迫过程中起重要的作用,被认为是引起有机体衰老的一类重要的酶^[1]。本文就LOX的一些生理功能及其与一些成熟衰老相关因子的关系进行综述,为进一步认识LOX在促进果实成熟衰老和抗病虫及伤害胁迫中所起的作用提供参考。

1 LOX与脂质过氧化作用

LOX多以游离脂肪酸为底物,有些LOX可以直接攻击磷脂或生物膜^[1]。LOX-Fe³⁺与底物结合,催化脱除C11亚甲基上的氢原子,经重排反应产生C13或C9脂肪酸自由基,同时LOX-Fe³⁺被还原形成LOX-脂肪酸复合物,随后与O₂反应生成脂质过氧自由基。这些脂质过氧化物和自由基会进一步毒害细胞膜系统,导致细胞膜功能丧失和细胞降解死亡^[3]。而细胞膜完整性和功能的丧失是植物组织开始衰老的基本特征。LOX及其氧化物可能直接参与了植物组织的衰老过程^[3]。LOX启动植物组织膜脂过氧化作用,促使合成蛋白质的酶失活,抑制叶绿体的光化学活性以及加速膜的降解。同时,脂质过氧化过程产生的自由基也加剧了细胞膜的降解,加速组织的衰老。通过施加自由基链反应的抗氧化剂可抑制豌豆叶绿体LOX活性,可见LOX在叶片衰老过程中参与了叶绿体膜结构和功能的改变^[4]。LOX以其Fe³⁺氧化态参与催化氧化过程,它可以自我活化,被其催化产生的脂质过氧化物活化或氧化,但当脂质过氧化物积累过多时,即会导致其自身毁坏^[3]。

2 LOX与成熟衰老相关因子

乙烯(ethylene, ETH)在促进果实成熟和器官衰老

过程中发挥着重要作用,人为调节乙烯的合成可以调控果实的成熟进程。植物组织把 1-氨基环丙烷羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)转变为乙烯完全依赖于 O₂,而乙烯的合成有自由基和过氧化物的参与,这通过自由基清除剂没食子酸丙酯或 LOX 抑制剂的处理可以减少乙烯的生成,而加入 LOX 或 LOX 的底物都可以促进乙烯的生成^[1,2]。在某些胁迫条件下,LOX 能取代 ACC 氧化酶将 ACC 转化为乙烯,这个发现丰富了乙烯生物合成的理论,为探索控制果实成熟衰老机制提供了理论依据。

脱落酸(abscisic acid, ABA)和茉莉酸(jasmonic acid, JA)对植物组织衰老的促进作用越来越被肯定。茉莉酸类物质(jasmonates, JAs)对植物衰老具有强烈的促进作用,它能促使植物呼吸放慢,叶绿素降解,气孔关闭,叶片脱落,并还伴随其它反应,如核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(RubpCase)降解,并阻碍其生物合成,促进蛋白(水解)酶、过氧化物酶的活性等^[610]。Nojavan-Asghari 等^[7]报道, JAs 可刺激番茄、马铃薯细胞及橄榄叶片等的乙烯合成。许文平等^[11]研究亦发现 LOX 及 JA 对乙烯的生物合成有强烈的促进作用。而 LOX 是 JA 合成步骤中的关键酶,它以亚麻酸或亚油酸为前体物,经一系列反应后生成 JA^[10]。有研究报道 LOX 参与试管马铃薯的形成、膨大与成熟,其作用模式可能是通过改变 JA 含量来起作用^[12]。可见 LOX 在植物组织衰老过程中可能发挥着重要的作用^[2,3,12,13]。有试验表明 ABA 含量的增加将会促进果实的成熟与植株的衰老,它可能是通过直接促进水解酶活性增加或促进乙烯的合成来间接地对果实成熟衰老发挥作用。Beaudoin 等^[14]报道若抑制 ABA 的合成则会导致乙烯生成量下降,果实成熟延后。而外源施加 ABA 可以提高乙烯的生成量^[14,15]。Nojavan-Asghari 等^[7]的试验表明, LOX 能参与 ABA 的生物合成,它可催化紫黄质形成黄质醛,而后者为新黄质或紫黄质向 ABA 转化的中间体。通过 LOX 抑制剂的作用可减少 JA 的生物合成,同时显著减少 ABA 的积累。外源施加 JA 及 ABA 都能诱导 LOX 基因表达,并能提高 LOX 的活性^[1,7,10]。

陈昆松等^[16]报道,在失水激活的苹果根系 LOX 活性变化与 ABA 的累积过程一致, LOX 抑制失水诱导的 ABA 积累。外源大豆 LOX 能增加 ABA 含量^[17]。ATP 提高了粗提液 LOX 活性,蛋白激酶抑制剂抑制 LOX 活性,磷酸酯酶抑制剂对 LOX 活性有促进作用^[15]。纯化的大豆 LOX 和苹果 LOX,使根系蛋白激酶活性升高,作用类似蛋白激酶的底物^[17]。失水引起活性氧早期升高,外源 H₂O₂ 诱发 ABA 积累,

提高 LOX 和蛋白激酶活性及细胞内钙离子浓度,抗氧化剂就减弱失水对 ABA 的诱导。比如,Creelman 等^[15]报道,失水处理 15min 使根系蛋白激酶和磷酸酶活性升高,40min 后 ABA 快速积累;³²P_i 活体标记后再失水处理 15min 后,³²P_i 标记的产物高于对照,蛋白激酶抑制剂削弱失水处理下 ABA 的积累。这是阴离子通道抑制剂和钙离子螯合剂及其通道拮抗剂降低了失水对蛋白激酶和 LOX 活性及 ABA 的诱导^[6,14,15]。

3 LOX 与果实成熟衰老

LOX 的活性变化与果实的成熟衰老关系密切。LOX 活性上升,导致果实内花青素积累增多,而叶绿素则大量降解^[1,3]。LOX 对生物膜结构的破坏被认为可能是导致果实软化的因素之一, LOX 的不同的同工酶参与了果实成熟衰老过程中香气的合成^[2]。陈昆松等^[16]研究发现猕猴桃果实后熟进程中的硬度与 LOX 活性变化呈显著负相关($r = -0.8788$)。通过低温处理可显著抑制 LOX 活性,并减少乙烯生成,延缓果实的衰老^[16,17]。罗云波^[18]对番茄果实的成熟过程进行研究,结果是外源 LOX 处理明显增加果实组织的渗透率,加速了成熟衰老的进程。Droillard 等^[19]研究发现番茄果实采收后初期 LOX 活性增加并导致了果实成熟的启动, LOX 启动的膜脂过氧化作用与果实软化的启动有关, LOX 的自我活化能促进果实的快速软化,而外源乙烯处理则可以促进番茄果实 LOX 活性增加。

罗云波等^[20]以普通丽春番茄和转反义 ACC 合成酶(ACS)基因的乙烯合成缺陷型番茄为材料的研究发现,外源乙烯能够促进果实组织切片和整个果实的 LOX 活性显著提高,乙烯参与了 LOX 的活性调节,但外源乙烯对 LOX 的提取液没有作用,说明乙烯需要存在于果实中的中间环节。罗云波等^[18,20]还研究发现 LOX 促进乙烯生物释放量增加,是通过其与多元不饱和脂肪酸作用的产物—脂质过氧化自由基参与乙烯合成途径中 ACC 到乙烯的转化。LOX 参与细胞膜的分解和果实的硬度有密切的相关性,转基因番茄果实较低的 LOX 活性对保持果实硬度有益。超微透射电镜观察结果^[20]表明, LOX 对果实细胞的衰老有促进作用,而转反义 ACS 番茄表现出较强的抗衰老能力。

4 LOX 基因在成熟衰老与抵抗伤害和病虫害中的作用

对于 LOX 基因的研究近年来取得了可喜的进

展,已经分别从许多植物包括大部分农作物中克隆到了LOX基因,并发现其为一个基因家族^[19]。但有关LOX基因在果实成熟衰老过程中的功能研究报道不多,多为与伤害及与病虫害侵染防御相关的研究报道。Ferrie等^[21]从番茄果实中克隆到tomloxA和tomloxB基因,Heitz等^[22]从叶片中克隆到tomloxC和tomloxD基因。tomloxA只在种子和成熟果实中表达,tomloxB只在果实中表达,tomloxC只在成熟果实的转色期和红熟期表达,tomloxD在叶片、花瓣及雌性器官中都有表达^[22]。LOX主要存在于叶绿体片层膜上或线粒体中^[1]。将LOX基因导入植株后,LOX活性被广泛抑制^[22]。在拟南芥的转反义LOX-2基因植株中,LOX基因表达受到抑制,JA合成受到阻碍^[23]。Dubbs等^[24,25]从大豆中克隆到VLXA基因、VLXB基因、VLXC基因及VLXD基因,其中VLXD为VLX蛋白的主要类型,它主要存在于内果皮中间层中,其活性较低,主要起着贮藏蛋白的作用;其它3个基因主要分布在中果皮内,活性较高;4个基因的产物占大豆植株可溶性蛋白的12%左右。

植物受到伤害和病虫害侵害时,LOX活性和代谢产物剧增,氢过氧化物、氧化自由基及挥发性醛类化合物都不利于病虫生长,能够促进伤口愈合,也能抵御微生物的侵染,表现为抗病植株的LOX活性较敏感植株的高得多^[1]。Royo等^[26]从马铃薯中克隆到与伤害相关的LOX1基因、LOX2基因和LOX3基因,他们发现这3个基因的表达也具有特异性,LOX1多在块茎中表达,利用在块茎膜脂中丰富的亚油酸作底物,而其它2个基因则利用叶片中普遍存在的亚麻酸作底物。在伤害处理30min后即能检测到LOX3基因大量转录。Rusćrucci等^[5]研究指出在用隐性病毒激发处理烟草叶片腐烂的过程中,大量的游离寡聚脂肪酸发生了依赖于LOX的过氧化过程,在这个过程中伴随着LOX活性提高,出现了LOX转录产物的短暂积累。抑制或激活LOX途径可以抑制或激活细胞死亡,说明脂肪酸的过氧化作用能够模拟叶片腐烂的症状。Kolomiets等^[13]从马铃薯中克隆到了POTLX-1基因和POTLX-2基因,发现它们间的同源性高达96%,并且它们的转录只在根和发育着的块茎中被检测到。Göbel等^[4]用晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)的抽取物处理马铃薯的培养细胞时,发现stlox1、stlox3基因大量表达,并且LOX活性大幅度提高,同时使一些与抵御病虫害相关的基因表达量大大增加。可见LOX可能在伤害及病虫害防御中扮演着重要的角色,它本身可能是通过其作用的产物如茉莉酸的信号作用,使植物体构建起防御体

系^[1,6,7,10,22,23,26]。

5 结束语

目前对于LOX生理生化特性的研究较多,而在其作用机理特别是分子生物学方面的研究严重滞后。要对其各方面的功能作详尽而又合理的解释,尤其是对其在调控成熟衰老方面的作用机理作准确的述说还需对LOX的作用机理作更深入的研究。在今后的研究中,应用分子生物学技术对LOX在调控果实成熟及组织衰老方面的作用途径作针对性的研究将显得更为必要。

参考文献

- 1 Siedow J N. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, 1: 101109.
- 2 Todd J F, Paliyath G, Thompson J E. Characteristics of a membrane-associated lipoxygenase in tomato fruit. *Plant Physiol*, 1990, 94: 12251232.
- 3 Paliyath G, Droillard M J. The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiol Biochem*, 1992, 30: 789812.
- 4 Göbel C G, Feussner I, Schmidt A, et al. Profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J Bio Chem*, 2001, 9: 62676273.
- 5 Rusćrucci C, Montillet J L, Agnel J P, et al. Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogam on tobacco leaves. *J Biol Chem*, 1999, 51: 3644636455.
- 6 Rickauer M, Brodschelm W, Bottin A, et al. The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. *Planta*, 1997, 202: 155162.
- 7 Nojavan-Asghani M, Ishizawa. Inhibitory effects of methyl jasmonate on the germination and ethylene production in Cocklebur seeds. *J Plant Growth Regul*, 1998, 17: 1318.
- 8 Penninckx I A M A, Thomma B P H J, Buchala A, et al. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1998, 10: 21032113.
- 9 陈昆松, 张上隆. 脂氧合酶与果实的成熟衰老——文献综述. *园艺学报*, 1998, 4: 338344.
- 10 马崇坚, 柳俊, 谢从华. 茉莉酸类物质的功能与胁迫防御. *华中农业大学学报*, 2001, 6: 603608.
- 11 许文平, 陈昆松, 李方. 脂氧合酶、茉莉酸和水杨酸对猕猴桃果实后熟软化进程中乙烯生物合成的调控. *植物生理学报*, 2000, 6: 507514.
- 12 马崇坚, 柳俊, 谢从华. 抑制脂氧合酶对马铃薯块茎形成及膨大的影响. *园艺学报*, 2003, 3: 291295.
- 13 Kolomiets K V, Hannapel D J, Gladon R J. Potato

- lipoxygenase genes expressed during the early stages of tuberization. *Plant Physiol*, 1996, 112: 446450.
- 14 Beaudoin N, Serizet C, Gosti F O, et al. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *The Plant Cell* 2000 12: 11031115.
 - 15 Creelman R A, Bell R A, Mullet J E. Involvement of a lipoxygenase-like enzyme in abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol*, 1992 99: 12581260.
 - 16 陈昆松, 张上隆, 吕均良. 脱落酸、吲哚乙酸和乙烯在猕猴桃果实后熟软化进程中的变化. *中国农业科学*, 1997, 2: 5457.
 - 17 陈昆松, 李方, 张上隆, 等. ABA 和 IAA 对猕猴桃果实成熟进程的调控. *园艺学报*, 1999, 2: 8186.
 - 18 罗云波. 脂氧合酶与番茄采后成熟的关系. *园艺学报*, 1994, 4: 357360.
 - 19 Droillard M J, Rouet-Mayer M A, Bureau J M, et al. Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp. *Plant Physiol*, 1993 103: 12111219.
 - 20 罗云波, 生吉萍, 李钰. 番茄脂肪氧合酶与乙烯释放的关系. *园艺学报*, 1999, 1: 2832.
 - 21 Ferrie B J, Beaudoin N, Burkhardt B, et al. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol*, 1994, 106: 109118.
 - 22 Heitz T, Bergey D R, Ryan C A. Wounding, systemin, and methyl jasmonate transiently induce a gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves. *Plant Physiol*, 1997, 114: 10851093.
 - 23 Bell E, Creelman R A, Mullet J E. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 86758679.
 - 24 Dubbs W E, Grimes H D. Specific lipoxygenase isoforms accumulate in distinct regions of soybean pod walls and mark a unique cell layer. *Plant Physiology*, 2000, 123: 12691279.
 - 25 Dubbs W E, Grimes H D. The mid-pericarp cell layer in soybean pod walls is a multicellular compartment enriched in specific lipoxygenase isoforms. *Plant Physiology*, 2000, 123: 12811288.
 - 26 Royo J, Vancanneyt G, Perex A G, et al. Characterization of three potato lipoxygenase with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J Biol Chem*, 1996 271: 2101221019.

(责任编辑: 邓大玉 韦廷宗)

(上接第 346 页 Continue from page 346)

- 2 El-D A M S, Salama A, Wareing P F. Effects of mineral nutrition on endogenous cytokinins in plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *J Exp Bot*, 1979, 30(118): 971981.
- 3 Thorsteinsson B, L Eliasson. Growth retardation induced by nutritional deficiency or abscisic acid in *Lemna gibba*: the relationship of growth ratio and endogenous cytokinins content. *Plant Growth Regulation*, 1990, 9: 171181.
- 4 刘厚诚, 邝炎华. 不同长豇豆品种幼苗缺磷胁迫下的生长反应研究. 见: 中国农学会(编). 中国青年农业科学学术年报. 北京: 中国农业出版社, 1999. 913917.
- 5 Wu S R, Chen W F, Zhou X. Enzyme linked immunosorbent assay for endogenous plant hormones. *Plant Physiology Communications*, 1988, (5): 53~57.
- 6 Liu H C, Kuang Y H, Chen R Y, et al. Studies on seedling growth of different asparagus bean cultivars under P-deficiency stress. *Journal of South China Agricultural University*, 1999, 20(suppl): 611.
- 7 李宗霆, 周 燮. 植物激素及其免疫检测技术. 南京: 江苏科学技术出版社, 1996. 124~132, 176~196.
- 8 陆定志, 傅家瑞, 宋松泉. 植物衰老及其调控. 北京: 中国农业出版社, 1997, 171~173.
- 9 Gniazdowska A, Krawczak A, Mikulska M, et al. Low phosphate nutrition alters bean plants' ability to assimilate and translocate nitrate. *Journal of Plant Nutrition*, 1999, 22(3): 551563.
- 10 Liu H C, Kuang Y H, Chen R Y. Changes of IAA contents in different asparagus bean cultivars under phosphorus-deficiency stress. *Plant Physiology Communications* 2003 39: 125127.
- 11 Horgan J M, Wareing P F. Cytokinins and the growth response of seedlings of *Beyula pendulatha* and *Acer pseudoplatanus* L. to nitrogen and phosphorus deficiency. *J of Expt Bot*, 1980 31: 525-532.

(责任编辑: 邓大玉 韦廷宗)