

引用格式:

曾祥如, 姜依何, 任春梅. 色氨酸对拟南芥酪氨酸降解途径缺陷突变体 *sscd1* 细胞死亡的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(4): 424–428.

ZENG X R, JIANG Y H, REN C M. Effect of tryptophan on cell death of *Arabidopsis thaliana* tyrosine degradation pathway defective mutant *sscd1*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(4): 424–428.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 色氨酸对拟南芥酪氨酸降解途径缺陷突变体 *sscd1* 细胞死亡的影响

曾祥如<sup>1</sup>, 姜依何<sup>1</sup>, 任春梅<sup>1,2\*</sup>

(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:** 为了解色氨酸处理是否影响 *sscd1* 的细胞死亡, 以拟南芥野生型 Columbia(Col-0)和 *sscd1* 突变体为试验材料, 用色氨酸处理, 观察并统计幼苗的死亡情况, 检测叶绿素含量, 分析酪氨酸降解途径基因 *HGO*、*MAAI* 和 *SSCD1* 以及活性氧诱导基因 *BAP1*、*OXII*、*ZP* 的表达。结果表明: 色氨酸处理能明显抑制 *sscd1* 突变体幼苗死亡, 增加叶绿素的合成, 抑制 *sscd1* 突变体中酪氨酸降解途径基因 *HGO* 和 *MAAI* 以及活性氧诱导基因 *BAP1*、*OXII*、*ZP* 的上调。推测色氨酸可能通过增加叶绿素的生物合成, 减少活性氧的产生来抑制酪氨酸降解途径突变体 *sscd1* 的细胞死亡。

**关键词:** 拟南芥; 色氨酸; 叶绿素; *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(2021)04–0424–05

## Effect of tryptophan on cell death of *Arabidopsis thaliana* tyrosine degradation pathway defective mutant *sscd1*

ZENG Xiangru<sup>1</sup>, JIANG Yihe<sup>1</sup>, REN Chunmei<sup>1,2\*</sup>

(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:** To understand whether tryptophan treatment affects the cell death of *sscd1*, we treated *Arabidopsis thaliana* wild type Columbia(Col-0) and tyrosine degradation pathway defect *sscd1* mutant with tryptophan. We observed the phenotypes of seedlings, detected chlorophyll content and analyzed the expression of tyrosine degradation pathway genes and reactive oxygen species(ROS) inducible genes. The results showed that tryptophan treatment could significantly inhibit the death of *sscd1* mutant seedlings, increase chlorophyll biosynthesis, and inhibit the up-regulation of tyrosine degradation pathway genes *HGO*, *MAAI* and ROS inducible genes *BAP1*, *OXII* and *ZP* in *sscd1* mutant. This results indicated that tryptophan might inhibit cell death of the *sscd1* mutant by increasing chlorophyll biosynthesis and reducing the production of ROS.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*; tryptophan; chlorophyll; *sscd1* mutant; tyrosine degradation pathway

收稿日期: 2020–09–21

修回日期: 2020–11–29

基金项目: 国家“973”计划前期研究专项(2014CB160308)

作者简介: 曾祥如(1996—), 女, 新疆玛纳斯人, 硕士研究生, 主要从事植物分子遗传学研究, 1719809744@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

酪氨酸降解途径分为5步,首先酪氨酸经酪氨酸氨基转移酶和对羟基苯丙酮酸双氧化酶的催化生成尿黑酸,然后依次在尿黑酸 1,2-双加氧酶(homogentisate 1,2-dioxygenase, HGO)、马来酰乙酰胺乙酸异构酶(maleylacetoacetate isomerase, MAAI)、延胡索酰乙酰胺乙酸酶(fumarylacetoacetate hydrolase, FAH)的作用下形成延胡索酸和乙酰乙酸,最后进入三羧酸循环彻底分解<sup>[1-2]</sup>。

*SSCD1* 基因编码催化酪氨酸降解途径最后一步的酶—FAH<sup>[3]</sup>。动物中 FAH 缺失导致酪氨酸降解途径的中间代谢产物马来酰乙酰胺乙酸和延胡索酰乙酰胺乙酸的积累,产生有毒的异常代谢产物—琥珀酰丙酮<sup>[1]</sup>。血红素生物合成途径中,琥珀酰丙酮是 $\delta$ -氨基酮戊酸脱水酶( $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase, ALAD)的抑制剂,而琥珀酰丙酮的积累造成血红素合成受到抑制,从而引起 I 型遗传性酪氨酸血症,导致肝脏损害<sup>[4-5]</sup>。在拟南芥中,编码 FAH 的 *SSCD1* 基因突变后引起短日照下琥珀酰丙酮累积和细胞死亡<sup>[3,6]</sup>。植物中叶绿素的合成和动物中血红素的合成具有共同前体物质  $\delta$ -氨基酮戊酸( $\delta$ -aminolevulinic acid, ALA)<sup>[7-8]</sup>。ZHI 等<sup>[9]</sup>研究发现, *sscd1* 突变体的死亡是由于琥珀酰丙酮的积累影响了叶绿素正常合成,诱导活性氧大量产生,从而诱发细胞死亡。

色氨酸是具有多方面生理生化功能的芳香族氨基酸<sup>[10]</sup>,不仅能参与动物体内蛋白质的合成,还有助于烟酸及血红素的合成<sup>[11]</sup>。温燕梅<sup>[12]</sup>研究发现,色氨酸能够改善由甲氨蝶呤引起的大鼠肠道损伤,提高组织抗氧化能力并调节机体代谢。植物中,外源添加色氨酸能提高香菇受热胁迫后菌丝的恢复能力<sup>[13]</sup>;能促进小麦生长,提高它的抗氧化酶活性和光合特性<sup>[14]</sup>。为了解色氨酸处理是否能通过增加酪氨酸降解途径突变体 *sscd1* 的抗氧化能力来抑制细胞死亡,本试验以拟南芥野生型(Col-0)为对照材料, *sscd1* 突变体为试验材料,用色氨酸处理后对叶绿素含量进行检测,通过 RT-qPCR,分析酪氨酸降解途径关键基因及活性氧特异诱导基因的表达。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型 Columbia

(Col-0)由作物基因工程湖南省重点实验室植物信号转导课题组提供; *sscd1* 突变体由 HAN 等<sup>[3]</sup>分离。

### 1.2 主要试剂与仪器

色氨酸;丙酮(80%);种子消毒液(20% bleach + 0.1% Triton X-100);人工气候箱(PRX-450B, 温度(22 ± 2) °C,光照强度 80 ~ 120  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,相对湿度 65%);荧光定量 PCR 仪(Bio-RAD CFX connect<sup>TM</sup> optics Module);紫外分光光度计(UV-1700)。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 拟南芥的培养

表型观察材料的培养:消毒液浸泡拟南芥 Col-0 及 *sscd1* 突变体种子 10 min,用无菌水漂洗 2~3 遍后,分别铺种于含不同浓度(0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L)色氨酸的 MS(1% 蔗糖)固体培养基上,4 °C 春化 3 d,短日照下生长 6 d 后观察拍照,并统计幼苗死亡率。

酪氨酸降解途径基因表达材料的培养:野生型 Col-0 和 *sscd1* 突变体种子灭菌后铺种在 MS(1%蔗糖)培养基上,4 °C 春化 3 d,长日照下培养 7 d 后转入短日照培养 2 d(每日喷洒 2.0 mmol/L 色氨酸),第 3 天光照 4 h 后收取材料。

叶绿素含量及活性氧诱导基因表达量检测材料的培养:野生型 Col-0 和 *sscd1* 突变体种子灭菌后铺种在含 2.0 mmol/L 色氨酸的 MS(1%蔗糖)培养基上,4 °C 春化 3 d,短日照下培养 5 d,第 6 天光照 2 h 后收取材料。

#### 1.3.2 叶绿素相对含量的测定

采用丙酮法对拟南芥幼苗中叶绿素的含量进行测定<sup>[15]</sup>。随机取未经色氨酸处理与色氨酸处理后的材料各 0.05 g,吸干样品上的水分,液氮研磨后置于装有 1 mL 丙酮(80%)的离心管中,4 °C 黑暗 24 h,采用紫外分光光度计检测样品在 663 nm 和 645 nm 的吸光值。根据公式分别计算叶绿素 a 和叶绿素 b 浓度,相加即为叶绿素总浓度,再除以材料鲜质量即得每克叶绿素含量<sup>[16]</sup>。3 次重复,误差用 SE 表示。

#### 1.3.3 RNA 的提取与 RT-qPCR 分析

随机选取新鲜叶片 0.1 g,采用 Trizol 法提取材料总 RNA。采用荧光定量试剂盒(罗氏 SYBR qPCR

Mix)进行RT-qPCR。以两步法程序<sup>[17]</sup>在荧光定量PCR仪(Bio-RAD CFX connect<sup>TM</sup> optics Module)上完成测序,引物序列见表1<sup>[18]</sup>,以ACTIN2为内参。3次生物学重复。

表1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR	
基因名称	引物序列(5'-3')
ACTIN2	F AGCACTTGCACCAAGCAGCATG
	R ACGATTCTGGACCTGCCTCATC
HGO	F GGAGATTGATTTTCGTGTGATGGGTT
	R GCGGAGTCTTTCATTCCTGTGTGA
MAAI	F GCTGGACTCTGCTACTGCGA
	R AGGGCGATACGGACACGATG
SSCD1	F GACTCGCACTTCCTATCCAG
	R GACCATCGAAAAGCCCAGCT
BAP1	F ATCGGATCCCACCAGAGATTACGG
	R AATCTCGGCCTCCACAAACCAG
OXII	F GTTGAGGAAATCAAGGGTCATG
	R TGGACGATATTCTCCACATCC
ZP	F TACGAAGGAAAGAACGGAGGC
	R GGTATCGGCGGTATGTTGAGG

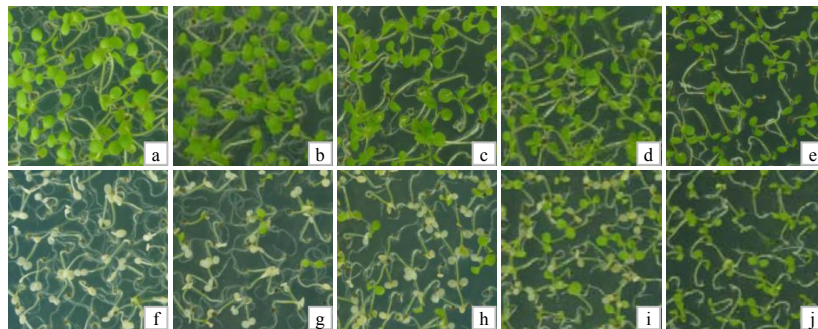
### 1.3.4 数据分析

基因表达数据在 Excel 中用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行分析。运用 T-test 评估数据间的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 色氨酸处理对 *sscd1* 突变体幼苗生长的影响

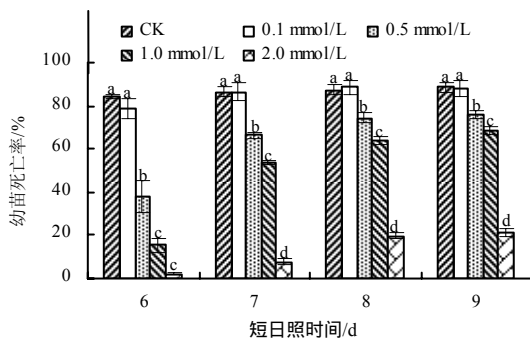
从图1可以看出,随着浓度的升高,拟南芥野生型的幼苗生长受到明显抑制,叶片逐渐变小,茎部及根部逐渐变短;2.0 mmol/L色氨酸处理后的 *sscd1* 幼苗几乎没有根,浮于培养基表面; *sscd1* 突变体的萎蔫白化随浓度升高逐渐减少。叶片全部白化表示细胞完全死亡<sup>[19]</sup>。从第6天开始,CK及仅添加0.1 mmol/L色氨酸的处理, *sscd1* 突变体幼苗出现明显死亡现象;添加0.5、1.0 mmol/L色氨酸时,幼苗死亡现象受到明显抑制;在添加2.0 mmol/L色氨酸处理下, *sscd1* 突变体与野生型Col-0表型无明显差异。随短日照处理时间的增长(图2),同浓度色氨酸处理后的幼苗死亡率有所增加;但与对照相比,当色氨酸浓度为0.5、1.0、2.0 mmol/L时,幼苗的死亡率显著降低,尤其是2.0 mmol/L色氨酸处理后,幼苗死亡率降低更加明显。说明色氨酸能够抑制 *sscd1* 突变体的细胞死亡。



a、b、c、d、e 分别为色氨酸浓度为 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 分别为色氨酸浓度为 0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L 时拟南芥突变体 *sscd1* 的表型。

图1 色氨酸处理后拟南芥野生型和 *sscd1* 突变体幼苗第6天的表型

Fig.1 Phenotypes of seedlings of *Arabidopsis thaliana* wild type Columbia and *sscd1* mutant treated with tryptophan at day 6



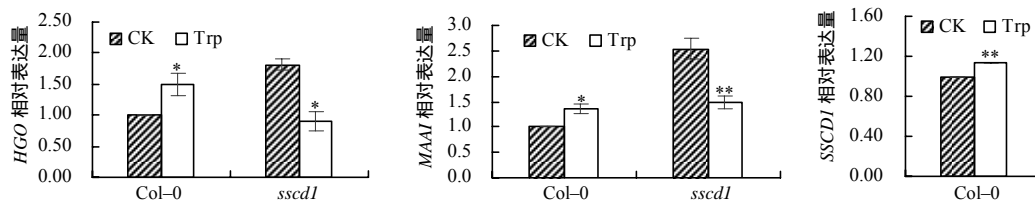
不同小写字母表示同一时段各处理差异显著( $P < 0.05$ )。

图2 不同浓度色氨酸处理下 *sscd1* 突变体幼苗的死亡率

Fig.2 The death rate of *sscd1* mutant seedlings treated with different concentrations of tryptophan

### 2.2 色氨酸处理对酪氨酸降解途径 HGO、MAAI 和 SSCD1 基因表达的影响

为了解色氨酸对酪氨酸降解途径的影响,对该途径关键基因 *HGO*、*MAAI* 和 *SSCD1* 的表达情况进行分析。从图3可以看出,野生型拟南芥经色氨酸处理后, *HGO*、*MAAI* 和 *SSCD1* 的表达量均明显增加,与未处理材料相比差异显著;而突变体中, *HGO* 和 *MAAI* 的表达均明显下调,约为未处理材料的一半,说明在 *sscd1* 突变体中,色氨酸处理能抑制 *HGO* 和 *MAAI* 的上调。



“\*”表示差异显著( $P < 0.05$ )；“\*\*”表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 3 色氨酸处理后酪氨酸降解途径基因 *HGO*、*MAAI* 和 *SSCD1* 的表达

Fig.3 The expression of the tyrosine degradation pathway genes *HGO*, *MAAI* and *SSCD1* after tryptophan treated

### 2.3 色氨酸处理对叶绿素含量的影响

为探究色氨酸是否通过影响叶绿素的生物合成抑制 *sscd1* 突变体的细胞死亡,对拟南芥野生型(Col-0)和 *sscd1* 突变体叶绿素含量进行测定。从图 4

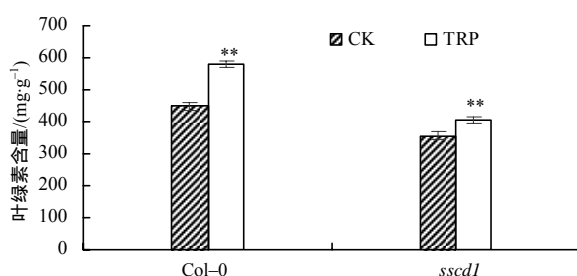
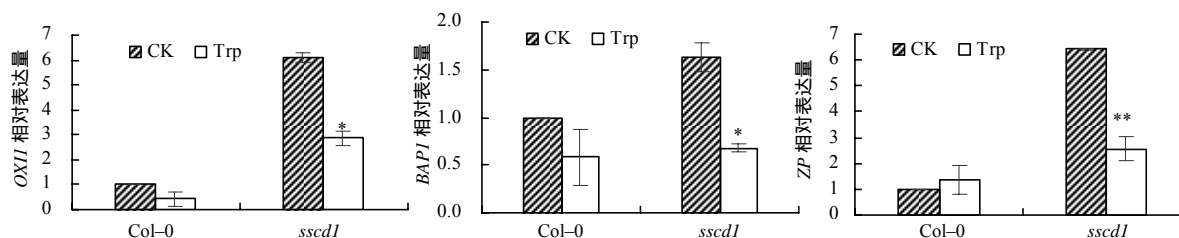


图 4 色氨酸处理后拟南芥野生型和 *sscd1* 突变体短日照 5 d 的叶绿素含量

Fig.4 The chlorophyll content of *Arabidopsis thaliana* wild type Columbia and *sscd1* mutant seedlings treated with tryptophan and short sunshine for 5 days



“\*”表示差异显著( $P < 0.05$ )；“\*\*”表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 5 色氨酸处理后拟南芥野生型和 *sscd1* 中活性氧标记基因的表达

Fig.5 The expression of ROS marker genes of *Arabidopsis thaliana* wild type Columbia and *sscd1* mutant treated with tryptophan

## 3 结论与讨论

在 *sscd1* 突变体中,由于 FAH 的缺失,阻断了酪氨酸降解,产生酪氨酸降解途径的异常代谢产物琥珀酰丙酮。琥珀酰丙酮对生物细胞组织有毒害作用,从而导致 *sscd1* 突变体的细胞死亡<sup>[3]</sup>。ZHOU 等<sup>[6]</sup>研究发现, *sscd1* 突变体的细胞死亡与琥珀酰丙酮的积累呈正相关。ZHI 等<sup>[20]</sup>研究发现, *sscd1* 突变体的细胞死亡会伴随着酪氨酸降解途径基因 *HGO* 和 *MAAI* 的表达上调,而且其死亡程度与该 2 个基因的表达上调呈正相关。说明 *HGO* 和 *MAAI* 表达上调与

可知,未经色氨酸处理时,野生型叶绿素含量明显高于 *sscd1* 突变体;用 2.0 mmol/L 色氨酸处理后的野生型与 *sscd1* 突变体的叶绿素含量与未经处理的相比均有极显著差异( $P < 0.01$ ),说明色氨酸处理能增加拟南芥叶绿素的生物合成。

### 2.4 色氨酸处理对活性氧诱导基因的影响

从图 5 可以看出,未经色氨酸处理时, *sscd1* 突变体中 *OXII*、*BAP1* 及 *ZP* 的相对表达量都明显高于野生型的;色氨酸处理后, *OXII* 和 *BAP1* 的相对表达量在野生型中略有降低, *ZP* 的相对表达量略有上升,但差异均不显著;色氨酸处理后的 *sscd1* 突变体中 *OXII*、*BAP1* 及 *ZP* 的相对表达量均显著下降,说明色氨酸处理能抑制 *sscd1* 突变体中活性氧诱导基因的上调,减少活性氧的产生。

琥珀酰丙酮的积累呈正相关。本研究中,外源添加色氨酸明显抑制了 *sscd1* 突变体幼苗死亡;在 *sscd1* 突变体中,色氨酸处理后 *HGO* 和 *MAAI* 表达与未处理的相比都显著下降。说明色氨酸的处理减少了琥珀酰丙酮的积累,从而抑制细胞死亡。

在植物中,琥珀酰丙酮与叶绿素合成前体 ALA 具有类似结构<sup>[4-5]</sup>。ZHI 等<sup>[9]</sup>研究发现,琥珀酰丙酮能够竞争性抑制 ALAD 活性,导致叶绿素合成减少,降低在短日照下光照-黑暗转换过程中叶绿素合成途径的反馈抑制,造成 *sscd1* 突变体中在黑暗下过度积累原叶绿素酸酯(protochlorophyllide, Pchlde),当

再次光照时诱导产生大量的活性氧,从而导致细胞死亡。本研究发现,色氨酸处理后,野生型和突变体的叶绿素含量均有明显升高,说明色氨酸能促进叶绿素的生物合成。*OXII* 是活性氧特异诱导表达的标记基因,当植物中产生大量活性氧时,*OXII* 的表达会迅速上调。单线态氧是活性氧的一种,*BAP1* 和 *ZP* 是单线态氧特异诱导表达基因。黑暗中过量累积的 Pchl<sub>ide</sub> 在进入光照时会立即产生单线态氧,上调 *BAP1* 和 *ZP* 的表达<sup>[9]</sup>。本研究中,色氨酸处理后,*sscd1* 突变体中 *OXII*、*BAP1* 和 *ZP* 的上调受到明显抑制,推测可能是添加色氨酸后促进了叶绿素的生物合成,增加了 *sscd1* 突变体在短日照下光照-黑暗转换过程中叶绿素合成途径的反馈抑制,从而减少了黑暗中 Pchl<sub>ide</sub> 的合成以及见光后活性氧的产生。

#### 参考文献:

- [1] LINDBLAD B, LINDSTEDT S, STEEN G. On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977, 74(10): 4641-4645.
- [2] DIXON D P, EDWARDS R. Enzymes of tyrosine catabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Science, 2006, 171(3): 360-366.
- [3] HAN C Y, REN C M, ZHI T T, et al. Disruption of fumarylacetoacetate hydrolase causes spontaneous cell death under short-day conditions in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2013, 162(4): 1956-1964.
- [4] SASSA S, KAPPAS A. Succinylacetone inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase and potentiates the drug and steroid induction of delta-aminolevulinic acid synthase in liver[J]. Transactions of the Association of American Physicians, 1982, 95: 42-52.
- [5] SASSA S, KAPPAS A. Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway. Profound inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity by succinylacetone[J]. The Journal of Clinical Investigation, 1983, 71(3): 625-634.
- [6] ZHOU L Z, YANG Z G, ZHI T T, et al. A GC/MS method for determination of succinylacetone in *Arabidopsis thaliana*[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(17): 4661-4667.
- [7] BATTERSBY A R. Tetrapyrroles: the pigments of life[J]. Natural Product Reports, 2000, 17(6): 507-526.
- [8] TANAKA R, YOSHIDA K, NAKAYASHIKI T, et al. Differential expression of two hemA mRNAs encoding glutamyl-tRNA reductase proteins in greening cucumber seedlings[J]. Plant Physiology, 1996, 110(4): 1223-1230.
- [9] ZHI T T, ZHOU Z, QIU B, et al. Loss of fumarylacetoacetate hydrolase causes light-dependent increases in protochlorophyllide and cell death in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2019, 98(4): 622-638.
- [10] 李剑欣, 张绪梅, 徐琪寿. 色氨酸的生理生化作用及其应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(3): 58-62.
- [11] LI J X, ZHANG X M, XU Q S. Physiological and biochemical effects of tryptophan and its application[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2005, 27(3): 58-62.
- [12] RADWANSKI E R, LAST R L. Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics[J]. The Plant Cell, 1995, 7(7): 921.
- [13] 温艳梅. 色氨酸缓解甲氨蝶呤引起的大鼠肠道损伤[D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [14] WEN Y M. Supplement of tryptophan ameliorates methotrexate-induced intestinal injury in rats[D]. Nanchang: Nanchang University, 2014.
- [15] 王晨, 罗义, 王刚正, 等. RNAi 法分析香菇色氨酸合酶基因的功能[J]. 食用菌学报, 2019, 26(4): 1-8.
- [16] WANG C, LUO Y, WANG G Z, et al. Functional analyses of tryptophan synthase gene *LetrpB* in *Lentinula edodes* by RNAi method[J]. Acta Edulis Fungi, 2019, 26(4): 1-8.
- [17] 强晓晶. 披碱草内生真菌对小麦抗旱性的影响机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- [18] QIANG X J. Mechanisms underlying the effects of endophytic fungi isolated from *Elymus dahuricus* on the drought resistance of wheat[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [19] ARNON D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in beta vulgaris[J]. Plant Physiology, 1949, 24(1): 1-15.
- [20] LICHTENTHALER H K, WELLBURN A R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents[J]. Biochemical Society Transactions, 1983, 11(5): 591-592.
- [21] 汤睿, 雷雨婷, 任春梅. 外源尿酸对拟南芥幼苗花青素生物合成的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2019, 45(1): 37-41.
- [22] TANG R, LEI Y T, REN C M. Effect of exogenous homogentisate on anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2019, 45(1): 37-41.
- [23] ZHOU Z, ZHI T T, HAN C Y, et al. Cell death resulted from loss of fumarylacetoacetate hydrolase in *Arabidopsis* is related to phytohormone jasmonate but not salicylic acid[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 13714.
- [24] 支添添, 周舟, 韩成云, 等. 台盼蓝染色鉴定拟南芥 *sd11* 突变体的细胞死亡[J]. 作物研究, 2013, 27(3): 217-218.
- [25] ZHI T T, ZHOU Z, HAN C Y, et al. Identification of cell death of *Arabidopsis thaliana* mutant *sd11* by trypan blue staining[J]. Crop Research, 2013, 27(3): 217-218.
- [26] 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.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳正