

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

水楊酸與硫代甲硫氨酸對大豆生長的影響

計畫類別：☒個別型計畫 ☐整合型計畫

計畫編號：CNAL92-07

執行期間：92 年 1 月 1 日至 92 年 12 月 31 日

計畫主持人：陳麗珠

共同主持人：

計畫參與人員：

執行單位：生活系

中華民國九十三年二月十二日

摘 要

穀胺醯胺合成酵素(Glutamine synthetase ; GS,EC 6.3.1.2)是植物體內轉換無機氮為有機氮的重要酵素，也是植物老化過程中的指標性酵素。硫代甲硫胺酸(Methionine sulphoximine ; MSO)是一種人工合成的抑制劑，其對 GS 具有抑制的作用。另一方面，當植物遭遇逆境時，體內的水楊酸 (Salicylic acid ; SA) 濃度會有升高的現象。通常，SA 被認為是植物體內一種傳遞外來刺激信號的化合物，可以預先告知植物迅速調整本身內部的生理狀態，或者誘發一些生化反應，以抵抗外在環境的變化。例如：有些研究以外加 SA 處理大麥植株的方式，已證實 SA 能夠減緩除草劑及重金屬對植物的傷害。

本研究分為先以 SA 對大豆植株作一前處理，從植物外觀、GS 活性及蛋白質合成三方面，綜合論述 SA 是否能夠減緩 MSO 對植物的傷害。

研究結果顯示，無論以單獨 MSO 處理大豆植株，或是經過 SA 前處理的大豆植株，其結果都是造成植物死亡，但是兩者細胞凋亡的模式並不相同，前者類似老化死亡，後者為似 PCD 的死亡。尤其在 SA 與 MSO 的交互作用影響下，反而使葉片的細胞結構遭受破壞加速死亡。所以，對於外加 SA 的濃度於大豆植株，是否能夠減緩 MSO 對植物所受到的傷害之假設，本研究初步結果顯示是無法成立的。

Effects of Salicylic acid and MSO on Soybean Growth and Development

Abstract

Glutamine synthetase (GS) is a key enzyme in N metabolism and it catalyses the synthesis of Glutamine (Gln) from glutamic acid, ATP, and NH_4^+ . L-Methionine sulfoximine (MSO) is a glutamate analogue, it is also the GS inhibitor. Salicylic acid (SA) is an endogenous growth regulator of phenolic. At the same time, SA can induce a protective effect on plants under stress. Convincing data have been obtained on the SA-induced in the resistance of barley seedlings to heavy metal and herbicide.

This research is divided into two parts to confer what influences on soybean treated by MSO and SA. First, we demonstrate the effects on soybean seeds treated by MSO alone according to the expression of GS gene, including GS activity and GS biosynthesis. Second, we use pre-treated SA of soybean seedlings to determine if SA could reduce the damages of plants caused by MSO.

By applying MSO to soybean seeds, there are no effects on budding of them. But the growth and development of roots and shoots are inhibited by MSO. GS activity of roots, shoots and cotyledons decrease by increasing MSO concentration. But the GS protein is not only decreased but also accumulated with increasing MSO concentration. This is may be that MSO is converted to MSO-phosphate which mimics the tetrahedral intermediate formed at the active site of GS by the reaction of an enzyme bound gamma-glutamyl phosphate with ammonia.

On the other hand, the plants that are treated by MSO alone or pre-treated SA all died. But the cell apoptosis between different treatments aren't the same. When we only applied MSO to the soybean seedlings, the plants would be senescence naturally. But when we pre-treated SA before exposure MSO, the plants senescence faster than treated MSO alone. According to the serious information, including GS activity and protein biosynthesize. Senescence of pre-treated SA soybean seedlings is similar to program cell death (PCD). We consider the soybean is damaged by MSO on GS, and we try to reduce the damage by pre-treated SA to soybean. But all the results show that can't reduce damages caused by MSO.

一、研究緣起及目的

植物體內的代謝系統維持穩定的狀態，是植物良好生長所需的要件之一。當植物生長受到空氣污染、重金屬污染、乾旱、淹水或病原菌侵害等外在環境影響時，植物體本身的狀態會為了延續生命而改變。GS是植物轉換氮源的重要酵素，GS的表現量會受到不同的作用而產生改變，例如：重金屬、除草劑、光照等。

另一方面，當植物受到外在逆境時，體內會誘發像 SA 般類似信號的分子，告知植物必須調整本身內部的狀態或者誘發一些反應，以抵抗外在環境的變化。相關實驗(Ananieva, Alexieva, & Popova, 2002; Metwally, Finkemerier, Georgi, & Dietz, 2003)證明，以 SA 做過處理的大麥植株，能夠減緩除草劑及重金屬的傷害，延緩植物的死亡。因此，本研究嘗試利用大豆植株，從植物外觀、GS 活性及蛋白質的三方面表現量，綜合論述 SA 是否能夠減緩 MSO 對植物的傷害。

二、文獻探討

(一) 穀胺醯胺合成酵素

由氮素代謝途徑來看，GS是一個重要的酵素。植物的GS分子量為300 kDa到370 kDa之間，它是由8個多胜肽次單元組合而成。在高等植物葉子的組織裡，依其所在的位置來區分，GS通常以兩種型式存在。位於細胞質的稱為GS₁，其次單元大小約為37-43 kDa；而位於葉綠體的稱為GS₂，其次單元大小約為43-45 kDa。GS₁與GS₂不但在細胞內的位置不同，其基因的表現也因不同的生長時期、器官及細胞而有所不同，但是功能卻極為相似(Lea & Ireland, 1999)。高等植物的GS大小與其四面體結構都與哺乳動物的GS類似，但是和細菌的GS不同。從結構上來說，植物和細菌的GS與ATP結合的活性位置有很大的差別(Kim & Rhee, 1988)。此外，細菌的GS由12個多胜肽次單元組成，且其每個次單元分子量約為50

kDa(Meister, 1974; Stadtman & Ginsburg, 1974)。

(二) 硫代甲硫胺酸(Methionine sulphoximine ; MSO)

硫代甲硫胺酸(3-amino-3-carboxypropylmethy-sulphoximine ; Methionine sulphoximine , MSO)是穀胺酸的相似物(圖1)。

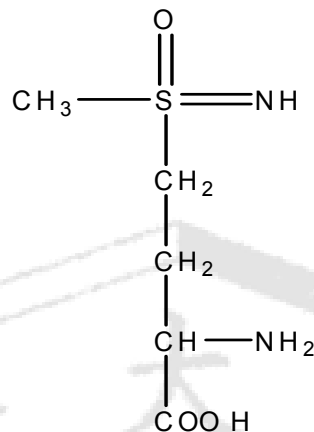


圖 1. 硫代甲硫胺酸 (Methionine sulphoximine ; MSO)

MSO最早是從氯化氮處理玉米蛋白質(zein)的產物中，所分離出的有毒物質，它會使動物發生抽筋或癲癇。另外，MSO也可以經由亮胺酸(leucine)、氨肽酶(aminopeptidase)和磷酸酶類(phosphatase)分解的三胜肽而得(Lea, 1991)。早期的研究發現(Griffith & Meister, 1978; Rowe & Meister, 1970)，MSO是一種神經毒，能夠有效的抑制動物大腦中GS的功能。經由活體實驗證實，其作用的機制為MSO轉換為磷酸化的MSO後，呈現四面體的分子形狀。而這樣的分子構造，讓MSO更能與GS結合，進而取代原本與鉍結合的活性位置。因此，在很多種類的生物中，MSO都能有效的抑制GS(Maughan & Cobbett, 2003)。

Givan(1979)認為MSO會使植物產生過量的氨，形成毒害，而抑制了CO₂的同化作用，進而影響光合作用的進行，包括光磷酸化的裂解及葉綠體的形狀改變。但是Walker *et al.*(1984)的研究結果卻反對這項說法。他們認為氨的累積對抑制光合作用的重要性並不大，應該還有其他的因素。他們分別對小麥的葉子處理了

MSO與30mM的NH₄Cl，而處理過量氨的小麥葉子之光合作用被抑制的情況並不明顯；處理MSO小麥葉子中的蘋果酸(malate)的含量減少，且絲胺酸的含量卻增加了。Walker認為蘋果酸應該是由穀胺酸與carboxylation of phosphoenolpyruvate直接合成而得的。Johansson and Larsson(1986)用*Lemna gibba*做材料，也發現過量氨對抑制光合作用的功效並不是那樣的明顯。Ikeda *et al.*(1984)對小麥葉子處理MSO，結果累積了大量的氨，但是只要外加穀胺醯胺，仍能恢復光合作用的效率。而在分離的葉綠體實驗中發現，MSO對於光合作用CO₂的同化作用速率並無直接影響(Anderson & Done, 1977; Muhitch & Fletcher, 1983)。

(三) 植物的自我防禦機制

植物受到細菌、真菌及病毒的侵害時，會產生自身的防禦機制，例如：細胞壁的加厚、形成角質層、累積病原菌蛋白 (pathogenesis-related protein ; PR protein) 及產生抗毒素 (phytoalexins) 來抵抗病原菌的侵入。而植物體內所產生的防禦機制屬非專一性；也就是說，當植物受到病原菌的感染後所引發的抵抗機制，也可以在非病原菌侵入的地方表現出來，使整個植株都具備抗性。因此，植物體內應該有一個可以移動的信號，使防禦的機制傳遞至整個植株(Pieterse & Loon, 1999)。水楊酸 (Salicylic acid ; SA) 在諸多研究中被學者專家認為，應該是植物體內傳遞信號的一種化合物。因為當植物體受到病原菌感染時，植物體內的內生SA濃度會有升高的現象。而且在利用同位素標定合成SA之前驅物benzoic acid的實驗中，可以清楚的發現SA會在病原菌接種的部位形成。此外，SA會從接種區移動到非接種部位，證實SA是具有傳遞訊息功能的信號之一(Durner, Shah, & Klessig, 1997)。

三、研究方法

略

四、結果與討論

本研究針對MSO，SA對大豆葉片內GS酵素活性、蛋白累積與基因表現的探討，所獲得的初步結論如下：

利用外加SA於大豆植株，以減緩MSO對其所造成的傷害。本研究的結果顯示，該假設無法成立。無論以單獨MSO處理大豆植株，或是經過SA前處理的大豆植株，其結果都是造成植物死亡，但是兩者的模式並不相同。前者類似老化死亡，後者較接近PCD的死亡。所以，在SA與MSO的交互作用影響下，反而使大豆植株產生PCD，細胞的結構遭受破壞而加速大豆植株的死亡。

爲了確立本實驗之結論，未來應加以探討與MSO有關的作用機制，例如：銨離子的累積、葉綠體的結構改變等等，並與SA所引發的H₂O₂氧化機制的角色，和細胞程式死亡機制轉變效應作一綜合討論，以釐清造成植物加速死亡的原因爲何。

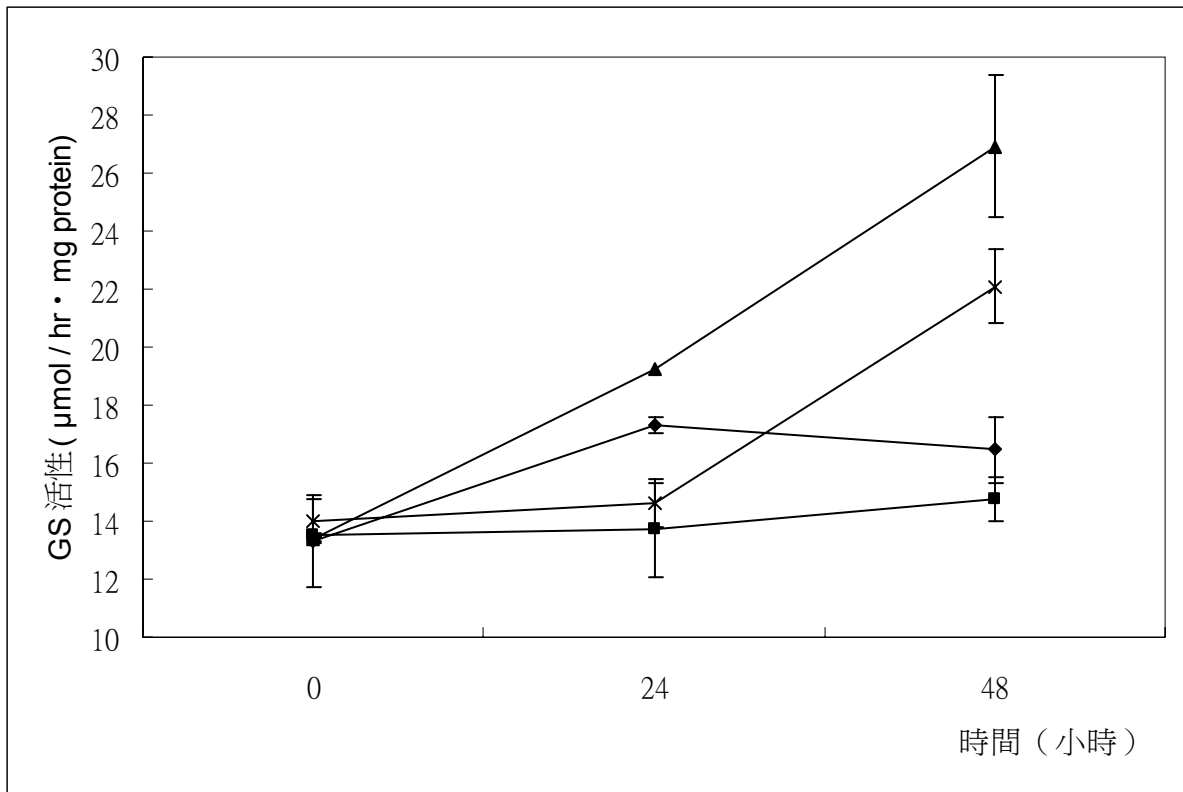


圖 2. 大豆植株不同處理之 GS 活性

- 為對照組，▲ 為 500μM SA 處理，◆ 為 500μM MSO 處理，
× 為 500μM SA+500μM MSO。

每個實驗至少進行三次，取其平均值與標準差。

本實驗一共重複三次，取其平均及標準差。

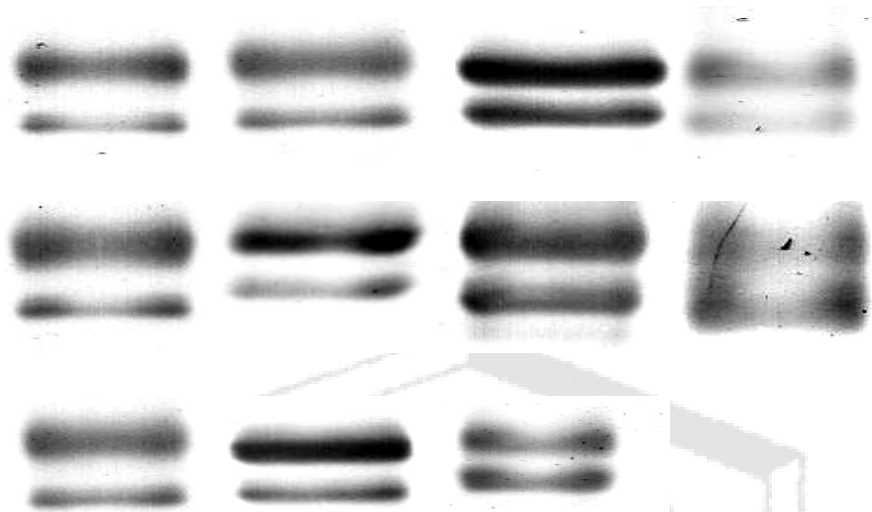


圖 3. 大豆植株不同前處理之 GS 西方墨點分析圖

將第二枚三小葉複葉全開之大豆植株，以不同的前處理 24 小時後，連續觀察 72 小時，每 24 小時取下第一、二枚三小葉複葉進行可溶性蛋白萃取，每個樣品取 10 μ g 以 10%SDS 膠體電泳，並以西方墨點偵測 GS 的含量。

A. 以海格蘭氏液前處理 24 小時後，將海格蘭氏液中之植株分別放入 500 μ M SA 連續觀察 72 小時。

B. 以海格蘭氏液前處理 24 小時後，將海格蘭氏液中之植株分別放入 500 μ M MSO 連續觀察 72 小時。