

钙对花生叶片糖代谢有关酶活性的影响

郭振飞 卢少云 李明启

(华南农业大学生物技术学院, 广州 510642)

摘要 5 mmol/L Ca^{2+} 抑制花生叶片果糖-1,6-二磷酸酯酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇式丙酮酸磷酸酯酶、丙酮酸激酶和 NADP-磷酸甘油醛脱氢酶活性。以含 0、5、15 mmol/L Ca^{2+} 的 Hoagland 营养液培养花生幼苗, 在 5 mmol/L Ca^{2+} 条件下, 果糖-1,6-二磷酸酯酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性最高, 0、15 mmol/L Ca^{2+} 均使酶活性降低, 光合速率亦呈现相同变化趋势。丙酮酸激酶活性在缺 Ca^{2+} 时最高, 与呼吸速率变化相同。15 mmol/L Ca^{2+} 提高了叶绿素含量。

关键词 钙; 花生叶片; 酶活性

EFFECT OF CALCIUM ON SOME ENZYME ACTIVITIES OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN PEANUT LEAVES

Guo Zhenfei Lu Shaoyun Li Mingqi

(College of Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract The activities of fructose 1,6-bisphosphatase, NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate phosphatase and pyruvate kinase isolated from peanut leaves were inhibited by 5 mmol/L of Ca^{2+} . When peanut seedlings were grown in Hoagland solution containing 0, 5 or 15 mmol/L of Ca^{2+} , fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase) showed the highest activity at 5 mmol/L of Ca^{2+} , but the highest activity of pyruvate kinase (PK) was found at 0 mmol/L Ca^{2+} . Photosynthetic and respiratory rates showed a similar changing trend as the activities of FBPase, PEPCase and PK. The high concentration of Ca^{2+} (15 mmol/L) enhanced the chlorophyll content.

Key words Calcium; Peanut leaves; Enzyme activity

由于钙调素(CaM)的发现, 对 Ca^{2+} 生理功能研究取得了很大进展, 国内外在这方面的大量研究证明, Ca^{2+} 作为第二信使调节植物的生长和发育过程。然而, Ca^{2+} 对植物代谢调节的研究则被忽视^[1]。植物叶片糖代谢能为植物生长提供碳源和能量, 关于 Ca^{2+} 对其调节研究很少, 只有 Ca^{2+} 对叶绿体和细胞质果糖-1,6-二磷酸酯酶(FBPase)活性调节的报告^[2,3]。本文以花生叶片为材料, 测定了 Ca^{2+} 对糖酵解、磷酸戊糖途径和卡尔文循环中一些关键酶活性的影响, 并研究其与光合、呼吸作用的关系。

1 材料与方 法

材料 供试材料为花生 (*Arachis hypogaea* L.) 品种粤油 116, 由华南师范大学植物生理研究室提供。种子萌发后播种于蛭石, 在生长室以含不同钙浓度的 Hoagland 营养液培养至 5 叶期, 取成长叶片进行测定。培养温度 25 °C, 光强 110 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 光照时间 16 h。

酶的提取和活性测定 按每克材料加入 5 ml 提取液 (含 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 10 mmol/L MgCl_2 , 5 mmol/L DTT, 20% 乙二醇), 研磨成匀浆, 于 15 000 \times g 离心 20 min, 其上清液即为粗酶液, 用于测定酶活性。

FBPase 和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活性测定 按上海植物生理学会方法^[4], 测定介质分别为 pH8.8 和 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液。

NADP- 和 NAD- 磷酸甘油醛脱氢酶活性测定 按 Ruyters 和 Miyachi 的方法^[5]。以 NADH 代替 NADPH, 测定 NAD- 磷酸甘油醛脱氢酶活性。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPCase) 活性测定 按焦进安和施教耐的方法^[6]。

PEP 磷酸酯酶活性测定 按 Duff 等^[7]方法。介质为 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.7) 缓冲液^[8]。

丙酮酸激酶 (PK) 活性测定 按郭振飞和李明启^[9]方法进行。

光合速率和呼吸速率测定 在生长室 110 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 光强下, 用 Li-6200 型光合作用测定仪测定花生幼苗顶端第二片叶的光合速率。用黑布将叶室遮光后, 测定呼吸释放 CO_2 量。

叶绿素含量测定 按 Arnon^[10]方法。

可溶性蛋白质含量 测定按 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 方法^[11], 以牛血清白蛋白作标准。

2 结果和讨论

2.1 Ca^{2+} 对植物糖代谢中一些酶活性的影响

Charles 和 Halliwell 曾报告 Ca^{2+} 抑制卡尔文循环的 FBPase 和景天庚酮糖 -1,7- 二磷酸酯酶活性^[12], 细胞质 FBPase 活性亦受 Ca^{2+} 抑制, Ca^{2+} 的抑制作用是与 Mg^{2+} 相竞争^[3]。 Ca^{2+} 也抑制植物叶片 PEP 羧化酶活性 (PEPCase)^[6]。我们过去对鸡蛋果叶片细胞质丙酮酸激酶的研究发现, 丙酮酸激酶 (PK) 受 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 比值调节^[13]。本文从花生成长叶提取粗酶液, 向酶活性测定介质加入 5 mmol/L CaCl_2 , 测定 Ca^{2+} 对糖代谢的一些酶活性的影响 (表 1)。

Ca^{2+} 对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 NADP-磷酸甘油醛脱氢酶活性无影响, 对 NAD-磷酸甘油醛脱氢酶仅表现轻微抑制作用。FBPase、PEPCase、PEP 磷酸酯酶和

表 1 Ca^{2+} 对花生叶片一些酶活性的影响
Table 1 Effect of Ca^{2+} on activities of some enzymes in peanut leaves

酶 Enzyme	比活性 Specific activity ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ protein min^{-1})	
	0	5 mmol/L Ca^{2+}
6-磷酸葡萄糖脱氢酶 Glucose-6-phosphate dehydrogenase	0.037(100)	0.040(108.1)
果糖 -1,6- 二磷酸酯酶 Fructose-1,6-bisphosphatase	0.082(100)	0.014(17.1)
NAD- 磷酸甘油醛脱氢酶 NAD-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.328(100)	1.147(86.4)
NADP- 磷酸甘油醛脱氢酶 NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.0427(100)	0.040(93.7)
PEP 羧化酶 PEP carboxylase	0.031(100)	0.016(51.6)
PEP 磷酸酯酶 PEP phosphatase	0.032(100)	0.016(50)
丙酮酸激酶 Pyruvate kinase	0.074(100)	0.036(48.6)

PK 受 Ca^{2+} 强烈抑制(表 1)。FBPase 是卡尔文循环的调节酶, PK 是糖酵解的调节酶, PEP 磷酸酯酶也是糖酵解代谢的酶, 它催化 PEP 水解为丙酮酸, 是 PK 催化反应的支路^[4], 表 1 结果说明, Ca^{2+} 对卡尔文循环和糖酵解代谢的关键酶均有抑制作用, 而且与过去的报告是一致的。

我们以含不同水平 Ca^{2+} (0、5、15 mmol/L) 的 Hoagland 营养液培养花生幼苗, 测定成长叶的酶活性, 结果表明, 丙酮酸激酶活性在缺 Ca^{2+} 时最高, 5 和 15 mmol/L 的 Ca^{2+} 引起酶活性降低(图 1), 这与 Ca^{2+} 抑制丙酮酸激酶活性(表 1)是一致的。FBPase、PEPCase 和 PEP 磷酸酯酶则表现出一致的变化, 在 5 mmol/L Ca^{2+} 条件下活性最高, 缺 Ca^{2+} 和高 Ca^{2+} 均降低酶活性(图 1)。

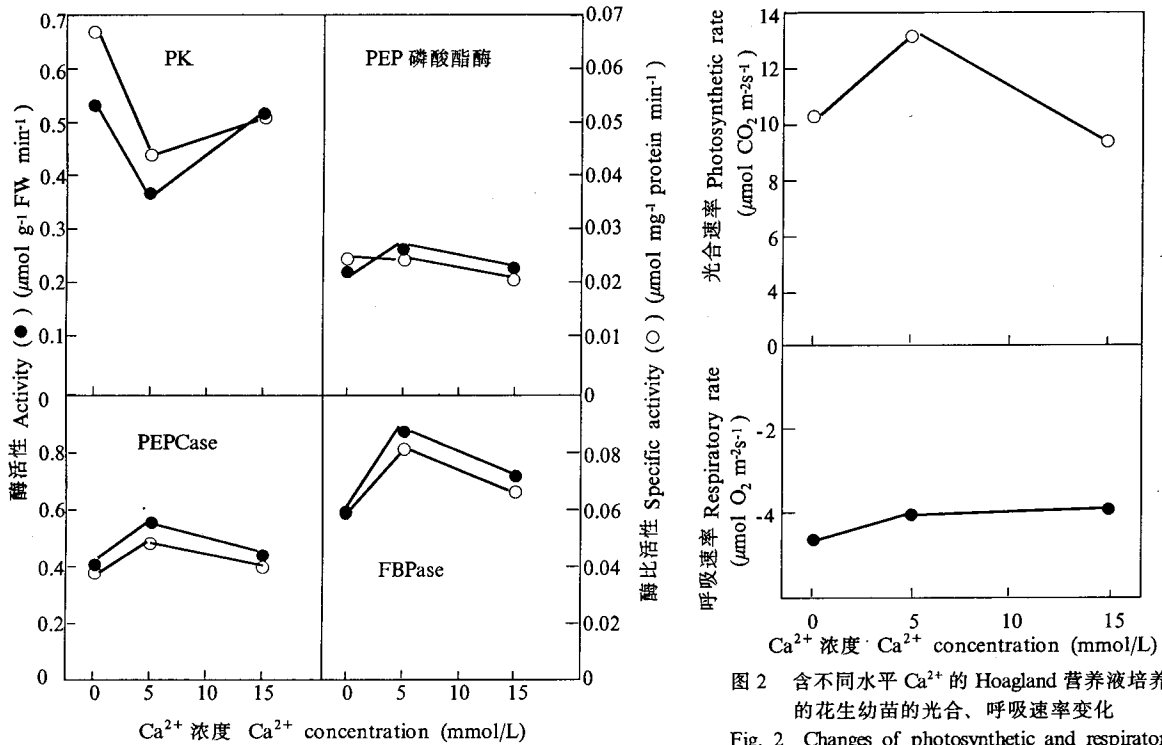


图 1 含不同水平 Ca^{2+} 的 Hoagland 营养液培养的花生幼苗的酶活性变化
Fig. 1 Changes of enzyme activities of peanut seedlings grown in Hoagland solution containing different levels of Ca^{2+}

图 2 含不同水平 Ca^{2+} 的 Hoagland 营养液培养的花生幼苗的光合、呼吸速率变化
Fig. 2 Changes of photosynthetic and respiratory rates of peanut seedlings grown in Hoagland solution containing different levels of Ca^{2+}

2.2 Ca^{2+} 对花生叶片光合、呼吸速率影响

以不同水平 Ca^{2+} 的营养液培养花生幼苗, 在 5 mmol/L Ca^{2+} 时叶片的光合速率最高, 缺 Ca^{2+} 和高 Ca^{2+} 时均下降, 分别降低 20.8% 和 27.3%(图 2)。 Ca^{2+} 对花生光合速率的影响与其对 FBPase 和 PEPCase 活性影响(图 1)是一致的。叶片的呼吸速率则表现出不同的变化, 在缺 Ca^{2+} 时最高, 5 和 15 mmol/L 时降低了 15%(图 2)。这与 Ca^{2+} 抑制丙酮酸激酶活性(图 1)是一致的。

2.3 Ca^{2+} 对花生叶片叶绿素含量的影响

叶片光合速率常与叶绿素含量的变化是一致的。我们测定了不同水平 Ca^{2+} 培养的花生幼苗叶片叶绿素含量, 0 和 5 mmol/L Ca^{2+} 培养的幼苗叶绿素含量无明显差异, 15 mmol/L Ca^{2+} 培养

的叶绿素含量提高, 叶绿素 a/b 比值降低(表 2)。尽管如此, 5 mmol/L Ca^{2+} 培养时花生叶片光合速率最大, 0 和 15 mmol/L Ca^{2+} 时均降低, 说明缺 Ca^{2+} 或高 Ca^{2+} 引起的光合速率变化与叶绿素含量变化无关, 而与 Ca^{2+} 影响 FBPase、PEPCase 活性(图 1)有关。

关于 Ca^{2+} 生理功能的研究, 多是注意到它在 CaM 参与下对生长发育过程的调节作用, 而 Ca^{2+} 对植物代谢的直接作用(不依赖 CaM)研究甚少。 Ca^{2+} 在菠菜叶绿体 FBPase 光活化中的促进作用是一个很典型的不依赖 CaM 过程^[2]。 Ca^{2+} 抑制纯化的叶绿体 FBPase 活性, 但照光引起叶绿体游离 Ca^{2+} 浓度短暂提高, 促进 FBPase 活化, 加入光诱导 Ca^{2+} 内流的抑制剂钉红(Ruthenium red)后, 抑制了 FBPase 的光活化^[2]。本试验结果表明, 虽然 Ca^{2+} 对提取的 FBPase、PEPCase 活性具抑制作用, 但不同 Ca^{2+} 水平培养试验说明, 缺 Ca^{2+} 亦会降低酶活性, 并降低光合速率, 植物需要适量的 Ca^{2+} , 以维持正常代谢活动。

表 2 不同水平 Ca^{2+} 培养的花生叶片叶绿素含量
Table 2 Chlorophyll contents of peanut leaves grown in Hoagland nutrition containing different concentrations of Ca^{2+}

Ca^{2+} 浓度 Ca^{2+} concen- tration (mmol/L)	叶绿素含量 Chlorophyll content (mg g ⁻¹ FW)	叶绿素 a/b Chlorophyll a/b
0	2.468 ± 0.279 a	1.269 ± 0.029 a
5	2.486 ± 0.164 a	1.270 ± 0.047 a
15	2.683 ± 0.021 b	1.175 ± 0.039 b

参考文献

- 1 Kauss H. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. *Ann Rev Plant Physiol*, 1987, 38:47-72
- 2 Kreimer G et al. Stromatal free calcium concentration and light-mediated activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Plant Physiol*, 1988, 86:423-428
- 3 Prado F E et al. Regulation by Ca^{2+} of a cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase from spinach leaves. *Plant Physiol*, 1991, 96:1026-1033
- 4 上海植物生理学会编. 植物生理学实验手册. 上海:上海科学技术出版社, 1985, 162-164, 183-184
- 5 Ruyters G, Miyachi S. Changes in plastic and cytoplasmic pyruvate kinase activity during chloroplast development of pea in blue and red light. *Plant Cell Physiol*, 1983, 24:863-871
- 6 焦进安, 施教耐. Ca^{2+} 对植物磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的抑制作用. *植物生理学通讯*, 1987, (4):42-45
- 7 Duff S M G et al. Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol*, 1989, 90:734-741
- 8 郭振飞等. 水稻叶片磷酸烯醇式丙酮酸磷酸酯酶活性及其部分特性. *植物学报*, 1994, 36(9):703-708
- 9 郭振飞, 李明启. 鸡蛋果叶片细胞质丙酮酸激酶的部分纯化及其调节性质. *植物生理学报*, 1993, 19:105-110
- 10 Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24:1-15
- 11 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254
- 12 Charles S A, Halliwell B. Action of calcium ions on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose bisphosphatase and other enzymes of the Calvin cycle. *Biochem J*, 1980, 188:775-779
- 13 Guo Z F, Li M Q. Regulation of pyruvate kinase in mature leaves of *Passiflora edulis* by Ca^{2+} and Mg^{2+} . *Chinese J Bot.*, 1994, 6:139-144
- 14 Duff S M G et al. Phosphate starvation inducible 'bypasses' of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol*, 1989, 90:1275-1278