

## Zn胁迫下小麦S-腺苷甲硫氨酸代谢途径关键基因表达模式分析

柴兴苹<sup>1</sup>, 张玉秀<sup>2</sup>, 谭金娟<sup>1</sup>, 冯珊珊<sup>1</sup>, 柴团耀<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院大学生命科学学院, 北京100049; <sup>2</sup>中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京100083

**摘要:** 从Zn胁迫下小麦幼苗的抑制差减杂交(SSH) cDNA文库中筛选出S-腺苷甲硫氨酸(SAM)代谢途径中的9个关键基因, 并采用实时荧光定量PCR对其表达模式进行分析。结果表明, Zn (1 mmol·L<sup>-1</sup>)胁迫下小麦的S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因(*SAMS*)表达呈下降趋势, 而参与谷胱甘肽(GSH)和烟酰胺(NA)合成代谢的关键基因均上调表达; 不同浓度Zn处理4 h后, 小麦SAM代谢途径中基因的快速响应存在差异。可见, Zn胁迫下, 小麦SAM代谢途径中GSH和NA的合成代谢增强, GSH和NA可能参与小麦对Zn胁迫的响应及降低Zn毒害的作用。

**关键词:** 小麦; Zn; S-腺苷甲硫氨酸; 表达模式

## Analysis of Expression Patterns of Genes Participated in S-Adenosylmethionine (SAM) Metabolic Pathway in Wheat under Zn Stress

CHAI Xing-Ping<sup>1</sup>, ZHANG Yu-Xiu<sup>2</sup>, TAN Jin-Juan<sup>1</sup>, FENG Shan-Shan<sup>1</sup>, CHAI Tuan-Yao<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Life Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; <sup>2</sup>School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China

**Abstract:** A suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA library of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under different concentrations of Zn for different treatment time was established and several genes involved in the metabolic pathway of S-adenosylmethionine (SAM) were selected. To clarify the relationship between SAM metabolic pathway and response of wheat to Zn stress, the expression levels of nine genes participated in SAM metabolic pathway were analysed by real-time quantitative PCR. The results showed that *SAMS* was down-regulated in both shoots and roots of wheat after exposed to Zn (1 mmol·L<sup>-1</sup>) stress; while *SAHase*, *γ-ECS*, *GST*, *NAS3* and *NAAT* were up-regulated under identical treatment. Expression patterns of SAM metabolism genes in wheat under low Zn concentration (0.5 mmol·L<sup>-1</sup>) were different from those under high Zn concentration (5 mmol·L<sup>-1</sup>). These results suggest that synthesis of glutathione (GSH) and nicotianamine (NA) in SAM metabolic pathway in wheat are enhanced under Zn stress. Thus, GSH and NA may play significant roles in the response of wheat to Zn stress and reduce Zn toxicity.

**Key words:** wheat; Zn; S-adenosylmethionine; expression pattern

环境中Zn含量过高, 不仅对小麦生长产生有害的影响, 而且使籽实中Zn含量过高而产生残毒, 危害人们的健康(龚红梅和沈野2010)。近几十年, 工业废弃物的大量排放, 造成农田生态环境的Zn污染, 致使作物减产, 并且导致Zn在食物链中富集, 进入人体后引起一些疾病的发生。近年来, 关于植物Zn营养利用以及Zn污染影响植物生长发育均有一些报道(Van Assche等1980), 但关于植物对Zn毒害抗性机制的研究较少。

我们前期构建了Zn胁迫下小麦抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH) cDNA文库, 发现S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)代谢途径相关基因的表达对Zn胁迫存在响

应(未发表资料)。为了深入研究该代谢途径对Zn胁迫的响应, 本文以SSH文库的构建材料(小麦‘京冬8号’)为研究对象, 分析了Zn胁迫下SAM代谢途径中各支路关键基因的表达模式, 为阐明Zn胁迫下植物的响应机制和植物对Zn毒害的抗性机理提供理论基础。

S-腺苷甲硫氨酸合成酶(S-adenosylmethionine synthetase, *SAMS*)可催化ATP和蛋氨酸生成SAM

收稿 2013-02-01 修定 2013-03-29

资助 转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-130B)和中国科学院“十二五”生命科学前沿(KSCX2-EW-J-29)。

\* 通讯作者(E-mail: tychai@ucas.ac.cn; Tel/Fax: 010-88256343)。

(Cantoni 1953)(图1)。SAM参与多种生化反应,是生物体内重要的代谢产物,具有转甲基、转氨丙基、转硫等多种生理作用。SAM经过转甲基、水解和转硫作用生成半胱氨酸(Cys)(纪宇等2005),Cys经 $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸生成谷胱甘肽(glutathione, GSH)(图1)。研究表明, $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase,  $\gamma$ -ECS)是GSH合成中的限速酶(Nocctor等1998)。在植物中,GSH和其他抗氧化物质(如维生素C、维生素E、类胡萝卜素)一样,能够减少由于环境和代谢产物胁迫而引发的活性氧自由基(active oxygen species, AOS)的积累,消除AOS对植物机体的伤害作用;另一方面,GSH又能够在谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)的催化作用下与外源物质结合,缓解有害物质的伤害。

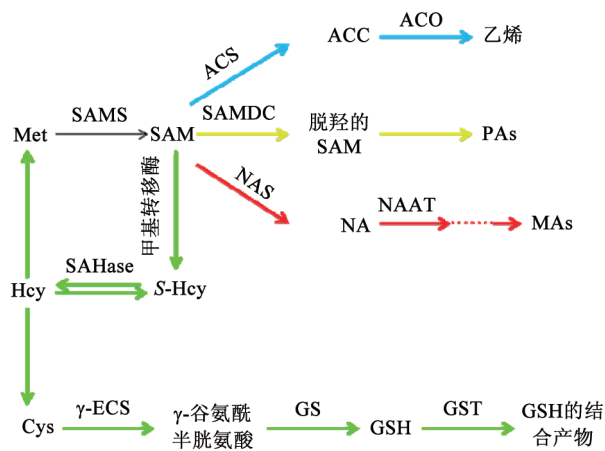


图1 SAM的代谢途径

Fig.1 The metabolic pathway of SAM

Met: 蛋氨酸(methionine); SAMS: *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶(*S*-adenosylmethionine synthetase); SAM: *S*-腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosylmethionine); *S*-Hcy: *S*-腺苷高半胱氨酸(*S*-adenosylhomocysteine); SAHase: *S*-腺苷高半胱氨酸水解酶(*S*-adenosylhomocysteine hydrolase); Hcy: 高半胱氨酸(homocysteine); Cys: 半胱氨酸(cysteine);  $\gamma$ -ECS:  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase); GS: 谷胱甘肽合成酶(glutathione synthetase); GSH: 谷胱甘肽(glutathione); GST: 谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase); ACS: 1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase); ACC: 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid); ACO: ACC氧化酶(ACC oxidase); SAMDC: *S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(*S*-adenosylmethionine decarboxylase); PAs: 多胺(polyamines); NAS: 烟酰胺合成酶(nicotianamine synthase); NA: 烟酰胺(nicotianamine); NAAT: 烟酰胺氨基转移酶(nicotianamine aminotransferase); MAs: 麦根酸类植物高铁载体(mugineic acid family phytosiderophores)。

SAM是生物合成多胺(polyamines, PAs)和乙烯的前体(Yang和Hoffman 1984)。*S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶(*S*-adenosylmethionine decarboxylase, SAMDC)催化SAM形成脱羧的SAM,为PAs生物合成提供氨丙基供体(图1),是植物PAs生物合成途径中的一个关键酶(Chiang等1996)。PAs在植物体内的作用主要有两种:一种是作为生长调节物质对植物的生长发育起调节作用;另一种是作为渗透调节物质在植物受到环境胁迫时起作用(汪沛洪1990)。此外,SAM在1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, ACS)催化下生成1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC),后者在ACC氧化酶(ACC oxidase, ACO)的催化下生成乙烯(图1)。研究表明,PAs和乙烯在植物的逆境响应中发挥重要作用(Bouchereau等1999;陈坤明和张承烈2000;Kasukabe等2004)。

SAM在烟酰胺合成酶(nicotianamine synthase, NAS)的催化下形成烟酰胺(nicotianamine, NA)(图1),后者是 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 及其他二价金属离子在体内吸收和转运的载体(Douchkov等2002)。研究发现,*HvNAS*的转基因水稻植株与野生型植株相比Zn含量增加了80%(王育花等2008),且种子中的Zn含量也明显增加(Masuda等2009);*NAS*的转基因烟草新叶中Zn含量比对照高出2.5倍(Takahashi等2003)。这表明NAS在Zn运输过程中起到一定的作用。NA进一步在烟酰胺氨基转移酶(nicotianamine aminotransferase, NAAT)等催化下经过一系列步骤可形成脱氧麦根酸,再转化为麦根酸和差向异构羟基麦根酸等麦根酸类植物高铁载体(mugineic acid family phytosiderophores, MAs)(Suzuki等2006)。研究报道,MAs不仅能活化根际土壤中的Fe,还可以活化土壤中的Zn,显著提高Zn在根际土壤中的移动性和在根系外体中的累积量,从而提高植物对Zn的吸收量(Zhang等1991)。此外,Cakmak等(1996)研究发现,Zn高效小麦品种比低效品种根系分泌更多的MAs。

## 材料与方法

### 1 试验材料与处理

将小麦‘京冬8号’(*Triticum aestivum* L. cv.

‘Jingdong 8’)种子表面消毒,在蒸馏水中萌发后,将幼苗转入1/2Hoagland培养液中培养,每3 d更换1次培养液。幼苗长出3片真叶后,选取长势一致的幼苗,用含 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (处理浓度依据SSH文库结果,未发表资料)的培养液胁迫处理0~72 h,分别在处理0、0.5、4、8、12、24和72 h后取植株的地上部和根系组织样品,于液氮速冻后在 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,用于SAM代谢途径相关基因表达谱的研究。此外,选取长势一致的三叶期小麦幼苗,分别在含0.5和 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的培养液中处理0和4 h后,取植株的地上部和根系组织样品,于液氮速冻后在 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱中保存,用于SAM代谢途径快速响应的研究。温室的相对湿

度( $75\pm 5\%$ ),温度( $22\pm 3^\circ\text{C}$ ),光强 $165 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,光照周期16 h/8 h(光照/黑暗)。

## 2 RNA提取、纯化与反转录

用TRIZOL (Invitrogen)提取总RNA;采用TransScript™ One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)去除总RNA中的DNA及合成cDNA。

## 3 SAM代谢途径基因筛选与PCR引物

以小麦为材料,用SSH技术构建了Zn胁迫下小麦幼苗的正反向SSH cDNA文库(未发表资料)。本研究所用的小麦SAM代谢途径相关基因(表1)均来源于SSH文库的序列。PCR引物(表1)用Primer Premier v5.0设计,由上海生工生物技术有限公司合成。

表1 小麦SAM代谢途径中一些基因及实时荧光定量PCR引物

Table 1 Several genes involved in the metabolic pathway of SAM in wheat and primers for real-time quantitative PCR

基因	引物
<i>SAMS</i>	F: 5'-TGATGCTGGTCTTACTGGTCG-3'; R: 5'-GATAAGGGCTCAGGCACACC-3'
<i>SAMDC</i>	F: 5'-GAATGGTGAGCAGGAGCATGGTAG-3'; R: 5'-TTGTGTCCGAGCTCTCCAACAAG-3'
<i>SAHase</i>	F: 5'-GCACACCTCCTCACTCAAACCAAT-3'; R: 5'-GCACCAACGGAACTCTATCAACT-3'
$\gamma$ - <i>ECS</i>	F: 5'-CGATTTTCAGTTCAGAGCAAGATATG-3'; R: 5'-GAGCGGTGTGTTATCAGTATCAGTCC-3'
<i>GST</i>	F: 5'-CGACCTCACCAATTTCTCCT-3'; R: 5'-CTTACTTTATTTCCGTTGGTTTCAG-3'
<i>NAS3</i>	F: 5'-CGAACTCCTCTCTTCTGCGTCAC-3'; R: 5'-TGAACCTCCGTCATCATCGCACAG-3'
<i>NAAT</i>	F: 5'-TTGGTCTACTAAGGGAATCATCAG-3'; R: 5'-TGGATCTCCTTCAAAAAGATGTAAGT-3'
<i>ACSI</i>	F: 5'-TTGTTCCGTCACCATACTACCCT-3'; R: 5'-GAACCTTACTCCTCGCTTCTTT-3'
<i>ACO1</i>	F: 5'-GAACACTGGCATCCCTGACG-3'; R: 5'-GTGAAGACATCCTCCCAATCC-3'
<i>18S rRNA</i>	F: 5'-GTGACGGGTGACGGAGAATT-3'; R: 5'-GACACTAATGCGCCCGGTAT-3'

## 4 实时荧光定量PCR

实时荧光定量PCR采用TransStart Green qPCR SuperMix UDG试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)。10  $\mu\text{L}$ 的PCR体系包括: 5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ TransStart Green qPCR SuperMix、0.2  $\mu\text{L}$  50 $\times$ Passive Reference Dye (II)、0.2  $\mu\text{L}$ 引物F ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、0.2  $\mu\text{L}$ 引物R ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、0.5  $\mu\text{g}$ 模板,加ddH<sub>2</sub>O至10  $\mu\text{L}$ 。检测采用美国Stratagene公司Mx3000P sequence detection system。为对反应中RNA进行均一化处理,选取小麦*18SrRNA*基因作为内标基因,每个反应重复3次。PCR反应条件:热启动 $50^\circ\text{C}$  2 min,  $95^\circ\text{C}$ 预变性10 min;  $95^\circ\text{C}$ 变性15 s、 $60^\circ\text{C}$ 退火15 s、 $72^\circ\text{C}$ 延伸20 s,共40个循环。反应结束后温度从 $60^\circ\text{C}$ 上升到 $95^\circ\text{C}$ 绘制熔解曲线,曲线为单峰时,认为扩增产物正确,不存在非特异性扩增。

扩增后将每对引物PCR产物进行测序比对以保证扩增产物为目的基因片段。目的基因的表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算(Livak和Schmittgen 2001),而且基因在各处理下的相对表达水平都通过对照条件下该基因的相对表达量进行校正。

## 5 乙烯释放量的测定

对小麦植株进行不同时间的Zn ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )处理后,取地上部和根系,用蒸馏水冲洗干净后装入5 mL医用安培瓶中,密封并置于室温下1 h,然后用注射器于瓶中抽取1 mL气体,注入日本Shimadzu公司的GC-7AG气相色谱仪测定乙烯释放量[以 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}(\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$ 表示]。每个试验设4次重复。本研究结果差异显著性分析采用 $t$ -检验,  $P=0.05$ ,差异显著用\*表示。



## 实验结果

### 1 Zn胁迫不同时间对小麦SAM代谢途径基因表达的影响

从SSH文库中筛选出SAM代谢途径中的9个关键基因(表1)。通过实时荧光定量PCR的方法分析Zn ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )胁迫0~72 h后小麦SAM代谢途径相关基因转录水平的变化。结果表明,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn处理后, 根中*SAMS*相对表达量明显下降, 且在Zn处理后24 h达到最低(图2-A); 与根中类似, 地上部*SAMS*在Zn处理后也下调表达(图3-A)。*SAMDC*是PAs合成途径的关键基因, Zn处理后, 根中的相对表达量呈下降趋势(图2-B), 并在处理4 h时达到最低; 而地上部的相对表达量在Zn处理4 h后达到最高(图3-B)。此外, SAM也是合成NA的底物, NAS和NAAT是NA代谢支路上的关键酶。Zn处理后小麦根中的*NAS3*和*NAAT*均上调表达(图2-F和G); 地上部*NAAT*在Zn处理后也上调表达(图3-F)。在GSH合成途径中, 小麦地上部和根系中*SAHase*、 $\gamma$ -*ECs*和*GST*分别在Zn处理4和12 h时上调表达(图2-C~E, 图3-C~E)。小麦根中参与乙烯合成的关键酶基因*ACS1*和*ACO1*在Zn处理后均呈下调表达趋势, 并在处理后24 h达到最低(图2-H和I)。这些结果与Zn胁迫下小麦SSH文库中相应基因的表达模式相一致(未发表资料)。

### 2 不同浓度Zn胁迫对小麦SAM代谢途径基因表达的影响

低浓度( $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和高浓度( $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) Zn处理下, 小麦SAM代谢途径各基因在根系和地上部的表达模式存在差异。对于PAs合成途径, 根系中*SAMDC*表达量在低浓度Zn胁迫4 h后显著增加, 而高浓度Zn胁迫下无明显变化; 地上部*SAMDC*表达量变化与根中类似(图4-A和图5-A)。高浓度和低浓度Zn处理对GSH合成途径各基因表达的影响不同: 根中*SAHase*的表达量在高浓度Zn处理下显著降低, 在低浓度下没有变化(图4-B), 而在地上部其表达量均显著增加(图5-B); 两种浓度Zn处理下, 根中 $\gamma$ -*ECs*表达量均降低(图4-C); 根中*GST*表达量在低浓度和高浓度Zn处理下均没有显著变化(图4-D), 而地上部其表达量在两个浓度Zn处理下均显著降低(图5-C)。NA合成途径中, 根中*NAS3*表达量在低浓度Zn处理下无明显变化, 但在高浓度Zn

处理后显著降低(图4-E)。此外, 在高浓度和低浓度Zn处理下, 根中*NAAT*的表达量均降低(图4-F), 而地上部均上调表达(图5-D)。总之, PAs合成途径在低浓度Zn胁迫下响应明显, 而在高浓度下无明显变化; 由*NAS3*和*NAAT*调控的NA合成代谢及*GST*催化下GSH与底物的结合作用均在高浓度Zn胁迫下显著增强。

### 3 Zn处理不同时间对小麦根系及地上部乙烯释放量的影响

为了进一步探讨植物SAM代谢支路上乙烯合成途径对Zn胁迫的响应, 本研究测定了Zn胁迫下小麦的乙烯释放量。结果显示,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Zn处理后, 根系中乙烯释放量随处理时间的延长而逐渐增加, 在处理96 h达到最高(图6-A); 而地上部乙烯释放量在处理0.5 h后显著降低, 而后恢复到对照(0 h)水平(图6-B)。

## 讨论

目前关于植物Zn胁迫耐性研究主要集中于生理机制方面, 如阻止吸收、螯合解毒和体内区室化分隔作用(龚红梅和沈野2010), 而对Zn胁迫分子响应机理研究较少。本研究基于Zn胁迫小麦SSH文库结果(未发表资料), 筛选出对Zn胁迫响应的SAM代谢途径, 并对该途径中关键基因的表达模式进行进一步分析, 为研究小麦的Zn胁迫分子响应机制提供了参考依据。

*SAMS*是合成SAM的关键基因, 受环境胁迫调控(李昌澎等2011; Van Breusegem等1994)。本研究发现, Zn ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )处理下小麦根和地上部*SAMS*均下调表达(图2-A和图3-A); 早期研究结果显示Zn胁迫( $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )下, 拟南芥中*SAMS1*的表达量升高, 而Zn超富集植物遏蓝菜和鼠耳芥中*SAMS*的表达没有明显变化(van de Mortel等2006; Becher等2004)。这表明*SAMS*在不同的植物中对Zn胁迫的响应机制存在差异。

PAs和乙烯均在植物的逆境响应过程中起作用。此外, 有研究发现二者的调控作用是相互拮抗的。例如, PAs抑制许多单子叶和双子叶植物叶的衰老(Kaur-Sawhney等1982)和果实成熟(Kakkar和Rai 1993); 乙烯则促进这些过程。Apelbaum等(1981)研究结果显示PAs能够抑制苹果叶片中乙烯

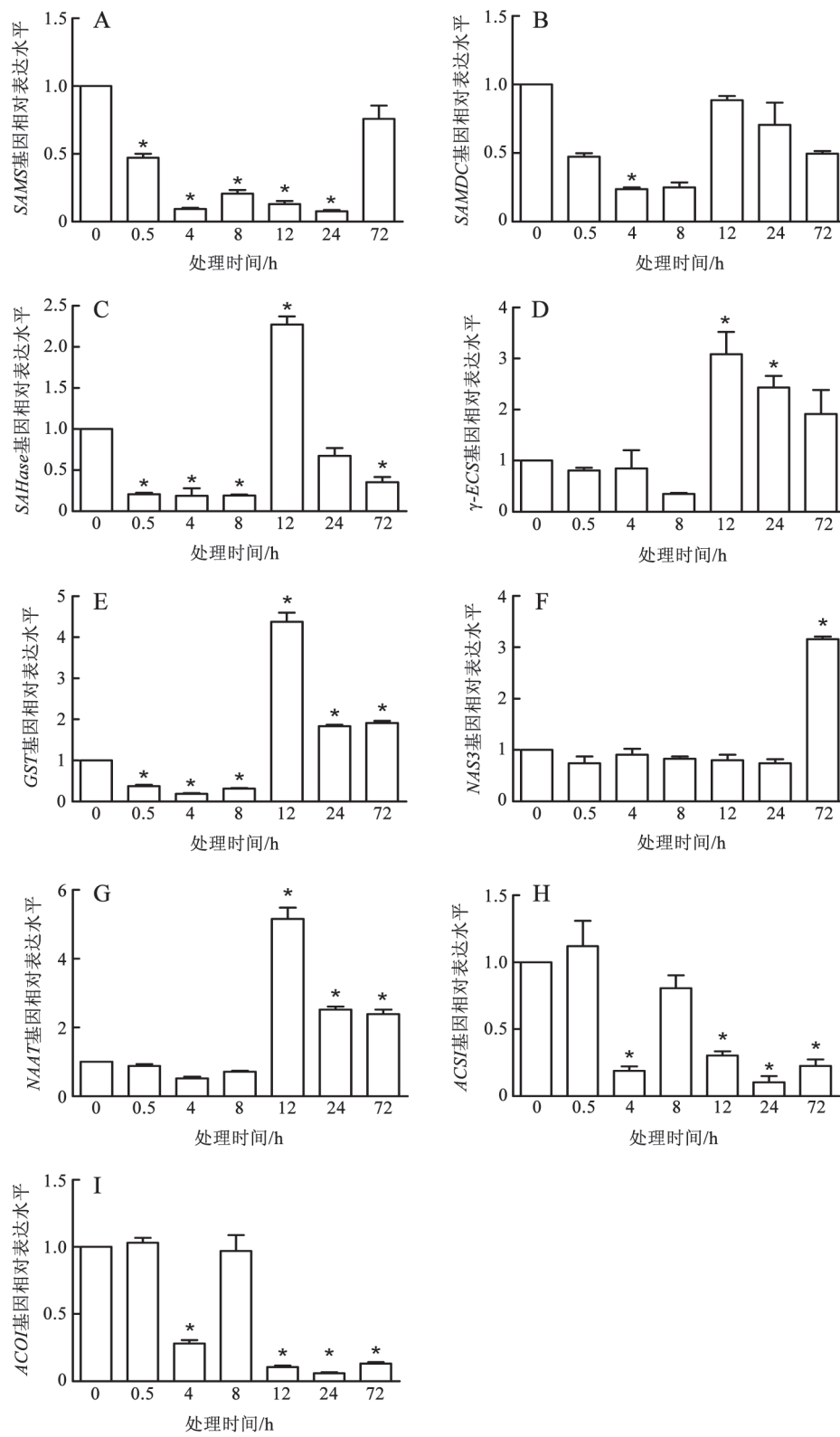


图2 Zn (1 mmol·L<sup>-1</sup>)对小麦根中SAM代谢途径基因表达的影响

Fig.2 Effects of Zn (1 mmol·L<sup>-1</sup>) on transcription levels of genes in SAM metabolic pathway in wheat roots

采用t-检验进行显著性分析,\*表示各处理与对照(0 h)存在显著差异(P ≤ 0.05)。

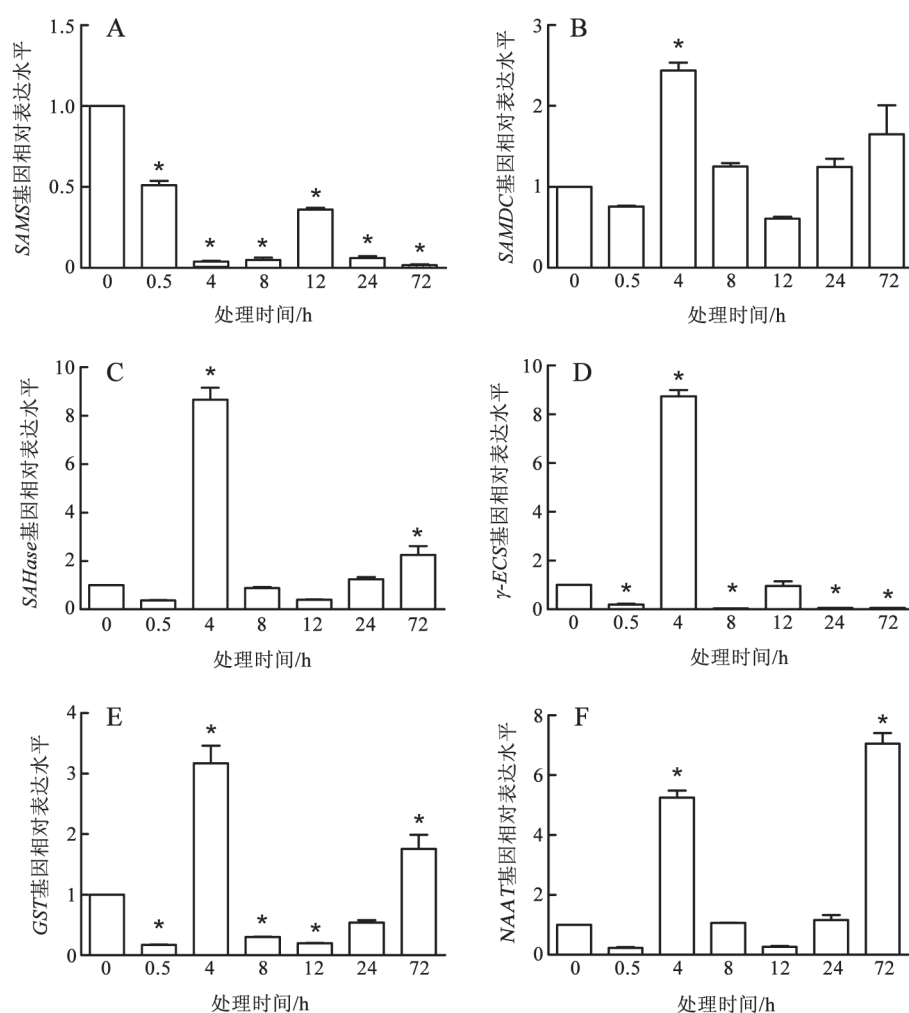


图3 Zn (1 mmol·L<sup>-1</sup>)处理对小麦地上部SAM代谢途径基因表达的影响

Fig.3 Effects of Zn (1 mmol·L<sup>-1</sup>) on transcription levels of genes in SAM metabolic pathway in wheat shoots

采用 $t$ -检验进行显著性分析,\*表示各处理与对照(0 h)存在显著差异( $P \leq 0.05$ )。

的合成; Kumar等(1996)研究发现降低马铃薯中SAMDC的表达能够增加乙烯的合成。本研究结果显示, Zn (1 mmol·L<sup>-1</sup>)胁迫下, 小麦根中SAMDC的表达呈下降趋势(图2-B), 而此时根中乙烯释放量则整体呈上升趋势(图6-A); Zn胁迫下小麦地上部SAMDC的表达量升高(图3-B), 而乙烯的释放量则先下降, 然后逐渐恢复到对照水平(图6-B)。以上结果表明, 小麦响应Zn胁迫的过程中, PAs和乙烯的合成可能是相互竞争的。

ACS和ACO是乙烯合成的限速酶(Kende 1993)。其中ACS的表达受到许多信号的调控(Wang等2002), 植物中不同的ACS家族成员可以正调控或负调控乙烯的合成(Nakatsuka等1998)。

ACO也是由一个多基因家族编码的, 各家族成员对环境胁迫的响应不同(Jiang和Deyholos 2006; 陈冬花等2011), 而且在不同的生长阶段其表达具有组织特异性(Blume和Grierson 1997; Barry等1996)。我们的研究也发现, 小麦三叶期幼苗中ACS1和ACO1的表达具有组织特异性, 在根中表达, 而叶片中检测不到它们的表达。Zn胁迫下, 小麦根中乙烯释放量增加(图6-A), 而ACS1和ACO1的表达量均降低(图2-H和I)。因此, ACS1和ACO1可能负调控乙烯的合成。

研究表明, Zn胁迫下番茄幼苗中GSH的含量增加, 且叶片中的含量高于根系中的(丁海东等2006), 随胁迫时间的延长其含量逐渐降低; 这与本

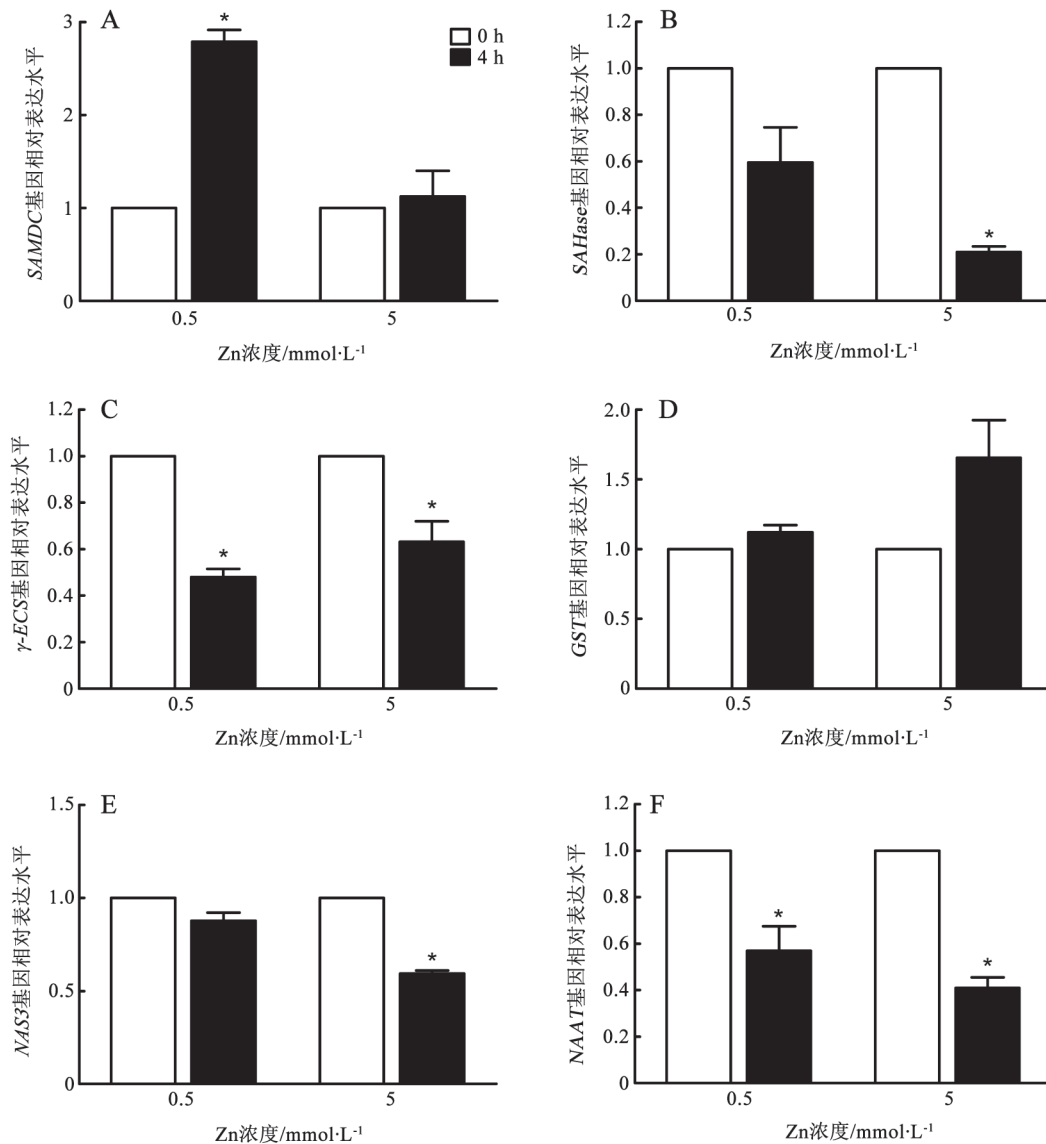


图4 不同浓度Zn处理下小麦根中SAM代谢途径基因的表达模式

Fig.4 Expression patterns of genes in SAM metabolic pathway in wheat roots treated with different concentrations of Zn  
采用 $t$ -检验进行显著性分析,\*表示处理(4 h)与对照(0 h)存在显著差异( $P \leq 0.05$ )。

研究中小麦Zn胁迫下GSH合成途径中 $\gamma$ -ECS和GST的表达模式相一致(图2-D和E, 图3-D和E)。Di Baccio等(2005)研究也表明, Zn胁迫下, 杨树幼叶中 $\gamma$ -ECS的表达量升高。此外, GSH作为生物体内主要非蛋白还原态硫的贮藏物质之一, 在生物体抵抗各种胁迫(干旱、冷害、重金属等)的过程中起着重要的作用。因此, Zn胁迫下, GSH合成途径上关键酶基因的上调表达能够提高植物体内GSH的含量, 进而降低Zn胁迫造成的毒害。

NAS在高等植物中普遍存在, 其组织表达模式

与物种及环境胁迫相关(Higuchi等1999, 2001; Mizuno等2003)。小麦NAS3在根中表达(图2-F), 且在Zn胁迫下表达量增加; 而在叶中检测不到NAS3的表达, 推测NAS3在正常条件以及Zn胁迫条件下均只在根中特异性表达。另外, 有研究发现, 增加Zn<sup>2+</sup>敏感型粟酒酵母(Zn<sup>2+</sup>-hypersensitive *Schizosaccharomyces pombe*)中NA的含量能够降低自身的Zn敏感性, 并能减少内质网中的Zn含量(Weber等2004); Zn超富集植物鼠耳芥中的NAS2和NAS3在Zn胁迫的抗性响应中发挥重要的调控作用, Zn胁迫

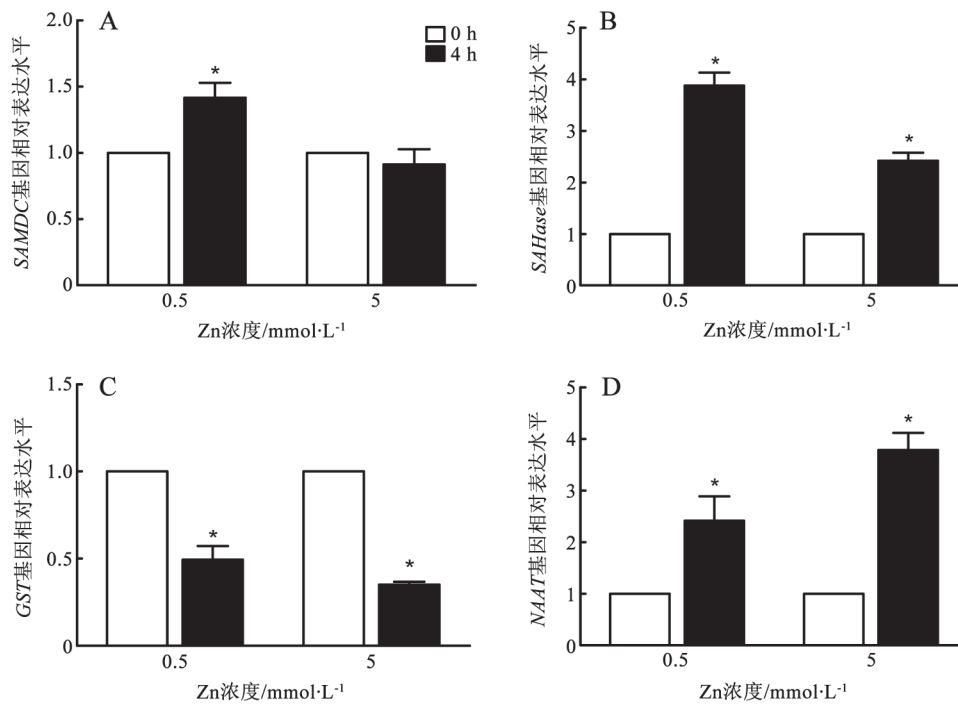


图5 不同浓度Zn处理下小麦地上部SAM代谢途径基因的表达模式

Fig.5 Expression patterns of genes in SAM metabolic pathway in wheat shoots treated with different concentrations of Zn  
采用 $t$ -检验进行显著性分析,\*表示处理(4 h)与对照(0 h)存在显著差异( $P \leq 0.05$ )。

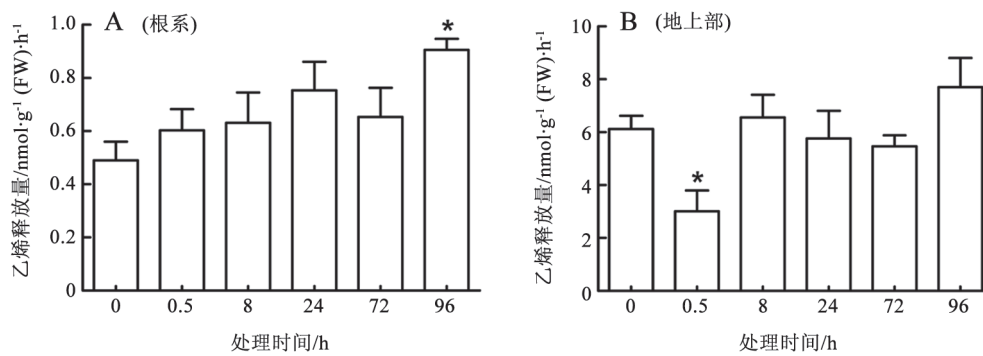


图6 Zn (1 mmol·L<sup>-1</sup>)对小麦根系及地上部乙烯释放量的影响

Fig.6 Effects of Zn (1 mmol·L<sup>-1</sup>) on ethylene release in wheat roots and shoots  
采用 $t$ -检验进行显著性分析,\*表示各处理与对照(0 h)存在显著差异( $P \leq 0.05$ )。

迫下,二者的转录及蛋白表达水平均高于对照(Becher等2004; Weber等2004)。这些结果表明,NA在真核微生物及高等植物抵抗Zn胁迫的过程中发挥重要的作用。此外,Zn胁迫下小麦根中NAAT上调表达(图2-G),有利于MAs的合成。由此推测,Zn胁迫下,植物可能通过增强NA及MAs的合成来整合植物体内多余的Zn<sup>2+</sup>,缓解Zn对植物的毒害。

由此可见,小麦SAM代谢途径各支路对Zn胁迫的响应不尽相同,其中GSH和NA支路代谢活动增强;在不同的Zn胁迫强度下,小麦SAM各代谢支路的快速响应存在差异。此外,PAAs和乙烯合成途径在Zn胁迫的响应中可能存在竞争作用。总之,SAM代谢途径在Zn胁迫响应中发挥重要作用,但其参与的具体生理生化和分子机制还需进一步研究。



## 参考文献

- 陈冬花(2011). 小麦盐胁迫响应基因*TaACO1*和*TaSTPK*的克隆与功能分析[学位论文]. 泰安: 山东农业大学
- 陈坤明, 张承烈(2000). 干旱期间春小麦叶片多胺含量与作物抗旱性的关系. 植物生理学报, 26 (5): 381~386
- 丁海东, 齐乃敏, 朱为民, 万延慧(2006). 镉、锌胁迫对番茄幼苗生长及其脯氨酸与谷胱甘肽含量的影响. 中国生态农业学报, 14: 53~55
- 龚红梅, 沈野(2010). 植物对重金属锌耐性机理的研究进展. 西北植物学报, 30: 633~644
- 纪宇, 李振涛, 朱奇, 李爱秀(2005). S-腺苷高半胱氨酸水解酶及其抑制剂的研究进展. 药学进展, 29 (11): 481~486
- 李昌澎, 周琳璘, 陈亮, 黄林周, 陈晓杰, 王宇坤, 胡银岗(2011). S-腺苷甲硫氨酸代谢途径相关基因在小麦水分胁迫中的表达. 西北植物学报, 31 (6): 1120~1126
- 汪沛洪(1990). 植物多胺代谢的酶类与胁迫反应. 植物生理学通讯, (1): 1~7
- 王育花, 陈芬, 储成才, 肖国樱(2008). 转大麦烟酰胺合成酶基因提高水稻逆境胁迫耐受性的研究. 广西农业生物科学, 27: 25~30
- Apelbaum A, Burgoon AC, Anderson JD, Lieberman M, Ben-Arie R, Mattoo AK (1981). Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. Plant Physiol, 68: 453~456
- Barry CS, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton AJ, Grierson D (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. Plant J, 9: 525~535
- Becher M, Talke IN, Krall L, Krämer U (2004). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. Plant J, 37: 251~268
- Blume B, Grierson D (1997). Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. Plant J, 12: 731~746
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. Plant Sci, 140: 103~125
- Cakmak I, Sari N, Marschner H, Ekiz H, Kalayci M, Yilmaz A, Braun HJ (1996). Phytosiderophore release in bread and durum wheat genotypes differing in zinc efficiency. Plant Soil, 180: 183~189
- Cantoni GL (1953). S-Adenosylmethionine; a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. J Biol Chem, 204: 403~416
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. FASEB J, 10: 471~480
- Di Baccio D, Kopriva S, Sebastiani L, Rennenberg H (2005). Does glutathione metabolism have a role in the defence of poplar against zinc excess? New Phytol, 167: 73~80
- Douchkov D, Herbig A, Koch G, Mock HP, Melzer M, Stephan UW, Bäumlein H (2002). Nicotianamine synthase: gene isolation, gene transfer and application for the manipulation of plant iron assimilation. Plant Soil, 241: 115~119
- Higuchi K, Suzuki K, Nakanishi H, Yamaguchi H, Nishizawa NK, Mori S (1999). Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. Plant Physiol, 119: 471~480
- Higuchi K, Watanabe S, Takahashi M, Kawasaki S, Nakanishi H, Nishizawa NK, Mori S (2001). Nicotianamine synthase gene expression differs in barley and rice under Fe-deficient conditions. Plant J, 25: 159~167
- Jiang YQ, Deyholos MK (2006). Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. BMC Plant Biol, 25
- Kakkar RK, Rai VK (1993). Plant polyamines in flowering and fruit ripening. Phytochemistry, 33: 1281~1288
- Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S (2004). Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol, 45: 712~722
- Kaur-Sawhney R, Shih LM, Flores HE, Galston AW (1982). Relation of polyamine synthesis and titer to aging and senescence in oat leaves. Plant Physiol, 69: 405~410
- Kende H (1993). Ethylene biosynthesis. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 44: 283~307
- Kumar A, Taylor MA, Arif SA, Davies HV (1996). Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. Plant J, 9: 147~158
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. Methods, 25 (4): 402~408
- Masuda H, Usuda K, Kobayashi T, Ishimaru Y, Kakei Y, Takahashi M, Higuchi K, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2009). Overexpression of the barley nicotianamine synthase gene *HvNAS1* increases iron and zinc concentrations in rice grains. Rice, 2 (4): 155~166
- Mizuno D, Higuchi K, Sakamoto T, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2003). Three nicotianamine synthase genes isolated from maize are differentially regulated by iron nutritional status. Plant Physiol, 132: 1989~1997
- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. Plant Physiol, 118: 129~1305

- Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Foyer CH (1998). Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiol*, 118: 471~482
- Suzuki M, Takahashi M, Tsukamoto T, Watanabe S, Matsuhashi S, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Nakanishi H, Mori S et al (2006). Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytochelatins in zinc-deficient barley. *Plant J*, 48: 85~97
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK (2003). Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell*, 15: 1263~1280
- Van Assche F, Ceulemans R, Clijsters H (1980). Zinc mediated effects on leaf CO<sub>2</sub> diffusion conductances and net photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* L. *Photosynth Res*, 1: 171~180
- Van Breusegem F, Dekeyser R, Gielen J, Caplan A (1994). Characterization of a S-adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant Physiol*, 105: 1463~1464
- van de Mortel JE, Villanueva LA, Schat H, Kwekkeboom J, Coughlan S, Moerland PD, Ver Loren van Themaat E, Koornneef M, Aarts MGM (2006). Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol*, 142: 1127~1147
- Wang KLC, Li H, Ecker JR (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 14: S131~S151
- Weber M, Harada E, Vess C, Roepenack-Lahaye E, Clemens S (2004). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J*, 37: 269~281
- Yang SF, Hoffman NE (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol*, 35: 155~189
- Zhang F, Romheld V, Marschner H (1991). Release of zinc mobilizing root exudates in different plant species as affected by zinc nutritional status. *J Plant Nutr*, 14: 675~686