

精氨酸脱羧酶基因*AtADC2*通过调节超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性增强拟南芥耐盐性

郭彩明, 陈宗明, 陈春丽*

华中农业大学生命科学技术学院, 武汉430070

摘要: 腐胺(Put)在植物耐盐中有重要作用。精氨酸脱羧酶(ADC)是Put合成的关键限速酶, 该酶参与植物对盐胁迫响应的机制还不清楚。本文以拟南芥中编码ADC的基因*AtADC2*功能缺失突变体(*adc2-3*)和*AtADC2*超表达家系(*ADC2-OE*)为材料, 用NaCl模拟盐胁迫条件, 研究*AtADC2*对盐胁迫下拟南芥生长的影响机制。结果表明, 盐胁迫诱导*AtADC2*基因在拟南芥主根根尖表达上调。在150 mmol·L⁻¹ NaCl胁迫下, 与野生型相比, *adc2-3*生长受到严重抑制, 丙二醛(MDA)、超氧阴离子(O₂⁻)和过氧化氢(H₂O₂)含量均上升, 而*AtADC2*超表达家系中H₂O₂含量有所下降。另外, 盐处理后*AtADC2*超表达家系中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性显著升高, 而*adc2-3*中变化不明显。由此可见, 盐胁迫诱导*AtADC2*基因表达, 从而调节SOD和CAT活性来增强拟南芥的抗盐性。

关键词: 腐胺; 精氨酸脱羧酶; 盐胁迫; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶

AtADC2 Enhances Salt Tolerance through Regulating Activities of Superoxide Dismutase and Catalase in *Arabidopsis thaliana*

GUO Cai-Ming, CHEN Zong-Ming, CHEN Chun-Li*

College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: Putrescine (Put) plays an important role in plant salt tolerance. Arginine decarboxylase (ADC) is a key rate-limiting enzyme in Put biosynthesis, but it remains unclear how ADC is involved in salt responses in plants. In this study, the loss-of-function mutant and the line overexpressing the *AtADC2* gene encoding ADC were used to analysis how ADC affected the growth of *Arabidopsis thaliana* under the salt stress conditions. The results showed that salt treatment enhanced *AtADC2* expression in the primary root tip. When grown in the presence of 150 mmol·L⁻¹ NaCl, the growth of the *AtADC* T-DNA insertion mutant line *adc2-3* was inhibited more than wild type. The accumulation of malondialdehyde (MDA), superoxide anion (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂) all increased in the mutant, but H₂O₂ decreased in the *AtADC2* overexpression line. Enzyme activity assay showed that superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were significantly increased in *AtADC2* overexpression line, but no change was detected in the *adc2-3* mutant with salt treatment. These results indicate that the salt-stress-inducible *AtADC2* gene may regulate SOD and CAT activities in response to salt stress.

Key words: putrescine; arginine decarboxylase; salt stress; superoxide dismutase; catalase

多胺(polyamines, PAs)是一类具有强生物活性的低分子量脂肪族含氮碱, 广泛存在于原核和真核生物体内, 包括腐胺(putrescine, Put)、亚精胺(spermidine)、精胺(spermine)、热精胺(thermospermine) (Kusano等2007)。在动物中, PAs与大分子(如DNA、RNA和蛋白质)相互作用, 稳定它们的结构, 从而维持细胞的正常生长(D'Agostino等2005); 在植物中, PAs参与了许多生理过程, 如种子形成、胚胎发育、花发育、茎生长、果实的成熟和木质部形成(Cui等2010; Milhinhos等2013; Urano等2005; Vuosku等2012)。我们前期的研究结果也显示, 外

源PAs以及相应抑制剂对模式植物拟南芥的处理, 对植株根系的生长发育起着重要影响(高红和陈春丽2013)。此外, PAs也参与了各种生物和非生物胁迫(Ha等1998; Kusano等2008; Alcázar等2010a)。

在模式植物拟南芥的PAs合成途径中, 精氨酸

收稿 2015-05-08 修定 2015-07-09

资助 国家自然科学基金资助项目(J1103510)和中央高校基本科研业务费专项资金项目(2013PY084)。

致谢 英国杜伦大学生物学院Lindsey K.教授和Rowe J. H.博士修改英文。

* 通讯作者(chenchunli@mail.hzau.edu.cn; Tel: 027-87281300)。

脱羧酶(arginine decarboxylase, ADC)是Put合成的关键性限速酶,催化L-精氨酸合成Put (Hanfrey等2001)。其他PAs的合成,则需要甲硫氨酸在S-腺苷甲硫氨酸和脱羧S-腺苷甲硫氨酸的催化下提供氨丙基。Put作为合成其他PAs的前体,由亚精胺合成酶催化合成亚精胺,亚精胺分别经精胺合成酶、热精胺合成酶催化,再加入一个氨丙基形成精胺和热精胺(Kim等2014)。PAs含量的变化与多种胁迫有密切关系。在水稻、拟南芥、烟草等植物中Put、亚精胺或精胺含量的增加与植株耐性的提高有关(Alcázar等2010a)。拟南芥中有2个基因拷贝*AtADC1*和*AtADC2*编码ADC (Soyka和Heyer 1999)。超表达*AtADC1*, Put含量增加提高了拟南芥的耐冷性,而ADC缺失突变体对低温更敏感,进一步研究发现Put通过调节脱落酸的合成和相关基因的表达来响应低温(Cuevas等2008);超表达*AtADC2*, Put含量的增加提高了拟南芥的耐旱性,这可能是通过诱导气孔的关闭从而降低水分的损失(Alcázar等2010b)。当植物受到外界胁迫时,细胞内会积累过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS),抗氧化酶系统能够及时清除ROS,从而保护细胞免受伤害。研究发现,拟南芥ADC突变体中超表达柑橘*PtADC*,提高Put的合成。干旱处理后,转基因家系中ROS积累明显减少,但是用ADC抑制剂D-精氨酸处理转基因家系后发现ROS清除能力有所下降(Wang等2011)。此外,在氧化胁迫下,*Os-LDC-like 1*缺失突变体中PAs含量明显积累,表现出耐胁迫性。外源施加亚精胺和精胺也显著抑制ROS的积累,减轻细胞损伤。研究表明,*Os-LDC-like 1*通过调节PAs的含量,从而改变抗氧化酶的活性(Jang等2012)。Ds插入突变体*adc2-1*中游离Put含量减少,对盐胁迫更敏感,通过外源施加Put,耐盐性有所恢复(Urano等2004),但是相关机制尚不清楚。本研究采用T-DNA插入导致ADC2表达缺失的突变体和ADC2超表达的转基因家系等材料,探究*AtADC2*参与盐胁迫的途径,为进一步阐明PAs与盐胁迫之间的关系提供依据。

材料与方 法

1 植物材料与盐胁迫处理

所用材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野

生型Col-0, T-DNA插入的*AtADC2*功能缺失突变体*adc2-3* (购于Arabidopsis Biological Resource Center at Ohio State University), 本实验室构建的*AtADC2*超表达转基因家系*ADC2-OE*和*AtADC2*启动子融合*GUS*转基因家系*pAtADC2::GUS*。

拟南芥种子经70%乙醇表面消毒1 min, 然后用1%次氯酸钠灭菌15 min, 无菌水洗净。将无菌种子点种于1/2MS培养基(Duchefa Biochemie)上, 其中含1% (W/V)的蔗糖, 4 °C春化3 d。置于22 °C、光/暗周期16 h/8 h、光强120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 条件下培养。盐胁迫处理时, 将种子点种于含150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的1/2MS培养基中进行培养。

2 丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的测定

参照Heath和Packer (1968)的方法, 略有修改。取新鲜拟南芥幼苗, 分析天平称取约0.5 g, 加5%三氯乙酸(TCA) 5 mL, 用预冷的研钵研磨至匀浆, 倒入离心管中。在4 °C条件下, 4 276.4 \times g离心10 min, 取上清2 mL, 加入0.67%硫代巴比妥酸(TBA) 2 mL, 于100 °C沸水中煮30 min, 室温自然冷却后取1.5 mL, 室温下13 000.4 \times g离心后取上清。用分光光度计分别测定上清液在450、532和600 nm处的吸光值, 并按公式计算: MDA浓度=6.45 \times ($A_{532}-A_{600}$)-0.56 \times A_{450} , 再算出单位鲜重组织中MDA的含量。

3 NBT、DAB、GUS组织化学染色

氯化硝基四氮唑蓝(nitrotetrazolium blue chloride, NBT)染色参考Ramel等(2009)的方法, 略有修改。染色液含0.1% (W/V) NBT、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 叠氮化钠、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液, pH 7.8。将拟南芥幼苗放入NBT染液, 染色7 min, 用水洗净, 拍照。

二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)染色参考Ramel等(2009)的方法, 略有修改。称取DAB溶解于10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.8), 终浓度为1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。用1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl调节pH为3.8, 染色前每1 mL染液中加入1 μL 30% H_2O_2 , 再稀释1/10为工作液浓度。将拟南芥幼苗放入DAB染液, 染色8 min, 用水洗净后拍照。

GUS活性检测染色液含1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 2.1 mL、1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 2.9 mL、0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0) 2.0 mL、1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{KFe}(\text{CN})_4$ 1.0 mL、1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{KFe}(\text{CN})_3$ 1.0 mL、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯霉素0.2 mL、1% Triton-X 0.1 mL、甲醇20.0 mL、

β -D-葡萄糖苷酸(X-Gluc) 0.1 g, 加入ddH₂O定容至100 mL, 在黑暗条件下溶解, 放入4 °C冰箱中避光保存。将幼苗放入GUS染色液中, 37 °C染色1 h, 滴加适量透明剂压片, 于微分干涉显微镜(Nikon Eclipse 80i, DXM1200c)下观察拍照。

4 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性的测定

参照Luo等(2011)的方法测定SOD和CAT的活性, 略有修改。用分析天平称取样品约0.3 g, 置于冷却的研钵中, 加4 mL预冷的磷酸缓冲液(pH 7.8)进行研磨, 移入离心管, 在4 °C条件下7 127.3×g离心20 min, 上清液即为粗酶液。

SOD活性测定体系含0.05 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.8) 1.3 mL、130 mmol·L⁻¹甲硫氨酸0.16 mL、750 μ mol·L⁻¹氮蓝四唑0.16 mL、100 μ mol·L⁻¹ EDTA-Na₂ 0.16 mL、酶液0.06 mL、核黄素0.16 mL, 28 °C强光下反应10 min。阴性对照不加入酶液且不光照; 阳性对照不加入酶液但光照, 在560 nm处测定吸光值。根据公式计算: SOD活性=($A_{CK}-A_E$) $\times V_T \times 0.5 \times W \times V_S / A_{CK}$, 其中, V_T 为总酶液量(mL), V_S 为所用酶液量(50 μ L), W 为叶片鲜重(g), A_{CK} 为阳性对照吸光度, A_E 为样品管吸光度。

CAT活性测定体系含0.2 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.8) 3.0 mL、粗酶液0.4 mL、蒸馏水2.0 mL, 25 °C预热后, 逐管加入0.1 mol·L⁻¹ H₂O₂ 0.6 mL, 240 nm下测定吸光度, 以失活酶液作为对照, 每隔1 min读数1次, 共测4 min。以1 min内 A_{240} 减少0.1的酶量为1个酶活单位(U)。根据公式计算: CAT活性= $\Delta A_{240} \times V_T / (0.1 V_1 \times t \times FW)$ 。其中, $\Delta A_{240} = A_{S0} - A_S$, A_{S0} 为加入失活酶液的对照管吸光度, A_S 为样品管吸光度; V_T (mL)为粗酶提取液总体积; V_1 (mL)为测定用粗酶提取液体积; FW (g)为样品鲜重; 0.1为 A_{240} 每下降0.1为1个酶活单位; t (min)为反应时间。

5 数据处理

所有实验结果均为3次重复。采用Microsoft Excel软件对数据进行处理及绘图, 采用SPSS Statistics软件中LSD test进行统计分析。

实验结果

1 盐胁迫诱导*AtADC2*基因在拟南芥主根根尖上调表达

对*pAtADC2::GUS*转基因拟南芥幼苗主根进

行GUS染色观察的结果显示, GUS的表达主要位于主根根尖伸长区与成熟区(图1-A), 表明*AtADC2*基因主要在该区域表达; 与对照相比, 经150 mmol·L⁻¹ NaCl处理, GUS在主根根尖伸长区和成熟区区域的染色加深(图1-B), 说明盐胁迫诱导*AtADC2*基因在主根根尖上调表达。

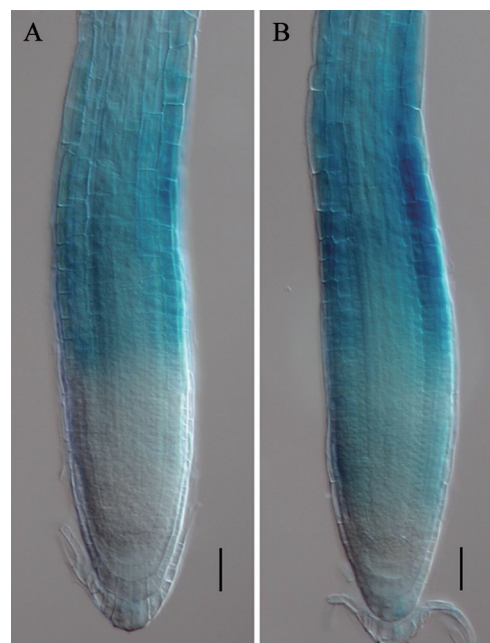


图1 盐胁迫下*pAtADC2::GUS*转基因家系中GUS在主根根尖的表达

Fig.1 GUS expression in the primary root tip of *pAtADC2::GUS* transgenic line under salt stress

将正常条件下生长5 d的*pAtADC2::GUS*转基因拟南芥幼苗分别移到1/2MS培养基(A, 对照)和含150 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2MS培养基(B)上, 2 h后对主根进行GUS染色观察。标尺=200 μ m。

2 盐胁迫下*adc2-3*及*ADC2-OE*的生长及MDA含量的变化

图2-A~C显示, 在正常条件下, Col-0、*adc2-3*、*ADC2-OE*地上部分长势相当; 150 mmol·L⁻¹ NaCl处理后, 与野生型Col-0相比, *ADC2-OE*地上部分长势较好, 而*adc2-3*地上部分长势明显弱于野生型Col-0和*ADC2-OE* (图2-D~F)。

MDA含量测定结果显示, 盐胁迫下, 与野生型相比, *adc2-3*中MDA含量显著升高, 而*ADC2-OE*中变化不显著(图3)。这表明, 在盐胁迫下, *adc2-3*中细胞膜系统受到损伤, 从而表现出对盐敏感, 即*AtADC2*基因参与盐胁迫这一非生物逆境的响应。

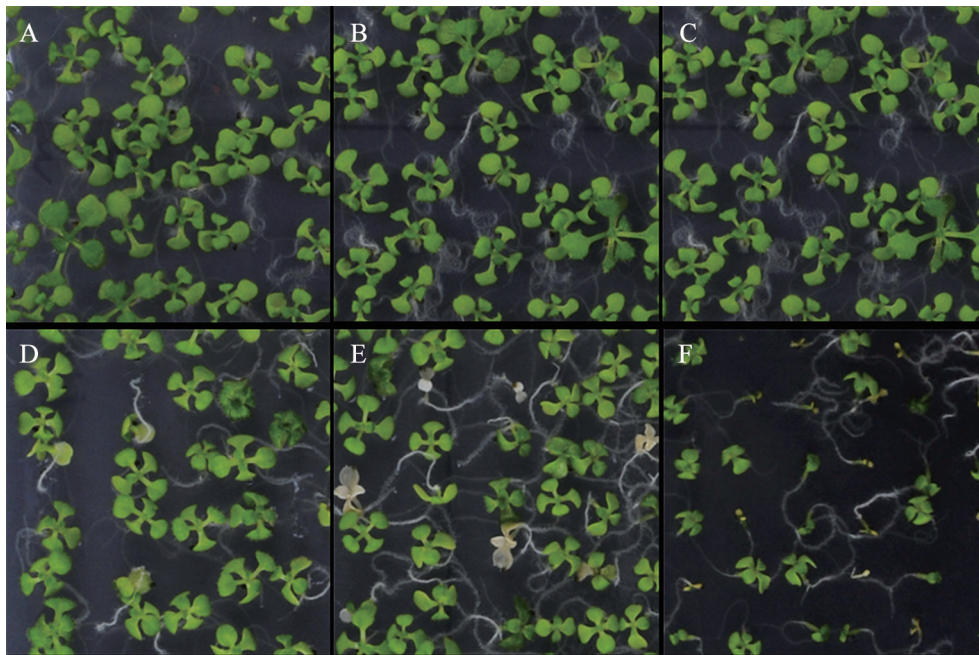


图2 盐胁迫下Col-0 (B和E)、*adc2-3* (C和F)和*ADC2-OE* (A和D)植株的表型观察

Fig.2 Observation of phenotypes of Col-0 (B and E), *adc2-3* (C and F) and *ADC2-OE* (A and D) plants under salt stress

A~C: 对照; D~F: 150 mmol·L⁻¹ NaCl.

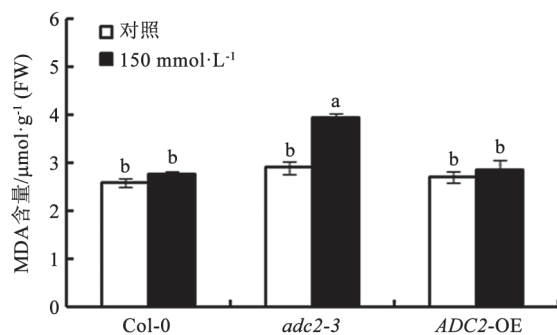


图3 盐胁迫下Col-0、*adc2-3*和*ADC2-OE*植株中MDA含量的变化

Fig.3 Changes in MDA contents in Col-0, *adc2-3* and *ADC2-OE* plants under salt stress

Col-0、*adc2-3*、*ADC2-OE*点种于1/2MS (对照)和含150 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2MS培养基上培养20 d后测定植株中MDA含量。不同小写字母表示同一处理时间下不同处理之间差异显著 ($P < 0.05$)。

3 盐胁迫下*adc2-3*及*ADC2-OE*主根根尖O₂⁻含量的变化

对幼苗主根进行NBT染色观察的结果显示,在正常条件下,Col-0、*adc2-3*、*ADC2-OE*主根根尖染色没有明显差异(图4-A~C); 150 mmol·L⁻¹

NaCl处理后Col-0、*adc2-3*、*ADC2-OE*植株主根根尖染色均有不同程度加深,其中*adc2-3*的根尖染色呈现较深的程度,且与Col-0染色有显著差异(图4-E),*ADC2-OE*染色也比Col-0染色深(图4-F)。说明150 mmol·L⁻¹ NaCl处理后,*adc2-3*中O₂⁻明显增多,可能由此导致细胞膜过度受损,因而表现出不耐盐。

4 盐胁迫下*adc2-3*及*ADC2-OE*主根根尖H₂O₂含量的变化

对幼苗主根进行DAB染色观察的结果显示,在正常条件下,Col-0、*adc2-3*、*ADC2-OE*主根根尖DAB染色没有明显差异(图5-A~C); 150 mmol·L⁻¹ NaCl处理后,Col-0、*adc2-3*、*ADC2-OE*主根根尖染色均加深,但是*adc2-3*根尖染色最深,且与Col-0染色有显著差异,而*ADC2-OE*染色比Col-0浅(图5-D~F),说明150 mmol·L⁻¹ NaCl处理后,*adc2-3*中H₂O₂明显增多,可能由此导致突变体植株细胞膜受损,而*ADC2-OE*中受盐胁迫产生的H₂O₂比较少,有利于*ADC2-OE*植株的生长。

5 盐胁迫下*adc2-3*及*ADC2-OE*植株中SOD和CAT活性的变化

SOD和CAT活性测定结果显示,在正常条件



图4 盐胁迫下Col-0 (A和D)、*adc2-3* (B和E)和*ADC2*-OE (C和F)植株中主根根尖的NBT染色

Fig.4 NBT-staining primary root tips of Col-0 (A and D), *adc2-3* (B and E) and *ADC2*-OE (C and F) plants under salt stress
将正常条件下生长5 d的幼苗分别移到1/2MS培养基和含150 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2MS培养基上, 48 h后对主根进行NBT染色观察。
A~C: 对照; D~F: 150 mmol·L⁻¹ NaCl。标尺=200 μm。

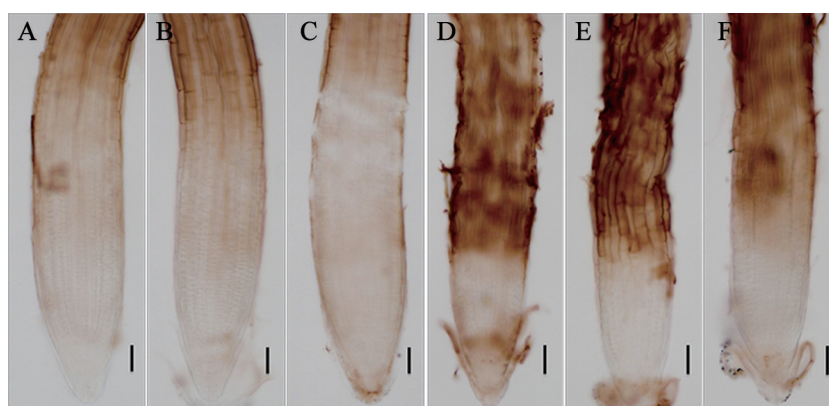


图5 盐胁迫下Col-0 (A和D)、*adc2-3* (B和E)和*ADC2*-OE (C和F)植株中主根根尖的DAB染色

Fig.5 DAB-staining primary root tips of Col-0 (A and D), *adc2-3* (B and E) and *ADC2*-OE (C and F) plants under salt stress
将正常条件下生长5 d的幼苗分别移到1/2MS培养基和含150 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2MS培养基上, 48 h后对主根进行DAB染色观察。
A~C: 对照; D~F: 150 mmol·L⁻¹ NaCl。标尺=200 μm。

下, Col-0、*adc2-3*、*ADC2*-OE中SOD和CAT活性没有显著差异。150 mmol·L⁻¹ NaCl处理后, Col-0、*adc2-3*、*ADC2*-OE中SOD和CAT活性均显著上升; 与野生型相比, *ADC2*-OE家系中SOD和CAT活显著升高, 而*adc2-3*中差异不显著(图6-A和B)。由NBT和DAB染色可知, 盐处理后*adc2-3*中O₂⁻和H₂O₂过量积累, 而SOD和CAT活性并没有显著上升, 即*adc2-3*中不能快速清除O₂⁻和H₂O₂而导致细胞膜过度受损; *ADC2*-OE中虽然比野生型Col-0积累较多O₂⁻, 但是SOD和CAT活性显著上升, 能够不断地清除O₂⁻和H₂O₂的积累, 所以增强了耐盐性。

讨 论

我们研究了*AtADC2*启动子融合*GUS*转基因植株中*GUS*表达模式, 发现*AtADC2*基因在主根根尖有强烈表达。前人研究表明*AtADC1*和*AtADC2*的表达模式表现不同, 二者功能也存在冗余(Hummel等2004; Urano等2005)。其中, *AtADC2*在种子萌发、根和叶中强烈表达, 而*AtADC1*在整个营养生长阶段表达都较低(Hummel等2004)。这与我们观察到的结果一致。但我们的研究结果不仅在器官水平上显示*AtADC2*基因的表达模式, 还清楚观察到该基因在组织细胞水平的表达位置。*AtADC2*

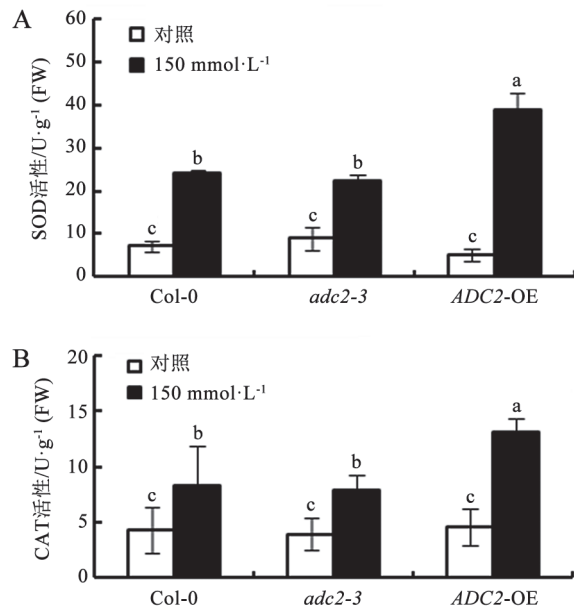


图6 盐胁迫下Col-0、*adc2-3*和*ADC2-OE*植株中SOD和CAT活性的变化

Fig.6 Changes in SOD and CAT activities in Col-0, *adc2-3* and *ADC2-OE* plants under salt treatment

Col-0、*adc2-3*、*ADC2-OE*点种于1/2MS (对照)和含150 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2MS培养基上培养20 d后测定植株中SOD和CAT活性。不同小写字母表示同一处理时间下不同处理之间差异显著($P < 0.05$)。

启动子融合*GUS*转基因植株中*GUS*染色结果表明,该基因仅在根尖组织的伸长区细胞表达,暗示该基因的功能可能与拟南芥主根的伸长有关系。

进一步采用盐胁迫处理,我们观察到*AtADC2*基因的启动子在拟南芥主根根尖表达呈明显上调变化,表明*AtADC2*基因参与盐胁迫响应。已有报道认为*AtADC1*和*AtADC2*的表达受低温或冷冻在不同程度上诱导(Alet等2011; Urano等2004; Perez-Amador等2002; Soyka和Heyer 1999)。此外,*AtADC2*基因的表达也受脱落酸和茉莉酸的诱导(Perez-Amador等2002; Soyka和Heyer 1999)。我们的结果显示*AtADC2*基因的表达在盐胁迫下显著上升,与前人的研究结果综合表明该基因广泛参与盐害、冷害等非生物逆境响应,暗示内源Put的提高可能对增强植株的耐胁迫性起着重要作用。

另外,我们的研究发现*adc2-3*的生长在盐处理下受到严重抑制。MDA是膜脂过氧化最重要的产物之一,MDA含量可反映膜脂过氧化的程度,以间

接测定膜系统受损情况(林艳等2012)。我们分析MDA含量的变化发现,盐处理后,*adc2-3*中MDA含量显著升高,这表明由于*adc2-3*中膜系统受损较严重,植株表现出不耐盐性。奇怪的是,盐处理后,Col-0和*ADC2-OE*中MDA含量与未处理相比,变化并不明显。

在正常生长条件下,植物体内ROS的产生和清除处于一个动态平衡, O_2^- 促进细胞的分裂,而 H_2O_2 促进细胞的分化(Tsukagoshi等2010)。但是当植物受到外界胁迫时,这一动态平衡就会被打破,导致细胞内积累过多的ROS。过量ROS的积累会引起膜脂的过氧化反应,损害膜的结构(赵宝龙等2015)。此外,ROS也会引起其他一些蛋白质功能的失活、攻击核酸导致DNA损伤,以及影响DNA的复制和转录(王瑞刚等2005)。植物主要依靠抗氧化酶系统来及时清除过多的ROS,从而维持细胞的生长。抗氧化酶系统主要包括SOD、CAT、POD、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、抗坏血酸/谷胱甘肽循环系统等。SOD是植物体内ROS自由基清除系统的第一道防线,催化 O_2^- 生成 H_2O_2 (Neill等2002)。而植物细胞中高浓度的 H_2O_2 主要依靠CAT进行分解。体外实验发现, PAs能够直接清除ROS如 O_2^- 、 H_2O_2 ,保护细胞免受ROS的毒害。另外, PAs被认为是细胞膜的保护者(Jang等2012)。因此,我们采用NBT和DAB染色,发现盐处理后突变体*adc2-3*中 O_2^- 和 H_2O_2 都显著高于野生型,而*ADC2-OE*中 H_2O_2 的含量有所减少, O_2^- 的含量比野生型中的高。通过测定植物体内SOD和CAT的活性,发现盐胁迫处理后,这两种酶的活性在所有材料中都显著升高,这与植物自身保护机制相一致。但是我们还发现,盐处理后,Col-0和*adc2-3*中SOD和CAT活性没有显著性差异,这与*adc2-3*不耐盐相一致。盐处理后,与野生型相比,*adc2-3*中积累了大量的ROS,但是SOD和CAT活性并没有显著上升,因此*adc2-3*中不能及时清除积累的ROS,从而表现出不耐盐性。而盐处理后,尽管*ADC2-OE*家系中有过多的 O_2^- 积累,但是与野生型相比,*ADC2-OE*家系中SOD和CAT活性均显著升高,能够及时清除过多 O_2^- 的积累,从而提高植物的耐盐性。此外,在正常条件下,*AtADC2*中由于赤霉素的缺失导致植株矮化和开花推迟。通过转录组分析

超表达家系,发现一系列属于AP2/ERF结构域家族的转录因子显著下调,这些转录因子参与盐、冷、干旱等胁迫响应(Alcázar等2005)。PAs合成基因影响一些胁迫相关基因的表达,这暗示着PAs可能在植物响应胁迫中起到信号分子的作用。

由以上分析可知,盐胁迫诱导*AtADC2*表达上调。盐处理后,*adc2-3*表现出对盐敏感,而*ADC2-OE*表现出耐盐性。*adc2-3*中 O_2^- 和 H_2O_2 过多积累,损伤植株细胞膜;*AtADC2*表达上调会引起SOD和CAT活性的改变,从而调节植株对盐胁迫的响应。

参考文献

- 高红,陈春丽(2013).多胺生物合成抑制剂D-精氨酸对拟南芥幼苗根系生长的影响.植物生理学报,49(10):1082~1088
- 林艳,郭伟珍,徐振华,贾宗锴(2012).大叶女贞抗寒性及冬季叶片丙二醛和可溶性糖含量的变化.中国农学通报,28(25):68~72
- 王瑞刚,陈少良,刘力源,郝志勇,翁海娇,李鹤,杨爽,段彬(2005).盐胁迫下3种杨树的抗氧化能力与耐盐性研究.北京林业大学学报,27(3):46~52
- 赵宝龙,刘鹏,王文静,孙军利,马海新(2015).5-氨基乙酰丙酸(ALA)对盐胁迫下葡萄叶片中AsA-GSH循环的影响.植物生理学报,51(3):385~390
- Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF (2010a). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta*, 231(6): 1237~1249
- Alcázar R, García-Martínez JL, Cuevas JC, Tiburcio AF, Altabella T (2005). Overexpression of *ADC2* in *Arabidopsis* induces dwarfism and late-flowering through GA deficiency. *Plant J*, 43(3): 425~436
- Alcázar R, Planas J, Saxena T, Zarza X, Bortolotti C, Cuevas J, Birián M, Tiburcio AF, Altabella T (2010b). Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous *arginine decarboxylase 2* gene. *Plant Physiol Biochem*, 48(7): 547~552
- Alet AI, Sanchez DH, Cuevas JC, Del Valle S, Altabella T, Tiburcio AF, Marco F, Ferrando A, Espasandín FD, González ME et al (2011). Putrescine accumulation in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines enhances tolerance to dehydration and freezing stress. *Plant Signal Behav*, 6(2): 278~286
- Cuevas JC, López-Cobollo R, Alcázar R, Zarza X, Koncz C, Altabella T, Salinas J, Tiburcio AF, Ferrando A (2008). Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiol*, 148(2): 1094~1105
- Cui X, Ge C, Wang R, Wang H, Chen W, Fu Z, Jiang X, Li J, Wang Y (2010). The *BUD2* mutation affects plant architecture through altering cytokinin and auxin responses in *Arabidopsis*. *Cell Res*, 20(5): 576~586
- D'Agostino L, Di Pietro M, Di Luccia A (2005). Nuclear aggregates of polyamines are supramolecular structures that play a crucial role in genomic DNA protection and conformation. *FEBS J*, 272(15): 3777~3787
- Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RJ (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(19): 11140~11145
- Hanfrey C, Sommer S, Mayer MJ, Burtin D, Michael AJ (2001). *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J*, 27(6): 551~560
- Heath RL, Packer L (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 125(1): 189~198
- Hummel I, Bourdais G, Gouesbet G, Couée I, Malmberg RL, Amrani AE (2004). Differential gene expression of *ADC1* and *ADC2* in *Arabidopsis thaliana* characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. *New Phytol*, 163(3): 519~531
- Jang SJ, Wi SJ, Choi YJ, An G, Park KY (2012). Increased polyamine biosynthesis enhances stress tolerance by preventing the accumulation of reactive oxygen species: T-DNA mutational analysis of *Oryza sativa* lysine decarboxylase-like protein 1. *Mol Cells*, 34(3): 251~262
- Kim DW, Watanabe K, Murayama C, Izawa S, Niitsu M, Michael AJ, Berberich T, Kusano T (2014). Polyamine oxidase5 regulates *Arabidopsis* growth through thermospermine oxidase activity. *Plant Physiol*, 165(4): 1575~1590
- Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3): 367~381
- Kusano T, Yamaguchi K, Berberich T, Takahashi Y (2007). Advances in polyamine research in 2007. *J Plant Res*, 120(3): 345~350
- Luo H, Li H, Zhang X, Fu J (2011). Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology*, 20(4): 770~778
- Milhinhos A, Prestele J, Bollhoner B, Matos A, Vera-Sirera F, Rambla JL, Ljung K, Carbonell J, Blázquez MA, Tuominen H et al (2013). Thermospermine levels are controlled by an auxin-dependent feedback loop mechanism in *Populus* xylem. *Plant J*, 75(4): 685~698
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J Exp Bot*, 53(372): 1237~1247
- Perez-Amador MA, Leon J, Green PJ, Carbonell J (2002). Induction of the arginine decarboxylase *ADC2* gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 130(3): 1454~1463
- Ramel F, Sulmon C, Bogard M, Couée I, Gouesbet G (2009). Dif-

- ferential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biol*, 9: 28
- Soyka S, Heyer AG (1999). *Arabidopsis* knockout mutation of *ADC2* gene reveals inducibility by osmotic stress. *FEBS Lett*, 458 (2): 219~223
- Tsakagoshi H, Busch W, Benfey PN (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, 143 (4): 606~616
- Urano K, Hobo T, Shinozaki K (2005). *Arabidopsis ADC* genes involved in polyamine biosynthesis are essential for seed development. *FEBS Lett*, 579 (6): 1557~1564
- Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, Ito T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2004). *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase *AtADC2* is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem Biophys Res Commun*, 313 (2): 369~375
- Vuosku J, Suorsa M, Ruottinen M, Sutela S, Muilu-Mäkelä R, Julkunen-Tiitto R, Sarjal T, Neubauer P, Häggman H (2012). Polyamine metabolism during exponential growth transition in Scots pine embryogenic cell culture. *Tree Physiol*, 32 (10): 1274~1287
- Wang J, Sun PP, Chen CL, Wang Y, Fu XZ, Liu JH (2011). An arginine decarboxylase gene *PtADC* from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 62 (8): 2899~2914