

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20170034

# 胡杨 *PeAPY1* 和 *PeAPY2* 调控拟南芥耐盐机制研究

邓佳音<sup>1</sup> 张艳丽<sup>1</sup> 张一南<sup>1</sup> 赵瑞<sup>1</sup> 李金克<sup>2</sup> 周晓阳<sup>2</sup> 刘香芬<sup>3</sup> 陈少良<sup>1</sup>

(1 北京林业大学生物科学与技术学院 2 北京林业大学分析测试中心 3 河北石家庄市城市水系管理处)

**摘要:**本文研究了胡杨 apyrase 基因(*PeAPY1* 和 *PeAPY2*)对植物耐盐性的影响。以 *PeAPY1* 和 *PeAPY2* 过表达拟南芥、拟南芥 *Atapy1* 和 *Atapy2* 突变体、野生型(WT)拟南芥及空载体(VC)为实验材料,研究盐胁迫条件下的植物根长、相对电导率、细胞活力、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平、eATP浓度、抗氧化酶活性的变化。研究结果显示:低盐浓度(50 mmol/L NaCl)对拟南芥各基因型的生长和生理生化指标没有显著影响;而高盐浓度(100 mmol/L NaCl)抑制了各株系的根长生长、细胞活力和抗氧化酶(超氧化物歧化酶/SOD、抗坏血酸过氧化酶/APX、过氧化氢酶/CAT)活性,却提高了相对电导率、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平和 eATP 浓度。但与 *Atapy* 突变体株系相比较,*PeAPY* 过表达株系受高盐胁迫的影响较小。主要是由于 *PeAPY1/2* 的过表达提高了 apyrase 酶活,下调了 eATP 浓度及其诱发的活性氧水平,同时,过表达株系还通过保持抗氧化酶活性来抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的水平,从而降低活性氧及其对膜脂的过氧化,保持了膜的稳定性、细胞活力和生长,最终提高了植物耐盐性。

**关键词:***PeAPY1*; *PeAPY2*; 盐胁迫; 膜透性; 胞外 ATP; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

中图分类号:S792.11; Q945 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2017)06-0013-09

DENG Jia-yin<sup>1</sup>; ZHANG Yan-li<sup>1</sup>; ZHANG Yi-nan<sup>1</sup>; ZHAO Rui<sup>1</sup>; LI Jin-ke<sup>2</sup>; ZHOU Xiao-yang<sup>2</sup>; LIU Xiang-fen<sup>3</sup>; CHEN Shao-liang<sup>1</sup>. ***PeAPY1* and *PeAPY2* of *Populus euphratica* regulating salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2017) **39**(6) 13-21 [Ch, 36 ref.]

1 College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P. R. China;

2 Analytical and Testing Center, Beijing Forestry University, Beijing, 100083, P. R. China;

3 Bureau of Urban Water Resources Management, Shijiazhuang, Hebei, 050000, P. R. China.

We investigated the effects of *Populus euphratica* apyrase genes (*PeAPY1* and *PeAPY2*) on salt tolerance of higher plants. Using *PeAPY1* and *PeAPY2* transgenic plants, *Atapy1* and *Atapy2* mutants, *Arabidopsis* wild type (WT) and vector controls (VC), we examined the effects of NaCl on root length, relative electrolyte leakage, cell viability, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, extracellular ATP (eATP) and antioxidant enzyme activities. Results showed that the low salinity (50 mmol/L NaCl) had no significant effects on root growth, physiological and biochemical parameters. However, a high salinity (100 mmol/L NaCl) markedly reduced root length, cell viability and activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase / SOD, ascorbate peroxidase / APX, catalase / CAT). In contrast, the high NaCl increased relative electrolyte leakage, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and eATP levels in all the tested lines. *PeAPY1/2*-transgenic lines exhibited a less pronounced effects as compared with the *Arabidopsis Atapy* mutants under high salinity. We inferred that the overexpression of *PeAPY1/2* led to an up-regulated apyrase, which hydrolyzed eATP and down-regulated the ATP induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Moreover, *PeAPY1/2* -transgenic lines maintained activity of antioxidant enzymes under salt stress. This would reduce the membrane peroxidation induced by the

收稿日期: 2017-02-12 修回日期: 2017-03-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270654, 31570587)、教育部科学技术研究(科学技术类)项目(113013A)、北京市自然科学基金项目(6172024)、高等学校学科创新引智计划项目(111 project, B130007)、教育部创新团队发展计划项目(IRT13047)。

第一作者: 邓佳音。主要研究方向:树木逆境生理。Email:dengjiayin12345@163.com 地址:100083 北京市海淀区清华东路35号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 陈少良,教授,博士生导师。主要研究方向:树木逆境生理。Email:lschen@bjfu.edu.cn 地址:同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

reactive oxygen species. As a result, the membrane integrity and cell viability were less affected by salt stress, leading to an increased salt tolerance in *PeAPY1/2*-transgenic plants.

**Key words** *PeAPY1*; *PeAPY2*; salt stress; membrane leakage; eATP; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

胞内 ATP(三磷酸腺苷又称腺苷三磷酸, adenosine triphosphate)是高能磷酸化合物的典型代表,为细胞内特殊的自由能载体。生物体代谢所发生的化学反应多有 ATP 参与<sup>[1-3]</sup>,ATP 同时也为机体生命活动提供能量。在胞外发现的 ATP 对细胞的生命活动同样具有重要作用<sup>[4-5]</sup>。最早在动物细胞外基质中发现了胞外 ATP(extracellular ATP, eATP)<sup>[6]</sup>,随后证实,eATP 来源于细胞的正常分泌而非由细胞凋亡质膜破裂所引起的胞内 ATP 外泄<sup>[7]</sup>。同样,在植物细胞中也证实了 eATP 的存在。人们发现 eATP 可以参与植物生长发育和生理活动的调节,例如外源 ATP 可以促进捕蝇草叶片闭合<sup>[8]</sup>,并且,eATP 在调控植物生长发育过程中表现出两相性<sup>[9]</sup>。更为重要的是,eATP 可以作为信号分子调控植物的生长和发育<sup>[10-11]</sup>,如参与调控棉花(*Gossypium hirsutum*)纤维的生长<sup>[12]</sup>与生物胁迫的抗逆调节等生理过程。

在渗透胁迫条件下,eATP 会诱发活性氧水平的提高,高浓度的 eATP 还会诱发植物细胞的程序化死亡(PCD)<sup>[13]</sup>。因此,在胁迫条件下,控制 eATP 的水平对植物适应胁迫环境至关重要。Sun 等<sup>[13]</sup>发现胡杨细胞能够调控 ATP 水平,避免高浓度的 eATP 诱发的 PCD,从而提高了细胞的耐盐性。研究者推测,盐处理的胡杨细胞很可能是利用 apyrase(三磷酸腺苷双磷酸酶)水解胞外 ATP,维持细胞的活力<sup>[14]</sup>。最近,Deng 等<sup>[15]</sup>研究发现,胡杨 apyrase 2 能够调控 eATP 水平,提高植物的低温耐受性。

Apyrase 能将 eATP 的高能磷酸键水解形成核苷酸和磷酸。通过对胡杨 *PeAPY2* 纯化蛋白酶学特性分析,发现 *PeAPY2* 虽能水解多种嘌呤和嘧啶核苷酸,但还是对 ATP 的亲和力最高<sup>[15]</sup>。近几年,apyrase 蛋白成为抗逆胁迫研究领域的新热点。目前人们已经在马铃薯(*Solanum tuberosum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、大豆(*Glycine soja*)、胡杨(*Populus euphratica*)等植物中发现了 apyrase 的存在,同时对 apyrase 的功能进行了分析与研究。拟南芥中共有 7 个 apyrase 蛋白,其中 *AtAPY1* 与 *AtAPY2* 相似度较高,达到 87%<sup>[16-17]</sup>。Apyrase 通过调节 eATP 浓度来调节植物的生长、发育及抗逆胁迫<sup>[16,18]</sup>,如 APY1、APY2 和 eATP 在生物胁迫、植物防御反应和生长变化中发挥重要作用<sup>[19-20]</sup>。

我国的胡杨主要分布于内蒙古西部、甘肃、青

海、新疆等地区<sup>[21]</sup>。胡杨因其对生态环境的重要性受到人们广泛关注,探究其在干旱盐渍条件下的抗逆机制成为研究热点,研究人员从光合作用<sup>[22]</sup>、离子区隔化<sup>[23]</sup>、抗氧化能力<sup>[24]</sup>、植物激素<sup>[25]</sup>等角度探讨了胡杨的耐盐机理。但胡杨 Apyrase 如何调控植物的耐盐性,至今研究较少<sup>[18,20]</sup>。

本文利用胡杨 *PeAPY1* 和 *PeAPY2* 过表达株系、拟南芥 *Atapy1* 和 *Atapy2* 突变体、空载体(VC)、野生型(WT)拟南芥株系,通过测定不同盐浓度胁迫条件下各株系生长和生理生化指标的变化,以探究胡杨 apyrase 提高植物耐盐性的机理,为后续 apyrase 的抗逆机制研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料培养

本实验所用 *PeAPY1* 与 *PeAPY2* 过表达株系、*Atapy1* 与 *Atapy2* 突变体拟南芥种子均来源于 Deng 等<sup>[15]</sup>转基因材料。培养方法:将不同基因型的拟南芥种子春化 3 d 后播种于 1/2 MS 培养基中,光照培养。培养条件:光照强度约为 100 μmol/(m<sup>2</sup>·s)、16 h 光照/d,生长温度为 22 ℃,湿度为 60%。每个实验重复 3 次,且每个基因型种子不少于 25 粒。

### 1.2 材料处理

将 *PeAPY1-OE* 与 *PeAPY2-OE* 过表达株系、*Atapy1* 突变体、*Atapy2* 突变体、野生型拟南芥 WT (*Arabidopsis thaliana*, Columbia ecotype) 和空载体(VC) 6 种基因型拟南芥种子春化后播种于正常 1/2 MS 培养基中,光照培养,垂直放置,使种子萌发。3 d 后,将萌发的种子分别转移至含有 0、50、100 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 培养基中进行盐胁迫处理。

### 1.3 测定方法

#### 1.3.1 根长的测定

将已萌发的种子转移至含不同盐浓度的培养基中进行胁迫处理 7 d 后,拍照,并使用 ImageJ 软件测量幼苗根长长度,分析不同基因型幼苗根长在盐胁迫下的长度变化。

#### 1.3.2 细胞活力的测定

不同基因型的拟南芥种子点种于正常培养基中,生长 7 d 后,将幼苗转移至含不同盐浓度的液体培养基中处理 12 h 后,使用浓度为 10 μmol/L 的荧光素二乙酸酯(Fluorescein diacetate, FDA)对其进行染色,染色 10 min 后置于 Leica SP5 激光共聚焦

显微镜下观察拟南芥根尖荧光强度, 激发光波长为 488 nm, 接收光波长为 505~525 nm, 并用 ImageJ 软件计算荧光强度值。

### 1.3.3 细胞膜透性的测定

萌发的拟南芥种子在含盐培养基中胁迫处理 7 d 后, 参照陈爱葵等<sup>[26]</sup>的方法测定膜透性: 取胁迫后拟南芥幼苗, 去离子水冲洗 3 次后将全株拟南芥切成约 1 mm 长小段, 放入 10 mL 试管中, 加入 5 mL 去离子水, 静止 12 h 后使用雷磁 DDS-307 电导率仪测定电导率值 C1, 而后将试管置于 100 °C 沸水中加热 0.5 h 后取出, 待溶液冷却至室温后, 再次测定此试管中溶液的电导值 C2。其中, 相对电导率值 = C1/C2。

### 1.3.4 根细胞内源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的测定

将生长于正常培养基中的拟南芥植株, 置于含盐液体培养基中胁迫处理 12 h 后, 用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>特异性荧光探针—H<sub>2</sub>-DCFDA 对幼苗进行染色, 时间为 10 min。染色后置于 Leica SP5 激光共聚焦显微镜 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) 下观察拟南芥根尖荧光强度, 激发光波长为 488 nm, 接收光波长为 510~530 nm, 并用 ImageJ 软件计算荧光强度值。

### 1.3.5 抗氧化酶活力的测定

萌发的拟南芥种子在含盐培养基中胁迫处理 7 d 后, 收集幼苗, 迅速放于研钵中用液氮研磨, 称量约 0.1 g 粉末于 1.5 mL 离心管中且置于液氮中以防止样品冻融。随后在样品中加入 1 mL 酶提取液, 12 000 r/min, 4 °C, 离心 10 min。取上清溶液, 并放在冰上保持酶活力。

抗坏血酸过氧化酶 (Ascorbate peroxidase, APX) 活性的测定参考 Nakano 等<sup>[27]</sup>和荆晓姝等<sup>[28]</sup>的方法。

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性的测定参考 Aebi<sup>[29]</sup>的方法。

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性的测定参考 Wang 等<sup>[30]</sup>和 Giannopolitis 等<sup>[31]</sup>的方法。

蛋白定量测定: 使用质量浓度为 0.5 mg/mL 的 BSA 标准蛋白配置成终质量浓度为 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 mg/mL 的蛋白酶液 50 μL, 在各管中加入 500 μL 的考马斯亮蓝 G-250, 摆匀后静置 5 min, 测定其在 595 nm 处的吸收值, 绘制蛋白标准曲线, 以此来计算各样品中所含有的蛋白含量。

### 1.3.6 根细胞 eATP 浓度测定

参照 Deng 等<sup>[15]</sup>的方法测定 eATP 浓度: 将各基因型拟南芥种子播种于 1/2 MS 固体培养基 (24 孔

板) 中, 每孔点种 6 颗种子, 并加入 200 μL 蒸馏水以防止培养基过度水分蒸发及保湿。将板置于光照下培养 7 d 后, 吸掉蒸馏水, 加入不同盐浓度的 1/2 MS 液体培养基处理 12 h 后, 吸取 20 μL 溶液, 使用 Enlighten ATP Assay System Bioluminescence kit (Promega) 在冷光仪 (Promega Corp., Madison, WI, USA) 中测定各样品中的 eATP 浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐胁迫对拟南芥根长的影响

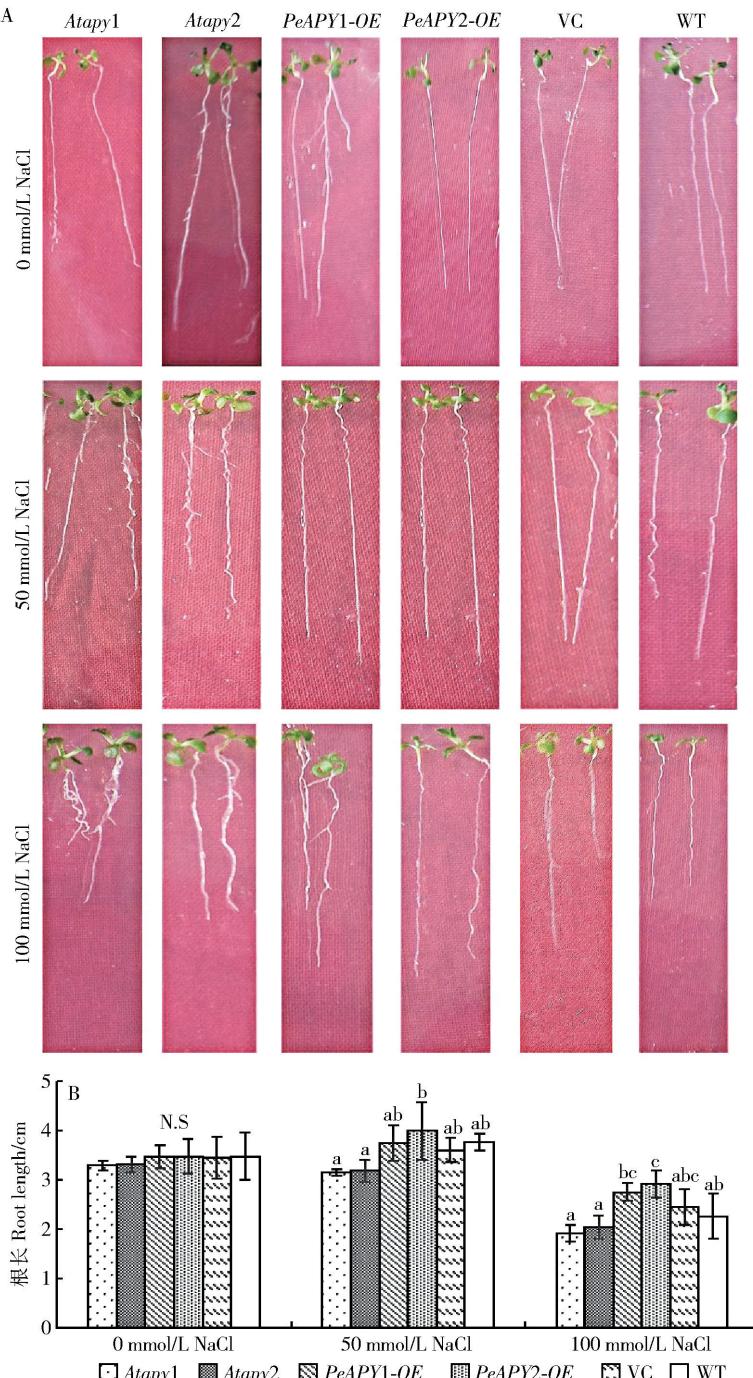
根长度可以直观反映植株的生长状态。本文研究了不同 NaCl 浓度对 *PeAPY* 过表达 (*PeAPY1-OE*、*PeAPY2-OE*)、*Atapy* 突变体 (*Atapy1*、*Atapy2*)、空载体 (VC) 与野生型 (WT) 拟南芥根系生长的影响。通过比较不同基因型的根长 (图 1A), 可以发现, 在 50 mmol/L NaCl 胁迫下, 拟南芥幼苗的根长生长受抑制程度较小, 各基因型根长与对照没有显著差异, 但突变体较其他基因型根长略小 (图 1A)。在 100 mmol/L NaCl 胁迫下, 拟南芥幼苗生长状态受抑制程度较高, 但从图 1B 中可以看出, *PeAPY* 过表达株系的根长高出突变体株系约 18% (图 1B), 差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。这说明 *PeAPY* 过表达株系的耐盐性高于野生型植株 *Atapy* 突变体。

### 2.2 盐胁迫对细胞膜透性的影响

细胞膜对于植物正常生长与生理代谢活动具有十分重要的作用。当植物受到逆境胁迫时, 会引起细胞膜损伤, 从而使胞质的胞液外渗而使相对电导率值变大, 电导率的高低在一定程度上反映了细胞膜受损伤的情况, 电导率越大, 说明植物受损伤程度愈高。本文通过测定盐胁迫条件下相对电导率的变化来比较不同基因型耐盐能力的高低。在无 NaCl 条件下, 各基因型的电导率无较大差别 (图 2)。随着盐处理浓度的增加过表达株系与突变体株系的电导率逐渐增大: 在 50 mmol/L NaCl 胁迫下, 各基因型的电导率值上升幅度相对较小, 而在 100 mmol/L NaCl 胁迫下, 各株系电导率明显提高, 但过表达株系的电导率显著低于突变体株系 ( $P < 0.05$ )。这表明高盐浓度对植物细胞膜的伤害程度加大, 但 *PeAPY* 过表达株系能够维持膜系统的稳定性以保证植物正常地进行生长与代谢活动。

### 2.3 盐胁迫对根细胞活力的影响

荧光素二乙酸酯 (Fluorescein diacetate, FDA) 在活细胞的酯酶作用下, FDA 迅速被分解放出荧光素, 因此可根据细胞荧光强度判定细胞活力的大小。对各株系根细胞在不同盐浓度处理下荧光强度的测定发现, 在高 NaCl 浓度 (100 mmol/L) 胁迫下, 过表



A. NaCl 对 *PeAPY* 过表达株系 (*PeAPY1-OE*, *PeAPY2-OE*)、*Atapy* 突变体 (*Atapy1*, *Atapy2*)、空载体 (VC) 与野生型 (WT) 拟南芥根生长的影响; B. *PeAPY* 过表达株系、*Atapy* 突变体、空载体与野生型拟南芥在盐胁迫下的根长平均值。每个数值均为 3 次重复实验的平均值, 每次实验统计 25 株, 误差线为标准误差 (SE); 柱形图上标注的不同字母表示同一盐浓度下不同株系之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ); N.S 表示同一处理条件下各基因型之间无显著差异。下同。A, effects of NaCl on root growth of *PeAPY*-transgenic plants (*PeAPY1-OE*, *PeAPY2-OE*), *Atapy* mutants (*Atapy1*, *Atapy2*), vector control (VC) and wild-type (WT) arabidopsis; B, average root length of *PeAPY*-transgenic plants, arabidopsis *Atapy* mutants, VC and wild-type under salt stress. Each column shows the mean of three independent experiments. Bars represent the standard error of the mean. Columns labelled with different letters show significant differences ( $P < 0.05$ ) between the WT and *PeAPY*-transgenic lines; N.S, no significant difference. The same below.

图 1 NaCl 对 *PeAPY* 过表达株系、*Atapy* 突变体、空载体、野生型拟南芥生长的影响

Fig. 1 Effects of NaCl on root growth of *PeAPY*-transgenic plants, *Atapy* mutants, vector control and wild-type arabidopsis

达株系荧光值明显高于野生型和突变体株系(图 3);在较低盐浓度(50 mmol/L NaCl)胁迫下,各基因型之间的荧光值差别较小,但过表达株系略高于突

变体株系(图 3)。荧光定量结果显示,突变体株系在较高盐浓度处理下,其细胞活力值比对照下降了 42%,而过表达株系仅下降了 24% (图 3)。这表明

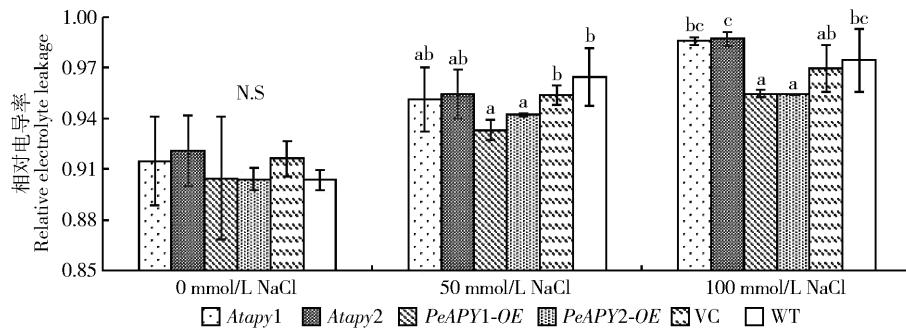


图2 NaCl对PeAPY过表达株系、Atapy突变体、空载体、野生型拟南芥相对电导率的影响

Fig. 2 Effects of NaCl on relative electrolyte leakage of *PeAPY*-transgenic plants (*PeAPY1-OE*, *PeAPY2-OE*), *Atapy* mutants (*Atapy1*, *Atapy2*), vector control (VC) and wild-type (WT) arabidopsis

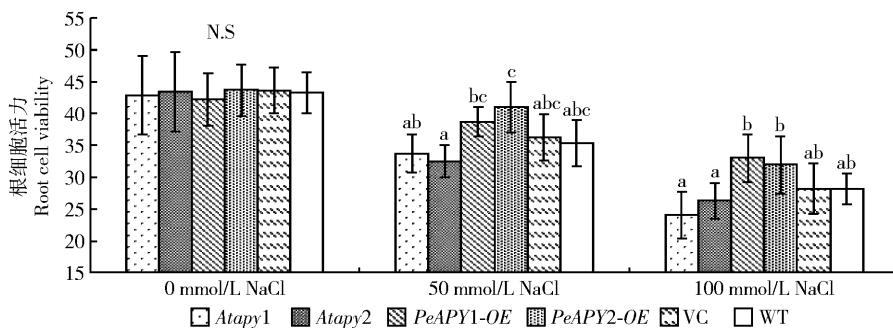


图3 NaCl对PeAPY过表达株系、Atapy突变体、空载体、野生型拟南芥细胞活力的影响

Fig. 3 Effects of NaCl on cell viability of *PeAPY*-transgenic plants (*PeAPY1-OE*, *PeAPY2-OE*), *Atapy* mutants (*Atapy1*, *Atapy2*), vector control (VC) and wild-type (WT) arabidopsis

*PeAPY*过表达植株在盐胁迫条件下能够保持相对较高的细胞活力,这对植物生长、代谢的正常进行具有十分重要的意义。

#### 2.4 盐胁迫对根细胞eATP浓度的影响

Apurate是水解eATP的关键酶,因此eATP浓度成为判定植物调控耐盐能力高低的重要指标<sup>[14]</sup>。我们检测了盐胁迫条件下根部eATP的浓度变化,发现在盐胁迫条件下拟南芥根部eATP浓度升高。如图4所示,在低盐胁迫下,根部eATP浓度略高于对照,当盐浓度上升至100 mmol/L时,各株系eATP浓度高出对照处理9%,而且,突变体与过表达株系之间就表现出了较大的浓度差异( $P < 0.05$ ):与

WT和Atapy突变体相比较,*PeAPY*过表达株系的eATP浓度较低(图4)。这些结果表明,*PeAPY*过表达株系水解eATP的能力较强,避免了高浓度eATP浓度诱发的细胞的程序化死亡<sup>[13]</sup>,从而使*PeAPY*过表达植株的耐盐能力高于拟南芥apyrase突变体。

#### 2.5 盐胁迫对根细胞内源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的影响

在盐胁迫条件下,植物细胞活性氧水平的提高会导致膜系统的过氧化<sup>[32-33]</sup>。本文利用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>特异性荧光探针—H<sub>2</sub>DCFDA来检测各基因型拟南芥根细胞内源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的水平变化。如图5所示,在50 mmol/L NaCl处理下,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量比对照处理植株略

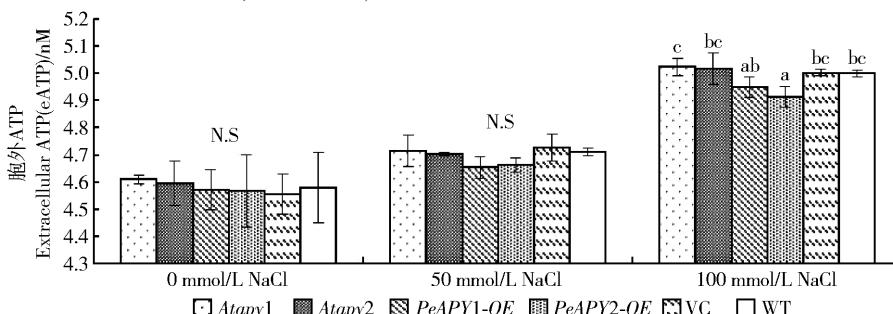


图4 NaCl对PeAPY过表达株系、Atapy突变体、空载体、野生型拟南芥胞外ATP的影响

Fig. 4 Effects of NaCl on extracellular ATP of *PeAPY*-transgenic plants (*PeAPY1-OE*, *PeAPY2-OE*), *Atapy* mutants (*Atapy1*, *Atapy2*), vector control (VC) and wild-type (WT) arabidopsis

有升高,且各基因型之间无明显差异;在用 100 mmol/L NaCl 胁迫下,NaCl 诱导突变体株系 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量显著增加,但 PeAPY 过表达株系 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的水平显著

低于突变体株系( $P < 0.05$ ),表明过表达植株在盐胁迫条件下能有效调控活性氧的水平,以减轻对膜系统的过氧化破坏。

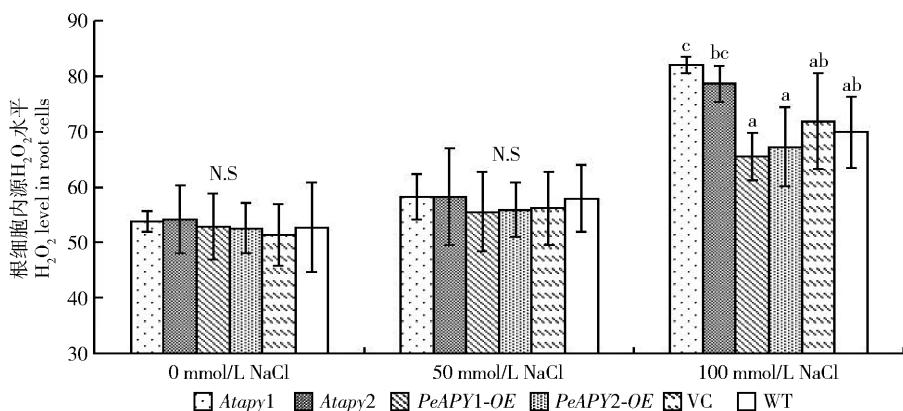


图 5 NaCl 对 PeAPY 过表达、Atapy 突变体、空载体、野生型拟南芥根细胞内源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平的影响

Fig. 5 Effects of NaCl on endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of PeAPY-transgenic plants (PeAPY1-OE, PeAPY2-OE), Atapy mutants (Atapy1, Atapy2), vector control (VC) and wild-type (WT) arabidopsis

## 2.6 盐胁迫对根细胞抗氧化酶的影响

为了探讨 apyrase 在活性氧平衡方面的作用,我们利用不同 NaCl 浓度(50、100 mmol/L)进行胁迫处理,并检测盐胁迫对拟南芥植株抗坏血酸过氧化酶(APX)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物岐化酶(SOD)酶活性的影响。

从图 6 中可以看出,与对照处理相比,植株在盐胁迫条件下 APX 酶活力逐渐降低。然而,随着盐处理浓度的提高,过表达株系与突变体之间的差异在显著增大( $P < 0.05$ ):突变体株系在 50 mmol/L 和 100 mmol/L NaCl 胁迫下 APX 活性分别下降了 26% 和 48%;而过表达株系在相应的 NaCl 胁迫下 APX 活性分别下降了 23% 和 31%(图 6A)。

CAT 酶活在低盐胁迫和高盐胁迫条件下都有所下降,但过表达株系与突变体之间有明显差异( $P < 0.05$ )。与对照相比,突变体株系在 50 mmol/L 和 100 mmol/L NaCl 胁迫下 CAT 活性分别下降了 44% 和 15%,而过表达株系在 50 mmol/L NaCl 和 100 mmol/L NaCl 胁迫下 CAT 活性只下降了 20% 和 1%(图 6B)。

与 CAT 相对应,突变体株系的 SOD 酶活在低盐浓度胁迫条件下下降约 50%,而过表达株系的 SOD 酶活下降幅度较小,约 30%(图 6C)。在盐胁迫浓度上升至 100 mmol/L NaCl 时,各株系 SOD 酶活与低盐胁迫时无明显差别,但过表达株系的 SOD 酶活要显著高于野生型和突变体(图 6C)。

## 3 结论与讨论

度的提高 NaCl 对各株系的影响也不断增大。低盐浓度对各基因型拟南芥幼苗根生长抑制程度较小,而高盐浓度对拟南芥幼苗抑制程度提高,但与 Atapy1、Atapy2 突变体、野生型植株相比,PeAPY1、PeAPY2 过表达株系根系生长状态良好,所受影响相对较小(图 1)。这表明 PeAPY1、PeAPY2 过表达植株的耐盐性高于 Atapy1、Atapy2 突变体和野生型拟南芥<sup>[34-35]</sup>。与之相对应,细胞活力的测试结果也反映了相同的趋势(图 3)。PeAPY1、PeAPY2 过表达株系耐盐性的提高与其调控膜稳定性和活性氧平衡的能力有关。相对电导率是反映植物细胞膜系统状况的重要指标。拟南芥在盐胁迫下,细胞膜受损会引起胞液外渗继而使相对电导率增大(图 2)。而在高盐浓度下,PeAPY1、PeAPY2 过表达株系较 Atapy1、Atapy2 突变体及野生型植株所受影响较小(图 2),这是由于 PeAPY1、PeAPY2 基因能够抑制活性氧对膜脂的过氧化作用,降低了盐胁迫对细胞的伤害程度。实验室前期的研究显示,细胞活性氧的产生与 eATP 有关<sup>[13]</sup>。在植物受到渗透胁迫时,ATP 被释放到胞外空间,通过 eATP 信号网络诱发活性氧的累积,诱发植物应激反应<sup>[14]</sup>。有研究显示,AtAPY2 过表达可以降低机械损伤引起的活性氧积累,说明在损伤引起的信号转导过程中,apyrase 可能通过降解 eATP 而抑制其诱发的下游反应<sup>[36]</sup>。Sun 等<sup>[14]</sup>发现盐诱发的 ATP 的瞬时释放能够通过调控细胞活性氧平衡提高胡杨细胞耐盐性,随后(< 20 min) eATP 水平下降。这可能是胡杨细胞利用 apyrase 水解 eATP,避免高浓度的 eATP 诱发的 PCD<sup>[13]</sup>,以维持细胞的活力。再有,胡杨 apyrase 2 能够调控

从拟南芥根长生长的反应可以看出,随着盐浓

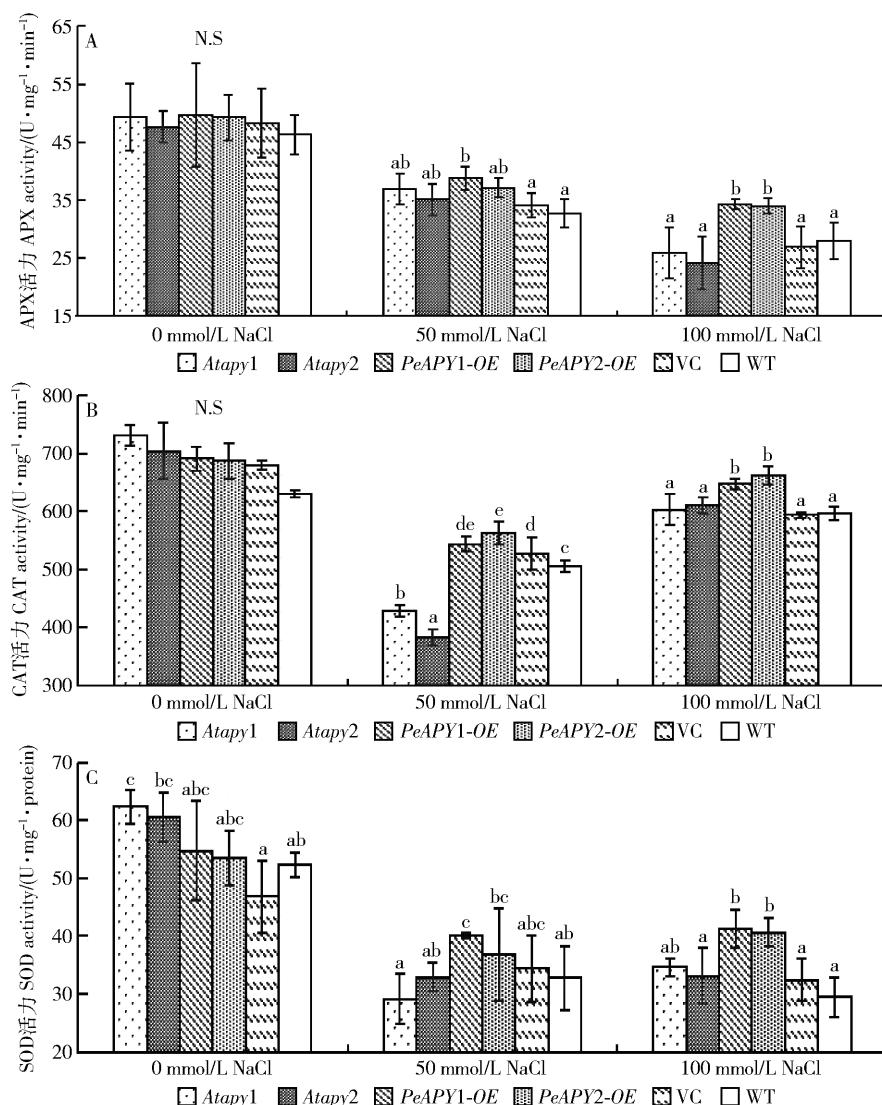


图 6 NaCl 对 *PeAPY* 过表达株系、*Atapy* 突变体、空载体、野生型拟南芥抗氧化酶 APX、CAT 和 SOD 酶活力的影响

Fig. 6 Effects of NaCl on antioxidant enzyme APX (A), CAT (B) and SOD (C) of *PeAPY1*-transgenic plants (*PeAPY1-OE*, *PeAPY2-OE*), *Atapy* mutants (*Atapy1*, *Atapy2*), vector control (VC) and wild-type (WT) *arabidopsis*

eATP 水平, 提高植物的低温耐受性<sup>[15]</sup>。由此可见, apyrase 对 eATP 浓度的有效控制, 对植物耐受胁迫环境至关重要。

拟南芥 eATP 的浓度变化显示, 在高浓度 NaCl 胁迫下, *PeAPY1*、*PeAPY2* 过表达株系的 eATP 含量明显低于 *Atapy1*、*Atapy2* 突变体, 这是由于 *PeAPY1*、*PeAPY2* 过表达提高了 apyrase 酶活, apyrase 通过分解 eATP 抑制了由 eATP 诱发的一系列毒害作用, 如活性氧的爆发<sup>[13]</sup>。本文 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的测试结果也显示, 高浓度 NaCl 诱导突变体株系 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量显著增加, 过表达株系 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量显著低于突变体株系(图 5)。我们的研究结果还表明, *PeAPY1*、*PeAPY2* 过表达株系除了通过控制 eATP 水平调控活性氧, 还能提高抗氧化酶活性控制活性氧的积累。在高盐胁迫下 *PeAPY1*、*PeAPY2* 过表达株系抗氧化酶 SOD、APX、

CAT 的酶活均高于 *Atapy1*、*Atapy2* 突变体(图 6)。结合拟南芥根细胞内源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平的变化, 我们推测盐胁迫下 *PeAPY1*、*PeAPY2* 过表达株系还能通过提高抗氧化酶活抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的升高, 进而降低盐胁迫对细胞的伤害作用。

综上所述, 我们提出了胡杨 apyrase (*PeAPY1* 和 *PeAPY2*) 调控拟南芥耐盐的信号通路(图 7): 在高盐胁迫下, *PeAPY1*、*PeAPY2* 过表达株系通过提高 apyrase 酶活下调 eATP 浓度, 并提高抗氧化酶 SOD、APX、CAT 酶活力来抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的水平, 降低活性氧对膜脂的过氧化, 从而维持膜的稳定性, 保持细胞的活力和生长, 最终提高了植物耐盐性。

鉴于胡杨 apyrase 能够有效调控胞外 ATP 浓度, 在阻断 eATP 诱发 PCD 的同时, 还能通过上调抗氧化酶活性增强对胞内活性氧的控制, 因此, 在对树

木进行耐盐性遗传改良的过程中,可以通过基因工程手段过表达胡杨 *PeAPY1* 和 *PeAPY2*,以提高盐敏感树木的抗盐性。

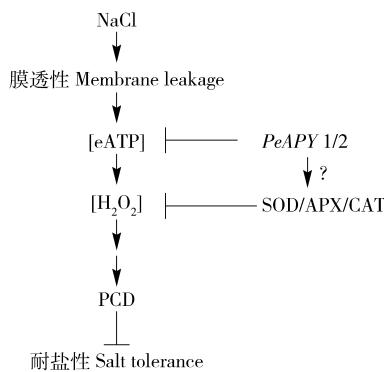


图7 胡杨 apyrase (*PeAPY1* 和 *PeAPY2*) 调控拟南芥耐盐性的信号通路

Fig.7 A schematic model showing the role of *Populus euphratica* apyrase (*PeAPY1* and *PeAPY2*) in salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*

## 参 考 文 献

- [1] GOLDBERG A L. The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells [J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 203(1-2): 1-15.
- [2] OSTROM R S, GREGORIAN C, INSEL P A. Cellular release of and response to ATP as key determinants of the set-point of signal transduction pathways [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(16): 11735-11739.
- [3] ASHCROFT S J, ASHCROFT F M. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels [J]. Cellular Signalling, 1990, 2(3): 197-214.
- [4] GORDON J L. Extracellular ATP: effects, sources and fate [J]. Biochemical Journal, 1986, 233(2): 309.
- [5] CHIVASA S, MURPHY A M, HAMILTON J M, et al. Extracellular ATP is a regulator of pathogen defence in plants [J]. The Plant Journal, 2009, 60(3): 436-448.
- [6] FISKE C H, SUBBAROW Y. Phosphocreatine [J]. Journal of Biological Chemistry, 1929, 81(3): 629-679.
- [7] HOLTON P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves [J]. The Journal of Physiology, 1959, 145(3): 494-504.
- [8] JAFFE M J. The role of ATP in mechanically stimulated rapid closure of the Venus's flytrap [J]. Plant Physiology, 1973, 51(1): 17-18.
- [9] ROUX S J, SONG C, JETER C. Regulation of plant growth and development by extracellular nucleotides [M] // BALUŠKA F, MANCUSO S, VOLKMANN D. Communication in plants. Berlin: Springer, 2006: 221-234.
- [10] DEMIDCHIK V, NICHOLS C, OLIYNYK M, et al. Is ATP a signalling agent in plants? [J]. Plant Physiology, 2003, 133(2): 456-461.
- [11] DEMIDCHIK V, SHANG Z, SHIN R, et al. Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and  $\text{Ca}^{2+}$  channels [J]. The Plant Journal, 2009, 58(6): 903-913.
- [12] CLARK G, FRALEY D, STEINEBRUNNER I, et al. Extracellular nucleotides and apyrases regulate stomatal aperture in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2011, 156(4): 1740-1753.
- [13] SUN J, ZHANG C L, DENG S R, et al. An ATP signalling pathway in plant cells: extracellular ATP triggers programmed cell death in *Populus euphratica* [J]. Plant Cell & Environment, 2012, 35(5): 893-916.
- [14] SUN J, ZHANG X, DENG S, et al. Extracellular ATP signaling is mediated by  $\text{H}_2\text{O}_2$  and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in the salt response of *Populus euphratica* cells [J/OL]. PloS One, 2012, 7(12): e53136 [2017-01-12]. doi:10.1371/journal.pone.0053136.
- [15] DENG S R, SUN J, ZHAO R, et al. *Populus euphratica* APYRASE2 enhances cold tolerance by modulating vesicular trafficking and extracellular ATP in *Arabidopsis* plants [J]. Plant Physiology, 2015, 169(1): 530-548.
- [16] COHN J R, UHM T, RAMU S, et al. Differential regulation of a family of Apyrase genes from *Medicago truncatula* [J]. Plant Physiology, 2001, 125(4): 2104-2119.
- [17] STEINEBRUNNER I, JETER C, SONG C, et al. Molecular and biochemical comparison of two different apyrases from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2000, 38(12): 913-922.
- [18] 刘丹丹, 邓澍荣, 张一南, 等. 胡杨 *PeAPY2* 基因的克隆及其转化细胞的耐盐性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(3): 276-284.
- [19] LIU D D, DENG S R, ZHANG Y N, et al. Cloning of apyrase gene *PeAPY2* from *Populus euphratica* and the salt tolerance of the transformed cells [J]. Genomics and Applied Biology, 2013, 32(3): 276-284.
- [20] LIM M H, WU J, YAO J C, et al. Apyrase suppression raises extracellular ATP levels and induces gene expression and cell wall changes characteristic of stress responses [J]. Plant Physiology, 2014, 164(4): 2054-2067.
- [21] 魏庆营. 胡杨[M]. 北京:中国林业出版社, 1990.
- [22] 马焕成, 王沙生, 蒋湘宁. 盐胁迫下胡杨的光合和生长响应[J]. 西南林学院学报, 1998, 18(1): 34-42.
- [23] MA H C, WANG S S, JIANG X N. Photosynthetic and growth response to salt stress in *P. euphratica* [J]. Journal of Southwest Forestry College, 1998, 18(1): 34-42.
- [24] 戴松香, 陈少良, Eberhard Fritz, 等. 盐胁迫下胡杨和毛白杨叶细胞中的离子区隔化 [J]. 北京林业大学学报, 2006, 28(增刊2): 1-5.
- [25] DAI S X, CHEN S L, FRITZ E, et al. Ion compartmentation in leaf cells of *Populus euphratica* and *P. tomentosa* under salt stress [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2006, 28(Suppl. 2):

1–5.

- [24] 朱会娟, 王瑞刚, 陈少良, 等. NaCl 胁迫下胡杨 (*Populus euphratica*) 和群众杨 (*P. popularis*) 抗氧化能力及耐盐性 [J]. 生态学报, 2007, 27(10): 4113–4121.
- ZHU H J, WANG R G, CHEN S L, et al. Genotypic differences between *Populus euphratica* and *P. popularis* in antioxidative ability and salt tolerance under NaCl stress [J]. Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(10): 4113–4121.
- [25] 马焕成, 陈绍良, 王沙生. 脱落酸与胡杨抗盐性的关系 [J]. 西南林业大学学报, 1998, 18(1): 8–14.
- MA H C, CHEN S L, WANG S S. Salt resistance in relation to ABA in *P. euphratica* [J]. Journal of Southwest Forestry College, 1998, 18(1): 8–14.
- [26] 陈爱葵, 韩瑞宏, 李东洋, 等. 植物叶片相对电导率测定方法比较研究 [J]. 广东教育学院学报, 2010, 30(5): 88–91.
- CHEN A K, HAN R H, LI D Y, et al. A comparison of two methods for electrical conductivity about plant leaves [J]. Journal of Guangdong Education Institute, 2010, 30(5): 88–91.
- [27] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. Plant and Cell Physiology, 1981, 22(5): 867–880.
- [28] 荆晓妹, 孙苑玲, 向敏, 等. 秋茄硫氧还蛋白调控活性氧平衡增强烟草耐盐机制研究 [J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(6): 17–26.
- JING X S, SUN Y L, XIANG M, et al. Overexpression of *KcTrx* in tobacco enhances salt tolerance through the regulation of ROS homeostasis under NaCl stress [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(6): 17–26.
- [29] AEBI H. Catalase in vitro [J]. Methods in Enzymology, 1984, 105: 121–126.
- [30] WANG R G, CHEN S L, DENG L, et al. Leaf photosynthesis, fluorescence response to salinity and the relevance to chloroplast salt compartmentation and anti-oxidative stress in two poplars [J]. Trees, 2007, 21(5): 581–591.
- [31] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedling [J]. Plant Physiology, 1977, 59(2): 315–318.
- [32] HERNANDEZ J A, CORPAS F J, GOMEZ M, et al. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria [J]. Physiologia Plantarum, 1993, 89(1): 103–110.
- [33] HERNÁNDEZ J A, OLMOS E, CORPAS F J, et al. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants [J]. Plant Science, 1995, 105(2): 151–167.
- [34] WU J, STEINEBRUNNER I, SUN Y, et al. Apyrases (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolases) play a key role in growth control in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2007, 144(2): 961–975.
- [35] WOLF C, HENNIG M, ROMANOVICZ D, et al. Developmental defects and seedling lethality in apyrase *AtAPY1* and *AtAPY2*, double knockout mutants [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64(6): 657–672.
- [36] HSIEH H L, SONG C J, ROUX S J. Regulation of a recombinant pea nuclear apyrase by calmodulin and casein kinase II [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1494(3): 248–255.

(责任编辑 赵 勃 范 娟  
责任编委 张建国)