

徐港明, 符 杏, 丰 华, 等. 多胺对大豆下胚轴不定根中二胺氧化酶基因表达和酶活性的影响[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1237-1243.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.06.007

## 多胺对大豆下胚轴不定根中二胺氧化酶基因表达和酶活性的影响

徐港明, 符 杏, 丰 华, 苏国兴

(苏州大学医学部基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123)

**摘要:** 为探究不定根再生过程中多胺对多胺氧化酶的调控机制, 用外源多胺及多胺氧化酶抑制剂处理大豆幼苗下胚轴, 检测大豆下胚轴不定根再生情况以及二胺氧化酶基因(*CuAO*)表达和酶活性的变化。结果显示, 低浓度的腐胺、亚精胺和精胺都显著促进大豆下胚轴不定根的生长, 最适浓度分别为 1.00 mmol/L、0.25 mmol/L 及 0.05 mmol/L, 高浓度多胺则对不定根的生长表现出一定的抑制作用。3 种外源多胺最适浓度处理后 *CuAO* 基因表达明显上调, 显著高于对照组, 且一直维持较高的水平, *CuAO* 酶活性显著高于对照组。在 3 种多胺处理中, 腐胺处理的效果最好。*CuAO* 专性抑制剂氨基胍可显著抑制大豆下胚轴不定根的生长, 这可能与 *CuAO* 活性受到氨基胍抑制有关。表明, *CuAO* 基因表达受外源多胺的诱导, 多胺促进大豆下胚轴不定根的生长可能与其诱导 *CuAO* 基因表达以及促进酶的活性有关。

**关键词:** 大豆下胚轴; 不定根; 腐胺; 亚精胺; 精胺; 二胺氧化酶

**中图分类号:** S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)06-1237-07

## Changes of diamine oxidase gene expression and enzyme activity during regeneration of soybean hypocotyl adventitious roots promoted by exogenous polyamines

XU Gang-ming, FU Xing, FENG Hua, SU Guo-xing

(School of Basic and Biological Science, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** Soybean [*Glycine max*(L.) Merr.] seedling hypocotyls were treated with exogenous polyamine and aminoguanidine to explore the regulating mechanism of polyamine on polyamine oxidase in adventitious root regeneration. The number of adventitious roots, the changes of diamine oxidase gene expression and the enzyme activity were measured. Low concentrations of putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) significantly promoted the growth of soybean hypocotyl adventitious roots, and the optimum concentrations were 1.00 mmol/L, 0.25 mmol/L and 0.05 mmol/L, respectively. On the contrary, polyamines at high concentrations showed inhibitory effects. The gene expression level of *CuAO* was up-regulated by polyamines and maintained a high level afterwards. Correspondingly, the *CuAO* activity was gradually increased by exogenous polyamines during the regeneration of adventitious roots. Put showed the best effect. In addition, the

role of aminoguanidine (AG, a specific inhibitor of *CuAO*) was detected. It could significantly inhibit the growth of soybean adventitious root, which might be related to the inhibition of *CuAO* activity by AG. These results imply that the expression of *CuAO* gene can be induced by exogenous polyamines, the induction of *CuAO* gene expression and the improvement of the enzyme activity might have contributed to the promotion of soybean hypocotyl

收稿日期: 2016-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171467)

作者简介: 徐港明(1990-), 男, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 主要从事植物生长发育研究。(E-mail) 164807616@qq.com

通讯作者: 苏国兴, (E-mail) suguoxing@suda.edu.cn

adventitious root growth.

**Key words:** soybean hypocotyl; adventitious root; putrescine; spermidine; spermine; diamine oxidase

植物不定根的生长是一个复杂的生理过程,不仅受到光照、温度、氧分压和水分等环境因素的影响<sup>[1-5]</sup>,而且还受诸如生长素、脱落酸、乙烯、多胺、NO 等因子的调控<sup>[6-8]</sup>。

多胺作为一类重要的植物生长调节物质,在植物花的形成、胚胎发育等过程中起着重要作用<sup>[9-10]</sup>。大量研究结果表明,多胺能调节植物根系的生长发育。莫淑媚等<sup>[11]</sup>发现精胺对灵发素诱导罗汉果不定根的形成有显著的改善作用,使罗汉果组培苗的整个根系表现出“多、粗、短、壮”的特点。Jarvis<sup>[12]</sup>发现精胺处理能显著提高绿豆幼茎插条的生根数,并且多胺与 IBA 在诱导生根方面有相加效应。辛蓓等<sup>[13]</sup>对苹果砧木试管苗不定根发生效应的研究发现, $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-5}$  mol/L 外源多胺处理对不定根再生有不同程度的促进效应。Altamura 等<sup>[14]</sup>指出,精氨酸脱羧酶不可逆抑制剂(二氟甲基精氨酸)和鸟氨酸脱羧酶不可逆抑制剂(二氟甲基鸟氨酸)共同处理可以完全抑制烟草茎的不定根再生和多胺积累,亚精胺合酶抑制剂[甲基-(乙二醛)-双-鸟嘌呤]也可强烈抑制外植体生根。但是多胺调节植物根系生长和发育的作用机理仍不清楚。

多胺对植物根系生长发育的调控可能还与多胺氧化酶催化多胺的氧化降解有关<sup>[15]</sup>。然而,在不定根再生过程中多胺氧化酶基因表达以及基因表达与酶活性关系方面的研究鲜有报道。本研究拟以大豆中黄 25 下胚轴为试验材料,采用外源多胺、多胺氧化酶抑制剂进行处理,研究多胺对大豆下胚轴不定根再生的影响,以及二胺氧化酶基因表达和酶活性的变化,以期探究多胺调节植物不定根发育的作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]种子中黄 25 由中国农业科学院作物科学研究所提供。多胺及氨基胍购自 Sigma 公司。Trizol 法所需试剂均购自 Sun-ShineBio 公司。反转录和荧光定量 PCR 反应试剂均购自 Promega 公司。荧光定量 PCR 检测系统为博日公司的 line-gene K FQD-48A。紫外可见分光光度计为日本岛津公司的 UV-2600/2700。台式高速

离心机为 Eppendorf 公司的 Centrifuge 5417。

### 1.2 方法

1.2.1 大豆下胚轴的培养 选取大小均一、种皮无破损的大豆种子,用自来水清洗干净,然后在 25 ℃ 下用蒸馏水浸种 24 h,将吸胀后的种子均匀撒在盛有干净湿润砂基质的中转箱中,置于恒温培养箱内培养,温度(25±2) ℃,光照度 2 700 ~ 3 000 lx,光照时间 12 h/d,5 d 后选取萌发状态一致的大豆幼苗,切去原有根系,保留子叶节以下 5 cm 的下胚轴作为试验材料。

1.2.2 外源多胺处理 将上述下胚轴分别插入盛有 15 ml 处理溶液的西林瓶中处理 24 h,处理溶液为:(1) 腐胺(Put)(0 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、2.0 mmol/L、4.0 mmol/L);(2) 亚精胺(Spd)(0 mmol/L、0.05 mmol/L、0.25 mmol/L、1.00 mmol/L、2.00 mmol/L);(3) 精胺(Spm)(0 mmol/L、0.01 mmol/L、0.05 mmol/L、0.10 mmol/L、0.50 mmol/L);(4) 氨基胍(AG)(0 mmol/L、0.50 mmol/L、1.00 mmol/L、2.00 mmol/L)。处理时下胚轴下端浸入液面下约 2 cm,每个处理用 10 个下胚轴,设 3 个重复。置于光照培养箱中培养,温度(25±2) ℃,光照度 2 700 ~ 3 000 lx,光照时间 12 h/d。处理结束后,将下胚轴移入蒸馏水中,每天定时统计不定根数,以突出下胚轴切口表面 1 mm 以上的作为不定根进行统计。

1.2.3 二胺氧化酶活性的测定 用 1.00 mmol/L 的腐胺、0.25 mmol/L 的亚精胺、0.05 mmol/L 的精胺及 1.0 mmol/L 的氨基胍处理大豆下胚轴 24 h,处理结束后,将下胚轴移入蒸馏水中,每天定时检测二胺氧化酶活性。检测方法参照刘俊和刘友良的方法<sup>[16]</sup>。称取外植体鲜质量 0.5 g,加入 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 6.5) 1.6 ml,冰浴研磨。匀浆液经 10 000 r/min 离心 20 min (4 ℃),上清液即为二胺氧化酶的粗提取液。吸取 0.2 ml 粗提取液,加入 0.1 ml 过氧化物酶液(150 U/ml)、0.2 ml 的 *N,N*-二甲基苯胺/4-氨基氨基吡啶显色液和 2.5 ml 的 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(pH 6.5)中,然后加入 0.1 ml 的 20 mmol/L 的腐胺,启动反应,以不加腐胺的反应为对照,25 ℃ 下反应 30 min。测定波长 555 nm 处

的吸光值,以吸光值变化 0.01 为一个酶活力单位 (U)。

**1.2.4 *CuAO* 基因表达的检测** 按 Trizol 法<sup>[17]</sup> 提取大豆下胚轴总的 RNA。RNA 样品经微量核酸蛋白检测仪检测,确定 RNA 浓度及纯度后,参照 Promega 公司逆转录说明书合成 cDNA 第一链。据 GenBank 基因组数据库基因序列设计 *CuAO* 基因及内参基因的特异性引物,引物序列如下:*CuAO* (5'-AACCAAGGACAGAAGGACAGTGAG-3'/3'-AATGCCACCGTCTGATACTGA-5'); *Actin* (5'-TGAACCTCGTGTGCTCCCG-3'/3'-CATACATGGCAGGCA-CATTGA-5')。采用 SYBR Green 荧光染料法,参照 GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (A6002, Promega) 说明书对目的基因及内参基因进行扩增,用荧光定量 PCR 系统 line-gene K FQD-48A 检测荧光信号,扩增条件为:95 ℃ 预变性 3 min,进入循环后 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火并延伸 45 s,共 40 个循环,荧光信号的检测在第 3 步进行。反应结束后,根据系统反馈的  $C_t$  值,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算各组目的基因的表达水平相对于第 0 d 的变化倍数,其中  $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{目的基因}}} -$

$C_{t_{\text{内参基因}}})_{\text{试验组}} - (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{内参基因}}})_{\text{对照}}$ ,对照为刚切下未经任何处理的下胚轴。

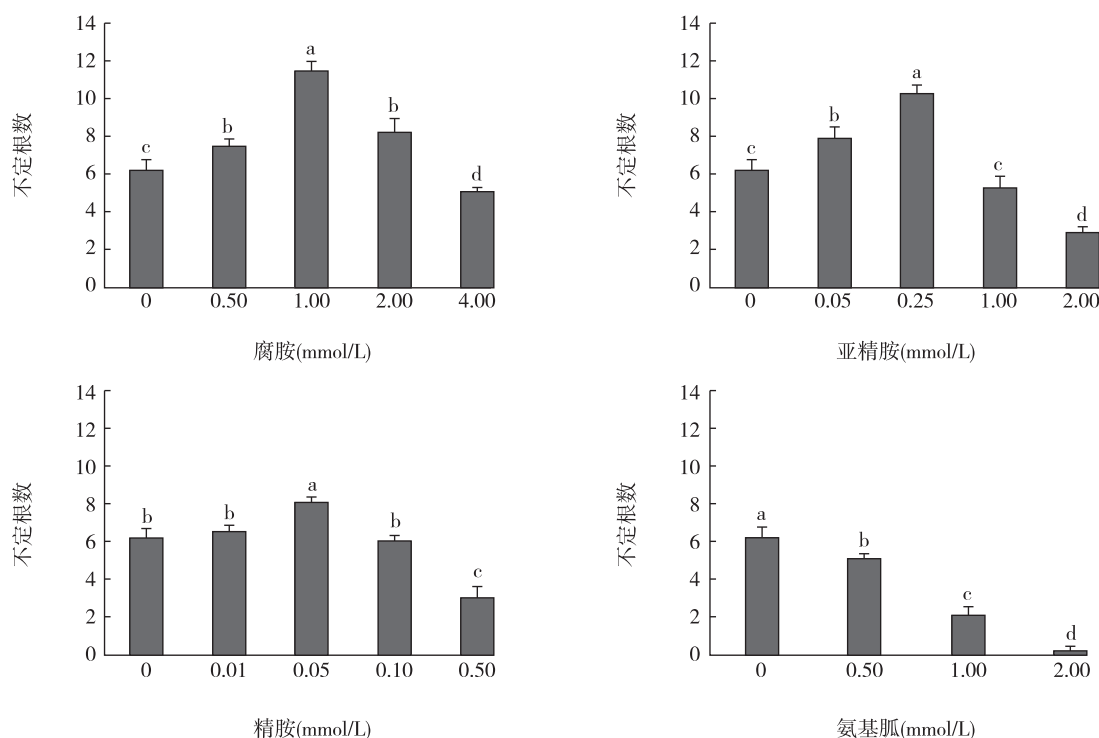
### 1.3 数据分析

Duncan's 检验不同处理下测得的平均值,比较不同处理间的差异。

## 2 结果及分析

### 2.1 外源多胺对大豆下胚轴不定根再生的影响

**2.1.1 大豆下胚轴不定根生长的变化** 3 种外源多胺对不定根再生的影响均呈现出低浓度促进,高浓度抑制的现象(图 1)。腐胺、亚精胺和精胺促进不定根再生的最适浓度分别为 1.00 mmol/L、0.25 mmol/L 和 0.05 mmol/L。在腐胺、亚精胺和精胺的最适浓度处理下,大豆下胚轴不定根再生数量较对照分别增加了 85.5%、65.5% 和 30.7% ( $P < 0.05$ )。与对照相比,随着氨基胍浓度的升高,大豆下胚轴不定根的数量依次减少了 18.6%、65.1% 和 96.5% ( $P < 0.05$ ),但是当氨基胍浓度达到 2.00 mmol/L 时,对大豆下胚轴产生明显的毒害作用,因此后期试验采用 1.00 mmol/L 的氨基胍进行处理。



不同小写字母表示不同处理间达 0.05 水平显著差异。

图 1 外源多胺及氨基胍对大豆下胚轴不定根数量的影响

Fig. 1 Effect of exogenous polyamine and aminoguanidine on adventitious root number of soybean hypocotyl

2.1.2 外源多胺最适浓度下大豆下胚轴不定根数量的变化 用 3 种多胺在各自最适浓度下处理大豆下胚轴 24 h, 统计不同时间下胚轴不定根的数量。结果(图 2)显示, 与对照组一样, 3 种多胺处理的大豆下胚轴在第 3 d 开始生根。腐胺与亚精胺处理组

不定根数目在第 4 d 较对照组明显增多, 而精胺处理组在第 5 d 才明显高于对照。但是 1 mmol/L 氨基胍处理延迟了不定根的再生, 并且不定根的数目明显低于对照组。

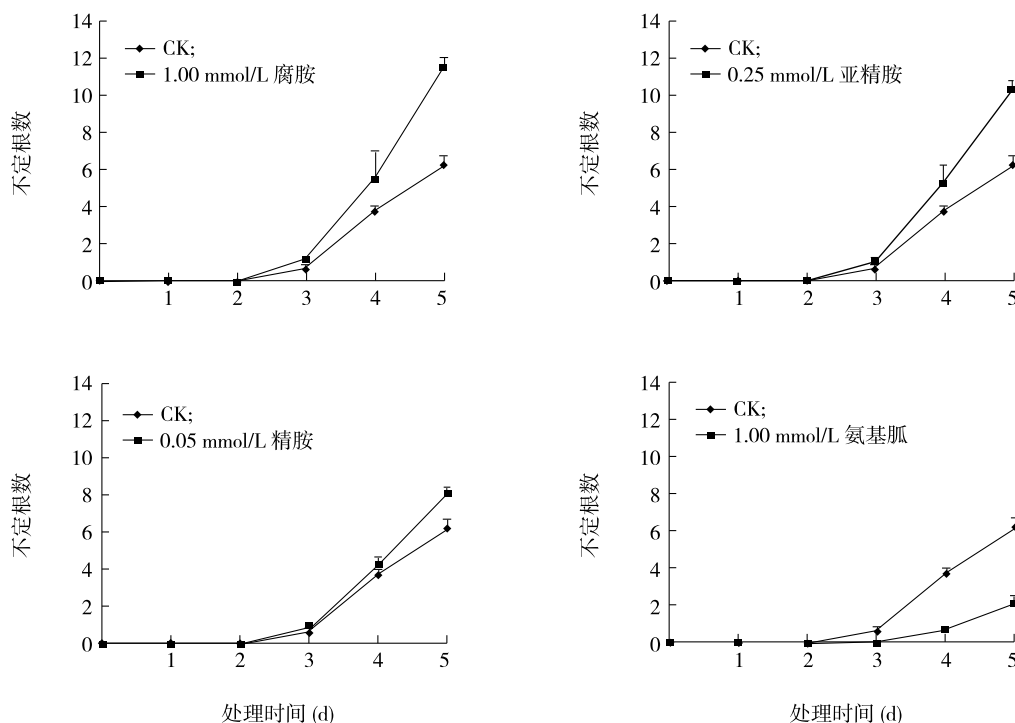


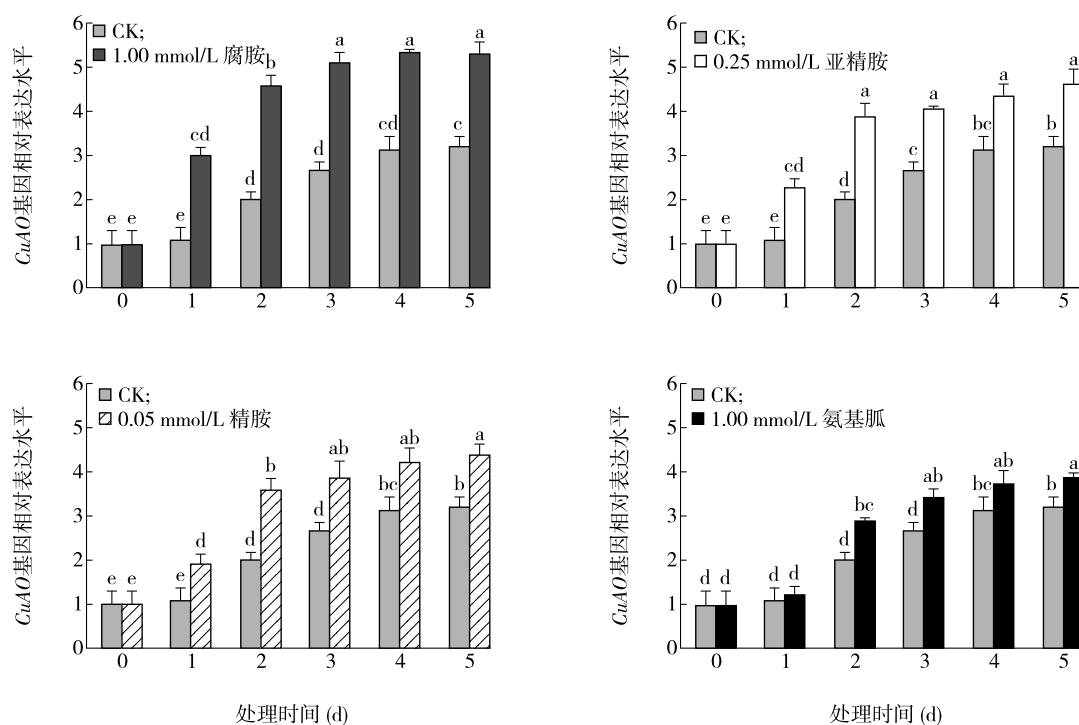
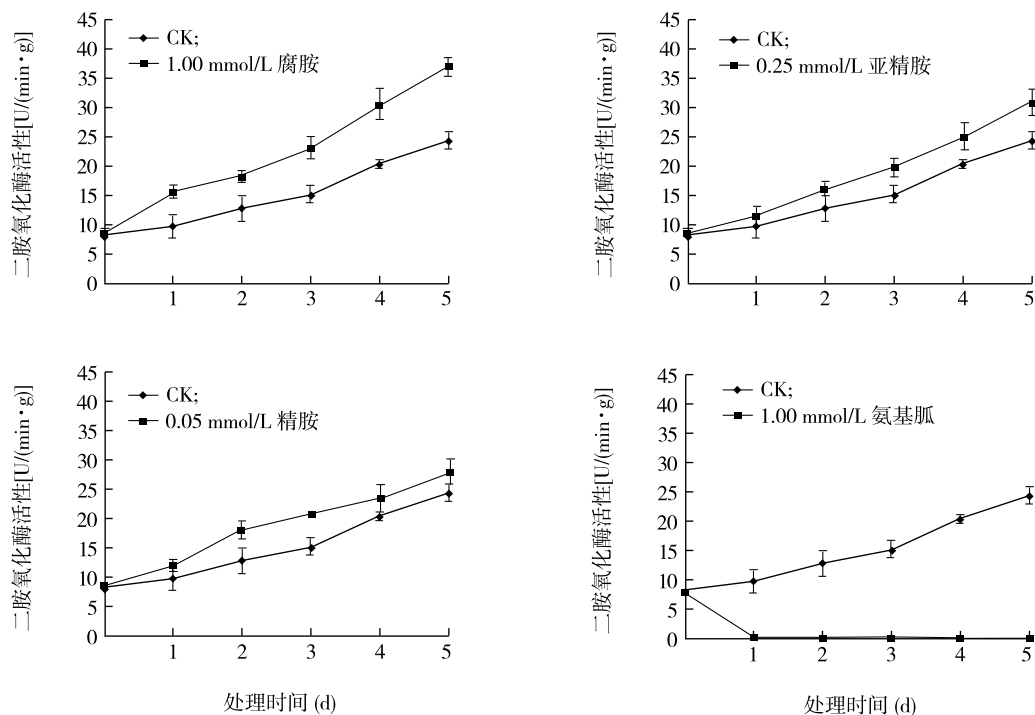
图 2 外源多胺及氨基胍最适浓度处理后大豆下胚轴不定根的数量变化

Fig. 2 Changes in adventitious root number of soybean hypocotyl after exogenous polyamine and aminoguanidine applied at the appropriate concentrations

## 2.2 外源多胺处理后大豆下胚轴二胺氧化酶基因表达和酶活性的变化

2.2.1 二胺氧化酶基因表达的变化 在腐胺、亚精胺及精胺的最适浓度处理下, 大豆下胚轴的 *CuAO* 基因表达明显上调, 在处理第 1 d 分别为对照的 2.7 倍、2.1 倍和 1.8 倍, 差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。之后多胺处理组的 *CuAO* 基因表达水平一直维持在较高水平(图 3)。在根再生过程中, 对照组的 *CuAO* 基因表达水平也逐渐升高, 但总体水平比处理组要低(图 3)。氨基胍处理显著提高了 *CuAO* 基因的表达水平, 在氨基胍处理的第 2 d, *CuAO* 基因表达水平为对照组的 1.4 倍, 差异达显著水平 ( $P < 0.05$ ), 在氨基胍处理后的第 5 d 时, *CuAO* 基因的表达水平仍高于对照(图 3)。

2.2.2 二胺氧化酶活性的变化 检测 3 种外源多胺处理后大豆下胚轴不定根再生过程中二胺氧化酶活性的变化, 结果(图 4)显示, 在根再生过程中, 对照组和处理组的二胺氧化酶活性均呈上升趋势, 呈现与二胺氧化酶基因表达相似的变化, 且 3 种外源多胺处理后的二胺氧化酶活性都显著高于对照组。在第 5 d 时腐胺、亚精胺和精胺处理组的二胺氧化酶活性分别比对照组高出 51.4%、26.3% 和 15.4%, 以腐胺处理对酶活性的促进作用最为明显。而用 1 mmol/L 的氨基胍处理 1 d 后, 发现氨基胍处理对二胺氧化酶活性的抑制效果非常明显, 在整个不定根的再生过程中均未检测到二胺氧化酶活性(图 4)。

图3 外源多胺及氨基胍处理对大豆下胚轴 *CuAO* 基因表达的影响Fig.3 Effect of exogenous polyamine and aminoguanidine on *CuAO* gene expression of soybean hypocotyl图4 外源多胺及氨基胍处理后大豆下胚轴 *CuAO* 酶活性的变化Fig.4 Changes in *CuAO* activity of soybean hypocotyl after exogenous polyamine and aminoguanidine treatment



### 3 讨论

多胺为低分子多聚阳离子,广泛存在于植物、动物、真菌和细菌等生物有机体中<sup>[18]</sup>。一般认为,它们通过与DNA、RNA、酸性磷脂及蛋白等一些多聚阴离子类生物大分子相互作用从而参与调节很多生长发育过程<sup>[19-20]</sup>。徐东花等<sup>[21]</sup>发现亚精胺能够通过影响内源激素及相关酶的活性来调控菊花不定根的形成。Li等<sup>[22]</sup>发现多胺能通过调节多胺合成基因的表达,参与黄瓜幼苗对盐胁迫的响应。近期的研究结果也表明,在多胺促进植物生长发育的过程中,多胺氧化酶起到了很重要的作用<sup>[23]</sup>。

本研究结果表明,外源多胺处理大豆下胚轴,能诱导不定根的再生,其效果与多胺处理浓度有关(图2),低浓度促进不定根再生,高浓度抑制,最适浓度分别是腐胺 1.00 mmol/L、亚精胺 0.25 mmol/L 和精胺 0.05 mmol/L。高浓度多胺抑制不定根的再生可能与其毒性有关<sup>[24]</sup>。本研究还发现,在诱导大豆下胚轴不定根再生过程中,不同种类多胺的诱导效果呈现一定的差异,腐胺的处理效果最佳,其次是亚精胺。李海航等<sup>[25]</sup>在多胺促进绿豆下胚轴切条形成不定根的研究中也有类似的报道。

多胺促进不定根再生可能与多胺对二胺氧化酶基因的表达和酶活性的调节作用有关。*CuAO* 基因表达的检测结果表明,3种多胺均能显著上调下胚轴 *CuAO* 基因的表达,同时可促进 *CuAO* 活性。腐胺、亚精胺和精胺对 *CuAO* 基因表达和酶活性的诱导作用与它们促进不定根再生的作用变化相一致,其中腐胺的作用效果最好。大量报道指出,*CuAO* 是豆科作物中最为丰富的胞壁氧化酶,腐胺是 *CuAO* 的最适作用底物之一<sup>[26-27]</sup>。3种外源多胺在大豆下胚轴不定根再生过程中,均能显著上调 *CuAO* 基因的相对表达量,暗示 *CuAO* 基因表达受多胺的调节,其可能是一种调节基因。因此,多胺一方面可能通过上调 *CuAO* 基因表达,以增加 *CuAO* 酶蛋白量,另一方面可能通过促进酶的活性,参与大豆下胚轴不定根再生的诱导。

氨基胍是一种已知的 *CuAO* 专性抑制剂。用氨基胍处理后,大豆下胚轴的 *CuAO* 活性受到强烈抑制,不定根的再生也受到明显抑制,这从药理学的角度进一步表明了二胺氧化酶在不定根生长发育中的作用。这与高凤鸣等<sup>[28]</sup>在多胺诱导大豆子叶节愈伤组织形成中的研究结果相一致。氨基胍处理可上调

*CuAO* 基因的表达(图3)。可能是由于氨基胍强烈抑制 *CuAO* 活性,导致内源性多胺的积累,从而促进 *CuAO* 基因的表达。氨基胍处理引起内源多胺的积累在胡文婷等<sup>[29]</sup>关于多胺氧化降解参与大豆子叶节分化形成不定根的研究中有过报道。

### 参考文献:

- [1] 刘红江,蒋银涛,陈留根,等. 不同播栽方式对水稻根系生长及产量形成的影响[J]. 江苏农业学报,2015,31(2):310-316.
- [2] 王金祥,严小龙,潘瑞焱. 不定根形成与植物激素的关系[J]. 植物生理学通讯,2005,41(2):133-142.
- [3] 何海旺,罗海玲,龚明霞,等. 飞机草不定根形成过程中的结构和生理变化[J]. 南方农业学报,2015,46(8):1378-1384.
- [4] 赵艳,高晓余,查友贵,等. 植物生长调节剂与不定根的形成[J]. 湖北农业科学,2011,50(1):12-16.
- [5] 蒋兆坤,高玉亮,李葵花. 马铃薯扦插苗不定根生根过程的解剖学观察[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):105-106,270.
- [6] 谢学韵,余常兵,侯加佳,等. 低氧胁迫对油菜幼苗不定根生长的影响[J]. 中国油料作物学报,2013,35(3):284-289.
- [7] LIAO W, XIAO H, ZHANG M. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in adventitious root development of marigold[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2009, 31(31):1279-1289.
- [8] 田海丽,全雪丽,秦嘉泽,等. IBA 浓度与培养基对黄芩不定根生物量和总黄酮含量的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):65-66.
- [9] KUSANO T, YAMAGUCHI K, BERBERICH T, et al. Advances in polyamine research[J]. Journal of Plant Research, 2007, 120(3):345-350.
- [10] KUSANO T, BERBERICH T, TATEDA C, et al. Polyamines: essential factors for growth and survival[J]. Planta, 2008, 228(3):367-381.
- [11] 莫淑媚,周凤珏,许鸿源. 精胺(Spm)对灵发素(LFS)诱导罗汉果不定根形成的影响[J]. 种子,2015(11):11-13.
- [12] JARVIS B C, SHANNON P R M, YASMIN S. Involvement of polyamines with adventitious root development in stem cuttings of mung bean[J]. Plant and Cell Physiology, 1983, 24(4):677-683.
- [13] 辛蓓. 外源生长素和多胺对 M26 试管苗不定根发生效应的研究[D]. 保定:河北农业大学,2006.
- [14] ALTAMURA M, TORRIGIANI P, CAPITANI F, et al. De novo root formation in tobacco thin layers is affected by inhibition of polyamine biosynthesis[J]. Journal of Experimental Botany, 1991, 42:1575-1582.
- [15] 任筠. *CuAO* 及其催化产物  $H_2O_2$  在绿豆下胚轴不定根发生过程中的作用研究[D]. 西安:陕西师范大学,2010.
- [16] 刘俊,刘友良. 盐胁迫下大麦幼苗多胺的种类和状态与多胺氧化酶活性的关系[J]. 植物生理与分子生物学学报,2004,30(2):141-146.
- [17] 刘易科,孙洪波,胡珀,等. 2种大豆总RNA提取方法的改良[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(12):83-

- 86.
- [18] GALSTON A W, KAUR S R. Polyamines as endogenous growth regulators[M]. Holland: Kluwer Academic Publishers, 1995: 158-178.
- [19] LUCKEL F, KUBO K, TSUMOTO K, et al. Enhancement and inhibition of DNA transcriptional activity by spermine: a marked difference between linear and circular templates[J]. Febs Letters, 2005, 579(23): 5119-5122.
- [20] BOUCHEREAU A, AZIZ A, LARHER F, et al. Polyamines and environmental challenges: recent development[J]. Plant Science, 1999, 140: 103-125.
- [21] 徐东花, 孙霞, 孙宪芝, 等. 亚精胺调控菊花不定根发生的生理机制[J]. 植物生理学报, 2014, 50(10): 1546-1554.
- [22] LI B, GUO S R, SUN J. Effects of exogenous spermidine on free polyamine content and polyamine biosynthesis gene expression in cucumber seedlings under salt stress[J]. Plant Science Journal, 2011, 29(4): 480-485.
- [23] SONG X G, SHE X P, YUE M, et al. Involvement of copper amine oxidase (*CuAO*)-dependent hydrogen peroxide synthesis in ethylene-induced stomatal closure in *Vicia faba*[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2014, 61(3): 390-396.
- [24] FRIEDMAN R, ALTMAN A, BACHRACH U. Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings: I. effects of exogenous compounds and changes in endogenous polyamine content[J]. Plant Physiology, 1982, 70(3): 844-848.
- [25] 李海航, 潘瑞焱. 多胺、青霉素、苯甲酸钠和多菌灵对绿豆下胚轴插条生根的影响[J]. 植物生理学报, 1988(2): 39-42.
- [26] SLOCUM R D, FUREY III M J. Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in pea and maize tissues[J]. Planta, 1991, 183(3): 443-450.
- [27] YANG R, CHEN H, HAN Y, et al. Purification of diamine oxidase and its properties in germinated fava bean (*Vicia faba* L.)[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(8): 1709-1715.
- [28] 高凤鸣, 胡文婷, 苏国兴. 多胺诱导大豆子叶节愈伤组织形成丛生芽的机理研究[J]. 大豆科学, 2015, 34(6): 1006-1010.
- [29] 胡文婷, 杨北宁, 苏国兴. 多胺氧化降解在大豆子叶节分化形成不定根中的作用[J]. 苏州大学学报(自然科学版), 2011, 27(4): 81-87.

(责任编辑:王妮)