

## 过氧化氢酶 2 不参与调控拟南芥根部对镉胁迫的耐受性

贾骥骏 (合肥工业大学食品科学与工程学院, 安徽合肥 230009)

**摘要** [目的] 探讨过氧化氢酶(CAT2)在拟南芥根部响应镉胁迫过程中对主根生长、活性氧积累以及生长素信号的影响。[方法] 在 1/2 MS 固体培养基中加入不同浓度的镉处理拟南芥 Col-0 和 CAT 功能缺失突变体 *cat2* 幼苗。[结果] 研究发现镉胁迫会抑制主根的生长, 而 *cat2* 的根长的抑制率与 Col-0 并无明显差异。镉处理后 Col-0 和 *cat2* 根中 CAT 活性也不会发生显著变化。进一步比较 Col-0 和 *cat2* 根在镉胁迫下的活性氧的积累, 两者活性氧增长率大致相同。最后检测 DR5::N7-VENUS 和 *cat2* DR5::N7-VENUS 根中生长素的信号表达, 发现镉胁迫对 Col-0 和 *cat2* 根中生长素的抑制率也没有差异。[结论] CAT2 不参与调控拟南芥根部对镉胁迫的耐受性。

**关键词** 拟南芥; 镉胁迫; 过氧化氢酶; 活性氧; 生长素

中图分类号 Q 945.78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)22-0001-04

## Regulation of Tolerance to Cadmium Stress in Arabidopsis Roots without Catalase 2

JIA Qi-jun (School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

**Abstract** [Objective] Impact of catalase was discussed in the article based on the result of primary root length, reactive oxygen species accumulation and auxin signal in the primary root of *Arabidopsis thaliana* responsive experiment under cadmium stress. [Method] Different concentrations of cadmium were added to 1/2 MS solid medium to treat *Arabidopsis* Col-0 and CAT2 loss-of-function mutant *cat2* seedlings. [Result] The study found that cadmium stress inhibited the root length of the main root, but the inhibition rate of *cat2* root length was not significantly different from that of Col-0. However, the root length results between *cat2* and Col-0 were no obvious differences. A similar conclusion also could be derived from the CAT activity in primary root after the cadmium stress treatment. Further comparing the accumulation of active oxygen in the roots of Col-0 and *cat2* under the cadmium stress, the growth rate of their active oxygen is roughly the same. Finally, the signal expression of auxin in Col-0 DR5::N7-VENUS and *cat2* DR5::N7-VENUS roots was detected. It was found that there was no difference in the inhibition rate of auxin in Col-0 and *cat2* roots by cadmium stress. [Conclusion] CAT2 is not involved in the regulation of tolerance to cadmium stress in *Arabidopsis* roots.

**Key words** *Arabidopsis thaliana*; Cadmium stress; Catalase; Reactive oxygen; Auxin

近年来, 重金属污染已经威胁到工农业的持续健康发展, 严重影响农作物的品质和产量, 造成巨大的经济损失。其中, 高毒性、高水溶性的镉(Cd)容易被植物吸收在体内富集, 影响植物正常的生长发育和新陈代谢, 最终造成植物死亡<sup>[1]</sup>。而这些被镉污染的植物通过食物链进入人体后, 积累到一定剂量会引起急性或慢性中毒, 损害肝脏、肾脏、骨骼, 甚至引发癌症<sup>[2]</sup>。

Cd 胁迫抑制植物根系发育, 庞大的根系不仅能够支持固定整个植株, 而且不断地从土壤中吸收植物生长所必需的营养物质, 满足地上植物组织生长、发育、代谢需求<sup>[3-7]</sup>, 当植物受到土壤中镉胁迫后, 根作为第一道防线直接参与植物对胁迫的应激响应; Cd 胁迫诱导活性氧(ROS)的积累, 破坏生物大分子及细胞的完整性, 影响植物生长必需元素(Fe、Ca、Mg、P 和 K)和水分的吸收、运输及抗氧化酶的活性, 从而抑制植物生长发育<sup>[8-9]</sup>; Cd 胁迫会抑制植物体内生长素表达分布, 有研究表明, 当植物受到 Cd 胁迫后, 植物体内的生长素的合成和极性运输被抑制, 主根长度变短, 侧根数量减少, 植物可以动态和差异性的调节生长素相关基因的转录, 使植物在逆境下更好地适应和生存<sup>[10-11]</sup>。

植物在受到 Cd 胁迫后会激活多种响应途径来抵抗或减弱胁迫程度。植物首先会限制 Cd 的吸收与运输, 将大部分吸收的 Cd 储存在根部液泡中, 减少 Cd 由根系向地上部的转运<sup>[12-13]</sup>; 然后植物螯合素与 Cd 结合, 降低细胞内游离的

Cd<sup>2+</sup>, 减轻对植物的毒害<sup>[14]</sup>; Cd 胁迫诱导 ROS 在植物体内大量积累, 这些 ROS 随后被超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸氧化酶(APX)、谷胱甘肽(GSH)等构成的抗氧化系统所清除进而避免植物受到氧化胁迫<sup>[15-18]</sup>。

CAT 是 ROS 清除体系的重要组成部分, 主要负责清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[19]</sup>。Cd 胁迫能够不同程度地改变植物体内抗氧化酶的活性, 表明包括 CAT 在内的抗氧化酶参与植物对 Cd 胁迫的响应<sup>[20]</sup>。CAT 是否参与拟南芥根对 Cd 胁迫的耐受性响应并没有被明确报道, 拟南芥中已经报道的共有 3 个 CAT 基因, 其中 CAT2 是植物 CAT 的主要形式。因此, 借助 CAT2 缺失突变体 *cat2*, 以期探究 CAT2 是否参与到植物根部对 Cd 胁迫的调控响应。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 研究对象。**拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)哥伦比亚野生型(Col-0)、T-DNA 插入突变体 *cat2*(SALK\_057998)、转基因材料 DR5::N7-VENUS、*cat2* DR5::N7-VENUS。

**1.1.2 主要试剂。**MS, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 蔗糖, 2-吗啉乙磺酸, 琼脂粉, 氯化镉(CdCl<sub>2</sub>), 聚乙烯吡咯烷酮(PVPP), 抗坏血酸(ASC), DCFH-DA 荧光染料, 无水乙醇, 次氯酸钠。

**1.1.3 主要仪器。**垂直培养板, 灭菌锅, 激光共聚焦显微镜 LSM710, 扫描仪, 超净工作台, 冰箱, pH 计, 紫外分光光度计。

## 1.2 方法

**1.2.1 拟南芥种子消毒。**取少量拟南芥种子于离心管中, 超净工作台内加入 70% 乙醇浸泡 5 min, 弃上清; 向离心管中加入 25% 次氯酸钠, 振荡后静置 15 min, 弃掉上清; 向离心管中

**基金项目** 国家自然科学基金项目(31300225)。

**作者简介** 贾骥骏(1993—), 男, 安徽界首人, 硕士, 从事植物分子生物学研究。

**收稿日期** 2018-04-12

加入 1 mL 无菌 ddH<sub>2</sub>O 振荡弃掉上清,重复 6~8 遍;用无菌枪头将种子均匀地点到 1/2 MS 固体培养基培养板上,晾干后用透气胶带封口,4 °C 冰箱内低温春化 3 d 后将培养板放入植物人工气候室进行生长 7 d。生长条件:光照强度分为 80~100 μmol/(m<sup>2</sup>·s)、16 h 光照、8 h 黑暗、温度 22 °C (白天)/20 °C (夜晚)、湿度 60%。

**1.2.2 拟南芥杂交。**待拟南芥 *cat2* 和 Col-0 *DR5::N7-VENUS* 正常生长到抽薹开花后,取尚未开花的花苞作为母本,开花势头较好的花作为父本。将父本的花粉涂抹在已经去除势的母本柱头上,低光 3 d 后转正常光照,待荚果成熟后所得即为杂合 F<sub>1</sub> 代,自交产生 F<sub>2</sub> 代,从中分离出纯合的 *cat2 DR5::N7-VENUS*<sup>[21]</sup>。

**1.2.3 镉胁迫处理。**配制 0.1 mol/L CdCl<sub>2</sub> 母液,根据终浓度将一定体积的 CdCl<sub>2</sub> 加入 1/2 MS 培养基中混匀,倒入一次性培养板待凝固后即可使用,试验使用工作浓度为 0、10、30 μmol/L。在超净工作台中,用无菌镊将 6 d 的苗移到胁迫培养基中处理 4 d,扫描后统计根长。

**1.2.4 根长统计及分析。**扫描仪扫描 10 d 左右拟南芥整株形态,Image-J 测量每棵幼苗的主根长度,Excel 对数据进行计算和分析。

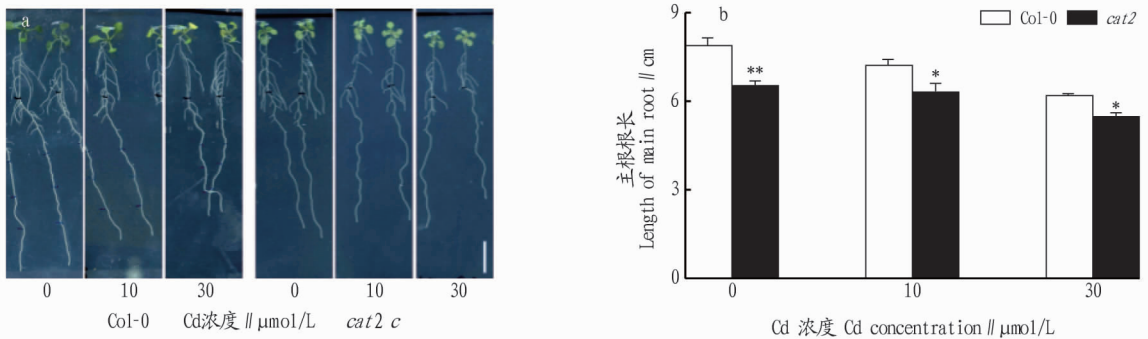
**1.2.5 ROS 染色 (DCFH-DA 法)。**将 DCFH-DA 母液加入预冷的 pH 6.0 磷酸钾缓冲液,配成终浓度为含有 100 μmol/L DCFH-DA 的荧光探针染液,避光保存;取 7 d 生长状态一致

的幼苗,低温孵育 15 min 后,使用磷酸钾缓冲液漂洗 3~5 遍后制片;激光共聚焦观察荧光信号表达,激发光 488 nm,发射光 525 nm,单通道扫描<sup>[22]</sup>。

**1.2.6 CAT 酶活测定。**取 200~300 mg 拟南芥根部,液氮充分研磨后加入 100 mg PVPP,然后加入 1.5 mL 0.1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/1 mmol/L EDTA (pH 7.5),1 mmol/L ASC,4 °C,12 000 g,10 min,吸取 1 mL 上清液转移到新离心管中,置于冰上后备用;使用紫外分光光度计测定 CAT 酶活,反应体系为:880~970 μL 缓冲液+20 μL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+10~100 μL 酶提取液,充分混匀后,反应 90 s。记录 30~60 s 斜率数,最后根据公式计算 CAT 酶活。

## 2 结果与分析

**2.1 不同浓度 Cd 对 Col-0 和 *cat2* 根长的影响** 使用 CAT 功能缺失突变体 *cat2* 探究 CAT 是否参与植物根部对 Cd 胁迫的调控响应。选取垂直培养至 6 d、大小均一的拟南芥幼苗,使用浓度为 0、10、30 μmol/L CdCl<sub>2</sub> 进行 4 d 胁迫处理。结果如图 1 所示,在 1/2 MS 培养基上生长的苗的根部随着 Cd 浓度的增加,Col-0 和 *cat2* 根长受到抑制,侧根数量减少,地上部出现明显的黄化表型。在 30 μmol/L Cd 处理条件下,与对照组相比,Col-0 和 *cat2* 主根根长抑制率约为 23% 和 16%,并无显著性差异。表明 CAT2 功能缺失并不影响拟南芥根部对 Cd 的耐受性。



注:图 1a 的 bar=1 cm,图 1b 的各个样本统计数量≥20,“\*”表示  $P<0.05$ ,”\*\*”表示  $P<0.01$

Note:bar of graph 1a was 1 cm,sample number of graph 1b was not small than 20,“\*”stands for  $P<0.05$ ,”\*\*”stand for  $P<0.01$

图 1 Cd 处理后 Col-0 和 *cat2* 根长的统计

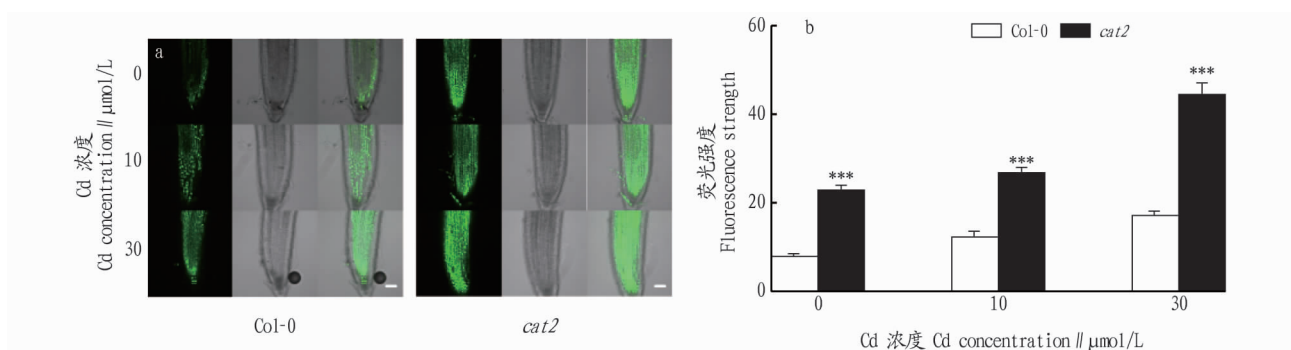
Fig.1 The statistics of root lengths of Col-0 and *cat2* after Cd treatment

**2.2 不同浓度 Cd 对 ROS 积累的影响** 重金属胁迫能够诱导植物体内产生大量 ROS,破坏植物体内的氧化平衡状态,造成植物受到氧化损伤。试验借助激光共聚焦显微镜使用 DCFH-DA 荧光探针对 Cd 处理的拟南芥根部 ROS 积累情况进行分析。正常情况下,Col-0 根中的 ROS 积累较弱,而随着 Cd 浓度的增加,根中的 ROS 逐渐增加。30 μmol/L Cd 处理后,Col-0 根中的 ROS 有明显增加;由于 *cat2* 中 CAT 功能缺失,不能及时清除体内产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,故体内氧化水平处于较高的水平,从图 2 可以看出,*cat2* 在 0 μmol/L 时根部的 ROS 水平显著高于 Col-0,当 *cat2* 受到 Cd 处理后,体内的 ROS 会随着 Cd 浓度的积累而增加。10 μmol/L 时,和对照组相比,*cat2* 根部的 ROS 并没有显著变化,而在 30 μmol/L 时,

Col-0、*cat2* 根中 ROS 都明显增加,与对照组相比,Col-0 的 ROS 增加了 114.7%,*cat2* 增加了 93.3%,并无显著性差异。表明 CAT2 可能不参与 Cd 胁迫下拟南芥根对 ROS 积累的调控。

**2.3 不同浓度 Cd 对 CAT 活性的影响** CAT 活性能够反应出植物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的清除能力。取 Cd 处理 7 d 后的 Col-0、*cat2* 根部,测定其根部 CAT 活性。从图 3 可以看出,随着 Cd 浓度的增加,*cat2* 根部的 CAT 活性均没有明显的变化。由于 CAT2 突变,和 Col-0 相比,*cat2* 根部的 CAT 酶活性下降约 80%,表明 Cd 胁迫对拟南芥根的 CAT 活性没有明显影响。

**2.4 不同浓度 Cd 对生长素信号的影响** 研究发现重金属胁迫会影响生长素在植物根中的合成、运输、信号转导。为



注:绿色荧光表示 ROS 积累量

Note: Green fluorescence stands for ROS accumulation

图 2 Cd 处理后 Col-0 和 *cat2* 根中 ROS 的积累

Fig.2 Accumulation of ROS in Col-0 and *cat2* roots after Cd treatment

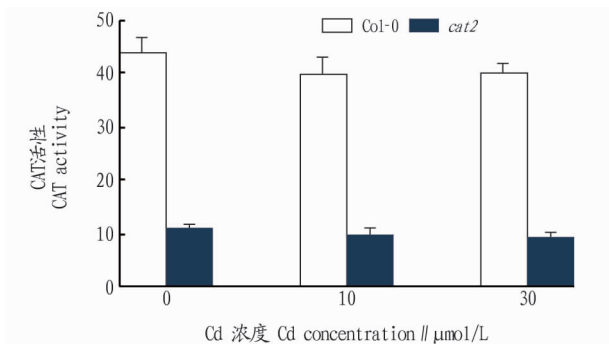
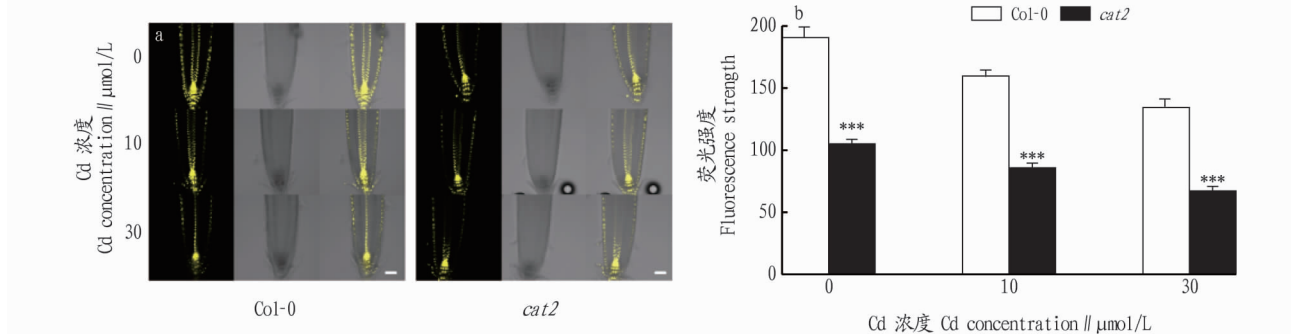


图 3 Cd 处理 Col-0 和 *cat2* 根中 CAT 活性测定

Fig.3 CAT activity in Col-0 and *cat2* roots after Cd treatment



注:黄色荧光代表生长素积累量

Note: Yellow fluorescence stands for auxin accumulation

图 4 Cd 处理 Col-0 和 *cat2* 根中生长素的变化

Fig.4 Analysis of auxin in Col-0 and *cat2* roots after Cd treatment

以上结果表明 CAT2 缺失可能会减少根中生长素的信号,但并不参与 Cd 胁迫下拟南芥根部对生长素的调控。

### 3 讨论

在长期的进化过程中植物演化出多种抵抗重金属的防御机制,多种抗氧化酶参与植物对重金属胁迫的响应已经得到证实。试验使用 Cd 浓度梯度处理模式植物拟南芥 Col-0 和 CAT2 功能缺失突变体 *cat2*,分析统计主根长度发现,*cat2* 主根根长的抑制率低于 Col-0,说明 CAT2 可能不参与 Cd 对拟南芥根长抑制的调节。通过测定不同浓度 Cd 处理后的 Col-0、*cat2* 根中的 CAT 活性,进一步证明 *cat2* 受到 Cd 胁迫后根中的 CAT 活性无显著变化。ROS 和生长素作为重要的

了进一步确定 CAT2 在拟南芥根响应 Cd 胁迫后生长素的作用,用 *cat2* 与生长素报告基因 Col *DR5::N7-VENUS* 杂交从 F2 代中分离出纯合的 *cat2 DR5::N7-VENUS*,激光共聚焦显微镜检测生长素荧光信号表达。结果如图 4 所示,Col *DR5::N7-VENUS* 根中生长素表达强烈,但随着 Cd 处理浓度的增加,根尖、中柱鞘、外层细胞中荧光强度逐渐减弱,表明 Cd 胁迫会改变拟南芥根的中生长素信号表达;而对照组中 *cat2 DR5::N7-VENUS* 与 Col *DR5::N7-VENUS* 相比,根中荧光强度降低,30 μmol/L Cd 处理后,根中生长素信号随之降低,进一步分析荧光强度发现,和对照组相比,Col-0 和 *cat2* 的荧光强度分别下降了 29.4% 和 36.6%,并无显著性差异。

信号分子,广泛参与到植物生长发育、新陈代谢、胁迫响应等众多生理生化反应的调控。分析 Cd 处理后根中的 ROS 积累发现,CAT2 不参与到 Cd 胁迫下拟南芥根中对 ROS 的调控。通过比较根中生长素报告基因的荧光强度,发现 CAT2 也不参与 Cd 胁迫抑制根中生长素的信号表达的调控。

研究报道,镉处理玉米幼苗后,根中 CAT 的活性和蛋白含量会下调,而转录水平会随着处理时间而增加,并改变转录后的蛋白空间结构<sup>[23]</sup>。当小麦受到 Cd 胁迫后,CAT 活性降低会抑制  $K^+/Na^+$  比率,进而破坏离子通道的正常交换,影响扩膜运输效率<sup>[24]</sup>。而该试验发现拟南芥受到镉胁迫后,根中 CAT 酶活并未发生显著变化,这可能由于不同植物对

镉的耐受能力是不同的,镉胁迫并未改变 CAT 转录和蛋白表达。

谷胱甘肽(GSH)在植物抵抗逆境胁迫过程中起着重要作用。研究报道,植物中的 GSH 可以螯合 Cu 和 Cd,降低细胞内游离的重金属浓度,这些复合物随之转移到液泡并排出体外,从而减轻重金属对植物的毒害作用。拟南芥可能通过 GSH 途径参与调控 Cd 胁迫。

综上所述,CAT2 不参与调控拟南芥根部对镉胁迫的耐受性,并且不参与 ROS 积累、生长素信号表达的调控。

#### 参考文献

[1] CUYPERS A, PLUSQUIN M, REMANS T, et al. Cadmium stress: An oxidative challenge[J]. *Biomaterials*, 2010, 23(5): 927-940.

[2] WANG L, CUI X F, CHENG H G, et al. A review of soil cadmium contamination in China including a health risk assessment[J]. *Environmental science & pollution research*, 2015, 22(21): 16441-16452.

[3] RAVEN J A, EDWARDS D. Roots: Evolutionary origins and biogeochemical significance[J]. *Journal of experimental botany*, 2001, 52: 381-401.

[4] PIRES N D, DOLAN L. Morphological evolution in land plants: new designs with old genes[J]. *Philosophical transactions of the royal society of London*, 2012, 367(1588): 508-518.

[5] LÓPEZ-BUCIO J, CRUZ-RAMÍREZ A, HERRERA-ESTRELLA L. The role of nutrient availability in regulating root architecture[J]. *Current opinion in plant biology*, 2003, 6(3): 280-287.

[6] HODGE A. Plastic plants and patchy soils[J]. *Journal of experimental botany*, 2006, 57(2): 401-411.

[7] ATKINSON J A, RASMUSSEN A, TRAINI R, et al. Branching out in roots: Uncovering form, function, and regulation[J]. *Plant physiology*, 2014, 166(2): 538-550.

[8] ARAVIND P, PRASAD M N V, MALEK P, et al. Zinc protects *Ceratophyllum demersum* L. (free-floating hydrophyte) against reactive oxygen species induced by cadmium[J]. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 2009, 23(1): 50-60.

[9] SHARMA A, MUKHERJEE A, TALUKDER G. Modification of cadmium toxicity in biological systems by other metals[J]. *Current science*, 1985, 54: 539-549.

[10] WANG R, WANG J H, ZHAO L, et al. Impact of heavy metal stresses on the growth and auxin homeostasis of *Arabidopsis* seedlings[J]. *Biomaterials*, 2015, 28(1): 123-132.

[11] YUAN H M, LIU W C, JIN Y, et al. Role of ROS and auxin in plant response to metal-mediated stress[J]. *Plant signaling & behavior*, 2013, 8(7): 85-100.

[12] CHEN F, WU F B, DONG J, et al. Cadmium translocation and accumulation in developing barley grains[J]. *Planta*, 2007, 227(1): 223-232.

[13] CHOLEWA E, PETERSON C A. Evidence for symplastic involvement in the radial movement of calcium in onion roots[J]. *Plant physiology*, 2004, 134(4): 1793-1802.

[14] ERNST W H O, KRAUSS G J, VERKLEIJ J A C, et al. Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view[J]. *Plant, cell & environment*, 2008, 31(1): 123-143.

[15] GRATÃO P L, MONTEIRO C C, TEZOTTO T, et al. Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants[J]. *Biomaterials*, 2015, 28(5): 803-816.

[16] PEREIRA G J G, MOLINA S M G, LEA P J, et al. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*[J]. *Plant & soil*, 2002, 239(1): 123-132.

[17] ANJUM S A, TANVEER M, HUSSAIN S, et al. Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): Consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation[J]. *Environmental science & pollution research*, 2015, 22(21): 17022-17030.

[18] MOBIN M, KHAN N A. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress[J]. *Journal of plant physiology*, 2007, 164(5): 601-610.

[19] MHAMDI A, NOCTOR G, BAKER A. Plant catalases: Peroxisomal redox guardians[J]. *Archives of biochemistry & biophysics*, 2012, 525(2): 181-192.

[20] ANN C, KAREN S, JOS R, et al. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. *Journal of plant physiology*, 2011, 168(4): 309-316.

[21] RIAHI A, HDIDER C. Bioactive compounds and antioxidant activity of organically grown tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars as affected by fertilization[J]. *Scientia horticulturae*, 2013, 151(2): 90-96.

[22] ORACZ K, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, KRANNER I, et al. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination[J]. *Plant physiology*, 2009, 150(1): 494-505.

[23] 周希琴, 莫灿坤. 植物重金属胁迫及其抗氧化系统[J]. *新疆教育学院学报*, 2003, 19(2): 103-108.

[24] ZHANG G P, FUKAMI M, SEKIMOTO H. Influence of cadmium on mineral concentrations and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage[J]. *Field crops research*, 2002, 77(2): 93-98.

#### 名词解释

扩展被引半衰期:指该期刊在统计当年被引用的全部次数中,较新一半是在多长一段时间内发表的。被引半衰期是测度期刊老化速度的一种指标,通常不是针对个别文献或某一组文献,而是对某一学科或专业领域的文献的总和而言的。

扩展 H 指数:指该期刊在统计当年被引的论文中,至少有 h 篇论文的被引频次不低于 h 次。

来源文献量:指来源期刊在统计当年发表的全部论文数,它们是统计期刊引用数据的来源。

文献选出率:按统计源的选取原则选出的文献数与期刊的发表文献数之比。

参考文献量:指来源期刊论文所引用的全部参考文献数,是衡量该期刊科学交流程度和吸收外部信息能力的一个指标。

平均引文数:指来源期刊每一篇论文平均引用的参考文献数。

平均作者数:指来源期刊每一篇论文平均拥有的作者数,是衡量该期刊科学生产能力的一个指标。

地区分布数:指来源期刊登载论文所涉及的地区数,按全国 31 个省市计(不包括港澳台)。这是衡量期刊论文覆盖面和全国影响力大小的一个指标。

机构分布数:指来源期刊论文的作者所涉及的机构数。这是衡量期刊科学生产能力的另一个指标。

海外论文比:指来源期刊中,海外作者发表论文占全部论文的比例。这是衡量期刊国际交流程度的一个指标。

基金论文比:指来源期刊中,各类基金资助的论文占全部论文的比例。这是衡量期刊论文学术质量的重要指标。

引用半衰期:指该期刊引用的全部参考文献中,较新一半是在多长一段时间内发表的。通过这个指标可以反映出作者利用文献的新颖度。