

拟南芥 *CEO1* 基因在氯化镉诱导的氧化胁迫中的作用

崔香环^{1,*}, 朱佩燕², 李保珠²

¹ 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; ² 河南大学植物逆境生物学重点实验室, 河南开封 475001

摘要: 以拟南芥 *ceo1* 突变体为材料, 研究 *CEO1* (clone eight-one) 在镉胁迫条件下作用的结果表明, 与野生型植株相比, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 处理 10 d 后, 拟南芥 *ceo1* 突变体表现为植株生长矮小, 叶片卷曲发黄, 根系短小。镉处理后, 拟南芥突变体幼苗叶中 H_2O_2 的积累较多; 镉处理 1 h 后的突变体中抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性明显上升, 至 2 h 时又开始下降, 而镉处理 2 h 后, 野生型 APX 活性才开始增加。镉处理 2 h 后的野生型的谷胱甘肽还原酶 (GR) 显著增加, 而突变体无明显变化。两种类型拟南芥的超氧化物歧化酶 (SOD) 与过氧化氢酶 (CAT) 的活性没有明显差异。

关键词: 拟南芥; *CEO1*; 镉胁迫; 活性氧; 抗氧化酶

The Role of *Arabidopsis CEO1* Gene under CdCl_2 -Induced Oxidative Stress

CUI Xiang-Huan^{1,*}, ZHU Pei-Yan², LI Bao-Zhu²

¹ School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ² Key Laboratory of Plant Stress Biology, Henan University, Kaifeng, Henan 475001, China

Abstract: The role of *Arabidopsis thaliana CEO1* (clone eight-one) under cadmium stress was studied by using *A. thaliana ceo1* mutants. The result indicated that *ceo1* mutant seedlings exhibited dwarf phenotype, yellower and more curly leaves, and shorter roots after 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 treatment for 10 d as compared with the wild-type ones. In addition, the content of H_2O_2 increased more obviously in the leaves of mutant seedlings after cadmium treatment. The activity of ascorbate peroxidase (APX) evidently increased after cadmium treatment for 1 h and didn't decrease in the mutants till 2 h, while APX activity began to enhance in the wild-type ones at 2 h after treatment. The activity of glutathione reductase (GR) remarkably increased in the wild-type ones and invisibly changed in the mutants after 2 h treatment. In contrast, the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) have no obvious difference between the both types of plants after treatment.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *CEO1*; cadmium stress; reactive oxygen species; antioxidative enzymes

镉(Cd)是环境中的主要重金属污染源,是危害植物毒性最强的元素之一,其毒性仅次于汞。据报道,植物遭受镉毒害后,植株生长受到强烈抑制,叶绿体和线粒体受损,叶片变黄并出现坏死斑,光合作作用和呼吸作用下降,最终导致生物产量下降 (Benavides 等 2005; Rodriguez-Serrano 等 2006)。还有研究表明,镉伤害植物是通过氧化胁迫而引起的 (Rodriguez-Serrano 等 2006)。正常条件下,植物细胞本身具有防止活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和自由基早期形成的非酶机制和清除它们的酶促防御系统。其中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 消除超氧阴离子自由基 (O_2^-) 的毒害,过氧化氢酶 (catalase, CAT)、抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX) 和谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR) 参与细胞内不同区室 H_2O_2 的清除,因而 ROS 维持在一个较低水平。此

外,许多植物在遭受镉胁迫时,体内的抗氧化酶活性发生改变,ROS和自由基大量积累,膜脂过氧化,最终表现为生长受抑制,甚至死亡 (Shaw 1995; Gallego 等 1996; Sandalio 等 2001)。镉对植物的伤害是通过氧化胁迫进行的,但植物应答镉胁迫的分子机制还不太清楚。据报道,拟南芥 *CEO1* (clone eight-one) 是植物中特有的一种蛋白,其中存在富含 Trp 和 Glu 的 WWE 基序,该区域与酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) Yap1 (yeast activator proteins) 中的 WW 基序具有一定的同源性 (Ahlfors 等 2004)。Yap1 是酵母应答氧化胁迫通路的 H_2O_2 转录因子,此基因的缺失会导致酵母对 H_2O_2 和镉所引起的氧化胁迫的

收稿 2009-02-24 修定 2009-07-15

资助 国家自然科学基金项目 (30670183)。

* 通讯作者 (E-mail: cuixh@tongji.edu.cn; Tel: 021-65989464)。

敏感性(Carmel-Harel等2001)。已有研究表明,拟南芥*CEO1*基因在酵母中表达后, *Yap1*缺失型和野生型酵母的抗氧化能力增强(Belles-Boix等2000),表明*CEO1*在生物的氧化胁迫中起作用。虽然*CEO1*在酵母细胞中有互补*Yap1*的作用,可增强其对氧化胁迫的抗性,但它在植物中是否参与对镉诱导的氧化胁迫的应答,其作用机制又如何,都不太清楚。为此,本文以拟南芥*CEO1*基因的突变体为材料,探讨了拟南芥*CEO1*基因在镉诱导的氧化胁迫中的作用。

材料与方 法

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型(Col-0)和*CEO1* (AT1g32230)的T-DNA插入突变体*ceol* (Salk_116432)种子购自拟南芥生物资源中心(*Arabidopsis* Biological Resource Center, ABRC)。野生型和纯合突变体种子分别经0.1%升汞表面消毒7 min,用无菌水冲洗几次,然后点种于0.8%琼脂粉的MS培养基上,放在4℃中2 d后,移入光照培养室中(光/暗周期为12 h/12 h,昼夜温度为22/18℃,光照强度为120~130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,相对湿度为70%左右)培养。MS培养基上萌发后生长4 d的拟南芥野生型和*ceol*突变体幼苗移到含有150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl₂的MS培养基上生长10 d后照相,并参照Cui等(2008)文中的方法测定根长。参照Lee等(2002)文中的方法,将生长在含150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl₂的MS培养基上10 d的拟南芥野生型和*ceol*突变体的叶片分别转移到含0.1 mg·mL⁻¹二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)的50 mmol·L⁻¹ Tris-

乙酸(pH 5.0)缓冲液中染色,黑暗下室温孵育24 h,未处理的作为对照,然后将材料投入到80%的乙醇中煮沸10 min脱去叶绿素,然后在新鲜的乙醇中浸泡4 h,观察并照相。另外,选取在MS培养基上萌发后生长14 d的野生型(WT)和*ceol*突变体拟南芥苗,用150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CdCl₂分别处理0、1、2、3 h,然后称重,液氮速冻,存于-80℃冰箱待用。按Jiang和Zhang(2001)文中的方法制备幼苗的粗酶液并测定SOD、CAT、APX、GR的活性。所有操作均在4℃下进行。以上实验至少重复3次,在0.05概率水平上用Student's *t*检验计算差异显著性。

结果与讨论

1 CdCl₂对*ceol*突变体生长的影响

图1显示,在镉处理10 d后,野生型拟南芥幼苗表现为叶片变黄、植株矮化的症状。这与Rodriguez-Serrano等(2006)在豌豆(*Pisum sativum*)中观察到的现象是相似的。而与野生型相比,拟南芥*ceol*突变体植株更加矮小,叶片小、卷曲且明显失绿,根系更为短小(图1-c)。这表明镉明显抑制*ceol*突变体幼苗的生长。此外,从镉处理后两种植株的主根长度变化来看,与未处理的相比,镉处理后,野生型主根长度下降33%,而突变体却下降69%(图1-e)。这些结果表明,*ceol*突变体幼苗的生长对镉胁迫更加敏感,显示*CEO1*基因可能介导了拟南芥幼苗对镉胁迫的应答。

2 *CEO1*对镉胁迫下拟南芥幼苗产生H₂O₂的影响

为了检测镉胁迫对拟南芥野生型和*ceol*突变

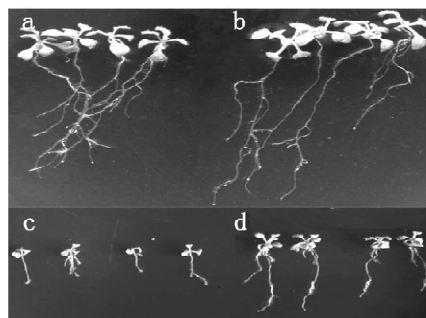
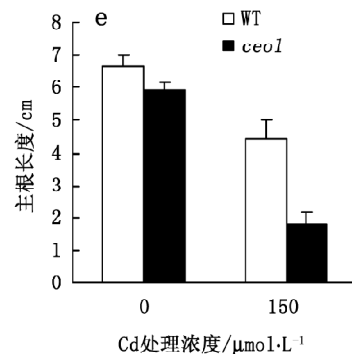


图1 *CEO1*对镉胁迫下拟南芥幼苗生长的影响

Fig.1 The effect of *CEO1* on the growth of *Arabidopsis* seedlings under cadmium stress

a和b分别为生长在MS培养基上的*ceol*突变体和野生型拟南芥;c和d分别为镉处理后的*ceol*突变体和野生型拟南芥;e为拟南芥幼苗主根生长的分析。WT:野生型拟南芥;*ceol*:*CEO1*基因的突变体。



体植株产生 H_2O_2 的影响, 我们用 DAB 染色方法确定植物体内 H_2O_2 的水平。在有过氧化物酶存在下, DAB 一旦与 H_2O_2 接触就会迅速形成红褐色聚合物沉淀, 因此, 可以通过直接观察颜色深浅及其出现的部位来分析 H_2O_2 的含量和产生部位。图 2 显示, 在未作 $CdCl_2$ 处理的拟南芥 *ceol* 突变体和野生型植株中 H_2O_2 的染色较浅(图 2-a、b), 突变体的染色较深(图 2-a); 而 $CdCl_2$ 处理 10 d 后, 这两种植株的染色都明显变深(图 2-c、d), 其中 *ceol* 突变体植株

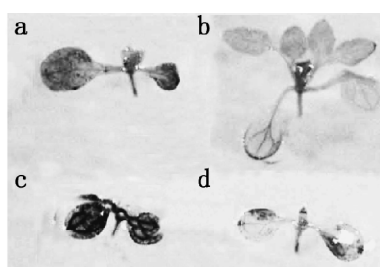
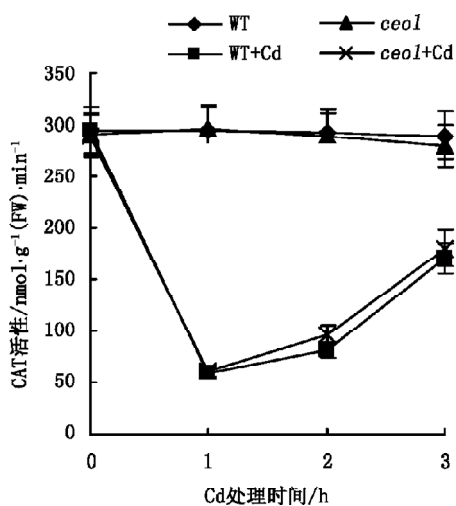


图 2 DAB 染色法确定拟南芥幼苗中 H_2O_2 水平

Fig.2 Detection of H_2O_2 level in *Arabidopsis* seedlings by DAB staining

a 和 b 分别为生长在 MS 培养基上的 *ceol* 突变体和野生型拟南芥; c 和 d 分别为镉处理后的 *ceol* 突变体和野生型拟南芥。



的染色程度变化更明显(图 2-c)。这表明 *ceol* 突变体叶片中积累了更多的 H_2O_2 。这些结果不仅进一步佐证了汤春芳等(2004)和 Rodriguez-Serrano 等(2006)报道的“镉对植物的伤害是由氧化胁迫引起的”看法, 而且还表明, *CEO1* 基因可能参与拟南芥幼苗对镉诱导的氧化胁迫的应答。

3 *CEO1* 对镉胁迫下拟南芥中 CAT 和 SOD 活性的影响

图 3 显示, 虽然在镉处理 1 h 内, CAT 或 SOD 的酶活性在拟南芥野生型与突变体中均明显下降, 但处理后的不同时间内, 野生型与突变体中 2 种酶的活性变化趋势和幅度均基本上一致。突变体的 SOD 的酶活性本底水平略低于野生型, 而 CAT 酶活性的本底水平差异不明显。这些结果表明, 虽然镉胁迫明显影响了拟南芥幼苗中 CAT 和 SOD 的活性, 但 *CEO1* 基因的缺失对镉胁迫诱导的 2 种酶的活性变化不明显, 这说明 CAT 和 SOD 在 *CEO1* 基因介导拟南芥幼苗对镉诱导的氧化胁迫的应答过程中作用不明显, 且突变体中较低的 SOD 本底水平是由 *CEO1* 基因缺失引起的, 与镉胁迫似乎没有关系。

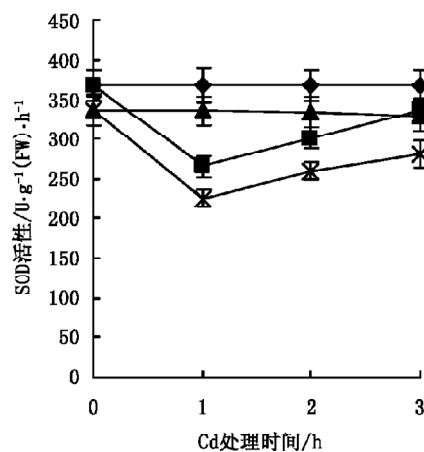


图 3 *CEO1* 对镉胁迫下拟南芥幼苗 CAT 和 SOD 活性的影响

Fig.3 The effects of *CEO1* on the activities of CAT and SOD in *Arabidopsis* seedlings under cadmium stress

WT: 野生型拟南芥; *ceol*: *CEO1* 基因的突变体。

4 *CEO1* 对镉胁迫下拟南芥中 APX 和 GR 活性的影响

如图 4 所示, 镉胁迫下拟南芥野生型与 *ceol* 突变体中 APX 和 GR 的活性均有显著变化。与处理

前相比, 野生型的 APX 活性明显下降, 直至 2 h 后才有所回升, 而 *ceol* 突变体在处理 1 h, 其 APX 的活性下降到最低水平, 比处理前下降 96%, 随后开始回升, 至 2 h 时又下降。虽然两者的酶活性之

后又均回升,但仍远远低于处理前的酶活性水平。从GR的酶活性变化来看,两者的GR活性在处理后的1 h内都急剧下降,下降趋势和幅度无明显差异。从处理后1 h开始,突变体中此种酶活性开始缓慢回升,至2 h时,酶的活性也仅为处理前的60%,之后无明显变化;而野生型植株的此酶活性于处理后2 h时开始急剧上升,3 h后,酶活性为处理前的117%。此外,从图4也可以看出,未作镉胁迫处

理的拟南芥 *ceol* 突变体中两种酶活性均低于野生型,这可能就是镉处理前的 *ceol* 突变体叶片中 H_2O_2 染色比野生型染色深(图2)的原因。这些结果表明,拟南芥植株中APX和GR可能参与对镉胁迫的应答,且 *CEOI* 基因的缺失不仅导致拟南芥 *ceol* 突变体幼苗中APX和GR的本底水平下降,而且镉处理后二者的活性均有变化,尤其是对镉胁迫抑制GR活性的上升更明显。这说明拟南芥 *CEOI* 基因的

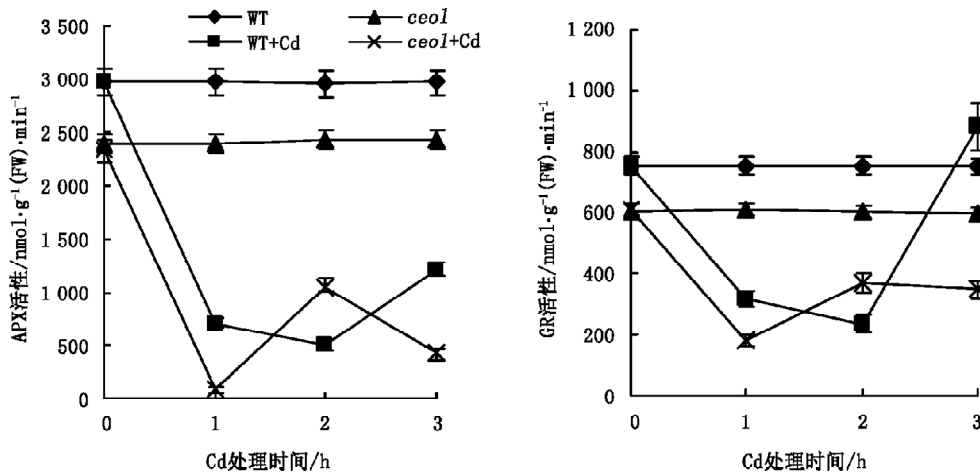


图4 *CEOI* 对镉胁迫下拟南芥幼苗的APX和GR活性的影响

Fig.4 The effects of *CEOI* on the activities of APX and GR in *Arabidopsis* seedlings under cadmium stress

WT: 野生型拟南芥; *ceol*: *CEOI* 基因的突变体。

表达可能调节着镉胁迫下APX和GR的活性。

参考文献

- 汤春芳, 刘云国, 曾光明, 李程峰, 徐卫华(2004). 镉胁迫对萝卜幼苗活性氧产生、脂质过氧化和抗氧化酶活性的影响. 植物生理与分子生物学学报, 30: 469~474
- Ahlfors R, Lang S, Overmyer K, Jaspers P, Brosche M, Tauriainen A, Kollist H, Tuominen H, Belles-Boix E, Piippo M et al (2004). *Arabidopsis* RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses. *Plant Cell*, 16: 1925~1937
- Belles-Boix E, Babiychuk E, Montagu MV, Inze D, Kushnir S (2000). CEO1, a new protein from *Arabidopsis thaliana*, protects yeast against oxidative damage. *FEBS Lett*, 482: 19~24
- Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2005). Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol*, 17: 21~34
- Carmel-Harel O, Stearman R, Gasch AP, Botstein D, Brown P, Storz G (2001). Role of thioredoxin reductase in the Yap1p-dependent response to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 39: 595~605
- Cui XH, Hao FS, Chen H, Chen J, Wang XC (2008). Expression of

- the *Vicia faba* VjPIP1 gene in *Arabidopsis thaliana* plants improves their drought resistance. *J Plant Res*, 121: 207~214
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996). Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci*, 121: 151~159
- Jiang MY, Zhang JH (2001). Effect of ABA on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol*, 42: 1265~1273
- Lee BH, Lee H, Xiong LM, Zhu JK (2002). A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell*, 14: 1235~1251
- Rodriguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gomez M, del Rio LA, Sandalio LM (2006). Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant Cell Environ*, 29: 1532~1544
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot*, 52: 2115~2126
- Shaw BP (1995). Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biol Plant*, 37: 587~596