

活性氧不敏感型拟南芥的突变体对 H₂O₂ 的响应

何金环¹, 李利红¹, 宋纯鹏^{2,*}

¹ 郑州牧业工程高等专科学校生物工程系, 郑州 450011; ² 河南大学生命科学学院, 河南开封 475001

摘要: 检测拟南芥 *ros* 突变株对 H₂O₂ 响应的结果表明, 此种突变体对 H₂O₂ 有较强的耐受性, 表现为气孔开度对 H₂O₂ 不敏感和 H₂O₂ 胁迫时的膜脂过氧化水平较低。采用激光扫描共聚焦显微术(LSCM)并结合 H₂O₂ 荧光探针 H₂DCFDA 检测外源 ABA 诱导保卫细胞的结果显示, 突变体内荧光强度比野生型拟南芥低, 暗示此种突变体消除 H₂O₂ 的能力可能有提高, 从而可增强植株抗氧化胁迫的能力。

关键词: 拟南芥; 突变体; 过氧化氢; 激光扫描共聚焦显微术

Response of Reactive Oxygen Intermediates-insensitive Mutant Seedlings in *Arabidopsis thaliana* to Hydrogen Peroxide

HE Jin-Huan¹, LI Li-Hong¹, SONG Chun-Peng^{2,*}

¹Department of Bioengineering, Zhengzhou College of Animal Husbandry and Engineering, Zhengzhou 450011, China; ²College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng, Henan 475001, China

Abstract: The result showed that the mutants had stronger resistance to H₂O₂, the stomatal aperture was not sensitive to H₂O₂ and had a lower level of peroxidation of membrane-lipid under the H₂O₂ stress. Using of the laser scanning confocal microscopy technique and combining the H₂O₂ fluorescence probe H₂DCFDA to examine the production H₂O₂ in guard cell by exogenous ABA, it showed that the fluorescence intensity in the mutant seedlings was lower than that in wild-type ones. It suggested that the ability of clearing H₂O₂ of mutant seedlings raised, thus the resistance of seedlings to oxygen stress maybe increased.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; mutant; hydrogen peroxide; laser scanning confocal microscopy

活性氧作为植物“第二信使”(Allan和Fluhr 1997; Neuenschwander等1995)的研究已成为逆境生物学研究领域的重大理论课题。而作为信号分子的H₂O₂(刘新等2001)在植物细胞中的转导细节及其与胞内其他信号分子的时空关系还知之甚少, 尤其是H₂O₂受体的研究目前仍是空白。

突变体分析是剖析复杂生物学过程的有力工具, 包括拟南芥在内的一些植物突变体已广泛用于植物发育和代谢途径的研究。用激素突变体研究激素代谢及其分子机制已有不少成功的例子[如生长素(Estelle和Somerville 1987)和脱落酸(Hobbie和Estelle 1994; Ishitani等1997)等的突变体]。同样, 活性氧突变体也可以用于分析氧化信号转导中各个成分的作用, 并进行有关基因表达和调控的分子遗传学分析, 从而为识别和克隆H₂O₂调节基因以及研究逆境条件下植物生长的调控机制(王学臣和任海云 1992)提供新的手段。

我们实验室曾采用甲基磺酸乙酯(ethyl

methanesulfonate, EMS)化学诱变方法和氧化胁迫(0.1 mmol·L⁻¹ H₂O₂)选择技术, 以重力作用下的弯曲生长为指标, 筛选得到了活性氧不敏感突变体(reactive oxygen intermediates-insensitive mutant, *ros*)。本文进一步分析这一突变体对H₂O₂的响应, 以期探讨H₂O₂这一信号分子的代谢途径及其在信号转导途径中的作用提供直接的实验材料。

材料与amp;方法

野生型拟南芥种子(*Arabidopsis thaliana*)由美国亚利桑那大学朱健康教授提供, 并从中筛选得到 *ros* 突变体 M₃ 代种子。种子以 75% 乙醇表面消毒 30 s, 再以 0.1% 升汞表面消毒 3 min, 并用无菌水冲洗 3~5 次后, 播种于 MS 固体培养基

收稿 2006-09-04 修定 2006-12-26

资助 国家自然科学基金(G1999011700)。

*通讯作者(E-mail: songcp@henu.edu.cn; Tel: 0378-2855010)。

(MS+3%蔗糖+0.7%琼脂, pH 5.7)上,再置于4℃下48 h,放入培养间[温度为(23±2)℃,日光灯光强200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,每天16 h光照和8 h黑暗,相对湿度为70%]培养。种子萌发3~5 d后,对其幼苗喷洒0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 H_2O_2 。暗处理2~4 h后,放回培养间。2~3 d后观察和测定根长,计算各个培养皿中根长的平均值和标准误。根据实验方案,取生长2周左右、中部完全展开的叶片,用蒸馏水洗净,撕取下表皮,叶肉细胞培养在基本缓冲液(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 0.05 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 ,用Mes调pH值至6.3)中,在23℃和光照下气孔完全张开。然后从基本缓冲液中取出表皮条,放入不同的处理液[0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱落酸(abscisic acid, ABA)、100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 过氧化氢酶(catalase, CAT)、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA+100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ CAT]中处理。每隔一定的时间检测气孔开度的变化。气孔开度在10×40倍的光学显微镜下以测微尺测定。每个处理取3个表皮条,每个表皮条取3个视野,测8~10气孔开度,每个处理重复4~6次,统计其气孔开度的平均值和平行实验间的方差。叶中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定参照林植芳和李双顺(1984)文中的方法并略有改动。

测定气孔保卫细胞内 H_2O_2 含量时,取生长12 d的拟南芥野生型及其突变体叶片较绿的完全展开叶片,作以下分析检测:(1)荧光探针的负载(Doke 1997; Pei等2000)。事先将2',7'-二氯荧光素乙酰酸盐(2',7'-dichlorofluoresceindiacetate, H_2DCFDA)配成50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液,分成小包装冷冻保存。将去叶肉细胞的表皮条培养在5 mL负载缓冲液(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, pH 7.2)中,然后从预先配好的含有 H_2DCFDA 的DMSO溶液中取5 μL 加入盛有表皮条的负载缓冲液中,混匀,避光负载15~30 min。(2)荧光图像的记录。将负载 H_2DCFDA 的表皮条用新鲜的pH 7.2的负载缓冲液漂洗2次,以洗去细胞表面的多余探针,然后用盖玻片迅速将表皮条固定在显微镜载物台上,用激光共聚焦扫描显微镜观察。根据实验方案,取终浓度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ABA刺激保卫细胞。在

研究保卫细胞的吸收速率时,事先在与投射光图像相对应的荧光图像中选定不同的区域。激光扫描共聚焦显微术(laser scanning confocal microscopy, LSCM)的工作条件为:激发光波长(Ex)=488 nm,采集荧光波长(Em)=525 nm,激光功率(Power)3%,放大倍数(Zoom)3,中速扫描,采集分辨率(Frame)512×512。软件为Time-Course。为确保结果的可比性,荧光图像在相同的设置[即通过人工将仪器中相关参数如采集荧光的孔径相对大小(Iris)、光电倍增管增益(Gain)、光电倍增管电压(Offset)等设置为固定值]下获得。每个实验至少重复3次,取有代表性的结果进行分析。

结果与讨论

1 H_2O_2 对野生型拟南芥及其突变体幼苗根生长的影响

用0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 喷洒生长3~5 d的野生型拟南芥及其突变体幼苗后,2~3 d测定根长的结果表明,野生型植株根生长受抑,其根长明显短于突变体(图1)。由此可以看出,拟南芥突变体对外源 H_2O_2 (0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)有很强的耐受性。

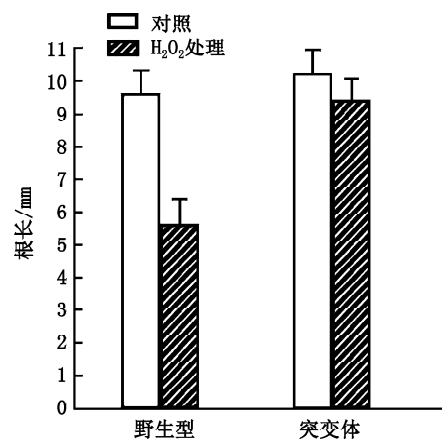


图1 H_2O_2 对野生型拟南芥及其突变体幼苗根生长的影响
Fig. 1 Effect of H_2O_2 on root growth of *A. thaliana* and its mutant seedlings

2 H_2O_2 对野生型拟南芥及其突变体叶片气孔开度的影响

用0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 处理野生型拟南芥及其突变体的表皮条后的结果显示, H_2O_2 处理的野生型拟南芥气孔关闭明显,而拟南芥突变体的气孔

变化不明显, 气孔没有关闭(图2)。说明突变体对外源 H_2O_2 不敏感。

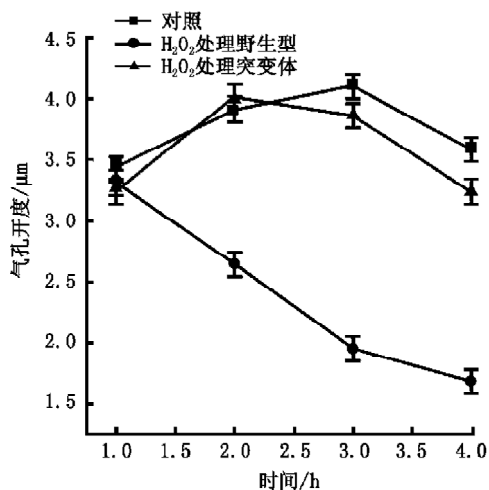


图2 H_2O_2 对野生型拟南芥及其突变体叶片气孔开度的影响

Fig. 2 Effect of H_2O_2 on stomatal aperture in leaves of *A. thaliana* and its mutant seedlings

3 H_2O_2 对野生型拟南芥及其突变体叶中MDA含量的影响

图3显示, 低浓度 H_2O_2 处理的野生型拟南芥, 其MDA含量增加不明显, 受 H_2O_2 胁迫的野生型拟南芥MDA含量高于突变体, 随着 H_2O_2 浓度的升高, 前者MDA含量升高, 而后者基本上

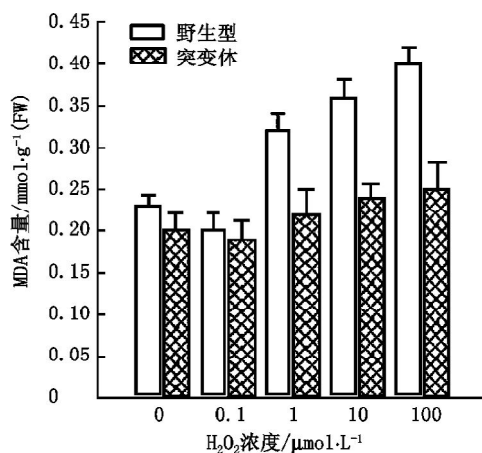


图3 H_2O_2 对野生型拟南芥及其突变体叶中MDA含量的影响

Fig. 3 Effect of H_2O_2 on MDA content in leaves of *A. thaliana* and its mutant seedlings

无变化。说明突变体内有较高的活性氧清除系统。

4 ABA和CAT对野生型拟南芥叶片气孔开度的影响

将气孔完全开放的野生型拟南芥的表皮条分别置于 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA、 $100 \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ CAT和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA+ $100 \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ CAT以及不加ABA和CAT的缓冲液中, 以后每0.5 h检测1次气孔开度的结果表明, ABA浓度升高, 气孔开度下降, 并且随着ABA处理时间的延长, 气孔开度逐渐下降; $100 \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的CAT可部分逆转ABA所诱导的气孔关闭(图4)。这些结果表明, H_2O_2 可能参与ABA诱导的气孔关闭过程。

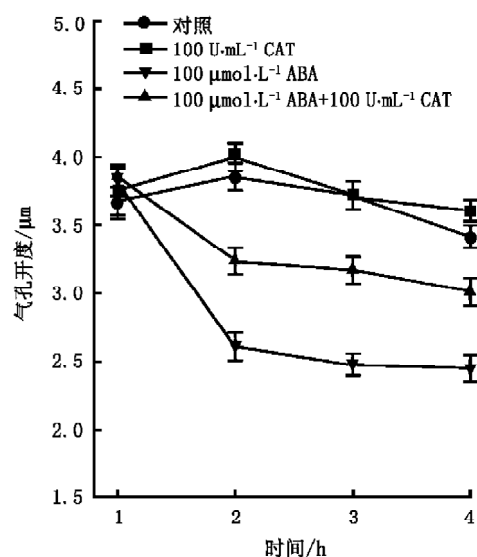


图4 ABA和CAT对野生型拟南芥叶片气孔开度的影响

Fig. 4 Effects of ABA and CAT on stomatal aperture in leaves of *A. thaliana* seedlings

5 外源ABA诱导的野生型拟南芥及其突变体气孔保卫细胞 H_2O_2 的产生

基于上述结果, 我们进一步用LSCM技术检测外源ABA诱导的 H_2O_2 产生及气孔关闭过程。从图5可以看出, 细胞内区域①和②(可能是叶绿体区和质膜附近区域) H_2O_2 荧光强度最先增强, 随后在区域③和④(可能是胞质区域)也表现出 H_2O_2 荧光增强, 并随着时间的延长($10\sim 200 \text{s}$), H_2O_2 荧光逐步遍布整个保卫细胞, 野生型拟南芥保卫

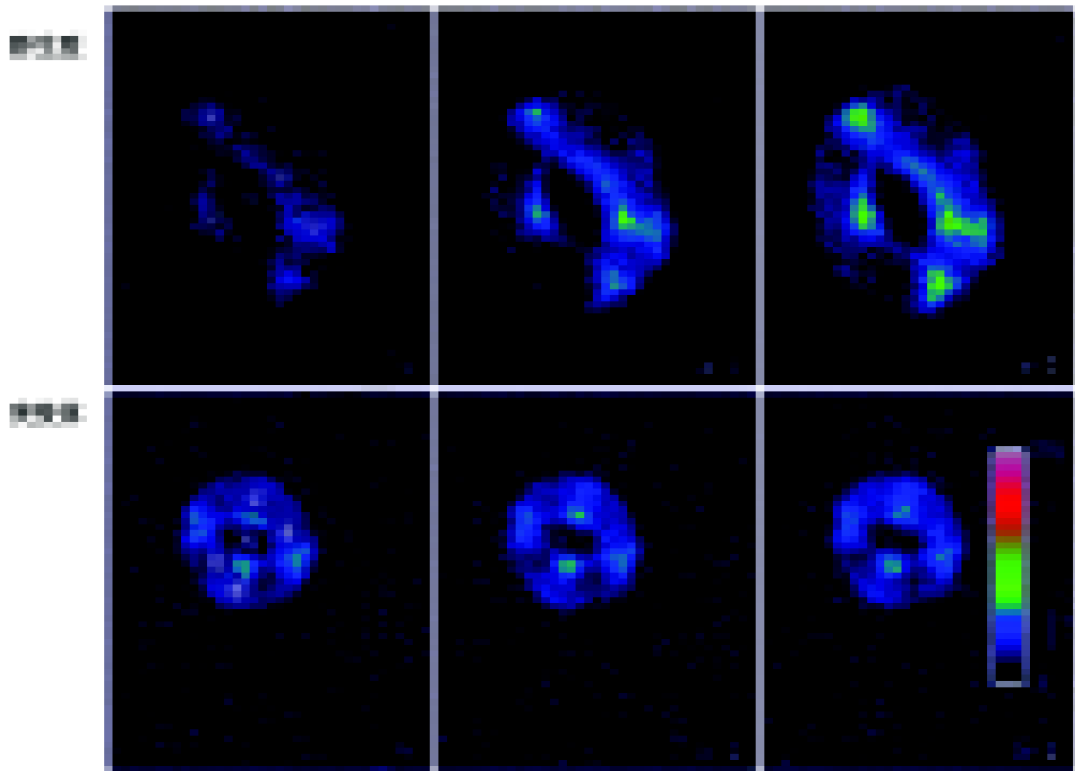


图5 外源ABA诱导保卫细胞 H_2O_2 的产生

Fig. 5 Generation of H_2O_2 in guard cells induced by exogenous ABA

a、a-1、a-2和b、b-1、b-2分别显示野生型拟南芥及其突变体在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理后10、100、200 s时的荧光强度。细胞内区域①和②可能是叶绿体区和质膜附近区域, ③和④可能是胞质区域, BG显示细胞内部背景荧光亮度。

细胞内荧光从局部的亮斑逐渐扩展。叶绿体区域的荧光增强尤为明显, 短时间内荧光即增加, 说明外源ABA确实能诱导胞内 H_2O_2 的产生。而在突变体胞内的荧光强度增加不明显, H_2O_2 荧光强度保持较低的水平。

总之, 突变体对 H_2O_2 的响应有了改变, 其对 H_2O_2 的耐受性较强。可能是在 H_2O_2 的正常代谢中, 细胞内消除 H_2O_2 的某一酶基因发生了突变(如过氧化氢酶或抗坏血酸过氧化物酶), 或它们的过量表达及时消除了体内多余的 H_2O_2 , 从而可避免细胞受到毒害。另外, 以 H_2O_2 荧光探针 H_2DCFDA 结合LSCM可以直接检测外源ABA诱导拟南芥保卫细胞内 H_2O_2 的产生, 实验中观察到野生型拟南芥胞内 H_2O_2 荧光强度比突变体拟南芥高, 暗示突变体拟南芥 H_2O_2 产量低可能是其体内ABA诱导产生的 H_2O_2 及时被消除或者产生 H_2O_2 的途径被阻断。

参考文献

- 刘新, 孟繁霞, 张蜀秋, 姜成后(2001). 气孔保卫细胞信号转导中的第二信使. 植物生理学通讯, 37 (6): 556~560
- 林植芳, 李双顺(1984). 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系. 植物学报, 26 (6): 605~615
- 王学臣, 任海云(1992). 干旱胁迫下植物根与地上部间的信息传递. 植物生理学通讯, 28 (6): 397~402
- 杨惠敏, 王根轩(2001). 保卫细胞胞质中 Ca^{2+} 浓度变化与气孔开闭之间的关系. 植物生理学通讯, 37 (3): 269~273
- Allan AC, Fluhr R (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, 9: 1559~1572
- Alvarea ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb CJ (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 92: 773~784
- Doke N (1997). The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: Scandalios JG (ed). *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 785~813
- Estelle MA, Somerville C (1987). Auxin-resistant mutants of

- Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. Mol Gen Genet, 206: 200~208
- Hobbie L, Estelle M (1994). Genetic approaches to auxin action. Plant Cell Environ, 17: 525~540
- Ishitani M, Xiong LM, Zhu JK (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. Plant Cell, 9: 1935~1949
- Neuenschwander U, Vernooij B, Friderich L, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1995). Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? Plant J, 8: 227~233
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 6553~6557
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. Nature, 406: 731~734
- Wu SJ, Ding L, Zhu JK (1996). *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. Plant Cell, 8: 617~627
- Zhang X, Dong FC, Gao JF, Song CP (2001). Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure. Cell Res, 11: 37~43