

镉诱导拟南芥根尖过氧化氢积累 导致植物根生长抑制

张司南^{1§} 高培尧^{2§} 谢庆恩³ 赵旭华³ 李霞^{3*}

(1. 兰州大学 兰州 730020; 2. 石家庄市外国语学校 石家庄 050000;
3. 中国科学院遗传与发育生物学研究所农业资源研究中心 石家庄 050021)

摘要 以模式植物拟南芥为材料研究了植物主根对不同浓度镉胁迫的响应。结果表明, 随镉浓度的升高, 植物主根生长受到明显抑制, 胎盘兰染色表明高剂量的镉造成主根根尖细胞死亡。进一步二氨基联苯胺(DAB)染色发现镉胁迫诱导植物根尖大量积累过氧化氢, 而在胁迫培养基中加入维生素 C 可显著改善植物根的生长、降低过氧化氢积累, 并减少镉诱导的根尖细胞死亡。上述结果表明, 镉胁迫诱导的拟南芥主根生长抑制很可能是由于根尖细胞过氧化物积累所致。

关键词 拟南芥 镉 根生长 维生素 C 过氧化物

中图分类号: X503 文献标识码: A 文章编号: 1671-3990(2010)01-0136-05

Cadmium-induced root growth inhibition is mediated by hydrogen peroxide production in root tip of *Arabidopsis*

ZHANG Si-Nan¹, GAO Pei-Yao², XIE Qing-En³, ZHAO Xu-Hua³, LI Xia³

(1. Lanzhou University, Lanzhou 730020, China; 2. Shijiazhuang Foreign Language School, Shijiazhuang 050000, China;
3. Center for Agricultural Resources Research, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050021, China)

Abstract *Arabidopsis* was used as a model plant and the young seedling root response to Cd stress investigated. The study shows that increasing concentrations of Cd inhibits root elongation. Both the meristematic and elongation zones are severely truncated, suggesting some degree of impact on cell division and elongation. Plant roots die under Cd overdose. DAB staining analysis shows hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in root tips when seedlings are treated with Cd. Furthermore, vitamin C (Vc) dramatically increases seedling tolerance to Cd treatment. Put together, the results demonstrate that Cd-inhibited root growth is likely caused by reduced meristematic and elongation cell division, mediated by ROS (reactive oxygen species) production.

Key words *Arabidopsis thaliana*, Cadmium, Root growth, Vitamin C, Hydrogen peroxide

(Received Aug. 7, 2009; accepted Sept. 12, 2009)

随着工业发展, 工矿企业产生的工业废弃物及农业生产中农药的大量应用, 使人类赖以生存的土壤和水源受到严重污染。镉是这些废弃物及农药中的一种有毒重金属, 对动植物健康和生态系统有很大危害^[1]。因此, 镉污染已成为全球非常重要且急需解决的环境问题之一。人们在关注如何用物理、化学和生物技术对污染的环境进行修复的同时, 也在关注如何提高植物和作物抗重金属镉的能力^[2]。通过农作物及产品摄入是镉进入人体并危害人类身心

健康的重要来源之一, 因此培育在污染土壤上生长的无镉或低镉作物新品种成为生物学家关注的重点^[3]。

镉不是高等植物必需的成分, 无任何生物功能。土壤中的镉可通过植物阳离子 Zn 和 Fe 的转运蛋白或者非特异的 Nramp 家族蛋白吸收并在各种组织中积累^[4-7]。镉积累会使叶绿素合成降低, 光合器官受损, 植物光合作用明显减弱^[8-9]。镉降低氮等营养吸收, 破坏碳和氮代谢^[10]。高剂量镉可严重影响植物各生命过程, 导致生长发育延缓甚至死亡, 其

§ 同等贡献者

* 通讯作者: 李霞(1964-), 女, 博士, 博士生导师, 主要从事植物抗逆分子遗传学的研究。E-mail: xli@genetics.ac.cn

收稿日期: 2009-08-07 接受日期: 2009-09-12

中镉诱导过氧化物积累被认为可能是导致植物细胞伤害的重要原因^[11-12]。无论在细胞系还是不同物种植物在镉处理时不仅可检测到过氧化物的产生, 还可检测到相关酶类活性的差异表达^[13-17]。目前, 已有的遗传学证据和基因组表达谱分析结果显示, 拟南芥中络合素(PCs)和谷胱甘肽(GSH)很可能在植物降低镉毒害中起关键作用^[18-19]。但对植物细胞如何消解重金属镉的毒害作用及植物在生理生化、细胞尤其分子水平的响应机制还知之甚少。

模式植物拟南芥为进行上述几个层面的研究提供了有力的途径。最近已经发现拟南芥无论是萌发还是幼苗生长对于镉的响应都非常显著, 而这种响应过程伴随过氧化物的积累及相关酶活性的改变, 说明植物对镉的响应有保守的机制^[20-21]。进一步对拟南芥抗镉机理的研究将有助于了解植物对镉吸收转运解毒等调控机制。本文研究了拟南芥根对不同浓度镉胁迫的响应及过氧化氢在其中的作用, 为揭示植物对镉的响应机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料与处理

供试材料为拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)哥伦比亚生态型。将种子在蒸馏水中浸泡 20 min, 经 50% Bleach 消毒 5 min, 无菌水冲洗 4 次后, 无菌移液器枪头点播在 MS 培养基上, 23℃ 温室生长 8 d。光周期 16 h(光)/8 h(暗)培养。选取萌发 8 d 均一的 180 株 Col-0 幼苗进行分组试验: 1) Hoagland 营养液(正常对照, Cd1); 2) Hoagland 营养液+ 10 mg · L⁻¹ 硫酸镉(Cd2); 3) Hoagland 营养液+ 20 mg · L⁻¹ 硫酸镉(Cd3); 4) Hoagland 营养液+1 000 mg · L⁻¹ 硫酸镉(Cd4); 5) Hoagland 营养液+20 mg · L⁻¹ 硫酸镉+50 mg · L⁻¹ 维生素 C (Cd+Vc)。每个培养皿中植入 30 株, 在处理的第 0 d、1 d、2 d 和 3 d 每个处理随机取 8 株, 放入 EP 管中进行胎盘兰染色或过氧化氢染色, 并用于根长测定和表型观察。各处理分别重复 3 次。

1.2 根生长测量

将已经染色的各处理的拟南芥幼苗摆放在一薄层培养基上, 用 EPSON 扫描仪扫描, 拟南芥幼苗根长用 Photoshop 软件测量, 计算平均根长和标准差。

1.3 二氨基联苯胺(DAB)染色检测过氧化氢

细胞中过氧化物酶能将过氧化氢中的氧释放出来, 氧化 DAB, 形成定位于过氧化物酶活性部位的金黄色沉淀^[22]。将拟南芥完全浸泡在 DAB 染色液中, 于光下 25℃ 处理 2 h; 将 DAB 完全吸出, 用蒸馏水清洗 4 次, 去除拟南芥上吸附的染液; 加入 70%乙醇, 水浴煮沸处理 10 min 脱色。显微镜下观察染色情况。

黄色越明显, 过氧化氢积累越多, 反之则越少。

1.4 胎盘兰染色检测细胞死亡

当细胞损伤或死亡时, 胎盘兰可穿透变性细胞膜与解体的 DNA 结合, 使其着色, 故可用此方法辨别细胞的死活。将拟南芥浸入胎盘兰溶液中, 5 min 后吸去染色, 用蒸馏水清洗 4 次, 最后在蒸馏水中浸泡 1 h 后观察染色情况。根部细胞死亡数目越多, 蓝色越明显, 当根部细胞完全死亡, 则变成深蓝色, 反之则颜色越浅。

2 结果与分析

2.1 镉胁迫抑制拟南芥根生长甚至导致根死亡

镉可以破坏植物细胞代谢, 从而导致植物生长发育异常^[9]。更值得关注的是植物根对镉胁迫的响应及其生理生化和遗传机理。MS 培养基上萌发 8 d 的拟南芥 Col-0 幼苗对不同浓度镉的响应结果显示, 随镉浓度增加, 拟南芥幼苗的根在处理 3 d 内表现出明显差异, 10 mg · L⁻¹ 和 20 mg · L⁻¹ 镉胁迫下, 与对照相比, 幼苗主根生长受到显著抑制(图 1)。而重度镉(1 000 mg · L⁻¹)胁迫下, 幼苗主根根尖部分明显萎缩, 伸长区缩短, 根毛区根肿胀, 根生长完全被抑制(图 2)。此外, 幼苗地上部分也明显发育迟滞, 呈现水样化。很显然镉处理对拟南芥幼苗根的发育有非常强的负面影响。

2.2 重度镉胁迫引起的主根抑制由根尖细胞死亡所致

由于重度镉胁迫条件下拟南芥幼苗主根的生长完全停止, 为了解植物主根是否已经死亡, 采用胎盘兰对镉胁迫 3 d 的植物进行染色观察。结果表明, 与正常条件下幼苗主根相比, 重度镉处理(1 000 mg · L⁻¹)幼苗主根根尖尤其是分生区呈深蓝色(图 3), 说明幼苗主根分生区细胞已经死亡, 这也是导致植

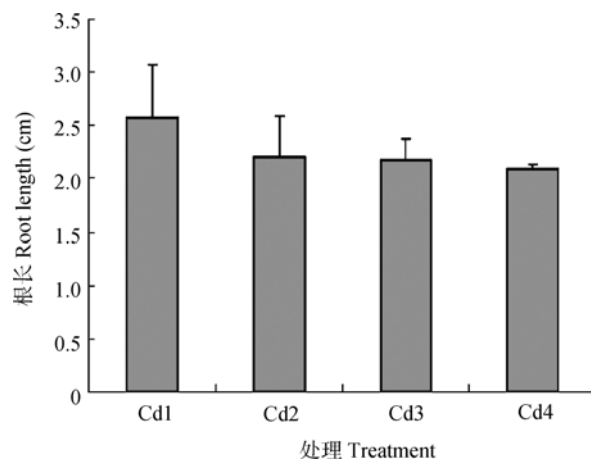


图 1 不同镉处理下拟南芥的根长
Fig. 1 Root length of *Arabidopsis* under different Cd treatments

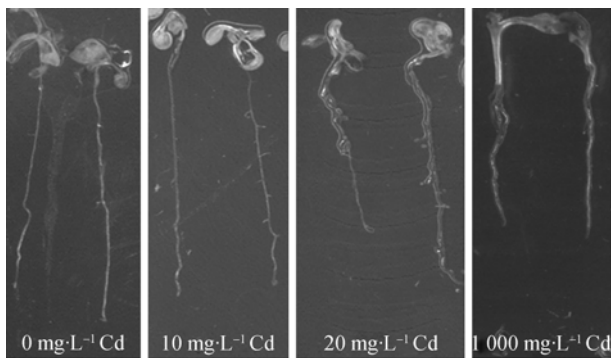


图 2 拟南芥主根对不同浓度镉处理的响应

Fig. 2 Effects of different concentrations of Cd stress on the growth of root of *Arabidopsis*

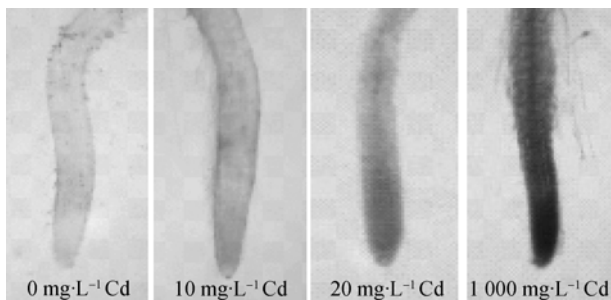


图 3 不同浓度镉胁迫拟南芥根尖细胞的染色结果

Fig. 3 Trypan blue staining of cells in root tips of *Arabidopsis* under different concentrations of Cd stress

物根不伸长的原因。10 mg · L⁻¹ 镉处理下未检测到细胞死亡, 但 20 mg · L⁻¹ 镉胁迫已导致部分幼苗根尖细胞死亡(图 3)。

2.3 镉胁迫诱导拟南芥根尖过氧化氢积累

已经有研究发现, 镉胁迫可引起植物细胞内过氧化物过度积累。本研究结果表明, 镉胁迫下拟南芥幼苗根尖过氧化氢量发生明显变化(图 4)。无胁迫幼苗根尖基本是透明的, 随镉浓度增加, 根尖颜色逐渐增强。在 20 mg · L⁻¹ 镉处理下, 根尖分生区颜色变化不明显, 但伸长区和根毛区呈深棕色; 而重度镉(1 000 mg · L⁻¹)胁迫下, 拟南芥分生区呈非常重的棕色(图 3A)。对重度镉胁迫处理下不同时间过氧

化氢产生情况的检测发现, 镉处理 1 d 过氧化氢在根尖中的积累就发生明显变化, 随时间延长过氧化氢积累继续增强, 过氧化氢积累也从根尖细胞扩展到多根毛区细胞及疏导组织(图 3 B)。上述结果说明镉诱导根尖过氧化氢大量积累很可能参与了镉诱导的主根生长异常。

2.4 维生素 C 提高植物抗镉能力

为进一步证明过氧化氢是导致镉诱导根生长抑制的原因, 在 20 mg · L⁻¹ 的镉培养基中加入 50 mg · L⁻¹ 的抗氧化剂维生素 C(Vc), 取样 DAB 染色, 并测定了植物根长, 以不加 Vc 的处理为对照(图 4A)。染色结果表明, 加入 Vc 大幅度降低了植物根尖过氧化氢积累, 即使有过氧化氢产生, 也主要集中在表皮细胞(图 5B)。与之相呼应, 加入 Vc 后拟南芥幼苗根细胞死亡状况被明显改善, 植物主根细胞的死亡仅限于部分表皮细胞, 分生区的细胞未检测到细胞的死亡(图 5C)。幼苗主根的伸长和不加 Vc 的对照极显著不同, 甚至比正常条件下生长的幼苗根生长还旺盛(图 5D), 植物地上部分生长也非常正常。表明过氧化物积累的确是镉造成根生长抑制的重要原因, 抗氧化剂 Vc 可提高拟南芥幼苗抗镉胁迫的能力。

3 讨论

镉是环境和土壤中最主要的重金属污染物之一, 它严重影响植物生长、发育和结实等各个过程。由于植物根系是镉胁迫感知和响应的重要器官, 所以揭示镉对植物根伤害及根系对镉响应的生理和分子机理对未来提高植物抗镉能力和培育抗镉作物新品种有重要意义, 同时还对培育镉富集植物, 从而用生物技术修复污染土壤有重要的参考价值。最近虽然有一些关于镉影响植物根系生长、侧根发育的报道^[14], 但植物根在镉胁迫条件下生长放缓和停滞的详尽机制仍不清楚。

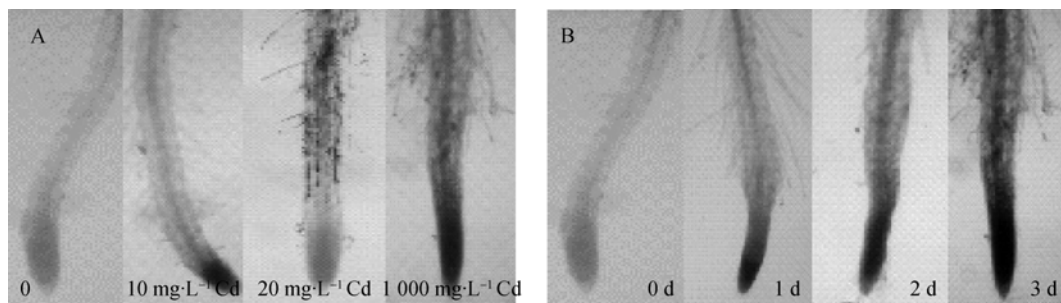


图 4 镉胁迫诱导拟南芥主根过氧化氢过度积累

Fig. 4 H₂O₂ accumulation in *Arabidopsis* main roots under different concentrations of Cd stress

A: 不同浓度镉处理 3 d 根尖过氧化氢的积累情况 H₂O₂ accumulation in *Arabidopsis* root tip under different concentration Cd stress for 3 d; B: 1 000 mg · L⁻¹ 镉处理 0 d、1 d、2 d、3 d 根尖过氧化氢积累 H₂O₂ accumulation in root tip under 1 000 mg · L⁻¹ Cd stress for 0, 1, 2, 3 days, respectively.

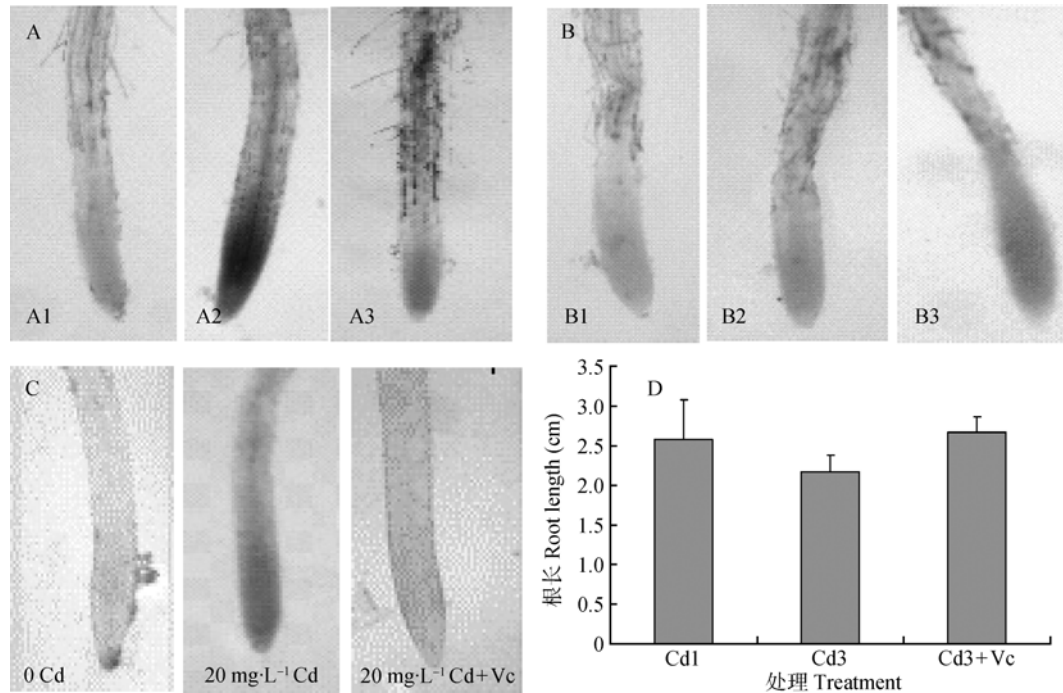


图 5 外源维生素 C 对拟南芥幼苗对镉胁迫响应的影响

Fig. 5 Effects of exogenous Vc on H_2O_2 accumulation, cell death and length of root of *Arabidopsis* seedlings under Cd stress

A 和 B 分别为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}$ 和 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd} + 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Vc}$ 处理 1 d(1)、2 d(2)、3 d(3)时根尖镉积累情况 A and B are Cd accumulation in root tip after $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}$ and $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd} + 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Vc}$ treatment for 1 day (1), 2 days (2) and 3 days(3); C: 镉胁迫 3 d 幼苗主根胎盘染色情况 Trypan blue staining of main roots after Cd treatment for 3 day; D: Vc 对主根伸长的影响 Effects of Vc on root elongation.

本研究利用模式植物拟南芥为材料, 对植物主根在不同程度镉胁迫下的生长及响应进行了研究。结果表明, 轻度镉胁迫造成主根伸长减缓主要是由于根尖分生细胞的分裂活力下降, 根伸长区细胞减少, 细胞伸长受到抑制。最近研究发现, 拟南芥中金属离子转运蛋白如 CAX4、Nramp6 等在镉的吸收和转运中起重要作用^[4, 23-24]。镉吸收及其在细胞尤其是根尖细胞中的积累无疑会影响细胞代谢和各种生物过程, 进而影响植物根分生区细胞的正常发育及随后的根生长。当然镉抑制根的生长也不排除离子营养匮乏或植物细胞内离子恒稳态的失衡, 因为镉和植物生长发育所必需的铁以及锌离子共用转运蛋白, 镉的大量吸收势必会影响这些营养离子的匮乏和体内的离子平衡^[25]。高浓度镉造成根生长停滞主要是由于根尖分生区细胞死亡所致。长时间过量镉会引起整个根的死亡, 最终可能导致整株植物死亡。

过氧化物包括过氧化氢和一氧化氮在植物逆境响应中起非常重要的作用。适量过氧化物可诱导植物逆境响应信号转导系统从而使植物避免逆境伤害, 但过量过氧化物会直接造成 DNA 损伤和细胞死亡^[26]。最近, 用拟南芥植物的悬浮细胞、豆类植物等都发现一氧化氮和过氧化氢在镉处理后受到强烈诱导, 基因表达和相关酶活性检测也进一步证明过氧

化物的产生和积累在植物细胞对镉伤害中起重要作用, 也是导致植物细胞死亡的重要诱导因子^[9,14]。本研究结果发现, 镉处理下, 随时间延长, 过氧化氢在根, 尤其根尖、根毛和一些表皮细胞中过量积累。过氧化氢过量积累很可能也是造成拟南芥根尖细胞分裂活力降低和细胞伸长抑制以及细胞最终死亡的主要原因。进一步支持了过氧化物是植物镉毒害重要诱因的假说。镉胁迫下加入抗氧化剂 Vc 很大程度上降低镉对植物生长发育和根伸长的毒害作用的结果, 从另一个角度进一步证明了过氧化物在镉对拟南芥伤害和死亡中的重要作用。镉诱导过氧化物过量产生造成对细胞伤害的机制很可能在真核生物中是共有的一种响应, 因为在小鼠中也有类似的结果, 而且加入 Vc 和 Ve 能有效地提高动物对镉的抗性^[27]。

综上所述, 本试验证明过氧化物介导镉胁迫造成的植物根尖细胞功能异常及死亡, 包括分生细胞分裂活力下降和细胞伸长异常, 以及随后的根生长迟滞, 甚至死亡。外源抗氧化剂可以明显提高植物抗镉胁迫的能力。该结果对未来培育抗镉胁迫的植物和作物提供了新的思路。将来利用生理生化、遗传和分子生物学综合手段, 结合离子组学新方法将加快解析镉从根部吸收、转运以及从根到地上部分长距离运输的机制, 揭示镉抗性和超富集的遗传学基础。

参考文献

- [1] De Vries W, Römken P F, Schütze G. Critical soil concentrations of cadmium, lead, and mercury in view of health effects on humans and animals[J]. *Rev Environ Contam Toxicol*, 2007, 191: 91–130
- [2] Wan Ngah W S, Hanafiah M A. Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wasters as adsorbents: A review[J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 3935–3946
- [3] Grant C A, Clarke J M, Duguid S, et al. Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation[J]. *Sci Total Environ*, 2008, 390: 301–310
- [4] Eide D, Broderius M, Fett J, et al. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5624–5628
- [5] Korshunova Y O, Eider D, Clark W G, et al. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range[J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 40: 37–44
- [6] Guerinot M L. The ZIP family of metal transporters[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465: 190–198
- [7] Thomine S, Wang R, Ward J, et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 4991–4996
- [8] Siedlecka A, Krupa Z. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*[J]. *Plant Physiol Biochem*, 1996, 34: 834–841
- [9] Bi Y, Chen W, Zhang W, et al. Production of reactive oxygen species, impairment of photosynthetic function and dynamic changes of mitochondria are early events in cadmium induced cell death in *Arabidopsis*[J]. *Biol Cell*, 2009, 101: 629–643
- [10] Hernandez L, Carpena-Ruiz R, Garate A. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium[J]. *J Plant Nutr*, 1996, 19: 1581–1589
- [11] Romero-Puertas M, Rodriguez-serrano M, Corpas F, et al. Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves[J]. *Plant Cell Environ*, 2004, 27: 1122–1134
- [12] Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas M C, Pazmiño D M, et al. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: Cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium[J]. *Plant Physiol*, 2009, 150: 229–243
- [13] Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, et al. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity[J]. *Plant Cell Environ*, 2006, 29: 1956–1969
- [14] Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas M C, Zabalza A, et al. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots: Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*[J]. *Plant Cell Environ*, 2006, 29: 1532–1544
- [15] Drazkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z. The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress[J]. *Chemosphere*, 2007, 67: 188–193
- [16] Ortega-Villasante C, Hernández L E, Rellán-Alvarez R, et al. Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings[J]. *New Phytol*, 2007, 176: 96–107
- [17] Romero-Puertas M C, Corpas F J, Rodríguez-Serrano M, et al. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants[J]. *J Plant Physiol*, 2007, 164: 1346–1357
- [18] Howden R, Goldsbrough P, Anderson C, et al. Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 1059–1066
- [19] Cobbett C, May R, Howden B, et al. The glutathione-deficient cadmium-sensitive mutant, cad2-1, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase[J]. *Plant J*, 1998, 16: 73–78
- [20] Li W Q, Khan M A, Yamaguchi S, et al. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Growth Regulation*, 2005, 46: 45–50
- [21] Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, et al. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots[J]. *Biochimie*, 2006, 88: 1751–1765
- [22] Watanabe N, Lam E. BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 3200–3210
- [23] Cailliatte R, Lapeyre B, Briat J F, et al. The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity[J]. *Biochem J*, 2009, 422(2): 217–228
- [24] Mei H, Cheng N H, Zhao J, et al. Root development under metal stress in *Arabidopsis thaliana* requires the H^+ /cation antiporter CAX4[J]. *New Phytologist*, 2009, 183(1): 95–105
- [25] Lin Y F, Liang H M, Yang S Y, et al. Arabidopsis IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter[J]. *New Phytologist*, 2009, 182(2): 392–404
- [26] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 373–399
- [27] Sen Gupta R, Sen Gupta E, Dhakal B K, et al. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species[J]. *Mol Cells*, 2004, 17: 132–139