

拟南芥 SnRK2. 2/2. 3 激酶参与 调节镉胁迫响应的机制探究

朱 淋, 孙曼丽, 曾 沥, 魏 炜

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘 要: 为探究拟南芥 *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 基因对 Cd 胁迫响应的分子机制, 以野生型 (WT)、双突变体 *SnRK2. 2/2. 3*、过表达 *SnRK2. 2* 和过表达 *SnRK2. 3* 的转基因植物为材料, 研究 *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 基因与 Cd 胁迫响应的关系. 发现过表达两个基因可以提高拟南芥对 Cd 的耐受性, 表现为可以减少 Cd、丙二醛(MDA)及活性氧(ROS)的累积量, 增加抗氧化酶 CAT、POD 和 SOD 的活性. qRT-PCR 结果显示在 Cd 胁迫下, 两种过表达植株中铁转运蛋白 *IRT1* 和转录因子 *FIT*、*bHLH038* 和 *bHLH039* 表达水平受到明显抑制, ABA 合成相关基因 *AAO3* 和 *NCED3* 的表达量显著上调. 在 Cd 胁迫下, 两种过表达植株中 ABA 含量显著高于 WT 和双突变体. 以上结果表明: 拟南芥遭受 Cd 胁迫时, *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 基因通过下调 *IRT1* 基因表达从而减少植物对 Cd 的吸收, 同时通过增加内源 ABA 含量来缓解 Cd 对植物的毒害.

关键词: 拟南芥; Cd 胁迫; *SnRK2. 2*; *SnRK2. 3*; ABA

中图分类号: Q50 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.066001

Mechanism of *SnRK2. 2/2. 3* kinase involved in regulating cadmium stress response in *Arabidopsis thaliana*

ZHU Lin, SUN Man-Li, ZENG Li, WEI Wei

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In order to explore the molecular mechanism of *Arabidopsis SnRK2. 2* and *SnRK2. 3* genes in response to Cd stress. Wild-type (WT), double mutant *SnRK2. 2/2. 3*, overexpressing *SnRK2. 2* and overexpressing *SnRK2. 3* transgenic plants were used as materials to study the relationship between *SnRK2. 2* and *SnRK2. 3* genes and Cd stress response. The study found that the overexpression of *SnRK2. 2* and *SnRK2. 3* genes can improve the tolerance of *Arabidopsis* Cd, which showed that the overexpression of the two genes can reduce the accumulation of Cd, malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) and increase the activities of antioxidant enzymes CAT, POD and SOD. qRT-PCR results showed that under Cd stress, the expression levels of iron-regulated transporter *IRT1* transcription factors *FIT*, *bHLH038* and *bHLH039* were significantly inhibited, and the expressions levels of ABA synthesis-related genes *AAO3* and *NCED3* were significantly up-regulated in the two overexpressed plants. Under Cd stress, the ABA content of the two overexpressed plants was significantly

收稿日期: 2022-03-24

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(2021YFYZ0018)

作者简介: 朱淋(1997—), 女, 四川威远人, 硕士研究生, 主要从事植物抗性分子机理研究. E-mail: 1628617207@qq.com

通讯作者: 魏炜. E-mail: wwwfbxw@163.com

higher than that of the WT and double mutant. These results suggested that when *Arabidopsis* was under Cd stress, *SnRK2.2* and *SnRK2.3* genes reduced the uptake of Cd by down-regulating the expression of the *IRT1* gene, and alleviated the toxicity of Cd to plants by increasing the content of endogenous ABA.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; Cd stress; *SnRK2.2*; *SnRK2.3*; ABA

1 引言

随着工业生产的扩大和城市的快速发展使得大量有害、有毒物质进入土壤,目前土壤重金属污染已成为环境治理的焦点话题^[1,2]. 其中,Cd 污染是毒性最大的重金属污染之一. 植物的根系吸收 Cd 后会直接或间接地影响植物的生长发育如呼吸作用、光合作用、细胞生长、营养物质吸收等,导致植物生长量下降^[3,4],并通过食物链对人体健康产生危害^[5].

植物为了生存进化出了复杂且精密的防御机制来应对外界不良环境^[6]. 体内多种抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等参与清除 Cd 胁迫产生的过量活性氧^[7-9]. 植物螯合素、金属硫蛋白等植物螯合剂与 Cd 结合形成无毒性的螯合物运输到细胞外,或者将其转移到液泡中,进而减轻游离 Cd 对细胞的毒害^[10]. 此外,许多转录因子如 bHLH(basic Helix-Loop-Helix)转录因子、WRYK 转录因子等和金属转运蛋白在植物对重金属胁迫的反应和耐受性中发挥重要作用^[11]. FIT(FER-like iron-deficiency-induced transcription factor)、AtbHLH038 和 AtbHLH039 是拟南芥中铁稳态所必需的基本螺旋-环-螺旋转录因子^[12]. 有报道指出 *FIT* 和 *AtbHLH038* 或 *AtbHLH039* 的共同过表达可激活与重金属隔离和螯合相关基因的表达,进而提高了拟南芥对 Cd 的耐受性^[13]. 铁转运蛋白 IRT1(iron-regulated transporter 1)作为一种广谱金属转运蛋白^[14],对铁的吸收和稳态至关重要,并对 Cd 离子有较高的亲和性,研究发现过表达 *AtIRT1* 的拟南芥对 Cd 更敏感^[15]. 在拟南芥中 *IRT1* 的表达受到 FIT 和 bHLH1b 转录因子的严格调控,其中 bHLH1b 转录因子包括 bHLH038、bHLH039、bHLH100 和 bHLH101^[12].

蔗糖非酵解型蛋白激酶 2(sucrose non-fermenting related protein kinase 2, SnRK2)是一种植物特有的蛋白激酶^[16],已知 SnRK2 家族成员参与了植物对于干旱、盐害的响应以及依赖脱落酸(ABA)途径的植物发育调控^[17]. 拟南芥 SnRK2.

2/2.3/2.6 通过调控下游 ABA 应答元件结合蛋白(ABA responsive element binding protein / ABRE binding factors, AREB/ABFs)参与干旱等渗透胁迫的 ABA 信号转导途径^[18]. 过表达小麦 *TaSnRK2.4* 基因会诱导下游抗逆基因的表达,引起一系列抗逆生理变化,从而提高了植株的耐盐性及对低温、干旱的抗性^[19]. SnRK2 主要是通过磷酸化下游各类转录因子或者蛋白,进而触发体内某些信号机制来适应植物所处的环境^[20]. ABA 在植物生长发育中起着重要的作用,如种子休眠、发芽和幼苗生长^[21]. 此外,ABA 在调节植物对于干旱、寒冷、盐分和重金属等不利环境胁迫的反应中起着重要作用^[22]. 在缺少 ABA 的情况下,蛋白磷酸酶 2Cs (protein phosphatase 2Cs, PP2Cs)会同 SnRK2 相结合,在此,SnRK2 不具有活性;当存在 ABA 时,ABA 率先同 ABA 受体 RCAR/PYR/PYL(regulatory components of ABA receptors / pyrabactin resistance / PYR like)形成 ABA 受体-PP2Cs 复合物,抑制 PP2Cs 活性,从而释放 SnRK2 激酶活性,激活的 SnRK2 通过磷酸化下游因子激活 ABA 响应基因的表达产生 ABA 信号机制,再传递到不同的信号通路中发挥作用^[23]. ABA 强烈诱导 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 的表达,这两个激酶是 ABA 信号通路中的关键蛋白激酶^[24]. 然而在重金属 Cd 胁迫下,*SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因是否参与调节 Cd 胁迫响应以及具体的作用机制还不清楚.

本研究以野生型(WT)、双突变体 *SnRK2.2/2.3*、过表达 *SnRK2.2* 及过表达 *SnRK2.3* 的转基因植物为材料,通过一系列生物化学及分子生物学实验,探究了拟南芥 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因参与植物 Cd 胁迫响应的可能分子机制,为更好地了解 SnRK2 基因家族在植物抵抗重金属胁迫中的作用机制,为有效解决重金属污染对作物生长及农产品安全带来的问题提供一定的理论依据.

2 材料与方法

2.1 材料

实验所用材料拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)

遗传背景均为哥伦比亚 (*Columbia*, *Col-0*) 生态型. 由本实验室提供以下实验材料: 拟南芥野生型 (wild-type, WT); 双突变体 *SnRK2. 2/2. 3*: 由 T-DNA 插入突变体 *SnRK2. 2* (GABI-Kat807G04) 和 *SnRK2. 3* (SALK-107315) 杂交获得; 过表达 *SnRK2. 2* 植株 (*SnRK2. 2OE*): 用 pcAMBIA1307-myc-35S 载体构建 *SnRK2. 2* 过表达重组载体, 通过农杆菌介导法获得转基因植株; 过表达 *SnRK2. 3* 植株 (*SnRK2. 3OE*): 用 pFGC5941-basta-35S 载体构建 *SnRK2. 3* 过表达重组载体, 通过农杆菌介导法获得转基因植株; 所用转基因植株均为筛选至 T3 代的纯合系.

2.2 试验方法

2.2.1 拟南芥的培养及处理 将 WT、双突变体和两种过表达植株的种子经 1% 次氯酸钠溶液消毒后, 播种于 1/2 MS 固体培养基中 (含 1.5% 蔗糖, w/v; pH 5.8), 在 4 ℃ 黑暗条件下春化 3 d 后, 放入恒温培养箱中竖直培养 3 d, 选取长势一致的幼苗移栽到不含或含 80 μmol/L CdCl₂ 的 1/2MS 固体培养基中, 竖直培养 1 w 后, 观察表型. 将土壤和蛭石按 3 : 1 的比例均匀混合灭菌后装入小花盆中, 选取 MS 固体培养基中生长一致且状态良好的 7 日龄 WT、双突变体和两种过表达植株的幼苗分别移栽到土壤中. 拟南芥幼苗在土壤中生长一周后, 用含 600 μmol/L CdCl₂ 的营养液进行浇灌处理, 同时设置对照组为用等量不含 CdCl₂ 的营养液进行浇灌处理. 拟南芥生长条件为: 温度 23 ℃, 光照强度 200 μmol · m⁻² · s⁻¹, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗.

2.2.2 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析 将 7 日龄的 WT 幼苗移至 80 μmol/L CdCl₂ 的 1/2MS 液体培养基中处理 0 h, 6 h, 12 h, 24 h. 为了测定 Cd 胁迫下 WT、双突变体及两种过表达植株中铁转运蛋白 *IRT1* (AT4G19690), 转录因子 *FIT* (AT2G28160)、*bHLH038* (AT3G56970) 和 *bHLH039* (AT3G56980), ABA 合成相关基因 *AAO3* (AT2G27150) 和 *NCED3* (AT3G14440) 的表达量变化, 将 7 日龄的四种植株幼苗转移到不含或含 80 μmol/L CdCl₂ 的 1/2MS 液体培养基中处理 6 h. 取样, 液氮冷冻. 利用植物总 RNA 提取试剂盒 (天根) 提取所有处理样品的总 RNA, 使用 *TransScript*® One-Step gDNA Relative and cDNA Synthesis SuperMix (全式金) 进行反转录获得 cDNA. 以 cDNA 为模板, 以拟南芥 *Actin2* 为参考

基因, 使用 2xT5 Fast qPCR Mix (SYBRGreen11) 试剂盒 (擎科) 进行 qRT-PCR. 反应体系为 cDNA 模板 1 μL, FP 0.5 μL, RP 0.5 μL, SYBR Mix 10 μL, 灭菌水补齐 20 μL; 程序设置为 95 ℃ 3 min, 然后 95 ℃ 5 s, 54 ℃ 15 s, 72 ℃ 10 s, 共 35 个循环. 设置 3 个生物学重复和 3 个技术重复, 相对表达量用公式 2^{-ΔΔCt} 计算^[25]. 所用引物如表 1.

表 1 qRT-PCR 所用引物
Tab. 1 Primers used for qRT-PCR

引物名称	引物序列 (5'-3')
<i>Actin2</i> -F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG
<i>Actin2</i> -R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
<i>SnRK2. 2</i> -F	CCATTCGAGGATCCACAGG
<i>SnRK2. 2</i> -R	GGATGTGATCTCCGGAATAG
<i>SnRK2. 3</i> -F	GAGGTACTGCTTCGTCAGG
<i>SnRK2. 3</i> - R	GCATTCAGGTGATATCCGTATG
<i>IRT1</i> -F	GGGATCATAGTTCACTCG
<i>IRT1</i> -R	CTCAGCCTGGAGGATACAAC
<i>FIT</i> -F	GGAGAAGGTGTTGCTCCATC
<i>FIT</i> -R	TCCGAGAAGGAGAGCTTAG
<i>bHLH038</i> -F	CAATGCTAGTGAACGTGACC
<i>bHLH038</i> -R	GTTGCAGCTCTGGTATGTAC
<i>bHLH039</i> -F	GACGGTTTCTCGAAGCTTG
<i>bHLH039</i> -R	GGTGGCTGCTTAACGTAACAT
<i>AAO3</i> -F	GAGGGTGTGGTGCTTGTCTT
<i>AAO3</i> -R	CCGCGAACCGCTTATGAATC
<i>NCED3</i> -F	GAGTGTCTGTCTGAAATCCG
<i>NCED3</i> -R	CGAATCCTGAGACTTTAGGCC

2.2.3 生理指标测定 选取植物相同部位的新鲜叶片组织, 液氮充分研磨后, 用试剂盒测定 H₂O₂ 和丙二醛 (MDA) 的含量以及过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, 所用试剂盒购自苏州科铭生物技术有限公司.

2.2.4 Cd 含量测定 收集 600 μmol/L CdCl₂ 溶液处理 20 d 后的 WT、双突变体及两种过表达植株的各组织 (根茎叶), 待样品烘干后, 将样品送往成都栢晖生物科技有限公司, 使用原子吸收光谱法测定样品中 Cd 含量.

2.2.5 ABA 含量测定 将 1/2 MS 固体培养基上生长 10 d 的幼苗转移到不含或含 80 μmol/L CdCl₂ 的 1/2 MS 液体培养基中处理 24 h 后, 用蒸馏水冲洗幼苗, 然后用纸巾吸干多余水分, 收集样

品. 利用 ABA 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(酶免),测定植物幼苗的内源 ABA 含量. 使用全波长多功能酶标仪(Thermo)测量 450 nm 处吸光值.

2.2.6 数据处理与分析 采用拍照-Image J 软件计算的方法测定根长;实验数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,GraphPad Prism 8.0 软件作图. 数据分析采用方差分析和多重比较,图中数据表示为至少三个独立实验的平均值±标准误,小写字母 a、b、c 等表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著.

3 结果与分析

3.1 Cd 胁迫诱导拟南芥 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因表达

随着胁迫时间的延长,*SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因的表达量均呈现先上升后下降的趋势,在胁迫 6 h 时表达量上调至最高,较未胁迫时分别上调了约 3.8 倍和 3.0 倍. 在胁迫 12 h 时两者的表达量虽有所下降但仍高于初始值,直到胁迫 24 h 时基本降到初始值. 总体表明 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因受 Cd 胁迫的诱导(图 1).

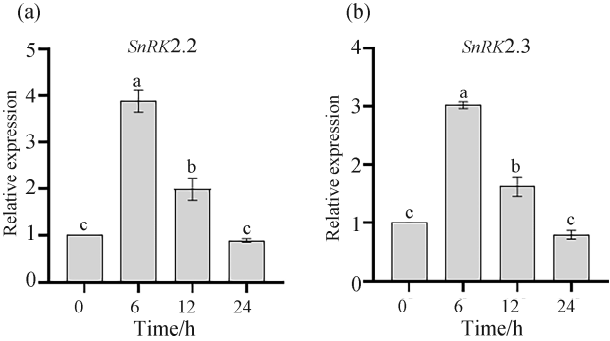


图 1 Cd 胁迫下 WT 中 *SnRK2.2* (a)和 *SnRK2.3* (b) 基因的表达
Fig. 1 Expression of *SnRK2.2* (a) and *SnRK2.3* (b) genes in WT under Cd stress

3.2 拟南芥在 Cd 胁迫下根的生长

在未添加 Cd 的 1/2 MS 培养基上,四种材料的长势基本相同,但添加了 Cd 的 1/2 MS 培养基中两种过表达植株的长势优于 WT 和双突变体(图 2a). 在含有 80 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 培养基中,WT 与双突变体在根长和鲜重上并无显著差异,*SnRK2.2OE* 和 *SnRK2.3OE* 的根长分别比 WT 长约 24.19%和 26.23%(图 2b),*SnRK2.2OE* 和 *SnRK2.3OE* 的鲜重分别比 WT 重约 11.10%和 10.67%(图 2c). 由此可以看出 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 的过表达可以增强拟南芥对 Cd 胁迫的耐受性.

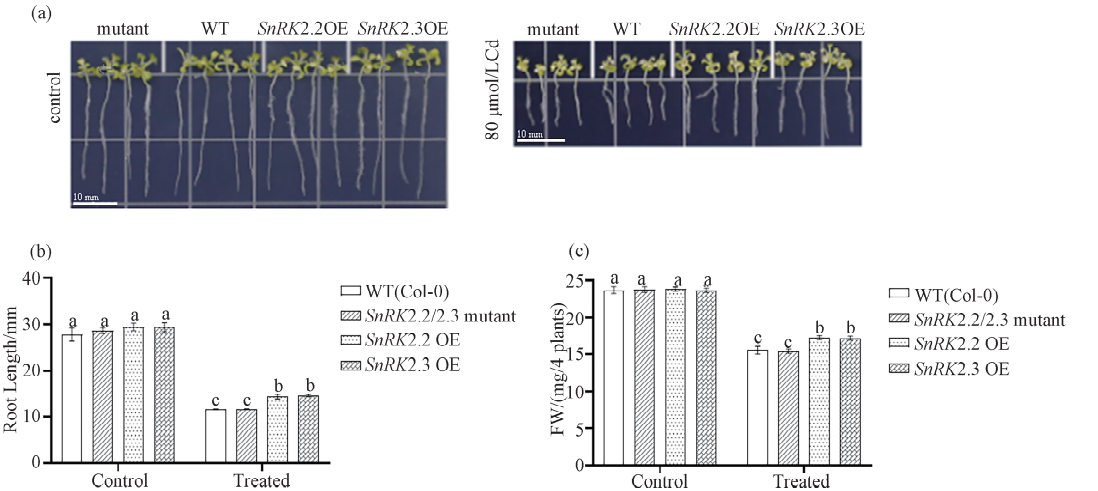


图 2 Cd 胁迫下植株根长的表型

(a) 在不含或含 80 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 的 1/2 MS 培养基中植株生长 1 w 的根长表型;(b) 根长统计;(c) 植株鲜重

Fig. 2 Phenotype of plants root length under Cd stress

(a) Root length phenotype of plants grown on 1/2 MS medium without or with 80 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ for one week; (b) root length statistics; (c) fresh plant weight

3.3 Cd 胁迫下拟南芥 MDA 和 H₂O₂ 积累

对四种植株叶片中的 MDA 含量进行测定,结果如图 3a 所示. 在无 Cd 胁迫时,四种植株体内 MDA 含量差异不显著;Cd 胁迫下,WT 和双突变体中积累了较多的 MDA,并且两者之间无明显差

异,而 *SnRK2.2OE*、*SnRK2.3OE* 植株较 WT 和双突变体积累了更少的 MDA. 说明 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 的过表达可以在一定程度上减少 Cd 胁迫下拟南芥中 MDA 的积累.

从图 3b 可知:在正常生长条件下,四种植株之

间的 H_2O_2 含量并无显著差异;在 Cd 胁迫下,WT 和双突变体内积累的 H_2O_2 含量显著高于 *SnRK2. 2* OE、*SnRK2. 3*OE 植株. 结果表明 *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 的过表达可以减少 Cd 胁迫下 ROS 积累.

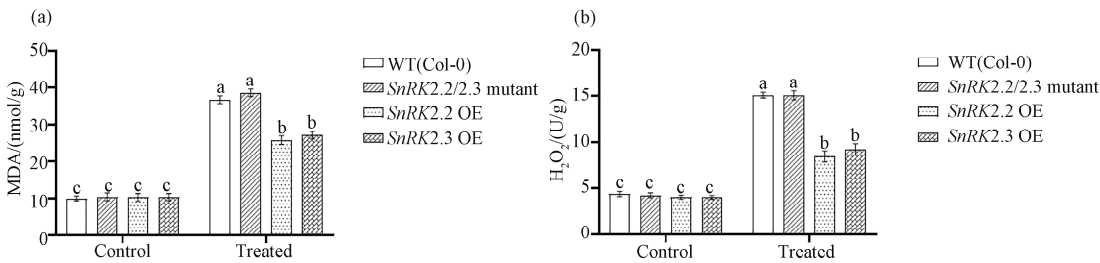


图 3 Cd 胁迫下植株中 MDA (a)和 H_2O_2 (b) 的含量
Fig. 3 Contents of MDA (a) and H_2O_2 (b) in plants under Cd stress

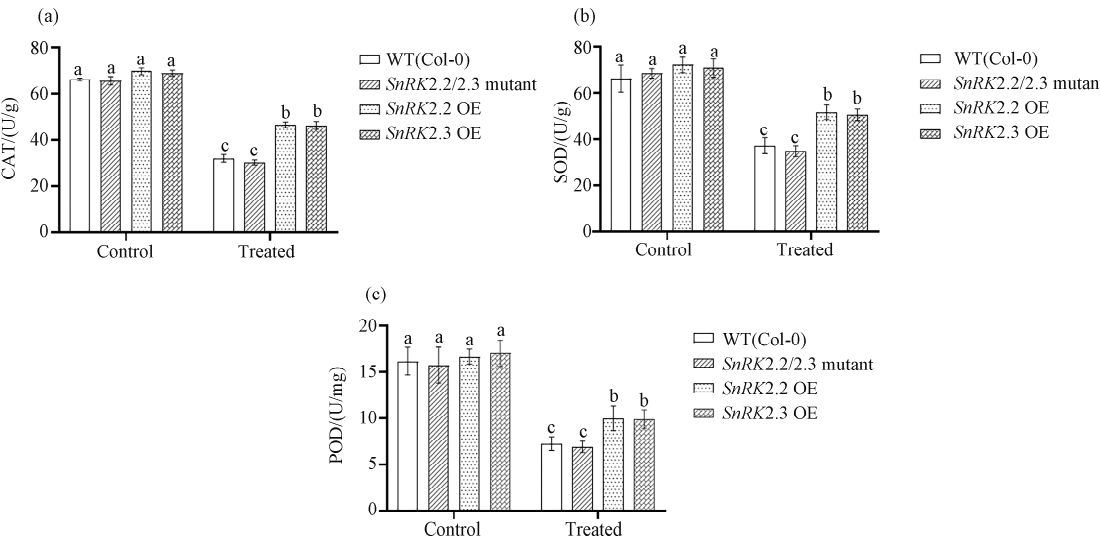


图 4 Cd 胁迫下植株中 CAT (a), SOD (b)及 POD (c)活性
Fig. 4 Activities of CAT (a), SOD (b) and POD (c) in plants under Cd stress

3.4 Cd 胁迫下拟南芥抗氧化酶活性

检测四种植物材料的 CAT、POD 和 SOD 活性变化,结果如图 4 所示. 未用 Cd 处理时,四种植株体内的 CAT、POD 和 SOD 活性都没有表现出显著性差异. 当植株受到 Cd 胁迫时, *SnRK2. 2*OE、*SnRK2. 3*OE 植株中 CAT、POD 和 SOD 活性均显著高于 WT 和双突变体,但在 WT 和双突变体中差异不显著. 这些结果说明 *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 基因过表达会提高拟南芥在 Cd 胁迫下体内抗氧化酶活性,有助于增强植株对氧化损伤的抗性.

3.5 拟南芥中 Cd 的积累

我们检测了 Cd 胁迫下四种植株体内 Cd 的含量. 结果显示,四种拟南芥的根、茎、叶中 Cd 的含量呈现出相同的分布规律,即根中含量最高,茎中次之,叶中含量最低(图 5). 对比 WT、双突变体和过表达植物的根茎叶中 Cd 含量发现,三种组织器

官中的 Cd 含量均是双突变体最高,而在 *SnRK2. 2*OE 和 *SnRK2. 3*OE 植株中显著降低. 结果表明 *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 基因的过表达可降低植株体内 Cd 的积累.

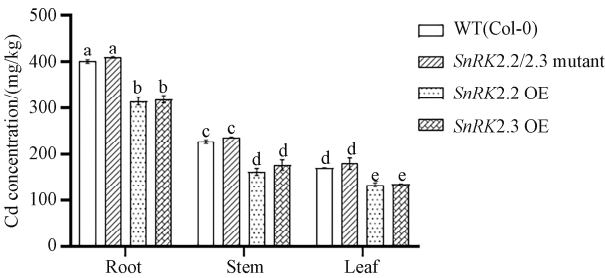


图 5 Cd 胁迫下植株中 Cd 含量
Fig. 5 Cd content in plants under Cd stress

3.6 Cd 胁迫下拟南芥 *IRT1*、*FIT*、*bHLH038* 及 *bHLH039* 的表达

检测了在 Cd 胁迫下四种植株体内的 *IRT1* 表达水平,结果如图 6a 所示. 在正常条件下,

SnRK2.2OE 和 *SnRK2.3OE* 中 *IRT1* 基因的表达量显著高于 WT 和双突变体,而后两者间没有明显差异,说明正常条件下 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因的过表达能够刺激 *IRT1* 基因的表达;在 Cd 胁迫处理下,在两种过表达植株中 *IRT1* 的表达水平显著低于 WT 和双突变体,双突变体中 *IRT1* 的表达水平最高. 随后进一步检测了其上游转录因子 *FIT*、*bHLH038* 及 *bHLH039* 的表达量,在无胁迫时,两种过表达植株的转录因子 *FIT* 的表达水平显著高于 WT 和双突变体;而转录因子 *bHLH038* 和 *bHLH039* 在四种植株中表达量无

明显差异,说明 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因过表达会上调 *FIT* 的表达,而 *bHLH038* 和 *bHLH039* 的表达不受 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因的直接影响. 在受 Cd 胁迫时,两种过表达植株中转录因子 *FIT*、*bHLH038* 及 *bHLH039* 的表达水平显著低于 WT 和双突变体,三个转录因子在双突变体中表达量最高(图 6bcd). 我们推测可能是 Cd 胁迫下 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因过表达抑制了转录因子 *FIT*、*bHLH038*、*bHLH039* 表达水平,导致 *IRT1* 表达量降低,使得植物对 Cd 的吸收减少.

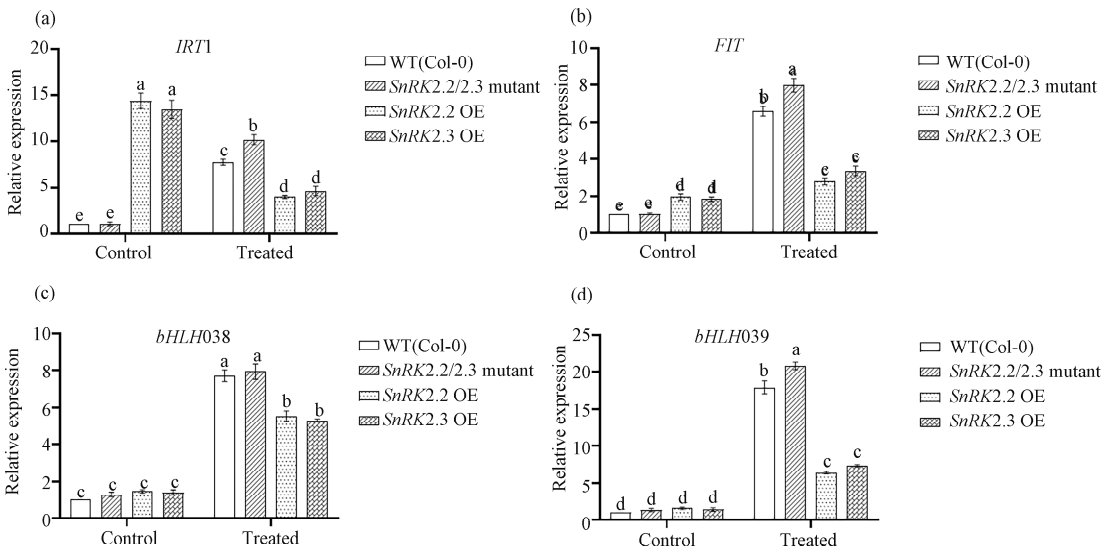


图 6 Cd 胁迫下植株中 *IRT1* (a), *FIT* (b), *bHLH038* (c) 及 *bHLH039* (d) 的表达水平
Fig. 6 Expression levels of *IRT1* (a), *FIT* (b), *bHLH038* (c) and *bHLH039* (d) in plants under Cd stress

3.7 Cd 胁迫下拟南芥 ABA 合成相关基因的表达

我们测定了 ABA 合成途径中的关键合成酶 AAO3 和 NCDE3 的基因表达水平. 结果表明添加重金属 Cd 后 *SnRK2.2OE* 和 *SnRK2.3OE* 植株中 AAO3 和 NCDE3 基因表达量显著高于 WT 和双突变体,而在对照组中,四种植株中 AAO3 和 NCDE3 基因表达水平差异不显著(图 7). 随后,我们

也测定了在 Cd 胁迫 24 h 后四种植株体内的 ABA 含量,发现在 Cd 胁迫下, *SnRK2.2OE* 和 *SnRK2.3OE* 植株较 WT 和双突变体具有更高的 ABA 含量(图 8). 因此我们推测 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因的过表达可能通过上调 ABA 合成途径中关键合成酶基因的表达来增加植物体内 ABA 含量进而增强了植株对 Cd 的耐受性.

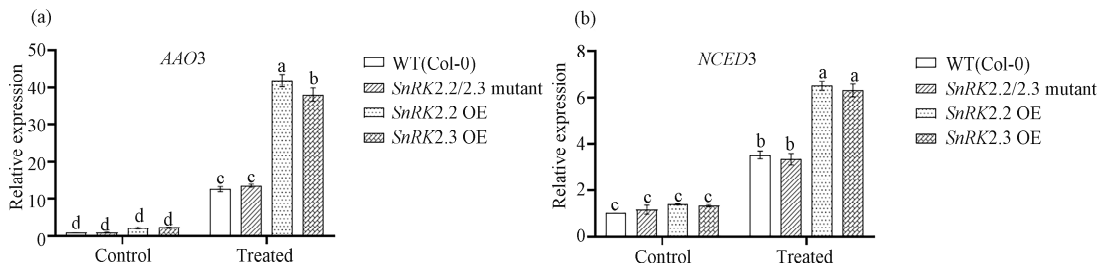


图 7 Cd 胁迫下植株中 AAO3 (a) 和 NCED3 (b) 的表达水平
Fig. 7 Expression levels of AAO3 (a) and NCED3 (b) in plants under Cd stress

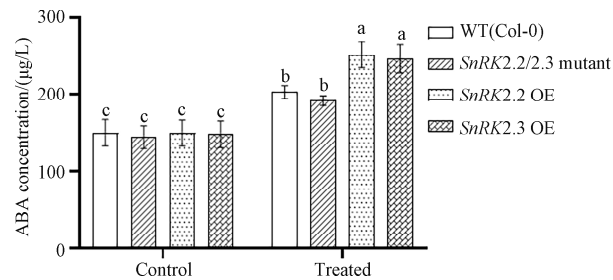


图 8 Cd 胁迫下植株中 ABA 含量
Fig. 8 ABA content in plants under Cd stress

4 讨 论

众多研究表明植物吸收过量 Cd 后会抑制植物的生长^[26, 27],我们也得出一致的实验结果. 在 Cd 胁迫下不同拟南芥材料的生长均受到一定程度的抑制,但两种过表达材料的长势优于 WT 和双突变体,直观表明 *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 基因过表达可以提高拟南芥对 Cd 的耐受性. 然而 WT 和双突变体在 Cd 胁迫下并未表现出明显的差异,我们推测在应对 Cd 胁迫时,双突变体中可能存在其他与 *SnRK2. 2*、*SnRK2. 3* 功能冗余的基因,在一定程度可以弥补双突变体的缺陷. 在过量重金属 Cd 胁迫下,植物体内产生大量的活性氧,会造成细胞成分的氧化损伤,当细胞膜受到破坏时会伴随丙二醛的积累^[28]. 本研究中,在 Cd 胁迫下两种过表达植株中 H_2O_2 和 MDA 的积累量显著低于 WT 和双突变体,表明 *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 的过表达有效降低拟南芥体内的 MDA 和 H_2O_2 的积累量. 当植物受到 Cd 毒害时,体内多种抗氧化酶参与重金属的解毒,比如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等. SOD 催化 O_2^- 转化为 H_2O_2 和 O_2 ,在抗氧化酶系统中起着关键作用,CAT 和 POD 将多余的 H_2O_2 转化为 O_2 和 H_2O 以进一步解毒^[29]. 从我们的实验结果可以看出在 Cd 胁迫条件下两种过表达植株比 WT 和双突体具有更高的 CAT、SOD、POD 活性,表明 *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 的过表达可提高 Cd 胁迫下抗氧化酶的活性,有助于植物清除由 Cd 胁迫所产生的活性氧,进而增强植物对 Cd 的抗性.

本研究中,在正常条件下,两种过表达植株中 *IRT1* 和 *FIT* 表达量较 WT 和双突变体偏高,这说明无 Cd 胁迫时 *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 的过表达可上调这两个基因的表达. 然而在 Cd 胁迫下两种过表达植株中 *bHLH* 转录因子基因(*FIT*、*bHLH038* 和 *bHLH039*) 和铁转运蛋白基因

(*IRT1*)的表达均低于 WT 和双突变体. 四种植株对 Cd 耐受性的差异可能正是由于这些基因在过表达植株中表达量下降所致. 已有研究表明 *bHLH* 转录因子通过调节激活与重金属转运和解毒相关基因的表达来增加植物对重金属的耐受性^[30]. Wu 等^[13]研究发现 *AtbHLH039* 过表达拟南芥受 Cd 胁迫时其体内 *MTP3*(metal tolerance protein 3)和 *IREG2*(iron regulated gene 2)表达水平较 WT 显著上调,并对重金属 Cd 表现出更强的耐受性. 植物在受到 Cd 胁迫时,通常还会影响与 Cd 转运相关基因的表达,如 *IRT1*. *IRT1* 是一种重要的铁转运蛋白,参与金属离子的运输,其具有广泛的底物,除了金属 Fe^{2+} ,还可吸收 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 等^[31]. Xu 等^[32]发现 *IRT1* 功能缺失突变体内 Cd 的累积量低于野生型植株. Yuan 等^[33]表明 *FIT* 与 *AtbHLH038* 或 *AtbHLH039* 相互作用,形成 *FIT/AtbHLH038* 或 *FIT/AtbHLH039* 异二聚体,来调控 *IRT1* 的表达. 因此,我们推测 Cd 胁迫下两种过表达植株中 *IRT1* 表达量受到明显抑制可能是其上游转录因子 *FIT*、*bHLH038* 和 *bHLH039* 表达水平低所导致的,然而其上游转录因子的表达水平低可能是 *SnRK2. 2* 和 *SnRK2. 3* 的过表达抑制了某些同其相互作用的蛋白因子,对于这一结果背后的机制还需进一步研究. 以上结果表明过表达植物对 Cd 的耐性是通过这些基因协同作用来实现的.

在植物受到胁迫时,ABA 作为一种适应胁迫反应的调节因子,ABA 含量会迅速增加并参与调节胁迫响应以此来应对不良环境的伤害^[34]. 王志坤^[35]发现当 Cd 浓度为 2.5 mg/kg 时,大豆幼苗期叶片中 ABA 含量显著增加,为对照的 13.6 倍. Hsu 等^[36]研究了耐 Cd 水稻品种和对 Cd 敏感的水稻品种在 Cd 处理下水稻幼苗体内 ABA 含量的变化发现在 Cd 胁迫下耐 Cd 水稻品种的叶片和根系中 ABA 含量明显高于 Cd 敏感水稻品种,表明内源性 ABA 含量的增加与水稻幼苗的 Cd 耐受性密切相关. 已有研究表明植物面对重金属胁迫时,ABA 信号激活负责编码抗氧化酶和非酶防御系统相关基因的表达,此外 ABA 还可通过产生 ROS 诱导第二信使激活防御反应,进而提高植物在逆境环境下的抗性^[37]. Bashir 等^[38]研究表明植物在受到 $CdCl_2$ 溶液短期处理时,会上调 ABA 合成基因(*Glyma17G242200*)的表达量,进而升高内源性 ABA 浓度,使得植物抗性增强. 从我们的实验结

果可以看出, Cd 胁迫下两种过表达植株中 ABA 合成相关基因 AAO3 和 NCDE3 的表达水平显著上调, 并且两种过表达植物中的 ABA 含量显著高于 WT 和双突变体. 这就表明过表达植株对 Cd 耐受性增强可能与体内 ABA 含量的增加有关.

综上所述, 我们发现重金属 Cd 可以诱导 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因的表达, *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 基因在 Cd 胁迫下是通过下调 *IRT1* 基因的表达和增加内源 ABA 浓度来增强植物对 Cd 的耐受性. 本研究结果为进一步全面解析 *SnRK2.2* 和 *SnRK2.3* 抵抗 Cd 胁迫的分子机制提供了一定的依据.

参考文献:

- [1] 骆永明, 滕应. 我国土壤污染的区域差异与分区治理修复策略[J]. 中国科学院院刊, 2018, 33: 145.
- [2] Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants [J]. Biochimie, 2006, 88: 1707.
- [3] Susana M, Liliana B, Roberto A, *et al.* Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms [J]. Environ Exp Bot, 2012, 83: 33.
- [4] Schor-Fumbarov T, Goldsbrough P B, Adam Z, *et al.* Characterization and expression of a metallothionein gene in the aquatic fern *Azolla filiculoides* under heavy metal stress [J]. Planta, 2005, 223: 69.
- [5] Bazzaz F A, Rolfe G L, Carlson R W. Effect of Cd on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower [J]. Physiol Plantarum, 2010, 32: 373.
- [6] Mahmud J A, Hasanuzzaman M, Nahar K, *et al.* Insights into citric acid-induced cadmium tolerance and phytoremediation in *Brassica juncea* L.: coordinated functions of metal chelation, antioxidant defense and glyoxalase systems [J]. Ecotox Environ Safe, 2018, 147: 9901.
- [7] Shahid M, Dumat C, Khalid S, *et al.* Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: a comparison of foliar and root metal uptake [J]. J Hazard Mater, 2016, 325: 36.
- [8] Etesami H, Jeong B R. Silicon (Si): review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants [J]. Ecotox Environ Safe, 2018, 147: 881.
- [9] Shahid M A, Balal R M, Khan N, *et al.* Selenium impedes cadmium and arsenic toxicity in potato by modulating carbohydrate and nitrogen metabolism [J]. Ecotox Environ Safe, 2019, 180: 588.
- [10] Verbruggen N, Hermans C, Schat H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants [J]. Curr Opin Plant Biol, 2009, 12: 364.
- [11] Hossain M A, Piyatida P, Jaime A, *et al.* Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation [J]. Am J Bot, 2012, 2012: 37.
- [12] Kurt F, Filiz E. Genome-wide and comparative analysis of *bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100* and *bHLH101* genes in *Arabidopsis*, tomato, rice, soybean and maize: insights into iron (Fe) homeostasis [J]. Biometals, 2018, 31: 489.
- [13] Wu H L, Chen C L, Du J, *et al.* Co-overexpression *FIT* with *AtbHLH38* or *AtbHLH39* in *Arabidopsis*-enhanced cadmium tolerance via increased cadmium sequestration in roots and improved iron homeostasis of shoots [J]. Plant Physiol, 2012, 158: 790.
- [14] Barberon M, Zelazny E, Robert S, *et al.* Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (*IRT1*) transporter controls iron uptake in plants-Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (*IRT1*) transporter controls iron uptake in plants-Mono [J]. P Natl Acad Sci USA, 2011, 108: E450.
- [15] Connolly E L, Fett J P, Guerinet M L. Expression of the *IRT1* metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation [J]. Plant Cell, 2002, 14: 1347.
- [16] Coello P, Hey S J, Halford N G. The sucrose non-fermenting-1-related (*SnRK*) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield [J]. J Exp Bot, 2011, 62: 883.
- [17] Shukla V, Mattoo A K. Sucrose non-fermenting-1-related protein kinase 2 (*SnRK2*): a family of protein kinases involved in hyperosmotic stress signaling [J]. Physiol Mol Biol Pla, 2008, 14: 91.
- [18] Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, *et al.* Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of *SnRK2* kinases in abscisic acid signaling in response to osmotic stress [J]. Plant Cell Environ, 2015, 38, 35.

[19] Mao X G, Zhang H Y, Tian S J, *et al.* TaSnRK2. 4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis* [J]. J Exp Bot, 2010, 61: 683.

[20] Yasunari F, Kazuo N, Takuya Y, *et al.* Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Physiol, 2009, 50: 2123.

[21] 黄彦菱, 姜雅淇, 李小意, 等. 拟南芥 CARK 家族响应脱落酸信号的研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2021, 58: 026004.

[22] Jiang C J, Shimono M, Sugano S, *et al.* Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice-magnaporthe grisea interaction [J]. Mol Plant Microbe In, 2010, 23: 791.

[23] Sheard L B, Zheng N. Signal advance for abscisic acid [J]. Nature, 2009, 7: 462.

[24] Zhang Z H, Ali S, Zhang T X, *et al.* Identification, evolutionary and expression analysis of *PYL-PP2C-SnRK2s* gene families in soybean [J]. Plants, 2020, 9: 1356.

[25] Gu S B, Wang X, Bai J Y, *et al.* The kinase CIPK11 functions as a positive regulator in cadmium stress response in *Arabidopsis* [J]. Gene, 2020, 772: 145372.

[26] Ali B, Qian P, Jin R, *et al.* Physiological and ultrastructural changes in *Brassica napus* seedlings induced by cadmium stress [J]. Biol Plantarum, 2014, 58: 131.

[27] Rehman S, Abbas G, Shahid M, *et al.* Effect of salinity on cadmium tolerance, ionic homeostasis and oxidative stress responses in conocarpus exposed to cadmium stress: implications for phytoremediation [J]. Ecotox Environ Safe, 2019, 171: 146.

[28] Kaushik D, Aryadeep R. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants [J]. Front Env Sci, 2014, 2: 53.

[29] Nouairi I, Ammar W B, Youssef N B, *et al.* Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress [J]. Acta Physiol Plant, 2009, 31: 237.

[30] Cui Y C, Xu G Y, Wang M L, *et al.* Expression of *OsMSR3* in *Arabidopsis* enhances tolerance to cadmium stress [J]. Plant Cell Tiss Org, 2013, 113: 331.

[31] 谭松, 印莉萍. 二价铁转运体 IRT1 的研究历程及最新进展[J]. 科学通报, 2017, 62: 10.

[32] Xu Q R, Pan W, Zhang R R, *et al.* Inoculation with *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* produces abscisic acid that reduces IRT1-mediated cadmium uptake of roots [J]. J Agr Food Chem, 2018, 66: 5229.

[33] Yuan Y X, Wu H L, Wang N, *et al.* FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Cell Res, 2008, 18: 385.

[34] Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R, *et al.* Abscisic acid: emergence of a core signaling network aba; abscisic acid [J]. Annu Rev Plant Biol, 2010, 61: 651.

[35] 王志坤. Cd 污染对大豆内源激素及生长发育的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.

[36] Hsu Y T, Kao C H. Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings [J]. Plant Cell Environ, 2010, 26: 867.

[37] Kanchan V, Neha U, Nitin K, *et al.* Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 161.

[38] Bashir W, Anwar S, Zhao Q, *et al.* Interactive effect of drought and cadmium stress on soybean root morphology and gene expression [J]. Ecotox Environ Safe, 2019, 175: 90.

引用本文格式:

中 文: 朱淋, 孙曼丽, 曾沂, 等. 拟南芥 SnRK2. 2/2. 3 激酶参与调节镉胁迫响应的机制探究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2022, 59: 066001.

英 文: Zhu L, Sun M L, Zeng L, *et al.* Mechanism of SnRK2. 2/2. 3 kinase involved in regulating cadmium stress response in *Arabidopsis thaliana* [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2022, 59: 066001.