

拟南芥响应过氧化氢突变体的筛选及遗传分析

雷凯健<sup>1,2</sup>,王棚涛<sup>1</sup>,刘浩<sup>1\*</sup>

(1. 河南大学 生命科学学院/植物逆境生物学重点实验室,河南 开封 475004; 2. 河南大学 药学院,河南 开封 475004)

**摘要:** 利用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变获得的拟南芥突变体库筛选过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)敏感突变体,以期研究氧化胁迫的分子机制提供遗传材料。从该突变体库中筛选出1株H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>敏感突变体*hps12*(hydrogen peroxide sensitive 12)。表型分析发现,*hps12*突变体植株矮小,果荚较短,并且在4 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理下*hps12*的子叶变绿情况明显低于野生型(WT),突变体的离体叶片在10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理下相比WT表现出更为明显的衰老症状。进一步遗传学分析表明,该突变体为单基因隐性突变。

**关键词:** 过氧化氢; *hps12*; 子叶变绿率; 叶绿素; 衰老

**中图分类号:** Q945.78      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2015)10-0053-04

Screening and Genetic Analysis of Hydrogen Peroxide Sensitive Mutant *hps12* in *Arabidopsis thaliana*

LEI Kaijian<sup>1,2</sup>, WANG Pengtao<sup>1</sup>, LIU Hao<sup>1\*</sup>

(1. The Key Laboratory of Plant Stress Biology/College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, China; 2. College of Pharmacy, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**Abstract:** In order to investigate the mechanism of ROS signaling transduction in after-germination process, we screened hydrogen peroxide sensitive mutants from an EMS mutant library in *Arabidopsis*, to provide genetic material for study of molecular mechanism of oxidative stress. As a result, *hydrogen peroxide sensitive mutant 12* (*hps12*) was screened from this library. Phenotype analysis indicated that *hps12* plant was dwarf, and the pod was shorter than wild type (WT). The cotyledon greening rate of *hps12* decreased after treated with 4 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Furthermore, the isolated leaves of the *hps12* mutant showed more obvious symptoms of senescence than WT under treatment of 10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Genetic analysis suggested that *hps12* was a single recessive mutant.

**Key words:** hydrogen peroxide; *hps12*; cotyledon greening rate; chlorophyll; senescence

细胞内活性氧 ROS (reactive oxygen species) 在根形态建成、顶端生长、植物防御以及植物激素响应等生理活动中充当第二信使,是植物体生长发育过程中的重要组分,同时其又作为毒性分子对细胞具有伤害作用<sup>[1-3]</sup>。ROS 的种类主要包括 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、O<sub>2</sub><sup>·-</sup>、·OH 和<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 等,其中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所参与的信号途径一直是研究的热点和难点。有研究表明,在多种生物及

非生物胁迫条件下,如热胁迫、盐胁迫、冷害以及病虫害等都会引起细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的积累,并进一步引起下游相关基因,如 NAC 家族基因、WRKY 家族基因及乙烯响应元件结合蛋白 APETALA2 (AP2) 等的表达<sup>[4-5]</sup>。但是,植物体内 ROS 含量的动态平衡机制至今仍不清楚。目前众多研究证实,锌指蛋白 Zat12 广泛参与冷胁迫与氧化胁迫过程。超表达 *Zat12* 植株在外源施加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后,与野生型

收稿日期:2015-04-10  
基金项目:国家自然科学基金项目(31170253); 河南省高等学校重点科研项目(15A180001)  
作者简介:雷凯健(1981-),女,河南开封人,讲师,博士,主要从事植物逆境生物学研究。E-mail:leikaijian@126.com  
\* 通讯作者:刘浩(1978-),男,河南许昌人,副教授,博士,主要从事植物激素信号互作研究。  
E-mail:liuhao@henu.edu.cn

(wild type, WT) 相比,其体内一系列响应氧化胁迫的基因转录水平提高<sup>[6]</sup>。抗坏血酸过氧化物酶 1 (ascorbate peroxidase 1, APX1) 被认为是细胞内 ROS 水平的核心调控子,它可以清除植物叶绿体光氧化系统中产生的  $H_2O_2$ <sup>[7]</sup>。Maruta 等<sup>[8]</sup>通过研究伤害及茉莉酸甲酯 (MeJA) 处理后的 KO - APX1 (APX1 缺失突变体) 的表型发现,APX1 含量升高可以提高叶绿体和细胞核对氧化胁迫的耐受性。拟南芥结合蛋白 CEO1 (clone eighty - one, 也称作 RCD1), 同样能显著提高植物的抗氧化胁迫能力,是近年来研究氧化胁迫的一个明星分子;序列分析表明,CEO1 具有 3 个典型的核定位信号(NLS),即:KKRKR、KRRR 和 KKHR,暗示其是核定位蛋白<sup>[9]</sup>。Katiyar-Agarwal 等<sup>[10]</sup>发现, RCD1 与 SOS1 (salt overly sensitive 1) 互作,表明 RCD1 参与调控的氧化胁迫与盐胁迫存在交叉机制。最近有文章报道, APX6 基因在调控种子萌发时的氧化状态方面起到了非常重要的作用,并且该调控过程涉及 ABA 与生长素信号的互作<sup>[11-12]</sup>。

尽管人们已经发现了一些参与 ROS 调控的基因,然而,ROS 所调节的种子萌发及萌发后过程是否存在其他调节因子还并不清楚,并且其分子机制依然未知。基于此,采用遗传学方法,以甲基磺酸乙酯(EMS)诱变后的拟南芥突变体库作为试验材料,通过在培养基中施加低浓度的  $H_2O_2$  进而在种子萌发后筛选对  $H_2O_2$  敏感的突变体,并对筛选获得的潜在突变体进行详细的表型分析,以期揭示植物的 ROS 信号网络提供遗传材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料及其培养

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) WT 种子材料生态型为 Columbia (Col - 0)。ceol 突变体种子购自 SALK 种子资源库。种子经 0.1 % 升汞表面消毒 5 min 后,无菌水清洗 5 ~ 7 次,点种于 1% MS 培养基上。置于 4 °C 春化 2 d 后竖直放入培养室中,于 16 h 光照/16 h 黑暗、22 °C、光照强度 90 ~ 120 mmol/(m<sup>2</sup> · s)、相对湿度 60 % 条件下培养。

### 1.2 突变体的筛选

利用 EMS 诱变剂对拟南芥 WT 种子进行诱变并获得突变体库。将突变体库种子撒播于加有 4 mmol/L  $H_2O_2$  的 0.6% MS 培养基上,待种子萌发并生长到 7 d 时,挑选对  $H_2O_2$  敏感且子叶发育相对较差的幼苗作为潜在的突变体。然后将潜在突变体分别移至正常培养基中使其恢复正常生长,待其完全恢复正常生长后移至土中,观察这些突变体在整个生长周期内叶片大小、株高、果荚长度等生长发育表型是否与 WT 存在不同,将上述表型能够稳定遗传的突变体作为  $H_2O_2$  敏感突变体。

### 1.3 子叶变绿率统计

在无菌条件下,将消毒后的 WT 及突变体种子

均匀点播在 1.2% MS 培养基及分别加有 0.5 μmol/L 甲基紫精(MV)、4 mmol/L  $H_2O_2$ 、100 mmol/L NaCl 的 MS 培养基上,春化 3 d 后竖直培养。统计生长 7 d 的幼苗子叶绿色株的数目,将不加其他试剂的 MS 培养基作为对照(CK)。

### 1.4 衰老表型分析

取生长大约 15 d 的 WT 及突变体植株的离体叶片,用双蒸水(CK)、10 mmol/L  $H_2O_2$  及 500 mmol/L 甘露醇处理 3 d 后,将水分吸干,用电子天平各称取 0.03 g,分别放入 10 mL 试管中,向试管中加入 3 mL 95% 乙醇,用锡纸包裹试管(防止叶绿素见光分解)。将试管放入 42 °C 的水浴锅至少 3 h,然后分别测 665 nm、649 nm 处的吸光值,计算叶绿素含量,  $C_a = 13.95A_{665} - 6.88A_{649}$ ,  $C_b = 24.96A_{649} - 7.32A_{665}$ ,其中  $C_a$ 、 $C_b$  分别表示叶绿素 a、b 含量<sup>[13]</sup>。

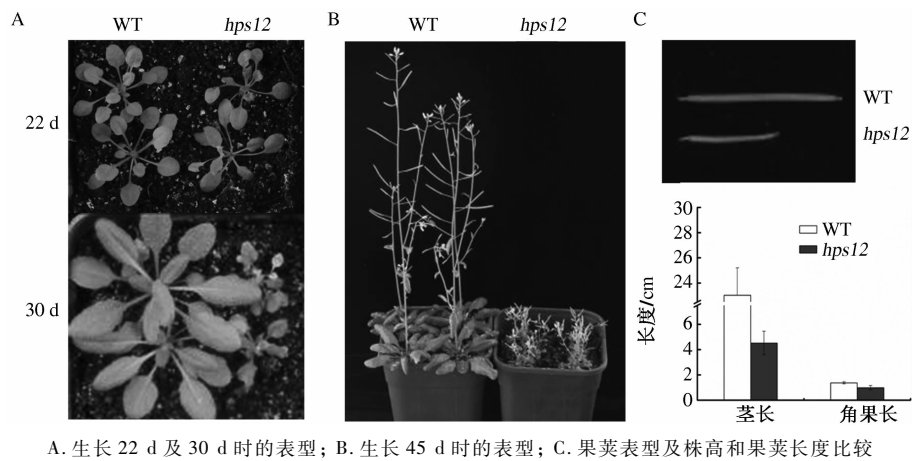
## 2 结果与分析

### 2.1 $H_2O_2$ 敏感突变体的筛选

从大约 40 000 粒种子的 EMS 突变体库中筛选获得 12 株候选突变体,这些突变体都不同程度地显示出对  $H_2O_2$  敏感的表型,其中 1 株突变体 *hps12* (hydrogen peroxide sensitive 12) 在生长 22 d 时,与 WT 相比大小差别不大,但在生长 30 d 时,较 CK 明显矮小(图 1A)。在生长 45 d 时,WT 植株茎长可以达到 23.04 cm,而 *hps12* 的茎长只有 4.52 cm;同时发现 *hps12* 的角果长仅有 0.98 cm,而 WT 的角果长度为 1.37 cm(图 1B、C)。综上,突变体 *hps12* 植株矮小,茎长和角果长较短。这些结果暗示,*HPS12* 不仅影响早期的种子萌发过程,同时也参与调控植物后期的生长发育过程。

### 2.2 突变体的子叶变绿情况分析

上述研究结果表明,*HPS12* 功能丧失能够导致植株矮小、茎及果荚长度变短等,而已知 *CEO1* 是参与氧化胁迫的明星分子,其功能缺失后同样显示出植株矮小等表型,因此,以 *CEO1* 功能缺失突变体为对照,在胁迫处理下观察 *HPS12* 和 *CEO1* 功能缺失突变体表型之间是否存在差异。由图 2 可知,经 MV 处理后,ceol 突变体对 MV 不是很敏感,子叶变绿率高达 78%,与文献中所报道的结果一致<sup>[10]</sup>;而突变体 *hps12* 子叶变绿率只有 8.57%,与 WT 表型类似,两者生长均受到严重抑制。经 4 mmol/L  $H_2O_2$  处理后,WT、*hps12* 和 *ceol* 生长均受到抑制,突变体 *hps12* 子叶变绿率仅为 65.71%,对  $H_2O_2$  较为敏感,而 *ceol* 和 WT 的子叶变绿率则分别为 76.19% 和 87.62%。经 100 mmol/L NaCl 处理,WT 和 *ceol* 植株生长都受到了明显的抑制,子叶变绿率分别为 28.57% 和 10.48%,而 *hps12* 则为 87.62%。上述结果表明,突变体 *hps12* 在  $H_2O_2$  处理下子叶生长情况明显较差,而在 NaCl 处理下子叶生长情况优于 WT,同时也暗示了 *HPS12* 和 *CEO1* 在功能上存在差异,可能不是同一个基因。



A. 生长 22 d 及 30 d 时的表型; B. 生长 45 d 时的表型; C. 果荚表型及株高和果荚长度比较

图 1 WT 与 *hps12* 植株在不同时期的表型分析

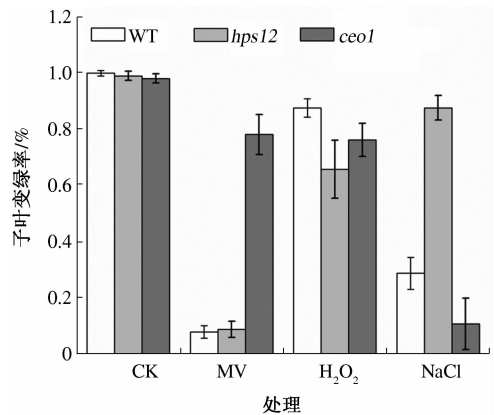
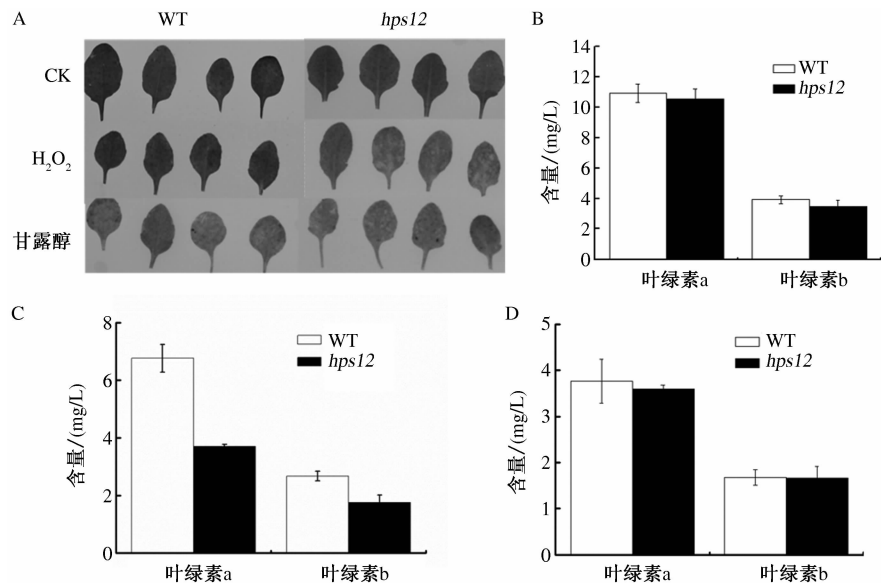


图 2 WT、*hps12* 及 *ceo1* 植株在氧化胁迫下的子叶变绿率

2.3 突变体的衰老表型分析

在植物叶片衰老过程中,ROS 含量增加<sup>[14]</sup>。为进一步探索 *HPS12* 对植物衰老是否有影响,将生长 15 d 的 *hps12* 突变体和 WT 植株叶片进行不同胁迫处理观察衰老情况。处理 3 d 后发现,在双蒸水处理后 WT 与 *hps12* 突变体的叶片叶绿素含量均较高,且无差异(图 3B);在 10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理下 *hps12* 突变体叶片比 WT 提前出现发黄衰老的症状(图 3A),且叶绿素含量也明显减少(图 3C);而 500 mmol/L 甘露醇处理后,突变体 *hps12* 与 WT 叶片叶绿素含量均明显减少并没有明显差异(图 3D),这表明 *hps12* 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应具有特异性。



A. *hps12* 与 WT 离体叶片在胁迫下的衰老情况; B. 双蒸水处理后 WT 与 *hps12* 叶片的叶绿素含量; C. 10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后 WT 与 *hps12* 叶片的叶绿素含量; D. 500 mmol/L 甘露醇处理后 WT 与 *hps12* 叶片的叶绿素含量

图 3 WT 与 *hps12* 在胁迫下的叶片衰老情况及叶绿素含量

2.4 突变体的遗传学分析

为了验证筛选到的突变体 *hps12* 是否是单基因隐性突变,将突变体与 WT 植株进行杂交。将杂交后收获的种子 T<sub>1</sub> 代进行播种,并对其表型进行观

察。通过 4 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理发现,其子叶变绿率均与 WT 无明显差异。再移至 MS 培养基使其恢复正常生长,之后移至土中后继续观察其生长状况,在整个生长周期与 WT 均无明显差异,表明该基因是

隐性突变基因。 $T_1$  代自交后收获  $T_2$  代种子,将大约 800 多株植株移至土中进行表型观察,经过卡方检验,发现其分离比为 3:1 (639:223)。表明该突变体为单基因隐性突变。

### 3 结论与讨论

ROS 作为植物第二信使已得到人们的广泛认同,而  $H_2O_2$  作为 ROS 的一种,近年来其对种子萌发的调控机制也受到植物生物学家的关注。Bailly 等<sup>[15]</sup>认为,在种子休眠被打破的过程中, $H_2O_2$  的积累是必不可少的。Liu 等<sup>[16]</sup>研究表明,外源施加  $H_2O_2$  可以促进 CYP707A 基因家族的表达,促进 ABA 代谢、降低体内 ABA 含量,在这个过程中需要另外一个信号分子 NO 的参与;与此同时, $H_2O_2$  通过调控 GA 生物合成关键基因例如 *GA3ox* 和 *GA20ox* 的表达促进 GA 生物合成;如果抑制  $H_2O_2$  的产生则会促使种子进入休眠阶段,抑制种子萌发。尽管目前的研究已经表明  $H_2O_2$  在种子萌发过程中起重要作用,但是由于  $H_2O_2$  特异突变体的稀少,目前对于其调控机制知之甚少。

本研究以利用 EMS 诱变获得的拟南芥突变体库为试验材料,筛选到 1 株在  $H_2O_2$  处理下种子萌发后生长明显受到抑制,生长发育后期植株明显矮小,并且茎长、果荚长度明显变短的突变体 *hps12*。进一步分析发现,在幼苗期 *HPS12* 对  $H_2O_2$  处理下的子叶变绿具有调节作用。另外,对幼苗期突变体的离体叶片进行各种胁迫处理发现,*hps12* 对  $H_2O_2$  处理敏感,其叶绿素含量比 WT 降低。这与之前的子叶变绿率表型相一致,并进一步说明 *hps12* 可能参与了氧化胁迫与衰老的信号交叉途径。这些结果暗示,*hps12* 作为  $H_2O_2$  敏感突变体,可能不仅仅参与了对种子萌发的调控,同时也特异性地介导了衰老信号转导过程。遗传学分析表明,*hps12* 是单基因隐性突变。该突变体的获得将为研究植物尤其是农作物的氧化胁迫调控途径的分子机制提供重要的遗传材料。

#### 参考文献:

- [1] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, et al. Reactive oxygen gene network of plants[J]. Trends Plant Sci, 2004, 9 (10): 490-498.
- [2] Foyer C H, Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses[J]. Plant Cell, 2005, 17 (7): 1866-1875.
- [3] Foyer C H, Shigeoka S. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis[J]. Plant Physiol, 2011, 155 (1): 93-100.
- [4] Vanderauwera S, Zimmermann P, Rombauts S, et al. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis[J]. Plant Physiol, 2005, 139 (2): 806-821.
- [5] Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev T S, et al. Transcriptional footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2006, 141 (2): 436-445.
- [6] Davletova S, Schlauch K, Couto J, et al. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2005, 139 (2): 847-856.
- [7] Davletova S, Rizhsky L, Liang H, et al. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2005, 17 (1): 268-281.
- [8] Maruta T, Inoue T, Noshi M, et al. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 protects organelles against oxidative stress by wounding- and jasmonate-induced  $H_2O_2$  in *Arabidopsis* plants[J]. Biochimica et Biophysica acta, 2012, 1820 (12): 1901-1907.
- [9] Belles-Boix E, Babiychuk E, Van Montagu M, et al. CEO1, a new protein from *Arabidopsis thaliana*, protects yeast against oxidative damage[J]. FEBS Lett, 2000, 482 (1/2): 19-24.
- [10] Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Kim K, et al. The plasma membrane  $Na^+/H^+$  antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103 (49): 18816-18821.
- [11] Chen C, Letnik I, Hacham Y, et al. Ascorbate peroxidase 6 protects *Arabidopsis thaliana* desiccating and germinating seeds from stress and mediates crosstalk between ROS, ABA and auxin[J]. Plant Physiol, 2014, 166 (1): 370-383.
- [12] Chen C, Twito S, Miller G. New cross talk between ROS, ABA and auxin controlling seed maturation and germination unraveled in *APX6* deficient *Arabidopsis* seeds[J]. Plant Signal Behav, 2014, 9 (12): e976489.
- [13] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [14] Zimmermann P, Zentgraf U. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development[J]. Cell Mol Biol Lett, 2005, 10 (3): 515-534.
- [15] Bailly C, El Maarouf Bouteau H, Corbineau F. Seed dormancy alleviation and oxidative signaling[J]. J Soc Biol, 2008, 202 (3): 241-248.
- [16] Liu Y, Ye N, Liu R, et al.  $H_2O_2$  mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination[J]. J Exp Bot, 2010, 61 (11): 2979-2990.