



过表达胡杨*PEPKR2*负调控拟南芥的镉耐受性

刘艺 殷可欣 冯冰 闫彩霞 赵紫焱 董凯悦 赵瑞 陈少良

Overexpression of *Populus euphratica* *PEPKR2* negatively regulates cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana*

Liu Yi, Yin Kexin, Feng Bing, Yan Caixia, Zhao Ziyang, Dong Kaiyue, Zhao Rui, Chen Shaoliang

引用本文:

刘艺, 殷可欣, 冯冰, 闫彩霞, 赵紫焱, 董凯悦, 赵瑞, 陈少良. 过表达胡杨*PEPKR2*负调控拟南芥的镉耐受性[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(4):21–36. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240376

Liu Yi, Yin Kexin, Feng Bing, Yan Caixia, Zhao Ziyang, Dong Kaiyue, Zhao Rui, Chen Shaoliang. Overexpression of *Populus euphratica* *PEPKR2* negatively regulates cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2025, 47(4):21–36. doi: 10.12171/j.1000–1522.20240376

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240376>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

过表达胡杨*PeAnn1*负调控拟南芥的抗旱性

Overexpression of *PeAnn1* from *Populus euphratica* negatively regulates drought resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*

北京林业大学学报, 2020, 42(6): 14–25. <https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200031>

胡杨*PeREM1.3*过表达提高烟草耐盐性的机制

Overexpression mechanism of *PeREM1.3* from *Populus euphratica* enhancing salt tolerance in transgenic tobacco

北京林业大学学报, 2019, 41(1): 1–9. <https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180338>

镉胁迫下美洲黑杨无性系‘中荷1号’转录组分析

Transcriptome analysis of clone *Populus deltoides* ‘Zhonghe 1’ under cadmium stress

北京林业大学学报, 2021, 43(7): 12–21. <https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210037>

胡杨*miR1444b*在拟南芥中正调控植物抗旱性

Populus euphratica *miR1444b* positively regulates plants response to drought stress in *Arabidopsis thaliana*

北京林业大学学报, 2018, 40(4): 1–9. <https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20180043>

NaHCO_3 胁迫对转*TaLEA*基因山新杨生长及光合、叶绿素荧光特性的影响

Effects of NaHCO_3 stress on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in *Populus davidiana* × *P. bolleana* overexpressed *TaLEA*

北京林业大学学报, 2017, 39(10): 33–41. <https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170099>

胡杨*PeAPY1*和*PeAPY2*调控拟南芥耐盐机制研究

PeAPY1 and *PeAPY2* of *Populus euphratica* regulating salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*

北京林业大学学报, 2017, 39(6): 13–21. <https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170034>

DOI:10.12171/j.1000-1522.20240376

过表达胡杨 *PEPKR2* 负调控拟南芥的镉耐受性

刘 艺 殷可欣 冯 冰 闫彩霞 赵紫焱 董凯悦 赵 瑞 陈少良

(北京林业大学生物科学与技术学院, 林木资源高效生产全国重点实验室, 北京 100083)

摘要:【目的】磷酸烯醇丙酮酸羧化酶激酶相关激酶(PEPKRs)是植物特有的 CDPK/SnRK 超家族成员, 但其在胡杨响应重金属胁迫中的调控机制尚不清楚。本文通过研究胡杨 *PEPKR2* 在镉胁迫过程中的作用, 旨在进一步揭示植物响应镉胁迫的生理与分子调控机制。【方法】克隆胡杨 *PEPKR2* 基因, 利用 DNAMAN 进行同源氨基酸序列比对, 并用 Mega 7 软件构建进化树。以野生型(WT)、转空载体对照(VC)和过表达 *PePEPKR2* 拟南芥(*PePEPKR2*-OE1、*PePEPKR2*-OE7 和 *PePEPKR2*-OE11)株系为实验材料, 对各株系拟南芥进行不同浓度的镉处理, 从生理和分子水平探究 *PePEPKR2* 在植物响应镉胁迫中的作用机制。【结果】(1)胡杨 *PEPKR2* 氨基酸序列与毛果杨 *PEPKR2* 相似度最高, 亲缘关系最近; 镉胁迫处理之后, 胡杨根、茎、叶中 *PEPKR2* 表达量均发生了显著性变化; *PePEPKR2* 蛋白定位于细胞核中。(2)在镉胁迫条件下, 过表达 *PePEPKR2* 的拟南芥株系的根长、存活率和鲜质量均低于 WT 和 VC, 而相对电导率显著高于 WT 和 VC, 表明过表达株系对镉胁迫更敏感。(3)镉胁迫处理后, 相较于 WT 和 VC, 过表达拟南芥株系的幼苗根尖 Cd^{2+} 内流速度显著加快, Cd^{2+} 含量也显著升高; 土壤条件下, 过表达株系的根和叶中 Cd^{2+} 含量均显著高于 WT 和 VC。(4)镉胁迫处理后, 过表达拟南芥株系的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的升高幅度均低于 WT 和 VC, 过氧化物酶活性的降低幅度均高于 WT 和 VC, 抗氧化酶相关基因的转录水平变化与酶活性的变化趋势一致; 最终导致过表达拟南芥株系根尖的 H_2O_2 含量显著高于 WT 和 VC。(5)土壤条件下, 经镉胁迫处理后, 过表达拟南芥株系的叶绿素相对含量、最大光化学效率、实际光化学效率、电子传递速率、净光合速率、蒸腾速率、气孔导度均低于 WT 和 VC, 而细胞间 CO_2 浓度则高于 WT 和 VC。【结论】过表达 *PePEPKR2* 增加了 Cd^{2+} 在拟南芥中的积累, 削弱了活性氧清除能力, 进而使光合系统功能紊乱, 最终负调控拟南芥的镉耐受性。本研究为利用基因工程改良杨树的镉修复能力提供了理论支持。

关键词: 胡杨; 蛋白激酶; *PePEPKR2*; 镉胁迫; 活性氧; 光合作用; 转基因

中图分类号: S792.11 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2025)04-0021-16

引文格式: 刘艺, 殷可欣, 冯冰, 等. 过表达胡杨 *PEPKR2* 负调控拟南芥的镉耐受性 [J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(4): 21-36. Liu Yi, Yin Kexin, Feng Bing, et al. Overexpression of *Populus euphratica* *PEPKR2* negatively regulates cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(4): 21-36.

Overexpression of *Populus euphratica* *PEPKR2* negatively regulates cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana*

Liu Yi Yin Kexin Feng Bing Yan Caixia Zhao Ziyang Dong Kaiyue
Zhao Rui Chen Shaoliang

(State Key Laboratory of Efficient Production of Forest Resources, School of Biological Science and
Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase-related kinases (PEPKRs), belonging to the plant-exclusive CDPK/SnRK superfamily, have not yet been fully elucidated in terms of their regulatory

收稿日期: 2024-11-14 修回日期: 2024-12-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(32371828、32071730、31770643), 高等学校学科创新引智计划项目(111 Project、B130007), 北京市自然科学基金项目(6182030、6172024), 中央高校基本科研业务费专项(2019ZY25)。

第一作者: 刘艺。主要研究方向: 植物逆境生物学。Email: ly4862ccc@163.com 地址: 100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者: 赵瑞, 博士, 副教授。主要研究方向: 林木逆境生理。Email: ruizhao@bjfu.edu.cn 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

mechanisms underlying the heavy metal stress response in *Populus euphratica*. This study investigated the role of *Populus euphratica* PEPKR2 during cadmium (Cd) stress to further elucidate the physiological and molecular regulatory mechanisms underlying plant responses to Cd toxicity. [Method] The PEPKR2 gene was cloned from *P. euphratica*, and the DNAMAN was used for homologous amino acid sequence alignment, while a phylogenetic tree was constructed using Mega 7 software. Using wild-type (WT), empty vector control (VC), and *Pe*PEPKR2-overexpressing *Arabidopsis thaliana* lines (*Pe*PEPKR2-OE1, *Pe*PEPKR2-OE7, and *Pe*PEPKR2-OE11) as experimental materials, plants were subjected to graded cadmium treatments to investigate the mechanistic role of *Pe*PEPKR2 in plant responses to Cd stress at both physiological and molecular levels. [Result] (1) The amino acid sequence of *P. euphratica* PEPKR2 (*Pe*PEPKR2) exhibited the highest sequence similarity and closest phylogenetic relationship with its ortholog in *Populus trichocarpa*. Following cadmium stress treatment, differential expression patterns of PEPKR2 were observed across root, stem, and leaf tissues in *P. euphratica*, with statistically significant alterations in transcript abundance. Subcellular localization assays confirmed the nuclear compartmentalization of *Pe*PEPKR2 protein. (2) Under cadmium stress conditions, *Pe*PEPKR2-overexpressing plants exhibited significantly reduced root elongation, survival rate, and fresh biomass compared with WT and VC plants, whereas relative electrolyte leakage was markedly elevated. These phenotypic divergences collectively demonstrated hypersensitivity of *Pe*PEPKR2-overexpressing lines to Cd toxicity. (3) Following cadmium stress exposure, *Pe*PEPKR2-overexpressing plants exhibited significantly accelerated Cd^{2+} influx rates and elevated Cd^{2+} accumulation in root tips compared with WT and VC plants. Furthermore, under soil-grown conditions, transgenic lines demonstrated markedly higher Cd^{2+} concentrations in both roots and leaves relative to WT and VC plants. (4) Under cadmium stress, the *Pe*PEPKR2-overexpressing plants exhibited smaller increases in superoxide dismutase and catalase activities, but greater decreases in peroxidase activity compared with WT and VC plants. These changes in antioxidant enzyme activities were consistent with the transcriptional patterns of their corresponding genes. Consequently, the *Pe*PEPKR2-overexpressing lines accumulated significantly higher levels of H_2O_2 in root tips than the controls. Under soil culture conditions, after cadmium stress treatment, overexpressed lines exhibited lower relative chlorophyll content, maximum photochemical efficiency, actual photochemical efficiency, electron transport rate, net photosynthetic rate, transpiration rate, and stomatal conductance while higher intercellular CO_2 concentration than WT and VC lines. [Conclusion] Overexpression of *Pe*PEPKR2 enhances Cd^{2+} accumulation in *Arabidopsis thaliana*, compromises reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity, and subsequently disrupts photosynthetic function, ultimately conferring negative regulation of Cd tolerance. This study provides theoretical support for genetic engineering approaches to improve cadmium phytoremediation potential in *Populus* species.

Key words: *Populus euphratica*; protein kinase; *Pe*PEPKR2; cadmium stress; reactive oxygen species; photosynthesis; transgenosis

重金属镉易于被植物根部吸收,并在植物体内不同部位积累,进而通过食物链传递,最终对人类健康构成威胁^[1]。因此,开发有效的土壤重金属污染的治理方法至关重要。植物修复以其高效率、环保及低成本等优势已被广泛应用于土壤重金属污染治理^[2]。植物能够吸收土壤中的重金属,并将其富集于体内,从而实现对污染土壤的修复^[3]。在此过程中,植物细胞通过螯合作用、区隔化和外排机制来适应重金属胁迫^[4]。因此,鉴定与镉吸收、转运、区隔化

和解毒相关的关键基因,并利用基因工程手段增强植物对重金属污染环境的修复能力,具有重要的研究意义和应用价值。

在真核生物中,蛋白激酶在调节细胞分裂、代谢以及对环境信号响应方面发挥重要作用。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中,约4%的基因编码蛋白激酶^[5]。钙依赖型蛋白激酶/蔗糖非发酵-1-相关蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase/Snf1-related protein kinase, CDPK/SnRK)超家族在植物生

长发育、生物和非生物胁迫响应等多种生理过程中具有重要功能^[6]。这类蛋白激酶包含真核生物丝氨酸-苏氨酸激酶的典型催化结构域^[7]。CDPK/SnRK超家族在植物非生物胁迫信号转导过程中扮演重要角色。例如,水稻(*Oryza sativa*)中的 *OsCDPK7* 基因在盐胁迫和低温胁迫下被显著诱导表达,其表达水平与水稻对低温、盐和干旱胁迫的耐受性密切相关^[8]。在拟南芥中, *AtCRK1* 的缺失会降低植株对盐胁迫的耐受性^[9],而 *AtCPK28* 则在低温胁迫下被显著诱导表达,其激酶活性在低温处理后迅速激活^[10]。此外,小麦(*Triticum aestivum*)中的 *TaCDPK27* 能够正向调控植株的耐盐性^[11]。而玉米(*Zea mays*)中的 *ZmCDPK7* 可通过减少活性氧积累来增强植株耐热性^[12]。在苜蓿(*Medicago sativa*)中,生长素 2,4-D 和热处理能够激活并促进 *MsCPK3* 的表达^[13]。SnRK2s 是参与植物非生物胁迫信号转导的关键酶^[14],同时也是 ABA 信号通路的重要组成部分,广泛参与植物抵抗环境压力的多种生理过程^[15]。*PtSnRK2* 基因在干旱和盐胁迫处理下表达量显著增加,这表明 *PtSnRK2* 可能参与植物对非生物胁迫的响应过程^[16]。磷酸烯醇丙酮酸羧化酶激酶作为一种非钙离子依赖型蛋白激酶,主要在天冬氨酸代谢和 C_4 植物的光合作用中发挥重要作用^[17]。磷酸烯醇丙酮酸羧化酶激酶相关激酶(phosphoenolpyruvate carboxylase kinase-related kinases, PEPKRs)是 CDPK/SnRK 超家族的成员,且为植物所特有^[5]。在 CDPK/SnRK 基因家族的扩增过程中,片段重复是主要的基因复制方式,而 PEPKRs 相较于其他亚家族成员更容易被保留下来^[6]。另外,PEPKRs 与其他 CDPK/SnRK 家族成员在非催化结构域上无明显相似性,其蛋白质预测结构包含 N 端和 C 端的延伸区域^[5]。然而,目前关于 PEPKRs 功能的研究还很少。在盐胁迫、水分胁迫和复合胁迫条件下,天蓝苜蓿(*Medicago lupulina*)中 *MICDPKs*、*MICRKs* 和 *MIPEPKRs* 的表达量发生变化,推测这些蛋白可能参与植物对非生物胁迫的响应过程^[18]。在小麦中,热处理和聚乙二醇处理可诱导 *TaPEPKR2* 的表达,而 *TaPEPKR2* 的过表达能提高小麦和拟南芥对高温和脱水胁迫的耐受性^[19]。尽管目前草本植物中的 PEPKRs 已有相关研究,但木本植物中 PEPKRs 的功能研究仍处于空白状态。

胡杨(*Populus euphratica*)具有较强的抗旱性和耐盐性,是研究木本植物适应非生物胁迫机制的理想材料^[20]。然而,胡杨对重金属胁迫的耐受性相对较弱,尤其在镉胁迫下,其早期防御反应的缺失使其比灰杨(*P. canescens*)更为敏感^[21]。尽管如此,胡杨仍然可以通过多种方式来应对镉胁迫,如限制镉吸

收、增加镉的区隔化和提高抗氧化防御系统,从而减轻镉的毒性。例如, *PePCR2*(plant cadmium resistance 2)可以通过促进根系外排镉以及调节其他镉转运体的活性,降低细胞质中镉浓度,进而增强胡杨对镉的抗性^[22]。此外,镉处理可上调 *PePCR10* 的表达,而 *PePCR10* 的过表达则通过降低镉含量,增强 84K 杂交杨(*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*)对镉的耐受能力^[23]。NO 通过促进 Ca^{2+} 的内流来抑制胡杨细胞对 Cd^{2+} 的吸收,从而缓解镉胁迫对胡杨细胞造成的生长抑制^[24]。 H_2S 处理可增强胡杨的抗氧化酶活性,限制镉的内流,并促进镉进入液泡,从而改善抗氧化系统和细胞镉稳态,有效减轻镉的毒性^[25]。*PeCPK21*(calcium-dependent protein kinase 21)可与重金属胁迫相关蛋白^[26]、拟南芥 NF-YC3(nuclear transcription factor YC3)^[27]相互作用,从而限制镉的积累并增强活性氧(ROS)清除系统,提高拟南芥对镉胁迫的耐受性。过表达胡杨 *PeMAX2*(more axillary branches 2)不仅能够提高拟南芥对镉的吸收能力,还可通过提高抗氧化酶活性增强对镉的耐受性^[28]。相较于新疆杨,胡杨对镉的耐受能力更强,主要体现在叶绿素含量、非光化学猝灭系数和超氧化物歧化酶活性的特异性^[29]。

CDPK/SnRK 超家族在植物各种应激反应的信号通路中发挥重要作用,而 PEPKRs 作为该超家族的成员,已被证实参与植物对盐、水分和高温等一系列的胁迫的响应。然而,目前尚不清楚 PEPKRs 是否参与植物对重金属胁迫的响应,以及是否能增强植物对镉污染土壤的修复能力。在木本植物胡杨中,PEPKRs 是否调控镉的吸收和耐受性仍不明确。因此,本研究克隆了胡杨 *PePEPKR2* 基因,并将 *PePEPKR2* 在拟南芥中异源表达。拟通过植物生理学、细胞生物学、生物化学和分子生物学实验技术,从生理和分子水平深入研究胡杨 *PEPKR2* 在镉胁迫响应过程中的作用,以期为进一步揭示胡杨响应重金属胁迫的生理与分子调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用材料包括在北京林业大学苗圃栽培的一年生胡杨幼苗,哥伦比亚型拟南芥(*Columbia ecotype*, Col_0)种子,亚细胞定位载体 pCambia-1300-GFP 和过表达载体 pCambia-1300-FLAG 菌株均由实验室保存提供。DH5 α 大肠杆菌感受态细胞和 GV3101 农杆菌感受态细胞购买于上海唯地生物技术有限公司, Cd^{2+} 特异性荧光探针(LeadmiumTM Green AM)和 H_2O_2 特异性荧光探针(H_2DCFDA)购

买于赛默飞世尔科技有限公司,植物 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒购买于康为世纪生物科技有限公司,荧光定量 PCR 试剂盒、高纯度质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒购买于北京擎科生物科技有限公司。引物合成由北京擎科生物科技有限公司和北京祥鸿生物科技有限公司完成,测序由北京睿博兴科生物技术有限公司完成。

1.2 *PePEPKR2* 的克隆和生物信息学分析

使用 TRIzol 法从胡杨叶片中提取总 RNA,利用逆转录试剂盒去除基因组 DNA,以 RNA 为模板反转录成 cDNA 进行 PCR 扩增,获取 *PePEPKR2* 的编码(coding sequence, CDS)序列。50 μ L 的反应体系包括 5 μ L cDNA、正向和反向引物各 1 μ L、2 $\times$ KOD OneTM PCR Master Mix(Sigma-Aldrich, Germany) 25 μ L,剩余用 18 μ L ddH₂O 补齐。基因克隆引物利用 Takara 网站上的引物设计工具(In-Fusion Cloning Primer Design Tool)设计,引物序列见表 1。PCR 程序为 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 恒温。回收后纯化 PCR 产物与 pMDTM18-T(宝日医生物技术(北京)有限公司)连接,并转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中,在含有氨苄青霉素(50 μ g/mL)的 LB 固体培养基上筛选阳性克隆,进一步进行菌液 PCR 和测序鉴定。不同植物的 *PEPKR2* 同源氨基酸序列通过 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线获取,使用 DNAMAN 和 Mega7 软件对 *PePEPKR2* 氨基酸序列进行多重序列比对和系统发育分析。

1.3 镉胁迫下 *PePEPKR2* 的时空表达模式

选取长势良好且一致的胡杨幼苗,用 50 μ mol/L CdCl₂ 溶液处理,分别取处理 0、3、6、12、24、48 h 后的胡杨根、茎和叶片;对照组用等量的水处理,并在同一时间取样,分别提取总 RNA 后逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, *PeActin7* 为胡杨内参基因, *PePEPKR2* 基因特异性引物见表 1。荧光定量 PCR(RT-qPCR)

程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环,熔解曲线分析为 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 公式计算 *PePEPKR2* 的相对表达量。

1.4 过表达拟南芥阳性植株的获取和筛选

1.4.1 构建植物表达载体

将重组质粒 pMD18-T-*PePEPKR2* 和表达载体 pCAMBIA-1300-FLAG 分别进行双酶切,胶回收纯化目的条带, 37 $^{\circ}$ C、30 min 连接胶回收产物。将连接产物转化至 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中,在含卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 平板培养基上筛选阳性单克隆,进行菌液 PCR 鉴定和测序,提取质粒用于后续实验。

1.4.2 过表达植株的获得和筛选

将空表达载体 pCAMBIA-1 300-FLAG 和重组质粒 pCAMBIA1300-FLAG-*PePEPKR2* 分别转化到 GV3101 农杆菌感受态细胞中,加入 500 μ L 液体 LB 培养基,置于 28 $^{\circ}$ C 摇床活化 3 h。将活化后的菌液涂布在含有卡那霉素(50 μ g/mL)和利福平(25 μ g/mL)的 LB 固体培养基上,筛选阳性单克隆进行菌液 PCR 和测序鉴定。选取转化成功的农杆菌扩繁,通过沾花法侵染 T₀ 代野生型拟南芥,成熟后收集获得 T₁ 代种子。

1.4.3 阳性植株的鉴定

将 T₁ 代种子消毒后播种到含潮霉素(25 μ g/mL)的 1/2MS 培养基上,4 $^{\circ}$ C 低温层积 2 d,后转移至光照培养间培养,培养间条件为白天 23 $^{\circ}$ C,夜晚 20 $^{\circ}$ C;光照 16 h,黑暗 8 h;光照强度为 50 μ mol/(m²·s),相对湿度为 65%。培养 9 d 后将存活下来且正常生长的拟南芥幼苗移栽到土壤中继续生长,利用 SDS 法提取拟南芥叶片 DNA,鉴定阳性植株并收集得到 T₂ 代种子,继续用含有潮霉素的 LB 固体培养基筛选得到拟南芥 T₃ 代纯合体种子。

使用 TRIzol 法提取野生型、转空载体和 T₃ 代过表达拟南芥株系的总 RNA,反转录为 cDNA,用

表 1 本实验所用引物序列
Tab. 1 Primer sequence used in this study

引物名称	上游引物(5'—3')	下游引物(5'—3')
<i>PeActin7</i>	ATTGGCCTTGGGGTTAAGAG	CACACTGGAGTGATGGTTGG
<i>AtActin2</i>	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
<i>AtSOD</i>	AGGAAACATCACTGTTGGAGAT	GAGTTTGGTCCAGTAAGAGGAA
<i>AtPOD</i>	CGTGCCCTTCATATTGTTGG	GACGCCATCAACAACGAGTC
<i>AtCAT</i>	AGGATCAAACCTTTGAGGGGTAG	CTTGTTGGTTCTGGAATCTACT
<i>PePEPKR2</i>	ATGAGGAAGAAGAGGAAAGGCAGTGA	AAATGCTCTACACAGATTGTTAGCTGTG
<i>PePEPKR2</i> -RT-qPCR	GCTTGCAAGCATTGCTACTG	GGAGCCAAATTTACCACGCC

特异性引物进行 RT-qPCR 检测 *PePEPKR2* 基因表达量,反应程序同上。同时进行半定量 PCR,反应程序为 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 28 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃ 恒温; 利用琼脂糖凝胶电泳检测半定量扩增产物,大小为 200 bp^[30]。

取 4 周龄拟南芥叶片在液氮中研磨至粉末状,每 0.3 g 鲜质量样品加入 1 mL RIPA 裂解液提取拟南芥各株系总蛋白。将混合物涡旋震荡摇匀,然后在冰上静置 1 h,随后 4 ℃、13 000 r/min 离心 15 min,取上清(总蛋白)用于蛋白免疫印迹实验。将上清与 5 × SDS 上样缓冲液混合,在 95 ℃ 下完全变性 5 min,然后在冰上冷却。将混合物在恒压 120 V 下进行 SDS-PAGE 电泳 2 h,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。利用 Anti-FLAG 检测目的蛋白的表达情况,以 Anti-Actin 为阳性对照。

1.5 *PePEPKR2* 的亚细胞定位

将空载体 pCAMBIA-1300-GFP 进行双酶切,同时以 *PePEPKR2* 的 CDS 序列为模板进行 PCR 扩增,回收并纯化酶切产物和 PCR 产物,将回收产物连接后转化至 DH5 α 感受态细胞中,在含有卡那霉素的 LB 固体培养基上筛选阳性单克隆,进行菌液 PCR 并测序鉴定。选取测序正确的菌落,扩繁后提取重组质粒转化到 GV3101 农杆菌感受态细胞中,活化后涂布在含有利福平和卡那霉素的 LB 固体培养基上,筛选转化成功的农杆菌并扩繁。将重悬后的菌液瞬时转化至烟草叶片,室温暗培养 2 d,使用徕卡共聚焦显微镜观察 GFP 荧光。同时利用细胞核染料(DAPI)对烟草叶片进行染色,观察蓝色荧光,确定 *PePEPKR2* 的亚细胞定位。

1.6 镉胁迫下转基因拟南芥的镉耐受性检测

1.6.1 根长

将筛选后的 T₃ 代拟南芥各株系种子进行表面灭菌,并分别播种在含有 0、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 的 1/2MS 固体培养基上。4 ℃ 低温层积处理 2 d 后,将培养基垂直放置于培养间培养 7 d,拍照并使用 ImageJ 软件测量统计拟南芥幼苗的根长。

1.6.2 存活率

选取 T₃ 代拟南芥各株系种子进行表面灭菌并分别播种在含 0、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 的 1/2 MS 固体培养基上。每个株系播 45 粒种子,各处理均做 3 组重复。4 ℃ 低温层积处理 2 d,置于培养间水平培养 9 d,统计幼苗存活率并拍照记录。

1.6.3 相对电导率

将 T₃ 代拟南芥各株系的种子进行表面灭菌并分别播种于 0 和 125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 的 1/2MS 培养基上。生长 7 d 后每组取 5 棵完整拟南芥幼苗,3 组重

复,加入去离子水,室温放置 24 h 后测定溶液的电导率,记为 EC1,沸水浴 30 min,使电解质完全泄露,冷却至室温后测定电导率,记为 EC2;细胞膜的透性用相对电导率(EL)来表征,EL 为 EC1 与 EC2 的比值乘以 100%。

1.6.4 鲜质量

将筛选后的 T₃ 代拟南芥各株系种子进行表面灭菌,并分别播种在含 0 和 125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 的 1/2MS 培养基上,4 ℃ 低温层积 2 d 后置于培养间培养 7 d。每个株系每种处理各取 35 棵幼苗,吸干表面水分进行质量测定,记录鲜质量,每组 3 个重复。

1.7 拟南芥根尖 Cd²⁺ 离子流测定

各株系拟南芥在 0 和 125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 培养基上生长 7 d 后,利用非损伤微测系统检测各株系拟南芥距离根尖 300 μm 处根表面的 Cd²⁺ 离子流。

1.8 拟南芥根尖 Cd²⁺ 和 H₂O₂ 含量测定

将分别生长在 0 和 125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 的 1/2MS 培养基上 7 d 的各株系幼苗转移至含有 10 $\mu\text{mol/L}$ Cd²⁺ 特异性荧光探针的溶液中,置于黑暗环境下孵育 2 h,使用徕卡共聚焦显微镜检测 Cd²⁺ 荧光,激发波长为 522 nm,发射波长为 578 nm,观察前需用 ddH₂O 清洗 3 次,相对荧光强度通过 ImageJ 计算。每组设置 3 个重复。检测 H₂O₂ 含量时,将幼苗在含有 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 特异性荧光探针的溶液中孵育 40~50 min,激发波长为 488 nm,发射波长为 510~530 nm。

1.9 拟南芥的抗氧化酶的活性和基因表达量测定

将筛选得到的 T₃ 代拟南芥各株系种子播种于 0、125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 的 1/2MS 培养基上,生长 7 d 后取 0.1 g 样品,加入液氮研磨成粉末,测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性。使用 TRIzol 法提取总 RNA 并反转录成 cDNA,以拟南芥 *AtACTIN2* 基因为内参,通过 RT-qPCR 检测 *AtSOD*、*AtPOD*、*AtCAT* 基因的表达水平。每种处理 3 组重复,相关引物序列见表 1。

1.10 镉胁迫下土壤培养

在超净工作台中将灭菌后的种子播在 1/2MS 固体培养基上。4 ℃ 低温层积处理 2 d 后转移至光照培养间生长 9 d,将正常生长含有 4 片嫩叶的拟南芥幼苗移栽至土壤中(泥炭土、营养土、蛭石质量比为 1:1:1)继续培养。25 d 后挑选土壤中长势相近的拟南芥,每个株系 3 个重复,分为对照组和实验组,对照组正常浇水,实验组用含有 125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ 的溶液进行处理,每周浇 2 次,处理 15 d 后,测定各株系 Cd²⁺ 含量和其他生理指标,并拍照记录处理前后

各株系拟南芥生长状态。

1.10.1 拟南芥植株 Cd^{2+} 含量测定

将根和叶分开取样洗净,在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下干燥 3 d 后磨成粉末状。每 1 g 干质量样品加入 25 mL HNO_3 和 5 mL HClO_4 ,使用微波消解仪消解完全,稀释过后使用电感耦合等离子体发射光谱仪测定 Cd^{2+} 含量。

1.10.2 拟南芥生理参数的测定

使用便携式叶绿素仪测定叶绿素相对含量,用 SPAD 值表示。将土培后的拟南芥整株置于黑暗条件下处理 30 min 后,使用便携式荧光仪测定叶片的叶绿素荧光参数,包括最大光化学效率(F_v/F_m)、实际光化学效率(YII)和相对电子传递速率(ETR)^[31]。采用便携式光合测量仪测定各株系拟南芥的光合参数,包括净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)、气孔导度(G_s)和胞间二氧化碳浓度(C_i)。以上各生理参数均在拟南芥培养环境中原位测 3~5 次,每个株系 3 个生物学重复,取平均值。

1.11 实验数据分析

使用 Excel、MEGA 7.0、DNAMAN、ImageJ 8.0 软件进行实验数据的处理和统计。使用 Graphpad Prism8 绘图。采用 SPSS 25.0 进行单因素方差分析,显著性水平均小于 0.05。

2 结果与分析

2.1 *PePEPKR2* 序列分析

从胡杨中克隆出 *PEPKR2* 的 CDS 序列,该序列编码 469 个氨基酸。将胡杨 *PEPKR2* 氨基酸序列与银白杨(*Populus alba*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、紫柳(*Salix purpurea*)、蓖麻(*Ricinus communis*)、巴西橡胶(*Hevea brasiliensis*)、麻风树(*Jatropha curcas*)、可可(*Theobroma cacao*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、枣(*Ziziphus jujuba*)、苹果(*Malus domestica*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)和水稻(*Oryza sativa*)的 *PEPKR2* 同源蛋白进行多重序列比对分析。胡杨 *PEPKR2* 在进化过程中比较保守,与其他物种的 *PEPKR2* 同源性保持在 54.55%~99.15% 之间(图 1A)。系统发育分析结果表明,胡杨 *PEPKR2* 与毛果杨 *PEPKR2* 亲缘关系最为密切(图 1B)。

2.2 镉胁迫下 *PePEPKR2* 在胡杨中的表达模式

胡杨根系中 *PEPKR2* 的表达量在处理 0 h(对照)最高,随着处理时间增加,该基因的表达量显著降低,在处理 12 h 时有所回升,但仍低于 0 h 的表达量(图 2A)。胡杨茎中 *PePEPKR2* 的表达量呈现先下降后上升后下降最后回升的趋势,在处理 6 h 时升高到最大值,显著高于对照,到 48 h 时恢复到初

始状态,与对照无显著差异(图 2B)。胡杨叶中 *PePEPKR2* 的表达量总体上呈现先上升后下降的趋势,处理 12 h 时达到最低值,显著低于对照,随后恢复至初始值,与对照无显著差异(图 2C)。

2.3 *PePEPKR2* 转基因拟南芥的筛选与鉴定

DNA 鉴定结果(图 3A)显示:目的片段大小为 1 410 bp,野生型(WT)没有条带,其他株系在 1 000~2 000 bp 之间有单一条带。半定量结果显示:6 个过表达株系均扩增出目的片段(200 bp 左右),所有株系拟南芥内参基因 *AtActin2* 表达一致,且 WT 和转空载(VC)株系中没有检测到目的基因 *PePEPKR2* 的条带(图 3B)。RT-qPCR 结果显示, *PePEPKR2* 在 OE6 中的表达量与 WT 没有显著差异,在其余 5 个株系中的表达量均显著升高(图 3C)。蛋白免疫印迹实验结果表明,所有转基因株系都可表达出 *PePEPKR2* 蛋白,在 *PePEPKR2*-OE1、*PePEPKR2*-OE7 和 *PePEPKR2*-OE11 株系中表达量相对更高(图 3D)。基于此,选择以上 3 个过表达株系用于后续实验。

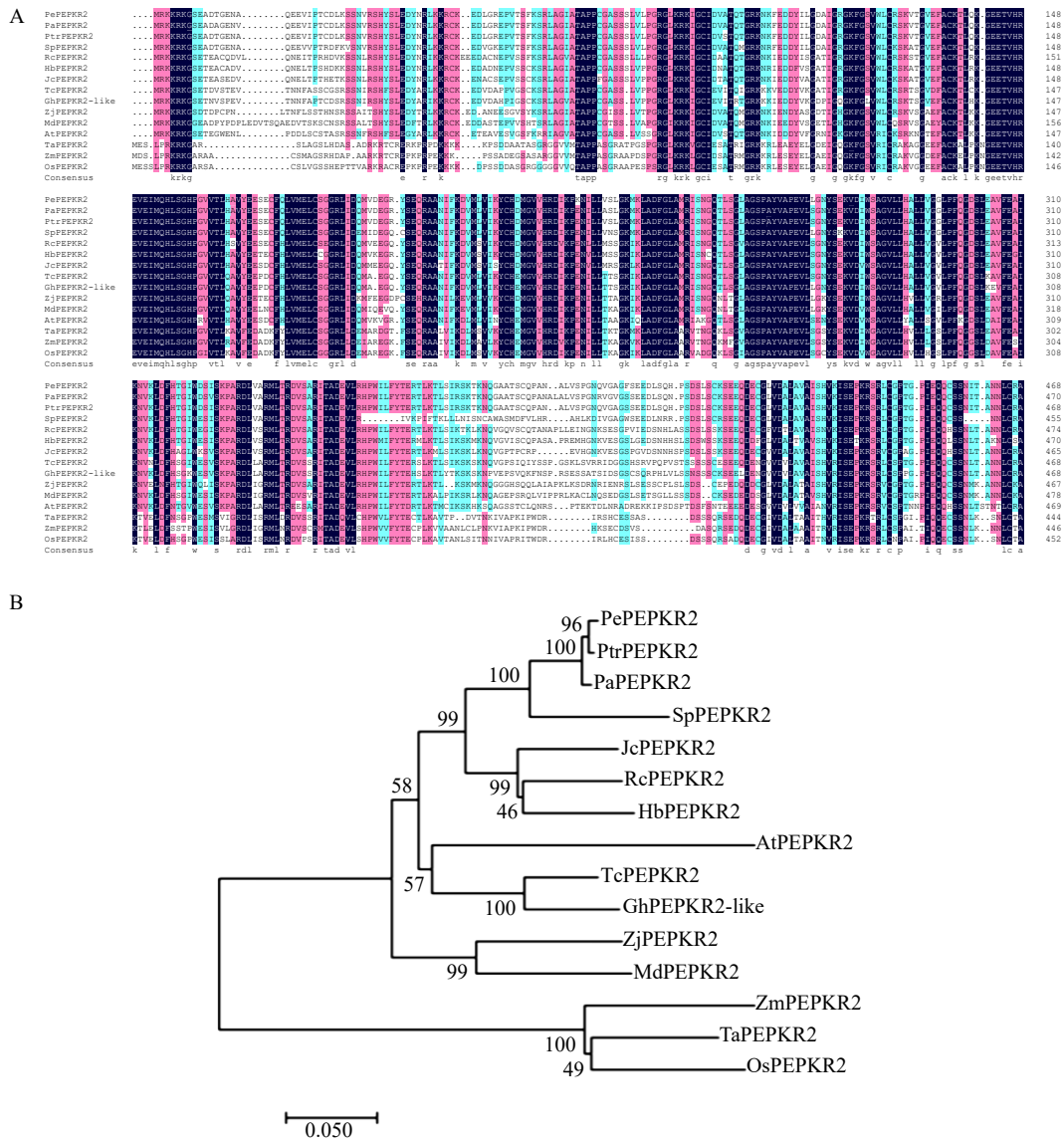
2.4 *PePEPKR2* 的亚细胞定位

在共聚焦显微镜下观察绿色荧光在烟草叶肉细胞内的分布情况,转空载体 GFP 的绿色荧光分布在细胞核与细胞质中,而 *PePEPKR2*-GFP 融合蛋白的荧光信号定位于细胞核中;用细胞核特异性荧光染料对细胞核进行标记,在叠加场中, *PePEPKR2*-GFP 绿色荧光与 DAPI 蓝色荧光重叠,进一步证明 *PePEPKR2* 蛋白定位于细胞核中(图 4)。

2.5 镉胁迫下各株系拟南芥的镉耐受性分析

对照组($0\text{ }\mu\text{mol/L CdCl}_2$)各株系拟南芥的根生长良好且无显著差异, CdCl_2 处理后,各株系拟南芥根长均受到抑制,镉处理浓度越高,抑制程度更明显(图 5A)。其中,过表达 *PePEPKR2* 的拟南芥株系的主根长度均显著小于 WT 和 VC,说明过表达 *PePEPKR2* 拟南芥的根生长受到更加强烈的抑制(图 5B)。

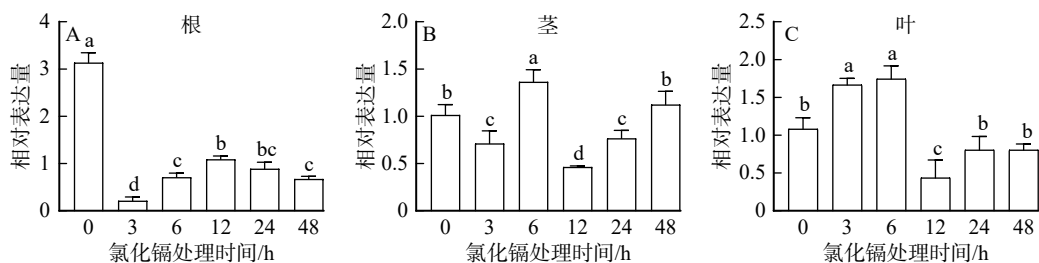
对照组各株系拟南芥生长正常且没有显著性差异,随着 CdCl_2 处理浓度的增加,叶片变小颜色更黄,受抑制程度不断增加(图 5C)。当处理浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,过表达株系的存活率略低于 WT 和 VC,但没有显著性差异;当处理浓度为 $125\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,各株系存活率相较于对照组明显下降,但过表达株系与 WT 和 VC 的差异不显著;当处理浓度为 $150\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,WT 和 *PePEPKR2*-OE1 的存活率受影响最大,分别降低到 62% 和 53%,VC 保持较高的存活率(82%),其余过表达株系降低到 73%~75%(图 5D)。结果表明在镉胁迫下,过表达 *PePEPKR2* 拟南芥株系幼苗的存活率相对受到更为严重的影响。



Pe. 胡杨; Ptr. 毛果杨; Pa. 银白杨; Sp. 紫柳; Jc. 麻风树; Rc. 蓖麻; Hb. 巴西橡胶; Tc. 可可; Gh. 陆地棉; Zj. 枣; Md. 苹果; At. 拟南芥; Zm. 玉米; Ta. 小麦; Os. 水稻

图1 PEPKR2 多重序列比对(A)与系统发育分析(B)

Fig. 1 Multiple sequence alignment of PEPKR2 (A) and phylogenetic analysis (B)



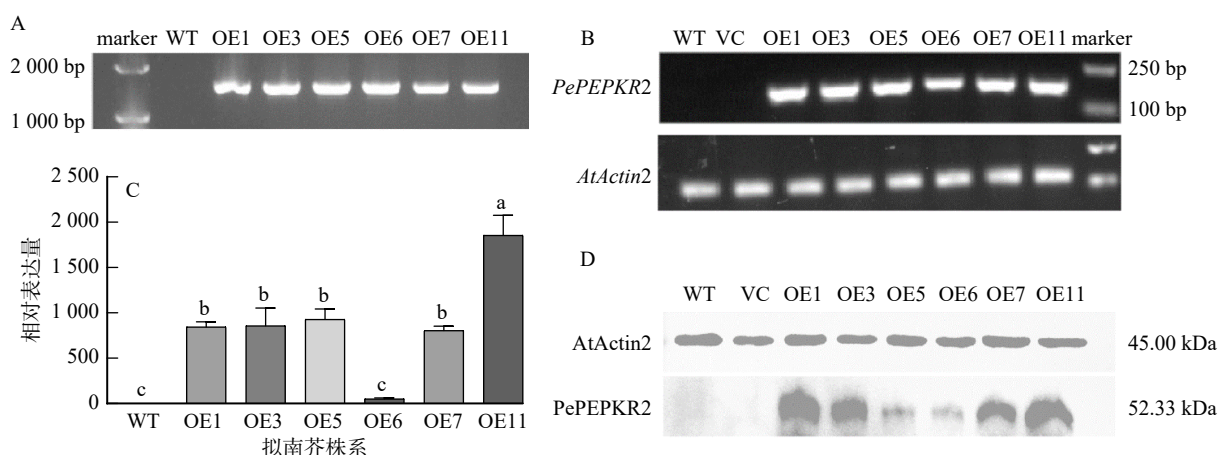
不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图2 镉胁迫下胡杨根、茎、叶中 *PePEPKR2* 表达量的变化

Fig. 2 Changes of *PePEPKR2* expression in roots, stems and leaves of *Populus euphratica* under cadmium stress

125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理后, 各株系拟南芥的相对电导率相对于对照组均有不同程度的上升, 其中 WT 和 VC 的相对电导率分别升高了 13.44%、14.23%, *PePEPKR2*-OE1、*PePEPKR2*-OE7 和 *PePEPKR2*-

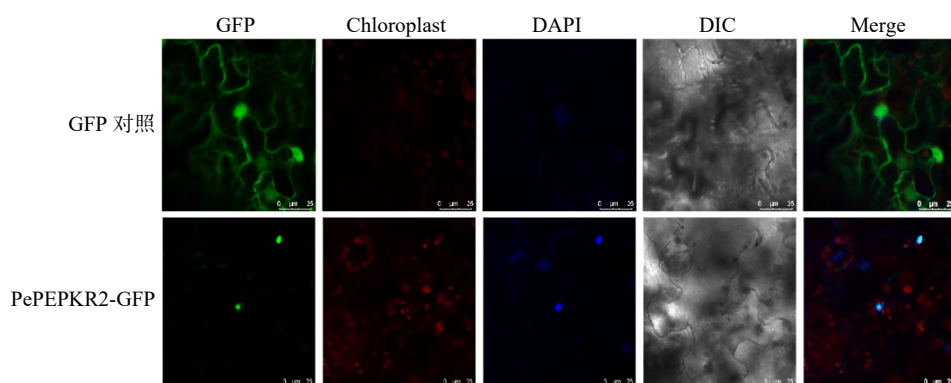
OE11 转基因株系的电导率分别升高了 52.61%、45.52% 和 27.91%, 上升幅度明显大于 WT 和 VC (图 5E)。这说明过表达拟南芥株系在镉胁迫条件下细胞膜受损程度更大。



WT. 野生型; VC. 空载对照; OE. 过表达株系。下同。

图 3 各拟南芥株系 DNA 鉴定 (A)、半定量 PCR (B)、荧光定量 PCR (C) 和蛋白免疫印迹 (D)

Fig. 3 DNA identification (A), semiquantitative PCR assay (B), RT-qPCR (C) and western blotting (D) of different *A. thaliana* lines



GFP 为绿色荧光; Chloroplast 为叶绿体自发荧光; DAPI 为细胞核染料; DIC 为明场; Merge 为叠加场

图 4 *PePEPKR2* 的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of *PePEPKR2*

125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理后, 各株系拟南芥幼苗的鲜质量较对照组显著下降, 其中 *PePEPKR2*-OE1、*PePEPKR2*-OE7 和 *PePEPKR2*-OE11 株系的下降程度显著高于 WT 和 VC, 说明镉胁迫对过表达拟南芥生长的影响更大(图 5F)。

综合以上镉胁迫下各株系耐受性表型分析, 发现过表达 *PePEPKR2* 拟南芥对镉胁迫更加敏感, *PePEPKR2* 负调控拟南芥对镉的耐受性。

2.6 镉胁迫下各株系拟南芥的 Cd^{2+} 含量和 Cd^{2+} 离子流的变化

对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2)各株系拟南芥根尖几乎检测不到荧光信号, 125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理后根细胞中的荧光强度显著增加, 且过表达 *PePEPKR2* 株系中的荧光强度显著高于 WT 和 VC(图 6A)。说明镉处理后, 过表达 *PePEPKR2* 株系根尖细胞积累了更多的 Cd^{2+} 。

对照组各株系的根部几乎检测不到 Cd^{2+} 离子流, 但在 125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理后的拟南芥根部检测到明显的 Cd^{2+} 内流, 且相对于 WT 和 VC, 过表

达 *PePEPKR2* 拟南芥株系根尖的 Cd^{2+} 内流速度明显更快(图 6B), 这表明过表达 *PePEPKR2* 促进了 Cd^{2+} 在拟南芥根尖的吸收与积累。土壤条件下各株系拟南芥根系和叶片中的 Cd^{2+} 含量结果也进一步佐证了这一结论(图 6C、D)。

2.7 镉胁迫下各株系拟南芥幼苗根尖 H_2O_2 含量变化

对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2)所有拟南芥株系根尖的 H_2O_2 荧光强度都很弱且无显著差异。125 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理导致各株系根细胞中荧光强度显著升高, 但过表达 *PePEPKR2* 株系的荧光强度显著高于 WT 和 VC, 表明镉处理后, 过表达株系根细胞积累了更多的 H_2O_2 , 氧化损伤更为严重(图 7)。

2.8 镉胁迫下各株系拟南芥的抗氧化酶活性及抗氧化酶基因表达量的变化

对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2)各拟南芥的抗氧化酶活性无显著性差异; 镉处理后, WT、VC 和过表达 *PePEPKR2* 拟南芥株系的 SOD 和 CAT 活性均呈现上升趋势, 但过表达 *PePEPKR2* 拟南芥株系上升的幅度明显小于 WT 和 VC; POD 的活性在镉胁迫后

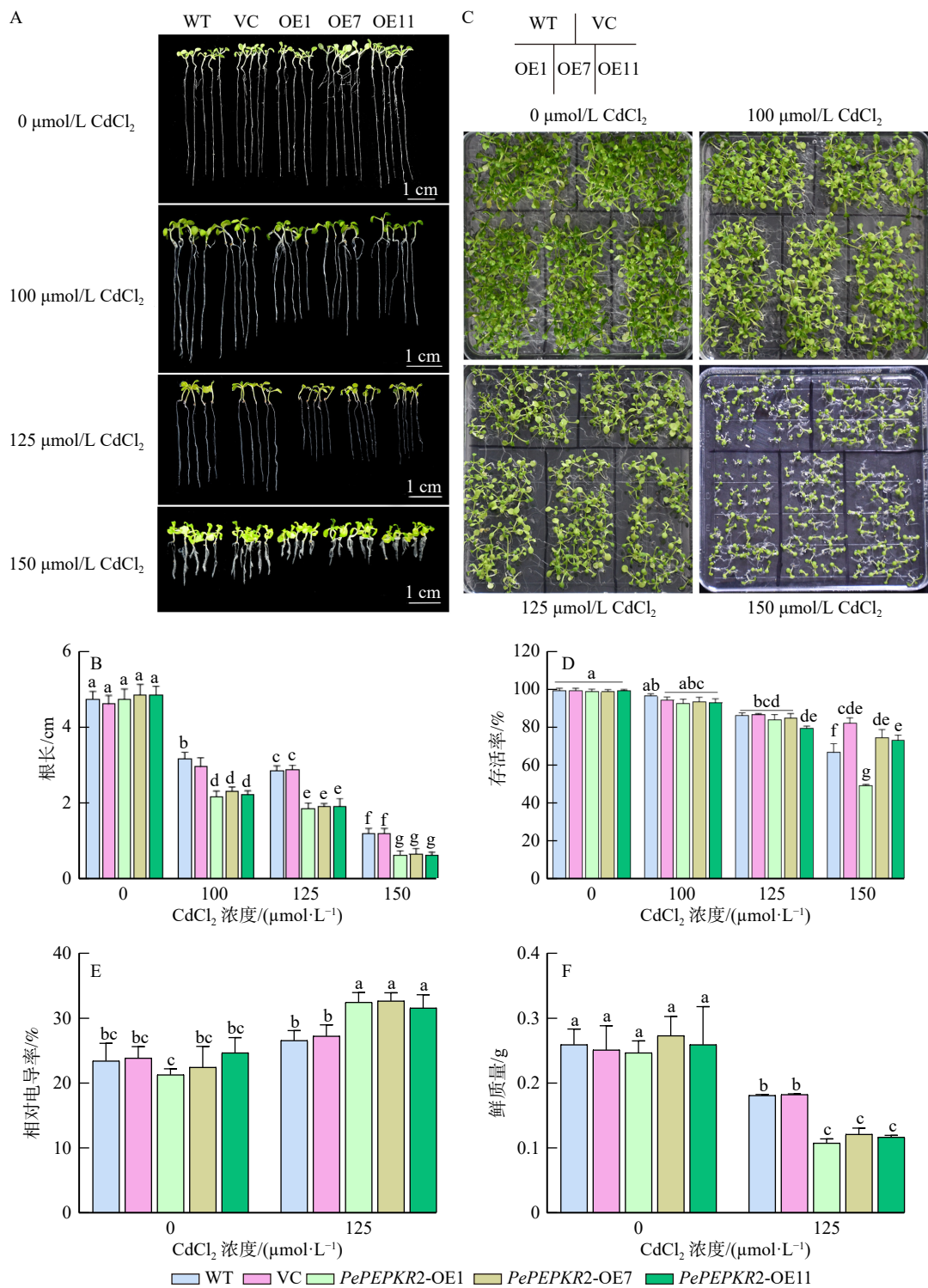


图 5 各株系拟南芥镉耐受性

Fig. 5 Cadmium tolerance of each *A. thaliana* lines

有所降低, 其中 *PePEPKR2*-OE7 下降程度最为明显 (图 8A ~ C)。SOD、CAT 和 POD 酶相关基因的表达量与酶活性总体上变化趋势一致 (图 8D ~ F)。

2.9 镉胁迫下土壤中拟南芥生长状态

在镉处理前, 各株系拟南芥生长状态良好且没有明显区别 (图 9A); 镉处理 15 d 后, 过表达 *PePEPKR2* 拟南芥株系长势明显不如 WT 和 VC, 叶片发黄和萎蔫卷曲的现象更严重, 且植株矮化 (图 9B)。

2.10 镉胁迫下拟南芥叶绿素含量、叶绿素荧光参数和光合参数的影响

对照组(0 $\mu\text{mol/L CdCl}_2$)中, 除 *PePEPKR2*-OE11 株系中叶绿素含量略高, 其余株系叶绿素含量无明显差异。镉处理之后, 所有拟南芥株系的叶绿素含量均明显下降, 且 WT 和 VC 的下降幅度明显小于过表达 *PePEPKR2* 拟南芥株系 (图 10A)。这表明镉胁迫对过表达 *PePEPKR2* 株系叶绿素含量影响更大。

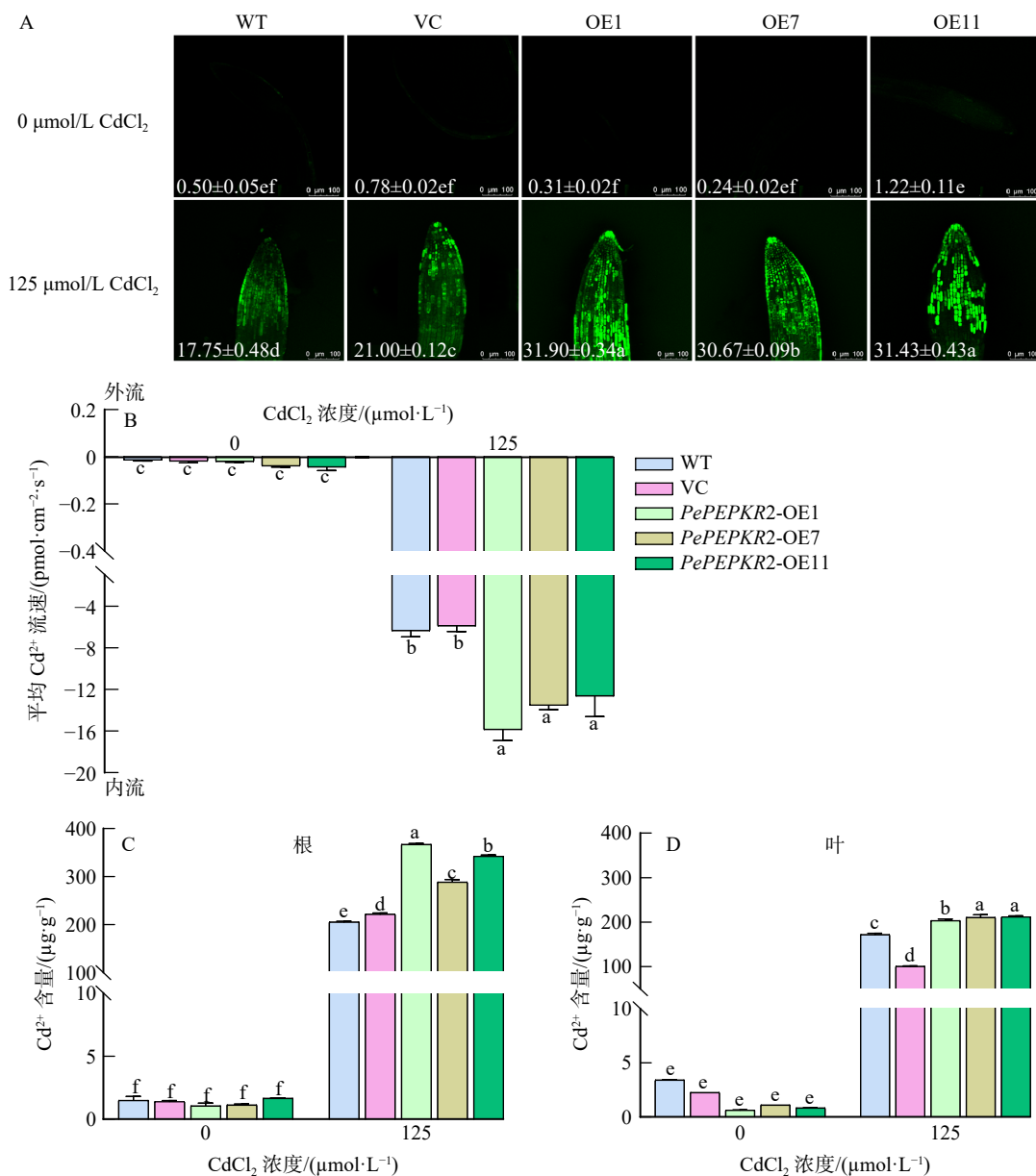


图 6 镉胁迫下各株系拟南芥 Cd²⁺ 荧光强度(A)、Cd²⁺ 流速(B)和 Cd²⁺ 含量(C~D)

Fig. 6 Cd²⁺ fluorescence intensity (A), Cd²⁺ flux (B) and Cd²⁺ content (C~D) of different *A. thaliana* lines under CdCl₂ stress

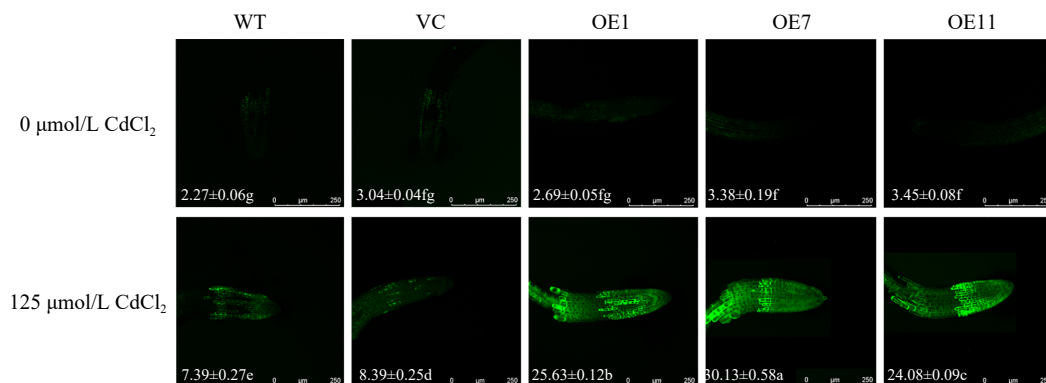


图 7 镉胁迫下拟南芥各株系根细胞 H₂O₂ 荧光强度

Fig. 7 H₂O₂ fluorescence intensity in different *A. thaliana* root cells under CdCl₂ stress

对照组各株系拟南芥的荧光参数(F_v/F_m 、Y II 和 ETR)均无显著性差异, 镉胁迫处理后均呈下降趋

势, 且 *PePEPKR2* 过表达株系的 3 个荧光参数的下降幅度均高于 WT 和 VC(图 10B~D)。这表明镉胁迫

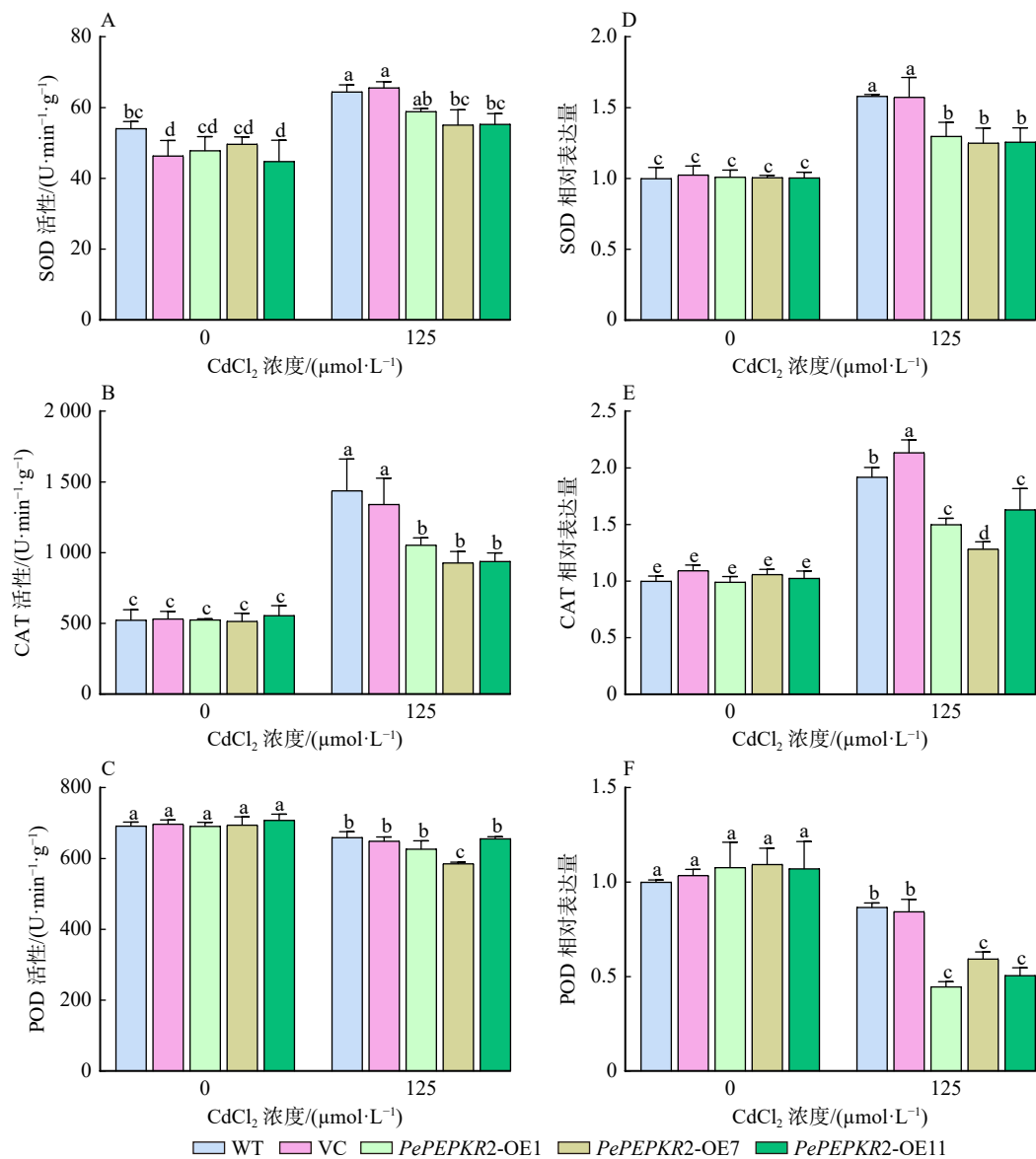


图 8 镉胁迫下各株系拟南芥抗氧化酶活性(A~C)及其相关基因表达量(D~F)
Fig. 8 Activity (A–C) and transcription (D–F) of antioxidant enzyme under CdCl₂ stress in *A. thaliana*

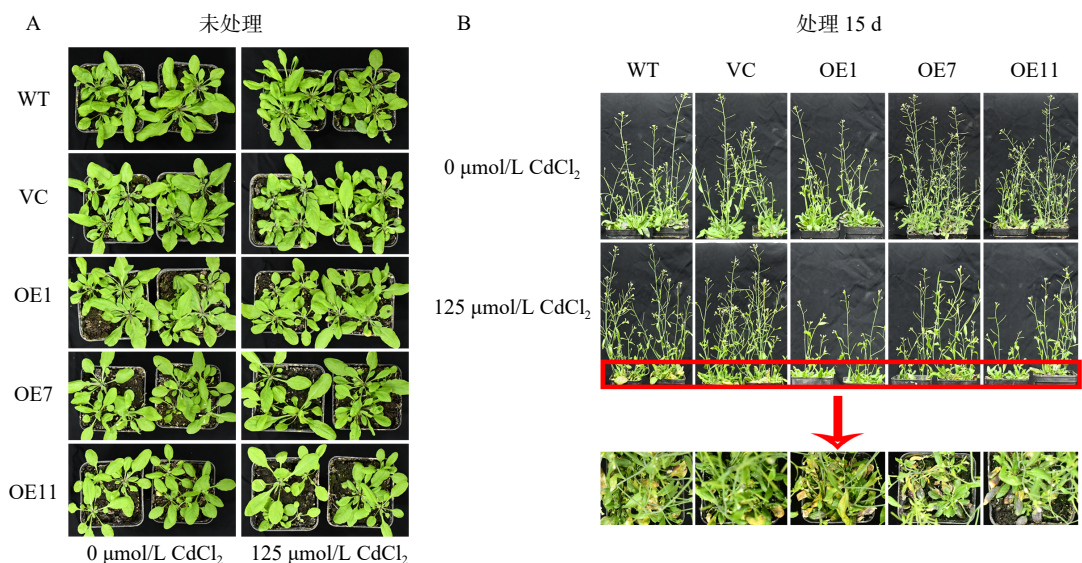
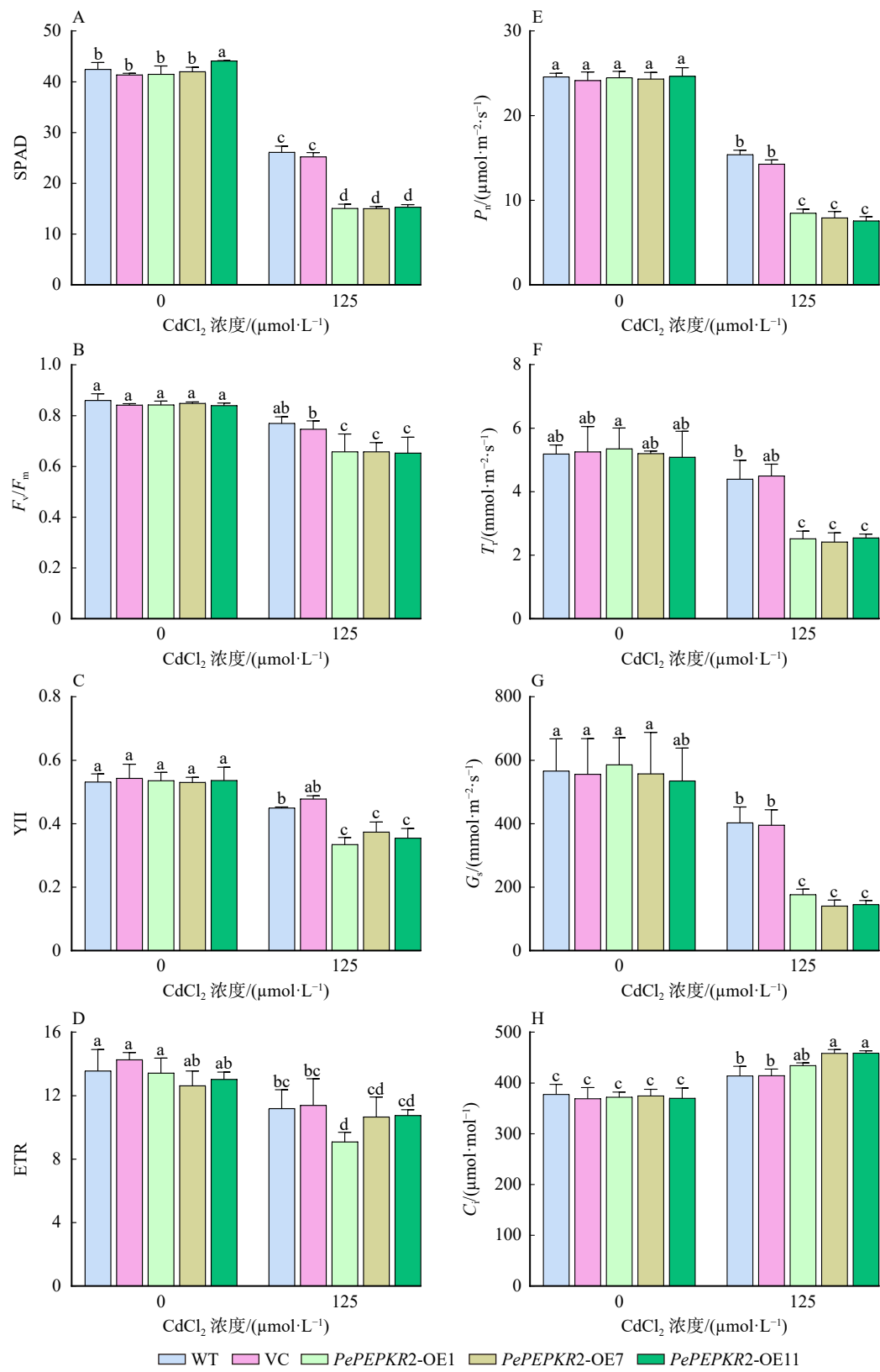


图 9 各株系拟南芥在镉处理前后的生长状态
Fig. 9 Growth state of different *A. thaliana* lines before and after cadmium treatment



SPAD. 叶绿素含量; F_v/F_m . 最大光化学效率; ETR. 相对电子传递效率; YII. 实际光化学效率; P_n . 净光合速率; T_r . 蒸腾速率; G_s . 气孔导度; C_i . 胞间二氧化碳浓度

图 10 镉胁迫下拟南芥各株系的叶绿素含量(A)、叶绿素荧光参数(B~D)和光合参数(E~H)

Fig. 10 Chlorophyll content (A), chlorophyll fluorescence parameters (B~D) and photosynthetic parameters(E~H) in different *A. thaliana* lines under CdCl₂ stress

迫对过表达 *PePEPKR2* 株系光反应过程的抑制作用更为显著。

对照组各株系拟南芥的各项光合参数均无明显差异; 而镉处理 15 d 后各株系拟南芥的净光合速率

(P_n)、蒸腾速率(T_r)和气孔导度(G_s)均有所下降,且 *PePEPKR2* 过表达株系的这3个光合参数的下降幅度均显著高于 WT 和 VC(图 10E ~ G)。而胞间二氧化碳浓度(C_i)经镉处理后明显升高,且过表达 *PePEPKR2* 株系的升高幅度显著高于 WT 和 VC(图 10H)。这些结果表明,相比于 WT 和 VC,过表达 *PePEPKR2* 株系的光合作用和碳同化作用受到了镉胁迫更严重的抑制。

3 讨 论

在工业发展与城市扩张的进程中,人类活动如矿业开采以及农药的过度使用等,导致大量重金属镉渗入土壤环境,进而引发了严重的镉污染问题^[32]。调查报告显示,我国超过 7.0% 的土壤样本中镉含量超过了环境质量标准,对农林产品质量安全和人体健康构成了严重威胁,因此,修复镉污染的土壤刻不容缓^[33]。植物修复具有效率高和对环境友好等特点,因此,探究植物响应镉胁迫的耐性机制,对增强植物修复能力、减缓土壤镉污染具有重要的理论和现实意义。

本研究揭示了胡杨 *PePEPKR2* 基因在镉胁迫响应中的功能及其作用机制。镉处理后,胡杨 *PePEPKR2* 基因表达量发生了变化,表明 *PePEPKR2* 能够响应镉胁迫。*PePEPKR2* 在胡杨根、茎、叶中的差异表达(图 2)暗示其响应机制可能受组织特异性调控网络的驱动。这种差异表达同样存在于实验室前期报道的 *PeCPK21* 基因在胡杨根和叶的镉响应模式中^[26]。*PePEPKR2* 的亚细胞定位结果(图 4)表明,胡杨不同组织可能通过激活整合不同的转录因子和信号通路来协调基因表达,进而响应环境胁迫。

为进一步解析 *PePEPKR2* 的功能机制,将该基因在模式植物拟南芥中过表达,探究 *PePEPKR2* 对拟南芥耐镉性的影响。在镉胁迫环境下,植物的生长发育会受到显著抑制,主要表现为根系活力下降、细胞生长受阻、幼苗生长迟缓,植株整体呈现矮小状态,叶片出现枯黄、变小以及卷曲等现象^[34]。本研究结果表明, *PePEPKR2* 的过表达加剧了镉胁迫对过表达 *PePEPKR2* 拟南芥生长的抑制作用,具体表现为根长、存活率和鲜质量的下降,相对电导率(细胞膜受损伤程度)的上升(图 5),以及对土培拟南芥生长的严重抑制(图 9),从而削弱了转基因拟南芥的耐镉性。尽管已有研究初步揭示了 *PEPKR* 在植物抗逆性中的作用,例如在天蓝苜蓿(*Medicago lupulina*)中 *PEPKRs* 能够响应盐胁迫和水分胁迫^[18],以及 *TaPEPKR2* 可以增强小麦和拟南芥对高温和脱水胁迫的耐受能力^[19]。但尚未见 *PEPKR* 与植物耐

镉性相关的研究。因此,本研究首次证实了 *PePEPKR2* 能够提高拟南芥对镉胁迫的耐受性。

植物根系作为抵御镉胁迫的第一道屏障,主要通过减少根系对镉的吸收以及限制镉向地上部分的转运,来降低镉对植物的毒害^[35]。本研究利用非损伤微测技术和 Cd^{2+} 特异性探针分别动态监测拟南芥幼苗根尖的稳态 Cd^{2+} 离子流,检测根尖 Cd^{2+} 含量。镉处理之后,转基因拟南芥根尖 Cd^{2+} 内流速度显著加快,根尖 Cd^{2+} 含量也显著高于 WT 和 VC(图 6A ~ B),这表明过表达 *PePEPKR2* 增强了拟南芥根尖细胞对 Cd^{2+} 的吸收和积累能力。土培拟南芥不同组织镉积累的定量分析结果进一步证实了 *PePEPKR2* 对镉积累的促进作用(图 6C ~ D)。*PePEPKR2* 可能通过调控离子通道活性或金属转运蛋白表达,介导植物对镉的吸收。另外有研究^[1]发现,植物对重金属的耐受性与积累能力之间没有直接的关联,某些种群可能积累了大量的重金属,但不一定表现出较高的耐受性。过表达 *PePEPKR2* 促进了 Cd^{2+} 的吸收和积累,但却加强了对镉胁迫的敏感性。植物中没有专门的镉转运通道,只能共用其他必需金属元素(锰^[36]、铁^[37]、锌^[38])转运蛋白进行迁移。这种竞争性抑制通过双重拮抗效应破坏离子稳态:一方面,镉与必需金属离子竞争导致微量元素亏缺;另一方面, Cd^{2+} 与胞内蛋白活性中心结合引起功能紊乱。上述离子失衡机制与转基因拟南芥耐镉性下降表型高度一致,可能是 *PePEPKR2* 负调控镉耐受性的关键枢纽。

镉胁迫导致植物出现氧化应激,促使植物合成抗氧化酶来清除活性氧,进而减轻对细胞的损伤^[39]。在本研究中镉处理后,拟南芥根尖的 H_2O_2 含量显著上升,且转基因株系的 H_2O_2 含量显著高于 WT 和 VC(图 7)。这一结果表明,过表达 *PePEPKR2* 基因显著加剧了镉胁迫诱导的根尖活性氧积累,暗示该基因可能通过调控氧化还原稳态,加重植物细胞的氧化损伤。进一步研究发现,镉处理导致拟南芥幼苗的抗氧化酶活性发生显著变化:SOD 和 CAT 活性显著升高,但转基因拟南芥的酶活性上升幅度不及 WT 和 VC(图 8A ~ B);值得注意的是,POD 活性在镉处理后显著下降,且转基因株系的下降程度显著大于 WT 和 VC 株系(图 8C)。POD 酶活性的下降可能与镉进入细胞后替换铁离子,从而抑制 POD 活性有关^[40]。这几类抗氧化酶基因的表达量变化趋势与酶活性变化趋势一致(图 8D ~ F),进一步证明了过表达 *PePEPKR2* 对镉胁迫下转基因株系维持活性氧平衡的不利影响。综上所述, *PePEPKR2* 的过表达可能通过抑制抗氧化酶系统的应激性上调,加剧镉胁迫诱导的氧化损伤,进而负调控转基因拟南芥对

镉胁迫的耐受性。

镉会阻碍叶绿素的生物合成,破坏叶绿体结构,进而影响到植物的光合作用^[41]。本研究发现,镉处理导致土培转基因拟南芥的叶绿素含量显著低于WT和VC(图10A)。这一发现表明,*PePEPKR2*的过表达显著提高了拟南芥叶绿体系统对镉胁迫的敏感性。镉的毒性导致活性氧的过量产生,进一步影响植物的光合作用^[42]。为了评估镉胁迫对拟南芥光合系统的影响,进一步测定了镉处理后拟南芥的叶绿素荧光参数和光合参数。结果表明,镉处理过后拟南芥的叶绿素荧光参数(F_v/F_m 、YII、ETR)(图10B~D)和光合参数(P_n 、 T_r 、 G_s)(图10E~G)均呈下降趋势,而 C_i 呈上升趋势(图10H)。这一结果与甜瓜(*Cucumis melo*)^[43]和紫苏(*Perilla frutescens*)^[44]在镉处理后的各项参数变化趋势相似。转基因拟南芥的各项参数均不如WT和VC,表明过表达*PePEPKR2*导致光系统II(PSII)反应中心受到更为严重的损伤,光合同化能力也受到更为严重的抑制。综上所述,*PePEPKR2*的过表达显著增强了拟南芥光合系统对镉胁迫的敏感性。推测*PePEPKR2*通过转录因子调控抗氧化酶基因、光合作用相关的酶基因、叶绿素合成以及气孔运动信号通路相关的基因的表达,最终使过表达拟南芥株系的光合作用和碳同化能力减弱,负调控对镉的耐受性。

综上所述,过表达*PePEPKR2*增强了拟南芥对镉胁迫的敏感性,主要体现在对离子平衡、活性氧平衡和光合作用的不良影响,从而负调控拟南芥对镉的耐受性。本研究从分子和生理水平揭示了镉胁迫对过表达*PePEPKR2*拟南芥的影响,为进一步揭示胡杨响应镉胁迫的机制提供线索和思路。

4 结 论

本研究通过在拟南芥中过表达胡杨的*PePEPKR2*基因,探讨*PEPKR*在胡杨耐镉性中的功能,以及*PePEPKR2*在镉胁迫条件下的生理和分子调控机制。研究结论如下。

*PePEPKR2*在进化过程中表现出较高的保守性,与毛果杨的同源基因*PEPKR2*具有最近的遗传距离;其次,在拟南芥中过表达*PePEPKR2*显著增强了植株对镉胁迫的敏感性,同时削弱了镉胁迫下拟南芥的离子平衡能力、活性氧平衡能力,以及光合和碳同化能力。这些结果表明,*PePEPKR2*在镉胁迫响应中具有重要的负调控作用。

本研究不仅为提升植物镉污染修复能力提供了理论支持和基因资源,还为农林业生产与环境保护奠定了重要的理论基础。未来,我们可进一步深入

研究*PePEPKR2*调控植物耐受镉胁迫的分子机制。例如,通过在杨树中同源过表达该基因,筛选并验证与其相互作用的关键蛋白,寻找其下游靶蛋白及相关基因;同时,利用*PePEPKR2*突变体回补实验进一步验证其功能。通过这些研究,最终阐明*PePEPKR2*响应镉胁迫的分子机制和信号调控网络,为植物抗逆性研究开辟新的视角。在此基础上,有望培育出更具抗镉能力的杨树新品种,从而有效降低镉对环境 and 人体健康的危害。

参 考 文 献

- [1] Baker A J M, Reeves R D, Hajar A S M. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae)[J]. New Phytologist, 1994, 127(1): 61–68.
- [2] Luo Z B, He J L, Polle A, et al. Heavy metal accumulation and signal transduction in herbaceous and woody plants: paving the way for enhancing phytoremediation efficiency[J]. Biotechnology Advances, 2016, 34(6): 1131–1148.
- [3] Salt D E, Blaylock M, Kumar N P, et al. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants[J]. Biotechnology (Nature Publishing Company), 1995, 13(5): 468–474.
- [4] Mehra R K, Tripath R D. Environmental pollution and plant responses[M]. Boca Raton: CRC Press, 1999.
- [5] Hrabak E M, Chan C W, Gribskov M, et al. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases[J]. Plant Physiology, 2003, 132(2): 666–680.
- [6] Wu P, Wang W, Duan W, et al. Comprehensive analysis of the CDPK-SnRK superfamily genes in Chinese cabbage and its evolutionary implications in plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 162.
- [7] Hanks S K, Hunter T. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification[J]. The FASEB Journal, 1995, 9(8): 576–596.
- [8] Saijo Y, Hata S, Kyoizuka J, et al. Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants[J]. The Plant Journal, 2000, 23(3): 319–327.
- [9] Tao X C, Lu Y T. Loss of *AtCRK1* gene function in *Arabidopsis thaliana* decreases tolerance to salt[J]. Journal of Plant Biology, 2013, 56(5): 306–314.
- [10] Ding Y L, Yang H, Wu S F, et al. CPK28-NLP7 module integrates cold-induced Ca^{2+} signal and transcriptional reprogramming in *Arabidopsis*[J]. Science Advances, 2022, 8(26): eabn7901.
- [11] Yue J Y, Jiao J L, Wang W W, et al. The calcium-dependent protein kinase TaCDPK27 positively regulates salt tolerance in

- wheat[J]. *International Journal of Molecular Science*, 2022, 23(13): 7341.
- [12] Zhao Y L, Du H W, Wang Y K, et al. The calcium-dependent protein kinase ZmCDPK7 functions in heat-stress tolerance in maize[J]. *Journal of Integrative Plant*, 2021, 63(3): 510–527.
- [13] Davletova S, Mészáros T, Miskolczi P, et al. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52(335): 215–221.
- [14] Li J, Wang X Q, Watson M B, et al. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase[J]. *Science*, 2000, 287: 300–303.
- [15] Wang C, Liu Y, Li S S, et al. Insights into the origin and evolution of the plant hormone signaling machinery[J]. *Plant Physiology*, 2015, 167(3): 872–886.
- [16] Yu X, Takebayashi A, Demura T, et al. Differential expression of poplar sucrose nonfermenting1-related protein kinase 2 genes in response to abiotic stress and abscisic acid[J]. *Plant Research*, 2017, 130(5): 929–940.
- [17] Agetsuma M, Tsuchida Y, Imanari E. Regulatory phosphorylation of PEP carboxylase (PEPC) in C4 photosynthesis: redox regulation of a cytosolic protein kinase (PK) activity in vivo[J]. *Plant and Cell Physiology Supplement*, 2004, 45: 506.
- [18] Zhang X M, Liu L X, Su Z M, et al. Expression analysis of calcium-dependent protein kinases (CDPKs) superfamily genes in *Medicago lupulina* in response to high calcium, carbonate and drought[J]. *Plant and Soil*, 2019, 441(1/2): 219–234.
- [19] Zang X S, Geng X L, He K X, et al. Overexpression of the Wheat (*Triticum aestivum* L.) *TaPEPKR2* gene enhances heat and dehydration tolerance in both wheat and *Arabidopsis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1710.
- [20] Polle A, Chen S L. On the salty side of life: molecular, physiological and anatomical adaptation and acclimation of trees to extreme habitats[J]. *Plant Cell and Environment*, 2015, 38(9): 1794–1816.
- [21] Polle A, Klein T, Kettner C. Impact of cadmium on young plants of *Populus euphratica* and *P. × canadensis*, two poplar species that differ in stress tolerance[J]. *New Forests*, 2013, 44(1): 13–22.
- [22] Lv F L, Shan Q H, Qiao K, et al. *Populus euphratica* plant cadmium resistance 2 mediates Cd tolerance by root efflux of Cd ions in poplar[J]. *Plant Cell Reports*, 2023, 42(11): 1777–1789.
- [23] Guan J, Yang Y H, Shan Q H, et al. Plant cadmium resistance 10 enhances tolerance to toxic heavy metals in poplar[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2023, 203: 108043.
- [24] 王少杰, 赵楠, 申泽丹, 等. 镉胁迫下 NO 对胡杨细胞 Cd²⁺ 吸收调控机制的研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2015, 37(6): 11–16.
- Wang S J, Zhao N, Shen Z D, et al. Mediation of NO on Cd²⁺ uptake in *Populus euphratica* cells under cadmium stress[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2015, 37(6): 11–16.
- [25] Sun J, Wang R G, Zhang X, et al. Hydrogen sulfide alleviates cadmium toxicity through regulations of cadmium transport across the plasma and vacuolar membranes in *Populus euphratica* cells[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 65: 67–74.
- [26] Yin K X, Zhao R, Liu Z, et al. *Populus euphratica* CPK21 interacts with heavy metal stress-associated proteins to mediate Cd tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Stress*, 2024, 11: 100328.
- [27] Yin K X, Liu Y, Liu Z, et al. *Populus euphratica* CPK21 interacts with NF-YC3 to enhance cadmium tolerance in *Arabidopsis*[J]. *International Journal of Molecular Science*, 2024, 25(13): 7214.
- [28] 安珂悦, 马思圆, 李静, 等. 胡杨 PeMAX2 对拟南芥镉吸收和耐受能力的影响 [J/OL]. *河南农业大学学报*, 2024. [2025–03–24]. DOI: 10.16445/j.cnki.1000-2340.20240527.001.
- An K Y, Ma S Y, Li J, et al. Effects of *Populus euphratica* PeMAX2 on cadmium uptake and tolerance in *Arabidopsis*[J/OL]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2024. [2025–03–24]. DOI: 10.16445/j.cnki.1000-2340.20240527.001.
- [29] 原改换, 欧庸彬, 吴秀丽, 等. 镉胁迫对 3 种杨树光化学生理和抗氧化系统的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(9): 133–137, 202.
- Yuan G H, Ou Y B, Wu X L, et al. Effects of cadmium stress on photochemical physiology and antioxidant system of three poplar species[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(9): 133–137, 202.
- [30] 温馨, 殷可欣, 马思圆, 等. 过表达胡杨 PePKS5 提高拟南芥耐盐性 [J]. *北京林业大学学报*, 2024, 46(2): 62–74.
- Wen X, Yin K X, Ma S Y, et al. Overexpression of *Populus euphratica* PePKS5 enhancing salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2024, 46(2): 62–74.
- [31] 侯思源, 张会龙, 尧俊, 等. 胡杨 PeREM6.5 调控拟南芥水分胁迫耐受机制 [J]. *北京林业大学学报*, 2022, 44(9): 40–51.
- Hou S Y, Zhang H L, Yao J, et al. *Populus euphratica* PeREM6.5 regulating tolerance mechanism to water stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2022, 44(9): 40–51.
- [32] Kaplan O, Ince M, Yaman M. Sequential extraction of cadmium in different soil phases and plant parts from a former industrialized area[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2011, 9: 397–404.
- [33] Meng X X, Li W F, Shen R F, et al. Ectopic expression of IMA small peptide genes confers tolerance to cadmium stress in *Arabidopsis* through activating the iron deficiency response[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 422: 126913.
- [34] 杨红霞, 陈俊良, 刘巍. 镉对植物的毒害及植物解毒机制研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(2): 1–8.
- Yang H X, Chen J L, Liu W. Research progress on cadmium toxicity and detoxification mechanism in plants[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(2): 1–8.

- [35] 王学华, 戴力. 作物根系镉滞留作用及其生理生化机制 [J]. [中国农业科学](#), 2016, 49(22): 4323–4341.
- Wang X H, Dai L. Immobilization effect and its physiology and biochemical mechanism of the cadmium in crop roots[J]. [Scientia Agricultura Sinica](#), 2016, 49(22): 4323–4341.
- [36] Chang J D, Huang S, Yamaji N, et al. OsNRAMP1 transporter contributes to cadmium and manganese uptake in rice[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2020, 43(10): 2476–2491.
- [37] Zhang C, Tong C C, Cao L, et al. Regulatory module WRKY33-ATL31-IRT1 mediates cadmium tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2023, 46(5): 1653–1670.
- [38] Tan L T, Qu M M, Zhu Y X, et al. ZINC TRANSPORTER5 and ZINC TRANSPORTER9 function synergistically in zinc/cadmium uptake[J]. [Plant Physiology](#), 2020, 183(3): 1235–1249.
- [39] He J, Qin J, Long L, et al. Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus × canescens*[J]. [Physiologia Plantarum](#), 2011, 143(1): 50–63.
- [40] Pourrut B, Shahid M, Dumat C, et al. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants[J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011, 213: 113–136.
- [41] 惠俊爱, 党志. 长期镉胁迫对玉米 CT38 生长和生理特性的影响 [J]. [生态环境学报](#), 2013, 22(7): 1226–1230.
- Hui J A, Dang Z. Long-term effects of cadmium stress on the growth and physiological characteristics of maize CT38[J]. [Ecology and Environmental Sciences](#), 2013, 22(7): 1226–1230.
- [42] Kumar A, Kumari N, Singh A, et al. The effect of cadmium tolerant plant growth promoting rhizobacteria on plant growth promotion and phytoremediation: a review[J]. [Current Microbiology](#), 2023, 80(5): 153.
- [43] 张永平, 沈若刚, 姚雪琴, 等. 镉胁迫对甜瓜幼苗抗氧化酶活性和光合作用的影响 [J]. [中国农学通报](#), 2015, 31(34): 82–88.
- Zhang Y P, Shen R G, Yao X Q, et al. Effects of cadmium stress on antioxidant enzyme activities and photosynthesis in melon seedlings[J]. [Chinese Agricultural Science Bulletin](#), 2015, 31(34): 82–88.
- [44] Li S, Yang W, Yang T, et al. Effects of cadmium stress on leaf chlorophyll fluorescence and photosynthesis of *Elsholtzia argyi*: a cadmium accumulating plant[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2015, 17(1–6): 85–92.

(责任编辑 赵田芸
责任编辑 卢孟柱)