

土壤外源 Cd 胁迫对小麦幼苗生长自由基代谢及抗氧化酶活性的影响

林仁漳, 杜文超, 王晓蓉, 郭红岩

(污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 江苏 南京 210093)

摘要:通过盆栽试验研究了土壤外源 Cd 污染胁迫对小麦幼苗生长、Cd 吸收、自由基代谢及抗氧化酶活性的影响。结果表明, 土壤 Cd 含量在 $0\sim 33\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 范围内, 小麦未产生明显的毒害症状, 且 Cd 含量低于 $3.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时促进小麦生长; 随着土壤外源 Cd 浓度的增加, 小麦根系和叶片 Cd 含量显著增加。电子顺磁共振(EPR)研究结果显示, 小麦叶片自由基水平高于根系, 且随 Cd 浓度的变化, 叶片自由基响应比根系更敏感; 与对照相比, Cd 浓度低于 $3.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, Cd 处理使小麦叶片自由基水平降低, 高浓度的 Cd 处理($\geq 3.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 则使小麦叶片自由基水平升高。叶片 SOD、CAT、POD、APX 等抗氧化酶在低于 $3.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 Cd 处理时, 没有明显变化, 但更高浓度的 Cd 处理则诱导酶活性升高, 表明氧化胁迫程度增加。综合生物量、自由基变化及抗氧化酶的响应结果, 初步确定土壤外源 Cd 对小麦幼苗的毒性临界点在 $3.3\sim 10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间。

关键词: Cd; 小麦; 电子顺磁共振; 自由基; 氧化胁迫; 生态毒性

中图分类号: Q945.78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)01-0023-07

Free Radical Metabolism and Response of Antioxidant Enzymes in Wheat Seedlings (*Triticum aestivum* L.) Exposed to Soil Cadmium

LIN Ren-zhang, DU Wen-chao, WANG Xiao-rong, GUO Hong-yan

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Effects of soil Cd concentration ($0\sim 33\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) on growth, Cd accumulation, free radical metabolism and antioxidant system of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) were investigated by using pot experiments in this study. No obvious toxic symptom in seedlings was observed in the whole dose range. However, a slightly positive effect on the seedling growth was observed at low Cd concentrations (less than $3.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). EPR investigation showed that the level of free radicals in the leaves was higher than that in the roots, and responded sensitively to soil Cd exposure. When exposed to lower Cd (less than $3.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the level of free radicals in the leaves decreased, but significantly increased with increasing Cd concentrations. The activities of some antioxidant enzymes in the leaves, including superoxide dismutase (SOD, EC1.12.1.1), catalase (CAT, EC1.11.1.6), guaiacol peroxidase (POD, EC1.11.1.7), ascorbate peroxidase (APX, EC1.11.1.11), did not change much at low Cd concentrations (less than $3.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), but fluctuated drastically at high Cd concentrations. Based on the results of this study, we propose that the toxic critical value of soil Cd in inducing oxidative stress to wheat seedlings is between $3.3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Keywords: Cd; *Triticum aestivum* L.; electron paramagnetic resonance; free radical; oxidative stress; ecotoxicity

镉(Cd)是环境中最具危害性的重金属元素之一,通过工业排放、化肥施用、污水灌溉、污泥农用等

途径进入农田系统中的 Cd,不仅对作物生长、发育产生不良影响,而且会通过食物链传递对人和动物健康构成威胁。Cd 污染问题已成为威胁土壤生态安全和制约农业可持续发展的重要因素^[1-3]。发展新的研究方法,研究土壤 Cd 污染对农作物的危害、评价土壤 Cd 污染对食品安全的影响,是目前环境科学领域研究的热点问题之一。

污染物通过诱导活性氧自由基产生,进而对生物

收稿日期: 2007-03-13

基金项目: 国家自然科学基金(20577021); 江苏省自然科学基金(BK2004091); 江苏省国土生态地球化学调查项目(20031230008)

作者简介: 林仁漳(1978—),男,博士研究生,主要从事污染土壤修复及生态毒理诊断研究。E-mail: rzhl@163.com

联系作者: 王晓蓉 E-mail: ekxr@nju.edu.cn

体造成不同程度(个体、细胞、分子水平上)的氧化损伤,可能是污染物致毒的重要路径^[4-7]。由于活性氧自由基的寿命很短,检测困难,已有研究大多通过间接的方法,如抗氧化酶的响应或活性氧毒性作用终点产物的测定来推测机体所受的氧化胁迫^[7,8],目前,提供污染物胁迫诱导活性氧产生的直接证据鲜见报道。

电子顺磁共振(EPR)结合自旋捕获技术是当前研究自由基最直接、有效的手段,近来已广泛应用于动物毒理、生物医学等领域的研究^[9]。在环境科学领域,国内学者进行了有益的尝试,将其用于研究污染物与水生生物体内自由基代谢的关系,在阐明污染物致毒机制方面取得了突破性进展^[10,11],但将该技术用于研究农田土壤污染胁迫与农作物生长及自由基代谢关系的研究尚未见报道。

本研究将通过盆栽试验,结合自旋捕获-电子顺磁共振技术,以大宗作物小麦(*Triticum aestivum* L.)为试验对象,研究不同浓度土壤外源 Cd 污染胁迫对小麦幼苗生长、自由基代谢以及抗氧化酶活性的影响,以期进一步明确土壤 Cd 污染的生态毒性效应,在此基础上提出土壤外源 Cd 的临界毒性阈值(critical toxic threshold),为 Cd 污染土壤的生态风险评价和早期预警提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

EMX 10/12 型 EPR 谱仪(Bruker 公司);J2-HS 高速冷冻离心机(Beckman 公司);Z-81001 型原子吸收分光光度计(Hitachi 公司);岛津 UV-220 型分光光度计。4-POBN(分析纯,购自 Sigma 公司)。

1.2 盆栽试验处理

盆栽试验在室内温室开展,供试作物为小麦(*Triticum aestivum* L., 南农 9918),供试土壤取自南京八卦洲蔬菜基地,基本理化性质为:pH 5.3,有机质 1.75%,CEC 21.38 cmol·kg⁻¹,总 Cd 0.35 mg·kg⁻¹。外源 Cd 的添加浓度分别为 0(对照),0.3、1.0、3.3、10、33 mg Cd²⁺·kg⁻¹土,试验时称取过 3 mm 筛的风干土样 500 g 于塑料花盆中,以 CdCl₂ 溶液形式添加至上述污染水平,并以溶液形式加入 N(150 mg·kg⁻¹土),P₂O₅(100 mg·kg⁻¹土),K₂O(150 mg·kg⁻¹土)做基肥,充分混匀后放置陈化,每天及时补充水分,保持土壤相对含水率在 65%左右,各处理重复 3 次。

两周后播种小麦种子,每盆 25 颗(播种前用 30%次氯酸钠溶液消毒 10 min,用水冲洗干净后浸泡 24

h),待出苗后匀至 20 株·盆⁻¹,整个培养期间维持室内温度白天 25℃,夜间 20℃,每天光照 13 h,光强 400 μmol·m⁻²·s⁻¹。幼苗生长 14 d 后,测量株高,收获幼苗(两叶一心期),分为地上部和根系,先用自来水充分冲洗根表,再用 20 mmol·L⁻¹ EDTA 溶液浸泡根系 10 min,以去除根表吸附的重金属,最后用去离子水冲洗干净,并用吸水纸吸干。测量地上部和根系鲜重后,首先称取部分叶片和根系样品用于自由基捕获,剩余样品用于相关指标测定。

1.3 测定方法

1.3.1 植株 Cd 含量测定

植株用 HNO₃-HClO₄ 湿法消解定容后,用原子吸收分光光度法测定 Cd 含量。

1.3.2 自由基捕获

分别称取小麦叶片 0.2 g,置于研钵中,加入适量液氮冷冻后,迅速研磨成粉末,立即加入 0.5 mL 系列浓度为 0、5、10、25、50 mmol·L⁻¹ 的 4-POBN 水溶液,在冰浴中充分研磨匀浆,匀浆液在 4℃下,以 10 000×g 离心 15 min,收集上清液于塑料离心管中,迅速做 EPR 测试,考察捕获剂浓度对自由基捕获效率的影响,上述各处理均重复 3 次。另取对照组叶片适量,以 1:2.5 (g:mL)的比例加入 25 mmol·L⁻¹ 的 4-POBN 溶液,采用上述同样方法处理后分装成 5 份,于液氮中保存,分别在 0、24、48、72、96 h 时进行 EPR 测试,考察样品保存时间对测定的影响。上述操作均在无氧条件下进行。EPR 测定在常温(25℃)下进行,吸取 200 μL 上清液注入石英扁平槽中,采用 EMX 10/12 型 EPR 仪检测,检测条件分别是:中心磁场:3 480 G;扫描宽度:200 G;微波功率:20 mW;调制频率:100 KHz;调制幅度:1.0 G;扫描次数:5 次。获得的信号强度用于表征自由基含量。后续实验采用优化后的方法进行操作,处理过的样品保存于液氮中,48 h 内测定。根系样品自由基的检测方法同叶片一致。

1.3.3 抗氧化酶活性测定

粗酶液的提取参照 Cho^[12]的方法。酶液蛋白含量测定采用考马斯亮蓝染色法^[13]。超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光还原法^[14];过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的测定参照 Cakmak^[15]的方法;抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定参照 Asada^[16]的方法。

1.4 统计分析

数据采用 SPSS(10.0)软件处理,实验结果表示为平均值±标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 小麦幼苗自由基捕获实验条件优化及 EPR 图谱解析

由图 1 可以看出,无论是对照还是 $33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组,随着捕获剂浓度的提高,叶片样品的 EPR 信号强度逐渐增大,在 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到稳定,故本研究中均采用这个浓度来捕获小麦样品的自由基。图 2 考察了液氮保存条件下样品的稳定性,结果表明,样品 EPR 信号强度在 72 h 内保持稳定,到 96 h 时才略有降低。因此,液氮低温保存可以较长时间地保持样品的稳定性,以满足样品批量分析的要求。

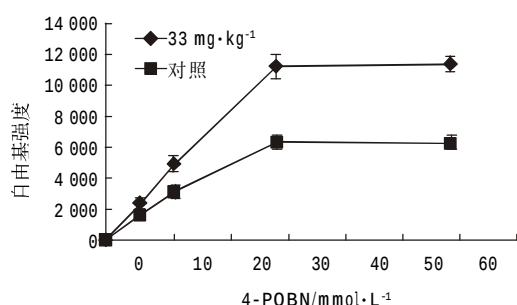


图 1 捕获剂浓度对样品 EPR 检测信号强度的影响

Figure 1 Effect of the concentration of 4-POBN solution on the intensity of EPR signal

图 3 是 4-POBN 捕获自由基的典型 EPR 图谱,分析发现其 6 个峰应分别来源于自旋加合物上硝基 ^{14}N ($I=1$) 及 α -碳上的 ^1H ($I=1/2$) 的未成对电子在磁场下的分裂,超精细分裂常数为 $a(^1\text{H})=2.6 \text{ G}$; $a(^{14}\text{N})=15.6 \text{ G}$, g 因子为 2.006 2,与文献报道 4-POBN 捕获的以碳为中心的自由基特征参数一致^[17-19]。这类自由基由活性氧对组织周围有机物的氢摘除反应产生,寿命短暂,通过 4-POBN 捕获形成可供 EPR 检测的更为稳定的加合物^[19]。机体内的自由基处于清除与产生的动态平衡中,EPR 信号强度反映了这一动态平

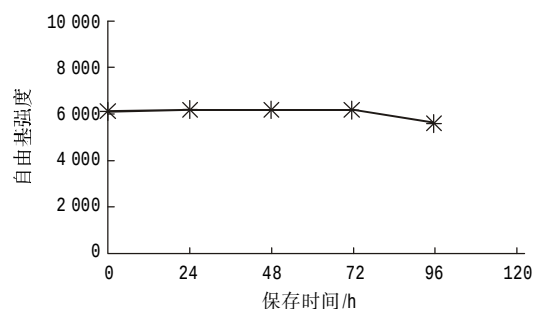


图 2 液氮保存时间对样品 EPR 检测信号强度的影响

Figure 2 Effect of stored time on the intensity of EPR signal

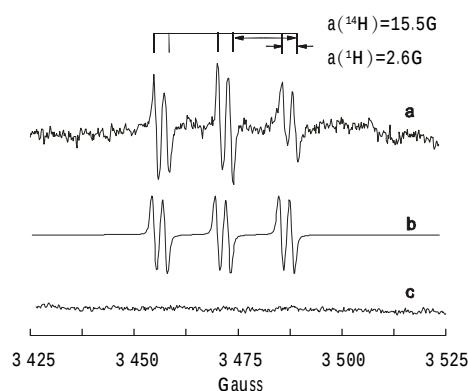


图 3 典型的 EPR 谱图: a. 样品; b. 计算机模拟图; c. 基线

Figure 3 Typical EPR spectra of wheat leaves in the presence of POBN: (a) EPR spectra obtained with wheat leaves; (b) computer simulated spectrum; (c) a baseline of 25 mM 4-POBN

衡下自由基的稳定浓度。由于碳中心自由基与机体内活性氧的累积水平息息相关,从而可能指示机体遭受的氧化胁迫程度^[20]。

2.2 土壤 Cd 胁迫对小麦幼苗生长的影响

表 1 显示,随着土壤外源 Cd 浓度的增加,小麦根系和叶片 Cd 含量显著提高,且根系含量明显高于叶片。在最高浓度处理组,根系和叶片 Cd 含量分别达到 29.4 和 $2.52 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (鲜重),分别为对照的 33 和 36 倍。Cd 通常被认为具有很强的毒性,但在本研

表 1 不同浓度土壤 Cd 对小麦 Cd 累积及生长指标的影响

Table 1 Biomass, shoot lengths and Cd uptake of wheat seedlings under soil Cd exposure

土壤 Cd 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	植株鲜重/ $\text{mg} \cdot \text{plant}^{-1}$		株高/cm	植株 Cd 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ FW	
	根系	地上部		根系	叶片
0	34.6 ± 4.5	230 ± 26	20.3 ± 2.1	0.90 ± 0.05	0.07 ± 0.01
0.3	41.0 ± 2.7	289 ± 21	21.8 ± 2.4	1.75 ± 0.13	0.09 ± 0.01
1.0	$44.9 \pm 4.4^*$	$316 \pm 24^*$	22.6 ± 1.0	$3.69 \pm 0.02^*$	$0.19 \pm 0.03^*$
3.3	$50.0 \pm 3.2^*$	$387 \pm 21^{**}$	$23.9 \pm 1.4^*$	$6.80 \pm 0.03^{**}$	$0.69 \pm 0.12^{**}$
10	$45.6 \pm 2.6^*$	$339 \pm 30^*$	$23.8 \pm 0.4^*$	$18.9 \pm 1.2^{**}$	$1.91 \pm 0.08^{**}$
33	$45.6 \pm 2.9^*$	254 ± 18	20.7 ± 0.9	$29.4 \pm 0.2^{**}$	$2.52 \pm 0.27^{**}$

注: * 与对照有显著差异($P < 0.05$); ** 与对照有极显著差异($P < 0.01$)。

究的试验浓度范围内,小麦幼苗未出现毒害症状,Cd 暴露下幼苗生物量和株高都比对照有不同程度的增加,以 $3.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理增加幅度最大,根系鲜重提高了 44.5%,地上部鲜重提高 67.9%,株高提高 17.7%。以往大多数研究都报道 Cd 胁迫导致植物生长受阻,甚至枯萎死亡^[21-23],但也有低浓度 Cd 刺激水稻^[24,25]、大豆^[26]、大麦^[27]等幼苗生长的报道。Stolt 等^[28]研究发现,在水培条件下, $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 能轻微提高小麦地上部干重,更高的浓度则抑制小麦的生长。方学智等^[29]也报道,低于 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd 促进小白菜的生长。Cd 对植物的影响存在剂量效应特征,不同研究所得结论的差异可能与试验采用的植物种类、暴露浓度、暴露时间的差异等有关,但低浓度 Cd 刺激植物生长的现象似乎无可争议,以往的文献对这种现象鲜有讨论,其机制目前尚不完全清楚。有学者把这种低浓度毒物刺激生长的现象与所谓的“毒物兴奋效应”相联系,即由生物体对胁迫响应的“过渡补偿”引起的^[25]。宏观上观察到的生长刺激现象可归因于低剂量 Cd 对细胞分裂与增殖的促进效应,这种促进效应在动物和植物细胞培养实验中都被观察到^[30,31]。Sobkowiak 等^[26]认为,低剂量 Cd 对细胞增殖的刺激作用,可能与 Cd 能部分代替 Zn^{2+} 的功能有关,Cd 与细胞内的 Zn 结合位点具有更强的亲和性,可以介导多个转录因子结合到基因的调控区域上,并且还作为转录和复制过程中的关键酶的辅助因子发挥作用。

以往关于 Cd 的植物毒性的研究多数是在水培条件下开展的,而土壤环境中由于存在土壤胶体对重金属离子的吸附固定作用,重金属的存在形态和生物有效性与溶液中差别很大,目前对于实际土壤环境中 Cd 的生态毒性知之甚少。从本研究的结果看,小麦幼苗对土壤 Cd 的耐性很强,在 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (土壤二级标准限量值)到 $33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的污染水平内,未出现明显的毒害症状,说明宏观生长指标对于 Cd 污染胁迫的响应不敏感,这些指标的显著伤害往往意味着 Cd 污染达到很高的水平。

2.3 土壤 Cd 胁迫对小麦幼苗自由基代谢的影响

图 4 反映了不同浓度土壤 Cd 处理下,小麦叶片和根系自由基水平的变化。由图可知,叶片自由基水平大大高于根系,并且随土壤 Cd 剂量变化叶片自由基的响应比根系明显,这可能与叶片是主要的光合作用器官,代谢活动活跃有关。随着土壤 Cd 污染水平的增加,叶片自由基水平呈先降低后升高趋势,在 $3.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组,叶片自由基水平下降到对照组的

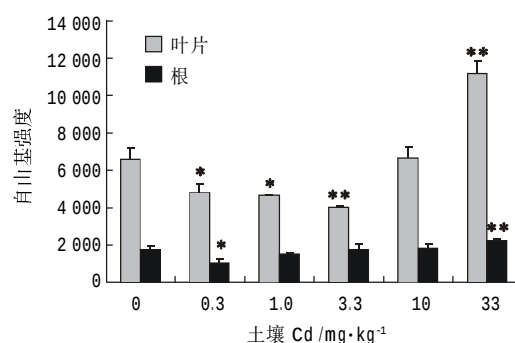


图 4 土壤 Cd 对幼苗根和叶片自由基水平的影响

Figure 4 The free radical levels in the leaves and roots of wheat seedlings exposed to concentrations of soil Cd. Asterisks indicate significant differences between treatment and control: *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

60%左右,更高剂量的 Cd 处理使得自由基水平又提高,在 $33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组,自由基水平是对照的 1.7 倍。

生物体内的自由基水平取决于其产生和清除的动态平衡关系。低浓度 Cd 处理使小麦体内自由基水平降低,可能是由于前期诱导的 ROS 作为第二信使启动了细胞的抗氧化防御反应^[32],而这种对污染胁迫响应的“过渡补偿”(over-compensate),可能使自由基清除速率大大的提高,从而降低了机体内自由基的水平。许多研究都观察到低浓度 Cd 胁迫下,植物体内抗氧化酶的活性显著升高^[33-35]。Maksymiec 等^[36]研究发现在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 处理下,拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 叶片的 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 含量比对照显著降低,同时 SOD、CAT、APX 等抗氧化酶显著升高。另一种原因可能与低浓度 Cd 胁迫下活性氧产生路径的调整有关^[25]。在较高浓度的 Cd 胁迫下,由于超出了机体抗氧化系统的防御能力,因此出现自由基的累积,将导致机体的氧化应激。

目前,对于 Cd 胁迫诱导植物产生自由基的机制仍存在争议。Cd 是非变价元素,因此不能象 Cu 和 Fe 那样通过 Fenton 或 Haber-Weiss 反应产生自由基。有些学者^[37,38]认为,通过破坏酶的活性中心、抑制酶活性、降低机体抗氧化防御能力是 Cd 胁迫诱导自由基累积的原因。然而,在 Cd 胁迫下植物抗氧化酶活性的诱导或者抑制都曾被报道过^[1,3,27]。因此,抗氧化酶活性变化是植物对氧化胁迫响应的结果而非引起自由基累积的直接原因,但反过来也会影响自由基的代谢平衡。愈来愈多的研究认为^[39,40],Cd 诱导活性氧自由基代谢失衡,可能与干扰或阻断植物叶绿体和线粒体

中的电子传递链,从而诱发一系列氧代谢的链反应有关,这种干扰作用对自由基产生的影响可以是正向的也可能是负向的。

在低浓度下,叶片自由基随土壤 Cd 浓度的变化与小麦生长指标的变化趋势相反,可能意味着低浓度 Cd 刺激小麦生长与降低氧化胁迫水平存在内在联系。Wu 等^[27]研究发现在 100 d 的生长期,0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 在促进几种生态型大麦生长的同时降低了叶片脂质过氧化产物 MDA 的含量。同样的现象在大蒜^[41]、胡萝卜^[42]上也被观察到。而较高浓度的 Cd 处理下,小麦叶片自由基显著升高,生物量比 3.3 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理组已有所降低,但仍然高于对照组,可能是由于早期土壤 Cd 的暂时性刺激的结果,随着胁迫时间的延长,幼苗生长可能会受阻,Arduini 等^[43]对细叶芒的研究结果进一步佐证了这一推测。

2.4 抗氧化酶活性的变化

为了清除体内活性氧,生物体通常拥有一套完备的抗氧化防御系统,包括抗氧化酶系和非酶抗氧化剂。重要的抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)以及抗坏血酸

-谷胱甘肽循环中的关键酶如抗坏血酸过氧化物酶(APX)等。

本研究中,不同浓度土壤外源 Cd 处理下,小麦叶片几种抗氧化酶活性的变化如图 5 所示。由图可知,在较低剂量的 Cd 处理下($\leq 3.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),这些抗氧化酶的活性变化不明显,更高剂量的 Cd 处理诱导酶活性的提高。对于 SOD,只有 33 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的处理组显著诱导了酶活性,与对照比提高了 20%。CAT、POD、APX 等 3 种酶活性的变化规律一致,10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理组的酶活性最高,分别比对照提高了 35%、56%、64%,更高浓度的 Cd 处理又抑制了酶活性。

污染胁迫下植物的抗氧化酶活性变化是植物体抵抗氧化胁迫的适应机制之一,反过来间接指示了机体内的氧化胁迫程度。本研究中 SOD 活性在高浓度处理组显著提高,可能是由于体内超氧化物的累积引起的。许多研究表明, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可以激活机体本身存在的 SOD 酶或者通过诱导酶蛋白编码基因的表达而合成新的 SOD^[33,44,45]。在低浓度 Cd 处理下,SOD 活性轻微下降说明机体内没有超氧化物的积累。Wu 等^[27]研究也发现,在 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低浓度 Cd 处理下,大麦叶

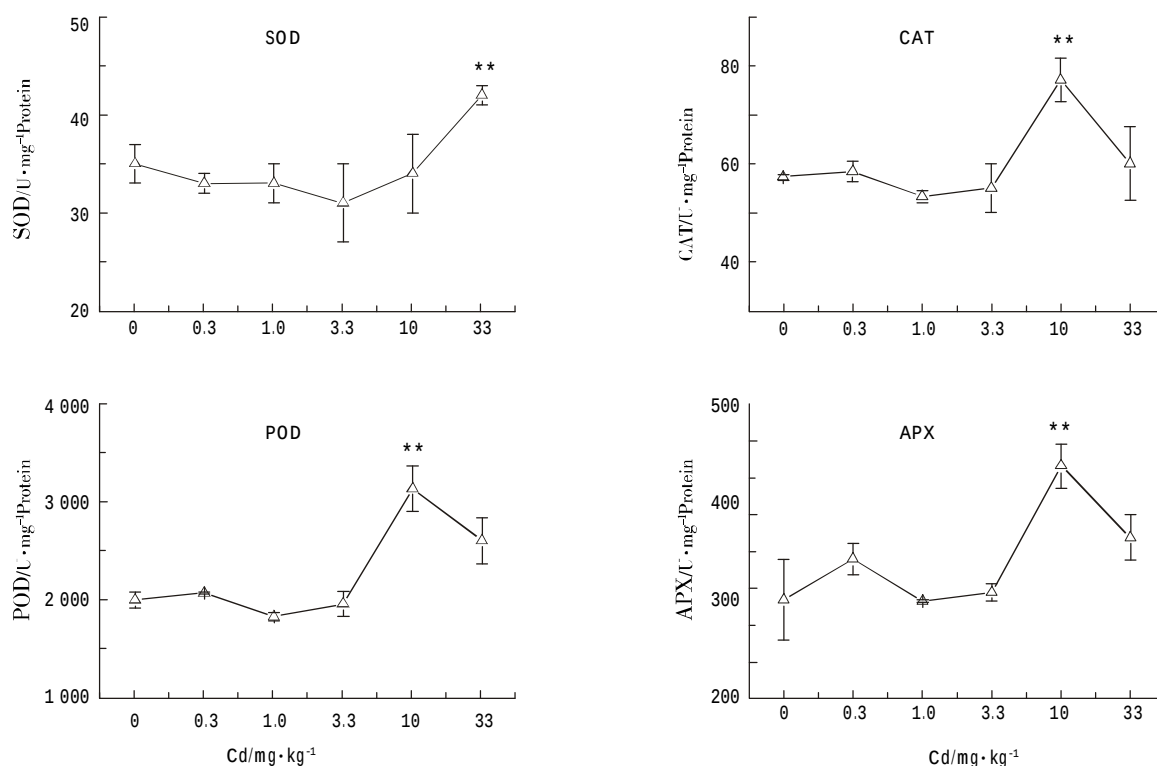


图 5 不同浓度土壤 Cd 处理下小麦叶片抗氧化酶活性变化

Figure 5 Effects of Cd concentration on the activities of SOD, CAT, POD, APX (D) in the leaves of wheat seedlings

Each value is the mean of three individual replicates $\pm$ SD. * and ** indicate significantly different from the control at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

片的 SOD 活性比对照降低, 并且脂质过氧化产物 MDA 也相应地降低。

CAT、POD、APX 等 3 种过氧化氢清除酶对 Cd 胁迫的响应表现出一致的规律(图 5), 与它们存在相同的调控机制有关^[33]。低浓度 Cd 处理下, 酶活性无明显变化, 表明组织中没有 H₂O₂ 的积累。相反, 10 mg·kg⁻¹ 处理使这 3 种酶活性显著提高, 表明出现了 H₂O₂ 的积累。而最高浓度处理组中酶活性的降低可能是由于过多的 H₂O₂ 或 Cd 的积累导致酶蛋白的破坏引起的。

本研究中小麦叶片抗氧化酶对土壤 Cd 胁迫的响应模式, 进一步证明, 低浓度未引起自由基累积, 而高浓度 Cd 胁迫诱导活性氧的累积, 与 ERP 的研究结果吻合。但在低浓度 Cd 处理下, 抗氧化酶活性未见显著升高, 没有表现出与自由基水平变化互为消长的趋势, 未见前面所述的抗氧化系统的“过渡补偿”效应, 这可能与本研究开展的是试验期为 14 d 的静态实验有关。

3 结论

土壤外源 Cd 在 0 ~ 33 mg·kg⁻¹ 的浓度范围内对小麦幼苗生长不产生明显的毒害作用, 且 3.3 mg·kg⁻¹ 以下的土壤 Cd 能够刺激小麦生长, 宏观生长指标对土壤 Cd 污染胁迫的响应不敏感。建立了 4-POBN 捕获-电子顺磁共振技术检测小麦体内自由基的方法, 发现 25 mmol·L⁻¹ 4-POBN 水溶液能有效捕获小麦体内的碳中心自由基, 并且液氮保存能够在 72 h 之内维持 4-POBN 加合物的稳定性。小麦叶片自由基水平高于根系, 并且随土壤外源 Cd 浓度的变化比根系自由基更敏感, 低于 3.3 mg·kg⁻¹ 的 Cd 处理使小麦叶片自由基水平降低, 更高浓度的 Cd 处理, 使自由基水平升高, 并且诱导抗氧化酶活性的升高; 小麦叶片自由基变化对不同浓度土壤 Cd 胁迫的响应相当敏感, 可望作为一种敏感分子生物标志物应用于土壤污染早期预警和生态风险评价中。综合生物量、自由基变化和抗氧化酶响应的结果, 从引起机体产生氧化胁迫的角度出发, 初步确定土壤外源 Cd 对小麦幼苗的毒性临界点在 3.3~10 mg·kg⁻¹ 之间。

参考文献:

- [1] McLaughlin M J, Parker D R, Clarke J M. Metals and micronutrients—food safety issues [J]. *Field Crop Res*, 1999, 60: 143–163.
- [2] Adams M L, Zhao F J, McGrath S P, et al. Predicting cadmium concentrations in wheat and barley grain using soil properties[J]. *J Environ Qual*, 2004, 33: 532–541.
- [3] Ranieri A, Castagna A, Scebba F, et al. Oxidative stress and phytochelatin characterization in bread wheat exposed to cadmium excess [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43: 45–54.
- [4] 王晓蓉, 罗义, 施华宏, 等. 分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评价中的应用[J]. *环境化学*, 2006, 25(3): 320–325.
- [5] 孙光闻, 朱祝军, 方学智. Cd 对白菜活性氧代谢及 H₂O₂ 清除系统的影响[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(12): 2012–2015.
- [6] Piqueras A, Olmas E, Martinez-Solano J R, et al. Cadmium-induced oxidative burst in tobacco BY cells, time course, subcellular location and antioxidant response[J]. *Free Radic Res*, 1999, 31S: 333–338.
- [7] Radetski C M, Ferrari B, Cotellet S, et al. Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste in cineraria bottom ash leachates[J]. *Sci Total Environ*, 2004, 333: 209–216.
- [8] Dorta D J, Leite S, DeMarco K C, et al. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment[J]. *J Inorg Biochem*, 2003, 97: 251–257.
- [9] Luo Y, Wang X R, Shi H H, et al. EPR investigation of in vivo free radical formation and oxidative stress induced by 2,4-dichlorophenol in the freshwater fish *Carassius auratus* [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2005, 24: 2145–2153.
- [10] Shi H H, Wang X R, Luo Y Y, et al. Electron paramagnetic resonance evidence of hydroxyl radical generation and oxidative damage induced by tetrabromobisphenol A in *Carassius auratus* [J]. *Aqua Toxicol*, 2005, 74: 365–371.
- [11] 罗义, 施华宏, 王晓蓉, 等. 2, 4-二氯苯酚诱导鲫鱼肝脏自由基的产生和脂质过氧化[J]. *环境科学*, 2005, 26(3): 29–32.
- [12] Cho U H, Seo N H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 113–120.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [14] Dhindsa R S, Dhinsa P P, Thorpe T A. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid-peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase [J]. *J Exp Bot*, 1980, 32: 127–132.
- [15] Cakmak I, Strboe D, Marschner H. Activities of hydrogen peroxide scavenging enzymes in germinating wheat seeds [J]. *J Exp Bot*, 1993, 44: 127–132.
- [16] Asada K. Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging [J]. *Methods Enzymol*, 1984, 105: 422–429.
- [17] Buettner G R. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts [J]. *Free Radic Biol Med*, 1987, 3: 259–303.
- [18] Deighton N, Johnston D J, Glidewell S M, et al. The involvement of oxygen-derived free radicals in the resistant response of potato tubers to *Erwinia carotovora* [J]. *Protoplasma*, 1992, 171: 167–169.
- [19] Muchenschnebel I, Goodman B A, Deighton N, et al. Botrytis cinerea induces the formation of free radicals in fruits of *Capsicum annuum* at positions remote from the site of infection [J]. *Protoplasma*, 2001, 218: 112–116.
- [20] Pirker K F, Goodman B A, Pascual E C, et al. Free radicals in the fruit

- of three strawberry cultivars exposed to drought stress in the field [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40: 709–717.
- [21] 张金彪, 黄维南. Cd 对植物的生理生态效应的研究进展[J]. *生态学报*, 2000, 20(3): 514–523.
- [22] Rubio M I, Escrig I, Martinez-Cortina C, et al. Cadmium and nickel accumulation in rice plants: effect on mineral nutrition and possible interaction of abscisic and gibberelic acids [J]. *Plant Growth Regul*, 1994, 14: 151–157.
- [23] Watanabe M, Suzuki T. Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2002, Part C 131: 491–500.
- [24] Liu J G, Li K Q, Xu J K, et al. Interaction of Cd and five mineral nutrients for uptake and accumulation in different rice cultivars and genotypes [J]. *Field Crop Res*, 2003, 83: 271–281.
- [25] Aina R, Labra M, Fumagalli P, et al. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots [J]. *Environ Exp Bot*, 2007, 59: 381–392.
- [26] Sobkowiak R, Deckert J. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2003, 41: 767–772.
- [27] Wu F, Zhang G P, Dominy P. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity [J]. *Environ Exp Bot*, 2003, 50: 67–68.
- [28] Stolt J P, Sneller F E C, Bryngelsson T, et al. Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat [J]. *Environ Exp Bot*, 2003, 49: 21–28.
- [29] 方学智, 朱祝军, 孙光闻. 不同浓度镉对小白菜生长及抗氧化系统的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2004, 23(5): 877–880.
- [30] Von Zglinicki T, Edwall C, Ostlund E, et al. Very low cadmium concentration stimulate DNA synthesis and cell growth [J]. *J Cell Sci*, 1992, 103: 1073–1081.
- [31] Beyersmann D, Hechtenberg S. Cadmium, gene regulation, and cellular signaling in mammalian cells [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 1997, 144: 247–261.
- [32] 徐勤松, 施国新, 周红卫, 等. Cd、Zn 复合污染对水车前叶绿素含量和活性氧清除系统的影响[J]. *生态学报*, 2003, 22(1): 5–8.
- [33] Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44: 25–37.
- [34] Shah K, Kumar R G, Verma S, et al. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings [J]. *Plant Sci*, 2001, 161: 1135–1144.
- [35] Ott T, Fritz E, Polle A, et al. Characterisation of antioxidative systems in the ectomycorrhiza-building basidiomycete *Paxillus involutus* (Bartsch) Fr. And its reaction to cadmium [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2002, 42: 359–366.
- [36] Maksymiec W, Krupa Z. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Environ Exp Bot*, 2006, 57: 187–194.
- [37] Rometo-Puertas M C, Rodriguez-Serrano M, Corpas F J, et al. Cadmium induced subcellular accumulation of $O_2^{\cdot -}$ And H_2O_2 in pea leaves [J]. *Plant Cell Environ*, 2004, 27: 1122–1134.
- [38] Sandalio L M, Dalurzo H C, Gómez M, et al. Cadmium induces changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52: 2115–2126.
- [39] Wang Y D, Fang J, Leonard S S, et al. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species [J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36: 1434–1443.
- [40] Qadir S, Qureshi M I, Javed S, et al. Genotypic variation in phytoremediation potential of *Brassica juncea* cultivars exposed to Cd stress [J]. *Plant Sci*, 2004, 167: 1171–1171.
- [41] Zhang H Y, Jiang Y N, He Z Y, et al. Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*) [J]. *J Plant Physiol*, 2005, 162: 977–984.
- [42] Sanità di Toppi L, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants [J]. *Environ Exp Bot*, 1999, 41: 105–130.
- [43] Arduini I, Masoni A, Mariotti M, et al. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation [J]. *Environ Exp Bot*, 2004, 52: 89–100.
- [44] Foyer C H, Lopez-Delgado H, Dat J F, et al. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanism of acclamatory stress tolerance and signaling [J]. *Physiol Plant*, 1997, 100: 241–254.
- [45] Somashekaraiah B V, Padmaja K, Prasad A R K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mungbean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation [J]. *Physiol Plant*, 1992, 85: 85–89.

致谢:感谢南京大学现代分析中心睦云霞老师在 EPR 测试和图谱解析上的指导。