

Cd 胁迫下绿豆和箭舌豌豆叶片抗氧化系统的变化

张芬琴¹, 沈振国^{2*}, 徐朗莱²

(1.河西学院农业与生物技术学院, 甘肃 张掖 734000; 2.南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘要:研究了 Cd 胁迫下绿豆(*Phaseolus aureus*)和箭舌豌豆(*Vicia sativa*)幼苗的生长,叶片内过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、超氧化歧化酶(SOD)、愈创木酚过氧化物酶(GPOD)和谷胱甘肽还原酶(GR)的同工酶活性,还原性谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(ASC)以及 Cd 含量的变化。结果显示,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫 9 d 期间,随着 Cd 胁迫时间的延长,绿豆和箭舌豌豆幼苗主根的伸长量及其根系干重显著降低($P<0.05$),根表面出现越来越明显的褐色,绿豆叶表面出现可见的褐色斑点;两种植物叶片的 CAT、APX 和 SOD 同工酶活性以及绿豆叶片的 GR 活性呈先升后降的趋势,而两种植物叶的 GPOD 活性明显增加;在箭舌豌豆叶片中,GR 活性随 Cd 暴露时间的延长而增加,而 GSH 先降后升;在绿豆叶片中,GSH 和 ASC 随 Cd 暴露时间的延长而降低;与此同时,两种植物叶片中 Cd 的含量也随 Cd 胁迫时间的延长而增加,和箭舌豌豆相比,绿豆叶片中 Cd 含量增加更多。结果表明,箭舌豌豆有较强的抗氧化能力。

关键词:Cd 胁迫;绿豆和箭舌豌豆;叶片;抗氧化系统;变化

中图分类号:Q945.78 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)01-0007-10

The Change of Antioxidant System in Leaves of Mung Bean(*Phaseolus aureus*) and Common Vetch(*Vicia sativa*) Seedlings Under Cd Stress

ZHANG Fen-qin¹, SHEN Zhen-guo^{2*}, XU Lang-lai²

(1.College of Agriculture and Biological Technology, Hexi University, Zhangye 734000, China; 2.College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The effects of cadmium (Cd) on the plant growth, activities of antioxidant enzymes and contents of antioxidants in leaves of mung bean (*Phaseolus aureus*) and common vetch (*Vicia sativa*) were investigated using hydroponic experiments. Cadmium at 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly decreased the main root elongation and roots dry weight, and increased activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPOD) in the leaves of both species. Activity of glutathione reductase (GR) in *V. sativa* leaves increased, and content of ascorbic acid (ASC) remained unchanged with Cd exposure time, whereas reduced glutathione (GSH) appeared to decrease for initial 6 days and then increased. But in *P. aureus* leaves, activity of GR and contents of GSH and ASC decreased with Cd exposure time. Compared to *P. aureus*, *V. sativa* had higher activities of SOD, CAT, APX and GR, and contents of ASC and GSH in the leaves under Cd stress. In contrast, *V. sativa* leaves had lower GPOD activity than *P. aureus*. Results from native PAGE showed that Cd treatment with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ also changed the isozyme patterns of these antioxidant enzymes in the leaves of both species. The results suggested that tolerance of *V. sativa* to Cd could be attributed, at least in part, to its antioxidant capacity than *P. aureus*.

Keywords: cadmium stress; *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa*; leaves; antioxidant system; change

当前,重金属污染已经成了严重的环境问题,重金属不仅限制作物产量,而且通过食物链危害人体健康。

对植物来说,镉(Cd)是最有毒的环境污染物之一。研究表明,Cd 可以干扰植物的许多生理生化过程,如光合作用、呼吸作用、氮和蛋白质代谢以及营养吸收等^[1-2]。然而,与 Cd 毒害有关的机理还不清楚。不过,也有研究证实 Cd 毒害是由 Cd 胁迫诱导了活性氧(ROS)如超氧阴离子($\text{O}_2\cdot^-$)和过氧化氢(H_2O_2)的产生而引起的^[3],它具有较高的毒性,可以氧化生物

收稿日期:2011-03-31

基金项目:国家自然科学基金(30571107,31160053)

作者简介:张芬琴(1963—),女,甘肃民勤人,博士,教授,主要从事植物抗性生理生化与农业环境保护方面的教学与研究工作。

E-mail: fenqinzh@hxy.edu.cn

* 通讯作者:沈振国 E-mail: zgshen@njau.edu.cn

大分子物质如脂质、蛋白质以及核酸等,并由此导致膜质过氧化、细胞膜损伤和酶失活等。

为了避免 ROS 的氧化伤害,植物体已经进化形成了抗氧化防御系统。这个系统包括抗氧化酶类如超氧化歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化物酶(GPOD)和谷胱甘肽还原酶(GR)等以及抗氧化剂如还原性谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(ASC)等^[4]。在植物体内,SOD 将 $O_2^{\cdot-}$ 歧化为 H_2O_2 ,而 H_2O_2 可通过 CAT 和 ASC-GSH 循环及 APX 还原成 H_2O 。GR 通过将氧化型的谷胱甘肽(GSSG)还原成 GSH 在植物抗氧化防御过程中发挥关键的作用。这些防御氧化损伤的机制在 Cd 暴露的一些植物中已经被观察到^[5-7]。然而,在过去的研究中,由于研究者所用的植物种类及其年龄不同、Cd 暴露的时间以及试验条件不同等所得结论也不同,关于植物抗氧化系统对 Cd 的响应机理目前仍有争论^[3]。

我们先前的研究表明^[8],较高浓度的 Cd 不仅明显抑制了绿豆 (*Phaseolus aureus* Roxh. VC-3762)和箭舌豌豆 (*Vicia Sativa* L.cv.333/A)幼苗的生长与干物质积累,还影响了其正常的生理生化过程。二者相比,箭舌豌豆 333/A 受到的影响较小。到目前为止,还很少有人将这两种对 Cd 胁迫响应有明显差异的植物同时作为试材进行研究。本研究拟通过 Cd 胁迫该两种植物不同的时间后观测其形态及叶片内抗氧化系统中抗氧化酶活性及其同工酶谱和抗氧化物质的变化和叶片内 Cd 的积累,以考察两种植物耐 Cd 性的差异及探究 Cd 毒害植物的机制,为选择 Cd 积累少但耐性强的品种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药品与溶液配制

磷酸钾 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.8); 甲硫氨酸 ($13 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 氮蓝四唑 ($75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.245 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 核黄素 ($2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 乙二胺四乙酸 ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 四甲基乙二胺 ($28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 核黄素 ($2.8 \times 10^{-2} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 磷酸 [$36 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH7.8), $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH6.5), $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH7.8)]; 抗坏血酸 ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 过氧化氢 ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 四甲基乙二胺 ($28 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 氧化型谷胱甘肽 ($0.5, 3.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 还原型辅酶 II ($0.12, 0.5, 0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 2,6-二氯酚靛酚 ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 噻唑兰 ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); FeCl_3 /

$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%); 愈创木酚 ($16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 联苯胺 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 二硫苏糖醇-乙醇 ($60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 三氯乙酸 ($20\%, 5\%$); 磺基水杨酸 (5%); 5,5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 谷胱甘肽还原酶 ($10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)。以上药品中的生化药品均为生化纯,化学药品均为分析纯。

1.2 仪器设备

岛津 UV-2450/2550 紫外可见分光光度计; 新 JY600C 通用型电泳仪; CR21G II 日立高速冷冻离心机; 凝胶成像分析系统等。

1.3 材料培养

分别挑选大小一致且饱满的绿豆和箭舌豌豆种子若干,用 0.1% 的 HgCl_2 进行 5 min 的表面消毒,之后用去离子水充分冲洗;洗后,于 25°C 的温度下用去离子水浸种 12 h。之后,将种子置于黑暗、 25°C 的条件下使其发芽;待其出芽后,挑选发芽一致的种子播于装有石英砂的塑料网篮中,网篮置于盛有营养液[组成浓度为 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): $0.51 \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $0.03 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0.097 \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $0.088 \text{ K}_2\text{SO}_4$, 0.38 KNO_3 , $1.0 \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $0.27 \text{ Mg}(\text{NO}_3)_2$, $6.6 \times 10^{-3} \text{ H}_3\text{BO}_4$, $5.1 \times 10^{-3} \text{ MnCl}_2$, $0.3 \times 10^{-3} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.16 \times 10^{-3} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.1 \times 10^{-3} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 $45 \times 10^{-3} \text{ Fe EDTA}$]的培养钵中培养。培养期间,每日通气 1 次,每 2 d 更换 1 次营养液。待幼苗长至第一对真叶完全展开时,选长势良好且较为一致的幼苗移栽到含 1 L 上述营养液的培养钵中继续培养至第 2 对真叶长出,根据我们过去的研究结果^[8],在培养液中加入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd (CdCl_2) 对两种幼苗进行 Cd 胁迫,设 3 个重复。在胁迫期间,每日早、晚为幼苗通气 1 次,将营养液的 pH 调到 5.2~5.5。分别于胁迫的 3、6 d 和 9 d 后采样测定有关指标。

1.4 测定方法

植株主根长度的测量和根系干重的称量采用常规法,用直尺测量主根长度,用万分之一电子天平称根系干重;超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定与活性电泳参照 Giannopolitis 等的方法^[9];抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性的测定与活性电泳参照 Nakano 等的方法^[10];谷胱甘肽还原酶(GR)活性的测定与活性电泳分别参照 Schaedle 等^[11]和 Laemmli 等^[12]的方法;过氧化氢酶(CAT)活性的测定与活性电泳分别参照 Rao 等^[13]和 Klotz 等^[14]的方法;愈创木酚过氧化物酶(GPOD)活性的测定与活性电泳参照 Rao 等的方法^[13];ASC 含量测定参照 Arakawa 等的方法^[15];GSH 含量测定参照 Griffith 的方法^[16]。

1.5 数据统计

采用 Duncan 法并使用 DPS v3.01 专业版软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 Cd 胁迫下两种植物根和叶片表面的毒害症状

与对照相比,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫绿豆和箭舌豌豆幼苗约 3 d,绿豆部分根表面出现褐色(图 1-A-2),这一症状大约在 6 d 时也出现在箭舌豌豆的根表面(图 1-A-4),并且随着 Cd 胁迫时间的延长,这一症状越来越明显。约 7 d 时,绿豆叶片上出现可见的褐色斑点(图 1-B),而箭舌豌豆的叶片上未见。

2.2 Cd 胁迫下两种植物幼苗主根伸长生长和根系干重的变化

由表 1 和表 2 可见,随着 Cd 胁迫时间的延长,绿豆和箭舌豌豆主根的伸长量及其根系干重均显著降低($P<0.05$)。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫 3 d 后,绿豆主根的伸长量和根系干重分别是其对照的 77%和 52%,9 d 后分别是其对照的 52%和 20%。与这些结果相似,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫 3 d 后,箭舌豌豆主根的伸长量和根系干重分别是其对照的 80%和 68%,9 d 后分别是其对照的 59%和 46%。无论何时和何种植物,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫其根系干重比主根伸长量降低更多。同时,与箭舌豌豆相比,绿豆的主根伸长量和

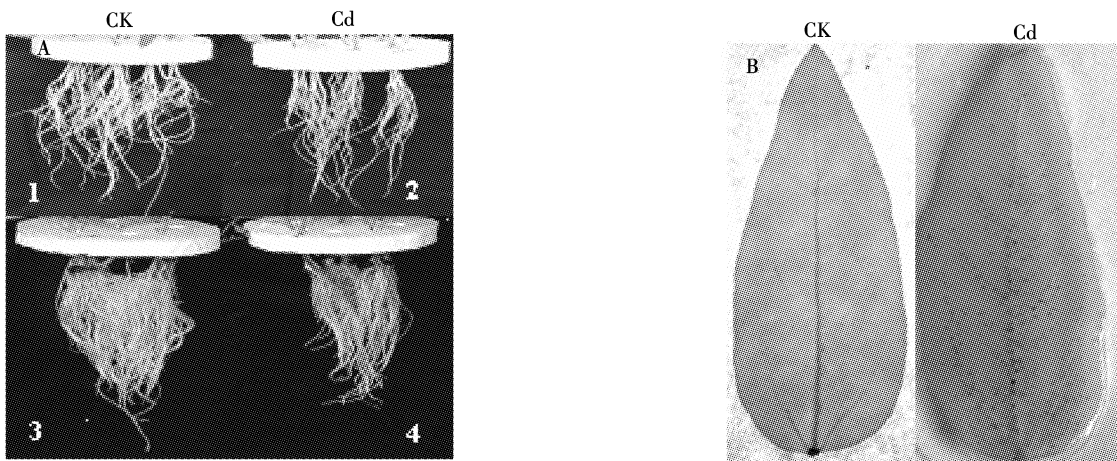


图 1-A 中,1:绿豆对照;2:绿豆 Cd 胁迫 3 d;3:箭舌豌豆对照;4:箭舌豌豆 Cd 胁迫 6 d

图 1 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下绿豆或箭舌豌豆根(A)和绿豆叶片(B)上出现的受害症状

Figure 1 The symptom on the roots(A) of mung bean or common vetch and the leaves(B) of mung bean under 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd stress

表 1 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下两种植物幼苗主根伸长量的变化

Table 1 The change of the main root length of mung bean or common vetch under 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd stress

Cd 胁迫天数/d Cd stress days	绿豆/Mung bean		箭舌豌豆/Common vetch	
	0 Cd	100 Cd	0 Cd	100 Cd
3	5.97 $\pm$ 0.30a(100%)	4.60 $\pm$ 0.30b(77.08%)	5.58 $\pm$ 0.43a(100%)	4.48 $\pm$ 0.35b(80.28%)
6	8.66 $\pm$ 0.71a(100%)	4.83 $\pm$ 0.39b(55.74%)	9.94 $\pm$ 1.00a(100%)	6.83 $\pm$ 0.51b(68.75%)
9	10.19 $\pm$ 0.58a(100%)	5.32 $\pm$ 0.40b(52.20%)	13.50 $\pm$ 0.98a(100%)	7.99 $\pm$ 0.32b(59.20%)

注:表中数据是 3 次重复的平均值 $\pm$ SE;同一植物同行内不同字母代表在 $P<0.05$ 水平上的差异显著性。下同。

表 2 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下两种植物幼苗根系干重的变化

Table 2 The change of the roots dry weight of mung bean or common vetch under 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd stress

Cd 胁迫天数/d Cd stress days	绿豆/Mung bean		箭舌豌豆/Common vetch	
	0 Cd	100 Cd	0 Cd	100 Cd
3	0.16 $\pm$ 0.01a(100%)	0.07 $\pm$ 0.01b(52.40%)	0.18 $\pm$ 0.01a(100%)	0.13 $\pm$ 0.01b(68.97%)
6	0.21 $\pm$ 0.02a(100%)	0.06 $\pm$ 0.01b(27.45%)	0.27 $\pm$ 0.02a(100%)	0.16 $\pm$ 0.01b(59.05%)
9	0.33 $\pm$ 0.03a(100%)	0.07 $\pm$ 0.01b(20.00%)	0.38 $\pm$ 0.03a(100%)	0.18 $\pm$ 0.01b(46.71%)

根系干重降低更明显。由此可说明,绿豆比箭舌豌豆对 Cd 胁迫更敏感。

2.3 Cd 胁迫下两种植物幼苗叶的抗氧化酶活性及同工酶谱的变化

2.3.1 SOD 活性及其同工酶谱的变化

100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫后,绿豆和箭舌豌豆幼苗叶的 SOD 活性变化相似,呈现先升高后降低的趋势。Cd 胁迫 3 d 时,两种植物幼苗叶的 SOD 活性显著升高 ($P<0.05$)。6 d 时,二者均达到最高值(图 2-A、B),分别比各自的对照高出约 60% 和 78%。从电泳图谱上看,各自 SOD 同工酶的活性谱带也显出相应的变化。胁迫 6 d 时,二者的活性谱带均较其对照的宽和强(图 2-C-c、D-b)。与绿豆的同工酶谱相比,Cd 胁迫后箭舌豌豆叶的 SOD 同工酶谱带数增加(图 2-D)。

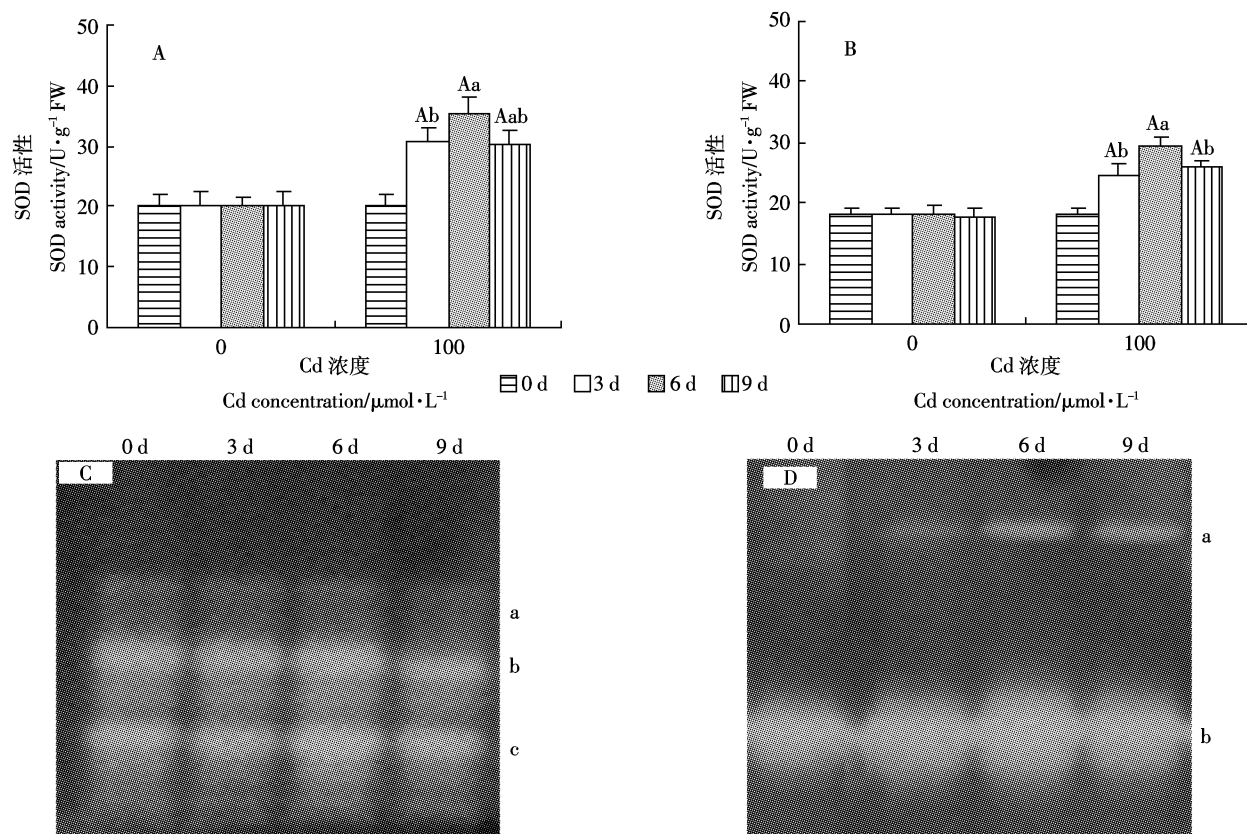
2.3.2 CAT 活性及其同工酶谱的变化

随着 Cd 胁迫时间的延长,绿豆和箭舌豌豆幼苗叶的 CAT 活性及其同工酶谱的变化如图 3 所示。在

Cd 胁迫 9 d 时,两种植物叶内的 CAT 活性均显著高于对照 ($P<0.05$),但随时间的推移有下降的趋势。在胁迫 3 d 时,CAT 活性在两种植物叶中分别增加了约 45% 和 73%。这个结果与 CAT 同工酶 PAGE 活性分析得到的结果基本一致。在绿豆的对照叶中,存在一条 CAT 的同工酶活性带,Cd 胁迫后新增 1 条谱带 a,1 条原有的谱带 b 也因 Cd 胁迫而增强(图 3-C)。类似地,Cd 胁迫也诱导了箭舌豌豆叶内新增 1 条 CAT 同工酶的活性谱带,且活性明显强于绿豆的(图 3-D)。

2.3.3 APX 活性及其同工酶谱的变化

与对照相比,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫增加了绿豆和箭舌豌豆叶片的 APX 活性(图 4)。两者的活性最高值出现在胁迫 6 d 时,分别高出其对照的约 54% 和 55%。随胁迫时间的继续延长均呈下降的趋势,至胁迫 9 d 时绿豆的下降到对照的水平,而箭舌豌豆的仍维持高于对照的水平。从绿豆(图 4-C)和箭舌豌豆(图 4D)叶片的 APX 活性谱带的变化也可看出,Cd



图中数值是 3 次重复的平均值;大写字母表示的差异显著性是 Cd 胁迫与其对照相比;
小写字母表示的是胁迫后与胁迫初始相比,不同的字母代表在 $P<0.05$ 水平上有显著差异。下同

图 2 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下绿豆(A、C)和箭舌豌豆(B、D)幼苗叶 SOD 同工酶活性及其酶谱的变化
Figure 2 The change of the SOD isoenzyme activity and activity staining following PAGE of extracts from the leaves of mung bean (A, C) or common vetch (B, D) seedling under 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd stress

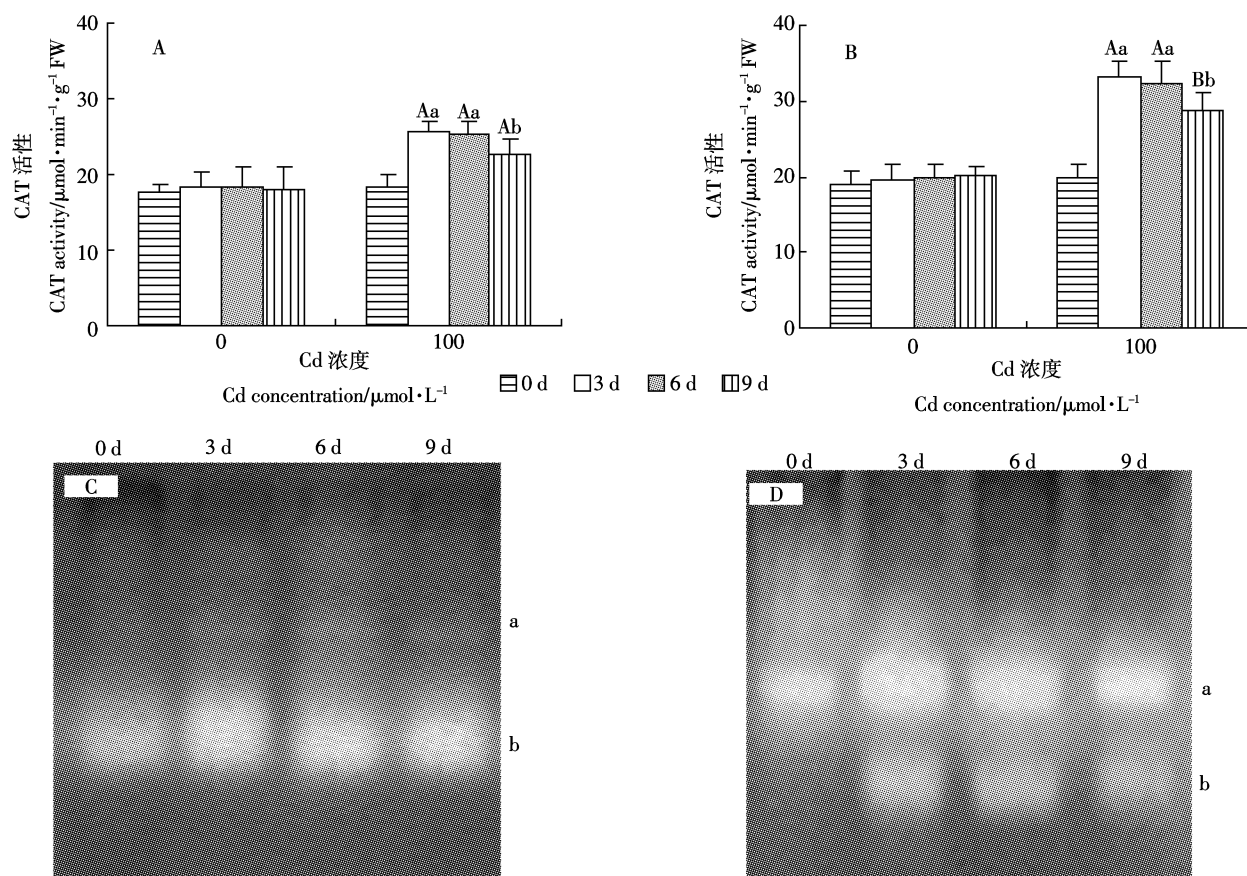


图3 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd胁迫下绿豆(A、C)和箭舌豌豆(B、D)幼苗叶CAT同工酶活性及其酶谱的变化

Figure 3 The change of the CAT isoenzyme activity and activity staining following PAGE of extracts from the leaves of mung bean (A, C) or common vetch (B, D) seedlings under 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress

胁迫6 d时两者的APX活性谱带较宽且染色较深,此后变窄染色变浅。

2.3.4 GPOD活性及其同工酶谱的变化

由图5可见,与对照相比,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd胁迫增加了绿豆和箭舌豌豆叶片的GPOD活性及其同工酶谱带数。胁迫9 d时,两者的活性分别是其对照的约4倍和1倍。与箭舌豌豆相比,绿豆叶的GPOD在Cd胁迫3 d时即有所升高,而箭舌豌豆的在Cd胁迫6 d时才较明显升高。与此同时,Cd胁迫3 d时,绿豆叶的GPOD同工酶有两条新带出现(图5-C-e、d),胁迫第6 d直到第9 d时新出现的谱带及原有的谱带均变宽变深,说明其活性增强。箭舌豌豆的变化与此相似,但新带出现在6 d后(图5-D-e)。相比之下,绿豆的GPOD活性较高,且其同工酶谱带数也较多。

2.3.5 GR活性及其同工酶谱的变化

由图6可见,随Cd胁迫时间的延长,绿豆与箭舌豌豆叶的GR活性及其同工酶图谱呈现出不同的变化。在Cd胁迫3 d时,两者的活性均显著增加($P <$

0.05)。与其对照相比,分别增加了16%和26%。Cd胁迫6 d时,绿豆的GR活性比对照降低了14%;与此不同,Cd胁迫6 d时箭舌豌豆的GR活性比对照增加了49%。在各自的同工酶谱中,绿豆的GR同工酶主要有两条,其中一条(图6-C-b)在3 d时有所增宽;箭舌豌豆的GR同工酶主要有3条,其中一条(图6-D-b)在Cd胁迫3 d后有所变窄,一条(图6-D-c)在Cd胁迫6 d后有所增宽。

2.4 抗氧化剂含量变化

2.4.1 ASC含量的变化

100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd胁迫没有影响箭舌豌豆叶的ASC含量,但导致了绿豆叶的ASC含量的显著降低(图7)。在Cd胁迫9 d时,绿豆叶的ASC含量下降了24%。推测,ASC含量的下降可能不仅与合成减少有关,还可能与活性氧的清除有关,下降了的ASC主要被运用于绿豆叶内的ASC-GSH循环。

2.4.2 GSH含量的变化

GSH含量也随Cd胁迫时间的推移而下降,但箭

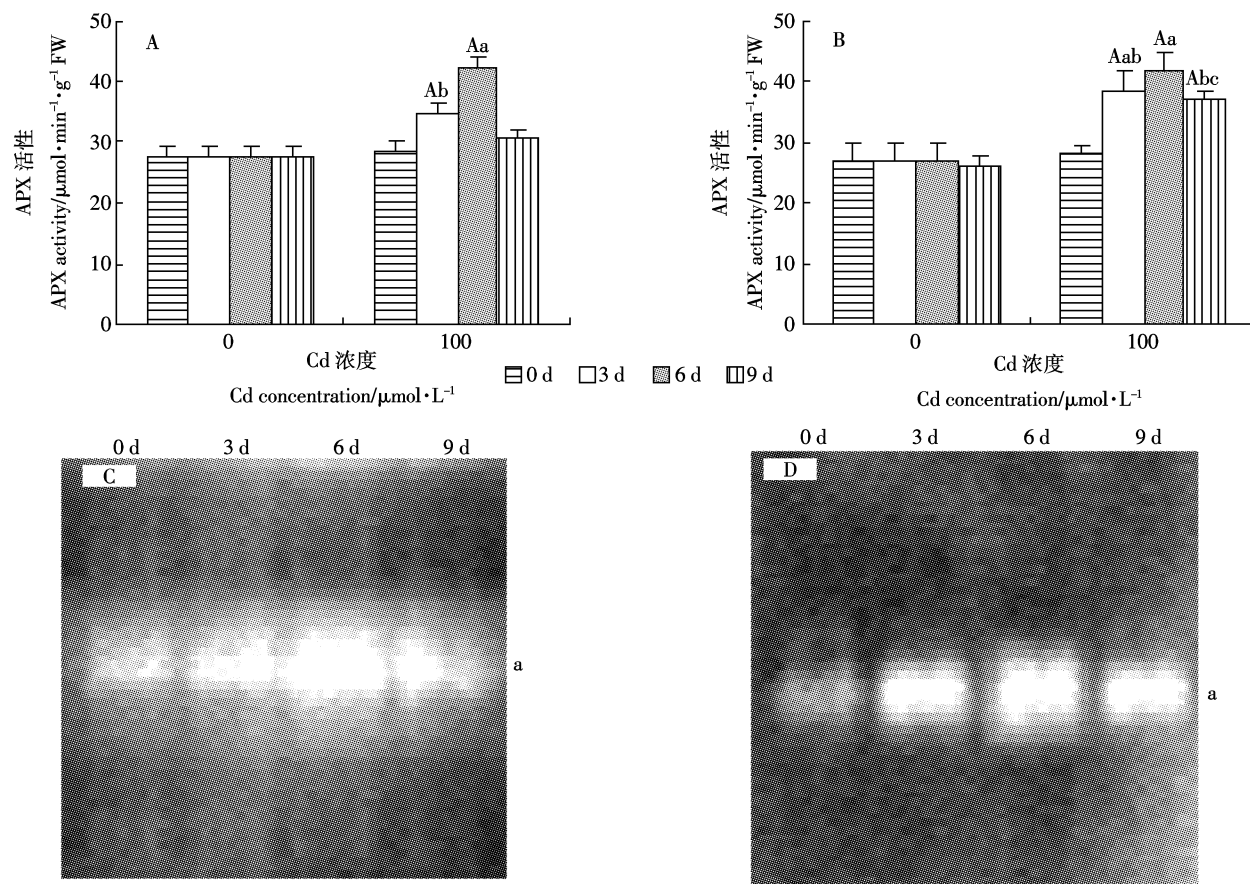


图 4 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下绿豆(A、C)和箭舌豌豆(B、D)幼苗叶 APX 同工酶活性及其酶谱的变化

Figure 4 The change of the APX isoenzyme activity and activity staining following PAGE of extracts from the leaves of mung bean (A, C) or common vetch (B, D) seedlings under $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress

舌豌豆的在胁迫 9 d 时,其含量又回升到对照的水平(图 8)。推测,Cd 胁迫后,GSH 的降低也与其参与活性氧的清除有关。但因 Cd 胁迫明显降低了绿豆叶的 GR 活性(图 6),所以 GSH 不能如箭舌豌豆那样在 Cd 胁迫的后期还能得以恢复。

2.5 Cd 胁迫下两种植物幼苗叶内的 Cd 含量

由图 9 可见,随着 Cd 胁迫时间的延长,绿豆和箭舌豌豆叶内的 Cd 含量显著增加($P < 0.05$),两种相比,绿豆叶内增加更多。推测这与绿豆叶的抗氧化酶 SOD、CAT 和 APX 的活性较低有关。

3 讨论

有研究表明,Cd 诱导豌豆叶^[17]、假马齿苋根和叶^[18]等植物组织内的 SOD 活性升高,但较高或较低浓度的 Cd 较长时间暴露于植物时则使其组织中的 SOD 活性降低^[19]。本研究结果表明,在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁迫 9 d 内,两种植物幼苗叶的 SOD 活性均显著升高($P < 0.05$),但随着胁迫时间的延长(6 d 后),则均呈

下降趋势(图 2)。许多研究证明,植物在受到各种胁迫时,其体内的 SOD 活性增加是为了将胁迫产生的活性氧 $\text{O}_2 \cdot$ 歧化为 H_2O_2 ,而使植物免受 $\text{O}_2 \cdot$ 的氧化损伤^[20]。

在植物组织中,一些酶调控着细胞内由 SOD 酶催化产生的另一种活性氧—— H_2O_2 的代谢,其中 CAT、APX 和 GPOD 是较为重要的酶。研究发现,Cd 明显促进了萝卜叶片^[21]、假马齿苋根和叶^[18]以及玉米^[22]的 CAT 活性,但显著降低了拟南芥^[23]等植物组织中的 CAT 活性。Dixit V 等^[17]认为在豌豆叶中,Cd 诱导的 CAT 活性降低是 H_2O_2 诱导的结果。本研究中,Cd 胁迫后两种植物叶组织的 CAT 活性变化与 SOD 的相似,即表现为先升后降的趋势,由此可推测上述前人研究结果的不同可能是由于供试植物样受 Cd 胁迫的时间不同所造成的。另外,Cd 胁迫诱导产生了 $\text{O}_2 \cdot$,后者被 SOD 歧化后生成的 H_2O_2 可由 CAT、APX 和 GPOD 等酶进行清除。与 CAT 相比,Cd 胁迫后,两种植物叶组织的 APX 活性也发生了类似的变化(图 4),推测其主

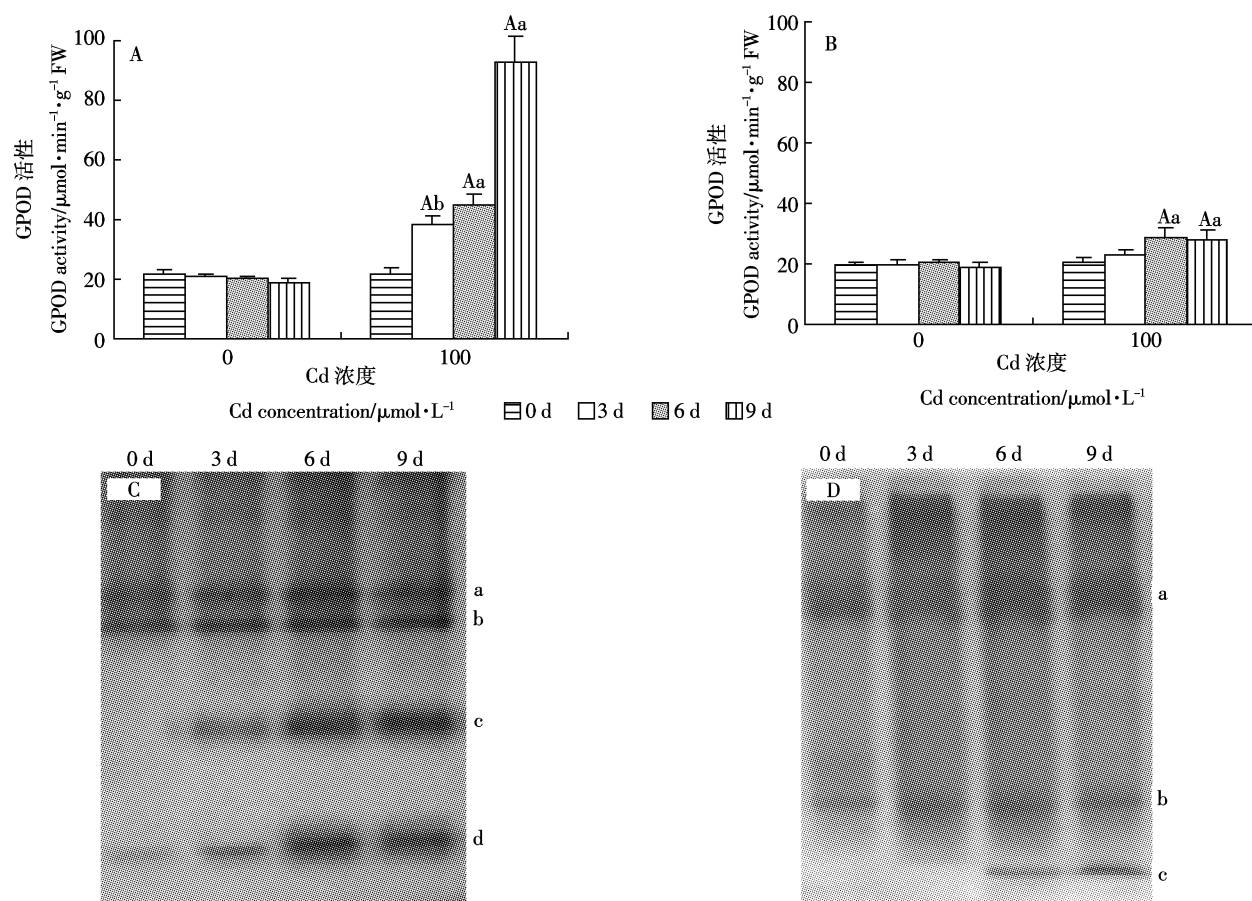


图 5 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下绿豆(A、C)和箭舌豌豆(B、D)幼苗叶 GPOD 同工酶活性及其酶谱的变化

Figure 5 The change of the GPOD isoenzyme activity and activity staining following PAGE of extracts from the leaves of mung bean (A, C) or common vetch (B, D) seedling under $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress

要作用可能与 CAT 的相同。

PODs 是一族能利用 H_2O_2 氧化供氢体的酶。与 CAT 相比,它们对 H_2O_2 有较高的亲和力,但对供氢体的要求则较为广泛,如酚类、胺类、某些杂环化合物及一些无机离子均可作为 PODs 的供氢体。因此,PODs 也被认为是逆境胁迫下植物体清除 H_2O_2 的关键酶之一。其中,人们在植物体外利用愈创木酚作为供氢体去测定 POD 活性的较多,因此测得的 POD 被特指为 GPOD。与 SOD、CAT 和 APX 不同,GPOD 在受 Cd 胁迫的两种植物叶组织中的变化有所不同(图 4)。在绿豆叶组织中,Cd 胁迫 6~9 d 时,GPOD 活性显著高于其对照($P<0.05$),且与箭舌豌豆相比差异也很显著($P<0.05$)。Fecht-Christoffers 等^[24]报道,过量的 Mn 导致豇豆叶上出现毒害症状棕褐色斑点与 GPOD 催化 H_2O_2 将酚类物质氧化成茶褐色物质有关。本研究也发现,在 Cd 胁迫约 6 d 后绿豆叶片上有较多的棕色斑点出现,而在箭舌豌豆的叶片上没有观察到(图 1),推测 Cd 胁迫后,绿豆叶片 GPOD 活性的显著升

高不仅与叶片上棕色斑点的出现有关,还与 H_2O_2 的清除有关。

GR 存在于高等植物的叶绿体、细胞质和线粒体等细胞器中,是抗坏血酸-谷胱甘肽循环的关键酶,它通过维持较高的 GSH/GSSG 比率以防细胞遭受氧化胁迫伤害。研究表明,豌豆根^[17]的 GR 活性被 Cd 激活,但向日葵叶^[25]和金鱼藻^[26]的 GR 因 Cd 的暴露而降低。本研究表明,Cd 胁迫后两种植物叶的 GR 活性呈现不同的变化。其中,绿豆叶的 GR 在 Cd 胁迫后的第 4 d 升高,其后下降到对照水平之下;而箭舌豌豆的在胁迫期间均高于其对照的。后者的活性较高,说明其能维持较高的 GSH/GSSG 比率,这可能也是箭舌豌豆具有强于绿豆 Cd 耐性的重要原因。

GSH 是植物体内重要的非蛋白巯基物质,它在植物的代谢方面有许多功能。本研究发现,绿豆叶内 GSH 在 Cd 胁迫的整个过程中呈逐渐下降的趋势,而箭舌豌豆叶内 GSH 在 Cd 胁迫的前期(6 d 前)呈下降趋势(图 8),到 Cd 胁迫的后期(9 d)GSH 含量几乎回

升到了 0 d 时的水平, 这可能与 Cd 胁迫下箭舌豌豆叶中 GR 活性不下降, 反而升高有关。

在本研究中, 与 GSH 相似, Cd 胁迫也导致绿豆叶中的 ASC 含量降低(图 7), 表明 Cd 胁迫影响了绿豆叶的 ASC-GSH 循环。在豌豆叶中积累 H_2O_2 是由于 Cd 限制了它的 ASC-GSH 循环^[17], 由此可推测 Cd 胁迫下, 绿豆叶中可能积累了较多的 H_2O_2 , 箭舌豌豆叶中积累的 H_2O_2 可能较少。

4 结论

(1) Cd 胁迫诱导绿豆和箭舌豌豆叶的抗氧化酶 SOD、CAT、APX、GR 和 GPOD 的活性发生了显著的变化, 较高的 CAT、APX 和 SOD 活性与植物的 Cd 耐性有关。

(2) Cd 胁迫诱导了绿豆叶内的抗氧化物质 ASC 和 GSH 含量的降低与绿豆对 Cd 敏感有关。

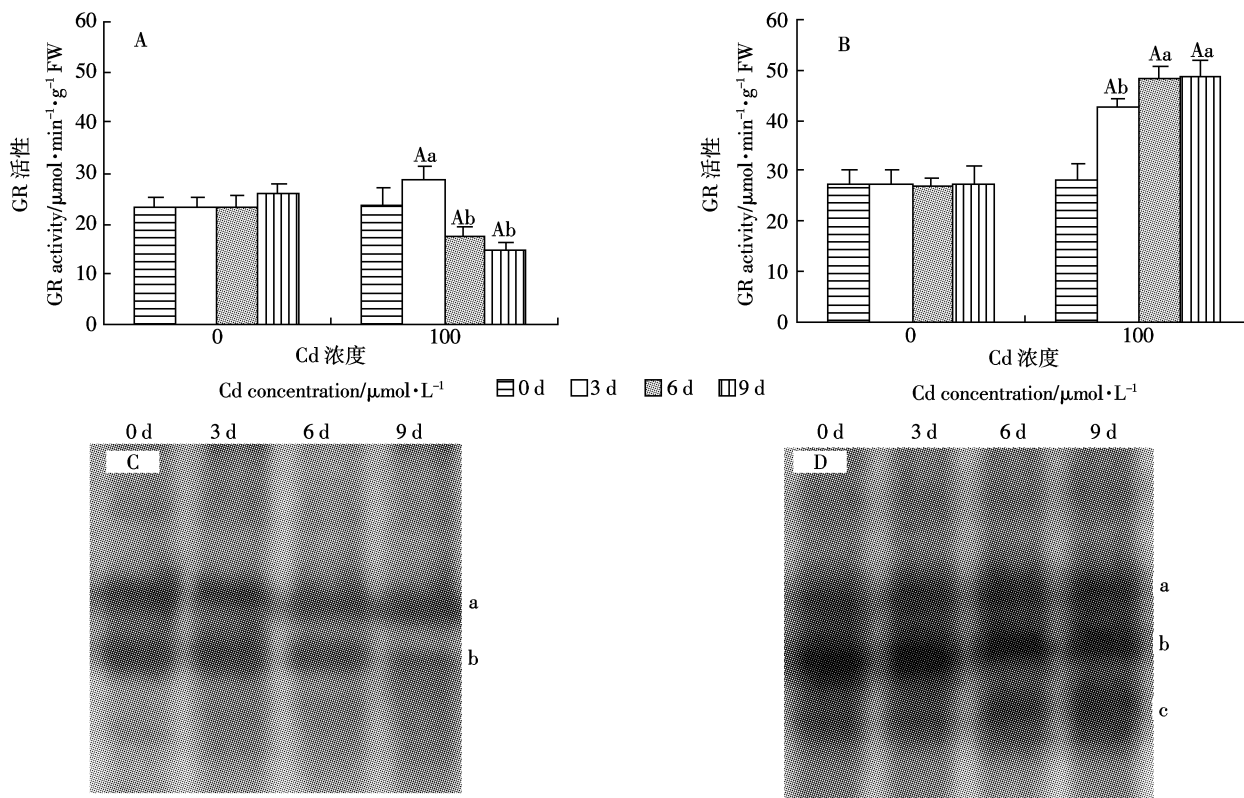


图 6 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下绿豆(A、C)和箭舌豌豆(B、D)幼苗叶 GR 同工酶活性及其酶谱的变化

Figure 6 The change of the GR isoenzyme activity and activity staining following PAGE of extracts from the leaves of mung bean (A, C) or common vetch (B, D) seedling under $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress

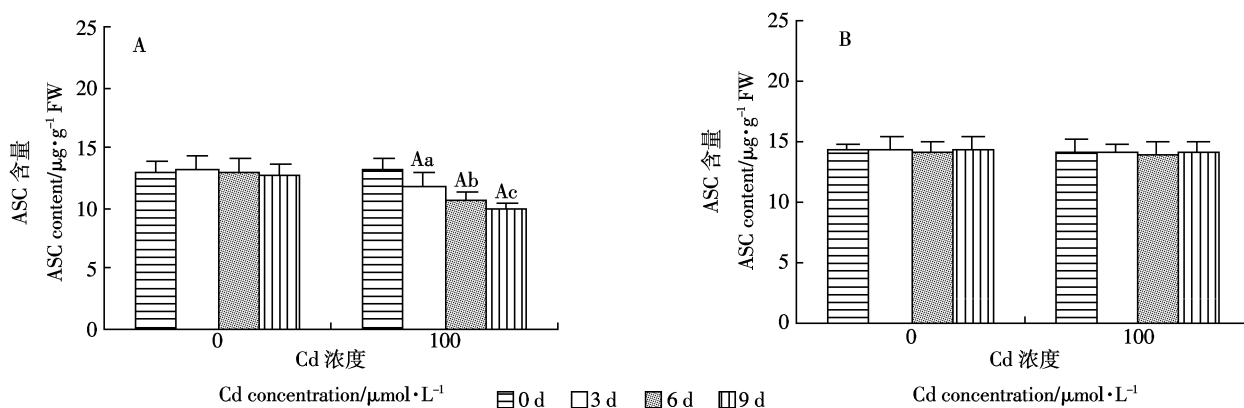


图 7 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下绿豆(A)和箭舌豌豆(B)幼苗叶中 ASC 含量的变化

Figure 7 The change of the ASC content in the leaves of mung bean(A) or common vetch(B) seedlings under $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd stress

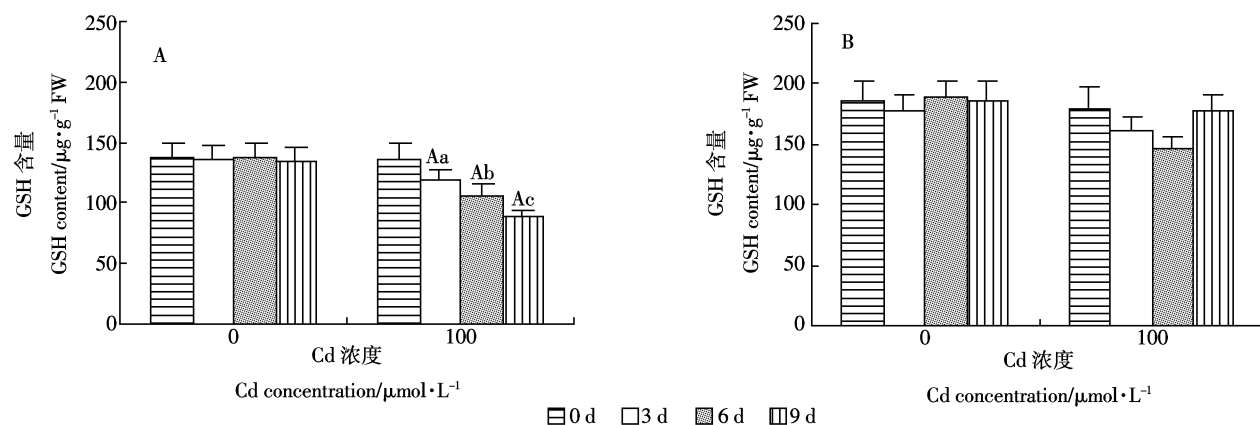


图8 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd胁迫下绿豆(A)和箭舌豌豆(B)幼苗叶中 GSH 含量的变化

Figure 8 The change of the GSH content in the leaves of mung bean (A) or common vetch (B) seedlings under 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd stress

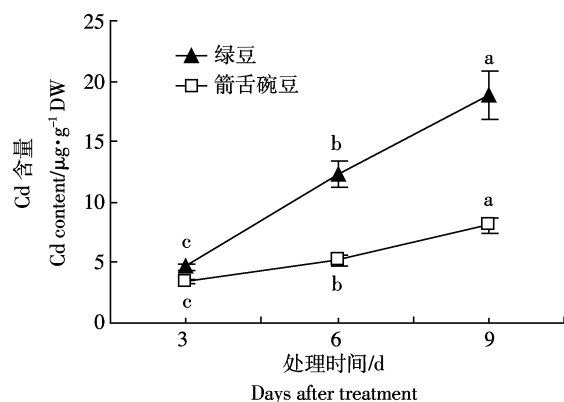


图9 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd胁迫下绿豆和箭舌豌豆幼苗叶内的 Cd 含量变化

Figure 9 The change of Cd content in the leaves of mung bean or common vetch seedlings under 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd stress

(3)由上述结果推测,Cd胁迫下两种植物叶中产生的活性氧(如 $\text{O}_2\cdot$ 和 H_2O_2 等)存在着差异,这些差异与它们的 Cd 耐性不同有关系,绿豆叶片 GPOD 活性的显著升高不仅与叶片上棕色斑点的出现有关,而且还与 H_2O_2 的清除有关,但更直接的关系尚需进一步的研究证实。

参考文献:

- [1] Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants[J]. *Biochimie*, 2006, 88: 1707-1719.
- [2] Sanita di Toppi L, Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants[J]. *Environ Exp Bot*, 1999, 41: 105-130.
- [3] Schutzendubel A, Nikolova P, Rudolf C, et al. Cadmium and H_2O_2 -induced oxidative stress in *Populus canescens* roots[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40: 577-584.
- [4] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 405-410.
- [5] Uruguchi S, Watanabe I, Yoshitomi A, et al. Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea*[J]. *J Exp Bot*, 2006, 57: 2955.
- [6] Semane B, Cuypers A, Smeets K, et al. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione-metabolism and antioxidative defence system [J]. *Physiol Plant*, 2007, 129: 519-528.
- [7] Ekmekci Y, Tanyolac D, Ayhan B. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars[J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165: 600-611.
- [8] 崔 玮, 张芬琴, 金自学. Cd^{2+} 处理对两种豆科作物幼苗生长的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(1): 60-63.
- [9] CUI Wei, ZNANG Fen-qin, JIN Zi-xue. Effects of treatment with Cd^{2+} on seedling growth of two beans[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(1): 60-63.
- [10] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase in higher plants[J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: 309-314.
- [11] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22: 867-880.
- [12] Schaedle M, Bassham J A. Chloroplast glutathione reductase[J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: 1011-1012.
- [13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [14] Rao M V, Paliyath G, Ormrod D P. Ultraviolet-B-and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiol*, 1996, 110: 125-136.
- [15] Klotz M G, Hutcheson S W. Multiple periplasmic catalases in phytopathogenic strains of *Pseudomonas syringae*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 2468-2473.
- [16] Arakawa N, Tsutsumi K, Sanceda N G, et al. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline[J]. *Agric Biol Chem*, 1981, 45(5): 1289-1290.
- [17] Griffith O W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine[J]. *Anal Biochem*, 1980, 106: 207-212.

- [17] Dixit V, Pandey V, Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad)[J]. *J Exper Bot*, 2001, 52: 1101–1109.
- [18] Singh S, Eapen S, D'Souza S F. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L.[J]. *Chemosphere*, 2006, 62: 233–246.
- [19] 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.
- [20] Chaoui A, Mqazhoudi S, Ghorbal M H, et al. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. *Plant Sci*, 1997, 127: 139–147.
- [21] 汤春芳, 刘国云, 曾光明, 等. 镉胁迫对萝卜幼苗活性氧的产生、膜脂过氧化和抗氧化酶活性的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(4): 469–471.
- TANG Chun-fang, LIU Yun-guo, ZENG Guang-ming, et al. Effects of cadmium stress on active oxygen generation, lipid peroxidation and antioxidant and antioxidant enzyme activities in radish seedlings [J]. *Acta Photophysiological Sinica*, 2004, 30(4): 469–471.
- [22] 黄 辉, 李 升, 郭娇丽. 镉胁迫对玉米幼苗抗氧化系统及光合作用的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(2): 211–215.
- HUANG Hui, LI Sheng, GUO Jiao-li. The Influence of cadmium to the antioxidant system and photosynthesis of seedling of *Zea mays* L. [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(2): 211–215.
- [23] Skórzyńska-Polit E, Drażkiewicz M, Krupa Z. The activity of the antioxidant system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biol Plant*, 2003, 47: 71–78.
- [24] Fecht-Christoffers M M, Führes H, Braun H P, et al. The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidase in the leaf apoplast of cowpea in Manganese tolerance [J]. *Plant Physiol*, 2006, 140: 1451–1463.
- [25] Gallego S M, Benavides M P, Tomaro ML. Effect of heavy metal ions on sunflower leaves: Evidence for involvement of oxidative stress [J]. *Plant Sci*, 1996, 121: 151–159.
- [26] Aravind P, Prasad M N V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43: 107–116.