

镉对超富集植物滇苦菜抗氧化系统的影响

汤叶涛^{1,2}, 关丽捷¹, 仇荣亮^{1,2,*}, 应蓉蓉¹, 刘凤杰¹, 胡鹏杰¹

(1. 中山大学环境科学与工程学院, 广州 510275; 2. 广东省环境污染控制与修复技术重点实验室, 广州 510275)

摘要:采用水培实验, 研究镉(Cd)对一种新发现的Cd超富集植物——滇苦菜抗氧化系统的影响。结果表明, 中、低浓度Cd($1 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理下滇苦菜生物量与对照无显著差异, 而高浓度Cd($50 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)抑制了滇苦菜的生长, 整株生物量比对照降低了72%和86%。 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理下地上部Cd浓度达到 $270 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (干重), 转运系数为1.41, 符合超富集植物的特征。滇苦菜地上部Cd富集浓度最高达 $3919 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 且64%—87%的Cd分布在地上部。中、低浓度Cd($1 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)胁迫下, 滇苦菜的丙二醛(MDA)和 H_2O_2 含量、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)产生速率及各抗氧化酶活性与对照没有显著差异。但高浓度Cd($50 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)胁迫下, 地上部MDA、 H_2O_2 含量和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率比对照分别提高了5—17、1.6—6倍和2.9—7.2倍, 地下部分别提高了1—5、1.4倍和9.5—11倍。同时, 高浓度Cd处理下地上部和地下部超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性以及地上部谷胱甘肽(GSH)含量显著上升, 但谷胱甘肽还原酶(GR)和过氧化氢酶(CAT)活性变化不明显。研究表明, 滇苦菜对Cd有较强的富集和转运能力。中、低浓度Cd处理未对滇苦菜造成明显的氧化胁迫, 高浓度Cd处理时滇苦菜地上部与地下部均受到氧化胁迫, 但对抗氧化胁迫的响应方式不同。

关键词:抗氧化系统; 镉; 超富集植物; 滇苦菜; 活性氧

Antioxidative defense to cadmium in hyperaccumulator *Picris divaricata* V.

TANG Yetao^{1,2}, GUAN Lijie¹, QIU Rongliang^{1,2,*}, YING Rongrong¹, LIU Fengjie¹, HU Pengjie¹

1 School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Environmental Pollution Control and Remediation Technology, Guangzhou 510275, China

Abstract: A hydroponic experiment was conducted to investigate the role of the antioxidative defense system in cadmium (Cd) tolerance of a new Cd-hyperaccumulator *Picris divaricata* V. The results showed that low and moderate levels of Cd ($1 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in solution did not affect the growth of *P. divaricata*, whereas high levels of Cd addition ($50 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) inhibited the growth, with 72% and 86% biomass reduction compared to the control. Cd concentration in shoots reached $270 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ at $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd with a translocation factor of 1.41, in accordance with the characteristics of Cd hyperaccumulation. The maximum shoot concentration of Cd reached $3919 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and about 64%—87% of total Cd was allocated in the shoots. Addition of $1 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd did not affect the amounts of malondialdehyde (MDA), H_2O_2 , superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and the activities of antioxidative enzymes. However, $50 - 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd induced the accumulation of MDA, H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$ both in the shoots and roots, which were increased by 5—17 and 1—5 folds, 1.6—6 and 1.4 folds, 2.9—7.2 and 9.5—11 folds than those of the control, respectively. Meanwhile, high levels of Cd significantly enhanced the activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) in shoots and roots as well as the shoot glutathione (GSH) concentration, but had no obvious effects on the activities of glutathione reductase (GR) and catalase (CAT). We concluded here that *P. divaricata* has a strong capability in Cd accumulation and translocation. Low and moderate addition of Cd did not induce any obvious oxidative stress; high Cd treatments induced the lipid peroxidation and accumulation of reactive oxygen species (ROS), which might be removed by different mechanisms in shoots and roots.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(40571144); 广东省自然科学基金团队资助项目(06202438); 国家教育部博士点基金资助项目(20070558005); 广东省环境污染控制与修复技术重点实验室开放基金资助项目(2006K0012)

收稿日期:2008-09-17; **修订日期:**2009-02-17

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: eesql@mail.sysu.edu.cn

Key Words: antioxidative system; cadmium; hyperaccumulator; *Piris divaricata* V.; reactive oxygen species

镉(Cd)对植物具有明显的毒害作用,它易于被植物吸收和积累,超过一定剂量则严重影响植物的生命代谢活动,阻碍植物生长发育甚至导致植物死亡^[1]。Cd由于氧化还原电位低,不会通过Fenton和Haber-Weiss反应直接干扰植物体内的氧化还原反应^[2]。但大量研究显示^[3-5],受Cd胁迫的植物同样表现出活性氧(ROS)积累、酶失活、DNA和蛋白质破坏以及膜脂过氧化伤害等症状。抗氧化系统是植物受逆境胁迫时抵抗不良影响的重要机制,通过各类抗氧化剂可清除胁迫产生的ROS,如超氧阴离子自由基(O_2^-)和 H_2O_2 等。抗氧化剂主要包括专性的抗氧化酶类如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽还原酶(GR)、抗坏血酸过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶,以及非专性的抗氧化物质如抗坏血酸和谷胱甘肽(GSH)等。这些抗氧化剂在植物抵抗Cd胁迫中的作用,已从芦苇^[6]、印度芥菜^[7]、燕麦、不结球白菜和生菜^[8]等植物中得到证实。

作为耐性的一种极端形式,植物对Cd的超富集是对逆境胁迫的长期适应机制。尽管超富集植物与普通植物相比对Cd具有更强的耐性,Cd同样会诱导超富集植物体内ROS的积累^[9-10],因此仍需要发挥抗氧化系统的作用以清除Cd胁迫产生的ROS,保证植物体的正常生理代谢功能。目前对Cd超富集植物抗氧化系统的研究较少,且研究表明*Thlaspi caerulescens*^[11]、东南景天(*Sedum alfredii*)^[9]、龙葵(*Solanum nigrum* L.)^[10]等不同超富集植物抗氧化系统对Cd的响应差异很大,SOD、CAT、POD、GSH等抗氧化物质在Cd胁迫下的表现尚无明显的规律性可循。本试验以课题组新发现的Cd超富集植物滇苦菜(*Piris divaricata* V.)为材料^①,研究水培条件下Cd处理对滇苦菜膜脂过氧化、ROS积累及抗氧化系统(SOD、CAT、POD、GR和GSH)的影响,探讨滇苦菜对Cd胁迫的抗氧化响应机制及与其它超富集植物的不同,为丰富超富集植物对Cd耐性的生理机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物培养

滇苦菜种子采于云南省兰坪铅锌矿区。种子用2%的NaClO消毒10min后在营养土中萌发。培养65d后,将长势一致的幼苗移入20%的Hoagland营养液预培养。营养液配方为($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$):800 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot4\text{H}_2\text{O} + 100\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + 420\text{MgSO}_4\cdot7\text{H}_2\text{O} + 1300\text{KNO}_3 + 9.0\text{H}_3\text{BO}_3 + 0.5\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O} + 0.15\text{ZnSO}_4\cdot7\text{H}_2\text{O} + 0.08\text{CuSO}_4\cdot5\text{H}_2\text{O} + 0.02(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} + 25\text{Fe-EDTA}$ 。营养液用2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES(2-morpholinoethanesulphonic acid)-1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH调节pH为5.8,连续24h曝气。植物预培养7d后,在上述营养液中进行5个Cd浓度处理,分别为0(对照,CK),1,10,50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 $\text{CdCl}_2\cdot2.5\text{H}_2\text{O}$ 形态加入)。每处理设3个重复,每个重复4株植物,每3d换1次营养液。温室生长条件为:白天/夜晚温度为25/18℃,相对湿度70%—75%。

处理3周后收获。植物根用自来水和去离子水洗净,将样品分地上部与根部称鲜重。于105℃下杀青30 min,75℃下烘干后,称干重。各部分含水率通过鲜重和干重的差求出。

1.2 植物Cd含量测定

称取0.2 g植物干样,采用浓 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ (体积分数5:1)法消解,植物Cd含量用电感耦合等离子体发射光谱(ICP-AES)测定。

1.3 植物中丙二醛(MDA)的测定

称取0.2 g植物鲜样,加2 ml 10%三氯乙酸(TCA)和少量石英砂,冰浴研钵内研磨匀浆,用TCA定容至5 ml。 $12\ 000\times g$ 离心20 min,上清液为样品提取液。取上清液2 ml(对照加2 ml蒸馏水),加入2 ml 0.6%硫代巴比妥酸(TBA)溶液,摇匀。将试管放入沸水浴中煮沸10 min,取出试管并冷却,3000 r/min离心15 min,取

① Tang等,待发表的数据

上清液量体积,以对照溶液为空白测定 450、532 nm 和 600 nm 处的吸光值。

1.4 植物中 ROS 的测定

O_2^- 和 H_2O_2 的测定分别参照陈建勋等^[12]和 Jin 等^[9]介绍的方法。

1.5 抗氧化酶活性的测定

SOD、POD、CAT 活性采用李合生等^[13]介绍的方法。GR 活性测定参照 Foyer 和 Halliwell^[14]的方法。

1.6 GSH 的测定

GSH 提取同 MDA 的样品提取方法,GSH 含量参照陈建勋等^[12]的方法,采用巯基试剂 DTNB(5,5'-dithio-bis-nitrobenzoic acid) 测定。

1.7 数据分析

数据处理和图表制作采用 Excel 2003,所有结果为 3 次重复数据的平均值,差异显著性采用 SPSS 11.5 的 One-way ANOVA(Duncan 法)进行检验,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 Cd 对滇苦菜生长的影响

滇苦菜生物量和含水率随 Cd 处理浓度的增加显著降低(地下部含水率除外,表 1)。营养液 Cd 浓度 $\leq 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,植株生长正常,其生物量和含水率与 CK 差异不明显;但 Cd 浓度 $\geq 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,叶片出现不均匀黄斑,根系发黑且须根明显减少。50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理下,整株生物量比 CK 降低 72% 和 86%,其中地上部鲜重仅为 CK 的 22% 和 9.8%,含水率为 CK 的 88% 和 84%;地下部鲜重和含水率的变化没有地上部显著。

表 1 不同 Cd 处理下的滇苦菜生物量和含水率

Table 1 Biomass and hydrous ratio of *P. divaricata* in different Cd treatments

Cd/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	鲜重 Fresh weight/(g·plant $^{-1}$)			含水率 Hydrous ratio/%	
	地上部 Shoot	地下部 Root	总量 Total	地上部 Shoot	地下部 Root
CK	1.356 \pm 0.195 a	0.276 \pm 0.028 a	1.632 \pm 0.222	91.3 \pm 0.7 a	94.9 \pm 0.4 a
1	1.391 \pm 0.665 a	0.235 \pm 0.109 ab	1.626 \pm 0.773	92.3 \pm 0.4 a	94.1 \pm 0.4 ab
10	1.220 \pm 0.226 a	0.261 \pm 0.054 ab	1.480 \pm 0.262	92.5 \pm 0.5 a	94.5 \pm 0.8 ab
50	0.303 \pm 0.167 b	0.149 \pm 0.049 bc	0.453 \pm 0.213	80.8 \pm 9.7 b	92.3 \pm 1.2 ab
100	0.134 \pm 0.040 b	0.094 \pm 0.031 c	0.228 \pm 0.059	76.8 \pm 3.5 b	90.9 \pm 4.1 b
显著性 Sig	* *	*	* *	* *	ns

数值表示 3 个重复的平均值 \pm 标准差;同一列不同小写字母表示 5% 水平上的显著性差异,One-way ANOVA(Duncan 检验);Sig 表示显著性水平,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$;*** $P < 0.001$;ns 表示不显著;下同

2.2 滇苦菜对 Cd 的富集和转运

转运系数是植物地上部重金属含量与地下部重金属含量的比值。表 2 表明,滇苦菜地上部和地下部 Cd

表 2 滇苦菜对 Cd 的富集浓度和转运系数

Table 2 Cd concentration and translocation factor in *P. divaricata*

Cd/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	地上部/(mg·kg $^{-1}$ DW)		地下部/(mg·kg $^{-1}$ DW)	转运系数 Translocation factor
	Shoot	Root		
CK	ND		ND	-
1	33.2 \pm 0.3 c		11.4 \pm 4.0 c	3.22 \pm 1.28 a
10	271 \pm 16 c		193 \pm 23 c	1.41 \pm 0.12 b
50	1766 \pm 94 b		3287 \pm 246 b	0.54 \pm 0.01 b
100	3920 \pm 937 a		7021 \pm 1271 a	0.64 \pm 0.39 b
Sig	* * *		* * *	* *

ND 表示显著性未检出

含量随着营养液 Cd 浓度的增加显著上升。当 Cd 浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 地上部 Cd 含量达 $271 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 且转运系数为 1.41。 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理时, 地上和地下部 Cd 含量最高, 分别为 $3920 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $7021 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。与富集浓度不同, 滇苦菜对 Cd 的转运随 Cd 处理浓度总体呈降低趋势, 中、低 Cd 浓度时转运系数大于 1, 但高浓度 Cd 处理下转运系数小于 1。

富集量是植物吸收重金属的总量, 而富集率是指植物各部位重金属富集量占整株植物重金属富集量的百分比。滇苦菜地上部的 Cd 富集量远远大于地下部(图 1), 而地上部 Cd 的富集率随处理浓度变化呈现 U 型趋势(图 2), $1\text{--}50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理时下降, 在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理时增加到 75%。整个植株富集的 Cd 有 64%—87% 分布在地面上部, 表明滇苦菜具有较强的吸收与向上运输 Cd 的能力。

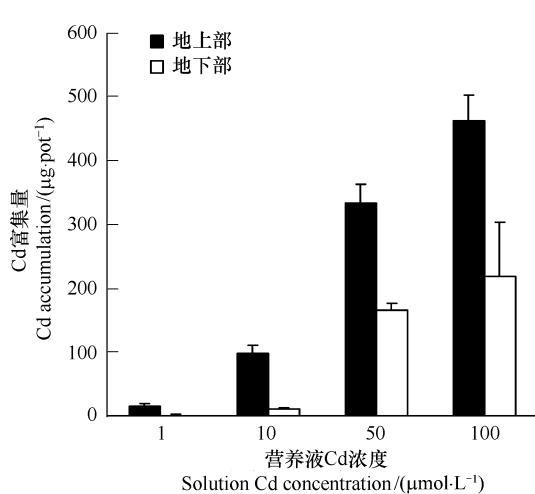


图 1 滇苦菜对 Cd 的富集量

Fig. 1 Cd accumulation in *P. divaricata*

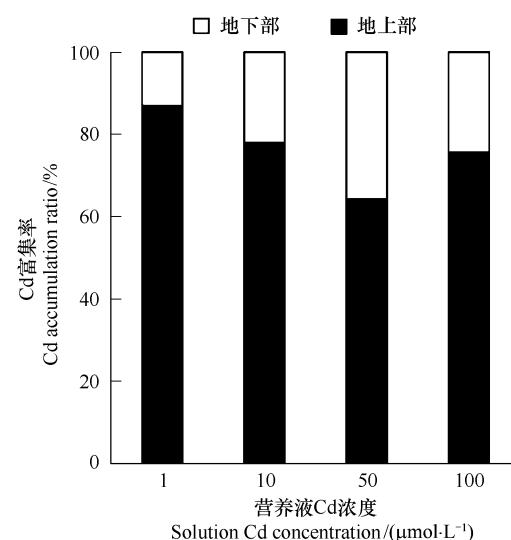


图 2 Cd 在滇苦菜地上和地下部的分布

Fig. 2 Cd distribution in the shoots and roots of *P. divaricata*

2.3 Cd 对滇苦菜的氧化胁迫

2.3.1 Cd 对滇苦菜 MDA 积累量的影响

由图 3 可见, 当营养液 Cd 浓度 $\leqslant 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 地上和地下部的 MDA 含量没有受到显著影响 ($P > 0.05$), 地上部 MDA 含量略低于地下部。但 Cd 处理浓度达到 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, MDA 含量迅速上升, 尤其是地上部, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理时地上部 MDA 含量为地下部的 2.25 倍。与 CK 相比, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理下地上部 MDA 含量上升了约 5 倍和 17 倍, 地下部上升 1 倍和 5 倍。

2.3.2 Cd 对滇苦菜 ROS 产生量的影响

滇苦菜地上部的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率除 $1\text{--}10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理比 CK 略低, 总体呈上升趋势(图 4A)。Cd 浓度为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率为 CK 的 2.9 倍和 7.2 倍, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理与 CK 的差异达极显著水平($P < 0.01$); 地下部 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率的变化与地上部类似, 在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理时显著上升, 为 CK 的 9.5 倍和 11 倍。总的来说, 滇苦菜地上部 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率高于地下部, 特别在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理时比地下部高 94%。

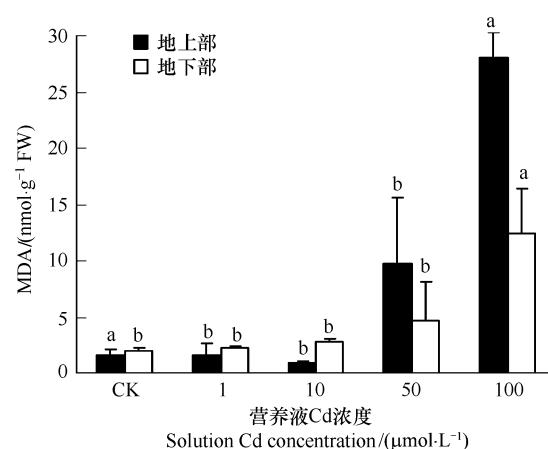


图 3 Cd 胁迫下滇苦菜的 MDA 含量

Fig. 3 MDA concentrations in *P. divaricata* upon exposure to Cd

地上部 H_2O_2 的含量在 $1—50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理时与 CK 没有显著差异 ($P > 0.05$)，最高 Cd 浓度时 H_2O_2 的含量明显升高，为 CK 的 6 倍，与 CK 及其它各处理间的差异达极显著水平 ($P < 0.01$) (图 4B)；地下部 H_2O_2 含量同样随 Cd 浓度的增加呈上升趋势，在 50 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理时为 CK 的 140% 和 137% ，但处理间差异不显著。

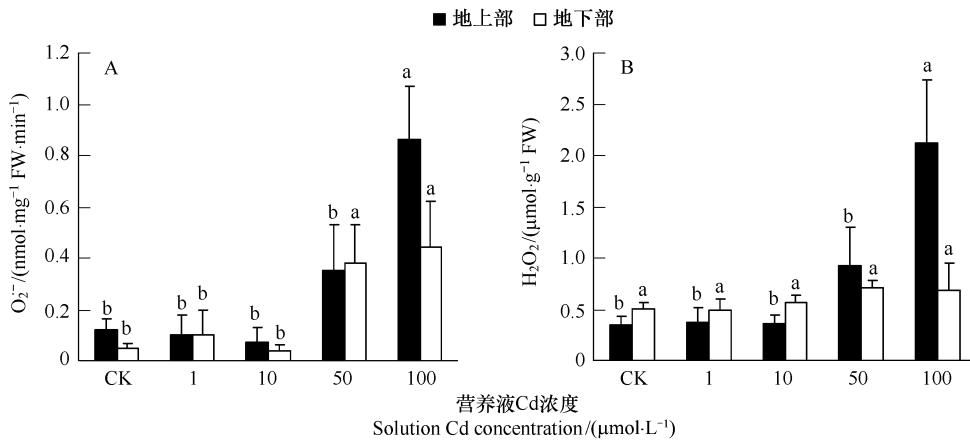


图 4 Cd 胁迫下滇苦菜 O_2^- 产生率(A)和 H_2O_2 含量(B)变化

Fig. 4 The rate of O_2^- generation (A) and H_2O_2 concentration (B) in *P. divaricata* upon exposure to Cd

2.3.3 Cd 对滇苦菜抗氧化酶活性的影响

Cd 对滇苦菜 SOD 活性影响表现为随 Cd 浓度增大而上升，各处理地下部活性均比地上部高(图 5A)。 $1—50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下，地上部 SOD 活性比 CK 提高了 $61\%—171\%$ 。在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 时，SOD 活性为 CK 的 6.3 倍，且与其它处理和 CK 差异显著 ($P < 0.05$)；地下部 SOD 活性的变化没有地上部明显， $1—50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理比 CK 提高了 $33\%—46\%$ ，在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增加最大，为 CK 的 2.5 倍。

地上部 POD 活性随着 Cd 浓度的增大而呈现上升趋势， $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理与 CK 差异不显著 ($P > 0.05$)，但 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理较 CK 显著提高，均为 CK 的 2 倍(图 5B)；在地下部，除 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理引起 POD 活性增加，其它 Cd 处理对 POD 活性的影响均不显著。总体上，地下部 POD 活性比地上部的高。

地上部 CAT 活性随 Cd 浓度增大缓慢增加，在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时有所下降，但仍高于 CK(图 5C)。地下部 CAT 活性变化与地上部相似。各处理下地上部 CAT 活性均比地下部高，但处理间差异不显著 ($P > 0.05$)。与上述 3 种酶活性变化不同，各处理下地上部和地下部的 GR 活性均比对照有所降低，但差异不显著(图 5D)。

2.3.4 Cd 对滇苦菜 CSH 含量的影响

滇苦菜地上部 GSH 含量随 Cd 处理浓度增大呈先下降再上升的趋势(图 6)。在 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 时，GSH 含量降低，为 CK 的 83% 和 67% ，到 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 时，GSH 含量显著上升，为 CK 的 4.2 倍，且与 CK 和其它处理差异显著 ($P < 0.05$)；在 Cd 浓度为 $1—50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，地下部 GSH 含量略有增加，但在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时下降为 CK 的 70% 。

3 讨论

3.1 滇苦菜对 Cd 的富集能力和耐性

关于超富集植物的衡量标准基本趋于一致，即超富集植物至少应同时具有 2 个基本特征：其一是临界含量特征，广泛采用的参考值是植物地上部(主要指茎或叶)中重金属富集的临界含量 Cd 为 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ；其二是转运特征，即地上部重金属含量大于其根部重金属含量。在本试验中，Cd 处理浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，滇苦菜没有出现任何受害症状，其生物量与 CK 没有差异，地上部的 Cd 浓度达到 $270 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 且转运系数大于 1

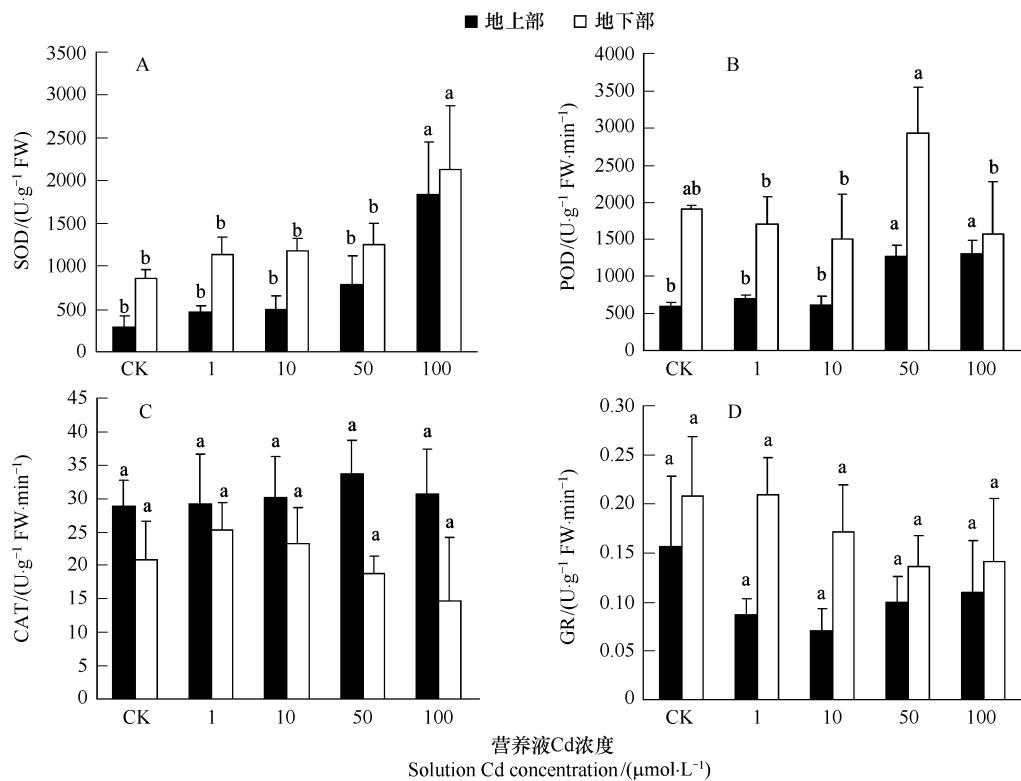


图 5 Cd 对滇苦菜抗氧化酶活性的影响

Fig. 5 Effects of Cd on activities of antioxidant enzymes in *P. divaricata*

(表1和表2),完全符合超富集植物的衡量标准。到 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理以上,滇苦菜的生物量下降,根系 Cd 含量急剧升高,转运系数降低至小于 1。对 Cd 超富集植物东南景天的研究也表明,转运系数随 Cd 浓度的增加呈下降趋势^[15]。这可能是由于高 Cd 处理导致根系严重受害,从而被动吸收大量 Cd 于根部所致。

滇苦菜在 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 营养液浓度即产生受害症状,说明它尽管对 Cd 具有较强的吸收和转运能力,但在水培下对 Cd 的耐性并不很强,可能介于 10—50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间。不同超富集植物对 Cd 的耐性差异很大,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 能够促进东南景天^[15]和圆锥南芥^[16]生物量的增加,但 5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cd 可使 *A. halleri*^[17] 和 *T. caerulescens* (Ganges 生态型)^[18] 的生物量比对照降低 45% 和 36%。对 *T. caerulescens* 而言,富集能力更强的 Ganges 生态型却表现出比低富集能力的 Prayon 生态型更弱的耐性^[18],这意味着该物种对 Cd 的超富集并不是一种耐性策略^[19]。植物对 Cd 的耐性和超富集很可能与 Zn 类似,在遗传上是不同的、独立的特征,耐性受一个单一的主要基因所控制,而超量吸收可能是由多基因控制的过程^[20]。

3.2 滇苦菜对 Cd 的胁迫反应和抗氧化防御系统

Cd 对植物伤害的重要机制之一是 ROS 的过量积累导致膜脂过氧化,MDA 是脂类物质过氧化的最终产物,故常作为植物逆境胁迫的重要指标。本研究中,Cd 浓度 $\leq 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对滇苦菜 MDA 水平没有显著影

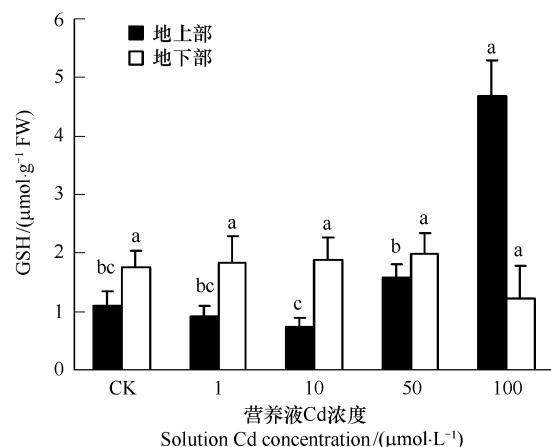


图 6 Cd 胁迫下滇苦菜 GSH 的含量变化

Fig. 6 GSH concentrations in *P. divaricata* upon exposure to Cd

响,其保持膜脂稳定性的能力较小麦^[1]和*Bacopa monnieri* L.^[5]等更强。但 Cd 处理浓度 $\geq 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,ROS 与 MDA 含量迅速上升,说明高浓度 Cd 引起了滇苦菜体内的自由基反应与脂质过氧化,这是因为 Cd 与含 N 或 S 的基团和蛋白质具有很强的亲和性而形成二硫键,从而导致膜离子通道结构的破坏^[5]。地下部 MDA 含量在 Cd 浓度 $\leq 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时高于地上部,而在高 Cd 胁迫下远远低于地上部(图 3),这与东南景天和龙葵 MDA 含量对 Cd 的胁迫响应类似^[9-10]。另外,高 Cd 处理导致地上/地下生物量的比率急剧下降(表 1),表明地上部比地下部对 Cd 更敏感^[17],这与高浓度 Cd 处理下地上部 MDA 和 H₂O₂含量更高一致。

SOD 是对抗已产生的 ROS 的第一道防线:将 O₂⁻歧化为 H₂O₂和 O₂。本研究表明,滇苦菜 SOD 活性随 Cd 处理浓度增加而提高,具有典型的剂量-效应关系(图 5A)。同样,在圆锥南芥的地上部^[16],富集生态型龙葵的根部^[10],芦苇的根、匍匐枝和叶部^[6],SOD 活性随 Cd 处理也表现出增加趋势。SOD 活性的提高可能是由于 ROS 的累积刺激更多的 SOD 被激活^[21],或者是由于编码 SOD 的基因表达的增强,进而产生更多的 SOD^[22]。相反,Wojcik 等^[11]发现 *T. caerulescens* 的 SOD 活性随着 Cd 处理浓度增加而下降。这可能是细胞内的 H₂O₂对该酶产生的抑制作用所致,这些 H₂O₂分布于细胞内不同的区间,能由一系列的非酶或酶的过程产生^[23]。滇苦菜地下部的 SOD 活性比地上部高,可能因为根系是植物吸收矿质营养和水分的主要器官,最先感受逆境胁迫而直接受害^[24],因此植物通过提高根系 SOD 活性,以适应环境胁迫。

滇苦菜地上和地下部 POD 活性随着 Cd 浓度的增加而上升,且根部活性远远高于地上部(图 5B),这与富集生态型龙葵在 Cd 处理下 POD 活性变化不完全一致^[10]。POD 活性在滇苦菜和龙葵中均为根部活性大于叶片。但龙葵在低 Cd 处理时根部 POD 活性上升,随着 Cd 浓度增大,POD 活性逐渐降低至低于 CK 随后再上升。POD 活性提高,可能因为离子的微环境或者是在根系组织有特别基因表达^[25]。也可能 Cd²⁺进入植物组织后,植物体内产生的有毒物质 H₂O₂迅速增加,增加了 POD 酶的底物,因而当底物的浓度在 POD 酶正常分解能力范围内时,POD 活性会随酶底物浓度的增加而提高^[26]。

Cd 胁迫下 CAT 活性在滇苦菜根部和地上部变化都不显著(图 5C)。与 SOD 和 POD 不同的是,地上部 CAT 活性大于根系,在高浓度时差异更为明显。通常 CAT 活性在植物根系和茎中低于叶片^[27-28],表明光合作用是 ROS 的主要来源,而非叶组织内存在较少的叶绿体和过氧化物酶体。但研究发现,尽管在黑暗中生长的 *T. caerulescens* 没有由光合作用产生的 ROS,CAT 仍保持高活性,表明根系随时准备清除大量产生的 ROS^[29]。根系是 Cd 进入植物的主要通道,Cd 超富集植物保持根系高的 CAT 活性是合理和高效的防御策略。

除 POD 和 CAT 等抗氧化酶外,GSH 也对 H₂O₂起消除作用,在 GPX 的催化下,GSH 直接还原 H₂O₂,并转化为氧化型谷胱甘肽(GSSG)。GSSG 与 NAD(P)H 在 GR 的催化下,重新还原成 GSH。滇苦菜地上部 GSH 含量随 Cd 处理浓度增加而升高(图 6),而相应 GR 活性呈下降趋势(图 5D)。当植物细胞遭到逆境胁迫,GSH 生物合成会被刺激,以补偿其它抗氧化物质的降低^[30]。滇苦菜地上部 GSH 含量升高可能是由于叶片大量 ROS 的产生,诱导体内合成更多 GSH。所以尽管没有 GR 还原 GSSG 补充 GSH,滇苦菜 GSH 含量没有降低,反而上升,这也暗示抗坏血酸—谷胱甘肽循环可能不是地上部抵抗 ROS 的主要途径。滇苦菜 GR 活性随 Cd 浓度下降,可能是高 Cd 处理使酶蛋白失活所致。许多植物会因重金属胁迫而导致 GR 活性下降^[6,31],但也有 GR 活性随 Cd 处理增加的报道,譬如 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理 7d 后的豌豆(*Pisum sativum*)^[23]和 40—160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理 14d 后的 *Brassica juncea*^[7]。GR 活性上升将直接导致 GSH 的含量增加,这对于抗坏血酸-谷胱甘肽循环的功能以及 PCs 的合成都是很重要的^[32]。

3.3 滇苦菜抗氧化系统、ROS 与 Cd 之间的关系

相关分析表明(表 3),滇苦菜地上部 Cd 含量与 MDA 和两种 ROS 均呈极显著正相关关系,Cd 与 H₂O₂含量和 O₂⁻产生率的相关系数高达 0.959 和 0.904,说明 Cd 显著诱导了滇苦菜 ROS 的产生和膜脂过氧化产物的积累。同时,SOD 和 O₂⁻产生率、POD 活性和 GSH 含量与 H₂O₂含量之间相关性极显著,说明 SOD、POD 和 GSH 在清除 ROS 的过程中起着重要作用,而 CAT 和 GR 对 H₂O₂的作用不明显。这与前面的讨论结果是一致的。在地下部,Cd 仅与 MDA 含量和 O₂⁻产生速率呈极显著正相关,而 ROS 与其相应的抗氧化剂之间无相关

性,意味着地下部对抗氧化胁迫的方式与地上部存在很大差异。Møller^[33]提出消除 ROS 危害的 3 条途径:(1)避免或者减少 ROS 的产生;(2)ROS 产生后对其进行清除;(3)对 ROS 导致的损害进行修复。本研究表明,Cd 胁迫下滇苦菜地上部抗氧化酶(SOD、POD)的活性和抗氧化物质(GSH)的浓度均较 CK 显著提高,可推断地上部防御膜脂过氧化主要的途径是第 2 条,即通过各种抗氧化剂,尤其是 SOD、POD 和 GSH 的作用清除 ROS。而根部的 MDA、H₂O₂ 和 O₂^{·-} 都明显比地上部低,其抗氧化剂与膜脂过氧化程度也无显著相关性,因此根部很有可能避免或减少 ROS 的产生,而不是完全通过增加抗氧化酶的活性来抵抗氧化胁迫。

表 3 Cd 处理下滇苦菜 Cd 富集浓度、ROS 及抗氧化物质之间的相关性

Table 3 Correlations between the Cd concentration, ROS and antioxidants in Cd-treated *P. divaricata*

地上部 Aboveground				地下部 Underground		
Cd-SOD	0.854 **	SOD - O ₂ ^{·-}	0.746 **	Cd-SOD	0.507	SOD-O ₂ ^{·-}
Cd-POD	0.848 **	POD-H ₂ O ₂	0.848 **	Cd-POD	0.009	POD-H ₂ O ₂
Cd-GSH	0.962 **	CAT-H ₂ O ₂	-0.007	Cd-GSH	-0.525	CAT-H ₂ O ₂
Cd-O ₂ ^{·-}	0.904 **	GR-H ₂ O ₂	0.123	Cd-O ₂ ^{·-}	0.798 **	GR-H ₂ O ₂
Cd-H ₂ O ₂	0.959 **	GSH-H ₂ O ₂	0.921 **	Cd-H ₂ O ₂	0.268	GSH-H ₂ O ₂
Cd-MDA	0.805 **			Cd-MDA	0.744 **	

* 表示在 0.05 水平显著相关; ** 表示在 0.01 水平显著相关; n = 15

References:

- [1] Wu F B, Zhang G P, Dominy P. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. Environmental and Experimental Botany, 2003, 50:67-78.
- [2] Clements S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Biochimie, 2006, 88:1707-1719.
- [3] Schützendübel A, Nikolova P, Rudolf C, Polle A. Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus × canescens* roots. Plant Physiology and Biochemistry., 2002, 40:577-584.
- [4] Ranieri A, Castagna A, Sciebba F, Careri M, Zagnoni I, Predieri G, Pagliari M, di Toppi L S. Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43: 45-54.
- [5] Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, Govindarajan R, Kuriakose S V, Prasad M N V. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Plant Physiology Biochemistry, 2006, 44: 25-37.
- [6] Iannelli M A, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Massacci A. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40:977-982.
- [7] Seth C S, Chaturvedi P K, Misra V. The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008, 71:76-85.
- [8] da Rosa Correa A X, Rorig L R, Verdinelli M A, Cotelle S, Férid J F, Radetski C M. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. Science of Total Environment, 2006, 357:120-127.
- [9] Jin X F, Yang X E, Islam E, Liu D, Mahmood Q. Effects of cadmium on ultrastructure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. Journal of Hazardous Materials., 2008, 156: 387-397.
- [10] Sun R L, Zhou Q X, Sun F H, Jin C X. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly-discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. Environmental and Experimental Botany, 2007, 60:468-476.
- [11] Wójcik M, Skórzyńska-Polit E, Tukiendorf A. Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd stress. Plant Growth Regulation, 2006, 48:145-155.
- [12] Chen J X, Wang X F. Experimental instruction in plant physiology. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2002, 124-125.
- [13] Li H S. Theory and Technique of Plant Physiological and Biochemical Experiments. Beijing: Higher Education Press, 2000, 164-169.
- [14] Foyer C H, Halliwell B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta., 1976, 133, 21-25.
- [15] Yang X E, Long X X, Ye H B, He Z L, Calvert D V, Stoffella P J. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). Plant and Soil., 2004, 259:181-189.
- [16] Qiu R L, Zhao X, Tang Y T, Yu F M, Hu P J. Antioxidative response to Cd in a newly discovered cadmium hyperaccumulator, *Arabis paniculata*

- F. Chemosphere, 2008, 74:6-12.
- [17] Zhao F J, Jiang R F, Dunham S J, McGrath S P. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. New Phytologist, 2006, 172:646-654.
- [18] Cosio C, Desantis L, Frey B, Diallo S, Keller C. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. Journal of Experimental Botany, 2005, 56:765-775.
- [19] Meerts P, Van Isacker N. Heavy metal tolerance and accumulation in metallocolous and non-metallocolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. Plant Ecology, 1997, 133:221-231.
- [20] Macnair M R, Bert V, Huitson S B, Saumitou-Laprade P. Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. Proceedings of the Royal Society B, 1999, 266:2175-2179.
- [21] 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. Physiologia Plantarum, 1992, 85:85-89.
- [22] Bowler C, Van Montagu M, Inze D. Superoxide dismutase and stress tolerance, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 83-116.
- [23] Dixit V, Pandey V, Shyam R. Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). Journal of Experimental Botany, 2001, 52:1101-1109.
- [24] Slomka A, Libik-Konieczny M, Kuta E, Miszalski Z. Metalliferous and non-metalliferous populations of *Viola tricolor* represent similar mode of antioxidative response. Journal of Plant Physiology, 2008, 165:1610-1619.
- [25] Blinda A, Abou-Mandour A, Azarkovich M, Brune A, Dietz K J. Heavy metal-induced changes in peroxidase activity in leaves, roots and cell suspension cultures of *Hordeum vulgare* L//C. Obinger U ed. Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology, University of Geneva, 1996, 374-379.
- [26] Li Y, Wang H X, Wu Y S. Effects of cadmium and iron on the some physiological indicators in leaves of tobacco. Acta Ecologica Sinica, 1992, 12(2) : 147-154.
- [27] Shaw B P. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. Biologia Plantarum, 1995, 37: 587-596.
- [28] Havar E A, Brisson L F, Zelitch I. Distribution of catalase isoforms in *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry, 1996, 41: 699-702.
- [29] Boominathan R, Doran P M. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 83(2) : 158-167.
- [30] Potters G, Gara L D. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? Plant Physiology and Biochemistry, 2002, 40: 537-548.
- [31] Smith I K, Vierheller T L, Thorne C A. Properties and functions of glutathione reductase in plants. Physiologia Plantarum, 1989, 77, 449-456.
- [32] Cobbett C S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiology, 2000, 123:825-832.
- [33] Møller I M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001, 52: 561-591.

参考文献:

- [12] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导. 广州: 华南理工大学出版社, 2002, 124-125.
- [13] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000, 164-169.
- [26] 李元, 王焕校, 吴玉树. Cd、Fe 及其复合污染对烟草叶片几项生理指标的影响. 生态学报, 1992, 12(2) : 147-154.