

Cd胁迫对2种基因型番茄幼苗活性氧清除系统的影响

赵首萍,张永志,于国光,王钢军,叶雪珠

(浙江省农业科学院农产品质量标准研究所/农业部农产品及转基因产品质量安全监督检验测试中心,杭州 310021)

摘要:为了探明Cd对不同基因型番茄活性氧清除系统影响的基因型差异,利用人工气候箱内水培的方法,测定了0,15,30 mg/L Cd处理对2种基因型番茄(高积累型‘以色列189’,低积累型‘合作903’)幼苗活性氧清除系统的影响。结果表明,Cd处理对番茄活性氧清除系统影响显著,且因品种、部位及酶而不同:高Cd积累品种‘以色列189’茎叶过氧化物酶(POD)、及过氧化氢酶(CAT)随Cd浓度增加而显著增加,并显著高于低Cd积累品种‘合作903’,而‘合作903’则有降低趋势;茎叶超氧化物歧化酶(SOD)都是先增加后降低。通过分析,发现‘以色列189’防卫酶对Cd耐性强于‘合作903’,SOD对Cd耐性不如POD和CAT。‘以色列189’因其较强的抗氧化能力及GSH含量,在高积累前提下,没有产生过多的脂质过氧化产物TBARS。

关键词:番茄;镉;活性氧清除系统;幼苗

中图分类号:S1,S6

文献标志码:A

论文编号:2011-0352

The Effect of Cadmium Stress on Two Genotype Tomato Seedlings

Zhao Shouping, Zhang Yongzhi, Yu Guoguang, Wang Gangjun, Ye Xuezh

(Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Institute of Quality Standards for Agro-products/Center for Inspection and Testing for Quality and Safety of Agricultural and Genetically Modified Products, Ministry of Agriculture, P.R.China, Hangzhou 310021)

Abstract: In order to investigate the different response of antioxidant system to Cd stress in relation to genotype in different tomato cultivars, Hydroponically grown tomato young seedlings under 0, 15 and 30 mg/L Cd stress were used, we detected antioxidant system in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) seedlings (hyper-accumulator ‘YSL189’ and low-accumulator ‘HZ903’). The results showed that the activity of antioxidant enzyme varied significantly because of Cd stress in relation to different cultivars, tissues and enzymes. For ‘YSL189’, the activities of POD and CAT in above-ground tissue were increased followed the addition of Cd in growing medium, and get higher values significantly than ‘HZ903’ which decrease tendency in the two enzymes; both cultivars possess increased and then decreased SOD in stem-leaves tissue. We made the conclusion that according to the different antioxidant enzymes, the POD and CAT can adopt to higher Cd concentration than SOD, especially in high-accumulator ‘YSL189’. Because of higher antioxidant enzymes activities and higher GSH level, the ‘YSL189’ get no more TBARS than ‘HZ903’ base on the higher Cd accumulation.

Key words: tomato; cadmium; antioxidant system; seedlings

0 引言

镉(Cd)是生物毒性最强的重金属之一,据统计,中国镉污染耕地面积为1.33万hm²,涉及11个省的25个

地区,并有11处污灌区达到了生产“镉米”的程度^[1]。镉在生物体内的半衰期长达10~35年,属于蓄积性毒物,微量Cd通过食物链进入人体即可通过生物放大和

基金项目:浙江省农业科学院重点实验室前瞻项目“蔬菜重金属低积累特性早期分子标记研究”(2010R19Y01D01);浙江省农业科学院创新提升项目资助“Cd对番茄毒害效应基因型差异研究”(2008R19Y01D03)。

第一作者简介:赵首萍,女,1976年出生,黑龙江鸡西人,博士,主要从事植物营养研究。通信地址:310021 杭州市石桥路198号,浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, Tel: 0571-86419052, E-mail: zhaoshouping760320@yahoo.com.cn。

通讯作者:叶雪珠,女,1974年出生,浙江龙游人,副研究员,主要从事农产品质量安全研究。通信地址:310021 杭州市石桥路198号,浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, Tel: 0571-86415206, E-mail: zjcpaper@yahoo.com.cn。

收稿日期:2011-02-15, **修回日期:**2011-04-18。

积累效应,对人体产生一系列损伤,如“骨痛病”等^[2]。国内外众多研究者在Cd与植物互作机理的各个相关方面进行了大量深入的研究,包括污染土壤的植物修复及提高植物抗性^[3-4]。但这些研究都存在一定的局限性,没有从根本上解决植物吸收Cd的问题,充分利用植物的自身潜力,挖掘低Cd积累的种质资源,寻找低Cd积累过程的控制因子,利用分子生物手段改良种质资源显得尤为重要,而分子生物学途径的改良依赖于重金属低积累的机理研究。

蔬菜重金属积累量的差异也已经得到认可,Wang等^[5]通过研究6种蔬菜对Cd和Pb的富集吸收能力发现,叶菜类蔬菜如大白菜(*Brassica pekinensis* L.)、青菜(*Brassica chinensis* L.)和蕹菜(*Ipomoea aquatica* Forsskal)比非叶菜类蔬菜如丝瓜(*Luffa cylindrical* Roem.)、茄子(*Solanum melongena* L.)和豇豆(*Vigna sinensis* L.)具有较高的富集系数(Cd和Pb的总量),表明叶菜类蔬菜比非叶菜类蔬菜更容易吸收土壤中的Cd和Pb。与之相似,Alexander等^[6]对6种常见蔬菜(每种蔬菜5个品种)吸收Cd、Cu、Pb和Zn的研究表明,在几个污染梯度中,不同蔬菜对重金属元素的吸收存在显著差异。与此同时,大量研究都证实了生物体通过提高防卫系统(超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、还原型谷胱甘肽GSH等)的活性来提高对Cd的耐性^[7],但防卫系统与Cd积累特性基因型差异的关系还鲜见报道。笔者选择以不同Cd积累特性的番茄品种为材料,重点研究品种间防卫系统对Cd胁迫的响应差异,以期探讨Cd积累特性差异的生理基础及利用分子生物学手段改良种质资源提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

于2010年8月—10月在浙江省农业科学院农产品检测与标准实验室进行。

1.2 试验材料

材料为本研究室前期通过温室盆栽及实验室水培鉴定得到的番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)高Cd积累品种‘以色列189’和低Cd积累品种‘合作903’。

1.3 试验方法

1.3.1 种子萌发及处理培养方法 番茄种子用1% NaClO浸泡表面消毒30 min,28℃黑暗浸种24 h。采用人工气候箱内的倒置培养皿法进行培养:萌发的种子均匀摆放于托盘内倒置培养皿上的滤纸上,托盘内放2 L含Cd 0, 15, 30 mg/L的1/2 Hoagland营养液,使滤纸可以吸水保持湿润。重金属Cd以CdCl₂·2.5H₂O

形式提供,为保证重金属浓度,每天早换营养液一次,托盘置于人工气候箱内培养,培养温度:(28±2)℃,相对湿度75%,光照:20000 lx,昼夜循环:光照14 h/黑暗10 h。

1.3.2 取样及各指标测定方法 苗龄15天,取各处理幼苗,分茎叶和地下部取样,液氮速冻后,-40℃冰箱保存,备用,同时测定各处理番茄幼苗的根长及株高,其中Cd 30处理,根部生物量不足以分析测试,因此未取样。POD、SOD、CAT及GSH和TBARS含量采用南京建成生物公司提供的试剂盒,按照操作说明进行测定。其中,POD活性采用愈创木酚法测定,SOD活性采用羟胺比色法测定,CAT活性采用钼酸铵法测定,GSH含量采用2-硝基-5-巯代苯甲酸比色法,TBARS采用比色法测定。

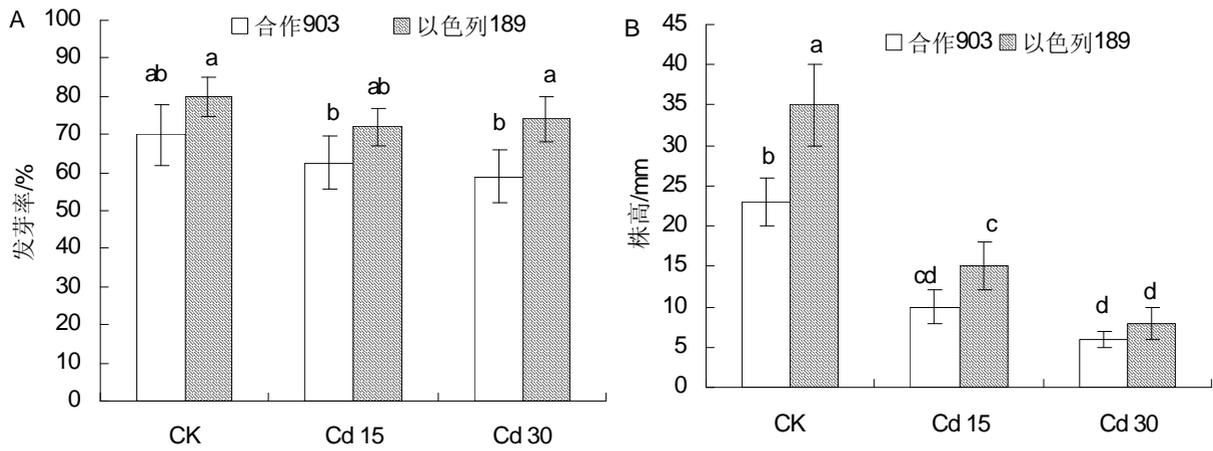
1.3.3 数据分析 数据用计算机软件Microsoft Excel及SPSS11.5进行统计分析,方差分析利用SPSS11.5软件,采用Duncan法分析。

2 结果与分析

2.1 发芽率及株高对Cd胁迫响应的基因型差异分析

不同基因型番茄品种间对Cd胁迫的响应有很大差异。如图1(A)所示,Cd胁迫对供试2个品种的处理对发芽率都没有显著影响。但品种间的表现不同,在对照(CK)处理及Cd 15处理时,尽管‘以色列189’的发芽率高于‘合作903’,但是并没有达到显著水平,而在Cd 30处理时,‘以色列189’的发芽率则显著高于‘合作903’,这说明与‘合作903’相比,高积累品种‘以色列189’的种子在萌发阶段就表现出较强的抗Cd特性,Cd胁迫降低了发芽率,但对‘合作903’的降低作用大于‘以色列189’,可见,在发芽率上,高积累品种‘以色列189’表现出了较强的耐性。

从株高变化来看,Cd处理显著降低了株高。从图1(B)结果来看,在没有Cd的对照处理中,‘以色列189’的株高显著高于‘合作903’,即品种本身的遗传特性决定了‘以色列189’的株高显著高于‘合作903’,但是在Cd 15处理后,二者株高均显著降低,且品种间没有显著差异。这说明与低积累品种‘合作903’相比,高积累品种的株高更易受到Cd胁迫的影响。随着处理Cd浓度增加,二者表现又出现差异,图1(B)中‘以色列189’的株高在Cd浓度增加后仍然显著降低,而‘合作903’的株高在Cd 15与Cd 30处理间则没有显著差异,这可能说明在供试Cd浓度下,Cd对‘以色列189’的毒害作用大小取决于Cd浓度的高低,而对‘合作903’的毒害作用则取决于有无Cd存在,或者说供试Cd浓度已经接近或超过了‘合作903’的耐受范围,对‘合作903’造成了自身不能修复的破坏。供试2个品



图中不同字母表示不同处理差异显著性($P < 0.05$); 误差线代表标准误 \pm SE; 图中数据为3次重复平均值

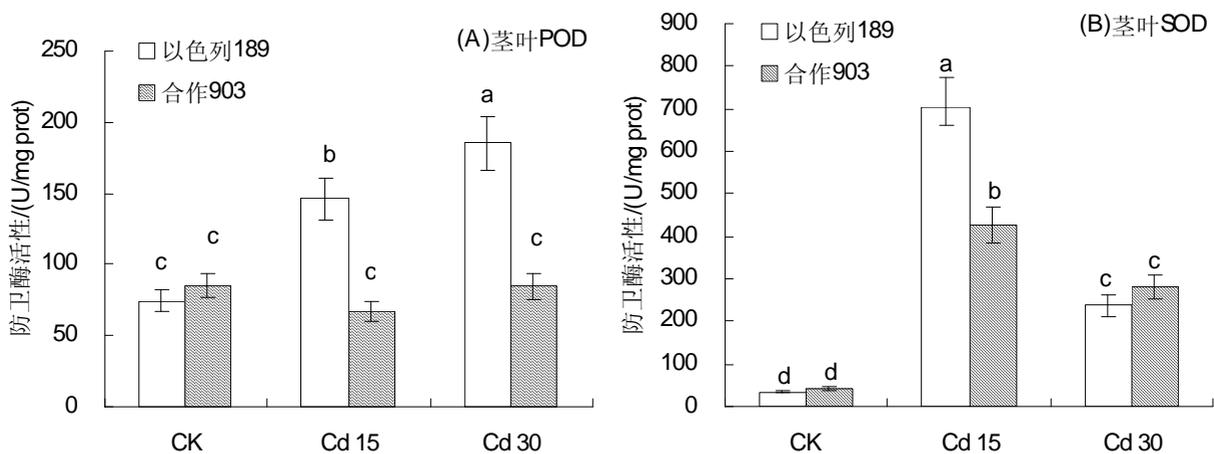
图1 Cd对不同基因型番茄发芽率(A)和株高(B)的影响

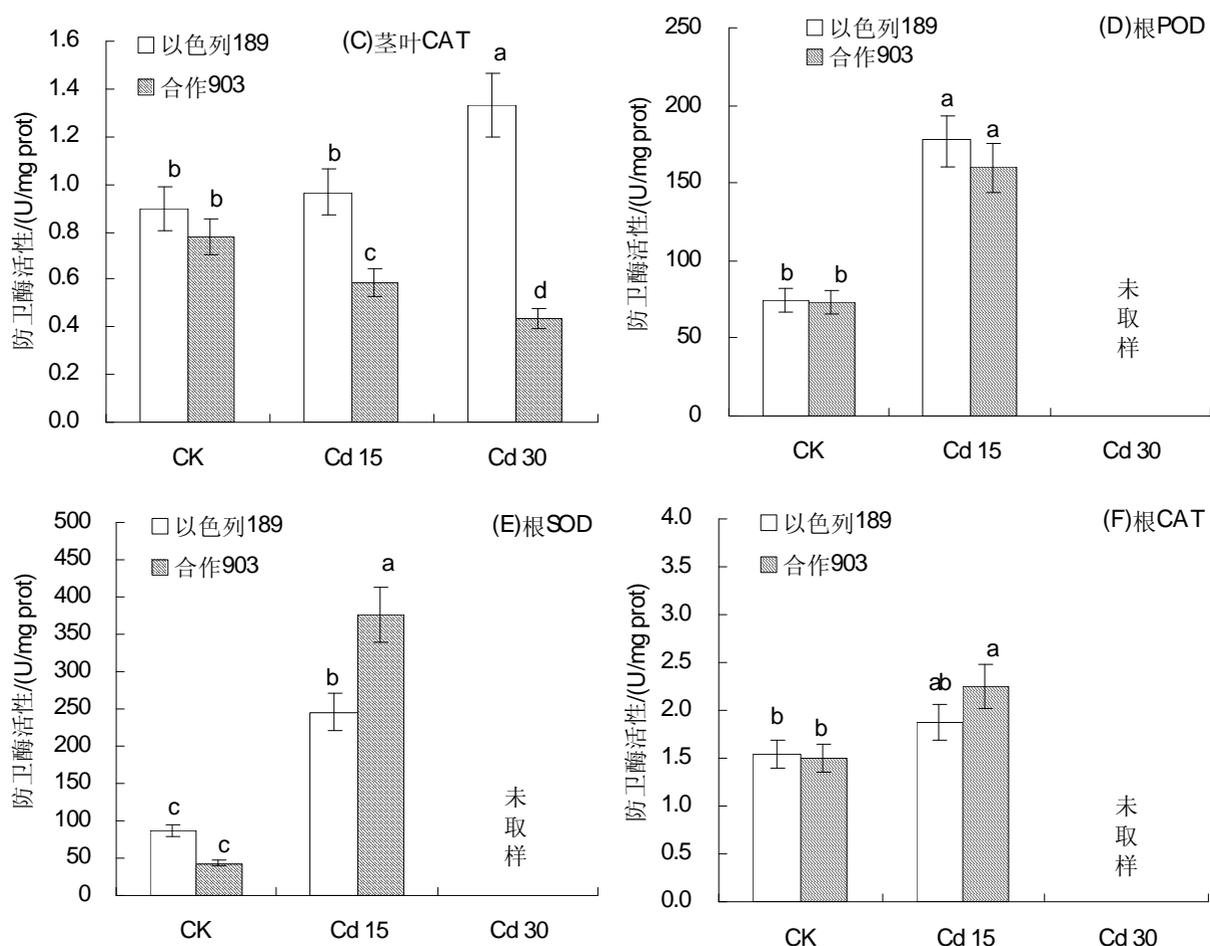
种在株高上的差异表现间接说明了‘以色列189’可以耐受的Cd胁迫范围要大于‘合作903’,即耐性强于‘合作903’。

2.2 不同基因型品种间防卫酶POD、SOD和CAT对Cd胁迫响应差异

防卫系统在植物抗胁迫中的作用早已得到证实,从图2数据看出,供试品种根部及茎叶SOD、POD和CAT在没有Cd胁迫条件下,品种间都没有显著差异。随着处理Cd浓度的增加,高积累品种防卫酶活性与低积累品种出现显著差异,尤其是在茎叶。与低积累品种‘合作903’相比,高积累品种‘以色列189’在Cd胁迫处理时,茎叶表现出显著高的POD和CAT活性,且差异随Cd处理浓度的增加而增加,而根部POD和CAT则没有品种间差异;SOD的活性只在Cd 15处理时茎叶‘以色列189’显著高于‘合作903’,这点与POD和SOD变化趋势相同,但根部则是‘合作903’显著高于‘以色列189’,又不同于POD和CAT的情况。这说明防卫酶对Cd胁迫的响应存在品种、部位及酶种类的差异。

虽然SOD、POD、CAT在植物耐受Cd胁迫中起到一定的作用,但是这种作用有一定的限度,即在一定Cd浓度范围内,防卫酶活性得以增加以维持植物正常生长,Cd浓度超出一定范围后,防卫酶活性也会作为Cd毒害的目标而降低。在供试品种根部都表现为Cd处理显著增加了防卫酶的活性,但是茎叶情况不同。对高积累品种‘以色列189’来说,POD和CAT的活性随Cd浓度增加而增加,SOD活性则是先增加后降低;而低积累品种‘合作903’茎叶的POD活性在处理间没有显著差异,CAT活性随Cd浓度增加而显著降低,SOD活性与‘以色列189’相同,即先增加后降低。这说明不同品种间的不同防卫酶对Cd胁迫的耐受程度也不同。图2数据说明,供试Cd浓度处理可能已经超过了‘合作903’的耐受范围,对‘合作903’的防卫酶产生了毒害效应,即‘合作903’的茎叶POD和CAT没有增加,反而降低,尤其是CAT;相反,高积累品种的POD和CAT则是显著增加,说明供试Cd浓度仍然在‘以色列189’的耐受范围内,进一步说明‘以色列189’





图中不同字母表示不同处理差异显著性($P < 0.05$); 误差线代表标准误 \pm SE; 图中数据为3次重复平均值

图2 Cd胁迫对供试不同基因型番茄品种防卫酶POD(A, D)、SOD(B, E)和CAT(C, F)活性的影响

对Cd的耐性强于‘合作903’。此外,不同防卫酶间的耐性也有差异,尽管为高Cd积累品种,‘以色列189’的茎叶SOD表现与‘合作903’相同,都是先增加后降低,这可能是Cd毒害所致,可能SOD对Cd胁迫比较敏感,至少比POD和CAT要敏感,这方面还有待于进一步研究。

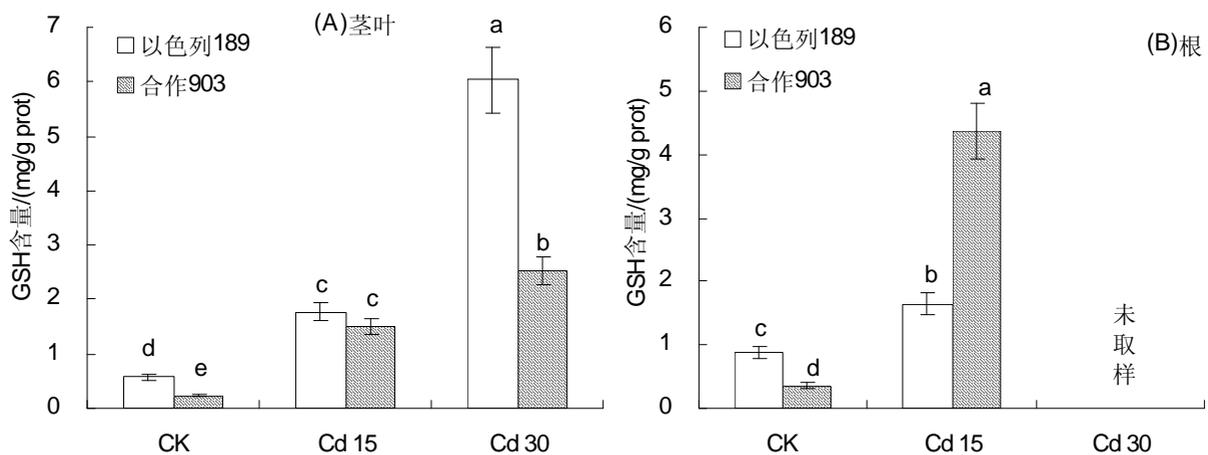
2.3 还原型谷胱甘肽(GSH)对Cd胁迫响应的基因型差异分析

还原型谷胱甘肽(GSH)作为植物络合素(PCs)的合成前体,决定了植物对Cd的积累及抗Cd的能力^[8],本实验对GSH含量变化情况进行测定(图3)后发现,茎叶GSH含量在Cd 30处理时,高积累品种‘以色列189’显著高于低积累品种‘合作903’,而在Cd 15处理时品种间没有显著差异;根部在Cd 15处理时‘合作903’显著大于‘以色列189’。从GSH的变化来看,似乎根部更敏感,根部在Cd 15处理时就表现出差异,而茎叶Cd 15处理没有差异,Cd 30处理时品种间才有差异,但是差异趋势却与根部相反。

不论品种间的差异如何,根部和茎叶的GSH含量都在Cd处理后显著增加,尤其是茎叶,Cd 15处理使得供试品种的茎叶GSH显著增加,并且增加的幅度随着Cd浓度的增加而增加,至Cd 30处理时,品种间出现显著差异,高积累品种‘以色列189’的茎叶GSH含量显著高于低Cd积累品种,这与前人研究结果一致^[8],即高Cd积累品种在受到Cd胁迫后,GSH迅速增加并显著高于低Cd积累品种。根部的GSH含量虽然也是显著受Cd胁迫的诱导,却是低积累品种‘合作903’显著高于高积累品种‘以色列189’,这或许与重金属的浓度分布有关,还有待于进一步的研究证实。

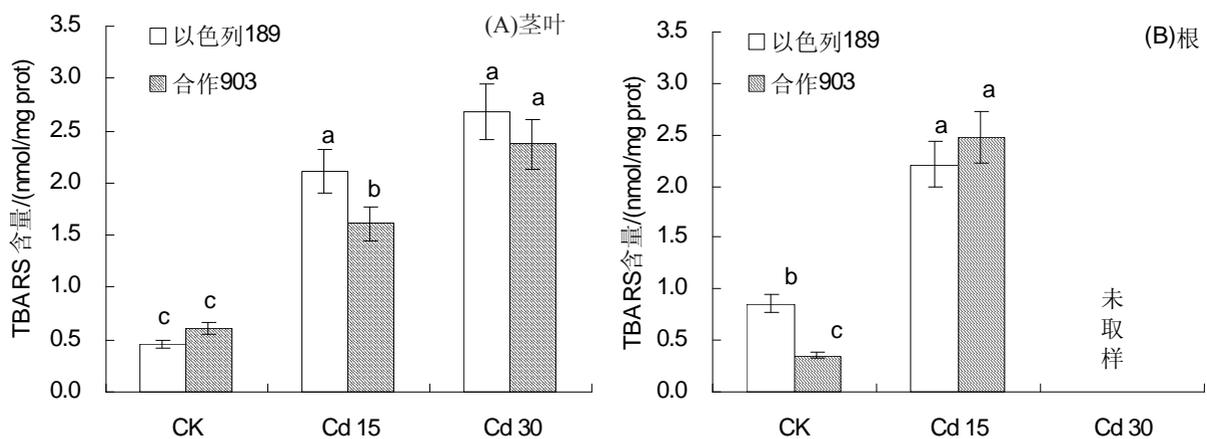
2.4 Cd胁迫对膜质过氧化产物TBARS含量影响的基因型差异分析

脂质过氧化是不饱和脂肪酸中所发生的一系列活性氧反应,其产物硫代巴比妥酸反应底物(TBARS)含量是反映脂质过氧化作用强弱的一个重要指标。图4说明,供试番茄品种在Cd胁迫后,TBARS含量显著增加,这一点没有品种差异,也没有植株部位的差异。



图中不同字母表示不同处理差异显著性($P < 0.05$); 误差线代表标准误 \pm SE; 图中数据为3次重复平均值

图3 Cd胁迫对供试不同基因型番茄品种茎叶(A)和根(B)GSH含量的影响



图中不同字母表示不同处理差异显著性($P < 0.05$); 误差线代表标准误 \pm SE; 图中数据为3次重复平均值

图4 Cd胁迫对供试不同基因型番茄品种茎叶(A)和根(B)中硫代巴比妥酸反应底物(TBARS)含量的影响

但是品种间增加的幅度不同,在Cd 15处理时高积累品种‘以色列189’显著高于低积累品种,而在Cd 30处理时,品种间又没有显著差异。从TBARS的变化情况可以看出,‘以色列189’虽然是高Cd积累品种,但是其膜质的过氧化程度并不高,这一点可能归因于其较高的活性氧清除系统,即防卫酶活性(图2),尽管吸收了较多的重金属,但由于其活性氧清除系统的强大功能,使得细胞膜并未受到过多的氧化,TBARS的含量不高于低Cd积累品种,这可能是‘以色列189’较强的耐Cd积累的另一个方面。

研究中,高Cd积累品种具有Cd高积累的特性;同时,茎叶的防卫酶SOD和CAT在Cd处理后都显著高于低Cd积累品种‘合作903’;非酶抗氧化物质GSH的含量也在Cd 30处理显著高于低Cd积累品种;同样情况下,膜质过氧化产物TBARS的含量在Cd 30处理下却没有品种间差异。对于高积累品种‘以色列189’来说,这一系列指标间是否存在必然的联系,还需要进一

步的研究。

3 讨论

SOD、POD和CAT是植物适应多种逆境胁迫的重要酶类,被统称为植物保护酶系统。如Cd胁迫导致水稻中SOD和POD的活性增强^[9]以及豌豆叶中SOD和CAT活性增强^[10],转APX拟南芥和水稻提高了对Cd的抗性^[4,11]等都证实防卫酶系统对于缓解抗Cd引起的氧化胁迫有重要作用。但是,这一反应因品种及抗性的不同而异,且不同植物和不同器官的防卫系统也表现出较大差异^[12],Cd超富集植物具有更强的抗氧化能力^[13]。吕朝晖等^[14]对Cd处理烟草幼苗研究发现,耐性高的品种POD活性提高显著,杨居荣等^[15]用Cd处理小麦、玉米、黄瓜和大豆,结果显示,耐性强的品种SOD、POD和CAT活性提高,而耐性弱的大豆三种酶活性降低。这与本研究结果一致,即高积累品种‘以色列189’的POD和CAT在Cd胁迫后显著增加,而低积累品种‘合作903’的POD没有显著变化,CAT则显著

降低。

但是也有研究报道,高浓度的Cd会明显抑制植物的防卫系统活性,对于这一点,Iannelli等^[12]认为,在低、高浓度Cd胁迫下,植物分别表现出抗氧化活性增加和减少2种情况,说明抗氧化系统既具有解毒功能,同时又是Cd对植物毒害效应的作用位点,供试品种Cd 30处理下的茎叶SOD活性降低可能都就是由于Cd毒害作用而显著降低。研究结果还进一步说明了Cd耐性的差异不仅表现在品种间,同时也表现在不同防卫酶之间,高积累品种‘以色列189’的POD和CAT对Cd的耐性要强于SOD,而这一点在国内外鲜见报道。

由于TBARS含量测定方法会受到多糖,氨基酸等分子的干扰,因此仅仅用该指标来代表伤害具有一定的不确定性。同时,在植物体适应重金属胁迫过程中,抗氧化系统上调或下调的情况,与不同的处理时间或处理方式,重金属的种类及植株取样部位、时间都有关。更为重要的是,Cd的伤害中有关活性氧伤害并不是首要的因素,而本研究仅探讨了在实验室内水培条件下,Cd处理对2种番茄抗氧化系统中SOD、POD、CAT、GSH和TBARS的影响差异,尚未涉及其他与重金属相关的防卫酶、结合肽、防卫基因及重金属吸收转运基因的研究,因此,高镉高积累‘以色列189’和低积累品种‘合作903’的Cd耐性差异机理还需要进一步深入研究。

4 结论

高积累品种‘以色列189’的在发芽率上表现出较强耐性,Cd胁迫显著降低番茄株高。

Cd胁迫处理显著增加防卫酶活性,但因品种、部位及酶的种类不同而有差异。Cd处理后,茎叶POD、CAT活性‘以色列189’显著高于‘合作903’,根部POD和CAT无品种间差异;SOD在Cd 15处理的茎叶‘以色列189’显著大于‘合作903’,而根部相反。高积累品种‘以色列189’茎叶的POD和CAT活性随Cd浓度增加而显著增加,‘合作903’茎叶POD在不同Cd浓度处理间没有显著差异,而CAT则随Cd浓度增加而显著降低;茎叶SOD没有品种间差异,都是Cd 15处理显著增加,Cd 30处理显著降低。根部SOD、POD、CAT都是在Cd处理后显著增加。不同防卫酶对Cd耐性有差异,高积累品种‘以色列189’的SOD不如POD和CAT的Cd耐性强,而低积累品种‘合作903’的POD和CAT对Cd的耐性不如高积累品种。

Cd处理显著增加茎叶GSH含量,且高积累品种增加幅度大,并在Cd 30处理时显著高于低积累品种;Cd处理显著增加巴比妥酸反应底物TBARS含量,但

在高Cd处理时,品种间无显著差异。说明‘以色列189’因其较强的抗氧化能力及GSH含量,在高积累前提下,没有产生过多的脂质过氧化产物TBARS。

参考文献

- [1] 陈怀满.土壤-植物系统中的重金属污染[M].北京:科学出版社,1999:71-125.
- [2] Mills R F, Franci A, Ferreira-Rocha P S, et al. The plant P1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels[J]. FEBS Lett.,2005,579:783-791.
- [3] Luo Y M, Christie P, Baker A J M. Metal uptake by *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl and metal solubility in a Zn/Cd contaminated soil after addition of EDTA[M]/Proceedings of the Fifth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements[J]. Austria :Vienna,1999:882-883.
- [4] Shi W M, Muramoto Y, Ueda A. Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*[J]. Gene,2001,273:23-27.
- [5] Wang G, Su M Y, Chen Y H, et al. Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in southeastern China[J]. Environmental Pollution,2006,144:127-135.
- [6] Alexander P D, Alloway B J, Dourado A M. Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables[J]. Environmental Pollution,2006,144:736-745.
- [7] Kartik C, Nancy G L. Physiological State, Growth Mode, and Oxidative Stress Play a Role in Cd(II)-Mediated Inhibition of *Nitrosomonas europaea* 19718[J]. Appl. Environ. Micro,2008:2447-2453.
- [8] Zhu Y L, Pilon-Smiths E A H, Jouanin L, et al. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance[J]. Plant Physiol,1999,119:73-79.
- [9] Sandalio L M, Dalurzo H C, Gomez M, et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants[J]. J Exp Bot,2001,52(364):2115-2126.
- [10] Dixit V, Pandey V, Yam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad)[J]. J Exp Bot,2001,52(358):1101-1109.
- [11] 段苏然,施卫明,王俊儒.过量表达pAPX基因提高水稻对镉胁迫的耐性[J].土壤学报,2006,43(1):111-116.
- [12] Iannelli M A, Pietrini F, Fiore L, et al. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants[J]. Plant Physiol. Biochem., 2002,40(11):977-982.
- [13] Boominathan R, Doran P M. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*[J]. Biotechnol. Bioeng,2003,83(2):158-167.
- [14] 吕朝晖,王焕校.镉铅对小麦脱氢酶(ADH)基因表达的初步研究[J].环境科学学报,1998,18(5):500-503.
- [15] 杨居荣,贺建群,蒋婉茹.Cd污染对植物生理生化的影响[J].环境保护,1995,14(5):193-197.