

Cd胁迫对萌发大豆种子中活性氧代谢的影响

张治安, 王振民, 徐克章

(吉林农业大学农学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:以砂培法研究了不同浓度(5、10、30、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)Cd 胁迫对萌发大豆种子中活性氧代谢的影响。结果表明,低浓度(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)Cd 处理下,在萌发初期(1~3 d)大豆种子中 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 含量与对照无显著差异,萌发第 3 d 大豆种子中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性明显高于对照,萌发第 4~6 d Cd 对 SOD、CAT 活性产生抑制作用,同时 MDA 含量和种子外渗电导率显著升高;高浓度(10、30、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)Cd 处理下,萌发 2~6 d 种子中 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 含量、MDA 含量和外渗电导率显著增加,SOD 和 CAT 活性明显下降;Cd 对萌发大豆种子中过氧化物酶(POD)具有激活效应,且随着 Cd 浓度的增加激活效应逐渐增强。大豆种子萌发受 Cd 胁迫伤害过程中,活性氧代谢失衡,从而造成膜脂过氧化加剧。

关键词:镉; 大豆种子; 活性氧代谢; 抗氧化酶

中图分类号:X171.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)04-0670-04

Effect of Cadmium Stress on Active Oxygen Metabolism in Germinated Soybean Seeds

ZHANG Zhi-an, WANG Zhen-min, XU Ke-zhang

(College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Effect of active oxygen metabolism in germinated soybean seeds under cadmium stress were studied with pot culture experiment. The results showed that compared with the control, under the treatment of lower concentration cadmium, there were no significant differences in generative rate of superoxide radical (O_2^-), H_2O_2 content in germinated soybean seeds during the beginning period (1~3 d). Under the treatment of lower concentration cadmium, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) were increased significantly on the 3rd day, while, they decreased and malondialdehyde (MDA) content and membrane electrolytic leakages increased significantly after four days. Compared with the control, under the treatment of higher concentration (10, 30, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) cadmium, the generative rate of O_2^- , H_2O_2 content, MDA content, membrane electrolytic leakages increased significantly and the activities of SOD, CAT decreased during 2~6 d. Cd^{2+} stimulated peroxidase (POD) activity and the activity increased gradually with the increase of Cd^{2+} concentrations. Injury effects of Cd^{2+} stress on active oxygen metabolism in germinated soybean seeds could aggravate the membrane lipid peroxidation.

Keywords: cadmium; soybean seeds; metabolism of active oxygen; antioxidant enzymes

植物生长在自然环境条件下,不可避免地受到多种逆境胁迫,如重金属、干旱、盐、高温、低温、高辐射、紫外线、养分缺乏和大气污染物。这些非生物胁迫均会产生次级胁迫,使植物直接或间接地形成过量的活性氧自由基(ROS),如超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2),而 ROS 对细胞膜系

统、脂类、蛋白质和核酸等大分子具有强烈的破坏作用^[1-5]。

重金属 Cd 是一种植物非必需元素,由于大量工业废弃物长期排放,使大量 Cd 进入土壤-植物生态系统,并通过食物链危及人类健康^[6,7]。研究表明,Cd 通过损伤植物光合作用、呼吸作用和营养代谢等而强烈抑制植物生长,甚至导致植物死亡^[8]。大豆是我国重要的经济作物,研究 Cd 胁迫对大豆的生长影响具有较大的理论和实践意义。本文从 Cd 对萌发大豆种子生理代谢影响的角度,研究了不同浓度 Cd 处理对萌发大豆种子中 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 含量、丙二醛

收稿日期:2004-10-06

基金项目:国家自然科学基金项目(30370862);吉林省科技厅项目(20000204-01-04)

作者简介:张治安(1964—),男,副教授,在读博士,主要从事植物化学调控及逆境生理的研究和植物生理学教学工作。

E-mail:zhangzhian6412@yahoo.com.cn

(MDA) 含量、种子外渗电导率、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性等生理生化指标的影响,为揭示镉对大豆的伤害机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆(*Glycine max*)品种为吉农 7 号,由吉林农业大学大豆研究所提供。挑选籽粒完整无损、大小均匀的大豆种子,用 0.1% HgCl_2 浸泡消毒 10 min,去离子水清洗干净并用滤纸吸干后,播种于装有石英砂的大搪瓷盘中,每盘播种 100 粒,然后分别浇入等量浓度为 5、10、30、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 溶液,对照浇去离子水,置于 22 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下发芽 6 d,每天补充一定量相应浓度的 CdCl_2 溶液或去离子水。每个浓度处理设 5 次重复,分别取发芽后 1、2、3、4、5、6 d 的种子(包括胚根、胚芽、胚轴及子叶)测定各项生理指标。

1.2 方法

1.2.1 H_2O_2 含量和 O_2^- 产生速率的测定

H_2O_2 含量用分光光度法^[9]测定,以 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示;超氧阴离子自由基(O_2^-)产生速率采用羟胺氧化法^[10]测定,以 $\text{nmol}\text{O}_2^-\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。

1.2.2 MDA 含量和外渗电导率的测定

丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)显色法^[11],以 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示;外渗电导率用电导率仪法^[11]测定。

1.2.3 SOD、POD 和 CAT 活性的测定

超氧化物歧化酶(SOD)活性用蛋蓝四唑(NBT)光化学还原法^[12]测定,以抑制 NBT 光氧化还原 50% 的酶量为一个酶活力单位,用 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。过氧化

物酶(POD)活性的测定采用愈创木酚法^[13],酶活性以 $\Delta\text{OD}_{470}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。过氧化氢酶(CAT)活性采用紫外吸收法^[9]测定,以每分钟减少 0.1 个 OD_{240} 值所需的酶量为一个酶活力单位,用 $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 表示。

1.3 数据处理

应用 SAS6.0 软件进行邓肯氏多重极差分析,以评价本试验中镉处理与对照之间生理指标的差异显著性。

2 结果

2.1 Cd 胁迫下 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量的变化

O_2^- 是 O_2 的单电子还原产物,是生物体内最初形成的活性氧自由基,它在植物体内的积累并衍生为毒性更大的 $\cdot\text{OH}$ 导致植物体衰老死亡。由图 1A 可以看出,在萌发开始的 1~4 d 内,对照组大豆种子中 O_2^- 产生速率逐渐上升,4~6 d 基本维持在一定的水平上;5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 处理,在萌发 1~3 d 内对大豆种子中 O_2^- 产生速率无显著影响,萌发 4~6 d 明显增加 O_2^- 产生速率;10、30 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 处理组,从萌发第 2 d 即增加 O_2^- 产生速率,且表现出随浓度的升高而升高的变化,萌发第 3 d,种子中 O_2^- 产生速率分别为对照的 1.31、1.71 和 1.84 倍,差异显著 ($P<0.05$)。 O_2^- 作为一种活性很强的自由基,当积累到一定水平后,必然会对植物代谢过程造成一定伤害。

植物细胞内的 H_2O_2 主要是由 O_2^- 歧化而形成的。由图 1B 可知,萌发过程中大豆种子 H_2O_2 含量的变化趋势与 O_2^- 产生速率基本一致,Cd 处理 3~6 d 明显增加大豆种子 H_2O_2 水平,Cd 浓度越大 H_2O_2 含量越高,说明 Cd 胁迫对大豆种子中 H_2O_2 的积累有明显的促进作用。

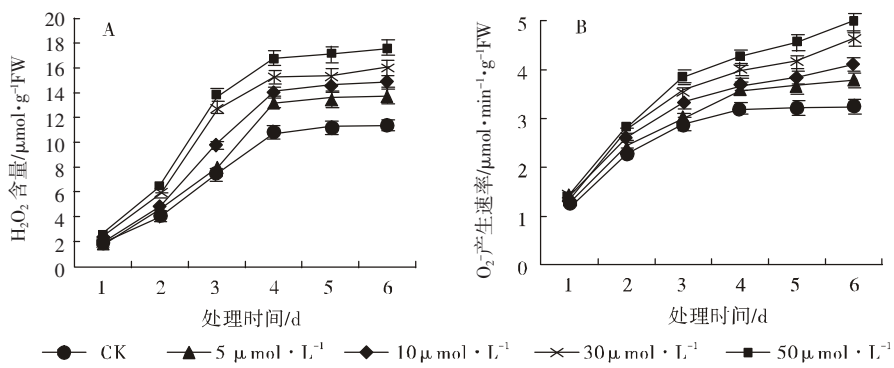


图 1 Cd 胁迫对大豆种子萌发过程中 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量的影响
Figure 1 Effect of cadmium stress on O_2^- production rate, H_2O_2 contents of soybean seeds during germination

2.2 Cd 胁迫下 SOD、CAT 和 POD 活性的变化

SOD 是植物体内以氧自由基为底物的酶,在活性氧代谢中处于重要地位,可淬灭超氧负离子的毒性,终止由超氧负离子启动的一系列自由基连锁反应所造成的生物膜损伤,为植物体内最重要的清除活性氧自由基的酶^[9,10]。图 2A 显示,在正常条件下,大豆种子萌发初期的 SOD 活性迅速增强,萌发 4 d 后变化趋势平缓。5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 处理 1~4 d 对萌发大豆种子 SOD 活性有明显的促进作用,但处理 4 d 后即显示抑制作用,10、30 与 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 处理第 3 d 即有明显的抑制作用,并随着时间延长而加剧。

从图 2B 可以看出,大豆种子萌发 1~4 d 内,CAT 活性逐渐升高,以后稳定在一定水平,与 SOD 活性的变化趋势基本一致。5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 处理第 3 d

对萌发大豆种子 CAT 活性有促进作用,说明萌发大豆体内产生了应激反应;10、30、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 处理 3~6 d,表现出明显降低 CAT 活性,与对照组差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)。

CAT 能够清除植物组织中的 H_2O_2 , 限制潜在的活性氧伤害。在本研究中,CAT 活性的下降将会造成 H_2O_2 的积累,从而导致细胞膜结构的损伤。

POD 是植物呼吸代谢的末端氧化酶之一,可催化有毒物质的氧化分解,是一种对环境因子比较敏感的酶,它和 CAT 不同的是需要另一个底物。图 2C 表明,镉对萌发大豆种子中 POD 活性有明显促进作用,且 POD 活性随着处理浓度的增加而升高。处理第 4 d,30、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CdCl_2 处理的 POD 活性分别是对照的 130%和 146%,差异极显著($P<0.01$)。

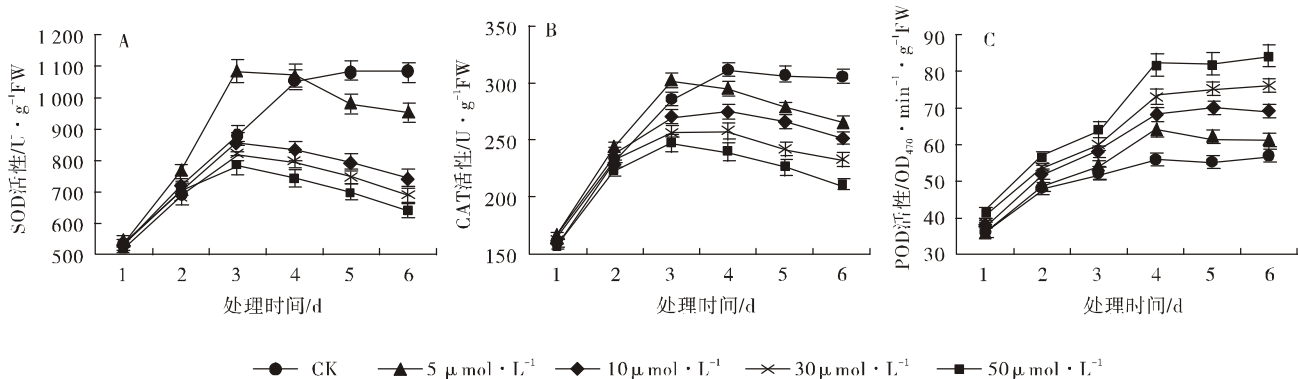


图 2 镉胁迫对大豆种子萌发过程中 SOD、CAT 和 POD 活性的影响

Figure 2 Effect of cadmium stress on SOD, CAT and POD activities of soybean seeds during germination

2.3 Cd 胁迫下 MDA 含量和外渗电导率的变化

MDA 是细胞质膜脂质过氧化的产物之一,其含量高低及种子浸出液的外渗电导率大小可反映细胞膜脂质过氧化的水平和膜受伤害的程度。图 3A 显示,萌发大豆种子中 MDA 含量在 Cd 处理 1~3 d 内上升缓慢,其含量变化整体上略滞后于 O_2^- 产生速率和

H_2O_2 含量水平。而 4~6 d MDA 含量急剧上升,且与 Cd 处理浓度间分别呈显著正相关,并与对照组差异显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)。

图 3B 表明,1~4 d 内萌发大豆种子外渗电导率逐渐降低,以后变化平稳;Cd 胁迫明显增加萌发种子的外渗电导率,并且表现出胁迫浓度越高种子外渗电

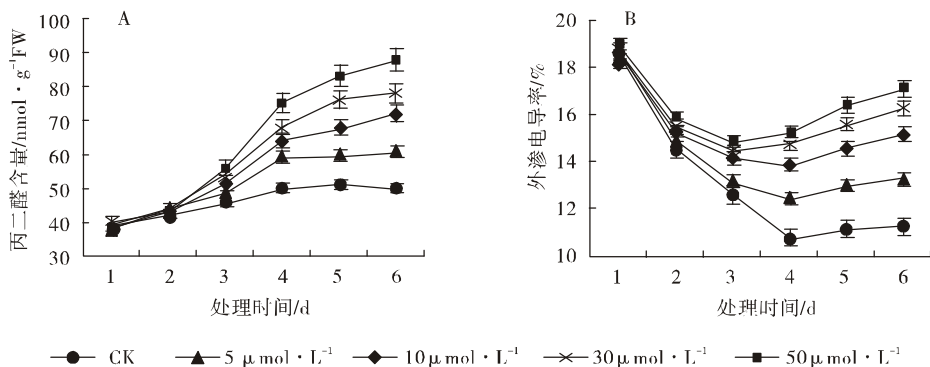


图 3 Cd 胁迫对大豆种子萌发过程中 MDA 含量和外渗电导率的影响

Figure 3 Effect of cadmium stress on MDA content and electric conductivity of soybean seeds during germination

导率越高的变化。说明随 Cd 胁迫时间延长和胁迫强度增加,膜脂过氧化作用加剧,膜透性增加。

3 讨论

种子萌发过程中,由于各种代谢活跃启动,不可避免地产生许多活性氧,主要包括 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 。这些类型的活性氧相互转化、协同作用能导致细胞氧化损伤,特别是脂质过氧化作用,造成细胞膜结构破坏、膜透性增大和电解质外渗。而细胞结构的完整性是种子活力的基础,它的丧失,特别是细胞膜受损是种子劣变的重要原因^[12,18]。所幸的是,种子组织中存在 SOD、POD、CAT 等保护性酶和 ASA、GSH 等非酶性抗氧化物质,可清除萌发过程中产生的大量活性氧,维持相对较高水平的活性氧动态平衡,减轻活性氧造成的脂质过氧化作用,有利于维持种子在萌发过程中膜结构的完整性。研究表明,耐性较弱的大豆^[13]种子在逆境胁迫初期,其磷酸化作用降低,但其呼吸电子传递仍保持相对较高的活性,这种电子传递的电子传递和 ATP 形成能力的不平衡导致电子传递的电子漏,从而产生大量的 O_2^- 及 H_2O_2 等多种活性氧^[14-16]。

本试验表明,Cd 胁迫下,萌发大豆种子随胁迫时间延长,种子内 O_2^- 和 H_2O_2 积累(图 1),在 Cd 胁迫初期(1~3 d),萌发大豆种子体内活性氧积累过程中,SOD、CAT、POD 等抗氧化酶由于底物浓度增加而被诱导,从而加强代谢清除 O_2^- 及 H_2O_2 的能力,说明活性氧代谢基本处于平衡状态;随着 Cd 胁迫时间的延长(4~6 d)和胁迫强度的增加,萌发大豆种子 SOD、CAT 活性下降和 POD 活性升高,表明酶系统平衡可能被破坏,将不利于对活性氧的清除,造成机体活性氧的增加,从而加速膜脂过氧化作用,使 MDA 含量和膜透性增加。同时,POD 具有吡啶乙酸(IAA)氧化酶功能^[17-19],在镉胁迫下 POD 活性的剧烈增加可导致 IAA 含量下降;POD 还可促进植物细胞壁中半纤维素、果胶质等发生交链,形成木质素,增加细胞壁木质化程度,阻止细胞伸长,从而抑制幼苗的生长。

Cd 胁迫下,萌发大豆种子中,一方面提高了活性氧(O_2^- 、 H_2O_2)的产生速率,另一方面破坏了以 SOD 为主导的细胞保护酶系统和抗氧化还原剂,在这双重因素的作用下,加速膜脂过氧化链式反应,增加过氧化

有害物积累,使细胞膜系统破坏及大分子生命物质损伤,最终导致衰老趋于死亡。

参考文献:

- [1] Kanazawa S. Changes in antioxidative in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark induced senescence [J]. *Physiol Plant*, 2000, 109: 211–216.
- [2] Becana M. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules [J]. *Physiol Plant*, 2000, 109: 372–381.
- [3] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control[J]. *Annu Rev Plant Mol Biol*, 1998, 49: 249–279.
- [4] Lin C C, Kao C H. Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves [J]. *Plant Growth Regul*, 2000, 30:151–155.
- [5] 邵国胜, MUHAMMAD Jaffar Hassan, 章秀福, 等. 镉胁迫对不同水稻基因型植株生长和抗氧化酶系统的影响[J]. 中国水稻科学, 2004, 18 (3): 239–244.
- [6] 仲维科, 凡要播, 王敏健. 我国农作物的重金属污染及其防止对策[J]. 农业环境保护, 2001, 20(4): 270–272.
- [7] 刘 鹏, 徐根娣, 降雪梅, 等. 铝对大豆幼苗膜质过氧化和体内保护系统的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(1): 51–54.
- [8] Sanit di Toppi L, Lambardi M, Response to cadmium in carrot in vitro liants and cell suspension cultures[J]. *Plant Sci*, 1998, 137: 119–129.
- [9] 邹 歧. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [10] 王爱国, 罗光华. 植物的超氧物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(6): 55–57.
- [11] 张治安, 张美善, 蔚荣海. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.
- [12] Beamen L, Beaman B L. The role of oxygen and its derivatives in microbial pathogenesis and host defense[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1984, 38: 27–48.
- [13] 杨居荣, 贺建群, 蒋婉茹. Cd 污染对植物生理生化的影响[J]. 农业环境保护, 1995, 14(5): 193–197.
- [14] 林植方, 李双顺, 林贵珠, 等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶及脂质过氧化作用的关系[J]. 植物学报, 1984, 26(6): 605–608.
- [15] 蒋明义, 郭少川. 水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用 [J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(2): 144–150.
- [16] 傅爱根, 王爱国, 罗广华. 大豆萌发过程的活性氧代谢[J]. 热带亚热带植物学报, 1997, 5(4): 32–38.
- [17] Jita P, Braha B P. A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedlings of barley[J]. *Hordeum Vulgare L Environ Poll*, 1998, 101: 99–105.
- [18] 马国英, 徐锡忠, 章崇玲. 种子老化过程中膜的变化及其原因[J]. 植物生理学通讯, 1991, 27(3): 233–236.
- [19] 朱雪竹, 董 斌, 谢翼飞, 等. 不同形态铝对小麦抗氧化系统的影响 [J]. 环境化学, 2001, 20(2): 119–123.