

镉胁迫对不结球白菜Vc合成L-半乳糖途径基因表达及抗氧化系统的影响

张琳, 崔红米, 王建军, 侯喜林, 李英*

南京农业大学园艺学院, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京210095

摘要: 为了探究Cd²⁺胁迫对不结球白菜的种子萌发以及L-半乳糖途径基因表达、抗坏血酸(L-ascorbic acid, AsA)含量及抗氧化酶等指标的影响, 以不结球白菜品种‘苏州青’为材料, 设定不同浓度的Cd²⁺处理种子和幼苗。结果表明, Cd²⁺胁迫对不结球白菜种子萌发时胚根的损伤随Cd²⁺浓度的增加而加重; AsA含量在6~12 h内持续升高, 24 h时显著降低, 48 h时, Cd²⁺胁迫的AsA含量均显著低于对照, 总AsA含量与对照差异不显著。L-半乳糖途径多个基因的表达量均与AsA含量变化保持一致, *PMI*和*GGP*对50 μmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫较为敏感, 在Cd²⁺胁迫12 h达到峰值; *PMM*、*GMP*、*GPP*、*GalDH*和*GalLDH*对100 μmol·L⁻¹ Cd²⁺胁迫响应较为迅速, 在Cd²⁺胁迫后6 h达到峰值; 胁迫5 d时, SOD在抗氧化酶系统中起主要防御功能; 胁迫10 d时, POD、CAT和APX清除活性氧的效率要高于SOD; MDA含量随Cd²⁺浓度增大和Cd²⁺胁迫时间延长显著急剧升高; 胁迫10 d时, Cd²⁺胁迫的叶绿素含量均显著低于对照水平。这表明Cd²⁺胁迫对不结球白菜的形态发育及抗氧化系统均造成了不同程度的损伤, 对抗坏血酸合成相关基因的表达造成了不同程度的影响。

关键词: 不结球白菜; Cd²⁺胁迫; L-半乳糖途径; 抗坏血酸; 抗氧化系统

Effects of Cadmium Stress on Genes Expression in L-Galactose Pathway Involved in Vc Biosynthesis and Antioxidant System of *Brassica campestris* ssp. *chinensis*

ZHANG Lin, CUI Hong-Mi, WANG Jian-Jun, HOU Xi-Lin, LI Ying*

College of Horticulture, State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: In order to investigate the effects of Cd²⁺ stress on the seed germination, genes expression in the L-galactose pathway, AsA content and antioxidant enzymes and other indicators in non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*), we used non-heading Chinese Cabbage ‘Suzhouqing’ as material, and set different concentrations of cadmium treatments of seeds and seedlings. The results showed that the radicles injury of germinated seeds under Cd²⁺ stress aggravated along with the increase of Cd²⁺ concentration. The contents of AsA continued to rise during 6–12 h, then significantly decreased at 24 h, which were significantly lower than that of the control at 48 h, while total AsA contents had no significant difference with the control. The expression of most genes in the L-galactose pathway were consistent with AsA contents, *PMI* and *GGP* were sensitive to 50 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ stress, and reached the peak at 12 h after treatment; *PMM*, *GMP*, *GPP*, *GalDH* and *GalLDH* responded swiftly to 100 μmol·L⁻¹ Cd²⁺ stress, which showed the peak values at 6 h after treatment. SOD played the main role of defense in the antioxidant system after 5 d treatment, while the ROS scavenge efficiencies of POD, CAT and APX were higher than that of SOD after 10 d treatment; the contents of MDA increased sharply along with the increase of Cd²⁺ concentration and the extension of treatment time; chlorophyll contents with Cd²⁺ treatment were significantly lower than that of the control eventually. These results revealed that cadmium stress made the damage to morphological development and antioxidant system in non-heading Chinese cabbage, and also made different effects on genes expression in AsA biosynthesis pathway.

Key words: non-heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*); Cd²⁺ stress; L-galactose pathway; ascorbic acid; antioxidant system

收稿 2015-01-13 修定 2015-06-26

资助 中央高校基本科研业务费自主创新重点研究项目(KYZ201111)、国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2012AA100202)和江苏省科技支撑计划(BE2012325)。

* 通讯作者(E-mail: yingli@njau.edu.cn; Tel: 025-84395756)。

镉(Cd)是一种毒性很强的重金属,属于蓄积性毒物,镉在土壤中移动性高,对作物危害严重(张雯等2014)。我国对蔬菜中 Cd^{2+} 含量有明确规定:根菜类限量 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,叶菜类限量 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,其他蔬菜限量 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (何江华等2003)。当 Cd^{2+} 在植物体内积累到一定浓度时,植物会表现出根系短小变褐、侧根少、茎生长缓慢、叶片变黄、卷曲以及斑点,植株矮小、褪绿、产量下降等不良症状(Schutzendubel等2001)。

不结球白菜是十字花科芸薹属植物,原产中国,含有丰富的矿物质和维生素C(宋玉萍等2007),在我国南方栽培十分广泛。维生素C又名抗坏血酸(L-ascorbic acid, AsA),在植物光合作用、细胞分裂和生长代谢中发挥着重要作用(安华明等2004;王洪政和沈振国2006),同时AsA还是植物和大多数动物体内重要的非酶类抗氧化剂,在环境胁迫条件下能维持较高水平(陈坤明等2004),从而增强植物的抗逆性。植物体内AsA的积累调控非常复杂,AsA水平随植株的生长发育而变化,同时也受到环境因子的调节。L-半乳糖途径是高等植物中AsA生物合成的最主要途径(Dowdle等2007; Smirnoff和Wheeler 2000),研究植物AsA生物合成途径每步反应催化酶与AsA积累的联系,或可探究 Cd^{2+} 胁迫对AsA合成积累的影响。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)是植物体内活性氧清除系统的主要保护酶,其协同作用可抵抗活性氧对植物细胞造成的伤害(陈艺晖等2011)。抗坏血酸过氧化物酶(ascorbic acid peroxidase, APX)是以抗坏血酸为电子供体的专一性强的过氧化物酶,它和SOD、过氧化氢酶(catalase, CAT)、单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)、脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)以及谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)一起构成了植物体内清除活性氧的酶系统(Chen和Asada 1989)。丙二醛(malondialdehyde, MDA)作为脂膜过氧化作用的终产物,其含量与细胞膜受损害程度密切相关,MDA的大量积累可影响电解质外渗,严重时甚至可导致细胞死亡(Kuk等2003; Limón-Pacheco和Gonsebatt 2009; 惠竹梅等2013)。重金属胁迫下,植物受损最普遍

的症状之一就是叶绿素含量减少导致的叶片退绿(Ekmekci等2008; Ghnaya等2005; Mobin和Khan 2007)。叶绿素可以从根本上影响光合器官的功能,进而影响整个植物的新陈代谢,因此叶绿素含量是评价重金属胁迫的重要因素之一。

较多的重金属进入植物体内会影响植物正常生理代谢活动(张雯等2014)。目前有关烟草(Guan等2009)、大蒜(Zhang等2005)、水稻(肖美秀等2006)、蚕豆(李源等2009)和二穗短柄草(张雯等2014)等作物在 Cd^{2+} 胁迫条件下的形态发育、抗氧化酶系统活性以及细胞活力等方面的研究已有较多的报道。

有研究表明,不结球白菜对重金属元素的富集以镉为首(陈晓婷等2002)。本文针对不结球白菜对 Cd^{2+} 胁迫的生理响应机制进行研究,初步探讨了 Cd^{2+} 胁迫对不结球白菜种子萌发以及L-半乳糖途径基因表达、抗坏血酸含量及抗氧化酶等指标的影响,为不结球白菜镉污染的诊断和响应机理的研究提供参考。

材料与方法

1 材料与胁迫处理

不结球白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino)品种‘苏州青’由南京农业大学白菜课题组提供。试验所用试剂 $\text{CdCl}_2\cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 为分析纯,购于南京寿德实验器材有限公司。

不结球白菜种子(100粒)用去离子水冲洗干净,于铺有2层滤纸的培养皿上催芽,用0、50、100和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 处理液(用 $\text{CdCl}_2\cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 配制,浓度以 Cd^{2+} 计,以蒸馏水处理为对照,下同)浸湿滤纸,每隔24 h统计发芽率并补充处理液。 Cd^{2+} 胁迫于第3天结束,统计各处理的胚轴和胚根长度(每皿随机选取10棵进行测定)。

不结球白菜播种穴盘,4~5片真叶时,选取生长整齐一致的幼苗移至营养钵,基质为泥炭:蛭石=2:1,用改进的1/2Hoagland (pH=6.5)(郭世荣2003)营养液浇灌植株。缓苗5 d后,用不同浓度的 Cd^{2+} 处理液浇灌植株,每天浇1次,以浇透营养钵为准,按时间点取样测定,每个样品取3次重复。

2 AsA和T-AsA含量的测定

分别于 Cd^{2+} 胁迫后0、6、12、24和48 h对不

结球白菜进行取样, 叶片中AsA和总抗坏血酸[T-AsA, 即AsA+DHA (脱氢抗坏血酸)]含量参照Bartoli等(2006)的高效液相色谱法(HPLC), 并做适当改动。HPLC高效液相色谱仪型号为Agilent 1120 Compact LC。取0.2 g叶片, 放入研钵中, 加入1.5 mL 0.1%的草酸充分研磨, 12 000×g 4 °C 离心20 min, 上清液用0.22 μm过滤器过滤到一个洁净的离心管中, 用于测定AsA含量。

取200 μL滤液, 加入200 μL的20 mg·mL⁻¹ DTT溶液, 涡旋混匀, 暗处反应15 min, 测定T-AsA含量。在高效液相色谱仪上进样, 色谱条件为流动相0.1%的乙酸, 流速1 mL·min⁻¹, 进样10 μL, 柱温30 °C, 检测波长为245 nm。

3 RNA的提取和实时荧光定量PCR引物设计

RNA提取试剂盒购自天根公司, 具体方法参

照TianGen植物RNA提取试剂盒说明书。分别以0、6、12、24和48 h取样的不结球白菜叶片总RNA为模板, 按照TaKaRa公司PrimeScript® RT (TaKaRa, Japan) 试剂盒说明书反转录部分合成cDNA。

实时定量PCR检测L-半乳糖途径的8个基因表达量所用引物参照张硕(2011)一文设计(表1), 内参基因为*Actin*, 实验所用引物由南京金斯瑞生物公司进行合成。实时定量体系参照TaKaRa公司SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书。荧光定量PCR仪为伯乐公司的biorad-IQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)。PCR程序采用两步法: 95 °C 2 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40个循环; 设置65 °C到95 °C的熔解曲线。实验数据用仪器自带软件处理, 用Excel 2010软件分析。

表1 荧光定量引物

Table 1 Primer of real-time PCR

基因名称	引物	序列(5'→3')
6-磷酸甘露糖异构酶 (mannose-6-phosphate isomerase, <i>PMI</i>)	q-pmi-f q-pmi-r	AGAACTACGAGTGGGGCAA TTATCCGAAACCCACGACTT
甘露糖磷酸转移酶 (phosphomannomutase, <i>PMM</i>)	q-pmm-f q-pmm-r	GTCAGTGTGGAGTCGTCGG AATGTTCCCCTTTTGATTGG
GDP-D-甘露糖焦磷酸化酶 (GDP-D-mannose pyrophosphorylase, <i>GMP/VTCl</i>)	q-gmp-f q-gmp-r	AAAGAAGTCTCCCGCCAAGC GCACCGTGAAAGCCTAACCC
GDP-D-甘露糖-3,5-表异构酶 (GDP-D-mannose-3',5'-epimerase, <i>GME</i>)	q-gme-f q-gme-r	GCGACGAGTTCACCTTGTT CCCATTGATCCTAGCAGCCT
GDP-L-半乳糖磷酸化酶 (GDP-L-galactose phosphorylase, <i>GGP/VTc2</i>)	q-ggp-f q-ggp-r	GCTGATTGTGGAAGGCAGAT AGGCAGTCCCCTTGGTGATA
L-半乳糖-1-磷酸酶 (L-galactose-1-phosphate phosphatase, <i>GPP/VTc4</i>)	q-gpp-f q-gpp-r	TACCATAGCCGATTGGAACG CCAATGCTTGCTGATGAATG
L-半乳糖脱氢酶 (L-galactose dehydrogenase, <i>GalDH</i>)	q-GDH-f q-GDH-r	AAGCAGGATGCCATTCAGGA ACAGGAAGGGAAGACACGGT
L-半乳糖-1,4-内酯脱氢酶 (L-galactono-1,4-dehydrogenase, <i>GalLDH</i>)	q-GLDH-f q-GLDH-r	GAAATCCTGGGCTTTGACTG CTCCCTTCGTGCTTTGTTGT
内参基因 <i>Actin</i>	q-actin-f q-actin-r	GTTGCTATCCAGGCTGTTCT AGCGTGAGGAAGAGCATAAC

4 不结球白菜中Cd²⁺含量的测定

不结球白菜幼苗于Cd²⁺胁迫5和10 d分别取样, 样品用去离子水充分洗净, 将地上部和根部分开, 80 °C烘干至恒重, 研磨成粉末后充分混匀, 取0.50 g, 加入HNO₃:HClO₄ (4:1, V:V)混合液消煮(Zhao等1994), ICP-AES (Perkin Elmer 2100 DV, USA)测定Cd²⁺含量。

5 其他各项生理指标的测定方法

粗酶液的提取按照李合生(2000)的方法进行, 用于测定抗氧化酶SOD、POD和CAT的活性。取冻存的叶片样品0.2 g, 加入5 mL含1%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的50 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.0), 冰浴研磨成匀浆, 4 °C下15 000×g离心15 min, 上清液即为粗酶提取液。SOD活性测定参照李合生(2000)

的氮蓝四唑(NBT)光化还原法,以抑制NBT光还原反应50%的酶量为1个酶活力单位,结果以 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)计算。POD活性测定参照李合生(2000)的愈创木酚显色法,以1 min内 A_{470} 变化0.01为1个酶活力单位,结果以 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白) $\cdot\text{min}^{-1}$ 计算。CAT活性测定参照Zhang等(2005)的方法,以1 min内 A_{420} 减少0.1为1个酶活力单位,结果以 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ (蛋白)计算。APX活性参考Nakano和Asada (1981)和朱祝军(1997)的方法在 A_{290} 条件下测定。MDA含量采用硫代巴比妥显色法进行测定(李合生2000),取0.2 g样品,加入1.6 mL 10% TCA研磨,12 000 \times g离心10 min,取上清1.5 mL,加入1.5 mL 0.67% TBA后,沸水煮30 min,冷却后离心,取上清后分别测定 A_{450} 、 A_{532} 和 A_{600} ,按相应公式进行计算,以 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)表示。叶绿素含量用比色法进行测定,参考郭胜伟和高云东(2004)的方法并稍作改动,根据提取液中叶绿素浓度,换算每克鲜叶中叶绿素含量 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)。

6 数据处理与分析

所有指标测定均重复3次,试验数据采用SPSS 20.0和Excel 2010进行One-way ANOVA单因素方差分析和统计处理,组间比较用LSD检验,荧光定量PCR数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行计算分析。

实验结果

1 不同浓度镉胁迫对白菜种子萌发的影响

用不同浓度的 Cd^{2+} 处理不结球白菜种子,观察种子萌发的形态变化(图1),统计种子发芽率及胚轴、胚根长度(表2)。图1结果显示,随着 Cd^{2+} 浓度升高,胚根伸长受到了显著的抑制,同时胚根形态出现了不同程度的卷曲,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫后胚根几乎无法正常生长。

Cd^{2+} 胁迫第1天,50、100和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的发芽率显著高于对照;第2天,3种处理的发芽率与对照无显著差异,各组分的发芽率均达到了90%以上;第3天,对照的发芽率达到100%, Cd^{2+} 胁迫的发芽率与对照无显著差异。以上结果表明, Cd^{2+} 胁迫对不结球白菜种子发芽率的影响不显著。 Cd^{2+} 胁迫第3天,各组分的胚轴长度无显著差异,而50、100和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的胚根长度分别比对照降低了15.74%、43.47%和65.26%,其中,100和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的胚根长度与对照差异达到显著水平,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的胚根生长受到了严重抑制(图1和表2)。据此,本研究的后续实验 Cd^{2+} 胁迫浓度均选用0、25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

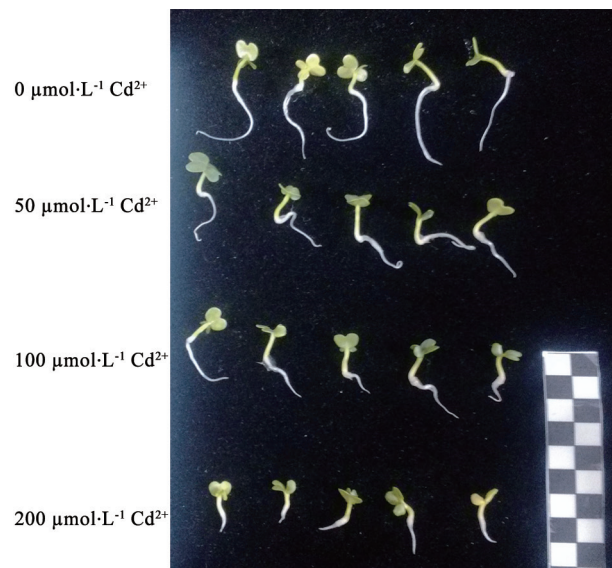


图1 镉胁迫对不结球白菜种子萌发形态的影响

Fig.1 Effects of Cd^{2+} stress on morphology of non-heading Chinese cabbage seedling
标尺为5 mm·格⁻¹。

表2 不同浓度镉胁迫对不结球白菜种子发芽的影响

Table 2 Effects of different concentrations of Cd^{2+} on germination of non-heading Chinese cabbage seed

Cd^{2+} 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	发芽率/%			胚轴长度/mm	胚根长度/mm
	第1天	第2天	第3天		
0(对照)	21.11 ^c	98.00 ^a	100.00 ^a	6.75 ^a	19.69 ^a
50	42.22 ^a	92.27 ^a	93.33 ^a	6.19 ^a	16.59 ^a
100	38.89 ^a	94.53 ^a	96.67 ^a	6.73 ^a	11.13 ^b
200	32.22 ^b	93.74 ^a	95.56 ^a	5.23 ^a	6.84 ^c

不同的小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。下图同此。

2 不同浓度镉胁迫对白菜AsA和总AsA含量的影响

如图2-A所示, 与对照相比, Cd^{2+} 胁迫的AsA含量总体保持先升高后降低的趋势。25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的AsA含量分别在6、12和6 h达到峰值而后降低。 Cd^{2+} 胁迫6 h时, 各处理的AsA含量均随 Cd^{2+} 浓度增加急剧升高且显著高于对照水平, 其中, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的AsA含量显著高于其他 Cd^{2+} 胁迫水平。 Cd^{2+} 胁迫12~48 h, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的AsA含量显著低于其他三种处理。50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫6~12 h的AsA含量均显著高于对照, 24 h时, AsA含量与对照差异不显著。 Cd^{2+} 胁迫至48 h, 各处理的AsA含量均显著低于对照。

如图2-B所示, 与对照相比, Cd^{2+} 胁迫6~24 h, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的总AsA含量始终低于对照水平。50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫12 h, 总AsA含量显著高于对照, 胁迫24 h, 总AsA含量又降低显著低于对照水平。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫6~12 h, 总AsA含量均显著高于对照, 24 h时, 总AsA含量高于对照但未达到差异显著水平。最终 Cd^{2+} 胁迫48 h时, 各处理的总AsA含量与对照差异均不显著。

3 不同浓度镉胁迫对白菜L-半乳糖途径相关基因表达的影响

外界环境条件通过影响植物AsA合成途径相关基因的表达进而影响AsA的积累。L-半乳糖途径是以D-果糖-6-磷酸为起始原料, 经6-磷酸甘露

糖异构酶(PMI)催化形成D-甘露糖-6-磷酸, D-甘露糖-6-磷酸由甘露糖磷酸转移酶(PMM)催化形成D-甘露糖-1-磷酸, D-甘露糖-1-磷酸在GDP-D-甘露糖焦磷酸化酶(GMP)的作用下, 与一个分子的三磷酸鸟苷(GTP)反应生成GDP-D-甘露糖, GDP-D-甘露糖可通过GDP-D-甘露糖3,5-差向异构酶(GME)的作用形成GDP-L-半乳糖, GDP-L-半乳糖经GDP-L-半乳糖磷酸化酶(GGP)的催化形成L-半乳糖-1-磷酸, L-半乳糖-1-磷酸在L-半乳糖-1-磷酸酶(GPP)的作用下脱去磷酸基团, 形成L-半乳糖, 再经L-半乳糖脱氢酶(L-GDH)的作用, 生成L-半乳糖-1,4-内酯, L-半乳糖-1,4-内酯在L-半乳糖-1,4-内酯脱氢酶(L-GLDH)的作用下最终生成AsA。

如图3所示, 大多数基因的表达趋势均是上调达到峰值后, 随胁迫时间延长又逐渐下调, 与AsA含量的变化基本一致。与对照相比, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的8个基因表达量始终处于较低水平, 与AsA含量结果一致。不同浓度 Cd^{2+} 胁迫下各个基因表达量达到峰值的时间有所不同。其中, PMM、GMP、GPP、GalDH和GalLDH对100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 胁迫响应较为迅速, 在 Cd^{2+} 胁迫6 h达到峰值; PMI和GGP对50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫较为敏感, 在 Cd^{2+} 胁迫12 h达到峰值; GME在 Cd^{2+} 胁迫过程中的变化趋势比较复杂, 6 h时, 各处理的GME表达量差异不显著, 12 h时, 25和50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的GME表达量显著低于对照水平, 而100

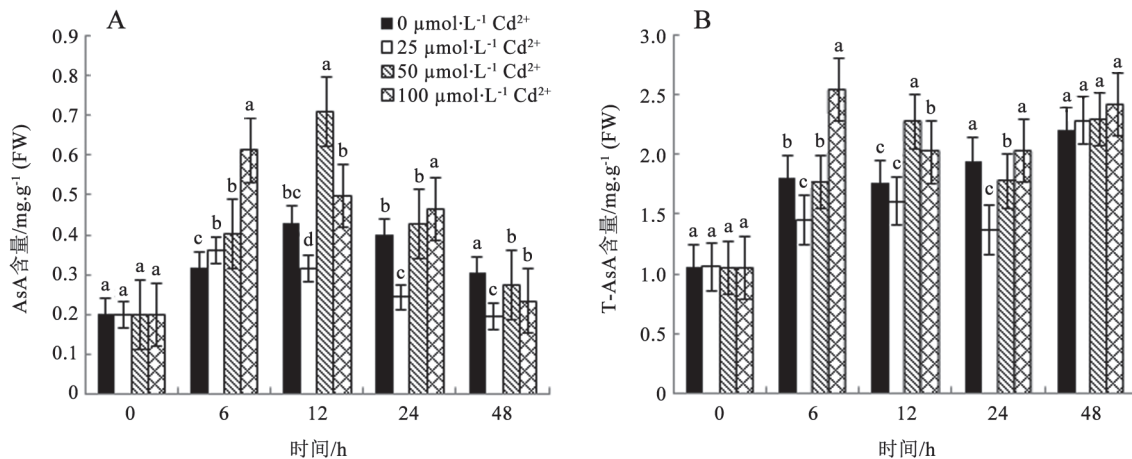


图2 镉胁迫对不结球白菜叶片AsA和T-AsA含量的影响

Fig.2 Effects of Cd^{2+} stress on the contents of AsA and total AsA in non-heading Chinese cabbage leaves

不同的小写字母表示同一时间不同处理间差异显著($P < 0.05$)。下图同此。

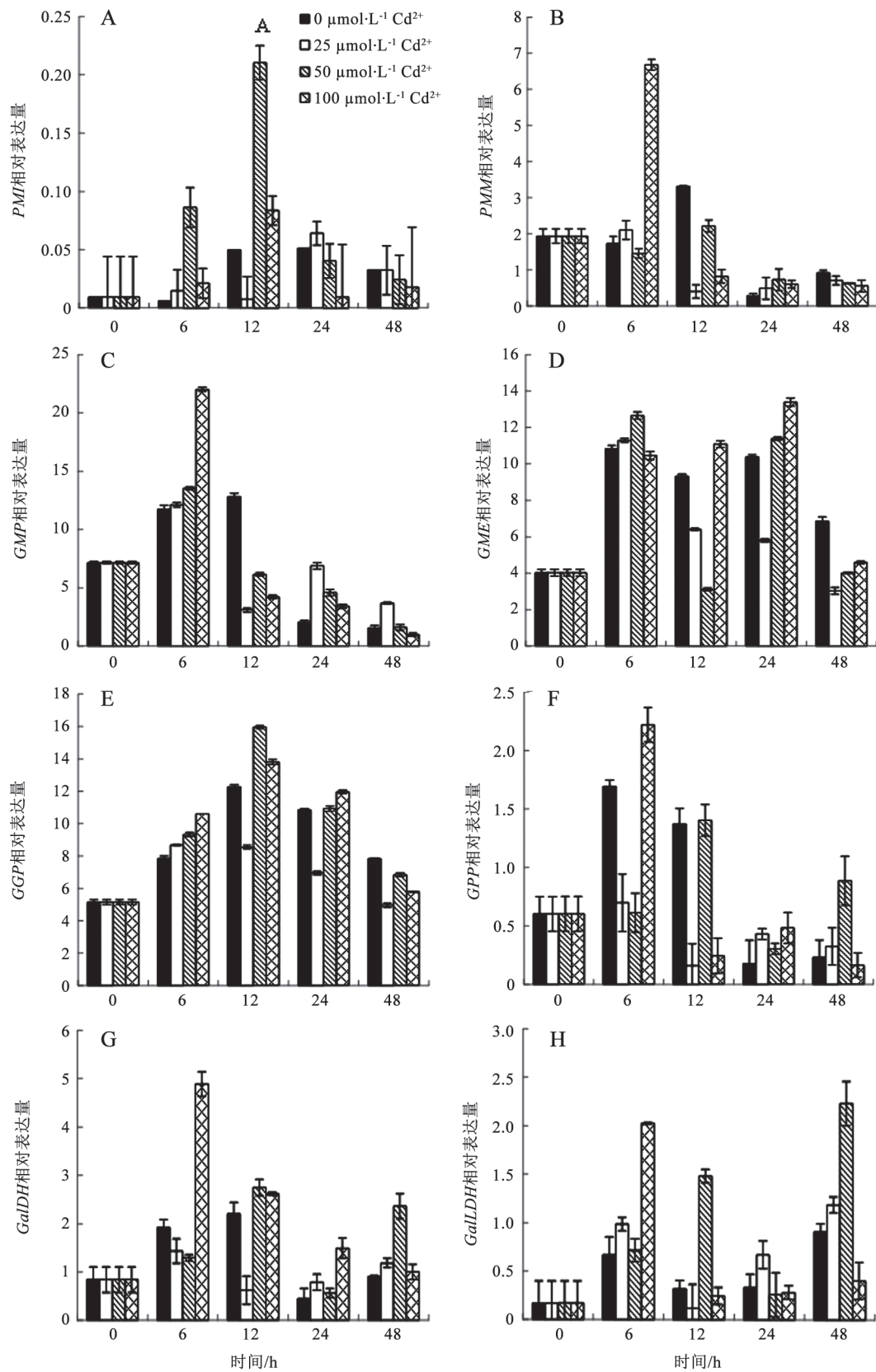


图3 镉胁迫对不结球白菜叶片L-半乳糖途径相关基因相对表达量的影响

Fig.3 Effects of Cd²⁺ stress on relative expression of genes involved in the L-galactose pathway in non-heading Chinese cabbage leaves

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的基因表达量显著高于对照水平; 24 h时, 50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的基因表达量显著高于对照, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的基因表达趋势与其相反; 至48 h Cd^{2+} 胁迫结束时, 25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的GME表达量均显著低于对照水平。表明 Cd^{2+} 胁迫通过影响AsA合成途径相关基因的表达从而影响AsA含量的积累。

4 不同浓度镉胁迫对白菜抗氧化防御系统的影响

4.1 不结球白菜中 Cd^{2+} 含量的积累

不同浓度 Cd^{2+} 胁迫下不结球白菜的地上部和根部 Cd^{2+} 含量差异显著(表3), Cd^{2+} 胁迫5 d时, 25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的根部 Cd^{2+} 含量分别为地上部的4.09倍、4.00倍和3.97倍; Cd^{2+} 胁迫10 d时, 25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的地上部 Cd^{2+} 含量分别为根部的0.26倍、0.26倍和0.27倍。由此可知, Cd^{2+} 主要积累在不结球白菜的根系中, 经过长时间、高浓度的胁迫后, 叶片也会积累一定的 Cd^{2+} , 地上部和根部 Cd^{2+} 含量均随 Cd^{2+} 胁迫浓度的增加以及 Cd^{2+} 胁迫时间的延长而积累。

4.2 不结球白菜中SOD、POD、CAT和APX活性变化

如图4所示, Cd^{2+} 胁迫5 d时, 与对照相比, 各处理的SOD活性显著升高; Cd^{2+} 胁迫10 d时, 各处理

的SOD活性降低显著低于对照水平, 25、50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的SOD活性分别比对照降低了36.23%、46.78%和79.20%。 Cd^{2+} 胁迫5 d时, 各浓度处理的POD活性显著低于对照水平; Cd^{2+} 胁迫后10 d时, 各浓度处理的POD活性与对照无显著差异。

胁迫5 d时, 50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的CAT活性降低显著低于对照; 至 Cd^{2+} 胁迫10 d时, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的CAT活性显著高于对照, 而50和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫处理则与对照差异不显著。 Cd^{2+} 胁迫5 d时, 除25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫外, 其余 Cd^{2+} 胁迫的APX活性与对照均无显著差异; Cd^{2+}

表3 镉胁迫对不结球白菜幼苗 Cd^{2+} 含量的影响

Table 3 Effects of Cd^{2+} stress on Cd^{2+} contents of non-heading Chinese cabbage seedling

Cd^{2+} 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	地上部 Cd^{2+} 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)		根部 Cd^{2+} 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	
	5 d	10 d	5 d	10 d
0	—	—	—	—
25	108.9 ^c	223.7 ^c	445.1 ^c	863.5 ^e
50	217.3 ^b	298.4 ^b	869.5 ^b	1 158.2 ^b
100	267.8 ^a	357.1 ^a	1 063.2 ^a	1 329.8 ^a

—: 表示没有检测到。

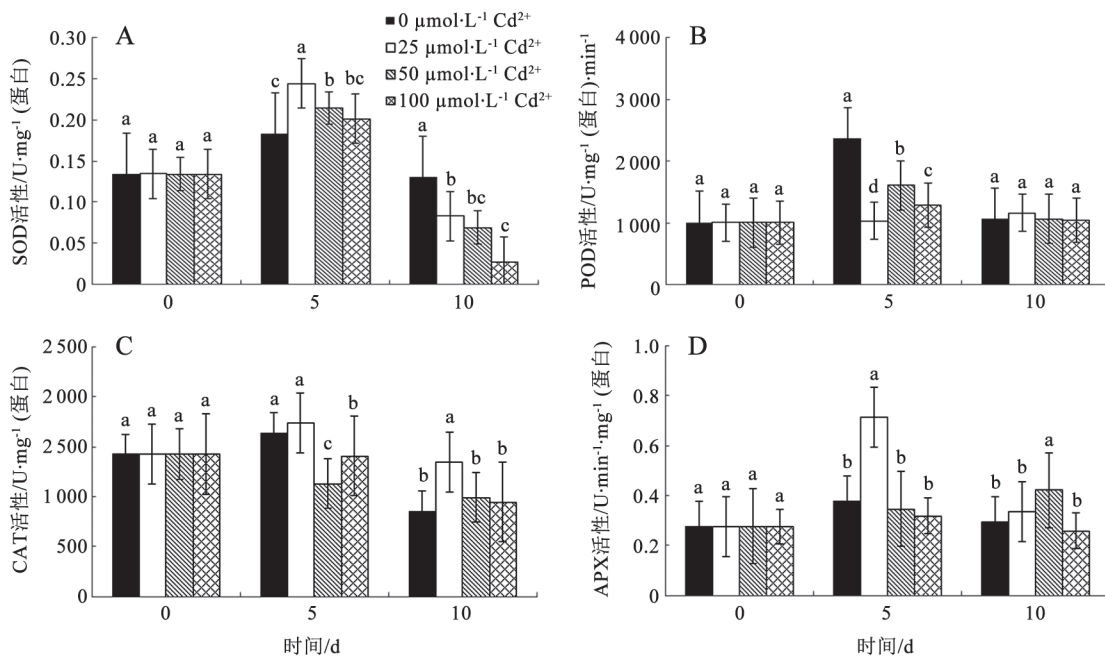


图4 镉胁迫对不结球白菜叶片SOD、POD、CAT和APX活性的影响

Fig.4 Effects of Cd^{2+} stress on enzymatic activities of SOD, POD, CAT and APX in non-heading Chinese cabbage leaves

胁迫10 d时,除 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫外,其余 Cd^{2+} 胁迫处理与对照APX活性差异也均不显著。

Cd^{2+} 胁迫后5 d时, SOD在抗氧化酶系统中起主要的防御功能,至 Cd^{2+} 胁迫10 d时, POD、CAT和APX清除活性氧的效率要相对高于SOD。表明抗氧化酶系统在清除活性氧的过程中协同作用,在 Cd^{2+} 胁迫的不同时期起主导作用的抗氧化酶也会发生变化,这可能与幼苗叶片中不同时期的 Cd^{2+} 含量积累有关(表3)。

4.3 不结球白菜中丙二醛和叶绿素含量变化

图5-A显示, Cd^{2+} 胁迫5 d时, 丙二醛含量显著升高, 且随浓度增加而升高, 25、50和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的叶片丙二醛含量分别比对照升高了

23%、41%和164%。之后随着胁迫时间延长, 丙二醛含量持续升高。 Cd^{2+} 胁迫10 d时, 25、50和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的叶片丙二醛含量分别比对照升高了23%、129%和155%。

如图5-B所示, Cd^{2+} 胁迫5 d时, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的叶绿素含量显著高于对照和其他处理, 25和 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的叶绿素含量与对照差异均不显著。 Cd^{2+} 胁迫10 d时, 25、50和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 胁迫的叶绿素含量均显著低于对照水平。表明幼叶光合色素合成在不同程度上受到了 Cd^{2+} 胁迫的影响, 随着 Cd^{2+} 胁迫浓度的升高以及胁迫时间的延长, 叶绿体受到的损伤加剧, 叶绿素含量逐渐降低。

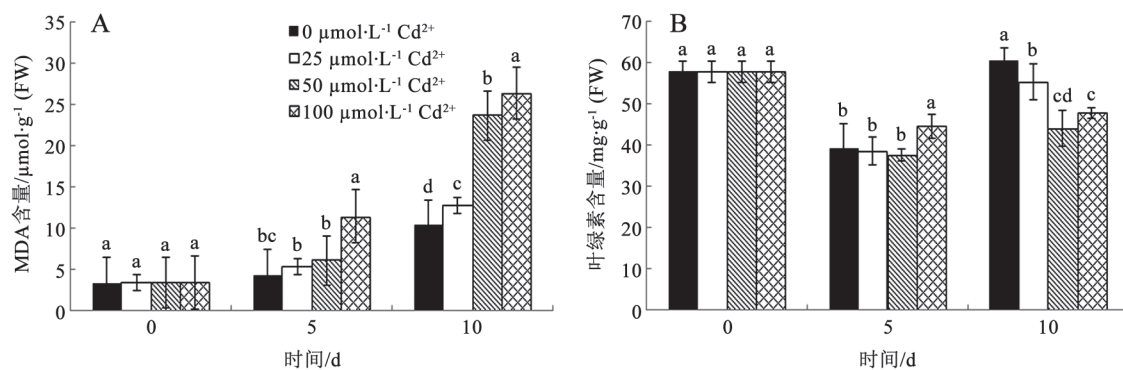


图5 镉胁迫对不结球白菜叶片丙二醛和叶绿素含量的影响

Fig.5 Effects of Cd^{2+} stress on the contents of MDA and chlorophyll in non-heading Chinese cabbage leaves

讨 论

Cd^{2+} 是植物非必需元素, Cd^{2+} 进入植物体内并积累到一定程度, 植物就会表现出毒害症状, 如生长迟缓、植株矮小、褪绿、产量下降等。重金属对植物的伤害首先表现在幼苗的根部(杨居荣和黄翌1994), 与本文研究结果相一致(图1、表2和3)。本研究发现, Cd^{2+} 对不结球白菜胚芽和胚根长度的抑制随着 Cd^{2+} 浓度升高而增加(图1和表2), 表明 Cd^{2+} 对胚根生长的抑制和毒害具有明显的累积作用, 这与韩宝贺等(2014)的研究相一致。

本研究表明, Cd^{2+} 胁迫通过影响AsA合成L-半乳糖途径相关基因的表达从而影响AsA的积累, 与Ren等(2013)研究结果一致。L-半乳糖途径中不同基因在不同浓度 Cd^{2+} 胁迫下基因表达量达到峰值的时间不同, 同一基因在不同浓度 Cd^{2+} 胁迫下表达

量亦存在显著差异(图3)。 Cd^{2+} 胁迫后, AsA生物合成途径中8个关键基因的表达量都发生了不同程度的变化, 表明植物对AsA合成的调节是个协同的过程, 同时也表明L-半乳糖途径相关基因对 Cd^{2+} 胁迫的响应是一个复杂的过程。

前人研究发现, 植物在一定的低温、干旱、缺镁和重金属胁迫下, 依赖于抗坏血酸的 H_2O_2 清除酶的活性增加(Suzuki等2001), AsA含量会持续或者短暂升高, AsA在植物细胞中维持较高的还原型对氧化型的比率(AsA/DHA)对清除细胞内ROS非常重要(Mittler 2002)。由于胁迫条件下ROS的变化趋势不同, 作为清除过量ROS的抗氧化剂, AsA也会随着ROS的变化而变化(Massot 2012)。植株遭受 Cd^{2+} 胁迫后, 体内的抗氧化防御系统被激活, AsA是植物抗氧化防御系统的重要组成部分, 因此植物表现出短时间内AsA含量显著升高, 而随

着胁迫时间延长, 植物受到的氧化损伤超出了自身的调控能力范围, 因而抗坏血酸含量不再继续升高, 植株表现出受到损伤。本文中, Cd^{2+} 胁迫对不结球白菜造成了不同程度的氧化损伤, 与对照相比, Cd^{2+} 胁迫的叶片AsA含量短时间内(6 h)升高后又降低且显著低于对照水平, 与前人研究结果一致。

植物体内存在着一套负责清除活性氧产生的抗氧化系统。在植物正常情况下, 植物体内抗氧化系统使活性氧的产生和清除处于动态平衡状态(尹永强等2007), 在 Cd^{2+} 胁迫下, 植物体内游离态 Cd^{2+} 增加, 间接产生活性氧自由基, 导致细胞抗氧化防御系统平衡失调, 造成氧化压力, 影响植物生理生化活动, 阻碍植物生长发育(Gallgo等1996)。活性氧随着 Cd^{2+} 胁迫浓度的增加及 Cd^{2+} 胁迫时间的延长而积累并激发抗氧化防御反应(Ann 2010)。

低浓度 Cd^{2+} 胁迫下, 蔬菜体内抗氧化酶活性呈上升趋势, 当 Cd^{2+} 浓度达到或超过一定范围后, 活性氧清除酶的活性则会降低, 这可能是由于低浓度的 Cd^{2+} 胁迫后, 植物对 Cd^{2+} 胁迫产生了应激反应, 使根系活力上升, 植株利用过氧化物酶等自身防御系统清除了低浓度 Cd^{2+} 对其产生的损伤。此外, 段昌群等(1992)认为低剂量、短时间的重金属胁迫可以提高或加速植物的某些生理生化反应, 而大剂量的镉则会对植物产生强烈的毒性。

Cd^{2+} 胁迫能够引起不结球白菜体内活性氧代谢紊乱, 且 Cd^{2+} 浓度越高, 胁迫时间越长, 对质膜选择透性、组成、结构和生理生化等的伤害越大(Gallgo等1996)。有研究表明, 不同物种之间, Cd^{2+} 胁迫引起的抗氧化系统酶活性变化有所不同, 在转*BjCAT3*基因过量表达的转基因烟草中, CAT在清除活性氧过程中起主导作用(Guan等2009), 而大蒜苗的抗氧化酶系统中SOD和POD的作用则超过了CAT(Zhang等2005)。本研究中 Cd^{2+} 胁迫5 d后, Cd^{2+} 胁迫的SOD活性显著高于对照, POD活性显著降低, CAT和APX活性变化差异不显著, 此时SOD起主要的抗氧化防御功能。 Cd^{2+} 胁迫10 d时, SOD活性均显著低于对照水平, POD、CAT和APX清除活性氧的效率要相对高于SOD, 与前人研究结果一致。

植物在逆境环境下, 细胞膜中的不饱和脂肪酸会在活性氧自由基的攻击下发生过氧化作用而生成MDA, 从而造成细胞质膜损伤, 导致细胞质膜的选择性功能受到破坏, 细胞内电解质大量外渗, 因此植物中MDA含量的变化可以反映细胞膜脂过氧化作用的强弱及细胞质膜的变性程度(胡晓辉2009)。研究表明, Cd^{2+} 浓度越高, 幼苗根组织中的MDA含量越高, 细胞膜脂过氧化作用越强, 幼苗受到的毒害作用越大(徐劼等2014), 与本文研究结果一致。有研究认为, Cd^{2+} 胁迫会导致植物叶片细胞的叶绿体结构受损, 降低植物叶片中光合色素含量(Drazic和Mihailovic 2005)及光合电子传递速率, 因而导致叶绿素的生物合成受阻。在重金属胁迫环境下, 植物叶绿素含量下降, 光合作用减弱, 进一步影响植物的新陈代谢活动(徐劼等2014)。Sanita di Toppi和Gabbrielli (1999)的研究表明, 叶绿体合成、光合作用等植物生理过程受低剂量的 Cd^{2+} 影响而失调。 Cd^{2+} 胁迫下植物细胞中活性氧增加, 参与了对叶绿素的降解(Liang和Arthur 1992)或直接破坏了叶绿体微结构, 使得叶绿素含量降低, 与本文研究结果一致(图5)。

本研究表明, Cd^{2+} 胁迫诱导活性氧产生从而导致膜脂过氧化是 Cd^{2+} 毒害不结球白菜的重要机制之一。AsA含量、SOD活性以及MDA含量对 Cd^{2+} 胁迫的敏感性高于其他几项指标, 因此, 本研究推测, 不结球白菜幼苗叶片的AsA含量、SOD活性以及MDA含量可以对土壤 Cd^{2+} 污染起到早期指示作用。

参考文献

- 安华明, 陈力耕, 樊卫国, 胡西琴(2004). 高等植物中维生素C的功能、合成及代谢研究进展. 植物学通报, 21 (5): 608~617
- 陈坤明, 宫海军, 王锁民(2004). 抗坏血酸的生物合成、转运及其生物学功能. 西北植物学报, 24 (2): 329~336
- 陈晓婷, 王果, 张潮海, 方玲(2002). 石灰泥炭对镉铅锌污染土壤上小白菜生长和元素吸收的影响. 土壤与环境, 11 (1): 17~21
- 陈艺晖, 林河通, 林艺芬, 张居念, 赵云峰(2011). 拟茎点霉侵染对龙眼果实采后果皮褐变和活性氧代谢的影响. 中国农业科学, 44 (23): 4858~4866
- 段昌群, 王焕校, 曲仲湘(1992). 重金属对蚕豆(*Vicia faba*)根尖的核酸含量及核酸酶活性影响的研究. 环境科学, 13 (5): 31~36
- 郭胜伟, 高云东(2004). 比色法测定中华芦荟叶片中叶绿素含量方法的研究. 中医药学刊, 22 (1): 12~16
- 郭世荣(2003). 无土栽培学. 北京: 中国农业出版社, 111~115

- 韩宝贺, 朱宏, 张艺馨(2014). 镉对三种草坪草种子萌发与生长的影响. 中国草地学报, 36 (3): 98~102
- 何江华, 柳勇, 王少毅, 陈俊坚, 魏秀国(2003). 广州市郊区菜园主要蔬菜的重金属含量. 园艺学报, 30 (3): 290
- 胡晓辉, 杜灵娟, 邹志荣(2009). Spd浸种对盐胁迫下番茄(*Solanum lycopersicum*)幼苗的保护效应. 生态学报, 29 (9): 5152~5157
- 惠竹梅, 王智真, 胡勇, 邓敏敏, 张振文(2013). 2,4-表油菜素内酯对低温胁迫下葡萄幼苗抗氧化系统及渗透调节物质的影响. 中国农业科学, 46 (5): 1005~1013
- 李合生(2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社
- 李源, 李金娟, 魏小红(2009). 镉胁迫下蚕豆幼苗抗氧化能力对外源NO和H₂O₂的响应. 草业学报, 18 (62): 186~191
- 宋玉萍, 李英, 高红亮, 王建军, 侯喜林(2007). 不结球白菜维生素C积累与相关酶活性研究. 西北植物学报, 27 (11): 2240~2244
- 王洪政, 沈振国(2006). 根系抗坏血酸在小麦幼苗铝耐性中的作用. 西北植物学报, 26 (4): 753~758
- 肖美秀, 林文雄, 陈冬梅, 梁康迳, 柯庆明(2006). 镉胁迫对耐性不同的水稻幼苗膜脂过氧化和保护酶活性的影响. 中国生态农业学报, 14 (4): 256~258
- 徐劫, 胡博华, 戈涛, 陈沁(2014). 镉胁迫对生菜种子萌发及幼苗生理特性的影响. 湖北农业科学, 53 (20): 4892~4896
- 杨居荣, 黄翌(1994). 植物对重金属的耐性机理. 生态学杂志, 13 (6): 20~26
- 尹永强, 胡建斌, 邓明军(2007). 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展. 中国农学通报, 23 (1): 105~110
- 张硕(2011). 不结球白菜抗坏血酸合成相关基因的克隆与表达及*BcPMI2*的功能分析[学位论文]. 南京: 南京农业大学
- 张雯, 王丽蓉, 殷恒霞, 李毅, 赵鹏善, 马小飞(2014). 镉胁迫对二穗短柄草幼苗叶片中无机离子稳态的影响. 麦类作物学报, 34 (2): 255~260
- 朱祝军(1997). 油菜种子发芽过程中依赖于抗坏血酸的H₂O₂清除酶活性的变化. 浙江农业大学学报, 23 (5): 505~509
- Ann C, Michelle P, Tony R, Marijke J, Els K, Heidi G, Kelly O, Ambily RN, Elke M, Tom JA et al (2010). Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23: 927~940
- Bartoli CG, Yu JP, Gomez F, Fernández L, McIntosh L, Foyer CH (2006). Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *J Exp Bot*, 57: 1621~1631
- Chen GX, Asada K (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol*, 30 (7): 987~998
- Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Rolinski S, Smirnoff N (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J*, 52: 673~689
- Drazic G, Mihailovic N (2005). Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. *Plant Sci*, 168: 511~517
- Ekmekeci Y, Tanyolac D, Ayhan B (2008). Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *J Plant Physiol*, 165: 600~611
- Gallgo SM, Benavidas MP, Tomaro ML (1996). Effect of heavy metal iron excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci*, 121: 151~159
- Ghnaya T, Nouairi I, Slama I, Messedi D, Grignon C, Abdelly C, Ghorbel MH (2005). Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. *J Plant Physiol*, 162: 1133~1140
- Guan ZQ, Chai TY, Zhang YX, Xu J, Wei W (2009). Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. *Chemosphere*, 76: 623~630
- Kuk YI, Shin JS, Burgos NR, Hwang TE, Han O, Cho BH, Jung S, Guh JO (2003). Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Sci*, 43: 2109~2117
- Liang P, Arthur BP (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 25: 967~971
- Limón-Pacheco J, Gonsébat ME (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res-Gen Tox En*, 674: 137~147
- Massot C, Stevens R, Génard M, Longuenesse JJ, Gautier H (2012). Light affects ascorbate content and ascorbate-related gene expression in tomato leaves more than in fruits. *Planta*, 235: 153~163
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7: 405~410
- Mobin M, Khan N (2007). Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol*, 164: 601~610
- Nakona Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22: 867~880
- Ren J, Chen ZW, Duan WK, Song XM, Liu TK, Wang JJ, Hou XL, Li Y (2013). Comparison of ascorbic acid biosynthesis in different tissues of three non-heading Chinese cabbage cultivars. *Plant Physiol Bioch*, 73: 229~236
- Schutzendubel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A (2001). Cadmium-induced changes in anti-oxidative systems, hydrogen peroxide content and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol*, 127 (3): 887~898
- Smirnoff N, Wheeler GL (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol*, 35: 291~314
- Suzuki N, Koizumi N, Sano H (2001). Screening of cadmium responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 24: 1177~1188
- Sanita di Toppi L, Gabbriellini R (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot*, 41 (2): 105~130
- Zhang HY, Jiang YN, He ZY, Ma M (2005). Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). *J Plant Physiol*, 162: 977~984
- Zhao FJ, McGrath SP, Crosland AR (1994). Comparison of three wet digestion methods for the determination of plant sulphur by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Commun Soil Sci Plant Anal*, 25: 407~418