

萌发期硫酸铜胁迫对绿豆生长的影响及其细胞内密度变化反应

傅涵¹, 石琴琴¹, 钟鸣², 刘誉^{1*}

¹暨南大学医学院生化系, 广州510632, ²广州市东来生物科技有限公司, 广州510530

摘要: 绿豆(*Vigna radiata*)在硫酸铜胁迫下水培发芽后再移植土种, 观察胚芽和幼苗生长情况; 测定胚芽和幼苗细胞内密度变化(DANCE反应), 以及胚芽的超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量, 研究萌发期硫酸铜胁迫对绿豆生长的影响及其DANCE反应。结果显示, 硫酸铜胁迫抑制胚芽生长, 以胁迫3~4 d最为显著, 并出现芽细胞DANCE反应。移植土壤后, 胁迫组幼苗出现代偿性加快生长, 生长率随萌发期硫酸铜胁迫浓度增加而提高。土种3 d后, 胁迫组幼苗表现生长状态恢复正常, 但是, 胁迫组幼苗根、茎、叶均出现DANCE反应。根、茎、叶部在土种1~2 d后均发生DANCE反应, 其中根部反应持续1 d, 茎部反应持续3 d, 而叶部反应则持续至土种第5日。土种6 d后, 各胁迫组幼苗均无DANCE反应。硫酸铜胁迫还导致胚芽SOD活性和MDA含量显著增高, SOD基因mRNA表达增加, 提示硫酸铜胁迫促进胚芽产生自由基。研究结果表明, 绿豆的DANCE反应可能是发芽减慢和幼苗代偿性生长所致, 发芽期适当的环境胁迫可能有助于植物幼苗生长。

关键词: 绿豆; 硫酸铜; 胁迫; DANCE

环境变化如干旱、高盐、重金属和低温等因素可严重影响植物的生长发育(Xu等2015)。随着各国工业化进程, 工厂排放的工业废料不断增加, 对环境的影响日益严重, 尤其是含重金属污水的排放可能导致生物圈污染, 而重金属在农作物中的积累又可能造成人类的健康问题(Xiong和Wang 2005)。因此, 重金属对农作物的污染问题已引起各国的高度重视, 国际上对农作物的重金属胁迫研究逐年增加(Ashraf和Ali2007)。

最近的研究发现, 植物在环境因素胁迫下通过生理性自我调节作用以适应不良环境(Wahid和Khaliq 2015)。当重金属污染严重时, 植物通过抑制自身细胞的分裂和延长分裂周期以减少细胞的损伤, 表现为一些酶的活性改变和生长减慢。重金属在植物中严重积累可促使植物体内产生氧自由基, 从而导致氧自由基积累(Pál等2006; He 2011), 对植物细胞造成损害, 包括DNA损伤、光合作用受抑制(Patel等2015; MacFarlane 2003; Malecka等2001)、细胞表面碳水化合物减少(Luo等2013)等。作为对重金属毒性的反应, 植物细胞启动一种防御机制, 包括一些抗氧化酶如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性增高(Kumar等2012), 加快清除植物中的氧自由基, 形成第一道防线(龚双姣等2008)。此外, 细胞产生的氧自由基及其积累可导致丙二醛(malondialdehyde, MDA)增多, 后者是一种位于细胞表面的脂溶性产物, 能增加细胞膜的通透性而损害细胞的正常生理功能(Hussain等2013)。因此, 植物细胞中SOD活性和

MDA含量变化是研究植物对重金属胁迫反应的重要指标。

在前期研究中, 我们发现动物和微生物(包括细菌和真菌)细胞对环境因素和药物发生一种以细胞内密度改变为特征的反应, 可用不连续蔗糖密度梯度离心(discontinuous sucrose gradient centrifuge, DSGC)法测定。这种反应表现为DSGC条带发生上移(细胞内物质密度减小)或下移(细胞内物质密度增加), 称为非生理性细胞内密度改变(density alteration in non-physiological cells, DANCE反应)(Liu等2011)。细胞的DANCE反应在倾斜光纤光栅传感技术研究中得到了证实(Guo等2015), 其机制涉及细胞的生化与分子生物学改变。动物实验显示, 荷瘤小鼠(*Mus musculus*)肝脏组织细胞发生规律性DANCE反应(朱晓杨等2015), 高剂量肾上腺素皮下注射则引起小鼠肺组织细胞DANCE反应(Liu等2016), 提示药物作用和体内的病理变化均可引起动物体内组织细胞DANCE反应。细菌实验显示, 氨苄霉素和酮康唑分别引起细菌[大肠杆菌(*Escherichia coli*)]和真菌[白念珠菌(*Candida albicans*)] DANCE反应(Liu等2011), 证明细菌在抗菌素作用下发生细胞内物质密度改变。然而, 植物细胞是否在环境因素或药物作用下发生DANCE反应尚不清楚。最近研究发现, 低浓度硫

收稿 2016-08-01 修定 2016-11-24

资助 中国科技部科技创新基金(12C26214405312)。

* 通讯作者(E-mail: xyuliu05@126.com)。

酸铜可延缓马齿苋(*Portulaca oleracea*)的发芽期(Mohanapriya等2006),而高浓度硫酸铜则对绿豆(*Vigna radiata*)发芽及其胚芽生长均有显著的抑制作用(Liu等2007; Sharaff和Archana 2015)。因此,我们推测硫酸铜胁迫造成绿豆发芽受抑制与细胞内的物质代谢改变有关,其中,生物大分子的合成与分解代谢改变可能导致细胞内物质密度的变化,即DANCE反应。

本研究以不同剂量硫酸铜对发芽期绿豆进行胁迫,再将胚芽移植土壤正常种植;观察绿豆发芽和土种后幼苗的生长情况,分析胚芽细胞中SOD活性和MDA含量,测定胚芽和幼苗各部分细胞DANCE反应,旨在研究发芽期硫酸铜胁迫对绿豆生长的影响及其机制。

材料与方 法

1 材料与试剂

绿豆[*Vigna radiata* (L.) Wilczek] ‘白绿8号’购自广州家乐福超市;核黄素、L-甲硫氨酸、氯化硝基四氮唑蓝(nitro-blue tetrazolium chloride, NBT)、2-硫代巴比妥酸、EDTA- Na_2 购自美国AMRESCO公司;三氯甲烷(分析纯)、二水磷酸氢二钠(分析纯)、二水磷酸二氢钠(分析纯)、蔗糖(分析纯)、无水乙醇(分析纯)、异丙醇(分析纯)购自广州化学试剂厂;中性红染液购自北京Leagene公司;SOD和MDA检测ELISA试剂盒购自上海恒远生物科技有限公司;TRIzol试剂购自TIANGEN公司;DNase1、RNase-free试剂盒购自Fermentas公司;cDNA合成试剂盒、SYBR Green qPCR Master Mix购自Biotool公司。

2 硫酸铜胁迫

绿豆经0.1% (*m/V*)氯化汞溶液消毒后,用去离子水清洗3次,再以可饮用自来水浸泡24 h,将其平放在表面铺有少量细沙的吸水纸上,置于培养盒中,20粒绿豆·盒⁻¹,共8盒,分4组(2盒·组⁻¹),分别以4种不同浓度硫酸铜胁迫。参照文献(Liu等2007; Sharaff和Archana 2015; Pradhan等2015)报道方法,硫酸铜用蒸馏水配制浓度分别为0、50、400和1 000 mg·L⁻¹的溶液, pH6.2, 4组绿豆分别均匀喷洒上述4种浓度硫酸铜溶液各2 mL,每24 h喷洒一次,共4次;避光连续培养,第5日胁迫结束(Wahid和Khaliq 2015)。

3 DANCE反应测定

3.1 样本处理

绿豆在硫酸铜胁迫下水培,每天以列表法从每组随机收集2~7株胚芽(250~300 mg),置于玻璃匀浆器中并加入500 μL 生理盐水进行碾磨,每组碾磨15次;碾磨液以DSGC法测定DANCE反应。

经硫酸铜胁迫4 d后,将剩余的胚芽移栽到土壤正常种植,每天浇灌自来水1次,共种植6 d。每天分别采集各组幼苗2~5株,分离叶、茎、根。各部分称取约250 mg,加入500 μL 生理盐水进行碾磨,碾磨液以DSGC法测定DANCE反应。

3.2 DSGC法测定DANCE反应

以蒸馏水配制蔗糖溶液,浓度分别为30%、40%、50%、60%、70%和80% (*m/V*)。按浓度由高到低顺序,依次将不同浓度蔗糖溶液沿管壁加入 $\varnothing 1 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ 的离心管中,每一浓度层560 μL 。将200 μL 样品碾磨液小心沿管壁加样到蔗糖浓度梯度的顶层,在室温下以水平转子离心机离心,490 $\times g$, 5 min。目测各样品条带并与对照组比较:若某条带消失或减少75%以上,或比对照组条带增加2倍量或出现新的条带,则判断为发生DANCE反应。

4 SOD活性和MDA含量测定

4.1 植物样品处理

量取0.2 mol·L⁻¹磷酸氢二钠228.75 mL、0.2 mol·L⁻¹磷酸二氢钠21.25 mL,加37.2 mg EDTA- Na_2 ,配制成50 mmol·L⁻¹ pH7.8磷酸缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)。称取0.5 g绿豆芽,加3 mL PBS在冰浴研钵中碾磨5 min。将碾磨液转移至小烧杯,以2 mL PBS冲洗研钵,冲洗液一并转移至小烧杯,然后将碾磨液用细胞超声波破碎仪进行破碎,200 W, 5 min (每超声5 s间隔5 s,温度为0 $^{\circ}\text{C}$)。超声波破碎液用低温高速离心机进行离心(13 000 $\times g$, 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$),弃沉淀,上清液(样品提取液)用于SOD活性(Beauchamp和Fridovich 1971)和MDA含量测定。

4.2 SOD活性检测

取10 mL离心管16支,其中12支作为样品组(每一样品3个重复,共4组),4支作为对照组(暗对照、光对照各2个重复)。以PBS配制反应混合液,使每管含甲硫氨酸13 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NBT 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、核黄素2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。样品组每管含样品提取液0.05 mL,各管终体积为5.0 mL。

将各反应混合液摇匀, 暗对照组置于暗处(加入核黄素后立刻用双层黑色布遮光), 光对照组和样品组置于 $72 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 日光灯下反应30 min, 反应温度控制在 $25\sim 35^\circ\text{C}$ 之间。反应结束后, 用黑色布遮盖各组终止反应, 以暗对照组作为空白, 在560 nm测定吸光度值。SOD活性单位采用抑制NBT光化还原50%为一个活性单位(Kumar等2012; 王爱国等1983; Sairam等2011), 活性检测重复3次, 取均值。

4.3 MDA含量测定

参照上海恒远生物科技有限公司ELISA操作说明书配制标准品, 分设空白孔、标准孔、待测样品孔。待测样品孔中每孔加样品提取液 $10 \mu\text{L}$ (设2个复孔), 封板后置于 37°C 温育30 min。温育结束后用洗涤液清洗5次, 然后每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 酶标试剂温育、洗涤(同上)。洗涤结束后加入显色液 37°C 避光显色15 min, 最后加入终止液终止反应。在450 nm波长下检测各孔的吸光度(OD值), 根据标准孔所得标准曲线计算样品提取液MDA含量, 重复3次, 取均值。

5 细胞形态观察及绿豆苗生长率测定

在硫酸铜胁迫期间, 每天每组采集约250 mg绿豆胚芽, 连续4 d, 拍照并比较各组发芽情况。按前述方法将胚芽制备成碾磨液并测定其DANCE反应。分别吸出各DSGC条带并转移到EP管中, $1300\times\text{g}$ 离心5 min, 弃上清, 加入1 mL PBS, 离心洗涤3次; 再加入中性红染色液(活细胞专用) $200 \mu\text{L}$ 染色30 min, 离心, 弃染液, 加入1 mL PBS, 离心洗涤1次; 最后加入 $200 \mu\text{L}$ PBS并混匀, 在显微镜下观察各条带细胞形态并拍照(王珂等2007)。

经硫酸铜胁迫4 d, 胚芽称重后移栽土壤, 每天浇水1次, 观察幼苗生长状态并拍照。土种6 d后结束实验, 称重各组绿豆苗, 按下式计算生长率: (绿豆苗湿重-胚芽湿重)/胚芽湿重 $\times 100\%$ 。

6 实时定量PCR分析

实验发现, 硫酸铜胁迫第3日绿豆芽的DANCE反应比较显著, 因此, 选择硫酸铜胁迫绿豆芽3 d, 以实时定量PCR (real-time quantitative PCR, qPCR)分析SOD基因mRNA相对表达水平(Nair和Chung 2014; Borges等2011; Sairam等2011)。

6.1 总RNA提取和cDNA合成

取绿豆芽根部100 mg, 加入1 mL TRIzol试剂,

按说明书提取总RNA。采用DNase1 RNase-free试剂盒纯化RNA, 以分光光度计检测RNA纯度和浓度($1.8 < A_{260/280} < 2.0$)。按照Biotool使用说明书, 取 $1 \mu\text{g}$ 样品RNA合成cDNA。

6.2 qPCR反应

绿豆芽SOD三个同工酶和内参基因的qPCR引物通过生工(Sangon Biotech)设计和合成, 碱基序列如下: Mn-SOD (正向: 5'-CCAGAAAACCC-TAGCATCG-3'; 反向: 5'-AGTCCAGATCAGGT-AGCGTGT-3') (GenBank: XM_014634528.1)、Fe-SOD (正向: 5'-GAGGGTCCAAAAGTCAATGC-3'; 反向: 5'-CATAAGTCCTGTGGTGCTTCC-3') (GenBank: XM_014656720.1)、Cu-Zn-SOD (正向: 5'-ACTGGCACTCTTGCTGGTCT-3'; 反向: 5'-GG-CACCATGCTCCTTGTTAT-3') (GenBank: HQ259253.1)、 β -actin (正向: 5'-CCTGGCATCCACGAGACAAC-3'; 反向: 5'-ATCAGCAATG-CCTGGGAACA-3') (GenBank: NM_001317309.1)。qPCR反应体系: $1 \mu\text{L}$ cDNA、 $1 \mu\text{L}$ 引物、 $10 \mu\text{L}$ $2\times\text{SYBR Green qPCR Master Mix}$, 总体积为 $20 \mu\text{L}$ 。反应在荧光定量PCR仪(Bio-Rad)中进行。反应程序: 预变性 95°C 10 min; 变性 95°C 15 s, 退火/延伸 60°C 60 s, 共40循环; 溶解曲线采用 95°C 15 s, 60°C 60 s, 95°C 15 s, 每分钟升高 0.5°C 。每样品设2个复孔。实验重复3次, 取均值。

7 统计学处理

数据处理使用SPSS统计软件, 以平均数 \pm 标准差表示。采用单因素方差(one-way ANOVA)分析各组数据间差异显著性, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

实验结果

1 硫酸铜胁迫对绿豆发芽的影响

水培条件下, 硫酸铜胁迫对绿豆发芽的影响随着胁迫时间和硫酸铜浓度增加而加重。硫酸铜胁迫48 h对胚芽的影响不明显, 但胁迫72 h以后, 高浓度组(400 和 $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)胚芽的根和茎较正常对照组显著短小; 胁迫96 h后, 高浓度组茎的生长基本停滞, 但对根须生长的表现影响较小(图1)。

2 萌发期硫酸铜胁迫对土种绿豆苗生长的影响

萌发期经硫酸铜胁迫4 d后再移栽土壤正常种植, 可见高浓度胁迫组幼苗的早期生长较对照组

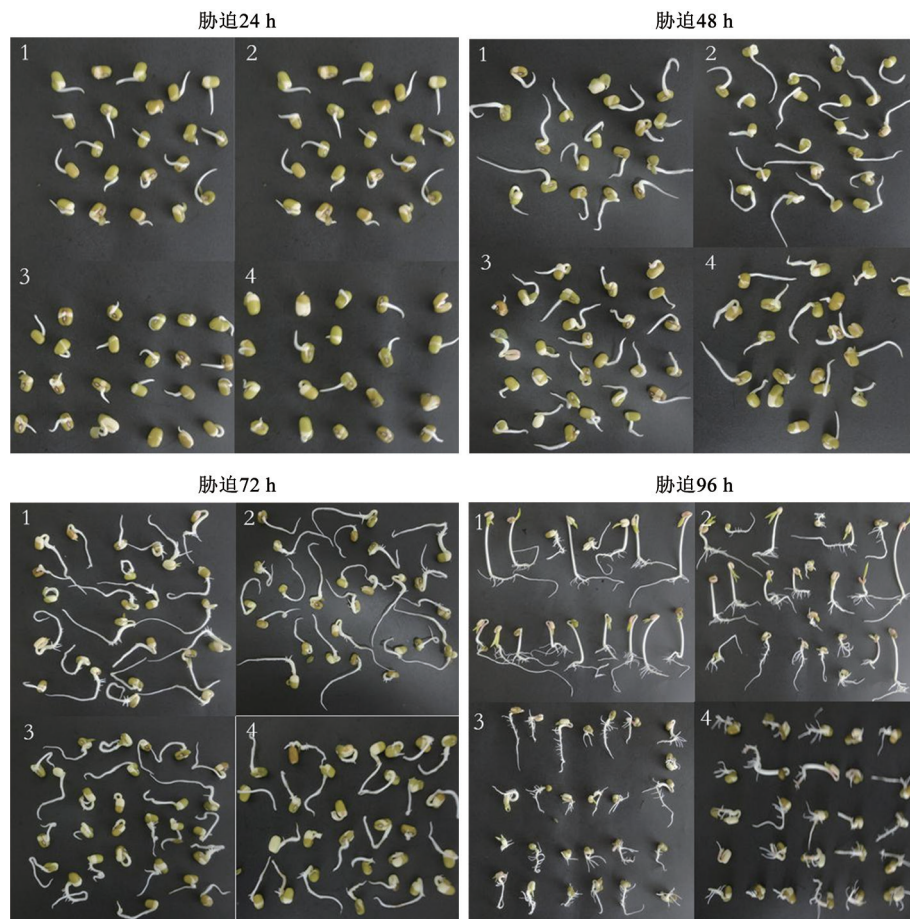


图1 水培养条件下不同浓度硫酸铜胁迫后绿豆发芽情况

Fig.1 Mung bean sprouts cultured in water under stress of copper sulphate at different concentrations

1: 对照组; 2: $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸铜; 3: $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸铜; 4: $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸铜。图2和3同。

慢。土培1 d后, 茎部仍然较短, 叶未完全打开; 土种2 d后 $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组可见叶的发育慢于其它组; 但是, 土种3~6 d后, 各胁迫组与对照组相比, 表观生长情况基本无显著性差别, 提示萌发期硫酸铜胁迫对移栽土壤幼苗的后期生长表观影响基本消除(图2)。

萌发期硫酸铜胁迫后移栽土壤种植的绿豆苗, 其生长率亦有不同的表现。对照组经土种6 d后生长率为16.81%, 而萌发期经硫酸铜(浓度分别为 50 、 400 和 $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)胁迫, 移植土壤6 d后生长率分别为80.51%、121.21%和161.71%。因此, 萌发期经硫酸铜胁迫的绿豆芽在土壤的生长率较高, 且硫酸铜胁迫浓度越高, 土种幼苗生长率越高, 呈显著性剂量依赖关系(表1)。结果表明, 萌发期硫酸铜胁迫导致绿豆发芽减慢, 但土种后绿豆苗的生长出现代偿性加快。

3 硫酸铜胁迫与绿豆的DANCE反应

DSGC梯度离心结果显示, 对照组(无胁迫)绿豆在水培1~2 d后出现S30~S80共6条细胞带, 随着水培时间增加而改变: S80在水培3 d (72 h)后消失, S70在4 d (96 h)后消失(图3, 各组第1管), 提示胚芽的正常生长发育导致DSGC条带上移。低浓度($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)硫酸铜胁迫组(图3, 各组第2管)与对照组的表观基本一致, 在各时间点均未见DANCE反应, 提示该浓度硫酸铜胁迫对发芽期绿豆不能引起明显的DANCE反应, 与图1的表观生长状态一致。高浓度(400 和 $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)硫酸铜胁迫1~2 d未发现DANCE反应, 但是, 高浓度硫酸铜胁迫3 d (72 h)后, 胚芽较对照组多出S80条带; 4 d (96 h)后, $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组较对照组多出S70条带, 而 $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组则多出S70和S80二条带(图3, 各组第3、4管); 提示高浓度硫酸铜胁迫3 d后导致绿豆芽的DANCE

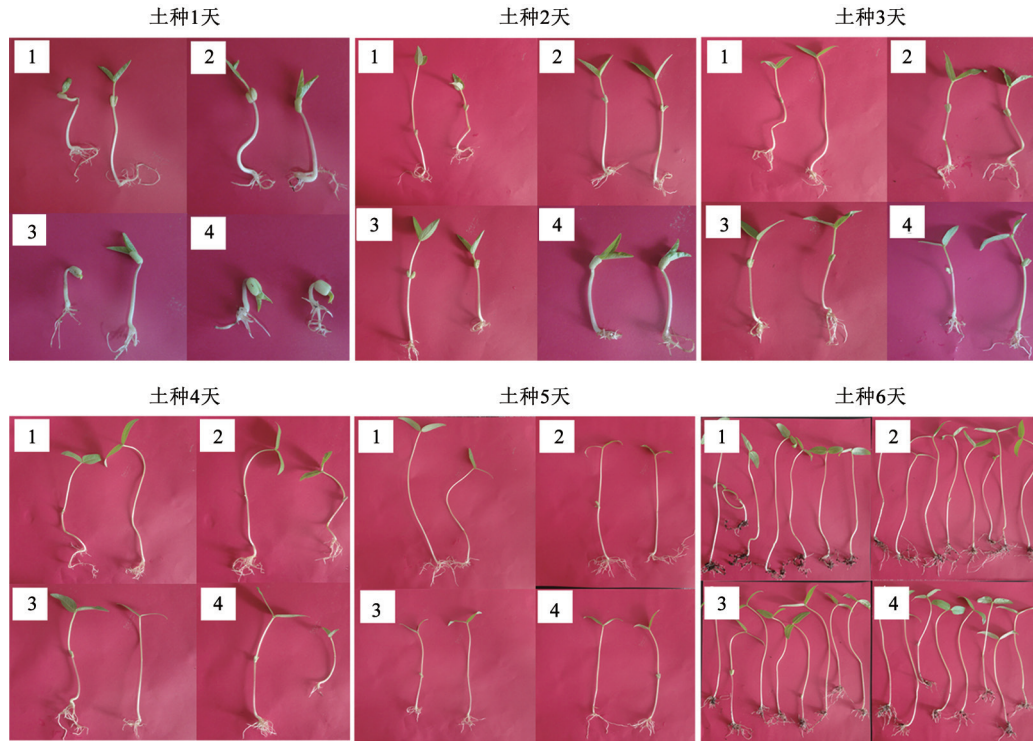


图2 水培条件下不同浓度硫酸铜胁迫96 h后移栽土壤绿豆苗的生长状态

Fig.2 Mung bean seedlings transplanted to soil after water culture for 96 h under stress of copper sulphate at different concentrations

表1 萌芽期硫酸铜胁迫对绿豆土培后生长率的影响

Table 1 Effect of copper sulphate stress during germination on the growth rate of mung bean seedlings after transplant to soil

硫酸铜浓度/mg·L ⁻¹	0 (对照)	50	400	1 000
平均土培前湿重/g	0.357±0.008	0.236±0.027*	0.198±0.001**	0.175±0.003**
平均土培后湿重/g	0.417±0.008	0.426±0.006	0.438±0.010	0.458±0.005**
平均生长率/%	16.81	80.51**	121.21**	161.71**

*: 与对照组相比有显著差异($P<0.05$); **: 与对照组相比有极显著差异($P<0.01$)。图6和7同。

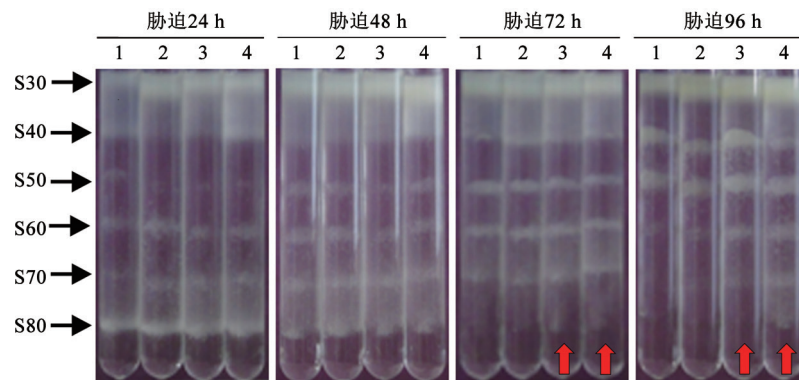


图3 水培条件下不同浓度硫酸铜胁迫后绿豆芽的DANCE反应

Fig.3 DANCE response determined in mung bean sprouts after water culture under stress of copper sulphate at different concentrations

红色箭头表示DANCE反应(与对照组相比出现新的条带)。

反应(图3, 红色箭头所示)。

水培条件下硫酸铜胁迫4 d后再移植土种的绿豆苗, 其叶茎根各部分DANCE反应具有时空特点。土种1 d后各胁迫组均有DANCE反应, 表现为茎部(stem, S)多出S70和根部(root, R)多出S50条带; 而高浓度组(400和1 000 mg·L⁻¹)叶部(leaf, L)的S40和S50二条带则明显减少或缺失, 提示叶部发育滞后。土种2 d后各胁迫组的茎部较对照组多出S50条带, 而1 000 mg·L⁻¹浓度组茎部还多出S60和S70二条带。土种3 d后, 低浓度组恢复正常(无DANCE反应), 而高浓度组茎部仍然较对照组多出S50和S60二条带, 提示茎部发育处于较早期状态。土种

4~5 d后, 高浓度组叶部较对照组明显多出S50条带。土种6 d后, 各胁迫组均未检出DANCE反应, 提示细胞已恢复正常的生长状态(图4)。上述结果显示, 萌发期硫酸铜胁迫可致绿豆移植土壤后发生DANCE反应, 以土种1 d后最明显。其中, 根部DANCE反应1 d后恢复正常, 茎部反应持续3 d, 而叶部DANCE反应时间最长, 持续到土种第5日。

4 硫酸铜胁迫对绿豆芽细胞形态的影响

萌发期高浓度硫酸铜(1 000 mg·L⁻¹)胁迫4 d后, 绿豆芽研磨液经DSGC离心可见S30~S80六条带(图3, 第4管), 较对照组(图3, 第1管)多出S70和S80二条带。各细胞条带经洗涤和活细胞染色后, 镜

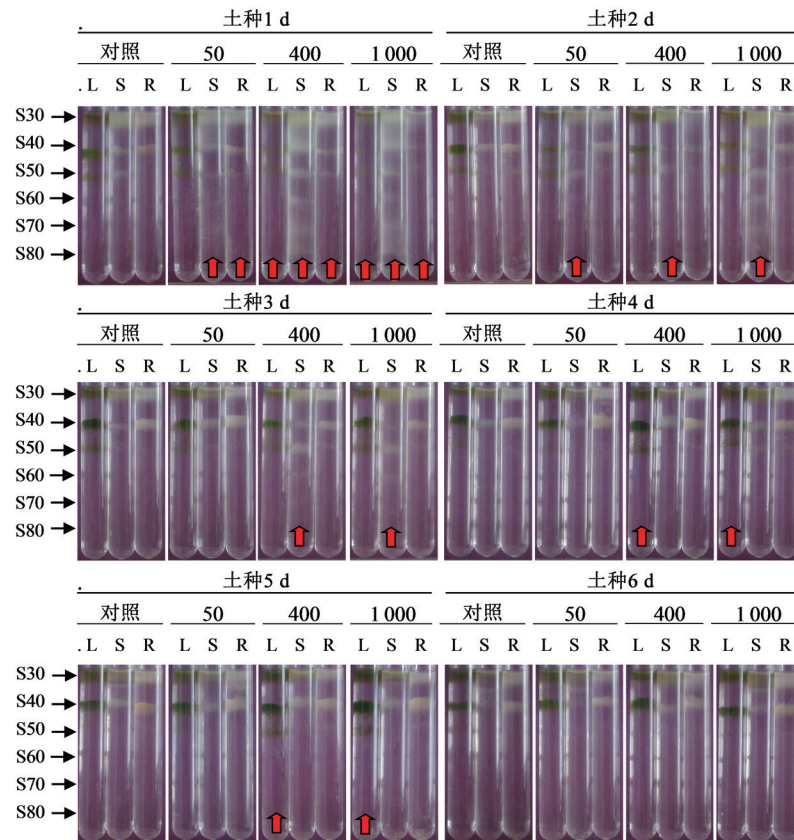


图4 水培条件下不同浓度硫酸铜胁迫96 h后移栽土壤绿豆苗的DANCE反应

Fig.4 DANCE response determined in mung bean seedlings transplanted to soil after water culture for 96 h under stress of copper sulphate at different concentrations

L: 叶; S: 茎; R: 根。红色箭头表示DANCE反应(与对照组相比缺失或出现新的条带)。

下可见不同密度的植物细胞(图5)。对照组S60和胁迫组S30的细胞数较少, 但对照组和胁迫组各条带细胞形态无显著性差异, 提示萌发期高浓度硫酸铜胁迫对胚芽细胞的形态影响较小。

5 硫酸铜胁迫对绿豆芽SOD活性和MDA含量的影响

水培条件下硫酸铜胁迫对绿豆芽SOD活性和MDA含量均有刺激作用。各胁迫组胚芽的SOD活性和MDA含量显著增高, 提示胚芽的氧自由基增

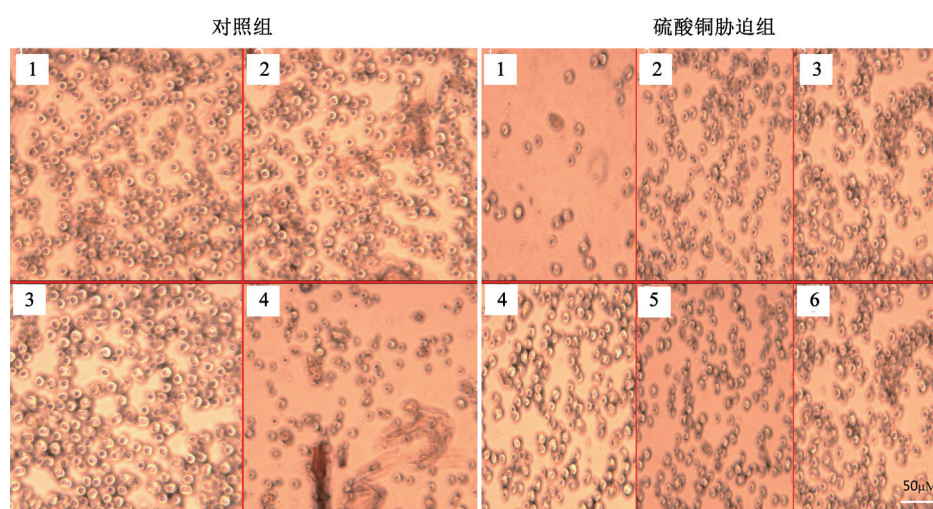


图5 水培条件下 $1\ 000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸铜胁迫96 h后绿豆芽匀浆各DSGC条带细胞染色

Fig.5 Stained cells of DSGC bands from mung bean sprout homogenates after water culture for 96 h under stress of copper sulphate at $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

1~6: 分别为S30~S80条带。

加。胚芽的SOD活性在胁迫24 h后最高, 但与硫酸铜胁迫浓度无显著的剂量依赖关系。但是, 胚芽MDA含量则与硫酸铜胁迫浓度有关, 在同一胁迫时间内, 硫酸铜胁迫浓度增加MDA含量随之增高, 表现出明显的剂量依赖关系(图6)。

6 硫酸铜胁迫对绿豆芽SOD基因mRNA表达的影响

由于重金属对植物细胞的毒性作用导致SOD活性增高, 因此, 本研究测定了硫酸铜胁迫3 d后绿豆芽SOD三个同工酶的mRNA相对表达水平, 包括Mn-SOD、Fe-SOD和Cu-Zn-SOD的mRNA。结果

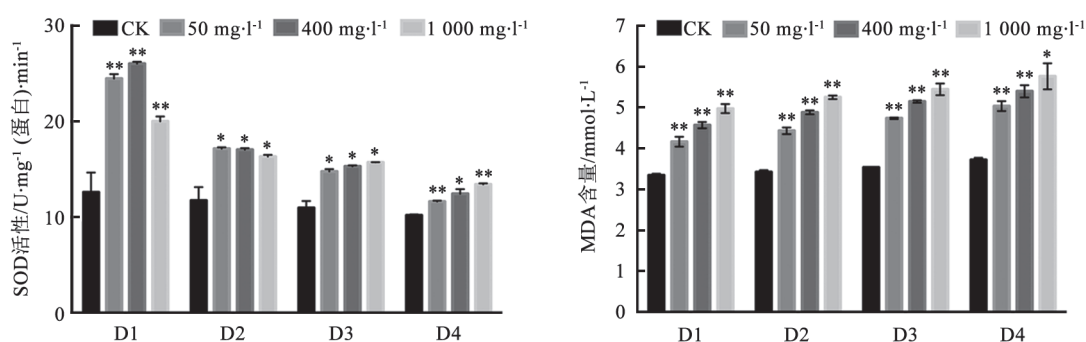


图6 水培条件下硫酸铜胁迫不同时间对绿豆芽SOD活性和MDA含量的影响

Fig.6 Effect of copper sulphate stress on the activity of SOD and content of MDA in mung bean sprouts after water culture under copper sulphate stress for different time intervals

CK: 对照组(无硫酸铜胁迫); D1: 胁迫时间24 h; D2: 胁迫时间48 h; D3: 胁迫时间72 h; D4: 胁迫时间96 h。

显示, Mn-SOD的mRNA水平在硫酸铜胁迫3 d后无显著性改变, 而Fe-SOD和Cu-Zn-SOD二种SOD同工酶的mRNA表达显著增高, 其中Cu-Zn-SOD的mRNA表达水平增加幅度最大, 提示硫酸铜胁迫主要引起胚芽中Fe-SOD和Cu-Zn-SOD二种SOD同工酶表达增加(图7)。

讨 论

重金属铜是动植物体内重要的微量元素, 为农作物和禽畜正常生长所必需。然而, 高浓度铜离子对植物产生毒害作用, 当铜离子浓度达到 $2\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 植株出现萎蔫甚至死亡。因此, 我们选

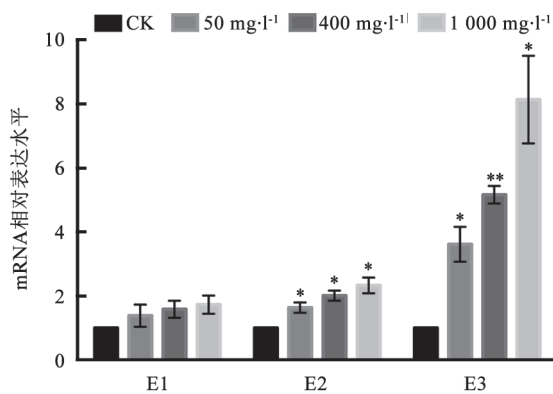


图7 水培条件下不同浓度硫酸铜胁迫3 d后绿豆芽3种SOD同工酶mRNA相对表达水平

Fig.7 Relative mRNA levels of the three SOD isoenzymes in mung bean sprouts cultured in water for 3 d under stress of copper sulphate at different concentrations

CK:对照组(无硫酸铜胁迫); E1: Mn-SOD; E2: Fe-SOD; E3: Cu-Zn-SOD.

用硫酸铜作为绿豆发芽期的胁迫药物,研究硫酸铜胁迫对其发芽和生长的影响以及DANCE反应,对于进一步研究绿豆的培育和种植技术将具有重要的农业科学意义。

我们发现,水培条件下硫酸铜胁迫对绿豆发芽具有显著的抑制作用,尤其是茎和根生长显著减慢。但是,在胚芽转移到土壤正常种植后,解除胁迫的幼苗生长呈代偿性加速,其生长率高于对照组。因此我们推测,植物发芽期适当的环境胁迫可能有利于淘汰质差的种子和提高幼苗生长率。

从绿豆芽及其幼苗的DANCE反应情况看,DANCE反应主要是由于胚芽生长减慢所致。在正常情况下,绿豆发芽初期出现细胞内密度较高的条带(S70和S80),提示细胞的生物大分子合成旺盛,处于发育分裂期的细胞较多。随着胚芽和幼苗的生长,较高密度的条带逐渐消失(S60~S80),呈现细胞条带上移现象,说明从胚芽到幼苗的生长过程中细胞分化增加,分化后细胞内物质密度减小。相比之下,发芽期因硫酸铜胁迫导致芽胚细胞分裂和分化过程减慢,更多细胞仍停留在早期发育阶段,因而出现较高细胞内密度的DSGC条带延迟消失。

硫酸铜胁迫导致绿豆DANCE反应具有时空特点。发芽期硫酸铜胁迫主要造成S70和S80条带

延迟消失,可能是由于茎根生长减慢所致。当胚芽移植土壤1 d后,高浓度硫酸铜胁迫组叶部条带很弱或不显现,提示叶部的发育生长滞后。茎部的高密度条带(S60~S80)在土种1 d后明显较多,可能是茎部生长代偿性加快的结果,提示土种1~3 d可能是茎部代偿性加快生长期。高浓度硫酸铜胁迫组幼苗叶部在土种第2日开始出现S40和S50,且持续到土种第5日,较对照组多出S50,提示叶部代偿性快速生长期可能在土种第2~5日。从硫酸铜胁迫引起绿豆不同部位和不同时期DANCE反应来看,根部的代偿性加快生长最早、持续时间最短(1 d),茎部次之(3 d),而叶部较迟,但持续时间最长(4 d)。有趣的是,在发芽期硫酸铜胁迫后,幼苗经土种3 d其表现生长状态与对照组无显著差别,但是,在土种第3~5日幼苗仍然可检测出DANCE反应,这种现象说明,植物表现“正常”之下仍然存在细胞反应。因此,测定植物细胞的这种DANCE变化是否可用于研究植物对环境因素或药物反应值得进一步研究。

细胞的DANCE反应是细胞内物质密度改变所致。导致细胞内物质密度改变的直接原因是细胞内物质代谢或细胞膜功能变化,前者可引起细胞内物质组成成分或含量变化,后者可能造成细胞内外物质交换的改变,两者均可能造成细胞内物质密度改变。不仅细胞的生长、分化、发育、衰老可能引起胞内物质密度改变,物理、化学、药物、毒物、微生物等环境因素和疾病也可能造成细胞内密度改变;后一类情况属于非生理性或病理性改变,称为DANCE反应。理论上,上述的所有因素造成的细胞内物质密度变化均可定性或定量检测,因而测定细胞内物质密度变化或DANCE反应可能应用于研究细胞的很多生理性和非生理性(包括病理性)改变。我们的研究发现,硫酸铜胁迫抑制绿豆发芽和引起土种后幼苗代偿性生长,同时导致绿豆不同部分在不同时间DANCE反应,具有明显的时空特征,可能为研究植物不同部位和不同时间对致病因素的反应机制提供一种新的实验手段。

环境因素对植物的影响是可导致植物细胞的SOD活性和MDA含量改变(王建华等1989; Lee等1982; 蒋明义等1990)。SOD的主要作用是清除植

物体内氧自由基,对细胞具有保护作用,而MDA则由氧自由基的氧化作用产生,反映细胞受到有害物质的影响。我们发现,绿豆芽在硫酸铜胁迫下MDA含量显著增高,说明细胞可能因硫酸铜胁迫而致氧自由基增加,继而引起SOD基因高表达,细胞内SOD含量增高,加快清除过氧化物以保护细胞免受损伤(Malecka等2001),但是,硫酸铜胁迫引起的氧自由基增加是否与绿豆细胞的DANCE反应有关尚有待进一步研究。因此,硫酸铜胁迫可能激发豆芽细胞的自身防护系统,增强植物对有害环境因素的抵抗能力,并通过减慢细胞分裂和生长而保存能量。从另一角度看,适当的环境胁迫可能是增强植物生命力的一种有效途径。

参考文献

- Ashraf R, Ali TA (2007). Effect of heavy metals on soil microbial community and mung beans seed germination. *Pak J Bot*, 39 (2): 629–636
- Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 44 (1): 276–287
- Borges A, Tsai SM, Caldas DGG (2011). Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Rep*, 31 (5): 827–838
- Gong SJ, Ma TW, Jiang YF, Chen J, Liu YD, Li J (2008). Antioxidant enzyme activities induced by cadmium stress in three species of mosses. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 28 (9): 1765–1771 (in Chinese with English abstract) [龚双姣, 马陶武, 姜业芳, 陈军, 刘应迪, 李菁(2008). 镉胁迫下3种藓类植物抗氧化酶活性变化的比较研究. *西北植物学报*, 28 (9): 1765–1771]
- Guo T, Liu F, Liu Y, Chen NK, Guan BO, Albert J (2014). *In-situ* detection of density alteration in non-physiological cells with polarimetric tilted fiber grating sensors. *Biosens Bioelectron*, 55 (15): 452–458
- He J, Li H, Luo J, Ma C, Li S, Qu L, Gai Y, Jiang X, Janz D, Polle A, et al (2013). A transcriptomic network underlies microstructural and physiological responses to cadmium in *Populus × canescens*. *Plant Physiol*, 162 (1): 424–439
- He J, Qin J, Long L, Ma Y, Li H, Li K, Jiang X, Liu T, Polle A, Liang Z, et al (2011). Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus × canescens*. *Physiol Plantarum*, 143 (1): 50–63
- Hussain I, Akhtar S, Ashraf MA, Rasheed R, Siddiqi EH, Ibrahim M (2013). Response of maize seedlings to cadmium application after different time intervals. *Int Sch Res Not*, (1): 1–9
- Jiang MY, Jing JH, Wang ST (1991). Effect of osmotic stress on membrane-lipid peroxidation and endogenous protective systems in rice seedlings. *Acta Phytophysiol Sin*, 17 (1): 80–84 (in Chinese with English abstract) [蒋明义, 荆家海, 王韶唐(1991). 渗透胁迫对水稻幼苗膜脂过氧化及体内保护酶系统的影响. *植物生理学报*, 17 (1): 80–84]
- Kumar A, Prasad MNV, Sytar O (2012). Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. *Chemosphere*, 89 (9): 1056–1065
- Lee EH, Bennett JH (1982). Superoxide dismutase: a possible protective enzyme against ozone injury in snap beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol*, 69 (6): 1444–1449
- Liu M, Shi QQ, Fu H, Wei JG, Li JX, Zhong M, Liu Y. (2016). Alteration of intracellular density is a pathological response in adrenaline-induced acute pulmonary edema in mice. *Chin J Pathophysiol*, 32 (5): 769–780
- Liu Y, Wei JG, Wu BB, Lan FF, Zhu YC, Wang M, Li HC, Li LN, Li JX, Fei J (2011). Density alteration in non-physiological cells. *Chem Phys Lett*, 47(3):533–536
- Liu YH, Yu L, Lin FL (2007). Difference of effects on seed germination and initial growth of mung bean under different heavy metal stress. *Seed*, 26 (11): 41–44 (in Chinese with English abstract) [刘拥海, 俞乐, 林馥丽(2007). 不同重金属胁迫对绿豆种子萌发和幼苗初期生长影响的差异. *种子*, 26 (11): 41–44]
- MacFarlane GR (2003). Chlorophyll *a* fluorescence as a potential biomarker of zinc stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Bull Environ Contam Toxicol*, 70 (1): 90–96
- Malecka A, Jarmuszkiewicz W, Tomaszewska B (2001). Antioxidant defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochim Pol*, 48 (3): 687–698
- Mohanapriya S, Senthilkumar P, Sivakumar S, Dineshkumar M, Subbhuraam CV (2006). Effects of copper sulfate and copper nitrate in aquatic medium on the restoration potential and accumulation of copper in stem cuttings of the terrestrial medicinal plant, *Portulaca oleracea* Linn. *Environ Monit Ass*, 121 (1–3): 233–244
- Nair PMG, Chung IM (2014). Physiological and molecular level studies on the toxicity of silver nanoparticles in germinating seedlings of mung bean (*Vigna radiata* L.). *Acta Physiol Plant*, 37 (1): 1–11
- Pál M, Horváth E, Janda T, Páldi E, Szalai G (2006). Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *J Plant Nutr Soil Sci*, 169 (2): 239–246
- Patel A, Pandey V, Patra DD (2015). Influence of tannery sludge on oil yield, metal uptake and antioxidant activities of *Ocimum basilicum* L. grown in two different soils. *Ecol Eng*, 83 (10): 422–430
- Pradhan S, Patra P, Mitra S, Dey KK, Basu S, Chandra S, Palit P, Goswami A (2015). Copper nanoparticle (CuNP) nanochain arrays with a reduced toxicity response: a biophysical and biochemical outlook on *Vigna radiata*. *J Agric Food Chem*, 63 (10): 2606–2617
- Sairam RK, Dharmar K, Lekshmy S, Chinnusamy V (2011). Expression of antioxidant defense genes in mung bean (*Vigna radiata* L.) roots under water-logging is associated with hypoxia tolerance. *Acta Physiol Plant*, 33 (3): 735–744
- Sharaff M, Archana G (2015). Assessment of microbial communities in mung bean (*Vigna radiata* L.) rhizosphere upon exposure to phytotoxic levels of copper. *J Bas Microbiol*, 55 (11): 1299–1307

- Wahid A, Khaliq S (2015). Architectural and biochemical changes in embryonic tissues of maize under cadmium toxicity. *Plant Biol*, 17 (5): 1005–1012
- Wang AG, Luo GH, Shao CB, Wu SJ, Guo JY (1983). A study on the superoxide dismutase of soybean seeds. *Acta Phytophysiol Sin*, 9 (1): 77–84 (in Chinese with English abstract) [王爱国, 罗广华, 邵从本, 吴淑君, 郭俊彦(1983). 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. *植物生理学报*, 9 (1): 77–84]
- Wang JH, Liu HX, Xu T (1989). The Role of superoxide dismutase (SOD) in stress physiology and senescence physiology of plant. *Plant Physiol Commun*, (1): 1–7 (in Chinese) [王建华, 刘鸿先, 徐同(1989). 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用. *植物生理学通讯*, (1): 1–7]
- Wang K, Liang W, Wang J (2007). Voability detection of *Microcystis aeruginosa* by staining methods. *Environ Sci Technol*, 30 (10): 20–22 (in Chinese with English abstract) [王珂, 梁文艳, 王金丽(2007). 铜绿微囊藻中性红染色研究. *环境科学与技术*, 30 (10): 20–22]
- Xiong ZT, Wang H (2005). Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage. (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Environ Tox*, 20 (2): 188–194
- Xu L, Wei PP, Zhang DY, Xu ZL, He XL, Huang YH, Ma HX, Shao HB. (2015). Expression and function analysis of the transcription factor *GmMYB111* in soybean. *Sci Agric Sin*, 48 (15): 3079–3089 (in Chinese with English abstract) [许玲, 卫培培, 张大勇, 徐照龙, 何晓兰, 黄益洪, 马鸿翔, 邵宏波(2015). 大豆转录因子基因*GmMYB111*的克隆及功能分析. *中国农业科学*, 48 (15): 3079–3089]
- Zhu X, Liu M, Li J, Shi Q, Liu Y (2015). DANCE in tumor-bearing mouse liver cells and the mechanism. *Highlights Sci Pap Online*, 8 (7): 699–706 (in Chinese with English abstract) [朱晓杨, 刘敏, 李菊香, 石琴琴, 刘誉(2015). S180荷瘤小鼠肝脏细胞的DANCE反应及其机制. *中国科技论文在线精品论文*, 8 (7): 699–706]

Effect of copper sulphate stress during germination on the growth of mung bean and the intracellular density change response

FU Han¹, SHI Qin-Qin¹, ZHONG Ming², LIU Yu^{1,*}

¹Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China; ²Dawnlight Biotech Company, Guangzhou 510530, China

Abstract: Mung beans were cultured in water for germination under stress of copper sulphate and then transplanted to soil, in order to study the effects of copper sulphate stress during germination on the growth of mung beans in soil and the intracellular density change (DANCE response). Mung bean germination in water and the seedling growth in soil were observed, and growth rates of the seedlings were calculated. Mung bean sprouts and seedlings were determined for DANCE response, and the sprouts were determined for the levels of superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) contents. The results show that copper sulphate stress inhibited mung bean germination, significantly in day 3 and 4, with DANCE response in the cells. After transplantation to soil, all seedlings of the stressed groups showed compensatory growth, and the growth rates increased with the concentration of copper sulphate. In day 3 after transplantation to soil, the seedlings of all stressed groups apparently recovered normal growth. Seedlings of all stressed groups showed DANCE response in roots, stems and leaves in day 1 after transplantation, which lasted for 1 day in roots, 3 days in stems, and 5 days in leaves. However, in day 6 all seedlings showed no DANCE response. SOD activity and MDA content significantly increased in the sprouts after copper sulphate stress, with elevated levels of SOD mRNAs, indicating increased production of free radicals. The present study suggests that DANCE response in the mung beans might be a result of delayed germination in water and compensatory growth after transplantation; appropriate stress during germination might promote the growth of plantseedlings.

Key words: mung bean; copper sulphate; stress; DANCE

Received 2016-08-01 Accepted 2016-11-24

This work was supported by the Science Foundation of the Ministry of Science and Technology of China (Grant No. 12C26214405312).

*Corresponding author (E-mail: xyuliu05@126.com).