

水杨酸浸种对镉诱导两种豆科植物根活性氧产生的缓解及其机理

张喜峰¹, 张红晓², 关天霞¹, 曾秀存¹, 张芬琴^{1,*}

¹河西学院农业与生物技术学院, 甘肃张掖734000; ²河南科技大学农学院, 河南洛阳471003

摘要: 研究了水杨酸(SA)浸种对镉(Cd)耐性不同的两种豆科植物——绿豆和箭舌豌豆种子萌发及其幼苗生长的影响, 以及Cd胁迫下SA浸种对两种豆科植物幼苗根内活性氧产生的缓解效应及其机理。结果表明: (1)与各自的对照相比, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对两种豆科植物种子发芽率无明显影响, 但使绿豆和箭舌豌豆幼苗根长分别增加了54.63%和32.94%; 当SA浓度达1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 绿豆和箭舌豌豆种子的发芽率分别下降了5.33%和3.33%, 根长分别下降了16.64%和27.76%; (2) 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理明显增强了两种豆科植物根内过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子(O_2^-)的产生, 抑制了根的伸长; 而Cd处理前的100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种使 H_2O_2 和 O_2^- 产生显著降低, Cd抑制根伸长生长的作用明显减轻。同时, SA浸种也明显增强了Cd胁迫下两种豆科植物根内超氧化物歧化酶(SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性、降低了过氧化氢酶(CAT)的活性。结果说明: SA可缓解Cd诱导的活性氧产生, 这种缓解效应可能与其上调SOD和APX活性有关。

关键词: 水杨酸; 浸种; 缓解; 活性氧; 豆科植物

Alleviating Effect and Mechanism of Seed Soaking with Salicylic Acid on Reactive Oxygen Species Production Induced by Cadmium in the Roots of Two Legume Species

ZHANG Xi-Feng¹, ZHANG Hong-Xiao², GUAN Tian-Xia¹, ZENG Xiu-Cun¹, ZHANG Fen-Qin^{1,*}

¹College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye, Gansu 734000, China; ²College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China

Abstract: Our study was carried out to explore the effect of seed soaking with salicylic acid (SA) on the seed germination and seedling growth of two legume species with different cadmium (Cd) tolerance, viz. mung bean and common vetch. The alleviating effect of seed soaking with SA on the reactive oxygen species production induced by Cd in the roots of two legume species, and its mechanism was also investigated. Our results show that: (1) compared with its control, the seed germination of two legume species was not significantly affected by soaking with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA, but the root length of mung bean was significantly affected, increasing by 54.63% and of common vetch by 32.94%. The seed germination of mung bean and common vetch soaked with 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA decreased by 5.33% and 3.33%, respectively, and the root length of mung bean and common vetch decreased by 16.64% and 27.76%, respectively. (2) The production of hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion (O_2^-) in roots of mung bean and vetch were significantly increased by the 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd treatment, but roots elongation was inhibited. By seeds soaking with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA before Cd induction, the production of H_2O_2 and O_2^- decreased. In addition, after soaking with SA, the activities of superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) were increased but the activity of catalase (CAT) decreased, in roots of both species. These results indicate that SA could alleviate the reactive oxygen species production induced by Cd, and this alleviation is likely associated with up-regulation of SOD and APX activities by SA.

Key words: salicylic acid; seed soaking; alleviation; reactive oxygen species; legume species

镉(cadmium, Cd)是毒性较大的重金属, 具有较好的水溶性, 可被植物的根吸收和积累(Wang等2008)。进入植物体内的Cd通过诱导产生活性氧如 O_2^- 和 H_2O_2 导致植物遭受氧化胁迫(Garnier等2006), Cd也可通过食物链进入人体(Benitez等2010)。

随着Cd在电镀、冶金工业和军事等领域的日

益广泛应用以及含Cd化肥、农药和农膜等农资越来越多地投入农业生产, 大气、水体和土壤都受

收稿 2015-08-04 修订 2015-09-28

资助 国家自然科学基金(31160053)。

* 通讯作者(E-mail: fenqinzh@hxy.edu.cn; Tel: 0936-8280648)。

到了越来越严重的污染, 这些污染已经成为许多国家的环境和社会问题(Fairbrother等2007; Rogan等2009; Swaddiwudhipong等2010)。为此, Cd污染治理越来越受到人们的关注, 耐Cd植物筛选、植物Cd耐性机理以及提高植物Cd耐性机制研究也逐渐成为国内外的热点。

研究发现, 豆科植物中的一些种类在矿业废弃地植被恢复中具有一定的作用(张志权等2002)。箭舌豌豆(*Vicia sativa*)又名救荒野豌豆、大巢菜等, 是豆科野豌豆属一年生闭花授粉植物(董德珂等2015)。我们以前的研究发现, 在常见的10种人类食用或动物饲用豆科植物中, 绿豆‘Roxh.VC-3762’对Cd比较敏感, 箭舌豌豆‘西牧333/A’具有一定的Cd耐性(张芬琴2009), 并发现Cd胁迫使这两种植物遭受不同程度的氧化伤害(Zhang等2009, 2011)。另外, 他人研究证实, 小分子的酚类物质水杨酸(salicylic acid, SA)可以通过激活植物抗性相关代谢以缓解环境胁迫对植物造成的伤害(Dražić和Mihailovic 2005; 水德聚等2012; Parashar等2014; Belkadhi等2015)。为此, 本研究以Cd耐性不同的绿豆‘Roxh.VC-3762’和箭舌豌豆‘西牧333/A’两种豆科植物为材料, 研究SA浸种处理对Cd诱导这两种植物根活性氧产生的缓解效应及其机理, 旨在为提高植物Cd耐性和Cd污染治理提供有用的理论依据, 为SA的生理作用及其作用机理积累科学资料。

材料与方法

1 试验材料

供试材料为绿豆[*Vigna radiata* (Linn.) Wilczek.] Cd敏感品种‘Roxh.VC-3762’和箭舌豌豆(*Vicia sativa* L.) Cd耐性品种‘西牧333/A’(张芬琴等2009)。

2 试验设计

试验1: 分别挑选大小一致且饱满的绿豆和箭舌豌豆种子若干, 用0.1% (*m/V*)的HgCl₂进行5 min的表面消毒, 之后用去离子水充分冲洗; 洗后, 于25 °C下分别用0~1 000 μmol·L⁻¹共6个浓度的SA浸种16 h。此后, 将种子置于黑暗、25 °C的条件下发芽; 待其出芽后(以露白为准)计算发芽率。每处理设3次重复, 每重复含50粒种子。发芽6 d后, 测量幼苗的根长。发芽期间, 每天用各自的浸种液冲

洗种子以维持一定的处理浓度与湿度。

试验2: 分别挑选大小一致且饱满的种子若干, 用0.1% (*m/V*)的HgCl₂进行5 min的表面消毒, 之后用去离子水充分冲洗; 洗后, 于25 °C的温度用0和100 μmol·L⁻¹ SA浸种16 h。挑选发芽一致的种子播于装有石英砂的塑料网篮中, 网篮置于盛有营养液[组成为: 0.51 mmol·L⁻¹ NH₄NO₃、0.03 mmol·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄、0.097 mmol·L⁻¹ K₂HPO₄、0.088 mmol·L⁻¹ K₂SO₄、0.38 mmol·L⁻¹ KNO₃、1.30 mmol·L⁻¹ Ca(NO₃)₂、0.27 mmol·L⁻¹ Mg(NO₃)₂、6.6×10⁻³ mmol·L⁻¹ H₃BO₄、5.1×10⁻³ mmol·L⁻¹ MnCl₂、0.53×10⁻³ mmol·L⁻¹ ZnSO₄、0.25×10⁻³ mmol·L⁻¹ CuSO₄、0.11×10⁻³ mmol·L⁻¹ Na₂MoO₄和45×10⁻³ mmol·L⁻¹ Fe(II)-EDTA]的培养钵中培养。培养至地上部高约3 cm时, 选长势良好且一致的幼苗移栽到含1 L上述营养液的培养钵中继续培养至长约10 cm。之后, 用含有50 μmol·L⁻¹ CdCl₂的培养液培养6 d后采收, 测定有关指标。每处理设3个重复, 每重复中含有15株幼苗。在处理期间, 每日早晚为幼苗通气1次、每隔2 d更换1次营养液(用NaOH或HCl调pH为5.2~5.5)。

3 测定方法

采用常规法, 用学生直尺测主根长; 以发芽种子数/测试种子总数×100%计算发芽率; SOD活性测定参照Giannopolitis和Ries (1977)之法, SOD活性电泳采用PAGE方法, 活性显色采用Beauchamp和Fridovich (1971)之法; APX活性测定参照Nakano和Asada (1981)之法, APX活性电泳采用PAGE方法, 参照Rao等(1996)之法显色; CAT活性测定参照Rao等(1996)之法, CAT活性电泳采用PAGE方法, 参照Klotz和Hutcheson (1992)之法; O₂⁻产生速率的测定参照王爱国和罗广华(1990)之法; H₂O₂含量测定参照Jiang和Zhang等(2001)之法。

4 数据处理

原始数据采用Excel数据分析制图, 统计分析采用DPS软件进行差异显著性分析。

实验结果

1 不同浓度SA浸种对两种豆科植物种子萌发及其幼苗根伸长生长的影响

由表1可见, 在SA浸种浓度为0~1 000 μmol·L⁻¹

范围内, 较低浓度的SA浸种不影响两种植物种子的发芽率, 较高浓度的SA浸种使其发芽率降低, 但在两种植物之间存在一定的差异。

当SA浸种浓度达 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 绿豆种子的发芽率显著降低($P<0.05$), 箭舌豌豆种子发芽率与其对照相比无显著差异($P>0.05$)。与SA浸种影响两种植物种子萌发情况相似, 较低浓度SA浸种促进了其幼苗根的伸长生长, 较高浓度的SA浸种对其伸长生长则有抑制作用。由表1可见, 在 $50\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内, 随着SA浸种浓度的增大, 两种植物幼苗根的伸长生长呈上升趋势。当浓度达 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 绿豆和箭舌豌豆幼苗的根长分别增加了54.63%和32.94%, 差异显著($P<0.05$); 当等于或大于 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 两种植物幼苗根的伸长生长呈下降趋势; 当浓度达 $1\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 绿豆和箭舌豌豆幼苗的根长分别下降了16.64%和27.76%, 差异显著($P<0.05$)。

相比之下, 绿豆种子发芽率和幼苗根的伸长生长对SA浸种处理较敏感。

2 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对Cd胁迫下两种植物根系受害症状的缓解及伸长生长的影响

如表2所示, 50 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd胁迫下, 绿豆根长分别为对照的72.31%和43.68%, 但 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种+ $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理使其分别达到对照的90.02%和57.05%, 分别提高了17.71%和13.37%。与此相似, 50 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd胁迫下, 箭舌豌豆的根长分别为对照的85.58%和61.31%, 但 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种+ $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理使其分别达对照的95.41%和70.25%, 分别提高了9.83%和8.94%。

试验还发现, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理后, 绿豆根系(图1-A)于约3 d、箭舌豌豆根系(图1-B)于约6 d时先后变成褐色, 这种症状因 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理而减轻。

$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理约3 d时, 两种植物根系表面均出现褐变现象(根表呈现黄褐色), 并随时间的推移而加深。

表1 SA浸种对绿豆和箭舌豌豆种子萌发及其幼苗根伸长生长的影响

Table 1 Effect of seed soaking with different concentrations of SA on seed germination and seedling root lengths of mung bean and common vetch

SA浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	发芽率/%		根长/cm	
	绿豆	箭舌豌豆	绿豆	箭舌豌豆
0 (对照)	100 ^a (100%)	100 ^a (100%)	7.45±0.25 ^e (100%)	4.25±0.13 ^d (100%)
50	100 ^a (100%)	100 ^a (100%)	7.87±0.20 ^d (105.64%)	4.47±0.30 ^e (105.18%)
100	100 ^a (100%)	100 ^a (100%)	11.52±0.17 ^a (154.63%)	5.65±0.28 ^a (132.94%)
200	100 ^a (100%)	100 ^a (100%)	9.17±0.39 ^b (123.09%)	4.96±0.20 ^b (116.71%)
500	96.67±2.42 ^b (96.67%)	100 ^a (100%)	8.27±0.13 ^c (111.00%)	4.15±0.12 ^c (97.65%)
1 000	94.67±2.73 ^b (94.67%)	96.67±3.01 ^b (96.67%)	6.21±0.02 ^f (83.36%)	3.07±0.13 ^f (72.24%)

表中数据是3次重复的平均值±标准偏差; 括号内为各处理与对照相比的差异百分数; 同列中不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上有显著差异。表2同。

表2 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对Cd抑制两种植物幼苗根伸长生长的影响

Table 2 Effect of seed soaking with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA on seedling root lengths of mung bean and common vetch

处理	根长/cm	
	绿豆	箭舌豌豆
$0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA+ $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd (对照)	6.03±0.23 ^b (100%)	5.48±0.19 ^b (100%)
$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA	7.10±0.58 ^a (115.04%)	5.97±0.15 ^c (108.94%)
$50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd	4.36±0.21 ^d (72.31%)	4.69±0.45 ^d (85.58%)
$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA+ $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd	5.43±0.18 ^c (90.02%)	5.23±0.11 ^c (95.41%)
$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd	2.63±0.19 ^f (43.68%)	3.36±0.30 ^f (61.31%)
$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA+ $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd	3.44±0.20 ^e (57.05%)	3.85±0.11 ^e (70.25%)

相比之下, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 浸种对绿豆在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 胁迫下的缓解效应最为明显。

3 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 浸种对 Cd 胁迫下两种豆科植物根内 O_2^- 产生的影响

根据活性氧 O_2^- 与氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)反应生成蓝色物质的量与 O_2^- 的多少成正比的原理, 将不同处理后的两种植物幼苗根用一定浓度的NBT液浸泡处理后的结果如图2-A、B所示。与各自对照相比, 单独 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 浸种处

理对绿豆和箭舌豌豆根的颜色变化无明显影响, 单独 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理使两种植物幼苗根呈不同程度的深蓝色, 且绿豆根的蓝色更深, 说明其根组织内 O_2^- 产生速率更大, 而 Cd 处理前的 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 浸种处理可使二者的蓝色变浅。

由图2-C可见, 与各自的对照相比, 单独的 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 浸种处理对绿豆和箭舌豌豆根组织内 O_2^- 的产生速率无显著影响 ($P>0.05$), 单独的 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理则使其显著增加 ($P<0.05$), 而 Cd 处

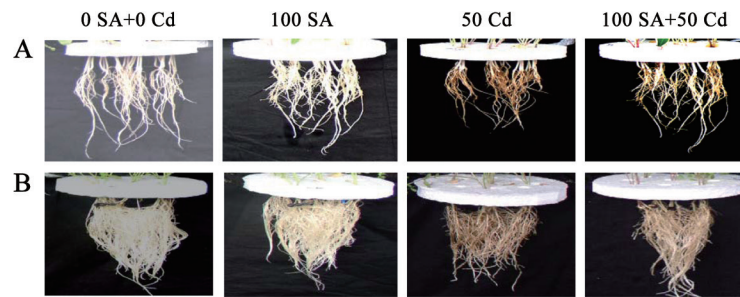


图1 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 浸种对 Cd 胁迫下绿豆(A)和箭舌豌豆(B)幼苗根表褐变的影响

Fig.1 Effect of seed soaking with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA on the brown stain on roots of mung bean (A) and common vetch (B) under Cd stress

图中 0 SA+0 Cd、100 SA、50 Cd 和 100 SA+50 Cd 分别代表 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA+ $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd (对照)、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA、 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA+ $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 处理。下图同。

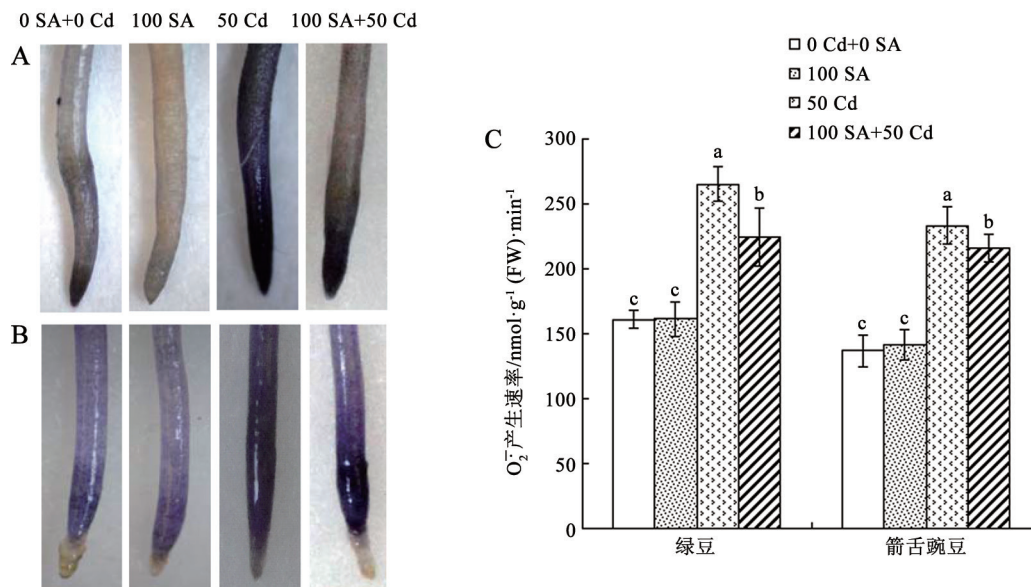


图2 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 浸种对 Cd 胁迫下绿豆和箭舌豌豆根内 O_2^- 组织化学染色定位及其产生速率的影响

Fig.2 Effect of seed soaking with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA on O_2^- localization *in situ* and production rate in the roots of mung bean and common vetch under Cd stress

A: 绿豆, B: 箭舌豌豆。同一植物各柱形上不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下图同。

理前的 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理对Cd处理效应具有显著的缓解作用($P<0.05$)。

两种相比, SA浸种对Cd诱导产生 O_2^- 的缓解作用在绿豆根组织内的表现更为明显。

4 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对Cd胁迫下两种豆科植物根组织内 H_2O_2 积累的影响

根据活性氧 H_2O_2 与二甲基联苯胺(3,3-diaminobenzidine, DAB)反应生成棕红色物质的量与 H_2O_2 的多少成正比的原理, 将不同处理后的两种植物幼苗根用一定浓度的DAB液浸泡处理后的结果如图3-A、B所示, 与各自对照相比, 单独 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理对绿豆和箭舌豌豆根的颜色变化无明显影响, 单独 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理使两种植物幼苗根呈不同程度的棕红色, 且绿豆根的颜色更深, 说明其根组织内积累较多的 H_2O_2 , 而Cd处理前的 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理可使二者的颜色变浅。由图3-C可见, 与各自的对照相比, 单独的 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理对绿豆和箭舌豌豆根组织内 H_2O_2 积累无显著影响($P>0.05$), 单独的 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理则使其显著增加($P<0.05$), 而Cd处理前的 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理对Cd处理效应具有显著的缓解作用($P<0.05$)。两种相比, SA浸种对

Cd胁迫伤害效应的缓解作用同样在绿豆根组织内的表现更为明显。

5 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对Cd胁迫下两种豆科植物根组织的SOD活性及同工酶谱的影响

$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理对绿豆和箭舌豌豆根组织内的SOD活性及其同工酶谱的影响如图4所示。单独 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理没有使绿豆和箭舌豌豆根组织内SOD活性发生显著变化($P>0.05$), 也没改变其同工酶谱, 而单独 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理及Cd处理前加 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理均显著提高了其根组织内SOD的活性($P<0.05$), 并使其同工酶带增宽(图4-A第3、4条带)或带数增加(图4-B第3、4条带中箭头所示)。与各自对照相比, 单独 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理分别使绿豆和箭舌豌豆根组织内SOD活性增加112%和123%, 而SA浸种加Cd处理分别使其增加175%和151%。两种相比, Cd处理前加SA浸种处理使绿豆根组织内SOD活性增加更多。

6 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对Cd胁迫下两种豆科植物根组织内的CAT活性及同工酶谱的影响

$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理对绿豆和箭舌豌豆根组织的CAT活性及其同工酶谱的影响如图5所

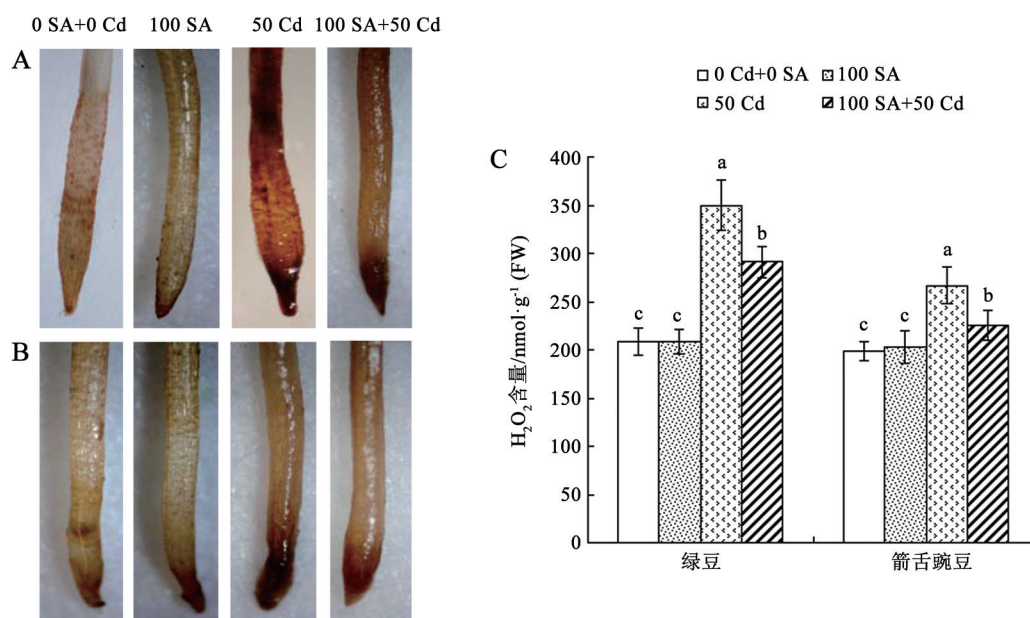


图3 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对Cd胁迫下绿豆和箭舌豌豆根内 H_2O_2 组织化学染色定位及其含量的影响

Fig. 3 Effect of seed soaking with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA on H_2O_2 localization *in situ* and content in the roots of mung bean and common vetch under Cd stress

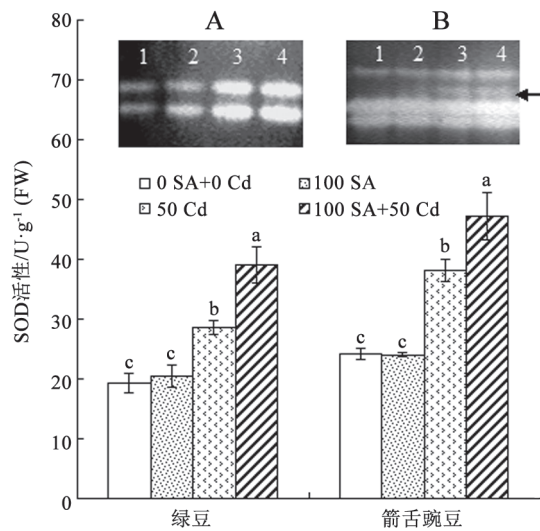


图4 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对Cd胁迫下绿豆和箭舌豌豆根内SOD活性及其同工酶谱的影响

Fig.4 Effect of seed soaking with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA on SOD activities and isoforms in the roots of mung bean and common vetch under Cd stress

1、2、3和4分别代表0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA+0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd (对照)、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA +50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理。下图同。

示。单独100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理使绿豆和箭舌豌豆根组织内CAT活性分别下降了17.23%和14.12%，与各自对照相比差异显著($P<0.05$)，但没有明显改变其同工酶活性谱带(图5-A第1、2条带)；单独50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理显著($P<0.05$)提高了两者根组织内的CAT活性。与各自对照相比，分别提高了46.42%和95.06%，并使两种的同工酶活性带明显增宽(图5-A和B第3条带)；与此相反，50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理前加100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理分别使绿豆和箭舌豌豆根组织CAT活性下降了16.34%和11.22%，其同工酶的活性谱带也有所变窄(图5-A和B第4条带)，但酶活性仍然分别高出各自对照的23.33%和73.20%，同工酶活性谱带也宽于各自对照的。两种相比，Cd单独处理使箭舌豌豆根组织内的CAT活性增加更多；而Cd处理前的SA浸种处理使绿豆根组织内CAT活性下降更多。

7 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对Cd胁迫下两种植物根组织内APX的影响

100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理和单独的Cd处理以及Cd处理前加SA浸种处理均提高了绿豆和箭舌豌豆根的APX活性，使其同工酶的活性谱带相应地

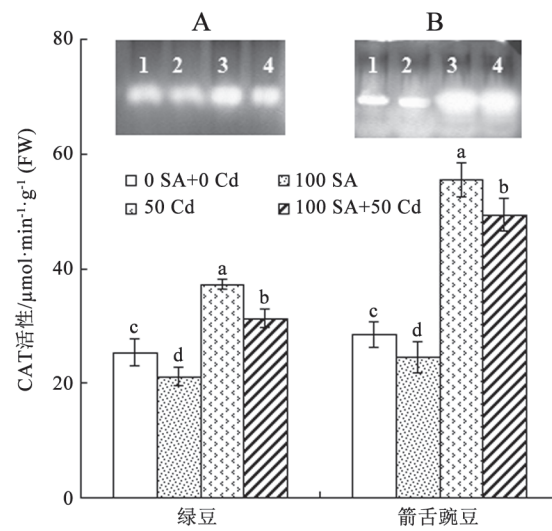


图5 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对Cd胁迫下绿豆和箭舌豌豆根组织内CAT活性及其同工酶谱的影响

Fig.5 Effect of seed soaking with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA on CAT activities and isoforms in the roots of mung bean and common vetch under Cd stress

增宽(图6-A和B第2、3和4条带)，尤其是Cd处理前的SA浸种处理效果较为突出。与对照相比，Cd处理前的SA浸种处理分别使绿豆和箭舌豌豆根组织的APX活性升高了73.01%和86.65%。但是，与单独的50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理相比，Cd处理前的100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理分别使绿豆和箭舌豌豆根的APX活性升高了44.87%和36.00%。由此说明，Cd处理前的SA浸种处理效应在绿豆根组织内表现更突出。

讨 论

SA是植物体内的一种重要的信号分子，可能在提高植物对生物和非生物胁迫的耐性方面很有前途(Horváth等2007)。外源SA的供应不仅影响植物组织内一些酶的活性(Ahmad等2011)、植物对离子的吸收与转运(Shi和Zhu 2008)、种子萌发(Agami 2013)和光合作用(Liu等2014)等生理活动，而且还可缓解臭氧(Pasqualini等2002)、盐分(Khan等2014)和重金属(Zhang等2011; Belkadi等2015)的伤害作用。

本研究发现，在一定的浓度范围内，较低浓度的SA浸种不影响供试植物绿豆和箭舌豌豆种子的发芽率，但较高浓度使其种子发芽率降低；较低浓

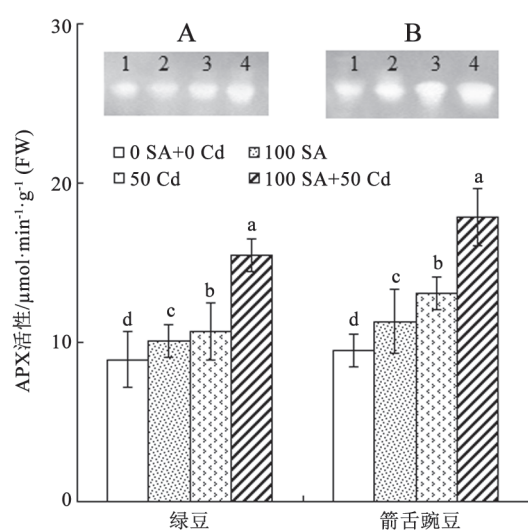


图6 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种对Cd胁迫下绿豆和箭舌豌豆根组织内APX活性及其同工酶谱的影响

Fig.6 Effect of seed soaking with 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA on APX activities and isoforms in the roots of mung bean and common vetch under Cd stress

度的SA浸种对绿豆和箭舌豌豆的根伸长生长有促进作用, 而浓度较高时有抑制作用(表1和2), 这与Luo等(2001)所得的结果是一致的。

Metwally等(2003)的研究发现, 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的SA浸种预处理有效地防止了大麦幼苗生长期间Cd的毒害。与此相似, 本研究中, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理明显缓解了Cd对两种供试植物幼苗根伸长生长的抑制作用(表1、2)。

在我们的试验中, 单独100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理没有引起绿豆和箭舌豌豆根组织中 O_2^- 的显著积累($P>0.05$, 图2), 而单独的50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理则使两者根组织内的 O_2^- 显著增加($P<0.05$), 由此推测Cd处理抑制根的伸长生长与其诱导 O_2^- 的产生有关, 而Cd处理前的SA浸种处理使两种植物的根伸长生长有所增加可能是SA浸种处理抑制了 O_2^- 的产生(图2)。我们过去的研究发现, Cd诱导绿豆和箭舌豌豆叶内产生 O_2^- 与Cd激活质膜结合酶NADPH氧化酶有关(Zhang等, 2009), Cd处理后两者根内产生 O_2^- 是否与Cd激活根细胞质膜上的NADPH氧化酶有关以及SA浸种处理使Cd诱导产生的 O_2^- 降低是否与SA降低膜上的NADPH氧化酶活性有关尚需进一步的研究。

与两种植物根中积累 O_2^- 的情况相似, 单独的

SA浸种处理对其根组织中 H_2O_2 的积累无显著($P>0.05$)影响, 而单独的Cd处理则使其显著增加($P<0.05$), Cd处理前的SA浸种处理使其显著降低($P<0.05$, 图3)。在植物体内, H_2O_2 的来源之一是 O_2^- 的歧化, 因此推测本研究中 H_2O_2 增加和降低与 O_2^- 增加和降低有关, 且与Cd处理和SA浸种预处理有关。

植物在适应环境过程中已进化获得了一个较为复杂的抗氧化体系以抵抗 O_2^- 和 H_2O_2 等活性氧的伤害, 这个体系包括酶类如SOD、CAT和PODs以及参与ASC-GSH循环的酶和抗氧化剂类如ASC、GSH、类胡萝卜素以及 α -生育酚等(Drażkiewicz等2007)。Gratão等(2005)认为, 通常情况下, 重金属通过诱导活性氧的增加而引起氧化胁迫, SOD、CAT、PODs、APX和GR以及ASC和GSH在防止重金属氧化伤害方面发挥着重要的作用。由于处理浓度、时间以及材料的不同, 使Cd表现出了既可激发(Skórzyńska-Polit等2003)又可抑制(Gallego等1996)抗氧化酶活性的作用。

SOD是细胞内存在极为广泛的清除 O_2^- 的酶, 它将 O_2^- 歧化为 O_2 和 H_2O_2 , 后者再被CAT、POD(Skórzyńska-Polit等2003)以及APX (Hegedüs等2001)等清除。许多试验证明, Cd胁迫下 H_2O_2 含量的升高是SOD活性升高的结果(Cho等2005; Drażkiewicz等2007)。本研究通过活性电泳及定量分析均发现, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理诱导了绿豆和箭舌豌豆根内SOD活性的增加, 这与汪洪等(2008)和Dinakar等(2008)的结果一致。由于Cd处理促使了SOD活性的升高, 所以无论是绿豆还是箭舌豌豆, 其根组织内的 H_2O_2 均高于各自的对照(图3)。Cd处理后, 绿豆和箭舌豌豆根内SOD活性的增加有利于将各自细胞内产生的 O_2^- (图2)歧化为 O_2 和 H_2O_2 以降低 O_2^- 的氧化伤害。前人的研究发现, SA浸种可增强Cd胁迫下水稻、玉米和小麦根及玉米叶的SOD活性(Choudhury和Panda 2004; Guo等2007; Krantev等2008)。本研究也发现, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理前的100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA浸种处理使绿豆和箭舌豌豆根组织内的SOD活性均高于单独50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理的(图4), 推测这与SA浸种处理可降低 O_2^- 产生速率有关。

各种金属胁迫下许多植物体内积累或产生

H₂O₂时均会引起其体内的H₂O₂清除酶CAT、APX和(或)POD等变化(Zhang等2007; Muñoz等2008)。本研究显示, 50 μmol·L⁻¹ Cd处理后, 绿豆和箭舌豌豆根组织内的CAT活性增加(图5), 这个增加有利于清除Cd诱导产生的H₂O₂, 但是Cd处理前的SA浸种使CAT活性明显降低。早期研究认为SA使CAT活性降低是因为其结合于CAT的结果(Chamnongpol等1998)。SA浸种或预处理使CAT活性降低的结果也见于Chen等(2007)和Mahdavian等(2008)的研究。本研究说明, SA浸种使两种豆科植物根内的CAT没有参与H₂O₂的清除。

本研究显示, 与CAT不同, 单独的SA浸种处理提高了APX的活性。在过去的研究中人们认为SA是APX的抑制剂, 但在花生幼苗的研究中, 发现SA却不是APX较好的抑制剂(Vasyukova等2007)。Cd处理诱导的APX活性升高在其他植物的研究中也得到了证实(Cho等2005)。Krantev等(2008)观察到, Cd处理前的SA浸种处理也提高了玉米叶的APX活性。本研究的酶活性测定和活性电泳鉴定两方面所得结果(图6)与Krantev等的结果一致。

综上所述, Cd抑制绿豆和箭舌豌豆根伸长生长与其导致根组织内产生O₂⁻和H₂O₂有关, 而适宜浓度的SA浸种可缓解Cd的抑制效应与SA能降低O₂⁻和H₂O₂的产生与积累有关, 这种缓解作用是通过SA提高清除O₂⁻的SOD和清除H₂O₂的APX酶活性来实现的, 而有关SA是在转录水平上还是在翻译水平上对其进行了调节还有待进一步研究。

参考文献

- 董德珂, 董瑞, 刘志鹏, 王彦荣(2015). 532份箭舌豌豆种质资源复叶表型多样性. 草业科学, 32 (6): 935~941
- 水德聚, 石瑜, 曹亮亮, 杨涛, 汪炳良(2012). 外源水杨酸预处理对高温胁迫下白菜耐热性和光合特性的影响. 植物生理学报, 48 (4): 386~392
- 王爱国, 罗广华(1990). 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系. 植物生理学通讯, 26 (6): 55~57
- 汪洪, 赵士诚, 夏文建, 王秀斌, 范洪黎, 周卫(2008). 不同浓度镉胁迫对玉米幼苗光合作用、脂质过氧化和抗氧化酶活性的影响. 植物营养与肥料学报, 14 (1): 36~42
- 张芬琴(2009). 镉胁迫对二种不同耐性豆科植物生长与活性氧代谢的影响及水杨酸对镉毒害的缓解效应[博士学位论文]. 南京: 南京农业大学
- 张志权, 束文圣, 廖文波, 蓝崇钰(2002). 豆科植物与矿业废弃地植被恢复. 生态学报, 21 (2): 47~52
- Agami RA (2013). Alleviating the adverse effects of NaCl stress in maize seedlings by pretreating seeds with salicylic acid and 24-epibrassinolide. S Afr J Bot, 88: 171~177
- Ahmad P, Nabi G, Ashraf M (2011). Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. S Afr J Bot, 77: 36~44
- Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem, 44: 276~287
- Belkadi A, De Haro A, Obregon S, Chaibi W, Djebali W (2015). Exogenous salicylic acid protects phospholipids against cadmium stress in flax (*Linum usitatissimum* L.). Ecotox Environ Safe, 120: 102~109
- Benitez ER, Hajika M, Yamada T, Takahashi K, Oki N, Yamada N, Nakamura T, Kanamaru K (2010). A major QTL controlling seed cadmium accumulation in soybean. Crop Sci, 50 (5): 1728~1734
- Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sander-mann H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 5818~5823
- Chen J, Zhu C, Li LP, Sun ZY, Pan XB (2007). Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. J Environ Sci, 19: 44~49
- Cho UH, Seo NH (2005). Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant Sci, 168: 113~120
- Choudhury S, Panda SK (2004). Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in *Oryza sativa* L. roots. Bulg J Plant Physiol, 30 (3-4): 95~110
- Dinakar N, Nagajyothi PC, Suresh S, Udaykiran Y, Damodharam T (2008). Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. J Environ Sci, 20 (2): 199~206
- Drazic G, Mihailovic N (2005). Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. Plant Sci, 168: 511~517
- Drązkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z (2007). The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. Chemosphere, 67: 188~193
- Fairbrother A, Wenstel R, Sappington K, Wood W (2007). Framework for metals risk assessment. Ecotox Environ Safe, 68 (2): 145~227
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996). Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Sci, 121: 151~159
- Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel JP, Blein JP, Ranjeva R, Montillet JL (2006). Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. Plant Cell Environ, 29: 1956~1969
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977). Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol, 59: 309~314
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2000). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Funct Plant Biol, 32: 481~494
- Guo B, Liang YC, Zhu YG, Zhao FJ (2007). Role of salicylic acid in

- alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress. *Environ Pollut*, 147: 743~749
- Hegedüs A, Erdei S, Horváth G (2001). Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci*, 160 (10): 85~93
- Horváth E, Szalai G, Janda T (2007). Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *J Plant Growth Regul*, 456 (26): 290~300
- Jiang M, Zhang J (2001). Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Physiol*, 42 (11): 1265~1273
- Khan MIR, Asgher M, Khan NA (2014). Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiol Bioch*, 80: 67~74
- Klotz MG, Hutcheson SW (1992). Multiple periplasmic catalases in phytopathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol*, 58 (8): 2468~2473
- Krantev A, Yordanova R, Janda T, Szalai G, Popova L (2008). Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J Plant Physiol*, 165 (9): 920~931
- Liu S, Dong Y, Xu L, Kong J (2014). Effects of foliar applications of nitric oxide and salicylic acid on salt-induced changes in photosynthesis and antioxidative metabolism of cotton seedlings. *Plant Growth Regul*, 73: 67~78
- Luo JP, Jiang ST, Pan LJ (2001). Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall: relationship with H₂O₂ production and H₂O₂-metabolizing enzyme activities. *Plant Sci*, 161: 125~132
- Mahdavian K, Ghorbanli M, Kalantari KM (2008). Role of salicylic acid in regulating ultraviolet radiation-induced oxidative stress in pepper leaves. *Russ J Plant Physiol*, 55 (4): 560~563
- Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, Dietz KJ (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol*, 132: 272~281
- Muñoz N, González C, Molina A, Zirulnik F, Luna CM (2008). Cadmium-induced early changes in O₂⁻, H₂O₂ and antioxidative enzymes in soybean (*Glycine max* L.) leaves. *Plant Growth Regul*, 56: 159~166
- Nakano Y, Asada K (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22: 867~880
- Parashar A, Yusuf M, Fariduddin Q, Ahmad A (2014). Salicylic acid enhances antioxidant system in *Brassica juncea* grown under different levels of manganese. *Int J Biol Macromol*, 70: 551~558
- Pasqualini S, Della Torre G, Ferranti F, Ederli L, Piccioni C, Reale L, Antonielli M (2002). Salicylic acid modulates ozone-induced hypersensitive cell death in tobacco plants. *Physiol Plant*, 115: 204~212
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 110: 125~136
- Rogan N, Serafimovski T, Dolenc M, Tasev G, Dolenc T (2009). Heavy metal contamination of paddy soils and rice (*Oryza sativa* L.) from Kočani Field (Macedonia). *Environ Geochem Health*, 31: 439~451
- Shi Q, Zhu Z (2008). Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environ Exp Bot*, 63: 317~326
- Skórzyńska-Polit E, Drażkiewicz M, Krupa Z (2003). The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plant*, 47: 71~78
- Swaddiwudhipong W, Mahasakpan P, Funkhiew T, Limpatanachote P (2010). Changes in cadmium exposure among persons living in cadmium-contaminated areas in northwestern Thailand: a five-year follow-up. *J Med Assoc Thailand*, 93 (10): 1217~1222
- Vasyukova NI, Ozeretskovskaya OL (2007). Induced plant resistance and salicylic acid: a review. *Appl Biochem Microbiol*, 43 (4): 367~373
- Wang Z, Zhang Y, Huang Z, Huang L (2008). Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant Soil*, 310 (1-2): 137~149
- Zhang F, Zhang H, Wang G, Xu L, Shen Z (2009). Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *J Hazard Mater*, 168: 76~84
- Zhang F, Zhang H, Xia Y, Wang G, Xu L, Shen Z (2011). Exogenous application of salicylic acid alleviates cadmium toxicity and reduces hydrogen peroxide accumulation in root apoplasts of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa*. *Plant Cell Rep*, 30: 1475~1483
- Zhang FQ, Wang YS, Lou ZP, Dong JD (2007). Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere*, 67: 44~50