

箭舌豌豆根系抗坏血酸及相关酶对镉胁迫的响应

芮海云^{1,2}, 张兴兴², 庄凯², 沈振国², 张芬琴³

(1 泰州学院, 江苏泰州 225300; 2 南京农业大学 生命科学院, 南京 210095; 3 河西学院, 甘肃张掖 734000)

摘要:以箭舌豌豆(*Vicia sativa* L.)品种 L3(耐镉)和 ZM(镉敏感)为材料,研究了不同程度镉胁迫下箭舌豌豆幼苗根系抗坏血酸(AsA)含量、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)同工酶活性、抗坏血酸过氧化物酶(APX)同工酶活性以及 APX 基因表达的变化。结果显示:(1)2 个箭舌豌豆品种根系 AsA 和脱氢抗坏血酸(DHA)含量在镉胁迫下显著升高;AsA/DHA 比值在镉耐性品种 L3 中显著升高,在敏感品种 ZM 中显著下降;相同镉处理浓度下,L3 根系 AsA 含量和 AsA/DHA 比值显著大于 ZM。(2)2 个品种根系 DHAR 的活性电泳共显示 4 条同工酶条带,它们的活性均随镉处理浓度的升高而升高;其中 DHAR1 只在 L3 显示,DHAR4 只在 ZM 显示;相同镉处理浓度下,品种 L3 的 DHAR 的总活性大于品种 ZM。(3)2 个品种根系 APX 的活性电泳共显示 11 条同工酶条带,其中的 APX1、2、4 仅在敏感品种 ZM 中受镉胁迫诱导,APX 8 在耐性品种 L3 中受到比敏感品种 ZM 更显著的诱导;克隆得到 1 个箭舌豌豆 APX 基因,荧光定量 RT-PCR 结果显示该基因的转录在 L3 和 ZM 根系均受镉处理诱导。研究表明,镉胁迫下 2 个箭舌豌豆品种根系 AsA 含量,AsA 代谢相关酶 DHAR 和 APX 的活性以及 APX 的转录水平均显著升高;镉耐性品种 L3 较敏感品种 ZM 能更有效地促进 AsA 循环,维持更高的 AsA 水平,从而更有效地缓解镉胁迫诱导产生的氧化胁迫,这可能是 L3 较 ZM 具有更高镉耐性的重要机制之一。

关键词:箭舌豌豆;镉耐性;抗坏血酸;抗坏血酸过氧化物酶;脱氢抗坏血酸还原酶

中图分类号:Q945.78

文献标志码:A

Study on Ascorbic Acid and Relative Enzymes Against Cadmium Stress in the Roots of *Vicia sativa* L.

RUI Haiyun^{1,2}, ZHANG Xingxing², ZHUANG Kai², SHEN Zhenguo², ZHANG Fenqin³

(1 Taizhou University, Taizhou, Jiangsu 225300, China; 2 College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3 College of Hexi, Zhangye, Gansu 734000, China)

Abstract: Two varieties of *Vicia sativa* L. with different Cd tolerances (Cd-tolerant variety L3, Cd-sensitive variety ZM) were studied to compare concentrations of ascorbic acid (AsA), activities of dehydroascorbate reductase (DHAR) isoenzymes and ascorbate peroxidase (APX) isoenzymes, and APX gene expression in response to Cd treatment in the roots. Results showed that: (1) Cd treatment significantly increased the concentrations of AsA and dehydroascorbate (DHA) in the roots of both L3 and ZM. Cd treatment also tended to increase ratio of AsA/DHA in L3, but to decrease the ratio in ZM. At the same Cd treatment, L3 roots had higher AsA concentration and AsA/DHA ratio than that of ZM. (2) Four isoforms of DHAR were obtained in L3 and ZM roots by native PAGE and their activities generally increased with increasing Cd concentration. DHAR1 was obtained only in L3 and DHAR4 only in ZM. At equivalent Cd concentrations, the total activity of DHAR was higher in roots of L3 than that in ZM. (3)

收稿日期: 2016-03-03; 修改稿收到日期: 2016-06-16

基金项目: 国家自然科学基金(31160053, 31560072); 泰州学院博士基金(TZXY2015JB005)

作者简介: 芮海云(1969—), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物逆境生理研究。E-mail: njrtz@sina.com

Eleven APX isoforms were obtained in both L3 and ZM roots by native PAGE. APX1, 2, 4 were induced by Cd treatment only in ZM and the activity of APX8 was more significantly induced in L3 than that in ZM. An APX gene was cloned and subjected to RT-PCR analysis. The gene expression level was upregulated under Cd stress in the roots of both varieties. These results suggested that concentration of AsA, activities of DHAR and APX, and APX gene expression level increased in response to cadmium stress in the roots of two *V. sativa* varieties. It is possible that the more effective AsA recycle in the roots of L3 contributed to its higher AsA concentration than that in ZM, and this could be related to its stronger protection from ROS generation and finally contributed to its higher tolerance to Cd stress.

Key words: *Vicia sativa* L. ; cadmium tolerance; ascorbic acid; ascorbate peroxidase; dehydroascorbate reductase

镉是毒性最强的重金属之一,因其易被植物吸收,并进一步通过食物链危害人体健康,因此受到特别的关注。镉不具有氧化还原活性,不能引起 Fenton 和 Haber-Weiss 反应,但镉胁迫常导致植物产生和积累大量的活性氧(ROS)^[1-2],ROS 会诱导膜脂过氧化、产生质膜损伤,因此氧化损伤被认为是植物镉毒害的主要原因之一^[3]。许多研究报道了镉处理下植物氧化胁迫的产生^[4-5]。抗坏血酸(AsA)是植物体内高丰度小分子抗氧化物质,是抗氧化系统的重要组成部分,被认为是氧化还原的中心,在植物抵抗氧化胁迫中具有重要作用。AsA 存在于植物细胞质、叶绿体、线粒体和质外体中,可以通过抗坏血酸过氧化物酶 APX 的催化作用或者本身直接与 H₂O₂ 反应,将 H₂O₂ 还原为 H₂O,降低植物细胞的 H₂O₂ 积累,减轻植物的氧化胁迫伤害。AsA 本身被氧化为脱氢抗坏血酸(DHA),DHA 通过脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)还原为 AsA。据报道,AsA 含量升高能提高植物对各种胁迫,如盐、紫外线和冷胁迫的抵抗能力^[6-7]。Burkey 等^[8]发现,臭氧胁迫下耐性品种菜豆叶中 AsA 的含量比敏感品种高,耐性品种能维持相对较高的 AsA 库水平。Sharma 和 Dubey^[9]报道铝胁迫诱导水稻幼苗 APX 活性升高,同时其同工酶的组成也发生改变。也有报道 AsA 能提高植物对镉胁迫的抵抗能力,如外源添加 AsA 合成的前体 L-半乳糖酸-1,4-内酯,硬粒小麦(*Triticum durum* cv Creso) AsA 合成增加,镉胁迫产生的氧化胁迫得到缓解^[10]。

本实验以中国西北地区广泛种植的耐寒旱、食饲兼用的作物箭舌豌豆(*Vicia sativa* L.)为实验材料,研究 2 个不同镉耐性的箭舌豌豆品种在镉胁迫下根系 AsA 含量、APX 同工酶谱和基因表达以及 DHAR 同工酶谱的变化,进一步探讨植物抗坏血酸代谢响应镉胁迫的机理。

1 材料和方法

1.1 材料培养及处理

实验材料箭舌豌豆包括 1 个镉耐性品种 L3 和 1 个镉敏感品种 ZM。种子经 3% 的 H₂O₂ 消毒 15 min,用去离子水彻底冲洗后,浸种 16 h,转移至蛭石中 20 ℃~25 ℃萌发。3 d 后,挑选长势良好且一致的幼苗转移至含 2.5 L Hoagland 营养液的培养钵中培养,每培养钵移苗 10 棵。培养条件如下:昼/夜温度 25 ℃/20 ℃,相对湿度 60%~80%,光照时间 12 h,光照强度 400 μmol·m⁻²·s⁻¹。每 3 d 换 1 次营养液,营养液 pH 控制在 5.5 左右。

实验一:2 个箭舌豌豆品种移苗 7 d 后,用 25 μmol·L⁻¹ 镉处理(镉以 CdCl₂·2.5 H₂O 的形式加入)。每个处理 3 次重复,处理液每 3 d 换 1 次。分别在处理 0、2、4、6、8、10、12、14 d 取样用于根系生长指标测定。

实验二:0(Control)、10、25、50 μmol·L⁻¹ 镉处理(处理方法同实验一),处理 7 d 后收获根部,立即用于实验,或于液氮中冷冻后,-80 ℃保存供生理指标的测定。

实验三:移苗 3 d 后,转移至加入 25 μmol·L⁻¹ CdCl₂ 的营养液中处理(处理方法同实验一),每个处理重复 3 次,处理 96 h 内根系取样,每个样品为 4 株苗的混合样,取样时间为 0、12、24、48、96 h。所取样品立即于液氮中速冻,-80 ℃保存用于根系总 RNA 的提取。

1.2 测定项目及方法

1.2.1 根系生长指标 分别在 25 μmol·L⁻¹ 镉处理 0、2、4、6、8、10、12、14 d,测量幼苗主根长后,收获根部,吸去表面水分称取鲜重。

1.2.2 质膜完整性 质膜完整性的测定参照 Schützendübel 等^[11] 的伊文思蓝(Evans blue)吸收法。取 10 株新鲜植物 1 cm 主根根尖,于 0.025%

(W/V)伊文思蓝溶液中染色 30 min,去离子水冲洗 15 min 彻底清除浮色后,于 1% SDS(W/V)50% (V/V)甲醇中研磨成匀浆,50 ℃水浴 15 min 后,14 000×g 离心 15 min,取上清测 600 nm 下吸光值。

1.2.3 膜脂过氧化的组织化学检测 膜脂过氧化的组织化学检测参照 Yamamoto 等^[12]的方法。将 2 cm 主根根尖浸入 Schiff 试剂(0.5 g 碱性品红,0.5 g $K_2S_2O_5$,100 mL 1 mol·L⁻¹ HCl,100 mL H₂O)中染色 60 min,然后用 0.5% (W/V)的 $K_2S_2O_5$ 溶液(溶于 0.05 mol·L⁻¹的 HCl)冲洗,置于配有数码相机的体视显微镜下观察、拍照。

1.2.4 AsA 和 DHA 含量 AsA 含量测定参照 Kampfinkel 等^[13]的方法。取 1 g 新鲜植物根系,加入预冷的 5 mL 6% TCA 冰浴研磨,4 ℃离心(12 000×g,20 min),上清液为待测液。总 AsA 含量的测定:取 0.2 mL 待测液(对照取 0.2 mL 6% TCA),加 0.2 mL 10 mmol·L⁻¹ DTT 和 0.4 mL 0.2 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.4),充分混匀,42 ℃反应 15 min 后向其中加入 0.2 mL 0.5% N-乙基马来酰亚胺(NEM)、1 mL 10% TCA、0.8 mL 42% H₃PO₄、0.8 mL 4% 联吡啶、0.4 mL 3% FeCl₃,迅速剧烈震荡混匀,42 ℃反应 40 min,测定 525 nm 处吸光值。还原型 AsA 测定以 0.2 mL H₂O 和 0.2 mL PBS 分别代替 DTT 和 NEM,其他同上。总 AsA 含量减去还原型 AsA 含量即为氧化型 AsA,即脱氢抗坏血酸(DHA)含量。AsA 溶解于 6% TCA,同法作标准曲线。

1.2.5 DHAR 和 APX 的活性电泳 蛋白提取及不连续活性聚丙烯酰胺凝胶电泳(native PAGE)参照 Laemmli^[14]的方法在 4 ℃下进行。分离胶和浓缩胶(不含 SDS)铺进电泳槽,电泳槽各孔加入等量的蛋白质,电泳缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-HCl,恒定电流 30 mA。电泳完毕,进行酶的活性染色。

DHAR 的 native PAGE 采用 4% 的浓缩胶和 10% 的分离胶。DHAR 的活性染色参照 Aravind 等^[15]的方法。将电泳后的凝胶浸入含 4 mmol·L⁻¹ GSH,2 mmol·L⁻¹ DHA 的 0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH 6.2)中,于摇床上温育 20 min。水洗后,于含 0.1% FeCl₃ 和 0.1% $K_3[Fe(CN)_6]$ 的 0.1 mol·L⁻¹ HCl 溶液中孵育,在浅蓝色背景上出现深蓝色的条带。蒸馏水漂洗,图像扫描。

APX 的 native PAGE 采用 4% 的浓缩胶和 8% 的分离胶。APX 的活性染色采用 Rao 等^[16]的方法。凝胶先在含 2 mmol·L⁻¹ AsA 的 50 mmol·

L⁻¹ PBS 中孵育 30 min,再在含 4 mmol·L⁻¹ AsA 和 2 mmol·L⁻¹ H₂O₂ 的 50 mmol·L⁻¹ PBS(pH 7.0)中孵育 20 min。缓冲液冲洗 1 min 后,在含 28 mmol·L⁻¹ TEMED 和 2.45 mmol·L⁻¹ NBT 的 PBS(pH 7.8)中,轻轻摇动,染色 10~15 min。水洗,终止反应。图像扫描。

1.2.6 APX 基因表达的荧光定量 PCR 分析 于 NCBI 网站查寻箭舌豌豆所在豆科植物 APX 的基因序列。利用 DNAMAN6.0 软件进行核酸序列比对,根据 3 种豆科植物:豌豆(*Pisum sativum*)、大豆(*Glycine max*)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)的高度保守序列,设计引物进行 PCR 扩增,得到了箭舌豌豆 APX 全序列。测序结果表明它与豌豆细胞质 PsAPX01 基因(序列号为 X62077.1)的核苷酸序列一致性为 94%。实时荧光定量 PCR 反应液使用 SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus, Takara)试剂盒,使用 7500 Real-Time PCR 系统(Applied Biosystems, USA)检测基因表达量的变化。PCR 所用 APX 特异性引物为,正向:5'-GCTGGTGTGTTGCTGTTG-3';反向:5'-CCCTCTGGTGGTGGATGG-3'。Actin 作为内参,Actin(序列号 GU946218.1)特异性引物:正向:5'-TCTGTGTGATGGTGTGAGTC-3';反向:5'-ACAGCAACATAGGCAAGC-3'。PCR 条件:95 ℃,30 s 解链;随后 95 ℃,5 s;60 ℃,34 s,共 40 个循环。各处理的基因表达量与对照相比,以 Actin 为内参,对照表达量为 1,得到处理后各目的基因的相对表达量。

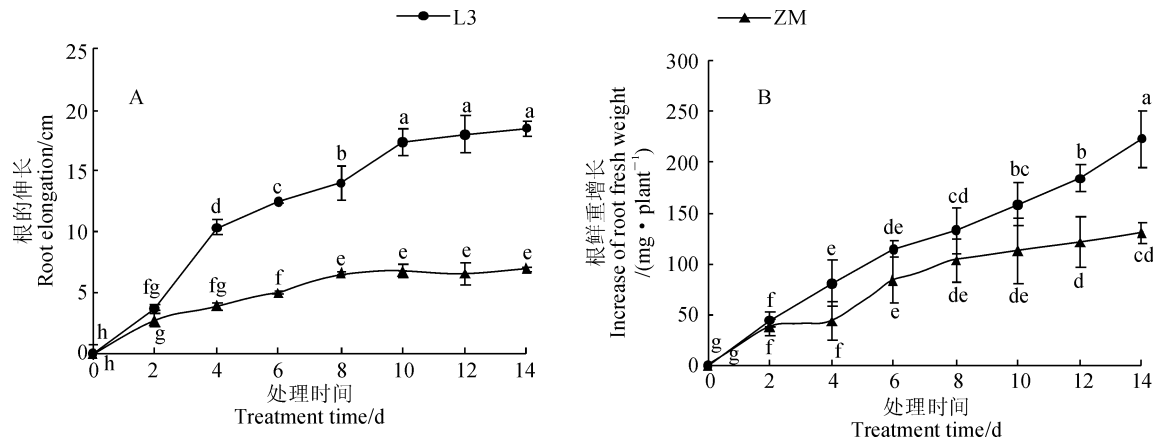
1.3 数据处理

使用 SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, U. S. A.)数据处理软件包进行方差分析和 LSD 多重比较,不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。使用 Quantity One (Bio-Rad)软件进行凝胶条带强度的定量分析。

2 结果与分析

2.1 镉胁迫对 2 个箭舌豌豆品种根系生长的影响

2 个箭舌豌豆品种 L3 和 ZM 根在 25 μmol·L⁻¹ 镉处理下的生长情况如图 1 所示。在实验记录的 1~14 d 内,ZM 主根的伸长生长量和根系鲜重增长量均始终小于 L3,品种间差异在处理 4 d 以后即达到显著水平,且这种差异表现出随着处理时间延长而逐渐增加的趋势,并以主根伸长表现得更突出,如在处理 14 d 时,品种 ZM 主根伸长量和根系鲜重增长量分别比同期 L3 显著降低 63% 和 41%。可见,



不同字母表示处理时间之间或者品种间在 0.05 水平存在显著性差异;数值为平均数±标准差;下同

图 1 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 处理下 2 个箭舌豌豆品种 L3 和 ZM 主根的伸长和根鲜重的增长

The different normal letters indicated significant difference among cultivars or treatment times at 0.05 level;Data are means±SD (n=3);
The same as below

Fig. 1 Effects of 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd treatment on root elongation and increase of root fresh weight in two *V. sativa* varieties, L3 and ZM

在中度镉胁迫条件下,镉敏感品种 ZM 根系的生长较耐镉品种 L3 受到更显著的抑制。

2.2 镉胁迫下 2 个箭舌豌豆品种根尖的膜脂过氧化和质膜损伤

使用 Schiff 试剂对镉处理 7 d 的 2 个箭舌豌豆品种根尖膜脂过氧化程度进行了组织化学检测, Schiff 试剂与膜脂过氧化产生的醛类化合物反应生成粉红色物质,结果如图 2 所示。其中,在对照(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd)条件下,2 个箭舌豌豆品种的根尖几乎观察不到粉红色;在 10~50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉处理条件下,L3 和 ZM 根尖都出现粉红色,且随镉处理浓度的增加根尖粉红色逐渐明显,显示膜脂过氧化程度逐渐加深;在相同镉处理浓度下,ZM 较 L3 根尖染色更深。说明镉胁迫下 ZM 根尖膜脂过氧化程度更严重,它受到了比 L3 更严重的氧化胁迫。

Evans blue(伊文思蓝)是非渗透性染料,若根尖能被 Evans blue 染成蓝色,说明根尖细胞对 Evans blue 通透,其质膜完整性受到破坏,且染色越深表示根尖细胞质膜损伤的程度越大。镉处理下 2 个箭舌豌豆品种根尖 Evans blue 吸收量的分析表明(图 3), 10~50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉处理 7 d 后,2 个箭舌豌豆品种根尖质膜均受到明显损伤,损伤程度随镉处理浓度的增加而显著增加;在相同镉处理浓度下,ZM 根尖的质膜损伤程度显著大于 L3。

2.3 镉胁迫对 2 个箭舌豌豆品种根系 AsA、DHA 含量和 AsA/DHA 比值的影响

表 1 结果显示,各浓度镉处理 7 d 后 2 个箭舌豌豆品种根系 AsA 和 DHA 含量都较对照(0 $\mu\text{mol} \cdot$

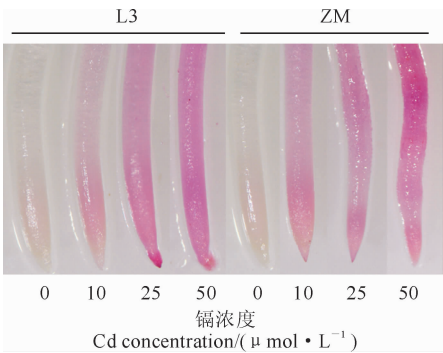


图 2 不同浓度镉胁迫下 2 个箭舌豌豆品种 L3 和 ZM 根尖膜脂过氧化的 Schiff 染色

Fig. 2 Histochemical detection of lipid peroxidation by Schiff's reagent in the root tips of two *V. sativa* varieties, L3 and ZM

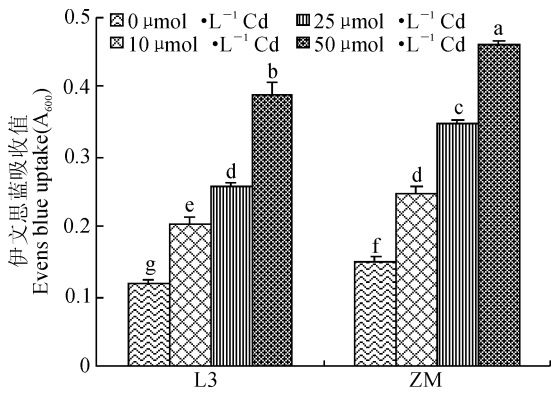


图 3 不同浓度镉对 2 个箭舌豌豆品种 L3 和 ZM 根尖伊文思蓝吸收的影响

Fig. 3 Quantitative assay of Evans blue uptake in the root tips of two *V. sativa* varieties, L3 and ZM

表 1 不同浓度镉胁迫条件下 2 个箭舌豌豆品种根系 ASA、DHA 含量和 AsA/DHA 比值

Table 1 The concentrations of AsA, DHA and the ratio of AsA/DHA in the roots of two *V. sativa* varieties L3 and ZM under Cd stress

品种 Cultivar	镉浓度 Cd concentration/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	抗坏血酸含量 AsA content ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	脱氢抗坏血酸含量 DHA content ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	抗坏血酸/ 脱氢抗坏血酸 AsA/ DHA
L3	0	0.30±0.03e	0.37±0.02c	0.83±0.12bcd
	10	0.92±0.03cd	0.53±0.13bc	1.82±0.44a
	25	1.18±0.01b	0.69±0.10b	1.72±0.24a
	50	1.63±0.19a	1.41±0.19a	1.17±0.20b
ZM	0	0.42±0.07e	0.41±0.03c	1.01±0.19bc
	10	0.83±0.02d	1.39±0.06a	0.60±0.04d
	25	0.97±0.05c	1.51±0.10a	0.65±0.07cd
	50	0.79±0.04d	1.48±0.42a	0.58±0.10d

注:结果为 3 次重复实验的平均值±标准差(n=3)
Note: Values are means±SD (n=3) of three different experiments

L⁻¹ Cd)显著升高;L3 根系的 AsA/DHA 比值较对照显著升高,而 ZM 根系的 AsA/DHA 比值较对照显著降低。在相同镉处理浓度下,L3 根系的 AsA 含量和 AsA/DHA 比值均显著大于 ZM。以上结果说明,镉胁迫下耐性品种 L3 具有较敏感品种 ZM 更强的产生 AsA 和维持氧化还原稳态的能力。

2.4 镉胁迫对 2 个箭舌豌豆品种根系 DHAR 同工酶谱的影响

对镉处理 7 d 的 2 个箭舌豌豆品种根系的可溶性蛋白提取物进行活性电泳和 DHAR 活性染色,可见 4 条 DHAR 同工酶条带(图 4)。这些同工酶的活性均随着镉处理浓度的升高而升高,其中 DHAR1 只在 L3 根系中显示,而 DHAR4 只在 ZM 根系中显示,DHAR2 和 DHAR3 在 L3 根系中的活性高于 ZM。进一步对凝胶条带强度进行定量分析的结果显示,在 10、25 和 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉处理下 L3 和 ZM 根系中 DHAR 同工酶总活性均随着镉处理浓度的升高而显著升高。在 25 和 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉处理下,L3 根系 DHAR 的总活性分别是 ZM 的 1.25 和 1.16 倍,显著高于 ZM。

2.5 镉胁迫对 2 个箭舌豌豆品种根系 APX 同工酶谱和基因表达的影响

对镉处理 7 d 的 2 个箭舌豌豆品种根系的可溶性蛋白提取物进行活性电泳和 APX 活性染色,可见 11 条 APX 同工酶条带(图 5)。其中,APX 5、6、9、10、11 条带在 2 个品种根系中均不受镉胁迫诱导;APX 1、2、4 条带在 ZM 根系中受镉胁迫的显著诱导,但在 L3 根系中不受镉胁迫的诱导;APX3 条带在 2 个品种根系均受镉胁迫诱导,但品种间无显

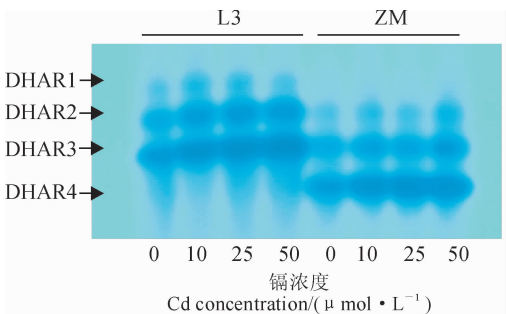


图 4 镉胁迫下两个箭舌豌豆品种 L3 和 ZM 根系 DHAR 同工酶谱

Fig. 4 Changes of DHAR isozyme profile under increasing Cd concentration in the roots of the two *V. sativa* varieties, L3 and ZM

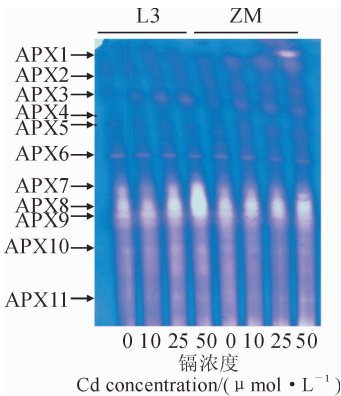


图 5 不同浓度镉胁迫下 2 个箭舌豌豆品种 L3 和 ZM 根系 APX 同工酶谱的变化

Fig. 5 Changes of APX isozyme profile under increasing Cd concentration in the roots of the two *V. sativa* varieties, L3 and ZM

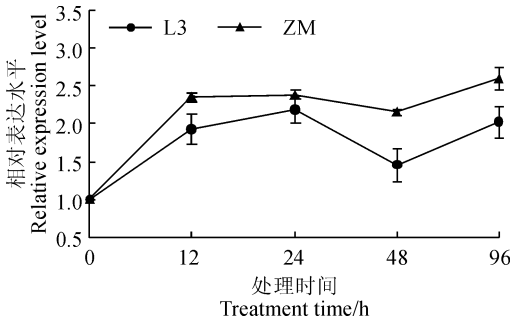


图 6 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉处理下 2 个箭舌豌豆品种 L3 和 ZM 根系 APX 基因表达的荧光定量 PCR 分析
Fig. 6 Real time RT-PCR analysis of APX gene in response to 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd treatment in the roots of two *V. sativa* varieties, L3 and ZM

著差异;APX 7、8 是 2 个主要的 APX 同工酶条带,在 2 个品种中均随着镉处理浓度的升高而升高,其中 APX 8 在 L3 根系中较 ZM 升高更显著。进一步对凝胶条带强度进行定量分析发现,10、25 和 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉处理下 L3 和 ZM 根系中 APX 同工酶总活性均较对照显著升高,在 L3 根系中分别是对照的 1.06、1.09 和 1.16 倍;在 ZM 根系中分别是对照的 1.16、1.21 和 1.26 倍;相同镉处理浓度下,L3 与 ZM 根系中 APX 的总活性没有显著差异。

同时,进一步通过荧光定量 RT-PCR 考察了镉胁迫下 2 个箭舌豌豆品种根系中 1 个细胞质 APX 基因的表达情况,发现镉胁迫诱导了这一 APX 基因的转录表达(图 6)。其中,在镉胁迫处理 12 h 时,2 个箭舌豌豆品种根系中该 APX 基因的表达已见上调,随后 APX 基因的表达水平随镉胁迫处理时间的延长保持在对照表达量的 2.0 倍左右水平,而品种间没有显著差异。

3 讨论

镉胁迫影响植物正常的生长发育^[17-18],一般镉对根的抑制较地上部严重,根的伸长对镉胁迫最敏感^[19];镉胁迫还常导致植物的氧化胁迫。本实验中,镉对箭舌豌豆品种 ZM 根生长的抑制程度显著大于品种 L3;ZM 根尖膜脂过氧化和质膜损伤程度也显著大于 L3。这些结果证明品种 ZM 对镉胁迫比 L3 更敏感。

同时,本研究中镉胁迫使 2 个箭舌豌豆品种根系 AsA 含量都显著升高,而在相同镉处理浓度下 L3 根系 AsA 含量高于 ZM,DHA 含量低于 ZM,AsA/DHA 的比值始终大于 ZM,这说明 AsA 参与

了镉胁迫下箭舌豌豆根系的抗氧化响应,L3 根系具有更强的抗氧化、保持氧化还原稳态的能力,这可能是 L3 较 ZM 具有更强镉耐性的重要原因之一。

植物体内 AsA 的水平取决于 AsA 的合成、循环、降解和转运等环节,其中 AsA 循环在植物胁迫响应中起着尤其重要的作用^[20]。AsA 氧化形成的 DHA 一方面可在 DHAR 的催化下还原为 AsA,另一方面可以自发水解成 2,3-二酮古洛酸^[21]。DHAR 催化 DHA 还原,可以减少 DHA 的分解,促进 AsA 的循环再生。本实验中 2 个箭舌豌豆品种根系共鉴定到 4 条 DHAR 同工酶带,这些同工酶的活性都随镉处理浓度的升高而显著升高,说明箭舌豌豆根系 DHAR 活性受镉胁迫的显著诱导。相同镉处理浓度下,耐性品种 L3 根系 DHAR 的总活性高于敏感品种 ZM,这可能使 L3 根系较 ZM 更有效地促进 DHA 还原为 AsA,而具有更高的 AsA 水平和 AsA/DHA 比值。Chen 等^[22]报道,在烟草和玉米叶片过表达小麦 DHAR 基因可提高 DHAR 活性,增加 AsA 含量和 AsA/DHA 比值。Yin 等^[23]报道过表达拟南芥 DHAR 基因的烟草植株 AsA 含量和 APX 活性在铝胁迫下增加,对铝的耐性提高。镉胁迫下,植物产生的 ROS 常积累于质外体^[24],因此质外体 ROS 的清除对提高植物镉耐性有重要作用。本实验前期的研究发现,镉胁迫下 2 个箭舌豌豆品种根系 ROS 主要积累于细胞壁和质外体空间^[25]。AsA 是质外体中最重要的抗氧化分子^[23]。但质外体缺乏 AsA 代谢相关酶,质外体中 AsA 氧化产生的 DHA 要通过 AsA/DHA 转运体转运过质膜,然后在共质体中由 DHAR 还原为 AsA,AsA 再转运至质外体^[26]。因此,共质体中的 DHAR 可以同时还原共质体和质外体中的 DHA 为 AsA。本实验中,耐镉品种 L3 根系较镉敏感品种 ZM 具有更高的 DHAR 活性,可以更有效地促进共质体和质外体中的 DHA 还原为 AsA,更有效地减轻镉胁迫诱导产生的氧化胁迫,从而提高 L3 对镉胁迫的耐性。目前,关于根系 DHAR 同工酶研究的报道较少,Shimaoka 等^[27]曾报道分离了菠菜叶片中占 90% DHA 还原活性的两种 DHAR 同工酶。本实验中两个箭舌豌豆品种根系 DHAR 同工酶差异显著,这些差异对它们 DHA 还原能力的影响值得今后深入研究。

AsA 抗氧化的主要途径是通过 APX 催化 AsA 与 H_2O_2 反应,将 H_2O_2 还原为 H_2O 。本实验中 2 个不同镉耐性的箭舌豌豆品种根系 APX 活性都随

镉处理浓度的升高而升高,说明 APX 活性受镉处理的诱导。高等植物中,APX 存在多种同工酶,包括胞质 APX、叶绿体基质 APX 和类囊体膜结合 APX、微体(包括乙醛酸循环体和过氧化物酶体)膜结合 APX 和线粒体膜结合 APX^[28]。本实验在 2 个箭舌豌豆品种根系中共鉴定到 11 条 APX 同工酶带,其中 APX1、2、4 只在 ZM 根系受到诱导,而活性最高的同工酶 APX8 在 L3 根系较 ZM 受到更显著的诱导。推测 2 个箭舌豌豆品种根系 APX 总活性虽然没有显著差异,但不同的 APX 同工酶受到不同程度的诱导,可能导致 2 个箭舌豌豆品种根系催化 H_2O_2 分解能力的差异。本实验中 2 个箭舌豌豆品种根系中 1 个胞质 APX 基因在镉胁迫下显著上调表达,说明 APX 活性的升高与其基因表达增加有关,镉胁迫下箭舌豌豆根系 APX 活性存在转录

水平的调控。

另外,除通过 APX 催化 H_2O_2 的分解、减轻植物的活性氧伤害,AsA 还可能通过其它过程影响植物的镉耐性。我们前期的研究发现镉胁迫下 ZM 根尖较 L3 更明显地木质化^[25],木质化过程包含 H_2O_2 参与的酚类物质的氧化,酚类物质氧化过程中会产生中间产物酚自由基,对质膜等结构造成损伤^[29]。AsA 是有效的酚自由基清除剂,L3 的镉耐性可能与其维持较高的 AsA 水平,减少了酚自由基的伤害有关。AsA 还可作为酶的辅因子对一系列重要的酶促反应起调控作用,影响植物细胞的分裂分化和伸展,AsA 还是植物细胞的信号转导分子^[30-32]。因此,AsA 还可能通过影响细胞壁木质化和木栓化过程、影响细胞分裂以及根的生长,从而影响植物的镉耐性,这些都需要今后进一步深入研究。

参考文献:

- [1] OLMOS E, MARTÍNEZ-SOLANO J R, PIQUERAS A, *et al.* Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line) [J]. *J. Exp. Bot.*, 2003, **54**(381): 291-301.
- [2] PÉREZ-CHACA M V, RODRÍGUEZ-SERRANO M, MOLINA A S, *et al.* Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in *Glycine max* (L.) roots [J]. *Plant Cell Environ.*, 2014, **37**(7): 1 672-1 687.
- [3] GARNIER L, SIMON-PLAS F, THULEAU P, *et al.* Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity [J]. *Plant Cell Environ.*, 2006, **29**(10): 1 956-1 969.
- [4] DENG X, XIA Y, HU W, *et al.* Cadmium-induced oxidative damage and protective effects of N-acetyl-L-cysteine against cadmium toxicity in *Solanum nigrum* L. [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2010, 180: 722-729.
- [5] DOMÍNGUEZ D M, GARCÍA F C, RAYA A C, *et al.* Cadmium-induced oxidative stress and the response of the antioxidative defense system in *Spartina densiflora* [J]. *Physiol. Plantarum*, 2010, **139**(3): 289-302.
- [6] CHEN Z, GALLIE D R. Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance[J]. *Plant Physiol.*, 2005, **138**(3): 1 673-1 689.
- [7] ELTAYEB A E, KAWANO N, BADAWI G H, *et al.* Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses[J]. *Planta*, 2007, **225**(5): 1 255-1 264.
- [8] BURKEY K O, EASON G, FISCUS E L. Factors that affect leaf extracellular ascorbic acid content and redox status[J]. *Physiol. Plantarum*, 2003, 117: 51-57.
- [9] SHARMA P, DUBEY R S. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum[J]. *Plant Cell Rep.*, 2007, 26: 2 027-2 038.
- [10] PARADISO A, BERARDINO R, DE PINTO M C, *et al.* Increase in ascorbate-glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants [J]. *Plant Cell Physiol.*, 2008, **49**(3): 362-374.
- [11] SCHÜTZENDÜBEL A, POLLE A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization[J]. *J. Exp. Bot.*, 2002, 53: 1 351-1 365.
- [12] YAMAMOTO Y, KOBAYASHI Y, MATSUMOTO H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots[J]. *Plant Physiol.*, 2001, **125**(1): 199-208.
- [13] KAMPFENKEL K, VANMONTAGU M, INZE D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue [J]. *Anal. Biochem.*, 1995, **225**(1): 165-167.
- [14] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the

assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, **227**(5 259): 680-685.

[15] ARAVIND P, NARASIMHA M, PRASAD V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism[J]. *Plant Physiol. Bioch.*, 2005, **43**(2): 107-116.

[16] RAO M V, PALIYATH C, ORMROD D P. Ultraviolet B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol.*, 1996, **110**(1): 125-136.

[17] MOHAMED A A, CASTAGNA A, RANIERI A, *et al.* Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis [J]. *Plant Physiol. Bioch.*, 2012, **57**: 15-22.

[18] PODAZZA G, ARIAS M, PRADO F E. Cadmium accumulation and strategies to avoid its toxicity in roots of the citrus rootstock Citrumelo[J]. *J. Hazard. Mater.*, 2012, **215**: 83-89.

[19] GUO Y T, MARSCHNER H. Uptake, distribution, and binding of cadmium and nickel in different plant species[J]. *J. Plant Nutr.*, 1995, **18**(12): 2 691-2 706.

[20] STEVENS R, PAGE D, GOUBLE B, *et al.* Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydroascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress [J]. *Plant Cell Environ.*, 2008, **31**(8): 1 086-1 096.

[21] NOCTOR G, FOYER C H. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control[J]. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1998, **49**: 249-279.

[22] CHEN Z, GALLIE D R. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling[J]. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**(6): 3 525-3 530.

[23] YIN L, WANG S, ELTAYEB A E, *et al.* Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminum stress in transgenic tobacco[J]. *Planta*, 2010, **231**(3): 609-621.

[24] QUEVAL G, HAGER J, GAKIRE B, *et al.* Why are literature data for H₂O₂ contents so variable? A discussion of potential difficulties in the quantitative assay of leaf extracts [J]. *J. Exp. Bot.*, 2008, **59**(2): 135-146.

[25] RUI H, CHEN C, ZHANG X, *et al.* Cd-induced oxidative stress and lignification in the roots of two *Vicia sativa* L. varieties with different Cd tolerances. [J]J. *Hazard. Mater.*, 2016, **301**: 304-313.

[26] HOREMANS N, FOYER C H, ASARD H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane[J]. *Trends Plant Sci.*, 2000, **5**(6): 263-267.

[27] SHIMAOKA T, YOKOTA A, MIYAKE C. Purification and characterization of chloroplast hydroascorbate reductase from Spinach leaves[J]. *Plant Cell Physiol.*, 2000, **10**: 1 110-1 118.

[28] SHIGEOKA S, ISHIKAWA T, TAMOI M, *et al.* Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes[J]. *J. Exp. Bot.*, 2002, **53**(372): 1 305-1 319.

[29] FECHT-CHRISTOFFERS M M, BRAUN H P, LEMAITRE-GUILLIER C, *et al.* Effect of manganese toxicity on the proteome of the leaf apoplast in cowpea[J]. *Plant Physiol.*, 2003, **133**(4): 1 935-1 946.

[30] PIGNOCCHI C, FOYER C H. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling[J]. *Curr Opin. Plant Bio.*, 2003, **6**(4): 379-389.

[31] GREEN M A, FRY S C. Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate[J]. *Nature*, 2005, **433**(7 021): 83-87.

[32] HOUDE M, DIALLO A. Identification of genes and pathways associated with aluminum stress and tolerance using transcriptome profiling of wheat near-isogenic lines[J]. *BMC Genomics*, 2008, **9**: 400-412.

(编辑:裴阿卫)