

青鲜素与谷胱甘肽对万寿菊镉积累的影响*

张银秋^{1,2} 台培东^{1**} 李培军¹ 吴海燕^{1,2} 方英^{1,2} 杜彦玲^{1,2} 董殿波^{1,2} 赵青^{1,2}

(¹ 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; ² 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 通过水培试验研究了细胞分裂抑制剂青鲜素(MH)对万寿菊(*Tagetes erecta* L.)生理生化指标及不同部位叶片Cd积累的影响及在MH处理下,外源喷施含硫化合物半胱氨酸(Cys)及谷胱甘肽(GSH)对万寿菊Cd积累的作用。结果表明:0.1 mg·L⁻¹ Cd溶液中添加4 mmol·L⁻¹ MH并未对万寿菊体内的丙二醛(MDA)含量、硝酸还原酶(NR)及超氧化物歧化酶(SOD)活性产生明显影响。在连续3 d对万寿菊不同部位叶片取样分析结果表明,未加MH的Cd溶液中(对照),万寿菊顶部叶片Cd含量由0.81 mg·kg⁻¹上升至4.89 mg·kg⁻¹,而中部及底部叶片Cd含量分别由0.24和0.32 mg·kg⁻¹上升至1.34和1.71 mg·kg⁻¹,说明Cd优先积累在万寿菊的顶部叶片中,即Cd主要积累于地上部的生长点;而加入MH后则显著抑制了万寿菊顶部叶中Cd积累,其顶部叶片Cd含量仅由0.28 mg·kg⁻¹上升至2.15 mg·kg⁻¹,与对照相比显著降低,中部及底部叶片Cd含量的增加与对照相比则差异不显著,表明细胞分裂与植物Cd积累存在一定的关系,旺盛的细胞分裂将促进万寿菊叶片对Cd的积累。通过喷施GSH能够逆转MH对万寿菊地上部Cd积累的抑制,而Cys则无此效果,由此可以推断GSH在植物Cd积累中起着十分重要的作用,其所参与的新陈代谢过程或自身与Cd作用促进了万寿菊地上部对Cd的积累。

关键词 镉积累; 细胞分裂; 谷胱甘肽; 生理生化指标

中图分类号 Q945.78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2010)5-0887-05

Effects of maleic hydrazide and glutathione on Cd accumulation in *Tagetes erecta* L. ZHANG Yin-qiu^{1,2}, TAI Pei-dong¹, LI Pei-jun¹, WU Hai-yan^{1,2}, FANG Ying^{1,2}, DU Yan-ling^{1,2}, DONG Dian-bo^{1,2}, ZHAO Qing^{1,2} (¹Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(5): 887–891.

Abstract: A hydroponic experiment was conducted to study the effects of cell division inhibitor maleic hydrazide (MH) on the physiological and biochemical characteristics of *Tagetes erecta* L., and the Cd accumulation in *T. erecta* leaves at different positions under the stress of 0.1 mg Cd·L⁻¹. Meanwhile, the S-containing compounds cysteine (Cys) and glutathione (GSH) were foliar-sprayed to investigate their effects on the Cd accumulation. The results showed that adding 4 mmol MH·L⁻¹ to the culture solution had no obvious effects on the malondialdehyde (MDA) content and nitrate reductase and superoxide dismutase activities of *T. erecta*. In the control (without MH addition), the Cd concentration of top part leaves in consecutive three days increased from 0.81 to 4.89 mg·kg⁻¹, while that of mid and bottom part leaves increased from 0.24 and 0.32 mg·kg⁻¹ to 1.34 and 1.71 mg·kg⁻¹, respectively, illustrating that Cd first accumulated in top part leaves, i. e., the growth point of the plant. Adding MH to the solution inhibited the Cd accumulation in top part leaves significantly ($P < 0.05$), but had less effects on the Cd accumulation in mid and bottom part leaves, compared with the control, which suggested that Cd accumulation in leaves had definite relations with cell division, in other words, exuberant cell division could promote leaf Cd accumulation. Foliar-spraying GSH alleviated the inhibitory effect of MH, while foliar-spraying Cys had less effect, suggesting that GSH participated in the metabolism of the plant, or interact with Cd, and thereby, the Cd level in plant shoots increased.

Key words: Cd accumulation; cell division; glutathione; physiological and biochemical index.

* 国家自然科学基金项目(20977095, 40930739)和中国科学院陆地生态过程重点实验室基金资助项目。

** 通讯作者 E-mail: taipedong@hotmail.com

收稿日期: 2009-10-22 接受日期: 2010-01-15

镉(Cd)是环境中最重要的重金属污染物之一,它可以通过在植物不同的组织和器官中富集而进入食物链,进而对人类的健康造成威胁(Wang *et al.*, 2008)。因此,研究Cd在不同植物以及植物的不同器官的富集机制,对控制农作物的Cd积累及利用植物修复Cd污染土壤有着极为重要的意义(Uraguchi *et al.*, 2009)。

植物进化出不同的生理机制来抵御Cd胁迫。例如通过细胞壁的固定从而避免大量的Cd进入细胞质;与其他物质结合(植物螯合素等)钝化Cd的生物毒性等。而金属络合机制作为植物对Cd的重要耐性机制而被广泛研究(Aina *et al.*, 2007)。Cd可以与植物体内的多种物质络合,如各种有机酸(柠檬酸等)、富含巯基类物质(植物螯合素等)等。大量研究表明,植物Cd积累不受植物蒸腾速率和光合速率的影响,而仅受植物的生长速率的影响(Lu *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2009; 张银秋等, 2010),尤其与其体内的含硫物质的代谢有着密切的关系(Feng *et al.*, 2009)。

本试验通过对万寿菊施加细胞分裂抑制剂——青鲜素(MH)以及喷施含硫化合物(半胱氨酸Cys、谷胱甘肽GSH),研究万寿菊(*Tagetes erecta* L.)对Cd的吸收机制,为植物吸收Cd的生理学研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试植物万寿菊种子购于沈阳农业大学。

1.2 研究方法

1.2.1 万寿菊种子的培养 种子经2% H_2O_2 消毒10 min后,用去离子水冲洗,播种于装有蛭石的盆中,发芽后以Hoagland营养液浇灌,待长出2~4片真叶后选取长势一致的苗移入容积为400 ml的陶瓷罐中,每罐1株,装300 ml营养液,于光照培养箱(光暗周期16 h/8 h,光照强度 $350 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 25 °C,相对湿度75%)中培养,培养期间每3 d更换1次营养液,待长至3~4 g(鲜质量)时选取长势一致植株用于进一步处理。

1.2.2 青鲜素对万寿菊生理生化指标的影响 分空白+Cd(对照组)、青鲜素+Cd(处理组)2组处理,每组3个重复。Cd以 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 的形式加入

营养液中,浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,青鲜素浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培养3 d后取根、茎、叶测其鲜质量并及时用于丙二醛、硝酸还原酶及超氧化物歧化酶指标分析。

1.2.3 青鲜素对万寿菊不同部位叶片Cd含量的影响 取空白+Cd、青鲜素+Cd 2组处理,每组3个重复,所加药品浓度同1.2.2。共处理3 d,期间每天取样1次,连续取样3 d,将万寿菊叶片分顶部叶(L-1),中部叶(L-2)及底部叶(L-3)取样并测其鲜质量,所得不同部位叶片用于Cd含量分析。

1.2.4 含硫物质对万寿菊Cd含量的影响 另取3批相同处理,即每批为空白+Cd、青鲜素+Cd 2组,每组3个重复,所加药品浓度同1.2.2。3批处理分别喷施半胱氨酸、谷胱甘肽及蒸馏水,其中半胱氨酸、谷胱甘肽浓度为 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。处理3 d后取其根、茎、叶测其鲜质量并用于Cd含量分析。

1.3 分析方法

样品经 $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ 混合(4:1, V/V)消解后,用火焰原子吸收分光光度计测定Cd含量(Chaoui *et al.*, 1997);采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定丙二醛(MDA)(Heath & Packer, 1968);采用氮蓝四唑(NBT)光还原法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性(Krivosheeva *et al.*, 1996),以SOD抑制NBT光还原相对百分率为50%的酶量作为一个酶活力单位(U);硝酸还原酶活性采用 α -萘胺比色法测定(王韶唐, 1986)。

1.4 数据处理

采用Excel和SPSS 11.5软件对数据进行平均值计算和单因素方差分析,采用最小显著差异法(LSD)进行比较($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 青鲜素对万寿菊生长的影响

图1表明, $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的MH对 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd条件下万寿菊各器官的含水量、叶片、茎中和根部的丙二醛含量、硝酸还原酶及SOD活性,均未产生显著性影响。

2.2 青鲜素对万寿菊Cd积累的影响

从图2可以看出,单独Cd处理条件下(对照),万寿菊叶片中Cd含量随着Cd处理时间延长而增加,且顶部叶片Cd含量始终保持较高水平。第1天

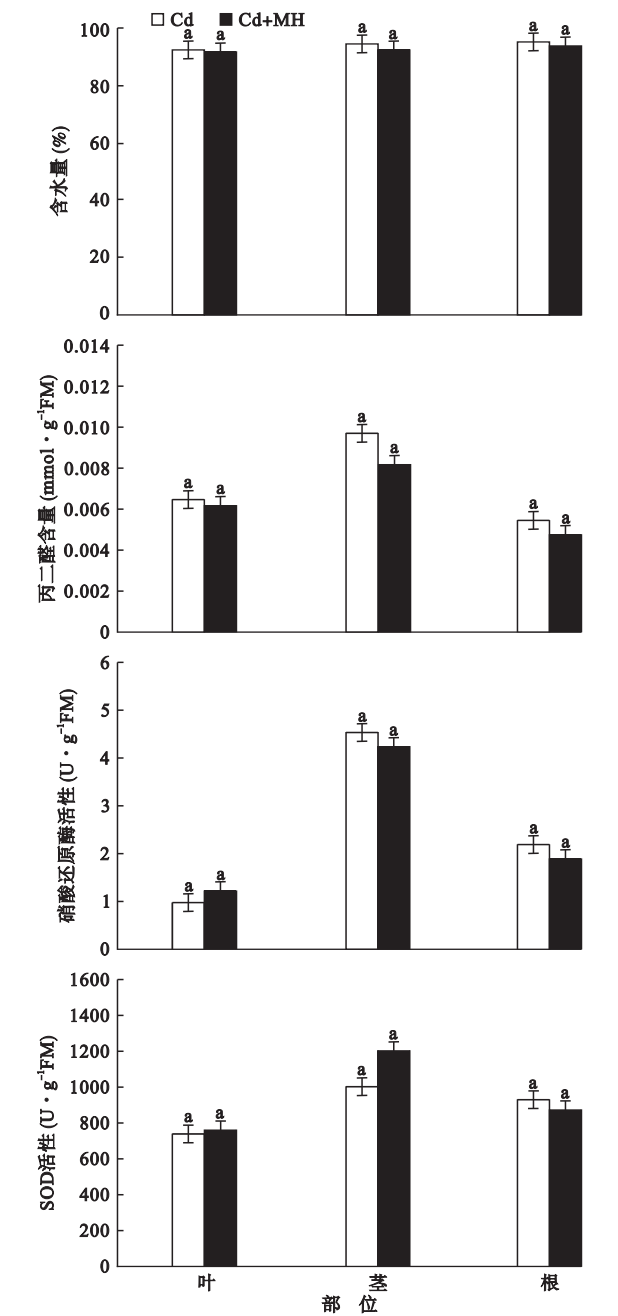


图1 MH对0.1 mg · L⁻¹ Cd处理下万寿菊各指标的影响
Fig.1 Effect of MH on different indices of *Tagetes erecta* L. in 0.1 mg · L⁻¹ Cd solution
数据为平均值±标准差;相同字母代表处理和对照之间差异不显著。

万寿菊顶部叶片 Cd 含量为 0.81 mg · kg⁻¹,第 2、3 天其含量则分别上升了 1.5 和 6 倍左右,达到 1.21 和 4.89 mg · kg⁻¹,与第 1 天相比较差异显著 ($P<0.05$);而中部和底部叶片 Cd 含量较顶部叶片含量较低,第 1 天中部和底部叶片 Cd 含量为 0.24 和 0.32 mg · kg⁻¹,第 2、3 天则分别上升至 0.42、0.52 和 1.34、1.71 mg · kg⁻¹。在含 Cd 营养液中施加

MH 后,第 1 天万寿菊顶部叶片 Cd 含量为 0.28 mg · kg⁻¹,与对照相比显著下降 ($P<0.05$),并且随着时间的增加 MH 处理下万寿菊顶部叶片 Cd 含量与对照相比一直保持较低水平,仅由 0.28 mg · kg⁻¹ 上升至 2.15 mg · kg⁻¹,而中部及底部叶片 Cd 含量则较对照变化不明显。

2.3 外施含硫化化合物对青鲜素处理下万寿菊镉吸收的影响

叶面喷施含硫化化合物半胱氨酸 (Cys) 及谷胱甘肽 (GSH) 对 MH 处理下万寿菊各部位 Cd 含量产生一定的影响 (图 3)。MH 处理下,喷施 Cys 的植株叶片 Cd 含量较未喷施的变化不明显,根、茎中 Cd 含量与喷施 H₂O 的植株相比差异不显著。与喷施 Cys 有所不同,喷施 GSH 后万寿菊叶片中 Cd 含量明显回升,基本达到未施加 MH (对照) 时叶片 Cd 含量水平,而根、茎中 Cd 含量变化不明显。

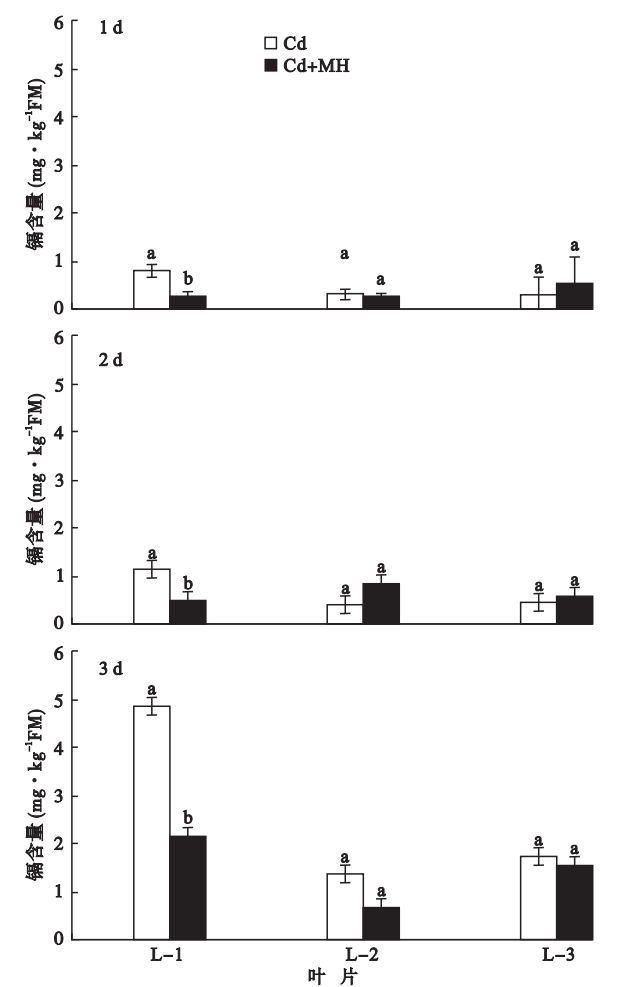


图2 MH处理下万寿菊不同部位叶片镉含量随时间的变化
Fig.2 Effect of MH on Cd content in leaves at different position on the stem of *Tagetes erecta* L. with increasing exposure period

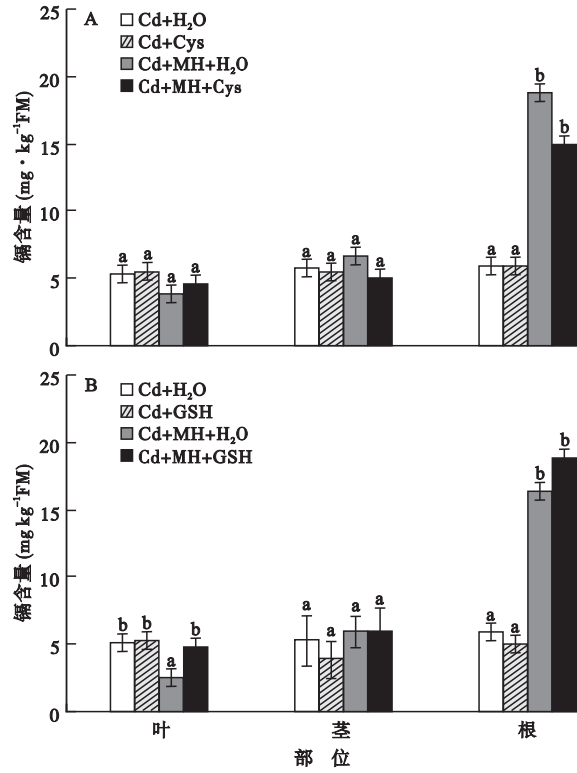


图 3 外源喷施 Cys (A) 与 GSH (B) 对 MH 处理下万寿菊各部位 Cd 含量的影响
Fig. 3 Effect of Cys (A) and GSH (B) on Cd content in different parts of *Tagetes erecta* L. exposed to MH in mg · L⁻¹ Cd solution

3 讨论

青鲜素为农业上广泛使用的植物生长抑制剂,研究表明其在植物体内可以被输送至分裂组织打破有丝分裂进而抑制植物的生长 (Ito *et al.*, 2001),近年来,青鲜素又被作为染色体断裂剂而用于科学研究 (Panda *et al.*, 1997)。有研究表明,将不同浓度的 MH 加入含 Cd 营养液中,可以明显降低万寿菊的相对生长速率及地上部 Cd 含量,万寿菊叶片中可溶性蛋白含量也有所降低 (张银秋等, 2010),表明万寿菊地上部镉积累与万寿菊的生长速率之间存在一定的联系。但 MH 对 0.1 mg · L⁻¹ Cd 处理下万寿菊其他生理生化指标是否产生影响尚未清楚,因此,本试验进一步研究了特定浓度 MH 对 0.1 mg · L⁻¹ Cd 处理下万寿菊生理生化指标的影响。由图 1 万寿菊各部分含水量的变化可以看出,所用浓度的 MH 并没有显著影响到万寿菊的水分代谢。当植物受到逆境胁迫时,体内会产生大量的活性氧、自由基,使植物体的结构及功能受损,而丙二醛则是膜质过氧化的重要产物之一,因此被用作膜质过氧化损

伤的指标 (Sun *et al.*, 2007)。同时, SOD 作为植物体内重要的抗氧化防御酶之一,其含量的变化反映了植物体内活性氧对组织细胞的伤害程度 (Aravind & Prasad, 2003)。本试验中, 4 mmol · L⁻¹ 的 MH 并未使万寿菊体内的 MDA 含量大量增加 (图 1),说明万寿菊各组织细胞内的质膜并未受到损害。另外,万寿菊体内尤其叶片中 SOD 含量较对照无显著差异,也说明了万寿菊体内的氧代谢并未受到 MH 显著影响 (图 1)。而万寿菊叶片中硝酸还原酶活性也未受到 MH 显著影响 (图 1),表明 MH 处理下万寿菊对氮的同化能力未发生变化。总之, 4 mmol · L⁻¹ 的 MH 并未对万寿菊主要生理生化指产生显著的影响 (图 1),说明此浓度 MH 未对 0.1 mg · L⁻¹ Cd 处理下万寿菊产生明显的毒害作用。

植物对 Cd 的吸收、转运及积累随着植物种类的不同而有所差异,目前对于植物积累重金属的生理学机制尚未清楚。Salt 等 (1995) 通过对印度芥菜地上部 Cd 积累的研究发现, Cd 主要积累于印度芥菜的幼叶部位。本研究结果与前者一致,即万寿菊顶部叶片 (幼叶) 中 Cd 含量远远超过中部及底部叶片,并且这种差异随着处理时间的延长而显著增加 (图 2)。通过施加细胞分裂抑制剂 MH 后,万寿菊顶部叶片 Cd 积累很快受到抑制,而中部及底部叶片受到的影响较弱,其原因可能是由于万寿菊的分生组织细胞分裂受到抑制后,植物的生长发育受到影响,进而影响到顶部叶片对 Cd 的积累,而中部与底部叶片由于自身细胞分裂程度较弱,并未受到 MH 的显著影响,因而对 Cd 的积累并未发生显著变化。而 MH 处理时间对万寿菊不同部位叶片 Cd 积累的影响也可得出相似的结论。另外, MH 处理对万寿菊根部 Cd 含量的影响与叶片中相反,即 MH 显著增加了根部 Cd 含量的积累 (图 3),有研究表明,植物根部吸收 Cd 与地上部 Cd 积累是 2 个相互独立的过程 (Salt *et al.*, 1995),因此 MH 处理下万寿菊根部 Cd 含量的变化可能是由于其根部特殊的生理代谢机制所导致。

硫作为植物生长的必需元素在植物生长发育及抵抗 Cd 毒害的过程中发挥着重要的作用 (王云等, 2008)。植物体内 Cd 诱导所产生的植物螯合素 (PCs)、金属硫蛋白 (MTs) 等均为富含硫的化合物。而合成植物螯合素的前体物质 Cys、GSH 则为植物体内硫的主要存在形式并参与蛋白质合成等重要的植物生长代谢过程 (Rauser *et al.*, 1991)。本试验

中, MH 通过抑制万寿菊分生组织的细胞分裂而影响到万寿菊叶片当中 Cd 的累积, 但通过叶面喷施 Cys、GSH 后, 万寿菊地上部尤其是叶片中 Cd 积累受到了不同的影响; 喷施 GSH 对 MH 处理下万寿菊叶片中的镉含量起到了显著的逆转作用, 而 Cys 的作用则不明显(图 3), 说明 GSH 对万寿菊地上部 Cd 积累起到一定的促进作用。GSH 在植物的生长发育及逆境胁迫中起着十分重要的作用。一方面, GSH 是植物体内还原性硫的主要储藏库以及有机硫运输的主要形式(Buwalda *et al.*, 1990), 其可通过韧皮部输送至植物的生长点以供植物生长需要(Bergmann & Rennenberg, 1993); 另一方面, GSH 作为植物螯合素的合成前体物质, 在植物重金属积累方面也起着举足轻重的作用(Zhu *et al.*, 1999)。因此, 本试验中通过施加 GSH 减缓了 MH 对万寿菊叶片 Cd 积累的抑制作用, 其原因一方面可能由于 GSH 在某种程度上可以促进植物生长点的生长代谢, 从而抵消了一部分 MH 对细胞分裂的抑制效应, 使植物的生长代谢得以恢复进而促进了万寿菊叶片对 Cd 的积累; 另一方面也可能由于 GSH 本身与 Cd 作用也对万寿菊 Cd 积累起到一定的促进作用。

综上所述, 在 MH 未使万寿菊显著受害的情况下, 其可通过抑制万寿菊分生组织的细胞分裂进而抑制万寿菊地上部的 Cd 积累, 说明万寿菊的 Cd 积累与其生长代谢程度有一定的关系; 而含硫化合物(GSH)在某种程度上可以逆转 MH 对万寿菊 Cd 积累的影响, 表明硫代谢对植物 Cd 积累起着重要的作用。但究竟哪些关键硫代谢过程影响着植物 Cd 积累, 还需进一步研究。

参考文献

王 云, 张海军, 唐为忠, 等. 2008. 硫对镉胁迫下小麦幼苗生长和一些生理特性的影响. 农业环境科学学报, **27** (3): 1029–1032

王韶唐. 1986. 植物生理学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社.

张银秋, 台崇帆, 李培军, 等. 2010. 植物生长抑制剂对万寿菊镉积累和化学形态的影响. 农业环境科学学报, **29** (2): 258–263

Aina R, Labra M, Fumagalli P, *et al.* 2007. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environmental and Experimental Botany*, **59**: 381–392.

Aravind P, Prasad MNV. 2003. Zinc alleviates cadmium induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: A free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**: 391–397.

Bergmann L, Rennenberg H. 1993. Glutathione metabolism in plants// DeKok LJ, Stulen I, Rennenberg H, eds. Sul-

phur Nutrition and Sulphur Assimilation in Higher Plants: Regulatory and Environmental Aspects. The Hague: SPB Academic Publishing; 109–123.

Buwalda F, Stulen I, de Kok LJ, *et al.* 1990. Cysteine, γ -glutamylcysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. II. Glutathione accumulation in detached leaves exposed to H_2S in the absence of light is stimulated by the supply of glycine to the petiole. *Physiologia Plantarum*, **80**: 196–204.

Chaoui A, Ghorbal MH, El Ferjani E. 1997. Effects of cadmium-zinc interactions on hydroponically grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, **126**: 21–28.

Feng Q, Tai PD, Li PJ, *et al.* 2009. The role of sulfur in cadmium accumulation of marigold plant. *Journal of Plant Nutrition*, **32**: 919–928.

Heath RL, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **125**: 189–198.

Ito A, Hayama H, Kashimura Y, *et al.* 2001. Effect of maleic hydrazide on endogenous cytokinin contents in lateral buds, and its possible role in flower bud formation on the Japanese pear shoot. *Scientia Horticulturae*, **87**: 199–205.

Krivoshcheva A, Tao DL, Ottander C, *et al.* 1996. Cold acclimation and photoinhibition of photosynthesis in Scots pine. *Planta*, **200**: 296–305.

Lu L, Tian S, Yang X, *et al.* 2009. Cadmium uptake and xylem loading are active processes in the hyperaccumulator, *Sedum alfredii*. *Journal of Plant Physiology*, **166**: 579–587.

Panda KK, Patra J, Panda BB. 1997. Persistence of cadmium-induced adaptive response to genotoxicity of maleic hydrazide and methyl mercuric chloride in root meristem cells of *Allium cepa* L.: Differential inhibition by cycloheximide and buthionine sulfoximine. *Mutation Research*, **389**: 129–139.

Rausser WE, Schupp R, Rennenberg H. 1991. Cysteine, γ -glutamylcysteine, and glutathione levels in maize seedlings. *Plant Physiology*, **97**: 128–138.

Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, *et al.* 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiology*, **109**: 1427–1433.

Sun RL, Zhou QX, Sun FH, *et al.* 2007. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Environmental and Experimental Botany*, **60**: 468–476.

Uraguchi S, Kiyono M, Sakamoto T, *et al.* 2009. Contributions of apoplasmic cadmium accumulation, antioxidative enzymes and induction of phytochelatins in cadmium tolerance of the cadmium-accumulating cultivar of black oat (*Avena strigosa* Schreb.). *Planta*, **230**: 267–276.

Wang L, Zhou QX, Ding LL, *et al.* 2008. Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Journal of Hazardous Materials*, **154**: 818–825.

Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Jouanin L, *et al.* 1999. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiology*, **119**: 73–79.

作者简介 张银秋, 女, 1980 年生, 博士研究生。主要从事植物重金属积累方面研究。E-mail: zhangyq992003@yahoo.com.cn

责任编辑 魏中青