

镉对玉米幼苗活性氧代谢、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其基因表达的影响

赵士诚¹, 孙静文¹, 马有志², 汪洪¹, 梁国庆¹, 周卫¹

(¹中国农业科学院农业资源与农业区划研究所/农业部植物营养与养分循环重点开放实验室, 北京 100081;

²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】研究镉胁迫对玉米 (*Zea Mays*) 幼苗活性氧代谢, 超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性及其基因表达的影响。【方法】用营养液培养的方法研究了不同镉浓度 (0、5、20 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和处理时间 (12、24、48、96 和 168 h) 下玉米幼苗内活性氧代谢、SOD 和 CAT 活性及其基因表达的变化。【结果】镉处理后植株内超氧自由基 (O_2^-) 产生速率迅速升高, 24 h (叶) 或 48 h (根) 后又逐步下降; H_2O_2 随镉浓度和处理时间的增加而大量积累。镉处理的植物 SOD 活性开始随镉浓度升高, 48 h 后被消耗和抑制逐步下降, 但后期 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的活性仍显著高于其它处理; CAT 活性除叶中 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理被抑制降低外均被诱导, 开始随镉浓度升高, 随后随镉浓度和胁迫时间逐步下降。镉诱导的 SOD 基因表达与其活性变化相似, 而 CAT 基因表达随镉浓度和处理时间逐步增强, 说明在玉米幼苗内镉通过抑制 SOD 的基因转录抑制其活性, 而对 CAT, 镉胁迫导致其产生了翻译后蛋白修饰。【结论】镉处理诱导了玉米幼苗内活性氧产生、SOD 和 CAT 的活性及基因表达增加, 随胁迫的加剧, SOD 和 CAT 的活性和 SOD 表达被抑制, CAT 则产生转录后或翻译后修饰。

关键词: 镉; 玉米; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶; 基因表达

Effects of Cadmium on Reactive Oxygen Species Metabolism, Activities and Gene Expressions of Superoxide Dismutase and Catalase in Maize (*Zea Mays*) Seedling

ZHAO Shi-cheng¹, SUN Jing-wen¹, MA You-zhi², WANG Hong¹, LIANG Guo-qing¹, ZHOU Wei¹

(¹Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Plant Nutrition and Nutrient Cycling Research, Ministry of Agriculture, Beijing 100081; ²Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: 【Objective】The aim of this experiment was to examine the effects of cadmium stress on the metabolism of reactive oxygen species (ROS), the activities and the gene expressions of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in maize (*Zea Mays*) plants. 【Method】Maize seedlings were treated with 0, 5, 20 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd for periods of 12 to 168 h under hydroponic condition. 【Result】The results showed that the generation rate of superoxide radical (O_2^-) was increased at first with Cd stress, then decreased in leaves and roots after 24 h and 48 h Cd exposure respectively. The levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) rose with the increasing cadmium concentration and the prolonged Cd exposure time. SOD activities in plants were enhanced by 12 h and 24 h Cd exposure. Moreover, higher SOD activities in leaves and roots were observed under higher Cd concentrations. The expressions of genes encoding SOD showed the same trends as SOD activities in plants exposed to Cd, indicating that Cd affected SOD function in gene transcription level in maize plants. CAT activities in plants were increased with 5-20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd treatments, but decreased under 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd exposure. CAT gene expressions in leaves increased with Cd concentration and exposure time,

收稿日期: 2007-11-07; 接受日期: 2008-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471003) 和国家重点基础发展规划项目 (2002CB410809)

作者简介: 赵士诚 (1975-), 男, 河南永城人, 博士研究生, 研究方向为植物营养生理。Tel: 010-62122416; E-mail: zhaosc402@sohu.com。通讯作者周卫 (1966-), 男, 江西湖口人, 研究员, 研究方向为植物营养生理。Tel: 010-82108671; E-mail: wzhou@caas.ac.cn

suggesting that Cd caused post-translation modification of CAT protein. 【Conclusion】 The ROS generation in maize seedlings was induced by Cd stress, which might result in the changes of antioxidant enzymes such as SOD and CAT in their activities and corresponding gene expressions.

Key words: Cadmium; Maize; Superoxide dismutase; Catalase; Gene expression

0 引言

【研究意义】镉 (Cd) 是在空气、水和土壤中已发现的最毒的污染物之一, 且对动、植物都是非必需的元素。高浓度的镉能干扰植物的光合作用, 抑制呼吸作用, 影响营养元素的吸收、运输及代谢, 从而影响植物的生长发育; 同时镉能引起活性氧 (ROS) 产生、导致氧化胁迫并干扰抗氧化系统^[1,2]。研究重金属胁迫下植物氧化代谢变化及分子机理是了解重金属毒害机理和提高植物对重金属毒害耐性的关键。【前人研究进展】镉是非还原型重金属, 不能参加 Fenton 反应, 但通过干扰 PSI 和 PSII 途径中的电子传递链、抗氧化防卫机制等, 能引起活性氧的产生, 如超氧自由基 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2) 等, 这些活性氧能很快与蛋白质、膜脂、DNA 碱基等反应致使细胞受损害甚至死亡^[3-6]。植物为适应环境正常生长, 一方面通过螯合素络合、液泡隔离和细胞壁固定等降低镉的毒害^[7], 同时也形成了不同的活性氧清除机制, 包括酶清除系统和非酶清除系统, 其中超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 是酶清除系统中两个重要的组分, 在活性氧清除中起着关键的作用。SOD 包括定位于细胞质、细胞核、过氧化物体和叶绿体中的 Cu/Zn-SOD、叶绿体中的 Fe-SOD (不是所有植物中都存在) 和线粒体及过氧化物体中的 Mn-SOD, 其中 Cu/Zn-SOD 是含量最丰富的一种, 且前两者受氧化胁迫的调节^[8,9]。SOD 能将 O_2^- 歧化成 H_2O_2 和 O_2 , 是生物体内活性氧清除的第一道防线, 而 CAT 又可将 H_2O_2 催化分解为 H_2O 和 O_2 , CAT 主要存在于植物过氧化物酶体与乙醛酸循环体中, 可清除在光呼吸及脂肪酸 β -氧化过程中产生的 H_2O_2 , 也可以无需外加底物在过氧化物体中将 H_2O_2 分解成 H_2O 和 O_2 ^[10]。【本研究切入点】镉胁迫下植物体内活性氧产生及活性氧清除酶活性的变化已有大量报道^[4,6,7,11], 但对镉胁迫下的抗氧化酶的基因表达信息研究较少, 其中少数对于抗氧化酶分子水平的研究仅限于加与不加镉处理。【拟解决的关键问题】本研究拟以玉米为试材综合研究不同镉浓度 (5、20 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 及不同处理时间 (12、24、48、96 和 168 h) 下叶片和根系的活性氧代谢, SOD 和 CAT

的活性和基因表达变化, 为深入了解植物适应镉毒害的生理和分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养

参照汪洪等^[12]所用的培养方法, 将精选的玉米种子 (农大 108) 用 10% 的 H_2O_2 浸泡消毒 30 min, 用去离子水漂洗并浸泡过夜, 然后放入垫有湿滤纸的白磁盘中, 上盖湿纱布放入恒温箱中催芽 (28℃, 75% 的相对湿度), 两天后挑选生长一致的芽, 放入酸洗过的石英砂中在光照培养箱中生长, 温度和光周期分别为 28℃/25℃ 和 14 h/10 h (白天/黑夜), 75% 的相对湿度, 白天光照强度为 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。挑选生长一致的两叶期幼苗移入营养液, 在光照培养箱中继续生长 (条件同上), 营养液组成 ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): K_2SO_4 0.75, KH_2PO_4 0.25, KCl 0.1, $Ca(NO_3)_2$ 2.0, $MgSO_4$ 0.6, Fe-EDTA 4.0×10^{-3} , H_3BO_3 1.0×10^{-3} , $MnSO_4$ 1.0×10^{-3} , $ZnSO_4$ 1.0×10^{-3} , $CuSO_4$ 1.0×10^{-4} , $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 5.0×10^{-6} 。营养液每隔 2 d 换 1 次并持续通气, 第 3 片叶全展开后加入镉 ($CdSO_4$), 供镉浓度分别为 0、5、20 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 分别用 Cd0、Cd5、Cd20 和 Cd100 表示。各处理分别于加镉后 12、24、48、96 和 168 h 分根系和叶片取样, 样品经去离子水冲洗后液氮速冻放入 -80℃ 冰箱保存以供分析用。

1.2 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量的测定

O_2^- 产生速率的测定按照王爱国等^[13]的羟胺氧化法, H_2O_2 含量的测定按照 Gay 等^[14]的方法, 用丙酮浸提, 钛试剂比色测定。

1.3 SOD 和 CAT 活性的测定

称取 1.0 g 去脉样品, 加入 5 ml 预冷的 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液 (pH 7.8, 含 0.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 EDTA 和 2% 的 PVP) 研磨, 匀浆物 15 000 \times g 4℃ 离心 10 min, 取上清液测定酶活性和蛋白含量。SOD 活性按照 Giannopolitis 等^[15]的比色方法测定, 以抑制 NBT 还原的 50% 为一个酶活单位。CAT 活性按照 Aebi^[16]的方法测定, 反应液包括 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液 (pH 7.0), 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 和酶提取液, 在 240 nm 连续测定 H_2O_2 分解 3 min。

酶液蛋白含量的测定按照 Bradford^[17]的方法, 以 BSA 为标准蛋白质。

1.4 SOD和 CAT基因的克隆

玉米叶片中总 RNA 的提取用 Trizol 试剂 (天根公司), 取提取的总 RNA 2 μg 用 AMV 以 Oligo (dT) 为下游引物进行反转录, 具体方法参照 Takara 公司反转录试剂盒说明书。根据 GENE BANK 中已发表的玉米中 *Cu/Zn-SOD* (注册号: X17565) 和 *CAT* (注册号: X12538) 基因序列设计特异引物克隆基因, 引物分别为 *Cu/Zn-SOD*: P1 5'-TGTC AAGGCACAATCTTCTTC-3', P2 5'-CGATGTC TTCGGGATGTTATTC-3'; *CAT*: P1 5'-GTGCCACCACAATAACCAC-3', P2 5'-TTCCGT CAACTTCTCTTCGTT-3', PCR 反应参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 反应中所使用的各种试剂购自 Takara 公司。PCR 产物电泳回收后与 pMD18-T 连接后转化 *E.Coli-DH5 α* , 对转化后的菌液进行 PCR 鉴定, 具体方法参照《分子克隆试验指南》^[18], 鉴定后的 PCR 产物由上海生工测序, 用 BLAST 程序对核苷酸序列查询比对, 所得序列用 DNAMAN 软件分析, 正确序列用做杂交探针。

1.5 Northern 杂交

将 30 μg 总 RNA 甲醛变性电泳分离后转到尼龙膜上, 以 α -³²P-dCTP 标记纯化的 PCR 产物为探针, 进行 Northern 杂交, 具体方法参照《分子克隆试验指

南》^[18]。

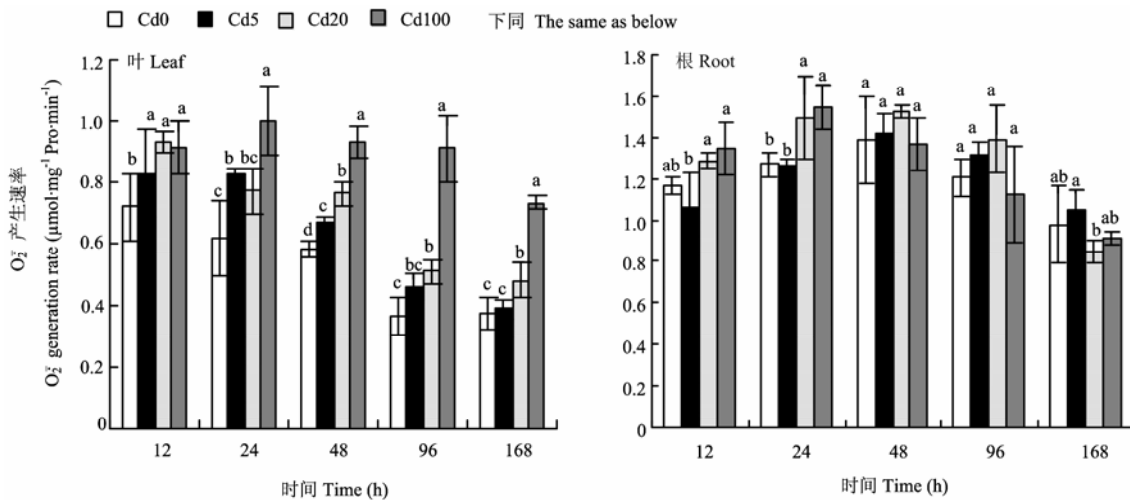
1.6 数据分析

试验中每个处理设 3 个重复, 取平均值做分析用, 数据处理分析用 SPSS11.5 中的 ANOVA, 用 LSD 检验并进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同镉处理对 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量的影响

为评价镉对玉米幼苗造成的氧化胁迫, 测定了植株的 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量。营养液加镉 12 h 后, 叶中的 O_2^- 产生速率均较对照显著增加, 但镉处理浓度超过 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后开始降低; 5 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理在 24 h 达最高, 此后也逐步下降, 但 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的降低速度远低于其它处理, 且后期的产生速率远高于其它处理。在根中, O_2^- 产生速率除 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理在 12 h 低于对照外, 均随镉浓度和处理时间增加, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理在 24 h 后开始下降, 而 5 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理在 48 h 达最高, 此后开始逐步下降, 后期 20 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理低于对照 (图 1)。对 H_2O_2 含量, 在叶中 12 h 后均较对照增加, 但到 24 h 又有所降低, 此后又随镉浓度和处理时间的增加而逐步升高; 在根中从 12~24 h 各处理间的含量变化不大, 24 h 后所有镉处理的 H_2O_2 含量随镉浓度和处理时间逐步升高, 168 h 后分别较对照增加了 73.5%、86.8% 和 158.2% (图 2)。



方柱上不同字母表示差异达 5% 显著水平。下同
Different letters above the square column indicate significant different at 5% level. The same as below

图 1 不同镉处理对玉米幼苗 O_2^- 产生速率的影响

Fig. 1 Effects of different Cd treatments on O_2^- generation rate of maize seedlings

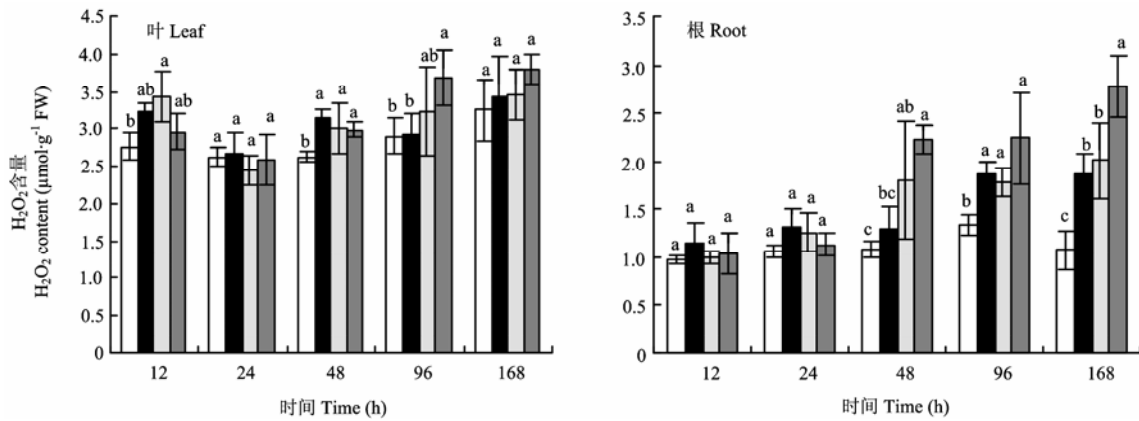


图 2 不同镉处理对玉米幼苗 H_2O_2 含量的影响

Fig. 2 Effects of different Cd treatments on H_2O_2 content of maize seedlings

2.2 不同镉处理对 SOD 和 CAT 活性的影响

SOD 可以清除细胞内产生的 O_2^- 。营养液加镉后, 20 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理叶中的 SOD 活性均随镉浓度和处理时间增加, 但 48 h 后开始下降, 到 168 h 又有所升高, 而 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的活性 24 h 后已开始下降, 且在试验中一直低于两高镉处理; 在根中 20 和

$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的 SOD 活性开始也同样增加, 但处理间差异不显著, 分别在 48 和 24 h 达最高, 此后开始逐步下降, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的 SOD 活性在试验中一直呈下降趋势且低于对照。在整个试验中叶和根中的 SOD 活性一直是 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 $> 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 $> 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 (图 3)。

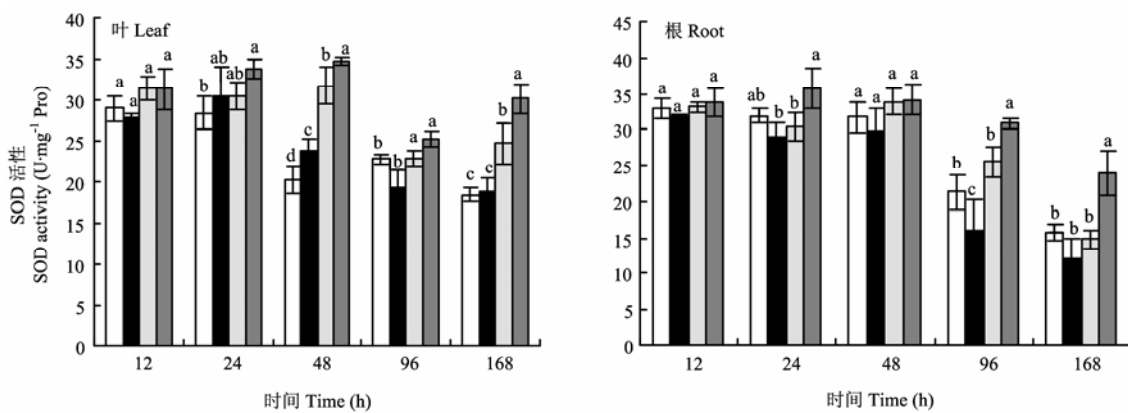


图 3 不同镉处理对玉米幼苗 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effects of different Cd treatments on SOD activity of maize seedlings

CAT 能催化分解 H_2O_2 。加镉处理后, 5 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理叶中的 CAT 活性受诱导显著增加, 但 12 h 后开始下降, 而 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的活性则开始就被抑制且低于对照; 在根中 3 个镉处理的 CAT 活性均被诱导, 与镉浓度和处理时间成正比并显著升高, 且增幅远高于叶中, 但 24 h 也开始下降, 且高镉处理 ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 下降的更快, 但所有镉处理的活

性在试验中一直高于对照 (图 4)。

2.3 不同处理对玉米叶片 SOD 和 CAT 表达的影响

在植物体内, 由于 Cu/Zn-SOD 是 SOD 同工酶中含量最多的一种且受逆境胁迫诱导影响, 笔者根据玉米的 *Cu/Zn-SOD* 基因序列设计特异引物, 以反转录产物为模板, 用 RT-PCR 方法克隆基因, PCR 产物电泳凝胶回收测序后得到一条长 501 bp 的基因片段, 对比

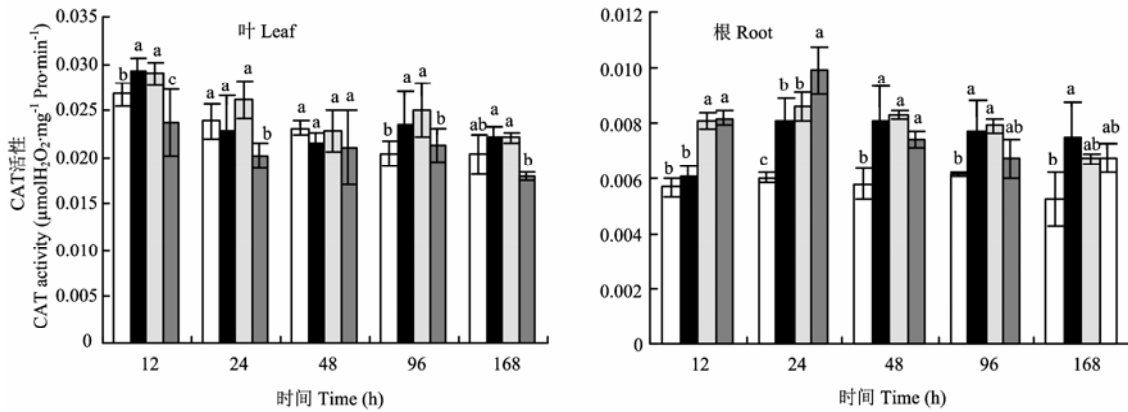


图 4 不同镉处理对玉米幼苗 CAT 活性的影响

Fig. 4 Effects of differernt Cd treatments on CAT activity of maize seedlings

结果表明为玉米 *Cu/Zn-SOD* 序列的一部分。用同样的方法得到一条长 728 bp 的 CAT 序列片段, 结果表明为玉米 CAT 序列的 3'端。

SOD 和 *CAT* 的 Northern 杂交结果如图 5 示, 加镉处理后 *Cu/Zn-SOD* 表达均被诱导较对照增加, 其中以 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的最高, 此后各处理表达量继续增加, 但在 48 h 各处理间表达量基本一致, 到 96 和 168 h 除 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理仍保持较高的表达量外, 其余处理均明显下降。对 *CAT*, 镉处理 12 h 后, 20 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的表达量较对照显著增加, 但在 24 h 却均出现降低, 此后各处理均随处理时间又持续增加, 168 h $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理降低, 而 20 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理仍保持较高的表达量。各处理泳道中出现 3 条带说明 *CAT* 存在 3 个同工酶, 且均受镉胁迫诱导表达。

3 讨论

在本研究中, 营养液加镉后, 玉米幼苗的 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量都表现增加, 说明镉对玉米造成了氧化胁迫。在正常生长的植物体内, 活性氧的产生和清除处于动态平衡,

活性氧并不积累, 当遇外界胁迫后平衡被打破, 造成活性氧的积累。镉胁迫下植物体内活性氧大量产生、积累已有不少报道^[4,5,19]。本研究中 20 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理植株的 *SOD* 活性均较对照升高, 其中 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理增加高于 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理(图 3), 所有镉处理根系和 5 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理叶片 *CAT* 活性开始也升高, 而以根中增加较多(图 4), 说明

镉胁迫产生的活性氧作为第二信使诱导了植物体内抗氧化酶的活性升高, 高浓度的镉诱导的 *SOD* 活性也较高, 对氧化胁迫作出二次防御^[20]。*SOD* 是植株内活性氧清除的第一道防线, 能通过歧化反应清除 O_2^- 。植株 *SOD* 活性增加后, O_2^- 被大量清除, 所以 O_2^- 产生速率从 48 h 开始降低。尽管 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的 *SOD* 活性同期高于两低镉处理, 但叶中 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的 O_2^- 产生速率仍远高于两低镉处理, 可能是因为持续、高浓度的镉胁迫产生的 O_2^- 超过了 *SOD* 的清除能力, 造成 O_2^- 的大量积累。Dixit 等^[7]认为镉先接触到根系并通过根系进入植株, 所以根系先产生氧化信号, 其 O_2^- 产生速率开始高于叶片, 此后尽管根系镉含量高于叶中, 但由于大部分的镉被运进液泡隔离或在质外体细胞壁等形成复合物固定, 细胞内自由 Cd^{2+} 浓度较低, 而镉的毒害主要由自由 Cd^{2+} 产生; 镉被运输到叶片后, 由于叶片对镉的络合固定能力低于根系, 自由 Cd^{2+} 浓度较高, 叶中又存在较多的叶绿体、线粒体和过氧化物体等活性氧产生器官, 这也是后期根中 O_2^- 产生速率降低, 而叶中仍较高及同期叶中 H_2O_2 含量高于根系的原因之一。对于 O_2^- 产生速率的变化, Shamin 等^[21]在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理 20 d 的水稻根和茎中, 刘云国等^[22]在 125 和 $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理 4 d 的萝卜苗中也得到类似的结果。*CAT* 能分解清除 H_2O_2 , 所以在 0~24 h 除叶中 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理外 H_2O_2 含量均较对照不显著。随着镉诱使的氧化胁迫持续存在并逐步加剧, 同时 O_2^- 被大量歧化成 H_2O_2 , 48 h 后植物体内的 H_2O_2 开始大量积累(图 2、图 4), 植株内的 *SOD* 和 *CAT* 也因为清除不断产生的活性氧大量消耗和被抑制活性

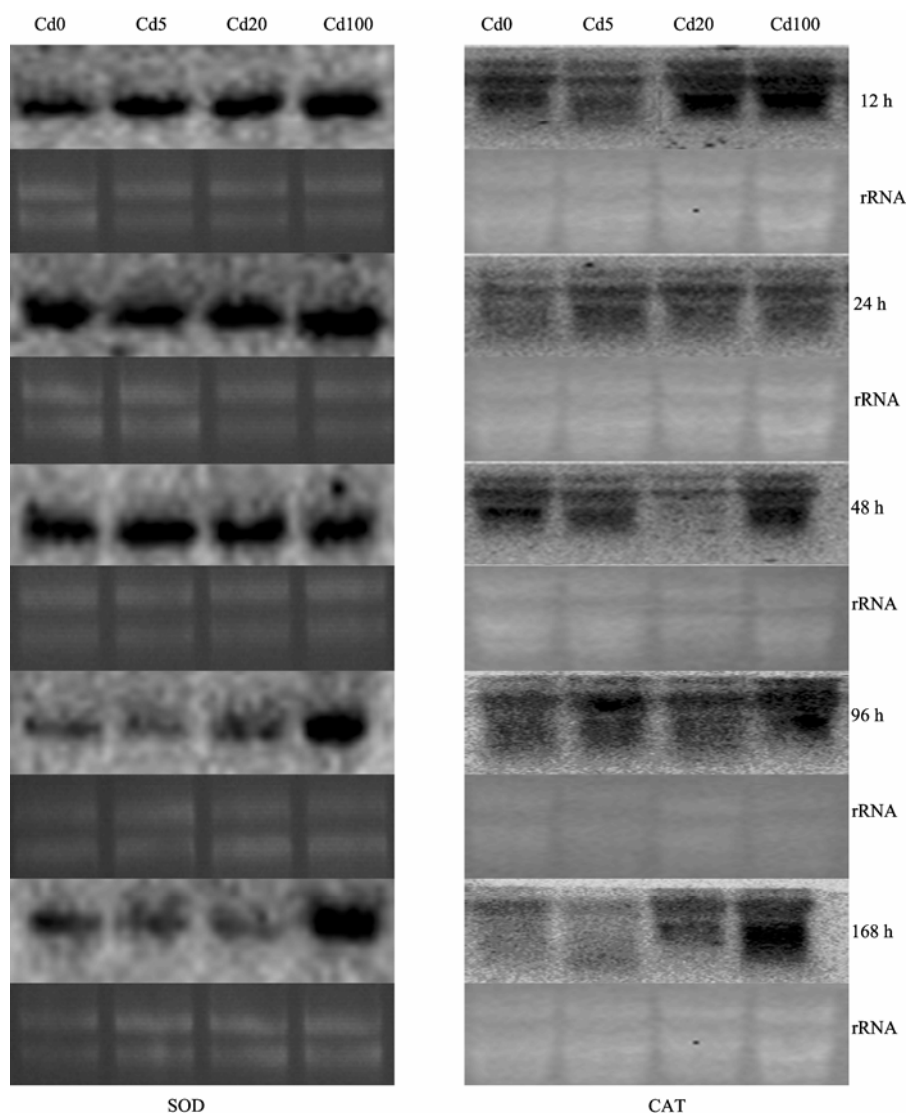


图 5 不同镉处理对玉米幼苗 *SOD* 和 *CAT* 基因表达的影响

Fig. 5 Effects of different Cd treatments on gene expressions of *SOD* and *CAT* of maize seedlings

逐步降低。研究中叶片 *CAT* 活性为同期根系的 3~4 倍，虽然在高浓度活性氧的抑制下出现降低， $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的 *CAT* 活性由于胁迫严重在 12 h 就开始下降，但对 H_2O_2 的清除能力还是强于根系，所以 48 h 后，叶片 H_2O_2 的增加速率低于根中。对于镉胁迫下 H_2O_2 积累、*SOD* 和 *CAT* 活性的变化，类似结果在用镉处理的豌豆幼苗、苏格兰松根、拟南芥和小麦^[7,23~25]中也有报道。本试验中 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理植株中的 *SOD* 活性大部分时间低于对照和两高镉处理，说明正常环境下的镉浓度对植物造成的轻微氧化胁迫不足以引起 *SOD* 防御机制的形成。

抗氧化酶对活性氧的清除能力是在其基因转录成

mRNA 再表达成蛋白质，并形成一定的空间结构后才表现出的。本研究中 Northern 杂交结果表明，营养液加镉后，玉米叶片 *Cu/Zn-SOD* 的表达被诱导升高，96 h 后 5 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的基因转录被抑制开始降低，而 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的表达量仍较高，这与叶片 *SOD* 活性的变化趋势相似（图 3、图 5）。叶片 *CAT* 活性在镉处理后开始增加，从 24 h 开始逐步降低，而其基因转录水平在 24 h 后虽有所降低，但从 48 h 又继续增加，168 h 后 20 和 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的表达仍保持较高水平（图 5）。Romero-Puertasa 等^[2]用 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理豌豆幼苗 14 d 后发现叶片 *Cu/Zn-SOD* 活性、基因转录水平和蛋白含量均较对照下降；而

CAT 的活性和蛋白含量较对照下降, 但转录水平却随处理时间升高, 这试验也支持我们的结果, 说明镉胁迫下植物对 SOD 功能的调控通过转录水平进行, 镉通过抑制 *Cu/Zn-SOD* 基因的转录抑制其酶活性; 但对 CAT, 镉胁迫导致了其基因翻译后蛋白的氧化修饰。同时 Romero-Puertas 等^[26]研究镉处理下 CAT 蛋白的氧化修饰也表明, 氧化的 CAT 蛋白可能是特异的过氧化物体氧化蛋白酶的攻击目标, 这也是镉胁迫下 CAT 活性降低的一个原因。

4 结论

镉胁迫后玉米幼苗内 O_2^- 产生速率开始升高, 然后又逐步下降; H_2O_2 随镉处理浓度和处理时间的增加而大量积累。SOD 活性开始被镉诱导升高, 48 h 后被消耗和抑制逐步下降, 但后期 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理的活性仍显著高于其它处理。CAT 活性除 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理叶中开始就降低外均被诱导升高, 然后随镉浓度和处理时间逐步下降。镉胁迫下玉米对 *Cu/Zn-SOD* 功能通过基因转录水平调控, 而对 CAT 则是通过转录后或翻译后蛋白氧化修饰。

References

- [1] Pereira G J G, Molina S M G, Lea P J, Azevedo R A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant Soil*, 2002, 239: 123-132.
- [2] Romero-Puertas M C, Corpas F J, Rodriguez-Serrano M, Gomez M, del Rio L A. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 164: 1346-1357.
- [3] Sandalio L M, Dalurzo H C, Gomez M, Romero-Puertas M C, del Rio L A. Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experiment Botany*, 2001, 52: 2115-2126.
- [4] Romero-Puertas M C, Rodriguez-Serrano M, Corpas F J, Gomez M, del Rio L A, Sandalio L M. Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves. *Plant, Cell and Environment*, 2004, 27: 1122-1134.
- [5] Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semane B, Hoet P, Laere A V, Vangronsveld J. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43: 437-444.
- [6] Wu F B, Zhang G P. Four barley genotypes respond differently to cadmium: liquid peroxidation and activity of antioxidant capacity. *Environment and Experiment Botany*, 2003, 50: 67-78.
- [7] Dixit V, Pandey V, Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.cv. Azad). *Journal of Experiment Botany*, 2001, 52: 1101-1109.
- [8] Kliebenstein P J, Monde R A, Last R L. Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate Regulation and protein localization. *Plant Physiology*, 1998, 118: 637-650.
- [9] Corpas F J, Fernandez-Ocana A, Carreras A, Valderrama R. The expression of different superoxide dismutase forms is cell-type dependent in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Cell Physiology*, 2006, 47(7): 984-994.
- [10] Foyer C H, Descourvieres P, Kunert K J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, 1994, 17: 507-523.
- [11] Zhang H Y, Jiang Y N, He Z Y, Ma M. Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162: 977-984.
- [12] 汪洪, 周卫, 林葆. 钙对镉胁迫下玉米生长及生理特性的影响. *植物营养与肥料学报*, 2001, 7(1): 78-87.
Wang H, Zhou W, Lin B. Effects of Ca on growth and some physiological characteristics of maize under Cd stress. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2001, 7(1): 78-87. (in Chinese)
- [13] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系. *植物生理学通讯*, 1990, (6): 55-57.
Wang A G, Luo G H. Quantificational relation of superoxide radical and hydroxylamine of plant. *Plant Physiology Communications*, 1990, (6): 55-57. (in Chinese)
- [14] Gay C, Gebicki J M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochemistry*, 2000, 284: 217-220.
- [15] Giannopolitis C N, Roes S K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in high plants. *Plant Physiology*, 1977, 59: 309-314.
- [16] Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzyme*, 1984, 105: 121-126.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-259.
- [18] J. 萨姆布鲁克, D.W. 拉塞尔著, 黄培堂译. 分子克隆(第三版). 北京: 科学出版社, 2002.
Sambrook J, Russell D W. Huang P T translation. *Molecular Cloning* (3th edit). Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [19] Rodriguea-serrano M, Romero-Puertas M, Zabalza A, Corpas F J, Gomez M, del Rio L A, Sandalio L M. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive

- oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant, Cell and Environment*, 2006, 29: 1532-1544.
- [20] Sagi M, Fluhr R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*, 2006, 141: 336-340.
- [21] Shah K, Kumar R G, Verma S, Dubey R S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 2001, 161: 1135-1144.
- [22] 刘云国, 汤春芳, 曾光明, 徐卫华, 李程峰. 镉诱导萝卜幼苗活性氧产生、脂质过氧化和抗氧化酶活性的变化. *广西植物*, 2005, 25(2): 164-168.
- Liu Y G, Tang C F, Zeng G M, Xu W H, Li C H. Cadmium-induced superoxide anion generation, lipid peroxidation and changes of antioxidant enzyme activities in radish seedlings. *Guihaia*, 25(2): 164-168. (in Chinese)
- [23] Schutzendube A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heysen R, Godbold D L, Polle A. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiology*, 2001, 127: 887-898.
- [24] Cho U H, Seo N H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*, 2005, 168: 113-120.
- [25] Zhao Z Q, Kneer R, Zhu Y G, Smith S E. Alleviating effect of Zn on Cd toxicity- induced oxidative stress in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 2005, 28(11): 1947-1959.
- [26] Romero-Puertas M C, Palma J M, Gomez M, Rio LAD, Sandalio L M. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell and Environment*, 2002, 25: 677-686.

(责任编辑 郭银巧)