

铜、镉毒害对番茄生长和膜功能蛋白酶活性的影响及外源 NO 的缓解效应

崔秀敏, 吴小宾, 李晓云, 李絮花*

(山东农业大学资源与环境学院, 山东泰安 271018)

摘要: 为探讨外源 NO(SNP 为供体)对 50 $\mu\text{mol/L}$ 铜、镉毒害的缓解效应,采用营养液培养方法,研究了不同程度的铜、镉毒害(5 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$)对番茄幼苗生物量、根系活力、硝酸还原酶、光合特性及生物膜 ATPase、 H^+ -PPase 等功能蛋白酶活性的影响。结果表明,铜、镉胁迫显著抑制番茄生长。随处理浓度增加,番茄根系活力、硝酸还原酶活性显著降低,番茄长势越差;铜、镉胁迫对根系离子吸收的影响远远大于叶片,尤其是铜胁迫,50 $\mu\text{mol/L}$ 铜胁迫使番茄根系铜含量增加了 12 倍。铜浓度的增加对镉含量无影响,镉浓度的增加降低了铜的吸收。铜、镉胁迫使番茄净光合速率(Pn)、气孔导度(Gs)和蒸腾速率(Tr)显著降低,胞间 CO_2 浓度(Ci)显著增加,表现为非气孔限制。50 $\mu\text{mol/L}$ 铜、镉处理显著降低叶片、根系质膜 H^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase 和根系液泡膜 H^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase 和 H^+ -PPase 活性;提高了 5 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 部分处理叶片液泡膜 H^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase 和 H^+ -PPase 的活性。表明生物膜功能蛋白对不同程度铜、镉胁迫的响应时间和部位存在差异。铜毒害对细胞质膜 ATPase 的影响较大,而镉毒害对液泡膜伤害的程度较大。100 $\mu\text{mol/L}$ SNP 可以显著缓解铜、镉胁迫导致的番茄生长受抑,铜、镉总吸收量显著高于胁迫处理。

关键词: 番茄; 铜胁迫; 镉胁迫; 酶活性; 一氧化氮

中图分类号: S641.2; Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X (2011)02-0349-09

Responses of growth, functional enzyme activity in biomembrane of tomato seedlings to excessive copper, cadmium and the alleviating effect of exogenous nitric oxide

CUI Xiu-min, WU Xiao-bin, LI Xiao-yun, LI Xu-hua*

(College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: The effects of the toxicity of copper, cadmium (5 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$) on tomato seedlings growth and physiological and biochemical characteristics were investigated, using nutrient solution culture in greenhouse in this study. The testing indices included copper and cadmium contents, root activity, nitrate reductase activity, photosynthetic characteristics, ATPase and H^+ -PPase activities in biomembrane. The alleviating effect of exogenous nitric oxide under copper, cadmium stress was also discussed preliminarily. The results showed that copper, cadmium stress significantly restrained tomato growth. With the increase of stress degree, root activity and nitrate reductase activity declined dramatically, and the appearance of plant turned into worse. The copper, cadmium stress had a more severe effect on ion adsorption in roots than in leaves, particularly for copper. Copper stress at 50 $\mu\text{mol/L}$ increased copper content by 12 times in tomato roots, but had no effect on cadmium content. The cadmium stress reduced copper absorption. The copper, cadmium stress dramatically decreased net photosynthetic rate (Pn), transpiration rate (Tr), and stomatal conductance (Gs), while enhanced the intercellular CO_2 concentration (Ci).

收稿日期: 2010-05-14

接受日期: 2010-10-14

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(BS2009HZ016)资助。

作者简介: 崔秀敏(1977—),女,山东茌平人,博士,副教授,主要从事植物逆境营养机理调控研究。E-mail: xiumincui@sdau.edu.cn

* 通讯作者 E-mail: lixh@sdau.edu.cn

The copper, cadmium stress (50 $\mu\text{mol/L}$) also remarkably depressed the activities of H^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase in plasma membrane of leaves and roots, and the activities of H^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase and H^+ -PPase in root vacuolar membrane, indicating the response time and location of function protein of biological membrane to copper and cadmium stress varied with stress levels. Copper toxicity damaged more on the plasma membrane, while cadmium toxicity injured more on vacuolar membrane. Addition of 100 $\mu\text{mol/L}$ SNP (a NO donor) could significantly alleviate the inhibitory effects induced by excessive copper, cadmium, and increased the total absorption of copper and cadmium.

Key words: tomato; copper stress; cadmium stress; photosynthesis; ATPase activity; nitric oxide (NO)

铜(Cu)是植物生长发育所必需的微量元素,是多酚氧化酶、细胞色素氧化酶及抗坏血酸氧化酶等多种酶的组成成分,参与植物的光合作用、呼吸作用等许多过程,在植物的新陈代谢过程中起着重要的作用;然而过量的Cu会对植物产生毒害作用^[1]。镉(Cd)是植物非必需元素,能干扰植物的光合作用,增加质膜透性从而影响植物对营养元素的吸收和积累^[2];因其具有较高的移动性和毒性,被视为是对人类最具威胁的重金属之一。此外,植物中积累的Cd还可通过食物链进入人体,给人类健康带来潜在危害。随着农业生产上含重金属有机肥、化肥等的大量施用,菜田土壤受到重金属Cu、Cd的污染越来越重^[3-6]。

NO广泛存在于植物组织中,参与植物对各种非生物胁迫的调节。据报道,NO能缓解盐胁迫对黄瓜、水稻、小麦和玉米的伤害作用^[7-10];通过诱导气孔关闭和增强根细胞质膜内向 K^+ 通道的活性等提高小麦的抗旱性^[11-12];缓解Cd胁迫对玉米、水稻、向日葵的伤害^[13-15],以及缓解缺Fe对玉米的伤害^[16]。然而,目前关于Cu、Cd毒害对细胞微域(包括质膜和液泡膜等)功能蛋白酶活性的研究较少,而对于外源NO对重金属的缓解效应的研究只处于初步探索阶段^[17-18]。因此,探讨番茄铜、镉毒害及其解毒机理对于蔬菜的安全生产具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方 法

1.1 试验设计

试验在山东农业大学温室内进行。番茄品种为“玫瑰”(Lycopersicon esculentum Mill. cv. Meigui)。种子经55℃温汤浸种消毒15 min,然后在润湿的吸水纸上26℃催芽。种子露白后,播于洗净的蛭石中,萌发后用1/4 Hoagland营养液浇灌。当幼苗具有3~4片真叶时,挑选生长一致的植株洗净根部蛭石后,移栽于5 L塑料盆中,用厚度为3 cm的泡

沫塑料板做成楔形盖子,覆盖在塑料盆顶部。每盆栽5株,用1/2 Hoagland营养液栽培。1周后换成完全营养液,此后每3 d更换一次营养液,电动气泵24 h连续通气。

番茄植株具有6片真叶时进行处理。由于高浓度的硫酸铜在营养液中容易产生絮状沉淀(前期试验结果),因此,参考前人的报道,本试验铜、镉胁迫采用 CuCl_2 和 CdCl_2 。在其它元素不变的情况下,试验设:1)Hoagland正常营养液;2)Hoagland正常营养液添加 CuCl_2 使 Cu^{2+} 浓度为5 $\mu\text{mol/L}$;3)Hoagland正常营养液添加 CuCl_2 使 Cu^{2+} 浓度为50 $\mu\text{mol/L}$;4)Hoagland正常营养液添加 CdCl_2 使 Cd^{2+} 浓度为5 $\mu\text{mol/L}$;5)Hoagland正常营养液添加 CdCl_2 使 Cd^{2+} 浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 共5个处理,分别用CK,Cu1,Cu2,Cd1,Cd2表示。

另外,设置外源NO对铜、镉毒害(50 $\mu\text{mol/L}$)的缓解试验。以SNP为外源NO的供体,Cu、Cd添加方式同上。试验处理如下:1)Hoagland正常营养液;2)50 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 ;3)50 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ SNP;4)50 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ NaNO_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ NaNO_3 ;5)50 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$;6)50 $\mu\text{mol/L}$ CuCl_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ SNP + 0.1% Hb(牛血红蛋白)。分别用CK,Cu,Cu+S,Cu+N,Cu+F,Cu+S+H表示,相应的镉处理分别用CK,Cd,Cd+S,Cd+N,Cd+F,Cd+S+H表示。

以上每个处理3次重复,温室内随机排列。处理期间每隔2 d更换1次营养液,用低浓度KOH或HCl调节pH达 5 ± 0.2 。温室内光照约12 h,白天最高温度32℃,夜间最低温度15℃。处理8 d后,测定光合作用,然后一次性取样,调查生长势,部分样品称重后液氮速冻,-80℃保存,用于酶活性及含水量测定;部分样品烘干用于矿质元素测定。

1.2 测定项目与方法

根系活力、硝酸还原酶及光合参数测定^[19]:根

系活力测定采用 TTC 法;硝酸还原酶活性的测定采用活体法;光合参数用 CIRAS-1 便携式光合系统(英国 PP-systems 公司产)测定,光强为 800 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

ATPase 等酶活性的测定:质膜和液泡膜微囊的提取参考于丙军^[20]和 Kasamo^[21]的方法;质膜 H^+ -ATPase(P-H⁺-ATPase)和 Ca^{2+} -ATPase(P-Ca²⁺-ATPase)活性参照郝鲁宁和余叔文^[22]的方法测定;液泡膜 H^+ -ATPase(V-H⁺-ATPase)、 Ca^{2+} -ATPase(V-Ca²⁺-ATPase)、液泡膜 H^+ -PPase(V-H⁺-PPase)活性参照何龙飞^[23]的方法测定。详细步骤参见文献[18]。

试验数据采用 Microsoft Excel 进行统计分析及绘图,用 SAS 统计软件对平均数用 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的铜、镉处理对番茄幼苗生长势的影响

5、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Cu、Cd 处理均显著降低番茄生物量及株高,地上部和根重鲜重和株高均显著低于对照(表 1)。胁迫离子浓度越高,对生长的抑制作用越大。表现出植株矮小、生长缓慢、心叶黄化,有典型的毒害症状,但均能维持基本的生长。一旦 Cu、Cd 毒害解除,番茄植株仍能够逐渐恢复正常生长。

表 1 铜、镉胁迫对番茄幼苗生长势的影响
Table 1 Effects of Cu, Cd stress on growth of tomato seedlings

处理 Treat.	地上部 Shoot wt. (g/pot, FW)	根重 Root wt. (g/pot, FW)	株高 Plant height (cm)
CK	24.55 ± 1.58 a	9.52 ± 0.93 a	20.51 ± 1.43 a
Cu1	18.61 ± 2.17 b	7.96 ± 1.06 b	16.25 ± 1.12 b
Cu2	13.87 ± 1.07 c	5.07 ± 0.72 c	11.77 ± 1.29 c
Cd1	19.13 ± 2.14 b	7.65 ± 0.69 b	17.38 ± 1.40 b
Cd2	14.29 ± 2.83 c	4.82 ± 0.65 c	12.79 ± 1.07 c

注(Note): 同列不同字母表示差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant at 5% level.

2.2 不同浓度的铜、镉胁迫对番茄幼苗铜、镉含量的影响

不同浓度 Cu 胁迫处理时,番茄叶片和根系 Cu 含量均显著高于对照,尤其是根系。表 2 看出,5、50

$\mu\text{mol}/\text{L}$ Cu 胁迫处理植株 Cu 含量分别比对照提高了 6 和 12 倍。Cu 浓度越高,对根长和根尖的生长抑制作用越重,根系变褐色,不断有根系死亡。Cu 胁迫处理的植株未检测到 Cd。5、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Cd 处理均显著提高番茄叶片和根系 Cd 含量,且浓度越高,番茄吸收 Cd 越多。不同浓度 Cd 胁迫对根系 Cd 含量的影响大于叶片,对 Cu 含量的影响不显著。Cd 是非必需营养元素,相对于 Cu,番茄对 Cd 的吸收明显较低;但即使叶片中 Cd 含量仅 2 ~ 3 mg/kg,也会严重抑制植株生长。

表 2 铜、镉胁迫对番茄幼苗铜、镉含量的影响(mg/kg, DW)

Table 2 Effects of Cu, Cd stress on the Cu, Cd contents in tomato seedlings

处理 Treat.	叶片 Leaf		根系 Root	
	Cu	Cd	Cu	Cd
CK	14.78 ± 3.23 c		55.39 ± 6.27 c	
Cu1	20.53 ± 2.67 b		387.54 ± 1.58 b	
Cu2	29.85 ± 1.58 a		713.96 ± 1.58 a	
Cd1	11.29 ± 2.19 c	2.17 ± 0.59 b	62.75 ± 4.55 c	7.59 ± 0.72 b
Cd2	9.76 ± 2.35 c	3.85 ± 0.44 a	58.39 ± 3.91 c	12.88 ± 0.46 a

注(Note): 同列数据后不同字母表示差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant at 5% level.

2.3 不同浓度的铜、镉对番茄幼苗根系活力和硝酸还原酶活性的影响

根系活力反映了植物根系的生长发育状况。重金属胁迫条件下,随着铜、镉处理浓度的增加,番茄的根系活力受到明显的影响。图 1 看出,5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Cu 处理时,番茄的根系活力显著下降;而 Cd 浓度达到 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时才受到显著影响,而且 Cu 处理根系活力下降幅度更大。

硝酸还原酶(NR)是高等植物氮素同化的限速酶,可直接调节硝酸盐还原,从而调节氮代谢,并影响到光合碳代谢。图 1 显示,随着 Cu 处理浓度的增加,番茄叶片 NR 活性不断下降,在 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理时,显著低于对照。在 Cd 浓度为 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 处理时, NR 活性有所升高;随着浓度增大,活性受到抑制,但相对于 Cu 处理下降幅度较小。

2.4 不同浓度的铜、镉对番茄幼苗光合特性的影响

由表 3 可见,铜、镉胁迫下,番茄的净光合速率、气孔导度随着处理浓度的增加明显下降,当 Cu、Cd 浓度为 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时与对照相比达到显著水平;在 Cu、Cd 胁迫下,蒸腾速率明显降低,50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Cu 处

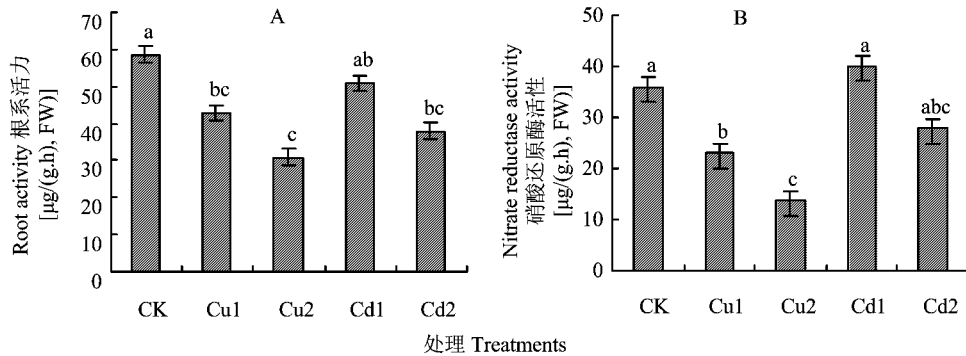


图1 铜、镉胁迫对番茄幼苗根系活力(A)与叶片硝酸还原酶(B)活性的影响

Fig. 1 Effect of Cu and Cd on the root activity (A) and nitrate reductase activity of the leaves (B) in tomato seedlings

[注(Notes): 柱上不同字母表示差异达5%显著水平 Different letters above the bars mean significant at 5% level.]

表3 铜、镉胁迫对番茄幼苗叶片光合参数的影响

Table 3 Effect of Cu, Cd stress on the photosynthetic parameters of tomato seedlings

处理 Treatments	光合速率 Pn [µmol/(m ² ·s)]	蒸腾速率 Tr [mmol/(m ² ·s)]	气孔导度 Gs [mmol/(m ² ·s)]	胞间 CO ₂ 浓度 Ci (µmol/mol)
CK	12.80 ± 2.42 a	5.63 ± 0.92 a	163 ± 8.08 a	218 ± 14.43 a
Cu1	8.90 ± 1.85 ab	4.11 ± 0.79 ab	135 ± 22.52 ab	256 ± 17.89 ab
Cu2	4.70 ± 0.35 b	2.57 ± 0.85 b	88 ± 20.79 b	287 ± 28.86 b
Cd1	9.20 ± 1.56 ab	3.70 ± 0.67 ab	138 ± 15.59 ab	243 ± 13.86 ab
Cd2	6.80 ± 1.21 b	3.19 ± 0.74 ab	103 ± 11.43 b	283 ± 15.10 b

注(Notes): 同列数据后不同字母表示差异达5%显著水平 Values followed by different letters in a column are significant at 5% level.

理下降幅度更显著;而胞间 CO₂ 浓度,在 Cu、Cd 胁迫下不断上升,50 µmol/L 处理显著高于对照。

2.5 不同浓度的 Cu、Cd 对番茄幼苗叶片和根系质膜 H⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活性的影响

Cu、Cd 处理对质膜 H⁺-ATPase 活性的影响不同。图 2 表明,5 µmol/L 的 Cu 处理对叶片和根系质膜 H⁺-ATPase 活性无明显影响,50 µmol/L Cu 处理使叶片和根系质膜 H⁺-ATPase 活性下降,达显著水平。50 µmol/L 的 Cd 处理使叶片质膜 H⁺-ATPase 活性下降,根系质膜 H⁺-ATPase 活性也明显下降,但均未达到显著水平,与 Cu 处理相比下降幅度较小。与 H⁺-ATPase 活性变化趋势相似,5 µmol/L 的 Cu、Cd 处理对叶片和根系质膜 Ca²⁺-ATPase 活性无显著影响;50 µmol/L 的 Cu 处理使叶片和根系质膜 Ca²⁺-ATPase 活性显著下降,而 50 µmol/L 的 Cd 处理仅有叶片质膜 Ca²⁺-ATPase 活性显著下降。

2.6 不同浓度的铜、镉对番茄幼苗液泡膜 H⁺-ATPase 和 Ca²⁺-ATPase 活性的影响

图 3 看出,对于液泡膜 H⁺-ATPase,5 µmol/L 的 Cu、Cd 处理对叶片和根系 H⁺-ATPase 活性影响

不显著。50 µmol/L 的 Cu 处理使叶片液泡膜 H⁺-ATPase 活性显著上升,但抑制根系液泡膜 H⁺-ATPase 活性;50 µmol/L 的 Cd 处理对叶片液泡膜 H⁺-ATPase 活性影响不显著,而使根系液泡膜 H⁺-ATPase 活性显著受到抑制,且与 Cu 处理相比受抑制较大。叶片液泡膜 Ca²⁺-ATPase 活性与叶片液泡膜 H⁺-ATPase 变化趋势相似,Cu、Cd 胁迫下根系液泡膜 Ca²⁺-ATPase 均明显下降,Cd 处理比 Cu 处理下降幅度更大,并达到显著水平。

2.7 不同浓度的铜、镉对番茄幼苗液泡膜 H⁺-PPase 活性的影响

5 µmol/L 的 Cu 处理对叶片和根系液泡膜 H⁺-PPase 活性影响不显著,而 5 µmol/L 的 Cd 处理显著降低根系 H⁺-PPase 的活性。50 µmol/L 的 Cu 处理使叶片液泡膜 H⁺-PPase 活性显著上升,抑制根系液泡膜 H⁺-PPase 活性,而 50 µmol/L 的 Cd 处理对叶片液泡膜 H⁺-PPase 活性影响不显著,使根系液泡膜 H⁺-PPase 活性显著受到抑制(图 4)。

2.8 外源 NO 对番茄铜、镉毒害的缓解效应

由表 4 可知,50 µmol/L 的 Cu、Cd 处理显著抑

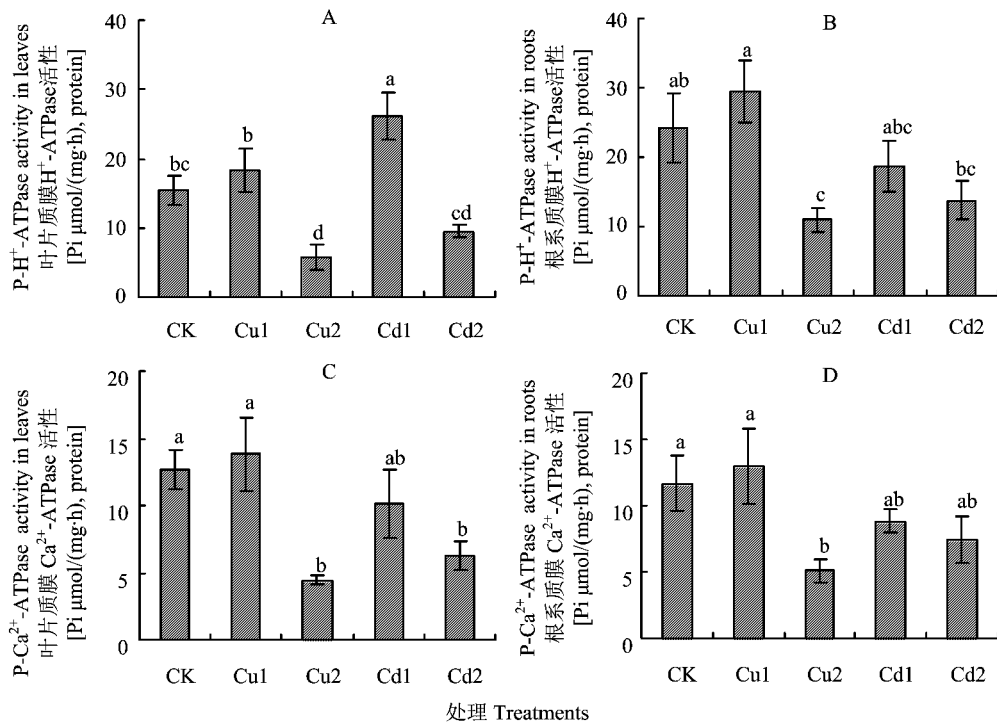


图2 铜、镉胁迫对番茄叶片和根系质膜 H⁺-ATPase (A,B) 和 Ca²⁺-ATPase (C,D) 活性的影响

Fig. 2 Effects of Cu, Cd stress on H⁺-ATPase (A,B) and Ca²⁺-ATPase (C,D) activity in plasma membrane of tomato leaves and roots

[注 (Note): 柱上不同字母表示差异达 5% 显著水平 Different letters above the bars mean significant at 5% level.]

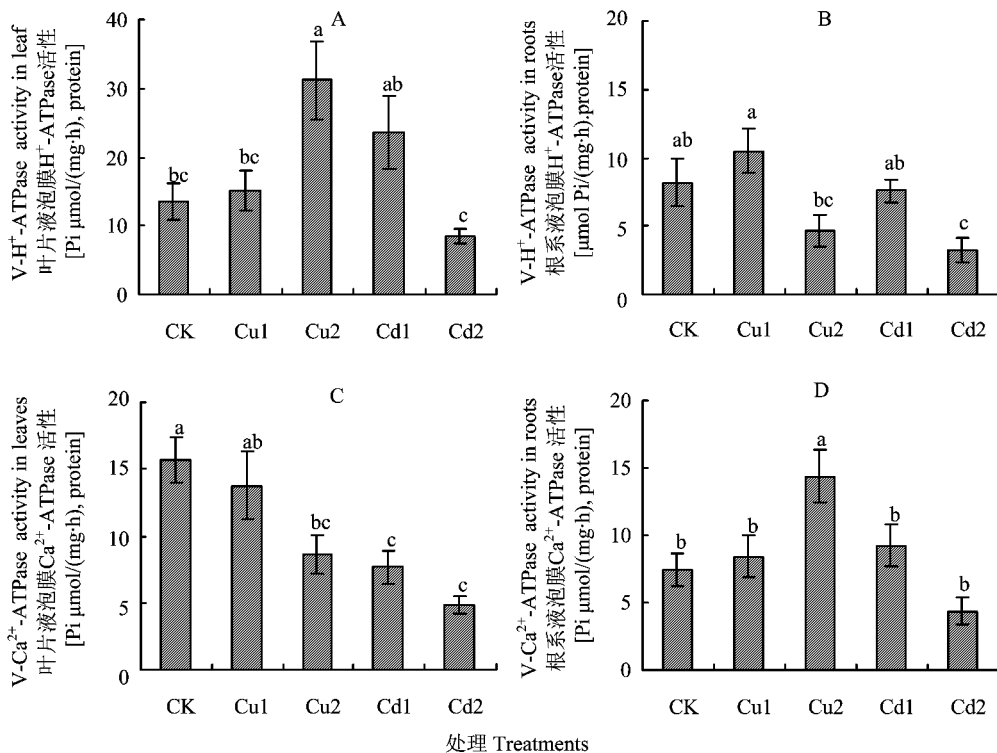


图3 铜、镉胁迫对番茄叶片和根系液泡膜 H⁺-ATPase (A, B) 和 Ca²⁺-ATPase 活性 (C, D) 的影响

Fig. 3 Effects of Cu, Cd stress on H⁺-ATPase (A, B) and Ca²⁺-ATPase (C, D) activities in vacuolar membrane of tomato leaves and roots

[注 (Note): 柱上不同字母表示差异达 5% 显著水平 Different letters above the bars mean significant at 5% level.]

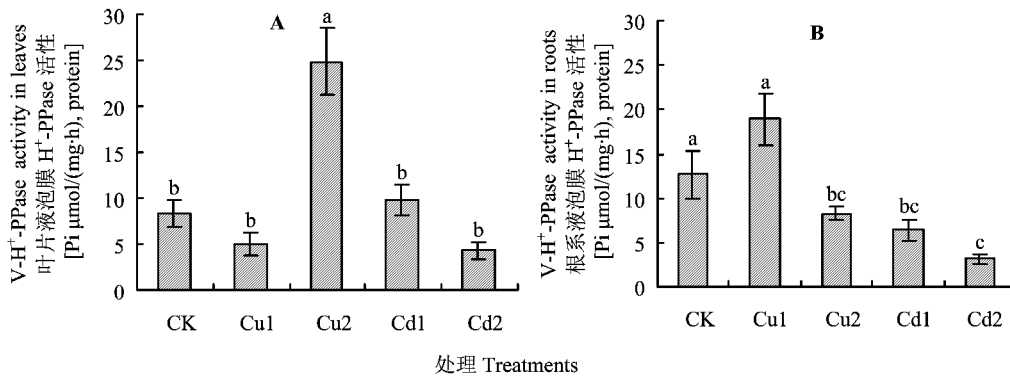


图 4 铜、镉胁迫对番茄叶片和根系液泡膜 H⁺-PPase 活性的影响

Fig. 4 Effects of Cu, Cd stress on H⁺-PPase activities in vacuolar membrane of tomato leaves and roots

[注(Note) : 柱上不同字母表示差异达 5% 显著水平 Different letters above the bars mean significant at 5% level.]

表 4 外源 NO 对铜、镉胁迫下番茄幼苗的缓解效应

Table 4 Effects of exogenous NO on the growth of tomato seedlings under Cu, Cd stress

处理 Treatments	地上部鲜重 Shoot fresh weight (g/pot)	地下部鲜重 Root fresh weight (g/pot)	株高 Shoot height (cm)	铜吸收量 Absorption of Cu (μg/pot)	镉吸收量 Absorption of Cd (μg/pot)
CK	26.00 ± 1.69 a	10.05 ± 1.43 a	21.17 ± 1.71a	75.63 b	0
Cu	15.83 ± 2.54 b	5.47 ± 1.18 b	14.37 ± 1.07 b	52.21 d	
Cu + S	24.89 ± 1.07 a	9.15 ± 0.93 a	19.53 ± 1.43 a	101.25 a	
Cu + N	15.17 ± 2.83 b	5.89 ± 0.73 b	13.70 ± 1.40 b	48.50 d	
Cu + F	16.35 ± 2.39 b	5.48 ± 0.98 b	14.53 ± 1.47 b	19.56 e	
Cu + S + H	17.11 ± 2.70 b	5.25 ± 0.85 b	14.97 ± 1.54 b	60.53 c	
Cd	16.23 ± 2.09 b	5.26 ± 1.58 b	14.17 ± 1.12 b		10.59 b
Cd + S	23.87 ± 1.46 a	8.87 ± 0.86 a	18.86 ± 1.33 a		14.61 a
Cd + N	15.52 ± 1.90 b	5.59 ± 0.83 b	14.09 ± 1.28 b		9.52 b
Cd + F	15.67 ± 2.01 b	5.78 ± 0.92 b	13.85 ± 1.07 b		8.96 b
Cd + S + H	16.63 ± 1.74 b	5.55 ± 0.75 b	14.66 ± 1.31 b		9.20 b

注(Note) : 同列不同字母表示差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in a column are significant at 5% level.

制番茄植株的生长, 施加 SNP 处理 (Cu + S 和 Cd + S) 则显著缓解因 Cu、Cd 胁迫引起的植株鲜重和株高的下降, 使其恢复到正常水平。添加 NO 清除剂血红蛋白 (Cu + S + H 和 Cd + S + H) 后, SNP 的缓解效果被消除; 但在 Cu、Cd 处理液中加入 NO_x⁻ (Cu + N 和 Cd + N) 或亚铁氰化钠 (Cu + F 和 Cd + F) 并无此效果。NO_x⁻ 是 NO 的分解产物, Na₃Fe(CN)₆ 是 SNP 的相似物或分解产物, 两者均不能产生 NO, 血红蛋白是 NO 的清除剂。由此可以说明, SNP 释放出的 NO 确实起到缓解重金属 Cu、Cd 对番茄生长的

抑制作用。

外源 NO 使番茄植株叶片、茎、根系 Cu、Cd 含量并未显著降低, 但 Cu、Cd 总吸收量显著高于胁迫处理, 这主要是因为植株生长势较高引起的。

3 讨论与结论

根系活力和硝酸还原酶活性是根系生命力和氮素代谢的重要评定指标, 本试验表明, 50 μmol/L Cu、Cd 处理均使其活性显著下降, 导致生长势受到抑制, 这与以往报道一致^[24-25]。光合作用的强弱对

于植物生长、产量及抗逆性都具有十分重要的影响,常作为判断植物生长和抗逆性大小的指标。在重金属胁迫条件下,光合作用容易受到抑制,甚至在植物伤害以前,净光合速率已表现下降。只有当胞间 CO_2 浓度降低和气孔导度减小时,才可认为光合速率降低是由于气孔限制所引起;相反,如果光合速率的降低伴随着胞间 CO_2 浓度的提高,那么光合作用的主要限制因素可能是非气孔因素^[16]。本研究中,Cu、Cd 胁迫处理 8 d 后,番茄叶片的 Pn、Gs 下降,Ci 升高,说明此时非气孔限制成为主要因素,胁迫解除后,植物仍可恢复生长。

质膜 H^+ -ATPase 是一种 P-型质子泵,它产生的跨膜电化学势梯度是维持离子跨膜运输首要驱动力^[26]。本研究表明,50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cu、Cd 处理使质膜 H^+ -ATPase 活性显著下降,这将打破跨膜的电化学势梯度,降低细胞壁酸化的能力,打破细胞内酸度平衡,进而影响养分离子及各种溶质的跨膜运输,最终导致植物生长受阻。重金属胁迫下,Zn、Cd 等离子从胞质转入液泡是其避免毒害的重要策略,而液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase,则可以利用 ATP 和 PPi 水解的自由能,建立跨膜的质子电化学势梯度,参与各种溶质的转运,维持液泡膜的正常功能^[27-28]。50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cu、Cd 胁迫使番茄根系液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性显著受到抑制,而叶片液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性显著上升或无影响显著,表明质膜和液泡膜功能蛋白对不同程度 Cu、Cd 胁迫的响应时间和部位存在差异。叶片和根系、质膜和液泡膜上 ATPase 和 H^+ -PPase 变化差异可能是植物对重金属毒害的应对策略:Cu、Cd 胁迫在短时间内可能使液泡膜 H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性受到抑制,但随着胁迫时间的延长, H^+ -ATPase 和 H^+ -PPase 活性会逐渐升高以建立新的细胞微域稳态平衡^[26,29]。从外观上看,Cu、Cd 毒害对根系的伤害比叶片严重。这是因为营养液培养条件下,根系始终处于近距离 Cu、Cd 离子包围中,根系的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 离子远高于叶片,尤其是 Cu^{2+} (表 2),所以无论是 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cu 处理还是 50 $\mu\text{mol/L}$ Cd 处理,根系生物量受到的抑制程度均大于地上部(表 1)。

Ca^{2+} -ATPase 是植物细胞中 Ca^{2+} 的转运系统的重要组成部分,在质膜和液泡膜上均有分布,对调节细胞内 Ca^{2+} 的浓度和信号传导具有非常重要的作用^[30]。本研究看出,50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cu 处理使番茄

叶片和根系质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性显著下降,液泡膜 Ca^{2+} -ATPase 活性变化则截然相反;50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cd 处理使叶片质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性显著下降,同时显著抑制了叶片和根系液泡膜 Ca^{2+} -ATPase 活性。由以上分析推断,番茄生物膜 Ca^{2+} -ATPase 对 Cu、Cd 胁迫信号的响应部位可能不同(Cu 胁迫在质膜,Cd 胁迫在液泡膜),但具体的响应机制需要进一步试验研究。

NO 在植物生长发育及干旱、盐害、冷害和病原菌侵染等逆境胁迫反应中起重要作用^[31-32]。本研究表明,外源 NO 参与了番茄对重金属 Cu、Cd 胁迫的应答反应^[17-18,33]。同胁迫处理相比,外施 100 $\mu\text{mol/L}$ SNP 处理的番茄植株叶片、茎、根系 Cu、Cd 含量并未显著降低,但 Cu、Cd 胁迫引起的生长抑制却得到了显著缓解,Cu、Cd 总吸收量显著高于胁迫处理。外源 NO 通过何种途径对过多的 Cu、Cd 进行微域调控,Cu、Cd 的代谢途径如何及其与生物膜 ATPase 等功能蛋白的关系,均有待于进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] Marschner H. Mineral nutrition of higher plants (2nd) [M]. London: Academy Press, 1995. 333-347.
- [2] Zhang G P, Fukami M, Sekimoto H. Influence of cadmium on mineral concentrations and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage[J]. Field Crops Res., 2002, 77: 93-98.
- [3] Brun L A, Maillat J, Hinsinger Pepin P M *et al.* Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils [J]. Environ. Poll., 2001, 111: 293-302.
- [4] 卢东,宗良纲,肖兴基,等. 华东典型地区有机与常规农业土壤重金属含量的比较研究[J]. 农业环境科学学报,2005,24(1): 143-147.
Lu D, Zong L G, Xiao X J *et al.* A comparison of heavy metals concentration in soils of organic and conventional farming in typical regions of Eastern China[J]. J. Agric. Environ. Sci., 2005, 24(1): 143-147.
- [5] 黄治平,徐斌,张克强,杨秀春. 连续四年施用规模化猪场猪粪温室土壤重金属积累研究[J]. 农业工程学报,2007,23(11): 239-243.
Huang Z P, Xu B, Zhang K Q, Yang X C. Accumulation of heavy metals in the four years' continual swine manure-applied greenhouse soils[J]. Trans. Chin. Soc. Agric. Eng., 2007, 23(11): 239-243.
- [6] 曾希柏,李莲芳,白玲玉,等. 山东寿光农业利用方式对土壤砷累积的影响[J]. 应用生态学报,2007,18(2): 310-316.
Zeng X B, Li L F, Bai L Y *et al.* Arsenic accumulation in different agricultural soils in Shouguang of Shandong Province [J].

- Chin. J. Appl. Ecol., 2007, 18 (2): 310–316.
- [7] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues [J]. *Planta*, 1999, 208: 337–344.
- [8] Shi Q H, Ding F, Wang X F, Wei M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress [J]. *Plant Physiol. Biochem.*, 2007, 45: 542–550.
- [9] 阮海华, 沈文飙, 叶茂炳, 徐朗莱. 一氧化氮对盐胁迫下小麦叶片氧化损伤的保护效应[J]. *科学通报*, 2001, 46 (23): 1993–1997.
- Ruan H H, Shen W B, Ye M B, Xu L L. Protection of nitric oxide on salt induced membrane oxidation in wheat leaves[J]. *Bull. Sci.*, 2001, 46 (23): 1993–1997.
- [10] 张艳艳, 刘俊, 刘友良. 一氧化氮缓解盐胁迫对玉米生长的抑制作用[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(4): 455–459.
- Zhang Y Y, Liu J, Liu Y L. Nitric oxide alleviates growth inhibition of maize seedlings under NaCl stress[J]. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 2004, 30(4): 455–459.
- [11] Uchida A, Jagendorf A T, Hibino T *et al.* Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice[J]. *Plant Sci.*, 2002, 163: 515–523.
- [12] Mata C G, Lamattina L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress [J]. *Plant Physiol.*, 2001, 126 (3): 1196–1204.
- [13] 闻玉, 赵翔, 张骁. 水分胁迫下一氧化氮对小麦幼苗根系生长和吸收的影响[J]. *作物学报*, 2008, 34(2): 344–348.
- Wen Y, Zhao X, Zhang X. Effects of nitric oxide on root growth and absorption in wheat seedlings in response to water stress [J]. *Acta Agron. Sin.*, 2008, 34(2): 344–348.
- [14] Hsu Y T, Kao C H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves[J]. *Plant Growth. Regul.*, 2004, 42: 227–238.
- [15] Laspina N V, Groppa M D, Tomaro M L, Benavides M P. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress[J]. *Plant Sci.*, 2005, 169: 323–330.
- [16] 敬岩, 孙宝腾, 符建荣. 一氧化氮改善铁胁迫玉米光合组织结构及其活性[J]. *植物营养与肥料学报*, 2007, 13 (5): 809–815.
- Jing Y, Sun B T, Fu J R. Nitric oxide improves photosynthetic structure and activity in iron-deficient maize [J]. *Plant Nutr. Fert. Sci.*, 2007, 13 (5): 809–815.
- [17] 张义凯, 韩小娇, 金洪, 等. 外源 NO 对铜胁迫下番茄光合、生物发光特性及矿质元素吸收的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2010, 16(1): 172–178.
- Zhang Y K, Han X J, Jin H *et al.* Effects of exogenous nitric oxide on photosynthetic and bioluminescent characteristics as well as mineral element contents in tomato under copper stress [J]. *Plant Nutr. Fert. Sci.*, 2010, 16(1): 172–178.
- [18] Zhang Y K, Han X J, Chen X L *et al.* Exogenous nitric oxide on antioxidative system and ATPase activities from tomato seedlings under copper stress[J]. *Sci. Horticul.*, 2009, 123 (2): 217–223.
- [19] 李合生, 孙群, 赵世杰, 章文华. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 高等教育出版社, 2000.
- Li H S, Sun Q, Zhao S J, Zhang W H. The principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- [20] 於丙军, 龚红梅, 李名旺, 等. 葡聚糖与蔗糖密度梯度离心制备膜微囊方法的比较[J]. *南京农业大学学报*, 1997, 20(4): 14–18.
- Yu B J, Gong H M, Li M W *et al.* Comparison of dextran-70 and sucrose density gradients centrifugation for preparing membrane vesicles[J]. *J. Nanjing Agric. Univ.*, 1997, 20(4): 14–18.
- [21] Kasamo K. Comparison of plasma membrane and tonoplast H^+ -translocating ATPase in *Phaseolus mungo* L. roots[J]. *Plant Cell Physiol.*, 1986, 27: 49–59.
- [22] 郝鲁宁, 余叔文. 大麦根细胞质膜 Ca^{2+} -ATP 酶和 Ca^{2+} 转运系统的特性[J]. *植物生理学报*, 1993, 19(2): 172–180.
- Hao L N, Yu S W. Characteristics of Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+} -translocation of barley root plasma membrane [J]. *Acta Photophy. Sin.*, 1993, 19(2): 172–180.
- [23] 何龙飞, 沈振国, 刘友良. 铝胁迫对小麦根系液泡膜 ATP 酶、焦磷酸酶和膜脂组成的效应[J]. *植物生理学报*, 1999, 25 (4): 350–356.
- He L F, Shen Z G, Liu Y L. The responses of ATPase and PPase activities and lipid composition of tonoplast in roots of two wheat cultivars to aluminium stress [J]. *Acta Photophy. Sin.*, 1999, 25(4): 350–356.
- [24] 冯建鹏, 史庆华, 王秀峰, 洪艳艳. 镉对黄瓜幼苗光合作用、抗氧化酶和氮代谢的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15 (4): 970–974.
- Feng J P, Shi Q H, Wang X F, Hong Y Y. Effects of cadmium on photosynthesis, antioxidant enzyme and nitrogen metabolism of cucumber seedlings [J]. *Plant Nutr. Fert. Sci.*, 2009, 15(4): 970–974.
- [25] 甘金华, 李进平, 熊治廷, 李荣. 铜胁迫对两种不同来源长萼鸡眼草生长及氮代谢的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(3): 1057–1065.
- Gan J H, Li J P, Xiong Z T, Li R. Effects of copper stress on growth and nitrogen metabolism of *Kummerowia stipulacea* (Maxim.) Makino from two different sites [J]. *J. Agro-Environ. Sci.*, 2008, 27(3): 1057–1065.
- [26] Michelet B, Boutry M. The plasma membrane H^+ -ATPase: a highly regulated enzyme with multiple physiological functions [J]. *Plant Physiol.*, 1995, 108: 1–6.
- [27] Leach R P, Rogers W J, Wheeler K P *et al.* Molecular markers for ion compartmentation in cells of higher plants [J]. *J. Exp. Bot.*, 1990, 41: 1089–1094.
- [28] Vazquez M D, Poschenrieder C, Barker A J M *et al.* Compartmentation of zinc in roots and leaves of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. *Bot. Acta*, 1994, 107: 243–257.

- [29] 乔磊,崔继哲. 液泡膜转运蛋白在植物细胞代谢中的作用[J]. 生命科学,2009,21(2): 330-334.
Qiao L, Cui J Z. Functions of tonoplast transporters in plant cell metabolism[J]. Chin. Bull. Life Sci., 2009, 21(2): 330-334.
- [30] 韩宁. 盐地碱蓬液泡膜 Ca^{2+} 主动运输体及其在耐盐性中的作用[D]. 济南: 山东师范大学博士学位论文,2005.
Han N. Vacuolar Ca^{2+} transporters and salt tolerance in C_3 halophyte *Suaeda salsa* L. [D]. Jinan: PhD dissertation, Shandong Normal University, 2005.
- [31] Crawford N M, Guo F Q. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions[J]. Trends Plant Sci., 2005, 10: 195-200.
- [32] Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D. New insights into nitric oxide signaling in plants[J]. Ann. Rev. Plant Biol., 2008, 59: 21-39.
- [33] 张义凯,崔秀敏,杨守祥,陈秀灵. 外源一氧化氮对镉胁迫下番茄幼苗活性氧代谢及光合特性的影响[J]. 应用生态学报, 2010,21(6): 1432-1438.
Zhang Y K, Cui X M, Yang S X, Chen X L. Effects of exogenous nitric oxide on active oxygen metabolism and photosynthetic characteristics in tomato seedlings under cadmium stress [J]. Chin. J. Appl. Ecol., 2010, 21(6): 1432-1438.