

叶面喷施褪黑素对小白菜幼苗镉耐性的影响

刘自力, 黄一凡, 朱正波, 陈亚华, 崔瑾*

南京农业大学生命科学学院, 南京210095

摘要: 以小白菜‘矮脚黄’为试验材料, 探究叶面喷施褪黑素($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对小白菜幼苗Cd胁迫($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)耐性的影响。试验测定小白菜幼苗生物量和生理指标变化, 以及Cd吸收和转运相关基因转录水平。结果表明, 叶面喷施褪黑素能有效缓解Cd胁迫对小白菜幼苗生长造成的抑制, 并伴随着叶绿素含量以及光合参数的提高, 显著降低活性氧(O_2^- 、 H_2O_2)和MDA的含量, 提高抗氧化酶(SOD、CAT、POD、APX)的活性和抗氧化物质(AsA、GSH)的含量, 并且显著降低小白菜幼苗中Cd的含量。进一步研究发现, 叶面喷施褪黑素能够显著降低IRT1、IRT2、Nramp1、Nramp3、HMA2、HMA4的转录水平。综上所述, 叶面喷施褪黑素能够清除Cd胁迫下小白菜幼苗中过量积累的活性氧, 缓解氧化胁迫, 并通过影响小白菜Cd吸收和转运相关基因的转录来降低小白菜幼苗对Cd的积累, 提高Cd耐性。

关键词: 褪黑素; 镉; 抗氧化作用; 小白菜; 转运系数

镉(cadmium, Cd)是毒性最高的重金属元素之一, 由于其具有较高的迁移能力, 可以从土壤转移到植物中, 并在植物中富集, 不仅会影响植物正常的生长发育, 而且还会通过食物链进入人体, 从而危害人类健康(赵兴敏等2009)。近年来, 由于矿产资源的开发利用, 工业废物、汽车尾气的排放和农药、化肥的广泛使用, 使得土壤Cd污染越来越严重, 尤其是城郊农田和矿区周边农田(胡蔚等2014)。因此, 探讨如何缓解植物Cd胁迫并降低其对Cd的积累具有重要的现实意义。

褪黑素(melatonin)是一种生命必需的吲哚胺类物质, 在高等植物中广泛存在(王蕊等2016; 左佳琦等2014)。研究发现, 褪黑素在植物非生物胁迫过程中发挥重要作用, 包括重金属胁迫(Arno和Hernández-Ruiz 2014)。褪黑素具有极强的抗氧化能力, 通过与自由基的级联互动, 1个褪黑素可以清除10个ROS (Tan等2002, 2015), 褪黑素还能直接或间接调控抗氧化酶系统和其他抗氧化物质的水平来缓解逆境对植物造成的氧化损伤, 提高植物抗逆性(Liu等2015; Ramón等2012)。有研究发现, 在拟南芥中过表达褪黑素合成的关键酶基因SNAT能显著提高内源褪黑素含量, 并缓解Cd胁迫对拟南芥根长的抑制, 提高光合色素的含量, 降低根系中Cd的含量(Gu等2017)。叶面喷施褪黑素可以通过提高抗氧化酶活性、增加植物螯合肽含量以及细胞区室化作用显著缓解番茄Cd毒, 并显著降低番茄叶片中Cd的含量(Hasan 2016)。褪黑素能够

通过调控苜蓿中ABC转运体、PCR2和拟南芥中PDR8、HMA4的表达来降低苜蓿和拟南芥根系中Cd的含量(Gu等2017)。褪黑素是否可以通过调控小白菜中与Cd吸收和转运相关基因的表达来影响小白菜对Cd的吸收和积累仍不清楚, 将褪黑素运用于缓解小白菜Cd毒的研究还未见报道。

小白菜(*Brassica chinensis*)是十字花科芸薹属芸薹种白菜亚种的一个变种, 在我国南方地区广泛栽培, 由于城郊农田和矿区周边农田是小白菜的主要产区, 因而更易受到Cd污染。研究发现, 一些城市郊区及矿区农田生长的小白菜地上部Cd含量达到 $0.73\sim 2.96 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (DW), 已远远超过食用安全标准, 对人类的健康构成了极大的威胁(陈亚华等2006; 丁爱芳和潘根兴2003)。本文采用叶面喷施褪黑素的方式, 研究了褪黑素对小白菜缓解Cd毒过程中的影响, 探讨褪黑素在植物Cd积累和耐性中的作用, 为进一步揭示植物耐Cd机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和处理

以小白菜(*Brassica chinensis* L.)品种‘矮脚黄’为试验材料, 于2017年6月在南京农业大学生命科

收稿 2018-03-01 修定 2018-03-15

资助 国家重点研发计划(2016YFD0800700-3)和现代农业产业技术体系建设专项(CARS-23-A03)。

* 通讯作者(cuijin@njau.edu.cn)。

学学院植物发育生物学实验室人工智能光照培养箱中进行。挑选籽粒饱满的小白菜种子, 用5%的NaClO进行表面消毒10 min, 清水洗净后在烧杯中浸种4 h, 随后置于催芽盘中催芽24 h, 种子发芽后, 挑选大小均一的种子点种于96孔育苗板中, 用1/4Hoagland营养液培养。参数设置如下: 光周期为14 h光照/10 h黑暗; 温度为光照25°C/黑暗23°C; 湿度为80%; 光强为200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

小白菜幼苗在水培条件下长到两叶一心期开始褪黑素(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)叶面喷施处理和Cd胁迫(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理, 后续试验褪黑素每24 h喷施一次, 每次喷10 mL, 让液体均匀布满叶片为宜, 每24 h更换营养液, 处理时间为7 d。Cd以CdCl₂的形式添加到营养液中。所有营养液的pH均由0.1 mmol·L⁻¹ NaOH及0.1 mmol·L⁻¹ HCl调至7.0±0.1。处理7 d后收样分别进行各项目测定。

1.2 测定项目和方法

地上部分及根鲜重、干重由电子天平测得; 测完鲜重后放置烘箱, 85°C烘干至恒重即得干质量。根长由直尺测得。

光合色素含量的测定参照Gu等(2017)方法。净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)、气孔导度(G_s)和胞间二氧化碳浓度(C_i)等光合参数测定参照Chen等(2017)方法。

小白菜幼苗内源褪黑素含量的测定参照Gu等(2017)方法。

O₂⁻含量的测定参照李忠光和龚明(2005)方法, H₂O₂含量测定参照Rodriguez等(2004)方法; MDA含量测定参照Zhang和Sun (2009)方法。

抗氧化酶(SOD、POD、APX和CAT)活性测

定参照Shah和Nahakpam (2012)方法。还原型抗坏血酸(AsA)含量测定参照Wang等(2017)方法。还原型谷胱甘肽(GSH)含量测定参照Chen等(2015)方法。

金属元素Cd含量测定参照Wu等(2015)方法。Cd转运系数(translocation factor, TF)计算公式为: $TF=C_{\text{shoot}}/C_{\text{root}}$, C_{shoot} 和 C_{root} 分别代表植物地上部分和根系中金属元素浓度(Rezvani和Zaefarian 2011)。

基因荧光定量分析参照Wu等(2015)方法。实时荧光定量PCR引物设计见表1。

1.3 数据处理

采用Excel 2007软件对数据进行整理, 采用SPSS 20数据处理系统进行方差分析, 采用Duncan新复极差法进行差异显著性检验, $P<0.05$ 。采用OriginPro 2017绘制图表。

2 实验结果

2.1 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗生长的影响

Cd胁迫下小白菜幼苗的生长受到显著的抑制, 与对照相比, 小白菜幼苗地上部分鲜重、干重以及根长分别降低约48.5%、46.2%和31.3%; 叶面喷施褪黑素显著缓解了Cd胁迫对小白菜幼苗生长的抑制, 与Cd处理相比, 小白菜幼苗地上部分鲜重、干重以及根长分别提高了约29%、30%和23.3%, 但褪黑素单独处理并没有影响小白菜幼苗的生长(表2)。

2.2 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗叶绿素含量和光合参数的影响

叶绿素和光合参数是反映植物光合能力的重

表1 qPCR所用引物

Table 1 Primers used in qPCR

基因	引物序列(5'→3')	
	正向	反向
<i>Actin</i>	GGAGCTGAGAGATTCCGTTG	GAACCACCACTGAGGACGAT
<i>IRT1</i>	TGGCAATCTTTTCGCGGTG	GCCGAGCATGCATTGAGAAG
<i>IRT2</i>	CTCGTCGACCTTCTGGCTAC	ACTTGGCGACGACAGACATT
<i>Nramp1</i>	CCCCGAAGACCGTGCTAAAT	TACCCACCACGTTTCGTAGC
<i>Nramp3</i>	TCTTGATTGTTTCGTCTTC	TCCCATGTAGCGATAAG
<i>HMA2</i>	GAGGATGCCACATGGTTGGA	CTTTGGTACGGCGGAAGAGT
<i>HMA4</i>	TTCCCCACAAGAATCGCTCC	CACTCGAACCTTCCACGTCA

*Actin*作为对照, 引物设计参照Xiao等(2012)。采用2^{-ΔΔC_t}法进行相对定量分析。

表2 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗生长的影响

Table 2 The effect of foliar feeding of melatonin on the growth of Cd stress-induced Chinese cabbage seedlings

处理	地上部分		根		
	鲜重/g·(5株) ⁻¹	干重/g·(5株) ⁻¹	鲜重/g·(5株) ⁻¹	干重/g·(5株) ⁻¹	长度/cm
对照	1.65±0.03 ^a	0.13±0.01 ^a	0.20±0.01 ^a	0.02±0.01 ^{ab}	16.3±0.7 ^a
褪黑素	1.77±0.11 ^a	0.12±0.02 ^a	0.20±0.02 ^a	0.02±0.01 ^{ab}	15.2±0.3 ^a
Cd	0.88±0.02 ^c	0.07±0.01 ^b	0.14±0.01 ^b	0.01±0.01 ^b	11.2±0.7 ^b
褪黑素+Cd	1.24±0.04 ^b	0.10±0.01 ^a	0.18±0.01 ^a	0.02±0.01 ^a	14.6±0.3 ^a

对照: 无Cd处理也无褪黑素处理; 褪黑素: 单独叶面喷施褪黑素处理; Cd: 单独镉胁迫; 褪黑素+Cd: 镉胁迫同时叶面喷施褪黑素处理。其中Cd浓度为20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 褪黑素浓度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同一列不同字母表示不同处理后在5%水平上差异显著($P<0.05$), 以下图、表同此。

要指标(Maghsoudi等2016; 郭培国和李荣华2000)。Cd胁迫显著降低了小白菜幼苗叶绿素的含量, 并伴随光合参数数值的下降, 与对照相比, 小白菜幼苗叶绿素含量和净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间 CO_2 浓度(C_i)分别降低了约33.6%、40%、35%和22%; 叶面喷施褪黑素显著缓解了Cd胁迫下叶绿素的下降幅度, 并提高了光合参数, 与Cd胁迫相比, 叶绿素含量和 P_n 、 G_s 、 C_i 分别升高了约22.6%、22.7%、46%和15.3%。Cd胁迫并没有影响小白菜幼苗的蒸腾速率(T_r), 而单独叶面喷施褪黑素后小白菜幼苗 T_r 数值和叶绿素含量明显升高, 但并不影响 P_n 、 G_s 和 C_i (表3)。

2.3 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗内源褪黑素含量的影响

Cd胁迫和褪黑素叶面喷施处理均能引起小白菜幼苗内源褪黑素含量增加, 褪黑素可能在小白菜幼苗响应Cd胁迫过程中发挥重要作用。与对照相比, Cd胁迫下小白菜幼苗地上部分和根系中内源褪黑素含量分别提高了约14%和20%; 叶面喷施褪黑素进一步提高了Cd胁迫下小白菜幼苗中内源褪黑素的含量, 与Cd处理相比, 地上部分和根系内源褪黑素含量分别升高约8%和14%(图1)。

2.4 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗 O_2^- 、 H_2O_2 和MDA积累的影响

活性氧(O_2^- 、 H_2O_2)和丙二醛(MDA)的含量可以直接反应Cd胁迫对植物造成氧化损伤的程度(Yang等2015)。Cd胁迫下小白菜幼苗中 O_2^- 的含量显著升高, 与对照相比, 升高了约53%; 而叶面喷施褪黑素处理能够使 O_2^- 含量保持在较低水平, 与对照相比, 叶面喷施褪黑素使 O_2^- 含量降低约55.7%, 与Cd处理相比, 叶面喷施褪黑素能够降低Cd胁迫下 O_2^- 的含量约63%(图2-A)。Cd胁迫下小白菜幼苗中 H_2O_2 和MDA的含量同样显著升高, 与对照相比, 升高了约26.7%和34.5%; 叶面喷施褪黑素后一定程度降低了Cd胁迫下 H_2O_2 和MDA的含量, 与Cd处理相比, 降低约33%和26%(图2-B和C)。

2.5 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗SOD、POD、CAT和APX活性的影响

清除植物体中过量的活性氧对于维持植物正常的生理代谢具有重要意义, 植物体中抗氧化酶活性越高, 抵御胁迫的能力就越强(Bowler等1992)。Cd胁迫会引起小白菜幼苗中SOD、POD、CAT和APX的活性显著提高, 与对照相比, 分别提高了约28%、40%、22%和156%; 叶面喷施褪黑素能进一

表3 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗叶绿素含量和光合参数的影响

Table 3 Effect of foliar feeding of melatonin on chlorophyll content and photosynthetic parameters in Cd stress-induced Chinese cabbage seedlings

处理	总叶绿素/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW)	$P_n/\mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$G_s/\text{mmol}(\text{H}_2\text{O})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$C_i/\mu\text{mol}(\text{CO}_2)\cdot\text{mol}^{-1}$	$T_r/\text{mmol}(\text{H}_2\text{O})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
对照	1.13±0.02 ^b	28.7±1.9 ^a	0.53±0.01 ^a	302.67±8.33 ^{ab}	12.2±0.1 ^c
褪黑素	1.39±0.06 ^a	27.5±0.8 ^a	0.58±0.03 ^a	320.00±6.09 ^a	14.5±0.3 ^b
Cd	0.75±0.02 ^d	17.2±1.9 ^c	0.34±0.04 ^b	235.33±19.54 ^c	12.3±1.2 ^c
褪黑素+Cd	0.92±0.01 ^c	21.1±2.5 ^b	0.63±0.02 ^a	271.00±6.93 ^{bc}	19.7±0.5 ^a

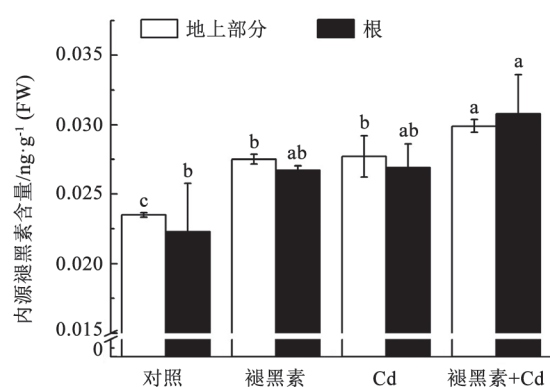


图1 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗内源褪黑素含量的影响

Fig.1 Effect of foliar feeding of melatonin on the accumulation of endogenous melatonin in Cd stress-induced Chinese cabbage seedlings

步提高Cd胁迫下抗氧化酶的活性,与Cd处理相比,SOD、POD、CAT和APX的活性分别提高约41%、24%、55%和30%;并且叶面喷施褪黑素较对照相比同样能够显著提高SOD和APX的活性,而POD和CAT的活性没有显著性变化(图3)。

2.6 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗AsA和GSH含量的影响

抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)是两种重要的抗氧化物质,并参与AsA-GsH循环,在非生物胁迫中发挥重要作用,AsA和GSH的含量越高,抵御非生物胁迫的能力就越强(Cuypers等2001)。Cd胁迫会引起AsA和GSH含量的升高,与对照相比,小白菜幼苗地上部分和根系中AsA的含量提高约13.8%和80% (图4-A),GSH的含量提高约150%和420% (图4-B);叶面喷施褪黑素进一步提高Cd胁迫下AsA和GSH的含量,与Cd处理相比,小白菜幼苗地上部分和根系中AsA的含量提高约8.3%和42.4% (图4-A),GSH的含量提高约25%和13% (图4-B)。而叶面喷施褪黑素对小白菜幼苗中AsA和GSH的含量并没有显著性影响(图4-A和B)。

2.7 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗Cd积累和转运系数的影响

叶面喷施褪黑素能够缓解Cd胁迫对小白菜幼苗造成的抑制,通过测定小白菜幼苗中Cd含量发现,叶面喷施褪黑素能显著降低小白菜幼苗地上部分和根系中Cd的浓度,与Cd处理相比,分别降低约34.5%和11.4% (图5-A)。通过对单株小白菜幼

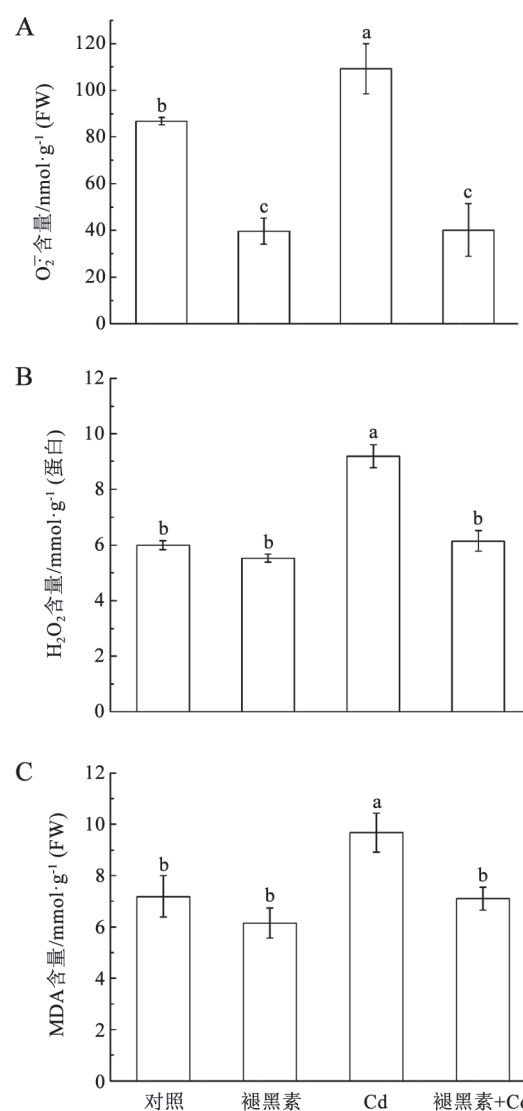


图2 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗O₂⁻ (A)、H₂O₂ (B)和MDA (C)积累的影响

Fig.2 Effect of foliar feeding of melatonin on the accumulation of O₂⁻ (A), H₂O₂ (B) and MDA (C) in leaves of Cd stress-induced Chinese cabbage seedlings

苗Cd含量数据分析发现,单株小白菜幼苗地上部分Cd含量明显降低,与Cd处理相比降低约16.7%,而根系中Cd含量显著增加,与Cd处理相比增加约35.9% (图5-B)。通过对转运系数的分析发现,Cd胁迫下小白菜幼苗对Cd转运系数达0.0847,而叶面喷施褪黑素显著降低了小白菜对Cd的转运系数,与Cd处理相比,降低约26.2% (图5-C)。结果表明,叶面喷施褪黑素可以通过降低小白菜中Cd向地上部分的转运进而降低小白菜幼苗地上部分Cd的含量,提高其对Cd的耐性。

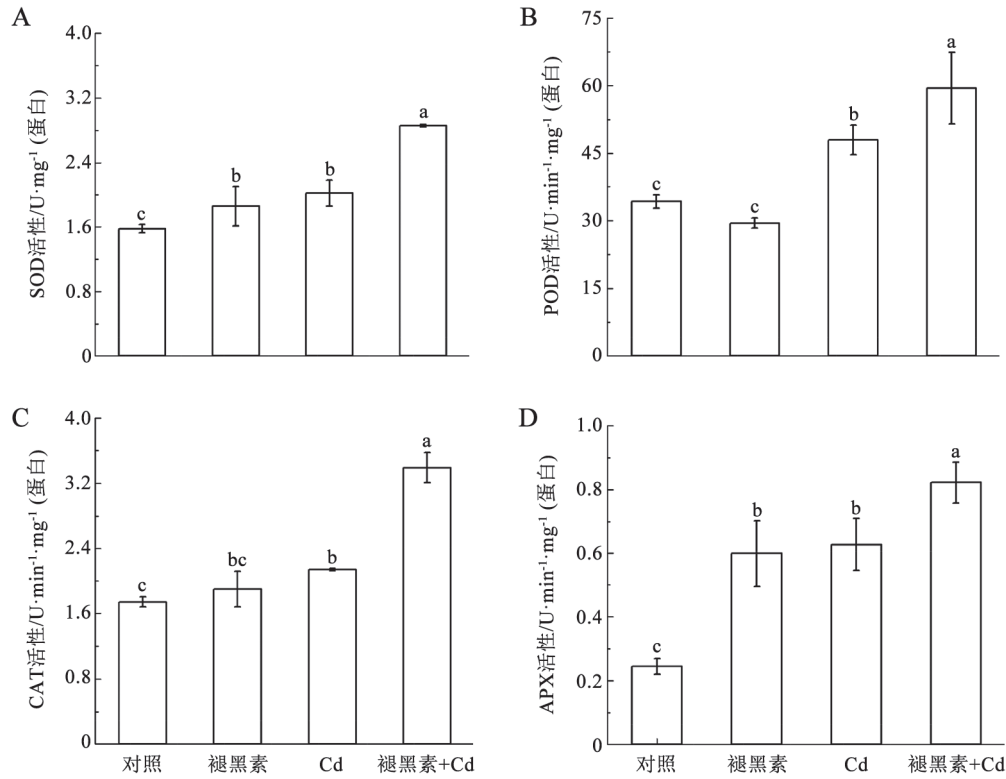


图3 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗SOD (A)、POD (B)、CAT (C)和APX (D)活性的影响
Fig.3 Effect of foliar feeding of melatonin on the activity of SOD (A), POD (B), CAT (C) and APX (D) in leaves of Cd stress-induced Chinese cabbage seedlings

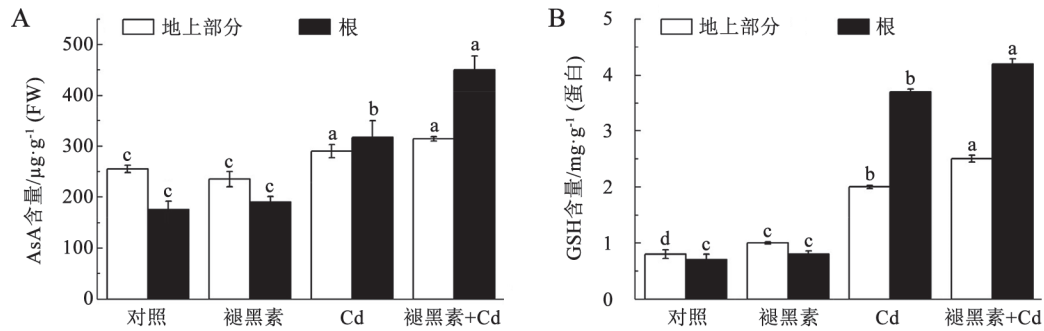


图4 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗AsA (A)和GSH (B)含量的影响
Fig.4 Effect of foliar feeding of melatonin on the concentration of AsA (A) and GSH (B) in Cd stress-induced Chinese cabbage seedlings

2.8 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗Cd吸收和转运相关基因转录水平的影响

ZIP基因家族在调控植物对Cd的吸收过程中发挥重要作用,在Cd胁迫条件下,小白菜幼苗中 $IRT1$ 和 $IRT2$ 基因转录水平均被显著上调,与Cd处理相比,分别上调了7.8倍和9.5倍,叶面喷施褪黑素后发现,Cd胁迫下 $IRT1$ 和 $IRT2$ 基因的转录水平

又显著降低,与Cd处理相比,分别下调了3.6倍和4.7倍,而叶面喷施褪黑素并没有影响 $IRT1$ 和 $IRT2$ 基因的转录(图6-A和B)。同样,Cd胁迫会上调 $Nramp1$ 、 $Nramp3$ 、 $HMA2$ 和 $HMA4$ 的转录水平,天然抗性巨噬细胞蛋白(natural-resistance-associated macrophage protein, Nramp)能直接参与Cd的转运,如 $Nramp3$ 可以活化液泡中的Cd,然后通过液泡膜

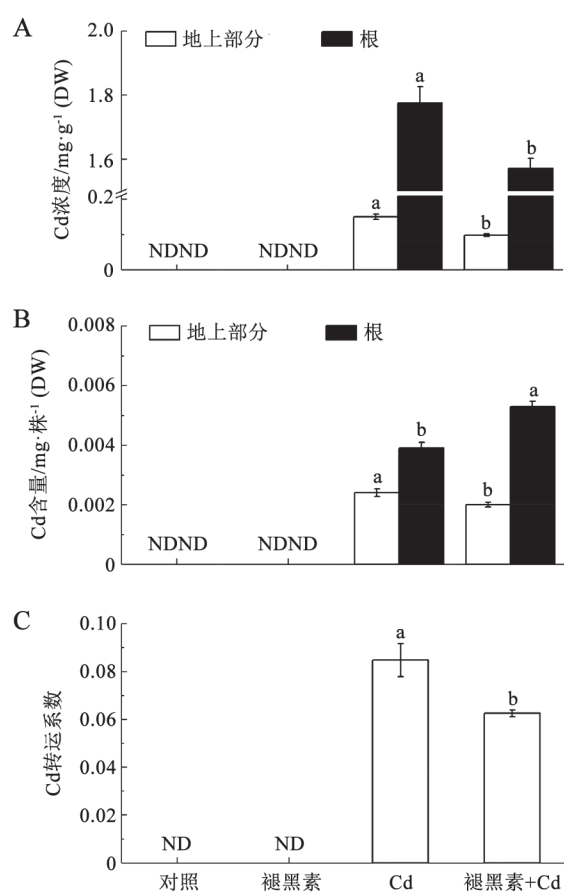


图5 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗Cd浓度(A)、含量(B)和转运系数(C)的影响

Fig.5 Effect of foliar feeding of melatonin on the concentration (A), content (B) and translocation factor (C) of Cd in Cd stress-induced Chinese cabbage seedlings

ND表示没有检测到数值。

上的转运蛋白将其转运到液泡中(Lin和Aarts 2012)。重金属ATP酶基因(*HMA2*、*HMA4*)参与调控Cd向木质部的装载,促进Cd由根向地上部分的转运(Haydon和Cobbett 2007; Verret等2005),叶面喷施褪黑素后,Cd胁迫下这些基因的转录水平又被显著下调(图6-C~F)。以上结果表明,叶面喷施褪黑素可以通过调节小白菜Cd吸收和转运相关基因的转录来影响小白菜幼苗对Cd的吸收和积累。

3 讨论

镉(Cd)是植物生长发育中非必需且有毒的重金属元素,Cd胁迫会引起植物体产生过量的活性氧,造成细胞膜脂质过氧化,破坏膜结构的完整性,导致叶绿素降解,抑制植物正常生长(Drażkiewicz

和Baszyński 2005; Agnieszka等2000)。Gu等(2017)研究发现Cd胁迫会引起苜蓿产生过量的活性氧,根长和鲜重显著降低。本研究发现,Cd胁迫下小白菜幼苗中活性氧的含量显著升高,生物量显著下降,并且伴随叶绿素含量降低和光合参数的下降,表明Cd胁迫会抑制植物的正常生长,并通过诱导小白菜幼苗产生过量的活性氧,引起脂质过氧化,造成氧化胁迫。

褪黑素是抗氧化能力极强的物质,它可以在细胞内直接清除·OH和H₂O₂分子,使活性氧保持在相对较低的水平,从而降低活性氧对细胞造成的氧化损伤(Allegra等2003; Pieri等1994, 1995)。褪黑素还可通过激活抗氧化酶及抗氧化物质相关基因的表达,提高植物体自身抗氧化酶的活性(Rodriguez等2004; Yin等2013),增加抗氧化物质(AsA和GSH)含量(Wang等2012; 徐向东等2010),以清除植物中过量的活性氧。已有研究表明,褪黑素可以通过影响抗坏血酸系统来清除由高温胁迫产生的过量活性氧(徐向东等2010),提高黄瓜幼苗对高温胁迫的耐受性;褪黑素还可以通过影响抗氧化系统来降低硝酸盐胁迫对黄瓜幼苗造成的氧化胁迫(王伟香等2016)。本试验发现,叶面喷施褪黑素能够降低Cd胁迫下O₂⁻、H₂O₂和MDA的含量,并提高SOD、POD、CAT和APX的活性,增加AsA和GSH的含量。此外,叶面喷施褪黑素能够引起小白菜幼苗内源褪黑素含量的升高。因此推测褪黑素缓解Cd胁迫的作用机制可能是小白菜通过吸收环境中的褪黑素后通过清除活性氧自由基来维持膜系统的完整性,从而有效缓解Cd胁迫对小白菜幼苗造成的氧化损伤。

本研究发现Cd胁迫下小白菜幼苗中Cd含量明显增加,而叶面喷施褪黑素能显著降低小白菜幼苗地上部分Cd含量,并降低Cd由根向地上部分的转运(图5-C)。植物由根系从土壤中吸收Cd,并装载进木质部进而运输到地上部分,已有研究证明这些过程受一些基因的调控(Han等2014)。*IRT1*、*IRT2*主要参与调控植物对Cd的吸收(Guerinot 2000; Wu等2015);天然抗性巨噬细胞蛋白(Nramp)可以活化液泡中的Cd,然后通过液泡膜上的转运蛋白将其转运到细胞质中(Lin和Aarts 2012),重金属ATP酶基因(*HMA2*、*HMA4*)参与调控Cd向木质部

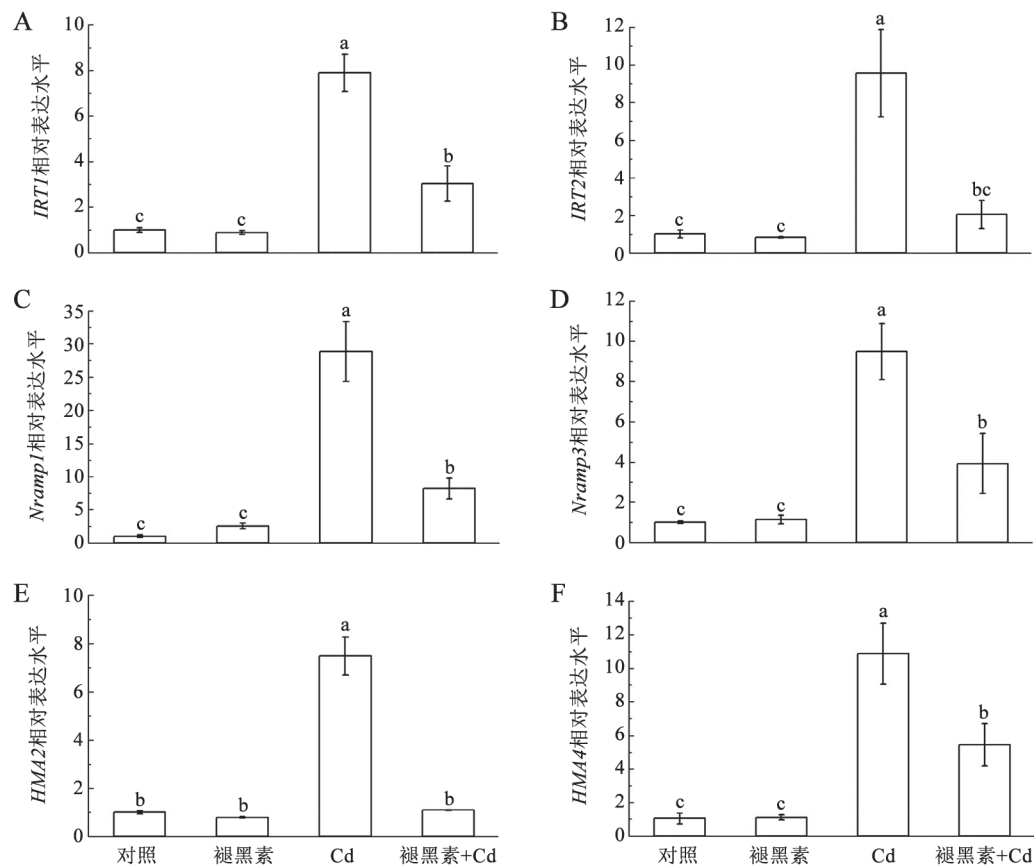


图6 叶面喷施褪黑素对Cd胁迫下小白菜幼苗中IRT1 (A)、IRT2 (B)、Nramp1 (C)、Nramp3 (D)、HMA2 (E)和HMA4 (F)转录水平的影响

Fig.6 Effect of foliar feeding of melatonin on gene expression of IRT1 (A), IRT2 (B), Nramp1 (C), Nramp3 (D), HMA2 (E) and HMA4 (F) in Cd stress-induced Chinese cabbage seedlings

的装载,促进Cd由根向地上部分的转运(Haydon和Cobbett 2007; Verret等2005)。本研究发现叶面喷施褪黑素显著下调Cd胁迫下IRT1、IRT2、Nramp1、Nramp3、HMA2、HMA4基因的转录。因此可以推测叶面喷施褪黑素可能是通过影响IRT1、IRT2的转录来影响小白菜对Cd的吸收,并通过影响Nramp1、Nramp3的转录来抑制其对液泡中Cd的活化作用,降低细胞质中有生物毒性的有效Cd浓度,通过下调HMA2、HMA4转录来抑制Cd由根向地上部分的转运,提高小白菜幼苗对Cd的耐性。

参考文献

- Agnieszka SC, Anna S, Maria S, et al (2000). The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology*, 145: 159–171
- Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, et al (2003). The chemistry

- of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res*, 34: 1–10
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress. *Trends Plant Sci*, 19: 789–797
- Bowler C, And MVM, Inze D (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Bio*, 43: 83–116
- Chen J, Yang LB, Gu J, et al (2015). *MAN3* gene regulates cadmium tolerance through the glutathione-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 205: 570–582
- Chen Q, Zhang XY, Liu YY, et al (2017). Hemin-mediated alleviation of zinc, lead and chromium toxicity is associated with elevated photosynthesis, antioxidative capacity; suppressed metal uptake and oxidative stress in rice seedlings. *Plant Growth Regul*, 81: 253–264
- Chen YH, Huang SH, Liu SH, et al (2006). Study of the heavy metal contamination in soils and vegetables in Nanjing area. *Resour Environ Yangtze Basin*, 15: 356–360 (in Chinese with English abstract) [陈亚华, 黄少华, 刘胜环

- 等(2006). 南京地区农田土壤和蔬菜重金属污染状况研究. 长江流域资源与环境, 15: 356–360]
- Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H (2001). The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol Bioch, 39: 657–664
- Ding AF, Pan GX (2003). Contents of heavy metals in soils and Chinese cabbages (*Brassica chinensis*) from some urban vegetable fields around Nanjing and the human health risks. Ecol Environ, 12: 409–411 (in Chinese with English abstract) [丁爱芳, 潘根兴(2003). 南京城郊零散菜地土壤与蔬菜重金属含量及健康风险分析. 生态环境学报, 12: 409–411]
- Drażkiewicz M, Baszyński T (2005). Growth parameters and photosynthetic pigments in leaf segments of *Zea mays* exposed to cadmium, as related to protection mechanisms. J Plant Physiol, 162: 1013–1021
- Gu Q, Chen ZP, Yu XL, et al (2017). Melatonin confers plant tolerance against cadmium stress via the decrease of cadmium accumulation and reestablishment of microRNA-mediated redox homeostasis. Plant Sci, 261: 28–37
- Guerinot ML (2000). The ZIP family of metal transporters. Biochim Biophys Acta, 1465: 190–198
- Guo PH, Li RH (2000). Effects of high nocturnal temperature on photosynthetic organization in rice leaves. Acta Bot Sin, 42: 673–678 (in Chinese with English abstract) [郭培国, 李荣华(2000). 夜间高温胁迫对水稻叶片光合机构的影响. 植物学报, 42: 673–678]
- Han B, Yang Z, Xie YJ, et al (2014). *Arabidopsis* HY1 confers cadmium tolerance by decreasing nitric oxide production and improving iron homeostasis. Mol Plant, 7: 388–403
- Hasan MK (2016). The mechanisms of melatonin mediated-cadmium stress tolerance and detoxification in tomato (*Solanum lycopersicum*) (dissertation). Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [Hasan MK (2016). 褪黑素调控番茄镉胁迫抗性及解毒作用机制(学位论文). 杭州: 浙江大学]
- Haydon MJ, Cobbett CS (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. New Phytol, 174: 499–506
- Hu W, Xia Y, Chen YH, et al (2014). Effects of proline on cadmium accumulation in *Brassica chinensis*. J Plant Physiol, 50: 931–936 (in Chinese with English abstract) [胡蔚, 夏妍, 陈亚华等(2014). 脯氨酸对不结球白菜(*Brassica chinensis*)镉积累的影响. 植物生理学报, 50: 931–936]
- Li ZG, Gong M (2005). Improvement of measurement method for superoxide anion radical in plant. Acta Bot Yunnan, 27: 211–216 (in Chinese with English abstract) [李忠光, 龚明(2005). 植物中超氧阴离子自由基测定方法的改进. 云南植物研究, 27: 211–216]
- Lin YF, Aarts MG (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. Cell Mol Life Sci, 69: 3187–3206
- Liu N, Jin ZY, Wang SS, et al (2015). Sodic alkaline stress mitigation with exogenous melatonin involves reactive oxygen metabolism and ion homeostasis in tomato. Sci Hortic, 181: 18–25
- Maghsoudi K, Emam Y, Pessarakli M (2016). Effect of silicon on photosynthetic gas exchange, photosynthetic pigments, cell membrane stability and relative water content of different wheat cultivars under drought stress conditions. J Plant Nutr, 39: 1001–1015
- Pieri C, Marra M, Moroni F, et al (1994). Melatonin: A peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. Life Sci, 55: 271–276
- Pieri C, Moroni F, Marra M, et al (1995). Melatonin is an efficient antioxidant. Arch Gerontol Geriatr, 20: 159–165
- Ramón PF, Edith MP, Randy OC, et al (2012). Melatonin regulates Arabidopsis root system architecture likely acting independently of auxin signaling. J Pineal Res, 53: 279–288
- Rezvani M, Zaefarian F (2011). Bioaccumulation and translocation factors of cadmium and lead in *Aeluropus litoralis*. Aust J Agri Engi, 2: 114–119
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, et al (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J Pineal Res, 36: 1–9
- Shah K, Nahakpam S (2012). Heat exposure alters the expression of SOD, POD, APX and CAT isozymes and mitigates low cadmium toxicity in seedlings of sensitive and tolerant rice cultivars. Plant Physiol Bioch, 57: 106–113
- Tan DX, Manchester LC, Estebanzubero E, et al (2015). Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. Molecules, 20: 18886–18906
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, et al (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. Curr Top Med Chem, 2: 181–197
- Verret F, Gravot A, Auroy P, et al (2005). Heavy metal transport by *ATHMA4* involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His 11 stretch. Febs Lett, 579: 1515–1522
- Wang P, Yin LH, Liang D, et al (2012). Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate-glutathione cycle. J Pineal Res, 53: 11–20
- Wang R, Yang XL, Xu H, et al (2016). Research progress of melatonin biosynthesis and metabolism in higher plants. J Plant Physiol, 52: 615–627 (in Chinese with English abstract) [王蕊, 杨小龙, 须晖等(2016). 高等植物褪黑素的合成和代谢研究进展. 植物生理学报, 52: 615–627]
- Wang WX, Zhang RM, Sun Y, et al (2016). Effect of exogenous melatonin on the antioxidant system of cucumber seedlings under nitrate stress. Acta Hortic Sin, 43: 695–703 (in Chinese with English abstract) [王伟香, 张锐敏,

- 孙艳等(2016). 外源褪黑素对硝酸盐胁迫条件下黄瓜幼苗抗氧化系统的影响. 园艺学报, 43: 695–703]
- Wang ZF, Li Q, Wu WG, et al (2017). Cadmium stress tolerance in wheat seedlings induced by ascorbic acid was mediated by NO signaling pathways. *Ecotox Environ Safe*, 135: 75–81
- Wu Q, Su NN, Cai JT, et al (2015). Hydrogen-rich water enhances cadmium tolerance in Chinese cabbage by reducing cadmium uptake and increasing antioxidant capacities. *J Plant Physiol*, 175: 174–182
- Xiao D, Zhang NW, Zhao JJ, et al (2012). Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalisation in non-heading Chinese cabbage. *Funct Plant Biol*, 39: 342–350
- Xu XD, Sun Y, Guo XQ, et al (2010). Effects of exogenous melatonin on ascorbate metabolism system in cucumber seedlings under high temperature stress. *Chin J Appl Ecol*, 21: 2580–2586 (in Chinese with English abstract) [徐向东, 孙艳, 郭晓芹等(2010). 褪黑素对高温胁迫下黄瓜幼苗抗坏血酸代谢系统的影响. *应用生态学报*, 21: 2580–2586]
- Yang YQ, Li X, Yang SH, et al (2015). Comparative physiological and proteomic analysis reveals the leaf response to cadmium-induced stress in poplar (*Populus yunnanensis*). *PLoS One*, 10: e0137396
- Yin LH, Wang P, Li MJ, et al (2013). Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to Marssonina apple blotch. *J Pineal Res*, 54: 426–434
- Zhang W, Sun DY (2009). Molecular and genetic evidence for the key role of *AtCaM3* in heat-shock signal transduction in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 149: 1773–1784
- Zhao XM, Dong DM, Hua XY, et al (2009). Distribution characters and bioactivity of lead, cadmium, chromium and arsenic in farmland soils near pollution sources. *J Agro-Environ Sci*, 28: 1573–1577 (in Chinese with English abstract) [赵兴敏, 董德明, 花修艺等(2009). 污染源附近农田土壤中铅镉铬砷的分布特征和生物有效性研究. *农业环境科学学报*, 28: 1573–1577]
- Zuo JQ, Xie JH, Xue YX, et al (2014). Progress research of melatonin in plant: a multifunctional response to various stress. *Genom Appl Biol*, 33: 709–715 (in Chinese with English abstract) [左佳琦, 谢佳恒, 薛宇轩等(2014). 褪黑素对缓解植物逆境胁迫作用的研究进展. *基因组学与应用生物学*, 33: 709–715]

Effects of foliar feeding of melatonin on cadmium tolerance of Chinese cabbage seedlings

LIU Zi-Li, HUANG Yi-Fan, ZHU Zheng-Bo, CHEN Ya-Hua, CUI Jin*

College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Potted Chinese cabbage cultivar ‘Aijiaohuang’ were used to study the effects of foliar feeding of melatonin ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cadmium tolerance of Chinese cabbage seedlings under cadmium ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) stress. Biomass and physiological indices were determined, and transcription of Cd absorption and translocation related genes were tested, too. The results showed that foliar feeding of melatonin significantly alleviated the Cd toxic symptoms, including the improvement of both biomass and chlorophyll content. These responses were consistent with a significant decrease of ROS (O_2^- , H_2O_2) and MDA. Melatonin enhanced the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, POD, APX) and content of antioxidant substance (AsA, GSH), and significantly decreased Cd accumulation of roots and shoots in Chinese cabbage seedlings. Furthermore, *IRT1*, *IRT2*, *Nramp1*, *Nramp3*, *HMA2*, *HMA4* were blocked by melatonin. Therefore, foliar feeding of melatonin could scavenge active oxygen to alleviate the effect of growth inhibition on Chinese cabbage seedlings caused by Cd stress. Meanwhile, melatonin may enhance Cd tolerance of Chinese cabbage seedlings by reducing expression of genes which restrained Cd uptake and accumulation.

Key words: melatonin; cadmium; antioxidation; Chinese cabbage; translocation factor

Received 2018-03-01 Accepted 2018-03-15

This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2016YFD0800700-3), and China Agriculture Research System (CARS-23-A03).

*Corresponding author (cuijin@njau.edu.cn).