

# 外源钙对镉胁迫下南美蟛蜞菊毛状根生长、抗氧化酶活性和镉吸收的缓解效应

施和平<sup>1</sup>, 王云灵<sup>1</sup>, 曾宝强<sup>2</sup>, 陈利华<sup>2</sup>

1 华南师范大学生命科学学院 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631

2 香港教育学院科学与环境学系, 香港 新界

施和平, 王云灵, 曾宝强, 等. 外源钙对镉胁迫下南美蟛蜞菊毛状根生长、抗氧化酶活性和镉吸收的缓解效应. 生物工程学报, 2012, 28(6): 747-762.

Shi HP, Wang YL, Tsang PoKeung Eric, et al. Antioxidative enzyme activities and cadmium absorption efficiency of *Wedelia trilobata* hairy roots under cadmium stress. Chin J Biotech, 2012, 28(6): 747-762.

**摘 要:** 为了探讨外源钙对重金属镉 (Cd) 缓解南美蟛蜞菊 *Wedelia trilobata* 毛状根毒害的生理机理, 采用溶液培养法研究了重金属 Cd 单独及其与 Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根生长、抗氧化酶超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化物酶 (POD) 活性及对 Cd<sup>2+</sup> 吸收的影响。结果表明, Cd ≤ 50 μmol/L 时促进毛状根生长; 高于 100 μmol/L Cd 则抑制其生长, 使其侧根短小, 根尖变褐或变黑。与对照相比, 不同浓度 Cd 培养的毛状根 POD 活性、SOD 活性和 MDA 含量都比对照明显提高, 但高于 100 μmol/L Cd 培养的毛状根可溶性蛋白含量均比对照降低。与仅添加 200 μmol/L 或 300 μmol/L Cd 的毛状根相比, Cd 和 10~30 mmol/L Ca 组合培养可促进毛状根生长, 使其主、侧根变粗; 提高其可溶性蛋白含量; 降低其 MDA 含量、POD 活性及 SOD 活性。原子吸收分光光度法测定结果表明, 南美蟛蜞菊毛状根能吸收和吸附重金属 Cd<sup>2+</sup>, 当 Cd<sup>2+</sup> 浓度为 100 μmol/L 时毛状根对 Cd<sup>2+</sup> 的吸收量最大, 而 Cd<sup>2+</sup> 浓度为 300 μmol/L 时毛状根对 Cd<sup>2+</sup> 的吸附量最大。外源加入 10~30 mmol/L Ca<sup>2+</sup> 可显著减少毛状根对 Cd<sup>2+</sup> 的吸收和吸附, 并可调节其抗氧化酶活性, 降低其膜脂过氧化水平而解除重金属镉对毛状根生长的抑制或毒害。

**关键词:** 镉, 南美蟛蜞菊, 毛状根, 抗氧化酶, 吸收, 钙

**Received:** October 21, 2011; **Accepted:** January 9, 2012

**Supported by:** Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 031510), Hong Kong Croucher Foundation.

**Corresponding author:** Heping Shi. Tel: +86-20-85214793; E-mail: shihp@scnu.edu.cn

广东省自然科学基金项目 (No. 031510), 香港裘槎基金资助。

# Alleviated affect of exogenous $\text{CaCl}_2$ on the growth, antioxidative enzyme activities and cadmium absorption efficiency of *Wedelia trilobata* hairy roots under cadmium stress

Heping Shi<sup>1</sup>, Yunling Wang<sup>1</sup>, PoKeung Eric Tsang<sup>2</sup>, and LeeWah Andrew Chan<sup>2</sup>

1 Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China

2 Department of Science and Environmental Studies, the Hong Kong Institute of Education, New Territories, Hong Kong, China

**Abstract:** In order to study the physiological mechanism of exogenous calcium on the toxicity of heavy metal cadmium (Cd) to *Wedelia trilobata* hairy roots, the effects of Cd alone, and in combination with different concentrations of Ca on growth, contents of soluble protein and malondialdehyde (MDA), activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD),  $\text{Cd}^{2+}$  absorption in *W. trilobata* hairy roots were investigated. Cd concentrations lower than 50  $\mu\text{mol/L}$  enhanced the growth of hairy roots, while concentrations higher than 100  $\mu\text{mol/L}$  inhibited growth, making the branched roots short and small, and also turning the root tips brown, even black. In comparison with the control (0  $\mu\text{mol/L}$  Cd), the soluble protein content in hairy roots was found to increase when cultured with 10–50  $\mu\text{mol/L}$  Cd, and decrease when exposed to a cadmium concentration higher than 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd. In addition, the activities of POD and SOD activity and MDA content were significantly higher than the control. Compared to the control (hairy roots cultured without 10–30 mmol/L Ca), 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd or 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10–30 mmol/L Ca resulted in increased growth, causing the main root and secondary roots thicker and also an increase in soluble protein content. On the contrary, MDA content and POD and SOD activities decreased. Quantitative analysis by Atomic Absorption Spectrophotometry showed that *W. trilobata* hairy roots can absorb and adsorb heavy metal Cd in the ionic form of  $\text{Cd}^{2+}$ . The maximum content of  $\text{Cd}^{2+}$  absorbed by the hairy roots was obtained with a concentration 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  while that of  $\text{Cd}^{2+}$  adsorbed by hairy roots was achieved with a concentration of 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$ . The exogenous addition of 10–30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  was found to reduce the absorption, adsorption of  $\text{Cd}^{2+}$  and the toxicity of Cd significantly. This reduction in toxicity was caused by the reduction in the absorption of Cd and decreasing the lipid peroxidation through regulating the activities of antioxidant enzymes SOD and POD in the hairy roots.

**Keywords:** cadmium, *Wedelia trilobata*, hairy roots, antioxidative enzymes, absorption, calcium

镉 (Cd) 虽不是植物生长必需的微量元素, 但由于其移动性强、被植物吸收利用和累积后, 不仅可影响植物的产量和品质, 导致植物生长被抑制或产生毒害; 而且也易通过食物链进入人和动物体内富集来危及人和动物健康, 是目前土壤和水体环境中最受关注的、毒性最强的重金属元素之一, 而且 Cd 污染问题已成为威胁土壤生态安全和制约农业可持续发展的一个重要因素<sup>[1]</sup>。因而, 如何治理和控制重金属 Cd 污染, 寻找降

低 Cd 毒害或修复被 Cd 污染环境的有效方法, 一直是国内外环境科学研究的热点与难点。根既是植物吸收矿质离子的最主要器官, 也是镉最直接、最严重的受害器官之一。有研究表明, 利用植物尤其是重金属蓄积植物的根系对土壤和水体中某种重金属污染元素具有特殊的吸收富集和转化能力, 不失为治理重金属污染, 实现生态修复的高效而廉价的有效方法之一<sup>[2]</sup>。与对照根 (自然根) 相比, 由发根农杆菌 *Agrobacterium*

*rhizogenes* 感染植物细胞遗传转化后产生的毛状根, 由于具有产生分枝侧根能力很强、可快速自主生长, 根系极发达及具有很大的吸收面积; 近年相继有人利用可离体自主快速生长的毛状根来吸收重金属离子 Ni 和 Cd<sup>[3]</sup>, 或根滤重金属铀以修复被放射性金属元素铀污染的环境<sup>[4]</sup>, 以及利用毛状根迅速吸收和转化废水中的 2,4-D 等污染物<sup>[5]</sup>。但到目前为止, 国内外少见利用发根农杆菌遗传转化产生的毛状根或其再生植株来开展对重金属污染物修复的更多研究报道。南美蟛蜞菊 *Wedelia trilobata* (L.) A.S.Hitche 是华南地区常见的用作园林绿化的耐阴地被植物和护坡植物, 并具有较强的对有害金属元素的吸附积累作用<sup>[6]</sup>, 但因其植物根系不发达, 目前仍未见大量利用该植物进行环境修复的研究报道。我们曾用发根农杆菌获得了可自主生长的南美蟛蜞菊毛状根<sup>[7]</sup>; 而开展其毛状根对重金属镉的吸收和镉耐受能力的研究, 是今后开发利用生长迅速, 且根系发达的南美蟛蜞菊毛状根系及其再生植株进行重金属镉污染环境生物修复的前提。但至今为止, 未见有关重金属 Cd 对南美蟛蜞菊毛状根生长和毒害的影响及其对 Cd 吸收的任何报道。

钙 (Ca) 是植物生长发育必需的大量元素。已有研究表明, Ca 可以与 Cd 竞争植物根系上吸收位点, 降低植物含 Cd 量<sup>[8]</sup>; 而外源 Ca 可以增强植物对许多非生物逆境的适应性, 减轻逆境对植物所造成的伤害<sup>[9]</sup>。但到目前为止, 少见有关 Cd 和 Ca 结合对毛状根生长或毒害影响的系统研究报道。

本研究以发根农杆菌遗传转化产生的可在

无激素培养基上自主生长的南美蟛蜞菊毛状根为材料, 来探讨重金属 Cd 及其与 Ca 结合对南美蟛蜞菊毛状根生长、抗氧化酶活性以及吸收 Cd 影响的生理机理, 旨在为今后开展利用生长迅速的具发达根系的南美蟛蜞菊毛状根及其再生植株来净化被重金属 Cd 污染的水体和土壤环境奠定实验技术基础和提供可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

采用由含农杆菌型野生 Ri 质粒的发根农杆菌 ATCC15834 遗传转化南美蟛蜞菊叶片外植体所产生的、能在 MS 培养基上自主快速生长并已继代培养的毛状根, 其诱导和继代培养见欧少云等的方法<sup>[7]</sup>。

### 1.2 培养基及培养条件

在探讨培养基中 Cd 浓度对南美蟛蜞菊毛状根生长、抗氧化酶活性的影响时, 采用添加不同浓度 Cd (以 CdCl<sub>2</sub> 的形式加入) 的液体 MS 培养基, 其中 Cd 浓度分别为 0、10、50、100、300 μmol/L; 而在探讨 Cd 与 Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根生长及酶活性的影响时, 采用 200、300 μmol/L Cd 和 10、20、30 mmol/L Ca 组合的 MS 培养基进行培养; 在探讨培养基中 Cd 浓度及其与 Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根吸收及吸附 Cd 的影响时, 分别采用 100 μmol/L 或 300 μmol/L Cd 和 10、20、30 mmol/L Ca 组合的 MS 培养基进行培养。以上所有培养基在灭菌前 pH 值调至 5.8~6.0, 经 121 °C 高温湿热灭菌后待用。每 250 mL 锥形瓶中盛 50 mL 液体培养基, 定量接种南美蟛蜞菊毛状根后, 将培养瓶置于摇床上, 于 (25±2) °C 下振荡培养。

### 1.3 Cd 对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响

选取生长旺盛的南美蟛蜞菊毛状根, 剪切成 4~5 cm 且具根尖的根段, 按定量接种法接入含有不同浓度 Cd 或 Cd-Ca 组合的液体 MS 培养基中进行暗培养。每锥形瓶的接种量为 0.2 g (FW)。在为期 25 d 的培养过程中观察毛状根的生长变化并进行生物量的测定。每隔 5 d 随机抽取不同浓度处理的毛状根培养物各 3 瓶, 用自来水冲洗去培养物上的残留液体培养基, 然后再用蒸馏水冲洗并用吸水纸吸干水分后进行毛状根生物量(鲜重) 测量。将新鲜毛状根培养物保存于 -80 °C 的超低温冰箱中, 用于进行毛状根可溶性蛋白含量、POD、SOD 活性和 MDA 含量的测定。

### 1.4 毛状根可溶性蛋白含量、POD、SOD 活性及 MDA 含量的测定

为了探讨不同浓度 Cd 单独及其与 Ca 组合对毛状根过氧化物酶 (POD) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 及丙二醛 (MDA) 含量的影响, 取毛状根定量接种到仅添加 10、50、100  $\mu\text{mol/L}$  或 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 及 200  $\mu\text{mol/L}$  或 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  组合的液体 MS 培养基中进行培养, 并分别在培养后 5、10、15、20、25 d 取样进行测定。其中, 毛状根培养物可溶性蛋白含量的测定参照 Bradford 的方法<sup>[10]</sup>, 用考马斯亮蓝 G-250 进行染色并用紫外分光光度法测定。培养过程中其 SOD 活性变化的测定基本按照 Beauchamp 和 Fridovich 的测定方法<sup>[11]</sup>, 以抑制 NBT 光还原 50% 所需要的酶量为 1 个酶活性单位; 其 POD 活性的测定按照张志良等的愈创木酚法进行<sup>[12]</sup>, 以制备酶提取液所用的磷酸缓冲液作空白对照, 用每分钟  $OD_{470}$  变化值表示酶活性的大小, 即以  $OD_{470}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  蛋白表示。MDA

含量的测定按 Heath 和 Packer 的方法<sup>[13]</sup>。实验重复测定 3 次, 取平均值。

### 1.5 南美蟛蜞菊毛状根 Cd 含量测定

南美蟛蜞菊毛状根在培养 2~3 d 后, 分别移入含 100、300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 (或) 10、20、30 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  组合的液体培养基中, 分别培养 2 d、4 d 和 6 d 后, 取出毛状根, 用去离子水洗 1 遍后, 再用约 50 mL 20 mmol/L EDTA 液洗 2~3 次, 收集 EDTA 洗涤液, 经浓缩、常规消化后供测定毛状根吸附的 Cd 含量用; 残余的培养基经滤纸过滤后用去离子水定容至 50 mL, 经常规消化后供测定培养基残存的 Cd 含量用。毛状根样品置于 60 °C~70 °C 下烘干, 精密称取粉碎过的毛状根样品于 100 mL 锥形瓶中, 加混酸 ( $V_{\text{HNO}_3} : V_{\text{HClO}_4} = 4 : 1$ ) 15 mL 消化, 电炉上加热烘干后, 1%  $\text{HNO}_3$  定容, 供测定毛状根吸收的 Cd 含量。各样品的 Cd 含量采用原子吸收分光光度计法测定。其测定条件为: 波长 228.8 nm, 灯电流 7 mA, 狭缝宽度 113 nm, 干燥 110 °C, 30 s, 灰化 500 °C。实验重复测定 3 次, 取平均值。

### 1.6 数据处理

数据处理采用 SPSS13.0 软件进行方差分析, 采用 LSD 法进行处理间的差异性比较 ( $P < 0.05$ ), 采用 Excell 2003 进行图表制作。

## 2 结果与分析

### 2.1 重金属 Cd 单独及其与 Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响

南美蟛蜞菊毛状根接种至 MS 液体培养基中培养 1~2 d 后, 可见从毛状根根段开始产生新的白色侧根, 且根段不断伸长。与对照相比, 培养

至 10 d 时,无论是低浓度还是高浓度 Cd 培养的毛状根,其主、侧根都变粗,根段表面从浅红色变成紫红色。其中,10~50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根分支能力较强,根尖白色且健壮;而高浓度 100~300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的美蟛蜞菊毛状根的主根很少伸长,侧根数量少且短小,根尖开始发黄(图 1, A-E)。随着培养基中 Cd 浓度的升高和培养时间的延长,各浓度 Cd 培养的美蟛蜞菊毛状根在培养后期时根尖都逐渐变黄,起始根段开始变绿,并逐渐老化;而高浓度 100~300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根根段开始发黑,呈现明显的重金属 Cd 毒害症状。

图 2 为 Cd 浓度对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响。从图 2 可见,对照(不添加 Cd 的 MS 培养基)毛状根生物量(鲜重)在 0~20 d 的培养期内,随着培养时间的延长而逐渐增加,至培养 20 d 时达到最大,其生物量增值倍数达到 12.475;随后毛状根逐渐老化,生长速率下降。与对照相比,不同浓度 Cd 培养的毛状根生物量在培养后 5~10 d 期间也逐渐增加,除高浓度 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 外, $\leq 100$   $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根生物量增值倍数都与对照相当或略高。但培养 15 d 后,除低浓度 10  $\mu\text{mol/L}$  Cd 外,50~300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根生物量增值倍数都随培养基 Cd 浓度



图 1 重金属镉单独及其与钙组合对南美蟛蜞菊毛状根生长形态的影响

Fig. 1 Effect of Cd alone or in combination with calcium on the growth and morphology of hairy roots. (A-E) Hairy roots cultured for 10 days in medium with different concentration of Cd. (A) 0  $\mu\text{mol/L}$ . (B) 10  $\mu\text{mol/L}$ . (C) 50  $\mu\text{mol/L}$ . (D) 100  $\mu\text{mol/L}$ . (E) 300  $\mu\text{mol/L}$ . (F-H) Hairy roots cultured for 20 days in medium with 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd and 10~30 mmol/L Ca. (F) 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd+10 mmol/L Ca. (G) 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd +20 mmol/L Ca. (H) 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd +30 mmol/L Ca.

的增加而逐渐下降, 培养至 25 d 时, 高浓度 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根鲜重增值倍数仅为同期对照毛状根的 40.69%。这表明高浓度 Cd 不仅抑制南美蟛蜞菊毛状根的生长, 而且会使毛状根出现毒害症状。

图 3 为 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响。与对照 (仅添加 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的) 毛状根相比, 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合培养的毛状根鲜重增值倍数比对照显著提高, 其中以 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 20 mmol/L Ca 组合培养促进毛状根生长的效果最好, 不仅毛状根生长旺盛, 而且分支侧根更多; 在毛状根培养过程的各个时期, 其鲜重增值倍数分别为对照的 6.53 倍、4.88 倍、5.22 倍、4.91 倍和 4.17 倍; 同时, 与对照相比, 培养 5 d 后, 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~30 mmol/L Ca 组合培养南美蟛蜞菊毛状根根表面也由浅红色变成紫红色, 不仅根表面颜色比对照深; 且其主、侧根变得更粗而弯曲 (图 1, F, G, H)。而与对照 (仅添加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的) 毛状根相比, 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合培养的毛状根根尖褐变程度和根生长受抑制程度明显比对照轻, 不仅毛状根根系能产生较多的分枝侧根, 根生长形态正常, 根尖褐化变慢; 而且 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合培养的毛状根鲜重增值倍数与 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~30 mmol/L Ca 组合培养的趋势相似, 其根表面也呈现深紫红色、根体增粗且部分弯曲。这表明, 低浓度 Cd 对毛状根生长的影响较小, 甚至促进生长; 但高浓度 Cd 则抑制其生长, 且浓度愈高抑制程度愈强, 甚至产生毒害; 但外源添加 10~30 mmol/L Ca 可缓解高浓度 Cd 对毛状根生

长的抑制和毒害。

## 2.2 Cd 单独及其与 Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根可溶性蛋白含量的影响

图 4 为培养基 Cd 浓度对南美蟛蜞菊毛状根可溶性蛋白含量的影响。从图 4 可见, 无论是对照还是不同浓度 Cd 培养的毛状根, 其可溶性蛋白含量都随着培养时间的延长而呈先上升后逐

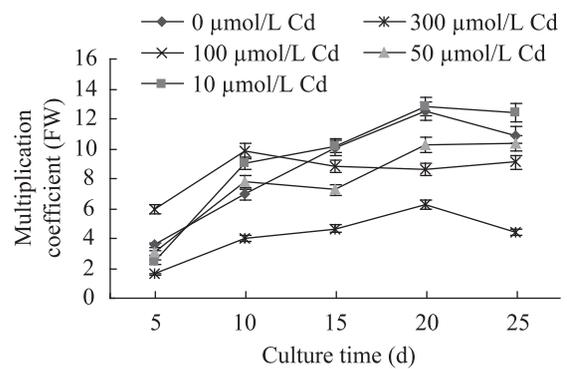


图 2 Cd 浓度对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响

Fig. 2 Effect of Cd concentration in MS medium on the growth of *W. trilobata* hairy roots.

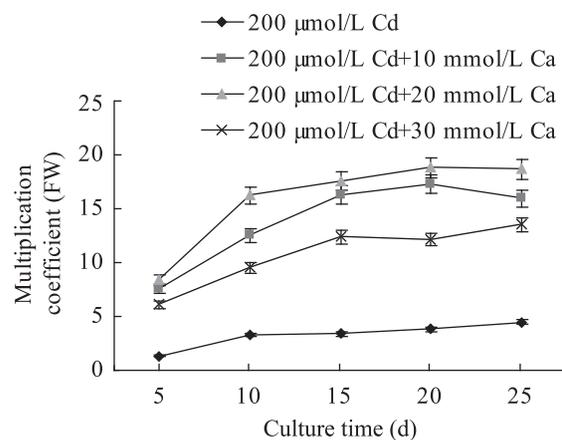


图 3 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根生长的影响

Fig. 3 Effect of 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10~30 mmol/L Ca on the growth of *W. trilobata* hairy roots.

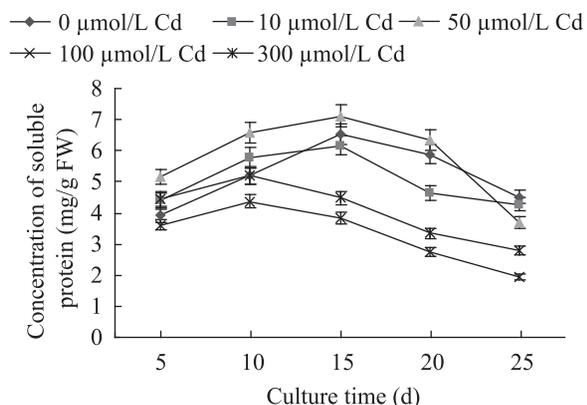


图 4 Cd 浓度对南美蟛蜞菊毛状根可溶性蛋白含量的影响

Fig. 4 Effect of Cd concentration on the soluble protein content in hairy roots of *W. trilobata*.

渐下降的趋势。与对照相比, 10  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理的毛状根可溶性蛋白含量仅在培养后 5~10 d 期间比同期对照提高; 而后随着培养时间延长而逐渐下降。50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理的毛状根可溶性蛋白含量几乎在整个培养期间都比对照提高, 其中, 以培养 15 d 的可溶性蛋白含量最高, 达到 7.12 mg/g FW; 而 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根可溶性蛋白含量则比对照低; 而当毛状根在 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 中培养时, 其可溶性蛋白含量仅在培养后 5~10 d 期间比同期对照提高, 且随着培养时间延长而逐渐下降; 但其可溶性蛋白含量在 5~25 d 的培养期间均比 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根高。这表明在培养过程中添加 10~50  $\mu\text{mol/L}$  Cd 可在一定程度上促进毛状根可溶性蛋白的产生, 但随着 Cd 胁迫时间的延长和 Cd 浓度的升高, 毛状根的蛋白质合成受阻或合成能力逐渐下降。

而与对照 (仅添加 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd) 培养的毛状根相比, 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~20 mmol/L Ca

组合培养的毛状根可溶性蛋白含量在培养后 5~15 d 间均比对照略高, 而当毛状根在 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 30 mmol/L Ca 组合的培养基中培养时, 虽在培养 5~15 d 期间的可溶性蛋白含量比对照低, 但在培养 15~25 d 期间, 其可溶性蛋白含量随培养时间的延长而逐渐升高, 且明显高于对照。与对照 (仅添加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根) 相比, 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~30 mmol/L Ca 组合培养的毛状根可溶性蛋白含量也随着培养时间的延长呈现先升高后逐渐下降的趋势, 但其含量均比同期对照明显升高, 尤其是当毛状根在 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 30 mmol/L Ca 中培养时, 其可溶性蛋白含量分别是同期对照的 2.39 倍、1.80 倍、1.62 倍、3.11 倍和 2.67 倍。这表明, 随着 Cd 胁迫处理时间的延长, Ca 可能通过促进蛋白水解酶活性, 加强了某些蛋白质的分解, 通过提高南美蟛蜞菊毛状根的可溶性蛋白含量来影响重金属 Cd 对毛状根生长的抑制或毒害。

### 2.3 Cd 单独及其与 Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根 POD 活性的影响

植物体内的超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 是活性氧自由基清除系统中重要的保护酶, 其活性的提高可以为细胞清除过多的自由基, 是使细胞免受毒害的调节反应, 但这种调节能力有一定限度。从图 5 可见, 对照 (0  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根) 的 POD 活性在培养过程中呈缓慢上升的趋势, 与对照相比, 不同浓度 Cd 培养的毛状根 POD 活性则呈先上升后下降的趋势; 而无论是低浓度 Cd (10  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$ ) 还是高浓度 Cd (100  $\mu\text{mol/L}$  和 300  $\mu\text{mol/L}$ ) 培养的毛状根 POD 活性在 5~20 d 内均比同期对照高。

其中, 100  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根 POD 活性在培养至 10 d 达到最高, 为同期对照的 1.47 倍, 但培养 10 d 后其 POD 活性随着培养时间的延长而逐渐下降, 至培养 25 d 时其 POD 活性甚至比对照及其他浓度 Cd 培养的都低; 而 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根 POD 活性则在培养的各个时期都比对照和其他镉浓度培养的毛状根高, 其 POD 活性分别比同期对照增加 25.6%、63.6%、77.6%、64.4% 和 44.4%, 达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。这表明, 在一定 Cd 浓度范围内南美蟛蜞菊毛状根可通过提高其 POD 活性来抵御 Cd 胁迫引起的毛状根生长的抑制或毒害。

图 6 为 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根 POD 活性影响的测定结果。从图 6 可见, 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~30 mmol/L Ca 组合培养的毛状根 POD 活性均比对照 (仅添加 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd) 毛状根的 POD 活性明显降低, 其毛状根 POD 活性在培养后 5~20 d 内均随时间的延长而逐渐升高; 20 d 后, 除 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 30 mmol/L Ca 组合培养的毛状根 POD 活性继续升高外, 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10 mmol/L 及 20 mmol/L Ca 组合培养的毛状根 POD 活性迅速下降, 培养到 25 d 时分别仅为对照的 31.1% 和 38.0%。而 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~30 mmol/L Ca 组合培养的毛状根 POD 活性与 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~30 mmol/L Ca 组合培养的毛状根的 POD 活性变化趋势相似, 其 POD 活性也比仅添加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 培养的毛状根明显降低。这表明, 外源 Ca 与 Cd 组合可以明显降低南美蟛蜞菊毛状根的 POD 活性, 并可能通过对 POD 活性的调节来拮抗或减轻重金属 Cd 对南美蟛蜞菊毛状根生长的抑制或毒害。

## 2.4 Cd 单独及其与 Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根 SOD 活性的影响

图 7 为 Cd 浓度对南美蟛蜞菊毛状根 SOD 活性影响的测定结果。从图 7 可见, 与对照相比, 不同浓度 Cd 培养的南美蟛蜞菊毛状根 SOD 活性在培养后 5~20 d 间随培养时间的延长而逐渐升高, 且其活性均比同期对照明显提高; 而培养 20 d

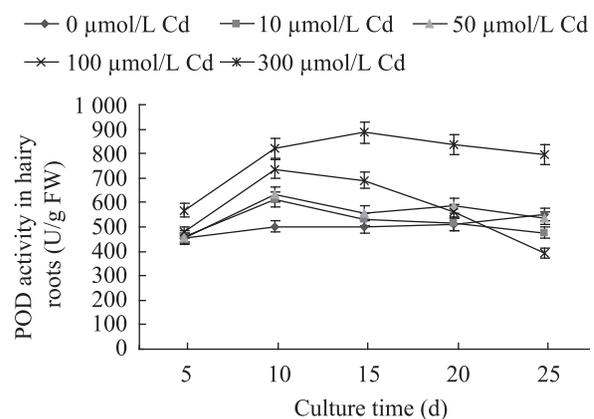


图 5 Cd 浓度对南美蟛蜞菊毛状根 POD 活性的影响  
Fig. 5 Effect of Cd concentrations on POD activities in hairy roots of *W. trilobata*.

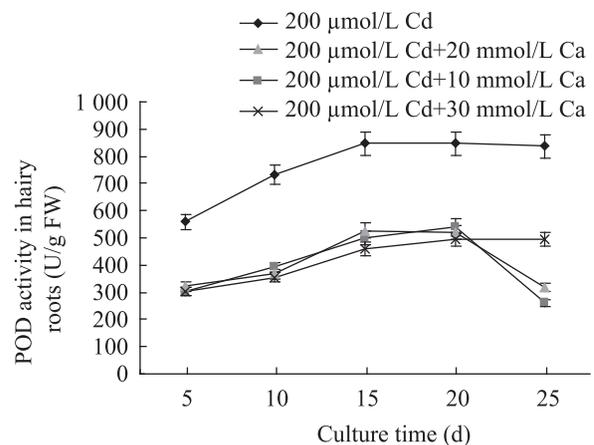


图 6 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根 POD 活性的影响  
Fig. 6 Effect of 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10~30 mmol/L Ca on POD activities in hairy roots of *W. trilobata*.

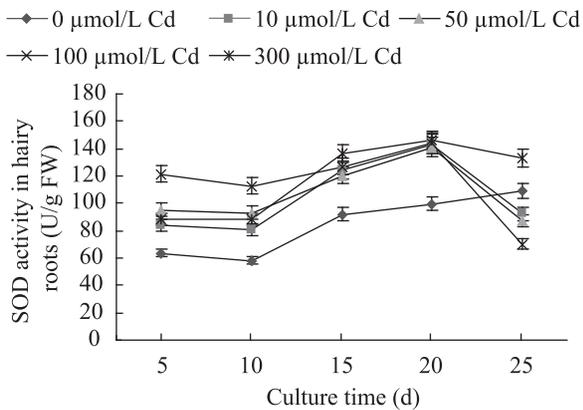


图7 Cd浓度对南美蟛蜞菊毛状根SOD活性的影响  
Fig. 7 Effect of Cd concentrations on SOD activities in hairy roots of *W. trilobata*.

后,对照毛状根的SOD活性继续上升;而不同浓度Cd培养的毛状根SOD活性则逐渐下降,培养至25 d时,10、50、100 μmol/L Cd培养的毛状根SOD活性甚至比同期对照还低;其中以100 μmol/L Cd培养的毛状根SOD活性最低,仅为同期对照SOD活性的64.06%。该结果表明,重金属Cd可明显提高毛状根的SOD活性,并可能通过对毛状根SOD活性的调节来影响Cd对毛状根生长的抑制或毒害。

而与对照相比,当南美蟛蜞菊毛状根在200 μmol/L Cd和10 mmol/L或30 mmol/L Ca中培养5~20 d时,其SOD活性大都比同期仅添加200 μmol/L Cd培养的毛状根低,但培养至20~25 d时其SOD活性与对照相当或略升高;而200 μmol/L Cd和20 mmol/L Ca培养的毛状根SOD活性在培养后5~25 d期间则始终比对照降低,培养至25 d时其SOD活性为同期对照的46.76%。此外,当毛状根在300 μmol/L Cd和10、20和30 mmol/L Ca组合中培养时,在整个培养过程中其SOD活性呈先升后降的趋势,其SOD

活性均较对应的仅添加300 μmol/L Cd培养的毛状根不同程度的降低。可见,与仅加高浓度Cd培养的毛状根相比,外源加入10~30 mmol/L Ca可降低毛状根的SOD活性。而SOD作为一种重要的防御酶,其活性的维持和提高是植物耐受Cd胁迫的物质基础之一。该结果表明,南美蟛蜞菊毛状根对Cd胁迫具有一定的耐受能力;而外源添加一定浓度的Ca可能通过降低毛状根的SOD活性,来减轻或缓解重金属Cd对南美蟛蜞菊毛状根生长的抑制或毒害。

## 2.5 Cd单独及其与Ca组合对南美蟛蜞菊毛状根MDA含量的影响

膜脂过氧化产物MDA含量的高低是细胞膜受损伤程度的重要指标之一。从图8可见,无论南美蟛蜞菊毛状根是在10 μmol/L或50 μmol/L低浓度Cd,还是在高浓度100 μmol/L Cd和300 μmol/L Cd中培养,其MDA含量均比同期对照升高,并且随着Cd浓度的增加而逐渐升高;其中,以300 μmol/L Cd培养的毛状根MDA含量最高,在整个培养过程中,其MDA含量分别

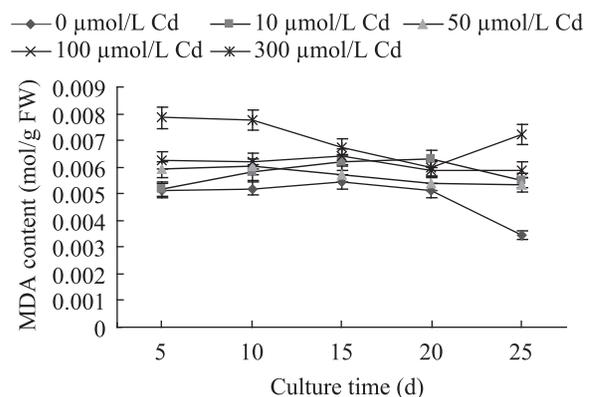


图8 Cd浓度对南美蟛蜞菊毛状根MDA含量的影响  
Fig. 8 Effect of Cd concentration on MDA content in hairy roots of *W. trilobata*.

为同期对照毛状根 MDA 含量的 1.53、1.49、1.23、1.17 和 2.10 倍。这可能表明, 重金属 Cd 对南美蟛蜞菊毛状根生长的抑制或毒害可能与其对毛状根细胞膜脂过氧化的促进有关。

而与对照 (仅添加 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd) 相比, 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 20~30 mmol/L Ca 组合培养的南美蟛蜞菊毛状根 MDA 含量比对照降低, 而 200  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10 mmol/L Ca 组合培养的毛状根 MDA 含量在 5~15 d 培养期间比对照略高, 而培养 15 d 后也逐渐降低, 至培养 25 d 时其 MDA 含量比同期对照降低了 33.72%。图 9 为 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根 MDA 含量的影响。从图 9 可见, 与对照 (仅添加 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd) 相比, 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10、20 和 30 mmol/L Ca 组合培养的毛状根 MDA 含量在培养后 5~20 d 期间, 其 MDA 含量都比对照明显降低; 而培养至 25 d 时, 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 10~20 mmol/L Ca 组合培养的毛状根的 MDA 含量略高于对照, 但 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 和 30 mmol/L Ca 培养毛状根的 MDA 含量则比对照低。可见, 外源加入 10~30 mmol/L Ca 可降低毛状根的 MDA 含量。这可能表明, 外源 Ca 可能通过降低毛状根细胞膜脂过氧化程度而对重金属镉对毛状根生长的抑制或毒害产生拮抗作用或缓解效应。

## 2.6 $\text{Cd}^{2+}$ 及其与 $\text{Ca}^{2+}$ 组合对南美蟛蜞菊毛状根吸收 $\text{Cd}^{2+}$ 的影响

图 10 为培养液  $\text{Cd}^{2+}$  浓度对南美蟛蜞菊毛状根吸收重金属  $\text{Cd}^{2+}$  的影响。从图 10 可见, 当毛状根在含有 100  $\mu\text{mol/L}$  和 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  的培养基中培养时, 毛状根能从培养基中吸收重金属  $\text{Cd}^{2+}$ , 其中当培养基镉浓度 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  时,

毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收量较高, 且  $\text{Cd}^{2+}$  吸收量随培养时间的延长而逐渐升高。然而, 当毛状根在 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  培养基中培养 2 d、4 d 和 6 d 后, 其  $\text{Cd}^{2+}$  吸收量则分别比 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  培养的同期毛状根降低约 40.23%、32.35% 和 42.53%。这表明, 南美蟛蜞菊毛状根能吸收重金属  $\text{Cd}^{2+}$ , 但其对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收效率与  $\text{Cd}^{2+}$  的浓度和培养时间的长短等因素有关。

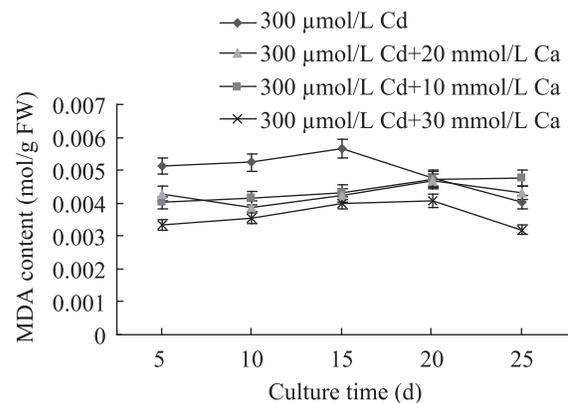


图 9 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd 与 10~30 mmol/L Ca 组合对南美蟛蜞菊毛状根 MDA 含量的影响

Fig. 9 Effect of 300  $\mu\text{mol/L}$  Cd in combination with 10~30 mmol/L Ca on MDA content in hairy roots of *W. trilobata*.

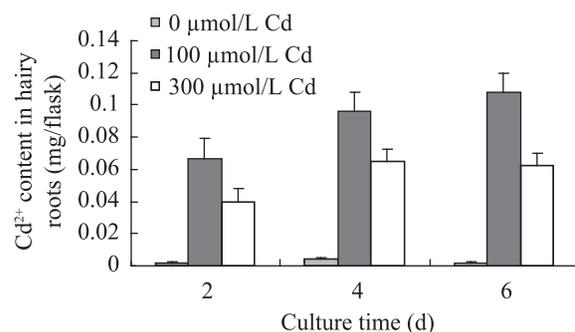


图 10  $\text{Cd}^{2+}$  浓度对南美蟛蜞菊毛状根吸收  $\text{Cd}^{2+}$  的影响

Fig. 10 Effect of Cd concentrations on absorption of  $\text{Cd}^{2+}$  in hairy roots of *W. trilobata*.

图 11 和图 12 分别为 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  和 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  与 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  组合培养对南美蟛蜞菊毛状根吸收  $\text{Cd}^{2+}$  的测定结果。由图 11 可知, 与对照 (仅添加 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  培养的毛状根) 相比, 外源添加 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  可显著降低毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收, 其镉含量大都随培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高而逐渐下降。培养到第 6

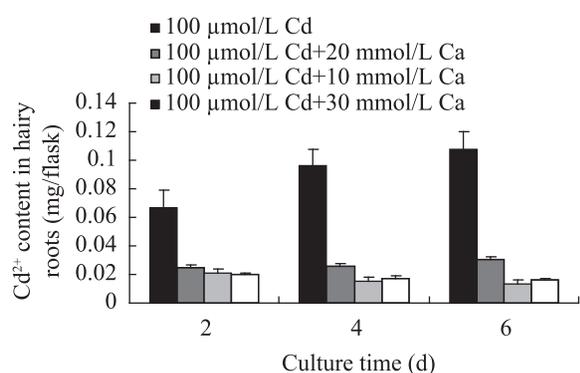


图 11 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  与 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  组合对南美蟛蜞菊毛状根吸收  $\text{Cd}^{2+}$  的影响

Fig. 11 Effect of 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  in combination with 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  on absorption of  $\text{Cd}^{2+}$  in hairy roots of *W. trilobata*.

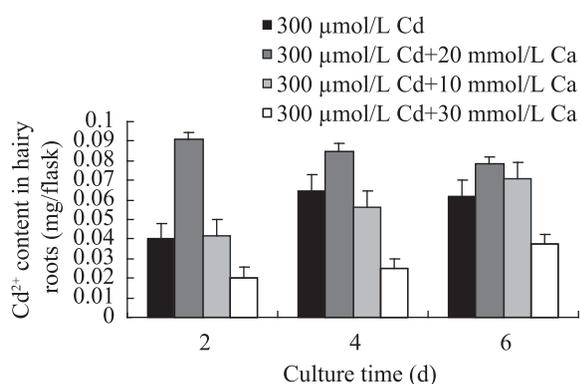


图 12 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  与 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  组合对南美蟛蜞菊毛状根吸收  $\text{Cd}^{2+}$  的影响

Fig. 12 Effect of 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  in combination with 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  on absorption of  $\text{Cd}^{2+}$  in hairy roots of *W. trilobata*.

天时, 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  与 10~30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  组合培养的毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收量分别比同期对照降低了 71.56%、87.49% 和 85.32%, 达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。而从图 12 可见, 与对照 (仅添加 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  培养的) 毛状根相比, 外源加入 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  时, 毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收量不但没有降低, 反而比对照有明显提高, 培养 2 d、4 d 和 6 d 时其毛状根  $\text{Cd}^{2+}$  含量分别为同期对照毛状根  $\text{Cd}^{2+}$  吸收量的 2.26 倍、1.31 倍和 1.26 倍; 但外源加入 30 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  时毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收才受到明显抑制, 培养至 6 d 时, 其毛状根吸收的  $\text{Cd}^{2+}$  含量约比同期对照降低 61.58%。可见, 外源添加  $\text{Ca}^{2+}$  可以影响南美蟛蜞菊毛状根对重金属  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收能力, 但当用高浓度  $\text{Cd}^{2+}$  培养毛状根时, 需添加较高浓度的外源  $\text{Ca}^{2+}$  才能有效抑制毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收。而这表明外源  $\text{Ca}^{2+}$  可能通过降低或减少毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸收, 从而拮抗或减弱高浓度  $\text{Cd}^{2+}$  对毛状根生长的抑制或毒害。

## 2.7 $\text{Cd}^{2+}$ 及其与 $\text{Ca}^{2+}$ 组合对南美蟛蜞菊毛状根吸附 $\text{Cd}^{2+}$ 的影响

图 13 为  $\text{Cd}^{2+}$  浓度对南美蟛蜞菊毛状根吸附  $\text{Cd}^{2+}$  的影响。从图 13 可见, 当毛状根在含有 100  $\mu\text{mol/L}$  和 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  的培养基中培养时, 毛状根能吸附培养基中的  $\text{Cd}^{2+}$ , 并且其  $\text{Cd}^{2+}$  吸附量随培养基  $\text{Cd}^{2+}$  浓度的增加及培养时间的延长而升高; 其中 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  培养的毛状根吸附的  $\text{Cd}^{2+}$  含量较 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  培养的高, 培养 2 d、4 d 和 6 d 后, 其  $\text{Cd}^{2+}$  吸附量分别约为同期 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  的 0.82 倍、3.74 倍和 5.26 倍。这表明, 南美蟛蜞菊毛状根具有较强的吸附重金属  $\text{Cd}^{2+}$  的能力, 且毛状根对镉的吸附作用与所用的  $\text{Cd}^{2+}$  浓度及培养时间长短等有关。

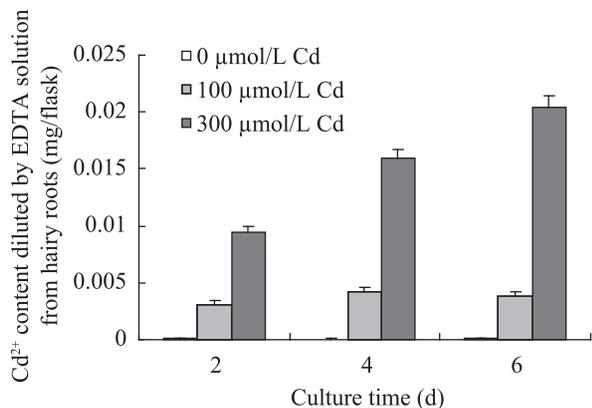


图 13  $\text{Cd}^{2+}$  浓度对 EDTA 洗脱的毛状根重金属  $\text{Cd}^{2+}$  含量的影响

Fig. 13 Effect of  $\text{Cd}^{2+}$  concentration on  $\text{Cd}^{2+}$  content diluted by EDTA solution from hairy roots of *W. trilobata*.

图 14 为 100  $\mu\text{mol/L}$  和 10~30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  组合对南美蟛蜞菊毛状根吸附  $\text{Cd}^{2+}$  的测定结果。由图 14 可知, 与对照 (仅 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  培养的毛状根) 相比, 外源加入 10~30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  时毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量随着  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高增加而逐渐降低; 其中以培养 4 d 时 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  与 10~30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  组合培养的毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量下降程度最明显, 其  $\text{Cd}^{2+}$  吸附量分别比同期对照下降约 38.16%、62.26% 和 66.90%, 达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。而与 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  与 10~30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  组合相比, 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  和 10~30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  组合更可降低毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量; 培养到 6 d 时, 毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量分别比同期对照 (仅添加 300  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  培养的毛状根) 下降了 66.01%、71.13% 和 97.53%, 差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。可见, 外源加入 10~30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  能不同程度地降低毛状根对  $\text{Cd}^{2+}$  的吸附量, 并因而减少  $\text{Cd}^{2+}$  对南美蟛蜞菊毛状根的抑制或毒害。

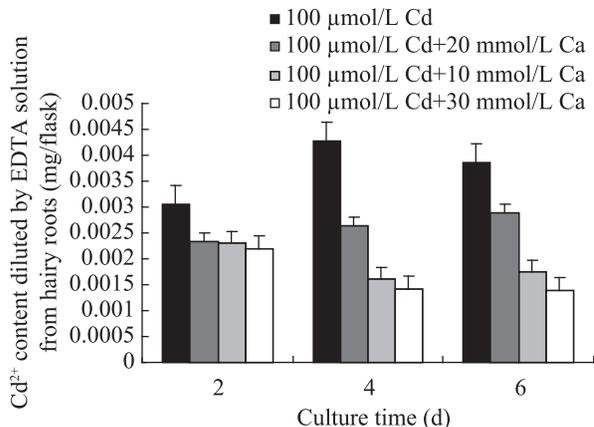


图 14 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  与 10~30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  组合对 EDTA 洗脱的毛状根  $\text{Cd}^{2+}$  含量的影响

Fig. 14 Effect of 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Cd}^{2+}$  in combination with 10~30  $\text{mmol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  on  $\text{Cd}^{2+}$  content diluted by EDTA solution from hairy roots of *W. trilobata*.

### 3 讨论

一些研究表明,  $\text{Cd}$  对植物生长、根的形态和侧根发生及其毒害的影响具有浓度剂量效应和因植物类型而异<sup>[14-15]</sup>, 如低浓度 (0.1  $\text{mg/L}$ )  $\text{Cd}$  可促进小白菜 *Brassica chinensis* L. 侧根的发育, 而  $\geq 5$   $\text{mg/L}$   $\text{Cd}$  则可使小白菜根变短变粗, 根毛缺乏, 侧根分枝减少<sup>[14]</sup>; 而受镉毒害的玉米幼苗根尖膨大变褐继而腐烂<sup>[15]</sup>。然而, 所有这些有关  $\text{Cd}$  对植物生长和毒害的研究大都是通过水培、沙培或盆栽的方法来研究  $\text{Cd}$  对完整植株生长的影响, 少见有关  $\text{Cd}$  对细胞培养物如愈伤组织或毛状根生长影响的系统研究报道, 未见有关重金属  $\text{Cd}$  对南美蟛蜞菊 *W. trilobata* 毛状根生长影响及其  $\text{Cd}$  耐受能力研究的报道。Fornazier 等发现, 低浓度 (0.01~0.1  $\text{mmol/L}$ )  $\text{CdCl}_2$  能明显促进甘蔗 *Saccharum officinarum* L. 愈伤组织的生长, 但高浓度 (0.5~1  $\text{mmol/L}$ )  $\text{CdCl}_2$  则强烈抑制其生长<sup>[16]</sup>。这与本实验的结果不完全一致。在本实验

中,培养基中  $Cd \leq 50 \mu\text{mol/L}$  时能促进南美蟛蜞菊毛状根生长,而高于  $100 \mu\text{mol/L}$   $Cd$  则抑制毛状根生长,使其侧根短小,根尖发褐或变黑,浓度越高抑制越重甚至产生毒害。所不同的是,在本实验中,无论是低浓度还是高浓度  $Cd$  培养南美蟛蜞菊毛状根,培养 10 d 后其主、侧根都变粗,分支较对照少;根体由浅红色变成紫红色;之后,随着培养时间的延长和培养基  $Cd$  浓度的加大,毛状根根尖逐渐变黄,直至发褐或变黑。然而,张艳等<sup>[17]</sup>液体培养黄瓜毛状根时发现, $Cd \leq 10 \text{ mg/L}$  能促进毛状根生长,并使根增粗,而  $Cd \geq 15 \text{ mg/L}$  才抑制黄瓜毛状根生长,使根变得十分短而小,根尖膨大但不变褐,根表面变红。此外, $Cd \leq 50 \mu\text{mol/L}$  几乎不影响褐脉少花龙葵毛状根的生长,甚至还能略促进生长;但  $\geq 100 \mu\text{mol/L}$  高浓度  $Cd$  则开始抑制生长,且浓度愈高抑制作用愈明显,使毛状根侧根根尖变褐变短,数目减少<sup>[18]</sup>。这与本实验的结果不完全一致。而这种差异表明重金属  $Cd$  对植物毛状根生长及毒害影响的程度不仅具有剂量效应,而且还可因植物或毛状根类型而异。

已有的研究表明, $Cd$  对植物的毒害可能是通过损害生物体内的抗氧化保护酶  $POD$  和  $SOD$  的活性及蛋白质的合成等变化表现出毒性<sup>[19]</sup>。如低浓度  $Cd$  能促进植物蛋白质合成,但高浓度  $Cd$  则对蛋白质合成起破坏或抑制作用<sup>[15]</sup>。而张利红等在研究  $Cd$  污染对小麦生长和部分生理特性影响时发现,随着  $Cd$  浓度的增加,小麦幼苗的  $SOD$ 、 $POD$  活性随  $Cd$  浓度的增高而增加<sup>[20]</sup>;而不同浓度  $Cd$  培养的黄瓜毛状根可溶性蛋白含量大都随着培养时间延长而逐渐下降,但其  $SOD$  和  $POD$  活性则逐渐升高<sup>[17]</sup>。然而在高浓度  $Cd$

培养时,油菜 *Brassica napus* L. cv Drakkar 植株的抗氧化酶  $SOD$  和  $CAT$  活性均急剧下降;但高浓度  $Cd$  也可显著降低白菜 *Brassica campestris* L. ssp. chinensis (L.) Makino 叶片和芦苇 *Phragmites australis* L. 幼苗的  $SOD$ 、 $CAT$  及  $POD$  活性<sup>[21-22]</sup>;然而也有报道表明,在超积累植物庭荠 *Alyssum maritimum* L. 中,高浓度  $Cd$  却可提高该植物的  $SOD$  活性<sup>[23]</sup>;而受  $Cd$  胁迫时,印度芥菜 *Brassica juncea* L. 植株的抗氧化酶活性则保持恒定或几乎不变<sup>[24]</sup>。此外,随着镉浓度增加,土培的  $Cd$  超富集植物圆锥南芥 *Arabis paniculata* Franch 的  $SOD$  活性呈下降趋势,但其  $POD$  和  $CAT$  等活性则呈先升高后降低的变化趋势<sup>[25]</sup>。而这些与本实验的结果不一致。在本实验中,各浓度  $Cd$  培养的南美蟛蜞菊毛状根的  $POD$  和  $SOD$  活性均随着  $Cd$  浓度提高而逐渐升高,其中尤以  $POD$  活性的表现最为明显, $300 \mu\text{mol/L}$   $Cd$  培养的毛状根  $POD$  活性明显高于其他浓度培养的毛状根。这些结论表明, $Cd$  对植物抗氧化保护酶活性的影响程度可能与所使用的  $Cd$  浓度、植物类型以及毛状根的生长特性等有关。

丙二醛 (MDA) 是植物细胞膜脂过氧化作用的产物之一,其含量的高低在一定程度上能反映膜脂过氧化水平和膜结构的受害程度及植株的自我修复能力。有关  $Cd$  促进植物细胞膜脂质过氧化已有不少报道。如用  $10\sim 50 \mu\text{mol/L}$   $Cd$  培养印度芥菜和油菜时发现, $Cd$  胁迫仅使油菜体内的脂质过氧化水平增加,而印度芥菜的 MDA 含量则保持不变<sup>[24]</sup>。但扁桃 *Prunus dulcis* L. 幼苗在  $0\sim 150 \mu\text{mol/L}$   $Cd$  水培时发现,无论是根还是叶中,高浓度  $Cd$  可通过提高脂质过氧化水平而对植株产生氧化损伤<sup>[26]</sup>。而在本实验中,无论南

美螞蟥菊毛状根在低浓度  $\leq 50 \mu\text{mol/L Cd}$ , 还是在高浓度 ( $> 100 \mu\text{mol/L Cd}$ ) 中培养, 其 MDA 含量大都比同期对照 (不加 Cd 处理) 升高, 并且  $300 \mu\text{mol/L Cd}$  处理的 MDA 含量在培养的各个时期几乎都是最高的。而施和平等<sup>[18]</sup>报道, 不同浓度 Cd 培养的褐脉少花龙葵毛状根 MDA 含量均比同期对照显著提高, 表明 Cd 可促进毛状根细胞膜脂质过氧化。然而, 在 Cd 胁迫处理的胡萝卜 *Daucus carota* L. 植株及其毛状根中并未出现明显的膜脂过氧化<sup>[27]</sup>。这显然与本实验的结果相反。而这种差异的产生表明 Cd 对植物细胞膜脂过氧化的促进也可能因所使用的 Cd 浓度、植物种类和毛状根类型等而异。

Ca 是植物生长发育必需的大量元素。已有的研究表明, 外源钙可能通过对有害矿质元素的拮抗作用<sup>[28]</sup>、维持较高的抗氧化保护酶系统活力<sup>[29]</sup>以及发挥钙信使系统的功能<sup>[30]</sup>等而发挥作用。如在镉胁迫下, 玉米根部供钙可明显提高其 SOD、POD 和 CAT 活性, 降低其叶片丙二醛含量<sup>[15]</sup>。而在 Cd<sup>2+</sup>毒害下, 用  $5 \text{ mmol/L Ca}^{2+}$  和  $10 \text{ mmol/L Ca}^{2+}$  处理玉米种子后, 其幼苗的 SOD 和 CAT 活性增加, 而 MDA 含量逐渐下降, 表明 Ca 能减少以至消除 Cd<sup>2+</sup>对种子活力和幼苗生长的毒害作用<sup>[31]</sup>。然而, 这些研究都是以完整植物为材料, 少见有关 Ca 和 Cd 结合对毛状根生长影响的研究报道。在本实验中, 南美螞蟥菊毛状根不仅能从培养基中吸收和吸附 Cd<sup>2+</sup>, 而且, 所吸收和吸附的 Cd<sup>2+</sup>含量随着培养基 Cd<sup>2+</sup>浓度的升高而增加; 但外源加入  $10\sim 30 \text{ mmol/L Ca}^{2+}$  后, 毛状根吸收和吸附的 Cd<sup>2+</sup>含量则逐渐降低。此外还发现, 与仅添加 Cd<sup>2+</sup>培养相比, 外加  $10\sim 30 \text{ mmol/L Ca}^{2+}$  不仅能通过离子拮抗而减少

毛状根对 Cd<sup>2+</sup>的吸收, 降低其 Cd<sup>2+</sup>含量, 而且可降低毛状根可溶性蛋白含量和 MDA 含量, 提高其抗氧化酶 SOD 活性, 降低其膜脂过氧化水平, 从而解除或减轻重金属 Cd<sup>2+</sup>对其生长的毒害。贺迪等<sup>[22]</sup>发现, 在营养液中 Cd<sup>2+</sup>浓度由  $2 \mu\text{mol/L}$  增加到  $0.6 \text{ mmol/L}$  时, 芦苇幼苗的 SOD、CAT 和 POD 等抗氧化酶活性显著降低, 而加入  $10 \text{ mmol/L CaCl}_2$  则可抑制 MDA 产生, 并刺激 Cd<sup>2+</sup>胁迫芦苇幼苗叶片 SOD 和 CAT 活性的增强, 从而提高芦苇对 Cd<sup>2+</sup>的抗性。而这与本实验的结果相似。这说明, 外源 Ca<sup>2+</sup>可以缓解过量 Cd<sup>2+</sup>胁迫引起的膜脂过氧化和刺激植物细胞抗氧化酶活性的提高, 从而对 Cd<sup>2+</sup>导致的毛状根生长的抑制或毒害产生拮抗或缓解效果。

有研究表明, 外源 Ca<sup>2+</sup>在逆境胁迫中的作用可能与 Ca<sup>2+</sup>-CaM 的作用或与 Ca<sup>2+</sup>在稳定细胞结构方面发挥的作用有关<sup>[30]</sup>。而在研究 Cd<sup>2+</sup>对萝卜 *Raphanus sativus* L. 种子萌发和幼苗生长时还发现, Ca<sup>2+</sup>可部分逆转 Cd<sup>2+</sup>对种子生长和 Cd<sup>2+</sup>吸收的抑制, 而 Cd<sup>2+</sup>不仅可与 Ca<sup>2+</sup>竞争 CaM 的结合位点; 还可抑制 Ca<sup>2+</sup>-CaM 依赖的磷酸二酯酶的活化, 这表明 Cd<sup>2+</sup>对种子萌发的毒害是通过 Cd<sup>2+</sup>对 Ca<sup>2+</sup>-CaM 的影响而发挥作用<sup>[32]</sup>。而在我们的结果中, 外源供给  $10\sim 30 \text{ mmol/L Ca}^{2+}$  后, 毛状根吸收和吸附的 Cd<sup>2+</sup>含量虽比对照明显降低, 或随着培养基中 Ca<sup>2+</sup>浓度增加而降低, 但含有相当高含量 Cd<sup>2+</sup>的毛状根仍能较好地正常生长。这表明外源加入足够 Ca<sup>2+</sup>并不能完全抑制毛状根对 Cd<sup>2+</sup>的吸收和吸附; 而这是否表明在 Cd-Ca 拮抗过程中, 外源 Ca<sup>2+</sup>是否是通过 Ca<sup>2+</sup>-CaM 介导而发挥作用? 或者说是否通过维持细胞内 Ca<sup>2+</sup>的低稳态水平而发挥其生理作用? 重金属镉毒害

是否与通过影响  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 的功能有关则待进一步研究。

本实验的结果表明, 南美蟛蜞菊毛状根具有较强的重金属 Cd 耐受能力; 而外源加入 Ca 可拮抗 Cd 对毛状根生长的抑制或毒害, 减少毛状根对 Cd 的吸收和吸附。我们的结果为今后利用具发达根系的南美蟛蜞菊毛状根及其再生植株来对受重金属 Cd 污染的环境进行植物修复奠定了相关的前期工作基础并提供了可能性。

## REFERENCES

- [1] Wagner GJ. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron*, 1993, 51(5): 173–212.
- [2] Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, et al. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 1995, 13(5): 468–474.
- [3] Boominathan R, Doran PM. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 83(2): 158–167.
- [4] Eapen S, Suseelan KN, Tivarekar S, et al. Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environ Res*, 2003, 91(2): 127–133.
- [5] Angelinia VA, Orejasb J, Medinaa MI, et al. Scale up of 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solutions using *Brassica napus* hairy roots. *J Hazard Mater*, 2011, 185(1): 269–274.
- [6] Qian JH, Zayed A, Zhu YL, et al. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: III. uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species. *J Environ Qual*, 1999, 28(5): 1448–1455.
- [7] Ou SY, Shi HP, Tsang PK Eric. Induction and *in vitro* culture of *Wedelia trilobata* hairy roots. *Chin J Biotech*, 2010, 26(3): 378–385.  
欧少云, 施和平, 曾宝强. 南美蟛蜞菊毛状根诱导及其离体培养. *生物工程学报*, 2010, 26(3): 378–385.
- [8] Andersson A, Nillsson KO. Influence of lime and soil pH on Cd availability to plants. *Ambio*, 1974, 3(5): 198–200.
- [9] Jiang YB, Li JH, Fang LY, et al. Effect of calcium on drought resisting of alfalfa seedlings. *Chin J Grassland*, 2008, 30(1): 117–120.  
姜义宝, 李建华, 方丽云, 等. 钙处理对苜蓿幼苗抗旱性的影响. *中国草地学报*, 2008, 30(1): 117–120.
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [11] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971, 44(1): 276–287.
- [12] Zhang ZL, Zhai WJ. *A Text-Manual for Plant Physiology*. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2003: 123–124.  
张志良, 翟伟菁. *植物生理学实验指导*. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 123–124.
- [13] Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 1968, 125(1): 189–198.
- [14] Qin TC, Wu YS, Wang HX, et al. Effect of cadmium, lead and their interactions on the physiological and ecological characteristics of root system of *Brassica chinensis*. *Acta Ecol Sin*, 1998, 18(3): 320–325.  
秦天才, 吴玉树, 王焕校, 等. 镉、铅及其相互作用对小白菜根系生理生态效应的研究. *生态学报*, 1998, 18(3): 320–325.
- [15] Kong XS, Guo XP, Zhang MX. Effect of Cadmium stress on seed leng growth and physiology-chemistry of maize. *J Huazhong Agri Univ*, 1999, 18(2): 111–113.  
孔祥生, 郭秀璞, 张妙霞. 镉胁迫对玉米幼苗生长及生理生化的影响. *华中农业大学学报*, 1999, 18(2): 111–113.
- [16] Fornazier RF, Ferreira RR, Pereira GJG, et al. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2002, 71(2): 125–131.

- [17] Zhang Y, Shi HP, Tsang PK Eric. Influences of heavy metal cadmium alone and in combination with zinc on the growth and activities of antioxidant enzymes of *Cucumis sativus* hairy roots. *Chin J Biotech*, 2009, 25(1): 60–68.  
张艳, 施和平, 曾宝强. 重金属镉及其与锌组合对黄瓜毛状根生长及其抗氧化酶活性的影响. *生物工程学报*, 2009, 25(1): 60–68.
- [18] Shi HP, Tsang PK Eric, Wang YL, et al. Effect of cadmium, alone or in combination with  $\text{CaCl}_2$ , on the growth, antioxidative enzyme activity and cadmium absorption of *Solanum nigrum* L. var *pauciflorum* hairy roots. *Chin J Biotech*, 2010, 26(2): 147–158.  
施和平, 曾宝强, 王云灵, 等. 镉及其与钙组合对褐脉少花龙葵毛状根生长、抗氧化酶活性和吸收镉的影响. *生物工程学报*, 2010, 26(2): 147–158.
- [19] Chugh LK, Gupta VK, Sawhney SK. Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry*, 1992, 31(2): 395–400.
- [20] Zhang LH, Li PJ, Li XM, et al. Effects of cadmium stress on the growth and physiological characteristics of wheat seedlings. *Chin J Ecol*, 2005, 24(4): 458–460.  
张利红, 李培军, 李雪梅, 等. 镉胁迫对小麦幼苗生长及生理特性的影响. *生态学杂志*, 2005, 24(4): 458–460.
- [21] Sun GW, Zhu ZJ, Fang XZ. Effects of different cadmium levels on the growth and antioxidant enzymes in *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino. *Acta Horticult Sin*, 2004, 31(3): 378–380.  
孙光闻, 朱祝军, 方学智. 不同镉水平对白菜生长及抗氧化酶活性的影响. *园艺学报*, 2004, 31(3): 378–380.
- [22] He D, Liu YG, Huang YE, et al. Effects of calcium on chlorophyll and antioxidant enzymes in *Phragmites australis* under cadmium stress. *J Agro-Environ Sci*, 2007, 26(1): 197–201.  
贺迪, 刘云国, 黄玉娥, 等. 钙对不同浓度镉胁迫下芦苇幼苗叶绿素及抗氧化酶系统的影响. *农业环境科学学报*, 2007, 26(1): 197–201.
- [23] Schickler H, Capsi H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol Plant*, 1999, 105(1): 39–44.
- [24] Nouairi I, Ben Ammar W, Ben Youssef N, et al. Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. *Acta Physiol Plant*, 2009, 31(2): 237–247.
- [25] Yu FM, Tang YT, Qiu RL, et al. Antioxidative responses to cadmium stress in the hyperaccumulator *Arabis paniculata* Franch. *Acta Sci Circum*, 2010, 30(2): 409–414.  
于方明, 汤叶涛, 仇荣亮, 等. Cd 胁迫下超富集植物圆锥南芥抗氧化机理. *环境科学学报*, 2010, 30(2): 409–414.
- [26] Nada E, Ferjani BA, Ali R, et al. Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture. *Acta Physiol Plant*, 2007, 29(1): 57–62.
- [27] Sanita di Toppi L, Lamberdi M, Pecchioni N, et al. Effects of cadmium stress on hairy root of *Dacus carota*. *J Plant Physiol*, 1999, 154: 385–391.
- [28] Skórzyńska-Polit E, Tukendorf A, Selstam E, et al. Calcium modifies Cd effect on runner bean plants. *Environ Exp Bot*, 1998, 40(3): 275–286.
- [29] Wang H, Zhou W, Lin B. Effects of Ca on growth and some physiological characteristics of maize under Cd stress. *Plant Nutri Fert Sci*, 2001, 7(1): 78–87.  
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.
- [30] Wang LJ, Liu YL, Ma K. The role of calcium in promotion of proline accumulation induced by salt stress in *Ficus carica* L. cells. *Acta Photophysiol Sin*, 1999, 25(1): 38–42.  
汪良驹, 刘友良, 马凯. 钙在无花果细胞盐诱导脯氨酸积累中的作用. *植物生理学报*, 1999, 25(1): 38–42.
- [31] Song SQ, Jian WJ, Fu JR. Effect of  $\text{Cd}^{2+}$  on seed vigor of *Zea mays* L. and antagonism of  $\text{Ca}^{2+}$  to  $\text{Cd}^{2+}$ . *Chin J Appl Environ Biol*, 1997, 2(1): 1–5.  
宋松泉, 简伟军, 傅家瑞.  $\text{Cd}^{2+}$ 对玉米种子活力的影响及  $\text{Ca}^{2+}$ 的拮抗作用. *应用与环境生物学报*, 1997, 2(1): 1–5.
- [32] Rivetta A, Negrini N, Cocucci M. Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin in  $\text{Cd}^{2+}$  toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ*, 1997, 20(5): 600–608.