



王 朋, 邓小娟, 黄益安, 等. 镉胁迫下不同大豆品种各器官中镉和非蛋白巯基物质的动态变化[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(2): 42-50.

镉胁迫下不同大豆品种各器官中镉和非蛋白巯基物质的动态变化

王 朋, 邓小娟, 黄益安, 方小龙, 张 杰, 万海波, 杨存义

(广东省植物分子育种重点实验室/国家大豆改良中心 广东分中心/华南农业大学 农学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探讨不同大豆品种各器官镉和非蛋白巯基物质的动态变化,揭示巯基物质在大豆镉抗性和积累中的作用。【方法】在镉(Cd)污染的土壤中种植镉抗性和籽粒积累不同的大豆品种中黄24和华夏3号,采集不同生育时期的根、茎和叶,分析各品种的Cd抗性指标(根系和地上部鲜质量)、Cd积累指标(各器官Cd浓度)和非蛋白巯基物质[总非蛋白巯基肽(NPT)、谷胱甘肽(GSH)和植物螯合肽(PC)]的浓度变化。【结果】在10 mg·kg⁻¹的Cd胁迫下,中黄24不同时期Cd抗性指标明显低于华夏3号,而中黄24初花期后各器官Cd浓度均显著地高于华夏3号。Cd胁迫下2个品种随发育进程根系中NPT、GSH和PC浓度上升,而叶片中则下降;敏感品种中黄24各器官中巯基物质对Cd胁迫响应比抗性品种华夏3号更显著。关联分析发现,大豆根部巯基物质浓度与各器官Cd浓度呈正相关,且以成熟期最为显著,而初花期后地上部的PC与各器官Cd浓度呈负相关。【结论】在大豆不同生育期不同器官中Cd和非蛋白巯基物质浓度变化复杂,非蛋白巯基物质在大豆抵抗Cd胁迫中扮演多种角色。

关键词: 镉胁迫; 大豆; 非蛋白巯基; 谷胱甘肽; 植物螯合肽

中图分类号: S565.1; X171.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2016)02-0042-09

Dynamic changes of cadmium and non-protein thiol in different organs of different soybean genotypes under cadmium stress

WANG Peng, DENG Xiaojuan, HUANG Yi'an, FANG Xiaolong, ZHANG Jie, WAN Haibo, YANG Cunyi
(Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding/Guangdong Sub-center of National Soybean Improvement Center/College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】Dynamic changes of cadmium and non-protein thiols in different soybean genotypes were researched to investigate effects of non-protein thiols on Cd tolerance and accumulation of soybean.【Method】The soybean varieties of Zhonghuang24 and Huaxia3 were planted in the pots with contaminated soil. Roots, shoots and leaves were collected in different periods. Cd tolerance indexes (including root and shoot fresh mass), Cd accumulation and the concentrations of non-protein thiols [including the total of non-protein thiol peptides (NPT), glutathione (GSH) and phytochelatin (PC)] of soybeans in different periods were determined.【Result】The resistance indexes of Zhonghuang24 were significantly lower than those of Huaxia3 in different periods at the Cd concentration of 10 mg·kg⁻¹, and Cd accumulations in all organs were higher than those of Huaxia3 after flowering stage (especially at pod and mature stages). The NPT, GSH and PC concentrations increased in root and reduced in leaf along with

收稿日期: 2015-05-16 优先出版时间: 2016-01-18

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20160118.1513.010.html>

作者简介: 王 朋 (1988—), 男, 硕士研究生, E-mail: wp.102300@163.com; 通信作者: 杨存义 (1966—), 男, 副教授, 博士, E-mail: ycy@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31271745); 广东省科技计划项目 (2013B020301); 国家科技支撑计划 (2011BAD35B06); 863 计划 (2012AA101106)

the development progress, and the effects of non-protein thiols in Zhonghuang24 under Cd stress were stronger those of Huaxia3. The correlation analysis indicated that there was a positive correlation between thiol concentration in root and the Cd concentration in all organs, especially at mature stage. There was a negative correlation between PC concentrations in stem and leaf after flowering stage, especially more significant at pod and mature stages. 【Conclusion】The concentrations of thiols and Cd in soybean organs show complex changes at different growth stages under Cd stress. Non-protein thiols play multiple roles in Cd detoxification and transportation at different growth stages.

Key words: Cd stress; soybean; non-protein thiol; glutathione; phytochelatin

大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 是我国主要粮食和饲料原料,各地均有广泛种植。随着工业的快速发展,废水、废液大量排放,重金属污染的农田面积日益增加^[1]。镉(Cd)是污染农田的主要重金属之一,Cd不但会阻碍植物的正常生长,而且通过根系积累在植物的可食部分危害人类的健康^[2-4]。Cd污染的土壤中生产的大豆种子容易受到Cd污染^[5-8],但大豆Cd抗性与籽粒积累存在基因型差异^[5, 7-8],利用大豆的遗传潜力选育抗Cd且低积累的大豆品种可提高大豆品质^[9-10]。全面了解大豆抗Cd和籽粒重金属累积的遗传机制是开展大豆抗Cd、Cd低积累品种选育的基础。

Cd进入植物体内后可与细胞内活性物质结合,诱导产生氧化胁迫使细胞受到伤害^[11-12]。植物进化了一系列的抗性机制抵御Cd毒害,主要包括:1)植物体内产生一系列抗氧化酶和抗氧化剂克服Cd诱导的氧化胁迫;2)抗坏血酸-谷胱甘肽循环系统维持细胞氧化还原平衡;3)植物体内螯合物与Cd结合;4)Cd区室化及外排机制等^[13-14]。植物体内的半胱氨酸(Cys)、甲硫氨酸(Met)、金属硫蛋白(MTs)、谷胱甘肽(GSH)和植物螯合肽(PC)等巯基物质可螯合Cd离子,解除Cd的毒害。在水稻 *Oryza sativa*、小麦 *Triticum aestivum* 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等植物中证实巯基物质在重金属螯合、固定等方面起到了重要作用^[15-19],但在遏蓝菜 *Thlaspi caerulescens*、白玉草 *Silene vulgaris*、蒿柳 *Salix viminalis* 和蜈蚣草 *Pteris vittata* 等植物中发现巯基物质的积累与抗重金属胁迫并无相关性,抗性品种较敏感品种具有较低巯基物质浓度^[20-23]。巯基物质的结合与重金属亚细胞分布相关,形成PC-Cd螯合物进入液泡后,通过氨基酸循环再生,最终导致液泡中的重金属不断积累,但并未造成巯基物质的升高^[23-24]。巯基物质还是植物体内重要的抗氧化剂和信号物质^[25],谷胱甘肽代谢能够直接减少细胞内H₂O₂的形成^[26]。植物体内非蛋白巯基物质主要包含总非蛋白巯基肽

(NPT)、谷胱甘肽(GSH)和植物螯合肽(PC)^[27]。Vazquez等^[28]研究大豆和白羽扇豆 *Lupinus albus* 植物中螯合物对镉胁迫的作用时,发现镉胁迫下大豆苗期植株巯基总量、GSH和PC均有增加,但和白羽扇豆相比,大豆苗期植株巯基总量、GSH和PC与镉抗性无显著相关。本研究利用Cd污染的土壤进行盆栽试验,通过比较在不同发育时期镉抗性不同的大豆品种间各器官巯基物质的动态变化,以揭示巯基物质与镉抗性和积累间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

根据赵云云等^[5, 7-8]的研究结果,选择了镉抗性和籽粒积累不同的大豆品种华夏3号(抗性品种)和中黄24(敏感品种)为研究材料。选取大小一致、饱满圆润的大豆种子,用体积分数为5%的NaClO浸泡1 min,去离子水冲洗后播于石英砂(已经洗涤、高温烘干)中发芽育苗,待幼苗子叶展开时选取大小一致的幼苗移栽于温室盆中,每个盆中移栽3株幼苗。每盆土壤7 kg,3次重复,设对照(土中不添加Cd)和处理(土中加入Cd 10 mg·kg⁻¹),充分混匀。在整个培养期间采用定量浇水、施肥保证每盆管理一致。

1.2 生物量的测定

分别在苗期(第3片复叶完全展开)、初花期、初荚期和成熟初期根据取样要求将一定数目的大豆植株用自来水从盆中冲洗取出,以确保得到完整的植株,用吸水纸吸干表面水分,分别测定大豆根、茎、叶鲜质量,随后立即放入-20℃冰箱中冷冻,用于测定相关指标。抗性指数(TI)计算如下:TI = Cd处理的生物量/对照的生物量。

1.3 各器官镉浓度的测定

分别从每个重复当中称取干样1 g装至50 mL三角瓶中,倒入10 mL预先准备好的φ为69%的HNO₃+φ为72%的HClO₄混合液(体积比87:13)

浸泡,封口过夜后,放入恒温电热板中进行消化,当三角瓶中的液体呈无色透明状且体积小于 1 mL 时,将其取出、室温冷却,定容 50 mL 后过滤。采用原子吸收分光光度计(原子吸收光谱法,日立 180-80 光谱带宽度 1.3 nm)测定镉离子含量,精确度为 0.01 mg · kg⁻¹[29]。

1.4 非蛋白硫基物质的测定

NPT 含量的测定采用比色法[30]:取鲜样 1 g 放置于研钵中,加入预冷的体积分数为 5% 的 SSA(含 6.3 mmol · L⁻¹ DTPA) 6 mL 和少量石英砂冰浴,充分研磨,4 ℃ 离心(12 000 r · min⁻¹) 15 min,上清液冷藏。取上清液 0.2 mL 加入 0.25 mol · L⁻¹ 的 Tris-HCl(pH 8.3) 2.65 mL 和 10 mmol · L⁻¹ 的 DTNB 0.15 mL,室温放置 15 min,然后在 412 nm 波长下用分光光度计比色测定。以等量的未加 DTNB 的溶液作为对照,以 GSH-SH 为标样制作标准曲线[19]。

GSH 的测定采用比色法[31]:取鲜样组织 1 g 放置于研钵中,加入预冷的体积分数为 5% 的 TCA 溶液 6 mL 和少量的石英砂,冰浴充分研磨,4 ℃ 离心(12 000 r · min⁻¹) 15 min,上清液冷藏。取上清液 0.2 mL,加入 0.25 mol · L⁻¹ 的 Tris-HCL 缓冲液(pH 8.3),摇匀,再加入体积分数为 3% 的甲醛溶液 0.2 mL,摇匀,室温静置 20 min 后,立刻加入预先

25 ℃ 水浴的 DTNB 分析溶液 3 mL,摇匀,静置 5 min 后立刻在波长为 412 nm 处测定吸光度,根据 GSH 标准曲线计算 GSH 浓度。

采用差减法计算植物组织内 PC 浓度[32]:

PC 浓度 = NPT 浓度 - GSH 浓度。

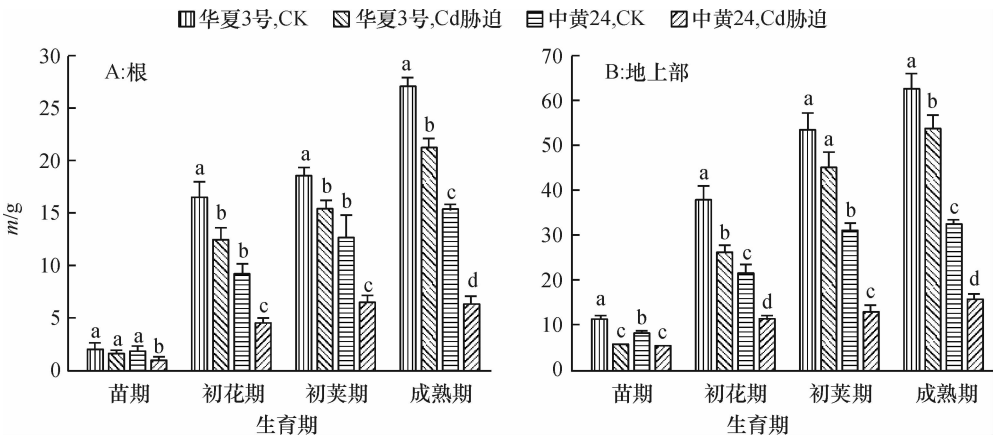
1.5 数据分析

采用 Excel 2003、SigmaPlot 10.0 和 SPSS 17.0 统计分析软件进行数据处理、作图和差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 镉胁迫下不同生育期大豆品种间鲜质量差异

镉胁迫下 2 个品种根系和地上部鲜质量均比对照有所下降,但抗性品种华夏 3 号下降幅度小,而敏感品种中黄 24 下降幅度大(图 1)。2 个品种随 Cd 胁迫时间延长根系和地上部鲜质量差异明显;抗性品种华夏 3 号根系鲜质量在 4 个时期分别是对照的 77.6%、74.6%、82.3% 和 78.7%,地上部鲜质量分别为对照的 50.8%、69.4%、85.0% 和 85.6%;而敏感品种中黄 24 根系鲜质量在 4 个时期分别为对照的 51.6%、48.8%、51.1% 和 41.1%,地上部鲜质量分别为对照的 62.5%、52.9%、42.0% 和 47.7%。表明 2 个品种间对镉胁迫抗性的差异在初花期后更明显。



相同部位同一时期不同柱子上凡是有有一个相同小写字母者,表示差异不显著(P>0.05,Duncan's 法)。

图 1 镉处理下不同时期 2 个大豆品种根和地上部鲜质量的变化

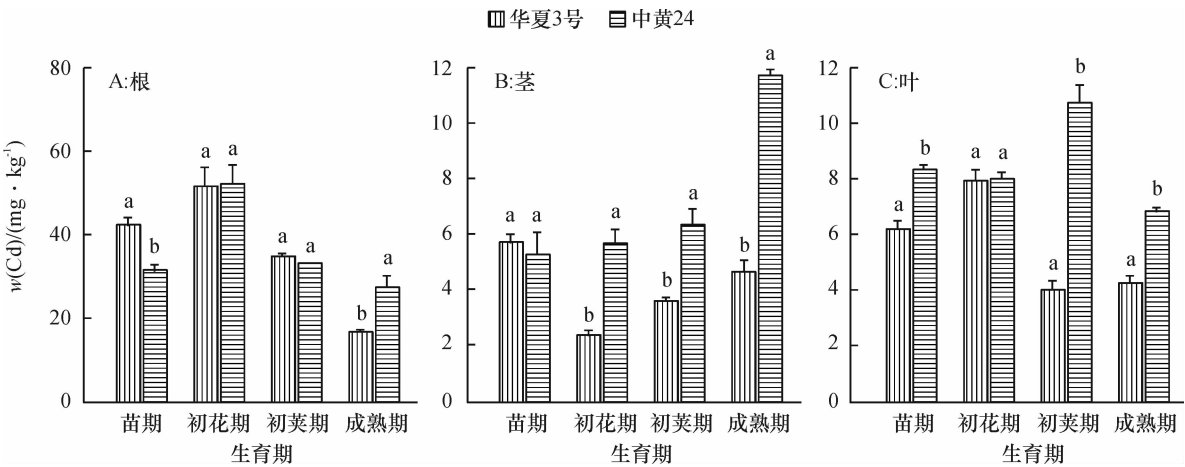
Fig.1 Fresh mass of roots and shoots of two soybean varieties at different stages under Cd stress

2.2 镉胁迫下各器官镉浓度的变化

镉胁迫下不同发育时期大豆根系镉浓度远高于叶片和茎,华夏 3 号各器官镉浓度在初荚期后都低于中黄 24(图 2)。2 个品种根系镉浓度在不同发育时期呈不同的变化,苗期敏感品种中黄 24 的根系镉浓度显著低于华夏 3 号,是华夏 3 号镉浓度的 75.4%;2 个品种根系镉浓度最高值均出现在初花期且无显著差异;初荚期至成熟期 2 个品种根系镉浓

度不断下降,但中黄 24 的下降幅度较小,成熟期中黄 24 根系镉浓度是华夏 3 号的 163.4%(图 2A)。2 个品种茎部镉浓度在不同发育时期也呈不同的变化,苗期 2 个品种茎部 Cd 浓度差异不显著,华夏 3 号苗期后迅速下降至初花期最低然后又缓慢增长,而中黄 24 不断增加至成熟期最高,中黄 24 茎部 Cd 浓度在初花期、初荚期、成熟期分别是华夏 3 号的 233%、175% 和 248%(图 2B)。2 个品种叶部镉浓度在不同

发育时期均呈先升后降至成熟期最低的趋势,苗期中黄24是华夏3号的132.2%,初花期2个品种差异不显著,初荚期和成熟期中黄24分别是华夏3号的265.5%和160.6%(图2C)。



相同部位同一时期不同柱子上凡是有有一个相同小写字母者,表示品种间差异不显著($P > 0.05$, Duncan's 法)。

图2 镉处理下不同时期2个大豆根、茎和叶中镉浓度的变化

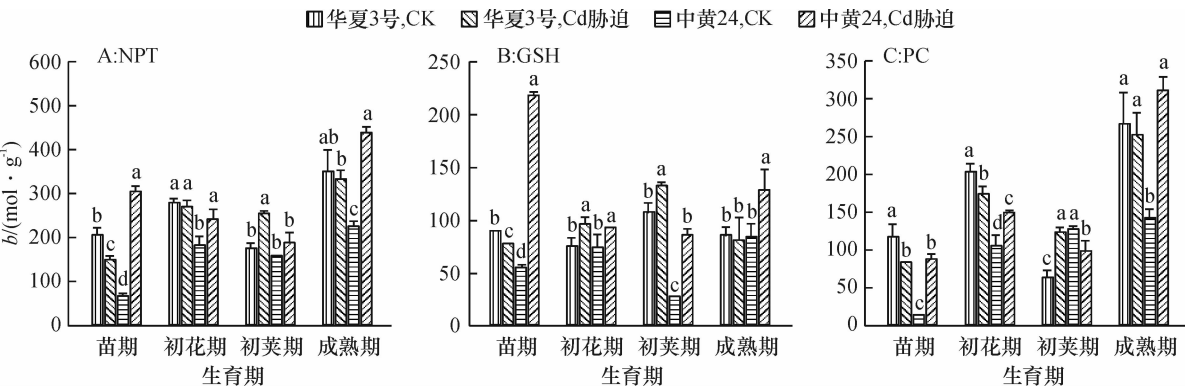
Fig.2 The Cd concentrations in roots, stems and leaves of two soybean varieties at different stages under Cd stress

2.3 镉胁迫下大豆根系各种巯基物质浓度的变化

对照条件下2个品种在不同发育时期根系中NPT浓度变化趋势相似,初花期前不断增加,初荚期下降,成熟期又快速增加。镉胁迫条件下2个品种在不同发育时期NPT浓度变化完全不同,敏感品种中黄24在苗期大幅增加、初花期和初荚期逐渐下降、成熟期又显著增加,而抗性品种华夏3号随发育不断增加。2个品种间NPT浓度在同一发育时期存在差异,对照条件下中黄24号NPT浓度除初荚期外均显著低于华夏3号,而在镉胁迫条件下苗期和成熟期中黄24显著高于华夏3号,初花期差异不显著,初荚期中黄24显著低于华夏3号。不同发育时期2个品种对镉胁迫响应不同,敏感品种中黄24根系NPT浓度4个时期均高于对照,分别是对照的447%、133%、120%和193%;抗性品种华夏3号NTP浓度仅在初荚期高于对照,其他3个时期均低于对照,分别为对照的72.7%、96.4%和94.5%

(图3A)。

对照条件下2个品种不同发育时期根系中GSH变化趋势不同,敏感品种中黄24在初花期略有上升,初荚期显著下降,成熟期达初花期水平;抗性品种华夏3号在初荚期略高于其他3个时期。镉胁迫下2个品种根系中GSH均呈先增加后减少趋势。同一发育时期2个品种间根系中GSH存在差异,对照条件下苗期和初荚期中黄24显著性低于华夏3号,初花期和成熟期相似;镉胁迫下苗期和成熟期中黄24根系中GSH显著高于华夏3号,初花期差异不显著,初荚期中黄24显著低于华夏3号。不同发育时期2个品种对镉胁迫响应不同,敏感品种中黄24根系中GSH浓度均显著高于对照,4个时期分别为对照的401%、125%、305%和151%;抗性品种华夏3号根系中GSH浓度只在初花期和初荚期显著性高于对照,4个时期分别为对照的85.3%、128.6%、123.6%和94.3%(图3B)。



相同指标同一时期不同柱子上凡是有有一个相同小写字母者,表示差异不显著($P > 0.05$, Duncan's 法)。

图3 镉处理下2个大豆品种不同时期根系中NPT、GSH和PC浓度的变化

Fig.3 The NPT, GSH and PC concentrations in roots of two soybean varieties at different stages under Cd stress

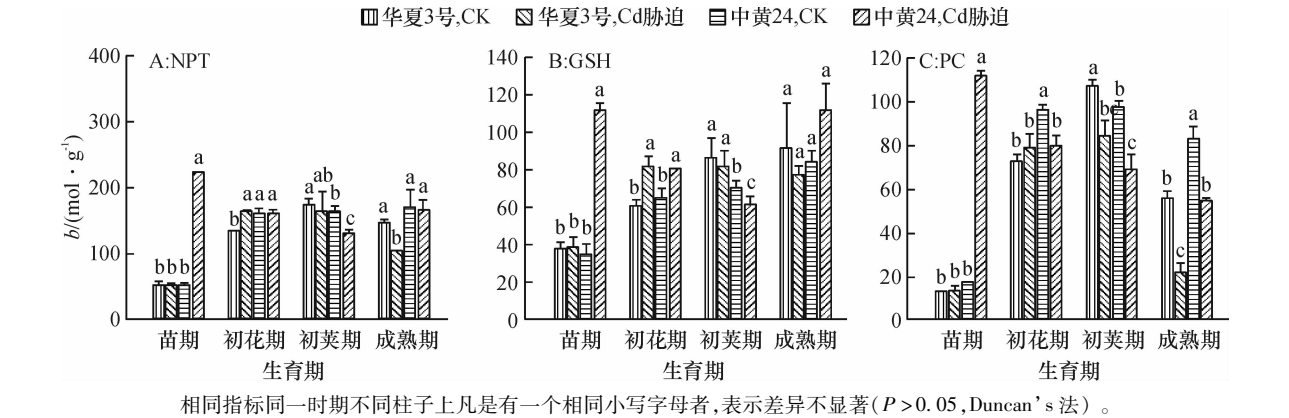
对照条件下 2 个品种根系 PC 浓度随发育呈上升趋势,但华夏 3 号在初荚期显著下降。镉胁迫下 2 个品种根系 PC 浓度随发育变化趋势相似,除初荚期有显著下降外,其他时期呈上升趋势。同一发育时期 2 个品种根系 PC 浓度存在差异,对照条件下初荚期敏感品种中黄 24 高于抗性品种华夏 3 号,其他时期敏感品种中黄 24 均低于抗性品种华夏 3 号;镉胁迫下苗期和成熟期 2 个品种差异不显著,但初花期和初荚期敏感品种中黄 24 均低于抗性品种华夏 3 号。不同发育时期 2 个品种对镉胁迫响应不同,除初荚期外其他 3 个时期中黄 24 根系 PC 浓度显著高于对照,4 个时期分别为对照的 635.6%、137.6%、78.5% 和 219.2%,而抗性品种华夏 3 号根系中 PC 浓度则显著低于对照,4 个时期分别为对照的 70.5%、84.7%、192.2% 和 94.3% (图 3C)。

2.4 镉胁迫下大豆茎部各种疏基物质浓度的变化

对照条件下 2 个品种茎部 NPT 浓度随发育变化趋势不同,中黄 24 在初花期前有显著增加后维持不变;华夏 3 号在初荚期前呈不断增加,但在成熟期时有所下降。镉胁迫条件下 2 个品种茎部 NPT 浓度随发育变化不同,敏感品种中黄 24 苗期大幅增加后逐渐下降,成熟期略有增加;抗性品种华夏 3 号初花期大幅增加,初荚期无变化,成熟期显著下降。同一发育时期 2 个品种茎部 NPT 浓度存在差异,对照条件下只在初花期中黄 24 高于华夏 3 号,而镉胁迫下苗期和成熟期敏感品种中黄 24 显著高于抗性品种华夏 3 号,初花期 2 个品种相似,初荚期敏感品种中黄 24 显著低于抗性品种华夏 3 号。不同发育时期 2 个品种对镉胁迫响应不同,敏感品种中黄 24 苗期显著高于对照,4 个时期镉胁迫下茎部 NPT 浓度分别为对照的 435.7%、100.2%、79.2% 和 98.1%,而抗性品种华夏 3 号在苗期和初荚期与对照无显著差异,4 个时期镉胁迫下 NPT 浓度分别为对照的 98.8%、121.6%、95.0% 和 69.5% (图 4A)。

对照条件下 2 个品种茎部 GSH 均随发育逐渐增加。镉胁迫下 2 个品种茎部 GSH 呈不同的变化趋势,敏感品种中黄 24 茎部 GSH 浓度在苗期快速增加,初花期后逐渐下降;抗性品种华夏 3 号在初花期显著增加后保持不变。同一发育时期 2 个品种间存在差异,对照条件下初荚期中黄 24 显著低于华夏 3 号,其他时期 2 个品种 GSH 浓度差异不显著;镉胁迫下苗期中黄 24 显著高于华夏 3 号,初花期和成熟期差异不显著,初荚期中黄 24 显著低于华夏 3 号。不同发育时期 2 个品种对镉胁迫响应不同,敏感品种中黄 24 在苗期和初花期显著高于对照,镉胁迫下各时期 GSH 浓度分别为对照的 315.2%、124.6%、86.7% 和 131.9%,而抗性品种华夏 3 号初花期显著高于对照,其他时期与对照无显著差异,各时期镉处理下 GSH 浓度分别为对照的 100.7%、134.5%、94.2% 和 84.6% (图 4B)。

对照条件下 2 个品种茎部 PC 随发育呈相似的变化趋势,即初荚期前不断增加,成熟期下降。镉胁迫下 2 个品种茎部 PC 浓度变化趋势不同,华夏 3 号在初荚期前增加,成熟期显著下降;中黄 24 苗期大幅增加后逐渐下降。同一发育时期 2 个品种间存在差异,对照条件下苗期中黄 24 和华夏 3 号相似,初花期和成熟期中黄 24 显著高于华夏 3 号,而初荚期中黄 24 显著低于华夏 3 号;镉胁迫下苗期中黄 24 显著高于华夏 3 号,初花期差异不显著,初荚期中黄 24 显著低于华夏 3 号,成熟期中黄 24 显著高于华夏 3 号。不同发育时期 2 个品种对镉胁迫响应不同,敏感品种中黄 24 在苗期显著高于对照,而初荚期和成熟期显著低于对照,镉胁迫下 4 个时期 PC 浓度分别是对照的 634.3%、83.5%、70.6% 和 65.5%;抗性品种华夏 3 号在初荚期和成熟期 PC 浓度显著低于对照,而在苗期和初花期与对照差异不显著,4 个时期 PC 浓度分别是对照的 98.8%、107.9%、77.9% 和 39.2% (图 4C)。



相同指标同一时期不同柱子上凡是有有一个相同小写字母者,表示差异不显著 ($P>0.05$, Duncan's 法)。

图 4 镉处理下 2 个大豆品种不同时期茎部 NPT、GSH 和 PC 浓度的变化

Fig. 4 The NPT, GSH and PC concentrations in stems of two soybean varieties in different periods under Cd stress

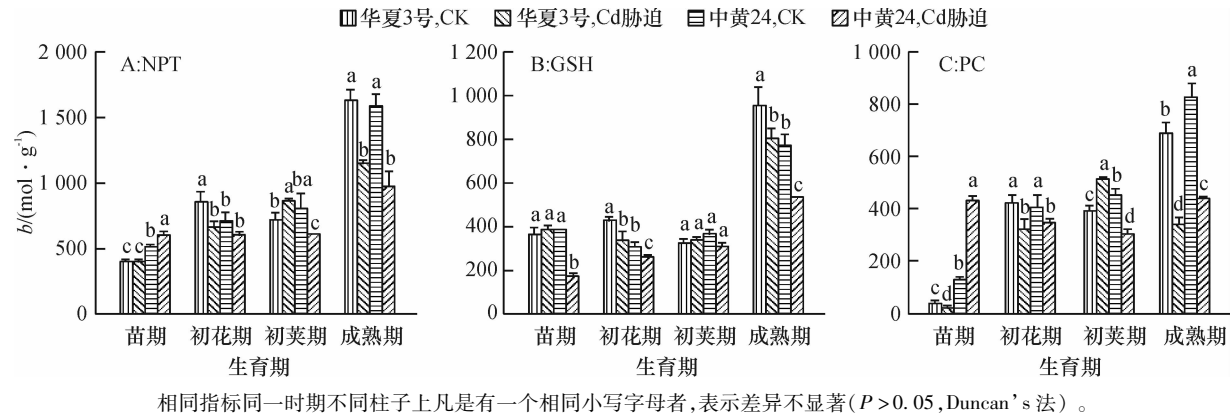
2.5 镉胁迫下大豆叶片各种巯基物质浓度的变化

对照条件下2个品种叶片中NPT浓度随发育呈上升趋势。镉胁迫下2个品种叶片中NPT浓度随发育表现不同的变化,敏感品种中黄24初荚期前无显著变化,而成熟期有显著增加;抗性品种华夏3号则不断增加。同一发育时期2个品种间存在差异,对照条件下初花期中黄24显著低于华夏3号,其他时期差异不显著;镉胁迫下苗期中黄24显著高于华夏3号,初花期和成熟期差异不显著,初荚期中黄24显著低于华夏3号。不同发育时期2个品种对镉胁迫响应不同,敏感品种中黄24苗期NPT浓度显著高于对照,其他时期叶部NPT浓度显著低于对照,镉胁迫下4个时期叶片NPT浓度分别是对照的118.9%、85.1%、73.8%和60.8%;抗性品种华夏3号初花期和成熟期叶部NPT浓度显著低于对照,初荚期显著高于对照,苗期无差异,镉处理下4个时期叶片NPT浓度分别是对照的101.6%、76.6%、119.1%和69.7%(图5A)。

对照条件下2个品种叶片中GSH浓度随发育时间呈上升趋势。镉胁迫下2个品种叶片中GSH浓度随发育呈不同的变化,敏感品种中黄24呈小幅增加,而抗性品种华夏3号在初荚期前呈小幅下降,在成熟期有大幅增加。同一发育时期2个品种间存在差异,对照处理初花期和成熟期中黄24显著低于华

夏3号,苗期和初荚期差异不显著;镉胁迫下苗期、初花期和成熟期中黄24显著低于华夏3号,初荚期差异不显著。不同发育时期2个品种对镉胁迫响应不同,镉胁迫下敏感品种中黄24叶片中GSH浓度在4个时期均显著低于对照,分别为对照的45.5%、83.7%、82.8%和69.0%;镉胁迫下华夏3号叶片GSH浓度在初花期与成熟期低于对照,其他时期与对照差异不显著,4个时期分别为对照的106.1%、77.1%、104.1%和84.3%(图5B)。

对照条件下2个品种叶片中PC浓度均随着发育不断上升。镉胁迫下2个品种叶片中PC浓度变化不同,敏感品种中黄24苗期大幅增加后逐渐下降,成熟期略有增加;抗性品种初荚期前不断增加,成熟期下降。同一发育时期2个品种间存在差异,对照条件下除初花期外其他时期中黄24均显著高于华夏3号;镉胁迫下苗期中黄24显著高于华夏3号,初荚期中黄24显著低于华夏3号,而成熟期中黄24显著高于华夏3号。不同发育时期2个品种对镉胁迫响应不同,敏感品种中黄24叶片中PC浓度在苗期显著高于对照,其他时期显著低于对照,4个时期分别为对照的337.7%、86.2%、66.5%和53.1%;抗性品种华夏3号叶片中PC浓度在初荚期显著高于对照,其他时期显著低于对照,4个时期分别为对照的61.3%、76.1%、129.8%和49.5%(图5C)。



相同指标同一时期不同柱子上凡是有有一个相同小写字母者,表示差异不显著($P>0.05$, Duncan's 法)。

图5 镉处理下2个大豆品种不同时期叶部NPT、GSH和PC浓度的变化

Fig. 5 The NPT, GSH and PC concentrations in leaves of two soybean varieties in different periods under Cd stress

2.6 不同时期各器官中巯基物质浓度与镉浓度和抗性指数的关联分析

镉胁迫下不同时期不同器官中巯基物质浓度与镉浓度和抗性指数之间的相关性见表1。初花期根系中GSH与各器官镉浓度呈显著正相关,与各器官抗性指数呈显著负相关;成熟期根系中NPT、GSH和PC均与各器官镉浓度呈显著正相关,与各器官抗性指数呈显著负相关。表明发育前期大豆根系中主要是小分子的GSH响应镉胁迫,而后期根系中NPT、

GSH和PC均起到一定的作用。

苗期茎部NPT、GSH和PC与叶部镉浓度呈显著正相关,与根系抗性指数呈显著负相关;初花期时只有茎部GSH与各器官的镉浓度呈显著正相关,而与各器官的抗性指数呈显著负相关;初荚期茎部GSH和初花期相似,但茎部NPT和PC与各器官的镉浓度呈显著负相关,与各器官的抗性指数呈显著正相关;成熟期茎部GSH与根、茎的镉浓度呈显著正相关,与根、地上部的抗性指数呈显著负相关。表明大豆茎

部 GSH 在各时期作用一致, NPT 和 PC 在不同时期作用不同。

苗期叶部 GSH 与叶部镉浓度呈显著负相关, 与根系抗性指数呈显著正相关; 叶部 PC 与叶部镉浓度呈显著正相关, NPT、PC 与根系抗性指数呈显著负相关。初花期叶部 NPT 与各器官的镉浓度呈显著正相关, 与各器官的抗性指数呈显著负相关; 叶部 PC 与

各器官的镉浓度呈显著负相关, 与各器官的抗性指数呈显著正相关。初荚期叶部 GSH 与叶部镉浓度呈显著负相关, 叶部 NPT、GSH 均与地上部抗性指数呈显著正相关。成熟期叶部 GSH、PC 与各器官镉浓度均呈显著负相关, 叶部 GSH 与各器官抗性指数呈显著正相关。表明在不同时期大豆植株叶部巯基物质对镉胁迫响应不同。

表 1 大豆各器官中巯基物质与镉浓度和抗性指数的相关分析¹⁾

Tab.1 Correlation analysis of non-protein thiol and Cd contents in organs, and tolerance indexes of two soybean genotypes

生育期	性状	根			茎			叶		
		NPT	GSH	PC	NPT	GSH	PC	NPT	GSH	PC
苗期	$w(\text{Cd})_{\text{根}}$	0.435	0.429	0.359	0.404	0.427	0.388	0.177	-0.316	0.324
	$w(\text{Cd})_{\text{茎}}$	0.520	0.536	0.362	0.514	0.535	0.501	0.291	-0.435	0.441
	$w(\text{Cd})_{\text{叶}}$	0.672 *	0.735 **	0.379	0.724 **	0.742 **	0.711 **	0.502	-0.655 **	0.656 **
	$\text{TI}_{\text{根}}$	-0.780 **	-0.885 **	-0.358	-0.885 **	-0.895 **	-0.875 **	-0.688 **	0.836 **	-0.831 **
	$\text{TI}_{\text{地上部}}$	-0.511	-0.522	-0.372	-0.500	-0.521	-0.483	-0.270	0.415	-0.421
初花期	$w(\text{Cd})_{\text{根}}$	0.302	0.948 **	0.129	0.556	0.976 **	-0.191	0.876 **	-0.479	-0.951 **
	$w(\text{Cd})_{\text{茎}}$	0.135	0.793 **	0.024	0.487	0.875 **	-0.146	0.722 **	-0.524	-0.779 **
	$w(\text{Cd})_{\text{叶}}$	0.294	0.969 **	0.123	0.574	0.989 **	-0.194	0.887 **	-0.489	-0.901 **
	$\text{TI}_{\text{根}}$	-0.156	-0.781 **	-0.019	-0.482	-0.874 **	0.144	-0.697 *	0.533	0.773 **
	$\text{TI}_{\text{地上部}}$	-0.197	-0.856 **	-0.500	-0.519	-0.927 **	0.162	-0.783 **	0.531	0.846 **
初荚期	$w(\text{Cd})_{\text{根}}$	0.726 **	0.755 **	0.597 *	-0.581 *	0.894 **	-0.858 **	-0.056	-0.342	-0.101
	$w(\text{Cd})_{\text{茎}}$	0.416	0.436	0.421	-0.818 **	0.909 **	-0.950 **	-0.421	-0.442	-0.291
	$w(\text{Cd})_{\text{叶}}$	0.218	0.245	0.313	-0.900 **	0.818 **	-0.945 **	-0.575	-0.657 *	-0.425
	$\text{TI}_{\text{根}}$	-0.420	-0.445	-0.434	0.828 **	-0.922 **	0.963 **	0.412	0.513	0.266
	$\text{TI}_{\text{地上部}}$	-0.152	-0.170	-0.267	0.932 **	-0.774 **	0.945 **	0.641 *	0.587 *	0.504
成熟期	$w(\text{Cd})_{\text{根}}$	0.796 **	0.818 **	0.694 *	-0.007	0.666 *	-0.405	-0.191	-0.839 **	-0.750 **
	$w(\text{Cd})_{\text{茎}}$	0.812 **	0.907 **	0.701 *	0.090	0.736 **	-0.330	-0.101	-0.874 **	-0.693 *
	$w(\text{Cd})_{\text{叶}}$	0.770 **	0.786 **	0.691 *	-0.129	0.573	-0.505	-0.279	-0.807 **	-0.827 **
	$\text{TI}_{\text{根}}$	-0.816 **	-0.916 **	-0.678 *	-0.119	-0.756 **	0.305	0.075	0.880 **	0.674 *
	$\text{TI}_{\text{地上部}}$	-0.816 **	-0.939 **	-0.686 *	-0.188	-0.789 **	0.244	0.002	0.888 **	0.617 *

1) TI 为根或地上部的抗性指数; “*”和“**”分别表示 0.05 和 0.01 显著相关。

3 讨论与结论

土壤中的镉不仅对大豆生长发育有严重的影响,而且积累在籽粒中通过食物链危害人类健康^[33]。在镉污染的土壤上种植大豆必须选择抗 Cd、籽粒 Cd 低积累的大豆品种,而对大豆 Cd 抗性的评价通常以相对籽粒产量和相对地上部生物量为主要指标,对籽粒 Cd 积累以籽粒 Cd 浓度为^[7-8, 34]。本研究发现华夏 3 号各器官在镉处理下 4 个时期均比中黄 24 有较高的生物量,且其根系和地上部相对值高于中黄 24,表明华夏 3 号的镉抗性在整个发育时期表现一致。同时发现 2 品种各器官镉浓度在不同发育时期不同,成熟期中黄 24 各器官镉浓度均显著高于华夏 3 号,表明华夏 3 号低积累特性在成熟期才充分表现。这一结果与盆栽筛选试验结果一

http://xuebao.scau.edu.cn

致^[7]。

植物进化了一系列机制以抵御镉胁迫,包括减少重金属生物利用率、控制重金属进入细胞、螯合重金属以促进重金属流出细胞、区室化隔离、ROS 解毒等,其中,体内产生的巯基物质(GSH、PC、CYS 等)螯合镉是重要解毒机制之一^[18, 35]。巯基物质与镉具有很高的亲和性,形成无毒的络合物存在于细胞质或运输到液泡中,既解除了镉离子的毒性,又阻断了镉离子向其他组织的迁移^[36]。同时巯基物质 GSH 还是植物体内重要的抗氧化剂和信号物质^[25],GSH 代谢能够直接减少细胞内 H₂O₂ 的形成^[26]。本研究发现镉抗性和籽粒积累不同的 2 个大豆品种各器官中巯基物质在不同发育时期的动态变化不同。苗期镉胁迫下抗性品种华夏 3 号根系中 NPT、GSH 和 PC 浓度显著性下降,茎、叶中则无显著性变化;敏感品

种中黄 24 的 NPT 浓度在根、茎、叶(尤以根和茎)显著上升。初花期镉胁迫下抗性低积累品种华夏 3 号和敏感品种中黄 24 的根和茎中 NPT、GSH 和 PC 浓度均显著升高,但叶部 NPT、GSH 和 PC 浓度显著下降,敏感品种更为显著。初荚期镉胁迫下抗性品种华夏 3 根 NPT、GSH 和 PC 浓度显著高于敏感品种中黄 24;敏感品种中黄 24 茎部 NPT、GSH 和 PC 浓度比华夏 3 号下降更为显著;抗性品种华夏 3 号叶部 NPT、GSH 和 PC 浓度比敏感低品种中黄 24 显著上升。成熟期镉胁迫下敏感品种中黄 24 根系 NPT、GSH 和 PC 浓度显著上升,而抗性低积累品种华夏 3 号根系 NPT、GSH 和 PC 浓度无显著变化;华夏 3 号茎部和叶部 NPT、GSH 和 PC 浓度显著低于中黄 24。表明镉胁迫下敏感品种中黄 24 的根、茎和叶中非蛋白巯基物质的变化幅度远高于抗性品种华夏 3 号,这一现象在遏兰菜、白玉草、柳蒿、蜈蚣草等植物中也观察到^[20-23]。

有研究发现品种抗性与巯基物质的积累并无显著相关,甚至在一些植物中抗性品种巯基浓度低于敏感品种^[20, 22-23]。本研究对非蛋白巯基物质(NPT、GSH 和 PC)与抗性指数的相关分析发现,不同器官中各种巯基物质对抗性贡献不相同,根系中各发育时期各种巯基物质浓度与抗性呈负相关;各发育时期茎部 GSH 与抗性指标均呈负相关,而茎部 PC 自初花期就与抗性呈正相关,总巯基物质只在初荚期呈正相关;叶部只有 GSH 与抗性指标在各发育时期均是正相关,而叶部 PC 自初花期就与抗性呈正相关,总巯基物质只在初荚期呈正相关。

不同发育时期各器官中非蛋白巯基肽与各器官中镉积累相关性不尽相同。根系中各发育时期各种巯基物质浓度与各器官镉浓度呈正相关,且以初花期后根系 GSH 最为显著。茎部只有 GSH 与各器官镉浓度在各发育时期呈正相关,而茎部 PC 初花期至成熟期均与各器官镉浓度呈负相关。叶部只有 GSH 与各器官镉浓度在各发育时期呈负相关;叶部 PC 苗期与各器官镉浓度呈正相关,其他时期呈负相关。

在镉胁迫下与螯合相关的蛋白(PC)和氨基酸(甘氨酸、丝氨酸、谷氨酸)在镉低积累品种中具有较高的活性^[37]。镉胁迫下大豆巯基物质的变化规律预示着大豆中巯基物质不仅仅是螯合作用。植物体内巯基物质的作用有 3 个方面:一是金属螯合剂发挥着解毒作用;二是谷胱甘肽是一种重要的抗氧化剂;三是可作为 ROS 产生的信号分子^[13-14]。镉胁迫下抗性品种与敏感品种不同时期巯基物质变化不尽相同,敏感品种巯基物质变化更为显著,这与遏兰菜、

白玉草、柳蒿、蜈蚣草等植物的结果^[20-23]一致。这可能是由于不同抗性品种巯基物质合成机制不同,镉胁迫下抗性品种巯基物质与镉结合形成螯合物质固定在液泡中,然后通过氨基酸循环,重新形成新的螯合物,而巯基物质变化并不大,这一现象也在生菜和石竹等植物中被发现^[23-24]。另一种可能与巯基物质的抗氧化功能有关,镉胁迫下敏感品种体内积累较多活性氧,产生大量巯基物质作为内源活性氧清除剂清除活性氧,维持细胞代谢稳定,而抗性品种体内活性氧较低,同时还有其他物质可清除活性氧。因此镉胁迫下大豆中巯基物质的作用是多方面的,有待深入研究。

参考文献:

- [1] 曾希柏,徐建明,黄巧云,等. 中国农田重金属问题的若干思考[J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 186-193.
- [2] SANITA D, TOPPI L, GABBRIELLI R. Response to cadmium in higher plants [J]. Environ Exp Bot, 1999, 41(2): 105-130.
- [3] BENAVIDES M P, GALLEGO S M, TOMARO M L. Cadmium toxicity in plants [J]. Brazil J Plant Physiol, 2005, 17(1): 21-34.
- [4] LUX A, MARTINK M, VACULIK M, et al. Root responses to cadmium in the rhizosphere: A review [J]. J Exp Bot, 2011, 62(1): 21-37.
- [5] ZHAO Y, FANG X, MU Y, et al. Metal pollution (Cd, Pb, Zn, and As) in agricultural soils and soybean, *Glycine max*, in southern China [J]. B Environ Contam Tox, 2014, 92(4): 427-432.
- [6] ZHUANG P, LI Z A, ZOU B, et al. Heavy metal contamination in soil and soybean near the Dabaoshan Mine, South China [J]. Pedosphere, 2013, 23(3): 298-304.
- [7] 赵云云,钟彩霞,方小龙,等. 华南地区夏播大豆品种镉耐性及籽粒镉积累的差异[J]. 大豆科学, 2013, 32(3): 336-340.
- [8] 赵云云,钟彩霞,方小龙,等. 华南地区 11 个春播大豆品种抗镉性的差异[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(3): 111-113.
- [9] GRANT C A, CLARKE J M, DUGUID S, et al. Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation[J]. Sci Total Environ, 2008, 390(2/3): 301-310.
- [10] 赵云云,郭秀兰,钟彩霞,等. 大豆抗镉污染低积累育种的研究进展[J/OL]. 分子植物育种(网络版), 2011, 9: 1692-1699(2011-08-12) [2015-03-08]. <http://www.biopublisher.cn/index.php/mpb/article/html/576/>. DOI:10.5376/mpb.cn.2011.09.0096.
- [11] SHARMA S S, DIETZ K. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance [J]. Trends Plant

- Sci, 2009, 14(1): 43-50.
- [12] CUYPERS A, KAREN S, JOS R, et al. The cellular red-ox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings [J]. J Plant Physiol, 2011, 168(4): 309-316.
 - [13] LIN Y F, AARTS M G. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants [J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(19): 3187-3206.
 - [14] SETH C S, REMANS T, KEUNEN E, et al. Phytoextraction of toxic metals: A central role for glutathione [J]. Plant Cell Environ, 2012, 35(2): 334-346.
 - [15] HARTLEY-WHITAKER J, AINSWORTH G, VOOIJS R, et al. Phytochelatin synthase is involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus* [J]. Plant Physiol, 2001, 126(1): 299-306.
 - [16] GALLEGOS M, PENA L B, BARCIA R A, et al. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms [J]. Environ Exp Bot, 2012, 83: 33-46.
 - [17] GUO J, DAI X, XU W, et al. Overexpressing *GSH1* and *AsPCS1* simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana* [J]. Chemosphere, 2008, 72(7): 1020-1026.
 - [18] SARWAR N, ISHAQ W, FARID G, et al. Zinc-cadmium interactions: Impact on wheat physiology and mineral acquisition [J]. Ecotox Environ Safe, 2015, 122: 528-536.
 - [19] 高可辉. 镉胁迫及缺硫对水稻非蛋白巯基物质含量和谷胱甘肽硫转移酶活性的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2011.
 - [20] EBBS S, LAU I, AHNER B, et al. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl) [J]. Planta, 2002, 214(4): 635-640.
 - [21] LI Y, DHANKHER O P, CARREIR L, et al. Overexpression of phytochelatin synthase in *Arabidopsis* leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity [J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(12): 1787-1797.
 - [22] WOJAS S, CLEMENS S, HENNIG J, et al. Over expression of phytochelatin synthase in tobacco: Distinctive effects of *AtPCS1* and *CePCS* genes on plant response to cadmium [J]. J Exp Bot, 2008, 59(8): 2205-2219.
 - [23] ANETOLI M, VOOIJS R, TEN BOOKUM W, et al. Arsenate tolerance in *Silene paradoxa* does not rely on phytochelatin-dependent sequestration [J]. Environ Pollut, 2008, 152(3): 585-591.
 - [24] MAIER E A, MATTHEWS R D, MCDOWELL J A, et al. Environmental cadmium levels increase phytochelatin and glutathione in lettuce grown in a chelator-buffered nutrient solution [J]. J Environ Qual, 2003, 32(4): 1356-1364.
 - [25] JOZEFCZAK M, REMANS T, VANGRONSVELD J, et al. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(3): 3145-3175.
 - [26] JOZEFCZAK M, KEUNEN E, SCHAT H, et al. Differential response of *Arabidopsis* leaves and roots to cadmium: Glutathione-related chelating capacity vs antioxidant capacity [J]. Plant Physiol Bioch, 2014, 83: 1-9.
 - [27] ZAGORCHEV L, SEAL C E, KRANNER I, et al. A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(4): 7405-7432.
 - [28] VAZQUEZ S, GOLDSBROUGH P, CARPENA R O. Comparative analysis of the contribution of phytochelatin to cadmium and arsenic tolerance in soybean and white lupin [J]. Plant Physiol Bioch, 2009, 47(1): 63-67.
 - [29] WEI S, LI Y, ZHAN J, et al. Tolerant mechanisms of *Rorippa globosa* (Turcz.) Thell. hyper accumulating Cd explored from root morphology [J]. Bioresource Technol, 2012, 118: 455-459.
 - [30] RAMA DEVI S, PRASAD M. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants [J]. Plant Sci, 1998, 138(2): 157-165.
 - [31] GUPTA M, RAI U N, TRIPATHI R D, et al. Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.) Royle [J]. Chemosphere, 1995, 30(10): 2011-2020.
 - [32] BHARGAVA P, KUMAR SRIVASTAVA A, URMI S, et al. Phytochelatin plays a role in UV-B tolerance in N_2 -fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* [J]. J Plant Physiol, 2005, 162(11): 1220-1225.
 - [33] GILL S S, TUTEJA N. Cadmium stress tolerance in crop plants [J]. Plant Signal Behav, 2011, 6(2): 215-222.
 - [34] LI H, DONG Y, YIN H, et al. Characterization of the stress associated micro RNAs in *Glycine max* by deep sequencing [J]. BMC Plant Biol, 2011, 11: 170.
 - [35] VERBRUGGEN N, HERMANS C, SCHAT H. Molecular mechanisms of metal hyper accumulation in plants [J]. New Phytol, 2009, 181(4): 759-776.
 - [36] LI T, DI Z, ISLAM E, et al. Rhizosphere characteristics of zinc hyperaccumulator *Sedum alfredii* involved in zinc accumulation [J]. J Hazard Mater, 2011, 185(2/3): 818-823.
 - [37] AHSAN N, NAKAMURA T, KOMATSU S. Differential responses of microsomal proteins and metabolites in two contrasting cadmium (Cd)-accumulating soybean cultivars under Cd stress [J]. Amino Acids, 2012, 42(1): 317-327.

【责任编辑 周志红】