

秋华柳抗氧化酶系统对镉胁迫的响应^①

周 翠, 张 雯, 王 婷,
刘 媛, 马文超, 魏 虹

西南大学 生命科学学院/三峡库区生态环境教育部重点实验室/重庆市三峡库区植物生态与资源重点实验室, 重庆 400715

摘要: 采用水培方式, 研究了秋华柳在不同的镉(Cd)质量浓度梯度: 0 mg/L(CK), 2 mg/L(T1), 10 mg/L(T2), 20 mg/L(T3), 50 mg/L(T4)下的氧化胁迫程度及其叶片抗氧化酶系统对 Cd 胁迫的响应特征. 结果表明: 1) 秋华柳叶片 MDA 质量分数与 Cd 胁迫质量浓度呈显著正相关关系, 胁迫 12 d 后 MDA 质量分数极显著增加, 表明植物生理功能早期出现暂时性修复后细胞膜损伤程度显著增加. 2) 不同质量浓度和时间的 Cd 胁迫下, 植物抗氧化酶活性表现出不同的变化规律, 不同酶活性存在不同的阈值. 3) SOD 和 CAT 酶活性随着 Cd 处理时间的延长和质量浓度的增加均呈先上升后下降的趋势, 与对照相比始终保持着高活性状态; 在氧化胁迫前期, APX 酶具有较高的酶活性, 在 Cd 解毒前期中起主要作用; 随着 Cd 胁迫程度的增加, GR 酶活性升高, 与 Cd 胁迫质量浓度呈极显著正相关关系. 4) 秋华柳叶片中 POD 酶活性与 Cd 处理质量浓度间无统计学意义. 5) 在耐受 Cd 的阈值内, 秋华柳叶片抗氧化酶系统通过活性变化的协同作用, 共同应对 Cd 胁迫. 表明秋华柳抗氧化酶系统对 Cd 既具有解毒功能, 也是 Cd 毒性的作用位点.

关键词: 秋华柳; Cd 胁迫; 抗氧化酶

中图分类号: Q945.79

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)10-0027-08

重金属污染具有隐蔽性、滞后性等特点, 已成为国家实施可持续发展战略的重要瓶颈^[1]. 相对于其它重金属, Cd 极易被植物吸收并在体内富集, 对植物的生命代谢活动具有明显的毒害作用, 严重时可导致植物死亡^[2-3], 成为重金属污染治理的首要目标. 利用植物修复的方式达到治理土壤重金属污染的目的是近年来重金属污染治理领域理论与实践研究的热点. 已有研究结果表明, 柳属的某些物种具有较好的 Cd 耐受和吸附积累能力, 是治理和修复 Cd 污染土壤的潜力物种之一^[4-6].

Cd 毒害植物的重要机制是引起植物体内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的积累, 造成细胞膜脂质过氧化、酶失活、DNA 断裂等^[7-10], 植物体内抗氧化防御系统失衡, 造成的氧化伤害与 Cd 胁迫程度呈正相关关系^[11-13]. 研究表明, 植物通过启动体内的一系列功能蛋白, 如超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸-谷胱甘肽循环(AsA-GSH)等, 清除体内过多的 ROS. 重金属富集植物滇苦菜(*Picris divaricata* V.)^[14]、龙葵(*Solanum nigrum* L.)^[15]、东南景天(*Sedum alfredii*)^[16]等体内的抗氧化酶活性在重金属胁迫下都有不同程度的提高.

秋华柳(*Salix variegata* Franch.)是柳属速生灌木树种, 生物量大, 自然分布广泛^[17]. 孙晓灿等^[18]、贾中民等^[19]、刘媛等^[20]对秋华柳的 Cd 富集效应及生理响应的研究表明, 秋华柳能耐受水淹和 Cd 污染并

① 收稿日期: 2016-07-26

基金项目: 国家国际科技合作专项(2015DFA90900); 三峡后续工作库区生态与生物多样性保护专项(5000002013BB5200002); 重庆市林业重点科技攻关项目(渝林科研 2015-6); 中央财政林业科技推广示范项目(渝林科推[2014-10]).

作者简介: 周 翠(1992-), 女, 安徽宿州人, 硕士研究生, 主要从事应用生态学的研究.

通信作者: 魏 虹, 博士, 教授.

对 Cd 有良好的富集作用且根系活力不会对秋华柳的植物修复造成阻碍,具备修复 Cd 污染土壤的潜力.但对于秋华柳的 Cd 耐受解毒机制尚不明确,值得进一步关注.本研究采用水培的方式,对秋华柳进行 Cd 梯度质量浓度处理,分析不同 Cd 质量浓度对秋华柳叶片的氧化胁迫程度及抗氧化酶系统的应对特征,以期进一步了解秋华柳应对 Cd 胁迫的耐受和解毒机制.

1 材料与方法

1.1 试验材料

2015 年 3 月从重庆市嘉陵江同兴镇河岸(29°41'2" N, 106°26'56" E)剪取长 15~20 cm, 茎径 0.5~1 cm 的秋华柳扦插条,带回实验室先后用自来水、超纯水冲洗干净,固定于胶合板后插入装有 1/2 Hoagland 改良营养液的水培箱中转至光照培养箱中培养,每盆 5 株,每 3 d 更换一次营养液.光照培养箱参数设定为:相对湿度 60%,温度 25/20 ℃,光照强度 10000/0 lx,光照/无光照时间 16/8 h.

1.2 试验设计

2015 年 6 月,从中挑选生长基本一致的秋华柳扦插苗(萌条长约 40 cm)进行试验处理,随机分为 5 组.以加入 CdCl₂ · 2.5H₂O 的形式进行 Cd 质量浓度梯度设置,共 5 个 Cd 质量浓度处理水平,分别为 0 mg/L (CK), 2 mg/L(T1), 10 mg/L(T2), 20 mg/L(T3), 50 mg/L(T4),各处理组分别定义为低质量浓度处理组(T1),中质量浓度处理组(T2),高质量浓度处理组(T3,T4),每个处理 4 个重复.其中,T1 的 Cd 处理质量浓度接近矿区等重度污染区土壤的 Cd 质量浓度^[21].分别在 Cd 处理 0 d,6 d,12 d 和 18 d 时采集秋华柳叶片,用超纯水冲洗干净,滤纸擦干后密封保存于自封袋中,置于-80 ℃冰箱,待取样全部结束后进行一次测试.

1.3 测定指标与方法

采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(Malondialdehyde,简称 MDA)质量分数^[22];紫外分光光度法测定过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)活性;氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性^[23].

1.4 数据分析

利用 SPSS 20.0 统计分析软件进行数据统计分析,用单因素方差分析(One-way ANOVA)及重复测量方差分析(Repeated measures)分析不同质量浓度梯度 Cd 胁迫对秋华柳叶片中 MDA 质量分数和 SOD, CAT,POD,GR,APX 酶活性的影响;用 Duncan 多重比较(Duncan's multiple range test)检验各处理组之间的差异;用相关分析探究不同 Cd 质量浓度与秋华柳叶片抗氧化酶系统各指标间的相关性.采用 Origin 8.5 软件作图.

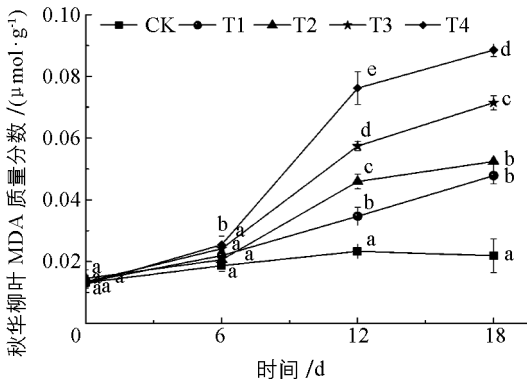
2 试验结果与分析

2.1 不同质量浓度 Cd 胁迫对秋华柳叶片 MDA 质量分数的影响

MDA 作为膜脂过氧化的产物,是表征细胞是否受到氧化胁迫的重要参数^[24].本研究中,秋华柳叶片 MDA 质量分数与 Cd 处理质量浓度和胁迫时间呈正相关关系(图 1),随着胁迫时间的延长,秋华柳叶片细胞受氧化胁迫程度逐渐加深.处理 6 d 时,各处理组间差异无统计学意义(T4 除外);处理 12 d 时,各处理组 MDA 质量分数显著增加;处理 18 d 时,MDA 质量分数增长减缓,各处理组变化趋势与 12 d 时相似,但 T1,T2 处理组间差异无统计学意义.

2.2 不同质量浓度 Cd 胁迫对秋华柳叶片抗氧化酶活性的影响

重复测量方差分析结果表明,不同 Cd 处理质量浓度对秋华柳叶片抗氧化酶活性在时间、质量浓度及



图中数据均为平均值±标准误(n=4),
不同小写字母表示不同组间差异有统计学意义(p<0.05).

图 1 秋华柳叶片丙二醛(MDA)质量分数

时间与质量浓度间的交互效应上均造成了影响(表 1). 其中, Cd 处理时间、时间与质量浓度交互效应均对 POD 酶活性产生统计学意义($p<0.01$), 不同 Cd 处理质量浓度对 POD 酶活性存在统计学意义($p<0.05$), 而秋华柳叶片中 SOD,CAT,APX,GR 酶活性均受到 Cd 胁迫在时间、质量浓度及时间与质量浓度间的交互效应三方面的差异有统计学意义($p<0.01$).

表 1 Cd 胁迫对秋华柳叶片抗氧化酶活性的影响

	SOD		POD		CAT		APX		GR	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
时间	315.996	* *	4.644	* *	48.281	* *	125.413	* *	151.794	* *
质量浓度	59.994	* *	2.587	*	37.104	* *	90.248	* *	37.244	* *
时间与质量浓度	24.809	* *	2.640	* *	6.725	* *	16.158	* *	13.988	* *

注: * * 表示不同组间差异有统计学意义($p<0.01$), * 表示不同组间差异有统计学意义($p<0.05$).

图 2(a)为秋华柳叶 SOD 酶活性. 随着 Cd 胁迫时间的延长, 秋华柳叶 SOD 酶活性中低质量浓度处理 T1,T2 组呈持续上升, 高质量浓度处理 T3,T4 组呈先升后降的趋势. 处理 6 d 时, 高质量浓度处理 T3,T4 组 SOD 酶活性显著高于 CK,T1 和 T2 组, 中低质量浓度处理 T1,T2 组与 CK 间差异无统计学意义, 但酶活性均高于 CK. 处理 12 d 时, T3,T4 组酶活性达到峰值. 处理 18 d 时, T1,T2 组酶活性持续上升, T3,T4 组酶活性有所下降, 但维持着高活性状态, 与对照相比差异有统计学意义.

除 18 d 时, 高质量浓度处理 T4 组 POD 酶活性显著高于其它处理组外, 随 Cd 处理质量浓度的增加和时间的延长, 与对照相比, 秋华柳叶 POD 酶活性均无统计学意义(图 2(b)). 说明在秋华柳叶中 POD 酶对 Cd 胁迫不敏感.

随着处理时间的延长, T1,T2,T3 组 CAT 酶活性均呈现先上升后下降的趋势, 高质量浓度 T4 处理组酶活性则持续上升(图 2(c)). 处理 6 d 时, 各处理组 CAT 酶活性出现激增, T2,T3,T4 处理组酶活性均显著高于 CK 组, 但 T2,T3,T4 处理组间差异无统计学意义. 处理 12 d 和 18 d 时, 酶活性大小与 Cd 胁迫质量浓度呈正相关关系, 与对照相比差异有统计学意义.

随着 Cd 处理时间的延长, 高质量浓度处理 T3,T4 组 APX 酶活性均呈先增加后降低的趋势, 处理 18 d 时, T3,T4 组 APX 酶活性显著低于 T1,T2 组; 与高质量浓度处理组不同, T1,T2 组 APX 酶活性在 Cd 胁迫期间则持续上升(图 2(d)). 处理 12 d 时, T4 处理组显著高于 CK,T1,T2 处理组, T1,T2,T3 处理组间差异无统计学意义. 处理 6 d 时, 高质量浓度 T3,T4 组 APX 酶活性达到峰值, 显著高于 CK, T1,T2 组; 与对照相比, 分别增加 1.87,2.28 倍. 中低质量浓度 T1,T2 组间差异无统计学意义, 但均高于 CK 组.

如图 2(e)所示, 秋华柳叶 GR 酶活性在处理前期增长缓慢, 处理 6 d 时, 仅高质量浓度处理 T3,T4 组显著高于 CK 组. 处理 12 d 和 18 d 时, 各处理组酶活性均升高且显著高于对照. 处理 12 d 时, 各处理组间酶活性差异无统计学意义. 处理 18 d 时, T3,T4 组间, T1,T2 组间差异无统计学意义.

2.3 Cd 胁迫质量浓度与秋华柳叶片抗氧化酶系统各指标间的相关性分析

不同 Cd 处理质量浓度对秋华柳叶片的氧化胁迫及其抗氧化酶系统各项生理指标的影响程度均不相同, 相关性分析结果很好地反映了不同 Cd 处理质量浓度对秋华柳叶片抗氧化酶系统各指标的影响程度(表 2).

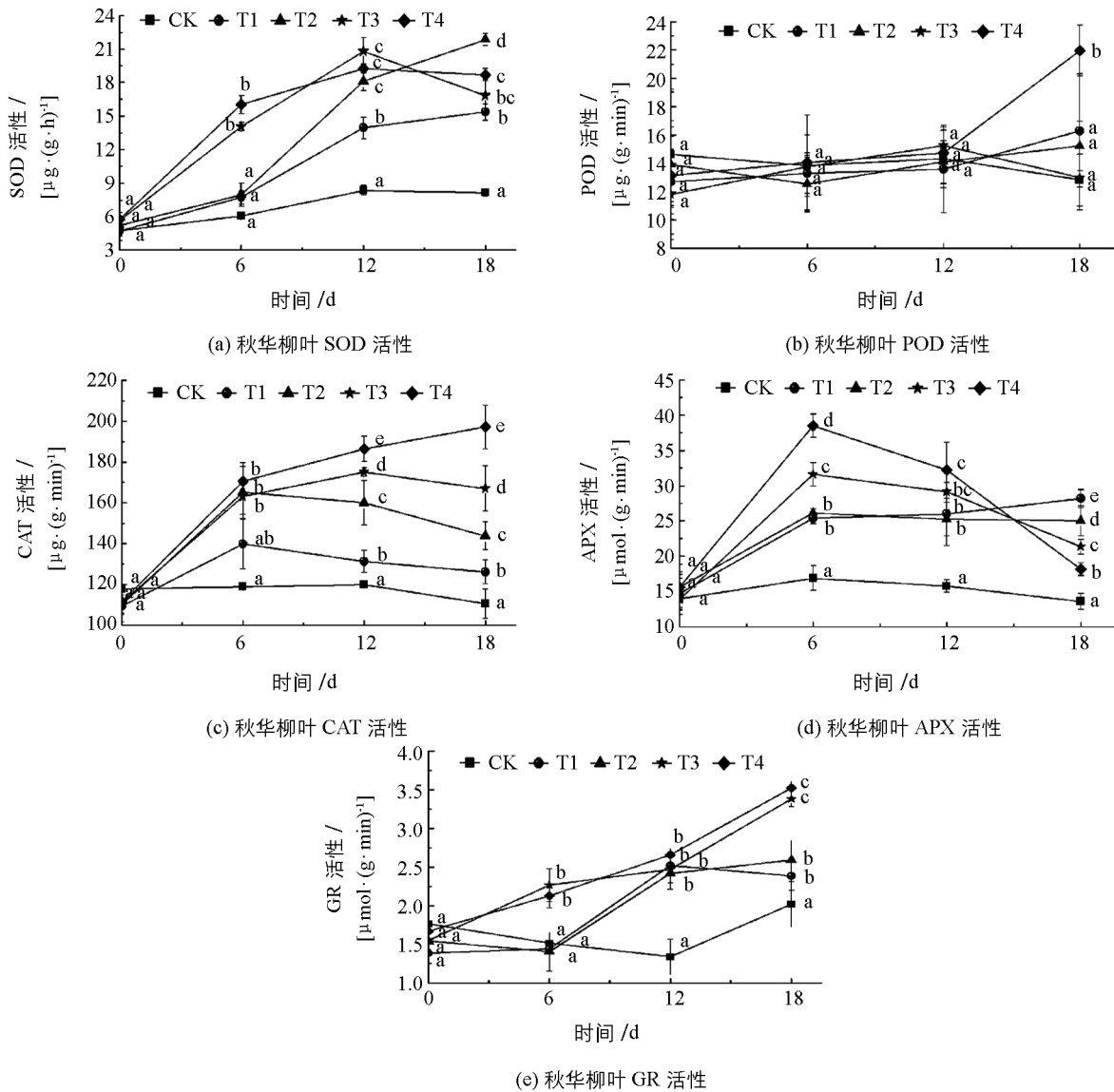
表 2 不同 Cd 胁迫质量浓度与秋华柳叶片各生理指标间的相关性

胁迫时间/ d	MDA	抗氧化酶活性				
		SOD	POD	CAT	APX	GR
6	0.916*	0.921*	0.236	0.924*	0.976**	0.785
12	0.994**	0.903*	0.268	0.987**	0.966**	0.767
18	0.985**	0.712	0.635	0.990**	0.067	0.976**

注: * * 表示不同组间差异有统计学意义($p<0.01$), * 表示不同组间差异有统计学意义($p<0.05$).

结果表明, 在 Cd 处理 6 d 时, 秋华柳叶 MDA 质量分数与 Cd 质量浓度呈显著正相关关系($p<0.05$),

12 d 和 18 d 时呈极显著正相关关系($p<0.01$),说明随着 Cd 胁迫质量浓度和处理时间的增加,秋华柳叶片细胞膜损伤程度显著增加.



图中数据均为平均值±标准误($n=4$),不同小写字母表示不同组间差异有统计学意义($p<0.05$).

图 2 秋华柳叶片中抗氧化酶活性

不同质量浓度 Cd 处理与秋华柳叶片抗氧化酶活性间的相关关系不尽相同.结果显示,POD 酶活性与不同 Cd 处理质量浓度间始终无显著性相关关系,GR 酶活性在长时间 Cd 处理(18 d)下与其呈极显著正相关关系($p<0.01$).而 SOD,CAT,APX 3 种抗氧化酶活性与 Cd 处理质量浓度间有不同程度的相关关系.处理 6 d 时,APX 酶活性与 Cd 胁迫质量浓度呈极显著正相关关系($p<0.01$),SOD,CAT 酶活性呈显著正相关关系($p<0.05$);处理 12 d 时,SOD 酶活性与 Cd 处理质量浓度呈显著正相关关系($p<0.05$),CAT,APX 酶活性均呈极显著正相关关系($p<0.01$);处理 18 d 时,CAT 酶活性与 Cd 处理质量浓度呈极显著正相关关系($p<0.01$),相关系数 r 高达 0.990.

3 讨 论

Cd 对植物造成伤害的重要机制之一是引起植物体内活性氧的积累,质膜正常生理功能受损,细胞内稳态失衡^[25-26],植物生长受阻,严重时可导致植物死亡.MDA 是植物膜脂过氧化的主要产物,质量分数的变化可在一定程度上反映植物体受重金属氧化胁迫的水平^[27].本研究结果显示,秋华柳叶片 MDA 质量分数

与 Cd 胁迫质量浓度间始终呈显著正相关关系。在处理 6 d 时,秋华柳叶片中 MDA 质量分数随 Cd 质量浓度增加而增加,但各处理组之间除高质量浓度 T4 处理组(50 mg/L)外,秋华柳叶 MDA 水平与对照相比差异并无统计学意义,说明秋华柳叶片细胞膜没有完全受损,仍具有较好的生理功能,对 Cd 具有一定的耐性。但随着处理时间的延长,MDA 质量分数迅速上升,且随着 Cd 胁迫质量浓度的增加而显著增加,说明高质量浓度 Cd 胁迫引起了秋华柳体内活性氧自由基的反应与细胞膜脂质过氧化,Cd 与含 S 或 N 的基团和蛋白质形成二硫键,从而破坏了细胞膜离子通道结构^[28]。这与 Cd 超富集植物滇苦菜^[14]、龙葵^[15]、东南景天^[16]等 MDA 质量分数对 Cd 的胁迫响应类似。

重金属进入植物体内诱导产生的大量 ROS,若不能被及时清除,会引起一系列对植物体有害的反应。如 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 在一定条件下可以通过哈伯·韦斯反应($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$)和芬顿反应($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$)生成 $\cdot OH$ 。 $\cdot OH$ 可以引起植物体细胞膜受损及细胞质渗漏,导致细胞快速脱水死亡^[29]。为了减少 ROS 对植物体造成的损害,植物抗氧化系统是逆境胁迫下抵御不良影响的重要机制,以此清除体内过多的 ROS。

SOD 是植物抗氧化系统的第一道防线,可将 $O_2^{\cdot-}$ 歧化为毒性较弱的 H_2O_2 和 O_2 ,减轻 $O_2^{\cdot-}$ 对植物体的毒害作用,是植物清除 $O_2^{\cdot-}$ 的主要酶^[30],CAT 和 POD 均有清除 H_2O_2 的能力^[31]。已有研究表明,Cd 超富集植物滇苦菜在 Cd 胁迫下抗氧化酶活性均有所提升,尤其 SOD,POD 在高质量浓度 Cd 胁迫下,活性仍显著上升。CAT 酶活性虽变化不明显,但仍高于对照组^[14]。本研究中对秋华柳叶片 SOD 酶活性与 Cd 胁迫强度的相关分析结果显示,低质量浓度 Cd 诱导了秋华柳叶 SOD 酶活性的升高,而高质量浓度 Cd 或长时间的 Cd 胁迫则使 SOD 酶活性降低^[32],SOD 酶活性存在一个阈值,既在一定质量浓度 Cd 处理或处理时间内,酶活性得以提升和维持,超过这个阈值范围,酶活性下降^[33]。在重金属超富集植物圆锥南芥^[34]、短毛蓼^[35]、富集生态型龙葵^[15]中,SOD 酶活性在应对逆境胁迫时也呈现出了相同的响应趋势。这有可能因为 SOD 酶含有巯基,可与 Cd 发生络合反应,导致其失去活性,也有可能因为 Cd 与其金属同工酶的 Fe-SOD, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD 等的金属辅助因子间相互竞争离子通道,从而抑制了金属辅助因子对金属的吸收^[36]。SOD 酶活性在 Cd 胁迫下的这种低升高抑效应也有可能是因为高质量浓度的 H_2O_2 使 Fe-SOD, Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 失活所致^[37]。另一方面,秋华柳叶 CAT 酶活性与 Cd 处理质量浓度间始终呈显著正相关关系,且随着 Cd 处理时间的延长,高质量浓度处理组酶活性一直呈上升趋势,中、高质量浓度处理组的酶活性在处理后期有所下降,可能因为 Cd 干扰了其分子结构或改变了其空间结构^[38],但与对照相比仍保持着高活性状态。CAT 酶在秋华柳叶中的高活性可能因为 CAT 酶不直接参与 H_2O_2 的分解过程,而是酶的血红素铁先与 H_2O_2 反应生成铁过氧化物活性体,CAT 酶再将 1 分子的 H_2O_2 氧化,从而完成分解过程^[39]。而 CAT 酶和 H_2O_2 亲和力较弱,对 H_2O_2 的米氏常数 K_m 值较大,因此为了除去低质量浓度的 H_2O_2 就需要植物体提供相当高活性的 CAT 酶才能实现^[40]。

通常情况下,植物体内过多的 H_2O_2 主要由 AsA-GSH 循环清除,而 GSH,GR 和 APX 是 AsA-GSH 循环的主要参与者^[41]。Cd 能直接或间接诱导 GR 酶活性中心的巯基氧化,也可诱导酶蛋白的重新合成^[42],进而提高 GR 酶的活性,GR 酶活性的提高可使植物细胞内 GSH/GSSG 的比值维持在较高的水平,使植物体免受氧化伤害^[43]。本研究,相关性分析结果显示,秋华柳 APX 酶活性与 GR 酶活性表现出不同的变化特点,APX 酶活性对早期的 H_2O_2 清除效果较明显,而 GR 酶主要在 H_2O_2 的后期清除中发挥作用。说明在 Cd 处理前期,GSH 及 APX 酶在 Cd 解毒中起主要作用,随着胁迫时间的延长,秋华柳体内 Cd 诱导植物螯合态(Phytochelatins PCs)的合成,作为 PCs 合成前体的 GSH 及其衍生物质量分数下降,GR 酶开始发挥更重要的作用。同时,含有硫醇的 GR 酶因硫醇被 Cd 结合而减少,后期活性也相应受到抑制,因此 AsA-GSH 循环对 H_2O_2 的清除效果因 GSH 质量分数的减少和 GR 酶活性的降低而减弱,造成了 H_2O_2 在细胞内的大量累积,进而导致膜脂过氧化产物的进一步积累。

在整个试验期间秋华柳叶 POD 酶活性差异无统计学意义(18 d 时,T4 除外),说明在秋华柳叶中 POD 酶对 Cd 胁迫不敏感,与其它重金属富集植物在 Cd 胁迫处理下 POD 酶活性的变化规律不完全一致。这可能与 POD 酶的双重作用性有关,一方面,POD 酶作为细胞抗氧化酶系统的成员之一,表现为 POD 酶对

H₂O₂ 的拮抗作用,可在逆境或衰老初期表达,清除体内过多的 H₂O₂;另一方面,POD 酶可作为衰老指标,表现为 POD 酶对 H₂O₂ 的协同作用,可在逆境或衰老后期表达,参与活性氧的生成、叶绿素的降解,并能引发膜脂过氧化作用^[44],具体机制有待进一步研究。

综上所述,Cd 胁迫对秋华柳叶片造成氧化胁迫,引起脂质过氧化,致使 MDA 质量分数升高,且其质量分数与 Cd 胁迫质量浓度呈显著正相关关系。在氧化胁迫的细胞微环境中,秋华柳叶片的抗氧化酶系统作出应激反应,清除细胞内过多的 ROS。不同质量浓度和时间的 Cd 胁迫下,秋华柳叶片抗氧化酶活性分别表现出不同的变化规律。其中 SOD, CAT 是 2 种高活性酶,随着 Cd 胁迫质量浓度的增加和处理时间的延长始终维持着高活性状态。在氧化胁迫前期,APX 具有较高的酶活性,随着 Cd 胁迫程度的增加,GR 酶活性升高,通过 AsA-GSH 循环清除 ROS。而秋华柳叶中 POD 酶对 Cd 胁迫不敏感。不同的抗氧化酶活性存在不同的阈值,植物在耐受 Cd 质量浓度的阈值内,抗氧化酶系统通过活性变化的协同作用,共同应对 Cd 胁迫。同时也说明抗氧化酶系统对 Cd 既具有解毒功能,也是 Cd 毒性的作用位点。

参考文献:

- [1] 龚继明. 重金属污染的缓与急 [J]. 植物生理学报, 2014, 50(5): 567—568.
- [2] 王振中, 张友梅, 邓继福, 等. 重金属在土壤生态系统中的富集及毒性效应 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(10): 1948—1952.
- [3] WU F, ZHANG G, DOMINY P. Four Barley Genotypes Respond Differently to Cadmium: Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Capacity [J]. Environmental & Experimental Botany, 2003, 50(1): 67—78.
- [4] KACALLKOVA L, TLUSTOSI P, SZAKOVA J. Phytoextraction of Risk Elements by Willow and Poplar Trees [J]. International Journal of Phytoremediation, 2015, 17(1—6): 414—421.
- [5] 钱永强, 周晓星, 韩 蕾, 等. 3 种柳树叶片 PSII 叶绿素荧光参数对 Cd²⁺ 胁迫的光响应 [J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(6): 8—14.
- [6] 贾中民, 程 华, 魏 虹, 等. 三峡库区岸生植物秋华柳对镉胁迫的光合响应 [J]. 林业科学, 2012, 48(6): 152—158.
- [7] ROMERO-PUERTAS M C, CORPAS F J, RODRIGUEZ-SERRANO M, et al. Differential Expression and Regulation of Antioxidative Enzymes by Cadmium in Pea Plants [J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(10): 1346—1357.
- [8] RODRIGUEZ-CELMA J, RELLAN-ALVAREZ R, ABADIA A, et al. Changes Induced by Two Levels of Cadmium Toxicity in the 2-DE Protein Profile of Tomato Roots [J]. Journal of Proteomics, 2010, 73(9): 1694—1706.
- [9] BESSON-BARD A, WENDEHENNE D. Nitric Oxide Contributes to Cadmium Toxicity in Arabidopsis by Promoting Cadmium Accumulation in Roots and by Up-Regulating Genes Related to Iron Uptake [J]. Plant Physiology, 2009, 149(3): 1302—1315.
- [10] BI Y H, CHEN W L, ZHANG W N, et al. Production of Reactive Oxygen Species, Impairment of Photosynthetic Function and Dynamic Changes in Mitochondria are Early Events in Cadmium-Induced Cell Death in *Arabidopsis thaliana* [J]. Biology of the Cell, 2009, 101(11): 629—643.
- [11] ROMERO-PUERTAS M C, MCCARTHY I, SANDALIO L M, et al. Cadmium Toxicity and Oxidative Metabolism of Pea Leaf Peroxisomes [J]. Free Radical Research, 1999, 31(Suppl): S25—S31.
- [12] DIXIT R V, PANDEY V, SHYAM R. Differential Antioxidative Responses to Cadmium in Roots and Leaves of Pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) [J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(358): 1101—1109.
- [13] KAPOOR D, KAUR S, BHARDWAJ R. Physiological and Biochemical Changes in Brassica Juncea Plants under Cd-Induced Stress [J]. Biomed Research International, 2014(5): 726070—726083.
- [14] 汤叶涛, 关丽捷, 仇荣亮, 等. 镉对超富集植物滇苦菜抗氧化系统的影响 [J]. 生态学报, 2010, 30(2): 324—332.
- [15] SUN R L, ZHOU Q X, SUN F H, et al. Antioxidative Defense and Proline/Phytochelatin Accumulation in A Newly Discovered Cd-Hyperaccumulator, L [J]. Environmental & Experimental Botany, 2007, 60(3): 468—476.
- [16] JIN X, YANG X, ISLAM E, et al. Effects of Cadmium on Ultrastructure and Antioxidative Defense System in Hyperaccumulator and Non-Hyperaccumulator Ecotypes of *Sedum alfredii* Hance [J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 156(1—3): 387—397.
- [17] 张艳红, 曾 波, 付天飞, 等. 长期水淹对秋华柳(*Salix variegata* Franch.) 根部非结构性碳水化合物含量的影响 [J].

- 西南师范大学学报(自然科学版), 2006, 31(3): 153—156.
- [18] 孙晓灿, 魏 虹, 谢小红, 等. 水培条件下秋华柳对重金属 Cd 的富集特性及光合响应 [J]. 环境科学研究, 2012, 25(2): 220—225.
- [19] 贾中民, 魏 虹, 孙晓灿, 等. 秋华柳和枫杨幼苗对镉的积累和耐受性 [J]. 生态学报, 2011, 31(1): 107—114.
- [20] 刘 媛, 马文超, 张 雯, 等. 镉胁迫对秋华柳根系活力及其 Ca、Mg、Mn、Zn、Fe 积累的影响 [J]. 应用生态学报, 2016, 27(4): 1109—1115.
- [21] 房 辉, 曹 敏. 云南会泽废弃铅锌矿重金属污染评价 [J]. 生态学杂志, 2009, 28(7): 1277—1283.
- [22] 张义凯, 崔秀敏, 杨守祥, 等. 外源 NO 对镉胁迫下番茄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.
- [23] ELAVARTHI S, MARTIN B. Spectrophotometric Assays for Antioxidant Enzymes in Plants [J]. Methods in Molecular Biology, 2010, 639: 273—281.
- [24] CHEN L, HAN Y, JIANG H, et al. Nitrogen Nutrient Status Induces Sexual Differences in Responses to Cadmium in *Populus yunnanensis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(14): 5037—5050.
- [25] SCHUZENDUBEL A, SCHWANZ P, TEICHMANN T, et al. Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, *Hydrogen peroxide* Content, and Differentiation in *Scots pine* Roots [J]. Plant Physiology, 2001, 127(3): 887—898.
- [26] PERFUS-BARBEOCH L, LEONHARDT N, VAVASSEUR A, et al. Heavy Metal Toxicity: Cadmium Permeates Through Calcium Channels and Disturbs the Plant Water Status [J]. Plant Journal, 2002, 32(4): 539—548.
- [27] KHOSHGOFTARMANESH AH, KHODARAHMI S, HAGHIGHI M. Effect of Silicon Nutrition on Lipid Peroxidation and Antioxidant Response of Cucumber Plants Exposed to Salinity Stress [J]. Archives of Agronomy & Soil Science, 2013, 60(5): 639—653.
- [28] MISHRA S, SRIVASTAVA S, TRIPATHI R D, et al. Phytochelatin Synthesis and Response of Antioxidants During Cadmium Stress in *Bacopa monnieri* L [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2006, 44(1): 25—37.
- [29] 夏民旋, 王 维, 袁 瑞, 等. 超氧化物歧化酶与植物抗逆性 [J]. 分子植物育种, 2015, 13(11): 2633—2646.
- [30] 杨 牟, 何 平, 段才绪, 等. 外源 SNP, Spd 对盐碱胁迫下射干幼苗体内抗氧化酶活性的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 37(6): 13—19.
- [31] SREENIVASULU N, GRIMM B, WOBUS U, et al. Differential Response of Antioxidant Compounds to Salinity Stress in Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Seedlings of Foxtail Millet (*Setaria italica*) [J]. Physiologia Plantarum, 2000, 109(4): 435—442.
- [32] CHAMSEDDINE M, WIDED B A, GUY H, et al. Cadmium and Copper Induction of Oxidative Stress and Antioxidative Response in Tomato (*Solanum lycopersicon*) Leaves [J]. Plant Growth Regulation, 2009, 57(1): 89—99.
- [33] 袁祖丽, 吴中红. 镉胁迫对烟草根抗氧化能力和激素含量的影响 [J]. 生态学报, 2010, 30(15): 4109—4118.
- [34] QIU R L, ZHAO X, TANG Y T, et al. Antioxidative Response to Cd in A Newly Discovered Cadmium Hyperaccumulator, *Arabis paniculata* F [J]. Chemosphere, 2008, 74(1): 6—12.
- [35] 李 燕, 刘可慧, 于方明, 等. Mn 对超富集植物短毛蓼 (*Polygonum pubescens* Blume.) 抗氧化机理的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(12): 2422—2427.
- [36] ALSCHER R G, ERTURK N, HEATH L S. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stress in Plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(372): 1331—1341.
- [37] 窦俊辉, 喻树迅, 范术丽, 等. SOD 与植物胁迫抗性 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(2): 359—364.
- [38] 史 静, 潘根兴, 夏运生, 等. 镉胁迫对两品种水稻生长及抗氧化酶系统的影响 [J]. 生态环境学报, 2013, 22(5): 832—837.
- [39] 李 璇, 岳 红, 王 升, 等. 影响植物抗氧化酶活性的因素及其研究热点和现状 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 973—978.
- [40] 尹永强, 胡建斌, 邓明军. 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 105—110.
- [41] XIANG C, OLIVER D J. Glutathione Metabolic Genes Coordinately Respond to Heavy Metals and Jasmonic Acid in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 1998, 10(9): 1539—1550.
- [42] NOCTOR G, FOYER C H. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Contro [J]. Annual Review of

Plant Biology, 1998, 49(4): 249–279.

[43] SCHUTZENDUBEL A, POLLE A. Plant Responses to Abiotic Stresses: Heavy Metal-Induced Oxidative Stress and Protection by Mycorrhization [J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(372): 1351–1365.

[44] 廖源林, 蔡仕珍, 邓辉茗, 等. 苦楝叶片抗氧化系统对 Cd^{2+} 胁迫的响应 [J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(11): 22–27.

Response of the Antioxidant Enzyme System of *Salix variegata* Franch to Cadmium Stress

ZHOU Cui, ZHANG Wen, WANG Ting,
LIU Yuan, MA Wen-chao, WEI Hong

School of Life Sciences / Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges

Reservoir Region (Ministry of Education) / Chongqing Key Laboratory of Plant Ecology and Resources

Research in Three Gorges Reservoir Region, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The degree of oxidative stress can be determined through the amount of malondialdehyde (MDA) present within the leaf, while information about the anti-oxidative defense systems within the leaf can be obtained through the abundance of super oxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR). A hydroponic experiment with different cadmium treatments (Cd^{2+} 0, 2, 10, 20 and 50 mg/L) was conducted over 18 days in order to investigate the effects of cadmium on oxidative stress and the response of the anti-oxidative defense systems in the leaf of *Salix variegata* to cadmium stress. The concentrations of MDA and the aforementioned enzymes were then analyzed once the experiment was completed. A significant positive correlation was shown to exist between MDA content in the leaf of *S. variegata* and cadmium concentration, MDA content being significantly higher after 12 days of treatment, which implied that the degree of oxidative stress increased significantly after a temporary repair of the plant physiological function. The enzymes that made up the anti-oxidative defense system in the leaf played different roles when *S. variegata* was under cadmium stress. This implied that different enzymes of the anti-oxidative defense system had different thresholds. The activities of the SOD and CAT showed a similar trend in change: they first increased with increasing Cd treatment concentration and time, followed then by a decline, always maintaining a relatively high activity in comparison with the CK. In the early stage of the oxidative stress, the activity of APX maintained relatively high activities, suggesting an important role in defending against the toxicity of cadmium. The activity of GR in the leaf of *S. variegata* increased steadily with increasing cadmium stress, exhibiting a highly significant positive correlation between them. No significant correlation was detected between POD activity and cadmium concentration. There were different thresholds for Cd tolerance of the anti-oxidative defense system, in which different enzymes helped to cope with varying degrees of cadmium stress. These defense mechanisms also worked in conjunction with plant synergy. The antioxidant enzyme system of *S. variegata* was useful in defending against the toxicity of the cadmium ion. Moreover, the enzymes could also act as an active site for the cadmium ion and be subsequently harmed from this interaction.

Key words: variegated willow (*Salix variegata*); cadmium stress; antioxidant enzyme

