

镉中毒水稻苗期体内总蛋白量和 POD、CAT 活性的变化

施农农

(杭州教育学院生物系 杭州 310020)

摘 要 镉对水稻种子苗期生长、体内蛋白质的分解抑制、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性抑制在低于致死浓度下均呈明显的剂量效应($R > 0.88$)。镉对种子造成伤害的临界浓度为 0.05mmol/L , 此时种子根芽生长势明显弱于无镉害对照($P < 0.01$), 并比对照推迟 2 天达到 100% 萌芽率, 过氧化氢酶活性与对照差异显著($P < 0.05$), 但是总蛋白分解和过氧化物酶活性与对照差异不明显; $0.5 \sim 1\text{mmol/L Cd}^{++}$ 胁迫 5 天的种子仅长弱芽不长根, 萌芽率为零, 各生长指标与对照均呈极显著差异($P < 0.01$); 镉对种子的致死浓度为 $> 1\text{mmol/L}$ 。镉对水稻种子苗期的生长生理抑制推断是由于镉抑制了蛋白酶、肽酶的分解活性, 抑制了 POD、CAT 参与的戊糖磷酸途径(PPP)的运转, 造成构建幼叶、幼根的细胞成份缺乏所致。POD、CAT 活性的有时不规则增减甚至高于对照, 可能是机体抵御逆境的一种自卫体现。萌芽第 5 天二酶活性回落或增长迟缓是机体由异养转向自养的体现, 此情形在对照和受镉害的萌芽种子中均表现出来。

关键词 镉; 水稻萌芽; 总蛋白; 过氧化物酶; 过氧化氢酶

来自工业污染的重金属镉对农作物造成的毒害越来越引起人们的关注。研究报导镉能抑制作物生长, 促进早衰, 降低产品质量, 与其能影响作物体内活性氧自由基的代谢平衡^[1], 降低细胞有丝分裂指数, 涉及染色体畸变, 瓦解核仁结构^[2], 破坏叶绿体超微结构, 降低叶绿素含量和光合效应^[3]以及抑制作为种子出苗率高重要指标的水解酶的活性^[4]等有关。

本研究意图从镉中毒对水稻苗期生长势、总蛋白分解量、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性这些重要生理指标的变化, 进一步探讨镉害对作物生理生化方面的影响, 以更全面查明作物镉中毒机制, 为如何从根本上治理镉害, 保证农作物无公害生长提供理论依据和有效途径。

1 材料方法

1.1 播种

水稻种子(中优 590)浸种 24 小时后, 取大小一致种子按一定间隔均匀置于铺有二层脱脂棉的培养皿中。培养皿以预先分别加入 20ml 浓度分别为 10、5、1、0.5、0.1 和 0.05mmol/L 的 CdCl_2 溶液, 蒸馏水作对照, 于 32°C 下培养。每天采样测定种子的根、芽伸长长度及计算萌芽率。(以幼芽达种子长度一半, 幼根与种子等长作为萌芽标志), 每个处理重复 10 次取平均值, 连续测定 5 天。以对照生长势为 100, 计算出各处理的相对生长势百分比。

1.2 酶粗提液制备

0.5g 整株幼苗用 5ml 冰蒸水研磨后, 于 3000rpm 下, 离心 2 分钟, 取上清定容至 25ml, 迅速冷藏, 现制现用。

1.3 总蛋白含量测定

按 Doumas BT^[5] 等方法测得样品在 A_{540nm} 下的吸光度, 并从蛋白质标准曲线中查出相应蛋白质含量, 再以每克鲜重的量表示。

1.4 过氧化物酶活性测定

方法见波钦诺克^[6], 酶活性以 20℃ 下每克鲜重所含 POD 在 15 分钟内氧化愈创木酚产生的四愈创木酚于 A_{440nm} 下的吸光度表示。

1.5 过氧化氢酶活性测定

用 KMnO₄ 滴定法^[7], 酶活性以每克鲜重在 20 分钟内被分解的过氧化氢毫克数表示。

以上各指标每个处理均重复 3 次后取平均值。各处理数据用 Stat 5.0 进行显著性差异检验和相关分析。

表 1 不同浓度 Cd 离子胁迫对水稻种子苗生长势的影响 (%)

[Cd ⁺⁺] mmol/L	10	5	1	0.5	0.1	0.05	对照
第一天 芽根	0	0	0	0	50	100	100
萌芽率	0	0	0	0	29	71	100
总蛋白	107	89	113	91	90	86	100
POD 活性	8	2	8	38	88	88	100
CAT 活性	33	56	44	56	67	56	100
第二天 芽根	0	0	13	63	88	100	100
萌芽率	0	0	0	0	52	80	100
总蛋白	111	103	100	119	88	92	100
POD 活性	5	2	19	51	83	90	100
CAT 活性	9	5	5	23	95	109	100
第三天 芽根	0	0	10	29	65	75	100
萌芽率	0	0	0	0	60	90	100
总蛋白	175	140	156	126	102	100	100
POD 活性	2	1	5	50	88	121	100
CAT 活性	4	8	40	80	92	96	100
第四天 芽根	0	0	6	34	68	74	100
萌芽率	0	0	0	0	57	86	100
总蛋白	121	121	133	127	120	101	100
POD 活性	3	1	3	63	104	98	100
CAT 活性	21	17	52	97	93	97	100
第五天 芽根	0	0	4	31	69	89	100
萌芽率	0	0	0	0	41	63	100
总蛋白	171	177	154	147	112	104	100
POD 活性	1	3	7	84	93	110	100
CAT 活性	13	26	19	84	87	90	100
平均 芽根	0	0	7	31	68	88	100
萌芽率	0	0	0	0	48	78	100
总蛋白	137	126	131	122	102	97	100
POD 活性	4	2	8	57	91	101	100
CAT 活性	16	22	32	68	87	90	100

2 结果

2.1 种子萌芽生长的变化

不同浓度镉离子胁迫下水稻种子的苗期素质表现为 Cd⁺⁺ 对水稻种子开始造成伤害的临界浓度为 0.05mmol/L, 此浓度下胁迫 5 天种子平均根芽萌发势分别仅为对照的 78% 和 88%, 差异极显著 (P < 0.01), 达到 100% 萌芽率的时间比对照推迟 2 天; 0.5、1mmol/L Cd⁺⁺ 胁迫下的种子只长弱芽不长根, 芽长仅为对照的 31% 和 7% (P < 0.01), 萌芽率为零; 1mmol/L 以上浓度胁迫下种子完全失活而致死 (表 1、表 2)。相关分析表明, 0 ~ 1mmol/L 小于致死浓度范围内根芽生长势随着镉离子浓度增加而减弱, 呈极显著相关 (R ≥ 0.98), 在致死浓度内 (> 1mmol/L) 种子生长势均极其微弱或为零, 呈不显著相关 (表 3)。

2.2 总蛋白含量的变化

镉离子胁迫强度在低于致死浓度下

(0 ~ 1mmol/L) 与水稻种子体内总蛋白的分解抑制呈明显剂量效应关系, 离子强度越大, 总蛋白量越高, 分解量越小 (R > 0.9)。在 < 1mmol/L 的致死浓度范围内不同胁迫强度下, 总蛋白量分解极少, 始终处于较高水平, 二者相关性不显著 (表 1, 3)。不同 Cd⁺⁺ 处理及对照种子体内总蛋白含量随萌芽时间延长均呈逐渐减少趋势, 但是萌芽 5 天 Cd⁺⁺ ≥ 0.5mmol/L 的种子总蛋白量仍保持在 233mg/g 鲜重以上, 约为对照总蛋白含量的 147% 以上, 差异极显著 (P < 0.01); Cd⁺⁺ 为 0.1mmol/L 时, 种子总蛋白量虽已下降到 177mg/g 鲜重, 仍占对照的 112%, 差异显著 (P < 0.05); Cd⁺⁺ 为 0.05mmol/L 时, 胁迫 5 天的种子总蛋白量降到

164mg/g, 占对照的 104%, 差异不明显(表 1, 2, 图 1)。

表 2 不同强度镉胁迫下种子萌芽期主要生长指标与对照 T 测试结果

生长指标	浓度(mmol/L)						
	10	5	1	0.5	0.1	0.05	
芽长	t	6.693712	6.693712	6.411106	6.036825	6.368784	5.418570
	P	0.000001**	0.000001**	0.000001**	0.000003**	0.000001**	0.000014**
根长	t	9.468951	9.468951	9.468951	9.468951	8.031443	5.041000
	P	0.000000**	0.000000**	0.000000**	0.000000**	0.000000**	0.000037**
总蛋白量	t	-5.542880	-6.265950	-6.289740	-4.831570	-2.320830	1.908154
	P	0.000072**	0.000021**	0.000020**	0.000266**	0.035902*	0.077092
过氧化物酶	t	6.832041	6.936882	6.548698	7.076237	2.760586	-1.54047
	P	0.000008**	0.000007**	0.000013**	0.000006**	0.015323*	0.145739
过氧化氢酶	t	10.18309	9.399590	8.772361	4.631902	8.797625	2.546292
	P	0.000000**	0.000000**	0.000000**	0.000388**	0.000000**	0.023284*

* 0.010000 < P < 0.050000 差异显著

** P < 0.010000 差异极显著

表 3 不同镉离子胁迫强度与水稻种子萌芽期主要生长指标的指数或线性相关方程和相关系数

[Cd ²⁺] 梯度	芽长	根长	总蛋白	POD 活性	CAT 活性
0~1 mmol/L	$y = 3.3809e^{-2.9041x}$ R ² =0.9547 n=5	$y = 3.4192x + 2.8283$ R ² =0.7772 n=5	$y = 0.1264e^{0.4463x}$ R ² =0.8485 n=5	$y = 271.81e^{-3.4137x}$ R ² =0.8769 n=5	$y = 63.462e^{-0.5949x}$ R ² =0.8300 n=5
0~10 mmol/L	$y = 0.016x + 0.1352$ R ² =0.6926 n=3	$y = 0$ R ² = #N/A n=3	$y = 0.163e^{0.0112x}$ R ² =0.0729 n=3	$y = 4.4856e^{-0.0112x}$ R ² =0.0164 n=3	$y = 27.201e^{-0.0962x}$ R ² =0.5426 n=3

2.3 过氧化物酶活性变化

镉离子对 POD 活性呈现抑制效应, 并且在小于致死浓度范围内(0~1mmol/L)随着浓度增大抑制强度增大, 剂量效应明显(R>0.93), 在致死浓度范围内(>1mmol/L)二者相关性不显著(表 3)。≥0.5mmol/L 胁迫的种子 POD 活性极其微弱, 仅为对照的 1~84%, 差异极显著(P<0.01); 0.1mmol/L 胁迫的种子 POD 活性是对照的 93%, 与对照差异显著(P<0.05); 0.05mmol/L 则高出对照 1%, 但差异不明显(表 1, 2)。图 2a 表明随着萌芽天数的增加, ≤0.5mmol/L 胁迫的种子 POD 活性呈逐渐增长趋势, 且在萌芽的第 3、4、5 天, 0.05 或 0.1mmol/L 胁迫的萌芽种子 POD 活性有时大于对照, 分别为对照的 101~121%和 104%, 并且两浓度胁迫的种子与对照一样, 在萌芽第 4 天 POD 活性达到各自最大值, 而后开始回落。

2.4 过氧化氢酶活性变化

镉离子对 CAT 活性在小于致死浓度范围内同样呈现剂量抑制效应(R>0.9)。在致死

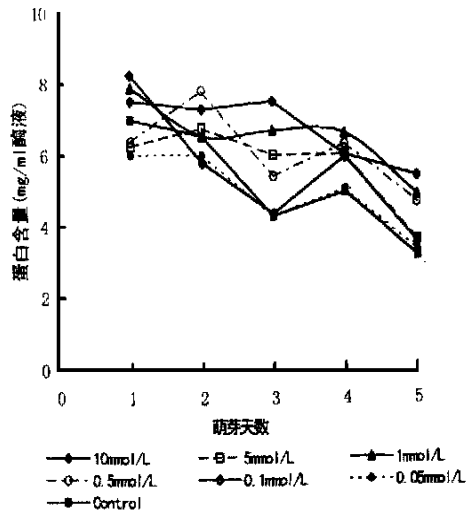


图 1 不同浓度 Cd 离子胁迫对水稻种子萌芽 5 天内总蛋白量变化的影响

浓度下二者相关性不显著(表 3)。≥0.1mmol/L 胁迫的种子 CAT 活性为对照的 13~87%，呈极显著差异(P<0.01)；0.05mmol/L 胁迫种子 CAT 活性为对照的 90%，与对照差异显著(P<0.05)(表 1, 2)。图 2b 表明，萌芽种子(对照及 0.05、0.1mmol/L 胁迫)随着萌芽天数增加，CAT 活性呈逐渐增加趋势，萌芽第 2 天增幅最大，到第 5 天除对照增幅减小，0.05 和 0.1mmol/L 胁迫种子 CAT 活性停止增长；0.5mmol/L 胁迫种子萌芽第 3、4 天活性增幅最大而后又回落；1、5 和 10mmol/L 胁迫种子 CAT 活性在低水平呈不规则增减。

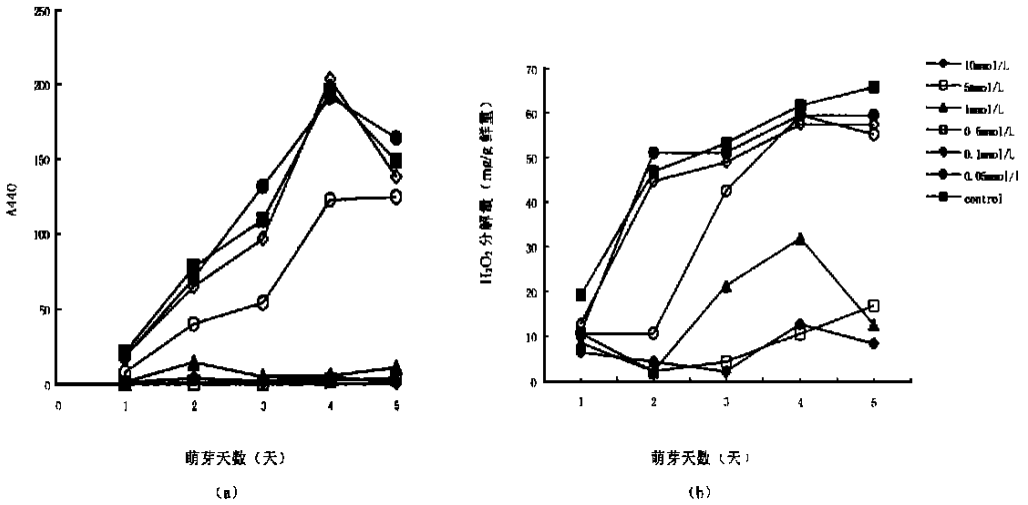


图 2 不同浓度 Cd 离子胁迫对水稻种子萌芽 5 天内 POD(a) 和 CAT(b) 活性变化的影响

3 讨论

经过休眠期的水稻种子在适宜的温度、湿度、氧气环境条件下萌芽需经过吸胀、萌动、发芽阶段。在此阶段中种子体内各类与萌芽有关的重要酶包括过氧化物酶、过氧化氢酶纷纷活化，贮藏在胚乳糊粉层中的蛋白质，在蛋白酶和肽酶作用下水解成各种氨基酸，被转运到胚细胞中重新利用形成结构蛋白质，成为萌生幼叶、幼根的细胞组成成分。因此种子萌发过程中贮藏蛋白质逐渐减少而结构蛋白不断增多^[6]。

受镉离子胁迫的水稻种子总蛋白含量随胁迫强度减弱而减少，说明种子萌发时贮藏蛋白分解为氨基酸这一生理代谢过程受到高浓度镉离子的抑制，可能是由于镉离子能抑制蛋白酶和肽酶活性，并随离子浓度的增加抑制强度增大的缘故，导致氨基酸含量不足，无法合成结构蛋白来作为形成幼叶、幼根的细胞成份，因而当 Cd⁺⁺ ≥ 0.5mmol/L 时，种子总蛋白量仍维持一定的水平，而此浓度下种子仅长弱芽不长根，出苗率为零。无镉害的对照种子则总蛋白分解迅速，含量下降，根芽长势良好，出苗率高。

POD 和 CAT 具有同功酶的特点，均能抵抗外界的不良影响，是机体防御机制上的二种重要的酶^[8]，它们能够分别以不同途径清除植物体内有毒的过氧化氢。Hendrick (1975) 认为^[9]，种子休眠是由于 6-磷酸-葡萄糖酵解 (EMP) 途径和戊糖磷酸途径 (PPP) 之间缺乏平衡，而 PPP 在整个呼吸过程中比重的加强是种子转向萌发的重要条件，POD 则可以通过氢醌和醌的可逆氧化还原反应，把 NADPH 氧化成 NADP，推动专一于 NADP 的 G-6-磷

酸脱氢酶对G-6-磷酸的氧化,从而促进PPP运转,为种子萌芽创造条件。

因此POD和CAT活性变化总趋势虽为 Cd^{++} 越低,活性越大,越有利种子的萌芽生根,但是受不同程度镉胁迫的种子POD和CAT活性却时常出现不规则的增减,甚至有时活性高于无镉害的对照,这种现象正是POD和CAT抵御逆境能力的一种机体自卫的体现。0.05mmol/L镉逆境下CAT较POD更具敏感性($P < 0.05$),POD则相对更具防御性。种子萌芽第5天POD和CAT活性回落或者增加迟缓是由于种子萌生的芽鞘叶含叶绿素,能进行光合作用制造生长所需养份,幼苗逐渐从异养转向自养的标志。此情形对已萌芽的受或不受镉害的种子来说都是一样的。

体外试验结果认为镉离子浓度对POD和CAT产生的抑制作用是间接性的,也即 Cd^{++} 本身不影响酶的活性,种子中毒后体内POD和CAT活性升高或降低,不是由镉离子直接引起,而是由中毒水稻种子异常生理变化间接引起,镉离子如何导致种子生理异常而使POD和CAT活性发生变化,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 罗立新等. 镉胁迫对小麦叶片细胞膜脂过氧化影响. 中国环境科学. 1998, 18(1): 72~75
- 2 张义贤. 重金属对大麦(*Hordeum vulgare*)毒性研究. 环境科学学报. 1997, 17(2): 199~205
- 3 G. Quzounidou et. al., Physiological and ultrastructural effects on cadmium of wheat leaves. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1997, 32(2): 154~160
- 4 施农农等. 重金属镉对水稻种子萌芽生长及体内水解酶的活性的影响. 农业环境保护. 1999, 5: 213~216
- 5 Dumas BT. et. al., Chin Chem 1981, 27: 1624
- 6 X. H. 波钦诺克. 植物生物化学分析方法. 荆家海等译. 科学出版社, 1981, 197~207
- 7 A. Galston et. al. 新编植物生理学. 戴尧仁等译, 北大出版社, 1989
- 8 武内忠男等. 新酶组织化学. 朱逢春主译. 北京: 人民卫生出版社, 1983, 121
- 9 Hendrick, S. B. et. al., Breaking of seed dormancy by catalase inhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. as A., 1973, 72: 306~309



(上接第124页)

参 考 文 献

- 1 Zhao D W and Seip H M. Water, Air and Soil Pollution, 1991, 60: 83-97
- 2 徐仁扣, 季国亮. 预测土壤和地表水酸化趋势的MAGIC模型. 土壤学进展, 1994, 22(5): 36~39
- 3 Cosby B J et al. Water Resources Research, 1985a, 21: 51~63
- 4 Cosby B J et al. Water Resources Research, 1985b, 21: 1591~1601
- 5 张万儒. 森林土壤分析方法(国家标准). 北京: 中国标准出版社, 1987: 68~76
- 6 于天仁. 土壤化学原理. 北京: 科学出版社, 1987: 150
- 7 熊毅, 李庆逵. 中国土壤(第二版). 北京: 科学出版社, 1987: 394~398