

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2019090202

顾艳芳, 邓媛, 梁婵娟. 微囊藻毒素对黄瓜幼苗抗氧化酶及其同工酶的影响[J]. 环境化学, 2020, 39(12): 3402-3409.

GU Yanfang, DENG Yuan, LIANG Chanjuan. Effect of microcystins on antioxidative enzymes activities and isozymes pattern in cucumber seedlings [J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(12): 3402-3409.

微囊藻毒素对黄瓜幼苗抗氧化酶及其同工酶的影响*

顾艳芳^{1,2} 邓媛¹ 梁婵娟^{1,2**}

(1. 江苏省厌氧生物技术重点实验室, 江南大学环境与土木工程学院, 无锡, 214122;

2. 江苏省水处理技术与材料协同创新中心, 无锡, 214122)

摘要 为了进一步清晰作物对微囊藻毒素(MCs)的适应性机制, 本文通过水培实验研究了不同浓度 MCs (5、10、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 对黄瓜幼苗叶片抗氧化酶活性及其同工酶组成、活性氧(ROS)积累与质膜过氧化及生长的影响。结果表明, MCs (5—50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 胁迫 7 d 后黄瓜叶片中过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)同工酶条带变粗变亮, 酶活性上升, 其中 POD 活性增幅大于 CAT, 且 POD 同工酶有新条带出现(对照处理未见)。而超氧化物歧化酶(SOD)活性与其同工酶组成均无变化, 因而超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)的增幅高于过氧化氢(H_2O_2), 致使丙二醛(MDA)含量增加, 而黄瓜幼苗干重降低。100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜叶片 POD 和 CAT 活性增幅最大, 且同工酶条带宽度和亮度高于其他处理, 但不同 SOD 同工酶出现不同的响应, SOD 活性仍与对照无显著差异, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 增幅加大, 导致氧化损伤程度加剧, 黄瓜幼苗干重降幅增大。恢复 7 d 后, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜叶片 SOD 活性、CAT 活性、丙二醛含量和黄瓜幼苗干重恢复至对照水平, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜幼苗各指标均优于胁迫期, 而 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜氧化损伤不可逆, 生长难以恢复。综上, MCs 胁迫下黄瓜幼苗 CAT 和 POD 同工酶表达量增加有利于增强酶活性, 清除 MCs 诱发的 H_2O_2 积累, 增强黄瓜对 MCs 的耐受性, 且调控能力受 MCs 浓度限制。

关键词 微囊藻毒素, 黄瓜, 抗氧化酶, 同工酶, 活性氧。

Effect of microcystins on antioxidative enzymes activities and isozymes pattern in cucumber seedlings

GU Yanfang^{1,2} DENG Yuan¹ LIANG Chanjuan^{1,2**}

(1. Jiangsu Province Key Laboratory of Anaerobic Biological Technology, School of Environmental and Civil Engineering,

Jiangnan University, Wuxi, 214122, China; 2. Jiangsu Cooperative Innovation Center of Technology and Material of Water Treatment, Wuxi, 214122, China)

Abstract: To further clarify the adaptive mechanism of crops to microcystins (MCs), we studied effects of MCs (5, 10, 50 and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) on antioxidative enzymes activity, isozymes composition, reactive oxygen species (ROS) and plasma membrane peroxidation, and growth in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by hydroponic experiments. Activities of peroxidase (POD) and catalase (CAT) were increased in cucumber leaves treated with 5, 10 or 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs for 7 d, and their isozyme bands were thicker and brighter. In addition, the increased degree of POD activity was greater than that of CAT as a new POD isoenzyme band appeared (not seen in the

2019 年 9 月 2 日收稿 (Received: September 2, 2019).

* 国家自然科学基金(31971407, 31370517)和江苏省自然科学基金(BK20161131)资助。

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31971407, 31370517) and the Jiangsu Province Natural Science Foundation (BK20161131).

** 通讯联系人, Tel: 13511659547, E-mail: liangchanjuan@jiangnan.edu.cn

Corresponding author, Tel: 13511659547, E-mail: liangchanjuan@jiangnan.edu.cn

control treatment). However, the activity of superoxide dismutase (SOD) and its isoenzyme composition were not changed, and the increase in superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) was higher than that of hydrogen peroxide (H_2O_2), which led malondialdehyde content increased and dry weight decreased. MCs at the concentration of $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ caused the largest increase in activities of POD and CAT and the width and brightness of isozyme bands in leaves, but did not affect SOD activity. At the same treatment the increase in $O_2^{\cdot-}$ content aggravated oxidative damage and suppressed badly the accumulation of dry weight. After 7 d of recovery, activities of SOD and CAT, malondialdehyde content and dry weight in cucumber treated with $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs were all recovered to the control levels. All parameter above mentioned in cucumber seedlings treated with 10 or $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs were better than those measured during the stress period. However, the oxidative damage was irreversible and the growth was difficult to recover in cucumber seedlings treated with $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs. In conclusion, increase in CAT and POD isozymes expression in cucumber leaves caused by MCs stress were beneficial to increasing the enzyme activity and removing H_2O_2 induced by MCs, thus enhancing the tolerance of cucumber to MCs. In addition, the regulation ability of these antioxidative enzymes was limited by the concentration of MCs.

Keywords: microcystins, cucumber, antioxidative enzymes, isozyme, reactive oxygen species.

微囊藻毒素 (microcystins, MCs) 是蓝藻水华中出现频率最高、产量最大和危害最严重的一类藻毒素^[1]. 地表水中总 MCs 浓度一般为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[2], 超过世界卫生组织提出的 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MC-LR 饮用水安全标准. 用受 MCs 污染的水进行农业灌溉不仅对农作物的生长、产量和品质有不利影响, 且可导致溶解态的 MCs 在农作物可食部分中积累, 进而通过食物链对人体健康构成潜在危害^[3-5]. 目前关于 MCs 的植物毒性机制包括抑制蛋白磷酸酶活性, 阻碍植物营养吸收, 诱导氧化应激, 降低光合效率等^[6-8], 其中 MCs 诱导过量活性氧 (ROS) 产生是 MCs 的重要致毒机制之一, 过量的 ROS 可导致蛋白质、膜脂、DNA 及其他细胞组分的严重损伤^[9]. ROS 的清除依赖抗氧化防御系统, 了解抗氧化防御系统在植物应答 MCs 胁迫的调节作用对清晰植物对 MCs 胁迫的适应性机制甚为必要. 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 作为植物抗氧化酶系统中调节体内 ROS 积累最主要的酶. 已有研究报道了 MCs 胁迫对植物抗氧化酶活性的影响^[10-11], 如 $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 胁迫下水稻幼苗叶片 SOD 活性上升而 POD 活性无显著变化; $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 暴露 30 d 诱导水稻幼苗的 SOD 活性增加. 已有研究显示, 不同抗氧化酶活性对 MCs 的响应规律并不一致, 受胁迫强度、植物物种等因素影响, 而活性变化的内在机制尚未清晰. 植物体内抗氧化酶存在不同的抗氧化酶同工酶亚基, 由不同的抗氧化酶同工酶基因编码而成, 在植物抵抗不良环境过程中发挥重要作用^[12], 而现今还未见 MCs 影响植物抗氧化酶同工酶的相关研究.

鉴于此, 本文以自然水体 MCs 污染现状为依据, 以重要蔬菜作物黄瓜为试验材料, 以明晰 MCs 胁迫下植物抗氧化酶活性变化与同工酶组成变化的关系为切入点, 结合 ROS 积累和膜脂过氧化程度变化, 进一步揭示植物抗氧化酶系统在植物适应 MCs 胁迫中的作用机制, 不仅可为丰富植物 MCs 致毒机理提供新数据, 也为寻找提高植物耐 MCs 胁迫途径提供新方向.

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 MCs 的制备

取太湖蓝藻, 参照闫海等^[13]的方法制备藻粉. 称取 1 g 干燥的藻粉, 加入 40 mL 5% 的冰乙酸, 室温抽提 2 h, 4°C , $8000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液, 沉淀用 40 mL 5% 冰乙酸继续搅拌抽提, 重复 2 次, 合并 3 次抽提的上清液, 调节 pH 值为 3.0, 然后离心去除杂质蛋白, 调节 pH 值为 7.0, 即为粗提液. 粗提液过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜后, 经 10 mL 甲醇 (100%) 和 10 mL 超纯水预活化的 Sep-pak C18 柱 (500 mg/6 mL, Waters corporation, 美国) 固相萃取, 之后洗脱、浓缩至 1 mL. 采用高效液相色谱 (ultimate 3000, Dionex

corporation, 美国) 确定 MCs 的含量^[4]。

1.2 试材培养和处理

供试黄瓜 (*Cucumis sativus* L) 品种为“新津研 4 号”。挑选籽粒饱满的种子经消毒、浸泡后, 置于恒温光照培养箱中 (25 °C) 催芽 2 d, 幼芽转移到蛭石中培养, 待子叶完全展开后, 转移至含有 Hoagland 营养液^[14] 的 6.88 L 周转箱中水培。营养液每 3 d 更新 1 次。当幼苗两片真叶完全展开时, 用不同浓度 MCs 处理 (5、10、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 以不含 MCs 的营养液作为对照, 每个处理 3 次重复。在处理 7 d 后进行各指标的测定 (胁迫期), 然后剩余植株在对照条件下培养 7 d (恢复期), 再取样测定。

1.3 指标测定

根据 Sharma 等^[15] 的方法提取 SOD, CAT 和 POD 粗酶液, 取 0.2 g 植株叶片于预冷的研钵中, 加入 5 mL 抗氧化酶提取液 (50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.8 的磷酸缓冲液, 其中含有 10% 聚乙烯吡咯烷酮), 冰浴研磨至匀浆, 所得匀浆于 4 °C, 10000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 上清液即为粗酶液。粗酶液用于抗氧化酶活性测定和同工酶电泳。以牛血清白蛋白为标准, 采用考马斯亮蓝法测定上清液中的蛋白质含量^[16]。

抗氧化酶同工酶采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳^[15], 由于生物大分子在电泳过程中保持其天然的形状和电荷, 依据其电泳迁移率的不同和凝胶的分子筛作用将蛋白进行分离。然后, 用专一的作用底物/染料进行染色得到确定的抗氧化酶同工酶谱图。SOD 和 POD 同工酶电泳采用浓度为 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, CAT 同工酶电泳采用浓度为 7% 分离胶和 3% 浓缩胶, 上样量为 30 μL 混合液 (含 20 μL 粗酶液和 10 μL 溴酚蓝溶液), 其中, 可溶性蛋白含量约为 50 μg 。实验在含 pH 8.3 的 Gly-Tris 缓冲液的垂直电泳槽内进行, 整个电泳过程温度控制为 4 °C 以防止蛋白变性, 浓缩胶电压为 75 V, 分离胶电压为 150 V, 待溴酚蓝至胶底部 1 cm 处结束电泳。剥胶, 染色。SOD 同工酶采用氮蓝四唑染色法^[15]。CAT 同工酶采用铁氰化钾染色法^[17]。POD 同工酶采用醋酸联苯胺染色法^[18]。染色后水洗终止染色, 使用凝胶成像系统拍照保存。

SOD、CAT 和 POD 活性测定参见 Fidalgo 等^[19] 报道, SOD 活性测定采用氮蓝四唑光还原法, POD 活性测定采用愈创木酚法, CAT 活性测定采用紫外吸收法。丙二醛 (MDA) 含量测定采用硫代巴比妥酸法^[20]。过氧化氢 (H_2O_2) 含量测定采用硫酸钛法^[21]。超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 含量测定采用羟氨氧化法^[22]。通过称量天平测定黄瓜幼苗单株干重。

1.4 数据处理和分析

所有数据均为 3 次独立试验的平均值 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ SD), 并采用 SPSS 20.0 软件处理数据, Origin 8.5 软件进行绘图, 不同字母表示显著性差异 ($P<0.05$)。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 微囊藻毒素对黄瓜幼苗抗氧化酶活性及其同工酶的影响

抗氧化同工酶是植物体内最活跃的酶系之一, 逆境胁迫可以调节同工酶基因在不同水平上表达, 导致酶结构的改变, 这种改变体现在同工酶酶谱的条带数量、宽度和亮度^[23]。SOD 是植物抵抗外界胁迫增加的 ROS 及其反应产物的第一道防线, 它将 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 歧化生成 H_2O_2 和 O_2 ^[24]。如图 1A 所示, MCs 暴露 7 d 后, 5、10、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜叶片 SOD 活性均与对照无显著差异。这与前人研究报道 5—50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 诱导水稻幼苗 SOD 活性上调^[6] 不同, 这可能与植物种类不同有关。Chen 等^[10] 报道 SOD 活性对 MCs 的响应存在物种差异性。SOD 同工酶谱图显示出 7 条 SOD 同工酶条带 (图 1B), 5、10、50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜幼苗叶片中 7 条 SOD 同工酶条带的亮度和宽度均与对照无显著差异, 这与同处理下 SOD 活性变化一致 (图 1A)。而 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理叶片中 SOD 1 和 SOD 5 条带变宽变亮, SOD 6 和 SOD 7 条带变暗变窄, 表明不同 SOD 同工酶对 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 响应存在差异, 其中 SOD 1、SOD 5、SOD 6 和 SOD 7 对 MCs 胁迫较为敏感。结合同浓度 MCs 处理下 SOD 活性变化可知, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理 SOD 活性与对照无显著差异可能是 SOD 6 和 SOD 7 表达量下降与 SOD 1 和 SOD 5 表达量增加共同作用的结果。李荣锦等^[25] 发现高浓度 NaCl 诱导 SOD V 消失, 而其他同工酶活性增强, 最终表现为 SOD 活性增强。黄雪妮等^[23] 也发现低浓度 Cd 增强水稻 SOD 同工酶条带亮度, 增加 SOD 活性, 而

$100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 抑制水稻 SOD 同工酶亚基 (S3 和 S4) 的表达, 而致使 SOD 活性下降. 因此, MCs 胁迫下 SOD 活性受其同工酶共同调控. 恢复 7 d 后, 所有 MCs 处理 ($5\text{--}100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 黄瓜叶片中 SOD 活性仍与对照无差异, 各同工酶条带也恢复至对照水平.

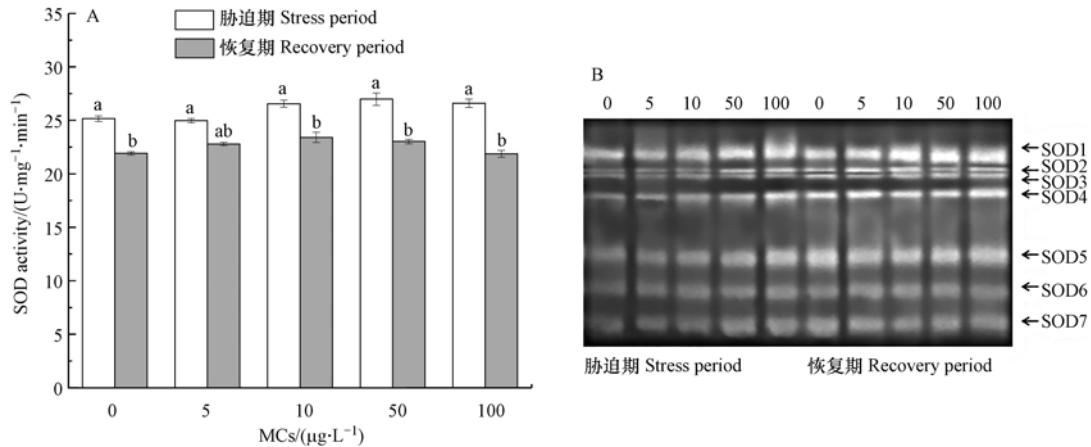


图 1 MCs 对黄瓜叶片 SOD 活性 (A) 及同工酶组成 (B) 的影响

Fig.1 Effects of MCs on SOD activity (A) and isozyme composition (B) in cucumber leaves

CAT 能够将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 , 是清除 ROS 的第二道防线^[26]. 如图 2A 所示, MCs 处理 7 d 后, $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜叶片中 CAT 活性与对照无显著差异, 10 、 50 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜叶片中 CAT 活性分别高于对照 6.96%、23.6% 和 35.7% (图 2A). CAT 同工酶谱图显示 2 条 CAT 条带 (图 2B), 其中 CAT 2 在 MCs 胁迫下变粗变亮. 表明 CAT 2 对 MCs 胁迫较为敏感, CAT 2 蛋白含量和活性增加是 CAT 活性增加的重要原因之一. 赵会君等^[27] 也发现盐胁迫下 CAT 同工酶条带增宽, CAT 活性上升, 增强了水稻的耐盐性. Du 等^[28] 报道盐胁迫诱导黄瓜根中 CAT 同工酶表达, 而对叶中 CAT 同工酶无影响, 造成根中 CAT 活性下降. 表明 CAT 同工酶活性是 CAT 活性变化的重要原因之一. 恢复 7 d 后, $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜 CAT 活性仍维持在对照水平, 10 、 50 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜叶片中 CAT 活性仍高于对照, 分别为 20.7%、27.0% 和 36.8%, CAT 同工酶条带仍较对照粗和亮, 表明即使解除 MCs 暴露后, 植物体内 CAT 仍保持较高活性. 前期研究^[29] 表明持续较高的酶活性有利于发挥其解毒作用.

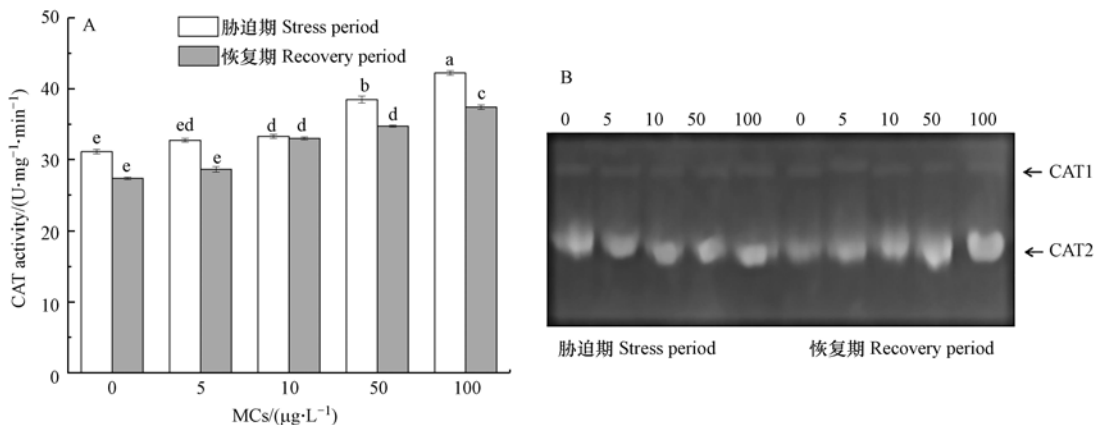


图 2 MCs 对黄瓜叶片 CAT 活性 (A) 及同工酶组成 (B) 的影响

Fig.2 Effects of MCs on CAT activity (A) and isozyme composition (B) in cucumber leaves

POD 作为清除 H_2O_2 的另一种抗氧化酶, 是清除 ROS 的第三道防线. 如图 3A 所示, MCs (5 、 10 、 50 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 7 d 后黄瓜叶片中 POD 活性分别高于对照 95.7%、188%、290% 和 345%, 响应浓度低于 CAT, 且各 MCs 处理 POD 活性增幅高于 CAT, 这可能与 POD 和 CAT 对 H_2O_2 的亲合力有关, POD 对 H_2O_2 的亲合力较高^[17]. POD 同工酶谱图显示 4 条同工酶 (图 3B), 其中 POD 同工酶 (POD 2 和 POD 3) 条带

在 5—100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 胁迫下增粗变深,表明 POD 2 和 POD 3 同工酶对 MCs 胁迫较为敏感,MCs 胁迫下黄瓜叶片中 POD 2 和 POD 3 同工酶表达增强可能是 POD 活性增加的原因之一.郭小境等^[30]也发现酸雨胁迫下水稻幼苗 POD 同工酶条带增粗变深,POD 活性上升,增强水稻的耐酸性.此外,中、高浓度 MCs (10—100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理出现新的 POD 同工酶(POD 4)条带(对照处理未见).惠俊爱等^[31]发现镉胁迫下玉米叶片也出现新的 POD 条带(对照处理未见),促进 POD 活性增加,增强玉米对镉毒性的防御能力.因此,中、高浓度 MCs 胁迫下 POD 同工酶条带的增加可能是 POD 活性增加的又一重要原因.结合 CAT 活性与其同工酶谱变化(图 2),推测 POD 活性增幅较大与其同工酶条带增多有关,表明不同抗氧化酶对 MCs 的响应差异与其同工酶谱组成有关.这与前期研究结果^[30]相似.恢复 7 d 后,所有 MCs 处理黄瓜叶片中 POD 活性高于对照处理但低于胁迫期,同工酶条带较胁迫期变细变浅,表明解除 MCs 胁迫后,POD 活性有一定程度的恢复.

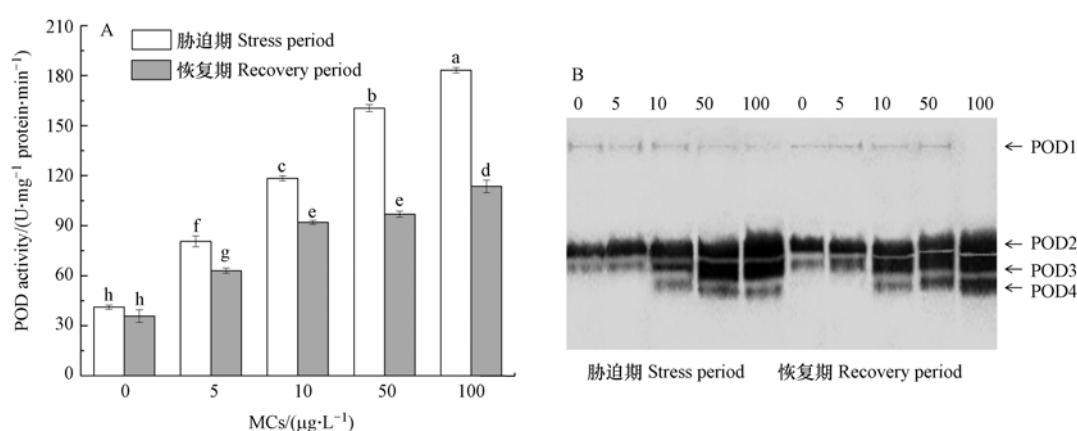


图 3 MCs 对黄瓜叶片 POD 活性(A)及同工酶组成(B)的影响

Fig.3 Effects of MCs on POD activity (A) and isozyme composition (B) in cucumber leaves

2.2 微囊藻毒素对黄瓜幼苗活性氧积累和脂质过氧化的影响

逆境胁迫下,通过酶促和非酶促反应生成 ROS,ROS 能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,生成脂质过氧化产物,其中 MDA 是脂质过氧化最重要的产物之一,其含量表征植物脂质过氧化程度,进而间接表征细胞膜系统受损程度和植物的抗逆性^[32].如图 4 所示,MCs (5、10、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 7 d 后黄瓜叶片中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和 MDA 含量均显著高于对照处理($P<0.05$),且呈浓度依赖性增加.表明 MCs 胁迫下黄瓜叶片 ROS 的动态平衡被破坏, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 积累导致细胞氧化损伤发生.其中,中、高浓度 MCs (10—100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理黄瓜叶片 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 增幅远大于 H_2O_2 ,分别高出 105% (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs)、141% (50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs) 和 163% (100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs) (图 4A, B).由于 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可被 SOD 歧化生成 H_2O_2 , H_2O_2 又可通过 H_2O_2 清除酶(CAT 和 POD 等)转化为 H_2O 和 O_2 . SOD 活性的稳定在一定程度上维持了 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 转化为 H_2O_2 的含量,而 CAT 和 POD 活性的增强提升了 H_2O_2 的清除能力,有利于减轻 H_2O_2 的过量积累(图 4B).因此,相比 $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 含量增幅较小可能与 MCs 胁迫下 SOD 活性不变和 CAT 和 POD 同工酶表达及其活性增加有关(图 2 和图 3).恢复 7 d 后,所有 MCs 处理 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 含量虽高于对照但低于胁迫期,MDA 含量在 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理恢复至对照水平,可能原因是解除 MCs 暴露后,ROS 的积累较胁迫期降低,其增加量在植物可调节范围内,未导致细胞氧化损伤.10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理 MDA 含量虽高于对照但低于胁迫期,结合 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 含量变化,表明黄瓜叶片 CAT 和 POD 同工酶的高表达及其活性的增加有利于减轻 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 含量的积累,减轻脂质过氧化.而 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理 MDA 含量仍高于对照,与胁迫期无差异.这可能是因为 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 发生 Fenton 反应,产生毒性更强的 $\cdot\text{OH}$,加剧细胞氧化损伤^[32].王妮敏等^[29]也发现高浓度 MCs 导致水稻根系发生氧化损伤,造成其根系难以恢复.

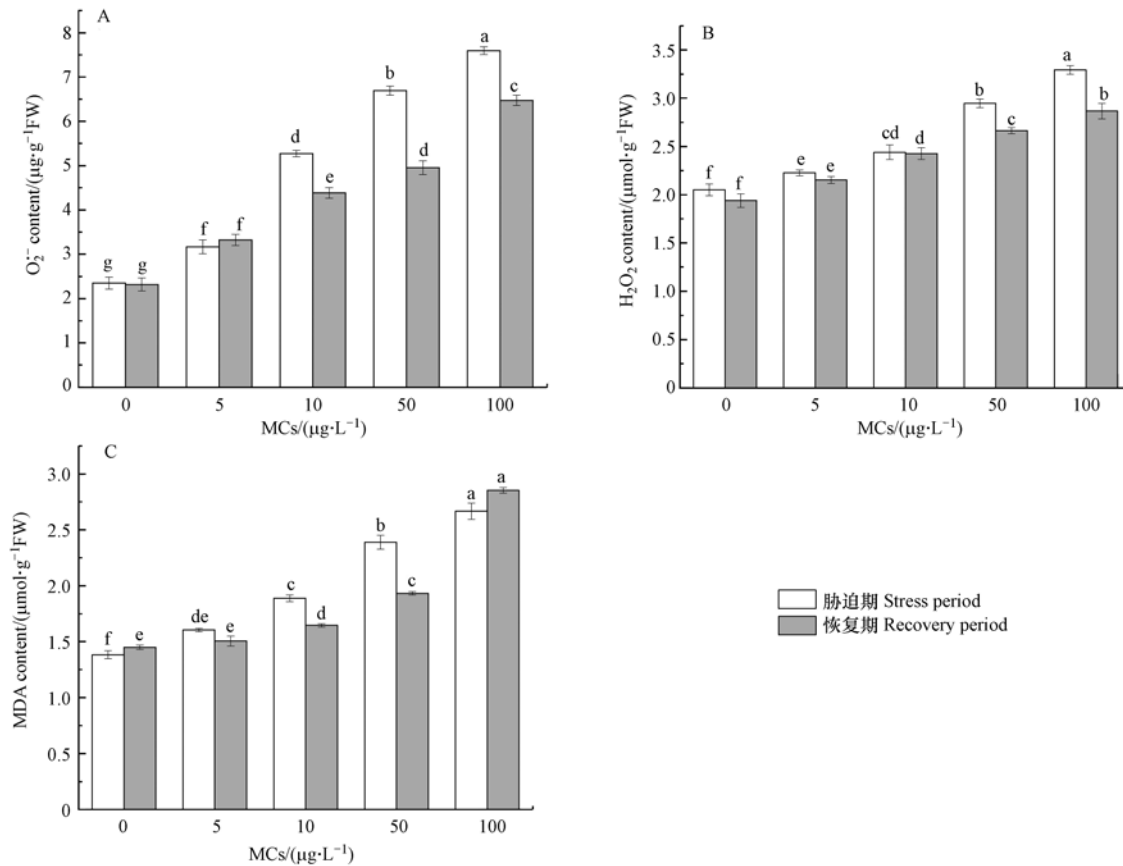


图 4 MCs 对黄瓜叶片 O_2^- (A)、 H_2O_2 (B) 和 MDA 含量 (C) 的影响

Fig.4 Effects of MCs on contents of O_2^- (A), H_2O_2 (B) and MDA (C) in cucumber leaves

2.3 微囊藻毒素对黄瓜幼苗生长的影响

如图 5 所示, MCs (5 、 10 、 50 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 7 d 后黄瓜幼苗干重分别低于对照处理 8.73% 、 17.6% 、 26.4% 和 36.2% 。表明 MCs 对黄瓜幼苗干重的抑制作用成浓度依赖性, 这与 Zhu 等^[4]发现 MCs (10 — $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 抑制黄瓜幼苗生长一致。也有研究报道低浓度 MCs 对植物生长无显著影响甚至促进生长^[33], 但在本实验考查浓度范围内未发现这种现象。这可能是由于黄瓜对 MCs 的耐受阈值较低, 本实验设置浓度超过其耐受阈值。结合抗氧化酶活性、ROS 含量和脂质过氧化程度变化, 表明 MCs 对黄瓜幼苗干重的抑制与 MCs 诱导 CAT 和 POD 活性的升高不足以清除过量的 H_2O_2 及 SOD 活性表达导致 O_2^- 的过量积累引起脂质过氧化有关 (图 4C)。脂质过氧化可导致细胞代谢紊乱, 破坏叶绿体和线粒体结构, 导致光合能力受损植物合成有机物的能力降低^[8,34]。因此, MCs 胁迫下黄瓜叶片 O_2^- 和 H_2O_2 积累导致的脂质过氧化是黄瓜幼苗干重下降的重要原因之一。这与王余等^[35]的报道一致。此外, 黄瓜幼苗干重降低还与 MCs 诱导氧化损伤导致植物根系矿质元素吸收受抑有关^[6]。恢复 7 d 后, $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜幼苗干重恢复到对照水平, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜幼苗干重虽低于对照但高于胁迫期。而 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理黄瓜幼苗干重受抑更严重, 降幅达 56.7% 。结合抗氧化酶活性和脂质过氧化的恢复水平, 再次表明黄瓜 CAT 活性和脂质过氧化程度是黄瓜幼苗干重变化的重要原因之一。高浓度 MCs 处理黄瓜幼苗干重较胁迫期降幅进一步加大, 表明高浓度 MCs 暴露后, 即使解除暴露, 其生长在短时间内仍难以恢复, 这可能与高浓度 MCs 对黄瓜叶片脂质过氧化的不可逆伤害有关。此外, MCs 对植物营养吸收、光合能力和线粒体结构与功能等其他生理、生化的抑制^[36]也可能是植物生长难以恢复的重要原因之一。总之, 黄瓜的恢复能力受到 MCs 浓度限制。这与 Zhu 等^[4]报道水稻的恢复能力受 MCs 浓度限制一致。

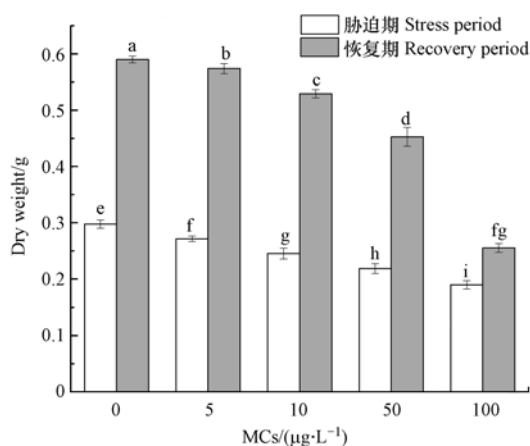


图5 MCs对黄瓜幼苗干重的影响

Fig.5 Effect of MCs on dry weight of cucumber seedlings

3 结论 (Conclusion)

(1) 在低、中浓度 MCs ($5, 10, 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 胁迫下, 黄瓜叶片 SOD 活性及其同工酶组成均与对照无差异, POD 和 CAT 同工酶表达量上调, 促进 POD 和 CAT 活性增加, 减轻由于 H_2O_2 过量积累而引发的氧化损伤, 继而在胁迫解除后植物生长得到较好恢复。

(2) 高浓度 MCs ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 胁迫下, 黄瓜叶片 SOD 同工酶响应不同, 而 SOD 活性无明显变化, 加剧 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 过量积累引发的脂质过氧化, 进而在胁迫解除后植物生长难以恢复。

(3) 黄瓜叶片中 SOD、CAT 和 POD 活性及其同工酶对 MCs 胁迫的响应存在差异, POD 对 MCs 胁迫更敏感, 响应幅度最大, 响应差异的原因仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] RASTOGI R P, SINHA R P, INCHAROENSAKDI A. The cyanotoxin-microcystins: Current overview[J]. Reviews in Environmental Science and Bio-Technology, 2014, 13(2): 215-249.
 - [2] MACHADA J, CAMPOS A, VASCONCELOS V, et al. Effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on plant-soil systems: A review of their relevance for agricultural plant quality and public health[J]. Environmental Research, 2017, 153: 191-204.
 - [3] LIANG C, WANG W M, WANG Y. Effect of irrigation with microcystins-contaminated water on growth, yield and grain quality of rice (*Oryza sativa*) [J]. Environmental Earth Sciences, 2016, 75(6): 1-10.
 - [4] ZHU J Z, REN X Q, LIU H Y, et al. Effect of irrigation with microcystins-contaminated water on growth and fruit quality of *Cucumis sativus* L. and the health risk[J]. Agricultural Water Management, 2018, 204: 91-99.
 - [5] MACHADO J, AZEVEDO J, FREITAS M, et al. Analysis of the use of microcystin-contaminated water in the growth and nutritional quality of the root-vegetable, *Daucus carota* [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(1): 752-764.
 - [6] CAO Q, STEINMAN A D, YAO L, et al. Increment of root membrane permeability caused by microcystins result in more elements uptake in rice (*Oryza sativa*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 145: 431-435.
 - [7] REDOUANE E M, EL AMRANI ZERRIFI S, EL KHALLOUFI F, et al. Mode of action and fate of microcystins in the complex soil-plant ecosystems[J]. Chemosphere, 2019, 225: 270-281.
 - [8] JIANG J, SHAN Z, ZHOU J, et al. Effects of microcystin-LR on photosynthetic activity and chloroplast ultrastructure of rice (*Oryza sativa* L. japonica) leaves[C]. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2014: 248.
 - [9] GARDA T, RIBA M, VASAS G, et al. Cytotoxic effects of cylindrospermopsin in mitotic and non-mitotic *Vicia faba* cells [J]. Chemosphere, 2015, 120: 145-153.
 - [10] CHEN J Z, SONG L R, DAI E, et al. Effects of microcystins on the growth and the activity of superoxide dismutase and peroxidase of rape (*Brassica napus* L.) and rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Toxicon, 2004, 43(4): 393-400.
 - [11] CAO Q, REDISKE R R, YAO L, et al. Effect of microcystins on root growth, oxidative response, and exudation of rice (*Oryza sativa*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 149: 143-149.
 - [12] 邹春静, 盛晓峰, 韩文卿, 等. 同工酶分析技术及其在植物研究中的应用[J]. 生态学杂志, 2003, 22(6): 63-69.
- ZOU C J, SHENG X F, HAN W Q, et al. Isozyme analysis technology and its application in plant research[J]. Chinese Journal of Ecology, 2003, 22(6): 63-69 (in Chinese).

- [13] 闫海, 潘纲, 张明明, 等. 微囊藻毒素的提取和提纯研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(2): 355-359.
YAN H, PAN G, ZHANG M M, et al. Study on the extraction and purification of microcystins[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2004, 24(2): 355-359(in Chinese).
- [14] LI H, CHENG Z. Hoagland nutrient solution promotes the growth of cucumber seedlings under light-emitting diode light[J]. Acta Agriculturae Scandinavica, 2015, 65(1): 74-82.
- [15] SHARMA P, KUMAR A, BHARDAWAJ R. Plant steroidal hormone epibrassinolide regulate-heavy metal stress tolerance in *Oryza sativa* L. by modulating antioxidant defense expression[J]. Environmental and Experimental Botany, 2016, 122: 1-9.
- [16] BRADFORD M M. A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [17] WOODBURY W, SPENCER A K, STAHPMAN M A. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 301-305.
- [18] 王秀芬. 过氧化物酶同工酶最佳染色法[J]. 河北农业大学学报, 1990, 13(4): 82-84.
WANG X F. A goog dyeing method for superoxide isoenzyme[J]. Journal of Hebei Argricultural University, 1990, 13(4): 82-84(in Chinese).
- [19] FIDALGO F, AZENHA M, SILVA A F, et al. Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses[J]. Food and Energy Security, 2013, 2(1): 70-80.
- [20] PUCKETTE M C, WENG H, MAHALINGAM R. Physiological and biochemical responses to acute ozone-induced oxidative stress in *Medicago truncatula*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45(1): 70-79.
- [21] MUKHERJEE S P, CHOUDHURI M A. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings[J]. 1983, 58(2): 166-170.
- [22] GAJEWSKA E, SKLODOWSKA M. Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves[J]. Biometals, 2007, 20(1): 27-36.
- [23] 黄雪妮, 屈凡, 马名立, 等. 镉胁迫对 2 个宁夏主栽水稻品种幼苗期抗氧化同工酶亚基及其活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 107-112.
HUANG X N, QU F, MA M L, et al. Effects of cadmium stress on antioxidant isoenzyme and enzyme activities of two main rice cultivars at seedling stage in Ningxia area[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 44(7): 107-112(in Chinese).
- [24] WANG Y, BRANICKY R, NOE A, et al. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling[J]. Journal of Cell Biology, 2018, 217(6): 1915-1928.
- [25] 李荣锦, 张敏, 蒋泽平, 等. NaCl 胁迫对构树组培苗抗氧化酶活性及同工酶谱的影响[J]. 林业科学, 2009, 45(2): 39-47.
LI R J, ZHANG M, JIANG Z P, et al. Effect of NaCl stress on antioxidant enzyme activities and isoenzyme pattern of *Broussonetia papyrifera* plantlets[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2009, 45(2): 39-47(in Chinese).
- [26] RACCHI M L. Antioxidant defenses in plants with attention to *Prunus* and *Citrus* spp[J]. Antioxidants (Basel), 2013, 2(4): 340-369.
- [27] 赵会君, 马名立, 代飞燕, 等. 盐胁迫对宁夏水稻不同品种萌发指标和同工酶的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 44-47.
ZHAO H J, MA M L, DAI F Y, et al. Effects of NaCl stress on seed germination and isoenzymes of different Ningxia rice cultivars[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(20): 44-47(in Chinese).
- [28] DU C X, FAN H F, GUO S R, et al. Applying spermidine for differential responses of antioxidant enzymes in cucumber subjected to short-term salinity[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2010, 135(1): 18-24.
- [29] 王妮敏, 邓巧, 邹华, 等. 微囊藻毒素对水稻根系生长和抗氧化系统的影响[J]. 环境科学, 2014, 35(4): 1468-1472.
WANG W M, DENG Y, ZOU H, et al. Effects of microcystins on growth and antioxidant system of rice roots[J]. Environmental Science, 2014, 35(4): 1468-1472(in Chinese).
- [30] 郭小境, 王锦莹, 任潇茜, 等. 梁婢娟水稻根系抗氧化酶及其同工酶对酸雨胁迫的响应[J]. 环境化学, 2019, 38(2): 377-384.
GUO X J, WANG J Y, REN X Q, et al. Response of antioxidant enzyme activities and isozyme pattern in rice roots to acid rain stress[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(2): 377-384(in Chinese).
- [31] 惠俊爱, 党志, 叶庆生. 镉胁迫对玉米叶片抗氧化酶同工酶的影响[C]. 全国农业环境科学学术研讨会, 2009: 41-46.
HUI J A, DANG Z, YE Q S. Effects of Cadmium stress on antioxidant isozyme in leaves of maize[C]. Proceedings of the National Symposium on Agricultural Environmental Science, 2009: 41-46(in Chinese).
- [32] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12): 909-930.
- [33] BITTENCOURT-OLIVEIRA M C, HEREMAN T C, MACEDO-SILVA I, et al. Sensitivity of salad greens (*Lactuca sativa* L. and *Eruca sativa* Mill.) exposed to crude extracts of toxic and non-toxic cyanobacteria[J]. Brazilian Journal of Biology, 2015, 75(2): 273-278.
- [34] DING W, NAM ONG C J F M L. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity[J]. Fems Microbiology Letters, 2003, 220(1): 1-7.
- [35] 王余, 朱雯倩, 王妮敏, 等. 微囊藻毒素对水稻幼苗生长与叶绿素荧光的影响[J]. 环境科学学报, 2015, 35(2): 602-607.
WANG Y, ZHU W Q, WANG W M, et al. Effects of microcystins on growth and chlorophyll fluorescence in rice seedlings[J]. Acta Scientiae Circumstantiae 2015, 35(2): 602-607(in Chinese).
- [36] BURATTI F M, MANGANELLI M, VICHI S, et al. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation[J]. Archives of Toxicology, 2017, 91(3): 1049-1130.