

## 硫对铜胁迫下大豆种子的解毒作用

陈玉胜, 陈全战

(南京晓庄学院 生物化工与环境工程学院, 江苏 南京 211171)

**摘要:** 设置 0、0.5、1.0、2.0 和 4.0 mmol · L<sup>-1</sup> 铜离子浓度梯度, 同时在各浓度梯度中分别添加 5.0 和 10.0 mmol · L<sup>-1</sup> 的硫, 进行大豆种子萌发试验, 通过测定相对电导率和保护酶活性等指标研究了硫对大豆种子铜胁迫下的解毒作用。结果表明: 铜对大豆种子的发芽活性具有抑制作用, 且随胁迫浓度的增加抑制作用加强; 硫对 1.0 mmol · L<sup>-1</sup> 铜离子的解毒作用效果明显, 能够提高种子的活力指数和根长, 减少电解质渗透率; 5.0 mmol · L<sup>-1</sup> 硫能够增加铜胁迫下大豆种子 POD 活性, 降低 CAT 活性。结果证明硫对一定浓度的铜胁迫能够起到缓解作用, 其中保护酶参与了细胞膜完整性的维持。

**关键词:** 铜胁迫; 硫; 大豆; 保护酶

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)04-0630-04

## Detoxification of Sulfur on Soybean Seeds Under Copper Stress

CHEN Yu-sheng, CHEN Quan-zhan

(School of Biochemical and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, Jiangsu, China)

**Abstract:** The alleviation effects of exogenous sulfate on copper toxicity during the seed germination of soybean (Sudou No. 4) was studied. The soybean seeds were soaked in solution with different copper concentrations of 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mmol · L<sup>-1</sup>, supplied with 5.0, 10.0 mmol · L<sup>-1</sup> sulfur, and then the seeds germination, relative permeability and activities of protective enzymes were investigated. The results showed the seed vigor was decreased with the increasing of copper concentration. Addition of sulfur could alleviate the toxicity of 1.0 mmol · L<sup>-1</sup> copper to soybean seeds, especially in increasing seed activity index, enhancing root length, and reducing the relative permeability of cell membrane. Under different copper concentrations, 5.0 mmol · L<sup>-1</sup> could increase POD activity and decrease CAT activity. The results indicated that sulfur alleviated copper toxicity on soybean seeds to a certain extent, and protective enzymes could maintain the integrity of cell membrane.

**Key words:** Copper stress; Sulfur; Soybean; Protective enzymes

近年来,随着工业“三废”、城市垃圾的排放及农用化学品应用的日趋广泛,土壤环境污染日益严重,土壤一旦受到重金属污染不仅会危害植物的生长和发育,而且会影响农产品的品质,并通过食物链危及人类健康<sup>[1]</sup>。铜既是植物生长发育必需的微量营养元素,也是重要的环境污染物之一<sup>[2]</sup>。过量的铜一方面能破坏膜通透性影响离子平衡,进而造成代谢紊乱,另一方面可以取代某些酶蛋白中维持功能所必需的特定元素或与酶蛋白中非活性基团结合导致变性<sup>[3]</sup>,对不同重金属所造成的毒害效应植物往往会有相应的保护机制来进行对抗或缓解,其中硫对这些重金属的缓解作用尤为突出。

硫也是植物生长必需的营养元素,植物吸收的 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 可转化为含硫氨基酸、多肽及蛋白质等化合

物,如半胱氨酸(cysteine, Cyst)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、植物螯合肽及类金属硫蛋白等。GSH 是细胞内重要的抗氧化物之一,可提高植物的抗逆性。大量研究证明, GSH 和 Cyst 等小分子巯基化合物的存在也可以缓解重金属毒害<sup>[4-5]</sup>。同时, GSH-AsA (ascorbic acid, 抗坏血酸, AsA) 循环途径可以降低植物体内重金属引起的活性氧。GSH 可作为重要的巯基化合物,能够结合细胞内的重金属,减轻重金属对植物的毒害<sup>[6-7]</sup>。因此,硫素营养供应状况必然影响到植物对过量铜的耐性。现以大豆为材料,探讨外源硫对大豆种子萌发过程中铜毒害的缓解效应,为进一步阐明大豆耐铜性机理提供依据。

收稿日期: 2010-02-01

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金资助项目(07KJD180125)。

第一作者简介: 陈玉胜(1968-), 男, 实验师, 硕士, 研究方向为植物生理生化。E-mail: yschen@njxzc.edu.cn。

通讯作者: 陈全战, 博士。E-mail: qzchen65@hotmail.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

苏豆 4 号 (Sudou No. 4) 由江苏省农业科学院提供。铜胁迫采用  $\text{CuCl}_2$  (分析纯), 外源硫用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (分析纯), 取健壮饱满的大豆种子用 75% 的酒精消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次。各取 40 粒, 分别置于处理液中浸泡 6 h, 铜离子浓度梯度分别为 0、0.5、1.0、2.0、4.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 添加的  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度梯度分别为 0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (S0), 5.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (S1) 和 10.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (S2), 每个处理 40 粒种子, 3 次重复。浸种后, 播种于加有 2 层纱布的培养皿中, 遮光, 25℃ 萌发, 每天用处理液使纱布保持湿润。

### 1.2 测定项目与方法

发芽期间, 统计发芽粒数, 计算发芽势  $G_v$ , 发芽率  $G$ , 发芽指数  $GI$ , 活力指数  $VI$ 。

计算公式如下:  $G_v = \text{最高 1 a 的发芽种子数} / \text{供试种子总数} \times 100\%$

$G = G_a / G_n \times 100\%$  ( $G_a$ : 发芽终止时的全部发芽种子数;  $G_n$ : 供试种子总数)

$GI = \sum (G_t / D_t)$  ( $G_t$ : 在第  $t$  天的全部正常发芽数;  $D_t$ : 发芽天数)

$VI = GI \times W$  ( $W$ : 第 4 天发芽大豆的单株平均鲜重)

电导率测定采用 DDS-IIA 型电导仪, 测定浸出液和煮沸后浸出液电导率的相对比率<sup>[8]</sup>; 过氧化物酶 (POD) 活性采用愈创木酚法测定, 以单位质量新鲜样品 1 min 的  $A_{470}$  增加 0.01 酶量为 1 个酶活单位 (U)<sup>[9]</sup>; 过氧化氢酶活性采用紫外分光光度法测定, 以单位质量新鲜样品 1 min 内  $A_{240}$  减少 0.1 的酶量为 1 个酶活单位 (U)<sup>[10]</sup>。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 硫对铜胁迫下大豆种子萌发的影响

从图 1 和 2 可以看出, 0 ~ 1.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的铜可以促进种子萌发, 提高发芽率和发芽指数, 特别是 1.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  铜对发芽指数的促进比较显著, 比对照提高了 11.8% ( $P < 0.05$ ), 硫虽然能增加铜胁迫下大豆种子的发芽率和发芽指数, 但效果不显著 ( $P > 0.05$ )。随着铜浓度增加, 发芽率和发芽指数均显著下降, 同时外源硫加重了这种趋势,

表现出硫和铜的协同毒害效应。

从图 3 和图 4 看出, 活力指数和根长对铜离子比较敏感, 随铜离子浓度的增加而逐渐降低。当溶液中添加 5.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫时, 1.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  铜胁迫下种子的活力指数和根长比对照分别增加了 7.6% 和 32.1%, 硫浓度达到 10.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 这种趋势进一步增加, 达到 10.1% 和 50% ( $P < 0.05$ ), 硫对 0.5、2.0 和 4.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  铜胁迫的大豆种子起不到缓解作用, 且有协同毒害作用, 但高浓度硫对铜的协同作用趋势较缓。结果表明, 较低浓度铜离子可以促进种子的萌发, 但萌发种子的活性较低, 硫对一定浓度铜胁迫起到缓解作用, 且这种缓解作用在高浓度硫时表现更突出。

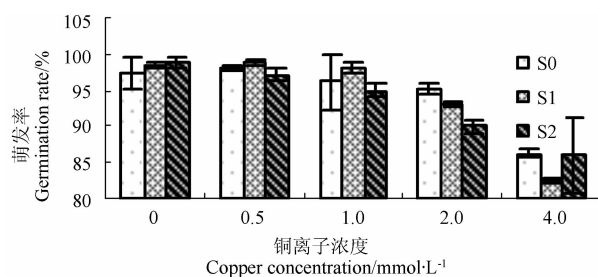


图 1 硫对铜胁迫下大豆种子萌发率的影响

Fig. 1 Effect of sulfur on germination rate of soybean seeds under copper stress

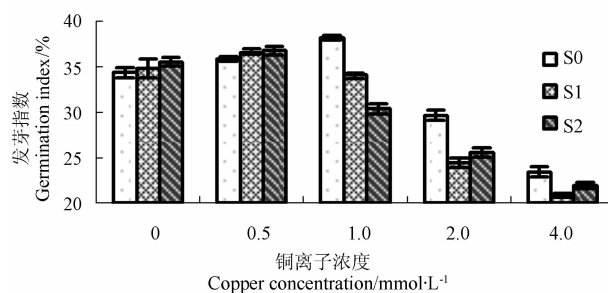


图 2 硫对铜胁迫下大豆种子发芽指数的影响

Fig. 2 Effect of sulfur on germination index of soybean seeds under copper stress

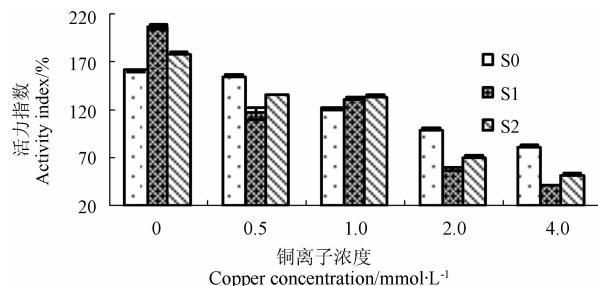


图 3 硫对铜胁迫下大豆种子活力指数的影响

Fig. 3 Effect of sulfur on activity index of soybean seeds under copper stress

### 2.2 硫对铜胁迫下大豆种子电解质渗透率的影响

从图 5 可知, 在 0 ~ 1.0  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  铜胁迫下, 大豆种子的电解质渗透率先下降后上升, 在添加

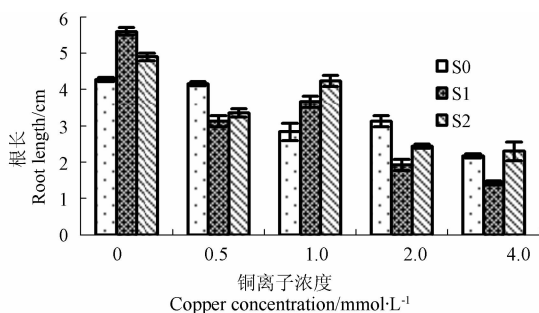


图4 硫对铜胁迫下大豆种子根长的影响

Fig.4 Effect of sulfur on root length of soybean seeds under copper stress

5.0和10.0 mmol·L<sup>-1</sup>硫时,电解质渗透率普遍出现下降趋势,随添加硫离子浓度的增加,这种趋势进一步增强,表现出硫对铜毒害的缓解作用,尤其对1.0 mmol·L<sup>-1</sup>铜毒害的缓解作用比较显著,差值分别是21.2%和28.4% ( $P < 0.01$ )。在高浓度铜胁迫下,这种缓解作用不明显。

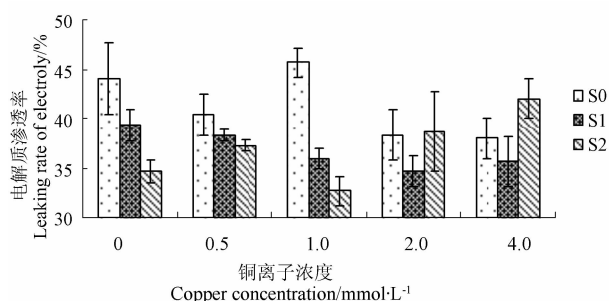


图5 硫对铜胁迫下大豆种子电解质渗透率的影响

Fig.5 Effect of sulfur on relative permeability of soybean under copper stress

### 2.3 铜和硫离子对大豆种子保护酶活性的影响

**2.3.1 过氧化物酶** 从图6可知,在0~2.0 mmol·L<sup>-1</sup>铜胁迫下,大豆种子过氧化物酶的活性都低于对照,在添加5.0 mmol·L<sup>-1</sup>硫时,过氧化物酶的活性得到了一定的提高,但随硫浓度的增加活性又迅速降低;在4.0 mmol·L<sup>-1</sup>铜胁迫时,过氧化物酶活性随硫浓度的增加反而下降。表明在低浓度铜毒害下,低浓度硫能提高过氧化物酶活性,而高浓度硫则降低过氧化物酶活性;而在高浓度铜毒害下,外源硫反而降低过氧化物酶活性。

**2.3.2 过氧化氢酶** 从图7可知,低铜(0~1.0 mmol·L<sup>-1</sup>)可以促进过氧化氢酶活性的增加,随铜离子浓度的增加,酶活性迅速降低,添加硫时,加重这种趋势,特别是对高硫反应更为明显;但在2.0~4.0 mmol·L<sup>-1</sup>浓度范围内,随硫离子浓度的增加,过氧化氢酶的活性又开始上升。因此,低铜可以促进过氧化氢酶活性增强,硫对高铜毒害的种子通过

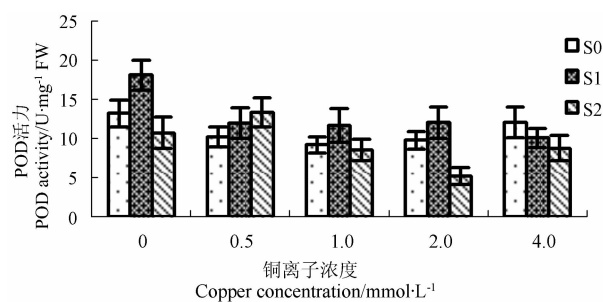


图6 硫对铜胁迫下大豆种子过氧化物酶活性的影响

Fig.6 Effect of sulfur on POD activity of soybean under copper stress

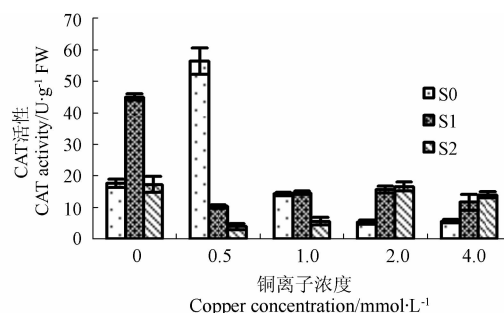


图7 硫对铜胁迫下大豆种子过氧化氢酶活性的影响

Fig.7 Effect of sulfur on CAT activity of soybean under copper stress

增加过氧化氢酶活性来起到部分缓解作用。

## 3 讨论

硫素营养在植物代谢过程中的重要性已引起人们的广泛关注<sup>[11]</sup>,铜作为植物正常生命活动所必需的微量营养元素<sup>[12]</sup>,它广泛参与各种生命活动,但适合植物生长的土壤铜含量范围很窄,土壤中稍微过量的铜便会影响细胞代谢和离子平衡,对植物产生毒害作用<sup>[13]</sup>。

植物遭受生物和理化因子伤害时,膜上受体接受并传递胁迫信号,引发质膜和细胞器的氧化猝发,产生ROS (reactive oxygen species, ROS),ROS的增加会损害膜系统,导致电解质外渗,铜离子浓度达到1.0 mmol·L<sup>-1</sup>时,电解质渗透率最大,一定浓度硫降低了电解质的渗透率,起到保护膜系统作用(图5),这种保护作用部分归因于硫可以增强抗氧化酶的活性来清除过量的ROS,随铜离子浓度的增加,对大豆种子胁迫效应增强。在一定浓度铜胁迫的范围内,外源硫能够使过氧化物酶表现出增强的趋势(图6),但当铜离子浓度达到并超过1.0 mmol·L<sup>-1</sup>时,CAT的活性迅速下降,这与高浓度Cd对大豆种子POD和CAT分别起到激活和致敏

的效应相一致<sup>[14]</sup>。低浓度硫对铜离子起到了解毒作用, POD 酶起关键作用,其活性持续增加,但在高硫和铜离子浓度大于  $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,2 种离子的协同作用导致了 POD 酶活性的迅速降低,这与硫能增加一定浓度铜离子毒性是一致的<sup>[15]</sup>,但在 POD 酶活性下降的同时, CAT 酶活性却有所增强,这可能与硫对两种酶作用效应不一致和 2 种酶对过氧化氢的清除作用存在着一种协调关系有关。

## 参考文献

- [1] Pandey N, Sharma C P. Effect of metal  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  on growth and metabolism of cabbage [J]. Plant Science, 2002, 163:753-758.
  - [2] 常红岩, 孙百晔, 刘春生. 植物铜素毒害研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2000, 31(2): 227-230. (Chang H Y, Sun B Y, Liu C S. Advances in the study of plants copper toxicity [J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science), 2000, 31(2): 227-230.)
  - [3] 陈金峰, 胡斌杰, 韩艳霞, 等. 钙对铜胁迫下大豆种子的解毒作用[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1072-1075. (Chen J F, Hu B J, Han Y X, et al. Detoxification of calcium on soybean seeds under copper stress [J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 1072-1075.)
  - [4] Tripathi R D, Rai U N, Gupta M, et al. Induction of phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L. f.) royle under cadmium stress [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1996, 56: 505-512.
  - [5] Glaeser H, Coblenz A, Kruczek R, et al. Glutathione metabolism and heavy metal detoxification in *Schizosaccharomyces pombe* [J]. Current genetics, 1991, 19: 207-213.
  - [6] 刘传平, 郑爱珍, 田娜, 等. 外源 GSH 对青菜和大白菜镉毒害的缓解作用[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(4): 26-30 (Liu C P, Zheng A Z, Tian N, et al. Alleviation of glutathione on cadmium toxicity of *Brassica chinensis* L. and *Brassica pekinensis* Rupr. [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2004, 27(4): 26-30.)
  - [7] Drazkiewicz M, Skórzyńska Polit E, Krupa Z. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.) [J]. Plant Science, 2003, 164: 195-202.
  - [8] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993. (Zhang Z L. The Experimental guide for plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 1993.)
  - [9] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. (Zou Q. The experimental guide for plant physiology [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2000.)
  - [10] 张治安, 张美善, 蔚荣海. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国, 农业科学技术出版社, 2004. (Zhang Z A, Zhang M S, Wei R H. The experimental guide for plant physiology [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2004.)
  - [11] Hawkesford M J. Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency[J]. Journal of Experimental Botany, 2000, 51: 131-138.
  - [12] Sommer A L. Copper as an essential for plant growth [J]. Plant Physiology, 1931, 6: 339-345.
  - [13] Demidchik V, Sokolik A, Yurin V. The effect of  $\text{Cu}^{2+}$  on ion transport systems of the plant cell plasma lemma [J]. Plant Physiology, 1997, 114: 1313-1325.
  - [14] 张治安, 王振民, 徐克章. 镉胁迫对萌发大豆种子中活性氧代谢的影响[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(4): 670-673. (Zhang Z A, Wang Z M, Xu K Z. Effect of cadmium stress on active oxygen metabolism in germinated soybean seeds [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2005, 24(4): 670-673.)
  - [15] 陈玉胜, 陈亚华, 王桂萍, 等. 硫对水稻种子萌发过程中铜毒害的缓解效应[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(2): 44-48. (Chen Y S, Chen Y H, Wang G P, et al. The alleviation effect of exogenous sulfate on copper toxicity in seed germination of rice [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2007, 30(2): 44-48.)
- 
- (上接第 629 页)
- [5] 王玲玲, 杜吉到, 郑殿峰, 等. 大豆源库流关系的研究进展[J]. 大豆科学, 2009, 28(1): 167-171. (Wang L L, Du J D, Zheng D F, et al. Advances in the studies of relation among source sink and Flux of soybean [J]. Soybean Science, 2009, 28(1): 167-171.)
  - [6] 高明杰. 多小叶大豆种质[J]. 大豆通报, 2008(4): 33. (Gao M J. Soybeans germplasm with multi-micropophylla [J]. Soybean Bulletin, 2008(4): 33.)
  - [7] 董志新, 李绍长, 张煜星, 等. 大豆源库间物质转化及同化物运输规律[J]. 新疆农业科学, 2001, 38(4): 174-176. (Dong Z X, Li S C, Zhang Y X, et al. Soybean source-sink substance transferring and the rule of assimilating substance translation [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2001, 38(4): 174-176.)
  - [8] Baand J E, Wier A T, Boethel D J. Source strength influence on soybean yield formation during early and late reproductive development [J]. Crop Science, 1995, 35: 1104-1110.
  - [9] 满为群, 杜维广, 张桂茹, 等. 大豆高光效种质与高产品种源库平衡研究 I. 去叶、去荚对光合速率和干物质积累的影响[J]. 中国油料作物学报, 1995, 17(2): 8-11. (Man W Q, Du W G, Zhang G R, et al. Study of source-sink balance between high photosynthetic rate germplasm and high yielding variety of soybean I. Effect of defoliating and depodding on photosynthetic rate and dry matter accumulation of soybean [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1995, 17(2): 8-11.)