

外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗生长的影响*

丁继军^{1,2} 刘柿良¹ 潘远智^{1**} 李 丽³¹四川农业大学风景园林学院, 成都 611130; ²长江三峡实业有限公司, 湖北宜昌 443002; ³西南林业大学林学院, 昆明 650224)

摘要 采用温室盆栽试验,研究了不同浓度(0、20、40、60、80、100 mg·L⁻¹)的外源抗坏血酸(AsA)与谷胱甘肽(GSH)对 50 mg·kg⁻¹镉(Cd)胁迫下石竹幼苗生长的影响.结果表明:50 mg·kg⁻¹ Cd 显著抑制了石竹幼苗的生长,适宜浓度的外源 AsA 能够缓解 Cd 对石竹幼苗生长的胁迫,显著提高其生物量、株高、分蘖数、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等抗氧化酶活性,以及 AsA 和 GSH 含量,但随着外源 AsA 浓度的增加,缓解效应下降,甚至产生促氧化效应;外源 GSH 可以及时补充 Cd 胁迫下石竹幼苗体内的非酶抗氧化剂,但抗氧化酶活性变化相对较小,其缓解 Cd 毒害的主要机制可能是促进根系中金属螯合肽(PCs)的合成,增加其与 Cd 的螯合,从而降低石竹幼苗体内 Cd 含量.研究表明,35~45 mg·L⁻¹的外源 AsA 和 55~65 mg·L⁻¹的外源 GSH 都能很好地缓解石竹幼苗 Cd 毒害,且前者效果优于后者.

关键词 抗坏血酸 谷胱甘肽 镉胁迫 石竹

文章编号 1001-9332(2014)02-0419-08 **中图分类号** Q945, Q948 **文献标识码** A

Effects of exogenous AsA and GSH on the growth of *Dianthus chinensis* seedlings exposed to Cd. DING Ji-jun^{1,2}, LIU Shi-liang¹, PAN Yuan-zhi¹, LI Li³ (¹College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ²Three Gorges Industrial Co. Ltd., Yichang 443002, Hubei, China; ³College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2014, 25(2): 419-426.

Abstract: A pot experiment was carried out under greenhouse condition to investigate the effects of different concentrations (0, 20, 40, 60, 80 and 100 mg·L⁻¹) of exogenous AsA, GSH on *Dianthus chinensis* seedlings which were stressed by 50 mg·kg⁻¹ Cd in the soil. The results indicated that 50 mg·kg⁻¹ of Cd significantly inhibited the growth of *D. chinensis* seedlings. An appropriate concentration of exogenous AsA significantly improved the biomass, plant height, tiller number, GAT and APX activities, and AsA and GSH contents. However, with the increase of exogenous AsA concentration, the ameliorating effect decreased and prooxidant effect occurred. Exogenous GSH could replenish the non-enzymatic antioxidants of *D. chinensis* seedlings, but the changes of antioxidant enzyme activities were relatively slight. The main mechanisms of GSH to alleviate Cd toxicity might be promoting root PCs synthesis, thereby reducing the Cd concentration in the seedlings. Both 35-45 mg·L⁻¹ exogenous AsA and 55-65 mg·L⁻¹ exogenous GSH could alleviate the Cd toxicity on *D. chinensis* seedlings, and the former was superior to the latter.

Key words: AsA; GSH; cadmium stress; *Dianthus chinensis*.

21 世纪以来,随着我国经济的迅猛发展与城市化进程的加快,城市绿地土壤的重金属污染情况日趋严重^[1].镉(Cd)是一种生物毒性大、移动性较强的重金属元素,能对植物产生很强的毒害,严重时导

致植物死亡^[2].调查发现,世界各国城市土壤都存在不同程度的 Cd 污染,城市园林植物的生境因此不可避免地遭到破坏^[3].近年来,许多学者致力于探索缓解城市园林观赏植物土壤重金属 Cd 毒害的途径,研究了植物生长调节物质、矿物质元素、基因工程、微生物及其他增强植物抗土壤重金属 Cd 毒害的方法,部分方法已较成熟,只是由于其成本高昂

* 四川农业大学“211 工程”双支计划项目资助.

* * 通讯作者. E-mail: scpyzls@163.com

2013-03-18 收稿,2013-11-21 接受.

或操作不易等原因而难以普及应用于生产生活之中;还有的方法仍待考究^[4]. 抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)是植物组织内 AsA-GSH 循环中两种重要的非酶抗氧化剂^[5]. 目前,部分学者采用水培方式研究外源 AsA、GSH 对水稻^[6]、青菜和大白菜^[7]等作物的逆境抗性生理的影响,但有关外源 AsA、GSH 对城市地被植物 Cd 毒害的影响以及 AsA 和 GSH 的剂量效应尚鲜报道.

石竹(*Dianthus chinensis*)是石竹科(Caryophyllaceae)石竹属(*Dianthus*)多年生草本植物,是中国传统名花之一,观赏价值高,生物量大,且易繁殖和养护,广泛应用于城市地被绿化. 本文采用温室盆栽试验,研究了不同浓度的外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗生长的影响,旨在为探索缓解地被植物 Cd 毒害的途径提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

将园土碾碎、自然风干、剔除杂物,再与发酵土(由秸秆与畜禽粪便发酵而成)按 1:2 的比例混匀后过 5 mm 钢筛,用多菌灵粉剂消毒,静置数天. 土壤的基本理化性质:pH 为 6.4,全 N、全 P 和全 K 分别为 0.45、0.71 和 3.65 g·kg⁻¹,有机质含量为 39.32 g·kg⁻¹,Cd 含量为 0.31 mg·kg⁻¹.

供试石竹购自成都市郫县成青花卉苗圃的一年生实生幼苗. 将生长健壮且长势一致的石竹幼苗从营养杯中翻出,剪除老叶,用清水洗净根系,剪去烂根,每盆栽植 3 株,操作时不损伤根系.

1.2 试验方法

温室盆栽试验于 2012 年 6—9 月在四川农业大学成都校区教学科研基地进行. 塑料盆规格为 34 cm×21 cm×27 cm(上径×下径×高),盆下放置蓄水垫盘,每盆装土 10 kg,盆土浇清水至田间持水量的 60% 左右,平衡 1 周,将石竹幼苗植入. 培养 10 d 待石竹正常生长,将盆栽植物分成 12 组,1 号为对照组,记为 CK,2~12 号为处理组,每组 5 盆,共 60 盆. 将 50 mg·kg⁻¹(由预备试验得到)的 CdCl₂·2.5H₂O(分析纯)配成溶液,分 5 次均匀地浇灌在处理组盆土中,每两次间隔时间 2 d,浇灌时间为 9:00—11:00,渗出液反复回收浇灌,直到 Cd 离子与土壤均匀混合,CK 灌以清水. 每次浇灌 Cd 溶液的当天 16:00—18:00,按表 1 对植株进行叶面喷施外源 AsA、GSH,每次均喷至叶片滴液为度,CK 与处理 I 均喷以蒸馏水. 待石竹幼苗在 Cd 污染的

表 1 试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of the experiment (Cd: mg·kg⁻¹; AsA, GSH: mg·L⁻¹)

处理 Treatment	CK	I	II	III	IV	V	VI
AsA+Cd	-	0+50	20+50	40+50	60+50	80+50	100+50
GSH+Cd	-	0+50	20+50	40+50	60+50	80+50	100+50

盆土中生长 15 d 时,取植株中部叶片,测定各项生理生化指标. 2 个月时,测定株高、分蘖数、生物量以及石竹幼苗根、茎、叶的单位质量含 Cd 量,以上各指标的测定均重复 3 次.

1.3 测定方法

质膜透性、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性测定参照熊庆娥^[8]的方法. O₂⁻和 H₂O₂含量的测定分别参照李合生^[9]、王爱国和罗广华^[10]的方法,AsA、GSH 含量测定分别参照 Tanaka 等^[11]和 Ellman^[12]的方法,抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性测定参照 Nakano 和 Kozi^[13]的方法,脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性的测定参照 Stasolla 和 Yeung^[14]的方法. 将收获的整株植物用自来水洗净,再用蒸馏水冲洗 2~3 遍,用不锈钢工具把样品的叶、茎和根分开,在 105 °C 烘箱内杀青 30 min,装入牛皮纸信封,再在 70~80 °C 下烘干至恒量,称量,计算抗性系数(处理生物量/对照生物量). 石竹幼苗各部分用料理机粉碎后,采用湿样消解法消解植物样品,采用原子吸收分光光度计(AA320N 型)测定 Cd 含量.

1.4 综合评定

采用模糊数学中的隶属函数法,将各处理抗性指标的隶属函数值累加,求平均数,以评价抗性. 具体计算公式如下:

如果指标与抗性之间存在正相关,则按下式计算:

$$U_{ijk} = \frac{X_{ijk} - X_{k \min}}{X_{k \max} - X_{k \min}}$$

如果指标与抗性之间存在负相关,则按下式计算:

$$U_{ijk} = 1 - \frac{X_{ijk} - X_{k \min}}{X_{k \max} - X_{k \min}}$$

式中: U_{ijk} 为第 i 个外源物质第 j 个处理浓度对第 k 项指标的隶属函数值; X_{ijk} 为第 i 个外源物质第 j 个处理浓度对第 k 项指标的测定值; $X_{k \max}$ 为所有处理

第 k 项指标的最大值; $X_{k \min}$ 为所有处理第 k 项指标的最小值; U_{ijk} 越大表明抗性越强。

1.5 数据处理

利用 Excel 2003 对试验数据进行初步计算, 采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, Duncan 法进行多重比较 ($\alpha=0.05$), 采用 Origin 8.6 软件作图。

2 结果与分析

2.1 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗生长的影响

由表 2 可知, Cd 胁迫下 (处理 I) 石竹幼苗地下部、地上部和整株生物量较 CK 分别下降 23.8%、22.5% 和 22.7%, 株高和分蘖数分别下降 36.8%、54.7%。

喷施不同浓度外源 AsA 后, 随着外源 AsA 浓度的增大, 石竹幼苗各部分生物量先增大后减小, 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ AsA 处理 (处理 III) 石竹地下部、地上部和整株生物量分别较 Cd 胁迫处理 (处理 I) 增加 13.9%、21.6% 和 26.0%, 株高和分蘖数增加 30.7% 和 83.0%, 但仍小于 CK; 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ AsA 处理 (处理 VI) 石竹地上部和整株生物量仅为 Cd 胁迫处理 (处理 I) 的 94.6% 和 95.4%, 地下部生物量与处理 I 差异不显著, 株高和分蘖数较 Cd 胁迫处理 (处理 I) 下降 11.9% 和 18.9%。

喷施不同浓度的外源 GSH 后, 由抗性系数可知, 随着外源 GSH 浓度的增大, 石竹幼苗各部分生物量先增大后平缓下降, 处理 II ~ VI 石竹幼苗地下

部生物量和分蘖数差异不显著, 处理 IV 石竹地上部、整株生物量和株高都达到最大值, 分别是处理 I 的 1.3、1.2 和 1.3 倍, 但仍比 CK 低, 处理 V 和 VI 石竹生物量和株高均下降, 但始终高于处理 I。

2.2 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗各部分单位质量含 Cd 量的影响

由图 1 可知, Cd 胁迫下 (处理 I) 石竹幼苗各部分单位质量含 Cd 量分别是 CK 的 19.1、5.3 和 6.4 倍。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 AsA 后, 处理 II ~ VI 根部单位质量含 Cd 量先增加后减少, 各处理间差异显著, 处理 III 达到最大值, 是处理 I 的 1.5 倍, 处理 VI 则只有处理 I 的 93.1%; 而石竹幼苗茎和叶的单位质量含 Cd 量呈现下降趋势, 处理 VI 分别是处理 I 的 82.7% 和 96.3%。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 GSH 后, 处理 II ~ VI 根部单位质量含 Cd 量持续下降直至变化不大, 处理 IV、V 和 VI 石竹幼苗叶片根部单位质量含 Cd 量差异不显著, 处理 I、II 和 III 茎部单位质量含 Cd 量差异不显著, 处理 VI 石竹根部、茎部和叶片单位质量含 Cd 量均为处理 II ~ VI 中的最低值, 分别只有处理 I 的 60.8%、43.0% 和 36.9%, 但仍比 CK 相应部位单位质量含 Cd 量高。

另外, 外源 AsA 的浓度与石竹幼苗的根、茎和叶单位质量含 Cd 量的相关系数分别为 0.92 ($P < 0.05$)、0.81 ($P < 0.05$) 和 0.31 ($P > 0.05$); 外源 GSH 的浓度与三者的相关系数分别为 0.89 ($P < 0.05$)、0.90 ($P < 0.05$) 和 0.90 ($P < 0.05$)。

表 2 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗生长的影响

Table 2 Effects of exogenous AsA and GSH on growth of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress (mean \pm SE)

处理 Treat- ment	生物量 Biomass ($\text{g} \cdot \text{pot}^{-1}$)			株高 Plant height (cm)	分蘖数 Tiller number	抗性系数 Resistance coefficient	
	地下部 Root	地上部 Shoot	整株 Whole plant				
AsA	CK	1.89 \pm 0.11a	13.66 \pm 0.30a	15.56 \pm 0.37a	27.50 \pm 2.38a	11.7 \pm 2.1a	-
	I	1.44 \pm 0.05d	10.59 \pm 0.26c	12.02 \pm 0.21c	17.37 \pm 1.62cd	5.3 \pm 1.5cd	0.77
	II	1.75 \pm 0.03b	13.43 \pm 0.45a	15.18 \pm 0.42a	23.17 \pm 1.20b	7.0 \pm 1.0bcd	0.98
	III	1.64 \pm 0.12bc	13.51 \pm 0.40a	15.15 \pm 0.50a	22.71 \pm 0.64b	9.7 \pm 2.1ab	0.97
	IV	1.58 \pm 0.06cd	11.23 \pm 0.10b	12.81 \pm 0.07b	18.33 \pm 0.58c	7.7 \pm 1.2bc	0.82
	V	1.48 \pm 0.04d	10.33 \pm 0.20cd	11.81 \pm 0.23c	17.48 \pm 1.96cd	6.3 \pm 1.5cd	0.76
	VI	1.45 \pm 0.10d	10.02 \pm 0.20d	11.47 \pm 0.19c	15.25 \pm 0.72d	4.3 \pm 1.5d	0.74
GSH	CK	1.89 \pm 0.11a	13.66 \pm 0.30a	15.56 \pm 0.37a	27.50 \pm 2.38a	11.7 \pm 2.1a	-
	I	1.44 \pm 0.05b	10.59 \pm 0.26c	12.02 \pm 0.21d	17.37 \pm 1.62cd	5.3 \pm 1.5b	0.77
	II	1.44 \pm 0.08b	10.75 \pm 0.38c	12.18 \pm 0.32d	18.93 \pm 0.26cd	5.3 \pm 2.5b	0.78
	III	1.59 \pm 0.06b	11.30 \pm 0.29b	12.90 \pm 0.31c	20.16 \pm 2.15c	7.7 \pm 1.2b	0.83
	IV	1.53 \pm 0.21b	13.21 \pm 0.14a	14.73 \pm 0.14b	23.36 \pm 0.42b	8.3 \pm 0.6b	0.95
	V	1.59 \pm 0.08b	11.34 \pm 0.19b	12.93 \pm 0.26c	19.31 \pm 0.06cd	6.7 \pm 1.5b	0.83
	VI	1.49 \pm 0.35b	11.66 \pm 0.27b	13.15 \pm 0.28c	20.22 \pm 0.20c	7.3 \pm 1.5b	0.85

同列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different letters indicated significant difference at 0.05 level.

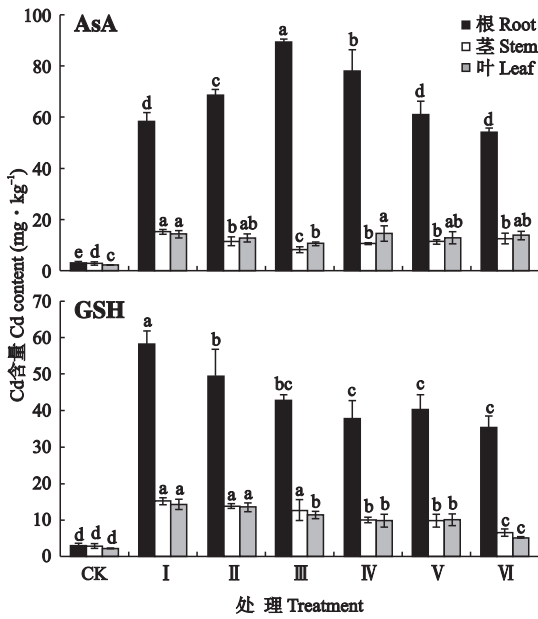


图1 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗各部分单位质量含 Cd 量的影响

Fig.1 Effects of exogenous AsA, GSH on Cd content of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress.

同一部分不同小写字母代表不同浓度外源 AsA、GSH 处理差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters in the same part indicated significant difference at 0.05 level among different concentration exogenous AsA, GSH treatments.

2.3 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗叶片 MDA 含量和相对电导率的影响

由图2可知,Cd胁迫下(处理 I)石竹幼苗叶片 MDA 含量和相对电导率分别是 CK 的 1.2 和 1.9 倍。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 AsA 后,其 MDA 含量和相对电导率随外源 AsA 浓度的增大先降低再升高,处理 III 石竹幼苗叶片 MDA 含量和相对电导率分别只有处理 I 的 83.5% 和 59.5%,处理 VI 的 MDA 含量和相对电导率与处理 I 无显著差异。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 GSH 后,其 MDA 含量和相对电导率都随外源 GSH 浓度的增大缓慢下降,处理 V、VI 有微小波动。

2.4 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗 O₂⁻ 产生速率和 H₂O₂ 含量的影响

由图3可知,Cd胁迫下(处理 I)石竹幼苗叶片 O₂⁻ 产生速率是 CK 的 4.0 倍。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 AsA 后,叶片 O₂⁻ 产生速率呈现随外源 AsA 浓度的升高先降低后升高的趋势,处理 III 最小,为处理 I 的 44.0%,但仍比 CK 高,处理 V 和 VI 的产生速率回升后与处

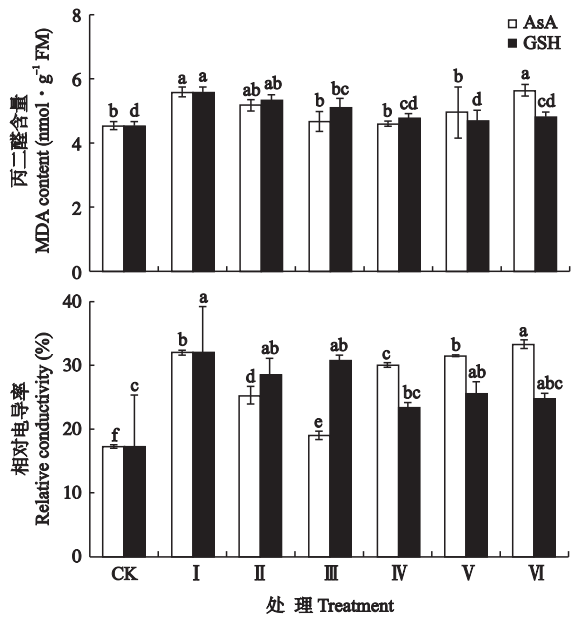


图2 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗叶片 MDA 含量和相对电导率的影响

Fig.2 Effects of exogenous AsA, GSH on MDA content and relative conductivity of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress.

不同小写字母代表同一外源物质不同浓度处理差异显著 ($P < 0.05$) Different small letters in the same exogenous substance indicated significant difference among different concentration treatments at 0.05 level. 下同 The same below.

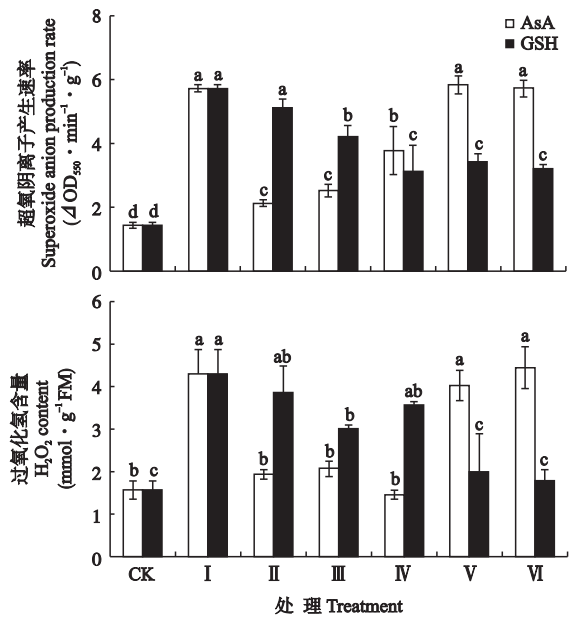


图3 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗叶片 O₂⁻ 产生速率和 H₂O₂ 含量的影响

Fig.3 Effects of exogenous AsA, GSH on superoxide anion production rate and H₂O₂ content of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress.

理 I 差异不显著. 石竹幼苗叶片 O₂⁻ 产生速率与其叶片单位质量 Cd 含量的相关系数为 0.81, 与叶片

H_2O_2 含量的相关系数达到了 0.87。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的 GSH 后, 石竹叶片 O_2^- 产生速率随外源 GSH 浓度的升高而下降, 处理 IV 最低, 只有处理 I 的 54.4%, 仍然显著高于 CK, 处理 V 和 VI 较处理 IV 略有回升, 但三者差异不显著。石竹幼苗叶片 H_2O_2 含量随外源 GSH 浓度升高而下降, 处理 VI 只有处理 I 的 41.4%, 处理 V、VI 与 CK 之间差异不显著。

2.5 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗 SOD、CAT、POD 活性的影响

由图 4 可知, Cd 胁迫下(处理 I)石竹幼苗叶片 SOD 的活性是 CK 的 1.7 倍, 而 CAT、POD 的活性分别只有 CK 的 88.3% 和 79.1%。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 AsA 后, 处理 II ~ VI 叶片 SOD 活性呈现先上升后下降, 继而又上升的趋势, 处理 III 叶片 SOD 活性最高, 较处理 I 增加了 16.4%; 而处理 II ~ VI 石竹幼苗叶片 CAT、POD 活性呈现出随外源 AsA 浓度的升高先上

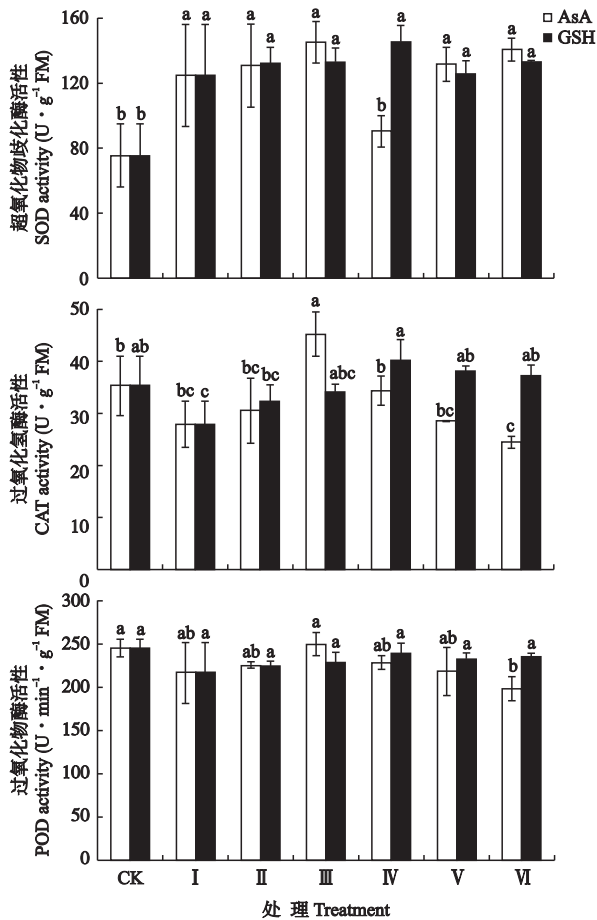


图 4 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗叶片 SOD、CAT、POD 活性的影响

Fig. 4 Effects of exogenous AsA, GSH on SOD, CAT, POD activities of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress.

升后下降的趋势, 处理 III 叶片 CAT、POD 活性最高, 分别是处理 I 的 1.6、1.2 倍。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 GSH 后, 处理 II ~ VI 石竹幼苗叶片 SOD、POD 活性与处理 I 无显著差异, CAT 活性随外源 GSH 浓度的升高先增大后减小。

外源 AsA 处理下石竹幼苗叶片 SOD、CAT、POD 活性变化显著于外源 GSH 处理。

2.6 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗叶片 AsA-GSH 循环中酶活性的影响

由图 5 可知, Cd 胁迫下(处理 I)石竹幼苗叶片

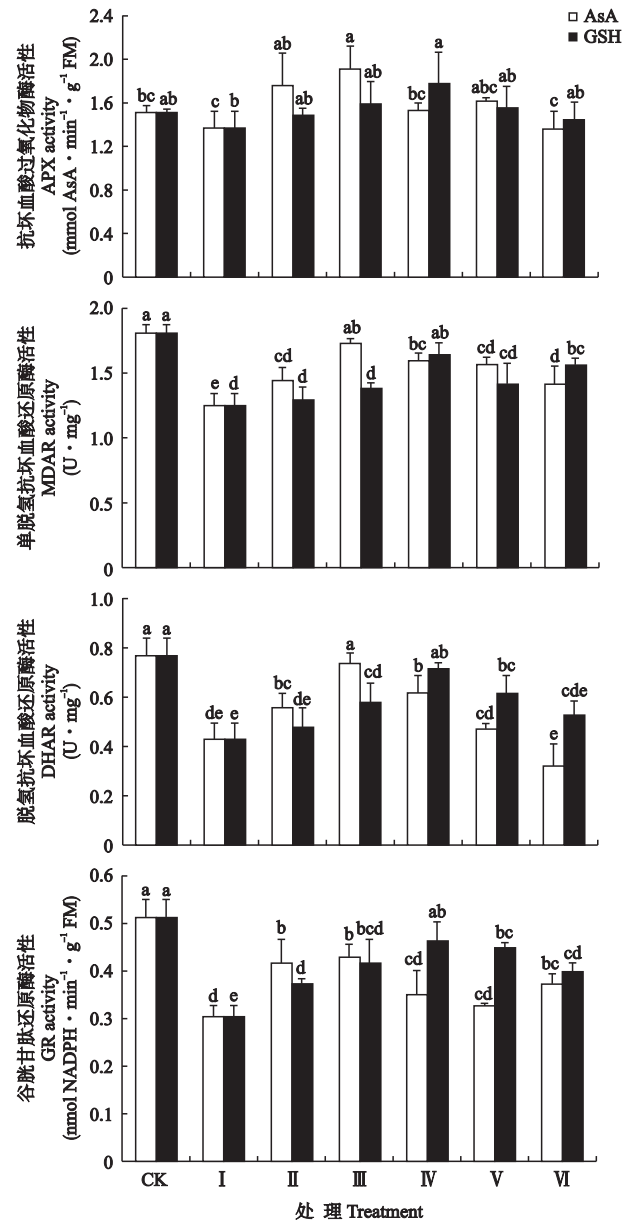


图 5 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗叶片 AsA-GSH 循环中酶活性的影响

Fig. 5 Effects of exogenous AsA, GSH on enzyme activities in AsA-GSH circle of *Dianthus chinensis* seedlings.

APX、MDAR、DHAR 和 GR 活性分别是 CK 的 90.1%、69.4%、55.8% 和 59.8%。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 AsA 后, 处理 II ~ VI 石竹叶片 APX、MDAR、DHAR、GR 活性呈现出随 AsA 浓度的增大先上升后下降的趋势。其中, 处理 III APX 活性较处理 I 增加了 40.4%, 甚至超过了 CK, 处理 VI 与处理 I 无显著差异; 处理 III MDAR 的活性最大, 处理 VI 与处理 I 差异不显著; 处理 III DHAR 的活性最高, 处理 VI 显著低于处理 I 和 CK; 处理 III GR 的活性最高, 是处理 I 的 1.4 倍, 仍显著低于 CK, 处理 VI 最低, 与处理 I 差异不显著; 另外, 整个试验过程中 MDAR 活性一直高于 DHAR 活性, 且变化幅度小于 DHAR。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 GSH 后, 处理 II ~ VI 石竹幼苗叶片 APX、MDAR、DHAR、GR 活性随外源 GSH 浓度的增加先上升后略微下降。其中, 处理 IV APX 的活性最高, 显著高于处理 I, 与 CK 差异不显著; 处理 IV MDAR 的活性最高, 是处理 I 的 1.3 倍; 处理 IV DHAR 的活性最高, 较处理 I 增加了 65.1%, 处理 I 和 II、V 和 VI 差异均不显著; 处理 IV GR 的活性最高, 较处理 I 增加了 53.3%。

外源 AsA 处理下石竹幼苗叶片 APX、MDAR、DHAR、GR 活性变化显著于外源 GSH 处理。

2.7 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗叶片 AsA 和 GSH 含量的影响

由图 6 可知, Cd 胁迫下 (处理 I) 石竹幼苗叶片

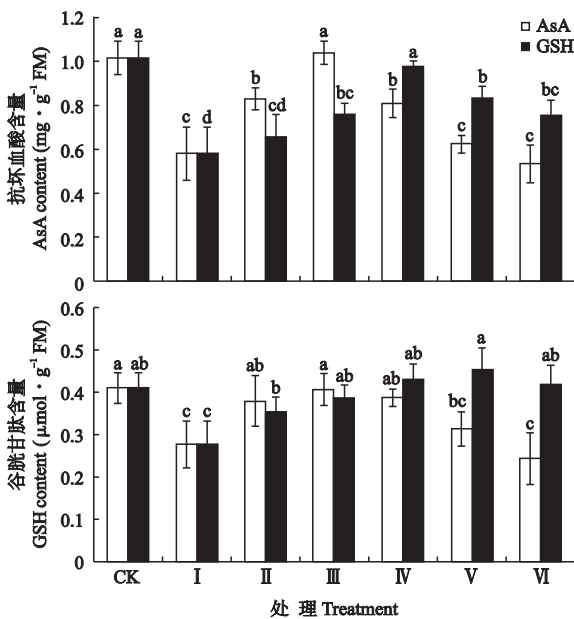


图 6 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗叶片 AsA 和 GSH 含量的影响

Fig. 6 Effects of exogenous AsA, GSH on AsA and GSH contents of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress.

表 3 不同处理隶属函数值

Table 3 Membership function value in different treatments

处理 Treatment	CK	I	II	III	IV	V	VI	平均 Mean
AsA	0.815	0.132	0.597	0.858	0.514	0.333	0.122	0.482
GSH	0.815	0.132	0.377	0.478	0.739	0.648	0.582	0.539

AsA、GSH 含量分别只有 CK 的 56.9% 和 68.3%。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 AsA 后, 其叶片 AsA 和 GSH 的含量均呈现随外源 AsA 浓度升高先增加后减小的趋势。其中, 处理 III AsA 含量最高, 较处理 I 增加了 79.3%, 处理 VI 与处理 I 差异不显著; 石竹幼苗叶片 GSH 和 AsA 含量呈显著正相关, 相关系数达到 0.76。

向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 GSH 后, 其 AsA 和 GSH 含量都随外源 GSH 的浓度增大先上升后平缓下降, AsA 在处理 IV 达到最大值, GSH 在处理 V 达到最大值, 两者均在处理 VI 下降到最小值, 但仍高于处理 I。

2.8 综合评定

由表 3 可知, Cd 胁迫下 (处理 I) 石竹幼苗的抗性较 CK 急剧下降。向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源 AsA 后, 其抗性先上升后下降, 处理 III 抗性值 > CK, 处理 VI 抗性值 < 处理 I, 说明适合浓度的外源 AsA 能缓解石竹幼苗 Cd 毒害, 但高浓度的外源 AsA 有显著的促氧化作用; 向石竹幼苗叶面喷施外源 GSH 后, 其抗性值逐渐上升, 处理 IV 达到最大值, 处理 V、VI 的抗性值略微下降。由此可知, 35 ~ 45 mg · L⁻¹ 的外源 AsA 和 55 ~ 65 mg · L⁻¹ 的外源 GSH 都能很好地缓解石竹幼苗 Cd 毒害, 但前者效果优于后者。

3 讨论

在 50 mg · kg⁻¹ Cd 胁迫土壤中生长的石竹幼苗叶片 O₂⁻ 产生速率和 H₂O₂ 含量分别较 CK 增加了 3.0 和 2.9 倍, 叶片膜透性增大, 石竹幼苗的叶面出现明显的灼烧斑点。这可能是因为石竹幼苗吸收 Cd 后, 诱导 PCs 在其体内合成, 并与 PCs 中的硫醇结合, 导致石竹幼苗细胞内的 GSH 库迅速消减以及含有硫醇基的 GR 活性降低, 同时 APX 活性也可能因对硫醇敏感而降低, 细胞清除 ROS 的能力下降, 导致 H₂O₂ 在细胞内积累, 这些 H₂O₂ 作为细胞程序化死亡的信号分子诱导次生代谢, 导致细胞壁硬化及木质化, 降低了细胞的存活能力, 最终导致细胞程序化死亡^[15]。

研究表明,施加外源物质能够提高植物对逆境胁迫的耐受性,如外源 AsA 能提高盐胁迫下大麦叶绿体内 ROS 清除能力^[16];外源 NO 可以缓解 Cd 胁迫对番茄幼苗叶片光合结构的破坏^[17];外源 Ca^{2+} 、ABA 和 H_3PO_4 能够缓解羊草 (*Leymus chinensis*) 幼苗的盐胁迫^[18] 等。本研究中,向石竹幼苗叶面喷施适宜浓度的外源 AsA 和 GSH 后, O_2^- 和 H_2O_2 的含量都显著下降,缓解了石竹幼苗受到的 Cd 毒害,这分别与外源 AsA 对酸雨胁迫油菜 (*Brassica campestris*)^[19] 幼苗的缓解效应和外源 GSH 对海州香薷 (*Elsholtzia haichowensis*)^[20] Cu 毒害的缓解作用结果一致。

本研究表明,外源 GSH 和外源 AsA 缓解石竹幼苗 Cd 毒害的机理不同。外源 AsA 处理下石竹幼苗叶片 CAT、POD、APX、DHAR、MDAR、GR 活性变化均显著于外源 GSH 处理,这可能是因为 AsA 除了直接参与清除 ROS,还可作为一些活性位点含有铜和铁的单氧或二氧化物酶的辅酶,提高酶活性,调节许多重要酶促反应^[21]。另外,外源 AsA 下处理 V、VI 的石竹幼苗生物量、株高和分蘖数降低,且叶片上出现许多灼伤斑点,叶片 ROS 含量较处理 I 不减反增,抗氧化酶活性降低,这说明高浓度的外源 AsA 与 Cd 协同氧化石竹幼苗^[22],使其细胞产生了更多的 O_2^- 等 ROS,加剧其氧化损伤。周琴等^[23] 与张佩等^[19] 在研究外源 AsA 对酸雨、Cd 胁迫油菜幼苗的缓解效应时,都发现低浓度的外源 AsA 可有效缓解油菜受到的逆境胁迫,而高浓度的 AsA 对其不但没有缓解作用,反而出现促氧化作用。由此可见,AsA 作用具有显著的剂量效应,但到目前为止还难以确定 AsA 在何种情况下起促氧化作用,一些试验结果笼统地表述为低剂量的 AsA 对生物体具有抗氧化作用,高剂量的 AsA 具有促氧化作用。目前,AsA 促氧化作用的机理有 3 种:与 AsA 还原 O_2^- 等 ROS 生成的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)有关;与细胞内过渡金属离子的存在有关;与 AsA 代谢生成草酸过程中产生的 ROS 有关^[24]。本研究中,处理 V、VI 石竹幼苗体内 AsA 含量已经达到饱和,过量的 AsA 需要通过代谢排出体外,在此过程中可能产生大量的草酸(未列出试验数据),同时产生的 ROS 损害了细胞,因此出现高浓度外源 AsA 促氧化的现象。

而外源 GSH 缓解石竹幼苗 Cd 毒害并不主要通过调节抗氧化酶活性来起作用。外源 GSH 处理下石竹幼苗不仅根系对土壤中 Cd^{2+} 的吸收减少了,根系中的 Cd^{2+} 向地上部的运输也受到了抑制,地上部 Cd

毒害的缓解作用显著高于根系,这可能是外源 GSH 能够提高石竹幼苗对土壤高浓度 Cd 胁迫耐受性的关键原因:GSH 是合成植物金属螯合肽(PCS)的直接前体,植物和一些真菌体内的螯合肽合成酶(PCS)可催化 GSH 聚合而形成不同分子量的 PCS^[25],PCS 可与重金属形成螯合物并转运到液泡内隔离^[26]。这与外源 GSH 对海州香薷^[20] 毒害的缓解作用的结果一致,但在外源 GSH 对小麦^[27] 幼苗铜(Cu)毒害的缓解作用研究中,认为小麦幼苗吸收 GSH 的量增加,合成了足够多的 PCS 与进入小麦体内的 Cu 螯合并积累在液泡中,使小麦体内 Cu 越来越多。本研究认为,被转运到液泡的螯合物在其他酶的作用下被排出体外,从而抑制了游离的 Cd^{2+} 向地上部运输,减少了石竹幼苗体内 Cd 含量。另外,外源 GSH 作用下处理 V、VI 的石竹幼苗抗性(表 3)略微下降,但仍高于处理 I,更高浓度的外源 GSH 是否会像 AsA 一样,与 Cd 协同氧化胁迫石竹幼苗,由于本研究中外源 GSH 浓度范围有限,还需要进一步探索。

综上所述,喷施 $35 \sim 45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 外源 AsA、 $55 \sim 65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GSH 都可以有效缓解石竹幼苗 Cd 毒害,从而改善其生长状况,但前者效果优于后者。

参考文献

- [1] Wang X-M (王兴明), Tu J-F (涂俊芳), Li J (李晶), et al. Effects of Cd on rape growth and antioxidant enzyme system. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2006, **17**(1): 102–106 (in Chinese)
- [2] Jin C-X (金彩霞), Zhou Q-X (周启星), Fan J (樊静), et al. Changes of Cd forms on wheat root-soil interface under stress of combined Cd and chlorimuron-ethyl. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2007, **18**(7): 1498–1504 (in Chinese)
- [3] Jin C-X (金彩霞), Zhou Q-X (周启星), Sun R-L (孙瑞莲), et al. Research advances on eco-chemical behaviors and toxicological effects of cadmium in root soil interface. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2005, **16**(8): 1553–1557 (in Chinese)
- [4] Yao H (姚慧), Cai Q-S (蔡庆生). The approach to alleviate the stress injury of plants by heavy metals and its mechanism. *Zhejiang Agricultural Sciences* (浙江农业科学), 2011(1): 144–147 (in Chinese)
- [5] Noctor G, Foyer CH. Ascorbic and glutathione keeping active oxygen under control. *Plant Physiology*, 1998, **49**: 249–279
- [6] Zheng Q-W (郑启伟), Wang X-K (王效科), Xie J-Q (谢居清), et al. Effects of exogenous ascorbate acid on membrane protective system of *in situ* rice leaves under O_3 stress. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2006, **26**(4): 1131–1137 (in Chinese)

- [7] Liu C-P (刘传平), Zheng A-Z (郑爱珍), Tian N (田娜), *et al.* Alleviation of glutathione on cadmium toxicity of *Brassica chinensis* L. and *Brassica pekinensis* Rupr. *Journal of Nanjing Agricultural University* (南京农业大学学报), 2004, **27**(4): 26–30 (in Chinese)
- [8] Xiong Q-E (熊庆娥). *Plant Physiology Experiment Tutorial*. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 2003 (in Chinese)
- [9] Li H-S (李合生). *Plant Physiology and Biochemistry Experimental Principles and Techniques*. Beijing: Higher Education Press, 2000 (in Chinese)
- [10] Wang A-G (王爱国), Luo G-H (罗广华). Quantitative relation between the reaction the hydroxylamine and superoxide anion radical in plant. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 1990, **26**(6): 55–57 (in Chinese)
- [11] Tanaka K, Suda Y, Kondo N. Ozone tolerance and the ascorbate-dependent hydrogen peroxide decomposing system in chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 1985, **26**: 1425–1431
- [12] Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, **82**: 70–77
- [13] Nakano Y, Kozi A. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 1981, **22**: 867–880
- [14] Stasolla C, Yeung EC. Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination. *Physiologia Plantarum*, 2001, **111**: 196–205
- [15] Schutzendubel A, Nikolova P, Rudolf C, *et al.* Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus canescens* roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, **40**: 577–584
- [16] Herbertte S, Taconnat L, Hugouvieux V, *et al.* Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie*, 2006, **88**: 1751–1765
- [17] Zhang Y-K (张义凯), Cui X-M (崔秀敏), Yang S-X (杨守祥), *et al.* Effects of exogenous nitric oxide on active oxygen metabolism and photosynthetic characteristics of tomato seedlings under cadmium stress. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2010, **21**(6): 1432–1438 (in Chinese)
- [18] Yan H (颜宏), Shi D-C (石德成), Yin S-J (尹尚军), *et al.* Effects of Ca²⁺, ABA and H₃PO₄ on relieving stress of Na₂CO₃ and NaCl. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2000, **11**(6): 889–892 (in Chinese)
- [19] Zhang P (张佩), Zhou Q (周琴), Sun X-F (孙小芳), *et al.* The alleviative effects of AsA on the growth of rape seedlings under Cd stress. *Journal of Agro-Environment Science* (农业环境科学学报), 2008, **27**(6): 2362–2366 (in Chinese)
- [20] Qian M (钱猛), Zhu C-H (朱昌华). Alleviation of glutathione on copper toxicity of *Elsholtzia haichowensis* Sun. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 2010, **46**(12): 1243–1246 (in Chinese)
- [21] Davey MW, Montagu MV, Inze D. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, **80**: 825–860
- [22] Lee SH, Oe T, Blair IA. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science*, 2001, **292**: 2083–2086
- [23] Zhou Q (周琴), Zhang P (张佩), Cao C-X (曹春信), *et al.* Alleviative effects of exogenous AsA on acid rain stressed oilrape seedlings. *Journal of Agro-Environment Science* (农业环境科学学报), 2010, **29**(8): 1437–1442 (in Chinese)
- [24] Guo H-T (郭海涛), Xin L (辛玲). Oxidation promotion of ascorbic acid in the cells and its mechanism. *Feed Review* (饲料博览), 2006(2): 24–27 (in Chinese)
- [25] Ha SB, Smith AP, Howden R, *et al.* Phytochelatin synthase genes from arabidopsis and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell*, 1999, **11**: 1153–1163
- [26] Kim DY, Bovet L, Kushnir S, *et al.* AtATM3 is involved in heavy metal resistance in arabidopsis. *Plant Physiology*, 2006, **140**: 922–932
- [27] Peng X-Y (彭向永), Chang B (常宝), Xu S-R (徐术人), *et al.* Effects of glutathione on alleviation of copper toxicity and its correlation with accumulation of nitrogen sulfur and phosphorus in wheat seedlings. *Journal of Agro-Environment Science* (农业环境科学学报), 2012, **31**(5): 867–873 (in Chinese)

作者简介 丁继军,男,1987年生,硕士研究生.主要从事植物生长调节研究. E-mail: dingjijun20062072@126.com

责任编辑 肖红
