

外源 NO 对镉胁迫下长春花质膜过氧化 ATP 酶活性及光合特性的影响

刘柿良, 杨容子*, 潘远智**, 丁继军, 何 杨, 王 力

(四川农业大学风景园林学院, 成都 611130)

摘 要: 为了解镉胁迫下外源 NO 对地被植物生理响应的调控机制, 采用盆栽试验研究了外源 NO(SNP)对镉胁迫下长春花幼苗生长、活性氧代谢、质膜 ATP 酶活性及光合特性的影响。结果表明, 外施 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 能缓解 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 镉胁迫对长春花幼苗生长的抑制, 增加叶长、叶宽、株高、基径和生物量。与镉胁迫相比, 施用 SNP 能够降低叶片和根系中丙二醛(MDA)、过氧化氢(H_2O_2)含量和过氧根离子自由基($\text{O}_2 \cdot$)产生速率, 提高过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及还原型谷胱甘肽(GSH)含量。SNP 能显著缓解镉胁迫对叶绿素 a(Chla)、叶绿素 b(Chlb)和总叶绿素的抑制, 提高叶片净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、蒸腾速率(T_r)和气孔限制值(L_s), 降低胞间 CO_2 浓度(C_i)和瞬时光能利用效率(LUE)。同时, 外源 NO 能诱导叶片和根系中质膜 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性提升到正常水平(对照)。但外施 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NO 分解产物 NaNO_x 或 SNP 相似物 $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 对镉胁迫则无明显缓解作用。因此, 外源 NO 可通过提高活性氧清除能力, 增加叶绿素含量, 增强质膜 ATP 酶活性, 从而提高叶肉细胞光合能力, 加强离子跨膜运输和信号转导, 缓解镉胁迫对细胞质膜的损伤。

关键词: 一氧化氮; 镉胁迫; 长春花; 抗氧化系统; ATP 酶; 光合作用

中图分类号: X503.23 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)12-2360-09 doi:10.11654/jaes.2013.12.008

Effects of Exogenous Nitric Oxide on Lipid Peroxidation and ATPase Activity in Plasma Membrane and Photosynthetic Characteristics of *Catharanthus roseus* Under Cadmium Stress

LIU Shi-liang, YANG Rong-jie*, PAN Yuan-zhi**, DING Ji-jun, HE Yang, WANG Li

(Landscape Architecture College of Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: Ornamental plant *Catharanthus roseus* is an important landscaping and anticancer drug source plant that widely grows in the city gardens and on the roadsides in China. A controlled pot-experiment was carried out to investigate the effects of exogenous nitric oxide(NO) supplied with the sodium nitroprusside(SNP, an exogenous NO donor) on growth, photosynthetic characteristics, and the reactive oxygen metabolism and ATPase activity in plasma membrane of *Catharanthus roseus* tissues under cadmium stress. The results showed that addition of $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ exogenous SNP alleviated the inhibitory effects of $25 \text{ mgCd} \cdot \text{kg}^{-1}$ on the growth of *C. roseus* seedlings, increased the leaf length and width, plant height, basal diameter and biomass(fresh and dry weight) of the plants. Applying SNP decreased the contents of malondialdehyde(MDA), hydrogen peroxide(H_2O_2), and glutathione(GSH) and the production rate of superoxide anion radical($\text{O}_2 \cdot$), but significantly promoted the activities of catalase(CAT), peroxidase(POD) and superoxide dismutase(SOD) in the leaves and roots compared with no SNP treatment. Also, SNP supply alleviated the Cd inhibitory effects on chlorophyll a(Chla), chlorophyll b(Chlb) and total chlorophyll, increased the net photosynthetic rate(P_n), stomatal conductivity degrees(G_s), transpiration rate(T_r) and stomatal limit value(L_s), and decreased the intercellular CO_2 concentration(C_i) and instantaneous light use efficiency(LUE). Furthermore, exogenous NO elevated H^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase activities of plasma membrane in the leaves and roots to the levels without Cd stresses. However, applying 100

收稿日期: 2013-04-12

基金项目: 四川农业大学“211 工程”双支计划项目资助

作者简介: 刘柿良(1986—), 男, 四川南充人, 博士研究生, 主要从事植物生理生态和栽培应用研究。E-mail: liushiliang9@163.com

* 同等贡献作者。

** 通信作者: 潘远智 E-mail: scpyzls@163.com

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium nitrate or nitrite(the decomposition products of NO) or the same concentration of sodium ferrocyanide(an analog of SNP) had no significant alleviating effects on cadmium stress. These results suggest that exogenous NO could mitigate Cd damages to the cell membrane of *C. roseus* seedlings via scavenging reactive oxygen species, increasing chlorophyll contents and promoting ATPase activity in the plasma membrane.

Keywords: nitric oxide; cadmium stress; *C. roseus*; antioxidant system; ATPase; photosynthesis

镉(Cd)是植物生长发育的非必需元素,因具有较高的移动性和水中溶解性,极小浓度即可产生较大危害,被视为是对环境和人类健康最具威胁的重金属之一^[1]。据报道,Cd 能干扰植物代谢,抑制生长^[2];诱导活性氧(ROS)产生,扰乱抗氧化系统^[3];干扰叶绿素合成,导致光合速率下降;增强质膜透性,影响对营养元素的吸收、分配^[2]。近年来,国内外对如何解除或缓解重金属胁迫越来越重视。一氧化氮(NO)是一种氧化还原信号分子,也是一种活性氮(RNS)。大量研究证实,外源 NO 可参与植物对 Cd 胁迫的应答。Cd 胁迫下,NO 可缓解苜蓿(*Medicago truncatula*)^[4]、黑麦草(*Lolium perenne*)^[2]质膜过氧化,降低活性氧水平,增强 ATP 酶活性,减少羽扇豆(*Lupinus luteus*)细胞程序性死亡(PCD)^[5],减轻小麦(*Triticum aestivum*)^[6]等幼苗伤害。但目前对 NO 在 Cd 胁迫的作用机理了解不多,在园林植物上的研究报道甚少。

重金属污染土壤的植物修复中,通常采用的超富集植物生长缓慢、重金属迁移量较小且景观价值不高,仅适合作重金属抗性机理的理论研究^[7],不适宜城市大面积污染土壤的修复。而园林地被花卉植物具有个体小、种类多、生长快等特点,生长一段时间后即被整株移出,不会造成土壤二次污染。若能从繁多的花卉资源中筛选出修复重金属污染土壤具有重要作用的植物,将为植物修复开辟新途径。长春花(*Catharanthus roseus*)是我国广泛栽培的多年生草本花卉植物,不仅可作城市节约型园林绿化,而且因其体内含有多具抗癌活性的生物碱,已成为国际上研究和应用最多的抗癌植物药源^[8]。目前对长春花的研究主要集中在生物半合成^[8-9]、盐分胁迫^[10]及 Cd 对离体细胞作用^[11]等方面,而关于外源 NO 缓解土壤 Cd 胁迫的研究还尚未见报道。因此,本研究以长春花(*C. roseus*)为材料,采用盆栽试验研究 Cd 胁迫对长春花质膜过氧化、ATP 酶活性及光合特性的影响,探讨外源 NO 缓解长春花 Cd 胁迫的机制,以期为在地被花卉植物中筛选出 Cd 污染的修复植物提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试长春花由成都市郫县静菊花木服务有限公司提供,发酵土由温江区花木交易中心提供。

1.2 试验方法

2012 年 4—5 月,在温江区周边取未开垦的自然土壤(不含腐叶根),采样范围为土壤表层 0~20 cm。自然风干、捣碎、剔除杂物,研磨,过 5 mm 筛,按照 1:1 比例将发酵土和自然土壤均匀混合成种植土,并用适量多菌灵消毒,堆积静置 45 d。然后将种植土(干土)按照每盆 8 kg 的标准装入带托盘塑料花盆(下口径 20 cm,上口径 30 cm,深 25 cm)中备用。种植土基本理化性质为:pH 值为 6.5,有机碳(C)38.75 g·kg⁻¹,全氮(N)0.73 g·kg⁻¹,全磷(P)0.52 g·kg⁻¹,全钾(K)3.28 g·kg⁻¹,总 Cd 为 0.475 mg·kg⁻¹。

2012 年 5 月 18 日,将装有种植土的塑料花盆置于四川农业大学成都校区实验基地大棚[透光率为 80%;大棚内外温度接近,为(25±3)℃;相对湿度为 78%]内,用清水(不含 Cd 等干扰物质)控制土壤含水量为田间持水量的 60%。选取生长健壮且长势一致的盆栽长春花,除去原有土,剪除损伤的烂根、叶,操作时不损伤根系。再用清水小心冲洗,每盆栽植 3 株,种植深度 1.5~2 cm。养护管理期间,视植物生长情况浇水,并保持土壤湿度基本一致。为避免其他物质影响结果,试验中不喷施农药与追施化肥。

植物恢复生长后,于 2012 年 5 月 25 日开始进行预实验。首先设系列 Cd(0、5、10、25、50、100 mg·kg⁻¹)浓度梯度,于每盆中添加 CdCl₂·2.5H₂O,添加方法为以分析纯 CdCl₂·2.5H₂O 与蒸馏水配制成约 300 mL 溶液均匀施入相应塑料盆中(渗出液反复回收浇灌,直到 Cd 离子与土壤均匀混合)。试验 15 d 后,根据幼苗相对生长速率^[4]筛选出适宜的 Cd 胁迫处理浓度。2012 年 6 月 20 日,在选出的适宜胁迫浓度处理液中加入外源 NO 供体硝普钠([Na₂Fe(CN)₅]·NO,SNP),按系列 SNP(0、25、50、100、200、400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度梯

度均匀施入相应塑料盆中(渗出液反复回收浇灌,直到 Cd^{2+} 与土壤均匀混合)。15 d 后,根据幼苗相对生长速率筛选出 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为 SNP 进一步处理浓度。每处理 3 次重复。

SNP 除了产生 NO 外,还会生成 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 和 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 等^[12]。因此,设定 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{NaNO}_2/\text{NaNO}_3$ (NaNO_x) 和 $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 处理作为试验相关对照。2012 年 7 月 16 日,进行 NO 对 Cd 胁迫的缓解试验,4 个处理分别为:对照(CK); $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ (T1); $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+} + 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP (T2); $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+} + 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaNO}_x$ (T3); $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+} + 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (T4)。在 Cd 处理对生长表现明显抑制时,处理 15 d 后取根系和倒数第 2 片全展叶进行各项指标测定。每处理 3 次重复。

1.3 测定方法

1.3.1 生长指标和生物量的测定

用游标卡尺和直尺分别测量基径、株高、叶长和叶宽。鲜样先用自来水冲洗 2~3 次,再用蒸馏水冲洗 2 次,用吸水纸吸干后称量鲜重, 105°C 杀青 30 min 后在 80°C 烘箱内烘干 48 h 后称干量。

1.3.2 光合特性指标及相对生长速率的测定

利用 Li-6400 便携式光合测定仪(Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) 的开放气路, CO_2 钢瓶将参比室的 CO_2 浓度稳定在 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, 空气流速为 $0.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, 叶室温度控制在 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 相对湿度 $(60 \pm 5)\%$ 。测定前将待测叶片在 $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 饱和光强下诱导 30 min, 使叶片充分光适应。对不同处理下随机选取充分受光、叶位一致的连体叶片的净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)、气孔导度(G_s)和胞间 CO_2 浓度(C_i)进行测定,同时记录 PPFD 和大气 CO_2 浓度(C_a), 并据此计算气孔限制值 $L_s = 1 - C_i/C_a$ 和瞬时光能利用效率(Light use efficiency, LUE) $\text{LUE} = P_n / \text{PPFD}$ 。测定时间为 9:00—11:30。

光合参数测定后,参照 Lichtenthaler 等^[13]的方法测定叶绿素 a(Chla)、叶绿素 b(Chlb)。每个处理下随机选取 5 株完整幼苗,取出洗净并在 105°C 杀青 30 min 后在 80°C 烘箱内烘干 48 h 后称量。根据第 5 d 和第 15 d 植株总生物量统计数据,计算其相对生长速率:

$$\text{RGR} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (T_2 - T_1)。$$

式中: W_1 和 W_2 分别表示前、后两次收获时的总生物量; $(T_2 - T_1)$ 表示测量间隔时间。

1.3.3 丙二醛、活性氧产生量和抗氧化物质的测定

过氧化氢(H_2O_2)和丙二醛(MDA)含量采用李合生等^[14]的方法测定; O_2^- 产生速率测定采用 Elstner 和 Heupel^[15]的方法; 过氧化氢酶(CAT)活性采用紫外吸收法, 过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法, 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法, 测定过程参照李合生等^[14]的方法; 还原型谷胱甘肽(GSH)含量参照 Nagalakshmi 和 Prasad^[16]的方法, 采用巯基试剂 DTNB 测定。

1.3.4 质膜 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性的测定

质膜分离参照 Wang 和 Sze^[17]的方法并略作改动。取 2.0 g 鲜样加入 2 倍(W/V)体积预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)[Hepes-Tris $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值为 7.6, 甘露醇 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, EGTA $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 乙二胺四乙酸(EDTA) $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 苯甲基磺酰氟(PMSF) $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1.5% PVP, 0.5% 牛血清蛋白, 抗氧化剂 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ $5.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 二硫苏糖醇(DTT) $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$], 冰浴研磨。研磨液经 4 层纱布过滤, 滤液 $13\ 000 \times g$ 离心 30 min, 取上清液 $60\ 000 \times g$ 离心 30 min, 弃上清液, 沉淀悬浮于 1.0 mL 悬浮 PBS (Hepes-Tris $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值为 7.6, 甘露醇 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, EDTA $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, DTT $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中, 置于不连续梯度蔗糖(45%、36% 和 22%) 中, 经 $70\ 000 \times g$ 离心 2 h, 36% 和 45% 间带溶液为质膜微囊, 取出测定 ATPase 活性。

质膜 H^+ -ATPase 活性测定采用 Wang 和 Sze 方法^[17]; 质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性测定参照缪颖等^[18]的方法。

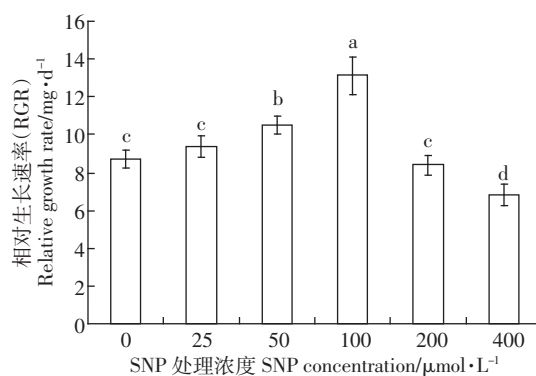
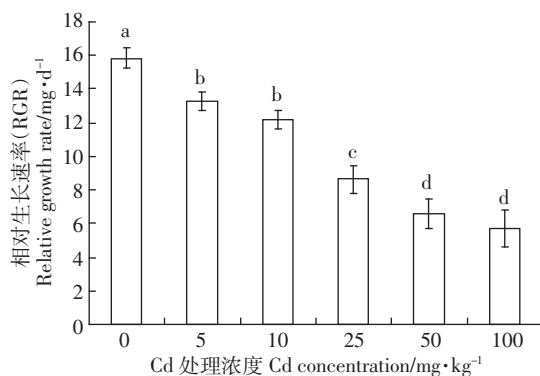
1.4 数据分析

数据采用 SPSS 17.0 软件统计分析, 单因素方差检验(One-way ANOVA)和最小显著性差异法(LSD)检验, Microsoft Excel 2003 制表作图。显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗生长的影响

图 1 显示, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd 胁迫显著抑制长春花生长($P < 0.05$), RGR 比 CK 处理分别降低 16.16% 和 22.82%。Cd 胁迫浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, RGR 比 CK 处理降低 45.32%。此时, Cd 对植物生长造成了严重抑制, 但能表现出重金属抗性^[19]。故选用 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为 Cd 胁迫的处理浓度。同时, 在 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd 胁迫下, 长春花 RGR 随着 SNP 处理浓度的增大先升后降。较低浓度 SNP ($\leq 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理缓解 Cd 胁迫对植物生长抑制, RGR 随 SNP 浓度增大而升



不同小写字母表示在不同处理之间差异显著 ($P < 0.05$)

Different small letters indicate significant differences among treatments at 0.05 level. The same below

图 1 不同浓度 Cd 胁迫及 25 mg·kg⁻¹ 胁迫下不同浓度 SNP 处理对长春花幼苗相对生长速率的影响

Figure 1 Relative growth rates of *C. roseus* seedlings under different Cd levels and different SNP rates at 25 mg·kg⁻¹ Cd stress

高。当 SNP 浓度为 100 μmol·L⁻¹ 时, RGR 升高到最大值。故选用 100 μmol·L⁻¹ SNP 探讨 NO 对长春花 Cd 毒害的缓解效应。

25 mg·kg⁻¹ Cd 胁迫下长春花叶长、叶宽、株高、基径和鲜重、干重较 CK 处理显著下降(表 1), 表明 Cd 胁迫明显抑制了幼苗生长。添加 100 μmol·L⁻¹ SNP 处理(T2)能够缓解 Cd 胁迫对幼苗生长的抑制, 叶长、叶宽、株高和基径比 Cd 胁迫处理(T1)分别提高了 4.53%、5.16%、8.53% 和 3.63%, 鲜重、干重比 Cd 胁迫处理分别提高 11.32%、46.77%, 且达到了显著水平。而外施 100 μmol·L⁻¹ NaNO_x(T3)或 Na₃Fe(CN)₆(T4)不能明显缓解 Cd 胁迫对幼苗生长的抑制, T4 处理下叶长较 T1 下降 1.02%, 干重在 T3 和 T4 处理下比 T1 分别提高 9.85%、11.69%。

2.2 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗质膜过氧化的影响

与 CK 处理相比, 25 mg·kg⁻¹ Cd 胁迫加深细胞损伤程度, 显著提高活性氧水平(图 2), 幼苗叶片和根系中 MDA、H₂O₂ 含量及 O₂⁻ 产生速率明显升高。外施 100 μmol·L⁻¹ SNP 后, MDA、H₂O₂ 含量和 O₂⁻ 产生速

率降至正常水平 ($P < 0.05$), 质膜过氧化得到缓解。外施 100 μmol·L⁻¹ NaNO_x 或 Na₃Fe(CN)₆ 明显降低 Cd 胁迫下幼苗叶片、根系 H₂O₂ 含量和 O₂⁻ 产生速率及根系中 MDA 含量, 但未能显著降低叶片内的 MDA 含量 ($P > 0.05$)。相关分析表明(表 3), MDA、H₂O₂、O₂⁻ 相互间均极显著正相关 ($P < 0.01$)。

2.3 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗活性氧清除系统的影响

由表 2 可知, 25 mg·kg⁻¹ Cd 胁迫显著降低幼苗叶片和根系内 CAT、SOD 活性, 外施 100 μmol·L⁻¹ 的 SNP 处理能显著提高 Cd 胁迫下幼苗叶片和根系中 CAT、SOD 活性。Cd 胁迫下, 幼苗叶片和根系中 POD 活性显著升高, 添加 SNP 后叶片中 POD 活性进一步升高, 而根系明显降低; GSH 含量与 POD 活性在叶片中具有相似的变化趋势。Cd 胁迫下, 根系中 GSH 含量比 CK 处理降低 28.28%, 外施 SNP 使 GSH 含量比 Cd 胁迫处理提高 84.98%。然而, 外施 100 μmol·L⁻¹ NaNO_x 或 Na₃Fe(CN)₆ 并未显著影响 Cd 胁迫下幼苗酶活性, 仅显著影响根系中 GSH 含量。由表 3 可知, SOD 与 CAT、GSH 极显著正相关 ($P < 0.01$), 与 POD 无显著相

表 1 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗生长的影响

Table 1 Effects of exogenous NO on the plant growth of *C. roseus* seedlings under Cd stresses

处理 Treatment	叶长 Leaf length/cm	叶宽 Leaf width/cm	株高 Plant height/cm	基径 Basal diameter/mm	鲜重 Fresh weight/g	干重 Dry weight/g
CK	9.36±0.03a	3.34±0.05a	27.62±0.23a	8.37±0.16a	26.77±0.59a	5.69±0.26a
T1	8.83±0.05c	3.10±0.02b	24.02±0.50c	7.98±0.05b	22.88±0.12c	3.25±0.11d
T2	9.23±0.03b	3.26±0.08a	26.07±0.40b	8.27±0.04a	25.47±0.42b	4.94±0.19b
T3	8.89±0.01c	3.15±0.04b	24.68±0.54c	8.10±0.03b	23.21±0.03c	3.57±0.19c
T4	8.74±0.08d	3.12±0.03b	24.08±0.08c	8.13±0.03b	23.13±0.03c	3.63±0.78c

注: 表中数值为平均值±标准误差。不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Note: Data are means±SE. Different small letters indicate significant differences among treatments at 0.05 level. The same below.

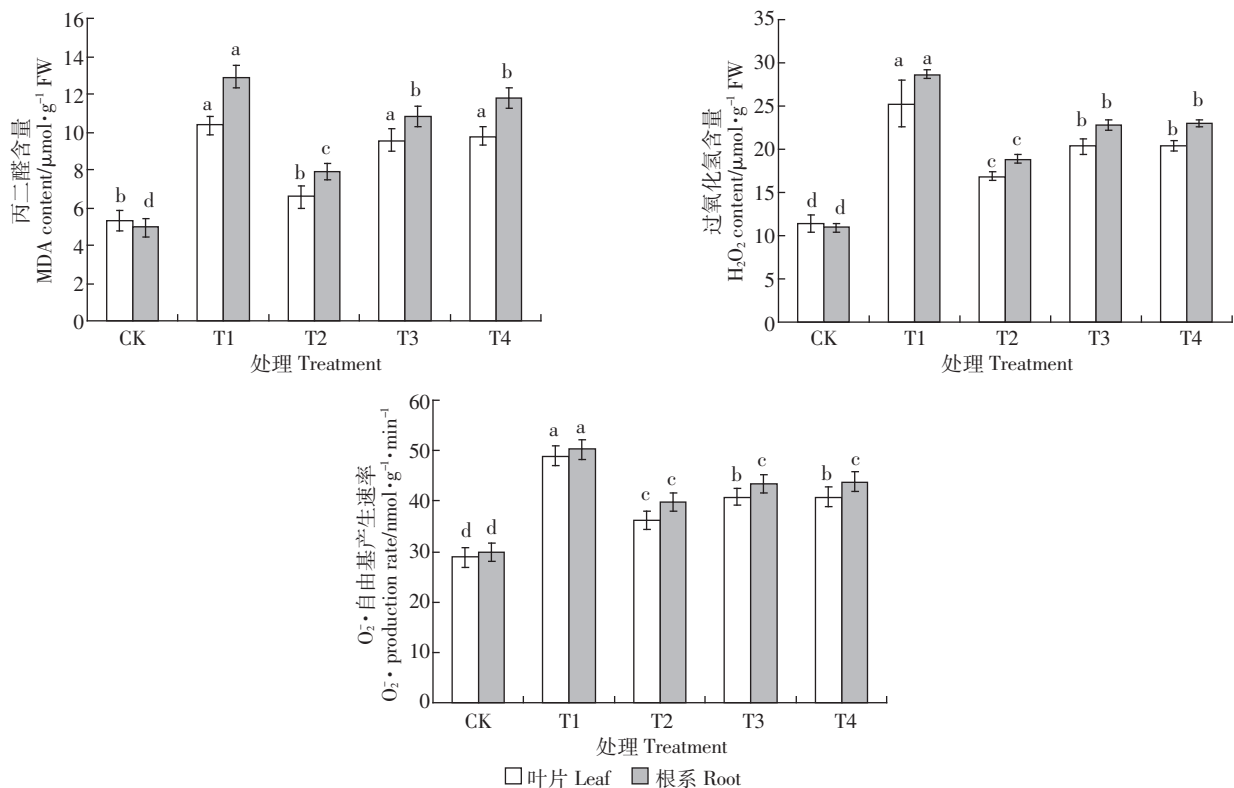


图 2 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗 MDA、H₂O₂ 含量和 O₂·⁻ 产生速率的影响
Figure 2 Effects of exogenous NO on MDA, H₂O₂ contents and O₂·⁻ production rates of *C. roseus* seedlings under Cd stresses

表 2 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花抗氧化酶活性和抗氧化物质含量的影响
Table 2 Effects of exogenous NO on antioxidant enzymes and antioxidant contents of *C. roseus* under Cd stresses

植物器官 Plant organs	处理 Treatment	CAT 活性 CAT activity/ Unit·g ⁻¹ ·min ⁻¹ FW	POD 活性 POD activity/ Unit·g ⁻¹ ·min ⁻¹ FW	SOD 活性 SOD activity/ Unit·g ⁻¹ FW	GSH 含量 GSH content/ μmol·g ⁻¹ FW
叶片 Leaf	CK	29.82±1.98a	184.76±16.73c	36.43±1.57a	1.98±0.12c
	T1	23.35±1.96b	223.35±19.06b	23.35±1.96b	2.35±0.06b
	T2	31.89±2.51a	291.89±12.50a	35.23±3.63a	2.74±0.20a
	T3	24.14±1.40b	226.48±16.87b	26.52±3.12b	2.18±0.19bc
	T4	26.35±1.12b	226.36±10.12b	27.69±1.94b	2.42±0.13b
根系 Root	CK	34.97±1.18a	168.97±13.14c	46.76±3.17a	2.97±0.04c
	T1	26.01±3.06b	324.17±22.65a	34.25±3.68c	2.13±0.10d
	T2	36.54±1.57a	205.20±11.18b	41.87±1.05b	3.94±0.15a
	T3	26.48±2.09b	226.48±19.56b	36.48±2.09c	3.08±0.08bc
	T4	27.12±1.00b	293.79±23.09a	37.12±1.00c	3.22±0.13b

关性($P>0.05$);GSH 与 CAT 极显著正相关,与 POD 负相关。

2.4 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗叶绿素的影响

由表 4 可知,25 mg·kg⁻¹ Cd 胁迫显著降低 Chla、Chlb、Chl(a+b)和 Chl a/b,比 CK 处理分别下降 54.61%、48.10%、53.19% 和 12.61%。外施 100 μmol·L⁻¹ SNP 能显著缓解 Cd 胁迫对叶片 Chla、Chlb 和 Chl(a+b)抑制作用,提高 Chl a/b 值,与正常条件(CK)之间无显

著性差异($P>0.05$)。而外施 100 μmol·L⁻¹ 的 NaNO_x 或 Na₃Fe(CN)₆ 处理并未显著提高 Cd 胁迫处理下幼苗叶绿素含量和叶绿素 a/b 值。

2.5 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗叶片气体交换参数的影响

25 mg·kg⁻¹ Cd 胁迫对幼苗叶片气体交换参数和 LUE 影响显著(表 5)。T1 处理下, P_n 、 T_r 、 G_s 和 L_s 较 CK 处理分别下降 42.37%、49.85%、49.60%、44.83%, C_i 和

表 3 长春花幼苗丙二醛含量、活性氧和抗氧化物活性之间的相关性($n=30$)

Table 3 Correlation coefficients between MDA content, reactive oxygen species and antioxidant activity in *C. roseus* seedling($n=30$)

	MDA 含量 MDA content	H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content	O ₂ ^{·-} 产生速率 O ₂ ^{·-} production rate	CAT 活性 CAT activity	POD 活性 POD activity	SOD 活性 SOD activity	GSH 含量 GSH content
MDA 含量 MDA content	1.00						
H ₂ O ₂ 含量 H ₂ O ₂ content	0.943**	1.00					
O ₂ ^{·-} 产生速率 O ₂ ^{·-} production rate	0.924**	0.979**	1.00				
CAT 活性 CAT activity	-0.642**	-0.603**	-0.608**	1.00			
POD 活性 POD activity	0.608**	0.634**	0.598**	-0.306	1.00		
SOD 活性 SOD activity	-0.468**	-0.490**	-0.525**	0.780**	-0.231	1.00	
GSH 含量 GSH content	-0.101	-0.076	-0.032	0.576**	-0.101	0.576**	1.00

注:表中结果根据 5 个处理水平的数据计算。*, $P<0.05$ (双侧);**, $P<0.01$ (双侧)。下同。
Note: Results in the table are calculated based on data of five treatments. *, $P<0.05$ (bilateral); **, $P<0.01$ (bilateral). The same below.

表 4 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗叶片叶绿素含量的影响

Table 4 Effects of exogenous NO on chlorophyll contents in leaves of *C. roseus* seedlings under Cd stresses

处理 Treatment	叶绿素 a Chla/mg·g ⁻¹ FW	叶绿素 b Chlb/mg·g ⁻¹ FW	叶绿素 a+b Chl(a+b)/mg·g ⁻¹ FW	叶绿素 a/b Chl a/b
CK	2.82±0.06a	0.79±0.08a	3.61±0.11a	3.57±0.12a
T1	1.28±0.11b	0.41±0.03b	1.69±0.11b	3.12±0.21b
T2	2.73±0.10a	0.74±0.10a	3.47±0.19a	3.69±0.15a
T3	1.31±0.13b	0.43±0.05b	1.74±0.17b	3.05±0.03b
T4	1.46±0.20b	0.45±0.07b	1.91±0.26b	3.24±0.10b

表 5 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗叶片气体交换参数和瞬时光能利用效率的影响

Table 5 Effects of exogenous NO on gas exchange parameters and LUE in leaves of *C. roseus* seedlings under Cd stresses

处理 Treatment	$P_n/\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$T_r/\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$G_s/\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$C_i/\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	LUE/mm $\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$	L_s
CK	26.79±1.02a	6.88±0.04a	87.03±1.51a	192.70±15.26c	15.30±1.56c	0.29±0.01a
T1	15.44±1.18c	3.45±0.20b	43.86±1.49c	289.57±14.83a	32.91±2.66a	0.16±0.05b
T2	23.46±1.23b	6.64±0.34a	81.94±1.87b	204.77±16.44c	24.81±3.60b	0.27±0.03a
T3	15.85±1.79c	3.56±0.20b	46.36±1.44c	256.28±21.51b	21.28±1.99b	0.19±0.04b
T4	16.56±2.27c	3.53±0.22b	45.23±2.36c	245.08±21.54b	20.42±1.94b	0.17±0.03b

注: C_i 为胞间 CO₂ 浓度; G_s 为气孔导度; L_s 为气孔限制值;LUE 为瞬时光能利用效率; P_n 为净光合速率; T_r 为蒸腾速率。下同。

Note: C_i , intercellular CO₂ concentration; G_s , stomatal conductance; L_s , stomatal limitation; LUE, light use efficiency; P_n , net photosynthetic rate; T_r , transpiration rate.

LUE 比 CK 处理提高 50.27%、115.10%。而外施 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 下, P_n 、 G_s 、LUE 在 T2 与 CK 处理间差异显著, T_r 、 C_i 和 L_s 在两处理间无明显变化。T2 处理下, P_n 、 T_r 、 G_s 、 L_s 较 Cd 胁迫处理 (T1) 分别提高 51.94%、92.46%、86.82%、68.75%; C_i 和 LUE 比 T1 降低 29.28%、24.61%。Cd 胁迫下, 外施 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaNO_x 或 Na₃Fe(CN)₆ 对叶片 P_n 、 T_r 、 G_s 、 L_s 影响不显著 ($P>0.05$), 对 C_i 和 LUE 影响显著。同时, 外施 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP、NaNO_x 或 Na₃Fe(CN)₆ 下, 叶片 LUE 在三者间差异不显著。相关性分析可知(表 6), P_n 与 T_r 、 G_s 和 L_s 极显著正相关, 与 C_i 极显著负相关, 与 LUE 无显著相关性

表 6 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗叶片气体交换参数和瞬时光能利用效率之间的相关性($n=18$)

Table 6 Correlation coefficients between gas exchange parameters and LUE in seedling leaves of *C. roseus* under Cd stresses($n=18$)

	P_n	T_r	G_s	C_i	LUE	L_s
P_n	1.00					
T_r	0.954**	1.00				
G_s	0.954**	0.997**	1.00			
C_i	-0.841**	-0.833**	-0.831**	1.00		
LUE	-0.470	-0.408	-0.444	0.601*	1.00	
L_s	0.822**	0.845**	0.853**	-0.820**	-0.519*	1.00

($P>0.05$)。

2.6 外源 NO 对 Cd 胁迫下长春花幼苗质膜 ATPase 活性的影响

质膜 H^+ -ATPase 活性变化与植物细胞抗性的强弱紧密相关, Ca^{2+} -ATPase 能通过主动运输对胞内 Ca^{2+} 平衡起微调作用。图 3 显示, $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd 胁迫显著降低幼苗叶片和根系质膜 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性, 添加 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SNP 能使 ATPase 活性提高到正常水平(CK)。而外施 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaNO_3 或 $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 下, 叶片和根系质膜 H^+ -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase 活性较 Cd 胁迫处理无显著差异。

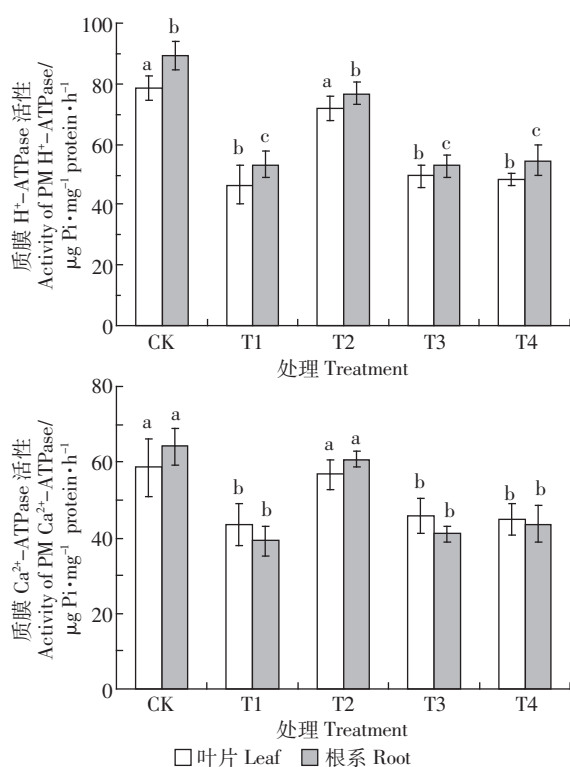


图3 不同 Cd 浓度处理对长春花质膜 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响

Figure 3 Effects of exogenous NO on H^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase activities in plasma membrane of *C. roseus* under Cd stresses.

3 讨论

质膜作为植物细胞与环境的交流界面,是重金属进入植物体引起胁迫响应的原初部位^[20]。研究表明, Cd 胁迫能抑制植物生长,干扰活性氧代谢^[21]。NO 可通过质外体直接作用使细胞壁松弛,提高膜的流动性和离子的选择性^[22],增强与外界信息交流和次生代谢产物区域化。试验中 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP 能够缓解 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd 胁迫对幼苗生长的抑制,生物量恢复到对

照水平(表 1),可能与 NO 阻断 $O_2^{\cdot-}$ 转变为过氧亚硝酸阴离子(ONOO^-)引发 PCD 有关^[23]。Cd 胁迫能诱导植物体内脂氧合酶和还原性辅酶 II(NADPH)氧化酶活性升高,导致 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 等积累^[24]。Panda 等^[25]发现, Cd 胁迫使水稻(*Oryza sativa*)MDA 积累, SNP 能提高 SOD、GR 活性,降低 CAT 活性,从而清除过量 H_2O_2 。也有研究表明, SNP 处理能提高黑麦草 CAT、POD 和 SOD 等活性,降低 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 积累^[2]。本研究中, Cd 胁迫提高叶片与根系 MDA、 H_2O_2 含量和 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率(图 2), CAT 和 SOD 活性受到抑制, POD 活性与 GSH 含量升高(表 2)。添加外源 SNP 能显著提高 Cd 胁迫下叶片和根系 SOD 活性,降低 H_2O_2 含量和 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率, Singh 等^[6]对 Cd 胁迫下小麦的研究也得到类似结果。这可能是 NO 作为抗性基因的信号分子,增强 SOD 编码基因 mRNA 表达量,诱导同工酶 Zn-SOD 表达的结果^[5]。同时, SNP 能够激活 Cd 胁迫下 CAT 活性(表 2),由于 NO 对含铁酶类(CAT、APX 等)有很高的亲和性^[2],能够诱导同工酶 CAT1 和 CAT2 的表达或调节 CAT 与细胞色素 C 氧化酶(COX)等含血红素铁酶类活性。研究中 GSH 含量升高是 NO 激活了 ASA-GSH 循环有效运转,可能是通过鸟苷酸环化酶(GC)介导催化三磷酸鸟苷(GTP)转化为鸟嘌呤核苷-3'(cGMP),与对苜蓿^[4]的研究结果一致。大量研究表明,外源 NO 能降低 Cd 胁迫下 POD 活性^[5,19],而本研究与此相悖的结果可能与处理的方式、浓度和时间等有关。而试验中,施用 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源 NaNO_3 或 $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 均未达到施加 SNP 的效果。

光合作用的强弱常被作为判断植物抗逆性大小的指标。Cd 胁迫下,幼苗叶片叶绿素含量下降;施用 SNP 能显著增加 Chla、Chlb 和 Chl(a+b)含量,提高 Chl a/b 值(表 4),表明 NO 有助于叶绿素含量的平衡,可能因为 NO 能够促进 Cd 胁迫下类囊体膜蛋白复合体的组装和稳定^[26],增强叶绿体对光能的吸收和利用能力。同时, Farquhar 和 Sharkey^[27]认为,可以用 C_i 和 L_s 判断 G_s 变化是否是光合速率变化的主因。如果 C_i 和 P_n 变化方向相同且减少, L_s 增大,认为光合速率的下降主要是气孔导度的降低;如果 P_n 下降, C_i 上升, L_s 减小,认为光合速率变化的决定因素是叶肉细胞的光合活性,而非气孔导度^[26]。试验中, P_n 和 L_s 在 Cd 胁迫下显著下降, C_i 升高(表 5); P_n 与 C_i 极显著负相关,与 L_s 极显著正相关(表 6),表明光合作用的下降是非气孔因素。LUE 的提高是因为非光化学猝灭系数(NPQ)

升高,NPQ 的主要成分状态转换(qT)能将激发能在 PSI 和 PSII 间平衡分配,这也表明幼苗叶片在 Cd 胁迫下耗散过剩能量具有叶黄素循环的途径(将另文发表)。而外施 SNP 提高叶片 P_n 、 G_s 和 T_r ,降低 C_i 和 LUE,说明 NO 对 Cd 诱导的光合活性下降具有缓解作用,能够提高 Cd 胁迫下叶肉细胞的光合能力,这与刘建新等^[19]研究外源 NO 供体对镉胁迫下黑麦草(*L. perenne*)幼苗光合作用的影响结果一致。本研究表明(表 5),施用 NaNO_3 或 $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 与施加 SNP 对叶片 LUE 具有同样的变化趋势($P>0.05$),其原因有待进一步研究。

质膜 H^+ -ATPase 活性变化与植物细胞抗性强弱紧密相关, Ca^{2+} -ATPase 能通过主动运输对胞内 Ca^{2+} 平衡起微调作用。Cd 胁迫降低幼苗叶片和根系质膜 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性(图 3),改变膜组成和流动性,干扰电荷平衡和 H^+ 流动^[21];使跨膜电势梯度和细胞酸度失衡,降低细胞壁酸化能力从而影响跨膜运输,这可能与胞内 Ca 调素(CaM)有关。Cd 胁迫造成胞内 Ca^{2+} 水平上升,同时由于 CaM 含量下降导致质膜 Ca^{2+} -ATPase 活性下降,高水平的 Ca^{2+} 无法有效泵出细胞,于是通过信号传导降低质膜 H^+ -ATPase mRNA 的转录水平,导致活性下降^[28]。Cui 等^[29]研究发现,NO 能够诱导提高 H^+ -ATPase 的活性,可能因为 Cd 胁迫下增加了对 Ca 和 Mg 等元素的吸收。本研究添加 SNP 能使叶片和根系质膜 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性提高到正常水平(CK),这主要是通过 ATPase 的水解产生大量质子并泵出细胞质,提高介质 H^+ 的浓度,降低介质 pH 值造成的,这与 Wang 等^[19]的研究结果一致。

4 结论

本研究表明,25 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd 胁迫抑制长春花幼苗的生长,诱导质膜过氧化,干扰活性氧代谢,增加质膜透性,影响光合作用。外施适宜浓度 NO(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP)可以缓解 Cd 对长春花的毒害作用,其可能机理为:(1) 通过提高 Cd 胁迫下抗氧化酶(CAT、SOD、POD)活性和提高抗氧化物质(GSH 等)含量,消除或平衡细胞中的活性氧水平;(2) 增加 Cd 胁迫下叶绿素的含量,提高叶肉细胞的光合能力;(3) 增强质膜 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性,加强离子跨膜运输和 Ca^{2+} 信号转导,保护 Cd 胁迫对细胞质膜的伤害。

参考文献:

- [1] Zhao F J, Ma J F, Meharg A A, et al. Arsenic uptake and metabolism in plants[J]. *New Phytologist*, 2009, 181:777-794.
- [2] Wang Q H, Liang X, Dong Y J, et al. Effects of exogenous nitric oxide on cadmium toxicity, element contents and antioxidative system in perennial ryegrass[J]. *Plant Growth Regulation*, 2013, 69:11-20.
- [3] Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, et al. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43:437-444.
- [4] Xu J, Wang W Y, Yin H G, et al. Exogenous nitric oxide improves antioxidant capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress[J]. *Plant and Soil*, 2010, 326:321-330.
- [5] Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Deckert J, et al. Nitric oxide implication in cadmium-induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 58:124-134.
- [6] Singh H P, Batish D R, Kaur G, et al. Nitric oxide(as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2008, 63:158-167.
- [7] 刘俊祥,孙振元,勾 萍,等. 镉胁迫下多年生黑麦草的光合生理响应[J]. 草业学报, 2012, 21(3):191-197.
LIU Jun-xiang, SUN Zhen-yuan, GOU Ping, et al. Response of photosynthetic physiology of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) to Cd^{2+} stress[J]. *Acta Prataculture Sinica*, 2012, 21(3):191-197.
- [8] Mujib A, Ilah A, Aslam J, et al. *Catharanthus roseus* alkaloids: Application of biotechnology for improving yield[J]. *Plant Growth Regulation*, 2012, 68:111-127.
- [9] Olivia G, Audrey O, Gégory G, et al. A type-B response regulator drives the expression of the hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase gene in periwinkle[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169:1571-574.
- [10] Cartmill A D, Valdez-aguilar L A, Cartmill D L, et al. Arbuscular mycorrhizal colonization does not alleviate sodium chloride-salinity stress in Vinca[*Catharanthus roseus* (L.) G. Don][J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2013, 36:164-178.
- [11] Zheng Z, Wu M. Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*[J]. *Plant Science*, 2004, 166:507-514.
- [12] Delledonne M, Xia Y, Dixon R A, et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance[J]. *Nature*, 1998, 394:585-588.
- [13] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes[J]. *Methods in Enzymology*, 1987, 148:350-382.
- [14] 李合生,孙 群,赵世杰. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000:125-128.
LI He-sheng, SUN Qun, ZHAO Shi-jie. Theory and technique of plant physiological and biochemical experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000:125-128.

- [15] Elstner E F, Heupel A. Inhibition of nitrite formation from hydroxyl ammonium-chloride: A simple assay for superoxide dismutase[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 70: 616–620.
- [16] Nagalakshmi N, Prasad M N V. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus* [J]. *Plant Science*, 2001, 160: 291–299.
- [17] Wang Y, Sze H. Similarities and differences between the tonoplast-type and the mitochondrial H^+ -ATPase of oat roots[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260: 10434–10443.
- [18] 缪颖, 曹家树, 将有条, 等. 大白菜干烧心病发生过程中 Ca^{2+} -ATPase 活性的变化[J]. 园艺学报, 1998, 25(1): 51–55.
MIAO Ying, CAO Jia-shu, JIANG You-tiao, et al. Changes of Ca^{2+} -ATPase activity in inner leaves during the development of tipburn in Chinese cabbage[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1998, 25(1): 51–55.
- [19] 刘建新, 胡浩斌, 王鑫. 外源一氧化氮供体对镉胁迫下黑麦草幼苗活性氧代谢、光合作用和叶黄素循环的影响[J]. 环境科学学报, 2009, 29(3): 626–633.
LIU Jian-xin, HU Hao-bin, WANG Xin. Effects of an exogenous nitric oxide donor on active oxygen metabolism, photosynthesis and the xanthophyll cycle in Ryegrass (*Lolium perenne* L.) seedlings under cadmium stress[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(3), 626–633.
- [20] Hiroaki K, Kazuaki, Hirokazu A, et al. Cadmium sorption to plasma membrane isolated from barley roots is impeded by copper association onto membranes[J]. *Plant Science*, 2011, 180: 300–305.
- [21] Janicka-Russak M, Kabała K, Burzyński M. Different effect of cadmium and copper on H^+ -ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63: 4133–4142.
- [22] Leshem Y Y, Hamaraty E. Plant aging: The emission of NO and ethylene and effect of NO-releasing compounds on growth of pea (*Pisum sativum*) foliage[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1996, 148: 258–263.
- [23] Kelm M, Schfer S, Dahmann R, et al. Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation[J]. *Cardiovascular Research*, 1997, 36: 185–194.
- [24] Shah K, Kumar R G, Verma S, et al. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings[J]. *Plant Science*, 2001, 161: 1135–1144.
- [25] Panda P, Nath S, Chanu T T, et al. Cadmium stress-induced oxidative stress and role of nitric oxide in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33: 1737–1747.
- [26] Gutiérrez D, Gutiérrez E, Pérez P, et al. Acclimation to future atmospheric CO_2 levels increases photochemical efficiency and mitigates photochemistry inhibition by warm temperatures in wheat under field chambers[J]. *Physiologia Plantarum*, 2009, 137: 86–100.
- [27] Farquhar G D, Sharkey T D. Stomatal conductance and photosynthesis [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1982, 33: 317–345.
- [28] Wdowikowska A, Kłobus G. Plant P-type ATPases[J]. *Postepy Biochemistry*, 2011, 57: 85–91.
- [29] Cui X M, Zhang Y K, Wu X B, et al. The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants[J]. *Plant, Soil and Environment*, 2010, 6: 274–281.