

外源 AsA 对土壤重金属镉胁迫下石竹(*Dianthus chinensis*)幼苗生长的影响

丁继军^{1,2}, 潘远智^{1*}, 刘柿良¹, 何 杨¹, 王 力¹, 李 丽³

(1.四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:为探讨外源抗坏血酸(AsA)对土壤重金属镉(Cd)胁迫下石竹(*Dianthus chinensis*)幼苗生长的影响,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 AsA 处理对 50 mg·kg⁻¹ 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,≤40 mg·L⁻¹ 的外源 AsA 可显著缓解 Cd 胁迫,石竹幼苗的生物量、株高、分蘖数、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)、谷胱甘肽还原酶(GR)的活性,AsA 和谷胱甘肽(GSH)的含量都显著高于 Cd 胁迫下石竹幼苗,而细胞膜透性、地上部 Cd 含量的产生速率以及 H₂O₂ 的积累量则显著低于 Cd 胁迫下石竹幼苗;但随着外源 AsA 喷施浓度的增加,缓解效应下降,甚至产生促氧化效应。综合试验各因素表明,35~45 mg·L⁻¹ 的外源 AsA 对石竹幼苗受到的 Cd 毒害缓解效果较佳。

关键词:土壤;石竹幼苗;AsA;镉胁迫;缓解效果

中图分类号:X503.233 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)08-1520-09 doi:10.11654/jaes.2013.08.005

Effects of Exogenous AsA on the Growth of *Dianthus chinensis* Seedlings Under Soil Cd Stress

DING Ji-jun^{1,2}, PAN Yuan-zhi^{1*}, LIU Shi-liang¹, HE Yang¹, WANG Li¹, LI Li³

(1.College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2.The Three Gorges Industrial Co., Ltd., Yichang 443002, China; 3.College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: In order to investigate alleviating effects of exogenous ascorbic acid(AsA) for *Dianthus chinensis* seedlings suffering cadmium stress, a greenhouse pot experiment was conducted to explore the effects of different concentrations(0, 20, 40, 60, 80 mg·L⁻¹ and 100 mg·L⁻¹) of exogenous AsA on the growth of *Dianthus chinensis* seedlings. Cd(50 mg·kg⁻¹) significantly inhibited the growth of *Dianthus chinensis* seedlings. Spraying exogenous AsA(≤40 mg·L⁻¹) markedly alleviated the stress effect of Cd. Exogenous AsA significantly increased the activities of the catalase(CAT), peroxidase(POD), ascorbate peroxidase(APX), monodehydroascorbate reductase(MDAR), dehydroascorbate reductase(DHAR) and glutathione reductase(GR). Compared with *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress, exogenous AsA also significantly increased the biomass, plant height, number of tillers, and the contents of AsA and GSH. Exogenous AsA markedly reduced the cell membrane permeability, the shoots Cd content, production rates and accumulative amount of H₂O₂. However, the alleviating effect of exogenous AsA was showed as quadratic curve. With higher concentration, the exogenous AsA showed pro-oxidant effects. The present study indicated that the optimal concentration of exogenous AsA was 35~45 mg·L⁻¹ to alleviate the Cd stress.

Keywords: soil; *Dianthus chinensis* seedlings; AsA; Cd stress; alleviating effect

随着工业化与城市化进程的加快,城市及城郊地区土壤中重金属含量不断增加,土壤重金属污染日益

成为国际范围内最重要的生态与环境问题之一^[1]。镉(Cd)对植物具有很强的生理毒害作用,影响植物的光合作用、呼吸作用、氮同化作用等,抑制植物生长,严重时甚至导致植株死亡^[2]。Cd 污染土壤后容易被植物根系吸收并在体内累积,当超过一定浓度时就会产生植物毒害效应^[3-5]。目前,世界各国城市土壤都存在不同程度的 Cd 污染^[2],城市地被观赏植物将难免生长在 Cd 污染的土壤中。石竹(*Dianthus chinensis*)是

收稿日期:2013-01-18

基金项目:四川农业大学双支计划

作者简介:丁继军(1987—),男,四川眉山人,硕士研究生,主要从事园林植物生理生态与栽培繁殖的研究。

E-mail:dingjijun20062072@126.com

* 通信作者:E-mail:潘远智 E-mail:scpyzls@163.com

多年生草本植物,是中国传统名花之一,观赏价值较高,生物量较大且易繁殖、易养护,在园林上应用广泛。因此,探索缓解石竹 Cd 毒害的途径具有重要意义。

近年来,许多学者研究了矿物质元素、植物生长调节物质、微生物、基因工程及其他增强植物抗重金属 Cd 胁迫能力的方法,有些方法已较成熟,但因其操作复杂或经费昂贵等原因而无法普及应用于生产生活之中;有些方法则仍存在疑问^[6]。抗坏血酸(Ascorbic acid, AsA)是植物体内一种普遍存在于组织中的重要高分度小分子抗氧化物质^[7],目前部分学者采用水培方式研究外源 AsA 对油菜^[8]、黄瓜^[9]以及草坪草^[10]等植物的逆境抗性生理的影响已取得成效,但是 AsA 对土壤重金属 Cd 胁迫下的城市地被植物生长的影响,尤其是有关 AsA 作用的剂量效应,国内外鲜有研究报道。本试验通过温室盆栽试验,研究不同浓度的外源 AsA 对高浓度 Cd 污染土壤中生长的石竹幼苗生长的影响,为探索缓解地被植物 Cd 胁迫的途径提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤

供试土壤由园土和发酵土(由树叶杂草、秸秆与畜禽粪便发酵而成)按照 2:1 的体积比配成。将园土碾碎、自然风干、剔除杂物,再与发酵土按比例混匀后过 5 mm 钢筛,然后用多菌灵粉剂消毒,静置半月。供试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、3.65 mg·kg⁻¹,有机质含量为 41.32 mg·kg⁻¹,Cd 含量为 0.31 mg·kg⁻¹。

1.1.2 植物材料

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,减去烂根,按每盆 3 株上盆,操作时不损伤根系。

1.2 试验方法

1.2.1 盆栽试验

采用温室盆栽试验,于 2012 年 8—11 月在四川农业大学成都校区教学科研基地进行。选用塑料盆,规格为 34 cm×21 cm×27 cm(上径×下径×高),作栽培容器(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 周后,将石竹幼苗上盆,培养 10 d 后石竹正常生长。将 50 mg·kg⁻¹(由预备试验得到的临界浓度)的 CdCl₂·2.5H₂O 水溶液

均匀浇灌在盆土中(各盆中浇灌量保持一致,渗出液反复回收浇灌,直到 Cd²⁺与盆栽土壤均匀混合),浓度以纯 Cd 计,单位为 mg·kg⁻¹,Cd 处理 5 d 后按表 1 向石竹叶片喷施不同浓度的外源 AsA,CK 用清水浇灌和喷施,每个处理 5 盆,以叶片滴液为度,每 2 d 喷一次,共喷施 5 次。分别于 15、30、45 d 后,取植株中部叶片,测定各项生理生化指标。处理两个月后收获植物,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 ℃烘箱内杀青 30 min,装入牛皮纸信封,再在 70~80 ℃下烘干至恒重,称量。用料理机粉碎后,采用湿样消解法消解植物样品,原子吸收分光光度计(AA320N 型)测定其中的镉含量。以上指标的测定均重复 3 次。

抗性系数=处理总生物学产量/对照总生物学产量

表 1 试验因素与水平

Table 1 The factors and levels of this experiment

处理 Treatment	CK	I	II	III	IV	V	VI
Cd/mg·kg ⁻¹	0	50	50	50	50	50	50
AsA/mg·L ⁻¹	0	0	20	40	60	80	100

1.2.2 测定方法

质膜透性、POD、SOD 和 CAT 的活性测定采用熊庆娥^[11]的方法,O₂·、H₂O₂ 含量测定分别采用李合生^[12]、王爱国^[13]的方法,AsA 和 GSH 的含量测定分别采用 Tanaka^[14]和 Ellman^[15]的方法,APX 和 GR 活性测定采用 Nakano^[16]的方法,DHAR 和 MDAR 活性测定采用 Stasolla 和 Yeung^[17]的方法。

1.3 数据分析

利用 Microsoft Excel 2003 对试验数据进行初步计算,SPSS 17.0 程序进行单因素方差分析,Duncan's 法进行多重比较,采用 Origin 8.6 绘制相关图表。

2 结果与分析

2.1 外源 AsA 对石竹幼苗各部分生物量、Cd 含量的影响

CK 与处理 I~IV 的石竹幼苗生长正常,而处理 V、VI 的石竹幼苗叶片上出现明显的灼伤斑点。由表 2 可知,处理 I 的石竹幼苗地下部、地上部和整株生物量较 CK 分别下降了 23.81%、22.47%和 22.75%。处理 II 的石竹幼苗地下部、地上部和整株生物量是处理 I 的 1.22、1.27 倍和 1.26 倍($P<0.05$)。由抗性系数可知,随着外源 AsA 浓度的增大,石竹幼苗各部分生物量呈现先增后减的趋势,处理 III 石竹幼苗地下部、地

表 2 Cd 胁迫下外源 AsA 对石竹幼苗生长的影响

Table 2 Effects of the exogenous AsA on the growth of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress

处理 Treatment	生物量(干重)Biomass(Dry weight)/g·盆 ⁻¹			株高/cm Plant height	分蘖数/个 Tiller number	抗性系数 Coefficient
	地下部 Root	地上部 Shoot	整株 Whole plant			
CK	1.89±0.11a	13.66±0.30a	15.56±0.37a	27.50±2.38a	11.67±2.08a	—
I	1.44±0.05d	10.59±0.26c	12.02±0.21c	17.37±1.62cd	5.33±1.53cd	0.77
II	1.75±0.03b	13.43±0.45a	15.18±0.42a	23.17±1.20b	7.00±1.00bcd	0.98
III	1.64±0.12bc	13.51±0.40a	15.15±0.50a	22.71±0.64b	9.67±2.08ab	0.97
IV	1.58±0.06cd	11.23±0.10b	12.81±0.07b	18.33±0.58c	7.67±1.15bc	0.82
V	1.48±0.04d	10.33±0.20cd	11.81±0.23c	17.48±1.96cd	6.33±1.53cd	0.76
VI	1.45±0.10d	10.02±0.20d	11.47±0.19c	15.25±0.72d	4.33±1.53d	0.74

注: 同列中不同小写字母表示 $P<0.05$ 水平下差异显著。下同。

Note: Different letters indicate difference significance at the level 0.05, so do the followings.

上部和整株干重分别较处理 I 增加了 13.89%, 21.61% 和 26.04%, 但仍小于对照 CK ($P<0.05$)。处理 V 和 VI 差异不明显, 地下部干重与处理 I 差异不显著。另外, 石竹幼苗株高和分蘖数的变化与整株干重变化趋势呈现显著的正相关, 相关系数分别为 0.917 和 0.695 ($P<0.05$)。

由表 3 可知, 处理 I 石竹幼苗的根、茎和叶单位质量含 Cd 量分别是 CK 的 19.07、5.33 倍和 6.35 倍。处理 II~VI 的根部单位质量含 Cd 量呈现先上升后下降的趋势, 各处理间差异显著, 处理 III 达到最大值, 是处理 I 的 1.54 倍 ($P<0.05$), 处理 VI 则只有处理 I 的 93.07%, 两者差异不显著; 而茎和叶的单位质量含 Cd 量则呈现下降的趋势, 处理 VI 分别是处理 I 的 82.70% 和 96.29% ($P<0.05$)。

2.2 外源 AsA 对石竹幼苗叶片相对膜透性、 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率和 H_2O_2 含量的影响

如图 1 所示, 处理 I 的石竹幼苗叶片相对电导率在 15、30、45 d 皆显著高于 CK, 分别是 CK 的 2.14、1.85 倍与 1.88 倍。喷施 AsA 后, 石竹幼苗叶片相对电导率呈现先下降后上升的趋势, 3 个时间点都是处理 III 下降到最低值, 但依旧高于 CK, 处理 VI 达到最大值, 甚至在 15 d 和 30 d 时高出处理 I, 45 d 时, 处理 IV、V 和 VI 之间差异不显著 ($P<0.05$)。

处理 I 的石竹幼苗在培养 15、30、45 d 后其叶片中 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率分别是 CK 的 3.74、3.98 倍和 4.39 倍 ($P<0.05$)。向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的 AsA 后, 叶片 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率在 3 个时间点均呈现随外源 AsA 浓度升高而先减缓后加快的趋势, 处理 III 产生速率最小, 分别为处理 I 的 42.37%、43.98% 和 28.93%, 但是仍比 CK 高, 处理 V 和 VI 的产生速率回升后与处理

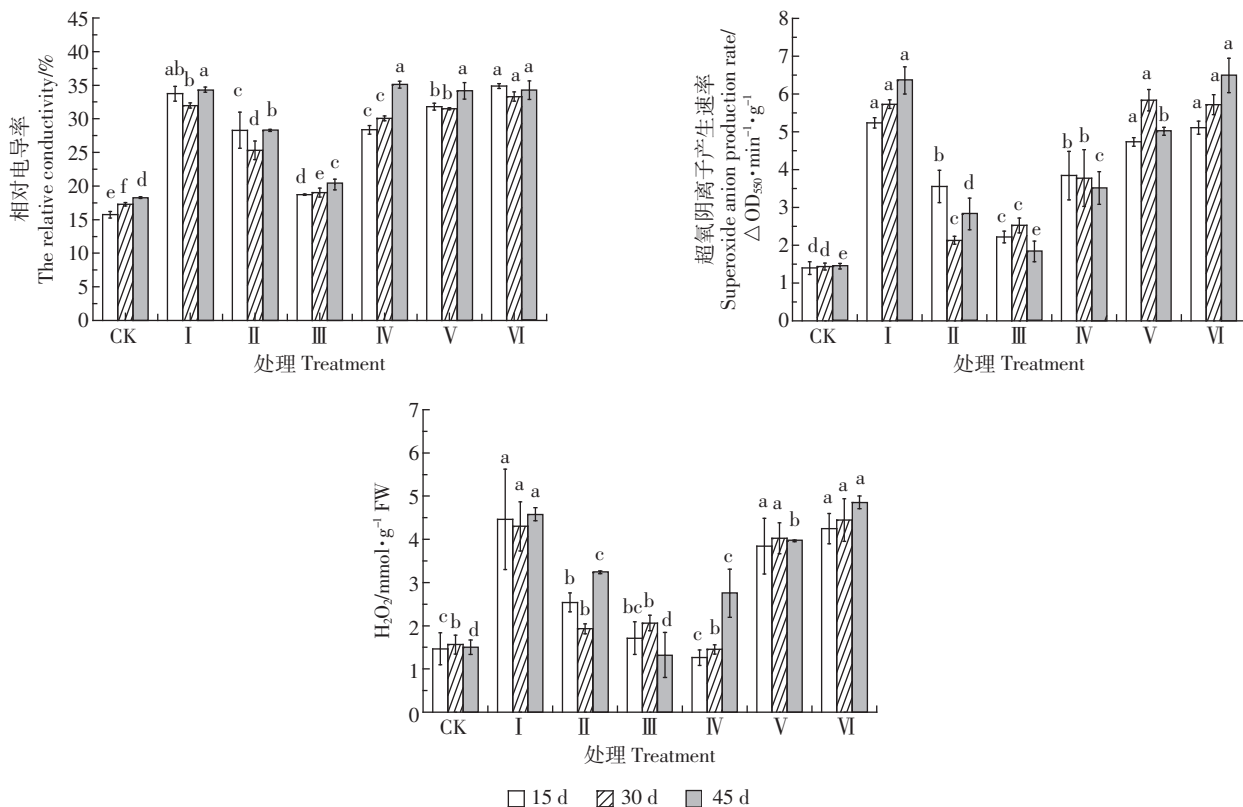
表 3 Cd 胁迫下外源 AsA 对石竹幼苗各部分 Cd 含量的影响 ($mg \cdot kg^{-1}$)Table 3 Effects of the exogenous AsA on the Cd contents of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress ($mg \cdot kg^{-1}$)

处理 Treatment	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	地上部 Shoot
CK	3.05±0.63e	2.85±0.64d	2.25±0.09c	2.31±0.13d
I	58.16±3.64d	15.20±0.98a	14.28±1.39a	13.15±1.48a
II	68.54±2.30c	11.52±1.72b	12.85±1.56ab	10.58±0.27b
III	89.42±1.01a	8.17±1.18c	10.52±0.70b	7.83±1.92c
IV	77.89±8.32b	10.53±0.33b	14.51±3.06a	11.05±1.11ab
V	60.99±5.21d	11.26±0.93b	12.84±2.41ab	10.53±1.23b
VI	54.13±1.66d	12.57±2.09b	13.75±1.68ab	11.84±1.99ab

I 差异不显著 ($P<0.05$)。是形成单线态氧、 H_2O_2 以及 $\cdot OH$ 等活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的主要分子, 由表 4 和图 1 均可发现石竹幼苗叶片 H_2O_2 含量与 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率的相关系数达 0.87 ($P<0.05$), 说明 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 在石竹幼苗叶片膜脂过氧化方面起着协同作用。

2.3 外源 AsA 对石竹幼苗 POD、SOD、CAT 活性的影响

如图 2 所示, 处理 I 的石竹幼苗叶片抗氧化酶活性较 CK 有了显著的变化, 15、30、45 d 时 POD 和 CAT 分别只有 CK 的 89.06%、88.26%、70.13% 和 108%、79.09%、75.08%, 而 SOD 在 3 个时间点分别是 CK 的 1.08、1.65 倍和 1.39 倍。处理 II~VI 叶片 CAT 活性呈现出先上升后下降的趋势, 30 d 时处理 III 叶片的 CAT 活性上升到最大值, 达到处理 I 的 1.62 倍; 而处理 II~VI 叶片 POD 和 SOD 活性则都呈现先上升后下降继而又开始上升的趋势, 30 d 时处理 III 叶片 POD 和 SOD 活性达到最高, 分别较处理 I 增加了 15.31% 和 16.40%, 30 d 和 45 d 时处理 V 叶片 POD 和



不同字母代表同一时间不同处理在 $P < 0.05$ 水平下差异显著。下同

Different letters indicate difference significance at the level 0.05 among different treatments at the same time, so do the followings.

图 1 Cd 胁迫下外源 AsA 对石竹幼苗叶片膜透性、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率和 H_2O_2 含量的影响

Figure 1 Effects of the exogenous AsA on the the relative conductivity, superoxide anion production rates and H_2O_2 contents and of *Dianthus chinensis* seedlings leaves under Cd stress

表 4 试验中石竹幼苗各指标间的相关系数(r)

Table 4 Correlation coefficients between the various indicators of *Dianthus chinensis* seedlings in this experiment

Item	Cd _{HT}	$\oint$	$\int$	H_2O_2	POD	SOD	CAT	APX	MDAR	DHAR	GR	AsA	GSH
Cd _{HT}	1												
$\oint$	0.77	1											
$\int$	0.60	0.88	1										
H_2O_2	0.39	0.70	0.87	1									
POD	-0.43	-0.67	-0.57	-0.48	1								
SOD	0.47	0.26	0.38	0.46	-0.33	1							
CAT	-0.34	-0.72	-0.58	-0.59	0.51	0.10	1						
APX	-0.04	-0.54	-0.49	-0.45	0.43	0.09	0.42	1					
MDAR	-0.65	-0.74	-0.62	-0.58	0.59	-0.27	0.66	0.25	1				
DHAR	-0.57	-0.87	-0.82	-0.83	0.69	-0.37	0.73	0.45	0.74	1			
GR	-0.74	-0.83	-0.82	-0.57	0.42	-0.21	0.54	0.18	0.72	0.66	1		
AsA	-0.63	-0.89	-0.85	-0.81	0.67	-0.27	0.73	0.48	0.77	0.87	0.71	1	
GSH	-0.48	-0.74	-0.73	-0.76	0.63	-0.26	0.68	0.37	0.65	0.84	0.56	0.76	1

注: $\oint$ 和 $\int$ 分别代表相对电导率和 $\text{O}_2^{\cdot -}$; $0 \leq |r| \leq 0.3$ 表示微弱相关, $0.3 < |r| \leq 0.5$ 表示低度相关, $0.5 < |r| \leq 0.8$ 表示显著相关, $0.8 < |r| \leq 1$ 表示高度相关。

Note: $\oint$ and $\int$ respectively represent the relative conductivity and superoxide anion. $0 \leq |r| \leq 0.3$ indicates weak correlation, $0.3 < |r| \leq 0.5$ indicates low correlation, $0.5 < |r| \leq 0.8$ indicates significant correlation, $0.8 < |r| \leq 1$ indicates highly correlated.

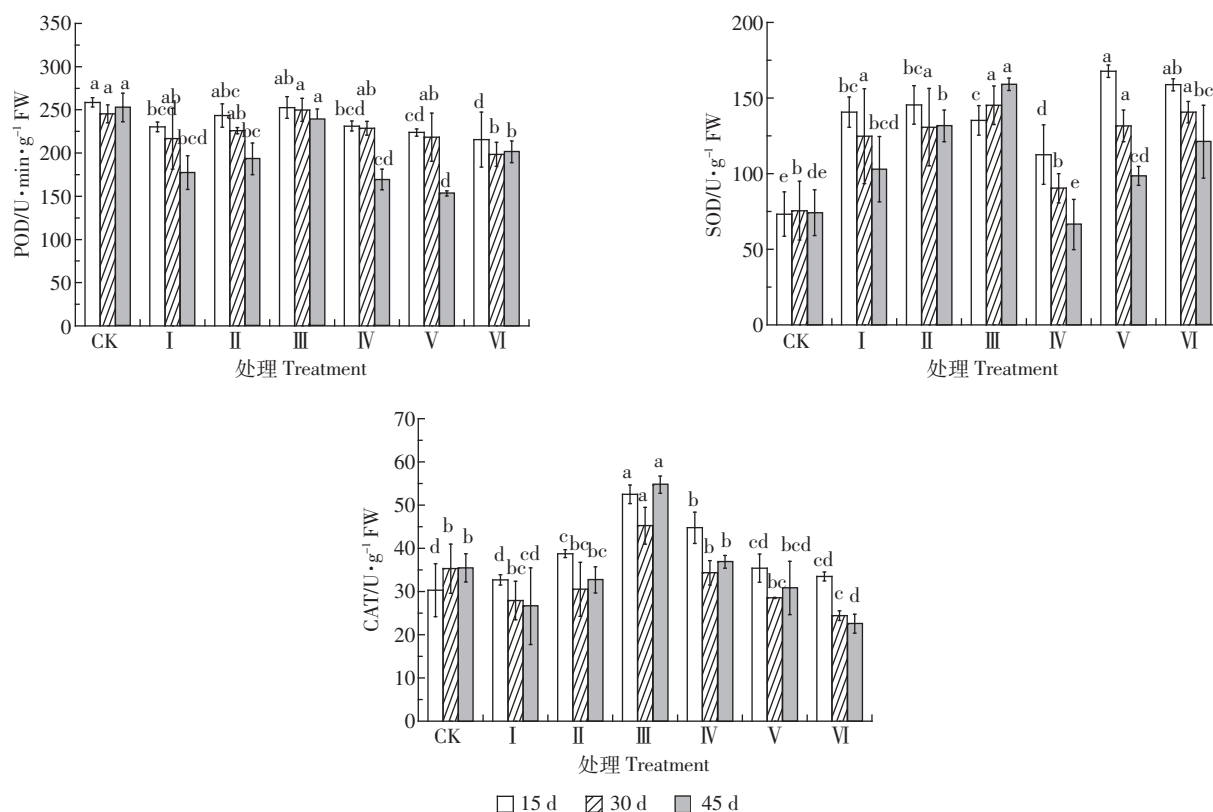


图2 Cd胁迫下外源AsA对石竹幼苗叶片POD、SOD、CAT活性的影响

Figure 2 Effects of the exogenous AsA on the POD, SOD, CAT activity of *Dianthus chinensis* seedlings leaves under Cd stress

SOD活性较处理I均无显著差异($P < 0.05$)。据表4可得,石竹幼苗叶片POD和CAT活性均与 $O_2 \cdot$ 产生速率和 H_2O_2 含量呈显著负相关,而SOD活性却与后两者呈现低度正相关,说明石竹幼苗叶片SOD在其耐镉胁迫过程中发挥着重要作用。

2.4 外源AsA对石竹幼苗叶片AsA-GSH循环中酶活性的影响

如图3所示,3个时间点处理I的石竹幼苗叶片抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性较CK逐渐下降,分别是CK的92.31%、90.07%和88.24%,喷施AsA后处理II~VI石竹幼苗叶片APX活性呈现出随AsA浓度的增大先上升后下降的趋势,15、30、45 d时处理III的APX的活性较处理I分别增加了23.61%、40.44%和32.59%,甚至超过了CK,处理VI与处理I已无显著差异,且低于CK($P < 0.05$)。

3个时间点处理I的石竹幼苗叶片单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)活性大幅度下降,处理II~VI石竹幼苗叶片MDAR活性随外源AsA浓度的增大先上升后下降,处理III依旧为最大,与CK差异不显著,处理VI与处理I差异不显著,但显著低于CK($P < 0.05$)。

3个时间点处理I的石竹幼苗叶片脱氢抗坏血

酸还原酶(DHAR)活性较CK大幅度下降,处理II~VI石竹幼苗叶片DHAR活性随外源AsA浓度的增大先上升后下降,处理III依旧为最大,处理VI略低于处理I,极显著低于CK。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活性($P < 0.05$)。

3个时间点处理I石竹幼苗叶片谷胱甘肽还原酶(GR)的活性较CK分别下降了40.74%、41.18%和47.17%。随着外源AsA浓度的增加,石竹幼苗叶片GR活性亦呈现先上升后下降的趋势,处理III达到最大,3个时间点分别是处理I的1.47、1.43倍和1.32倍,但在30 d和45 d时仍显著低于CK;处理VI达到最低,与处理I差异不显著($P < 0.05$)。

由表4可知,在整个试验过程的石竹幼苗叶片AsA-GSH循环中,APX、MDAR、DHAR和GR活性之间呈显著正相关,与叶片单位质量Cd含量、相对电导率、 $O_2 \cdot$ 产生速率和 H_2O_2 含量呈显著负相关($P < 0.05$)。

2.5 外源AsA对石竹幼苗叶片AsA和GSH含量的影响

如图4所示,处理I的石竹幼苗叶片AsA含量只有CK的58.04%、56.86%和30%。向石竹幼苗叶面

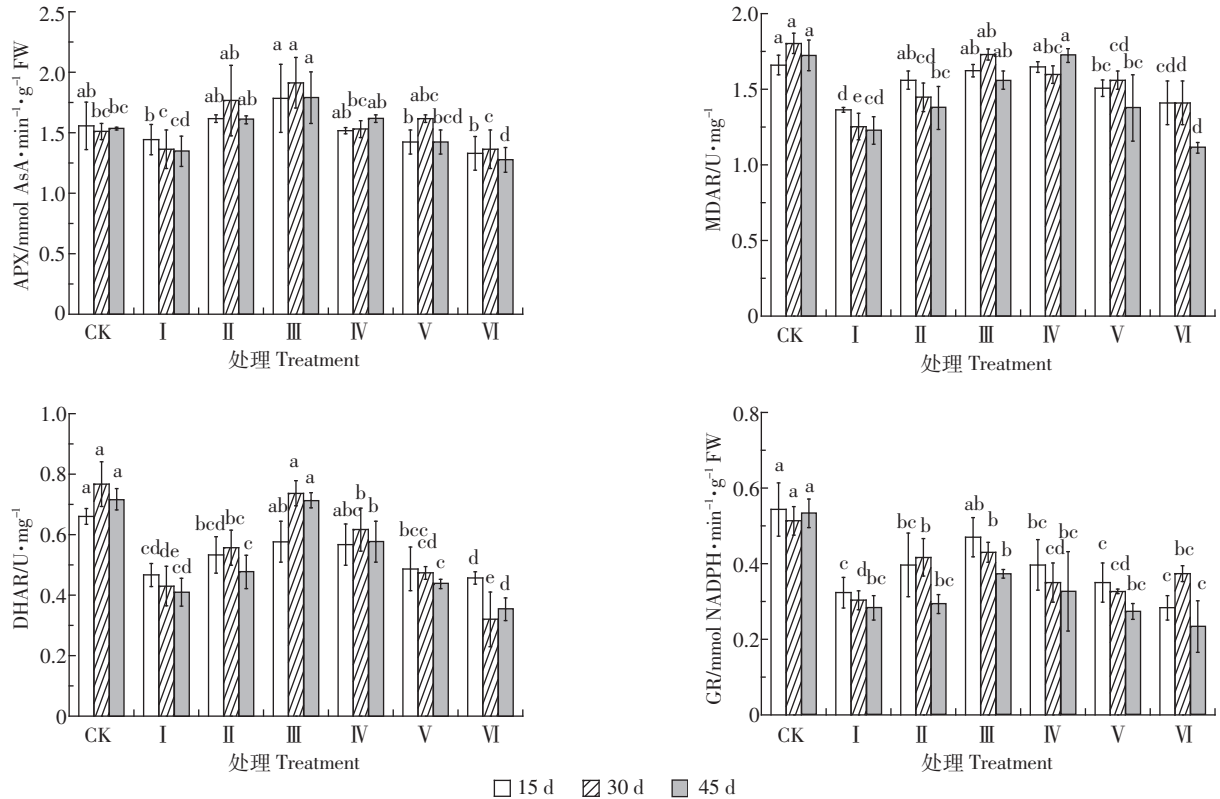


图 3 Cd 胁迫下外源 AsA 对石竹幼苗叶片 AsA-GSH 循环中酶活性的影响

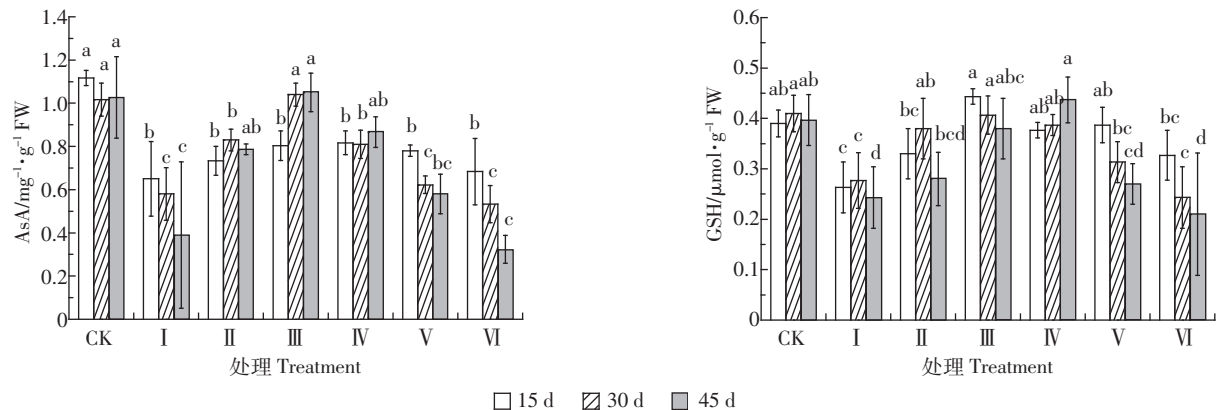
Figure 3 Effects of the exogenous AsA on the enzyme activities in the AsA-GSH cycle of *Dianthus chinensis* seedlings leaves under Cd stress

图 4 Cd 胁迫下外源 AsA 对石竹幼苗叶片 AsA 和 GSH 含量的影响

Figure 4 Effects of the exogenous AsA on the AsA, GSH contents of *Dianthus chinensis* seedlings leaves under Cd stress

喷施不同浓度的 AsA 后, 叶片 AsA 的含量在 3 个时间点均呈现随外源 AsA 浓度的升高先增加后减小的趋势。15 d 时, 处理 I ~ VI 之间差异不显著; 30 d 时, 处理 III 石竹幼苗叶片 AsA 含量达到最高, 较处理 I 增加了 79.31%, 处理 VI 与处理 I 差异不显著; 45 d 时, 处理 III 是处理 I 的 2.69 倍, 但仍低于 CK。据表 4 可知, 石竹叶片 AsA 含量与叶片单位质量 Cd 含量、膜透性、 $\text{O}_2 \cdot$ 产生速率和 H_2O_2 含量均呈显著负相关, 相

关系数分别为 -0.63、-0.89、-0.85 和 -0.81 ($P < 0.05$)。

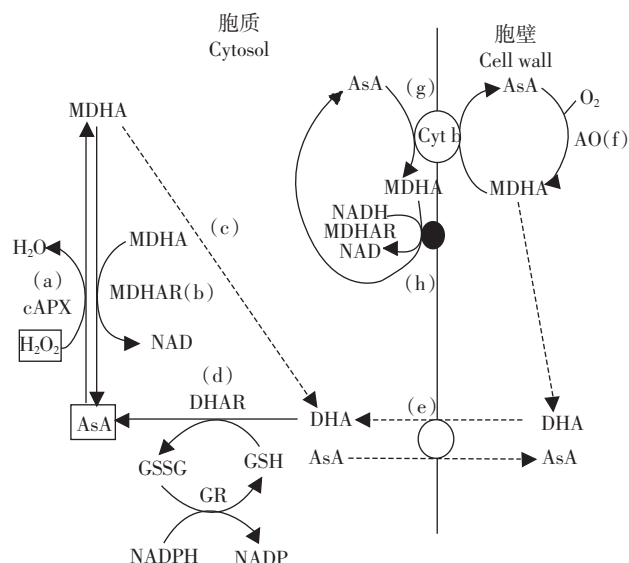
同样地, 15、30、45 d 时, 处理 I 的石竹幼苗叶片 GSH 含量较 CK 分别下降了 33.33%、31.71% 和 40%。向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的 AsA 后, 叶片 GSH 的含量在 3 个时间点也均呈现随外源 AsA 浓度的升高先增加后减小的趋势。由表 4 亦知, 石竹幼苗叶片 GSH 含量与叶片单位质量 Cd 含量、膜透性、 $\text{O}_2 \cdot$ 产生速率和 H_2O_2 含量均呈显著负相关, 相关系数分别为

-0.48、-0.74、-0.73 和 -0.76。所以,石竹叶片 GSH 含量和 AsA 含量显著正相关,相关系数达 76%,但处理 IV~VI 石竹幼苗叶片 GSH 含量减小的程度较 AsA 要小,这可能是与 GR 活性较 MDAR 和 DHAR 活性高有关($P < 0.05$)。

3 讨论

在植物细胞的正常代谢过程中,有多种途径可产生 ROS,如叶绿体、线粒体和质膜的电传递至分子氧过程伴随产生活跃的、具有毒性的 ROS,生物和非生物胁迫的介入会使电子传递链和酶代谢紊乱,ROS 的水平升高^[18]。本试验结果显示,在 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 处理下,石竹幼苗叶片中 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率和 H_2O_2 含量分别较对照提升了 3.04 倍和 2.89 倍,叶片膜透性增大,各部分 Cd 含量增加,POD、CAT 以及抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环中 APX、MDAR、DHAR 和 GR 活性下降,AsA、GSH 含量降低,最终石竹幼苗株高、分蘖数和各部分生物量均显著下降。这与在玉米^[19]、绿豆和箭舌豌豆^[20]、龙葵^[21]等植物中得到的结论一致。究其原因,在高浓度 Cd 胁迫下,植物体内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率加快,导致单线态氧、 H_2O_2 以及羟基自由基等 ROS 分子积累,使其体内抗氧化酶(POD、CAT、APX 等)活性降低,非酶抗氧化剂(AsA、GSH 等)含量下降,进而加剧了 ROS 的释放,诱导植物细胞内 ROS 爆发,引起膜脂过氧化,细胞膜透性增大,细胞内重要的物质大量外渗、外界有毒物质进入细胞,细胞内新陈代谢发生紊乱,植物的生长发育受到抑制,故而生物量降低。

AsA 是植物体内最主要也是最重要的非酶抗氧化剂,能够直接清除单线态氧以及 H_2O_2 等多种 ROS 自由基,也可以通过 AsA-GSH 循环间接清除 H_2O_2 等^[22-23]。如图 5 所示,在 AsA-GSH 循环中,APX 以 AsA 为底物将 H_2O_2 还原为 H_2O ,同时形成单脱氢抗坏血酸(MDHA),MDHA 很不稳定,一部分被单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)还原为 AsA,另一部分进一步氧化生成脱氢抗坏血酸(DHA),DHA 以 GSH 为底物在 DHAR 的作用下生成 AsA,此反应产生的氧化型谷胱甘肽(GSSG)又可在 GR 的催化下被还原成 GSH^[24]。本试验中,在 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 胁迫下,石竹幼苗体内的 AsA 被大量消耗使含量降低,喷施一定浓度范围的外源 AsA 及时补充了石竹幼苗内源 AsA 的不足,继而提高了 POD、CAT、AsA-GSH 循环中 APX、MDAR、DHAR 和 GR 的活性以及 GSH 的含量。由表



(a)cAPX,胞质 AsA 过氧化物酶;(b) and (h),MDHAR,单脱氢 AsA 还原酶;(c)Disproportionation,歧化反应;(d)DHAR,脱氢 AsA 还原酶;(e)Facilitated diffusion,易化扩散;(f)AO,AsA 氧化酶;(g)Cytb 系统

图 5 植物胞内 AsA-GSH 循环示意

Figure 5 The AsA-GSH cycle within plant cells

4 可知,石竹幼苗叶片中 AsA 的含量与其叶片单位质量镉含量、质膜透性、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率以及 H_2O_2 的含量皆呈现显著的负相关;与 POD、CAT、APX、MDAR、DHAR、GR 活性和 GSH 的含量呈现显著的正相关。另外,其对 SOD 活性的影响不大,由图 2 可知, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 胁迫下,石竹幼苗叶片的 SOD 活性增至对照 CK 的 1.65 倍,随着外源 AsA 施加浓度的上升, SOD 活性相应地先下降后上升,其活性的下降可能是由于一定浓度范围内的外源 AsA 提高了石竹幼苗体内 POD、CAT 和 AsA-GSH 循环中 APX、MDAR、DHAR 和 GR 的活性,石竹体内 ROS 含量得到控制;后来其活性再次上升则可能是因为过高浓度的外源 AsA 引起了促氧化反应,石竹幼苗体内的 ROS 再次升高所致。这足以说明,SOD 酶作为一种诱导酶^[25]在抗氧化反应过程中的敏感性,也验证了 SOD 是植物体内清除 ROS 系统的第一道防线,影响着植物体内 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的浓度,在植物自身防御系统中处于核心的地位^[26]。这与外源 AsA 对 Cd 胁迫下黑藻抗氧化系统的保护作用研究结果一致^[27]。

本试验中,处理 III 的石竹幼苗叶片 APX 等抗氧化酶的活性和 AsA 等抗氧化剂含量均为处理最高值,石竹幼苗的株高和生物量也为所有处理最大值;而处理 V、VI 的石竹幼苗体内的 ROS 含量较处理 I

不减反增,抗氧化酶活性降低,株高、分蘖数和生物量降低($P<0.05$),且叶片上出现明显的灼伤斑点。这可能是高浓度的外源 AsA 表现出与 Cd 的协同促氧化作用^[28],使石竹幼苗细胞产生更多的 ROS,加剧了其氧化损伤。张佩^[8]与周琴^[29]分别在研究外源 AsA 对镉、酸雨胁迫油菜幼苗的缓解效应时,也发现施用低浓度的外源 AsA 可缓解油菜受到的胁迫,而高浓度的 AsA 不但没有缓解作用,反而出现促氧化作用。由此可见 AsA 作用具有剂量效应,但到目前为止还无法确定 AsA 在什么情况下起促氧化作用,只是一些试验足够证明在生物体内高剂量的 AsA 具有促氧化作用,低剂量的 AsA 具有抗氧化作用。对 AsA 促氧化作用的机理目前有 3 种说法:与细胞内过度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;与 AsA 还原 ROS 生成的羟基自由基有关^[30]。作者认为本试验中向石竹幼苗叶面喷施 80、100 mg·L⁻¹ 的外源 AsA 后,产生的促氧化作用可能是因为处理 V、VI 石竹幼苗体内 AsA 含量已经达到饱和,过量的 AsA 要代谢排出体外,在代谢的过程中产生大量的草酸,同时产生自由基损害了细胞。

4 结论

综上所述,喷施适宜浓度的外源 AsA 可补充石竹幼苗体内的非酶抗氧化剂,提高抗氧化酶活性,有效缓解土壤重金属 Cd 对石竹幼苗的氧化胁迫,从而改善其生长状况。但喷施过高浓度的外源 AsA 不仅缓解效应下降,而且还具有与 Cd 协同氧化的作用,加剧了石竹幼苗的氧化胁迫。综合试验各因素表明,35~45 mg·L⁻¹ 的外源 AsA 对石竹幼苗 Cd 毒害的缓解效果较佳。

参考文献:

- [1] 沈迪玉,杨万勤,张健,等. 镉胁迫对欧美杂交杨(*Populus deltoides*×*Populus nigra*)光合作用与生物量生产的影响[J]. 四川农业大学学报,2010,28(1):61-66.
SHEN Di-yu, YANG Wan-qin, ZHANG Jian, et al. Effects of cadmium on photosynthetic characters and biomass production of a poplar(*Populus deltoides*×*Populus nigra*)[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2010, 28(1):61-66.
- [2] 贺迪,刘云国,黄玉娥,等. 钙对不同浓度镉胁迫下芦苇幼苗叶绿素及抗氧化酶系统的影响[J]. 农业环境科学学报,2007,26(1):197-201.
HE Di, LIU Yun-guo, HUANG Yu-e, et al. Effects of calcium on chlorophyll and antioxidant enzymes in *Phragmites australis* under cadmium stress[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(1):197-201.
- [3] Alavala Matta Reddy, Surabhi Giridara Kumarb, Gottimukkala Jyothsnakumaric, et al. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.] and bengalgram (*Cicerarietinum* L.)[J]. *Chemosphere*, 2005, 60(1):97-104.
- [4] Un-Haing Cho, Nam-Ho Seo. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation[J]. *Plant Science*, 2005, 168(1):113-120.
- [5] Karen Smeets, Joske Ruytinx, Brahim Semane, et al. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2008, 63(1-3):1-8.
- [6] 姚慧,蔡庆生. 缓解植物重金属胁迫伤害的途径及其机理[J]. 浙江农业科学,2011(1):144-147.
YAO Hui, CAI Qing-sheng. Approach to the mechanism to alleviate the stress injury of plants by heavy metals[J]. *Zhejiang Agricultural Sciences*, 2011(1):144-147.
- [7] Davey M W, Montagu M V, Inze D. Plant L-ascorbic acid:Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing [J]. *J Sci Food Agric*, 2000, 80:825-860.
- [8] 张佩,周琴,孙小芳,等. 抗坏血酸对镉胁迫下油菜幼苗生长的影响[J]. 农业环境科学学报,2008,27(6):2362-2366.
ZHANG Pei, ZHOU Qin, SUN Xiao-fang, et al. The alleviative effects of AsA on the growth of rape seedlings under Cd stress[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(6):2362-2366.
- [9] 徐伟君. 高温胁迫对黄瓜幼苗抗坏血酸代谢影响的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学硕士学位论文,2007.
XU Wei-jun. Study on the effects of high temperature on the metabolism of ascorbic acid in cucumber seedlings[D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University of Science and Technology master's degree thesis, 2007.
- [10] 赵慧颖. 外源抗坏血酸对高氮条件下高羊茅草坪草耐热性的影响及其调控机理[D]. 南京:南京农业大学硕士学位论文,2008.
ZHAO Hui-ying. Effects of ascorbic acid on heat resistance and regulation mechanism under high nitrogen in tall fescue turfgrass[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural master's degree thesis, 2008.
- [11] 熊庆娥. 植物生理学试验教程[M]. 成都:四川科学出版社,2003.
XIONG Qing-e. Plant physiology test tutorial[M]. Chengdu:Sichuan Science Press, 2003.
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.
LI He-sheng. Plant physiology and biochemistry experimental principles and techniques[M]. Beijing:Higher Education Press, 2000.
- [13] WANG Ai-guo, LUO Guang-hua. Quantitive relation between the reaction the hydroxylamine and superoxide anion radical in plant[J]. *Plant Physiol Com*, 1990(6):55-57.
- [14] Tanaka K, Suda Y, Kondo N. Ozone tolerance and the ascorbate-dependent hydrogen peroxide decomposing system in chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiol*, 1985, 26:1425-1431.
- [15] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, 82:70-77.
- [16] Nakano Y, Kozi A. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-spe-

- cific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22:867-880.
- [17] Claudio Stasolla, Edward C Yeung. Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination[J]. *Physiologia Plantarum*, 2001, 111(2):196-205.
- [18] 杜秀敏, 殷文璇, 赵彦修, 等. 植物中 ROS 的产生及清除机制[J]. 生物工程学报, 2001, 17(2):121-125.
- DU Xiu-min, YIN Wen-xuan, ZHAO Yan-xiu, et al. The generation of reactive oxygen species and scavenging mechanisms of plants [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, 17(2):121-125.
- [19] 宇克利, 邹婧, 邹金华. 镉胁迫对玉米幼苗抗氧化酶系统及矿质元素吸收的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(6):1050-1056.
- YU Ke-li, ZOU Jing, ZOU Jin-hua. Effects of cadmium stress on antioxidant enzyme system and absorption of mineral elements in maize seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(6):1050-1056.
- [20] 张芬琴, 张红晓, 沈振国. Cd 胁迫下不同耐性豆科植物根内 ROS 产生与基因组 DNA 多态性变化[J]. 生态学杂志, 2012, 31(9):2330-2336.
- ZHANG Fen-qin, ZHANG Hong-xiao, SHEN Zhen-guo. Reactive oxygen production and genome DNA polymorphism change in root tip tissues of two leguminous species with different tolerance under Cd stress[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(9):2330-2336.
- [21] 刘金光, 张玉秀, 史沛丽, 等. 镉对龙葵种子萌发及子叶抗氧化酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(5):880-884.
- LIU Jin-guang, ZHANG Yu-xiu, SHI Pei-li, et al. Effect of cadmium on seed germination and antioxidative enzymes activities in cotyledon of *Solanum nigrum* L.[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(5):880-884.
- [22] Sergi Munne-Bosch, Leonor Alegre. Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants[J]. *FEBS Letters*, 2002, 524(1-3):145-148.
- [23] 黄文敏, 邢伟, 李敦海, 等. 外源抗坏血酸对烟草细胞生长及衰老的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(5):1157-1161.
- HUANG Wen-min, XING Wei, LI Dun-hai, et al. Effects of exogenous ascorbic acid on the growth and senescence of tobacco BY-2 suspension cells[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(5):1157-1161.
- [24] Nicholas Smirnoff. Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Science*, 2000, 355(1402):1455-1464.
- [25] 杜海荣, 杨田甜, 吕荣芳, 等. 氟污染对玉米幼苗生长及生理特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(2):216-222.
- DU Hai-rong, YANG Tian-tian, LÜ Rong-fang, et al. Effects of fluoride pollution on the growth and physiological characteristics of maize seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(2):216-222.
- [26] 罗娅, 汤浩茹, 张勇. 低温胁迫对草莓叶片 SOD 和 AsA-GSH 循环酶系统的影响[J]. 园艺学报, 2007, 34(6):1405-1410.
- LUO Ya, TANG Hao-ru, ZHANG Yong. Effect of low temperature stress on activities of SOD and enzymes of Ascorbate-Glutathione Cycle[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, 34(6):1405-1410.
- [27] 许丙军, 施国新, 徐勤松, 等. 外源抗坏血酸对镉胁迫下黑藻抗氧化系统的保护作用[J]. 应用生态学报, 2006, 17(9):1768-1770.
- XU Bing-jun, SHI Guo-xin, XU Qin-song, et al. Protective effects of exogenous ascorbic acid on antioxidant system in hydrilla verticillata under Cd²⁺ stress[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(9):1768-1770.
- [28] Seon Hwa Lee, Tomoyuki Oe, Ian A Blair. Vitamin C induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins[J]. *Science*, 2001, 292(5524):2083-2086.
- [29] 周琴, 张佩, 曹春信, 等. 外源抗坏血酸对酸雨胁迫油菜幼苗的缓解效应[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(8):1437-1442.
- ZHOU Qin, ZHANG Pei, CAO Chun-xin, et al. Alleviative effects of exogenous ASA on acid rain stressed oilrape seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(8):1437-1442.
- [30] 郭海涛, 辛玲. 抗坏血酸在细胞内的促氧化作用及其机理[J]. 生理代谢调控, 2006(2):24-27.
- GUO Hai-tao, XIN Ling. Promote the oxidation of ascorbic acid in the cells and its mechanism[J]. *Physiological and Metabolic Regulation*, 2006(2):24-27.