

# 外源谷胱甘肽对石竹幼苗镉毒害的缓解效应

丁继军<sup>1,2</sup> 潘远智<sup>1\*</sup> 李 丽<sup>3</sup> 刘柿良<sup>1</sup> 崔明峰<sup>1,4</sup> 高佩刚<sup>1</sup>

<sup>1</sup>四川农业大学风景园林学院, 成都 611130; <sup>2</sup>长江三峡实业有限公司, 湖北宜昌 443002; <sup>3</sup>西南林业大学林学院, 昆明 650224; <sup>4</sup>成都易合建筑景观设计有限公司, 成都 610032

**摘 要** 为了探讨外源谷胱甘肽(GSH)对地被植物镉(Cd)毒害的缓解效应, 采用温室盆栽土培的方法, 研究了不同浓度(0、20、40、60、80、100 mg·L<sup>-1</sup>)的外源GSH处理对50 mg·kg<sup>-1</sup> Cd胁迫下石竹(*Dianthus chinensis*)幼苗生长的影响。结果发现, 50 mg·kg<sup>-1</sup> Cd显著抑制了石竹幼苗的生长。喷施外源GSH后, 一定浓度范围内(≤60 mg·L<sup>-1</sup>)的外源GSH可显著缓解石竹幼苗的Cd胁迫, 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, 抗坏血酸(AsA)和GSH含量以及生物量、株高、分蘖数都显著高于无外源GSH处理的石竹幼苗, 而丙二醛(MDA)含量、细胞膜透性、Cd含量、O<sub>2</sub><sup>-</sup>的产生速率以及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的积累量则显著低于无外源GSH处理的石竹幼苗, 但随着外源GSH喷施浓度的增加, 缓解效应有下降的趋势。试验表明55–65 mg·L<sup>-1</sup>的外源GSH缓解效果最佳。  
**关键词** 抗坏血酸-谷胱甘肽循环, 镉胁迫, 石竹幼苗, 外源谷胱甘肽, 缓解效应

## Mitigation effects of exogenous glutathione on the growth of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress

DING Ji-Jun<sup>1,2</sup>, PAN Yuan-Zhi<sup>1\*</sup>, LI Li<sup>3</sup>, LIU Shi-Liang<sup>1</sup>, CUI Ming-Feng<sup>1,4</sup>, and GAO Pei-Gang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Landscape Architecture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; <sup>2</sup>The Three Gorges Industrial Co., Ltd., Yichang, Hubei 443002, China; <sup>3</sup>College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China; and <sup>4</sup>Cheng Du Yihe Landscape Architecture Design Co., Ltd., Chengdu 610032, China

### Abstract

**Aims** The objective was to investigate exogenous glutathione (GSH) mitigation effects of Cadmium (Cd) toxicity on ground cover plants.

**Methods** A greenhouse pot experiment was conducted to explore the effects of spraying different concentrations (0, 20, 40, 60, 80 and 100 mg·L<sup>-1</sup>) exogenous GSH on *Dianthus chinensis* seedlings exposed to 50 mg·kg<sup>-1</sup> Cd in the soil.

**Important findings** 50 mg·kg<sup>-1</sup> Cd significantly inhibited the growth of *D. chinensis* seedlings; however, a range of concentrations of sprayed exogenous GSH significantly relieved Cd stress on *D. chinensis* seedlings. Sprayed *D. chinensis* seedlings had increased activities of the catalase (CAT), peroxidase (POD), ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDAR), dehydroascorbate reductase (DHAR) and glutathione reductase (GR), as well as increased ascorbic acid (AsA) and GSH contents, biomass, plant height and number of tillers. There were decreases in malondialdehyde (MDA), cell membrane permeability, Cd contents, O<sub>2</sub><sup>-</sup> production rates and accumulated amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, with increased exogenous GSH concentration, there was a downward trend in mitigation effects. Considering all factors, the mitigation effects were maximized by spraying 55–65 mg·L<sup>-1</sup> exogenous GSH.

**Key words** AsA-GSH cycle, Cd stress, *Dianthus chinensis* seedling, exogenous GSH, mitigation effect

镉(Cd)是对生物体有毒害的重金属元素, Cd胁迫会导致植物体内过多活性氧(ROS, 如O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、·OH等)的产生与积累, 从而引发或者加剧细胞膜脂过氧化, 蛋白质变性以及核苷酸受损等, 严

重时导致细胞死亡(He *et al.*, 2007)。植物会通过调节自身的防御体系对Cd胁迫作出适应性反应, 以保护细胞免受ROS的伤害, 维持细胞膜的稳定。抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环在植物机体清除

ROS过程中发挥着极其重要的作用(Manisha *et al.*, 1999)。其中, GSH是一种普遍存在于植物体内的小分子硫醇类化合物——由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸形成的三肽化合物(Anderson, 1998), 它是一种重要的水溶性抗氧化物质, 在植物细胞中可以直接使一些ROS还原, 但是GSH与 $H_2O_2$ 的反应速度相当慢, 因而在植物中依赖GSH直接还原 $H_2O_2$ 不是其主要的清除途径, 与GSH相关的生理过程在植物适应环境胁迫上具有十分重要的作用, 这些生理过程和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)等酶的活性密切相关(鲁丽丽, 2006)。目前, 部分学者采用水培方式研究外源GSH对小麦(*Triticum aestivum*) (彭向永等, 2012)、香薷(*Elsholtzia ciliata*) (钱猛和朱昌华, 2010)以及月季(*Rosa chinensis*) (姜玉东等, 2010)等植物的逆境抗性生理的影响已取得成效, 但是外源GSH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GSH功能的剂量效应, 国内外鲜有研究报道。

石竹(*Dianthus chinensis*)是石竹科石竹属多年生草本植物, 是中国传统名花之一, 观赏价值较高, 易繁殖, 易养护, 在园林上应用广泛。试验通过温室盆栽的方法, 研究不同浓度的外源GSH对高浓度Cd污染土壤中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 材料和方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 供试土壤

采用温室盆栽试验。供试土壤由菜园土和发酵土(由秸秆与畜禽粪便发酵而成)按照2:1的比例配成。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, 静置数天后, 测定土壤的基本理化性质, pH为6.4, 全氮、全磷和全钾分别为0.45、0.71、3.65  $mg \cdot kg^{-1}$ , 有机质含量为41.32  $mg \cdot kg^{-1}$ , Cd含量为0.31  $mg \cdot kg^{-1}$ 。

#### 1.1.2 植物材料

供试石竹为购自成都市郫县成青花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取出, 剪除老叶, 用清水洗净根系,

剪去烂根, 按每盆3株种于种植土中, 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天后, 石竹正常生长。将50  $mg \cdot kg^{-1}$  (由预备试验得到的临界浓度)的 $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ 水溶液均匀浇灌在盆土中(渗出液反复回收浇灌, 直到 $Cd^{2+}$ 与盆栽土壤均匀混合), 浓度以纯Cd计, 单位为 $mg \cdot kg^{-1}$ , Cd处理5天后按表1向石竹叶片喷施不同浓度的外源GSH, CK用清水浇灌和喷施, 每个处理5盆, 以叶片滴液为度, 每2天喷一次, 共喷施5次。

#### 1.2.2 样品分析

待植物在重金属污染的盆土中生长15、30、45天后, 取植株中部成熟叶片, 测定各项生理生化指标。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)的活性测定参照熊庆娥(2003)的方法。 $O_2^-$ 和 $H_2O_2$ 含量分别采用李合生(2000)、Wang和Luo(1990)的方法, AsA和GSH的含量分别按照Ellman(1959)和Tanaka等(1985)的方法测定。APX和GR活性的测定参考Nakano和Kozi(1981), DHAR和MDAR活性的测定参照Stasolla和Yeung(2001)的方法。

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 °C烘箱内杀青30 min, 装入牛皮纸信封, 在70–80 °C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, 上海精密科学仪器有限公司)测定其中的Cd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

### 1.3 数据分析

利用Excel 2003对试验数据进行初步计算, 用SPSS 17.0进行单因素方差分析、Duncan's多重比较、相关性和线性回归分析, 采用Origin 8.6绘制相关图表。

表1 试验设计

Table 1 Design of this experiment

处理 Treatment	CK	I	II	III	IV	V	VI
镉 Cd (mg·kg <sup>-1</sup> )	0	50	50	50	50	50	50
谷胱甘肽 Glutathione (mg·L <sup>-1</sup> )	0	0	20	40	60	80	100

表2 Cd胁迫下外源谷胱甘肽对石竹幼苗生长的影响(平均值±标准偏差)

Table 2 Effects of the exogenous glutathione on the growth of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress (mean ± SD)

处理 Treatment	生物量 Biomass (g DW·pot <sup>-1</sup> )			株高 Plant height (cm)	分蘖数 Tiller number	抗性系数 Coefficient
	地下部 Root	地上部 Shoot	整株 Whole plant			
CK	1.89 ± 0.11 <sup>a</sup>	13.66 ± 0.30 <sup>a</sup>	15.56 ± 0.37 <sup>a</sup>	27.50 ± 2.38 <sup>a</sup>	11.8 ± 2.08 <sup>a</sup>	–
I	1.44 ± 0.05 <sup>b</sup>	10.59 ± 0.26 <sup>c</sup>	12.02 ± 0.21 <sup>d</sup>	17.37 ± 1.62 <sup>d</sup>	5.3 ± 1.53 <sup>b</sup>	0.77
II	1.44 ± 0.08 <sup>b</sup>	10.75 ± 0.38 <sup>c</sup>	12.18 ± 0.32 <sup>d</sup>	18.93 ± 0.26 <sup>cd</sup>	5.3 ± 2.52 <sup>b</sup>	0.78
III	1.59 ± 0.06 <sup>b</sup>	11.30 ± 0.29 <sup>b</sup>	12.90 ± 0.31 <sup>c</sup>	20.16 ± 2.15 <sup>c</sup>	7.7 ± 1.54 <sup>b</sup>	0.83
IV	1.53 ± 0.21 <sup>b</sup>	13.21 ± 0.14 <sup>a</sup>	14.73 ± 0.14 <sup>b</sup>	23.36 ± 0.42 <sup>b</sup>	8.3 ± 0.58 <sup>b</sup>	0.95
V	1.59 ± 0.08 <sup>b</sup>	11.34 ± 0.19 <sup>b</sup>	12.93 ± 0.26 <sup>c</sup>	19.31 ± 0.06 <sup>cd</sup>	6.7 ± 1.53 <sup>b</sup>	0.83
VI	1.49 ± 0.03 <sup>b</sup>	11.66 ± 0.27 <sup>b</sup>	13.15 ± 0.28 <sup>c</sup>	20.22 ± 0.20 <sup>c</sup>	7.3 ± 1.53 <sup>b</sup>	0.85

处理同表1。同列不同小写字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。

Treatment see Fig. 1. Different small letters within the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ).

## 2 结果和分析

### 2.1 GSH对石竹幼苗生长的影响

由表2可知, 处理I石竹幼苗的生物量、株高、分蘖数均显著低于CK, 石竹地下部分、地上部分和整株生物量较CK分别下降了23.81%, 22.47%和22.75% ( $p < 0.05$ )。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, 石竹各部分生物量呈现先增后减的趋势, 处理IV石竹地下部、地上部和整株生物量分别达到最大值, 是处理I的1.06、1.25和1.34倍( $p < 0.05$ ), 仍低于CK, 处理V和VI差异不显著。另外, 由表3可知, 外源GSH与石竹幼苗的株高、分蘖数和生物量的相关系数分别为0.446 ( $y_{株高} = 0.027x + 18.562$ ), 0.417 ( $y_{分蘖数} = 0.021x + 5.730$ )和0.523 ( $y_{生物量} = 0.138x + 12.298$ ) ( $p < 0.05$ ), 说明外源GSH对Cd胁迫下石竹幼苗生物量的影响主要体现在对株高的影响。

### 2.2 外源GSH对石竹幼苗各部分Cd含量的影响

由图1可知, 石竹幼苗在施加有50 mg·kg<sup>-1</sup> Cd的土壤中生长一段时间后, 处理I根、茎和叶的单位质量含Cd量分别是CK的19.07倍、5.33倍和6.35倍( $p < 0.05$ )。喷施外源GSH后, 处理II–VI根部单位质量含Cd量则呈现持续下降的趋势, 处理

V略微有波动, 处理IV、V和VI石竹根部单位质量含Cd量差异不显著, 处理I、II和III茎部单位质量含Cd量差异也不显著, 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中最低值, 分别只有处理I的60.83%、43.03%和36.90%, 但仍比CK相应部位单位质量Cd含量高( $p < 0.05$ )。由表3可知, 石竹幼苗根、茎和叶的单位质量Cd含量与外源GSH浓度相关系数分别为-0.837、-0.899和-0.888, 说明外源GSH降低了石竹幼苗对Cd的吸收和转移, 且这种效应表现为叶( $y_{叶} = -0.081x + 14.786$ ,  $R^2 = 0.701$ ) > 茎( $y_{茎} = -0.083x + 15.510$ ,  $R^2 = 0.808$ ) > 根( $y_{根} = -0.209x + 54.481$ ,  $R^2 = 0.701$ ) ( $p < 0.01$ )。

### 2.3 外源GSH对石竹幼苗叶片MDA含量和相对电导率的影响

如图2所示, 石竹幼苗在含有50 mg·kg<sup>-1</sup> Cd的土壤中生长15、30、45天后, 其叶片MDA含量分别较CK增加了23.08%, 23.13%和26.46%, 其叶片相对电导率是CK的2.15、1.85和1.87倍( $p < 0.05$ )。向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源GSH后, 其叶片MDA含量随外源GSH浓度的增加略微下降, 但各处理间差异不显著。其叶片相对电导率随外源GSH浓度的升高而下降, 处理IV石竹叶片相对电导率只有处理I的63.56%、72.71%和58.74% ( $p < 0.05$ ), 处

表3 Cd胁迫下石竹幼苗各指标与外源谷胱甘肽浓度之间的相关性分析与线性回归分析

Table 3 Correlation and linear regression analysis between each index of *Dianthus chinensis* seedlings and exogenous glutathione concentration under Cd stress

指标 Index	PB	PH	NT	Cd <sub>Root</sub>	Cd <sub>Stem</sub>	Cd <sub>Leaf</sub>	Con	MDA含量 MDA content	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> 产生速率 O <sub>2</sub> <sup>-</sup> production rate
<i>r</i>	0.523	0.446	0.417	-0.837	-0.899	-0.888	0.619	0.804	0.875
<i>b</i>	0.138*	0.027	0.021	-0.209**	-0.083**	-0.081**	-0.075**	-0.009**	-0.027**
<i>a</i>	12.293	18.562	5.730	54.481	15.510	14.786	31.240	5.486	5.477

指标 Index	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 含量 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> content	POD活性 POD activity	SOD活性 SOD activity	CAT活性 CAT activity	APX活性 APX activity	MDAR活性 MDAR activity	DHAR活性 DHAR activity	GR活性 GR activity	AsA含量 AsA content	GSH含量 GSH content
<i>r</i>	0.840	0.417	0.122	0.721	0.204	0.672	0.462	0.637	0.565	0.757
<i>b</i>	-0.025**	0.187	0.049	0.101**	0.001	0.003**	0.001	0.001**	0.002*	0.002**
<i>a</i>	4.338	220.339	130.075	29.968	1.477	1.270	0.483	0.347	0.643	0.311

APX, 抗坏血酸过氧化物酶; AsA, 抗坏血酸; CAT, 过氧化氢酶; Cd<sub>Leaf</sub>, 单位质量叶的Cd含量; Cd<sub>Root</sub>, 单位质量根的Cd含量; Cd<sub>Stem</sub>, 单位质量茎的Cd含量; Con, 相对电导率; DHAR, 脱氢抗坏血酸还原酶; GR, 谷胱甘肽还原酶; GSH, 谷胱甘肽; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 过氧化氢; MDA, 丙二醛; MDAR, 单脱氢抗坏血酸还原酶; NT, 分蘖数; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 超氧阴离子; PB, 整株生物量; PH, 株高; POD, 过氧化物酶; SOD, 超氧化物歧化酶。 *r*, *b*和*a*分别表示Pearson相关系数、回归直线斜率和回归直线截距。

APX, ascorbate peroxidase; AsA, ascorbic acid; CAT, catalase; Cd<sub>Leaf</sub>, Cd content per unit mass of leaf; Cd<sub>Root</sub>, Cd content per unit mass of root; Cd<sub>Stem</sub>, Cd content per unit mass of stem; Con, relative conductivity; DHAR, dehydroascorbate reductase; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; MDA, malondialdehyde; MDAR, dehydroascorbate reductase; NT, number of tillers; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide anion; PB, whole plant biomass; PH, plant height; POD, peroxidase; SOD, superoxide dismutase. *r*, *b* and *a* represent the Pearson correlation coefficient, regression line slope and the regression line intercept, respectively. \*, *p* < 0.05; \*\*, *p* < 0.001.

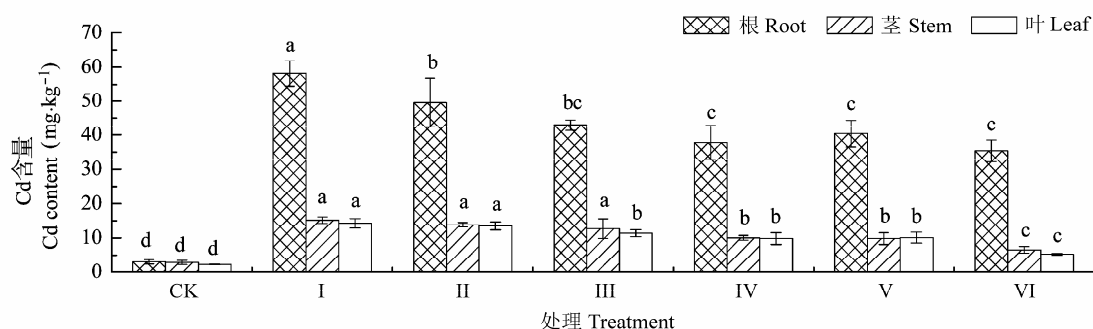


图1 Cd胁迫下外源谷胱甘肽对石竹幼苗各部分Cd含量的影响(平均值±标准偏差)。处理同表1。不同小写字母表示同一部位不同浓度外源谷胱甘肽处理差异显著(*p* < 0.05)。

Fig. 1 Effects of exogenous glutathione on the Cd content of different parts of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress (mean ± SD). Treatment see Table 1. Different small letters indicate significant difference in the same location with different exogenous glutathione treatments (*p* < 0.05).

理V和处理VI有微小的波动。由表3可知, 石竹幼苗叶片MDA含量和相对电导率与外源GSH浓度的相关系数分别为-0.619 ( $y = -0.075x + 31.24$ )和-0.804 ( $y = -0.009x + 5.486$ ) (*p* < 0.01)。

#### 2.4 外源GSH对石竹幼苗叶片O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的影响

如图3所示, 50 mg·kg<sup>-1</sup> Cd的土壤中生长的石竹幼苗在培养15、30、45天后, 其叶片中O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率分别是CK的3.74、3.98和4.39倍, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量分别是CK的3.03、2.76和3.05倍(*p* < 0.05)。向石竹

幼苗叶面喷施不同浓度的外源GSH后, 其O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率在3个时间点均呈现随外源GSH浓度升高而先下降后变化平缓的趋势, 处理IV达到最低, 3个时间点分别只有处理I的57.63%、54.45%和42.92% (*p* < 0.05), 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。同样地, 试验中石竹幼苗叶片H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量随外源GSH浓度升高而下降直至不再变化, 处理VI在3个时间点只有处理I的34.98%、41.40%和38.43% (*p* < 0.05), 处理V、VI和CK之间差异不显著。另外, 由表4

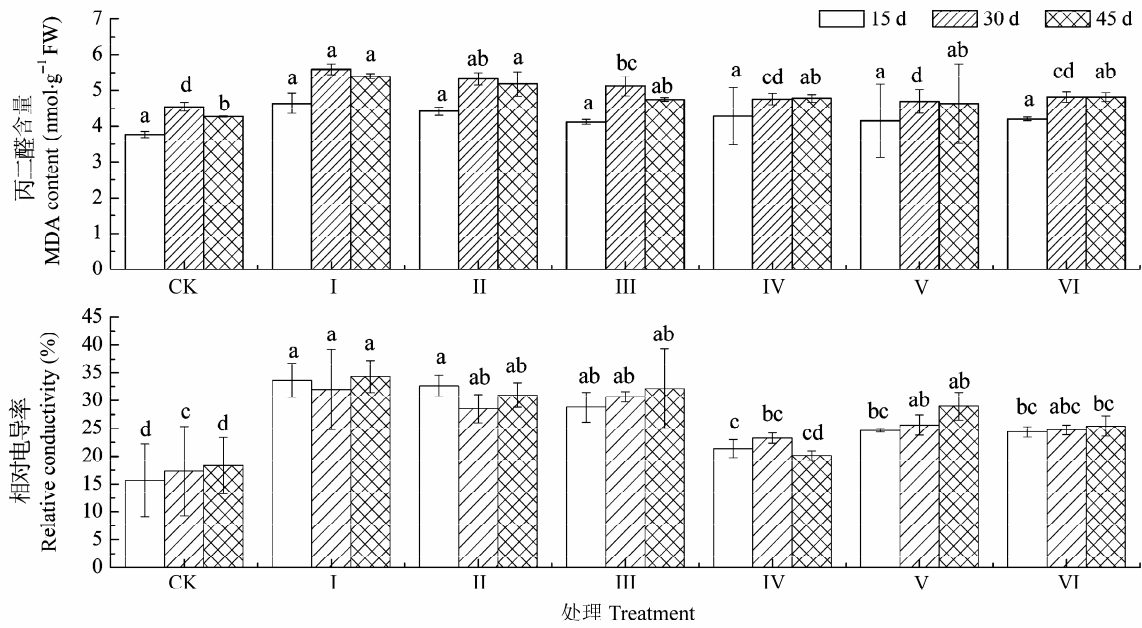


图2 Cd胁迫下外源谷胱甘肽对石竹幼苗叶片丙二醛含量和相对电导率的影响(平均值±标准偏差)。处理同表1。不同小写字母表示相同处理时间下不同浓度的外源谷胱甘肽处理间差异显著( $p < 0.05$ )。

Fig. 2 Effects of exogenous glutathione on malondialdehyde (MDA) content and the relative conductivity of *Dianthus chinensis* seedling leaves under Cd stress (mean ± SD). Treatment see Table 1. Different small letters indicate significant difference between exogenous glutathione treatments of same treatment duration ( $p < 0.05$ ).

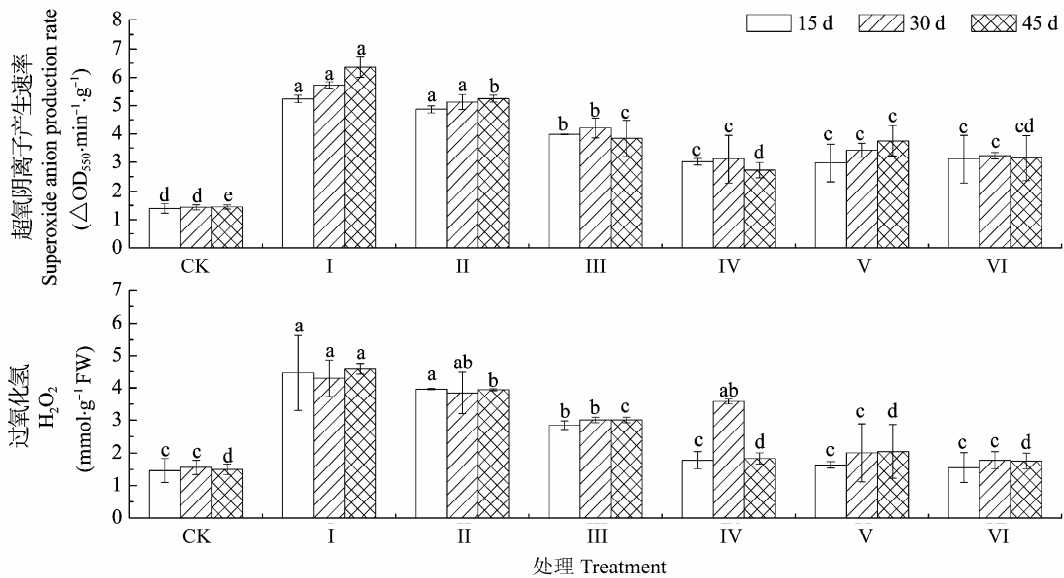


图3 Cd胁迫下外源谷胱甘肽对石竹幼苗叶片O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的影响(平均值±标准偏差)。处理同表1。不同小写字母表示相同处理时间下不同浓度的外源谷胱甘肽处理间差异显著( $p < 0.05$ )。

Fig. 3 Effects of exogenous glutathione on superoxide anion production rate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content of *Dianthus chinensis* seedling leaves under Cd stress (mean ± SD). Treatment see Table 1. Different small letters indicate significant difference between exogenous glutathione treatments of same treatment duration ( $p < 0.05$ ).

可知, O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量之间的相关系数达到0.72, 由表3可知, 两者与外源GSH浓度相关

系数分别达到-0.875 ( $y = -0.027x + 5.477$ )和-0.840 ( $y = -0.025x + 4.338$ ) ( $p < 0.01$ )。

表4 石竹幼苗各指标间的相关系数

Table 4 Correlation coefficients between various indicators of *Dianthus chinensis* seedlings

指标 Index	Cd <sub>root</sub>	Con	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	POD	SOD	CAT	APX	MDAR	DHAR	GR	AsA	GSH
Cd <sub>root</sub>	1												
Con	0.70**	1											
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.91**	0.72**	1										
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.72**	0.52*	0.72**	1									
POD	-0.52*	-0.74**	-0.56**	-0.33	1								
SOD	0.66**	0.66**	0.49*	0.42	-0.50*	1							
CAT	-0.37	-0.10	-0.6**	-0.42	0.14	0.27	1						
APX	-0.11	-0.19	-0.35	0.08	0.39	0.03	0.47*	1					
MDAR	-0.85**	-0.73**	-0.84**	-0.62**	0.57**	-0.40	0.48*	0.19	1				
DHAR	-0.71**	-0.70**	-0.76**	-0.49*	0.46*	-0.33	0.45*	0.29	0.78**	1			
GR	-0.78**	-0.56**	-0.84**	-0.61**	0.45*	-0.28	0.59**	0.24	0.72**	0.83**	1		
AsA	-0.74**	-0.66**	-0.83**	-0.48*	0.55**	-0.25	0.52*	0.47*	0.81**	0.87**	0.84**	1	
GSH	-0.49*	-0.39	-0.65**	-0.59**	0.52*	0.06	0.73**	0.28	0.58**	0.54*	0.68**	0.65**	1

指标同表3。

Index see Table 3. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

## 2.5 外源GSH对石竹幼苗叶片POD、SOD、CAT活性的影响

如图4所示, 培养15、30、45天后, 处理I 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个时间点时分别是CK的1.08、1.65和1.39倍( $p < 0.05$ )。向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源GSH后, 处理15天时, 处理II-VI石竹叶片POD活性与处理I无显著差异; 45天时, POD活性随外源GSH浓度的增大先增大后减小再增大, 处理III最大活性时与CK无显著差异。培养15、30天时, 处理II-VI石竹叶片SOD活性与处理I无显著差异。30天时, 处理II-VI石竹幼苗叶片CAT活性随外源GSH浓度的增大先增大后减小到变化不明显, 15、45天时处理II-VI石竹幼苗叶片CAT活性与处理I无显著差异。由表3可知CAT活性与外源GSH浓度的相关系数达到0.721 ( $y = 0.101x + 29.968$ ) ( $p < 0.01$ )。

## 2.6 外源GSH对石竹幼苗叶片APX、MDAR、DHAR和GR活性的影响

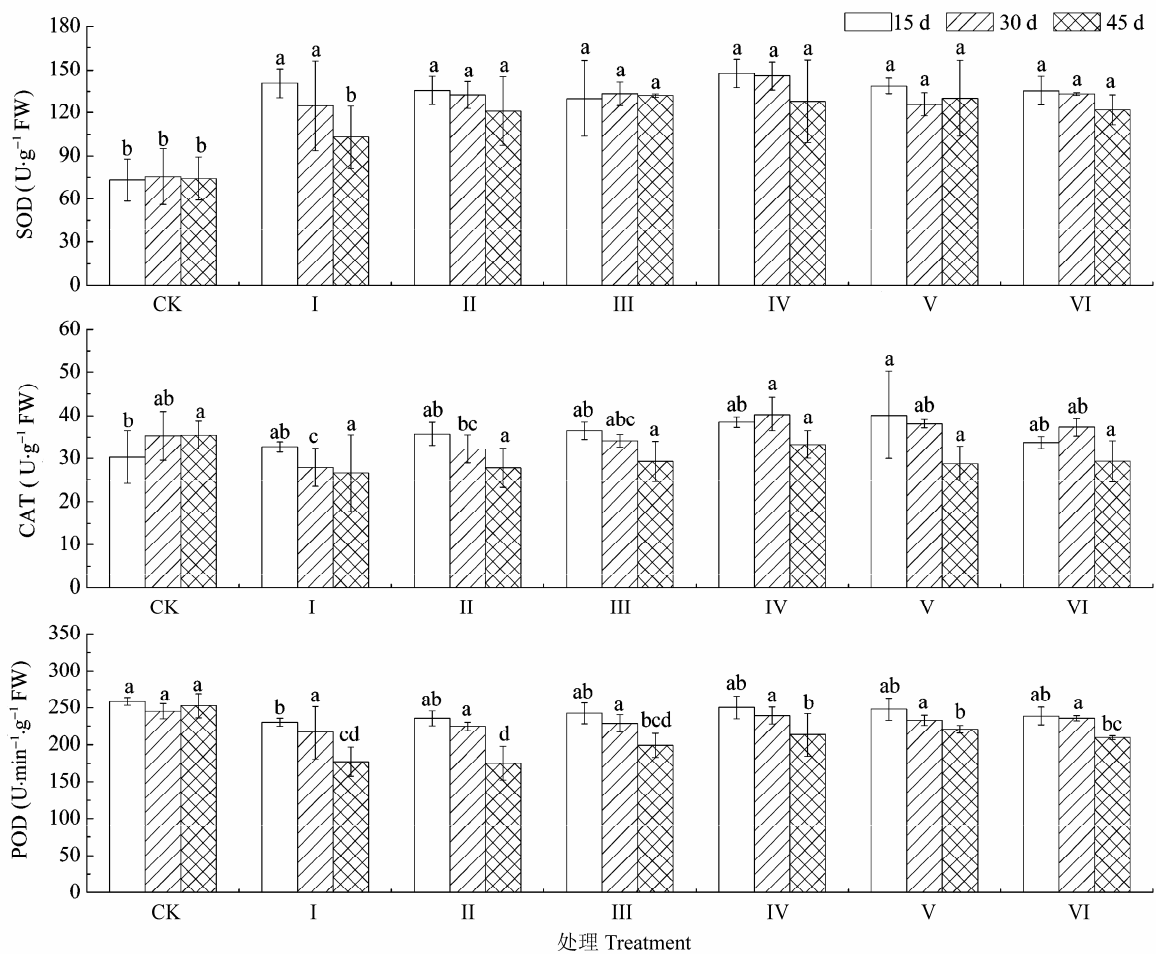
如图5所示, 在3个时间点处理I石竹幼苗叶片APX、MDAR、DHAR和GR活性平均值较CK分别下降了8.50%、26.01%、34.72%和43.40% ( $p < 0.05$ )。向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的外源GSH后, 处理II-VI石竹叶片APX活性在处理第15天时较处理I无显著变化, 在第30、45天时先上升后平

缓下降, 处理III的活性达到最高, 显著高于处理I ( $p < 0.05$ ), 与CK差异不显著; 处理II-VI石竹叶片MDAR活性在3个时间点均随外源GSH浓度的增加而先上升后平缓下降, 处理IV均达到最大值, 分别是处理I的1.15、1.32和1.28倍( $p < 0.05$ ); 处理II-VI石竹叶片DHAR活性在第15天时无显著差异, 30、45天时随外源GSH浓度的增加而先上升后平缓下降, 处理IV均达到最大值, 分别较处理I增加了14.89%、65.12%和53.66% ( $p < 0.05$ ), 处理I和II、V和VI在3个时间点差异均不显著; 处理II-VI石竹叶片GR活性也随外源GSH浓度的增加而先上升后平缓下降, 处理III的活性达到最高, 分别是处理I的1.19、1.40和1.14倍( $p < 0.05$ )。

另外, 由表4可知, MDAR与DHAR和GR的相关系数分别为0.78和0.72, GR与DHAR的相关系数为0.83, 由表3可知, MDAR和GR与外源GSH浓度的相关系数分别达到了0.672 ( $y = 0.003x + 1.270$ )和0.637 ( $y = 0.001x + 0.347$ ) ( $p < 0.01$ )。

## 2.7 外源GSH对石竹幼苗叶片AsA和GSH含量的影响

如图6所示, 石竹幼苗在含有50 mg·kg<sup>-1</sup> Cd的土壤中生长期15、30、45天后, 其叶片AsA含量只有CK的58.04%、56.86%和30%, GSH含量也降为CK的66.67%、68.29%和60.00% ( $p < 0.05$ )。向石竹幼苗叶面喷施不同浓度的GSH后, 3个时间点



**图4** Cd胁迫下外源谷胱甘肽对石竹幼苗叶片过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶活性的影响(CAT) (平均值±标准偏差)。处理同表1。不同小写字母表示相同处理时间下不同浓度的外源谷胱甘肽处理间差异显著( $p < 0.05$ )。  
**Fig. 4** Effects of exogenous glutathione on peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities of *Dianthus chinensis* seedling leaves under Cd stress (mean ± SD). Treatment see Table 1. Different small letters indicate significant difference between exogenous glutathione treatments of same treatment duration ( $p < 0.05$ ).

石竹叶片的AsA和GSH含量都随外源GSH的浓度增大而先增加后平缓下降, AsA在处理IV达到最大值, GSH在处理V达到最高值, 两者在处理VI下降到最低值, 但仍高于处理I。由表3可知, 石竹幼苗叶片AsA与GSH的含量与外源GSH浓度的相关系数分别为0.565 ( $y = 0.002x + 0.643$ ) ( $p < 0.05$ )和0.757 ( $y = 0.002x + 0.311$ ) ( $p < 0.01$ ), 说明外源GSH更多地直接影响石竹幼苗的GSH含量。

### 3 讨论

在50 mg·kg<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup>胁迫下, 石竹幼苗体内O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率加快, 导致单线态氧、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以及·OH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, 诱导石竹幼苗细胞内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、外界的有毒物质进入细胞, 细胞内新陈代谢发生紊乱, 石竹幼苗的生长发育受到抑制, 故而生物量降低。

施加外源物质能够提高植物对逆境胁迫的耐受性, 如外源抗坏血酸(AsA)能提高盐胁迫下大麦(*Hordeum vulgare*)叶绿体内ROS的清除能力(Herbette *et al.*, 2006); 外源半胱氨酸(Cys)可提高小麦幼苗对铜胁迫的耐受性(彭向永和宋敏, 2011); 外源NO能够减轻冷害胁迫对棉花光系统II的伤害, 增强棉花(*Gossypium hirsutum*)的抗冷

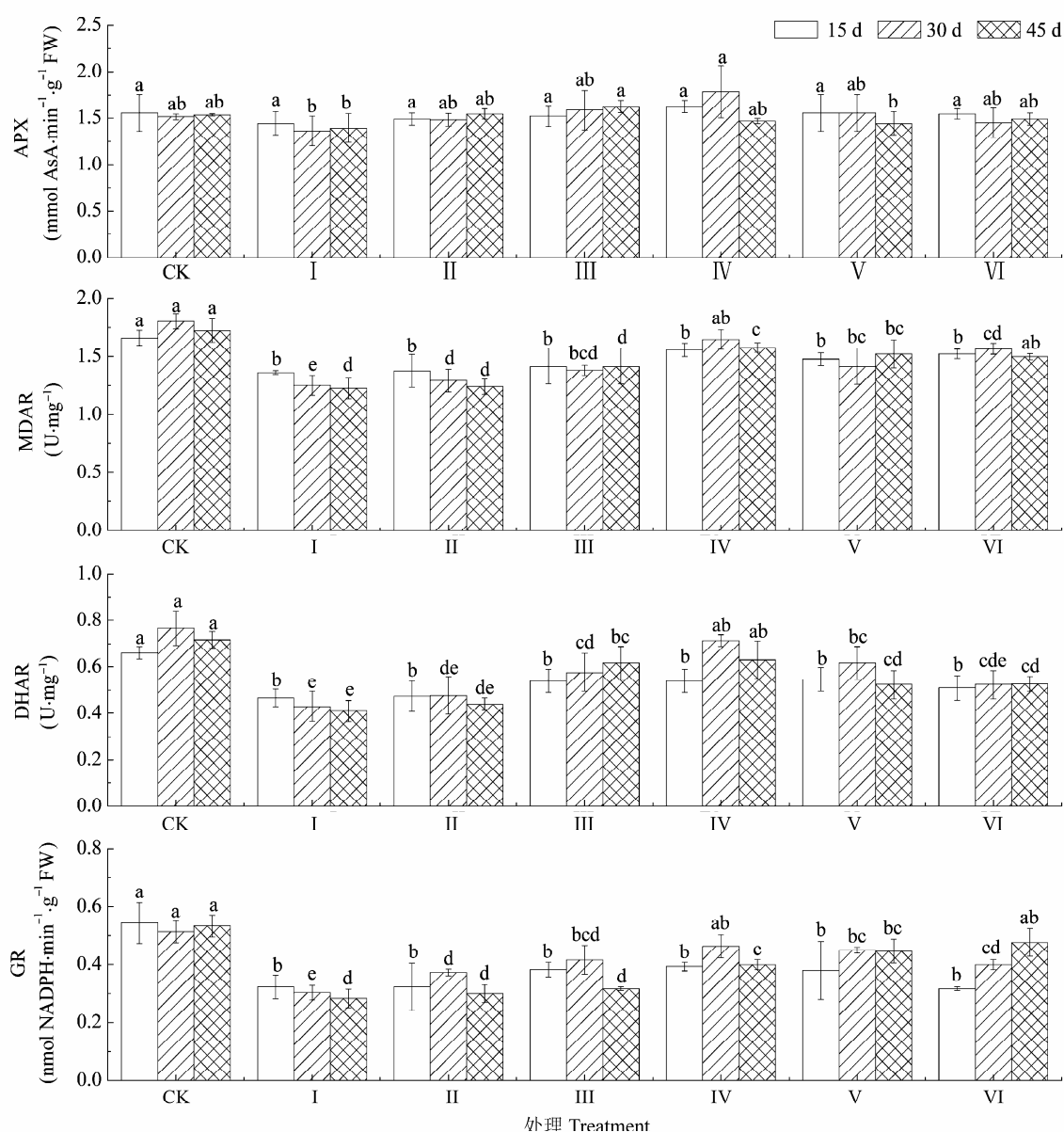


图5 Cd胁迫下外源谷胱甘肽对石竹幼苗叶片抗坏血酸过氧化物酶(APX)、单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性的影响(平均值±标准偏差)。处理同表1。不同小写字母表示相同处理时间下不同浓度的外源谷胱甘肽处理间差异显著( $p < 0.05$ )。

**Fig. 5** Effects of exogenous glutathione on ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDAR), dehydroascorbate reductase (DHAR) and glutathione reductase (GR) activities of *Dianthus chinensis* seedling leaves under Cd stress (mean  $\pm$  SD). Treatment see Table 1. Different small letters indicate significant difference between exogenous glutathione treatments of same treatment duration ( $p < 0.05$ ).

性(杨美森等, 2012)等。GSH是植物体内一种必需的代谢物和有力的调节物, 是AsA-GSH循环中重要的非酶抗氧化剂, 可以清除因重金属诱导产生的过量 $H_2O_2$ , 也能直接与 $O_2^-$ 和 $\cdot OH$ 等ROS发生非酶反应而对其进行清除(陈沁和刘友良, 2000)。本试验中, 向生长在 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ Cd}^{2+}$ 土壤中的石竹

幼苗叶面喷施 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的外源GSH, 及时补充了其内源GSH ( $y = 0.002x + 0.311, R^2 = 0.573$ )的不足, 降低了其体内游离态 $\text{Cd}^{2+}$ 的积累量, 减缓了叶片 $O_2^-$ 产生速率, 降低了 $H_2O_2$ 和 $\cdot OH$ 等ROS的含量, 在一定程度上提高了POD、CAT、APX、MDAR、DHAR和GR的活性以及AsA、GSH的含



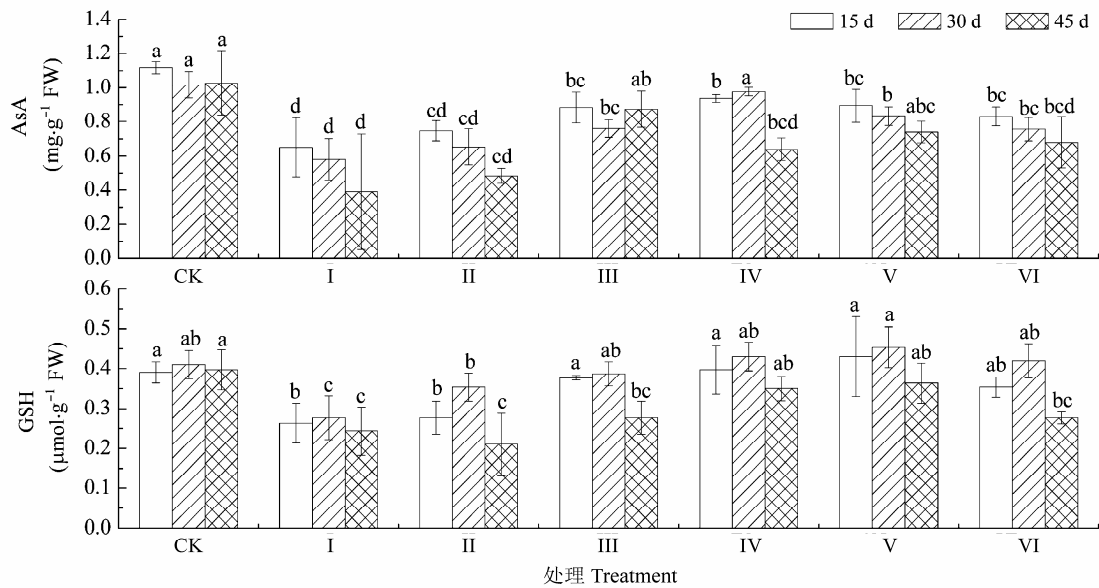


图6 Cd胁迫下外源谷胱甘肽对石竹幼苗叶片抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)含量的影响(平均值±标准偏差)。处理同表1。不同小写字母表示相同处理时间下不同浓度的外源谷胱甘肽处理间差异显著( $p < 0.05$ )。

Fig. 6 Effects of exogenous glutathione on ascorbic acid (AsA) and glutathione (GSH) content of *Dianthus chinensis* seedling leaves under Cd stress (mean ± SD). Treatment see Table 1. Different small letters indicate significant difference between exogenous glutathione treatments of same treatment duration ( $p < 0.05$ ).

量,从而有效地缓解了石竹幼苗受到的高浓度Cd毒害。

由试验结果可知,外源GSH降低了石竹幼苗根系内Cd含量,这可能是因为GSH在植物螯合态合成酶的催化下在细胞质中聚合形成植物螯合肽(phytochelatins, PC) (Ha *et al.*, 1999), PC具有很强的重金属亲和力,与石竹幼苗从土壤中吸收的Cd<sup>2+</sup>螯合后形成无毒的化合物Cd-S4-complex,这些化合物随即被转运到石竹幼苗根系细胞液泡中,并且在其他酶的作用下被排出细胞外,从而降低了石竹幼苗细胞内游离的Cd<sup>2+</sup>浓度,且防止了Cd<sup>2+</sup>敏感酶变性失活。另外,外源GSH抑制了石竹幼苗根系中的Cd<sup>2+</sup>向地上部运输,对地上部Cd毒害的缓解作用大于根系,这与外源GSH对海州香薷(*Elsholtzia haichomensis*)铜毒害的缓解作用的结果(钱猛和朱昌华, 2010)一致。

本试验中,随着外源GSH的喷施,石竹幼苗叶片的O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率下降, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等ROS的含量减少,一方面是这些ROS直接由GSH还原,另一方面与石竹幼苗体内的抗氧化酶系统关系密切。SOD、POD、CAT是植物体内重要的保护酶, SOD可以催化O<sub>2</sub><sup>-</sup>发生歧化反应生成H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和O<sub>2</sub>, POD和CAT则

将H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分解成H<sub>2</sub>O。生长在含有50 mg·kg<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup>的土壤中的石竹幼苗的叶片体内POD与CAT活性都大幅度下降, SOD活性不减反增;向石竹幼苗叶面喷施GSH后, POD与CAT活性有先增后减的趋势,而处理I–VI的SOD活性从始至终均处在较高水平,没有显著变化,足以说明SOD酶作为一种诱导酶(杜海荣等, 2010)在逆境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,影响着植物体内的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和O<sub>2</sub><sup>-</sup>的浓度,在植物自身防御系统中处于核心的地位(罗娅等, 2007)。这也与外源AsA对Cd胁迫下黑藻(*Hydrilla verticillata*)抗氧化系统的保护作用研究结论一致(许丙军等, 2006)。在AsA-GSH循环中, APX利用AsA将H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>还原为H<sub>2</sub>O,同时形成MDHA, MDHA很不稳定,一部分MDAR被还原为AsA,另一部分进一步氧化生成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 (Smirnoff, 2000),所以APX、MDAR、DHAR和GR活性决定了植物体内的AsA-GSH循环所起到的抗逆境生理作用。试验中, MDAR和GR在AsA-GSH循环中的敏感性强于

APX和DHAR, 且MDAR与AsA、GR与GSH的相关系数分别达到0.81和0.68 (表4), 这说明MDAR还原MDHAR是AsA再生的主要途径, 而GR是生成GSH的重要酶, 这分别与Mittova等(2000)和Jin等(2003)结论一致。

#### 4 结论

综上所述, 喷施适宜浓度的外源GSH可补充石竹幼苗体内的非酶抗氧化剂, 提高抗氧化酶活性, 有效地缓解土壤重金属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GSH, 缓解效应有下降的趋势。由于本试验设计的外源GSH浓度范围有限, 更高浓度的外源GSH是否会与Cd协同氧化胁迫石竹幼苗还需要进一步研究。综合试验各因素表明, 55–65 mg·L<sup>-1</sup>的外源GSH对土壤重金属Cd胁迫下石竹幼苗的缓解效果最佳。

基金项目 四川农业大学双支计划。

#### 参考文献

- Anderson ME (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111–112, 1–14.
- Chen Q, Liu YL (2000). Effect of exogenous GSH on growth of barley seedlings under salt stress. *Acta Agronomica Sinica*, 4, 193–197. (in Chinese with English abstract) [陈沁, 刘友良 (2000). 外源GSH对盐胁迫下大麦幼苗生长的影响. 作物学报, 4, 193–197.]
- Du HR, Yang TT, Lü RF (2010). Effects of fluoride pollution on the growth and physiological characteristics of maize seedlings. *Journal of Agro-Environment Science*, 29, 216–222. (in Chinese with English abstract) [杜海荣, 杨田甜, 吕荣芳 (2010). 氟污染对玉米幼苗生长及生理特性的影响. 农业环境科学学报, 29, 216–222.]
- Ellman GL (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70–77.
- Ha SB, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS, Smith AP (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell*, 11, 1153–1164.
- He D, Liu YG, Huang YE, Lian XJ, Zhang W (2007). Effects of calcium on chlorophyll and antioxidant enzymes in *Phragmites australis* under cadmium stress. *Journal of Agro-Environment Science*, 26, 197–201.
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, Piette L, Magniette MLM, Cuine S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou JP, Vavasseur A, Leonhardt N (2006). Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie*, 88, 1751–1765.
- Jiang YD, Wang ZH, Gao JP (2010). Effects of GSH on tolerance to water deficit stress in cut rose. *Acta Horticulturae Sinica*, 37, 597–606. (in Chinese with English abstract) [姜玉东, 王子华, 高俊平 (2010). 谷胱甘肽对切花月季“Samantha”失水胁迫耐性的影响. 园艺学报, 37, 597–606.]
- Jin YH, Tao DL, Hao ZQ, Ye J, Du YJ, Liu HL, Zhou YB (2003). Environmental stresses and redox status of ascorbate. *Acta Botanica Sinica*, 45, 795–801.
- Li HS (2000). *Principle and Technology of Plant Physiology and Biochemistry Experiment*. Higher Education Press, Beijing. (in Chinese) [李合生 (2000). 植物生理生化实验原理和技术. 高等教育出版社, 北京.]
- Lu LL (2006). *Study on the Alleviatory Effect of GSH on Limonium bicolor Under NaCl Stress*. Master degree dissertation, Shandong Normal University, Jinan. (in Chinese with English abstract) [鲁丽丽 (2006). GSH对NaCl胁迫下二色补血草盐害缓冲机制的研究. 硕士学位论文, 山东师范大学, 济南.]
- Luo Y, Tang HR, Zhang Y (2007). Effect of low temperature stress on activities of SOD and enzymes of ascorbate-glutathione cycle. *Acta Horticulturae Sinica*, 34, 1405–1410. (in Chinese with English abstract) [罗娅, 汤浩茹, 张勇 (2007). 低温胁迫对草莓叶片SOD和AsA-GSH循环酶系统的影响. 园艺学报, 34, 1405–1410.]
- Manisha G, Ann C, Jaco V, Herman C (1999). Copper effects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 106, 262–267.
- Mittova V, Volokita M, Guy M, Tai M (2000). Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*, 100, 42–51.
- Nakano Y, Kozi A (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867–880.
- Peng XY, Chang B, Xu SR (2012). 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*, 31, 867–873. (in Chinese with English abstract) [彭向

- 永, 常宝, 徐术人 (2012). 谷胱甘肽对小麦幼苗铜毒害的缓解作用及其与氮、硫、磷积累的相关性. *农业环境科学学报*, 31, 867–873.]
- Peng XY, Song M (2011). Effects of exogenous cysteine on growth, copper accumulation and antioxidative systems in wheat seedlings under Cu stress. *Acta Ecologica Sinica*, 31, 3504–3511. (in Chinese with English abstract) [彭向永, 宋敏 (2011). 外源半胱氨酸对铜胁迫下小麦幼苗生长、铜积累量及抗氧化系统的影响. *生态学报*, 31, 3504–3511.]
- Qian M, Zhu CH (2010). Alleviation of glutathione on copper toxicity of *Elsholtzia haichowensis* Sun. *Plant Physiology Journal*, 46, 1243–1246. (in Chinese with English abstract) [钱猛, 朱昌华 (2010). 外源GSH对海州香薷铜毒害的缓解作用. *植物生理学通讯*, 46, 1243–1246.]
- Smirnoff N (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Science*, 355, 1455–1464.
- Stasolla C, Yeung EC (2001). Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination. *Physiologia Plantarum*, 111, 196–205.
- Tanaka K, Suda Y, Kondo N (1985). Ozone tolerance and the ascorbate-dependent hydrogen peroxide decomposing system in chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 26, 1425–1431.
- Wang AG, Luo GH (1990). Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiology Communications*, (6), 55–57.
- Xiong QE (2003). *Experimental Guidance of Plant Physiology*. Sichuan Science and Technology Press, Chengdu. (in Chinese) [熊庆娥 (2003). *植物生理学试验教程*. 四川科学技术出版社, 成都.]
- Xu BJ, Shi GX, Xu QS (2006). Protective effects of exogenous ascorbic acid on antioxidant system in *Hydrilla verticillata* under Cd<sup>2+</sup> stress. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 17, 1768–1770. (in Chinese with English abstract) [许丙军, 施国新, 徐勤松 (2006). 外源抗坏血酸对镉胁迫下黑藻抗氧化系统的保护作用. *应用生态学报*, 17, 1768–1770.]
- Yang MS, Wang YF, Gan XX (2012). Effects of exogenous nitric oxide on growth, antioxidant system and photosynthetic characteristics in seedling of cotton cultivar under chilling injury stress. *Scientia Agricultura Sinica*, 45, 3058–3067. (in Chinese with English abstract) [杨美森, 王雅芳, 干秀霞 (2012). 外源一氧化氮对冷害胁迫下棉花幼苗生长、抗氧化系统和光合特性的影响. *中国农业科学*, 45, 3058–3067.]

责任编辑: 麻 密 责任编辑: 李 敏