

不同形态氮素对龙葵镉毒害的缓解效应

蒋 婷, 姜贝贝, 潘远智*, 谭 森, 张梦琪, 杨亚男, 刘柿良

(四川农业大学风景园林学院, 成都 611130)

摘 要:为探讨不同形态氮素对龙葵(*Solanum nigrum*)镉毒害的缓解效应,采用温室盆栽试验,研究了外源添加不同形态氮素($\text{NO}_3^--\text{N}[\text{NaNO}_3]$ 、 $\text{NH}_4^+-\text{N}[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 和 $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}[\text{NH}_4\text{NO}_3]$),对 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd 胁迫下龙葵生长的影响。试验结果表明, $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd 显著抑制了龙葵的生长;外源添加一定浓度的不同形态氮素可显著缓解龙葵的 Cd 胁迫; NH_4^+-N 对龙葵地上部生物量的增产效果优于 NO_3^--N 和 $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$;不同浓度 NO_3^--N 的施加显著降低叶片 CAT 和 POD 活性, SOD 活性呈先升后降趋势;CAT 活性随着添加 NH_4^+-N 浓度的增加先升后降, POD 活性逐渐上升, SOD 活性逐渐下降;叶片 CAT 与 SOD 活性随着 $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$ 添加浓度的增加逐渐降低至稳定,而 POD 活性则先升后降;叶片超氧阴离子产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量显著低于对照; NH_4^+-N 和 $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$ 处理下的 GR 活性降低,添加 NO_3^--N 的则先上升后下降。AsA 含量和 APX 活性则较无外源氮素处理的龙葵升高,较低浓度的 NO_3^--N 处理下 GSH 含量呈现随其浓度的增加逐渐升高的趋势。 NH_4^+-N 对龙葵镉毒害的缓解效应优于其他两种处理方式。

关键词:氮素;龙葵;镉胁迫;缓解效应;抗坏血酸-谷胱甘肽循环

中图分类号:X503.23 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2015)06-1060-09 doi:10.11654/jaes.2015.06.007

Mitigation of Different Forms of Exogenous Nitrogen on Cd Toxicity to *Solanum nigrum*

JIANG Ting, JIANG Bei-bei, PAN Yuan-zhi*, TAN Miao, ZHANG Meng-qi, YANG Ya-nan, LIU Shi-liang

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

Abstract: Cadmium (Cd) pollution poses a serious risk to human health. *Solanum nigrum* is a Cd-hyperaccumulator. However, Cd absorption by *Solanum nigrum* may be affected by different forms of exogenous nitrogen. Here we did an experiment in greenhouse to investigate the effects of different forms of exogenous nitrogen ($\text{NO}_3^--\text{N}[\text{NaNO}_3]$, $\text{NH}_4^+-\text{N}[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ and $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}[\text{NH}_4\text{NO}_3]$) on *Solanum nigrum* seedlings exposed to $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd in soil. At certain concentrations, different forms of exogenous nitrogen significantly relieved the Cd stress on *Solanum nigrum* treatment. Under Cd stress, the CAT and POD activities of *Solanum nigrum* leaves were significantly reduced, but SOD activity increased at first and then reduced by different concentrations of NO_3^--N . Exogenous NH_4^+-N increased CAT activity at first and reduced then; however, POD activity was gradually increased but SOD activity reduced by NH_4^+-N . Applying $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$ increased CAT and SOD activities, while led to a rise and then reduction in POD activity. Superoxide anion production rate, GR activity, H_2O_2 and MDA content of *Solanum nigrum* leaves under Cd stresses were significantly lower in exogenous nitrogen treatment than in no-nitrogen treatment. Exogenous nitrogen increased AsA content and APX activity, compared with those of no exogenous nitrogen treatment. Low concentrations of NO_3^--N increased GSH content. The experimental results show that NH_4^+-N is more effective in mitigating Cd stress of *Solanum nigrum* than others.

Keywords: nitrogen; *Solanum nigrum*; cadmium stress; mitigation; AsA-GSH cycle

近年来,人类各种工业活动导致大量重金属进入土壤,严重威胁了人类健康和生态平衡^[1]。植物修复是修复土壤重金属污染中备受推崇的方法,而如何提高

其修复效率成为了研究的重点。其中配合施肥等农艺措施在生产上意义重大^[2],并且发现氮肥能提高一般植物和富集植物修复镉(Cd)污染的效率^[3];另一方面,植物的抗逆性与活性氧(ROS)的清除紧密相关,过量的重金属会使 ROS 的产生与清除机制失去平衡,引发膜脂过氧化作用^[4],致使植物体受到伤害。而植物本身具有一个高效的抗氧化防御系统,在这个系统中抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环是清除植

收稿日期:2015-01-07

基金项目:四川农业大学大学生创新性实验计划(1310626068);四川省大学生创新创业训练计划(201410626051)

作者简介:蒋 婷(1992—),女,四川南充人,在读本科生,从事植物修复重金属研究。E-mail:JITyeh@163.com

*通信作者:潘远智 E-mail:scpyzls@163.com

物体内 ROS 自由基的重要途径^[5]。

龙葵(*Solanum nigrum*)是我国研究人员新发现的 Cd 超累积植物,其耐 Cd 机制的研究意义重大。目前对龙葵的研究主要集中在 Cd 富集特性、解毒机理及部分生理代谢机制方面。魏树和等^[6]发现龙葵是 Cd 超积累植物;王林等^[7]在此基础上通过研究龙葵地上部和地下部吸收积累 Cd 的变化探讨氮、钾肥提高龙葵修复 Cd 污染土壤的可行性;曾秀存等^[8]研究了两种基因型龙葵对 Cd 胁迫的生理响应,但最终研究表明两种龙葵均不是 Cd 超富集植物。研究认为,施 N 能增加 Cd 在土壤中的生物有效性^[9];NO₃⁻-N 与 NH₄⁺-N 分别促进水稻根和地上部生长,且 NH₄⁺-N 促进水稻 Cd 吸收^[10];也有研究表明施加 NO₃⁻-N 会减少菜心(*Brassica campestris*)对 Cd 的吸收量^[11]。由此可见,不同形态氮素对不同植物 Cd 的生物有效性的影响存在差异。目前,国内外对 Cd 胁迫下植物抗氧化系统的研究,多集中于研究抗氧化酶防御系统(SOD、POD、CAT),对 AsA-GSH 循环系统研究较少,尤其是对 Cd 胁迫下外源添加不同形态氮素的 AsA-GSH 循环的研究更少。因此,本研究以龙葵为材料,研究不同形态氮素(NO₃⁻-N[NaNO₃], NH₄⁺-N[(NH₄)₂SO₄]和 NH₄⁺-N+NO₃⁻-N[NH₄NO₃])对龙葵的抗坏血酸-谷胱甘肽代谢循环和吸收 Cd 的影响,以期进一步揭示超富集植物龙葵的耐 Cd 机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤

采用温室盆栽试验,于 2013 年 5—10 月在四川农业大学成都校区实验基地进行。供试土样取自四川农业大学成都校区实验基地未开垦的自然土壤(不含腐叶根),采样深度为 0~20 cm。将其自然风干、捣碎、剔除杂物,研磨,过 5 mm 筛,并用适量多菌灵消毒,堆积静置 45 d 后,按照每盆 8 kg 的标准装入带托盘塑料花盆中备用。花盆规格为下口径 20 cm、上口径 30 cm、深 25 cm。测定种植土的基本理化性质为:pH 6.8,全氮 0.73 g·kg⁻¹,全磷 0.38 g·kg⁻¹,全钾 3.76 g·kg⁻¹,有机碳 32.92 g·kg⁻¹,总 Cd 0.419 mg·kg⁻¹。

1.1.2 植物材料

供试龙葵通过向公司购买种子,自行培育而成。

1.2 试验设计

将装有种植土的塑料花盆置于大棚(透光率 80%;温度为 25±3 ℃;相对湿度为 78%)内,用清水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(植株长出 4 片真叶)的龙葵幼苗,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 1.5~2.0 cm。养护管理期间,每天观察植株生长情况,浇水时浇透,并将溢出的水倒回盆内,使土壤湿度基本一致。10 d 后,植株恢复生长,将 40 mg·kg⁻¹(由预试验得到的临界浓度)的 Cd²⁺(CdCl₂·2.5H₂O)水溶液均匀浇灌在盆土中(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 15 d 后按表 1(三种不同形态 N 素的浓度梯度设为 0、25、50、100、200、400 mg·kg⁻¹干土)向龙葵浇灌不同浓度、不同形态的外源氮素,CK 用清水浇灌,每个处理 3 盆,重复 3 次。浇灌分 3 次进行,保证最终施加到土壤的 N 素含量均相同,通过计算可知:NO₃⁻-N[以 NaNO₃ 为试验 N 素],加入该 N 肥的质量梯度为 795、1590、3180、6360、12 720 mg;NH₄⁺-N[以 (NH₄)₂SO₄ 为试验 N 素],加入该 N 肥的质量梯度为 590、1180、2360、4720、9440 mg;NH₄⁺-N+NO₃⁻-N(以 NH₄NO₃ 为试验 N 素),加入该 N 肥的质量梯度为 357、714、1428、2856、5712 mg。

表 1 试验设计

Table 1 Experimental design

处理 Treatment	氮形态 Nitrogen form	氮素处理浓度/mg·kg ⁻¹	镉 Cd/ mg·kg ⁻¹
CK		0	40
T1	NO ₃ ⁻ -N(NaNO ₃)	25	40
T2		50	40
T3		100	40
T4		200	40
T5		400	40
T6	NH ₄ ⁺ -N[(NH ₄) ₂ SO ₄]	25	40
T7		50	40
T8		100	40
T9		200	40
T10		400	40
T11	NH ₄ ⁺ -N+NO ₃ ⁻ -N(NH ₄ NO ₃)	25	40
T12		50	40
T13		100	40
T14		200	40
T15		400	40

注:T1-T5 表示 NO₃⁻-N(NaNO₃) 处理的不同浓度;T6-T10 表示 NH₄⁺-N[(NH₄)₂SO₄] 处理的不同浓度;T11-T15 表示 NH₄⁺-N+NO₃⁻-N(NH₄NO₃) 处理的不同浓度。

Note:T1-T5 represent different concentrations of NO₃⁻-N(NaNO₃), T6-T10 represent treatments treated with different concentrations of NH₄⁺-N[(NH₄)₂SO₄], and T11-T15 represent NH₄⁺-N+NO₃⁻-N(NH₄NO₃) treatments.

1.3 测定项目与方法

处理 30 d 后,取植株中部成熟叶片,测定各项生理生化指标。称取鲜叶 0.5 g 剪碎,加 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 值 7.8 的 PBS(内含 1% PVP)5 mL 及少量石英砂,于冰浴中研磨提取,经 $15\,000 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下离心 15 min,上清液定容至 10 mL,上清液为酶提取液,用于以下测定。

1.3.1 过氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性

参照李合生等^[12]的方法。SOD 采用 NBT 光氧化还原法,以抑制 NBT 光氧化还原 50%的酶量为一个酶活性单位。

1.3.2 超氧阴离子产生速率和过氧化氢(H_2O_2)含量

分别参照王爱国等^[13]和 Patterson 等^[14]的方法,采用羟胺法测定超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)的产生速率,过氧化氢(H_2O_2)含量采用分光光度计法测定。

1.3.3 丙二醛(MDA)含量

采用 Cakmak^[15]的方法,结合硫代巴比妥酸法测定。

1.3.4 还原型谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(AsA)含量

参照 Nagalakshmi 等^[16]的方法测定还原型谷胱甘肽(GSH)含量,采用巯基试剂 DTNB;抗坏血酸(AsA)含量的测定则采用分光光度计法^[17]。

1.3.5 谷胱甘肽还原酶(GR)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的活性

参照 Milosevic 等^[18]的方法测定 GR 活性;采用抗坏血酸氧化法^[19]测定 APX 活性,具体过程有所改动。

1.3.6 Cd 含量

龙葵根、茎、叶样品 Cd 含量采用湿样消解法,用原子吸收分光光度计(上海精密科学仪器有限公司, AA320N 型)测定龙葵地上和地下部分镉含量。

1.3.7 龙葵生物量

处理 45 d 后,采用破坏性收获法采集植株。用蒸馏水将收获的植株上附着的杂质洗净,将样品分为根、茎、叶三部分,准确称重;在 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱内杀青 30 min,再在 $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重,计算单株龙葵根、茎、叶及单株生物量。

1.4 数据分析

采用 Excel 2010 对试验数据进行初步计算,在 SPSS 17.0 上进行单因素方差分析、Duncan's 多重比较分析,单因素方差检验(One-way ANOVA)和最小显著性差异法检验(LSD),最后采用 Excel 2010 制表作图。显著性水平设定 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同形态氮素对龙葵生长的影响

由表 2 可知,不同形态氮素对龙葵的地上部分生物量构成显著的差异,而对龙葵的地下部分生物量(干重)影响不大。外源添加不同浓度 NO_3^--N 的龙葵地上部分均显著高于 CK,且地上部分干重随着 NO_3^--N 浓度的增加而逐渐增加,T5 处理较 CK 增加了 62.80%。 NH_4^+-N 的影响与 NO_3^--N 相似,且 NH_4^+-N 处理下龙葵地上部分干重增加最多。 $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$ 处理下龙葵地上部干重虽与前二者变化趋势相同,但对地下部分干重影响极显著。从而得知,在三种氮素形态中, NH_4^+-N 的处理对地上部生物量(干重)的增加显著高于 NO_3^--N 或 $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$ 。

2.2 不同形态氮素对龙葵各部分 Cd 含量的影响

从表 3 可看出,外源施加 NO_3^--N 后,龙葵的地上部和地下部 Cd 积累含量受到显著影响,且地上部 Cd 含量明显高于地下部。施用 NH_4^+-N 的各组处理中,龙葵的各部分 Cd 含量积累变化显著,呈现明显的正相关,T10 浓度处理下的龙葵各部分 Cd 含量达到最大

表 2 Cd 胁迫下不同形态氮素对龙葵地上部和地下部干重的影响

Table 2 Effects of different forms of exogenous nitrogen on shoot and root dry weights of *Solanum nigrum* under Cd stresses

处理 Treatment	氮素形态 Nitrogen form	氮素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	生物量 Biomass/ $\text{g} \cdot \text{Plant}^{-1}$ D.W. 地上部 Shoot	地下部 Root
CK		0	$5.86 \pm 0.41\text{g}$	$1.31 \pm 0.11\text{e}$
T1	NO_3^--N (NaNO_3)	25	$6.08 \pm 0.60\text{g}$	$1.35 \pm 0.08\text{e}$
T2		50	$6.84 \pm 0.97\text{efg}$	$1.49 \pm 0.07\text{de}$
T3		100	$7.06 \pm 0.38\text{efg}$	$1.82 \pm 0.15\text{cd}$
T4		200	$9.52 \pm 0.18\text{bc}$	$1.56 \pm 0.07\text{de}$
T5	NH_4^+-N [(NH_4) ₂ SO_4]	400	$9.54 \pm 0.41\text{bc}$	$1.66 \pm 0.30\text{de}$
T6		25	$6.35 \pm 0.89\text{fg}$	$1.54 \pm 0.02\text{de}$
T7		50	$7.36 \pm 0.27\text{ef}$	$2.16 \pm 0.18\text{bc}$
T8		100	$8.89 \pm 0.56\text{cd}$	$2.16 \pm 0.10\text{bc}$
T9	$\text{NH}_4^+-\text{N}+$ $\text{NO}_3^--\text{N}(\text{NH}_4\text{NO}_3)$	200	$10.39 \pm 1.86\text{b}$	$2.29 \pm 0.39\text{b}$
T10		400	$11.76 \pm 0.74\text{a}$	$2.33 \pm 0.58\text{b}$
T11		25	$5.97 \pm 0.65\text{g}$	$1.39 \pm 0.14\text{e}$
T12		50	$6.92 \pm 1.07\text{efg}$	$2.36 \pm 0.18\text{b}$
T13		100	$6.99 \pm 0.10\text{efg}$	$2.49 \pm 0.19\text{ab}$
T14		200	$7.95 \pm 0.67\text{de}$	$2.82 \pm 0.10\text{a}$
T15		400	$9.58 \pm 0.47\text{bc}$	$2.86 \pm 0.09\text{a}$

注:处理同表 1,同列不同小写字母表示各处理间的差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: See Table 1 for treatment detail. Different small letters within a column indicate significant differences between treatments ($P<0.05$). The same below.

值。 $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$ 对龙葵各部分积累 Cd 随浓度升高呈现先升后降趋势。综合比较三种不同形态氮素对龙葵积累 Cd 的影响可知, NH_4^+-N 更能促进龙葵积累 Cd。

2.3 不同形态氮素对龙葵叶片 MDA 含量的影响

由图 1 可知,在 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd 处理下生长的龙葵,外源添加不同形态氮素后,叶片的 MDA 含量显著下降。 NO_3^--N 和 NH_4^+-N 处理下龙葵叶片 MDA 含量随着处理浓度的增加而降低, $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$ 处理

下龙葵叶片 MDA 含量则随着处理浓度的增加呈现先降后升的趋势,但各浓度下的叶片 MDA 含量仍旧低于 CK。比较三种氮素形态处理下的龙葵 MDA 含量可知, NO_3^--N 处理下的龙葵叶片 MDA 含量下降幅度大于其他两种形态。

2.4 不同形态氮素对龙葵叶片超氧阴离子产生速率和 H_2O_2 含量的影响

如图 2 所示, $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd 的土壤中生长的龙葵在外源施加不同形态氮素后,其叶片中超氧阴离子产生速率均减缓。 NO_3^--N 和 $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$ 处理的超氧阴离子产生速率随着氮素处理浓度的升高呈现先减缓后增快的趋势,但产生速率仍比 CK 慢。 NH_4^+-N 处理下叶片的超氧阴离子产生速率在 T10 处理有最小值,较 CK 降低了 38.10%。由此可见, NH_4^+-N 对龙葵叶片超氧阴离子产生速率的影响最为显著。同样地,试验中外源施加不同形态氮素均对龙葵叶片 H_2O_2 含量产生显著影响,且 NH_4^+-N 对龙葵叶片 H_2O_2 含量的影响最为显著。

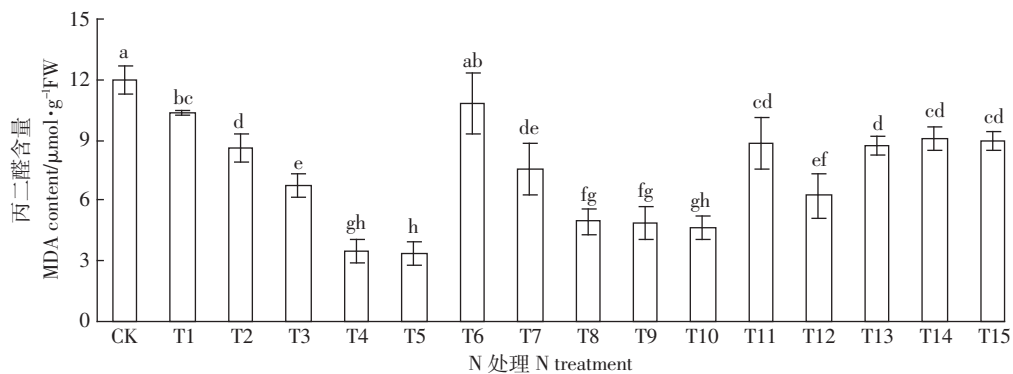
2.5 不同形态氮素对龙葵叶片 SOD、CAT、POD 活性的影响

如图 3 所示, NO_3^--N 处理下的龙葵叶片的 SOD 活性随着处理浓度的增加呈现先升高后降低的趋势,在 T2 处理达到最大值,CAT 和 POD 活性则随着处理浓度的升高逐渐降低。龙葵叶片的 SOD 活性在 NH_4^+-N 处理下则随着处理浓度的升高逐渐降低; $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$ 与之相同,但降低幅度比 NH_4^+-N 小。而 NH_4^+-N 处理下的 CAT 活性则随着处理浓度的升高先升后降,在 T7 处理活性最大;POD 在该浓度活性最大,且各浓度下的活性均高于 CK。 $\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$ 处理下

表 3 Cd 胁迫下不同形态氮素对龙葵地上部和地下部 Cd 积累量的影响

Table 3 Effects of different forms of exogenous nitrogen on Cd content of *Solanum Nigrum* under Cd stresses

处理 Treatment	氮素形态 Nitrogen form	氮素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Cd 积累量 content/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	
			地上部 Shoot	地下部 Root
CK		0	332.09±18.77g	85.71±9.54e
T1	NO_3^--N	25	342.17±44.06fg	86.34±8.36e
T2	$[\text{NaNO}_3]$	50	358.89±52.65efg	141.01±18.53ab
T3		100	442.11±58.21abc	144.52±23.04ab
T4		200	448.15±48.89bc	113.81±9.89cd
T5		400	417.22±27.45bcd	100.52±6.64de
T6	NH_4^+-N	25	388.84±11.09def	93.39±12.94e
T7	$[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$	50	415.40±23.20bcd	98.51±11.01de
T8		100	455.51±23.23b	130.98±15.08bc
T9		200	521.33±16.82a	157.20±21.00a
T10		400	524.71±17.06a	160.62±18.66a
T11	$\text{NH}_4^+-\text{N}+\text{NO}_3^--\text{N}$	25	348.68±15.90fg	93.36±13.53e
T12	$-\text{N} [\text{NH}_4\text{NO}_3]$	50	375.14±12.86defg	118.31±20.40cd
T13		100	418.55±15.23bcd	151.07±25.06a
T14		200	401.95±14.30cde	154.52±20.42a
T15		400	386.10±15.07def	154.67±25.64a



图中不同小写字母表示各个处理间差异显著($P<0.05$)。下同

Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$) between different treatments. The same below

图 1 Cd 胁迫下不同形态氮素对龙葵叶片丙二醛含量的影响

Figure 1 Effects of different forms of exogenous nitrogen on MDA content of *Solanum nigrum* leaves under Cd stresses

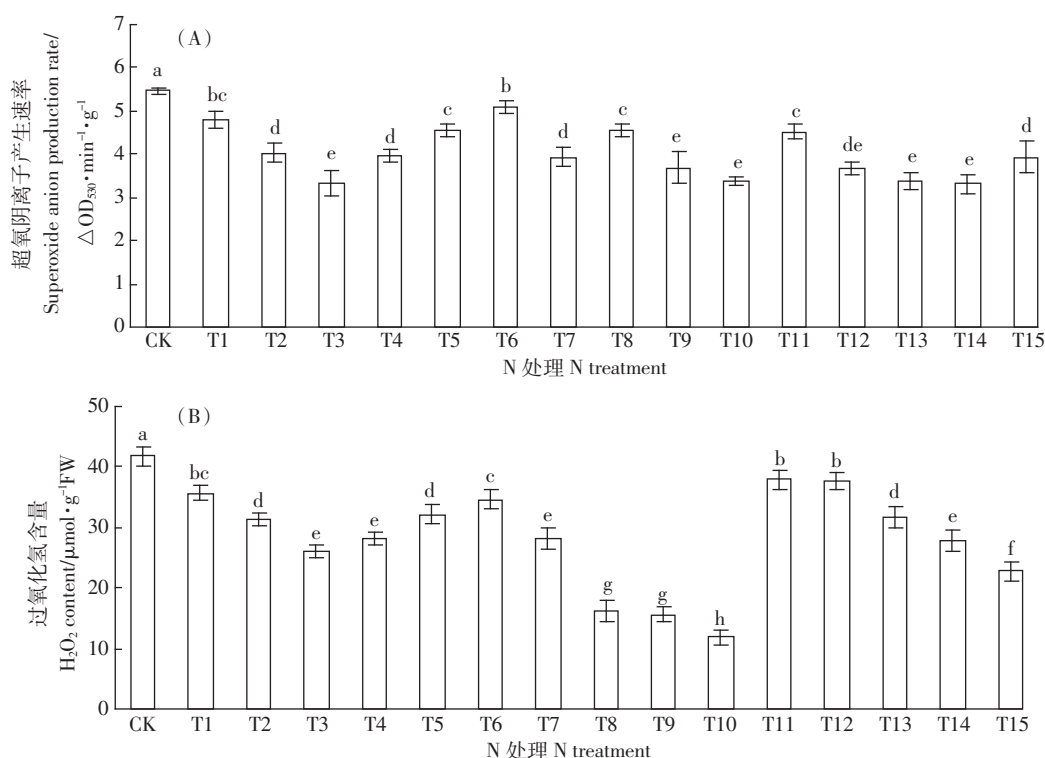


图2 Cd胁迫下不同形态氮素对龙葵叶片超氧阴离子产生速率(A)和过氧化氢含量(B)的影响

Figure 2 Effects of different forms of exogenous nitrogen on superoxide anion production rate(A) and H₂O₂ content(B) of *Solanum nigrum* leaves under Cd stresses

的龙葵叶片的SOD和CAT活性随处理浓度的升高而降低,POD活性则先升高后降低。

2.6 不同形态氮素对龙葵叶片APX和GR活性的影响

如图4所示,不同浓度的NH₄⁺-N处理下,其APX含量呈现逐步上升趋势,T10处理有最大值,较CK上升了34.24%。龙葵叶片的APX含量在不同浓度的NO₃⁻-N处理下呈现先上升后缓慢下降的趋势,但均大于CK。与其他两种形态相比,NH₄⁺-N+NO₃⁻-N的处理对龙葵叶片内APX含量的影响相对不明显,各浓度间变化微小。同时,施加外源氮素后,龙葵叶片的GR活性也有显著变化。T2处理活性最大,较CK增加了19.87%。GR活性在NH₄⁺-N的处理下差异显著,随着浓度的升高,活性逐渐下降。NH₄⁺-N+NO₃⁻-N对GR活性的影响也是显著的,且活性均小于CK。

2.7 不同形态氮素对龙葵叶片AsA和GSH含量的影响

由图5可知,龙葵叶片的AsA含量在不同浓度NO₃⁻-N处理下呈现逐渐升高的趋势,且从图表走势可看出,浓度达到T4后,AsA含量的增长走势渐缓,逐步趋于稳定。不同浓度NH₄⁺-N处理后,AsA含量呈现逐步上升的趋势。相对来说,NH₄⁺-N+NO₃⁻-N的处理对龙葵苗中AsA含量的影响不明显。同时,NO₃⁻-N

处理的龙葵GSH含量随着处理浓度的增加先上升后下降,在T2处理含量最高。龙葵在NH₄⁺-N处理下的GSH含量随着氮处理浓度的升高而逐渐下降至最后趋于稳定;NH₄⁺-N+NO₃⁻-N的处理则对龙葵叶片的GSH含量影响并不显著。

3 讨论

3.1 不同形态氮素对Cd胁迫下龙葵生长的调节作用

重金属胁迫会导致植物缺乏氮素,增施氮肥能够缓解重金属的毒害作用。本试验中,不同的氮素水平下,龙葵地上部及地下部的生物量都有显著提高,可能是较低浓度的Cd胁迫刺激了根细胞壁增强交换位点蛋白活性^[20],在根系对Cd²⁺进行交换排除作用的同时也加强根系对水分和营养物质的吸收。张敬锁等^[10]对水稻的研究结果与本试验一致,NH₄⁺-N对龙葵地上部生物量增产最显著,对地下部不明显。这可能是由于龙葵对NH₄⁺具有较高的吸收运输能力,足以满足地上部的增长对氮素的需求。有研究表明,土壤中Cd的不同形态及土壤本身理化性质的不同都可能在一定程度上影响植物对Cd²⁺的吸收和运输。施加外源氮素后,龙葵的地上部和地下部Cd积累量均有所增

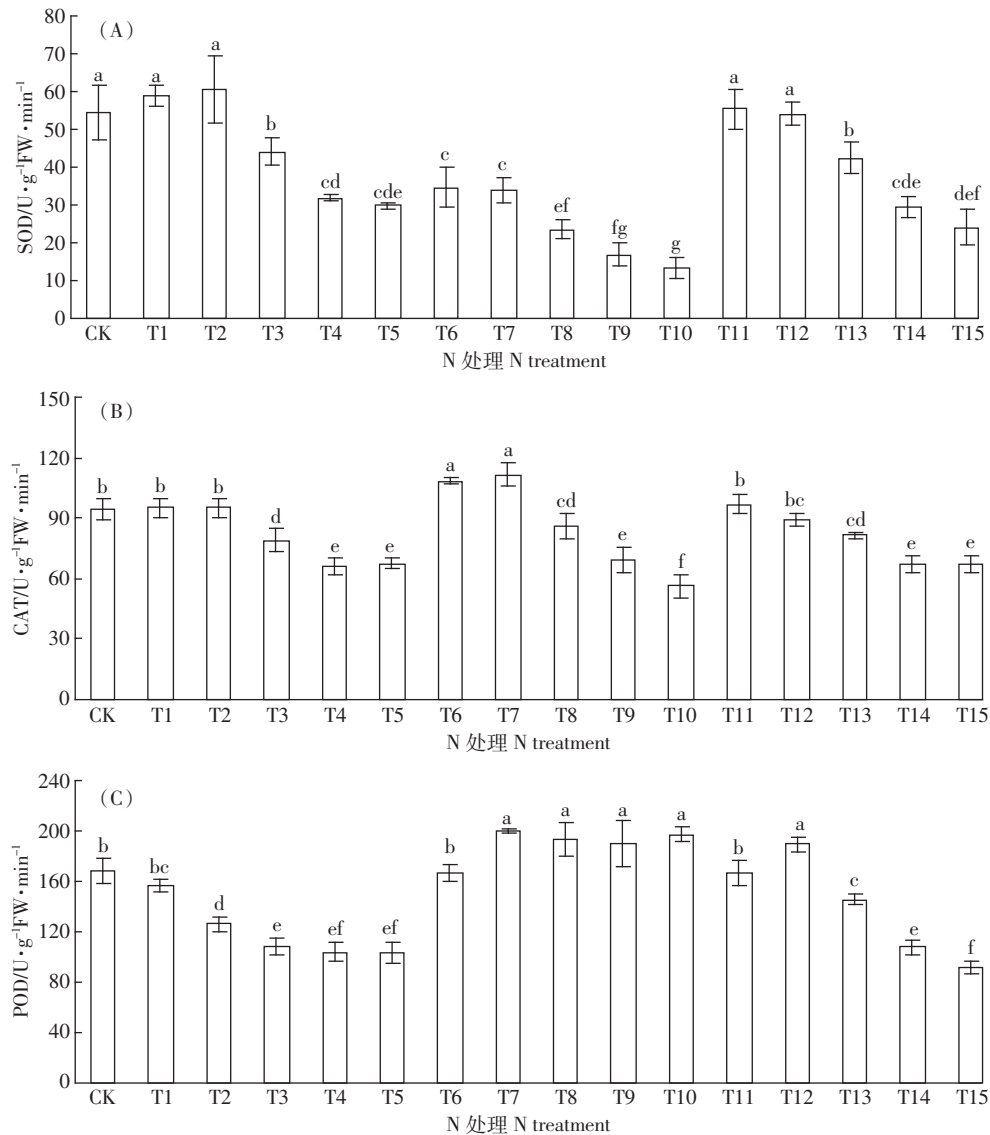


图 3 Cd 胁迫下不同形态氮素对龙葵叶片超氧化物歧化酶(A)、过氧化氢酶(B)、过氧化物酶(C)活性的影响

Figure 3 Effects of different forms of exogenous nitrogen on superoxide dismutase(SOD)(A), catalase(CAT)(B) and peroxidase(POD)(C) activities of *Solanum nigrum* leaves under Cd stresses

加,表明外源氮素缓解了 Cd 胁迫。而地上部的积累量大于地下部,可能是因为龙葵是 Cd 超富集植物,对 Cd 的转运能力强,而添加外源氮素强化了它对 Cd 的转运能力。 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 对地上部 Cd 积累增加作用显著,与李继光等^[21]研究的超积累植物东南景天的结果一致。可能是因为 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 肥料水解后经过硝化作用,会降低土壤 pH^[22],土壤 pH 值的降低显著影响了 Cd 的有效形态,从而显著增加了龙葵地上部的 Cd 积累量。这可能是 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 效果优于其他两种形态氮素的重要原因。而 NH_4^+ 、 NO_3^- 本身理化性质相反,同时存在可能影响了龙葵对氮素的正常吸收,因此可能需要根系生物量的增加来摄取足够的氮素营养以满足地上

部的增长。

3.2 不同形态氮素对 Cd 胁迫下龙葵清除自由基的促进作用

为了减缓和抵御伤害,植物会调动抗氧化酶类(SOD、CAT、GR 等)和抗氧化物质(GSH、AsA 等)来清除活性氧和自由基,同时氮素的增加会影响植物本身抗氧化代谢的调节。龙葵叶片的 H_2O_2 含量和超氧自由基产生速率较无外源添加氮素均有下降,则说明对重金属的毒害有缓解效果。

MDA 是膜脂氧化的最终产物,常被作为植物细胞 ROS 累积水平和受损程度的重要指标。三种形态氮素影响下均表现了 MDA 含量不同程度的降低,

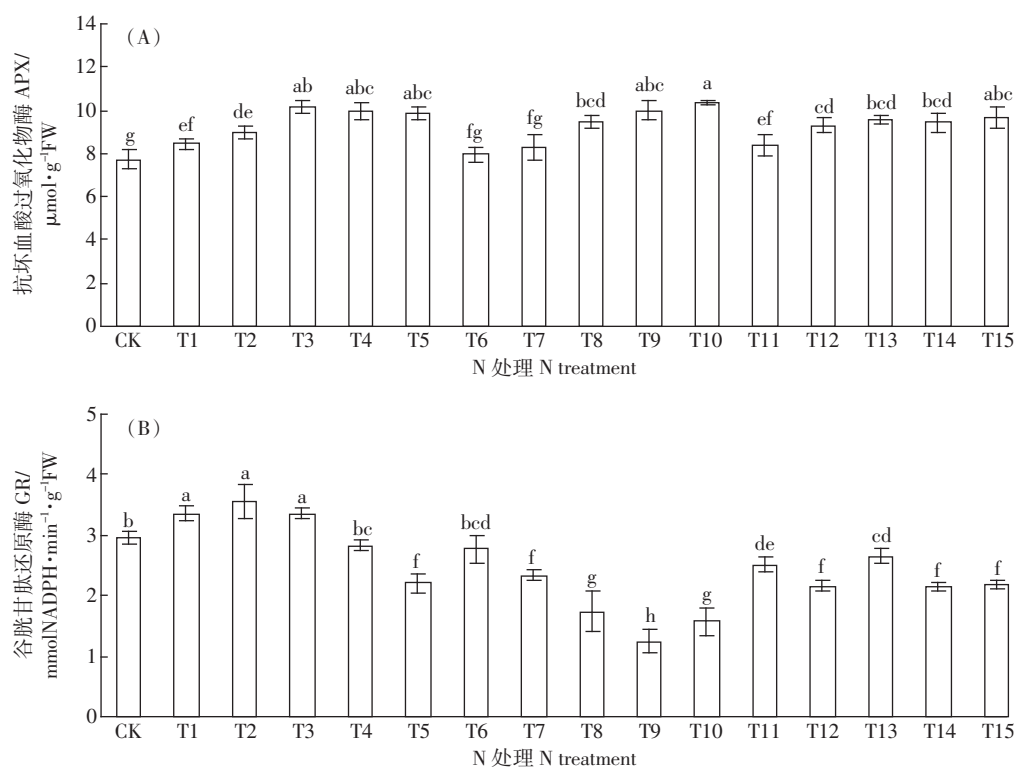


图4 Cd胁迫下不同形态氮素对龙葵叶片抗坏血酸过氧化物酶(A)和谷胱甘肽还原酶(B)活性的影响

Figure 4 Effects of different forms of exogenous nitrogen on ascorbate peroxidase (APX)(A) and glutathione reductase (GR)(B) activities of *Solanum nigrum* leaves under Cd stresses

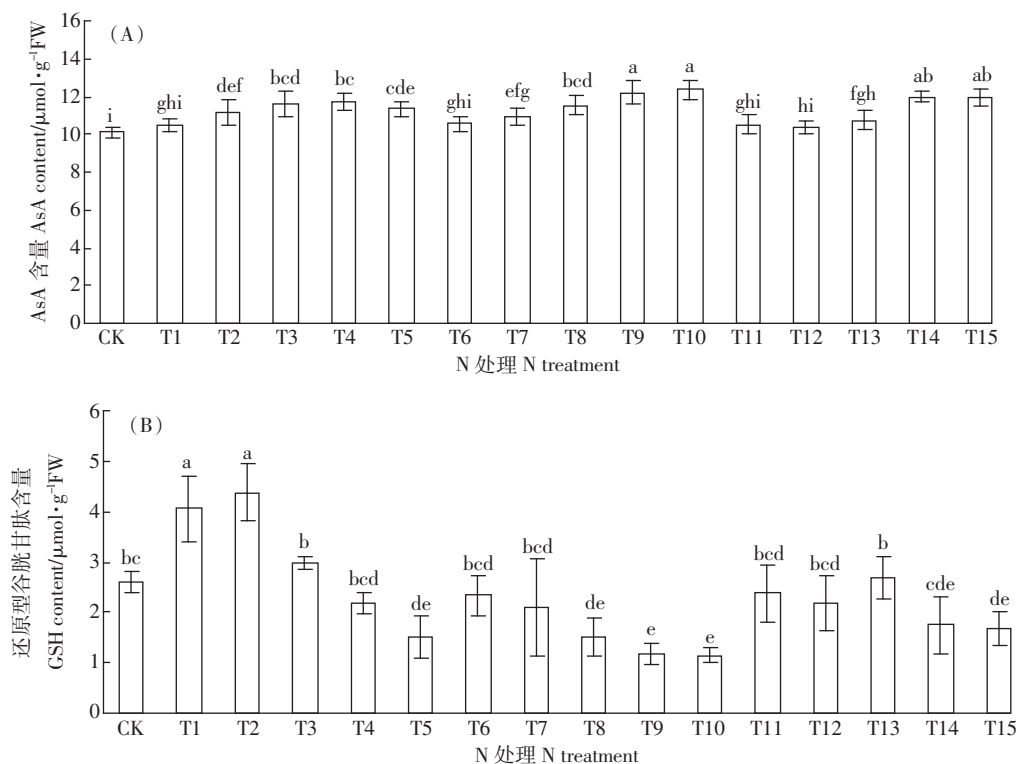


图5 Cd胁迫下不同形态氮素对龙葵叶片抗坏血酸(A)和谷胱甘肽含量(B)的影响

Figure 5 Effects of different forms of exogenous nitrogen on ascorbic acid (AsA)(A) and glutathione (GSH)(B) content of *Solanum nigrum* leaves under Cd stresses

表明外源添加氮素对 Cd 毒害起到了缓解作用。试验结果表明 NO_3^- -N 对于缓解 Cd 胁迫产生的 ROS 发挥了作用,而在较低浓度 NO_3^- -N 条件下, SOD 是发挥作用的主导物质。这可能是因为 SOD 是对抗 ROS 的第一道防线,一定范围内的 ROS 积累会刺激产生更多的 SOD^[23]。POD 与 CAT 在 NH_4^+ -N 较低浓度下催化缓解 ROS 过程中发挥主导作用,当 NH_4^+ -N 浓度较高时,则仅仅 POD 在清除 ROS 中发挥作用。依此类推,较低浓度的 NH_4^+ -N+ NO_3^- -N 环境下, POD 在清除 ROS 中发挥主导作用。这可能是由于 N 素对含铁酶类(CAT、APX 等)有很高的亲和性,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。

3.3 不同形态氮素对 Cd 胁迫下龙葵抗坏血酸-谷胱甘肽代谢循环的促进作用

抗坏血酸和谷胱甘肽作为植物体内重要的非酶抗氧化剂,可以直接作用和清除活性氧。植物应答活性氧积累等生物胁迫时, GSH 库增大^[24]。本试验说明在施加低浓度的外源 NO_3^- -N 时, 龙葵可以通过调节 GSH 来维持细胞体内的氧化还原平衡,减缓了 Cd 的毒害作用,而高浓度的 NO_3^- -N 则降低了 GSH 含量,增加了氧化胁迫程度。因龙葵对 NH_4^+ 和 NO_3^- 的吸收机制不同,缓解 Cd 胁迫的能力不同,应对氧化胁迫的方式不同,所以可能会导致对龙葵中的 GSH 含量的影响存在差异。

AsA 能够直接清除 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。施加外源不同形态的氮肥, 龙葵中 AsA 含量均较 CK 有所增加,清除活性氧的能力加强,缓解了 Cd 的毒害效应。APX 是植物体内重要的抗氧化酶,它的活性决定了植物 AsA-GSH 循环抗逆境生理的作用。本研究表明,外源施加氮肥提高了龙葵的 APX 活性,与丁继军等^[25]的研究结果一致,外源添加物能提高重金属胁迫下的 APX 活性,有利于 AsA 的合成,提高清除 ROS 自由基的能力,缓解 Cd 胁迫。

在氧化胁迫条件下, GSH 通过还原 H_2O_2 来缓解氧化胁迫,同时 GSH 被氧化成 GSSG,而 GSSG 又可以在 GR 的作用下还原为 GSH。由此可知,在重金属胁迫下,谷胱甘肽还原酶(GR)对活性氧的清除起关键作用^[26]。催化还原为 AsA 的过程要消耗 NADPH,而 NADPH 浓度的降低可能影响 GR 活性,这可能是引起本试验结果的原因。有研究表明在一定程度上施用 NH_4^+ -N 能促进植物对 Cd 的吸收, Cd 吸收的增加引

起了氧化胁迫消耗 GSH, GR 要将 GSSG 还原为 GSH, 故活性会加强。但由于施用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 会降低土壤 pH 值,表现出酸化土壤的作用,随着 pH 值的降低,植物吸收 Cd 的量会减少,引起的氧化胁迫会减弱,降低 GR 的活性,故本试验的结果是高浓度的 NH_4^+ -N 处理降低了龙葵叶片的 GR 活性。同时, GSH 在清除 ROS 时本身被氧化成 GSSG,而 GR 活性降低,所以不能及时将 GSSG 还原,导致 GSH 含量下降。

4 结论

(1)外源添加不同形态氮素均能显著提高龙葵幼苗地上部(茎秆、叶片和果实)生物量(干重),且 NH_4^+ -N 处理对地上部生物量的增产效果明显好于 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N+ NO_3^- -N。

(2)与 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cd 胁迫(CK)相比,幼苗叶片的超氧阴离子产生速率、过氧化氢(H_2O_2)与丙二醛(MDA)含量在不同形态氮素处理下均呈不同程度的显著降低,表明不同形态氮素对幼苗的 Cd 毒害有所缓解。

(3)外源添加不同形态氮素在一定程度上能提高抗氧化酶活性,增加抗氧化剂含量,缓解 Cd 对其产生的氧化胁迫,改善生长状况。不同形态氮素对龙葵 Cd 积累的促进顺序为: NH_4^+ -N> NO_3^- -N。

参考文献:

- [1] Wu F Z, Yang W Q, Zhang J, et al. Cadmium accumulation and growth responses of a poplar(*Populus deltoids* × *Populus nigra*) in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177: 268–273.
- [2] 郑春荣, 陈怀满. 土壤-水稻体系中污染重金属的迁移及其对水稻的影响[J]. 环境科学学报, 1990, 10(2): 145–162.
ZHENG Chun-rong, CHEN Huai-man. Transfer of heavy metals through soil-plant system and its influence on the growth of rice[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1990, 10(2): 145–162.
- [3] 王激清, 茹淑华, 苏德纯. 氮肥形态和螯合剂对印度芥菜和高积累镉油菜吸收镉的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(4): 625–629.
WANG Ji-qing, RU Shu-hua, SU De-chun. Effects of nitrogenous fertilizers and chelators on absorption of cadmium by Indian mustard and oilseed rape[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(4): 625–629.
- [4] Hsu Y T, Kuo M C, Kao C H. Cadmium-induced ammonium ion accumulation of rice seedlings at high temperature is mediated through abscisic acid[J]. *Plant and Soil*, 2006, 287(1): 267–277.
- [5] Alscher R G, Donahue J L, Cramer C L. Reactive oxygen species and antioxidant relationships in green cells[J]. *Plant Physiology*, 1997, 100(2): 224–233.

- [6] 魏树和, 周启星, 王 新, 等. 一种新发现的镉超积累植物龙葵 (*Solanum nigrum* L.) [J]. 科学通报, 2004, 49(24): 2568–2573.
WEI Shu-he, ZHOU Qi-xing, WANG Xin, et al. *Solanum nigrum* (*Solanum nigrum* L.) is a new discovery of cadmium hyperaccumulator [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(24): 2568–2573.
- [7] 王 林, 周启星, 孙约兵. 氮肥和钾肥强化龙葵修复镉污染土壤[J]. 中国环境科学, 2008, 28(10): 915–920.
WANG Lin, ZHOU Qi-xing, SUN Yue-bing. Intensification of *Solanum nigrum* L. remedying cadmium contaminated soils by nitrogen and potassium fertilizers [J]. *China Environmental Science*, 2008, 28(10): 915–920.
- [8] 曾秀存, 许耀照, 张芬琴. 两种基因型龙葵对镉胁迫的生理响应及镉吸收差异[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(5): 885–890.
ZENG Xiu-cun, XU Yao-zhao, ZHANG Fen-qin. Difference of cadmium absorption and physiological responses to cadmium stress in two different *Solanum nigrum* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(5): 885–890.
- [9] Eriksson J E. Effects of nitrogen-containing fertilizers on solubility and plant uptake of cadmium[J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 1990, 49: 355–368.
- [10] 张敬锁, 李花粉, 张福锁, 等. 不同形态氮素对水稻体内镉形态的影响[J]. 中国农业大学学报, 1998, 3(5): 90–94.
ZHANG Jing-suo, LI Hua-fen, ZHANG Fu-suo, et al. Influence of the form of nitrogen on the chemical forms of cadmium in rice [J]. *Journal of China Agricultural University*, 1998, 3(5): 90–94.
- [11] 吴启堂, 陈 卢, 王广寿, 等. 化肥种类对不同品种菜心吸收累积Cd的影响[J]. 应用生态学报, 1996, 7(1): 103–106.
WU Qi-tang, CHEN Lu, WANG Guang-shou, et al. Effect of chemical fertilizer sources on uptake and accumulation of Cd by *Brassica chinensis* cultivars [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1996, 7(1): 103–106.
- [12] 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. Plant physiology and biochemistry test principles and techniques [M]. Beijing: China Higher Education Press, 2000: 125–128.
- [13] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990(6): 55–57.
WANG Ai-guo, LUO Guang-hua. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants [J]. *Plant Physiology Communications*, 1990(6): 55–57.
- [14] Patterson B D, Macrae E A, Ferguson I B. Estimation of hydrogen peroxide in plant extracts using Titanium(IV) [J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 139: 487–492.
- [15] Cakmak I. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants [J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2005, 168: 521–530.
- [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] Law M Y, Charles S A, Halliwell B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat [J]. *Biochemical Journal*, 1983, 210(3): 899–903.
- [18] Milosevic N, Slusarenko A J. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1996, 49(3): 143–158.
- [19] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 314–315.
Institute of Plant Physiology & Ecology, SIBS, CAS. Modern plant physiology laboratory manual [M]. Beijing: Science Press, 1999: 314–315.
- [20] 刘柿良, 石新生, 潘远智, 等. 镉胁迫对长春花生长、生物量及养分积累与分配的影响[J]. 草业学报, 2013, 3(22): 154–161.
LIU Shi-liang, SHI Xin-sheng, PAN Yuan-zhi, et al. Effects of cadmium stress on growth, accumulation and distribution of biomass and nutrient in *Catharanthus roseus* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 3(22): 154–161.
- [21] 李继光, 李廷强, 朱 恩, 等. 不同氮形态对东南景天镉积累的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2008, 34(3): 327–333.
LI Ji-guang, LI Ting-qiang, ZHU En, et al. Effects of different nitrogen forms on cadmium accumulation of *Sedum alfredii* Hance [J]. *Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci)*, 2008, 34(3): 327–333.
- [22] 杨 锴, 王火焰, 周健民, 等. 不同水分条件下几种氮肥对水稻土中外源镉转化的动态影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(5): 1202–1207.
YANG Mao, WANG Huo-yan, ZHOU Jian-min, et al. Effects of applying nitrogen fertilizers on transformation of external cadmium in the paddy soil with different soil moisture [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(5): 1202–1207.
- [23] 汤叶涛, 关丽捷, 仇荣亮, 等. 镉对超富集植物滇苦菜抗氧化系统的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(2): 324–332.
TANG Ye-tao, GUAN Li-jie, QIU Rong-liang, et al. Antioxidative defense to cadmium in hyperaccumulator *Picris divaricata* V. [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(2): 324–332.
- [24] 杜 琳, 张 荃. 植物谷胱甘肽与抗氧化胁迫[J]. 山东科学, 2008, 21(2): 27–32.
DU Lin, ZHANG Quan. Glutathione and oxidative stress tolerance of plants [J]. *Shandong Science*, 2008, 21(2): 27–32.
- [25] 丁继军, 潘远智, 李 丽, 等. 外源谷胱甘肽对石竹幼苗镉毒害的缓解效应[J]. 植物生态学报, 2013, 37(10): 950–960.
DING Ji-jun, PAN Yuan-zhi, LI Li, et al. Mitigation effects of exogenous glutathione on the growth of *Dianthus chinensis* seedlings under Cd stress [J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2013, 37(10): 950–960.
- [26] 李晓云, 王秀峰, 吕乐福, 等. 外源NO对铜胁迫下番茄幼苗根系抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(4): 1023–1030.
LI Xiao-yun, WANG Xiu-feng, LÜ Le-fu, et al. Effects of exogenous nitric oxide on ascorbate-glutathione cycle in tomato seedlings roots under copper stress [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(4): 1023–1030.