

硫对镉胁迫下小白菜叶片 AsA-GSH 循环和植物络合素含量的影响

孙惠莉¹, 吕金印^{2*}, 贾少磊¹

(1.西北农林科技大学理学院, 陕西 杨凌 712100; 2.西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用水培试验研究了不同镉、硫水平对小白菜叶片中抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环和植物络合素含量的影响。结果表明,适度增硫降低了镉胁迫下小白菜叶片中过氧化氢(H₂O₂)和丙二醛(MDA)含量,提高了 AsA-GSH 循环中关键酶的活性、抗氧化物质和植物络合素的含量。低镉(5 μmol·L⁻¹)水平下,随着硫浓度的增加,小白菜叶片中 H₂O₂ 的含量显著下降,MDA 含量先降后升,谷胱甘肽还原酶(GR)活性、抗氧化物质及植物络合素含量持续升高,抗坏血酸过氧化物酶(APX)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)及 AsA 含量呈先升后降的趋势,且均在 3 mmol·L⁻¹ 硫处理达到峰值。高镉(50 μmol·L⁻¹)水平下,随着硫浓度的增加,小白菜叶片中 H₂O₂ 和 MDA 含量均先降后升,AsA-GSH 循环关键酶活性、抗氧化物质及植物络合素含量均呈先升后降趋势,且多数在 2 mmol·L⁻¹ 硫处理达到峰值。研究表明适度增硫处理能维持小白菜叶片 AsA-GSH 循环快速有效地运转,增加植物络合素的合成,保持较强的抗氧化物质的再生能力和重金属螯合解毒能力,对降低镉胁迫伤害具有重要作用。但是过高 SO₄²⁻ 离子浓度存在一定的盐胁迫毒害效应,因而影响其对小白菜镉生物毒性的降低作用。

关键词:小白菜;镉;硫;抗坏血酸;谷胱甘肽;植物络合素

中图分类号:X503.231 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2013)07-1294-08 **doi:**10.11654/jaes.2013.07.002

Effects of Sulfur on Ascorbate – Glutathione Cycle and the Content of Phytochelatins in the Leaves of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) Under Cadmium Stress

SUN Hui-li¹, LÜ Jin-yin^{2*}, JIA Shao-lei¹

(1.College of Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2.College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: A series of hydroponics experiments were performed to investigate effects of sulfur on ascorbate (AsA)–glutathione (GSH) cycle and the content of phytochelatins (PCs) in pakchoi (*Brassica chinensis* L.) leaves under cadmium (Cd) stress. The results showed that application of moderate level of sulfur decreased the contents of peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA), but increased key enzyme activities and antioxidant content of AsA–GSH cycle in pakchoi leaves. Under low Cd stress (5 μmol·L⁻¹), the content of H₂O₂ were significantly decreased and the content of MDA fell first then rose with increasing concentration of sulfur, while PCs content and the activity of glutathione reductase (GR) were raised. Along with the increase of the sulfur concentration, other key enzymes activities, such as ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR) in AsA–GSH cycle and the content of AsA increased at the beginning, reaching to the peak in the 3 mmol·L⁻¹ sulfur level. Under high Cd stress (50 μmol·L⁻¹), the contents of H₂O₂ and MDA decreased first then increased, while the key enzymes activities and antioxidant content of AsA–GSH cycle showed an opposite tendency, and many of them reached to the peak in the 2 mmol·L⁻¹ sulfur level. The results indicated that application of moderate level of sulfur could maintain the efficiency metabolism of AsA–GSH cycle during the stress period, increase the synthesis of PCs and keep the regenerative capacity of antioxidant substances and heavy metal chelating ability. Although sulfur plays an important role in reducing Cd toxicity, overhigh concentration of SO₄²⁻ could cause toxicity of salt stress and thus affect its Cd toxicity relief.

Keywords: *Brassica chinensis* L.; cadmium; sulfur; ascorbate; glutathione; phytochelatins

收稿日期: 2012-12-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271624)

作者简介: 孙惠莉(1986—), 女, 山东莱芜人, 在读硕士, 主要从事植物微量元素吸收与代谢机理研究。E-mail: sunhui2004@126.com

* 通信作者: 吕金印 E-mail: Jinyinlv@163.com

镉(Cd)是一种高迁移率的有毒重金属,即使在低浓度的水平下也会对植物、动物、微生物产生危害,还可以通过生物富集和食物链危害人类健康。镉能使植物组织细胞产生活性氧(ROS),引起膜脂过氧化,改变活性氧代谢有关酶的活性,影响植株生长。植物体内存在防御 ROS 毒害作用的 ROS 清除系统^[1]。抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环系统是植物体内清除自由基的重要途径,它负责清除 ROS,并可调控体内的氧化还原势使信号转导系统朝着有利于植物生长的方向进行^[2]。但在逆境条件下,植物体内抗氧化系统会发生变化,影响 ROS 的清除效率。

硫(S)是植物生长的必需元素,在植物的生长发育和逆境应答过程中起着重要的作用。硫参与半胱氨酸(Cys),甲硫氨酸(Met)和谷胱甘肽(GSH)等含硫氨基酸的代谢过程,植物在镉污染的土壤中生长的能力与硫还原同化过程密切相关。镉胁迫引起与硫还原同化和 GSH 合成途径有关的酶活性的改变,并可刺激植物络合素(PCs)的合成。大量研究证明,GSH 和 Cys 等小分子巯基化合物的存在也可以缓解重金属毒害,同时抗坏血酸-谷胱甘肽循环途径可以降低植物体内重金属引起的活性氧,谷胱甘肽(GSH)可作为一种重要的巯基化合物结合细胞内的重金属,减轻重金属对植物的毒害。植物络合素是一种富硫的多肽化合物,对镉毒害有解毒作用,它的合成与硫代谢密切相关,供硫可以增强 PC-Cd 复合物的稳定性^[3]。因此,含硫代谢物在抗坏血酸-谷胱甘肽抗氧化循环系统和络合素合成中起着极其重要的作用。镉硫交互方面的研究^[4-7]表明,如果提高植物中的硫含量就可能有助于增强植物对镉胁迫的抗性或耐性。

本研究采用水培方法模拟轻度和重度镉污染下的土壤环境,设置的轻度镉污染处理浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,约相当于土壤 $\text{Cd } 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,是根据土壤环境质量标准(GB 5618—1995),为保障农业生产,维护人体健康的土壤限制值的最高含量(即三级标准)设定,这对明确硫对土壤镉污染临界含量下的作用效果更有实际意义。重度镉污染处理浓度为国家镉污染三级标准的 10 倍。同时将 1/2Hoagland 营养液中的硫浓度作为硫处理梯度的起始浓度,并在此基础上设置了 2、3、4、5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度梯度。近年来,采用不同调控措施控制镉污染已有不少报道^[8-11],但关于硫降低小白菜镉毒害的机理尚不清楚。本试验以常规蔬菜小白菜(*Brassica chinensis* L.)为材料,研究了镉硫交互下小白菜叶片中抗坏血酸-谷胱甘肽循环系

统酶活性、相关抗氧化物质以及植物络合素含量的变化情况,以阐明硫对短期镉胁迫下小白菜生理方面的缓解效应,为硫肥在缓解植物重金属毒害方面的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小白菜(*Brassica chinensis* L.)品种为“矮抗青”,种子购自杨凌农科大农城种业科技中心。

1.2 试验设计

试验于 2011 年 12 月—2012 年 1 月在西北农林科技大学生命科学学院光照培养室中进行。选取籽粒饱满一致的小白菜种子,用 10% H_2O_2 溶液表面灭菌 30 min,经无菌水漂洗几次后放在湿滤纸上于 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗下催芽。待胚根长至 2 cm 左右时,置于尼龙网上用自来水预培养至 2 片真叶,然后转入塑料桶中用 1/2Hoagland 营养液继续进行培养。每桶培养 10 株,每 3 d 更换一次营养液,电动气泵 24 h 连续通气。

培养 12 d 后取生长比较一致的幼苗进行处理。参考前人的报道^[12],镉、硫分别采用 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 和 Na_2SO_4 ,在原来的 1/2Hoagland 营养液基础上进行处理。 Cd 水平分别为:5.0(约相当于土壤 $\text{Cd } 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,国家土壤镉污染三级标准)、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,分别表示为 $\text{Cd}5$ 、 $\text{Cd}50$;S 水平分别为:1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,分别表示为 $\text{S}1$ 、 $\text{S}2$ 、 $\text{S}3$ 、 $\text{S}4$ 、 $\text{S}5$,其中 $\text{S}1$ 为正常供硫(1/2Hoagland 营养液的硫浓度)。 $\text{Cd} \times \text{S}$ 共 10 个处理,均为 5 次重复。试验以两个镉水平下的正常供硫为对照,处理期间每 2 d 更换一次营养液,调节处理营养液 pH 至 5.6。光照培养室昼/夜温度:(25 ± 3)/(21 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,光暗:(14/10)h,光强:150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。处理 7 d 后一次性采样,液氮速冻,保存于 -80°C ,用于下述生理指标的测定。

1.3 测定项目及方法

过氧化氢(H_2O_2)含量测定参考 Lin 等^[13]的方法;抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定参考 Nakano 等^[14]的方法;谷胱甘肽还原酶(GR)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDHAR)活性及还原型谷胱甘肽(GSH)与氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量测定参考 Ma 等^[15]的方法;抗坏血酸(AsA)和脱氢抗坏血酸(DHA)含量的测定参考 Kampfenkel 等^[16]的方法;丙二醛(MDA),非蛋白巯基(NPT)和植物络合素(PCs)含量测定参考齐君等^[17]的方法。以上测定均重复 3 次。

1.4 数据处理

试验数据用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析,并用 Duncan's 新复极差法对平均数进行多重比较, Sigma Plot.v10.0 软件制图。

2 结果与分析

2.1 硫对镉胁迫下小白菜 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

在逆境条件下,植物细胞内 H_2O_2 和 MDA 大量积累,使细胞质膜过氧化加剧,导致膜系统产生损伤,细胞受到伤害^[1]。图 1 显示正常供硫下,高镉水平小白菜叶片中的 H_2O_2 和 MDA 含量比低镉水平分别显著增加 55.1%、53.1% ($P<0.05$)。低镉 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水平下,增加硫浓度降低了小白菜叶片中 H_2O_2 和 MDA 的含量,且均在 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理时有显著降低,降幅分别为 34.1%、23.7% ($P<0.05$)。高镉 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水平下,小白菜叶片中 H_2O_2 和 MDA 的含量先下降后上升,与正常供硫相比, $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理的降幅分别为 25.3%、39.4%,差异显著 ($P<0.05$)。之后随着硫浓度的增加, H_2O_2 和 MDA 的含量急剧回升,说明硫对 H_2O_2 和 MDA 产生的抑制作用是在一定范围起作用的。

2.2 硫对镉胁迫下小白菜叶片 APX、GR、DHAR 和 MDHAR 活性的影响

APX 是植物 AsA-GSH 氧化还原途径的重要组成部分,是清除 H_2O_2 ,特别是叶绿体中 H_2O_2 的关键酶。图 2(A)表明,随着硫浓度的增加,不同镉水平下的小白菜叶片 APX 活性表现出相似的变化趋势。低镉 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水平下,APX 活性随硫浓度的增加呈先升后降的趋势,在 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理下增幅为 49.6%,差异显著 ($P<0.05$)。高镉 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水平下,APX

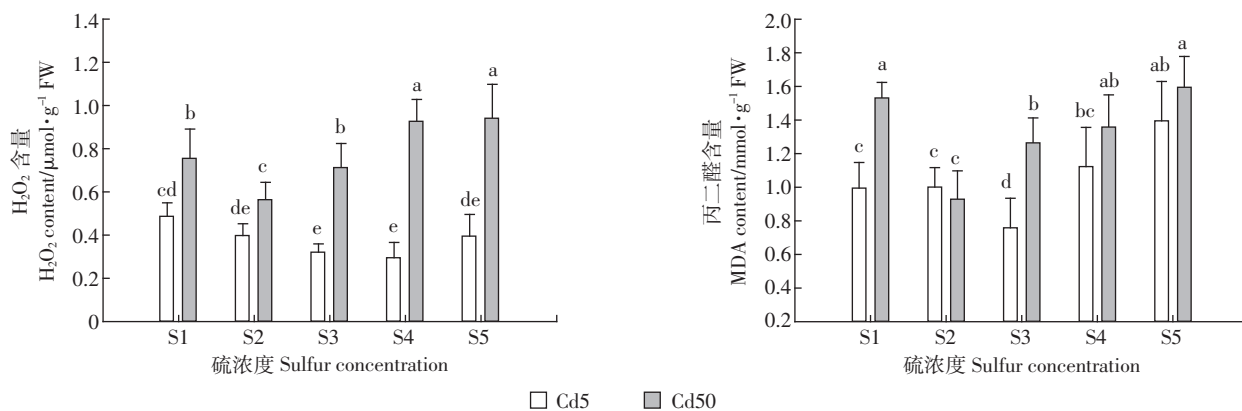
活性随着硫水平的增加逐渐下降,在 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理下活性较高。

GR 是植物细胞中将 GSSG 还原为 GSH 的关键酶,也是 AsA-GSH 循环清除 H_2O_2 的酶促系统组分之一。图 2(B)表明,低镉 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水平下,GR 活性随着硫浓度的增加持续上升,增幅分别为 16.7%、47.4%、65.4%、95.7%。高镉 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水平下,GR 活性先升后降,在 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理时达到峰值,与 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理相比,增幅为 31.4%。

DHAR 以 GSH 为底物,将 DHA 还原为 AsA, MDHAR 则以 NAD(P)H 为底物,催化单脱氢抗坏血酸(MDHA)生成 AsA,二者同属于 AsA-GSH 循环酶催化系统的重要组成部分。图 2(C)、图 2(D)表明,正常供硫浓度下,不同浓度镉胁迫对 DHAR 和 MDHAR 活性影响不大,随着硫浓度的增加,不同镉水平下的两者活性均呈先升后降的趋势。低镉 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水平下,均在 $3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理下达到峰值,与正常供硫相比,两者增幅分别为 55.2%、35.1%,高镉 ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水平下,则均在 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理下达到峰值,与正常供硫相比,两者增幅分别为 36.7%、16.3%。

2.3 硫对镉胁迫下小白菜叶片 AsA 含量及 AsA/DHA 比值的影响

AsA 的氧化还原状态反映了植物细胞内外环境的氧化还原状况,当遭遇逆境胁迫时,AsA/DHA 比率、相关代谢物和酶类会发生相应的变化^[18]。正常供硫浓度下,不同镉水平下的 AsA 含量及 AsA/DHA 比率差异不显著(图 3),随着硫浓度的增加,不同镉水平下的 AsA 含量及 AsA/DHA 比率均呈先升后降的趋势。低镉 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 水平下,AsA 含量及 AsA/DHA



图中的不同字母表示不同处理间差异达到 5% 显著水平,下同

Different letters indicate significant differences according to Duncan's multiple range test ($P<0.05$). The same below

图 1 硫对镉胁迫下小白菜 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

Figure 1 Effect of sulfur on the content of H_2O_2 in the leaves of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) under cadmium stress

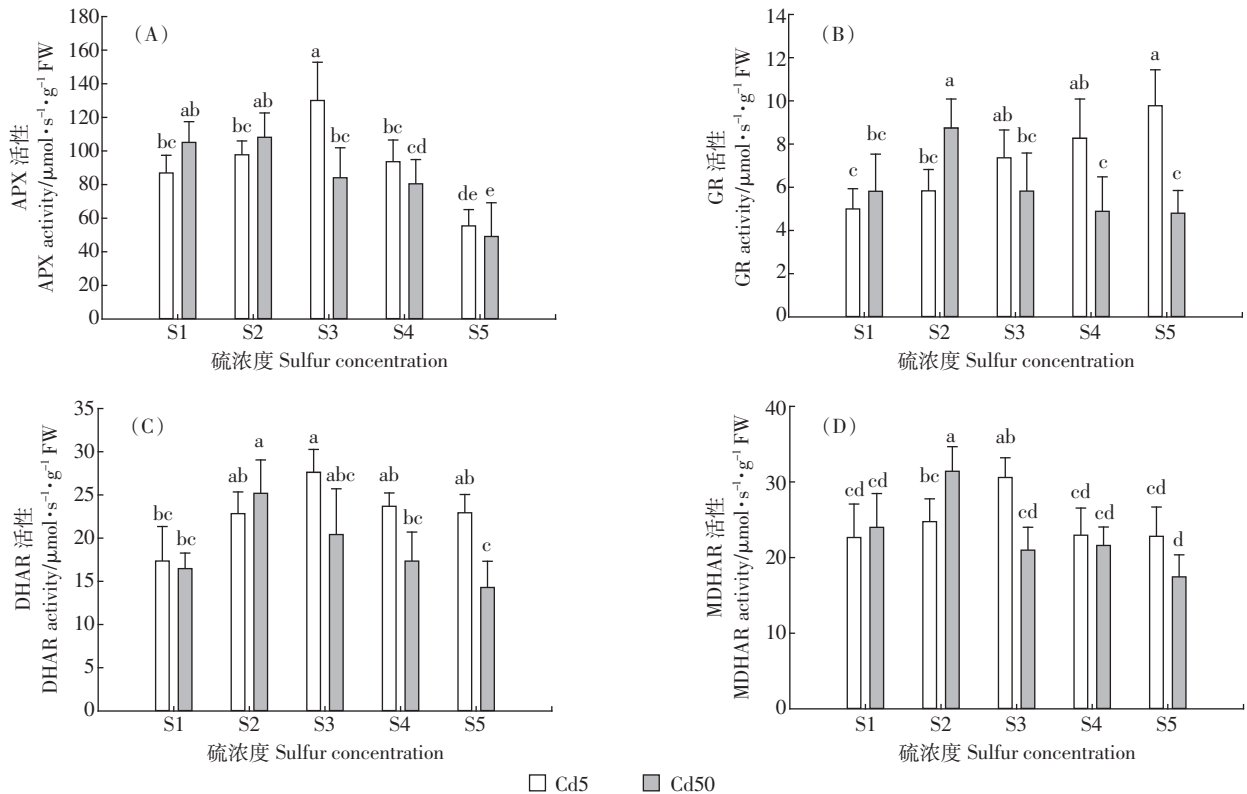


图 2 硫对镉胁迫下小白菜叶片 APX、GR、DHAR、MDHAR 活性的影响

Figure 2 Effects of sulfur on the activities of APX, GR, DHAR and MDHAR in the leaves of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) under cadmium stress

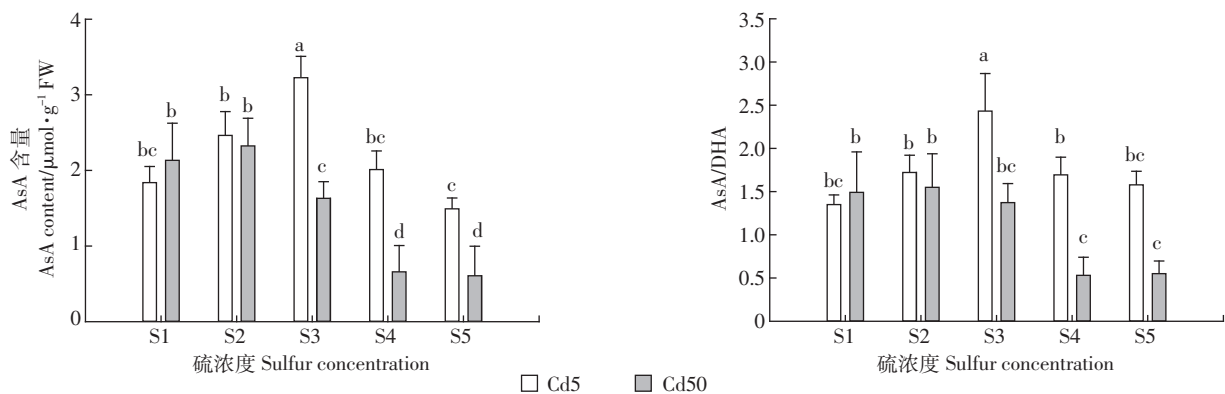


图 3 硫对镉胁迫下小白菜叶片 AsA 含量和 AsA/DHA 比值的影响

Figure 3 Effects of sulfur on the content of AsA and AsA/DHA ratio in the leaves of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) under cadmium stress

比率均在 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫处理达到峰值,与正常供硫相比,增幅分别为 75.5%、80.1%,差异显著 ($P < 0.05$)。高镉 ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 水平下,只在 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫处理有所上升,但差异不显著 ($P > 0.05$),之后急剧下降。

2.4 硫对镉胁迫下小白菜叶片 GSH 含量及 GSH/GSSG 比值的影响

GSH 普遍存在于植物体内,含量丰富,它在还原态硫的储存和转运中具有重要作用。谷胱甘肽水平的

高低与植物对各种生物异源物质及生物与非生物环境胁迫的忍耐关系密切^[9]。GSH/GSSG 比值表示谷胱甘肽氧化还原势,在抗氧化胁迫及氧化还原等信号传导中发挥至关重要的作用。图 4 表明,正常供硫浓度下,随着镉胁迫程度的增加,GSH 含量和 GSH/GSSG 比值均显著上升 ($P < 0.05$),增幅分别为 30.3%、82.9%,随着硫浓度的增加,低镉胁迫下的 GSH 含量及 GSH/GSSG 比值均持续上升,最高分别达到正常供

硫时的1.28倍、1.45倍。高镉($50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)水平下,两者随着硫浓度的增加均呈先升后降的趋势,并分别在 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理达到峰值,与正常供硫相比,增幅分别为26.2%、28.2%。

2.5 硫对镉胁迫下小白菜叶片 NPT 和 PCs 含量的影响

植物体内的非蛋白巯基(NPT)包括植物络合素(PCs)、谷胱甘肽(GSH)、 γ -谷氨酰半胱氨酸(γ -EC)、半胱氨酸(Cys),这些富硫物质与重金属胁迫和硫素代谢都密切相关^[12]。图5表明,小白菜叶片中 PCs 含量与 NPT 含量的变化相似。正常供硫浓度下,不同镉水平下的 NPT 含量和 PCs 含量差异显著($P<0.05$),增幅分别为90.9%、115.5%。镉浓度为 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,两者含量随硫浓度的增加呈逐渐上升的趋势,最高均可达正常供硫水平的3倍多。镉浓度为 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,增施硫,两者均呈先升后降的趋势,在 $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理下达到峰值,分别是正常供硫时的1.6倍、1.7倍多($P<0.05$)。

3 讨论

研究表明,镉硫交互处理下小白菜的生长都没有受到明显的抑制,植株的干重、鲜重几乎没有差异(数据未列出),分析可能原因,一是镉胁迫处理时间较短(7 d),植株生物量上的差异尚不能反映出来,二是实验材料矮抗青属于对镉胁迫有较高耐性的小白菜品种。与膜脂过氧化程度紧密相关的两个生理指标叶片中 H_2O_2 含量和MDA含量均变化明显。这表明,在培养液中增加外源硫,提高了AsA-GSH循环效率,清除过量镉引发的活性氧,同时增加了植物体内NPT、GSH和PCs等含硫化合物的生物合成量,可以显著减轻镉的毒害效应,但对两个浓度镉毒害的缓解效应的最适硫浓度不一致,说明硫对镉毒害的缓解存在着一定的剂量效应。

本试验中,镉处理后小白菜中 H_2O_2 、MDA含量显著上升,表现出明显的氧化胁迫特征。增施硫后,两种

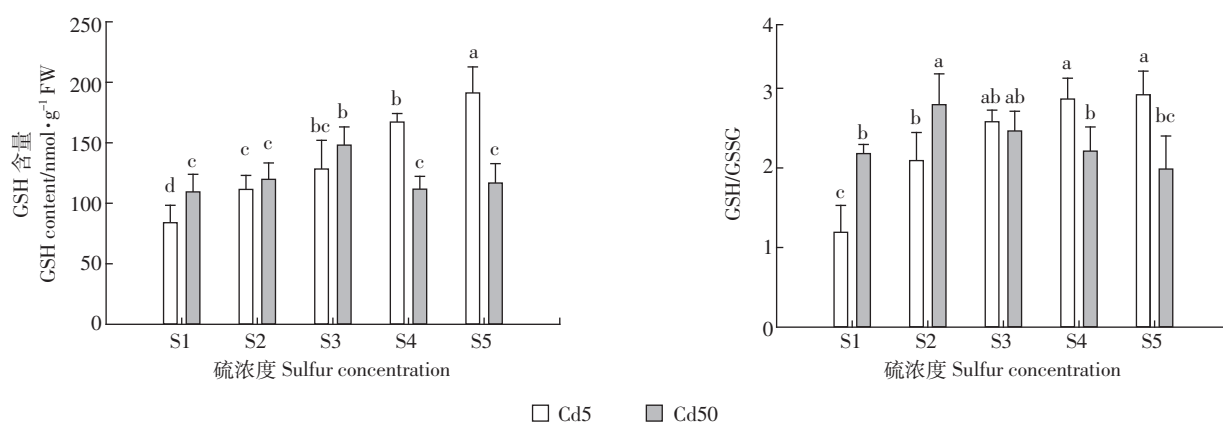


图4 硫对镉胁迫下小白菜叶片 GSH 含量和 GSH/GSSG 比值的影响

Figure 4 Effects of sulfur on the content of GSH and GSH/GSSG ratio in the leaves of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) under cadmium stress

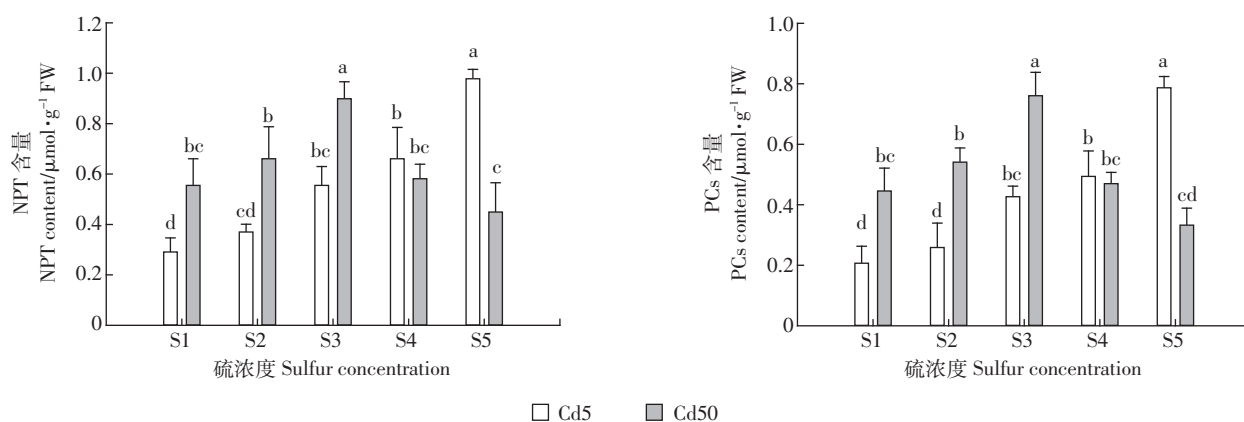


图5 硫对镉胁迫下小白菜叶片 NPT 和 PCs 含量的影响

Figure 5 Effects of sulfur on the contents of NPT and PCs in the leaves of Pakchoi (*Brassica chinensis* L.) under cadmium stress

镉水平下小白菜叶片中的 H_2O_2 和 MDA 含量均随着硫浓度增加呈先下降后上升的趋势,总的来看,随着镉水平的提高,小白菜叶片 H_2O_2 和 MDA 含量累积,镉胁迫对小白菜的毒害加剧,而适度增硫(Cd5+S3, Cd50+S2)后小白菜叶片中的 H_2O_2 和 MDA 含量下降,表明适度增硫处理可降低镉胁迫下小白菜叶片活性氧自由基水平,缓解其膜脂过氧化程度。

植物叶绿体中存在抗氧化酶与抗氧化物质两个活性氧自由基清除系统,对叶绿体起保护作用。由于叶绿体中缺少过氧化氢酶(CAT),在叶绿体中, H_2O_2 的清除主要靠依赖于抗坏血酸的 APX 及相应的抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环系统完成,该循环中的酶主要由 APX、MDHAR、DHAR 和 GR 所构成^[20]。植物在一定的低温、干旱、缺镁和重金属胁迫下,依赖于抗坏血酸的 H_2O_2 清除酶的活性上升^[21]。李会合^[22]采用 3 个硫浓度和 3 个镉水平交互处理研究了镉硫交互对东南景天抗氧化酶活性的影响,结果显示,超积累东南景天叶片 APX 活性随着 S、Cd 水平的提高而显著增加,与本研究硫处理的前 3 个浓度(1、2、3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)结果基本一致。MDHAR、DHAR 可以催化 AsA 的再生而使 AsA 在植物组织中保持较高的还原态,与 AsA 含量的变化有一定的对应关系。而 GR 的作用是利用 NADPH 的电子将 GSSG 还原为 GSH,从而使细胞内谷胱甘肽库保持在还原状态,GR 活性可能与 GSH 含量的变化有一定的对应关系。本试验中,除去 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉处理下的 GR 活性持续上升外,两个镉水平下的 AsA-GSH 循环关键酶活性均呈先升后降的趋势,并分别在 S3、S2 达到峰值。表明 Cd5+S3 与 Cd50+S2 处理下,硫可以激活 AsA-GSH 循环关键酶的活性,可能是由于植物体硫元素供给的比较充分,可以合成较多还原性的硫代谢物 GSH 和 PCs,有利于重金属的固定从而减弱毒性并同时诱导关键酶的活性增加,较好地维持 AsA-GSH 循环系统的完整性,以消除产生的膜脂过氧化胁迫。因此,适度供硫可以保护植物并减轻自由基产生的氧化胁迫,从而提高其对镉胁迫的耐性。

AsA 是植物体内普遍存在的一种抗氧化剂,可直接清除 $\text{O}_2\cdot$ 、 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 等活性氧自由基,GSH 是植物细胞中普遍存在的一种具有特殊功能的多肽,AsA 和 GSH 是 AsA-GSH 循环中两种重要的抗氧化物质,在抵御植物体内活性氧损伤方面具有重要作用,通常两者相偶联起作用^[23]。本试验中,在低镉($5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)水平下,与正常供硫相比,3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理的 AsA

含量及 AsA/DHA 比率显著升高,高镉($50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理下,随着硫浓度的升高,AsA 含量、AsA/DHA 比率只在 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫处理有所上升,之后急剧下降。这表明硫能促进 AsA 含量的提高,对镉诱导下产生的 H_2O_2 等活性氧具有清除作用。两个镉水平下,GSH 含量及 GSH/GSSG 比率的变化趋势与 AsA 含量及 AsA/DHA 比率变化趋势一致,GSH 含量及 GSH/GSSG 比率的增加可能与供硫水平的提高促进 GSH 的生物合成有关。在镉硫交互处理下,小白菜吸收矿质硫营养后,首先被同化为 Cys,进一步合成 GSH,保持较高的氧化还原力,同时外源硫可以促进 AsA 含量的提高,参与到清除自由基的反应中,进而提高植物对镉的耐性,可能是硫减缓镉毒害的重要原因之一。抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环系统对 H_2O_2 的清除作用受镉和硫浓度影响,在一定镉硫(Cd5+S3 与 Cd50+S2)组合浓度内,这种清除作用是有效的,但当镉硫浓度超过一定值时,清除作用就会下降。

植物耐镉胁迫机制的另一个重要方面是巯基物质(Cys、GSH、PCs)与进入细胞的镉络合,然后将其转移至液泡中储存^[24]。细胞内巯基物质的含量与供硫浓度和镉胁迫程度等因素密切相关。供硫浓度的提高通常导致 SO_4^{2-} 和包括 NPT 及含硫氨基酸等含硫物质在植物体内的累积^[25]。镉胁迫可以促进植物对硫的吸收代谢,受到镉胁迫时,许多植物如大豆、烟草、蕃茄、土豆及玉米,其 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶活性明显增强,导致 GSH 的上升;GSH 的前体半胱氨酸被大量诱导合成^[26],植物体内硫代谢的两个关键酶 ATP 硫化酶及 APS 还原酶的活性同样被诱导^[27]。本试验中,在不同的镉胁迫程度下,植物叶片中的巯基物质和植物络合素含量的变化趋势有所不同。低镉水平下,随着硫浓度的增加,NPT 和 PCs 的含量持续升高,高镉水平下,两者的含量先升后降,差异显著。可见镉硫交互对 NPT 和 PCs 合成的促进效应在不同浓度镉硫组合上表现不完全一致。安志装等^[12]研究了镉硫交互处理对水稻蛋白硫基含量的影响,发现只有低硫处理的根和叶片 NPT 含量有所提高,高硫处理下水稻根、茎和叶 NPT 含量与对照没有显著的差异,与本试验结果基本一致。在一定的镉胁迫环境下,供硫浓度的提高为进一步促进植物体内 GSH 和 PCs 等物质的合成提供了丰富的硫源,进一步使 NPT 物质与络合形成的络合物数量上升,这些络合物通过一些转运蛋白被转运到胞外,或者络合物的形式进行区域化隔离,以降低镉对小白菜的毒害作用。因此适度的硫在缓解镉毒性

的过程中扮演着重要的角色。

4 结论

本研究结果表明,适度镉硫(Cd5+S3与Cd50+S2)组合处理能够保持较高且相对协调平衡的APX、DHAR、GR和MDHAR活性,维持较强的氧化还原力(AsA/DHA比率、GSH/GSSG比率)和高水平的抗氧化物质(AsA、GSH),为小白菜叶片AsA-GSH循环快速有效地运转奠定物质基础,使过量产生的H₂O₂能被及时清除,降低其膜脂过氧化程度,对于提高小白菜的抗氧化胁迫能力具有重要作用。同时,PCs含量的增加可以整合植物体内过多的镉,减轻或者避免过量镉对植物体造成的伤害。但过高SO₄²⁻离子浓度有一定盐胁迫毒害效应,会影响其对降低小白菜镉生物毒性的作用,说明硫缓解镉毒害存在剂量效应关系。另外,植物络合素合成的上升,也有可能促进镉从根系向地上部的转运。因此,在应用硫肥提高植物镉耐性的同时,应考虑到可能会增加镉等重金属在蔬菜等农产品中的积累,对该安全风险有必要引起关注和进行进一步研究。

参考文献:

- [1] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48: 909-930.
- [2] 王俊力, 王 岩, 赵天宏, 等. 臭氧胁迫对大豆叶片抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. *生态学报*, 2011, 31(18): 2068-2075.
WANG Jun-li, WANG Yan, ZHAO Tian-hong, et al. Effects of ozone on AsA-GSH cycle in soybean leaves[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(18): 2068-2075.
- [3] Rausch T, Wachter A. Sulfur metabolism: A versatile platform for launching defence operations[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(10): 503-509.
- [4] Fässler E, Plaza S, Pairaud A, et al. Expression of selected genes involved in cadmium detoxification in tobacco plants grown on a sulphur-amended metal-contaminated field[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, 70: 158-165.
- [5] Anjum N A, Umar S, Ahmad A, et al. Sulphur protects mustard (*Brassica campestris* L.) from cadmium toxicity by improving leaf ascorbate and glutathione[J]. *Plant Growth Regulation*, 2008, 54: 271-279.
- [6] Babula B, Ryant P, Adam V, et al. The role of sulphur in cadmium (II) ions detoxification demonstrated in vitro model: *Dionaea muscipula* Eil [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2009, 7: 353-361.
- [7] Mishra S, Tripathi R D, Srivastava S, et al. Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 2155-2161.
- [8] 王 云, 蔡 汉, 陆任云, 等. 壳聚糖对镉胁迫条件下小麦幼苗生长和生理的影响[J]. *生态学杂志*, 2007, 26: 1671.
WANG Yun, CAI Han, LU Ren-yun, et al. Effects of chitosan on *Triticum aestivum* growth and physiology under cadmium stress[J]. *Chinese Journal Ecology*, 2007, 26: 1671.
- [9] 张丽娜, 宗良纲, 任 恩, 等. 硅对低镉污染水平下水稻幼苗生长及吸收镉的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26: 494.
ZHANG Li-na, ZONG Liang-gang, REN Cai, et al. Effects of silicon on seedling growth and uptake of Cd in the low level of Cd pollution[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26: 494.
- [10] 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: 197.
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: 197.
- [11] Zawoznik M S, Groppa M D, Tomaro M L, et al. Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Science*, 2007, 17: 190.
- [12] 安志装, 王校常, 严蔚东, 等. 镉硫交互处理对水稻吸收累积镉及其蛋白巯基含量的影响[J]. *土壤学报*, 2004, 41(5): 728-733.
AN Zhi-zhuang, WANG Xiao-chang, YAN Wei-dong, et al. Effects of sulfate and cadmium interaction on cadmium accumulation and content of nonprotein thiols in rice seedlings[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 41(5): 728-733.
- [13] Lin Z F, Li S S, Lin G Z, et al. The accumulation of hydrogen peroxide in senescing leaves and chloroplasts in relation to lipid peroxidation[J]. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1988, 14: 16-22.
- [14] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiology*, 1981, 22(5): 867-880.
- [15] Ma F W, Cheng L L. The sun exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate glutathione pathway than the shade peel[J]. *Plant Science*, 2003, 165(4): 819-827.
- [16] Kampfenkel K, Vanmontagu M, Inz D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue[J]. *Analytical Biochemistry*, 1995, 225: 165-167.
- [17] 齐 君, 吕金印, 李鹰翔, 等. Cr胁迫对青菜中植物络合素含量及AsA-GSH代谢关键酶活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(7): 1303-1309.
QI Jun, LÜ Jin-yin, LI Ying-xiang, et al. Effects of chromium stress on the content of phytochelatin and activities of key enzymes of ascorbate-glutathione cycle in *Brassica chinensis* L. [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(7): 1303-1309.
- [18] 马玉华, 王永红, 王 荔, 等. 强光对苹果盆栽苗叶片抗坏血酸含量的影响[J]. *江西农业学报*, 2010, 22(11): 23-25.
MA Yu-hua, WANG Yong-hong, WANG Li, et al. Effects of strong light on content of ascorbate in leaves of potted apple seedling[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, 22(11): 23-25.
- [19] 陈坤明, 宫海军, 王锁民. 植物谷胱甘肽代谢与环境胁迫[J]. *西北植物学报*, 2004, 24(6): 1119-1130.
CHEN Kun-ming, GONG Hai-jun, WANG Suo-min. Glutathione

- metabolism and environmental stresses in plants[J]. *Acta Bot Boreal Occident Sin*, 2004, 24(6):1119-1130.
- [20] 魏国平, 朱月林, 刘正鲁, 等. 硝酸钙胁迫对营养液栽培嫁接茄子叶片抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 植物生态学报, 2008, 32(5):1023-1030.
- WEI Guo-dong, ZHU Yue-lin, LIU Zheng-lu, et al. Effects of calcium nitrate stress on ascorbate-glutathione cycle metabolism in leaves of hydroponically-grown grafted eggplant seedlings[J]. *Journal of Plant Ecology*, 2008, 32(5):1023-1030.
- [21] 杨广东, 朱祝军. 不同光照条件下缺镁对黄瓜生长及活性氧清除系统的影响[J]. 园艺学报, 2001, 28(5):430-434.
- YANG Guang-dong, ZHU Zhu-jun. Effects of magnesium deficiency on growth and active oxygen scavenging system in cucumber under different light intensities[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(5):430-434.
- [22] 李会合. 镉硫交互对东南景天抗氧化酶活性的影响[J]. 水土保持学报, 2011, 25(5):103-106.
- LI Hui-he. Effects of sulfur and cadmium interactions on antioxidant enzymes activity in hyperaccumulator-*Sedum alfredii* Hance[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2011, 25(5):103-106.
- [23] 王 聪, 朱月林, 杨立飞, 等. NaCl 胁迫对菜用大豆种子抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. 植物营养与肥科学报, 2010, 16(5):1209-1216.
- WANG Cong, ZHU Yue-lin, YANG Li-fei, et al. Effects of NaCl stress on ascorbate-glutathione cycle in vegetable soybean seeds[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2010, 16(5):1209-1216.
- [24] 张玉秀, 于 飞, 张媛雅, 等. 植物对重金属镉的吸收转运和累积机制[J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(5):1317-1321.
- ZHANG Yu-xiu, YU Fei, ZHANG Yuan-ya, et al. Uptake, translocation and accumulation of cadmium in plant[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2008, 16(5):1317-1321.
- [25] Marschner H, Rimmington G M. Mineral nutrition of higher plants[J]. *Plant, Cell and Environment*, 1988, 11:147-148.
- [26] Howarth J R, Dominguez-Solis J R, Gutierrez-Alcala G, et al. The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51:589-598.
- [27] Lee S, Leustek T. The effect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*[J]. *Plant Science*, 1999, 141:201-207.