



Cd胁迫下外源谷胱甘肽对紫花苜蓿氮代谢及Cd累积特征的影响

李航, 李祖然, 李博, 陈建军, 何永美, 杨姝

引用本文:

李航, 李祖然, 李博, 陈建军, 何永美, 杨姝. Cd胁迫下外源谷胱甘肽对紫花苜蓿氮代谢及Cd累积特征的影响[J]. 农业资源与环境学报, 2022, 39(6): 1225–1233.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13254/j.jare.2022.0108>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

7种紫花苜蓿对云南某铅锌矿区土壤镉铅的累积特征及品种差异

杨姝, 贾乐, 毕玉芬, 湛方栋, 陈建军, 李博, 祖艳群, 李元

农业资源与环境学报. 2018, 35(3): 222–228 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2017.0334>

松嫩平原西部盐碱地紫花苜蓿产量和品质对刈割频次与施肥的响应

那佳, 黄立华, 晏益民, 张璐, 黄金鑫

农业资源与环境学报. 2021, 38(5): 882–890 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2020.0539>

钝化材料的老化对水稻土中Cd钝化稳定性的影响

单志军, 陈勇红, 张丽, 刘岩, 焦位雄, 林大松

农业资源与环境学报. 2021, 38(2): 167–175 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2020.0218>

野生小花南芥体内AsA-GSH循环对土壤Cd、Pb胁迫的响应

刘梅, 李祖然, 张光群, 王吉秀, 祖艳群

农业资源与环境学报. 2021, 38(4): 558–569 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2020.0404>

二氧化钛纳米颗粒对玉米幼苗吸收镉及其植物毒性的影响

郑泽其, 李剑涛, 吴佳妮, 连加攀, 史瑞滢, 刘维涛

农业资源与环境学报. 2022, 39(6): 1217–1224 <https://doi.org/10.13254/j.jare.2021.0535>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

李航, 李祖然, 李博, 等. Cd胁迫下外源谷胱甘肽对紫花苜蓿氮代谢及Cd累积特征的影响[J]. 农业资源与环境学报, 2022, 39(6): 1225–1233.

LI H, LI Z R, LI B, et al. Effects of exogenous glutathione on nitrogen metabolism and cadmium accumulation in *Medicago sativa* under cadmium stress[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2022, 39(6): 1225–1233.



开放科学 OSID

Cd胁迫下外源谷胱甘肽对紫花苜蓿氮代谢及Cd累积特征的影响

李航¹, 李祖然³, 李博¹, 陈建军¹, 何永美¹, 杨姝^{2*}

(1. 云南农业大学资源与环境学院, 昆明 650201; 2. 云南农业大学理学院, 昆明 650201; 3. 云南农业大学园林园艺学院, 昆明 650201)

摘要:为研究镉(Cd)胁迫下外源谷胱甘肽(GSH)对紫花苜蓿(*Medicago sativa*)氮代谢及Cd累积特征的影响,以4种紫花苜蓿为植物材料,设置对照、Cd处理和混合处理(Cd+GSH)开展水培试验。结果表明,Cd胁迫影响紫花苜蓿氮代谢,谷氨酸合成酶活性较对照处理最高降低43.79%。Cd胁迫下喷施GSH后,总氮、氮代谢关键酶活性、游离氨基酸和可溶性蛋白较Cd处理均有不同程度地变化,其中谷氨酸合成酶活性较Cd处理最高增加79.05%。外源GSH影响紫花苜蓿体内Cd的化学形态与亚细胞分布:施加GSH后盐酸提取态占比较Cd处理最高增加14.81个百分点;外源GSH处理下液泡中的Cd含量占比较Cd处理最高上升11.91个百分点;GSH处理还能显著提高紫花苜蓿植物螯合肽(PCs)含量,有效阻止Cd以游离态的形式进入细胞器。研究表明,Cd胁迫下外源GSH可提高紫花苜蓿硝酸还原酶等氮代谢关键酶活性,维持氮代谢正常进行;外源GSH可能通过提高PCs的合成水平和减轻Cd毒害,间接对氮代谢进行调控。

关键词:紫花苜蓿;Cd胁迫;谷胱甘肽;氮代谢;Cd累积特征

中图分类号:X173;S541.9 文献标志码:A 文章编号:2095-6819(2022)06-1225-09 doi: 10.13254/j.jare.2022.0108

Effects of exogenous glutathione on nitrogen metabolism and cadmium accumulation in *Medicago sativa* under cadmium stress

LI Hang¹, LI Zuran³, LI Bo¹, CHEN Jianjun¹, HE Yongmei¹, YANG Shu^{2*}

(1. College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. School of Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. School of Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: To study the effects of exogenous glutathione (GSH) on nitrogen metabolism and cadmium (Cd) accumulation in *Medicago sativa* under Cd stress, four *Medicago sativa* varieties were used as plant materials. The treatments were control, Cd, and mixed (Cd+GSH). The results showed that Cd stress had higher impact on the four *Medicago sativa* varieties for total nitrogen content and activity of major nitrogen metabolism enzymes with up to 43.79% reduction in glutamate synthase activity. After spraying GSH under Cd stress, total nitrogen, key enzyme activities of nitrogen metabolism, free amino acids, and soluble protein all changed to different degrees compared with Cd treatment, with the highest increase of 79.05% in glutamate synthase compared with Cd treatment. Exogenous GSH affected the chemical form and subcellular distribution of Cd in *Medicago sativa*, with the highest increase of 14.81 percentage points in the hydrochloride extracted state after GSH application compared with the Cd treatment. The proportion of Cd content in vesicles under exogenous GSH treatment increased by 11.91 percentage points compared with the Cd treatment. GSH treatment also significantly increased the content of

收稿日期:2022-03-08 录用日期:2022-05-12

作者简介:李航(1998—),男,湖南衡阳人,硕士研究生,从事土壤重金属污染修复方面的研究。E-mail:1140212357@qq.com

*通信作者:杨姝 E-mail:zkun@sina.com

基金项目:国家自然科学基金项目(31860112)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(31860112)

<http://www.aed.org.cn>

phytochelatin in *Medicago sativa* plants, effectively preventing Cd from entering the organelle in its free form. This study shows that exogenous GSH under Cd stress can increase the activity of key enzymes of nitrogen metabolism such as nitrate reductase in *Medicago sativa* and maintain normal nitrogen metabolism. Cd toxicity can be mitigated by compartmentalisation. Exogenous GSH may indirectly regulate nitrogen metabolism in this way.

Keywords: *Medicago sativa*; Cd stress; glutathione; nitrogen metabolism; Cd accumulation characteristics

我国部分地区重金属污染较为严重,2014年全国土壤污染状况调查公报显示,重金属Cd污染超标点位占全部取样点位的7%,位列重金属污染之首^[1]。

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是一种优质牧草,在我国有较大的种植面积,研究显示其具有一定的Cd耐性和Cd吸收累积能力^[2]。谷胱甘肽(GSH)是一类普遍存在于植物体内的含巯基低分子化合物,也是植物螯合肽(PCs)的前体物质和谷胱甘肽-S-转移酶的底物,能直接清除单线态氧以及过氧化氢(H₂O₂)等多种活性氧(ROS)自由基,也能通过抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环间接清除ROS^[3]。目前,外源GSH对Cd毒害缓解作用的研究主要集中在与Cd螯合、AsA-GSH循环、阻断Cd转运吸收及抗氧化酶共同作用调控细胞内ROS等方面。Cd胁迫会影响植物对氮素的吸收、分配和累积,使植物氮素代谢紊乱,甚至造成植物死亡^[4]。GSH与氮代谢存在紧密联系,是氮与硫营养之间协调的关键,扮演着调控因子的角色^[5]。GSH在生物固氮的结瘤过程中具有关键作用,GSH合成的缺乏抑制了蒺藜苜蓿根瘤的形成^[6];同时,也有研究表明外源GSH能够削弱外界胁迫对于植物氮代谢的抑制,蓝藻受到氯化钠胁迫时,外源GSH能在一定程度上提高蓝藻的固氮能力^[7]。目前,对于Cd胁迫下GSH对植物氮代谢的影响研究较少,本研究以紫花苜蓿为植物材料,开展水培试验,探讨Cd胁迫下外源GSH对紫花苜蓿氮代谢及Cd累积特征的影响,为植物代谢生理生态和植物逆境生理生态等领域研究提供数据支撑,同时为紫花苜蓿用于Cd污染土壤的治理和综合利用提供基础性研究资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试4个品种紫花苜蓿为甘农3号、甘农9号、中苜1号和WL525HQ,苜蓿种子由云南农业大学动物科学技术学院草业科学实验室提供。随机挑选颗粒饱满、无虫蛀紫花苜蓿种子若干,用酒精清洗30 s,用0.1% HgCl₂溶液消毒8 min,再用蒸馏水冲洗4~5次,备用。

1.2 试验设计

紫花苜蓿种子置于25℃恒温、黑暗的育苗盘中发芽,待其子叶展开后移至植物补光灯下继续培育,真叶长出后选取叶面积较大、根部发育完整的植株移入水培盒(12.6 cm×8.6 cm×11.2 cm)中。水培盒内放置充气泵,24 h向水培液中充气。每日在恒定光强(10 000 lx)下光照12 h,培养环境为(25±3)℃。培养液为Hoagland营养液,由去离子水自行配制,其组成为硝酸钙945 mg·L⁻¹、硝酸钾607 mg·L⁻¹、磷酸铵115 mg·L⁻¹、硫酸镁493 mg·L⁻¹、铁盐溶液2.5 mg·L⁻¹、微量元素5 mg·L⁻¹,pH为6.0。

根据课题组前期试验结果,设置对照处理(0 mg·L⁻¹ Cd, 0 mg·L⁻¹ GSH)、Cd处理(15 mg·L⁻¹ Cd, 0 mg·L⁻¹ GSH)和混合处理(15 mg·L⁻¹ Cd, 25 mg·L⁻¹ GSH),其中Cd以CdCl₂形式溶于营养液中,外源GSH以溶液形式喷洒至叶片上。每个处理设3个重复,每个重复5棵植株。每3 d更换一次营养液并施加Cd胁迫,同时喷洒GSH溶液,喷洒量根据植株大小有所差异,以叶片均匀打湿为准。生长4周后收获紫花苜蓿,测定各指标。

1.3 指标测定

紫花苜蓿收获后,用自来水清洗后再用去离子水清洗2遍,用滤纸擦干表面水分,测定株高;将植株分为地上部和地下部,于105℃杀青30 min,80℃恒温烘干至质量恒定,测定地上部和地下部的生物量。

地上部指标测定:游离氨基酸含量采用茚三酮法测定;可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝法测定;总氮含量采用凯氏定氮仪法^[8]测定;脯氨酸含量采用酸性茚三酮法测定;天冬酰胺合成酶、谷氨酸合成酶、谷氨酸脱氢酶活性采用NADH速率法测定;谷氨酰胺合成酶活性采用氯化铁比色法测定;硝酸还原酶活性采用NADPH速率法测定;亚硝酸盐还原酶活性采用萘胺比色法测定。试剂盒购自苏州格锐思生物科技有限公司。

样品消解:将烘干的紫花苜蓿样品粉碎,称取0.5 g放入锥形瓶中,用混合酸(高氯酸:硝酸=1:5, V/V)消解,用石墨电热板140℃加热消解,待样品消解完全,冷却至室温后过滤,定容。采用AA320N型火焰

原子吸收分光光度计测定地上部与地下部 Cd 含量。

采用差速离心法提取地上部亚细胞组分并采用石墨炉原子吸收分光光度法测定 Cd 的亚细胞分布^[9];使用两步连续提取法,分离地上部乙醇提取态、盐酸提取态和残渣态的 Cd,并采用火焰原子吸收分光光度法测定各形态的 Cd 含量^[10]。

1.4 数据处理

利用 Excel 2018 对试验所有原始数据进行初步计算,再用 SPSS 26.0 进行单因素方差分析和差异显著性检验(LSD 法),并采用 Origin 2018 绘制相关图表。所有数据为平均值±标准差,显著性水平设定为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 Cd胁迫下外源 GSH 对紫花苜蓿株高和生物量的影响

由表 1 可知,与对照相比,Cd 胁迫下甘农 9 号、中苜 1 号、WL525HQ 地上部生物量显著下降,甘农 9 号降幅达 32.92% ($P<0.05$)。与 Cd 处理相比,混合处理中苜 1 号、WL525HQ 地上部生物量显著增加, WL525HQ 增加 34.33% ($P<0.05$)。Cd 胁迫影响地下部生物量,与对照相比, Cd 胁迫的中苜 1 号、WL525HQ 地下部生物量显著降低, WL525HQ 降低 48.84% ($P<0.05$);与 Cd 处理相比,喷施 GSH 处理后中苜 1 号、WL525HQ 地下部生物量均增加,其中 WL525HQ 增加 75.76% ($P<0.05$)。

表 1 外源 GSH 对 Cd 胁迫下紫花苜蓿生物量及株高的影响
Table 1 Effect of exogenous GSH on biomass and plant height of

<i>Medicago sativa</i> under Cd stress				
指标 Index	品种 Variety	对照 Control	Cd 处理 Cd treatment	混合处理 Mixed treatment
地上部 生物量/g	甘农 3 号	5.54±1.26a	5.58±0.62a	6.55±0.65a
	甘农 9 号	4.89±0.76a	3.28±0.45b	4.17±0.23ab
	中苜 1 号	4.77±0.18a	4.21±0.10b	5.04±0.27a
	WL525HQ	5.72±1.27a	4.02±0.36b	5.40±0.25a
地下部 生物量/g	甘农 3 号	1.33±0.12a	1.19±0.06a	1.45±0.17a
	甘农 9 号	1.11±0.10a	0.64±0.26a	1.12±0.08a
	中苜 1 号	1.44±0.15a	0.92±0.16b	1.32±0.10a
	WL525HQ	1.29±0.07a	0.66±0.14b	1.16±0.04a
株高/cm	甘农 3 号	27.67±2.52a	28.83±1.89a	30.83±1.26a
	甘农 9 号	22.33±2.08a	16.00±2.65b	19.67±2.08a
	中苜 1 号	20.33±0.58a	15.33±1.26b	22.67±1.53a
	WL525HQ	21.33±3.06a	16.67±1.15b	20.67±1.53a

注:同行不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。
Note: Different letters in the same row indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

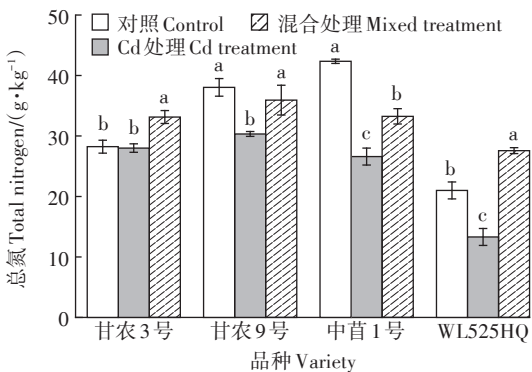
Cd 胁迫对株高有一定抑制作用,与对照相比,甘农 9 号、中苜 1 号、WL525HQ 株高均显著降低,其中甘农 9 号降幅最大,达 28.35%;与 Cd 处理相比,喷施 GSH 处理以上 3 个品种株高均显著增加,其中中苜 1 号的 GSH 处理增加 47.88% ($P<0.05$),增幅最大。

2.2 Cd胁迫下外源 GSH 对紫花苜蓿氮代谢的影响

2.2.1 氮素形态及含量

由图 1 可知,与对照相比,Cd 胁迫处理甘农 9 号、中苜 1 号、WL525HQ 总氮含量显著降低,中苜 1 号降幅达 37.19% ($P<0.05$)。外源 GSH 混合处理 4 种紫花苜蓿总氮含量较 Cd 处理显著提高,其中 WL525HQ 增幅最大,提高 107.36% ($P<0.05$)。

由表 2 可知, Cd 胁迫和外源 GSH 对游离氨基酸含量影响较小,仅 WL525HQ 较对照显著降低 41.67%,其他品种无显著变化 ($P>0.05$)。Cd 胁迫下,甘农 9 号、中苜 1 号和 WL525HQ 的可溶性蛋白含量较对照显著降低, WL525HQ 降幅最大,较对照降低 21.94%;与 Cd 处理相比,喷施 GSH 处理甘农 3 号、WL525HQ 的可溶性蛋白含量无显著变化,中苜 1 号和甘农 9 号可溶性蛋白含量显著增加,其中中苜 1 号增幅最大,增加 20.46% ($P<0.05$)。Cd 胁迫下硝态氮含量均显著减少,甘农 9 号减少 42.45%,降幅最大;喷施 GSH 所有品种硝态氮含量较 Cd 处理均显著增加,甘农 3 号增幅最大,增加了 100.39% ($P<0.05$)。Cd 处理下脯氨酸含量品种间差异较大,与对照相比甘农 9 号降低 59.20%,甘农 3 号、中苜 1 号和 WL525HQ 的含量分别增加了 37.02%、130.75% 和 92.13%;喷施



不同字母表示同一品种的不同处理差异显著 ($P<0.05$)。下同
Different letters indicate that there are significant differences among treatments of the same variety ($P<0.05$). The same below

图 1 外源 GSH 对 Cd 胁迫下紫花苜蓿总氮含量的影响
Figure 1 Effect of exogenous GSH on the total nitrogen content of
Medicago sativa under Cd stress

表2 外源GSH对Cd胁迫下紫花苜蓿地上部氮素形态及含量的影响

Table 2 Effect of exogenous GSH on the above-ground nitrogen form and content of *Medicago sativa* under Cd stress

指标 Index	品种 Variety	对照 Control	Cd处理 Cd treatment	混合处理 Mixed treatment
游离氨基酸/ (mg·g ⁻¹)	甘农3号	0.10±0.01a	0.11±0.01a	0.12±0.01a
	甘农9号	0.10±0.02a	0.09±0.02a	0.11±0.02a
	中苜1号	0.12±0.01a	0.09±0.02a	0.12±0.01a
	WL525HQ	0.12±0.01a	0.07±0.02b	0.12±0.01a
可溶性 蛋白质/ (mg·g ⁻¹)	甘农3号	4.11±0.13b	4.47±0.10a	4.33±0.21ab
	甘农9号	5.15±0.15a	4.08±0.14c	4.67±0.06b
	中苜1号	4.02±0.08a	3.47±0.14b	4.18±0.04a
	WL525HQ	5.06±0.33a	3.95±0.30b	4.52±0.35ab
硝态氮/ (μg·g ⁻¹)	甘农3号	78.11±6.34b	46.01±0.64c	92.20±2.28a
	甘农9号	91.38±4.71a	52.59±6.33c	76.67±4.82b
	中苜1号	119.05±4.55a	72.14±8.85c	93.74±11.55b
	WL525HQ	85.10±2.10b	60.51±13.31c	105.47±9.18a
脯氨酸/ (μg·g ⁻¹)	甘农3号	24.20±1.06b	33.16±1.21a	22.94±0.62b
	甘农9号	70.96±6.06a	28.95±3.50b	23.36±2.40c
	中苜1号	28.13±3.12b	64.91±16.74a	20.50±9.29b
	WL525HQ	17.91±7.46b	34.41±0.95a	20.82±4.64b

GSH处理4个品种紫花苜蓿的脯氨酸含量较Cd处理显著降低($P<0.05$),降幅为19.31%~68.42%。

对株高、生物量、总氮等指标变化进行相关性分析(表3),发现总氮含量与地上部生物量、地下部生物量、游离氨基酸含量之间两两呈显著或极显著正相关关系,硝态氮与地下部生物量、总氮、游离氨基酸呈极显著正相关关系,而可溶性蛋白、脯氨酸与其他指标间均无显著相关关系。

2.2.2 氮代谢关键酶活性

与对照相比,Cd胁迫对甘农3号、甘农9号的亚

硝酸还原酶、硝酸还原酶及天冬酰胺合成酶活性无显著影响(图2a~图2c),中苜1号、WL525HQ的亚硝酸还原酶、硝酸还原酶及天冬酰胺合成酶活性显著降低($P<0.05$),3种酶活性最大降幅达到37.70%(WL525HQ)、40.00%(WL525HQ)、55.33%(WL525HQ)。与Cd处理相比,喷施外源GSH处理甘农3号、甘农9号亚硝酸还原酶、天冬酰胺合成酶活性无显著变化;中苜1号、WL525HQ的硝酸还原酶、天冬酰胺合成酶活性显著升高($P<0.05$)。可见Cd胁迫和外源GSH对紫花苜蓿的亚硝酸还原酶、硝酸还原酶及天冬酰胺合成酶活性影响不同,这种影响可能与紫花苜蓿的品种有关,甘农3号、甘农9号对Cd胁迫和外源GSH不敏感,Cd处理和混合处理时上述酶活性无显著变化,中苜1号和WL525HQ在Cd胁迫下酶活性显著降低,外源GSH能在一定程度上缓解Cd胁迫,提高酶活性。

Cd胁迫下甘农3号和甘农9号的谷氨酸脱氢酶活性呈显著上升趋势(图2d),较对照提高63.41%和131.73%,中苜1号、WL525HQ谷氨酸脱氢酶活性受到不同程度抑制,分别降低19.18%、21.78%($P<0.05$);喷施外源GSH后,与Cd处理相比甘农3号和甘农9号的谷氨酸脱氢酶活性降低28.82%、11.97%($P<0.05$);中苜1号和WL525HQ的谷氨酸脱氢酶活性呈上升趋势,较Cd处理增加了39.23%、52.46%($P<0.05$),Cd处理与混合处理下甘农3号、甘农9号与中苜1号、WL525HQ谷氨酸脱氢酶活性变化趋势相反,但对Cd胁迫与外源GSH均较为敏感。

Cd胁迫下,除甘农3号外其他品种的谷氨酸合成酶活性受到不同程度的抑制,活性较对照显著降低(图2e),WL525HQ降幅最大,达43.79%($P<0.05$);喷施外源GSH后,与Cd处理相比甘农9号、中苜1号、

表3 GSH对Cd胁迫下紫花苜蓿生理指标变化率的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of GSH on the change rate of physiological indexes of *Medicago sativa* under Cd Stress

指标 Index	株高 Plant height	地上部生物量 Aboveground biomass	地下部生物量 Underground biomass	总氮 Total nitrogen	可溶性蛋白 Soluble protein	游离氨基酸 Free amino acid	硝态氮 Nitrate nitrogen	脯氨酸 Proline
株高	1							
地上部生物量	0.709**	1						
地下部生物量	0.634**	0.596**	1					
总氮	0.201	0.489*	0.456**	1				
可溶性蛋白	0.265	0.226	0.230	0.153	1			
游离氨基酸	0.380*	0.407*	0.632**	0.406*	0.318	1		
硝态氮	0.080	0.313	0.593**	0.488**	0.160	0.478**	1	
脯氨酸	-0.335	-0.343	-0.320	0.179	0.026	-0.421	-0.123	1

注 Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

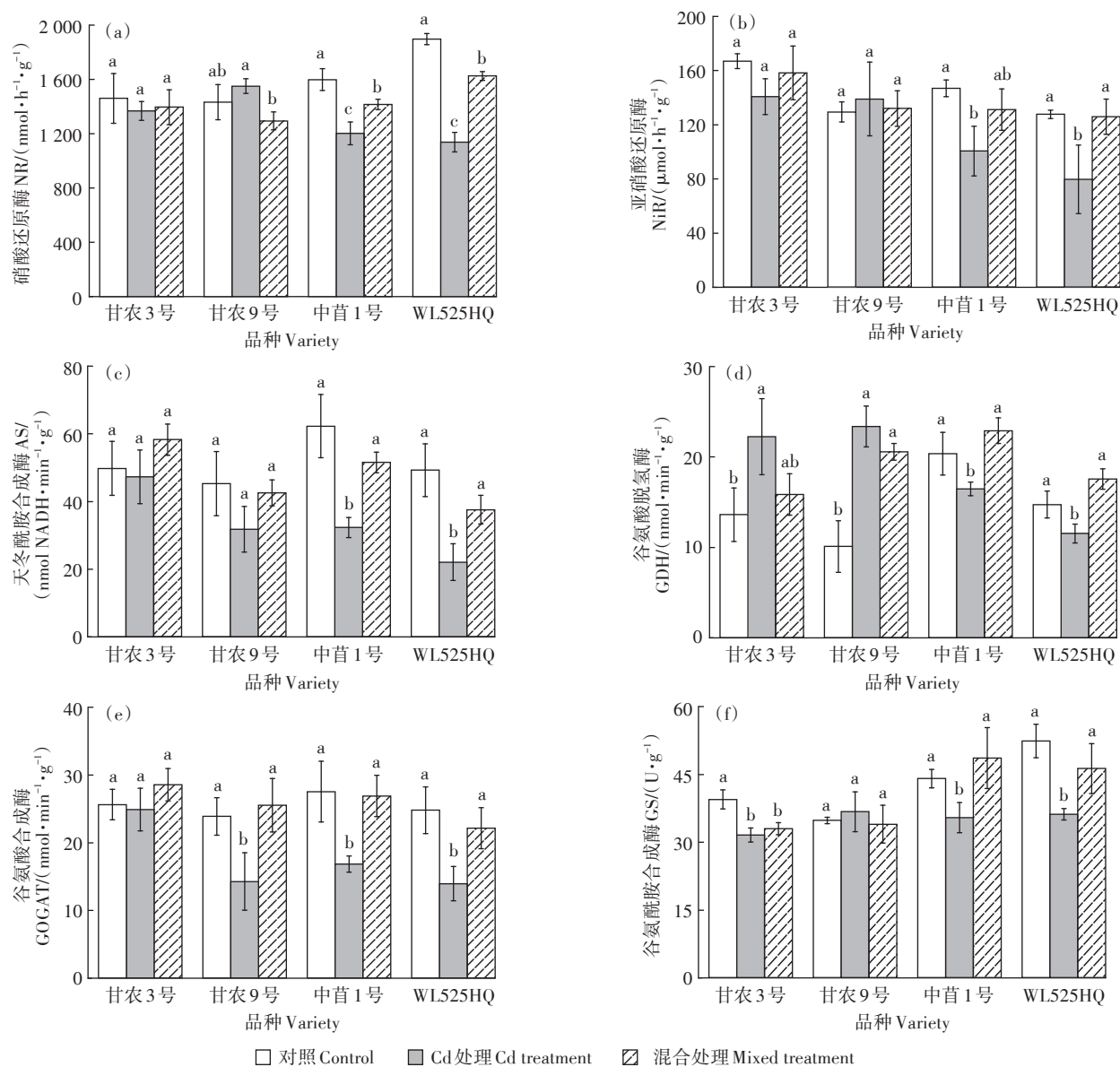


图2 外源GSH对Cd胁迫下紫花苜蓿叶片中氮代谢关键酶活性的影响

Figure 2 Effect of exogenous GSH on the activity of key enzymes of nitrogen metabolism in *Medicago sativa* leaves under Cd stress

WL525HQ的谷氨酸合成酶活性均有不同程度升高,增幅为58.84%~79.05% ($P < 0.05$)。Cd胁迫对甘农9号谷氨酰胺合成酶活性无显著影响,但使甘农3号、中苜1号和WL525HQ谷氨酰胺合成酶活性不同程度下降(图2f),降幅分别为20.03%、19.65%和30.93% ($P < 0.05$)。喷施外源GSH后,除甘农9号外,其他3个品种的谷氨酰胺合成酶活性较Cd处理有不同程度升高,其中中苜1号和WL525HQ分别升高37.30%和27.91% ($P < 0.05$)。上述结果表明谷氨酸-谷氨酰胺合成酶循环作为植物体内无机氮的常规途径,在Cd处理与混合处理下两者变化趋势一致,Cd胁迫会导致两者活性受到抑制,而外源GSH能一定程度缓解

Cd毒害,且缓解程度与紫花苜蓿品种相关。

2.3 外源GSH对紫花苜蓿Cd累积特征的影响

2.3.1 总Cd累积量

由表4可知,Cd胁迫下喷施GSH,仅中苜1号地上部Cd累积量较Cd处理显著降低14.70%;地下部Cd累积量仅WL525HQ显著降低10.10% ($P < 0.05$),其他品种无显著差异。各品种地下部Cd含量高于地上部Cd含量,外源GSH对苜蓿体内Cd含量影响较小。

2.3.2 Cd的亚细胞分布

由图3可知,对照中Cd主要富集在苜蓿的细胞壁中,甘农3号、甘农9号占比分别为45.74%、48.06%,中苜1号和WL525HQ占比则超过一半,分别

表4 外源GSH对Cd胁迫下紫花苜蓿地上部、地下部Cd积累量的影响

Table 4 Effect of exogenous GSH on the accumulation of above- and under ground Cd in *Medicago sativa* under Cd stress

品种 Variety	处理 Treatment	地上部 Aboveground/ (mg·kg ⁻¹)	地下部 Underground/ (mg·kg ⁻¹)
甘农3号	对照	0.68±0.22b	0.59±0.49b
	Cd处理	180.01±13.64a	284.88±8.11a
	混合处理	173.07±11.72a	285.07±5.82a
甘农9号	对照	0.20±0.17b	0.29±0.53b
	Cd处理	190.15±19.39a	392.43±34.47a
	混合处理	183.02±16.14a	401.26±12.13a
中苜1号	对照	0.27±0.34c	0.66±0.23b
	Cd处理	158.61±15.89a	382.56±6.42a
	混合处理	135.30±10.77b	399.00±34.81a
WL525HQ	对照	0.47±0.32b	1.31±0.66c
	Cd处理	159.75±8.18a	592.20±32.62a
	混合处理	148.19±15.89a	532.39±14.95b

注:同列同一品种不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference for the same variety ($P<0.05$).

为57.58%和54.58%。其次为液泡,甘农3号和甘农9号占比超过30%,中苜1号和WL525HQ占比分别为26.50%和27.62%。细胞器中Cd含量占比最低,仅甘农3号占比超过30%,其他品种均低于20%。

Cd处理中,甘农3号、甘农9号、WL525HQ仍是细胞壁含量占比最高,分别达到了43.58%、40.34%、41.88%,中苜1号液泡Cd含量占比(40.36%)则略高于细胞壁(38.88%),与对照相比更多的Cd富集到液泡中。

混合处理中,4个品种的紫花苜蓿均为液泡Cd含量占比最高,甘农3号、甘农9号、中苜1号和WL525HQ分别达到45.51%、52.25%、49.05%和50.59%,其次为细胞壁。与对照和Cd处理相比,苜蓿叶片细胞壁的Cd含量占比有所减少,而液泡中的Cd占比持续增加。Cd含量占比最低的仍是细胞器,上述4个品种分别为18.70%、18.00%、19.08%、17.29%。

2.3.3 Cd的化学形态

Cd的形态和含量测定结果(图4)显示,在对照中,苜蓿体内的Cd主要以盐酸提取态的形式存在,4个品种的

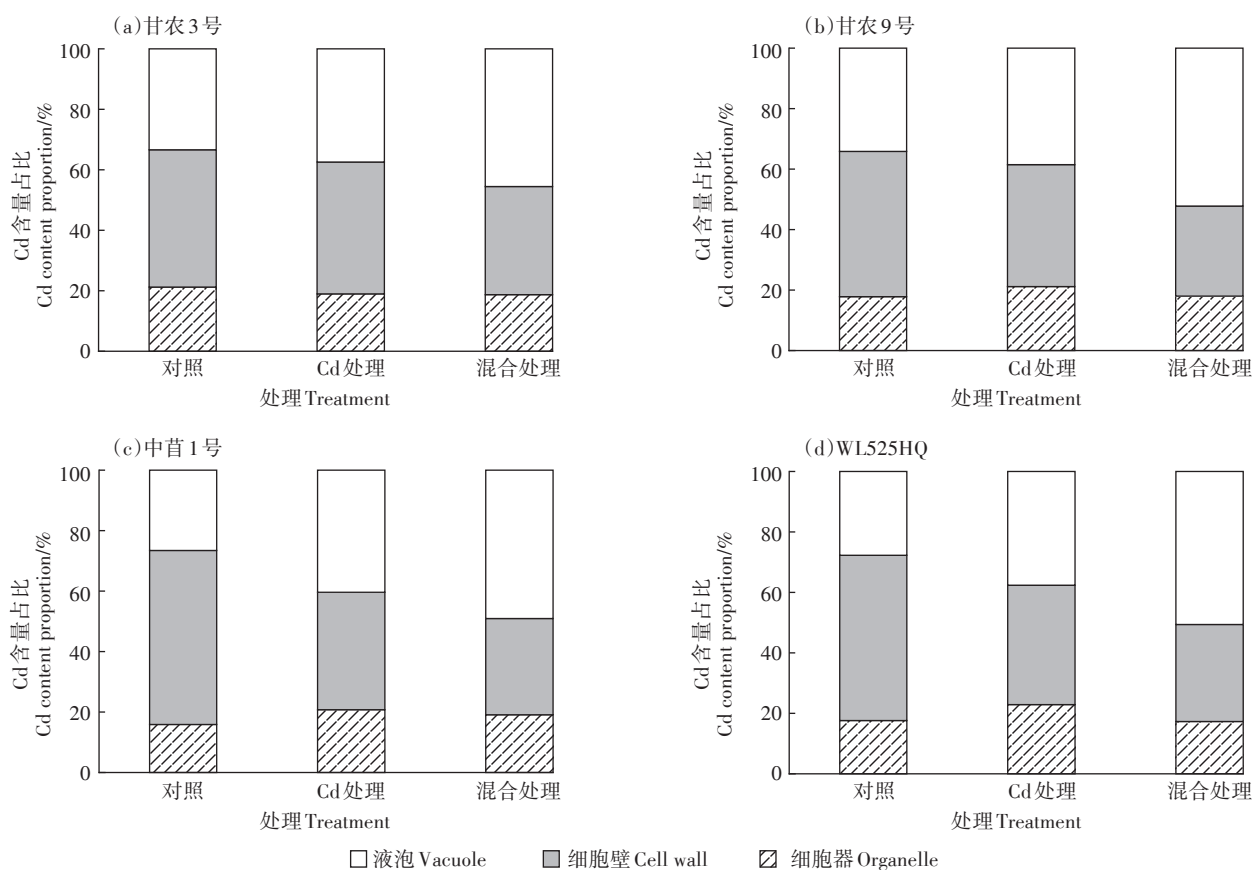


图3 外源GSH对Cd胁迫下紫花苜蓿叶片亚细胞中Cd分布的影响

Figure 3 Effect of exogenous GSH on the distribution of Cd in subcellular *Medicago sativa* leaves under Cd stress

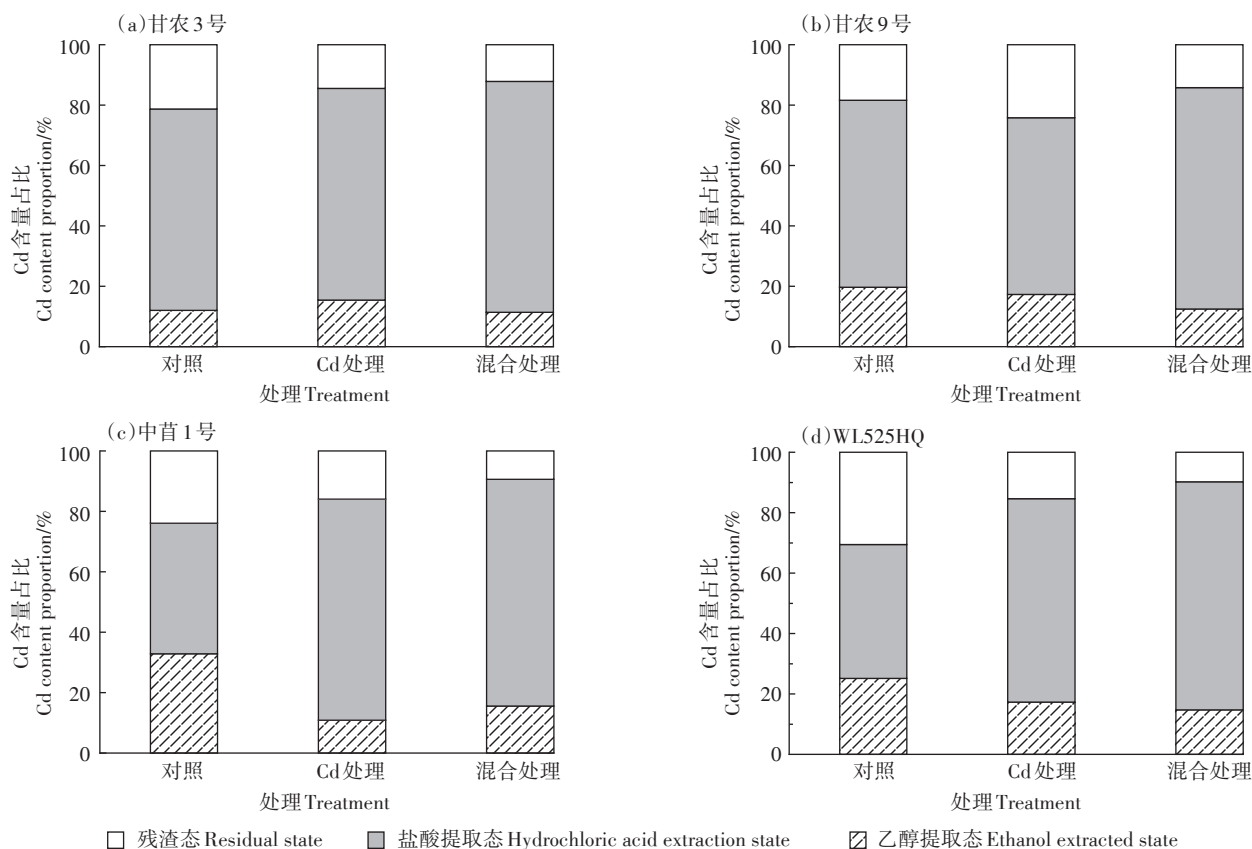


图4 外源GSH对Cd胁迫下紫花苜蓿叶片各提取态Cd含量分配比例的影响

Figure 4 Effect of exogenous GSH on the proportional distribution of Cd content in each extraction state of *Medicago sativa* leaves under Cd stress

盐酸提取态占比分别达到66.68%、62.00%、43.18%、44.22%。甘农3号、WL525HQ的残渣态占比高于乙醇提取态,甘农9号、中苜1号的乙醇提取态占比高于残渣态。

Cd胁迫下,各品种盐酸提取态占比仍最高,与对照相比,甘农3号、中苜1号、WL525HQ分别增加了3.43、29.99、23.13个百分点;乙醇提取态占比除甘农3号外,其他品种较对照均有所减少;残渣态仅甘农9号较对照增加5.78个百分点。

与Cd处理相比,施加GSH后4个品种盐酸提取态占比总体上升,甘农3号、甘农9号、中苜1号、WL525HQ分别增加了6.33、14.81、1.88、8.17个百分点,4个品种的乙醇提取态与残渣态较Cd处理相比均有所减少。

2.3.4 PCs含量

对PCs进行检测分析,结果如图5所示。总体来看,PCs含量表现为甘农3号>甘农9号>中苜1号≈WL525HQ。对照处理中各品种PCs含量在77~134 nmol·g⁻¹,Cd胁迫使PCs含量显著增加,甘农3号、甘

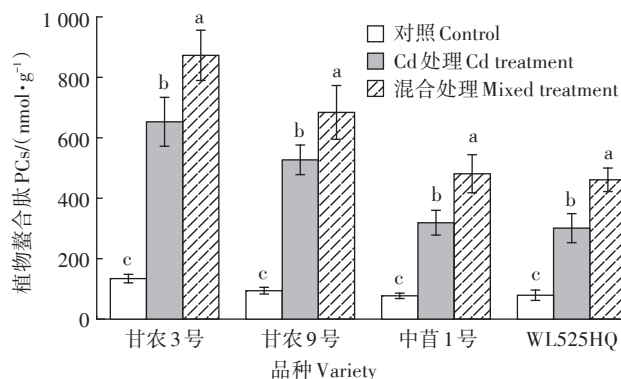


图5 外源GSH对Cd胁迫下紫花苜蓿叶片PCs含量的影响

Figure 5 Effect of exogenous GSH on PCs content in *Medicago sativa* leaves under Cd Stress

农9号、中苜1号、WL525HQ的PCs较对照分别增加387.31%、460.64%、314.29%、281.01% ($P < 0.05$)。喷施GSH处理PCs含量较Cd处理进一步增加,增幅分别为33.69%、29.79%、50.78%、53.15% ($P < 0.05$)。这说明外源GSH提升了紫花苜蓿叶片内PCs的合成水

平,能更有效地帮助植物抵抗Cd毒害。

3 讨论

植物株高、生物量对Cd胁迫有明显的响应,外源物质水杨酸(SA)、GSH可以缓解重金属对某些植物的损伤,提高植物的干物质累积量^[11-12]。本研究中,Cd胁迫下苜蓿的地上部和地下部生物量以及株高均有不同程度降低,且地下部生物量降幅大于地上部。本研究施加GSH后苜蓿生物量、株高均不同程度增加,与丁继军等^[13]的研究结果类似。生物量、株高的具体变化幅度则与苜蓿品种有关,研究发现甘农3号对Cd有较强的抗性^[14],在本试验中甘农3号对Cd胁迫敏感度较其他品种低,生物量、株高的变化幅度较小。相关性分析表明株高、生物量与总氮含量显著正相关(表3),与叶芳等^[14]的研究结果一致,说明植物氮含量对其生物量有直接的影响。而外源GSH也一定程度增加紫花苜蓿体内的可溶性蛋白和游离氨基酸含量,这种变化会增加细胞渗透浓度和功能蛋白数量,有助于维持细胞正常代谢,还可能合成一类能与Cd特异结合的蛋白质或多肽,从而减轻毒害^[15]。

Cd胁迫会抑制植物体内氮代谢关键酶活性,如硝酸还原酶、谷氨酸合成酶、谷氨酰胺合成酶等^[16],本试验也得到类似的结果。硝酸还原酶是硝态氮同化过程的限速酶^[17]。在本研究中,施加外源GSH能显著增强Cd胁迫下硝酸还原酶和亚硝酸还原酶活性。硝态氮经硝酸还原酶转化为铵态氮后,以谷氨酸合成酶/谷氨酰胺合成酶循环为主要途径,铵盐被转化为有机化合物^[18]。本试验中,GSH的施加使得Cd胁迫下谷氨酸合成酶、谷氨酰胺合成酶活性显著升高,同时作为植物合成有机物的重要途径之一,NADH-GDH通路中的谷氨酸脱氢酶活性显著增加^[19]。这说明外源GSH可能同时通过增强谷氨酸合成酶/谷氨酰胺合成酶循环、NADH-GDH模式促进植物将无机氮转化为有机氮。

Cd对植物的生长发育和细胞的新陈代谢具有重要影响^[20-22],本试验采取水培方式,苜蓿体内Cd含量远高于杨姝等^[23]的研究中土培试验的结果,SINGH等^[24]研究结果也验证了水培方式苜蓿体内Cd含量高于土培,这可能是由于水培条件下Cd均以离子态存在,极易被根部吸收。通过分析Cd的亚细胞分布可以发现,未施加GSH时Cd主要分布在叶片细胞的细胞壁中,施加GSH后,细胞壁Cd含量占比下降,而液泡中Cd含量占比增大;通过分析叶片Cd的化学形态

可以发现,未施加GSH时Cd主要以盐酸提取态存在,施加GSH后盐酸提取态的占比进一步增加。本试验紫花苜蓿叶片细胞Cd分布与化学形态分布虽与小麦^[25]的有所差异,但在施加外源GSH后,两者在变化趋势上相同,即外源GSH会增加液泡中Cd含量占比,提高盐酸提取态占比;同时外源GSH的施加使得紫花苜蓿PCs含量较Cd处理显著提高,而盐酸提取态Cd极易与PCs结合,以低分子量复合物存在于植物液泡中^[26]。这说明紫花苜蓿在Cd胁迫下,外源GSH作为PCs的合成底物,可以提高PCs的合成水平,并与进入细胞的Cd螯合且运输存放至液泡内,从而阻止游离态Cd进入细胞器,进而有效缓解Cd毒害。

4 结论

(1)Cd胁迫会抑制紫花苜蓿氮代谢,喷施外源GSH能显著提高硝酸还原酶等氮代谢关键酶的活性,维持植物的正常氮代谢过程,提高紫花苜蓿体内总氮和硝态氮含量。上述变化存在品种差异,甘农3号有较强耐Cd性,WL525HQ的耐Cd性则相对较弱。

(2)外源GSH影响紫花苜蓿对Cd的吸收累积特征,使Cd更多地以盐酸提取态的形式存在于植物液泡内,从而阻止Cd以游离态的形式进入细胞器,有效缓解Cd毒害,维持植物正常生长。

综上,Cd胁迫下外源GSH对紫花苜蓿氮代谢的正常进行具有一定促进作用,可能是通过减轻Cd毒害间接对氮代谢进行调控。GSH是否直接参与植物氮代谢过程还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 庄国泰. 我国土壤污染现状与防控策略[J]. 中国科学院院刊, 2015(4): 477-483. ZHUANG G T. Present situation and prevention and control strategy of soil pollution in China[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2015(4): 477-483.
- [2] YANG S, ZU Y Q, LI B, et al. Response and intraspecific differences in nitrogen metabolism of alfalfa (*Medicago sativa* L.) under cadmium stress[J]. *Chemosphere*, 2019, 220: 69-76.
- [3] 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 W M, XING W, LI D H, 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.
- [4] 杨姝, 祖艳群, 李博, 等. 不同品种紫花苜蓿氮代谢的Cd耐性评价及其鉴定指标筛选[J]. 农业环境科学学报, 2019(6): 1211-1217. YANG S, ZU Y Q, LI B, et al. Cadmium tolerance evaluation and evaluation index screening in nitrogen metabolism of different *Medicago sativa*

- cultivars[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019(6):1211-1217.
- [5] MARKUS W, MICHEL D. Synthesis of the sulfur amino acids: Cysteine and methionine[J]. *Photosynthesis Research*, 2005, 86(3):345-362.
- [6] PIERRE F, JUDITH H, CHRISTEL N, et al. Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2005, 18(3):254-259.
- [7] 陈因, 方大惟. 外源谷胱甘肽对氯化钠胁迫下蓝藻固氮活性的影响[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(5):328-331. CHEN Y, FANG D W. Effect of exogenous glutathione on nitrogen-fixing activity of blue-green algae under NaCl stress[J]. *Plant Physiology Journal*, 1996, 32(5):328-331.
- [8] 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, 2000. LI H S. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- [9] 秦丽, 李元, 祖艳群. Cd对超累积植物续断菊生长生理的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(S1):48-52. QIN L, LI Y, ZU Y Q. Effects of Cd on the physiological characteristics and growth of the *Sonchus asper* L. Hill[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(S1):48-52.
- [10] 吴慧梅, 李非里, 牟华倩, 等. 两步连续提取法测定植物中重金属的形态[J]. 环境科学与技术, 2012, 35(7):133-137. WU H M, LI F L, MOU H Q, et al. Analysis of heavy metal fractions in plants by two steps sequential extraction procedure[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 35(7):133-137.
- [11] 黄渊. 水杨酸对镉胁迫下黄豆种子萌发和幼苗抗氧化酶活性的调节及镉对土壤酶活性的影响[D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2014. HUANG Y. Regulation of salicylic acid on seed germination and antioxidant enzyme activity of soybean seedlings under cadmium stress and the effect of cadmium on soil enzyme activity[D]. Wuhu: Anhui Normal University, 2014.
- [12] 赵明香, 朱永立, 向蓉蓉, 等. 外源水杨酸对镉胁迫下烤烟生长及抗氧化特性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(2):34-41. ZHAO M X, ZHU Y L, XIANG R R, et al. Effect of exogenous salicylic acid on growth and antioxidant characteristics of flue-cured tobacco under cadmium and zinc stress[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2020, 48(2):34-41.
- [13] 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 J J, PAN Y Z, LI L, 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.
- [14] 叶芳, 刘晓静, 张进霞. 氮素形态对甘农3号苜蓿不同生育期氮代谢的影响[J]. 草地学报, 2015, 23(2):285-293. YE F, LIU X J, ZHANG J X. Effect of nitrogen forms on the nitrogen metabolism of *Medicago sativa* 'Gannong No.3' variety at different growth stages[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 23(2):285-293.
- [15] 张金彪, 周碧青, 黄维南. 镉胁迫对草莓氮代谢及果实品质的影响[J]. 热带作物学报, 2009, 30(11):1624-1629. ZHANG J B, ZHOU B Q, HUANG W N. Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism and fruit quality of strawberry[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2009, 30(11):1624-1629.
- [16] 陈亚慧, 刘晓宇, 王明新, 等. 蓖麻对镉的耐性、积累及与镉亚细胞分布的关系[J]. 环境科学学报, 2014, 34(9):2440-2446. CHEN Y H, LIU X Y, WANG M X, et al. Cadmium tolerance, accumulation and relationship with Cd subcellular distribution in *Ricinus communis* L[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2014, 34(9):2440-2446.
- [17] MICHELA S, ANDREA E, SERENELLA N. Effects of an *Medicago sativa* protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(24):800-808.
- [18] ARIF S W, TAHIR I, AHMAD S S, et al. Efficacy of 24-epibrassinolide in improving the nitrogen metabolism and antioxidant system in chickpea cultivars under cadmium and/or NaCl stress[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 225:48-55.
- [19] CHIRAZ C H, CARRAYOL E, GHORBEL M H. Physiological and biochemical effects of cadmium toxicity in enzymes involved in nitrogen and amino-acid metabolism in tomato plants[J]. *Acta Botanica Gallica*, 2009, 156(3):477-486.
- [20] LAESSON E H, BORMMAN J F, ASP H. Influence of UV-B radiation and Cd²⁺ on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1998, 49(323):1031-1039.
- [21] TERAMURA A H, SULLIVAN J H. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants[J]. *Photosynthesis Research*, 1994, 39(3):463-473.
- [22] 张琼, 陈晓燕, 陈梅, 等. 镉对绿豆幼苗生长影响的研究[J]. 漳州师范学院学报(自然科学版), 2006, 19(4):106-111. ZHANG Q, CHEN X Y, CHEN M, et al. Effects of cadmium on the growth of mung bean seedlings[J]. *Journal of Zhangzhou Teachers College (Natural Science Edition)*, 2006, 19(4):106-111.
- [23] 杨姝, 贾乐, 毕玉芬, 等. 7种紫花苜蓿对云南某铅锌矿区土壤镉铅的累积特征及品种差异[J]. 农业资源与环境学报, 2018, 35(3):222-228. YANG S, JIA L, BI Y F, et al. Interspecific differences and accumulative characteristics of cadmium and lead about seven alfalfa (*Medicago Sativa*) cultivars in a lead-zinc mine of Yunnan, China [J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2018, 35(3):222-228.
- [24] SINGH A, EAPEN S, FULEKAR M H. Potential of *Medicago sativa* for uptake of cadmium from contaminated environment[J]. *Romanian Biotechnological Letters*, 2009, 14(1):4164-4169.
- [25] 王晓莹. 还原型谷胱甘肽(GSH)缓解小麦幼苗镉胁迫机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021. WANG X Y. Mechanism of glutathione (GSH) alleviating cadmium stress in wheat seedlings[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2021.
- [26] 李丰涛, 祁建民, 牛韶华, 等. 闽中南红麻种植田土壤重金属含量及其富集特征[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2013, 42(2):127-133. LI F T, QI J M, NIU S H, et al. Heavy metal concentrations and bioaccumulation of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) growing in farmland of south-central part of Fujian Province[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2013, 42(2):127-133.