

刘建新, 胡浩斌, 王鑫. 2009. 外源一氧化氮供体对镉胁迫下黑麦草幼苗活性氧代谢、光合作用和叶黄素循环的影响 [J]. 环境科学学报, 29 (3): 626– 633

Liu JX, Hu H B, Wang X. 2009. Effects of an exogenous nitric oxide donor on active oxygen metabolism, photosynthesis and the xanthophyll cycle in Ryegrass (*Lolium perenne* L.) seedlings under cadmium stress [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(3): 626– 633

外源一氧化氮供体对镉胁迫下黑麦草幼苗活性氧代谢、光合作用和叶黄素循环的影响

刘建新^{1*}, 胡浩斌², 王鑫¹

1 陇东学院生命科学系, 庆阳 745000
2 陇东学院化学与化工学院, 庆阳 745000

收稿日期: 2008-05-27 修回日期: 2008-08-06 录用日期: 2009-01-14

摘要: 为了探讨外源 NO 对镉胁迫下牧草生理响应的调节作用, 采用溶液培养方法, 以多年生黑麦草为试验材料, 研究了外源 NO 供体硝普钠 (SNP) 对镉胁迫下黑麦草幼苗生长、活性氧代谢、光合作用和叶黄素循环的影响. 结果表明, 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 能明显缓解 100 mg L^{-1} Cd^{2+} 对黑麦草幼苗生长的抑制作用, 提高幼苗的生长速度. 与单纯镉胁迫相比, 外源 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 显著抑制镉胁迫下黑麦草幼苗根部和叶片超氧化物歧化酶 (SOD)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性的下降和过氧化物酶 (POD) 活性的升高, 促进过氧化氢酶 (CAT) 活性和谷胱甘肽 (GSH) 含量的提高, 降低抗坏血酸 (ASA)、 H_2O_2 和丙二醛 (MDA) 含量及超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 产生速率. 同时, 外源 SNP 处理不仅降低了镉胁迫下黑麦草叶片净光合速率 (P_n)、气孔导度 (G_s)、蒸腾速率 (T_r)、叶绿素最大荧光 (F_m)、PSII 原初光能转换效率 (F_v/F_m)、光合电子传递量子效率 (ΦPSII)、光化学荧光猝灭系数 (q_p)、光合电子传递速率 (ETR) 和光化学速率 (PCR) 的下降及初始荧光 (F_0) 的上升幅度, 还提高了非光化学荧光猝灭系数 (NPQ) 和叶绿素含量及叶黄素循环库 ($V+A+Z$) 的大小, 使叶黄素循环脱环氧化状态 ($A+Z$) / ($V+A+Z$) 升高. 由此表明, 外源 NO 可通过提高活性氧清除能力和增强依赖于叶黄素循环的非辐射能量耗散, 保护由镉胁迫引起的黑麦草幼苗叶片光合机构的破坏, 从而提高光合效率.

关键词: 一氧化氮; 镉胁迫; 叶绿素荧光; 叶黄素循环; 黑麦草

文章编号: 0253-2468 (2009) 03-626-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of an exogenous nitric oxide donor on active oxygen metabolism, photosynthesis and the xanthophyll cycle in Ryegrass (*Lolium perenne* L.) seedlings under cadmium stress

LIU Jianxin^{1,*}, HU Haobin², WANG Xin¹

1 Department of Life Science, Longdong University, Qingyang 745000
2 College of Chemistry & Chemical Engineering, Longdong University, Qingyang 745000

Received 27 May 2008 received in revised form 6 August 2008; accepted 14 January 2009

Abstract To understand the regulating effect of exogenous nitric oxide on the physiological response of herbage under cadmium stress, we have examined the effects of exogenous nitric oxide with the donor Sodium Nitroprusside (SNP) on the growth, metabolism of reactive oxygen species, photosynthesis and xanthophyll cycle in the perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Hydroponic experiments showed that addition of 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ exogenous SNP significantly alleviates the inhibitory effect of 100 mg L^{-1} Cd^{2+} stress on the growth of ryegrass seedlings in the following aspects: (1) inhibits the decrease of the activities of Superoxide Dismutase (SOD) and Ascorbate Peroxidase (APX); (2) inhibits the increase of peroxidase (POD) activity in roots and leaves of ryegrass seedlings; (3) promotes the increase of catalase (CAT) activity and glutathione (GSH) content; (4) decreases the contents of Ascorbic Acid (ASA), H_2O_2 , and malondialdehyde (MDA) and production rate of $\text{O}_2^{\cdot-}$. Exogenous SNP also inhibits the decreases of net photosynthetic rate (P_n), stomatal conductance (G_s), transpiration rate (T_r), maximum fluorescence (F_m), PSII intrinsic photochemical efficiency (F_v/F_m), quantum yield of PSII (ΦPSII), photochemical quenching (q_p), electron transport rate (ETR), and photochemical rate (PCR) and the

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 40171058)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 40171058)
作者简介: 刘建新 (1964—), 男, 副教授; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: liujx1964@163.com

Biography: LIU Jianxin (1964—), male, associate professor. * Corresponding author. E-mail: liujx1964@163.com
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

increase of minimal fluorescence (F_0); and also inhibits the increase of Non-Photochemical Quenching (NPQ), chlorophyll content, xanthophyll cycle pool size and the de-epoxidation extent of the xanthophyll cycle $(A + Z) / (V + A + Z)$. These results suggest that exogenous NO protects against damage of the leaf photosynthetic apparatus of ryegrass seedlings under Cadmium stress by promoting reactive oxygen scavenging and non-radiative energy dissipation through the xanthophyll cycle, thus elevating the photosynthetic efficiency.

Keywords nitric oxide; cadmium stress; chlorophyll fluorescence; xanthophyll cycle; ryegrass

1 引言 (Introduction)

随着采矿、冶炼和镉 (Cd) 处理工业的发展及农业中化肥的大量使用, 土壤 Cd 污染日益严重. 据调查, 日本有 $3.1 \times 10^5 \text{ hm}^2$ 的农田受到 Cd 污染, 我国遭受 Cd 污染的农田达 $1.2 \times 10^4 \text{ hm}^2$ (廖自基, 1992). 许多研究证实, 过量 Cd 不仅诱导植物产生过氧化损伤, 影响生长发育, 而且还使农作物产量和品质降低 (Shah *et al.*, 2001; Ranieri *et al.*, 2005). 此外, 农作物中蓄积的 Cd 还通过食物链危及人体健康. 因此, 研究植物 Cd 毒害的保护措施对农业的可持续发展具有重要意义.

一氧化氮 (Nitric Oxide, NO) 是植物体内最新发现的一种生物活性分子, 可通过酶促和非酶促反应途径产生; 其中酶促反应途径主要通过类似动物体内的一氧化氮合酶或硝酸还原酶催化合成 (Wendehenne *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 1999), 而非酶促途径包括酸性环境下的硝酸盐还原和光参与的类胡萝卜素转化等 (Wojtaszek, 2000). NO 对植物具有保护和毒害双重效应, 而且这种效应与细胞的生理环境以及 NO 有效生理浓度有关. 低浓度的 NO 可作为抗氧化剂, 对 O_2^- 等活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 具有清除作用, 并能诱导抗氧化酶基因的表达, 对植物具有保护效应 (Frank *et al.*, 2000); 高浓度 NO 则与 O_2^- 相互作用生成过氧亚硝酸阴离子 ($^-\text{OONO}$), 后者经质子化形成具有强氧化性的过氧亚硝酸 (HOONO), 会破坏生物大分子的结构与功能, 具有生物毒性 (Yamasaki *et al.*, 1999). 大量研究证明, NO 广泛参与植物对各种逆境胁迫的应答过程 (Dumer *et al.*, 1998; Garcia-Mata *et al.*, 2001; 阮海华等, 2004). 张艳艳等 (2004) 报道, NO 可以缓解盐胁迫下玉米幼苗的生长抑制; Zhao 等 (2004) 发现, NO 可通过提高盐胁迫下芦苇愈伤组织中质膜 H^+ -ATPase 的表达, 提高 K^+/Na^+ 比, 从而增强芦苇的抗盐性; NO 还能缓解盐胁迫对小麦幼苗的氧化损伤 (阮海华等, 2001); 延缓水稻在盐胁迫下叶绿素的降解和保持 PSII 的高活性 (Uchida *et al.*, 2002); 增强番茄幼苗光能的捕获和转换 (吴雪霞等, 2006), 提高 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗的光合作用 (樊怀福等, 2007). 近期的研究

表明, NO 还可减轻重金属胁迫对植物造成的伤害 (Hsu & Kao 2004; Kopyra & Gwozdz, 2003; Lasplina *et al.*, 2005). 黑麦草是栽培面积最大的优质牧草之一, 环境 Cd 污染严重制约其生长发育和农牧业的可持续发展. NO 对牧草 Cd 胁迫伤害是否具有缓解效应, 目前未见报道. 本研究以多年生黑麦草为材料, 研究外源 NO 供体 SNP 对 Cd 胁迫下幼苗生长及活性氧代谢、光合作用和叶黄素循环的影响, 以期对 Cd 污染环境的农业安全生产对策提供参考.

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 材料培养与处理

将供试多年生黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 品种 Caddishack 的种子 (购自草种公司) 在 28°C 下恒温催芽, 然后选露白一致的种子播种在装有珍珠岩的瓷盘中, 置于智能型光照培养箱内 28°C 下培养, 光周期为 14 h (光照) / 10 h (黑暗), 光照强度为 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. 待第 4 片叶全展时选长势一致的幼苗移入栽培槽 ($3 \text{ m} \times 0.4 \text{ m} \times 0.1 \text{ m}$) 在玻璃温室内进行水培, 营养液为 Hoagland 溶液, 每槽 100 L, 定植 2 行. 营养液每 2 d 更换 1 次, 用 H_2SO_4 调 pH 至 5.5~6.5 并用充氧机充气. 温室内保持昼温 $24 \sim 29^\circ\text{C}$ 、夜温 $15 \sim 21^\circ\text{C}$, 采用自然光照, 预培养 7 d 后开始进行各种处理. NO 供体 [$\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$, SNP, 德国 Merck 公司产品] 先用蒸馏水配成 100 mmol L^{-1} 的母液, 4°C 下保存, 用时按所需浓度稀释; Cd^{2+} 供体为硫酸镉 ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 国产分析纯).

实验首先设系列 Cd^{2+} ($0, 25, 50, 100, 150, 200 \text{ mg L}^{-1}$) 浓度梯度, 进行 Hoagland 营养液水培处理多年生黑麦草幼苗, 培养 10 d 后根据幼苗相对生长速率, 筛选出 100 mg L^{-1} 为 Cd^{2+} 胁迫浓度; 然后在选出的 100 mg L^{-1} Cd^{2+} 胁迫浓度中加入系列 SNP ($0, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 \mu\text{mol L}^{-1}$) 浓度梯度进行 Hoagland 营养液水培, 培养 10 d 后同样根据幼苗相对生长速率选出浓度为 $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的 SNP 用于进一步试验. 因 SNP 分解产物除 NO 外, 还会生成 NO_2^- , $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 最多降解生成 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的 NO_2^- (Delledonne *et al.*, 1998), 所以设 $1.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ 的 NO_2^- 处理作为对照. 根据筛

选的 Cd^{2+} 和 SNP 浓度, 外源 SNP 对 Cd 毒害缓解效应实验设置 4 个处理: ①对照 (CK), Hoagland 溶液; ②含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ 的 Hoagland 溶液, 以 Cd 表示; ③含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ 和 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 的 Hoagland 溶液, 以 Cd+SNP 表示; ④含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ 和 $1.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaNO}_2$ 的 Hoagland 溶液, 以 Cd+NaNO₂ 表示. 每处理 4 次重复, 处理 7 d 后取根系和倒数第 2 片全展叶进行各项指标测定.

2.2 测定方法

相对生长速率 (RGR) 的测定参照 Matsushita 和 M atoh (1991) 的方法. 在处理第 5 d 和第 10 d 分别取 30 株幼苗, 105°C 下杀青 15 min 后 70°C 下烘至恒重, 分别称重; W_1 表示第 5 d 幼苗干重 (mg), W_2 表示第 10 d 幼苗干重 (mg), 相对生长速率 ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) 按下式计算:

$$\text{RGR} = (W_2 - W_1) / (T_2 - T_1) \quad (1)$$

式中, T_2 和 T_1 分别表示 2 次测定的时间 (d).

采用 Mukherjee & Choudhuri (1983) 的方法测定 H_2O_2 含量; 用丙酮乙醇混合液提取, 比色法测定叶绿素含量; 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD) 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性及丙二醛 (MDA)、抗坏血酸 (ASA)、谷胱甘肽 (GSH) 含量和超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 产生速率均按陈建勋等 (2002) 的方法测定. 以抑制氮蓝四唑光还原 50% 的酶量为一个 SOD 酶活性单位 (U); CAT 活性以 1 min 减少 0.01 个 $\text{OD}_{240\text{nm}}$ 值所需的酶量为一个活性单位 (U); POD 活性以 1 min 增加 0.01 个 $\text{OD}_{470\text{nm}}$ 值所需的酶量为一个活性单位 (U); APX 活性以 1 min 内 $\text{OD}_{290\text{nm}}$ 减少 0.01 所需的酶量为一个活性单位 (U). 用英国 PP Systems 公司生产的

Ciras-2 型便携式光合测定系统在 10:00~12:00 测定叶片的净光合速率 (P_n)、气孔导度 (G_s)、胞间 CO_2 浓度 (C_i) 和蒸腾速率 (T_r). 测定时光强约 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, CO_2 浓度为 $390 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$, 温度为 25°C . 用 FM S2 便携调制式荧光仪 (英国 Hansatech 公司产) 在叶片暗适应 30 min 后测定初始荧光 (F_0)、最大荧光 (F_m). 然后, 测定光强为 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 下的恒态荧光 (F_s)、最大荧光 (F_m') 和最小荧光 (F_o'), 参照 Van Kooten & Snel (1990) 的方法计算 PSII 潜在光化学活性 $F_v/F_0 = (F_m - F_0) / F_0$, 原初光能转换效率 $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$, 光合电子传递量子效率 $\Phi\text{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$, 光合电子传递速率 $\text{ETR} = \Phi\text{PSII} \times \text{PFD} \times 0.5 \times 0.84$, 光化学速率 $\text{PCR} = (F_m' - F_o') / F_m' \times q_p \times \text{PFD}$ (式中 PFD 为光量子通量密度)、光化学荧光猝灭系数 $q_p = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$ 和非光化学荧光猝灭系数 $\text{NPQ} = F_m/F_m' - 1$. 用高效液相色谱仪按赵世杰等 (1995) 的方法测定叶黄素循环各组分紫黄质 (V)、单环氧玉米黄质 (A)、玉米黄质 (Z), 以 $(A + Z) / (A + Z + V)$ 表示脱环氧化状态. 各项指标中除 V、A、Z 以单位干重材料计算含量外, 其余以单位鲜重表示. 每项指标测定时至少重复 3 次, 取平均值.

2.3 数据分析

所有数据采用 SPSS11.5 软件进行方差分析, 并对平均数用 SSR 法多重比较.

3 结果 (Results)

3.1 不同浓度 Cd^{2+} 和 SNP 对黑麦草幼苗生长的影响

从图 1a 可见, $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ 处理 10 d 黑麦草

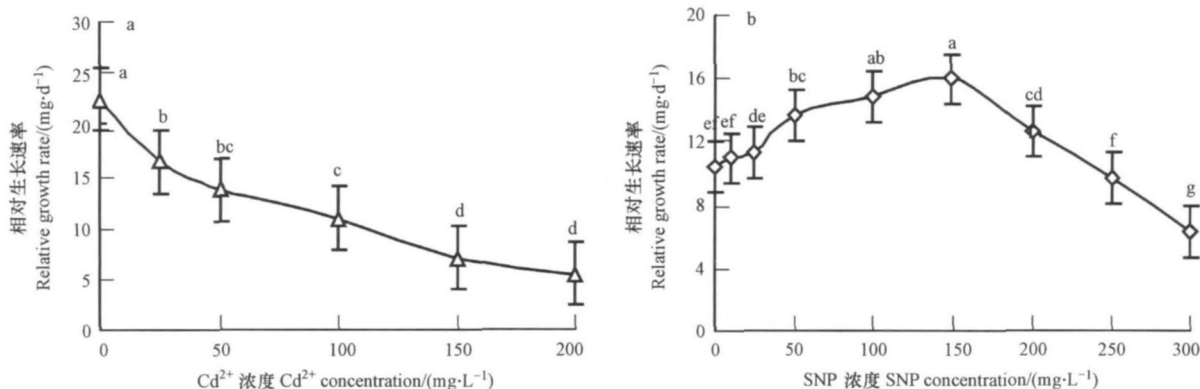


图 1 不同浓度 Cd^{2+} (a) 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ 胁迫下不同浓度 SNP (b) 对黑麦草幼苗相对生长速率的影响 (不同小写字母代表不同处理间在 0.05 水平差异显著, 下同)

Fig. 1 Effect of Cd^{2+} (a) and SNP under $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ stress (b) at various concentrations on the relative growth rate of ryegrass seedlings

© 1994-2012 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

幼苗的生长已显著受抑制, 100 mg·L⁻¹ Cd²⁺ 处理的抑制率达 51. 3%, 且表现出明显的 Cd 毒害症状. 随着 Cd²⁺ 处理浓度增加, 生长抑制率增大, Cd 毒害症状更加明显. 一般认为, 生长抑制率为 50% 左右的重金属浓度已对植物造成伤害, 但此时植物又能表现出重金属抗性. 因此, 选用 100 mg·L⁻¹ Cd²⁺ 为 Cd 胁迫处理浓度.

如图 1b 所示, 在 100 mg·L⁻¹ Cd²⁺ 胁迫下, 10~200 μmol L⁻¹ SNP 不同程度上缓解了 Cd²⁺ 对黑麦草幼苗的生长抑制, 其中 SNP 浓度为 150 μmol L⁻¹ 时相对生长速率最大, 而 250 和 300 μmol L⁻¹ 时则低于对照. 因此, 选用 150 μmol L⁻¹ SNP 探讨 NO 对

黑麦草 Cd 毒害的缓解效应.

3 2 外源 SNP 对 Cd 胁迫下黑麦草幼苗 H₂O₂ 和 MDA 含量及 O₂^{·-} 产生速率的影响

图 2 显示, 与对照相比, Cd 胁迫下黑麦草幼苗根和叶片中 H₂O₂ 和 MDA 含量及 O₂^{·-} 产生速率显著提高 ($p < 0.05$), 说明 Cd 胁迫诱导活性氧产生积累, 使细胞结构受到损伤; 添加 SNP 处理显著降低了 Cd 胁迫下根和叶片中 H₂O₂ 和 O₂^{·-} 的积累, 使 MDA 含量下降, 而 NaNO₂ 处理则无此效应, 表明外源 NO 能够缓解 Cd 胁迫对膜的过氧化损伤.

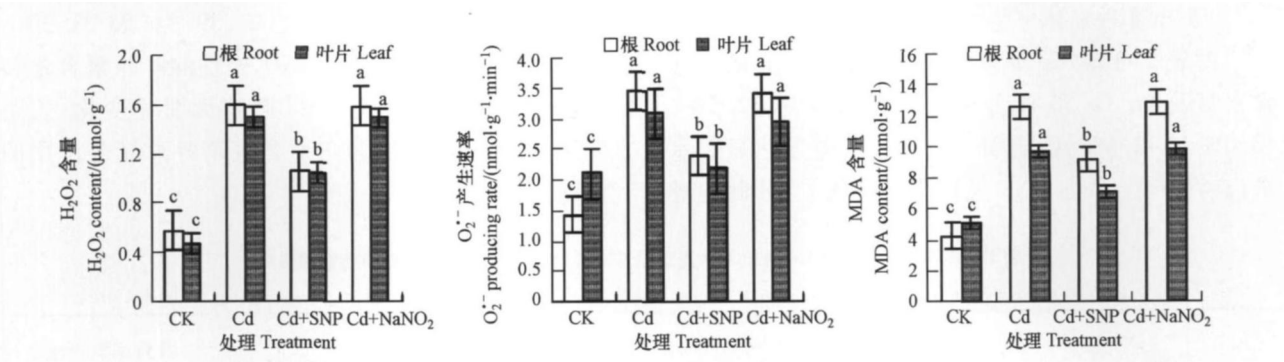


图 2 外源 NO 供体 SNP 对 Cd 胁迫下黑麦草幼苗根和叶片中 H₂O₂ 和 MDA 含量及 O₂^{·-} 产生速率的影响

Fig. 2 Effects of exogenous NO donor SNP on the contents of H₂O₂ and MDA, production rate of O₂^{·-} in roots and leaves of ryegrass seedlings under Cd stress

3 3 外源 SNP 对 Cd 胁迫下黑麦草幼苗活性氧清除系统的影响

SOD, CAT, POD 和 APX 等抗氧化酶和 GSH、ASA 等抗氧化物质构成了植物体主要的活性氧清除系统. 从表 1 和图 3 可见, 与对照相比, Cd 处理明显降低黑麦草幼苗根和叶片中 SOD 和 APX 的活性及 ASA 含量. 并且, 根和叶片中的变化趋势相同, 除

根中 CAT 活性与对照无明显变化外, POD 活性和 GSH 含量及叶片 CAT 活性显著高于对照 ($p < 0.05$); 施加 SNP 缓解了 Cd 胁迫对 SOD 和 APX 活性的抑制 ($p < 0.05$), 使 CAT 活性和 GSH 含量进一步提高, POD 活性和 ASA 含量降低; NaNO₂ 处理的 SOD, CAT, POD 和 APX 活性及 GSH 和 ASA 含量均与 Cd 处理无显著差异.

表 1 外源 NO 供体 SNP 对 Cd 胁迫下黑麦草幼苗 SOD, CAT, POD, APX 活性的影响

Table 1 Effects of exogenous NO donor SNP on activities of SOD, CAT, POD and APX in ryegrass seedlings under Cd stress (U·g⁻¹)

处理 Treatment	SOD 活性 SOD activity		CAT 活性 CAT activity		POD 活性 POD activity		APX 活性 APX activity	
	根 Root	叶片 Leaf	根 Root	叶片 Leaf	根 Root	叶片 Leaf	根 Root	叶片 Leaf
CK	38.86 ^b	28.06 ^b	12.81 ^b	26.18 ^c	1.71 ^c	1.27 ^c	3.51 ^a	10.75 ^a
Cd	24.57 ^c	16.18 ^c	14.23 ^b	33.28 ^b	4.83 ^a	3.38 ^a	2.52 ^c	4.72 ^c
Cd+SNP	40.16 ^a	35.43 ^a	23.74 ^a	40.03 ^a	2.76 ^b	2.21 ^b	3.06 ^b	5.96 ^b
Cd+NaNO ₂	27.08 ^c	15.96 ^c	17.18 ^b	31.26 ^c	4.27 ^a	2.98 ^a	2.48 ^c	4.08 ^c

注: 同列不同字母表示差异显著, $p < 0.05$; 下同 Different letters within the same column indicate significant difference at $p = 5\%$. The same below.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

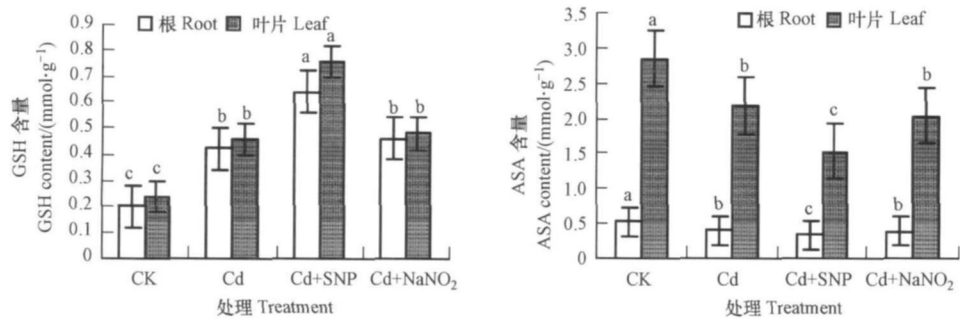


图 3 外源 NO 供体 SNP 对 Cd 胁迫下黑麦草幼苗 GSH、ASA 含量的影响
Fig 3 Effects of exogenous NO donor SNP on contents of GSH and ASA in ryegrass seedlings under Cd stress

3.4 外源 SNP 对 Cd 胁迫下黑麦草幼苗叶片叶绿素含量和气体交换参数的影响

由表 2 可知, Cd 处理使黑麦草幼苗叶片的叶绿素含量及 P_n 、 G_s 和 T_r 分别下降了 25.3%、32.5%、43.0% 和 42.4%, C_i 升高了 27.1%, 差异达显著水平 ($p < 0.05$). 添加 SNP 处理明显降低了 Cd 胁迫导

致的叶绿素含量及 P_n 、 G_s 和 T_r 的下降幅度, 分别比 Cd 处理提高了 23.3%、19.1%、39.3% 和 28.9%, C_i 则下降了 12.3%. 而 $NaNO_2$ 处理的叶绿素含量和上述各气体交换参数与 Cd 胁迫无明显变化. 表明外源 NO 可减轻 Cd 胁迫对黑麦草叶片光合作用的抑制.

表 2 外源 NO 供体对 Cd 胁迫下黑麦草幼苗叶片叶绿素含量和气体交换参数的影响
Table 2 Effects of exogenous NO donor on chlorophyll content and P_n , G_s , C_i and T_r in leaves of ryegrass seedlings under Cd stress

处理 Treatment	叶绿素含量 Chlorophyll content ($mg\ g^{-1}$)	净光合速率 (P_n) Net photosynthetic rate ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	气孔导度 (G_s) Stomatal conductance ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	胞间 CO_2 浓度 (C_i) Inter-cellular CO_2 concentration ($\mu L\ L^{-1}$)	蒸腾速率 (T_r) Transpiration rate ($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$)
CK	1.696 ^a	42.53 ^a	38.19 ^a	276.33 ^c	7.26 ^a
Cd	1.267 ^c	28.69 ^c	21.76 ^c	351.28 ^a	4.18 ^c
Cd+SNP	1.562 ^b	34.18 ^b	30.32 ^b	308.19 ^b	5.39 ^b
Cd+NaNO ₂	1.341 ^c	29.33 ^c	23.27 ^c	346.07 ^a	4.24 ^c

3.5 外源 SNP 对 Cd 胁迫下黑麦草幼苗叶片叶绿素荧光参数的影响

叶绿素荧光是光合作用变化的探针, 通过对各种荧光参数的分析可以获知有关光能利用途径的信息, 其中, F_0 和 F_m 分别表示 PSII 反应中心完全开放和完全关闭时的荧光产量, F_v/F_0 代表 PSII 潜在光化学活性, F_v/F_m 代表原初光能转化效率, $\Phi PSII$ 表示 PSII 光合电子传递的量子效率. 从表 3 可见, Cd 胁迫下 F_0 升高, F_m 、 F_v/F_0 、 F_v/F_m 和 $\Phi PSII$ 降低;

添加 SNP 处理显著抑制 Cd 胁迫下 F_0 的升高及 F_m 、 F_v/F_0 、 F_v/F_m 和 $\Phi PSII$ 的下降 ($p < 0.05$). 另外, 与对照相比, Cd 处理的 ETR、PCR 和 q_p 明显降低, NPQ 升高; 添加 SNP 后使 ETR、PCR、 q_p 和 NPQ 显著提高 ($p < 0.05$); 而 $NaNO_2$ 处理的上述各荧光参数与单纯 Cd 处理相比则无明显变化. 这说明, 外源 NO 对 Cd 胁迫导致的光合机构损伤具有保护效应, 可以促进 Cd 胁迫下光合电子的传递.

表 3 外源 NO 供体对 Cd 胁迫下黑麦草幼苗叶片叶绿素荧光参数的影响
Table 3 Effects of exogenous NO donor SNP on chlorophyll fluorescence parameters in leaves of ryegrass seedlings under Cd stress

处理 Treatment	叶绿素荧光参数 Parameters of chlorophyll fluorescence								
	F_0	F_m	F_v/F_0	F_v/F_m	$\Phi PSII$	ETR	PCR	q_p	NPQ
CK	140.26 ^c	1197.58 ^a	7.538 ^a	0.883 ^a	0.155 ^a	39.060 ^a	93.33 ^a	0.594 ^a	0.345 ^c
Cd	181.82 ^a	1107.69 ^c	5.092 ^c	0.836 ^c	0.126 ^c	31.752 ^c	70.53 ^c	0.462 ^b	0.371 ^b
Cd+SNP	163.94 ^b	1156.02 ^b	6.051 ^b	0.858 ^b	0.138 ^b	34.776 ^b	83.13 ^b	0.547 ^a	0.403 ^a
Cd+NaNO ₂	190.52 ^a	1112.56 ^c	4.840 ^c	0.829 ^c	0.124 ^c	31.248 ^c	74.60 ^c	0.492 ^b	0.369 ^b

3.6 外源 SNP 对 Cd 胁迫下黑麦草幼苗叶片叶黄素循环的影响

叶黄素循环的色素组成 $(A+Z)/(V+A+Z)$ 及叶黄素循环库 $(V+A+Z)$ 的大小与热耗散能力直接相关。由图 4 可知, 与对照相比, Cd 胁迫导致叶黄素循环库 $(V+A+Z)$ 降低和脱环氧化状态 $(A+Z)/(V+A+Z)$ 升高; 添加 SNP 后使 Cd 胁迫下的 $V+A+Z$ 增加, 达到与对照相当的水平, $(A+Z)/(V+A+Z)$ 进一步提高; 而 NaNO_2 处理的 $V+A+Z$ 和 $(A+Z)/(V+A+Z)$ 与单纯 Cd 处理相比无显著差异。

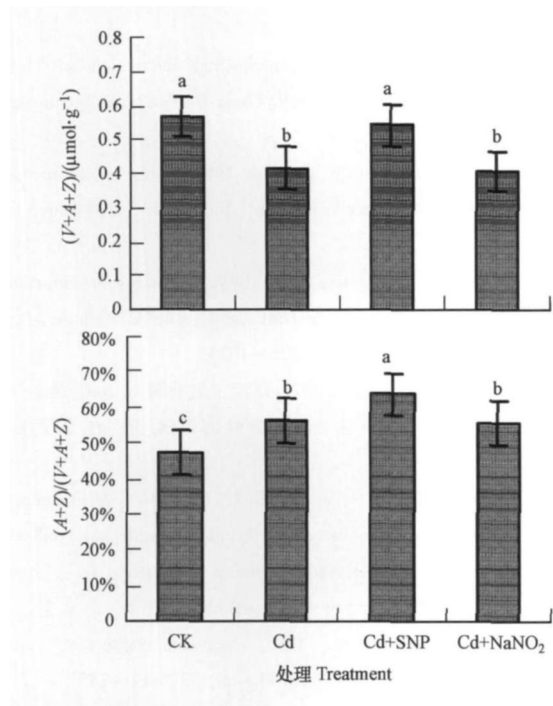


图 4 外源 NO 供体 SNP 对 Cd 胁迫下黑麦草叶片叶黄素循环的影响

Fig. 4 Effects of exogenous SNP on the xanthophyll cycle in ryegrass leaves under Cd stress

4 讨论 (Discussion)

SNP 是常用的 NO 供体, Delledonne 等 (1998) 报道, 0.5 mmol L^{-1} SNP 约产生 $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ NO。Cd 胁迫下黑麦草幼苗的生长速率明显降低, 低浓度 SNP ($10 \sim 200 \mu\text{mol L}^{-1}$) 能够缓解 100 mg L^{-1} Cd^{2+} 胁迫对黑麦草幼苗生长的抑制, 相反高浓度 (大于 $200 \mu\text{mol L}^{-1}$) SNP 会加重 Cd 胁迫的毒害作用 (图 1), 说明适宜浓度的外源 SNP 可以缓解 Cd 胁迫对黑麦草生长的抑制效应。

Cd 胁迫能诱导 NADPH 氧化酶活性提高 (Shah *et al.*, 2001), 使抗氧化系统功能失调, 导致 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和

H_2O_2 积累 (Sch tzenkel & Polk, 2002; Shah *et al.*, 2001), 从而破坏膜的结构和功能。有研究表明, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ SNP 预处理提高了 Cd Pb 胁迫下羽扇豆根尖 CAT、SOD 的活性, 降低了 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量 (Kopyra & Gwozdz, 2003)。Laspina 等 (2005) 发现, Cd 胁迫可使向日葵叶片 CAT 活性下降而 SOD 活性上升, H_2O_2 产生积累; NO 处理后降低了 SOD 活性, 使 CAT、APX 和 GR 活性提高, H_2O_2 积累降低。本试验结果表明, 100 mg L^{-1} Cd^{2+} 处理 7 d 会使黑麦草幼苗根和叶片中的 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 MDA 含量明显提高, SOD 和 APX 活性受到抑制, ASA 含量下降, 而 CAT 和 POD 活性及 GSH 含量上升; 外源 SNP 显著缓解了 Cd 胁迫下 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 MDA 的积累, 减缓 SOD 和 APX 活性的下降, 使 CAT 活性和 GSH 含量提高, POD 活性和 ASA 含量降低。关于 NO 缓解重金属胁迫伤害的机理目前还不十分清楚, 但从已有的研究推测, NO 参与调节活性氧代谢是可能的重要原因之一。一方面, NO 作为信号分子通过级联反应提高了 CAT、APX 等抗氧化酶活性, 有效清除活性氧, 从而减轻了对细胞的伤害 (Laspina *et al.*, 2005; Poliandri *et al.*, 2004); 另一方面, NO 作为抗氧化剂可直接与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 反应清除活性氧 (Beligni & Lamattina, 1999)。从本研究结果看, Cd 胁迫下 SOD 和 APX 活性及 ASA 含量的下降, 可能使 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 产生积累, 此时虽然 CAT 活性和 GSH 含量升高, 但可能因 CAT 与 H_2O_2 的亲和力较低, 不足以有效清除增加的 H_2O_2 ; GSH 含量的增加也不足以直接清除产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Freeman *et al.*, 2004), 从而引发膜脂过氧化, 使 MDA 显著增加。外源 SNP 通过提高 SOD、CAT 和 APX 活性及 GSH 含量来抑制 Cd 胁迫下活性氧的积累, 从而保护了膜结构; 而 ASA 含量的下降可能是 APX 活性提高所致。关于 POD 的生物学功能, 目前认为其具有清除和产生 H_2O_2 的双重效应。Kopyra 等 (2003) 的研究发现, NO 抑制 Cd 胁迫下羽扇豆根系 POD 的活性及同工酶表达。Hsu 等 (2004) 也证实, SNP 可降低由 Cd 胁迫引起的 POD 活性的升高。Wang 等 (2005) 指出, Al 处理条件下 SNP 可降低决明子根的 POD 活性, 减轻 Al 对根生长的抑制; 并认为 POD 活性升高是 Al 抑制根生长的原因, 因为 POD 可参与木质素等次生代谢的合成而使细胞伸展性下降。本研究中外源 SNP 显著降低 Cd 胁迫下 POD 活性的升高, 可能也是 NO 减轻 Cd 胁迫抑制黑麦草生长的重要原因。

Cd胁迫引起植物叶片 P_n 降低的原因有气孔和非气孔因素,当 C_i 和 G_s 同时下降时,气孔因素是主要的;若 C_i 升高而 G_s 下降则非气孔因素是主要的(Farquhar & Sharkey 1982). 本试验结果表明, Cd胁迫会抑制黑麦草叶片的光合作用,由于 C_i 升高,而 G_s 下降,因而光合作用的下降主要是非气孔因素,即叶肉细胞的光合活性降低所致. 外源 SNP处理提高了 Cd胁迫下叶片的 P_n 、 G_s 和 T_r 而 C_i 显著降低. 说明 NO 对 Cd诱导的光合活性下降具有缓解作用,能够提高 Cd胁迫下叶肉细胞的光合能力. 这与樊怀福等(2007)的外源 NO 对 NaCl胁迫下黄瓜幼苗光合特性影响的试验结果一致.

叶绿素荧光动力学变化常用于检测植物光合机构对环境胁迫的响应(罗俊等, 2004). Cd胁迫使黑麦草的 F_v/F_0 、 F_v/F_m 下降,而 F_0 增加,这揭示叶绿素的 PSII 反应中心受到损伤,活性下降(Schneitger *et al.*, 1994). $\Phi PSII$ 、 q_p 、ETR 和 PCR 的降低亦证实了光合电子传递受阻及光能转变为化学能的效率降低;而 NPQ 升高表明,非辐射能量耗散增加以保护光合机构免受过剩光能的伤害,这与叶黄素循环中脱环氧化状态 $(A+Z)/(V+A+Z)$ 的增加相对应,进一步证明 NPQ 的提高与 Z 的增加密切相关(Ma & Cheng 2003). Cd胁迫还引起了叶片叶绿素含量和叶黄素循环库的下降,其原因可能与活性氧积累发生氧化破坏有关. 外源 SNP处理后降低了 Cd胁迫下 F_0 的增加,使 F_v/F_0 、 F_v/F_m 、 $\Phi PSII$ 、 q_p 、ETR 和 PCR 显著提高,说明 NO 可以提高 Cd胁迫下叶肉细胞的光合活性,对 Cd胁迫导致的光合机构损伤具有保护效应. 同时,外源 SNP处理抑制了 Cd胁迫下叶绿素含量和叶黄素循环库的下降,使 NPQ 和叶黄素循环中脱环氧化状态 $(A+Z)/(V+A+Z)$ 增加,表明 NO 提高了 Cd胁迫下叶片对光能捕获和热耗散的能力,这可能是 NO 缓解 Cd胁迫下过剩光能氧化破坏和保持较高光化学效率的重要原因之一. NO 究竟是如何作为信号分子参与 Cd胁迫下光合机构的保护作用,其分子调控机制有待进一步研究.

5 结论 (Conclusions)

外源 NO 供体 SNP 能够缓解 Cd胁迫对黑麦草幼苗生长的抑制作用,其可能的机理是: ① 通过提高镉胁迫下植株体内的 SOD、APX 和 CAT 活性及 GSH 含量,增强活性氧的清除能力; ② 促进 Cd胁迫

下叶片光合电子的吸收、传递和光化学效率,提高光合速率; ③ 增强依赖于叶黄素循环的非辐射能量耗散,保护 Cd胁迫对叶片光合机构的破坏.

责任作者简介: 刘建新 (1964—), 男, 副教授, 主要从事植物逆境生理生态学方面的研究工作.

参考文献 (References):

- Beligni M V, Lamattina L. 1999. Is nitric oxide toxic or protective? [J]. Trends Plant Sci. 4(8): 299—300
- 陈建勋, 王晓峰. 2002. 植物生理学实验指导 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 119—127
- Chen J X, Wang X F. 2002. Experimental Instruction in Plant Physiology [M]. Guangzhou: South China University of Technology Press. 119—127 (in Chinese)
- Delledonne M, Xia Y J, Dixon R A, *et al.* 1998. Nitric oxide function as a signal in plant disease resistance [J]. Nature. 394(6693): 585—588
- Dumer J, Wendehenne D, Klessig D F. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 10328—10333
- 樊怀福, 郭世荣, 焦彦生, 等. 2007. 外源一氧化氮对 NaCl胁迫下黄瓜幼苗生长、活性氧代谢和光合特性的影响 [J]. 生态学报, 27(2): 546—553
- Fan H F, Guo S R, Jiao Y S, *et al.* 2007. The effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen metabolism and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress [J]. Acta Ecologica Sinica. 27(2): 546—553 (in Chinese)
- Farquhar G D, Sharkey T D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis [J]. Ann Rev Plant Physiol. 33: 317—345
- Frank S, Kämpfer H, Podda M, *et al.* 2000. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation [J]. Biochemical Journal. 346: 719—728
- Freeman J L, Persans M V, Nisman K, *et al.* 2004. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in Thlaspi nickel hyperaccumulators [J]. Plant Cell. 16: 2176—2191
- García-Mata C G, Lamattina L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress [J]. Plant Physiology. 126: 1196—1204
- Hsu Y T, Kao K H. 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves [J]. Plant Growth Regulation. 42: 227—238
- Kopyna M, Gwozdz E A. 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus* [J]. Plant Physiol Biochem. 41: 1011—1017
- 廖自基. 1992. 微量元素的环境化学及生物效应 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 299—302
- Liao Z J. 1992. The environmental chemistry of trace elements and its biological effect [M]. Beijing: China Environmental Science Press.

- 299—302(in Chinese)
- Laspina N V, Groppa M D, Tomaro M L, *et al*. 2005 Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress [J]. *Plant Science* 169(2): 323—330
- 罗俊, 张木清, 林彦铨, 等. 2004 甘蔗苗期叶绿素荧光参数与抗旱性关系研究 [J]. *中国农业科学*, 37(11): 1718—1721
- Luo J, Zhang M Q, Lin Y Q, *et al*. 2004 Studies on the relationship of chlorophyll fluorescence characters and drought tolerance in seedling of sugarcane underwater stress [J]. *Sci Agr Sin* 37(11): 1718—1721 (in Chinese)
- Ma F W, Cheng L L. 2003 The sun-exposed peel of apple fruit has higher xanthophyll cycle-dependent thermal dissipation and antioxidants of the ascorbate-gluthathione pathway than the shaded peel [J]. *Plant Science* 165 819—827
- Matsushita N, Matoh T. 1991. Characterization of Na⁺ exclusion mechanism of salt-tolerant reed plants in comparison with salt-sensitive rice plants [J]. *Physiol Plant* 83: 170—176
- Mukherjee S P, Choudhuri M A. 1983 Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in Vigna seedlings [J]. *Physiol Plant* 58 166—174
- Polandria A H, Velardez M O, Cabilla J P, *et al*. 2004. Nitric oxide protects anterior pituitary cells from cadmium-induced apoptosis [J]. *Free Radical Biol Med* 37(9): 1463—1471
- Ranieri A, Castagna A, Scebba F, *et al*. 2005 Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess [J]. *Plant Physiol Biochem*, 43: 45—54
- 阮海华, 沈文飏, 徐朗莱. 2004. 一氧化氮调节盐胁迫下小麦幼苗根部质膜 H⁺-ATPase 和焦磷酸酶活性提高耐盐性 [J]. *植物学报*, 46(4): 415—422
- Ruan H H, Shen W B, Xu L L. 2004 Nitric oxide modulates the activities of plasma membrane ATPase and PPase in wheat seedling roots and promotes the salt tolerance against salt stress [J]. *Acta Bot Sin* 46(4): 415—422 (in Chinese)
- 阮海华, 沈文飏, 叶茂炳, 等. 2001 一氧化氮对盐胁迫下小麦叶片氧化损伤的保护效应 [J]. *科学通报*, 46(23): 1993—1997
- Ruan H H, Shen W B, Ye M B, *et al*. 2001 Protection of nitric oxide on salt induced membrane oxidation in wheat leaves [J]. *Chin Sci Bull* 46(23): 1993—1997(in Chinese)
- Schneetger B, Crichtley C, Santore U J, *et al*. 1994. Relationship between photoinhibition of photosynthesis D1 protein turnover and chloroplast structure: effects of protein synthesis inhibitors [J]. *Plant Cell Environment* 17(1): 55—64
- Schwendel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization [J]. *J Exp Bot* 53(372): 1351—1365
- Shah K, Kumar R G, Verma S, *et al*. 2001 Effect of Cadmium on lipid peroxidation superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings [J]. *Plant Sci* 161 (6): 1135—1144
- Uchida A, Jagendorf A T, Hibino T, *et al*. 2002 Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice [J]. *Plant Sci* 163 515—523
- Van Kooten O, Snel J F H. 1990 The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology [J]. *Photosynthesis Research*, 25 147—150
- Wang Y S, Yang Z M. 2005. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. [J]. *Plant Cell Physiol* 46(12): 1—9
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig D F. 2001 Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells [J]. *Trends Plant Sci* 6(4): 177—183
- Woźniak O. 2000 Nitric oxide in plants: to NO or not to NO [J]. *Phytochemistry* 54(1): 1—4
- 吴雪霞, 朱月林, 朱为民, 等. 2006 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下番茄幼苗生长和光合作用的影响 [J]. *西北植物学报*, 26(6): 1206—1211
- Wu X X, Zhu Y L, Zhu W M, *et al*. 2006 Effects of exogenous nitric oxide on seedling growth of tomato under NaCl stress [J]. *Acta Bot Boreo-Occident Sin* 26(6): 1206—1211(in Chinese)
- Yanase H, Shanih S, Takahashi S. 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new feature of an old enzyme [J]. *Trends Plant Sci* 4(4): 128—129
- 张艳艳, 刘俊, 刘友良. 2004. 一氧化氮缓解盐胁迫对玉米生长的抑制作用 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 30(4): 455—459
- Zhang Y Y, Liu J, Liu Y L. 2004 Nitric oxide alleviates growth inhibition of maize seedlings under NaCl stress [J]. *J Plant Physiol Mol Biol* 30(4): 455—459 (in Chinese)
- Zhao L Q, Zhang F, Guo J K, *et al*. 2004 Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed [J]. *Plant Physiology* 134(2): 849—857
- 赵世杰, 孟庆伟, 许长城, 等. 1995 植物组织中叶黄素循环组分的高效液相色谱分析法 [J]. *植物生理学通讯*, 31(6): 438—442
- Zhao S J, Meng Q W, Xu C C, *et al*. 1995. Analysis of the xanthophyll cycle components in plant tissue by high performance liquid chromatography [J]. *Plant Physiol Commun* 31(6): 438—442 (in Chinese)