

外源 H₂O₂ 对镉胁迫下酸枣幼苗生长及生理特性的缓解效应

麻云霞¹, 李钢铁, 梁田雨¹, 马媛², 闫晶秋子¹, 杨超¹

(1.内蒙古农业大学沙漠治理学院,呼和浩特 010018;2.中国林业科学研究院沙漠林业实验中心,内蒙古 磴口 015200)

摘要: 通过温室盆栽土培试验,研究不同浓度(0,0.02,0.04,0.06,0.08,0.1,0.3 mmol/L)的外源 H₂O₂ 处理对 0.05 mmol/L Cd 胁迫下酸枣幼苗生长、光合系统和荧光特性等的影响。结果表明:(1)Cd 胁迫下,酸枣幼苗生长受到抑制,经 H₂O₂ 处理后,酸枣幼苗对镉抗性系数、光合色素含量、净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)和气孔导度(G_s)均升高,过氧化氢(H₂O₂)、丙二醛(MDA)含量和胞间 CO₂ 浓度(C_i)则出现不同程度的下降;(2)低浓度 H₂O₂ (≤ 0.08 mmol/L)处理后,酸枣叶片和根系内抗氧化酶[过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)]活性增强,叶片内 1,5—二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)、1,1—二磷酸景天庚酮糖酯酶(SBPase)和 1,6—二磷酸果糖醛缩酶(FBAase)活性最高显著上升 38.24%, 42.15%, 84.08%, 但转酮醇酶(TKase)活性无显著变化;(3)酸枣叶片内 PSⅡ最大光化学效率(F_v/F_m)、实际光化学效率(Φ PSⅡ)、光化学猝灭系数(qP)和吸收光能用于光化学反应的份额(P)在 H₂O₂ 处理下最大分别提高37.52%, 135.95%, 53.10%和 98.36%, PSⅡ非光化学猝灭系数(NPQ)、调节性能量耗散 Y(NPQ)、非调节性能量耗散 Y(NO)、吸收光能用于天线热耗散的份额(D)、PSⅡ反应中心非光化学耗散的份额(E_x)和双光系统间激发能分配不平衡偏离系数($\beta/\alpha-1$)分别降低 34.13%, 35.15%, 30.26%, 35.52, 32.30%和53.43%,缓解效果显著,但随着外源 H₂O₂ 喷施浓度的增加,缓解效应有下降趋势。综合分析发现,H₂O₂ 对酸枣镉毒的缓解作用与其改善酸枣光合作用、维持抗氧化系统高活性和提高 PSⅡ光化学效率等多种生理过程有关。其中以 0.08 mmol/L H₂O₂ 提高酸枣的修复效率最佳,可作为植物修复的强化措施。

关键词: 酸枣; 外源 H₂O₂; 镉胁迫; 生理特性; 缓解效应

中图分类号: S665.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-2242(2019)06-0361-09

DOI:10.13870/j.cnki.stbcxb.2019.06.051

Alleviative Effects of Exogenous H₂O₂ on Growth and Physiological Characteristics of *Zizyphus jujuba* Seedlings Under Cadmium Stress

MA Yunxia¹, LI Gangtie¹, LIANG Tianyu¹, MA Yuan², YAN Jingqiuzi¹, YANG Chao¹

(1.College of Desert science and Engineerin, Inner Mongolia Agricultural University, Inner Mongolia

Hohhot 010018; 2.Desert Forestry Experiment Center, Chinese Academy of Forestry, Dengkou, Inner Mongolia 015200)

Abstract: Through a pot soil-culture experiment in greenhouse, the effects of exogenous H₂O₂ treatment with different concentrations (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.3 mmol/L) on the growth, photosynthetic system, and fluorescence characteristics of *Z. jujube* seedlings under the stress of 0.05 mmol/L Cd were studied. The results showed that: (1) Under Cd stress, the growth of *Z. jujube* seedlings was inhibited. After H₂O₂ treatment, the Cd resistance coefficient, photosynthetic chlorophyll content, net photosynthetic rate (P_n), transpiration rate (T_r), and stomatal conductance (G_s) of *Z. jujube* seedlings increased, while H₂O₂, malondialdehyde (MDA) content, and intercellular CO₂ concentration (C_i) decreased with different degrees. (2) The activities of antioxidases (Peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT)) in the leaves and roots of *Z. jujube* enhanced after treatment with low concentration of H₂O₂ (≤ 0.08 mmol/L), and the activities of ribulose—1,5—bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), sedoheptulose—1,1—bisphosphatase (SBPase), and fructose 1,6—diphosphate aldolase (SBPase) in the leaves increased significantly by 38.24%, 42.15%, and 84.08%, respectively. However, there was no significant change for the activity of transketolase (TKase). (3) The maximal photochemistry efficiency (F_v/F_m), actual

收稿日期:2019-06-14
资助项目:林业公益性行业科研专项(201504412);国家自然科学基金项目(31260202)
第一作者:麻云霞(1991—),女,博士研究生,主要从事沙区植物资源保护与利用研究。E-mail:1572666975@qq.com
通信作者:李钢铁(1963—),男,教授,博士生导师,主要从事沙区植物资源保护与利用研究。E-mail:13848817183@163.com

photochemistry efficiency ($\Phi\text{PS II}$), photochemical quenching coefficient (qP), and the share of absorbed light energy for photochemical reactions (P) in the leaves of *Z. jujube* increased by 37.52%, 135.95%, 53.10%, and 98.36% respectively under the treatment of H_2O_2 . The PS II non-photochemical quenching coefficient (NPQ), regulatory energy dissipation Y (NPQ), non-regulatory energy dissipation Y (NO), the proportion of absorbed light energy used for antenna heat dissipation (D), the proportion of non-photochemical dissipation of PS II reaction center (E_x), and the unbalanced deviation coefficient of excitation energy distribution between two optical systems ($\beta/\alpha - 1$) decreased by 34.13%, 35.15%, 30.26%, 35.52, 32.30%, and 53.43%, respectively. The mitigate effect was significant, but the mitigation effect tended to decline with the increase of exogenous concentration of H_2O_2 . Comprehensive analysis showed that the mitigate effect of H_2O_2 on cadmium toxicity of *Z. jujube* was related to many physiological processes, such as improving photosynthesis of *Z. jujube*, maintaining the high activity of antioxidant system and improving photochemical efficiency of PS II. Among them, 0.08 mmol/L H_2O_2 was the best way to improve the repair efficiency of *Z. jujube*, which could be used as a strengthening measure of phytoremediation.

Keywords: *Zizyphus jujuba*; exogenous H_2O_2 ; cadmium stress; physiological characteristics; mitigation effect

近年来,随着社会工业化改革的快速推进,重金属对土壤、植被及农产品的毒害污染已经成为全球性的环境问题,2014 年在全国土地污染情况普查公告中发现我国土壤内所含镉(Cadmium, Cd)的点位超标率高达 7%^[1]。Cd 主要来源于铜、锌、铝矿山和蓄电池、燃料、电镀及用镉化合物作原料或触媒等的工业处理中排出的废水和废渣,是国家重点监测和管理的“五毒元素”之一。它是植物非必需元素,且是毒性最强的重金属,易迁移,不易降解,即使浓度极低也会对细胞产生毒害,这些重金属元素通常结合在生物大分子的活性位点,取代酶活性中心的金属离子,改变酶的活性,从而破坏其代谢功能。同时,Cd 可在植株体内不断富集,尤其在食用、药用器官的过量堆积,通过食物链传递进而危害人类健康安全。所以,Cd 污染土壤区的修复治理已成为重点探究和亟需解决的生态问题。

过氧化氢(Hydrogen peroxide, H_2O_2)是一种结构简单、性质稳定的细胞代谢产物,当植物受到外界胁迫刺激时, H_2O_2 能够通过调控有氧代谢过程(如光合作用、呼吸作用与过氧化物酶体)和防御系统(如酶促降解系统与非酶促清除系统)等途径,诱导植物对生物或非生物逆境的抗性。所以,目前 H_2O_2 作为抗逆分子在植物体内的信号转导及对各种逆境胁迫的生理应答机制已经成为当今细胞与分子生物学研究领域的热点。张美玲等^[2]以万寿菊为试材,研究了对植物不定根形成中的影响及其相互关系,结果表明,外源 H_2O_2 可明显促进万寿菊(*Tagetes erecta*)外植体不定根的形成,并且呈现出明显的剂量效应;An 等^[3]证明, H_2O_2 可作为根源信号介导胁迫下诱导的蚕豆(*Vicia faba*)气孔关闭;王琳等^[4]研究发现,低浓度 H_2O_2 可以明显改善铝敏感型黑豆幼苗在 Al 逆境环

境下的发育状况,主要通过调控质膜氧化还原系统平衡动态状态和抗性基因转录及表达水平来实现。

与传统的土壤修复方法相比,植物修复技术是利用植物系统及根际微生物来修复和消除由有机毒物和无机废弃物造成的土壤环境污染,具有造价低廉、环境污染小、治理效果持久和易被公众所接受等优点,为最具前景的新兴修复技术。酸枣(*Zizyphus jujuba* Mill var. *Spinosa* (Bunge) Hu ex H. F Chou) 为鼠李科(*Rhamnaceae*)枣属(*Zizyphus* Mill.)植物,落叶小乔木,原产于中国,已有 3 000 多年的栽培历史,是中国最早栽培的果树之一,也是我国的第一大干果树种^[5]。它生态适应性强,从湿润的东部海滨到干旱的西部荒漠均有分布,有重要的水土保持作用,是绿化荒山的先锋树种,同时又是蜜源植物、经济植物、药用植物,具有较高的利用价值,而且抗寒、耐盐碱、易繁殖、管理粗放,是一种具备植物修复基本特性的理想材料。目前,对该植物的研究主要分布在人工栽培、生物活性物质提取、药理作用探索、组培嫁接、抗旱生理及解剖结构研究等方面^[6]。而关于 H_2O_2 与酸枣 Cd 毒害关系的研究还未见报道。鉴于此,本研究以酸枣幼苗为研究对象,采用模拟 Cd 污染土壤培养法,拟通过考察不同浓度 H_2O_2 处理下 Cd 胁迫酸枣生长、光合色素含量、气体交换参数、抗氧化酶、叶绿素荧光参数、光系统吸收光能分配和碳同化关键酶活性等指标的变化,旨在能够定量评价 H_2O_2 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗的缓解效应,阐明其应答机理过程,这对于补充完善 H_2O_2 应用于提高植物抗逆性和胁迫生理生态研究有重要的意义,也为揭示酸枣的重金属解毒机制及全面增强酸枣种植推广和经济开发利用提供科学的理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试材培育

试验材料为酸枣,种子购自巴彦淖尔市林业科学研究所种质资源中心。试验于2017年5月到2018年1月在内蒙古农业大学教学实验基地温室大棚内进行。挑选籽粒健康、圆润均匀的种子用75%酒精消毒3 min,无菌水冲刷3~4次,之后将种子置于铺有双层滤纸($\varphi=90\text{ mm}$)的培养皿中,每皿40粒,放入25℃全自动光照培养箱中进行催芽。出芽结束后,转移至(25±5)℃人工气候室中,光照强度为600 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗交替时间为12 h/12 h,平均昼夜温度为25℃/17℃,湿度是(60±5)%。每2天浇灌1次Hoagland营养液,当幼苗发育到二叶一心时,2017年8月选取长势一致的幼苗移栽入塑料盆,规格为34 cm×21 cm×27 cm(顶径×底径×高度)。每盆定植2苗,花盆盛土量共6 kg,用园圃熟土作为育苗基质,基本土壤理化性质有机质为27.92 g/kg,最大田间持水量约31.09%,全磷含量0.59 g/kg,全氮含量1.28 g/kg,速效钾含量0.13 g/kg,速效磷含量0.06 g/kg,碱解氮含量0.18 g/kg,土壤pH 7.25。

1.2 试验方案

培养15天后,酸枣幼苗正常生长。将0.05 mmol/L(由预备试验结果表明的临界浓度) $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{ H}_2\text{O}$ 水溶液定额浇灌于育苗土质内(溢流液由花盆托盘集中收集重复利用进行浇灌,保证 Cd^{2+} 在盆内苗土分布均衡),以纯Cd作为浓度计量,Cd胁迫1周后于酸枣叶片施加各个梯度下的外源 H_2O_2 ,试验共设置8个处理:(1)对照(CK);(2)0.05 mmol/L Cd^{2+} ; (3)0.05 mmol/L $\text{Cd}^{2+} + 0.02\text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$; (4)0.05 mmol/L $\text{Cd}^{2+} + 0.04\text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$; (5)0.05 mmol/L $\text{Cd}^{2+} + 0.06\text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$; (6)0.05 mmol/L $\text{Cd}^{2+} + 0.08\text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$; (7)0.05 mmol/L $\text{Cd}^{2+} + 0.1\text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$; (8)0.05 mmol/L $\text{Cd}^{2+} + 0.3\text{ mmol/L H}_2\text{O}_2$ 。CK用蒸馏水作为培养液采用清水喷施,每种处理共6盆,依次摆放,喷施液均匀喷洒在叶片两面,直到叶片边缘有液滴滴下为度,喷施频率为1天1次,第14天测定生理生化指标,每个处理重复3次,最后取平均值为准。

1.3 样品测定

1.3.1 生物量及形态指标测量 株高:在不同处理下随机选取10株幼苗,用钢卷尺测定根茎基部到植株最高点的绝对高度。生物量:分别取植株地上部和根部,用超纯水清洗栽培基质及附着杂物,然后用滤纸将表面多余水分吸干,测定各部分鲜质量后在105℃烘箱内杀青25 min,85℃条件下烘干至质量恒定

时用电子秤称量,计算相关生物量。抗性系数=处理总生物学产量/对照总生物学产量。

1.3.2 光合色素含量和气体交换参数的测定 参照李合生等^[7]方法选取幼苗生长点下第3片完全展开的新叶对叶绿素a(Chl a)、叶绿素b(Chl b)、叶绿素(Chl)和类胡萝卜素(Car)等光合色素含量进行测定,再根据测定值计算叶绿素a含量/叶绿素b(Chla/Chlb)和类胡萝卜素含量/叶绿素含量(Car/Chl)等各指标值。

采用美国LI-COR公司的LI-6400 XT便携式光合仪测定系统,在9:00—11:00光源充足期间对净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间二氧化碳浓度(C_i)及蒸腾速率(T_r)等光合参数进行测定。

1.3.3 抗氧化酶和光合碳同化酶的测定 超氧化物歧化酶(SOD)含量的测定参考Giannopolitis等^[8]的方法,过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)含量的测定采用Jiang等^[9]的方法,丙二醛(MDA)和过氧化氢(H_2O_2)含量的测定采用陈建勋等^[10]的方法。

称幼苗叶片1.0 g液氮速冻,放于-80℃低温冰箱贮存,采用Rao等^[11]的方法开展粗酶液制备分离工作。1,5—二磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)、1,1—二磷酸景天庚酮糖酯酶(SBPase)和1,6—二磷酸果糖醛缩酶(FBAase)和转酮醇酶(Tkase)活性根据试剂盒(购自上海杰美基因医药科技有限公司)使用书进行样品测定,由ST-360酶标仪在450 nm下测定吸光值,计量光合碳同化酶浓度值。

1.3.4 荧光特性的测定 选取进行光合色素测定相同的叶片,用FMS-2型便携式叶绿素荧光分析仪在设定光强下测定。先进行30 min的叶片暗适应过程,试验叶片的中间部位放置于叶夹内部进行测定,饱和闪光强度为6 000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光化学强度为600 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。测得 F_v (暗平衡下最大可变荧光)、 F_o (弱光测定初始荧光)、 F_m (饱和脉冲光最大荧光)、 F_m' (光平衡后的最大荧光)、 F_s (光平衡后稳态荧光)和 F_o' (光下最小荧光),再由各项参数计算得出 F_v/F_m (PS II最大光化学效率)、 $\Phi\text{PS II}$ (实际光化学效率)、光化学猝灭系数 qP 、非光化学猝灭系数NPQ、调节性能量耗散 $Y(\text{NPQ})$ 、非调节性能量耗散 $Y(\text{NO})$ 。按照Braun等^[12]的方法得出2个光系统的激发能配置系数($\beta/\alpha - 1$):其中PS I激发能分配系数 $\alpha = f/(1+f)$,PS II激发能分配系数 $\beta = 1/(1+f)$,其中 $f = (F_m' - F_o)/(F_m' - F_o')$ 。参照Demmig-Adams等^[13]的公式计算 P (摄取光能给予光化学运转的份额)、 D (线热耗散的份额)及 E_x (非光化学反应耗散的份额)。

1.4 数据统计分析

试验数据运用 Excel 2010 及 SPSS 19.0 软件分析和制图,用 DPS 统计软件的 Duncan 极差法对平均数进行多重比较($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 外源 H₂O₂ 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗生长的影响

由表 1 可知,相比正常处理来说,Cd 胁迫明显抑制了酸枣幼苗的生长,在 T1 处理下,酸枣整株生物量、株高、分蘖量分别比 CK 降低了 30.26%,34.21%和48.76%,差异显

表 1 外源 H₂O₂ 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗发育形态的影响

处理	生物量/(g·pot ⁻¹ DW)			株高/cm	分蘖量	抗性系数
	地上部	根部	全株			
CK	15.25±0.47a	1.98±0.31a	17.22±0.33a	29.23±1.65a	12.1±0.05a	—
T1	10.46±0.19d	1.55±0.22d	12.01±0.17d	19.23±2.29d	6.2±1.62d	0.70
T2	12.75±0.38dc	1.60±0.12dc	14.34±0.15c	21.30±1.08c	6.4±2.01d	0.83
T3	13.78±0.56c	1.62±0.16c	15.40±0.15c	23.86±0.89c	7.2±0.45c	0.89
T4	13.99±0.11b	1.73±0.19b	15.71±0.14b	25.11±0.55b	10.2±0.45b	0.91
T5	14.71±0.24ab	1.79±0.10ab	16.49±0.09a	27.96±1.17a	8.6±0.45c	0.96
T6	13.30±0.31c	1.65±0.83d	14.95±0.11d	23.13±1.48c	7.0±0.23d	0.87
T7	10.88±0.47cd	1.21±0.77d	12.09±0.21d	20.10±0.34cd	6.6±1.52d	0.70

注:表中数值为平均值±标准误差;不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同。

2.2 外源 H₂O₂ 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗光合色素含量的影响

从图 1 可以看出,与 CK 相比,Cd 胁迫可以破坏酸枣幼苗叶片中的光合色素,Chl a、Chl b 和 Car 的含量分别显著降低了 41.32%,31.43%和 42.86%($p<0.05$)。施加不同浓度的外源 H₂O₂ 后,各光合色素的含量开始上升,当外源 H₂O₂ 为 0.08 mmol/L 时,Chl a、Chl b 和 Car 含量与 CK 相比无显著差异,这表明施加外源 H₂O₂ 有助于酸枣幼苗叶片色素含量恢复到对照水平,当 H₂O₂ 浓度大于 0.08 mmol/L 时,各光合色素含量开始出现下降现象。随 H₂O₂ 浓度增大,Chl a/Chl b 同样呈先升高后降低趋势,说明后期叶片类囊体的垛叠程度越小,光抑制越强。Cd 处理下,Car/Chl 略有升高但与 CK 相比差异不显著,说明类胡萝卜素比叶绿素对浓度不敏感,施加外源 H₂O₂ 下 Car/Chl 其相对含量增加,更利于植物幼苗叶片光能捕获复合体Ⅱ的稳定。由此可见,Cd 胁迫下酸枣幼苗叶绿素遭到破坏,叶绿素含量显著降低,而外源 0.05~0.08 mmol/L H₂O₂ 能够提高 Cd 胁迫下的光合色素含量,缓解 Cd 对酸枣幼苗光合色素的破坏作用。

2.3 外源 H₂O₂ 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片光合作用参数的影响

从图 2 可以看出,不同处理的酸枣光合特性结果与 CK 相比,Cd 胁迫下酸枣叶片光合特性中 C_i 增加了 53.82%,其他指标值如 P_n 、 G_s 和 T_r 分别下降 47.34%,51.97%,52.85%,差异均显著($p<0.05$)。

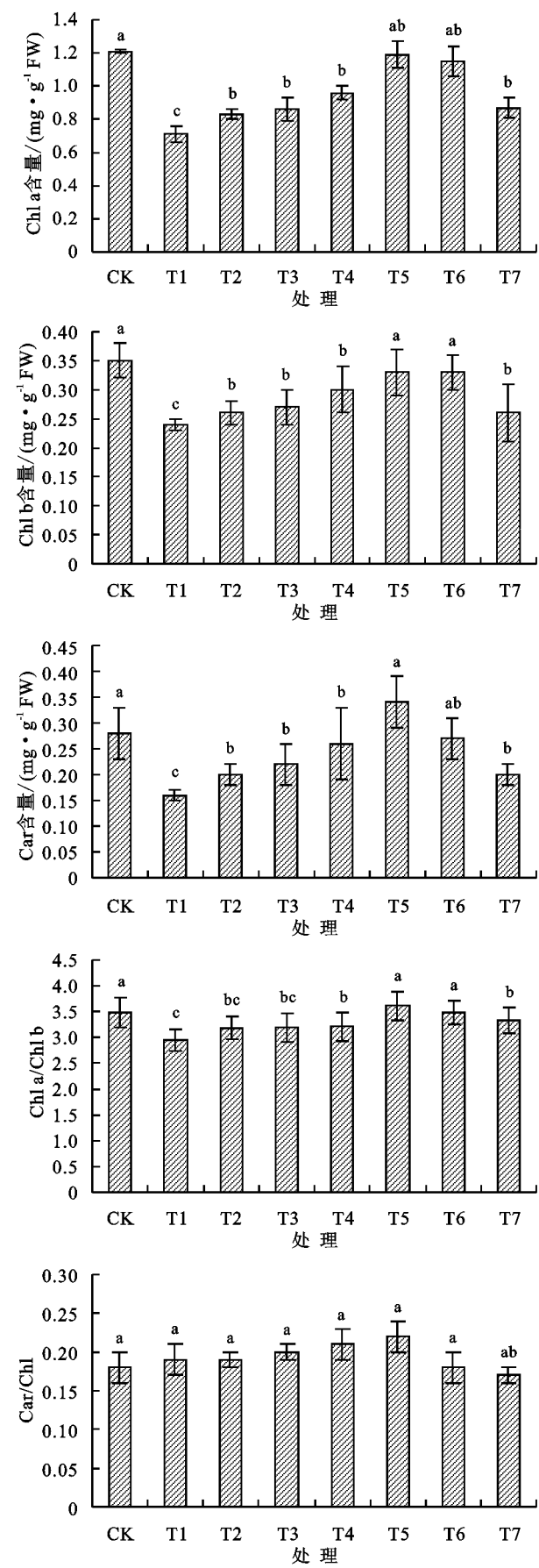
著($p<0.05$)。在施加不同浓度的 H₂O₂ 后,酸枣植株幼苗指标开始出现回升趋势,地上部、根部、全株生物量在 T5 处理下达到最高,分别是 Cd 胁迫下酸枣的 1.41,1.15 和 1.37倍($p<0.05$),但整体上仍低于 CK,处理 T6 和 T7 差异不显著;分蘖量则在 T4 处理下达到最大,是 CK 的 1.65 倍($p<0.05$);根据抗性系数表明,酸枣幼苗的抗胁迫能力随着喷施 H₂O₂ 浓度的提高表现为“钟形”变化趋势,在 T5 梯度下达到最高,表明适当浓度的 H₂O₂ 对酸枣幼苗的生长能起到促进作用。

施加不同浓度的外源 H₂O₂ 均能在一定程度上缓解 Cd 胁迫对幼苗叶片光合气体交换参数的抑制作用,其中以 T5 处理下效果最为明显,其中 C_i 相比 T1 显著下降 35.37%, P_n 、 G_s 和 T_r 相比 T1 分别显著上升 78.52%,95.60%,105.53%($p<0.05$)。酸枣幼苗叶片 P_n 、 G_s 和 T_r 随着 H₂O₂ 浓度的增加呈先上升后下降的趋势,而 C_i 则刚好相反,综合以上指标分析可知,施加 H₂O₂ 可以明显减轻 Cd 毒害对酸枣叶片光合性能的负面作用,从而促进叶肉细胞光合速率增强。

2.4 外源 H₂O₂ 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗 H₂O₂ 和 MDA 含量的影响

从图 3 可以看出,与 CK 比较,Cd 胁迫后酸枣幼苗叶片和根部内 H₂O₂、MDA 总量明显升高,叶片和根系中 H₂O₂ 分别升高 216.86%,196.46%,MDA 分别升高 263.80%,86.08%,差异均显著($p<0.05$),表明 Cd 毒害导致植株体内产生大量活性氧自由基,降低细胞膜稳定性,加重植物胁迫侵害。不同浓度的外源 H₂O₂ 处理可以降低酸枣幼苗 H₂O₂ 和 MDA 的积累,缓解 Cd 诱导的膜质过氧化,使 H₂O₂ 和 MDA 的积累量降低。其中在 T5 处理下效果最为明显,叶片和根系中 H₂O₂ 和 MDA 比 T1 分别降低 56.52%和 50.33%,61.57%和 35.39%,差异均显著($p<0.05$)。随着 H₂O₂ 浓度的增大,酸枣幼苗 H₂O₂ 含量先降低后升高,说明过高浓度的 H₂O₂ 会起到反作用,造成活性氧过量堆积。综上所述,表明 H₂O₂ 可缓解膜脂过氧化现象,减轻 Cd 胁迫对膜

系统的危害。



注:图中不同小写字母表示各个处理间差异显著($P<0.05$)。下同。

图 1 外源 H_2O_2 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片光合色素含量的影响

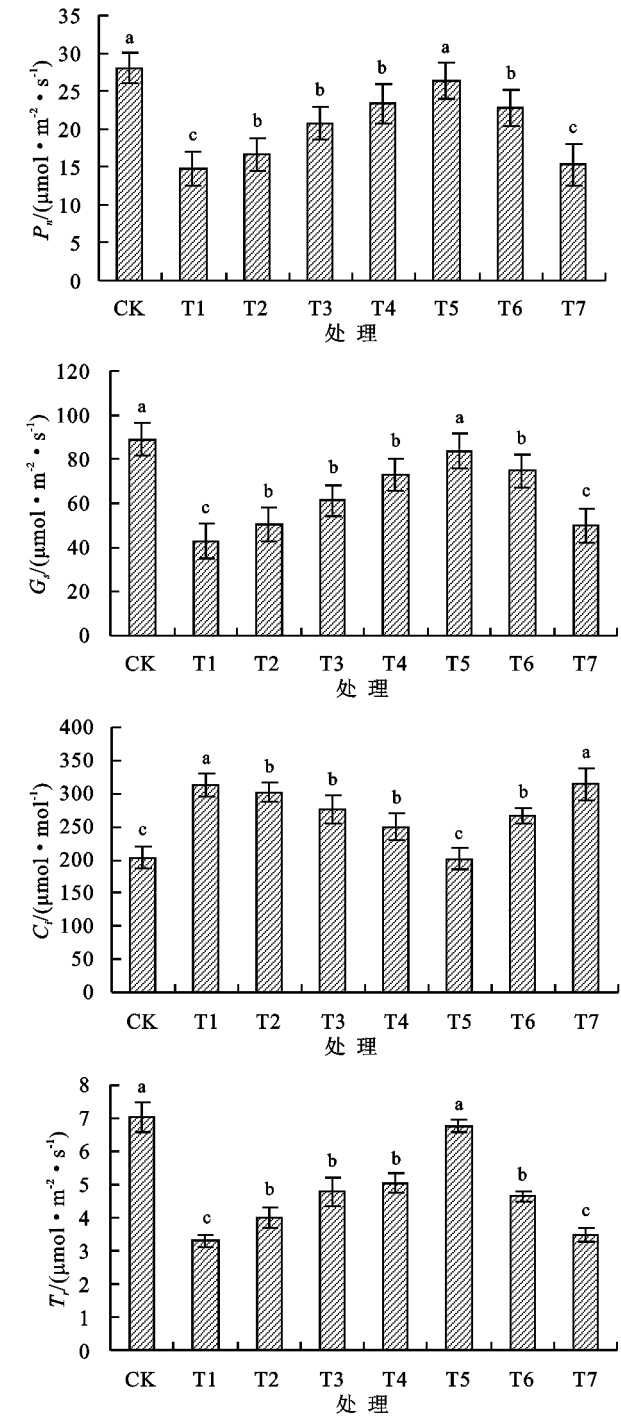


图 2 外源 H_2O_2 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片光合作用参数的影响

2.5 外源 H_2O_2 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗抗氧化酶活性的影响

从图 4 可以看出,酸枣幼苗叶片和根系中 SOD 活性在 Cd 胁迫下显著降低,分别比 CK 下降 42.53% 和 65.43% ($p<0.05$),但添加不同浓度的 H_2O_2 后减缓了 Cd 胁迫下 SOD 活性的下降。与 T1 处理相比,T5 处理下的酸枣叶片和根系 SOD 活性分别显著提高 36.03% 和 42.09% ($p<0.05$)。Cd 毒害致使酸枣植株 POD 和 CAT 活性出现上升,进而保证酸枣机体在 Cd 逆境中的稳定性。在 H_2O_2 浓度逐渐增大的情况下,POD 和 CAT 活性显示为持续上升态势,在 T5 处达到

最大值,酸枣叶片 POD 活性提高了 32.18%,差异显著 ($p<0.05$),根系提高了 19.58%,差异不显著;酸枣叶片和根系 CAT 活性分别提高了 45.81%,113.76%,差异均显著($p<0.05$)。经不同浓度的外源 H_2O_2 处理后,酸枣内 SOD、CAT 和 POD 活性的变化趋势较一致,都是随

H_2O_2 浓度的增大呈先上升后下降趋势,当 H_2O_2 浓度超过 0.08 mmol/L 时,抗氧化酶活性逐渐降低,甚至低于对照。表明施加适宜浓度的外源 H_2O_2 可以诱导酸枣幼苗抗氧化酶活性增强,进而提高酸枣幼苗的抗逆性,但浓度过大时有可能会起到反作用。

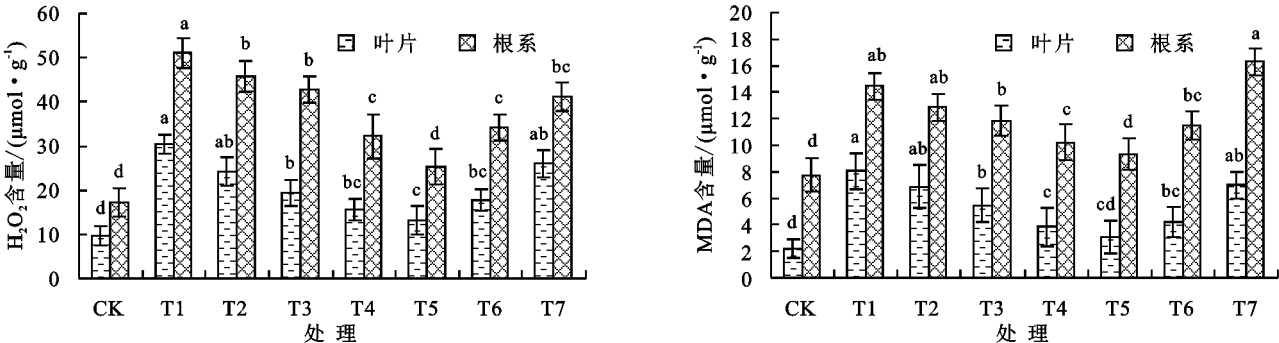


图 3 外源 H_2O_2 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

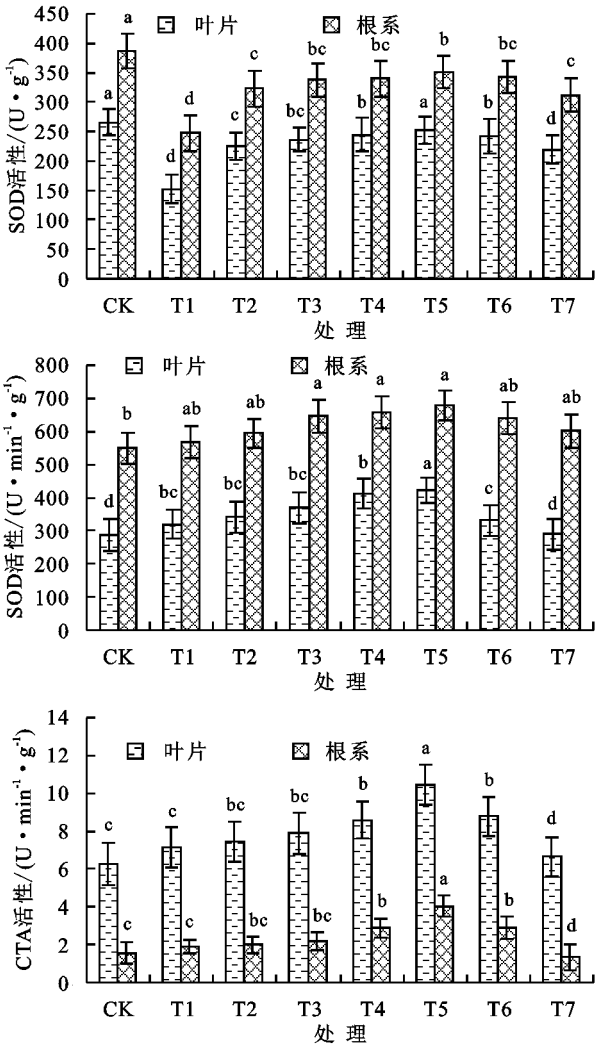


图 4 外源 H_2O_2 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗抗氧化酶活性的影响

2.6 外源 H_2O_2 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片叶绿素荧光参数的影响

由表 2 可知,Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片 F_v/F_m 、 $\Phi PS II$ 和 qP 相比 CK 来讲分别显著降低 31.38%,69.52%和 39.92%,NPQ、Y(NPQ)和 Y(NO)分别

显著提高 62.96%,79.44%和 46.62% ($p<0.05$)。与单一 Cd 处理相比,Cd+ H_2O_2 处理抑制了酸枣幼苗叶片 F_v/F_m 、 $\Phi PS II$ 和 qP 的下降及 NPQ、Y(NPQ)和 Y(NO)的升高,其中在 T5 处理下效果最为显著, F_v/F_m 、 $\Phi PS II$ 和 qP 分别显著提高 37.52%,135.95%,53.10%,NPQ、Y(NPQ)和 Y(NO)分别显著降低 34.13%,35.15%和 30.26% ($p<0.05$)。随着外源 H_2O_2 浓度的增加, F_v/F_m 、 $\Phi PS II$ 和 qP 呈先升高后降低的趋势,NPQ、Y(NPQ)和 Y(NO)则呈现为先降低后升高的相反趋势,说明施加 H_2O_2 能通过增强 PSII 反应中心活性、光能捕获效率、电子传递活性和减少热能损耗等途径增强酸枣幼苗在逆境中的适应性。

2.7 外源 H_2O_2 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片光系统间激发能和 PS II 吸收光能分配的影响

由表 3 可知,Cd 毒害下酸枣植株体内 β 、 $\beta/\alpha-1$ 、 D 和 E_x 与 CK 比较为显著升高,分别提高 31.12%,292.39%,71.65%和 45.31%,而 α 和 P 则呈现为完全不同的变化趋势,各自降低 60.40%,73.59% ($p<0.05$)。在外施 H_2O_2 的处理下, β 、 $(\beta/\alpha-1)$ 、 D 和 E_x 在 Cd 胁迫下的上升趋势及 α 和 P 的降低趋势均得到明显缓解,在 T5 处理下效果最为明显, β 、 $(\beta/\alpha-1)$ 、 D 和 E_x 与 T1 相比分别下降 12.37%,53.43%,35.52,32.30%,其中 β 未达到显著差异水平,其他指标均达到显著差异水平 ($p<0.05$), α 和 P 分别显著升高 82.91%,98.36% ($p<0.05$)。通过以上指标变化,可以表明 Cd 胁迫抑制了酸枣幼苗叶片光系统的光能转换和传递,而 H_2O_2 通过对酸枣幼苗叶片光系统间激发能和 PS II 吸收光能分配的传递通路再次配置调控,从而缓解 Cd 胁迫导致酸枣幼苗产生的光抑制现象。

表 2 外源 H₂O₂ 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片叶绿素荧光参数的影响

处理	F_v/F_m	$\Phi PS II$	qP	NPQ	$Y(NPQ)$	$Y(NO)$
CK	0.905±0.0021a	0.502±0.005a	0.724±0.001a	0.899±0.005d	0.287±0.009d	0.311±0.003d
T1	0.621±0.0019d	0.153±0.003d	0.435±0.007d	1.465±0.003a	0.515±0.011a	0.456±0.006a
T2	0.755±0.0013c	0.224±0.001c	0.520±0.008c	1.244±0.013b	0.436±0.010b	0.421±0.004b
T3	0.792±0.0016c	0.287±0.006c	0.583±0.004c	1.117±0.005c	0.400±0.015c	0.405±0.004c
T4	0.827±0.0012c	0.303±0.016c	0.621±0.011c	1.101±0.015c	0.378±0.002c	0.366±0.002c
T5	0.854±0.0029b	0.361±0.012b	0.666±0.002b	0.965±0.012d	0.334±0.012d	0.318±0.008d
T6	0.767±0.0011c	0.320±0.022c	0.589±0.014c	1.239±0.018b	0.411±0.013b	0.369±0.016b
T7	0.610±0.0014d	0.212±0.021d	0.443±0.012d	1.425±0.019a	0.499±0.010a	0.414±0.012a

表 3 外源 H₂O₂ 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片光系统间激发能和 PSⅡ 吸收光能分配的影响

处理	α	β	$\beta/\alpha-1$	P	D	E_x
CK	0.399±0.009a	0.574±0.003d	0.539±0.024d	0.462±0.005a	0.328±0.004d	0.245±0.007d
T1	0.158±0.005d	0.752±0.008a	2.115±0.014a	0.122±0.005d	0.563±0.006a	0.356±0.006a
T2	0.177±0.003c	0.748±0.016b	1.982±0.019b	0.179±0.013c	0.489±0.004b	0.331±0.005b
T3	0.240±0.011b	0.721±0.013b	1.661±0.023b	0.211±0.017b	0.444±0.002b	0.303±0.003b
T4	0.289±0.013ab	0.686±0.003c	1.380±0.020c	0.242±0.024ab	0.402±0.003c	0.288±0.001c
T5	0.332±0.017a	0.659±0.004cd	0.985±0.026cd	0.288±0.032a	0.363±0.002cd	0.241±0.004cd
T6	0.269±0.013ab	0.699±0.002c	1.600±0.023c	0.235±0.013ab	0.412±0.001c	0.292±0.004c
T7	0.164±0.006d	0.795±0.007a	2.581±0.026a	0.165±0.018d	0.492±0.005a	0.345±0.008a

2.8 外源 H₂O₂ 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片光合碳同化关键酶活性的影响

由表 4 可知,Cd 毒害对酸枣幼苗叶片 4 种光合碳同化关键酶活性形成了抑制作用,与 CK 相比,单一 Cd 处理下的 Rubisco、SBPase、FBAase 和 Tkase 活性分别下降 43.87%,55.16%,57.80%,33.33% ($p<0.05$)。随着外施 H₂O₂ 浓度的增加,叶片光合碳同化关键酶活性均呈现先增加后降低的趋势,在 T5 处理下达到最大值,但仍低于 CK,Rubisco、SBPase、FBAase 与 T1 相比提高 38.24%,42.15%,84.08%,差异显著 ($p<0.05$),Tkase 也高于 T1,但并未形成显著差异。说明 Cd 逆境降低了酸枣植株体内光合碳同化关键酶活性,外源 H₂O₂ 能有效改善胁迫对光合碳同化关键酶活性的负面效应。

表 4 外源 H₂O₂ 对 Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片光合碳同化关键酶活性的影响

处理	单位:U/g FW			
	Rubisco 活性	SBPase 活性	FBAase 活性	Tkase 活性
CK	3.51±0.157a	8.52±0.256a	3.72±0.086a	12.21±0.149a
T1	1.97±0.087d	3.82±0.152d	1.57±0.072d	8.14±0.131b
T2	2.23±0.034c	4.18±0.076c	1.98±0.138c	9.21±0.154bc
T3	2.63±0.052c	4.35±0.182c	2.26±0.281c	9.72±0.241bc
T4	2.96±0.041b	4.78±0.284b	2.45±0.111b	10.02±0.018bc
T5	3.19±0.152a	5.43±0.100ab	2.89±0.213ab	10.11±0.219bc
T6	2.84±0.021b	4.87±0.154b	2.32±0.032bc	9.29±0.242bc
T7	2.32±0.231c	4.03±0.143c	1.85±0.212c	7.78±0.172c

3 讨论

植物生长、生物量在重金属污染土壤植物修复过程中具有重要意义,不仅影响修复效率,而且可以直接指示重金属对植物的毒害程度。本研究结果表

明,Cd 胁迫显著降低了植株生物量,酸枣生长受到严重抑制,这与周蜜等^[14]对菊芋、王佳星等^[15]对紫金牛的探究结论相似。前人^[16-18]文献中证明,喷施小剂量外源 H₂O₂ 对植株的生理发育机能存在显著的保护效应,比如可以提高种子发芽率,加强不同植物种的耐旱性、耐热性等机能。试验中施加低浓度(0.02~0.08 mmol/L)H₂O₂ 处理不同程度提高酸枣幼苗的生物量、株高、分蘖数和抗性系数,高浓度(0.1~0.3 mmol/L)H₂O₂ 则加剧 Cd 胁迫对酸枣幼苗生长的抑制,这与 Andre’Dias 等^[19]的研究结果也一致,说明低浓度的 H₂O₂ 可作为植物对外界环境胁迫反应的调节因子,进而提高植物幼苗自身抵御胁迫和伤害的能力。

光合色素含量是反映光合强度的重要指标。郭智等^[20]对 Cd 胁迫下超积累植物龙葵(*Solanum nigrum*)光合特性的研究结果显示,Cd 胁迫明显降低了各种光合色素的含量。酸枣幼苗叶绿素含量在 Cd 胁迫后显著下降,而施加外源 H₂O₂ 可以有效保证酸枣幼苗色素积累总量和成分功能的运转特性,原因可能为外源 H₂O₂ 保护了类囊质膜的完整性,加剧了光能电子运转速率,因而进一步促进了叶片捕捉光能及转换效率的增强。该研究中,Cd 胁迫下酸枣叶片的 P_n 、 G_s 和 T_r 显著降低,但 C_i 大幅度增加,由此证明光合性能降低的关键原因是非气孔因素,光合生物活性及 RuBP 羧化因素等也制约了 CO₂ 的转换,致使其于细胞空隙间过量堆积。适宜浓度的 H₂O₂ 可以使 P_n 、 G_s 和 T_r 值明显上升, C_i 降低,表明 H₂O₂ 能够有效调控 Cd 毒害下酸枣植株叶肉细胞内光合碳同化途径及相关酶活性,保证 CO₂ 的稳定性与运输反应

性能,迫使胞间 CO_2 总储量所占份额减少,这与王艳玲^[21]在水稻上的研究结果相同。但目前也有报道^[22]显示,在 Cd 毒害下对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 幼苗施加 H_2O_2 后 C_i 值仍呈现为居高不下的态势,保证植株在逆境中的适应性,这和本试验结论有所出入,具体原因可能是不同外源物浓度、不同胁迫环境、不同试验对象及作用部位、不同处理方式等相关因素综合影响导致响应机制出现差异。

植物在低温、干旱、污染、高盐和强辐射等逆境下能加快膜脂过氧化作用的进程,打破活性氧的代谢平衡,破坏膜结构和功能。本研究中,Cd 胁迫下酸枣幼苗叶片 H_2O_2 和 MDA 含量增加,说明 Cd 胁迫诱导了酸枣幼苗叶片的氧化损伤。但施加一定浓度的外源 H_2O_2 可使 H_2O_2 和 MDA 含量出现一定程度的下降,特别是 0.08 mmol/L H_2O_2 处理下, H_2O_2 和 MDA 含量下降最为显著,说明外源 H_2O_2 能显著增强酸枣幼苗叶片中活性氧代谢循环,减少细胞内矿物质元素离子渗漏,保证细胞结构的完整性。这与 Wahid 等^[23]报道的结果相一致,即 H_2O_2 预处理小麦通过降低脂质过氧化来提高小麦幼苗的耐盐性。同时从本试验结果表明,0.08 mmol/L H_2O_2 处理亦能显著提高酸枣幼苗叶片的抗氧化酶活性(SOD、POD 和 CAT),说明可能是 H_2O_2 的信号放大功能激活了抗氧化防御机制的分子传导链,诱导 ROS 清除酶活性的提高及相应基因在一定程度上的表达,进一步提高了植物的抗性,关于大麦 (*Hordeum vulgare*)^[24]、玉米 (*Zea mays*)^[25] 的研究也进一步验证了上述结论。

叶绿素荧光变化能反映植物光合机构的运转状况。潘晨慧^[26]试验得出,不同剂量 H_2O_2 的施加可以使唐古特白刺 (*Nitraria tangutorum*) 幼苗 ΦPSII 、 qP 上升, NPQ 和 $Y(\text{NPQ})$ 下降。本试验结论显示,施加 H_2O_2 也可以促进 Cd 毒害下酸枣植株幼苗的 F_v/F_m 、 ΦPSII 和 qP 升高, NPQ、 $Y(\text{NPQ})$ 和 $Y(\text{NO})$ 大幅度降低,说明 H_2O_2 能够有效保证酸枣 PSII 电子在 Cd 逆境中的产生运输和光能利用平衡性能。同时酸枣叶片于逆境环境 PSI 和 PSII 光体系内配置紊乱,在施加 H_2O_2 下其光合机构中 β 与 $\beta/\alpha - 1$ 开始下降,而 α 则出现增加态势,证实 H_2O_2 可以增强 Cd 逆境下酸枣植株捕获激发效率。Cd 逆境下酸枣植株光化学运转份额 P 上升的主导因素为 H_2O_2 的施加推动了叶片内光系统性能发挥, P 值增大会降低 PSII 中剩余光能的堆积,从而使天线色素依赖 NPQ 耗散的激发能份额 D 值减小。于 PSII 反应部位损伤及封闭致使输送至反应中心的激发能是否分配给光化学体系时,只可经由反应中心耗散份额 E_x 的升高来诱导活性氧在叶肉细胞内的过量积累,且能直接造成反应中心叶绿素内部

蛋白的活性下降,引发 ΦPSII 的下跌。而且 H_2O_2 的处理对 Cd 逆境中酸枣幼苗 E_x 的上升产生了突出的缓解效应,证明施加 H_2O_2 能够采用调控 E_x 这一途径来减小 Cd 逆境给光反应系统带来的负面效应,这与 Tang 等^[27]对长春花 (*Catharanthus roseus*) 在胁迫环境下通过 H_2O_2 处理对 E_x 的调整提高植物抗胁迫伤害能力的报道结论相似。胡化广等^[28]对结缕草 (*Zoysia japonica*) 的调查显示在干旱胁迫过程中植株内 Rubisco 活性不断下降。Cd 逆境下酸枣幼苗 Rubisco 活性也发生急速下跌的相同趋势,原因之一可能是 Cd 逆境中光反应活性减小前馈抑制了暗反应,也可能是因为 Cd^{2+} 代替了其他矿质元素离子参与了 Rubisco 的活化反应进程。但 H_2O_2 明显减缓了酸枣叶片 Rubisco 活性的下降 SBPase、FBAase 活性下跌趋势也开始减缓,而 Tkase 活性值的浮动范围较小。由此证明喷施 H_2O_2 能够由增加光合碳同化关键酶活性进而提升 Cd 逆境中酸枣植株光合反应的高效运转。李翔等^[29]研究也证明,施加 2,4—表油菜素内酯 (EBR) 外源物可通过调控碳同化相关酶活性和基因的表达水平,提高植物抗性能力。综上所述,表明酸枣幼苗在施加 H_2O_2 后,叶片内叶绿素荧光参数、叶片光系统间激发能和 PSII 吸收光能分配及叶片光合碳同化关键酶活性可发挥协同作用来提高酸枣对 Cd 逆境的抗性,而外施 H_2O_2 对如何加强 Cd 逆境下植株光机能活性和碳同化关键酶活性的分子调控水平是下一步研究的重点。

4 结论

(1) Cd 胁迫使酸枣幼苗生物量、株高、分蘖数分别降低 30.26%, 34.21% 和 48.76%, 抗性系数为最低 (0.70), 说明 Cd 胁迫对酸枣的生长造成抑制作用, 施加 H_2O_2 后酸枣叶片内光合色素含量、 P_n 、 T_r 和 G_s 升高, H_2O_2 、MDA 含量和 C_i 均出现不同程度的下降。

(2) 低浓度 H_2O_2 (≤ 0.08 mmol/L) 处理后, 叶片和根系内抗氧化酶 (POD、SOD、CAT) 活性增强, 叶片内 TKase 活性无显著变化, Rubisco、SBPase 和 FBAase 活性显著提高, 分别最高上升 38.24%, 42.15%, 84.08%。

(3) 酸枣叶片内 F_v/F_m 、 ΦPSII 、 qP 和 P 在 H_2O_2 处理下最大分别提高 37.52%, 135.95%, 53.10% 和 98.36%, NPQ、 $Y(\text{NPQ})$ 、 $Y(\text{NO})$ 、 D 、 E_x 和 $\beta/\alpha - 1$ 分别降低 34.13%, 35.15%, 30.26%, 35.52%, 32.30% 和 53.43%。

综上所述可得, Cd 胁迫对植物的生长产生了一定的毒害效应, 在施加不同浓度的外源 H_2O_2 后, 植物的生长状况在不同程度上得到了一定的缓解, 且 H_2O_2 存在着明显的剂量效应, 由试验中酸枣各生理

指标综合分析,0.08 mmol/L 的外源 H_2O_2 对土壤重金属 Cd 胁迫下酸枣幼苗的缓解效果最佳,本试验重点研究了酸枣幼苗在 Cd 胁迫下生理生态指标对外源 H_2O_2 的响应,而有关分子机理和相应的基因生物学信息仍需进一步探索和研究。

参考文献:

- [1] 郑黎明,张杰,杨红飞,等.镉胁迫对荻生长、镉富集和土壤酶活性的影响[J].水土保持学报,2017,31(5):334-339.
- [2] 张美玲,廖伟彪,肖洪浪.一氧化氮和过氧化氢对万寿菊不定根形成的影响[J].中国沙漠,2012,32(1):105-111.
- [3] An G Y, Li B Z, Wu G L, et al. H_2O_2 could act as root source signal to mediate stomatal closure induced by salt stress of *Vicia faba* L. [J]. Plant Physiology Journal, 2012,48(3):265-271.
- [4] 王琳,陈奇,武孔焕,等.过氧化氢预处理增强敏感型黑豆抗铝能力的生理机制[J].西北植物学报,2013,33(2):336-342.
- [5] 杨锐,郎莹,张光灿,等.野生酸枣光合及叶绿素荧光参数对土壤干旱胁迫的响应[J].西北植物学报,2018,38(5):922-931.
- [6] 朱广龙,邓荣华,魏学智.酸枣叶表皮微形态对不同生态环境的适应特征[J].生态学报,2016,36(16):5193-5203.
- [7] 李合生,孙群,赵世杰.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [8] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants[J]. Plant Physiology, 1977, 59(2):309.
- [9] Jiang J L, Su M, Wang L Y, et al. Exogenous hydrogen peroxide reversibly inhibits root gravitropism and induces horizontal curvature of primary root during grass pea germination[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012,53:84-93.
- [10] 陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导[M].2 版.广州:华南理工大学出版社,2006.
- [11] Rao I M, Terry N. Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet: I. changes in growth, gas exchange, and calvin cycle enzymes [J]. Plant Physiology, 1989,90(3):814-819.
- [12] Braun G, Malkin S. Regulation of the imbalance in light excitation between photosystem II and photosystem I by cations and by the energized state of the thylakoid membrane[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-bioenergetics, 1990,1017(1):79-90.
- [13] Demmig-Adams B, Adams III W W, Barker D H, et al. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation[J]. Physiologia Plantarum, 1996,98(2):253-264.
- [14] 周蜜,吴玉环,刘星星,等.镉胁迫对菊芋生理变化及镉富集的影响[J].水土保持学报,2019,33(2):323-330.
- [15] 王佳星,余国源,谢瑛,等.土壤镉胁迫对紫金牛生理特性的影响[J].东北林业大学学报,2019,47(5):25-29.
- [16] 杨波,何俊瑜,任艳芳,等.过氧化氢对镉胁迫下水稻种子萌发的缓解效应[J].植物生理学报,2018,54(6):1111-1118.
- [17] 李雪萍,金鑫,廖伟彪,等.过氧化氢参与干旱条件下脱落酸诱导黄瓜不定根形成[J].干旱地区农业研究,2018,36(3):194-201.
- [18] 耿兴敏,肖丽燕,赵晖,等. H_2O_2 预处理及高温胁迫下杜鹃叶片活性氧及抗氧化酶亚细胞定位分析[J].西北植物学报,2019,39(5):791-800.
- [19] Andre'Dias de A N, Jose'Tarquinio P, Joa-quim Ene'as-Filho, et al. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt stress acclimation in maize plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2005,162:1114-1122.
- [20] 郭智,原海燕,奥岩松.镉胁迫对龙葵幼苗光合特性和营养元素吸收的影响[J].生态环境学报,2009,18(3):824-829.
- [21] 王艳玲. H_2O_2 处理在水稻响应镉胁迫中的作用机制初探[D].贵阳:贵州大学,2017.
- [22] Cho U H, Seo N H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation[J]. Plant Science, 2005,168(1):113-120.
- [23] Wahid A, Perveen M, Gelani S, et al. Pretreatment of seed with H_2O_2 improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins [J]. Journal of Plant Physiology, 2007,164(3):283-294.
- [24] Fedina S, Nedeva D, Click N. Pre-treatment with H_2O_2 induces salt tolerance in Barley seedlings[J]. Biologia Plantarum, 2009,53(2):321-324.
- [25] Azevedo N A D, Prisco J T, Enéas-filho J, et al. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants[J]. Journal of Plant Physiology, 2005,162(10):1114-1122.
- [26] 潘晨慧.交替途径及外源过氧化氢在唐古特白刺耐盐性中的作用[D].哈尔滨:东北农业大学,2018.
- [27] Tang Z H, Yang L, Zu Y G, et al. Variations of vinblastine accumulation and redox state affected by exogenous H_2O_2 in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don [J]. Plant Growth Regulation, 2009,57(1):15-20.
- [28] 胡化广,张振铭,季芳芳,等.干旱胁迫对结缕草叶绿素荧光和光合关键酶活性的影响[J].草地学报,2016,24(6):1304-1308.
- [29] 李翔,桑勤勤,束胜,等.外源油菜素内酯对弱光下番茄幼苗光合碳同化关键酶及其基因的影响[J].园艺学报,2016,43(10):2012-2020.