

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2020.06.005

GSH 对铅胁迫下多年生黑麦草幼苗抗氧化系统的调控

赵利清^{1,2}, 彭向永³, 刘俊祥¹, 毛金梅⁴, 孙振元^{1*}

(1. 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 国家开放大学, 北京 100039; 3. 曲阜师范大学生命科学学院, 山东 曲阜 273165; 4. 新疆林业科学院经济林研究所, 新疆 乌鲁木齐 830063)

摘要:本试验以 12 周龄的多年生黑麦草(*Lolium perenne* 'cuttle') 幼苗为试验材料,用铅(Lead,Pb),Pb+还原型谷胱甘肽(Glutathione,GSH)和 Pb+丁硫氨酸-亚砷亚胺(L-Buthionine-sulfoximine,BSO)处理 1 周,研究 GSH 对 Pb 胁迫下多年生黑麦草抗氧化系统的调控机理,寻求缓解植物 Pb 胁迫的有效措施。结果表明:Pb 胁迫下,外源 GSH 能够显著提高多年生黑麦草 Pb 的吸收和转运,增加抗氧化酶超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase,GPX)和谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase,GR)活性,显著增加抗氧化剂 GSH 含量及 GSH/氧化型谷胱甘肽(Oxidized glutathione,GSSG)比率,提高了植物的还原力。外源 GSH 也能够显著降低活性氧超氧阴离子(Superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(Hydrogen peroxide, H_2O_2)的产生量、膜的相对透性(Relative electric conductivity,EC)和丙二醛(Malondialdehyde,MDA)含量,保持了细胞的稳定性,减轻了膜脂的过氧化程度。外源 BSO 作用基本上与 GSH 相反。相关分析表明:GSH 可通过提高 SOD 和 GPX 等抗氧化酶的活性,促进 GSSG 和 GSH 的相互转化,降低活性氧产生量,提高植物抵抗逆境胁迫的能力。

关键词:多年生黑麦草;谷胱甘肽;抗氧化系统;铅

中图分类号:Q945.78;S812.8

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2020)06-1527-08

Effects of Glutathione(GSH) on Antioxidant Defense System of *Lolium Perenne* Seedlings under Lead Stress

ZHAO Li-qing^{1,2}, PENG Xiang-yong³, LIU Jun-xiang¹, MAO Jin-mei⁴, SUN Zhen-yuan^{1*}

(1. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of State Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. The Open University of China, Beijing 100039, China; 3. Qufu Normal University, Qufu, Shandong Province 273165, China; 4. Economic Forest Research Institute Xinjiang Academy of Forestry, Urumqi, Xinjiang 830063, China)

Abstract: In this study, *Lolium perenne* seedlings (12 weeks old) were exposed to Pb, Pb+GSH and Pb+BSO treatment for one week to investigate effects of glutathione on antioxidant defense system of leaf and root. The results showed that Pb+GSH treatment increased Pb absorption and transport. It also increased antioxidase activity such as superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX) and glutathione reduction(GR), antioxidant GSH content and GSH/GSSG ratio. It enhanced Seedlings' reducing power. On the contrary, the content of ROS($O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2), malondialdehyde content (MDA) and relative electric conductivity(EC) declined under Pb+GSH treatment. Pb+BSO treatment had almost opposite effects to that of Pb+GSH treatment. The correlation analysis indicated that GSH could reduce reactive oxygen species production and alleviate oxidative stress by increasing antioxidase activity and promoting the mutual transformation of GSSG and GSH.

Key words: *Lolium perenne*; Glutathione; Antioxidant defense system; Lead

由于工农业含铅(Lead,Pb)废弃物的长期排放,大量 Pb 进入了水体、土壤和植物生态系统,导致环境中 Pb 污染日趋严重^[1]。Pb 是一种有毒重金属,能够危害动物的神经、消化和心血管等多个系

统,也能诱导植物产生过量的活性氧(Reactive oxide species,ROS),如超氧阴离子(Superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(Hydrogen peroxide, H_2O_2)、羟基自由基(Hydroxyl free radical, $\cdot OH$)和单线

收稿日期:2020-07-14;修回日期:2020-08-19

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(CAFYBB2018ZB002)资助

作者简介:赵利清(1976-),女,内蒙古呼和浩特人,博士研究生,副教授,主要从事园林植物的分子育种研究,E-mail:195432830@qq.com;

* 通信作者 Author for correspondence, E-mail:sunzy@263.net

态氧(Singlet oxygen, 1O_2)等^[2]。这些 ROS 比分子氧具有更强的氧化性,可引发或者加剧细胞膜脂过氧化、蛋白质变性以及核苷酸受损等,严重时可导致细胞死亡^[3]。当细胞内 ROS 水平上升时,植物细胞就会启动抗氧化系统来抵御 ROS,抗氧化系统由抗氧化剂类和抗氧化酶类两部分组成,抗氧化剂类有还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)和抗坏血酸(Ascorbic acid, ASA)等,抗氧化酶类包括超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbic acid peroxidase, APX)和谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)等^[4]。

GSH 作为植物体内普遍存在的含-SH 的还原物质,在防御自由基对膜脂的过氧化中起重要作用^[5-6],它可直接使 ROS 还原,还可通过抗坏血酸-谷胱甘肽(ASA-GSH)循环完成 ROS 的清除^[7]。外源 GSH 可以诱导内源 GSH 分泌,减少了 ROS 的产生,增加抗氧化剂的还原能力和抗氧化酶的活性,减轻膜脂过氧化程度^[3,7-8]。丁硫氨酸-亚砷亚胺(L-Buthionine-sulfoximine, BSO), GSH 合成酶抑制剂,能够抑制 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamylcystein synthetase, γ -GCS)的活性,使 GSH 含量减少和抗氧化酶活性降低等^[9-10]。目前 GSH 调控抗氧化系统的研究多集中在外施 GSH 上,而将 GSH 和 BSO 同时进行的报道较少。

多年生黑麦草(*Lolium perenne*)属禾本科黑麦草属植物,其生长快、生物量大,根系发达,成坪速度快,能够多次刈割,可通过一次种植、多次刈割来实现污染土壤中 Pb 的原位持续清除^[11],也是利用水培方法开展研究的理想材料。

本研究利用外源的 GSH 和 BSO 处理多年生黑麦草幼苗,从正反两面分别比较处理前后抗氧化酶活性、抗氧化剂含量和一些抗性指标的变化,旨在探讨 GSH 调控抗氧化系统的机理,寻求缓解植物 Pb 胁迫的有效措施。

1 材料与方法

1.1 供试材料与培养

以多年生黑麦草品种‘卡特’(*Lolium perenne* ‘cuttle’)为试验材料,将种子均匀地撒播于装满营养土的花盆中,常规养护管理。培养 6 周后,将其转移至盛有 9 L 1/2 Hoagland 营养液的水培箱中继续培养 6 周,营养液 pH 值调为 6.0。

1.2 试验设计与处理

挑选大小及长势一致的幼苗,定置于盛有 1/2 Hoagland 营养液的培养盆中,每盆 12 穴,每穴 3 株。 $Pb(NO_3)_2$ 直接加入营养液中,为了避免 Pb^{2+} 与营养液中的 $H_2PO_4^-$ 反应而降低 Pb 效应, Hoagland 营养液去除标准配方中 KH_2PO_4 ,通过叶面喷施 1 次 20 mL 的 0.2% 的 KH_2PO_4 来补充磷和钾元素。GSH 和 BSO 采用叶面喷施法,每天 1 次,连续处理 1 周,处理期间利用充气泵持续充气。

试验共设 CK, Pb, Pb+GSH 和 Pb+BSO 4 个处理,通过前期试验筛选出 Pb 处理浓度,并根据文献^[1,12]确定 GSH 和 BSO 的处理浓度。每个处理 3 次重复,具体如下:

CK 处理: 1/2 Hoagland 营养液,喷蒸馏水 50 mL;

Pb 处理: $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} Pb(NO_3)_2$ 的 1/2 Hoagland 营养液,喷蒸馏水 50 mL;

Pb+GSH 处理: $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} Pb(NO_3)_2$ 的 1/2 Hoagland 营养液,先喷蒸馏水 25 mL,再喷施 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} GSH$ 25 mL;

Pb+BSO 处理: $0.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} Pb(NO_3)_2$ 的 1/2 Hoagland 营养液,先喷蒸馏水 25 mL,再喷施 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} BSO$ 25 mL。

处理 1 周后,于上午 9:00—11:00 分别取成熟叶片和根,先用自来水冲洗植株 3 次,去除表面杂物,再用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} Na_2EDTA$ 浸泡 15 min,吸附根系表面附着的矿物离子,最后用去离子水清洗 3 次,吸干水分,液氮速冻后于 -80°C 冰箱保存,备用。

1.3 测定方法

1.3.1 Pb 含量及转运系数测定 采用湿灰化法测定 Pb 含量,将用于测定生物量的根和叶干样品磨碎,过 40 目筛,精确称取 0.1 g 试样置于三角瓶中,加 10 mL ($HNO_3 : HClO_4 = 4 : 1$) 酸消化液过夜,然后在消煮炉上 $140 \sim 180^\circ\text{C}$ 加热消解至黄棕色烟雾慢慢挥发,再提高温度至 250°C ,消煮至大量冒白烟止,消化液呈透明状,冷却后用 2% HNO_3 定容至 50 mL 容量瓶,0.2 μm 膜过滤后,用原子吸收分光光度计火焰法测定 Pb 含量。转运系数 = 叶 Pb 浓度 / 根 Pb 浓度。

1.3.2 超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)组织化学染色 $O_2^{\cdot-}$ 染色根据 Doke 和 Ohashi^[13] 的方法进行,用含有 0.1% 的硝基氮蓝四唑(NBT), $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} NaN_3$ 和 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} KH_2PO_4$

K_2HPO_4 的缓冲液 (pH6.4) 浸泡叶片 30 min 以上, 叶片出现深蓝色聚合物后, 蒸馏水冲洗叶片, 拍照。 H_2O_2 染色按照南京建成生物工程研究所 DAB 染色试剂盒说明进行, 将剪成 3 cm 左右的叶片浸泡在染色液中, 染色 30 min 以上, 蒸馏水冲洗叶片, 拍照。

1.3.3 可溶性糖 (Soluble sugar, SS)、可溶性蛋白 (Soluble protein, SP) 和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和质膜透性 (Relative electric conductivity, EC) 的测定 SS 糖含量测定采用硫酸蒽酮比色法^[14]。MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸比色法^[14]。SP 含量测定采用考马斯亮蓝法^[15]。质膜透性采用相对电导率测定法: 将多年生黑麦草幼苗的叶、根用去离子水清洗 3~5 次后, 置于去离子水中室温下浸泡 2 h, 测定溶液的电导率 (C_1), 之后沸水浴 30 min, 再次测定电导率 (C_2), 质膜透性用 (C_1/C_2) $\times 100\%$ 来表示。

1.3.4 酶活性、过氧化氢 (H_2O_2)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 含量和 GSH/GSSG 比率测定 按照南京建成生物工程研究所试剂盒说明进行, 分别精确称取多年生黑麦草叶和根 0.2 g, 在液氮下研磨成粉末, 加入提取液, 离心后取

上清液进行测定, $GSH/GSSG = GSH \text{ 含量}/GSSG \text{ 含量}$ 。

1.4 数据统计

利用 EXCEL 2016 对试验数据进行统计和作图, 用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析、Duncan's 多重比较和 Pearson 相关性 (双侧) 分析, 用大小写字母来分别表示根和叶在 0.05 水平上的差异。

2 结果与分析

2.1 Pb 含量和转运系数

如图 1 所示, 多年生黑麦草根 Pb 含量大于叶 Pb 含量。Pb 胁迫下, 叶和根 Pb 含量显著高于 CK ($P < 0.05$), 但转运系数显著低于 CK, 说明多年生黑麦草的根部可以吸收大量 Pb, 但向地上部转运的 Pb 量较少。Pb+GSH 处理下, 根和叶片的 Pb 含量和转运系数均显著高于 Pb 处理, Pb+BSO 处理下, 叶 Pb 含量和转运系数显著减少, 但根 Pb 含量显著增加。以上这些说明 GSH 不仅促进了多年生黑麦草根对 Pb 的吸收, 而且也能够提高对 Pb 的转运能力, 而 BSO 可以促进根部对 Pb 吸收, 但抑制了 Pb 向上转运。

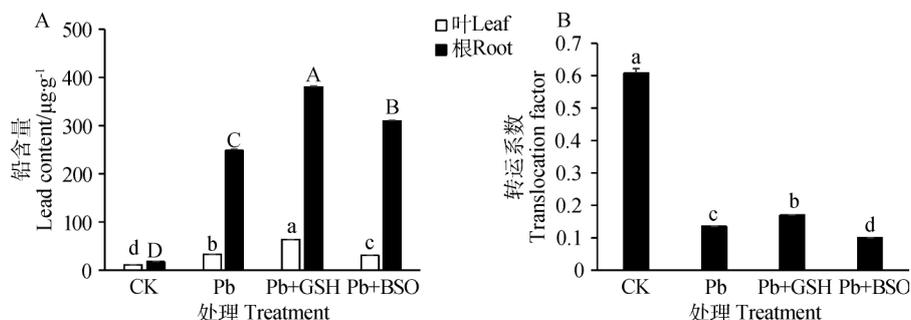


图 1 Pb, GSH 和 BSO 处理下多年生黑麦草幼苗 Pb 含量和转运系数

Fig. 1 The content of Pb and translocation factor in *Lolium perenne* seedlings induced by exogenous GSH and BSO under Pb stress
注: 图中不同小写字母表示叶处理间差异显著, 不同大写字母表示根处理间差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Note: Vertical bars marked with different lower-case letters indicate significant difference between treatments in leaf, and vertical bars marked with different upper-case letters indicate significant difference between treatments in root at the 0.05 level, the same as below

2.2 ROS 组织化学染色和 H_2O_2 含量

利用 DAB 用 NBT 对多年生黑麦草叶片进行染色, 如图 2 所示, Pb 胁迫下, H_2O_2 与 $O_2^{\cdot -}$ 叶片染色点比 CK 明显增多。与 Pb 处理相比, Pb+GSH 处理下, 叶片染色点都有所减少, 但 Pb+BSO 处理下的 $O_2^{\cdot -}$ 染色点明显增加, 而 H_2O_2 染色点变化不显著。 H_2O_2 含量与 H_2O_2 染色图表现出类似的变化趋势。总之, Pb 胁迫增加了多年生黑麦草 H_2O_2 与 $O_2^{\cdot -}$ 等 ROS 的生成量, GSH 可减少由 Pb 胁迫导致的 ROS 产生量, 而 BSO 可以增加 ROS 含量。

2.3 EC 和 MDA 的含量

如图 3 所示, 多年生黑麦草根 EC 值大于叶, 而 MDA 含量是叶大于根。Pb 胁迫下, 多年生黑麦草根和叶片中 EC 均显著高于对照 ($P < 0.05$)。与 Pb 处理比较, Pb+GSH 处理下根和叶片中 EC 显著下降, 而 Pb+BSO 处理下则显著升高 ($P < 0.05$)。MDA 含量变化规律与 EC 基本一致。结果表明, Pb 胁迫提高了多年生黑麦草膜的相对透性和膜脂的过氧化程度, GSH 可以减少膜透性和过氧化程度, 而 BSO 与 GSH 正好相反。

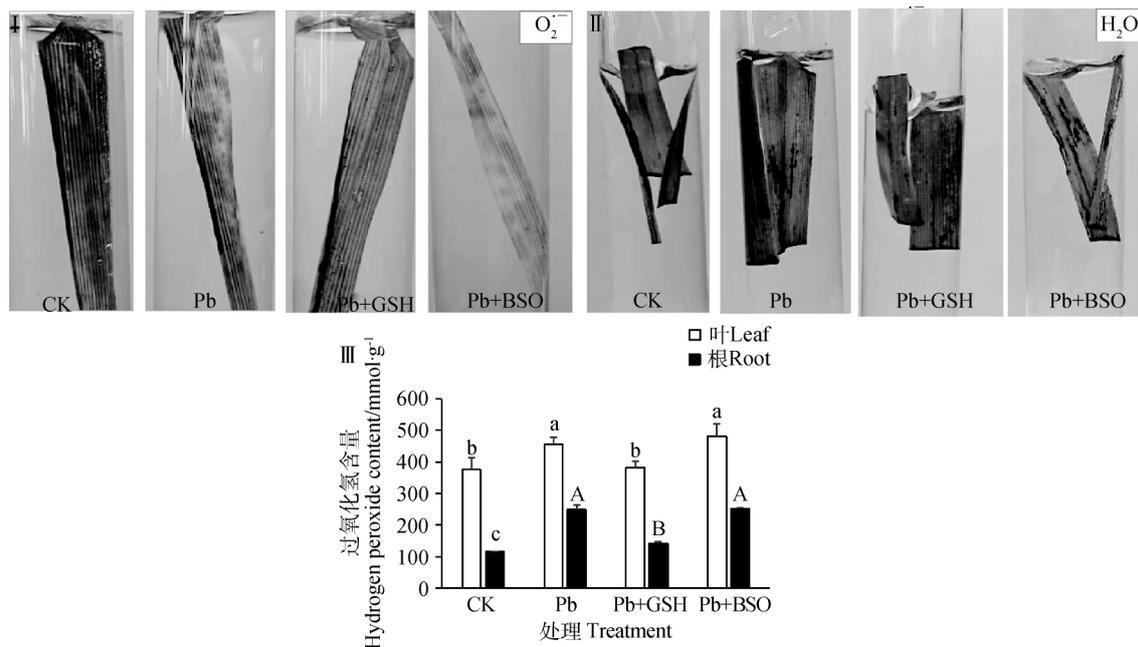


图 2 Pb, GSH 和 BSO 处理下多年生黑麦草幼苗 H₂O₂ DAB 染色、O₂⁻ NBT 染色和 H₂O₂ 含量
Fig. 2 DAB staining of H₂O₂, NBT staining of O₂⁻ and the content of H₂O₂ in *Lolium perenne* seedlings induced by exogenous GSH and BSO under Pb stress

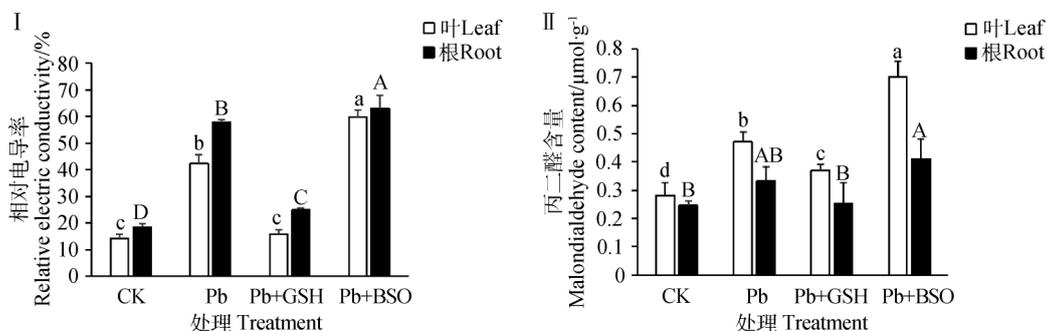


图 3 Pb, GSH 和 BSO 处理下多年生黑麦草幼苗 EC 和 MDA 含量

Fig. 3 Relative electric conductivity and malondialdehyde content in *Lolium perenne* seedlings induced by exogenous GSH and BSO under Pb stress

2.4 SS 和 SP 含量

渗透调节物质 SP 和 SS 等是植物抵御胁迫的重要物质^[16]。如图 4 所示,多年生黑麦草叶 SP 含量高于根。Pb 胁迫下,叶片中 SP 含量显著高于 CK ($P < 0.05$),根中的 SP 含量也高于 CK,但无显著差异。与 Pb 处理比较,Pb+GSH 和 Pb+BSO 处理叶片中 SP 含量均显著低于 Pb 处理 ($P < 0.05$),而根中 SP 含量变化不显著。多年生黑麦草叶的 SS 含量小于根的含量,叶和根的含量在 Pb、Pb+GSH 和 Pb+BSO 处理下变化趋势一致,在 Pb 胁迫下,显著高于 CK ($P < 0.05$),Pb+GSH 处理显著低于 Pb 处理,Pb+BSO 处理较 Pb 处理没有显著变化。结果表明,Pb 胁迫可提高多年生黑麦草根和叶中 SP 和 SS 渗透调节物质含量,外源 GSH 可

以减少 Pb 胁迫下叶片 SP 和 SS 积累量,BSO 对 Pb 胁迫下渗透调节物质影响较小。

2.5 SOD 和 GPX 活性

SOD 和 GPX 是 2 个重要的抗氧化酶,如图 5 所示,多年生黑麦草叶 SOD 活性大于根,Pb 胁迫下,根 SOD 活性的较 CK 显著降低 ($P < 0.05$),而叶 SOD 活性无显著变化。与 Pb 处理比较,Pb+GSH 处理下根和叶的 SOD 活性均显著升高 ($P < 0.05$)。Pb+BSO 处理下,较 Pb 处理叶 SOD 活性显著降低,而根 SOD 则显著增高。GPX 与 SOD 不同,活性是根大于叶,Pb 胁迫下的 GPX 活性显著高于 CK,Pb+GSH 处理下的活性高于 Pb 处理组。

Pb+BSO 处理下低于 Pb 处理组。说明了 Pb 胁迫可使多年生黑麦草 SOD 含量下降,GPX 含量升高,

外源 GSH 能够通过提高这两种酶的活性缓解 Pb 胁迫,BSO 则具有与 GSH 相反的效应。

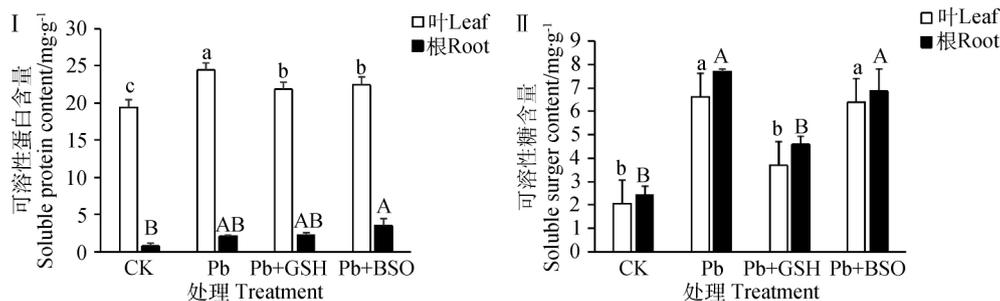


图 4 Pb,GSH 和 BSO 处理下多年生黑麦草幼苗 SS 和 SP 含量

Fig. 4 The content of soluble protein and soluble sugar in *Lolium perenne* seedlings induced by exogenous GSH and BSO under Pb stress

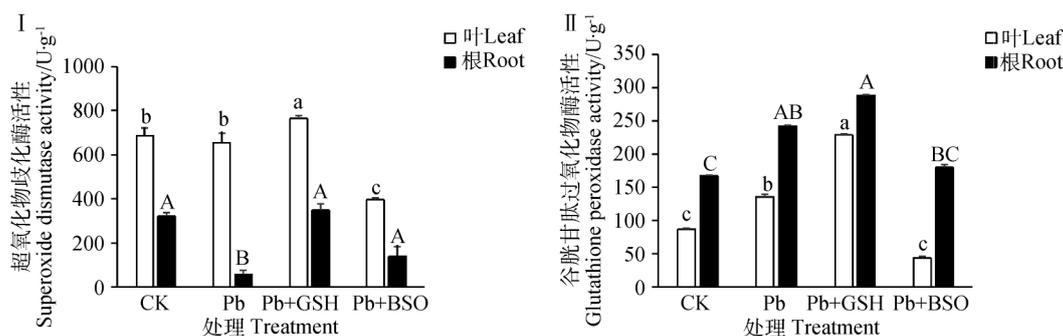


图 5 Pb,GSH 和 BSO 处理下多年生黑麦草幼苗 SOD 和 GPX 活性

Fig. 5 The activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in *Lolium perenne* seedlings induced by exogenous GSH and BSO under Pb stress

2.6 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶和谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase,GR) 活性

多年生黑麦草的 γ -GCS 活性是根大于叶。Pb 胁迫下, γ -GCS 的活性显著低于 CK, Pb + GSH 和 Pb + BSO 处理下, γ -GCS 活性均显著低于 Pb 处理 ($P < 0.05$)。GR 活性相反,是叶大于

根,Pb 胁迫下,根 GR 活性显著低于 CK。与 Pb 处理比较,Pb + GSH 处理下根和叶片 GR 活性显著升高,Pb + BSO 处理下则显著降低 ($P < 0.05$)。说明了 Pb 和 BSO 均能够降低 γ -GCS 和 GR 的活性,外源 GSH 能够提高 GR 活性,但降低了 γ -GCS 活性。

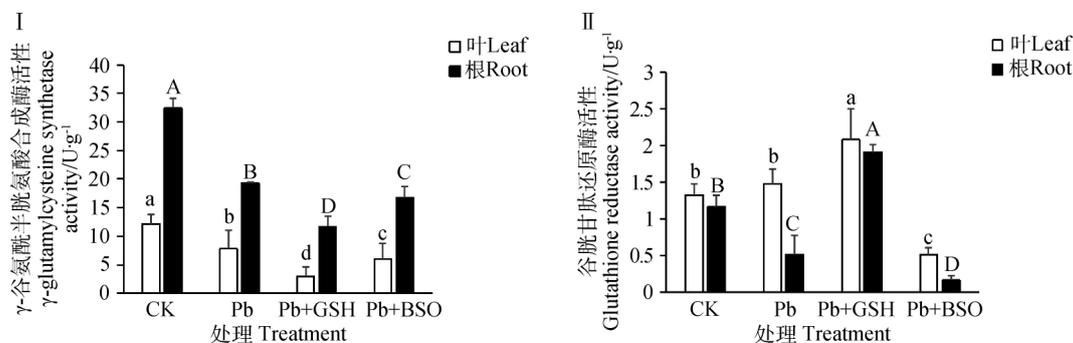


图 6 Pb,GSH 和 BSO 处理下多年生黑麦草幼苗 γ -GCS 和 GR 活性

Fig. 6 The activity of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione reductase in *Lolium perenne* seedlings induced by exogenous GSH and BSO under Pb stress

2.7 GSH,GSSG 含量和 GSH/GSSG 比率

图 7 显示,Pb 胁迫下,多年生黑麦草根和叶片

中 GSH 含量微量上调,根中 GSSG 含量微量下调,而叶中则微量上调,最终导致叶中 GSH/GSSG 微

量下调,而根中显著上调($P < 0.05$)。Pb+GSH 处理下,GSH,GSSG 含量和 GSH/GSSG 均显著高于 CK 和 Pb 处理组($P < 0.05$)。Pb+BSO 处理下,3 者均较 Pb 处理下调,但仅根中 GSH 含量差异达到

了显著水平。结果说明了 Pb 胁迫未对 GSH, GSSG 含量造成显著影响,外源 GSH 可提高 Pb 胁迫下多年生黑麦草 GSH 和 GSSG 含量和 GSH/GSSG,BSO 则相反。

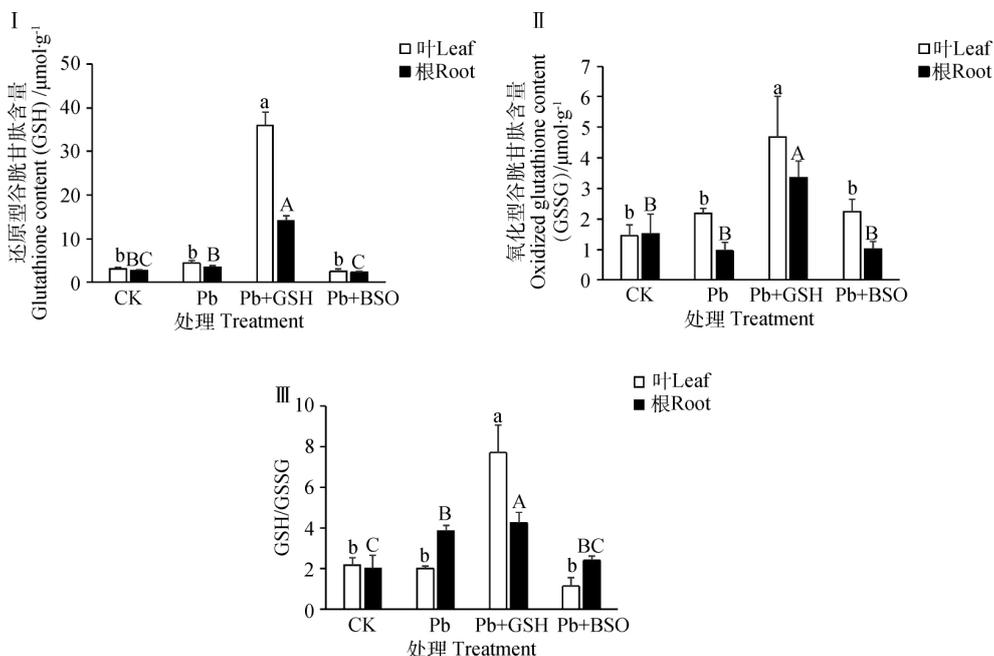


图 7 Pb,GSH 和 BSO 处理下多年生黑麦草幼苗 GSH,GSSG 含量和 GSH/GSSG

Fig. 7 The content of glutathione and oxidized glutathione, ratio of GSH to GSSG in *Lolium perenne* seedlings induced by exogenous GSH and BSO under Pb stress

2.8 GSH 含量与各指标相关性分析

Pearson 相关系数是衡量两组数据相关程度强弱的指标,统计学认为,相关系数越接近于 1 和-1,则相关程度越强,而相关系数越接近于 0,相关程度越弱。如表 1 显示,GSH 与各指标相关性在根和叶中表现出相似的规律。叶和根 GSH 与 Pb 含量分别呈极显著和显著正相关,说明 GSH 可提高多年生黑麦草吸收和转运重金属 Pb 的能力。GSH 与 SOD,GPX

酶活性呈极显著或显著正相关,而与 H₂O₂ 含量呈负相关,说明 GSH 可通过提高抗氧化相关酶活性,降低 ROS 产生量来缓解 Pb 胁迫。GSH 与 GSSG 和 GSH/GSSG 比值呈极显著或显著正相关,同时与 GR 活性呈极显著正相关,而与 γ -GCS 活性呈极显著或显著负相关,说明了 GSH 可以促进 GSSG 和 GSH 的相互转化,且处于不断变化的相对稳态,这种稳态可通过 GR 和 γ -GCS 等酶的活性变化进行调节。

表 1 多年生黑麦草幼苗 GSH 与各指标相关系数

Table 1 Correlation coefficients between GSH and various indicators in *Lolium perenne* seedlings

	还原型谷胱甘肽 GSH	铅 Pb	过氧化氢 H ₂ O ₂	相对电导率 EC	丙二醛 MDA	可溶性蛋白 SP	可溶性糖 SS	超氧化物歧化酶 SOD	谷胱甘肽过氧化物酶 GPX	谷胱甘肽还原酶 GR	γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 γ -GCS	还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽 GSH/GSSG	氧化型谷胱甘肽 GSSG
叶还原型谷胱甘肽 GSH in leaf	1	0.894**	-0.463	-0.519	-0.320	-0.094	-0.261	0.596*	0.744**	0.877**	-0.712**	0.927**	0.863**
根还原型谷胱甘肽 GSH in root	1	0.595*	-0.430	-0.464	-0.461	0.029	-0.096	0.574*	0.776*	0.825**	-0.612*	0.604*	0.912**

注:**表示极显著相关($P < 0.01$),*表示显著相关($P < 0.05$)

Note:** indicates extremely significant correlation at the 0.01 level,* indicates significant correlation at the 0.05 level

3 讨论

环境中的重金属可以进入植物体内并累积^[17-18],还会导致植物产生过量的 ROS,使膜脂过氧化水平加剧、稳定性下降,细胞内物质大量外渗^[19],也可诱导渗透调节物质产生^[20],调控抗氧化酶活性和抗氧化剂含量^[21-22]。本研究结果与前人一致,Pb胁迫能使多年生黑麦草 Pb, H₂O₂, MDA, SS, SP 和 GSH 含量增加,EC 值增大,叶片 ROS 染色点增多,还能够提高 GPX 活性,抑制 SOD 和 γ -GCS 活性,这表明 Pb 胁迫能够导致多年生黑麦草 Pb 的累积、氧化损伤和代谢异常。

GSH 作为一种抗氧化剂和重金属螯合剂的合成前体,在植物重金属吸收转运及抗氧化调控方面发挥着重要的作用^[23-24]。叶面施用的 GSH 可由筛管传输到根部,促进根部对重金属的吸收和转运,吸收和转运能力与 GSH 含量显著正相关^[24-26]。本研究中,叶面喷施 GSH 后的多年生黑麦草叶和根中 Pb 含量显著增高,相关系数分别为 0.894 和 0.595,而且转运系数也显著增加,这说明了 GSH 能够促进多年生黑麦草对 Pb 吸收和转运。有研究表明,BSO 能够增加油菜 (*Brassica napus*) 茎叶镉含量、降低根中镉含量,还有研究表明 BSO 能够降低玉米 (*Zea mays*) 根砷含量但对茎叶砷含量没有影响^[28],本研究与前人研究结果有所不同,BSO 处理后多年生黑麦草根中 Pb 增加,叶中却减少,这可能是植物种类、重金属种类和施用方式不同导致的。

GSH 能够降低重金属 Pb 和镉胁迫下植物 MDA 含量、EC 值、O₂⁻ 的产生速率以及 H₂O₂ 的累积量^[29-30]。本研究结果与前人类似,Pb 处理下多年生黑麦草叶面喷施 GSH 后,根和叶 MDA, H₂O₂ 和 EC 都降低,叶片 H₂O₂ 与 O₂⁻ 染色点减少,说明了 GSH 可清除多年生黑麦草 ROS,缓解 Pb 的毒害。喷施 BSO 后,多年生黑麦草 H₂O₂ 和 O₂⁻ 等 ROS 积累量增多,MDA 和 EC 增高,表明了 GSH 缺乏会导致 Pb 胁迫加剧。

SOD 和 GPX 可以清除机体内的 O₂⁻, H₂O₂, 有机氢过氧化物及脂质过氧化物,阻断 ROS 对机体的损伤^[31-33]。本研究中,GSH 处理后多年生黑麦草根和叶 SOD 和 GPX 活性增高,与刘传平^[34] 和 Hasanuzzaman^[3] 的研究结果一致,进一步证明了外源 GSH 具有提高抗氧化酶活性和抗氧化能力的作用。逆境胁迫下 BSO 能够降低 GPX 活性^[10],同样,BSO 处理下多年生黑麦草 GPX 下降。BSO 能增加逆境

胁迫下植物叶片 SOD 活性^[12],多年生黑麦草结果与其有差异,BSO 处理后叶中 SOD 显著降低,但是根中 SOD 显著增高,原因有待进一步研究。

植物能够通过细胞调节维持内外 GSH 的平衡,因此外施 GSH 会使内源 GSH 的增加。内源 GSH 的增加对 γ -GCS 活性存在抑制作用^[23],但能够提高 GR 的活性^[30],使 GSH/GSSG 保持较高的水平^[35]。与之相似,叶面施用 GSH 显著提高了多年生黑麦草内源 GSH 含量、GR 活性和 GSH/GSSG 比值,与此同时也抑制了 γ -GCS 活性。GSH/GSSG 提高意味着还原力水平提高,ROS 清除能力提升,抗逆性增加。本研究使用 BSO 处理多年生黑麦草后, γ -GCS 和 GR 的活性下降,GSH 含量减少,GSH/GSSG 比值下降,这与前人的研究结果一致^[9-10,12],也从相反的角度证实了 GSH 的功效。

4 结论

多年生黑麦草叶面喷施外源 GSH 能够改变 GR 和 γ -GCS 的活性、增加内源 GSH 含量、提高 GSH/GSSG 的比率、提高抗氧化酶 SOD 和 GPX 的活性、降低由于 Pb 胁迫导致增加的 ROS 和 MDA 含量、增加膜透性、促进植株对 Pb 的吸收和转运;而 GSH 合成抑制剂 BSO 对 Pb 胁迫多年生黑麦草的作用与 GSH 相反。综上所述,GSH 通过提高 SOD 和 GPX 等抗氧化酶活性、促进 GSSG 和 GSH 的相互转化、降低 ROS 产生量及膜质过氧化程度,提高植物抵抗逆境胁迫的能力。

参考文献

- [1] 原海燕,郭智,佟海英,等. Pb胁迫下外源GSH对马蔺体内Pb积累和非蛋白巯基化合物含量的影响[J]. 水土保持学报, 2013,27(4):212-216
- [2] Wahsha M, Bini C, Fontana S, et al. Toxicity assessment of contaminated soils from a mining area in Northeast Italy by using lipid peroxidation assay[J]. Journal of Geochemical Exploration, 2012(113):112-117
- [3] Hasanuzzaman M, Nahar K, Rahman A, et al. Exogenous glutathione attenuates lead-induced oxidative stress in wheat by improving antioxidant defense and physiological mechanisms [J]. Journal of Plant Interactions, 2018, 13(1):203-212
- [4] 王日明,王志强,向佐湘. 外源 γ -氨基丁酸对高温胁迫下黑麦草抗氧化防御系统及激素代谢的影响[J]. 草业科学, 2019, 36(1):111-122
- [5] 华春,王仁雷,刘友良. 外源 GSH 对盐胁迫下水稻叶绿体活性氧清除系统的影响[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29

- (5):415-420
- [6] 闫慧芳,毛培胜,夏方山. 植物抗氧化剂谷胱甘肽研究进展[J]. 草地学报,2013,21(3):428-434
- [7] Anjum N A,Ahmad I,Mohmood I,*et al.* Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—A review[J]. *Environmental and Experimental Botany*,2012(75):307-324
- [8] 赵娟,施国新,徐勤松,等. 外源谷胱甘肽(GSH)对水鳖 Zn²⁺毒害的缓解作用[J]. 热带亚热带植物学报,2006(3):213-217
- [9] Griffith O W,Meister A. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine) [J]. *Journal of Biological Chemistry*,1979,254(16):7558-7560
- [10] Mariana E,Dario F,Elizabeth A,*et al.* Glutathione,a key compound for As accumulation and tolerance in soybean plants treated with AsV and AsIII[J]. *Environmental and Experimental Botany*,2019(162):272-282
- [11] 刘俊祥,孙振元,勾萍,等. 镉胁迫下多年生黑麦草的光合生理响应[J]. 草业学报,2012,21(3):191-197
- [12] 周艳,刘慧英,邓嘉欣,等. GSH/GSSG 对盐胁迫下番茄幼苗谷胱甘肽化修饰和抗氧化系统的影响[J/OL]. 分子植物育种,2020-05-28/2020-07-07
- [13] Doke N,Ohashi Y. Involvement of an O₂⁻ generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*,1988,32(1):163-175
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:194-197,260-261
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Biochemistry*,1976,72(1-2):248-254
- [16] 陈晶晶,王英哲,金艳,等. 铅胁迫对 14 个紫花苜蓿杂交组合生理生化指标的影响[J]. 草地学报,2018,26(5):1277-1282
- [17] Wang H H,Shan X Q,Wen B,*et al.* Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and the relevant antioxidant response[J]. *Environmental and Experimental Botany*,2007,61(3):246-253
- [18] Pourrut B,Perchet G,Silvestre J, *et al.* Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots[J]. *Journal of Plant Physiology*,2008,165(6):571-579
- [19] 付晴晴,谭雅中,翟衡,等. NaCl 胁迫对耐盐性不同葡萄株系叶片活性氧代谢及清除系统的影响[J]. 园艺学报,2018,45(1):30-40
- [20] 毛雪飞,杨洁. 锌镉胁迫下 4 种农田杂草生理生化特性及对重金属的累积特征[J]. 西南林业大学学报(自然科学),2019,39(6):9-18
- [21] 刘霄霏,李惠英,陈良,等. 外源硒对镉胁迫下黑麦草生长和生理的影响[J]. 草地学报,2020,28(1):72-79
- [22] 丁继军,刘柿良,潘远智,等. 外源 AsA、GSH 对 Cd 胁迫下石竹幼苗生长的影响[J]. 应用生态学报,2014,25(2):419-426
- [23] 段喜华,唐中华,郭晓瑞. 植物谷胱甘肽的生物合成及其生物学功能[J]. 植物研究,2010,30(1):98-105
- [24] Yuan H Y,Guo Z,Liu Q Q,*et al.* Exogenous glutathione increased lead uptake and accumulation in *Iris lactea* var. *chinensis* exposed to excess lead[J]. *International Journal of Phytoremediation*,2018,20(11):1136-1143
- [25] Nakamura S,Wongkaew A,Nakai Y,*et al.* Foliar-applied glutathione activates zinc transport from roots to shoots in oilseed rape[J]. *Plant Science*,2018(283):424-434
- [26] John L F,Michael W P,Ken N,*et al.* Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in thlaspi nickel hyperaccumulators[J]. *The Plant Cell*,2004,16(8):2176-2191
- [27] Nakamura S I,Suzui N,Ito-Tanabata S, *et al.* Application of glutathione and dithiothreitol to oil seed rape (*Brassica napus* L.) roots affects cadmium distribution in roots and inhibits Cd translocation to shoots[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*,2016,62(4):379-385
- [28] Requejo R,Tena M. Influence of glutathione chemical effectors in the response of maize to arsenic exposure[J]. *Journal of Plant Physiology*,2012,169(7):649-656
- [29] Khan M,Daud M K,asharat A, *et al.* Alleviation of lead-induced physiological,metabolic and ultramorphological changes in leaves of upland cotton through glutathione[J]. *Environmental Science and Pollution Research*,2016,23(9):8431-8440
- [30] 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
- [31] 李西,吴亚娇,孙凌霞. 铅胁迫对三种暖季型草坪草生长和生理特性的影响[J]. 草业学报,2014,23(4):171-180
- [32] Mittler R. Oxidative stress,antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends in Plant Science*,2002,7(9):405-410
- [33] Margis R,Dunand C,Teixeira F K, *et al.* Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview[J]. *Febs Journal*,2008,275(15):3959-3970
- [34] 刘传平,郑爱珍,田娜,等. 外源 GSH 对青菜和大白菜镉毒害的缓解作用[J]. 南京农业大学学报,2004,27(4):26-30
- [35] 丁顺华,陈珊,卢从明. 植物叶绿体谷胱甘肽还原酶的功能研究进展[J]. 植物生理学报,2016,52(11):1703-1709

(责任编辑 闵芝智)