

DOI: 10.5846/stxb201312022863

胡拥军, 王海娟, 王宏斌, 杨晓燕, 李燕燕, 殷飞. 砷胁迫下不同砷富集能力植物内源生长素与抗氧化酶的关系. 生态学报, 2015, 35(10): 3214-3224.

Hu Y J, Wang H J, Wang H B, Yang X Y, Li Y Y, Yin F. The relationship between endogenous auxin and antioxidative enzymes in two plants with different arsenic-accumulative ability under arsenic stress. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(10): 3214-3224.

砷胁迫下不同砷富集能力植物内源生长素与抗氧化酶的关系

胡拥军, 王海娟, 王宏斌*, 杨晓燕, 李燕燕, 殷 飞

昆明理工大学环境科学与工程学院, 昆明 650500

摘要: 采用室内土培法, 研究了砷胁迫 (0, 50, 100 和 200 mg/kg) 对凤尾蕨属中砷超富集植物大叶井口边草 (*Pteris cretica* var. *nervosa*) 和非砷超富集植物剑叶凤尾蕨 (*Pteris ensiformis*) 生物量、株高、叶片内源 3-吲哚乙酸 (IAA) 含量、IAA 氧化酶 (IAAO) 活性、砷含量、抗氧化酶 (超氧化物歧化酶 SOD、过氧化物酶 POD、过氧化氢酶 CAT) 活性以及细胞膜脂过氧化产物丙二醛 (MDA) 含量的影响, 并用逐步回归法分析了 IAA 含量与砷含量、抗氧化酶活性、MDA 含量之间的关系。此外, 研究了 100 mg/kg 砷处理下 IAA、IAAO、3 种抗氧化酶和 MDA 的时间动态。结果表明, 与对照 (不加砷) 相比, 加砷处理下大叶井口边草的株高和生物量未出现显著变化, 但剑叶凤尾蕨在中、高浓度砷胁迫下则显著降低; 中、高浓度砷胁迫均使 2 种植物叶片含砷量、IAA 含量显著增加和 IAAO 活性显著下降, 但这种改变在大叶井口边草中更为显著; 加砷处理使大叶井口边草叶片 3 种抗氧化酶活性维持或增加, 剑叶凤尾蕨中 SOD 和 CAT 活性虽能维持, 但 POD 活性则显著下降, 说明砷胁迫下大叶井口边草具有更强的抗氧化能力。逐步回归分析结果显示, 2 种植物叶片 IAA 含量均与砷含量成正相关, 但在大叶井口边草中, IAA 含量还与 CAT 活性成正相关。时间动态研究表明, 第 13 天, 大叶井口边草具有最高的 IAA 含量、最低的 IAAO 活性以及最低的 CAT 活性, 而剑叶凤尾蕨中的变化规律则不明显。因此, 叶片保持较高的 IAA 含量、较低的 IAAO 和 CAT 活性有助于大叶井口边草超量富集砷。

关键词: 生长素; 3-吲哚乙酸 (IAA); 砷; 抗氧化酶; 大叶井口边草; 剑叶凤尾蕨

The relationship between endogenous auxin and antioxidative enzymes in two plants with different arsenic-accumulative ability under arsenic stress

HU Yongjun, WANG Haijuan, WANG Hongbin*, YANG Xiaoyan, LI Yanyan, YIN Fei

Faculty of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: Up to now, 11 arsenic hyperaccumulators and 4 non-hyperaccumulators in *Pteris* genus have been reported. The non-hyperaccumulators could be used as controls to reveal the responsive mechanisms of hyperaccumulators to arsenic pollution. Auxin plays an important role in plant cell growth, differentiation and division. In the present research, one arsenic hyperaccumulator (*Pteris cretica* var. *nervosa*) and one non-hyperaccumulator (*Pteris ensiformis*) were selected from *Pteris* genus to evaluate the effects of arsenic stress (0, 50, 100 and 200 mg/kg) on the plant biomass, height, frond indole-3-acetic acid (IAA) contents, arsenic accumulation, the activities of IAA oxidase and antioxidative enzymes (superoxide dismutase SOD, peroxidase POD and catalase CAT), as well as the content of malondialdehyde (MDA, a peroxidation product of cell membrane lipid) using a pot experiment. The relationship among the contents of IAA, arsenic

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31360132); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目 (2012HB007)

收稿日期: 2013-12-02; **网络出版日期:** 2014-08-13

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: whb1974@126.com

concentration, activities of 3 antioxidative enzymes and MDA contents in the fronds of two plants were also analyzed by step regression statistical method. In addition, the variation of IAA, IAAO, SOD, POD, CAT and MDA in two plants exposed to 100 mg/kg arsenic with culture time was examined. No significant difference was observed in the biomass and height of *P. cretica* var. *nervosa* under arsenic stress compared to the control (0 mg/kg), but a significant decrease was noted in *P. ensiformis* under medium or high arsenic stress. The concentrations of arsenic and IAA increased but the activity of IAAO decreased in the fronds of two plants exposed to medium or high arsenic stress, but this change was more significant in *P. cretica* var. *nervosa*. The activities of 3 antioxidative enzymes could maintain or increase in the fronds of *P. cretica* var. *nervosa* exposed to arsenic stress, but a significant decrease of POD was observed in *P. ensiformis*, in which the activities of SOD and CAT could maintain. Therefore, much stronger antioxidative ability was shown in *P. cretica* var. *nervosa* exposed to arsenic stress. The results from step regression analysis showed a significantly positive correlation between the IAA contents and arsenic concentrations in the fronds of two plants, and a significantly negative correlation was also observed between the IAA contents and CAT activities in the fronds of *P. cretica* var. *nervosa*. The result from time-course effect research showed that the highest IAA contents, the lowest IAAO and CAT activity were found in the 13th days in the culture process of *P. cretica* var. *nervosa* exposed to 100 mg/kg, but similar result was not observed for *P. ensiformis*. Therefore, a higher IAA contents, a lower IAAO and CAT activities may have contributed to arsenic hyperaccumulation in *P. cretica* var. *nervosa*.

Key Words: auxin; indole- 3-acetic acid (IAA); arsenic; antioxidative enzymes; *Pteris cretica* var. *nervosa*; *Pteris ensiformis*

自 Ma 等^[1]、Chen 等^[2]发现凤尾蕨属植物蜈蚣草(*Pteris vittata*)能超富集砷以来,人们开始利用超富集植物去除土壤和水体中的砷,同时,围绕蜈蚣草开展了很多该植物超富集砷的机理研究。目前国际公认砷超富集植物有 12 种,其中 11 种为凤尾蕨属植物,另 1 种为裸子蕨科粉叶蕨属植物^[3]。因此,砷超富集植物主要来源于凤尾蕨属。但是,并非凤尾蕨属植物都能超富集砷,人们也发现了几种不能超富集砷的凤尾蕨属植物,如 *Pteris straminea*、*Pteris tremula*^[4]、剑叶凤尾蕨(*Pteris ensiformis*)^[5]、半边旗(*Pteris semipinnata*)^[6]等。同属中不同砷富集能力植物为比较生理学的研究提供了极好材料,国内外有很多研究者运用凤尾蕨属中不同砷富集能力植物作为供试材料,比较研究了两类植物在砷吸收、转运、耐性^[7-8]和根际特征^[9]等方面的差异。

在理论上研究植物超富集砷机理、在实践中注重提高植物砷富集量的同时,有一个不容忽视的问题是植物支撑其超富集砷的物质基础研究。维持较好的生长状况和高生物量是实现植物修复技术产业化的重要前提和基础,而植物激素在其中起重要作用。植物激素在植物体内的含量虽然十分微量,但其在植物生长发育和逆境生理研究中却占据着重要地位。长期以来,对脱落酸和乙烯的抗逆机理研究甚多,但近年来,生长素和细胞分裂素在植物抗逆研究中的作用和机理也备受关注。这两类激素不同于其他植物激素的一个重要方面是:它们是植物存活所必需的。尽管其他植物激素可以作为调节植物某些特殊生长发育过程的开关,但是植物自始至终都需要一定量的生长素和细胞分裂素。在超富集植物中,这两类激素的水平直接影响到植物的生长发育状况和生物量。

在重金属胁迫下,外源添加生长素对植物重金属吸收和生理生化的影响,目前已有一些报道。LÓpez 等^[10]通过添加 100 $\mu\text{mol/L}$ IAA(吲哚乙酸, indole-3-acetic acid)+0.2 mmol/L EDTA(乙二胺四乙酸, ethylene diamine tetraacetic acid),使非超富集植物紫花苜蓿(*Medicago sativa*)叶片对铅的富集量增加了 28 倍;都瑞军^[11]对锌/镉超富集植物滇苦菜(*Picris divaricata* Vant.)的研究表明,经 100 $\mu\text{mol/L}$ IAA 处理,其叶片铅富集量上升了 46.5%;Liu 等^[12]在 200 $\mu\text{mol/L}$ 的含铅培养液中添加 100 $\mu\text{mol/L}$ IAA 后,在铅富集植物东南景天(*Sedum alfredii*)的 2 种生态型中,地上部铅含量显著增加,但对根富集 Pb 无显著影响;对豆科植物 *Sesbania drummondii* 的研究表明,添加 100 $\mu\text{mol/L}$ IAA 或 100 $\mu\text{mol/L}$ NAA(萘乙酸, 1-naphthleic acid)后,植物地上部 Pb 富集量分别增加了 654% 和 415%^[13]。Piotrowska-Niczypruk 等^[14]研究了外源添加的生长素、细胞分裂

素、赤霉素、茉莉酮酸和多胺对镉、铜、铅单一胁迫下一种绿藻 (*Chlorella vulgaris*) 生长和新陈代谢的影响,发现除茉莉酮酸使重金属吸收增加外,外源添加的几种植物激素减缓了金属离子的毒性。从已有的研究看,通过外源添加植物生长调节剂的研究偏多,比较超富集与非超富集植物内源生长素含量水平的研究尚少,目前尚缺少这两类植物内源激素水平是否存在差异的报道。

此外,过量的金属(包括重金属和一些过量营养元素)会诱导植物体内的活性氧水平提高,活性氧所导致的氧胁迫不利于植物的生长和产量^[15-17]。研究表明,植物已经发展了一套独特的防御策略来应对包括重金属污染等一系列非生物逆境下产生的活性氧,其中就包括抗氧化剂和抗氧化酶,如过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化酶(glutathione peroxidase, GPOX)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)、脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)、单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)、抗坏血酸氧化酶(ascorbic acid oxidase, APOX)等,可以大量清除活性氧^[18],主要包括有 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、 $K^{\cdot} \cdot O_2$ 等^[19]。Elobeid 和 Polle^[20] 的研究表明,镉诱导了植物细胞活性氧自由基(reactive oxide species, ROS)的生成,激发了生长素氧化酶的活性,进而导致生长素降解增强,有可能降低了与生长过程有关的许多基因的活性。目前砷超富集植物与非砷超富集植物中抗氧化酶活性的变化已有很多报道,但据我们所知,这两类植物内源激素含量与抗氧化酶活性变化之间的关系研究尚少。

本研究通过室内土培实验,研究砷超富集植物大叶井口边草 (*Pteris cretica* var. *nervosa*) 和非砷超富集植物剑叶凤尾蕨 (*P. ensiformis*) 在不同浓度砷胁迫下叶片中吲哚乙酸 (IAA) 含量、IAA 氧化酶 (indole-3-acetic acid oxidase, IAAO) 和几种抗氧化酶活性的变化,以及中等砷浓度 (100 mg/kg) 胁迫下 IAA、IAAO 和抗氧化系统的时间动态,结合逐步回归法揭示砷胁迫下两种植物叶片内源生长素 (IAA) 的含量与抗氧化酶活性的关系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤:将昆明理工大学呈贡校区梨园土风干过 5 mm 筛,取 1/2 梨园土、1/4 河沙、1/4 腐殖土进行充分混匀,并加入 N、P、K 营养元素作基肥 ($N:P_2O_5:K_2O=0.15:0.10:0.15$ g/kg 土,干重)。供试土壤的基本理化性质见表 1。

表 1 供试土壤的基本理化性质

Table 1 Basic physio-chemical characteristics of soil used ($n=3$)

pH	有机质 Organic matter/ (g/kg)	全 N Total nitrogen/ (g/kg)	全 P Total phosphorus/ (g/kg)	速效钾 Available potassium/ (g/kg)	重金属含量 Concentrations of heavy metals/(mg/kg)				
					Pb	Zn	Cu	Cd	As
7.63±0.1	42.46±2.81	1.54±0.47	2.1±0.43	0.71±0.09	0.68±0.03	9.01±1.2	34.7±3.81	—	—

—: 未检出; 表中数值以平均值±标准差表示

供试植物:砷超富集植物大叶井口边草 (*P. cretica* var. *nervosa*) 和非砷超富集植物剑叶凤尾蕨 (*P. ensiformis*) 初生小苗分别采自昆明理工大学校园和云南省红河州河口县附近橡胶林中。带回温室后进行修剪并于清洁土壤中适应性培养 2 个月,选取长势良好、大小一致的幼苗植株 (8—9 cm 高、带 7—8 片小叶) 进行盆栽试验。

1.2 实验设计

在供试土壤中进行加砷处理,分别添加 0、50、100 和 200 mg/kg 4 个浓度 (以 $Na_3AsO_4 \cdot 12H_2O$ 形式加入,砷浓度以纯砷计),平衡 6 周后装盆 (每盆 1 kg),每个处理重复 3 次。另外分别取 6 个大盆 (每盆装添加了 100 mg/kg 砷土壤 20 kg) 分为 2 组,分别种植 2 种植物,进行 2 种植物相关指标的时间动态测定 (从第 1 天开

始,每 7d 取 1 次样,直到第 49 天)。2 种植物培养 49d 后收获,先用自来水清洗,再用 1% 盐酸浸泡 10 min 以去除植物表面附着砷,最后用自来水和蒸馏水反复冲洗,用滤纸吸干植物表面水分,装入自封袋,放入冰箱在 -18°C 保存备用。另取一部分植物于烘箱 105°C 杀青 30 min,在 70°C 下烘干至恒重,磨碎混匀,称取 0.2 g 左右样品,用 $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ 在 130°C 下加热消化,经过滤、定容后测定植物砷含量。

1.3 测定方法

植物砷含量测定参照马丽等^[21]的原子荧光法(北京瑞利仪器有限公司,AF-610D);IAA 氧化酶(IAAO)测定采用张志良^[22]分光光度法;叶片内源 IAA 测定采用王若仲等^[23]、Liu 等^[24]的方法并加以修改:采集 2 种植物叶片立即放入液氮中,称取鲜样 2 g,用 80% 甲醇(10 mL/g FW,FW 表示鲜重)研磨成匀浆(加入少量 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚,避免光照), 4°C 下浸提过夜,经 4°C 下高速离心(10000 r/min,20 min),残渣用 5 mL g^{-1} 80% 甲醇洗提两次,合并上清液, 40°C 减压浓缩后经聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVPP)、二乙基氨基乙基交联葡聚糖凝胶(diethyl amino ethyl sephadex gel, DEAE)和 Sep-Pak C18 小柱等进行固相萃取,再经 50% 甲醇洗脱、流动相定容后上高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)分析(美国安捷伦科技有限公司,1200 系列)。HPLC 条件:色谱柱为反相液相 C_{18} 色谱柱($5\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\times 250\text{ mm}$),流动相为甲醇-1% 乙酸=40:60(体积分数)溶液,柱温为 45°C ,流速为 0.6 mL/min,紫外检测波长 268 nm。

1.4 数据处理

实验数据用 SAS 9.2 软件进行单因素或双因素方差分析,并用 Tukey's HSD 法进行多重比较。显著性差异水平 P 取 0.05,极显著差异水平 P 取 0.01。用 Origin 8.0 软件进行作图,SPSS 14.0 软件对数据进行多元逐步回归分析。

2 结果与分析

2.1 砷胁迫对植物生长的影响

在不同浓度砷胁迫下,砷超富集植物大叶井口边草的生物量与对照(0 mg/kg)相比无显著变化;非砷超富集植物剑叶凤尾蕨的生物量在低、中砷浓度处理下与对照相比无显著差异($P>0.05$),但在高砷浓度处理下则显著降低($P<0.05$)(图 1)。

砷胁迫下大叶井口边草的株高与对照相比差异不显著。剑叶凤尾蕨在中、高浓度砷胁迫下株高与对照相比显著下降,低砷浓度下则与对照无显著差异。双因素方差分析结果显示,2 种植物之间、砷处理浓度之间对植物的生物量和株高均有极显著影响($P<0.01$),两者交互作用对株高具有极显著影响(图 1)。

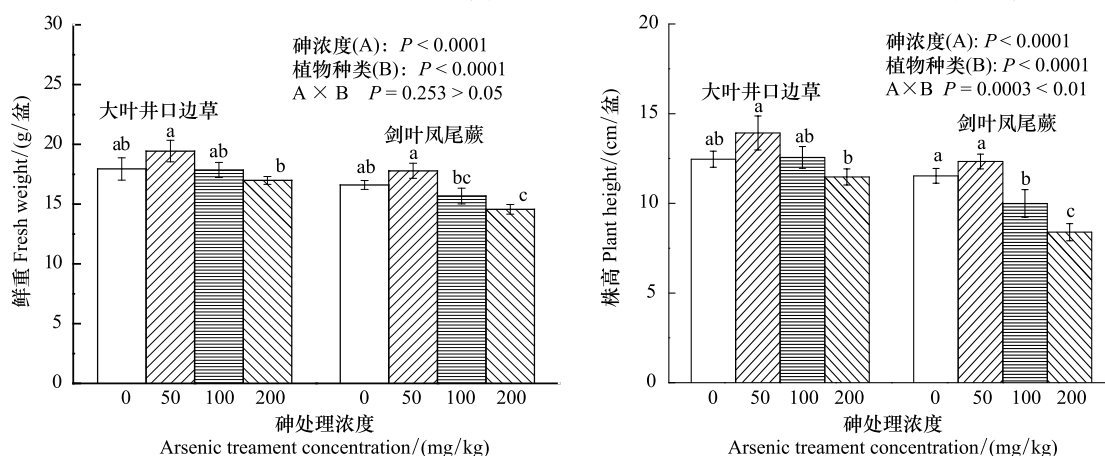


图 1 砷胁迫对植物生物量和株高的影响

Fig.1 Effect of arsenic stress on plant biomass and height

图中字母表示同一植物在不同砷处理浓度之间的差异,字母相同表示差异不显著($P>0.05$),字母不同则表示差异显著($P<0.05$)

2.2 砷胁迫下植物叶片对砷的吸收

从图 2 可知,培养结束时(49d)2 种植物叶片中砷含量与对照相比均显著增加,但大叶井口边草比剑叶凤尾蕨增加显著。在 200 mg/kg 处理下,大叶井口边草叶片含砷量达 (324.45 ± 8.47) mg/kg,而剑叶凤尾蕨中只有 (49.17 ± 4.99) mg/kg。双因素方差分析结果表明,2 种植物之间、砷处理浓度之间以及两者交互作用对植物叶片砷含量具有极显著差异。

2.3 砷胁迫对植物体内吲哚乙酸(IAA)含量的影响

2 种植物之间、砷处理浓度之间以及两者交互作用对植物叶片 IAA 含量具有极显著差异。随着砷处理浓度的增加,除 50 mg/kg 砷处理下 2 种植物叶片中 IAA 含量与对照相比均无显著差异外,100 和 200 mg/kg 砷浓度处理均使 IAA 含量显著增加,但大叶井口边草比剑叶凤尾蕨增加显著,两者达到极显著差异水平(图 3)。

图 3 显示添加 100 mg/kg 砷后两种植物叶片中 IAA 含量随时间的动态变化。大叶井口边草在培养 13 天时叶片中 IAA 含量达到最高,之后有所下降,但在第 43 天时又达到第 2 个高峰;剑叶凤尾蕨在培养过程中叶片 IAA 含量总体呈上升趋势,但整体含量水平较大叶井口边草低。双因素方差分析结果表明,2 种植物之间、培养时间之间以及两者交互作用对植物叶片中 IAA 含量具有极显著差异。

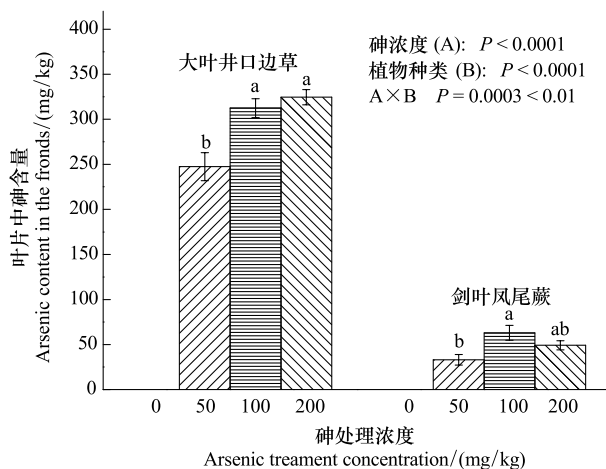


图 2 砷胁迫下植物叶片的砷含量

Fig. 2 Arsenic concentrations in the fronds of plants under arsenic stress

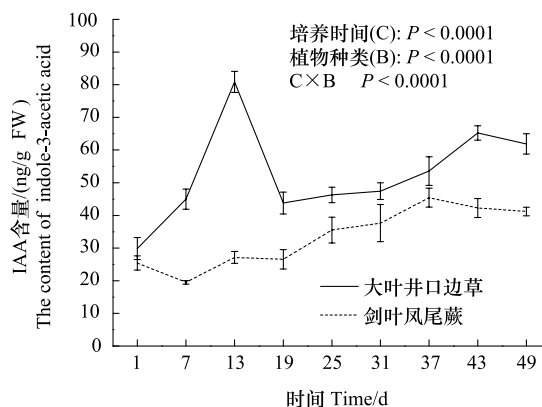
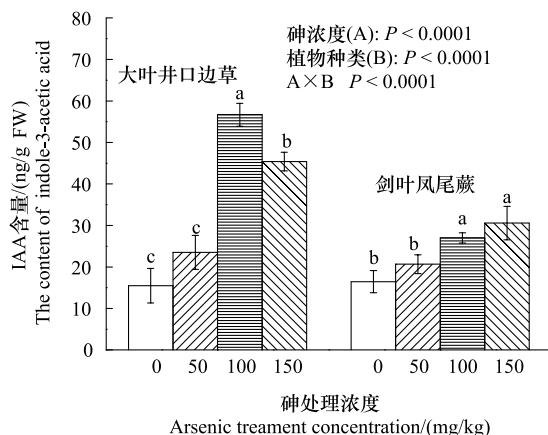


图 3 砷胁迫下植物叶片中吲哚乙酸(IAA)含量和 100 mg/kg 处理下的时间动态

Fig. 3 Indole-3-acetic acid(IAA) contents in the fronds of plants under arsenic stress and its time-course effect in 100 mg/kg treatment

2.4 砷胁迫对植物体内 IAA 氧化酶(IAAO)活性的影响

从图 4 可知,低浓度砷(50 mg/kg)胁迫下 2 种植物叶片中的 IAAO 活性与对照相比无显著差异,但在中、高浓度砷胁迫下均较各自的对照有显著降低,但在大叶井口边草中降低更为显著。双因素方差分析结果表明,2 种植物之间、砷处理浓度之间以及两者交互作用对植物叶片 IAAO 含量具有极显著差异。

图 4 显示添加 100 mg/kg 砷后两种植物叶片中 IAAO 活性随时间的动态变化。随着培养时间的延长,大叶井口边草在培养 13d 时,IAAO 活性显著降低,在第 3 周左右又恢复到原来活性,之后总体呈下降趋势;剑叶凤尾蕨除了在培养 37d 时有短暂显著降低外,总体上活性保持在较高水平。双因素方差分析结果表明,2 种植物之间、培养时间之间以及两者交互作用对植物叶片 IAAO 活性均具有极显著差异。

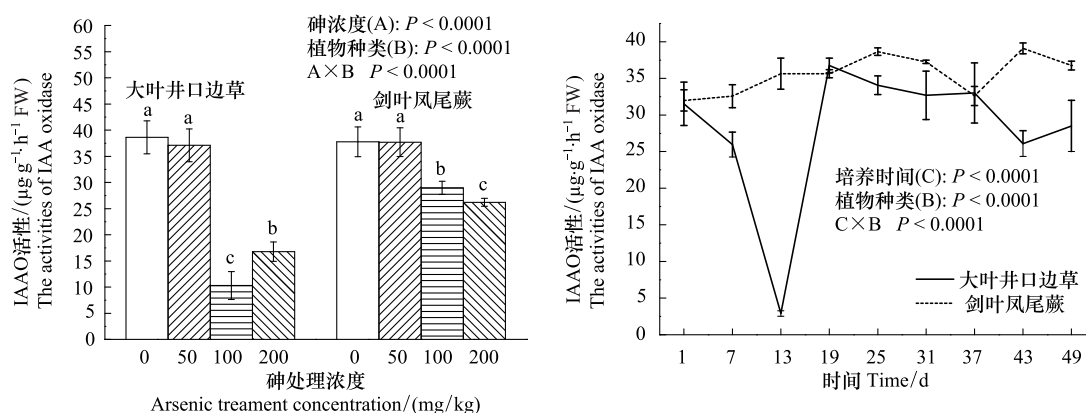


图4 砷胁迫下植物叶片吲哚乙酸氧化酶(IAAO)活性和100 mg/kg处理下的时间动态

Fig.4 Indole-3-acetic acid oxidase (IAAO) contents in the fronds of plants under arsenic stress and its time-course effect in 100 mg/kg treatment

2.5 砷胁迫下植物叶片抗氧化酶活性和丙二醛含量

2.5.1 培养结束时的变化

如图5所示,大叶井口边草在50 mg/kg 砷处理时 CAT 活性与对照相比显著增加,而中、高浓度砷处理下 CAT 活性又显著降低,但能保持在与对照持平的水平;剑叶凤尾蕨叶片中 CAT 活性在不同浓度砷处理下均显著降低。除中等砷浓度处理外,大叶井口边草叶片中的 SOD 活性均比对照显著增加,但剑叶凤尾蕨在各砷浓度处理时 SOD 活性均无显著变化。大叶井口边草叶片中 POD 活性在不同浓度砷处理下较对照显著增加,而

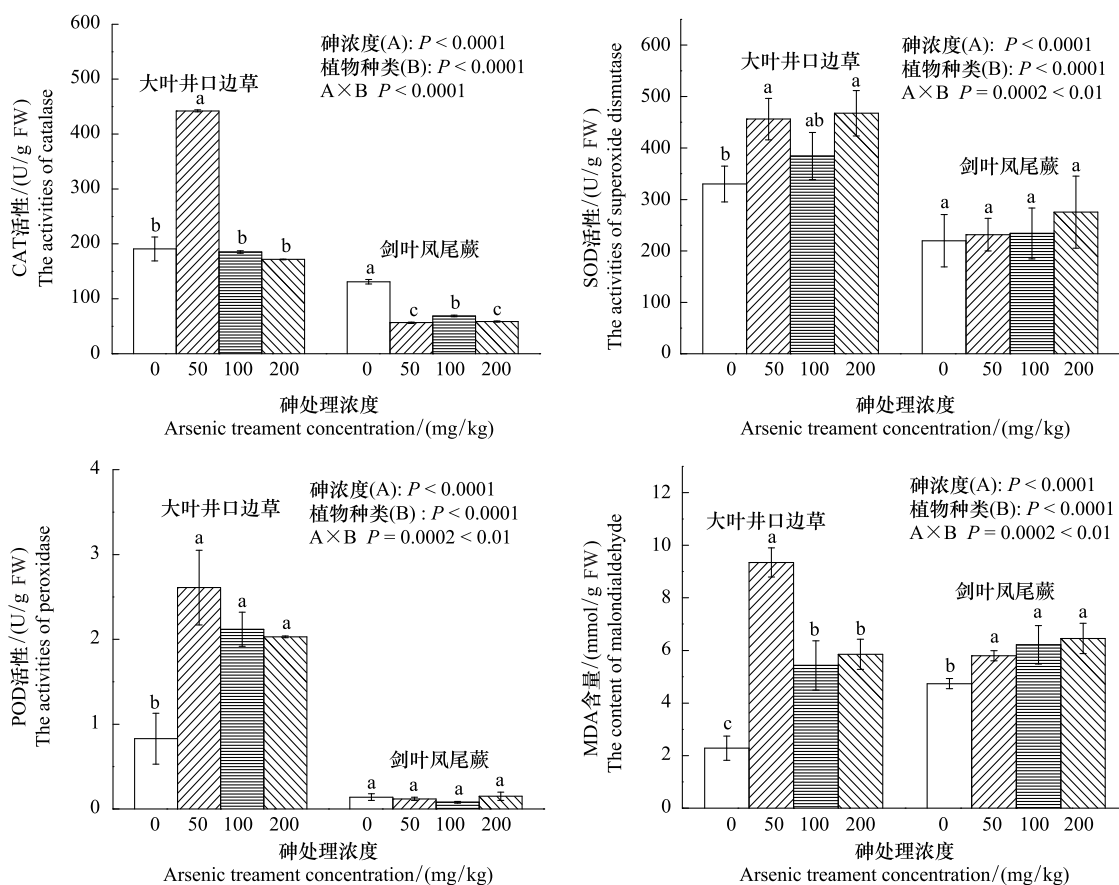


图5 砷胁迫下植物叶片抗氧化酶活性及丙二醛含量

Fig.5 Activities of antioxidant enzymes and malondialdehyde (MDA) content in the fronds of plants under arsenic stress

剑叶凤尾蕨叶片中 POD 活性则无显著变化。2 种植物在不同浓度砷胁迫下叶片中 MDA 含量均显著增加,其中,大叶井口边草叶片 MDA 含量在低浓度砷处理时便显著增加,但在中、高浓度砷处理时而又显著回落;剑叶凤尾蕨叶片中 MDA 含量在加砷处理时均显著增高(图 5)。

双因素方差分析结果表明,2 种植物之间、砷处理浓度之间以及两者交互作用对植物叶片抗氧化酶活性及丙二醛含量具有极显著差异。

2.5.2 培养过程中的时间动态

从图 6 可知,大叶井口边草叶片中 CAT 活性在培养 13d 时呈显著下降趋势,之后又回升至培养结束;剑叶凤尾蕨叶片 CAT 活性在培养 7d 时显著降低,至 19d 时又显著增加,至培养结束时均无显著变化。大叶井口边草叶片中 SOD 活性在前 25d 无显著变化,在第 25—37 天间则显著升高,到第 43 天又显著降低;剑叶凤尾蕨叶片中 SOD 活性在培养第 13 天时显著降低,第 37 天时才有显著升高,之后又有所下降。大叶井口边草叶片中 POD 活性在培养第 7 天时有短暂降低,之后保持升高趋势,到第 37 天时达到最高峰;剑叶凤尾蕨叶片中 POD 活性在培养第 7 天时也有显著降低,之后则无显著变化。第 31 天前,大叶井口边草和剑叶凤尾蕨叶片 MDA 含量均在第 7 天和第 19 天出现两次高峰,但剑叶凤尾蕨比大叶井口边草具有更高的 MDA 含量,第 31 天后,2 种植物的 MDA 含量基本趋于一致(图 6)。

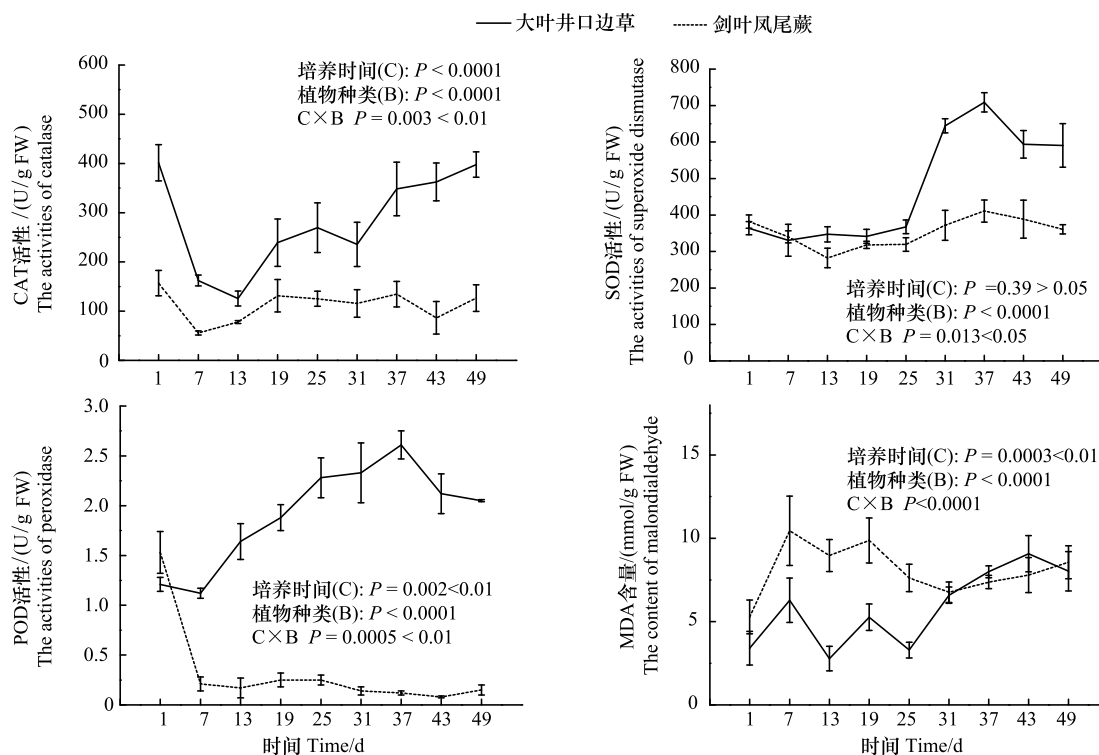


图 6 100 mg/kg 处理下植物叶片抗氧化酶活性和丙二醛含量的时间动态

Fig.6 Changes of activities of antioxidant enzymes and malondialdehyde content in the fronds of plants under 100 mg/kg arsenic stress with culture time extension

双因素方差分析结果表明,2 种植物之间、培养时间之间以及两者交互作用对植物叶片中抗氧化酶活性及丙二醛含量均具有显著差异。

2.6 逐步回归分析

令 y 为植物叶片中 IAA 含量, x_1 为植物叶片中砷含量, x_2 为植物叶片中 SOD 活性, x_3 为植物叶片中 POD 活性, x_4 为植物叶片中 CAT 活性, x_5 为植物叶片中 MDA 含量, 对 2 种植物分别进行多元逐步回归分析, 得到大叶井口边草 $y = 51.207 + 0.166x_1 - 0.132x_4$, $P = 0.0001$, $F = 70.987$, $r = 0.97$; 剑叶凤尾蕨 $y = 23.948 + 0.565x_1$, $P =$

0.01, $F=22.210$, $r=0.83$ 。因此, 大叶井口边草和剑叶凤尾蕨叶片中 IAA 含量均分别与其叶片中砷含量成显著正相关, 而大叶井口边草叶片中 IAA 含量还与其叶片中 CAT 活性成显著负相关。

3 讨论

本文研究了砷超富集植物大叶井口边草和非砷超富集植物剑叶凤尾蕨经不同浓度砷处理后叶片 IAA 含量、砷含量、抗氧化酶活性以及 IAA 含量与抗氧化系统之间的关系。结果表明, 在中、高浓度砷胁迫下, 砷超富集植物大叶井口边草叶片中 IAA 平均含量分别为 56.68 和 45.38 ng/g FW, 而非砷超富集植物剑叶凤尾蕨中则分别为 27.01 和 30.59 ng/g FW (图 3)。因此, 在中、高浓度砷胁迫下砷超富集植物比非砷超富集植物拥有显著高的 IAA 水平。随着砷胁迫浓度增加, 2 种植物叶片中 IAA 含量均显著增加, 但砷超富集植物比非砷超富集植物增加显著。砷超富集植物中相对高的生长素含量水平一方面保证了其在砷污染土壤上的生长, 另一方面可能有助于植物超富集砷, 2 种植物叶片砷含量均值分别是 324.45 和 49.17 mg/kg (图 2)。有研究表明, 在外源添加 IAA 后, 紫花苜蓿^[10]、滇苦菜^[11]、东南景天^[12] 的叶片对 Pb 的富集显著增加; 同样 Fassler 等^[25] 在对向日葵添加 10^{-10} mol/L IAA 时植物叶片的干重显著增加并且叶片中 Pb 和 Zn 含量也显著增加。由此可见, 在外源添加一定浓度 IAA 后, 植物吸收和转运了一部分 IAA, 进入植物体内的 IAA 在加强了植物抵抗重金属污染胁迫能力的同时, 也提高了植物吸收重金属的能力^[25]。在相对高的生长素支持下, 超富集植物大叶井口边草在高浓度砷胁迫下植物的生物量与对照相比无显著影响, 而非砷超富集植物剑叶凤尾蕨在同样处理下生物量则显著受抑制 (图 1)。

吴坤等^[26] 以烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 为材料, 添加不同浓度镉 (0, 5, 25, 50 mg/L) 进行实验, 发现当镉浓度为 5 mg/L 时, 烟草叶片中 IAA 含量显著上升, 但随着镉浓度的增加 IAA 含量显著下降。在本研究中也发现随砷处理浓度增加, 剑叶凤尾蕨叶片 IAA 含量也显著增加, 并未出现下降情况, 这表明砷胁迫下剑叶凤尾蕨体内的 IAA 含量能够维持, 以保证其能够在砷污染土壤上健康生长, 未观察到受害症状。实验中发现, 剑叶凤尾蕨在 100 mg/kg 浓度处理后一段时间除了长势较慢和植株矮小外, 仍有大部分幼苗长出且无明显受害, 大叶井口边草在同样情况下则能保持旺盛生长。剑叶凤尾蕨叶片中 IAA 的维持可能与其体内的较低的砷含量尚不构成毒害以及 IAAO 活性降低有关。面对砷胁迫, 两类植物均需先将有限的能量和资源分配到如何存活而不是大量富集砷上。但是, 剑叶凤尾蕨比大叶井口边草具有更高的 IAAO 活性, 从而降低了体内的 IAA 含量。研究表明, 生长素在植物体内的稳态经常被各种逆境胁迫 (盐性、干旱、寒冷、机械损伤和金属胁迫等) 所打破^[27-29], 从而改变了植物的生长和发育。生长素的作用具有明显的两重性, 低浓度生长素促进植物生长, 高浓度时植物生长则受抑制。然而, 这其中的浓度高低也有一相对阈值, 在相对高的 IAA 浓度下, IAA 能够促进烟草 BY-2 的细胞分裂^[30]。生长素的原初诱导基因的两个典型代表是 SAUR 和 GH3 基因家族^[31-32], 只有植物细胞中生长素足够高时细胞中的 GH3 基因才会最大量表达, 而高浓度生长素促使 SAUR 在茎的伸长区也表达增强^[33]。

一般植物在重金属胁迫下体内的活性氧 (ROS) 会大量增加, 导致植物内发生代谢紊乱, 从而对植物的生长和产量产生不利影响。植物将采取各种措施消除活性氧, 如不断提高各种抗氧化酶的活性。本研究表明, 在砷胁迫下, 与对照 (不加砷) 相比, 大叶井口边草叶片中 CAT、SOD 和 POD 活性能够维持或增加, 从未出现下降趋势, POD 活性增加尤为显著, 表明其具有强大的清除自由基能力。在剑叶凤尾蕨中, 虽然 SOD 和 POD 活性在各砷处理中与对照相比均未出现显著变化, 但 CAT 活性则一直保持降低趋势, 说明其清除 ROS 的能力比大叶井口边草低。

本研究对大叶井口边草叶片中 IAA 含量与砷含量、抗氧化酶活性和丙二醛含量进行逐步回归分析, 得出 IAA 含量与 CAT 活性成显著负相关。在中、高浓度砷胁迫下, 大叶井口边草叶片 CAT 活性与低浓度砷胁迫相比有显著下降 (图 5), 随着 CAT 活性下降, 细胞中有一定量的 H_2O_2 积累。长期以来, 植物体内的 H_2O_2 被看成是一种毒素, 但是, H_2O_2 也可作为一个细胞的信号分子和一些基因表达的调节剂^[34], H_2O_2 参与了细胞信号转

导途径从而导致对非生物胁迫的适应^[35]。另外,在生长素信号通道和氧化还原作用的信号通道之间的动态相互影响能够灵活地对细胞的新陈代谢作出高度响应^[36-37]。还有研究表明, H_2O_2 可作为信号分子促进生长素诱导的不定根形成^[38]。据报道,植物组织能耐受高浓度的 H_2O_2 , 范围为 10^2 — $2 \times 10^5 \mu\text{mol/L}$, 原因是植物抗氧化反应系统的设计更多的是为了控制细胞氧化还原电位状态, 而不是将 H_2O_2 完全清除^[39]。此外, 本研究逐步回归分析结果表明, 由于 CAT 活性降低带来了 IAA 含量增加。生长素过量时也会抑制植物生长, 但是, 植物体内的 IAA 绝大多数以非活性的共价化合物形式存在^[40]。内源 IAA 的浓度受 3 个主要的过程调节: 生物合成、降解和结合反应^[41], *GH3* 基因家族的多个成员是 IAA-酰胺连接酶, 能使生长素与氨基酸结合, 从而降低了自由态生长素的含量, 很多生长素会和糖苷、酰胺基结合^[42]。结合途径对植物来说具有重要的生理意义, 可以有效调节植物组织中内源生长素的含量^[40], 因此, 大叶井口边草中相对高的 IAA 水平有利于生长素在自由态和结合态中的转化。然而, 非砷超富集植物剑叶凤尾蕨中, 中、高浓度砷胁迫下的 CAT 活性与对照相比无显著变化(图 5), 也未发现该种植物中 CAT 与 IAA 的相关性。因此, 在大叶井口边草中, 低浓度砷处理下 CAT 活性显著升高有利于清除细胞内出现的活性氧, 但是仍能将活性氧(如 H_2O_2) 维持在一定水平, 随着砷胁迫浓度的提高, CAT 活性又显著下降, 使细胞内的 IAA 有所增加。虽然在高砷处理时大叶井口边草中 CAT 活性有显著下降, 但能维持在与对照(不加砷)一致的水平, 有利于植物体内抗氧化与维持相对高含量 IAA 的平衡。除我们的研究表明在砷超富集植物中叶片 IAA 含量受 CAT 调节外, 最近有研究表明, 添加外源生长素(0—25 nmol/L) 能增加野生型西红柿 (*Solanum lycopersicum*) 根尖 H_2O_2 的含量, 并存在剂量-效应关系, 这表明在根的生长部位, H_2O_2 含量也受生长素的调节^[43]。生长素能刺激羟基自由基的形成, 进而能增加细胞壁的伸展性^[44]。因此, 生长素和氧自由基的作用关系和调节规律非常复杂, 还有很多工作需要开展。

此外, 本研究的时间动态研究表明, 在第 13 天, 砷超富集植物大叶井口边草具有最高的 IAA 含量、最低的 IAAO 活性以及最低的 CAT 活性, 而剑叶凤尾蕨中的变化规律则不明显, 这三者之间的调控机理特别是 CAT 在生长素含量调节中的作用需要进一步深入研究。

4 结论

本研究表明, 砷超富集植物大叶井口边草在中、高浓度砷胁迫下能够维持生长, 而非砷超富集植物剑叶凤尾蕨生长则受抑制, 这一方面是因为大叶井口边草叶片中抗氧化酶活性(CAT、SOD 和 POD) 能够维持或增加, 从而能够抵抗砷毒害导致的氧化胁迫, 而剑叶凤尾蕨中这 3 种抗氧化酶的活性则无显著变化或显著减少, 说明其抗氧化能力比大叶井口边草低; 另一方面则与砷胁迫下大叶井口边草叶片中内源 IAA 含量比剑叶凤尾蕨增加显著、且具有更低的 IAAO 活性有关, 而相对高的内源 IAA 含量能够维持其在植物内的合成、运输和分配的平衡, 从而更好地促进植物细胞的分裂和分化。2 种植物叶片 IAA 含量均与砷含量成显著正相关, 但大叶井口边草叶片 IAA 含量还与 CAT 活性成显著负相关, 因此, 叶片保持较高的 IAA 含量、较低的 IAAO 和 CAT 活性有助于大叶井口边草超量富集砷。

致谢: 云南省烟草科学研究院杨光宇副研究员帮助植物激素测定, 昆明理工大学环境科学与工程学院潘波教授帮助写作, 特此致谢。

参考文献 (References):

- [1] Ma L Q, Komar K M, Tu C, Zhang W H, Cai Y, Kennelley E D. A fern that hyper-accumulates arsenic a hardy, versatile, fast-growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. *Nature*, 2001, 409(6820): 579-579.
- [2] Chen T B, Wei C Y, Huang Z C, Huang Q F, Lu Q G, Fan Z L. Arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and its arsenic accumulation. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(11): 902-905.
- [3] Zhao F J, Ma J F, Meharg A A, McGrath S P. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist*, 2009, 181(4): 777-794.
- [4] Meharg A A. Variation in arsenic accumulation-hyperaccumulation in ferns and their allies. *New Phytologist*, 2003, 157(1): 25-31.

- [5] Singh N, Ma L Q, Srivastava M, Rathinasabapathi B. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Science*, 2006, 170(2): 274-282.
- [6] Wang H B, Ye Z H, Shu W S, Li W C, Wong M H, Lan C Y. Arsenic uptake and accumulation in fern species growing at arsenic-contaminated sites of southern China: field surveys. *International Journal of Phytoremediation*, 2006, 8(1): 1-11.
- [7] Huang J W, Poynton C Y, Kochian L V, Elless M P. Phytoremediation of arsenic from drinking water using arsenic-hyperaccumulating ferns. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(12): 3412-3417.
- [8] Caille N, Zhao F J, McGrath S P. Comparison of root absorption, translocation and tolerance of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata* and the nonhyperaccumulator *Pteris tremula*. *New Phytologist*, 2005, 165(3): 755-761.
- [9] Gonzaga M I S, Ma L Q, Santos J A G, Matias M I S. Rhizosphere characteristics of two arsenic hyperaccumulating *Pteris* ferns. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(16): 4711-4716.
- [10] López M L, Peralta-Videa J R, Benitez T, Gardea-Torresdey J L. Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. *Chemosphere*, 2005, 61(4): 595-598.
- [11] 都瑞军. 化学螯合剂和植物激素提高超富集植物提取重金属效率 [D]. 广州: 中山大学, 2010.
- [12] Liu D, Li T, Yang X, Islam E, Jin X, Mahmood Q. Enhancement of lead uptake by hyperaccumulator plant species *Sedum alfredii* Hance using EDTA and IAA. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 78(3/4): 280-283.
- [13] Israr M, Sahi S V. Promising role of plant hormones in translocation of lead in *Sesbania drummondii* shoots. *Environmental Pollution*, 2008, 153(1): 29-36.
- [14] Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A, Zambrzycka E, Godlewska-Zytkiewicz B. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 52: 52-65.
- [15] Cakmak I, Horst W J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalysis and peroxidase activities in root tips of soybean *Glycine max*. *Physiologia Plantarum*, 1991, 83(3): 463-468.
- [16] Gratião P L, Polle A, Lea P J, Azevedo R A. Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 2005, 32(6): 481-494.
- [17] Stobrawa K, Lorenc-Plucińska G. Changes in antioxidant enzyme activity in the fine roots of black poplar (*Populus nigra* L.) and cottonwood (*Populus deltoides* Bartr. ex Marsch) in a heavy metal-polluted environment. *Plant and Soil*, 2007, 298(1/2): 57-68.
- [18] Andre C M, Larondelle Y, Evers D. Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective; a review. *Current Nutrition & Food Science*, 2010, 6(1): 2-12.
- [19] Meharg A A. Ecological impact of major industrial chemical accidents. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 1994, 138: 21-48.
- [20] Elobeid M, Göbel C, Feussner I, Polle A. Cadmium interferes with auxin physiology and lignification in poplar. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(3): 1413-1421.
- [21] 马丽, 王海娟, 杨晓燕, 胡拥军, 王宏宾. Fe^{3+} 对 3 种水生植物吸收不同形态砷的影响. *农业环境科学学报*, 2013, 32(6): 1111-1121.
- [22] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2003: 188-190.
- [23] 王若仲, 肖浪涛, 蔺万煌, 曹庸, 卜晓英. 亚种间杂交稻内源激素的高效液相色谱测定法. *色谱*, 2002, 20(2): 148-150.
- [24] Liu H T, Li Y F, Luan T G, Lan C Y, Shu W S. Simultaneous determination of phytohormones in plant extracts using SPME and HPLC. *Chromatographia*, 2007, 66(7/8): 515-520.
- [25] Fässler E, Evangelou M W, Robinson B H, Schulin R. Effects of indole-3-acetic acid (IAA) on sunflower growth and heavy metal uptake in combination with ethylene diamine disuccinic acid (EDDS). *Chemosphere*, 2010, 80(8): 901-907.
- [26] 吴坤, 吴中红, 邵付菊, 韩莹, 谢宝恩, 袁祖丽. 镉胁迫对烟草叶激素水平、光合特性、荧光特性的影响. *生态学报*, 2011, 31(16): 4517-4524.
- [27] Pfeiffer W, Höftberger M. Oxidative burst in *Chenopodium rubrum* suspension cells: induction by auxin and osmotic changes. *Physiologia Plantarum*, 2001, 111(2): 144-150.
- [28] Cheong Y H, Chang H S, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 661-677.
- [29] Joo J H, Yoo H J, Hwang I, Lee J S, Nam K H, Bae Y S. Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Letters*, 2005, 579(5): 1243-1248.
- [30] Chen J G. Dual auxin signaling pathways control cell elongation and division. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2001, 20(3): 255-264.
- [31] Hagen G, Kleinschmidt A, Guilfoyle T. Auxin regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta*, 1984, 162(2): 147-153.
- [32] McClure B A, Hagen G, Brown C S, Gee M A, Guilfoyle T J. Transcription, organization and sequence of an auxin-regulated gene cluster in

- soybean. *Plant Cell*, 1989, 1(2): 229-240.
- [33] Hagen G, Martin G, Li Y, Guilfoyle T J. Auxin-induced expression of the soybean GH3 promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology*, 1991, 17(3): 567-579.
- [34] Hung S H, Yu C W, Lin C H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 2005, 46(1): 1-10.
- [35] Kuźniak E, Urbanek H. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2000, 22(2): 195-203.
- [36] Pasternak T, Potters G, Caubergs R, Jansen M A K. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(418): 1991-2001.
- [37] Tognetti V B, Mühlenbock P, Van Breusegem F. Stress homeostasis-the redox and auxin perspective. *Plant Cell and Environment*, 2012, 35(2): 321-333.
- [38] Su G X, Zhang W H, Liu Y L. Involvement of hydrogen peroxide generated by polyamine oxidative degradation in the development of lateral roots in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48(4): 426-432.
- [39] Slesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signaling in response to environmental stresses. *Acta Biochimica Polonica*, 2007, 54(1): 39-50.
- [40] 许智宏, 薛红卫. 植物激素作用的分子机理. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 6-7.
- [41] Normanly J, Slovin J P, Cohen J D. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiology*, 1995, 107(2): 323-329.
- [42] Elobeid M, Polle A. Interference of heavy metal toxicity with auxin physiology // Gupta D K, Sandalio L M, eds. *Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation*. Berlin: Springer-Verlag, 2012: 249-259.
- [43] Ivanchenko M G, den Os D, Monhausen G B, Dubrovsky J G, Bednarova A, Krishnan N. Auxin increases the hydrogen peroxide (H_2O_2) in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth. *Annals of Botany*, 2013, 112(6): 1107-1116.
- [44] Liskay A, Kenk B, Schopfer P. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 2003, 217(4): 658-667.