

· 研究报告 ·

## Ca<sup>2+</sup>和K<sup>+</sup>对拟南芥幼苗镉毒害的缓解作用

汪骢跃<sup>†</sup>, 王宇涛<sup>†</sup>, 曾琬琳, 李韶山<sup>\*</sup>

华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广州 510631

**摘要** 该文探讨了外源钙(Ca)或钾(K)处理对不同程度的镉(Cd)胁迫(0–80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )下拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)幼苗的生长和生理特性的影响。综合Ca和K对不同浓度Cd胁迫下拟南芥幼苗生长、根长以及生物量的影响情况, 表明各浓度Cd胁迫下外源Ca<sup>2+</sup>的最适缓解浓度均为10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 而K<sup>+</sup>的最适缓解浓度在低浓度(20和40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )和高浓度(60和80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )Cd胁迫下分别为10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在低浓度Cd胁迫下, 添加适宜浓度的Ca<sup>2+</sup>或K<sup>+</sup>后幼苗可溶性蛋白和丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(SOD)活性相比未添加Ca和K的对照组无显著变化, 而过氧化物酶(POD)活性和总酚、类黄酮、花色素苷, 酸溶性硫醇化合物、谷胱甘肽(GSH)、植物螯合肽(PCs)的含量均下降; 高浓度Cd处理下, 添加适宜浓度的Ca<sup>2+</sup>或K<sup>+</sup>后幼苗的SOD活性升高, POD活性降低, 可溶性蛋白、MDA、总酚、类黄酮、花色素苷、酸溶性硫醇化合物、GSH以及PCs的含量也均低于对照组。在各浓度Cd胁迫下, 添加外源Ca或K均使拟南芥幼苗根部细胞DNA损伤减弱, 表现为TT噬啉二聚体的累积量显著减少( $P<0.05$ )。以上结果表明, 在Cd胁迫(尤其是高浓度Cd胁迫)下, 外源Ca或K通过调节酚类、金属螯合物质的代谢水平以及提高拟南芥的抗氧化能力来缓解Cd对拟南芥幼苗的毒害效应, 缓解细胞DNA损伤。该研究结果不仅能够深入探讨Ca和K对缓解重金属毒害的分子机理提供实验依据, 而且为Ca和K应用于重金属污染的防治提供参考。

**关键词** 拟南芥, 镉, 钙, 钾, 缓解作用

汪骢跃, 王宇涛, 曾琬琳, 李韶山 (2014). Ca<sup>2+</sup>和K<sup>+</sup>对拟南芥幼苗镉毒害的缓解作用. 植物学报 49, 262–272.

随着现代工农业生产的飞速发展与管理滞后, 工业生产中的“三废”、农药化肥用量以及固体废弃物(尤其是城市垃圾)不断增加, 使土壤中的镉(Cd)含量急剧上升, Cd污染问题日益严峻(Qiu et al., 2011; 冉烈和李会合, 2011)。Cd是生物毒性极强的一种重金属, 土壤中过量的Cd被植物吸收后积累在体内, 会对植物产生一系列毒害作用, 同时还会通过食物链传递进入人体, 直接威胁人类健康(何俊瑜, 2006)。植物受到Cd毒害后, 施加外源物质是否可以减轻伤害, 是值得研究的课题。

近年来的研究表明, 施加外源钙(Ca)可以有效减少植物体内Cd的含量, 并缓解Cd对植物的影响(周青等, 2001; Wang et al., 2005; Wang and Song 2009)。据报道, 施加外源Ca能够缓解Cd对葡萄(*Vitis vinifera*)叶片造成的伤害, 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的外源Ca处理即能显著抑制Cd胁迫所引起的叶片丙二醛(malony dialdehyde, MDA)和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量以及电解质

渗透率的升高, 并能减轻Cd胁迫对过氧化氢酶(catalase, CAT)活性、呼吸速率以及质膜H<sup>+</sup>-ATPase和Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性的抑制(张鑫荣等, 2008)。此外, 高浓度的外源Ca处理还能降低东南景天(*Sedum alfredii*)体内由Cd胁迫所诱导的脂质过氧化和细胞膜完整性被破坏等毒害效应, 进而减弱Cd对其生长的抑制作用(Tian et al., 2011)。有报道显示, 外源Ca处理能够促进烟草(*Nicotiana tabacum*)香毛簇对Cd的外排(Isaure et al., 2010)。总体上, 目前有关外源Ca处理与Cd胁迫相互作用的报道多集中在农作物和重金属修复植物上, 主要涉及外源Ca处理对植物Cd吸收的影响、外源Ca处理对Cd胁迫下植物多种抗氧化酶活性及其相互之间协调作用的影响、外源Ca处理对Cd胁迫下植物叶绿素含量的影响等方面。而外源Ca处理对Cd胁迫下植物其它生理代谢的影响报道较少。同时, 也有研究表明, 外源钾(K)能够通过降低Cd的生物有效性来缓解Cd对植物的毒害作用(Liu et al.,

收稿日期: 2014-01-07; 接受日期: 2014-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(No.31070242)、广东省高等学校珠江学者岗位计划资助项目(2012年度)、高等学校博士学科点专项科研基金(No.20114407110006)、广州市科技计划项目-科学研究专项(No.2014J4100053)和华南师范大学青年教师科研培育基金

<sup>†</sup> 共同第一作者。

<sup>\*</sup> 通讯作者。E-mail: lishsh@scnu.edu.cn

2012)。施用钾肥( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )能明显降低Cd的生物有效性,进而促进小麦(*Triticum aestivum*)干重的增长(陈苏等, 2007)。研究发现,施用高含量( $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )钾肥不仅能显著提高Cd污染土壤中种植的白菜产量,还能够抑制白菜对Cd的吸收(徐丹等, 2012)。目前有关植物Cd毒害与外源K处理之间相互关系的研究多集中在外源K处理对污染土壤中Cd的有效性和外源K处理对Cd污染土壤上植物生长等方面的影响,而有关外源K处理对Cd胁迫下抗氧化系统、次生代谢以及硫醇盐代谢等生理特性的影响研究较少。

本研究以模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为实验材料,探讨了 $\text{Ca}^{2+}/\text{K}^{+}$ 对Cd胁迫下拟南芥幼苗生长和生理特性的影响,进而期望通过人为调控的方式提高植物对Cd的耐受性,最终应用于轻度Cd污染区的农业生产,并为今后开发重度Cd污染区的植物修复技术提供坚实的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与处理

实验所用拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)为哥伦比亚野生型(Col-0)。拟南芥种子经次氯酸钠溶液消毒后播种于含1.5%蔗糖和0.8%琼脂的1/2MS培养基(pH5.8),垂直培养。在MS培养基中提前添加 $\text{CdCl}_2$ ,使 $\text{Cd}^{2+}$ 浓度分别为0、20、40、60和 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Ca处理则在上述各种 $\text{Cd}^{2+}$ 浓度的1/2MS培养基上再分别添加不同浓度的 $\text{CaCl}_2$ ,使 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度分别为4、6、8、10、20和 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。K处理则在上述各种 $\text{Cd}^{2+}$ 浓度的1/2MS培养基上再分别添加不同浓度的KCl,使 $\text{K}^{+}$ 浓度分别为6、8、10、20、30和 $40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。经不同浓度Ca和K缓解处理后,从中得出不同浓度Cd胁迫下的最适外源 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{K}^{+}$ 浓度。采用最适浓度的外源Ca和K作缓解处理,进行后续各指标的测定。

以上各处理均设置3皿作为重复,每皿50株。培养基均置于拟南芥培养室。培养室温度为 $22^\circ\text{C}$ ,光周期为16小时光照/8小时黑暗,光照强度为 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。种植时间为14天。

### 1.2 指标测定

取拟南芥幼苗,依次用EDTA- $\text{Na}_2$ 和去离子水洗去根部所黏附的培养基。采用烘干-称重法测定生物量。

采取拍照-Image J软件计算的方法测定拟南芥幼苗的根长。可溶性蛋白、丙二醛(MDA)含量以及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性的测定按照李合生(2006)的方法。总酚含量的测定参考李倩等(2012)的方法。类黄酮及花色素苷含量的测定参照Nogués和Baker(2000)的方法。酸溶性硫醇盐、谷胱甘肽(glutathione, GSH)及植物螯合肽(phytochelatins, PC)含量的测定参考王业社和刘可慧(2009)所述方法。利用单细胞凝胶电泳技术检测根细胞的DNA损伤程度,具体方法参考有关文献(Jiang et al., 2007; 聂志刚等, 2009; 魏志琴等, 2013)。

### 1.3 数据分析

实验所得数据用Microsoft Excel 2003软件和SPSS 17.0软件进行处理。通过单因素方差分析(One-way ANOVA)检验不同处理之间的差异显著性( $P<0.01$ , 差异极显著;  $P<0.05$ , 差异显著)。采用Origin 7.5软件作图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{K}^{+}$ 与镉组合对幼苗生长的影响

图1显示不同浓度Cd处理下添加不同浓度 $\text{Ca}^{2+}$ 或 $\text{K}^{+}$ 后培养14天拟南芥幼苗的生长情况。在添加外源Ca或K后,不同浓度的Cd处理对拟南芥生长的抑制作用均得到缓解。且在各浓度Cd胁迫下,与其它浓度外源Ca处理相比,添加8和 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Ca}^{2+}$ 处理组拟南芥幼苗生长较好(图1A);与其它外源K处理相比,添加 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}^{+}$ 处理组拟南芥幼苗生长较好(图1B)。

图2为不同浓度Cd处理下添加不同浓度外源 $\text{Ca}^{2+}$ 或 $\text{K}^{+}$ 后培养14天的拟南芥幼苗的根长统计结果。结果显示,未添加Cd( $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )时,随着外源 $\text{Ca}^{2+}$ 或 $\text{K}^{+}$ 浓度的增大,表现为先促进幼苗根的伸长,然后抑制根的伸长。在 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的Cd胁迫下,当外源 $\text{Ca}^{2+}$ 或 $\text{K}^{+}$ 的浓度增加到一定值时,对根伸长受到抑制的缓解作用最强;之后随着外源 $\text{Ca}^{2+}$ 或 $\text{K}^{+}$ 的浓度的增加,根长开始逐渐变短,缓解作用减弱。过高浓度的外源 $\text{K}^{+}$ 甚至加重抑制作用。 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的Cd胁迫下,添加 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Ca}^{2+}$ 时缓解作用最强(图2A)。在20和 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd

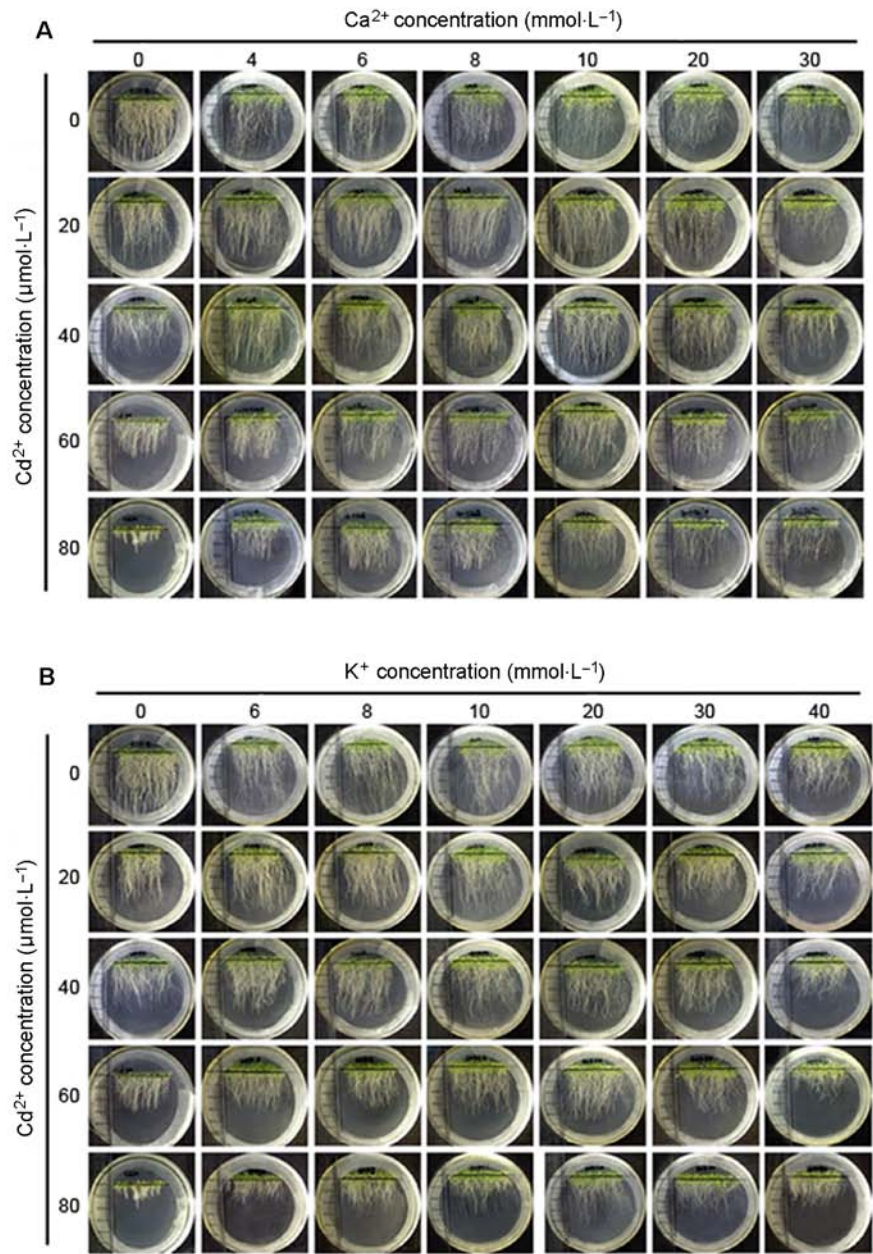


图1 Ca或K与Cd组合对拟南芥幼苗生长的影响

(A) Ca与Cd组合; (B) K与Cd组合

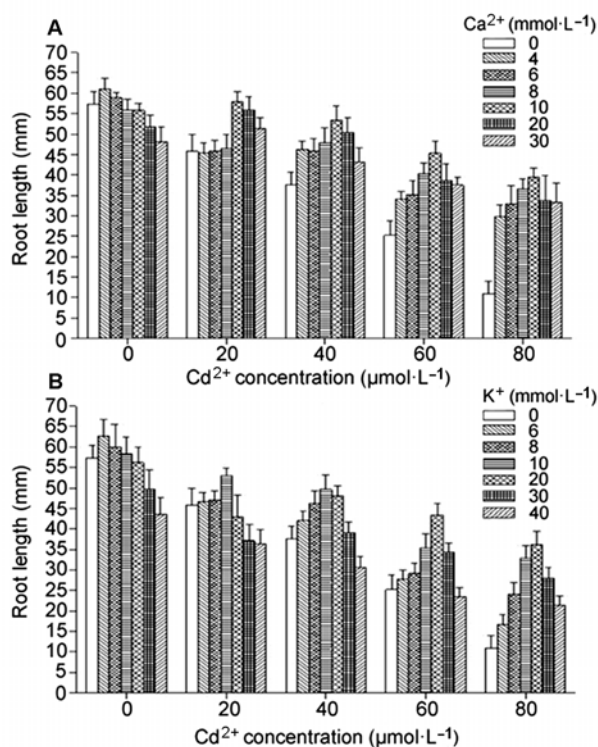
Figure 1 Effect of Cd in combination with Ca or K on the growth of Arabidopsis seedlings

(A) Cd in combination with Ca; (B) Cd in combination with K

处理下, 添加10 mmol·L<sup>-1</sup>K<sup>+</sup>时缓解作用最强。而在60和80 μmol·L<sup>-1</sup>Cd处理下, 添加20 mmol·L<sup>-1</sup>K<sup>+</sup>时缓解作用最强(图2B)。

图3为不同浓度Cd处理下添加不同浓度外源

Ca<sup>2+</sup>或K<sup>+</sup>后培养14天拟南芥幼苗的生物量统计结果。结果显示, 未添加Cd(0 μmol·L<sup>-1</sup>)时, 外源Ca或K处理均使生物量增大; 且当外源Ca<sup>2+</sup>浓度达到8 mmol·L<sup>-1</sup>, 外源K<sup>+</sup>浓度达到10 mmol·L<sup>-1</sup>时, 幼苗生



**图2** Ca或K与Cd组合对拟南芥幼苗根长的影响  
(A) Ca与Cd组合; (B) K与Cd组合

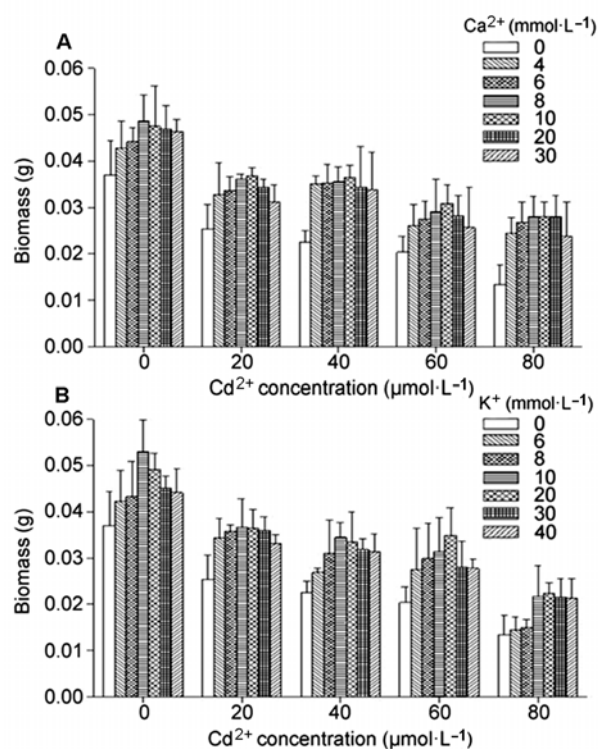
**Figure 2** Effect of Cd in combination with Ca or K on the root length of *Arabidopsis* seedlings  
(A) Cd in combination with Ca; (B) Cd in combination with K

物量达到最大值。在 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的Cd胁迫下, 外源Ca或K均可缓解Cd胁迫对拟南芥幼苗生物量积累的抑制作用, 使幼苗生物量增大。且各浓度Cd胁迫下, 添加 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ 时缓解作用最强(图3A)。在20和 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd胁迫下, 添加 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}^{+}$ 时缓解作用最强。而在60和 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd胁迫下, 添加 $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}^{+}$ 时缓解作用最强(图3B)。

综合Ca和K与Cd组合对拟南芥幼苗生长、根长以及生物量的影响情况, 可知外源Ca或K对Cd胁迫的缓解作用存在最适浓度效应。

## 2.2 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{K}^{+}$ 与镉组合对幼苗中可溶性蛋白和丙二醛含量以及抗氧化酶活性的影响

图4A显示不同浓度Cd处理下添加最适浓度 $\text{Ca}^{2+}$ 或 $\text{K}^{+}$ 后培养14天拟南芥幼苗的可溶性蛋白含量。结果表

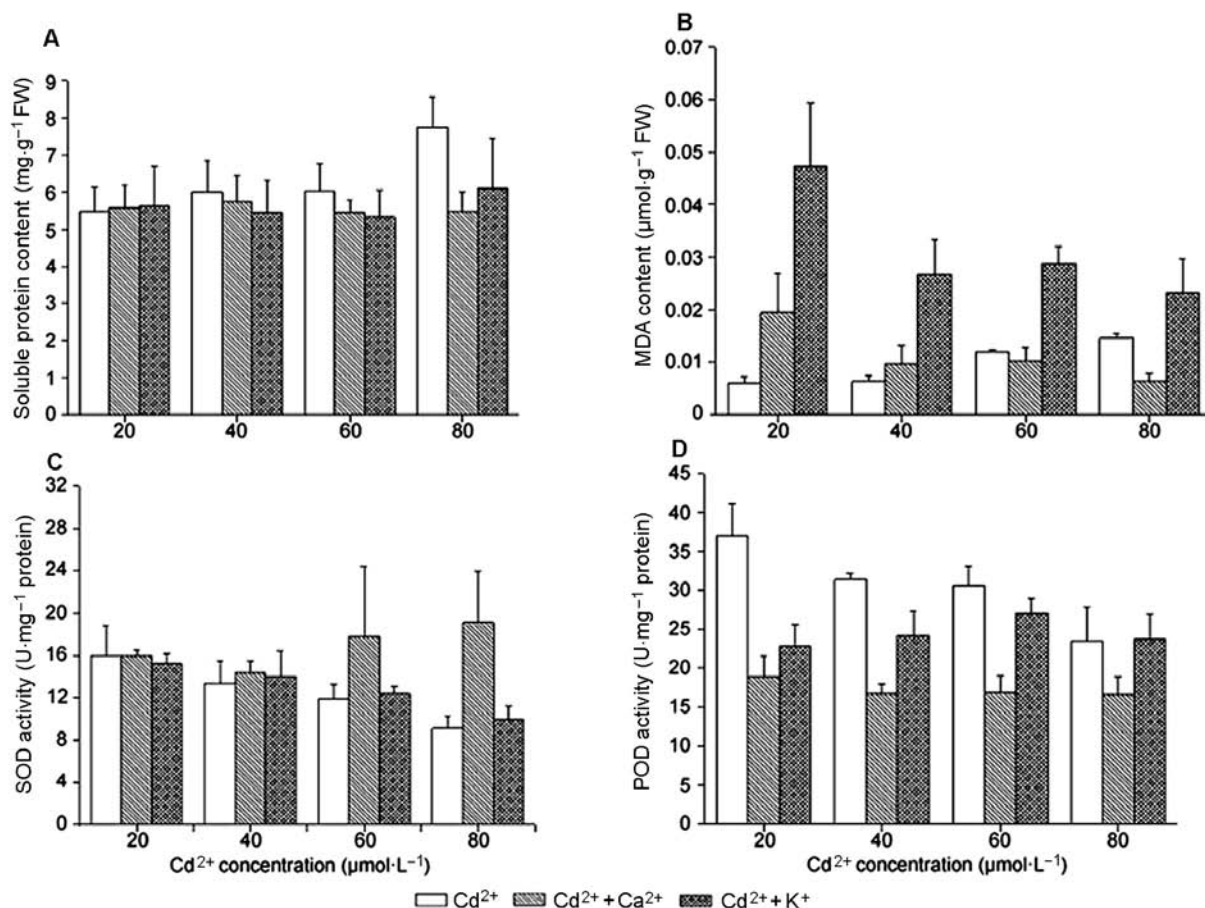


**图3** Ca或K与Cd组合对拟南芥幼苗生物量的影响  
(A) Ca与Cd组合; (B) K与Cd组合

**Figure 3** Effect of Cd in combination with Ca or K on the biomass of *Arabidopsis* seedlings  
(A) Cd in combination with Ca; (B) Cd in combination with K

明, 未添加Ca或K时, 随着Cd浓度的升高, 幼苗的可溶性蛋白含量逐渐增多。 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理下, 添加外源Ca或K后可溶性蛋白含量无显著变化; 40和 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理下, 外源Ca或K可使可溶性蛋白含量稍有下降;  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd处理下, 外源Ca可使幼苗的可溶性蛋白含量显著下降, 外源K和外源Ca处理下的可溶性蛋白含量无显著差异。以上结果表明, 较低浓度Cd处理下, 添加外源Ca或K后幼苗中可溶性蛋白含量无显著变化; 高浓度Cd处理下, 添加外源Ca或K可使幼苗中可溶性蛋白含量降低。

图4B显示不同浓度Cd处理下添加最适浓度 $\text{Ca}^{2+}$ 或 $\text{K}^{+}$ 后培养14天拟南芥幼苗的丙二醛(MDA)含量。结果表明, 未添加Ca或K时, 随着Cd浓度的升高, 幼苗的MDA含量上升。高浓度( $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )Cd胁迫下, 添加外源Ca可使幼苗中MDA含量显著下降( $P<0.05$ ),



**图4** Ca或K与Cd组合对拟南芥幼苗可溶性蛋白质含量(A)、丙二醛(MDA)含量(B)、超氧化物歧化酶(SOD)活性(C)以及过氧化物酶(POD)活性(D)的影响

**Figure 4** Effect of Cd in combination with K or Ca on the soluble protein content (A), MDA content (B), SOD activity (C), and POD activity (D) of Arabidopsis seedlings

缓解了拟南芥幼苗的细胞膜损伤,减少了膜脂的过氧化;而添加外源K后幼苗中MDA含量显著升高,对膜脂过氧化无缓解作用。

图4C显示不同浓度Cd处理下添加最适浓度Ca<sup>2+</sup>或K<sup>+</sup>后培养14天拟南芥幼苗的SOD活性。结果表明,未添加Ca或K时,随着Cd浓度的升高,幼苗的SOD活性下降。各浓度Cd处理下,添加外源K后幼苗中SOD活性均无明显变化;高浓度(60和80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) Cd处理下,外源Ca处理可使幼苗中SOD活性显著升高( $P<0.05$ )。

图4D显示不同浓度Cd处理下添加最适浓度Ca<sup>2+</sup>或K<sup>+</sup>后培养14天拟南芥幼苗的POD活性。结果表明,未添加Ca或K时,随着Cd浓度的升高,幼苗的POD

活性下降。各浓度Cd处理下,添加外源Ca和K均可使拟南芥幼苗的POD活性保持在较低水平;且相较于外源K,添加外源Ca的幼苗中POD活性更低。

### 2.3 Ca<sup>2+</sup>和K<sup>+</sup>与镉组合对幼苗中次生代谢产物的影响

图5显示不同浓度Cd处理下添加最适浓度Ca<sup>2+</sup>或K<sup>+</sup>后培养14天拟南芥幼苗中次生代谢产物的含量。结果表明,未添加Ca或K时,拟南芥幼苗中总酚、类黄酮、花色苷、酸溶性硫醇盐、谷胱甘肽(GSH)以及植物螯合肽(PCs)的含量均随着Cd浓度的升高而上升。图5A、B、D和F中各浓度Cd处理下,外源Ca处理使拟南芥幼苗中总酚、类黄酮、酸溶性硫醇化合物和PCs

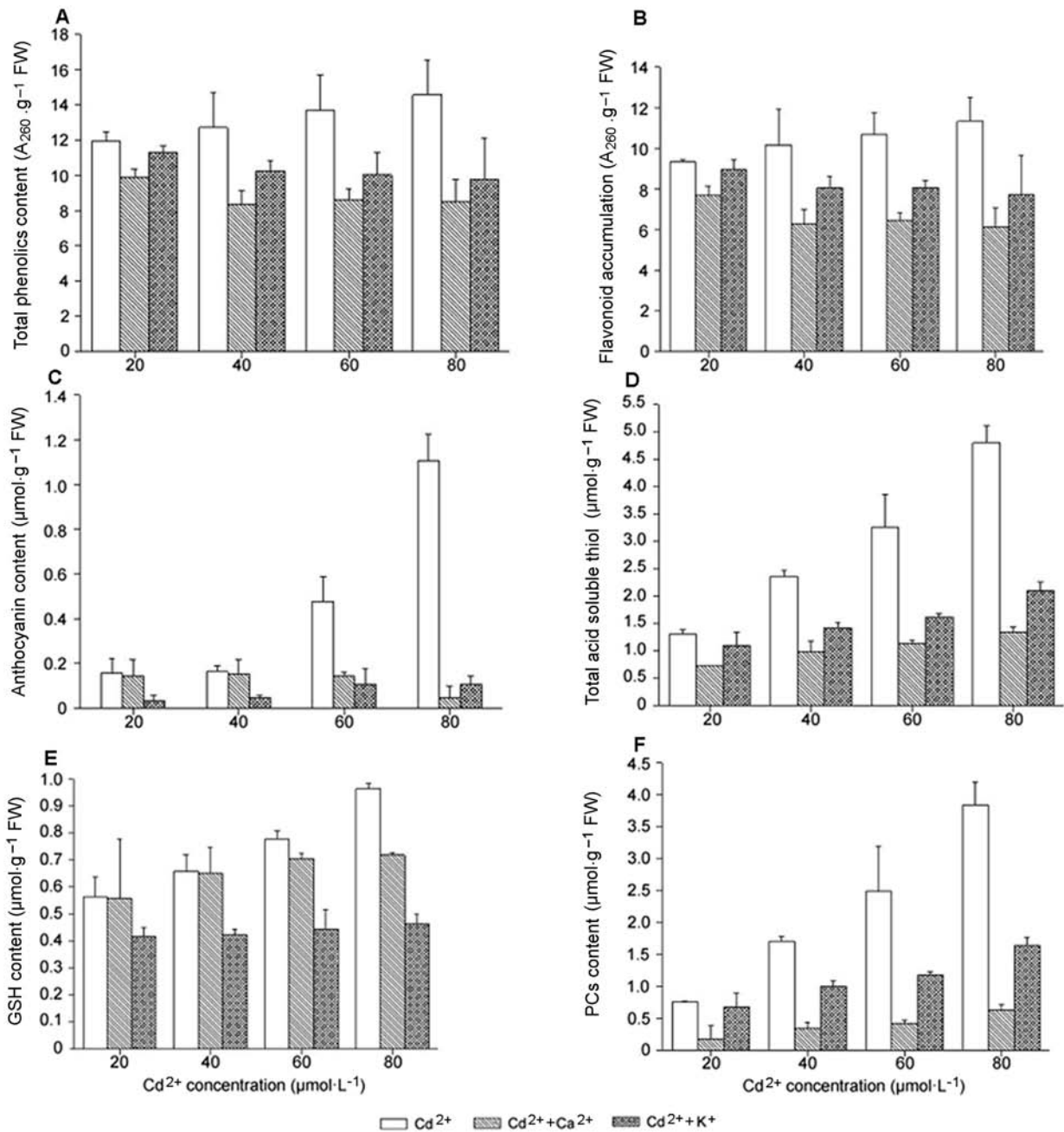


图5 Ca或K与Cd组合对拟南芥幼苗次生代谢产物的影响

(A) 总酚; (B) 类黄酮; (C) 花色素苷; (D) 酸溶性硫醇化合物; (E) 谷胱甘肽; (F) 植物螯合肽

Figure 5 Effect of Cd in combination with K or Ca on secondary metabolites of Arabidopsis seedlings

(A) Total phenolics content; (B) Flavonoid accumulation; (C) Anthocyanin content; (D) Total acid soluble thiol; (E) GSH content; (F) PCs content

含量均显著下降。20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd处理下, 添加外源K后上述4种物质含量略有下降但无显著差异; 40

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的Cd处理下, 外源K处理使幼苗中上述4种物质含量均显著下降( $P<0.05$ )。图5C显示



各浓度Cd处理下,外源K处理均使幼苗中花色素苷含量显著下降。20和40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd处理下,外源Ca处理与未添加Ca的幼苗中花色素苷含量无明显差异;60和80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd处理下,外源Ca处理使幼苗中花色素苷含量显著下降( $P<0.05$ )。图5E显示,20、40和60  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd处理下,外源Ca处理与未添加Ca的幼苗中GSH含量无明显差异;80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd处理下外源Ca处理使幼苗中GSH含量显著下降( $P<0.05$ )。20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd处理下,外源K处理的幼苗中GSH含量无明显变化;40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  及以上浓度的Cd处理下,外源K处理使幼苗中GSH含量显著下降( $P<0.05$ )。

## 2.4 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{K}^{+}$ 与镉组合对根部细胞DNA损伤的影响

图6显示不同浓度Cd处理下添加最适浓度 $\text{Ca}^{2+}$ 或 $\text{K}^{+}$ 后培养14天拟南芥幼苗根部细胞的彗星检测及DNA损伤量。图6A表明,未添加Ca或K时,随着Cd浓度的升高,幼苗根部细胞的DNA损伤加重,DNA电泳后拖尾变长。各浓度Cd处理下,添加外源Ca或K后均使幼苗根部细胞DNA电泳的拖尾与单一Cd处理相比变短,DNA损伤减弱。相同浓度Cd胁迫下,外源Ca处理的幼苗根部细胞DNA电泳后拖尾比外源K处理的短,DNA损伤较小。图6B表明,未添加Ca或K时,随着Cd浓度的升高,幼苗根部细胞DNA损伤量增加。各浓度Cd处理下,添加外源Ca或K均使得DNA损伤量显著减少。相同浓度Cd胁迫下,外源Ca处理的幼苗根部DNA损伤量比外源K处理的少( $P<0.05$ )。

## 2.5 讨论

作为植物必需的营养元素,Ca是多种酶的组分和激活剂,能调节细胞的充水度、黏性、弹性及渗透性,维持细胞的正常生理状态,还参与植物蛋白质的合成、酶的代谢等过程。Ca对于降低植物对Cd的吸收以及减轻Cd对植物、动物和人体的毒害具有重要作用(宋正国等,2009b)。K可以通过促进植物蛋白质的合成、激活酶的活性、参与细胞渗透调节作用等过程使植物维持正常的生理状态,减轻Cd的毒害作用(宋正国,2010)。

已有研究发现用Cd+Ca处理玉米种子,能减轻甚至消除Cd对种子活力和幼苗生长的毒害作用(宋玉泉等,1997)。本研究,20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下,10和

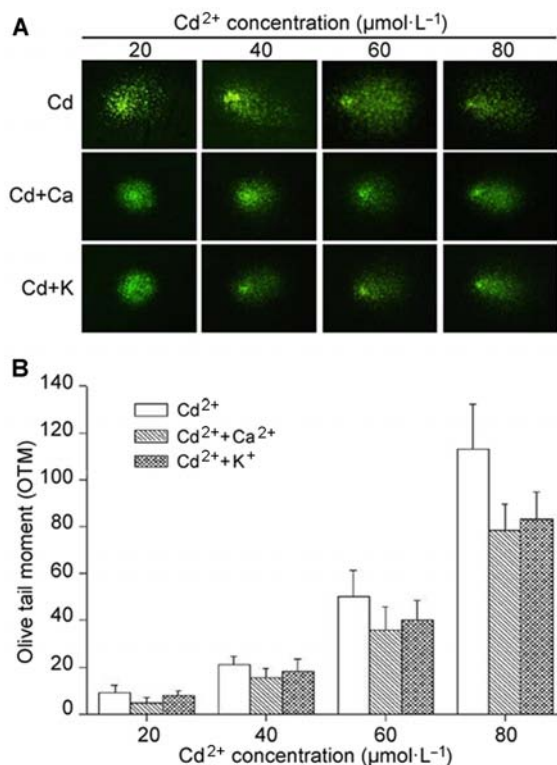


图6 Ca或K与Cd组合处理下拟南芥细胞DNA的损伤程度 (A) 彗星检测图片; (B) DNA损伤量(以OTM值代表)

Figure 6 TT dimer accumulation in Arabidopsis root cells under Cd in combination with K or Ca treatment

(A) Typical comet assay images illustrated DNA damage; (B) DNA damage calculated by Olive Tail Moment (OTM) from comet images

20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源Ca处理使拟南芥幼苗根系长度与对照相比显著变长,40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的Cd胁迫下,4、6、8、10和20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源Ca处理均使幼苗根系长度与对照相比显著增加。这与Li等(2005)得出拟南芥幼苗阶段Ca对Cd胁迫具缓解作用的结果一致。外源K对Cd胁迫下幼苗生长的缓解作用与外源Ca类似,20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下,10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源K处理后的拟南芥幼苗根系长度与对照相比显著增加;40和60  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下,8、10和20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源Ca处理均使幼苗根系长度与对照相比显著增加;80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下,6、8、10、20和30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源Ca处理均使幼苗根系长度与对照相比显著增加。此外,各浓度Cd胁迫下,随着外源 $\text{Ca}^{2+}$ 或 $\text{K}^{+}$ 浓度的增加,幼苗的根系长度和生物量均呈现先增加后降低的

趋势,表明外源Ca或K处理对Cd胁迫的缓解作用均存在最适浓度效应。各浓度Cd胁迫下,外源Ca处理的最适浓度均为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。20和 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下,外源K处理的最适浓度为 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 60和 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下,外源K处理的最适浓度为 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。添加了最适浓度的外源Ca或K后与受到单一Cd胁迫的对照相比拟南芥幼苗生长状况均显著变好,并且与同浓度Cd胁迫下其它浓度外源Ca或K处理相比也较好。外源Ca或K的浓度过高或过低都不利于缓解Cd的胁迫作用。推测过低浓度的外源Ca或K处理缓解作用较弱;而过高浓度的外源Ca或K处理可能增大了溶液浓度进而引起渗透胁迫和离子毒害,对缓解Cd胁迫不但没有效果,甚至会加重伤害。

SOD是氧自由基清除剂,可清除耗氧细胞中的 $\text{O}_2^-$ ,防止生物膜脂质过氧化,对生物膜起保护作用(赵士诚等,2008)。本研究中,  $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下,外源Ca处理后的幼苗SOD活性与对照相比显著升高,表明拟南芥幼苗在受到高浓度Cd胁迫时,外源Ca处理可能通过提高SOD活性来减轻Cd胁迫造成的氧化损伤。各浓度Cd胁迫下,外源K处理后的幼苗可溶性蛋白含量和SOD活性与对照相比均无显著变化,表明拟南芥幼苗在受到Cd胁迫时,外源K处理对SOD活性无显著影响。POD也是植物体内的抗氧化酶之一,POD活性不仅反映植物生长发育及内在代谢状况,而且也是植物抗性的标志之一(孙文越等,2001)。本研究中,各浓度Cd胁迫下,外源Ca处理后幼苗的POD活性与对照相比均显著下降。20和 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下,外源K处理后的幼苗与对照相比POD活性显著下降; 60和 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下外源K处理后的幼苗与对照相比POD活性无明显变化。值得注意的是,各浓度Cd胁迫下外源Ca或K处理后幼苗POD活性在各处理之间无显著变化,推测高浓度Cd胁迫下外源Ca或K可能通过维持POD活性的相对稳定而在拟南芥幼苗抵抗Cd胁迫过程中起重要作用。MDA是生物体代谢和生物膜系统脂质过氧化作用下的产物,MDA含量反映了细胞膜脂过氧化的程度。本研究中,  $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下外源Ca处理后幼苗的MDA含量与对照相比显著下降,膜脂过氧化得到缓解;而低浓度Cd胁迫下经外源Ca处理和各浓度Cd胁迫下经外源K处理后的拟南芥幼苗中MDA含量反而上升,推测可能是由于外源Ca或K使POD活性维持在一个较

低的且相对稳定的水平,不能有效缓解自由基对细胞膜系统的伤害。

酚类化合物是植物中最重要且分布最广泛的次生代谢物之一,具有天然的抗氧化活性(王玲平等,2010)。本实验中各浓度Cd胁迫下添加外源Ca和 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的Cd胁迫下添加外源K,均使幼苗中总酚和类黄酮含量与对照相比显著下降;各浓度Cd胁迫下添加外源K以及60和 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下添加外源Ca均使幼苗中花色苷含量与对照相比显著下降。添加外源Ca或K后幼苗中Cd胁迫所诱导的酚类化合物含量下降表明幼苗受Cd胁迫减小,从而进一步证实外源Ca或K对Cd胁迫具缓解作用。PCs的诱导合成是高等植物对重金属胁迫的一种响应机制(王超等,2009)。各浓度Cd胁迫下,外源Ca处理使幼苗中酸溶性硫醇化合物和PCs含量与对照相比均显著下降,而只在 $80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下,外源Ca处理使幼苗中GSH含量与对照相比显著下降。 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以上浓度的Cd胁迫下,外源K处理使酸溶性硫醇化合物、GSH和PCs含量与对照相比均显著下降;而在 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd胁迫下,添加外源K后上述物质含量均无显著差异。

Cd胁迫能够诱发植物根尖细胞加速老化,使核仁受损,从而破坏基因组模板的稳定性,并使DNA合成受阻(Liu et al., 2005)。张旭红等(2006)研究表明,Cd诱导蚕豆(*Vicia faba*)叶片DNA损伤,高浓度的Cd胁迫甚至会导致DNA双链断裂。本研究采用一种检测重金属污染影响植物遗传效应的快速而敏感的彗星检测方法(Jiang et al., 2007),研究结果表明,各浓度Cd胁迫下,外源Ca或K处理均使拟南芥幼苗根部DNA损伤量比对照显著减少。表明外源Ca或K处理能够减弱Cd胁迫引起的拟南芥幼苗根部细胞的DNA损伤,对Cd胁迫造成的DNA损伤起缓解作用。

本研究中,外源Ca或K处理通过提高或者稳定拟南芥幼苗的SOD和POD活性,缓解由Cd处理引起的氧化胁迫。外源Ca或K处理还通过调节Cd胁迫下次生代谢物质(如酚类活性物质、硫醇盐等),进一步缓解Cd对幼苗的胁迫作用。另外,外源Ca或K处理还明显缓解由Cd胁迫引起的拟南芥幼苗根部细胞的DNA损伤。这些结果都充分说明外源Ca或K能够缓解Cd胁迫对拟南芥幼苗的毒害效应。除此之外,外源Ca处理提高植物耐Cd的机制可能还体现在以下3个方面。(1)



$\text{Ca}^{2+}$ 通过竞争细胞膜上 $\text{Cd}^{2+}$ 的吸收位点,减少拟南芥对 $\text{Cd}^{2+}$ 的吸收。 $\text{Cd}$ 是植物生长的非必需元素,因此在植物体内没有特定的运输载体。研究表明, $\text{Cd}^{2+}$ 不仅能够通过细胞膜上的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道进入细胞(Hinkle et al., 1992),还能通过质膜上的K、Mg、Fe、Mn、Cu、Zn和Ni等的运输载体进入细胞(Perfus-Barbeoch et al., 2002; Clemens, 2006)。因此土壤中K、Na、Ca、Mg等营养元素对植物的Cd吸收具有一定的抑制作用,且这4种盐离子对植物Cd吸收的影响由大到小排序为: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ 。即化合价越高,离子半径越大,抑制作用越强(Hagemeyer and Waisel, 1989)。(2)  $\text{Ca}^{2+}$ 通过稳定膜结构维持细胞内外的离子平衡(汪洪等, 2001)。(3) Ca不仅作为一种植物必需的大量营养元素,更重要的是作为胞内的第二信使,启动一系列生理生化过程,激活植物体内的多种抗性机制(孙大业等, 2001)。已有研究表明,胞质中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的改变是植物细胞感受并传导逆境刺激信号的中心环节(陈贵林和贾开志, 2005);并且Ca通过Ca结合蛋白直接作用于靶细胞或调节靶细胞活动,参与生物基因的表达调节,如遗传物质DNA的合成、修复及转录等过程(Wang and Wang, 2007)。因此推测,Ca信使系统与植物抗重金属基因表达的调控密切关联。目前这方面的研究报道相对较少。Ca信使系统对植物重金属抗性的影响应予以足够重视。外源K同样能够对Cd胁迫起到一定的缓解作用。推测其原因如下:(1) 外源添加K使得 $\text{K}^+$ 浓度升高,与 $\text{Cd}^{2+}$ 竞争拟南芥根部的吸附位点,从而影响植物对 $\text{Cd}^{2+}$ 的吸附(宋正国等, 2009a);(2) 由于Cd处理造成根毛细胞膜的去极化,抑制 $\text{K}^+$ 内向通道活性,诱导外向 $\text{K}^+$ 通道开放,导致根系内 $\text{K}^+$ 外渗,引起植物必需的大量元素K的缺失(李隼等, 2011),而添加了外源K之后可能会弥补一部分缺失。目前有关K对Cd胁迫缓解机理的研究尚待深入。K通过何种途径缓解Cd对植物的毒害,其中的信号转导过程是怎样的,与其它生理代谢途径有无关联等一系列问题还有待探讨。

本研究所获得的结果虽然在一定程度上为外源Ca或K处理缓解拟南芥幼苗在Cd胁迫下受到的毒害作用提供了证据,但考虑到本研究中没有设置未添加Cd时单一Ca或K处理作为对照,在后续的研究中需作进一步的改进和完善。

综上所述,本研究获得以下结论:(1) 添加外源

Ca或K可以缓解重金属Cd对拟南芥幼苗的毒害效应,且外源Ca或K处理均存在最适浓度效应;(2) 外源Ca处理可提高幼苗SOD活性,同时外源Ca或K处理均可以稳定幼苗POD活性,共同防御Cd处理所造成的氧化胁迫,缓解膜脂过氧化伤害;(3) 外源Ca或K处理通过调节Cd胁迫下次生物质的代谢,来降低Cd胁迫下拟南芥幼苗中酚类活性物质以及与硫醇盐代谢相关的富含-SH物质的合成,进一步减弱Cd处理对幼苗的胁迫作用;(4) 外源Ca或K处理能够减弱Cd胁迫引起的拟南芥幼苗根部细胞的DNA损伤,对Cd胁迫造成的DNA损伤起到缓解作用。本研究结果为进一步深入研究Ca和K对Cd毒害的缓解机理提供了理论依据,同时对人为调控提高植物对Cd的耐受性以及指导Cd污染区的农业生产和开发植物修复技术具有一定的实践意义。

## 参考文献

- 陈贵林, 贾开志 (2005). 钙和钙调素拮抗剂对高温胁迫下茄子幼苗抗氧化系统的影响. 中国农业科学 38, 197–202.
- 陈苏, 孙丽娜, 孙铁珩, 晁雷, 杨春璐 (2007). 钾肥对镉的植物有效性的影响. 环境科学 28, 182–188.
- 何俊瑜 (2006). 水稻突变体对镉敏感的生理生化及籽粒中镉积累的基因型差异. 博士论文. 杭州: 浙江大学.
- 李合生 (2006). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社.
- 李倩, 刘子衿, 叶燕彬, 夏颖, 张枫 (2012). 分光光度法测定仙鹤草总酚含量的方法研究. 首都医科大学学报 33, 107–110.
- 李隼, 黄胜东, 赵福庚 (2011). 重金属镉对水稻根毛细胞钾离子吸收过程的影响. 植物生理学报 47, 481–487.
- 聂志刚, 王艳, 李韶山 (2009). 重金属诱导拟南芥原生质体DNA损伤的单细胞凝胶电泳检测. 植物学通报 44, 117–123.
- 冉烈, 李会合 (2011). 土壤镉污染现状及危害研究进展. 重庆文理学院学报(自然科学版) 30, 69–73.
- 宋玉泉, 简伟军, 傅家瑞 (1997).  $\text{Cd}^{2+}$ 对玉米种子活力的影响及 $\text{Ca}^{2+}$ 的拮抗作用. 应用与环境生物学报 3, 1–5.
- 宋正国, 徐明岗, 丁永祯, 孙楠, 刘平, 唐世荣 (2010). 钾对土壤镉有效性的影响及其机理. 中国矿业大学学报 39, 453–458.
- 宋正国, 徐明岗, 丁永祯, 孙楠, 唐世荣 (2009a). 共存阳离子(Ca, Zn, K)对土壤镉有效性的影响. 农业环境科学学报

- 28, 485–489.
- 宋正国, 徐明岗, 李菊梅, 居学海, 唐世荣 (2009b). 钙对土壤镉有效性的影响及其机理. 应用生态学报 **20**, 1705–1710.
- 孙大业, 郭艳林, 马力耕 (2001). 细胞信号转导(第3版). 北京: 科学出版社.
- 孙文越, 王辉, 黄久常 (2001). 外源甜菜碱对干旱胁迫下小麦幼苗膜脂过氧化作用的影响. 西北植物学报 **21**, 487–491.
- 汪洪, 周卫, 林葆 (2001). 钙对镉胁迫下玉米生长及生理特性的影响. 植物营养与肥料学报 **7**, 78–87.
- 王超, 王丽娅, 孙琴 (2009). 低浓度Cd暴露对金鱼藻营养元素吸收与植物络合素(PCs)合成的影响. 环境科学 **30**, 1179–1184.
- 王玲平, 周生茂, 戴丹丽, 曹家树 (2010). 植物酚类物质研究进展. 浙江农业学报 **22**, 696–701.
- 王业社, 刘可慧 (2009). 美人蕉(*Canna indica* Linn)镉胁迫的抗氧化机理. 生态学报 **29**, 2710–2715.
- 魏志琴, 陈志勇, 秦蓉, 王宇涛, 李韶山 (2013).  $\text{Cu}^{2+}$ 对拟南芥根的局部毒性及诱导DNA损伤和细胞死亡. 植物学报 **48**, 303–312.
- 徐丹, 陈怡, 王小晶, 樊驰, 王丽, 何慧明, 王正银 (2012). 钾肥对镉污染土壤白菜生长和镉含量的影响. 长江蔬菜 (2), 58–61.
- 张鑫荣, 杨洪强, 隋静, 乔海涛, 姜倩倩, 冉昆, 由淑贞, 张龙 (2008). 葡萄根系钙处理对叶片镉伤害的保护作用. 园艺学报 **35**, 1405–1410.
- 张旭红, 林爱军, 苏玉红, 朱永官 (2006). 镉引起蚕豆(*Vicia faba*)叶片DNA损伤和细胞凋亡研究. 环境科学 **27**, 787–793.
- 赵士诚, 孙静文, 马有志, 汪洪, 梁国庆, 周卫 (2008). 镉对玉米幼苗活性氧代谢、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其基因表达的影响. 中国农业科学 **41**, 3025–3032.
- 周青, 黄晓华, 施国新, 戴玉锦 (2001). 钙对紫外辐射B胁迫下小麦幼苗若干生物学特性的影响. 环境科学 **22**, 79–82.
- Clemens S (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* **88**, 1707–1719.
- Hagemeyer J, Waisel Y (1989). Uptake of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$  by excised roots of *Tamarix aphylla*. *Physiol Plant* **77**, 247–253.
- Hinkle PM, Shanshala ED, Nelson EJ (1992). Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake. *J Biol Chem* **267**, 25553–25559.
- Isaure MP, Sarret G, Harada E, Choi YE, Marcus MA, Fakra SC, Geoffroy N, Pairise S, Susini J, Clemens S, Manceau A (2010). Calcium promotes cadmium elimination as vaterite grains by tobacco trichomes. *Geochim Cosmochim Acta* **74**, 5817–5834.
- Jiang L, Wang Y, Li SS (2007). Application of the comet assay to measure DNA damage induced by UV radiation in the hydrophyte, *Spirodela polyrhiza*. *Physiol Plant* **129**, 652–657.
- Li WQ, Khan MA, Yamaguchi S, Kamiya Y (2005). Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* **46**, 45–50.
- Liu CH, Huang WD, Kao CH (2012). The decline in potassium concentration is associated with cadmium toxicity of rice seedlings. *Acta Physiol Plant* **34**, 495–502.
- Liu W, Li PJ, Qi XM, Zhou QX, Zheng L, Sun TH, Yang YS (2005). DNA changes in barley *Hordeum vulgare* seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere* **61**, 158–167.
- Nogués S, Baker NR (2000). Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *J Exp Bot* **51**, 1309–1317.
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* **32**, 539–548.
- Qiu Q, Wang YT, Yang ZY, Xin JL, Yuan JG, Wang JB, Xin GR (2011). Responses of different chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis* L.) cultivars to cadmium and lead exposure: screening for Cd+Pb pollution-safe cultivars. *CLEAN-Soil Air Water* **39**, 925–932.
- Tian SK, Lu LL, Zhang J, Wang K, Brown P, He ZL, Liang J, Yang XE (2011). Calcium protects roots of *Sedum alfredii* H. against cadmium-induced oxidative stress. *Chemosphere* **84**, 63–69.
- Wang CQ, Song H (2009). Calcium protects *Trifolium repens* L. seedlings against cadmium stress. *Plant Cell Rep* **28**, 1341–1349.
- Wang CQ, Wang BS (2007).  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin is involved in betacyanin accumulation induced by dark in  $\text{C}_3$  halophyte *Suaeda salsa*. *J Integr Plant Biol* **49**, 1378–1385.
- Wang CQ, Zhang FZ, Liu T (2005). Activity changes of calmodulin and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase during low-temperature-induced anthocyanin accumulation in *Alternanthera bettzickiana*. *Physiol Plant* **124**, 260–266.

## Alleviation of Cd Toxicity in *Arabidopsis thaliana* Seedlings by Exogenous $\text{Ca}^{2+}$ or $\text{K}^{+}$

Congyue Wang<sup>†</sup>, Yutao Wang<sup>†</sup>, Wanlin Zeng, Shaoshan Li<sup>\*</sup>

Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, School of Life Sciences,  
South China Normal University, Guangzhou 510631, China

**Abstract** We investigated the effect of exogenous Ca or K on the growth and physiological parameters of *Arabidopsis thaliana* seedlings under different levels of Cd stress (0, 20, 40, 60 and 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The optimal alleviation concentration for  $\text{Ca}^{2+}$  was 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  under all levels of Cd stress in terms of root growth and biomass of seedlings. The optimal alleviation concentration for  $\text{K}^{+}$  was 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  under low Cd stress (20 and 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and 20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  under high Cd stress (60 and 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Under low Cd treatment, the exogenous addition of Ca or K with the optimal concentration resulted in recovered root growth and increased biomass, with no change in superoxide dismutase (SOD) activity, soluble protein content or malony dialdehyde (MDA) content of seedlings. The addition of Ca or K significantly decreased peroxidase (POD) activity and decreased total phenol, flavonoid, anthocyanin, total acid thiol, glutathione (GSH) and phytochelatins (PCs). Under high Cd stress, the exogenous addition of the optimal concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{K}^{+}$  increased SOD activity and decreased POD activity. The addition of Ca or K significantly decreased levels of soluble protein, MDA, total phenol, flavonoid, anthocyanin, total acid thiol, GSH and PCs. Under all levels of Cd, the TT pyrimidine dimer contents were higher in the seedlings without than with Ca and K ( $P<0.05$ ), so the DNA damage in seedlings was alleviated by the addition of Ca or K. Exogenous addition of Ca or K can alleviate the toxicity of Cd in *Arabidopsis* seedlings, especially under high Cd stress, by mediating the metabolic levels of antioxidants, osmotic adjust substance, phenols and metal chelating substances, thus reducing DNA damage in cells. This study provides experimental data for the molecular mechanisms involving the alleviation effects of Ca and K on heavy metals and valuable references for the application of Ca and K in the remediation of heavy metal pollution.

**Key words** *Arabidopsis thaliana*, cadmium (Cd), calcium (Ca), potassium (K), alleviation effect

**Wang CY, Wang YT, Zeng WL, Li SS** (2014). Alleviation of Cd toxicity in *Arabidopsis thaliana* seedlings by exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{K}^{+}$ . *Chin Bull Bot* **49**, 262–272.

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this paper.

<sup>\*</sup> Author for correspondence. E-mail: lishsh@scnu.edu.cn