

· 研究报告 ·

褪黑素对铅胁迫下虎舌红和朱砂根生理响应及DNA损伤的调控效应

艾金祥¹, 宋嘉怡¹, 严浙楠¹, 王志超¹, 陈文倩¹, 吴玉环^{2,3}, 王燕燕¹
潘蕾蕾¹, 许俞韬¹, 刘鹏^{1*}

¹浙江师范大学植物学实验室, 金华 321004; ²杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036

³中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016

摘要 铅胁迫是影响植物生长的主要非生物因素之一。以二年生虎舌红(*Ardisia mamillata*)和朱砂根(*A. crenata*)为实验材料, 探究外源褪黑素(MT)处理对不同浓度铅胁迫下2种植物生理响应及DNA损伤的调控效应。结果表明, 相同处理时间内, 随着铅胁迫浓度的升高, 虎舌红与朱砂根的3种抗氧化酶活性、脯氨酸(Pro)及可溶性蛋白(SP)含量均先升高后降低, 而丙二醛(MDA)含量先降低后升高, 根尖胼胝质含量持续升高, 根系DNA损伤加剧。施加适宜浓度的外源褪黑素(MT)后, 不同浓度铅胁迫下2种植物的抗氧化酶活性得到有效增强, 且均在100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT处理时达到最大值, Pro和SP含量均显著升高, MDA含量则先显著降低而后缓慢升高, 根尖胼胝质含量持续增加, 根系DNA损伤得到改善; 随着MT浓度的持续升高, 其缓解作用逐渐减弱。相较于虎舌红, 朱砂根对铅胁迫的抗性更强, 生理响应更稳定。施加外源MT可有效缓解铅胁迫对虎舌红和朱砂根的毒害作用(缓解效果朱砂根>虎舌红), 增强二者对铅毒的耐受性, 其中100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT处理下缓解效果最佳。研究揭示了虎舌红和朱砂根抗铅性的优劣及外源MT对铅毒的缓解效应, 为紫金牛属植物抗铅性研究提供理论参考。

关键词 虎舌红, 朱砂根, 铅胁迫, 褪黑素, DNA损伤

艾金祥, 宋嘉怡, 严浙楠, 王志超, 陈文倩, 吴玉环, 王燕燕, 潘蕾蕾, 许俞韬, 刘鹏 (2022). 褪黑素对铅胁迫下虎舌红和朱砂根生理响应及DNA损伤的调控效应. 植物学报 57, 171–181.

铅(plumbum, Pb)是环境中最具毒性的重金属元素之一(Izbińska et al., 2014), 在土壤中难以淋溶且不能被微生物降解(吕潇等, 2016), 易被植物吸收, 从而影响植物正常生理反应(李春燕等, 2016)。紫金牛属(*Ardisia*)植物多为分布于热带和亚热带地区的常绿灌木, 具有较高的观赏性和药用价值, 其中虎舌红(*A. mamillata*)和朱砂根(*A. crenata*)分布范围较广且经济价值较高。虎舌红植株矮小, 果实鲜红, 叶片两面长满绒毛, 曾获得“中国99昆明世界园艺博览会”观赏植物一等奖, 有活血化瘀和清热利湿的功效, 对风湿、肺结核咯血、小儿疳积及胆囊炎等均有疗效(凌育赵等, 2019)。朱砂根四季常青, 果实呈鲜红色, 与绿叶相映成趣, 常被人们冠以美好的寓意, 其主要药

用功效是抑制癌细胞扩散及抗肿瘤, 此外, 还可用于治疗上呼吸道感染和止咳平喘等(张伟等, 2011)。虎舌红和朱砂根在天然药物及园林观赏中均有极大的开发潜力和市场应用前景。然而, 2种植物主要分布在长江中下游及华南地区, 该区域正是重金属的富集地, 长江、珠江三角洲地区土壤铅超标率达10%(骆永明和滕应, 2018)。过量的铅会破坏植物的细胞膜和光合系统(韩航等, 2018)、抑制呼吸作用(何玲莉等, 2015)、损伤根系并减少生物量的积累(王芳等, 2016)。因此, 缓解铅对虎舌红和朱砂根的毒害作用是生产中亟待解决的问题。

褪黑素(melatonin, MT)作为植物体内一种高效的抗氧化性激素, 对植株生长发育(Li et al., 2018)和

收稿日期: 2021-11-10; 接受日期: 2022-02-07

基金项目: 国家自然科学基金(No.41571049, No.30540056)、浙江省自然科学基金(No.Y5100390)和浙江省公益技术农业项目(No.2015C32127)

* 通讯作者。E-mail: sky79@zjnu.cn

抗逆生理响应(Debnath et al., 2018)均具有重要作用。逆境可诱导植物体合成褪黑素,从而有效提升植物叶绿素含量及净光合作用速率,维持膜内外离子平衡。目前,外源褪黑素的应用多集中于缓解高温(徐向东等, 2011; 齐晓媛等, 2021)、干旱(赵成凤等, 2021)和盐(赵丽娟等, 2021)等环境胁迫,其对铅毒害下植物的生理反应和DNA损伤的影响尚未见报道。本研究以虎舌红和朱砂根为材料,通过水培实验,探究外源MT对不同浓度铅胁迫下虎舌红和朱砂根抗逆性及DNA损伤的影响,旨在阐明二者抗铅性的优劣及外源MT对铅毒的缓解效应,为紫金牛属植物抗铅性研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料及处理

实验于2021年3–6月在浙江师范大学植物学实验室进行。选取长势一致的二年生盆栽扦插苗为实验材料。虎舌红(*Ardisia mamillata* Hance)及朱砂根(*Ardisia crenata* Sims)株高约15 cm,野生扦插苗采自江西省大余县吉村镇山区。选用上、下口径分别为18和10 cm、高度为10 cm的塑料花盆作为基质容器,用腐殖土和石英砂(3:1, v/v)作为培养基质,基质重约1 kg,每盆种植1株幼苗。在光照培养室内缓苗3周,期间适量浇水,保持土壤湿润。将虎舌红和朱砂根取出清洗,用0.1%高锰酸钾溶液浸泡根部,消毒约10分钟,然后用纯水洗净,于500 mg·L⁻¹ ABT生根粉溶液中浸泡2分钟,晾干后放入水培玻璃容器(长宽高均为10 cm),添加标准Hoagland营养液水培并贴标签进行标记。根据预实验(预实验结果表明设定的硝酸根浓度对虎舌红和朱砂根无胁迫作用)确定的铅浓度梯度处理虎舌红和朱砂根。用Pb(NO₃)₂配制铅浓度梯度为0、100和600 μmol·L⁻¹,并在铅胁迫下设置褪黑素处理浓度分别为0、50、100、150和200 μmol·L⁻¹,每2天喷施1次(于20:00–21:00进行处理)。设置处理组分别为:非铅胁迫组Pb₀MT₀ (CK)、Pb₀MT₅₀、Pb₀MT₁₀₀、Pb₀MT₁₅₀和Pb₀MT₂₀₀;低铅胁迫组Pb₁₀₀MT₀、Pb₁₀₀MT₅₀、Pb₁₀₀MT₁₀₀、Pb₁₀₀MT₁₅₀和Pb₁₀₀MT₂₀₀;高铅胁迫组Pb₆₀₀MT₀、Pb₆₀₀MT₅₀、Pb₆₀₀MT₁₀₀、Pb₆₀₀MT₁₅₀和Pb₆₀₀MT₂₀₀。常温培养,培养期间每隔3天更换1次营养液。各处理均设置3个平

行对照组,2种植物各45盆随机排列。

1.2 指标测定方法

分别在铅胁迫处理第7、14和21天取植株第3–4片叶(功能叶),剪除叶脉后取0.2 g叶片置于预冷处理的陶瓷研钵中,加入1.0 mL磷酸缓冲液并研磨成浆,再加缓冲液至2 mL。参照李合生(2000)的方法,用NBT光化还原法、高锰酸钾滴定法和愈创木酚法分别测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性。用茚三酮显色法测定叶片游离脯氨酸(proline, Pro)含量,考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白(soluble protein, SP)含量,硫代巴比妥酸法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。参照Köhle等(1985)的方法测定根尖胼胝质含量。在处理第21天从每株植物上随机剪取5条长10 mm的根尖,置于4°C、95%乙醇中保存12小时,加1.0 mL 1.0 mol·L⁻¹ NaOH溶液,研磨后转移至1.5 mL微量离心管中,80°C水浴30分钟后冷却至室温,12 500 ×g离心10分钟;取400 μL上清液于10 mL离心管中,并加入2.0 mL苯胺蓝显色液;吸取400 μL上清液于10 mL离心管,加入2.5 mL空白液,混匀后于50°C水浴20分钟,室温冷却,于400 nm激发光和485 nm发射光条件下测定荧光值。采用单细胞凝胶电泳法(郭炜, 2008)检测根系DNA损伤。将染色后的标本置于荧光显微镜(Axio Scope A1)下,用515–560 nm激发光观察,在400倍镜下获取彗星图像(每个样本随机观察10个细胞),并用CASP软件测定其尾长、尾部DNA含量、尾矩和Olive尾矩(Olive tail moment, OTM)。以上各指标均重复测定3次。

1.3 数据分析

采用Microsoft Excel软件整理实验数据。用IBM SPSS Statistics 25.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。用Duncan法进行多重比较(α=0.05)。经CASP软件分析获得彗星实验相关数据,使用Origin 2019b作图。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度褪黑素对铅胁迫下虎舌红和朱砂根抗氧化酶活性的影响

100 μmol·L⁻¹铅胁迫显著增强了虎舌红和朱砂根叶片

抗氧化酶活性, 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅处理则对二者抗氧化酶活性产生抑制作用(图1)。相同浓度铅胁迫下, 随着

MT浓度的增加, 对3种酶均表现出低促高抑的影响模式, 各处理组3种酶活性均在7天时MT₁₀₀处理下达

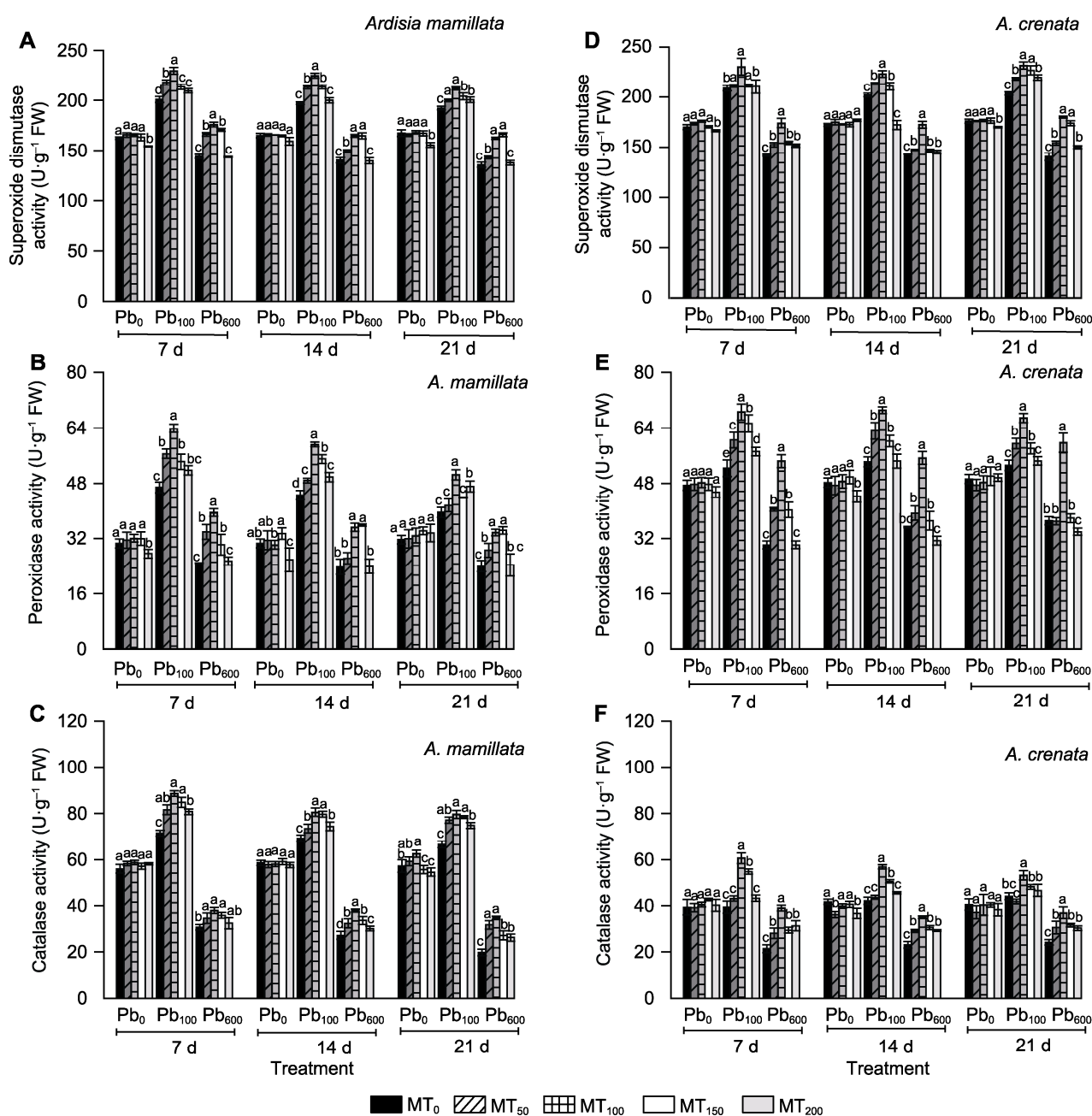


图1 不同浓度褪黑素处理对铅胁迫下虎舌红(A-C)和朱砂根(D-F)抗氧化酶系统的影响

Pb_0 、 Pb_{100} 和 Pb_{600} 表示铅浓度分别为0、100和600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; MT_0 、 MT_{50} 、 MT_{100} 、 MT_{150} 和 MT_{200} 表示褪黑素处理浓度分别为0、50、100、150和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。不同小写字母表示相同时期不同处理组间在0.05水平差异显著。

Figure 1 Effects of different concentrations of melatonin on antioxidant enzyme system of *Ardisia mamillata* (A-C) and *A. crenata* (D-F) under lead stress

Pb_0 , Pb_{100} , and Pb_{600} represent 0, 100, and 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of Pb, respectively; MT_0 , MT_{50} , MT_{100} , MT_{150} , and MT_{200} represent 0, 50, 100, 150, and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of melatonin, respectively. Different lowercase letters indicate significant differences among the treatments during the same stage at 0.05 level.

到最大。 $Pb_{100}MT_{100}$ 处理组的虎舌红和朱砂根SOD、POD及CAT活性分别较 $Pb_{100}MT_0$ 组增高14.31%、23.96%和30.96%及10.25%、23.96%和53.62%; $Pb_{600}MT_{100}$ 处理组两者酶活依次比 $Pb_{600}MT_0$ 组增高21.95%、58.97%和23.81%及22.56%、80.99%和82.16%。即2种胁迫浓度下,MT对朱砂根铅胁迫的缓解效果均优于虎舌红。

2.2 不同浓度褪黑素对铅胁迫下虎舌红和朱砂根膜脂过氧化和渗透调节物质的影响

低铅胁迫下,虎舌红和朱砂根在3个测定时期内可溶性蛋白(SP)和游离脯氨酸(Pro)含量均显著增加,且虎舌红增幅大于朱砂根,丙二醛(MDA)含量无显著变化;高铅胁迫下,虎舌红和朱砂根的Pro和SP含量有所下降,MDA含量显著升高,膜脂过氧化程度加剧(图2A–F)。喷施外源MT使铅胁迫下虎舌红和朱砂根Pro和SP含量增加,MDA含量降低,其中 MT_{100} 处理效果最佳。喷施MT后,虎舌红和朱砂根Pro含量分别在21和14天的 $Pb_{100}MT_{100}$ 处理组达到最大值,相较于 $Pb_{100}MT_0$ 处理组增加了18.04% (图2C)和58.72% (图2D);MDA含量均随MT浓度的增加呈先减后增的趋势,最大降幅均出现在21天 $Pb_{600}MT_{100}$ 处理组,分别较相同铅胁迫浓度下 MT_0 处理组降低44.78% (虎舌红)和46.65% (朱砂根)。SP含量最大值分别出现在14和21天的 $Pb_{100}MT_{100}$ 处理组,分别为 $Pb_{100}MT_0$ 处理下的1.14倍(图2E)和1.12倍(图2F)。上述结果表明,朱砂根的抗铅性及喷施MT后的恢复效果优于虎舌红。

2.3 不同浓度褪黑素对铅胁迫下虎舌红与朱砂根根尖胼胝质含量的影响

虎舌红和朱砂根根尖胼胝质含量随铅浓度的升高而显著增加(图3)。 $Pb_{100}MT_0$ 处理下虎舌红和朱砂根根尖胼胝质含量分别为CK的3.9和3.0倍, $Pb_{600}MT_0$ 处理下两者胼胝质含量分别为 $Pb_{100}MT_0$ 处理的1.4和1.6倍,表明低铅胁迫下,虎舌红根尖胼胝质含量增幅较大;高铅胁迫下,二者变化幅度相当。铅胁迫下,MT处理显著提高了虎舌红和朱砂根根尖胼胝质含量;非铅胁迫下,不同浓度MT处理对朱砂根根尖胼胝质含量影响不显著。 MT_{150} 处理下虎舌红根尖胼胝质含量显著高于其它处理组,较CK显著增加,增幅为6.53%。 Pb_{100} 和 Pb_{600} 胁迫时,虎舌红与朱砂根均在

MT_{100} 处理下出现最大增幅,分别较 $Pb_{100}MT_0$ 和 $Pb_{600}MT_0$ 显著增高30.44%、53.96%及23.85%、39.33%。在2种铅胁迫浓度下,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT对根尖胼胝质含量增加的效应表现为朱砂根优于虎舌红。

2.4 不同浓度褪黑素对铅胁迫下虎舌红和朱砂根根系DNA损伤的影响

铅胁迫下,虎舌红和朱砂根根系DNA受到明显损伤,损伤程度随铅浓度的升高而不断加剧。外源MT处理显著减缓了2种植物根系DNA损伤,且100–150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT作用效果最佳(图4A–C)。 Pb_{100} 处理使虎舌红和朱砂根根系DNA受损,外施MT后彗星尾长缩短,DNA损伤得到修复(图5A, B)。 Pb_{600} 处理下2种植物根系DNA断片增多且损伤程度加重,喷施MT后修复效果不明显。2种植物在受到不同浓度铅胁迫后OTM值均迅速上升,DNA受损严重(图6A, B)。 $Pb_{100}MT_0$ 处理下虎舌红和朱砂根OTM值分别为CK的4.9和4.3倍, $Pb_{600}MT_0$ 处理下两者OTM值均为 $Pb_{100}MT_0$ 的2倍,表明低铅胁迫下虎舌红抗性较差。相较其它MT处理组, MT_{100} 处理能有效减缓根系逆境损伤, $Pb_{100}MT_{100}$ 处理下虎舌红和朱砂根的OTM值比 $Pb_{100}MT_0$ 处理组分别降低16.31%和14.21%, $Pb_{600}MT_{100}$ 处理则下降12.05%和12.78%。由此表明,一定浓度MT可明显缓解铅毒造成的虎舌红和朱砂根根系DNA损伤,且对二者的缓解效果相当。

2.5 讨论

重金属铅在土壤中蓄积性强且分布面积广,当土壤中的铅积累到一定程度时,会因其自身毒性强和难转移等特点对植物产生严重的毒害作用(Shahid et al., 2012)。高浓度铅胁迫可引起植物膜脂过氧化(叶江华等, 2017)并抑制光合及呼吸作用(何玲莉等, 2015; 韩航等, 2018),最终阻碍其正常生长。如何有效缓解铅对植物的毒害是科学界面临的重要问题。虎舌红和朱砂根的主要产地与铅污染地区大面积重合,2种植物的正常生长及药用价值受到严重威胁。褪黑素可在不同胁迫条件下与不同的化学信号相互作用,调控活性氧(ROS)和活性氮(RNS)的产生,在调节植物生理活动及应对逆境胁迫中发挥重要作用(Zhao et al., 2021)。本研究表明,喷施100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT能有效增强虎舌红和朱砂根的活性氧清除效应,降低膜脂过氧

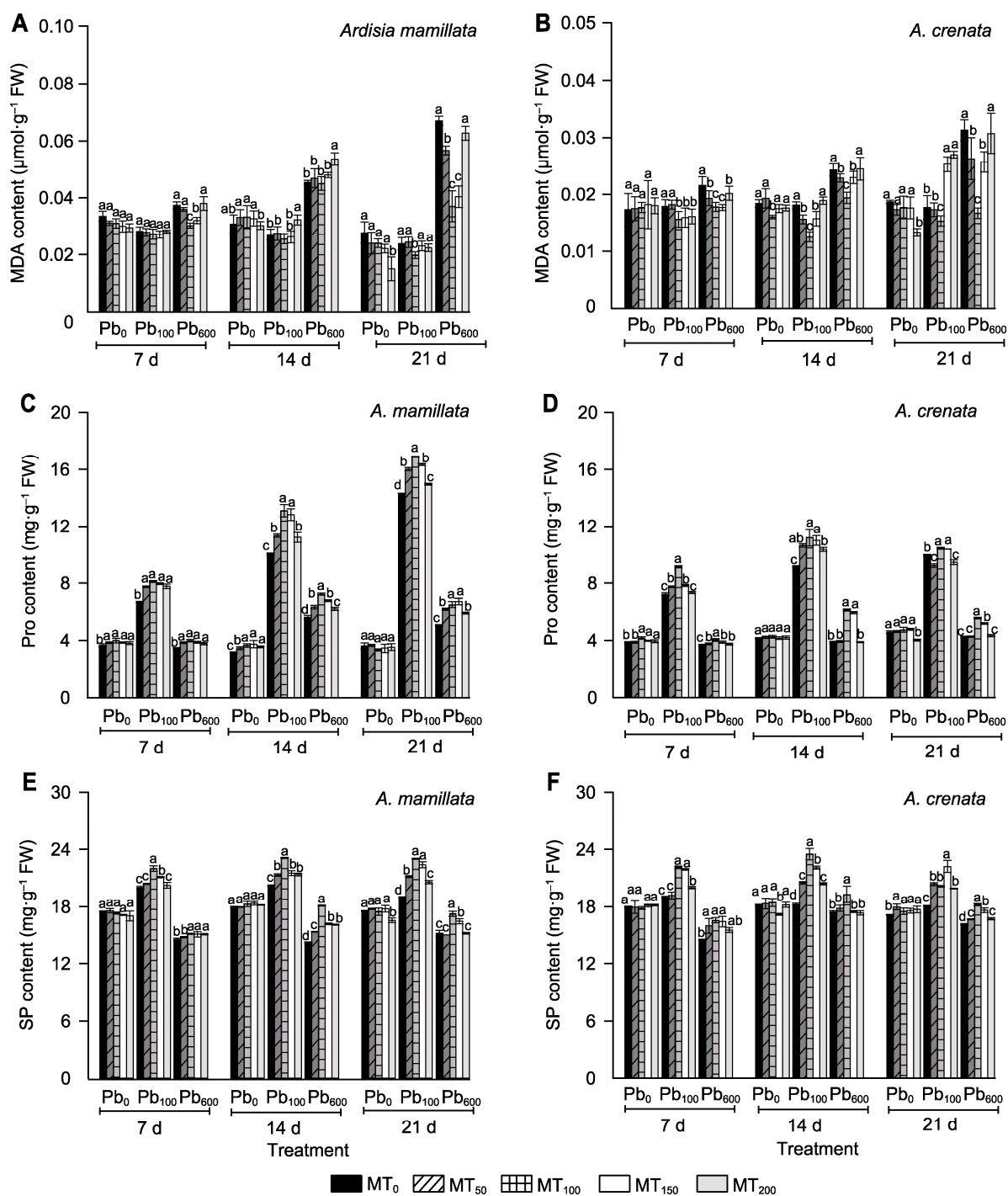


图2 不同浓度褪黑素对铅胁迫下虎舌红与朱砂根叶片丙二醛(MDA) (A, B)、脯氨酸(Pro) (C, D)和可溶性蛋白(SP) (E, F)含量的影响 (A), (C), (E) 虎舌红; (B), (D), (F) 朱砂根。Pb₀、Pb₁₀₀、Pb₆₀₀、MT₀、MT₅₀、MT₁₀₀、MT₁₅₀和MT₂₀₀同图1。不同小写字母表示相同时期不同处理组间在0.05水平差异显著。

Figure 2 Effects of different concentrations of melatonin on the contents of malondialdehyde (MDA) (A, B), proline (Pro) (C, D) and soluble protein (SP) (E, F) in leaves of *Ardisia mamillata* and *A. crenata* under lead stress (A), (C), (E) *Ardisia mamillata*; (B), (D), (F) *A. crenata*. Pb₀, Pb₁₀₀, Pb₆₀₀, MT₀, MT₅₀, MT₁₀₀, MT₁₅₀, and MT₂₀₀ are the same as shown in Figure 1. Different lowercase letters indicate significant differences among the treatments during the same stage at 0.05 level.

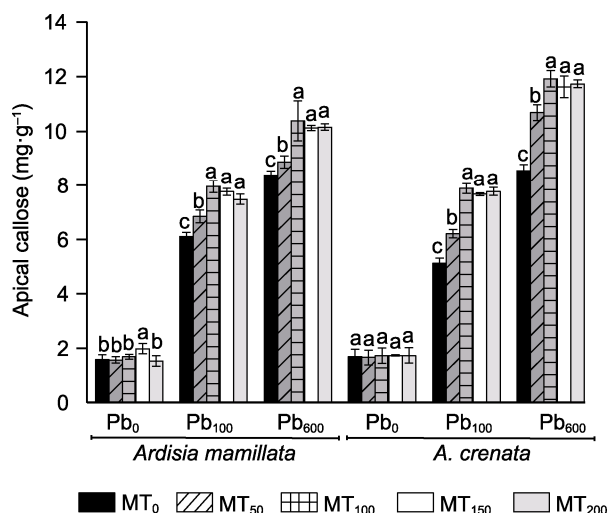


图3 不同浓度褪黑素对铅胁迫下虎舌红与朱砂根根尖胼胝质含量的影响

Pb₀、Pb₁₀₀、Pb₆₀₀、MT₀、MT₅₀、MT₁₀₀、MT₁₅₀和MT₂₀₀同图1。不同小写字母表示相同时期不同处理组间在0.05水平差异显著。

Figure 3 Effects of different concentrations of melatonin on callose content in root tips of *Ardisia mamillata* and *A. crenata* under lead stress

Pb₀, Pb₁₀₀, Pb₆₀₀, MT₀, MT₅₀, MT₁₀₀, MT₁₅₀, and MT₂₀₀ are the same as shown in Figure 1. Different lowercase letters indicate significant differences among the treatments during the same stage at 0.05 level.

化水平, 缓解铅胁迫下根系DNA损伤, 进而提高2种植物对铅毒的抗性。

植物体内的抗氧化酶可通过抑制氧自由基的产生或将其转化为低毒/无毒物质从而维系活性氧代谢平衡, 有效减轻逆境胁迫下活性氧自由基对植株造成的损害, 并增强其抗逆性(Etesami and Jeong, 2018)。韩航等(2018)发现铅胁迫下金丝草(*Pogonatherum crinitum*) POD活性增强而SOD和CAT活性降低。本研究中, 虎舌红和朱砂根3种抗氧化酶活性在铅胁迫下均表现增强。这与刘灿玉等(2015)用不同浓度铅处理莱菔大姜(*Zingiber officinale*)的研究结果相似。植物抗氧化防御系统对镉胁迫的响应因物种不同而异(安婷婷等, 2021), 推测其对铅胁迫的响应也存在类似效应。本研究中, SOD活性远高于POD和CAT且POD和CAT活性在高浓度铅胁迫时大幅下降, 这可能与SOD在CAT和POD之前将强氧化性的超氧阴离子自由基转化为低毒的过氧化氢有关。低浓度铅胁迫刺激2种植物中的SOD、POD和CAT保持在较高水平, 高浓度铅胁迫导致氧化应激反应, 继而发生膜脂过氧化, 对抗氧化酶活性产生抑制作用。喷施外源MT后, 2种植物叶片的酶活性明显高于对照组, 而随着MT浓度的升高, 其酶活性逐渐降低。MT作为植物体

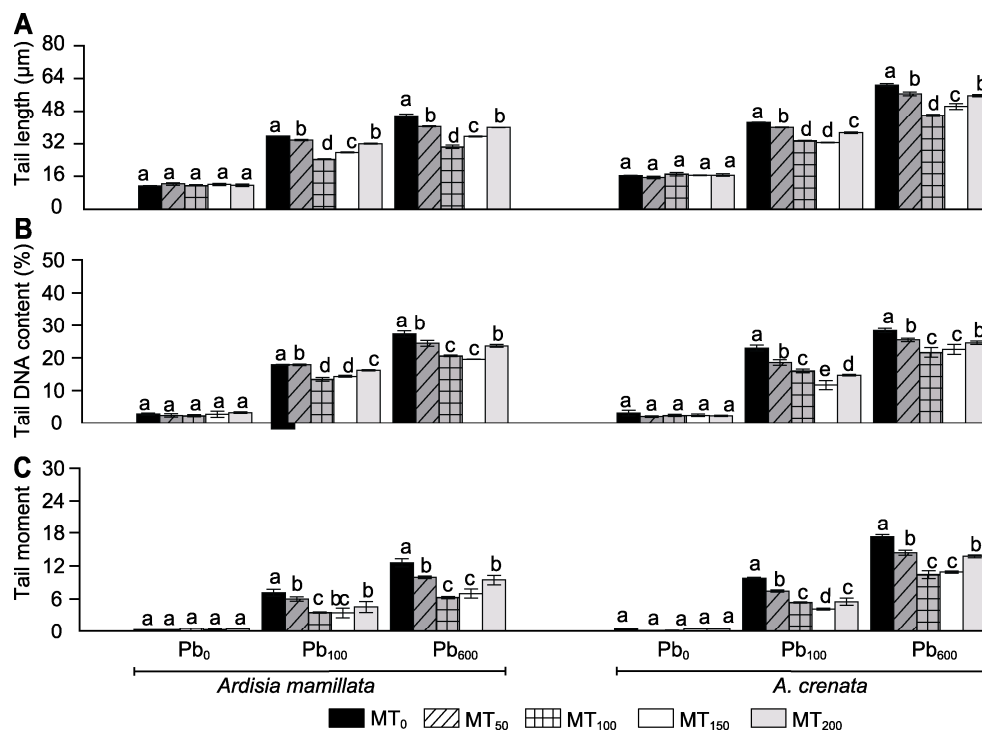


图4 不同浓度褪黑素对铅胁迫下虎舌红和朱砂根彗星尾长(A)、尾部DNA含量(B)及尾距(C)的影响

Pb₀、Pb₁₀₀、Pb₆₀₀、MT₀、MT₅₀、MT₁₀₀、MT₁₅₀和MT₂₀₀同图1。不同小写字母表示相同时期不同处理组间在0.05水平差异显著。

Figure 4 Effect of different concentrations of melatonin on tail length (A), tail DNA content (B), and tail moment (C) of *Ardisia mamillata* and *A. crenata* under lead stress

Pb₀, Pb₁₀₀, Pb₆₀₀, MT₀, MT₅₀, MT₁₀₀, MT₁₅₀, and MT₂₀₀ are the same as shown in Figure 1. Different lowercase letters indicate significant differences among the treatments during the same stage at 0.05 level.

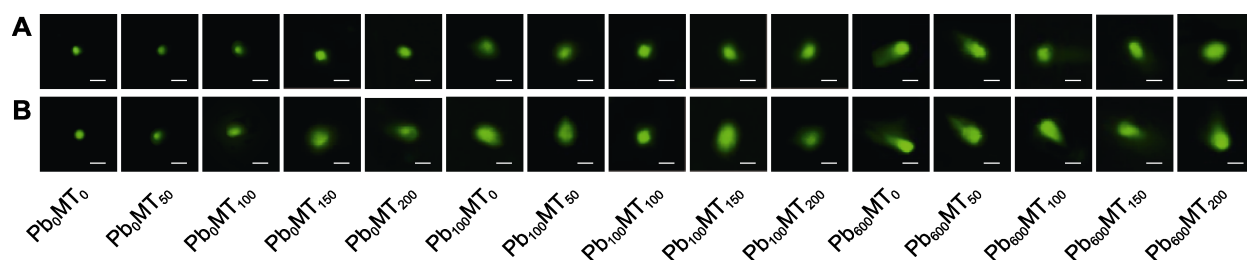


图5 不同浓度褪黑素对铅胁迫下虎舌红(A)和朱砂根(B)根系DNA损伤的影响

Bars=20 μm

Figure 5 Effects of different concentrations of melatonin on DNA damage in roots of *Ardisia mamillata* (A) and *A. crenata* (B) under lead stress

Bars=20 μm

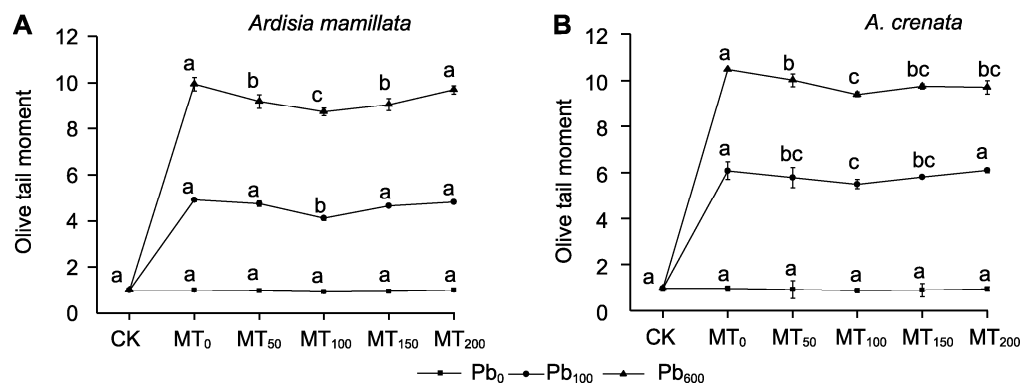


图6 不同浓度褪黑素对铅胁迫下虎舌红(A)和朱砂根(B)根系Olive尾距(OTM)值的影响

Pb₀、Pb₁₀₀、Pb₆₀₀、MT₀、MT₅₀、MT₁₀₀、MT₁₅₀和MT₂₀₀同图1。不同小写字母表示相同时期不同处理组间在0.05水平差异显著。

Figure 6 Effects of different concentrations of melatonin on Olive tail moment (OTM) value in roots of *Ardisia mamillata* (A) and *A. crenata* (B) under lead stress

Pb₀, Pb₁₀₀, Pb₆₀₀, MT₀, MT₅₀, MT₁₀₀, MT₁₅₀, and MT₂₀₀ are the same as in Figure 1. Different lowercase letters indicate significant differences among the treatments during the same stage at 0.05 level.

内有效的抗氧化物质,能直接清除植物体内的超氧阴离子自由基和过氧化氢,调控抗逆基因的表达,提高植物体内抗氧化酶水平(Tiryaki and Keles, 2012);还能保护细胞结构和抗氧化酶免受氧化损伤,但MT浓度过高则会导致缓解作用减弱(Li et al., 2018)。张建新等(2017)用0–0.4 mol·L⁻¹镉处理虎舌红和朱砂根,结果表明0.1 mol·L⁻¹以上的镉处理会损害抗氧化酶系统。对比本研究结果可知,虎舌红和朱砂根对镉胁迫的耐受程度优于铅胁迫。2种植物叶片中MDA含

量在铅胁迫后均呈现明显变化,随着提取时间的延长,叶片中MDA含量不断积累,叶肉细胞膜脂过氧化程度逐渐加剧(图2)。这与陈旋等(2021)的结论基本一致。然而本研究中,0 μmol·L⁻¹铅胁迫下,虎舌红与朱砂根在处理21天的不同浓度MT处理组间MDA含量呈显著差异。这与李冬等(2019)发现正常条件下随着外源MT浓度的升高,豌豆(*Pisum sativum*)幼芽各处理间MDA含量无显著差异的结论有所不同。究其原因,可能是不同植物材料在不同生长期对MT浓度

的敏感性有差异。在逆境条件下,植物体内Pro和SP含量增加,从而调节细胞质的渗透平衡和保护细胞膜结构(Teh et al., 2016)。本研究中,铅胁迫下质膜(plasma membrane, PM)表面SP含量增加,促进植物体信号转导和铅结合能力(邱丽丽等, 2017),同时,Pro含量升高增强了细胞渗透调节能力,外源施加MT后,虎舌红和朱砂根叶片中SP和Pro含量均随MT浓度的升高呈先升高后降低趋势,并在 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT处理下达到最大值。综上,3种抗氧化酶活性与Pro和SP含量具有相似的变化趋势,而与MDA含量变化趋势相反。结合各指标的功能,推测抗氧化酶与Pro和SP在植物应对氧化应激过程中存在交互作用。外源MT对铅胁迫下虎舌红与朱砂根生理指标的缓解效果具有明显的剂量-效应关系,其对重金属胁迫下植物体代谢的调控受多种生理反应和信号转导过程影响,还可能与不同类型植物中MT含量及其对不同重金属的耐受性强弱有关。

植物在遭遇生物或非生物胁迫时,胼胝质合酶在质外体部位快速合成胼胝质,并在韧皮部胞质分裂、气孔分化及胞间物质运输过程中起重要作用,是植物对逆境胁迫的一种重要响应机制(Nedukha, 2015; 张庆雯等, 2021)。研究表明,胼胝质含量增加对植物抗铅胁迫有促进作用(孙清斌等, 2016);胼胝质对植物抵御病害也具有重要意义(Ellinger et al., 2013; Ellinger and Voigt, 2014; 张镇川等, 2021)。本研究表明,朱砂根和虎舌红根尖胼胝质含量均随铅浓度的升高显著增加。结合渗透调节物质Pro和SP含量变化,随着胼胝质含量的增加,胼胝体逐渐形成并在细胞壁上沉积,堵塞筛孔、覆盖筛管端壁,从而使筛管进入休眠,抑制物质运输和信息传递,导致Pro和SP等物质含量减少,同时起到阻止铅离子进入植物体内的作用,暗示胼胝质的积累不仅作为一种毒害响应,还可能增强植物对环境胁迫的抗性。该研究结果与前人对铅诱导浮萍(*Lemna minor*)根内胼胝质合成的结论相似(Samardakiewicz et al., 2012)。相同铅浓度下,随着外施MT浓度的增加,根尖胼胝质含量先升高后维持不变,推测MT处理抑制 β -1,3-葡聚糖酶等具有降解胼胝质功能的酶活性,进而维持这种抑制作用以增强虎舌红和朱砂根对铅胁迫的抗性。

逆境条件下植物体内产生的活性氧会造成DNA

链断裂,引起碱性不稳定位点的形成(钟鸣等, 2012),进而减少小干扰RNA的转录,降低植物对胁迫的适应性(武亮和戚益军, 2020; Wu et al., 2020; 顾红雅等, 2021),最终导致细胞恶性转化甚至死亡。在彗星实验中,DNA断片数量与受损伤程度密切相关。受损DNA在碱性电泳液中解旋并释放DNA断链及片段,电泳过程中移向阳极并形成彗星图像。DNA损伤越严重,彗星尾部越长。目前,重金属对DNA损伤的研究多见于动物实验,而铅对植物DNA损伤的影响未见报道。通过彗星实验检测铅对2种植物DNA损伤的影响,发现在低浓度铅胁迫下朱砂根根系DNA受损程度高于虎舌红,高浓度铅胁迫时二者损伤程度相当。适宜浓度MT能有效缓解DNA损伤,二者的彗星图像尾长明显缩短,DNA断链也得到一定程度的修复,尤其在 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (虎舌红)和 $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (朱砂根) MT时缓解效果最佳;而MT浓度过高则缓解效果降低,甚至导致损伤加剧。本研究结果既验证了彗星实验用于植物DNA研究的可行性,又证明MT确实对重金属胁迫具有缓解作用(刘仕翔等, 2017)。Olive尾矩(OTM)指彗星尾部DNA百分含量和其尾部长度的乘积,是进行体外评价和定量分析DNA损伤程度的常用指标。我们发现, $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT处理时2种植物的OTM值最小,缓解效果最佳,推测MT可直接清除细胞中活性氧、诱导相关抗性基因表达、提高与DNA修复相关的酶活性(Zhao et al., 2021),从而对受损DNA链进行修复。MT对重金属胁迫下DNA损伤的具体修复机制有待进一步探究。

3 结论

铅胁迫下膜脂过氧化和根系DNA受损导致虎舌红和朱砂根的生理活性下降。相较而言,朱砂根对铅毒的耐受性强于虎舌红。MT通过增强植物的抗氧化酶活性、促进渗透调节物质积累、增加根尖胼胝质含量以及降低根系DNA损伤等途径增强虎舌红和朱砂根对铅胁迫的适应能力。其中 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT能有效减缓铅毒对2种植物的生长抑制,且对朱砂根的缓解效果优于虎舌红。在后续研究中,应着重探索与褪黑素相关的分子串扰网络,以便优化褪黑素在植物生长中的调控作用。

参考文献

- 安婷婷, 黄帝, 王浩, 张一, 陈应龙 (2021). 植物响应镉胁迫的生理生化机制研究进展. 植物学报 **56**, 347–362.
- 陈旋, 胡颖, 孙明升, 贾婕, 杨章旗 (2021). 外源调节物质对铅胁迫下格木幼苗生理特性的影响. 林业科学 **57**(2), 39–48.
- 顾红雅, 左建儒, 漆小泉, 杨淑华, 陈之端, 钱前, 林荣呈, 王雷, 萧浪涛, 王小菁, 陈凡, 姜里文, 白永飞, 种康, 王台 (2021). 2020年中国植物科学若干领域重要研究进展. 植物学报 **56**, 119–133.
- 郭炜 (2008). 紫外辐照导致植物细胞DNA损伤的彗星电泳检测及生理指标的测定. 硕士学位论文. 济南: 山东大学. pp. 18–20.
- 韩航, 陈顺钰, 薛凌云, 侯晓龙, 蔡丽平, 刘爱琴, 周垂帆 (2018). 铅胁迫对金丝草生长及生理生化的影响. 草业学报 **27**(4), 131–138.
- 何玲莉, 沈虹, 王燕, 王娟娟, 龚义勤, 徐良, 柳李旺 (2015). 铅胁迫下萝卜基因组DNA甲基化分析. 核农学报 **29**, 1278–1284.
- 李春燕, 王进鑫, 王敏, 陈科皓, 王榆鑫, 宋清玉 (2016). 铅胁迫下干旱对国槐和紫穗槐幼苗抗氧化酶活性的影响. 干旱地区农业研究 **34**(3), 174–178.
- 李冬, 王艳芳, 王悦华, 温烜琳, 蔡慧英, 郑晓蕾, 陈彤彤, 刘领 (2019). 外源褪黑素对镉胁迫下豌豆种子萌发、幼苗抗性生理及镉含量的影响. 核农学报 **33**, 2271–2279.
- 李合生 (2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社. pp. 164–169.
- 凌育赵, 刘经亮, 吴晓天, 刘佩珊 (2019). 虎舌红根茎三萜皂苷类成分的研究. 中成药 **41**, 2139–2144.
- 刘灿玉, 王允, 张逸, 曹逼力, 徐坤 (2015). 铅胁迫对姜叶片活性氧代谢的影响. 园艺学报 **42**, 2215–2222.
- 刘仕翔, 黄益宗, 罗泽娇, 黄永春, 杨秀文 (2017). 褪黑素对水稻镉积累及其化学结合形态的影响. 应用生态学报 **28**, 1588–1594.
- 骆永明, 滕应 (2018). 我国土壤污染的区域差异与分区治理修复策略. 中国科学院院刊 **33**, 145–152.
- 吕潇, 王聿双, 张晓倩, 刘海学 (2016). 不同浓度铅胁迫对向日葵幼苗蛋白质结构和表达的影响. 华北农学报 **31**(2), 60–64.
- 齐晓媛, 王文莉, 胡少卿, 刘梦雨, 郑成淑, 孙宪芝 (2021). 外源褪黑素对高温胁迫下菊花光合和生理特性的影响. 应用生态学报 **32**, 2496–2504.
- 邱丽丽, 赵琪, 张玉红, 戴绍军 (2017). 植物膜蛋白组组的逆境应答研究进展. 植物学报 **52**, 128–147.
- 孙清斌, 沈仁芳, 尹春芹, 赵学强 (2016). 铅胁迫下胡枝子根尖胼胝质形成规律及影响因素. 生态学报 **36**, 1073–1082.
- 王芳, 李永生, 王汉宁, 彭云玲, 方永丰, 王威, 马原忠 (2016). 钙对铅胁迫下玉米幼苗生长及生理特性的影响. 水土保持学报 **30**(3), 202–207.
- 武亮, 戚益军 (2020). 小RNA, 大本领: 22 nt siRNAs在植物适应逆境中的重要作用. 植物学报 **55**, 270–273.
- 徐向东, 孙艳, 郭晓芹, 孙波, 张坚 (2011). 高温胁迫下外源褪黑素对黄瓜幼苗光合作用及叶绿素荧光的影响. 核农学报 **25**, 179–184.
- 叶江华, 贾小丽, 陈晓婷, 林舜贤, 李远华, 王飞权, 胡永乐, 王海斌 (2017). 铅胁迫下不同茶树的生理响应及其亚细胞水平铅分布特性分析. 中国农业科技导报 **19**(11), 92–99.
- 张建新, 酆枫, 马丽, 张晓晓, 吴玉环, 杨云峰, 徐根娣, 刘鹏 (2017). 镉胁迫下朱砂根和虎舌红生理响应及其镉抗性. 水土保持学报 **31**(5), 321–327.
- 张庆雯, 王兆昊, 祁静静, 谢宇, 雷天刚, 何永睿, 陈善春, 姚利晓 (2021). 植物胼胝质合成酶研究进展. 园艺学报 **48**, 661–675.
- 张伟, 李锐, 李东, 祁献芳, 康文艺 (2011). 朱砂根化学成分和药理作用研究进展. 中国实验方剂学杂志 **17**(11), 279–282.
- 张镇川, 何冰, 李甜, 靳亚忠, 耿雪青 (2021). 冠菌素对番茄防御基因表达、胼胝质沉积及细菌生长的影响. 四川农业大学学报 **39**, 27–34.
- 赵成凤, 王晨光, 李红杰, 郑学慧, 杨梅, 张仁和 (2021). 干旱及复水条件下外源褪黑素对玉米叶片光合作用的影响. 生态学报 **41**, 1431–1439.
- 赵丽娟, 麻冬梅, 王文静, 马巧利, 李嘉文, 苏立娜 (2021). 外源褪黑素对盐胁迫下紫花苜蓿幼苗抗氧化能力以及光合作用效率的影响. 西北植物学报 **41**, 1355–1363.
- 钟鸣, 陈琢, 刘宛, 李培军, 台培东 (2012). 逆境胁迫下植物DNA损伤和DNA错配修复研究进展. 生态学杂志 **31**, 2404–2411.
- Debnath B, Hussain M, Irshad M, Mitra S, Li M, Liu S, Qiu DL (2018). Exogenous melatonin mitigates acid rain stress to tomato plants through modulation of leaf ultrastructure, photosynthesis and antioxidant potential. *Molecules* **23**, 388.
- Ellinger D, Naumann M, Falter C, Zwikowics C, Jamrow T, Manisseri C, Somerville SC, Voigt CA (2013). Eleva-

- ted early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **161**, 1433–1444.
- Ellinger D, Voigt CA** (2014). Callose biosynthesis in *Arabidopsis* with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Ann Bot* **114**, 1349–1358.
- Etesami H, Jeong BR** (2018). Silicon (Si): review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. *Ecotox Environ Safe* **147**, 881–896.
- Izbiańska K, Arasimowicz-Jelonek M, Deckert J** (2014). Phenylpropanoid pathway metabolites promote tolerance response of lupine roots to lead stress. *Ecotox Environ Safe* **110**, 61–67.
- Köhle H, Jeblick W, Poten F, Blaschek W, Kauss H** (1985). Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2+} -dependent process. *Plant Physiol* **77**, 544–551.
- Li JH, Arkorful E, Cheng SY, Zhou QQ, Li H, Chen X, Sun K, Li XH** (2018). Alleviation of cold damage by exogenous application of melatonin in vegetatively propagated tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Sci Hortic* **238**, 356–362.
- Nedukha OM** (2015). Callose: localization, functions, and synthesis in plant cells. *Cytol Genet* **49**, 49–57.
- Samardakiewicz S, Krzesłowska M, Bilski H, Bartosiewicz R, Woźny A** (2012). Is callose a barrier for lead ions entering *Lemna minor* L. root cells? *Protoplasma* **249**, 347–351.
- Shahid M, Arshad M, Kaemmerer M, Pinelli E, Probst A, Baque D, Pradere P, Dumat C** (2012). Long-term field metal extraction by *Pelargonium*: phytoextraction efficiency in relation to plant maturity. *Int J Phytoremediat* **14**, 493–505.
- Teh CY, Shaharuddin NA, Ho CL, Mahmood M** (2016). Exogenous proline significantly affects the plant growth and nitrogen assimilation enzymes activities in rice (*Oryza sativa*) under salt stress. *Acta Physiol Plant* **38**, 151.
- Tiryaki I, Keles H** (2012). Reversal of the inhibitory effect of light and high temperature on germination of *Phacelia tanacetifolia* seeds by melatonin. *J Pineal Res* **52**, 332–339.
- Wu HH, Li BS, Iwakawa HO, Pan YJ, Tang XL, Linghu QY, Liu YL, Sheng SX, Feng L, Zhang H, Zhang XY, Tang ZH, Xia XL, Zhai JX, Guo HW** (2020). Plant 22-nt siRNAs mediate translational repression and stress adaptation. *Nature* **581**, 89–93.
- Zhao DK, Wang HP, Chen SY, Yu DQ, Reiter RJ** (2021). Phytemelatonin: an emerging regulator of plant biotic stress resistance. *Trends Plant Sci* **26**, 70–82.

Effects of Exogenous Melatonin on Physiological Response and DNA Damage of *Ardisia mamillata* and *A. crenata* Under Lead Stress

Jinxiang Ai¹, Jiayi Song¹, Zhenan Yan¹, Zhichao Wang¹, Wenqian Chen¹
Yuhuan Wu^{2,3}, Yanyan Wang¹, Leilei Pan¹, Yutao Xu¹, Peng Liu^{1*}

¹Botany Laboratory, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; ²College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; ³Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China

Abstract Lead (Pb) is a major abiotic constraint affecting plant growth. To compare the anti-lead ability of two *Ardisia* species and investigate the physiological responses and DNA damage to the treatments of exogenous melatonin (MT) under lead stress, hydroponic experiment was carried out with 2-year-old seedlings of *A. mamillata* and *A. crenata*. The results showed that with the increasing of the lead stress concentration in the same period of time, the three antioxidant enzyme activities, proline (Pro) and soluble protein (SP) contents of the *A. mamillata* and *A. crenata* were all increased first and then decreased, while malondialdehyde (MDA) content decreased at first and then increased, the root tip callosin content continues to rise, DNA damage in roots was increased. After the application of appropriate concentrations of exogenous MT, the activities of antioxidant enzymes in both plants were effectively enhanced and reached a maximum at 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT treatment under different concentrations of Pb, and the contents of Pro and SP were significantly increased. However, the MDA content decreased significantly at first and then increased slowly. The root tip callosin content continues to increase and the root DNA damage was improved. With the increasing of MT concentration, the alleviating effect of melatonin on *A. mamillata* and *A. crenata* gradually weakened. *A. crenata* is more resistant to lead stress and its physiological response is more stable than *A. mamillata*. Exogenous application of MT can effectively alleviate the toxic effect of lead stress on *A. mamillata* and *A. crenata* (relief effect of *A. crenata* > *A. mamillata*), and enhance its tolerance to lead toxicity, among which 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT treatment has the best mitigation effect. We revealed the superiority of lead resistance of *A. mamillata* and *A. crenata*, and the alleviating effect of exogenous MT on lead poisoning, thus providing a theoretical reference for the study of lead resistance of *Ardisia*.

Key words *Ardisia mamillata*, *A. crenata*, lead stress, melatonin, DNA damage

Ai JX, Song JY, Yan ZN, Wang ZC, Chen WQ, Wu YH, Wang YY, Pan LL, Xu YT, Liu P (2022). Effects of exogenous melatonin on physiological response and DNA damage of *Ardisia mamillata* and *A. crenata* under lead stress. *Chin Bull Bot* 57, 171–181.

* Author for correspondence. E-mail: sky79@zjnu.cn