

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.02.017

# 菲胁迫下蒿柳抗氧化系统的响应

李霞<sup>1,2</sup>, 马晓东<sup>1</sup>, 邹竣竹<sup>1</sup>, 周晓星<sup>3</sup>, 孙振元<sup>1</sup>, 韩蕾<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 北京 100091;

2. 菏泽学院农业与生物工程学院(牡丹学院), 山东 菏泽 274000;

3. 岳阳市林业科学研究所, 湖南 岳阳 414000)

**摘要:** [目的] 研究菲胁迫下活性氧和抗氧化物质的变化规律, 探究蒿柳抗氧化系统的防御机制, 为提高其对多环芳烃(PAHs)的抗性加强植物修复的研究提供理论依据。[方法] 以蒿柳扦插苗为试验材料, 采用水培方式, 研究其在0、1.0 mg·L<sup>-1</sup>菲处理下活性氧、抗氧化酶、抗氧化剂以及丙二醛(MDA)的动态变化, 处理时间为16 d。[结果] 研究表明: (1) 菲处理后第4天, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量和氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)生成速率迅速增加, MDA含量升高, 过氧化氢酶(CAT)活性显著上升; 第8天超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性显著升高; 第16天时, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量下降到与对照无显著差异, O<sub>2</sub><sup>-</sup>和MDA的增加量下降。(2) 还原型谷胱甘肽(GSH)和谷胱甘肽还原酶(GR)在处理第4天即迅速上升, 谷胱甘肽-S-转移酶(GST)呈缓慢上升趋势。(3) 还原型抗坏血酸(AsA)含量在处理第4天低于对照, 但随着处理时间的延长呈上升趋势, 在第16天时高于对照。[结论] 菲胁迫下, O<sub>2</sub><sup>-</sup>是造成细胞膜脂过氧化的主要活性氧, SOD活性一直高于对照, 但不足以清除增加的O<sub>2</sub><sup>-</sup>, CAT和POD的升高可以清除过量的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; GSH是抵御菲胁迫的有效抗氧化剂, 并通过GST的催化参与菲的解毒。

**关键词:** 蒿柳; 菲; 活性氧; 抗氧化物质

**中图分类号:** S718.43

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2020)02-0138-07

人类的生存环境离不开地表水体和土壤, 然而, 由于工业化进程的加速, 有害物质的种类和数量急剧增加, 破坏生态平衡, 且易通过食物链的富集作用危及人类健康。多环芳烃(PAHs)具有难降解性、毒性(致癌、致突变、致畸效应)和生物蓄积性<sup>[1-2]</sup>, 是各国优先控制的一类污染物, 美国国家环保局(EPA)将萘、菲、芘、苯并[a]芘等16种PAHs列为优先控制污染物<sup>[3]</sup>。在中国东部109个农业土壤点收集的表层土壤样本中, PAHs的总浓度从8.8到3 880 μg·kg<sup>-1</sup>不等<sup>[4]</sup>。菲是三环的PAHs类, 主要来源于焦化厂、炼油厂等企业生产的废水、废气及汽车的尾气排放、垃圾焚烧等, 是PAHs的代表, 通常在土壤、水体和沉积物中的

含量较高。

植物修复是一种利用根系和地上部分修复污染土壤和沉积物的低成本修复技术, 近年来得到了广泛的研究; 但目前植物修复多环芳烃的研究多以草本植物为主, 而木本植物具有生物量大、根系发达及地上部分可多年生长等优点。生长较快的洋白蜡(*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.)、DN 34杨(*Populus deltoides* Marsh.×*P. nigra* L. DN 34)和黑柳(*Salix nigra* Marsh.)相比, 黑柳对土壤中PAHs的降解率最高<sup>[5]</sup>。Hultgren等<sup>[6]</sup>温室实验表明, 蒿柳(*Salix viminalis* L.)种植土壤中菲和芘的降解率分别是没有植物存在的1.47倍和1.27倍。

植物在修复PAHs的过程中, 应能承受由污染

收稿日期: 2019-07-29 修回日期: 2019-12-23

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“雄安新区水体净化灌木柳引种与应用模式”(CAFYBB2018ZB002); 湖南省林业科技计划项目“基于重金属污染植物修复的灌木能源柳引种与评价(XLK201834)”

\* 通讯作者: 韩蕾, 女, 研究员, 研究方向为观赏植物发育生理与分子生物学. E-mail: hdd@caf.ac.cn

物引起的胁迫,但高浓度 PAHs 对植物具有毒害作用,导致其形态学、细胞学以及代谢紊乱<sup>[7]</sup>,甚至死亡<sup>[8]</sup>。活性氧(ROS)是逆境下破坏植物防御系统,使细胞中毒死亡的重要因素,而抗氧化系统(AOS)在活性氧的清除中起重要作用,常被用于植物的抗性评价<sup>[9]</sup>。关于植物对 PAHs 胁迫活性氧生成及抗氧化反应的研究有少量报道,如 Salehi-Lisar 等<sup>[10]</sup>用苜蓿处理小麦(*Triticum aestivum* L.)、紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)和向日葵(*Helianthus annuus* L.),认为过氧化氢酶(CAT)是植物抵御胁迫的重要酶。Weisman 等<sup>[11]</sup>研究表明,PAHs 可诱导拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)的谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活性增加。Shen 等<sup>[7]</sup>认为,类胡萝卜素和超氧化物歧化酶(SOD)是非胁迫下参与活性氧清除的最有效的抗氧化剂。这些报道表明了抗氧化系统和 PAHs 之间的关系,但关于木本植物这方面的研究未见报道,而揭示植物膜脂过氧化的原因及关键抗氧化剂的响应是提高植物在 PAHs 污染环境中的抗性的关键。因此,本研究以蒿柳为研究对象,通过前期浓度筛选试验得出其在  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  菲处理下,植物的生长及根系生理指标受到显著影响,因此,研究该浓度下抗氧化系统的响应,为提高木本植物在 PAHs 胁迫下的抗性加强修复效应的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试植物

选取蒿柳同一无性系、直径为  $(1.0\pm 0.2) \text{ cm}$  的1年生枝条,在水中剪成  $10 \text{ cm}$  长插条,扦插在灰色塑料箱(容量  $20 \text{ L}$ )内,用 PVC 板支撑并用海绵固定。用自来水培养2周后抹芽,保留1个枝芽,改用  $1/2$  Hoagland 营养液培养,每3 d换1次营养液,继续培养8周。实验在玻璃温室内进行,自然光照。

### 1.2 有机污染试剂

供试有机污染物为菲(纯度 $>97\%$ ),其分子量为  $178.238 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$  纯水中溶解度为  $7.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,辛醇-水分配系数(LogKow)为 4.46。用甲醇(色谱纯)做溶剂配制菲的标准溶液。

### 1.3 试验设计

将长势一致的植株移入玻璃容器中适应1周后处理。菲标准溶液与蒸馏水配制的改良  $1/2$  Hoagland 营养液混合,配制成菲浓度为  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的处

液,以未加菲的蒸馏水配制的改良  $1/2$  Hoagland 营养液为对照, pH 值为 6.0,处理液中甲醇的浓度为  $0.05\%$ 。Chapin 等<sup>[12]</sup>报道,甲醇浓度小于  $0.1\%$  的营养液对植物根系生长没有影响。每个处理3个重复,每个重复15根插条。容器外壁用锡箔纸包裹,保持根系和溶液避光且防止菲的光降解,每2 d更换1次处理液,每4 d随机交换容器在温室中的位置。自然光照,对培养液全程通氧。分别于试验第0、4、8、12、16天采样,测定叶片的  $\text{O}_2^-$  生成速率、 $\text{H}_2\text{O}_2$  含量, SOD、过氧化物酶(POD)、CAT、GST、谷胱甘肽还原酶(GR)的活性,还原型谷胱甘肽(GSH)、还原型抗坏血酸(AsA)以及丙二醛(MDA)的含量。

### 1.4 指标测定方法

1.4.1  $\text{O}_2^-$  生成速率和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的测定及原位染色  
每个重复将3棵植株中上部叶片剪碎混匀,放入液氮迅速冷冻并研磨。每个重复称取  $0.1 \text{ g}$ ,  $\text{O}_2^-$  生成速率的定量测定采用盐酸羟胺法<sup>[13]</sup>,  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的测定参考 Brennan 等<sup>[14]</sup>的方法进行。原位染色取上部第7~9片成熟叶,用打孔器形成圆形叶盘(直径  $1 \text{ cm}$ ),采用 NBT 染色法测定  $\text{O}_2^-$ (图 1A), DAB 染色法测定  $\text{H}_2\text{O}_2$ (图 1B)。

1.4.2 抗氧化物质及 MDA 含量的测定  
取样方法同 1.4.1 节。SOD 活性测定采用氮蓝四唑法<sup>[15]</sup>; POD 活性测定采用愈创木酚法<sup>[16]</sup>; CAT 活性测定采用紫外吸收法<sup>[17]</sup>; GST 活性测定参考 Habdous 等<sup>[18]</sup>的方法; GR 活性测定采用 Parida 等<sup>[19]</sup>的试验方法。GSH 含量测定参考 Baker 等<sup>[20]</sup>的方法; AsA 含量测定参考 Foyer 等<sup>[21]</sup>的方法。MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法<sup>[22]</sup>。

### 1.5 数据分析

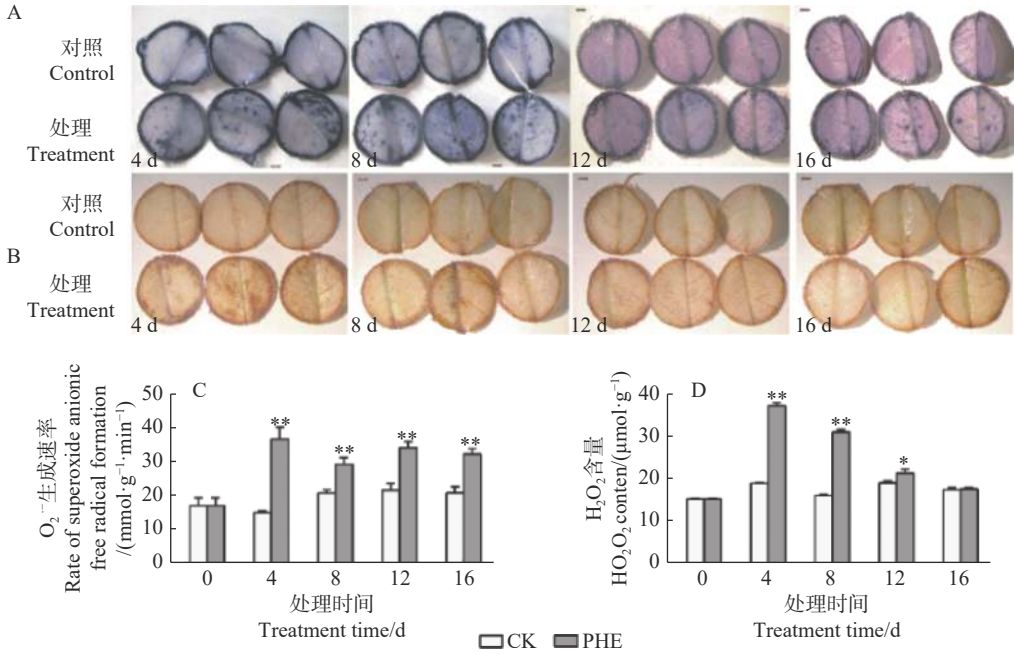
用 Excel2016 进行数据整理,用 GraphPad Prism Version 7.0 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA) 对测定数据作图,并进行单因素、双因素方差分析和多重比较。图中数据均为重复测定的平均值和标准误差。

## 2 结果与分析

### 2.1 菲胁迫下 $\text{O}_2^-$ 生成速率和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的变化

图 1 表明:  $\text{O}_2^-$  生成速率与  $\text{H}_2\text{O}_2$  均在菲处理后即大幅度增加。 $\text{O}_2^-$  生成速率在处理后就一直极显著高于对照 ( $p < 0.01$ ), 其中,第4天上升最快,为对照的 2.42 倍,之后有所下降。 $\text{H}_2\text{O}_2$  在菲处理

后第4天和第8天与对照达极显著差异 ( $p < 0.01$ )，分别为对照的1.95倍和1.92倍，之后呈下降趋势，处理第16天时与对照相比无显著差异 ( $p > 0.05$ )。



注：A：O<sub>2</sub><sup>-</sup>原位组织化学染色，B：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>原位组织化学染色。叶片上面的蓝色和黄色斑点分别代表O<sub>2</sub><sup>-</sup>和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的生成量。CK和PHE分别代表对照和1.0 mg·L<sup>-1</sup>菲处理。同一时间点对照与处理间，\*表示差异显著 ( $p < 0.05$ )，\*\*表示差异极显著 ( $p < 0.01$ )，下同  
Notes: A: Superoxide anionic free radical in situ histochemical staining, B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in situ histochemical staining. The blue and yellow spots on the leaves represent the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively. CK, PHE represent the control samples and treatment samples with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> phenanthrene respectively. Between control and treatment at the same time point, \* indicates significant difference ( $p < 0.05$ ), \*\* indicates  $p < 0.01$ , the following figures as the same.

图1 菲处理下蒿柳活性氧的动态变化

Fig. 1 Changes of ROS contents under phenanthrene treatment

2.2 菲胁迫下SOD、POD和CAT活性的变化

图2表明：菲胁迫下，SOD、POD和CAT活性均升高。与对照相比，SOD活性和POD活性均在处理第8天出现显著变化 ( $p < 0.05$ )，分别为对照的1.32和1.23倍，之后SOD的变化不大，

POD一直升高，第16天时达到最高，为对照的2.03倍。CAT在处理第4天迅速升高，为对照的2.69倍，之后出现下降，但与对照相比一直呈显著 ( $p < 0.05$ )或极显著差异 ( $p < 0.01$ )。

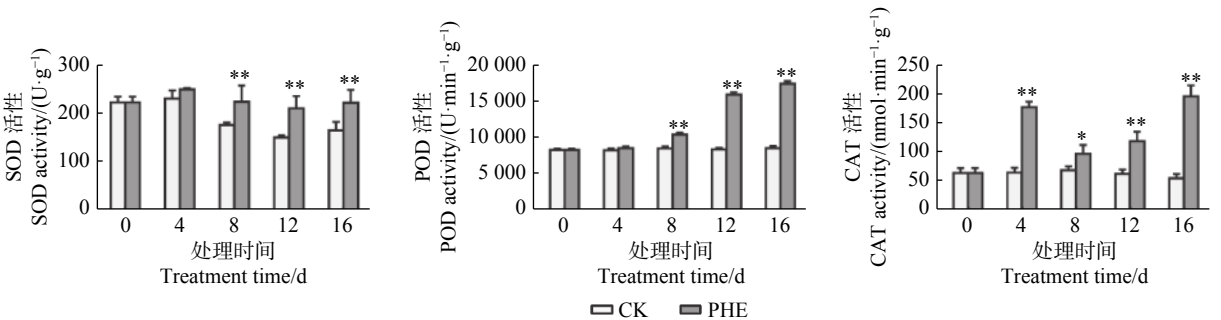


图2 菲处理下蒿柳SOD、POD、CAT活性的变化

Fig. 2 Changes of SOD、POD、CAT activity under phenanthrene treatment

2.3 菲胁迫下GST和GR活性的变化

图3表明：菲处理后，GST和GR活性均上

升；GST活性在处理第4天和第8天与对照相比差异不显著，第12~16天迅速上升，第16天时为

对照的 1.94 倍, 差异极显著 ( $p < 0.01$ )。GR 活性在处理后即迅速上升, 与对照相比呈极显著差异 ( $p < 0.01$ ), 第 16 天为对照的 2.24 倍。

## 2.4 菲胁迫下 GSH 和 AsA 含量的变化

图 4 表明: 菲处理后, GSH 含量迅速升高,

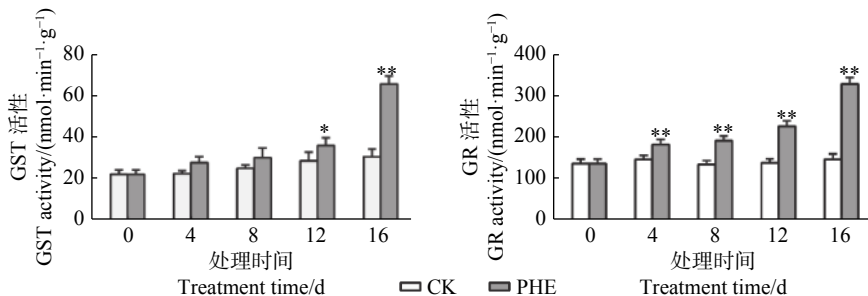


图 3 菲处理下蒿柳 GST 和 GR 活性的变化

Fig. 3 Changes of GST and GR activity under phenanthrene treatment

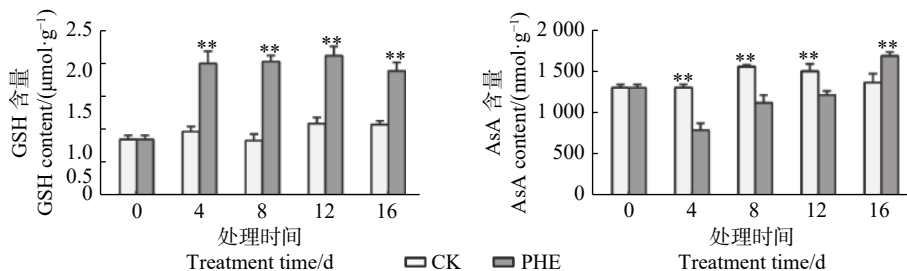


图 4 菲处理下蒿柳 GSH 和 AsA 含量的变化

Fig. 4 Changes of GSH and AsA contents under phenanthrene treatment

## 2.5 菲胁迫下 MDA 含量的变化

图 5 表明: 菲胁迫下, MDA 含量一直高于对照, 第 8 天上升最快, 与对照相比差异极显著 ( $p < 0.01$ ), 为对照的 1.24 倍, 第 16 天时有所下降, 为对照的 1.14 倍。

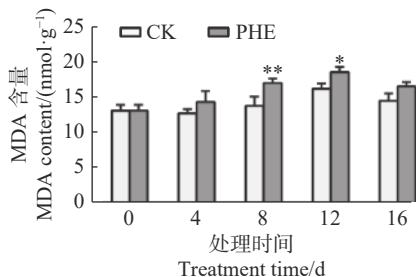


图 5 菲处理下蒿柳 MDA 含量的变化

Fig. 5 Changes of MDA contents under phenanthrene treatment

# 3 讨论

## 3.1 菲胁迫下活性氧的动态变化

植物遭受胁迫后往往体内活性氧增加, 主要包括  $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ 、单线态氧 ( $^1O_2$ ) 和羟自由基

且一直处于较高水平, 与对照相比呈极显著差异 ( $p < 0.01$ ), 最大为对照的 2.43 倍。AsA 的含量处理后即低于对照, 第 4 天时为对照的 60.6%, 但随着胁迫时间的延长呈上升趋势, 第 16 天时高于对照 ( $p < 0.01$ ), 为对照的 1.23 倍。

( $\cdot OH$ )。  $O_2^{\cdot-}$  和  $H_2O_2$  能直接氧化细胞内的许多组分, 破坏生物大分子, 造成膜脂过氧化。本试验中,  $O_2^{\cdot-}$  生成速率在菲处理后一直高于对照, 这是因为 PAHs 被植物吸收后首先在体内发生羟基化反应, 单加氧酶 (如细胞色素 P-450) 可使单环和 PAHs 转化为羟基化合物, 在此过程中可能把电子漏给  $O_2$  形成  $O_2^{\cdot-}$ , 或者在无氧条件下发生氧化还原反应形成超氧化物和过氧化物<sup>[23-24]</sup>。随着处理时间的延长,  $O_2^{\cdot-}$  生成速率的增加量有所下降, 这与 SOD 活性的升高有关, SOD 歧化  $O_2^{\cdot-}$  生成  $H_2O_2$ , 但 SOD 的升高不足以清除产生的  $O_2^{\cdot-}$ , 因此,  $O_2^{\cdot-}$  一直高于对照。菲处理后  $H_2O_2$  含量迅速升高, 之后一直下降, 最后与对照无显著差异, 这说明 CAT 和 POD 活性的上升可以清除多余的  $H_2O_2$ 。较高浓度的  $H_2O_2$  可以在过氧化物酶体和乙醇酸循环中被 CAT 催化转化为  $O_2$  和  $H_2O$ , 而在不含 CAT 的叶绿体、细胞质及含 CAT 很少的线粒体中,  $H_2O_2$  又在 POD 的催化下反应生成  $O_2$  和  $H_2O$ <sup>[25]</sup>。

### 3.2 菲胁迫下抗氧化物质的动态变化

诱导植物氧化应激是 PAHs 已知的效应<sup>[26]</sup>, 研究表明, 抗氧化酶对 PAHs 有不同的响应, 依据植物种类和 PAHs 的浓度而不同。拟南芥在 0、0.25、0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 菲处理下, CAT 活性无显著变化, SOD 和 POD 活性上升<sup>[27]</sup>。在荧蒽处理下, 拟南芥随荧蒽浓度的升高叶片 SOD 活性提高, GSH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 MDA 含量均有不同程度的增加<sup>[28]</sup>。本试验中, 3 种酶活性在菲处理后都升高, 对于缓解氧化胁迫起重要作用。SOD 以 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 为底物, 将其歧化为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。CAT 可直接清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 是早期反应的重要保护酶。POD 则有不同的反应机制, Chroma 等<sup>[29]</sup> 研究得出, POD 和细胞色素 P450 这 2 种酶系统在植物体内对外源物质多氯联苯 (PCBs) 和 PAHs 的解毒机制中都有部分参与。本研究中, POD 与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 成显著负相关 ( $p < 0.05$ ), POD 可能利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化菲或其代谢中间产物, 使其变成低毒或无毒的物质, 这与 Gao 等<sup>[30]</sup> 的研究结果一致。

GSH 和 AsA 是植物体内重要的抗氧化剂。本试验中, 菲处理后 GSH 含量迅速上升, GR 的活性上升使蒿柳保持较高的 GSH 含量。GSH 除清除活性氧外以外, 对有毒的外来化合物具有解毒作用, 是植物防御系统的重要组成部分<sup>[31]</sup>。GST 专一催化 GSH 的巯基与其它化合物的亲电基团作用, 生成谷胱甘肽衍生物<sup>[32]</sup>。本试验中, 菲诱导了 GST 活性上升, 且在第 16 天时达到对照的 2.1 倍, 说明随着菲向地上部分的转运增多, 经细胞色素第一步代谢后, 代谢生成的羟基化合物等中间产物可以在 GST 的催化下与 GSH 结合, 从而达到解毒的目的。AsA 含量与对照相比降低, Caviglia 等<sup>[33]</sup> 也报道了类似的结果, 长期 (2 周和 4 周) 施用除草剂百草枯后, 植物组织中的抗氧化剂浓度显著降低, 植物组织产生大量草酸钙, 草酸钙的前体是抗坏血酸。这是因为植物组织中的 AsA 可以被在细胞中积累的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 迅速转化。Wieczorek 等<sup>[34]</sup> 把蒽和苯并 [k] 荧蒽喷洒在芹菜叶片上, 导致 AsA 含量降低, 总酸含量升高, 可以间接证明这种转化。本研究在处理过程中, 虽然 AsA 低于对照, 但一直呈上升趋势, 而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量一直下降, 间接证明了这种相关性。

### 3.3 菲胁迫下 MDA 的动态变化

MDA 含量是活性氧积累和脂质过氧化的生物

标志物<sup>[35]</sup>, 通常用于说明植物对氧化应激的敏感性<sup>[36]</sup>。植物中 PAHs 毒性引起的 MDA 积累在拟南芥和菜心 (*Brassica campestris* var. *campestris* L.) 中已有报道<sup>[27, 37]</sup>。本研究中, MDA 在胁迫过程中一开始上升, 后呈下降趋势, 这与 Salehi-Lisar 等<sup>[10]</sup> 用苜蓿处理下盆栽小麦、紫花苜蓿和向日葵的研究结果一致。这是由于蒿柳在一开始产生氧化应激反应, 应激条件下的代谢失衡导致活性氧的产生, 活性氧作为信号分子被传导到植物体内, 触发抗氧化系统的防御机制, 从而达到适应环境的目的, 从而缓解应激条件<sup>[36, 38]</sup>。

## 4 结 论

PAHs 是一种能诱导蒿柳叶片细胞氧化应激反应的污染物。菲处理下, 首先, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 大量增加, MDA 含量升高, 蒿柳表现出积极的防御措施, 表现为抗氧化酶和抗氧化剂的上升; SOD 活性升高, 但不足以清除多余的 O<sub>2</sub><sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 是造成细胞膜脂过氧化的主要活性氧; CAT 与 POD 的升高可以清除菲胁迫下产生的过量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 对于缓解氧化胁迫起重要作用, 其中, CAT 是蒿柳早期响应的重要标志物; 抗氧化剂中, GSH 对 PAHs 的反应最敏感, GSH 是蒿柳应对菲胁迫的重要抗氧化剂, 并通过 GST 的催化对植物体内菲的代谢中间产物进行解毒。

### 参 考 文 献:

- [1] Ruby M V, Lowney Y W, Bunge A L, *et al.* Oral bioavailability, bioaccessibility, and dermalabsorption of PAHs from soil-state of the Science[J]. *Environmental Science Technology*, 2016, 50(5): 2151-2164.
- [2] Gong C, Shen G, Huang H, *et al.* Removal and transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons during electrocoagulation treatment of an industrial wastewater[J]. *Chemosphere*, 2017, 168(1): 58-64.
- [3] Jan F, Khan S, Ishaq M, *et al.* Brick kiln exhaust as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the surrounding soil and plants: A case study from the city of Peshawar[J]. *Arabian Journal of Geosciences*, 2014, 7(1): 13-19.
- [4] Sun Z, Liu J, Zhuo S J, *et al.* Occurrence and geographic distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in eastern China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(13): 12168-12175.
- [5] Spriggs T, Banks M K, Schwab P. Phytoremediation of Polycyclic

- Aromatic Hydrocarbons in Manufactured Gas Plant-Impacted Soil[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2005, 34: 1755-1762.
- [6] Hultgren J, Pizzul L, Castillo Mdel P, *et al.* Degradation of PAH in a creosote-contaminated soil. A comparison between the effects of willows (*Salix viminalis*), wheat straw and a nonionic surfactant[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 2010, 12(1): 54-56.
- [7] Shen Y, Li J F, Gu R C, *et al.* Carotenoid and superoxide dismutase are the most effective antioxidants participating in ROS scavenging in phenanthrene accumulated wheat leaf[J]. *Chemosphere*, 2018, 197: 513-525.
- [8] Alkio M, Tabuchi T M, Wang X, *et al.* Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(421): 2983-2994.
- [9] 何彩云, 李梦颖, 罗红梅, 等. 不同沙棘品种抗旱性的比较[J]. *林业科学研究*, 2015, 28(5): 634-639.
- [10] Salehi-Lisar S Y, Deljoo S. The physiological effect of fluorene on *Triticum aestivum*, *Medicago sativa*, and *Helianthus annuus*[J]. *Cogent Food & Agriculture*, 2015, 1: 1020189.
- [11] Weisman D, Alkio M, Colon-Carmona A. Transcriptional responses to polycyclic aromatic hydrocarbon-induced stress in *Arabidopsis thaliana* reveal the involvement of hormone and defense signaling pathways[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 59.
- [12] Chapin S, Moilanen L, Kielland K. Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge[J]. *Nature*, 1993, 361: 150-153.
- [13] Elstner E F, Heupel A. Inhibition of Nitrite Formation from Hydroxyl ammonium-chloride: A Simple Assay for Superoxide Dismutase[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 70(2): 616-620.
- [14] Brennan T, Frenkel C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear[J]. *Plant Physiology*, 1977, 59(3): 411-416.
- [15] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 211-213.
- [16] 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: 164-165.
- [17] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 168-169.
- [18] Habdous M, Vincent-Viry M, Visvikis S, *et al.* Rapid spectrophotometric method for serum glutathione-S-transferases activity[J]. *Clin Chim Acta*, 2002, 326(1-2): 131-142.
- [19] Parida A K, Das A B, Mohanty P. Investigations on the antioxidative defence responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes[J]. *Plant Growth Regulation*, 2004, 42: 213-226.
- [20] Baker M A, Cerniglia G J, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples[J]. *Analytical biochemistry*, 1990, 190(2): 360-365.
- [21] Foyer C H, Rowell J, Walker D. Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination[J]. *Planta*, 1983, 157: 239-244.
- [22] Castrejón S E, Yatsimirsky A K. Cyclodextrin enhanced fluorimetric determination of malonaldehyde by the thiobarbituric acid method[J]. *Talanta*, 1997, 44(6): 951-957.
- [23] 程国玲, 李培军, 王凤友, 等. 多环芳烃污染土壤的植物与微生物修复研究进展[J]. *环境污染治理技术与设备*, 2003, 4(6): 30-36.
- [24] 杨道丽. 植物细胞色素P450对土壤菲、芘污染胁迫的响应[D]. 昆明: 云南师范大学, 2006: 19-21.
- [25] 周丛义, 吴国利, 段壮芹, 等. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NOX系统: 一种植物体内重要的发育调控与胁迫响应机制[J]. *植物学报*, 2010, 45(5): 615-631.
- [26] Pašková V, Hilscherová K, Feldmannová M, *et al.* Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-heterocyclic derivatives[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(12): 3238-3245.
- [27] Liu H, Weisman D, Ye Y B, *et al.* An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Science*, 2008, 176(3): 375-382.
- [28] 叶媛蓓. 拟南芥对多环芳烃胁迫的生理响应[D]. 福州: 福建农林大学, 2007: 15-20.
- [29] Chroma L, Mackova M, Kucerova P, *et al.* Enzymes in Plant Metabolism of PCBs and PAHs[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2002, 22(1-2): 35-41.
- [30] Gao Y Z, Li H, Gong S S. Ascorbic acid enhances the accumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Roots of Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.)[J]. *Plos One*, 2012, 7(11): e50467.
- [31] Kavi Kishor P B, Sreenivasulu N. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue?[J]. *Plant, Cell & environment*, 2014, 37(2): 300-311.
- [32] Mannervik B, Danielson U H. Glutathione transferases-structure and catalytic activity[J]. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 1998, 23(3): 283-337.
- [33] Caviglia, A M, Modenesi P. Oxidative stress and ascorbic acid contents in *Parmotrema reticulatum* and *Parmelia sulcata thalli*[J]. *The Lichenologist*, 1999, 31(1): 105-110.
- [34] Wiczorek J, Sienkiewicz S, Pietrzak M, *et al.* Uptake and phytotoxicity of anthracene and benzo[k]fluoranthene applied to the leaves of celery plants (*Apium graveolens* var. *secalinum* L.)[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2015, 115: 19-25.
- [35] Gunes A, Pilbeam D, Inal A. Effect of arsenic-phosphorus interaction on arsenic induced oxidative stress in chickpea plants[J]. *Plant and*

Soil, 2009, 314(1-2): 211-220.

- [36] Davletova S, Schlauch K, Coutu J, *et al.* The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(2): 847-856.

[37] 梁勇生. 菜心对多环芳烃吸收及胁迫响应的机理研究[D]. 南宁: 广西大学, 2018: 64-65.

- [38] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, *et al.* Reactive oxygen gene network of plants[J]. *Plant Science*, 2004, 9(10): 490-498.

## Response of Antioxidant System of *Salix viminalis* under Phenanthrene Stress

LI Xia<sup>1,2</sup>, MA Xiao-dong<sup>1</sup>, ZOU Jun-zhu<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-xing<sup>3</sup>, SUN Zhen-yuan<sup>1</sup>, HAN Lei<sup>1</sup>

(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. College of Agriculture and Bioengineering (Peony Institute), Heze University, Heze 274000, Shandong, China; 3. Yueyang Research Institute of Forestry, Yueyang 414000, Hu'nan, China)

**Abstract:** [Objective] In order to explore the defense mechanism of the antioxidant system of *Salix viminalis*, the dynamic changes of reactive oxygen and antioxidant substances under phenanthrene stress were observed which can provide new evidence for improving the resistance of plants to polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) stress and enhancing the phytoremediation potential. [Method] The cutting seedlings of *S. viminalis* were selected as experimental materials, and a 16-day hydroponic experiment with 0 and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> phenanthrene concentrations were conducted to study the dynamic changes of reactive oxygen, antioxidant enzymes, antioxidants and malondialdehyde (MDA) contents. [Result] The Results showed that: (1) Under phenanthrene treatment, the superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content increased rapidly, then MDA content rose. Catalase (CAT) activity significantly increased on the 4th day, and the superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) activity increased on the 8th day. On the 16th day, no significant difference was found in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content between the samples treated with phenanthrene and that of the control. Meanwhile, the increment of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and MDA also slowed down. (2) The contents of reduced glutathione (GSH) and glutathione reductase rose rapidly on the 4th day under phenanthrene treatment, and the activity of glutathione-s-transferase (GST) increased slowly. (3) Under phenanthrene treatment, the content of ascorbic acid was initially lower than the control group, but higher on the 16th day as the treatment time continued. [Conclusion] Under phenanthrene stress, O<sub>2</sub><sup>-</sup> is the main reactive oxygen causing cell membrane lipid peroxidation. SOD activity is always higher than that of the control group, but not enough to eliminate the increased O<sub>2</sub><sup>-</sup>. The increase of CAT and POD could eliminate the excessive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. GSH is an effective antioxidant to resist the stress of phenanthrene and participates in the detoxification of phenanthrene through the catalysis of GST.

**Keywords:** *Salix viminalis*; phenanthrene; reactive oxygen; antioxidants

(责任编辑: 徐玉秀)