

DOI: 10.11686/cyxb2020411

http://cyxb.magtech.com.cn

王龙, 樊婕, 魏畅, 等. 外源抗坏血酸对铜胁迫菊苣幼苗生长的缓解效应. 草业学报, 2021, 30(4): 150—159.

WANG Long, FAN Jie, WEI Chang, et al. Mitigative effect of exogenous ascorbic acid on the growth of copper-stressed chicory (*Cichorium intybus*) seedlings. Acta Prataculturae Sinica, 2021, 30(4): 150—159.

外源抗坏血酸对铜胁迫菊苣幼苗生长的缓解效应

王龙¹, 樊婕¹, 魏畅¹, 李鸽子², 张静静¹, 焦秋娟¹, 陈果³, 孙彦姿⁴, 柳海涛^{1*}

(1. 河南农业大学资源与环境学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学农学院, 河南 郑州 450046; 3. 成都理工大学生态环境学院, 四川 成都 610059; 4. 西北农林科技大学草业与草原学院, 陕西 咸阳 712100)

摘要:为探究外源抗坏血酸(AsA)对铜(Cu)胁迫下菊苣幼苗生长的缓解效应,本研究以普那菊苣为试验材料,采用溶液培养法研究外源AsA对50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu胁迫下菊苣幼苗的生长、Cu积累和生理特性的影响。结果表明,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu胁迫严重抑制了菊苣幼苗的叶绿素含量、光合作用和生物量的积累,加剧了细胞膜脂质过氧化程度,降低了抗氧化酶(SOD、POD、CAT、APX)活性以及可溶性蛋白含量。外源AsA降低了根系对Cu的吸收和转运,缓解了Cu胁迫对菊苣幼苗的伤害,具体表现为根系、茎叶及总干物质质量提高;减少了光合色素(叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素以及类胡萝卜素)的降解,提高了光合作用参数;降低脂质过氧化对细胞膜的损伤;提高了抗氧化酶活性、可溶性蛋白含量以及内源AsA含量。总之,外源AsA通过提高Cu胁迫下菊苣幼苗光合作用特征、抗氧化酶活性和渗透调节物质的含量,缓解了Cu胁迫对菊苣幼苗生长的毒害作用。该结果为外源AsA应用于缓解植物Cu毒害及丰富菊苣耐Cu机制提供依据。

关键词:抗坏血酸;铜胁迫;菊苣幼苗;生理特性;缓解效应

Mitigative effect of exogenous ascorbic acid on the growth of copper-stressed chicory (*Cichorium intybus*) seedlings

WANG Long¹, FAN Jie¹, WEI Chang¹, LI Ge-zi², ZHANG Jing-jing¹, JIAO Qiu-juan¹, CHEN Guo³, SUN Luan-zi⁴, LIU Hai-tao^{1*}

1. College of Resources and Environment, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China; 3. College of Ecology and Environment, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059, China; 4. College of Grassland Agriculture, Northwest A & F University, Xianyang 712100, China

Abstract: This research explored the mitigative effect of exogenously applied ascorbic acid (AsA) on the growth, Cu accumulation and physiological characteristics of chicory (*Cichorium intybus*) seedlings under copper stress (Cu-stress). Cu-stress was achieved by growing seedlings in hydroponic culture with 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} added to the culture solution. It was found that Cu-stress at 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ severely suppressed the chlorophyll content, and photosynthesis and biomass accumulation of the chicory seedlings. Cu-stress also increased the degree of cell membrane lipid peroxidation, and reduced soluble protein contents and the antioxidant activities of superoxide dismutase, peroxidase, catalase and ascorbate peroxidase. In contrast, exogenous AsA decreased the absorption and

收稿日期:2020-09-07;改回日期:2020-10-29

基金项目:国家自然科学基金青年基金(31901090),国家重点研发计划资助(2018YFD0800304),河南农业大学青年英才专项基金项目(30500671),河南农业大学科技创新基金项目(KJCX2020A18),山东农业大学作物生物学国家重点实验室开放课题项目基金(2018KF05)和河南省大学生创新创业训练计划项目(202010466037)资助。

作者简介:王龙(1988-),男,河南漯河人,博士,讲师。E-mail: hndwanglong@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: liuhaitaoky@henau.edu.cn

transport of Cu by the root system and ameliorated the damage of Cu-stress to chicory seedlings. Specifically, exogenous AsA increased the root system, shoot and total dry matter biomass, decreased the degradation of photosynthetic pigments (chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoid) and enhanced the photosynthetic parameters, reduced the damage of lipid peroxidation to the cell membrane, and enhanced the antioxidant activities, soluble protein levels and endogenous AsA concentration. These results provide reference data for the application of exogenous AsA in mitigating Cu toxicity to plants and enhancement of the Cu tolerance mechanism of chicory.

Key words: ascorbic acid; copper stress; chicory seedlings; physiological characteristics; mitigative effect

随着现代冶金业和农业生产的不断发展,含铜(Cu)杀虫剂和除草剂的大量使用以及工业“三废”的随意倾倒,使得土壤与水体中积累了相当数量的Cu元素,其中很大一部分受污染的土壤是农田,对农业的安全生产造成严重影响。农田土壤中积累过多的Cu不仅会降低农作物的产量及品质,还会通过食物链向高营养级的生物体传递,最终威胁人体健康^[1]。根据2014年发布的《全国土壤污染状况调查公报》显示,我国土壤总的点位超标率为16.1%,其中Cu污染点位超标率占2.1%,位居第4^[2],因此,农田土壤的Cu污染问题已成为目前不可忽视的环境问题之一。Cu作为植物生长发育所必需的微量元素之一,参与植物体内多种生化反应以及多种代谢过程^[3],对植物生长发育起着重要作用。然而,当植物体积累的Cu超过一定阈值时则表现为毒害作用^[4],如降低光合作用、干扰细胞正常的代谢、生长发育受抑制等。研究表明,Cu对植物的抑制作用一方面是通过抑制其他矿质离子的吸收,表现为“缺素”反应^[5];另一方面,通过取代酶或蛋白质的活性中心,使其活性降低或变性,引发代谢紊乱^[6]。

植物修复具有成本低、修复面积大、环境友好的特点,是目前土壤污染修复中常用的一种方法^[7-8]。牧草作为常用的土壤修复植物,因其具有易于栽培、生长速度快、生物量大、重金属吸收量多等优点而受到研究人员的广泛青睐。迄今为止,常见用于土壤重金属污染修复的牧草有10余种,如黑麦草(*Lolium perenne*)、苜蓿(*Medicago sativa*)、菊苣(*Cichorium intybus*)等^[7]。其中,菊苣作为一种多年生草本植物,具有适应性广、抗逆性强、再生快、营养丰富、适口性好、产草量高等优良特性,被作为高档蔬菜 and 优质牧草栽培利用^[9-10];同时,研究发现菊苣根提取物具有较强的抗氧化性^[11-12],并且对重金属具有较高的吸收能力,是一种具有重要经济价值和开发潜力的新兴作物^[13-14]。研究表明,在外界无胁迫情况下,植物自身能够产生较低水平的活性氧(reactive oxygen species, ROS),不会对植物体造成损伤,当受到外界Cu胁迫时,植物体内细胞的稳态水平被破坏,细胞中积累过量的ROS,对植物体造成氧化损伤,如破坏细胞膜结构和光合系统^[15-16]。为了抵御外界Cu胁迫,植物体会启动自身的抗氧化防御系统(包括酶类抗氧化系统和非酶类抗氧化系统)清除过多的ROS,以维持细胞的正常功能。

抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)作为植物体内一种重要的小分子非酶抗氧化物,通过对外界刺激的识别、信号传递、基因表达和代谢调节等一系列过程激发植物自身的防御机制,清除体内过多的ROS,缓解环境胁迫对植物的毒害作用。还有研究表明,AsA具有促进植物生长发育和增产的作用^[17-18]。近年来,利用外源AsA提高植物抵御外界胁迫方面有了一定的研究和应用,如减轻Al³⁺胁迫对水稻(*Oryza sativa*)幼苗的氧化损伤^[19-20],缓解蚕豆(*Vicia faba*)根尖细胞由于Pb²⁺、Hg²⁺胁迫而引起的遗传毒性效应^[21],增加燕麦(*Avena sativa*)幼苗对盐胁迫的抗性^[22],提高盐胁迫小麦(*Triticum aestivum*)的光合作用特征参数等^[23]。

修复被重金属污染的土壤一直是国内外研究的热点。目前对于菊苣用于重金属修复的研究大多是关于镉(Cd)污染,对于Cu污染的研究相对较少,除此之外,关于重金属胁迫对菊苣生长发育的影响研究多数集中在种子萌发阶段,对于幼苗生长阶段的研究还很缺乏,尤其对于外源AsA增强菊苣抗Cu性能的生理响应机制尚不明确。因此,本研究以普那菊苣为试验材料,采用营养液培养法研究外源AsA对Cu胁迫菊苣幼苗生长特征、细胞膜稳定性及光合效率和抗氧化酶活性的影响,阐明外源AsA对铜胁迫菊苣幼苗的缓解效应,为AsA应用于缓解植物Cu毒害及丰富菊苣耐Cu机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 幼苗培养与处理

本试验选用的品种为普那菊苣(*C. intybus* cv. Puna)。育苗前,挑选颗粒饱满、均匀一致的种子,用5%的过氧化氢溶液浸泡15 min,随后用去离子水反复冲洗干净,并用吸水纸吸干种子表面的水分,将其均匀洒在铺有少量湿润细沙的培养皿中,放入植物光照培养箱中进行培养。待种子长出两叶一心后,选取长势一致的幼苗用海绵固定移栽到体积为2 L的水培盆(长34 cm、宽25 cm、高12 cm)中继续培养。为防止烧苗,移栽后先用1/8 Hoagland营养液进行培养,待幼苗适应后,改1/4 Hoagland营养液培养,依次逐渐增加至完全浓度的营养液,每3 d更换一次培养液,减少营养元素的损失对试验造成的误差,水培幼苗生长至四叶一心时,开始进行处理。

设置两因素两水平(Cu:0和50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; AsA:0和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的水培试验,共设置4个处理:0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu+0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA(即对照组,只添加营养液)、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu+0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA、0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu+200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA、50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu+200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsA,分别记作CK、Cu₅₀、AsA₂₀₀、Cu₅₀+AsA₂₀₀,该试验浓度是依据李贺勤等^[24]和Sharma等^[25]的研究结果以及本试验前期的预试验进行综合选择。其中Cu供体以CuCl₂·2H₂O的形式添加入营养液中,AsA的供体以L-抗坏血酸的形式加入营养液中,对于复合处理,Cu溶液与AsA溶液同时加入营养液中。每个处理设5次重复。培养期间,每3 d更换一次处理液,并用0.1 mol·L⁻¹HCl和0.1 mol·L⁻¹NaOH调节pH值为6.5^[26],每次更换处理液时随机移动培养盆的位置,以保证外界条件的一致性。所有试验均在模拟自然状态的人工气候室内进行,白天(25±2) °C,光照16 h,光照强度400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$;夜间(20±2) °C,8 h黑暗,湿度控制在60%左右。

处理2周(14 d)后进行采样,此时幼苗出现明显铜毒害症状。在采样前先利用便携式光合仪(LI-6400,美国)测定植株的光合速率、蒸腾作用等气体交换参数;随后,将植株根系和地上部分分离,将根系浸泡于20 mmol·L⁻¹的Na₂-EDTA溶液中15 min,然后用去离子水清洗,去掉根系表面残留的Cu²⁺;地上部分直接用去离子水清洗,用吸水纸吸干表面水分,一部分鲜样装入牛皮纸袋中,置于烘箱中105 °C杀青20 min,再于75 °C下烘至恒重,用于测定根系与地上部的生物量;另一部分鲜样进行液氮处理并于超低温冰箱-80 °C保存,用于各种抗氧化酶活性、渗透调节物质等生理生化指标的测量。

1.2 生理生化指标测定

采用便携式光合仪(LI-6400,美国)进行叶片气体参数的测定,测定时使用开放气路,温度控制在25 °C,光照强度控制在1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。测量指标包括光合速率(net photosynthetic rate, P_n)、气孔导度(stomatal conductance, G_s)、胞间CO₂浓度(intercellular CO₂ concentration, C_i)、蒸腾速率(transpiration rate, T_r)。采用乙醇提取法测定叶绿素含量^[27];采用考马斯亮蓝染料结合比色法测定可溶性蛋白含量^[28];参照Chen等^[29]的方法测定内源AsA含量。采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量^[30-31];采用氮蓝四唑(NBT)还原法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性^[31];采用愈创木酚法测定过氧化物酶(peroxidase, POD)活性^[31];参照Aebi^[32]的方法测定过氧化氢酶(catalase, CAT)活性;参照Nakano等^[33]的方法测定抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性。

1.3 Cu含量的测定

将0.25 g烘干后的样品与10 mL混酸(高氯酸:硝酸=1:3, v/v)摇匀后过夜,用电热板加热消煮,待溶液颜色澄清透明后,用去离子水赶酸至体积为1 mL左右,随后用去离子水定容到25 mL,待测。用原子吸收光谱仪—石墨炉法(AAS, ZEE nit 700, Analytikjena, 德国)测定Cu含量^[25],每次测定有3个读数,取其平均值作为最终结果。

1.4 数据分析

耐受指数 = 处理组的干物质重量($\text{g}\cdot\text{plant}^{-1}$)/对照组相应干物质重量($\text{g}\cdot\text{plant}^{-1}$) \times 100%

茎叶/根系Cu积累量($\mu\text{g}\cdot\text{plant}^{-1}$) = Cu含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) \times 茎叶/根系质量($\text{g}\cdot\text{plant}^{-1}$)

转运系数 = 茎叶Cu积累量/根系Cu积累量 \times 100%

使用Microsoft Excel 2010软件进行数据处理,采用IBM SPSS statistics 22.0进行方差分析(ANOVA)。用最小显著极差法进行多重比较(LSD, $P < 0.05$),分析结果以平均数±标准差表示,并用Origin 2018作图。

2 结果与分析

2.1 外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗生物量和耐受指数的影响

与对照组(CK)相比,Cu胁迫下菊苣幼苗根系和茎叶的长度均显著降低($P < 0.05$),分别降低了29.32%和38.27%(表1);从植株的干物质积累量可以看出,与CK相比,Cu胁迫下根系和茎叶分别降低了44.44%和45.36%,说明Cu胁迫对菊苣幼苗的根系和茎叶均呈不同程度的抑制作用,Cu胁迫下幼苗的侧根变少、根长变短、叶片的颜色较浅、植株生长明显受抑制。与幼苗根系相比,茎叶的耐受指数更低,说明茎叶对Cu胁迫的变化更敏感。

外源 AsA 的添加也降低了菊苣幼苗根系和茎叶的生长,均未达到显著水平,说明 AsA₂₀₀ 处理对菊苣幼苗植株的生长能够产生抑制作用,并且对茎叶的抑制程度要高于根系。当 Cu 和 AsA 同时添加时,与单一的 Cu 胁迫组相比,菊苣幼苗根系和茎叶的长度和生物量均增加,并且未达到显著水平,但仍低于单一的 AsA 处理。耐受指数能够反映植株在逆境环境中生长的抑制程度^[24],从耐受指数上可以看出(表1),Cu 和 AsA 同时存在时对根系和茎叶的抑制率分别为 27.78% 和 29.90%(与 CK 相比),介于单一的 Cu 处理(44.44% 和 45.36%)和 AsA 处理(11.11% 和 20.62%)之间。这些结果说明外源 AsA 对 Cu 胁迫下的菊苣幼苗有一定的缓解作用。

表1 外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗生物量和耐受指数的影响

Table 1 Effect of exogenous AsA on the biomass and tolerance index of chicory seedling under Cu stress

处理 Treatment	根长 Root length (cm)	茎叶长 Shoot height (cm)	根系干重 Root dry weight (g·plant ⁻¹)	茎叶干重 Shoot dry weight (g·plant ⁻¹)	根系耐受指数 Tolerance index of root (%)	茎叶耐受指数 Tolerance index of shoot (%)
CK	33.20±2.79a	27.57±2.81a	0.18±0.01a	0.97±0.08a	100.00±0.24a	100.00±2.08a
AsA ₂₀₀	28.45±2.57ab	25.13±2.09ab	0.16±0.02a	0.77±0.10ab	88.89±0.44b	79.38±1.29b
Cu ₅₀	23.47±2.96b	17.02±2.71b	0.10±0.01b	0.53±0.06b	55.56±0.26c	54.64±0.96c
Cu ₅₀ +AsA ₂₀₀	25.42±1.52b	23.05±1.79ab	0.13±0.01ab	0.68±0.11ab	77.80±0.25b	70.10±0.67b

注:同列不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters in the same column show the significant difference among different treatments at the level of 0.05. The same below.

2.2 外源 AsA 对 Cu 胁迫菊苣幼苗叶片光合参数和叶绿素含量的影响

光合作用是植物进行有机物合成的主要途径,植物的光合作用在受到逆境胁迫时会受到阻碍(表2)。与CK相比,Cu胁迫下菊苣幼苗叶片净光合速率、气孔导度、胞间CO₂浓度及蒸腾速率分别降低了49.37%、70.00%、37.13%和49.42%($P < 0.05$),说明Cu胁迫下菊苣幼苗叶片的光合作用受到抑制。与Cu胁迫相比,外源AsA的添加能够不同程度地提高Cu胁迫下菊苣幼苗叶片的 P_n 、 G_s 、 C_i 、 T_s 参数,分别提高了43.93%、66.67%、24.28%、68.00%。该结果也说明外源AsA处理能够有效缓解Cu胁迫对菊苣幼苗叶片光合作用的抑制。

叶片光合色素含量是反映外界胁迫程度的重要指标之一。与CK相比,Cu胁迫下叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素及类胡萝卜素的含量均显著降低($P < 0.05$),分别下降了41.94%、26.48%、34.09%、31.38%。外源AsA添加后,光合色素含量较Cu胁迫组均有所升高,其中叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素达显著水平,分别比Cu胁迫下增加了63.89%、17.20%、30.23%。说明外源AsA能够提高菊苣幼苗茎叶的光合色素含量,从而缓解Cu胁迫引发的损伤。

2.3 外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗 Cu 含量和转运系数的影响

正常处理条件下,菊苣幼苗根系和茎叶中的Cu含量分别为6.32和2.43 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW,表明菊苣能够吸收微量元素Cu,维持植株正常的生长发育。单一Cu胁迫下,菊苣幼苗根系的Cu含量是茎叶的4倍左右,但根系对Cu的

积累量要小于茎叶(其转运系数为 1.39),说明菊苣吸收的 Cu 大部分都积累到茎叶中(表 3),可通过多次刈割,实现修复 Cu 污染的目的。在 Cu 胁迫下,外源 AsA 的添加能够降低根系和茎叶的 Cu 含量,分别降低了 24.88% 和 34.65%,同时,外源 AsA 也降低了 Cu 的转运系数(1.19),说明外源 AsA 不仅能够降低菊苣幼苗对 Cu 的吸收,而且也降低了 Cu 向茎叶的转运。

表 2 外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗光合参数和叶绿素含量的影响

Table 2 Effect of exogenous AsA on the photosynthetic parameters and chlorophyll content of chicory seedling under Cu stress

处理 Treatment	净光合速率 Net photosynthetic rate ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	气孔导度 Stomatal conductance ($\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	胞间二氧化碳浓度 Intercellular CO_2 concentration ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1}$)	蒸腾速率 Transpiration rate ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	叶绿素 a Chlorophyll a ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	叶绿素 b Chlorophyll b ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	类胡萝卜素 Carotenoids ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	叶绿素(a+b) Chlorophyll (a+b) ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
CK	19.69±1.19a	0.30±0.05a	572.49±56.63a	3.46±0.35a	1.24±0.06a	2.53±0.04a	0.44±0.03a	3.76±0.10a
AsA ₂₀₀	14.46±1.63b	0.25±0.02a	454.69±54.46ab	2.87±0.36b	1.13±0.09a	2.41±0.07a	0.42±0.02a	3.54±0.16a
Cu ₅₀	9.97±1.29c	0.09±0.02c	359.92±28.37b	1.75±0.49c	0.72±0.06b	1.86±0.11b	0.29±0.01b	2.58±0.17b
Cu ₅₀ +AsA ₂₀₀	14.35±1.25b	0.15±0.03b	447.30±41.92ab	2.94±0.27b	1.18±0.05a	2.18±0.07a	0.35±0.02b	3.36±0.13a

表 3 外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗 Cu 含量和转运系数的影响

Table 3 Effect of exogenous AsA on the Cu content and translocation factor of chicory seedling under Cu stress

处理 Treatment	根系 Root		茎叶 Shoot		转运系数 Translocation factor
	Cu 含量 Cu content ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$)	Cu 积累量 Cu accumulation ($\mu\text{g} \cdot \text{plant}^{-1}$)	Cu 含量 Cu content ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{DW}$)	Cu 积累量 Cu accumulation ($\mu\text{g} \cdot \text{plant}^{-1}$)	
CK	6.32±1.12	1.13±0.88	2.43±0.52	2.36±0.31	
Cu ₅₀	158.19±2.68	15.82±1.41	41.44±0.84	21.96±2.50	1.39±1.13
Cu ₅₀ +AsA ₂₀₀	118.84±2.21	15.45±1.69	27.08±0.69	18.41±2.19	1.19±0.95

2.4 外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗丙二醛、可溶性蛋白和抗坏血酸含量的影响

丙二醛(MDA)作为细胞膜脂质过氧化的最终分解产物,其含量的高低可以反映细胞膜过氧化的水平和受损的程度^[34]。Cu 胁迫下,菊苣幼苗根系和茎叶的 MDA 含量分别比 CK 显著增加了 231.30% 和 220.22% ($P < 0.05$) (图 1),说明菊苣幼苗根系和茎叶的细胞膜均受到了严重的 Cu 毒害作用,并且根系受 Cu 胁迫的毒害作用更大。单一外源 AsA 处理时,幼苗根系和茎叶的 MDA 含量与 CK 相比有所升高,但未达到显著水平。当 Cu 和 AsA 同时添加时,外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗根系和茎叶的细胞膜受损失程度具有明显的缓解作用,其 MDA 含量分别降低了 40.31% 和 33.26%,说明外源 AsA 能有效缓解 Cu 胁迫对菊苣幼苗细胞膜造成的损伤。

可溶性蛋白作为植物细胞内重要的渗透调节物质,参与体内多种稳态平衡,并与植物的抗逆性关系密切。与 CK 相比,Cu 胁迫下菊苣幼苗根系和茎叶的可溶性蛋白含量显著降低 ($P < 0.05$),分别降低了 36.58% 和 36.88% (图 1),说明 Cu 胁迫处理影响了菊苣体内渗透调节系统的平衡。与 Cu 胁迫相比,外源 AsA 和 Cu 的添加能够使菊苣幼苗根系和茎叶的可溶性蛋白含量显著提高 ($P < 0.05$),分别提高了 20.68% 和 20.29%。该结果说明外源 AsA 能有效促进 Cu 胁迫下菊苣幼苗根系和茎叶渗透调节物质积累,以应对 Cu 胁迫对植物细胞造成的伤害。

抗坏血酸-谷胱甘肽(AsA-GSH)循环是存在于植物体内的重要的 H_2O_2 清除系统,主要通过谷胱甘肽和抗坏血酸的氧化还原来清除过量的 H_2O_2 ,在维持 H_2O_2 的平衡中发挥着重要作用。Cu 胁迫下菊苣幼苗根系和茎叶的 AsA 含量与 CK 相比显著降低 ($P < 0.05$),分别为 CK 的 0.66 和 0.77 倍。添加外源 AsA 和 Cu,根系和茎叶的 AsA 含量与 Cu 胁迫相比均显著升高,分别是 Cu 胁迫的 1.90 和 2.11 倍,根系和茎叶的 AsA 含量也高于 CK,分别是 CK 的 1.47 和 1.39 倍。根系的 AsA 含量要高于茎叶。说明 Cu 胁迫能够降低菊苣幼苗根系和茎叶内源 AsA 含

量,添加外源 AsA 可提高根系和茎叶中内源 AsA 含量,对 Cu 毒害具有一定的缓解效应。

2.5 外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗抗氧化酶活性的影响

正常生理条件下,植物通过自身的保护酶系统清除体内的 ROS,保护细胞膜免受伤害;当受到外界胁迫时,会使得植物体内的保护酶系统失调,造成 ROS 积累,使细胞膜受到伤害。抗氧化酶(SOD、POD、CAT、APX)系统是植物体内重要的保护酶系统,它们相互协调清除植物体内过多的 ROS,维持机体的稳态。与 CK 相比,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu 胁迫显著降低了菊苣幼苗根系和茎叶的 SOD、POD、CAT、APX 活性 ($P<0.05$),并且根系的抗氧化酶活性的损失大于茎叶(图 2)。对于根系各种抗氧化酶活性损失率的大小顺序为:POD (57.48%)>APX (53.11%)>CAT (47.78%)>SOD (46.71%),对于茎叶抗氧化酶活性损失率的大小顺序为:APX (52.73%)>POD (44.77%)>SOD (43.62%)>CAT (40.07%)。该结果说明 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu 胁迫使菊苣幼苗清除 ROS 的能力降低,并且对根系的伤害作用强于茎叶。与 Cu 胁迫相比,当 Cu 和 AsA 同时存在时,外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗根系和茎叶的 SOD、POD、CAT、APX 活性均有不同程度的增加,其中 SOD 和 POD 达到显著水平。对于根系抗氧化酶活性来说,外源 AsA 处理对 POD 活性增加最大(81.99%),其次为 SOD(68.36%),APX 最少(32.31%),对茎叶来说,SOD 活性增加最大(54.37%),其次为 CAT(52.00%),APX 最小(31.42%)。说明

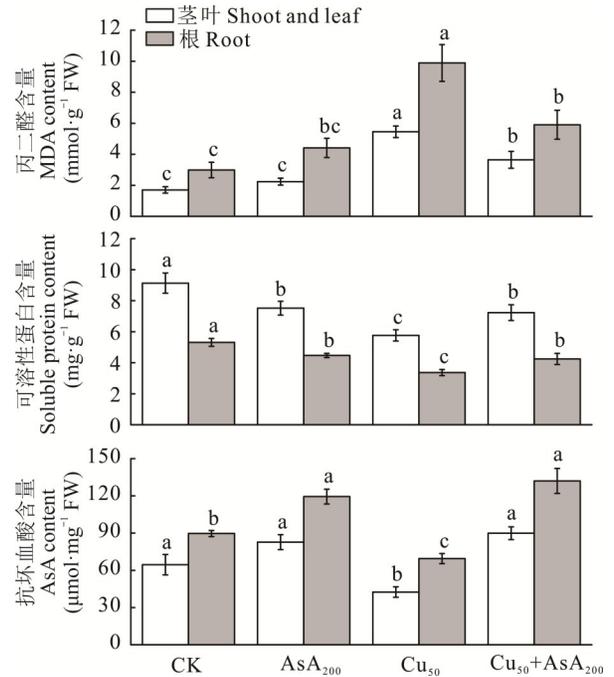


图 1 外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗 MDA、可溶性蛋白和 AsA 含量的影响

Fig. 1 Effect of exogenous AsA on the content of MDA, soluble protein and AsA of chicory seedling under Cu stress

不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P<0.05$),下同。Different lowercase letters above bars show the significant difference among different treatments at the level of 0.05. The same below.

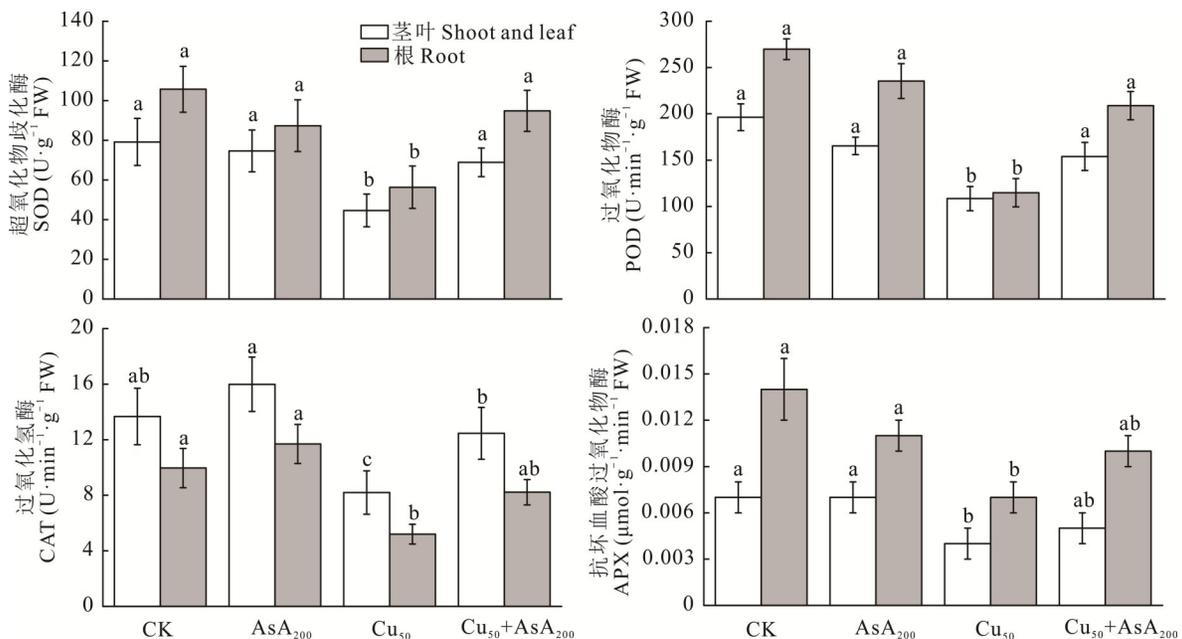


图 2 外源 AsA 对 Cu 胁迫下菊苣幼苗抗氧化酶活性的影响

Fig. 2 Effect of exogenous AsA on the activities of SOD, POD, CAT and APX of chicory seedling under Cu stress

外源 AsA 对菊苣幼苗的 Cu 胁迫具有一定的缓解效应。

3 讨论

Cu 作为植物生长发育所必需的微量元素,在一定范围内对植物生长有益,当超过一定阈值时,则对植物的生长产生毒害作用,最终影响干物质量的积累。本研究中,Cu 胁迫下菊苣幼苗表现出明显的毒害现象,如植株矮小,根长变短、侧根变少,茎叶数少且颜色发黄等。Cu 胁迫严重限制了菊苣幼苗根系和茎叶干物质量的积累(表 1),这与李贺勤等^[24]、丁园等^[35]、Raza 等^[36]的研究结果相一致。从叶绿素水平上能够看出(表 2),Cu 胁迫降低了菊苣幼苗茎叶中叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素的含量,且叶绿素 a 下降幅度比叶绿素 b 大,使叶绿素 a 与叶绿素 b 的比值减少,降低了类囊体的垛叠程度,从而使菊苣幼苗叶片捕获、转化光能的能力下降,抑制了光合作用的进行^[37-38]。从光合作用参数的结果来看,Cu 胁迫菊苣幼苗叶片净光合速率(P_n)、蒸腾速率(T_r)、胞间 CO_2 浓度(C_i)和气孔导度(G_s)均显著降低(表 2),说明 Cu 胁迫导致与光合作用直接相关的 PS II 活性降低,使得叶绿体光合作用的生理过程受阻。该结果与前人报道的结果相一致^[39-40]。造成这种现象的原因是多方面的:一方面,Cu 胁迫打破了植物体内正常的元素吸收、运输以及渗透调节等方面的平衡,使代谢过程紊乱;另一方面,较多的 Cu 进入植株体后,不仅与核酸、蛋白质等大分子物质相结合,还可取代某些酶的活性位点,使其活性降低或丧失,导致生理功能发生紊乱^[41-42]。

研究表明,外源 AsA 能够有效缓解逆境胁迫对植物的抑制作用^[25]。外源 AsA 的添加不仅提高了菊苣幼苗根系和茎叶的长度和生物量,而且在一定程度上提高了光合色素(叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、类胡萝卜素)的含量,增强了茎叶捕获、转化光能的效率(表 1, 2)。这可能是由于外源 AsA 抑制了有关叶绿素降解酶的活性^[43]或者促进了与叶绿素生物合成相关酶的合成^[44],从而提高了茎叶的叶绿素含量,最终增加了生物量。也有研究表明,AsA 作为抗氧化保护剂,保护了光合作用中的电子传递体免受伤害,从而提高了光化学电子的传递效率^[45]。还有研究表明,类胡萝卜素也可作为抗氧化剂参与到光保护过程^[46],外源 AsA 能够通过增加类胡萝卜素的含量以达到防止脂质过氧化以及保护细胞膜结构稳定的目的。

根系是植物吸收水分和养分的主要器官,也是感受外界胁迫的首要部位^[47]。在正常条件下,菊苣幼苗能够吸收微量元素 Cu,维持植株正常的生长发育。Cu 胁迫下,菊苣幼苗根系的 Cu 含量是茎叶的 4 倍左右(表 3),但 Cu 胁迫下植株根冠细胞分裂及生长受抑制,使得根系的伤害要大于茎叶,导致茎叶中 Cu 的积累量要高于根系。从转运系数(其值 > 1)能够看出,菊苣可以作为一种修复植物,通过对茎叶的多次刈割,达到修复 Cu 污染的目的,但由于菊苣积累的 Cu 大部分在茎叶中,当将其作为蔬菜食用时还需谨慎。当外源 AsA 添加后,根系和茎叶中的 Cu 含量和积累量都在降低,并且转运系数也降低(表 3),这可能是 AsA 改变了菊苣体内矿质元素的分布或者干扰了与 Cu 吸收相关基因的表达以及代谢通路,阻碍了植物对 Cu 的吸收^[48]。

逆境胁迫能够诱导植物产生大量的活性氧自由基(ROS),并在细胞中过量积累,破坏了细胞质膜的结构并干扰其正常的代谢过程,植物通过自身保护酶系统的协调配合,共同清除植物体内的 ROS,以抵御外界胁迫^[48-50]。研究表明,SOD 是清除 ROS 的第一道防线,可歧化 O_2^- 生成 H_2O_2 和过氧化物,并减少更具毒性的羟基自由基($\cdot OH$)的形成;CAT、POD、APX 共同作用把 H_2O_2 和过氧化物转化为 H_2O 与 O_2 ^[51],从而维持植物体内较低浓度的 H_2O_2 ,减轻或解除质膜过氧化作用对细胞膜的损伤。丙二醛含量是表征细胞膜脂质过氧化程度的重要指标^[52]。本研究中,Cu 胁迫导致菊苣幼苗根系和茎叶中 MDA 含量大幅提高(图 1),说明 Cu 胁迫下 ROS 过量产生,严重破坏了细胞膜的完整性和稳定性。另外,Cu 胁迫显著降低了菊苣幼苗的 SOD、POD、CAT、APX 活性,这与前人的结果相一致^[53],表明菊苣幼苗自身清除 ROS 的能力下降,这主要是由于高浓度的 Cu 使植物体内的蛋白结构被破坏,酶活性和代谢途径受抑制。外源 AsA 添加后,菊苣幼苗根系和茎叶中 MDA 含量降低(图 1),而保护酶的活性却升高(图 2),表明外源 AsA 通过提高菊苣幼苗的抗氧化酶活性,进而缓解 Cu 胁迫对细胞质膜的氧化损伤。

AsA-GSH 循环是植物体内重要的 H_2O_2 清除系统,可以直接或者间接地清除体内产生的 ROS,参与植物对环境胁迫的改善,促进植物生长发育和增产^[52-53]。本研究中,Cu 胁迫下菊苣幼苗根系和茎叶的 AsA 含量显著降

低,外源 AsA 的添加能够显著提高菊苣幼苗内源 AsA 含量(图 1)。同时,Cu 胁迫下,菊苣幼苗根系和茎叶的渗透调节物质(如可溶性蛋白)含量显著降低,外源 AsA 的添加能够增加菊苣幼苗根系和茎叶中可溶性蛋白含量,这可能是由于 AsA 促进了 Cu 胁迫下菊苣幼苗根系和茎叶渗透调节物质积累,也可能是 AsA 的存在抑制了渗透调节物质的降解,以缓解 Cu 胁迫对植物细胞造成的伤害。

4 结论

综上所述,Cu 胁迫显著抑制了菊苣幼苗根系生长、叶绿素含量和光合作用参数,同时也加剧了细胞膜脂质的过氧化程度,降低了抗氧化酶活性以及可溶性蛋白含量,导致根系和茎叶生物量显著降低。Cu 胁迫下,外源 AsA 能够降低脂质过氧化对细胞膜的损伤,提高了抗氧化酶活性、可溶性蛋白含量以及内源 AsA 含量,同时也降低了根系对 Cu 的吸收和转运,保持较高的叶绿素含量和光合作用参数,最终表现为促进 Cu 胁迫下菊苣幼苗的生长和生物量的增加。因此,外源 AsA 通过调控抗氧化酶活性和渗透调节物质的含量,缓解了 Cu 胁迫对菊苣幼苗生长的毒害作用。

参考文献 References:

- [1] Sun J W, Huang Y Z, Shi M C, *et al.* The review of heavy metals biotoxicity in soil. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(6): 2861—2869.
孙晋伟,黄益宗,石孟春,等.土壤重金属生物毒性研究进展.生态学报,2008,28(6):2861—2869.
- [2] Chen N C, Zheng Y J, He X F, *et al.* Analysis of the report on the national general survey of soil contamination. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(9): 1689—1692.
陈能场,郑煜基,何晓峰,等.《全国土壤污染状况调查公报》探析.农业环境科学学报,2017,36(9):1689—1692.
- [3] Hansch R, Mendel R R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(3): 259—266.
- [4] Xue Y W, Wang Y F, Zhao C J, *et al.* Effects of copper stress on germination and antioxidant system in wheat seedlings. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2016, 38(1): 54—59.
薛盈文,王玉凤,赵长江,等.铜胁迫对小麦种子萌发及幼苗抗氧化系统的影响.江西农业大学学报,2016,38(1):54—59.
- [5] Yadav S K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 2010, 76(2): 167—179.
- [6] Wang R N, Nie L C, Zhang S S, *et al.* Research progress on plant resistance to heavy metal stress. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(1): 157—170.
王若男,卮兰春,张双双,等.植物抗重金属胁迫研究进展.园艺学报,2019,46(1):157—170.
- [7] Zhang X F, Xiao H P, Li Z A, *et al.* Forage grass in phytoremediation of heavy metals-contaminated soils: A review. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(8): 1640—1646.
张杏锋,夏汉平,李志安,等.牧草对重金属污染土壤的植物修复综述.生态学杂志,2009,28(8):1640—1646.
- [8] Zhou Q X, Tang J C, Wei S H. Discussion on geochemical bases and relevant theories of environmental green remediation. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2020, 36(1): 1—10.
周启星,唐景春,魏树和.环境绿色修复的地球化学基础与相关理论探讨.生态与农村环境学报,2020,36(1):1—10.
- [9] Elbanna M F, Mosa A, Gao B, *et al.* Sorption of lead ions onto oxidized bagasse-biochar mitigates Pb-induced oxidative stress on hydroponically grown chicory: Experimental observations and mechanisms. *Chemosphere*, 2018, 208: 887—898.
- [10] Li H L, Tang Y J, Zeng F. Effects of multiple contamination of uranium and heavy metals on chlorophyll fluorescence characteristics of *Cichorium intybus* L. *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2015, 38(2): 17—23.
李华丽,唐永金,曾峰.铀和重金属复合污染对菊苣叶绿素荧光特性的影响.湖南师范大学自然科学学报,2015,38(2):17—23.
- [11] Wang Q Z, Cui J. Use potential of a forage chicory: II utilization value and exploitive potential. *Pratacultural Science*, 2010, 27(2): 150—156.
王隼珍,崔健.牧草菊苣及其利用潜力II利用价值和开发潜力.草业科学,2010,27(2):150—156.
- [12] Wang Q Z, Cui J. A review on pharmic effect of chicory research and development. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 34(17): 2269—2272.
王隼珍,崔健.菊苣的药理药效研究及开发前景.中国中药杂志,2009,34(17):2269—2272.

- [13] Sha L J, He L Z, Yang M B, *et al.* Relationship of absorption and accumulation of heavy metals by *Cichorium intybus* L. (partim) with soil chemistry. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 31(5): 1019–1024.
沙凌杰, 和丽忠, 杨明斌, 等. 饲用欧洲菊苣吸收积累土壤重金属与土壤性质的关系. *西南农业学报*, 2018, 31(5): 1019–1024.
- [14] Pang L Y, Zhang H, Luo C Y, *et al.* Forage crop rotation and its benefit in the purple farming area of Sichuan Province. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010, 19(3): 110–116.
庞良玉, 张鸿, 罗春燕, 等. 四川紫色丘陵农区坡耕地饲草种植模式及效益. *草业学报*, 2010, 19(3): 110–116.
- [15] Baxter A, Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(5): 1229–1240.
- [16] Gallie D R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 64(2): 433–443.
- [17] Gallie D R, Ashihara H, Riganti C, *et al.* L-ascorbic acid: A multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*, 2013, 11(24): 755–764.
- [18] Guo T R. Alleviative effects of exogenous ascorbic acid on aluminum toxicity in barley seedlings. *Journal of Triticeae Crops*, 2012, 32(5): 895–899.
郭天荣. 外源抗坏血酸对铝毒害大麦幼苗的缓解效应. *麦类作物学报*, 2012, 32(5): 895–899.
- [19] Zhou X H, Gu Z H, Xu H N, *et al.* The effects of exogenous ascorbic acid on photosynthetic characteristics in *Oryza sativa* L. under aluminum stress. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2015, 36(3): 73–78.
周小华, 谷照虎, 徐慧妮, 等. 外源抗坏血酸 AsA 对铝胁迫下水稻光合特性的影响. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2015, 36(3): 73–78.
- [20] Wu L F, Lu W D, Wei X M, *et al.* Effect of lead and mercury combined with ascorbic acid treatment on the genotoxic of *Vicia faba*. *Experiment Science and Technology*, 2015, 13(3): 40–42.
吴丽芳, 陆伟东, 魏晓梅, 等. 抗坏血酸对铅、汞胁迫下蚕豆根尖染色体畸变的研究. *实验科学与技术*, 2015, 13(3): 40–42.
- [21] Xu F F, Wang A B. Effects of ascorbic acid on active oxygen metabolism of rice chloroplast under salt stress. *Hybrid Rice*, 2016, 31(3): 68–70, 75.
徐芬芬, 王爱斌. 抗坏血酸对盐胁迫下水稻叶绿体活性氧代谢的影响. *杂交水稻*, 2016, 31(3): 68–70, 75.
- [22] Dong Q L, Xia F S, Li X Y, *et al.* Effect of ascorbic acid priming on the vigor of oat seeds under NaCl stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(4): 202–208.
董秋丽, 夏方山, 李晓禹, 等. 抗坏血酸引发对 NaCl 胁迫燕麦种子活力的影响. *草业学报*, 2018, 27(4): 202–208.
- [23] Stallen N V, Noten V, Demeulemeester M, *et al.* Identification of commercial chicory cultivars for hydroponic forcing and their phenetic relationships revealed by random amplified polymorphic DNAs and amplified fragment length polymorphisms. *Plant Breeding*, 2010, 119(3): 265–270.
- [24] Li H Q, Wang W H, Jiang X W. Effects of exogenous ascorbic acid on seedling growth, copper accumulation and antioxidant enzyme activities of *Pogostemon cablin* under copper stress. *Environmental Chemistry*, 2016, 35(7): 1431–1437.
李贺勤, 王维华, 江绪文. 抗坏血酸对铜胁迫下广藿香幼苗生长、铜积累和抗氧化酶活性的影响. *环境化学*, 2016, 35(7): 1431–1437.
- [25] Sharma R, Bhardwaj R, Thukrala K. Oxidative stress mitigation and initiation of antioxidant and osmoprotectant responses mediated by ascorbic acid in *Brassica juncea* L. subjected to copper (II) stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 182: 3814–3825.
- [26] Chen J X, Wang X F. *Plant physiology experiment guide*. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2006.
陈建勋, 王晓峰. *植物生理学实验指导*. 广州: 华南理工大学出版社, 2006.
- [27] Wang X K, Huang J L. *Experimental principles and techniques of plant physiology and biochemistry*. Beijing: Higher Education Press, 2015.
王学奎, 黄见良. *植物生理生化实验原理与技术*. 北京: 高等教育出版社, 2015.
- [28] Law M Y, Charles S A, Halliwell B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochemistry*, 1983, 210(3): 899–903.
- [29] Chen Q, Zhang X D, Wang S S, *et al.* Transcriptional and physiological changes of alfalfa in response to aluminium stress. *Journal of Agricultural Science*, 2011, 149(6): 737–752.
- [30] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase I. Occurrence in high plants. *Plant Physiology*, 1977, 59(2): 309–314.
- [31] Chance B, Mehley A C. Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 1955, 136(2): 764–775.

- [32] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 1984, 105: 121–126.
- [33] Nakano K, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 1981, 22(5): 867–880.
- [34] Miller G, Shulaev V, Mittler R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiology Plantarum*, 2008, 133(3): 481–489.
- [35] Ding Y, Liu J D, Shi R R. Effects of adding cadmium and copper to chicory seedlings. *Jiangxi Journal of Animal Husband & Veterinary Medicine*, 2008, 11(3): 28–29.
丁园, 刘继东, 史蓉蓉. 外源添加镉、铜对菊苣幼苗的影响. *江西畜牧兽医杂志*, 2008, 11(3): 28–29.
- [36] Raza M A S, Saleem M F, Ashraf M Y, *et al.* *Glycine betaine* applied under drought improved the physiological efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.) plant. *Soil Environment*, 2012, 31(1): 67–71.
- [37] Guo S K, Zhao K F. The possible mechanisms of NaCl inhibit photosynthesis of maize seedlings. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2001, 27(6): 461–466.
郭书奎, 赵可夫. NaCl胁迫抑制玉米幼苗光合作用的可能机理. *植物生理学报*, 2001, 27(6): 461–466.
- [38] Zhou X H, Zhou Z Y, Li K Z. Effects of exogenous ascorbic acid on alleviating aluminum stress in rice seedlings. *Guihaia*, 2020, 40(4): 526–535.
周小华, 周泽仪, 李昆志. 外源抗坏血酸缓解水稻幼苗的铝胁迫效应. *广西植物*, 2020, 40(4): 526–535.
- [39] Laporte D, Valdés, Natalia, *et al.* Copper-induced increases in the level of transcripts encoding enzymes of the antioxidant system and metallothioneins involve the activation of CaMs, CDPKs and MEK1/2 in the marine alga *Ulva compressa*. *Aquatic Toxicology*, 2016, 177(8): 433–440.
- [40] Asgharipour M R, Khatamipour M, Razavi-Omrani M. Phytotoxicity of cadmium on seed germination, early growth, proline and carbohydrate content in two wheat varieties. *Iranian Journal of Medical Physics*, 2014, 5(4): 559–565.
- [41] Movahed N, Eshghi S, Jamali B, *et al.* Ameliorative effects of paclobutrazol on vegetative and physiological traits of grapevine cuttings under water stress condition. *Acta Horticulturae*, 2012, 931: 475–483.
- [42] Li H, Chang J J, Chen H J, *et al.* Exogenous melatonin confers salt stress tolerance to watermelon by improving photosynthesis and redox homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, 2017(8): 295–298.
- [43] Xiao X W, Xu X, Yang F. Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. *Silva Fennica*, 2008, 42(5): 705–719.
- [44] Tian S K, Li Y X, Yang X E, *et al.* Mechanisms of copper uptake, transportation and detoxification in plants. *Chinese Journal of Soil Science*, 2006, 37(2): 387–394.
田生科, 李延轩, 杨肖娥, 等. 植物对铜的吸收运输及毒害机理研究进展. *土壤通报*, 2006, 37(2): 387–394.
- [45] Kim J Y, Lee S I, Kim J A, *et al.* Sound waves increases the ascorbic acid content of alfalfa sprouts by affecting the expression of ascorbic acid biosynthesis-related genes. *Plant Biotechnology Reports*, 2017, 11(5): 355–364.
- [46] Varkouhi A K, Mountrichas G, Schiffelers R M, *et al.* Polyplexes based on cationic polymers with strong nucleic acid binding properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 45(4): 459–466.
- [47] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373–399.
- [48] Pandhair V, Sekhon B S. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: An overview. *Journal of Plant Biochemistry Biotechnology*, 2006, 15(2): 71–78.
- [49] Huang S C, Wang X D, Liu X, *et al.* Isolation, identification, and characterization of an aluminum-tolerant *Bacterium burkholderia* sp. SB1 from an acidic red soil. *Pedosphere*, 2018, 28(6): 905–912.
- [50] Fan W, Xu J M, Wu P, *et al.* Alleviation by abscisic acid of Al toxicity in rice bean is not associated with citrate efflux but depends on ABI5-mediated signal transduction pathways. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2019, 61(2): 140–154.
- [51] Muhammad N, Zvobgo G, Fu L, *et al.* Physiological mechanisms for antagonistic interaction of manganese and aluminum in barley. *Journal of Plant Nutrition*, 2019, 42(5): 466–476.
- [52] Venkatesh J, Park S W. Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical Studies*, 2014, 55(1): 38–52.
- [53] Gul H, Ahmad R, Hamayun M. Impact of exogenously applied AsA on growth, some biochemical constituents and ionic composition of guar (*Cymopsis tetragonoloba*) subjected to salinity stress. *Pakhtunkhwa Journal of Life Science*, 2015, 3(12): 22–40.