

铜对节节草生理代谢及抗氧化酶活性的影响*

李影** 刘登义

(安徽师范大学生命科学学院省重要生物资源保护与利用研究安徽省重点实验室, 芜湖 241000)

【摘要】 采用盆栽试验方法,研究了重金属 Cu 对节节草的生理代谢及抗氧化酶活性的影响.结果表明,低浓度 Cu(500 mg·kg⁻¹)处理下节节草生理代谢变化不明显.高浓度 Cu(1 000~3 000 mg·kg⁻¹)处理下,节节草体内叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均显著下降,叶绿素 b 的含量仅为对照的 43%;可溶性糖含量平均为对照的 1/2,细胞膜透性平均高出对照 1~2 倍,MDA 含量平均为对照的 1~3 倍,表明高浓度 Cu 胁迫对节节草细胞膜系统及主要细胞器的结构与功能具有破坏作用.Cu 胁迫下节节草抗氧化酶活性随 Cu 浓度增加而上升,POD 和 SOD 酶活性平均分别增长 34.73% 和 51.55%,且与 Cu 浓度呈显著正相关($r_{\text{POD}}=0.978$, $r_{\text{SOD}}=0.926$, $P<0.05$).

关键词 节节草 Cu 毒害 生理代谢 抗氧化酶活性

文章编号 1001-9332(2006)03-0498-04 **中图分类号** X131.3 **文献标识码** A

Physiological metabolism and protective enzyme activity of *Equisetum ramosissimum* under Cu stress. LI Ying, LIU Dengyi (Provincial Key Laboratory of Conservation and Exploitation of Biological Resources, College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2006, 17(3): 498-501.

The study with pot culture experiment showed that *Equisetum ramosissimum* did not appear obvious poisoning symptoms when treated with low concentration Cu (500 mg·kg⁻¹), while serious injuries were found when treated with high concentration Cu (1 000-3 000 mg·kg⁻¹), which reflected in the severe damage of cell membrane and cytoarchitecture as well as the structure and function of main organelles, and the significant decrease of the contents of leaf chlorophyll a and b and stem soluble monosaccharose. The cell membrane osmolarity and the average MDA content of the plant exposed to heavy copper pollution was 1~2 and 1~3 times greater than the control, respectively. It could be concluded that high concentration Cu disturbed the physiological metabolism, and critically threatened the normal growth of *E. ramosissimum*. The activities of protective enzyme, especially of SOD and POD, were enhanced with increasing Cu concentration, and had a positive correlation with Cu concentration ($r_{\text{POD}}=0.978$, $r_{\text{SOD}}=0.926$, $P<0.05$).

Key words *Equisetum ramosissimum*, Cu injury, Physiological metabolism, Protective enzyme activity.

1 引言

随着工业、农业、交通等领域含 Cu 污染物的日益增长,尤其是近几年来含 Cu 杀虫剂在农业生产上的频繁使用、铜矿的过度开采及工业生产中含 Cu 污染物的大量排放,给动植物及环境带来了严重危害,甚至危及人类健康^[4,6,13,14,25],其对生态系统的危害,也引起国内外有关人士的重视^[18,22,26].利用(超)富集植物和耐性植物对矿业废弃地进行植物修复被认为是当今较为经济有效的方法^[1,11,17].因此,筛选新型的修复物种,探索其对重金属的毒害反应及其耐性机制,已成为当今学术界研究的热点和难点之一^[3,19,21].近年来有学者发现一些蕨类植物对重金属具有较强耐受性和富集能力^[7,8,10,19,20],可用于重金属污染土壤的植物修复,但有关重金属对蕨类植物毒害性质的系统研究却少见报道.木贼科植物节节草(*Equisetum ramosissimum*)生命力

强,生长迅速,根状茎发达,在铜尾矿区有很强的生长优势.节节草用于矿业废弃地的生态恢复上,有很大的发展潜力^[8,10].本研究通过盆栽试验系统地研究了 Cu 对节节草的毒害性质及其活性氧清除系统酶的活性变化,以期了解 Cu 对节节草的毒害机制,为进一步探索植物对重金属的耐性机理奠定科学基础,并为节节草在矿业废弃地植物修复中的应用提供有力的科学依据.

2 材料与方法

2.1 供试材料与设计

2.1.1 试验材料 节节草采集于安徽省铜陵市铜尾矿区,用自来水将根系土壤冲洗干净,于正常土壤中进行预培养 2 周,取大小相当的幼株进行盆栽试验.

* 国家重点基础研究发展规划项目(2004CB418503)、国家自然科学基金项目(30470270)和安徽省自然科学基金资助项目(03043501).

** 通讯联系人.

2005-04-12 收稿,2005-08-28 接受.

2.1.2 试验设计 盆栽土壤取自安徽师范大学后山园田土,其基本理化性质见表 1。每盆栽土 2 kg,以水溶液形式 1 次性添加 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,使土壤中 Cu 含量(以纯 Cu 计算)分别为 500、1 000、2 000 和 3 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,以未加 Cu 的处理作为对照组,并将其稳定 2 周后,每盆栽种幼苗 5 株,每处理设 3 个重复。于安徽师范大学花房中培养,30 d 后,取样分析。

表 1 土壤基本理化性质

Table 1 Basic physico-chemical properties of soil

| 土样 Sample | pH | 总 N Total N ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 总 P Total P ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 总 K Total K ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | 有机质 Organic matter ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | Cu ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) |
|--------------|------|---|---|---|---|--|
| CT | 6.87 | 0.75 | 0.14 | 3.01 | 3.26 | 800~2000 |
| PS | 7.31 | 1.24 | 0.21 | 10.02 | 13.6 | 25.46 |

CT:铜尾矿区 Copper tail; PS:盆栽土壤 Pot soil.

2.2 分析方法

2.2.1 生理指标的测定 细胞膜透性和可溶性糖含量的测定参照张志良^[27]的方法,光合色素含量和 MDA 含量的测定参照朱广廉^[30]的方法。

2.2.2 保护酶活性的测定 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定按王爱国方法^[31],过氧化氢酶(CAT)活性和过氧化物酶(POD)活性的测定参照 Proinok^[15]的方法。

3 结果与讨论

3.1 Cu 对节节草细胞膜透性的影响

植物细胞原生质膜的稳定性在维持细胞内外离子的浓度差和物质的主动运输起着重要作用^[16]。细胞膜透性是评价植物对污染物反应的方法之一。细胞外渗液的电导率与污染物浓度成正相关^[5,9]。对节节草在 Cu 胁迫下细胞膜透性进行测量结果表明,Cu 处理对植物地上部电导率影响显著,其电导率大小随 Cu 浓度的增加而升高(图 1)。相关分析表明,植物电导率的大小与 Cu 浓度间存在显著的正相关性, ($r = 0.935, P < 0.05$),处理组电导率大小分别是其对照组的 1.6~2.67 倍。由于在 Cu 胁迫下,植物体内积累大量的活性氧(ROS)能氧化细胞质膜和细胞器膜中的不饱和脂肪酸(亚油酸、亚麻酸),造成膜脂结构的破坏,损害细胞的结构及功能,

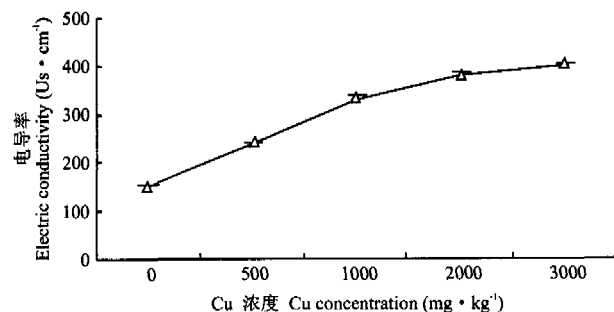


图 1 Cu 胁迫下节节草电导率的变化

Fig. 1 Electric conductivity of Cu stress on *E. ramosissimum*.

甚至导致细胞死亡^[3,12]。因此,随 Cu 污染浓度的升高,可能造成 ROS 积累量增加,使细胞原生质膜遭到严重破坏,植物细胞膜通透性表现出明显增大趋势,对植物造成严重伤害。

3.2 Cu 对节节草光合色素含量的影响

不同浓度 Cu 处理节节草地上茎中的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量见表 2。由表 2 可以看出,叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量均随 Cu 浓度的升高而下降,两者呈现显著或极显著的负相关性,其相关系数分别为 -0.988 和 -0.882,且处理组叶绿素 a 和叶绿素 b 含量分别是其对照组的 0.99~0.65 和 1.01~0.43 倍。方差分析表明,Cu 处理组与对照组存在差异,低浓度处理时(500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)节节草叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量与对照组相近或略高于对照组,分别是对照的 0.99 和 1.01 倍;随 Cu 浓度的加大(1 000~3 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)叶绿素 a 和叶绿素 b 含量均低于对照,当 Cu 浓度为 3 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,叶绿素 b 含量下降幅度较明显,叶绿素 a/b 高于其对照,是对照组的 1.51 倍。这可能是因为 Cu 是植物正常生命活动所必需的微量矿质元素,且叶绿素 a 和 b 是由一种金属色素蛋白构成^[12,13,16],因此 Cu 浓度低时,可能参与并促进植物色素蛋白的合成,有利于植物的各种生命活动,对植物不会造成明显伤害,反而对其生长发育有一定的促进作用;当 Cu 含量高于植物生命所需时,大量的氧自由基不能迅速清除,破坏了线粒体和叶绿体的结构和功能^[6],并造成色素蛋白被氧化,抑制叶绿素的合成,导致叶绿素破坏,尤其对叶绿素 b 的伤害较明显,造成叶绿素 a 和 b 含量下降,从而阻碍了植物的光合作用,影响了植物的正常生长发育。

表 2 Cu 胁迫下节节草光合色素含量的变化

Table 2 Chlorophyll content of *E. ramosissimum* under Cu stress ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

| 项目 Item | CK | 500 | 1000 | 2000 | 3000 |
|-----------------|-------|-------|--------|--------|---------|
| 叶绿素 a Chl a | 0.975 | 0.965 | 0.866* | 0.783* | 0.631** |
| 叶绿素 b Chl b | 0.469 | 0.473 | 0.411* | 0.321* | 0.201** |
| 类胡萝卜素 Chl k | 0.233 | 0.261 | 0.292 | 0.227 | 0.214 |
| 叶绿素 a/b Chl a/b | 2.079 | 2.040 | 1.946* | 1.860* | 3.139** |

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

由表 2 可以看出,Cu 污染下,节节草类胡萝卜素含量变化无明显规律。相关分析表明,两者无明显相关性($P > 0.05$),说明 Cu 污染对节节草的类胡萝卜素含量影响不明显。

3.3 Cu 对节节草可溶性糖含量的影响

重金属对植物的危害不仅作用在细胞质膜、叶绿体等上,对植物体内的碳水化合物、矿质元素代谢

等生理活动也有很大影响.不同 Cu 处理下节节草体内可溶性糖的含量见图 2.由图 2 可见,可溶性糖含量随 Cu 浓度的升高而下降,处理组可溶性糖平均含量是对照组含量的 1/2.相关分析表明,两者间呈显著负相关性,相关系数为 $-0.877 (P < 0.05)$,显示出 Cu 胁迫对植物碳水化合物代谢的破坏作用.可溶性糖主要是来自植物光合同化产物的积累和转化^[16].由上述可知,高浓度 Cu 对植物的光合作用造成严重破坏,使得体内光合同化物积累量少或无足够的同化物转化形成其他糖类物质.因此,高浓度 Cu 胁迫下,节节草体内可溶性糖含量下降.

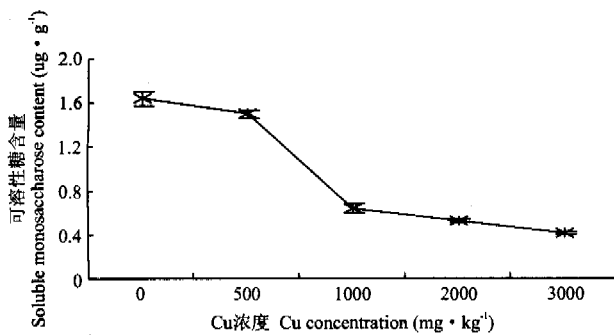


图 2 Cu 胁迫下节节草体内可溶性糖含量的变化
Fig. 2 Content of soluble monosaccharose of *E. ramosissimum* under Cu stress.

3.4 丙二醛含量的变化

丙二醛(MDA)是植物体内膜脂过氧化产物,其含量反映着细胞活性氧引起膜脂过氧化,导致植物细胞伤害的程度^[29].Cu 胁迫下节节草体内 MDA 含量的变化见图 3.总体上,随着 Cu 浓度的增加,植物体内 MDA 含量呈上升趋势.相关分析表明,两者具有明显的正相关性($r = 0.937, P < 0.05$).方差分析表明,处理组 MDA 含量与对照呈现显著差异,平均是对照组含量的 1~3 倍.当 Cu 浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,MDA 含量略低于对照组,说明低浓度 Cu 污染对植物毒害性较小.随着 Cu 浓度的升高($1000 \sim 3000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),MDA 含量逐渐上升,这可能是由于 Cu 浓度的增加,使得植物体内自由基的含量逐渐积累,不能及时被清除,造成细胞膜脂严重氧化,细胞受到伤害.

3.5 Cu 胁迫下抗氧化系统酶活力的变化

由图 4 可以看出,SOD 和 POD 酶活性大小总体上随 Cu 浓度的升高而增加.相关分析表明,两者之间均存在极显著的正相关性,其相关系数分别为 0.926 和 0.978.处理组的 SOD 和 POD 活性的平均增长幅度分别为 34.73% 和 51.55%.CAT 活性总体上随 Cu 浓度的升高而上升,CAT 活性与 Cu 浓度

间无明显相关性($P > 0.05$).植物体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等保护酶系统具有清除活性氧自由基的功能,以减轻活性氧对植物的伤害^[2,23,24,28].SOD、POD 和 CAT 酶活性均随 Cu 浓度的升高呈上升趋势,尤其是 SOD 和 POD 酶活性的上升幅度与 Cu 污染程度间也有着密切关联,而且 SOD 和 POD 酶活性与 MDA 含量均呈显著正相关($r_{\text{SOD}} = 0.856, P < 0.05; r_{\text{POD}} = 0.928, P < 0.05$),说明在 Cu 胁迫下 SOD 和 POD 酶活性的升高在清除体内过量的氧自由基方面有着重要的作用,这可能是节节草抵抗活性氧化及 Cu 毒害的重要物质基础之一.CAT 酶活性的变化虽然从统计学上尚不能明确其在植物抗氧化上的独立作用,但 CAT 酶是一种含 Fe 的血蛋白酶类,它可催化由 SOD 在清除自由基时产生的 H_2O_2 ^[24].当 Cu 浓度为 $1000 \sim 3000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,CAT 酶活性较对照有所升高,这可能是因为在高浓度 Cu 污染下,CAT 酶有协助 SOD 酶一起抵御

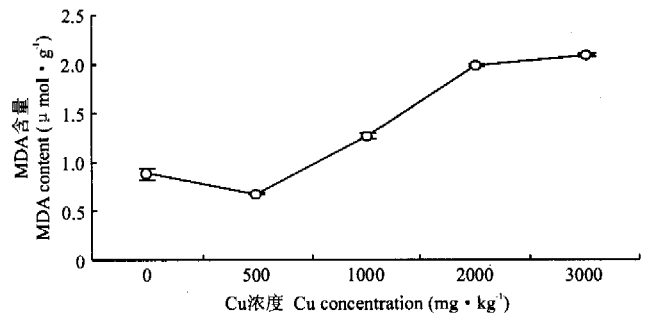


图 3 Cu 胁迫下节节草体内 MDA 含量的变化
Fig. 3 MDA content of *E. ramosissimum* under Cu stress.

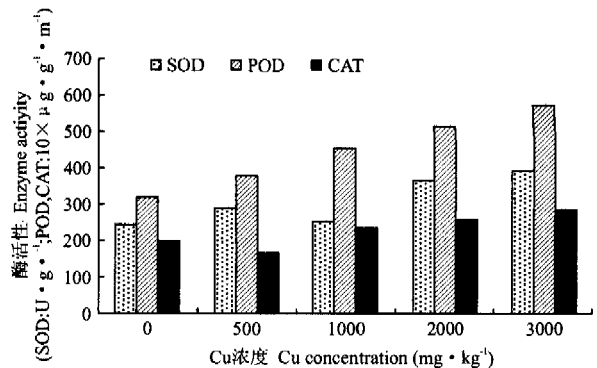


图 4 Cu 胁迫下节节草 SOD、POD、CAT 酶活性的变化
Fig. 4 Enzyme activity of SOD, POD and CAT of *E. ramosissimum* under Cu stress.

自由基氧化的功能,但有关其在植物抗 Cu 毒害上的具体作用还有待于进一步深入研究.

4 结 论

4.1 低浓度 Cu 污染对节节草生理代谢的伤害较

小,且对其生长发育有一定的促进作用;高浓度 Cu 对植物细胞原生质膜造成破坏,体内 MDA 高度积累,导致细胞膜通透性增大,光合色素受到破坏(受损程度顺序为叶绿素 b>叶绿素 a>类胡萝卜素),大大降低了植物光合水平,致使节节草碳代谢等生理活动紊乱,加速组织、细胞衰老,甚至死亡,严重阻碍了植物的正常生长发育。

4.2 Cu 胁迫下,节节草体内形成了自身的生理防御系统,SOD 和 POD 酶活性随污染浓度的升高而提高,能很好地清除由 Cu 污染造成的活性氧,从而减轻活性氧对植物的伤害,是节节草抵御 Cu 毒害的物质基础之一.高浓度 Cu 污染时,CAT 酶活性的维持(或升高)在协助 SOD 酶清除自由基方面起着一定的作用。

参考文献

- Baker AJM, Mc Grath SP, Reeves RD, et al. 2000. Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resources for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N, ed. Phytoremediation of Contaminated Soil and Water. Boca Roton FL, USA: CRC Press. 85~107
- Bowler SR, Mérésie BD. 1990. Relationships among freezing, low temperature flooding, and ice encasement tolerance in alfalfa. *Can J Plant Sci*, 70: 227~235
- Brit LR, Lebrum M. 1999. Plant responses to metal toxicity. *Plant Biol Path*, 322: 43~54
- De Vos HR, Schat H, De Waal MAM, et al. 1991. Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmolemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiol Plant*, 82: 523
- Gao X-L(高侠莉), Wang A-M(王爱民), Yuan Z-F(袁宗飞), et al. 1997. The effect of waste water on ecology-physiological and cytotoxicology of vegetables. *China Environ Sci* (中国环境科学), 17(5): 443~445(in Chinese)
- Huang Y-S(黄玉山), Qiu G-H(邱国华). 1998. Physiological differences of *Festuca rubra* copper tolerant merlin and sensitive S59 to copper treatment at their early developmental stages. *Chin J Appl Environ Boil* (应用与环境生物学报), 4(2): 126~131(in Chinese)
- Lena QM, Ma LK. 2001. A fern that hyper-accumulates arsenic. *Nature*, 409: 579
- Li Y(李 影), Wang Y-B(王友保), Liu D-Y(刘登义). 2003. Investigation on the vegetation of copper tailing wasteland in Shizishan, Tongling, Anhui Province. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 14(11): 1981~1984(in Chinese)
- Li Y(李 元), Wang H-X(王焕校), Wu Y-S(吴玉树). 1992. Effects of cadmium and iron on the some physiological indication in leaves of tobacco. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 12(2): 147~154(in Chinese)
- Liu DY, Li Y, Chu L, et al. 2005. Study of the tolerance of *Hippochaete ramosissimum* to Cu stress. *Sci China*, 48(supp.): 150~155
- Myrna EW. 1997. Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environ Sci Technol*, 31: 182~186
- Nagalakshmi N, Prasad MNV. 1998. Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*: Protective role of free radical scavengers. *Bull Environ Contam Toxicol*, 61(5): 623~628
- Ouzounidou G. 1994. Copper-induced changes on growth metal content and photosynthetic function of *Alyssum tanum* plants. *Environ Exp Bot*, 34(2): 165~172
- Pan G-X(潘根兴), Chang AC, Page AL. 2002. Modeling transfer and partitioning of potentially toxic pollutants in soil-crop system for human food security. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 13(7): 854~858(in Chinese)
- Proinoké KH. 1981. The Methods of Analysis of Biochemistry on Plants. Beijing: Science Press. 197~209(in Chinese)
- Pan R-Z(潘瑞焜), Dong Y-D(董愚得). 1995. Plant Physiology. Third Edition. Beijing: Higher Education Press. 35(in Chinese)
- Wang D(王 狄), Li F-M(李锋民), Xiong Z-Y(熊治延), et al. 2000. Relationship between copper toxicity and phytoaccumulation. *Soil Environ Sci* (土壤与环境), 9(2): 146~148(in Chinese)
- Wang S-H(王松华), Yang Z-M(杨志敏), Xu L-L(徐朗莱). 2003. Mechanisms of copper toxicity and resistance of plants. *Ecol Environ* (生态环境), 12(3): 336~341(in Chinese)
- Wang Y-B(王友保), Liu D-Y(刘登义), Zhang L(张 莉), et al. 2004. Patterns of vegetation succession in the process of ecological restoration on the deserted land of Shuizishan Copper Tailing in Tongling city. *Acta Bot Sin* (植物学报), 46(7): 780~787
- Wei C-Y(韦朝阳), Chen T-B(陈同斌). 2002. The ecological and chemical characteristics of plants in the areas of high arsenic levels. *Acta Phytocool Sin* (植物生态学报), 26(6): 695~700(in Chinese)
- Wei C-Y(韦朝阳), Chen T-B(陈同斌). 2001. Hyperaccumulators and phytoremediation of heavy metal contaminated soil: A review of studies in China and abroad. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 21(7): 1196~1203(in Chinese)
- Xu H-N(徐红宁), Xu J-L(许嘉琳). 1993. The effect of complex pollution of heavy metals in soil environment on the growth of wheat. *China Environ Sci* (中国环境科学), 13(5): 367~371(in Chinese)
- Yan B, Dai QJ, Li XZ, et al. 1996. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant Soil*, 179: 261~268
- Yang J-R(杨居荣), He J-Q(贺建群), Zhang G-X(张国祥), et al. 1996. Reaction of some enzyme activities in crops of different tolerance to the stress of Cd. *China Environ Sci* (中国环境科学), 16(2): 113~117(in Chinese)
- Yang J-R(杨居荣), Zha Y(查 燕). 1999. Existing forms of heavy metals and their toxicity in foods. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 10(6): 766~770(in Chinese)
- Yu G-Y(余国营), Wu Y-Y(吴燕玉), Wang X(王 新). 1995. Impact of heavy metal combined pollution on soybean growth and its integrated assessment. *Chin J Appl Ecol* (应用生态学报), 6(3): 433~439(in Chinese)
- Zhang Z-L(张志良). 1990. Direction of Plant Physiology Experiment. Beijing: Higher Education Press. 160~162(in Chinese)
- Zhou C-F(周长芳), Wu G-R(吴国荣), Shi G-X(施国新), et al. 2001. The role of antioxidant systems in Cu²⁺ stress resistance in *Alternanthera philoxeroides*. *Acta Bot Sin* (植物学报), 43(4): 389~394(in Chinese)
- Zhou R-L(周瑞莲), Zhao H-L(赵哈林). 2002. Protecting enzyme system of herbage and its functions in the cold growing process in alpine and cold region. *Acta Bot Boreali-Occid Sin* (西北植物学报), 22(3): 566~573(in Chinese)
- Zhu G-L(朱广廉), Zhong H-W(钟海文), Zhang F-Q(张发琴). 1990. Experiment of Plant Physiology. Beijing: Peking University Press. 123(in Chinese)
- Zhu Y-J(朱云集), Wang C-Y(王晨阳), Ma Y-X(马元喜), et al. 2000. Effects of arsenic stress on the growth and metabolism of the wheat root system. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 20(4): 707~710(in Chinese)

作者简介 李 影,女,1979年生,硕士,讲师.主要从事环境生物学及恢复生态学研究,已发表论文5篇. E-mail: alison79@163.com

责任编辑 梁仁禄