

文章编号:1000-8551(2011)04-0807-05

X 射线能谱和 FTIR 分析铜胁迫对玉米幼苗的影响

乔琳^{1,2} 傅兆麟² 乔传英³

(1. 周口师范学院实验中心,河南周口 466001;2. 淮北师范大学生命科学院,安徽淮北 235000;

3. 周口师范学院生命科学系,河南周口 466001)

摘要:应用 X 射线能谱和傅里叶变换 - 衰减全反射红外光谱 (FTIR-ATR) 分析方法结合一些生理指标的变化及幼苗叶片下表皮扫描电镜观察,研究一定浓度 ($0, 200, 400, 800, 1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) Cu^{2+} 胁迫对玉米幼苗的影响。结果表明,随着 Cu^{2+} 浓度增高,叶绿素含量呈下降趋势,抗氧化酶 (SOD、CAT、POD、APX) 活性均先升高后降低。利用 SEM 及 X 射线能谱检测玉米表面发现,高浓度的 Cu^{2+} 胁迫会使玉米叶片细胞扭曲、拉长,而且细胞表面铜元素含量升高,并影响其他营养元素的吸收。铜处理导致幼苗叶片 3338 cm^{-1} 、 2918 cm^{-1} 、 2849 cm^{-1} 及 1377 cm^{-1} 吸收峰强度较对照增强,整体呈现先升后降的趋势。

关键词:铜胁迫;玉米;X 射线能谱;FTIR-ATR;抗氧化酶

EFFECTS OF CU STRESS ON MAIZE SEEDLINGS USING X-RAY ENERGY SPECTRUM AND FTIR SPECTRA METHODS

QIAO Lin^{1,2} FU Zhao-lin² QIAO Chuan-ying³

(1. Laboratory Centre, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466001;

2. School of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei, Anhui 235000;

3. Department of Life Science, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466001)

Abstract: The effects of Cu^{2+} stress on maize seedlings by using scanning electron microscope, X-ray energy spectrum and Fourier transform infrared attenuated total reflection (FTIR-ATR) spectrometry were investigated, and antioxidative enzymes activities such as SOD, CAT, POD, APX were measured. Results showed that, with the increasing of Cu^{2+} concentration, the content of chlorophyll decreased, and antioxidative enzyme activities increased at first and then decreased at higher concentration stress. High concentration Cu^{2+} treatment twisted the cells' shape and increased copper content on leaf surface, and absorption of other nutrients were also affected. The result of FTIR-ATR analysis showed that the organic content of leaf were changed by Cu^{2+} stress.

Key words: copper stress; maize; X-ray energy spectrum; FTIR-ATR; antioxidative enzymes

随着人口增长和工业的发展,重金属污染日益严重,不仅影响作物的生长发育,并能进入食物链而影响人类健康^[1]。 Cu^{2+} 是造成水体重金属污染的重要元素之一,会毒害作物,并在作物体内富集^[2~6]。过量的 Cu^{2+} 可破坏作物的形态结构,降低叶片中叶绿素含量,影响抗氧化酶活性、矿质元素吸收平衡及蛋白质等构成细胞和组织的主要物质含量、构象^[7,8]。

X 射线能谱是目前用于样品表面元素分析最有效的工具之一,对样品损伤轻微,能获得表面元素成分信息。傅里叶变换红外色谱 (FTIR) 是一种基于化合物中官能团和极性键振动的结构分析技术,已被广泛应用于药材质量检测、作物品质鉴定、植物分类等各个领域^[9~11]。本文应用 X 射线能谱及 FTIR-ATR 法研究了玉米幼苗在受到重金属铜胁迫时,叶片表面元素及

收稿日期:2010-08-13 接受日期:2010-10-25

基金项目:河南省科技厅自然科学基金项目(092300410074)

作者简介:乔琳(1985-),男,河南周口人,硕士研究生,专业方向为植物学。E-mail: qiaolin@zknu.edu.cn

通讯作者:乔传英(1964-),女,河南周口人,讲师,从事植物生理生化研究。E-mail:lantianqey@163.com

叶片 FTIR 波峰的变化,结合分析玉米生理指标及叶片微形态变化,以期进一步了解玉米幼苗对 Cu^{2+} 胁迫的响应机理,为作物重金属污染监测提供一种快速有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 供试玉米(*Zea mays L.*)品种为郑单958。

1.1.2 仪器与试剂 QUANTA 200 扫描电子显微镜, FEI 公司; EDS-NS7 X 射线能谱仪, Thermo Fisher 公司; Nicolet5700 傅里叶变换红外光谱仪, Nicolet 公司; U-3300 型紫外可见光分光光度计, 日立公司。分析纯 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 。

1.2 试验方法

将田间所取土样室温风干、磨碎、过200目筛,装于塑料盆中,每盆600g;分别配置 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 加入土壤中,使每kg土壤中N,P,K含量分别为100、100和80mg;再在每盆中分别加入不同量的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 水溶液,使土壤中不同处理的 Cu^{2+} 浓度分别为0、200、400、800 和 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、HCl 调土壤 pH 值 6.0~7.0 之间。每处理3个重复。

玉米种子用5% NaClO 浸泡10min,去离子水冲洗,于25°C ± 1°C恒温条件下催芽。出芽后移栽至盆中,幼苗在培养室日光灯照射培养,温度25°C ± 1°C、光强800 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、光暗比12h/12h,每天浇1次去离子水保持土壤含水量。培养15d后取其幼苗叶片测定各项指标。

表1 不同浓度铜处理对叶绿素含量的影响

Table 1 Effects of Cu^{2+} stress on chlorophyll content in leaves of maize seedling

处理 treatment	$0\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$400\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$800\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$1000\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
叶绿素 a chla(mg/g)	$1.27 \pm 0.01\text{a}$	$1.09 \pm 0.05\text{b}$	$0.79 \pm 0.02\text{c}$	$0.66 \pm 0.02\text{d}$	$0.49 \pm 0.06\text{e}$
叶绿素 b chlb(mg/g)	$0.96 \pm 0.03\text{a}$	$0.67 \pm 0.02\text{b}$	$0.46 \pm 0.05\text{c}$	$0.36 \pm 0.02\text{d}$	$0.29 \pm 0.03\text{d}$
叶绿素 a/b chla/b	$1.33 \pm 0.05\text{c}$	$1.64 \pm 0.05\text{b}$	$1.73 \pm 0.06\text{ab}$	$1.88 \pm 0.07\text{a}$	$1.65 \pm 0.05\text{b}$
叶绿素 a + b Chla + b(mg/g)	$2.24 \pm 0.03\text{a}$	$1.76 \pm 0.07\text{b}$	$1.24 \pm 0.04\text{c}$	$1.02 \pm 0.04\text{d}$	$0.78 \pm 0.08\text{e}$

注:数据后的不同小写字母表示不同处理之间达到 $P = 0.05$ 水平的显著差异。下表均同。

Note: Data with different letters are significant difference at level 0.05. The same as following tables.

SOD、POD、CAT 和 APX 等多种抗氧化酶组成植物体内活性氧清除系统。由表2可见, Cu^{2+} 胁迫使4种保护酶均呈先升后降趋势,并分别在 Cu^{2+} 浓度为200、400、800 和 400 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时达到其相应峰值,且相比对照均有显著升高,说明低浓度 Cu^{2+} 能诱导玉米叶

1.3 测定指标及方法

超氧化歧化酶(SOD)活性测定用 NBT 法^[12], 过氧化氢酶(CAT)活性测定用 Chance B 的方法^[13], 过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚法^[14], 抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性测定采用 Nakano 的方法^[15], 叶绿素含量的测定采用 Arnon 的方法^[16]。

扫描电子显微镜高真空模式(HV 25.00KV)下观察叶片表皮细胞。

取玉米幼苗叶片于50°C干燥箱中烘干48h,一部分在扫描电子显微镜中进行X射线能谱仪测定其表面矿质含量,一部分叶片烘干用于FTIR-ATR法傅里叶变换红外色谱测定,按照给定的测试条件(光谱范围4000~400 cm^{-1} , 分辨率为0.1 cm^{-1} , 扫描累加次数32次), OMNI 直接测定红外光谱, ATR 校正, 测定前对背景进行扫描, 得到的红外光谱进行基线校正, 确定峰值和吸光度。

1.4 数据分析

试验数据结果采用 SPSS17.0 统计分析, Origin7.5 作图。

2 结果与分析

2.1 Cu^{2+} 胁迫下玉米幼苗叶片生理指标变化

叶绿素含量高低在一定程度上反映了光合作用的水平。从表1中可以看出,土壤中以不同浓度 Cu^{2+} 处理后,玉米幼苗叶片中叶绿素 a、b 及叶绿素总量随土壤中 Cu^{2+} 浓度的增加而显著下降,在 Cu^{2+} 浓度达到 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,可以观察到玉米幼苗叶片出现失绿现象。

片 SOD、POD 等抗氧化酶活性不同程度地升高,以及时清除 Cu^{2+} 胁迫产生的过多活性氧。随着 Cu^{2+} 浓度的升高,各抗氧化酶活性不同程度下降,至 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,4 种酶活性均显著低于相对对照,分别为对照的 63.6%、88.9%、71.4%、71.8%。

表2 不同浓度铜处理对玉米幼苗叶片抗氧化酶活力的影响
Table 2 Activities of antioxidative enzymes SOD, CAT, POD and APX in the leaves of maize seedling treated under Cu^{2+} stress

处理 treatment	$0\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$400\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$800\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$1000\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
SOD ($\text{Umg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$47.2 \pm 2.0\text{bc}$	$65.13 \pm 2.9\text{a}$	$55.4 \pm 3.1\text{b}$	$39.8 \pm 1.0\text{c}$	$30.0 \pm 3.6\text{d}$
CAT ($\text{Umg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$230.5 \pm 17.6\text{c}$	$269.6 \pm 14.3\text{b}$	$356.6 \pm 18.4\text{a}$	$388.4 \pm 5.4\text{a}$	$204.9 \pm 9.7\text{c}$
POD ($\text{Umg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$3.74 \pm 0.57\text{b}$	$4.16 \pm 0.59\text{a}$	$4.31 \pm 0.80\text{a}$	$3.27 \pm 0.77\text{c}$	$2.67 \pm 0.50\text{d}$
APX ($\text{Umg}^{-1} \text{min}^{-1}$)	$0.39 \pm 0.01\text{c}$	$0.37 \pm 0.04\text{c}$	$0.47 \pm 0.01\text{a}$	$0.44 \pm 0.06\text{b}$	$0.28 \pm 0.04\text{d}$

2.2 Cu^{2+} 胁迫下玉米叶片细胞形态及各元素的相对含量

扫描电镜观察发现,正常玉米叶片表面光滑,细胞形状规则,排列紧密(图1-A)。将视场放在叶片某处放大600倍,扫描得到一系列能谱分析结果。能谱图上仅出现的C和O峰值高,同时也有一定的Si、K、Ca等,而 Cu^{2+} 含量为0(图2-A)。对能谱图进行分析后各元素的相对含量见表3。

图1可见,与对照的细胞形态相比, $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cu^{2+} 处理15d的玉米叶片表皮细胞与对照差异不明显,随着 Cu^{2+} 浓度增大,玉米叶片表皮细胞形状出现

不规则、细胞被拉长现象,且浓度越大, Cu^{2+} 对玉米叶片的毒害越明显。相应的,扫描能谱图上显示出随着 Cu^{2+} 浓度增大,玉米叶片对 Cu^{2+} 的吸收峰也逐渐上升,同时对其他离子的吸收也产生了不同程度的影响。如表3所示,叶片中Si、K、Ca含量随 Cu^{2+} 浓度的增加显著降低,Mg、Zn元素出现先升高后降低的趋势,Fe元素随着 Cu^{2+} 浓度明显增高,说明 Cu^{2+} 能促进玉米对Fe的吸收。在 $0 \sim 400\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Cu^{2+} 处理的幼苗叶片中均未发现铜元素,而在 $800 \sim 1000\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 检测到少量铜。

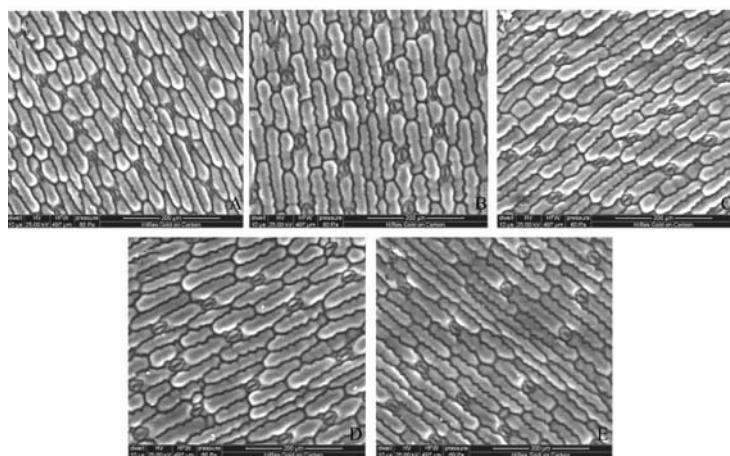


图1 Cu^{2+} 胁迫下玉米幼苗叶片(15d)表面扫描电镜观察($600\times$)

Fig. 1 SEM observation on nether epidermis of maize leaves under Cu^{2+} stress($600\times$)

A:CK; B: $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; C: $400\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; D: $800\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; E: $1000\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

表3 铜胁迫对玉米叶片中元素含量的影响

Table 3 Effect of Cu^{2+} stress on element concentration of maize leaves

Cu^{2+} ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	元素 element (%)						
	Si	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Cu
0	0.79a	1.7a	1.67a	—	—	—	—
200	0.81a	1.56a	1.59a	0.48b	0.03b	—	—
400	0.56b	0.91b	1.61a	0.53b	0.03b	0.06b	—
800	0.29c	1.04b	1.52b	0.86a	0.05a	0.19a	0.16a
1000	0.19d	1.36b	0.56c	0.5b	0.07a	0.06b	0.17a

2.3 Cu^{2+} 胁迫下玉米幼苗叶片的FTIR图谱分析

图3为不同 Cu^{2+} 处理玉米幼苗叶片各主要化学成分的综合反应,可以根据所含化学成分的官能团特征找到相应红外光谱吸收峰的归属。其中 3338cm^{-1} 处有吸收强、峰形圆而钝的谱带,是典型的缩合OH伸缩振动吸收,以及蛋白质、氨基酸、核酸、维生素等物质中N-H键的伸缩振动吸收的叠加,主要反应玉米叶片中所含蛋白质、核酸等物质在光谱中的贡献。结合 1058cm^{-1} 处的吸收峰,判断叶片内含有伯醇。在铜胁迫时,上述物质的峰值表现先升后降的现象,表明低浓

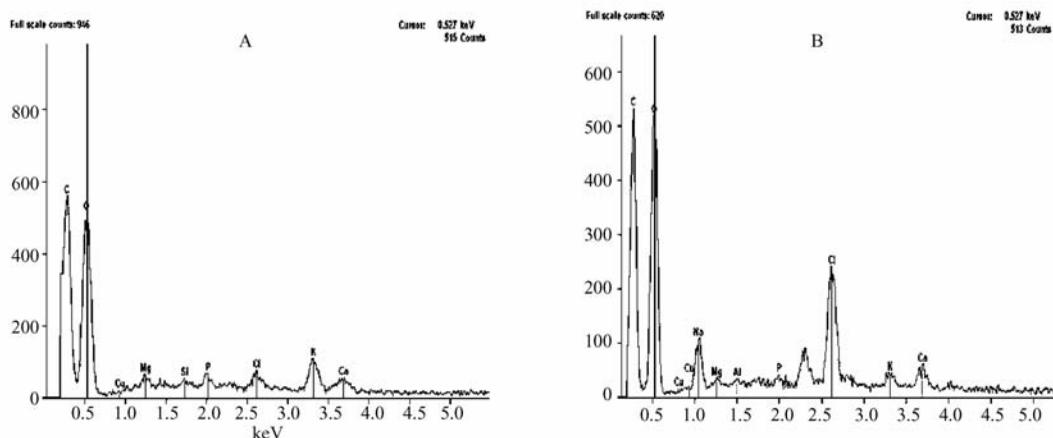


图2 玉米幼苗叶片(15d)表皮细胞X射线扫描能谱图

Fig. 2 Illustrations of scanning electron microscope X-ray energy spectrum of epidermal leaf cells of maize

A : CK; B : 800 mg · kg⁻¹

度的 Cu^{2+} 胁迫能促进此类物质的生成。

2918cm^{-1} 和 2849cm^{-1} 附近是饱和 CH_2 上 C - H 的伸缩振动吸收峰,由图3可知, Cu^{2+} 处理导致 A_{2918} 及 A_{2849} 均高于对照组,其峰值也随着 Cu^{2+} 浓度的增加出现先升后降的趋势, A_{1600} 蛋白吸收区域变化趋势也与之一致。且以上物质的吸收峰波数并未发生明显位移,说明 Cu^{2+} 胁迫下,玉米叶片中蛋白质等分子骨架中的 N - H、 CH_2 基团没有发生显著变化。在指纹区 1058cm^{-1} 处的峰值随着 Cu^{2+} 浓度的增加出现位移,在 Cu^{2+} 胁迫时峰值均出现在 1037cm^{-1} 处。且指纹区存在的其他变化,都说明高浓度的 Cu^{2+} 胁迫影响了玉米叶片内含有的有机物质。

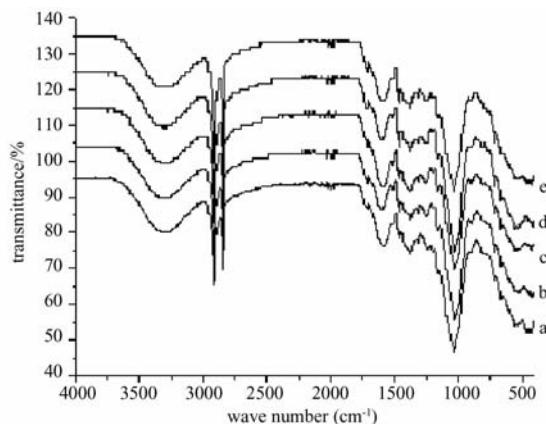


图3 玉米叶片(15d)和FTIR谱图

Fig. 3 FTIR spectra of maize leaves under Cu^{2+} stressa:CK; b: $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; c: $400\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;d: $800\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; e: $1000\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

3 讨论

叶绿体是植物进行光合作用的细胞器,植物受到重金属毒害后普遍出现叶片褪绿现象,试验表明这是由于叶绿素含量降低造成的,这与前人的观点相一致^[17]。SOD、CAT等抗氧化酶体系随着 Cu^{2+} 浓度的增大而出现先升后降的趋势,在 FTIR 谱图中蛋白质等分子的 N - H、 CH_2 基团也有这种随着 Cu^{2+} 浓度的增大而出现先升后降的趋势。高浓度的 Cu^{2+} 胁迫造成了 SOD、CAT 等抗氧化酶体系酶活性的降低,在 FTIR 中也出现了指纹区部分峰的位移,说明玉米叶片内有机物质的变化。

与之相对应,这种单一金属胁迫同时影响了玉米对其他矿质元素的吸收,X射线能谱表面分析发现:叶片中 Si、K、Ca 含量显著降低,这与张自坤等人以黄瓜为研究对象所得出的结果相似^[18],其中 Mg、Zn 元素出现先升高后降低的趋势却又与张自坤的试验结果不同。Fe 元素随着 Cu^{2+} 浓度明显增高,说明 Cu^{2+} 胁迫能促进玉米对 Fe 的吸收,这与 Vardake 等人以小麦为研究对象所得出的结果相似^[19],但不同于徐照丽等用烟草进行的试验结果^[20]。 Cu 影响植物对微量元素的吸收及分配,导致严重的营养缺乏和营养不平衡,从而进一步影响植物的正常生长^[21], Cu 和必需元素之间的这种相互作用可能是导致植物产生毒害的原因之一^[22]。而且随着 Cu^{2+} 胁迫浓度的升高,在叶片表面也检测到了 Cu 元素。这种高浓度的 Cu^{2+} 胁迫最终也表现在细胞形态上,玉米叶片表皮细胞形状出现不规

则、扭曲、被拉长的现象。有关重金属 Cu 对玉米的生理特性的影响还有待进一步研究。

4 结论

Cu^{2+} 胁迫会降低玉米幼苗的叶绿体含量, 影响 SOD、CAT 等抗氧化酶活性以及叶片元素和有机物质含量的变化。

高浓度的 Cu^{2+} 胁迫破坏玉米叶片表皮细胞结构从而影响玉米幼苗的生长。

参考文献:

- [1] Intawongse M, Dean J R. Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract [J]. Food Addit Contam, 2006, 23(1): 36 ~ 48
- [2] Baryla A, Laborde C, Montillet J L, et al. Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plants exposed to copper [J]. Environ Pollut, 2000, 109: 131 ~ 135
- [3] Chen L M, Lin C. C and C H Kao. Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzymes, H_2O_2 level and cell wall peroxidase activity in roots [J]. Bot Bull Acta Sinica, 2000, 41: 99 ~ 103
- [4] 徐镇坚, 田兵, 华跃进. 不同金属辅基和酶剂量对超氧化物歧化酶抗氧化、促氧化作用的影响 [J]. 核农学报, 2006, 20(4): 349 ~ 352
- [5] 葛才林, 骆剑锋, 刘冲, 殷朝珍, 王泽港, 马飞, 罗时石. 重金属对水稻光合作用和同化物输配的影响 [J]. 核农学报, 2005, 19(3): 214 ~ 218
- [6] 张军, 束文圣. 植物对重金属镉的耐受机制 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2006, 32(1): 1 ~ 8
- [7] Chamseddine M, Wided B A, Guy H, Marie-Edith C, et al. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicum*) leaves [J]. Plant Growth Regulation, 2009, 57: 89 ~ 99
- [8] 张志峰, 刘园, 张浩. 傅里叶变换红外光谱法并结合主要成分分析法鉴别灯盏花和多舌飞蓬的研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(12): 3263 ~ 3266
- [9] Bureau S, Ruiz D, Reich M, et al. Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit [J]. Food Chemistry, 2009, 115: 1113 ~ 1140.
- [10] Boulet J C, Williams P, Doco T. A fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 69: 79 ~ 85
- [11] Komatsu H, LIU L, Murray Ian V J, et al. A Mechanistic link between oxidative stress and membrane mediated amyloidogenesis revealed by infrared spectroscopy [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1768: 1913 ~ 1922
- [12] Beyer W F, Fridovich Y. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions [J]. Anal Biochem, 1987, 161: 559 ~ 566
- [13] Chance B, Maehly A C. Assay of catalases and peroxidases [J]. Methods Enzymology, 1955, 2: 764 ~ 775
- [14] Maehly A C. Plant peroxidase [J]. Methods Enzymology, 1955, 2: 801 ~ 813
- [15] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. Plant Cell Physiol, 1981, 22: 867 ~ 886
- [16] Arnon D I. Copper Enzymes in isolated Chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. Plant Physiology, 1949, 24: 1 ~ 15
- [17] Chen L Q, Guo Y F, Yang L M. Synergistic defensive mechanism of phytochelatins and antioxidative enzymes in *Brassica chinensis* L. against Cd stress [J]. Chinese Science Bulletin, 2008, 53(10): 1503 ~ 1511
- [18] 张自坤, 刘作新, 张颖, 舒乔生. 铜胁迫对嫁接和自根黄瓜幼苗光合作用及营养元素吸收的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(1): 135 ~ 139
- [19] Vardake E, Cook C M, Lanaras T. Interelemental relationship in the soil and plant tissue and photosynthesis of field cultivated wheat growing in naturally enriched copper soils [J]. Journal of plant nutrition, 1997, 20(4 ~ 5): 441 ~ 453
- [20] 徐照丽, 张晓梅. 利用铁、铜间相互作用减轻烤烟铜毒害的研究 [J]. 中国烟草科学, 2006(2): 37 ~ 40
- [21] Liu J, XiongZ T, Li T Y. Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. From Cu contaminated and noncontaminated sites [J]. Envior Exp Bot, 2004, 52: 43 ~ 51
- [22] Kinraide T B, Pedler J F, Parker D R. Relative effectiveness of calcium and magnesium in the alleviation of rhizotoxicity in the wheat induced by copper, zinc, aluminum, sodium and low pH [J]. Plant Soil, 2004, 259(1 ~ 2): 201 ~ 208
- [23] 周长芳, 吴国荣, 施国新, 等. 水花生抗氧化系统在抵御 Cu^{2+} 胁迫中的作用 [J]. 植物学报, 2002, 43(4): 389 ~ 394

(责任编辑 邱爱枝)