

# 锌离子对菖蒲的胁迫反应研究

高 尚<sup>1</sup>, 黄民生<sup>1</sup>, 戴兴春<sup>1</sup>, 周守标<sup>2</sup>

(1. 华东师范大学资源与环境科学学院, 上海 200062; 2. 安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)

**摘要** 采用水培法, 以 Hoagland 溶液为基础培养液, 研究  $Zn^{2+}$  胁迫对菖蒲幼苗生长状况、细胞渗透性、过氧化物酶(POD)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、叶绿素以及脯氨酸质量比的影响。结果表明  $Zn^{2+}$  胁迫下菖蒲幼苗生长受到严重影响, 随着  $Zn^{2+}$  质量比的增加, 叶片电导率不断增大; POD、SOD 活性均高于对照, 并且呈现先升高后降低的正相关趋势; 叶绿素的质量比显著降低, 与  $Zn^{2+}$  质量比呈负相关趋势; 脯氨酸质量比则一直呈上升的变化趋势。研究结果说明, 酶活性的升高是由于菖蒲对  $Zn^{2+}$  胁迫做出的应激反应, 而高质量比  $Zn^{2+}$  却对菖蒲的保护酶活性有抑制作用。

**关键词** 菖蒲; 锌离子; 胁迫反应; 过氧化物酶; 超氧化物歧化酶; 叶绿素; 脯氨酸

**中图分类号** X171.4      **文献标识码** A      **文章编号** 1004-693X(2008)05-0055-04

## Response of *Acorus calamus* to $Zn^{2+}$ stress

GAO Shang<sup>1</sup>, HUANG Min-sheng<sup>1</sup>, DAI Xing-chun<sup>1</sup>, ZHOU Shou-biao<sup>2</sup>

(1. School of Resources and Environmental Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 2. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

**Abstract** *Acorus calamus* was cultured in Hoagland's solution. The effects of  $Zn^{2+}$  stress on the growth of *Acorus calamus*, the cell permeability, the activity of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) and the chlorophyll and proline concentrations were investigated. The results show that the growth of *Acorus calamus* was badly influenced and the leaves' conductivity increased. The activity of POD and SOD first increased, then decreased, but was higher than that in the control experiment. The chlorophyll concentration dramatically decreased and was negatively related with the  $Zn^{2+}$  concentration. The proline concentration increased along with the  $Zn^{2+}$  concentration. The results indicate that the increase of enzyme activity is an adaptation response of *Acorus calamus* stressed by  $Zn^{2+}$ , while a high concentration of  $Zn^{2+}$  inhibits the enzyme activity.

**Key words** *Acorus calamus*;  $Zn^{2+}$ ; stress response; POD; SOD; chlorophyll; proline

矿山开采、冶金、电镀、皮革等行业排放大量重金属废水、废渣, 导致土壤和水体污染并危害人类健康。研究表明, 一些水生植物对水体中的重金属有吸收富集作用<sup>[1-3]</sup>, 可以用于重金属污染水体的治理与修复<sup>[4-5]</sup>, 是一种投资小、效率高和“绿色”的污染治理措施。

水环境中重金属离子浓度过高将对植物造成伤害, 研究表明过氧化胁迫是其中主要机制, 即导致植

物体内产生大量的活性氧自由基(ROS), 从而使其体内的代谢失调, 造成生物膜脂和一些大分子过氧化<sup>[6]</sup>。

菖蒲(*Acorus calamus*)是天南星科的多年生挺水植物, 分布于我国南北各省, 是挺水植物群落中的优势种, 常作为水环境生态修复工程中常用的物种之一。本文通过分析不同的  $Zn^{2+}$  质量比下菖蒲幼苗的生物量、细胞渗透性、POD 活性、SOD 活性、叶绿素

基金项目: 上海市科委重点项目(062312019)

作者简介: 高尚(1983—)男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 研究方向为水污染控制工程。E-mail: lofty0210033@163.com

通讯作者: 黄民生, 教授, E-mail: inshuang@des.ecnu.edu.cn

及脯氨酸质量比,研究了菖蒲对不同  $Zn^{2+}$  质量比的胁迫反应,旨在探讨菖蒲抗氧化酶系统在抵抗  $Zn^{2+}$  胁迫中的作用,探索  $Zn^{2+}$  对菖蒲的毒害性及菖蒲对  $Zn^{2+}$  的耐受性机理,以期对受  $Zn^{2+}$  污染水体的植物修复提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供应品种

为减少外界因素对试验的影响,将水培的菖蒲无菌苗移栽到无污染的沙土里培养 3 个月后,取高 30 cm 左右、长势和质量基本相同的幼苗作为试验材料。

### 1.2 实验设计

实验菖蒲先置于 Hoagland 营养液( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  945 mg/L,  $KNO_3$  367 mg/L,  $NH_4H_2PO_4$  115 mg/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  493 mg/L)中培养 2 ~ 3 d,使它们适应室内的环境条件。然后将  $ZnCl_2$  与去离子水配成母液,逐级稀释与 Hoagland 营养液混合,参照阮肖龙等<sup>[7]</sup>的方法,配制  $Zn^{2+}$  的质量比分别为 0(对照)、5 mg/g、15 mg/g、25 mg/g 和 35 mg/g(鲜重,下同),进行人工模拟受  $Zn$  污染的废水,并分别编号为 1 ~ 5 组。每组设 3 个平行样,3 个平行样所测得的结果求平均值作为统计数据,在处理于第 7 d 取样进行测定。

### 1.3 实验仪器

日本岛津 UV2120202 分光光度计;长沙 VORTEX21K 离心机;江苏康氏电动震荡机;浙江 DDS-12 型电导仪。

### 1.4 粗酶的制备与处理

称取水培的菖蒲嫩叶 0.1 g 进行研磨(冰浴),研磨介质为磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH = 7.8), 2 mmol/L  $Na_2-EDTA$ , 1% (w/w)聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。每克鲜重约加 2 ~ 3 mL 研磨介质, 5 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为粗酶提取液。

### 1.5 分析方法

a. 植株外伤症状:用目测估计的方法<sup>[8]</sup>。将菖蒲植株的外伤症状分为 4 级:正常生长(无伤害),目测不到伤害症状,轻度伤害,仅叶梢及中心部位部分失绿或转为黄绿色;中度伤害,中心部位及外围叶不同程度失绿;重度伤害,植株干枯,部分叶片焦黄失绿。

b. 细胞渗透性的测定<sup>[9]</sup>:取经不同质量比  $Zn^{2+}$  处理的菖蒲苗的同一功能区鲜叶片各 0.2 g,用双蒸水迅速冲洗干净,用刀片将材料切成长 0.5 cm 的小段,用双蒸水迅速冲洗 2 次,再用吸水纸吸净表面水分,放入装有 40 mL 双蒸水的三角烧瓶中,于电动震荡机上以 300 r/min 的转速震荡 1 h,过滤后用 DDS-12 型电导仪测量其电导率。

c. POD 活性:采用 Poqinnock<sup>[10]</sup>的方法测定。用愈创木酚-过氧化氢试剂(0.2 mol/L, pH = 6.0 磷酸缓冲液 50 mL 30% (v/v) 的过氧化氢 0.028 mL,愈创木酚 0.019 mL)测定其在 470 nm 处的光密度值。

d. SOD 活性:采用氮蓝四唑(NBT)法测定。根据 Giannop 等<sup>[11]</sup>的方法,测定 SOD 对氮蓝四唑(NBT)光还原的抑制作用,在 560 nm 下测定光密度。以抑制光还原 NBT 50% 为一个酶活力单位。

e. 叶绿素质量比和组成:用乙醇-丙酮混合法<sup>[12]</sup>测定叶绿素质量比。将 0.1 g 的叶片加 5 mL 的丙酮以及少许的  $CaCO_3$  进行研磨,再加入 80% (v/v) 的丙酮到 5 mL,然后转移至离心管中进行 3 000 r/min 离心,离心 10 min 后用 80% (v/v) 的丙酮将上清液定容到 10 mL,取上述溶液用分光光度计在 440 nm、663 nm 和 645 nm 下分别测得叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素 a + b。

f. 脯氨酸质量比:采用酸性茚三酮比色法<sup>[13]</sup>测定。取 1 g 材料加入到 10 mL 的 80% 乙醇中,研成匀浆,过滤,5 000 r/min 离心,取上清液 2 mL,加入 2 mL 冰醋酸、2 mL 茚三酮,将该混合物沸水浴 60 s。冷却后用乙醇补到原体积,并在波长 515 nm 下比色,用 80% 乙醇作对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 $Zn^{2+}$ 质量比对菖蒲生长的影响

菖蒲幼苗自处理的第 5 天起,第 3、4 和 5 组均出现明显的受伤症状,其中第 3 组(15 mg/g)的部分叶片颜色由绿转为黄绿,第 4 组(25 mg/g)的部分叶片已不同程度地失绿,第 5 组(35 mg/g)的菖蒲幼苗受伤最大,表现为部分叶片叶梢发黄,出现轻微干枯症状。随着时间的推移,伤害症状愈加明显,在第 7 天,第 5 组的部分叶片已经呈现出枯死现象(见表 1)。

表 1  $Zn^{2+}$  处理菖蒲苗第 7 天的外伤症状

组号	质量比/ ( $mg \cdot g^{-1}$ )	症状	组号	质量比/ ( $mg \cdot g^{-1}$ )	症状
1	0	正常生长	4	25	中度伤害
2	5	正常生长	5	35	重度伤害
3	15	轻度伤害			

### 2.2 $Zn^{2+}$ 质量比对菖蒲细胞膜渗透性的影响

细胞膜的渗透性可以反映出细胞的生理状态,是评价植物抗性能力的重要指标之一<sup>[14]</sup>。从图 1 可见,菖蒲幼苗的电导率与  $Zn^{2+}$  质量比呈正相关,相关系数  $r = 0.9471$ ,回归方程为  $y = 60.32 + 6.473x$ 。即随着  $Zn^{2+}$  质量比的增大,菖蒲幼苗的电导率呈上升趋势,说明菖蒲幼苗在  $Zn^{2+}$  的影响下,细胞膜受到了不同程度的损害,导致细胞质外渗。

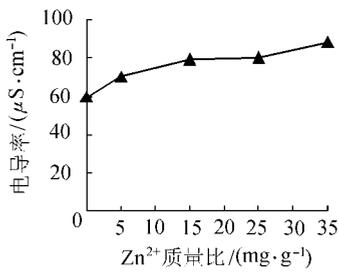


图1 Zn<sup>2+</sup>质量比对菖蒲细胞渗透性的影响

### 2.3 Zn<sup>2+</sup>胁迫对菖蒲幼苗 POD 活性的影响

POD 是植物中普遍存在的一种氧化还原酶类,参与植物体内的生理生化过程,具有许多重要的生理功能<sup>[15]</sup>。由图 2 可见,当 Zn<sup>2+</sup> 质量比由 0 升至 15 mg/g 时,POD 活性也随之升高,说明菖蒲对 Zn<sup>2+</sup> 胁迫有应激反应,符合植物对胁迫反应的典型特征,与马文丽等<sup>[16]</sup>用镉处理乌麦种子萌发幼苗的结果相一致,但过高的质量比造成 POD 活性受到抑制。POD 活性与 Zn<sup>2+</sup> 的相关系数  $r = 0.1261$ ,回归方程为  $y = 0.2548 + 0.0003x$ ,总体趋势呈正相关。

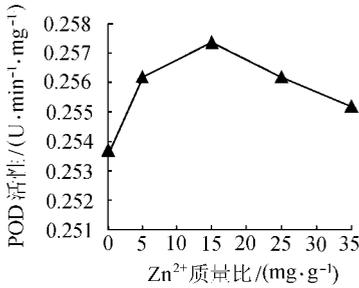


图2 Zn<sup>2+</sup>质量比对菖蒲 POD 活性的影响

### 2.4 Zn<sup>2+</sup>胁迫对菖蒲幼苗 SOD 活性的影响

SOD 是植物体内清除活性氧的关键酶,可清除植物体内的超氧阴离子自由基,将氧阴离子自由基歧化为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,减缓自由基对膜的伤害<sup>[17-18]</sup>。SOD 作为超氧自由基清除剂,在适度逆境条件下,其活性有所提高,以增加植物的抗逆能力。由图 3 可见,随着 Zn<sup>2+</sup> 质量比的增加菖蒲幼苗 SOD 活性也相应增加,说明在外界 Zn<sup>2+</sup> 的影响下,菖蒲体内产生了大量的活性氧自由基,使 SOD 底物增加,导致 SOD 活性上升,但当 Zn<sup>2+</sup> 质量比增加到 15 mg/g 时,SOD 活性反而出现下降的趋势。初步分析认为,这是由于随着

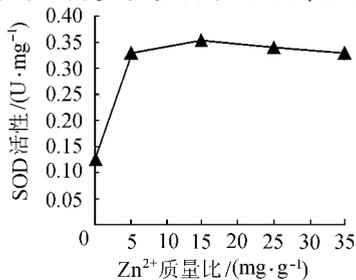


图3 Zn<sup>2+</sup>质量比对 SOD 酶活性的影响

Zn<sup>2+</sup> 质量比的不断增大,植物体受到抑制和损害加重,部分 SOD 酶被破坏,从而会导致 SOD 活性下降。SOD 活性与 Zn<sup>2+</sup> 的相关系数  $r = 0.4749$ ,回归方程为  $y = 0.1707 + 0.0415x$ ,总体趋势呈正相关。

### 2.5 Zn<sup>2+</sup>胁迫对菖蒲幼苗中叶绿素的影响

Alberte 等<sup>[19]</sup>认为重金属对植物胁迫的响应不仅表现在形态特征上,还表现于生理生化特征上。由图 4 可看出,菖蒲叶片中叶绿素的质量比与 Zn<sup>2+</sup> 质量比呈负相关,说明 Zn<sup>2+</sup> 经植物富集后与叶绿素合成酶(原叶绿素脂还原酶、 $\delta$ -氨基乙酰丙酸合成酶和胆色素原脱氨酶)的肽链中富含 -SH 的部分结合,从而抑制了酶活性,也就阻碍了叶绿素的合成<sup>[20]</sup>,叶绿素的降低必然会影响菖蒲的光合作用,从而也就影响了植物进行生物量的合成。叶绿素的质量比与 Zn<sup>2+</sup> 的相关系数  $r = 0.9514$ ,回归方程为  $y = 24.204 - 2.7545x$ ,呈负相关。

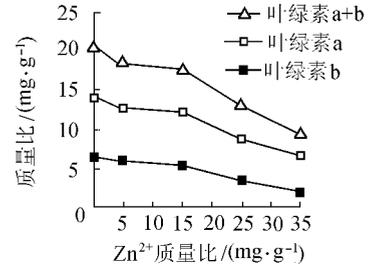


图4 Zn<sup>2+</sup>胁迫下菖蒲幼苗叶中叶绿素质量比的变化

### 2.6 Zn<sup>2+</sup>胁迫对菖蒲幼苗中脯氨酸的影响

脯氨酸通常被看做是植物体内的氨基酸库,脯氨酸质量比变化常作为植物体内氨基酸代谢是否受重金属影响的考察指标<sup>[21]</sup>,Smirnoff<sup>[22]</sup>认为环境胁迫下植物内源脯氨酸具有清除活性氧的作用,这一生理功能已在强光、紫外辐射、重金属锌、铜和镉等胁迫下的多种植物中得到了证实。由图 5 可以看出,脯氨酸的质量比随着 Zn<sup>2+</sup> 质量比的升高而呈上升的趋势,菖蒲幼苗叶中脯氨酸的这种变化与其受 Zn<sup>2+</sup> 胁迫有关。这种变化是植物在逆境下的适应性表现,是一种防护反应,脯氨酸的这种生理变化可以防止细胞结构和功能遭受伤害,降低细胞酸度以及调节植物细胞质渗透物质。脯氨酸的质量比与

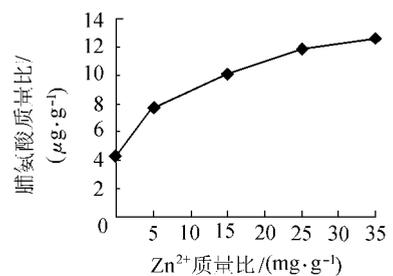


图5 Zn<sup>2+</sup>胁迫下菖蒲幼苗叶中脯氨酸质量比的变化

Zn<sup>2+</sup>的相关系数  $r = 0.9514$ , 回归方程为  $y = 3.1824 + 2.0527x$ , 呈正相关。

### 3 结 论

a. 重金属 Zn<sup>2+</sup> 对菖蒲的生长有伤害作用, 可通过电导率进行反映。当 Zn<sup>2+</sup> 质量比从 0 上升到 35 mg/g 时, 叶片的电导率由开始的 60.32  $\mu\text{S}/\text{cm}$  上升到 91.25  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , 说明细胞膜被破坏的程度加深。

b. Zn<sup>2+</sup> 的质量比从 0 上升到 15 mg/g 时, POD 的活性相应从 0.2537 U/(min·mg) 上升到 0.2574 U/(min·mg), 而 SOD 的活性则从开始的 0.1258 U/mg 上升到 0.3533 U/mg, 说明菖蒲对低质量比 Zn<sup>2+</sup> 的胁迫有应激反应, 但过高的 Zn<sup>2+</sup> 质量比 ( $\geq 15$  mg/g) 会使菖蒲 POD 和 SOD 部分失活。

c. 叶绿素的质量比与 Zn<sup>2+</sup> 质量比呈负相关。当 Zn<sup>2+</sup> 质量比由 0 上升到 35 mg/g 时, 叶绿素的质量比则由 20.60 mg/g 降到 9.564 mg/g。Zn<sup>2+</sup> 的胁迫会影响菖蒲的光合作用。

d. 脯氨酸的质量比一直随着 Zn<sup>2+</sup> 质量比的升高而呈上升的趋势, 当 Zn<sup>2+</sup> 质量比达到 35 mg/g 时, 脯氨酸质量比达 12.65  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 较对照提高了 285.2%, 说明植物对 Zn<sup>2+</sup> 的胁迫作用有一定的应急防护功能。

#### 参考文献:

[1] YANG Chen-sheng, LAN Chong-yu, SHU Wen-sheng. Accumulation and distribution of heavy metals in artificial wetland with *Typha latifolia* [J]. Technology of water treatment 2002 28(2):101-104.

[2] BALDANTONI D, ALFRANI A, TOMMASI P D, et al. Assessment of macro and microelement accumulation capability of two aquatic plants[J]. Environ Pollution, 2004, 130:149-156.

[3] PANICH-PAT T, POKETHITHIYOOK P, KRUA TRACHUE M, et al. Removal of lead from contaminated soils by *Typha angustifolia* [J]. Water, Air, and Soil Pollution 2004, 155:159-171.

[4] LIU Deng-yi, TIAN Sheng-ni, YANG Shi-yong, et al. Effects of copper minetailings on seed germination and seedling growth of five legumes species [J]. Chin J Appl Ecol 2002, 13(5):596-600.

[5] MEAGHER R B. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutant [J]. Curr Opin Plant Biol 2000, 3:153-162.

[6] MA Wen-li, WANG Zhuan-hua. Effects of lead stress on antioxidant enzyme of black wheat and common wheat [J]. Shanxi Agron Sci 2004, 32(2):8-12.

[7] 阮肖龙, 林东教, 罗健, 等. 香根草对水体中 Cu 和 Zn 的耐受性研究 [J]. 华中农业大学学报, 2004, 35(12):282-286.

[8] QIN Tian-cai. Effects of cadmium, lead single and combination pollution on the contents of ascorbic acid in *Brassica chinensis* [J]. Chin J Ecol, 1997, 16(3):31-34.

[9] WANG You-bao, LIU Deng-yi. Effect of Cu, As and their combination pollution on eco-physiological index of wheat [J]. Chin J Appl Ecol 2001, 12(5):773-776.

[10] POQINNOCK X H. Botany biochemistry analyze method [M]. Beijing: Science Press, 1981:197-209.

[11] GIANNOP L, SUPEROXIDE D. Purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedling [J]. Plant Physiol, 1977, 59:315-318.

[12] 张志良. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.

[13] 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, 2003.

[14] 王宝山. 生物自由基与植物膜伤害 [J]. 植物生理学通讯, 1988(2):12-16.

[15] POLITYCKA A. Peroxidase activity and lipid peroxidation in roots of cucumber seedlings influenced by derivatives of cinnamic and benzoic acid [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 1996, 18(4):365-370.

[16] MA Wen-li, JIN Xiao-di, Wang Zhuan-hua. Effects of cadmium on seed germination, growth of seedling and antioxidant enzymes of rye and wheat [J]. Agro-Environ Sci 2004, 23(1):55-59.

[17] DENG Bi-yu, YAN Qin-sheng, LI Wen-jie. Improved method of measuring SOD activities with 1,2,3-trithy-droxy-benzence self-oxidation [J]. Progr Biochem Biophys, 1991, 18(2):163.

[18] DU Dong, WANG You-nian, YU Ji-yuan, et al. The effects of exogenous betaine on photosynthesis of peach leaves under water stress [J]. Beijing Agric Coll 2004, 19(2):1-5.

[19] ALBERTE R S, THOMBER J P, FISCUS E L. Water stress effects on the content and chlorophyll in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize [J]. Plant Physiol, 1997, 59:351-353.

[20] SOMASHEKARIAH B V, PADAMAJAES K, PRASAD R K. Phytotoxicity of cadmium ions on germination seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation [J]. Plant Physiol, 1992, 65:85-89.

[21] JIANG Xing-yu, ZHAO Ke-fu. Mechanism of heavy metal injury and resistance of plants [J]. Chin Appl Environ Biol, 2001, 7(1):92-99.

[22] SMIRNOFF N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation [J]. New Phytol, 1993, 125(1):27-58.

(收稿日期 2007-06-13 编辑 徐 娟)