

铜离子胁迫对苦草生长特性及生理指标的影响

陈萍萍¹, 赵凤斌², 王丽卿^{1①}, 季高华¹ (1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 2. 上海水生环境工程有限公司, 上海 200090)

摘要: 设置 0、1、2、4 和 6 mg · L⁻¹ 5 个 Cu²⁺ 浓度梯度, 研究 Cu²⁺ 胁迫对苦草生长特性和生理指标的影响。结果表明, Cu²⁺ 对苦草的胁迫作用明显, 当 $\rho(\text{Cu}^{2+})$ 为 2 mg · L⁻¹ 时, 苦草生长受到抑制, 株高变小, 鲜质量下降, 但仍能生存; 当 $\rho(\text{Cu}^{2+})$ 为 4 mg · L⁻¹ 时, 出现明显受抑制现象, 在持续胁迫 30 d 后, 苦草外侧叶片出现腐烂变黑。微量的 Cu²⁺ 有利于激活过氧化氢酶 (CAT) 活性, 增强植株的抗逆性。CAT 活性对逆境的响应早于 MDA 和 H₂O₂ 含量, 因此监测 CAT 活性的变化对苦草的抗逆生理研究更具时效性和准确性。当 $\rho(\text{Cu}^{2+})$ 为 2 mg · L⁻¹ 时, 苦草生长受到抑制, 高于此浓度的 Cu²⁺ 污染水体不宜建植苦草沉水植被净化系统。

关键词: Cu²⁺; 苦草; 生长特性; 生理指标

中图分类号: Q9451; X173 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673 - 4831(2013)02 - 0230 - 04

Effect of Copper Ion Stress on Growth and Physiological Parameters of *Vallisneria natans*. CHEN Ping-ping¹, ZHAO Feng-bin², WANG Li-qing¹, JI Gao-hua¹ (1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Aquatic Environment Engineering Co. Ltd., Shanghai 200090, China)

Abstract: An experiment was designed to have 5 treatments, i. e. 0, 1, 2, 4 and 6 mg · L⁻¹ of $\rho(\text{Cu}^{2+})$ to explore effects of Cu²⁺ on growth and physiological indices of *Vallisneria natans*. Results show that the effect of Cu²⁺ stress on *V. natans* was significant. When $\rho(\text{Cu}^{2+})$ was 2 mg · L⁻¹, growth of *V. natans* was inhibited with the plants shortened in plant height and reduced in fresh weight, but they still survived. When $\rho(\text{Cu}^{2+})$ was 4 mg · L⁻¹, the phenomena of inhibition became more obvious on the plants, of which the outer leaves began to decay and turn black after 30 days of stress. A trace amount of Cu²⁺ was conducive to activation of catalase (CAT) and enhancement of stress resistance of the plants. The experiment found that CAT reacted earlier than MDA and H₂O₂ did, therefore, it was more accurate and effective to monitor changes in CAT activity for physiological studies of stress resistance of *V. natans*. As 2 mg · L⁻¹ of $\rho(\text{Cu}^{2+})$ can inhibit the growth of *V. natans*, so that, it is not suitable to build any Cu²⁺-contaminated wastewater purification system with *V. natans* as submerged vegetation when Cu²⁺ concentration in the wastewater is higher than 2 mg · L⁻¹.

Key words: Cu²⁺; *Vallisneria natans*; growth characteristics; physiological indicator

苦草 (*Vallisneria natans*) 为多年生的无茎、丛生草本植物, 是最常见的沉水植物之一^[1], 广泛分布于各类水生生态系统中, 具有耐受性强、光补偿点低和繁殖能力强等优点, 常被用作富营养化湖泊中沉水植物恢复重建的先锋物种^[2]。苦草是浅水湖泊生态系统结构中沉水植被的重要组成部分, 对湖泊生态系统有重要影响, 是修复富营养化湖泊的有效途径之一^[3-4], 它不仅吸收富营养化水体中的磷, 亦可抑制沉积物和上覆水中碱性磷酸酶活性 (APA), 还可抑制沉积物的再悬浮, 使上覆水中各形态磷浓度均保持在较低水平, 对于控制内源磷释放有抑制作用^[4]。然而, 苦草对水体的环境效应是建立在其能够正常生长的前提下的, 在一些污染水体, 特别是受 Cu²⁺ 污染的水体中, 苦草群落的重建

会受到影响。因此, 有必要研究苦草对 Cu²⁺ 环境的适生性。

在天然生态系统中, Cu 以不同价态在自然界中循环, 一般不会不会对苦草的恢复重建产生影响。但随着近代工业的飞速发展, 越来越多的工业废水排放到河流、湖泊中, 引起了水体的重金属污染。Cu 是生物体发挥正常生理功能所必需的微量元素, 但过量的 Cu 离子对有机体具有毒性。过量的 Cu 对机体的损害可能有: 引起生物大分子的氧化, 导致蛋白质或 DNA 的损伤, 催化活性氧簇 (reactive oxygen

收稿日期: 2012 - 10 - 31

基金项目: 上海市科委重大项目 (08DZ1203103); 上海市重点学科水生生物学建设基金 (s30701)

① 通信作者 E-mail: lqwang@shou.edu.cn

species, ROS)的形成,结合于蛋白质上引起蛋白聚集等^[5],从而影响沉水植物——苦草等的正常生长和繁殖。笔者研究了实验室条件下不同浓度 Cu^{2+} 胁迫对苦草的生长特性以及叶片 H_2O_2 含量、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)含量的变化,以期获取苦草对工业废水中 Cu^{2+} 的耐受阈值,为受 Cu^{2+} 污染的水体中苦草等沉水植物的恢复重建提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以苦草为试验材料,供试苦草采自上海海洋大学校园水系。培养容器为圆柱形的培养瓶($r = 14 \text{ cm}$, $h = 40 \text{ cm}$)。采用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 配制不同的 Cu^{2+} 浓度梯度。

1.2 试验设计

试验在上海海洋大学水域生态修复实验室进行。试验前从苦草根部分向上截留 5 cm 后置于圆柱形培养瓶中进行培养,每瓶栽培 20 株,暂养 20 d,以使苦草适应试验环境。苦草暂养 20 d 后选取长势一致的 15 瓶作为供试材料。试验设计 5 个 Cu^{2+} 浓度梯度,分别为 0、1、2、4 和 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 的 1/40 Hoagland 营养液,自然光照,昼夜温度分别为 (25 ± 5) $^\circ\text{C}$ 和 (18 ± 5) $^\circ\text{C}$,每 3 d 更换 1 次含有 Cu^{2+} 的 1/40 Hoagland 营养液,每个浓度设 3 个重复。

试验初始测定苦草株高和鲜质量等指标,试验开始后每隔 10 d 分别从各浓度处理组中取 10 株沉水植物测定株高、鲜质量以及苦草叶片中 H_2O_2 含量、CAT 活性及 MDA 含量。试验持续 40 d。

1.3 指标的测定方法

H_2O_2 含量测定采用分光光度法^{[6]166};CAT 活性测定采用高锰酸钾滴定法^{[6]167},CAT 活性用 1 g 鲜质量样品在 1 min 内分解 H_2O_2 的质量表示,单位为 $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$;MDA 含量测定采用 TBA 比色法^[7]。

1.4 数据处理

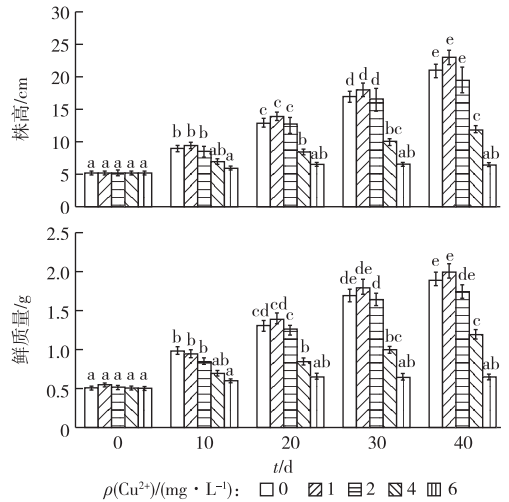
采用 Excel 2003 软件进行数据分析和作图,采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析和多重比较(Duncan 检验, $\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同 Cu^{2+} 浓度对苦草株高和鲜质量的影响

不同 Cu^{2+} 浓度对苦草株高和鲜质量产生明显影响。如图 1 所示,试验 10、20、30 和 40 d 时对照

组株高略低于 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组($P > 0.05$),而 2 ~ 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组随着 Cu^{2+} 浓度的增加,株高和鲜质量依次下降。试验 20 d 时,4 和 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组苦草株高和鲜质量显著低于 0、1 和 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组($P < 0.05$)。试验结束时,0、1、2 和 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组株高和鲜质量与试验初始相比均有显著增加($P < 0.05$),6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组苦草株高和鲜质量则无显著变化($P > 0.05$),且试验 20 d 时植株外侧叶片开始腐烂,试验结束时几乎整个植株发生腐烂。



同一幅图中直方柱上方英文小写字母不同表示同一时间不同 Cu^{2+} 浓度处理间或同一 Cu^{2+} 浓度处理不同时间之间某指标差异显著($P < 0.05$)。

图 1 Cu^{2+} 胁迫对苦草株高和鲜质量的影响

Fig. 1 Effects of Cu^{2+} stress on plant height and fresh weight of *Vallisneria natans*

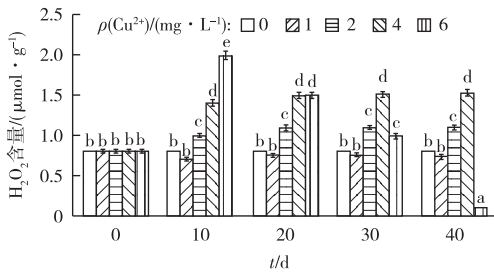
2.2 不同 Cu^{2+} 浓度对苦草叶片 H_2O_2 含量的影响

由图 2 可知,对照组与 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 H_2O_2 含量在整个试验期间未显著增加($P > 0.05$)。1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 H_2O_2 含量比对照组略低,但两者之间始终无显著差异($P > 0.05$)。试验 10 d 时,2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 H_2O_2 含量较试验初始显著增加($P < 0.05$),随着试验时间的延长, H_2O_2 含量略有增加,但差异不显著($P > 0.05$)。4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 H_2O_2 含量呈现先增加后平稳变化的趋势,试验 20 d 后稳定维持在约 1.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 水平。6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组在试验 10 d 时 H_2O_2 含量达到最大,为 2.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$,之后迅速递减,试验结束时 H_2O_2 含量趋于 0,且不同测定时间之间差异显著($P < 0.05$)。

2.3 不同 Cu^{2+} 浓度对苦草叶片 CAT 活性的影响

如图 3 所示,对照组与 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 CAT 含量在整个试验期间未发生显著变化($P > 0.05$)。1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 CAT 活性比对照组略低,但两者

之间始终无显著差异($P > 0.05$)。2 mg · L⁻¹浓度组 CAT 活性一直呈增加趋势,试验 0 和 20 d 之间,以及试验 20 和 40 d 之间 CAT 活性差异显著($P < 0.05$)。4 mg · L⁻¹浓度组 CAT 活性呈现先增加后平稳变化的趋势,试验 20 d 后保持稳定。6 mg · L⁻¹浓度组在试验 10 d 时 CAT 活性达到最大,为 105 mg · min⁻¹ · g⁻¹,之后迅速递减,试验结束时 CAT 活性仅为 5 mg · min⁻¹ · g⁻¹。可见,苦草叶片 CAT 活性与 H₂O₂ 含量的变化趋势较一致,这也与两者之间的生物学特性以及两者之间的相互关系是密不可分的。



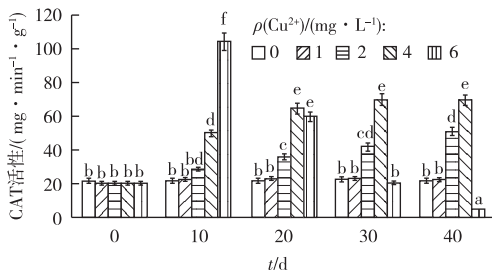
叶片以鲜质量计。

直方柱上方英文小写字母不同表示同一时间不同 Cu²⁺ 浓度处理间或同一 Cu²⁺ 浓度处理不同时间之间 H₂O₂ 含量差异显著($P < 0.05$)。

图2 不同 Cu²⁺ 浓度对苦草叶片 H₂O₂ 含量的影响

Fig.2 Hydrogen peroxide content in leaf tissues of

Vallisneria natans as affected by Cu²⁺ concentration in water



叶片以鲜质量计。

直方柱上方英文小写字母不同表示同一时间不同 Cu²⁺ 浓度处理间或同一 Cu²⁺ 浓度处理不同时间之间 CAT 活性差异显著($P < 0.05$)。

图3 不同 Cu²⁺ 浓度对苦草叶片 CAT 活性的影响

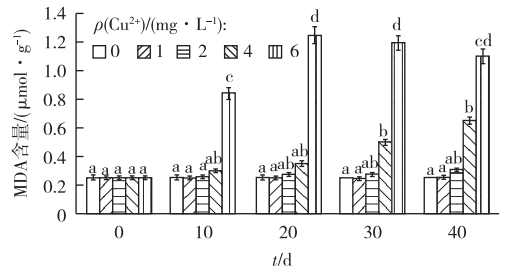
Fig.3 CAT activity in leaf tissues of *Vallisneria natans*

as affected by Cu²⁺ concentration in water

2.4 不同 Cu²⁺ 浓度对苦草叶片 MDA 含量的影响

苦草叶片 MDA 含量的变化滞后于 H₂O₂ 含量和 CAT 活性的变化。由图 4 可知,与对照组相比,1 mg · L⁻¹试验组苦草叶片 MDA 含量未显著增加($P > 0.05$)。2 mg · L⁻¹浓度组 MDA 含量呈现增加趋势,但与初始值之间无显著差异($P > 0.05$)。4 mg · L⁻¹浓度组 MDA 含量在试验 20 d 内无显著变

化($P > 0.05$),20 d 后则显著增加($P < 0.05$)。6 mg · L⁻¹浓度组在试验 20 d 内 MDA 含量显著增加($P < 0.05$),20 d 后呈下降趋势,但与试验 20 d 时相比差异不显著($P > 0.05$),仍维持在较高水平。



叶片以鲜质量计。

直方柱上方英文小写字母不同表示同一时间不同 Cu²⁺ 浓度处理间或同一 Cu²⁺ 浓度处理不同时间之间 MDA 含量差异显著($P < 0.05$)。

图4 不同 Cu²⁺ 浓度对苦草叶片 MDA 含量的影响

Fig.4 MDA content in leaf tissues of *Vallisneria natans*

as affected by Cu²⁺ concentration in water

3 讨论

在植物细胞的正常代谢过程中,细胞内氧自由基的产生和清除处于动态平衡状态,因此不会对细胞产生伤害^[8]。H₂O₂ 是最主要的活性氧产物。CAT 是一种广泛存在于动植物组织中的氧化还原酶,可将 H₂O₂ 分解成 H₂O 和 O₂,以清除体内的 H₂O₂,避免其在体内积累,从而使细胞免于遭受 H₂O₂ 的毒害^[9]。许多胁迫反应可使细胞内 CAT 活性发生改变,这也是 H₂O₂ 在体内变化的一种标志性反应^[10],因此测定 CAT 活性的变化有助于植物体抗逆境生理的研究。MDA 是膜脂氧化的最终分解产物,其含量可以反映植物遭受盐胁迫伤害的程度,是膜系统受伤害的重要标志之一^[11],即 MDA 是在 CAT 失活的情况下 H₂O₂ 所致膜脂氧化的产物,3 者之间具有直接联系。有研究表明,H₂O₂ 能够诱导气孔关闭^[12],在 H₂O₂ 积累过量的情况下植物气孔会被迫关闭,导致植株无法吸收进行光合作用所必需的 CO₂,从而出现植株生长受抑制现象。笔者试验中,2、4 和 6 mg · L⁻¹浓度组苦草叶片 H₂O₂ 含量在大部分情况下明显高于对照组,相应地,苦草株高和鲜质量也都出现受抑制现象。

CAT 是一种模式蛋白,过量的 Cu²⁺ 对 CAT 具有抑制作用^[13],CAT 作为 H₂O₂ 的重要清除剂,在维持 H₂O₂ 的动态平衡中起到重要作用,高浓度 Cu²⁺ 可抑制 CAT 活性,导致 H₂O₂ 等超氧化物的大量积累,继而导致膜脂氧化,最终产生 MDA。笔者

试验中,4 和 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cu}^{2+}$ 胁迫下 H_2O_2 含量增加,诱导 CAT 活性加强,以减少 H_2O_2 积累量,使苦草组织免受毒害,随着 Cu^{2+} 浓度和试验时间的增加,且当 Cu^{2+} 浓度超出苦草的耐受值时,CAT 活性下降,MDA 含量增加,植株表现为受损伤现象。这也验证了沉水植物与很多陆生植物在超氧胁迫下的抗逆生理过程基本一致。

Cu 是有机体必需的一种金属元素,少量的 Cu 对生物体有积极作用。作为 SOD 的重要辅基,Cu 对清除氧自由基以保护细胞有重要作用^[14],可见,低浓度 Cu^{2+} 有助于植物的生长。笔者试验中,1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组苦草生长优于对照组,主要表现为株高和鲜质量大于对照组,与对照组相比, H_2O_2 和 MDA 积累量较少,CAT 活性较高。

Cu^{2+} 对苦草的作用表现为低浓度 Cu^{2+} 对苦草叶片 CAT 具有激活作用^[15],因此 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 CAT 活性高于对照组,相应地,所积累的 H_2O_2 和 MDA 含量较低。随着 Cu^{2+} 浓度的增加, Cu^{2+} 对植株具有胁迫作用,产生对机体造成伤害的超氧阴离子 (O_2^-) 和羟自由基等,SOD 能催化 O_2^- 转化为 H_2O_2 和 O_2 ,而 CAT 能将有毒的 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ^[16],使苦草呈现一定的抗逆性,因此,CAT 在清除自由基和 H_2O_2 方面起着重要作用^[17]。笔者试验中,2 和 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组试验 20 d 内 CAT 活性明显增强,而 H_2O_2 和 MDA 含量基本未增加,这是因为 CAT 将在逆境条件下产生的 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,未发生膜脂氧化反应,相应地就没有 MDA 的产生。4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组试验 20 d 时以及 6 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 Cu^{2+} 的累积胁迫作用超出了 CAT 的分解能力,破坏了植物体内 H_2O_2 的动态平衡, H_2O_2 的累积导致气孔关闭,植物固碳途径被阻断,植株无法得到足够的能量和有机物,进而出现生长抑制甚至枯萎死亡现象。可见,植物体内 MDA 和 H_2O_2 含量对逆境的响应要滞后于 CAT 活性的变化。笔者试验中,2 和 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 CAT 活性在试验 10 d 时显著增加,而在试验 20 d 时 H_2O_2 和 MDA 含量明显增加,该现象印证了上述结论。因此,采用 CAT 作为苦草抗逆研究的生理指标,要比以 MDA 和 H_2O_2 含量作为监测指标更具时效性,且更直观。

4 结论

(1) Cu^{2+} 对苦草的胁迫作用明显,当 $\rho(\text{Cu}^{2+})$ 为 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,苦草出现生长抑制,株高变小,鲜质量减小,但仍能生存。当 $\rho(\text{Cu}^{2+})$ 为 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

时,出现明显抑制现象,在持续胁迫 30 d 后苦草外侧叶片出现腐烂变黑。因此,当 $\rho(\text{Cu}^{2+}) > 2 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不宜采用建植苦草沉水植物系统的方式进行水体净化处理。

(2) 植物体内有较多的产物与植株的抗逆性有关,笔者试验中,CAT 活性对逆境的响应早于 MDA 和 H_2O_2 含量。因此,相对于一般植物胁迫研究中测定 MDA 含量变化来说,选用 CAT 活性指标来衡量苦草的胁迫程度更具时效性。

参考文献:

- [1] 黄玉源,雷泽湘,何柳静,等.不同磷浓度对水生植物苦草的影响研究[J]. 境科学与技术,2011,4(2):2-16.
- [2] 宋睿,锦林,耿金菊,等.不同浓度铵态氮对苦草的生理影响[J]. 中国环境科学,2011,31(3):448-453.
- [3] 秦伯强,高光,胡维平,等.浅水湖泊生态系统恢复的理论与实践思考[J]. 湖泊科学,2005,7(1):9-16.
- [4] 雷泽湘,陈光荣,谢贻发,等.太湖大型水生植物的管理探讨[J]. 环境科学与技术,2009,32(6):189-194.
- [5] MILLHAUSER G L. Copper Binding in the Prion Protein[J]. Accounts of Chemical Research,2004,37(2):79-85.
- [6] 邹琦. 组织中过氧化氢含量及过氧化氢酶活性的测定[M]//植物生理学实验指导. 北京:中国农业出版社,2000.
- [7] 李合生,孙群,赵氏杰. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:260-261.
- [8] 廖祥儒,朱新产. 活性氧代谢和植物抗盐性[J]. 生命的化学,1996,16(6):19-22.
- [9] 杨冬业,张丽珍,徐淑庆. 西瓜不同生长阶段的过氧化氢酶活性研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(18):9604-9606.
- [10] 陈金峰,王官南,程素满. 过氧化氢酶在植物胁迫响应中的功能研究进展[J]. 西北植物学报,2008,28(1):188-193.
- [11] BRIGHT J, DESIKAN R, HANCOCK J T, et al. ABA-Induced NO Generation and Stomatal Closure in Arabidopsis Are Dependent on H_2O_2 Synthesis[J]. The Plant Journal,2006,45(1):113-122.
- [12] 孙国荣,关旻,阎秀峰. 盐胁迫对星星草幼苗保护酶系统的影响[J]. 草地学报,2001,9(1):34-38.
- [13] 刘陶陶,王希成. 铜离子对海参精氨酸激酶活力与结构的影响[J]. 海洋科学,2011,35(1):17-21.
- [14] 杜君,李海兰,李慧,等. 铜离子胁迫对葡萄酒酵母的影响[J]. 中国农业科学,2010,43(15):3259-3265.
- [15] 何士敏,方平,何莉. 沙棘叶片内过氧化氢酶的研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(9):4880-4882.
- [16] 冯优,滕莉,王凤山. 超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 食品与药品,2006,8(2):5-8.
- [17] 沈仁权,顾其敏. 基础生物化学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1980:175.

作者简介:陈萍萍(1987—),女,山东青岛人,硕士生,主要从事水环境与生态修复方面的研究。E-mail: chpp-1212@163.com