

小白菜叶内叶绿素和抗氧化系统对芘胁迫的动态响应

蔡顺香^{1,2}, 何 盈^{1,2}, 兰忠明^{1,2}, 邱孝煊^{1,2}

(1.福建省农业科学院土壤肥料研究所, 福建 福州 350013; 2.福建省农业科学院农业资源与环境研究中心, 福建 福州 350013)

摘 要:通过盆栽试验,研究了土壤中芘胁迫对小白菜叶内叶绿素及抗氧化系统动态变化的影响。结果表明,芘胁迫对小白菜叶片叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a+b 和类胡萝卜素的动态影响基本一致,都是在第 18 d 苗期时随着芘浓度的增加显著降低,25 d 开始各处理的含量差异不显著。小白菜叶片的 CMP、MDA 和 AsA 均随种植时间的延长呈现先升高再降低的过程,39 d 时 CMP 达到最高值,施芘处理显著高于对照;MDA 在 32 d 时上升至最高值,且随着芘浓度的增加而增大,39 d 以后急剧下降并维持在较低水平,各个处理间差异不显著;46 d 时 AsA 含量达到峰值,高浓度芘处理极显著高于对照。游离脯氨酸在 25 d 时随芘浓度的增加而急剧增加,32 d 以后逐渐下降,各处理间差异不显著。小白菜叶片的 CAT 活性在种植期间呈下降趋势,39 d 时随芘浓度的增加有所提高;与 CAT 活性的变化趋势相反,POD 活性随种植时间的延长呈上升趋势,39 d 和 46 d 时高浓度处理的 POD 活性显著高于对照。

关键词:芘;多环芳烃;小白菜;叶绿素;抗氧化系统;胁迫

中图分类号:Q945.78 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2009)03-0460-06

Dynamics Response of Pyrene Stress on Chlorophyll and Antioxidative System in Leaves of Chinese cabbage

CAI Shun-xiang^{1,2}, HE Ying^{1,2}, LAN Zhong-ming^{1,2}, QIU Xiao-xuan^{1,2}

(1.Institute of Soil and Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2.Research Centre of Agricultural Resource and Environment, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: The effects of pyrene stress on the dynamics change of chlorophyll and antioxidative system in leaves of Chinese cabbage were studied through experiment of flowerpot cultivation in soil. The results showed as follow: the dynamics influence of chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b and carotenoid pigment contents presented similar trend. They all reduced by increasing pyrene concentrations at 18 days and became no significant differences among them from 25 days to 46 days. The contents of CMP, MDA and AsA in leaves of Chinese cabbage all raised at first and then decreased with time. The maximum content of CMP was observed at 39 days and increased significantly in pyrene treated soil than in control soil; The MDA contents reached the top value at 32 days and increased with pyrene treatments, then reduced sharply at lower levels after 39 days without significant differences in treatments; The AsA contents were observed the highest values at 46 days and high pyrene concentration treatment increased extremely than control treatment. The contents of Pro increased sharply with increasing pyrene concentration at 25 days, then reduced gradually and changed indistinctively in treatments after 32 days. The activities of CAT reduced with planting time and increased with pyrene treatments at 39 days. On the contrary, the POD activities were stimulated with growing time and the results of high level treatments increased significantly with CK at 39 days and 46 days.

Keywords: pyrene; polycyclic aromatic hydrocarbons; Chinese cabbage; chlorophyll; antioxidative system; stress

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是环境中普遍存在的一类有机污染物,对人和动物有致癌、致畸、致突变的作用,美国环保局(USEPA)将其列为优先控制的有机污染物,我国也已将其列入有机污染物的黑名单中^[1]。随着“三废”的排放,PAHs 在环

境中不断累积,环境中有 90 %以上的 PAHs 最终随着大气沉降、污水灌溉和污泥等废弃物的使用而进入土壤中,芘带有 4 个苯环,在环境中常被检测出,通常作为监测 PAHs 污染的指示化合物^[2]。在我国许多城郊地区土壤中均报道存在较为严重的 PAHs 污染^[3-5]。残留在土壤中的 PAHs 不仅影响土壤的正常功能,影响作物生长,而且还可以通过生物富集进入食物链,危及人体健康。

近年来,PAHs 对植物毒害的研究主要集中在对

收稿日期:2008-05-21

基金项目:福建省自然科学基金(U0750002)

作者简介:蔡顺香(1971—),女,高级实验师,主要从事植物逆境生理及农产品质量安全研究。E-mail:cai-sx@163.com

植物种子萌发、幼苗生长及生理生化和植物吸收的影响等方面^[6-13]。但是已有研究都仅限在植物遭受胁迫早期的生理指标与污染物浓度关系方面,而对植物的整个生长过程生理生化指标随污染物浓度的动态变化尚未见报道。本试验以大众化叶菜小白菜为材料,研究土壤中不同浓度苊对小白菜叶片叶绿素和抗氧化系统动态变化的影响,进一步探讨有机污染物苊对叶菜类蔬菜毒害的机制,以期为蔬菜的安全生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试小白菜(*Brassica Campestris* L. ssp. *Chinensis* L3.)为一代交配的华京冠菜,种子购自福州科翔种业有限公司;有机污染物苊购自鞍山市天长化工有限公司,纯度大于98%;试验用土壤为菜园土,基本理化性质:pH 6.75,有机质 22.8 g·kg⁻¹,全氮 1.50 g·kg⁻¹,全磷 1.65 g·kg⁻¹,全钾 27.5 g·kg⁻¹,碱解氮 162.4 mg·kg⁻¹,有效磷 109.7 mg·kg⁻¹,速效钾 33.7 mg·kg⁻¹,小于 0.002 mm 粒径 26.6%,大于 0.02 mm 粒径 52.8%。

1.2 试验设计

盆栽试验在福建省农科院土肥所网室内进行。设5个处理,土壤施苊量分别为0、50、100、200、400 mg·kg⁻¹,苊以无水乙醚溶解后添加于土壤中,待乙醚挥发干净,将土壤搅拌均匀,每个处理设3次重复。盆钵直径19.2 cm、高14.8 cm,每盆装风干土壤3 kg,随机排列。每千克土施N 0.30 g、P₂O₅ 0.10 g、K₂O 0.24 g,氮肥为尿素,磷肥为磷酸二氢钾,钾肥为磷酸二氢钾和硫酸钾。肥料全部作基肥,于装盆时与土壤混匀。

1.3 取样

2007年10月25日播种,14 d后视出苗疏密酌情间苗。自11月12日开始每隔7 d取各盆生长一致的小白菜新长出的1~2片顶叶,测定如下生理指标:叶绿素a(Chl a)、叶绿素b(Chl b)、类胡萝卜素(Car)、细胞质膜透性(CMP)、丙二醛(MDA)、游离脯氨酸(Pro)和抗坏血酸(AsA)含量,以及过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)的活性。其中叶绿素和类胡萝卜素的测定于11月12日(播种后18 d)第1次取样,12月10日(播种后46 d)第5次取样,其他生理指标于11月19日(播种后25 d)第1次取样,12月17日(播种后53 d)第5次取样。

1.4 测定方法

Chl 和 Car 采用80%丙酮溶液浸提,多波长分光光度法测定;MDA 采用硫代巴比妥酸法;CMP 采用电

导率法;Pro 采用茚三酮比色法;AsA 采用2,2-二联吡啶比色法;POD 活性采用愈创木酚法,以每分钟470 nm处OD值增加0.01定义为1个活力单位,以U·mg⁻¹(FW)表示;CAT 活性采用紫外分光光度法,将每分钟240 nm处OD值减少0.01为1个活力单位,用U·mg⁻¹(FW)表示^[15]。各项指标测定3次重复,取平均值。

1.5 数据处理与统计分析

原始数据的计算与处理采用EXCEL软件,统计分析采用DPS软件进行方差分析和显著性检验, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 苊胁迫对小白菜叶内 Chl 和 Car 含量动态变化的影响

苊胁迫下小白菜叶片 Chl a、Chl b、Chl a+b 及 Car 含量的变化呈现相同的规律(图1~图4)。种后18 d,苊对小白菜叶片各色素的影响最显著:低浓度(50 mg·kg⁻¹)下的含量与对照相比差异不显著,随着土壤苊浓度的增加,各色素的含量显著下降,200 mg·kg⁻¹和400 mg·kg⁻¹苊处理下小白菜叶片各色素含量与对照差异达极显著水平。试验观察可见,从出苗至种后18 d(苗期),随着苊浓度的增加,植株子叶边缘卷起,叶片变小,苗高显著下降,而新长出的真叶出现明显失绿症状,400 mg·kg⁻¹苊处理还出现死苗现象。种植25 d后,小白菜进入莲座期,试验观察到胁迫症状消失,各处理的 Chl a、Chl b、Chl a+b 和 Car 含量与对照之间差异不显著。说明在小白菜整个生长过程中,18 d以前的幼苗叶片 Chl 和 Car 含量对苊胁迫的反应很敏感,莲座期后,随着根系的生长,根际微生物数量增加,土壤中苊的毒

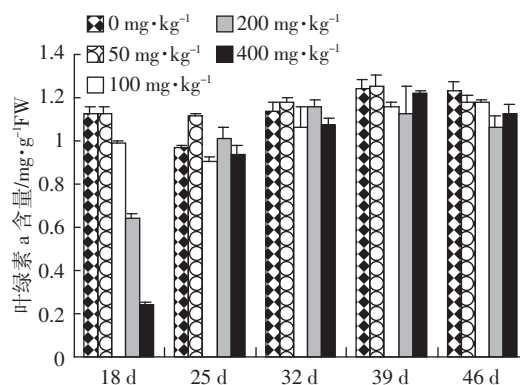


图1 小白菜叶片叶绿素a含量动态变化图
Figure 1 Dynamics change of chlorophylla
in leaves of Chinese cabbage

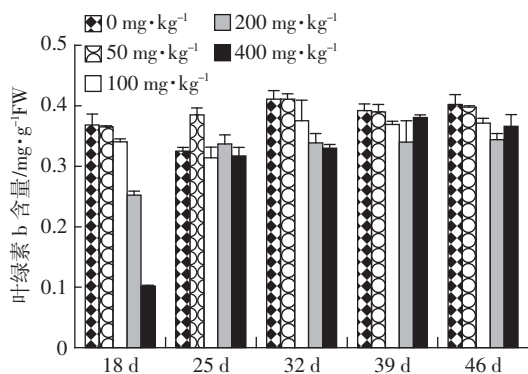


图 2 小白菜叶片叶绿素 b 含量动态变化图

Figure 2 Dynamics change of chlorophyll b in leaves of Chinese cabbage

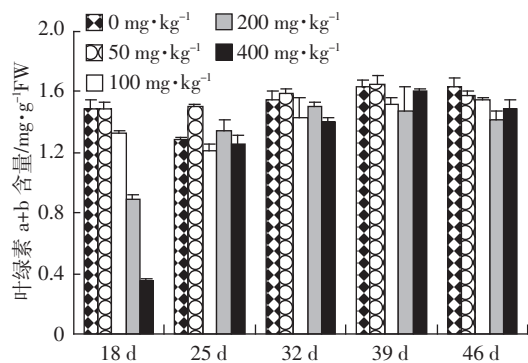


图 3 小白菜叶片叶绿素 a+b 值动态变化图

Figure 3 Dynamics change of chlorophyll a+b in leaves of Chinese cabbage

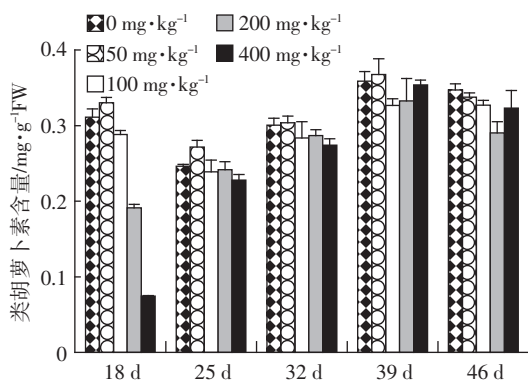


图 4 小白菜叶片类胡萝卜素含量动态变化图

Figure 4 Dynamics change of carotenoid pigment in leaves of Chinese cabbage

性反而下降,小白菜不再表现出受砒胁迫或毒害的迹象。

2.2 砒胁迫对小白菜叶片 CMP 和 MDA 动态变化的影响

图 5 显示,种后 25 d 至 46 d,小白菜叶片 CMP 随砒浓度增加而升高,高浓度砒胁迫下的 CMP 与对

照差异达显著水平,53 d 时各个处理的 CMP 数值下降且与对照差异不显著。可见经过 53 d 的胁迫,小白菜叶片产生了抵抗砒胁迫的抗氧化系统,叶片的 ROS 自由基得以清除,先前损伤的细胞膜得以恢复。图 5 还可看出,小白菜叶片 CMP 随种植时间的延长呈现升高再下降的过程,39 d 时各个处理的 CMP 值达到峰值。

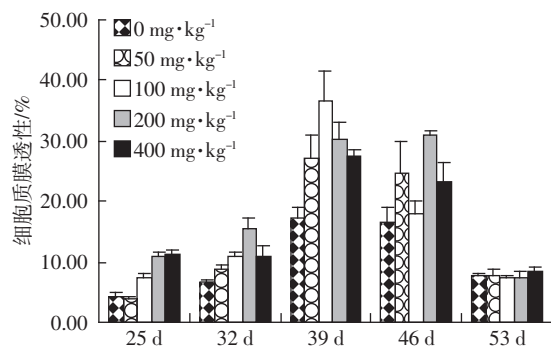


图 5 小白菜叶片细胞质膜透性动态变化图

Figure 5 Dynamics change of CMP in leaves of Chinese cabbage

MDA 是细胞质膜脂过氧化的产物,种植 25 d, 200 mg·kg⁻¹ 和 400 mg·kg⁻¹ 砒处理的 MDA 极显著高于对照,32 d 时增幅达到最大。39 d 以后所有处理的 MDA 含量急剧下降,各处理与对照之间差异不显著(图 6)。另外可以看出,小白菜生长过程中,50 mg·kg⁻¹、100 mg·kg⁻¹ 砒处理的叶片 MDA 含量与对照均无显著差异。说明 100 mg·kg⁻¹ 砒胁迫是小白菜叶片累积 MDA 的一个阈值,砒浓度超过 100 mg·kg⁻¹,小白菜叶片开始遭受活性氧的伤害,结果叶片细胞累积 MDA。

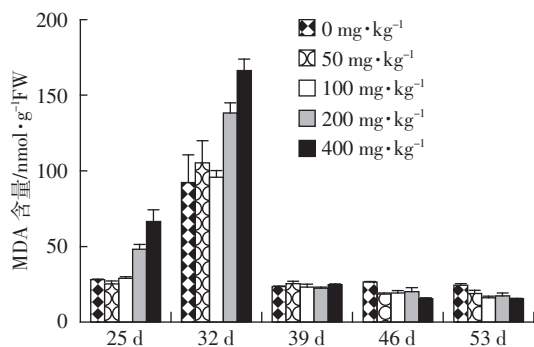


图 6 小白菜叶片 MDA 含量动态变化图

Figure 6 Dynamics change of MDA in leaves of Chinese cabbage

2.3 砒胁迫对小白菜叶片 Pro 和 AsA 含量动态变化的影响

由图 7 可以看出,种后 25 d,小白菜叶片内 Pro

含量随土壤中苊浓度的增加而上升。各浓度苊处理与对照呈极显著性差异,400 mg·kg⁻¹ 苊处理的 Pro 含量达到最高,为对照的 13.25 倍。32 d 时,对照及低浓度苊处理的 Pro 含量上升,400 mg·kg⁻¹ 苊处理的 Pro 含量下降,与对照相比增幅明显下降。各浓度苊处理的 Pro 含量随时间延长逐渐下降,53 d 时各浓度苊处理与对照间的差异不显著。相反,小白菜叶片 AsA 含量随着种植时间的延长表现为先上升再下降的过程,种后 46 d,各个处理的 AsA 含量达到最高值,53 d 开始下降,各浓度苊处理与对照的差异不显著(图 8)。AsA 含量对苊胁迫的响应出现在种后 39 d 和 46 d,施苊处理的 AsA 含量有所提高,种后 46 d 增幅达到最大,100、200、400 mg·kg⁻¹ 苊处理的 AsA 均显著高于对照,分别比对照增加了 44.01%、42.75%、44.89%。

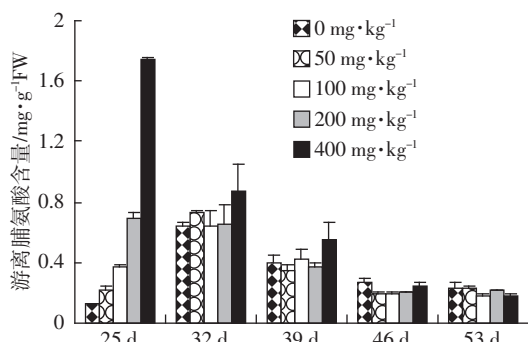


图 7 小白菜叶片游离脯氨酸含量动态变化图

Figure 7 Dynamics change of pro contents in leaves of Chinese cabbage

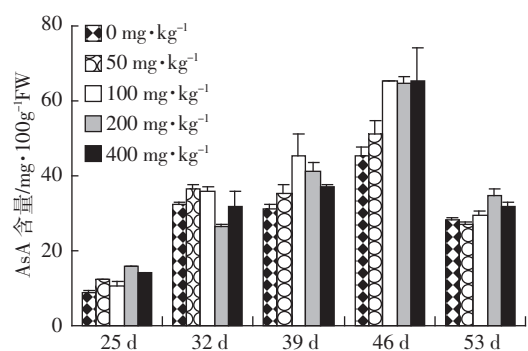


图 8 小白菜叶片抗坏血酸(AsA)含量动态变化图

Figure 8 Dynamics change of AsA contents in leaves of Chinese cabbage

2.4 苊胁迫对小白菜叶内 CAT 和 POD 活性动态变化的影响

图 9 显示,小白菜叶内 CAT 活性随种植时间延长而显著降低,对照及各浓度苊处理的差异不明显。与 CAT 活性的变化趋势相反,POD 活性随种植时间

的延长逐渐上升(图 10)。与 AsA 含量变化趋势相似,POD 活性对苊胁迫的响应也出现在种后 39 d 和 46 d,200、400 mg·kg⁻¹ 苊处理的 POD 活性与对照之间的差异极显著,种后 53 d POD 活性随苊浓度增加而下降,各浓度苊处理与对照的差异不显著。

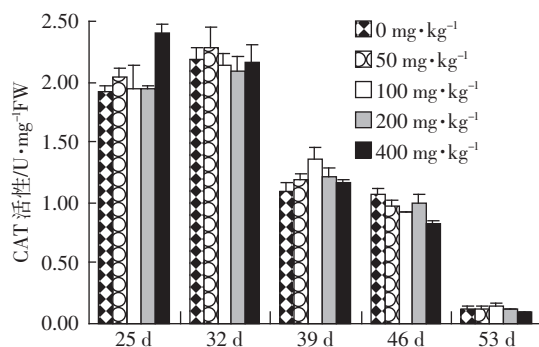


图 9 小白菜叶片 CAT 活性动态变化图

Figure 9 Dynamics change of CAT activity in leaves of Chinese cabbage

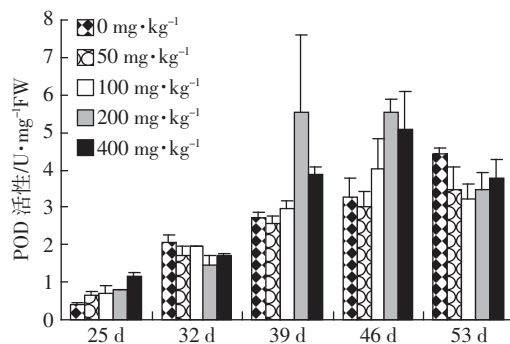


图 10 小白菜叶片 POD 活性动态变化图

Figure 10 Dynamics change of POD activity in leaves of Chinese cabbage

3 讨论

叶绿素是植物吸收太阳能、进行光合作用的重要物质,其含量的高低在一定程度上反映了植株利用光能及制造有机物的能力。逆境会使叶绿体受伤,叶绿素含量下降,与光合作用相关的酶失活或变性,从而使光合速率下降,同化物形成减少^[14]。已有研究表明,辣椒在遭受苊胁迫 10 d 后生长明显受抑制,叶绿素含量显著下降^[12];苦草经不同浓度的苊胁迫 10 d 后,其叶绿素 a 和叶绿素 b 前期很快下降,后又趋于平缓^[10]。本研究结果也表明,苊胁迫 18 d 时小白菜叶片的叶绿素含量随苊浓度的增加显著降低,叶片失绿症状明显,400 mg·kg⁻¹ 苊处理出现部分死苗。Lee 等^[6]认为植物在苗期时对低分子量的烃化合物很敏感,容易溶解

于植物的疏水组织中而进入细胞膜,从而对植物产生毒性,引起生物量的减少及其他毒害症状。Reilley等^[7]则提出 PAHs 的间接影响作用,认为可能是 PAHs 阻碍了植物根系从污染土壤中吸收养分和水分的能力,导致地上部叶片色素含量下降,光合作用受影响。种植 25 d 以后砒对小白菜叶片各色素的影响不显著。则可能是随着小白菜的生长发育,根系对土壤砒毒害的修复能力增强的缘故,同时土壤中砒被根际微生物部分降解,砒对小白菜的毒害作用降低,也可能是生长的小白菜根系足够发达从而能够从土壤中吸取足够的养分和水分,使小白菜叶内 Chl 和 Car 的合成不再受阻的缘故。有机污染物对其他作物的影响也呈现出类似的结果。卞晓东^[13]研究发现 1,2,4-三氯苯和萘能显著降低茼蒿叶片的 SPAD 值,叶片的净光合速率、气孔导度、胞间 CO₂ 浓度等光合指标下降,但生长后期各处理间的上述指标差异变小。另外,Pro 是水溶性最强的氨基酸,系植物体内的渗透调节物质,反映了植物受逆境胁迫的程度以及忍受及抵抗逆境的能力。试验结果表明,种植 25 d 时 Pro 含量对砒胁迫的响应最强,随砒浓度的增加急剧增长,可能正是 Pro 的增加,缓解了砒胁迫对小白菜叶片细胞造成的伤害,使叶绿素的合成得以恢复的缘故。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是指具有较高化学反应活性的氧的几种代谢产物,如超氧阴离子自由基(O₂⁻·),羟自由基(·OH),过氧化氢(H₂O₂)等。当植物处于逆境条件时,会导致活性氧在体内的过量积累。这些活性氧极为活泼,可攻击各种生物大分子,引起细胞膜结构和功能的改变,对植物产生毒害。然而,植物体内也有防御系统,能够降低或消除活性氧对膜脂的攻击能力。抗氧化酶 POD、CAT 等和抗氧化剂 AsA 等能清除代谢过程产生的 ROS。在植物正常生长时,ROS 的产生与清除维持在平衡状态。当植物遭受胁迫时,体内的 ROS 呈累积状态,从而影响植物正常的生长^[14]。本试验中砒胁迫导致小白菜幼苗叶片的膜脂过氧化,使膜脂组分发生改变,进而使幼苗叶片的 CMP 增大、MDA 累积量升高,这同杨志峰等^[12]在辣椒上的研究结果相类似。砒对小白菜叶片的 CMP 含量的影响在种植 39 d 时达到峰值,而 MDA 的累积在 32 d 时最高且各个处理之间的差异最显著,说明砒胁迫导致的 ROS 对小白菜叶片细胞 CMP 含量的影响更缓慢且持久,细胞膜在遭受破坏后的恢复所需的时间也更长些。CAT 和 POD 位于细胞质,是酶防御体系的两种重要酶,它们都具有清除 H₂O₂ 的能力,而

AsA 能够清除植物体内产生的 ROS。本试验中,CAT 酶活性在小白菜的整个生长期随着时间延长下降,种植后 39 d 随砒浓度的增加而稍有上升。POD 酶活性在 32 d 以后仍呈增长趋势,第 39 d 和 46 d 随砒浓度增加急剧增加。AsA 在种植后 39 d 随砒浓度增加而增加,46 d 时增幅达到最大。由此可见,在砒胁迫下,小白菜叶片细胞内主要是抗氧化酶 POD 和抗氧化剂 AsA 产生了积极的响应,及时清除了细胞代谢产生的 ROS,使得种植后 32 d 小白菜叶片细胞不再累积 MDA,细胞质膜也慢慢修复了。

参考文献:

- [1] Wilson S C, Jones K C. Bioremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons: A review[J]. *Environmental pollution*, 1993, 81: 229-249.
- [2] 孙铁珩, 李培军, 周启星, 等. 土壤污染形成机理与修复技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
SUN Tie-hang, LI Pei-jun, ZHOU Qi-xing, et al. The form mechanism and restore technology of soil pollution[M]. Beijing: Science Publishing Company, 2005.
- [3] 陈来国, 冉勇, 麦碧娴, 等. 广州周边菜地中多环芳烃的污染现状[J]. 环境化学, 2004, 23(3): 341-344.
CHEN Lai-guo, RAN Yong, MAI Bi-xian, et al. Pollution situation of polynuclear aromatic hydrocarbons in vegetable soils around Guangzhou[J]. *Environmental Chemistry*, 2004, 23(3): 341-344.
- [4] 葛成军, 安琼, 董元华, 等. 南京某地农业土壤中有机污染分布状况研究[J]. 长江流域资源与环境, 2006, 15(3): 361-365.
GE Cheng-jun, AN Qiong, DONG Yuan-hua, et al. Distribution of organic pollutants in agricultural soil in Nanjing City[J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2006, 15(3): 361-365.
- [5] 许姗姗, 刘文新, 陶澍. 全国多环芳烃年排放量估算[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(3): 476-479.
XU Shan-shan, LIU Wen-xin, TAO Shu. Estimation of annual emission of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(3): 476-479.
- [6] Lee S H, Lee W S, Lee C H, et al. Degradation of phenanthrene and phrene in rhizosphere of grasses and legumes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 153: 892-898.
- [7] Reilley K A, Banks M K, Schwab A P. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere[J]. *Journal Environ Q*, 1998, 25: 212-219.
- [8] 何炜, 屠幼英, 林道辉, 等. 多环芳烃的吸收累积对茶叶化学成分的影响[J]. 茶叶, 2005, 31(4): 220-223.
HE Wei, TU You-ying, LIN Dao-hui, et al. Absorption and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tea plant and its effect on chemical components in tea leaves[J]. *Journal of Tea*, 2005, 31(4): 220-223.
- [9] 刘建武, 林逢凯, 王郁, 等. 多环芳烃(萘)污染对水生植物生理指标的影响[J]. 华东理工大学学报, 2002, 28(5): 520-524.

- LIU Jian-wu, LIN Feng-kai, WANG Yu, et al. Effects of PAHs(naphthalene) pollution on the physiological index of hydrophyte[J]. *Journal of East China University of Science and Technology*, 2002, 28(5):520-524.
- [10] 尹 颖, 孙媛媛, 郭红岩, 等. 茈对苦草的生物毒性效应[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(7):1528-1533.
- YIN Ying, SUN Yuan-yuan, GUO Hong-yan, et al. Bio-toxic effects of pyrene on *Vallisneria spiralis*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(7):1528-1533.
- [11] 王泽港, 葛才林, 万定珍, 等. 1, 2, 4-三氯苯和萘对水稻幼苗生长的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(6):1402-1407.
- WANG Ze-gang, GE Cai-lin, WAN Ding-zhen, et al. Effect of 1, 2, 4-trichlorobenzene and naphthalene stress on the growth of rice seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(6):1402-1407.
- [12] 杨志峰. 土壤茈污染对蔬菜的毒害特征[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2006.
- YANG Zhi-feng. Injury characteristics of pyrene pollution in soil on different vegetables[D]. Tai'an: Thesis for Master Degree of Shandong Agricultural University, 2006.
- [13] 卞晓东. 1, 2, 4-三氯苯和萘胁迫对茈白生长发育的影响[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2007.
- BIAN Xiao-dong. Effect of 1, 2, 4-trichlorobenzene and naphthalene stress on the growth of *Zizania latifolia*[D]. Yangzhou: Thesis for Master Degree of Yangzhou University, 2007.
- [14] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- PAN Rui-chi. Plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Publishing Company, 2004.
- [15] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. (第二版), 广州: 华南理工大学出版社, 2006.
- CHEN Jian-xun, Wang Xiao-feng. Instructor of plant physiological experiment (the second edition)[M]. Guangzhou: South China University of Science and Technology Publishing Company, 2006.