

doi: 10.7541/2021.2019.260

千屈菜无菌苗对重金属铜和铬的生理生化响应

张诗雯^{1,2} 刘畅子^{1,2} 母丹丹³ 吴志刚¹ 李涛¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049;

3. 水生藻安生物科技(武汉)有限公司, 武汉 430075)

摘要: 实验以千屈菜(*Lythrum salicaria* Linnaeus)无菌苗为材料, 用含不同浓度 Cu^{2+} (0、5、10、20和40 mg/L)和 Cr^{6+} (0、5、10、20和40 mg/L)的1/10霍格兰溶液对千屈菜进行培养, 测定叶绿素、丙二醛(MDA)、可溶性蛋白和可溶性糖等含量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等活性的变化, 以探讨 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 对千屈菜无菌苗生理生化特征指标的影响。研究表明: 随着 Cu^{2+} 浓度的增加, 千屈菜无菌苗渗透调节物质(可溶性糖和可溶性蛋白)表现为低促高抑现象, 膜脂化程度加剧, 但叶绿素含量基本未受影响, 且抗氧化酶活性(SOD、POD和CAT)持续上升。随着 Cr^{6+} 浓度的升高, 叶绿素含量也基本未受影响, 膜脂化程度在0—20 mg/L未受显著影响。CAT活性受到持续抑制, 但SOD和POD活性持续上升。综上, 千屈菜对重金属铜和铬具有一定的抗性, 其叶绿素含量基本未受影响, 抗氧化酶活性上升, 且具有一定的渗透调节能力。在 Cu^{2+} 浓度低于5 mg/L和 Cr^{6+} 浓度低于20 mg/L时千屈菜生理生化指标所受影响相对较小。实验结果为进一步研究千屈菜对铜、铬和其他重金属的响应, 及千屈菜在水体修复方面的生态应用提供一定的理论基础。

关键词: 千屈菜无菌苗; 重金属; 铜胁迫; 铬胁迫; 生理生化响应

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)05-1074-08



水体重金属污染是全球主要的环境问题之一^[1]。随着工业和农业的不断发展以及城市化进程的持续推进, 工农业废水、固体废弃物和生活废水等污染物的排放量日趋增加, 导致水体重金属污染越来越严重。水体重金属污染会影响水生植物和动物的生存, 还会通过直接或间接的作用危害人类生命健康。铜是植物生长必需的微量元素, 但水体中高浓度的铜离子(Cu^{2+})会严重影响水生生物的生存, 对植物具有高毒性^[2], 影响植物的光合作用、膜系统、酶系统等。因此铜也被认为是生态系统中毒性最大的重金属之一^[3]。铬是现代工业如电镀、橡胶、印染、油漆和机械制造等行业的重要金属元素。但其也是地壳中发现的毒性最大的重金属之一^[4]。当其随工业废渣排入环境中后, 会严重污染土壤和水体, 危害植物的各项生理活动^[4]。在水体中, 铬主要以三价铬离子(Cr^{3+})和六价铬离子(Cr^{6+})的形式存在。其中六价铬离子易溶于水, 其

毒性约为三价铬离子的100倍。

千屈菜(*Lythrum salicaria* Linnaeus)属于桃金娘目千屈菜科千屈菜属, 多年生草本, 分布于全国各地。千屈菜能够有效去除水体中的总氮和总磷^[5], 具有较强的重金属抗性, 对土壤中的金属镉^[6]、镍^[1]、铜、铬、锌、锰和砷等^[7, 8]具有良好的富集能力。在含有铜和铬等多种重金属的废水中, 千屈菜长势良好, 具有较强的重金属抗性^[9]。此外, 千屈菜为花卉植物, 外形优美, 花朵繁茂且花期长。因此, 千屈菜十分适用于修复污染水体, 尤其是重金属污染水体。但目前关于千屈菜的研究主要集中在其富集效果和净化效率方面, 对其生理响应机制的研究还十分缺乏。本研究以千屈菜无菌苗为实验材料, 可以尽量排除植株个体差异和水体其他生物(尤其是微生物)的影响。实验从光合色素、膜脂系统和抗氧化系统等方面研究千屈菜对铜(Cu^{2+})和铬(Cr^{6+})的耐性机理, 为其在重金属污染水体修复中的应用提

收稿日期: 2019-11-28; **修订日期:** 2020-11-17

基金项目: 淡水生态与生物技术国家重点实验室(2019FBZ01); 中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB31000000)资助 [Supported by the State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology (2019FBZ01); the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDB31000000)]

作者简介: 张诗雯(1994—), 女, 硕士研究生; 研究方向为植物生理学。E-mail: zshiwen@ihb.ac.cn

通信作者: 吴志刚(1987—), 男, 博士研究生; 研究方向为植物生态学。E-mail: wuzg@ihb.ac.cn

供理论依据,也为其他植物的抗重金属研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验以千屈菜无菌苗为植物材料。千屈菜无菌苗培养方法:选取生长健壮的千屈菜,用自来水冲洗干净后再于流水下冲洗0.5h。随后在紫外超净台中,将千屈菜先用无菌水反复冲洗3次,再用0.1%的氯化汞灭菌8—10min,最后用无菌水反复冲洗5次。将灭菌后的千屈菜切成5—10 mm长的茎段,辨认形态学上端后,置于MS基础培养基(青岛海博HB8469)中。其中,培养基含6-苄氨基嘌呤(6-BA)1 mg/L和萘乙酸(NAA)0.1 mg/L, pH 5.8—6.0。待千屈菜茎段萌芽后,将其转入新的MS培养基中(激素和酸碱度同上),待其继续生长和生根,最终成长为完整植株。

选择长势良好的千屈菜无菌苗,取约10 cm左右长度的植株,置于1/10 无菌Hoagland培养液(pH 5.8—6.0)中进行预培养。每隔2天更换1次培养液,预培养2周后进行实验。整个培养过程在全封闭培养箱中进行,培养条件为平均光照40 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,光照周期为12h:12h光暗循环,温度25℃。

1.2 实验设计

选取长势一致的千屈菜无菌苗,分别置于添加了0(对照)、5、10、20和40 mg/L Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$)与添加了0(对照)、5、10、20和40 mg/L Cr^{6+} ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)的1/10 无菌 Hoagland 培养液中。整个实验均在全封闭培养箱中完成,培养条件与预培养时一致,全程处理4d。待处理结束后,在相同的时间段内取出千屈菜无菌苗,用去离子水洗净、揩干,随后测定各项生理生化指标,每组设置3个重复。

1.3 实验方法

叶绿素含量的测定采用丙酮乙醇(1:1)浸提法^[10]。取植株叶片剪碎后于暗光条件下浸提,分别在645和663 nm处测定吸光度,用Arnon公式计算叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素的含量。

丙二醛含量的测定:取植株叶片置于玻璃匀浆器中,加入适量0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 7.2),于冰水浴条件下研磨成10%的植物匀浆。离心后取上清液,应用硫代巴比妥酸法原理^[11],采用南京建成生物工程研究所试剂盒(A003-1)进行测定。

可溶性糖含量的测定:取植株叶片置于玻璃研磨器中,加入适量蒸馏水研磨成10%的植物匀浆,沸水浴后离心并取上清,应用蒽酮比色法原理^[11],采用南京建成生物工程研究所试剂盒(A145-1-1)进行测定。

可溶性蛋白含量的测定:取植株叶片置于玻璃匀浆器中,加入适量生理盐水在冰水浴条件下研磨成10%的植物匀浆,离心后取上清,应用考马斯亮蓝G-250法原理^[11],采用南京建成生物工程研究所试剂盒(A045-2)进行测定。

抗氧化酶(SOD、POD、CAT)活性的测定:取植株叶片置于玻璃匀浆器中,加入适量0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 7.2),于冰水浴条件下研磨成10%的植物匀浆。3500 r/min,离心10min,取上清液进行测定。其中SOD、POD和CAT酶活分别应用黄嘌呤氧化酶-羟胺法^[12]、愈创木酚法^[11]和钼酸铵法^[13]原理,采用南京建成生物工程研究所试剂盒(A001-1、A084-3-1和A007-1-1)进行测定。

1.4 统计分析

实验数据通过Microsoft Excel 2017进行整理并作图分析,采用SPSS 23.0统计软件对所有指标与 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 浓度进行单因素方差分析和邓肯检验, $P<0.05$ 表示差异显著。图中不同字母表示差异水平为 $P<0.05$,相同字母表示差异水平为 $P>0.05$ 。

2 结果

2.1 铜离子和铬离子对千屈菜叶绿素含量的影响

随着 Cu^{2+} 浓度的升高,叶绿素a、叶绿素b和叶绿素总量均呈“升-降-升”趋势(图1a)。在 Cu^{2+} 浓度为5 mg/L时,叶绿素a、叶绿素b和叶绿素总量均显著升高($P<0.05$),达到最高值。随后,叶绿素a逐渐下降,并在 Cu^{2+} 浓度为20 mg/L时相对对照组显著减少,而在最高浓度(40 mg/L)时又有所上升。叶绿素b整体变化趋势与叶绿素a相同,且在 Cu^{2+} 浓度为40 mg/L时显著上升。叶绿素总量变化趋势与叶绿素a相同,在 Cu^{2+} 浓度为5 mg/L时达到最高含量为1.26 mg/g,后逐渐下降至0.93 mg/g。当 Cu^{2+} 浓度升高至40 mg/L时,叶绿素总量又显著回升。

随着 Cr^{6+} 浓度的升高,叶绿素a、叶绿素b和叶绿素总量也呈现“升-降-升”趋势(图1b),在 Cr^{6+} 浓度为10 mg/L时三者含量均达到最高。在0—10 mg/L Cr^{6+} 浓度条件下,千屈菜叶绿素a、叶绿素b和叶绿素总量不断上升,其中叶绿素总量达到1.34 mg/g。当 Cr^{6+} 浓度继续升高至20 mg/L时,三者均有所下降,其中叶绿素总量下降至1.18 mg/g。在此过程中,叶绿素a和叶绿素总量变化显著。在最高 Cr^{6+} 浓度(40 mg/L)条件下,千屈菜叶绿素含量有所回升,其中叶绿素总量上升至1.30 mg/g,但未超过10 mg/L时的叶绿素总量。

2.2 铜离子和铬离子对千屈菜丙二醛含量的影响

在不同浓度铜离子培养条件下,千屈菜无菌苗

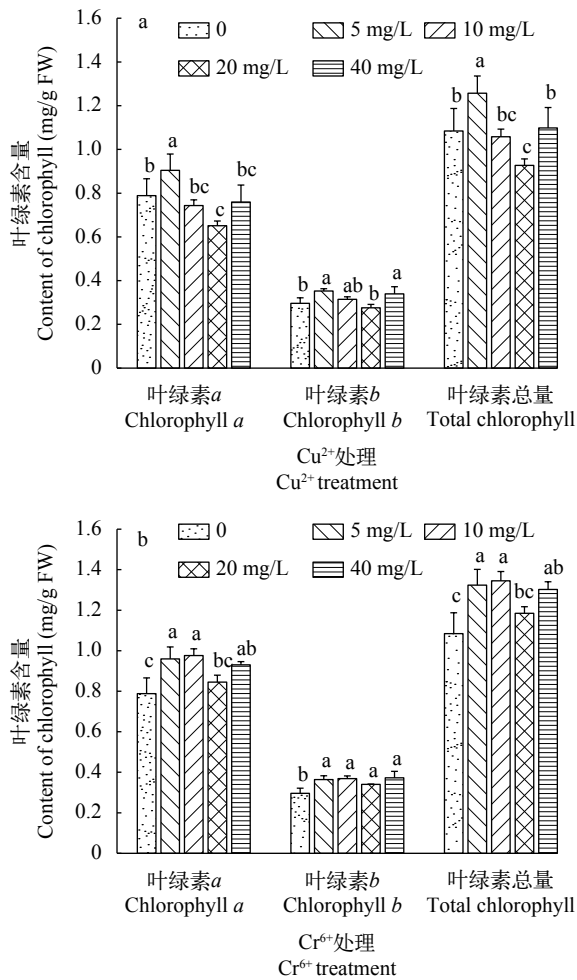


图1 不同浓度 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 对千屈菜无菌苗叶绿素含量的影响
Fig. 1 The effects of different concentrations of Cu^{2+} and Cr^{6+} on chlorophyll contents of *Lythrum salicaria*

不同字母表示差异水平为 $P < 0.05$, 相同字母表示差异水平为 $P > 0.05$; 下同

Means with different letters indicate significant difference at $P < 0.05$, same letters indicate no significant difference at $P > 0.05$; the same applies below

的丙二醛(MDA)含量均高于对照组(图2), 整体呈上升趋势。其中 Cu^{2+} 浓度为10和40 mg/L时, 千屈菜MDA含量显著高于对照组($P < 0.05$)。

在不同浓度铬离子培养条件下, 千屈菜无菌苗的MDA含量先降后升(图2)。在 Cr^{6+} 浓度为0—20 mg/L时, 千屈菜无菌苗MDA含量变化不显著。当 Cr^{6+} 浓度增加至40 mg/L时, 千屈菜无菌苗MDA含量达到最大值0.95 nmol/mg prot, 显著高于其余所有处理组。

2.3 铜离子和铬离子对千屈菜可溶性糖含量的影响

在不同浓度铜离子培养条件下, 千屈菜无菌苗的可溶性糖含量整体呈先升后降趋势(图3)。在 Cu^{2+} 浓度为10 mg/L时, 千屈菜无菌苗可溶性糖含量

达到最高值5.02 mg/g, 显著高于对照组($P < 0.05$)。当 Cu^{2+} 浓度从10增加至20 mg/L时, 可溶性糖含量降至2.18 mg/g, 降幅达56.61%。当 Cu^{2+} 浓度继续增加至40 mg/L后, 可溶性糖含量有所上升, 但仍低于对照组。

在不同浓度铬离子培养条件下, 千屈菜无菌苗的可溶性糖含量变化趋势与铜处理下相反(图3)。在 Cr^{6+} 浓度为0—10 mg/L, 千屈菜无菌苗的可溶性糖含量逐渐下降。在 Cr^{6+} 浓度为10 mg/L时可溶性糖含量降至最低为2.41 mg/g, 显著低于对照组。当 Cr^{6+} 浓度增加至20—40 mg/L, 可溶性糖含量又显著上升至对照组水平。

2.4 铜离子和铬离子对千屈菜可溶性蛋白含量的影响

在不同浓度铜离子培养条件下, 千屈菜无菌苗的可溶性蛋白含量整体呈先升后降趋势(图4)。千屈菜无菌苗可溶性蛋白含量在 Cu^{2+} 浓度为5 mg/L时达到最大值为4.02 g prot/L, 显著高于对照组($P < 0.05$)。在 Cu^{2+} 浓度为10 mg/L时, 可溶性蛋白含量显著下降了39.28%。在 Cu^{2+} 浓度为40 mg/L时, 可溶性蛋白浓度已降为对照组的60.86%。

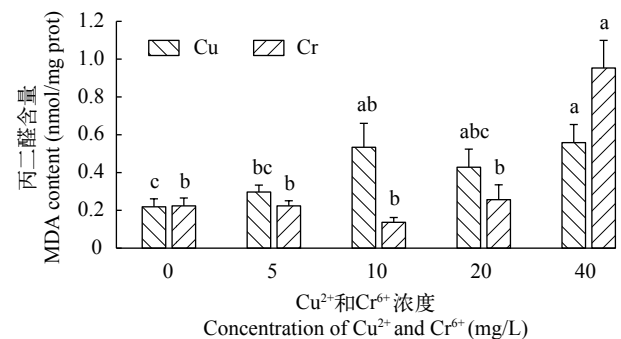


图2 不同浓度 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 对千屈菜无菌苗丙二醛含量的影响
Fig. 2 The effects of different concentrations of Cu^{2+} and Cr^{6+} on malonaldehyde contents of *Lythrum salicaria*

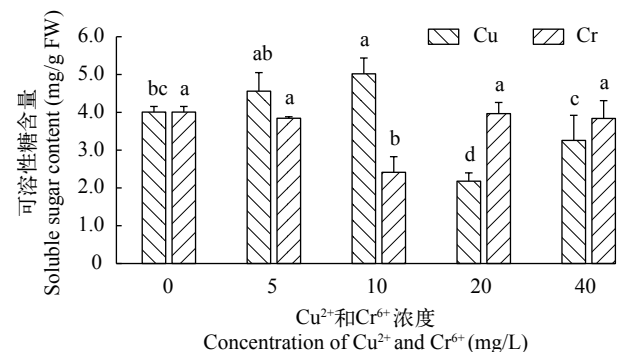


图3 不同浓度 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 对千屈菜无菌苗可溶性糖含量的影响
Fig. 3 The effects of different concentrations of Cu^{2+} and Cr^{6+} on soluble sugar contents of *Lythrum salicaria*

在不同浓度铬离子培养条件下, 千屈菜无菌苗可溶性蛋白含量表现为“降-升-降”趋势(图 4)。当 Cr^{6+} 浓度为 5 mg/L 时, 千屈菜无菌苗可溶性蛋白含量显著下降。随后在 Cr^{6+} 浓度为 10 mg/L 时, 可溶性蛋白浓度上升。在 Cr^{6+} 浓度为 10—40 mg/L, 可溶性蛋白含量持续下降。在 Cr^{6+} 浓度为 40 mg/L 时, 可溶性蛋白含量下降至 1.10 g prot/L, 显著低于其余所有处理组。

2.5 铜离子和铬离子对千屈菜抗氧化酶活性的影响

铜离子和铬离子对千屈菜SOD活性的影响

随着铜离子浓度的上升, 千屈菜无菌苗的超氧化物歧化酶(SOD)活性呈持续上升趋势(图 5)。在 Cu^{2+} 浓度为 5、10、20 和 40 mg/L 条件下, SOD 分别比对照组上升了 8.37%、41.13%、74.17% 和 100.04%。在 Cu^{2+} 浓度为 40 mg/L 时, SOD 活性达到最大值为 14.96 U/mg prot。

随着铬离子浓度的上升, 千屈菜无菌苗的 SOD 活性也呈持续上升趋势, 且均显著高于对照组($P < 0.05$; 图 5)。在 Cr^{6+} 浓度为 5 和 20 mg/L 时, 千屈菜无菌苗 SOD 活性分别上升 41.77% 和 44.7%。当 Cr^{6+} 浓度增加至 40 mg/L 时, SOD 活性则上升了 138.18%。

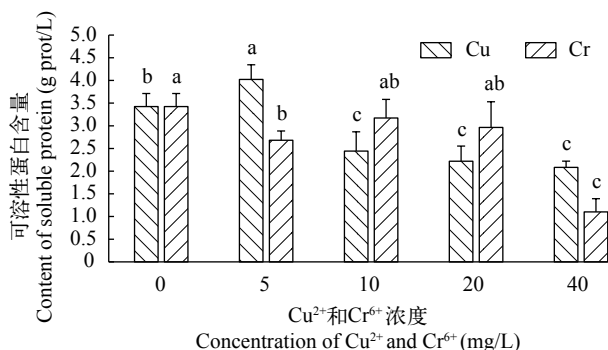


图 4 不同浓度 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 对千屈菜无菌苗可溶性蛋白含量的影响

Fig. 4 The effects of different concentrations of Cu^{2+} and Cr^{6+} on soluble protein contents of *Lythrum salicaria*

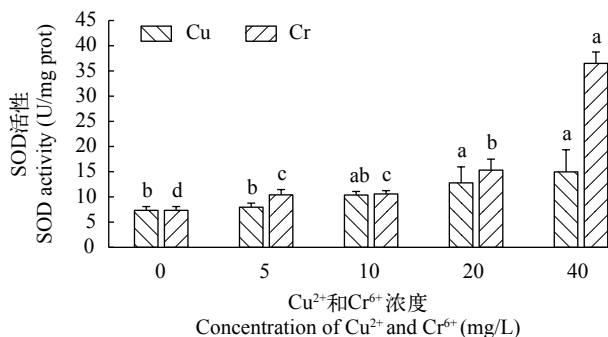


图 5 不同浓度 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 对千屈菜无菌苗 SOD 活性的影响

Fig. 5 The effects of different concentrations of Cu^{2+} and Cr^{6+} on SOD activity of *Lythrum salicaria*

铜离子和铬离子对千屈菜POD活性的影响 随着铜离子浓度的上升, 千屈菜无菌苗的过氧化物酶(POD)活性整体呈先升后降趋势(图 6)。当 Cu^{2+} 浓度为 20 mg/L 时, 千屈菜无菌苗 POD 活性达到最大值 11.76 U/mg prot, 显著高于对照组($P < 0.05$)。当 Cu^{2+} 浓度继续增至 40 mg/L 时, POD 活性则显著下降为 6.87 U/mg prot, 低于对照组。

千屈菜无菌苗在铬离子培养条件下的 POD 活性整体高于在铜离子培养条件下的(图 6)。在 Cr^{6+} 浓度为 0—10 mg/L, 千屈菜无菌苗的 POD 活性随 Cr^{6+} 浓度的增加而升高。当 Cr^{6+} 浓度为 20 mg/L 时, POD 活性略有下降, 但仍高于对照组。当 Cr^{6+} 浓度增加至最高 40 mg/L 时, POD 活性显著上升至最大值 26.33 U/mg prot, 显著高于其余任何处理组。

铜离子和铬离子对千屈菜CAT活性的影响

千屈菜无菌苗的过氧化氢酶(CAT)活性随着铜离子浓度的增加呈持续上升趋势(图 7), 且其整体活性远高于铬离子培养条件下的活性。CAT 活性在各 Cu^{2+} 浓度处理组间变化显著($P < 0.05$)。当 Cu^{2+} 浓度在 10 mg/L 时, CAT 活性已显著高于对照组。当 Cu^{2+} 浓度为 40 mg/L 时, CAT 活性达到最大值 12.10 U/mg prot,

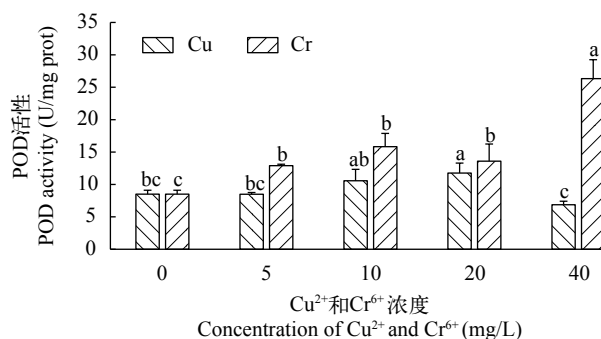


图 6 不同浓度 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 对千屈菜无菌苗 POD 活性的影响

Fig. 6 The effects of different concentrations of Cu^{2+} and Cr^{6+} on POD activity of *Lythrum salicaria*

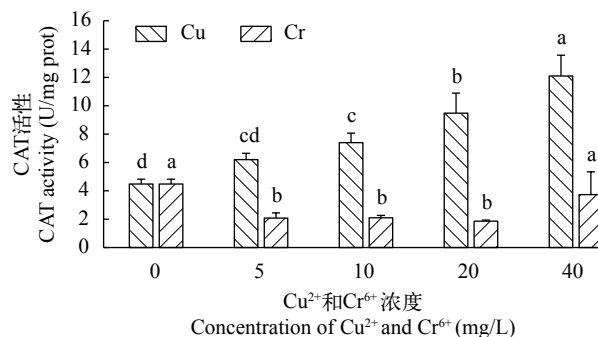


图 7 不同浓度 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 对千屈菜无菌苗 CAT 活性的影响

Fig. 7 The effects of different concentrations of Cu^{2+} and Cr^{6+} on CAT activity of *Lythrum salicaria*

是对照组的2.7倍。

在铬离子培养条件下,千屈菜无菌苗CAT活性整体水平均低于对照组(图7)。在最低 Cr^{6+} 浓度5 mg/L条件下, CAT活性即显著低于对照组。在 Cr^{6+} 浓度为5—20 mg/L, CAT活性变化不大。当 Cr^{6+} 浓度增加至40 mg/L时, CAT活性显著上升至3.73 U/mg prot,但仍低于对照组。

3 讨论

3.1 铜和铬离子对千屈菜叶绿素含量的影响

叶绿素广泛存在于植物的绿色组织中,是植物进行光合作用的物质基础。叶绿素的含量与植物的光合作用和营养状况密切相关,能够反映植物的生长状况。重金属对植物叶绿素的影响主要是破坏叶绿体膜和类囊体膜,抑制叶绿素的合成^[14]。

在本研究中,千屈菜无菌苗在铬离子培养条件下的叶绿素含量显著高于铜离子。在2种离子培养条件下,千屈菜无菌苗叶绿素含量均呈“升-降-升”的趋势。在低浓度铜处理中千屈菜叶绿素含量呈上升趋势,其原因可能是 Cu^{2+} 是叶绿体类囊体膜的组成成分,还是叶绿素合成过程中酶促反应的辅因子^[15]。因此,低浓度 Cu^{2+} 能促进叶绿素的合成。但随着 Cu^{2+} 浓度的升高,大量 Cu^{2+} 进入植物体内,破坏了叶绿素的结构或使得叶绿素加速分解。

在低浓度的 Cr^{6+} 培养条件下,千屈菜叶绿素含量显著上升,这可能是千屈菜受到低浓度 Cr^{6+} 刺激,促进了叶绿素的合成。但随着 Cr^{6+} 浓度在千屈菜细胞内的大量积累,取代了叶绿体所需要的铁和镁元素, Cr^{6+} 与蛋白质上的SH基结合^[16, 17],损害了叶绿体的结构和功能。此外,千屈菜在铜和铬离子培养条件下叶绿素a/b值逐渐降低,说明叶绿素a受到的影响更大,植株对光能的捕获能力降低。苦草在铜处理下的响应也是如此^[18]。

重金属常通过直接或间接损伤叶绿体结构与相关酶作用干扰叶绿素合成途径来降低植物体内的叶绿素浓度。植物在重金属条件下叶绿素含量常表现为逐渐降低或低促高抑现象。此外也有研究发现一些植物在高浓度重金属处理下,其叶绿素含量会增加。例如美人蕉在高浓度(40 mg/L)铬胁迫下,叶绿素含量有所升高^[19]。再力花(*Thalia dealbata*)^[20]、江蕲(*Gracilaria verrucosa*)^[21]和线叶眼子菜(*Potamogeton pusillus*)^[22]等在重金属处理下,叶绿素含量呈“升-降-升”趋势。但出现该现象的机理尚不清楚,在本实验中,千屈菜在40 mg/L铜和铬处理下,叶绿素含量也有所上升,可能与特定浓度造成的抗性机制或应答有关^[20, 23]。

3.2 铜和铬离子对千屈菜丙二醛含量的影响

细胞膜具有调节和控制物质进出细胞的重要生理功能。植物在胁迫条件下,酶系统和非酶系统会产生氧自由基,导致膜脂过氧化^[2],形成脂质过氧化物,损害细胞膜稳定性,影响植物的正常代谢。其中MDA是膜脂过氧化最重要的产物之一,其含量可反映植物脂质过氧化程度和细胞损伤程度。在本实验中,千屈菜无菌苗在不同浓度 Cu^{2+} 培养条件下MDA含量整体呈上升趋势,各 Cu^{2+} 浓度处理组MDA含量均高于对照组。在 Cu^{2+} 浓度为20 mg/L时膜脂化程度略有缓解,说明千屈菜细胞保护机制起了一定作用,但其含量依然高于对照组。这说明千屈菜细胞膜在各浓度铜处理下均受到损害。菹草无菌苗在铜处理下也表现出类似的机制^[24]。

在本实验中,千屈菜无菌苗MDA含量整体随 Cr^{6+} 浓度的增加而升高。黑藻和绿萝^[25]在铬胁迫下其MDA含量也随 Cr^{6+} 浓度的升高而升高,但上升幅度明显。而千屈菜在 Cr^{6+} 浓度为0—20 mg/L时,MDA含量上升幅度较小,与对照组的差异均不显著,表明其受到的影响较小。在 Cr^{6+} 浓度为10 mg/L时,千屈菜MDA含量甚至略有下降,说明其保护机制产生了一定的作用。但当 Cr^{6+} 浓度增加至40 mg/L时,千屈菜MDA含量骤增,显著高于其余所有处理组。这表明此时其保护机制可能已经无法及时清除过多的氧自由基,导致细胞膜脂化程度快速加重。综上,千屈菜细胞膜脂化程度受铜离子损害较大,而低浓度 Cr^{6+} (≤ 20 mg/L)对千屈菜细胞膜脂化程度影响很小。

3.3 铜和铬离子对千屈菜渗透调节物质的影响

可溶性糖和可溶性蛋白是植物体内重要的渗透调节物质。在重金属胁迫下,植物可以通过积累可溶性糖和可溶性蛋白来维持细胞渗透势,保证水分供应和生理代谢。可溶性糖在植物体内分布广泛,可在胁迫条件下提高植物保水力和吸水力,提高原生质的弹性^[26]。在本实验中,千屈菜无菌苗可溶性糖含量在铜处理下呈先升后降趋势,与千屈菜在Cd和Pb胁迫下的变化一致^[27],表现为低促高抑现象。当 Cu^{2+} 浓度为5和10 mg/L时,千屈菜可溶性糖含量高于对照组,说明其可通过提高可溶性糖含量来维持细胞渗透势。而高浓度的 Cu^{2+} 对千屈菜可溶性糖有抑制作用,但当 Cu^{2+} 浓度为40 mg/L时可溶性糖含量又有所回升,且与对照组差异不显著。在铬处理下,千屈菜可溶性糖含量变化趋势则与 Cu^{2+} 相反,表现为先降后升趋势,与菹草在铬胁迫下的响应一致^[28]。这可能是由于低浓度 Cr^{6+} 不足以引起千屈菜渗透系统的防御反应,反而刺激了千屈

菜的某些生理活动如光合产物合成, 使得可溶性糖的利用效率增加。但可溶性糖含量除在 Cr^{6+} 浓度为 10 mg/L 时显著下降外, 其余处理组变化均不显著。这表明千屈菜可溶性糖含量在铬处理下所受影响可能不是很大, 具有较好的铬抵抗能力。

可溶性蛋白也是植物体内分布广泛的营养物质和渗透调节物质^[26], 可维持细胞渗透势, 调节代谢, 提高植物抗胁迫的能力。在本研究中, 千屈菜无菌苗可溶性蛋白在铜处理下呈先升后降趋势。这与菹草(*Potamogeton crispus*)在铜胁迫下可溶性蛋白的变化趋势一致^[24]。三叶草(*Trifolium pretense*)的铜污染研究也表明低浓度 Cu^{2+} 可诱导可溶性蛋白的含量, 而高浓度 Cu^{2+} 则有抑制作用^[29]。这说明低浓度 Cu^{2+} 对千屈菜可溶性蛋白含量具有激活作用。此外, 可溶性蛋白含量在 10 、 20 和 40 mg/L 之间下降幅度不显著, 说明千屈菜可能对 Cu^{2+} 具有一定抗性。在铬处理下, 千屈菜可溶性蛋白含量则整体呈下降趋势, 这与苦草在铬处理下的响应一致^[30]。但较低浓度的 Cr^{6+} 对其影响不大, 在 Cr^{6+} 浓度 20 mg/L 时, 千屈菜可溶性蛋白含量依然与对照组无显著差异。而当 Cr^{6+} 浓度进一步升高为 40 mg/L 时, 可溶性蛋白含量才发生显著下降。综上, 千屈菜在铜和铬处理下均具有一定的渗透调节抗性, 其中铬处理对千屈菜渗透调节物质的影响相对较小。

3.4 铜和铬离子对千屈菜抗氧化酶活性的影响

在重金属胁迫下, 植物会产生大量活性氧(ROS), 这些活性氧在细胞中大量积累后会损伤细胞膜、大分子蛋白质、DNA和RNA等。为抵御活性氧带来的毒性作用, 植物会激活抗氧化酶机制来清除过多的活性氧。SOD、POD和CAT是植物体内重要的清除活性氧的酶类。SOD可以将 O^{2-} 转化为毒性相对较弱的 H_2O_2 , 而CAT和POD则可以把 H_2O_2 进一步转化为 H_2O 和 O_2 ^[31]。在铜胁迫下, 轮叶黑藻(*Hydrilla verticillata*)的SOD和POD活性持续升高^[32], 鱼草(*Cabomba caroliniana*)的POD和CAT活性也逐渐增强^[33], 以缓解铜离子的胁迫作用。在铬胁迫下, 2种菹属植物的SOD、POD和CAT活性不断增强^[16], 超富集植物李氏禾(*Leersia hexandra*)在 Cr^{6+} 浓度 20 mg/L 以内抗氧化酶活性也逐渐升高^[31], 以抵御氧化胁迫。

在本实验中, 千屈菜SOD活性在铜和铬处理下均呈持续上升趋势, 且在铬处理下千屈菜的SOD活性整体显著高于铜。这表明千屈菜在铜和铬处理下能良好地激发SOD活性, 清除过多的自由基, 降低氧化损伤。并且相对于铜处理而言, 千屈菜SOD对铬处理反应更加敏感。千屈菜POD活性在铜处

理下表现为先升后降, 表明低浓度 Cu^{2+} 能激发POD活性, 而高浓度 Cu^{2+} 会抑制POD活性。在铬处理下, 千屈菜POD活性则整体呈上升趋势, POD活性随 Cr^{6+} 浓度的增加不断上升, 以清除机体内的过氧化氢, 且其POD响应机制相对于铜处理下更为积极。千屈菜在铜处理下, CAT活性随 Cu^{2+} 浓度增加而不断升高, 表明CAT在铜处理下发挥了重要作用, 与伊乐藻(*Elodea canadensis*)的响应一致^[34]。而铬处理则对千屈菜CAT活性表现为在所有浓度范围内的持续抑制效应, 这与*Halimione portulacoides*根系对铬的响应相似^[35]。综上, 千屈菜抗氧化酶系统在铜和铬处理下响应积极。在铜处理下千屈菜体内活性氧的清除由SOD、POD和CAT三种酶共同参与, 而在铬处理下参与活性氧清除的酶主要是SOD和POD。

4 结论

本实验分别测定了铜(Cu^{2+})和铬(Cr^{6+})培养条件下千屈菜无菌苗的叶绿素、丙二醛、可溶性糖、可溶性蛋白含量和SOD、POD、CAT活性。结果表明千屈菜对 Cu^{2+} 和 Cr^{6+} 具有一定的抗性, 在2种离子处理下千屈菜叶绿素含量基本未受影响, 抗氧化酶活性上升, 且具有一定的渗透调节能力。千屈菜在 Cu^{2+} 浓度低于 5 mg/L 时生理生化指标所受影响相对较小, 表明其具有修复水体低浓度铜污染的潜力; 而千屈菜在 Cr^{6+} 浓度低于 20 mg/L 时其生理生化指标所受影响相对较小, 与一些铬超富集植物的耐受能力相近, 表明其在铬污染水体修复方面具有较高的应用潜力。但千屈菜无菌苗在水体修复中的实际应用还需要更深入的研究。

参考文献:

- [1] Bingol N A, Ozmal F, Akin B. Phytoremediation and biosorption potential of *Lythrum salicaria* L. for nickel removal from aqueous solutions [J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2017, 26(6): 2479-2485.
- [2] Shahid M, Dumat C, Khalid S, et al. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: a comparison of foliar and root metal uptake [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017(325): 36-58.
- [3] Zhang K, Su F L, Liu X M, et al. The average concentration function of dissolved copper in Hun River, Liaoning province, Northeastern China [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(35): 27225-27234.
- [4] Hayat S, Khalique G, Irfan M, et al. Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview [J]. *Protoplasma*, 2012, 249(3): 599-611.

- [5] Chen D Q, Liu X Z, Chen Y Q, *et al.* Removal of Nitrogen and Phosphorus in Lightly Polluted Urban Landscape River by Aquatic Ornamental Plant [C]//Xu Q J, Ju Y H, Ge H H (Eds.), 2nd International Conference on Energy, Environment and Sustainable Development (EESD 2012). Switzerland: Trans Tech Publications Ltd, 2013: 1943-1949.
- [6] Ma W, Zhao B, Ma J. Comparison of heavy metal accumulation ability in rainwater by 10 sponge city plant species [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, **26**(26): 26733-26747.
- [7] Sun L, Zheng L. The Ecological Risk Assessment of Heavy Metals In The Kuihe River Basin (xuzhou Section) And The Characteristics of Plant Enrichment [C]//IOP. 2017 3rd International Conference on Environmental Science and Material Application (ESMA). Bristol: Iop Publishing Ltd, 2018: 108.
- [8] Marchand L, Nsanganwimana F, Cook B J, *et al.* Trace element transfer from soil to leaves of macrophytes along the Jalle d'Eysines River, France and their potential use as contamination biomonitors [J]. *Ecological Indicators*, 2014(46): 425-437.
- [9] Sun H, Wang Z, Gao P, *et al.* Selection of aquatic plants for phytoremediation of heavy metal in electroplate wastewater [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, **35**(2): 355-364.
- [10] Xu F F, Ye L M, Xu W H, *et al.* Comparison of methods of chlorophyll extraction in Chinese cabbage [J]. *Northern Horticulture*, 2010(23): 32-34. [徐芬芬, 叶利民, 徐卫红, 等. 小白菜叶绿素含量的测定方法比较 [J]. 北方园艺, 2010(23): 32-34.]
- [11] Li H S. Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiments [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 260-261. [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, 2000: 260-261.]
- [12] Wang M, Li H, Zhu H F. The modified xanthine oxidase (hydroxylamine) method was used to detect SOD activity in serum [J]. *Journal of North Sichuan Medical College*, 2003, **18**(2): 92-93. [王珉, 李洪, 朱红枫. 改良的黄嘌呤氧化酶-羟胺法检测血清SOD活性 [J]. 川北医学院学报, 2003, **18**(2): 92-93.]
- [13] Peng J, Wang D Y, Xu C M, *et al.* Ammonium molybdate method for detecting the activities of rice catalase [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, **25**(16): 61-64. [彭建, 王丹英, 徐春梅, 等. 钼酸铵法测定水稻过氧化氢酶活性 [J]. 中国农学通报, 2009, **25**(16): 61-64.]
- [14] Seregin I V, Ivanov V B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2001, **48**(4): 523-544.
- [15] Yruela I. Copper in plants [J]. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2005, **17**(1): 145-156.
- [16] Bashri G, Parihar P, Singh R. Physiological and biochemical characterization of two *Amaranthus* species under Cr (VI) stress differing in Cr (VI) tolerance [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016(108): 12-13.
- [17] Wang H X, Shi G X, Xu Q S, *et al.* Photosynthetic physiological characteristics and ultrastructure of *Salvinia natans* leaves under Cr⁶⁺ Stress [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2008, **28**(11): 2244-2250. [王红霞, 施国新, 徐勤松, 等. Cr⁶⁺胁迫对槐叶萍叶片光合生理特征及超微结构的影响 [J]. 西北植物学报, 2008, **28**(11): 2244-2250.]
- [18] Gao G Q, Wang X L, Lu L, *et al.* Effects of water Cu pollution on growth and chlorophyll fluorescence characteristics of *Vallisneria natans* [J]. *Guihaia*, 2019, **39**(2): 209-217. [高桂青, 王香莲, 卢龙, 等. 水体铜污染对苦草生长及叶绿素荧光特性的影响 [J]. 广西植物, 2019, **39**(2): 209-217.]
- [19] Zhao B, Zhu S X, Xu C. Response of physiological and ecological characteristics of *Canna indica* under Cr (VI) stress [J]. *Science Technology and Engineering*, 2017, **17**(32): 44-49. [赵斌, 朱四喜, 徐铖. 铬胁迫对美人蕉生理生态特性与铬积累的影响 [J]. 科学技术与工程, 2017, **17**(32): 44-49.]
- [20] Tang Q, Zhu S X, Zhao B, *et al.* Physiological and biochemical responses of *Thalia dealbata* of wetland plants to Cr stress [J]. *Science Technology and Engineering*, 2018, **18**(35): 108-115. [汤茜, 朱四喜, 赵斌, 等. 湿地植物再力花对铬胁迫的生理生化响应 [J]. 科学技术与工程, 2018, **18**(35): 108-115.]
- [21] Dong S G, Hu Z K. Study on purification function of *Gracilaria verrucosa* to heavy metal Cu, Pb and Cd [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2017(3): 31-37. [董树刚, 胡泽坤. 江蓠对海水重金属铜、铅、镉的净化作用研究 [J]. 海洋湖沼通报, 2017(3): 31-37.]
- [22] Monferran M V, Pignata M L, Wunderlin D A. Enhanced phytoextraction of chromium by the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus* in presence of copper [J]. *Environmental Pollution*, 2012(161): 15-22.
- [23] Li X J. Studies on resistance of *Toona sinensis* to heavy metal [D]. Tianjin: Tianjin University of Technology, 2012: 25-28. [李晓晶. 香椿对重金属的抗性研究 [D]. 天津: 天津理工大学, 2012: 25-28.]
- [24] Yang X K. The toxicologic study of heavy metal copper and zinc on *Potamogeton crispus* L. aseptic seedlings [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2015: 12-13. [杨笑可. 重金属铜、锌对菹草无菌苗的毒理学研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2015: 12-13.]
- [25] Ma X N, Chang G H, Chen Y Q, *et al.* Physiological response of combination of two plants to Cr (VI) stress [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, **38**(7): 21-27. [马晓宁, 常国华, 陈映全, 等. 2种植物组合在Cr(VI)胁迫下的生理响应 [J]. 环境科学与技术, 2015, **38**(7): 21-27.]
- [26] Chen K. Comparative evaluation of adaptability of four woody plants against winter flooding and summer drought [D]. Chongqing: Southwest University, 2017: 4-

5. [陈珂. 四种木本植物对冬涝夏旱的适应性比较研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017: 4-5.]
- [27] Sun G. Effects of cadmium and lead stress on the seed germination and seedling growth in *Lythrum salicaria* L. [D]. Jilin: Jilin Agricultural University, 2013: 19-20. [孙刚. 镉、铅胁迫对千屈菜种子萌发、幼苗生长及生理生化的影响 [D]. 吉林: 吉林农业大学, 2013: 19-20.]
- [28] Chen H, Shi G X, Xu Q S, *et al.* Toxic effects of Cr^{6+} on chlorophyll fluorescence parameters, antioxidant systems and ultrastructure of *Potamogeton crispus* [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2009, **29**(5): 559-564. [陈辉, 施国新, 徐勤松, 等. Cr^{6+} 对菹草叶绿素荧光参数、抗氧化系统和超微结构的胁迫影响 [J]. *植物研究*, 2009, **29**(5): 559-564.]
- [29] Chu L, Liu D Y, Wang Y B, *et al.* Effect of copper pollution on seedling growth and activate oxygen metabolism of *Trifolium pretense* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, **15**(1): 119-122. [储玲, 刘登义, 王友保, 等. 铜污染对三叶草幼苗生长及活性氧代谢影响的研究 [J]. *应用生态学报*, 2004, **15**(1): 119-122.]
- [30] Vajpayee P, Rai U N, Ali M B, *et al.* Chromium-induced physiologic changes in *Vallisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluent [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, **67**(2): 246-256.
- [31] Yan Y, Li J P, Zhang X H. Response of *Leersia hexandra* Swart to chromium-induced oxidative stress [J]. *Ecology and Environment Sciences*, 2008, **17**(4): 1476-1482. [闫研, 李建平, 张学洪. 超富集植物李氏禾对铬诱导的氧化胁迫响应 [J]. *生态环境*, 2008, **17**(4): 1476-1482.]
- [32] Mu D D, Ru S Y, Li T, *et al.* Effect of copper stress on physiological metabolism in sterile seedlings of *Hydrilla verticillata* (L. F.) Royle [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(2): 419-424. [母丹丹, 汝双燕, 李涛, 等. 铜胁迫对轮叶黑藻无菌苗生理代谢的影响 [J]. *水生生物学报*, 2016, **40**(2): 419-424.]
- [33] Gu W, Shi G X, Chao J G, *et al.* Toxic effects of Hg^{2+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} on cell membrane system of *Cabomba caroliniana* A. Gray [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, **19**(5): 1138-1143. [谷巍, 施国新, 巢建国, 等. 汞、镉、铜污染对鱼草细胞膜系统的毒害作用 [J]. *应用生态学报*, 2008, **19**(5): 1138-1143.]
- [34] Koca F D, Yilmaz D D, Duman F, *et al.* Comparison of phytotoxic effects of bio-synthesised copper oxide nanoparticle and ionic copper on *Elodea canadensis* [J]. *Chemistry and Ecology*, 2018, **34**(9): 839-853.
- [35] Duarte B, Silva V, Cacador I. Hexavalent chromium reduction, uptake and oxidative biomarkers in *Halimione portulacoides* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012(83): 1-7.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES OF *LYTHRUM SALICARIA* ASEPTIC SEEDLINGS TO COPPER AND CHROMIUM

ZHANG Shi-Wen^{1, 2}, LIU Chang-Zi^{1, 2}, MU Dan-Dan³, WU Zhi-Gang¹ and LI Tao¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Shuishengzaoan (Wuhan) Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 430075, China)

Abstract: An experiment of hydroponic culture was carried out to investigate the effects of copper and chromium on *Lythrum salicaria* Linnaeus aseptical seedlings. The plants were cultured in 1/10 sterile Hoagland nutrition liquid with Cu^{2+} at 0, 5, 10, 20, 40 mg/L and Cr^{6+} at 0, 5, 10, 20, 40 mg/L respectively for 4 days. We analyzed the toxic effects on chlorophyll content, malondialdehyde (MDA) content, the activity of antioxidant enzymes (SOD, POD, CAT), soluble sugar content and soluble protein content of the seedlings. The results suggested that the osmotic regulatory substances (soluble sugar and soluble protein) increased at low copper concentrations and then decreased at higher concentrations. With the increase of Cu^{2+} concentration, the degree of membrane peroxidation increased, while the chlorophyll content was not significantly affected. The activity of antioxidant enzymes (SOD, POD and CAT) was high under the copper treatment. With the increase of chromium concentration, the chlorophyll content was also not inhibited. The extent of membrane peroxidation was not significantly affected when the chromium concentration was 0—20 mg/L. The CAT activity was continuously inhibited, but SOD and POD were well activated. In conclusion, *L. salicaria* has a certain resistance to copper and chromium. Its chlorophyll content was rarely affected, the antioxidant enzyme system responded well, and could regulate the osmotic system for stress reaction. When the concentration of Cu^{2+} is lower than 5 mg/L and the concentration of Cr^{6+} is lower than 20 mg/L, its physiological and biochemical indicators are relatively less affected. Our findings provide theoretical basis for further research on the response of *L. salicaria* under the treatment of heavy metals, as well as its ecological application of water restoration.

Key words: *Lythrum salicaria*; Heavy metal; Copper stress; Chromium stress; Physiological and biochemical response