

铜污染对玉米幼苗的毒性及其机制研究

熊 思 林爱军* 宋 亮 魏连爽 李 强

(北京化工大学 化学工程学院, 北京 100029)

摘 要: 用不同质量浓度的 Cu 处理玉米幼苗, 分析了 Cu 毒性对幼苗生长的影响和体内氧化损伤情况, 并采用分步提取技术研究了玉米幼苗地上部分中 Cu 的化学形态分布。结果表明加 Cu 处理明显抑制了玉米的生长和发育, 并引起肉眼可见的伤害。铜胁迫导致玉米幼苗叶片中抗氧化酶系统中酶活性的变化, 在本研究的 Cu 处理质量浓度范围(5 ~ 160 mg/L)内, 随着 Cu 质量浓度的增加, 幼苗叶片中的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性升高, 过氧化氢酶(CAT)活性先升高后下降。铜胁迫还会导致植物体内的氧化损伤, 丙二醛含量随 Cu 处理质量浓度提高而增加。玉米幼苗累积的 Cu 在体内以不同的化学形态分布, 通过体内结合机制降低体内 Cu 的移动性是玉米幼苗抵抗 Cu 污染危害的重要机制之一。

关键词: 植物毒性; Cu; 形态分析

中图分类号: X173

引 言

近年来, 随着有色金属的开采加工利用、含铜农药的使用、含铜饲料添加剂的使用, 大量的 Cu 进入土壤环境, 在土壤中累积并造成污染^[1]。我国已有超过 16% 的耕地受重金属污染^[2], 而 Cu 作为几种污染最普遍的重金属之一^[3], 环境 Cu 累积对植物的影响以及在植物中的累积规律都需要进一步的研究。

Cu 是植物生长所必需的微量元素之一^[4], 因此微量的 Cu 进入环境对植物的生长有一定的促进作用, 但过量的铜可以影响植物对二价铁的吸收和转运, 甚至引起缺铁病^[5]。过量的 Cu 对植物体内的酶也有影响, 如 Cu²⁺ 能抑制玉米幼苗根系和叶片的生长, 这是因为 Cu 影响了玉米幼苗根系和叶组织中的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的活性^[6]。对香根草、三叶草等的研究也表明低浓度的 Cu 刺激生长, 而高浓度的 Cu 却会提高 Cu 累积、抑制生长、破坏活性氧清除系统、增加丙二醛含量、提高叶片细胞膜透性^[7-8]。在 Cu 超积累植物体内, 为了抵抗 Cu 引起的伤害, 主要是通过酶学和非

酶学机制消除 Cu 引起的氧化伤害^[9]。

玉米属于易于吸收 Cu 的农作物, 并且 Cu 通过玉米吸收有可能进入整个食物链, 因此有必要研究 Cu 污染对玉米幼苗的毒性及其机制并明确玉米体内累积的 Cu 的化学形态, 为降低污染土壤收获玉米的利用风险提供基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料: 玉米(*Zea mays L.*)品种品糯 28, 北京中品开元种子有限公司; 供试重金属 CuSO₄ · 5H₂O, 分析纯, 北京化工厂。

1.2 玉米种子的培养

玉米种子经质量分数 30% H₂O₂ 溶液消毒 30 min 后, 以自来水充分冲洗, 再经自来水浸种 1 h, 用纱布包好在 25 °C 保湿催芽。种子露白后播在蛭石中, 用自来水保持种子湿润, 在 LRH 系列生化培养箱中催芽。7 d 后将玉米幼苗移入 Hoagland 营养液并放置在光照培养箱内生长保持光照 12 h/d, 光强为 4000 lux, 温度 25 °C。每日早晚 9 点以 10% 的稀盐酸和 1 mol/L 的氢氧化钠调节营养液的 pH 值至 6.0, 2 d 更换一次营养液, 每日通气 6 次, 每次 20 min。移入培养箱 5 d 后, 分别用 0.0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、160.0 mg/L 的 Cu 处理玉米, 每个处理重复 3 次, 所有处理每个重复中均为 4 株生长状况类似且长势状况良好的植株。实验加入的 Cu

收稿日期: 2013-02-07

基金项目: 国家自然科学基金(81072989)

第一作者: 女, 1990 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: linaj@mail.buct.edu.cn

<http://www.journal.buct.edu.cn>

为 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 对照用营养液。处理 12 d 后, 收获植物进行测定。

1.3 分析方法

1.3.1 生物量测定

取样后分地上部和地下部, 称取鲜重。数出须根数, 测量须根长及地上部分高。

1.3.2 H_2O_2 半定量染色试验

采用 Schiitzendiibel 等^[10] 给出的方法进行活体根的 H_2O_2 染色, 染色 30 min 后用蒸馏水冲洗 3 次, 观察并拍照。

1.3.3 抗氧化酶活性和丙二醛含量测定

取 0.5 g 玉米幼苗叶片去叶脉剪碎, 置于预冷的研钵中, 加入预冷的 pH 为 7.8 的磷酸缓冲液 10 mL 进行冰浴研磨提取, 然后转入离心管, 在 6000 r/min 下离心 10 min, 取上清液测定以下指标。

参照文献[11]的方法测定 SOD 活性。SOD 活性单位以抑制氮蓝四唑光化还原的 50% 为一个酶活性单位表示。

采用分光光度法^[11] 测定 POD 活性。以每 min 内 A_{470} 变化 0.01 为 1 个 POD 活性单位。

采用高锰酸钾滴定法^[12] 测定过氧化氢酶 (CAT) 活性。酶活性用每 g 鲜重样品在 10 min 内分解 H_2O_2 (mg) 的量表示。

采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法^[11] 测定丙二醛含量, 以 $\mu\text{mol/g}$ 计。

1.3.4 植物内 Cu 形态分析

参照文献[13]的方法, 采用下列 5 种提取剂依次逐步提取: 80% 乙醇 (E), 去离子水 (W), 1 mol/L NaCl 溶液 (NaCl), 2% HAc (HAc), 0.6 mol/L HCl (HCl)。

2 结果与讨论

2.1 Cu 处理对玉米幼苗生长的影响

在铜胁迫下, 玉米幼苗受到的影响显而易见, 植株逐渐矮小, 叶片失绿变黄, 叶片面积变小。如表 1 所示, 地上部、地下部的鲜重及植株地上部分株高均随着 Cu 质量浓度的升高逐渐下降, 须根数、须根长在低质量浓度 (<5 mg/L) 时略微升高, 然后随着 Cu 质量浓度的增加而递减, 并且总体表现出递减的趋势。这和高质量浓度的重金属对植株根系造成胁迫, 使其幼苗根尖细胞有丝分裂数减少, 分裂速度减慢, 导致幼苗生长缓慢, 长势不良相符合^[7]。分析原因可能是 Cu 是植物生长所必须的微量元素, 低

质量浓度的 Cu 可以促进植物的生长; 但是高质量浓度 Cu 溶液会使植物产生毒害, 是通过影响酶促生理活动, 进而对植物的光合作用、呼吸代谢功能产生不良的影响, 从而使玉米幼苗生长不良^[6]。

表 1 不同 Cu 处理对玉米幼苗生长的影响

Table 1 Effect of Cu^{2+} treatment on the growth of maize seedlings

$\rho_{\text{Cu}} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	单株鲜重/g		平均须根数	须根长/cm		地上部分高/cm
	地上部	地下部		平均	最长	
0	6.59	2.12	12.0	12.47	15.00	14.92
5	3.56	1.62	13.0	13.21	15.63	15.23
10	3.46	1.59	12.0	11.35	13.27	13.34
20	2.56	1.51	11.0	9.32	12.75	13.01
40	2.00	1.48	11.0	9.18	12.42	12.59
80	1.59	1.37	10.0	8.85	11.63	11.57
160	1.49	1.31	8.0	7.42	10.62	9.64

2.2 Cu 处理对玉米幼苗活氧化胁迫的影响

2.2.1 玉米幼苗 H_2O_2 含量

本文研究的 Cu 引起的植物根部 H_2O_2 积累如图 1 所示。从图 1 可以看出, 随着 Cu 质量浓度的提高, 幼苗根颜色染色也逐渐加深, 说明 Cu 质量浓度增加引起 H_2O_2 的累积。分析 Cu 引起 H_2O_2 的累积可能是因为过量的浓度增加了亚细胞间的 ROS 水平, 进而产生了氧化胁迫^[14]。ROS 包括超阴离子、 H_2O_2 、羟基自由基, 它们都影响了主要的蛋白质、脂质、碳水化合物以及核酸的合成^[15]。

2.2.2 玉米幼苗体内丙二醛含量

丙二醛是膜脂氧化的最终产物, 其积累量能体现植物细胞膜的伤害程度^[16]。Cu 处理对玉米幼苗叶片丙二醛含量的影响如图 2 所示。从图 2 可以看出, 在营养液添加 Cu 质量浓度 5 ~ 10 mg/L 下, 丙二醛含量逐渐上升, 说明此时 Cu 处理已经对植株形成了伤害, 膜脂过氧化加剧, 膜结构受损失程度加深。随着 Cu 质量浓度升高, 直至 40 mg/L, 丙二醛含量有一个下降的过程, 这说明植株启动了膜保护系统应激机制来抵抗这种伤害。但此后, 随着 Cu 质量浓度的进一步升高, 丙二醛含量急剧上升, 这时高 Cu 质量浓度已经使幼苗到了一个无法逆转的伤害, 膜结构受损失程度已经到达一个相当严重的水平。

2.2.3 酶活性的变化

植物细胞内具有多种抗氧化酶可以降低或消除

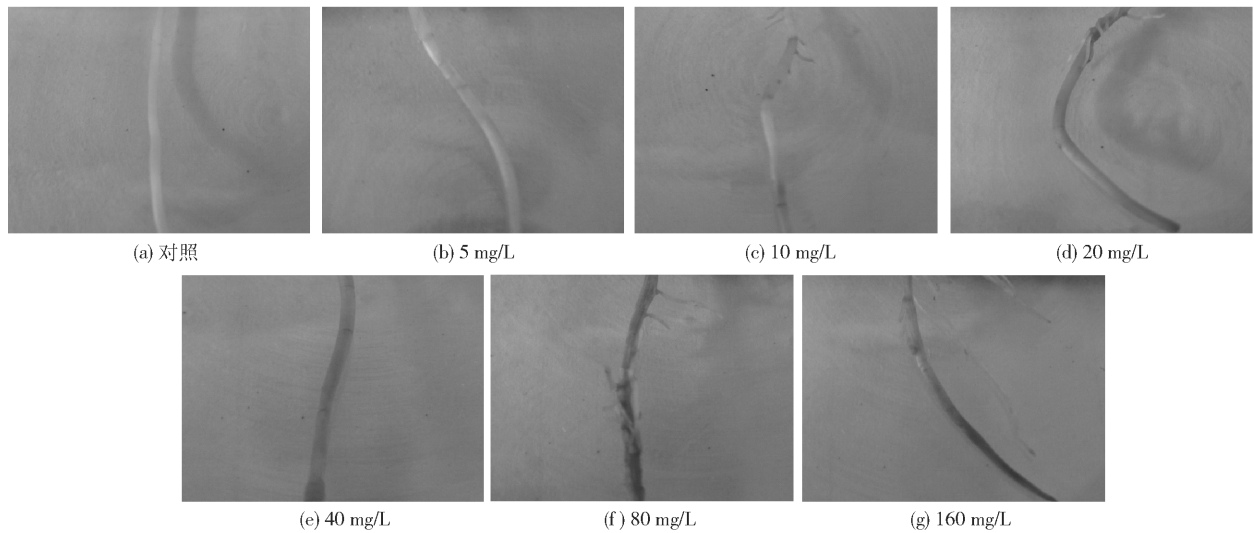


图1 不同 Cu 质量浓度下玉米幼苗活体根的 H₂O₂ 染色图片

Fig. 1 Accumulation of H₂O₂ in maize seedlings for treatment with different mass concentrations of Cu²⁺

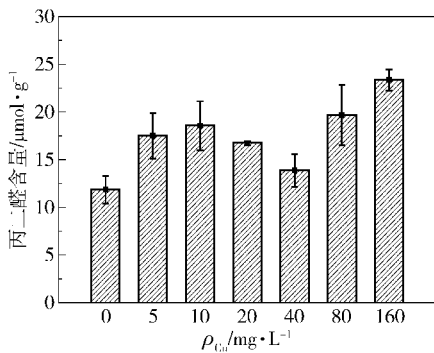


图2 Cu 处理对玉米幼苗叶片丙二醛含量的影响

Fig. 2 Content of MDA in leaves of maize seedlings for different concentrations of Cu²⁺

活性氧的伤害。SOD、POD、CAT 三者协调作用,共同组成植物体内一个有效的活性氧清除系统,以有效清除自由基和过氧化物^[17]。SOD、CAT 共同作用能把 O₂⁻ 和 H₂O₂ 转化为 O₂,并能起到减少具毒性和高活性的·OH 的形成,POD 和 CAT 则可催化 H₂O₂ 形成 H₂O,从而有效阻止 O₂⁻ 和 H₂O₂ 的积累,限制这些自由基对膜脂过氧化的启动^[8]。

在本试验中,重金属 Cu 处理后,玉米幼苗体内活性氧清除系统遭到破坏,叶片内 SOD 和 POD 活性均随 Cu 质量浓度的增加表现出升高的趋势(图 3 ~ 4),CAT 活性随 Cu 质量浓度的增加先升高后降低(图 5)。低质量浓度 Cu 处理时(< 10 mg/L),玉米幼苗叶片中 3 种酶的活性都升高,这是玉米幼苗对 Cu 污染的应激反应,对于降低植物体内产生的活性氧自由基、保护膜结构的完整有重要作用,在一定程

度上能抵抗、忍耐或减缓 Cu 的胁迫。此时活性氧清除系统能保持平衡,从而保证植物体自身正常的生长代谢,这和前文玉米幼苗植株长势、鲜重、根长、根数等指标随 Cu 质量浓度升高而总体下降的过程中处于低质量浓度(< 10 mg/L)时出现略微升高的现象所述原理一致。

在 Cu 处理质量浓度为 20 mg/L 时,POD 含量出现短暂的下降,此后一直升高,这一结果与前面丙二醛含量的变化类似,这说明保护酶的高活性特征能够帮助植物降低膜脂过氧化作用。在高 Cu 质量浓度时,玉米幼苗体内活性氧清除系统中这 3 种酶的平衡遭到破坏,不能阻止 O₂⁻ 和 H₂O₂ 的积累,从而影响植物体的正常生长代谢,使之出现严重的受毒害症状。

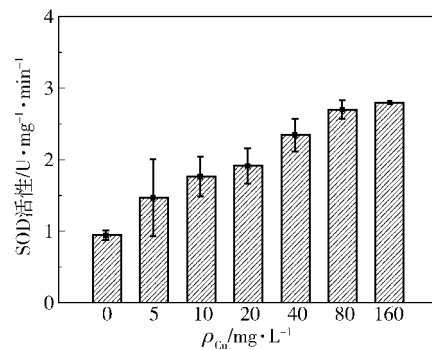


图3 Cu 处理对玉米幼苗叶片 SOD 活性的影响

Fig. 3 Activity of SOD in leaves of maize seedlings for different concentrations of Cu²⁺

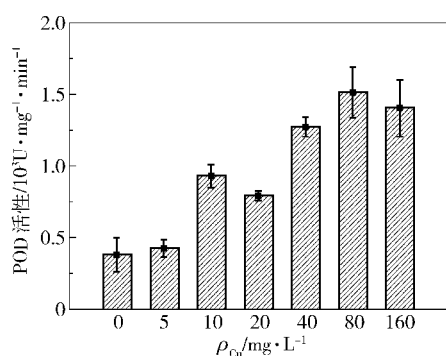


图 4 Cu 处理对玉米幼苗叶片 POD 活性的影响

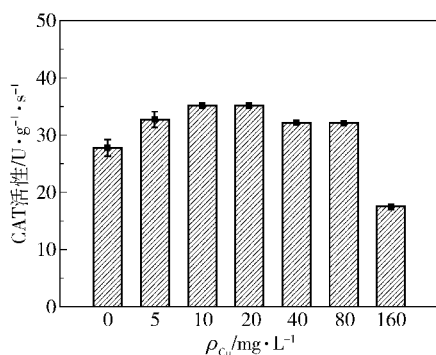
Fig. 4 Activity of POD in leaves of maize seedlings for different concentrations of Cu^{2+} 

图 5 Cu 处理对玉米幼苗叶片 CAT 活性的影响

Fig. 5 Activity of CAT in leaves of maize seedlings for different concentrations of Cu^{2+}

2.3 Cu 处理下玉米体内的 Cu 化学形态分析

表 2 为玉米幼苗地上部分 Cu 形态分布,由表 2 可知,每种提取态的重金属含量都随着 Cu 质量浓度的升高而增加,并且不同质量浓度处理下 Cu 的形态分布不同。低质量浓度(5 mg/L) Cu 处理下酸的提取态含量高于水的提取态含量,高质量浓度(10 ~ 160 mg/L)处理下水的提取态含量高于酸的提取态含量。这可能是因为植物体内 Cu 质量浓度高时表面吸附较多。

分析不同 Cu 质量浓度处理下各种重金属的含量,总体情况是水提取态与乙醇提取态较多,这说明玉米幼苗叶片的 Cu 主要以高活性形态存在,部分 Cu 可能与有机酸等物质形成络合物,并储存在液泡中。氯化钠提取态含量最少。此外,Cu 的多种提取物化学形态中,含量差别都不是相当明显,这说明玉米幼苗叶片中的细胞中有多种配位基团与 Cu 结合。

表 3 为玉米幼苗地上部分各形态 Cu 分配比例,由表 3 可知,随着 Cu 质量浓度的增加,每种提取态

表 2 玉米幼苗地上部分 Cu 形态分布

Table 2 Cu^{2+} distribution in the shoots of maize seedlings

$\rho_{\text{Cu}} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	不同提取剂提取的 Cu 质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$				
	E	W	NaCl	HAc	HCl
5	0.155	0.094	0.080	0.126	0.104
10	0.233	0.119	0.115	0.085	0.114
20	0.205	0.176	0.095	0.158	0.159
40	0.464	0.456	0.178	0.414	0.293
80	1.172	1.178	0.432	1.033	0.502
160	1.376	3.615	0.963	3.238	1.462

重金属含量分配比例表现出不同的变化趋势:10 mg/L Cu 处理时,活性重金属分配比例升高,10 ~ 160 mg/L Cu 处理时,活性重金属分配比例下降。这说明低质量浓度的 Cu 处理促进玉米幼苗地上部分中的 Cu 向活性较强的形态转移,高质量浓度的 Cu 处理促进 Cu 向活性较弱的形态转移。过量的 Cu 有可能与可溶态有机化合物如蛋白质、多肽、氨基酸和有机酸等结合并被储存在液泡中,减轻游离 Cu 对细胞原生质的伤害。

表 3 玉米幼苗地上部分各形态 Cu 分配比例

Table 3 Distribution ratio of various forms of Cu^{2+} in the shoots of maize seedlings

$\rho_{\text{Cu}} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Cu 分配比例/%				
	E	W	NaCl	HAc	HCl
5	27.73	16.82	14.31	22.54	18.60
10	34.98	19.87	17.27	12.76	17.12
20	25.85	22.19	11.98	19.92	20.05
40	25.71	25.26	9.85	22.94	16.23
80	27.15	27.29	10.01	23.93	11.63
160	12.92	33.93	9.04	30.39	13.72

3 结论

(1)随着 Cu 质量浓度的增大,玉米幼苗植物鲜重逐渐下降,叶片失绿变黄,叶片面积变小,并且在 160 mg/L Cu 处理时,玉米植株甚至开始枯萎;Cu 处理还会使根短、粗,根尖变褐。Cu 处理对苗期玉米有较强的生长抑制效应且引起肉眼可见的生理伤害。

(2)随着 Cu 质量浓度的升高, H_2O_2 含量、丙二醛含量、SOD 活性及 POD 活性均表现出逐渐增高的趋势,CAT 活性表现出先升高后降低的趋势。苗期

玉米在 Cu 处理作用下的毒性作用机制之一是引起了体内的氧化胁迫,导致生理代谢失调。

(3) 低质量浓度的 Cu 处理促进玉米幼苗地上部分中的 Cu 向活性较强的形态转移,高质量浓度的 Cu 处理促进 Cu 向活性较弱的形态转移。苗期玉米抵抗 Cu 毒性的机制之一是通过一定的体内结合机制降低 Cu 在体内的移动性以及 Cu 对原生质体的伤害,减轻 Cu 污染的危害。

参考文献:

- [1] 李庚飞. 某矿区附近不同作物对 3 种重金属富集能力的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(26): 257-261.
Li G F. Study on the concentration capacity to three kinds of heavy metals for different crops around the gold area [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(26): 257-261. (in Chinese)
- [2] 白田田, 夏保强, 王昆, 等. 提案称我国 16% 耕地重金属污染 粮食安全引担忧[EB/OL]. (2013-03-12) [2013-05-28]. http://www.farmer.com.cn/xwpd/jjsn/201303/t20130312_818497.htm.
Bai T T, Xia B Q, Wang K, et al. Proposal called that 16% farmed have been polluted by heavy metal in China, so food security gets concerns[EB/OL]. (2013-03-12) [2013-05-28]. http://www.farmer.com.cn/xwpd/jjsn/201303/t20130312_818497.htm. (in Chinese)
- [3] 陈贵英, 李维, 陈顺德, 等. 环境铜污染影响及修复的研究现状综述[J]. 绿色科技, 2011(12): 125-128.
Chen G Y, Li W, Chen S D, et al. Research advances of the effects of environmental copper pollution and bioremediation of Cu-contaminated soil[J]. Journal of Green Science and Technology, 2011(12): 125-128. (in Chinese)
- [4] 张红晓, 张芬琴. 铜在植物细胞中的运输和分布[J]. 洛阳理工学院学报: 自然科学版, 2011, 21(3): 3-5.
Zhang H X, Zhang F Q. Copper delivery and distribution in plant cells[J]. Journal of Luoyang Institute of Science and Technology: Natural Science Edition, 2011, 21(3): 3-5. (in Chinese)
- [5] Monnet F, Bordas F, Deluchat V, et al. Toxicity of copper excess on the lichen *Dermatocarpon luridum*: Antioxidant enzyme activities [J]. Chemosphere, 2006, 65: 1806-1813.
- [6] 黄真池, 彭舒, 欧阳乐军, 等. Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 对玉米幼苗生长和抗氧化酶活性的影响[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(1): 37-42.
Huang Z C, Peng S, Ouyang L J, et al. Effects of Cu^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} on the antioxidant enzyme activities of maize seedlings[J]. Journal of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2012, 40(1): 37-42. (in Chinese)
- [7] 努扎艾提·艾比布, 刘云国, 宋华晓, 等. 重金属 Zn Cu 对香根草生理生化指标的影响及其积累特性研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(1): 54-59.
Nuza'aiti A, Liu Y G, Song H X, et al. Effects of Zn and Cu on physiological and biochemical processes and their accumulation characteristics of vetiver[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(1): 54-59. (in Chinese)
- [8] 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.
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. (in Chinese)
- [9] 张红晓, 刘佳, 宋玉峰, 等. 海州香薷根系对铜胁迫的抗氧化响应[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 204-208.
Zhang H X, Liu J, Song Y F, et al. Antioxidant response of roots of *Elsholtzia haichowensis* under copper stress[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(27): 204-208. (in Chinese)
- [10] Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots [J]. Plant Physiology, 2001, 127: 887-898.
- [11] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2006: 68-75.
Chen J X, Wang X F. Plant physiology experimentation [M]. Guangzhou: South China Science and Engineering University Press, 2006: 68-75. (in Chinese)
- [12] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 76-77.
Zou Q. Plant physiology biochemistry experimentation [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 76-77. (in Chinese)
- [13] 许嘉琳, 鲍子平, 杨居荣, 等. 农作物体内铅、镉、铜的化学形态研究[J]. 应用生态学报, 1991, 2(3): 244-248.
Xu J L, Bao Z P, Yang J R, et al. Chemical forms of Pb, Cd and Cu incrops[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 1991, 2(3): 244-248. (in Chinese)
- [14] 曹玉伟, 马军, 郭长虹, 等. 植物彗星实验及其在生

- 态毒理监测中的应用[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(2): 183-189.
- Cao Y W, Ma J, Guo C H, et al. Plant comet assay and its application on environment pollution monitoring[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(2): 183-189. (in Chinese)
- [15] Khatun S, Ali M B, Hahn E J, et al. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants[J]. Environmental and Experimental Botany, 2008, 64(3): 279-285.
- [16] 杜海荣, 杨田甜, 吕荣芳, 等. 氟污染对玉米幼苗生长及生理特性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(2): 216-222.
- Du H R, Yang T T, Lv R F, et al. Effects of fluoride pollution on the growth and physiological characteristics of maize seedlings[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(2): 216-222. (in Chinese)
- [17] Elkahoui S, Hernández J A, Abdelly C, et al. Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells[J]. Plant Science, 2005, 168(3): 607-613.

Toxicity of copper to maize seedlings and its mechanism of action

XIONG Si LIN AiJun SONG Liang WEI LianShuang LI Qiang

(College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Hydroponics experiments were used to investigate the toxic effects of copper(II) on maize seedlings and the mechanism responsible. When treated with different concentrations of copper(II), the growth and the oxidative damage of maize seedlings was monitored and a sequential extraction technique was used to study the distribution of chemical forms of Cu^{2+} in the shoots of maize seedlings. The results showed that the growth inhibition of maize seedlings increased with increasing Cu^{2+} concentration and the presence of Cu^{2+} led to macroscopic scars. Copper(II)-induced stress leads to changes in enzyme activity in the antioxidant enzyme system of maize seedling blades. In the mass concentration range of Cu^{2+} employed (5 - 160 mg/L), the activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) increased and the activity of catalase (CAT) initially increased and then decreased with increasing Cu^{2+} concentration. Copper(II) also results in oxidative damage in the plants, and the content of malondialdehyde increased with increasing concentration of Cu^{2+} . The Cu^{2+} accumulated in maize seedlings in different chemical forms, and one of the main mechanisms to resist Cu^{2+} pollution is by decreasing the mobility of Cu^{2+} in plants by means of the binding mechanism.

Key words: plant toxicity; copper; morphological analysis