

锌对紫花苜蓿生理生化特性的影响及积累能力研究

代惠萍¹, 赵桦¹, 李军超², 刘鹏涛³, 赵利敏¹, 吴三桥¹

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100;

3. 全国农业技术推广服务中心, 北京 100125)

摘要:以紫花苜蓿为试材, 采用土培试验方法, 研究了重金属 Zn 胁迫对紫花苜蓿体内丙二醛含量、脯氨酸含量、可溶性糖含量和可溶性蛋白质含量的影响及紫花苜蓿对 Zn 的积累能力。结果表明: 胁迫 23 d 时, 随锌胁迫浓度的增加, 紫花苜蓿不同器官中丙二醛含量、脯氨酸含量、可溶性糖含量和可溶性蛋白质含量增加, 同时, 紫花苜蓿叶片的锌积累量大于茎和根系的积累量。综合研究表明, 在 900 μM Zn 胁迫下, 根据渗透调节物质的积累量, 可初步判断紫花苜蓿有解毒和积累锌的能力, 具有用于修复重金属 Zn 污染土壤的潜能。

关键词: 锌(Zn); 紫花苜蓿; 生理生化; 积累

中图分类号: S 551⁺. 7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2014)10-0050-04

随着土壤重金属污染问题越来越突出, 重金属在土壤-植物系统中的迁移转化引起了国内外研究者关注^[1-4]。锌(Zn)是植物生长发育所必需的微量营养元素之一, 不但参与植物生长素代谢、碳水化合物转化, 还能够促进抗氧化酶合成、促进生殖器官发育和提高作物抗逆性、改善品质等。基质中若缺乏 Zn, 植物便不能正常生长或生长不良^[5-8]。同时, Zn 又是一种有毒的重金属元素, 当基质中 Zn 含量过高时, 会激发一系列抑制植物生长的反应, 干扰光合作用和呼吸系统, 刺激次级代谢。徐卫红等^[9]和李文一等^[10]对黑麦草的研究表明, Zn 浓度为 8 mmol/kg 时, 黑麦草出现中毒症状, 叶片皱缩、叶色变暗、叶缘焦枯、植株矮化、成熟延迟。研究植物对土壤环境中 Zn 的生理生化响应对于正确评价土壤 Zn 污染水平、食品安全和人类健康都具有极其重要的意义。

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.) 属豆科蝶形花亚科苜蓿属多年生草本植物, 是世界上分布最广的豆科牧草, 具有“牧草之王”的美誉。目前, 紫花苜蓿对 Zn 的耐受性以及在其体内的积累尚不清楚。现以紫花苜蓿为试材, 研究 Zn 胁迫下对生理生化指标的变化规律及 Zn 在其体内的分布和积累情况, 探讨 Zn 胁迫对紫花苜蓿幼苗生长的毒害作用及其作用机理, 以期对紫花苜蓿的

重金属抗性机制和利用紫花苜蓿修复重金属污染土壤提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试苜蓿品种“敖汉”为陕西主栽品种。

1.2 试验方法

试验于 2013 年 3 月在陕西理工学院生物科学与工程学院植物学实验室进行。选取饱满、无病虫害的苜蓿种子, 用 0.1% 的 HgCl_2 消毒 10 min, 以质量比为 1:1 的蛭石和草炭为栽培基质, 用 Hoagland 作为营养液在阳光充足的不透明盆内培养。苜蓿幼苗生长 2 个月后, 选生长一致的幼苗, 向盆内加入 ZnSO_4 , 使 Zn 质量浓度分别达到 0、300、600、900 μM 。每个处理 6 次重复。溶液 pH 值用 NaOH 或 HCl 调至 6.5。胁迫 23 d 时进行收获, 每个处理收获 6 株。

1.3 项目测定

1.3.1 生物量的测定 在胁迫 23 d 时收获, 每个处理收获 6 株, 测量株高、根长及鲜重, 将叶、茎和根 3 个器官分开。

1.3.2 Zn 含量的测定 采用火焰原子分光光度法。将液氮下储存的紫花苜蓿根、茎、叶 3 个器官的粉末分别称取 20 mg 放入三角瓶中, 加入浓硫酸 7 mL、高氯酸 1.5 mL 在消解炉上消化, 用加热的蒸馏水将三角瓶中残留的物质缓慢涮洗入 10 mL 容量瓶中, 冷却后定容, 采用原子吸收分光光度计测定, 计算根、茎和叶吸 Zn 含量^[11]。

1.3.3 丙二醛、可溶性糖、可溶性蛋白质和脯氨酸含量的测定 采用硫代巴比妥酸(TBA)法稍作改进测定丙

第一作者简介: 代惠萍(1972-), 女, 陕西武功人, 博士, 讲师, 硕士生导师, 现主要从事逆境生理及分子学等教学与科研工作。E-mail: daihp72@aliyun.com.

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目(2013JQ3015); 陕西理工学院人才启动资助项目(SLGQD13-16)。

收稿日期: 2014-01-16

二醛含量;采用蒽酮比色法测定可溶性糖含量;脯氨酸含量测定按照汤章城^[12]的方法;采用考马斯亮蓝-250 蛋白染色法测定可溶性蛋白质含量^[13]。

1.4 数据分析

所有数据均采用重复平均值计算,采用统计软件 SPSS 12 进行统计分析。One-Way ANOVA 方差分析比较不同处理间各项指标的差异,通过 LSD 法进行差异显著性($P<0.05$)分析。

2 结果与分析

2.1 锌胁迫对紫花苜蓿不同器官中 Zn 积累量的影响

由图 1 可知,随着 Zn 处理浓度的升高,各器官的 Zn 含量呈现先升高后降低又升高的变化趋势。Zn 胁迫 23 d 时,在 300、600、900 μM 浓度下,叶片的 Zn 积累量比 CK 增加 2.07~3.85 倍,茎的 Zn 积累量比 CK 增加 0.73~1.66 倍,根的 Zn 积累量比 CK 增加 0.98~2.37 倍,不同器官的 Zn 积累量均显著高于对照。在 900 μM Zn 胁迫下,紫花苜蓿不同器官 Zn 积累量为叶>根>茎,差异显著($P<0.05$)。

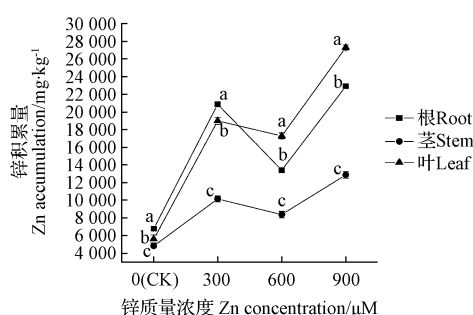


图 1 锌胁迫对紫花苜蓿不同器官锌积累的影响

注:同一品种不同字母表示达 0.05 差异显著水平。下同。

Fig. 1 Effect of different Zn stress on Zn accumulation in different organs of *Medicago sativa* L.

Note: Different letters in same date mean significant difference at 0.05 level (LSR method). The same below.

2.2 Zn 胁迫对 MDA 含量的影响

从图 2 可知,随着 Zn 胁迫浓度升高和胁迫时间的延长,紫花苜蓿的不同器官的 MDA 含量均呈上升趋势,胁迫 23 d 时,在 300、600、900 μM 的 Zn 胁迫下,叶片的 MDA 含量分别比 CK 增加 0.41、1.12、1.18 倍,茎的 MDA 含量分别比 CK 增加 25.8%、53.5%、81.8%,根的 MDA 含量分别比 CK 增加 10.5%、36.8%、73.7%。表明 Zn 毒害引起紫花苜蓿产生了氧化胁迫,氧化损伤随 Zn 胁迫浓度的增加而加强。在 900 μM Zn 胁迫下,不同器官 MDA 含量由大到小依次为茎>叶>根。

2.3 Zn 胁迫对紫花苜蓿渗透调节物质的影响

从图 3A 可知,随着 Zn 胁迫浓度升高,紫花苜蓿的不同器官中可溶性蛋白质含量均呈增加趋势。Zn 胁迫

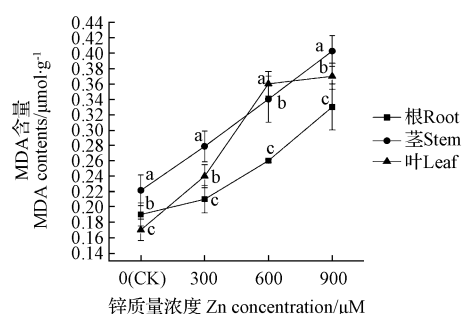


图 2 锌胁迫对紫花苜蓿不同器官 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effect of different Zn stress on MDA content in different organs of *Medicago sativa* L.

23 d 时,在 300、600、900 μM 的 Zn 胁迫下,紫花苜蓿叶中可溶性蛋白质含量分别比 CK 增加 0.95、4.79、6.88 倍,茎中可溶性蛋白质含量分别比 CK 增加 0.89、2.05、3.37 倍,根中可溶性蛋白质含量分别比 CK 增加 0.44、0.96、1.50 倍,在 900 μM Zn 胁迫下,不同器官可溶性蛋白质含量由大到小依次为根>叶>茎,但差异不显著。可溶性蛋白质含量反映了生物体细胞代谢酶的变化,在不同浓度 Zn 胁迫下,紫花苜蓿体内为适应 Zn 胁迫可能诱导了蛋白质的合成,因此表现出可溶性蛋白质含量升高。

从图 3B 可知,随着 Zn 胁迫浓度增加,紫花苜蓿不同器官中脯氨酸含量均呈上升趋势。到 23 d 时,在 300、600、900 μM 的 Zn 胁迫下,叶的脯氨酸含量分别比 CK 增加 14.8%、38.7%、196.6%,茎的脯氨酸含量分别比 CK 增加 3.0%、40.2%、112.5%,根的脯氨酸含量分别比 CK 增加 10.4%、27.4%、41.6%。在 900 μM Zn 胁迫下,不同器官脯氨酸含量由大到小依次为根>茎>叶。逆境条件下,紫花苜蓿体内脯氨酸含量的上升可视为植物的保护性反应。脯氨酸作为重要的渗透调节物质,它的积累有着对逆境适应的意义,因而认为脯氨酸含量的提高可能也是紫花苜蓿耐 Zn 机制之一。

从图 3C 可知,随着 Zn 胁迫浓度增加,紫花苜蓿的叶片和茎中可溶性糖含量均呈增加趋势,而根系中的可溶性糖含量增加不显著。Zn 胁迫 23 d 时,各浓度间不同器官中的可溶性糖含量均高于 CK,在 300、600、900 μM 的 Zn 胁迫下,叶的可溶性糖含量分别比 CK 增加 13.2%、37.0%、63.7%,茎的可溶性糖含量分别比 CK 增加 18.9%、39.2%和 54.1%,根的可溶性糖含量分别比 CK 增加 23.6%、47.8%、63.5%。在 900 μM Zn 胁迫下,不同器官可溶性糖含量大小为:叶>茎>根,且差异显著($P<0.05$)。

3 结论与讨论

在重金属胁迫下,植物形成了受遗传性制约的适应机制,活性氧代谢在其中占据重要地位,是植物对逆境

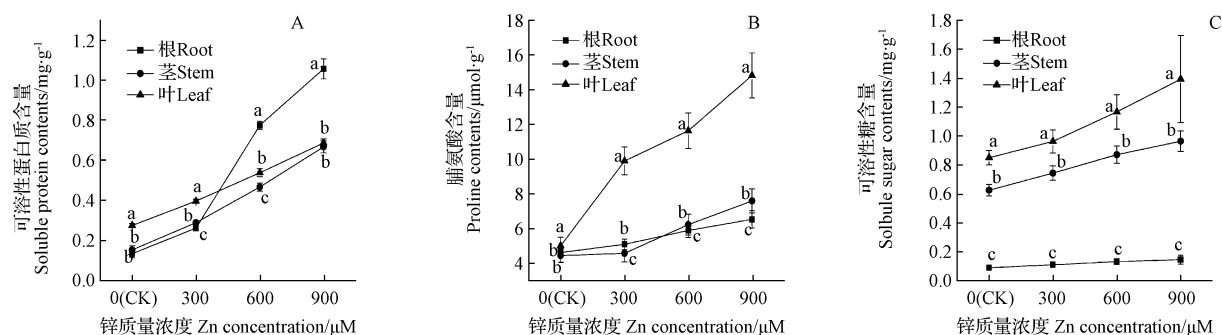


图3 Zn胁迫对紫花苜蓿不同器官可溶性蛋白质、脯氨酸和可溶性糖含量的影响

Fig. 3 Effect of different Zn stress on the soluble protein content, proline content and soluble sugar content in different organs of *Medicago sativa* L.

产生和清除处于动态平衡状态;逆境胁迫下,细胞内活性氧产生与清除之间的平衡遭到破坏,导致氧自由基的大量积累,从而引发膜脂过氧化,其最终产物MDA含量的高低通常用来表示膜脂过氧化水平。该试验中,随Zn处理浓度的增加,紫花苜蓿不同器官中MDA含量逐渐增加,此结果与徐春丽等^[14]研究结论一致。

近年来研究表明,重金属对植物体产生毒性的生物学途径可能有两方面:一是大量的重金属离子进入植物内,干扰了离子间原有的平衡系统,造成正常离子的吸收、运输、渗透和调节等方面的障碍,从而使代谢过程紊乱;二是较多的重金属离子进入植物体内后,不仅与核酸、蛋白质和酶等大分子物质结合,而且还可取代某些酶和蛋白质行使其功能时所必需的特定元素,使其变性或活性降低^[15]。该试验中,随着锌浓度的增加,紫花苜蓿的不同器官可溶性蛋白质含量呈升高趋势。Zn作为一种逆境条件促进了蛋白质的合成。随着Zn胁迫的不断加重,紫花苜蓿体内的脯氨酸含量和可溶性糖含量呈增加趋势,可能是较高浓度的锌与蛋白质等大分子物质结合使其变性,而后紫花苜蓿通过提高体内可溶性糖含量、脯氨酸含量来提高细胞渗透势和功能蛋白的数量,有助于维持细胞正常代谢来提高对Zn胁迫的适应性。

参考文献

[1] Dai H P, Wei Y, Zhang Y Z, et al. Influence of photosynthesis and chlorophyll synthesis on Cd accumulation in *Populus × canescens* [J]. Journal of Food, Agriculture & Environment, 2012, 10(1): 1020-1023.
[2] Dai H P, Shan C J, Lu C, et al. Response of antioxidant enzymes in *Populus × canescens* under cadmium stress [J]. Pakistan Journal of Botany,

2012, 44(6): 1943-1949.

[3] Chang J, Yoon I, Kim K W. Heavy metal and arsenic accumulating fern species as potential ecological indicators in As-contaminated abandoned mines [J]. Ecological Indicators, 2009(9): 1275-1279.
[4] Broadley M R, White P J, Hammond J P, et al. Zinc in plants [J]. New Phytologist, 2007, 173: 677-702.
[5] 刘娣, 刘爱红, 王金花, 等. 缺锌苹果树有机酸与锌吸收分配的关系 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3381-3391.
[6] Emily H. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2004(15): 572-578.
[7] 杨红飞, 王友保, 李建龙. 铜、锌污染对水稻土中油菜 (*Brassica chinensis* L.) 生长的影响及累积效应研究 [J]. 生态环境学报, 2011, 20(10): 1470-1477.
[8] Pinton R, Cakmak I, Marschner H. Effect of zinc deficiency on proton fluxes in plasma membrane-enriched vesicles isolated from bean roots [J]. Journal of Experimental Botany, 1993, 44(3): 623-630.
[9] 徐卫红, 熊治庭, 王宏信, 等. 锌胁迫对重金属富集植物黑麦草养分吸收和锌积累的影响 [J]. 水土保持学报, 2005, 19(4): 32-43.
[10] 李文一, 徐卫红, 胡小凤, 等. Zn胁迫对黑麦草幼苗生长、生理生化及Zn吸收的影响 [J]. 农业工程学报, 2007, 23(5): 190-194.
[11] 代惠萍. 植物对非生物胁迫的生理响应机制 [M]. 成都: 西南交通大学出版社, 2013.
[12] 汤章城. 现代植物生理学实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 305-306.
[13] 邹琦. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 161-162.
[14] 徐春丽, 肖家欣, 齐笑笑, 等. 锌胁迫对“不知火”和“椪柑”的生理指标及锌分布的影响 [J]. 生态学杂志, 2010, 29(2): 319-323.
[15] 张义贤. 重金属对大麦 (*Hordeum vulgare*) 毒性的研究 [J]. 环境科学学报, 1997, 17(2): 199-205.

Effects of Zn on the Physiological and Biochemical Characteristics and Accumulation Abilities of *Medicago sativa* L.

DAI Hui-ping¹, ZHAO Hua¹, LI Jun-chao², LIU Peng-tao³, ZHAO Li-min¹, WU San-qiao¹

(1. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100; 3. National Agricultural Technology Extension Center, Beijing 100125)

小叶罗汉松一年生幼苗根瘤形态与解剖构造的观察

招礼军, 朱栗琼, 黄宝灵, 文祥凤, 韦立秀, 孙基伦

(广西大学 林学院, 广西 南宁 530004)

摘要:以小叶罗汉松为试材, 观察研究了一年生幼苗所结根瘤的形态和显微解剖构造, 以了解小叶罗汉松根瘤的特征。结果表明: 小叶罗汉松根瘤在形态上有圆球形、圆锥形、马鞍状、串珠状及不规则形态等; 在构造上存在有限型和无限型 2 种根瘤; 与其共生的微生物有根瘤菌、Frankia 放线菌及真菌; 研究发现小叶罗汉松根瘤在形态、解剖构造的类型及其与之共生的微生物等均呈现多样性。

关键词:小叶罗汉松; 根瘤; 形态; 解剖特征; 多样性

中图分类号:S 791.46 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)10-0053-03

小叶罗汉松(*Podocarpus brevifolius* (Stapf) Foxw) 属罗汉松科(Podocarpaceae)罗汉松属植物, 也称为短叶罗汉松、珍珠罗汉松, 因其独特的造型, 观赏价值极高, 在园林绿化及盆景制作上具有广泛的应用前景。目前关于小叶罗汉松的研究主要集中在栽培技术、盆景制作方法等方面^[1-2], 其枝叶中含有抗肿瘤活性物质也受到医药界的关注^[3]。但对小叶罗汉松有关生物学和生态学方面的研究很少, 特别是对该树种的根际微生物及其共生体的研究尚鲜见报道。长期以来, 豆科植物与根瘤菌、木本双子叶植物与 Frankia 放线菌共生结瘤已成为共识, 也有研究发现非豆科的木本双子叶植物可以和根瘤菌共生结瘤形成固氮体系^[4-5]。在裸子植物中, 罗汉松属(*Podocarpus*)植物结瘤和形成菌根是普遍现象^[6-7], 一般认为罗汉松属的结瘤菌属于 Frankia 放线菌^[8]; 而黄宝灵等^[9]发现了几种罗汉松属植物的根瘤在形态与结构上与豆科植物的根瘤有许多相似之处, 并从罗汉松

根瘤中分离出了根瘤菌^[10], 由此推测罗汉松属植物可以同时与多种微生物形成共生体。该研究从小叶罗汉松根际共生体的形态和解剖构造着手, 以期为进一步揭示裸子植物复杂的共生体更多的特性提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为于 2012 年 11 月中旬在广西大学校园内随机选取绿化用成年小叶罗汉松 3 株, 在每株树下随机选择一年生幼苗各 5 株, 挖掘并用蒸馏水清洗干净根系, 置于装有蒸馏水的锥形瓶中, 带回室内供观察解剖和研究。

1.2 试验方法

制片采用徒手切片, 分别对苗木的各级侧根及根瘤进行横切和纵切制片, 蒸馏水装片。将制片置于 Nikon E100 数码显微镜下观察和照像。

2 结果与分析

2.1 小叶罗汉松幼根及根瘤的形态特征

野生一年生小叶罗汉松幼根为直根系, 主根发达但弯曲不直, 淡棕色。一级侧根较多, 大部分较整齐地呈二列状排列, 少数侧根上已长出二级侧根。侧根均较粗壮, 所有根尖呈弯曲状, 无根毛, 但几乎全部覆盖有一层

第一作者简介:招礼军(1970-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事树木生理生态等研究工作。E-mail: zhlj-70@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170033); 广西自然科学基金资助项目(2013GXNSFAA019063)。

收稿日期:2014-01-15

Abstract: Taking *Medicago sativa* L. as material, the effect of Zinc (Zn) on the proline content, malondialdehyde(MDA) content, soluble protein content and soluble sugar content of *Medicago sativa* L. and its accumulation abilities of Zn were measured and analyzed using the soil potted culture experiment methods. The results showed that the contents of MDA, proline, soluble protein and soluble sugar significantly increased when the Zn stress increased to 900 μ M, compared to control (non-Zn), after 23 days Zn exposure, the accumulation contents of Zn in leaves were significantly higher than root and stem. Taken together, these results indicated that the *Medicago sativa* L. was a promising remedial potential for the high level of Zn contamination soil, it was the absorbing and accumulation function for Zn from the contaminated soil.

Key words: Zinc(Zn); *Medicago sativa* L.; physiological and biochemical; accumulation