

离子液体 1-己基-3-甲基咪唑溴化盐对萝卜幼苗的毒性以及水杨酸对其缓解效应研究

刘 萍, 王 添 乐, 丁 义 峰, 王 雪 瑞, 张 妍, 卢 芳

(河南师范大学 生命科学院, 河南 新乡 453007)

摘 要:以萝卜“新科原种 791”品种为试验材料,研究了不同浓度(0、50、100、150、200 mg/L)的离子液体 1-己基-3-甲基咪唑溴化盐($[C_6mim]Br$)对萝卜种子萌发和幼苗生长的影响,以及在不同浓度的离子液体溶液中均加入相同浓度(30 mg/L)的水杨酸(SA)对离子液体的影响进行缓解效应研究。结果表明:各浓度的离子液体处理均使萝卜种子发芽率以及幼苗的干鲜重比值降低,叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性和叶绿素含量下降,膜脂过氧化作用产物丙二醛(MDA)的含量升高。SA 能在一定程度上缓解 $[C_6mim]Br$ 对萝卜种子萌发与幼苗生长的毒害。

关键词:萝卜;离子液体;SA;毒性;缓解

中图分类号:S 631.104⁺.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0005-04

近年来离子液体被广泛应用于化学研究的各个领域,成为 21 世纪绿色化工的前沿热点^[1]。但研究表明,离子液体对藻类、微生物、动植物均有不同程度的生物毒性^[2-6]。虽然,离子液体对普通农作物的影响已有研究,但对于如何缓解离子液体造成的影响却鲜有报道。

水杨酸(SA)是苯丙氨酸代谢途径的产物,其参与植物抗逆反应的诱导过程,具有提高植物非生物抗逆性作用^[7-8]。据报道,SA 可以提高盐胁迫下玉米幼苗叶片 SOD 和 POD 的活性,防止 MDA 积累,降低质膜透性,从而缓解伤害^[9]。SA 对镉、铬、铅等重金属对莴苣、大豆等农作物种子萌发的胁迫也具有一定的缓解作用^[10-11]。

该试验以常见蔬菜萝卜为试材,研究了离子液体对其种子萌发和幼苗生长的影响,以及 SA 对离子液体环境中萝卜种子萌发和幼苗生长的作用。以期对离子液

体可能存在的农业生态风险进行初步评价,并为缓解离子液体造成的环境胁迫探索一定方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试萝卜(*Raphanus sativus* L.)“新科原种 791”品种种子由辽宁省新民市吉祥种苗有限公司生产。离子液体 1-己基-3-甲基咪唑溴化盐(1-hexyl-3-methylimidazolium bromide, $[C_6mim]Br$)由河南师范大学化学与环境科学学院提供。SA 及其它用于生理指标测定的试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 种子材料的表面消毒 将种子置于烧杯中,用 0.1% $HgCl_2$ 水溶液消毒 5 min 后,用去离子水将种子清洗 3 次。

1.2.2 浸种与催芽 处理组:将 $[C_6mim]Br$ 浓度设定为 50、100、150、200 mg/L,以去离子水为对照;缓解组:将 SA(30 mg/L)分别加入上述不同浓度的离子液体溶液中,以不加 SA 的各 $[C_6mim]Br$ 浓度处理组做对照。每

第一作者简介:刘萍(1958-),女,河南潢川人,教授,现主要从事植物生理学等教学与科研工作。E-mail:Liuping5812@sina.com.

基金项目:河南省重点科技攻关计划资助项目(122102310356)。

收稿日期:2014-11-25

method of calculating the accumulated germination rate, germination energy and germination index, etc. The results showed that different culture substrates had little effect on the germination rate, but had a certain effect on the length of the radicle, the order was sand > perlite and vermiculite each 50% > distilled water; the germination rate, germination energy and vigor index were the highest when the concentration of GA_3 was 50 mg/L, and the germination index had negative correlation with the concentration of GA_3 ; the germination rate had negative correlation with the concentration of PEG; the germination energy and the length of the radicle increased firstly and decreased later with the concentration increased of PEG; and they were the highest at the concentration of 2.5%.

Keywords: *Asparagus officinalis*; seeds; cultivation substrates; GA_3 ; PEG; sprouting character

个培养皿中分别加入上述各溶液 16 mL, 摆放 100 粒种子, 于 28℃ 暗恒温 3~4 d。每处理浓度重复 3 次以减小误差, 每天更换处理液以防液体浓度变化。

1.2.3 水培 当种子萌发, 胚根长度长至 5 cm 左右时, 将长势一致的幼苗转入培养缸中, 在 28℃/16h 光、24℃/8h 暗, 光量子数 70~80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的条件下进行培养, 每天更换培养液以防液体浓度变化。当幼苗长出第 2 对真叶时进行各项生理指标的测定。

1.3 项目测定

种子发芽率参考国家标准^[12], 于萌发的第 7 天进行计算; 苗长采用直接测量法; 干鲜比采用自然含水量法^[13]; SOD 活性采用氮蓝四唑法^[13]测定; POD 活性采用愈创木酚比色法^[14]测定; 叶绿素含量采用分光光度法^[13,15]测定; MDA 含量用硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定^[15-16]。

1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理分析。“++”代表 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 处理与 0 mg/L 相比具极显著性差异 ($P < 0.01$), “+”代表 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 处理与 0 mg/L 相比有显著性差异 ($P < 0.05$); “**”代表 SA 缓解组与相应浓度的 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 处理相比具极显著性差异 ($P < 0.01$), “*”代表 SA 缓解组与相应浓度的 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 处理相比具显著性差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 对萝卜种子发芽率的影响及 SA 的缓解作用

图 1 显示, 萝卜种子的发芽率随着 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 处理浓度的增加而下降。当 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 处理浓度为 150 mg/L 和 200 mg/L 时, 种子的发芽率分别与 0 mg/L 相比下降了 28.68% 和 30.88%, 均达到了显著性差异水平。在不同浓度的 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 中加入 30 mg/L 的 SA 后, 对萝卜种子发芽率的降低均有一定的缓解作用, 种子发芽率分别比各自浓度的 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 单独处理提高了 1.47%、1.49%、0.81%、4.12%、5.32%, 但均未达到显著性差异水平。

2.2 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 对萝卜幼苗干鲜重比值的影响及 SA 的缓解作用

由图 2 可知, 低浓度的 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 处理对萝卜幼苗的干鲜重比值影响不明显, 但浓度在 100 mg/L 及其以上时则有较为明显的降低, 其中 150、200 mg/L 达到极显著性差异水平。SA 缓解的各组幼苗干鲜重比值均比各处理组有所增加, 其中 0、50、100、150 mg/L 缓解组的升幅分别为 48.81%、50.59%、51.03% 和 28.14%, 均达到极显著性差异水平。200 mg/L 缓解组达到显著性差异水平。

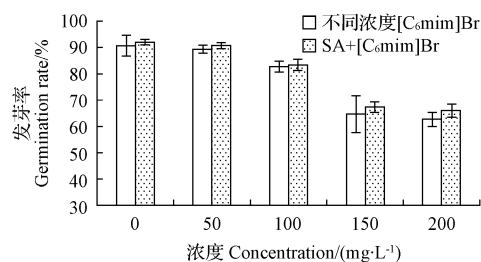


图 1 不同浓度的 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 对萝卜种子发芽率的影响以及 SA 的缓解效应

Fig. 1 Effect of different concentrations $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ on the germination rate of radish seeds and the mitigation of SA

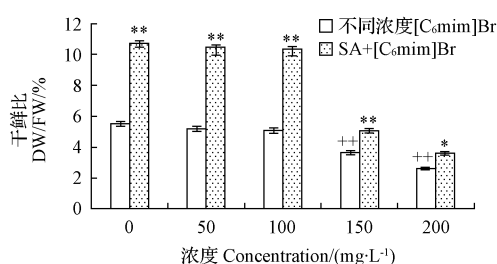


图 2 不同浓度的 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 对萝卜幼苗干鲜比的影响以及 SA 的缓解效应

Fig. 2 Effect of different concentrations $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ on DW/FW of radish seedlings and the mitigation of SA

2.3 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 对萝卜幼苗叶片叶绿素含量的影响及 SA 的缓解作用

图 3 结果表明, 随着 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 处理浓度的增加, 萝卜幼苗叶片中叶绿素含量逐渐下降, 当 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 处理浓度 ≥ 150 mg/L 时降低加速。与 0 mg/L 相比, 各处理组叶片中叶绿素含量分别降低了 26.61%、35.46%、89.99% 和 90.23%, 均达到极显著差异水平。SA 对各浓度 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 的影响均有缓解作用, 在 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 为 50 mg/L 以下时, 叶片中叶绿素含量分别提高了 41.01%、39.18%, 达到极显著性差异水平。在 100 mg/L 时提高了

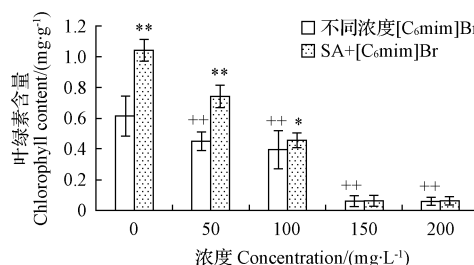


图 3 不同浓度 $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ 对萝卜幼苗叶片叶绿素含量的影响及 SA 的缓解作用

Fig. 3 Effect of different concentrations $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Br}$ on the chlorophyll content of radish seedlings leaves and the mitigation of SA

13.24%,达到了显著性差异水平。但当 $[C_6mim]Br$ 处理浓度 ≥ 150 mg/L时,缓解效果不明显,仅提高了2.92%和5.12%,未达到显著性差异水平。

2.4 $[C_6mim]Br$ 对萝卜幼苗叶片SOD活性的影响及SA的缓解作用

由图4可知,萝卜幼苗叶片中SOD活性随着 $[C_6mim]Br$ 处理浓度的增加而下降。与0 mg/L相比,各处理组SOD活性依次比对照下降4.31%、11.15%、17.19%和20.02%,在 $[C_6mim]Br$ 处理浓度为100 mg/L时达到显著性差异水平,在150 mg/L和200 mg/L时达到极显著性差异水平。30 mg/L的SA对各浓度 $[C_6mim]Br$ 的影响均有缓解作用,SOD活性比各处理组分别提高7.44%、2.05%、6.25%、11.67%和4.75%,其中对150 mg/L处理组的缓解达到显著性差异水平。

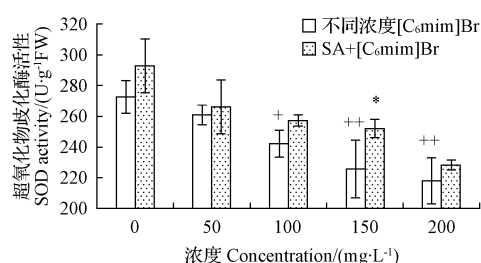


图4 不同浓度 $[C_6mim]Br$ 对萝卜幼苗叶片SOD活性的影响以及SA的缓解效应

Fig. 4 Effect of different concentrations $[C_6mim]Br$ on SOD activity of radish seedling leaves and the mitigation of SA

2.5 $[C_6mim]Br$ 对萝卜幼苗叶片POD活性的影响及SA的缓解作用

图5结果表明,萝卜幼苗叶片中POD活性随着 $[C_6mim]Br$ 处理浓度的增加而下降,至 $[C_6mim]Br$ 浓度达到200 mg/L时,酶活性已接近0。与0 mg/L相比,各处理组POD活性分别比对照下降了9.99%、60.01%、92.89%、96.19%。其中100、150、200 mg/L处理组达到了极显著性差异水平。SA缓解的各组均比各处理组酶活性有提高,提高幅度分别为30.00%、22.22%、100.00%、197.18%和431.57%,其中在 $[C_6mim]Br$ 100、150、200 mg/L时达到极显著差异水平。

2.6 $[C_6mim]Br$ 对萝卜幼苗叶片MDA积累的影响及SA的缓解作用

图6显示,随着 $[C_6mim]Br$ 处理浓度的增加,萝卜幼苗叶片中MDA的含量逐步升高,当 $[C_6mim]Br$ 处理浓度 ≥ 100 mg/L时升高加速,至 $[C_6mim]Br$ 处理浓度为200 mg/L时,叶片中MDA含量与0 mg/L相比升高了128%,达到极显著性差异水平。SA各缓解组叶片中MDA含量均低于相应的处理组,但均未达到显著性差异水平。

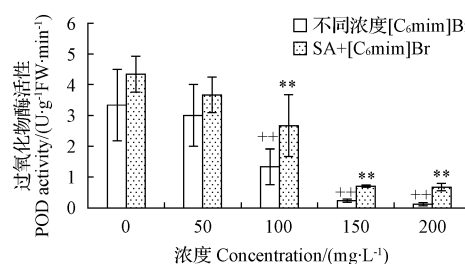


图5 不同浓度 $[C_6mim]Br$ 对萝卜幼苗叶片POD活性的影响及SA的缓解作用

Fig. 5 Effect of different concentrations $[C_6mim]Br$ on POD activity of radish seedling leaves and the mitigation of SA

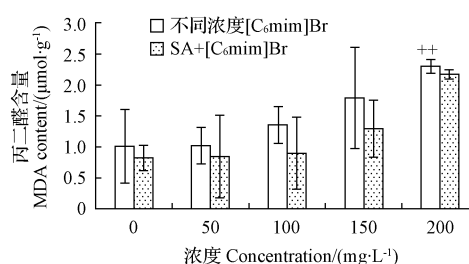


图6 不同浓度 $[C_6mim]Br$ 对萝卜幼苗叶片MDA含量的影响及SA的缓解作用

Fig. 6 Effect of different concentrations $[C_6mim]Br$ on MDA content of radish seedlings leaves and the mitigation of SA

3 讨论

近年来研究已表明,咪唑类离子液体对植物均有一定的毒性^[17]。然而,不同离子液体对不同植物产生的生理影响却各不相同^[18-19]。该研究结果显示,离子液体 $[C_6mim]Br$ 在低浓度时对萝卜种子萌发及幼苗生长的影响不明显,但浓度在100 mg/L及其以上时,则有较为明显的毒害作用。这与杨芬芬等^[20]对黄瓜、玉米和白菜的研究结果类似。研究结果中萝卜叶片的主要保护酶SOD、POD活性迅速下降,叶绿素含量明显减少,MDA大量积累,该结果与陈忠林等^[21]对小麦的研究报道也相似。已有研究表明(咪唑、季胺、吡啶等)离子液体的急性生态毒性远高于甲醇、乙腈等有机溶剂^[22-23]。因此,对离子液体的应用应谨慎,以免可能对环境造成的伤害。

为了寻求应对离子液体污染的有效方法,该研究尝试以一定浓度的SA进行缓解。SA是植物本身的代谢产物,在一定的浓度范围内对植物无害,并可促进种子萌发,增强幼苗渗透调节能力,提高细胞保护酶活性,抑制脂膜过氧化作用,降低盐分胁迫对细胞膜伤害^[24-26]。该研究结果显示,在未处理离子液体的对照组中加入SA即可使萝卜种子萌发率增加,幼苗的生长及生理活动加强,这证明SA对正常条件下植物的生长与生理都具有积极的调节作用。在每个浓度的离子液处理组中加

入 30 mg/L 的 SA 与离子液体单独处理相比,均可降低由不同浓度离子液体处理对萝卜种子萌发、幼苗生长和幼苗叶片生理的负面影响,证明 SA 对离子液体引起的化学伤害有较好的缓解或修复作用,其中对萝卜幼苗叶片中 SOD、POD 活性以及叶绿素含量下降作用的缓解效果较为显著,叶片细胞的脂膜过氧化作用也得到有效缓解。

(该文作者还有吕保鹤,单位同第一作者。)

参考文献

- [1] Pernak J, Goc I, Mirska I. Anti-microbial activities of protic liquids with lactate anion[J]. *Green Chemistry*, 2004, 6(7): 323-329.
- [2] Ranke J, Mölter K, Stock F, et al. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 58(3): 396-404.
- [3] Skladanowski A C, Stepnowski P, Kleszczyński K, et al. AMP deaminase *in vitro* inhibition by xenobiotics. A potential molecular method for risk assessment of synthetic nitro- and polycyclic musks, imidazolium ionic liquids and N-glucopyranosyl ammonium salts[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005, 19(2): 291-296.
- [4] Stepnowski P, Skladanowski A C, Ludwiczak A, et al. Evaluating the cytotoxicity of ionic liquids using human cell line HeLa[J]. *Human and Experimental Toxicology*, 2004, 23(11): 513-517.
- [5] Stock F, Hoffman J, Ranke J, et al. Effects of ionic liquids on the acetylcholinesterase a structure-activity relationship consideration[J]. *Green Chemistry*, 2004, 6(6): 286-290.
- [6] Couling D J, Bernot R J, Docherty K M, et al. Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure-property relationship modeling[J]. *Green Chemistry*, 2006, 8(1): 82-90.
- [7] 任非, 张荣佳. ABA 和 SA 对于提高植物抗旱及抗盐性的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2012(3): 17-20.
- [8] Shakirova F M, Sakhabutdinova A R, Bezrukova M V, et al. Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity[J]. *Plant Sci*, 2003, 164: 317-322.
- [9] 时丽冉, 杜军华. 水杨酸对盐害下玉米幼苗脂膜稳定性及 K^+/Na^+ 比的影响[J]. *青海师范大学学报(自然科学版)*, 2001(1): 50-52.
- [10] 任艳芳, 何俊瑜. 外源水杨酸对镉毒害下莴苣种子萌发的缓解效应[J]. *华北农学报*, 2009(24): 121-125.
- [11] 徐芬芬, 邓接楼. 水杨酸对胁迫下大豆种子萌发的影响[J]. *大豆科学*, 2012, 31(5): 852-854.
- [12] 中华人民共和国国家标准 GB/T 3543-1995. 农作物种子检验规程[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [13] 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: 105-109, 134-137, 167-169.
- [14] 刘萍, 李明军. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 123-125.
- [15] 张志良, 翟伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 67-70, 274-276.
- [16] 宋纯鹏, 梅慧生, 储钟稀, 等. Ga^{2+} 对叶绿体中超氧自由基产生以及由 ACC 形成乙烯的影响[J]. *植物生理学报*, 1992, 18(1): 55-62.
- [17] Ding Y, Zhang L, Xie J, et al. Binding characteristics and molecular mechanism of interaction between ionic liquid and DNA[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114(5): 2033-2043.
- [18] Plechkova N V, Seddon K R. Applications of ionic liquids in the chemical industry[J]. *Chemistry Society Reviews*, 2008, 37(1): 123-150.
- [19] 王自春, 黄登宇, 袁静明. 二价金属离子对平阳霉素与 DNA 作用的影响[J]. *高等学校化学报*, 1995(3): 410-412.
- [20] 杨芬芬, 孟洪, 李春喜, 等. 离子液体对三种农作物发芽和生长的毒性研究[J]. *环境工程学报*, 2009, 3(4): 751-754.
- [21] 陈忠林, 王洋, 关伟, 等. 离子液体 $[C_2mim][Val]$ 对小麦幼苗生长及生理特性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(8): 1508-1513.
- [22] Wella A S, Coombe V T. On the freshwater ecotoxicity and biodegradation properties of some common ionic liquids[J]. *Org Process Res Dev*, 2006, 10: 794-798.
- [23] Bernot R J, Brueske M A, Evans-White M A, et al. Acute and chronic toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Daphnia magna*[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2005, 24: 87-92.
- [24] 付丽娟, 杜红豆, 王锐, 等. 喷施 SA 对黑麦草抗盐性的影响[J]. *北方园艺*, 2011(6): 68-71.
- [25] Raskin I. Role of salicylic acid in plant[J]. *Annu Rev Plants Physiol Plant Mol Biol*, 1992, 43: 439-463.
- [26] 池春玉. 喷施水杨酸缓解镉对黑麦草毒害作用的研究[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(19): 39-41.

Study on Ionic Liquid $[C_6mim]Br$ Toxicity with Radish Seedlings and the Mitigation of SA

LIU Ping, WANG Tian-le, DING Yi-feng, WANG Xue-rui, ZHANG Yan, LU Fang, LYU Bao-he
(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007)

Abstract: Using radish "Xinke Yuanzhong 791" as material, the influence of different concentrations (0, 50, 100, 150, 200 mg/L) of the ionic liquid $[C_6mim]Br$ on radish seed germination and seedling growth were studied. The same concentration (30 mg/L) of salicylic acid (SA) in each ionic liquid was added, in order to alleviate the toxicity of $[C_6mim]Br$. The results showed that all the concentrations of ionic liquids lowered the radish seed germination rate, and dropped the seedling leaf superoxide dismutase (SOD) activity, peroxidase (POD) activity, chlorophyll content, but raised membrane lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) content. However, SA to a certain extent, could alleviate $[C_6mim]Br$ toxicity of radish seed germination and seedling growth.

Keywords: radish; ionic liquid; SA; toxicity; mitigation