

高等植物内源激素与土壤荧蒽、苯并(a)芘污染诱导的剂量-效应关系

李秀颖^{1,2}, 宋玉芳^{1,3*}, 周启星^{1,3}, 孙铁珩^{1,3}

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 沈阳大学沈阳环境工程重点实验室, 沈阳 110041)

摘要:以小麦(*Triticum aestivum*)为供试植物, 草甸棕壤为供试土壤, 采用室内培养箱盆栽方法, 研究了荧蒽、苯并(a)芘单一及复合污染胁迫与小麦叶片中 3 种植物内源激素赤霉素(gibberellic acid, GA_3)、细胞分裂素类的玉米素及玉米素核苷总量(zeatin and zeatin riboside, Z&ZR)、脱落酸(abscisic acid, ABA)的污染诱导剂量-效应关系. 结果表明, 荧蒽单一及与苯并(a)芘复合污染胁迫对小麦体内 ABA 的合成有明显的诱导作用, 并且荧蒽单一污染的诱导作用较强, 当荧蒽浓度为 $16\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, ABA 含量比对照增加了 198%. 荧蒽、苯并(a)芘复合污染对 GA_3 的合成表现为明显的诱导抑制效应, 而 GA_3 对单一污染胁迫响应趋势不明显. 荧蒽、苯并(a)芘单一及复合污染胁迫对 Z&ZR 的合成均产生明显的诱导抑制效应. 本研究表明, 3 种内源激素对土壤低剂量多环芳烃污染指示具有重要作用, 其对荧蒽、苯并(a)芘单一及复合污染响应的敏感性顺序为: Z&ZR > ABA > GA_3 .

关键词: 土壤污染; 有机污染物; 植物激素; 小麦

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)06-1384-04

Dose-Response Relationships Between Endogenous Phytohormones of High Plant and Concentrations of Fluoranthene and Benzo(a)pyrene in Soils

LI Xiu-ying^{1,2}, SONG Yu-fang^{1,3}, ZHOU Qi-xing^{1,3}, SUN Tie-heng^{1,3}

(1. Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Graduated School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Environment Engineering, University of Shenyang, Shenyang 110041, China)

Abstract: By means of indoor pot experiment, three phytohormones, gibberellic acid (GA_3), zeatin and zeatin riboside (Z&ZR), abscisic acid (ABA) of wheat (*Triticum aestivum*) were measured under the stress of fluoranthene and benzo(a)pyrene in meadow brown soil singly and combinedly. The results indicated that significant dose-response relationship was observed between ABA contents and the concentrations of single fluoranthene and combined pollution of fluoranthene and benzo(a)pyrene, and ABA content responded more intensive to single fluoranthene than to combined treatment. When treated with $16\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ single fluoranthene, ABA content increased by 198% as compared with control. Significant effects on GA_3 content of combined treatment were also observed, but GA_3 responded insensitively to single fluoranthene and benzo(a)pyrene treatment. Z&ZR responded intensively under stress of both single and combined pollution, and the inducible effects were accordant. It can be concluded that endogenous phytohormones play an important role in indicating PAHs polluted soil, and the sensitivity of the three phytohormones responded to fluoranthene and benzo(a)pyrene single and combined pollution is in the sequence: Z&ZR > ABA > GA_3 .

Key words: soil polluted; organic pollutants; phytohormones; wheat (*Triticum aestivum*)

植物是土壤污染的直接受体之一. 在感受和传递环境因素的刺激, 协调植物正常生长发育过程中, 植物激素的作用最显著, 研究也最多^[1]. 随着环境污染问题研究的深入, 植物内源激素对环境污染胁迫的指示作用开始引起学者们的重视. 有些研究已经表明, 内源激素与植物抗逆性有关, 并且对植物抵御重金属胁迫发挥着重要的指示作用^[2~4]. 但是, 高等植物内源激素与环境中持久型有毒有害有机污染物污染响应关系研究鲜见报道^[2,6~8]. 多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)具有强疏水

性, 难降解, 易在土壤等环境介质中滞留和累积, 是典型的一类持久型有机污染物, 被列为美国环保局优先控制有机污染物^[9]. 农田土壤中残留的 PAHs 容易污染地下水和农作物, 甚至通过食物链危害人

收稿日期: 2006-08-04; 修订日期: 2006-10-17

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418503); 国家自然科学基金项目(20337010, 20577056)

作者简介: 李秀颖(1982~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为污染生态学, E-mail: mailxiuying@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: songyufang@iae.ac.cn

体健康,已经引起广泛关注,但是其污染诊断指标体系还有待完善^[10].内源激素对植物抗逆性的显著指示作用,有可能使其成为潜在的污染诊断生物指示物.

荧蒽(4环)和苯并(a)芘(5环)属多环芳烃类污染物,其中,苯并(a)芘更是作为致癌物的代表被广泛研究^[11~13].本研究选择赤霉素(GA₃)、细胞分裂素类的玉米素(Z)及玉米素核苷(ZR)总含量(Z&ZR)、脱落酸(ABA)为指标,通过测定土壤荧蒽、苯并(a)芘污染胁迫条件下小麦叶片中内源激素含量的变化,分析了植物内源激素与土壤中污染物浓度之间的剂量-效应关系,以期探讨以植物激素含量变化

作为土壤污染诊断指标的可行性提供基础依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料

荧蒽、苯并(a)芘均为分析纯,购于 Fluka 公司(瑞士),酶联免疫试剂盒购自中国农业大学.其它药品均为市购分析纯.供试土壤为 0~20 cm 草甸棕壤土,采自中国科学院沈阳生态实验站休耕地.供试土壤被挑除石砾和动植物残体后自然风干,研磨过 2 mm 筛备用.土壤理化性质(表 1)按常规方法进行测定^[14,15].小麦(*Triticum aestivum*)为辽春十,购自辽宁省农业科学院种子站.

表 1 供试土壤的理化性质
Table 1 Physical and chemical properties of test soils

土壤类型	全氮 /g•kg ⁻¹	全磷 /g•kg ⁻¹	全钾 /g•kg ⁻¹	有机质 /g•kg ⁻¹	阳离子交换量 /cmol•kg ⁻¹	pH	总荧蒽 /mg•kg ⁻¹	总苯并(a)芘 /mg•kg ⁻¹
草甸棕壤	0.91	0.42	1.83	16.58	12.36	6.22	0.037	ND

1.2 仪器设备及试验条件

低温超速离心机(日立 CP-80MX),光照培养箱(哈尔滨东联 HPG-280BX),氮气浓缩仪(北京来亨 L-128),酶联免疫分光光度计(荷兰 Thermo labsystems),恒温箱(哈尔滨东联 HPP-9082),塑料花盆(直径 10 cm,高 7.5 cm).

1.3 小麦培养

1.3.1 生长预试验

于 90 mm 直径玻璃培养皿中放置 2 层定性滤纸,用蒸馏水浸湿后,将小麦种子均匀放入其中,盖好玻璃培养皿,置于恒温培养箱中 25℃暗处培养.对照种子发芽率>90%(本试验发芽率 95%),试验结束,开始植物培养试验.

1.3.2 土壤染毒试验

将一定量的荧蒽、苯并(a)芘丙酮溶液均匀的加入到盛有 600g 风干土壤的容器中,搅拌均匀,放置在暗处过夜,直至丙酮挥发至干.配置获得几何级数的荧蒽、苯并(a)芘染毒土壤(1、2、4、8 和 16 mg•kg⁻¹).荧蒽、苯并(a)芘复合比例为 1:1.

1.3.3 小麦培养试验

称取 200 g 染毒土壤于塑料盆中.挑选籽粒饱满的小麦种子,经 2% H₂O₂ 表面消毒 5 min,用去离子水反复冲洗,再用滤纸吸干水分后,均匀播种于土壤中.每盆 15 粒种子.播种时保持种子的胚向下并且方向一致,调节土壤含水量为最大持水量的 60%,于光照培养箱中培养.每天光照 14 h,温度 23℃/18℃±1℃(光照/无光照),光照强度 11 000 lx.

每个处理设 3 个重复.

1.4 植物激素的提取和测定

取生长 14 d 的小麦叶片 1 g,用液氮速冻后保存在 -20℃冰箱中,供测定用.植物激素的提取、纯化、测定和计算参照何钟佩^[15]的方法.将植物样剪碎于研钵中,加入一定量 80% 的冷甲醇于冰浴中研磨,4℃提取,放置过夜.然后于离心机中 3 800 r/min 下离心 15 min,上清液过 C₁₈ 固相萃取柱,收集的样品以 N₂ 吹脱至干,除去提取液中的甲醇.测定时将吹干的样品用样品稀释液(磷酸缓冲液, pH 7.5)定容.植物激素的测定采用间接酶联免疫法(ELISA),结果以 1 g 鲜植物样中内源激素的含量表达.

1.5 数据分析

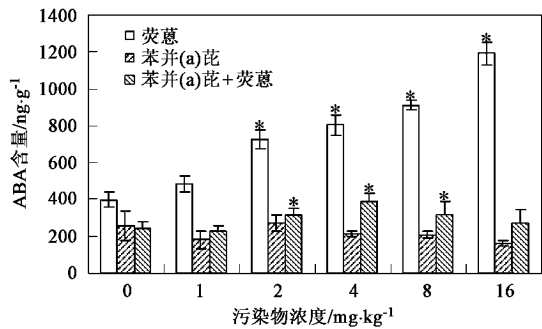
试验数据使用统计软件 SPSS12.0.以 One-way ANOVA, Dunnett's t test(2-sided)进行单因素方差分析.

2 结果与讨论

2.1 荧蒽、苯并(a)芘单一及复合污染与小麦体内 ABA 含量的关系

由图 1 可见,ABA 与土壤中荧蒽单一及复合污染均表现为显著剂量-效应关系.单一污染条件下,随着荧蒽浓度增加,ABA 含量明显上升($p < 0.05$),荧蒽浓度为 2、4、8 和 16 mg•kg⁻¹时,ABA 含量分别比对照增加 82%、101%、127%和 198%.相比之下苯并(a)芘单一污染与 ABA 的诱导响应关系不是十分明显.随着苯并(a)芘浓度的增加,ABA 含量有所下

降,但差异不显著($p < 0.05$). 茺蓼、苯并(a)茺复合污染对 ABA 表现为较低浓度下的诱导刺激效应及较高浓度下的污染抑制效应. 图 1 显示,在茺蓼、苯并(a)茺复合污染浓度为 $1 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,随着复合浓度增加,ABA 含量增加. 当浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,ABA 含量达到最大值,比对照增加了 64%. 此后随着复合浓度增加,ABA 含量下降,但仍然高于对照. 总体看,茺蓼单一污染对 ABA 具有较强的诱导效应,ABA 对茺蓼污染诱导响应最敏感. 苯并(a)茺对小麦叶片 ABA 含量变化未产生显著影响,可能因为苯并(a)茺水溶性极低($3.8\text{E} - 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 25°C),导致其生物有效性很低.



平均值 $\pm$ 标准偏差, * 表示处理与对照相比差异显著,下同
图 1 不同污染物浓度下 ABA 含量变化
Fig.1 Variation of ABA contents under different concentrations of pollutants

ABA 含量变化可能是植物通过调节蒸腾作用速率,减少污染物在植物体内的移动,从而减轻污染物对植物的毒害做出的反应. 因此,从植物激素与污染物的作用机理方面可以推测 ABA 在植物抵御不良环境中起重要的调控作用.

2.2 茺蓼、苯并(a)茺单一及复合污染与小麦体内 GA₃ 含量的关系

从图 2 可以看出,GA₃ 对茺蓼、苯并(a)茺单一及复合污染均有响应,但响应关系不同. 在试验浓度范围内,随着土壤中茺蓼浓度的增加,GA₃ 含量呈波动变化,GA₃ 含量与污染物浓度之间没有明显的规律性变化. 在不同浓度苯并(a)茺胁迫下,各处理 GA₃ 含量与对照相比有所下降,但变化趋势不显著($p < 0.05$). 其中苯并(a)茺浓度在 $1、16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,GA₃ 含量分别比对照减少了 21% 和 19%. 相对于单一污染而言,GA₃ 对茺蓼、苯并(a)茺复合污染响应程度较强,在较低浓度下 GA₃ 含量随复合浓度升高而升高,在 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时达到最大值,比对照增加了

41%. 此后,GA₃ 含量随复合浓度升高呈下降趋势,当茺蓼、苯并(a)茺复合浓度为 $16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,GA₃ 含量比对照减少了 23%. 复合污染胁迫对 GA₃ 含量表现为明显的诱导抑制效应. 同茺蓼、苯并(a)茺单一污染与 GA₃ 含量之间的响应关系比较,茺蓼、苯并(a)茺复合污染对 GA₃ 含量产生明显的协同毒性效应.

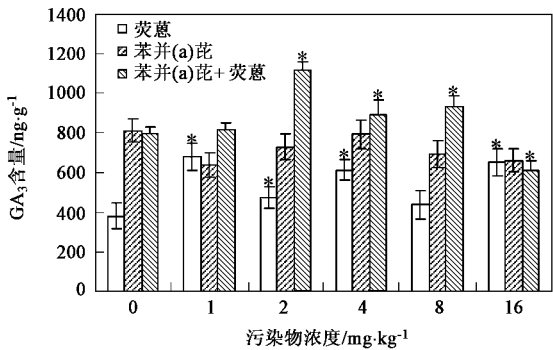


图 2 不同污染物浓度下 GA₃ 含量变化
Fig.2 Variation of GA₃ contents under different concentrations of pollutants

2.3 茺蓼、苯并(a)茺单一及复合污染与小麦体内 Z&ZR 含量的关系

由图 3 可见,Z&ZR 对茺蓼、苯并(a)茺污染响应敏感. 单一污染条件下,茺蓼浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,Z&ZR 含量达到最大值,比对照增加了 148%. 此后,随着茺蓼浓度增加,Z&ZR 含量明显下降($p < 0.05$). 在较低浓度时,苯并(a)茺单一污染对 Z&ZR 含量产生明显诱导刺激作用($p < 0.05$),导致 Z&ZR 含量随着苯并(a)茺浓度增加而增加,当苯并(a)茺浓度为 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,Z&ZR 含量达到最大值. 此后,随着苯并(a)茺浓度增加,Z&ZR 含量明显下降. 复合污染条

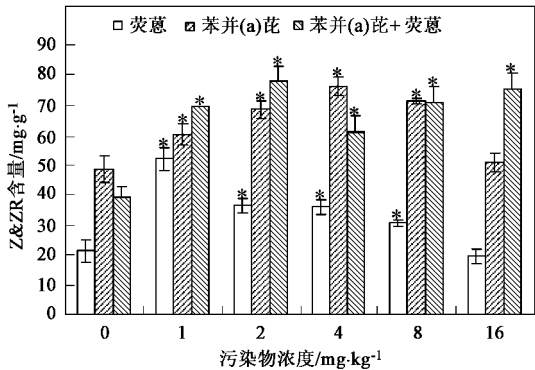


图 3 不同污染物浓度下 Z&ZR 含量变化
Fig.3 Variation of Z&ZR contents under different concentrations of pollutants

件下,Z&ZR 含量与污染物浓度之间仍显现明显的剂量-效应关系($p < 0.05$). 在较低浓度范围内,Z&ZR 含量随复合浓度升高而显著增加,Z&ZR 含量值比荧蒽、苯并(a)芘单一污染条件下大. 当复合浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,Z&ZR 含量达到最大值, 比对照增加 99%. 此后, 随着复合浓度增加,Z&ZR 含量出现波动, 并略有下降. 总体来看,Z&ZR 对荧蒽、苯并(a)芘复合污染的响应趋势与苯并(a)芘单一污染时更趋于一致.

Z&ZR 是细胞分裂素类植物激素, 在植物抗逆及细胞循环中扮演重要角色. 细胞分裂素合成与细胞对环境胁迫的反应和植物防御机制有关. 当植物遭遇逆境胁迫时, 能引起细胞分裂素的大量合成, 从而直接或间接地清除自由基, 减少脂质过氧化作用, 使植物产生抗逆性. 因此, 细胞分裂素是植物抗逆的指示物. 本研究中, 随着不同污染物浓度的增加,Z&ZR 含量均出现先升高后降低的趋势. 污染物较低浓度导致 Z&ZR 含量增加的结果说明, 在低浓度胁迫下, 植物自身的防御机制没有受到明显的破坏, 仍具有抵御外来物质毒性作用的抗性. 此后, 随着污染物浓度增加,Z&ZR 含量下降的结果表明, 植物自身的防御机制开始受到伤害. Z&ZR 含量下降是土壤中污染物引起植物根系与土壤渗透压失衡的征兆, 两者之间的联系是, 当渗透压失衡时, 细胞分裂素的含量下降^[16]. 当污染物浓度过高时, 渗透压失衡状态不可逆,Z&ZR 含量明显下降, 表明污染对植物的毒害作用严重. 因此, 在 Z&ZR 含量上升与下降的浓度区间, 可以视为荧蒽、苯并(a)芘植物毒性的预警值^[17].

3 结论

通过研究多环芳烃与 ABA、GA₃、Z&ZR 之间的剂量-效应关系和作用机理, 初步明确了 3 种内源激素对土壤低剂量多环芳烃污染的指示作用. 不同植物激素对多环芳烃的毒性响应具有明显差异, ABA 在荧蒽单一及与苯并(a)芘复合污染胁迫时含量显著增加, 并且对荧蒽的响应较敏感. GA₃ 对 2 种污染物复合污染具有明显的响应趋势, 对单一污染则呈波动变化. Z&ZR 对荧蒽、苯并(a)芘单一及复合污染 3 种处理均具有显著的先上升后下降的响应趋势,

表明 Z&ZR 对多环芳烃类污染胁迫响应最为敏感. 可以判断 3 种内源激素对土壤中多环芳烃污染胁迫响应的敏感性顺序为: Z&ZR > ABA > GA₃.

参考文献:

[1] 娄成后. 植物生理学[M]. 北京: 农业出版社出版, 1979. 301 ~ 303.

[2] Atıcı Ö, Agar G, Battal P. Interaction between endogenous plant hormones and α -amylase in germinating chickpea seeds under cadmium exposure[J]. Fresenius Environ Bull, 2003, 12(7): 781 ~ 785.

[3] 李智念, 王光明, 曾之文. 植物干旱胁迫中的 ABA 研究[J]. 干旱地区农业研究, 2003, 21(2): 99 ~ 104.

[4] 张淑兰, 王化庆. 脱落酸在植物对不良环境响应中的作用[J]. 昌潍师专学报, 2000, 19(5): 23 ~ 26.

[5] Pospíšilová J. Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress[J]. Biol Plant, 2003, 46(4): 491 ~ 506.

[6] Sharma S S, Kumar V. Responses of wild type and abscisic acid mutants of *Arabidopsis thaliana* to cadmium[J]. J Plant Physiol, 2002, 159(12): 1323 ~ 1327.

[7] Degenhardt B, Gimmler H, Hose E, et al. Effect of alkaline and saline substrates on ABA contents, distribution and transport in plant roots[J]. Plant Soil, 2000, 225(1 ~ 2): 83 ~ 94.

[8] Hsu Y T, Kao C H. Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings[J]. Plant Cell Environ, 2003, 26(6): 867 ~ 874.

[9] 宋玉芳, 常士俊, 李利, 等. 污灌土壤中多环芳烃的积累与动态变化研究[J]. 应用生态学报, 1997, 8(1): 93 ~ 98.

[10] Sotres F G, Cepeda C T, Leiros M C, et al. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties[J]. Soil Biol Biochem, 2005, 37(5): 877 ~ 887.

[11] 万寅婧, 占新华, 周立祥. 土壤中芘、菲、蔡、苯对小麦的生态毒性影响[J]. 中国环境科学, 2005, 25(5): 563 ~ 566.

[12] 李康, 周忠良, 陈立桥, 等. 苯并(a)芘对鲫鱼生物标志物的影响研究[J]. 环境科学研究, 2006, 19(1): 91 ~ 95.

[13] 高学晟, 姜霞, 区自清. 多环芳烃在土壤中的行为[J]. 应用生态学报, 2002, 13(4): 501 ~ 504.

[14] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业技术出版社, 1999. 312 ~ 320.

[15] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1993. 60 ~ 68.

[16] Hare P D, Du Plessis S, Cress W A, et al. Stress-induced changes in plant gene expression: prospects for enhancing agricultural productivity in South Africa[J]. S Afr J Sca, 1996, 92: 431 ~ 439.

[17] 王三根. 细胞分裂素在植物抗逆和延衰中的作用[J]. 植物学通报, 2000, 17(2): 121 ~ 126.