

甲磺隆对沉水植物伊乐藻的生理生态效应研究

潘慧云, 李小路, 徐小花, 高士祥*

(南京大学环境学院污染控制和资源化研究国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 采用室内水培实验方法, 研究不同浓度甲磺隆对伊乐藻生长的影响及其体内光合色素含量和 3 种抗氧化酶活性的变化。结果表明, 甲磺隆可以刺激伊乐藻新芽萌发, 但是对植株的生长具有明显的抑制作用。浓度 ≤ 5.0 mg/L 的甲磺隆在实验初期可促进伊乐藻体内叶绿素含量的增加, 随时间的延长, 最终抑制叶绿素的合成, 降低了植物体的光合作用能力。低浓度条件下, CAT 及 POD 活性先升高后降低, 而 SOD 活性持续升高。较高浓度和较长时间处理时, 伊乐藻抗氧化酶系统活性下降。甲磺隆胁迫可以引起伊乐藻体内活性氧的产生和积累, 诱导抗氧化酶活性, 当胁迫超过一定强度时, 抗氧化酶活性受到抑制, 活性氧不能及时清除, 从而对植物体形成氧化损伤, 这可能是该类除草剂对水生植物的重要致毒机制之一。

关键词: 沉水植物; 甲磺隆; 伊乐藻; 氧化损伤

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)07-1844-05

Physiological Effects of Metsulfuron-methy on *Elodea nuttallii*

PAN Hui-yun, LI Xiao-lu, XU Xiao-hua, GAO Shi-xiang

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Physiological effects of metsulfuron-methy on *Elodea nuttallii* was studied. The growth status, the photosynthetic pigments content and activities of anti-oxidation enzymes of *Elodea nuttallii* were examined with different contents of metsulfuron-methyl in cultural solution. The results showed that metsulfuron-methy could stimulate the sprout bourgeoning but restrained the growth of frond remarkably. At lower concentrations, metsulfuron-methy could increase the content of chlorophyll at the beginning, but inhibited the syntheses of chlorophyll ultimately and reduced the plant's photosynthetic capacity. Activities of CAT and POD increased at first and then decreased, while SOD activities increased all the time. With higher concentration and longer treatment time, the activities of anti-oxidation enzymes would decrease. It is indicated that metsulfuron-methy can arise the formation and accumulation of reactive oxygen species in *Elodea nuttallii*, and induce activities of anti-oxidation enzymes. When stress intensity exceeds a certain value, the activities of anti-oxidation enzymes will be inhibited and reactive oxygen species can not be removed in time and will finally result in oxidative damages to the plant. This may be an important toxicity mechanism of this kind of herbicide to aquatic plants.

Key words: submerged macrophyte; metsulfuron-methy; *Elodea nuttallii*; oxidative damages

自 20 世纪 70 ~ 80 年代以来, 除草剂用量大幅度增长, 大量除草剂进入环境中可能引起非靶生物的中毒或死亡, 对生态系统的结构和功能产生不良影响^[1], 由此产生的生态效应已引起发达国家的广泛重视^[2]。

沉水植物是水生生态系统的初级生产者, 对维持水生生态系统的平衡和稳定起着重要的作用^[3,4]。对湖泊富营养化形成过程的研究显示, 沉水植物的退化是导致富营养化过程加剧和水华暴发的重要因素^[5,6]。生物环境和非生物环境都可能对沉水植物的生长形成胁迫^[7~9], 目前的研究主要集中在水体环境、氮磷、重金属等因子对沉水植物的影响上^[10,11], 而农药对其的危害研究很少。国外已有研究表明, 大型水生植物对除草剂较为敏感, 即使低浓度条件下, 也会对植物的生长产生影响^[12~14]。因此, 研究我国常用除草剂与沉水植物退化的关系对深入理解湖泊富营养化的形成机制和进行富营养化湖泊的生态恢

复有重要意义。

甲磺隆属磺酰脲类除草剂, 具有良好的环境特性, 广泛应用于长江流域及其以南地区^[15,16]。本研究以甲磺隆为目标化合物, 以常见沉水植物伊乐藻为对象, 分析甲磺隆对伊乐藻生长状况和光合色素含量的影响, 以及伊乐藻体内抗氧化酶活性的变化过程。旨在揭示该类除草剂对沉水植物的致毒机制, 同时探讨对除草剂胁迫灵敏的生物指标, 以期为水环境生态风险评价和湖泊富营养化的控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试药品: 95.5% 甲磺隆原药, 由南京利民有限

收稿日期: 2007-07-15; 修订日期: 2007-09-09

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2002CB412307)

作者简介: 潘慧云(1978 ~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为污染水体的生态修复, E-mail: pian_321@126.com

* 通讯联系人, E-mail: eesxg@nju.edu.cn

公司提供.

伊乐藻采自太湖,预培养 2 周后,选择一定量生长良好、生长状况一致的植物个体,清水洗净后植于 2 L 烧杯中,施药前适应性培养 3 d.

1.2 实验设计及样品采集

实验共设 4 个甲磺隆处理浓度,分别为:0.1、1.0、5.0 和 10.0 mg/L,并设空白对照组,各组设 2 个平行.实验室自然条件下培养,实验期间水温为 13 ~ 21℃,定期补充水和营养液,分别在实验初始及施药后 6、12 和 18 d 采样.

分别在各组采集植物茎叶混和样品 3 份,每份约 0.2 g,准确称重后用液氮冷冻,置于冰箱中保存待测生理生化指标.实验结束后,将各处理组植物取出称量鲜重.

1.3 实验方法

参照文献[17]测定植物体叶绿素含量,过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)及超氧化物歧化酶(SOD)活性.

1.4 数据处理和统计分析

实验结果取各组测定结果的平均值,并用 SPSS13.0 对组间数据进行 *t* 检验, *p* < 0.05 表明差异显著, *p* < 0.01 表明差异极显著.

2 结果与分析

2.1 伊乐藻的生长状况

实验过程中观察并记录伊乐藻的生长状况,实验结束称量伊乐藻鲜重并对萌发的新芽计数.通过观察发现,甲磺隆的存在对伊乐藻的形态没有明显影响,在低浓度、短时间暴露下,伊乐藻生长良好,随着用药浓度升高和处理时间延长,植物体颜色逐渐发暗,在实验后期较高浓度组伊乐藻部分死亡,其中 10.0 mg/L 组在 15 d 后完全死亡.

各组伊乐藻生物量的变化及新芽萌发数见表 1.结果显示甲磺隆抑制了伊乐藻的生长,并且随着甲磺隆用量的增加,抑制强度也增加,表现为相对生长率的下降.1.0 mg/L 及以上浓度的甲磺隆显著(*p* < 0.01)抑制植物体生长,相对生长率仅为对照的 67%.同时,处理组伊乐藻新芽萌发个数却明显增加,尤其低剂量(0.1 mg/L)时,新芽萌发数高于对照组新芽个数的 2 倍.结果表明,甲磺隆可以刺激伊乐藻新芽萌发,但是对植株的生长具有明显的抑制作用.

2.2 不同浓度甲磺隆对伊乐藻光合色素含量的影响

光合色素是在光合作用中参与吸收、传递光能

表 1 甲磺隆对伊乐藻生长状况的影响				
Table 1 Effects of metsulfuron-methy on the growth of <i>Elodea nuttallii</i>				
甲磺隆浓度 /mg·L ⁻¹	鲜重/g		相对生长率	新芽数/个
	初始	结束		
CK	4.98	7.89	0.58	6
0.1	4.87	7.48	0.54	14
1.0	5.35	7.42	0.39	10
5.0	5.66	7.68	0.36	11
10.0 ¹⁾	4.88	—	—	—

1) 10.0 mg/L 组在实验结束时已经死亡

或引起原初光化学反应的色素.高等植物的光合色素包括叶绿素 a(Chl-a)、叶绿素 b(Chl-b)和类胡萝卜素(Car).经不同浓度甲磺隆处理后,伊乐藻中各光合色素含量见表 2.

由表 2 可知,加入的甲磺隆浓度 ≤ 5.0 mg/L 时,在实验初期伊乐藻中叶绿素 a、叶绿素 b 及叶绿素总量增加,第 6 d 时,5.0 mg/L 组伊乐藻中叶绿素 a 及叶绿素总量最高,分别增加 51.2% 和 52.6%.而高浓度的甲磺隆(10.0 mg/L)则在实验开始就降低了伊乐藻中叶绿素的含量,尤其叶绿素 a 在第 6 d 即下降至原始含量的 61.0%.随实验时间延长,对照组伊乐藻体内叶绿素含量开始增加,各处理组伊乐藻中叶绿素含量增加减缓.第 12 d 时,除 10.0 mg/L 组外,各处理组与对照组的叶绿素 a、叶绿素 b 及叶绿素总量均无显著性差异(*p* > 0.05).实验结束时,所有处理组伊乐藻体内叶绿素 a 及叶绿素总量均低于对照,但叶绿素 b 含量略高.除 10.0 mg/L 组外,各处理组伊乐藻体内光合保护色素——类胡萝卜素含量始终高于对照,第 18 d 时,各处理组类胡萝卜素含量为对照组 2 倍以上.

光合作用是植物体内极为重要的代谢过程,其强弱对植物生长及抗逆性具有十分重要的影响.光合色素是光合作用的物质基础,叶绿素含量及消长与光合强度密切相关,叶绿素含量的高低在很大程度上反映了植株的生长状况和光合作用能力^[18].伊乐藻中的叶绿素含量在不同时期、不同处理下均不同,高浓度(10.0 mg/L)甲磺隆处理使其始终显著低于对照,说明甲磺隆在高浓度下抑制了叶绿素的合成.而低浓度处理时,在实验初期刺激了伊乐藻体内叶绿素含量的增加,但随着处理时间延长,各处理组伊乐藻中叶绿素含量逐渐降低,并均低于对照.这一结果表明即使在低浓度条件下,长时间的暴露也会影响伊乐藻体内叶绿素的含量.类胡萝卜素既是光合色素,又是内源抗氧化剂,除在光合作用中具有一

定的功能外,在细胞内还可吸收剩余能量,淬灭活性氧,从而防止膜脂过氧化^[19].Car 的升高表明植物体对环境胁迫产生了响应,刺激类胡萝卜素的合成以形成保护.甲磺隆胁迫下,除最高浓度组外,各处理组 Car 含量在实验初期略高于对照,中后期均高于对照,一定程度上说明伊乐藻对甲磺隆的胁迫产生响应.但高浓度的甲磺隆超出了植物体的承受范围,直接抑制了类胡萝卜素的合成.Chl-a/Chl-b 值的变

化,能反映叶片光合活性的强弱.伊乐藻中 Chl-a/Chl-b 值在不同处理浓度和处理时间下均低于对照,说明其光合作用受到抑制.Car/Chl 值的高低与植物忍受逆境的能力有关.各组伊乐藻的 Car/Chl 值在处理前期及中期变化不大,第 12 d 时,仅最高浓度组 Car/Chl 显著高于对照($p < 0.05$),至 18 d,各处理组 Car/Chl 均显著高于对照($p < 0.05$),说明植物体在甲磺隆的胁迫下产生应激反应以对机体形成保护.

表 2 甲磺隆对伊乐藻光合色素含量的影响

Table 2 Effects of metsulfuron-methy on photosynthetic pigments content of *Elodea nuttallii*

时间/d	甲磺隆浓度/mg·L ⁻¹	Chl-a/mg·g ⁻¹	Chl-b/mg·g ⁻¹	Chl(总量)/mg·g ⁻¹	Car/mg·g ⁻¹	Chl-a/Chl-b	Car/Chl
初始	CK	0.41	0.16	0.57	0.08	2.58	0.14
	0.1	0.41	0.16	0.57	0.08	2.58	0.14
	1.0	0.41	0.16	0.57	0.08	2.58	0.14
	5.0	0.41	0.16	0.57	0.08	2.58	0.14
	10.0	0.41	0.16	0.57	0.08	2.58	0.14
6	CK	0.39	0.15	0.54	0.08	2.64	0.15
	0.1	0.42	0.18	0.60	0.09	2.29	0.15
	1.0	0.56	0.24	0.80	0.11	2.26	0.14
	5.0	0.62	0.25	0.87	0.13	2.46	0.15
	10.0	0.25	0.15	0.40	0.06	1.72	0.15
12	CK	0.70	0.23	0.93	0.13	3.08	0.14
	0.1	0.69	0.25	0.94	0.15	2.81	0.16
	1.0	0.74	0.27	1.01	0.16	2.72	0.16
	5.0	0.62	0.26	0.88	0.14	2.42	0.16
	10.0	0.28	0.18	0.46	0.08	1.56	0.18
18	CK	0.85	0.27	1.12	0.05	3.15	0.04
	0.1	0.55	0.35	0.90	0.10	1.59	0.11
	1.0	0.71	0.35	1.06	0.14	2.02	0.13
	5.0	0.60	0.33	0.93	0.13	1.86	0.14
	10.0	—	—	—	—	—	—

以上结果表明,甲磺隆对伊乐藻的光合系统产生了影响,10.0 mg/L 甲磺隆超过了植物的耐受范围,直接抑制了光合色素的合成,而较低浓度则可促进 Car 的合成以对植物体形成一定的保护,但较长时间的暴露仍会抑制光合色素,尤其是叶绿素 a 的合成,从而影响植物的光合作用,加快植物体的老化.上述测定指标中,Chl-a/Chl-b 在甲磺隆胁迫下显著降低,其变化趋势明显并有一定的规律性,可以考虑其作为农药胁迫的生物标志物.

2.3 不同浓度甲磺隆对伊乐藻体内抗氧化酶活性的影响

生物在进化过程中形成了一套完整的抵抗外界不良因素的抗氧化酶系统,过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)是植物体中非常重要的末端抗氧化酶,可以清除植物体内多余活性氧,是植物抗逆性的重要生理指标^[17].图 1~3 分别为伊乐藻体内 3 种酶的活性变化过程.

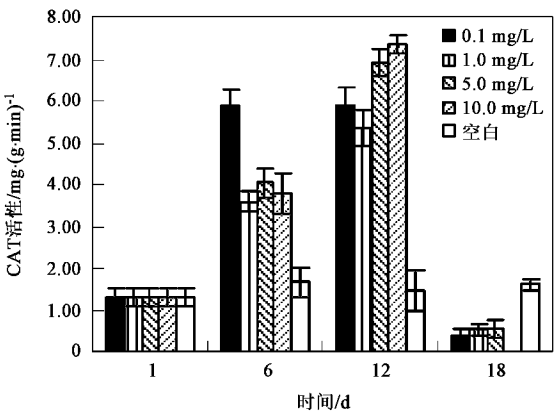


图 1 伊乐藻体内 CAT 活性变化

Fig.1 Changes of CAT activity of *Elodea nuttallii*

从图 1 可以看出,各处理组伊乐藻体内 CAT 活性在第 6 和 12 d 均显著升高(除 1.0 mg/L 组 $p < 0.05$ 外,其余各组 $p < 0.01$).甲磺隆浓度为 0.1 mg/L 时,CAT 活性在第 6 d 达到最高[5.91

mg•(g•min)⁻¹],并在第12 d基本保持不变.而甲磺隆浓度较高时,CAT活性逐渐升高,在第12 d达到最大,且浓度越高CAT活性也越高.18 d时,各处理组伊乐藻体内CAT活性迅速降低至对照组水平以下($p < 0.01$).相同浓度、不同时间的处理下,伊乐藻体内CAT酶活性先升高后降低.

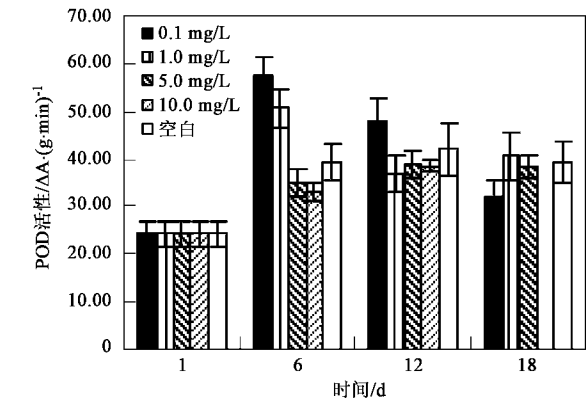


图2 伊乐藻体内 POD 活性变化

Fig.2 Changes of POD activity of *Elodea nuttallii*

由图2可知,低浓度甲磺隆(≤ 1.0 mg/L)显著诱导伊乐藻体内POD活性($p < 0.05$),而较高浓度则抑制了POD活性.第12 d时,仅0.1 mg/L组POD活性高于对照.第18 d时,各处理组POD活性均接近或低于对照,仅0.1 mg/L组与对照有显著差异($p < 0.05$).低浓度甲磺隆处理(≤ 1.0 mg/L)可诱导POD活性,并随处理时间延长POD活性逐渐降低,而高浓度时(≥ 5.0 mg/L)直接抑制POD活性.

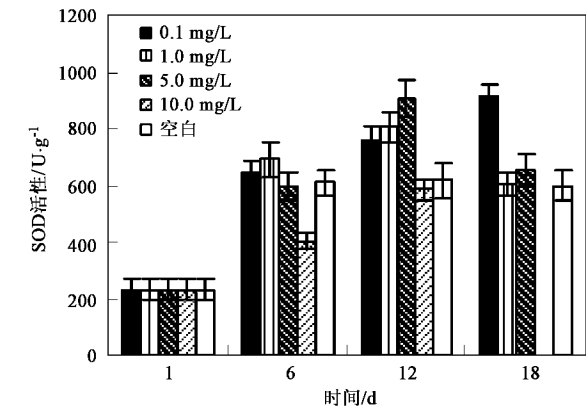


图3 伊乐藻体内 SOD 活性变化

Fig.3 Changes of SOD activity of *Elodea nuttallii*

由图3可知,除最高浓度组外,各处理组伊乐藻体内SOD活性均呈升高趋势.第6 d时,0.1 mg/L和1.0 mg/L组SOD活性均高于对照,其中1.0 mg/L组

与对照有显著性差异($p < 0.05$),而浓度较高的处理组SOD活性接近或低于对照.随处理时间延长,除10.0 mg/L组外,其余各组SOD活性均升高并显著高于对照.第12 d时,浓度低于10.0 mg/L的处理组,SOD活性还表现出较好的剂量-效应关系.18 d时,0.1 mg/L组的SOD活性继续升高,其余各组则降低并接近对照组水平.0.1 mg/L组的SOD活性在整个实验过程中始终升高,其余各组则表现为先升高后降低.

综合以上结果可以看出,伊乐藻体内的3种抗氧化酶均对甲磺隆胁迫作出了敏感的反应.0.1 mg/L的甲磺隆处理时,SOD活性持续升高,CAT、POD活性先升高后降低,说明伊乐藻对该浓度水平的甲磺隆具有一定的耐受能力,可以调动体内的酶系统对环境胁迫产生响应,对机体形成保护.较高浓度的甲磺隆处理下,3种酶活性均为先升高后降低,更高浓度下(10.0 mg/L)则直接抑制酶活性,说明高浓度、长时间甲磺隆胁迫使得伊乐藻体内氧自由基大量积累,最终对抗氧化酶系统形成了伤害.

已有研究认为,污染物胁迫下生物体内产生自由基并导致氧化胁迫可能是其重要的致毒机制之一.氧化胁迫可能导致DNA断裂、脂质过氧化、酶蛋白失活等^[20],是生物体产生毒性伤害的一个重要途径.SOD是生物体内唯一以自由基为底物的抗氧化酶,可通过歧化反应使O₂⁻生成H₂O₂和O₂,从而阻止危害性很大的O₂⁻大量生成^[21].因此,SOD被诱导,表明污染物引起了伊乐藻体内大量O₂⁻的生成.由于CAT在高H₂O₂浓度情况下能发挥高效作用,此时CAT活性也相应受到显著诱导.高浓度组暴露对SOD、CAT、POD活性表现出抑制作用,说明其超过了植物体可以承受的浓度范围,对抗氧化酶产生了一定的伤害.同时,大量的活性氧的积累,会破坏叶绿素等生物功能分子,使植物体的一些生理生化代谢紊乱,严重时造成植株死亡.文中所讨论的处理组伊乐藻体内光合色素含量的变化及植物的相对生长率下降就是植物体受到损伤的一种外在表现.从几种酶活性在低浓度暴露时显示氧化应激,高浓度暴露显示氧化损伤的现象看,产生氧化胁迫确实是甲磺隆污染对伊乐藻产生损伤的重要途径之一.

3 结论

(1)甲磺隆对伊乐藻的生理生态具有明显的效应.甲磺隆可以刺激伊乐藻新芽的萌发,但是对植株

的生长具有明显的抑制作用。

(2)低浓度(≤ 5.0 mg/L)甲磺隆在短时间内可促进叶绿素含量的增加,但较长时间的暴露仍会抑制叶绿素,尤其是 Chl-a 的合成,从而影响植物的光合作用,加快植物体的老化.较低浓度的甲磺隆可促进 Car 的合成以对植物体形成一定的保护. Chl-a/Chl-b 在甲磺隆胁迫下显著降低,其下降趋势明显并有一定的规律性,可以考虑其作为农药胁迫的生物标志物。

(3)植物体内的抗氧化酶系统对甲磺隆胁迫作出了敏感响应.低浓度条件下, CAT 及 POD 活性先升高后降低,而 SOD 活性持续升高.较高浓度和较长处理时间时,酶活性下降,说明甲磺隆胁迫可引起植物体内活性氧的产生和积累,诱导抗氧化酶活性,当胁迫超过一定强度时,植物体不能及时清除氧自由基,最终酶活性降低,植物体受到损伤.甲磺隆胁迫下伊乐藻体内产生自由基并导致氧化胁迫可能是其重要的致毒机制之一。

参考文献:

[1] Brink P J, Hartgers E M, Fettweis U, *et al.* Sensitivity of macrophyte dominated freshwater microcosms to chronic levels of the herbicide linuron I. Primary producers [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1997, **38** (1): 13-24.

[2] Davies J, Honegger J, Tencalla F G, *et al.* Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron—a case study [J]. *Pest Management Science*, 2003, (59): 231-237.

[3] Van Donk E, Van de Bund W J. Impact of submerged macrophytes including charophytes on phyto- and zooplankton communities: allelopathy versus other mechanisms[J]. *Aquatic Botany*, 2002, **72**: 261-274.

[4] 种云霄,胡洪营,钱易.大型水生植物在水污染治理中的应用研究进展[J]. *环境污染治理技术与设备*, 2003, **4**(2): 36-40.

[5] 胡小贞,金相灿,杜宝汉,等.云南洱海沉水植被现状及其动态变化[J]. *环境科学研究*, 2005, **18**(1): 1-5.

[6] 马凯,蔡庆华,谢志才,等.保安湖沉水植物分布的 GIS 模拟[J]. *生态学报*, 2003, **23**(11): 2271-2277.

[7] Brönmark C, Weisner S E B. Indirect effect of fish community structure on submerged vegetation in shallow, eutrophic lakes an

alternative mechanism[J]. *Hydrobiologia*, 1992, (243/244): 293-301.

[8] Ifranullah H M, Moss B. Factors influencing the return of submerged plants to a clear-water, shallow temperate lake[J]. *Aquatic Botany*, 2004, **80**: 177-191.

[9] 许秋瑾,金相灿,王兴民,等. 氨氮与镉单一和复合作用对沉水植物穗花狐尾藻和轮叶黑藻光合能力的影响[J]. *环境科学*, 2006, **27**(10): 1974-1978.

[10] 谷巍,施国新,张超英,等. Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对菹草光合系统及保护酶系统的毒害作用[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2002, **28**(1): 69-74.

[11] 谢永宏,于丹,耿显华. CO_2 浓度升高对沉水植物菹草叶表型及生理生化特征的影响[J]. *植物生态学报*, 2003, **27**(2): 218-222.

[12] Coyner A, Gupta G, Jones T. Effect of chlorsulfuron on growth of submerged aquatic macrophyte *Potamogeton pectinatus* (sago pondweed) [J]. *Environmental Pollution*, 2001, (111): 453-455.

[13] Coors A, Kuckelkorn J, Hammers-Wirtz M, *et al.* Application of in-situ bioassays with macrophytes in aquatic mesocosm studies[J]. *Ecotoxicology*, 2006, (15): 583-591.

[14] Belgers J D M, Van Lieverloo R J, Van der Pas L J T, *et al.* Effects of the herbicide 2, 4-D on the growth of nine aquatic macrophytes[J]. *Aquatic Botany*, 2007, **86**: 260-268.

[15] 苏少泉. 磺酰脲类除草剂作用特性与使用问题[J]. *世界农业*, 1992, (9): 27-29.

[16] 魏东斌,张爱茜,韩塑睽,等. 磺酰脲类除草剂研究进展[J]. *环境科学进展*, 1999, **7**(5): 34-42.

[17] 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. 134-169.

[18] 刘振亚,刘贞琦. 作物光合作用的遗传及其在育种中的应用研究进展[A]. 见:作物育种研究与进展(第 1 集)[C]. 北京:中国农业出版社, 1993. 168-183.

[19] Willekens H, Vancamp W, Linze D, *et al.* Ozone, sulfur dioxide, and ozone ultraviolet-B have similar effect on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana glauca* L. [J]. *Plant Physiology*, 1994, (106): 1007-1014.

[20] Di Giulio R T, Washburn P C, Wenning R J, *et al.* Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1989, (8): 1103-1123.

[21] 刘爱荣,张远兵,陈登科. 盐胁迫对盐芥 (*Thellungiella halophila*) 生长和抗氧化酶活性的影响[J]. *植物研究*, 2006, **3** (2): 216-221.