

海州香薷 (*Elsholtzia haichouensis* Sun) 不同生态型 Cu 吸收和酸性磷酸酶活性差异

柯文山¹ ,熊治廷² ,金则新³ ,柯世省³

(1. 湖北大学生命科学学院 ,武汉 430062 2. 武汉大学资源与环境科学学院 ,武汉 430079 ;

3. 台州学院生命科学学院 ,台州 31700)

摘要 :以海州香薷铜矿区种群 (大冶铜绿山)和非矿区种群 (红安)为对象 ,通过水培实验 ,比较分析了两个种群根中铜的吸收、MDA 含量、根伤流流量和酸性磷酸酶活性变化的差异。结果显示 ,红安非矿区种群根中的 MDA 含量随处理浓度的增加而显著升高 ,铜绿山矿区种群则没有明显的变化 ;在 $\geq 20 \mu\text{mol/L}$ Cu 处理时 ,非矿区种群根伤流流量急剧下降而矿区种群反而增大。红安种群根中的 Cu 吸收量明显比铜绿山种群的高 ,如 $20 \mu\text{mol/L}$ Cu 处理时 ,红安种群根中的铜含量在处理后的第 1 天和第 5 天分别是铜绿山种群的 3 倍和 4 倍 ; $80 \mu\text{mol/L}$ Cu 处理时 ,第 1 天和第 5 天的 Cu 含量则分别是铜绿山种群的 20 倍和 5 倍。然而 ,铜绿山种群根分泌的和组织内的酸性磷酸酶活性则明显高于红安种群 ,如在 $80 \mu\text{mol/L}$ Cu 处理的第 3 天和第 5 天 ,铜绿山种群根组织内的酸性磷酸酶活性都约为红安种群的 3 倍 ,根系分泌的酶活性则分别为红安种群的 1.6 倍和 1.8 倍。两个种群也表现出不同的变化趋势 :铜绿山种群在低浓度处理时 ,根分泌的和组织内的酸性磷酸酶活性有所增强 ,高浓度处理时下降 ,而红安随处理浓度的增加则显著下降。总之 ,铜胁迫下 ,海州香薷红安种群根系过氧化损伤明显 ,而铜绿山种群根系没有产生明显的过氧化损伤 ,铜绿山种群根系增强酸性磷酸酶的分泌以及保持组织内的高活性 ,可能分别在减少其铜的吸收及胁迫条件下维持体内正常的磷生理代谢方面具有重要作用。

关键词 :海州香薷 ;铜积累 ;酸性磷酸酶 ;MDA ;伤流液

文章编号 :1000-0933 (2007)08-3172-10 中图分类号 :Q948 ,X171 文献标识码 :A

Differences of Cu uptake and acid phosphatase activities of two *Elsholtzia haichowensis* Sun populations

KE Wen-Shan¹ , XIONG Zhi-Ting² , JIN Ze-Xin³ , KE Shi-Sheng³

1 School of Life Science , Hubei University , Wuhan 430062 , China

2 School of Resource and Environmental Scienc , Wuhan University , Wuhan 430079 , China

3 School of Life Science , Taizhou College , Taizhou , Zhejiang Province 31700 , China

Acta Ecologica Sinica 2007 27 (8) 3172 ~ 3181.

Abstract : Two *Elsholtzia haichouensis* Sun populations , one from Cu mine sites (Tonglushan) and the other from uncontaminated sites (Hong'an) in Hubei province , were investigated in hydroponic experiments for the differences of Cu accumulation and ecophysiological responses to Cu under Cu treatment. The results showed that a significant increase of

基金项目 :国家自然科学基金资助项目 (29877021) ;浙江省自然科学基金资助项目 (Y504256)

收稿日期 :2006-10-09 ;修订日期 :2007-05-30

作者简介 :柯文山 (1965 ~) ,男 ,湖北人 ,博士 ,副教授 ,主要从事植物种群生态、环境污染毒理生态和污染的生物修复研究。E-mail :kokews2000@163.com

Foundation item :The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 29877021) and Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Y504256)

Received date 2006-10-09 ;**Accepted date** 2007-05-30

Biography :KE Wen-Shan , Ph. D. , Associate professor , mainly engaged in plant population ecology , eco-toxicology and bioremediation of contaminated environment. E-mail :kokews2000@163.com

malondialdehyde (MDA) concentration in roots was observed in Hong'an population, whereas no significant change was observed in Tonglushan population. The root pressure exudates (ml) decreased significantly in Hong'an population, but increased significantly in Tonglushan population at high Cu concentration ($\geq 20 \mu\text{mol/L}$) treatment. Cu concentration in roots of Hong'an population was significantly higher than that in Tonglushan population. For example, Cu concentration in Hong'an population was 3 times and 4 times higher than that in Tonglushan population after $20 \mu\text{mol/L}$ Cu treatment for one day and three days, respectively. Cu concentration in Hong'an population was 20 times and 5 times higher than that in Tonglushan population after $80 \mu\text{mol/L}$ Cu treatment for one day and three days, respectively. The intracellular and secreted acid phosphatase activities (APase) in roots were significantly higher in Tonglushan population than in Hong'an one. The intracellular APase activities in Tonglushan population were 3 times higher than that in Hong'an population after $80 \mu\text{mol/L}$ Cu treatment for three days and five days; The root secreted APase activities in Tonglushan population were 1.6 times and 1.8 times higher than that in Hong'an population after $80 \mu\text{mol/L}$ Cu treatment for three days and five days. In conclusion, excess Cu caused serious oxidative damage in roots of Hong'an population, but not in Tonglushan population. The high activities of intracellular and root-excreted APases in Tonglushan population might play an important role in reducing Cu accumulation in roots and maintaining normal phosphorus physiology metabolism in root cells under Cu stress.

Key Words : *Elsholtzia haichowensis* Sun ; Cu accumulation ; MDA ; acid phosphatases ; root pressure exudates

Cu 是植物生长发育以及生理代谢必需的微量元素,但过量的 Cu 又会对植物产生毒害。最先受毒害的是植物根系,过量的 Cu 可抑制根生长、细胞膜酯质过氧化,也使一些酶代谢受阻。然而,一些植物能够适应高铜环境,通过长期的进化,形成了抗性生态型^[1,2]。研究资料表明,抗性生态型和非抗性生态型相比,其重金属抗性差异与其重金属吸收运输差异(吸收对策)有关^[3~5],且与抗性植物体内所形成的特殊生理生化特征有关^[6,7]。

酸性磷酸酶是植物体内比较重要的酶类之一,在调节植物 P 营养方面具有重要作用^[8]。一方面,根尖外层细胞的酸性磷酸酶以及分泌到土壤根际的酶参与了土壤有机磷的分解,与磷利用效率关系密切^[9]。另一方面,植物体内的酸性磷酸酶在维持体内磷营养状态及植株体内磷的再利用有密切的关系^[10,11]。重金属污染土壤中 P 的可利用性较低,而重金属耐受型植物常具有较高的 APase 活性,既可保证植物对低 P 的有效吸收又可保证植物体内 P 营养的循环利用,对于植物适应这种污染环境具有重要意义^[12]。在微生物如细菌 *Citrobacter* sp. 中,发现金属的吸收是由其产生的大量酸性磷酸酶活性调节的^[13];在真菌 *Aspergillus niger* 中,酸性磷酸酶可能参与 Cu 的抗性和吸收过程^[14]。然而,植物中的酸性磷酸酶与重金属的抗性机制和吸收是否有密切的关系,还没有充分的证据说明。

海州香薷 (*Elsholtzia haichowensis* S.)是我国科学工作者发现的对铜有较高耐性和较强富集能力的本土植物^[15~20]。该植物能旺盛生长于铜矿区,常被当作铜矿的指示植物^[15,16]。近几年,有关海州香薷对铜污染土壤的植物修复和植被恢复,以及其铜抗性的生理生化机理等方面做过许多有益的探讨^[21~33]。由于长期在污染环境下生存,铜矿区的海州香薷可能已经发生了与污染环境相适应的抗性进化,形成了特殊的生理生化过程。它们对铜胁迫的生理反应可能与那些非污染区种群不同^[22,33]。基于上述原因,本文以分别来源于大冶铜绿山(污染区)和红安(非污染区)的 2 个海州香薷种群为对象,通过室内水培试验,就其根系对铜的吸收积累以及铜离子胁迫下根系活力、过氧化反应和酸性磷酸酶活性进行比较研究,以期通过污染区和非污染区海州香薷种群对铜的生理反应的差异,进一步了解海州香薷植物抗性种群的铜吸收对策及酸性磷酸酶在海州香薷植物铜抗性和铜吸收的作用,为进一步探究重金属抗性种群的抗性进化及抗性机理提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料和培养

海州香薷 (*E. haichowensis*)的种子分别采自湖北省大冶铜绿山古铜矿遗址(污染区)和红安县枣林乡(非

污染区)。种子来源地的土壤性状见表 1。种子用 0.3% 的次氯酸钠消毒 20 min ,蒸馏水洗净 ,于光照培养箱萌发 ,培养于 25 ℃/16 h 光照、20 ℃/8 h 黑暗条件。挑选萌发的种子于酸洗过的石英砂中培养。待幼苗长至 6 ~8 叶苗龄时 ,挑选生长一致植株 ,移栽于盛有 1/2 浓度 Hoagland 营养液 (1/2HS)的塑料碗 (高 6cm ,直径 15 cm)中。营养液 (HS)组成 (单位均为 mmol/L) 5 KNO₃ , 5 Ca (NO₃)₂ · H₂O , 2 MgSO₄ · 7H₂O , 1 KH₂PO₄ , 0.02 FeSO₄ · 7 H₂O , 0.02 Na₂-EDTA , 0.045 H₃BO₃ , 0.01 MnCl₂ · 4H₂O , 和 (单位为 μmol/L) :0.8 ZnSO₄ , 0.3 CuSO₄ · 5 H₂O , and 0.1 NaMoO₄ · 2 H₂O。溶液 pH 用 0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 调节至 5.5 ± 0.3。植物培养于 25 ℃/12 h 光照、20 ℃/12 h 黑暗 ,相对湿度 45% ~65%、光照强度大于 10 000 lx 的人工培养室中。

表 1 海州香薷两个种群取样点位置及土壤 (0 ~10 cm) 性状
Table 1 Coordinates of two sites and characters in the local soils supporting the two natural populations of *E. haichowensis* (0 ~10 cm depth)

种群 Population	地理坐标 Coordinate	有机炭 Corg (%)	总铜 Cu _{Total} (mg·kg ⁻¹)	有效态铜 Cu _{EDTA} (mg·kg ⁻¹)	pH (H ₂ O)
铜绿山 Tonglushan	114°53'E ,30°05'N	1.02 ± 0.06	7789.8 ± 542.7	1704.8 ± 382.6	5.81 ± 0.24
红安 Hong'an	114°37'E ,31°18'N	2.46 ± 0.09	52.6 ± 2.8	8.7 ± 3.4	5.47 ± 0.15

表中数据为 3 个重复的平均值 ± 标准偏差 (n = 3) Data in the table are means ± SD (n = 3)

1.2 Cu²⁺ 处理

实验 1 幼苗预培养 1 周后 ,采用含有不同浓度的 Cu²⁺ 营养液 (1/2HS)进行处理培养。Cu²⁺ 处理水平为 :CK (对照) ,20 μmol/L 和 80 μmol/L ,以 CuSO₄ · 5H₂O 的形式提供。每个处理水平有 9 盆 (9 个重复) ,每盆 4 株幼苗 ,于不同时间 (每隔 1 d)取样 ,每次取 3 个重复 ,测根长、烘干称重及用于植物 Cu 含量测定。

实验 2 上述同样方法处理 ,每个处理水平有 9 个重复 ,每个重复 6 株幼苗 ,于不同时间 (每隔 1 d)取样 (包括处理前的取样) ,每次取 3 个重复 ,每个重复分两组 ,分别用于根组织和根分泌的酸性磷酸酶 (APase)活性测定。

实验 3 上述同样方法处理 ,每个处理水平有 3 个重复 ,每重复 4 株幼苗 ,处理一周后取样 ,用于根 MDA 含量测定。

实验 4 幼苗预培养 3 周后 ,进行不同浓度的 Cu²⁺ 处理。Cu²⁺ 处理水平为 :CK (对照) ,5、10、20 μmol/L 和 100 μmol/L ,以 CuSO₄ · 5H₂O 的形式提供。处理一周后收集根伤流液。每处理 4 个重复 ,每重复 8 株幼苗。

1.3 测定方法

1.3.1 丙二醛 (MDA) 含量的测定

参照 Heath 等^[6]的硫代巴比妥 (TBA) 法测定 MDA 含量 :准确称取 0.3 g 鲜根 ,用 3 ml 的 10 % 三氯乙酸将鲜根研磨成匀浆 ,4 000 g 离心 10 min。取 2 ml 上清液与 2 ml 的 16 % TBA 混匀 ,沸水浴显色 15 min ,迅速冷却后 4 000 g 离心 15 min ,上清液用可见分光光度计测定 450 、532 nm 和 600 nm 处光吸收值 ,计算 MDA 含量。

1.3.2 根伤流液的收集

根伤流液的收集参照 Llugany 等^[7]的方法 ,略加修改。处理一周后 ,将地上部分离根茎交接约 2 cm 处剪断 ,立即用塑料软管收集根伤流液。为防止液体渗漏 ,在塑料管口和植物茎结合处外层涂上凡士林。收集 24 h 的根伤流液 ,然后用微量注射器测量体积 (ml)。

1.3.3 根分泌酸性磷酸酶的测定

实验 2 的取样中 ,每处理每个重复取 3 株 ,余下用于测根组织内的酶活。根取出后用蒸馏水洗净 ,吸水纸吸去多余水分后立即放入盛 20 ml 反应液 (含 0.1 mol/L pH 5.0NaAc ,5 mmol/L pNPP)的小烧杯中 ,于 37 ℃ 反应 30 min ,1 mol/L NaOH 终止反应。反应释放的无机磷用钼酸铵分光光度法 (GB 11893-89)于 700 nm 处

测定。

1.3.4 根组织酸性磷酸酶的测定

取上述处理后的根鲜样 0.5 g 加 0.1 mol/L Hepes (pH 7.0)缓冲液 (1:3)冰浴研磨 ,6 000 g 4℃ 离心 30 min ,上清液用于测定酶活性。反应方法和测定方法同上。

1.3.5 植物 Cu 的测定

1、3 d 和 5 d 收获后的植物 ,用冷的 5 mmol/ L Ca (NO₃)₂ 溶液解析 30 min ,以脱去根表面吸附的铜 ,再用去离子水洗净 ,于 70 ℃ 烘箱烘 48 h。干样磨成粉 称一定量的粉样用 HNO₃:HClO₄ (3:1 ,体积分数)的混合酸浸泡过夜后 ,于 200 ℃ 的电热板 (SB-4 型 ,湖南长沙市华光电炉厂)上消化。溶液呈清亮透明后 ,蒸近干 ,冷却。用 0.5 mol/L 的稀硝酸定容至 25 ml ,比色法测定 P 元素 ,原子吸收分光测定仪 (AA240FS)测定 Cu 含量。

1.4 统计分析

实验数据分析用邓肯多重比较分析各平均数间差异的显著性 (SSR 检验 $p < 0.05$) ,计算于 Statistic 6.0 统计软件上进行。

2 结果

2.1 根 Cu 含量

两个种群根中的铜含量都随处理浓度的增加而增加 ,但两个种群的增加量表现出明显的不同 (表 2) :非矿区种群根中的增加量明显高于矿区种群。随处里时间的延长 ,两个种群根中的增加量也表现出明显的不同 :非矿区种群两个处理浓度都随处理时间的延长而显著增加 ,尤其高浓度 (80 μmol/L)处理 ,第 1 天根中的铜含量是对照的 50 多倍 ,第 3 天和第 5 天分别约是对照的 100 倍和 70 倍。而矿区种群根中的增加量明显少于矿区种群 ,如 80 μmol/L 铜处理 ,第 1 天根中的铜含量是对照的约 10 倍 ,第 3 天和第 5 天分别约是对照的 40 倍和 15 倍。

表 2 两个种群植物根 Cu 含量
Table 2 Cu concentration in roots of two *E. haichowensis* populations

种群 Population	Cu 处理 Cu treatment (μmol/L)	Cu 含量 Cu concentration		
		1 Day	3 Days	5 Days
红安 Hong'an population	CK	46.60 ±13.41 e	46.51 ±9.90 e	93.01 ±22.34 f
	20	515.45 ±41.6 c	663.87 ±93.08 c	968.18 ±136.56 d
	80	2390.35 ±338.69 a	4053.87 ±482.98 a	6135.84 ±687.94 a
铜绿山 Tonglushan population	CK	53.85 ±5.16 e	39.73 ±1.98 e	92.55 ±18.85 f
	20	170.13 ±16.61 d	340.97 ±23.25 d	238.44 ±48.09 e
	80	598.39 ±19.39 b	1862.90 ±142.01 b	1364.08 ±38.36 b

同一栏中的不同字母表示显著差异 (根据 SSR 检验 , $P < 0.05$) ,表中的数据为 3 个重复的平均值 ±SE Different letters in same vertical column indicate significant difference according to SSR test ($P < 0.05$). Data in the table are means ±SD of three values ($n = 3$)

2.2 MDA 含量

在不同浓度 CuSO₄ 处理 7 d 后 ,红安海州香薷的 MDA 含量随 CuSO₄ 浓度升高而急剧上升 ,如 MDA 含量 :对照为 6.04 nmol·g⁻¹FW 20 μmol/L 处理为 27.11 nmol·g⁻¹FW 和 80 μmol/L 处理为 38.93 nmol·g⁻¹FW。铜绿山海州香薷的 MDA 含量随 CuSO₄ 浓度升高变化很平稳 ,在各 CuSO₄ 浓度下 ,其 MDA 含量与对照组相比均无显著差异 ($P > 0.05$)。在 Cu 处理时 ,非矿区海州香薷的 MDA 含量显著高于矿区香薷 ($P < 0.05$) :Cu²⁺ 浓度为 20 μmol/L 时 ,香薷的 MDA 含量是铜绿山矿区种群的 3.4 倍 ;Cu²⁺ 浓度为 80 μmol/L 时 ,红安香薷的 MDA 含量是铜绿山的 5.2 倍 (图 1)。

2.3 铜对两个海州香薷种群根伤流液量的影响

铜胁迫下 ,两个种群的根伤流液量 (ml)变化显示在图 2。在 ≤10 μmol/L Cu 处理时 ,非矿区种群平均每株 24 h 的伤流液量明显较矿区大 ($P < 0.05$)。但在 20 μmol/L Cu 处理时非矿区种群的伤流液量显著减少

($P < 0.05$) ,100 $\mu\text{mol/L}$ Cu 处理时几乎收集不到伤流液 ,而矿区种群随处理浓度增加 ,伤流液数量明显上升 ($P < 0.05$) 。这说明在较高铜浓度胁迫下 ,非矿区种群根系明显受到损伤 ,其活力急剧降低 ,且损伤程度随处理浓度的增加而加大。相比之下 ,矿区种群根系活力在较高铜浓度的刺激下有所提高。

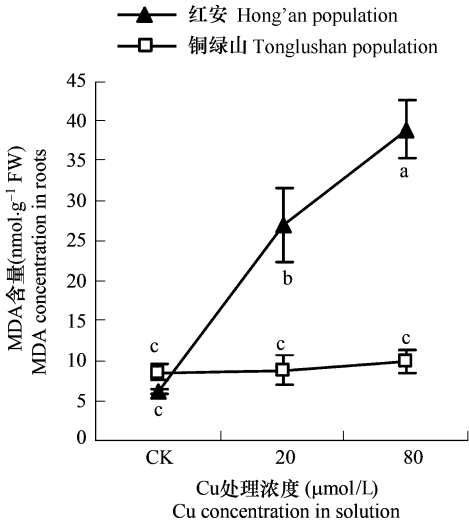


图1 两个种群植物根中MDA含量

Fig. 1 MDA concentration in roots of two *E. haichowensis* populations

图中不同字母表示显著差异 (根据 SSR 检验 , $P < 0.05$) Different letters in figure indicate significant difference according to SSR test ($P < 0.05$)

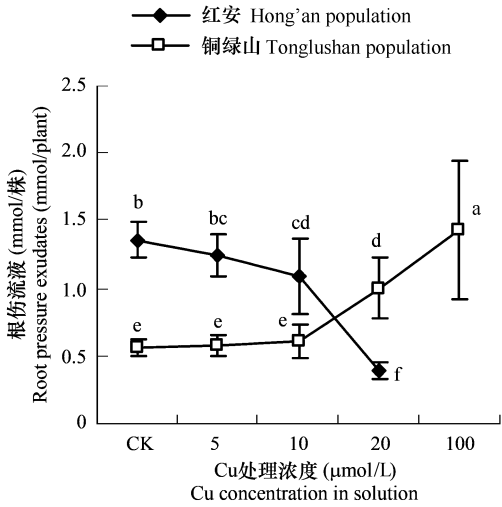


图2 海州香薷两个种群收集24 h的根伤流液 (ml/株)

Fig. 2 Root pressure exudates (ml/plant) collected for 24 h in two *E. haichowensis* populations

图中不同字母表示显著差异 (根据 SSR 检验 , $P < 0.05$) Different letters in figure indicate significant difference according to SSR test ($P < 0.05$)

2.4 Cu对根组织内酸性磷酸酶活性的影响

从图3A中可以看出 ,同一时间但不同Cu浓度处理下 ,矿区种群和非矿区种群根组织的酸性磷酸酶有明显不同变化方式。如在不同浓度处理5d后 ,红安种群酸性磷酸酶活性随处理浓度上升而急剧下降 ,而铜绿山种群只是在高浓度 (80 $\mu\text{mol/L}$ Cu)处理时明显低于对照水平 (图3A) ,但仍然显著高于红安种群 ($P < 0.05$) ,约为红安种群的3倍。同一浓度 (80 $\mu\text{mol/L}$ Cu)但不同时间处理下 ,矿区种群和非矿区种群根组织的酸性磷酸酶也有明显不同变化方式 (图3B) 。在浓度为80 $\mu\text{mol/L}$ Cu处理下 ,红安种群酸性磷酸酶活性随处理时间的延长而急剧下降 ,而铜绿山种群则不同 ,其酶活性在处理的第1天、第3天和第5天分别是红安种群的1.6、3倍和3倍。变化趋势为在第1天有所上升 ,第3天则明显高于对照 ($P < 0.05$) ,第5天下降到对照水平。因此 ,无论时间效应还是浓度效应 ,矿区种群根组织内的酸性磷酸酶都始终显著高于非矿区种群。

2.5 Cu对根分泌的酸性磷酸酶活性的影响

根系分泌的酸性磷酸酶活性在两个种群中也表现出明显不同的浓度效应 (图4A)和时间效应 (图4B) 。在不同Cu浓度处理5d后 ,红安种群根系分泌的酸性磷酸酶活性随处理浓度上升而急剧下降 ,而铜绿山种群只是在高浓度 (80 $\mu\text{mol/L}$ Cu)处理时明显低于对照水平 (图4A) ,但仍然显著高于红安种群 ($P < 0.05$) 。同一浓度 (80 $\mu\text{mol/L}$ Cu)不同时间处理 ,第1天 ,两个种群根系分泌的酸性磷酸酶都随处理浓度的增加而增加 ,且都明显高于对照 ($P < 0.05$) (图4B) 。很显然 ,在开始 ,Cu刺激了根系酸性磷酸酶的分泌 ,这可能是植物的应急反应。但第3天和第5天两个种群的变化明显不同 ,红安种群在铜的作用下 ,酶活性明显降低 ,而铜绿山种群只是在处理后的第5天才降至对照水平 ,其酶活性在处理的第3天和第5天约分别是红安种群的1.6倍和1.8倍。

3 讨论

本研究中 ,非矿区 (红安)海州香薷的MDA含量随铜处理浓度上升急剧升高 ,而矿区 (铜绿山)海州香薷

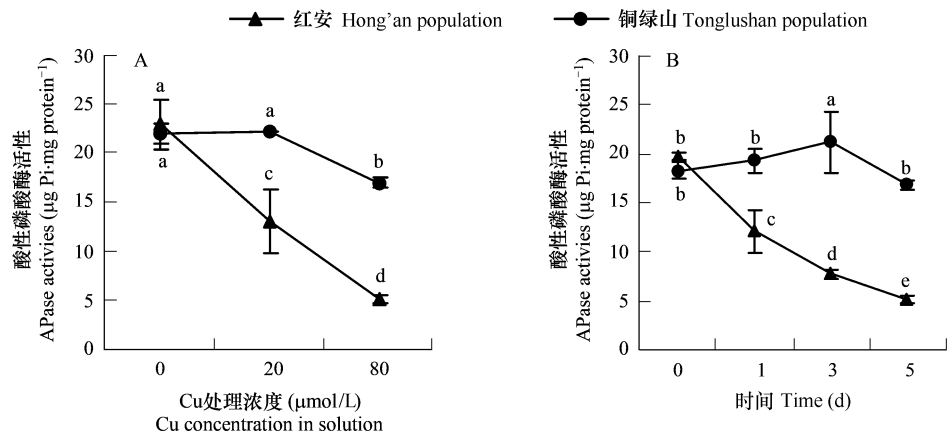


图 3 Cu 对海州香薷两个种群植物根组织酸性磷酸酶的影响

Fig. 3 Effect of Cu on intracellular acid phosphatase (APase) in roots of two *E. haichowensis* populations

图 A 和图 B 分别显示同一时间 (5 d) 不同 Cu 浓度处理和同一 Cu 浓度 (80 μmol/L) 不同时间处理后的酸性磷酸酶活性变化 ; 图上不同字母 (小写) 表示平均数 (n = 3) 间的差异显著 (P < 0.05) ; Figure A and Figure B indicate APase activities of roots after different Cu concentration treatments for 5 days and after 80 μmol/L Cu treatment for different time , respectively ; Different small letters in Figures indicate significant difference of means values (n = 3) (P < 0.05)

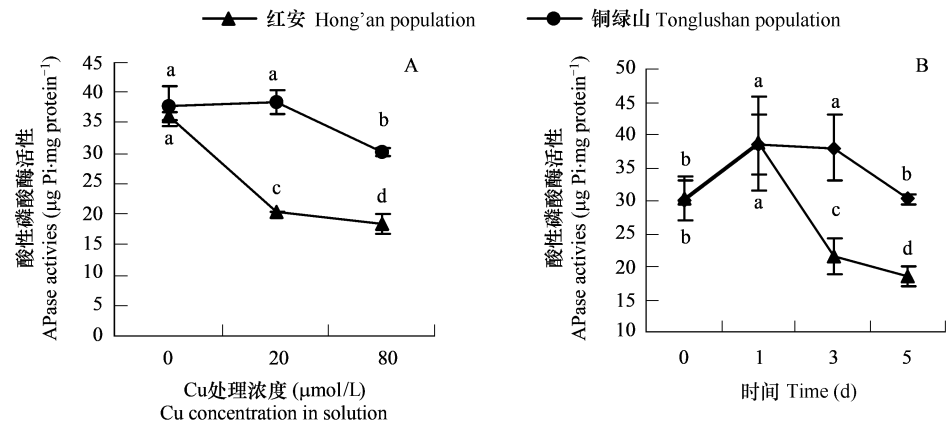


图 4 Cu 对海州香薷两个种群植物根分泌酸性磷酸酶的影响

Fig. 4 Effect of Cu on excreted acid Phosphatase (APase) of roots in two *E. haichowensis* populations

图 A 和图 B 分别显示同一时间 (5 d) 不同 Cu 浓度处理和同一 Cu 浓度 (80 μmol/L) 不同时间处理后的酸性磷酸酶活性变化 ; 图上不同字母 (小写) 表示平均数 (n = 3) 间的差异显著 (P < 0.05) ; Figure A and Figure B indicate APase activities of roots after different Cu concentration treatments for 5 days and after 80 μmol/L Cu treatment for different time (d) , respectively. Different small letters in Figures indicate significant difference of means values (n = 3) (P < 0.05)

则基本无变化 (图 1)。这结果表明, 过量的铜引起了非矿区海州香薷种群根系严重的过氧化伤害, 而矿区种群则具有较强的抗氧化能力^[33]。矿区种群这种抗氧化能力, 一方面, 可能与其较低的铜积累 (见表 2) 有关, 较少的铜积累本身诱导的过氧化胁迫相对较少。另一方面, 与其较高的抗氧化系统 (如抗氧化酶和抗氧化剂) 有关, 较高的抗氧化系统能有效地清除氧自由基的积累^[22, 33]。

本实验中, 在较高浓度 ($\geq 20 \mu\text{mol/L}$ Cu) 处理, 非矿区种群根伤流液的数量明显减少, 在 $100 \mu\text{mol/L}$ Cu 处理时几乎收集不到, 表明其根系受到明显伤害。这可能与其过量铜所诱导的植物体内活性氧自由基积累有关。植物体内活性氧自由基的大量生成而导致脂质的过氧化, 最终会导致膜结构和功能的破坏^[38]。而矿区种群根系在高浓度处理时, 伤流液反而增加, 说明矿区种群根系在高浓度 Cu 处理时仍然具有很高的活力。两个种群的这种差异也可从实验观察的现象中得到印证: 非矿区海州香薷的生长明显受到过量铜的抑制, 植

株矮小,叶片泛红,根尖发黑坏死,而矿区种群根系没有明显的变化。矿区种群根系伤流液在高浓度处理时反而增加,这可能与其喜铜有关,至于更深的机理有待进一步研究。

通过与非抗性种群的对比研究发现,海州香薷抗性种群积累的铜量,明显比非抗性种群少,且大部分富集于根中(表2)。根据 Baker^[3]的分类,这种吸收模式属于避性对策^[24]。和非矿区种群相比,矿区种群吸收累积较少的铜,同时也限制更多的铜向地上运输^[22],从而尽量减少地下和地上部分因过量铜积累而受伤害。因此,这种减少吸收并阻止铜离子向地上运输的机制可能是海州香薷矿区种群抗铜毒能力强的重要原因之一^[24]。虽然海州香薷抗性种群对铜的吸收较非抗性种群少,但其根中仍然能富集大量的铜,且能在很高铜污染的土壤中茂盛生长而不受伤害^[16]。因此,海州香薷适合于植物修复技术中的根固定技术,也是高铜污染土壤区植被恢复技术中很好的本土植物。

本实验中,Cu对两个种群根组织酸性磷酸酶活性的影响明显不同(图3)。非矿区种群酸性磷酸酶活性表现出明显的浓度效应和时间效应,即随Cu处理浓度的增加以及处理时间的延长,其活性都明显降低,具有明显的负相关关系(相关系数 R 分别为 -0.94 和 -0.93 , $P < 0.05$)。而矿区种群根中的酸性磷酸酶在铜处理的第1天和第3天活性增加(图3B),很明显,Cu诱导了矿区种群酸性磷酸酶的表达,这与小麦根在低pH(4.0)条件下Al引起的酸性磷酸酶活性增强的结果相似^[40]。许多研究表明,铜等重金属易引起植物对磷等营养元素的吸收利用而易导致磷等营养元素的缺失^[41,42]。海州香薷也有相似结果,过量的Cu减少了海州香薷对磷元素的吸收,导致磷元素低于正常水平(图5)。酸性磷酸酶活性增强是植物对磷饥饿进行自我拯救的重要机制之一^[40,43]。矿区种群虽然在第5天的酸性磷酸酶活性有明显的降低,但和非矿区种群相比,其活性仍然保持较高的水平,且明显高于非矿区种群。这些结果表明,矿区种群在过量铜环境中具有自我拯救机制,这种通过增强植物酸性磷酸酶活性或维持较高活性的机制对于植物在胁迫条件下维持正常的磷生理代谢具有重要作用。

在处理的第一天,两个种群根系分泌的酸性磷酸酶都明显增加(图4),这可能是植物的应急反应,表明两个种群对铜引起的植物磷吸收的障碍通过自我拯救机制而得到一定的缓解。然而,在随后的处理中,非矿区种群根系分泌的酶活性明显降低,而矿区种群仍然保持较高的水平,说明非矿区种群已失去了自我拯救能力,而矿区仍然有。在重金属胁迫下,细菌酸性磷酸酶的大量产生被认为是一种脱毒机制^[44,45]。在真菌 *Aspergillus niger* 中,酸性磷酸酶可能参与Cu的抗性和吸收过程^[44]。本实验海州香薷的研究结果也表明,矿区种群在铜处理时酸性磷酸酶活性增加或保持较高的活性。杨明杰^①的研究也发现,铜胁迫下,海州香薷根系体内的酸性磷酸酶活性显著提高。酸性磷酸酶的大量产生,作为一种脱毒机制,它促使金属离开细胞敏感的位点^[44,45]。同时,酸性磷酸酶的分泌,有利于植物对环境磷的吸收利用,而磷被认为对一些金属元素具有拮抗作用,能减少这些元素的吸收^[46]。如土壤或溶液中磷的增加会减少Cd和Zn的生物积累^[47,48];磷的增加也能减少植物对Cu的积累,相反,磷的不足促进了Cu的积累^[46]。或许,海州香薷矿区种群通过酸性磷酸

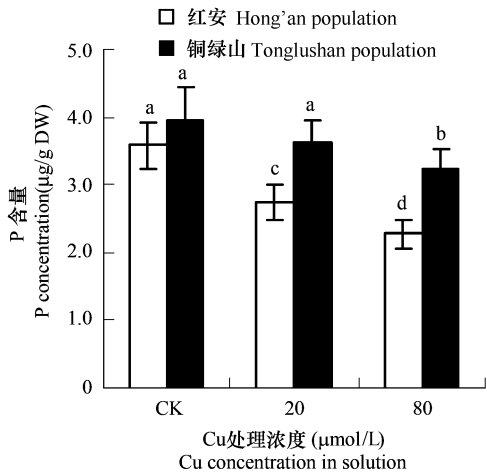


图5 Cu处理对海州香薷两个种群植物根P元素含量的影响

Fig.5 Effects of Cu on P concentration in roots of two *E. haichowensis* populations

图上不同字母(小写)表示平均数($n = 3$)间的差异显著($P < 0.05$); Different letters in Figures indicate significant difference of means values ($n = 3$) ($P < 0.05$)

① 杨明杰. 海州香薷铜超富集和耐性机理. 浙江大学博士论文. 2001. 78—79

酶的脱毒机制直接作用或通过调控磷的吸收来调控铜的间接作用 ,减少植物对铜的吸收。当然 ,铜的吸收积累是一个复杂的过程 ,有许多机制参与 ,其中酸性磷酸酶的作用需更多的实验说明 ,其分子机制也还需进一步研究。

总之 ,海州香薷两个种群在 Cu 积累以及对 Cu 的生理反应方面有明显的种群差异 :来自铜绿山铜矿区的种群 ,其根中积累的 Cu 明显低于非矿区红安种群 ,在铜胁迫下其根系没有产生明显的过氧化损伤 ,仍保持较高的活力 ;其根分泌的和组织内的酸性磷酸酶活性明显高于红安种群。海州香薷铜绿山种群的高 Cu 抗性可能与其采用铜吸收的避性对策有关 ,而高的酸性磷酸酶活性可能分别在减少其铜的吸收及胁迫条件下维持体内正常的磷生理代谢方面具有重要作用。

References :

[1] Duan C Q. Adaptation and microevolution of plants on contaminated environment. Chinese Journal of Ecology ,1995 ,14 (5) :43 — 50.

[2] Xiong Z T. Pollution resistant evolution plants and its genecological costs. Chinese Journal of Ecology ,1997 ,16 (1) :53 — 57.

[3] Baker A J M. Accumulators and excluders—strategies :the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrient ,1981 ,3 ,643 — 654.

[4] Cervantes C ,Gutierrezcorona F. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. FEMS Microbiology Review ,1994 ,14 :121 — 137.

[5] Purchase D ,Miles R J ,Young T W. Cadmium uptake and nitrogen fixing ability in heavy-metal-resistant laboratory and field strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. FEMS Microbiology Ecology ,1997 ,22 :85 — 93.

[6] Williams J W ,Silver S. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. Enzyme and Microbial Technology ,1984 ,6 :530 — 537.

[7] Blake R C ,Choate D M ,Bardhan S ,*et al.* Chemical transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from wastes site. Environmental Toxicology and Chemistry ,1993 ,12 :1365 — 1376.

[8] Zhang C L ,McManus M T. Identification and characterisation of two distinct acid phosphatases in cell walls of roots of white clover. Plant Physiology Biochemistry ,2000 ,38 (4) :259 — 270.

[9] Lefebvre D D ,Duff S M G ,Fife C A ,*et al.* Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells :Enhancement of intracellular ,cellsurface ,and secreted phosphatase activities compared to increases in Pi-absorption rate. Plant Physiology ,1990 ,93 :504 — 511.

[10] Lee R B. Phosphate in flux a wheat root and extracellular phosphatase activity in barley roots and rose cells. New Phytologist ,1988 ,109 :141 — 148.

[11] Li Y J ,Li B ,Liu J Z ,*et al.* Influence of phosphorus deficiency stress on acid phosphatase isozymes in addition lines between common wheat and *Agropyron elongatum*. Scientia Agricultura Sinica ,1998 ,31 (4) :26 — 31.

[12] Cox R M ,Hutchinson T C. The response of root acid phosphatase activity to heavy metal stress in tolerant and non-tolerant clones of two grass species. New Phytologist ,1980. 86 ,359 — 364.

[13] Jeong B C ,Macaskie L E. Production of tow phosphatases by a *Citrobacter* sp. grown in batch and continuous culture. Enzyme and Microbial Technology ,1999 ,24 :218 — 224.

[14] Tsekova K ,Galabova D ,Todorova K ,*et al.* Phosphatase activity and copper uptake during growth of *Aspergillus niger*. Process Biochemistry ,2002 ,37 :753 — 758.

[15] Tang S R ,Wilke B M ,Huang C Y. The uptake of copper by plants dominantly growing on copper mining spoils along the Yangtze River ,the People 's Republic of China. Plant and Soil ,1999 ,209 :225 — 232.

[16] Ke W S ,Xi H A ,Yang Y ,*et al.* Analysis on characteristics of phytogeochemistry of *Elsholtzia haichowensis* in Daye Tonglushan copper mine. Acta Ecologica Sinica ,2001 ,21 (6) :907 — 912.

[17] Jiang LY ,Shi W Y ,Yang X E ,*et al.* Cu hyperaccumulators in mining area. Chinese Journal of Applied Ecology ,2002 ,13 (7) :906 — 908.

[18] Yang X E ,Shi W Y ,Fu C X ,*et al.* Copper hyperaccumulators of Chinese native plants :characteristics and possible use for phytoremediation. In : Bassam ,N. E. L. ed. Sustainable Agriculture for Food ,Energy and Industry ,London :James and James Publishers ,1998. 484 — 489.

[19] Song J ,Zhao F J ,Luo Y M ,*et al.* Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. Environmental Pollution ,2004 ,128 :307 — 315.

[20] Weng G Y ,Wu L H ,Wang Z Q ,*et al.* Copper uptake by four *Elsholtzia* ecotypes supplied with varying levels of copper in solution culture. Environment International ,2005 ,31 :880 — 884.

[21] Shi J Y ,Chen Y X ,Tian G M ,*et al.* Copper uptake mechanism of *Elsholtzia splendens* and *Commelina communis*. Plant Nutrition and Fertilizer Science ,2004 ,10 (6) :642 — 646.

[22] Liu J ,Xiong Z. Differences in accumulation and physiological response to copper stress in three populations of *Elsholtzia haichowensis*. *Water , Air and Soil Pollution* ,2005 ,168 (2) :5 — 16.

[23] Shi J Y ,Chen Y X ,Huang Y Y , *et al.* SRXRF microprobe as a technique for studying elements distribution in *Elsholtzia splendens*. *Micron* , 2004 ,35 :557 — 564.

[24] Lou L Q ,Shen Z G ,Li X D. The copper tolerance mechanisms of *Elsholtzia haichowensis* a plant from copper-enriched soils. *Environmental and Experimental Botany* ,2004 ,51 :111 — 120.

[25] Chen Y X ,Wang Y P ,Wu W X , *et al.* Impacts of chelate-assisted phytoremediation on microbial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and non-accumulator. *Science of the Total Environment* ,2006 ,356 :247 — 255.

[26] Shi J ,Chen Y ,Lin Q , *et al.* The influence of root exudates and microbe on heavy metal activity in contaminated soil. *China Environmental Science* ,2004 ,24 (3) :316 — 319.

[27] Shu W S ,Yang K Y ,Zhang R Q , *et al.* Flora and heavy metals contents of dominant plants in an ancient copper spoil heap in Tonglvshan in Hubei province , China. *Chinese Journal of Environmental Acta* ,2001 ,7 (1) :7 — 12.

[28] Jiang LY ,Yang X E ,He Z L. Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by *Elsholtzia splendens*. *Chemosphere* , 2004 ,55 :1179 — 1187.

[29] Chen Y X ,Wang Y P ,Wu W X , *et al.* Impacts of chelate-assisted phytoremediation on microbial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and non-accumulator. *Science of the Total Environment* ,2006 ,356 :247 — 255.

[30] Li H ,Luo Y M ,Song J. Studies on copper accumulation and physiology characters of *Elsholtzia haichowensis* under Cu treatments. *Soils* ,2002 # : 225 — 228

[31] Peng H Y ,Yang X E ,Jiang L Y , *et al.* Copper phytoavailability and uptake by *Elsholtzia splendens* from contaminated soil as affected by soil amendments. *J. Environment Science Health Part A* 2005 ,40 (4) :839 — 856.

[32] Yang X E ,Peng H Y ,Jiang L Y , *et al.* Phytoextraction of copper from contaminated soil by *Elsholtzia splendens* as affected by EDTA , citric acid , and compost. *International J. Phytoremediation* ,2005 ,7 (1) :69 — 83.

[33] Xie M J ,Ke W S ,Xiong Z T , *et al.* MDA accumulation and antioxidation capacity of two *Elsholtzia haichowensis* populations under copper stress. *Chinese Journal of Ecology* ,2005 ,24 (8) :935 — 938.

[34] Jiang L Y ,Yang X E ,He Z L. Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by *Elsholtzia splendens*. *Chemosphere* , 2004 55 :1179 — 1187.

[35] Yang M J ,Yang X E ,Romheld V. Growth and nutrient composition of *Elsholtzia splendens* Nakai under copper toxicity. *J. Plant Nutrient* ,2002 , 25 (7) :1359 — 1375.

[36] Heath R L ,Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation , *Archeibiont Biochemistry and Biophysics* ,1968 ,125 :189 — 198.

[37] Llugany M ,Lombini A ,Poschenrieder C , *et al.* Different mechanisms account for enhanced copper resistance in *Silene armeria* populations from mine spoil and serpentine sites. *Plant and Soil* ,2003 ,251 :55 — 63.

[38] Luna C M ,Gouzalex C A ,Tripp V S. Oxidative damage caused by excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiology* ,1994 ,35 :11 — 15.

[39] Li F M ,Xiong Z T ,Hu H Y. Copper toxicity and accumulation in *Elsholtzia splendens*. *Environmental Science* ,2003 ,24 (3) :30 — 34.

[40] Zhu X Z ,Huang Y ,Zong L G , *et al.* Effects of aluminum speciation on wheat root growth and its enzyme activity. *Chinese Journal of Applied Ecology* ,2005 ,16 (6) :1043 — 1046.

[41] Biddappa C C ,Khan H ,Joshi O P , *et al.* Effect of root feeding of heavy metals on the leaf concentration of P ,K ,Ca and Mg in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant and Soil* ,1987 ,101 :295 — 297.

[42] Antosiewicz D M. The relationships between constitutional and inducible Pb-tolerance and tolerance to mineral deficits in *Biscutella laevigata* and *Silene inflata*. *Environmental and Experimental Botany* ,1995 ,35 (1) :55 — 69.

[43] Duff S M G ,Sarath G ,PlaxtonW C. The role of acid phosphatases in plant phosphorous metabolism. *Physiologia Plantarum* ,1994 ,90 :791 — 800.

[44] Montgomery D M ,Dean A C R ,Wiffen P , *et al.* Phosphatase production and activity in *Citrobacter freundlii* and a naturally occurring heavy-metal-accumulating *Citrobacter* sp. *Microbiology* ,1995 ,141 :2433 — 2441.

[45] Macaskie L E ,Empson R M ,Cheethman AK , *et al.* Uranium bioaccumulation by a *Citrobacter* sp. as a result of enzymically mediated growth of polycrystalline $\text{H}\text{U}\text{O}_2\text{P}\text{O}_4$. *Science* ,1992 ,257 :782 — 784.

[46] Xiong Z T ,Li Y H ,Xu B. Nutrition Influence on Copper Accumulation by *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicology and Environmental Safety* ,

2002 , 53 :200 — 205.

[47] Panwar B S , Singh J P , Laura R D. Cadmium uptake by cowpen and mungbean as affected by Cd and P application. *Water , Air and Soil Pollution* , 1999 , 112 :163 — 169.

[48] Yang Z , Zheng S , Zhao X , *et al.* Effect of phosphorus on the accumulation of cadmium and zinc in suspension-cultured wheat cells. *Acta Sci. Circumstance* , 1999 , 19 :693 — 695.

参考文献：

[1] 段昌群. 植物对环境污染的适应与植物的微进化. *生态学杂志* , 1995 , 14 (5) :43 ~ 50.

[2] 熊治廷. 植物抗污染进化及其遗传生态学代价. *生态学杂志* , 1997 , 16 (1) 53 ~ 57.

[11] 李玉京, 李滨, 刘建中, 等. 低磷营养胁迫对小麦——长穗偃麦草附加系酸性磷酸酶同工酶的影响. *中国农业科学* , 1998 , 31 (4) : 26 ~ 31.

[16] 柯文山, 席红安, 杨毅, 等. 大冶铜绿山矿区海州香薷 (*Elsholtzia haichowensis*) 植物地球化学特征分析. *生态学报* , 2001 , 21 (6) :907 ~ 912.

[17] 姜理英, 石伟勇, 杨肖娥, 等. 铜矿区超积累 Cu 植物的研究. *应用生态学报* , 2002 , 13 (7) 906 ~ 908.

[21] 施积炎, 陈英旭, 田光明, 等. 海州香薷和鸭跖草铜吸收机理. *植物营养与肥料学报* , 2004 , 10 (6) : 642 ~ 646.

[26] 施积炎, 陈英旭, 林奇, 等. 根系分泌物和微生物对土壤重金属活性的影响. *中国环境科学* , 2004 , 24 (3) :316 ~ 319.

[27] 束文圣, 杨开颜, 张志权, 等. 湖北铜绿山古铜矿冶炼渣植被与优势植物的重金属含量研究. *应用与环境生物学报* , 2001 , 7 (1) : 7 ~ 12.

[30] 李华, 骆永明, 宋静. 不同铜水平下海洲香薷的生理特性和铜积累研究. *土壤* 2002 4 : 225 ~ 228.

[33] 谢名吉, 柯文山, 熊治廷, 等. 三个不同来源海州香薷种群的抗氧化能力差异比较. *生态学杂志* 2005 , 24 (8) :935 ~ 938.

[39] 李锋民, 熊治廷, 胡洪营. 海州香薷对铜的蓄积及铜的毒性效应. *环境科学* 2003 , 24 (3) :30 ~ 34.

[40] 朱雪竹, 黄耀, 宗良纲, 等. 活性铝对小麦根生长及酶活性的影响. *应用生态学报* , 2005 , 16 (6) : 1043 ~ 1046.