

DOI: 10.5846/stxb201411132244

冯汉青, 杜变变, 王庆文, 王荣方, 贾凌云, 孙坤, 周田宝. 镉胁迫下活性炭对小麦幼根的保护作用. 生态学报, 2016, 36(10): - .

Feng H Q, Du B B, Wang Q W, Wang R F, Jia L Y, Sun K, Zhou T B. The role of activated carbon in protecting the roots of wheat seedlings under cadmium stress. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(10): - .

镉胁迫下活性炭对小麦幼根的保护作用

冯汉青^{1,*}, 杜变变¹, 王庆文¹, 王荣方², 贾凌云¹, 孙 坤¹, 周田宝²

1 西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070

2 西北师范大学化学化工学院, 兰州 730070

摘要: 本文对镉处理下活性炭对小麦幼根的保护作用进行了研究。在小麦幼根的水培环境中加入镉导致了小麦幼根根长的降低、干重及鲜重的下降、细胞死亡水平上升和可溶性蛋白含量的增加。将小麦幼根置于加入活性炭的水培环境中并未对小麦幼根的根长、干重、鲜重、细胞死亡水平和可溶性蛋白的含量造成不良的影响, 且在一定程度上促进了根的生长并降低了细胞的死亡水平。而在镉处理下加入活性炭则明显减缓了小麦幼根的根长的降低、干重及鲜重的下降、细胞死亡水平上升和可溶性蛋白含量的增加。上述观察表明, 活性炭的加入对于镉和氯苯胁迫下小麦幼根具有一定的保护作用。

关键词: 活性炭; 镉; 幼根; 小麦

The role of activated carbon in protecting the roots of wheat seedlings under cadmium stress

FENG Hanqing^{1,*}, DU Bianbian¹, WANG Qingwen¹, WANG Rongfang², JIA Lingyun¹, Sun Kun¹, ZHOU Tianbao²

1 College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

2 College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

Abstract: Aims: Our objectives were to reveal the role of activated carbon in protecting the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under Cd (cadmium) stress. Methods: The roots of wheat seedlings were subjected to hydroponic conditions, and the length, dry weight, fresh weight, level of cell death, and soluble protein content of the roots were measured and compared under Cd stress in the presence of activated carbon. Important findings: Under Cd stress, the length, dry weight, and fresh weight of the roots of wheat seedling significantly decreased, while the level of cell death and content of soluble proteins of the roots significantly increased. These observations indicate that Cd stress causes obvious damages to the roots of wheat seedlings. Sole application of activated carbon had no negative effects on the length, dry weight, fresh weight, level of cell death, and content of soluble proteins of the roots of wheat seedlings. In addition, the application of activated carbon enhanced the growth of the roots and decreased the level of cell death of the roots to some extent. Further, the values of the length, dry weight, fresh weight, level of cell death, and content of soluble proteins of the roots under Cd stress were compared with those under Cd stress in the presence of activated carbon. The results revealed that the values of the length, dry weight, and fresh weight of the roots under Cd stress were significantly lower than those under Cd stress in the presence of activated carbon, while the level of cell death and content of soluble proteins of the roots under Cd stress were significantly higher than those under Cd stress in the presence of activated carbon. These results indicate that

基金项目: 国家自然科学基金 (31260059)

收稿日期: 2014-11-13; 网络出版日期: 2015-00-00

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: fenghanq@nwnu.edu.cn

application of activated carbon can protect the roots of wheat seedlings against Cd stress.

Key Words: activated carbon; cadmium; root; wheat

由于活性炭具有强大的吸附作用且易于制备,从而被广泛应用于工业、材料以及医疗等多个科学领域。尽管活性炭并不是植物自身所需要的成分,但近年来活性炭也逐渐应用于植物学和生态学的研究当中。研究发现,在植物生长培养基中加入适量的活性炭可以显著改善培养基成分的比例、为根的生长创造暗环境、增加通气量、并能够吸附培养基中抑制植物生长的物质,从而在植物的微繁殖、体细胞胚发生、花药培养、原生质体培养中发挥了一定的作用^[1-5]。此外,植物叶片所产生的挥发性化合物和根部所产生的代谢物在植物与昆虫的相互作用以及在植物间的信息交流中起着重要作用;而由于活性炭对这些有机物具有较强的吸收作用,其也被作为一种有力的工具去研究这些植物所产生的化合物的含量、组分以及生理及生态学作用^[6-7]。

随着人类活动对自然环境影响的不断加剧,环境污染的问题日益严重。其中,最为严重的问题之一是重金属离子和有机物对环境的污染。这两大类污染物通过水体大量地进入植物体内。在污染环境的诸多重金属中,镉(Cd)在生物体内的蓄积性及毒性较强。研究发现,当镉在植物体内积累到一定程度时,会导致植物生长迟缓、营养元素的吸收受阻、光合作用和呼吸作用水平下降、褪绿乃至植物死亡^[8-11]。因此,镉严重破坏了植物在生态环境中的生长并对农业生产构成了一定的威胁。

如何减少重金属离子对植物的影响始终是植物学和生态学研究的重点和难点问题。由于活性炭同时具有吸附金属离子的作用^[12];因此,在植物受到重金属离子的胁迫下,活性炭的使用应有望成为一种对植物进行保护的有效方式。然而,目前国内外往往只对活性炭对金属离子的吸附作用进行的研究,而活性炭是否能够起到缓解金属离子对植物的毒害作用则研究甚少。

基于此,本文以小麦幼根为材料,研究了在重金属离子镉的胁迫下,活性炭对小麦幼根的保护作用。相信该研究能够进一步丰富活性炭在植物及生态学研究领域的应用思路,并能对如何减少重金属离子对植物的毒害这一问题的解决提供一定的借鉴和参考。

1 材料及方法:

1.1 植物材料的培养

将供试材料小麦(*Triticum aestivum* L.)品种为春小麦绵杂麦 168。种子用水冲洗 5—6 次,并用 0.1%的 NaClO 表面消毒 15 min,之后用蒸馏水冲洗 3—5 次以去除种子表面残余的 NaClO。此后将种子放于培养皿中用湿纱布覆盖,在 28℃ 黑暗条件下催芽。待露白之后选取露白一致的种子放置于平展开的纱布上,并将纱布置于盛有蒸馏水的培养皿上,用皮筋固定紧绷纱布,使根生长于蒸馏水中。在 28℃ 下培养生长。

1.2 材料处理及方法

对于 Cd 的处理:待根长到 2—3 cm 左右时(在该时期,幼苗尚未完全进入光合生长阶段,故而能降低光合作用产物向根部输送而干扰根对镉的耐受性),选取长势一致的小麦幼苗,用同样的方法将小麦幼苗的幼根并分别进行以下处理:1)置于蒸馏水(对照组);2)置于含有 25、50 或 100 mg/L 的 Cd(NO₃)₂ 溶液中;3)置于加入了活性炭的蒸馏水(添加比例为每升蒸馏水 3g 活性炭)中;4)置于加入了活性炭的 25、50、100 mg/L Cd(NO₃)₂ 溶液(添加比例为每升溶液 3g 活性炭)中。在上述不同溶液中培养 24h 或 48 h 后进行以下数据的测量。每个处理为 5 株小麦,实验为 4 次独立实验的平均值。

1.3 幼根长度的测定

将幼苗小心地从处理液中取出,立刻用蒸馏水冲洗 5—6 次,参考 He 等^[13]所报道的方法测量根长并记录数据。

1.4 幼根鲜重和干的重测定

根用蒸馏水冲洗 5—6 次后,用吸水纸将表面水分吸干,用分析天平测其鲜重,记录数据后放入烘箱,

100℃烘箱加热 30 min,然后在 $80 \pm 1^\circ\text{C}$ 烘干至恒重,用分析天平称其干重。

1.5 可溶性蛋白质含量的测定

将幼根切下,称重后放入研钵中,加 5 mL 蒸馏水研磨成匀浆,放置 0.5—1h 后在 4 000 r/min 离心 20 min,弃去沉淀,上清液转入另一离心管,并以蒸馏水定容所得提取液。吸取提取液 0.1mL,加入 5mL 考马斯亮蓝 G-250 蛋白溶液,充分混合,放置 2 min 后用在 595nm 下比色,记录吸光值,并依标准曲线计算蛋白质含量。

1.6 根细胞死亡程度

根细胞死亡程度参照 Hung 等^[14]所报道的方法进行。将处理后的小麦幼根用蒸馏水清洗、吸干,在室温下浸泡于 0.25% (W/V 质量百分数)的伊文思蓝溶液中染色 20 min。随后取出小麦幼根,用水清洗表面的伊文思蓝染液 15min,以去除过量的及未结合在细胞中的染料。然后将幼根放置在蒸馏水中过夜。之后,将幼根切成均匀小段,放入 5 mL 的 50%的甲醇(V/V 体积百分数)和 1% SDS(十二烷基磺酸钠)(W/V)的混合提取液中,在 50℃下水浴 1 h,将含有伊文思蓝的提取液在 595 nm 处测量 OD 值(光吸收值)。

1.7 统计学分析

以上测量取 4 次以上的独立实验结果的平均值,并将数值表示为平均值±标准偏差(SD)。使用方差检验的 Kruskal-Wallis 单因素分析的数据进行分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学上的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 在不同 Cd 浓度处理下活性炭对小麦幼根的保护作用

将小麦幼苗分别置于含有 25、50 或 100 mg/L 的 Cd (NO_3)₂ 溶液中处理 24 小时,并以置于蒸馏水中的小麦幼根作为对照(control)。结果显示,在上述不同浓度的 Cd 处理 24 小时后,小麦幼根的根长较之对照显著性下降(图 1)。用加入活性炭(activated carbon, AC)的蒸馏水处理小麦幼苗,发现和对照相比,单独活性炭(AC)的处理使得小麦幼根的根长有所增加。而在 Cd 溶液中加入活性炭(AC+Cd)则显著性缓解了 Cd 处理对小麦幼根的根长的抑制作用。较之在 25、50 或 100 mg/L 的 Cd 单独处理下,在上述不同 Cd 溶液中加入活性炭使得小麦幼根的根长分别显著性增加了约 1.3 倍、1.6 倍和 1.5 倍(图 1)。

在不同浓度的 Cd 处理 24 小时后,小麦幼根的鲜重和干重较之对照也显著性下降(图 2)。和对照相比,单独活性炭的处理对小麦幼根的鲜重和干重无显著性差异。而在 Cd 溶液中加入活性炭(AC+Cd)则显著性缓解了 Cd 处理对小麦幼根的鲜重和干重的降低作用。较之在 25、50 或 100 mg/L 的 Cd 单独处理下,在上述不同 Cd 溶液中加入活性炭使得小麦幼根的鲜重分别显著性增加了约 1.5 倍、1.6 倍和 1.3 倍(图 2);而使得小麦幼根的干重分别显著性增加了 1.2 倍、1.7 倍和 1.4 倍(图 2)。

测量表明,和对照相比,小麦幼根的可溶性蛋白质含量在 Cd 处理下显著性上升。而较之在的 Cd 单独处理下,在 Cd 处理下加入活性炭则使得可溶性蛋白质的含量显著性下降(图 3)。较之在 25、50 或 100 mg/L 的 Cd 单独处理下,在上述不同 Cd 溶液中加入活性炭使得小麦幼根可溶性蛋白质的含量分别显著性降低了约 27%、27%和 10%(图 3)。

同时本研究对上述不同处理下的小麦幼根细胞的死亡程度进行了研究。结果表明,与对照组相比,单独

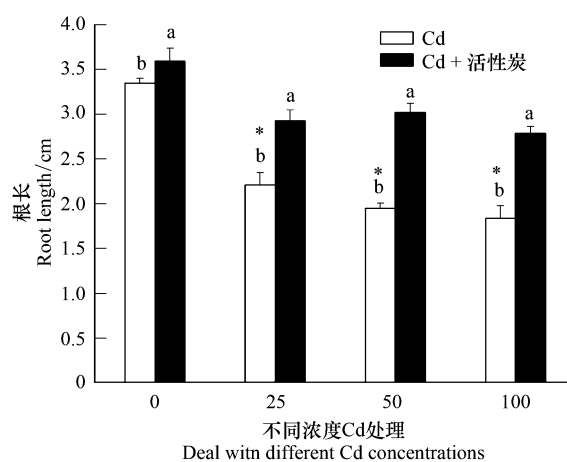


图 1 不同处理对小麦幼根根长的影响

Fig.1 The effects of different treatments on the length of wheat seedlings' roots

数值为 4 次平行实验的平均值±标准差,不同字母表示在同一浓度的 Cd 处理下数值之间在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异。星号表示 Cd 处理下数值较之对照在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异

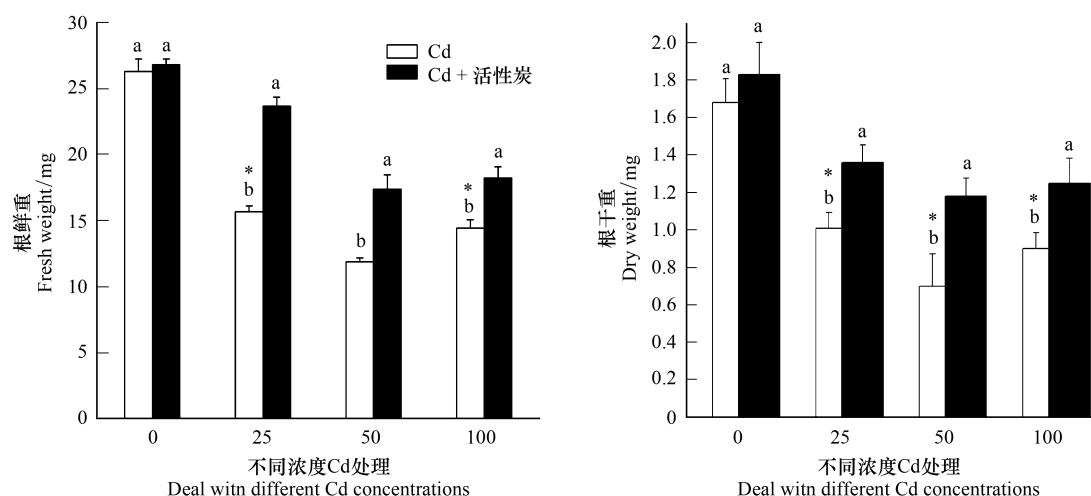


图2 不同处理对小麦幼根鲜重和干重的影响

Fig.2 The effects of different treatments on the fresh weight and dry weight of wheat seedlings' roots

数值为4次平行实验的平均值±标准差,不同字母表示在同一浓度的Cd处理下数值之间在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异。星号表示Cd处理下数值较之对照在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异

AC处理下根细胞死亡程度有一定的下降。而Cd处理下的根细胞死亡程度较之对照显著性增加。较之在Cd单独处理下,在Cd溶液中加入活性炭使得小麦幼根幼根细胞死亡水平有所降低。其中,在50 mg/L的Cd对细胞死亡的缓解作用最为明显(缓解了约14%(图4))。

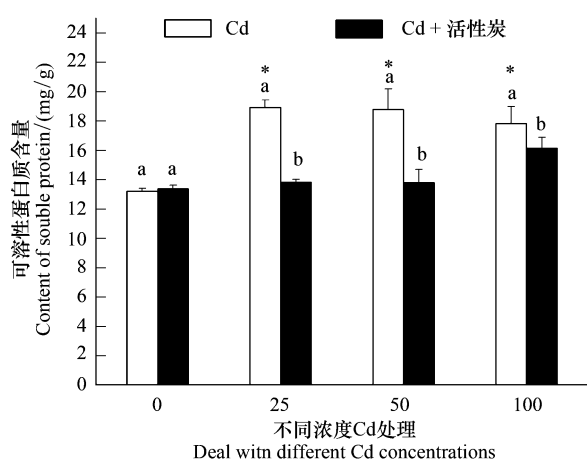


图3 不同处理对小麦幼根可溶性蛋白水平的影响

Fig.3 The effects of different treatments on the content of soluble protein of wheat seedlings' roots

数值为4次平行实验的平均值±标准差,不同字母表示在同一浓度的Cd处理下数值之间在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异。星号表示Cd处理下数值较之对照在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异

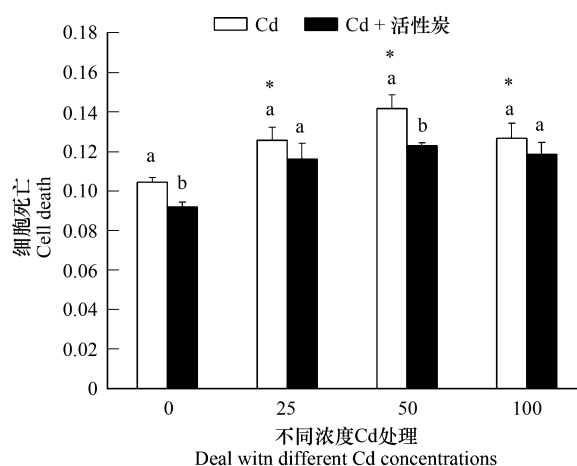


图4 不同处理对小麦幼根细胞死亡水平的影响

Fig.4 The effects of different treatments on the level of wheat seedlings' roots cell death

数值为4次平行实验的平均值±标准差,不同字母表示数值之间在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异;数值为4次平行实验的平均值±标准差,不同字母表示在同一浓度的Cd处理下数值之间在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异。星号表示Cd处理下数值较之对照在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异

选取了50 mg/L的Cd溶液处理下小麦幼根细胞进行伊文思蓝染色发现:50 mg/L Cd处理下的根细胞染色程度与对照组相比明显加深。单独AC处理下小麦幼根细胞染色程度略浅于对照;而Cd和AC共同处理后的小麦幼根与单独Cd处理下的小麦幼根相比,前者染色程度明显性低于后者(图5)。上述结果表明,AC的加入明显缓解了50 mg/L Cd处理下幼根细胞的死亡,可见Cd处理下AC的加入对小麦幼根细胞具有一定的

保护作用。

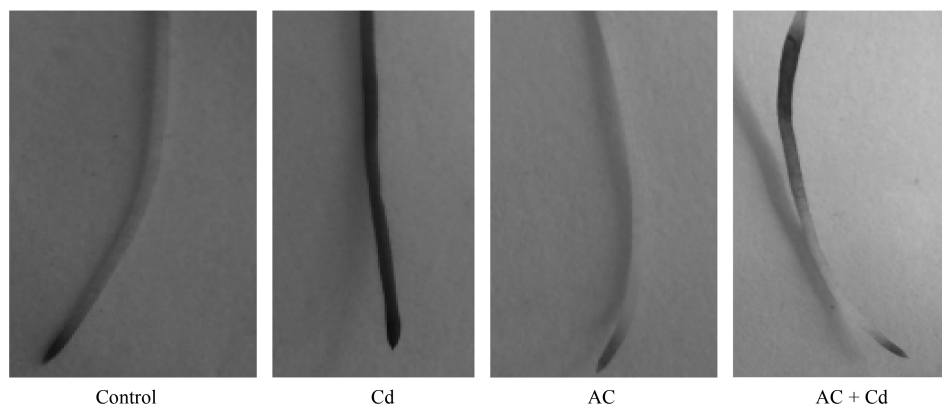


图5 利用伊文思蓝染色检测不同处理下小麦幼根死亡程度

Fig.5 The effects of different treatments on the level of cell death in wheat seedlings' roots examined using Evans blue staining assay

2.2 在同一 Cd 浓度不同时间处理下活性炭对小麦幼根的保护作用

为了进一步探索在 Cd 处理不同时间下活性炭对小麦幼根的保护作用。将小麦幼苗置于 100 mg/L 的 Cd (NO₃)₂ 溶液中分别处理 24h 或 48h。并在 Cd 溶液处理不同时间下,比较了 Cd 单独处理和和 Cd 溶液中加入活性炭 (AC+Cd) 处理下小麦幼根参数的差异。实验发现,在 Cd 溶液 48 小时下活性炭对小麦幼根的保护作用强于在 24 小时下。在 100 mg/L 的 Cd(NO₃)₂ 溶液处理 24 后,Cd 处理和 AC+Cd 处理下小麦幼根根长、鲜重和干重的差值分别为 0.96 cm、4 mg 和 0.29 mg;而在 Cd(NO₃)₂ 溶液处理 48 后,Cd 处理和 AC+Cd 处理下小麦幼根根长的差值为 2.12 cm、13 mg 和 1.59 mg(图 6A、B、C)。而在 100 mg/L 的 Cd(NO₃)₂ 溶液处理 24 后,Cd 处理和 AC+Cd 处理下幼根蛋白质含量和细胞死亡的差值分别为 1.69 mg/g 和 0.0082;而在 Cd(NO₃)₂ 溶液处理 48 后,Cd 处理和 AC+Cd 处理下小麦幼根根长的差值为 2.41 mg/g 和 0.016(图 6D、E)。

3 讨论

根是植物经受水体或土壤中污染物的主要器官。本研究发现,不同浓度的 Cd 处理导致了小麦根长和生物量(鲜重及干重)的显著性降低(图 1 和 2)以及细胞死亡的发生(图 4 和 5),表明了 Cd 胁迫抑制了小麦根的生长;而由于植物组织的生长抑制和生物量的下降是细胞死亡的必然结果,因而提示了 Cd 对小麦根生长和生物量的抑制作用可能和其导致了细胞死亡有关。

有学者认为,植物在受到环境胁迫时会大量合成一些可溶性蛋白质来保护或维持植物的基本结构或功能^[15-16]。Alayat 等^[17]报道了 Cd 处理引起了小麦叶片可溶性蛋白含量上升,且可溶性蛋白含量的上升水平和 Cd 处理浓度正相关。Kavita 和 Dubey 发现,Cd 也可以通过抑制蛋白酶的活性而导致了植物中可溶性蛋白含量的上升^[18]。因此,尽管 Cd 胁迫下可溶性蛋白含量的变化有着较为复杂的机理,但可溶性蛋白含量的上升反映了植物受到了 Cd 的胁迫压力。而本研究也发现,不同浓度的 Cd 引起了根可溶性蛋白含量的增加(图 3)。

单独对小麦根施加活性炭使得根长略有增加,也使得根细胞死亡程度有所降低,但其对小麦幼根的鲜重、干重以及可溶性蛋白质的含量无显著性影响(图 1,2,3,4 和 5),这表明了在非胁迫环境下加入活性炭能够在一定程度上优化根的生长和细胞活力。推测这可能是由于活性炭可以增加根部的通气量和吸附植物的代谢废物^[1-5]所致。而在不同浓度的 Cd 处理下,活性炭均能够在不同程度上减缓小麦幼根根长、干重及鲜重的下降,以及细胞死亡水平和可溶性蛋白含量的增加(图 1,2,3,4 和 5)。我们也进一步研究了在较长时间 Cd 胁迫下活性炭对小麦幼根的保护作用。以 100 mg/L 的 Cd 溶液处理 24 小时和 48 小时为例;在 Cd 溶液处理 48 小时下活性炭对小麦幼根的保护作用较之在 24 小时下更加明显(图 6)。综合的结果显示,活性炭的加入能

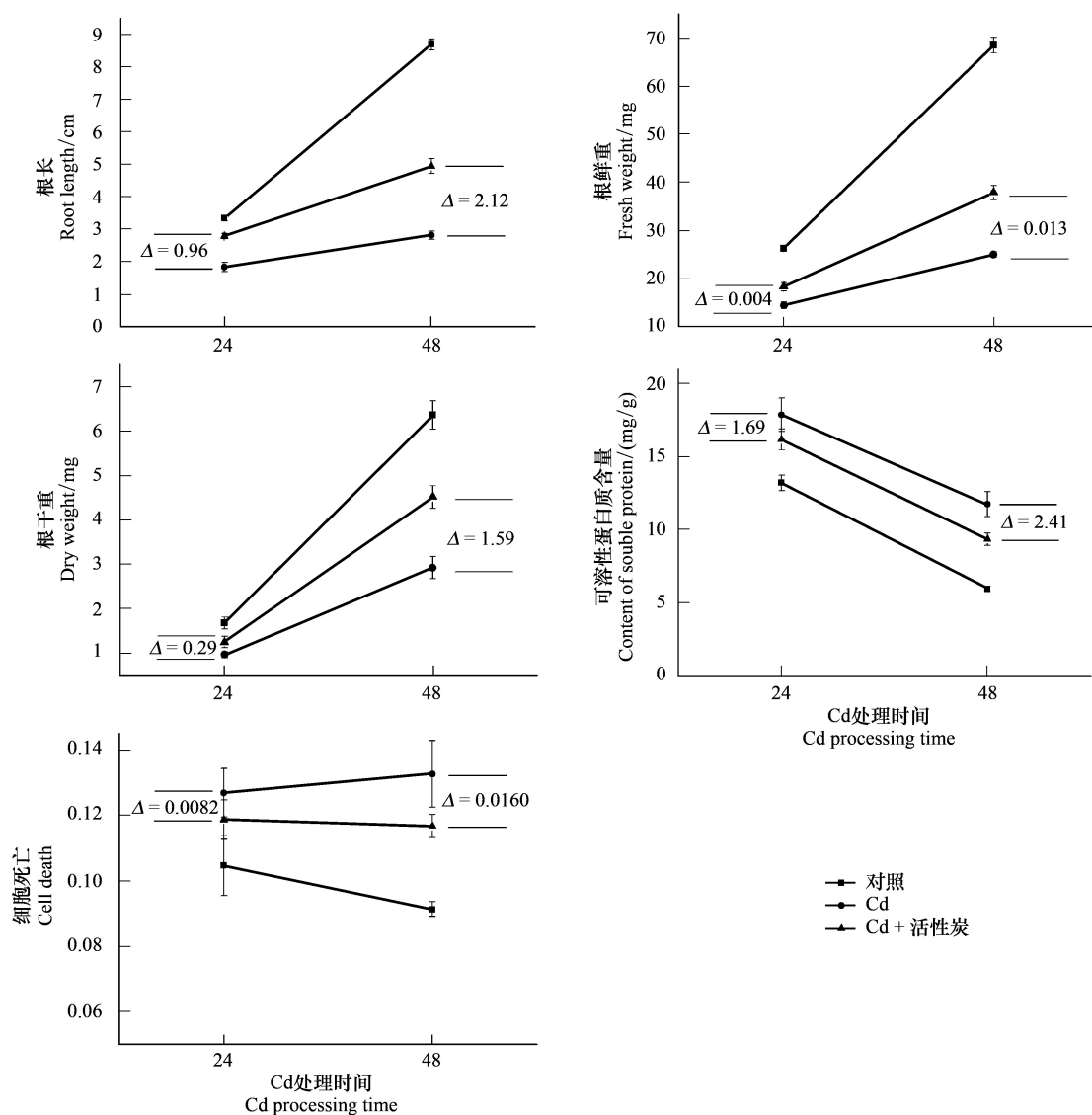


图 6 不同时间 Cd(100 mg/L) 处理下活性炭对小麦幼根的保护作用

Fig.6 The role of activated carbon in protecting the roots of wheat seedlings under cadmium stress with different times

数值为 4 次平行实验的平均值±标准差

起到缓解 Cd 对植物的毒害作用。

以前的研究表明,活性炭对水中的 Cd 具有较强的吸附性能^[12],因而,活性炭对于镉处理下小麦幼根的保护作用可能主要归结于活性炭对 Cd 的吸附。而 Rao 等的工作表明,随着活性炭剂量的增加,活性炭的可交换位点及表面积不断上升,因而可以进一步提高对 Cd 的吸附性^[19]。而我们猜测,在植物生长的过程中,活性炭也可能吸附了 Cd 与根代谢物所形成的其他可能抑制根细胞生长或活力的化合物。其细节化的机理还有待进一步的研究探讨。同时,除了 Cd 之外,活性炭能够对多种污染性的重金属及有机物进行吸附^[20-21]。因此,施加活性炭有望成为减少重金属离子和有机物对植物毒害的有效方式。但活性炭的剂量必须以考虑其成本为前提。本实验室已经通过生物废料研制了一些成本低廉的活性炭^[22],有望进一步降低该方法的使用成本。

参考文献 (References):

- [1] 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214-217.

- [2] 李永文, 刘新波. 植物组织培养技术. 北京: 北京大学出版社, 2007.
- [3] 陈龙清, 鞠庆坤. 活性炭对几种植物试管苗生根的影响. 华中农业大学学报, 1995, 14(6): 600-602.
- [4] Thomas T D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnology Advances, 2008, 26(6): 618-631.
- [5] 刘根林, 梁珍海, 朱军. 活性炭在植物组织培养中的作用概述. 江苏林业科技, 2001, 28(5): 46-48.
- [6] Barney J N, Spark J P, Greenberg J, Whitlow T H, Guenther A. Biogenic volatile organic compounds from an invasive species: impacts on plant-plant interactions. Plant Ecology, 2009, 203(2): 195-205.
- [7] Perry L G, Thelen G C, Ridenour W M, Weir T L, Callaway R M, Paschke M W. Dual role for an allelochemical: ($\pm$)-catechin from *Centaurea maculosa* root exudates regulates conspecific seedling establishment. Journal of Ecology, 2005, 93(6): 1126-1135.
- [8] Obata H, Umebayashi M. Effects of cadmium on mineral nutrient concentrations in plants differing in tolerance for cadmium. Journal of Plant Nutrition, 1997, 20(1): 97-105.
- [9] 陈志良, 莫大伦, 仇荣亮. 镉污染对生物有机体的危害及防治对策. 环境保护科学, 2001, 27(4): 37-39.
- [10] 檀建新, 尹君, 王文忠, 贾荣革, 史吉平. 镉对小麦、玉米幼苗生长和生理生化反应的影响. 河北农业大学学报, 1994, 17(增刊): 83-87.
- [11] 王连臻. 镉对小麦苗期生长及生理指标的影响. 安徽农业科学, 2008, 36(9): 3529-3530.
- [12] 朱冬冬, 任淑华. 活性炭纤维对镉离子吸附性能的研究. 当代化工, 2013, 42(10): 1383-1384.
- [13] He X, Fang J J, Li J J, Qu B Y, Ren Y Z, Ma W Y, Zhao X Q, Li B, Wang D W, Li Z S, Tong Y P. A genotypic difference in primary root length is associated with the inhibitory role of transforming growth factor-beta receptor-interacting protein-1 on root meristem size in wheat. The Plant Journal, 2014, 77(6): 931-43.
- [14] Hung W C, Huang D D, Chien P S, Yeh C M, Chen P Y, Chi W C, Huang H J. Protein tyrosine dephosphorylation during copper-induced cell death in rice roots. Chemosphere, 2007, 69(1): 55-62.
- [15] Baker J, Van dennSteele C H, Dure L III. Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. Plant Molecular Biology, 1988, 11(3): 277-291.
- [16] Amina B, Réda D M, Rachid R, Houria D. Physiological and biochemical changes observed in alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia* treated with Paracetamol. International Journal of Biosciences, 2013, 9(3): 132-141.
- [17] Alayat A, Souiki L, Grara N, Djebbar M R, Boumedris Z E, Benosmane S, Amamra R, Berrebbah H. Effects of cadmium on water content, soluble protein, proline changes and some antioxidant enzymes in wheat (*Triticum durum* desf.) leaves. Annual Research & Review in Biology, 2014, 4(24): 3835-3847.
- [18] Kavita S, Dubey R S. Cadmium elevates level of protein, amino acids and alters activity of proteolytic enzymes in germinating rice seeds. Acta Physiologiae Plantarum, 1998, 20(2): 189-196.
- [19] Rao M M, Ramesh A, Rao G P C, Seshaiiah K. Removal of copper and cadmium from the aqueous solutions by activated carbon derived from *Ceiba pentandra* hulls. Journal of Hazardous Materials, 2006, 129(1/3): 123-129.
- [20] Anirudhan T S, Sreekumari S S. Adsorptive removal of heavy metal ions from industrial effluents using activated carbon derived from waste coconut buttons. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(12): 1989-1998.
- [21] Hatt J W, Germain E, Judd S J. Granular activated carbon for removal of organic matter and turbidity from secondary wastewater. Water Science & Technology, 2013, 67(4): 846-853.
- [22] Zhou T, Wang H, Ji S, Feng H, Wang R. Synthesis of mesoporous carbon from okara and application as electrocatalyst support. Fuel Cells, 2014, 14(2): 296-302.