

钴在蚕豆中的积累分布及其对叶片光合作用和抗氧化酶活性的影响

王建宝^{1,2}, 唐运来^{1,2*}, 徐 静^{1,2}, 徐国聪^{1,2}, 邹 玥^{1,2}, 陈 浩³

(1 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川绵阳 621000; 2 西南科技大学 核废物与环境安全国防重点学科实验室, 四川绵阳 621000; 3 四川省原子能研究院, 成都 610066)

摘 要:以 6 叶期蚕豆(*Vicia faba* L.) 幼苗为材料, 用不同浓度钴(0、20、40、80、120 mg · kg⁻¹) 土培处理 14 d, 研究不同浓度钴处理对蚕豆体内钴的富集和分布特征, 以及叶片光合色素含量、叶绿素荧光参数、光合作用参数、生长指标和 POD、SOD、CAT 活性的影响。结果显示: (1) 蚕豆的根、茎、叶均能吸收一定量的钴, 但不同器官间积累量有显著差异, 并表现为根>叶>茎, 且在不同钴浓度处理下根吸收量也存在显著差异。 (2) 不同浓度钴处理下, 蚕豆叶片叶绿素(a、b) 含量、气孔导度(G_s)、最大光化学效率(F_v/F_m)、PSⅡ潜在活性(F_v/F_0) 等参数与对照组相比表现出 0~40 mg · kg⁻¹ 浓度下促进, 40~120 mg · kg⁻¹ 浓度下抑制, 而净光合速率(P_n)、胞间 CO₂ 浓度(C_i) 以及光系统Ⅱ最小荧光(F_0)、最大荧光(F_m) 表现为在 0~80 mg · kg⁻¹ 浓度下促进, 80~120 mg · kg⁻¹ 浓度下抑制, 蒸腾速率(T_r) 和类胡萝卜素含量则在各浓度下一直表现为促进, 并且以上光合作用相关参数与对照组相比都在 40 mg · kg⁻¹ 浓度下促进作用达到最大。 (3) 蚕豆幼苗的根长、株高、生物量以及抗氧化酶 POD、SOD 和 CAT 活性均随着钴浓度增加表现出先升高后降低的趋势。研究表明, 蚕豆的根、茎、叶均能积累钴, 且吸收量有随土壤钴浓度增加而增加的趋势, 但以根部的富集能力最强、积累量最大; 低浓度钴可以诱导蚕豆中抗氧化酶活性增强, 促进其叶片光合色素含量、光合作用效率提高和植株生长发育, 而高浓度钴则表现出相反趋势, 抑制蚕豆的光合效率和生长发育。

关键词: 蚕豆; 钴; 富集; 光合作用; 抗氧化酶活性

中图分类号: Q945.79

文献标志码: A

Accumulation and Distribution of Cobalt in Broad Bean and Its Effects on the Photosynthesis and Antioxidant Enzyme Activities

WANG Jianbao^{1,2}, TANG Yunlai^{1,2*}, XU Jing^{1,2}, XU Guocong^{1,2}, ZOU Yue^{1,2}, CHEN Hao³

(1 Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621000, China; 2 State Defense Key Laboratory of the Nuclear Waste and Environmental Security, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621000, China; 3 Sichuan Institute of Atomic Energy, Chengdu 610066, China)

Abstract: The soil cultivation experiment was used to investigate the accumulation and distribution of cobalt in broad bean(*Vicia faba* L.) and the effects of cobalt on the photosynthetic characteristics and antioxidant properties of broad bean leaves. Broad bean seedlings at the six-leaf stage were treated with different concentration cobalt(0, 20, 40, 80, 120 mg · kg⁻¹), and the cobalt content in roots, stems and leaves, photosynthetic pigment content, photosynthetic gas exchange parameters, chlorophyll fluorescence parameters of leaves, growth indexes, POD, CAT and SOD activities of leaves were investigated on the 14th day after the cobalt treatment. The results showed that: (1) the roots, stems and leaves of broad bean could absorb and

收稿日期: 2014-10-09; 修改稿收到日期: 2015-03-02

基金项目: 四川省科技支撑计划(2012SZ0064); 四川省生物质资源利用与改性工程技术中心基金(13ZXSK02)

作者简介: 王建宝(1988—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事核废物的生物效应及其生物修复研究。E-mail: 994263618@qq.com

* 通信作者: 唐运来, 副教授, 硕士生导师, 主要从事核废物的生物效应及其生物修复研究。E-mail: tyl@swust.edu.cn

accumulate a certain amount of cobalt, and there was a significant positive correlation between the cobalt content of broad bean and soil cobalt content. There were obviously differences in cobalt content between the different organs, and the order of cobalt content from high to low was roots, leaves and stems. (2) Chlorophyll a content (Chl a), chlorophyll b content (Chl b), stomatal conductance (G_s), the maximal photochemical efficiency of PS II (F_v/F_m) and the potential activity of PS II (F_v/F_0) took on the promoting effects on 0–40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and the inhibitory effects on 40–120 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Net photosynthetic rate (P_n), intercellular CO_2 concentration (C_i), the minimum fluorescence of PS II (F_0), the maximum fluorescence of PS II (F_m) took on the promoting effects on 0–80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and the inhibitory effects on 80–120 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Transpiration rate (T_r), carotenoid content (Car) took on the promoting effects on 0–120 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and all photosynthetic parameters in promoting maximum 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. (3) Root length, plant height, biomass, POD, CAT and SOD activities showed a obvious rise under low concentrations of cobalt, and a decline under high concentrations of cobalt. These results showed low concentrations of cobalt could improve the photosynthesis and growth, while high concentrations of cobalt significantly inhibited the photosynthetic efficiency, growth and development of plants.

Key words: broad bean; cobalt; accumulation; photosynthesis; antioxidant enzyme activities

近年来,在世界范围内随着城市化、工业化及农用化学品的过量使用,环境污染、生态破坏的形势日益严峻,严重影响到人类的生存和健康。其中重金属元素对环境的污染和破坏作用尤为严重,越来越受到人们的关注。重金属引起的土壤污染也日益成为环境、土壤科学家们研究的热点问题^[1]。重金属在生物体内的行为特征主要包括吸收、迁移、富集、毒害、解毒和抗性等,因此对这几个环节的研究一直是重金属污染生态学的研究热点^[2]。

钴是合成维生素 B_{12} 的主要成分,参与酶的组成,并是多种酶的活化剂和抑制剂,可以改变植物体内营养物质的含量,而且还能促进植物离体部分的生长。施钴还可以提高植物的抗逆境能力,如对干旱、病虫害、低温的抵抗能力^[3]。低浓度的钴对幼苗期玉米、小麦生长有促进作用,而高浓度的钴则对它们的生长有明显的抑制作用^[4-5]。目前关于钴影响植物的研究主要集中在植物富集方面^[6-7],而钴对植物光合作用和抗氧化特性影响的报道几乎没有。蚕豆作为一种重要的经济作物,对其进行环境安全性的研究有着重要的意义。本研究主要通过对蚕豆幼苗植株钴富集特性及其叶片叶绿素含量、叶绿素荧光参数、光合作用参数、生长指标和相关酶活性的测定统计,分析钴在蚕豆体内的吸收、富集及对其叶片光合作用和抗氧化特性的影响,以期为后续的重金属污染生态学研究提供一定的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试植物为四川冬季常见植物蚕豆 (*Vicia fa-*

ba L.) 品种‘成胡 10 号’(Chenghu No. 10),属于豆科野豌豆属,生长速度快,生物量较大,根系发达,对病虫害抗性强。蚕豆种子购于四川省绵阳市农资市场,实验用土采自西南科技大学后山的菜园土,采用常规方法测定其理化性质^[6]。供试土壤基本理化性质为:pH 值 7.15、有机质含量 5.93 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、速效磷含量 7.28 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、碱解氮含量 51.74 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、速效钾含量 21.28 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有效镁含量 138.20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有效钾含量 450.20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有效钙含量 2 321.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、有效钴含量 1.98 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、全钴含量 22.10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.2 材料培养及处理

选取子粒饱满、大小一致的蚕豆种子在 10 月中旬播种于西南科技大学核废物与环境安全国防重点学科实验室的温室,在普通石英砂中砂培至四叶期,挑选长势一致的健康植株进行盆栽土培,缓苗至 6 叶期后移栽至含有混匀氯化钴的土壤的盆中,每盆 3 株。其中,盆中土壤钴含量设置 0、20、40、80、120 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 等 5 个剂量处理水平,每个处理设置 5 次重复(每个重复 3 盆),在处理 14 d 后选取植株进行各项指标测定。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 植株生长指标及钴含量 取不同钴浓度处理的蚕豆整株幼苗,用测微尺测量幼苗株高、根长,然后在 105 $^{\circ}\text{C}$ 条件下杀青 30 min,75 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干至恒重,称取其干重;而后将根、茎、叶分开研细,取 3 种器官干粉 0.30 g 于 10 mL 硝酸中,采用微波消解仪(Mars,美国 CEM 公司)进行微波消解,用原子吸收光谱(AA700,美国 PE 公司)于 240.7 nm 波长下测

定钴元素的含量,每个部分重复测量 3 次,并计算钴的富集系数和转运系数。

地上部分富集系数(aboveground enrichment factors,下简称 BCF_s)=植物地上部分钴含量/(施入钴的浓度+土壤本底值)^[9]

转运系数(transfer coefficient,下简称 T_F)=植物地上部分钴含量/地下部分钴含量^[9]

1.3.2 叶片叶绿素含量 参照 Lichtenthaler^[10] 的丙酮提取法提取光合色素,采用紫外分光光度计(UV3900H,日本 Hitachi 公司)测定各样品(提取液上清液)470、663 和 646 nm 下的吸光值(A),每个样品测定 3 次重复,并依据以下公式计算:

叶绿素 a 含量(Chl a)=12.21A₆₆₃-2.81A₆₄₆

叶绿素 b 含量(Chl b)=20.13A₆₄₆-5.03A₆₆₃

类胡萝卜素含量(Car)=(1 000A₄₇₀-3.27C_a-104C_b)/229

1.3.3 叶片光合气体交换参数 选取从上到下第三片完全展开的成熟叶片,采用便携式光合仪(Li-6400,美国 Li-COR 公司),于上午 9:00~11:30 在设定光强为 800 μmol·m⁻²·s⁻¹条件下,测定各植株净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间 CO₂ 浓度(C_i)、蒸腾速率(T_r),每个处理测定 5 次重复。

1.3.4 叶片叶绿素荧光参数 选取从上到下第三片完全展开的成熟叶片,测定前暗适应 20 min,运用多功能叶绿素测定仪(MPEA,美国),测定光系统Ⅱ最小荧光(F₀)、最大荧光(F_m)、最大光化学效率(F_v/F_m)、PSⅡ潜在活性(F_v/F₀)等叶绿素荧光参数,饱和脉冲的光强为 10 000 μmol·m⁻²·s⁻¹,饱和脉冲的持续时间为 600 ms,饱和脉冲的间隔为 20 s,每个处理测定 5 次重复。

1.3.5 抗氧化酶活性 称取不同浓度钴处理的植株的叶片(去叶脉)0.50 g,加入适量预冷的 pH 7.0 磷酸缓冲液,冰浴研磨成匀浆,转移至 10 mL 容量瓶中,用该缓冲液冲洗研钵数次,合并冲洗液至容量

瓶中并定容至刻度。将提取液转入 10 mL 离心管中,于 10 000 g/min 离心 8 min,取上清液 4 ℃低温用于酶活测定。SOD 活性采用 NBT 还原法^[11]测定,POD 活性采用愈创木酚显色法^[12]测定,CAT 活性采用紫外分光光度计吸收法^[13]测定。

1.4 数据处理

用统计分析软件 DPSv 7.5 对所有测定的指标进行方差分析,检测处理间的差异显著性,所有数据用平均值±标准差表示,并用 Origin 9.0 作图。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度钴处理下蚕豆植株体内钴的积累与分布特征

从表 1 可以看出,蚕豆根、茎和叶部钴的富集吸收量均随着土壤中钴处理浓度的升高而增加,且处理间存在显著性差异(P<0.05);各器官对钴的积累吸收量趋势表现为:根>叶>茎。其中,根、茎、叶钴含量在钴处理浓度为 20 mg·kg⁻¹时分别为相应对照(CK)的 2.01、1.33、1.61 倍,在 40 mg·kg⁻¹钴处理时分别为 CK 的 4.51、1.64、2.64 倍,在 120 mg·kg⁻¹钴处理时分别为 CK 的 14.69、2.52、3.40 倍。可见,在各浓度钴处理条件下,蚕豆植株内钴含量较 CK 增加的倍数与相应土壤中钴浓度较 CK 增加的倍数相比,有较为明显的增加,表现最显著的是蚕豆根部。其主要原因可能是外源钴显著提高了土壤中钴的活性,从而促进了植株对钴的吸收。

植株地上部分的富集系数 BCF_s 代表植株地上部分富集钴的能力,而转移系数 T_F 代表植株将根部的钴转移到地上部分的能力。由表 1 还可知,随着土壤中钴处理浓度的增加,蚕豆茎和叶富集钴的能力逐渐下降,蚕豆根部转移钴的能力也逐渐下降;但是,当钴浓度为 120 mg·kg⁻¹时,蚕豆 BCF_s 和 T_F 仍分别达到 0.212 和 0.289。由此说明蚕豆植株的根对钴有较强的富集能力。

表 1 不同浓度钴处理下蚕豆植株各器官的钴含量

Table 1 Co contents in organs of broad bean seedling under different concentration treatments

钴浓度 Co concentration /(mg·kg ⁻¹)	根 Root/(mg·g ⁻¹)	茎 Stem/(mg·g ⁻¹)	叶 Leaf/(mg·g ⁻¹)	地上富集系数 BCF _s	转运系数 T _F
0(CK)	0.006 1±0.001 3e	0.004 2±0.001 2d	0.004 5±0.000 5b	4.394	1.426
20	0.012 3±0.002 1d	0.005±0.000 4cd	0.007 3±0.000 2b	0.582	1.041
40	0.027 6±0.002 4c	0.006±0.000 9bc	0.011 9±0.003 3a	0.445	0.678
80	0.078 0±0.004 4b	0.008 6±0.000 6b	0.014 3±0.000 3a	0.279	0.294
120	0.089 6±0.001 8a	0.010 6±0.001 6a	0.015 3±0.000 4a	0.212	0.289

注:同列不同字母表示浓度处理间差异达 0.05 显著水平。
Note: Different letters in same column indicate significant difference among different Co concentration treatments at 0.05 level.

2.2 钴处理对蚕豆幼苗生长的影响

由图 1 可知,随着土壤中钴浓度的增加,蚕豆幼苗根长、株高、干重值均呈现出先增加后降低的趋势,各处理之间均有显著差异($P < 0.05$),并都高于相对应的 CK 值,且均在 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时达到最大值;其根长、株高、生物量在钴浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时分别比 CK 增加 44.6%、16.5%、24.5%,在钴浓度为 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 分别比对照增加 11.5%、12.6% 和 8.8%。说明在本实验的浓度范围内钴处理对蚕豆幼苗生长均具有不同程度的促进作用,但是过高浓度钴对蚕豆幼苗生长表现出的促进作用明显减弱;同时说明蚕豆幼苗对土壤中的钴有较强的耐受能力。

2.3 钴处理对蚕豆植株叶片光合色素含量的影响

叶绿素在植物光合作用的光能吸收、传递和转化等过程中具有重要作用,叶绿素含量降低是引起光合速率降低的重要原因之一^[14]。由图 2 可知,钴处理对蚕豆叶片叶绿素含量(叶绿素 a、b)主要表现

为低浓度促进高浓度抑制效应,并在钴浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时均达到最大值,且显著($P < 0.05$)高于对照组和其余处理组。其中,叶绿素 a 含量在钴浓度为 20 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时比对照分别增加 15.6% 和 31.5%,在 80 和 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时则比对照分别下降 5.6%、14.2%;叶绿素 b 含量在钴浓度为 20 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时分别比对照组增加 17.8% 和 34.7%,在 80 和 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时比对照组分别下降 9.6% 和 19.1%。同时,蚕豆叶片叶绿素 a/b 则表现出相反的变化趋势,即低浓度降低高浓度升高,并在钴浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时达到最小值。另外,蚕豆叶片类胡萝卜素含量虽然也随着钴浓度增加而先升高后降低,也在钴浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时达到最大值;但与对照相比各钴处理浓度均表现为促进作用,只是随着处理浓度增加该促进作用逐渐减弱,如其在 40 和 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理下分别比对照增加 33.6% 和 3.5%。以上些结果表明低浓度的钴处理能显著促进蚕豆叶片光合色素的合成,而高浓度钴

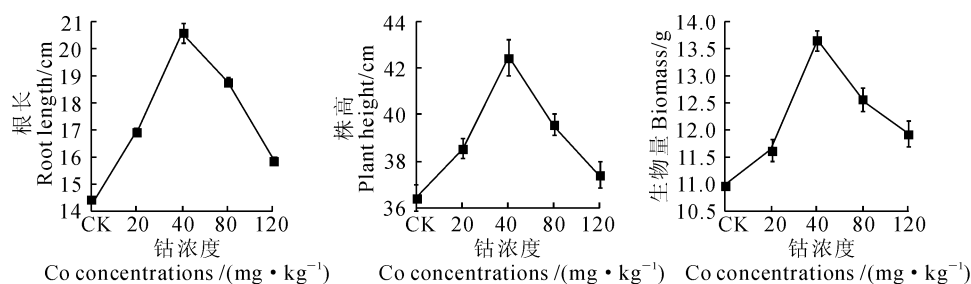


图 1 不同钴浓度下蚕豆幼苗株高、根长和生物量的变化

Fig. 1 The broad bean seedling plant height, root height and biomass with different Co concentrations

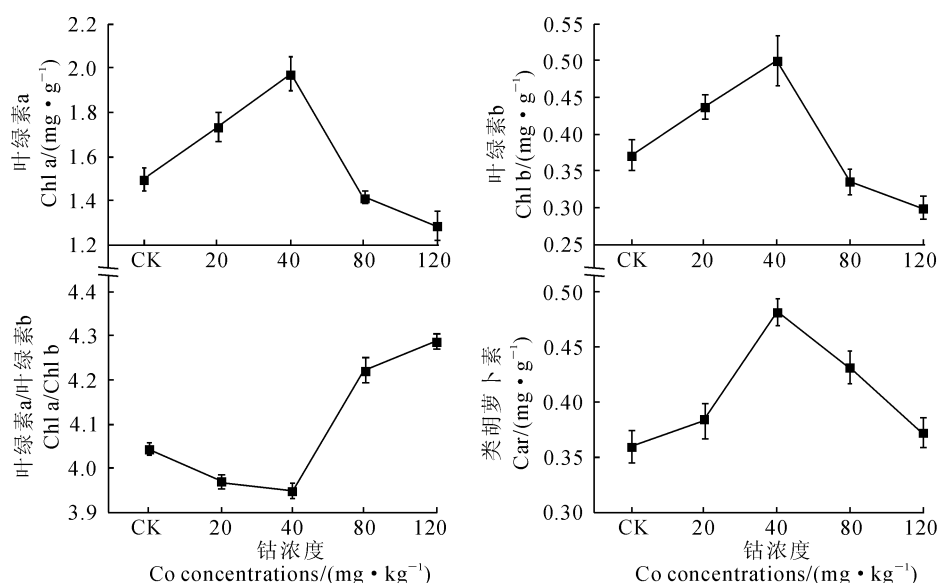


图 2 不同钴浓度下蚕豆叶片光合色素含量的变化

Fig. 2 The photosynthetic pigment contents in leaves of broad bean plants with different Co concentrations

则显著抑制叶片叶绿素合成或者促进其降解,也显著减弱对类胡萝卜素合成的促进作用,从而使得叶片表现出缺素症状。

2.4 钴处理对蚕豆植株叶片光合气体交换参数和叶绿素荧光参数的影响

由图 3 可知,随着土壤中钴浓度的增加,蚕豆植株叶片光合气体交换参数净光合速(P_n)、气孔导度(G_s)、胞间二氧化碳浓度(C_i)和蒸腾速率(T_r)均表现出先增加后降低的变化趋势,并均在钴浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时达到最大值,但各指标受到促进的钴浓度和变化幅度不同。其中,与对照相比较,各浓度钴处理对蚕豆叶片的 T_r 均表现出不同程度促进作用,只是随着处理浓度增加其促进作用先强后弱;其余指标均表现出低浓度促进高浓度抑制的现象,蚕豆叶片的 P_n 和 C_i 均在 $20 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的钴处理下得到促进,而其 G_s 在 $20 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的钴处理受到促进,它们在其余钴浓度处理下均受到抑制;在 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 钴处理条件下,蚕豆叶片的 P_n 、 C_i 、 T_r 、 G_s 分别比相应对照显著增加 341%、181%、741%、141%。可见,蚕豆叶片光合气体交换参数对土壤中钴浓度变化的响应趋势相同,在 20 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 钴处理下均得到促进,并且 T_r 变化最大, C_i 、 G_s 变化幅度相对较小。

同时,蚕豆叶片各叶绿素荧光参数随土壤钴浓度的变化趋势与光合气体交换参数相似(图 4)。蚕豆叶片的初始荧光(F_0)、最大荧光产量(F_m)、光系统 II 最大光化学量子产量(F_v/F_m)和光系统 II 潜在活性(F_v/F_0)均随着土壤中钴浓度的增加而呈现先

增加后降低的趋势,且均在 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时达到最大值;与对照相比,各指标均表现出低浓度得到促进高浓度受到抑制的现象,只是前两者的促进浓度为 $20 \sim 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,而后两者的促进浓度分别为 20 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。其中,蚕豆叶片初始荧光(F_0)在钴浓度为 20、40 和 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时分别比对照组增加 16.1%、33.2% 和 5.6%,其最大荧光产量(F_m)分别增加 19.6%、47.8% 和 1.7%,而两者在钴浓度为 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时分别较对照组降低 2.9% 和 9.5%;同时,蚕豆叶片光系统 II 最大光化学量子产量(F_v/F_m)在钴浓度为 20 和 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时比对照组分别增加 0.8% 和 2.7%,其光系统 II 潜在活性(F_v/F_0)则分别增加 3.8% 和 14.0%,而两者在 80、 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度下分别较对照组降低 1.2%、2.0% 和 4.7%、8.7%。可见,蚕豆叶片的叶绿素荧光参数在钴浓度为 $80 \sim 120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时均受到抑制,表明其光系统 II 结构和功能在高浓度钴处理下均受到一定的损伤与破坏。

2.5 钴处理对蚕豆幼苗叶片抗氧化酶活性的影响

POD、SOD 和 CAT 都是酶促防御系统的重要抗氧化酶,能有效防御活性氧或其他过氧化自由基对细胞膜系统的伤害,抑制膜脂过氧化,以减轻胁迫活性氧对植物细胞膜结构和功能的破坏,其活性变化与植物体内氧化胁迫有直接关系,常作为衡量植物抗逆性强弱的指标之一^[15-19]。从图 5 可以看出,随着土壤中钴浓度增加,蚕豆叶片中 POD、SOD 和 CAT 活性值均呈先升高后下降的变化趋势,并均在 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度钴处理时达到最大值。其中,3 个

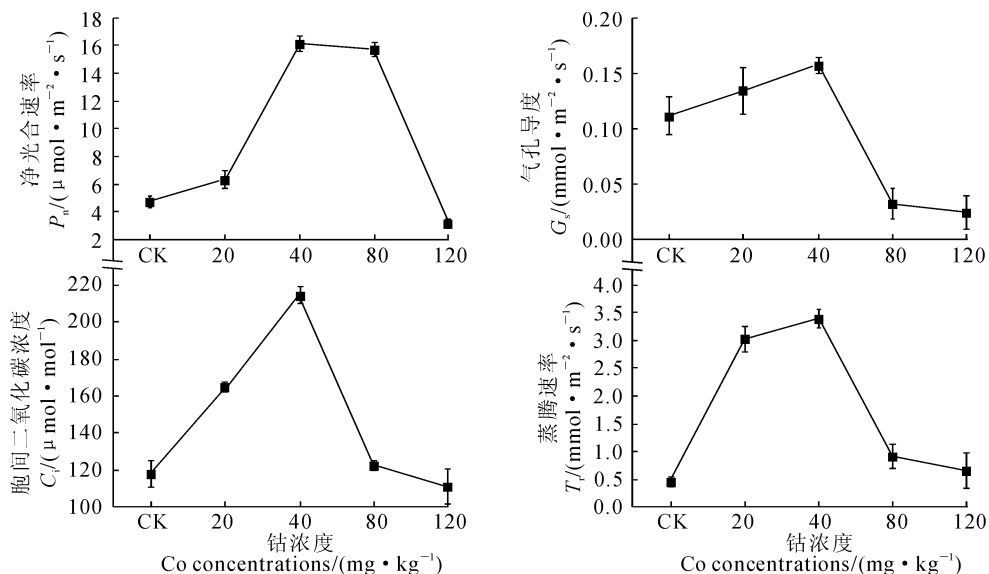


图 3 不同浓度钴处理下蚕豆幼苗光合特性参数的变化

Fig. 3 The broad bean seedling photosynthetic parameters with different Co concentrations

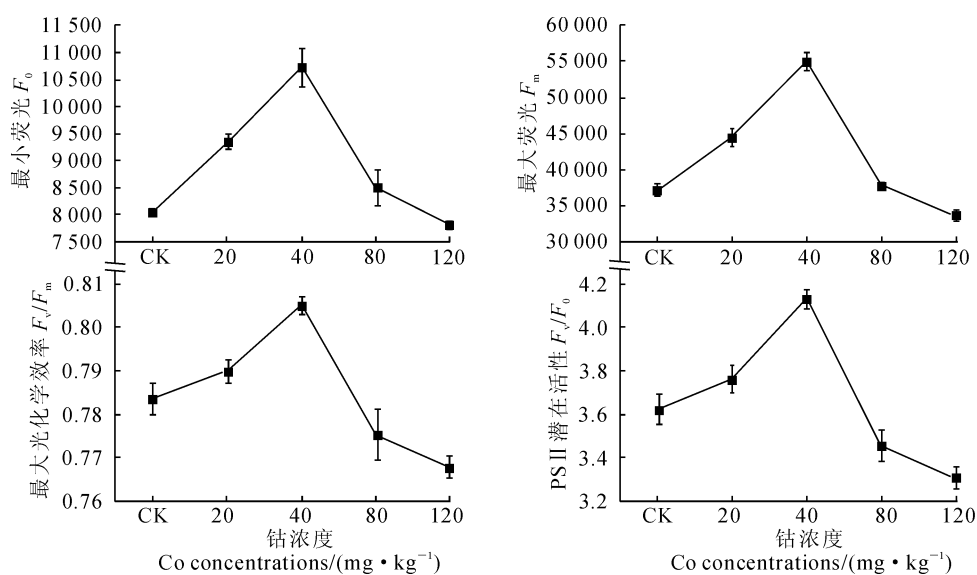


图4 不同浓度钴对蚕豆幼苗叶绿素荧光参数的影响

Fig. 4 Effects of different Co concentrations on broad bean seedling chlorophyll fluorescence parameters

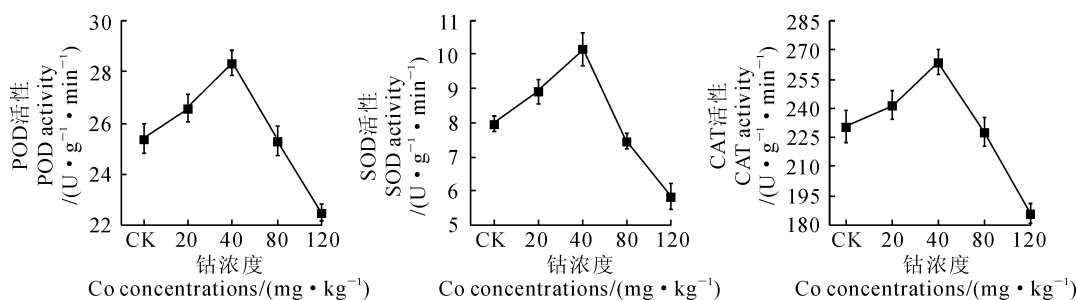


图5 不同浓度钴处理下蚕豆幼苗叶片抗氧化酶活性的变化

Fig. 5 The broad bean seedling antioxidant properties with different Co concentrations

抗氧化酶活性均在 20 和 40 mg · kg⁻¹ 条件下高于相应对照,而均在 80 和 120 mg · kg⁻¹ 条件下低于对照,并在 120 mg · kg⁻¹ 浓度条件下达到显著水平 ($P < 0.05$)。这说明低浓度(20 和 40 mg · kg⁻¹)钴胁迫能诱导蚕豆体内主要抗氧化酶活性上升,有效清除胁迫引起的过量积累的活性氧,维持活性氧代谢平衡,减轻活性氧及自由基对叶片细胞膜的过氧化伤害,此时植株叶片受到钴的毒害作用不明显;而当钴浓度达到 120 mg · kg⁻¹ 时,蚕豆体内抗氧化酶系统活性已显著降低,细胞内活性代谢失衡,活性氧大量积累,叶片细胞膜受到过氧化伤害,植株叶片受到钴的毒害作用明显加重。

3 讨论

3.1 不同钴浓度处理下蚕豆幼苗生长和钴富集分布特征

根长、株高和生物量是植物最基本的生长指标,是评估逆境胁迫程度和植物抗逆能力的重要标准。

大量研究表明,植物生长在逆境条件下会受到抑制,且胁迫程度越高受抑制现象越明显。本实验中蚕豆幼苗的根长、株高和生物量总体上随着钴浓度的增加先升高后降低,即低浓度钴处理对蚕豆幼苗生长具有显著促进作用,而高浓度钴处理则表现出对生长的显著抑制作用。

植株的生长与其自身对重金属的富集和分布特征密切相关。本研究中蚕豆各部分组织器官中钴的富集吸收量与土壤中钴含量呈正相关,即随着钴处理浓度的升高而增加;各器官对钴的积累吸收量分布规律为:根>叶>茎,这可能与钴在根、茎、叶中的运输机制不同有关。重金属在植株根部运输是在根共质体内运输,茎部运输是在木质部内运输,叶内运输是在跨叶细胞的液泡膜间运输^[20]。可能原因是相同钴浓度条件下,根的运输机制更加活跃;随着钴浓度的增大,钴在茎部和叶部运输受到的抑制作用更加明显,所以根部吸收量在不同钴浓度处理间存在显著性差异,而茎和叶间差异不显著。

3.2 不同钴浓度处理下蚕豆幼苗叶片光合作用特征

光合作用是植物生长和干物质积累的基础,钴对蚕豆生长的抑制首先表现在对其光合作用的抑制上。首先,光合色素含量是影响光合作用速率的重要因素。本研究发现蚕豆幼苗叶片中的光合色素含量随着钴浓度的增加呈现先升高后降低的变化趋势,这与本实验室先前报道的钴对油菜的生长呈现低促高抑的现象一致^[21]。有研究表明高浓度的重金属胁迫会显著抑制植物对合成叶绿素所需钙、铁、镁等元素的吸收,从而抑制了叶绿素合成,使得叶片表现出显著的缺素症状^[22]。本研究中 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下的低浓度钴显著促进蚕豆叶片叶绿素含量的增加,表现出了低剂量的刺激效应^[23];而高浓度钴可能会抑制植物对铁、镁的吸收,从而抑制了叶绿素的合成,相关机理还需要进一步研究。

其次,净光合速率(P_n)是反映植物光合作用效率的重要指标。在逆境胁迫下, P_n 往往会显著下降^[24],导致 P_n 下降的原因很多,包括叶绿素含量、叶片气孔导度、光合作用关键酶以及类囊体膜上光合膜蛋白的光化学转化效率等,可以分为气孔因素和非气孔因素两大类^[25]。先前有研究表明,黑麦草在高浓度铬胁迫下气孔的关闭是净光合速率下降的主要原因^[22]。本实验中蚕豆叶片叶绿素 a、b 含量在钴浓度为 $40 \sim 120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时受到抑制,吸收光能减少,影响了其光能的吸收和利用;叶片气孔导度、胞间 CO_2 浓度在钴浓度为 $80 \sim 120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时受到抑制,可能是由于气孔限制引起的浓度降低,进而二氧化碳同化能力下降;代表 PS II 原初光能转化效率反映光抑制程度的 F_v/F_m 在 $40 \sim 120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时受到抑制,再结合保护酶 SOD、POD 及 CAT 活性的变化趋势,说明在钴浓度为 $80 \sim 120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时 PS II 反应中心受到不可逆破坏,光合酶的活性降低,光反应中心光能转换、电子传递、光能磷酸化和光合作用暗反应等一系列过程受到抑制,导致 P_n 降低。

再次,叶绿素荧光是光合作用的探针,已被广泛应用于研究植物抗逆境生理^[26]。在植物遭受胁迫时,光系统 II (PS II) 最大光化学量子产量(F_v/F_m)通常会显著下降,其下降的幅度同植物受逆境伤害的程度显著正相关,因而 F_v/F_m 常被用来反映植物受逆境胁迫程度^[27]。本实验中钴浓度大于 40

$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, F_v/F_m 值开始显著下降,说明叶片 PS II 开始受到胁迫。同时,反映 PS II 潜在活性的 F_v/F_0 也是随钴浓度增加先上升后下降,说明低浓度的钴有利于蚕豆叶片的光合作用,而高浓度的钴则抑制蚕豆 PS II 的潜在活性,且 F_v/F_0 相较于对照组下降幅度比 F_v/F_m 更大,说明 F_v/F_0 比 F_v/F_m 能更准确反映蚕豆叶片 PS II 对钴胁迫的敏感性。

3.3 不同钴浓度处理下蚕豆幼苗抗氧化酶活性的变化特征

SOD、POD 及 CAT 是细胞抵御活性氧伤害的酶保护系统,在清除超氧自由基、控制膜脂过氧化作用、保护细胞膜正常代谢方面起重要作用^[28-29]。SOD、POD 和 CAT 具有协同作用特点,从而有效清除植株体内过多的自由基,提高植株耐受胁迫的能力^[30]。通过分析发现,随着钴处理浓度的增大,本研究中蚕豆叶片 SOD、CAT、POD 活性均先逐渐增强后又减弱,说明在低浓度钴处理下蚕豆叶片能通过增强自身保护酶活性来抵御钴对其所造成的伤害。其中,从 CK 到 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 钴处理,蚕豆叶片中 3 种保护酶活性均逐渐增大,能有效清除活性氧,降低了钴胁迫对细胞膜的膜脂过氧化水平,通过调节自身的保护酶活性来保护其内部组织,防止其受到由于活性氧积累带来的伤害;随着钴浓度的继续增大,3 种酶活性开始下降,在 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时已经低于 CK 值,至 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时已显著下降,说明此时蚕豆生长已经受到了严重的钴胁迫伤害。SOD、POD 和 CAT 值的变化说明了低浓度钴对蚕豆生长有诱导促进作用,而高浓度钴对其生长有胁迫伤害作用,进一步验证了陆宇等^[3]的观点。

综上所述,蚕豆在不同浓度钴处理下,其根、茎、叶均可积累一定量的钴,且根的积累量最大;其叶片的光合色素含量、净光合速率、气孔导度、胞间二氧化碳、蒸腾速率、PS II 最大光化学量子产量和 PS II 潜在活性等光合作用参数均表现为低浓度促进而高浓度抑制的现象,从而使蚕豆植株的根长、株高和生物量 3 个生长指标也表现出相似的变化趋势;蚕豆叶片主要抗氧化酶活性等指标也均表现为低浓度促进和高浓度抑制的现象。所以,钴对蚕豆植株生长发育和叶片光合效率的整体效应表现为低促高抑,而同期叶片主要保护酶活性的相似变化可能是其耐受钴胁迫的机制之一。

参考文献:

- [1] WANG H H(王海慧), HUAN H F(郇恒福), LUO Y(罗 瑛). Soil contaminated by heavy metals and its phytoremediation technology [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2009, **25**(11): 210–214 (in Chinese).
- [2] WANG H B(王宏宾), SHU W SH(束文圣), LAN C Y(蓝崇钰). Ecology for heavy metal pollution: recent advances and future prospects [J]. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2005, **25**(3): 596–605 (in Chinese).
- [3] 陆 宇. 豆科与禾本科牧草对土壤钴水平的形态与生理响应[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [4] FAN W H(樊文华), YANG L F(杨黎芳), XUE X G(薛晓光). Effect of cobalt on the physiological and yield of winter wheat [J]. *Soil and Fertilizers* (土壤肥料), 2005, (1): 45–47 (in Chinese).
- [5] GUO L G(郭利刚), BAI Y SH(白云生), FAN W H(樊文华). Effects of cobalt application on the growth and Co content of corn seedling [J]. *Journal of Shanxi Agricultural University* (山西农业大学学报), 2006, (3): 264–266 (in Chinese).
- [6] 胡欣欣. 土壤钴、镍向植物的转移及毒害效应研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [7] 陈舜华, 李藻发, 刘振声, 等. 核技术生物学应用[M]. 广州: 中山大学出版社, 1992: 323.
- [8] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [9] ZU Y Q(祖艳群), LI Y(李 元), ZHAO N(赵 娜). Effect of pig manure application on growth, physiology and accumulation characteristic of Pb and Zn in *Arabis alpina* var. *parviflora* Franch and *Oxyria sinensis* Hemsl [J]. *Journal of Agro-Environment Science* (农业环境科学学报), 2013, **32**(3): 508–516 (in Chinese).
- [10] LICHTENTHALER H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes [J]. *Methods in Enzymology*, 1987, **148**: 350–382.
- [11] 赵世杰, 刘华山, 董新纯. 植物生理实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 152–154; 161–163.
- [12] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导(3 版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 123–124, 127–128.
- [13] SUN Y(孙 云), JIANG CH L(江春柳). Determination and observation of the changes of the ascorbate peroxidase activities in the fresh leaves of tea plants [J]. *Chinese Journal of Tropical Crop* (热带作物学报), 2008, **29**(5): 562–563 (in Chinese).
- [14] DOWN TONW J S, GRANTW J, ROBINSON S P. Stomatal closure fully accounts for the inhibition of photo synthesis by abscisic acid [J]. *Plant Physiol.*, 1985, **77**: 85–88.
- [15] SUN H L(孙海丽), LI T(李 婷), ZHANG H(张 华). Effects of exogenous nitric oxide on growth and photosynthetic characteristics of pea seedling under iron-deficiency stress [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2011, **31**(4): 739–745 (in Chinese).
- [16] XIE Y P(谢逸萍), MA D F(马代夫), WANG X(王 欣). Effect of salt stress on photosynthesis, enzyme activity and biological characteristics in different sweet potato genotypes [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), 2012, **27**(S): 97–100 (in Chinese).
- [17] 周启星, 孔繁翔, 朱 琳. 生态毒理学[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [18] WANG X L(王秀玲), CHEN X(程 序), XIE G H(谢光辉). Effect of NaCl stress on physiological characteristics of sweet sorghum in sprout stages [J]. *Ecology and Environmental Sciences* (生态环境学报), 2010, **19**(10): 2 285–2 290 (in Chinese).
- [19] WANG Y J(王耀晶), WANG H X(王厚鑫), LIU M D(刘鸣达). Effect of silicon on physiological characteristics of kentucky bluegrass under salt stress [J]. *Chinese Journal of Grassland* (中国草地学报), 2012, (6): 13–17 (in Chinese).
- [20] YANG X E(杨肖娥), LONG X X(龙新宪), NI W ZH(倪吾钟). Physiological and molecular mechanisms of heavy metal uptake by hyper accumulating plants [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* (植物营养与肥料学报), 2002, **8**(1): 8–15 (in Chinese).
- [21] ZHANG SH X(张绍先), TANG Y L(唐运来), CHEN X(陈 霞), et al. Accumulation and distribution of cobalt in rape and the effects of cobalt on the photosynthesis of rape leaves [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(6): 1 203–1 209 (in Chinese).
- [22] VERNAY P, GAUTHIER-MOUSSARD C, HITMI A. Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. [J]. *Chemosphere*, 2007, **68**(8): 1 563–1 575.
- [23] NYITRAI P, BOKA K, GASPARD L, et al. Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, **160**(10): 1 175–1 183.
- [24] ZHOU J(周 建), YANG L F(杨立峰). Photosynthesis and chlorophyll fluorescence of *Magnolia grandiflora* seedlings under low temperature stress [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2009, **29**(1): 136–142 (in Chinese).
- [25] ASHRAF M, HARRIS P J C. Photosynthesis under stressful environments: An overview [J]. *Photosynthetica*, 2013, **51**(2): 163–190.
- [26] MURCHIE E H, LAWSON T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications [J]. *J. Exp. Bot.*, 2013, **64**(13): 3 983–3 998.
- [27] GOVINDJEE. Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence [J]. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1995, **22**: 131–160.
- [28] HE SH X(贺少轩), LIANG Z S(梁宗锁). Growth and physiological characteristics of wild sour Jujube seedlings from two provenances under soil water stress [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报), 2009, **29**(7): 1 387–1 393 (in Chinese).
- [29] JIN ZH M(金忠民), SHA W(沙 伟), ZANG W(臧 威). Effects of drought stress on protective enzymes of *Trifolium repens* seedling [J]. *Journal of Northeast Forestry University* (东北林业大学学报), 2010, **38**(7): 52–53 (in Chinese).
- [30] 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.

(编辑: 裴阿卫)