

文章编号: 1674-7054(2015)03-0298-06

东方水韭对人工污水胁迫的生理响应

盛玉辉¹, 关维元², 徐永星², 李婧¹, 刘保东¹

(1. 哈尔滨师范大学 黑龙江省普通高等学校植物生物学重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150025;

2. 浙江省建德市林业科学研究所 浙江 建德 311600)

摘要: 采用不同浓度的污水对长势基本相同的成熟东方水韭(*Isoetes orientalis*)植株进行处理,研究其在5, 10, 20倍浓度污水胁迫2~14 d的6项生理指标,即叶片的保护酶系统、渗透调节物质、叶绿素和丙二醛含量、相对电导率和光和速率的变化规律。结果表明,东方水韭在5倍和10倍浓度污水胁迫下的耐受性较好,在20倍污水胁迫下的耐受性较差,各项生理指标均显示出较大的损伤。根据污水胁迫强度及生态实际,笔者认为,污水胁迫不是造成东方水韭营养体濒危的主要原因。

关键词: 东方水韭; 污水胁迫; 生理指标; 濒危原因

中图分类号: Q 949

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2015.03.013

水韭科(Isoetaceae)植物是孑遗的古老蕨类,现存约有250种,主要分布在北半球的沼泽湿地,为多年生小型草本挺水植物^[1]。我国所产5种水韭都因生态环境的恶化而数量急剧衰减,面临着严重的生存危机,被列为国家一级保护的野生植物,尤其是中华水韭(*Isoetes sinensis*)已经达到国际极危(IUCN-CR)程度^[2-3]。东方水韭(*Isoetes orientalis*)因与中华水韭形态相似、分布区重叠,一直被误判为中华水韭,仅在浙江省松阳县有极少分布^[4],其濒危程度等于或高于中华水韭。由于我国水韭植物的野生数量极少,相关研究一直受到制约,以往的研究成果主要集中在种类鉴定^[4]、生态调查^[5]、孢子萌发生理^[6]、染色体分类^[7]和分子遗传^[8]等方面。自2012年刘保东成功批量繁殖并栽培中华水韭^[9]以来,取材量较大的中华水韭生理机理研究也有了报道,如刘婷婷等^[10]指出,中华水韭对温度变化这一古老的生态因素具有较强的适应能力,而孙昊等^[11]认为,中华水韭对除草剂等现代农业污染的生理抵抗能力较弱,邢建娇等^[12]和姜男等^[13]的实验结果证明,中华水韭的幼孢子体和成熟植株都对培养基质高度依赖,路靖等^[14]则通过培养观察配子体发育、颈卵器和胚胎的形态建成,找到了中华水韭生殖濒危的若干结构性或生理性限制因素。东方水韭作为新物种^[4]发表后,尚未见有关濒危机理的研究报道。东方水韭和中华水韭均在长江中下游地区繁衍了数亿年,历经了该地区的生态环境的变迁,不仅是研究该地区古生态和植物系统演化的活化石,而且6倍体的东方水韭与4倍体的中华水韭又有着密切的亲缘关系^[7],这对于研究亚洲的水韭起源及其物种演化也有重要的价值。水生植物逐渐消亡与其生活的水体质量存在着重要的联系^[5,15],原生境的改变对水韭种群数量的减少也有一定的影响^[6],农业污染物的积累可能是水韭濒危的重要原因^[11]。东方水韭产地的工业经济尚不发达,水环境污染源主要是生活污水和农业污水,因此,笔者利用相应的基本污水对东方水韭活植株进行不同程度的胁迫培养,比较分析多项生理指标的变化规律,以期在理论上探索东方水韭濒危的生理生态机理并科学预测濒危趋势,实践上为保护孑遗物种以及环境监测提供参考依据。

收稿日期: 2014-12-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170294)

作者简介: 盛玉辉(1993-),女,哈尔滨师范大学生命科学与技术学院2013级本科生, E-mail: 1012443950@qq.com

通信作者: 刘保东(1962-),男,教授,硕士生导师,主要从事孢子植物学的教学及科研工作, E-mail: 99bd@163.com

1 材料与方法

1.1 实验材料 东方水韭原植株由刘保东于2011年10月采自浙江省松阳县,凭证标本保存在哈尔滨师范大学植物标本室(HANU)。供试的活植株是栽培在哈尔滨师范大学温室($N45^{\circ}52'06''$, $E126^{\circ}32'59''$)的人工繁殖植株,繁殖方法同文献[9]。人工污水成分采用目前我国长江流域污水胁迫研究中广泛应用的基本污水配方^[16-18],即可溶性淀粉 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 尿素 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, MgSO_4 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NaHCO_3 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, H_3BO_3 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CuSO_4 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 以此为基础,分别配制5, 10, 20倍浓度的污水处理液。

1.2 试验设计 取60个口径和高度均为15 cm的普通塑料花盆,内装厚度为14 cm的风干暗棕壤,用蒸馏水润湿。选取株高在25~30 cm,叶片数大于30枚,长势良好的180株东方水韭人工植株,每盆栽3株,在培养室内缓苗15 d后,放置在4个长×宽×深为70 cm×70 cm×30 cm的塑料水池中,每池15盆,分别作为对照组、5倍浓度污水组、10倍浓度污水组和20倍浓度污水组。然后,在对照组中加入蒸馏水至水深20 cm,其余3组分别加注5, 10, 20倍浓度的污水至水深20 cm。培养条件:光照强度 $600 \sim 800 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、每天光照14 h、温度 $(25 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ 、空气相对湿度 $(80 \pm 5) \%$ 。胁迫培养期间,随时用蒸馏水补充自然蒸发的水份,保持水深20 cm。在胁迫的2, 5, 8, 11, 14 d,依次剪取各组3盆东方水韭的中外轮叶片,测定各项生理指标,重复3次。

1.3 生理指标测定与数据处理 采用文献[19]的方法测定相对电导率、MDA含量、可溶性蛋白含量、POD活性、CAT活性、叶绿素含量,用美国Li-6400光合仪测定挺水叶的净光合速率和蒸腾速率。用SPSS17.0和Excel软件分析所测数据并作图。

2 结果与分析

2.1 污水胁迫对相对电导率的影响 从图1可知,在污水处理期间,东方水韭的相对电导率总体呈上升趋势。随着胁迫天数的增加,各浓度处理的相对电导率逐渐增大;相同天数的相对电导率随着污水浓度的增加而增大;各个处理浓度下的相对电导率,在14 d时均达到最大值,且分别显著($P < 0.05$)高于对照1.0, 3.3, 4.4倍,表明东方水韭的相对电导率随着污水胁迫程度的加剧而上升。

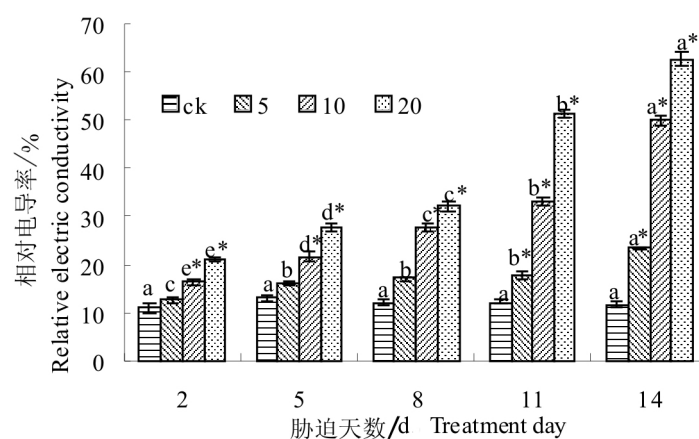


图1 污水胁迫对东方水韭相对电导率的影响

“CK”为对照,“5”为5倍浓度,“10”为10倍浓度,“20”为20倍浓度;不同小写字母表示相同胁迫强度下不同处理天数在0.05水平的差异显著;*表示相同处理时间下各处理强度在0.05水平与对照差异显著。下同

Fig. 1 Effects of sewage stress on relative electric conductance of *Isoetes orientalis*

“5”: 5 times of the sewage concentration; “10”: 10 times of the concentration; “20”: 20 times of concentration. The different lowercase letters within the same stress but under different treatment days show significant difference in relative electric conductance of *I. orientalis* at 0.05 levels; * indicates significant difference within the same treatment days under different treatment concentration as against the control (CK) at 0.05 levels. Similarly hereinafter

2.2 污水胁迫对 MDA 含量的影响 从图 2 可知, 污水处理的东方水韭 MDA 含量均高于同期对照组; 随着胁迫时间的延长, 5 倍和 10 倍处理表现出先升后降再升的总体趋势, 5 倍处理在胁迫 5 d 和 11 d 时分别出现 2 个峰值; 10 倍在胁迫 8 d 时达到第 1 个峰值, 随后出现下降后持续上升; 20 倍从胁迫开始均差异显著, 且随着胁迫处理天数的增加, 其 MDA 含量比对照组上升幅度大, 表明污水胁迫下的东方水韭叶片膜质过氧化作用逐渐增强。

2.3 污水胁迫对渗透调节物质的影响 从图 3 可知, 污水处理的东方水韭叶片内可溶性蛋白均高于同期对照; 在 5 倍胁迫 11 d 和 10 倍胁迫 8 d 时均达到最大值, 随后出现下降趋势; 20 倍胁迫 14 d 的叶片内可溶性蛋白含量与同期对照相比差异显著 ($P < 0.05$), 增加了 2.7 倍, 表明胁迫程度越强东方水韭叶片内可溶性蛋白的积累现象越明显。

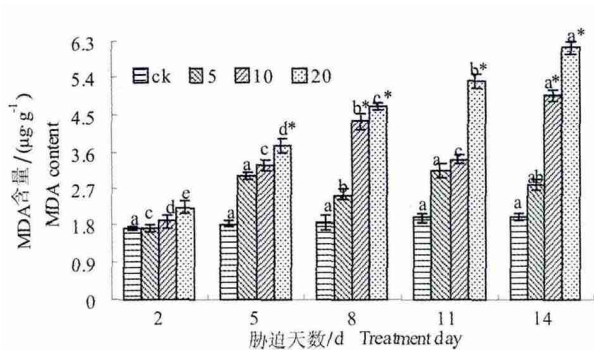


图 2 污水胁迫对东方水韭 MDA 含量的影响

Fig.2 Effects of sewage stress on MDA content of *I. orientalis*

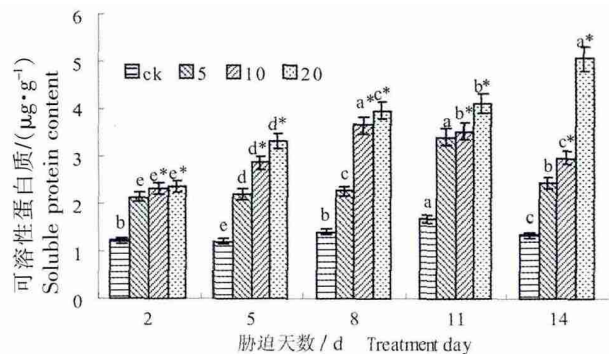


图 3 污水胁迫对东方水韭可溶性蛋白含量的影响

Fig.3 Effects of sewage stress on soluble protein content of *I. orientalis*

2.4 污水胁迫对保护酶系统的影响

2.4.1 污水胁迫对 POD 活性的影响 从图 4 可知, 在污水胁迫过程中, 东方水韭叶片内 POD 活性整体呈先升高后降低的趋势, 均在胁迫第 8 天达到最大值, 除 20 倍浓度胁迫 14 d 的含量低于对照组外, 其余均高于同期对照。10 倍浓度在 5 ~ 11 d 变化幅度较小; 胁迫 8 d 时, 20 倍浓度组的 POD 活性显著高于各处理组 ($P < 0.05$); 胁迫 14 d 时, 随污水浓度的增加, 东方水韭的 POD 活性减少幅度越大, 表明污水胁迫影响了东方水韭叶片内的 POD 活性。

2.4.2 污水胁迫对 CAT 活性的影响 从图 5 可知, 胁迫期间, 叶片内 CAT 活性整体呈先增加后降低的趋势。污水处理 8 d 时, 叶片的 CAT 活性均达到最大值, 其中 20 倍浓度组的 CAT 活性比对照高 1.0 倍; 污水处理 14 d 时, CAT 活性均显著降低 ($P < 0.05$), 其中 20 倍浓度组的 CAT 活性显著低于各组 ($P < 0.05$)。

2.5 污水胁迫对光合系统的影响

2.5.1 污水胁迫对叶绿素含量的影响 从图 6 可知, 整个胁迫期间, 东方水韭叶片叶绿素含量总体呈降低趋势, 随胁迫天数的增加, 叶片内叶绿素含量逐渐降低; 相同胁迫天数

下, 随污水浓度的增加, 叶片内叶绿素含量呈降低趋势。污水处理 14 d 时, 叶片内叶绿素含量均达到胁迫期间的最小值, 显著低于同期对照 ($P < 0.05$)。

2.5.2 污水胁迫对净光合速率的影响 从图 7 可知, 净光合速率随着污水胁迫程度的加强而下降, 同一处理水平的下降趋势随着胁迫时间的延长而加剧, 净光合速率均低于同期对照。在整个胁迫过程中, 20 倍污水处理组一直低于同时间的其他组, 且下降幅度最大。5 倍浓度污水胁迫 2 d 的净光合速率低于同期 10 倍浓度污水胁迫, 且在胁迫第 5 天有小幅上升; 各浓度处理 14 d 的叶片净光合速率均达到胁迫期

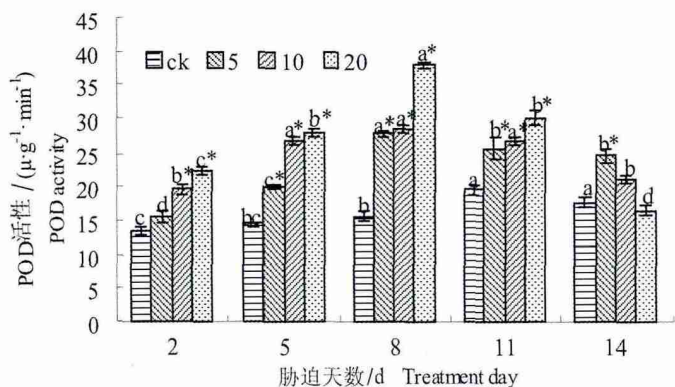


图 4 污水胁迫对东方水韭 POD 活性的影响

Fig.4 Effects of sewage stress on POD activity of *I. orientalis*

间的最小值, 其中 20 倍污水处理低于同期对照 67%, 差异显著 ($P < 0.05$)。

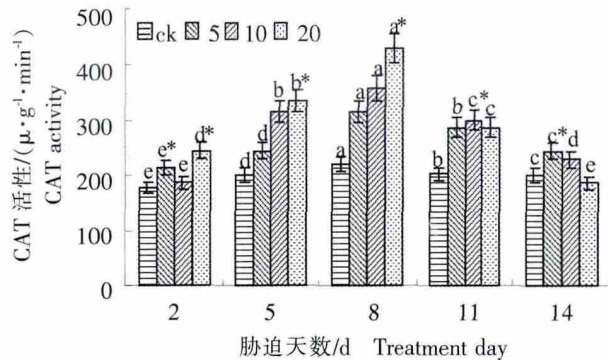


图5 污水胁迫对东方水韭CAT活性的影响

Fig.5 Effects of sewage stress on CAT activity of *L. orientalis*

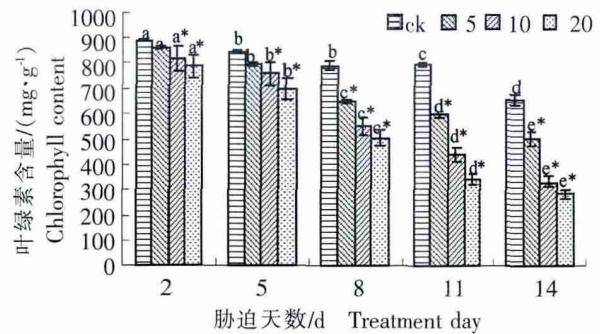


图6 污水胁迫对东方水韭叶绿素含量的影响

Fig.6 Effects of sewage stress on chlorophyll content of *L. orientalis*

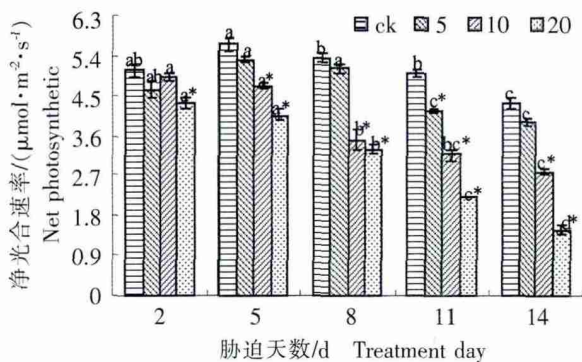


图7 污水胁迫对东方水韭净光合速率的影响

Fig.7 Effects of sewage stress on net photosynthetic rate of *L. orientalis*

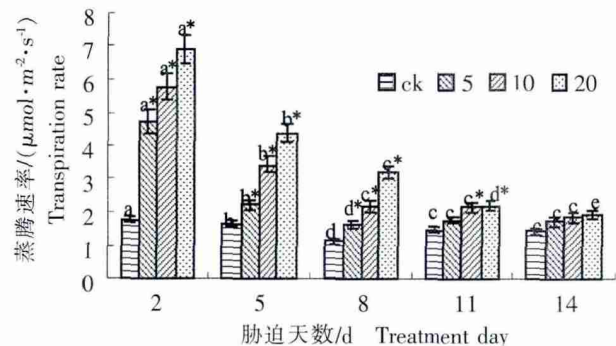


图8 污水胁迫对东方水韭蒸腾速率的影响

Fig.8 Effects of sewage stress on transpiration rate of *L. orientalis*

2.5.3 污水胁迫对蒸腾速率的影响 从图8可知,在整个胁迫过程中,东方水韭叶片蒸腾速率总体呈下降趋势。胁迫2 d时,各浓度污水处理的叶片蒸腾速率均达到最大值,且分别显著高于对照组,胁迫5 d后,叶片蒸腾速率显著下降 ($P < 0.05$),但11 d和14 d的差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

逆境胁迫下植物叶片的相对电导率会随着胁迫程度的增加而增加^[20];陈桂葵等^[21]指出,短时间内低浓度污水处理对植物的相对电导影响较小,甚至能促进生长。本实验结果支持陈桂葵等的观点,但短期胁迫是否能真正促进植株的生长有待于进一步研究。10倍浓度污水处理在14 d以及20倍浓度污水处理在11 d的相对电导率均超过50%,根据植物半致死标准^[22],低浓度的污水对东方水韭伤害并不严重。丙二醛含量的高低直接反应逆境下膜质过氧化程度^[23],POD和CAT能通过代谢活性氧减少对机体的伤害^[24-25],东方水韭的MDA含量的上升幅度随着胁迫程度的加强而增加,5倍污水胁迫8 d时,MDA的含量有小幅下降,可能与CAT活性达到最大值有关。受到逆境胁迫时,植物通过提高细胞液浓度、增加可溶性蛋白含量来适应环境^[26-27]。也有观点认为,污水胁迫天数与可溶性蛋白含量呈负相关^[28]。本实验结果表明,东方水韭叶片的渗透调节物质积累明显,胁迫后期维持细胞渗透压的主要物质并不是可溶性蛋白。

目前,对污水胁迫下的叶绿素含量变化认识不一。魏国余等^[29]、周建等^[30]认为,污水会使植物体内叶绿素的含量降低;胡宏友等^[31]的实验结果表明,污水对叶绿素的含量有促进作用。本实验结果与魏国余等人^[29]的研究结果一致,在不同浓度污水处理下,东方水韭叶片的叶绿素含量均低于同期对照,表明在污水胁迫下,叶绿素合成受到了阻碍或分解速度大于合成速度^[32]。聂磊等^[33]对水葱等多种湿地植物进行污水胁迫处理,结果发现污水胁迫会降低植物的净光合速率,笔者支持此观点,东方水韭可以通过调节光合系统来保持体内的水分。

综合东方水韭在污水胁迫下的各项生理指标的变化规律,笔者认为,该孑遗物种具有一定的抗逆能力,而且是通过协调各生理代谢间的关系而实现抗逆生长的,与近源种中华水韭(*Isoetes sinensis*)有一定的相似性^[10-11],中华水韭的研究成果对东方水韭具有一定的参考价值。本实验所用的污水只是按照长江中下游地区过去 10 多年来水体的污染情况而配制的人工污水^[16-18],只能初步验证在基本污水胁迫下东方水韭濒危的生理机理。而水体污染是综合性的,在时空上具有复杂性和不稳定性^[16-18, 21, 31],要针对性地揭示东方水韭在现实污水胁迫下的生理规律,还需要做进一步的研究。

参考文献:

- [1] ZHANG L B, W CARL T. Isoetaceae [M]// Editorial Committee. Flora of China. St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden Press, 2013: 35-36.
- [2] 于永福. 中国野生植物保护工作的里程碑[J]. 植物杂志, 1999(5): 3-11.
- [3] 严岳鸿, 张宪春, 马克平. 中国蕨类植物多样性与地理分布[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 76-86.
- [4] LIU H, WANG Q F, W CARL T. *Isoetes orientalis* (Isoetaceae), a new hexaploid quillwort from China[J]. Novon, 2005, 15(1): 164-167.
- [5] 刘星, 庞新安, 王青锋. 中国 3 种水韭属植物自然居群水体化学性质特征及差异性研究[J]. 植物生态学报, 2003(4): 510-515.
- [6] 刘虹. 珍稀极危水生植物中华水韭(水韭科)的生活史研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2006.
- [7] 刘星, 王勇, 王青锋, 等. 中国水韭属植物的染色体数目及其分类学意义[J]. 植物分类学报, 2002, 40(4): 351-356.
- [8] 陈媛媛, 叶其刚, 黄宏文. 中华水韭(*Isoetes sinensis*)等位酶分析的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(1): 91-94.
- [9] 刘保东. 极度濒危蕨类植物中华水韭人工批量繁育获得成功[J]. 生物多样性, 2012, 20(6): 784.
- [10] 刘婷婷, 孙昊, 关旻, 等. 低温胁迫对极度濒危植物中华水韭生理特性的影响[J]. 西北植物学报, 2013, 33(10): 2031-2036.
- [11] 孙昊, 刘婷婷, 关旻, 等. 极度濒危蕨类植物中华水韭对除草剂的生理响应[J]. 西北植物学报, 2013, 33(9): 1830-1837.
- [12] 邢建娇, 路靖, 李范, 等. 湿地极危植物中华水韭孢子育苗及幼孢苗管护[J]. 湿地科学, 2013, 11(3): 347-351.
- [13] 姜男, 邢建娇, 丁国华, 等. 几种栽培基质下中华水韭幼苗的生长规律[J]. 湿地科学, 2014, 12(1): 117-121.
- [14] 路靖, 关维元, 徐永星, 等. 中华水韭雌配子体及胚胎发育的初步研究[J]. 武汉植物学研究, 2013, 31(4): 353-359.
- [15] 林鹏. 中国红树林生态系统[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 329-352.
- [16] 况琪军, 谭渝云. 活性藻系统对氮、磷及有机物的去除研究[J]. 中国环境科学, 2001, 21(3): 212-216.
- [17] 吴智诚. 营养元素及培养条件对粪产碱杆菌降解机油的影响[J]. 环境科技, 2008, 21(5): 26-30.
- [18] 郑国臣, 赵峰, 李建政, 等. 微量元素对 ABR 发酵产氢产甲烷的影响[J]. 中国给水排水, 2012, 28(3): 20-23.
- [19] 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 上海: 科学出版社, 2004: 60-394.
- [20] BASSI R, SHARMA S. Proline accumulation in wheat young sporophytes exposed to zinc and copper[J]. Phytochem, 1993, 33(6): 1339-1342.
- [21] 陈桂葵, 陈桂珠, 黄玉山, 等. 人工污水对白骨壤幼苗生理生态特性的影响[J]. 应用生态学报, 1999, 10(1): 95-98.
- [22] SUKUMARAN N P, WEISER C J. An excised leaflet test for evaluating potato frost tolerance[J]. Hort Science, 1972, 7(5): 467-468.
- [23] HAMEED A, GOHER M. Drought induced programmed cell death and associated changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in wheat leaves[J]. Biologia Plantarum, 2013, 57(2): 370-374.
- [24] 金忠民, 沙伟, 臧威, 等. 干旱胁迫对白三叶幼苗保护酶的影响[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(7): 52-53.
- [25] 黄雪方, 李冬林, 金雅琴, 等. 5 种挺水植物对污水浸淹的生理反应及净水效果[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2012, 36(5): 66-70.
- [26] RIZHSKY L, LIANG H, SHUMAN J. When defense pathways collide: The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress[J]. Plant Physiol, 2004, 134(4): 1683-1696.
- [27] 颜建明, 郝继华, 颜敏华, 等. 低温弱光下 3 种渗透调节物质含量变化及其与品种耐性的关系[J]. 西北植物学报, 2009, 29(1): 105-110.
- [28] 鲁敏, 裴翡翡, 宁静, 等. 4 种湿地植物受污水胁迫生理生化特性影响的相关性研究[J]. 山东建筑工程学院学报, 2011, 26(5): 416-419.
- [29] 魏国余, 招礼军, 朱栗琼, 等. 城市污水对 4 种树木生理指标的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(17): 5078-5079.
- [30] 周建, 杨立峰, 郝峰鸽, 等. 低温胁迫对广玉兰幼苗光合及叶绿素荧光特性的影响[J]. 西北植物学报, 2009, 29(1):

136 – 142.

[31] 胡宏友, 卢昌义, 叶勇. 生活污水对长春花生长及生理影响的研究[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(4): 131 – 134.

[32] CHANDRA A, PATHAK P S, BHATT R K. Variation in drought tolerance of different stylosanthes accessions[J]. Biologia Plantarum, 2004, 48(3): 457 – 460.

[33] 聂磊, 贺漫媚, 代色平. 十种湿地挺水植物净化广州河涌污水的生理生态效应分析[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(9): 1776 – 1780.

Physiological Response of *Isoetes orientalis* to Artificial Sewage Water Stress

SHENG Yuhui¹, GUAN Weiyuan², XU Yongxing², LI Jing¹, LIU Baodong¹

(1. Key Laboratory of Plant Biology, College of Heilongjiang Province, Harbin Normal University, Harbin 150025, China;

2. Jiande Institute of Forestry Science of Zhejiang Province, Jiande 311600, China)

Abstract: *Isoetes orientalis* is a wild national protective endangered aquatic pteridophyte. It is an endemic ancient relict plant inhabited in the middle and lower reaches of Yangtze River. The relationship between pollution of water body and endangerment of *I. orientalis* had never been reported. Mature *I. orientalis* plants with similar growth vigor were treated for 2 – 14 days with different concentrations (5 times, 10 times and 20 times) of sewage water to observe the change of 6 physiological indexes of the plants, i. e., protective enzyme system, osmotic substance, chlorophyll content, malondialdehyde content, relative conductance and photosynthetic rate. *I. orientalis* was found to have a better tolerance to the stress of the sewage water under 5 and 10 times of the concentration but poor tolerance to the stress under the 20 times of concentration with comparatively obvious physiological injury. According to the sewage stress and the ecological conditions, the authors believe that the sewage water stress might not be the main reason for endangerment of *I. orientalis*.

Key words: *Isoetes orientalis*; sewage stress; physiological index; endangerment