

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.05.028

高氨氮对廖叶眼子菜光合及抗氧化系统的影响

裘 箐¹, 房 凯^{1,2}, 刘凯辉¹, 庞 思¹, 宗亿宣¹, 张松贺¹

(1. 河海大学环境学院, 南京 210098; 2. 宿迁市水利局, 宿迁 223800)

摘要: 在不同质量浓度氨氮条件下,对廖叶眼子菜(*Potamogeton polygonifolius*)体内氧化物质含量、抗氧化酶活性和叶绿素荧光变化进行了研究. 实验结果显示:高质量浓度氨氮(10 mg/L)下廖叶眼子菜的光合作用能力所受影响不大. 但是高质量浓度氨氮(5~10mg/L)会提高廖叶眼子菜体内氧化物质含量,植物自身防御机制进而会在一定时间内促使体内抗氧化酶活力及次生物质含量的上升,其中氨氮质量浓度为 10 mg/L 时抗氧化酶及次生物质反应强烈. 结果表明氧化能力的上升有助于缓解氨氮诱导的氧化胁迫及增强植物对氨氮的耐受性. 总体而言,较高的氨氮浓度会对廖叶眼子菜具有一定的影响,在使用该植物修复水体时需要考虑氨氮的浓度水平及其影响.

关键词: 氨氮胁迫; 廖叶眼子菜; 抗氧化; 光合; 生态修复

中图分类号: Q95 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2018)05-1091-06

Effects of high ammonium nitrogen on photosystem and antioxidant system of *Potamogeton polygonifolius*

QIU Zheng¹, FANG Kai^{1,2}, LIU Kai-Hui¹, PANG Si¹, ZONG Yi-Xuan¹, ZHANG Song-He¹

(1. College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China; 2. Suqian Water Conservancy Bureau, Suqian 223800, China)

Abstract: Changes in concentrations of oxidative material, antioxidase activities and chlorophyll fluorescence were investigated in *Potamogeton polygonifolius* exposed to different concentrations of ammonium nitrogen. The results show that 10mg/L of ammonium nitrogen had a little effect on photosynthetic capacity of *P. polygonifolius*. However, the 5 mg/L to 10 mg/L concentration of ammonium nitrogen could increase oxygen radicals and enhance the defensive capacity by stimulating the antioxidant enzymes activity and increasing content of secondary metabolites. 10 mg/L concentration of ammonium nitrogen had significant effect on the activity of antioxidant enzymes and content of secondary metabolites. The increased antioxidant capacity may alleviate ammonium-induced oxidative stress, and thus enhance the endurance of plants to cope with ammonium stress. Overall, higher concentration of ammonium nitrogen had some effect on *P. polygonifolius* and consequently, the concentration and impact of ammonium nitrogen should be considered when using *P. polygonifolius* to remediate water ecosystem.

Keywords: Ammonium-stress; *Potamogeton polygonifolius*; Antioxidant; Photosystem; Ecological remediation

收稿日期: 2017-06-12

基金项目: 国家自然科学基金(E51379063, E51579075); 江苏省自然科学基金(优秀青年)基金(BK20160087); 江苏省水利科技项目(2015085)

作者简介: 裘箐(1996-), 女, 江苏淮安人, 硕士研究生, 研究方向为水体生态修复. E-mail: 180938647@qq.com

通讯作者: 张松贺. E-mail: shzhang@hhu.edu.cn

1 引言

水生植物是水体生态系统的重要组成部分和主要的初级生产者,对生态系统物质和能量的循环和传递起调控作用^[1].它可以吸附水中的悬浮物,吸收水体收营养物质及起到潜在的去毒作用.水生植物通常也用来监测水生污染、对污染物进行生态毒理学评价,研究其进入生物链以后的生物积累、修饰和转运,对水体植物生态的保护和人畜健康方面有非常重要的意义^[2].然而近年来由于水体富营养化情况的出现,导致水生植物个体消失、种群衰退.其中,氮磷浓度的上升是主要因素.

水体氮主要包括有机氮、氨氮、亚硝氮和硝氮,其中氨氮的毒性较大.过量的氨氮不仅对水生植物本身造成伤害,而且影响水生植物表面附着的微生物^[3].在个体水平上,高浓度的氨氮抑制植物萌发和幼苗建立,并有助于可溶性碳水化合物含量降低,从而抑制生长.在细胞水平,氨氮会提升无机阴离子如氯离子、硫酸盐和磷酸盐含量的增加,抑制细胞对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的吸收.所以氨氮既是植物可以直接吸收利用的无机氮素,过量时又会对植物产生毒害作用,影响植物生长,破坏植物组织结构^[4].因此,筛选出较耐氨氮的水生植物作为富营养化湖泊生态修复的先锋物种具有重要意义.

本研究选取浮叶植物廖叶眼子菜(*Potamogeton polygonifolius*)为实验材料.实验研究了不同质量浓度氨氮对廖叶眼子菜丙二醛(MDA)含量、过氧化氢(H_2O_2)含量、叶绿素荧光、花青素含量、总酚含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性变化的影响,研究不同质量浓度氨氮对廖叶眼子菜的胁迫作用.

2 材料和方法

2.1 试验材料

廖叶眼子菜属于眼子菜科眼子菜属,是典型的浮叶草本植物,适宜生长于静水水体中.本实验所用植物材料均购自高淳水生植物养殖中心,实验前,将购回的植物样培养驯化一周,使植物适应室内的生长环境,在良好的生长状态下进行胁迫实验.

2.2 方法

2.2.1 实验设计 选取 8 个尺寸为 $670 \times 480 \times 390$ mm,体积 140 L 的塑料水箱.在每个桶中加入

7 cm 厚混合均匀的沉积物,加水至 36 cm 处(水深 29 cm),静置 3 d,使悬浮物沉降;将廖叶眼子菜按照密度约 200 株/ m^2 种入水箱中(尽量挑选植株均匀、叶片无损伤的植物);实验过程中保持水体深度不变,设置氨氮浓度梯度为 0、0.5、5、10 mg/L,每组设置两个平行,同时设置一组对照(未添加氨氮).每 2 d 使用一次连续流动分析仪(AA3),测定水体浓度氨氮变化量,通过添加适量氯化铵来控制氨氮浓度,使其保持与初始浓度一致;实验期间,对廖叶眼子菜叶片(中叶)的荧光动力学参数进行周期测定,共测定三个周期(第 1、7 和 14 d);实验结束阶段(第 14 d),采集廖叶眼子菜的生长状态良好叶片(中叶),测定其植物次生物质和抗氧化系统相关物质.(实验水箱编号:K-1, K-2(氨氮浓度 0 mg/L);A1-1, A1-2(氨氮浓度 0.5 mg/L);A2-1, A2-2(氨氮浓度 5 mg/L);A3-1, A3-2(氨氮浓度 10 mg/L)).

2.2.2 测试指标 叶绿素荧光测定:利用 OS5p 调制叶绿素荧光仪对植物叶片荧光动力学参数进行测定.花青素含量:采用分光光度法,单位 mg/g.总酚含量:采用分光光度法,单位 mg/g.丙二醛(MDA)的测定:参照 Hodges 丙二醛测定方法^[5],单位 nmol/mg protein.过氧化氢(H_2O_2)的测定,参照刘俊等植物过氧化氢含量测定方法^[6],单位 mmol/g protein.超氧化物歧化酶(SOD)的测定:参照水杨酸对 NBT 光化还原法,单位 U/mg protein.过氧化氢酶(CAT)的测定:参照 Aebi 过氧化氢酶测定方法^[7],单位 U/mg protein.过氧化物酶(POD)的测定:参照 Upadhyaya 过氧化氢酶测定方法^[8],单位 U/mg protein.

2.2.3 统计分析 采用 SPSS 软件进行数据分析及差异显著性分析.

3 结果与讨论

3.1 氨氮对 MDA、 H_2O_2 含量的影响

由图 1A 可见,在氨氮浓度小于 0.5 mg/L 条件下,廖叶眼子菜叶片 H_2O_2 的含量变化不大.当氨氮浓度 10 mg/L 内时,叶片内的 H_2O_2 含量比在 0.5 mg/L 时增长了 82%,且 0.5、5、10 mg/L 三组之间分别达到极显著水平. H_2O_2 是一种活性氧代谢的副产物,在许多氧化应急反应中过氧化氢都是一种关键的调节因子.正常情况下植物通过分泌抗氧化性质的酶及相关物质使活性氧自由基的产生和消除处于平衡状态^[9].当植物处在逆境胁迫

状态下,这种平衡被打破,植物细胞内会有过量的 H_2O_2 产生,进而攻击细胞膜和细胞器,造成损伤,破坏细胞功能^[10]. 我们的结果表明廖叶眼子菜暴露在 5 和 10 mg/L 氨氮 14 天后,其体内累积了活性氧.

MDA 是常用的膜脂过氧化指标,是植物器官衰老或在逆境条件下发生膜脂过氧化的产物之一.

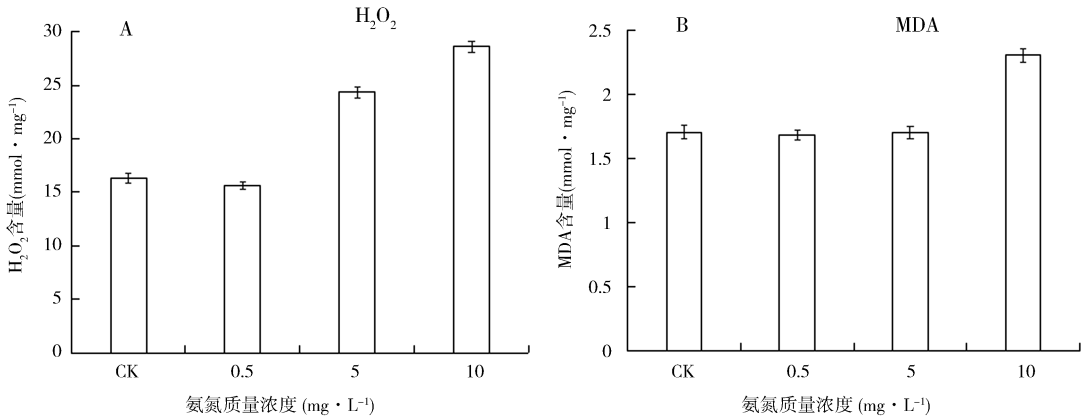


图 1 不同质量浓度氨氮下暴露 14 d 后叶片内 H_2O_2 (A) 和 MDA (B) 含量变化

Fig. 1 The change of H_2O_2 (A) and MDA (B) in leaves after 14 days of exposure to different concentrations of ammonium nitrogen

3.2 氨氮对光合指标的影响

为了分析氨氮对廖叶眼子菜光合作用的影响,我们监测了 F_o (最小叶绿素荧光)、 F_v (最大叶绿素荧光) 和 F_v/F_m (潜在最大光合作用能力) 在 0.5 mg/L 和 10 mg/L 氨氮条件下暴露 1d, 7d 和 14d 的变化规律. 由图 2A 可见,高质量浓度氨氮条件下廖叶眼子菜 F_o 值随着时间变化略有上升,组别间无显著性差异. 由图 2B 可见,高质量浓度氨氮条件下廖叶眼子菜 F_v 值随着时间变化下降了 5.3%, 下降幅度不大. 由图 2C 可见,高质量浓度氨氮条件下廖叶眼子菜 F_v 值随着时间变化上升了 0.7%, 上升幅度很小,组别间无显著性差异. 叶绿素荧光动力学是研究和探测植物光合生理与逆境胁迫关系的理想探针^[12]. 该技术在测定叶片光合作用过程中在光系统对光能的吸收、传递、耗散、分配等方面具有独特的作用,叶绿素荧光参数具有反映“内在性”的特点^[13,14]. F_o 表示反应中心没有进行光合作用时最原始状态下的最小荧光产量值, F_v 表示暗适应叶片给光的最大的可变荧光值. F_v/F_m 表示 PS II 的最大光合效率,反映了植物的潜在最大光能转换效率. 当 F_v/F_m 下降时,代表植物受到了胁迫^[15,16]. 我们的结果表明,

如图 1B 所示,氨氮浓度在 0~5 mg/L 范围内,MDA 含量变化比较平缓,但在 10mg/L 氨氮条件下,MDA 显著增加 ($P < 0.01$). MDA 含量的升高这一现象,通常是植物膜发生严重的过氧化损伤的标志,其含量的高低,间接地表示膜脂受损情况^[11]. 本研究结果显示 10mg/L 条件下 MDA 的增加可能与氨氮诱导的活性氧迸发有关.

在当前条件下,氨氮对廖叶眼子菜的叶片荧光值的影响不大,当前研究条件下氨氮对廖叶眼子菜的光合中心叶片进行光化学反应的能力范围没有太大影响.

3.3 氨氮对植物次生物质含量的影响

植物通过次级代谢途径产生的物质可称为次生代谢产物,简称为次生物质. 植物的次生代谢是植物在长期进化中与环境相互作用的结果,次生代谢产物在植物提高自身保护和生存竞争能力、协调与环境关系上充当着重要的角色,其产生和变化与环境有着很强的相关性和对应性. 代谢产物的种类异常繁杂,化学结构迥异^[17],一般可分为酚类化合物、萜类化合物、含氮有机碱三大类^[18]. 这类物质的作用之一是清除自由基,保护植物抵抗由 UV 照射、化学氧化剂、病原体入侵以及其他逆境时产生的氧化胁迫^[19]. 总酚是一类作用很强的自由基清除剂,其羟基具有强的供电子能力,能以单电子转移的方式清除氧自由基、多种活性氧或减少氧自由基产生的可能性^[20]. 如图 3A 所示,廖叶眼子菜的总酚含量随着氨氮浓度的增加呈现先升后降再升的趋势,且 10 mg/L 组与 5 mg/L 组间差异达到极显著水平. 重金属 Pb 胁迫也诱导植物酚类物质的合成^[21].

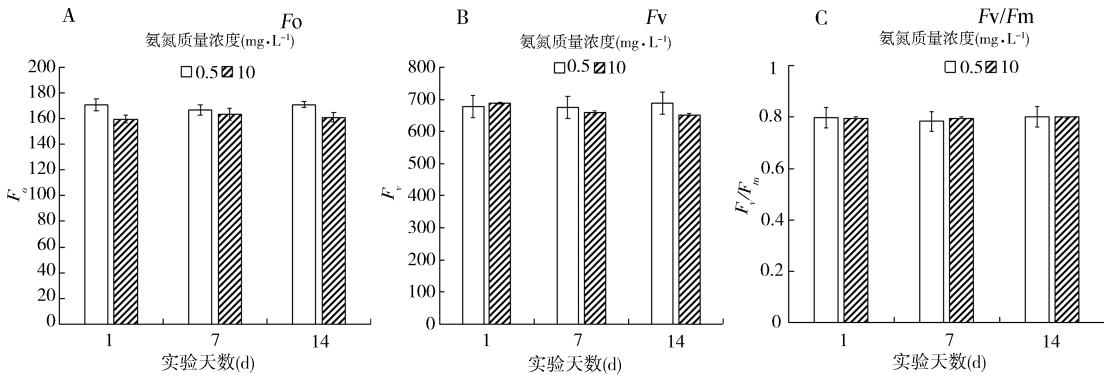


图 2 不同质量浓度氨氮下叶片 F_o (A)、 F_v (B)和 F_v/F_m (C)的变化

Fig. 2 The change of F_o (A), F_v (B) and F_v/F_m (C) in leaves under different concentrations of ammonium nitrogen

花青素属于黄酮类物质,是广泛存在于植物界中的一种天然水溶性色素^[22]。花青素有很强的抗氧化活性^[23],它是一种自由基清除剂,能和蛋白质结合防止过氧化。由图 3B 可见,廖叶眼子菜花青素含量随着氨氮浓度的增长呈现上涨趋势,在 10 mg/L

氨氮浓度条件下的廖叶眼子菜花青素含量是对照组的 1.72 倍,且不同组别间均达到显著水平($P < 0.05$)。花青素及总酚含量的增加有助于提高廖叶眼子菜对氨氮诱导的氧化胁迫的耐性。

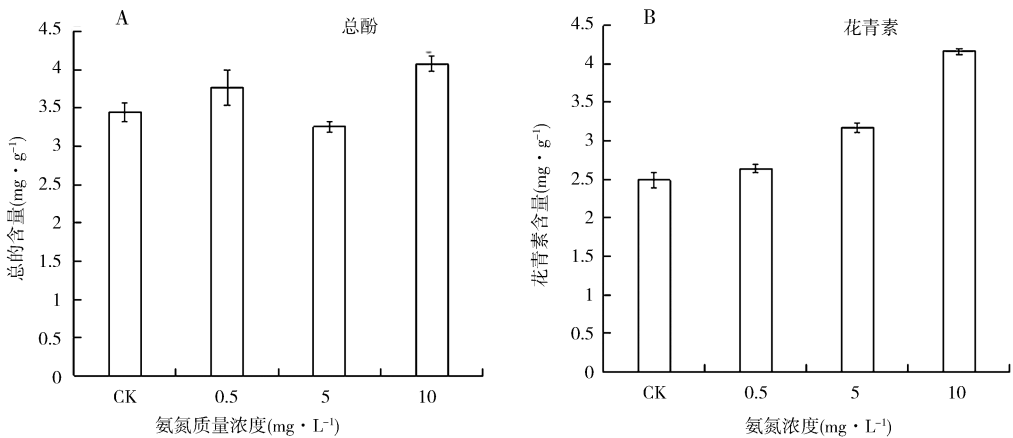


图 3 不同质量浓度氨氮下暴露 14d 后叶片内总酚(A)和花青素(B)含量变化

Fig. 3 The change of total phenols (A) and anthocyanin (B) in leaves after 14 days of exposure to different concentrations of ammonium nitrogen

3.4 氨氮对抗氧化酶活性的影响

SOD 是一种广泛存在于动植物、微生物中的金属酶,能催化生物体内超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)发生歧化反应,是机体内 $O_2^{\cdot-}$ 的天然消除剂。在生物体的自我保护系统中起着极为重要的作用。由图 4A 可见,氨氮质量浓度在 0.5 至 5 mg/L 内 SOD 活力下降了 22%,氨氮浓度在 5 至 10 mg/L 内 SOD 活力上升了 101%,SOD 活力总体呈现先略微下降后显著上升的趋势且组别间差异均达到极显著水平。SOD 酶是植物抗氧化的第一步,将超氧根阴离子歧化为过氧化氢和氧气。由于超氧根阴离子的毒性比过氧化氢毒性要强,因而 SOD 酶对降低氧化胁迫

迫至关重要。

POD 是一种以血红素为辅基的氧化酶^[24],以酚类为底物在清除过氧化氢的过程中形成复合型大分子。因此,POD 在去除过氧化氢的同时,有利于提高细胞壁的厚度,抵抗细胞内物质的流失。由图 4B 可见,随着氨氮浓度的上升 POD 呈现上升趋势,其中氨氮浓度在 5 至 10 mg/L 内 POD 活力上涨了 71%,且 10 mg/L 组与其他三组间差异达到极显著水平。由图 4C 可见,CAT 是催化过氧化氢分解成氧和水的酶,逆境胁迫下,细胞内易产生 H_2O_2 破坏膜系统的稳定,而 CAT 能把 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,从而清除 H_2O_2 以维护膜的稳定

性. CAT 活力随着氨氮质量浓度上升有升高趋势, 且 5、10 mg/L 组与 0、0.5 mg/L 组差异达到显著

性. SOD、POD、CAT 活性的提高有助于植物抵抗体内产生的多余活性氧自由基.

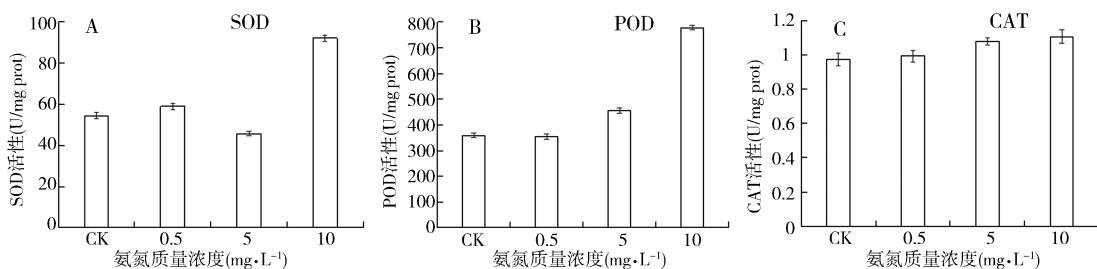


图 4 不同质量浓度氨氮下暴露 14d 后叶片内抗氧化酶活性变化

Fig. 4 The change of antioxidant enzymes activity in leaves after 14 days of exposure to different concentrations of ammonium nitrogen

4 结 论

目前我国主要水体中氨氮是关键污染因子, 然而关于其对水生植物的具体影响机制仍不清楚. 本研究分析了不同浓度氨氮影响下, 浮叶植物廖叶眼子菜的相关变化规律. 有研究发现, 在遭受逆境因子胁迫时, 植物体内保护系统启动, 以抵御外界环境胁迫对植物造成的伤害^[25,26]. 本次实验结果表明, 高浓度氨氮环境明显提高了廖叶眼子菜体内 MDA 和 H₂O₂ 含量, 过量 MDA 和 H₂O₂ 会攻击细胞膜和细胞器, 破坏细胞功能, 造成不可逆的伤害. 在这种情况下廖叶眼子菜会自发提高体内抗氧化物质的含量和活性. 其中花青素、总酚这类具有抗氧化性的次生物质含量上升以及 SOD、POD 和 CAT 这些抗氧化酶活性提高, 且次生物质含量和抗氧化酶活性的上升幅度总体大于 MDA 和 H₂O₂ 含量上升幅度. 抗氧化物质能有效地清除代谢过程产生过量的活性氧自由基, 使生物体内氧化物质维持在一个低水平上, 从而防止活性氧引起的膜脂过氧化及其它伤害过程. 结果表明氧化能力的上升有助于缓解氨诱导的氧化胁迫及增强植物对氨氮的耐受性. 通过对不同质量浓度氨氮条件下廖叶眼子菜叶绿素荧光的研究, 发现高浓度 (10 mg/L) 氨氮环境对廖叶眼子菜的 PSII 光化学反应中心损伤较小, 对其光合作用能力影响不大. 因此在利用廖叶眼子菜作为治理富营养湖泊生态修复的物种投入使用时需要酌情考虑水体氨氮的影响.

参考文献:

[1] 吕小央, 张松贺, 刘凯辉, 等. 水生植物-生物膜体系的生态功能与互作机制研究进展[J]. 水资源保护, 2015, 31: 20.

[2] 林鸿, 金晶, 姚雄, 等. 水生植物对水体的处理作用及应用[J]. 园林科技, 2010, (3): 6.

[3] 刘凯辉, 张松贺, 吕小央, 等. 南京花神湖 3 种沉水植物表面附着微生物群落特征[J]. 湖泊科学, 2015, 27: 103.

[4] 朱伟, 张俊, 赵联芳. 底质中氨氮对沉水植物生长的影响[J]. 生态环境学报, 2006, 15: 24.

[5] Hodges D M, Delong J M, Forney C F, *et al.* Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds[J]. *Planta*, 1999, 207: 604.

[6] 刘俊, 吕波. 植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27: 548.

[7] Yates D W. Methods of enzymatic analysis (third edition)[J]. *Febs Lett*, 1984, 176: 275.

[8] Upadhyaya A, Sankhla D, Davis T D, *et al.* Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves[J]. *J Plant Physiol*, 1985, 121: 453.

[9] 袁秋红. 重金属对水生植物抗氧化系统的影响及重金属胁迫蛋白研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2008.

[10] 周希琴, 莫灿冲. 植物重金属胁迫及其抗氧化系统[J]. 新疆教育学报, 2003, 19: 103.

[11] 金相灿, 郭俊秀, 许秋瑾, 等. 不同质量浓度氨氮对轮叶黑藻和穗花狐尾藻抗氧化酶系统的影响[J]. 生态环境学报, 2008, 17: 1.

[12] 张守仁. 叶绿素荧光动力学参数的意义及讨论[J]. 植物学报, 1999, 16: 444.

[13] Genty B, Briant M, Baker R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence

- [J]. *Biochem Bioph*, 1989, 990: 87.
- [14] Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. Chlorophyll fluorescence as a nondestructive indicator for rapid assessment of *vivo* photosynthesis[J]. *Ecol Stud*, 1994, 100: 49.
- [15] 李鹏民. 快速叶绿素荧光诱导动力学在植物逆境生理研究中的应用[D]. 山东农业大学, 2007.
- [16] 魏霞, 李守中, 郑怀舟, 等. 叶片气体交换和叶绿素荧光在植物逆境生理研究中的应用[J]. *福建师范大学学报:自然科学版*, 2007, 23: 130.
- [17] 段传人, 王伯初, 徐世荣. 环境应力对植物次生代谢产物形成的作用[J]. *重庆大学学报*, 2003, 26: 67.
- [18] 董妍玲, 潘学武. 植物次生代谢产物简介[J]. *生物学通报*, 2002, 37: 17.
- [19] Dai L P, Xiong Z T, Huang Y, *et al*. Cadmium-induced changes in pigments, total phenolics, and phenylalanine ammonia-lyase activity in fronds of *Azolla imbricata* [J]. *Environ Toxicol*, 2006, 21: 505.
- [20] 廉美娜, 朱玉环, 徐长林, 等. 祁连山东段高寒草甸植物总酚和黄酮含量及抗氧化活性研究[J]. *西北植物学报*, 2012, 32: 2492.
- [21] Wang C, Lu J, Zhang S, *et al*. Effects of Pb stress on nutrient uptake and secondary metabolism in submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2011, 74: 1297.
- [22] 李敏. 不同花青素提取物的组成、稳定性及抗氧化性比较研究[D]. 南京: 南京财经大学, 2013.
- [23] Gülçin L, Berashvili D, Gepdiremen A. Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla frutescens*, *decne*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 101: 287.
- [24] 吴明江, 于萍. 植物过氧化物酶的生理作用[J]. *生物学杂志*, 1994(6): 16.
- [25] 郭俊秀. 营养盐对沉水植物生长指标和抗氧化酶系统的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
- [26] 白晶月, 冯汉青, 戎福虎, 等. 细胞外 ATP 调节 NaCl 胁迫诱导的烟草悬浮细胞死亡和呼吸抑制[J]. *四川大学学报:自然科学版*, 2017, 54: 191.

引用本文格式:

中文: 裘箐, 房凯, 刘凯辉, 等. 高氨氮对廖叶眼子菜光合及抗氧化系统的影响[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 1091.

英文: Qiu Z, Fang K, Liu K H, *et al*. Effects of high ammonium nitrogen on photosystem and antioxidant system of *Potamogeton polygonifolius* [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2018, 55: 1091.