

离子液体 1-辛基-3-甲基咪唑溴化盐对小麦种子萌发与幼苗生长的影响

刘 萍¹, 孙莉萍¹, 刘海英¹, 徐克东¹, 丁义峰¹, 李效宇¹, 王健吉^{2,3}

(1. 河南师范大学生命科学院, 河南 新乡 453007; 2. 河南师范大学化学与环境科学学院, 河南 新乡 453007; 3. 河南省环境污染控制重点实验室, 河南 新乡 453007)

摘 要:用不同浓度(0、1、2、4、6、8 mg·L⁻¹)的 1-辛基-3-甲基咪唑溴化盐([C₈mim]Br)对冬小麦进行浸种和苗期水培,测定了种子的发芽势(3 d)、发芽率(7 d)和淀粉酶活力以及幼苗根长、芽长、根活力、超氧阴离子(O₂⁻)产生速率、叶片光合色素和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量(7 d)。结果表明,离子液体的暴露导致小麦种子发芽势、发芽率和淀粉酶活力均比对照显著降低,其 IC₅₀ 分别为 5.55、3.39、4.02 mg·L⁻¹;同时,处理组幼苗根长、芽长、根活力以及叶片中叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量也显著下降,其对幼苗根与苗生长的 IC₅₀ 分别为 0.64 mg·L⁻¹ 和 4.98 mg·L⁻¹。另外,处理组幼苗叶片中超氧阴离子产生速率和丙二醛含量均高于对照,差异多达显著或极显著水平,分别为对照的 113.63%~224.15% 和 101.69%~107.61%。在本试验条件下,1-辛基-3-甲基咪唑溴化盐对小麦种子萌发和幼苗生长均具有明显的抑制效应,且抑制效应具有典型的剂量依赖型特点。

关键词: 离子液体;冬小麦;种子萌发;幼苗生长;抑制效应

中图分类号: X503.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)02-0425-05

Effects of 1-octyl-3-methyl Imidazolium Bromide Ionic Liquid on the Germination and Growth of Wheat Seedlings

LIU Ping¹, SUN Li-ping¹, LIU Hai-ying¹, XU Ke-dong¹, DING Yi-feng¹, LI Xiao-yu¹, WANG Jian-ji^{2,3}

(1. School of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2. School of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 3. Henan Key Laboratory for Environmental Pollution Control, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Effects of 1-octyl-3-methyl imidazolium bromide ionic liquid ([C₈mim]Br) on the germination rate of wheat seeds and growth of seedlings were evaluated by water culture tests with different concentrations of [C₈mim]Br (0, 1, 2, 4, 6 and 8 mg·L⁻¹). The germination energy (exposed for 3 d), germination rate (exposed for 7 d) and α-amylase activity, length of root and shoot, root activity, the content of photosynthetic pigments, superoxide free radicals accumulation and malondialdehyde content (exposed for 7 d) in leaves were determined. The results showed that the germination energy, germination rate and α-amylase activity decreased, the IC₅₀ of inhibition was 5.55 mg·L⁻¹, 3.39 mg·L⁻¹ and 4.02 mg·L⁻¹, respectively, when the seeds were exposed to [C₈mim]Br. Furthermore, the length of root and shoot, root activity and the content of chlorophyll-a, chlorophyll-b, chlorophyll-a+b and carotenoid were also reduced when compared to the control, the IC₅₀ of inhibition of [C₈mim]Br on root and shoot was 0.64 mg·L⁻¹ and 4.98 mg·L⁻¹, respectively. In addition, 1-octyl-3-methyl imidazolium bromide led to the increase in the producing velocity of superoxide free radicals and content of malondialdehyde. These results indicated that 1-octyl-3-methyl imidazolium bromide greatly inhibited the seeds germination and seedling growth of wheat in dose-dependant.

Keywords: ionic liquid; winter wheat; seed germination; seedling growth; inhibitory effect

离子液体 (ionic liquid, IL) 是完全由离子组成、在室温下呈液体状态的盐, 所以又叫低温熔融盐。它

一般由有机阳离子和无机阴离子组成。当前研究的离子液体, 根据正离子的不同分为 4 类: 烷基季铵离子([NR_xH_{4-x}]⁺)、烷基季磷离子([PR_xH_{4-x}]⁺)、1,3-二烷基取代的咪唑离子([R₁R₃im]⁺)、N-烷基取代的吡啶离子([RPy]⁺)。根据负离子的不同可将离子液体分为两大类: 一类是卤化盐(正离子仍为上述 4 种)+AlX₃ (X = Cl、Br)。另一类离子液体, 很多对水、对空气稳定, 近

收稿日期: 2007-05-09

基金项目: 国家自然科学基金(20273019, 20573034); 河南省杰出人才创新基金(2006KYCX021)

作者简介: 刘 萍(1958—), 女, 教授, 主要从事植物生长发育的化学调控等研究。E-mail: liuping5812@sina.com

通讯作者: 李效宇, 王健吉

几年取得惊人进展。其正离子多为烷基取代的咪唑离子 $[R_1R_3\text{im}]^+$, 负离子多有 BF_4^- 、 PF_6^- , 也有 CF_3SO_3^- 、 $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ 、 $\text{C}_3\text{F}_7\text{COO}^-$ 、 $\text{C}_4\text{F}_9\text{SO}_3^-$ 、 CF_3COO^- 、 $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_3\text{C}^-$ 、 $(\text{C}_2\text{F}_5\text{SO}_2)_3\text{C}^-$ 、 $(\text{C}_2\text{F}_5\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ 、 SbF_6^- 、 AsF_6^- 、 NO_2^- 等^[1]。与传统的有机溶剂和电解质相比,离子液体具有一系列突出的优点:熔点低,蒸气压小,电化学窗口大,酸性可调及良好的溶解度、粘度和密度等^[2]。

目前离子液体的应用研究领域主要为:化学反应、分离过程、电化学等方面。2003年 BASF 公司首先实现了离子液体的规模化应用,预示了离子液体作为新型的绿色工业溶剂的大规模工业应用已经启动^[3]。然而,随着研究和应用的不断深入,人们逐渐认识到离子液体自身的绿色性问题,关于离子液体毒性的研究也引起了国内外研究者的关注^[4]。离子液体对藻类、微生物、动物均有不同程度的生物毒性^[5-9]。由于某些离子液体散失到环境中从而污染环境,且由于其稳定性,会通过水循环或其他途径进入农业生态系统。但离子液体对高等植物的影响研究尚未见报道。本文初步研究了 1-辛基-3-甲基咪唑溴化盐离子液体对小麦种子萌发和幼苗生长的影响,以期对离子液体的环境安全评价提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

冬小麦(*Triticum aestivum* L.)“郑麦 9023”品种。

试验中所用 1-辛基-3-甲基咪唑溴化盐 (1-Octyl-3-methyl imidazolium bromide ionic liquid, $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$) 溴化 1-辛基-3-甲基咪唑盐离子液体参考 Bonhôte^[10]的方法制备(Bonhôte et al, 1996):将 100 g N-甲基咪唑在 70 °C 下溶解于 300 mL 1,1,1-三氯乙烷中,剧烈搅拌,逐滴加入 273 g 新蒸的 1-溴辛烷。加热至 80 °C,回流 12 h。趁热用分液漏斗分出生成的产品,1,1,1-三氯乙烷洗涤,水洗后得到纯品,纯度 99.2%(HPLC),室温下为粘稠状液体,实验浓度范围内($< 300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)溶于水。核磁共振氢谱和文献报道相符^[11]。

1.2 试验方法

取粒大饱满的小麦种子,用 0.1% HgCl_2 表面消毒 7 min,去离子水反复冲洗,在 30 °C 的水中浸泡 48 h,然后在 33 °C 温箱中催芽。挑出露白一致的种子,在装有 5 种不同浓度(1、2、4、6、8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 液体培养罐的尼龙网上分别均匀放置 100 粒,每个浓度重复 3 次,进行种子萌发与幼苗生长试验,以去离子水

培养作为对照。培养室为恒温 25 °C,光强 4 000~4 500 lx,光暗比为 14:10,培养 7 d 后取样进行生理指标的测定。

1.3 测试指标

形态指标的测定:按国家种子质量检测标准,于小麦子粒萌发的第 3 d 计算发芽势,第 7 d 计算发芽率,第 3、5、7 d 各处理浓度随机取 30 株幼苗分别测量其根长、芽长^[12]。

生理指标测定:培养 7 d 后收获小麦的根和叶,去离子水反复冲洗后,立即用液氮进行速冻,真空冷冻干燥后,在 -50 °C 以下保存备用。

α -淀粉酶活力的测定:参照 Liu Xiaoli et al 的方法^[13]。幼苗根活力的测定(第 7 d):用氯化三苯基四氮唑(2,3,5,-triphenyl tetrazolium chloride)法^[14]。幼苗叶片叶绿素含量的测定(第 7 d):采用浸提法^[15]。幼苗叶片超氧阴离子产生速率的测定(第 7 d):按王爱国等的方法^[16]。幼苗叶片丙二醛含量的测定(第 7 d):采用硫代巴比妥酸法^[17]。

以上数据均采用 3 次重复的平均值,试验结果用 Excel 和 SPSS 统计软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 对小麦种子萌发的影响

2.1.1 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 对小麦种子发芽势和发芽率的影响

发芽势与发芽率是种子在逆境条件的首要特征,它会影响植物生长发育的各个时期^[18]。表 1 数据显示,随着 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 处理浓度的增大,小麦种子的发芽势和发芽率均呈现出逐渐降低的趋势,且与 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 浓度呈极显著线性负相关(r 分别为 -0.975 2**, -0.961 5**)。各处理间差异均达到极显著水平。说明 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 对小麦种子萌发有明显的抑制作用,且处理的 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 浓度越高,抑制种子发芽的效应越强(见表 1)。 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 对发芽势与发芽率的 IC_{50} 分别为 $5.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其理论方程与相关指数分别为:

$$y_{\text{发芽势}} = -0.0867x + 1.0467; r = -0.9752$$

$$y_{\text{发芽率}} = -0.1549x + 1.1231; r = -0.9615$$

2.1.2 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 对萌发小麦种子 α -淀粉酶活性的影响

α -淀粉酶是水解谷物种子中淀粉的主要酶,其活性的高低与种子萌发及幼苗生长有着密切的联系^[19]。从图 1 可以看出,随着 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 浓度的增大,种子中 α -淀粉酶活性逐渐下降。经 Pearson 相关分析, α -淀粉酶活性与 $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Br}$ 浓度呈极显著负相关

表 1 $[C_8mim]Br$ 对小麦种子发芽势和发芽率的影响Table 1 The effects of $[C_8mim]Br$ on germination of wheat seeds

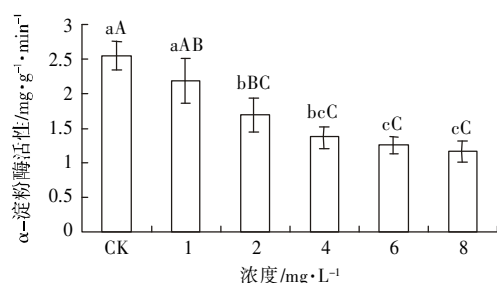
处理浓度/ $mg \cdot L^{-1}$	CK	1	2	4	6	8
发芽势 / %	89.67aA (100aA)	80.00bB (89.21bB)	72.33cC (80.67cC)	62.67dCD (69.89. dCD)	32.00eD (35.69eD)	12.00fE (13.38fE)
发芽率 / %	97.33aA (100aA)	85.67bB (88.01bB)	76.67cC (78.77cC)	71.00dD (72.95dD)	65.33eE (67.12eE)	50.00fF (51.37fF)

注:表中括号内为相对值。数据后的大小写字母分别表示 0.01 和 0.05 水平上的差异显著性,下同。

Note: Values in the brackets are relative values. Capital and small letters in the table represent significances of the differences among treatments at 0.01 and 0.05, respectively. The same below

($r=-0.9126$), 当 $[C_8mim]Br$ 浓度 $\geq 2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时, 各处理与对照间差异均达极显著水平。其对 α -淀粉酶活性 7 d 的 IC_{50} 为 $4.02 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 。

结果表明, $[C_8mim]Br$ 对萌发小麦种子 α -淀粉酶活性的抑制作用与对种子萌发率的抑制作用相一致。



图中大小写字母分别表示 0.01 和 0.05 水平上的差异显著性,下同。

Note: Capital and small letters in the figure represent significances of the differences among treatments at 0.01 and 0.05, respectively. The same below

图 1 $[C_8mim]Br$ 对萌发小麦种子 α -淀粉酶活性的影响Figure 1 Effect of $[C_8mim]Br$ on α -Amylase activity of wheat seeds

2.2 $[C_8mim]Br$ 对小麦幼苗生长的影响

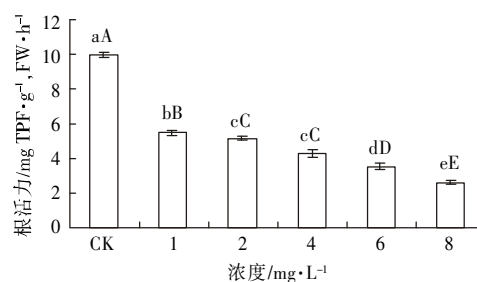
2.2.1 $[C_8mim]Br$ 对小麦幼苗根和芽生长的影响

表 2 数据显示,随着 $[C_8mim]Br$ 处理浓度的增大,小麦幼苗的根长和芽长依次降低,各处理浓度间差异多达显著或极显著水平。 $[C_8mim]Br$ 对幼苗根和芽生长 72 h 的 IC_{50} 分别为 $0.64 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 和 $4.98 \text{ mg} \cdot L^{-1}$,这说明, $[C_8mim]Br$ 对小麦幼苗的生长有明显的抑制作

用,且随 $[C_8mim]Br$ 浓度(自变量 X)的增大抑制作用增强。

2.2.2 $[C_8mim]Br$ 对小麦幼苗根系活力的影响

根系活力泛指根系的吸收能力、合成能力和还原能力等,是反映根系生长和功能状态的重要指标^[20]。由图 2 可知,小麦幼苗根活力随 $[C_8mim]Br$ 处理浓度的升高而急剧下降,其分别为对照的 55.06%、51.87%、43.33%、35.55%和 26.45%,各处理浓度间差异多达极显著水平。

图 2 $[C_8mim]Br$ 对小麦幼苗根活力的影响Figure 2 Effect of $[C_8mim]Br$ on root motarility of wheat seedlings

2.2.3 $[C_8mim]Br$ 对小麦幼苗叶片光合色素含量的影响

叶绿素是植物进行光合作用的主要色素,叶绿素含量的高低在一定程度上反映了植物光合作用水平^[21]。表 3 数据显示,小麦幼苗叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素的含量与 $[C_8mim]Br$ 处理浓度呈显著负相关,相关系数 r 分别为 -0.946 、 -0.873 、 -0.944 。处

表 2 $[C_8mim]Br$ 对小麦幼苗根长和芽长的影响Table 2 Effect of $[C_8mim]Br$ on the length of root and shoot of wheat seedlings

处理/ $mg \cdot L^{-1}$	根长/cm			芽长/cm		
	3 d	5 d	7 d	3 d	5 d	7 d
CK	2.48aA	6.88aA	10.79aA	2.44aA	5.15aA	8.36aA
1	1.11bBC	2.00bB	2.25bB	1.71bB	3.25bB	4.88bB
2	0.95bcCD	1.46cC	1.80bBC	1.59bBC	2.71cCD	4.54cB
4	0.79cdD	0.97dD	1.11cCD	1.36cCD	2.52cdCDE	4.35cB
6	0.44dE	0.70deDE	0.61cdD	1.34cCD	2.12deE	2.93dC
8	0.23eE	0.42eE	0.48dD	1.25cD	1.97eE	2.66cC

表 3 [C₈mim]Br 对小麦幼苗叶片中光合色素含量的影响

Table 3 Effect of [C₈mim]Br on pigment content of wheat

处理/mg · L ⁻¹	叶绿素a	叶绿素b	叶绿素a+b	类胡萝卜素
CK	4.17aA	0.76aA	4.93aA	2.98aA
1	3.48bB	0.51bAB	3.79bB	2.42bB
2	2.52cC	0.45bcBC	2.97cC	1.67cC
4	2.42cdC	0.41cdBC	2.83cdC	1.59cdC
6	2.09dCD	0.35cdBC	2.45dCD	1.34cdC
8	1.71eD	0.20dC	2.05eD	1.20dC

理组小麦幼苗叶片中类胡萝卜素的含量与叶绿素含量的变化趋势一致。

经[C₈mim]Br 处理,小麦幼苗叶片中叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量分别为对照的 16.49%~58.87%、23.47%~66.75%、17.56%~60.08%和 22.58%~58.93%。

2.2.4 [C₈mim]Br 对小麦幼苗叶片 O₂⁻产生速率和 MDA 含量的影响

从图 3 看出,随着[C₈mim]Br 浓度的增加,小麦幼苗叶片中 O₂⁻产生速率呈梯度上升,除 1 mg · L⁻¹ 处理组的 O₂⁻产生速率与对照(CK)相比差异不显著外,其他各处理间差异均达显著或极显著水平(图 3A)。O₂⁻

是一种活性氧自由基,可使细胞膜脂的不饱和脂肪酸发生连锁过氧化反应而降解,产生脂质过氧化物,其中最主要的产物是 MDA。因此,膜脂过氧化产物 MDA 的含量是细胞膜受损程度的重要指标之一,可用于表示植物生存环境条件的恶劣程度^[2]。在本试验中,小麦幼苗叶片 MDA 含量随[C₈mim]Br 处理浓度的增大而升高,各处理间差异多达显著或极显著水平(图 3B)。说明[C₈mim]Br 处理加剧了小麦幼苗膜脂过氧化程度,对小麦幼苗具有明显的毒害作用。

O₂⁻产生速率和 MDA 含量随[C₈mim]Br 浓度(自变量 X)增大呈上升趋势的理论方程与相关指数分别为:

$y=0.335\ 6x+0.913\ 5; r= 0.973$

$y=0.360\ 4x+23.12\ 9; r= 0.965$

3 结论

(1) [C₈mim]Br 对小麦种子萌发有明显的抑制作用,浓度越大,发芽势、发芽率和 α-淀粉酶活力受抑制程度越严重。

(2)[C₈mim]Br 明显抑制小麦幼苗根和芽的伸长,降低根活力,使叶片中叶绿素和类胡萝卜素的含量下降,叶片中 O₂⁻产生速率和 MDA 含量明显增加,对小麦幼苗细胞膜系统的完整性具有明显的破坏作用。

(3)在离子液体大规模商业化应用前,建议对其环境安全性进行科学评估。

总之,离子液体作为新型绿色溶剂的研究才刚刚展开,其自身的绿色性问题以及对环境的影响,更需要大量基础研究工作才能为离子液体的合成和应用提供科学的参考。

参考文献:

[1] 张英锋,李长江,包富山,等. 离子液体的分类、合成与应用[J]. 化学教育,2005,2: 7-12.
[2] Pernak J, Goc I, Mirska I. Anti-microbial activities of protic liquids with

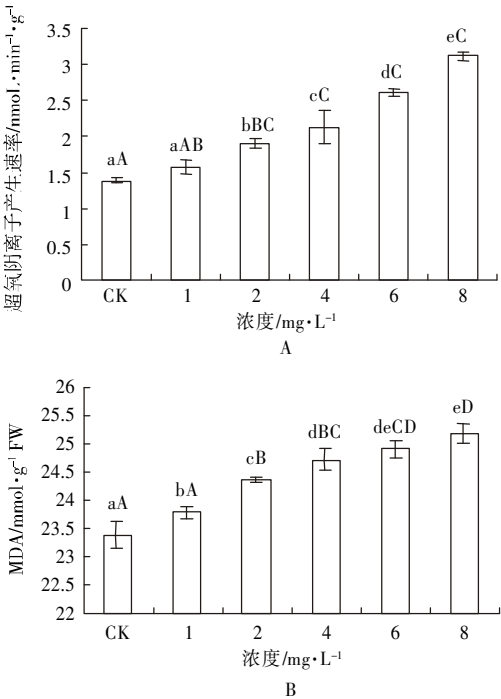


图 3 [C₈mim]Br 对小麦叶片中 O₂⁻产生速率和 MDA 含量的影响

Figure 3 Effects of [C₈mim]Br on O₂⁻ production and MDA content in the leaves of wheat seedlings

- lactate anion[J]. *Green Chem.* 2004, 6: 323–329.
- [3] R D Rogers, K R Seddon. Ionic Liquids—solvents of the future[J]. *Science*, 2003, 302: 792–793.
- [4] 胡雪生, 余江, 夏寒松. 离子液体的绿色合成及环境性质[J]. *化学通报*, 2005, 12: 906–910.
- [5] Ranke J, Mölter K, Stock F, et al. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays[J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2003, 28: 396–404.
- [6] Składanowski A C, Stepnowski P, Kleszczyński K, et al. AMP deaminase in vitro inhibition by xenobiotics. A potential molecular method for risk assessment of synthetic nitro- and polycyclic musks, imidazolium ionic liquids and N-glucopyranosyl ammonium salts[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2005, 19: 291–296.
- [7] Stepnowski P, Składanowski A C, Ludwiczak A, et al. Evaluating the cytotoxicity of ionic liquids using human cell line hela[J]. *Hum Exper Toxicol*, 2004, 23: 513–517.
- [8] Stock F, Hoffman J, Ranke J, et al. Effects of ionic liquids on the acetylcholin esterase—a structure–activity relationship consideration[J]. *Green Chem*, 2004, 6: 286–290.
- [9] Couling D J, Bernot R J, Docherty K M, et al. Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure–property relationship modeling[J]. *Green Chem*, 2006, 8: 82–90.
- [10] Bonhôte P, Dias A P, Papageorgiou N, et al. Hydrophobic, highly conductive ambient–temperature molten salts [J]. *Inorg Chem*, 1996, 35: 1168–1178.
- [11] Chun S, Dzyuba S V, Bartsch R A. Influence of structural variation in room–temperature ionic liquids on the selectivity and efficiency of competitive alkali metal salt extraction by a crown ether[J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 3737–3741.
- [12] 郑光华. 种子活力的原理及其应用[A]//植物生理生化进展[C]. 北京: 科学出版社, 1956: 154.
- [13] Liu X L, Zhang S Z, Shan X Q. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat [J]. *Chemosphere*, 2005, 61: 293–301.
- [14] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 39–41.
- [15] Jeffrey S W, Humphrey G F. Newspectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton[J]. *Biochem Physiol Pflanz*, 1975, 4: 167–191.
- [16] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. *植物生理学通讯*, 1990, 26 (6): 55–57.
- [17] 林植芳. 水稻叶片衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J]. *植物学报*, 1984, (6): 605–615.
- [18] Kummerová M, Kmentová E. Photoinduced toxicity of fluoranthene on germination and early development of plant seedling [J]. *Chemosphere*, 2004, 56: 387–393.
- [19] 肖玲. 砷对小麦种子萌发酶活性及呼吸强度影响的研究[J]. *陕西环境*, 1999, 6 (4): 22–24.
- [20] 周青, 黄晓华, 施国新, 等. 钙对紫外辐射 B 胁迫下小麦幼苗若干生物学特性的影响[J]. *环境科学*, 2001, 22 (6): 80–82.
- [21] Elvira S, Alonso R, Castillo F J, et al. On the response of pigments and antioxidants of *Pinus halepensis* seedlings to Mediterranean climatic factors and longterm ozone exposure[J]. *New Phytol*, 1998, 138: 419–432.
- [22] Debus R, Hund K. Development of analytical methods for the assessment of ecotoxicological relevant soil contamination[J]. *Chemosphere*, 1997, 35 (1/2): 239–261.

更正

本刊 2008 年第 1 期 273 页有一处基金项目有错:

在脚注里基金项目: 国家自然科学基金项目 (20777071); 中国科学院“百人计划”项目 (20477044) 应为: 国家自然科学基金项目 (20777071 和 20477044); 中国科学院“百人计划”项目

谨向作者致以诚挚的歉意!

本刊编辑部