

Tb(Ⅲ)对不同生长阶段辣根过氧化物酶生态毒性: 光照效应

张颂婧¹, 周青^{1,2}

(1.江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2.江南大学环境与土木工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 实验以辣根为研究材料, 采用生态毒理学中的急性毒性试验方法研究不同生长阶段与不同光照强度条件下 Tb(Ⅲ)对辣根过氧化物酶(HRP)的生态毒性。结果表明, 比较不同生长阶段不同光照强度下对照 CK的 HRP 活性, 数据显示不同生长阶段 HRP 活性对光强响应不尽一致。辣根在不同生长阶段和不同光照强度下, HRP 对高、低剂量 Tb(Ⅲ)毒害的响应存在明显差异。进一步比较不同光照强度各生长阶段的半效应剂量(EC_{50})及 Tb(Ⅲ)对 HRP 酶活的最小作用剂量(LOEC), 最大无作用剂量(NOEC)变化规律, 不同生长阶段光照强度对 Tb(Ⅲ)的生态毒性的影响不同, 9、11 月份 Tb(Ⅲ)的生态毒性受光强变化影响较小, 但 9 月份 Tb(Ⅲ)对 HRP 的毒害作用最小, 11 月份最大; 5 月份 HRP 对强光敏感, 7、9 月份 HRP 对强、弱光均较敏感, 11 月份 HRP 光敏性较差, 各阶段中强光下 HRP 对 Tb(Ⅲ)胁迫的敏感性小于强、弱光。

关键词: 生态毒理学; 辣根; 铽; HRP; 生长阶段; 光照强度

中图分类号: Q945.12 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2009)01-0049-05

The Ecotoxicity Effect of Tb(Ⅲ) on Horseradish POD During Different Growing Periods: Light Intensity

ZHANG Song-jing¹, ZHOU Qing^{1,2}

(1.The Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2.Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The environmental safe of rare earth used in agriculture is the key problem to limit rare earth application on agriculture. Horseradish was used as an experimental material to study ecotoxicity of Terbium at different light intensities during different growing periods by using the method of determining acute toxicity. The results showed that effects of light intensity on the activities of Horseradish POD (HRP) were different in different growing periods by comparison of the activities of HRP of control (CK). And there was a significant difference between the response of HRP to high and low concentration of Tb(Ⅲ) under different light intensities during different growing periods. The results also indicated that the effects of light intensity on Terbium ecotoxicity had a remarkable difference in different growing periods by the comparison of 24 h- EC_{50} of Tb(Ⅲ) and LOEC and NOEC. Light intensity had little effect on the ecotoxicity of Terbium in September and November, but the ecotoxicity of Terbium on HRP was the least(most)remarkable in September(November). Among all the growing periods May was sensitive to weak light while July and September were sensitive to both strong and weak light, November was less sensitive, but all periods were less sensitive to natural light intensity.

Keywords: eco-toxicology; horseradish; terbium(Ⅲ); HRP; growing period; light intensity

随着稀土(rare earths, RE)在农业中应用广度和深度的增加, RE 进入生态系统并通过食物链导入人

体^[1], RE 环境安全问题已引起政府高度重视。因此, 亟待对农用 RE 的生态毒理学效应做出科学评估^[2], 为 RE 农用提供科学指导。过氧化物酶(POD)是一种含有血红素的植物呼吸代谢末端氧化酶, 广泛存在于植物体内, 具有清除自由基、控制膜脂过氧化作用和保护细胞膜的正常代谢等多种生理功能^[3]。POD 对 RE 敏感, 常被作为研究 RE 毒理作用的生物标志物

收稿日期: 2008-01-27

基金项目: 国家自然科学基金(30570323); 国家发改委稀土国际合作项目(IFZ051210)

作者简介: 张颂婧(1987—), 女, 安徽淮南人, 国家生命科学基地班本科生。

通讯作者: 周青 E-mail: zhouqeco@yahoo.com.cn

之一^[4]。辣根过氧化物酶(HRP)是迄今研究较为深入的植物过氧化物酶之一,HRP具有多种生理功能,如参与活性氧代谢、参与 IAA 降解、参与木质素和木质酸的合成^[5]。目前有关辣根对 RE 胁迫响应,以及 RE 对 HRP 影响的研究报道较少。在前期工作中,我们研究了 Tb(III)与 HRP 的剂量效应关系,得出在辣根不同生长阶段特定光照强度背景下的 Tb(III)- EC_{50} 参数。此外,已从分子水平上揭示了 Tb(III)可以通过改变 HRP 空间结构而影响其活性。由于 RE 对植物的影响与植物生长阶段及诸多环境因素有关^[6],本文仍以辣根为实验材料,进一步探讨辣根不同生长阶段光照强度对 Tb(III)生态毒性的影响,为阐释 RE 毒害植物的机理与 RE 农用的环境安全问题提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

本实验材料采用盆栽的辣根(*Cochlearia armoricola* L.),依据常规方法栽培管理^[7],幼苗期室内培养温度为(20±1)°C,光照强度 1.5 klx,光暗时间比为 12 h:12 h。实验始于辣根幼苗期,止于收获期,实验共设 1、3、5、10、30、100、300、1 000 mg·L⁻¹ 8 个剂量 TbCl₃ 溶液,选择辣根不同生长阶段 1.5、8.0、12.0 klx 3 个光强级差来比较 Tb(III)对 HRP 酶活影响。分别在 5、7、9、11 月选取长势相近的辣根植株,均匀叶喷不同剂量 Tb(III)溶液,滴液为限,对照(CK)植株喷等量蒸馏水。各处理均 3 株,3 个平行。将处理后的辣根置于光照植物培养柜中,设定不同的培养光照强度(同上),用 TbCl₃ 处理 24 h 后,取样测定。

1.2 指标测定与数据处理

取各生长阶段不同处理下的辣根叶片测定 HRP 活性。HRP 活性的测定采用愈创木酚氧化法^[8]。采用几率单位-浓度对数直线回归法,得到 Tb(III)的剂量反应方程。当概率单位为 5 时,通过回归方程计算出各光照强度下 HRP 的 24 h- EC_{50} 。为保证计算结果的可信度,对所计算出的 24 h- EC_{50} (以下简化为 EC_{50})值进行 X^2 检验^[9]。

2 结果与分析

2.1 不同生长阶段辣根 HRP 活性对光照强度的响应

表 1 数据表明,不同生长阶段辣根 HRP 活性对光照强度的响应不尽一致。其中对弱光(1.5 klx)的响应特点是 7 和 11 月份 HRP 活性高(分别为 173.04 和

179.17 $\Delta A_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$),5 和 9 月低。对强光(12.0 klx)的反应是 5 和 11 月 HRP 活性高(分别为 211.43 和 178.09 $\Delta A_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$),7 和 9 月低。对中强光(8.0 klx)的响应表现是 5 和 11 月份 HRP 活性高(178.64、206.46 $\Delta A_{470} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$),7、9 月低。

2.2 不同光照强度与生长阶段 HRP 对 Tb(III)毒害的响应

不同生长阶段及光照强度背景下,辣根 HRP 对高(低)剂量 Tb(III)毒害的响应见表 1。弱光下(1.5 klx)HRP 对高(1 000 mg·L⁻¹)剂量 Tb(III)的响应特点是 7 与 11 月份 HRP 活性降幅较大,降幅分别为 CK 的 33.24%和 35.48%,低剂量(5 mg·L⁻¹)是 9 与 11 月份,活性降幅分别是 CK 的 90.95%和 90.76%;强光下(12.0 klx)HRP 对高剂量 Tb(III)的响应特点是 5 与 11 月降幅大(分别为 25.68%和 37.00%),低剂量是 5 与 7 月份降幅大(分别为 77.72%和 94.59%);中强光下(8.0 klx)HRP 对高剂量的响应特点是 5 与 11 月份降幅大(分别为 31.99%和 41.61%),低剂量是 5 与 7 月份降幅大(分别为 95.39%和 90.52%)。数据显示不同生长阶段各光照强度高(低)剂量 Tb(III)作用下 HRP 活性降幅不同,不同光强高剂量 Tb(III)作用下各生长阶段降幅与低剂量作用下也不尽一致,其中各光强下 9 月份降幅均较小,11 月份均较大,但 9、11 月份降幅变化幅度小于 5 与 11 月份。

2.3 Tb(III)对不同光照强度与生长阶段 HRP 的毒理学分析

比较不同光照强度与生长阶段下 Tb(III)对 HRP 的半效应剂量(EC_{50} /mg·L⁻¹),表 2 显示,弱光(1.5 klx)下 9 月份最大(1 282.99 mg·L⁻¹),11 月份最小(167.52 mg·L⁻¹);强光(12.0 klx)下 9 月份最大(1 509.85 mg·L⁻¹),5 月份最小(84.20 mg·L⁻¹);中强光(8.0 klx)下 9 月份最大(1 467.15 mg·L⁻¹),5 月份最小(337.21 mg·L⁻¹)。说明不同光照强度下各生长阶段 EC_{50} 不同,即不同生长阶段光强对 Tb(III)的生态毒性的影响不同。但 5 与 7 月份 EC_{50} 随光强变化幅度大于 9 与 11 月份,各光强下 9 月份 EC_{50} 均最大,11 月份均较小,说明 5 与 7 月份光强变化对 Tb(III)的生态毒性的影响大于 9 与 11 月份,9 月份辣根受 Tb(III)毒害作用在整个生长阶段中最小,而 11 月份最大。

比较辣根各生长阶段不同光照强度下 Tb(III)对 HRP 活性的最大无作用剂量(NOEC)和最小作用剂量(LOEC)规律可知,5 月份的 NOEC 与 LOEC 是弱光<强光;7 月份各光强下均较小;9 月份是中强光>弱光=强光;11 月份均较大。即光强影响 HRP 对 Tb(III)

表 1 辣根各生长阶段不同光照强度下 Tb(Ⅲ)对 HRP 酶活的影响
Table 1 Effect of Tb(Ⅲ) on HRP at different light intensities during different growing periods

生长阶段	Tb(Ⅲ)浓度/mg·L ⁻¹	HRP 酶活/ $\Delta A_{410} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$		
		1.5 klx	8.0 klx	12.0 klx
5 月份	CK	153.40±1.72(100.0)	178.64±6.11ab(100.0)	211.43±2.94a(100.0)
	1	154.50±2.43a(100.7)	179.01±5.50a(100.21)	183.91±1.83b(87.06)
	3	152.63±0.84a(99.50)	175.11±1.20ab(98.03)	171.43±3.18bc(81.15)
	5	152.26±0.03a(99.26)	170.24±2.36ab(95.39)	164.17±5.53cd(77.72)
	10	148.15±0.64ab(96.5)	167.38±1.56ab(93.69)	152.32±2.65d(72.04)
	30	141.63±1.77b(92.33)	155.13±3.97c(86.84)	137.12±2.76e(64.85)
	100	125.70±1.45cd(81.9)	124.41±3.25e(64.14)	100.43±4.71fg(47.50)
	300	119.64±4.99d(78.00)	94.54±4.71f(52.92)	88.62±4.11g(41.92)
	1 000	81.84±3.21e(53.35)	57.14±2.71g(31.99)	54.30±4.21h(25.68)
	7 月份	CK	173.04±4.01a(100.00)	157.42±3.72a(100.00)
1		182.37±3.78a(105.39)	163.65±1.78a(103.96)	110.40±0.88a(102.53)
3		176.99±2.83a(102.29)	159.41±0.15a(101.26)	101.91±1.02b(96.65)
5		163.98±0.38b(94.77)	142.50±4.21b(90.52)	101.85±0.21b(94.59)
10		146.24±0.87b(84.51)	136.00±2.65b(86.39)	92.23±3.50c(85.65)
30		124.17±2.89c(71.76)	110.44±2.82c(70.16)	89.72±0.02c(83.32)
100		95.33±3.81d(55.09)	96.26±2.38d(61.15)	79.14±1.61d(73.50)
300		62.73±1.78e(36.25)	75.71±1.11e(48.09)	67.86±2.32e(63.02)
1 000		57.51±1.82e(33.24)	68.29±2.41e(43.38)	58.84±1.46f(54.65)
9 月份		CK	152.10±2.82ab(100.00)	139.63±3.94ab(100.00)
	1	159.95±1.65a(105.16)	140.60±1.25ab(100.69)	115.40±0.94b(100.69)
	3	147.25±0.45c(96.81)	143.42±1.53a(102.72)	120.44±1.07a(105.09)
	5	138.33±3.10c(90.95)	145.62±0.81a(104.29)	116.06±1.61ab(101.27)
	10	131.76±0.92cd(86.63)	134.97±2.02b(96.67)	109.25±0.479c(95.33)
	30	118.91±3.25cd(78.17)	122.49±0.05c(87.73)	104.94±2.10c(91.56)
	100	94.48±0.34e(62.11)	104.43±0.33d(74.79)	78.24±1.01d(68.27)
	300	85.31±2.30f(56.09)	90.97±0.65e(65.15)	74.90±0.68e(65.35)
	1 000	83.18±1.90g(54.69)	73.57±1.25e(52.69)	66.88±0.50f(58.95)
	11 月份	CK	179.17±2.69a(100.00)	206.46±0.01ab(100.00)
1		179.21±2.19a(100.02)	217.32±5.57ab(105.26)	176.00±3.62a(98.83)
3		175.59±1.12a(98.00)	223.25±2.61a(108.13)	174.42±2.55a(97.94)
5		162.62±0.99b(90.76)	207.79±0.94b(100.64)	169.90±1.05a(95.40)
10		127.73±0.85c(71.29)	184.77±1.50c(89.49)	124.00±3.19b(69.63)
30		116.76±0.94d(65.17)	143.89±4.67d(69.69)	106.40±3.38c(59.75)
100		89.78±0.66e(50.11)	138.68±4.91d(67.17)	93.14±2.09d(52.30)
300		76.40±1.62f(42.64)	102.52±1.28e(49.66)	74.75±2.87e(41.97)
1 000		63.57±1.43g(35.48)	85.90±4.18f(41.61)	65.89±2.58e(37.00)

注:括号内数值为相对值,表中不同字母表示差异显著水平($P < 0.05$),以下同。

的响应规律是 5 月份 HRP 对强光敏感,7、9 月份 HRP 对强弱光均较敏感,11 月份 HRP 对各光强敏感性较差。各阶段中强光下 HRP 对 Tb(Ⅲ)的敏感性小于强、弱光。

3 讨论

辣根原产欧洲,喜阴凉,而耐热与寒^[7],辣根的这一特性与其固有的发育节律使 HRP 的变化在一定程

度上保留着辣根生育适应环境的痕迹。4—5 月份是辣根苗期,自然界光照强度较弱,其适宜弱光下生长,表现为中光和强光胁迫下,辣根抗环境胁迫,HRP 活性高于其他月份的 CK; 因幼苗阶段辣根光合作用较弱,生理代谢与生长尚慢,抗逆能力弱,HRP 对 Tb(Ⅲ)的敏感性因光强而增加,强光(12.0 klx)胁迫下 HRP 易受高、低浓度 Tb(Ⅲ)毒害(分别为 CK 的 25.68%和 77.72%,表 1), EC_{50} (84.20 mg·L⁻¹)最小;7—

表2 辣根不同生长阶段不同光照强度 Tb(III)对 HRP 酶活毒理指标相关分析

Table 2 Relationships of Tb(III) and activity of HRP at different light intensities during different growing periods

月份	光照/klx	NOEC/mg·L ⁻¹	LOEC/mg·L ⁻¹	EC ₅₀ (95%置信区间)/mg·L ⁻¹	回归方程	r ²
5月	1.5	10	30	1 185.93(1 185.32~1 187.51)	Y=-0.926x+7.848	0.931
	5.0	3	5	349.64(347.92~351.40)	Y=-0.734x+6.868	0.916
	8.0	10	30	337.21(335.73~338.72)	Y=-1.008x+7.547	0.996
	12.0	0	1	84.20(82.24~86.22)	Y=-0.608x+6.171	0.976
7月	1.5	3	5	244.07(242.83~245.31)	Y=-0.981x+7.117	0.982
	8.0	3	5	1 193.26(1 191.84~1 194.68)	Y=-0.607x+6.867	0.965
	12.0	1	3	335.27(333.90~336.65)	Y=-0.667x+6.686	0.957
9月	1.5	1	3	1 282.99(1 282.21~1 283.76)	Y=-0.825x+7.023	0.973
	8.0	10	30	1 467.15(1 466.30~1 467.99)	Y=-1.261x+8.365	0.934
	12.0	1	3	1 509.85(1 509.05~1 510.66)	Y=-0.981x+7.656	0.959
11月	1.5	3	5	167.52(166.74~168.40)	Y=-0.849x+6.889	0.941
	8.0	5	10	370.96(370.33~371.69)	Y=-0.689x+6.769	0.920
	12.0	5	10	168.91(168.11~169.71)	Y=-0.941x+7.095	0.863

注:Y 是概率单位,x 是 Tb(III)浓度对数。

8月份是辣根快速生长期,逢南方外界光照较强,不适于辣根生长(迟缓),所以CK的HRP活性小于其他实验月份CK。同时,弱光无法满足辣根光合作用需求,生长代谢受阻,导致强(弱)光下HRP对Tb(III)均较敏感,EC₅₀(分别为244.07和335.27 mg·L⁻¹)均较小;9月乃辣根生殖生长期(根系膨大期),外界强光照不适于其生长,且细胞分裂与生长合成的大量IAA抑制HRP酶活^[9],表现为CK的HRP活性小于其他月份CK。此阶段地上同化器官面积达到最大,地下器官迅速生长,抗性最强,光强变化对Tb(III)毒性影响不大,Tb(III)对HRP毒害作用最小;11月辣根进入成熟期,IAA分解及乙烯合成导致HRP活性高于其他月份的CK。可能由于辣根成熟期,HRP参于木质素的生物合成,活性氧的生产、叶绿素的降解,并能引发膜脂过氧化作用,表现为伤害效应。因此,辣根成熟期Tb(III)对HRP的伤害作用表现出协同效应,对HRP毒害作用最大。

本实验结果表明,不同生长阶段HRP对光强的反应不同;不同生长阶段和不同光强下的HRP响应Tb(III)胁迫的敏感性同样存在差异。与中强光条件相比,光强变化加剧了Tb(III)生态毒理效应,推测原因在于弱光使辣根光合作用减弱,生长代谢受阻,HRP活性下降;强光胁迫下,过剩光能传递给氧,活性氧积累超出HRP代谢能力范围,HRP等保护酶系统活性降低,自由基生成速度加快,细胞内自由基的产生和消除平衡受到破坏,膜脂过氧化加剧,膜系统损伤,膜通透性增大^[10-11],反馈促进Tb(III)通过各种途径进入

细胞,净通量增加。Tb(III)原子结构的电子轨道与Ca²⁺相似,可以与膜上的Ca²⁺结合位点相结合,从而部分取代Ca²⁺与膜上的Ca²⁺结合位点结合影响酶活;Tb(III)也可以与肽链氨基酸残基结合肽链上的O或N结合,改变HRP的二级结构进而影响其活性中心卟啉环微结构,最终导致HRP酶活降低;Tb(III)还能部分剪切肽链上的氨基酸残基,直接改变酶的整体结构,从而影响HRP活性^[12];Tb(III)也可能通过影响HRP基因的复制和转录对HRP合成起到抑制作用。本实验结果提示人们,在环境光照强度变化较大地区种植辣根,植株更容易遭受Tb(III)毒害。因此应尽量避免极端光照强度导致的Tb(III)生态毒理效应加剧,并减轻由此带来的农业经济损失和食品安全隐患。

4 结论

(1)不同生长阶段与光照强度背景下HRP活性存在差异,此与辣根适应环境的遗传保守性有关。

(2)Tb(III)对HRP的生态毒性既受生长阶段影响[9月份Tb(III)对HRP的生态毒性最小,11月份最大],也与生长环境光照强度有关,其中9与11月光强变化对Tb(III)生态毒性影响较小。

(3)毒理学指标显示,光照强度影响HRP响应Tb(III)胁迫的规律是5月份HRP对强光敏感,7与9月份对强、弱光均较敏感,11月份HRP对光照强度敏感性较差。而各阶段中强光下HRP响应Tb(III)胁迫的敏感性小于强光和弱光。

参考文献:

- [1] 张自立, 常江, 汪成胜, 等. 混合稀土对作物生长量的影响[J]. 中国稀土学报, 2001, 19(1): 85-87.
ZHANG Zi-li, CHANG Jiang, WANG Cheng-sheng, et al. Effects of rare earth elements on growth of crops[J]. *Journal of the Chinese Rare Earth Society*, 2001, 19(1): 85-87.
- [2] 刘苏静, 周青. 农用稀土的生态毒理学效应[J]. 中国生态农业学报, 2007, 15(3): 187-190
LIU Su-jing, ZHOU Qing. Ecotoxic effects of rare earths in agriculture[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2007, 15(3): 187-190
- [3] Nigel C Veitch. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 249-259.
- [4] 曹睿, 黄晓华, 周青. 稀土离子生态毒性的分子生态标志物研究[J]. 农业系统科学与综合研究, 2007, 23(3): 324-327.
CAO Rui, HUANG Xiao-Hua, ZHOU Qing. Research on molecular biomarker of rare earths ions ecotoxicity[J]. *System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture*, 2007, 23(3): 324-327.
- [5] 田国忠, 李怀方, 裴维蕃. 植物过氧化物酶研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(4): 332-344.
TIAN Guo-zhong, LI Huai-fang, QIU Wei-fan. Advances on research of plant peroxidases[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2001, 19(4): 332-344.
- [6] ZHENG Yi-hu, Herfried Richter, Gerd Sparovek, et al. Physiological and biochemical effects of rare earth elements on plants and their agricultural significance: A review[J]. *Plant Nutrition*, 2004, 27(1): 183-220.
- [7] 韩凤, 林茂祥, 李娟. 辣根的使用栽培技术[J]. 特种经济动物, 2004, 12(23): 24.
HAN Feng, LIN Mao-xiang, LI Juan. Practical cultivation technique of cochlearia armoracia L[J]. *Special Economic Animal and Plant*, 2004, 12(23): 24.
- [8] Feibo Wu, Guoping Zhang, Peter Dominy. Four barley genotypes respond differently to cadmium: Lipid peroxidation and activities of an antioxidant capacity[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2003, 50: 67-78.
- [9] 张伟, 阎海, 吴之丽. 铜抑制单细胞绿藻生长的毒性效应[J]. 中国环境科学, 2001, 21(1): 4-7.
ZHANG Wei, YAN Hai, WU Zhi-li. Toxic effects of copper on inhibition of the growths of unicellular green algae[J]. *China Environmental Science*, 2001, 21(1): 4-7.
- [10] Sala J M. Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold stored mandarin fruit[J]. *Postharv Biol Technol*, 1998, 13: 255-261.
- [11] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review[J]. *Ann Bot*, 2003, 91: 179-194.
- [12] 亓昭鹏, 周青, 杜江燕, 等. Tb³⁺离子与植物辣根过氧化物酶的作用方式探讨[J]. 化学学报, 2005, 63(1): 1-4.
YUAN Zhao-peng, ZHOU Qing, DU Jiang-yan, et al. Study on interaction ways between Tb(III) and horseradish peroxidase[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2005, 63(1): 1-4.