

Cu 和丹皮酚磺酸钠处理对凤丹根系生长、丹皮酚含量及 H⁺-ATPase 活性的影响

刘雁丽, 史萍, 夏妍, 王桂萍, 陈亚华^①

(南京农业大学生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 采用水培法, 研究了 Cu 单一处理及 Cu 与 EGTA 和丹皮酚磺酸钠 (SPS) 复合处理对凤丹 (*Paeonia suffruticosa* 'Feng Dan') 幼苗根长、根系中 Cu 和丹皮酚含量的影响, 并研究了 Cu 和 SPS 单一及复合处理对幼苗根系离体质膜和液泡膜微囊 H⁺-ATPase 活性的影响。结果显示: 经 5 μmol · L⁻¹ Cu 处理后凤丹幼苗根长和丹皮酚含量均略高于对照但总体上差异不显著; 经 10、20 和 30 μmol · L⁻¹ Cu 处理后, 幼苗根长和丹皮酚含量总体上均低于对照, 且随 Cu 浓度增加和处理时间延长, 降幅增大。与 10 μmol · L⁻¹ Cu 单一处理相比, 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ EGTA 和 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ SPS 复合处理均可以使根系中 Cu 含量显著降低、丹皮酚含量显著提高; 其中, 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ EGTA 处理组幼苗根系中 Cu 含量的降低幅度最大, 而 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ SPS 处理组幼苗根系中丹皮酚含量的增加幅度最大且显著高于对照。与对照相比, 经 5、10 和 20 μmol · L⁻¹ Cu 单一处理后丹凤根系离体质膜和液泡膜微囊 H⁺-ATPase 活性均降低, 且随 Cu 浓度提高降低幅度增大; 而经 0.1、0.2、0.5 和 1.0 μmol · L⁻¹ SPS 单一处理总体上可使膜微囊 H⁺-ATPase 活性逐渐增加; 与 10 μmol · L⁻¹ Cu 单一处理相比, 10 μmol · L⁻¹ Cu 与 0.1、0.2 和 0.5 μmol · L⁻¹ SPS 复合处理均可使膜微囊 H⁺-ATPase 活性提高, 且 H⁺-ATPase 活性均呈现随 SPS 浓度提高逐渐增加的趋势。研究结果揭示: 较高浓度 Cu 胁迫对凤丹幼苗根系生长及丹皮酚合成以及质膜和液泡膜微囊 H⁺-ATPase 活性均有明显抑制作用, 但添加外源丹皮酚磺酸钠对 Cu 胁迫伤害具有一定的缓解效应。

关键词: 凤丹; Cu 胁迫; 根系; 丹皮酚含量; 丹皮酚磺酸钠; H⁺-ATPase 活性

中图分类号: Q945.78; S567.1⁺⁵ 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)01-0020-08

Effects of Cu and sodium paeonol sulfonate treatments on growth, paeonol content and H⁺-ATPase activity in root of *Paeonia suffruticosa* 'Feng Dan' seedling LIU Yan-li, SHI Ping, XIA Yan, WANG Gui-ping, CHEN Ya-hua^① (College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(1): 20-27

Abstract: Effects of Cu single treatment and complex treatments of Cu with EGTA and sodium paeonol sulfonate (SPS) on root length and contents of Cu and paeonol in root of *Paeonia suffruticosa* 'Feng Dan' seedling were studied by water culture method, and effects of single and complex treatments of Cu and SPS on H⁺-ATPase activity of microcapsules *in vitro* of plasma membrane and tonoplast in root of *P. suffruticosa* 'Feng Dan' seedling were also studied. The results show that root length and paeonol content in root of *P. suffruticosa* 'Feng Dan' seedling treated by 5 μmol · L⁻¹ Cu are slightly higher than those of the control but without significant difference generally. After treated by 10, 20 and 30 μmol · L⁻¹ Cu, root length and paeonol content are generally lower than those of the control and the decrease range enhances gradually with rising of Cu concentration and prolonging of treatment time. Comparing to 10 μmol · L⁻¹ Cu single treatment, complex treatments of 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ EGTA and 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ SPS can cause significantly decrease of Cu content in root, but significantly increase of paeonol content in root. In which, decrease range of Cu content in 10 μmol · L⁻¹ Cu-

收稿日期: 2011-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871598)

作者简介: 刘雁丽(1984—), 女, 山东泰安人, 博士研究生, 主要从事植物营养生理学的研究。

^①通信作者 E-mail: yahuachen@njau.edu.cn

10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA treatment group is the highest and increase range of paeonol content in 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu-10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS treatment group is the highest and significantly higher than that in the control. Comparing to the control, H^+ -ATPase activity of microcapsules *in vitro* of plasma membrane and tonoplast decreases after treated by single treatment with 5, 10 and 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu and decrease range increases with rising of Cu concentration. But generally, single treatment with 0.1, 0.2, 0.5 and 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS can gradually enhance H^+ -ATPase activity. Compared with 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu single treatment, complex treatments of 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu with 0.1, 0.2 and 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS all can generally enhance H^+ -ATPase activity with a gradually increasing trend with rising of SPS concentration. It is suggested that Cu stress with relative high concentration has an obvious inhibition to root growth, paeonol synthesis and H^+ -ATPase activity of microcapsules of plasma membrane and tonoplast in root of *P. suffruticosa* 'Feng Dan' seedling, while adding exogenous sodium paeonol sulfonate has a mitigative effect on Cu stress injury.

Key words: *Paeonia suffruticosa* 'Feng Dan'; Cu stress; root system; paeonol content; sodium paeonol sulfonate (SPS); H^+ -ATPase activity

丹皮为药用牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)的干燥根皮,具有良好的药用价值。凤丹(*P. suffruticosa* 'Feng Dan')是著名的药用牡丹品种,产于安徽,亦称瑶丹、西山丹或安徽丹,安徽铜陵凤凰山的产品质量最佳,即“凤丹皮”,被奉为道地药材。近年来,凤丹被大量引种到各地,虽然凤丹在不同区域的生长状况相似,但生物活性成分差异很大^[1]。丹皮酚是丹皮中主要的药效成分,在土壤 Cu 污染严重的地区(如凤凰山 1 号尾矿区)出产的丹皮中丹皮酚的含量甚至高于非污染地区^[2]。Cu 是重金属元素,也是植物必需的微量元素之一,但 Cu 过量将会对植物产生极大的毒害作用,不仅抑制植物的生长、影响植物对其他营养元素的吸收以及植物的光合作用和呼吸作用,而且破坏细胞的膜系统和酶代谢,使植物的遗传效应发生变化^[3]。

据文献报道^[4-8],丹皮酚可以降低膜透性,对氧自由基有直接清除作用;对脂质过氧化反应和低密度脂蛋白氧化修饰具有抑制作用,可以增强抗氧化物酶的活性,显著降低 NO 含量和 NOS 活性;丹皮酚还具有类似于钙通道阻遏剂的作用,可抑制细胞 Ca^{2+} 内流,保护 Ca^{2+} -ATPase 活性及抗自由基氧化的作用。质膜 H^+ -ATPase 是植物生命活动过程中的主宰酶^[9-10],环境因子作用下物质膜 H^+ -ATPase 的活性变化及其调节在一定程度上能反映环境因子对植物造成伤害的原因,对揭示植物的抗逆机制有重要意义^[11-13],而 Al 和 Cu 等重金属胁迫能减弱物质膜的 H^+ -ATPase 活性^[14-15]。

为了解 Cu 胁迫对凤丹幼苗根系生长、丹皮酚含量的影响以及丹皮酚对 Cu 胁迫的作用,作者在 Cu

单一处理及 Cu-丹皮酚磺酸钠(SPS)复合处理条件下对凤丹根长、丹皮酚含量及 Cu 含量进行了分析;并采用不连续密度梯度离心法提取凤丹根细胞质膜和液泡膜微囊,研究了 Cu 和丹皮酚磺酸钠处理对凤丹根质膜和液泡膜 H^+ -ATPase 活性的影响,了解丹皮酚对 Cu 胁迫的缓解作用,以期对中药凤丹的生产以及丹皮酚生理活性的研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试凤丹种子由安徽铜陵新桥高科技农业示范园提供,经南京农业大学中药材研究所徐迎春教授鉴定。凤丹种子经质量体积分数 0.1% 的高锰酸钾消毒后,按照体积比 1:3 的比例与灭菌的黄沙混合,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中层积约 30 d,待种子露白后转移至 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中低温培养约 40 d 后供试。

1.2 幼苗胁迫处理及根长、Cu 和丹皮酚含量测定方法

1.2.1 胁迫处理方法 挑选生长一致的凤丹幼苗移入带孔盖板的塑料烧杯中,每杯 4 株;用 Hoagland 营养液(pH 5.5)预培养,每 3 天更换 1 次营养液,2 周后进行胁迫处理。共设置 2 组胁迫处理实验,处理时间均为 28 d,处理液均用 Hoagland 营养液(pH 5.5)配制,其中 Cu 均以 CuSO_4 的形式加入,每个处理设置 3 次重复,每 3 天更换 1 次处理液。预培养及胁迫处理期间保持全天通气,白天气温 22 $^{\circ}\text{C}$ ~ 28 $^{\circ}\text{C}$,夜间气温 10 $^{\circ}\text{C}$ ~ 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.1.1 Cu 胁迫对幼苗根长及根中 Cu 和丹皮酚含

量的影响实验 设置 5 组处理:0 (CK)、5、10、20 和 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu,其中对照(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu)为不添加 CuSO_4 的 Hoagland 营养液。分别于处理的第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天测量根系长度;分别于处理的第 14 天和第 28 天取样测定 Cu 和丹皮酚含量。

1.2.1.2 Cu 单一和 Cu 与 EGTA 或 SPS 复合处理对根中 Cu 和丹皮酚含量的影响实验 共设置 4 组处理:0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu (CK)、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu+10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu+10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS (丹皮酚磺酸钠, sodium paeonol sulfonate), 其中对照(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu)为不添加 CuSO_4 的 Hoagland 营养液。分别于处理的第 14 天和第 28 天取样测定 Cu 和丹皮酚含量。

1.2.2 根长测定方法 用直尺测量各处理每株幼苗主根的长度。

1.2.3 Cu 和丹皮酚含量测定方法 将凤丹幼苗根部剪下,用自来水冲洗 3 遍、去离子水冲洗 1 遍,吸干水分后置于 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥,冷却后研磨成粉末。精确称取烘干的凤丹根系样品粉末 0.200 0 g,采用硝酸-高氯酸法^[16]消解;用 Jena AAS nov AA400 火焰-原子吸收分光光度计(德国耶拿分析仪器股份公司)测定 Cu 含量,并采用国际标准样品(西红柿叶片:SRM1573a,美国国家标准技术研究所)进行质量控制,Cu 回收率为 93%~104%。

凤丹幼苗根于 40 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干后,用玛瑙研钵磨碎,过 40 目筛;参照文献[17]的方法测定丹皮酚含量。

1.3 离体胁迫处理和膜微囊 H^+ -ATPase 活性测定方法

1.3.1 膜微囊制备和纯化及纯度检测 随机收集幼苗幼嫩的侧根根尖组织,消毒后,用预冷(4 $^{\circ}\text{C}$)的去离子水冲洗 3 次,吸干表面水分后称取 50.00 g,参照姚秋菊等^[18]的方法,用不连续密度梯度离心法提取根细胞质膜和液泡膜微囊,经纯度检测后用于离体胁迫处理。

参照 Yan 等^[19]的方法检测膜微囊纯度。反应液总体积 0.5 mL,含 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP、5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgSO_4 、100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 和 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPES-Tris(pH 6.5)。在反应体系中分别加入质膜 H^+ -ATPase 抑制剂 Na_3VO_4 (0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、液泡膜 H^+ -ATPase 抑制剂 KNO_3 (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、线粒体 ATP 水解酶抑制剂 NaN_3 (1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和非特异性磷酸酶

抑制剂 Na_2MoO_4 (1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),根据不同抑制剂的敏感活性在总活性(不加抑制剂)中所占的比例换算膜微囊纯度。所有测定实验均重复 3 次。

1.3.2 膜微囊的离体处理方法 共设置 3 组处理:0 (CK)、5、10 和 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 单一处理;0 (CK)、0.1、0.2、0.5 和 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS 单一处理;10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu+0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu+0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu+0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu+0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS 复合处理。其中,对照(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 和 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SPS)为不添加 CuSO_4 或 SPS 的 Hoagland 营养液。用各处理液对膜微囊制剂进行处理,3 d 后取样测定质膜和液泡膜微囊的 H^+ -ATPase 活性。每处理设置 3 次重复。

1.3.3 H^+ -ATPase 活性测定 参照 Cheng 等^[20]的方法测定质膜 H^+ -ATPase 活性;参照何龙飞等^[21]的方法测定液泡膜 H^+ -ATPase 活性。每次测定设 3 次重复,重复测定 2~3 次。

1.4 数据分析

采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行相关性分析和方差分析($P=0.05$)。

2 结果和分析

2.1 Cu 处理对凤丹幼苗根长及根系中 Cu 和丹皮酚含量的影响

2.1.1 对根长的影响 用不同浓度 Cu 处理不同时间凤丹幼苗根长的变化见表 1。由表 1 可以看出:用 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理 7~28 d,对凤丹幼苗的根长略有促进作用,但与对照的差异均不显著($P>0.05$)。用 30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理 7~28 d,凤丹幼苗根长均最短,且根长均显著小于对照($P<0.05$);而用 10 或 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 处理 21~28 d,凤丹幼苗根长总体上显著低于对照。总体上看,随 Cu 处理浓度的提高,凤丹幼苗根长逐渐减小;而随处理时间的延长,幼苗根长逐渐增加,但低浓度处理组增加幅度大于高浓度处理组。

2.1.2 对根中 Cu 和丹皮酚含量的影响 根系是受重金属影响最主要的部位,也是最敏感的部位。用不同浓度 Cu 处理不同时间凤丹幼苗根中 Cu 和丹皮酚含量的变化见表 2。由表 2 可见:随着 Cu 浓度的提高和处理时间的延长,凤丹幼苗根系中 Cu 含量呈增

加趋势,各处理组的 Cu 含量均显著高于对照,且各处理组间也有明显差异。

随 Cu 处理浓度的提高,处理 14 和 28 d 时幼苗根系中丹皮酚含量均呈低浓度条件下高于对照、高浓度条件下显著低于对照的趋势。经 5 μmol · L⁻¹ Cu 处理 28 d, 凤丹幼苗根系中丹皮酚含量显著高于对

照;在 Cu 处理浓度大于 5 μmol · L⁻¹ 的条件下,凤丹幼苗根系中丹皮酚含量显著降低,且随 Cu 处理浓度提高降低幅度增大。经 0 ~ 20 μmol · L⁻¹ Cu 处理 28 d, 幼苗根系中丹皮酚含量均高于处理 14 d; 而用 30 μmol · L⁻¹ Cu 处理 28 d, 幼苗根系中丹皮酚含量低于处理 14 d。

表 1 不同浓度 Cu 处理对凤丹幼苗根长的影响($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 1 Effect of Cu treatment with different concentrations on root length of *Paeonia suffruticosa* 'Feng Dan' seedling ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Cu 浓度/μmol · L ⁻¹ Conc. of Cu	不同处理时间的根长/cm Root length at different treatment times			
	7 d	14 d	21 d	28 d
0 (CK)	9.40±0.53a	11.83±1.35a	15.77±0.56ab	21.90±1.87a
5	9.67±0.88a	12.50±1.06a	16.53±2.35a	22.20±1.72a
10	9.73±1.25a	12.01±1.21a	14.57±1.75ab	18.13±2.48b
20	8.90±0.85ab	10.70±1.30ab	13.10±2.15b	16.23±1.50b
30	8.70±1.00b	10.00±1.20b	11.33±1.65c	12.50±1.86c

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著 ($P=0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P=0.05$).

表 2 不同浓度 Cu 处理对凤丹幼苗根中 Cu 和丹皮酚含量的影响($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 2 Effect of Cu treatment with different concentrations on contents of Cu and paeonol in root of *Paeonia suffruticosa* 'Feng Dan' seedling ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Cu 浓度/μmol · L ⁻¹ Conc. of Cu	不同处理时间的 Cu 含量/mg · kg ⁻¹ Cu content at different treatment times		不同处理时间的丹皮酚含量/g · kg ⁻¹ Paeonol content at different treatment times	
	14 d	28 d	14 d	28 d
0 (CK)	20.02±1.11e	20.55±2.81e	0.34±0.05a	0.36±0.02b
5	485.57±48.43d	840.12±21.23d	0.39±0.01a	0.41±0.01a
10	912.87±36.92c	1 594.76±90.54c	0.25±0.01b	0.28±0.00c
20	1 395.76±46.21b	2 099.23±42.14b	0.22±0.01b	0.23±0.02d
30	1 900.82±71.78a	2 937.27±114.24a	0.21±0.01b	0.19±0.01e

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著 ($P=0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P=0.05$).

2.2 Cu 与 EGTA 或 SPS 复合处理对凤丹幼苗根系中 Cu 和丹皮酚含量的影响

经 Cu-EGTA 和 Cu-丹皮酚磺酸钠 (SPS) 复合处理 14 和 28 d 后凤丹幼苗根系中 Cu 和丹皮酚含量的变化见表 3。由表 3 可见:经 10 μmol · L⁻¹ Cu 处理 14 和 28 d 后,幼苗根系中 Cu 含量均显著高于对照。与之相比,用 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ EGTA 和 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ SPS 处理 14 和 28 d 后,幼苗根系中的 Cu 含量均显著降低。其中,10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ EGTA 处理组根系中的 Cu 含量与对照无显著差异;而 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ SPS 处理组根系中的 Cu 含量则显著高于对照。此外,随处理时间延长,不同处理组丹凤幼苗根系中的 Cu 含量增加。

由表 3 还可见:用 10 μmol · L⁻¹ Cu 处理 14 和

28 d, 凤丹幼苗根系中丹皮酚含量均显著低于对照。与之相比,用 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ EGTA 和 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ SPS 处理 14 和 28 d 后,凤丹幼苗根系中的丹皮酚含量显著增加。其中,10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ EGTA 处理组根系中的丹皮酚含量与对照无显著差异;而 10 μmol · L⁻¹ Cu-10 μmol · L⁻¹ SPS 处理组根系中的丹皮酚含量均显著高于对照。此外,随处理时间延长,不同处理组凤丹幼苗根系中丹皮酚呈增高趋势。

2.3 Cu 和 SPS 单一或复合处理对凤丹幼苗根离体膜和液泡膜微囊 H⁺-ATPase 活性的影响

2.3.1 膜微囊纯度检测结果

膜微囊的纯度以 H⁺-ATPase 专一性抑制剂对其活性抑制的强弱来判断。质膜、液泡膜和线粒体膜上 H⁺-ATPase 的专一性抑制剂分别为 Na₃VO₄、KNO₃ 和 NaN₃。检测结果表明:凤

丹幼苗根质膜微囊 H^+ -ATPase 活性被 Na_3VO_4 抑制了 67%, 而分别被 KNO_3 和 NaN_3 抑制了 2.1% 和 1.7%; 液泡膜微囊 H^+ -ATPase 活性被 KNO_3 抑制了 72%, 而

分别被 Na_3VO_4 和 NaN_3 抑制了 2.5% 和 1.5%。符合 H^+ -ATPase 活性测定的要求。

表 3 Cu 与 EGTA 或丹皮酚磺酸钠 (SPS) 复合处理对凤丹幼苗根系中 Cu 和丹皮酚含量的影响 ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 3 Effect of complex treatment of Cu with EGTA or sodium paeonol sulfonate (SPS) on contents of Cu and paeonol in root of *Paeonia suffruticosa* 'Feng Dan' seedling ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

处理 Treatment	不同处理时间的 Cu 含量/ $mg \cdot kg^{-1}$ Cu content at different treatment times		不同处理时间的丹皮酚含量/ $g \cdot kg^{-1}$ Paeonol content at different treatment times	
	14 d	28 d	14 d	28 d
0 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cu (CK)	29.89 \pm 37.42c	28.23 \pm 41.97c	0.31 \pm 0.01b	0.34 \pm 0.01b
10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cu	922.35 \pm 80.12a	1 143.45 \pm 73.93a	0.26 \pm 0.01c	0.28 \pm 0.01c
10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cu-10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ EGTA	67.33 \pm 35.32c	72.45 \pm 26.02c	0.31 \pm 0.01b	0.33 \pm 0.01b
10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cu-10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ SPS	500.56 \pm 82.23b	642.43 \pm 50.34b	0.35 \pm 0.01a	0.39 \pm 0.01a

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著 ($P=0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P=0.05$).

2.3.2 Cu 单一处理对膜微囊 H^+ -ATPase 活性的影响 经不同浓度 Cu 处理 3 d 后凤丹幼苗根离体质膜和液泡膜微囊 H^+ -ATPase 的活性见表 4。由表 4 可见:与对照相比,经 5、10 和 20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cu 处理后凤丹根质膜和液泡膜微囊 H^+ -ATPase 活性降低,且随 Cu 浓度的提高,对膜微囊 H^+ -ATPase 活性的抑制效应越明显。经 5、10 和 20 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cu 处理,凤丹幼苗根质膜微囊 H^+ -ATPase 活性分别下降至对照的 93.3%、82.1% 和 74.3%; 而液泡膜微囊 H^+ -ATPase 活性分别下降至对照的 96.5%、93.2% 和 69.9%。

表 4 Cu 单一处理对凤丹幼苗根离体质膜和液泡膜微囊 H^+ -ATPase 活性的影响 ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 4 Effect of Cu single treatment on H^+ -ATPase activity of microcapsules *in vitro* of plasma membrane and tonoplast in root of *Paeonia suffruticosa* 'Feng Dan' seedling ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Cu 浓度/ $\mu mol \cdot L^{-1}$ Conc. of Cu	微囊 H^+ -ATPase 活性/ $\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$ H^+ -ATPase activity in microcapsules	
	质膜 Plasma membrane	液泡膜 Tonoplast
0 (CK)	26.08 \pm 2.03a	23.99 \pm 1.59a
5	24.32 \pm 1.71ab	23.15 \pm 1.68ab
10	21.41 \pm 1.12b	22.37 \pm 1.91ab
20	19.39 \pm 1.01b	16.78 \pm 2.58b

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著 ($P=0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P=0.05$).

2.3.3 SPS 单一处理对膜微囊 H^+ -ATPase 活性的影响 经不同浓度 SPS 处理 3 d 后凤丹幼苗根质膜和液泡膜微囊 H^+ -ATPase 的活性见表 5。由表 5 可见:与对照相比,经 0.1、0.2、0.5 和 1.0 $\mu mol \cdot L^{-1}$ SPS 处理后幼苗根系质膜和液泡膜微囊 H^+ -ATPase 活性或略增加或略降低,但差异均不显著;总体上看,随 SPS 浓

度的增加,膜微囊 H^+ -ATPase 活性逐渐增加,其中,1.0 $\mu mol \cdot L^{-1}$ SPS 处理组膜微囊 H^+ -ATPase 活性最高。

表 5 丹皮酚磺酸钠 (SPS) 单一处理对凤丹幼苗根离体质膜和液泡膜微囊 H^+ -ATPase 活性的影响 ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

Table 5 Effect of sodium paeonol sulfonate (SPS) single treatment on H^+ -ATPase activity of microcapsules *in vitro* of plasma membrane and tonoplast in root of *Paeonia suffruticosa* 'Feng Dan' seedling ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

SPS 浓度/ $\mu mol \cdot L^{-1}$ Conc. of SPS	微囊 H^+ -ATPase 活性/ $\mu mol \cdot mg^{-1} \cdot h^{-1}$ H^+ -ATPase activity in microcapsules	
	质膜 Plasma membrane	液泡膜 Tonoplast
0.0 (CK)	26.33 \pm 1.61a	23.99 \pm 1.61a
0.1	26.48 \pm 1.79a	23.58 \pm 1.71a
0.2	26.03 \pm 1.73a	23.83 \pm 1.61a
0.5	27.00 \pm 2.23a	24.25 \pm 2.06a
1.0	30.29 \pm 2.01a	24.89 \pm 1.45a

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著 ($P=0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P=0.05$).

2.3.4 Cu-SPS 复合处理对膜微囊 H^+ -ATPase 活性的影响 经 Cu-SPS 复合处理 3 d 后凤丹幼苗根质膜和液泡膜微囊 H^+ -ATPase 活性见表 6。由表 6 可见:与不添加 SPS 的 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cu 处理组 (对照) 相比,10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cu 与 0.1、0.2 和 0.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ SPS 复合处理使凤丹幼苗根质膜微囊 H^+ -ATPase 活性分别提高了 3.4%、16.2% 和 27.3%, 且 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cu-0.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ SPS 复合处理组的质膜微囊 H^+ -ATPase 活性显著高于对照; 而 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$ Cu 与 0.2 和 0.5 $\mu mol \cdot L^{-1}$ SPS 复合处理组的液泡膜微囊 H^+ -ATPase 活性有所增加,但与对照差异不显著。

上述结果说明:在 10 μmol · L⁻¹ Cu 胁迫条件下添加 0.1 ~ 0.5 μmol · L⁻¹ SPS 总体上可以提高凤丹幼苗根系膜微囊 H⁺-ATPase 活性,且对质膜微囊 H⁺-ATPase 的保护作用大于对液泡膜微囊 H⁺-ATPase 的保护作用。

表 6 Cu-丹皮酚磺酸钠 (SPS) 复合处理对凤丹幼苗根离体质膜和液泡膜微囊 H⁺-ATPase 活性的影响 ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾
Table 6 Effect of complex treatment of Cu with sodium paeonol sulfonate (SPS) on H⁺-ATPase activity in microcapsules *in vitro* of plasma membrane and tonoplast in root of *Paeonia suffruticosa* 'Feng Dan' seedling ($\bar{X} \pm SE$)¹⁾

浓度/μmol · L ⁻¹ Concentration		微囊 H ⁺ -ATPase 活性/μmol · mg ⁻¹ · h ⁻¹ H ⁺ -ATPase activity in microcapsules	
Cu	SPS	质膜 Plasma membrane	液泡膜 Tonoplast
10	0.0	21.45 ± 1.11b	22.36 ± 1.63a
10	0.1	22.15 ± 1.32ab	21.87 ± 0.97a
10	0.2	24.88 ± 1.79ab	23.72 ± 2.15a
10	0.5	27.21 ± 1.88a	26.79 ± 2.15a

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著 ($P = 0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P = 0.05$).

3 讨论和结论

在重金属胁迫条件下,根长可以作为评价植物对重金属耐性的间接指标^[22]。当培养液中重金属元素的浓度大于 4 μmol · L⁻¹ 时,双穗雀稗 (*Paspalum distichum* L.) 和狗牙根 [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] 的根系生长受到显著抑制^[23]。但适当浓度的重金属可以促进植物的生长:低浓度 Cu (10 μmol · L⁻¹) 可以刺激向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 幼苗茎叶脯氨酸的合成并促进其营养生长^[24];用 50 和 100 μmol · L⁻¹ Cu 处理可促进 Cu 超积累植物海州香薷 (*Elsholtzia splendens* Nakai ex F. Maekawa) 的生长,并能增加根系的伸长量和植株的干质量^[25]。本研究结果显示:用 5 μmol · L⁻¹ Cu 进行处理,对凤丹幼苗的根长没有明显影响;但 Cu 处理浓度大于 5 μmol · L⁻¹,对凤丹幼苗的根长有抑制作用,且浓度越高抑制作用越明显。

席玉英等^[26]对矮牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr. var. *spontanea* Rehd.) 体内无机元素的分布规律进行了研究,认为矮牡丹对必需元素 Cu 有较强的吸收富集能力。沈章军等^[27]对安徽铜陵凤凰山铜尾矿牡丹种植基地土壤和牡丹中重金属污染状况进行了分析,结果表明:在牡丹种植地的土壤中,Cu 含量与牡丹根皮中的 Cu 含量呈正相关,丹皮内的 Cu 含量与丹龄之

间的相关系数为 0.842。本实验结果表明:低浓度 Cu (5 μmol · L⁻¹) 处理可以使凤丹幼苗根系中丹皮酚含量增加,随着处理时间的延长增加效果不变;而高浓度 Cu (高于或等于 10 μmol · L⁻¹) 处理对丹皮酚的积累具有抑制效应。

EDTA 和 EGTA 是最常用的、也是目前研究较多的螯合剂,与重金属均具有很强的结合能力。传统理论认为:植物对金属离子的吸收主要取决于溶液中该离子游离态的活度大小^[28]。在离子-螯合剂混合溶液中,只有自由离子才能被根系吸收,当 EDTA 将重金属离子由离子态转变为螯合态时,自由离子活度下降,植物对重金属的吸收减少,从而能够缓解重金属的生物毒性^[29]。本实验结果显示:与 Cu 单一胁迫处理相比,添加 EGTA 的复合处理可使凤丹幼苗根系中 Cu 含量显著降低,也证实了 EGTA 对 Cu 毒害具有一定的缓解作用。

酚类物质在提高植物抵御重金属胁迫的能力中具有重要作用^[30],可以通过与 Cu 等重金属离子的结合降低重金属对植物的胁迫作用^[31]。Xu 等^[32-33]和 Sillanpää^[34]的体外合成实验结果表明:丹皮酚可以与 Cu (II) 离子形成复合物。本实验结果表明:分别加入与 Cu 处理浓度相同的 EGTA 或丹皮酚磺酸钠 (SPS),可以显著降低凤丹幼苗根系中的 Cu 含量,但 SPS 的降低效果较 EGTA 差。在溶液中丹皮酚可能与 Cu 结合,但结合能力低于 EGTA,且形成的结合物不易被凤丹幼苗根系吸收,从而使凤丹幼苗根系中 Cu 含量降低。

质膜 H⁺-ATPase 是质膜上一种重要的功能蛋白,在植物细胞的物质转运、生长发育等方面具有重要作用,逆境胁迫往往导致植物细胞膜 H⁺-ATPase 活性的改变^[11,13]。杨颖丽等^[15]直接用 CuSO₄ 处理小麦 (*Triticum aestivum* L.) 后检测质膜微囊 H⁺-ATPase 的活性变化,结果表明:50、100 和 200 μmol · L⁻¹ CuSO₄ 能够抑制小麦质膜 H⁺-ATPase 的活性,其作用具有浓度依赖性。作者检测了 Cu 胁迫处理后丹凤根离体膜微囊 H⁺-ATPase 活性的变化,结果表明:与对照相比,5、10 和 20 μmol · L⁻¹ Cu 处理均使幼苗根系离体质膜和液泡膜微囊 H⁺-ATPase 活性下降,且 Cu 浓度越高 H⁺-ATPase 活性降幅越大,表明 5 ~ 20 μmol · L⁻¹ Cu 胁迫处理对凤丹幼苗根系质膜与液泡膜微囊 H⁺-ATPase 活性具有抑制作用,且该抑制作用具有浓度依赖性。

丹皮酚可以降低膜透性^[4],且还具有类似于钙通道阻遏剂(异博定)的作用,可抑制细胞 Ca^{2+} 内流,保护 Ca^{2+} -ATPase 活性^[8]。本实验结果显示:用 0.1、0.2、0.5 和 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丹皮酚磺酸钠(SPS)处理后,凤丹幼苗根系离体质膜和液泡膜微囊 H^{+} -ATPase 活性与对照无显著差异;与 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu 单一处理相比,添加 SPS 总体上可以使凤丹幼苗根系离体质膜和液泡膜微囊 H^{+} -ATPase 活性升高,即 SPS 可以提高 Cu 胁迫条件下凤丹幼苗根系离体质膜和液泡膜微囊 H^{+} -ATPase 活性,对 Cu 的抑制作用具有缓解作用。

综合上述实验结果可见:随 Cu 胁迫处理浓度的提高,凤丹根系中的 Cu 含量显著增加;适当浓度的 Cu 处理对凤丹幼苗根系生长没有明显影响,还可使根系中丹皮酚含量有所增加;但较高浓度的 Cu 胁迫处理对凤丹幼苗根系生长有明显的毒害作用,且对根系中丹皮酚的合成有一定的抑制作用,这种毒害和抑制作用具有浓度依赖性;在 Cu 胁迫条件下添加外源 SPS 以及 EGTA,可以提高凤丹根系中丹皮酚含量,显著降低根系中的 Cu 含量,对凤丹根系的 Cu 胁迫伤害具有一定的缓解作用。离体条件下,Cu 单一处理对凤丹根系质膜和液泡膜微囊 H^{+} -ATPase 活性有明显的抑制作用,但 SPS 单一处理对凤丹根系质膜和液泡膜微囊 H^{+} -ATPase 活性则有一定的促进作用;而 Cu 与 SPS 复合处理也能提高质膜和液泡膜微囊 H^{+} -ATPase 的活性,说明添加外源丹皮酚磺酸钠对 Cu 胁迫伤害具有一定的缓解效应,这可能是凤丹耐铜胁迫的机制之一。

参考文献:

- [1] 郭敏,陈卫平,徐迎春,等. 丹皮中微量元素对药材质量的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(9): 1083-1085.
- [2] 张敏,江建华,徐洁. 铜矿尾矿库复垦种植牡丹可行性研究[J]. 上海环境科学, 2000, 19(12): 585-587.
- [3] 杨世勇,王方,谢建春. 重金属对植物的毒害及植物的耐性机制[J]. 安徽师范大学学报:自然科学版, 2004, 27(1): 71-74, 90.
- [4] 吴婷,沈奇,吴晓慧,等. 丹皮酚及其磺化物对樱桃番茄果实的保鲜作用比较研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 330-334.
- [5] 吴晓慧,吴国荣,张卫明,等. 丹皮酚及其磺化物体外抗氧化作用[J]. 南京师大学报:自然科学版, 2005, 28(3): 83-85.
- [6] 戴敏,刘青云,顾承刚,等. 丹皮酚对脂质过氧化反应及低密度脂蛋白氧化修饰的抑制作用[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 625-627.
- [7] 宋宁宇,魏欣冰,刘睿,等. 丹皮酚对原代培养的大鼠皮质和海马神经元缺糖缺氧再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(5): 353-357.
- [8] 张广钦,禹志领,赵厚长. 丹皮酚对抗大鼠心肌缺血再灌注心律失常作用[J]. 中国药科大学学报, 1997, 28(4): 225-227.
- [9] 齐耀程,王宁,程彦伟,等. 水稻根尖质膜蛋白质组学研究方法的建立[J]. 中国水稻科学, 2008, 22(2): 111-117.
- [10] SERRANO R. Structure and function of plasma membrane ATPase [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1989, 40: 61-94.
- [11] ZHANG J S, XIE C, LI Z Y, et al. Expression of the plasma membrane H^{+} -ATPase gene in response to salt stress in a rice salt-tolerant mutant and its original variety[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99: 1006-1011.
- [12] ZHAO L Q, ZHANG F, GUO J K, et al. Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed [J]. Plant Physiology, 2004, 134: 849-857.
- [13] AHN S J, IM Y J, CHUNG G C, et al. Sensitivity of plasma membrane H^{+} -ATPase of cucumber root system in response to low root temperature[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 831-835.
- [14] MATSUMOTO H, YAMAMOTO Y, KASAI M. Changes of some properties of the plasma membrane-enriched fraction of barley roots related to aluminum stress: membrane-associated ATPase, aluminum and calcium [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2002, 38: 411-419.
- [15] 杨颖丽,杨宁,王静艳,等. 铜对小麦根质膜 H^{+} -ATPase 活性的影响[J]. 西北师范大学学报:自然科学版, 2005, 41(6): 50-53.
- [16] ZHAO F, MCGRATH S P, CROSLAND A R. Comparison of three wet digestion methods for the determination of plant sulphur by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1994, 25: 407-418.
- [17] 陈发奎,刘晓秋. 中药有效成分含量测定[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 969-970.
- [18] 姚秋菊,张晓伟,吕中伟,等. 硅对盐胁迫下黄瓜幼苗根系质膜、液泡膜酶活性的影响[J]. 华北农学报, 2008, 23(6): 125-129.
- [19] YAN F, ZHU Y Y, MÜLLER C, et al. Adaptation of H^{+} -pumping and plasma membrane H^{+} -ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency [J]. Plant Physiology, 2002, 129: 50-63.
- [20] CHENG Y W, QI Y C, ZHU Q, et al. New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress [J]. Proteomics, 2009, 9: 3100-3114.
- [21] 何龙飞,沈振国,刘友良. 铝胁迫对小麦根系液泡膜 ATP 酶、焦磷酸酶活性和膜脂组成的效应[J]. 植物生理学报, 1999, 25(4): 350-356.
- [22] LASAT M M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms [J]. Journal of Environmental Quality, 2002, 31:

- 109-120.
- [23] SHU W S, YE Z H, LAN C Y, et al. Lead, zinc and copper accumulation and tolerance in populations of *Paspalum distichum* and *Cynodon dactylon* [J]. *Environmental Pollution*, 2002, 120: 445-453.
- [24] 郭平, 刘畅, 张海博, 等. 向日葵幼苗对 Pb、Cu 富集能力与耐受性研究[J]. *水土保持学报*, 2007, 21(6): 92-95, 113.
- [25] YANG M J, YANG X E, RÖMHELD V. Growth and nutrient composition of *Elsholtzia splendens* Nakai under copper toxicity[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2002, 25: 1359-1375.
- [26] 席玉英, 上官铁梁, 张红, 等. 矮牡丹体内无机元素分布规律的研究[J]. *华北农学报*, 2002, 17(1): 136-139.
- [27] 沈章军, 王友保, 王广林, 等. 铜陵铜尾矿凤丹种植基地重金属污染初探[J]. *应用生态学报*, 2005, 16(4): 673-677.
- [28] KEDZIOREK M A, DUPUY A, BOURG A C M, et al. Leaching of Cd and Pb from polluted soil during the percolation of EDTA: laboratory column experiments modeled with a nonequilibrium solubilization step[J]. *Environmental Science Technology*, 1998, 32: 1609-1614.
- [29] GRČMAN H, VELIKONJA-BOLTA Š, VODNIK D, et al. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity[J]. *Plant and Soil*, 2001, 235: 105-114.
- [30] STEVENSON D E, HURST R D. Polyphenolic phytochemicals: just antioxidants or much more? [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64: 2900-2916.
- [31] FERNANDEZ M T, MIRA M L, FLORÉNCIO M H, et al. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, 92: 105-111.
- [32] XU X Y, XU T T, GAO J, et al. Bis(4-methoxy-2-oxidoacetophenone)copper(II) [J]. *Acta Crystallographica*, 2006, 62: 1768-1769.
- [33] XU T T, GAO J, XU X Y, et al. Synthesis, structure and antimicrobial study of two copper(II) complexes derived from paeonol and R-NH-propyldiamine [J]. *Journal of Coordination Chemistry*, 2007, 60: 1721-1729.
- [34] SILLANPÄÄ E R J. Bis-paeonoliminatocopper(II) [J]. *Polyhedron*, 1991, 10: 2051-2055.

(责任编辑: 张明霞)

新书推介: 《黑莓引种栽培与利用》

《黑莓引种栽培与利用》(Cultivation and Utilization of Blackberry in China), 吴文龙、李维林等著, 贺善安等作序。江苏科学技术出版社出版发行, ISBN 978-7-5345-7836-6, 开本 787 mm×1 092 mm, 印张 29.5, 精装本, 70 万字, 458 页, 附彩图 40 页, 2010 年 12 月第 1 版, 定价 200 元。

黑莓是第三代果树的重要成员, 由江苏省·中国科学院植物研究所于 20 世纪 80 年代引入中国, 并在黑莓引种筛选、品种选育、高效栽培、苗木繁殖、组织培养、果品加工、果品化学以及优良品种推广利用等方面开展了系统的研究工作。

本书详细介绍了黑莓这一新兴小浆果类果树品种的选育、高效栽培技术和产品加工技术等方面的研究成果, 并附有百余幅彩图和由著者开发并制订的产品加工技术规范, 为黑莓种植、加工产业的可持续发展提供了理论与技术支持, 可作为果树研究者、黑莓种植户和加工企业的参考书。