

离子液体[C₂mim][Val]对小麦幼苗生长及生理特性的影响

陈忠林¹, 王 洋¹, 关 伟¹, 胡 刚¹, 王禹书²

(1. 辽宁大学环境学院, 沈阳 110036; 2. 辽宁老秃顶子国家级自然保护区, 辽宁 本溪 117200)

摘 要 采用实验室营养液水培方法, 主要研究了离子液体 1-甲基-3-乙基-咪唑缬氨酸盐([C₂mim][Val])对小麦幼苗生长及叶片保护酶活性的影响。结果表明, 就小麦种子发芽这一生态毒理指标而言, [C₂mim][Val]浓度为 200~500 mg·L⁻¹ 时其发芽率显著降低; 从生长角度来看, 小麦幼苗对 100~200 mg·L⁻¹ 浓度的处理不敏感, 生长指标没有显著变化, 在 300~500 mg·L⁻¹ 处理下, 小麦幼苗地上部及地下部生物量、株高、根长发生显著变化, 均受到明显的抑制, 且抑制效应具有典型的剂量依赖型特点。不同浓度[C₂mim][Val]处理均致使超氧化物歧化酶(SOD)活性下降, 且浓度越高抑制作用越明显; 100~200 mg·L⁻¹ 浓度处理在 8~13 d 过氧化物酶(POD)活性高于对照, 后期不显著, 300~500 mg·L⁻¹ 浓度胁迫后期(18 d), 其活性均发生显著的变化, 分别为对照的 84%、83%、74%, 并造成膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)含量升高, 表明 300~500 mg·L⁻¹ 浓度胁迫使植物生长受到抑制。[C₂mim][Val]的亲水性及亲脂特性可能是其对植物存在潜在毒性的 2 个主要原因。

关键词 离子液体; 小麦; 种子发芽; 幼苗生长; 抑制效应

中图分类号: X503.231 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2011)08-1508-06

Effects of Ionic Liquid [C₂mim][Val] on the Growth and Physiological Characteristics of Wheat Seedlings

CHEN Zhong-lin¹, WANG Yang¹, GUAN Wei¹, HU Gang¹, WANG Yu-shu²

(1. College of Environment, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. National Nature Preserve of Laotudingzi of Liaoning Province, Benxi 117200, China)

Abstract Ionic liquids (IL) have attracted considerable attention from industry and the academic community as a new-generation “greener” solvent. With the application of ionic liquids, their toxicity on the plants has become focused. In this paper, the effects of ionic liquid, 1-methyl-3-ethyl-imidazole valine salt [C₂mim][Val] on wheat seedling growth and leaf protective enzyme activities were evaluated by water culture tests with different concentrations of [C₂mim][Val] (0, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg·L⁻¹). The results showed that the seed germination rate decreased significantly from the concentration of 200 mg·L⁻¹ to 500 mg·L⁻¹. The growth of wheat seedling was insensitive to the treatment of 100~200 mg·L⁻¹. Under 300~500 mg·L⁻¹ processing, aboveground and underground biomass, plant height and root length were inhibited obviously. In addition, the activities of super oxide dismutase (SOD) decreased with different concentrations of ILs, and the inhibitory effect was more obvious with the higher concentration. Treated 8~13 d at 100~200 mg·L⁻¹ ILs, the activities of guaiacol peroxidase (POD) increased in different concentration of ILs. After treated 18 d at 300~500 mg·L⁻¹ ILs, POD activity decreased 84%, 83%, 74% to controlling, and the content of malondialdehyde (MDA) in wheat seedlings increased too. The growth of wheat seedlings were inhabited at 300~500 mg·L⁻¹.

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

离子液体是一类完全由离子组成的液体, 由于具有熔点比较低、不易挥发、性质稳定等特点, 而在许多化学和生物反应中被用于代替传统溶剂, 并显示出良好的应用前景。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^[1]。然而离子液体一旦作为工业溶剂大规模使用, 就会不可避免的流失到环境中, 对环境和生物体存在潜在的风险。

近年来关于离子液体毒性的研究已经引起了国内外学者的关注^[2], 生物毒性的监测是判断一种化学物质环境毒性必不可少的方面。有研究表明, 离子液体对藻类、微生物、动物均有不同程度的毒性^[3-8], 而离子液体对高等植物影响的报道较少^[9-10], 特别是针

收稿日期 2011-01-29

基金项目: “211 工程”项目资助 (HJ211027); 国家自然科学基金 (20773056); 辽宁省科技厅基金 (20072051)

作者简介: 陈忠林 (1969—), 男, 硕士, 高级实验师, 主要从事环境污染生态学方面的研究。E-mail: zhenzhonglin1969@163.com

对高等植物生理指标保护酶的相关研究尚属空白。为探究离子液体对植物可能造成的毒害,采用在种子萌发期直接胁迫的方法,研究 $[C_2mim][Val]$ 对小麦幼苗生长及叶片保护酶活性的影响,旨在判断其对植物可能造成的危害,为有关生态风险评价提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

辽春 18 号小麦(*Triticum aestivum*)由辽宁省农业科学院提供。

1.2 实验方法

1.2.1 预实验

选择均一饱满的小麦种子,用 0.1% $HgCl_2$ 溶液表面消毒 10 min,蒸馏水冲洗数次后,分别用含有浓度为 0、25、50、100、200、300、400、500 $mg \cdot L^{-1}$ $[C_2mim][Val]$ 的蒸馏水溶液浸种,置于培养箱(28 $^{\circ}C$)暗催芽 12 h。将浸种后的种子捞出,用清水反复冲洗去表面粘液,滤干后分别置于铺有滤纸的培养皿(口径 90 mm)中,每皿 50 粒,加入等量浓度 $[C_2mim][Val]$ 的 Hoagland 营养液,发芽实验在 20 $^{\circ}C$ 恒温培养箱内进行。每日补加等量浓度的溶液,使其保持湿润状态,7 d 后计数发芽率,每处理设 3 个重复。

1.2.2 正式实验

将经过消毒的种子分别用含有浓度为 0、100、200、300、400、500 $mg \cdot L^{-1}$ $[C_2mim][Val]$ 的蒸馏水溶液浸种 12 h,转移至绑在塑料盆中(盆内径 20 cm,高 15 cm)的尼龙网上,每盆 100 粒,每处理重复 3 次。置室温自然光照下,分别用含有浓度为 0、100、200、300、400、500 $mg \cdot L^{-1}$ $[C_2mim][Val]$ 的 Hoagland 营养液水培

处理,7 d 后计数发芽率,当幼苗长到一心一叶时开始取样(处理后 8 d),以后每隔 5 d 取样 1 次,共取 3 次。

1.3 测定方法

发芽率是在处理 7 d 后种子发芽终止时全部正常发芽种子数与供试种子数的百分比;株高的测定是从每盆中随机选取 10 株幼苗,用直尺测量每株株高,即根上部分(从茎基部到最高点),求其平均值;根长是用直尺测量上述选取的 10 株幼苗根长(每株测定最长根长),求其平均值;地上及地下生物量的测定是在最后一次(18 d)测量完株高及根长后,将 10 株幼苗用电子天平称量幼苗鲜重,然后将其放入 80 $^{\circ}C$ 烘箱中烘干称重,直至质量不变,称量幼苗干重,求其平均值。测定 SOD、POD 及 MDA 指标的植物样品制备过程:称取叶片 0.5 g 加入 50 $mmol \cdot L^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7.8)及少量石英砂,于研钵中冰浴研磨成匀浆,4 $^{\circ}C$ 10 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 15 min,取上清液作为供试酶液,置于冰箱中保存用于 SOD、POD 及 MDA 的测定。SOD 活性采用 NBT 光化还原法^[11],POD 活性采用愈创木酚法^[11],MDA 含量采用硫代巴比妥酸(TBA)显色法^[11]测定。

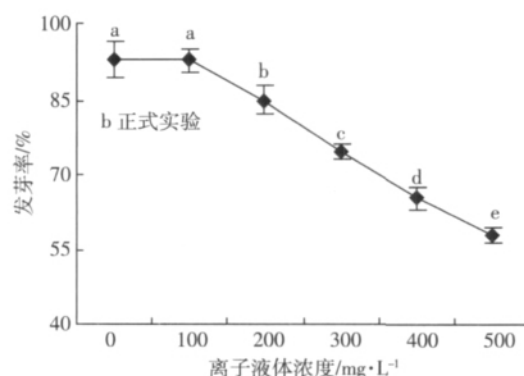
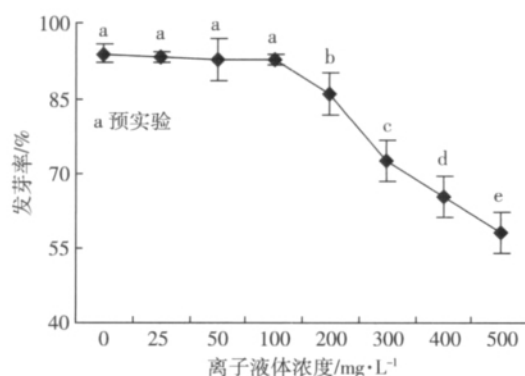
1.4 数据统计分析

数据统计分析采用 SPSS 17.0 软件,用 ANOVA (analysis of variance, LSD 检验法)进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 预实验及正式实验 $[C_2mim][Val]$ 对小麦发芽率的影响

发芽率是种子抗逆性能的首要特征指标。不同浓度 $[C_2mim][Val]$ 处理下预实验及正式实验小麦种子发芽率见图 1。从图 1a 可见,预实验低浓度处理(25~



图中不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下同。

Different small letters in the figure represent significance of the difference at 0.05 level. The same below.

图 1 $[C_2mim][Val]$ 对小麦种子发芽率的影响

Figure 1 The effect of $[C_2mim][Val]$ on germination rate of wheat seeds

100 mg·L⁻¹)时,发芽率呈现平缓的变化趋势,与对照无显著差异($P>0.05$)。高浓度处理(200~500 mg·L⁻¹)时,随浓度的升高发芽率呈持续下降趋势。

由图 1b 可知,正式实验中小麦种子发芽率随 [C₂mim][Val] 浓度升高逐渐降低(与预实验结果相近),100 mg·L⁻¹ [C₂mim][Val] 对小麦种子萌发没有影响,200~500 mg·L⁻¹ 浓度处理发芽率分别为对照的 91%、81%、70%、62%。因此可认为 [C₂mim][Val] 对小麦发芽率的影响与其浓度有关,200~500 mg·L⁻¹ [C₂mim][Val] 严重抑制小麦种子的萌发。

2.2 [C₂mim][Val]对小麦幼苗生物量的影响

由表 1 可知, [C₂mim][Val] 对小麦幼苗地上及地下生物量的鲜重和干重具有明显的浓度效应。300 mg·L⁻¹ 以下的 [C₂mim][Val] 胁迫轻微降低小麦幼苗的鲜重及干重,但与对照无显著差异($P>0.05$)。300~500 mg·L⁻¹ [C₂mim][Val] 处理下,地上和地下生物量的鲜重及干重呈现明显下降趋势,与对照之间差异显著($P<0.05$)。表明 [C₂mim][Val] 浓度的增加降低了生物量的积累。

2.3 [C₂mim][Val]对小麦幼苗株高及根长的影响

图 2 显示了处理 8~18 d 小麦株高及根长的变化

表 1 [C₂mim][Val]对小麦地上及地下生物量的影响

Table 1 Effects of [C₂mim][Val] on biomass above ground and under ground of wheat seedling

处理浓度/ mg·L ⁻¹	地上部/mg·株 ⁻¹		地下部/mg·株 ⁻¹	
	鲜重	干重	鲜重	干重
0	419.9a	56.2a	108.5a	9.5a
100	414.5a	55.2a	97.6ab	9.4a
200	394.7ab	51.1a	97.2ab	9.0a
300	362.7b	43.9b	89.7b	7.6b
400	356.6b	36.9c	66.3c	5.1c
500	263.6c	26.5d	48.0d	4.7c

注:同列不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: Different small letters in the same column represent significant difference at 0.05 level.

情况。总体来看,相同处理浓度下,小麦幼苗株高及最长根长随测定时间推迟而逐渐增加。当 [C₂mim][Val] 浓度为 100~200 mg·L⁻¹ 时,在整个处理期间对小麦幼苗株高及根长的影响没有明显差异($P>0.05$),表明没有受到抑制或促进作用。当 [C₂mim][Val] 浓度为 300~500 mg·L⁻¹ 时,小麦幼苗株高及根长均显著低于对照($P<0.05$),表明小麦幼苗的生长受到抑制。从图 2 还可以看出,处理浓度为 300~500 mg·L⁻¹ 时,随

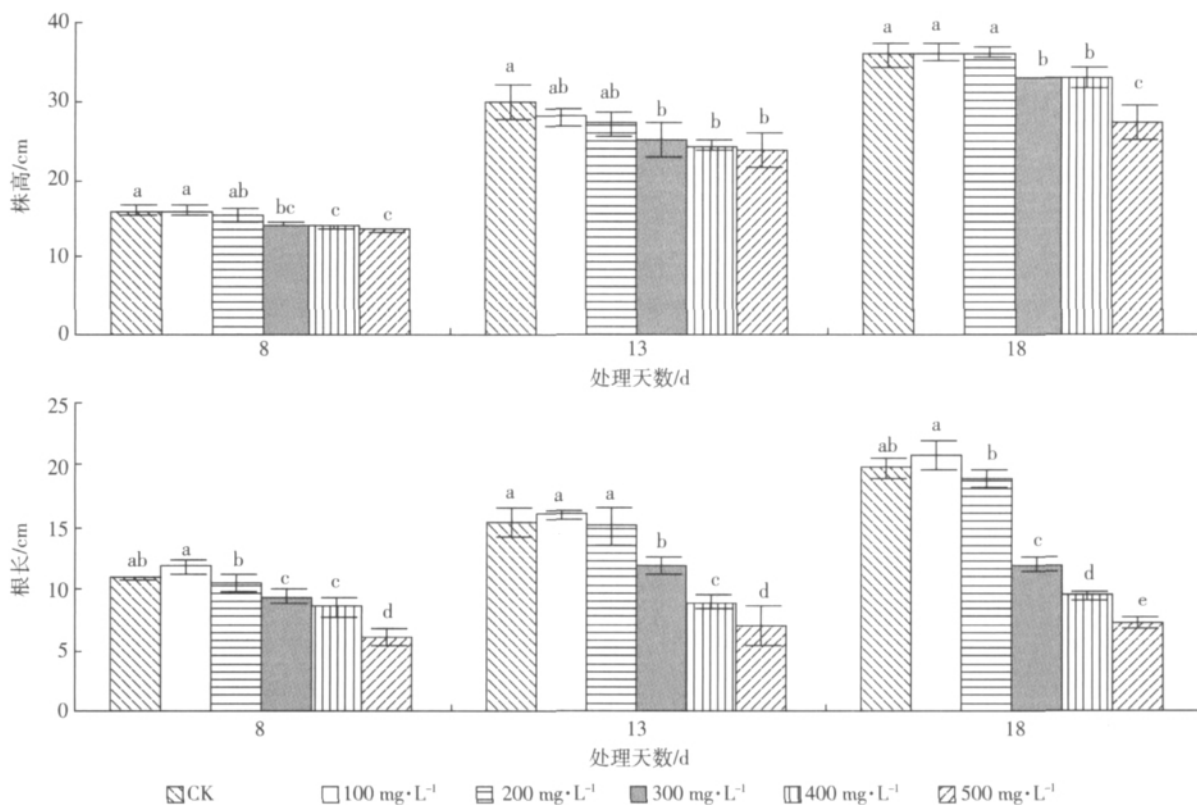


图 2 [C₂mim][Val]对小麦株高及根长的影响

Figure 2 Effects of [C₂mim][Val] on plant height and root length of wheat seedling

着处理时间的延长,相同浓度下小麦株高的增长明显高于根长的增长,表明根受到的抑制作用大于地上部分,这可能是根系直接接触离子液体,因此受到的毒害影响更强。

2.4 [C₂mim][Val]对小麦叶片中抗氧化酶活性的影响

植物体内的SOD、POD是活性氧自由基清除系统中两种重要的保护酶。在相同处理浓度下,相同叶位叶片的这两种保护酶活性随测定时间推迟均呈现持续下降的趋势,但与对照相比,小麦叶片中这两种酶的活性却发生不同变化(图3)。SOD活性随[C₂mim][Val]处理浓度的升高而依次下降,均显著低于对照($P < 0.05$),这说明[C₂mim][Val]对小麦叶片SOD酶活性有明显的抑制作用,且随[C₂mim][Val]浓度的增大抑制作用增强;相反,POD活性在前期(第8d)各浓度处理均显著高于对照($P < 0.05$),到中期(13d)只有100~200 mg·L⁻¹处理高于对照,其他浓度处理与对照均无显著性差异($P > 0.05$),至处理后期(18d),100~200 mg·L⁻¹处理虽然高于对照,但差异不显著($P > 0.05$),300~500 mg·L⁻¹处理明显低于对照($P < 0.05$),表明随着胁迫时间的增加,高浓度(300~500 mg·L⁻¹)处理能够明显抑制小麦叶片POD酶活性。

2.5 [C₂mim][Val]对小麦叶片中MDA含量的影响

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^[8]。图4表示不同浓度[C₂mim][Val]处理8~18d小麦幼苗叶片MDA含量的变化情况。可以看出100~200 mg·L⁻¹处理在整个实验期间MDA含量始终与对照差异不显著($P > 0.05$),500 mg·L⁻¹处理在第13d明显高于对照及其他处理($P < 0.05$),到第18d,300~500 mg·L⁻¹处理MDA含量显著增高,分别为对照的126%、128%、147%,说明[C₂mim][Val]高浓度处理(300~500 mg·L⁻¹)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。

3 讨论

外界有毒化学物进入环境之后会对植物产生多方面的影响,其中首先会表现在生长和生理指标的变化上。Jastorff等^[12]研究了两种离子液体对独行菜(*Lepidium sativum*)发芽的影响,他们发现*Lepidium sativum*仅在100 mg·L⁻¹的[OMIM]BF₄作用下时,萌芽率就降至0%,而只有在1000 mg·L⁻¹的高浓度[BMIM]BF₄作用下才出现较大程度的萌芽受抑制现

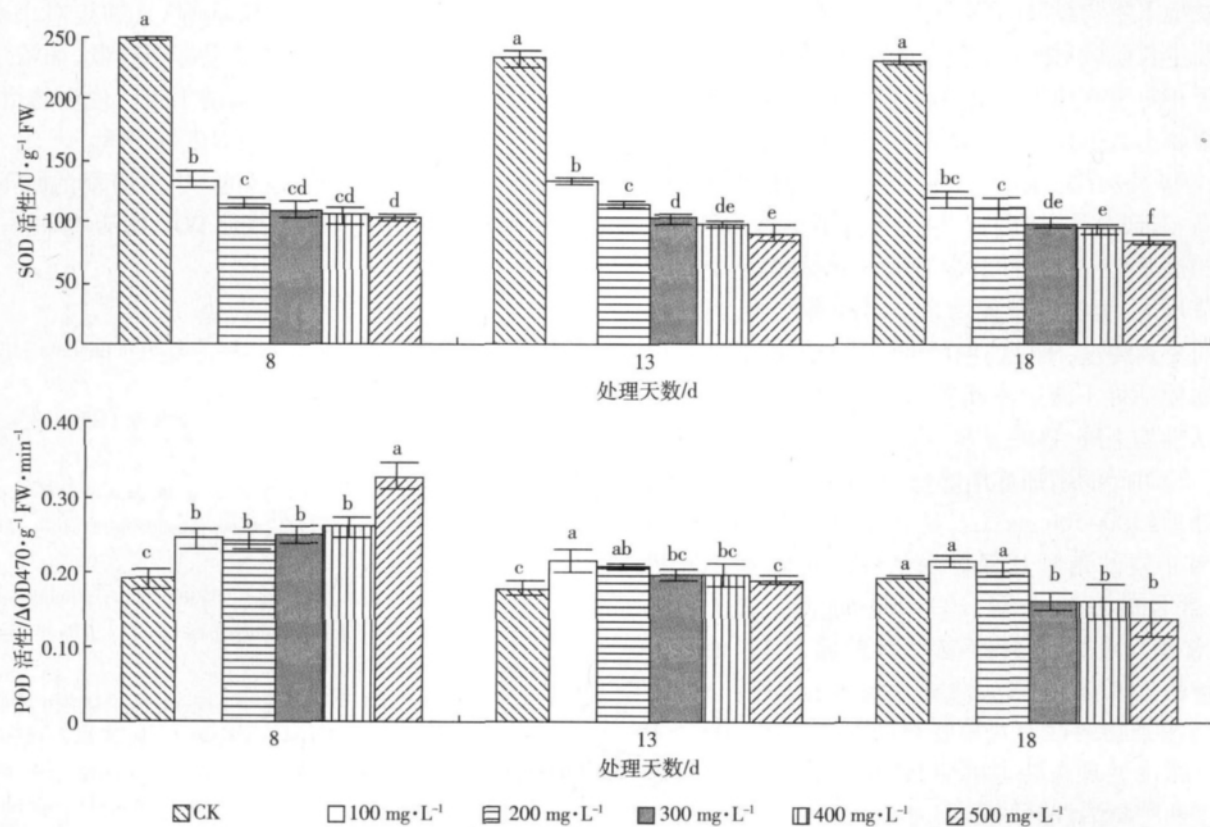
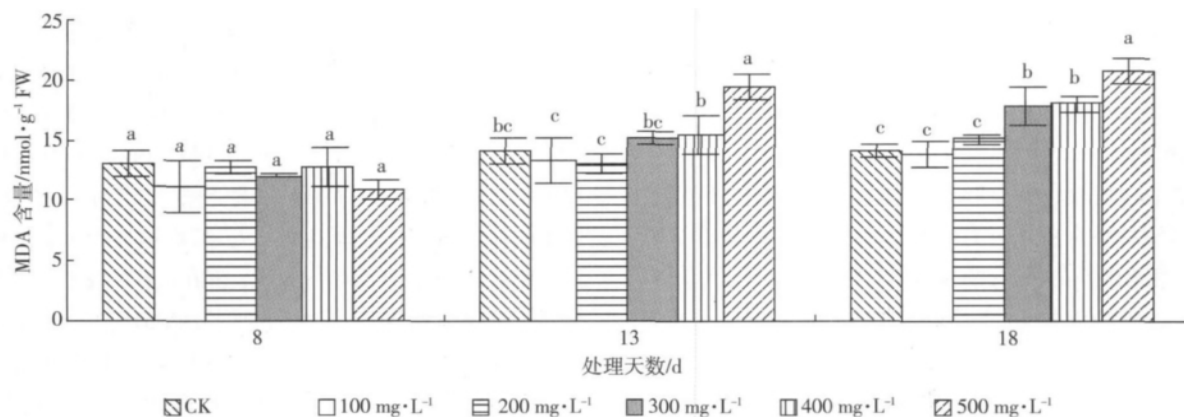


图3 [C₂mim][Val]对小麦叶片SOD和POD活性的影响

Figure 3 Effects of [C₂mim][Val] on the activity of SOD and POD of wheat seedling

图4 [C₂mim][Val]对小麦叶片MDA含量的影响Figure 4 The effect of [C₂mim][Val] on MDA content of wheat seedling

象。杨芬芬等^[10]报道了5种离子液体(浓度分别为100、500 mg·L⁻¹及1 000 mg·L⁻¹)对黄瓜发芽和生长状况的影响,其结果表明当浓度为100 mg·L⁻¹时,离子液体对黄瓜籽的生态毒性很低,即其发芽率和生长状况均未见明显变化,而当浓度较高(≥ 500 mg·L⁻¹)时,发芽和生长均受到抑制。

本实验结果表明,浓度 ≥ 200 mg·L⁻¹的[C₂mim][Val]显著抑制小麦的萌芽, ≥ 300 mg·L⁻¹使小麦幼苗地上及地下生物量、株高和根长显著降低。小麦发芽和幼苗生长阶段对[C₂mim][Val]浓度的敏感性不同,这是由于相对于其他生活史阶段,植物种子在萌发阶段对环境胁迫的抗性和耐性更弱,而在生理指标方面,张利红等^[13]报道镉胁迫下小麦幼苗的SOD、POD活性均升高。有研究^[14-15]表明,在逆境条件下,SOD、POD酶活性的提高是一种急性解毒措施,是使细胞免受毒害的调节反应,但其调节能力是临时和有限的,当细胞长时间受到胁迫,细胞内的活性物质包括酶亦会受到损伤而使活性下降。本实验结果表明,各浓度处理SOD活性均下降,POD活性在胁迫前期(8 d)均升高,随着实验时间的增加逐渐降低,至胁迫后期(18 d)高浓度处理(300~500 mg·L⁻¹)显著降低,表明离子液体胁迫对小麦幼苗叶片保护酶活性产生影响,但从MDA含量的变化来看,100~200 mg·L⁻¹浓度处理MDA含量与对照之间没有显著性差异,这可能是由于保护酶POD在清除活性氧方面起了关键作用,也可能与污染物的性质及植物材料有关;而300~500 mg·L⁻¹浓度处理在胁迫后期MDA含量显著增加,这是由于两种酶活性同时降低,小麦叶片细胞膜脂过氧化程度加剧,植物受到了伤害。

[C₂mim][Val]对植物的这种毒性可能是其阳离子

具有较强的亲脂性和亲水性,容易吸附在细胞膜表面或[C₂mim][Val]破坏了细胞膜稳定性,从而影响和破坏了细胞的正常生理功能,使活性氧清除系统中的保护酶活性降低,功能紊乱,活性氧浓度显著升高,MDA过量积累,细胞质膜受损伤,最终导致电解质严重泄露^[16-17]。

4 结论

(1)浓度 ≥ 200 mg·L⁻¹ [C₂mim][Val]胁迫对小麦种子萌发有显著抑制作用,使其发芽率降低,而浓度 ≥ 300 mg·L⁻¹明显抑制小麦幼苗的生长,使生物量、根长及株高降低,浓度越大抑制程度越严重。

(2)各浓度处理均造成小麦叶片SOD酶活性降低;300~500 mg·L⁻¹浓度处理后期使POD酶活性降低。

参考文献:

- [1] Rogers R D, Seddon K R. Ionic liquids—solvents of the future[J]. *Science*, 2003, 302: 792–793.
- [2] 吴波, 张玉梅, 王华平. 离子液体的安全性研究进展[J]. *化工进展*, 2008, 6(27): 814–818.
WU Bo, ZHANG Yu-mei, WANG Hua-ping. Progress of safety research of ionic liquids[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2008, 6(27): 814–818.
- [3] Matsumoto M, Mochiduki K, Kondo K. Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria[J]. *J Biosci Bioeng*, 2004, 98(5): 344–347.
- [4] Docherty K M, Kulpa C F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids[J]. *Green Chem*, 2005, 7: 185–189.
- [5] Couling D J, Bernot R J, Docherty K M, et al. Assessing the factors responsible for ionic liquids toxicity to aquatic organisms via quantitative structure–property relationship modeling[J]. *Green Chem*, 2006, 8: 82–90.
- [6] Pernak J, Sobaszekiewicz K, Mirska I. Anti-microbial activities of ionic

- liquids[J]. *Green Chem*, 2003, 5 :52–56.
- [7] Balczewski P, Bachowska B, Bialas T, et al. Synthesis and phytotoxicity of new ionic liquids incorporating chiral cations and or chiral anions[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55 :1881–1892.
- [8] 李效宇, 罗艳蕊, 李 磊, 等. 一种离子液体—溴化 1-辛基-3-甲基咪唑对大型溞摄食强度的影响[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(11) : 2331–2335.
- LI Xiao-yu, LUO Yan-rui, LI Lei, et al. Effects of the ionic liquid 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the feeding intensity of *Daphnia magna*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(11) :2331–2335.
- [9] 刘 萍, 孙莉萍, 刘海英, 等. 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 [J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(2) :425–429.
- LIU Ping, SUN Li-ping, LIU Hai-ying, et al. Effects of 1-octyl-3-methyl imidazolium bromide ionic liquid on the germination and growth of wheat seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(2) :425–429.
- [10] 杨芬芬, 孟 洪, 李春喜, 等. 离子液体对三种农作物发芽和生长的毒性研究[J]. *环境工程学报*, 2009, 3(4) :751–754.
- YANG Fen-fen, MENG Hong, LI Chun-xi, et al. Ecotoxicity of ionic liquids on the germination and growth of three seeds[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2009, 3(4) :751–754.
- [11] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. (第三版). 北京 :高等教育出版社, 2003 :268–270, 123–124, 274–276.
- ZHANG Zhi-liang, QU Wei-qing. Guidebook of phyto-physiology experiments[M]. Beijing :Higher Education Press, 2003 :268–270, 123–124, 274–276.
- [12] Jastorff B, Mölter K, Behrend P, et al. Progress in evaluation of risk potential of ionic liquids—basis for an eco-design of sustainable products [J]. *Green Chem*, 2005, 7 :362–372.
- [13] 张利红, 李培军, 李雪梅, 等. 镉胁迫对小麦幼苗生长及生理特性的影响[J]. *生态学杂志*, 2005, 24(4) :458–460.
- ZHANG Li-hong, LI Pei-jun, LI Xue-mei, et al. Effects of cadmium stress on the growth and physiological characteristics of wheat seedlings[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(4) :458–460.
- [14] 宇克莉, 邹 婧, 邹金华. 镉胁迫对玉米幼苗抗氧化酶系统及矿物质元素吸收的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(6) :1050–1056.
- YU Ke-li, ZOU Jing, ZOU Jin-hua. Effects of cadmium stress on antioxidant enzyme system and absorption of mineral elements in maize seedlings[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(6) :1050–1056.
- [15] 聂小琴, 李广悦, 吴彦琼, 等. 铈胁迫对大豆和玉米种子萌发和幼苗生长及 SOD 与 POD 活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(6) :1057–1064.
- NIE Xiao-qin, LI Guang-yue, WU Yan-qiong, et al. Response of seed germination and seedling growth and SOD and POD during seeds of bean and corn germination on uranium stress[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(6) :1057–1064.
- [16] 罗立新, 孙铁珩, 靳月华. 镉胁迫下小麦叶中超氧阴离子自由基的积累[J]. *环境科学学报*, 1998, 18(5) :495–499.
- LUO Li-xin, SUN Tie-heng, JIN Yue-hua. Accumulation of superoxide radical in wheat leaves under cadmium stress[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1998, 18(5) :495–499.
- [17] 牧 辉, 彭新晶, 戴 宁, 等. 离子液体[C₈mim]PF₆对水生生物的毒性作用[J]. *中国环境科学*, 2009, 29(11) :1196–1201.
- MU Hui, PENG Xin-jing, DAI Ning, et al. Toxicity of [C₈mim]PF₆ to aquatic organisms[J]. *China Environmental Science*, 2009, 29(11) :1196–1201.