

## 高氮磷胁迫下菖蒲 (*Acorus calamus* Linn.) 通气组织和根系释氧的响应\*

黄丹萍<sup>1,2</sup>, 贺 锋<sup>1\*\*</sup>, 肖 蕾<sup>1,2</sup>, 徐 栋<sup>1</sup>, 吴振斌<sup>1</sup>

(1: 中国科学院水生生物研究所淡水生态和生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

(2: 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘 要:** 以湿地植物菖蒲为研究对象, 在水培条件下观察 3 个浓度梯度的氮磷污水 (处理组 1、2、3 依次为 N:40 mg/L、P:4 mg/L; N:80 mg/L、P:8 mg/L; N:120 mg/L、P:12 mg/L) 对其胁迫后的根系释氧和通气组织的变化规律, 研究发现高氮磷胁迫明显抑制菖蒲株高和根系长度的生长, 减少植物根系数量; 高氮磷胁迫还可以增加植物根系释氧量和促进根系通气组织形成, 由于根系长度和数量的减少, 处理组的根系释氧总量不及对照组; 高氮磷胁迫不改变菖蒲根系释氧趋势, 根尖最大, 离根尖越远释氧越小. 研究还发现, 根尖释氧量大小和通气组织呈正相关, 根基和根中部释氧量与通气组织关系不显著, 说明植物通气组织的形式更有利于根尖释氧.

**关键词:** 菖蒲; 根系释氧; 通气组织; 氮磷胁迫; 水生植物

## Response between aerenchyma and radial oxygen loss of *Acorus calamus* Linn. under high nitrogen and phosphorus stress

HUANG Danping<sup>1,2</sup>, HE Feng<sup>1</sup>, XIAO Lei<sup>1,2</sup>, XU Dong<sup>1</sup> & WU Zhenbin<sup>1</sup>

(1: State Key Lab of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P. R. China)

(2: Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P. R. China)

**Abstract:** *Acorus calamus* Linn. has been selected as the experimental plant, and the variation of its aerenchyma and the quantity of its radial oxygen loss (ROL) under the stress of three different concentrations of nitrogen and phosphorus effluent (Group 1: N 40 mg/L, P 4 mg/L; Group 2: N 80 mg/L, P 8 mg/L; Group 3: N 120 mg/L, P 12 mg/L) in the water culture has been investigated. The results show that the stress of high concentrations of nitrogen and phosphorus significantly inhibited the growth of root length and plant height of *Acorus calamus* Linn. and reduced the number of plant roots; it could also increase the quantity of ROL and promote the formation of aerenchyma. The gross quantity of ROL in the stress group was less than that in the control group due to the decrease of root length and quantity. The ROL trend has not changed by the stress of high concentrations of nitrogen and phosphorus, and the further distance away from the roots, the smaller quantity of the ROL. This research also found that the amount of the root tip's ROL showed positive correlation with aerenchyma while the amount of ROL of basal zone and mature zone showed insignificant correlation with the aerenchyma.

**Keywords:** *Acorus calamus* Linn.; radial oxygen loss; aerenchyma; nitrogen and phosphorus stress; macrophyte

氮磷元素是水体富营养化的主要污染源<sup>[1-2]</sup>, 人工湿地因处理成本低且对污水中氮磷有很好的去除效果而受到广泛重视<sup>[3-4]</sup>. 植物是人工湿地的重要组成部分, 一方面可以吸收营养物质, 降低环境中氮磷物质; 另一方面可以向根际输氧<sup>[5-6]</sup>, 从而增加根际微生物酶的活性, 为根区解毒<sup>[7]</sup>. 氮磷作为植物生长的营养物

\* 国家自然科学基金项目(50808172)、湖北省杰出青年基金项目(2010CDA093)和国家水体污染控制与治理科技重大专项项目(2009ZX07106-002-004)联合资助. 2011-02-14 收稿; 2011-05-09 收修改稿. 黄丹萍, 女, 1985 年生, 硕士研究生; E-mail: hqdanp@126.com.

\*\* 通信作者; E-mail: hefeng@ihb.ac.cn.

质,在一定浓度下可以促进植物的生长,然而随着浓度升高,超过了一定范围,就会阻碍植物生长,高氮磷胁迫在影响植物根系生长方面表现得尤为明显.

植物根系释氧(Radial Oxygen Loss, ROL)是指湿地植物由于其根茎内部通气组织的存在,氧气可以运输到植物根部,一部分在输送过程中沿根壁释放到根际土壤中<sup>[8]</sup>. 湿地由于其间歇淹水导致湿地基质缺氧,基质缺氧会产生还原性的有毒物质<sup>[9]</sup>,如:  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ;而湿地植物由于根茎有强大的通气组织,能够将氧气沿着根向根尖输送,并到达根际区域,有利于植物根区解毒,在植物根际区域的还原态基质中形成氧化态的微环境.

影响植物根系释氧的环境因素较多,如光照<sup>[10-12]</sup>、底泥特性<sup>[13-14]</sup>、土壤盐度<sup>[16-20]</sup>、重金属<sup>[15-20]</sup>、油类污染物<sup>[21]</sup>等. Pi 等<sup>[22]</sup>研究了红树林植物在高浓度生活污水条件下根系释氧和铁膜形成的关系. 然而,对于水培条件下,湿地植物在高氮磷胁迫下根系释氧变化规律的研究还鲜见报道. 本文采用不同浓度氮磷对菖蒲进行胁迫,了解其根系的通气组织变化情况和根系释氧之间的相互关系,以期揭示植物在富营养状态下根系组织和活动的变化规律,为人工湿地植物优选提供科学参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 菖蒲的采集与实验设置

菖蒲(*Acorus calamus* Linn.) 采自中国科学院水生生物研究所官桥实验基地. 实验室内用自来水洗净根系,转入体积为 10 L 的塑料桶中(溶液 4 L),在 1/2 浓度的 Hoagland's 营养液中预培养 3 d,长出新根后开始实验. 选择整齐一致的菖蒲分别置于高氮磷溶液和对照营养液中,每桶 3 株植物,每种浓度设置 2 个平行. 对照组为 1/2 浓度的 Hoagland's 营养液,总体积 4 L,高氮磷浓度的选择参考崔克辉等<sup>[2, 23]</sup>的研究,依次为 N: 40 mg/L、P: 4 mg/L; N: 80 mg/L、P: 8 mg/L; N: 120 mg/L、P: 12 mg/L(分别为处理组 1、2、3). 菖蒲在温室内培养,培养温度为  $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,光照时间为 8 h. 铵态氮与硝态氮质量比为 3:1,磷选择  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . pH 范围是 6.8 ~ 7.0,溶液更换频率为一周,培养 3 个月后测定菖蒲根系释氧.

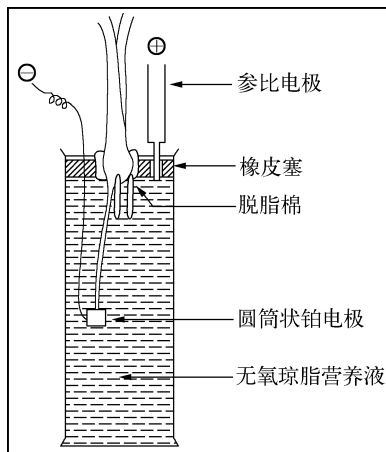


图 1 根系释氧测定装置<sup>[8]</sup>

Fig. 1 Diagram of the measurement of radial oxygen loss of roots

### 1.2 根系释氧测定方法

金属圆筒状铂电极法测定原理是在无氧琼脂介质中,由根表面扩散出的氧气在铂电极上被还原,通过外接的极谱记录仪显示电流,根据公式  $ROL = 4.975(I - I_0)/0.5\pi D^{[27-28]}$  计算出单位时间内的释氧量,其中 ROL 为根系释氧量( $\text{ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$ ),  $I$  为极谱仪测定的植物根系电流( $\mu\text{A}$ ),  $D$  为测定处根系的直径( $\text{cm}$ ), 0.5 是圆筒状铂电极的高度( $\text{cm}$ ).

### 1.3 厌氧介质的配制

于 1 L 1/2 浓度的 Hoagland's 营养液中加入 1 g 琼脂粉, 0.374 g KCl, 置于灭菌锅中,  $121^\circ\text{C}$ , 灭菌 15 min, 冷却后,通  $\text{N}_2$  至少 24 h,测定前检查溶液中是否有小气泡,如有用圆筒状铂电极将气泡赶至水面. 参比电极中加入饱和 KCl 溶液. 检验通  $\text{N}_2$  是否完全,可测定不加植物溶液中电流值,如果电流值在  $0 \sim 0.005 \mu\text{A}$  之间,则表示  $\text{O}_2$  已排净.

### 1.4 根系释氧的测定

将待测植物用具孔橡皮塞夹住,松紧程度用脱脂棉调整,根部、圆筒状铂电极和参比电极一并伸入液面以下(图 1),先测定无植物下的空白电流值  $I_0$ ,再将圆筒状铂电极套在植物根系上测定电流值  $I$ ,平行测定 3 ~ 4 次,植物根系直径则用游标卡尺多次测量,取平均值,实验前将要测定的根段用黑色笔标记.

### 1.5 石蜡切片

根系释氧测定后,分别在根系根尖、离根尖 4 cm 和 8 cm 处取样,FAA(90 ml 70% 酒精、5 ml 醋酸、5 ml

福尔马林)固定液中保存,抽真空 5 min 保证样品沉底,固定 24 h 后,酒精梯度脱水,二甲苯梯度脱酒精,埋蜡,切片,粘片(10 μm),脱蜡,番红固绿染色,做永久切片,显微镜下以 20 倍或 40 倍照相观察通气组织.

1.6 分析工具

用 AutoCAD 2004 计算通气组织所占切片的比例,用 SPSS 13.3 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),显著性水平设为 0.05.

2 结果与分析

2.1 高浓度氮磷对菖蒲根系的影响

菖蒲在 1/2 浓度的 Hoagland's 营养液中预培养 3 d 内陆续长出白色新根,水培下的新根表面光滑无根毛. 实验开始后一周左右植物根系发生变化,对照组植物根系长势最好,不仅根系数量多,还较长,非根尖区陆续有不定根长出,单根最长可达 55 cm,而处理组植物根系均停止生长,伴随黑色腐烂现象,腐烂从根尖开始.

菖蒲在高氮磷胁迫下,植物根系长度变化明显,对照组根系总长可达 1032 cm,各处理组菖蒲根系长度分别是对照组的 13.4%、10.7%、32.5%,对照组和处理组之间有显著差异( $P < 0.05$ ),但处理组间无显著差异(图 2).

高氮磷胁迫会显著影响植物根系的生长,这是由于污水中低浓度氮磷促进植物根内物质的合成,有利于植物根系生长,而高浓度氮磷综合作用于植物根系,产生了一系列包括自由基代谢失调、蛋白质合成和分解过程失衡,抗氧化剂和酶活性变化等影响,进而抑制根的生长<sup>[23]</sup>.

和实验前相比,实验后菖蒲株高均有所下降,对照组下降最缓慢(表 1),主要原因是水培条件下植物生长缓慢,且土培到水培有一个适应过程. 处理组菖蒲高度下降比对照组高,主要原因是高氮磷胁迫下,植物生长被抑制,崔克辉等<sup>[2]</sup>的研究也表明高氮磷污水对水稻株高有抑制作用.

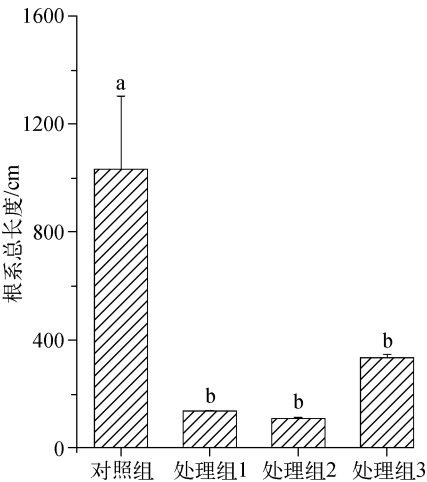


图 2 高氮磷胁迫下菖蒲根系长度  
Fig. 2 Root length of *Acorus calamus* Linn. under the stress of high N and P

表 1 实验前后菖蒲株高变化

Tab. 1 Changes of the plant length of *Acorus calamus* Linn. before and after the experiment

实验组	株高/cm(实验前)	株高/cm(实验后)	减少比例/%
对照组	51.0 ± 3.2	34.0 ± 5.2	13.7
处理组 1	54.0 ± 9.6	38.7 ± 5.8	28.3
处理组 2	52.0 ± 2.5	15.7 ± 1.5	69.8
处理组 3	49.0 ± 0.6	39.7 ± 18.8	19.0

2.2 植物根系释氧规律

植物根系释氧测定方法有多种,Colmer<sup>[24]</sup>曾综合比较了多种测定方法的优缺点,2006 年 Matsui 等<sup>[25]</sup>补充了一种新的测定整株植物根系释氧的方法——蒽醌比色法,但由于此方法对光异常敏感,在实际操作中有困难. 本实验综合比较各种测定方法并结合实验室的具体情况,选择了经典的根系释氧测定方法,即金属圆筒状铂电极法(高 0.5 cm,内径为 0.225 cm)<sup>[7, 26]</sup>,此方法能定量测定植物根系不同部位的根系释氧,了解植物根系释氧的空间分布形态.

菖蒲根系释氧总趋势为:在根尖释氧量最大,离根尖越远释氧量越小(图 3). 这主要是植物为了保证在缺氧环境中,根尖能够得到更多的释氧而自身产生的一种屏障,即根系释氧完全屏障(tigt barrier). 高氮磷胁迫下,植物根系释氧与氮磷浓度具有相关性,和对照组相比,处理组的根系释氧量普遍偏高. 但又因为处理

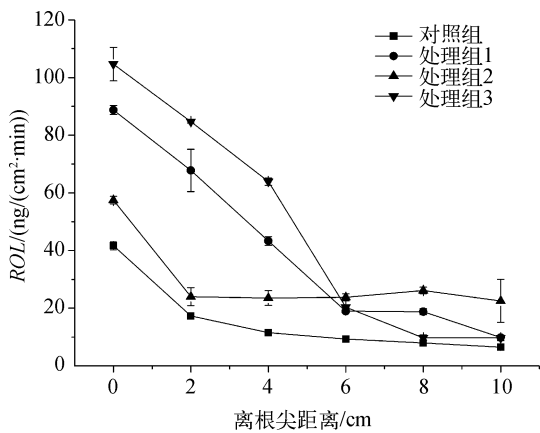


图3 高氮磷胁迫下菖蒲根系释氧变化  
Fig. 3 ROL of *Acorus calamus* Linn.  
under the stress of high N and P

表2 高氮磷胁迫后菖蒲根系数量和释氧总量  
Tab. 2 The gross quantity of ROL and root number of  
*Acorus calamus* Linn. under the stress of high N and P

实验组	根系数量	释氧总量/ (ng/(cm <sup>2</sup> ·min))
对照组	70 ± 9	4649 ± 446
处理组 1	23 ± 5	4818 ± 694
处理组 2	30 ± 9	5464 ± 706
处理组 3	17 ± 6	6597 ± 978

通气组织越大,根尖释氧量越大. 对照组和处理组 2 根尖通气组织所占比例呈显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 两组根尖释氧量也呈显著差异 ( $P < 0.05$ ), 在根中和根基则无此联系, 因此我们可以推测根尖通气组织所占比例大小与根尖释氧量呈正相关. 根中和根基形成的通气组织为氧气向根尖顺利传送提供便捷通道, 对在根中和根基处的释氧并无贡献作用. 故通气组织的形成对根尖释氧更有利, 而对植物其他部位影响不大.

致谢: 张甬元先生在论文修改过程中给予了大量的指导和帮助, 刘保元先生、梁威、周巧红、张丽萍等成员在实验设计和开展中给予了指导和支持, 武俊梅、董金凯、梁雪等同学在实验过程中提供帮助, 在此一并感谢.

3 参考文献

[ 1 ] Asikala S, Tanaka N, Wah H *et al.* Effects of water level fluctuation on radial oxygen loss, root porosity, and nitrogen removal in subsurface vertical flow wetland mesocosms. *Ecological Engineering*, 2009, **35**(3): 410-417.

[ 2 ] 崔克辉, 张甲辉. 模拟 N, P 污水对水稻幼苗过氧化物酶和超氧化物歧化酶的影响. *环境科学学报*, 1995, **15**(4): 447-453.

[ 3 ] 贺 锋, 吴振斌, 陶 菁等. 复合垂直流人工湿地污水处理系统硝化与反硝化作用. *环境科学*, 2005, **26**(1): 47-50.

[ 4 ] Brix H. Functions of macrophytes in constructed wetlands. *Water Science and Technology*, 1994, **29**: 71-78.

[ 5 ] 成水平, 吴振斌, 夏宜琮. 水生植物的气体交换与输导代谢. *水生生物学报*, 2003, **4**: 413-417.

[ 6 ] 吴振斌等. 复合垂直流人工湿地. 北京: 科学出版社, 2008: 1-12.

[ 7 ] 吴振斌, 贺 锋, 程旺元等. 极谱法测定无氧介质中根系氧气输导. *植物生理学报*, 2000, **26**(3): 177-180.

组根系数量(表 2)和根系总长度(图 1)均远远小于对照组, 所以处理组释氧总量呈减小趋势.

对照组通气组织是溶生性(lysigenous)通气组织形成的早期阶段, 部分细胞自溶, 而处理组均形成了明显的溶生性通气组织, 尤其以处理组 1 和处理组 3 通气组织最为明显, 在高氮磷胁迫下, 根细胞自身溶解, 形成明显的条状溶生性通气组织(图 4), 这说明高氮磷胁迫对植物根系通气组织的形成有促进作用, 而具体机制还有待进一步研究. 植物形成明显通气组织有两方面的作用, 第一, 通气组织的形成过程中细胞程序性死亡(Program Cell Death, PCD)从而减少了自身所需氧气量; 第二, 通气组织能形成畅通的通道, 为氧气向根区扩散且从根际向外界传输提供便利<sup>[29-30]</sup>.

根尖释氧量最大的是处理组 3, 处理组 3 根尖和根中部的释氧量达到 104.7 和 84.7 ng/(cm<sup>2</sup>·min), 其次是处理组 1 和处理组 2, 最小为对照组(图 3), 3 个处理组和对照组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 这说明高氮磷胁迫对植物根系释氧有影响, 但是处理组 1 和处理组 3 根尖释氧量差异不显著 ( $P > 0.05$ )<sup>[22]</sup>. 处理组 3 通气组织的截面积所占根横截面积比例均比其他组大, 根尖、根中、根基所占比例依次为 46%、53% 和 63%(图 5), 其次是处理组 1、处理组 2 和对照组. 但处理组 1 通气组织所占比例和处理组 3 通气组织所占比例比较, 差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 这和处理组 1 和处理 3 根尖释氧量差异不显著 ( $P > 0.05$ ) 相一致, Pi 等<sup>[22]</sup>研究也表明植物



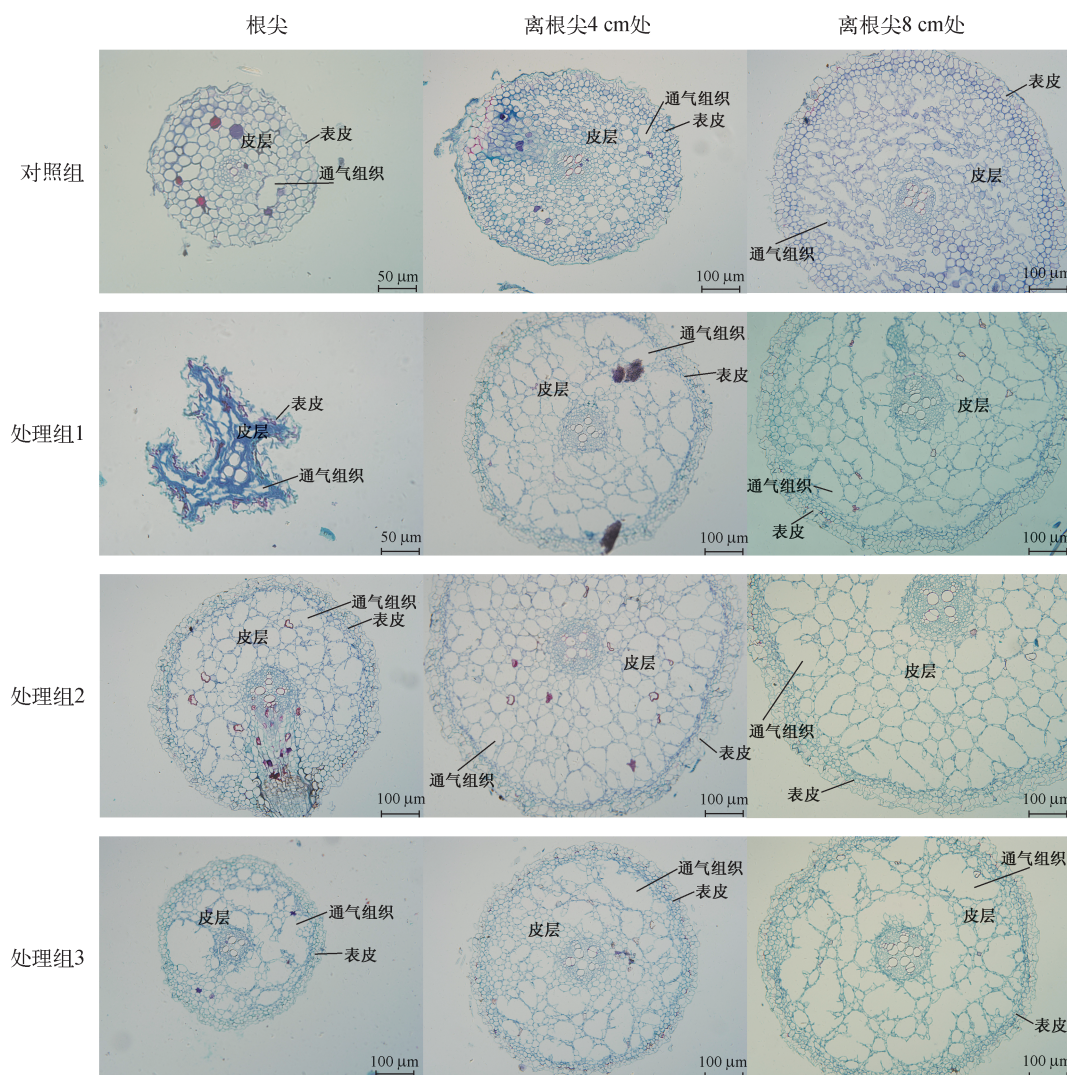


图4 高氮磷胁迫下菖蒲通气组织

Fig.4 Aerenchyma of *Acorus calamus* Linn. under the stress of high N and P

- [ 8 ] 邓 泓, 叶志鸿, 黄铭洪. 湿地植物根系泌氧的特征. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2007, **6**: 69-76.
- [ 9 ] Armstrong J, Armstrong W. *Phragmites australis*— A preliminary study of soil-oxidizing sites and internal gas transport pathways. *New Phytologist*, 1988, **108**(4): 373-382.
- [ 10 ] Connell EL, Colmer TD, Walker DL. Radial oxygen loss from intact roots of *Halophila ovalis* as a function of distance behind the root tip and shoot illumination. *Aquatic Botany*, 1999, **63**(3/4): 219-228.
- [ 11 ] Waters I, Armstrong W, Thompson CJ *et al.* Diurnal changes in radial oxygen loss and ethanol-metabolism in roots of submerged and non-submerged rice seedlings. *New Phytologist*, 1989, **113**(4): 439-451.
- [ 12 ] Inoue TM, Tsuchiya T. Interspecific differences in radial oxygen loss from the roots of three *Typha* species. *Limnology*, 2008, **9**(3): 207-211.
- [ 13 ] Engelaar W, Vanbruggen MW, Vandenhoek WPM *et al.* Root porosities and radial oxygen losses of rumex and plantago species as influenced by soil pore diameter and soil aeration. *New Phytologist*, 1993, **125**(3): 565-574.
- [ 14 ] Laskov C, Hoin O, Hupfer M. Environmental factors regulating the radial oxygen loss from roots of *Myriophyllum spicatum*

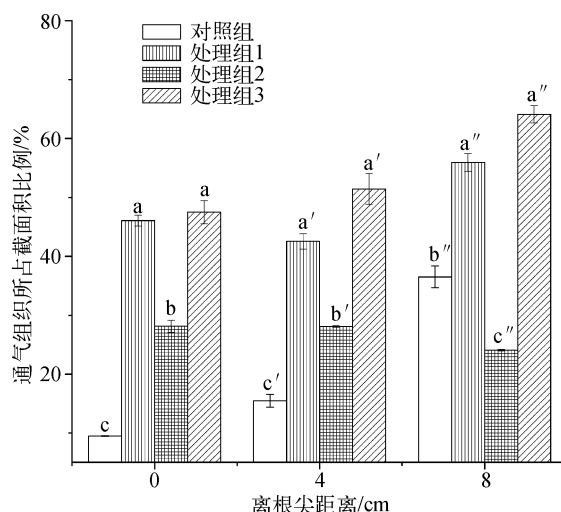


图 5 菖蒲根部通气组织所占比例(相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著)

Fig.5 Percentages of cross-sectional aera of aerenchma air spaces of *Acorus calamus* Linn.

and *Potamogeton crispus*. *Aquatic Botany*, 2006, **84**(4): 333-340.

- [15] Malik AI, English JP, Colmer TD. Tolerance of *Hordeum marinum* accessions to O<sub>2</sub> deficiency, salinity and these stresses combined. *Annals of Botany*, 2009, **103**(2): 237-248.
- [16] 吴灵琼, 成水平, 杨立华等. Cd<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对美人蕉的氧化胁迫及抗性机理研究. *农业环境科学学报*, 2007, **26**(4): 1365-1369.
- [17] Liu Y, Tam NFY, Yang JX *et al.* Mixed heavy metals tolerance and radial oxygen loss in mangrove seedlings. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, **58**(12): 1843-1849.
- [18] Mei XQ, Ye ZH, Wong MH. The relationship of root porosity and radial oxygen loss on arsenic tolerance and uptake in rice grains and straw. *Environmental*, 2009, **157**(8/9): 2550-2557.
- [19] Deng H, Ye ZH, Wong MH. Lead, zinc and iron(Fe<sup>2+</sup>) tolerances in wetland plants and relation to root anatomy and spatial pattern of ROL. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, **65**(2/3): 353-362.
- [20] Li H, Ye ZH, Wei ZJ *et al.* Root porosity and radial oxygen loss related to arsenic tolerance and uptake in wetland plants. *Environmental Pollution*, 2011, **159**: 30-37.
- [21] Armstrong J, Keep R, Armstrong W. Effects of oil on internal gas transport, radial oxygen loss, gas films and bud growth in *Phragmites australis*. *Annals of Botany*, 2009, **103**(2): 333-340.
- [22] Pi N, Tam NFY, Wong MH. Effects of wastewater discharge on formation of Fe plaque on root surface and radial oxygen loss of mangrove roots. *Environmental Pollution*, 2010, **158**(2): 381-387.
- [23] 崔克辉, 张甲耀. 模拟污水中氮, 磷对水稻幼苗过氧化氢酶和乙醇酸氧化酶的影响. *武汉大学学报: 自然科学版*, 1995, **41**(2): 245-250.
- [24] Colmer TD. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. *Plant Cell and Environment*, 2003, **26**(1): 17-36.
- [25] Matsui T, Tsuchiya T. A method to estimate practical radial oxygen loss of wetland plant roots. *Plant and Soil*, 2006, **279**(1/2): 119-128.
- [26] Armstrong W. Oxygen diffusion from roots of some british bog plants. *Nature*, 1964, **204**(496): 801-802.
- [27] Armstrong W. Aeration in higher plants. *Advances in Botanical Research*, 1979, **7**: 236-332.
- [28] Armstrong W, Healy MT. Oxygen diffusion in pea. *New Phytologist*, 1982, **91**(4): 647-659.
- [29] Arenovski AL, Howes BL. Lacunal allocation and gas transport capacity in the salt marsh grass *Spartina alterniflora*. *Oecologia*, 1992, **90**(3): 316-322.
- [30] Teal JM, Kanwishe JW. Gas transport in marsh grass *Spartina alterniflora*. *Journal of Experimental Botany*, 1966, **17**(51): 355-361.