

Hg, Cd 对莼菜冬芽茎、叶叶绿素含量 及活性氧清除系统的影响*

陆长梅 施国新 吴国荣 陈国祥 常福辰

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

提 要 本文研究了 Hg^{2+} , Cd^{2+} 对水生经济植物莼菜冬芽茎叶叶绿素含量、叶绿素 a/b 值、可溶性蛋白含量、 O_2^- 含量以及活性氧清除系统活性(SOD, CAT, POD)的影响. 实验结果表明: 叶绿素含量、叶绿素 a/b 值、可溶性蛋白含量随着 Hg^{2+} , Cd^{2+} 处理浓度的加大呈下降趋势; 低浓度 Hg^{2+} ($\leq 1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), Cd^{2+} ($\leq 5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 O_2^- 含量、SOD 活性、CAT 活性有激应升高, 但随着 Hg^{2+} , Cd^{2+} 处理浓度的加大又呈下降趋势; POD 活性随着 Hg^{2+} , Cd^{2+} 处理浓度的加大一直呈上升趋势. 莼菜冬芽对 Hg^{2+} 的反应较 Cd^{2+} 敏感, 叶片对 Hg^{2+} , Cd^{2+} 的反应较茎敏感.

关键词 Hg^{2+} Cd^{2+} 莼菜冬芽 叶绿素 活性氧

分类号 X503.23

重金属对水环境造成的污染已经引起人们的日益关注. Hg, Cd 是水体中主要金属污染物, 严重影响水生植物的生长发育. 目前 Hg, Cd 对植物影响的研究, 主要集中于陆生经济植物的吸收、富集以及对生长发育、代谢、品质等方面^[1-3]. 对高等水生经济植物的毒害作用研究甚少. 莼菜(*Brasenia schreberi*) 属睡莲科, 茎叶可作蔬菜, 地下茎富含淀粉和多糖, 可供药用, 是长江中下游重要的野生经济植物, 在江浙地区已大面积栽培^[4]. 莼菜是多年生浮叶草本植物, 沉水冬芽是莼菜度过寒冷等不良环境而进行营养繁殖的主要方式. 本文以莼菜冬芽为材料, 重点研究了 Hg, Cd 对其茎、叶叶绿素含量、可溶性蛋白含量、超氧阴离子(O_2^-) 的积累和抗氧化酶系统的影响, 以期为 Hg, Cd 等重金属胁迫的机理作一些有益的探讨.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

莼菜冬芽于 1997 年 11 月份采自苏州东山太湖水域, 实验所用冬芽生理年龄及生长状态基本一致.

1.2 培养及统计方法

实验用重金属试剂为分析纯 HgCl_2 , CdCl_2 , 用天然水分别配制成不同浓度的金属处理溶液. 根据预实验中植物对 Hg, Cd 的敏感度的差异, 确定 HgCl_2 溶液终浓度依次为 0, 0.5, 1, 2, $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, CdCl_2 溶液终浓度为 0, 2, 5, $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. 溶液存放于 4L 的玻璃缸中, 将越冬芽固定于玻璃板上置于处理液中培养, 各处理组均设三个重复, 自然光照, 培养温度 $10-12^\circ\text{C}$,

* 国家自然科学基金资助项目(39770046).

收稿日期: 1998-12-17; 收到修改稿日期: 1999-07-09. 陆长梅, 女, 1969 年生, 硕士, 讲师.

根据预实验确定取培养 6-8d 后的冬芽茎、叶分别进行各项测定. 最终结果取三次重复的平均值. 显著性差异分析采用单因素方差分析方法进行分析.

1.3 测定方法

叶绿素含量的测定根据 Arnon 的方法^[5]; 参照程光宇等的方法制备 SOD 粗酶液^[3], SOD 活性测定参照 Giannopolitis^[6] 的方法, 以抑制 NBT 光化还原 50% 为一个酶活性单位参照 Bradford 的考马斯亮蓝 G-250 法^[7] 测定可溶性蛋白含量; 按照王爱国、罗广华等的方法^[8] 测定 O_2^- 含量; 过氧化物酶(POD)活性的测定采用 X. H 波钦诺克的方法^[9], 单位以 $(\Delta OD_{470} \text{ g}^{-1} (\text{FW}))$ 计; 过氧化氢酶(CAT)活性的测定参照 Beers 的紫外分光光度法^[10], 并加以改进.

2 结果与分析

2.1 Hg^{2+} , Cd^{2+} 对菹菜冬芽茎、叶叶绿素含量、叶绿素 a/b 比值及可溶性蛋白含量的影响

经 Hg^{2+} , Cd^{2+} 处理后(图 1), 菹菜冬芽茎叶内叶绿素含量、叶绿素 a/b 比值及可溶性蛋白含量均发生明显的变化; 随着 Hg^{2+} , Cd^{2+} 处理浓度的增加, 冬芽茎叶内叶绿素和可溶性蛋白含量逐渐下降, 叶绿素 a/b 比值也逐渐减小. 显示出重金属 Hg^{2+} , Cd^{2+} 的毒害作用.

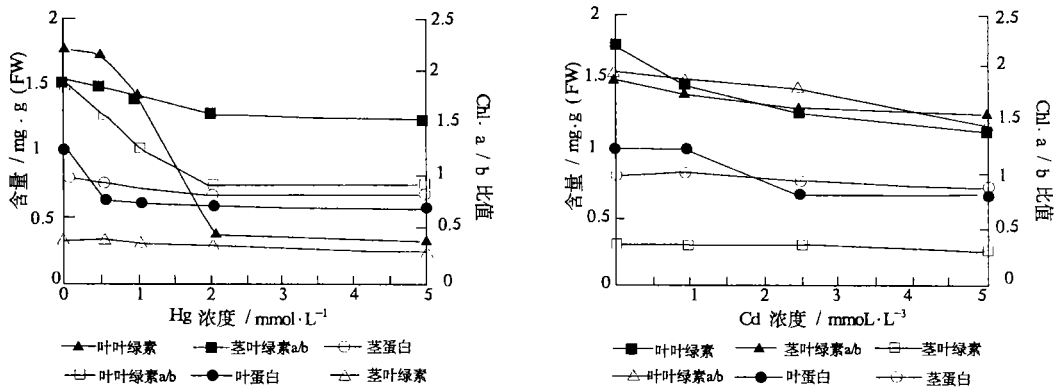


图 1 Hg^{2+} , Cd^{2+} 对菹菜越冬芽茎叶叶绿素含量, 叶绿素 a/b 比值及可溶性蛋白含量的影响

Fig. 1 Effects of Hg^{2+} , Cd^{2+} on chlorophyll contents, chl a/b values and soluble protein contents in stems and leaves of *Brasenia schreberi* winter bud

从图 1 可以看出菹菜冬芽对 Hg^{2+} 反应敏感. 就叶片而言, 低浓度的 Hg^{2+} 就产生显著的影响. 在 $0.5-2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 叶绿素含量、可溶性蛋白含量与叶绿素 a/b 比值同步下降; Hg^{2+} 浓度在 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 上述指标分别为对照的 23.5%, 59.28% 和 47.92%. 叶绿素含量和叶绿素 a/b 比值是反映植物光合能力的重要指标, 叶绿素崩解了约 3/4, 且其中叶绿素 a 的破坏更为明显, 这严重影响植物的光合能力, 而叶组织内可溶性蛋白含量大幅下降则可能与重金属 Hg^{2+} 对蛋白质合成系统的抑制有关^[11], 说明叶绿素系统破坏后的重建将是缓慢而困难的.

冬芽短缩茎对 Hg^{2+} 的敏感程度较叶片低, 在不同浓度 Hg^{2+} 处理下叶绿素含量、可溶性蛋白含量与叶绿素 a/b 比值均缓缓下降, 下降幅度较叶片小得多. 但显著性差异分析显示: 菹菜冬芽和叶内上述指标变化均达极显著水平 ($F_{茎} = 159.1185^{**}$, $F_{叶} = 365.9882^{**}$).

Cd^{2+} 对菹菜冬芽茎、叶的影响,与 Hg^{2+} 相比,表现出以下特点:菹菜冬芽的叶绿素含量、叶绿素 a/b 比值与可溶性蛋白含量受 Cd^{2+} 的影响程度较 Hg^{2+} 轻,与某些陆生植物的敏感度相似^[1,2,12];上述指标均随 Cd^{2+} 处理浓度增高而逐渐下降,且没有明显的转折点; Cd^{2+} $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组,上述指标下降到对照的 30% - 40%。以上结果表明菹菜对 Cd^{2+} 的敏感性较对 Hg^{2+} 要小,表现出一定的忍受能力;同样,叶片对 Cd^{2+} 的敏感程度高于茎 ($F_{\text{叶}} = 249.4828^{**}$, $F_{\text{茎}} = 55.66379^{**}$)。

2.2 Hg^{2+} , Cd^{2+} 对菹菜冬芽茎、叶内 O_2^- 含量与活性氧清除系统的影响

各种浓度 Hg^{2+} , Cd^{2+} 处理菹菜冬芽,其茎叶内 O_2^- 含量发生显著变化(图 2):低浓度范围内, O_2^- 含量明显增加,在 Hg^{2+} 浓度为 $0.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菹菜叶中 O_2^- 含量达最高值,为对照的 210.11%,而茎中 O_2^- 含量在 $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时达到最高值,此时 O_2^- 含量为对照的 202.5%。 Cd^{2+} 浓度在 $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,菹菜叶中 O_2^- 含量达最高值,为对照的 163.22%,在 Cd^{2+} $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,茎中 O_2^- 含量亦达最高值,为对照的 241.35%。随着 Hg^{2+} , Cd^{2+} 处理浓度的加大, O_2^- 含量又逐渐降低。 Hg^{2+} 处理较 Cd^{2+} 处理下降幅度大,叶中 O_2^- 含量下降幅度又较茎中的大。上述数据表明 Hg^{2+} , Cd^{2+} 在低浓度处理时,已对植物机体产生了毒害效应,诱导 O_2^- 大量产生,较高浓度下 O_2^- 含量的降低可能与细胞内代谢速率大幅度降低有关。菹菜叶较茎对重金属敏感, Hg^{2+} 较 Cd^{2+} 对植物细胞的毒害更显著,这与菹菜越冬芽茎、叶在形态、叶绿素含量、叶绿素 a/b 比值以及可溶性蛋白含量上表现一致。

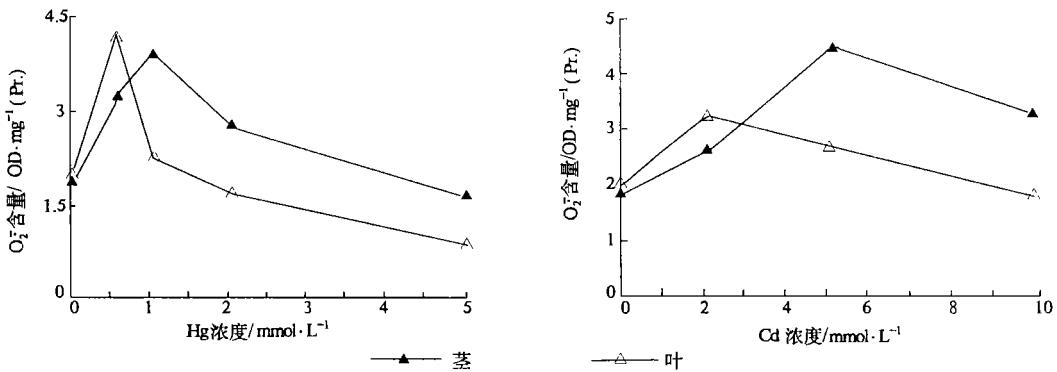


图 2 Hg^{2+} , Cd^{2+} 对菹菜越冬芽茎叶 O_2^- 含量的影响

Fig.2 Effects of Hg^{2+} , Cd^{2+} on O_2^- contents in stems and leaves of *Brasenia schreberi* winter bud

图 3 表明, Hg^{2+} , Cd^{2+} 处理后,菹菜冬芽茎叶内 SOD 活性在一定的浓度范围内较对照有明显升高,但当 Hg^{2+} , Cd^{2+} 浓度继续加大时, SOD 活性 ($\text{Hg}^{2+} > 2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Cd}^{2+} > 5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 又迅速或缓慢下降,甚至低于对照,其活性变化曲线呈现单峰曲线状,与 O_2^- 含量变化相近,但 SOD 活性的峰值滞后于 O_2^- 含量的峰值。

SOD 作为超氧阴离子自由基清除剂,其活性高低与植物抗逆性大小有一定相关性^[1,2]。在逆境诱导下增加 SOD 活性可提高植物机体适应能力,忍受逆境而得以生存。菹菜冬芽茎叶在浓度 Hg^{2+} , Cd^{2+} 胁迫下 O_2^- 含量增加,致使体内所具有的防御机能应激加强,防御体系中的

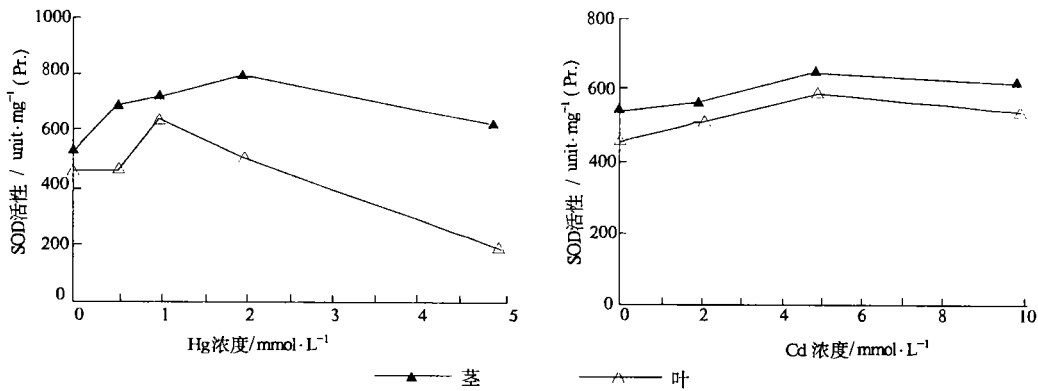


图3 Hg^{2+} , Cd^{2+} 对菹菜越冬芽茎、叶 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effects of Hg^{2+} , Cd^{2+} on SOD activities in stems and leaves of *Brasenia schreberi* winter bud

SOD 活性迅速升高以清除 O_2^- , 从而使植物体免遭伤害. 但随着 Hg^{2+} , Cd^{2+} 浓度继续增加, 它们使功能蛋白变构失活, 诱导 tRNA 水解, 导致蛋白质合成受阻的毒性效应也越来越显著^[3], 结果表现为 SOD 活性的降低.

SOD 歧化 O_2^- 产生 H_2O_2 , 随后活性氧 H_2O_2 由过氧化氢酶 (CAT) 加以清除, 将其分解成 H_2O 和氧. 在植物机体内, CAT 与 SOD 协同起保护作用. 如图 4 所示, Hg^{2+} , Cd^{2+} 对菹菜冬芽叶内 CAT 活性有显著影响 ($F_{\text{Hg}} = 355.6473^{**}$, $F_{\text{Cd}} = 14.54016^{**}$), 其活性变化曲线与 SOD 变化相似, 低浓度时刺激 CAT 活性升高, 而当浓度超过一定范围时则明显抑制其活性. CAT 活性下降造成 H_2O_2 的积累, 从而导致植物膜结构的伤害. 对茎而言, CAT 活性变化幅度相对较小, 表明茎的忍受力较叶大.

过氧化物酶 (POD) 是植物代谢的末端氧化酶之一, 它能催化分解体内 H_2O_2 等过氧化物, 其活性亦与植物生化过程及抗逆境能力有关. 在本实验的处理浓度下, Hg^{2+} , Cd^{2+} 明显对 POD 活性有促进作用, 而未发现抑制效应 (图 5), 说明 Hg^{2+} , Cd^{2+} 等进入植物组织后, 可能通过影响一系列生理生化反应产生并积累了一些对植物机体有害的过氧化物, 随着 POD 底物浓度的增加, 诱导 POD 活性提高. 在 SOD, CAT 活性下降的同时, POD 活性仍呈上升趋势, 这反映 POD 活性的提高对重金属逆境的适应存在较复杂的机制, 已知植物随着细胞老化, 体内 POD 活性逐渐增加^[13]. 作者正就逆境下 POD 活性与谷胱甘肽和抗坏血酸的关系作进一步的探讨.

3 讨论

Hg^{2+} , Cd^{2+} 等金属离子要对植物体产生影响首先要求被植物体吸附、吸收. 菹菜冬芽叶为扁平形器官, 其表面积/质量比要比圆柱形茎的表面积/质量比大得多, 表明叶有可能比茎吸附吸收较多的金属离子, 造成叶所受的伤害比茎大. 其次, 植物体内活性氧的产生多集中于与植物光合、呼吸有关的细胞器叶绿体、线粒体中^[14], 而叶绿体主要存在于光合作用的主要器官叶中, 茎中含量相对较少; 作者另有研究显示 Hg, Cd 对菹菜越冬芽光合膜光化学活性及多肽组分等均产生影响, 而且叶较茎敏感^[15]. 叶所受的伤害较茎大, 导致叶中尤其是叶绿体中产生较

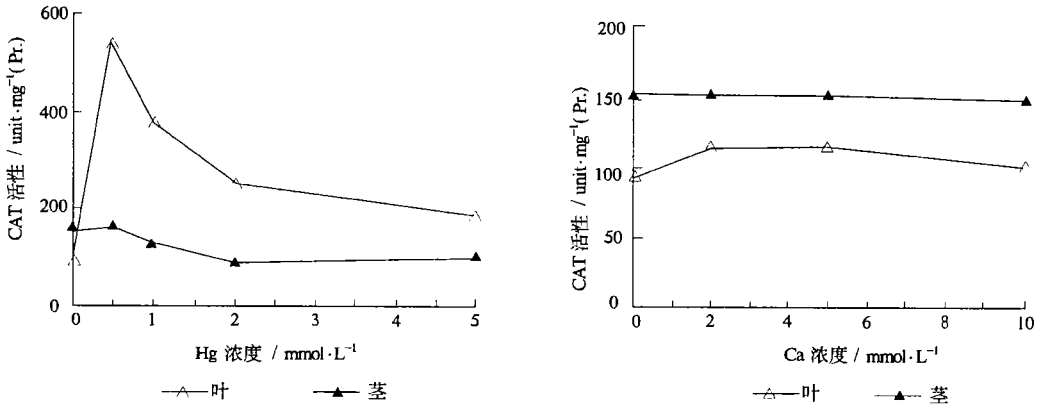


图 4 Hg^{2+} , Cd^{2+} 对菹菜越冬芽茎、叶 CAT 活性的影响

Fig. 4 Effects of Hg^{2+} , Cd^{2+} on CAT activities in stems and leaves of *Brasenia schreberi* winter bud

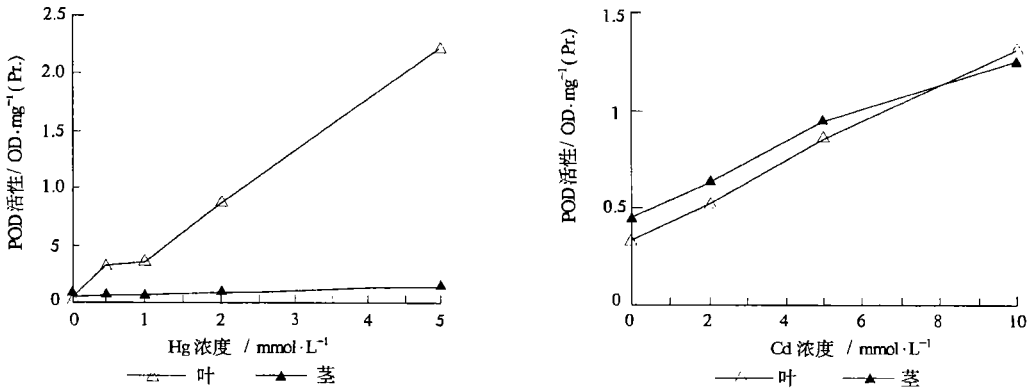


图 5 Hg^{2+} , Cd^{2+} 对菹菜越冬芽茎、叶 POD 活性的影响

Fig. 5 Effects of Hg^{2+} , Cd^{2+} on POD activities in stems and leaves of *Brasenia schreberi* winter bud

茎中更多的活性氧,活性氧的增加又诱导活性氧清除酶系统活性的激应增加,最终结果显示为叶中各项指标的变化较茎中显著。

前人认为因 Hg 有较高的扩散性和脂溶性,对植物的伤害主要表现在 Hg^{2+} 与细胞膜相互作用,并能改变细胞膜的透性,致使亚细胞的破裂;另一方面, Hg^{2+} 属于软酸,还对蛋白酶中-SH 有较大的亲和性,可抑制或提高某些酶的活性,干扰膜的结构与功能。而 Cd^{2+} 属于细胞原浆毒,可直接抑制含有羧基、氨基和巯基的酶系尤其是含巯基的酶,造成机体组织代谢障碍^[11]。从影响范围和作用对象看,可见 Hg 对植物的伤害要比 Cd 大,这与严重玲等的试验^[16]以及作者的试验结果相符。

参 考 文 献

- 1 严重玲,付舜珍,方重华等.Hg, Cd 及其共同作用对烟草叶绿素含量及抗氧化酶系统的影响.植物生态学报. 1997, 21(5):

- 468 - 473
- 2 罗立新, 孙 铁, 靳月华. 镉胁迫对小麦叶片细胞膜脂过氧化作用的影响. 中国环境科学. 1998, 18(1): 72 - 75
 - 3 程光宇, 魏锦城, 邹玉珍等. 构果实铜锌超氧化物歧化酶的纯化及其性质研究. 南京师范大学报(自然科学), 1991, 14(2): 82 - 92
 - 4 文 明主编. 长江中下游水域洲滩野生经济作物. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993
 - 5 Arnon D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts, Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, 1949, 24: 1 - 15
 - 6 Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase (I): Occurrence in higher plant. *Plant Physiol*, 1977, 59(2): 309 - 314
 - 7 Bradford M A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248 - 254
 - 8 王爱国, 罗广华. 植物的超氧自由基与羟胺的定量关系. 植物生理学通讯, 1990, 26(6): 55 - 57
 - 9 X H 波钦诺克. 植物生物化学分析方法. 北京: 科学出版社, 1981
 - 10 Beers R F, *et al.* A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Boil Chem*, 1952, 195: 133 - 140
 - 11 E I 奥西埃著. 生物无机化学导论. 北京: 化学工业出版社, 1987
 - 12 胡勤海, 叶 畅, 叶兆杰. 稀土元素镧对金鱼藻生长生理及细胞叶绿体结构的影响. 环境科学学报. 1997, 17(1): 82 - 86
 - 13 李振国, 吴有梅, 刘 愚等. 植物对二氧化硫的反应和抗性的研究. 植物生理学报. 1981, 7(14): 363 - 370
 - 14 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 植物的氧化代谢及活性氧对细胞的伤害. 中国科学院华南植物研究所集刊(第 4 集). 北京: 科学出版社, 1989
 - 15 陈国祥, 施国新, 何 兵等. Hg, Cd 对菹菜越冬芽光合膜化学活性及多肽组分的影响. 环境科学学报(待刊).
 - 16 严重玲, 付舜珍, 方重华等. Hg, Cd 及其共同作用对烟草叶绿素含量及抗氧化酶系的影响. 植物生态学报. 1997, 25(5): 468 - 473

Effects of Hg^{2+} , Cd^{2+} on Chlorophyll Content and Scavenging Systems of Activated Oxygen in Stems and Leaves of *Brasenia Schreberi* Winter Bud

LU Changmei SHI Guoxin WU Guorong CHEN Guoxiang CHANG Fuchen
(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract

This paper deals with the impact of Hg^{2+} , Cd^{2+} on chlorophyll contents and scavenging systems of activated oxygen in stems and leaves of *Brasenia schreberi* winter bud. The results indicate that, as increasing of the concentration of Hg^{2+} and Cd^{2+} , chlorophyll contents, chlorophyll a/b values and soluble protein contents decreased, the activities of SOD and CAT increased first and decreased afterwards and the activity of POD increased from beginning to end. The results also show that *Brasenia schreberi* winter bud is more sensitive to Hg^{2+} than to Cd^{2+} , its leaves is more sensitive than its stems.

Key Words Hg^{2+} , Cd^{2+} , *Brasenia schreberi*, winter bud, chlorophyll, activated oxygen