

莼菜(*Brasenia schreberi*)冬芽对 Cr⁶⁺ 污染的抗性反应*

杨顶田¹ 施国新² 宋东杰² 陈伟民¹

(1:中国科学院南京地理与湖泊研究所,南京 210008;

2:南京师范大学生命科学学院,南京 210097)

提 要 研究了 Cr⁶⁺ 污染对莼菜冬芽外部形态及过氧化物酶、硝酸还原酶活性、叶绿素、O₂⁻、MDA 的含量等生理指标的影响。结果显示:Cr⁶⁺ 对莼菜毒害机制在于抑制酶活性和损害细胞膜系统。在培养第三天时叶绿素的含量随着 Cr⁶⁺ 浓度的增加而降低;过氧化物酶的活性在 10mg/L 中最高;硝酸还原酶活性除在 5mg/L 中的略微升高外,在 10~40mg/L 之间随着 Cr⁶⁺ 培养浓度的升高而降低;O₂⁻ 的含量在 5mg/L 中的最高,在 10mg/L 中略高于对照,在随后培养中随浓度的升高而降低,MDA 的含量变化趋势和 O₂⁻ 相似。

关键词 莼菜 Cr⁶⁺ 过氧化物酶 硝酸还原酶 O₂⁻

分类号 X503.23

莼菜(*Brasenia schreberi* Gmel)属睡莲科,茎叶芽可食用,地下茎富含淀粉和多糖,可供药用,是长江中下游地区重要的野生经济植物,在江浙地区大面积栽培。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。丁小余等^[1]研究了 Cd²⁺ 对莼菜冬芽超微结构的影响;李大辉等^[2]研究了 Hg²⁺ 对其叶中淀粉含量的影响。陆长梅等^[3]就 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进行了分析。本文主要从 Cr⁶⁺ 对其生理影响的角度来研究。Cr⁶⁺ 对植物的毒性已在凤眼莲^[4]、辣椒^[5]等植物上进行详细的研究,主要使过氧化氢酶(CAT)活性下降,Fe 含量增加,超氧化歧化酶(SOD)活性下降。本文主要从外部形态及叶绿素含量、过氧化物酶活性、硝酸还原酶活性、超氧阴离子(O₂⁻)和膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)等几方面进行研究,旨在进一步了解莼菜在受重金属毒害时的生理方面的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

莼菜于 1998 年 11 月 18 日采自苏州东太湖(室温 2~11℃),用纯水培养 2d 后,分别加入 5mg/L、10mg/L、20mg/L 和 40mg/L 的 K₂Cr₂O₇(按纯 Cr⁶⁺ 计)和一组对照,实验为三次重复。在培养过程中观察其外部形态变化,第三天开始检测其生理指标。

* 国家自然科学基金资助项目(39770046)、江苏省自然科学基金资助项目(BK97107)。

收稿日期:2000-03-30;收到修改稿日期:2000-06-23。杨顶田,男,1969 年 4 月出生,博士生。

1.2 药品规格

实验所有药品均为国产分析纯试剂和分析纯以上级试剂。

1.3 生理生化测定方法

1.3.1 材料处理方法 取新鲜的供试材料,流水冲净表面杂物,用吸水纸吸去植物表面的水分,用电子天平称重。

1.3.2 叶绿素含量的测定^[6] 取1g叶片加5mL的蒸馏水、少量石英砂、碳酸钙进行研磨。再加5mL蒸馏水混匀。吸取研磨液2.5mL加入10mL丙酮,振荡,静置。将上清液(提取的叶绿素)放在663nm和645nm波长下测定(754分光光度仪,上海第三分析仪器厂)。

1.3.3 过氧化物酶活性的测定^[6] 取1g叶片加入1mol/L KH₂PO₄研磨后在4000rpm下离心,取过氧化物酶提取液1mL和混合反应液(50mL pH6.0的磷酸缓冲液+28μl愈创木酚+19μL过氧化氢)3mL放入比色皿在470nm(754分光光度仪)下每隔30s读数一次。换算为OD₄₇₀/min·g鲜重。

1.3.4 硝酸还原酶活性的测定^[6] 取0.5g叶片剪碎后,加入5mL pH7.5的1mol/L磷酸缓冲液和5mL KNO₃溶液中,抽气至叶下沉后放30℃处30min,取1mL溶液于试管中各加2mLα-萘酚和磺胺在30℃温浴30min,在754分光光度仪520nm检测。

1.3.5 O₂⁻产生速度的测定 按照王爱国的方法^[7]并略作改进,1g鲜重材料,用6mL 65mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.8)研磨,经四层纱布过滤,滤液在15000rpm离心10min。取上清液1mL(约0.5mg蛋白)加入磷酸缓冲液0.9mL和10mmol/L羟胺氧化物0.1mL,在25℃混合并培养20min。取0.5mL培养液依次加入0.5mL 17mmol/L对氨基苯磺酸和0.5mL 7mmol/Lα-萘胺,在25℃反应20min,反应后的显色液用同体积正丁醇充分摇匀,静置分层,取正丁醇相测OD₅₃₀,用磷酸缓冲液代替样品作空白。

1.3.6 MDA的测定 采用Heath等的硫代巴比妥酸(TBA)比色法^[7]。取1g鲜重材料,用5mL 65mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.8)研磨,用纱布过滤后在15000g离心10min。取上清液0.1mL,后序步骤循MDA试剂盒指示的顺序进行(MDA试剂盒购自南京建成生物工程公司)。

2 实验结果

2.1 蕹菜冬芽的外形观察

蕹菜冬芽叶片为盾形,幼叶深绿色,叶质较硬、拳卷。整个冬芽表面覆盖有浓厚粘液。用Cr⁶⁺处理后第三天看不出变化,叶柄、幼叶与对照无异。至第四天20mg/L Cr⁶⁺中培养的蕹菜老叶边缘出现烂斑,其中有的叶片上还有直径不等的黑斑,叶柄受害不明显,幼叶边缘出现褪色。第五天、第六天,坏死斑逐渐增多扩大,当坏死斑直径达到1cm左右时,其中心的叶片组织已呈腐烂状态。5mg/L Cr⁶⁺中培养的蕹菜受害现象不明显。

2.2 叶绿素含量的测定

测定了第三天各组的叶绿素含量(图1)。从图1中可看出:总叶绿素的含量和叶绿素a/b含量都是对照培养最高。40mg/L培养的蕹菜的叶绿素和对照相比,叶绿素a下降了0.314mg/g(FW),叶绿素b下降了0.130mg/g(FW);单从数值看叶绿素a下降的幅度比叶绿素b大。但叶绿素a/b变化幅度不大,基本保持在2左右(图2)。

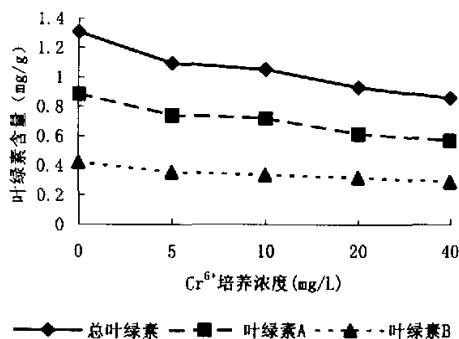
图1 叶绿素含量和Cr⁶⁺培养浓度的关系

Fig. 1 The relationship between content of chlorophyll and concentration of Cr⁶⁺

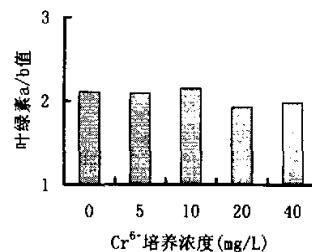


图2 叶绿素a/b值

Fig. 2 The ratio of chlorophyll a/b

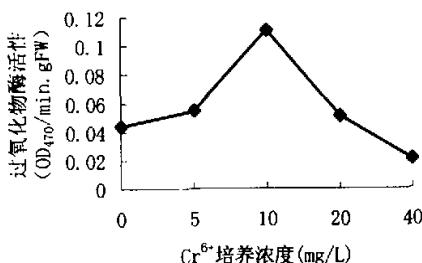
图3 过氧化物酶活性与Cr⁶⁺培养浓度的关系

Fig. 3 The relationship between peroxidase activity and concentration of Cr⁶⁺

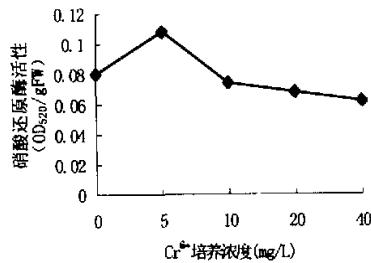
图4 硝酸还原酶活性与Cr⁶⁺培养浓度的关系

Fig. 4 The relationship between activity of nitrate reductase and concentration of Cr⁶⁺

2.3 过氧化物酶的测定

测定了第三天的过氧化物酶的活性,结果如图3,从图3中可以看出过氧化物酶活性在5mg/L时已开始升高,是对照的125%。到10mg/L时活性最高(0.111 OD₄₂₀/min·gFW),是对照的250%。浓度继续升高则酶的活性下降,40mg/L时已低于对照,只是对照的40.91%。

2.4 硝酸还原酶的测定

在第三天测定了硝酸还原酶的活性,结果如图4,从图中可以看出在第三天时莼菜硝酸还原酶活性(OD₅₂₀/gFW)在5mg/L中最高(0.108),比对照(0.080)高0.28。而在10mg/L中的莼菜硝酸还原酶活性已略低于对照(为0.074),20、40mg/L中硝酸还原酶活性低于对照且呈降低趋势。

2.5 O₂⁻,MDA的含量

在第三天测定了O₂⁻,MDA的含量,结果如图5,图6。随着培养液中Cr⁶⁺浓度的上升,莼

菜体内 O_2^- 含量 ($\text{OD}_{530}/\text{mgFW}$) 发生明显的变化。在 5mg/L 浓度时最高，每克鲜重达到 0.841，而对照仅为 0.712，上升了 18.1%。10mg/L 浓度时已开始略为下降，为 0.801。在 20mg/L 和 40mg/L 中莼菜的 O_2^- 含量分别低于对照。

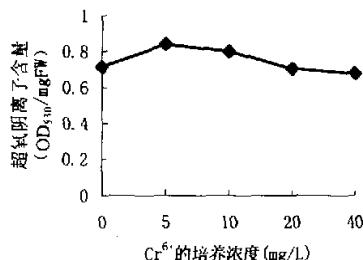


图 5 O_2^- 的含量和 Cr^{6+} 浓度的关系

Fig. 5 The relationship between O_2^- content and concentration of Cr^{6+}

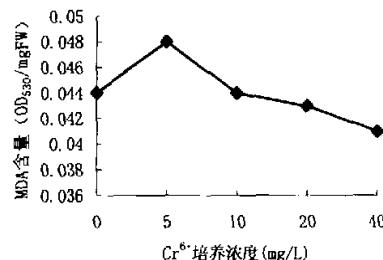


图 6 MDA 含量和 Cr^{6+} 培养浓度的关系

Fig. 6 The relationship between MDA content and concentration of Cr^{6+}

MDA 的含量 ($\text{OD}_{530}/\text{mgFW}$) 在 5mg/L 中最高 (为 0.048)，在 20mg/L 和 40mg/L 中莼菜的 MDA 含量分别是 0.043 和 0.041，且均低于对照。

3 讨论

过氧化物酶主要功能是减轻有机氢过氧化物对机体的伤害^[9]。莼菜在低浓度 Cr^{6+} 的处理时，诱导过氧化物酶体的产生；同时 Cr^{6+} 的强氧化性破坏过氧化物体膜，使过氧化物酶释放量增加，过氧化物酶活性增强。但当 Cr^{6+} 浓度超过一定限度时，过量的 Cr^{6+} 抑制过氧化物酶活性，而使酶活性降低，过氧化物酶清除有机氢过氧化物能力降低，莼菜受到毒害。可以看出 Cr^{6+} 浓度超过 10mg/L 时，酶活性开始趋于抑制；当浓度为 40mg/L 时，酶活性仅是对照的 40.9%。此外，就植物氧代谢酶系统而言，这种在低浓度 Cr^{6+} 胁迫时升高而在高浓度 Cr^{6+} 胁迫时降低的现象在白菜^[10]、萝卜^[11]、红菜苔^[12]与凤眼莲^[13]中均有记载，故可能涉及某种更为基本的共同机制，值得深入研究。

硝酸还原酶是诱导酶。本实验中测得的硝酸还原酶活性偏低，是放在纯水中培养的缘故。硝酸还原酶的活性在 5mg/L 时出现升高，主要因为 K_2CrO_4 可激活缺失部分钼铁的钼铁蛋白^[14]（在溶液中 CrO_4^{2-} 和 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 是存在一个平衡的^[15]）。当 Cr^{6+} 浓度增加到一定限度时将产生下述效果：(1) Cr^{6+} 直接抑制硝酸还原酶活性；(2) 硝酸还原酶的辅因子是 FAD，其氢来源是 NADH，自养植物的 NADH 来源可能是光合作用提供的^[16]， Cr^{6+} 抑制了参与光合作用的酶，故产生的 NADH 较少，因此硝酸还原酶活性降低。

已知 O_2^- 能攻击生物膜上的多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化，形成脂质过氧化物。氧自由基不但通过多不饱和脂肪酸过氧化引起细胞伤害，而且还能通过脂质氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤。 O_2^- 含量大幅度增加，造成代谢紊乱，是引起莼菜细胞伤害的主要原因之一。

随着培养浓度的增加, O₂⁻ 的含量逐渐降低, 可能与细胞受伤后代谢速率降低乃至黄化、死亡有关。

O₂⁻ 的含量增加导致膜脂过氧化, MDA 含量增加。通过 MDA 的含量可以间接知道细胞的受害程度。作为强氧化剂的 Cr⁶⁺, 使膜结构上的不饱和脂肪酸氧化而破坏膜结构, 增加膜的通透性^[17]。Cr⁶⁺ 渗入细胞可以直接与细胞核内的核酸等大分子物质结合, 抑制包括 ATPase 在内的多种酶的活性, 还可以直接和核酸结合而改变细胞核的立体结构, 使细胞核异固缩而改变细胞的正常有丝分裂, DNA 发生凝聚, 染色体发生断裂和畸变, 蛋白质合成停止, 从而造成细胞器结构和功能的缺陷, 代谢途径改变^[17]。

高浓度的 Cr⁶⁺ 对莼菜冬芽的毒害较重, 而低浓度 Cr⁶⁺ 的毒害效应较轻。从这一现象可以看出莼菜冬芽对 Cr⁶⁺ 有一定的忍耐力。主要因为:(1)细胞壁中的果胶质为结合重金属离子提供大量的离子交换位点^[18], 当结合点达到饱和时, 关键性的抗性机制则存在于细胞内的重金属结合体(如金属与金属硫蛋白和植物螯合肽结合), 由此解除了重金属的毒害^[18]。(2)Cr⁶⁺ 和 Cr³⁺ 可被植物体内的抗坏血酸、柠檬酸等逐渐变为有机结合态^[19], 而达到了解毒结果。(3)Tooru Kuwamoto 等^[20] 在研究海洋中 Cr³⁺ 存在形式时发现一些氨基酸如 L-组氨酸、L-天冬氨酸、甘氨酸、赖氨酸、半胱氨酸等均可结合 Cr³⁺; 一些脂肪酸如硬脂酸、月桂酸、油酸等也可与 Cr³⁺ 结合, 而且不受 pH 值的影响。在自然条件下 Cr⁶⁺ 很容易转变为 Cr³⁺^[20]。当 Cr⁶⁺ 浓度超过忍耐限度时, 莼菜冬芽受到毒害。

参 考 文 献

- 1 丁小余, 施国新, 杜开和等. Cd²⁺ 污染对莼菜叶片形态学伤害反应的研究. 西北植物学报, 1998, 18(3): 417-422
- 2 李大辉, 施国新, 常福辰等. Hg²⁺ 对莼菜冬芽叶结构和淀粉粒含量的影响. 南京师范大学学报(自然科学版), 1998, 21(3): 62-66
- 3 陆长梅, 施国新, 吴国荣等. 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. 湖泊科学, 1999, 11(4): 322-327
- 4 周易勇. 高浓度铬对凤眼莲的伤害及膜脂过氧化作用的影响. 环境科学, 1994, 14(3): 60
- 5 周易勇, 刘同仇, 邓波儿. 铬污染对辣椒叶绿素和铁含量及几种酶活性的影响. 环境科学, 1991, 11(3): 28-29
- 6 华东师范大学生物系植物生理教研组编. 植物生理学实验指导(73, 88, 143). 北京: 人民教育出版社, 1980
- 7 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, (6): 55-57
- 8 Heath R L, Pardue L. Photoperitration in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Bio-phys.*, 1968, 25: 189-198
- 9 方允中, 李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1996. 133-145
- 10 周易勇, 刘同仇, 邓波儿. 六价铬污染对小白菜产量、养分吸收及若干生理指标的影响. 环境科学学报, 1990, 10: 255-257
- 11 周易勇, 刘同仇, 邓波儿. 六价铬污染土壤对萝卜产量、品质和若干生理指标的影响. 华中农业大学学报, 增刊, 6: 76-79
- 12 周易勇, 刘同仇, 邓波儿. 六价铬污染对红菜苔产量、品质、养分吸收及叶片酶性的影响. 农业环境保护, 1990, 9(3): 25-26
- 13 周易勇. 铬对凤眼莲的污染与脂质过氧化的关系. 生态学报, 增刊, 1994(14): 141-143
- 14 黄巨富, 江志平, 路爱平等. 含铬重组液激活部分缺失金属原子簇的钼铁蛋白的研究. 植物学报, 1995, 37(4): 281-288
- 15 Cresser, M. S and Hargitt, R. The significance of the CrO₄²⁻ = HCrO₄⁻ equilibrium in the determination of chromium (VI) by flame spectrometry. *Talanta*, 1972, 23: 153-154
- 16 G. 里克特. 植物代谢(302). 北京: 科学出版社, 1985

- 17 吴玉萍,沈韫芬. LAS 和 $K_2Cr_2O_7$ 对梨形四膜虫 *Tetrahymena pyriformis* 细胞毒性效应的研究. 中国环境科学, 1993, 13(3): 204~208
- 18 黄玉山,孙健敏,谭凤仪. 植物重金属结合体的研究现况. 植物学报, 1992, 34(2): 146~158
- 19 任守信. 水中铬的化学形态分布. 中国环境科学, 1989, 9(1): 40~44
- 20 Tooru Kuwamoto, Shigekazu Tsurubo, Hiroyuki Tokoro, et al. Chemical speciation of chromium in sea water. *Analytical Chimica Acta*, 1981, 130: 289~294

The Resistant Reaction of *Brasenia schreberi* Winter-Bud to Cr^{6+} Pollution

YANG Dingtian¹ SHI Guoxin² SONG Dongjie² CHEN Weimin¹

(1; Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P. R. China;
2, Nanjing Normal University Nanjing 210097, P. R. China)

Abstract

This paper mainly deals with the changes of external morphology, the activity of peroxidase and nitrate reductase, the content of chlorophyll, O_2^- and MDA in *Brasenia schreberi* by Cr^{6+} treatment. The results showed the reason of Cr^{6+} injuring *Brasenia schreberi* was that Cr^{6+} inhibited the activity of enzymes and damaged membrane. In the third day, the content of chlorophyll reduced with the increasing concentration of Cr^{6+} , the activity of peroxidase was the highest at 10 mg/L, the activity of nitrate reductase was a little higher at 5mg/L, but reduced with the increasing concentration of Cr^{6+} up to 40mg/L, the content of O_2^- was the highest at 5mg/L, and a little higher than control group at 10mg/L, then it reduced with the increasing culture concentration of Cr^{6+} , the trend of changes in MDA was relatively similar with that of O_2^- .

Key Words *Brasenia schreberi*, Cr^{6+} , peroxidase, nitrate reductase, O_2^-