

# 莼菜 (*Brasenia schreberi*) 冬芽对 $\text{Cr}^{6+}$ 污染的抗性反应<sup>\*</sup>

杨顶田<sup>1</sup> 施国新<sup>2</sup> 宋东杰<sup>2</sup> 陈伟民<sup>1</sup>

(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  $\text{Cr}^{6+}$  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、 $\text{O}_2^-$ 、MDA 的含量等生理指标的影响。结果显示:  $\text{Cr}^{6+}$  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  $\text{Cr}^{6+}$  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  $\text{Cr}^{6+}$  培养浓度的升高而降低;  $\text{O}_2^-$  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  $\text{O}_2^-$  相似。

**关键词** 莼菜  $\text{Cr}^{6+}$  过氧化物酶 硝酸还原酶  $\text{O}_2^-$

**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<sup>[1]</sup>研究了  $\text{Cd}^{2+}$  对莼菜冬芽超微结构的影响; 李大辉等<sup>[2]</sup>研究了  $\text{Hg}^{2+}$  对其叶中淀粉含量的影响。陆长梅等<sup>[3]</sup>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  $\text{Cr}^{6+}$  对其生理影响的角度来研究。  $\text{Cr}^{6+}$  对植物的毒性已在凤眼莲<sup>[4]</sup>、辣椒<sup>[5]</sup>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 ( $\text{O}_2^-$ ) 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  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (按纯  $\text{Cr}^{6+}$  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<sup>[6]</sup> 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<sup>[6]</sup> 取 1g 叶片加入 1mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  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 + 28 $\mu\text{L}$  愈创木酚 + 19 $\mu\text{L}$  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  $\text{OD}_{470}/\text{min}\cdot\text{g}$  鲜重。

1.3.4 硝酸还原酶活性的测定<sup>[6]</sup> 取 0.5g 叶片剪碎后,加入 5mL pH7.5 的 1mol/L 磷酸缓冲液和 5mL  $\text{KNO}_3$  溶液中,抽气至叶下沉后放 30℃ 处 30min,取 1mL 溶液于试管中各加 2mL  $\alpha$ -萘酚和磺胺在 30℃ 温浴 30min,在 754 分光光度仪 520nm 检测。

1.3.5  $\text{O}_2^-$  产生速度的测定 按照王爱国的方法<sup>[7]</sup>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/L  $\alpha$ -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  $\text{OD}_{530}$ ,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<sup>[7]</sup>。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 莼菜冬芽的外形观察

莼菜冬芽叶片为盾形,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  $\text{Cr}^{6+}$  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  $\text{Cr}^{6+}$  中培养的莼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  $\text{Cr}^{6+}$  中培养的莼菜受害现象不明显。

### 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 培养的莼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)。

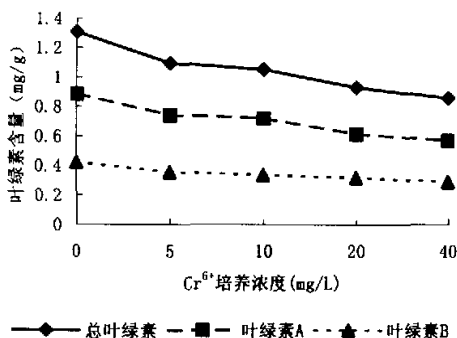
图 1 叶绿素含量和  $\text{Cr}^{6+}$  培养浓度的关系

Fig.1 The relationship between content of chlorophyll and concentration of  $\text{Cr}^{6+}$

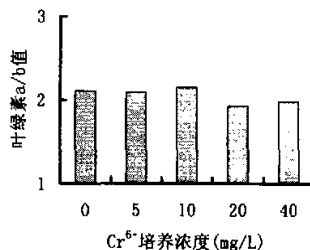


图 2 叶绿素 a/b 值

Fig.2 The ratio of chlorophyll a/b

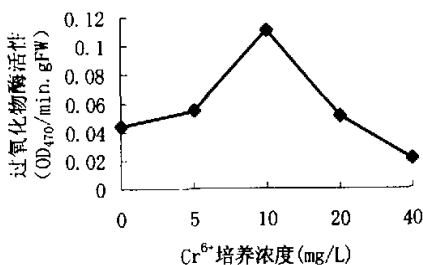
图 3 过氧化物酶活性与  $\text{Cr}^{6+}$  培养浓度的关系

Fig.3 The relationship between peroxidase activity and concentration of  $\text{Cr}^{6+}$

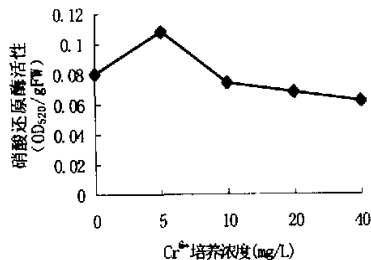
图 4 硝酸还原酶活性与  $\text{Cr}^{6+}$  培养浓度的关系

Fig.4 The relationship between activity of nitrate reductase and concentration of  $\text{Cr}^{6+}$

### 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  $\text{OD}_{470}/\text{min}\cdot\text{gFW}$ ),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( $\text{OD}_{520}/\text{gFW}$ )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 $\text{O}_2^-$ , MDA 的含量

在第三天测定了  $\text{O}_2^-$ , MDA 的含量,结果如图 5,图 6.随着培养液中  $\text{Cr}^{6+}$  浓度的上升,莼

菜体内  $O_2^-$  含量 ( $OD_{530}/mgFW$ ) 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.

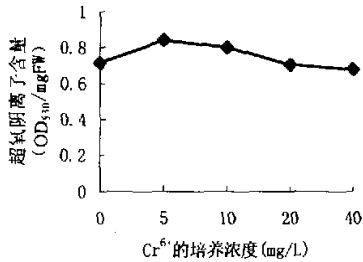


图 5  $O_2^-$  的含量和  $Cr^{6+}$  浓度的关系

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

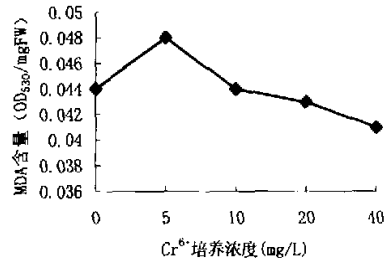


图 6 MDA 含量和  $Cr^{6+}$  培养浓度的关系

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

MDA 的含量 ( $OD_{530}/mgFW$ ) 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<sup>[9]</sup>. 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, 就植物氧化代谢酶系统而言, 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<sup>[10]</sup>、萝卜<sup>[11]</sup>、红菜苔<sup>[12]</sup> 与凤眼莲<sup>[13]</sup> 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<sup>[14]</sup> (在溶液中  $CrO_4^{2-}$  和  $Cr_2O_7^{2-}$  是存在一个平衡的<sup>[15]</sup>). 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<sup>[16]</sup>,  $Cr^{6+}$  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,  $\text{O}_2^-$  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。

$\text{O}_2^-$  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  $\text{Cr}^{6+}$ , 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<sup>[17]</sup>.  $\text{Cr}^{6+}$  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<sup>[17]</sup>.

高浓度的  $\text{Cr}^{6+}$  对莼菜冬芽的毒害较重, 而低浓度  $\text{Cr}^{6+}$  的毒害效应较轻. 从这一现象可以看出莼菜冬芽对  $\text{Cr}^{6+}$  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<sup>[18]</sup>, 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<sup>[18]</sup>. (2)  $\text{Cr}^{6+}$  和  $\text{Cr}^{3+}$  可被植物体内的抗坏血酸、柠檬酸等逐渐变为有机结合态<sup>[19]</sup>, 而达到了解毒结果. (3) Tooru Kuwamoto 等<sup>[20]</sup> 在研究海洋中  $\text{Cr}^{3+}$  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  $\text{Cr}^{3+}$ ; 一些脂肪酸如硬脂酸、月桂酸、油酸等也可与  $\text{Cr}^{3+}$  结合, 而且不受 pH 值的影响. 在自然条件下  $\text{Cr}^{6+}$  很容易转变为  $\text{Cr}^{3+}$ <sup>[20]</sup>. 当  $\text{Cr}^{6+}$  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.  $\text{Cd}^{2+}$  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.  $\text{Hg}^{2+}$  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.  $\text{Hg}$ ,  $\text{Cd}$  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. 高浓度铬对风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羧胺的定量关系. 植物生理学通讯, 1990, (6): 55-57
- 8 Heath R L, Parder L. Photoperitration in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Bio-phy.* 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. 六价铬污染对红苜蓿产量、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. 铬对风眼莲的污染与脂质过氧化物的关系. 生态学报, 增刊, 1994(14): 141-143
- 14 黄巨富, 江志平, 骆爱平等. 含铬重组液激活部分缺失金属原子簇的铝铁蛋白的研究. 植物学报, 1995, 37(4): 281-288
- 15 Cresser. M. S and Haggitt. R. The significance of the  $\text{CrO}_4^{2-} = \text{HCrO}_4^-$  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,沈福芬. 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状. 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 Dingtian<sup>1</sup>    SHI Guoxin<sup>2</sup>    SONG Dongjie<sup>2</sup>    CHEN Weimin<sup>1</sup>

(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,  $O_2^-$