

Cd²⁺、Hg²⁺ 对菱幼苗生长及其超氧化物歧化酶、过氧化物酶活性的影响*

李大辉 施国新 亦余 周长芳 解凯彬 常福辰

(南京师范大学生物系 南京 210097)

提 要 利用不同浓度 Cd²⁺、Hg²⁺ 处理菱幼苗, 研究重金属离子对菱生长、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性的影响, 比较 Cd²⁺、Hg²⁺ 对同一植物的毒性差异。Cd²⁺、Hg²⁺ 各处理浓度均抑制菱幼苗生长, 使叶绿素含量下降, 但 Cd²⁺ 的抑制作用比 Hg²⁺ 的作用明显。Cd²⁺、Hg²⁺ 对 SOD、POD 活性有不同的影响效果: Cd²⁺ 处理最初诱导 SOD、POD 活性升高, 但随浓度加大时间延长酶活性急剧下降; Hg²⁺ 处理的酶活性变化相对平缓, 其中 5 μmol/L 和 10 μmol/L Hg²⁺ 处理的 POD 活性持续上升。实验结果表明, 在相同处理时间和浓度条件下, Cd²⁺ 比 Hg²⁺ 对菱的毒性要大。依据实验结果, 作者探讨了重金属对植物的毒害机制。

关键词 Cd²⁺, Hg²⁺, 菱, 超氧化物歧化酶, 过氧化物酶

镉、汞等重金属是环境中毒性较大的污染物, 它们可以通过食物链传递, 从而对人体健康造成威胁^①。

关于 Cd²⁺、Hg²⁺ 等重金属对植物生理生化特性的影响, 国内外已有许多研究和报道^{②~⑧}, 其中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)等酶活性受到重金属离子胁迫后的变化是近年来的研究热点^{⑨~⑪}。SOD 和 POD 在生物体内对氧自由基、过氧化物起着清除作用, 抑制自由基对膜脂的过氧化作用, 避免膜的损伤和破坏。重金属离子胁迫可诱导这些酶的活性变化, 从而可以反映出植物的受害状况。但前人这些研究多是以单一重金属离子作用来研究, 缺乏 Cd²⁺、Hg²⁺ 对同一种植物影响的比较研究。

水生高等植物可以净化水质^⑫, 作为水质监测的指示植物^⑬, 受到污染后的生理生化变化可以作为水质污染的生态学指标。因此, 对水生植物受污染的研究有着现实的意义。我们以水生维管植物——菱为研究对象, 研究 Cd²⁺、Hg²⁺ 的毒性, 探讨重金属毒害机制。

菱角(*Trapa bispinosa* Roxb.)是一年生水生植物, 果实可食, 是一种在我国各地广泛栽培的水生经济植物。

1 材料和方法

本实验所用菱角栽种于南京师范大学生物系花房。待菱角萌发后第 3 周, 将菱角采出, 水培在玻璃缸中, 所用水为自来水(不含 Cd²⁺、Hg²⁺), 并在其中加 N、P、K 等无机离子(10⁻⁸ mol/L)。缸容积 25 L。Cd²⁺、Hg²⁺ 处理浓度设置为 5、10、15、20 μmol/L, Cd²⁺ 以 CdCl₂ 配制, Hg²⁺ 以 HgCl₂ 配制。以不加 Cd²⁺、Hg²⁺ 处理为对照, 以 0 μmol/L 表示。

每隔 1 d, 在上午 8:00~10:00 定时采样, 进行以下测定(酶活性测定重复 2 次)。

收稿日: 1998-06-01, 修回日: 1998-08-05。第一作者: 男, 1972 年 12 月出生, 硕士研究生, 从事植物发育生物学研究。

* 国家自然科学基金和江苏省自然科学基金资助课题。

- (1) 植株生长量: 以幼苗鲜重(FW) g 表示。每处理随机取菱苗标记后, 隔日定时称重。
- (2) 菱苗浮水叶叶绿素含量测定: 分光光度法, 参照华东师范大学生物系编《植物生理学实验指导》(1980)。用754型分光光度计, 在波长663 nm和645 nm下测定。
- (3) 酶液制备: 取浮水叶叶片洗净、吸干、称重后, 剪碎, 加50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.8), 冰浴中研磨匀浆, 冷冻离心机(0~4) 15 000 r/min 离心20 min。上清即为酶液。
- (4) 超氧化物歧化酶(SOD) 酶活性测定: 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)光化还原法, 参照刘祖祺等编《植物抗性生理学》(1997)。560 nm 波长, 754型分光光度计比色测定。以抑制NBT光化还原50%作为1个酶活单位, 酶活性以 U/mg protein 表示。
- (5) 过氧化物酶(POD) 酶活性测定: 参照张志良编《植物生理学实验指导》(1990)。酶活性以 $\Delta A_{470}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$ 表示。
- (6) 蛋白质含量测定: 考马斯亮蓝G-250法, 参照张志良编《植物生理学实验指导》(1990)。

2 实验结果

2.1 外部形态

处理第1 d, 各株菱苗菱盘浮出水面, 浮水叶质硬, 翠绿; 此时只在茎节上有1~2 cm长的沉水叶, 其丝状裂片未长出, 仅有突起出现; 不定根须状淡绿色。Cd²⁺ 处理的第3 d, 叶片褪绿明显, 从10 $\mu\text{mol/L}$ 开始, 浮水叶出现灰绿斑, 多位于叶缘、叶尖端, 根变成棕褐色; Hg²⁺ 处理的各梯度, 浮水叶无灰绿斑, 与对照差别不大, 只有少数叶褪绿发黄。第5 d至第7 d, 对照浮水叶翠绿, 沉水叶长6~14 cm, 叶细裂如丝, 裂片长1~3 cm, 且十分密集; Cd²⁺ 处理的除5 $\mu\text{mol/L}$ 外, 从10 $\mu\text{mol/L}$ 开始, 浮水叶大多数变黑褐色, 叶柄发白, 叶片易落, 沉水叶3~5 cm长, 裂片0.05~0.1 cm长, 十分稀疏; Hg²⁺ 处理的只是浮水叶褪绿加重, 沉水叶比 Cd²⁺ 处理的生长得要好。第9 d, 对照正常生长, 浮水叶组成的菱盘增大, 顶芽出水; Cd²⁺ 处理的从10 $\mu\text{mol/L}$ 开始, 浮水叶进一步老化变黑, 整张叶呈灰黑色, 卷曲, 叶柄松软发白, 叶易落, 茎干发软, 顶芽沉入水中, 整个植株外观呈灰暗的颜色, 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理的叶出现灰绿色斑; Hg²⁺ 处理的各株均与对照差别不大, 浮水叶无坏死的病斑, 仅褪绿发黄的叶增多, 沉水叶由绿转变为黄褐色。

2.2 菱幼苗生长量

Cd²⁺、Hg²⁺ 处理对菱幼苗生长均有不同程度抑制作用, 在相同处理时间、浓度条件下, Cd²⁺ 对菱幼苗生长抑制作用比 Hg²⁺ 处理的抑制作用明显: Cd²⁺ 抑制显著性水平在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 之间, Hg²⁺ 在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 之间(表1), 至第9 d, Cd²⁺ 处理的菱幼苗比 Hg²⁺ 处理的少增长11.7%~36.3%。

表1 Cd²⁺、Hg²⁺ 处理对菱幼苗生长量的影响(5株平均值)

Table 1 Effects of Cd²⁺、Hg²⁺ on growth weight of *T. Bispinosa* seedlings (average of 5 individuals) (g/plant)

项 目 Item	0 $\mu\text{mol/L}$		5 $\mu\text{mol/L}$		10 $\mu\text{mol/L}$		15 $\mu\text{mol/L}$		20 $\mu\text{mol/L}$	
	CK	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	
处理前称重 Weight before treatment	12.235	13.580	13.062	13.683	13.058	13.266	13.090	13.692	12.896	
处理第3 d称重 Weight on the third day	12.732	14.084	13.544	14.375	13.527	13.749	13.537	14.190	13.335	
处理第5 d称重 Weight on the fifth day	14.248	15.593	15.040	15.871	15.024	15.222	15.038	15.665	14.807	
处理第7 d称重 Weight on the seventh day	16.951	17.508	17.754	17.301	17.527	16.595	17.521	16.874	17.298	
处理第9 d称重 Weight on the ninth day	21.273	21.239	21.953	18.045	21.740	17.113	21.739	17.280	20.311	
9 d后增重的百分比 Increasing rate nine days later	73.9	56.4 ^{**}	68.1 ^{***}	30.2 [*]	66.5 ^{***}	29.0 [*]	58.4 ^{**}	26.0 [*]	57.5 ^{**}	

* $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.05$.

2.3 浮水叶叶绿素含量

从表2可以看出,浮水叶叶绿素含量减少随 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 处理时间延长、浓度加大而增加; Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 处理叶绿素含量减少不同: Cd^{2+} 处理的减少($P < 0.001$)比 Hg^{2+} 处理的减少($P < 0.05 \sim P < 0.01$)更显著,最大相差 81.6% (5 $\mu\text{mol/L}$, 第 9 d)。

表 2 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 对菱幼苗浮水叶叶绿素含量的影响(5 株平均值)

Table 2 Effects of Cd^{2+} 、 Hg^{2+} on chlorophyll content of *T. bispinosa*

seedlings (average of 5 individuals) (mg/g FW)

浓度 Concen- tration ($\mu\text{mol/L}$)	第 3 d The third day		第 5 d The fifth day		第 7 d The seventh day		第 9 d The ninth day	
	Cd^{2+}	Hg^{2+}	Cd^{2+}	Hg^{2+}	Cd^{2+}	Hg^{2+}	Cd^{2+}	Hg^{2+}
0	1.288 0		1.281 2		1.277 4		1.279 6	
5	0.929 6**	1.256 0	0.484 3*	1.203 6***	0.397 6*	1.201 4***	0.136 2*	1.187 4***
10	0.715 2*	1.241 4	0.458 0*	1.142 9**	0.102 7*	1.133 5**	0.032 2*	1.066 8**
15	0.684 5*	1.211 9***	0.250 0*	0.969 0**	0.021 1*	0.913 2**	0.005 7*	0.873 2**
20	0.617 3*	1.185 7***	0.133 0*	0.798 1**	0.013 8*	0.771 6*	0.001 2*	0.717 5*

* $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.05$.

2.4 浮水叶超氧化物歧化酶(SOD)酶活性

重金属胁迫引起 SOD 活性发生改变,而对照的改变不明显(图 1); Cd^{2+} 处理的 3~5 d 均引起 SOD 活性升高, Hg^{2+} 处理 3~7 d 均引起 SOD 活性升高;到第 9 d, SOD 活性下降, 15 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 处理的已测不到活性(图 1A), Hg^{2+} 处理的仍有较高活性(图 1B)。

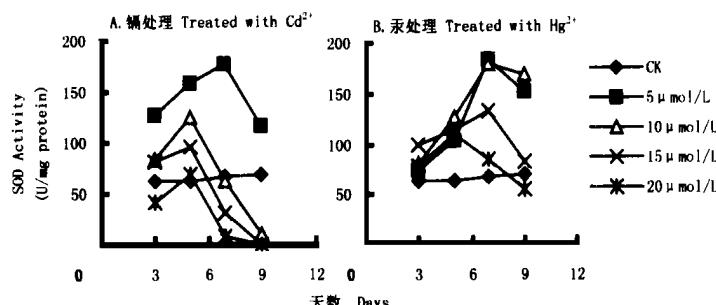
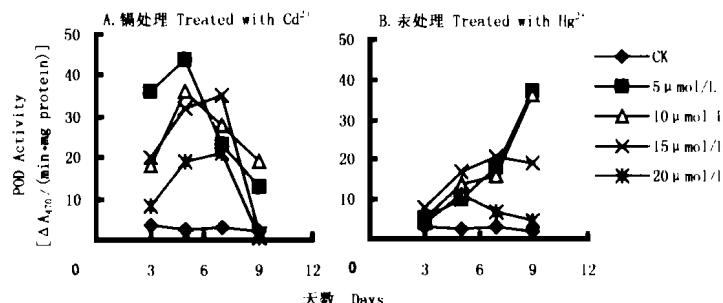


图 1 不同浓度 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 处理对浮水叶 SOD 活性的影响
Fig. 1 Effects of Cd^{2+} 、 Hg^{2+} on SOD activity of float leaf treated with different concentrations

2.5 浮水叶过氧化物酶(POD)酶活性

POD 活性的变化与 SOD 的相似, Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 处理的开始时期, POD 活性升高(图 2), 但 Cd^{2+} 处理的 POD 很快降低(图 2A), 而 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} 处理的 POD 持续上升(图 2B), 其它梯度相对缓慢下降。

图 2 不同浓度 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 处理对浮水叶 POD 活性的影响
Fig. 2 Effects of Cd^{2+} 、 Hg^{2+} on POD activity of float leaf treated with different concentrations



3 讨论

(1) 在高等植物中, 重金属的毒害主要表现在抑制植物水分的吸收和运输^[1], 抑制光合作用^[10]、呼吸作用^[2, 11], 抑制氮素代谢^[12]及细胞分裂等方面^[13]。从而使植物出现褪绿、萎黄、矮化、物候期延迟和生物量下降, 严重者致死。本实验中菱幼苗生长受到 Cd²⁺、Hg²⁺ 抑制(表 1)是光合作用、呼吸作用、蒸腾作用等方面受到破坏的综合结果, 因为它们是植物最基本的生理活动, 一旦受到抑制必然导致整个植株代谢过程紊乱, 生长发育受到影响。

(2) 叶子褪绿是植物受重金属毒害而出现的普遍现象^[5, 14]。在实验中, Cd²⁺、Hg²⁺ 处理均引起叶片褪绿(表 2)。褪绿是重金属进入叶片内积累到一定量时, 叶绿素受到破坏而发生的现象。Stobart AK^[15]等认为叶绿素含量下降的原因: 一是重金属抑制原叶绿素酸酯还原酶(protochlorophyllide reductase); 二是影响氨基-γ-酮戊酸(amino laevulinic acid) 的合成, 而这两样都是叶绿素生物合成所必需的。叶绿素含量的下降会影响光合作用, 对植物生长发育产生负面影响而出现毒害效应。

(3) 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD) 是植物抗氧化酶系统中两种重要的酶。它们在活性氧的清除、抑制膜脂过氧化等植物抗逆生理方面发挥作用。本实验中 Cd²⁺、Hg²⁺ 处理引起 SOD、POD 活性变化, 反映了重金属胁迫使活性氧自由基增多, 膜脂过氧化加剧。在低浓度 Cd²⁺、Hg²⁺ 处理时, 植物体内的 SOD、POD 受到活性氧自由基的诱导, 活性上升, 参与清除自由基; 在长时间高浓度作用后, 酶系统就会被重金属离子破坏而使 SOD 和 POD 活性下降(图 1, 图 2), 植株对自由基和过氧化物的防御能力减弱。这与前人研究结果相符^[5, 4, 16]。杨居荣等^[16]认为当 SOD 活性下降时, 多烯不饱和脂肪酸就可能过多地被过氧化, 致使一部分类囊体膜被破坏。重金属胁迫作用下, 使 SOD、POD 活性下降, 植物对自由基和过氧化物的防御能力降低, 从而受到毒害, 这也是重金属的毒性机制。

(4) 综合实验结果, 我们认为 Cd²⁺、Hg²⁺ 这两种污染物对植物危害的方式和机理不完全相同, 因此, 产生的伤害症状也是有区别的。Cd²⁺ 对菱起一种急性毒害的作用, 毒性较强, 而 Hg²⁺ 则起慢性毒害的作用, 毒性较弱。Cd²⁺ 在处理的第 3 d, 就使菱叶片很快呈现明显的病症, 出现各种坏死斑, 随处理时间延长、浓度的加大, 生长受严重影响($P < 0.001$), 整个叶片枯萎死亡($20 \mu\text{mol/L}$, 第 9 d); 在相同处理浓度、作用时间条件下, Hg²⁺ 对菱没有产生明显的毒害症状, 而随时间延长、浓度加大, 才逐渐使叶子失绿黄化, 生长受抑制和叶绿素含量减少($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 不如 Cd²⁺ 作用结果严重(表 1, 表 2)。SOD、POD 活性变化较为平缓, 其中 POD 在 $5 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$ Hg²⁺ 处理时, 活性持续升高(图 1B, 图 2B), 也体现 Cd²⁺ 比 Hg²⁺ 对菱的毒害要大。

(5) Cd²⁺、Hg²⁺ 对菱幼苗产生的不同作用, 也反映了菱对 Cd²⁺、Hg²⁺ 的耐受性不同。从图 1 和图 2 中看出, Cd²⁺ 处理的, SOD、POD 活性急剧下降, 至完全失活; Hg²⁺ 处理的, 酶活性变化相对平缓, 说明酶受到保护, 以维持受重金属干扰时的正常代谢过程, 表现对 Hg²⁺ 较强的耐受性。这种耐受差异的机制仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 王铸豪. 植物与环境. 北京: 科学出版社, 1986. 131 ~ 157
- 2 张志杰, 吕秋芳, 方芳. 水对小麦幼苗生长发育和生理功能的影响. 环境科学, 1989, 10(4): 10 ~ 13
- 3 罗立新, 靳月华. 锡胁迫对小麦叶片细胞膜脂过氧化的影响. 中国环境科学, 1998, 18(1): 72 ~ 75
- 4 宋松泉, 简伟军, 傅家瑞. Cd²⁺ 对玉米种子活力的影响及 Ca²⁺ 的拮抗作用. 应用与环境生物学报, 1997, 3(1): 1 ~ 5
- 5 Hag hiri F. Cadmium uptake by plants. *J Environ Qual*, 1973, 2: 93 ~ 96
- 6 Bazzaz F A, Rolfe G L, Carlson R M. Effect of Cd on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower. *Physiol Plant*, 1974, 32: 372 ~ 376
- 7 严重玲, 洪业汤, 傅禹珍等. Cd、Pb 胁迫对烟草叶片中活性氧清除系统的影响. 生态学报, 1997, 17(5): 488 ~ 492

- 8 陈愚, 任久长, 蔡晓明. 镉对沉水植物硝酸还原酶和超氧化物歧化酶活性的影响. 环境科学学报, 1998, 18(3): 313~317
- 9 吴玉树, 李森林. 水生维管束植物对滇池水体的净化效应. 生态学报, 1988, 8(4): 347~353
- 10 Reese R N, Roberts L W. Effects of cadmium on whole cell and mitochondrial respiration in tobacco cell suspension culture (*Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi*). *J Plant Physiol.*, 1985, 120: 123~130
- 11 Assche F V, Clijsters H. Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: Effects on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J Plant Physiol.*, 1986, 125: 355~360
- 12 Wickliffe C, Evans H J, Catter K R et al. Cadmium effects on the nitrogen fixation system of red alder. *J Environ Qual.*, 1980, 9: 180~184
- 13 段昌群, 王焕校. 重金属对蚕豆的细胞遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨. 植物学报, 1995, 37(1): 14~24
- 14 孙赛初, 王焕校, 李启任. 水生维管植物受 Cd 污染后的生理变化及受害机制初探. 植物生理学报, 1985, 1(2): 113~121
- 15 Stobart A K, Griffiths W T, Ameen-Bukhari I et al. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol Plant*, 1985, 63: 293~298
- 16 杨居荣, 贺建群, 张国祥等. 不同耐性作物中几种酶活性对 Cd 胁迫反应. 中国环境科学, 1996, 16(2): 113~117

EFFECTS OF Cd²⁺, Hg²⁺ ON GROWTH AND ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND PEROXIDASE IN *TRAPA BISPINOSA* ROXB. SEEDLINGS

Li Dahui Shi Guoxin Ding Xiaoyu Zhou Changfang Xie Kaibin Chang Fuchen

(Department of Biology, Nanjing Normal University Nanjing 210097)

Abstract Treating the Seedling of *Trapa bispinosa* using different concentrations of Cd²⁺ and Hg²⁺, the effects of Cd²⁺ and Hg²⁺ on growth and activity of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) in the species were studied. All treatments with different concentrations Cd²⁺/Hg²⁺ can inhibit growth and reduce chlorophyll content of *T. bispinosa* seedlings, but the inhibition of Cd²⁺ are more significant than that of Hg²⁺. Effects of Cd²⁺ and Hg²⁺ on activity of SOD and POD are different: treatment with Cd²⁺ can initially induce the activity of SOD and POD to rise, but with extending time and increasing concentration, the activity declines sharply; while activity of SOD and POD treated with Hg²⁺ relatively changes smoothly, in which activity of POD treated with 5 μmol/L and 10 μmol/L Hg²⁺ rises continually. Experimental results indicate that toxicity of Cd²⁺ on *T. bispinosa* seedlings is heavier than that of Hg²⁺ under the same treating time and concentration. According to the results, authors try to inquire into the toxicity mechanism of heavy metal on plants.

Key words Cd²⁺, Hg²⁺, *Trapa bispinosa* Roxb., SOD, POD