

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 卞余 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^[3, 4, 7, 8]。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^[9], 作为水质监测的指示植物^[1], 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 ΔA₄₇₀/(min·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 μmol/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 μmol/L 外, 从 10 μmol/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 μmol/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 μmol/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 株平均植)

Table 1 Effects of Cd ²⁺ 、Hg ²⁺ on growth weight of <i>T·Bispinosa</i> seedlings(average of 5 individuals) (g/ plant)											
项 目		0 μmol/L		5 μmol/ L		10 μmol/ L		15 μmol/L		20 μmol/ L	
Item		CK	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺	
处理前称重		12.235	13.580	13.062	13.683	13.058	13.266	13.090	13.692	12.896	
Weight before treatment											
处理第 3 d 称重		12.732	14.084	13.544	14.375	13.527	13.749	13.537	14.190	13.335	
Weight on the third day											
处理第 5 d 称重		14.248	15.593	15.040	15.871	15.024	15.222	15.038	15.665	14.807	
Weight on the fifth day											
处理第 7 d 称重		16.951	17.508	17.754	17.301	17.527	16.595	17.521	16.874	17.298	
Weight on the seventh day											
处理第 9 d 称重		21.273	21.239	21.953	18.045	21.740	17.113	21.739	17.280	20.311	
Weight on the ninth day											
9 d 后增重的百分比		73.9	56.4 [*]	68.1 ^{***}	30.2 [*]	66.5 ^{***}	29.0 [*]	58.4 ^{**}	26.0 [*]	57.5 ^{**}	
Increasing rate nine days later											

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

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)。

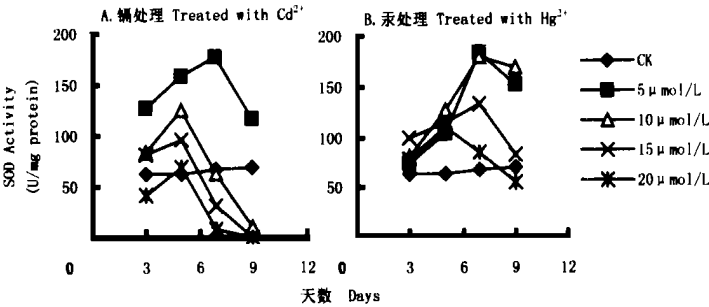


图 1 不同浓度 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 处理对浮水叶 SOD 活性的影响
Fig. 1 Effects of Cd^{2+} 、 Hg^{2+} on SOD activity of float leaf treated with different concentrations

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。

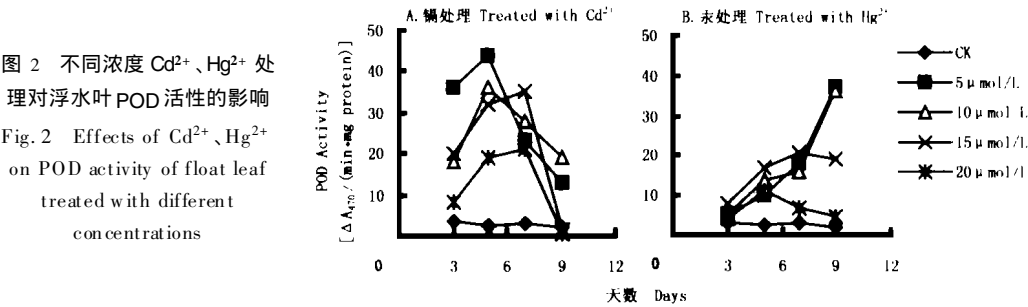


图 2 不同浓度 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 处理对浮水叶 POD 活性的影响
Fig. 2 Effects of Cd^{2+} 、 Hg^{2+} on POD activity of float leaf treated with different concentrations

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^[6], 抑制光合作用^[10]、呼吸作用^[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^[8,14]。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(aminolaevulinic 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 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^[8, 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 μmol/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 μmol/L 和 10 μmol/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. 汞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. 镉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 Wicklife C, Evens 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 Cd^{2+} 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 Cd^{2+} , Hg^{2+} 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 Cd^{2+} and Hg^{2+} , the effects of Cd^{2+} and Hg^{2+} on growth and activity of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) in the species were studied. All treatments with different concentrations Cd^{2+} , Hg^{2+} can inhibit growth and reduce chlorophyll content of *T. bispinosa* seedlings, but the inhibition of Cd^{2+} are more significant than that of Hg^{2+} . Effects of Cd^{2+} and Hg^{2+} on activity of SOD and POD are different: treatment with Cd^{2+} 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 Hg^{2+} relatively changes smoothly, in which activity of POD treated with $5 \mu\text{mol/L}$ and $10 \mu\text{mol/L}$ Hg^{2+} rises continually. Experimental results indicate that toxicity of Cd^{2+} on *T. bispinosa* seedlings is heavier than that of Hg^{2+} 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 Cd^{2+} , Hg^{2+} , *Trapa bispinosa* Roxb., SOD, POD