

Cd对萎蒿生理生化及叶片超微结构的影响

潘静娴, 戴锡玲, 宋莲花

(上海师范大学 生命与环境学院, 上海 200234)

摘要: 采用Cd砂土污染试验,研究了Cd对萎蒿生理生化特征及叶片超微结构的影响,结果表明在砂土Cd含量>180 mg/kg,萎蒿出现中毒症状,叶绿素含量、a/b值、POD含量均下降,MDA积累,膜质过氧化,叶绿体形状球形化、片层结构解体、双层膜边界模糊、嗜银颗粒增多,细胞核形状凹陷,核质分布不均匀、染色质凝胶化。低于180 mg/kg的砂土Cd浓度,萎蒿的上述生理生化指标和叶片超微结构基本正常。萎蒿可以耐受的Cd浓度不超过180 mg/kg。

关键词: 萎蒿; Cd; 生理生化; 超微结构

中图分类号: Q948.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)06-0837-05

Effects of Cd on physiology and biochemistry and leaf ultrastructure of Seleng wormwood

PAN Jing-Xian, DAI Xi-Ling, SONG Lian-Hua

(College of Biology and Environment, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: The physiology and biochemistry and leaf ultrastructure of Seleng woodworm were described in the experiment with the sandy medium polluted by Cd. The plant treated with the Cd concentration over 180 mg/kg, the assimilation of MDA and relative electricity rate and reduction of POD concentration were observed in leaves. Cd treatment was shown to damage the structure of chloroplasts, as manifested by the swelled shape and the dilation of the thylakoid membranes. Moreover, ultrastructure of cell nuclei was damaged in certain degree, such as shape deformation and nuclei distribution unevenness and chromatin gelatinization. But less than 180 mg/kg Cd, non toxicity of Seleng wormwood was showed for almost treatments, so the Cd resistance range of Seleng wormwood could not be over 180 mg/kg.

Key words: Seleng wormwood; cadmium; physiology and biochemistry; ultrastructure

Cd对生物体的毒害随着1935年日本骨痛病的出现而广泛受到重视,关于Cd造成的生理毒害和修复污染环境中Cd的研究也有不少研究报道(Jin等,2003;Bradford,1976;Seregin & Ivanov,2001;Nadakumar,1995;顾继光等,2002),尤其是Cd的生物修复技术研究已取得了一定进展,获得了不少Cd的超积累植物(Salt等,1998)。

萎蒿(*Artemisia selengensis*)是一种Cd修复植

物(潘静娴等,2006),有关萎蒿在Cd污染下的生长发育状况、耐Cd范围以及对Cd积累的阶段性差异已进行了研究,但涉及萎蒿Cd修复的生理机理如活性氧酶清除系统、叶绿体和细胞核超微结构等方面还未见文献报道。因此,本文设计了萎蒿的Cd污染砂土试验,探索萎蒿在Cd污染下的生理生化和叶片超微结构变化,为进一步证实萎蒿是一种Cd耐受植物提供理论依据。

收稿日期: 2006-10-30 修回日期: 2007-07-05

基金项目: 上海市教委基金(04DB12)[Supported by Education Department of Shanghai City(04DB12)]

作者简介: 潘静娴(1963-),女,湖南湘潭县人,博士,副教授,从事园艺产品安全性研究。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

植物材料为市售的南京白蒿,栽培一季留种。盆栽介质为过筛的清洁河砂。

1.2 试验方法

试验于2003年12月到2004年9月在上海师范大学塑料大棚中进行。称取清洁河砂,每盆800g,按0、20、40、60、80、100、120、140、160、180、200、240 mg/kg的浓度分别添加CdCO₃,制成不同含Cd量的人工污染河砂基质12个处理,重复3次,总计36个处理。污染河砂混匀装盆后,少量灌溉使含水量为田间持水量的65%~75%,直接将插条扦插盆中,每盆2株,于育苗棚内进行生根培养,成活后将所有扦插盆搬至栽培大棚内培养。生长期每天用电子称称重或加入相同体积的蒸馏水保持砂土含水量为65%~75%。新枝萌发后,于生长前期(1月下旬)、中期(3~4月)和后期(7~8月)取样测定叶片叶绿素、相对电导率、POD和MDA含量。生长中期分别取0、60、100、140、180和240 mg/L处理的嫩叶,田间固定后带回实验室,透射电镜制样,观察并拍照。

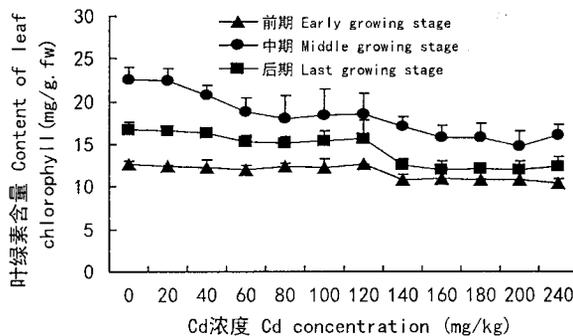


图1 Cd对萎蒿叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effect of Cd concentration on the chlorophyll content of Seleng wormwood

Cd浓度对叶绿素a/b的影响基本与叶绿素的相似,但影响的范围不同。在0~240 mg/kg范围内,生长的前期、中期和后期的叶绿素a/b基本呈现0、20、40、60、80、100、120、140、160 mg/kg > 180、200、240 mg/kg的趋势,0~160 mg/kg处理间和180~240 mg/kg处理间的差异不显著,显著降低叶绿素a/b的砂土Cd浓度为180 mg/kg,尤其是前期的叶绿素a/b值。此外,在试验时间内,无论Cd浓

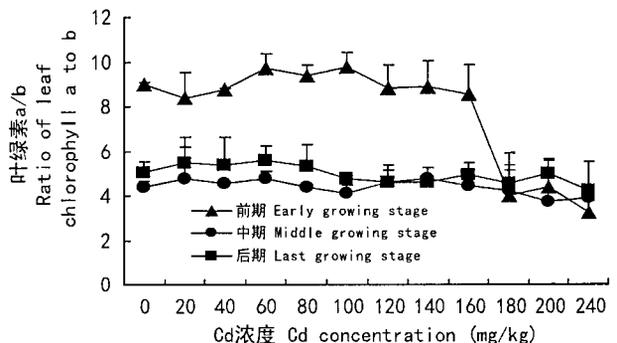
1.3 测定方法

叶绿素含量采用1:1的丙酮醋酸浸提法测定(潘静娴等,2003);MDA采用硫代巴比妥酸比色法(邹琦,2003)测定;质膜透性采用电解质外渗量法测定(刘祖祺等,1994);POD采用参考文献(刘祖祺等,1994)的方法测定。

2 结果与分析

2.1 Cd对萎蒿叶片叶绿素含量和叶绿素a/b的影响

无论是生长的前期、中期还是后期,不同浓度Cd对萎蒿叶绿素含量的影响显著,达到了F_{0.05}显著水平。从图1可以看出,随着砂土Cd浓度从20 mg/kg增加到240 mg/kg,叶绿素含量呈现0、20、40、60、80、100、120 mg/kg > 140、160、180、200、240 mg/kg的趋势,但0~120 mg/kg的处理间,140~240 mg/kg处理间差异不显著。说明Cd浓度超过140 mg/kg后才引起叶绿素含量的下降,但生长上叶片并未发生明显的黄化现象。此外,无论Cd浓度高低,萎蒿叶绿素含量均为生长的中期大于后期,后期大于前期,原因可能与前期萎蒿处于苗期,叶绿素积累少;后期叶面积增大,又引起单位面积叶绿素含量下降有关。



度高低,叶绿素a/b均为生长前期最高,中、后期低,但两者差异不明显。

2.2 Cd对萎蒿叶片MDA和细胞质膜透性的影响

MDA是生物膜系统脂质过氧化产物之一。它在细胞内浓度的大小表示脂质过氧化强度和膜系统受伤害的程度,是逆境生理的一个重要指标。从生长阶段看,MDA显著增大是在生长后期,生长前期和中期的MDA水平相对较低(图2),表明Cd对萎

萹蒿的毒害作用需要一段时间才会表现出来,也说明萹蒿对 Cd 有一定的耐受性。从不同 Cd 浓度看,在生长前期和中期,随着 Cd 浓度的增大,MDA 的积累并不显著;只有进入生长后期,当河砂中 Cd 达

180 mg/kg 时,细胞中 MDA 的积累才显著增加。可见,Cd 对萹蒿生长前期和中期的膜系统影响不大,膜系统仍然保持良好功能,后期才受到 Cd 的毒害,而且引起膜伤害的 Cd 浓度高达 180 mg/kg。

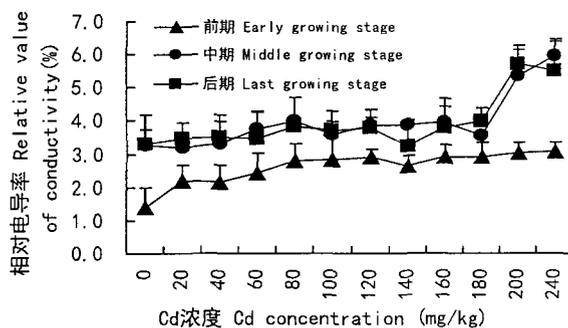
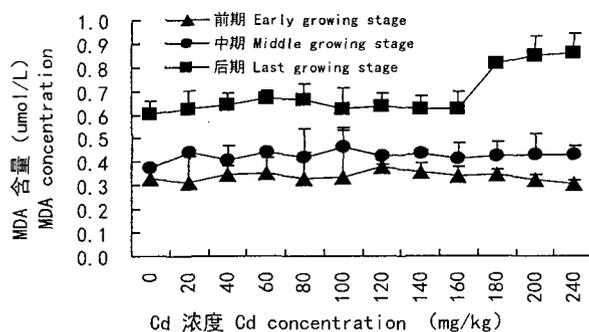


图 2 Cd 对萹蒿叶片 MDA 和细胞质膜透性的影响

Fig. 2 Effect of Cd concentration on MDA and cell membrane permeability of Seleng wormwood

质膜透性通常用相对电导率表示。不同生长时期的萹蒿叶片相对电导率并不简单地随 Cd 浓度的增加而增大(图 2)。生长前期,除对照外(差异不显著),其它处理的相对电导率大小基本相同,曲线平稳;生长的中期和后期,只有当河砂中 Cd 浓度大于 180 mg/kg 后,相对电导率才有显著增加。因此,Cd 浓度对萹蒿质膜透性的不利影响要到萹蒿生长的中期和后期才会出现,而且 Cd 浓度要超过 180 mg/kg。表明萹蒿对 Cd 具有较强的抗性,是一种 Cd 耐受性强的植物。

2.3 Cd 对萹蒿叶片 POD 活性的影响

过氧化物酶(POD)是植物体内活性氧防御系统的重要酶之一,其活性大小可以表示植物遭受逆境胁迫的程度和植物抗性的强弱。图 3 显示,无论是生长的前期、中期还是后期,随着 Cd 浓度从 20 mg/kg 增加到 240 mg/kg,萹蒿叶片 POD 活性均呈先上升,再下降的变化趋势。引起 POD 含量显著下降的砂土 Cd 含量为 180 mg/kg。此外,从时间变化看,POD 活性随着萹蒿受 Cd 毒害时间的延长而增大,后期最大、中期和前期较低,但后两者差异不显著。上述现象说明了高浓度 Cd 引起体内产生活性氧,造成萹蒿后期 MDA 的增加以及膜质过氧化,但萹蒿在一定浓度 Cd 时,体内的 POD 活性提高,能够清除活性氧,保证萹蒿免受 Cd 的毒害。POD 的增加可能是萹蒿耐受高浓度 Cd 的机制之一。

2.4 Cd 对萹蒿叶片超微结构的影响

2.4.1 叶绿体超微结构 不同浓度 Cd 对萹蒿叶绿

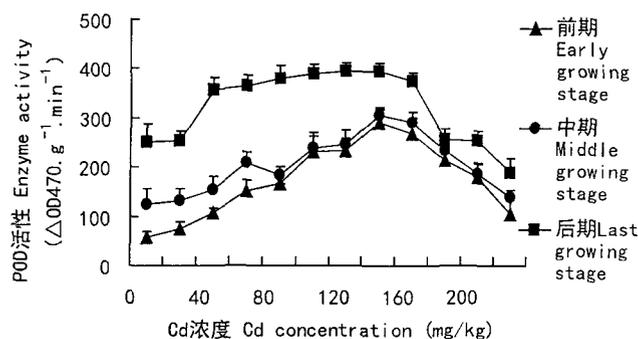
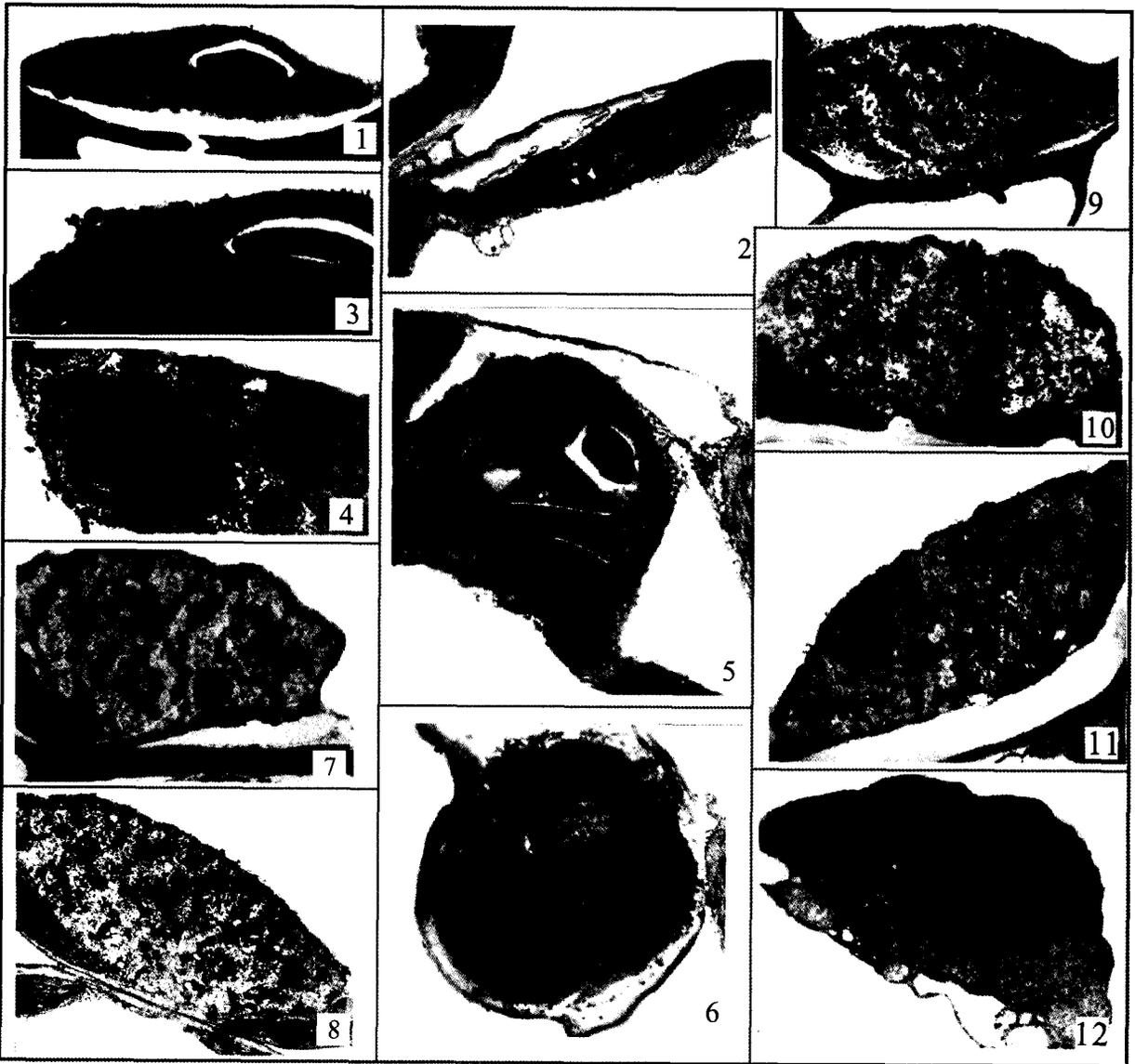


图 3 Cd 浓度对萹蒿 POD 的影响

Fig. 3 Effect of Cd concentration on POD of Seleng woodworm

体超微结构的影响与前述生理生化指标有较好的相关性。对照叶绿体超微结构保持完好,叶绿体形状呈椭圆形;类囊体片层排列整齐,双层膜完整清楚。60 mg/kg 和 100 mg/kg 的 Cd 处理,萹蒿叶绿体超微结构与对照相比,没有明显差异,结构完整清楚。Cd 浓度达到 140 mg/kg 时,萹蒿叶绿体呈现一定的受害症状,表现为部分叶绿体形状球形化,片层结构解体,嗜银颗粒相对增多,但多数叶绿体仍保持较好的结构。Cd 浓度为 180 mg/kg 和 240 mg/kg 的两个处理,叶绿体超微结构破坏严重,球形化,双层膜分辨不清,而且局部有损坏;类囊体片层解体,排列紊乱(图版 I)。叶绿体超微结构的变化充分说明了萹蒿在 Cd 浓度大于 180 mg/kg 下,才会受到 Cd 的毒害,低于该浓度,具有较好的抗性。



图版 I 不同 Cd 浓度下的萎蒿叶绿体和叶片细胞核超微结构
 Plate I Chloroplast ultrastructure and cell nuclei ultrastructure of leaves of Seleng woodworm under different Cd concentrations

1,7. 对照, ×10k; 2,8. 60 mg/kg 处理, ×10k; 3. 100 mg/kg 处理, ×20k; 4. 140 mg/kg 处理, ×17k; 5,11. 180 mg/kg, ×10k; 6. 240 mg/kg 处理, ×12k; 9. 100 mg/kg 处理, ×10k; 10. 140 mg/kg 处理, ×10k; 12. 240 mg/kg 处理, ×15k. k=1 000. ch. 叶绿体; gl. 基粒片层; s. 淀粉粒; p. 嗜银颗粒; N. 细胞核; Nm. 核膜; Nu. 核仁。

2.4.2 叶片细胞核超微结构 不同 Cd 浓度处理对萎蒿叶片细胞核有一定影响。对照细胞核形状规则,核质分布均匀,核仁清晰,核膜完整;60、100、140 和 180 mg/kg 的 4 个处理,形状规则,核质分布相对均匀,核膜边界完整清楚,但核仁消失,且 180 mg/kg 的 Cd 处理,核质有凝胶化发生;当 Cd 浓度达到 240 mg/kg 时,细胞核结构发生较大变化,形状发生凹陷,核膜不清晰,核仁消失,核质分布不均匀,染色质凝胶化,电

子密度增大,细胞核受到破坏。从细胞核来看,Cd 对萎蒿细胞的毒害浓度要达到 180 mg/kg 才会产生,与叶绿体超微结构变化有较大的吻合性。

3 讨论

重金属尤其是 Cd 对植物的毒性主要表现在以下几个方面:细胞内的重金属离子不仅能与酶活性中心

或蛋白质中的-SH 结合,而且取代金属蛋白中的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 等必需元素,引起物质分子结构发生改变(陈平等,2002);造成叶绿体和细胞超微结构发生改变(袁祖丽等,2005;Stoyanova & Tchakalova,1999);抑制或降低叶绿素合成酶的合成活性(Padmaja 等,1990;Stobart & Prasad,1985),影响叶绿素分子整合成色素蛋白复合体的过程(Horvath 等,1996),降低叶绿素含量及其 a/b 值(魏海英等,2003),最终导致植物发生代谢异常,产生毒害症状,甚至死亡。但是,Cd 超积累植物对 Cd 却表现抗性,源于这些植物体内具有抵抗 Cd 毒性的防御机制,如 Cd 在叶片中呈细胞区隔化分布,印度芥菜就是将 Cd 贮藏在叶片表皮毛中来解毒的(Salt 等,1995);与亲和性强的的大分子物质形成络合物,降低毒性(Gill,1985);诱导活性氧防御系统的产生,通过 SOD、POD 和 CAT 的共同作用,清除 Cd 造成的膜质过氧化产生的自由基,保护生物膜(徐勤松等,2001)。

本文证实萎蒿对 Cd 污染具有抗性机制,在 20~180 mg/kg 河砂 Cd 内,萎蒿体内的活性氧酶清除系统的 POD 发生作用,与 SOD 协同作用,有效清除了 Cd 引起的膜质过氧化产生的自由基,使萎蒿叶片叶绿体和细胞核超微结构未受损伤,叶绿素含量(显著降低的 Cd 浓度为 140 mg/kg 以上)及其 a/b 值没有降低,因此,萎蒿仍然能保持正常生长状态。但是,当砂土 Cd 浓度超过 180 mg/kg,萎蒿体内的 Cd 解毒机制效应降低,植株呈现一定的中毒症状。是否产生了金属络合蛋白 PC 还有待进一步研究。总之,试验从机理上证实了萎蒿确实是一种 Cd 耐性的植物。

参考文献:

- 刘祖祺,张石城. 1994. 植物抗性生理学[M]. 北京:中国农业出版社
- 邹琦. 2003. 植物生理学试验指导[M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版社
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantity of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, **72**:248-254
- Chen P(陈平), Yu SY(余土元), Ye LM(叶丽敏). 2002. Effects of Cd stress on growth and some physiological characteristics of weeping Lovegrass seedlings(镉胁迫对弯叶画眉草幼苗生长和生理特性的影响)[J]. *Acta Agrestia Sin*(草地科学), **10**(3): 212-216
- Gu JG(顾继光), Zhou QX(周启星). 2002. Cleaning up through phytoremediation; review of Cd contaminated soils(镉污染土壤的治理及植物修复)[J]. *Ecol Sci*(生态科学), **21**(4):352-356
- Gill E. 1985. Phytochelatins; the principal heavy metal complexing peptides of higher plants[J]. *Science*, **230**:674-676
- Horvath G, Droppa M, Oravec A, et al. 1996. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium-poisoned barley leaves[J]. *Planta*, **199**:238-243
- Jin YH, Clark AB, Slebose RJC, et al. 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair[J]. *Nature Genetics*, **34**:326-329
- Nadakumar PBA. 1995. Phytoextraction; The use of plant to remove heavy metals from soil[J]. *Environ Sci Tech*, **29**:1 232-1 238
- Pan JX(潘静娴), Li XG(李新国), Shen J(沈健), et al. 2006. Growth and Cd accumulation of Seleng wormwood in Cd-contaminated sandy soil(Cd 污染下萎蒿生长和 Cd 积累特性的研究)[J]. *Soils(土壤)*, **38**(2):181-185
- Pan JX(潘静娴), Huang DF(黄丹枫), Wang SP(王世平), et al. 2003. Study on growing media pH growth and photosynthetic characteristics of muskmelon seedlings(甜瓜幼苗生长及光合特性与育苗基质 pH 相关性研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), **21**(6):497-502
- Padmaja K, Prasad ARK. 1990. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* seedlings by cadmium acetate[J]. *Photosynthetica*, **24**:339-405
- Seregin IV, Ivanov VB. 2001. Physiological aspects of Cadmium and Lead toxic effects on higher plants[J]. *Russian J Plant Physiology*, **48**(4):523-544
- Stoyanova A, Tchakalova E. 1999. Cadmium induced ultrastructure changes in shoot apical meristem of *Elodea canadensis* Rich [J]. *Photosynthetica*, **37**(1):47-52
- Stobart AK, Griffiths WT, Ameen-Bukharil, et al. 1985. The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley [J]. *Physiol Plant*, **63**:293-298
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, et al. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard[J]. *Plant Physiol*, **109**:1 427-1 433
- Salt DE, Smith RD, Raskin I. 1998. Phytoremediation[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**:643-668
- Xu QS(徐勤松), Shi GX(施国新), Du KH(杜开河). 2001. Effect of Cd stress on the system of resistance to oxidation and microstructure of plantain(镉胁迫对水库车前叶片抗氧化酶系统和显微结构的影响)[J]. *Agric Ecol Environ*(农业生态环境), **17**(2):48-51
- Wei HY(魏海英), Fang YM(方炎明), Yin ZF(尹增芳). 2003. Effects of Pb, Cd single and joint pollution on some physiological characters of *Hypnum revolutum*(Pb, Cd 单一及复合污染对弯叶灰藓某些生理特性的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **23**(1):69-72