

Cd对槐叶苹的生理影响及外源 La、Ca的缓解效应比较

胡金朝, 施国新, 王学, 徐勤松, 马广岳, 王春涛

(南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210097)

摘要: 研究了 Cd^{2+} 毒害对低等水生植物槐叶苹的生理影响及外源 La、Ca 的缓解效应。结果表明, Cd^{2+} 污染时, 槐叶苹叶片出现褪绿、叶缘拳卷并伴有烂斑和根状叶断离现象。随着 Cd^{2+} 浓度的升高, 叶片的叶绿素含量、SOD、CAT、POD 活性先升后降, 但各指标达到最大值时的 Cd^{2+} 浓度各不相同, 以 POD 对应的最高。可溶性蛋白含量及丙二醛(MDA)产量分别呈现出下降和上升趋势, 且可溶性蛋白含量受 Cd^{2+} 的影响更大。外源 La 和 Ca 均能缓解 Cd^{2+} 对槐叶苹叶片叶绿素含量、可溶性蛋白含量的降低和 MDA 的积累, 对保护酶系统的影响存在较大差异。

关键词: 镉; 钙; 镉; 缓解; 槐叶苹

中图分类号: Q945.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)02-0156-05

Physiological effect of cadmium on *Salvinia natans* and comparison of the detoxication of exogenous lanthanum and calcium against it

HU Jin-zhao, SHI Guo-xin, WANG Xue, XU Qin-song,
MA Guang-yue, WANG Chun-tao

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The paper mainly studied the effects of La and Ca on low aquatic plant *Salvinia natans* growing in the solution containing different concentration of Cd. The results showed that the leaves of *Salvinia natans* lost green color, leaf margin twisted following with spoil spots and root-like leaf broke when Cd polluting. With the increasing of Cd concentration, the chlorophyll content, SOD, CAT and POD activities of the leaves increased first and decreased afterwards, but the Cd concentration was different when they reached maxima respectively, it was the highest when POD activity reached maxima. The soluble protein and MDA contents appeared decrease and increase trend respectively and the toxic effect of Cd on the soluble protein content was heavier than that on the MDA content. Exogenous La and Ca could alleviate the decrease of chlorophyll and soluble protein contents and the accumulation of MDA caused by Cd stress. The effect of La and Ca on protective enzyme system was much different.

Key words: La; Ca; Cd; mitigate; *Salvinia natans*

镉(cadmium)是环境中主要的重金属污染物之一, 不仅毒性大, 蓄积性强, 被植物体吸收和富集后

阻滞植物生长发育(Hart等, 1998), 而且能通过食物链危及动物和人类健康(Sugiyama, 1994)。近年

收稿日期: 2004-03-08 修订日期: 2004-05-18

基金项目: 国家自然科学基金(30370083); 江苏省教育厅自然科学基金(12003600JSJB131)。

作者简介: 胡金朝(1972-), 男, 河南兰考人, 博士生, 讲师, 主要研究重金属对高等水生植物的毒害。

来,有关镉对植物的影响已有大量报道(段昌群等,1991;Kneer 等,1992),但有关槐叶苹的 Cd^{2+} 毒害及其缓解研究未见报道。本文取蕨类水生植物槐叶苹(*Salvinia natans*)为材料,研究了不同浓度 Cd^{2+} 毒害下槐叶苹的形态特征、生理变化及外源 La 与 Ca 的缓解效应。以期能深入了解重金属毒害植物的机理并为植物抗重金属胁迫机制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所用槐叶苹采自南京师范大学生科院水生植物培育池和南京市江心洲。选取长势良好的植株置于实验室无底泥的水缸中,用自来水培养 3 d。然后分成两组,一组分别移入含有 2、4、6、8、10、20 mg/L $CdCl_2$ (以纯 Cd 计)的培养液中作毒害实验,

以不加 $CdCl_2$ 的作对照(用 0 mg/L 表示);另一组分别移入如表 1 所示的各缓解培养液中,另取两缸分别含 6 mg/L 与 10 mg/L 的单一 $CdCl_2$ (以纯 Cd 计)的培养液作缓解对照。两组材料均培养在 Forma 3744 全封闭培养箱中,光照强度 $70 \mu m^{-2} \cdot s^{-1}$,光暗周期 14/10 h,温度 D:N=25:20 $^{\circ}C$ 。观察槐叶苹的毒害症状,第三天取样分析。

1.2 实验方法

叶绿素含量的测定参照张志良的方法(张志良,1990),单位 mg/gFW;可溶性蛋白含量用考马斯亮蓝 G-250 法,以牛血清蛋白为标准蛋白(Bradford,1976);过氧化氢酶(CAT)活性用 CAT 试剂盒测定(波钦诺克,1981),其活性单位定义为:1 g 植物材料 1 s 分解 $1 \mu mol H_2O_2$ 的 CAT 量为一个活力单位,记为 U/gFW;超氧化物歧化酶(SOD)活性用 SOD 试剂盒测定,以每 1 mL 反应液中 SOD 抑制率

表 1 各缓解培养液设计

Table 1 Design of each mitigating solution

Cd^{2+}	$Cd^{2+} + La^{3+}$ (mg/L)					$Cd^{2+} + Ca^{2+}$ (mmol/L)				
6	6+0	6+3	6+6	6+9	6+12	6+0	6+5	6+10	6+15	6+20
10	10+0	10+3	10+6	10+9	10+12	10+0	10+5	10+10	10+15	10+20

达 50%时所对应的 SOD 量为一个亚硝酸盐单位,用 NU/gFW 表示;过氧化物酶(POD)活性用愈创木酚比色法测定(Maehly,1955),以每 1 min 吸光度的变化值表示酶活大小,单位 $\Delta D_{470} \cdot min^{-1} \cdot g^{-1}$;丙二醛(MDA)含量按 Heath 等的硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定(Heath 等,1968),单位 b/nmol. g^{-1} 。各实验数据重复 3 次,取平均值。

2 结 果

2.1 Cd^{2+} 对槐叶苹叶形态的影响

对照组槐叶苹长势良好,叶片鲜绿,富有光泽。 Cd^{2+} 处理 3 d 后,从 6 mg/L 开始随着 Cd^{2+} 浓度升高叶片逐渐失绿,8 mg/L Cd^{2+} 叶缘开始拳卷,部分根状叶脱离, Cd^{2+} 浓度越高,卷叶现象越明显。 Cd^{2+} 处理 5 d 后,4 mg/L Cd^{2+} 处理的槐叶苹叶片已明显失绿,少许叶片出现黑色烂斑,8 mg/L 以上 Cd^{2+} 毒害使叶片失绿严重,出现大量烂斑且叶缘呈干枯状拳卷,同时出现大量根状叶脱离。8 mg/L Cd^{2+} 处理 6 d 的植株移至花房水池中生长正常,10 mg/L 以上浓度处理的逐渐死亡。

2.2 La^{3+} 、 Ca^{2+} 对 Cd^{2+} 胁迫下槐叶苹叶片叶绿素含量的影响

低浓度 Cd^{2+} 处理下,叶绿素含量上升,4 mg/L 时为对照的 105.7%,6 mg/L 时为对照的 121.9%,但随着 Cd^{2+} 浓度增加,叶绿素含量逐渐减少,10 mg/L 时下降为对照的 86.9%,20 mg/L 时只有对照的 57.3%(图 1)。 Cd^{2+} 与 La^{3+} 或 Ca^{2+} 复合后处理,叶绿素含量均呈下降趋势。在较低 Cd^{2+} 浓度(6 mg/L)下,加入的 La^{3+} 和 Ca^{2+} 浓度分别为 3 mg/L 与 5 mmol/L 时叶绿素含量分别接近对照,较高 Cd^{2+} 浓度时(10 mg/L),与之组合的 La^{3+} 与 Ca^{2+} 均使叶绿素含量进一步降低(图 1)。

2.3 La^{3+} 、 Ca^{2+} 对 Cd^{2+} 胁迫下 SOD、CAT、POD 活性的影响

从表 2 可知,在不同浓度 Cd^{2+} 胁迫下,槐叶苹叶片中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及过氧化物酶(POD)活性均呈现先应激性升高然后降低的变化趋势,但三种酶活达最高时对应的 Cd^{2+} 浓度不同,POD、SOD、CAT 活性最高时的 Cd^{2+} 浓度分别为 8 mg/L、4 mg/L 与 2 mg/L。 Cd^{2+} 浓度为 10 mg/L 时,与之复合的 La^{3+} 使 SOD、

POD 活性升高后降低,使 CAT 活性降低;Ca²⁺ 使 SOD 活性先升后降而使 POD、CAT 活性下降。在较低浓度(6 mg/L)Cd²⁺ 胁迫下,与之复合的 La³⁺

和 Ca²⁺ 均使 SOD 活性升高、使 POD 活性降低,对 CAT 活性的影响不同:La³⁺ 使 CAT 活性升高,Ca²⁺ 使 CAT 活性升高后降低。

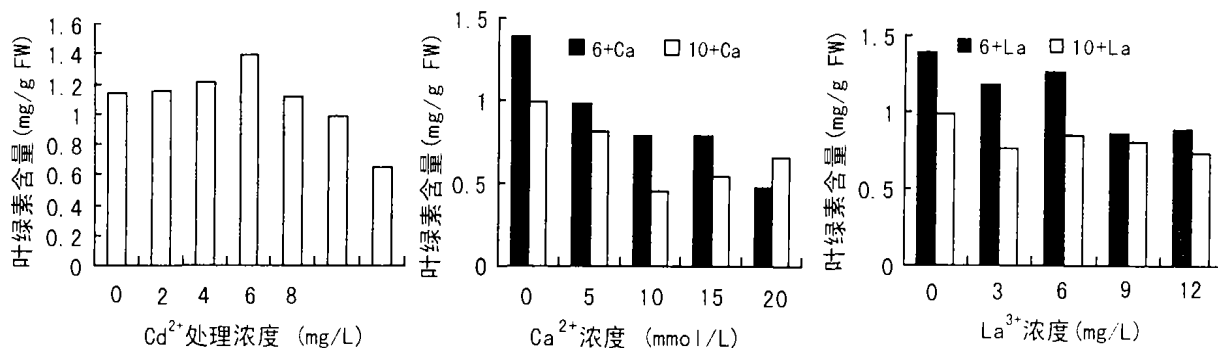


图 1 Cd²⁺ 污染、外源 Ca²⁺、外源 La³⁺ 对叶绿素含量的影响
Fig. 1 Effects of Cd²⁺, exogenous Ca²⁺, exogenous La³⁺ on chlorophyll content

表 2 La³⁺、Ca²⁺ 对 Cd²⁺ 胁迫下 SOD、CAT、POD 活性的影响
Table 2 Effects of La³⁺ and Ca²⁺ on SOD, CAT, POD activities under Cd²⁺ stress

Cd ²⁺ 浓度	SOD 活力	CAT 活力	POD 活力	Cd ²⁺ + La ³⁺ 浓度			Cd ²⁺ + Ca ²⁺ 浓度				
				SOD 活力	CAT 活力	POD 活力	SOD 活力	CAT 活力	POD 活力		
0	979.5	708.1	10.4	6+3	1 190.1	657.0	25.4	6+5	1 192.3	732.3	9.3
2	1 130.3	731.7	11.6	6+6	1 283.7	796.1	15.1	6+10	1 117.4	457.4	7.4
4	1 206.1	647.1	12.6	6+9	1 454.2	718.4	16.5	6+15	1 382.9	351.5	5.3
6	1 132.5	636.7	25.4	6+12	1 374.6	751.7	13.1	6+20	1 270.6	291.3	5.8
8	1 107.4	668.3	32.5	10+3	1 850.0	437.2	26.5	10+5	1 900.4	340.9	20.3
10	1 032.3	674.1	22.4	10+6	1 817.1	404.7	11.9	10+10	1 991.9	317.4	11.1
20	358.0	509.4	17.4	10+9	1 714.4	479.4	9.3	10+15	2 243.8	354.2	26.9
				10+12	1 705.2	325.2	7.6	10+20	1 675.2	350.7	7.1

注: Cd²⁺, La³⁺ 的单位为 mg/L; Ca²⁺ 的单位为 mmol/L。

2.4 La³⁺、Ca²⁺ 对 Cd²⁺ 胁迫下 MDA 含量的影响

膜脂过氧化产物 MDA 含量是细胞膜受伤害程度的重要指标之一,槐叶苹叶片中 MDA 含量随着 Cd²⁺ 胁迫浓度的加大而呈升高趋势。20 mg/L 处理的 MDA 含量为 0.026 8 nmol/g,是对照含量的 1.6 倍(图 2)。在较低浓度(6 mg/L)Cd²⁺ 胁迫下,La³⁺ 与 Ca²⁺ 使 MDA 含量升高后降低,Cd²⁺ 胁迫浓度较高(10 mg/L)时,3~12 mg/L La³⁺ 与 5~20 mmol/L 的 Ca²⁺ 均使 MDA 含量升高,表明 La³⁺ 与 Ca²⁺ 对 Cd²⁺ 毒害引起的 MDA 含量升高有类似的缓解效果(图 2)。

2.5 La³⁺、Ca²⁺ 对 Cd²⁺ 胁迫下细胞可溶性蛋白含量的影响

可溶性蛋白受 Cd²⁺ 的影响较大,随处理浓度的增大而持续下降。6 mg/L 与 10 mg/L 处理分别使

含量降低了 24.7% 和 58.1%,20 mg/L Cd²⁺ 处理时几乎测不到其存在(图 3)。缓解结果表明,3~6 mg/L La³⁺ 在较低浓度(6 mg/L)Cd²⁺ 胁迫下使可溶性蛋白含量进一步降低,9 mg/L 时则升高为对照的 104%。La³⁺ 在较高浓度(10 mg/L)Cd²⁺ 胁迫下对可溶性蛋白含量的影响与 Ca²⁺ 相似,均是使蛋白含量升高后降低(图 3)。

3 讨论

在研究中发现槐叶苹在低浓度 Cd²⁺ 毒害下,叶片中叶绿素含量应激性升高,表明低浓度 Cd²⁺ 能刺激叶绿素合成,这可能是植物的一种保护性适应现象。而高浓度处理时叶绿素含量下降,并最终导致叶片失绿。孙赛初等(1985)的实验表明,叶片褪绿

是植物受重金属毒害后出现的普遍现象。叶绿素含量下降的原因, Stobart 等(1985)认为一是重金属抑制原叶绿素酸酯还原酶(protochlorophyllide reductase)活性,二是影响氨基-酮戊酸(aminolaevulinic acid)的合成,这二者分别是叶绿素合成所必需的酶和原料。另外,叶绿素含量的下降还可能与 Cd²⁺ 在细胞内局部积累过多,与叶绿体中蛋白质上的一SH

基结合,或取代其中的 Fe²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺等,破坏了叶绿体结构和功能活性有关(孙赛初等,1985)。图 1 表明, Cd²⁺ 浓度较低(6 mg/L)时,与之组合的 La³⁺ 与 Ca²⁺ 均能缓解 Cd²⁺ 造成的叶绿素含量升高,从而稳定叶绿素的正常水平。而当 Cd²⁺ 浓度较高时(10 mg/L),与之组合的 Ca²⁺ 使叶绿素含量进一步降低,说明 Ca²⁺ 在 Cd²⁺ 浓度较高时并不具备

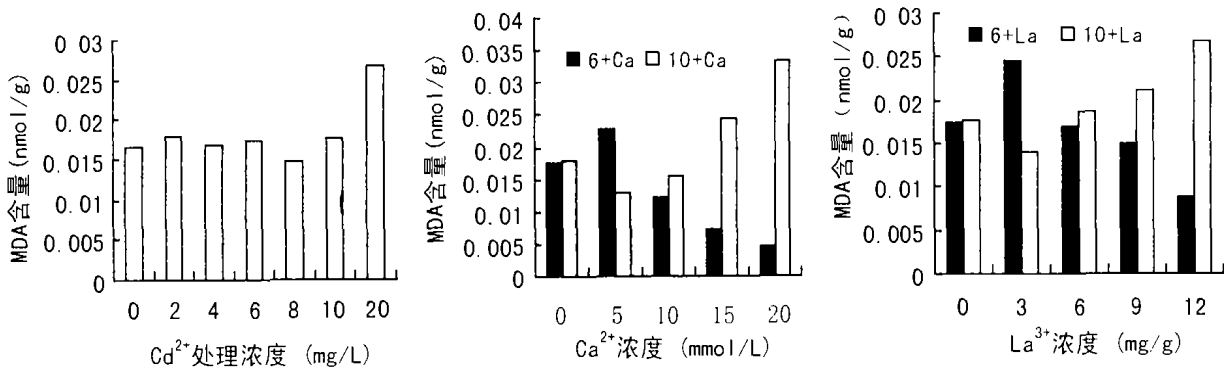


图 2 Cd²⁺ 污染、外源 Ca²⁺、外源 La³⁺ 对 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effect of Cd²⁺, exogenous Ca²⁺, exogenous La³⁺ on MDA content

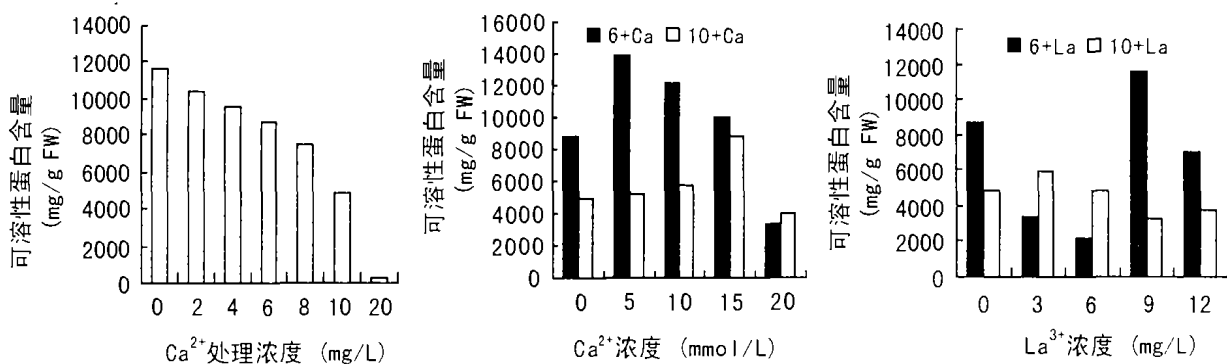


图 3 Cd²⁺ 污染、外源 Ca²⁺、外源 La³⁺ 对可溶性蛋白含量的影响

Fig. 3 Effect of Cd²⁺, exogenous Ca²⁺, exogenous La³⁺ on soluble protein content

明显的缓解效应而是加剧了对叶绿素的破坏。与之相似,在 Cd²⁺ 浓度较高时任何浓度的 La³⁺ 也无明显的缓解效应。

SOD、CAT、POD 等是植物体内抗氧化酶系统中几种主要的保护酶,它们在重金属胁迫中所起作用已得到许多证明(周长芳等,2001)。SOD 能以 O₂⁻ 为基质进行歧化反应: 2O₂⁻ + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂, 从而起到清除植物体内 O₂⁻ 的作用, CAT 和 POD 则负责清除 H₂O₂ 和其它氧自由基(Scandalios, 1993)。在正常情况下,植物体内产生和清除 O₂⁻ 的能力处于动态平衡(罗广华等,1989)。在 Cd²⁺ 胁迫

下,槐叶苹叶片中 SOD、CAT、POD 活性随着污染程度的加剧先应激性升高然后降低(表 2),表明在受害较轻的情况下,槐叶苹体内活性氧增多,诱导了抗氧化酶活性升高,在一定程度上减轻了自由基对膜的伤害。而在受害较重的情况下,超过了防御反应的限度,植物体结构破坏,酶活性降低,这时槐叶苹体内清除活性氧的能力减弱, O₂⁻ 和 H₂O₂ 等活性氧自由基就会大量积累,从而加剧膜脂过氧化程度,最终使膜结构和功能受到破坏,这也是重金属毒害植物的主要原因。Cd²⁺ 浓度为 6 mg/L 时,与之复合的 La³⁺ 能提高 SOD、CAT 活性而降低 POD 活

性;Ca²⁺使SOD活性升高,POD活性降低,CAT活性升高后降低。表明槐叶苹在受害较轻的情况下,La³⁺和Ca²⁺能通过提高植物的抗氧化酶活性,有效清除因胁迫而增多的活性氧,从而一定程度上减轻了自由基对膜的伤害。当Cd²⁺胁迫浓度较高(10 mg/L)时,虽然与之复合的La³⁺和Ca²⁺能使SOD活性有所升高,但CAT和POD活性却呈下降趋势,表明这时植物自身的保护酶功能发生紊乱,清除O₂⁻等自由基的整体反应已不协调。因此La³⁺和Ca²⁺缓解Cd²⁺对植物的毒害是有一定限度的,它们只能在一定Cd²⁺浓度范围内起作用。

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化主要产物之一,其含量可用以表示膜脂过氧化的程度(Chris等,1992)。槐叶苹叶片中MDA含量随着Cd²⁺胁迫浓度的加大而升高,表明膜脂过氧化程度加剧,这与植物体清除活性氧的能力减弱是一致的。从图3可以看出,Cd²⁺胁迫可导致可溶性蛋白含量下降,这可能有两方面原因,一是Cd²⁺进入细胞后促进了蛋白水解酶的活性,加强了原有蛋白质分解;二是Cd²⁺对蛋白合成的众多酶系均有毒害和纯化作用,并且会使蛋白质合成的相关细胞器受到损伤,抑制了新蛋白的合成。我们的实验结果表明,可溶性蛋白受Cd²⁺的影响较大,随处理浓度的增大而显著下降,Ca²⁺在Cd²⁺较低浓度时具有阻止蛋白含量减少的作用,而La³⁺只有在较高浓度时才具有缓解Cd²⁺毒害引起的蛋白含量降低作用。

综上所述,Cd²⁺对植物的毒害并不是破坏某一种酶或影响某一种物质的含量,而是对植物整个的生理活动和生化反应造成整体伤害,这与施国新等(2000)用汞、镉毒害黑藻叶细胞伤害的研究结果是一致的。外源La³⁺和Ca²⁺都能通过提高抗氧化酶活性,降低膜脂过氧化产物MDA含量,而稳定叶绿素水平,阻止蛋白含量减少,因此在一定程度上缓解槐叶苹受Cd²⁺毒害的症状,增强植物对重金属胁迫的抵抗力。实验结果表明在低Cd²⁺浓度下,La³⁺的最适缓解浓度为6~9 mg/L而Ca²⁺的最适缓解浓度是5~15 mmol/L。

参考文献:

张志良. 1990. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 154, 158.
罗广华, 王爱国, 邵从本, 等. 1989. 高浓度氧对水稻幼苗的

- 伤害及活性氧防御酶[J]. 中国科学院华南植物研究所集刊, 4: 169-176.
段昌群, 王焕校, 曲仲湘. 1991. 重金属对蚕豆根尖的核酸含量及核酸酶活性影响的研究[J]. 环境科学, 13(5): 31-35.
X H 波钦诺克(荆家海, 丁钟荣译). 1981. 植物生物化学分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 197-209.
Bradford MA. 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
Chris B, Marc VH, Dirk I. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 43: 83.
Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, et al. 1998. Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars[J]. *Plant Physiol*, 116: 1413-1420.
Heath RL, Parker L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 25: 189-198.
Kneer R, Zenk MH. 1992. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning[J]. *Phytochem*, 31: 2663-2667.
Machly AC. 1955. Plant peroxidase[J]. *Meth Enzym*, 2: 801-813.
Scandalios JG. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases[J]. *Plant Physiol*, 101: 7-12.
Shi GX(施国新), Du KH(杜开和), Xie KB(解凯彬) et al. 2000. Ultrastructural study of leaf cells damaged from Hg²⁺ and Cd²⁺ pollution in *Hydrilla verticillata* (汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 42(4): 373-378.
Stobart AK, Griffiths WT, Amcen-Bukhari. 1985. The effects of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley[J]. *Plant Physiol*, 63: 293-298.
Sugiyama M. 1994. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage[J]. *Cell Biol Toxicol*, 10: 1-22.
Sun SC(孙赛初), Wang HX(王焕校), Li QR(李启任). 1985. Preliminary studies on physiological changes and injury mechanism in aquatic vascular plants treated with cadmium(水生维管束植物受镉污染后的生理变化及受害机制初探)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), 11(2): 113-121.
Zhou CF(周长芳), Wu GR(吴国荣), Shi GX(施国新), et al. 2001. The role of antioxidant systems in Cu²⁺ stress resistance in *Alternanthera philoxeroides*(水花生抗氧化系统在抵御Cu²⁺胁迫中的作用)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 43(4): 389-394.