

Cd^{2+} 处理对菹草叶片保护酶活性和细胞超微结构的毒害影响

徐勤松 施国新 杜开和 张小兰 曾晓敏

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

摘要: 以不同浓度 Cd^{2+} 处理 5d 的菹草为实验材料, 测定了叶片 SOD, POD, CAT 等生理生化指标的变化, 并用透射电镜观察了 Cd^{2+} 对叶细胞超微结构, 尤其是对叶绿体, 线粒体和细胞核的损伤情况。结果表明: SOD 活性, 叶绿素含量随 Cd^{2+} 处理浓度的增加而下降, 而 CAT 和 POD 活性都是在 1mg/L 浓度下达到峰值, 而后降低。SOD 对 Cd^{2+} 毒害最敏感, 其次为 POD 和 CAT。电镜观察发现: 随 Cd^{2+} 浓度的增加, 对细胞超微结构的损伤程度也加剧。表现为叶绿体膨大, 被膜断裂、消失和叶绿体解体; 线粒体变形, 脊突膨大和空泡化; 细胞核核仁分散, 核膜断裂, 核空泡化。并探讨了 Cd^{2+} 对植物的毒害机制。

关键词: Cd^{2+} ; 菹草; 保护酶; 超微结构; 毒害

中图分类号: Q946.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)06-0584-06

大气沉降、渗漏和流入物使水环境中以 Cd^{2+} 为代表的重金属污染问题十分突出。由于水体中的重金属不仅不能被微生物降解, 而且还能发生各种形式之间的相互转化和在生物体内发生富集累积作用, 并最终通过水生食物链的生物放大作用对更高营养级的生物直至人类产生毒害, 因此给人类的生命和身体健康造成严重威胁。自从确认骨痛病是由 Cd^{2+} 引起以来, 重金属污染日益引起人们的关注^[1-4]。而研究植物受重金属毒害后的表现对于探讨重金属对植物的毒害机制, 及时发现和排除重金属污染源具有一定参考价值。为此, 作者选择全国分布广泛的沉水植物—菹草作为实验材料, 研究了 Cd^{2+} 对保护酶活性的影响和对细胞超微结构的损伤。以探讨重金属对植物的毒害与保护酶系统活性的变化和超微结构损伤之间的关系。同时为及时监控和防治重金属污染提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 菹草 [*potamogeton crispus* Linn.] 采自江苏省高邮湖移植在南京师范大学生命科学学院水生植物培育池。在实验室中先用去离子水驯化培养 7d。选取生长状态一致的植株作为实验材料。

1.2 材料处理 在各培养缸中一次性施入 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (AR), Cd^{2+} (以纯 Cd^{2+} 计) 的浓度梯度为 1mg/L 、 10mg/L 、 20mg/L 、 50mg/L , 另以在不含 Cd^{2+} 的去离子水中生长的植株作为对照。全部培养缸置于

Fomra 3744 型(英国产)全封闭光照培养箱中培养, 温度为 24°C , 光周期为 12h 光照(3500lx)和 12h 黑暗交替。每组设 3 个重复, 培养第 5d, 取相同部位的叶片, 去离子水洗净, 测定生理生化指标, 同时观察叶细胞超微结构的变化。

1.3 叶绿素含量测定 采用分光光度法^[5]

1.4 SOD、POD、CAT 活性的测定 取材于预冷的研钵中, 加入 0.05mol/L 的磷酸缓冲液 ($\text{pH}7.8$), 冰浴, 研磨, 10000r/min , 低温 ($0-4^\circ\text{C}$) 离心 20min, 取其上清液。SOD、CAT 活性用一般分光光度法, 按从南京建成生物工程研究所购买的试剂盒的顺序测定; POD 活性用愈创木酚法^[5]测定。全部试剂为分析纯, 对实验数据相关系数统计和趋势分析。

1.5 叶细胞超微结构观察 Cd^{2+} 处理第 5d 上午, 取相同部位的叶片, 用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定, 丙酮系列脱水, Epon812 浸透, 包埋, LKB 超薄切片机(奥的利产)用钻石刀切片, 厚度为 70nm , 切片经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色后, 于 Hitachi A-2 型透射电镜(日本产)下观察并拍照。

2 结果

2.1 Cd^{2+} 处理对菹草叶绿素含量的影响

由图 1 看出, Cd^{2+} 对叶绿素含量变化的影响明显, 随处理浓度的上升叶绿素含量直线下降, 其中

收稿日期: 2002-08-08; 修订日期: 2003-05-20

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(01043); 国家自然科学基金(39770046)资助

作者简介: 徐勤松(1976—), 男, 山东省临沭县人; 博士研究生; 主要研究重金属对高等水生维管束植物的毒害机制

50mg/L 浓度处理的叶绿素含量为对照的 73.56%。相关系数为 $r = -0.9766, P < 0.01^{**}$, 为极显著负相关。说明 Cd²⁺ 对叶绿素的破坏比较显著。

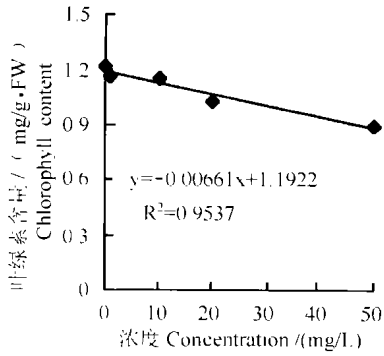


图1 Cd²⁺ 处理对叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effect of Cd²⁺ treatment on chlorophyll content

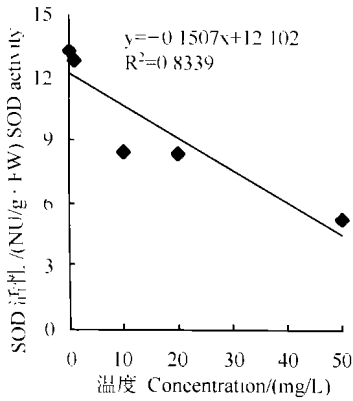


图2 Cd²⁺ 处理对 SOD 的影响

Fig. 2 Effect of Cd²⁺ treatment on SOD activity

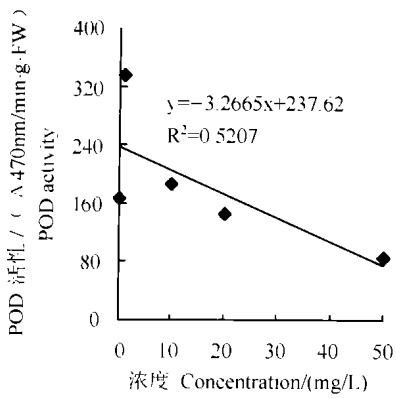


图3 Cd²⁺ 处理对 POD 的影响

Fig. 3 Effect of Cd²⁺ treatment on POD activity

2.2 Cd²⁺ 处理对苜蓿 SOD, POD, CAT 活性的影响
SOD 活性(图 2)和 POD 活性(图 3)都随 Cd²⁺ 处理浓度的上升而下降, SOD 活性下降趋势更明显, 50mg/L 浓度处理的 SOD 活性降为对照的 39.45%; 而

POD 活性在 1mg/L 浓度处理下达到最大值, 而后降低, 10mg/L 处理的酶活性仍高于对照, 20—50mg/L 处理后活性低于对照, 其中 50mg/L 处理的为对照的 51.74%; 在各浓度梯度下, CAT 活性都高于对照, 变化趋势平缓意味着 CAT 对 Cd²⁺ 有一定的耐受性(图 4)。

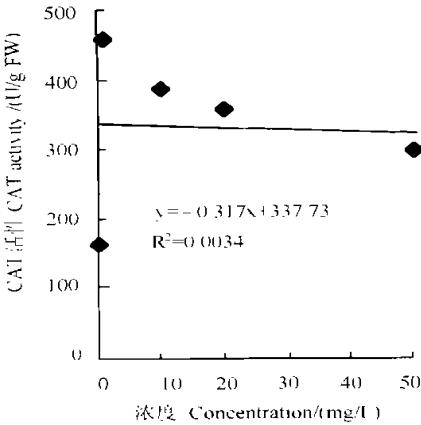


图4 Cd²⁺ 处理对 CAT 的影响

Fig. 4 Effect of Cd²⁺ treatment on CAT activity

2.3 Cd²⁺ 对叶细胞超微结构的损伤

2.3.1 叶绿体 叶绿体是植物细胞中大而明显的细胞器。对照叶绿体为规则的长椭圆形, 基质浓密, 被膜清晰, 基粒类囊体片层垛叠规则并和基质片层连成整体, 与叶绿体的长轴平行, 显示极其正常的结构状态(图版 I : 1)。Cd²⁺ 处理后, 叶绿体损伤明显: 1mg/L 处理的叶绿体膨大, 类囊体排列紊乱, 叶绿体被膜断裂(图版 I : 2); 随处理浓度的增大, 叶绿体被膜消失(图版 I : 3, 4); 50mg/L 浓度处理后类囊体片层有溶解现象, 叶绿体解体(图版 I : 6)。这意味着随 Cd²⁺ 处理浓度的增大对叶绿体的损伤程度加剧。

2.3.2 线粒体 正常叶细胞中的线粒体为椭圆形, 脊突分布均匀, 间质浓密(图版 I : 5)。1mg/L Cd²⁺ 处理的线粒体形状不规则, 脊突排列无序(图版 I : 7); 10mg/L Cd²⁺ 处理使线粒体几乎成为空泡, 有的濒临解体(图版 I : 8), 膜有断裂现象(图版 I : 4); 50mg/L Cd²⁺ 处理的线粒体只有残存的少数几个脊突, 线粒体空泡化明显(图版 I : 11)。可以看出 Cd²⁺ 浓度增加了对线粒体的损伤。

2.3.3 细胞核 对照叶细胞中的细胞核双层核膜清楚, 核仁致密与核质界限分明, 显示出良好的结构与功能状态(图版 I : 9); 较叶绿体和线粒体而言, 细胞核对 Cd²⁺ 的耐受性更强, 1mg/L 的细胞核无任何变化; 10mg/L Cd²⁺ 处理后, 核仁分散成数小核仁, 双层核膜仍保持完整(图版 I : 10); 50mg/L 浓度下细

胞核大部分消失,空泡化明显,伴随核膜有断裂现象(图版 I:11)。说明高浓度 Cd^{2+} 处理加重了对细胞核的破坏。

3 讨论

自由基伤害理论用于解释重金属对植物的毒害机理已有诸多报道^[2-4,7]。通常情况下,许多酶促反应和某些低分子化合物的自动氧化都会产生 O_2 , H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 等活性氧,植物在长期的进化过程中,体内同时存在两种主要的抗氧化系统,它们在一定范围内及时清除机体内过多的活性氧,以维持自由基代谢的动态平衡。其中 SOD、POD、CAT 组成了植物体内有效的清除活性氧的酶系统^[6]。它们和其他小分子物质(如谷胱甘肽和抗坏血酸等)共同作用能维持植物体内活性氧自由基在较低水平,从而避免了活性氧对植物细胞的伤害。而包括重金属胁迫在内的逆境胁迫都能导致植物细胞活性氧代谢的失调和自由基的积累^[7],并进一步损伤细胞的膜结构,使细胞生理生化代谢紊乱^[3-4]。有研究^[8]指出 SOD、POD、CAT 活性的维持和提高是作物耐受 Cd^{2+} 胁迫的物质基础之一。尤其是 SOD,它作为一种重要的防御酶,在提高植物抗逆性方面起关键作用。对菹草而言, Cd^{2+} 处理则降低了它们的活性,也就意味着削弱了抗氧化酶对活性氧的清除能力和增加了活性氧对植物细胞伤害的可能性。前人^[9]研究结果认为叶绿素的破坏与膜脂过氧化作用加剧有关。作者对睡莲^[10]和水车前^[11]的研究结果都表明由于重金属能导致植物体内 O_2 产生速率和膜脂过氧化产物(MDA)明显上升。这也是重金属对植物产生毒害的一个重要机制。Luna 等^[12]研究的结果证明重金属对植物的伤害是通过自由基介导的。

电镜观察结果表明重金属对植物的毒害与诱发细胞超微结构的损伤有一定关系。叶绿体,线粒体和细胞核是细胞生命活动中具有十分重要意义的三大细胞器。其中,线粒体和叶绿体是细胞内两个能量转换细胞器,它们将能量转换为驱动细胞进行正常生命活动所必需的能量^[13]。 Cd^{2+} 处理后,1mg/L 的浓度就使叶绿体膨大,被膜断裂;线粒体变形,脊突排列无序。随处理浓度的增加, Cd^{2+} 对叶绿体和线粒体的破坏也加重,表现为叶绿体被膜消失,部分类囊体瓦解,叶绿体解体;有的线粒体膜断裂,空泡化现象显著。前人^[14]的研究认为叶绿体类囊体结构的完整性和有序性对叶绿体在光合作用中进行正常有效的光能转换是非常必要的。由于 Cd^{2+} 处理

对叶绿素和叶绿体正常结构造成严重破坏,所以将严重影响植物光合作用的正常进行。这也与作者对 Cd^{2+} 在菹草叶细胞内的分布的研究的定位结果一致,观察在叶绿体上有重金属离子沉积^[15]。而线粒体空泡化或解体也是对线粒体的不可逆的损害,将造成全部功能的丧失^[16]。细胞核是真核细胞内最大最重要的细胞器,是细胞遗传代谢的调控中心^[13]。高浓度(50mg/L)处理后细胞核核质解体和核空泡化,这也是对细胞核的致死性损伤。前人^[17]研究认为核若出现空泡或解体,将造成细胞不可逆的伤害,这种细胞不能复活。细胞器超微结构的损伤也是重金属引起植物细胞膜脂过氧化作用的结果^[18]。这也与 Cd^{2+} 引起的保护酶系统活性的紊乱和降低有密切关系。因此,重金属 Cd^{2+} 对植物产生毒害的另一重要机制是由于高浓度 Cd^{2+} 造成对叶绿体,线粒体和细胞核等细胞器结构的不可逆损伤,破坏了细胞进行正常生命活动的结构基础。

参考文献:

[1] Sun S C, Wang H X, Li Q R. Preliminary studies on physiological changes and injury mechanism in aquatic vascular plants treated with cadmium [J]. *Acta Phytophysiol Sin.* 1985, **11** (2): 113—121[孙赛初,王焕校,李启任.水生维管束植物受镉污染后的生理变化及受害机制初探,植物生理学报,1985, **11** (2): 113—121]

[2] Chen Y. Effects of cadmium on nitrate reductase and superoxide dismutase of submerged macrophytes [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*. 1998, **18**(3): 313—317[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]

[3] Wong Y S, Luo G H, Guan Q W. Peroxidation damage of oxygen free radicals induced by cadmium to plant [J]. *Acta Bot Sin.* 1997, **39**(6): 522—526[黄玉山,罗广华,关文.镉诱导的自由基过氧化损伤,植物学报,1997, **39**(6): 522—526]

[4] Luo L X, Sun T H, Jin Y H. Effects of cadmium stress on lipid peroxidation in wheat leaves [J]. *China Environmental Science*. 1998, **18** (1): 72—75[罗立新,孙铁珩,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]

[5] Zhang Z L. Laboratory Guide for Plant Physiology (2nd edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1990, 88—91; 154—155[张志良.植物生理学实验指导(第二版),北京:高等教育出版社,1990, 88—91; 154—155]

[6] Chria R, Marc V H, Dirk I. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant physiol Plant Mol Biol.* 1992, **43**: 83

[7] Luo L X, Sun T H, Jin Y H. Accumulation of superoxide radical in wheat leaves under cadmium stress [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*

ae. 1998, **18**(5):495—499[罗立新, 孙铁珩, 靳月华. 镉胁迫下小麦叶中超氧阴离子自由基的积累, 环境科学学报, 1998, **18**(5): 495—499]

[8] Yang J R, He J Q, Zhang G X, et al. Reaction of some enzyme activities in crops of different tolerance to the stress of Cd [J]. *China Environmental Science*. 1996, **16**(2): 113—117[杨居荣, 贺建群, 张国祥等. 不同耐性作物中几种酶活性对 Cd 胁迫的反应, 中国环境科学, 1996, **16**(2): 113—117]

[9] Heath R L, Packer K. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968, **125**: 189—198

[10] Xu Q S, Shi G X, Gu G P, et al. Study of toxic effect of Hg²⁺ on *Nymphaea tetragona* Georgi [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin.* 2000, **20**(5): 784—789[徐勤松, 施国新, 顾龚平等. 不同浓度 Hg²⁺ 对睡莲的毒害影响研究, 西北植物学报, 2000, **20**(5): 784—789]

[11] Xu Q S, Shi G X, Du K H, et al. Studies on correlation between peroxidation damage by free radicals and ultrastructural changes of mesophyll cells in *Ottelia alismoides*(L.) Pers induced by Zn pollution [J]. *Chinese Bulletin of Botany*. 2001, **18**(5):597—604[徐勤松, 施国新, 杜开和等. 锌胁迫下水车前叶细胞自由基过氧化损伤与超微结构变化之间关系的研究, 植物学通报, 2001, **18**(5): 597—604]

[12] Luna C M, Gonzalez Z A, Tripp V S. Oxidative damage caused by on excess of copper in oat leaves [J]. *Plant Cell Physiol.* 1994: 11—15

[13] Zhai Z H, Ding M X, Wang X Z, Wang Y C, et al. Cell Biology [M]. Beijing: Higher Education Press, 1996, 149; 173[翟中和, 丁明孝, 王喜忠, 王永潮等著. 细胞生物学, 北京: 高等教育出版社, 1996, 149; 173]

[14] Li G F, Cai W P, Wu Y J. The relationship between structural status and photochemical activity of chloroplasts [J]. *Acta Phytophysiol Sin.* 1987, **13**(3): 295—301[李功藩, 蔡琬平, 吴亚君. 叶绿体结构状态与光化学活性的关系, 植物生理学报, 1987, **13**(3): 295—301]

[15] Xu Q S, Shi G X, Du K H. Ultrastructural location observation of Cd and Zn in leaf cells of *Potamogeton crispus* [J]. *Acta Botanica Yunnanica*. 2002, **24**(2): 241—245[徐勤松, 施国新, 杜开和. 重金属镉、锌在菹草叶细胞中的超微定位观察, 云南植物研究, 2002, **24**(2): 241—245]

[16] Peng M, Wang H X, Wu Y S. Ultrastructural changes induced by cadmium and lead in corn seedling cell [J]. *China Environmental Science*. 1991, **11**(6): 426—431[彭鸣, 王焕校, 吴玉树. 镉、铅诱导的玉米(*zea mays* L.) 幼苗细胞超微结构的变化, 中国环境科学, 1991, **11**(6): 426—431]

[17] Chien L C, Wu S H. Cytological studies on the cold resistance of plants-morphological changes of the intracellular structures of wheat in the overwintering period. *Acta Bot Sin.* 1965, **13**(1): 1—15[简令成, 吴素萱. 植物抗寒性的细胞学研究—小麦越冬过程中细胞形态结构的变化, 植物学报, 1965, **13**(1): 1—15]

[18] Chen S Y. Injury of membrane lipid peroxidation to plant cell [J]. *Plant Physiology Communications*. 1991, **27**(2): 84—90[陈少裕. 膜脂过氧化作用对植物细胞的伤害, 植物生理学通讯, 1991, **27**(2): 84—90]

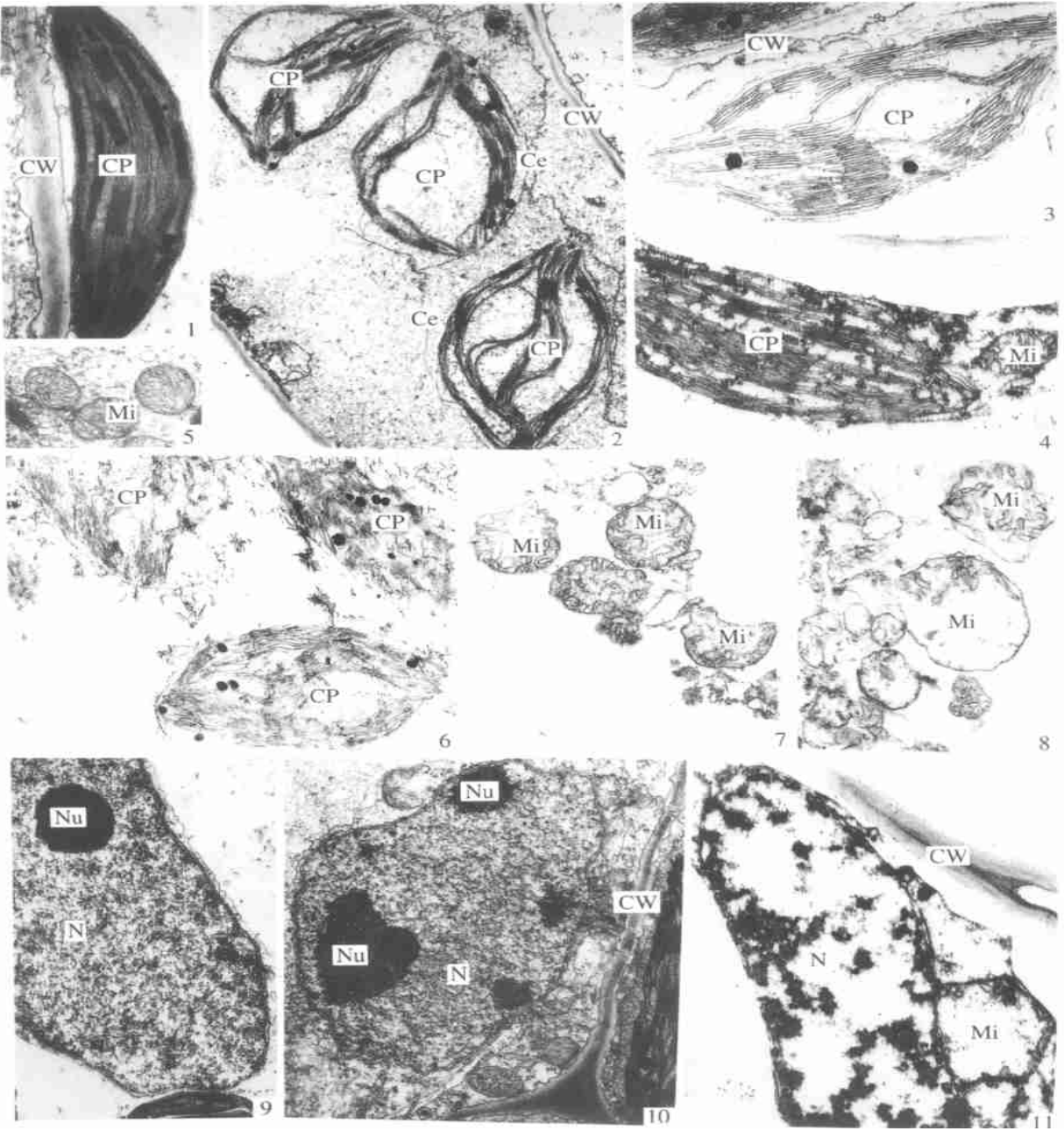
TOXIC EFFECT OF Cd²⁺ TREATMENT ON PROTECTIVE ENZYME
ACTIVITY AND ULTRASTRUCTURE
IN LEAF CELLS OF *POTAMOGETON CRISPUS*.

XU Qir-Song, SHI Guo-Xin, DU Kai-He, ZHANG Xiao-Lan, and ZENG Xiao-Min
(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing, 210097)

Abstract: Heavy metals are common pollutants in aquatic ecosystems due to atmospheric sedimentation geological leakage, untreated industrial effluents. Compared to most other pollutants, they are not biodegradable and persistent in the environment for a very long period, Their accumulation in organism and bio-magnification through food chain pose the great potential threat to aquatic organisms and to human health. So heavy metal pollution has become one of the most troublesome environmental problems and also received more and more attention. On the other hand, submerged macrophytes are directly exposed to heavy metals in water body and are more easily subjected to their toxicity In the present study, *Potamogeton crispus*, widespread in water body in China, is cultivated in nutrition media containing different concentration of Cd²⁺ for 5d to investigate the toxic effect of Cd²⁺ on macrophytes, including: chlorophyll content, changes of protect enzyme activity(SOD, POD, CAT)and the ultrastructural damages to leaf cells, mainly to chloroplasts, mitochondria and nuclei. The results show that: SOD activity and chlorophyll content decrease nearly linearly with augmentation of Cd²⁺ concentration by 26. 44% and 60. 55%, respectively, When the concentration was 50mg/L, statistical analysis indicate the changes of both indexes had reached significant levels($r_{SOD} = -0.9766$; $r_{chl} = -0.9132$); Both POD and CAT activity reached the peak value at 1mg/L, 101. 70% and 186. 39% higher than that of the

control, respectively. When treated with 20mg/L, Cd^{2+} POD activity declined by 12.87% and 48.27% at 50mg/L as compared to the control. Although the CAT activity began to decline when the treatment concentration rises further, it is still much higher than that of the control, by 86.88% over the normal value even at 50mg/L within the exposing concentration range. It illustrated CAT has a quite strong tolerance to Cd^{2+} pollution. Among the three enzymes, SOD is the most sensitive, followed by POD and CAT. Transmission electron microscopy observation indicates that the higher the pollutant concentration is, the more serious the damages to the leaf cells are, such as swelling of chloroplasts at 1mg/L metal concentration, disruption and disappearance of chloroplast envelopes at 10 and 20mg/L, and 50mg/L see the disintegration of chloroplasts; deforming and vacuolization of mitochondria at 1mg/L and 10mg/L concentration, respectively. The disintegration of nucleolus is found when treated with 10mg/L Cd^{2+} , 50mg/L induced the disruption of nuclear membrane and vacuolization of nucleus. Disintegration of chloroplasts, vacuolization of mitochondria and vacuolization of nucleus are irreversible damage to organelles and their normal physiological functions are lost. The changes of leaf cells ultrastructure are consistent with the damage of their membrane systems, which may be caused by the disturbance of protect enzyme activity. It can be inferred that one main toxic mechanism of Cd^{2+} is to destroy the structural foundation that the normal metabolism necessarily needs.

Key words: Cd^{2+} ; *Potamogeton crispus*; Protect enzyme; Ultrastructure; Toxicity



图版 I

1. 示叶绿体, $\times 12000$; 2. 示叶绿体膨胀, 被膜断裂, $\times 6000$; 3. 示叶绿体被膜消失, $\times 17000$; 4. 示叶绿体被膜消失和线粒体破裂, $\times 15000$; 5. 示正常线粒体, $\times 15000$; 6. 示叶绿体解体, $\times 10000$; 7. 示破坏的线粒体, $\times 17000$; 8. 示空泡化的线粒体, $\times 20000$; 9. 示细胞核和核仁, $\times 10000$; 10. 示核仁散开, $\times 12000$; 11. 示空泡化的细胞核和线粒体, $\times 15000$

Ce. 叶绿体膜 CP. 叶绿体 CW. 细胞壁 Mi. 线粒体 N. 细胞核 Nu. 核仁

1. showing chloroplast, $\times 12000$; 2. showing swelling chloroplast and disruption of chloroplast membrane, $\times 6000$; 3. showing disappearance of chloroplast membrane, $\times 17000$; 4. showing disappearance of chloroplast membrane and disrupted mitochondria, $\times 15000$; 5. showing normal mitochondria, $\times 15000$; 6. showing disintegration of chloroplast, $\times 10000$; 7. showing damaged mitochondria, $\times 17000$; 8. showing vacuolization of mitochondria, $\times 20000$; 9. showing nucleus and nucleolus, $\times 10000$; 10. showing disperse of nucleolus, $\times 12000$; 11. showing the vacuolization of mitochondria and nucleus, $\times 15000$

Ce. Chloroplast envelop CP. Chloroplast CW. Cell wall Mi. Mitochondria N. Nucleus Nu. Nuclear membrane