

镉在槐叶苹叶片中的蓄积及其生态毒理学分析

徐勤松*, 计汪栋, 杨海燕, 王红霞, 许 晔, 赵 娟, 施国新

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京 210046)

摘要:以分布广泛的浮水蕨类植物——槐叶苹为研究对象, 用含不同浓度 Cd(2.5, 5, 7.5 mg/L 和 10 mg/L) 的 10% Hoagland 营养液培养 7d, 旨在分析 Cd 在蕨类植物中的蓄积及其诱导产生的毒理学作用。随着培养液中 Cd 浓度的增加, (1) 槐叶苹叶片中 Cd 含量极显著上升; (2) Cd 处理造成槐叶苹叶片产生明显的矿质营养失衡症状, 主要表现为显著增加了对 Ca 和降低了对 P, K 和 Na 的吸收; (3) 叶绿素含量和叶绿素荧光 Fv/Fm 比值都逐渐降低; (4) 抗氧化防御系统活性或含量紊乱, 其中超氧化物歧化酶(SOD)活性下降最突出, 过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(AsA)和类胡萝卜素(Car)也都先升后降, 膜脂过氧化产物 MDA 含量则显著增多; (5) 可溶性蛋白含量一直下降; (6) 透射电镜观察发现细胞超微结构损伤明显, 主要为叶绿体膨胀和解体、线粒体嵴突减少和空泡化、细胞核核仁解体、核膜破裂、核质消失, 并有晶体出现。结果表明槐叶苹虽然对水体 Cd 有一定的净化作用, 但 Cd 浓度与毒害之间的剂量-效应关系明显; MDA 含量的明显上升以及叶绿素和可溶性蛋白含量的显著下降标志着槐叶苹遭受到明显的氧化损伤; Cd 破坏了槐叶苹进行正常生理活动所必需的生理和结构基础; SOD 可以作为 Cd 诱导产生氧化压力的分子生物标志物和水体 Cd 污染的灵敏生态毒理学指标, Cd 的半效应浓度为 2.41 mg/L, 最大允许浓度为 0.241 mg/L。

关键词:槐叶苹; Cd; 蓄积; 矿质营养; 氧化胁迫; 超微结构; 毒理

文章编号: 1000-0933(2009)06-3019-09 中图分类号: Q142, Q945, Q948, X171 文献标识码: A

Cadmium accumulation and phytotoxicity in an aquatic fern, *Salvinia natans* (Linn.)

XU Qin-Song*, JI Wang-Dong, YANG Hai-Yan, WANG Hong-Xia, XU Ye, ZHAO Juan, SHI Guo-Xin

College of Life Science, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Lab of Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210046, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(6): 3019 ~ 3027.

Abstract: Higher aquatic plants are known to accumulate and bioconcentrate heavy metals, while works dealing with fern are still very scarce. In this study, cadmium (Cd) accumulation and its influence on mineral nutrients, photosynthetic pigments and Fv/Fm , enzymatic and non-enzymatic antioxidants, protein content and ultrastructure of *Salvinia natans* (Linn.) All. plants exposed to 2.5, 5, 7.5 mg/L and 10 mg/L Cd for 7d were analyzed. It was found that, with the rise of the Cd concentration in culture medium, (1) Cd content increased in a concentration dependent manner. (2) Cd resulted in serious imbalance of nutrient elements, and promoted the adsorption of Ca and prohibited the adsorption of P, K and Na significantly. (3) Chlorophyll content and chlorophyll fluorescence Fv/Fm showed a decreasing trend. (4) Cd treatment led to the disorder of content/activity of antioxidant systems. A significant reduction in SOD activity was observed in Cd treated *S. natans*, in contrast, an increase was also noted in POD and CAT activity, levels of GSH, AsA and Car followed by a decline. MDA content increased evidently with augment of Cd concentration indicating the occurrence of oxidative stress. (5) Soluble protein content was found to be decreased at all the Cd concentration. (6) TEM observation revealed

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30800055); 江苏省教育厅自然科学基金资助项目(05KJB180067); 南京师范大学科研启动基金资助项目(2005104XGQ2B73)

收稿日期: 2008-03-18; 修订日期: 2009-03-04

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xuqinsong@njnu.edu.cn.

that Cd impaired the organelle ultrastructure obviously, such as swelling and disorganization of chloroplasts, decrease of cristae quantity and vacuolization of mitochondria, disaggregation of nucleolus, breakage of nuclear envelope, disappearance of karyoplasms, and appearance of crystal. Results suggest that *S. natans* was able to accumulate Cd, the correlation of dose-effect was significant between the toxicity and concentration, and Cd caused oxidative damage as evidenced by increased lipid peroxidation and decreased chlorophyll and protein contents. Cd pollution destroyed the physiological and ultrastructural foundation essential for normal growth and metabolism of plants. SOD could be served as a molecular biomarker of oxidative pressure imposed by Cd pollutant and a sensitive eco-toxicological indicator to evaluate Cd pollution on water environment, its 50% effective concentration (EC_{50}) for 7 d of exposure was 2.41 mg/L; the maximum permissible concentration (MPC) was 0.241 mg/L.

Key Words: *Salvinia natans*; Cd; bioconcentration; nutrient elements; oxidative stress; ultrastructure; phytotoxicity

近年来,水生植物在水质监测、污水净化和毒理评价中的作用日益引起重视^[1~4]。槐叶苹[*Salvinia natans* (Linn.) All.]是1年生根退化型浮水性蕨类植物,生长速度快,对污水净化具有一定的价值。研究结果显示槐叶苹对 Hg、Cu、Ni 和 As 都有较好的清除效果,并被用作研究系统来分析重金属的毒性效应^[5~8],但对重金属 Cd 的研究不够充分^[2]。

由于毒性强和水溶性好,使 Cd 成为极突出的水体污染物,它对水生植物的生理、生态和生化等方面的影响已有报道^[2,9,10],但对蕨类植物研究相对较少。鉴于此,本文选择分布广泛的槐叶苹作为受试材料,重点分析不同浓度 Cd 胁迫后槐叶苹对 Cd 的吸收、叶绿素含量和叶绿素荧光、抗氧化系统水平、矿质营养元素、可溶性蛋白以及细胞超微结构等方面的变化,以期对对镉污染的生态毒理学研究提供有益资料。

1 材料与方法

1.1 植物材料

槐叶苹是槐叶苹科1年生低等浮水蕨类植物,广布于北半球温带。生于水田、沟、塘、湖和静水河。羽叶在茎两侧紧密排列,形如槐叶。茎横走,无根,羽叶3片轮生,有短柄,2个漂浮水面,鲜绿色;1个细裂如丝,下垂水中形成假根,密生有节的粗毛。材料采自南京江心洲水域,后移植于南京师范大学水生植物培育池中。选取颜色、大小和长势一致的植株作为实验材料。

1.2 实验设计

实验材料于8:00放入含0,2.5,5,7.5 mg/L和10 mg/L $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ (AR) (以 Cd^{2+} 计)的10% Hoagland 营养液中,后将全部玻璃缸置于 Forma 3744 培养箱中,光照周期为12h:12 h (L:D),光暗温度为25℃和18℃,光照强度 $70 \mu m^{-2} \cdot s^{-1}$,实验设3次重复,每隔2 d 更换1次培养液。培养第7天取从顶端第3~6叶位的叶片进行生理生化指标测定和透射电镜观察。

1.3 实验方法

Cd 和营养元素含量测定:叶片先用自来水和双蒸水充分清洗,再用5mmol/L的EDTA 4℃清洗30 min,擦干后称取0.8g叶片,加入5ml 硝酸和0.5ml 高氯酸,控制温度在160℃左右加热。待硝化完全后,再加入0.7ml 盐酸,使样品溶解,定容到10ml,每个样品用电感耦合等离子体原子发射光谱仪(ICP-AES) (美国 Leeman 公司)重复测定2次。

叶绿素和类胡萝卜素含量测定:称取0.4g叶片,用80%的丙酮冰浴研磨,离心,用分光光度计(Thermo GEN ESYS 10)记录470nm,647nm和663nm吸收值,按 Lichtenthaler^[11]的公式计算。

叶绿素荧光用便携式植物效率分析仪(PEA, Hansatech®, U. N.)测定:激发光强为最大光强的50%,暗适应时间为20min,记录时间5s,测定均在室温下进行,至少重复6次,用可变荧光(F_v)与最大荧光(F_m)的比值 F_v/F_m 表示光合效能的大小^[12]。

酶液的提取和测定:取 0.5g 新鲜叶片于预冷的研钵中,加入 0.05mol/L 的磷酸缓冲液 (pH7.8),冰浴研磨,10 000 r/min,4℃ 离心 20min,取其上清液测定酶活性和可溶性蛋白含量。参照 Stewart 和 Bewley^[13] 的氯化硝基氮蓝四唑 (NBT) 法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性,以抑制 NBT 光化还原 50% 为一个酶活性单位。采用愈创木酚法^[14] 测定过氧化物酶 (POD) 活性,以每 min A470 变化 0.01 为 1 个活性单位。采用钼酸盐法测定过氧化氢酶 (CAT) 活性^[15]。用考马斯亮蓝 G-250 法测定可溶性蛋白含量^[16],以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准蛋白。

GSH 和 AsA 含量测定:取 0.5g 叶片,加 5ml 5% TCA 冰浴研磨,10 000g 4℃ 离心 20min,取上清液,分别用 DTNB 法和二联吡啶法在 412nm 和 525nm 波长下测定光吸收值,根据标准曲线计算 GSH 和 AsA 含量^[17]。

丙二醛 (MDA) 含量测定:取 0.5g 叶片,加 5ml 0.1% TCA 冰浴研磨,10 000g 离心 10min,上清液中的 MDA 含量根据 Dhindsa 和 Matowe^[18] 的硫代巴比妥酸 (TBA) 反应公式计算。

1.4 超微结构观察

第 7 天 8:00 从各培养缸中取相同部位叶片,2.5% 戊二醛和 1% 锇酸,4℃ 双重固定 2h,丙酮系列脱水,Epon 812 包埋,LKB 超薄切片机切片,厚度为 70nm,切片经柠檬酸铅-醋酸双氧铀双重染色后,于 Hitachi 600-A-2 透射电镜 (日本日立公司) 下观察并拍照。

1.5 统计分析

实验数据用 Origin 和 Windows XP 系统自带 Excel 软件分析处理和制图,实验结果用 3 次重复实验的平均值 ± 标准误差表示,质量为鲜重,将各生理指标与处理浓度作回归分析 (相关系数为 R), $P < 0.05$ 为显著相关, $P < 0.01$ 为极显著相关。各指标不同浓度间进行方差分析,不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。灰色关联度用邓聚龙^[19] 的方法分析。

2 结果与分析

2.1 Cd 在槐叶苹体内的积累

由图 1 可知,随培养液中金属浓度的增大,槐叶苹对 Cd 的吸收明显增多,几乎呈直线上升趋势。回归分析结果表明槐叶苹体内 Cd 含量与处理浓度间达到极显著正相关 ($R = 0.9910$, $P < 0.01$)。

通常用吸收富集系数来衡量某种植物对重金属的吸收和积累能力,富集系数指的是植物体或某器官中某元素含量与该元素在培养液 (或土壤) 中含量的比值。由图 2 可知,槐叶苹对 Cd 的富集系数表现出先升后降的趋势,并在 5 mg/L 浓度下达到最大值 89,而后则逐渐减少为 85 (7.5mg/L) 和 76 (10 mg/L),说明高浓度降低了槐叶苹对 Cd 的积累,这与高浓度 Cd 毒害引起细胞的功能性损伤加剧所导致的吸收下降等有关。

2.2 Cd 对槐叶苹营养元素吸收的影响

由表 1 可以看出,随培养液中 Cd 浓度的增大,槐叶苹体内各矿质元素受到的影响不同,可分成 3 类: (1) 显著促进对 Ca 的吸收,统计分析与 Cd 浓度达到显著正相关 ($R_{Ca} = 0.8894$, $P < 0.05$); (2) 低浓度下 Zn、Fe 和 Mn 含量上升,更高浓度则有所下降,但都高于正常值。统计分析为正相关,但未达到显著水平; (3) 极显著抑制对 P、K 和 Na 的吸收,各元素含量与 Cd 浓度都达到极显著负相关,相关系数分别为 $R_P = -0.9461$, $P < 0.01$; $R_K = -0.9378$, $P < 0.01$; $R_{Na} = -0.9270$, $P < 0.01$ 。

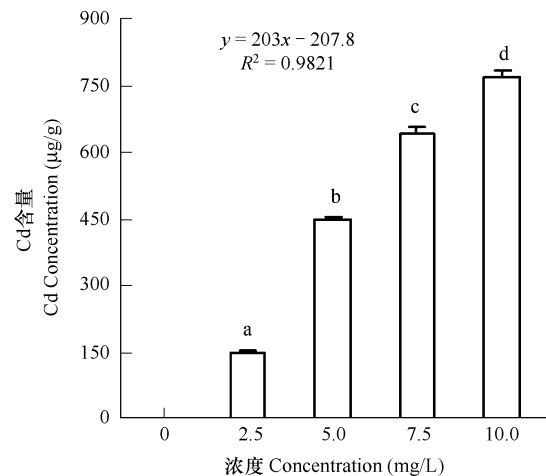


图 1 槐叶苹体内的 Cd 含量

Fig. 1 Content of Cd in *S. natans*

字母不同表示不同处理间差异水平显著 ($P < 0.05$), 下同
Different letters indicate significantly different values at 7 d ($P < 0.05$), the same below

2.3 Cd 对槐叶苹叶绿素含量的影响

叶绿素含量是植物光合器官生理状况的重要指标。如图 3 所示, Cd 处理后, 槐叶苹叶绿素含量呈递减趋势。当 Cd 浓度为 2.5 mg/L 时, 叶绿素含量降为对照的 86.17%, 而最大 10 mg/L 处理浓度则使之进一步降为对照的 71.67%。回归分析表明, 叶绿素含量与 Cd 浓度间达到极显著负相关($R = -0.9467, P < 0.01$)。

2.4 Cd 对槐叶苹叶绿素荧光的影响

快捷非损伤性获得的 Fv/Fm 比值可以很好地反映植物体受胁迫的程度^[12]。与叶绿素含量的变化一致, 随着培养液中 Cd 浓度的增加, 槐叶苹叶绿素荧光 Fv/Fm 比值也逐渐下降(图 4)。当 Cd 浓度为 2.5 mg/L 时, 叶绿素 Fv/Fm 比值仅比对照减少了 5.60%, 而当浓

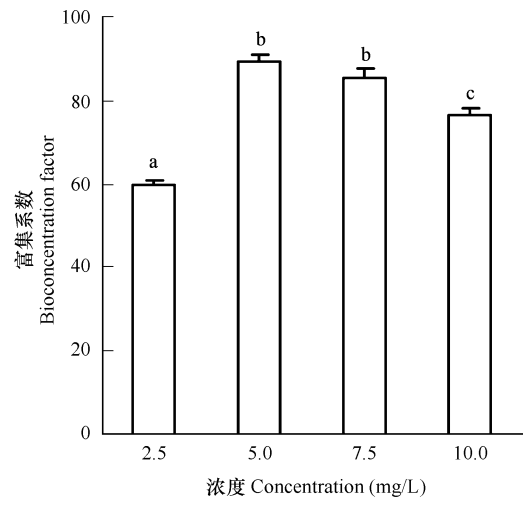


图2 槐叶苹对 Cd 的富集系数
Fig. 2 The bioconcentration factor of Cd in *S. natans*

表 1 Cd 毒害对槐叶苹营养元素吸收的影响
Table 1 Effects of Cd stress on nutrient element contents in *S. natans* (mean $\pm$ SD)

营养元素 Nutrients ($\mu\text{g/g}$)	Cd 浓度 concentrations (mg/L)				
	0	2.5	5	7.5	10
Ca	716.28 ^a $\pm$ 13.32	796.05 ^b $\pm$ 10.95	1065.77 ^c $\pm$ 18.76	957.13 ^d $\pm$ 19.12	1121.52 ^e $\pm$ 20.74
Zn	2.50 ^a $\pm$ 0.05	3.12 ^b $\pm$ 0.06	6.73 ^c $\pm$ 0.09	4.85 ^d $\pm$ 0.10	4.74 ^d $\pm$ 0.08
Fe	24.86 ^a $\pm$ 0.49	29.35 ^b $\pm$ 0.56	51.59 ^c $\pm$ 1.03	36.57 ^d $\pm$ 0.67	52.73 ^e $\pm$ 1.04
Mn	17.17 ^a $\pm$ 0.30	25.64 ^b $\pm$ 0.52	44.52 ^c $\pm$ 0.74	24.89 ^b $\pm$ 0.47	39.23 ^d $\pm$ 0.78
P	531.07 ^a $\pm$ 12.36	519.53 ^b $\pm$ 10.79	453.81 ^c $\pm$ 9.03	347.69 ^d $\pm$ 6.42	372.83 ^e $\pm$ 7.26
K	2327.11 ^a $\pm$ 46.08	1935.47 ^b $\pm$ 37.83	1341.84 ^c $\pm$ 24.28	858.35 ^d $\pm$ 19.71	1031.07 ^e $\pm$ 16.68
Na	506.33 ^a $\pm$ 9.12	414.19 ^b $\pm$ 8.28	308.99 ^c $\pm$ 6.16	195.57 ^d $\pm$ 5.97	245.18 ^e $\pm$ 3.93

同一行字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同 Treatments with no common letters in a row are significantly different ($P < 0.05$), the same below

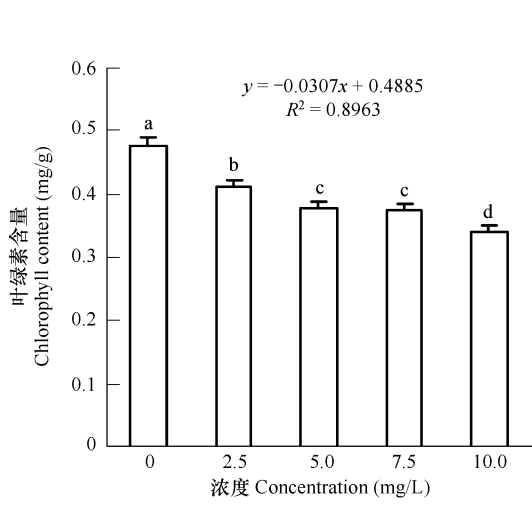


图3 Cd 对槐叶苹叶绿素含量的影响
Fig. 3 Effects of Cd on chlorophyll content in *S. natans*

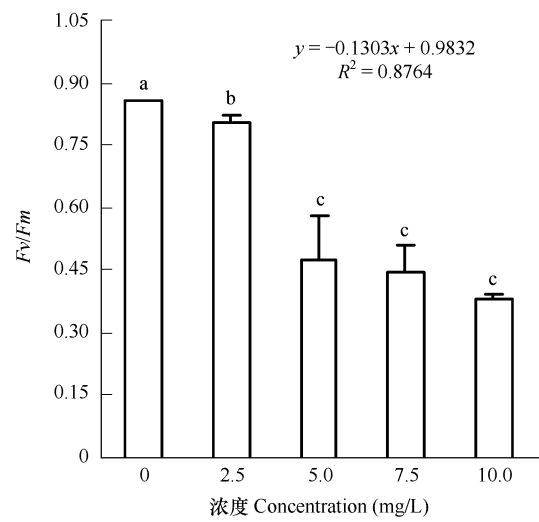


图4 Cd 对槐叶苹叶绿素荧光的影响
Fig. 4 Effects of Cd on Fv/Fm in *S. natans*

度达到最大 10 mg/L 时叶绿素 Fv/Fm 比值则比对照减少了 55.04%。回归分析表明,叶绿素 Fv/Fm 比值与 Cd 浓度间达到极显著负相关($R = -0.9362, P < 0.01$)。

2.5 Cd 对槐叶苹抗氧化系统的影响

SOD、POD 和 CAT 是植物体内酶促抗氧化系统的重要组成部分。由表 2 可以看出,槐叶苹体内的这 3 种抗氧化酶对 Cd 胁迫的反应不同。其中,SOD 一直呈下降趋势,2.5 mg/L 浓度时的酶活性即比对照值减少了 39.26%,而 10 mg/L 浓度则减少了 88.96%。统计分析显示该酶活与金属浓度间达到极显著负相关($R = -0.9652, P < 0.01$)。POD 和 CAT 活性都是在 2.5 mg/L 时达到峰值,分别比对照值增加了 13.94% 和 22.73,其后则随 Cd 浓度的增大而逐渐降低,10 mg/L 时的酶活性分别比对照减少了 68.47% 和 59.09%,它们与 Cd 处理浓度间分别达到极显著和显著负相关($R_{\text{POD}} = -0.9257, P < 0.01$; $R_{\text{CAT}} = -0.8397, P < 0.05$)。

表 2 Cd 毒害槐叶苹抗氧化系统的影响

Table 2 Effects of Cd stress on antioxidant systems in *S. natans* (mean $\pm$ SD)

项目 Item		Cd 浓度 Concentrations (mg/L)				
		0	2.5	5	7.5	10
抗氧化酶活性 Enzyme activity (U/g)	SOD	303.25 ^a $\pm$ 6.05	184.19 ^b $\pm$ 4.68	109.77 ^c $\pm$ 2.59	57.67 ^d $\pm$ 1.13	33.49 ^e $\pm$ 0.97
	POD	8.70 ^a $\pm$ 0.19	9.91 ^b $\pm$ 0.26	5.79 ^c $\pm$ 0.13	3.95 ^d $\pm$ 0.07	2.74 ^e $\pm$ 0.04
	CAT	871.95 ^a $\pm$ 17.32	1070.12 ^b $\pm$ 21.52	911.59 ^a $\pm$ 18.23	594.51 ^c $\pm$ 10.47	356.71 ^d $\pm$ 7.418
抗氧化物质含量 Antioxidants content (mg/g)	GSH	8.48 ^a $\pm$ 0.16	11.32 ^b $\pm$ 0.28	10.49 ^c $\pm$ 0.29	10.48 ^c $\pm$ 0.20	8.99 ^d $\pm$ 0.18
	AsA	3.58 ^a $\pm$ 0.08	4.80 ^b $\pm$ 0.12	5.14 ^c $\pm$ 0.18	5.18 ^c $\pm$ 0.11	3.89 ^d $\pm$ 0.08
	Car	0.088 ^a $\pm$ 0.001	0.094 ^b $\pm$ 0.002	0.087 ^a $\pm$ 0.002	0.085 ^a $\pm$ 0.002	0.067 ^c $\pm$ 0.001

GSH、AsA 和 Car 是植物体内非酶抗氧化系统中的小分子保护物质。由表 2 可以看出,各处理浓度下的 GSH 和 AsA 含量都高于正常水平,其中 GSH 在 2.5 mg/L 时含量最大,比对照增加了 33.47%,其后则逐渐下降,最大浓度 10 mg/L 时仍比对照多 5.91%。AsA 含量在 Cd 浓度小于 7.5 mg/L 时逐渐增多,并在 7.5 mg/L 下达到最高,比对照增加了 44.51%,10 mg/L 时比对照多 8.45%。与两者不同,Car 含量只在 2.5 mg/L 时略比对照提高了 7.39%,更高浓度则都低于对照值,10 mg/L 时比对照下降了 24.07%。统计分析表明前两者达到正相关,Car 为负相关,但都没有达到显著水平。

2.6 Cd 对槐叶苹 MDA 含量的影响

作为脂质过氧化的生物标志物,MDA 含量被广泛用来研究自由基所引发的组织伤害^[20]。由图 5 可以看出,随 Cd 浓度的增高,槐叶苹叶片中 MDA 含量明显上升,达到正常水平的 1.95 ~ 2.98 倍。统计分析表明两者之间达到显著正相关($R = 0.8657, P < 0.05$)。

2.7 Cd 对槐叶苹可溶性蛋白的影响

不同浓度 Cd 处理后,槐叶苹叶片可溶性蛋白含量一直下降(图 6)。浓度越高,下降幅度越大。与正常水平相比,2.5 mg/L 浓度时的含量减少了 34.57%,而 10 mg/L 浓度时的含量则使之急剧减少了 72.95%。统计分析表明,可溶性蛋白含量与 Cd 浓度间达到极显著负相关($R = -0.9667, P < 0.01$)。

2.8 Cd 对槐叶苹细胞超微结构的影响

叶绿体、线粒体和细胞核是植物叶细胞中有重要生理功能的 3 个细胞器。在正常生长条件下,叶绿体为比较规则的长椭圆形,类囊体垛叠整齐(图 7-1);线粒体

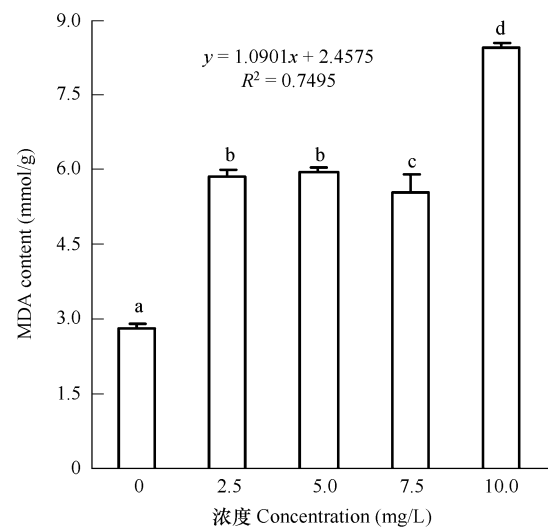


图 5 Cd 对槐叶苹 MDA 含量的影响

Fig.5 Effect of Cd on MDA content in *S. natans*

基质浓密,嵴突明显(图 7-1);细胞核核膜清晰,核仁致密,与核质界限分明(图 7-5)。而用不同浓度的 Cd 溶液培养后,各细胞器的超微结构发生明显改变,当处理浓度为 2.5 mg/L 时,叶绿体膨胀成近似球形(图 7-2),7.5 mg/L 则使叶绿体解体,类囊体片层散到细胞质中(图 7-3)。线粒体的反应最敏感,在最低 Cd 浓度下就出现嵴突模糊(图 7-2),接着出现明显空泡化(图 7-3,图 7-4),有的整个线粒体外膜还出现溶解现象(图 7-4)。细胞核直到较高浓度时才出现较大变化:核仁分散成若干小块、核膜破裂、部分核质消失,同时还有较大的晶体出现(图 7-6)。还观察到细胞质膜局部发生内陷,并包含多层泡状结构(图 7-4)。

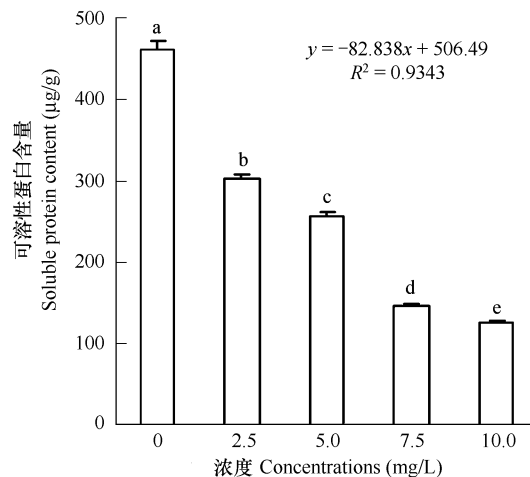


图 6 Cd 对槐叶苹可溶性蛋白含量的影响

Fig. 6 Effect of Cd on soluble protein content in *S. natans*

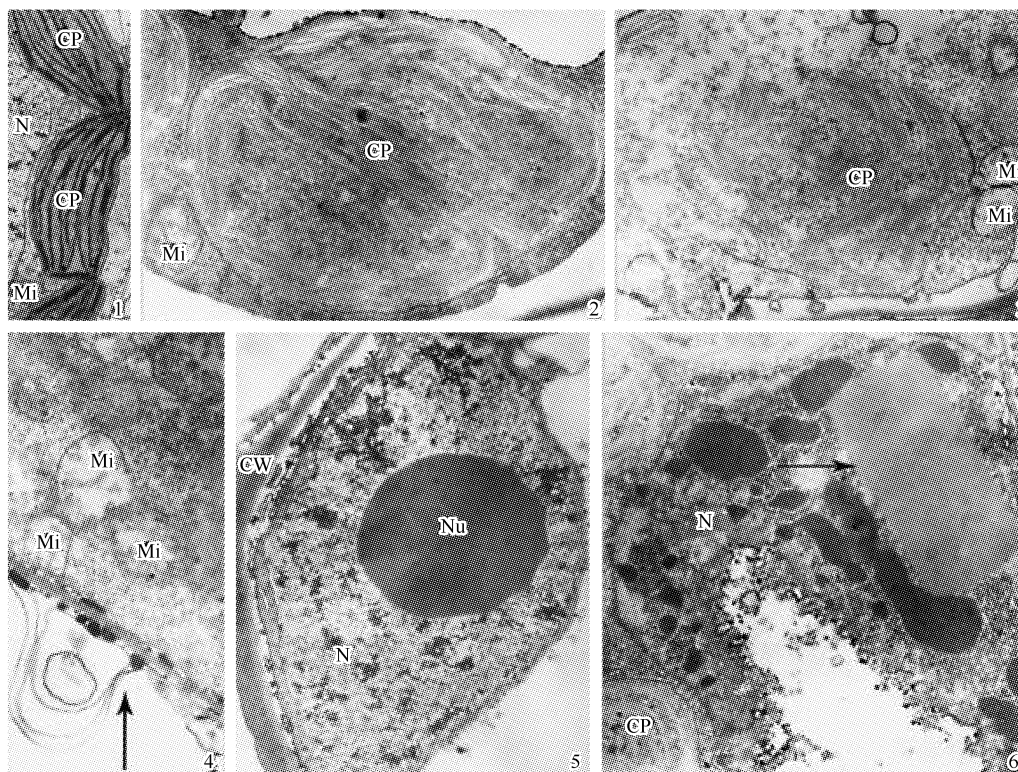


图 7 Cd 对槐叶苹叶细胞超微结构的影响

Fig. 7 Effects of Cd on ultrastructure of leaf cells in *S. natans*

1: 对照叶细胞的超微结构, 示叶绿体和线粒体 $\times 8\,000$; 2: 2.5mg/L Cd 处理的叶细胞, 示叶绿体膨胀 $\times 17\,000$; 3: 7.5mg/L Cd 处理的叶细胞, 示叶绿体解体和线粒体空泡化 $\times 12\,000$; 4: 7.5mg/L Cd 处理的叶细胞, 示线粒体空泡化和多泡状结构(箭头所示) $\times 20\,000$; 5: 对照叶细胞的超微结构, 示细胞核 $\times 15\,000$; 6: 7.5mg/L Cd 处理的叶细胞, 示细胞核核膜破裂、核质消失和晶体出现(箭头) $\times 12\,000$

1: Ultrastructure of control leaf cells, showing chloroplast and mitochondrion $\times 8\,000$; 2: Leaf cells treated with 2.5mg/L Cd, showing swelling chloroplast $\times 17\,000$; 3: Leaf cells treated with 7.5mg/L Cd, showing disorganization of chloroplast and vacuolization of mitochondria $\times 12\,000$; 4: Leaf cells treated with 7.5mg/L Cd, showing vacuolization of mitochondria and appearance of multicycle-like membrane (arrow) $\times 20\,000$; 5: Showing nucleus in normal leaf cells $\times 15\,000$; 6: Leaf cells treated with 7.5mg/L Cd, showing breakage of nuclear envelope, disappearance of karyoplasms, and appearance of crystal (arrow) $\times 12\,000$

3 讨论

研究表明,重金属的积累通常会导致植物体出现各种细胞学和生理学的变化^[1, 4, 9, 10],其中,有些与植物的重金属耐受性有关。作为植物正常生长的非必需元素,随着 Cd 在槐叶苹叶片中蓄积量的逐渐增多,对矿质营养、光合作用、保护系统以及超微结构完整性等的破坏也越严重,这也意味着 Cd 对槐叶苹的毒害作用与其金属吸收特性关系密切。

扰乱矿质营养元素吸收是重金属逆境对植物的一个共同毒害表现^[4, 21]。Cd 处理所造成的槐叶苹体内离子的失衡主要表现为显著促进对 Ca 和极显著抑制对 P、K 和 Na 的吸收(表 1)。肖细元等的研究认为重金属胁迫条件下植物对钙吸收的增多并分布在细胞壁中,有利于增加细胞壁的稳定性和维持正常的结构和功能,提高耐重金属(砷)毒害的能力^[22];而另一方面,植物细胞质内 Ca 浓度过高会与细胞质中的磷酸根形成沉淀,扰乱以无机磷为基础的能量代谢系统^[23]。研究结果已证实重金属(Cd 等)胁迫对水生植物的毒害程度和 Ca 在细胞质中局部区域的过量增多有一定关系。而槐叶苹对 P 和 K 吸收的下降则是由于 Cd 毒害削弱了水生植物的生理代谢,从而导致不能满足细胞对它们主动吸收所需要的能量^[4]。而细胞内重要的产能器官—叶绿体和线粒体超微结构的明显损伤也表明槐叶苹的能量代谢功能严重丧失(图 7-3,图 7-4)。

重金属通过多条途径影响水生植物的正常光合作用,包括破坏叶绿体的发育和结构^[9, 21]、降解叶绿素和光合膜多肽组分、光化学活性下降^[24]以及抑制光合速率^[4]等。Cd 处理后槐叶苹表现上出现的严重褪绿症状与叶绿素含量逐渐下降相符合,这是由于叶绿素合成减少或降解加速造成的^[2]。而叶绿素作为光合色素,参与光合作用中光能的吸收、传递和转化,在植物光合作用中起着关键性的作用。因此叶绿素含量的降低是重金属导致光合作用减弱的主要原因之一。同时,叶绿素荧光检测被用来灵敏快速地了解植物光合作用对外界环境因子的响应^[25],尤其是植物叶片 PS II 的最大光化学效率(F_v/F_m)可以作为 PS II 潜在光化学活性的度量,能很好的反应植物受胁迫的程度^[12, 25],在胁迫条件下该参数明显下降,表明有功能的反应中心含量降低^[26]。随着 Cd 处理浓度的增加,槐叶苹叶绿素荧光 F_v/F_m 比值的下降幅度非常明显,这说明槐叶苹叶片 PS II 的结构和功能受到了不同程度的损伤与破坏,从而不利于叶绿体把光能转化为化学能。电镜下观察到的叶绿体被膜的断裂和解体等致死性损伤也证明 Cd 破坏了槐叶苹进行光合作用的结构基础,Cd 对槐叶苹光合作用细胞器的这种破坏作用已经不可逆转。

大量研究表明:过渡金属(如 Cd)等异型物质都能够对生物体产生氧化压力,而生物体细胞内的抗氧化酶活性和抗氧化物质含量能够预测有机体的抗氧化状态,它们可以作为判断机体受到氧化压力程度的生物标志物^[20]。本实验中,Cd 处理后,槐叶苹叶片中的抗氧化防御系统中 SOD 活性受到的抑制作用最明显;当超过一定浓度后,POD 活性、GSH 和 Car 含量($< 2.5 \text{ mg/L}$)以及 CAT 活性和 AsA 含量($< 5 \text{ mg/L}$)也都开始减少或低于正常水平。这意味着 Cd 处理浓度越大,槐叶苹遭受的氧化压力程度越重,其抗氧化防御系统的抵抗能力越弱。MDA 含量的显著增加、叶绿素含量和蛋白含量的显著减少都证明 Cd 已对槐叶苹造成氧化损伤^[10]。叶绿体被膜、线粒体嵴突和外膜以及细胞核核膜等内膜结构完整性的明显破坏即是膜脂过氧化损伤的最直观细胞学佐证(图 7-3,图 7-4,图 7-6)。灰色关联度分析结果表明,抗氧化防御系统中,各成分对槐叶苹抗 Cd 毒害的作用不同,综合起来抗氧化物质的作用强于抗氧化酶,其具体顺序依次为:GSH (0.6029) > AsA (0.6021) > Car (0.6013) > POD (0.6010) > SOD (0.5759) > CAT (0.5106)。

综上所述,Cd 蓄积对槐叶苹所造成的毒害作用是对细胞内膜和非膜结构完整性、生理生化活动的整体伤害,导致出现内膜破裂和核质消失等致死性结构损伤、明显抑制光合作用、保护系统水平失调和矿质营养吸收失衡等。区别只在于不同结构和指标间的耐受性和敏感性有差异。所观察的三大细胞器中结构最先出现明显变化的是线粒体。各生理指标中,雷达图(图 8)显示 SOD 对 Cd 胁迫的反应最敏感,参考 Mohan 等^[2]的计算方法,其半效应浓度(EC_{50})为 2.41 mg/L ,最大允许浓度(MPC)为 0.241 mg/L 。该浓度远高于地面水环境质量标准 V 类水(0.01 mg/L),也说明槐叶苹对水体中的 Cd 具有一定的耐受性。

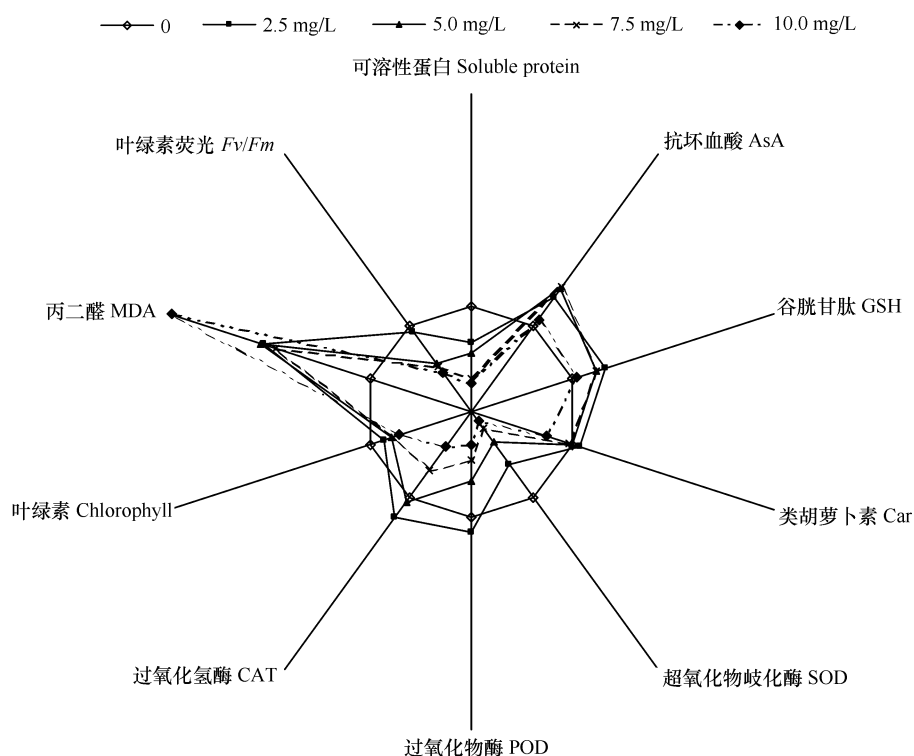


图8 Cd对槐叶苹各生理指标影响的雷达图分析

Fig. 8 Star-diagrams summarizing and correlating normalized values of physiological parameters measured in this study after treatment with increasing concentrations of Cd (2.5 ~ 10 mg/L) in *S. natans*

References:

- [1] Mohan B S, Hosetti B B. Aquatic Plants for Toxicity Assessment. Environmental Research Section A, 1999, 81: 259 — 274.
- [2] Mohan B S, Hosetti B B. Phytotoxicity of cadmium on the physiological dynamics of *Salvinia natans* L. grown in macrophyte ponds. Journal of Environmental Biology, 2006, 27 (4): 701 — 704.
- [3] Michael A. L. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. Environmental Pollution, 1995, 87: 319 — 336.
- [4] Xu Q S, Shi G X, Zhou Y M, *et al.* Distribution and toxicity of Cadmium in *Hydrilla verticillata* (L. F.) Royle. Acta Biologiae Experimentalis Sinica, 2004, 37(6): 461 — 468.
- [5] Sen A K, Mondal N G. *Salvinia natans*-as the scavenger of Hg (II). Water, Air, & Soil Pollution, 1987, 34(4): 439 — 446.
- [6] Sen A K, Mondal N G. Removal and uptake of copper (II) by *Salvinia natans* from waste water. Water, Air, & Soil Pollution, 1990, 49(1-2): 1 — 6.
- [7] Sen A K, Bhattacharyya M. Studies of uptake and toxic effects of Ni (II) on *Salvinia natans*. Water, Air, & Soil Pollution, 1994, 78(1-2): 141 — 152.
- [8] Mukherjee S, Kumar S. Adsorptive uptake of arsenic (V) from water by aquatic fern *Salvinia natans*. Journal of Water Supply Research and Technology, 2005, 54 (1): 47 — 53.
- [9] Dalla Vecchia F, La Rocca N, Moro I, *et al.* Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea Canadensis* exposed to cadmium. Plant Science, 2005, 168: 329 — 338.
- [10] Singh S, Eapen S, D'Souza S F. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. Chemosphere, 2006, 26: 233 — 246.
- [11] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymology, 1987, 148: 350 — 382.
- [12] Li D H, Liu Y D, Song L R. The effect of salt stress on some physiological and biochemical characteristics of *Nostoc sphaeroides* K tz (Cyanobacterium). Acta Hydrobiologica Sinica, 1999, 23(5): 414 — 419.
- [13] Stewert R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiology, 1980, 65: 245 — 248.

- [14] Maehly A C. Plant peroxidase. *Methods Enzymology*, 1955, 2: 801—813.
- [15] Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 1991, 196(2-3): 143—152.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantity of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248—254.
- [17] Chen J X, Wang X F. Experimental guidance of plant physiology. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2002. 119—127.
- [18] Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 1981, 32: 93—101.
- [19] Deng J L. Grey systems basic method. Wuchang: Huazhong University of Science and Technology Press, 1988. 17—28.
- [20] Wang L P, Zheng B H, Meng W. Molecular biomarkers in aquatic organisms in relation to the oxidative stress imposed by environmental pollutants. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(1): 380—388.
- [21] Ji W D, Shi G X, Zhang H, *et al.* Physiological and ultrastructural responses of *Potamogeton crispus* to Hg^{2+} stress. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(7): 2856—2863.
- [22] Xiao X Y, Liaio X Y, Chen T B, *et al.* Subcellular distributions of phosphorus and calcium in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and its tolerance to phytotoxicity of arsenic. *Acta Scientiae Circumstantia*, 2006, 26(6): 954—961.
- [23] Hepler P K, Wayne R O. Calcium and plant development. *Annual Review of Plant Physiology*, 1985, 36: 397—39.
- [24] Chen G X, Shi G X, He B, *et al.* Effect of mercury and cadmium on photochemical activity and polypeptide compositions of photosynthetic membranes from winter bud of *Brasenia schreberi*. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1999, 19(5): 521—525.
- [25] Maxwell K, Johnson GN. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 2000, 51: 659—668.
- [26] Krause G H, Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis; The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1991, 42: 313—349.

参考文献:

- [4] 徐勤松, 施国新, 周耀明, 等. 镉在黑藻叶细胞中的亚显微定位分布及其毒害效应分析. *实验生物学报*, 2004, 37(6): 461~468.
- [12] 李敦海, 刘永定, 宋立荣. 盐胁迫对葛仙米生理生化特性的影响. *水生生物学报*, 1999, 23(5): 414~419.
- [17] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导. 广州: 华南理工大学出版社, 2002. 119~127.
- [19] 邓聚龙. 灰色系统基本方法. 武昌: 华中理工大学出版社, 1988. 17~28.
- [20] 王丽平, 郑丙辉, 孟伟. 环境污染对水生生物产生氧化压力的分子生物标志物. *生态学报*, 2007, 27(1): 380~388.
- [21] 计汪栋, 施国新, 张慧, 等. 菹草对 Hg^{2+} 胁迫的生理和结构应答反应. *生态学报*, 2007, 27(7): 2856~2863.
- [22] 肖细元, 廖晓勇, 陈同斌, 等. 砷超富集植物蜈蚣草中磷和钙的亚细胞分布及其与耐砷毒的关系. *环境科学学报*, 2006, 26(6): 954~961.
- [24] 陈国祥, 施国新, 何兵, 等. Hg、Cd 对莼菜越冬芽光合膜光化学活性及多肽组分的影响. *环境科学学报*, 1999, 19(5): 521~525.