

铬胁迫对罗汉果幼苗生理生化指标的影响

张永霞^{1,2}, 石贵玉¹, 李霞², 张厚瑞³

(¹广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004; ²中国科学院遗传与发育研究所农业资源研究中心, 石家庄 050021;
³广西植物所, 广西桂林 541004)

摘要:重金属铬对植物的生长发育有着非常重要的抑制作用。但是至今为止,铬对中国特有药用植物罗汉果的生理生化影响的研究报道几乎没有。本实验以罗汉果幼苗为材料,研究了在不同浓度重金属铬离子培养基(0、50、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$)中生长15天的罗汉果幼苗的相关生理生化指标及其变化。结果表明,随着铬离子浓度的增加,植株叶片的叶绿素含量、蛋白质含量、可溶性糖含量、超氧化物歧化酶活性、过氧化氢酶活性一直下降;过氧化物酶活性先上升后下降;相反,脯氨酸和丙二醛含量则一直上升。铬离子的毒害导致体内保护酶活性受到抑制,膜系统受到伤害,从而影响了罗汉果幼苗的生长。在植物对铬离子的反应过程中,脯氨酸和活性氧信号可能起着非常重要的作用。

关键词:罗汉果;保护酶;生理生化;铬离子

中图分类号:Q418

文献标志码:A

论文编号:2010-1746

The Effect of Chromium Stress on Physiological and Biochemical Parameters of *Siraitia Grosvenorii* Seedlings

Zhang Yongxia^{1,2}, Shi Guiyu¹, Li Xia², Zhang Hourui³

(¹College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin Guangxi 541004; ²Center for Agricultural Resources, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Shijiazhuang 050021;
³Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin Guangxi 541004)

Abstract: Heavy metal chromium markedly inhibits plants growth and development. Although extensive studies have been conducted on the effects of chromium on other plant species such as wheat, effects of chromium on *Siraitia Grosvenorii* remain unknown. In this paper, the author studied physiological and biochemical parameters of *Siraitia Grosvenorii* under different levels of Cr^{6+} (0, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{mol/L}$). The results showed that the contents of chlorophyll, protein, soluble sugar, activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase were significantly decreased with increasing concentrations of chromium; the levels of peroxidase (POD) activity were increased at low concentrations of chromium and decreased when the plants were exposed to high concentrations of chromium. By contrast, the contents of proline and malonaldehyde (MDA) were substantially increased with increasing concentrations of chromium in the growth medium. The results indicated that chromium caused damage of the cellular membrane system and inhibition of activity of protective enzymes, which affected growth of *Siraitia Grosvenorii* seedlings. Proline and reactive oxygen species (ROS) signaling might play important roles in plant responses to chromium.

Key words: *Siraitia Grosvenorii*; protective enzymes; physiology and chemistry; chromium

基金项目:国家自然科学基金(30660036)。

第一作者简介:张永霞,女,1984年出生,内蒙古包头人,在读硕士,研究方向:转基因水稻抗逆新品种的研发。通信地址:050021河北石家庄槐中路286号中科院遗传与发育研究所农业资源研究中心, Tel: 0311-85871755, E-mail: zyx_915@126.com。

通讯作者:石贵玉,男,1953年出生,广西百色人,教授,主要从事植物生理生化研究。通信地址:541004广西桂林市育才路15号广西师范大学生命科学学院, Tel: 0773-5845952, E-mail: glshigy@163.com。

收稿日期:2010-06-03,修回日期:2010-06-24。

0 引言

罗汉果, 多年生藤本植物, 葫芦科苦瓜属, 主要分布在广西、广东和江西等省, 其中广西永福、桂林等地分布最多。罗汉果具有食用和保健两大功效, 在东南亚、日本、欧美等国家被誉为“东方神果”^[1], 是中国特有的名贵药材, 适用于糖尿病人^[2]。作为一种潜在的甜味剂, 罗汉果有着广阔的应用前景, 值得进一步深入的大力开发^[3]。

但是, 随着矿产资源的大量开发利用和工农业的快速发展, 各种化学产品、农药及化肥的广泛使用以及城市污泥、废水、废气、废渣排放量急剧增加, 导致重金属对土壤、水体的污染日益严重, 也严重影响了罗汉果的产量和品质, 并且直接或间接地通过食物链危害人类健康。例如, 李斐等^[4]对4种不同产地的罗汉果重金属铜和镉的含量进行了测定, 发现铜的含量均符合2005年版药典中重金属的限量标准, 但是镉含量都严重超标。如何控制和减轻重金属对植物的毒害, 更重要的是如何减少重金属在罗汉果中的积累已引起人们的广泛关注。

铬(Cr^{6+})作为工业的五毒之一, 是一种毒性较大的致畸、致突变剂^[5], 对动植物的生长发育有极强的伤害甚至致癌作用。有关铬的研究, 以前主要集中在小麦、大麦的细胞分裂、种子生理以及水生植物的生理生化影响上^[6-9], 但尚未见到过重金属铬对罗汉果影响的生理生化机理研究方面的报导。笔者以罗汉果幼苗为材料, 系统地分析了不同剂量的铬对罗汉果幼苗相关生理生化指标的影响, 旨在探讨铬对罗汉果幼苗毒害的作用机理和植物对铬伤害响应的生理生化机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料和处理

1.1.1 实验材料 广西师范大学生命科学学院实验室培养的罗汉果幼苗。

1.1.2 实验处理 通过芽体增殖对罗汉果幼苗进行继代培养, 然后接种在生根培养基($\text{MS}+2.0 \text{ mg/L BA}+0.05 \text{ mg/L NAA}$, 调pH值5.8)上培养, 20天后选取状态一致、大小相当的植株, 移种在含 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7(\text{AR})$ 的培养液中, 浓度梯度为 $50 \mu\text{mol/L}$ 、 $100 \mu\text{mol/L}$ 、 $150 \mu\text{mol/L}$ 、 $200 \mu\text{mol/L}$ (以纯Cr计), 另设对照为含 $0 \mu\text{mol/L}$ 铬的生根培养基, 每个处理10支试管。在温度 27°C , 每天光照12 h, 光照强度 2000 lx 的培养室中培养至15天时, 随机取样分析罗汉果幼苗中各项生理指标。

1.2 测定方法

1.2.1 叶绿素含量测定 采用分光光度法, 以80%丙酮研磨提取测定, 按Arnon法^[10]计算叶绿素含量。

1.2.2 蛋白质含量测定 参考马斯亮蓝染色法^[11], 以结晶牛血清清蛋白为标准, 测 $A_{595 \text{ nm}}$ 处光吸收, 单位: $\text{mg}/(\text{g}\cdot\text{FW})$ 。

1.2.3 脯氨酸含量测定 采用3,5-二硝基水杨酸法^[12]测定处理15天的罗汉果植株叶片。

1.2.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性测定: 按Gi-annopolitis和Ries^[13]的方法, 以每单位时间内抑制光化还原50%氮蓝四唑(NBT)为一个酶活性单位。

1.2.5 过氧化物酶(POD)活性测定 采用愈伤木酚氧化法^[10], 以 $A_{470 \text{ nm}}$ 波长下每分钟每克材料的光密度变化表示酶活性大小。

1.2.6 过氧化氢酶(CAT) 采用一般分光光度法, 按实验室购买的试剂盒的顺序测定。每毫克组织蛋白每分钟分解 $1 \mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 的量为一个酶活力单位, 单位: $\text{U}/(\text{mg}\cdot\text{prot})$ 。

1.2.7 丙二醛(MDA)含量测定 采用硫代巴比妥酸(TBA)法^[10], 以 $\mu\text{mol/g}$ 表示含量的大小。

2 结果与分析

2.1 铬处理对罗汉果幼苗脯氨酸和蛋白质含量的影响

脯氨酸是细胞内重要的渗透调节物质, 具有调节细胞渗透平衡、增强细胞结构稳定性和阻止氧自由基产生的作用^[14], 它与植物体内活性氧自由基的清除以及膜脂过氧化作用的减轻有密切关系^[15]。因此, 首先测定了不同剂量的铬对罗汉果幼苗中脯氨酸含量的影响。从图1中可以看到, 和其他植物一样, 在正常条件下, 游离脯氨酸的含量很低, 只有 0.0581 mg/g , 但在铬处理的罗汉果幼苗中脯氨酸的含量随着铬浓度的增加呈显著的上升趋势。在低浓度($50 \mu\text{mol/L}$)铬处理条件下, 罗汉果幼苗脯氨酸含量为 0.1167 mg/g , 与对照相比, 上升了100.86%; 当铬的浓度提高到 $200 \mu\text{mol/L}$ 时, 罗汉果幼苗中脯氨酸的含量高达 0.4224 mg/g , 和对照比上升了627.02%。统计结果表明, 铬离子浓度与罗汉果中脯氨酸含量呈极显著性相关($R^2=0.99$, $\alpha=0.01$)。

对铬处理条件下罗汉果幼苗中蛋白质含量进行测定, 研究发现随着铬处理浓度的增加, 罗汉果幼苗的蛋白质含量呈明显下降趋势(如图2)。对照罗汉果幼苗中蛋白质含量为 72.89 mg/g , 但 $50 \mu\text{mol/L}$ 铬处理15天罗汉果幼苗中蛋白质含量为 58.02 mg/g , 下降了20.40%; 当铬的浓度增加到 $200 \mu\text{mol/L}$ 时, 蛋白质含量仅为 23.47 mg/g , 和对照相比下降了67.80%。上述结果表明, 在 Cr^{6+} 胁迫下, 蛋白质合成受阻, 分解加快。这与徐勤松等^[8]、石贵玉等^[9]以铬处理水车前和水稻幼苗以及周建华等^[16]以镉处理水稻幼苗, 随着铬、镉

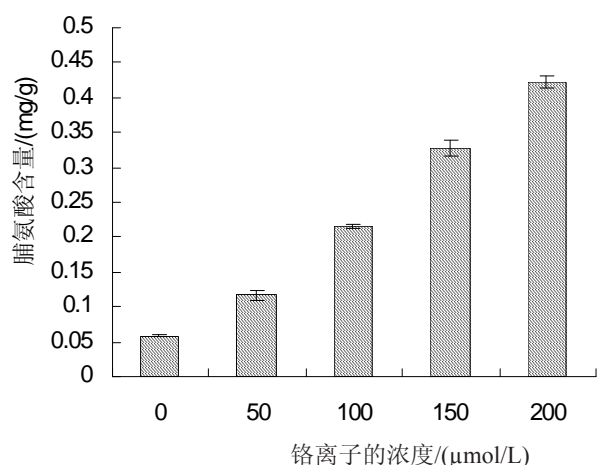


图1 铬处理对脯氨酸含量的影响

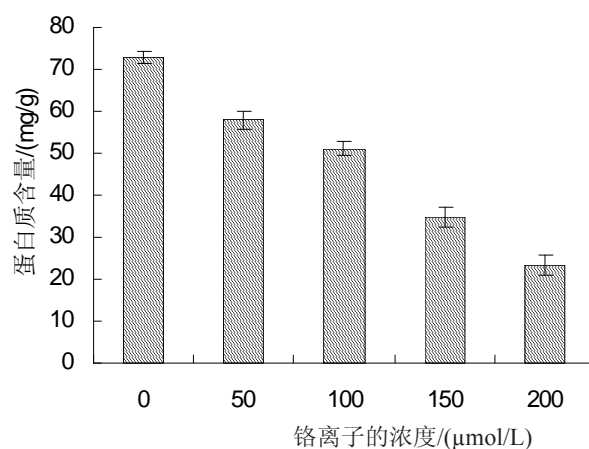


图2 铬处理对蛋白质含量的影响

浓度的增大,蛋白质含量下降愈明显的结果相一致。统计结果表明,铬离子浓度与蛋白质含量呈极显著性相关($R^2 = -0.99, \alpha = 0.01$)。

2.2 铬处理对罗汉果幼苗叶绿素和可溶性糖含量的影响

糖是调节渗透胁迫的小分子物质,脯氨酸的积累需要碳水化合物,碳水化合物通过氧化磷酸化作用为脯氨酸的合成提供必需的氧化还原能力,它是植物代谢的基础物质^[7]。在不同浓度的铬处理下,还发现罗汉果幼苗的叶色变黄。对叶绿素和可溶性糖含量的分析结果表明,铬对二者具有明显的抑制作用,且铬的浓度愈高,叶绿素和可溶性糖含量下降愈严重(如图3、图4)。例如,对照幼苗的叶绿素含量为2.105 mg/(g·FW),但在50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度铬处理时,罗汉果幼苗叶绿素含量为1.972 mg/(g·FW),下降了6.32%;当铬的浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 时,叶绿素的含量下降了46.03%。与对照组比较,铬为50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时,罗汉果幼苗可溶性糖含量下降了21.32%,在高浓度铬(200 $\mu\text{mol/L}$)处理

15天后,幼苗可溶性糖含量下降了48.26%。上述结果说明,重金属铬对罗汉果幼苗的叶绿素的合成以及光合作用的影响巨大,是抑制植物生长的重要因素。这与徐勤松等^[8]、石贵玉等^[9]以铬处理水车前和水稻幼苗以及周建华等^[10]以镉处理水稻苗,随着铬、镉浓度的增大,叶绿素和可溶性糖含量下降愈明显的结果相一致。经统计分析,铬离子浓度与罗汉果中叶绿素含量和可溶性糖呈极显著性相关($R^2 = -0.99, \alpha = 0.01$ 和 $R^2 = -0.97, \alpha = 0.01$)。

2.3 铬处理对罗汉果幼苗SOD和POD活性的影响

SOD和POD是一类重要的抗氧化酶,在清除重金属等诱导产生的氧自由基和过氧化物、抑制膜脂过氧化、保护细胞免遭伤害等方面起着重要作用^[11]。从图5可看出,罗汉果幼苗经不同浓度铬处理后,过氧化物相关的酶的活性也有变化。随着浓度的增加,SOD的活性呈下降趋势。如铬浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 时,罗汉果幼苗SOD活性比对照下降了10.11%,铬浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 和200 $\mu\text{mol/L}$ 时,其SOD活性与对照比

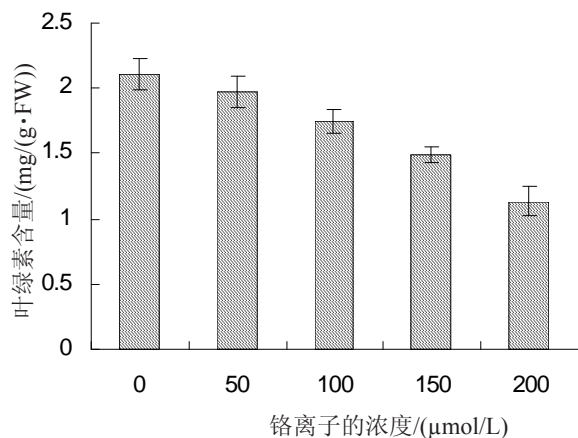


图3 铬处理对叶绿素含量的影响

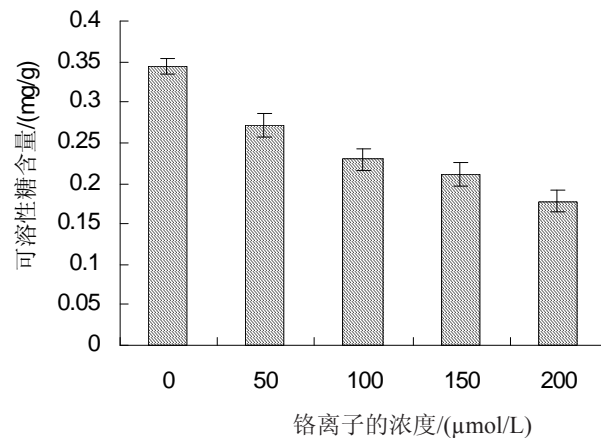


图4 铬处理对可溶性糖含量的影响

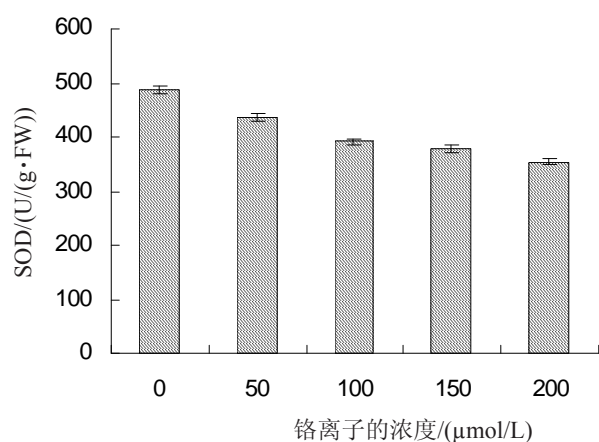


图5 铬处理对SOD活性的影响

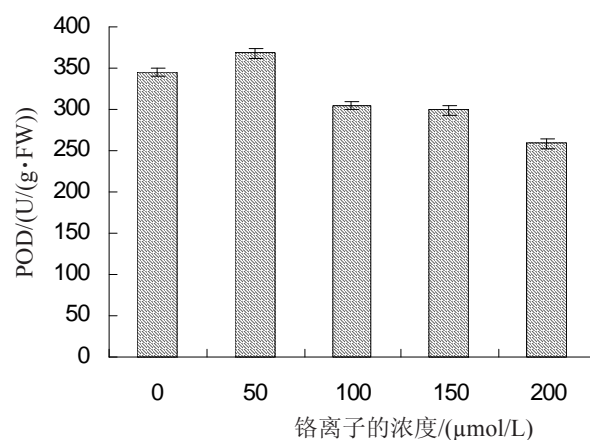


图6 铬处理对POD活性的影响

别下降了22.30%和27.25%。但罗汉果幼苗经铬处理后,POD活性则是呈先升高然后降低的趋势(如图6)。如铬浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 时,POD活性比对照升高了6.71%,而在铬浓度升高为100 $\mu\text{mol/L}$ 和200 $\mu\text{mol/L}$ 时,罗汉果幼苗体内POD活性与对照比分别下降了11.55%和24.95%。陈平等^[19]、石贵玉等^[20]、孔祥生等^[21]用重金属镉、铬处理水稻和玉米幼苗,亦发现随着镉和铬浓度的增加,植物体内SOD活性下降,而POD活性先增加后降低的结果。

2.4 铬处理对罗汉果幼苗CAT活性的影响

过氧化氢酶也被认为是生物演化过程中建立起来的生物防御系统的关键酶之一,其生物学功能是催化细胞内过氧化氢的分解,防止过氧化,在生物与非生物逆境中维持生物体内的氧化平衡^[22]。经研究发现,罗汉果苗在不同浓度的铬处理下,植物体内CAT活性随着铬浓度的升高而下降(如图7)。例如,当铬浓度为50 $\mu\text{mol/L}$ 时,罗汉果体内CAT活性与对照相比较下降了10.50%;当铬浓度升高为100 $\mu\text{mol/L}$ 时,CAT活性降低了30.34%,当铬的浓度进一步升高为200 $\mu\text{mol/L}$

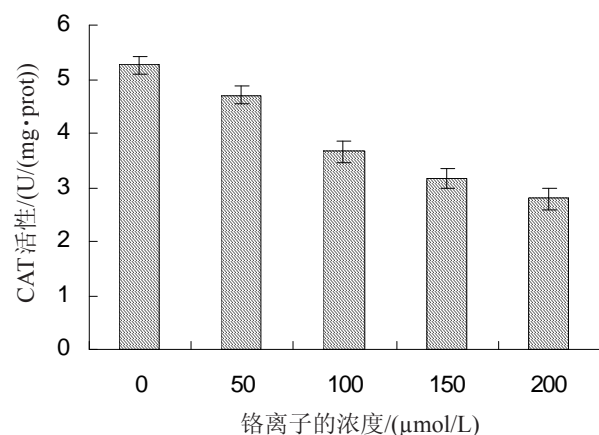


图7 铬处理对CAT活性的影响

时,罗汉果幼苗体内的CAT活性和对照相比降低了47.04%。罗汉果体内CAT对铬处理响应的变化趋势与徐勤松等^[8]用铬处理水车前时观察到的CAT活性下降的趋势一致。

2.5 铬处理对罗汉果MDA含量的影响

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化的产物,其含量可反映膜脂过氧化的程度^[23-25],是植物膜系统受伤害的重要指标之一。研究表明,罗汉果幼苗经不同浓度铬处理后,MDA含量均表现为上升趋势,浓度愈大上升幅度也越大(如图8)。例如,在铬浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时,罗汉果幼苗体内MDA含量为9.017 $\mu\text{mol/mg}$,与对照的7.167 $\mu\text{mol/mg}$ 相比上升了25.81%,但当铬浓度升高到200 $\mu\text{mol/L}$ 时,MDA含量则为11.05 $\mu\text{mol/mg}$,上升了54.19%。这些结果说明,经铬处理后罗汉果细胞膜受到破坏,这与石贵玉等^[10]人用 Cr^{6+} 处理烟草组培苗时随着 Cr^{6+} 浓度的增加,MDA含量亦增加的结果相一致(如图8)。

3 讨论与结论

从铬胁迫下罗汉果幼苗生理生化变化可以看

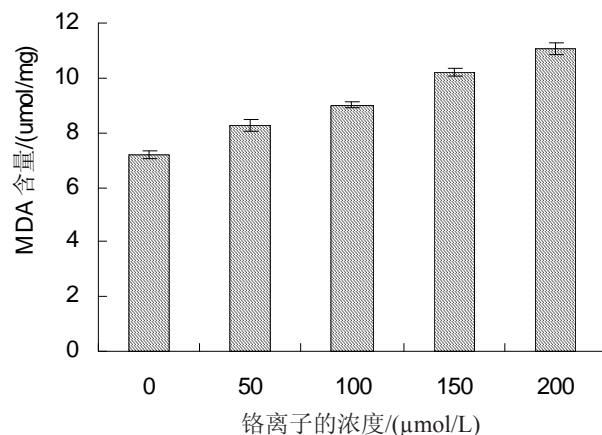


图8 铬处理对MDA含量的影响

出,随着铬离子浓度的增加,对植物的生长产生毒害作用。在 Cr^{6+} 胁迫下, Cr^{6+} 破坏了罗汉果幼苗体内的保护酶系统,使SOD活性和CAT活性下降,POD活性先上升后下降,蛋白质合成受阻, O_2^- 和 H_2O_2 等活性氧在体内累积,引起膜脂过氧化,产生了大量MDA影响细胞代谢,最终影响罗汉果幼苗的生长。此外,在 Cr^{6+} 胁迫下罗汉果的可溶性糖和叶绿素含量明显降低,膜的稳定性下降。叶片退绿是植物受重金属毒害后出现的普遍现象,其原因是 Cr^{6+} 抑制叶绿素合成过程中酶的活性,影响叶绿素的合成^[26]。 Cr^{6+} 可能引起细胞膜结构发生变化,从而破坏叶绿体的完整结构,导致叶绿素含量减少。叶绿素含量减少,影响植物对养分的吸收、运输和光合作用,从而引起植株生长量下降,使得可溶性糖的含量也下降。

另外,脯氨酸通过螯合金属离子能降低细胞内游离金属离子的含量,缓解了铬离子的毒性,通过清除自由基,增加谷胱甘肽水平和保护抗氧化酶的活性^[27]。此外,脯氨酸还能维持渗透压的平衡,清除羟自由基,缓解重金属对抗氧化酶的抑制作用。因此,在重金属铬离子的胁迫下,为了抵抗外界的变化,罗汉果幼苗体内的脯氨酸的浓度升高。这些变化都反映了铬作为一种有毒元素,干扰植物各种生理生化过程的阶段性和多元化。

本研究首次报道了中国重要经济作物罗汉果对铬胁迫处理所发生的生理生化变化,并为罗汉果对抗铬毒害的可能生理生化机理提供了重要的实验证据。本研究为将来改良罗汉果抗铬毒害以及减少罗汉果中铬的积累提供了重要参考。

参考文献

- [1] 袁辉. 桂林市罗汉果产业现状及发展对策[J]. 广西园艺, 2006, 17(6): 9-11.
- [2] 张建华, 黄均昌, 张德君. 罗汉果苷V测定方法研究[J]. 食品工业, 2007, 6: 57.
- [3] 曾祥林. 广西特产植物罗汉果研究进展[J]. 广西医学, 2009, 31(8): 1185.
- [4] 李斐, 王承南, 周莹, 等. 罗汉果中重金属铜和镉的含量分析与评价[J]. 微量元素与健康研究, 2006, 23(6): 30.
- [5] 顾公望, 张宏伟. 微量元素与恶性肿瘤[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993: 199-205.
- [6] 蒋德富, 杨晓华. 对冬小麦6246发芽及根尖细胞有丝分裂影响的初步研究[J]. 环境科学, 1981, 2(5): 14-1.
- [7] 张义贤. 三价铬和六价铬对大麦毒害效应的比较[J]. 中国环境科学, 1997, 17(6): 565-566.
- [8] 徐勤松, 施国新, 杜开和. 六价铬污染对水车前叶片生理生化及细胞超微结构的影响[J]. 广西植物, 2002, 22(1): 92-96.
- [9] 石贵玉. 重金属 Cr^{6+} 对水稻幼苗的毒害效应[J]. 广西科学, 2004, 11(2): 154-156.
- [10] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 88-91, 154, 160-161, 184-185, 257.
- [11] 李建武, 萧能庚, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 174.
- [12] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 1-3.
- [13] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutation occurrence in higher plants[J]. Plant Physiol, 1997: 53: 315.
- [14] 彭志红, 彭克勤, 胡家金. 渗透胁迫下植物脯氨酸积累的研究进展[J]. 中国农学通报, 2002, 18(4): 80-83.
- [15] Metha S K, Gaur J P. Heavy metal induced proline accumulation and its role in a meliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*[J]. New Phytol, 1999, 143: 253-259.
- [16] 周建华, 王锐. 硅营养缓解水稻幼苗Cd、Cr毒害的生理研究[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(1): 11-15.
- [17] Foy C D, White MC. The physiology of metal toxicology in plants[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1978, 29: 511-566.
- [18] 崔爱花, 毛树春, 韩迎春, 等. 裸苗移栽棉花缓苗期抗氧化酶活性和叶绿素含量的变化特点[J]. 棉花学报, 2008(5): 372-378.
- [19] 陈平, 余土元, 陈惠阳. 镉对镉胁迫下水稻幼苗生长及生理特性的影响[J]. 广西植物, 2002, 22(3): 277-282.
- [20] 石贵玉, 陈明媚. 铬、镉对水稻幼苗生长和生理的影响[J]. 广西植物, 2005, 25(3): 281-284.
- [21] 孔祥生, 郭秀璞, 张妙霞. 镉胁迫对玉米幼苗生长及生理生化的影响[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(2): 111-113.
- [22] Magbanua Z.V, de Moraes C.M, Brooks T.D, Williams W.P, et al. Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*[J]. Mol. Plant Microbe Interact, 20(6): 697-706.
- [23] 张利红, 李培军, 李雪梅, 等. 镉胁迫对大麦幼苗生长及生理特性的影响[J]. 生态学杂志, 2005, 24(4): 458-460.
- [24] 孔祥生, 郭秀璞, 张妙霞. 镉胁迫对玉米幼苗生长及生理生化的影响[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(2): 111-113.
- [25] Sugiyama M. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage[J]. Cell Biol Toxicol, 1994, 10: 1-22.
- [26] Stobart AK, Griffiths WT, Ameen-Bukhar II, et al. The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley[J]. Physiol. Plant, 1985, 63: 293-298.
- [27] Jin Xu, HengXia Yin, Xia Li. Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyper accumulator, *Solanum nigrum* L[J]. Plant Cell Rep, 2009, 28: 325-333.