

重金属 Hg 对黑三棱生长特性及超微结构影响研究

许响¹, 谷巍^{2*}, 陈娟², 高杰², 李红芳¹, 邵婧², 吴启南², 巢建国²

(1. 江苏联合职业技术学院连云港中医药分院, 江苏 连云港 222007; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 研究重金属 Hg 对黑三棱 *Sparganium stoloniferum* Buch.-Ham 生长特性及超微结构的影响。方法 分别采用 LI-6400 光合仪及 CCM-200 型叶绿素仪对黑三棱的光合、蒸腾速率和叶绿素含量(CCI 值)进行测定, 并通过 H7650 型透射电镜对其叶片超微结构进行观察。结果 在 Hg²⁺ 处理下, 随着 Hg²⁺ 处理浓度的增加及污染时间的延长, 三棱叶褪绿变黄, 药用部位块茎鲜质量明显降低, CCI 值、净光合速率(*P_n*)及蒸腾速率(*T_r*)下降, 细胞间隙 CO₂ 浓度(*C_i*)增大, 叶肉细胞中细胞核核仁分散, 核膜破损, 叶绿体膨胀至解体, 线粒体变形, 嵴突膨胀、减少。结论 重金属 Hg 污染破坏三棱叶细胞结构, 影响其光合作用, 使其生长发育受阻, 产量减少, 品质降低。

关键词: 三棱; 重金属; 光合特性; 生长特性; 超微结构

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2015)06-0579-04

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2015.0579

Effects of Hg on Growth Characteristics and Ultrastructure of *Sparganium Stoloniferum*

XU Xiang¹, GU Wei^{2*}, CHEN Juan², GAO Jie², LI Hong-fang¹, SHAO Jing², WU Qi-nan², CHAO Jian-guo²

(1. Lianyungang TCM Branch of Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang, 222007, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of Hg on growth characteristics and ultrastructure of *Sparganium stoloniferum*. **METHODS** The photosynthetic characteristics and transpiration rate were analyzed by LI-6400 Portable Photosynthesis System while the chlorophyll was measured by CCM-200 plus Chlorophyll Content Meter. Furthermore we also used H7650 transmission electron microscope to observe the ultrastructure of the blades. **RESULTS** The results showed that with the rising concentration of Hg²⁺ and the increasing polluted time, *P_n*, *T_r* and chlorophyll content decreased except *C_i*, and fresh weight of medicinal parts tuber also decreased. Meanwhile, the nuclear membrane was broken and nucleoli disappeared. The chloroplast swelled to collapse and the cristae of mitochondria swelled and decreased. **CONCLUSION** The study suggested that the heavy metal Hg can lead to the destruction of the ultrastructure and photosynthetic of *S. stoloniferum* and it also affected its production and quality.

KEY WORDS: *Sparganium stoloniferum*; heavy metal; photosynthetic characteristics; growth characteristics; ultrastructure

近年来, 环境污染日益严重, 重金属对土壤-水体的污染及由此造成的对水生植物的毒害已成为植物界的研究热点之一^[1]。Hg²⁺ 是水体重要污染源, 毒性大^[2], 能被植物体吸收、富集, 阻碍植物的正常生长发育, 并可通过食物链进入生命体, 危害动物及人体的健康^[3-4]。中药材栽培中重金属污染直接或间接引起中药材品质的变化, 是当前中药材生产中亟待解决的重要问题^[5-6]。目前, 有关重金属污染物对植物生长影响机制研究大多集中于农作物, 对药用植物影响研究鲜有报道。本文以黑三棱科植物黑

三棱 *Sparganium stoloniferum* Buch.-Ham 为材料, 研究其在重金属 Hg²⁺ 污染下形态、生理指标及超微结构等变化规律, 对指导水生药用植物生产及中药材安全性环境风险进行评估, 对于了解水生药用植物生态环境适应机制及提高中药品质具有理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2012 年 6 月 15 日采自南京中山植物园, 经南京中医药大学中药资源教研室谷巍教授鉴定为黑

收稿日期: 2015-05-30; 修稿日期: 2015-07-22

基金项目: 江苏省青蓝工程项目(2012); 国家自然科学基金(81073002); 江苏省优势学科建设工程项目(yssxk-2014)

作者简介: 许响(1983-), 男, 江苏连云港人, 江苏联合职业技术学院连云港中医药分院讲师。* 通信作者: guwei9926@126.com

三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum* Buch.-Ham. 选取生长旺盛、长势和个体大小基本一致的植株分别移栽于处理好的盆中,每盆 8 株,盆的规格为 70 cm×60 cm×50 cm,每盆加入过 40 目筛的晒干粉碎土 40 kg,并按实验设定浓度加入重金属,实验过程中随时添加改良 Hoagland 培养液^[7],保持水位距土面高约 5 cm。实验按预实验结果设定 0、1、5、10、50、100 mg/kg 6 个浓度梯度(汞源为 HgCl₂)。于胁迫第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天和第 35 天,分别测定三棱叶主要生理指标,试验重复 5 次。

1.2 指标测定

1.2.1 光合特性的测定 采用 LI-6400 型(LI-COR, USA)便携式光合测定仪在晴朗无云的天气于上午 10:00 测定三棱向阳倒 3 片展开叶的净光合速率(P_n)、细胞间隙 CO₂ 浓度(C_i)和蒸腾速率(T_r)。重复记录 5 次,取其平均值进行统计分析。

1.2.2 叶绿素 CCI 值测定 用 CCM-200(Opti-Sciences, USA)型叶绿素仪于上午 10:00 测定三棱向阳倒 3 片展开叶的 CCI 值。测定时,尽量避免主脉和有伤害的区域,在叶片中部主脉两边各重复测定 5 次。

1.2.3 超微结构观察 在三棱向阳倒 3 片展开叶上取大小约 1 mm² 左右的三棱叶片,用 2.5% 戊二醛和 2% 锇酸双重固定,丙酮系列脱水, Epon812 包埋, LKB 超薄切片仪切片,切片经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色后,于 H7650 型透射电镜下观察并拍照。实验依次观察三棱叶肉细胞的叶绿体、线粒体、细胞核的变化特征。

2 结果

2.1 Hg²⁺ 污染对三棱形态的影响

处理第 7 天,对照和浓度低于 10 mg/kg 处理组,叶均呈翠绿色,高于 10 mg/kg 处理组三棱老叶变黄;处理第 14 天,叶片颜色均出现明显变化,低于 10 mg/kg 的组,其叶呈深绿色,浓度达到 50 mg/kg 时,叶大面积变黄,部分植株开始死亡;处理第 35 天,浓度为 50 mg/kg 时,三棱植株大部分死亡。

2.2 Hg²⁺ 污染对三棱药用部位块茎鲜质量的影响

如图 1,处理 35 d 后,对 Hg²⁺ 污染下三棱药用部位块茎的鲜质量进行称量,发现 Hg²⁺ 的处理浓度低于 10 mg/kg 时,三棱块茎鲜质量随处理浓度的增大而降低,三棱能在低于 10 mg/kg Hg²⁺ 处理环境下生长,但产量较低。浓度高于 50 mg/kg,植

株部分死亡。

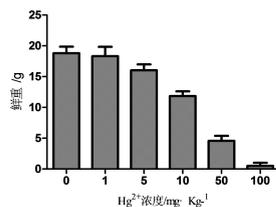


图 1 Hg²⁺ 对三棱药用部位块茎鲜质量的影响

2.3 Hg²⁺ 污染对三棱叶绿素 CCI 值的影响

由图 2 可以看出,重金属污染对叶绿素含量变化的影响比较明显。在 Hg²⁺ 胁迫下,随处理浓度的增加,污染时间的延长,三棱 CCI 值均呈下降趋势。胁迫至第 35 天,50 mg/kg 处理组叶绿素 CCI 值为对照组的 27.4%。经统计分析,叶绿素 CCI 值与 Hg²⁺ 处理浓度呈极显著负相关($P < 0.01$)。

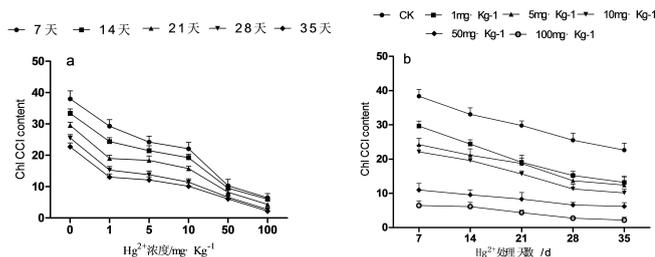


图 2 Hg²⁺ 对三棱叶片叶绿素 CCI 值的影响

2.4 Hg²⁺ 污染对三棱净光合速率的影响

光合作用是植物能量转化与同化物合成的基础,也是对重金属胁迫最敏感的生理现象。由图 3 可以看出,三棱净光合速率(P_n)随着 Hg²⁺ 处理浓度的上升而下降,三棱 P_n 与 Hg²⁺ 处理浓度呈极显著负相关($P < 0.01$)。

由图 3 可知,当处理浓度低于 1 mg/kg 时,三棱净光合速率随处理时间的延长先上升后下降,处理浓度高于 1 mg/kg 时,净光合速率随处理时间的延长而下降。处理至第 35 天,50 mg/kg 处理组净光合速率为对照组的 25.4%。

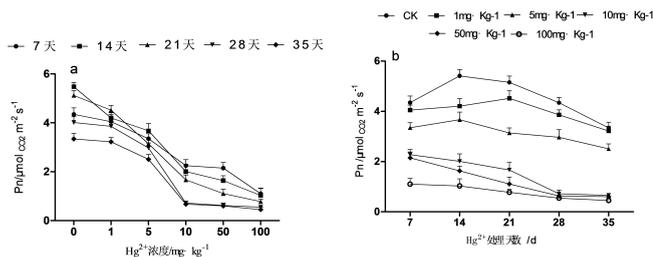


图 3 Hg²⁺ 对三棱叶片净光合速率的影响

2.5 Hg²⁺ 污染对三棱细胞间隙 CO₂ 浓度的影响

细胞间隙 CO₂ 浓度 (*C_i*) 是影响植物光合作用的一个重要因素,是光合作用直接的碳源。图 4 可知,Hg²⁺ 胁迫下三棱叶的 *C_i* 值随着胁迫浓度的增加和胁迫时间的延长而增大。如图 4,第 35 天,50 mg/kg 处理组叶片胞间 CO₂ 浓度为对照组的 1.33 倍。统计分析结果显示,三棱叶的细胞间隙 CO₂ 浓度与 Hg²⁺ 胁迫浓度呈极显著正相关 ($P < 0.01$)。

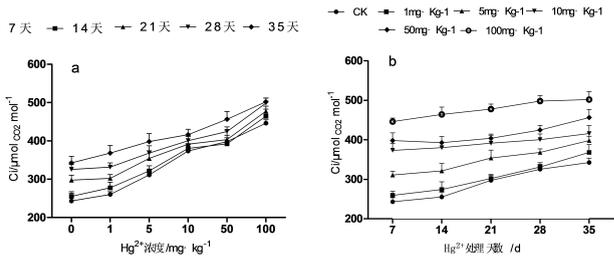


图 4 Hg²⁺ 对三棱叶片胞间 CO₂ 浓度的影响

2.6 Hg²⁺ 污染对三棱蒸腾速率的影响

如图 5,随着 Hg²⁺ 处理浓度的增大和处理时间的延长,三棱叶片蒸腾速率 (*T_r*) 均呈下降趋势。胁迫至第 35 天,叶片的蒸腾速率降到最小值,50 mg/kg 处理组为对照组的 30.5% (图 5)。蒸腾速率与 Hg²⁺ 处理浓度呈极显著负相关 ($P < 0.01$)。

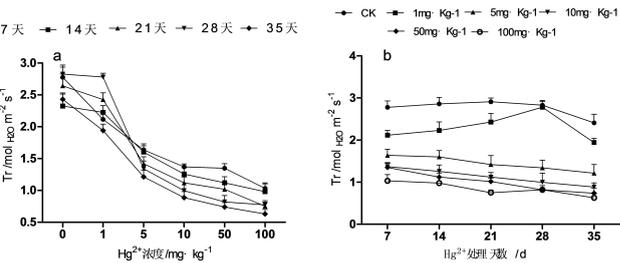
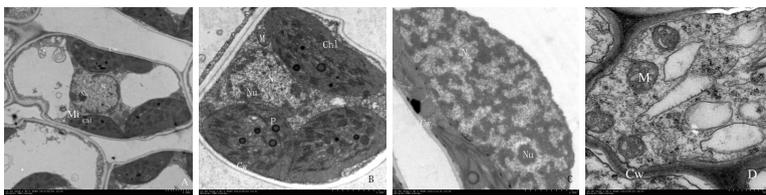


图 5 Hg²⁺ 对三棱叶片蒸腾速率的影响



A.对照三棱叶细胞;B.1 mg/kg Hg²⁺ 胁迫下的叶细胞;

C.50 mg/kg Hg²⁺ 胁迫下的细胞核;D.50 mg/kg Hg²⁺ 胁迫下的线粒体

N.细胞核;Nu.核仁;Nm.核膜;Chl.叶绿体;Cw.细胞壁;Mi.线粒体;P.嗜锻颗粒

图 6 三棱叶片超微结构

光合速率是反映植物光合作用能力的一个主要指标,逆境胁迫会影响植物的光合作用。净光合速率是光合系统功能的直接体现,也是植株光合系统能否正常工作的主要指标^[10]。Hg²⁺ 污染下,由于叶绿体双层膜结构遭破坏,直接影响到光合作用等

2.7 Hg²⁺ 污染对三棱超微结构的影响

电镜观察发现,对照叶细胞中,叶绿体为长椭圆形,内部结构清晰,基粒类囊体和基质类囊体形成完整的膜系统,被膜完好;线粒体长棒型,嵴突呈管状,排列整齐,间质浓密,被膜完整;核仁、核膜清晰,核质均匀;叶细胞质膜紧贴细胞壁。在 1 mg/kg Hg²⁺ 污染下,叶细胞整体有些变形。10 mg/kg Hg²⁺ 处理下,叶绿体形态改变,部分双层膜结构模糊不清,基粒片层松散、变形,出现大颗粒状的淀粉粒。50 mg/kg Hg²⁺ 处理下,整体结构呈收缩状态,叶绿体形状严重变形,基粒和类囊体膨胀成球形,细胞核开始解体,细胞膜不见,核质呈絮状,线粒体变成椭圆形,嵴结构部分位置已模糊不清,数目减少;100 mg/kg Hg²⁺ 处理下,叶绿体膨胀成球,细胞核解体,线粒体模糊不清 (图 6)。

3 讨论

叶绿素是植物进行机体代谢活动的重要物质,是光合作用捕获光的主要成分。Somashekarish 等^[8]认为,叶绿素含量的降低主要与叶绿素合成途径中几种酶有关,酶的活性受到抑制,会阻碍叶绿素的合成。在本文中,Hg²⁺ 污染使三棱叶片叶绿素含量降低,这可能是因为在大量的 Hg²⁺ 在三棱体内积累,抑制了原叶绿素酸酯还原酶和氨基-酮戊酸的合成,从而影响了叶绿素的生物合成;同时叶绿体膜系统结构遭到破坏,同样导致了叶绿素总量的下降^[9]。叶绿素是植物进行光合作用所必需的,叶绿素的减少,必将影响光系统的正常发挥,导致自发荧光强度、光合速率降低。

功能,使光合速率下降。光合作用的下降,使三棱生长受阻,发育延迟,生物量减少,品质降低。

植物细胞超微结构的改变是植物一系列生理活动异常的细胞学基础^[11]。植物细胞遭受重金属胁迫后其超微结构会发生不同程度的损伤,主要表现

在细胞核、叶绿体、线粒体、质膜等的异常变化。本文在电镜下观察到三棱叶细胞受 Hg^{2+} 毒害后,细胞器发生了不同程度的改变,由此可见,重金属 Hg^{2+} 对植物产生毒害的另一重要机制是由于高浓度 Hg^{2+} 造成叶绿体、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。

综上所述,在 Hg^{2+} 处理下,随着处理浓度的增加及处理时间的延长,三棱叶绿素含量、光合作用都受到不同程度的影响,植物叶肉细胞及叶绿体超微结构出现一定程度的毒害特征,生长发育受阻,生物量减少,品质降低。但在 Hg^{2+} 浓度小于 10 mg/kg 情况下,一定时间内三棱仍能维持其个体的生长,这为说明超富集植物三棱具有汞耐性提供了一定依据。

参考文献:

[1] Feleafel MN, Mirdad ZM. Hazard and effects of pollution by Lead on vegetable crops[J]. J Agr Envir Ethics, 2013, 26(3): 547-567.

[2] 何舞,王富华,李明阳,等.Pb、Cd、Hg 复合污染对蕹菜生长和重金属累积规律的影响[J].江西农业学报,2011, 23(12):41-44. He W, Wang FH, Li MY, et al. Effects of combined pollution of Pb,Cd and Hg on growth of water spinach and heavy metal accumulation regularity[J]. Acta Agr Jiangxi, 2011, 23(12): 41-44.

[3] Sytar O, Kumar A, Latowski D, et al. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants[J]. Acta Physiol Plant, 2013, 35(4): 985-999.

[4] 武征,郭巧生,王庆亚,等.夏枯草内在品质及生长特性对铅、铜、镉胁迫的响应[J].中国中药杂志,2010, 35(3):263-267. Wu Z, Guo QS, Wang QY, et al. Effects of Lead, Copper and cadmium stresses on growth and inherent quality of *Prunella vulgaris*[J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(3): 263-267.

[5] 孔四新,苏贺,詹延廷,等. Pb^{2+} 胁迫对冬凌草种子萌发和幼苗生

长的影响[J].中国中药杂志,2014, 39(21):4216-4221. Kong SX, Su H, Zhan YT, et al. Effects of Pb^{2+} stress on seed germination&seedling growth of *Rabdosia rubescens*[J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(21): 4216-4221.

[6] 谷巍,施国新,巢建国,等.汞、镉、铜污染对鱼草细胞膜系统的毒害作用[J].应用生态学报,2008, 19(5):1138-1143. Gu W, Shi GX, Chao JG, et al. Toxic effects of Hg^{2+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} on cell membrane system of *Cabomba caroliniana* A. Gray[J]. Chin J Appl Ecol, 2008, 19(5): 1138-1143.

[7] 武丽,李章海,叶文玲,等.钼胁迫对烟草光合荧光参数和叶绿体超微结构的影响[J].农业机械学报,2014, 45(8):262-268. Wu L, Li ZH, Ye WL, et al. Effects of photosynthetic Fluorescence Parameters and Chloroplast ultrastructure of tobacco under Molybdenum stress[J]. T Chin Soc Agr Mach, 2014, 45(8): 262-268.

[8] Moreno-Jiménez E, Esteban E, Carpena-Ruiz RO, et al. Arsenic- and mercury-induced phytotoxicity in the Mediterranean shrubs *Pistacia lentiscus* and *Tamarix gallica* grown in hydroponic culture[J]. Ecotox Environ Saf, 2009, 72(6): 1781-1789.

[9] 凌俐俐,黄翼,彭良志,等.镁缺乏和过量胁迫对纽荷兰脐橙叶绿素荧光特性的影响[J].生态学报,2014, 34(7):1672-1680. Ling LL, Huang Y, Peng LZ, et al. Influence of Magnesium deficiency and excess on chlorophyll fluorescence characteristics of Newhall navel orange leaves[J]. Acta Ecol Sin, 2014, 34(7): 1672-1680.

[10] 梁尧,姜晓莉,杨粉团,等.重金属铅胁迫对人参光合特征与皂苷含量的影响[J].中国中药杂志,2014, 39(16):3054-3059. Liang Y, Jiang XL, Yang FT, et al. Effects of Lead stress on net photosynthetic rate, SPAD value and ginsenoside production in Ginseng(*Panax ginseng*)[J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(16): 3054-3059.

[11] 王钧,邬卉,薛生国,等.锰胁迫对杠板归细胞超微结构的影响[J].生态学报,2014, 34(4):798-806. Wang J, Wu H, Xue SG, et al. Manganese stress on the ultrastructures of a Manganese tolerant plant, *Polygonum perfoliatum* L[J]. Acta Ecol Sin, 2014, 34(4): 798-806.

(编辑:董宇)

· 启事 ·

本刊欢迎广大作者网上注册投稿

网址: <http://xb.njucm.edu.cn>