

Cr^{6+} 对高丹草幼苗生理特性与根尖细胞有丝分裂的影响

赵 晖, 吕金印

(西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:采用室内培养的方法,研究了不同浓度(0、0.5、1.0、1.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) K_2CrO_4 处理高丹草幼苗后对其生长、相关生理特性及细胞分裂的影响。结果表明,随着 Cr^{6+} 处理浓度增加,高丹草幼苗生长受到抑制,质膜透性、丙二醛(MDA)含量持续升高;叶片中可溶性糖、脯氨酸(Pro)含量呈现升高趋势,1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下增加幅度最为显著;可溶性蛋白和叶绿素含量逐渐降低。此外,不同浓度(0、50、100、150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) Cr^{6+} 处理影响高丹草幼苗根尖分生区细胞有丝分裂,统计分析结果显示:有丝分裂指数、染色体畸变率、微核率与处理浓度间有很好的线性关系,处理浓度与有丝分裂指数显著负相关($P<0.05$),与染色体畸变率、微核率呈显著正相关($P<0.05$)。高丹草幼苗生长生理变化规律、根尖有丝分裂指数、染色体畸变率及微核率可以作为监测环境中 Cr^{6+} 含量的参考指标。

关键词:高丹草;铬;生理特性;有丝分裂

中图分类号:X503.233 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2009)04-0761-05

Effects of Cr^{6+} on Physiological Characteristics and Mitosis of Root Tip in the Seedlings of Sorghum Hybrid Sudangrass

ZHAO Hui, LV Jin-yin

(College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of different concentrations of Cr^{6+} (0, 0.5, 1.0, 1.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2CrO_4) on the growth, physiological characteristics and mitosis of Sorghum Hybrid Sudangrass. Different concentrations of Cr^{6+} induced a significant reduction of root length, root volume and dry weight except 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cr^{6+} treatment. The increasing concentration of Cr^{6+} caused a continuous rise of plasma membrane permeability and malondialdehyde (MDA) content, but resulted in a gradual reduction of chlorophyll content and soluble protein content in leaves. However, soluble sugar content and proline (Pro) content followed a pattern of first rise then decline, and documented the summit value under 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cr^{6+} treatment in leaves. Moreover, different concentrations of Cr^{6+} (0, 50, 100, 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2CrO_4) induced nuclear aberrance on root tip cells of Sorghum Hybrid Sudangrass. Furthermore, a significantly negative correlation between mitotic index and Cr^{6+} concentration, and a positive correlation between chromosomal aberration index, micronucleus index and Cr^{6+} concentration were also obtained ($P<0.05$). Hence, we suggest that the physiological index, characteristics mitotic index, chromosomal aberration index and micronucleus index can be available for monitoring environmental Cr^{6+} in contaminated areas.

Keywords: Sorghum Hybrid Sudangrass; chromium; physiological characteristics; cell division

随着工业经济的发展,土壤中重金属污染是我国当前面临的主要环境污染之一。铬、汞、镉、铅等均属于重金属元素,毒性较强,铬主要以三价 $\text{Cr}(\text{III})$ 和六价 $\text{Cr}(\text{VI})$ 形式存在,前者易被土壤吸附固定植物很难吸收,后者则易被植物吸收,且毒性强。当其在植物

中含量超过 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,对很多高等植物生长发育表现出明显毒害作用^[1-2]。目前,利用植物修复治理重金属污染的土壤、水体已受到广泛关注^[3],但研究发现,大多数超积累植物存在生长缓慢、生物量低、抗逆性差、分布受地域气候限制等缺点,从而限制了植物修复的广泛应用。近年来人们开始关注一些对重金属耐性强、生长快、生物量大、多年生和地域分布性广的植物,一些学者将这类植物称为耐性植物。与超积累植物相比,虽然耐性植物单位生物量含重金属较低,但其整株水平含量较高,修复重金属污染环境效率高、潜力大。研究污染环境中生长的植物的生长状

收稿日期:2008-07-23

基金项目:农业部公益性行业科研专项(200803034)

作者简介:赵 晖(1982—),女,河北唐山人,在读硕士研究生,主要从事土壤重金属植物修复方面的研究。

E-mail:zx860818@163.com

通讯作者:吕金印 E-mail:Jinyinlu@163.com

况、生理特征无疑对植物修复具有重要理论意义。

高丹草是高粱与苏丹草杂交的一种新型一年生禾本科 C4 饲料作物,在干旱半干旱地区有较好的适应性,且杂种优势明显、生物量大、抗逆性强^[4]。

本研究以高丹草为材料,测定了不同浓度 Cr⁶⁺处理对高丹草幼苗生理生化特性的影响,探讨 Cr⁶⁺对禾本科牧草毒害的机理,旨在为牧草的生产及重金属污染地区的植物修复提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养及铬处理

选择籽粒饱满均匀的“先锋”高丹草种子,0.1% HgCl₂ 消毒 10 min,自来水中浸泡 6~8 h,摆放于培养皿中,下面铺一层滤纸,上覆纱布,保持湿润,置 25 ℃ 恒温培养箱内催芽,待根长至 3.0 cm 左右时转移至光照培养箱内用 Hoagland 营养液培养,昼/夜培养温度:25 ℃/18 ℃,光照时间为:14 h/10 h,光强为:160 μmol·m⁻²·s⁻¹。每日间歇性通气 4~6 h,每 2 d 更换 1 次营养液。幼苗长至三叶一心时,选用生长一致植株,分别于含 K₂CrO₄:0 (CK)、0.5、1.0、1.8 mmol·L⁻¹ 的 Hoagland 营养液中培养,每个浓度设 3 个重复,处理 7 d 后取样测定。

1.2 测定方法

1.2.1 幼苗生长特性测定

分别取各处理高丹草幼苗各 10 株,滤纸吸干水分,直接测量各幼苗根系长度,排水法测单株幼苗根体积,然后置于称量瓶中 105 ℃ 下杀青 15 min,于 75 ℃ 烘干至恒重,称量各处理单株干重。

1.2.2 细胞质膜相对透性(PMP)

电导法,以%表示^[5]。

1.2.3 丙二醛(MDA)含量测定

采用 TBA 比色法^[5]。

1.2.4 叶绿素提取及测定

采用 80%丙酮浸提法^[5]。

1.2.5 可溶性糖含量

用蒽酮比色法^[5]测定。

1.2.6 脯氨酸(Pro)含量

用酸性茚三酮显色法^[5]测定。

1.2.7 可溶性蛋白含量

采用考马斯亮蓝 G-250 法^[5]。

1.2.8 高丹草根尖培养和分生区核型观察

用清水浸泡种子后摆放在铺有吸水纸的培养皿中,25 ℃ 恒温培养,生长期间分别用蒸馏水和 50、

100、150 mmol·L⁻¹ K₂CrO₄ 溶液处理。待根尖长至 1~1.5 cm 时取材,用卡诺氏液(95%酒精:冰醋酸=3:1)固定 12 h,放入 60 ℃ 1 mol·L⁻¹ 盐酸中解离 8~12 min。切取根尖,卡宝品红染色 15 min,压片、镜检。统计细胞有丝分裂、染色体畸变及核畸变频率,每个根尖统计 500~600 个细胞,每个处理统计 7~8 个根尖,共计约 4 000 个。Olympus 光学显微镜下摄影。

有丝分裂指数(%)=有丝分裂细胞数/观察细胞数×100%

染色体畸变率(%)=分裂异常细胞数/有丝分裂细胞数×100%

微核率(%)=微核细胞数/观察细胞数×100%

1.3 数据统计

试验数据用 SPSS 16.0 软件进行方差分析(ANOVA)和 LSD 检验,数值表示用 3 次重复的平均值±标准误。

2 结果与分析

2.1 Cr⁶⁺处理对高丹草幼苗生长特性的影响

由表 1 可以看出,随着 Cr⁶⁺处理浓度的增加,其根长、根体积呈降低趋势,干重先升后降,0.5 mmol·L⁻¹ 浓度下幼苗长势优于对照,根长、根体积差异不显著($P>0.05$),但干重与显著增加($P<0.05$),1.0、1.8 mmol·L⁻¹ 浓度处理下受害严重,根长、根体积、干重显著低于对照($P<0.05$),根冠比显著增加($P<0.05$),说明高浓度 Cr⁶⁺处理对高丹草幼苗生长有明显的抑制作用,尤其对地上部分。低浓度 Cr⁶⁺处理下幼苗生长状态良好,与对照无明显差异;高浓度 1.0、1.8 mmol·L⁻¹ 处理下叶片呈暗绿色,幼苗具有明显的失绿现象,根系发黄,植株矮化,叶片萎蔫,发育受阻,且高浓度胁迫下幼苗受害更为严重。

表 1 Cr⁶⁺对高丹草幼苗生长的影响

Table 1 Effect of Cr⁶⁺ on the seedlings growth of Sorghum Hybrid Sudangrass

铬浓度 Cr concentration/ mmol·L ⁻¹	根长 Root length/cm	根体积 Root volume/mL	干重 Dry weight/mg	根冠比 Root-shoot ratio
CK	10.68±0.30a	0.083±0.0025a	72.93±2.43b	0.37±0.023c
0.5	11.04±0.34a	0.084±0.0030a	78.92±2.53a	0.35±0.026c
1	8.3±0.37b	0.055±0.031b	59.86±1.62c	0.40±0.030b
1.8	7.3±0.36c	0.051±0.0029b	58.83±1.76c	0.49±0.015a

注:同列数据标有不同字母的表示差异具有显著性(LSD 检验, $P=0.05$)。Note: Values with different letter in the same column indicate a significant difference at $P=0.05$ level according to LSD test.

2.2 Cr⁶⁺处理对高丹草幼苗质膜相对透性、MDA 含量的影响

植物在逆境胁迫下细胞膜首先受到伤害,膜脂过氧化产物增加^[6]。本研究中随着 Cr⁶⁺处理浓度的增加,高丹草幼苗地上部和根中细胞膜相对透性、MDA 含量均呈增加趋势(图 1、图 2)。0.5 mmol·L⁻¹ 低浓度处理下,与对照差异不大。1.0、1.8 mmol·L⁻¹ 高浓度处理下,质膜透性地上部分别比对照增加 20.2%和 33.9%,地下部分别比对照增加 9.1%和 19.0%;叶片中 MDA 含量分别比对照增加了 56.9%和 105.9%。由此可见,高浓度 Cr⁶⁺胁迫对高丹草膜系统受严重伤害。

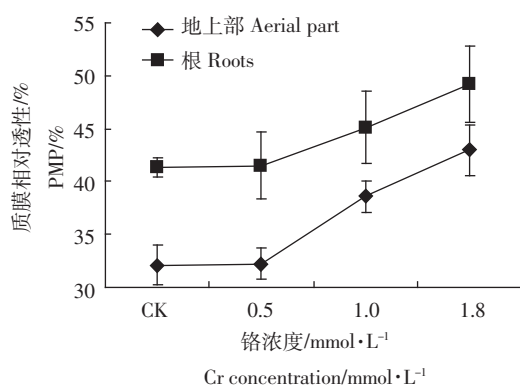


图 1 Cr⁶⁺对高丹草幼苗质膜透性(PMP)的影响

Figure 1 Effect of Cr⁶⁺ on plasma membrane relative permeability of Sorghum Hybrid Sudangrass seedlings

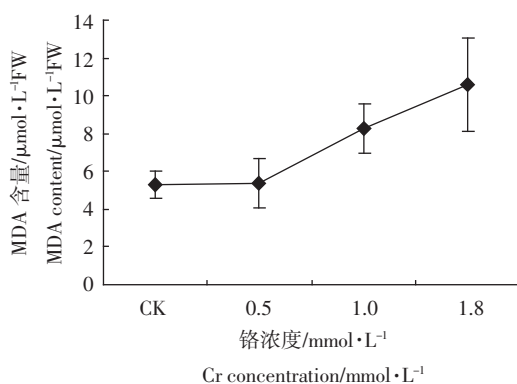


图 2 Cr⁶⁺对高丹草幼苗叶片 MDA 含量影响

Figure 2 Effect of Cr⁶⁺ on MDA content in leaves of Sorghum Hybrid Sudangrass seedlings

2.3 Cr⁶⁺处理对高丹草幼苗可溶性糖、脯氨酸(Pro)、叶绿素和可溶性蛋白含量的影响

可溶性糖和 Pro 是植物体内的渗透调节物质。从图 3、图 4 中可以看出,与对照相比,Cr⁶⁺高丹草幼苗叶片中可溶性糖和 Pro 含量均呈增加趋势,1.0、1.8 mmol·L⁻¹ 高浓度 Cr⁶⁺处理下 Pro 含量增加幅度更为明

显,说明糖和 Pro 起着重要的渗透调节作用。

由图 5 可以看出,叶绿素含量受铬浓度影响明显。随铬处理浓度的增加,叶绿素总量、叶绿素 a、叶绿素 b 含量均呈现下降趋势,与叶绿素 b 相比,叶绿素 a 含量变化幅度较大,表明叶绿素 a 对 Cr⁶⁺更为敏感。

重金属胁迫影响植物体内的蛋白质代谢,导致蛋白质的合成受阻。从图 6 可以看出,随着 Cr⁶⁺胁迫浓度的提高,高丹草幼苗叶片中可溶性蛋白含量逐渐降低,3 种 Cr⁶⁺处理叶片中可溶性蛋白含量分别比对照降低了 15.7%、42.4%、77.7%。

2.4 Cr⁶⁺处理对高丹草根尖细胞有丝分裂的影响

Cr⁶⁺对根尖细胞有丝分裂的影响主要表现为染色体断裂、染色体桥以及微核等畸变(图 7)。随 Cr⁶⁺处理浓度增大,有丝分裂指数降低,染色体畸变率和微核率增大(表 2)。经回归分析表明,Cr⁶⁺处理浓度(x)与细胞分裂指数(y_1)、染色体畸变率(y_2)和微核率(y_3)存在显著线性:

细胞分裂指数(y_1): $y_1 = -0.043x + 13.115$ ($R^2 = 0.942$,

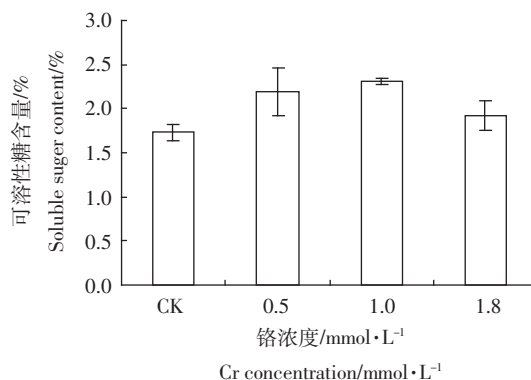


图 3 Cr⁶⁺对高丹草幼苗叶片可溶性糖含量影响

Figure 3 Effect of Cr⁶⁺ on soluble sugar content in leaves of Sorghum Hybrid Sudangrass seedlings

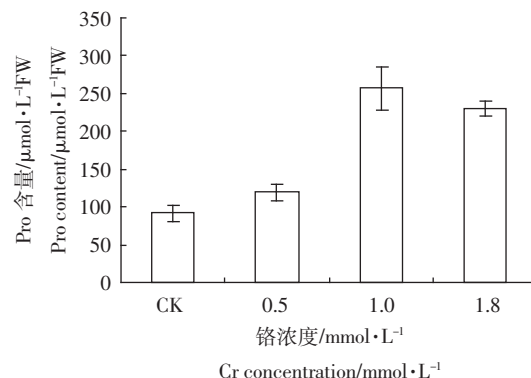


图 4 Cr⁶⁺对高丹草幼苗叶片 Pro 含量影响

Figure 4 Effect of Cr⁶⁺ on Pro content in leaves of Sorghum Hybrid Sudangrass seedlings

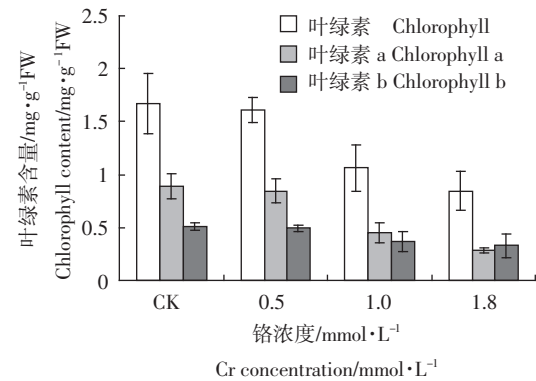


图 5 Cr⁶⁺对高丹草幼苗叶片叶绿素含量影响

Figure 5 Effect of Cr⁶⁺ on chlorophyll content in leaves of Sorghum Hybrid Sudangrass seedlings

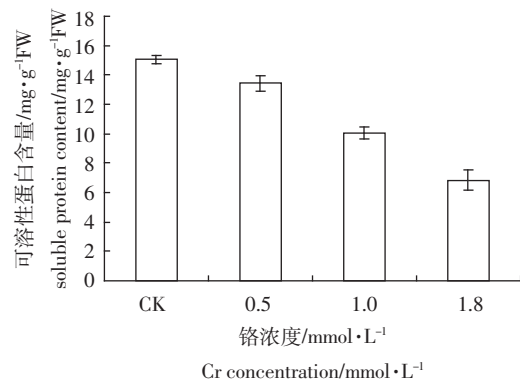


图 6 Cr⁶⁺对高丹草幼苗叶片可溶性蛋白含量影响

Figure 6 Effect of Cr⁶⁺ on soluble protein content in leaves of Sorghum Hybrid Sudangrass seedlings

$P<0.05$);

染色体畸变率(y_2): $y_2=0.132x+2.404$ ($R^2=0.913$, $P<0.05$);

微核率(y_3): $y_3=0.111x+0.90$ ($R^2=0.972$, $P<0.05$).

3 讨论

重金属对植物的毒害是多方面的,其机理较为复杂。本研究结果表明,低浓度 Cr⁶⁺对高丹草生长具有一定的促进作用,各生长特性优于对照。随着 Cr⁶⁺处理浓度的增大,对高丹草幼苗生长表现出抑制作用,根长、根体积、干重均下降,说明高丹草对低浓度 Cr⁶⁺具有一定的耐受性,当浓度增加到一定程度时,就产生了毒害,表现为对生长的抑制。

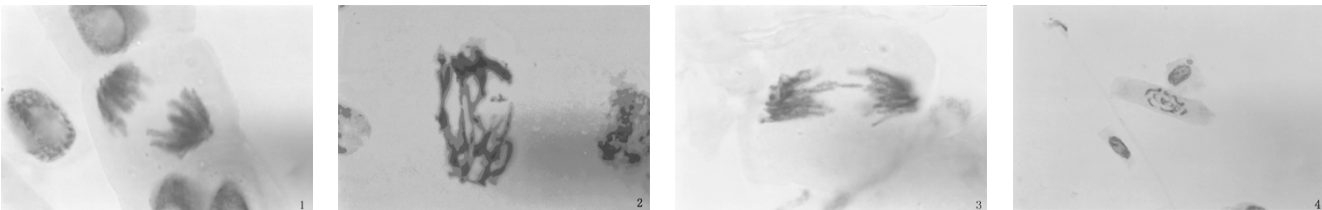
质膜是细胞与环境之间物质交换的界面,各种逆境对细胞的影响首先作用于细胞膜。在本研究中,随着 Cr⁶⁺处理浓度增加,质膜相对透性、MDA 含量增加,这与前人研究结果一致^[7]。这可能是重金属胁迫条件下,高丹草体内活性氧代谢失衡,过多的活性氧能够使植物细胞膜发生过氧化作用,细胞膜损伤和破坏。植物体内自身存在的抗氧化系统可清除过多的活性氧和自由基,以减轻伤害^[8]。

本研究中 Cr⁶⁺胁迫下,高丹草叶片中可溶性糖与 Pro 含量升高,可能是 Cr⁶⁺胁迫下高丹草幼苗积累较多的可溶性糖与 Pro,可以作为渗透调节物质以保护膜细胞膜免受伤害,维持原有的生理过程。对于减小膜

表 2 不同浓度 Cr⁶⁺处理对高丹草根尖细胞有丝分裂的影响

Table 2 Effect of Cr⁶⁺ on mitotic of the root tip of Sorghum Hybrid Sudangrass

Cr ⁶⁺ 处理 Treatment/ mmol·L ⁻¹	观察细胞数 Total amount of cells	有丝分裂细胞数 Amount of cell division	有丝分裂指数 Mitotic index	分裂异常细胞个数 Amount of abnormality cells	染色体畸变率 Chromosomal aberration index/%	微核 Micro-nucleus	微核率 Micro-nucleus index/%
CK	4 019	523	13.01	0	0.00	3	0.00
50	4 034	467	11.58	64	11.70	287	7.11
100	3 986	314	7.88	55	17.52	534	13.40
150	4 008	283	7.06	57	20.14	658	16.42



1.正常有丝分裂后期(Anaphase of regular mitosis);2.染色体桥和断片(Chromosome bridge and fragement);

3.染色体单桥(Chromosome bridge);4.微核(Micronucleus)

图 7 高丹草根尖细胞有丝分裂观察(放大倍数 16×100 倍)

Figure 7 Miosis of root tip cells in Sorghum Hybrid Sudangrass

脂过氧化程度、缓和膜透性的变化起到了一定的作用,也可能是植物对外界胁迫的一种适应性反应。 Cr^{6+} 胁迫下高丹草幼苗叶片蛋白质含量降低,可能是蛋白质分解加速,合成受抑所致。叶绿素含量降低是重金属对植物伤害的主要特征,其下降原因是重金属与叶绿体蛋白-SH结合,或是取代了 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子后叶绿体结构与功能受到影响,导致叶绿素分解^[9]。

Cr^{6+} 不仅影响植物生长及相关生理特性,并对根尖分生组织有丝分裂过程具有抑制作用。本研究中 Cr^{6+} 胁迫下高丹草有丝分裂指数降低,可能是 Cr^{6+} 与细胞核内的核酸等大分子结合,抑制了包括ATP酶在内的多种酶活性;影响纺锤体的形成和功能,细胞不能正常分裂,从而阻碍细胞向分化状态发展,其形态上表现为抑制根的生长。 Cr^{6+} 对高丹草根尖分生细胞的毒害表现为染色体畸变和微核效应,可能有几条途径导致:一是由于 Cr^{6+} 直接作用于带负电的DNA分子,造成断裂损伤;二是由于 Cr^{6+} 干扰了蛋白质合成或转录,结果使与染色体运动、DNA合成有关的物质不能形成;三是 Cr^{6+} 通过干扰某些损伤的正常修复过程,阻止染色体在正常条件下的重建。本研究中 Cr^{6+} 处理下致畸率升高,且与 Cr^{6+} 浓度存在相关性,因此,利用高丹草细胞有丝分裂指数、微核率和染色体畸变率可以作为监测环境中 Cr^{6+} 的参考指标。

参考文献:

- [1] 徐衍忠,秦绪娜,刘祥红,等. 铬污染及其生态效应[J]. 环境科学与技术, 2002, 25: 8-10.
XU Yan-zhong, QIN Xu-na, LIU Xiang-hong, et al. The study of chromium pollution and ecological effects [J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, 25: 8-10.
- [2] 杨德,吕金印,程永安,等. 铬在南瓜中的亚细胞分布及对某些酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(4): 1352-1355.
YANG De, LV Jin-yin, CHENG Yong-an, et al. Subcellular distribution of chromium and its effects on some enzyme activities in pumpkin[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(4): 1352-1355.
- [3] Mc Grath S P, Zhao F J, Lombi E. Phytoremediation of metals, metalloid-sand radionuclides[J]. *Adv Agron*, 2002, 75: 1-56.
- [4] 詹秋文,钱章强. 高粱与苏丹草杂种优势利用的研究[J]. 作物学报, 2004, 30(1): 73-77.
ZHAN Qiu-wen, QIAN Zhang-qiang. Heterosis utilization of hybrid between sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] and sudangrass [*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf][J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 30(1): 73-77.
- [5] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司, 2000.
GAO Jun-feng. The experimental manual for plant physiology[M]. Xi'an: The World Book Press, 2000.
- [6] 杨世勇,王方,谢建春. 重金属对植物的毒害及植物的耐性机制[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版), 2004, 27(1): 71-74.
YANG Shi-yong, WANG Fang, XIE Jian-chun. Plant toxicity of heavy metals and the molarant mechanisms of plants[J]. *Journal of Anhui Normal University Natural Science*, 2004, 27(1): 71-74.
- [7] 孔祥生,张妙霞,郭秀璞. Cd^{2+} 毒害对玉米幼苗细胞膜透性及保护酶活性的影响[J]. 农业环境保护, 1999, 18(3): 133-134.
KONG Xiang-sheng, ZHANG Miao-xia, GUO Xiu-pu. Effect of cadmium toxicity on celmembrane permeability and protective enzyme activity of maizeseeding[J]. *Agro-Environmental Protection*, 1999, 18(3): 133-134.
- [8] Tripathi B N, Gaur J P. Relationship between copper-and-zinc induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus*[J]. *Planta*, 2004, 10: 425-439.
- [9] Ouzounidou G, Moustakas M, Eleftheriou E P. Physiological and ultra-structural effect of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* C.) leaves[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1997, 32(2): 154-160.