

铬对烟草组培苗生长和某些生理指标的影响

石贵玉, 秦丽凤, 陈耕云

(广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 以烟草无菌苗为材料, 在培养基中添加 0、50、100、150、200、300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的重金属铬离子, 进行组织培养, 35 d 后分析植株生长和相关生理变化。结果表明, 低浓度 (50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 铬对烟草组培苗生长有促进作用, 株高、鲜重、叶绿素含量、蛋白质含量、SOD 活性呈现上升趋势; 高浓度铬处理则抑制生长, 株高、鲜重、叶绿素、蛋白质含量、SOD 活性都下降, 相反, POD 活性、MDA 含量和细胞膜透性显著增加。

关键词: 铬; 烟草; 组织培养; 生长生理

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)06-0899-04

Effects of Cr^{6+} on the growth and some physiological characters of tobacco by tissue culture

SHI Gui-Yu, QIN Li-Feng, CHEN Geng-Yun

(College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: After germfree tobacco seedlings being cultivated in culture medium added with Cr^{6+} solution in 0, 50, 100, 150, 200, 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ consistency respectively for 35 days, the growth and certain physiological functions of the tobacco were studied. The results indicated: (1) the callus and seedlings growth was promoted at 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ consistency, and the height, fresh weight, content of chlorophyll and protein, SOD (superoxide dismutase) activity of the seedlings increased; (2) the growth of callus and seedling was restrained distinctly under the high consistency (100~300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and the seedling height, fresh weight, content of chlorophyll and protein, activity of SOD (superoxide dismutase) decreased; (3) on the contrary, the activity of peroxidase (POD), content of MDA and the permeability of cell membrane had earned a remarkable increase with the high concentration of Cr^{6+} .

Key words: Cr^{6+} ; tobacco; tissue culture; growth physiology

随着工农业的发展, 三废 (废水、废气、废渣) 排放量急剧增加, 导致重金属元素在环境中的含量大增, 当其含量超过一定的浓度后, 就会对生物起到毒害作用, 表现为生理生长过程受阻, 生长发育停滞, 最后可能导致死亡。铬 (Cr^{6+}) 作为工业“五毒”之一, 是一种毒性较大的致畸、致突变剂 (顾公望等, 1993)。有关铬的研究, 主要集中在对大麦 (张义贤, 1997)、水车前 (徐勤松等, 2002) 和水稻 (石贵玉等, 2005) 等方面的研究, 但尚未见到对烟草组织培养方面的研究报导。本文以烟草组织培养苗为材料, 探讨铬对植物生长发育和一些生理的影响, 并以此为

指标, 旨在探讨铬在植物体内的积累以及对植物毒害的作用机理。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和处理

将实验室培养的烟草 (*Nicotiana tabacum*) 无菌苗的叶片在无菌条件下切成 0.5 cm^2 大小的外植体, 分别接入各种处理以及对照的培养基中, 每瓶 4 块。基本培养基: MS + 2.0 mg/LBA + 0.05 mg/LNAA, 调 pH 值 5.8。铬的来源是 CrSO_4 。培养基

收稿日期: 2006-01-11 修回日期: 2006-12-15

基金项目: 广西教育厅科研基金 [Supported by Scientific Research Foundation of Education Department of Guangxi]

作者简介: 石贵玉 (1953-), 男, 广西百色人, 教授, 主要从事植物生理与生理生态的教学和科研工作。

中含铬处理浓度:(1)50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (2)100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (3)150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (4)200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (5)300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (6)对照 6 个浓度的处理,每个处理 10 瓶。培养在温度 27℃、每天光照 12 h,光照强度 36 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的培养室中。培养至 35 d 时随机取样分析培养的再生组织苗中各项生理指标和生长情况。

1.2 测定方法

(1)植株生长量测定:测定 3 瓶组培苗的高度和鲜重变化,以苗高度、鲜重表示植株生长量。(2)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 法计算叶绿素含量(张志良等,2003)。(3)蛋白质含量测定:采用 Folin-酚试剂法(张志良等,2003)。(4)细胞膜透性测定:采用电导法(张志良等,2003),以电导率 $\mu\Omega/\text{cm}$ 表示膜透性的大小。(5)SOD(超氧化物歧化酶)活性测定:按 Giannopolitis 和 Ries(1997)的方法,以每单位时间内抑制光化还原 50% 的氮蓝四唑(NBT)为一个酶活性单位。(6)POD(过氧化物酶)活性测定:用愈伤木酚氧化法(张志良等,2003),以 470 nm 波长下每分钟每克材料的光密度变化表示酶活性大小。(7)MDA(丙二醛)含量测定:采用硫代巴比妥酸(TBA)法(张志良等,2003),以 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示含量的大小。

2 结果与分析

2.1 铬处理对烟草组培苗生长的影响

表 1 反映,烟草组培苗用不同浓度的铬处理,低浓度铬对烟草组培苗的株高、鲜重都表现出类似的结果,在 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时,铬处理对烟草组培苗株高和鲜重有促进作用,促进率分别为对照的 3.0% 和 11.1%;高浓度铬处理对组培苗株高和鲜重均呈抑制作用,苗高和鲜重随着浓度的增加明显减少,如 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制率为对照的 12.1% 和 34.0%,300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 则是 80.1% 和 83.0%,经统计软件 SPSS 分析,铬离子浓度与株高、鲜重均呈极显著性相关(两者分别为 $R=-0.964, P=0.01$ 和 $R=-0.861, P=0.01$)。实验结果说明低浓度的铬处理对烟草组培苗的生长有一定的促进作用,但随着浓度的增加,均对株高、鲜重有抑制作用。植株鲜重的变化,反映植株生长速率的快慢和积累干物质的能力大小。

2.2 铬处理对烟草叶绿素和蛋白质含量的影响

烟草组培苗用不同浓度的铬处理,低浓度铬对烟草组培苗的叶绿素和蛋白质含量有一定的促进效

表 1 铬对烟草组培苗生长的影响
Table 1 Effect of growth of Cr^{6+} on the tobacco

浓度($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration	株高 Seedling height (cm/plants)	鲜重 Fresh weight (g/bottle)
0	8.30 (100)	3.24 (100)
50	8.55 * (103.0)	3.60 (111.1)
100	8.00 * (96.4)	3.11 (96.0)
150	7.30 (87.9)	2.90 (66.0)
200	2.30 * (27.7)	0.86 (26.5)
300	1.65 (19.9)	0.53 (17.0)

* 差异显著性为 0.01,括号中的数字为百分比。

* Significant difference at 0.01 level. % in parentheses.

应,高浓度铬处理,则表现为抑制作用,且浓度愈高抑制愈严重(表 2),如 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时,与对照相比较,两者分别提高 6.7% 和 12.1%;100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时分别抑制 68.8% 和 31.6%,但 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 则分别抑制 77.2% 和 72.5%,这与徐勤松等(2002)和石贵玉等(2005)以铬处理水车前和水稻幼苗,随着铬浓度的增大,叶绿素含量下降愈明显的结果相一致。

表 2 铬对烟草叶绿素和蛋白质含量的影响
Table 2 Effect of Cr^{6+} on chlorophyll content and protein content of tobacco

浓度 Concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	叶绿素含量 Chlorophyll content (mg/gFW)	蛋白质含量 Protein content (mg $\cdot \text{mL}^{-1}$)
0	0.283 (100)	1.004 (100)
50	0.302 (106.7)	1.125 (112.1)
100	0.265 (31.2)	0.687 (68.4)
150	0.245 (28.8)	0.577 (57.5)
200	0.238 (28.0)	0.517 (51.5)
300	0.194 (22.8)	0.276 (27.5)

2.3 铬处理对烟草 SOD 和 POD 活性的影响

从图 1 可看出,烟草组培苗经不同浓度铬处理后,低浓度铬对组培苗 SOD 活性有促进作用,高浓度铬则表现为抑制作用,SOD 活性在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后随着浓度的上升呈下降趋势。如 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,SOD 活性比对照下降了 11.5%,300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时则下降了 27.6%。但烟草组培苗经铬处理后,POD 活性则随着浓度的增加有明显的上升趋势(图 2),如在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,酶活性比对照上升 39.2%,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时则上升 49.6%。陈平等(2002)、石贵玉等(2005)、孔祥生等(1999)用重金属镉、铬处理水稻和玉米幼苗,亦发现随着镉、铬浓度的增加,体内 SOD 活性下降,POD 活性增加的结果。

2.4 铬处理对烟草 MDA 含量和细胞膜透性的影响

MDA 是细胞膜分解的产物,MDA 含量和膜透

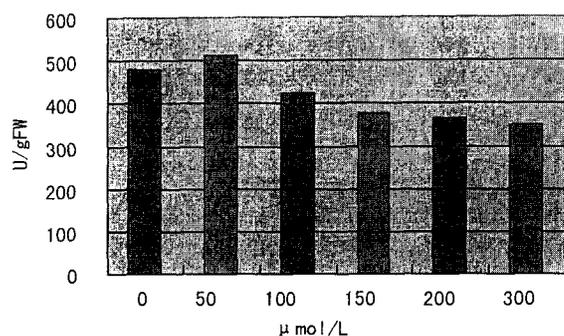


图 1 铬对 SOD 活性的影响

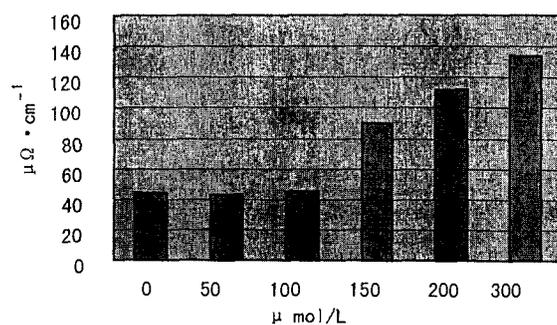
Fig. 1 Effects of Cr⁶⁺ on the SOD activity

图 4 铬对膜透性的影响

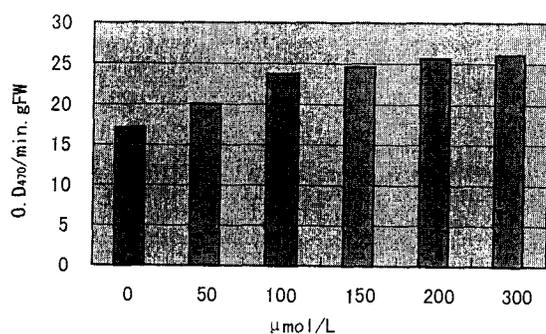
Fig. 4 Effects of Cr⁶⁺ on the permeability of membrane

图 2 铬对 POD 活性的影响

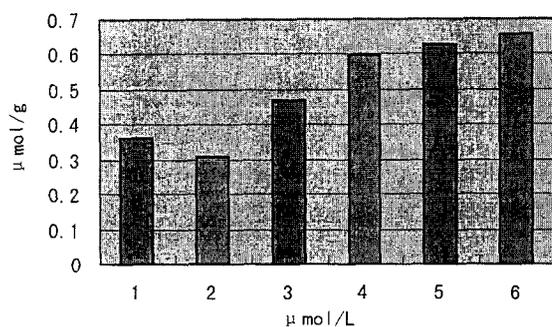
Fig. 2 Effects of Cr⁶⁺ on the POD activity

图 3 铬对 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effects of Cr⁶⁺ on the MDA content

性增加是膜系统损伤的表现之一。研究表明,烟草组培苗经不同浓度铬处理后,除低浓度(50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)外,MDA 含量和膜透性都表现为上升趋势,浓度愈大上升愈大(图 3、4)。如 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 MDA 含量和膜透性分别上升 29.1% 和 2.3%,但 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时则分别上升了 80.5% 和 207.4%,说明铬处理超过一定浓度后,细胞膜迅速受到破坏,同时产生大量的 MDA。

3 讨论

利用植物组织培养技术进行植物抗性生理的研究,是一种新的方法和思路。实验对象植物培养苗和细胞团易于操作控制,在胁迫环境下,植株细胞群不受外界其他因素影响,所受胁迫程度一致,生理生化变化一致,易于观察,获得结果具有一致性。本实验结果亦反映组织培养技术是抗性生理研究一种便利、有效的方法。

不少研究表明,铬过多对植物会产生严重损害,强烈抑制植物细胞和植株的生长(石贵玉等,2005;徐勤松等,2002)。在烟草组织培养中,重金属铬过多也表现出类似的结果:铬毒害使烟草培养苗细胞生长受阻,植株矮小,鲜重下降,叶绿素和蛋白质含量下降,同时抗氧化酶活性下降,细胞膜透性增加,膜分解产物丙二醛(MDA)含量亦增加。

Van Assche 等(1990)研究反映,细胞内重金属离子不仅能与酶活性中心或蛋白质中的巯基结合,而且还能取代金属蛋白中的必需元素(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+}),导致生物大分子构象改变、酶活性丧失,干扰细胞的正常生长如重金属离子抑制原叶绿素酸酯还原酶活性。本实验结果铬毒害使烟草组培苗叶绿素含量、植株鲜重下降,生长受到抑制可能与重金属铬大量抑制植物体内酶活性,从而影响植株代谢相关。

植物在正常情况下的酶促反应、叶绿体和线粒体的电子传递过程和一些低分子有机物的自动氧化反应,都会产生 O_2^- 和 H_2O_2 等活性氧,但它们又被植物细胞内的保护酶 SOD、POD、CAT、APX 和小分子抗氧化剂谷胱甘肽、维生素 C、维生素 E 等清除

以达到一种生理平衡。而在重金属胁迫下,这种活性氧的产生与清除之间的平衡会被破坏,植物细胞清除能力下降,活性氧增加。徐勤松等(2002)认为,铬胁迫严重破坏了体内抗氧化酶系统,尤其是SOD

的活性,使植物体内积累 O_2^- ,加剧膜脂过氧化作用。本实验也得到类似的结果,我们推测铬对烟草组培苗的毒害,是破坏了烟草组培苗体内的保护酶系统,使SOD活性下降,POD先上升后下降, O_2^- 和 H_2O_2



图5 铬对烟草组培苗生长的影响

Fig. 5 Effects of Cr^{6+} on the growth of tobacco by tissue culture

等活性氧在体内累积,引起膜脂过氧化,膜透性增大,产生大量MDA影响细胞代谢,最终影响烟草组培苗的生长。

参考文献:

- 张义贤. 1997. 三价铬和六价铬对大麦毒害效应的比较[J]. 中国环境科学, 17(6): 565-567
- 张志良, 瞿伟菁. 2003. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社: 67-70, 158-159, 256-258, 123-124, 274-276
- 顾公望, 张宏伟. 1993. 微量元素与恶性肿瘤[M]. 上海科学技术出版社: 199-205
- Chen P(陈平), Yu TY(余土元), Chen HY(陈惠阳), et al. 2002. Effects of Se on growth and some physiological characteristics of rice seedling under Cd stress(硒对镉胁迫下水稻幼苗生长及生理特性的影响)[J]. Guihaia(广西植物), 22(3): 277-282
- Giannopolitis C N, Ries S K. 1997. Superoxide dismutation I. Occurrence in higher plants[J]. Plant Physiol, 53: 315
- Kong XS(孔祥生), Guo XP(郭秀璞), Zhang MX(张妙霞). 1999. Effect of cadmium stress on seedling growth and physiology chemistry of maize(镉胁迫对玉米幼苗生长及生理生化的影响)[J]. J Huazhong Agric Univ(华中农业大学学报), 18(2): 111-113
- Shi GY(石贵玉), Chen MM(陈明媚). 2005. Effects of Cr^{6+} and Se on growth and some physiological of rice seedling(铬、硒对水稻幼苗生长和生理的影响)[J]. Guihaia(广西植物), 25(3): 281-284
- Van Assche F, Clijsters H. 1990. Effects of metal on enzyme activity in plants[J]. Plant Cell Environ, 13: 195-206
- Xu QS(徐勤松), Shi GX(施国新), Du KH(杜开和). 2002. Effects of Cr(VI) on physiological and ultrastructural changes in leaves of *Ottelia alismoides* (L.) pers(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]. Guihaia(广西植物), 22(1): 92-96
- Parial LC, Rooney LW. 1970. Use of dye-binding and biuret techniques for estimating protein in Brown and Milled Rice [J]. Cereal Chemistry, 47(1): 38
- Radovic RS, Maksimovic, Brkljacic MJ, et al. 1999. 2s albumin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds[J]. J Agric Food Chemistry, 47(4): 1467-1470
- Rout MK, Chrungoo NK. 1999. Lysine and methionine rich basic subunit of buckwheat grain legumin; Some results of a structural study[J]. Biochemistry & Molecular Biology International, 47(6): 921-926
- Sun YG(孙毅刚), Chai WF(柴文福). 2000. Buckwheat and its integrated use(荞麦及其综合利用)[J]. Cereal and Food Industry(粮食与食品工业), (4): 8-11
- Tang Y(唐宇), Zhao G(赵钢). 1990. Pilot study of nutrient quality on buckwheat character resources native to Sichuan (四川省荞麦品质资源营养品质的初步研究)[J]. Buckwheat Newsletter(荞麦动态), (2): 20-24
- You Xin(尤新). 1999. Eight kinds of health foods which should be developed urgently(我国亟待开发的八大类保健食品)[J]. Commercial Science and Technology Development(商业科技开发), (2): 38
- Zhang HZ(张宏志). 1995. Trace element and health in buckwheat(荞麦中的微量元素与健康)[J]. Trace Element and Health Research(微量元素与健康研究), (4): 42-43

(上接第957页 Continue from page 957)

& Genetic Systems, 71: 383-390