

几种重金属离子对组培盾叶薯蓣 叶绿素含量的影响

张露洁¹, 兰利琼, 卿人韦, 叶华勋, 傅华龙*

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要:研究了重金属离子 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 污染对组培盾叶薯蓣叶绿素含量的影响. 结果显示:当重金属离子浓度较低时,组培盾叶薯蓣叶绿素含量随重金属浓度增加而增加.随着重金属离子浓度增加,组培盾叶薯蓣叶绿素含量降低,其抑制效应随重金属浓度的增加而增强.三种金属离子对组培盾叶薯蓣叶绿素含量影响的强弱顺序依次为: Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} - Hg^{2+} - Cr^{6+} 互作、 Hg^{2+} - Cr^{6+} 互作、 Cd^{2+} - Cr^{6+} 互作、 Cd^{2+} - Hg^{2+} 互作.

关键词:重金属;盾叶薯蓣;叶绿素;影响

中图分类号:Q945

文献标识码:A

重金属(Hg、Cd、Pb、Cr等)是植物的非必需元素,对植物生长和发育具有显著的毒性.在细胞中游离的重金属离子会通过不同的途径干扰和破坏细胞的正常代谢^[1],导致植物生长异常直至死亡.我国出口的中药中存在的重金属含量超标问题严重影响了中药的出口创汇,在经济上造成了极大的损失^[2].因此,研究重金属对药用植物生长的影响对于生产绿色食品和中药、治理环境污染、保护生态环境和发展国民经济具有重要意义.盾叶薯蓣为薯蓣科薯蓣属多年生缠绕草本药用植物,为我国所特有的重要的中药资源^[3].本研究以 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 为影响因素,研究不同水平下三者单独和复合作用对组培盾叶薯蓣中叶绿素含量的影响,从而为重金属对植物的毒理研究提供一定的实验数据.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组培盾叶薯蓣苗 由四川大学藻类实验室提供并继代培养.

1.1.2 基本培养基 MS培养基^[4].本实验所用药品均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 实验设计 选择正交表 $L_8(2^7)$.本研究中各种金属因子的浓度水平是参照《中华人民共和国国家标准地面水环境质量标准》(GB3838-83)^[5]和《中华人民共和国农田灌溉水质标准》(GB5084-85)来设计的^[6].其中,复合实验中的1水平均是符合国家水质第三级标准的标准浓度,其余各处理浓度均是超出国家标准的浓度,即是污染浓度.在本实验中,由于各组的其它实验条件是一致的,因此各实验组中重金属因子浓度含量的差异就成为了影响组培薯蓣叶绿素a、b含量的唯一因素.

收稿日期:2005-06-06

作者简介:张露洁(1981-),女,壮族,2003级硕士研究生,主要从事药用植物的重金属污染方面的研究.

* 通讯作者

表 1 三种重金属离子及其浓度
Table 1 Concentration of heavy metals

因素	配比		
A	$\text{Cd}^{2+}/\text{CdCl}_2$	$A_1:0.01\text{mg/L}$	$A_2:0.05\text{mg/L}$
B	$\text{Hg}^{2+}/\text{HgCl}_2$	$B_1:0.001\text{mg/L}$	$B_2:0.005\text{mg/L}$
C	$\text{Cr}^{6+}/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	$C_1:0.05\text{mg/L}$	$C_2:0.25\text{mg/L}$

表 2 $L_8(2^7)$ 正交组合
Table 2 The orthogonal test table of $L_8(2^7)$

实验组编号	组合	实验组编号	组合
1	对照组	6	$A_2B_1C_1$
2	$A_1B_1C_1$	7	$A_2B_1C_2$
3	$A_1B_1C_2$	8	$A_2B_2C_1$
4	$A_1B_2C_1$	9	$A_2B_2C_2$
5	$A_1B_2C_2$		

1.2.2 接种培养 按实验设计,将盾叶薯蓣组培苗接种至培养基中,每种处理浓度做 3 组平行实验.具体培养条件如下:

- (1)150mL 组培专用三角瓶;
- (2)光源为日光灯,光照强度约为 2000lx,光暗比为 12h:12h;
- (3)培养温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$.

1.2.3 数据测定 接种培养 30d 后,采用分光光度法测定盾叶薯蓣的叶绿素 a、b 含量^[7].

$$\text{Ch}_a = (12.7A_{663} - 2.69A_{645})/G$$

$$\text{Ch}_b = (22.9A_{645} - 4.68A_{663})/G$$

1.2.4 单因子验证 以正交实验中设计的浓度为基本浓度,分别按下表所设计的浓度做 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 的单因子实验,并重复正交实验的各种测定.其中,2、3、4 组处理浓度是符合国家水质标准的标准浓度,其余各处理浓度均是超出国家标准的浓度,即是污染浓度.

表 3 单因子实验浓度设计
Table 3 Design of single factor experiment

	处理浓度(mg/L)						
	1	2	3	4	5	6	7
Cd^{2+} (A)	0	0.001	0.005	0.01	0.025	0.05	0.1
Hg^{2+} (B)	0	0.0001	0.0005	0.001	0.0025	0.005	0.01
Cr^{2+} (C)	0	0.001	0.002	0.05	0.125	0.25	0.5

2 结果与分析

2.1 复合重金属处理对组培盾叶薯蓣叶绿素的影响

2.1.1 极差分析结果 根据正交实验数据处理方法,进行正交实验极差分析^[9](表 5、6).由各组实验的 R 值可知,对组培盾叶薯蓣叶绿素 a 及 b 的影响大小顺序均为: Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} - Hg^{2+} - Cr^{6+} 交互、 Hg^{2+} - Cr^{6+} 交互、 Cd^{2+} - Cr^{6+} 交互、 Cd^{2+} - Hg^{2+} 交互.

2.1.2 方差分析结果 根据正交实验数据处理方法,进行正交实验方差分析^[8](表 5、6).

叶绿素 a 的各组 F 值均大于 $F_{0.01}(1, 14)$,因此,各因子及其交互作用对组培盾叶薯蓣叶绿素 a 的影响都是极显著的.

叶绿素 b 的 F_A 和 F_C 值大于 $F_{0.01}(1,14)$, 其余各组的 F 值均大于 $F_{0.05}(1,14)$. 因此, A、C(Cd^{2+} , Cr^{6+}) 对组培盾叶薯蓣叶绿素 b 的影响是极显著的, B(Hg^{2+}) 及各因子的互作作用对组培盾叶薯蓣叶绿素 b 的影响是显著的.

叶绿素 a、b 的各组 F 值大小顺序均是: Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} - Hg^{2+} - Cr^{6+} 互作、 Hg^{2+} - Cr^{6+} 互作、 Cd^{2+} - Cr^{6+} 互作、 Cd^{2+} - Hg^{2+} 互作. 方差分析结果与级差分析结果是一致的.

表 4 叶绿素含量
Table 4 Content of chlorophyll

实验组	Ch_a	Ch_b	$\text{Ch}_a + \text{Ch}_b$
$A_1B_1C_1$	97.7070	129.7634	227.4704
$A_1B_1C_2$	92.3556	126.1041	218.4597
$A_1B_2C_1$	21.9985	36.2499	58.2484
$A_1B_2C_2$	26.0959	42.7456	68.8415
$A_2B_1C_1$	22.4675	36.1807	58.6482
$A_2B_1C_2$	16.9338	28.0610	44.9948
$A_2B_2C_1$	12.1279	17.4437	29.5716
$A_2B_2C_2$	15.9777	23.1286	39.1063
$A_0B_0C_0$	10.8102	12.1630	22.9732

表 5 叶绿素 a 含量的极差及方差分析
Table 5 Range analysts and variance analysis on chlorophyll content a

变异来源	R	SS	df	MS	F	$F_{0.05}(1,14)$	$F_{0.01}(1,14)$	结果
A	80.301025	3294.8227	1	3294.8227	23.6588	4.6	8.86	极显著
B	51.048325	1737.2877	1	1737.2877	12.4748	4.6	8.86	极显著
$A \times B$	47.637775	1512.9051	1	1512.9051	10.8636	4.6	8.86	极显著
C	62.969225	2643.4155	1	2643.4155	18.9813	4.6	8.86	极显著
$A \times C$	48.009075	1536.5809	1	1536.5809	11.0336	4.6	8.86	极显著
$B \times C$	49.05825	1651.7187	1	1651.7187	11.8603	4.6	8.86	极显著
$A \times B \times C$	50.317725	1687.9156	1	1687.9156	12.1202	4.6	8.86	极显著
误差		1949.6971	14	139.2641				

表 6 叶绿素 b 含量的极差及方差分析
Table 6 Range analysts and variance analysis on chlorophyll content b

变异来源	R	SS	df	MS	F	$F_{0.05}(1,14)$	$F_{0.01}(1,14)$	结果
A	120.362675	9658.1157	1	9658.1157	24.962	4.6	8.86	极显著
B	70.23083	3288.2459	1	3288.2459	8.4987	4.6	8.86	显著
$A \times B$	54.910775	2010.1288	1	2010.1288	5.1953	4.6	8.86	显著
C	88.50213	5221.7154	1	5221.7154	13.4958	4.6	8.86	极显著
$A \times C$	56.126875	2100.1507	1	2100.1507	5.428	4.6	8.86	显著
$B \times C$	62.20603	2579.7264	1	2579.7264	6.6674	4.6	8.86	显著
$A \times B \times C$	62.727875	2623.1909	1	2623.1909	6.7798	4.6	8.86	显著
误差		5416.7895	14	386.9135				

根据图 1 可知,与空白组($A_0B_0C_0$)相比,各实验组的叶绿素的含量均有不同程度的减少,即重金属 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 对组培薯蓣叶绿素的含量均有不同程度的影响. 其中,第 2 组($A_1B_1C_1$)中 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 的浓度均为《中华人民共和国国家标准地面水环境质量标准》中规定的第三级标准浓度,但是,该组的叶绿素的含量与空白组相比仍有所降低. 这说明即使 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 的浓度符合环境质量标准,这三种重金属离子仍然会对组培薯蓣叶绿素的含量有一定的影响. 这一结果对于今后生产中提高薯蓣乃至其

它药用植物的品质都有重要的意义.而当这三种重金属离子中其中任意一种的浓度超过环境质量标准时,叶绿素的含量就会大幅减少,这说明 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 对组培薯蓣叶绿素 a、b 的含量的影响都是相当显著的,这是与方差分析结果相一致的.

由图可知,随着重金属离子浓度的增加,叶绿素的含量基本呈下降趋势,但是第 4 组 ($\text{A}_1\text{B}_2\text{C}_1$) 的含量要比第 3 组 ($\text{A}_1\text{B}_1\text{C}_2$) 的略高,第 8 组 ($\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_1$) 的含量要比第 7 组 ($\text{A}_2\text{B}_1\text{C}_2$) 的略高.根据极差分析结果,对组培薯蓣叶绿素 a、b 的含量的影响 Cd^{2+} 大于 Cr^{6+} 大于 Hg^{2+} .以第 2 组 ($\text{A}_1\text{B}_1\text{C}_1$) 为参照,由于第 4 组是 Hg^{2+} 浓度超标,而第 3 组是 Cr^{6+} 浓度超标,因此第 4 组叶绿素的含量的降低值要比第 3 组小.

同理,以第 6 组 ($\text{A}_2\text{B}_1\text{C}_1$) 为参照,由于第 8 组是 Hg^{2+} 浓度增大,而第 7 组是 Cr^{6+} 浓度增大,因此第 8 组叶绿素 a、b 的含量的降低值要比第 7 组小.这是与极差分析结果相一致的.

于这几种重金属离子的共同作用都比它们单独作用对组培薯蓣叶绿素 a、b 的含量的影响要小的原因,还有待于进一步的查证和研究.

2.2 单一重金属处理对组培盾叶薯蓣叶绿素的影响

2.2.1 对叶绿素含量的影响 由表 7、8、9 及图 2 可知,在单因子实验中,每组的叶绿素含量都是 Hg^{2+} 大于 Cr^{6+} 大于 Cd^{2+} ,即对组培盾叶薯蓣叶绿素含量的影响作用 Cd^{2+} 大于 Cr^{6+} 大于 Hg^{2+} ,这是与复合实验的结果是一致的.

同时,由图可知,在低浓度的 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 作用下,组培盾叶薯蓣叶绿素含量均呈现上升趋势,且基本高于空白对照组,且均在第 4 组达到最高峰,随着各处理浓度的继续增加,叶绿素含量开始下降,且均

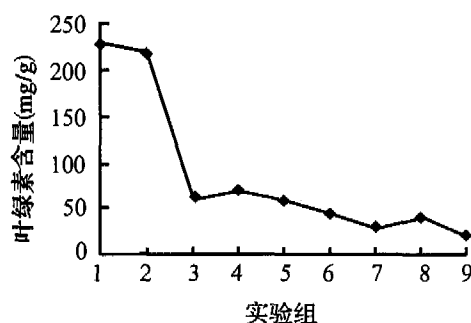


图 1 复合重金属处理对组培盾叶薯蓣叶绿素含量的影响
Fig. 1 Effect of combined pollution on chlorophyll content of tissue cultured *Dioscorea zingiberensis*

表 7 Cd^{2+} 胁迫下的叶绿素含量及 a/b 比值

Table 7 Chlorophyll content and a/b under stress of Cd^{2+}

组号	Ch_a	Ch_b	$\text{Ch}_a + \text{Ch}_b$	Ch_a/Ch_b
1	22.47675	11.37671	33.85346	1.975681
2	22.19924	11.45669	33.65593	1.937667
3	21.39627	11.54461	32.94088	1.853355
4	25.21367	13.88702	39.10069	1.815629
5	15.37757	9.582615	24.96019	1.604736
6	12.61845	8.403477	21.02193	1.501574
7	10.96164	8.006854	18.96849	1.369032

表 8 Hg^{2+} 胁迫下的叶绿素含量及 a/b 比值

Table 8 Chlorophyll content and a/b under stress of Hg^{2+}

组号	Ch_a	Ch_b	$\text{Ch}_a + \text{Ch}_b$	Ch_a/Ch_b
1	22.47675	11.37671	33.85346	1.975681
2	23.37324	12.16192	35.53516	1.921837
3	23.33277	12.29513	35.6279	1.897724
4	27.31748	14.53717	41.85465	1.879146
5	17.917	9.925617	27.84262	1.805127
6	16.42364	9.183985	25.60763	1.788291
7	14.06498	7.885059	21.95004	1.78375

表 9 Cr^{6+} 胁迫下的叶绿素含量及 a/b 比值
Table 9 Chlorophyll content and a/b under stress of Cr^{6+}

组号	Ch_a	Ch_b	$\text{Ch}_a + \text{Ch}_b$	Ch_a/Ch_b
1	22.47675	11.37671	33.85346	1.975681
2	22.61854	11.79216	34.4107	1.9181
3	22.94067	12.08272	35.02339	1.898635
4	25.8404	14.13236	39.97276	1.828456
5	17.0639	10.08195	27.14585	1.692519
6	15.51971	9.697911	25.21762	1.600314
7	11.64521	8.060909	19.70612	1.444653

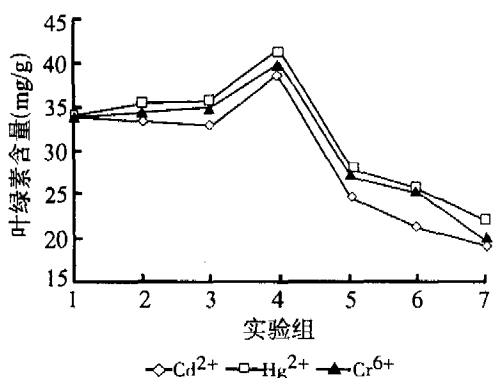


图 2 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 对组培盾叶薯蓣叶绿素的影响

Fig.2 Effect of Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} on chlorophyll content of tissue cultured *Dioscorea zingiberensis*

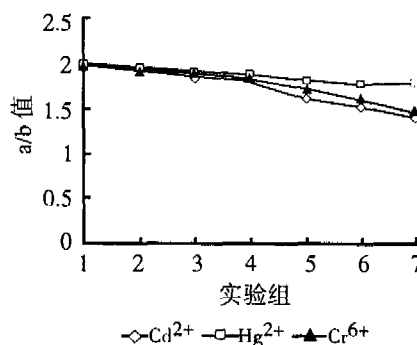


图 3 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 对组培盾叶薯蓣叶绿素 a/b 影响

Fig.3 Effect of Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} on chlorophyll a/b ratio of tissue cultured *Dioscorea zingiberensis*

低于空白对照组.出现这种现象的可能原因是:低浓度重金属离子对组培盾叶薯蓣的生长有促进作用,故叶绿素增加.而随着重金属浓度的不断增大,进入组培盾叶薯蓣的重金属离子的增多,组培盾叶薯蓣处于不正常生长条件下,生长受到抑制,故组培盾叶薯蓣叶绿素含量减少.

但在复合实验中,虽然第 2 组的三种重金属的浓度即单因子实验中的第四组浓度,但第 2 组叶绿素含量却较空白组略有降低.这是因为虽然三种重金属浓度各自都是三级标准浓度,但是三种重金属离子共同作用下,实际的重金属浓度就已经超过了标准浓度,因此叶绿素含量有所下降.在实际生产生活中,水体中基本上均含有不只一种重金属离子,因此,即使每种重金属的含量符合标准,它们的复合作用仍会对植物产生影响.

2.2.2 对叶绿素 a/b 比值的影响 由图 3 可知,叶绿素 a/b 值随 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 处理浓度的增加皆呈下降趋势,且都在各处理系列的第四组浓度处理下出现较明显的下降.其中以单一 Cd^{2+} 处理条件下下降最为明显,单一 Hg^{2+} 处理条件下下降比较平缓.从植物外部形态上来看, Cd^{2+} 处理系列的植株叶片也较其它处理系列偏黄.这也是与复合实验的结果相一致的.

在本研究中,叶绿素含量的减少与叶绿素 a/b 值的下降并不完全同步,其中叶绿素 a/b 值对外界重金属胁迫反应比较敏感,这可能是由于重金属首先破坏叶绿素 a 的缘故.与叶绿素总量相比,叶绿素 a/b 值是衡量叶片感受重金属的相对敏感的一个生理指标^[9].

4 结论

(1) Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 对组培盾叶薯蓣叶绿素含量和叶绿素 a/b 值均有明显影响. Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 对组培薯蓣叶绿素含量的影响的大小顺序为: Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} - Hg^{2+} - Cr^{6+} 互作、 Hg^{2+} - Cr^{6+} 互作、

Cd^{2+} - Cr^{6+} 互作、 Cd^{2+} - Hg^{2+} 互作。

(2) Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 及其交互作用对组培薯蓣叶绿素 a、b 的含量的影响均是显著的,其中这三种重金属离子及其交互作用对组培薯蓣叶绿素 a 含量的影响和 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 对组培薯蓣叶绿素 b 含量的影响是极显著的。

(3)在金属离子浓度较低时,组培盾叶薯蓣叶绿素含量随重金属浓度增加而增加。随着重金属离子浓度增加,组培盾叶薯蓣叶绿素含量降低,其抑制效应随重金属浓度的增加而增强。而 a/b 值随 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 处理浓度的增加持续下降。

参考文献:

- [1] 张玉秀,柴团耀, Gerard B. 植物学报, 999 41(5):453-457.
- [2] 王跃生,张晶. 中国中药杂志, 2000, 25(6):377.
- [3] 丁志遵. 作物品种资源, 1986, (2):1-4.
- [4] 潘瑞帜,董愚得. 植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社, 1995.
- [5] 环境保护法规标准选编[S]. 1989:335-336.
- [6] 环境保护法规标准选编[S]. 1989:343.
- [7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2001.
- [8] 钟平安. 生物统计[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 1983.
- [9] 任安芝. 应用与环境生物学报, 2000, 6(2):112-116.

Study on the Impact of a Several Heavy Metals Ion to the Chlorophyll Content of Tissue Cultured *Dioscorea zingiberensis*

ZHANG Lu-jie, QING Ren-wei, LAN Li-qiong, FU Hua-long
(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Effects pollution of Cd^{2+} , Hg^{2+} and Cr^{6+} on chlorophyll content of tissue cultured *Dioscorea zingiberensis* was measured. The results showed that Lower concentration of heavy metal increased chlorophyll content which was increased as increased of heavy metal concentration. While higher concentration decreased chlorophyll content, and the inhibiting effect increased as increased of heavy metal concentration. The one by one in size order of the primary and secondary impact of the content of chlorophyll of tissue cultured *Dioscorea zingiberensis* was: Cd^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} , the reciprocity of Cd^{2+} - Hg^{2+} - Cr^{6+} , the reciprocity of Hg^{2+} - Cr^{6+} , the reciprocity of Cd^{2+} - Cr^{6+} , the reciprocity of Cd^{2+} - Hg^{2+} .

Key words: heavy metal; chlorophyll; impact; *Dioscorea zingiberensis*