

Cr^{6+} 、 As^{3+} 污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究

施国新 解凯彬 杜开和 丁小余 常福辰

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

[摘要] 电镜观察发现,黑藻(*Hydrilla verticillata*(L.F.)Royle)叶细胞遭受 Cr^{6+} 、 As^{3+} 毒害初期,高尔基体消失,内质网膨胀后解体,叶绿体中的类囊体和线粒体中的脊突膨胀,核中染色质凝集.随着叶细胞毒害程度的加重,核仁消失,核膜破裂,叶绿体和线粒体解体,质壁分离使胞间连丝拉断,最后细胞死亡.结果表明: Cr^{6+} 、 As^{3+} 对细胞的膜结构与非膜结构都产生毒害作用.

[关键词] 黑藻 Cr^{6+} As^{3+} 污染 超微结构

[中图分类号] Q942; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)04-0093-05

Cr^{6+} 和 As^{3+} 是环境中重要的重金属污染物质,对植物具有毒害作用.近年来一些研究已涉及 Cr^{6+} 和 As^{3+} 对植物的毒害影响,但主要集中在生理生化的伤害反应^[1~3].为此,我们选择沉水植物黑藻作为研究对象,试图通过不同梯度浓度的 Cr^{6+} 、 As^{3+} 污染水对黑藻植株培养处理,查明这两种重金属离子对黑藻叶细胞超微结构伤害的规律性,同时为前人对生理生化伤害反应的研究结果提供细胞学上的佐证,并为通过观察植物细胞的受伤害程度及时发现和排除重金属污染源提供理论依据.

1 材料和方法

材料取于江苏省苏州市吴县东山镇太湖边水域生长的黑藻植株,将其移植于水生植物培育池中培育.于 1998 年 9 月下旬(20~24℃)选取生长旺盛的植株,先在无底泥的 11 个玻璃缸中用去离子水培养 2 d,然后在上午 10:00 分别在 5 个缸中加入 1、2、3、4 和 5 mg/L 的 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (按纯 Cr^{6+} 计),同时在另 5 个缸中加入同样梯度浓度的 As_2O_3 (按纯 As^{3+} 计),另 1 个缸黑藻作对照.

在不同浓度的 Cr^{6+} 、 As^{3+} 污染水中培养黑藻,从第 2 d 开始每天在上午 10:00 从各浓度培养缸中选取植株倒数第 5 叶叶中段,用 2.5% 戊二醛和 2% 锇酸双重固定,丙酮系列脱水,EPON812 包埋,LEICA 超薄切片机制片,切片经醋酸双氧铀——柠檬酸铅双重染色后,于 Hitachi 600-A-2 型透射电镜下观察并拍照.

2 观察结果

2.1 细胞核

在 3 mg/L Cr^{6+} 处理 5 d 的黑藻叶细胞中,染色质开始凝集,核仁边缘模糊松散.在 5 mg/L

收稿日期 2001-06-21

基金项目 国家自然科学基金(39770046)和江苏省教育厅自然科学基金(2000SWX0000SJ1)资助项目

作者简介 施国新,1950—,南京师范大学生命科学学院教授,博士生导师,主要从事植物学的教学与研究.

Cr^{6+} 处理5d,核仁消失,染色质电子密度增高成絮状[图版I,2],核质电子密度降低;同样浓度处理10d,核膜破裂,染色质呈颗粒状,核质散出[图版I,4]。而对照叶细胞中的细胞核中核仁完整,染色质分布均匀,核质电子密度较高,核膜清晰[图版I,1]。在 3 mg/L As^{3+} 处理3d的黑藻叶细胞与对照无明显差别,核仁在 5 mg/L As^{3+} 处理8d时消失,12d时细胞核内容物呈无序状态,部分核膜破损,核质、染色质散出。

2.2 叶绿体

叶绿体是黑藻叶细胞最明显的细胞器,在一个细胞切面上常可见到5~8个,呈椭圆形,两端微尖,类囊体基粒和片层排列较为完整[图版I,1]。在 3 mg/L Cr^{6+} 处理4d的叶细胞中,叶绿体膨胀成圆球形;同浓度处理6d,叶绿体中类囊体基粒和片层膨胀成零乱状态[图版I,8]。

一些叶绿体外膜没有破损,内部基粒和片层呈扭曲状[图版I,7]。在 5 mg/L Cr^{6+} 处理8d的细胞中,叶绿体外膜破损,膨胀的基粒和片层散入细胞基质中[图版I,6];同浓度处理10d,细胞基质中可见到零星散落的类囊体基粒和片层[图版I,4]。在 3 mg/L As^{3+} 处理6d的叶细胞中,叶绿体膨胀成球形,但在 5 mg/L As^{3+} 处理12d时,才见到叶绿体外膜破损的现象。

2.3 胞间连丝

黑藻叶细胞的质膜紧靠细胞壁,壁层中胞间连丝分布较多[图版I,3],在 3 mg/L Cr^{6+} 处理5d的叶细胞中,可观察到质膜在多个部位脱离细胞壁,开始出现质壁分离现象。由于质膜的收缩,一些胞间连丝被拉断[图版I,5]。在 5 mg/L Cr^{6+} 处理8d的叶细胞中,质膜破坏消失[图版I,6]。在 3 mg/L As^{3+} 处理10d的叶细胞中才见到明显的质壁分离和胞间连丝被拉断的现象。

2.4 高尔基体和内质网

高尔基体大多分布在叶细胞的细胞壁附近[图版I,3],少量在叶绿体之间的细胞基质中,在 3 mg/L Cr^{6+} 处理3d和 4 mg/L As^{3+} 处理3d的叶细胞中已见不到高尔基体存在,高尔基体是这两种离子处理后最早消失的细胞器。内质网存在的时间相对要长一些,在对照的叶细胞中,核糖体遍布在细胞基质中,内质网多为粗糙型[图版I,3]。在 3 mg/L Cr^{6+} 和 4 mg/L As^{3+} 各处理3d的叶细胞中,可观察到叶细胞内核糖体明显减少,内质网多为光滑型,部分膨胀成囊泡状。

2.5 线粒体

在黑藻叶细胞中,线粒体数量较多,在细胞中分布均匀,脊突明显[图版I,1],在 5 mg/L Cr^{6+} 处理5d的叶细胞中,线粒体脊突膨胀[图版I,2],同样浓度处理8d,线粒体脊突凌乱呈破坏状态,处理10d则可见到一些线粒体脊突破坏,外膜开始解体[图版I,9],部分线粒体成空泡状或解体消失。 5 mg/L As^{3+} 处理10d的细胞中,线粒体大多呈脊突部分损坏,但外膜完整。

经 5 mg/L Cr^{6+} 处理8d, 5 mg/L As^{3+} 处理10d,黑藻全株失绿,老叶腐烂。 2 mg/L Cr^{6+} 处理3d和 3 mg/L As^{3+} 处理3d的黑藻,除老叶略显黄色外,植株基本保持绿色,移植于培育池中,生长正常。

3 讨论

近年来,重金属污染对植物的毒害研究已引起了国内外学者的重视,特别在植物生理功能和酶系的破坏、重金属在植物体内的积累和分布等方面的报道较多^[4~6],也有涉及超微结构的零星报道^[7]。有关 Cr^{6+} 被植物吸收后会导致形态发育及超微结构上的伤害已有文献涉及^[8]。

徐国华 (2000), Poonann (1994) 等观察到莼菜等植物经 Cr^{6+} 处理后叶细胞壁膨大甚至出现空洞, 胞间连丝消失的现象, 并认为可能是 Cr^{6+} 氧化破坏了细胞壁纤维素分子之间的化学键所致^[9, 10]. 我们观察到受 Cr^{6+} 毒害后, 黑藻叶细胞壁也出现疏松的现象, 但直至细胞死亡, 壁仍是完整的, 未发现穿孔的现象. 这可能是由于不同的植物对 Cr^{6+} 的耐受性不同所致. 胞间连丝的消失, 我们经过仔细观察, 主要是由于细胞受 Cr^{6+} 的毒害, 出现质壁分离, 胞间连丝被拉断后消失. 在 Cr^{6+} 毒害早期, 尚未出现质壁分离时, 胞间连丝普遍存在, 在质膜受到破坏后, 细胞壁中未观察到胞间连丝, 这一结果和我们用 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 处理黑藻叶细胞观察到的结果相一致^[11]. 胞间连丝的消失, 是细胞受重金属毒害的重要特征之一.

前人用重金属离子 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 处理的植物根尖细胞核中的核仁裂解成多个或出现有丝分裂异常, 形成较多的微核^[12, 13]. 我们用 Cr^{6+} 、 As^{3+} 处理黑藻叶细胞, 其核仁在电镜下出现模糊松散的现象. 随着处理浓度增高和处理时间的延长, 核仁逐渐消失, 这表明不同离子对植物产生毒害及同一离子对植物不同部位产生毒害, 植物在结构上出现的伤害是有差异的, 这主要是植物不同部位对不同离子毒害的反应及耐受性是不同的.

我们曾对经 Cr^{6+} 处理的茳草^[14]和经 As^{3+} 处理的莼菜^[15]进行叶绿素含量的测定, 观察到叶绿素总量随 Cr^{6+} 和 As^{3+} 浓度的增高而逐渐减少, 光合速率降低. 这与黑藻叶细胞中叶绿体随着 Cr^{6+} 、 As^{3+} 浓度的增高, 其结构逐渐破坏的结果是一致的. 前人研究叶绿体结构状态与光合作用的光化学反应活性的关系时认为: 类囊体结构的完整性和有序性对叶绿体在光合作用中进行正常而有效的光能转换是非常必要的^[16]. 叶绿体的破坏直接影响光合电子传递链的正常功能^[17]. 可见, 叶细胞经 Cr^{6+} 、 As^{3+} 的毒害, 使叶绿体或类囊体膨胀, 已直接影响到光合作用的正常进行.

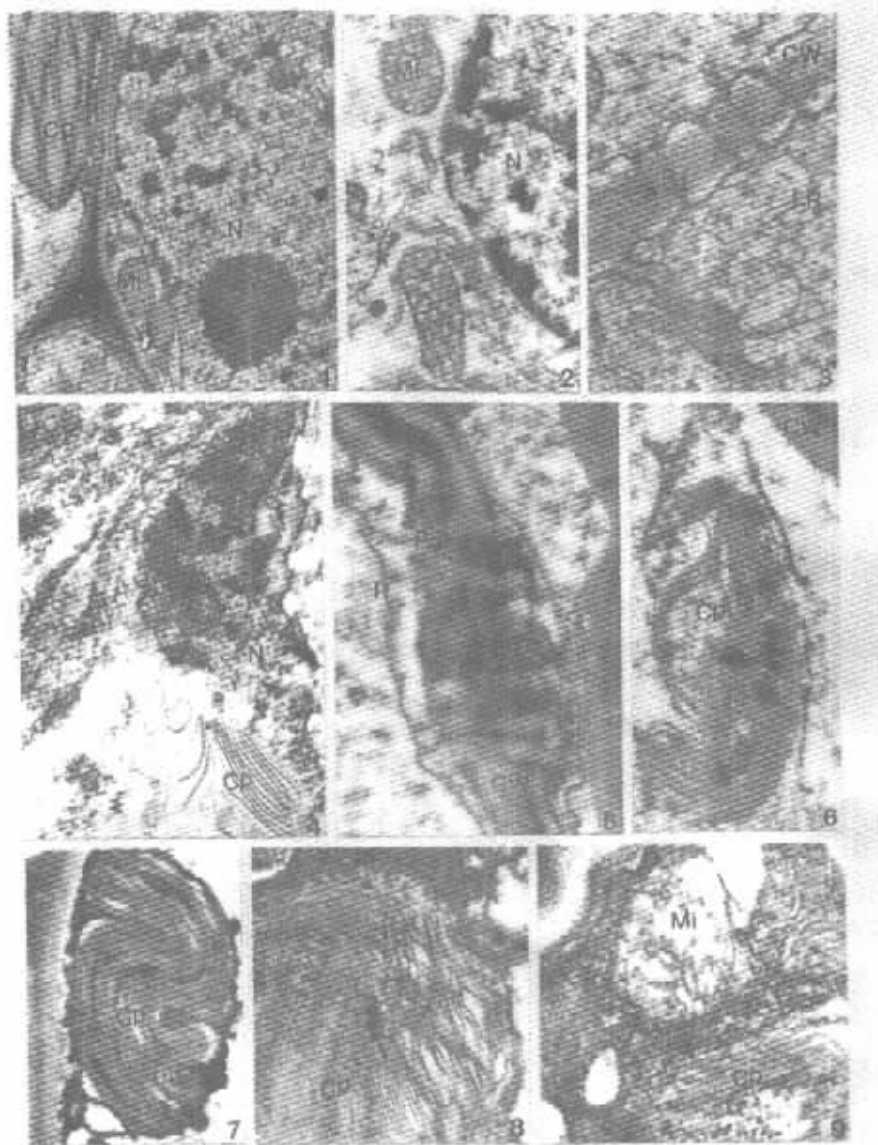
重金属毒害植物使叶片的呼吸机能受到严重破坏, 呼吸强度减弱, 目前是用生理方法进行测定^[18]. 从细胞结构分析, 在受 Cr^{6+} 、 As^{3+} 毒害的叶细胞中, 线粒体的脊突膨胀、减少, 直至外膜破裂, 直接影响叶片的呼吸功能, 这从结构上阐明了叶片呼吸功能下降的原因.

经观察, Cr^{6+} 、 As^{3+} 对黑藻叶细胞的毒害, 耐受性从弱到强的主要细胞器依次是: 高尔基体、内质网、线粒体、细胞核、叶绿体. 根据 Cr^{6+} 、 As^{3+} 对黑藻毒害处理的结果分析, Cr^{6+} 的毒性大于 As^{3+} .

4 图版说明

Cp: 叶绿体; CW: 细胞壁; ER: 内质网; G: 高尔基体; Mi: 线粒体; N: 细胞核; P: 质膜; Pd: 胞间连丝

(1) 对照叶细胞的超微结构, 示细胞核、核仁、叶绿体、线粒体. $\times 7000$ (2) 5 mg/L Cr^{6+} 处理 5 d 的叶细胞, 示核仁消失, 染色质成絮状. $\times 12000$ (3) 对照叶细胞的超微结构, 示胞间连丝、高尔基体、内质网. $\times 35000$ (4) 5 mg/L Cr^{6+} 处理 10 d 的叶细胞, 示核膜破裂. $\times 12000$ (5) 5 mg/L Cr^{6+} 处理 5 d 的叶细胞, 示胞间连丝由于质壁开始分离而部分拉断. $\times 50000$ (6) 5 mg/L Cr^{6+} 处理 8 d 的叶细胞, 示叶绿体外膜破损, 质膜消失. $\times 12000$ (7) 5 mg/L Cr^{6+} 处理 6 d 的叶细胞, 示叶绿体基粒和片层成扭曲状. $\times 10000$ (8) 5 mg/L Cr^{6+} 处理 6 d 的叶细胞, 示叶绿体中类囊体基粒和片层膨胀成零乱状态. $\times 40000$ (9) 5 mg/L Cr^{6+} 处理 10 d 的叶细胞, 示线粒体脊突破坏. $\times 2000$



图版 I

[参考文献]

- [1] 周易勇,刘同仇,邓波儿. 铬污染对辣椒叶绿素和铁含量及几种酶活性的影响[J]. 环境科学, 1991, 11(3): 28—29.
- [2] 张义贤. 三价铬和六价铬对大麦毒性效应的研究[J]. 中国环境科学, 1997, 17(6): 555—568.
- [3] 高世荣,修瑞琴,郑静. 三价砷对藻类群落结构的影响[J]. 环境科学, 1997, 18(4): 79—80.
- [4] Kuepper H, Kuepper F, Spiller M. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants [J].

- Photosynth Res ,1998 ,58(2) : 123—133.
- [5] Schickler H ,Caspi H. Title response of antioxidative enzymes to nickel and Cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum* [J]. Source physiol Plant ,1999 ,105(1) : 39—44.
- [6] Kaplan M. Accumulation of Copper in soils and leaves of tomato plant in greenhouses in Turkey [J]. J Plant Nuru , 1999 ,22(2) : 237—244.
- [7] Sawidis T ,Reiss H D. Effects of heavy metals on pollen tube growth and ultrastructure [J]. Protoplasma ,1995 ,185 (3—4) : 113—122.
- [8] Heumann H G. Effects of heavy metals on growth and ultrastructure of *Chara vulgaris* [J]. Protoplasma ,1987 ,136 : 37—48.
- [9] 徐国华 ,施国新 ,刘丽. Cr^{6+} 对莼菜叶的急性毒害 [J]. 南京师大学报(自然科学版) 2000 ,23(1) : 67—71.
- [10] Poonanm G ,Prakash C ,Santha D. Chromium (VI) induced morphological changes in *Limnanthemum cristatum* Grisel [J]. Apossible bioindicator ,1994 (44) : 201—206.
- [11] 施国新 ,杜开和 ,解凯彬 ,等. 汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究 [J]. 植物学报 , 2000 ,42(4) : 373—378.
- [12] 张义贤. 重金属对大麦毒性的研究 [J]. 环境科学学报 ,1997 ,17(2) : 199—205.
- [13] 段昌群 ,王焕校. 重金属对蚕豆的细胞遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨 [J]. 植物学报 , 1995 ,37(1) : 14—24.
- [14] 徐勤松 ,施国新 ,郝怀庆. Cd、Cr(VI) 单一及复合污染对苜蓿叶绿素含量和抗氧化酶系统的影响 [J]. 广西植物 , 2001 ,21(1) : 87—90.
- [15] 宋东杰 ,施国新 ,杨顶田. As^{3+} 对莼菜冬芽的毒害 [J]. 南京师大学报(自然科学版) 2000 ,23(1) : 72—76.
- [16] 李功藩 ,蔡琬平 ,吴亚君. 叶绿体结构状态与光化学活性的关系 [J]. 植物生理学报 ,1987 ,13(3) : 295—301.
- [17] Trebst A. Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts [J]. Annu Rev Plant Physiol ,1974 , 25 : 423—458.
- [18] Spalding B P. Effect of divalent metal chlorides on respiration and extractable enzymatic activities of douglas fir needle litter [J]. J Environ Qual ,1979 ,8 : 105.

Ultrastructural Study of Leaf Cells Damaged from Cr^{6+} and As^{3+} Pollution in *Hydrilla verticillata*

Shi Guoxin ,Xie Kaibin ,Du Kaihe ,Ding Xiaoyu ,Chang Fuchen

(College of Life Science ,Nanjing Normal University ,Nanjing 210097 ,PRC)

Abstract : Ultrastructural observation showed ,leaf cells damaged from Cr^{6+} and As^{3+} pollution in *H. Verticillata* at early stage dispersion of dictyosomes ,disintegration after swelling of endoplasmic reticulum ,swelling of thylakoids of chloroplast and cristae of mitochondria and condensation of chromatin of nucleus. More serious damage was shown in the plant cells with heavier pollution ,such as dispersion of nucleolus ,disruption of nuclear membrane ,disintegration of chloroplasts and mitochondria ,collapse of plasmodesmata due to plasmolysis and eventually cells death. The results indicated that Cr^{6+} and As^{3+} might injure all the membranous and non - membranous structure of cells.

Key words : *Hydrilla verticillata* ; Cr^{6+} ; As^{3+} ; pollution ; ultrastructure