

重金属 Cr^{6+} 对烟草组织培养的影响

陈耕云, 石贵玉, 徐美燕, 廖文雪

(广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541004)

[摘要] 以烟草组培苗为材料, 在培养基中添加不同浓度的重金属 Cr^{6+} 离子, 进行组织培养。30 d 后, 发现经过铬处理的烟草生长发育均受到不同程度的抑制。 Cr^{6+} 浓度的增加, 愈伤组织的长势、株高、根长、鲜重和干重总趋势均下降。叶片的叶绿素含量在 Cr^{6+} 浓度为 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时比对照高; 蛋白质含量和可溶性糖含量, 均比对照低。当 Cr^{6+} 浓度达到 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 烟草的生长发育完全被抑制。

[关键词] 烟草; 组织培养; 铬

[中图分类号] Q945

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-9021(2006)02-0028-03

[作者简介] 陈耕云(1980-), 女, 广西桂平人, 广西师范大学硕士研究生, 主要研究方向为植物生理、生化; 石贵玉(1953-), 男, 广西百色人, 广西师范大学教授, 主要从事植物生理生态教学与科研工作。

[基金项目] 广西教育厅科研基金资助项目。

随着工农业的发展, 三废(废水、废气、废渣)的排放量急剧增加, 致使一些重金属元素在环境中的含量大增。对生物造成严重毒害作用, 表现在生理生长过程受阻, 生长发育停滞, 最后可能导致生物死亡。铬作为工业的“五毒”之一, 是一种毒性较大的致畸、致突变剂^[1]。有关铬的研究, 主要集中在对小麦、大麦、水稻等方面的研究^[2-4], 但未见对烟草组织培养方面的研究报导。本文利用烟草的组织培养来研究铬对植物生长发育的影响来探讨铬在植物体内的积累以及对植物的毒害作用, 从而为减轻和治理土壤铬污染提供依据, 预防其对动植物以及人类的毒害作用。

1 材料与方法

1.1 材料与培养处理

以实验室培养的烟草(*Nicotinatabacum* L.)再生无菌苗为实验材料。将烟草叶片在无菌条件下切成 0.5 cm^2 大小的组织块, 分别接入各种含 Cr^{6+} 以及对照的培养基中, 每瓶4块。基本培养基: MS + $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + 0.05 mgL^{-1} NAA, PH 值 5.8。铬的来源是 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 培养基中含铬处理浓度为:

(1) $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (2) $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (3) $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (4) $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (5) $600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (6) $700 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (7) $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 (8) 对照 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每组10瓶。培养温度为 27°C , 光照为每天12 h, 光照强度为 2000 LX 。

培养至30 d时随机取样分析培养的组培苗内可溶性糖含量、叶绿素含量和蛋白质含量^[5]。同时, 分别取每组的3瓶称量组培苗的干重和鲜重, 本实验重复2次, 最后把已形成再生苗(转接到 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四个 Cr^{6+} 浓度中)接种于不含激素的培养基中, 20 d后观察其生长和生根情况。

1.2 测定方法

叶绿素含量测定采用分光光度法, 蛋白质含量测定采用紫外吸收法, 可溶性糖含量的测定采用蒽酮比色法^[6]。植株生长量测定采用处理30 d后2瓶组培苗的鲜重、干重以及转接20 d后组培苗的高度和根长度变化来表示。

对所得数据均算取平均值, 并用 SPSS 统计软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Cr^{6+} 处理对烟草株高和根长的影响

铬处理对烟草培养苗株高均表现为抑制作用, 且浓度愈高抑制愈明显(表1), 如在铬离子

100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,株高为对照的 55.1%,浓度上升到 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,株高只是对照的 5.6%。低浓度的 Cr^{6+} 对根长有一定的促进作用,如 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时分别是对照的 120% 和 183.3%,这与石贵玉的研究结果一致^[7],但根细长不粗壮,随着 Cr^{6+} 浓度的增加呈现抑制作用。至于低浓度 Cr^{6+} 处理对根长促进作用的原因有待进一步的研究。

经统计软件 SPSS 分析,铬离子浓度与株高呈极显著性相关 ($R = -0.964, P = 0.01$),也就是说,浓度对植物的株高生长有明显的抑制作用;但是与根长并无相关性。

表 1 Cr^{6+} 处理对烟草再生苗株高和根长的影响

浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	株高 (cm)	占对照的百分率 (%)	根长 (cm)	占对照的百分率 (%)
0	8.9	100	6.0	100
100	4.9	55.1	6.2	103
150	3.0	33.7	7.2	120
300	0.5	5.6	3.4	56.7

2.2 不同浓度 Cr^{6+} 处理对烟草组培苗鲜重和干重的影响

不同浓度铬处理对烟草干重和鲜重的影响,不明显,但对根长的作用明显,在 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,干重和鲜重均比其它铬浓度处理高。与对照相比,表现降低的趋势,且随着浓度的增加,抑制作用越明显。在浓度为 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,干重和鲜重下降率均在 90% 以上,说明这时植物体的生长受到了非常严重的抑制。经统计分析,铬离子浓度与干重和鲜重均呈极显著相关 (R 分别是 -0.956 和 -0.869)。

表 2 Cr^{6+} 处理对烟草再生组织鲜重和干重的影响

浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	干重 (克/每瓶)	占对照的百分率 (%)	鲜重 (克/每瓶)	占对照的百分率 (%)
0	0.672 5	100	16.02	100
100	0.376 2	55.9	5.45	34.1
150	0.524 2	77.9	11.42	71.3
200	0.413 9	61.6	7.80	40.7
300	0.362 9	53.4	4.03	25.2
600	0.052 8	7.8	0.75	4.7
700	0.041 1	6.1	0.27	1.7
800	0.022 4	3.3	0.20	1.3

2.3 不同浓度 Cr^{6+} 处理对烟草叶片中叶绿素含量的影响

除了在 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时,叶绿素含量略高于其它浓度处理外,总的趋势是随着铬离子浓度的增加而逐渐下降(表 3)。这与马广岳^[8]等以铬处理黑藻时,浓度与叶绿素含量呈负相关的结果一致。至于在用 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度处理时,叶绿素含量增高的原因有待进一步研究。经统计分析,铬离子浓度与叶绿素总含量 T 之间呈极显著性相关 ($R = -0.934$)。

表 3 Cr^{6+} 处理对烟草叶片中叶绿素和可溶性糖含量的影响

浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	100	150	200	300	600	700	800
叶绿素含量 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{FW}^{-1}$)	0.283	0.265	0.313	0.238	0.194	0.184	0.073	0.071
占对照的百分率 (%)	100	93.6	110	75.2	68.5	65.1	25.8	24.9
可溶性糖含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	207	163	146	129	128	101	74	24.9
占对照的百分率 (%)	100	78.7	70.5	61.9	61.8	48.8	35.7	9.7

2.4 不同浓度 Cr^{6+} 处理对烟草可溶性糖含量的影响

用不同浓度 Cr^{6+} 处理烟草后,体内可溶性糖含量与各处理的铬离子浓度呈负相关(表 3),如 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时为对照的 78.7%,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时是 61.9%,600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时下降到 48.8%,到 800 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时反为 9.7%,烟草组培苗受到了严重的毒害。可见,在铬离子浓度超过 600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的时候,它对烟草的抑制作用非常明显,下降率超过 50%。铬离子浓度与可溶性糖含量呈极显著相关 ($R = -0.948$), Cr^{6+} 对烟草组培苗的生长有极显著的抑制作用。

2.5 不同浓度 Cr^{6+} 处理对烟草中蛋白质含量的影响

表 4 Cr^{6+} 处理对烟草中蛋白质含量的影响

浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0	100	150	200	300	600	700	800
蛋白质含量 ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	1.003 7	0.687 2	0.564 6	0.517 9	0.275 8	0.114 2	0.002 7	0.291 5
占对照的百分率 (%)	100	68.5	56.3	51.6	29.1	27.4	11.4	10.2

与对照相比较,烟草经不同浓度 Cr^{6+} 处理后,其中蛋白质含量随着浓度增加均呈现下降趋势(表 4),如 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时是对照的 68.5%,200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时下降到 51.6%,600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时下降 27.4% 等,这与陈秀启^[9]等用 Hg^{+} , Pb^{+} 等处理烟草,随着浓度的提高蛋白质含量下降的结果一致。蛋白质含量的下降可能

与 Cr^{6+} 进入植物体内与其它离子或化合物形成金属络合物,进而抑制一些与蛋白质合成有关酶的活性,从而抑制体内代谢活动相关。经统计分析,铬离子浓度与蛋白质含量呈极显著相关($R = -0.928$)。

3 讨论

在培养基中加入重金属铬离子后,烟草苗的生长发育明显受到抑制,而且浓度越高,生长发育越迟缓,当浓度达到 $600 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生长几乎停止。实验结果说明,高浓度 Cr^{6+} 对烟草组培苗的生长发育有毒害作用,浓度与毒害效应呈正相关。 Cr^{6+} 对植物的毒害机理之一可能是植物吸收有毒金属离子后在根部积累下来,影响根细胞分裂,同时也影响根对其它离子的吸收,从而抑制了根生长和植株生长;重金属离子进入植物体内后还可以与生物大分子上的活性点位或非活性点位结合后,改变生物大分子(酶)的生理代谢功能,使生物体表现出中毒现象,甚至死亡^[10]。

叶绿素含量的高低直接影响光合作用的强弱,影响植株体内物质的积累和植物的生长,而重金属离子对光合作用的影响,Al - berte^[11] 的研究认为其主要原因是由于 Cr^{6+} 污染使叶绿体片层中捕光 Chla/b - Pro 复合体合成受到抑制。叶绿体被破坏,表现为叶绿体膨胀、类囊体排列紊乱、被膜消失和叶绿体解体^[12]。本实验结果反映, Cr^{6+} 浓度愈高,烟草叶绿体含量损伤愈严重,进一步说明 Cr^{6+} 对植物的毒害之一可能是影响叶绿体的功能。由于重金属 Cr^{6+} 污染既导致了叶绿素含量的下降,又对叶绿体正常结构造成不可逆损伤,所以抑制了植物的光合作用^[14],导致光合产物产量的积累下降和生长缓慢,使组织内可溶性糖含量相应低于对照。

烟草蛋白质含量多少,与烟草愈伤组织、再生苗的生长快慢相关。本实验中 Cr^{6+} 浓度愈高,蛋白质含量愈低,其原因之一可能是铬与氨基酸,蛋白质相结合而对其合成发生直接作用;又可能通过干扰蛋白质合成系统的 Mg 和 K 而对其合成发生间接作用,也可能直接以 DNA 为靶子,限制基因的表达,从而影响蛋白质的合成^[13]。

参考文献:

- [1] 顾公望,张宏伟.微量元素与恶性肿瘤[M].上海:上海科学技术出版社,1993.199-205.
- [2] 蒋德富,杨晓华.对冬小麦 6246 发芽及根尖细胞有丝分裂影响的初步研究[J].环境科学,1981,2(5):14-18.
- [3] 张义贤.三价铬和六价铬对大麦毒害效应的比较[J].中国环境科学,1997,17(6):565-567.
- [4] 徐勤松,施国新,杜开和.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].广西植物,2002,22(1):92-96.
- [5] 华东师范大学植物生理教研室.植物生理学实验指导[M].上海:人民教育出版社,1981.
- [6] 张志良.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,1990,88-91,160-161,184-185.
- [7] 石贵玉.镉对杂交水稻幼苗毒害效应的研究[J].广西师范大学学报(自然科学版),2005,23(3):74-76.
- [8] 马广岳,施国心,徐勤松,等. Cr^{6+} 、 Cr^{3+} 胁迫对黑藻生理生化影响的比较研究[J].广西植物,2004,32(2):161-165.
- [9] 陈秀启.几种重金属离子及类金属砷对烟草组织培养的影响[J].枣庄师专学报,1995,(2):80-83.
- [10] 王焕校.污染生态学.北京:高等教育出版社,2000.46.
- [11] Alberte R S. Water stress effects on the content and organization of chlorophyll in Mesophyll and bundle sheath chloroplasts [J]. Plant Physiol, 1997, 59: 351-353.
- [12] 倪才英,陈英旭,骆永明.紫云英(Astragalus sinicus L.)对重金属胁迫的响应[J].中国环境科学,2003,23(5):503-508.
- [13] 王亚馥,等.烟草组织培养的形态发生过程中糖代谢研究[J].西北植物学报,1988:46.

The Effect of Cr^{6+} on Tissue Culture of Tobacco

CHEN Geng-yun, SHI Gui-yu, XU Mei-yan, LIAO Wen-xue

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

[abstract] After tobaccos being cultivated in tissue culture polluted with Cr^{6+} of different gradient concentration for 30 days, their growth was found inhibited to some extent. The results showed that the growth of callus, seedling height, root length, fresh weight and dry weight fell with the increase of the Cr^{6+} . At both $150 \mu\text{molCr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$ and $200 \mu\text{molCr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$, the chlorophyll content of leaves was higher than the comparison, also the contents of protein and soluble sugar declined comparing with the comparison. The growth of tobacco was completely inhibited when Cr^{6+} reached $800 \mu\text{molCr}^{6+} \cdot \text{L}^{-1}$.

[Key words] tobacco; tissue culture; chromium

收稿日期 2006-03-15

[责任编辑 刘景平]