

裙带菜配子体对三种重金属离子 毒性耐受力的研究*

侯和胜 李凝[†] 吴超元 刘海航

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

[†](香港科技大学生物系 香港)

提要 裙带菜于1994年采自威海市俚岛养殖场。1995年2月—1997年3月,用不同浓度(0, 1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol/L}$)的 Cu^{2+} , Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 处理裙带菜配子体,研究这些重金属对其生长和代谢的影响。结果表明, Cu^{2+} 对裙带菜配子体生长的抑制效应最强:在 $1\mu\text{mol/L}$ 时已出现抑制效应,叶绿素含量和光合作用速率明显下降,脯氨酸和丙二醛含量升高; $10\mu\text{mol/L}$ 时,配子体生长几乎停止;超过 $10\mu\text{mol/L}$,配子体逐渐变绿,细胞解体死亡。 Cd^{2+} 在 $1\mu\text{mol/L}$ 浓度时,对裙带菜配子体生长有促进作用; $100\mu\text{mol/L}$ 时,对配子体生长、叶绿素含量、光合作用具较强的抑制作用,其抑制程度与 Cu^{2+} $1\mu\text{mol/L}$ 浓度相似; $1\ 000\mu\text{mol/L}$ 下,配子体细胞很快死亡。 Zn^{2+} 对裙带菜配子体的毒性很小; $1\ 000\mu\text{mol/L}$ 时,仍有缓慢生长。这3种金属离子毒性强弱的顺序是 $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。

关键词 裙带菜 配子体 重金属离子 生长 毒性

学科分类号 S 949

裙带菜是常见底栖褐藻,也是人工养殖的主要海藻之一。由于沿海水域工业污染的日益加重,某些重金属对其生长和发育已造成威胁。研究裙带菜配子体对重金属离子的耐受能力,可为避免和减轻这种危害提供科学依据。另外,在实验室条件下,裙带菜配子体无性繁殖系的发育和增殖可以人为控制(Pang *et al.*, 1996),因此,可将其用作很好的外源基因表达的受体材料。利用金属硫蛋白结合重金属而解除其毒害作用的能力,将其基因与目的基因构建于同一载体一起转入裙带菜配子体,可以大大加强转化配子体细胞对重金属离子毒性的耐受力,这样可以利用某些重金属离子作为选择压力筛选出转化细胞。这将形成一种新的转化细胞筛选系统。确定重金属离子对裙带菜配子体的致死浓度是建立这一系统的前提。本文报告3种重金属离子对裙带菜配子体生长和生理过程影响的研究结果,以期减少重金属离子毒害和发展新的转化细胞筛选技术提供依据。

*国家自然科学基金资助项目,39670584号;国家攀登计划B资助项目,PD-B-6-4-2号;山东省科委资助项目,961165301号。侯和胜,男,出生于1955年1月,博士,副教授,现工作单位:辽宁师范大学生物系, Fax: 0086-0411-4214450

收稿日期:1997-04-20, 收修改稿日期:1998-01-20

1 材料和方法

1.1 材料

实验于 1995 年 2 月—1997 年 3 月进行。裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 于 1994 年采自威海市俚岛养殖场。实验用配子体为中国科学院海洋研究所藻类生理组保存的该裙带菜配子体,配子体保存在加富海水中 (Pang *et al*, 1996),雌雄混合。为扩大培养,将配子体接种到 PESI 培养液中,在 25℃,3 000 lx, 12h: 12h 光暗周期条件下培养。获得一定量配子体后,用作实验材料。

1.2 实验方法

1.2.1 生长抑制效应实验 在 PESI 培养液中分别加入 Cu^{2+} , Cd^{2+} 和 Zn^{2+} , 其浓度均依次为 0, 1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 。各处理均用 100ml 三角瓶,培养液 50ml,配子体 150mg,在 25℃,3 000 lx, 12h: 12h 光暗周期下振荡培养。每 7 天测定一次各处理配子体重量,方法是用抽滤器将培养液抽滤干净后,称配子体鲜重。称重后换含相同浓度重金属离子培养液继续培养,至下一次称重。

1.2.2 生理抑制效应实验 在 PESI 培养液中分别加入 Cu^{2+} , Cd^{2+} 和 Zn^{2+} , 其浓度均依次为 0, 5, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 。各处理均用 200ml 三角瓶,培养液 100ml,配子体 500mg,在与生长测定相同的条件下培养。每 4 天测定一次叶绿素含量、光合速率、脯氨酸和丙二醛含量。叶绿素含量按 Arnon (1949) 的方法测定,单位以每毫克鲜重配子体中含叶绿素的微克数 ($\mu\text{g} / \text{mg}$) 表示;光合速率用氧电极测定 (叶济宇等, 1985),光合速率单位是每毫克叶绿素每小时放出氧气的微摩尔数,以 $\mu\text{mol} / (\text{mg} \cdot \text{h})$ 表示;脯氨酸含量按朱广廉等 (1990) 的方法测定,单位以每克鲜重配子体含脯氨酸的微克数 ($\mu\text{g} / \text{g}$) 表示;丙二醛含量按林植芳等 (1984) 的方法测定,单位以每克鲜重配子体含丙二醛的纳摩尔数 (nmol / g) 表示。

上述生长和生理抑制效应实验各处理均设 3 次重复,结果为 3 次重复的平均值。

2 结果

2.1 3 种重金属离子对生长的影响

3 种重金属离子对裙带菜配子体生长 (W/g) 的抑制效应不同。 Cu^{2+} 的抑制效应最强,在浓度为 1 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 时抑制效应就很明显,已接近生长的半抑制浓度;在 10 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 浓度时,配子体生长几乎停止,只是在处理初期略有生长。 Cd^{2+} 对裙带菜配子体的抑制比 Cu^{2+} 弱很多,在

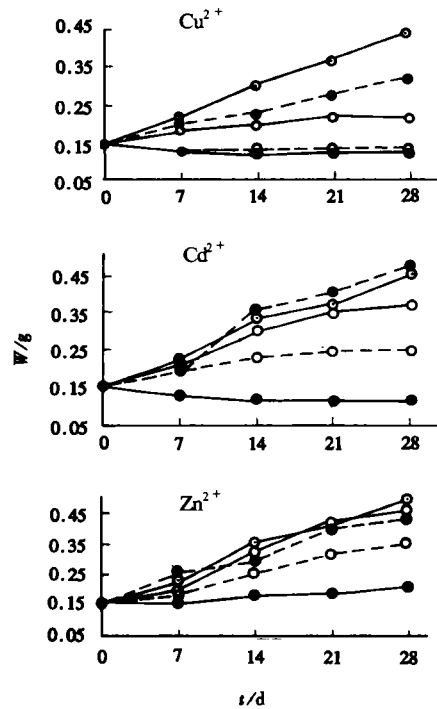


图 1 3 种重金属离子对裙带菜配子体生长的影响

Fig. 1 Influence of three heavy metal ions at different concentrations on growth of *U. pinnatifida* gametophyte

—○—对照; —●— 1 $\mu\text{mol} / \text{L}$; —○— 10 $\mu\text{mol} / \text{L}$;
—○— 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$; —●— 1 000 $\mu\text{mol} / \text{L}$

1 $\mu\text{mol/L}$ 时, Cd^{2+} 似乎有促进生长的作用; 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 裙带菜配子体的生长相当缓慢, 已达到半抑制浓度。 Zn^{2+} 对裙带菜配子体的毒性很弱, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 配子体的生长仍很旺盛; 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, Zn^{2+} 已表现出毒性(图 1)。

3 种重金属离子对裙带菜配子体的毒性与处理时间的长短有关。 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 都表现出随处理时间加长而毒性加强的趋势。 即使在抑制生长的浓度下 (Cu^{2+} 10 $\mu\text{mol/L}$; Cd^{2+} 100 $\mu\text{mol/L}$), 处理早期配子体仍有生长。 随处理时间加长(21d), 生长则完全停止, 鲜重不再增加, 甚至有所下降。 另外, 在配子体生长完全停止的各浓度实验中, 观察到配子体逐渐失去褐色而变为绿色; 显微镜下观察, 有些细胞已经解体, 内容物外溢。 这就是为什么在抑制生长浓度下, 配子体鲜重低于最初实验时配子体鲜重的原因。

表1 3 种不同浓度重金属离子对裙带菜配子体叶绿素含量和光合速率的影响

Tab. 1 Influences of three heavy metal ions at different concentrations on chlorophyll and photosynthetic rate of *U. pinnatifida* gametophyte

	测定时间 (d)	重金属 离子	重 金 属 离 子 浓 度 ($\mu\text{mol/L}$)						
			0	5	20	40	60	80	100
叶 绿 素 含 量	4	Cu^{2+}	7.9	7.4	6.4	5.0	4.8	4.1	3.3
		Cd^{2+}	8.1	8.1	7.6	6.7	6.9	6.3	6.3
		Zn^{2+}	8.4	8.3	8.1	8.0	7.8	7.5	7.1
	8	Cu^{2+}	7.9	7.0	6.1	4.5	3.2	2.1	1.0
		Cd^{2+}	8.2	6.9	6.5	5.8	5.7	5.2	6.1
		Zn^{2+}	8.6	8.2	7.8	7.8	7.5	7.0	6.4
	12	Cu^{2+}	7.9	6.3	5.7	3.5	1.8	1.4	0.4
		Cd^{2+}	8.1	6.4	5.9	4.7	4.5	5.0	4.3
		Zn^{2+}	8.4	8.2	7.3	7.3	7.0	6.5	5.2
16	Cu^{2+}	7.6	5.7	4.1	2.1	1.5	0.8	0.4	
	Cd^{2+}	8.0	6.1	5.6	4.4	4.6	4.6	3.2	
	Zn^{2+}	8.4	8.1	6.8	7.1	6.5	6.2	4.8	
光 合 速 率	4	Cu^{2+}	124	101	76	67	53	42	31
		Cd^{2+}	128	120	113	103	98	86	83
		Zn^{2+}	122	118	120	114	112	104	108
	8	Cu^{2+}	125	83	54	41	18	5	0
		Cd^{2+}	126	110	101	89	83	75	80
		Zn^{2+}	124	115	114	106	110	108	104
	12	Cu^{2+}	130	72	38	29	8	0	0
		Cd^{2+}	126	93	77	73	63	59	42
		Zn^{2+}	125	108	105	118	100	90	83
16	Cu^{2+}	128	65	26	20	0	0	0	
	Cd^{2+}	124	89	73	60	54	54	49	
	Zn^{2+}	126	110	108	105	97	89	80	

2.2 叶绿素含量和光合速率

在 $5\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 浓度下, 处理 12d 后, 配子体的叶绿素含量比对照低 20.3%, 光合速率比对照组降低 44.6%, 抑制作用已相当明显(表 1)。但在短时间内 (4d) 要达到同样的抑制效应, Cu^{2+} 浓度约为 $25\mu\text{mol/L}$ 左右。可见处理时间与毒性大小成正相关。 Cd^{2+} 对叶绿素和光合作用的抑制作用与处理时间成正相关的特点更加明显, 高浓度短时间 ($80\mu\text{mol/L}$, 4d) 的毒性低于低浓度长时间 ($5\mu\text{mol/L}$, 16d) 的毒性(表 1)。 Zn^{2+} 对裙带菜配子体的叶绿素和光合作用的抑制作用不明显, $100\mu\text{mol/L}$ 处理 16d, 叶绿素含量下降 42.9%, 光合作用下降 36.5%(表 1)。

2.3 脯氨酸和丙二醛含量

结果表明, 随 Cu^{2+} 浓度的增加或同一浓度处理时间的加长, 脯氨酸和丙二醛含量都

表 2 3 种不同浓度重金属离子下裙带菜配子体中脯氨酸、丙二醛含量的变化

Tab. 2 Changes of proline and malondialdehyde in gametophyte of *U. pinnatifida* at different concentrations of three heavy metal ions

	测定时间 (d)	重金属 离子	重 金 属 离 子 浓 度($\mu\text{mol/L}$)						
			0	5	20	40	60	80	100
脯 氨 酸 含 量	4	Cu^{2+}	140	159	203	327	430	539	635
		Cd^{2+}	152	148	189	186	205	236	292
		Zn^{2+}	135	136	128	133	132	162	186
	8	Cu^{2+}	142	182	246	402	512	603	0
		Cd^{2+}	148	140	141	208	237	249	343
		Zn^{2+}	139	135	134	149	154	171	215
	12	Cu^{2+}	140	221	296	461	535	0	0
		Cd^{2+}	142	151	182	226	251	261	390
		Zn^{2+}	141	143	155	162	176	170	208
16	Cu^{2+}	138	286	362	502	0	0	0	
	Cd^{2+}	146	145	208	221	241	281	435	
	Zn^{2+}	143	149	163	193	202	205	243	
丙 二 醛 含 量	4	Cu^{2+}	2.9	5.2	10.4	17.7	25.6	33.3	40.7
		Cd^{2+}	3.1	3.2	3.2	4.3	5.1	7.7	12.6
		Zn^{2+}	2.9	3.0	3.2	4.3	4.9	5.1	6.1
	8	Cu^{2+}	3.0	6.1	16.5	22.1	35.2	42.2	0
		Cd^{2+}	3.0	3.2	3.6	5.0	6.3	8.4	18.3
		Zn^{2+}	3.1	3.1	3.2	4.5	5.2	5.5	6.9
	12	Cu^{2+}	2.8	6.3	20.1	33.1	41.3	0	0
		Cd^{2+}	3.0	3.1	3.7	6.3	8.2	10.8	27.6
		Zn^{2+}	2.9	3.2	3.4	4.9	5.7	6.1	7.6
16	Cu^{2+}	2.8	7.2	30.2	40.0	0	0	0	
	Cd^{2+}	2.9	3.2	3.6	7.4	10.6	14.5	35.4	
	Zn^{2+}	3.0	1.1	3.4	5.0	6.2	7.0	8.1	

明显增加(表2)。100 $\mu\text{mol/L}$ 下处理4d,脯氨酸含量比对照组的增加约4.5倍,丙二醛增加约14倍。该浓度下处理8d,80 $\mu\text{mol/L}$ 下处理12d和60 $\mu\text{mol/L}$ 下处理16d,配子体已经变绿死亡,脯氨酸和丙二醛含量检测不到。在100 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 下处理16d后,配子体内脯氨酸比对照组的高了3倍,丙二醛高12倍; Zn^{2+} 在同样浓度下,脯氨酸含量比对照组的高1.7倍,丙二醛含量高2.7倍,可见其毒性远低于 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} (表2)。

3 讨论与结语

实验结果表明,3种重金属离子对裙带菜配子体毒性强弱的顺序是 $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。这与一些报道的结果是一致的。Rice等(1973)和Rai等(1981)的研究都表明,尽管重金属对藻类的毒性随种类和实验条件的变化而变化,但一般而言,其毒性大小的顺序是 $\text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Ag} > \text{Pb} > \text{Zn}$ 。本研究表明, Cu^{2+} 对裙带菜配子体的毒性很强,1 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 已明显抑制配子体生长,10 $\mu\text{mol/L}$ 已达致死浓度。因此,在自然海水条件下,裙带菜的生长发育和养殖生产,最可能受到 Cu^{2+} 污染的危害,而 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 的危险性小得多。

本文的结果表明, Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对裙带菜配子体叶绿素含量和光合作用的影响方式不同。 Cu^{2+} 直接作用于叶绿体及其类囊体,导致膜结构的破坏、色素降解、电子传递解偶联(Sorrentino, 1979)。因此,在 Cu^{2+} 毒性浓度下,裙带菜配子体很快丧失正常颜色,解体死亡。 Cd^{2+} 则可能通过抑制蛋白质合成表现出对生长、色素合成和光合作用等生理现象的抑制效应(Kremer *et al.*, 1982),所以,即使在毒害浓度下,配子体颜色没有明显变化,只是在高浓度、长时间处理下,配子体才开始变绿解体。这与Markham等(1980)的研究结果一致。

脯氨酸和丙二醛含量随 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 浓度加大和处理时间加长而显著增加,这可能是配子体细胞对伤害的反应。脯氨酸的增加表明氨基酸代谢途径改变或蛋白质分解加强。丙二醛的增加表明细胞膜的过氧化加快。这两种物质与叶绿素含量降低和光合速率下降平行出现,是配子体受伤害的产物,可以用做伤害程度的指标。

10 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 已达到裙带菜配子体的致死浓度,可以用做选择压力,筛选出与含有金属硫蛋白基因的外源基因载体整合的裙带菜配子体转化细胞。100 $\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 也可起到同样的作用,但选择的时间会比用 Cu^{2+} 的长。可是, Cd^{2+} 的毒性要比 Cu^{2+} 小得多,对细胞的伤害小,可能更适合用做裙带菜配子体外源基因转化细胞的筛选剂。

参 考 文 献

- 朱广廉 钟海文 张爱琴, 1990. 植物生理学实验. 北京:北京大学出版社. 249—251
- 叶济宇 李德耀, 1985. 植物生理学实验手册. 上海:上海科学技术出版社. 100—104
- 林植芳 李双顺 林贵珠, 1984. 水稻叶片的衰老与超氧歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系. 植物学报, 26(6):605—615
- Arnon D I, 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Betavulgaris*. *Plant Physiol*, 24(1):1—15
- Kremer B P, Markham J W, 1982. Primary metabolic effects of cadmium in the brown alga, *Laminaria saccharina*. *Z Pflanzenphysiol*, 108:125—130
- Markham J W, Kremer B P, Sperling K R, 1980. Effect of cadmium on *Laminaria saccharina* in culture. *Mar Ecol Prog Ser*, 3:31—39
- Pang S J, Wu C Y, 1996. Study on gametophyte vegetative growth of *Undaria pinnatifida* and its applications. *Chin J Oceanol Limnol*, 14:205—210
- Rai L C, Gaur J P, Kumar H D, 1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biol Rev*, 56:99—151
- Rice H V, Leighty D A, McLeod G C, 1973. The effects of some trace metals on marine phytoplankton. *Crit Rev Microbiol*, 3:27—49
- Sorrentino C, 1979. The effect of heavy metals on phytoplankton—a review. *Phykos*, 18:149—161

A STUDY ON TOLERANT CAPACITY OF *UNDARIA PINNATIFIDA* GAMETOPHYTE TO THE TOXICITY OF THREE HEAVY METAL IONS

HOU He-sheng, LI Ning[†], WU Chao-yuan, LIU Hai-hang

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

[†] (Department of Biology, The Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong)

Abstract Sporophytes of *U. pinnatifida* were collected from Lidao, Weihai in 1994. Gametophytes from the sporophytes were maintained in enriched seawater. To investigate into the effect of heavy metal ions on the growth from February 1995 to March 1997, the gametophytes were cultured in PESI medium treated with Cu^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} at 0, 1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol} / \text{L}$ concentrations. For the study of the influences of the metal ions on chlorophyll content, photosynthetic rate, proline and malondialdehyde (MDA) content of the gametophytes, the PESI medium treated with the ions at 0, 5, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ was employed. The culture condition was 25°C, 3 000 lx, 12:12h light: dark cycle. The intervals of measurement was 7 days for growth and 4 days for physiological study.

Copper, among the three metal ions investigated, was the most toxic metal ion to the gametophyte. A 50% reduction in growth took place when copper concentration was slightly higher than 1 $\mu\text{mol} / \text{L}$. Growth of the gametophyte stopped after 4 days' treatment at 10 $\mu\text{mol} / \text{L}$. The color of the cells changed from brown to green and the cells disintegrated rapidly when Cu^{2+}

concentration $10\mu\text{mol} / \text{L}$. Cd^{2+} might facilitate the growth at low concentration ($1\mu\text{mol} / \text{L}$), but started to retard the growth at $10\mu\text{mol} / \text{L}$. The growth rate of the gametophyte was reduced by 50% at $100\mu\text{mol} / \text{L}$ Cd^{2+} . The gametophytes died gradually at $1000\mu\text{mol} / \text{L}$ Cd^{2+} . Zn^{2+} had little negative effect on the gametophyte even at $100\mu\text{mol} / \text{L}$ but the growth was obviously inhibited at $1000\mu\text{mol} / \text{L}$ (Fig.1).

After 12 days' treatment at $5\mu\text{mol} / \text{L}$ Cu^{2+} , the chlorophyll content decreased by 20.3% and photosynthetic rate was 44.6% lower than that in the control. After 16,12 and 8days of the treatment at 60,80,100 $\mu\text{mol} / \text{L}$ Cu^{2+} respectively, the gametophytes died (Tab. 1). The toxic effect of Cd^{2+} on the chlorophyll content and the photosynthetic rate was stronger in $5\mu\text{mol} / \text{L}$, 16 days' treatment group than in $80\mu\text{mol} / \text{L}$, 4days' treatment group. This result indicated that Cd^{2+} might accumulate in the gametophytes during the treatment period. Zn^{2+} had a much less toxic effect on the gametophyte than Cu^{2+} and Cd^{2+} . $100\mu\text{mol} / \text{L}$ Cd^{2+} , 16 days' treatment could make 42.9% and 36.5% reductions of chlorophyll content and photosynthetic rates of the gametophytes, respectively. Proline and MDA contents in the gametophytes treated with $100\mu\text{mol} / \text{L}$ Cu^{2+} for 4 days were 4.5 and 14 times higher than those in the controls. In the gametophytes treated with $100\mu\text{mol} / \text{L}$ Cd^{2+} or Zn^{2+} for 16 days, proline and MDA were 3 and 12 times or 1.7 and 2.7 times higher than those in the controls. The order of the metal ions toxicity is $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$.

The results showed that pollution of Cu^{2+} in coastal areas may cause damages in the cultivation of the alga. The lethal Cu^{2+} and Cd^{2+} concentrations for the gametophyte have been identified; such concentrations can be used to screen the transgenic cells of the gametophyte, which are integrated with metallothionein gene.

Key words *Undaria pinnatifida* Gametophyte Heavy metal ions Growth Toxicity

Subject classification number S 949