

紫羊茅抗铜和敏感品种在发育早期 对铜离子反应的生理差异

黄玉山* 邱国华¹

(香港九龙城市大学生物及化学系 香港九龙)

(¹中山大学生物工程研究中心 广州 510275)

摘 要 紫羊茅(*Festuca rubra*)抗铜品种 Merlin 和敏感品种 S59 种子在水中吸胀 5 d 后长出的幼苗在一般培养液中分别培养了 0、2、4、6、8 和 10 d(分别称为 D0、D2、D4、D6、D8 和 D10)后再置于 $\rho(\text{Cu}^{2+}) = 5 \text{ mg/L}$ 的相同培养液中,其中约一半培养至 d 20,其余至 d 27.结果与同龄的幼苗相比,Merlin D6 在 27 d 和 20 d 的根中均有最高的干物质含量和最大的叶绿素浓度;在 27 d 苗的根中铜积累了最少;而 Merlin D6 的苗在各个抗性处理组中最高.在从 20 d 至 27 d 的培养期间,Merlin D6 地上部分的干物质增加最多,而根中则减少最多,叶绿素含量也减少最多,在根中积累的铜也最少;可是在敏感的 S59 中则没有这种特殊现象.这些现象暗示,即使是在抗性品种的 Merlin 中,在其不同的生长时期经铜处理,也表现出不同的抗性,并可能有一个抗性最大的生长期.

关键词 紫羊茅;重金属抗性;不同生长期;铜处理;生理反应

中图法分类号 Q945.14

PHYSIOLOGICAL DIFFERENCES OF FESTUCA RUBRA COPPER TOLERANT MERLIN AND SENSITIVE S59 TO COPPER TREATMENT AT THEIR EARLY DEVELOPMENTAL STAGES

WONG Yuk-Shan* & QIU Guohua¹

(Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, Kowloon, Hong Kong)

(Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract *Festuca rubra* copper tolerant Merlin and sensitive S59 seedlings that soaked in deionized water for 5 d were divided into seven groups, six of which were cultured respectively in normal media for 0, 2, 4, 6, 8 and 10 d, and correspondingly named as D0, D2, D4, D6, D8 and D10 prior to their exposure to copper at the mass concentration (ρ) of $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in the same media, and the rest one was grown in normal media throughout the culture. About half of each was harvested on 20 d and the others on 27 d. Among these seedlings, Merlin D6 had the highest dry material contents in shoots on 27 d and in roots on 20 d maximum chlorophyll contents on both d 20 and 27 seedlings, minimal copper accumulation in the roots of seedlings on 27 d, and the tallest shoots in Merlin seedlings on 20 d. For seedlings on 20 d, Merlin D6 showed a maximum increase in shoots and maximum decrease in roots of dry mass production, maximum reduction of chlorophyll content and minimal quantities of copper accumulation in roots after the further culture for a week. These results indicated that even in the copper tolerant Merlin, different tolerance to metal might express and a maximal tolerant point might exist when Merlin was treated by copper at the different developmental stages.

Key words *Festuca rubra*; heavy metal tolerance; copper treatment; different growth stages; physiological responses

微量的重金属，如锌和铜，对于生物系统的正常生长和发育是必需的，用作蛋白质和酶的结构和催化化合物的辅助因子^[1]。但是，过量的重金属对细胞具有极大的毒性，可引起各项生理生化指标的变化。大部分植物对于重金属是敏感的，但也有很多种植物能在较高浓度的重金属环境中生长。

在本研究中，我们利用对铜和镉^[2]及锌和铅^[3]具有较高的抗性的紫羊茅品种 Merlin 和敏感品种 S59 来调查在幼苗发育过程的不同时期对铜处理的生理反应差异，试图找出在 Merlin 生长过程中，其抗性表达的阶段性特征，如：抗性是否种子一萌发就存在，是否存在具较高抗性的生长期，以便寻找出植物中金属抗性的关键因素，为植物重金属抗性的分子机制研究提供初步的依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料和培养

紫羊茅(*Festuca rubra*)抗重金属品种 Merlin 和敏感品种 S59 种子的获得、处理和萌发，按文献[2]进行。Merlin 和 S59 种子经消毒后在水中吸胀 5 d，选取胚根长为 0.5 ~ 1.5 cm 的萌发种子，分为 7 组，其中 6 组(D0、D2、D4、D6、D8 和 D10)先在一般培养液^[2]中分别培养 0、2、4、6、8 和 10 d，然后改用 $\rho(\text{Cu}^{2+}) = 5 \text{ mg/L}$ (以 CuCl_2 供给)的相同培养基继续培养；以不含 Cu^{2+} 培养基处理作 CK。至 20 d 苗龄时，收取一半；继续培养 1 wk 后，收取剩下的另一半。收集的样品作以下测定。具体的实验设计如图 1。

1.2 干物质的测定和分析

收集 Merlin 和 S59 的根，用吸水纸吸干后称重 $m(\text{FW})$ ；将地上部分剪断后直接称重 $m(\text{FW})$ ，经 80℃ 72 h 烘干后，称干重 $m(\text{DW})$ 。并计算 20 d 培养与 27 d 培养的 $m(\text{DW})$ 增量。20 d 苗龄的 Merlin 和 S59 经 1 wk 培养后，其干物质的增加为 27d 苗龄的干物质含量减去 20 d 苗龄的干物质含量。

1.3 叶绿素含量的测定和分析

叶绿素含量的测定和计算同文献^[2]。20 d 苗龄的 Merlin 和 S59 的苗，经 1 wk 培养后，测定各处理组叶绿素的减少量[$m(\text{chl}_{\text{DN}})$]和照组叶绿素的减少量[$m(\text{chl}_{\text{CK}})$]，计算各处理组叶绿素含量的降低率[$w(\text{Chl}_{\text{DN}})$]= $m(\text{Chl}_{\text{DN}})/m(\text{Chl}_{\text{CK}})$ ，其中，DN 为 = D0、D2、D4、D6、D8 和 D10 之一。

1.4 Cu^{2+} 的测定和分析

Merlin 和 S59 的地上部分和根中 Cu^{2+} 的含量的测量，按文献^[2]的方法，但标准体积为 25 mL 而不是 50 mL。20 d 龄的 Merlin 幼苗经 1 wk 培养后， Cu^{2+} 增加为 27 d 幼苗中 Cu^{2+} 含量减去 20 d 幼苗中 Cu^{2+} 含量。

1.5 Merlin 和 S59 的地上部分的长度的测定和分析

随机选取 20 株 20 d 的 Merlin 和 S59 苗，测量它们的每株中最长的叶；Merlin 和 S59 幼苗的地上部分的相对长度的计算方法为：经铜处理的 Merlin 和 S59 幼苗的地上部分的长度除以对照组(CK)的地上部分的长度乘以百分之百。

2 结果

2.1 Cu^{2+} 对 Merlin 和 S59 幼苗干物质积累的影响

Merlin 和 S59 的 20 d 和 27 d 幼苗的干物质的积累情况如图 2。结果显示，几乎所有经 Cu^{2+} 处理组的地上部分(图 2A)和根(图 2B)的干物质的积累，都低于 CK，但抗 Cu^{2+} 品种 Merlin 比敏感品种 S59 积累较多的干物质。同时，Merlin D6 表现突出，它 27 d 幼苗龄苗的地上部分(图 2A)和 20 d 苗的根(图 2B)，分别具有最高的干物质含量，甚至高于 CK。

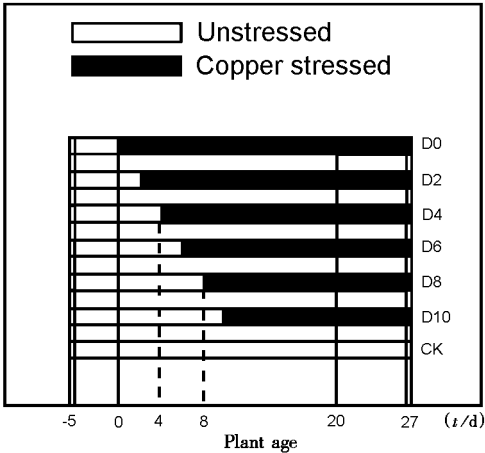


图 1 紫羊茅抗 Cu^{2+} 品种 Merlin 和敏感品种 S59 的 Cu^{2+} 处理示意图
Fig.1 Diagram of copper treatment applied to *Festuca rubra* tolerant Merlin and sensitive S59

图 2 还表示了 Merlin 和 S59 的 20 d 的幼苗 再经 1 wk 培养后的干物质积累情况. 图 2C 和 D 分别表示了地上部分和根的干物质的变化. 经过 1 wk 的培养, 主要的干物质变化都表现在地上部分, 在根中的干物质没有明显的变化. 但 Merlin 的 D6 苗又表现出其特殊性: 它的地上部分的干物质含量增加得最多; 但它在根中的干物质含量, 在所有的根中, 减少得最多.

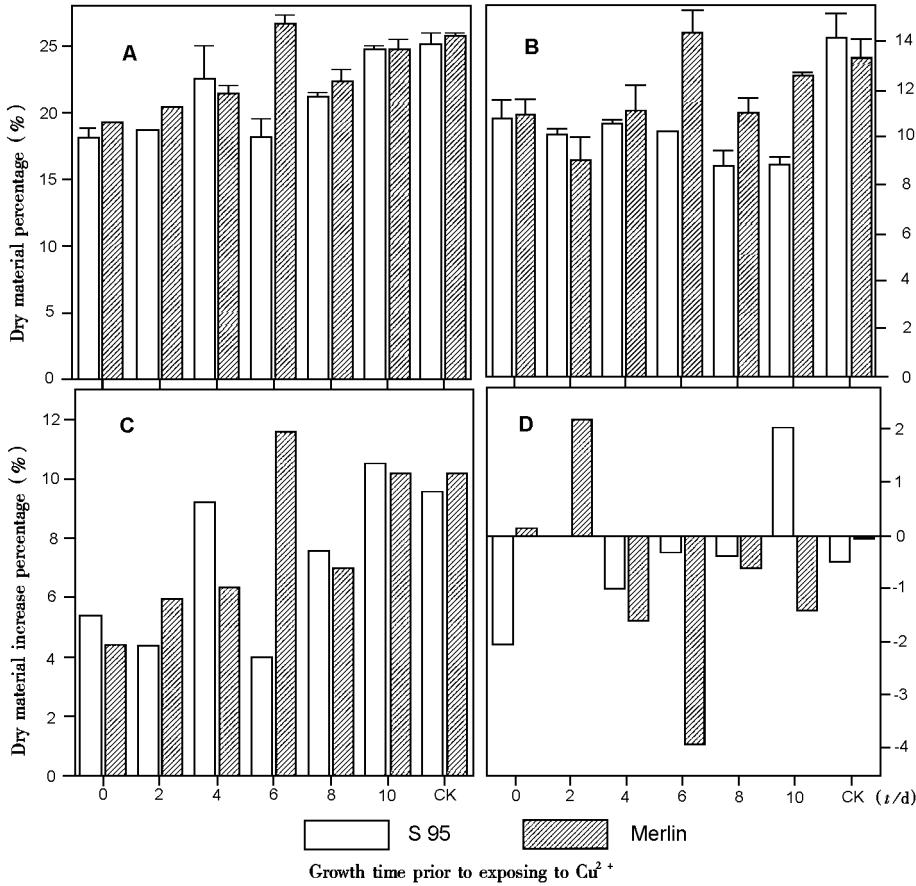


图 2 Cu^{2+} 处理对紫羊茅 Merlin 和 S59 的干物质含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.2 Effect of Cu^{2+} treatment on the dry material contents in shoots and roots of *Festuca rubra* cv. Merlin and S59
A: Shoots of seedlings on 27 d
B: Roots of seedlings on 20 d
C: Dry material changes in shoots during the culture of the last week (from 20 d to 27 d)
D: Dry material changes in roots during the culture of the last week (from 20 d to 27 d)

2.2 Cu^{2+} 处理后 Merlin 和 S59 幼苗叶绿素含量的变化

种子吸胀 5 d 后开始发芽, 因此, Merlin 和 S59 的 D0 苗从发芽开始, 就生长于逆境, 而其它(从 D2 到 D10)苗则先在正常的环境、后在逆境中生长. 在培养过程中, Cu^{2+} 敏感的 S59 的所有处理组, 在 Cu^{2+} 处理之前为正常的绿色, 但在逆境中生长 4、5 d 后就变黄, 并一直维持不变; 抗 Cu^{2+} 的 Merlin 的叶色在铜处理的 4、5 d 后, 也明显受到影响, 但随后会因不同时间的处理而有不同程度的恢复.

与同龄的 CK 相比, 处理组在 20 和 27 d 的 Merlin 和 S59 幼苗的叶绿素含量明显减少(图 3A、B), 特别是 S59 的苗, 它们的叶绿素含量不足对照苗的一半. 处理组中大多数 20 d 的苗, 再经过 1 wk 的培养后, 与 CK 一样, 叶绿素的绝对含量减少(图 3C), 只有少数组有所增加. 20 d 龄时叶绿素含量越高的苗, 再经 1 wk 培养后, 叶绿素的损失也越多(图 3A、C).

20 和 27 d 的 Merlin D6 苗, 在所有处理组中均有最高的叶绿素含量(图 3A、B), 各约为 CK 的 80%. 20d 的

Merlin D6 苗, 经一周培养后, 与 CK 相比, 叶绿素含量减少了 91%, 这在所有的 Cu^{2+} 处理的 Merlin 苗中是减少最多的, 与 CK 组的最接近(100%)(图 3C)。

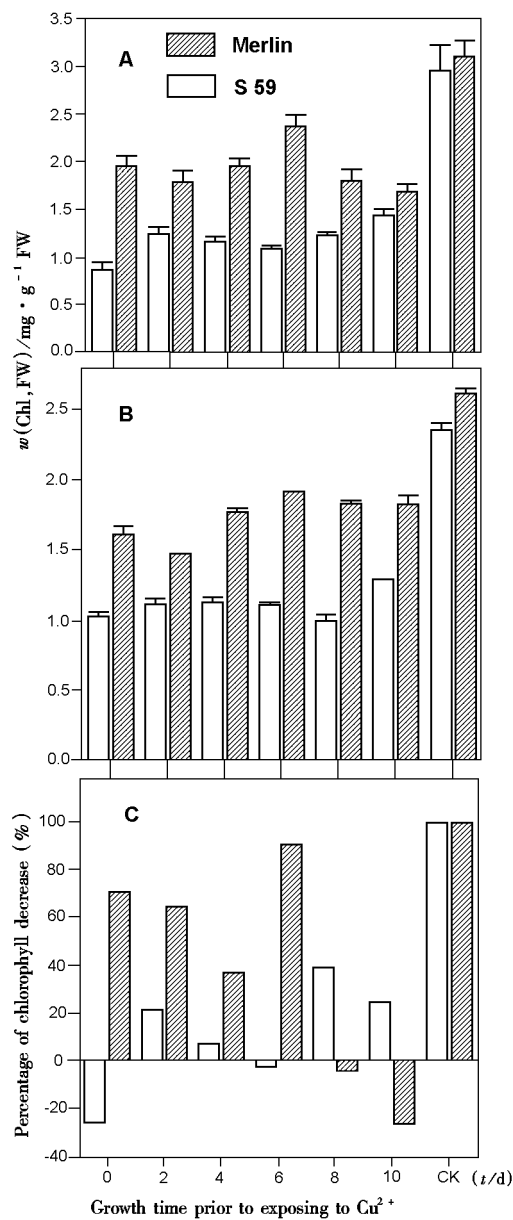


图 3 Cu^{2+} 处理后紫羊茅 Merlin 和 S59 的叶绿素含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.3 Variation of chlorophyll contents of *Festuca rubra* cv. Merlin and S59 seedlings by Cu^{2+} treatment

A: 20 d old
B: 27 d old
C: B - A

2.4 Cu^{2+} 处理的 Merlin 和 S59 苗的生长情况

在整个培养过程中, 除了肉眼能观察到叶的颜色

2.3 Merlin 和 S59 幼苗根中 Cu^{2+} 的积累

在 Cu^{2+} 敏感的 S59 不同苗龄组幼苗的根中, 积累的 Cu^{2+} 都明显高于抗 Cu^{2+} 品种 Merlin, 这对 27 d (图 4A) 和 20 d 的苗都是这样(数据未列出). 27 d 的 Merlin D6 幼苗所积累的 Cu^{2+} 最少, 虽然它在含 Cu^{2+} 培养基中培养时间不是最短. 而在 S59 不同苗龄组的幼苗中, 则没有这种现象, Cu^{2+} 的积累似乎随着在含 Cu^{2+} 培养基中培养时间的增加而增加, 只是 D0 的时间最长, D2 所积累的 Cu^{2+} 却是最高.

20 d 的苗继续培养 1 wk, S59 幼苗的根比 Merlin 的吸收更多的 Cu^{2+} ; 而 Merlin D6 苗的根在所有处理组中 CK 积累最少(图 4B). 虽然 D8、D10 比 D6 在含 Cu^{2+} 培养液中培养的时间更短, 但吸收的 Cu^{2+} 却更多.

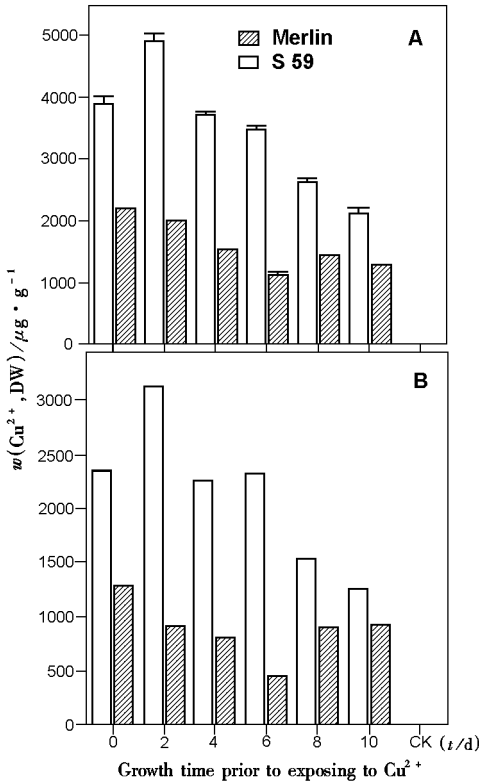


图 4 Cu^{2+} 处理的紫羊茅 Merlin 和 S59 根所积累的铜 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.4 Cu accumulation in roots of Cu^{2+} treated *Festuca rubra* cv. Merlin and S59

A: Roots of seedlings on 27 d

B: Cu accumulation in roots during the culture of last week (from d 20 to 27)

有不同程度的变化外, Cu^{2+} 处理也影响 Merlin 和 S59 苗的生长, 它们比对照苗长得矮许多. 在 Cu^{2+} 处理和非处理组中, S59 苗都比 Merlin 苗的高. 这可能是因为 ρ (Cu^{2+}) 太低 (5 mg/L), 压力不够, 而没能抑制敏感 S59, 显示出抗性 Merlin 的生长优势. 20d 的 Merlin 和 S59 苗的地上部分相对于各自 CK 组的高度如图 5, 可以看到 Merlin 苗的地上部分的相对长度都短于 S59 的. Merlin 中, D6 苗的地上部分最长, 并且是唯一一高长过相对应的 S59 的.

3 讨论

紫羊茅 Merlin 对锌、铅^[3]和铜、镉^[2]均具有较高的抗性. 在锌存在时, 植物络合素(PC)合成抑制剂对重金属抗性的品种 Merlin 和敏感的品种 S59 的根生长和根分生组织活性的影响, 以及锌诱导时这两个品种在细胞水平的变化均有报道^[4~6]. 本研究结果显示, 在幼苗发育的不同时期的铜处理, 导致 Merlin 和 S59 的 20 和 27 d 天幼苗的干物质产量和叶绿素含量都明显减少. 但是, 在抗铜的 Merlin 中, 这些指标的减少不象在 S59 中的那么严重, 在其根中也积累较少的铜, 而转移到地上部分的铜则更多, 这结果与以前的许多有关植物对重金属抗性的研究结果一致^[7~12]. Merlin 和 S59 幼苗的干物质产量的减少、根中铜积累的增加以及叶绿素含量的减少不是完全与植物在含铜培养基中的培养时间成正比, 似乎显示它们虽然受到铜处理的影响, 但不是由其在逆境中的培养时间决定的.

不仅 Merlin 和 S59 对铜处理有不同的反应, 即使在 Merlin 内, 在它们发育的不同时期用铜处理, 也会有不同的反应. 本文中最令人感兴趣的现象是: Merlin D6 的幼苗虽然在含铜培养液中培养时间不是最短的, 但它在 20 d 幼苗的根、27 d 幼苗的地上部分中均具有最大的干物质产量、20 和 27 d 幼苗中都有最大的叶绿素含量、在 27 d 的根中具有最低的铜的积累、是 Merlin 中生长得最高的一组. 这些 20 d 的幼苗, 在继续 1 wk 的培养期间, Merlin D6 幼苗的干物质含量在地上部分有最大的增加、在根中减少最多; 叶绿素含量在处理组中减少最多; 在根中铜积累的数量最小. 这些结果表明, Merlin D6 幼苗在 Merlin 的所有铜处理组中表现出最大的抗性, 因为铜处理会引起生物产量^[9]、叶绿素含量^[10]和生长量^[11]的降低. 这也就是说, 即使是抗铜的 Merlin, 在它不同的发育时期对铜也表现出不同的抗性能力. 而 D6 可能是其在发育过程中对铜较不敏感的苗龄.

在抗铜的 Merlin 中, 根中最低的铜积累与最大的干物质产量、最高的叶绿素含量和最长的苗生长紧密联系在一起, 使我们觉得排出和限制吸收^[13]的假说比其它任何假说都更为有效地解释植物对重金属的抗性. 抗铜的 Merlin 可能有较强的能力限制铜的吸收或者排出细胞中的铜, 以保持细胞中低含铜量和低的铜积累速率, 而在本研究中 Merlin D6 在所有的 Merlin 处理组中以最小的数量和最低的速率积累铜, 因而表现出最好的生长优势. 其实, 以前的许多研究结果也表明, 在敏感品种的植物根中比抗性品种的植物根中吸收了更多的重金属^[2,12], 这也说明, 抗性植物有能力使其根内积累较少的铜, 而非抗性植物则不能.

有人提出, 植物抗铜的最基本的机制可能在于细胞膜, 因为铜处理降低了细胞膜的强度, 导致 Cu^{2+} 由扩散而渗入^[14]; 在盐抗性植物根的质膜中, 存在一个 Na^+/H^+ 反向运输系统 (Na^+/H^+ antiport system), 已被广泛地应用于解释, 至少部分地解释抗盐植物中盐离子的排出^[15, 16], 这种反向运输系统或者在植物中起主动运输的质子泵 (proton pump)、 K^+ 通道 (channel) 或氨基酸载体 (amino acid carrier)^[17] 都可能将细胞内的铜运输至细胞外. 由此推想, 在抗铜的 Merlin 品种中, 沿着其发育过程可能存在一个对铜最不敏感的点 (如本研究中的 D6), 它的细胞膜强度最大, 最不容易受到铜的破坏, 细胞内的铜最快地被运输至细胞外, 其细胞的生理状态与对照组最接近, 因而在 Merlin 的所有处理组中, 其干物质含量、叶绿素浓度、铜的积累以及它们最后

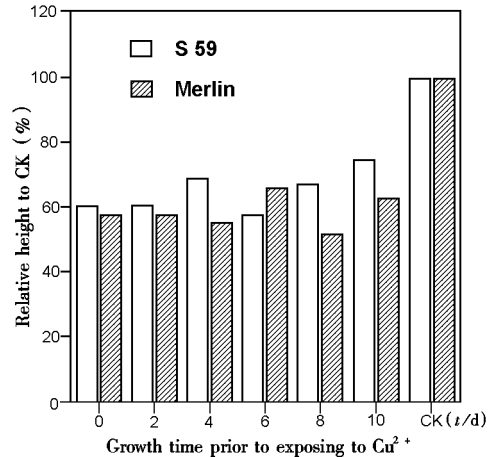


图 5 Cu^{2+} 处理后紫羊茅 Merlin 和 S59 在 20 d 时地上部分相对于对照的高度 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 Relative height of shoots of Cu^{2+} treated *Festuca rubra* cv. Merlin and S59 seedlings of 20 d to control

1 wk 培养后这些参数的变化都与对照组最为接近,显示其受到铜的影响最小,也可能是说这组的植物对铜的抗性最大。

参考文献

- 1 Steffens JC. Heavy metal-binding peptides of plants. *Annu Res Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1990,**41**:553 ~ 575
- 2 Wong YS, Lam EKH, Tam NFY. Physiological effects of copper treatment and its uptake pattern in *Festuca rubra* cv. Merlin. *Resourc, Conserv Recycl*. 1994,**11**:311 ~ 319
- 3 Smith RAH, Bradshaw AD. Stabilization of toxic mine wastes by the use of tolerant plant populations. *Trans Inst Miner Metal; Sect A*. 1972,**81**:230 ~ 237
- 4 Powell MJ, Davies MS, Francis D. Effects of zinc on cell nuclear and nucleolar size, and on RNA and protein content in the root meristem of a zinc-tolerant and nontolerant cultivar of *Festuca rubra* L. *New Phytol*. 1986,**104**:671 ~ 679
- 5 Davies KL, Davies MS, Francis D. The influence of an inhibitor of phytochelatin synthesis on root growth and root meristematic activity in *Festuca rubra* L. in response to zinc. *New Phytol*. 1991,**118**:565 ~ 570
- 6 Davies MS, Francis D, Thomas JD. Rapidity of cellular changes induced by zinc in a zinc tolerant and non-tolerant cultivar of *Festuca rubra* L. *New Phytol*. 1991,**117**:103 ~ 108
- 7 Lolkema PC, Donker MH, Schouten AJ *et al*. The possible role of metallothioneins in copper tolerance of *Silene cucubalus*. *Planta*. 1984,**162**:174 ~ 179
- 8 Lolkema PC, Vooijs R. Copper tolerance in *Silene cucubalus*. *Planta*. 1986,**167**:30 ~ 36
- 9 Ouzounidou G, Ciamporova M, Moustakas M *et al*. Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress I: Growth, mineral content and ultrastructure of roots. *Environ Exper Bot*. 1995,**35**:167 ~ 176
- 10 Ouzounidou G. Changes in variable chlorophyll fluorescence as a result of Cu-treatment: Dose-response relations in *Silene* and *Thlaspi*. *Photosynthetic*. 1993,**29**:455 ~ 462
- 11 Rai LC, Msllick N, Singh JB *et al*. Physiological and biochemical characteristics of a copper tolerant and a wild type strain of *Anabaena doliolum* under copper stress. *J Plant Physiol*. 1991,**138**: 68 ~ 74
- 12 Harmens H, Gusmao NGCPB, Den Hartog PR *et al*. Uptake and transport of zinc-sensitive and zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *J Plant Physiol*. 1993,**141**:309 ~ 315
- 13 Foster PL. Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. *Nature*. 1977,**269**:322 ~ 323
- 14 Strange J, Machaur MR. Evidence for a role for the cell membrane in copper tolerance *Mimulus guttatus* Fischer ex DC. *New Phytol*. 1991,**119**:383 ~ 388
- 15 Garbarino J, Du Pont FM. NaCl induces a Na^+/H^+ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiol*. 1988,**86**:231 ~ 236
- 16 Wilson C, Shannon MC. Salt-induced Na^+/H^+ antiport in root plasma membrane of a glycophytic and halophytic species of tomato. *Plant Science*. 1995,**107**:147 ~ 157
- 17 Sussman MR. Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1994,**45**:211 ~ 234