

微囊藻毒素对沉水植物苦草生长发育的影响

尹黎燕¹ 黄家权² 李敦海¹ 胡智泉¹ 刘永定¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 华中农业大学, 武汉 430070)

摘要: MG-RR 抑制大型沉水植物苦草 (*Vallisneria spiralis* (Lour.) Hara.) 的生长和发育。在 0.0001—10 mg/L 的浓度下, 苦草种子的发芽、子叶生长、真叶的形成和生长、不定根的形成和生长以及根毛的生长都受到了一定的抑制作用。当 MG-RR 浓度 ≥ 0.1 mg/L 时, 处理第 30 d, MG-RR 对苦草鲜重和第一片真叶的生长有极显著的抑制作用, 当 MG-RR 浓度为 10 mg/L 时, 根的生长和叶片的发生也受到了极显著的抑制作用。

关键词: 苦草; 微囊藻毒素; 生长和发育

中图分类号: X174 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2004)02-0147-04

中国湖泊富营养化和蓝藻水华污染十分严重^[1]。多种蓝藻可以产生有毒次生代谢物质如肽(肝毒素), 生物碱(神经毒素)和脂多糖(皮炎毒素)^[2]。产毒蓝藻主要有微囊藻、鱼腥藻、节球藻、束丝藻、念珠藻和颤藻等, 其中微囊藻在世界各国湖泊中普遍形成水华, 并产生微囊藻毒素。微囊藻毒素(MC)是结构为环状七肽的小分子肝毒素, 具有 60 多种变体, 以 MC-LR、MC-RR 和 MC-YR 为主。MC 进入生物体内对蛋白磷酸酶 1 和 2A 起抑制作用^[3,4]。大量的研究主要集中于微囊藻毒素对动物作用及其机理, 微囊藻毒素直接或间接进入动物体内破坏肝细胞, 引起肝肿大, 导致动物死亡^[5-8]。有关微囊藻毒素对植物影响的研究相对较少, 并且主要集中于陆生植物。MC 可以抑制植物幼苗的生长^[9-12]; 叶片的光合作用^[13]; 蛋白磷酸酶活性^[9]; 改变单链 DNA 酶活性和花色素苷含量^[12]。水生植物作为初级生产者, 在水生态系统中起着重要的作用, 它通过净化水体、抑制藻类生长等功能有效提高水体环境质量。但是近 20 年来, 湖泊中大型水生植物生物多样性下降, 很多水生植被退化非常严重, 在一些湖泊中甚至灭绝。MC 也可能在这个过程中起了重要作用。

有研究报道 MC 可以在水生植物中积累^[14-15], 但是有关 MC 对大型水生植物生长发育的影响未见报道。本文以大型沉水植物苦草为材料研究了

MG-RR 对苦草种子发芽, 叶片发生、生长, 根的生长和不定根形成及根毛生长的影响。

1 材料和方法

1.1 微囊藻毒素制备 取适量的滇池微囊藻水华干藻粉, 用 5% 的醋酸搅拌抽提 2h, 25 目浮游生物网过滤。滤渣加 5% 醋酸再抽提 2h, 合并滤液, 7000r/min 离心 15min。上清液过 Sep-Pak C18 柱, 甲醇洗脱液蒸干, 水溶解。经 HPLC 检测, 上述方法制备的 MG-RR 纯度为 76.8%。

1.2 苦草种子消毒及其培养 苦草种子由中国科学院武汉植物研究所水生植物生物学实验室提供。种子清洗与消毒顺序为: 自来水清洗种壳, 70% 酒精冲洗 30s, 2% NaClO 浸泡 8min, 用灭菌的蒸馏水洗 3—4 次。在 50mL 的三角瓶底层加入 10mL 含 0.8% 琼脂的 MS 培养基, 于 120℃湿热灭菌 20min 琼脂凝固前加入经抽滤灭菌的 MG-RR。待琼脂凝固后, 在上层加入 20mL 灭菌过的 MS 液体培养基。在液体培养基中加入经抽滤灭菌的 MG-RR, 使其终浓度达到预定要求, 然后在每瓶的固体培养基表面放入 40 粒经上述方法消毒过的苦草种子。每个处理浓度重复 3 次。培养条件为: 温度 25℃, 光暗周期 L:D=16:8, 光强 $40\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

1.3 生长与发育测定 于接种后第 10d 统计发芽

收稿日期: 2003-11-17; 修订日期: 2003-12-15

基金项目: 中国科学院重大项目(KZCX1-SW-12); 国家 973 项目(2002CB412300); 国家重大环境课题“滇池蓝藻水华污染控制技术研究”(K99-05-35-01); 中国科学院方向性创新课题(220316); 863 项目(2002AA601013)资助

作者简介: 尹黎燕(1976—), 女, 浙江嵊州人, 博士, 从事藻类生理生态方面的研究

通讯作者: 刘永定, E-mail: liuyd@ihb.ac.cn

率。第 10、20、30d 从每个瓶中取出 5 株幼苗,在倒置显微镜(Opton, Germany)下测量根长和叶长,记载根、叶个数,观察叶、根和根毛的生长。幼苗足够大时用直尺直接测量根和叶的长度。第 30d 时取出所有幼苗,称鲜重。

1.4 显微照相 用倒置显微镜(Opton, Germany)对苦草根毛和叶的发育情况进行照相。胶片为 200 啛的 Kodak 胶卷。

1.5 统计分析 用最小显著性分析方法对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 MC-RR 对苦草叶片生长和发育的影响

浓度为 0.0001—10mg/L 的 MC-RR 对苦草种子的发芽率均有一定的抑制作用,但是抑制作用不明显,且各浓度间无显著差异(图 1)。

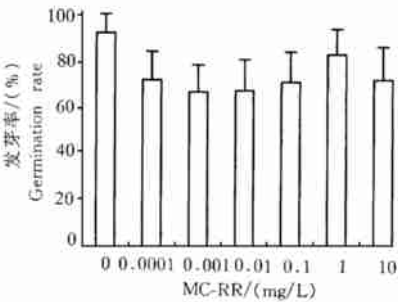


图 1 微囊藻毒素 MC-RR 对苦草种子发芽率的影响
Fig. 1 The effect of microcystin RR on the germination rate of seeds of *V. natans*

苦草子叶的生长(图 2)、真叶的产生(图 3)和叶片的生长(图 4)均不同程度的受到抑制。第 10d 时,当 MC-RR 浓度 ≥ 0.1 mg/L 时,子叶生长受到抑制(图 2),与对照相比,差异极显著,但第 30d 时,各处理与对照相比,差异均不显著。MC-RR 对苦草第一片真叶生长的抑制作用随 MC-RR 浓度的升高而加强,第 30d 时,当 MC-RR 浓度 ≥ 0.1 mg/L 时,抑

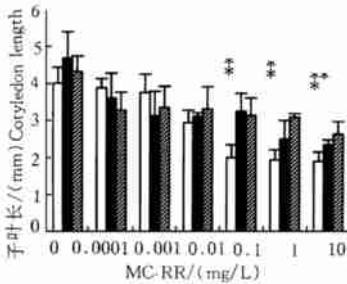


图 2 微囊藻毒素对苦草子叶长度的影响
Fig. 2 The effect of MC-RR on the length of cotyledon of *V. natans*

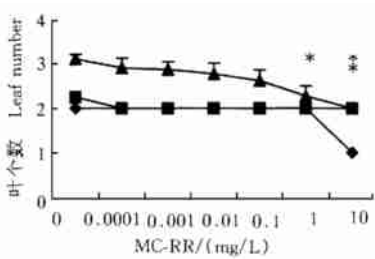


图 3 MC-RR 对苦草真叶个数的影响(片/株)
Fig. 3 The effect of microcystin RR on the number of leaves/individual of *V. natans*

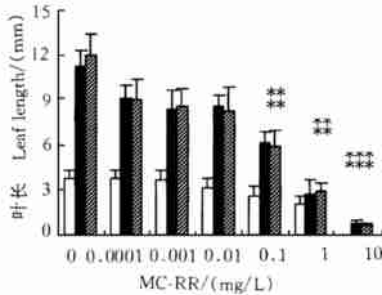


图 4 MC-RR 对苦草叶片生长的影响
Fig. 4 The effect of MG-RR on the length of leaves of *V. natans*

制作用极显著,10mg/L 的 MC-RR 处理下,第一片真叶几乎没有生长,呈萎缩坏死。MC-RR 抑制了苦草叶片的形成,随着 MC-RR 浓度的上升,叶片个数下降。第 10d 时,当 MC-RR 浓度达到 10mg/L 时,无真叶产生,第 20d 时,只有对照有第二片真叶产生。

2.2 MC-RR 对苦草根生长和发育的影响

MC-RR 对苦草不定根的形成和生长也有比较明显的抑制作用。10mg/L 的 MC-RR 对苦草不定根生长有极显著的抑制作用,其它处理与对照差异不显著(图 6)。但是 MC-RR 严重影响了不定根的形成,苦草不定根的数目随 MC-RR 浓度的升高而降低,20d 时只有对照有不定根产生,当 MC-RR 浓度高于 0.1mg/L 时,培养一个月未见不定根的形成(图 5)。

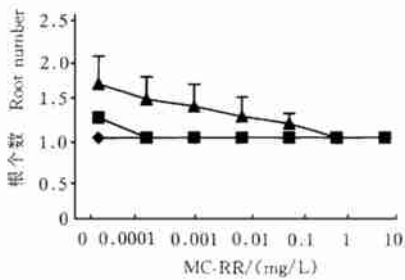


图 5 MC-RR 对苦草不定根数量的影响
Fig. 5 The effect of microcystin RR on the number of root of *V. natans*

MG-RR 抑制了苦草根毛的生长, 随着 MG-RR 浓度的加大, 抑制作用加强, 10mg/L 时, 根毛呈短缩状。

苦草鲜重随着 MG-RR 浓度的升高而降低, 0.01mg/L 的 MG-RR 对苦草鲜重有显著的抑制作用, 大于 0.01mg/L 的 MG-RR 对苦草鲜重有极显著的抑制作用(图 7)。

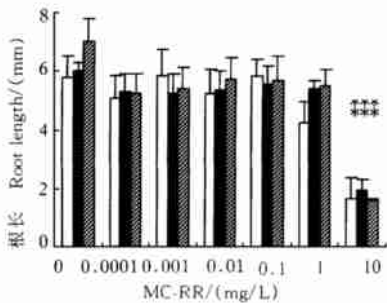


图 6 MG-RR 对苦草不定根长度的影响

Fig. 6 The effect of MG-RR on the length of adventitious roots of *V. natans*
□ 10d ■ 20d ▨ 30d

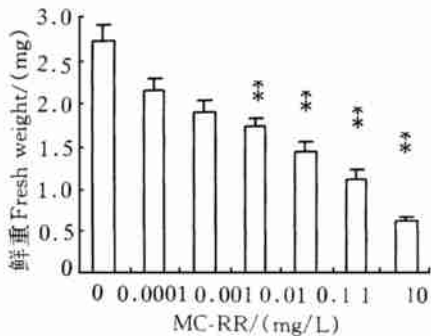


图 7 微囊藻毒素(MG-RR)对苦草鲜重的影响

Fig. 7 The effect of microcystin RR on the fresh weight of *V. natans*

3 讨论

研究结果表明, 微囊藻毒素 MG-RR 抑制了苦草的生长和发育, 这与前人研究的 MG-RR 对陆生植物的影响的结果是一致的^[9-13]。MC 是动物与植物中蛋白磷酸酶 1 (PP1) 和 2A (PP2A) 的抑制剂^[3]。蛋白磷酸化和去磷酸化在细胞信号转导中起了很重要的作用, 一旦蛋白磷酸酶受到了抑制, 细胞正常的分裂、分化和生长就受到干扰, 植物的生长和发育就受到抑制。本研究结果表明, MG-RR 抑制了苦草根毛的生长, 随着 MG-RR 浓度的提高, 抑制作用加强, 10mg/L 时, 根毛呈短缩状。这与 Smith^[17]的研究结果也是一致的, 他用两类结构不相关的蛋白磷酸酶 1 和 2A 的抑制剂 Okadaic acid 和 Calyculin A 对拟南芥的研究表明, PP1 和 PP2A 的抑制剂抑制了拟南芥

根和根毛的生长。有报道蛋白磷酸酶与生长素的转运有关^[18], 而根和根毛的生长正是由生长素调控的, 这与本实验的结果也是相符的。

MG-RR 0.0001—10mg/L 对苦草种子的发芽率有一定的抑制作用, 但是抑制作用不明显, 各浓度间无显著差异(图 1)。这可能是因为种子有种皮包裹着, MG-RR 进入较困难, 也有可能是种子本身对 MG-RR 就不是很敏感。MG-RR 抑制了苦草叶片和不定根的形成, 随着 MG-RR 浓度的上升, 叶片和不定根个数下降。第 10d 时, 当 MG-RR 浓度达到 10mg/L 时, 无真叶产生; 第 20d 时, 只有对照有第二片真叶和不定根产生; 当 MG-RR 浓度高于 0.1mg/L 时, 培养一个月未见不定根的形成。这可能是在 MG-RR 处理下, 苦草根和叶生长点细胞正常的分裂分化和生长受到影响, 以致于减缓了形成新的根和叶的速度, 甚至不能形成新生根叶。第 10d 时, 当 MG-RR 浓度 ≥ 0.1 mg/L 时, 子叶生长受到抑制, 与对照相比, 差异极显著, 但第 30d 时, 各处理与对照相比, 差异均不显著。这表明, MG-RR 并非完全抑制了子叶中细胞的生长和分裂, 只是减缓了细胞生长和分裂的速度。

作者以前的研究表明, 微囊藻毒素 MG-RR 可以被苦草吸收, MG-RR 主要分布于苦草的根中(未发表)。然而, MG-RR 对苦草叶生长的抑制作用要大于根, 0.1mg/L MG-RR 处理 30d 时, 叶生长的抑制作用就已经达到了极显著, 而根只有当 MG-RR 的浓度达到 10mg/L 时, 生长的抑制作用才达到极显著。这可能是由于根虽然吸收了较多的 MG-RR, 但它的代谢能力也强, GST, GPX 等解毒酶的活性高。

本实验是在无菌条件下进行的, 这就保证了苦草生长和发育的抑制作用是 MG-RR 产生的, 而不是其它原因。无菌条件还降低了 MC 被细菌降解的可能性。

以上结果表明, 微囊藻毒素 MG-RR 严重影响了苦草正常的生长和发育。近几十年来, 在富营养化和水华蓝藻成灾的高原湖泊滇池, 微囊藻毒素 MG-RR 的浓度常年可达到较高浓度, 水生植物退化非常严重, 尤其是苦草已经几乎灭绝, MC 可能也从中起了很重要的作用。

参考文献:

[1] LI X Y, Song L R, Liu Y D. The production, detection and toxicology of microcystins[J]. *Acta Hydrobiol. Sini.*, 1999, 23(5): 517—522. 李效宇, 宋立荣, 刘永定. 微囊藻毒素的产生、检测和毒理学研究[J]. *水生生物学报*, 1999, 23(5): 517—522

[2] Cannichael W W, Falconer I R. Algal toxins in seafood and drinking

- water[M]. London: Academic Press. 1993, 187—209
- [3] MacKintosh C, Beattie K A, Klumpp S, *et al.* Cyanobacterial microcystin LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants [J]. *FEBS Letters*, 1990, **264**: 187—192
- [4] Chen J P, Xu L H, Zhang Y Y. A study of inhibition of Microcystins on protein phosphatase in fish tissue homogenate [J]. *Acta Hydrobiol Sini*, 1998, **22**(1): 95—97 [陈加平, 徐立红, 张甬元. 微囊藻毒素对鱼组织匀浆液蛋白磷酸酶活性抑制作用的研究. 水生生物学报 1998, **22**(1): 95—97]
- [5] Zhou B S, Xu L H, Zhang Y Y, *et al.* The effect of microcystin LR on the liver ultrastructure of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Acta Hydrobiol Sini*, 1998, **22**(1): 90—92 [周炳升, 徐立红, 徐盈, 等. 微囊藻毒素 LR 对草鱼肝脏超微结构影响的研究[J]. 水生生物学报 1998, **22**(1): 90—92]
- [6] Li X Y, Liu Y D, Song L R *et al.* Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin LR [J]. *Toxicon*, 2003, **42**: 85—89
- [7] Yoshida T, Makita Y, Nagata S, *et al.* Acute oral toxicity of microcystin LR, a cyanobacterial hepatotoxin, in mice [J]. *Nat. Toxins*, 1997, **5**: 91—95
- [8] Malbrouck C, Trausch G, Devos P *et al.* Hepatic accumulation and effect of microcystin LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2003, Part. C: 1—10
- [9] Kurki Helaso K, Meriluoto J. Microcystin uptake inhibits growth and protein phosphatase activity in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings [J]. *Toxicon*, 1998, **36**: 1921—1926
- [10] Gehringer M M, Kewada V, Coates N *et al.* The use of *Lipidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR [J]. *Toxicon*, 2003, **41**: 871—876
- [11] McElhiney J, Lawton L A, Leifert C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure [J]. *Toxicon*, 2001, **39**: 1411—1420
- [12] Márta M, Csaba M, Erika M *et al.* Microcystin LR alters the growth, anthocyanin content and single stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings [J]. *Aquatic Toxicology* 2003. **62**: 1—9
- [13] Abe T, Lawson T, Weyers J B, *et al.* Microcystin LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice [J]. *New Phytol*, 1996, **133**: 651—658
- [14] Pflugmacher S, Wiegand C, Beattie K A *et al.* Uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by aquatic macrophytes [J]. *J. Appl. Bot*, 1998, **72**: 228—232
- [15] Pflugmacher S, Wiegand C, Beattie K A *et al.* Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud [J]. *Environ. Toxicol. Chem*, 2001, **20**: 846—852
- [16] Yamasaki S. Probable effects of algal bloom on the growth of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud [J]. *J. Plant Res*, 1993, **106**: 113—120
- [17] Smith R D, Wilson J E, Walker J C, *et al.* Protein phosphatase inhibitors block root hair growth and alter cortical cell shape of *Arabidopsis* roots [J]. *Planta*, 1994, **194**: 516—524
- [18] Garbers C, DeLong A, Derue-Are J, *et al.* A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in *Arabidopsis* [J]. *Embo J*, 1996, **15**: 2115—2124

THE EFFECT OF MICROCYSTIN ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF SUBMERGENT MACROPHYTE *VALLISNERIA NATANS* HARA.

YIN Li Yan¹, HUANG Jia Quan², LI Duan Hai¹, HU Zhi Quan¹ and LIU Yong Ding¹

(1. Institute of hydrobiology, The Chinese Academy of Science, Wuhan 430072; 2. Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070)

Abstract: It is well established that cyanobacteria are able to produce a range of toxic compounds, of which the microcystins are the most commonly known. In recent years, investigation into the toxicity of microcystins have mainly been centred on animals. Some data are available on toxicity to terrestrial plants. Little work has, however, been done on the effects of microcystins on aquatic plants. In recent years, aquatic macrophyte has reduced rapidly due to various reasons. We investigated the effect of MC-RR (from microcystins in Dianchi Lake) on the growth and development of a submergent macrophyte *Vallisneria natans*. Seeds are bacteria free cultured in MS medium with MC-RR. On day 10, 20 and 30, seedlings were taken photographs and seedling length measured. Results are as follows: *V. natans* are sensitive to microcystin RR. At the concentration of 0.0001—10 mg/L, seed germination rate, cotyledon length, leaf length, root length and root hairs declined in varying extent, and fresh mass of plants, the root and leaf formation were inhibited. Over the concentration of 0.01 mg/L, fresh mass of plants and leaf length was significantly reduced after 30d treatment. At the concentration of 10 mg/L, the root growth and leaf formation were also inhibited significantly and the root hairs disappeared, the new leaf turned yellow. It can be concluded that MC is harmful to the plant life of *Vallisneria natans*.

Key words: *Vallisneria natans* (Lour) Hara; Microcystin; Growth and Development