

# 菹草对 $Hg^{2+}$ 胁迫的生理和结构应答反应

计汪栋 施国新\* 张 慧 徐勤松 许 晔 杜开和

(南京师范大学生命科学学院 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室 南京 210097)

**摘要** 研究了不同处理浓度  $Hg^{2+}$  对菹草叶片矿质营养吸收、叶绿素含量、可溶性蛋白、丙二醛含量、脯氨酸含量、谷胱甘肽含量以及细胞超微结构的毒害影响。结果表明 随着  $Hg^{2+}$  浓度的增加,(1)菹草叶片叶绿素含量和可溶性蛋白含量逐渐下降,丙二醛含量和游离脯氨酸含量逐渐上升,谷胱甘肽含量则先升后降;(2) $Hg^{2+}$  对菹草的矿质营养吸收也产生了影响,主要是促进对  $Ca^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  的吸收,降低对大量元素 P、 $K^+$  的吸收;(3)SDS-PAGE 蛋白电泳图的条带随  $Hg^{2+}$  浓度增加而逐渐减少,亮度也随之减弱,并且在 5mg/L 和 7mg/L  $Hg^{2+}$  时导致了分子量为 83.6kDa 和 51.3kDa 多肽明显丢失;(4)电镜观察发现:随  $Hg^{2+}$  浓度的增加,对细胞超微结构的损伤程度也加剧,表现为被膜断裂、消失和叶绿体膨大、解体。 $Hg^{2+}$  破坏了菹草正常生理活动的结构基础和离子平衡,并造成功能紊乱。这些都是  $Hg^{2+}$  对菹草产生毒害的重要原因。 $Hg^{2+}$  对菹草的致死浓度范围应在 1~3mg/L。

**关键词** 菹草 超微结构  $Hg^{2+}$  胁迫

文章编号:1000-0933(2007)07-2856-08 中图分类号:Q945.78 文献标识码:A

## Physiological and ultrastructural responses of *Potamogeton crispus* to $Hg^{2+}$ stress

Ji Wang-Dong, Shi Guo-Xin\*, Zhang Hui, Xu Qin-Song, Xu Ye, Du Kai-He

College of Life Science, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Lab of Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210097, China

Acta Ecologica Sinica 2007, 27(7): 2856~2863.

**Abstract**: *Potamogeton crispus* plants exposed to 1, 3, 5, 7 mg/L  $Hg^{2+}$  for 7d were analyzed with reference to its toxic impact on mineral nutrition adsorption, total chlorophyll content, soluble protein, lipid peroxidation (MDA), proline, GSH and ultrastructure under lab conditions. The results revealed that, with the rise of  $Hg^{2+}$  concentration in culture medium, (1) the content of chlorophyll and soluble protein decreased gradually, while that of MDA and free proline increased and GSH content enhanced progressively up to 5 mg/L  $Hg^{2+}$  and followed by a decline at higher dose. (2) The addition of  $Hg^{2+}$  also affected the absorption of mineral nutrients; it mainly increased the absorption of  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ , but reduced that of P and  $K^+$ . (3) The amount and intensity of protein/peptide band decreased gradually with augment of  $Hg^{2+}$  concentration was observed in SDS-PAGE, respectively, and two polypeptides with apparent molecular weights 83.6kDa and 51.3kDa disappeared significantly in fronds treated with 5 and 7 mg/L  $Hg^{2+}$ . (4) Transmission electron microscope observation indicated that  $Hg^{2+}$  imposed injury action on ultrastructure of leaf cells, such as swelling of chloroplast, breakage and disappearance of chloroplast envelope and disaggregation in the end. The conclusion could be

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370083, 30670121);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20050319005);江苏省教育厅自然科学基金资助项目(05KJB180067)

收稿日期:2006-09-22;修订日期:2007-05-24

作者简介:计汪栋(1980~),男,江西景德镇人,硕士生,主要从事重金属对高等水生植物的毒害机制研究。E-mail:jiwangdong@tom.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail:gxshi@njnu.edu.cn

**Foundation item**:The project was financially supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30370083, 30670121);Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20050319005);Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. 05KJB180067)

**Received date** 2006-09-22; **Accepted date** 2007-05-24

**Biography** Ji Wang-Dong, Master candidate, mainly engaged in the phytotoxicity of heavy metal to higher aquatic plants. E-mail:jiwangdong@tom.com

reached that the death of plant was resulted from destruction of structure foundation of physiological function , unbalance of ion equilibrium and disorder of physiological metabolism. The lethal concentration scope of  $Hg^{2+}$  to *Potamogeton crispus* was 1 ~ 3 mg/L based on the experiment results.

**Key Words :** *Potamogeton crispus* ; Ultrastructure ;  $Hg^{2+}$  ; Stress

工业废水和生活垃圾被普遍认为是水环境重金属污染的主要来源。 $Hg^{2+}$  是大量工农业生产中主要的副产物之一 , 它毒性高 ( 重金属毒性系数 :  $Hg^{2+} = Cd^{2+} = 40$  ,  $Cu^{2+} = 5$  )<sup>[1]</sup>。不但影响水生植物的产量和质量 , 更严重的是能通过食物链的生物放大作用最终影响人畜健康。因此 , 水体重金属污染及由此造成的对水生植物的毒害已成为各国学者的研究热点之一<sup>[2~11]</sup>。而根生沉水植物-菹草 , 由于其生长快速 , 生物量大 , 分布面广 , 能积累大量的  $Fe^{3+}$  ,  $Pb^{2+}$  ,  $Ni^{2+}$  ,  $Mn^{2+}$  和  $Cu^{2+}$ <sup>[7]</sup> , 对水体重金属污染的植物修复有重要意义。Ali 等人<sup>[2]</sup>的研究还证明它具有一定的  $Hg^{2+}$  耐受性 , 对  $Hg^{2+}$  污染水体有很强的净化作用 ; 同时也不可避免的诱导产生了明显的氧化胁迫。但没有涉及对细胞结构和蛋白质等的影响 , 鉴于此 , 本文进一步研究了不同浓度  $Hg^{2+}$  对矿质营养元素吸收、光合色素、可溶性蛋白、丙二醛含量、游离脯氨酸含量和谷胱甘肽含量等变化 , 并用透射电镜观察了细胞超微结构的损伤 , 旨在从不同角度全面揭示  $Hg^{2+}$  对水生植物的毒害机理 , 为筛选灵敏的水环境监测植物和指标提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

菹草 [*Potamogeton crispus*] 眼子菜科多年生高等沉水草本植物 , 喜低温 , 根状茎细长 , 多分枝 , 侧枝短 , 叶呈披针形。采自江苏太湖水域 , 后将其移植于南京师范大学水生植物培养池中。于 2006 年 4 月中旬 (18 ~ 25℃) 在无底泥玻璃缸中用 10% Hoagland 营养液进行驯化培养。选取生长状况一致的植株作为实验材料。

### 1.2 试验设计

实验材料于上午 8:00 放入含 0 , 1 , 3 , 5mg/L 和 7mg/L  $HgCl_2$  (以纯  $Hg^{2+}$  计) 的 10% Hoagland 营养液中 , 后将全部玻璃缸放入 Forma 3744 全封闭培养箱 (英国产) 光照周期为 12h:12h (L:D) , 光照强度为 3500lx , 光暗温度为 25℃:18℃ (L:D) 内培养。实验设 3 次重复 , 培养第 7 天取相同部位叶片 , 去离子水洗净<sup>[12]</sup> , 擦干 , 进行生理指标的测定。同时取材进行电镜观察。

### 1.3 生理生化指标测定方法

菹草体内营养元素含量用电感耦合等离子体原子发射光谱仪 (ICP-AES) (美国 Leeman 公司产) 测定。叶绿素含量按照 Arnon<sup>[3]</sup> 的方法测定。可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法<sup>[4]</sup> 测定 , 以牛血清蛋白为标准蛋白。SDS-PAGE 蛋白电泳采用郭尧君<sup>[5]</sup> 的方法。丙二醛含量参照 Health 和 Packer 的硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法<sup>[6]</sup>。游离脯氨酸含量采用以酸性茚三酮显色法测定<sup>[7]</sup>。GSH 含量用一般分光光度法 , 用从南京建成生物工程研究所购买的 GSH 试剂盒测定。

### 1.4 超微结构观察

处理第 7 天于 8:00 从各浓度梯度培养缸中取植株相同部位的叶片 , 洗净 , 切成 1mm<sup>3</sup> 大小的样块 , 置于 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定 , 丙酮系列脱水 , Epon812 浸透包埋 , LKB 超薄切片机钻石刀切片 , 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 (日本) 下观察并拍照。

### 1.5 统计分析

每个处理重复 3 次 , 实验结果为 3 次实验的平均值 ± 标准差。将各生理指标与处理浓度作相关性分析 (相关系数为  $R$ ) , 试验原始数据的处理和制图采用 Excel 软件 , 处理组与对照组之间的差异显著性分析由 SPSS11.5 统计软件完成 , 其中  $p \geq 0.05$  ,  $p < 0.05$  和  $p < 0.01$  分别表示无显著、有显著和极显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 Hg<sup>2+</sup>对菹草营养元素吸收的影响

不同矿质元素受 Hg<sup>2+</sup> 的影响不同,由表 1 可见,可分成 2 类不同情形:(1)促进菹草对 Ca<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 的吸收。其中 Ca<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 与处理浓度达到极显著正相关 [ $R(\text{Ca}^{2+})=0.9676$ ,  $R(\text{Mg}^{2+})=0.9358$ ,  $p < 0.01$ ], Fe<sup>3+</sup> 为显著正相关 [ $R(\text{Fe}^{3+})=0.9186$ ,  $p < 0.05$ ], Zn<sup>2+</sup> 没有达到显著程度。(2)显著抑制对 Mn<sup>2+</sup>、Mo<sup>3+</sup>、B、P、K<sup>+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup> 的吸收。其中 B、Mo<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 一直呈下降趋势。统计分析表明均达到极显著负相关 [ $R(\text{B})=-0.9829$ ,  $R(\text{Mo}^{3+})=-0.9543$ ,  $R(\text{Cu}^{2+})=-0.9882$ ,  $R(\text{Mn}^{2+})=-0.9236$ ,  $p < 0.01$ ], P、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 与处理浓度显著负相关 [ $R(\text{P})=-0.9076$ ,  $R(\text{Na}^+)=-0.7857$ ,  $R(\text{K}^+)=-0.7142$ ,  $p < 0.05$ ].

表 1 Hg<sup>2+</sup> 处理下菹草体内营养元素的含量 (n=3)

Table 1 Nutrient contents in *P. crispus* treated with Hg<sup>2+</sup> (n=3)

营养元素 Nutrient (μg/g)	Hg <sup>2+</sup> 浓度 concentration (mg/L)				
	0	1	3	5	7
1 Ca <sup>2+</sup>	0.241 ± 0.02	0.263 ± 0.02	0.298 ± 0.02	0.329 ± 0.04	0.336 ± 0.02**
Zn <sup>2+</sup>	42.6 ± 0.04	45.7 ± 0.04	48.8 ± 0.08	37.7 ± 0.06	49.2 ± 0.09
Fe <sup>3+</sup>	51.9 ± 0.04	56.6 ± 0.05	58.9 ± 0.03	74.6 ± 0.02	85.4 ± 0.05*
2 Mg <sup>2+</sup>	284.0 ± 0.04	295.0 ± 0.02	302.0 ± 0.03	329.0 ± 0.01	331 ± 0.01**
Mn <sup>2+</sup>	16.1 ± 0.03	15.7 ± 0.05	17.8 ± 0.03	12.45 ± 0.02	10.4 ± 0.00**
Mo <sup>3+</sup>	0.647 ± 0.02	0.546 ± 0.02	0.314 ± 0.02	0.335 ± 0.02	0.164 ± 0.04**
B (μg/g)	2.57 ± 0.02	1.98 ± 0.03	1.64 ± 0.02	1.32 ± 0.02	0.968 ± 0.04**
P (μg/g)	711 ± 0.01	512 ± 0.06	324 ± 0.07	299 ± 0.03	303 ± 0.02*
K <sup>+</sup>	4071 ± 0.04	1076 ± 0.08	497 ± 0.05	140 ± 0.01	83.5 ± 0.01*
Cu <sup>2+</sup>	2.24 ± 0.03	2.03 ± 0.03	1.65 ± 0.06	1.06 ± 0.04	1.21 ± 0.02**
Na <sup>+</sup>	1315 ± 0.05	537 ± 0.03	163 ± 0.01	61.7 ± 0.01	54.7 ± 0.03*

\* , \*\* 表示 Hg<sup>2+</sup> 浓度与各指标显著(极显著)相关 \* and \*\* indicate correlation between Hg<sup>2+</sup> concentration and other indexes significant at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively

### 2.2 Hg<sup>2+</sup>对叶绿素含量的影响

由图 1 可见,菹草叶绿素含量随着 Hg<sup>2+</sup> 处理浓度的升高而逐渐下降。当 Hg<sup>2+</sup> 浓度为 1mg/L 时,叶绿素含量比对照下降了 41.97%。而 7mg/L 处理浓度的 Hg<sup>2+</sup> 则使叶绿素含量比对照减少了 63.47%。统计分析表明,叶绿素含量与 Hg<sup>2+</sup> 浓度间达到显著负相关 [ $R = -0.7896$ ,  $p < 0.05$ ]. 与总叶绿素含量变化趋势一致,叶绿素 a/b 比值也随着 Hg<sup>2+</sup> 处理浓度增大而明显降低(图 2),达到极显著负相关 [ $R = -0.973$ ,  $p < 0.01$ ].

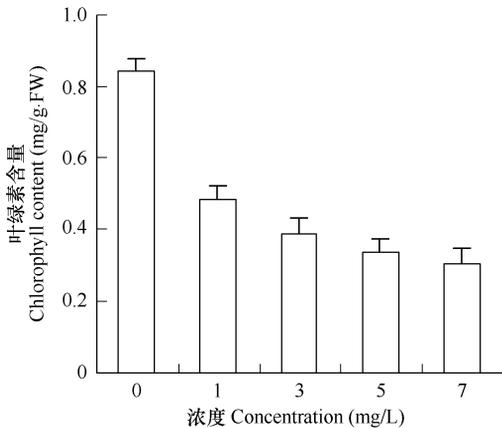


图 1 Hg<sup>2+</sup>对菹草叶绿素含量的影响

Fig. 1 Effects of Hg<sup>2+</sup> on chlorophyll content in *P. crispus*

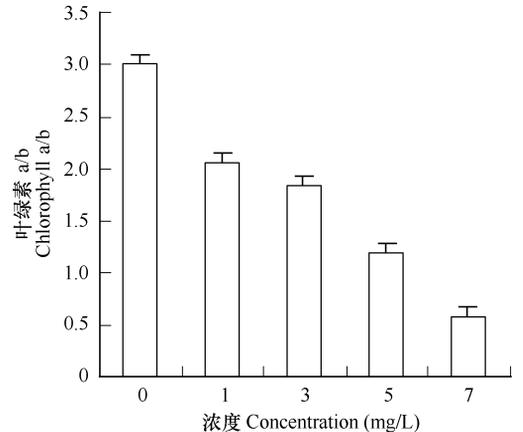


图 2 Hg<sup>2+</sup>对菹草叶绿素 a/b 的影响

Fig. 2 Effects of Hg<sup>2+</sup> on chlorophyll a/b in *P. crispus*

### 2.3 $Hg^{2+}$ 对叶绿体超微结构的影响

叶绿体是植物细胞中大而明显的细胞器。正常叶绿体为规则的长椭圆形, 基质浓密, 被膜清晰, 基粒类囊体片层堆叠规则并和基质片层连成整体, 与叶绿体的长轴平行, 显示其正常的结构状态, 通常还包含着一些淀粉粒 (图 3 e)。  $Hg^{2+}$  处理后, 随处理浓度的增大叶绿体损伤越明显。  $1\text{mg/L } Hg^{2+}$  处理的叶绿体膨胀, 类囊体排列紊乱 (图 3 f)。  $5\text{mg/L } Hg^{2+}$  浓度处理后类囊体片层有溶解现象, 叶绿体膜多处断裂 (图 3 g), 这意味着随  $Hg^{2+}$  处理浓度的增大对叶绿体的损伤程度加剧。最高  $7\text{mg/L } Hg^{2+}$  浓度处理后, 被膜彻底破裂, 内含物分散到细胞质中 (图 3 h)。

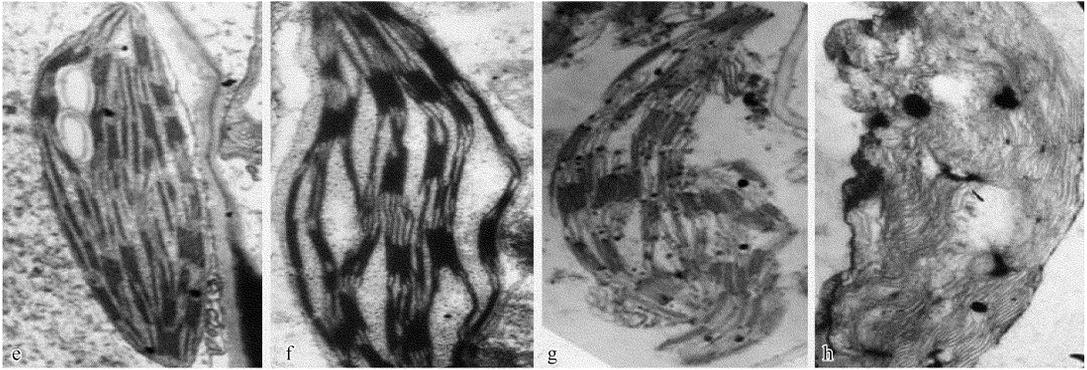


图 3  $Hg^{2+}$  对叶绿体超微结构的影响

Fig. 3 Effects of  $Hg^{2+}$  on ultrastructure of chloroplast

e. 对照叶细胞的超微结构, 示叶绿体  $\times 15\ 000$  f.  $1\text{mg/L } Hg^{2+}$  处理的叶细胞, 示膨胀的叶绿体  $\times 15\ 000$  g.  $5\text{mg/L } Hg^{2+}$  处理的叶细胞, 示叶绿体被膜破裂  $\times 15\ 000$  h.  $7\text{mg/L } Hg^{2+}$  处理的叶细胞, 示解体叶绿体  $\times 17\ 000$  e. Ultrastructure of control leaf cell, showing chloroplast  $\times 15\ 000$  f. Leaf cells treated with  $1\text{mg/L } Hg^{2+}$ , showing round chloroplast  $\times 15\ 000$  g. Leaf cells treated with  $5\text{mg/L } Hg^{2+}$ , showing rupture of chloroplast envelope  $\times 15\ 000$  h. Leaf cells treated with  $7\text{mg/L } Hg^{2+}$ , showing disaggregation of chloroplast  $\times 17\ 000$

### 2.4 $Hg^{2+}$ 对可溶性蛋白的影响

随着处理浓度的增高, 与叶绿素含量变化趋势相同, 菹草叶片可溶性蛋白含量亦呈下降趋势 (图 4)。其中  $Hg^{2+}$  处理浓度  $\leq 3\text{mg/L}$  时, 可溶性蛋白含量略有下降, 在处理浓度为  $3\text{mg/L}$  时, 可溶性蛋白含量比对照下降了  $14.63\%$ 。  $Hg^{2+}$  处理浓度  $\geq 5\text{mg/L}$  时, 植株中的可溶性蛋白含量显著下降,  $Hg^{2+}$  浓度达到  $7\text{mg/L}$  时, 可溶性蛋白含量达到最低, 比对照下降了  $51.55\%$ 。统计分析表明, 可溶性蛋白质含量与  $Hg^{2+}$  浓度间达到极显著负相关 [ $R = -0.9336$   $p < 0.01$ ]。从 SDS-PAGE 蛋白电泳图 (图 5) 也可以看出, 在低浓度  $Hg^{2+}$  ( $\leq 3\text{mg/L}$ ) 处

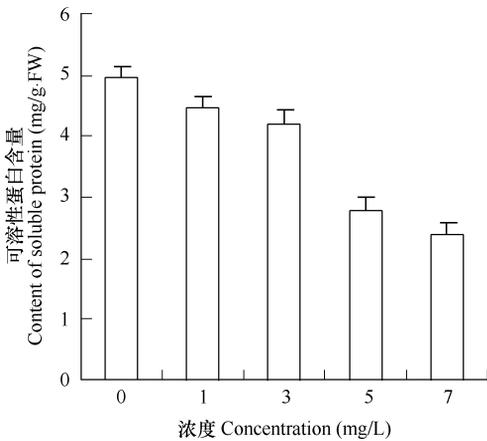


图 4  $Hg^{2+}$  对菹草叶片可溶性蛋白含量的影响

Fig. 4 Effects of  $Hg^{2+}$  on soluble protein content in *P. crispus*

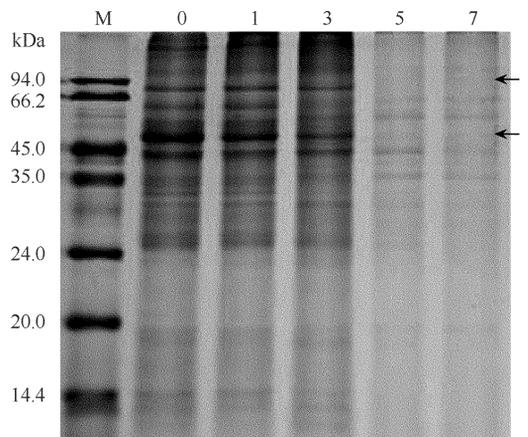


图 5 菹草可溶性蛋白电泳图

Fig. 5 Electrophoretogram of soluble protein in *P. crispus*

理后蛋白条带和亮度均与正常情况差异不明显,在  $\text{Hg}^{2+}$  浓度达到  $5\text{mg/L}$  和  $7\text{mg/L}$  后,除了蛋白条带亮度明显减弱外,还导致了分子量为  $83.6\text{kDa}$  和  $51.3\text{kDa}$  多肽的明显丢失。

## 2.5 $\text{Hg}^{2+}$ 对丙二醛 (MDA) 含量的影响

如图 6 所示,随着  $\text{Hg}^{2+}$  处理浓度的增高,膜脂过氧化产物 MDA 含量急剧上升。在  $\text{Hg}^{2+}$  浓度为  $1\text{mg/L}$  处理时,MDA 含量比对照上升了  $0.98$  倍。增至  $7\text{mg/L}$  时,苜蓿叶片的 MDA 含量达到最高峰,比对照上升了  $2.05$  倍。统计分析结果显示,MDA 含量与  $\text{Hg}^{2+}$  浓度达到显著正相关 [ $R=0.9316$   $p<0.01$ ]。

## 2.6 $\text{Hg}^{2+}$ 对游离脯氨酸 (Pro) 含量的影响

作为小分子重要的渗透调节物质,  $\text{Hg}^{2+}$  处理后苜蓿叶片中游离脯氨酸积累极明显 (图 7)。其中当  $\text{Hg}^{2+}$  处理浓度为  $3\text{mg/L}$  时,Pro 含量比对照增加了  $56.06\%$ 。而当  $\text{Hg}^{2+}$  处理浓度达到  $7\text{mg/L}$  时,Pro 含量达到最高峰,比对照上升了  $188.12\%$ 。统计分析结果表明,Pro 积累与  $\text{Hg}^{2+}$  浓度达到极显著正相关 [ $R=0.9448$   $p<0.01$ ]。

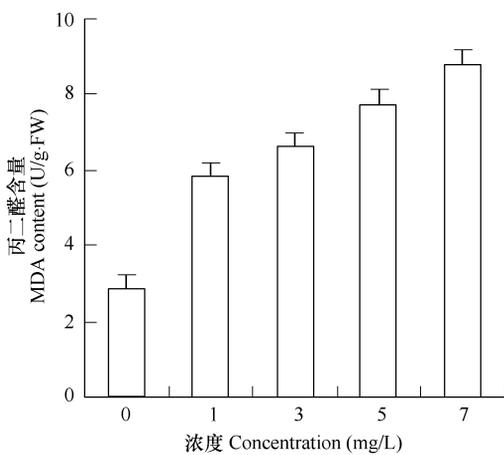


图 6  $\text{Hg}^{2+}$  对苜蓿丙二醛含量的影响

Fig. 6 Effect of  $\text{Hg}^{2+}$  on MDA content in *P. crispus*

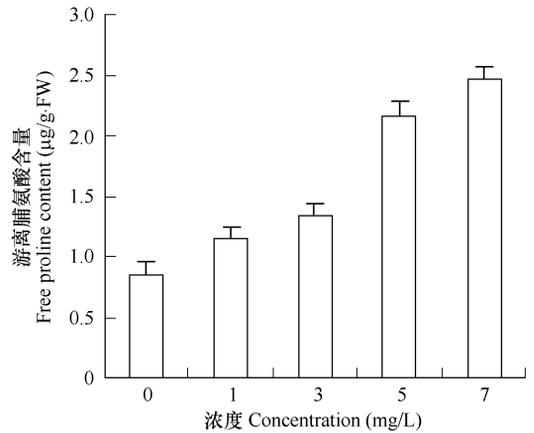


图 7  $\text{Hg}^{2+}$  对苜蓿游离脯氨酸含量的影响

Fig. 7 Effect of  $\text{Hg}^{2+}$  on free proline content in *P. crispus*

## 2.7 $\text{Hg}^{2+}$ 对谷胱甘肽 (GSH) 含量的影响

作为小分子保护物质之一的 GSH 含量随着  $\text{Hg}^{2+}$  处理浓度的增加先升后降,但含量都高于对照,存在激发、增长和消耗的过程 (图 8)。  $\text{Hg}^{2+}$  处理浓度  $\leq 3\text{mg/L}$  时, GSH 含量迅速上升,并在  $3\text{mg/L}$  时达到最大值,比正常值增加了  $162.22\%$ 。此后 GSH 含量缓慢下降,在  $7\text{mg/L}$  浓度时,仍比对照高  $42.22\%$ 。

## 3 讨论

重金属毒害植物的一个重要特征就是引起叶绿素减少、蛋白质含量降低,从而使植物失绿,产生毒害现象<sup>[9]</sup>。叶绿素作为植物光合作用的主要色素,其含量的高低与植物光合作用水平的强弱密切相关。本实验中发现,  $\text{Hg}^{2+}$  处理后苜蓿叶褪绿现象极明显,叶片出现黑褐色斑点,这与其叶绿素变化相一致。电镜观察也发现在  $1\text{mg/L}$   $\text{Hg}^{2+}$  处理时已表现出明显下降趋势,  $7\text{mg/L}$

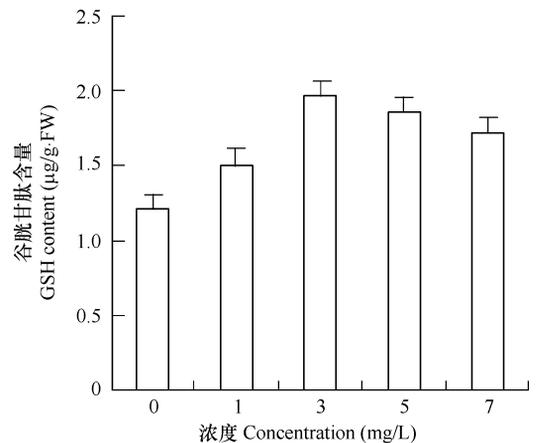


图 8  $\text{Hg}^{2+}$  对苜蓿谷胱甘肽含量的影响

Fig. 8 Effect of  $\text{Hg}^{2+}$  on GSH content in *P. crispus*

$\text{L}$   $\text{Hg}^{2+}$  对叶绿体破坏更加显著。Stobart A K<sup>[9]</sup> 等认为,叶绿素含量降低的原因:一是重金属抑制原叶绿素酸

酯还原酶;二是影响了氨基- $\alpha$ -酮戊酸的合成。施国新<sup>[18]</sup>认为这两种叶绿素生物合成的必需物质主要是影响了新叶绿素的产生,而在成熟叶中叶绿素含量的降低更主要是因重金属毒害破坏细胞内膜结构引起。徐勤松<sup>[19]</sup>研究认为重金属对叶绿体超微结构的损伤是引起叶绿素含量降低的结构原因。本实验结果也证明, $Hg^{2+}$  胁迫对叶绿体超微结构产生明显的破坏作用。如叶绿体膨胀,类囊体片层肿胀,双层膜破裂、叶绿体解体等。由此反映出重金属  $Hg^{2+}$  对菹草叶片内的主要光合色素和光合作用细胞器都造成严重的破坏作用,因此最终必将影响到植物光合作用的有效进行。

重金属毒害植物的另一重要原因在于其影响了植物对矿质元素的正常吸收<sup>[20]</sup>。当把菹草培养在不同  $Hg^{2+}$  浓度的培养液中后,极大的破坏了正常菹草叶细胞的离子平衡:一方面是明显促进了对  $Ca^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  的吸收,其中  $Hg^{2+}$  促进菹草对  $Fe^{3+}$  的吸收是由于它与 EDTA 络合的稳定性显著高于  $Fe^{3+}$ ,从而使培养液中的 EDTA- $Fe^{3+}$  盐中的  $Fe^{3+}$  更易于被吸收造成的<sup>[21]</sup>,而菹草体内这些元素含量的增加也可能对植物产生一定的不良影响,如  $Fe^{3+}$ 、 $Zn^{2+}$  等本身就是重金属元素。另一方面是显著抑制了对大量元素 P、 $K^+$ 、 $Na^+$  的吸收,这可能由于  $Hg^{2+}$  抑制了呼吸作用,导致能量减少,从而不能满足主动吸收时所需的能量造成的。

作为植物对重金属毒害的一种应答反应,前人研究表明重金属毒害后,植物体可以通过诱导合成植物络合素<sup>[22]</sup>、金属硫蛋白<sup>[23]</sup>和胁迫蛋白<sup>[24]</sup>来螯合进入体内的重金属或在损伤蛋白的修复和保护中起作用。但研究却发现,各  $Hg^{2+}$  处理浓度都使菹草叶片内的可溶性蛋白含量不断下降。周长芳等<sup>[25]</sup>的研究认为,这可能是由于其与-SH 基结合导致蛋白变性而降解,也可能是蛋白质合成酶的失活或 DNA 转录翻译途径受阻,影响了蛋白质的合成。从 SDS-PAGE 蛋白电泳(图 5)结果也证明,低浓度  $Hg^{2+}$  ( $\leq 3 mg/L$ )处理的蛋白条带和亮度均与正常情况差异不明显,而当  $Hg^{2+}$  浓度达到  $5 mg/L$  和  $7 mg/L$  后,除了蛋白条带亮度明显减弱外,还导致了分子量为  $83.6 kDa$  和  $51.3 kDa$  蛋白的明显丢失。这说明重金属  $Hg^{2+}$  胁迫不仅抑制了菹草体内新蛋白的产生,还加强了原有蛋白质的降解。这也是菹草对  $Hg^{2+}$  毒害非常敏感的一个重要原因。

MDA 是膜脂氧化的主要产物之一,其在生物体内的含量可用以表明生物体所受的氧化压力,间接反映细胞损伤的程度<sup>[26]</sup>。本文研究发现菹草中 MDA 含量随  $Hg^{2+}$  浓度增大一直呈上升趋势,说明菹草叶片的膜系统遭受到越来越严重的损伤,这可能是由于  $Hg^{2+}$  和膜蛋白中的-SH 直接结合以及氧化膜的不饱和脂肪酸引起膜结构的破坏。也与其明显抑制叶细胞内的 SOD、POD、CAT 等保护系统,使对活性氧的清除能力减弱有关,从而造成膜透性增大和选择性的丧失,这也是  $Hg^{2+}$  破坏菹草叶细胞离子平衡的重要原因。本实验电镜观察结果也从细胞学角度提供了佐证,随培养液中  $Hg^{2+}$  浓度的增加,细胞膜系统的破坏程度也越严重,例如叶绿体和细胞核的被膜以及类囊体膜等都出现断裂等。Pro 作为重要的渗透调节物质,它的积累可能一方面是细胞结构和功能遭受伤害时机体做出的反应,另一方面也是植物在逆境下的适应性表现,系一种防护效应<sup>[27]</sup>。菹草在受到  $Hg^{2+}$  处理后 Pro 含量上升,与清除体内因胁迫而产生的大量活性氧作用有关,可以作为鉴定植物相对抗性的指标。GSH 是抗氧化系统中重要的非酶系统,也是植物体内还原型硫长距离运输的主要形式。GSH 通过抗坏血酸的转换发挥作用,去除细胞中由于环境压力诱导的自由基  $OH^{\cdot}$ ,将  $H_2O_2$  还原成水和 -OH 基团,自身则转化为氧化型谷胱甘肽(GSSH)<sup>[28]</sup>。作为一种小分子保护物质,本试验表明,GSH 含量随着  $Hg^{2+}$  处理浓度的增加先升后降,但含量都高于正常值。由于无论从生理学还是细胞学的角度菹草叶细胞都受到了明显的破坏作用,因此作者认为单独 Pro 和 GSH 的保护作用都是有限的。

本文研究结果证明重金属  $Hg^{2+}$  对菹草的毒害是对光合作用、矿质营养等生理生化反应和内膜系统的整体伤害,破坏了植物进行正常生理代谢所必需的生理和结构基础,最终导致植物的死亡。鉴于游离脯氨酸含量和 MDA 含量变化明显,本文作者建议将其作为沉水植物受重金属污染的生态毒理学指标,用于监测和评价环境污染物对水生植物的影响。 $Hg^{2+}$  对菹草的致死浓度范围在  $1 \sim 3 mg/L$ 。

## References :

- [1] He M C. Bioavailability of heavy metals in aquatic environment and sediment quality assessment approaches. *Adv. Environ. Sci.*, 1998, 6(5): 9-

- 19.
- [2] Ali M B ,Vajpayee P ,Tripathi R D , *et al.* Mercury Bioaccumulation Induces Oxidative Stress and Toxicity to Submerged Macrophyte *Potamogeton crispus* L. . Bull Environ. Contam. Toxicol. 2000 65 573 – 582.
- [3] Gupta M ,Chandra P. Bioaccumulation and toxicity of mercury in root-submerged macrophyte *Vallisneria spiralis*. Environ. Pollution ,1998 ,103 327 – 332.
- [4] Gupta M ,Chandra P. Bioaccumulation and physiological changes in *Hydrilla verticillata* (L. f. )Royle in response to mercury. Bull. Environ. Contam. Toxicol. ,56 :319 – 326 .
- [5] Gupta M ,Tripathi R D ,Rai U N , *et al.* Role of Glutathione and Phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L. f. )Royle and *Vallisneria spiralis* L. under Mercury Stress. Chemosphere ,1998 37 (4 ) 785 – 800.
- [6] Ren D D ,Peng G H ,Huang H X , *et al.* Effect of rhodoxanthin from *Potamogeton crispus* L. on cell apoptosis in Hela cells. Toxicol. Vitro. 2006 , 20 :1411 – 1418.
- [7] Ali M B ,Tripathi R D ,Rai U N , *et al.* Physico-chemical characteristics and pollution level of lake Nainital (U. P. India ) :Role of macrophytes and phytoplankton in biomonitoring and phytoremediation of toxic metal ions. Chemosphere ,1999 ,39 2171 – 2182.
- [8] Shi G X ,Xu Q S ,Xie K B , *et al.* Physiology and ultrastructure of *Azolla imbricate* as affect by  $Hg^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  toxicity. Acta Botanica Sinica 2003 , 45 (4 ) #37 – 444.
- [9] Stobart A K ,Griffiths W T ,Ameen-Bukhari. The effects of  $Cd^{2+}$  on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Plant Physiol. ,1985 63 293 – 298.
- [10] Qin G Q ,Yan C L ,Wei L L. Effect of cadmium stress on the contents of tannin ,soluble sugar and proline in *Kandelia candel* (L. ) Druce seedlings. Acta Ecologica Sinica ,2006 26 (10 ) 3366 – 3371.
- [11] Zhou H W ,Shi G X ,Chen J Y , *et al.* Relieving to  $Hg^{2+}$  injury of *Alternanthera philoxeroides* 'antioxidant enzyme system by sprayed 6-BA. Acta Ecologica Sinica ,2003 23 (2 ) 387 – 392.
- [12] João P C. Copper toxicity to five *Parmelia lichens* in vitro. Environ. Exp. Bot. 2003 49 237 – 250 .
- [13] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts ,Polyphenolxydase in Beta vulgaris. Plant Physiol. ,1949 24 1 – 5.
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. ,1976 72 (1 ) 248 – 254.
- [15] Guo Y J. Method of Protein electric swimming. In :Guo Y J ,ed. Protein electric swimming experimental technique. Beijing Science Press ,1999. 54 – 87.
- [16] Heath R L ,Parker L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biophys. ,1968 25 :189 – 198.
- [17] Bates L E ,Waldren R P ,Teare I D , *et al.* Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil ,1973 39 205 – 207.
- [18] Shi G X ,Du K H ,Xie K B , *et al.* Ultrastructural study of leaf damaged from  $Hg^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  pollution in *Hydrilla verticillata*. Acta Botanica Sinica 2000 42 (4 ) 373 – 378.
- [19] Xu Q S ,Shi G X ,Zhou Y M , *et al.* Distribution and toxicity of cadmium in *Hydrilla verticillata* (L. F. ) royle. Acta Biologiae Exp. Sinica 2004 , 37 (6 ) #61 – 468.
- [20] Morales F ,Abadia A ,Gomez-Aparis J. Effects of combined NaCl and  $CaCl_2$  salinity on photosynthetic parameters of barley grown in nutrient solution. Plant Physiol. ,1992 86 #19 – 426.
- [21] Prasad M N V ,Malec P ,Waloszek A , *et al.* Physiological response of *Lemna trisulca* L. (duckweed ) to cadmium and copper bioaccumulation. Plant Sci. 2001 ,161 881 – 889.
- [22] DuPont F M ,Hurkman W J ,Vensel W H , *et al.* Differential accumulation of sulf-rich and sulf-poor wheat flour proteins is affected by temperature and mineral nutrition during grain development. J. Cereal. Sci. 2006 44 :101 – 112.
- [23] Cobbett C ,Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins :roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant Biol. , 2002 53 :159 – 182.
- [24] Sofia M E ,Boris A M ,Irina V G , *et al.* Heat shock protein HSP70 expression and DNA damage in Baikalian sponges exposed to model pollutants

and wastewater from Baikalsk Pulp and paper plant. *Aquatic Toxicol.* 2002 57 267—280.

- [25] Zhou C F, Wu G R, Shi G X, *et al.* The role of antioxidant systems in Cu stress resistance in *Alternanthera philoxeroides*. *Acta Bot. Sinica*, 2001, 43 (4) 389—394.
- [26] Li C S, Liu P, Xu G D, *et al.* Effect of seed soaking with aluminum on seed germination and seedling physiology of buck wheat. *Acta Ecologica Sinica*, 2006 26 (6) 2041—2047.
- [27] Thakur M, Sharma A D. Salt-stress-induced proline accumulation in germinating embryos: Evidence suggesting a role of proline in seed germination. *J. Arid. Environ.* 2005 62 517—523.
- [28] Cobbett C S. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000 3 211—216.

#### 参考文献:

- [1] 何孟常. 水体沉积物重金属生物有效性及评价方法. *环境科学进展*, 1998 6 (5) 9—19.
- [10] 覃光球, 严重玲, 韦莉莉. 秋茄幼苗叶片单宁、可溶性糖和脯氨酸含量对 Cd 胁迫的响应. *生态学报*, 2006 26 (10) 3366—3371.
- [11] 周红卫, 施国新, 陈景耀, 等. 6-BA 对水花生抗氧化酶系  $Hg^{2+}$  毒害的缓解作用. *生态学报*, 2003 23 (2) 387—392.
- [15] 郭尧君. 蛋白质电泳方法. 见: *蛋白质电泳实验技术*. 北京: 科学出版社, 1999. 54—87.
- [18] 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. *植物学报*, 2000 42 (4) 373—378.
- [19] 徐勤松, 施国新, 周耀明, 等. 镉在黑藻叶细胞中的亚显微定位分布及毒害效应分析. *实验生物学报*, 2004 37 (6) 461—468.
- [25] 周长芳, 吴国荣, 施国新, 等. 水花生抗氧化系统在抵御  $Cu^{2+}$  胁迫中的作用. *植物学报*, 2001 43 (4) 389—394.
- [26] 李朝苏, 刘鹏, 徐根娣, 等. 铝浸种对荞麦种子萌发和幼苗生理的影响. *生态学报*, 2006 26 (6) 2041—2047.