

Ni²⁺ 对槐叶苹叶片生理特征及亚显微结构的影响

计汪栋, 施国新*, 徐勤松, 许晔, 杨海燕, 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 210046)

摘要:通过 10% Hoagland 溶液培养试验研究了不同 Ni²⁺ 浓度(0、5、10、15、20 mg/L)对槐叶苹叶片矿质营养元素吸收、叶绿素含量、可溶性蛋白、保护酶系统、活性氧水平以及细胞亚显微结构的胁迫影响。结果表明,随着 Ni²⁺ 浓度的增加,①Ni²⁺ 对槐叶苹的矿质营养元素吸收的影响,主要是促进对 Ca²⁺、Na⁺、Zn²⁺、Fe³⁺、Mg²⁺ 的吸收,降低对 Mn²⁺、Mo²⁺、P、K⁺ 的吸收。②叶绿素、类胡萝卜素、可溶性蛋白和可溶性糖含量以及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性逐渐下降,且 20 mg/L 时数值均低于对照。而过氧化氢酶(POD)、超氧阴离子(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)和丙二醛(MDA)含量逐渐上升,分别为对照的 383%、168%、207% 和 131%。③不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)图谱显示,胁迫导致了相对分子质量(< 17 200)的多肽增加,并诱导了 94 000 多肽的出现和 35 000 多肽蛋白条带表达量加强。④电镜观察发现,Ni²⁺ 胁迫也对叶肉细胞亚显微结构造成了损伤,主要表现为:细胞核核仁解体,染色质凝聚,核膜断裂;叶绿体类囊体膨胀,被膜破裂;线粒体嵴数目减少,线粒体呈空泡状。可见,Ni²⁺ 破坏了槐叶苹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 Ni²⁺ 对槐叶苹产生胁迫的重要原因。

关键词: Ni²⁺; 槐叶苹; 生理; 亚显微结构; 胁迫

中图分类号: X173 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3301(2008)08-2308-06

Effects of Ni²⁺ on Physiological Characteristics and Submicroscopic Structure of *Salvinia natans* Leaves

Ji Wang-dong, Shi Guo-xin, Xu Qin-song, Xu Ye, Yang Hai-yan, Du Kai-he

(Jiangsu Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: Influence of 0, 5, 10, 15, 20 mg/L Ni²⁺ on growth, mineral nutrition, chlorophyll, carotenoid, soluble protein, soluble sugar, superoxide (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) contents as well as the activities of superoxide dismutase (SOD), guaiacolperoxidase (POD), and catalase (CAT) were studied in the leaves of *Salvinia natans* plants on 10 days after treatment. With the increase of the Ni²⁺ concentrations, exposure of the plants revealed that, ① the addition of Ni²⁺ affected the absorption of mineral nutrients, it mainly increased the absorption of Ca²⁺, Na⁺, Zn²⁺, Fe³⁺ and Mg²⁺, while reduced that of Mn²⁺, Mo²⁺, P and K⁺. ② The content of chlorophyll, carotenoid, soluble protein and soluble sugar content as well as activities of SOD and CAT decreased gradually. That of O₂⁻, H₂O₂ and MDA content as well as POD activity increased, 383%, 168%, 207%, 131% of these controls, respectively. ③ In the leaves of Ni²⁺-treated fronds, the polypeptide with apparent molecular weights 94 000, was became visible in SDS-PAGE, and the nature of it remains to be determined. The amount and intensity of polypeptide band increased gradually with augment of Ni²⁺ was also observed, the polypeptide with apparent molecular weight 35 000 increased significantly in fronds. ④ Transmission electron microscope observation indicated that Ni²⁺ also imposed injury action on submicroscopic structure of leaf cells, disaggregation of nucleolus, agglutination and disappearance of chromatin of nucleus, disruption of nuclear membrane, swelling of thylakoids and breakage of chloroplast envelope, decreasing of cristae quantity and vacuolization of mitochondria. The conclusion could be reached that the plant death was resulted from destruction under structure foundation of physiological function, unbalance of ion equilibrium and disorder of physiological metabolism.

Key words: Ni²⁺; *Salvinia natans*; physiological; submicroscopic; stress

Ni²⁺ 是兼具营养和毒害双重效应的微量重金属元素,研究表明,Ni²⁺ 是植物脲酶活性中心的组分,在植物氮素利用和代谢中发挥重要作用^[1];另一方面,过量的 Ni²⁺ 则不利于植物的正常生长,它能够扰乱光合作用、运输系统、矿质营养和细胞结构^[2]。随着电镀、电池和电子设备制造、油脂催化加工等工业的发展和大量化石燃料的燃烧,通过各种途径进入水环境的 Ni²⁺ 呈逐年上升之势,并已成为水环境主要的金属污染物之一^[3]。水体重金属污染及由此

造成的对植物的胁迫已成为各国学者的研究热点之一^[4~10]。作为我国四大淡水湖泊之一的太湖中的水生植被正在遭受毁灭性破坏,迫切需要人们了解水生植物对污染环境的耐受机制。目前,大量研究

收稿日期: 2007-08-19; 修订日期: 2007-11-12

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

作者简介: 计汪栋(1980~),男,硕士研究生,主要研究方向为重金属对高等水生植物的毒害机制, E-mail: jiwangdong@tom.com

* 通讯联系人, E-mail: gxshi@njnu.edu.cn

Ni^{2+} 胁迫的受试材料主要是陆生植物^[6-9], 而高等水生植物则较少^[10], 对浮水植物——槐叶苹的 Ni^{2+} 耐性机制更鲜见报道. 鉴于此, 本研究以太湖中常见的槐叶苹为材料, 通过营养液培养试验, 分析了其在不同 Ni^{2+} 浓度胁迫下, 矿质元素吸收、光合色素、保护酶活性、活性氧产生水平及细胞超微结构等的变化, 旨在从不同角度全面探讨槐叶苹对重金属污染环境的耐受性, 为污染水体中有毒金属的植物修复提供参考.

1 材料与方法

1.1 植物材料

槐叶苹 (*Salvinia natans*) 为一年生漂浮草本, 浮水叶长椭圆形, 排成两列, 下沉叶分裂成线状酷似须根. 2006 年 10 月初采自江苏太湖水域, 移植于南京师范大学水生植物培养池中. 于 11 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

整个试验在 Forma 3744 全封闭培养箱 (英国产) 中完成, 光照周期为 12 h: 12 h (L:D), 光照强度为 3 500 lx, 光暗温度为 25℃: 18℃ (L:D). 实验材料于 08:00 放入含 0.5、10、15 和 20 mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (以纯 Ni^{2+} 计) 的 10% Hoagland 培养液中. 实验设 3 次重复, 培养第 10 d 取相同部位叶片, 去离子水洗净、揩干, 进行生理指标的测定.

1.3 生理指标测定

叶片营养元素含量测定: 选取 1 g 鲜重叶片, 用去离子水洗净, 105℃ 下杀青 30 min, 然后在 70℃ 下烘至恒重, 将烘干的样品磨碎后, 经 $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$ 法消煮, 用电感耦合-等离子体原子发射光谱仪 (ICP-AES) (美国 Leeman 公司产品) 测定含量; 叶绿素含量采用 Arnon^[11] 的方法测定; 类胡萝卜素的抽提和测定参照 Middleton 等^[12] 的方法; 可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法^[13], 以牛血清蛋白为标准蛋白; 超氧化歧化酶 (SOD) 活性测定采用硝基蓝四氮唑还原法^[14]; 过氧化物酶 (POD) 活性测定采用愈创木酚法^[15]; 过氧化氢酶 (CAT) 活性测定采用钼酸盐法^[16]; 超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot -}$) 产生速率采用王爱国等^[17] 的羟胺氧化反应法测定; 过氧化氢 (H_2O_2) 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 H_2O_2 试剂盒测定; 丙二醛 (MDA) 和可溶性糖含量采用李合生^[18] 的方法; 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS-PAGE) 采用郭尧君^[19] 的方法, 分离胶质量分数为 16%, 浓缩胶质量分数为 5%, 上样量均为 40 μL , 在 4℃ 下进行电泳.

1.4 超微结构观察

处理第 10 d 于 08:00 从各浓度梯度培养缸中取植株相同部位的叶片, 洗净, 切成 1 mm³ 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, Epon 812 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. 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 SPSS 11.5 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 Ni^{2+} 对槐叶苹叶片吸收矿质元素的影响

从表 1 可以看出, 槐叶苹叶片对 Ni^{2+} 的吸收随其浓度增加而升高, 且不同矿质元素受 Ni^{2+} 浓度的影响不同, 可分成 2 类: ①促进槐叶苹叶片对 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 的吸收. 其中 Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 与处理浓度间呈极显著正相关 [$r(\text{Na}^+) = 0.993\ 0$, $r(\text{Zn}^{2+}) = 0.992\ 2$, $r(\text{Mg}^{2+}) = 0.967\ 4$, $p < 0.01$], Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 呈显著正相关 [$r(\text{Ca}^{2+}) = 0.826\ 2$, $r(\text{Fe}^{3+}) = 0.872\ 7$, $p < 0.05$]. ②显著抑制对 Mn^{2+} 、 Mo^{2+} 、 P 、 K^+ 的吸收. 分析表明, Mn^{2+} 、 K^+ 呈极显著负相关 [$r(\text{Mn}^{2+}) = -0.986\ 6$, $r(\text{K}^+) = -0.994\ 4$, $p < 0.01$], Mo^{2+} 、 P 呈显著负相关 [$r(\text{Mo}^{2+}) = -0.891\ 7$, $r(\text{P}) = -0.815\ 2$, $p < 0.05$].

2.2 Ni^{2+} 对槐叶苹叶片叶绿素和类胡萝卜素含量的影响

从表 2 可以看出, 随 Ni^{2+} 浓度的升高, 总叶绿素 (Chl) 含量、叶绿素 a (Chl-a)、叶绿素 b (Chl-b)、类胡萝卜素 (Car) 含量等变化趋势一致, 均呈单峰型变化, 且在低浓度 5 mg/L 时达到最大值, 分别为对照的 134.48%、117.65%、127.88% 和 132.09%. Ni^{2+} 为最高浓度 20 mg/L 时, 数值均低于对照, 差异分析表明, 它们与 Ni^{2+} 浓度间差异无显著相关性. Chl a/b 变化呈上升趋势, 在 20 mg/L 时, 略有下降. Car/Chl 总体呈下降变化. 差异分析表明, Chl a/b 呈显著负相关性 [$r_{\text{Chl a/b}} = 0.814\ 1$, $p < 0.05$], Car/Chl 呈无显著相关性.

表 1 Ni²⁺ 胁迫对槐叶苹叶片矿质元素含量的影响¹⁾/μg·g⁻¹

Table 1 Effects of Ni²⁺ addition on nutrient contents in *Salvinia natans* leaves/μg·g⁻¹

项目		Ni ²⁺ /mg·L ⁻¹				
		0	5	10	15	20
促进矿质吸收	Ni ²⁺	218 ± 4.36	347 ± 6.94	583 ± 11.7	1 328 ± 26.6	1 946 ± 38.9 **
	Ca ²⁺	9.23 ± 0.18	11.4 ± 0.23	21.6 ± 0.43	17.8 ± 0.36	30.7 ± 0.62 *
	Na ²⁺	785 ± 15.7	972 ± 19.4	1 263 ± 25.3	1 549 ± 30.9	1 732 ± 34.6 **
	Zn ²⁺	20.5 ± 0.41	27.4 ± 0.55	34.2 ± 0.68	39.5 ± 0.79	44.1 ± 0.88 **
	Fe ³⁺	60.3 ± 1.21	89.4 ± 1.79	83.7 ± 1.99	112 ± 2.24	157 ± 3.14 *
	Mg ²⁺	217 ± 4.34	274 ± 5.48	361 ± 7.22	398 ± 7.96	431 ± 8.62 **
抑制矿质吸收	Mn ²⁺	20.8 ± 0.42	17.5 ± 0.35	15.2 ± 0.30	10.3 ± 0.21	6.42 ± 0.13 **
	Mo ²⁺	1.964 ± 0.04	1.327 ± 0.01	0.739 ± 0.01	0.203 ± 0.01	0.346 ± 0.01 *
	P	413 ± 8.26	314 ± 6.28	267 ± 5.34	213 ± 4.26	156 ± 3.12 *
	K ⁺	3 079 ± 61.6	2 404 ± 48.1	1 838 ± 36.8	1 245 ± 24.9	821 ± 16.4 **

1) 表中的数据为平均值 ± 标准差; * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, 下同

表 2 Ni²⁺ 胁迫对槐叶苹叶片叶绿素和类胡萝卜素含量的影响/mg·g⁻¹

Table 2 Effects of Ni²⁺ addition on chlorophyll and carotenoid content in *Salvinia natans* leaves/mg·g⁻¹

Ni ²⁺	总叶绿素 Chl	叶绿素 a	叶绿素 b	类胡萝卜素	叶绿素 a/b	类胡萝卜素/总叶绿素
0	0.699 ± 0.014	0.510 ± 0.01	0.269 ± 0.005	0.081 ± 0.002	1.599 ± 0.031	0.116 ± 0.002
5	0.940 ± 0.019	0.600 ± 0.012	0.344 ± 0.007	0.107 ± 0.002	1.732 ± 0.034	0.114 ± 0.002
10	0.740 ± 0.015	0.475 ± 0.01	0.261 ± 0.005	0.088 ± 0.002	1.816 ± 0.036	0.120 ± 0.002
15	0.691 ± 0.014	0.440 ± 0.01	0.253 ± 0.005	0.081 ± 0.002	1.735 ± 0.035	0.117 ± 0.002
20	0.650 ± 0.013	0.400 ± 0.008	0.250 ± 0.005	0.044 ± 0.001	1.598 ± 0.032 *	0.067 ± 0.001

2.3 Ni²⁺ 对槐叶苹叶片可溶性蛋白及其 SDS-PAGE 电泳的影响

随着 Ni²⁺ 处理浓度的增大,可溶性蛋白含量呈缓慢下降趋势[图 1(a)].当达到最高浓度 20 mg/L 时,含量达到最低,为对照的 72.43%.分析结果表明,可溶性蛋白含量与 Ni²⁺ 处理浓度间达到极显著负相关性[$r = -0.984\ 9, p < 0.01$].从 SDS-PAGE 蛋白电泳图[图 1(b)]也可以看出,随着 Ni²⁺ 处理浓度的增大,导致了相对分子质量较小的多肽增加,即小于相对分子质量 17 200 的多肽表达量比对照条带图谱的表达量显著增加.同时,也诱导了相对分子质量

94 000 多肽的出现,相对分子质量 35 000 多肽蛋白条带表达量加强.

2.4 Ni²⁺ 对槐叶苹叶片 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

从图 2 可以看出,在 Ni²⁺ 胁迫下,3 种保护酶都表现出不同的变化趋势.SOD 和 CAT 活性变化呈下降趋势[图 2(a)和(c)],浓度为 20 mg/L 时,活性均达到最小值,分别比对照减少了 53.12% 和 75.06%.相比之下,POD 活性表现出先缓慢后显著上升趋势[图 2(b)].在最高浓度时,活性达最大值,为对照的 53.22%.CAT 活性存在明显的下降趋势[图 2(c)].差异分析表明,SOD、CAT 活性与 Ni²⁺ 处理浓度间达

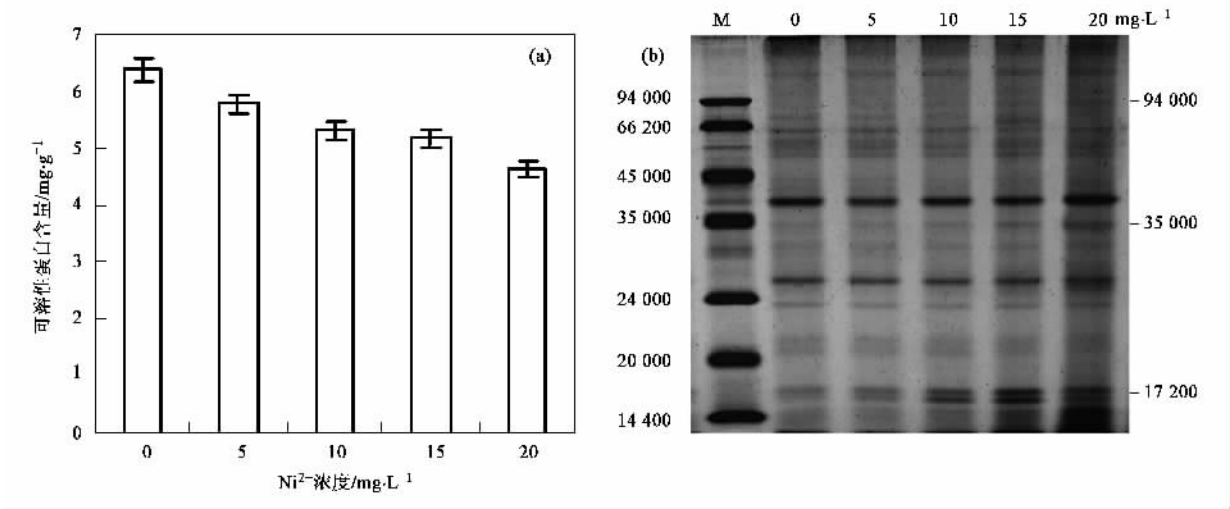


图 1 Ni²⁺ 胁迫对槐叶苹叶片可溶性糖含量及其 SDS-PAGE 蛋白电泳的影响

Fig.1 Effects of Ni²⁺ addition on soluble protein content and SDS-PAGE in *Salvinia natans* leaves

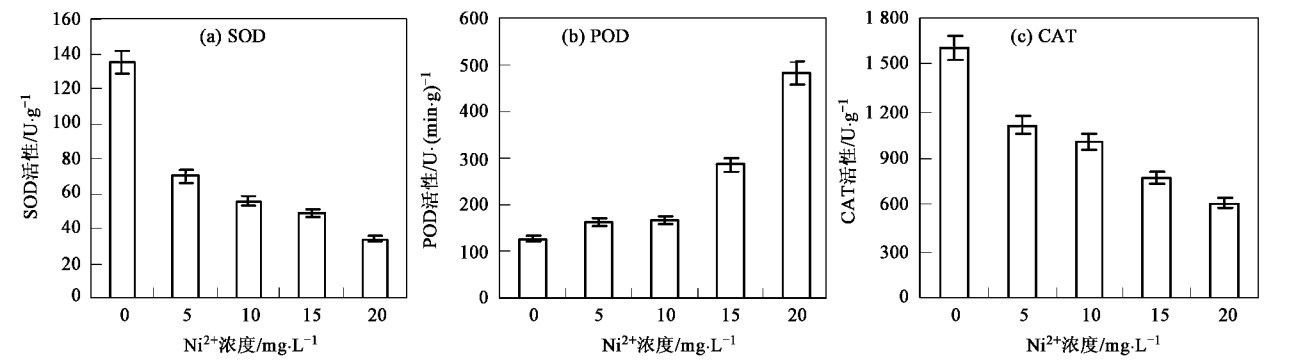


图 2 Ni^{2+} 胁迫对槐叶苹叶片 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

Fig.2 Effects of Ni^{2+} addition on SOD, POD and CAT activities in *Salvinia natans* leaves

到差异极显著负相关性[$r_{\text{SOD}} = -0.899\ 1$, $p < 0.01$; $r_{\text{POD}} = -0.965\ 5$, $p < 0.01$], POD 活性差异极显著正相关性[$r_{\text{CAT}} = 0.908\ 1$, $p < 0.01$].

2.5 Ni^{2+} 对槐叶苹叶片 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率、 H_2O_2 、MDA 和可溶性糖含量的影响

从表 3 可以看出, Ni^{2+} 胁迫下槐叶苹叶片 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量三者变化均逐步上升. 在最高浓度 20 mg/L 时, $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率达到最大, 为

对照 1.68 倍; H_2O_2 含量最大值为对照的 2.07 倍; 差异分析表明, 三者的变化与 Ni^{2+} 处理浓度间均达到差异极显著正相关[$r(\text{O}_2^{\cdot -}) = 0.989\ 7$, $p < 0.01$; $r(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.980\ 1$, $p < 0.01$; $r(\text{MDA}) = 0.986\ 6$, $p < 0.01$]. 可溶性糖含量一直减少, 在最高浓度时, 仅为对照的 0.51 倍. 差异分析表明, 与 Ni^{2+} 处理浓度间达到差异极显著负相关[$r(\text{可溶性糖}) = -0.971\ 3$, $p < 0.01$].

表 3 Ni^{2+} 胁迫对槐叶苹叶片 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 H_2O_2 、MDA 和可溶性糖含量的影响

Table 3 Effects of Ni^{2+} addition on $\text{O}_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , MDA and soluble sugar content in *Salvinia natans* leaves

项目	Ni^{2+} / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$				
	0	5	10	15	20
$\text{O}_2^{\cdot -}$ / $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$	94.19 ± 1.89	109.12 ± 2.19	120.96 ± 2.20	147.73 ± 2.96	157.50 ± 3.15 **
H_2O_2 / $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$	75.84 ± 1.52	95.42 ± 2.54	127.08 ± 3.13	151.66 ± 3.03	156.67 ± 1.91 **
MDA / $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$	21.13 ± 0.42	23.03 ± 0.46	23.62 ± 0.47	26.41 ± 0.53	27.60 ± 0.51 **
可溶性糖 / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	243.69 ± 4.87	232.14 ± 4.64	190.33 ± 3.81	179.76 ± 3.59	125.17 ± 2.50 **

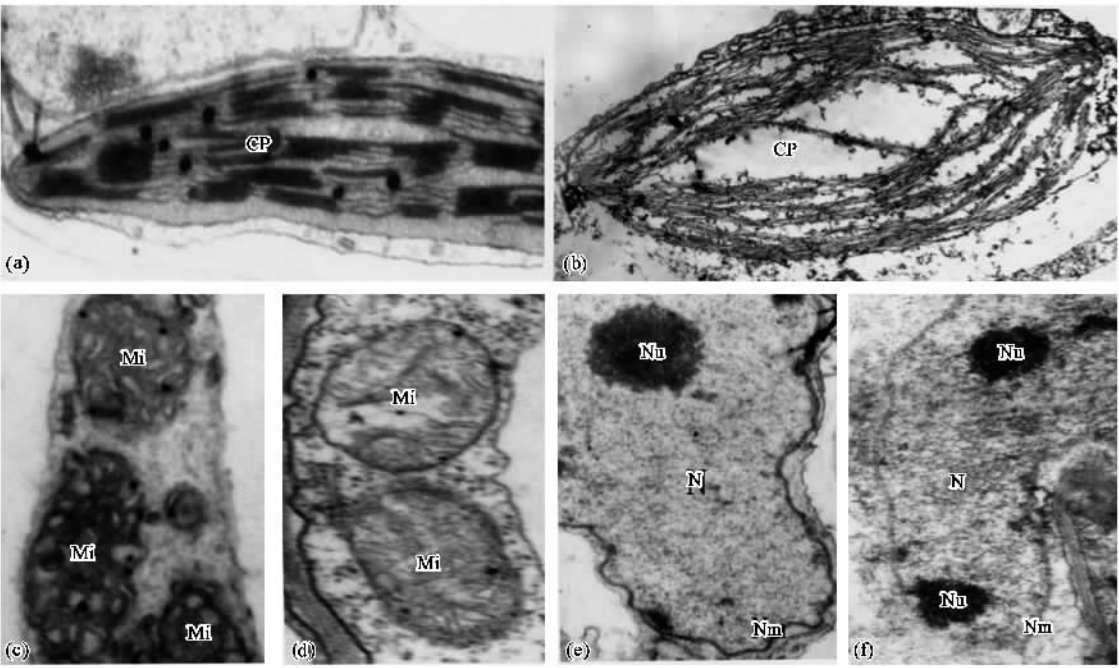
2.6 Ni^{2+} 对槐叶苹叶肉细胞超微结构的影响

电镜观察发现, Ni^{2+} 胁迫对叶肉细胞超微结构造成了明显损伤, 且随着浓度的增大, 破坏程度加重. ①叶绿体: 未胁迫的叶肉细胞超微结构正常情况下, 叶绿体呈梭形或长椭球形, 被膜和类囊体结构清楚, 基粒或基质片层与叶绿体长轴方向平行排列[图 3(a)]. 10 mg/L Ni^{2+} 时, 叶绿体基粒类囊体膨胀, 间质片层空间增大, 部分叶绿体内、外膜破裂[图 3(b)]. ②线粒体: 正常情况下, 线粒体呈比较规则的球形或椭球形, 在细胞质基质中少量分布, 双层被膜结构完整, 嵴清晰可见, 呈随机排列[图 3(c)]. 10 mg/L Ni^{2+} 时, 线粒体嵴突膨胀, 有致密的线状结构, 部分线粒体膜结构开始破裂[图 3(d)]. ③细胞核: 对照叶肉细胞中细胞核核膜清晰, 内部的染色质均匀分布, 核仁致密与核质界限分明[图 3(e)]. 15 mg/L Ni^{2+} 时, 细胞核核仁解体成数小核仁, 小核仁多

贴近核膜分布, 核基质分布不均匀, 核膜清晰度降低[图 3(f)].

3 讨论

Ni^{2+} 是重金属元素, 同时又是高等植物生长所必需的营养元素之一, 过量的 Ni^{2+} 对植物生长不利. 有研究表明, 重金属胁迫植物的一个重要原因在于其影响了植物对矿质元素的正常吸收^[5]. 本实验中发现, 当把浮水植物——槐叶苹培养在含不同 Ni^{2+} 浓度的培养液中第 10 d 后, 槐叶苹叶片内 Ni^{2+} 含量随处理浓度升高而积累增多, 同时也极大地破坏了正常叶片细胞的离子平衡: 一方面是明显促进了对 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 的吸收, 其中 Ni^{2+} 促进槐叶苹对 Fe^{3+} 的吸收可能是由于它与 EDTA 络合的稳定性显著高于 Fe^{3+} , 从而使培养液中的 EDTA-Fe 盐中的 Fe^{3+} 更易于被吸收造成的, 槐叶苹



(a) 对照叶绿体, $\times 8\ 000$; (b) $10\ \text{mg/L}\ \text{Ni}^{2+}$ 处理, 类囊体膨胀、破损, $\times 12\ 000$; (c) 对照线粒体, $\times 50\ 000$. (d) $10\ \text{mg/L}\ \text{Ni}^{2+}$ 处理, 线粒体的嵴突膨胀, 部分线粒体膜破裂, $\times 10\ 000$; (e) 对照细胞核, $\times 10\ 000$; (f) $10\ \text{mg/L}\ \text{Ni}^{2+}$ 处理, 核仁解体 and 凝胶状的染色质, $\times 15\ 000$
CP: 叶绿体; N: 细胞核; Nu: 核仁; Nm: 核膜

图 3 Ni^{2+} 胁迫对槐叶苹叶肉细胞超微结构的影响

Fig.3 Effects of Ni^{2+} addition on ultrastructure of *Salvinia natans* leaf cells

体内这些元素含量的增加也可能会对植物产生一定的不良影响,如 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{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 和微量元素 Mn^{2+} 、 Mo^{2+} 的吸收,这可能由于 Ni^{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.

本研究发现,槐叶苹在低浓度 Ni^{2+} ($\leq 5\ \text{mg/L}$) 胁迫下,叶绿素含量应激性升高,这是植物的一种保护性适应现象.高浓度 ($\geq 10\ \text{mg/L}$) 处理时,叶绿素含量下降,最终叶片失绿.这与 Ni^{2+} 在细胞内局部积累过多,与叶绿体中蛋白质上的一SH 基结合^[21],或取代其中的 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 等,破坏了叶绿体结构和功能活性有关.Chl a/b 可以反映捕光色素复合体 II (LHC II) 在所有含叶绿素的结构中所占的比重,其值升高表明 LHC II 含量的减少,光合机构遭受光氧化破坏的风险降低^[19].Car 既是光合色素,又是内源抗氧化剂,它可以耗散过剩光能,清除活性氧,防止膜脂过氧化^[12].实验结果表明, Ni^{2+} 处理后,Car 含量变化较为稳定,起到了减缓膜脂化的作用.电镜观察也发现, Ni^{2+} 胁迫对细胞超微结构产生了明显的破坏作用.这些结果反映出, Ni^{2+} 对槐叶苹的主要光合色素和光合作用细胞器都造成破坏作用,最终

影响了植物光合作用的有效进行.

可溶性蛋白含量受 Ni^{2+} 浓度影响变化不大,仅略有下降. Ni^{2+} 胁迫导致其含量下降,原因之一是 Ni^{2+} 进入细胞后促进了蛋白水解酶的活性,加强了原有蛋白质分解^[22].从 SDS-PAGE 蛋白电泳图[图 1 (b)]也可以看出,随着 Ni^{2+} 处理浓度的增大,导致了小分子量多肽的增加,即小于相对分子量 17 200 的多肽表达量比对照条带图谱的表达量显著增加,也诱导了 94 000 多肽的出现,35 000 多肽蛋白条带表达量加强.94 000 多肽的出现可能是槐叶苹对 Ni^{2+} 胁迫具有了一定的适应性,对外界环境做出的反应.说明 Ni^{2+} 胁迫不仅加强了原有蛋白质的降解,还可能诱导了新蛋白的产生.

重金属胁迫对植物的重要毒害机制之一是导致积累过量活性氧(ROS)而影响其正常代谢^[23],后者水平受到抗氧化酶和抗氧化剂的双重调节.SOD、POD、CAT 是酶促防御系统的重要保护酶,Car 是重要的内源抗氧化剂,本研究结果显示,随着溶液中 Ni^{2+} 浓度增大,槐叶苹叶片内活性氧增多的同时 SOD、CAT 活性显著下降,Car 含量也先升后降,表明它们对槐叶苹 Ni^{2+} 胁迫的防御作用是有限的.反过来,植物体内酶系统的功能紊乱必将严重削弱其清

除活性氧的能力,进而使 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 等大量积累,引起细胞膜结构损伤和生理代谢紊乱.电镜观察结果也从细胞学角度提供了佐证,如叶绿体被膜、类囊体膜和细胞核膜等的断裂,这也是重金属的植物毒理学机制之一^[24].MDA 是膜脂氧化的主要产物,其含量可用以表示膜损伤的程度^[8],本实验中,槐叶苹体内 MDA 含量随 Ni^{2+} 浓度增大而极显著上升也证明细胞膜系统遭受的破坏程度加剧.逆境条件下,植物通过合成积累可溶性糖等有机物质来调节细胞内的渗透压^[25],稳定细胞中酶分子的活性构象^[26],保护酶免受直接伤害,增强适应环境的能力.杨居荣等^[27]也指出可以根据高等水生植物叶片中可溶性糖含量的改变来鉴别植物对重金属抗性的强弱.但就槐叶苹而言, Ni^{2+} 处理后可溶性糖含量却呈下降趋势,这可能反映出槐叶苹对 Ni^{2+} 胁迫的耐受性较弱.

4 结论

(1)重金属对植物的胁迫并不是破坏某一种酶或某一种物质的含量,而是对植物整个生理生化反应和细胞结构造成整体伤害.

(2)重金属导致槐叶苹叶内离子平衡、酶系统紊乱、活性氧产生和细胞结构损伤,使植物的生理代谢失调并最终衰老和死亡.

参考文献:

[1] Eskew D L, Welch R M, Cary E E. Nickel: An essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants[J]. Science, 1983, **222**: 621-623.

[2] Baccouch S, Chaoui A, Ferjani E E. Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots[J]. Journal of Plant Nutrition, 2001, **24**: 1085-1097.

[3] Gomes-Junior R A, Moldes C A, Delite F S, *et al.* Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, **44**: 420-429.

[4] 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[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, **45**(4): 437-444.

[5] 徐勤松,施国新,许丙军,等. Cu、Zn 在黑藻叶片中的富集及其毒害学分析[J]. 水生生物学报, 2007, **31**(1): 1-8.

[6] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review[J]. Annals of Botany, 2003, **91**: 179-194.

[7] 邵瑞莹,王建龙. Ni^{2+} 生物吸附动力学及吸附平衡研究[J]. 环境科学, 2007, **28**(10): 2315-2319.

[8] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2002, **7**(9): 405-410.

[9] Rao M K V, Sresty T V S. Antioxidative parameters in the seedlings

of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) millspaugh) in response to Zn and Ni stresses[J]. Plant Science, 2000, **157**: 113-128.

[10] Sinha S, Pandey K. Nickel induced toxic effects and bioaccumulation in the submerged plant, *Hydrilla verticillata* (L. F.) royle under repeated metal exposure[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2003, **71**: 1175-1183.

[11] Amon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts, Polyphenolxydase in Beta vulgaris[J]. Plant Physiology, 1949, **24**: 1-5.

[12] Middleton E M, Teramura A H. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage[J]. Plant Physiology, 1993, **103**: 741-752.

[13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, **72**(1): 248-254.

[14] Beyer W F, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of changes in conditions[J]. Anal Biochem, 1987, **161**: 559-566.

[15] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003. 268-269.

[16] Karsten U. Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta)[J]. Planta, 1998, **205**: 257-262.

[17] 王爱国,罗广华. 植物的超氧物自由基与羟胺反应的定量关系[J]. 植物生理学通讯, 1990, **6**: 94-95.

[18] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003. 195-197.

[19] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 54-87.

[20] Dalla V F, La R N, Moro I, *et al.* Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium[J]. Plant Science, 2005, **168**: 329-338.

[21] 王海华,康健,曾富华,等. 高浓度镍对水稻幼苗生长及酶活性的影响[J]. 作物学报, 2001, **27**(6): 953-957.

[22] Prasad M N V, Malec P, Waloszek A, *et al.* Physiological response of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation[J]. Plant Science, 2001, **161**: 881-889.

[23] 徐卫红,王宏信,刘怀,等. Zn、Cd 单一及复合污染对黑麦草根分泌物及根际 Zn、Cd 形态的影响[J]. 环境科学, 2007, **28**(9): 2090-2095.

[24] 计汪栋,施国新,张慧,等. 菹草对 Hg^{2+} 胁迫的生理和结构应答反应[J]. 生态学报, 2007, **27**(7): 2856-2863.

[25] Hao F S, Wang X C, Chen J. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings[J]. Plant Science, 2006, **170**: 151-158.

[26] Gajewska E, Sklodowska M, Slaba M, *et al.* Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoot[J]. Biological Plant, 2006, **50**(4): 653-659.

[27] 杨居荣,贺建群,蒋婉茹. Cd 污染对植物生理生化的影响[J]. 农业环境保护, 1995, **14**(5): 193-197.