

Mn²⁺ 对菹草活性氧代谢及其亚显微结构的影响

徐小颖, 施国新, 徐勤松, 杨海燕, 许 晔, 春霞

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 通过溶液培养试验, 研究了不同 Mn²⁺ 浓度 (0.0, 0.9, 1.8, 2.7, 3.6 mmol/L) 胁迫对菹草抗氧化系统、活性氧产生和亚显微结构的影响。结果表明: 随着 Mn²⁺ 浓度的增加, 菹草叶片中的叶绿素 a、b 和总叶绿素含量都呈现先升后降的趋势; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性逐渐上升, 而过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性则呈先升后降趋势, 还原型谷胱甘肽 (GSH) 和抗坏血酸 (AsA) 含量呈先升后降趋势, 同时超氧阴离子 (O₂⁻) 产生速率、过氧化氢 (H₂O₂)、丙二醛 (MDA) 含量均呈逐渐上升趋势; 电镜观察发现, Mn²⁺ 对叶片细胞器的亚显微结构特别是叶绿体、线粒体和细胞核造成严重损伤。Mn²⁺ 破坏了菹草正常生理活动的结构基础和离子平衡, 并造成抗氧化系统功能紊乱, 这些都是 Mn²⁺ 对菹草产生毒害的重要原因。

[关键词] 菹草, Mn²⁺, 胁迫, 亚显微结构, ROS

[中图分类号] Q 944 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009) 01-0105-05

Effect of Manganese on Reactive Oxygen Species Metabolism and Submicroscopic Structure of *Potamogeton crispus*

Xu Xiaoying Shi Guoxin Xu Qinsong Yang Haiyan Xu Ye Ding Chunxia

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract The toxic effect of various concentrations of Mn²⁺ (0.0, 0.9, 1.8, 2.7, 3.6 mmol/L) was studied on antioxidant system, active oxygen generation and submicroscopic structure of *Potamogeton crispus*. The results showed that the content of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll all first increased and then decreased with increasing the concentration of Mn²⁺. Superoxide dismutase (SOD) activity generally increased, peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities enhanced a several fold, but with the manganese concentration increased continuously, they all decreased, which was possibly the reason of accumulation of O₂⁻ and H₂O₂. Glutathione (GSH) and ascorbic acid (AsA) contents changed at the same trend of POD and CAT. The level of lipid peroxidation was measured as the content of malondialdehyde (MDA), which was always increased and was the same as the change of O₂⁻ and H₂O₂. Transmission electron microscopy observation indicates that the higher Mn²⁺ concentration, the more serious damages to the leaf cells, especially chloroplast, mitochondrion and nucleus. The conclusion could be reached that the growth declining even death of plant was resulted from destruction of structure foundation of physiological function, interruption of ion and enzymes equilibrium and disorder of antioxidant system. But the influences of those aspects are in different extent in *Potamogeton crispus*.

Key words *Potamogeton crispus*, Mn²⁺, stress, submicroscopic structure, ROS

锰是植物生长必需的微量元素之一, 能够直接参与植物光合作用中电子传递系统的氧化还原过程, 对叶绿素维持正常的膜结构具有重要作用^[1-2]. 但是当锰的浓度较高时, 就表现出对植物的毒害作用^[3-5]. 锰胁迫对植物有较强的诱变作用, 可诱导产生大量的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), 导致体内的代谢失调. 研究表明^[3-5], 重金属能直接或者间接地通过形成 ROS 使植物体内产生氧化胁迫, 导致细胞膜脂质的过氧化, 蛋白质、色素、酶、核酸等的氧化损伤, 乃至植物死亡. 目前, 对锰胁迫的研究资料较少, 且主要集中在对高等陆生植物代谢过程中保护酶活性的影响^[6-8], 而锰对高等水生植物的毒害影响资料极少.

收稿日期: 2008-09-23

基金项目: 国家自然科学基金 (30670121, 30870139)、高等学校博士学科点专项科研基金 (20050319005) 资助项目.

通讯联系人: 施国新, 教授, 博士生导师, 研究方向: 重金属对水生高等维管束植物的生态效应. E-mail: gxsh@njnu.edu.cn

本文以高等水生植物菹草为受试材料,研究了不同锰离子浓度胁迫下菹草叶片的酶促抗氧化系统、非酶促抗氧化系统、膜脂过氧化程度、活性氧产生以及亚显微结构损伤,并探究了活性氧与酶促抗氧化系统和非酶促抗氧化系统的关系,以便为高等水生植物的重金属胁迫及抗性原理增加可靠的理论依据,并为下一步克隆重金属抗性基因,进而得到具有重金属高抗性的高等水生植物转基因植株奠定基础.

1 材料与方法

1.1 供试材料

菹草于 2008 年 3 月中旬采自江苏太湖水域,后将其移植于南京师范大学水生植物培养池中驯养. 于 4 月初 (18 ~ 25) 在无底泥玻璃缸中用 10% Hoagland 营养液进行培养,选取生长状况一致的植株作为实验材料.

1.2 研究方法

1.2.1 试验设计

整个试验在 Fom a 3744 全封闭培养箱 (英国产) 中完成,光照周期 L/D 为 12 h/12 h,光照强度为 3 500 lx,光暗 L/D 温度为 25/18 ℃. 实验材料于 8:00 放入含 0.009/0.18/0.27/0.36 mmol/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ (以纯 Mn^{2+} 计)的培养液中,培养第 10 d 取相同部位叶片,去离子水洗净、揩干,进行生理指标测定,实验重复 3 次.

1.2.2 酶液提取及活性测定

取鲜重 1 g 的叶片,加入 4 mL 浓度为 50 mmol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.8 含有 1% 聚乙烯吡咯烷酮和 10 mmol/L 的 β -巯基乙醇)及少量石英砂于冰浴上匀浆,4 层纱布过滤,滤液经 9 807 r/min 离心 20 min 上清液用于测定生理指标.

叶绿素含量按照 Arnon^[9]的方法测定; SOD 活性测定采用 NBT 光化还原法^[10]; POD 活性测定采用愈创木酚方法^[11]; CAT 活性测定采用钼酸盐方法^[12]; O_2^- 产生速率用王爱国等^[13]的方法测定; 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; MDA 含量按李合生等^[14]的方法测定; GSH 和 AsA 含量用陈建勋等^[15]的方法测定.

1.2.3 超微结构观察

在处理第 10 d 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 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, Epon812 浸透包埋, LEICA 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 H-7650 型透射电镜 (日本)下观察并拍照.

1.3 统计分析

实验结果为 3 次实验的平均值 ± 标准差,试验原始数据的处理和制图采用 Excel 和 SPSS 11.5 统计软件完成. 将各生理指标与处理浓度作相关性分析,其中 $P=0.05$, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 分别表示无显著、有显著和极显著相关.

2 结果与分析

2.1 Mn^{2+} 胁迫对菹草叶片叶绿素含量的影响

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^[9]. 本试验发现,叶绿素 a (Chl a)、叶绿素 b (Chl b) 以及总叶绿素的变化趋势是一致的. 低浓度 Mn^{2+} 处理下, Chl a、Chl b 以及总叶绿素含量都呈现上升趋势,在 Mn^{2+} 0.18 mmol/L 时,开始下降, 0.36 mmol/L 时,达到最小值, Chl a、Chl b 以及总叶绿素含量分别仅为对照的 44.3%、51.4% 和 46.3%. 方差分析结果表明: Chl a、Chl b 以及总叶绿素含量与 Mn^{2+} 处理浓度间的无显著性相关 [$r_{Chl a}=0.5716$, $p>0.05$; $r_{Chl b}=0.5545$, $p>0.05$; $r_{总叶绿素}=0.5674$, $p>0.05$].

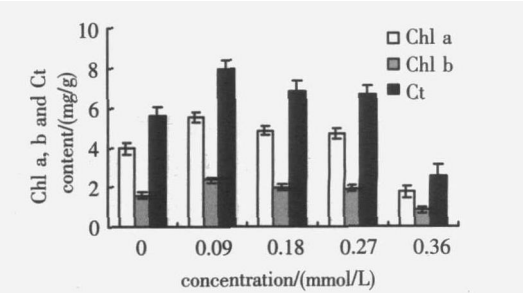


图 1 Mn^{2+} 胁迫下菹草叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量的变化

Fig.1 Change of chl a, chl b and total chlorophyll in aerial parts of *P. crispus* under Mn^{2+} stress

2.2 Mn^{2+} 胁迫对菹草叶片 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

SOD 广泛分布于细胞各组成部分, 催化 O_2^- 或 HO_2^- 歧化为 H_2O_2 , 一定程度上控制着 ROS 的含量, 但其活性又受 ROS 的影响^[10]. 由图 2-A 可以看出, 在 Mn^{2+} 胁迫下, SOD 活性变化随处理浓度的升高总体呈上升趋势. 0.09 mmol/L 浓度时为对照的 2.56 倍; 0.36 mmol/L 浓度时, 其活性为对照的 5.89 倍, 达到最大值. POD 可将 H_2O_2 转化成 H_2O , 从而清除过多的 H_2O_2 ^[8]. 由图 2-B 可以看出, 在 Mn^{2+} 胁迫下, POD 活性变化首先随处理浓度的升高呈上升趋势, Mn^{2+} 处理浓度 0.27 mmol/L 时, POD 活性逐渐上升, 并在 0.27 mmol/L 时达到最大值; 此后, POD 活性开始有所下降, 但在 0.36 mmol/L 浓度时仍是对照的 2.21 倍. CAT 主要存在于过氧化物酶体, 线粒体和胞质中也有存在, 清除 H_2O_2 不需底物, 但与 H_2O_2 亲和力低^[5]. 由图 2-C 可以看出, 在 Mn^{2+} 胁迫下, CAT 活性变化呈单峰曲线. 其首先随处理浓度的升高而急剧上升, 在 0.18 mmol/L 时达到最大值, 是对照的 10 倍; 然后随处理浓度的增大, CAT 活性逐渐下降, 但仍高于对照值. 方差分析结果表明: SOD 活性与 Mn^{2+} 处理浓度呈极显著正相关 [$r_{SOD} = 0.9798$, $p < 0.01$]. POD 活性与 Mn^{2+} 处理浓度间呈显著正相关 [$r_{POD} = 0.9138$, $p < 0.05$]. CAT 活性与 Mn^{2+} 处理浓度间无显著相关性 [$r_{CAT} = 0.6398$, $p > 0.05$].

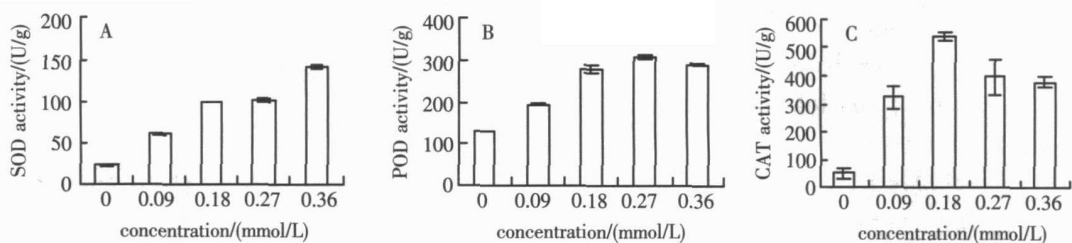


图 2 Mn^{2+} 胁迫下菹草叶片 SOD(A)、POD(B) 和 CAT(C) 活性的变化

Fig.2 Change of SOD(A), POD(B) and CAT(C) activities in aerial parts of *P. crispus* under Mn^{2+} stress

2.3 Mn^{2+} 胁迫对菹草叶片 GSH 和 AsA 含量的影响

GSH 和 AsA 是植物体内 2 种主要的非酶促抗氧化剂, 它们不仅可以作为抗坏血酸-谷胱甘肽氧化还原途径的底物, 还可以直接猝灭活性氧. 如图 3 所示, 随着 Mn^{2+} 处理浓度的增加, GSH 和 AsA 的含量都呈现先升后降的趋势, 存在激发、增长和消耗的过程. 在低浓度 Mn^{2+} 处理时, GSH 和 AsA 含量都逐渐升高, 随着处理浓度的增大, 两者的变化就不同了. 在 0.27 mmol/L 时, AsA 含量 (图 3-A) 就开始下降, 而 GSH 含量 (图 3-B) 在 0.36 mmol/L 才开始下降. 方差分析结果表明: GSH 和 AsA 含量与 Mn^{2+} 处理浓度间无显著相关性 [$r_{GSH} = 0.3919$, $p > 0.05$; $r_{AsA} = 0.5474$, $p > 0.05$].

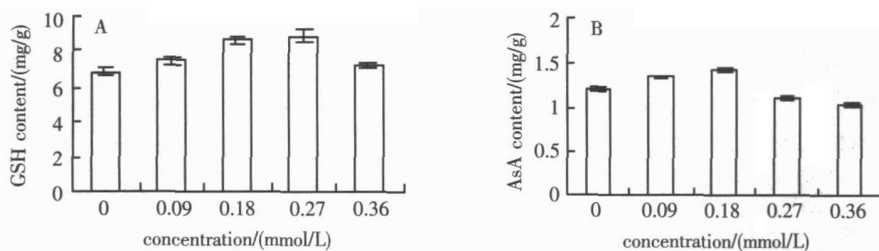


图 3 Mn^{2+} 胁迫下菹草叶片 GSH(A) 和 AsA(B) 含量的变化

Fig.3 Change of GSH(A) and AsA(B) contents in aerial parts of *P. crispus* under Mn^{2+} stress

2.4 Mn^{2+} 胁迫对菹草叶片 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 含量和 MDA 含量的影响

O_2^- 是 O_2 接受一个电子后形成的活性氧产物, 可自发地或在 SOD 的作用下歧化为 H_2O_2 和 O_2 . 过氧化物酶体的光呼吸以及脂酸的 α -氧化都能产生大量的 H_2O_2 , O_2^- 或 HO_2^- 的歧化也可产生 H_2O_2 . 由图 4-A, B 可以看出, 在 Mn^{2+} 胁迫下, 随着处理浓度的升高, O_2^- 产生速率和 H_2O_2 含量都急剧上升. 在 0.09 mmol/L 浓度时 O_2^- 产生速率为对照的 1.09 倍, H_2O_2 含量为对照的 1.01 倍; 0.36 mmol/L 浓度时, 两者均达到最大值, 分别增至对照的 3.76 倍和 3.10 倍. 由图 4-C 可以看出, 在 Mn^{2+} 胁迫下, MDA 含量急剧上升. 在 0.36 mmol/L 浓度时, 其含量为对照的 1.88 倍, 达到最大值. 方差分析结果表明: O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量与 Mn^{2+} 处理浓度间均达到极显著正相关 [$r_{O_2^-} = 0.9775$, $p < 0.01$; $r_{H_2O_2} = 0.9688$, $p < 0.01$].

$\tau_{MDA} = 0.9835, p < 0.01$.

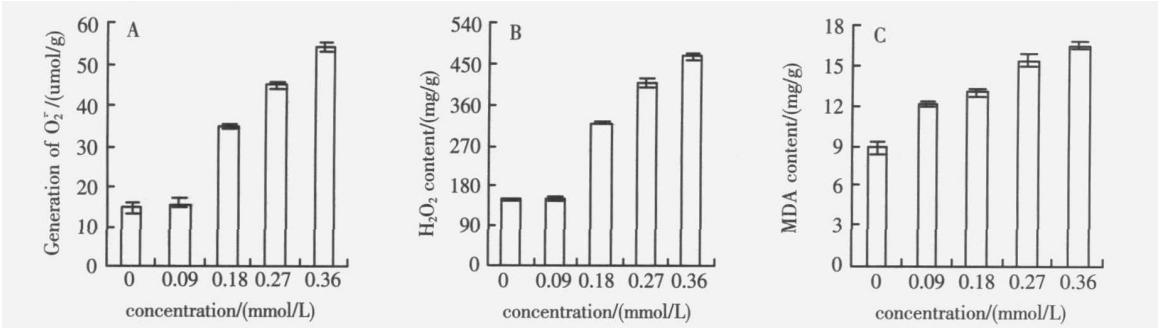


图 4 Mn^{2+} 胁迫下菹草叶片 O_2^- (A)、 H_2O_2 (B)和 MDA(C)的变化
Fig.4 Change of generation rate of O_2^- (A), H_2O_2 (B) and MDA(C) in aerial parts of *P. crispus* under Mn^{2+} stress

2.5 Mn^{2+} 对菹草叶片超微结构的影响

正常叶绿体为规则的长椭圆形,与叶绿体的长轴平行(图 5-1)。 Mn^{2+} 处理后,随处理浓度的增大叶绿体损伤越明显。 0.27 mmol/L Mn^{2+} 处理的叶细胞类囊体膨胀(图 5-2)。 0.36 mmol/L Mn^{2+} 浓度处理后类囊体膨胀更明显,部分膜破裂(图 5-3),这意味着随处理浓度的增大对叶绿体的损伤程度加剧。 正常菹草叶细胞的线粒体嵴突呈管状,间质浓密。 0.27 mmol/L Mn^{2+} 处理使部分嵴突消失,线粒体呈空泡状,线粒体被膜也有部分破裂(图 5-4)。

3 讨论

在研究中发现菹草叶片在低浓度 Mn^{2+} 毒害下,叶片中叶绿素含量应激性升高,表明低浓度 Mn^{2+} 能刺激叶绿素合成,这可能是植物的一种保护性适应现象^[16]。 而高浓度处理时叶绿素含量下降^[17],并最终导致叶片失绿。 叶绿素含量下降的原因,可能有以下原因:一是重金属抑制原叶绿素酸酯还原酶 (protophyllide reductase) 活性^[18],二是影响氨基-酮戊酸 (aminolevulinic acid) 的合成^[19],这二者分别是叶绿素合成所必需的酶和原料。 另外,叶绿素含量的下降还可能与 Mn^{2+} 在细胞内局部积累过多, Mn^{2+} 与叶绿体中蛋白质上的-SH 基结合,或取代其中的 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子,破坏了叶绿体结构和功能活性有关。

SOD 将 O_2^- 歧化成 H_2O_2 ,抑制 Haber-Weiss 反应,再由 CAT 和 POD 将 H_2O_2 分解成 H_2O ,从而阻止 O_2^- 和 H_2O_2 的积累^[20]。 只有三者协同才有利于清除过多的 ROS 并使之维持在较低水平。 本实验结果表明,低浓度 Mn^{2+} 能使菹草叶片内的酶促抗氧化剂 SOD、CAT 和 POD 活性逐渐增加,可能与许多抗氧化酶都是诱导酶有关,是植物对防止 ROS 伤害的一种保护性适应;同时,ASA 和 GSH 含量也应激性的上升,与酶促抗氧化剂协同作用,共同参与 ROS 的清除^[21]。 但在高浓度 Mn^{2+} 时,由于菹草叶片内 O_2^- 和 H_2O_2 逐渐增多,POD 和 CAT 活性以及 ASA 和 GSH 含量开始逐渐下降,CAT 比 POD 活性下降得快,ASA 比 GSH 下降得快,而 SOD 活性仍然保持上升趋势。 一方面由于 SOD 的高活性不断的将 O_2^- 歧化成 H_2O_2 , H_2O_2 是 CAT、POD 的作用底物,它的大量增加超过了 CAT、POD 的作用能力,不仅没有使 H_2O_2 含量降低,反而抑制了 CAT 和 POD 的酶活性;另一方面,可能是未被清除的 ROS 与酶分子中的金属离子起反应而导致酶分子失活。 ASA 和 GSH 含量后期的下降,说明单独的 ASA 和 GSH 的保护作用是有限的。 可见,高 Mn^{2+} 浓度时,SOD 起主要的保护作用。 而 CAT、POD、ASA 和 GSH 都是 ROS 清除系统中的重要保护剂,它们的活性及含量的下降又在一定程度上加重了 ROS 对膜的伤害。

MDA 是膜脂氧化的主要产物之一,其含量可用以表示膜脂氧化的程度^[22],本实验结果表明,在

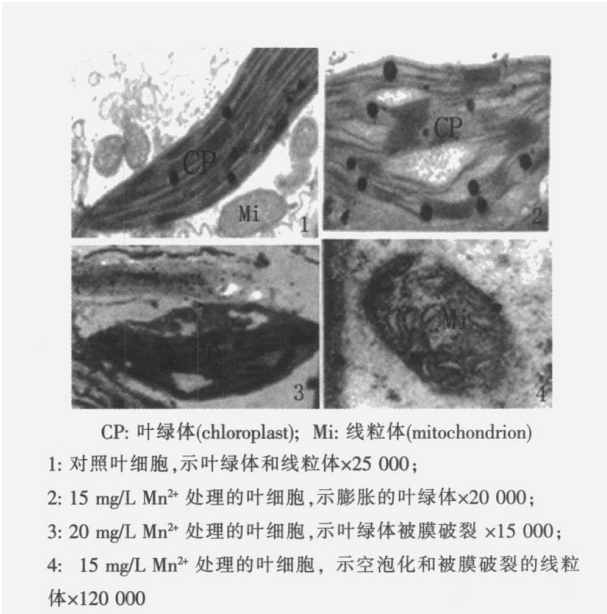


图 5 Mn^{2+} 对菹草叶片超微结构的影响
Fig.5 Effects of Mn^{2+} on ultrastructure of *P. crispus*

Mn^{2+} 胁迫下, 菹草叶片内的 MDA 含量随着 Mn^{2+} 胁迫浓度的加大而急剧升高, 这与植物体内清除 ROS 的能力减弱是一致的. 一方面是由于 O_2^- 和 H_2O_2 的大量积累直接导致膜脂过氧化, 使植物体内的膜系统遭到了严重破坏; 另一方面是由于 SOD 的过量表达加速了 O_2^- 的歧化, 导致 H_2O_2 的大量产生, 但是清除 H_2O_2 的酶 (即 CAT 和 POD) 活性并没有相应提高, 致使生成的 H_2O_2 与剩余的 O_2^- 反应产生活性更强的 OH^{\cdot} [23], 进一步加剧了对膜系统的破坏. 电镜观察结果发现, Mn^{2+} 对叶绿体和线粒体也造成明显损伤, 它们是两个能量转化细胞器. 将能量转换为驱动细胞进行正常生命活动所必需的能量, 对植物进行正常的生理代谢具有非常重要的意义. 高浓度的 Mn^{2+} 处理菹草叶片后, 造成这些细胞器的破坏.

综上所述, Mn^{2+} 对植物的毒害并不是破坏某一种酶或某一种物质的含量, 而是对植物体内生理生化和细胞结构造成整体伤害, 导致体内活性氧清除系统被破坏, ROS 大量积累, 使植物的生理代谢紊乱并最终衰老和死亡.

[参考文献]

- [1] 刘铮. 微量元素的农业化学 [M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [2] 任立民, 刘鹏. 锰毒及植物耐性机理研究进展 [J]. 生态学报, 2007, 27(1): 357-367.
- [3] 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 [J]. 植物学报, 2001, 43(4): 389-394.
- [4] 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): 2 856-2 863.
- [5] Prasad M N V, Malec P, Wabszek A, et al. Physiological response of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation [J]. Plant Science, 2001, 5(161): 881-889.
- [6] Polak T B, Milacic R, Pihlar B, et al. The uptake and speciation of various Al species in the *Brassica napus* species [J]. Phytochemistry, 2001, 57(2): 189-198.
- [7] 阎海, 王杏君, 林毅雄, 等. 铜、锌和锰抑制蛋白核小球藻生长的毒性效应 [J]. 环境科学, 2001, 22(1): 23-26.
- [8] 杨德俊, 杨卫韵, 刘鹏, 等. 锰对大豆若干生理特性的影响 [J]. 亚热带植物科学, 2005, 34(2): 8-10.
- [9] Amon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. Plant Physiology, 1949, 24: 1-5.
- [10] Beyer W F, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 2(161): 559-566.
- [11] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导 [M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2003: 67-69, 268-269.
- [12] Ulff K, Linda A E, Klaus L, et al. Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalgae *Chondrus crispus* (Rhodophyta) [J]. Planta, 1998, 205(2): 257-262.
- [13] 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): 55-57.
- [14] 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, 2000: 164-165.
- [15] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002: 125-127.
- [16] 胡金朝, 施国新, 王学, 等. Cd 对槐叶苹的生理影响及外源 La-Ca 的缓解效应比较 [J]. 广西植物, 2005, 25(2): 156-160.
- [17] Doncheva S, Georgieva K, Vassileva V, et al. Effects of succinate on manganese toxicity in pea plants [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2005, 28(1): 47-62.
- [18] Stobart A K, Griffiths W T, Ameen B. The effects of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley [J]. Plant Physiology, 1985, 63: 293-298.
- [19] Chris B, Marc V M, Dirk I. Superoxide dismutase and stress tolerance [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 83-116.
- [20] Fehet-Christoffers M M, Horst W J. Does apoplastic ascorbic acid enhance manganese tolerance of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris* [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2005, 168: 590-599.
- [21] 王学, 施国新, 徐勤松, 等. 镉、铈及重金属元素铬、锌对竹叶眼子菜的毒害作用 [J]. 中国稀土学报, 2004, 22(5): 682-686.
- [22] 王春涛, 施国新, 徐勤松, 等. 外源铈减轻了重金属镉对菹草的毒害作用 [J]. 中国稀土学报, 2004, 22(6): 821-824.
- [23] Shah K, Kumar R G, Verma A, Dubey R S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings [J]. Plant Science, 2001, 161: 1 135-1 144.

[责任编辑: 孙德泉]