

# 水鳖叶片矿质营养、保护酶活性及同工酶对 $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫的响应

计汪栋, 施国新, 徐勤松, 许 晔, 张 慧, 赵 娟

(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  $\text{Cu}^{2+}$  浓度 (0、2、4、6、8 mg/L) 胁迫下, 通过溶液培养试验对浮水植物水鳖叶片矿质营养吸收、活性氧产生、保护酶活性及同工酶的影响。结果表明, (1) 随着  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的增加,  $\text{Cu}^{2+}$  对水鳖的矿质营养吸收产生了影响, 主要是促进对  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  的吸收, 降低对  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{P}$ 、 $\text{K}^{+}$  的吸收。 (2) SDS-PAGE 蛋白电泳图的条带随  $\text{Cu}^{2+}$  浓度增加而逐渐减少, 亮度也随之减弱, 导致了多肽明显丢失。 (3) 谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性和过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 含量的变化趋势呈单峰曲线, 在  $\text{Cu}^{2+}$  浓度为 6 mg/L 时, 均达到最大值, 分别为对照的 2.51 倍和 3.74 倍。超氧阴离子 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 和丙二醛 (MDA) 含量的变化呈先缓慢后迅速上升趋势, 当  $\text{Cu}^{2+}$  浓度最高时均达顶峰, 分别为对照的 342.3% 和 334.2%; 超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性呈下降趋势, 过氧化物酶 (POD) 的活性呈上升趋势, 过氧化氢酶 (CAT) 活性仅略有上升。 (4) 同工酶谱分析显示, 随着  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的增加, SOD 谱带数和表达量均减少。POD 谱带数由少逐渐增多, 由 4 带增加到 7 带, 表达量也呈现上升趋势。CAT 酶谱带数无明显变化, 表达量略存在差异。  $\text{Cu}^{2+}$  对水鳖的致死浓度范围在 2~4 mg/L。

[关键词] 水鳖,  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫, 矿质营养, 保护酶, 同工酶

[中图分类号] Q944 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)01-0093-07

## Effects of Copper Stress on Mineral Nutrient, Protective Enzyme Activities and Their Isozyme Expression in Leaf of *Hydrocharis dubia*

Ji Wangdong, Shi Guoxin, Xu Qinsong, Xu Y e, Zhang Hui, Zhao Juan

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

**Abstract** *Hydrocharis dubia* plants exposed to 0, 2, 4, 6, 8 mg/L  $\text{Cu}^{2+}$  for 7 d were analyzed with reference to its toxic impact on mineral nutrient adsorption, active oxygen generation, protective enzyme activities and their isozyme expression. The results showed that with the rise of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration in culture medium: (1) the mineral nutrient absorption was affected by  $\text{Cu}^{2+}$  stress, as it increased the absorption of  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , and reduced that of  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{P}$  and  $\text{K}^{+}$ , with increasing the concentration of  $\text{Cu}^{2+}$ . (2) The amount and intensity of protein/peptide band decreased gradually with augment of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration was observed in SDS-PAGE, respectively, and many polypeptides disappeared significantly in fronds treated with  $\text{Cu}^{2+}$  stress. (3) GR activity and  $\text{H}_2\text{O}_2$  content change tendency assume the single peak curve in  $\text{Cu}^{2+}$  concentration to 6 mg/L, their datum up to maximum respectively better 2.51 times and 3.74 times than the control. The  $\text{O}_2^{\cdot-}$  content and MDA content change assume first slow, and then fast trend of escalation when  $\text{Cu}^{2+}$  concentration to 8 mg/L, their datum reaching the crest comparing 342.3% and 334.2% to the control. SOD activity assumes the drop tendency, POD activity assumes the trend of escalation, and CAT activity only has slightly rise. (4) Their isoenzymic spectrum analysis demonstration along with  $\text{Cu}^{2+}$  concentration increasing, the SOD isoenzymic band number and the expression quantity reduces. The POD isoenzymic band number gradually increases, increasing from 4 belts to 7 belts, and the expression quantity also presents the trend of escalation. The CAT isoenzymic band number does not obviously change, and the expression quantity has slight difference. The conclusion could be reached that the death of plant resulted from destruction of structure foundation of physiological function, unbalanced

收稿日期: 2007-04-10

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

作者简介: 计汪栋 (1980—), 硕士研究生, 研究方向: 重金属对水生高等维管束植物的生态效应。E-mail: jiwangdong@tom.com

通讯联系人: 施国新 (1950—), 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

ance of ion equilibrium and disorder of physiological metabolism. The lethal concentration scope of  $\text{Cu}^{2+}$  to *Hydrocharis dubia* was 2~4 mg/L based on the experiment results

**Key words** *Hydrocharis dubia*,  $\text{Cu}^{2+}$  stress, mineral nutrient, protective enzyme, isozyme

重金属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.正常生理情况下,ROS是植物光合、呼吸、固氮等代谢过程不可避免的产物,但在体内的抗氧化酶如 SOD、CAT、POD 和 GR 以及抗氧化剂的协同作用下,ROS 能不断地产生和被清除,使细胞内的 ROS 的产生和清除维持动态平衡<sup>[1]</sup>.研究表明,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<sup>[2]</sup>,蛋白质、色素、酶、核酸等的氧化损伤,乃至植物死亡<sup>[3]</sup>.重金属对水环境造成的污染已经引起人们日益关注.目前国内外就  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  等非必需重金属对水生植物的胁迫影响进行了一定研究<sup>[4-6]</sup>,而对  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫高等水生植物研究则相对较少.本文以浮水植物水鳖为受试材料,通过营养液培养试验,研究了不同  $\text{Cu}^{2+}$  浓度胁迫下水鳖叶片  $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、GR、MDA 含量以及 SOD、POD、CAT 活性的变化趋势以及同工酶谱的差异,旨在探讨抗氧化酶系统在抵抗重金属胁迫中的作用,旨在从不同层面揭示  $\text{Cu}^{2+}$  对水生植物的毒害机理,为水环境中重金属胁迫效应的诊断,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

水鳖(*Hydrocharis dubia*)为水鳖科水鳖属,分布在欧洲、亚洲及大洋洲,匍匐茎横生,株高 8~12 cm,叶近基生,圆形或肾形,全缘,中央部分膨胀成气室,花单性,果卵圆形,喜光线充足,水质不拘,生长适温为 18~20℃,栽培容易,可供水簇箱中栽培观赏.于 2006 年 6 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.7 月初(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 Foma 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).实验材料于上午 8 00 放入含 0、2、4、6 和 8 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (以纯  $\text{Cu}^{2+}$  计)的培养液中.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,揩干,进行生理指标的测定.

### 1.3 酶活性的测定及同工酶分析

SOD 活性测定采用 NBT 光化还原法测定<sup>[7]</sup>.POD 活性测定采用愈创木酚方法<sup>[8]</sup>.CAT 活性测定采用钼酸盐法<sup>[9]</sup>.同工酶分析采用垂直不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离胶质量分数为 7.5%,浓缩胶质量分数为 2.5%.上样量均为 30  $\mu\text{L}$ ,在 4℃下进行电泳. POD 和 CAT 同工酶电泳采用恒压,上层胶为 100 V,下层胶为 120 V. SOD 同工酶电泳采用恒流,上层胶为 15 mA,下层胶为 20 mA.当溴酚蓝指示剂移至前沿时,停止电泳. SOD 的活性染色参照罗广华等<sup>[10]</sup>方法. POD 的活性染色用联苯胺染色方法<sup>[11]</sup>. CAT 的活性染色用淀粉-碘化钾染色法<sup>[12]</sup>.

### 1.4 其他生理指标的测定

$\text{O}_2^-$  产生速率用王爱国和罗广华的羟胺氧化反应方法测定<sup>[13]</sup>.  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$  试剂盒测定. GR 活性采用 Vioria<sup>[14]</sup>. MDA 含量用 Heath 和 Parker 的硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定<sup>[15]</sup>.叶片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.

每个处理重复 3 次,实验结果为 3 次实验的平均值  $\pm$  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、有显著和极其显著差异.

2 结果

2.1 Cu<sup>2+</sup> 胁迫对水鳖叶片吸收矿质元素的影响

不同矿质元素受各个 Cu<sup>2+</sup> 浓度的影响不同, 由表 1 可见, 可分成 2 类不同情形: (1) 促进水鳖叶片对 Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、B、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 的吸收. 其中 Zn<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 与处理浓度达到极显著正相关 [ $r(\text{Zn}^{2+}) = 0.997\ 2$ ,  $r(\text{Mg}^{2+}) = 0.998\ 7$ ,  $P < 0.01$ ], Na<sup>+</sup>、B 为显著正相关 [ $r(\text{Na}^{+}) = 0.935\ 4$ ,  $r(\text{B}) = 0.921\ 7$ ,  $P < 0.05$ ], Ca<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup> 没有达到显著程度. (2) 显著抑制对 Mn<sup>2+</sup>、P、K<sup>+</sup> 的吸收, 统计分析表明, 其中 Mn<sup>2+</sup> 一直呈下降趋势, 与处理浓度间均达到极显著负相关 [ $r(\text{Mn}^{2+}) = -0.949\ 4$ ], P、K<sup>+</sup> 均呈显著负相关 [ $r(\text{P}) = -0.838\ 4$ ,  $r(\text{K}^{+}) = -0.872\ 4$ ,  $P < 0.05$ ].

表 1 Cu<sup>2+</sup> 处理下水鳖叶片内矿质元素的含量 (n = 3)

Table 1 Nutrient contents in *H. dubia* treated with Cu<sup>2+</sup> (n = 3)

金属离子浓度/(mg/L)		0	2	4	6	8
1	Ca <sup>2+</sup> (μg/g)	645 ± 12.21	695 ± 10.42	1 157 ± 20.01	1 288 ± 23.82	3 055 ± 55.43
	Zn <sup>2+</sup> (μg/g)	9 65 ± 0.02	11.3 ± 0.03	15.1 ± 0.03	16.0 ± 0.01	20.9 ± 0.03
	Fe <sup>3+</sup> (μg/g)	1.53 ± 0.03	3.04 ± 0.02	4.66 ± 0.02	6.54 ± 0.03	21.8 ± 0.02
	B (μg/g)	0.217 ± 0.001	0.278 ± 0.001	0.342 ± 0.002	0.578 ± 0.003	1.03 ± 0.001
	Na <sup>+</sup> (μg/g)	257 ± 4.21	529 ± 10.13	572 ± 14.43	1 314 ± 23.14	1 329 ± 24.63
	Mg <sup>2+</sup> (μg/g)	260 ± 4.02	315 ± 6.11	373 ± 7.52	440 ± 8.02	492 ± 9.81
2	Mn <sup>2+</sup> (μg/g)	122 ± 2.01	102 ± 2.13	73.7 ± 1.41	68.2 ± 1.23	55.1 ± 1.02
	P (μg/g)	586 ± 10.02	299 ± 4.02	252 ± 4.62	266 ± 4.22	131 ± 2.42
	K <sup>+</sup> (μg/g)	3 133 ± 60.02	2 749 ± 54.71	1 779 ± 34.84	1 753 ± 35.41	1 573 ± 30.71

2.2 Cu<sup>2+</sup> 对水鳖叶片可溶性蛋白及其 SDS-PAGE 电泳的影响

随着 Cu<sup>2+</sup> 处理浓度的增大, 水鳖叶片可溶性蛋白含量亦呈下降趋势 (图 1, A). 当浓度达到 8 mg/L 时, 可溶性蛋白含量达到最低, 仅为对照的 36.44%. 统计分析结果表明, 可溶性蛋白含量与 Cu<sup>2+</sup> 处理浓度间达到极显著负相关 [ $r = -0.973\ 2$ ,  $P < 0.01$ ]. SDS-PAGE 蛋白电泳图 (图 1, B) 也可以看出, 经 Cu<sup>2+</sup> 处理后, 明显导致了对照条带图谱中相对分子质量为 16 900 和 25 600 多肽的表达量的减少. 6 mg/L 浓度处理后, 引起了 25 600 多肽表达量的减少. 浓度达到 8 mg/L 时, 除了蛋白条带亮度明显减弱外, 还导致了 70 300 多肽的消失.

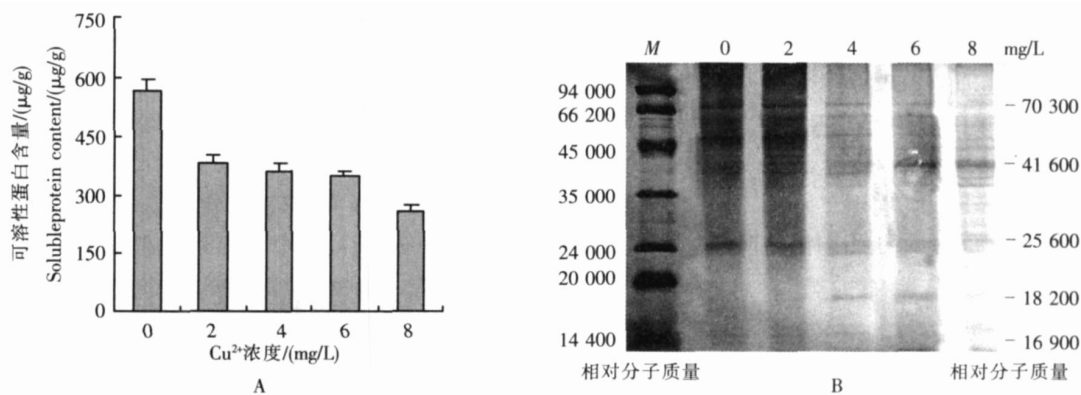


图 1 Cu<sup>2+</sup> 胁迫下水鳖叶片可溶性蛋白含量(A)及其 SDS-PAGE 蛋白电泳(B)的影响

Fig.1 Effect of soluble protein content(A) and SDS-PAGE(B) in *H. dubia* under Cu<sup>2+</sup> stress

2.3 Cu<sup>2+</sup> 胁迫对水鳖叶片 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、GR 和 MDA 的影响

从图 2(A, D)可以看出, Cu<sup>2+</sup> 胁迫下水鳖叶片 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率和 MDA 含量的变化趋势呈单峰曲线. 浓度达到 6 mg/L 时, 两者均达到最大值, 分别为对照的 2.51 倍和 3.74 倍. 在 8 mg/L 时, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 MDA 均下降, 但仍高于对照. 统计分析结果显示, 各处理浓度间 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 活性差异不显著 [ $r(\text{O}_2^{-}) = 0.439\ 2$ ,  $P \geq 0.05$ ], MDA 含量达到差异显著水平 [ $r(\text{MDA}) = 0.771\ 2$ ,  $P < 0.05$ ]. GR 活性和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的变化呈先缓慢后迅速上升趋势, 如图 2(B, C)所示. 当 Cu<sup>2+</sup> 浓度 ≤ 6 mg/L 时, 两者均变化不大. 在 8 mg/L 时, 此时两者变化均达最高, 分别为对照的 342.3% 和 334.2%. 差异分析结果表明, GR 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 均与处理浓度间达到显著差异

水平 [ $r(\text{GR}) = 0.877$ ,  $r(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.885$ ,  $P < 0.05$ ].

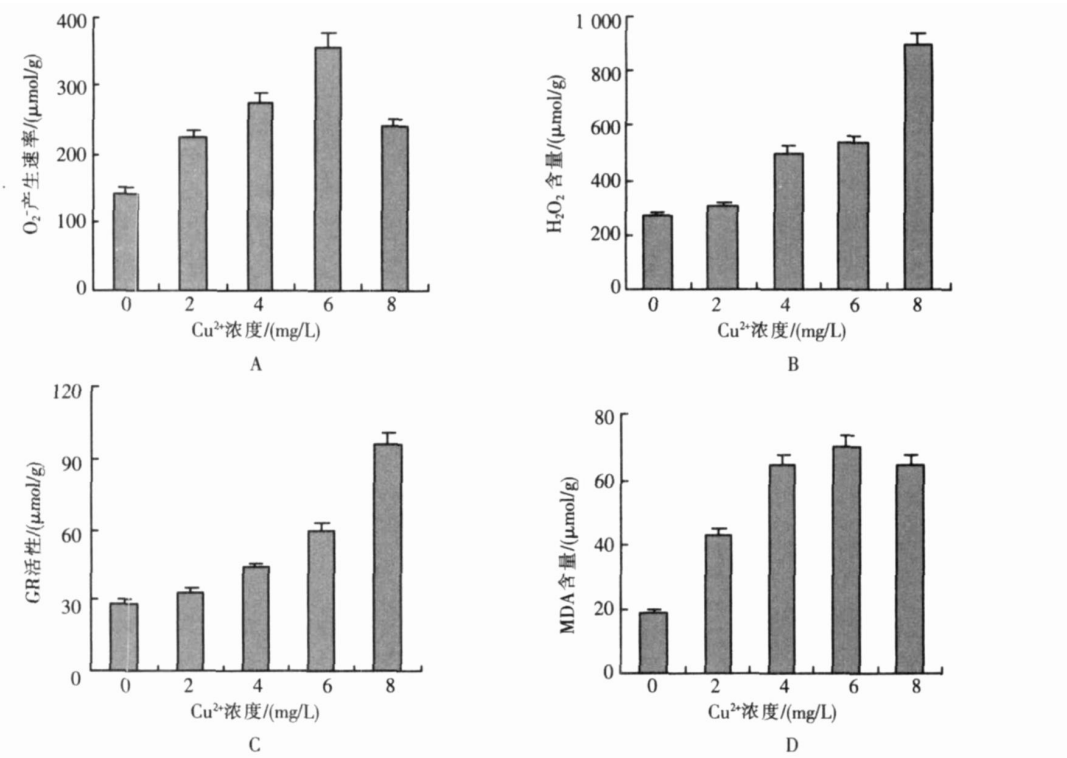


图 2 Cu<sup>2+</sup>胁迫下水鳖叶片 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、GR 和 MDA 的影响  
Fig.2 Effect of O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、GR and MDA in *H. dubia* under Cu<sup>2+</sup> stress

2. 4 Cu<sup>2+</sup>胁迫对水鳖叶片保护酶活性的影响

2. 4. 1 Cu<sup>2+</sup>胁迫对水鳖叶片 SOD 活性和同工酶的影响

Cu<sup>2+</sup>胁迫下,水鳖叶片的 SOD 活性变化呈下降趋势(图 3)。当 8mg/L 时, SOD 活性达到最小值,仅为对照的 0.57 倍。方差分析结果表明, SOD 活性与处理浓度间差异显著负相关 [ $r = -0.8951$ ,  $P < 0.05$ ]. 从 SOD 同工酶谱带(图 4)可以看出,也存在明显的差异。对照的 SOD 有 3 条谱带,酶活性的表达量最多,而各 Cu<sup>2+</sup> 浓度处理的 SOD 同工酶谱带数均只有 2 条谱带,且随着浓度的增加,酶活性的表达量有较为明显的变化,它们与 Cu<sup>2+</sup> 浓度处理也呈负相关性,即随 Cu<sup>2+</sup> 浓度增加谱带数和表达量均减少。

2. 4. 2 Cu<sup>2+</sup>胁迫对水鳖叶片 POD 活性和同工酶的影响

由图 5 可知, Cu<sup>2+</sup>胁迫下水鳖叶片 POD 活性表现出先迅速后缓慢上升趋势,在 2 mg/L 时, POD 活性快速升高,在 Cu<sup>2+</sup> ≥ 2mg/L 时,酶活性变化不大仅略有上升。8 mg/L 时, POD 活性达到最大值,为对照的

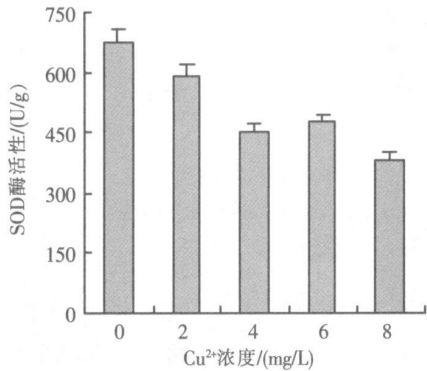


图 3 Cu<sup>2+</sup>胁迫下水鳖叶片 SOD 酶活性的变化  
Fig.3 Changes of SOD activity in aerial parts of *H. dubia* under Cu<sup>2+</sup> stress

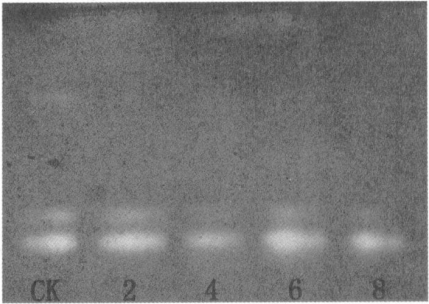


图 4 Cu<sup>2+</sup>胁迫下水鳖叶片 SOD 同工酶谱  
Fig.4 SOD isoenzymic zymogram in aerial parts of *H. dubia* under Cu<sup>2+</sup> stress

2.29倍, 但仅为  $2\text{ mg/L}$  时数值的 1.14倍. 统计分析结果表明, POD 活性与处理浓度间差异正相关 [ $r=0.6794$   $P<0.05$ ]. POD同工酶谱表明(图 6), 与对照相比各处理酶谱带数和表达量上均增多. 它们与  $\text{Cu}^{2+}$  浓度处理也呈正相关性, 即 POD 谱带数由少逐渐增多, 由 4带增加到 7带, 表达量也呈现上升趋势.

2.4.3  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫对水鳖叶片 CAT活性和同工酶的影响

$\text{Cu}^{2+}$  胁迫下, 水鳖叶片的 CAT活性变化略有上升趋势(图 7).  $2\text{ mg/L}$  时, 叶片 CAT处于激发态, 活性达到最低为对照的 0.99倍.  $\text{Cu}^{2+} \geq 4\text{ mg/L}$  时, CAT 活性逐渐上升, 最高浓度时数值为对照的 1.02倍. 统计分析结果表明, CAT 活性与处理浓度间差异正相关 [ $r=0.8788$   $P<0.05$ ]. 从图 8同工酶谱带可以看出, 在处理浓度内 CAT酶谱带无明显变化, 仅表达量稍有差异.

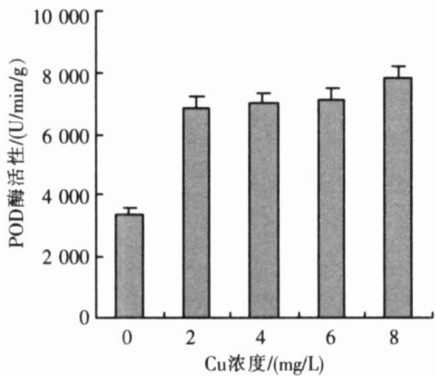


图 5  $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫下水鳖叶片 POD 酶活性的变化  
Fig.5 Changes of POD activity in aerial parts of *H.dubia* under  $\text{Cu}^{2+}$  stress

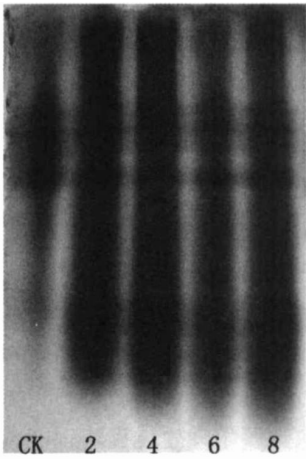


图 6  $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫下水鳖叶片 POD 同工酶酶谱  
Fig.6 POD isoenzymic zymogram in aerial parts of *H. dubia* under  $\text{Cu}^{2+}$  stress

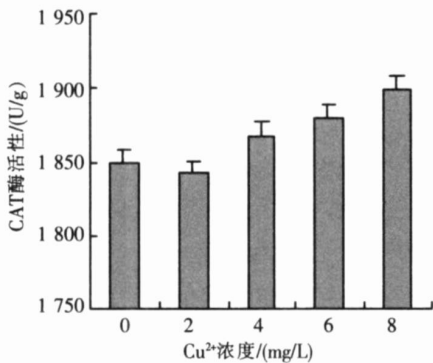


图 7  $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫下水鳖叶片 CAT 酶活性的变化  
Fig.7 Changes of CAT activity in aerial parts of *H. dubia* under  $\text{Cu}^{2+}$  stress

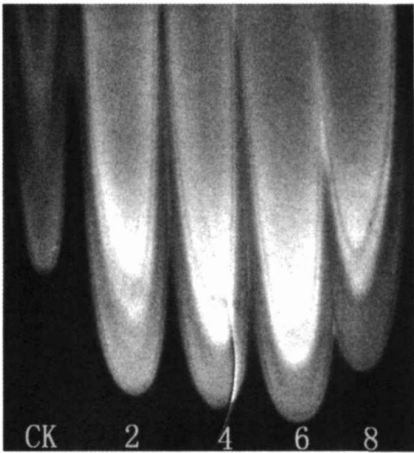


图 8  $\text{Cu}^{2+}$ 胁迫下水鳖叶片 CAT 同工酶酶谱  
Fig.8 CAT isoenzymic zymogram in aerial parts of *H. dubia* under  $\text{Cu}^{2+}$  stress

3 讨论

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<sup>[16]</sup>. 本实验中我们发现, 当把浮水植物水鳖培养在含不同  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的培养液中第 7 天后, 极大的破坏了正常水鳖叶片细胞的离子平衡: 一方面是明显促进了对  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{R Na}^{+}$ 、 $\text{M g}^{2+}$  的吸收, 而水鳖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  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  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  $\text{P}$ 、 $\text{K}^{+}$  的吸收, 这可能由于  $\text{Cu}^{2+}$  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。

前人研究表明重金属胁迫后,植物体可以通过诱导合成植物络合素<sup>[17]</sup>、金属硫蛋白<sup>[18]</sup>和胁迫蛋白<sup>[19]</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。但我们的研究却发现,各  $\text{Cu}^{2+}$  处理浓度都使水鳖叶片内的可溶性蛋白含量不断下降。周长芳等<sup>[2]</sup>的研究认为,这可能是由于其与  $-\text{SH}$  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 1, B) 结果也证明,经  $\text{Cu}^{2+}$  处理后,明显导致了对照条带图谱中相对分子质量为 16 900 和 25 600 多肽的表达量的减少。6 mg/L 浓度处理后,引起了 25 600 多肽表达量的减少。浓度达到 8 mg/L 时,除了蛋白条带亮度明显减弱外,还导致了 70 300 多肽的消失。这说明重金属  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫不仅抑制了水鳖体内新蛋白的产生,还加强了原有蛋白质的降解。

重金属胁迫的另一个重要原因是造成体内 ROS 的积累,引发生物膜脂的过氧化,并由此产生脂质过氧化产物 MDA,从而破坏膜系统的结构和功能。SOD 是 Mehler 反应产物  $\text{O}_2^-$  的关键性清除酶,其催化  $\text{O}_2^-$  发生歧化反应,转化成氧化性较弱的  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[20]</sup>,  $\text{H}_2\text{O}_2$  又在 CAT 和 POD 酶的作用下生成  $\text{H}_2\text{O}$ <sup>[21]</sup>,以降低活性氧对植株的毒害作用。三者的活性协调一致,维护膜系统的稳定性。但是由于酶的活性有一个阈值, SOD、POD 和 CAT 对膜系统的保护作用是有其一定限度的。本实验中,经过  $\text{Cu}^{2+}$  处理后,水鳖叶片中的保护酶失去了原有的平衡,导致体内  $\text{H}_2\text{O}_2$  过度积累,造成膜质过氧化物 MDA 迅速升高,即证明  $\text{Cu}^{2+}$  打破了活性氧产生和清除的平衡,诱导产生氧化胁迫。MDA 累积反过来又加剧了植物细胞的伤害,因为 MDA 可与蛋白结合,引起蛋白质分子内和分子间交联,从而使它们的结构功能和催化功能发生变化。 $\text{Cu}^{2+}$  胁迫下叶片 GR 活性显著上升,这有利于 GSH 含量提高、促进 PC 的合成,或者激活 ASA-GSH 循环途径使 APX 活性得以提高<sup>[21]</sup>,这些生理生化反应都能减缓  $\text{Cu}^{2+}$  造成的氧化损伤,从而增强水鳖对  $\text{Cu}^{2+}$  毒害的耐受性。与其它保护酶相比,  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫后水鳖抗氧化酶系统中 GR 活性的上升趋势最为明显,为此我们推测 GR 可能在水鳖对  $\text{Cu}^{2+}$  的耐性中起关键作用,这将有待对其它浮水植物比较实验后证实。

同工酶作为植物体内最活跃的酶系之一,它的合成和活性始终受到体内遗传基因的控制和调节。外界不良环境常常通过引起基因的变异而导致酶结构及活性的改变<sup>[22]</sup>,这种改变反映在同工酶的酶谱上,出现了不同数量及表达量的谱带,通过同工酶的分析可以初步了解植物对不良环境的适应及基因的变异情况。金属胁迫对 POD、SOD 同工酶表达的影响已有报道,如  $\text{Cu}^{2+}$  可诱导水花生叶中 SOD 同工酶的表达<sup>[2]</sup>,  $\text{Zn}^{2+}$  影响水鳖叶中 POD、SOD 同工酶的表达<sup>[23]</sup>。本试验研究表明,不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  处理水鳖叶片的同工酶及其活性的测定结果是一致的。SOD 随  $\text{Cu}^{2+}$  浓度增加其活性下降,谱带数及表达量均减少。CAT 活性变化趋势不大,同工酶谱上表达量略作改变而无酶带变化,说明 CAT 对  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫不敏感。而 POD 活性表现出迅速上升的变化趋势,酶谱带数和表达量上均增多,这可能是水鳖叶片 POD 对  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫的应激反应,这与前人<sup>[20]</sup>的研究结果(重金属胁迫下植物叶片的 POD 活性总是显著增加)相吻合。相比之下,  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫下水鳖叶片的 3 种抗氧化酶中只有 POD 起关键性作用。因此本文作者认为,水鳖叶片在遭受  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫后,活性氧代谢系统失调的主要产物为  $\text{O}_2^-$ ,而非  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,具体机制尚需进一步试验证实。

本文研究证明,重金属  $\text{Cu}^{2+}$  对水鳖的毒害是对矿质营养、保护酶系统等生理生化反应和细胞的整体伤害,破坏了植物进行正常生理代谢所必需的生理基础,最终导致植物的死亡。 $\text{Cu}^{2+}$  对水鳖的致死浓度范围在 2~4 mg/L。

## [参考文献]

- [1] 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[J]. 生态学报, 2006, 26(6): 2 041-2 047.
- [2] 周长芳,吴国荣,施国新,等. 水花生抗氧化系统在抵御  $\text{Cu}^{2+}$  胁迫中的作用[J]. 植物学报, 2001, 43(4): 389-394.
- [3] Prasad M N V, Malek P, Waloszek A, et al. Physiological response of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation[J]. Plant Sci. 2001(161): 881-889.
- [4] 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[J]. 实验生物学报, 2004, 37(6): 461-468.
- [5] Dalka V F, La R N, Moro I, et al. Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Eubiea Canadensis* exposed to cadmium[J]. Plant Sci. 2005(168): 329-338.

- [ 6 ] 许丙军, 施国新, 徐勤松, 等. 外源抗坏血酸对镉胁迫下黑藻抗氧化系统的保护作用 [ J ]. 应用生态学报, 2006 17 ( 9 ): 1766-1768
- [ 7 ] Beyer W E, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of changes in conditions [ J ]. Analytical Biochemistry, 1987 ( 161 ): 559-566
- [ 8 ] 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
- [ 9 ] Ulf Karsten. 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
- [ 10 ] 罗广华, 王爱国. 植物 SOD 同工酶活性显示及某些干扰 [ J ]. 植物生理学通讯, 1993 29 ( 2 ): 119-122
- [ 11 ] 胡能书, 万贤国. 同工酶技术及其应用 [ M ]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985 97
- [ 12 ] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [ M ]. 北京: 科学出版社, 1999 54-87
- [ 13 ] 王爱国, 罗广华. 植物的超氧化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
- [ 14 ] Vitria A P, Lea P J, Azevedo R A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues [ J ]. Phytochemistry, 2001 ( 57 ): 701-710
- [ 15 ] Heath R L, Parker L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [ J ]. Arch Biochem, 1968 ( 25 ): 189-193
- [ 16 ] Morales E, Abadia A, Gomez-Aparis J. Effects of combined NaCl and  $\text{CaCl}_2$  salinity on photosynthetic parameters of barley grown in nutrient solution [ J ]. Plant Physiol, 1992 ( 86 ): 419-426
- [ 17 ] Dupont FM, Hurkman W J, Vense W H, et al. Differential accumulation of sulfur-rich and sulfur-poor wheat flour proteins is affected by temperature and mineral nutrition during grain development [ J ]. Journal of Cereal Science, 2006 ( 44 ): 101-112
- [ 18 ] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis [ J ]. Annu Rev Plant Biol, 2002 ( 53 ): 159-182
- [ 19 ] Sofia M E, Boris A M, Irina V G, et al. Heat shock protein HSP70 expression and DNA damage in Balkian sponges exposed to model pollutants and wastewater from Bakaisk Pulp and paper plant [ J ]. Aquatic Toxicology, 2002 ( 57 ): 267-280
- [ 20 ] Fang W C, Kao C H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc [ J ]. Plant Sci, 2000 ( 158 ): 71-76
- [ 21 ] Schtitzendibela, Nikolova P, Rudolf C, et al. Cadmium and  $\text{H}_2\text{O}_2$  - induced oxidative stress in *Populus canadensis* roots [ J ]. Plant Physiol Biochem, 2002 ( 40 ): 577-584
- [ 22 ] Van Assche F, Clijsters H. Effects of metal on enzyme activity in plants [ J ]. Plant cell Environ, 1990 ( 13 ): 195-206
- [ 23 ] 郝怀庆, 施国新.  $\text{Zn}^{2+}$  对水鳖的毒性作用 [ J ]. 应用与环境生物学报, 2001, 7 ( 6 ): 526-531

[ 责任编辑: 孙德泉 ]