镍胁迫对菹草 (*Potamogeton crispus* L.) 活性氧及脯氨酸代谢的影响*

陈霖, 姜岩, 汪鹏合, 施国新**, 乔绪强, 田秀丽

(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: 本文以组织培养技术培养的菹草无菌苗为实验材料, 研究了不同浓度 (0、0.05、0.10、0.15、0.20 mmol/L) Ni^{2+} 胁迫对菹草过氧化氢 (H_2O_2)、超氧阴离子 (O_2^-) 和丙二醛 (MDA) 的含量、抗氧化系统、脯氨酸代谢途径的影响。结果显示: (1) Ni^{2+} 胁迫影响了活性氧水平, 主要表现为 H_2O_2 和 O_2^- 的大量积累; MDA 含量也随着 Ni^{2+} 浓度的升高呈上升趋势; (2) 随着 Ni^{2+} 浓度的升高, 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性及还原型谷胱甘肽 (GSH)、非蛋白巯基 (NP-SH) 含量均表现为先升后降趋势; 抗坏血酸 (AsA) 含量变化不明显; 植物络合素 (PCs) 则表现为上升趋势; (3) 脯氨酸代谢关键酶在 Ni^{2+} 胁迫下表现为: 鸟氨酸转氨酶 (OAT) 活性在 0~0.10 mmol/L Ni^{2+} 胁迫下高于对照组; 吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS) 活性在 Ni^{2+} 大于 0.10 mmol/L 时, 显著增加; 脯氨酸脱氢酶 (ProDH) 活性无显著变化; 脯氨酸 (Pro) 含量则均显著高于对照组。以上结果表明, Ni^{2+} 胁迫提高了活性氧的水平, 加重了膜脂氧化的程度, 干扰了抗氧化系统的内在平衡; 此外, 低浓度 Ni^{2+} 胁迫下菹草脯氨酸积累主要依赖于鸟氨酸途径, 而高浓度下则主要依靠谷氨酸途径。

关键词: 菹草; Ni^{2+} 胁迫; 活性氧; 脯氨酸代谢

Effect of nickel stress on reactive oxygen species and proline metabolism of *Potamogeton crispus* L.

CHEN Lin, JIANG Yan, WANG Penghe, SHI Guoxin, QIAO Xuqiang & TIAN Xiuli

(Jiangsu Key Lab of Biodiversity and Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, P. R. China)

Abstract: Sterile seedlings of *Potamogeton crispus* were cultured by tissue culture technique, and used as experimental materials. In this study, different concentrations of Ni^{2+} (0, 0.05, 0.10, 0.15 and 0.20 mmol/L) on contents of hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion (O_2^-) and malondialdehyde (MDA), antioxidant defense system and proline metabolism were investigated. The results indicated that (1) Ni^{2+} stress triggered the generation of reactive oxygen species (ROS) as evidenced by a substantial accumulation of H_2O_2 and O_2^- , accompanied by the increased MDA content with the increasing of Ni^{2+} concentration; (2) Activities of superoxide dismutase (SOD), peroxides (POD) and catalase (CAT), as well as contents of reduced glutathione (GSH) and non-protein thiols (NP-SH) increased at first and then decreased, while no outstanding changes were observed in ascorbate (AsA) content, and level of phytochelatin (PCs) increased significantly; (3) Analysis of enzyme activities showed that the accumulation of proline induced by Ni^{2+} stress is due to the increases of ornithine- δ -aminotransferase (OAT) at 0.05–0.10 mmol/L and pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) activity at 0.15–0.20 mmol/L, respectively, but there was not a statistically significant difference in ProDH activity. Our results demonstrated that Ni^{2+} induced the enhancement of reactive oxygen species level, aggravated lipid peroxidation and interfere with intrinsic balance of antioxidant defense system. In addition, proline accumulation is mediated by increased biosynthesis from ornithine at low concentrations (0.05 and 0.10 mmol/L), while glutamate pathway, instead of the ornithine pathway, plays a vital role when exposed to higher concentrations of Ni^{2+} .

Keywords: *Potamogeton crispus* L.; Ni^{2+} stress; reactive oxygen species; proline metabolism

* 江苏高校优势学科建设工程项目 (164320H106) 资助. 2012-03-30 收稿; 2012-07-09 收修改稿. 陈霖, 女, 1987 年生, 硕士研究生; E-mail: luanchenlin@126.com.

** 通信作者; E-mail: gxshi@njnu.edu.cn.

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,进入水环境的 Ni^{2+} 呈逐年上升之势,并已成为水环境主要的金属污染物之一^[1]. 据估计全球每年释放到环境中的有毒重金属高达数百万吨,其中镍为 $38.1 \times 10^5 \text{ t}$ ^[2]. 而我国,受重金属污染的农田面积在不断增加、土壤污染程度有加重的趋势,如广东省海口市某电镀厂废水使得下游农田土壤中镍含量超过允许限值4.54倍、生菜和菜心分别超过允许限值的0.75倍和1.23倍^[3]. 镍虽为植物的必需微量元素,但其含量若超过临界值,则不利于植物的正常生长,甚至会破坏植物细胞核仁结构,降低叶片叶绿素含量,影响活性氧水平及抗氧化系统等^[4-7]. 脯氨酸是植物体内的渗透调节物质,它还可以参与氧自由基清除,从而降低重金属诱发的氧化胁迫对植物的伤害^[8-9]. 大量资料表明,在干旱、高盐、极端温度、冰冻、紫外线胁迫等条件下,植物体会通过脯氨酸合成的增加和降解的减少提高体内脯氨酸的含量以保护细胞膜系统,维持细胞内酶的结构^[10-12]. 目前,关于脯氨酸代谢途径的研究主要集中于盐胁迫^[13-15],而对于水生植物抵抗重金属胁迫方面却很少涉及.

目前关于重金属毒害机制的实验材料均来自于野外植物体,实验结果容易受外界环境的限制. 而本文以植物组织培养技术培育出的菹草无菌苗为实验材料,重复性强,数据更为可靠、准确. 本文通过研究不同浓度 Ni^{2+} 胁迫对菹草 H_2O_2 、 O_2^- 及MDA、抗氧化酶(SOD、POD、CAT)、抗氧化剂(AsA、GSH、NP-SH和PCs)的影响,以期对植物的抗性原理增加相关的理论依据. 并研究 Ni^{2+} 胁迫下菹草脯氨酸含量及其代谢途径关键酶的变化,试图揭示 Ni^{2+} 胁迫下脯氨酸积累的生化机制.

1 材料和方法

1.1 供试材料

菹草(*Potamogeton crispus* L.), 眼子菜科(Potamogetonaceae)眼子菜属(*Potamogeton*), 多年水生草本植物. 于2010年11月采自南京市琵琶湖水域,以幼嫩菹草带节间的茎段培养的无菌苗为研究对象.

1.2 试验方法

1.2.1 菹草无菌苗的培养 取生长旺盛的菹草去除根和叶,用清水冲洗干净. 依次经过5%的 H_2O_2 15 min、10%的NaClO 30 s消毒,然后用无菌水清洗6遍后,将其剪成1 cm左右. 辨认形态学上端后,插入到添加6-BA(2.0 mg/L)和IBA(0.5 mg/L)MS培养基中诱导芽分化. 待茎间侧芽长至2 cm之时,转入添加6-BA(1.0 mg/L)的继代培养基中培养. 在继代培养基中培养一个月后,转入灭菌的1/10 Hongland 培养液中生根培养. 生长期均在培养室中完成,光照周期为16 h: 8 h(L:D),光照强度为240~300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗温度为25℃: 18℃(L:D).

1.2.2 菹草无菌苗 Ni^{2+} 处理 选取大小相似、生长状况一致的菹草无菌苗置于含0、0.05、0.10、0.15、0.20 mmol/L NiCl_2 (以纯 Ni^{2+} 计)的无菌1/10 Hongland 培养液中,实验条件与培养菹草无菌苗时一致. 处理5 d后进行生理指标测定,实验重复3次.

1.2.3 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和MDA含量的测定 O_2^- 产生速率用王爱国等^[16]的方法测定; H_2O_2 的含量采用分光光度法,用南京建成生物工程 H_2O_2 试剂盒测定;MDA含量按文献^[17]测定.

1.2.4 SOD、POD和CAT活性的测定 SOD活性测定采用NBT光化还原法^[18],以抑制NBT光还原50%所需的酶量为1个酶活性单位(U);POD活性测定采用愈创木酚方法^[19],以每分钟 OD_{470} 的变化为1个酶活性单位(U);CAT活性测定采用钼酸盐方法^[20],以每分钟分解1 μmol H_2O_2 所需的酶量为一个酶活性单位(U).

1.2.5 GSH、AsA、非蛋白巯基和植物络合素含量测定 GSH和AsA含量测定用陈建勋等^[21]的方法;非蛋白巯基(NP-SH)和植物络合素(PCs)含量测定用Nouairi等的方法^[22].

1.2.6 脯氨酸含量及P5CS、OAT、ProDH活性的测定 脯氨酸含量用酸性茚三酮法^[23];吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)活性的测定参照赵贵林等的方法^[24],以 $\Delta\text{OD}_{535} \text{ h}^{-1}$ 表示一个酶活单位(U);鸟氨酸转氨酶(OAT)和脯氨酸脱氢酶(ProDH)活性的测定参照Yang等^[25]的方法,分别以 ΔOD_{510} 和0.1 $\Delta\text{OD}_{340} \text{ min}^{-1}$ 为一个酶活单位(U).

1.3 统计分析

每个处理重复3次,实验结果为其平均值 $\pm$ 标准差. 运用Excel进行各项指标与 Ni^{2+} 浓度的相关性分析

并完成制图,用相关系数 r 对各指标与 Ni^{2+} 浓度间进行相关性统计; $P < 0.05$ 表示显著相关; $P < 0.01$ 表示极显著相关.由 SPSS 17.0 统计软件对各数据均值进行“单因素方差分析”完成数值间的差异性分析; $P < 0.05$,表示差异显著; $P < 0.01$,表示差异极显著,本文图表中不同小写字母表示数值之间差异显著($P < 0.05$),相同字母之间差异不显著.

2 实验结果

2.1 Ni^{2+} 对菹草 H_2O_2 含量、 O_2^- 产生速率和 MDA 含量的影响

当 Ni^{2+} 浓度为 $0 \sim 0.10$ mmol/L 时,菹草 H_2O_2 含量呈上升趋势,并在 0.10 mmol/L 处理浓度时达到最大值,是对照组的 1.75 倍,随着浓度进一步升高, H_2O_2 含量略微降低,但仍高于对照组(图 1A); O_2^- 和 MDA 的含量随着处理浓度的增加均呈上升趋势,并在 0.20 mmol/L 处理浓度时达到最大值,分别为对照组的 1.45 和 1.43 倍(图 1B、C);统计分析表明,处理组中菹草 H_2O_2 、 O_2^- 和 MDA 含量与对照组相比,均表现为显著差异($P < 0.05$);其中, O_2^- 的含量变化与 Ni^{2+} 处理浓度间呈极显著正相关($r_{\text{O}_2^-} = 0.9840$; $P < 0.01$);MDA 含量变化与 Ni^{2+} 处理浓度间呈显著正相关($r_{\text{MDA}} = 0.8213$; $P < 0.05$).

图 1 Ni^{2+} 胁迫对菹草 H_2O_2 、 O_2^- 产生速率和 MDA 含量的影响

Fig. 1 Effects of Ni^{2+} stress on H_2O_2 content, O_2^- generation rate and MDA content in *P. crispus*

2.2 Ni^{2+} 对菹草 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

SOD、POD 和 CAT 活性随着 Ni^{2+} 浓度的升高,均表现出先升后降的趋势.在 0.05 mmol/L Ni^{2+} 时,SOD 活性最高为对照组的 1.77 倍,随着处理浓度的逐渐升高,SOD 的活性逐渐降低但均高于对照组(图 2A);处理组的 POD 活性与对照组相比,分别为对照组的 1.23 、 1.30 、 1.31 和 1.19 倍(图 2B);CAT 的活性则在 Ni^{2+} 浓度为 0.05 mmol/L 时达到最大值,为对照组的 1.31 倍,随 Ni^{2+} 浓度升高逐渐降低,且在 0.20 mmol/L Ni^{2+} 处理时达到最低值,仅为对照组的 70.39% (图 2C).统计分析表明,处理组中 SOD 和 POD 的活性变化与对照组相比,均达到显著性差异水平($P < 0.05$);CAT 活性变化除 0.15 mmol/L Ni^{2+} 处理组外,其他各处理组与对照组相比均达到显著性差异($P < 0.05$).

图 2 Ni^{2+} 胁迫对菹草 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

Fig. 2 Effects of Ni^{2+} stress on SOD, POD and CAT activities in *P. crispus*

2.3 Ni²⁺对菹草 AsA、GSH、NP-SH 和 PCs 含量的影响

AsA 含量随着 Ni²⁺ 浓度的升高变化均不明显;GSH 和 NP-SH 的含量则随着胁迫浓度的增加均表现出先升后降的趋势,并在 0.10 mmol/L Ni²⁺ 浓度下达到最大值,分别为对照组的 1.57 倍和 1.52 倍;在 0.05 mmol/L Ni²⁺ 胁迫下菹草 PCs 的含量变化不明显,随着 Ni²⁺ 浓度的进一步增加,PCs 含量则表现为上升趋势,在 0.20 mmol/L Ni²⁺ 浓度下达到最大值,为对照组的 1.54 倍(表 1).统计分析表明,处理组中 AsA 含量与对照组相比均无显著性差异($P > 0.05$);处理组 GSH 含量与对照组相比,也只有 0.10 和 0.15 mmol/L Ni²⁺ 浓度下表现为显著性差异($P < 0.05$);而 NP-SH 和 PCs 含量,除 0.05 mmol/L Ni²⁺ 浓度外其他各处理组均与对照组达到显著性差异水平($P < 0.05$);其中,PCs 的含量变化与 Ni²⁺ 处理浓度间呈极显著正相关($r_{PCs} = 0.9654; P < 0.01$).

表 1 Ni²⁺胁迫对菹草 AsA、GSH、NP-SH 和 PCs 含量的影响
Tab. 1 Effects of Ni²⁺ stress on AsA, GSH, NP-SH and PCs contents in *P. crispus*

指标	Ni ²⁺ 浓度/(mmol/L)				
	0	0.05	0.10	0.15	0.20
AsA/(mg/g(FW))	1.96 ± 0.11 ^a	2.04 ± 0.10 ^a	2.13 ± 0.20 ^a	1.94 ± 0.14 ^a	2.01 ± 0.18 ^a
GSH/(mg/g(FW))	7.32 ± 0.61 ^c	7.85 ± 0.65 ^{bc}	11.4 ± 1.21 ^a	9.13 ± 0.58 ^b	8.75 ± 0.70 ^{bc}
NP-SH/(μmol/g(FW))	30.53 ± 2.18 ^c	33.20 ± 1.99 ^c	46.52 ± 4.15 ^a	40.45 ± 3.01 ^b	39.2 ± 2.20 ^b
PCs/(μmol/g(FW))	6.92 ± 0.54 ^b	7.82 ± 0.17 ^b	9.74 ± 1.01 ^a	9.97 ± 0.43 ^a	10.68 ± 0.55 ^a

2.4 Ni²⁺对菹草脯氨酸含量及脯氨酸代谢关键酶活性的影响

2.4.1 Pro 含量的变化 在 Ni²⁺ 胁迫下,Pro 含量均高于对照组,并在 0.15 mmol/L 时其含量达到最大值,为对照组的 1.61 倍(图 3A).统计分析表明,处理组 Pro 的含量与对照组相比均达到显著差异水平($P < 0.05$).

2.4.2 P5CS、OAT、ProDH 活性的变化 低浓度 Ni²⁺ 处理时,菹草 P5CS 活性变化不大,当 Ni²⁺ 浓度高于 0.10 mmol/L 时,P5CS 的活性开始急速上升,并在 0.20 mmol/L Ni²⁺ 处理时达到最大值,为对照组的 1.39 倍(图 3B);随着处理浓度的升高,OAT 的活性变化表现为先升后降的趋势,在 Ni²⁺ 浓度为 0.10 mmol/L 时达到最大值为对照组的 1.29 倍(图 3C);ProDH 的活性随着 Ni²⁺ 浓度的升高无显著变化(图 3D).统计分析表明,0.15 和 0.20 mmol/L Ni²⁺ 处理组的 P5CS 活性与对照组相比较达到了显著差异水平($P < 0.05$);除 0.15 mmol/L Ni²⁺ 处理组外,OAT 的活性与对照组相比均表现为显著性差异水平($P < 0.05$);ProDH 活性均与对照无显著性差异($P > 0.05$);其中,P5CS 活性的变化与 Ni²⁺ 处理浓度间达到显著正相关($r_{P5CS} = 0.8913; P < 0.05$).

3 讨论

重金属胁迫对植物的重要毒害机制之一是导致过量活性氧的产生,从而影响其正常代谢^[26].本实验结果表明,重金属 Ni²⁺ 导致了菹草体内 O₂⁻ 和 H₂O₂ 的大量积累.在高浓度 Ni²⁺ 胁迫下,H₂O₂ 含量略有下降,这是由于:1) 菹草体内 POD 和 CAT 的分解作用,本文中 CAT 活性在高浓度(大于 0.10 mmol/L)Ni²⁺ 下被明显抑制,因此 POD 在此过程起主要作用;2) 高浓度 Ni²⁺ 胁迫下 SOD 活性下降,H₂O₂ 生成量降低;3) 产生的 H₂O₂ 与 O₂⁻ 反应生成了羟自由基(·OH),进而导致了细胞膜的膜脂过氧化.MDA 是膜脂过氧化的主要产物之一,其含量是反映膜脂过氧化作用强弱和质膜受破坏程度的重要指标^[27].本文中,MDA 的含量随着浓度的增加不断增加,充分表明 Ni²⁺ 破坏了细胞膜的稳定性,对膜结构产生了氧化损伤.

植物体内的 SOD、POD 和 CAT 是活性氧酶促清除系统的关键酶.SOD 能够将 O₂⁻ 歧化成 H₂O₂,抑制 Haber-Weiss 反应,CAT 和 POD 可将 H₂O₂ 分解成 H₂O,从而阻止 O₂⁻ 和 H₂O₂ 的积累^[28].本实验结果表明,SOD 活性先升后降,但仍高于对照组.在正常的生理条件下,O₂⁻ 的积累可诱导 SOD 活性上升,但随着胁迫加重,其活性反而受其衍生物 H₂O₂ 和 ·OH 的抑制^[29-30].在 Ni²⁺ 胁迫下,POD 相比 CAT 表现出更好的稳定性,其活性处理组始终高于对照组.高浓度 Ni²⁺ 胁迫下 CAT 活性受到抑制可能是由于 O₂⁻ 的过量积累导

致^[30]. 然而,两者共同作用并未有效清除 H_2O_2 , 其含量始终高于对照组. 另外, $O_2^{\cdot -}$ 呈不断上升趋势, 充分表明抗氧化酶不能有效阻止由 Ni^{2+} 毒害导致的植物体内过量活性氧的产生.

同时,植物体内还存在 NP-SH、PCs、GSH 和 AsA 等活性氧非酶促清除系统^[31]. Mishra 等研究认为, NP-SH在抵抗重金属胁迫中起到了非常重要的作用,它一方面可以作为 PCs 合成的前体,另一方面可直接作为抗氧化剂抵抗重金属导致的氧化胁迫^[32]. 本文结果可以看出, NP-SH 含量比对照组均有所升高,这与 Mishra 等^[32] 在对 Cd 胁迫下假马齿苋的研究结果一致. GSH 一方面可以直接同 ROS 反应,将其还原,另一方面其自身的巯基可被氧化形成 GSSG,防止由氧化逆境诱导的蛋白质变性^[33-35]. Xiang 等^[36] 认为 H_2O_2 的过量积累可诱导编码 GSH 合成酶的 mRNA 解除抑制,以增加 GSH 的含量. 本实验中, GSH 含量除 0.05 mmol/L Ni^{2+} 处理组外均显著高于对照组,且与 H_2O_2 变化趋势保持一致. 高浓度下其含量下降的原因可能是 GSH 作为 PCs 的前体参与了 PCs 的合成过程. PCs 是植物体内由重金属诱导的能络合重金属的富含 Cys 的多肽^[37], 其巯基与重金属离子络合形成无毒的化合物,减少细胞内游离的重金属离子的浓度,从而减轻重金属的毒害作用^[31]. 本实验结果显示, PCs 含量与 Ni^{2+} 浓度呈极显著正相关,表明 Ni^{2+} 胁迫可诱导 PCs 在菹草体内大量积累. AsA 不仅可在 Halliw-Asada 循环中作为 APX 的底物清除 H_2O_2 ^[38], 同时还可还原 $O_2^{\cdot -}$, 清除 $\cdot OH$, 猝灭 O_2 , 歧化 H_2O_2 , 再生为 α -生育酚^[39]. 本实验研究发现, 与对照相比各处理组 AsA 含量均没有显著增加,表明 Ni^{2+} 胁迫下 AsA 在清除氧自由基中未发挥作用.

图3 Ni^{2+} 胁迫对菹草脯氨酸含量及 P5CS、OAT 和 ProDH 活性的影响

Fig. 3 Effects of Ni^{2+} stress on proline content, P5CS, OAT and ProDH activities in *P. crispus*

脯氨酸除了作为渗透调节物质以外,具有保护蛋白质、生物膜、亚细胞结构和清除活性氧等功能,在保护植物细胞免受重金属胁迫伤害中起到非常重要的作用^[40]. 文锦芬等研究发现 Pro 预处理可抑制 Cd^{2+} 胁迫诱导的烟草细胞 H_2O_2 的产生^[41]; Ozden 等^[42] 的研究表明, Pro 预处理的葡萄叶片,能降低其在 H_2O_2 胁迫下的 H_2O_2 和 MDA 含量. 本研究结果显示,在 Ni^{2+} 胁迫下,脯氨酸含量均有所上升,由此证实了 Pro 的积累是植物在逆境下细胞结构和功能遭受伤害时机体做出的防护效应. 植物细胞中脯氨酸合成有谷氨酸和鸟氨酸两条途径,谷氨酸途径的关键酶为吡咯啉-5-羧酸合成酶 (P5CS),鸟氨酸转氨酶 (OAT) 为鸟氨酸途径的关键酶^[43]. Zhen 等在对芦苇的研究中发现,在盐胁迫条件下,谷氨酸途径是脯氨酸合成的主要途径^[44];但 Chen 等^[45] 研究发现,铜胁迫下水稻叶片的脯氨酸合成途径则以鸟氨酸途径为主. 因此,脯氨酸积累途径因植物的种类、生理状态及环境胁迫因子的不同而有所差异. 在本研究中,低浓度 (0.05 ~ 0.10 mmol/L) Ni^{2+} 胁迫下,

OAT 活性明显上升,说明在低浓度 Ni^{2+} 胁迫下,Pro 的合成途径主要是鸟氨酸合成途径.然而,当 Ni^{2+} 浓度达到 0.15 mmol/L 时,OAT 活性下降,P5CS 活性则被明显激活,表明高浓度 Ni^{2+} 胁迫下菹草主要依靠谷氨酸途径来增加脯氨酸的积累.同时,脯氨酸的积累还依赖于 ProDH 催化的脯氨酸降解^[10].在本实验中,菹草 ProDH 在 Ni^{2+} 胁迫下变化不明显,说明脯氨酸的降解对 Ni^{2+} 胁迫下脯氨酸积累的作用不大,这与 Chen 等^[45] 的研究结果一致.

综上所述,重金属 Ni^{2+} 可诱导 H_2O_2 、 O_2^- 和 MDA 在菹草无菌苗体内大量积累,产生了明显的氧化胁迫.抗氧化酶(SOD、POD 和 CAT)和抗氧化剂(AsA、GSH、NP-SH 和 PCs)均能在一定范围内降低体内活性氧的过量积累,但随着胁迫浓度的增加, Ni^{2+} 最终使抗氧化系统发生紊乱,进而对菹草生理和生化反应造成整体伤害,破坏了植物的正常生理代谢.同时,菹草通过依次激活鸟氨酸途径和谷氨酸途径的关键酶来增加脯氨酸的含量,在抵抗镍胁迫造成的植物毒害的机制中发挥着重要作用.

4 参考文献

- [1] Gomes-Junior RA, Moldes CA, Delite FS *et al.* Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, **44**:420-429.
- [2] 马放,冯玉杰,任南琪.环境生物技术.北京:化学工业出版社,2003:124-126.
- [3] 廖金凤.电镀废水中铜锌铬镍对农业环境的影响.农村生态环境,1999,**15**(4):52-55.
- [4] 李晓玲,张义贤.氯化镍对绿豆和大麦核仁结构损伤的研究.山西大学学报:自然科学版,2006,**29**(3):313-316.
- [5] 郑爱珍.镍对大豆、玉米生长早期膜脂过氧化的影响.种子,2007,**26**(7):14-16.
- [6] 刘鹏刚,张玉秀,张媛雅等.垂序商陆对镍胁迫的抗氧化影响研究.西北林学院学报,2006,**26**(3):45-49.
- [7] Zhao J, Shi GX, Yuan QH. Polyamines content and physiological and biochemical responses to ladder concentration of nickel stress in *Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer leaves. *Biomaterials*, 2008, **21**:665-674.
- [8] Zhang LP, Mehta SK, Liu ZP *et al.* Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 2008, **49**:411-419.
- [9] Dinakar N, Nagajyothi PC, Suresh S *et al.* Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogaea* L. *Journal of Environmental Biology*, 2009, **30**(2):289-294.
- [10] Kishor PBK, Sangam S, Amrutha RN *et al.* Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 2005, **88**(3):424-438.
- [11] Ashraf M, Foolad MR. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, **59**:206-216.
- [12] 董秋丽,夏方山,董宽虎. NaCl 胁迫对芨芨草苗期脯氨酸代谢的影响.草业学报,2010,**19**:71-76.
- [13] 夏方山,董秋丽,董宽虎.盐胁迫对碱地风毛菊苗期脯氨酸代谢的影响.草地学报,2010,**18**(5):689-693.
- [14] 赵福庚,刘友良,张文华.大麦幼苗叶片脯氨酸代谢及其与耐盐性的关系.南京农业大学学报,2002,**25**(2):7-10.
- [15] 赵福庚,刘友良.大麦幼苗多胺合成比脯氨酸合成对盐胁迫更敏感.植物生理学报,2000,**26**(4):343-349.
- [16] 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.植物生理学通讯,1990,(6):55-57.
- [17] 李合生.植物生理生化实验原理和技术.北京:高等教育出版社,2000:164-165.
- [18] Beyer WF, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 1987, **161**(2):559-566.
- [19] 张志良,瞿伟菁.植物生理学实验指导:第3版.北京:高等教育出版社,2003:67-69,268-269.
- [20] Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 1991, **196**:143-151.
- [21] 陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导.广州:华南理工大学出版社,2002:125-127.
- [22] Nouairi I, Ben Ammar W, Ben Youssef N *et al.* Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. *Acta Physiologica Plantarum*, 2009, **31**(2):237-247.
- [23] Wang X, Shi GX, Xu QS *et al.* Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoides peltatum*. *Journal of Plant Physiology*, 2007, **164**(8):1062-1070.
- [24] 赵贵林,陈强,胡国霞等.水稻脯氨酸代谢关键酶对水分胁迫的响应.干旱地区农业研究,2011,**29**(3):80-83.
- [25] Yang YL, Zhang YY, Wei XL *et al.* Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars

- under short term lead stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, **74**:733-740.
- [26] 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. *环境科学*, 2007, **28**(9):2089-2095.
- [27] 杜琳,张荃. 植物谷胱甘肽与抗氧化胁迫. *山东科学*, 2008, **21**(2):28-32.
- [28] Fecht-Christoffers MM, Horst WJ. Does apoplastic ascorbic acid enhance manganese tolerance of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris*. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2005, **168**:590-599.
- [29] Fang YZ, Zheng RL. Theory and application of free radical biology. Beijing: Science Press, 2002:340-342.
- [30] Aravind P, Prasad MNV. Zinc alleviates cadmium induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2003, **41**:391-397.
- [31] Nouairi I, Ben Ammar W, Ben Youssef N *et al.* Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. *Acta Physiological Plantarum*, 2009, **31**(2):237-247.
- [32] Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD *et al.* Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, **44**:25-37.
- [33] 杜秀敏,殷文璇,赵彦修等. 植物中活性氧的产生及清除机制. *生物工程学报*, 2001, **17**(2):121-125.
- [34] 朱为民,丁海东,齐乃敏等. Cd^{2+} 胁迫对番茄幼苗抗坏血酸-谷胱甘肽循环代谢的影响. *华北农学报*, 2005, **20**(3):50-53.
- [35] Noctor G, Gomez L, Vanacker H *et al.* Interactions between biosynthesis compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany*, 2002, **53**(372):1283-1304.
- [36] Xiang C, Oliver DJ. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1998, **10**:1539-1550.
- [37] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, **53**(4):159-182.
- [38] Sun SQ, He M, Cao T *et al.* Antioxidative responses related to H_2O_2 depletion in *Hypnum plumaeforme* under the combined stress induced by Pb and Ni. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010, **163**:303-312.
- [39] Bartoli CG, Simontacchi M, Tambussi E *et al.* Drought and watering-dependent oxidative stress: Effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 1999, **50**:375-383.
- [40] Ashraf M, Foolad MR. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, **59**:206-216.
- [41] 文锦芬,杨双龙,龚明. Cd^{2+} 胁迫诱导烟草悬浮细胞脯氨酸积累的生化途径及外源脯氨酸对 Cd^{2+} 胁迫下 H_2O_2 产生的抑制作用. *植物生理学报*, 2011, **47**(4):392-398.
- [42] Ozden M, Demirel U, Kahraman A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H_2O_2 . *Scientia Horticulturae*, 2009, **119**:163-168.
- [43] Yang SL, Lan SS, Gong M. Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *Journal of Plant physiology*, 2009, **166**:1694-1699.
- [44] Zhen WB, Ma QH. Proline metabolism in response to salt stress in common reed [*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud]. *Botanica Marina*, 2009, **52**(4):307-315.
- [45] Chen CT, Chen LM, Lin CC *et al.* Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Science*, 2001, **160**:283-290.