

不同 pH 处理对菹草 (*Potamogeton crispus* L.) Cr^{6+} 毒害效应的影响^{*}

黄敏, 施国新^{**}, 夏海威, 吴娟, 乔绪强, 汪鹏合, 陈霖

(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 210023)

摘要: 对 Cr^{6+} 胁迫条件下不同 pH 处理对菹草无幼苗元素、光合色素、活性氧、丙二醛、抗氧化酶、脯氨酸 (Pro) 及多胺 (PAs) 含量的影响进行研究, 以探讨不同 pH 处理影响水生植物 Cr^{6+} 毒害效应的机制。结果表明: (1) 偏酸性 pH 处理加剧菹草对铬的蓄积, 而 pH 为 7.0 时 Cr^{6+} 胁迫所造成的矿质元素失衡有所减弱; (2) Cr^{6+} 胁迫下 pH 为 6.0 ~ 8.0 的处理延缓了菹草的失绿症状, 促进了光合色素的合成; (3) Cr^{6+} 胁迫下菹草超氧化物歧化酶、过氧化氢酶的活性在 pH 为 6.0 和 7.0 的处理组诱导程度最小; (4) Cr^{6+} 胁迫下 pH 为 6.0 和 7.0 处理的菹草 Pro 含量显著提高; (5) pH 为 4.0 和 5.0 的处理使腐胺 (Put) 含量显著提高, 而 pH 为 6.0 和 7.0 的处理则促进亚精胺 (Spd) 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 比值上升, 精胺 (Spm) 含量总体趋势为随 pH 值升高而逐步上升, 仅在 pH 为 4.0 和 5.0 的处理组中低于 Cr^{6+} 胁迫对照组。因此, pH 条件可影响菹草对铬及营养元素的积累, 抗氧化酶、Pro、PAs 代谢等生理生化过程, 导致铬毒性效应差异。在 pH 为 6.0 ~ 7.0 的范围内, 菹草能调节抗氧化酶系统, 较有效地清除体内活性氧, 提高机体中 Pro、PAs 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 比值, 减轻膜系统脂质过氧化, 维持机体内矿质元素平衡, 致使毒性效应达到最小程度。

关键词: 菹草; Cr^{6+} 胁迫; pH; 元素含量; 脯氨酸; 多胺

Toxicological effects of Cr^{6+} on *Potamogeton crispus* L. under different pH values

HUANG Min, SHI Guoxin, XIA Haiwei, WU Juan, QIAO Xuqiang, WANG Penghe & CHEN Lin

(*Jiangsu Key Lab of Biodiversity and Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, P. R. China*)

Abstract: Sterile seedlings of *Potamogeton crispus* were cultured by tissue culture technique which was used as experimental material. In this study, we investigated contents of element, photosynthetic pigments, reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and proline (Pro), polyamines (PAs) as well as activities of antioxidant enzymes in Cr^{6+} -treated *P. crispus* under different pH values so as to approach the physiological and biochemical mechanisms of pH value in affecting Cr^{6+} toxicity of aquatic plants. The results indicated that, (1) Acidic conditions enhanced the accumulation of Cr while pH 7.0 treatment helped *P. crispus* maintain the balance of nutrient elements; (2) pH 6.0, 7.0 and 8.0 treatments could retard the chlorosis and promote the biosynthesis of photosynthetic pigments; (3) Contents of ROS and MDA increased when the pH was 4.0, 5.0 and 9.0. Activities of superoxide dismutase and catalase were improved when the pH value was 4.0 and 5.0; However, activity of peroxides decreased with the increase of pH value; (4) In response to Cr^{6+} stress, plants showed sharp increase in proline content when the pH was 6.0 and 7.0; (5) An improved level of putrescine (Put) was noted in pH 4.0 and 5.0 treatments while spermidine (Spd) and free (Spd + Spm)/Put ratio increased in pH 6.0 and 7.0 treatments; For spermine (Spm) content, it generally increased with pH value and it was lower of the pH 4.0 and 5.0 treatments than that of the control group. Our results demonstrated that resistance of *P. crispus* to Cr^{6+} stress could be enhanced by reducing the excessive accumulation of Cr, promoting photosynthetic pigments, removing ROS efficiently, maintaining the balance of nutrient elements and keeping high levels of Pro, PAs as well as free (Spd + Spm)/Put ratio when pH value was within the range of 6.0 ~ 7.0.

^{*} 江苏高校优势学科建设工程项目 (164320H106) 资助。2013-06-19 收稿; 2013-09-30 收修改稿。黄敏 (1989 ~), 女, 硕士研究生; E-mail: huangmin1989824@163.com.

^{**} 通信作者; E-mail: gxshi@njnu.edu.cn.

Keywords: *Potamogeton crispus* L.; Cr^{6+} stress; pH value; element content; proline; polyamine

铬是发展国防、化工、农业等不可缺少的战略物资,被广泛应用于冶金、电镀、印染、印刷、农药化肥等领域^[1].但它又是剧毒且迁移性大的重金属元素,易随工农业废弃物进入环境,造成严重的水体铬污染,据统计我国每年排放铬渣近 $60 \times 10^4 \text{ t}$ ^[2].在较低水平下 Cr^{6+} 即对植物产生毒害作用,包括破坏营养和水分平衡^[3]、干扰色素合成、诱导线粒体电子传递失活^[4]、改变抗氧化酶活性、引起活性氧(ROS)代谢失调^[5]、破坏叶绿体和细胞膜的超微结构、对蛋白质及 DNA 等生物大分子造成损伤^[6],且通过食物链而对人、畜健康构成巨大威胁^[7].

作为重要的环境因素,pH 值会影响植物细胞内的多种代谢活动.据有关报道,在正常生长发育的植物细胞内存在精确的 pH 调控,细胞的代谢活动、DNA 复制、细胞分裂等均随 pH 值变化而被激活或抑制^[8].不适宜的 pH 值环境会造成植物营养元素缺乏,从而引起植株发育矮小、根系不发达等症状^[9-11].目前关于植物 pH 变化调控及其生理学意义已受到关注,但不同 pH 值对植物重金属胁迫影响的研究相对较少,尤其是对水生植物而言.研究表明,pH 值能对生物体结合重金属的活性位点产生显著的影响,不同重金属离子所要求的最佳吸附 pH 值也不同^[12-13].马尾藻对 Cd 吸附的最佳 pH 为 4.5,而石莼对 Cd 吸附的最佳 pH 为 8.0^[14].陈利等研究也发现 Cd^{2+} 对水稻幼苗的毒害直接受 pH 值影响,且在 pH 为 6.0 时水稻所受毒害程度较弱^[15].多胺(PAs)是一类高生物活性的脂肪族含氮碱,主要包括腐胺(Put)、亚精胺(Spd)和精胺(Spm),能促进植物的生长发育、延迟衰老、提高植物的抗逆性等,其在植物抵御氧化胁迫中的作用越来越受到关注^[16-19].

本文以沉水植物菹草无菌苗为实验材料,研究了 Cr^{6+} 胁迫条件下不同 pH 处理对菹草铬元素及矿物质元素积累、光合色素、ROS 水平及丙二醛(MDA)、抗氧化酶系统、脯氨酸(Pro)、多胺含量等生理指标的影响,分析了菹草体内各生理指标在 Cr^{6+} 毒害效应中的差异,以期对植物的抗性原理增添素材,同时为重金属污染水域的治理提供一定的理论参考.

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2012年4月采自南京市琵琶湖水域.以幼嫩菹草带节间茎段培养的无菌苗为研究对象.

1.2 实验方法

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)的 MS 培养基中诱导芽分化.待茎间侧芽长至 2 cm 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 1 个月后,转入灭菌的 1/10 Hoagland 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 $240 \sim 300 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光暗温度比为 $25^\circ\text{C} : 18^\circ\text{C}$ (L : D).

1.2.2 菹草无菌苗 Cr^{6+} 处理 选取大小相似,生长状况一致的菹草无菌苗,将挑选好的植株分成 3 组进行处理. Cr^{6+} 胁迫对照组:用含 0.05 mmol/L Cr^{6+} 的 1/10 Hoagland 营养液培养;pH 处理组:用含 0.05 mmol/L Cr^{6+} 的 1/10 Hoagland 营养液培养,且将 pH 分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 (使用 0.1 mmol/L HCl 或 0.1 mmol/L NaOH 溶液).实验条件与培养菹草无菌苗时的条件一致,实验过程中每天调 1 次 pH,每 2 d 换 1 次培养液.实验处理 8 d 后,测定生理指标,实验重复 3 次. Cr^{6+} 供试药品为重铬酸钾 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

1.2.3 元素含量的测定 称取菹草无菌苗 0.6 g (FW),硝酸和高氯酸消化后,用电感耦合等离子原子发射光谱仪(ICP-AES)(美国 Leeman 公司)进行测定.

1.2.4 叶绿素和类胡萝卜素含量的测定 称取 0.2 g (FW) 菹草无菌苗叶片,用 80% 的丙酮冰浴研磨,离心后用分光光度计(Thermo GENESYS 10)分别测定 470、647 和 663 nm 处的吸光度值,按 Lichtenthaler^[20] 的公式计算.

1.2.5 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量的测定 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率用羟胺氧化法^[21]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 含量用硫代巴比妥酸法^[22]测定。

1.2.6 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性的测定 SOD 活性测定采用氮蓝四唑(NBT)光化还原法,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,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法,以每分钟分解 1 μmol H_2O_2 所需的酶量为 1 个酶活性单位(U)。

1.2.7 Pro 和 PAs 含量的测定 Pro 含量用酸性茚三酮法测定^[23];PAs 含量采用 Aziz 等的高效液相色谱法测定^[24]。

1.3 统计分析

每个处理重复 3 次,实验结果为平均值 \pm 标准差。运用 Excel 进行各项指标的相关性分析并完成制图, $P < 0.05$ 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 ($P < 0.05$), 相同小写字母表示数值之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草元素含量的影响

当 Cr^{6+} 浓度为 0.05 mmol/L 时,菹草铬积累随 pH 值的增大呈下降趋势,尤其是 $\text{pH} > 7.0$ 的处理组,菹草中的铬含量急剧下降。相对于 Cr^{6+} 胁迫对照组而言, pH 为 4.0 和 5.0 的处理加剧了菹草中铬的积累。 pH 为 4.0 处理组,菹草对铬的吸收达到 77.66 $\mu\text{g/g}$ (FW),是 Cr^{6+} 胁迫对照组的 1.23 倍; pH 为 9.0 的处理组,菹草中铬含量仅为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 0.34 倍。统计分析表明,菹草中铬含量与 pH 值之间呈极显著负相关 ($r = -0.9778, P < 0.01$)。另外, Cr^{6+} 胁迫下不同矿质元素受 pH 值的影响不同。随着 pH 值的升高, Ca、P、Mg、Zn 含量均呈现先升后降趋势。B 含量的变化较特殊,它随着 pH 值的增大而升高,呈极显著正相关 ($r = 0.9659, P < 0.01$)。相对于 Cr^{6+} 胁迫对照组, pH 为 7.0 的处理组 Ca、P、Mg、Zn、B 含量均升高, pH 为 6.0 的处理组中各营养元素含量变化不大,而其他 pH 处理组均加重了 Ca、P、Mg 营养元素的损失,尤其是 pH 为 4.0 和 9.0 的处理组(表 1)。

表 1 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草元素含量的影响

Tab.1 Effects of different pH values on element contents in *P. crispus* under Cr^{6+} stress

实验处理	元素含量/($\mu\text{g/g}$ (FW))					
	Cr	Ca	P	Mg	Zn	B
Cr^{6+}	63.35 \pm 3.15 ^{bc}	1004.79 \pm 30.32 ^{bc}	1043.64 \pm 32.90 ^b	187.95 \pm 9.80 ^{bc}	22.35 \pm 0.58 ^b	8.26 \pm 0.38 ^d
$\text{Cr}^{6+}_{(\text{pH}=4.0)}$	77.66 \pm 4.19 ^a	660.03 \pm 40.82 ^e	711.63 \pm 32.74 ^e	128.34 \pm 10.78 ^e	19.34 \pm 0.69 ^e	6.73 \pm 0.49 ^e
$\text{Cr}^{6+}_{(\text{pH}=5.0)}$	68.81 \pm 3.31 ^b	884.24 \pm 35.93 ^d	915.83 \pm 53.09 ^e	174.05 \pm 8.17 ^e	23.17 \pm 0.65 ^b	8.10 \pm 0.37 ^{de}
$\text{Cr}^{6+}_{(\text{pH}=6.0)}$	58.67 \pm 3.57 ^{cd}	1016.19 \pm 53.89 ^b	1040.21 \pm 32.66 ^b	202.91 \pm 9.26 ^{ab}	23.90 \pm 1.06 ^b	8.82 \pm 0.40 ^d
$\text{Cr}^{6+}_{(\text{pH}=7.0)}$	52.92 \pm 3.16 ^d	1110.98 \pm 40.01 ^a	1130.93 \pm 49.01 ^a	219.70 \pm 12.66 ^a	26.90 \pm 0.90 ^a	10.63 \pm 0.52 ^c
$\text{Cr}^{6+}_{(\text{pH}=8.0)}$	27.13 \pm 2.40 ^e	922.40 \pm 24.09 ^{cd}	850.47 \pm 31.85 ^{cd}	173.22 \pm 9.80 ^c	19.94 \pm 0.86 ^c	13.82 \pm 0.98 ^b
$\text{Cr}^{6+}_{(\text{pH}=9.0)}$	21.46 \pm 2.92 ^e	899.11 \pm 56.34 ^d	784.68 \pm 31.04 ^{de}	151.41 \pm 9.00 ^d	18.40 \pm 0.98 ^c	17.13 \pm 1.06 ^a

2.2 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草光合色素含量的影响

Cr^{6+} 胁迫下,菹草叶片中叶绿素 a(Chl. a)、叶绿素 b(Chl. b)、胡萝卜素(Car)含量均随着 pH 值升高呈先升后降趋势(图 1)。Chl. a 含量在 pH 为 6.0、7.0 和 8.0 时较高,在 pH 为 7.0 时达最大值,为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 1.31 倍;最小值出现在 pH 为 4.0 时,仅为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 0.81 倍。Chl. b 含量在 pH 为 6.0 和 7.0 时较高,而在 pH 为 9.0 时含量最小,仅为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 0.77 倍。Car 含量在 pH 为 7.0 和 8.0 时升高,且中性或弱碱性处理的 Cr^{6+} 毒害菹草中的 Car 含量高于酸性处理组,在 pH 为 4.0 时达最小值,为 Cr^{6+} 胁迫

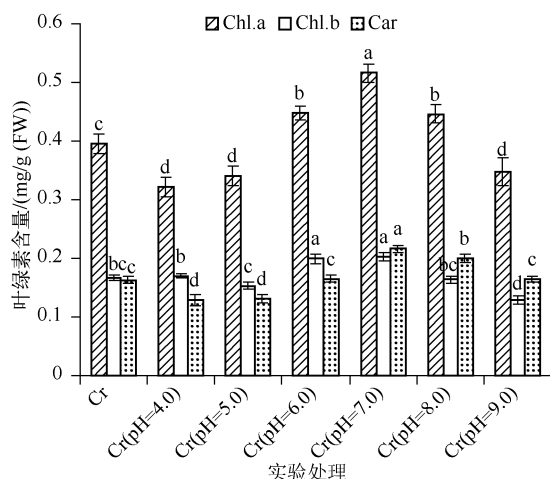


图1 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草光合色素含量的影响

Fig. 1 Effects of different pH values on photosynthetic pigment contents in *P. crispus* under Cr^{6+} stress

在 pH 为 4.0、7.0 处理组, 分别为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 1.44 和 0.81 倍. 统计分析表明, H_2O_2 含量在 pH 为 4.0、5.0 和 9.0 时明显高于其他组, 有显著差异 ($P < 0.05$), 而 O_2^- 产生速率在 pH 为 4.0 和 5.0 处理组显著高于其他组. 不同 pH 处理组中菹草 MDA 含量与 Cr^{6+} 胁迫对照组相比, 均存在显著差异 ($P < 0.05$).

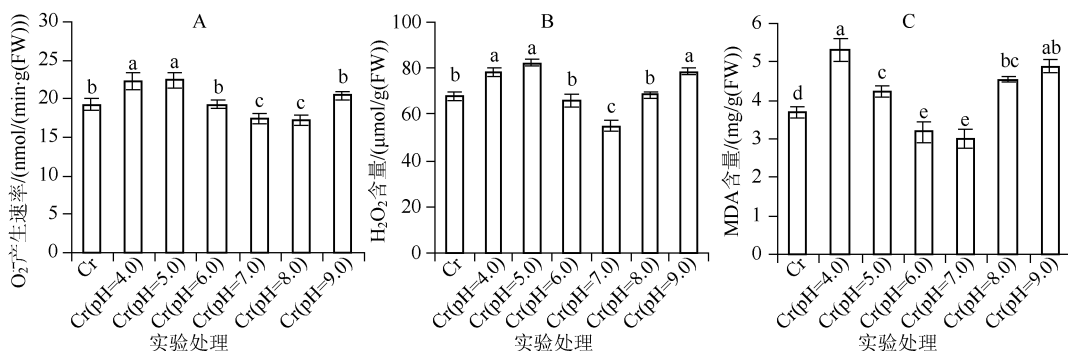


图2 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effects of different pH values on O_2^- generation rate, H_2O_2 content and MDA content in *P. crispus* under Cr^{6+} stress

2.4 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草 SOD、CAT 和 POD 活性的影响

在 Cr^{6+} 胁迫下, 菹草中 SOD、CAT 活性随着 pH 值升高呈先降后升趋势 (图3). SOD 活性在 pH 为 9.0 的处理组达最大值, 比 Cr^{6+} 胁迫对照组提高 25.27%; 在 pH 为 6.0 和 7.0 的处理组达最小值. CAT 活性最大值出现在 pH 为 4.0 的处理组, 比 Cr^{6+} 胁迫对照组提高 67.44%; 最小值在 pH 为 6.0 的处理组, 比 Cr^{6+} 胁迫对照组降低 26.23%. Cr^{6+} 胁迫下, 菹草中 POD 活性随 pH 值升高而逐渐下降. 在 pH 为 9.0 时最低, POD 活性比 Cr^{6+} 胁迫对照组降低 20.49%, pH 为 5.0 时最高, 比 Cr^{6+} 胁迫对照组提高 18.20%. 统计分析表明, SOD 活性在 pH 为 4.0、8.0 和 9.0 的处理组显著高于 Cr^{6+} 胁迫对照组 ($P < 0.05$); 而 CAT 活性在 pH 为 6.0 的处理组显著低于 Cr^{6+} 胁迫对照组 ($P < 0.01$), 且对 pH 变化较敏感; POD 活性在 pH 为 4.0 和 5.0 的处理组显

对照组的 0.79 倍. 统计分析表明, Cr^{6+} 胁迫下不同 pH 处理组与 Cr^{6+} 胁迫对照组的菹草 Chl. a 均有显著差异性 ($P < 0.05$). 在 pH 为 4.0 和 5.0 时 Car 含量明显低于其他各组, 有极显著差异 ($P < 0.01$).

2.3 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草的 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量的影响

在 Cr^{6+} 胁迫下, 菹草的 O_2^- 产生速率、 H_2O_2 和 MDA 含量均随 pH 值上升呈先降低后升高的趋势 (图2). O_2^- 产生速率及 H_2O_2 含量在 pH 为 4.0、5.0 和 9.0 时较高, MDA 含量在 pH 为 4.0、5.0、8.0 和 9.0 的处理组中也均显著高于 Cr^{6+} 胁迫对照组. O_2^- 产生速率在 pH 为 4.0 的处理组达最大值, 为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 1.16 倍; 在 pH 为 8.0 处理组达最小值, 仅为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 0.89 倍. H_2O_2 含量的最大值出在 pH 为 5.0 的处理组, 为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 1.21 倍. 最小值在 pH 为 7.0 的处理组, 为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 0.81 倍. 而 MDA 含量最大值、最小值分别出现在

显著高于对照组 ($P < 0.05$).

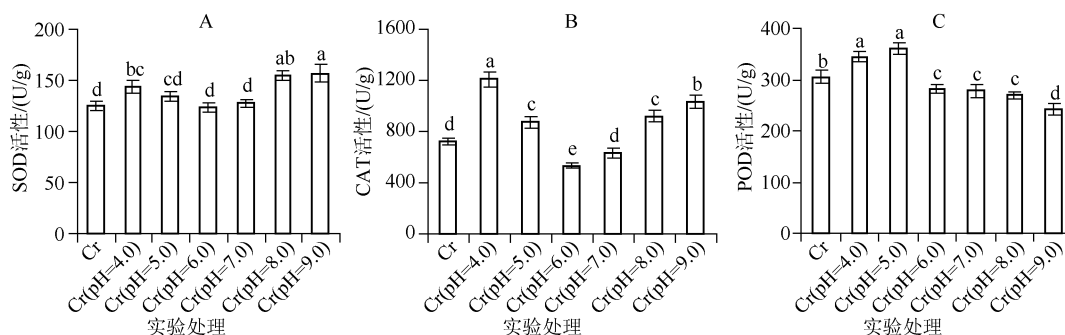


图3 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草 SOD、CAT 和 POD 活性的影响

Fig. 3 Effects of different pH values on SOD, CAT and POD activities in *P. crispus* under Cr^{6+} stress

2.5 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草 Pro 含量的影响

Cr^{6+} 胁迫下,菹草 Pro 含量随 pH 值升高呈先升后降的趋势(图4).相对于 Cr^{6+} 胁迫对照组, pH 为 6.0 和 7.0 处理组的 Pro 含量呈极显著升高 ($P < 0.01$), 分别比 Cr^{6+} 胁迫对照组高 21.77% 和 34.28%. 而 pH 为 4.0、5.0、8.0 和 9.0 处理组的 Pro 含量则下降, 分别比 Cr^{6+} 胁迫对照组下降 51.83%、55.66%、25.94% 和 37.75%. 统计分析表明, 不同 pH 处理组菹草的 Pro 含量与 Cr^{6+} 胁迫对照组表现为显著差异 ($P < 0.05$).

2.6 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草 PAs 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 值的影响

Cr^{6+} 胁迫下,菹草 Put 含量随着 pH 值升高呈先降后升趋势, Spd 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 比值则先升后降, 而 Spm 含量总体趋势是随着 pH 值的升高而增高, 且仅在 pH 为 4.0 和 5.0 的处理组低于 Cr^{6+} 胁迫对照组(图5). 相对于 Cr^{6+} 胁迫对照组, Put 含量在 pH 为 4.0 和 5.0 的处理组中显著升高 ($P < 0.05$), 最大值和最小值分别出现在 pH 为 4.0 和 6.0 的处理组. Spd 含量最高值出现在 pH 为 7.0 的处理组, 为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 1.69 倍; 最小值出现在 pH 为 4.0 的处理组, 仅为 Cr^{6+} 胁迫对照组的 0.45 倍. 游离态 (Spd + Spm)/Put 的最大值为 1.15, 出现在 pH 为 6.0 的处理组, 比 Cr^{6+} 胁迫对照组升高 44.91%, 而最小值在 pH 为 4.0 的处理组, 比 Cr^{6+} 胁迫对照组降低 58.32%. 相对于 Cr^{6+} 胁迫对照组, Spd 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 在 pH 为 6.0 和 7.0 的处理组中升高, pH 为 4.0、5.0 和 9.0 的处理组中下降. Spm 含量的最大值出现在 pH 为 8.0 的处理组, 比 Cr^{6+} 胁迫对照组升高 15.23%, 最小值出现在 pH 为 4.0 的处理组, 比 Cr^{6+} 胁迫对照组降低了 39.04%. 统计分析表明, 相对于 Cr^{6+} 胁迫对照组, pH 为 4.0 和 5.0 的处理组菹草的 Put 含量显著升高 ($P < 0.05$), pH 为 6.0 和 7.0 处理组的 Spd 含量显著升高 ($P < 0.05$), 而游离态 (Spd + Spm)/Put 比值相比 Cr^{6+} 胁迫对照组显著升高 ($P < 0.01$).

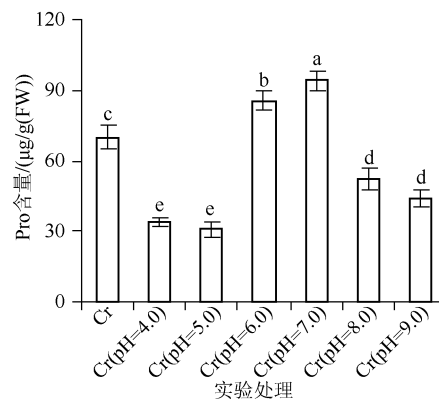


图4 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草 Pro 含量的影响

Fig. 4 Effects of different pH values on Pro content in *P. crispus* under Cr^{6+} stress

3 讨论

作为植物的非必需元素,铬在菹草体内蓄积量的逐渐增多,会导致菹草矿质元素吸收、光合作用、保护系统等功能受到严重破坏^[25],这意味着 Cr^{6+} 对菹草的毒害效应与其金属吸附特性密切相关. 本实验发现, 铬在菹草体内的积累与 pH 值呈负相关, 偏酸性条件下铬积累水平更高, 这暗示可通过调节 pH 的方式影响

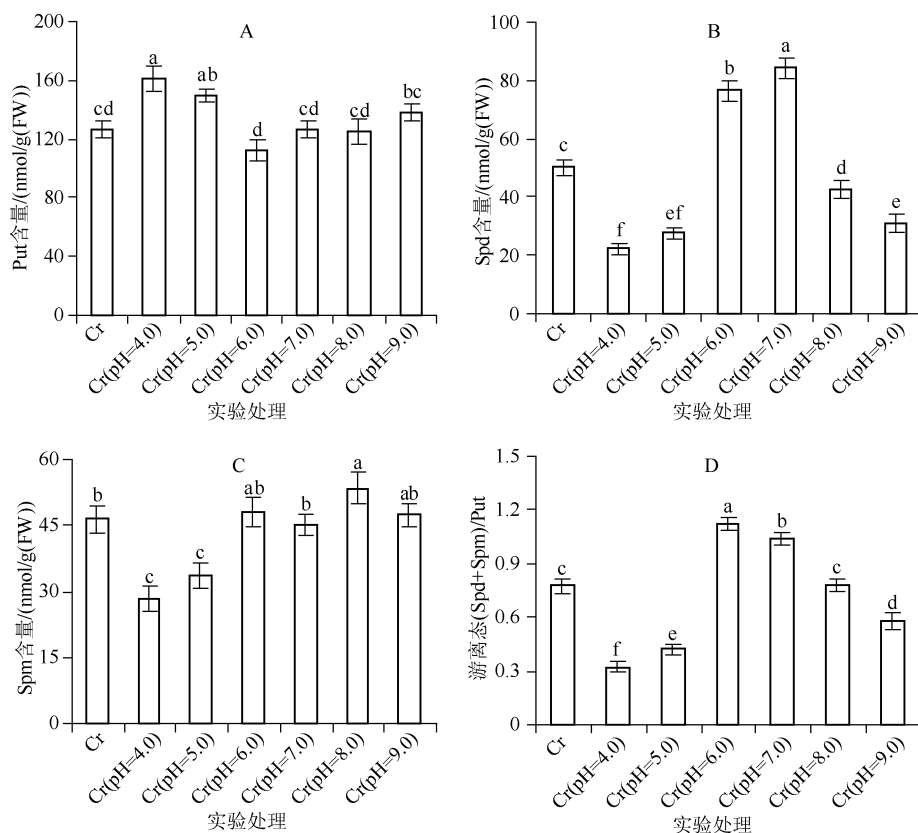


图 5 不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫下菹草 PAs 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 值的影响

Fig. 5 Effects of different pH values on PAs content and free (Spd + Spm)/Put in *P. crispus* under Cr^{6+} stress

水生植物的铬积累. 其主要原因可能是, pH 值的降低会影响植物吸附功能团的解离, 增加植物对某些重金属的吸收^[26-27]. 这与 Gadd 的研究结果一致, 即对于以阴离子形态存在的重金属离子, 如 CrO_4^{2-} 、 SeO_4^{2-} 和 $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ 等, pH 值下降会显著增加其吸附量^[28]. 破坏矿质营养元素的吸收平衡是重金属植物毒理学效应的一个重要方面^[29]. 有研究表明, Cr 能与 Fe、S、Mn 竞争转运通道和蛋白^[30], 与 P 竞争根表的结合位点, Cr^{6+} 可能是通过这些机制减少植物对矿质元素的吸收. 此外, Cr^{6+} 胁迫抑制矿质元素的吸收也可能是由于其对质膜 H^+ -ATP 酶活性的抑制造成的^[31]. 近年来有研究表明外源硅、钙、硫、磷、锌等营养元素的添加均能一定程度缓解重金属毒害效应, 减轻植物毒害症状^[32-36]. 本研究中, 随着 pH 值的升高, Ca、P、Mg、Zn 含量均呈先升后降趋势, 在偏离 pH 为 6.0~7.0 后, 菹草营养元素吸收受到更显著的抑制, 且这种抑制程度因不同元素而异. 这说明不同 pH 条件会影响 Cr^{6+} 胁迫下菹草营养元素的积累, 从而产生不同的毒害效应.

叶绿素作为植物进行光合作用的主要色素, 其含量高低能直接反映光合作用能力强弱以及植物遭受重金属毒害程度^[37]. 研究表明, 重金属 Cr^{6+} 胁迫下植物叶绿素含量降低, 其原因可能是: (1) 抑制了参与叶绿素合成的酶, 如原叶绿素酸酯还原酶; (2) 抗活性氧伤害的能力减弱, 导致膜脂过氧化, 致使叶绿体膜膨胀破裂, 类囊体膜解体, 从而导致叶绿素从组织中流失^[25, 38-39]. 本实验结果显示, 不同 pH 处理的 Cr^{6+} 胁迫的菹草中叶绿素含量下降幅度有差异, 在 pH 为 4.0 和 5.0 的处理组, 菹草的叶绿素含量显著下降, 这与 Gunawan 等的研究结果相符, 其研究证明酸性条件下花椰菜易失绿, 叶绿素转化为叶褐素^[40]. 这说明同样浓度 Cr^{6+} 胁迫下, 不同 pH 条件会影响光合色素水平, 从而影响光合作用. 本研究中, pH 在 6.0~8.0 范围内菹草光合色素所遭受的损伤较小, 说明其受到的重金属胁迫相对较弱.

重金属胁迫会诱导 ROS 的产生,而 ROS 可氧化蛋白质、脂质、多糖和核酸等生物大分子,造成生物膜透性增大、电导率增加、酶活性丧失及基因突变等伤害^[41]. Yeh 等研究发现, Cu^{2+} 能诱导水稻根细胞或悬浮细胞产生活性氧,并以活性氧作为信号分子诱导 MAPK 类蛋白激酶基因 OsMAPK 表达,启动根尖细胞程序性死亡^[42]. 因此,植物体内多余 ROS 的及时清除对机体重金属抗性至关重要. 有文献报道重金属 Cr^{6+} 导致菹草体内 O_2^- 和 H_2O_2 的大量积累^[39],本实验发现不同 pH 处理对 Cr^{6+} 胁迫菹草中 O_2^- 产生速率和 H_2O_2 有重要影响. 相对于其他 pH 处理组, pH 为 6.0 ~ 8.0 处理组中的 H_2O_2 和 O_2^- 含量基本保持稳定,且抗氧化酶 SOD、CAT 诱导相对较弱. 这说明在 pH 为 6.0 ~ 8.0 范围内,菹草所受的氧化损伤程度较轻,而在强酸及弱碱条件下菹草所产生的 ROS 积累较多,氧化损伤更为严重,这种伤害会诱导及促进抗氧化酶的合成与激活. 作为膜脂过氧化的主要产物之一,MDA 含量是反映膜脂过氧化作用的强弱和质膜受破坏程度的重要指标^[43]. 本研究发现,在 pH 为 6.0 和 7.0 的处理组中 MDA 含量较低,这一现象也同样证实以上观点. 因此,综合活性氧水平、膜脂的过氧化程度和抗氧化酶的活性,我们不难推断, Cr^{6+} 胁迫会对菹草膜结构产生氧化损伤,使膜的结构和功能遭受破坏. 在 pH 为 6.0 和 7.0 时,菹草受到由 Cr^{6+} 毒害引起的氧化胁迫最小.

Pro 是植物体内重要的渗透调节物质,可调节胞质 pH 值,且具有保护蛋白质、生物膜和清除活性氧等功能^[44],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^[45]. 逆境胁迫下往往引起植物细胞 Pro 含量升高,但 Pro 积累的生理意义至今仍有争议. 本研究发现, Cr^{6+} 胁迫下菹草 Pro 含量受 pH 值影响较大,且随 pH 值升高呈先升后降趋势,其趋势与 ROS 水平、膜系统氧化损伤趋势相反,由此证实 Pro 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,应作为一个抗性筛选指标,而非胁迫伤害指标. 另外,Pro 积累依赖于细胞质膜和液泡膜上的 H^+ -ATPase^[46],因此不同 pH 处理可通过影响菹草膜系统的氧化损伤程度,从而影响体内 Pro 积累. 本文的结果与之一致,即在 pH 为 6.0 和 7.0 处理组中,菹草所受的氧化胁迫较弱,膜结构和功能遭受的破坏较轻,Pro 可大量积累,缓解 Cr^{6+} 胁迫对菹草的毒害,使 pH 为 6.0 和 7.0 的处理组菹草表现出较低的铬毒害效应.

PA 作为一种生物活性物质,被认为在生物体内信号传递中起“第二信使”的作用,其含量及代谢平衡的维持在植物抵御逆境胁迫中起重要作用^[17-18]. 本研究发现, pH 为 4.0 和 5.0 处理组的 Cr^{6+} 胁迫菹草体内 Put 大量积累. Vuosku 等研究苏格兰松胚胎细胞时也发现类似现象,即低 pH 培养条件会导致 Put 含量升高^[47]. 这可能是因为 Put 在生理条件下具有特殊的阳离子特性,能调节细胞内离子平衡,故低 pH 培养条件能刺激植物体内 Put 积累^[48]. 另外,本实验中 pH 为 4.0 和 5.0 处理组的 Cr^{6+} 胁迫菹草由于积累较多 Cr^{6+} ,体内 ROS 过量积累,膜系统氧化损伤严重,这也能诱导 Put 的大量合成,因为 Put 可部分代替 SOD 的作用,通过歧化反应有效清除自由基^[49]. Spd 和 Spm 在细胞中以多聚阳离子方式存在,可以与细胞膜上带负电荷分子相互作用,以此增加细胞膜的稳定性^[50-51]. 细胞膜稳定性提高后可使 H^+ -ATPase、 H^+ -PPase 活性上升,进而可以稳定环境胁迫下细胞质的 pH 值,抑制细胞质酸化^[52]. Yang 等研究表明植物体内游离态 (Spd + Spm)/Put 比值与植物应激性耐胁迫能力呈正相关^[19]. 本实验中,Spd 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 比值明显表现为先升后降的趋势,且在 pH 为 6.0 和 7.0 处理组均明显提高. 可见,植物通过 PA 调节代谢的方式是多重的,菹草在偏酸条件下可通过提升 Put 含量对 Cr^{6+} 胁迫做出应激反应,而在中性 (pH 为 6.0 和 7.0) 水质中,菹草可通过调节体内 Spd 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 比值,提高细胞膜稳定性从而增强抗重金属胁迫能力.

综上所述,不同 pH 处理会影响菹草体内多种防御体系,从而引起毒害效应的差异. 在适宜的 pH 条件下,铬吸附量较小,矿质元素 (Ca、P、Mg) 吸收增强,光合色素分解减缓,Pro、PA 含量以及游离态 (Spd + Spm)/Put 比值升高,从而提高菹草对 Cr^{6+} 胁迫的耐受力,致使毒性效应达到最小程度. 对菹草而言最适 pH 范围为 6.0 ~ 7.0.

4 参考文献

- [1] Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H. Chromium toxicity in plants. *Environmental International*, 2005, **31**(5): 739-753.
- [2] 刘 婉,李泽琴. 水中铬污染治理的研究进展. *广东微量元素科学*, 2007, **14**(9): 5-9.

- [3] Gardea JL, Peralta JR, Montes M *et al.* Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresource Technology*, 2004, **92**(3): 229-235.
- [4] Dixit V, Pandey V, Shyam R. Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L.) root mitochondria. *Plant, Cell, and Environment*, 2002, **25**(5): 687-693.
- [5] Panda SK, Chaudhury I, Khan MH. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum*, 2003, **46**(2): 289-294.
- [6] Yu XZ, Gu JD, Huang SZ. Hexavalent chromium induced stress and metabolic responses in hybrid willows. *Ecotoxicology*, 2007, **16**(3): 299-309.
- [7] Costa M, Klein CB. Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 2006, **36**(2): 155-163.
- [8] 袁祖丽,孙晓楠,刘秀敏.植物耐受和解除重金属毒性研究进展.生态环境,2008,**17**(6):2494-2502.
- [9] 孙菲菲,赵彦坤,张文胜等.高 pH 对拟南芥萌发和主根伸长的影响.中国农学通报,2007,**23**(7):285-289.
- [10] Rayle DL, Cleland RE. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 1992, **99**(4): 1271-1274.
- [11] Irving HR, Gehring CA, Parish RW. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, **89**(5): 1790-1794.
- [12] 高 为,张 烨.垃圾焚烧飞灰浸出液中重金属对藻类的毒性.环境科技,2009,**22**(1):24-26.
- [13] 姜彬慧,林碧琴.重金属对藻类的毒性作用研究进展.辽宁大学学报:自然科学版,2000,**27**(3):281-287.
- [14] 蔡佳亮,黄 艺,郑维爽.生物吸附剂对废水重金属污染物的吸附过程和影响因子研究进展.农业环境科学学报,2008,**27**(4):1297-1305.
- [15] 陈 利,陈国祥,周泉澄等.根际 pH 与镉共同胁迫下对超高产杂交稻幼苗光合特性的影响.农业环境科学学报,2005,**24**(1):12-16.
- [16] Wang C, Zhu YL, Yang LF *et al.* Effects of NaCl stress on polyamines metabolism in vegetable soybean. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, **22**(11): 2883-2893.
- [17] Alcázar R, Marco F, Cuevas JC *et al.* Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Technology Letters*, 2006, **28**: 1867-1876.
- [18] Groppa MD, Benavides MP. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids*, 2008, **34**: 35-45.
- [19] Yang HY, Shi GX, Wang H *et al.* Involvement of polyamines in adaptation of *Potamogeton crispus* L. to cadmium stress. *Aquatic Toxicology*, 2010, **100**: 282-288.
- [20] Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 1987, **148**: 350-382.
- [21] 王爱国,罗广华.植物的超氧自由基与羟胺反应的定量关系.植物生理学通讯,1990,**6**:55-57.
- [22] 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.
- [23] Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 1973, **39**(1): 205-207.
- [24] Aziz A, Larher F. Changes in polyamine titers associated with the proline response and osmotic adjustment of rape leaf discs submitted to osmotic stresses. *Plant Science*, 1995, **112**: 175-186.
- [25] Ding BZ, Shi GX, Xu Y *et al.* Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb leaves to cadmium stress. *Environmental Pollution*, 2007, **147**(3): 800-803.
- [26] Calba H, Cazevielle P, Thé C *et al.* The dynamics of protons, aluminium and calcium in the rhizosphere of maize cultivated in tropical acid soils, experimental study and modelling. *Plant and Soil*, 2004, **260**(1/2): 33-46.
- [27] 黄宏霞.钝顶螺旋藻对 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 吸附特性的研究[学位论文].武汉:华中农业大学,2006.
- [28] Gadd GM. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2009, **84**(1): 13-28.
- [29] 王红霞,胡金朝,施国新等.外源多胺对铜胁迫下水螯叶片多胺代谢、抗氧化系统和矿质营养元素的影响.生态学报,2010,**30**(10):2784-2792.
- [30] Shanker AK, Djanaguiraman M, Sudhagar R *et al.* Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* L.). *Plant Science*, 2004, **166**(4):

- 1035-1043.
- [31] Shanker AK. Physiological, biochemical and molecular aspects of chromium toxicity and tolerance in selected crops and tree species[Dissertation]. Coimbatore: Tamil Nadu Agricultural University, 2003.
- [32] Inal A, Pilbeam DJ, Gunes A. Silicon increases tolerance to boron toxicity and reduces oxidative damage in barley. *Journal of Plant Nutrition*, 2009, **32**(1): 112-128.
- [33] 闵海丽,蔡三娟,徐勤松等. 外源钙对黑藻抗镉胁迫能力的影响. *生态学报*, 2012, **32**(1): 256-264.
- [34] Schiavon M, Pilon-Smits EAH, Wirtz M *et al.* Interactions between chromium and sulfur metabolism. *Journal of Environmental Quality*, 2008, **37**(4): 1536-1545.
- [35] Geng CN, Zhu YG, Liu WJ *et al.* Arsenate uptake and translocation in seedlings of two genotypes of rice is affected by external phosphate concentrations. *Aquatic Botany*, 2005, **83**: 321-331.
- [36] Malec P, Waloszek A, Prasad MNV *et al.* Zinc reversal of cadmium-induced energy transfer changes in photosystem II of *Ceratophyllum demersum* L. as observed by whole-leaf 77K fluorescence. *Plant Stress*, 2008, **2**: 121-126.
- [37] Stobart AK, Griffiths WT, Ameen-Bukhari I *et al.* The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiologia Plantarum*, 1985, **63**(3): 293-298.
- [38] Demetriou G, Neonaki C, Navakoudis E *et al.* Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, **1767**(4): 272-280.
- [39] 陈 辉,施国新,徐勤松等. Cr^{6+} 对菹草叶绿素荧光参数、抗氧化系统和超微结构的胁迫影响. *植物研究*, 2009, **29**(5): 559-564.
- [40] Gunawan MI, Barringer SA. Green color degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2000, **24**(3): 253-263.
- [41] 孙 涛,张玉秀,柴团耀. 印度芥菜 (*Brassica juncea* L.) 重金属耐性机理研究进展. *中国生态农业学报*, 2011, **19**(1): 226-234.
- [42] Yeh CM, Hung WC, Huang HJ. Copper treatment activates mitogen-activated protein kinase signalling in rice. *Physiologia Plantarum*, 2003, **119**(3): 392-399.
- [43] 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.
- [44] 肖 强,郑海雷,陈 瑶等. 盐度对互花米草生长及脯氨酸、可溶性糖和蛋白质含量的影响. *生态学杂志*, 2005, **24**(4): 373-376.
- [45] 陈 霖,姜 岩,汪鹏合等. 镍胁迫对菹草 (*Potamogeton crispus* L.) 活性氧及脯氨酸代谢的影响. *湖泊科学*, 2013, **25**(1): 131-137.
- [46] 汪良驹,刘友良,马 凯. 盐胁迫下无花果细胞质膜和液泡膜 H^{+} -ATPase 活性对脯氨酸积累的影响. *植物生理学报*, 2000, **26**(3): 232-236.
- [47] Vuosku J, Suorsa M, Ruottinen M *et al.* Polyamine metabolism during exponential growth transition in Scots pine embryonic cell culture. *Tree Physiology*, 2012, **32**(10): 1274-1287.
- [48] Young ND, Galston AW. Putrescine and acid stress induction of arginine decarboxylase activity and putrescine accumulation by low pH. *Plant Physiology*, 1983, **71**(4): 767-771.
- [49] Bouchereau A, Aziz A, Larher F *et al.* Polyamines and environmental challenges; recent development. *Plant Science*, 1999, **140**(2): 103-125.
- [50] Roy P, Niyogi K, SenGupta DN *et al.* Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress-induced damage of plasma membrane and PM-bound H^{+} -ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. *Plant Science*, 2005, **168**(3): 583-591.
- [51] Roussos PA, Pontikis CA. Changes of free, soluble conjugated and bound polyamine titers of jojoba explants under sodium chloride salinity in vitro. *Journal of Plant Physiology*, 2007, **164**(7): 895-903.
- [52] Bors W, Langebartels C, Michel C *et al.* Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry*, 1989, **28**: 1589-1595.