

# Hg<sup>2+</sup> 对水鳖 (*Hydrocharis dubia*) 叶片生理生化及超微结构的毒害效应\*

郝怀庆 施国新 杜开和 徐勤松

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

**提 要** 研究了不同浓度 Hg<sup>2+</sup> 对水鳖叶片光合放氧速率、呼吸速率、细胞膜透性、硝酸还原酶活性以及超微结构的毒害影响。结果表明,随着 Hg<sup>2+</sup> 浓度的增加,水鳖叶片的光合放氧速率逐渐下降,呼吸速率、硝酸还原酶活性先升后降,而细胞膜透性则逐渐上升。电镜观察发现,水鳖叶细胞遭受 Hg<sup>2+</sup> 毒害初期,染色质凝集,叶绿体中类囊体片层以及线粒体嵴突膨胀。随着叶细胞遭受毒害程度的加深,核膜破裂,染色质与核质消失,叶绿体膨胀解体,线粒体空泡化。

**关键词** 水鳖 Hg<sup>2+</sup> 光合放氧速率 细胞膜透性 硝酸还原酶 超微结构

**分类号** X503.23/Q948.8

水鳖 (*Hydrocharis dubia* (B. L.) Backer), 属水鳖科水鳖属, 为多年生水生经济植物, 在我国南北均有分布。全草可作猪、鸡、鸭饲料和鱼饵料, 也可供药用, 其幼叶柄可食。

近年来大量研究表明, Hg<sup>2+</sup> 作为自然环境中主要的重金属污染物之一, 不仅可以在植物体内大量积累, 严重影响植物的生长和发育<sup>[1]</sup>, 而且还会进入食物链, 危及人类的健康<sup>[2]</sup>。自从 1953 年日本发生水俣病事件以来, Hg<sup>2+</sup> 污染越来越受到人们的重视, 并且已做了大量工作<sup>[3-6]</sup>, 但大多是对陆生植物的研究, 而有关水环境中 Hg<sup>2+</sup> 对高等植物的研究报道尚不多见。本文以分布较广的水生植物——水鳖为研究对象, 对其进行毒理试验, 研究了不同浓度 Hg<sup>2+</sup> 对水鳖生理生化及超微结构方面的影响, 旨在揭示 Hg<sup>2+</sup> 对植物的毒害机制, 同时也为筛选灵敏的水环境监测植物提供素材。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试材料水鳖采自南京师范大学生命科学学院水生植物培育池和南京江心洲。5月上旬(温度 20-24℃)选取生长良好的植株, 先用去离子水培养 3d, 而后分别培养于含有 1, 2, 4, 6mg/L HgCl<sub>2</sub> 的培养液中(以纯 Hg 计), 以不加 HgCl<sub>2</sub> 的作对照, 用 0mg/L 表示。5d 后进行取样分析。

### 1.2 方法

1.2.1 光合放氧速率、呼吸速率的测定 采用李德耀的薄膜氧电极法<sup>[8]</sup>。

1.2.2 细胞膜透性测定 用 0.7cm 打孔器取水鳖叶片 0.5g 于三角瓶中, 加去离子水 50ml,

\* 国家自然科学基金(39770046)和江苏省自然科学基金(BK7107)共同资助。

收稿日期: 2000-07-26; 收到修改稿日期: 2000-12-08。郝怀庆, 女, 1975年生, 硕士。

振荡 1h, 过滤, 用 DDS-11 型电导仪测定滤液的电导率, 即表示细胞膜透性。

1.2.3 硝酸还原酶活性测定 采用体外法<sup>[9]</sup>。

1.2.4 超微结构观察 取各浓度处理植株倒数第 3 叶片, 距叶缘 1mm 处取材, 洗净, 切成 1mm<sup>2</sup> 大小的样块, 用 4% 戊二醛和 2% 锇酸双重固定, 丙酮系列脱水, Epon812 包埋, LKB 超薄切片机切片, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, Hitachi 600-A-2 型透射电镜下观察拍照。

1.2.5 数据处理 根据相关文献<sup>[10]</sup>的方法进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 Hg<sup>2+</sup> 对光合放氧速率及呼吸速率的影响

由表 1 可以看出, 光合放氧速率随 Hg<sup>2+</sup> 浓度的增加而逐渐下降。1mg/L 时光合放氧速率为对照的 89%, 6mg/L 时只为对照的 32.8%, 相关系数  $r = -0.9878$ , 呈极显著负相关关系。而呼吸速率在 1mg/L 时有所上升, 为对照的 120%, 而后开始下降, 6mg/L 时下降为对照的 46.7%。

表 1 Hg<sup>2+</sup> 对光合放氧速率、呼吸速率、膜透性的影响

Tab.1 Effect of Hg<sup>2+</sup> on photosynthetic O<sub>2</sub> evolution, respiration rate and permeability of cell membrane

Hg <sup>2+</sup> 浓度 (mg/L)	光合放氧速率 ( $\mu\text{molO}_2/\text{h}/\text{dm}^2$ )	呼吸速率 ( $\mu\text{molO}_2/\text{h}/\text{dm}^2$ )	相对膜透性 (%)
0	49.68 ± 0.78	29.79 ± 1.43	6.08 ± 0.22
1	44.24 ± 1.36	35.80 ± 1.76	8.92 ± 0.54
2	34.76 ± 0.89	23.22 ± 1.17	10.75 ± 0.25
4	23.17 ± 0.50	20.28 ± 0.96	13.79 ± 0.32
6	16.28 ± 0.77	13.90 ± 1.23	20.31 ± 1.03

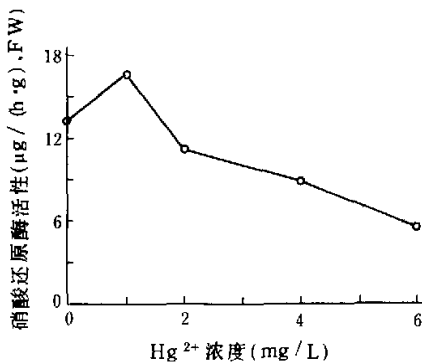


图 1 Hg<sup>2+</sup> 对硝酸还原酶活性的影响

Fig.1 Effect of Hg<sup>2+</sup> on Nitrate Reductase activity

### 2.2 Hg<sup>2+</sup> 对细胞膜透性的影响

如表 1 所示, 随着 Hg<sup>2+</sup> 浓度的增加, 水鳖叶细胞膜透性增大, 且膜透性的增大与 Hg<sup>2+</sup> 浓度呈极显著的正相关关系 ( $r = 0.9889$ )。

### 2.3 Hg<sup>2+</sup> 对硝酸还原酶活性的影响

硝酸还原酶活性变化趋势类似呼吸作用(图 1)。1mg/L Hg<sup>2+</sup> 能使水鳖叶硝酸还原酶活性升高, 上升为对照的 126%; 但随着 Hg<sup>2+</sup> 浓度的增加, 酶活性开始降低, 4mg/L 时为对照的 67.8%, 6mg/L 时仅为对照的 41.4%。硝酸还原酶活性的降低必然会影响硝酸盐的同化吸收, 从而导致氮代谢紊乱, 对植物产生毒害作用。

### 2.4 电镜观察结果

电镜观察发现, Hg<sup>2+</sup> 毒害对水鳖叶细胞超微结构造成了明显损伤, 并且随着 Hg<sup>2+</sup> 浓度的增大, 破坏程度加重。其中以细胞核、叶绿体和线粒体这三种细胞器的变化最为显著:

2.4.1 细胞核 对照株叶细胞中, 染色质与核质均匀分布, 核仁边缘清晰, 核膜完整(图版 I - 1);  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞中, 染色质开始凝集, 核膜模糊(图版 I - 3);  $2\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞中, 染色质进一步凝集, 电子密度增高(图版 I - 4);  $4\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞中, 核膜破损, 核质与染色质散出, 核仁结构松散, 呈破坏状态(图版 I - 7);  $6\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞中, 细胞核已溃解, 核中内容物散入细胞腔中。

2.4.2 叶绿体  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理后的叶细胞中, 叶绿体类囊体片层膨胀呈波状, 双层膜部分区域断裂或膨胀(图版 I - 5), 有部分叶绿体膨胀成圆球形(图版 I - 8);  $2\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞中, 基粒片层膨胀加剧, 叶绿体双层膜断裂(图版 I - 9);  $4\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞中, 叶绿体双层膜消失, 基粒类囊体片层膨胀, 呈念珠状(图版 I - 10),  $6\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞中, 可见到散落在基质中的类囊体基粒和片层(图版 I - 13)。而对照株叶细胞中, 叶绿体呈椭圆形, 基粒类囊体片层层叠整齐紧密, 层次清晰, 基质类囊体与基粒相连, 形成完整的膜系统, 叶绿体膜完整(图版 I - 2);

2.4.3 线粒体 对照株叶细胞中, 线粒体数目较多, 大多呈圆球形, 嵴突明显, 呈短囊状(图版 I - 2);  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞中, 线粒体嵴突膨胀, 线粒体双层膜开始变模糊(图版 I - 11);  $2\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞中, 嵴突减少, 线粒体中出现空泡, 双层膜破损(图版 I - 6);  $4\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞中, 线粒体嵴突消失, 内腔空泡, 双层膜破裂, 线粒体呈透明状(图版 I - 12)。  $6\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 可以见到少量空泡状的线粒体残体。

### 3 讨论

作者从生理生化及超微结构两方面研究了  $\text{Hg}^{2+}$  对水鳖的毒害影响。结果表明, 在  $\text{Hg}^{2+}$  毒害下, 水鳖叶片光合放氧速率以及呼吸速率下降, 膜透性增大, 硝酸还原酶活性降低。已有研究表明,  $\text{Hg}^{2+}$  是植物的非必要元素, 也是毒性较强的诱变剂。  $\text{Hg}^{2+}$  不仅易与酶活性中心或蛋白质中的 -SH 基结合, 还能取代金属蛋白中心的必需元素如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  等, 使生物大分子构象改变, 导致酶活性丧失及必需元素缺乏, 干扰细胞的正常代谢过程<sup>[11]</sup>。这在本实验中也得到了证实。

施国新等<sup>[12]</sup>的研究表明  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  对植物细胞的超微结构有明显的损伤诱变作用, 作者在电镜观察中也发现, 经  $\text{Hg}^{2+}$  处理后, 水鳖叶细胞核遭到了破坏, 最初染色质凝集, 核膜破裂; 随着  $\text{Hg}^{2+}$  浓度的增加, 核膜消失, 染色质与核质解体、消失, 整个细胞核溃解。而细胞核是遗传信息贮存、复制和表达的场所, 它控制着细胞的遗传和代谢活动, 与生物体的生存息息相关。细胞核结构的破坏会直接影响到细胞的正常生理代谢活动。叶绿体是植物进行光合作用的场所, 它能否正常行使功能对于植物体非常重要。实验中水鳖叶细胞受  $\text{Hg}^{2+}$  毒害后, 叶绿体膨胀变形, 基粒类囊体片层膨胀解体, 叶绿体膜破裂。而李功藩等<sup>[13]</sup>研究表明, 叶绿体中类囊体结构的完整性与有序性对于叶绿体在光合作用中进行正常而有效的光能转换是非常必要的。叶绿体结构的破坏必然会影响到光合作用的正常进行。另外, 实验结果表明  $\text{Hg}^{2+}$  毒害下, 线粒体结构也受到了严重破坏, 从而导致水鳖的呼吸功能下降。这与前面所测得的生理指标是相一致的。由此可见, 高浓度的  $\text{Hg}^{2+}$  对水鳖叶细胞超微结构具有不可逆转的破坏作用, 最终将导致植物死亡, 这也是重金属对植物的毒害机制之一。

## 参 考 文 献

- 1 吴燕玉,王 新,梁仁禄等.重金属复合污染对土壤-植物系统的生态效应Ⅱ.对作物、苜蓿、树木吸收元素的影响.应用生态学报,1997,8(5):545-552
- 2 Sugiyama M. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biol Toxicol*, 1994, 10:1-22
- 3 马成仓. Hg 对油菜叶细胞膜的损伤及细胞的自身保护作用.应用生态学报,1998,9(3):323-326
- 4 Vallee, B I, Ullmer D D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Annu Rev Biochem*, 1972, 41:91-128
- 5 韩宏英. Hg 对斜生栅藻生长发育及光合作用的影响.环境科学学报,1984,4(2):157-163
- 6 张义贤. 重金属对大麦毒性的研究.环境科学学报,1997,17(2):199-205
- 7 陆长梅,施国新,吴国荣等. Hg, Cd 对莴菜冬芽、叶绿素含量及活性氧清除系统的影响.湖泊科学,1999,11(4):323-327
- 8 李德耀,叶济宇. 薄膜氧电极的制作与呼吸或光合控制的测定.植物生理学通讯,1980,(1):35-40
- 9 华东师范大学生物系植物生理教研组.植物生理学实验指导.北京:人民教育出版社,1980.66-70
- 10 杜荣骞.生物统计学.北京:高等教育出版社,12-23,280-292
- 11 Van Assche F, Clijsters H. Effects of metal on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ*, 1990, 13:195-206
- 12 施国新,杜开和,解凯彬等.汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究.植物学报,2000,42(2):373-378
- 13 李功藩,蔡瑞平,吴亚君.叶绿体结构状态与光化学活性的关系.植物生理学报,1987,13(3):295-301

## Toxic Effect of $Hg^{2+}$ on Physiology and Ultrastructure of *Hydrocharis dubia*

HAO Huaqing    SHI Guoxin    DU Kaihe    XU Qinsong  
(College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, P. R. China)

### Abstract

The toxic effect of various concentrations of  $Hg^{2+}$  on the photosynthetic  $O_2$  evolution, respiration rate, the permeability of cell membrane, nitrate reductase activity and the ultrastructure changes in leaf cells of *Hydrocharis dubia* were studied. The results showed that the photosynthetic  $O_2$  evolution decreased, respiration rate and nitrate reductase activity first increased and then decreased, while the permeability of cell membrane was increased. Ultrastructure observation revealed that the chromatin condensed, the thylakoids of chloroplast and cristae of mitochondria swelled at the early stage when the leaves suffered the poison of  $Hg^{2+}$ . With the increasing of the poison, nuclear membrane disrupted, the chromatin and nucleoplasm disappeared, chloroplast disintegrated and mitochondria vesiculated.

**Key Words** *Hydrocharis dubia* (BL.) Backer,  $Hg^{2+}$ , photosynthetic  $O_2$  evolution, permeability of cell membrane, nitrate reductase, ultrastructure

## 图版说明 (Captions of plates)

1. 对照叶细胞, 示细胞核, 核仁  $\times 10000$  (Control leaf cell, showing nucleus, nucleolus  $\times 10000$ );
  2. 对照叶细胞, 示叶绿体, 线粒体  $\times 17000$  (Control leaf cell, showing chloroplast, mitochondria  $\times 17000$ );
  3.  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示染色质凝集  $\times 12000$  (Treated with  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing the polymerized chromatin  $\times 12000$ );
  4.  $2\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示染色质凝集  $\times 10000$  (Treated with  $2\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing the agglutating of chromatin  $\times 10000$ );
  5.  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示类囊体膨胀  $\times 30000$  (Treated with  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing swollen thylakoids  $\times 30000$ );
  6.  $2\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示线粒体嵴减少  $\times 30000$  (Treated with  $2\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing cristae of mitochondria reduced  $\times 30000$ );
  7.  $4\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示核膜破裂  $\times 12000$  (Treated with  $4\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing nucleus membrane disrupted  $\times 12000$ );
  8.  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示叶绿体膨胀成圆球形  $\times 10000$  (Treated with  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing the chloroplast swell to round  $\times 10000$ );
  9.  $2\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示叶绿体膜破裂, 类囊体膨胀  $\times 15000$  (Treated with  $2\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing disrupted chloroplast membrane and swollen thylakoids  $\times 15000$ );
  10.  $4\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示叶绿体膜消失  $\times 12000$  (Treated with  $4\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing chloroplast membrane disappeared  $\times 12000$ );
  11.  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示线粒体嵴膨胀  $\times 20000$  (Treated with  $1\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing the swollen cristae of mitochondria  $\times 20000$ );
  12.  $4\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示线粒体呈空泡状  $\times 30000$  (Treated with  $4\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing the mitochondria have been empty  $\times 30000$ );
  13.  $6\text{mg/L Hg}^{2+}$  处理的叶细胞, 示细胞基质中的类囊体  $\times 12000$  (Treated with  $6\text{mg/L Hg}^{2+}$ , showing thylakoids in the cytoplasmic matrix  $\times 12000$ )
- CP: 叶绿体 (Chloroplast) Ce: 叶绿体膜 (Chloroplast envelope) N: 细胞核 (Nucleus) Nu: 核仁 (Nucleolus)  
Nm: 核膜 (Nuclear membrane) Mi: 线粒体 (Mitochondria) CW: 细胞壁 (Cell Wall) CN: 染色质与核质 (Chromatin and nucleoplasm) ER: 内质网 (Endoplasmic Reticulum)

郝怀庆等:  $Hg^{2+}$  对水鳖叶片生理生化及超微结构的毒害效应HAO Huaiqing, et al.: Toxic Effect of  $Hg^{2+}$  on physiology and Ultrastructure of *Hydrocharis dubia*

图版 I

Plate I

