

## 外源钙对菹草 (*Potamogeton crispus* L.) 汞胁迫的影响效应\*

吴娟, 施国新\*\*, 黄敏, 夏海威, 乔绪强, 汪鹏合

(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:** 以组织培养的菹草无菌苗为实验材料, 研究了外源  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  的添加对汞 (Hg) 胁迫下菹草体内 Hg 积累、矿质元素、光合色素、活性氧、丙二醛 (MDA)、维生素 C ( $V_C$ )、维生素 E ( $V_E$ )、谷胱甘肽 (GSH) 以及多胺 (PAs) 代谢产生的影响效应机制。结果表明: (1) Hg 胁迫下, 菹草体内 Hg 大量积累, 达  $165.79 \mu\text{g/g}(\text{FW})$ , 并伴随矿质元素 P、K、Fe、Mg 和 Na 含量的明显降低。外源  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  的添加很大程度上可抑制菹草体内 Hg 积累, 使其降至  $110.15 \mu\text{g/g}(\text{FW})$ , 并减轻 Hg 胁迫所造成的元素失衡; (2) Hg 胁迫使菹草体内光合色素含量及叶绿素 a/b 值大幅降低, 并诱导积累大量超氧阴离子、过氧化氢及 MDA, 同时  $V_C$ 、 $V_E$  和 GSH 含量显著提升。外源  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  的添加则减缓了菹草体内光合色素的分解, 降低活性氧水平, 减轻了膜脂过氧化程度, 更使  $V_C$ 、 $V_E$  及 GSH 含量在一定程度上恢复到正常水平; (3) Hg 胁迫下, 伴随着多胺氧化酶、二胺氧化酶和精氨酸脱羧酶活性的显著提升以及鸟氨酸脱羧酶活性的降低, 导致菹草体内腐胺 (Put)、精胺 (Spm) 含量明显降低, 亚精胺 (Spd) 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 比值轻微增加。而外源  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  添加后, 菹草通过调节体内 PAs 代谢酶活性, 改变了 Hg 胁迫下 PAs 含量变化, 主要表现为 Put、Spm 含量回升显著, 游离态 (Spd + Spm)/Put 比值进一步升高。综上所述, 外源 Ca 的添加可抑制 Hg 的吸收并参与调节多胺代谢, 通过内源多胺含量的改变抑制了植物体内活性氧的积累、膜脂过氧化、光合色素及抗氧化物质的分解, 增强菹草无菌苗对重金属 Hg 的耐受力, 对减轻植物 Hg 胁迫有重要作用。

**关键词:** 菹草; 汞; 外源钙; 氧化胁迫; 多胺

## Effects of exogenous calcium on resistance of *Potamogeton crispus* L. to mercury stress

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

(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* L. were cultured by tissue culture technique, and were used as experimental materials. In this study, the effects of exogenous calcium (Ca) application on mercury (Hg) accumulation, mineral nutrition, photosynthetic pigments, superoxide anion, hydrogen peroxide, malondialdehyde (MDA), vitamin C and E, glutathione (GSH) and polyamines metabolism of the tested plants under the stress of  $1.5 \mu\text{mol/L}$  Hg stress were investigated. The results demonstrated that, (1) Hg stress induced a substantial accumulation of Hg at  $165.79 \mu\text{g/g}(\text{FW})$  and resulted in serious imbalance of nutrient elements, such as inhibiting the absorption of P, K, Fe, Mg and Na, whereas exogenous Ca significantly reduced the accumulation of Hg by 66.4% and effectively reduced the Hg-induced imbalance of nutrient elements in *Potamogeton crispus* L. (2) Hg treatment severely reduced chlorophyll concentration and chlorophyll-a/b ratio, and raised  $\text{O}_2^-$  generation rate,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and MDA contents, while increased the levels of  $V_C$ ,  $V_E$  and GSH. Application of exogenous Ca markedly retarded the degradation of photosynthetic pigments and also significantly improved the levels of antioxidant capacity in the tested plants. (3) Hg treatment enhanced polyamine oxidase, diamine oxidase and arginine decarboxylase activities. Furthermore, reduced ornithine decarboxylase resulted in the decrease of putrescine (Put) and spermine (Spm) and in, slightly, the increase of spermidine (Spd) content. Exogenous Ca altered polyamines content of Hg stress by modulating polyamines metabolizing enzymes activities, mainly presented as significant increase in Put and Spm contents, and further increased the ratio of free (Spd + Spm)/Put. These results indicated

\* 江苏高校优势学科建设工程项目 (164320H106) 资助。2013-05-10 收稿; 2013-08-29 收修改稿。吴娟 (1988~), 女, 硕士研究生; E-mail: apple925288@126.com.

\*\* 通信作者; E-mail: gxshi@njnu.edu.cn.

that the supplement of exogenous Ca relieved the phytotoxicity of Hg to *Potamogeton crispus* L. by depressing the accumulation of Hg and involving in regulation of a series of physiological and biochemical mechanisms, particularly polyamines metabolism.

**Keywords:** *Potamogeton crispus* L.; mercury; exogenous calcium; oxidative stress; polyamines

汞(Hg)是一种全球性的高毒性重金属污染物,全世界每年释放到环境中的汞有 $1.5 \times 10^4$  t<sup>[1]</sup>.近年来,根据环境保护部对全国河流、湖泊、水库等水质状况的调查,我国7大水系、主要湖泊、近岸海域及部分地区的地下水均受到不同程度的汞污染<sup>[2]</sup>.以太湖为例,近年来屡见含汞工业污水未经任何处理排入太湖的报道,而太湖底泥中的Hg含量已达到了轻度污染水平<sup>[3-4]</sup>.水中的汞对植物危害极大,它对植物的毒害表现在生理、生化、细胞及分子水平,如光合作用、活性氧积累、蛋白质代谢、膜的完整性丧失和超微结构损伤等<sup>[5-8]</sup>.其中,氧化胁迫是汞对植物造成毒害的重要途径,光合色素、活性氧水平、丙二醛、维生素C、维生素E等物质含量的变化常作为评价植物受毒害程度的重要指标.

钙(Ca)不仅是细胞壁和细胞膜的结构成分,还是耦联胞外信号和胞内生理反应的第二信使,参与胞内信号转导与调控<sup>[9]</sup>.研究表明,一定浓度的外源Ca对Cd、Ni等重金属胁迫条件下植物的生长发育、生理代谢和超微结构都有明显的改善作用,如Wang等<sup>[10]</sup>的研究表明在含Cd的营养液中加入Ca可减少白车轴草幼苗对Cd的积累以及提高保护酶活性,Ouzoumidou等<sup>[11]</sup>认为Ca处理可以改善Ni胁迫下水稻幼苗的生长和光合作用.多胺(PAs)是植物体内具有生理活性的一组进化上高度保守的小分子量有机多聚阳离子,是调控植物生长发育的重要活性物质,如Durmu等<sup>[12]</sup>的研究表明腐胺(Put)和精胺(Spm)均能增强玉米抵抗百草枯氧化胁迫的能力;Choudhary等<sup>[13]</sup>研究发现多胺能够通过抑制萝卜细胞膜上的重金属ATP酶(HMAs)基因的表达,从而抑制重金属离子进入植物体内.本课题组多年研究也表明外源多胺能够增强植物受逆境胁迫的耐力,如Xu等<sup>[14]</sup>研究表明Spd能够缓解Cu胁迫对空心莲子草造成的氧化伤害,Yang等<sup>[15]</sup>认为外施Spm和Spd可保持植物体内较高的脯氨酸水平和抗氧化系统活性,从而缓解重金属Cd的胁迫.

目前关于外源Ca对重金属的缓解机制阐述多集中于Ca<sup>2+</sup>在稳定细胞结构方面发挥的作用以及Ca<sup>2+</sup>可与重金属离子竞争离子通道等<sup>[16-18]</sup>,但是对于外源Ca是否能够影响水生植物内源多胺含量以致从内源多胺代谢方面提高水生植物重金属抗性相关方面的研究却很少涉及.除此之外,外源Ca对重金属的研究多集中在藻类和陆生植物方面<sup>[17-19]</sup>,对水生植物重金属胁迫的研究甚少,更鲜见对水生植物无菌苗抗Hg胁迫的影响报道.因此本文以组织培养技术培养的菹草无菌苗为实验材料,采用在营养液中添加Ca的方法,研究其对汞胁迫下菹草的氧化损伤和多胺代谢的影响,探讨外源Ca通过减少Hg吸收及改变内源多胺含量减轻重金属胁迫伤害的生理机制,以期更全面地揭示Ca的生理作用与逆境胁迫的关系,为水生植物对Hg的抗性研究提供新素材.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

菹草(*Potamogeton crispus* L.)隶属于眼子菜科(Potamogetonaceae)眼子菜属(*Potamogeton*),为多年生水生草本植物.本实验所用菹草于2012年4月采自太湖水域,以幼嫩带节间的茎段诱导产生的菹草无菌苗作为研究对象.

### 1.2 研究方法

1.2.1 菹草无菌苗的培养 菹草外植体的灭菌处理、芽诱导、继代培养以及生根生长的培养条件均参考高健等<sup>[20]</sup>的方法并作适当修改.

1.2.2 材料处理 选取大小相似、生长状况一致的菹草无菌苗平均分成4组进行处理:对照组,用1/10 Hoagland营养液培养;Ca处理组,用含25 mmol/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>的1/10 Hoagland营养液培养;Hg处理组,用含1.5 μmol/L HgCl<sub>2</sub>(此浓度为Hg对菹草无菌苗的半效应浓度)的1/10 Hoagland营养液培养;Ca + Hg处理组,在含有1.5 μmol/L HgCl<sub>2</sub>的1/10 Hoagland营养液中加入25 mmol/L Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(根据预实验选择).实验条件与培养菹草无菌苗时一致,每天更换培养液.培养5 d后,取材,用蒸馏水洗净,吸干,进行相关指标的测定,实验设置3次重复.

1.2.3 元素含量测定 称取 0.2 g (FW) 菹草, 硝酸和高氯酸消化后, 用 PerkinElmer 等离子质谱仪 (NexION 300 ICP-MS, USA) 测定.

1.2.4 叶绿素和类胡萝卜素含量测定 称取 0.4 g (FW) 菹草叶片, 加入 80% 的丙酮冰浴研磨, 离心, 用分光光度计 (Thermo GEN ESYS 10, USA) 分别测定 470、647 和 663 nm 的光吸收值, 参考 Lichtenthaler<sup>[21]</sup> 的公式计算.

1.2.5  $O_2^-$  产生速率、 $H_2O_2$ 、丙二醛 (MDA) 含量的测定  $O_2^-$  产生速率参考王爱国等<sup>[22]</sup> 的方法测定;  $H_2O_2$ 、MDA 的含量用南京建成生物工程研究所购买的试剂盒 (序号: A046) 测定, 单位为 mmol/g (FW).

1.2.6 GSH、 $V_C$  和  $V_E$  含量测定 取 0.5 g 植物组织, 加 5 ml 5% 三氯乙酸 (TCA) 冰浴研磨, 10000 转/min, 4℃ 离心 20 min, 取上清液, 用 2-硝基苯甲酸 (DTNB) 显色法测定 412 nm 下的光吸收值, 根据标准曲线计算谷胱甘肽 (GSH) 含量<sup>[23]</sup>.  $V_C$ 、 $V_E$  含量用从南京建成生物工程研究所购买的试剂盒 (序号: A008、A009) 测定, 单位为 mg/g (FW).

1.2.7 多胺含量及其代谢酶的测定 多胺含量的测定参考 Aziz 等<sup>[24]</sup> 的方法, 单位为 nmol/g (FW); 精氨酸脱羧酶 (ADC) 和鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 的活性测定参考赵福庚等<sup>[25]</sup> 的方法, 其活性分别以  $1 \mu\text{mol Agm/h}$  和  $1 \mu\text{mol Put/min}$  为 1 个酶活性单位 (U) 表示; 多胺氧化酶 (PAO) 和二胺氧化酶 (DAO) 的活性测定参照汪天等<sup>[26]</sup> 的方法, 以  $0.001 \Delta\text{OD}_{550}/\text{min}$  为 1 个酶活性单位 (U).

### 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. 采用 Excel 和 SPSS 17.0 软件对实验数据进行制图和统计分析. 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; 图中不同小写字母表示数值之间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母表示数值之间差异不显著 ( $P > 0.05$ ).

## 2 实验结果

### 2.1 菹草外观生长结果

实验结果表明, 培养 5 d 后, Hg 处理组的菹草无菌苗植株褪绿明显, 植株极易断裂, 并出现萎黄甚至伴有黑褐色斑点症状, 转移至不含重金属离子的 Hoagland 培养液中不能恢复正常生长而逐渐死亡. Ca + Hg 处理组的植株也存在失绿症状, 但症状较轻, 未出现斑点、萎黄及脆弱易断现象. 对照组和 Ca 处理组的菹草无菌苗植株挺拔, 叶色鲜亮. 在整个处理期间, Hg 处理组早期即表现出毒害症状, 老叶损伤程度明显大于新叶.

### 2.2 外源 Ca 对 Hg 胁迫下菹草无菌苗各元素吸收的影响

外源 Ca 对 Hg 胁迫下菹草无菌苗各元素吸收的影响不同 (表 1), 分为 3 类: (1) 与 Hg 处理组相比, Ca + Hg 处理组菹草无菌苗体内 Hg 含量下降 66.4% ( $P < 0.05$ ). 其次, Hg 胁迫下菹草无菌苗体内 Ca 含量仅比对照组增加 26.55%, 而 Ca + Hg 处理组中 Ca 含量比对照组提高 41.98%. 统计分析表明, 外源 Ca 对 Hg 胁迫下 Hg 的吸收积累影响较大, 差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ ). (2) 与对照组相比, 单一 Hg 处理组菹草无菌苗体内的 P、K、S 含量显著下降, 分别为对照组的 71.72%、73.21% 和 77.18% ( $P < 0.05$ ), 而 Ca + Hg 处理组中 P、K、S 的含量分别达到对照组的 80.69%、101.00% 和 79.11% ( $P < 0.05$ ). (3) Hg 胁迫降低了菹草无菌苗对 Fe、Na、Mg 的吸收, 含量分别为对照组的 70.18% ( $P < 0.05$ )、75.58% ( $P < 0.05$ ) 和 67.51% ( $P < 0.05$ ). Ca + Hg 处理后, Fe 和 Na 含量分别达到对照组的 93.01% 和 82.30% ( $P < 0.05$ ). 相对于 Mg 和 Mn 而言, 外源 Ca 的加入使其在菹草无菌苗体内的含量显著下降. Ca 处理组和 Ca + Hg 组相比于对照组, 其 Mg 和 Mn 的含量分别下降了 47.63%、40.53% 以及 49.52%、38.41%. 统计分析表明, Ca 处理组及 Ca + Hg 处理组与对照组之间 Mg、Mn 含量差异均达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ).

### 2.3 外源 Ca 对 Hg 胁迫下菹草无菌苗光合色素含量和叶绿素 a/b 值的影响

$1.5 \mu\text{mol/L}$  Hg 处理导致菹草无菌苗叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素和叶绿素 a/b 值分别较对照组下降 58.03% ( $P < 0.01$ )、72.20% ( $P < 0.05$ )、55.09% ( $P < 0.01$ ) 和 80.11% ( $P < 0.05$ ) (表 2). 正常条件下添加  $25 \text{ mmol/L}$  的外源 Ca 有利于叶绿素的合成, Ca 处理组中, 叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素含量分别较对照组提升了 13.4%、14.8% 和 1.8%; Ca + Hg 处理组中, 叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素含量和叶绿素 a/b 分别达到了对照组的 76.34% ( $P < 0.05$ )、88.09%、76.64% ( $P < 0.05$ ) 和 87.30%, 分别是单一 Hg 处理组的

1.32、1.22、1.39和1.09倍。

表1 外源Ca对Hg胁迫下菹草无菌苗元素吸收的影响\*

Tab.1 Effects of exogenous Ca on element contents in *P. crispus* under Hg stress

| 元素含量( $\mu\text{g/g(FW)}$ ) | 实验处理组                     |                        |                        |                           |
|-----------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|
|                             | 对照                        | Ca                     | Hg                     | Ca + Hg                   |
| Hg                          | —                         | —                      | $165.79 \pm 16.24^a$   | $110.15 \pm 9.70^b$       |
| Ca                          | $950.59 \pm 100.09^b$     | $1333.37 \pm 120.53^a$ | $1203.04 \pm 89.27^a$  | $1341.56 \pm 117.38^a$    |
| P                           | $1374.00 \pm 124.66^a$    | $1390.41 \pm 139.78^a$ | $985.43 \pm 100.22^c$  | $1108.69 \pm 100.29^{bc}$ |
| K                           | $4893.72 \pm 499.74^{ab}$ | $5496.90 \pm 506.72^a$ | $3582.57 \pm 461.94^c$ | $4951.15 \pm 511.11^{ab}$ |
| S                           | $629.85 \pm 69.93^a$      | $611.03 \pm 60.64^a$   | $486.14 \pm 50.03^b$   | $498.28 \pm 51.24^b$      |
| Mg                          | $181.62 \pm 16.85^a$      | $86.50 \pm 9.81^c$     | $122.61 \pm 13.86^b$   | $73.62 \pm 8.82^c$        |
| Fe                          | $49.19 \pm 5.00^a$        | $48.70 \pm 5.34^a$     | $34.52 \pm 2.90^b$     | $45.75 \pm 4.47^a$        |
| Na                          | $139.63 \pm 13.55^a$      | $145.06 \pm 14.95^a$   | $105.53 \pm 10.11^b$   | $114.91 \pm 12.18^b$      |
| Mn                          | $3.15 \pm 0.27^a$         | $1.56 \pm 0.13^b$      | $3.21 \pm 0.32^a$      | $1.21 \pm 0.11^b$         |

\* 同列数字后不同字母表示5%水平下的差异显著。

表2 外源Ca对Hg胁迫下菹草无菌苗光和色素含量和叶绿素a/b值的影响\*

Tab.2 Effects of exogenous Ca on photosynthetic pigment contents and chlorophyll-a/b ratio in *P. crispus* under Hg stress

| 指标               | 实验处理组                  |                     |                     |                        |
|------------------|------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|
|                  | 对照                     | Ca                  | Hg                  | Ca + Hg                |
| 叶绿素 a/(mg/g(FW)) | $0.803 \pm 0.080^a$    | $0.911 \pm 0.044^a$ | $0.466 \pm 0.041^c$ | $0.613 \pm 0.057^b$    |
| 叶绿素 b/(mg/g(FW)) | $0.277 \pm 0.022^{ab}$ | $0.318 \pm 0.034^a$ | $0.200 \pm 0.013^c$ | $0.244 \pm 0.025^{bc}$ |
| 类胡萝卜素/(mg/g(FW)) | $0.167 \pm 0.014^a$    | $0.170 \pm 0.008^a$ | $0.092 \pm 0.011^c$ | $0.128 \pm 0.011^b$    |
| 叶绿素 a/b          | $2.897 \pm 0.061^a$    | $2.864 \pm 0.304^a$ | $2.321 \pm 0.061^b$ | $2.530 \pm 0.313^{ab}$ |

\* 同列数字后不同字母表示5%水平下的差异显著。

#### 2.4 外源Ca对Hg胁迫下菹草无菌苗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA含量及O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率的影响

单施Hg处理组,菹草无菌苗体内的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA含量和O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率均显著升高,分别为对照组的1.52、1.31和1.56倍( $P < 0.01$ );外源Ca的添加在不同程度上抑制了H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA的积累及O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率的升高,分别为Hg胁迫组的75.34%、80.23%和75.02%( $P < 0.05$ )(图1)。单施Ca处理组与对照组无明显差异。

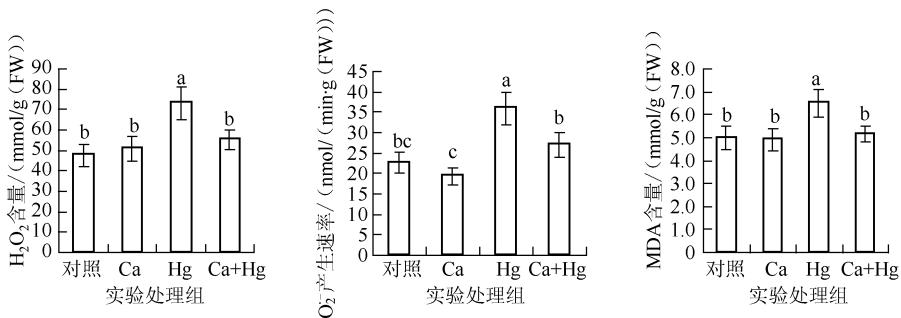


图1 外源Ca对Hg胁迫下菹草H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA含量及O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生速率的影响

Fig.1 Effects of exogenous Ca on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA contents and O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation rate in *P. crispus* under Hg stress

### 2.5 外源 Ca 对 Hg 胁迫下菹草无菌苗 $V_C$ 、 $V_E$ 和 GSH 含量的影响

$V_C$ 、 $V_E$  和 GSH 是植物体内主要的非酶促抗氧化剂,可以直接猝灭活性氧. 本实验研究发现,单施 Hg 处理组使菹草无菌苗体内的  $V_C$ 、 $V_E$  和 GSH 含量明显升高,而外添 Ca 之后,使其在一定程度上恢复到正常水平. 1.5  $\mu\text{mol/L}$  Hg 处理 5 d 后,菹草无菌苗体内  $V_C$ 、 $V_E$  和 GSH 含量分别为对照组的 1.39、1.84 和 1.46 倍 ( $P < 0.01$ ),而 Ca + Hg 处理组的  $V_C$ 、 $V_E$  和 GSH 含量降低,分别达到对照组的 96.51%、135.00% 和 113.00%. 单施 Ca 处理组与对照组无明显差异. 统计分析表明,Hg 与 Ca + Hg 处理条件下  $V_C$ 、 $V_E$  和 GSH 含量差异均达到极显著水平 ( $P < 0.01$ ) (图 2).

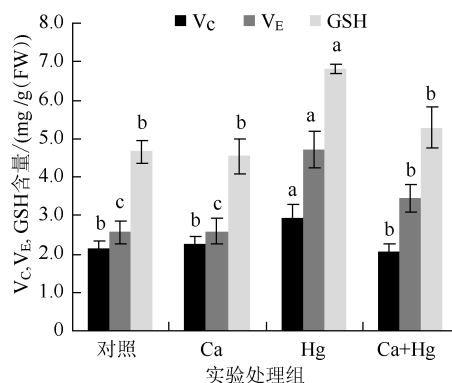


图 2 外源 Ca 对 Hg 胁迫下菹草  $V_C$ 、 $V_E$  和 GSH 含量的影响

Fig. 2 Effects of exogenous Ca on  $V_C$ ,  $V_E$  and GSH contents in *P. crispus* under Hg stress

### 2.6 菹草无菌苗体内总 PAs 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 的比值变化

与对照组相比,单施 Hg 处理组对 Put、Spd 的含量并无显著影响,Spm 含量显著降低了 37.5% ( $P < 0.05$ );单一 Ca 处理组使 Put 含量略有上升,Spd 含量略有下降,Spm 含量显著上升至对照组的 1.34 倍;Ca + Hg 处理组中,Put、Spm 含量分别为对照组的 0.94、1.69 倍. 与单一 Hg 处理组相比,Ca + Hg 处理组有效地抑制了 Hg 胁迫下 Put、Spm 含量的变化,分别使 Put、Spm 显著提高了 1.16、2.70 倍 ( $P < 0.05$ ). 不同处理组 Spd 含量与对照组相比变化均不明显. 游离态 (Spd + Spm)/Put 的比值在 Ca + Hg 处理组达到最大值,Hg 处理组次之,单一 Ca 处理组与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 3).

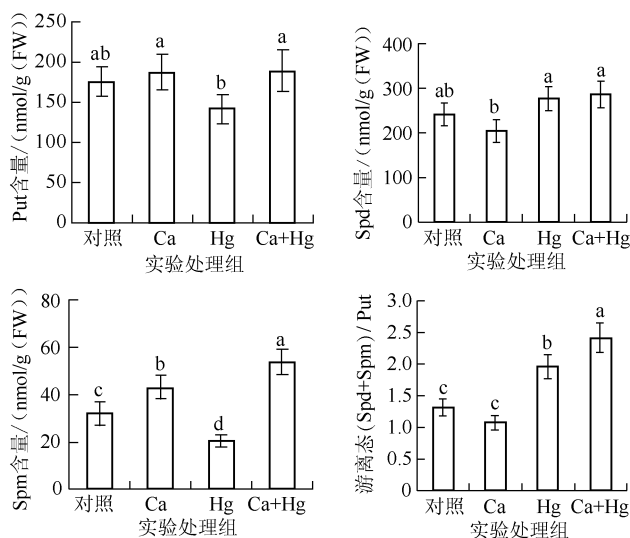


图 3 外源 Ca 对 Hg 胁迫下菹草总 PAs 含量及游离态 (Spd + Spm)/Put 比值的变化

Fig. 3 Effects of exogenous Ca on change of total PAs contents and free (Spd + Spm)/Put ratios in *P. crispus* under Hg stress

### 2.7 菹草无菌苗体内 ADC 和 ODC 活性的变化

与对照组相比,外添 Ca 之后,ADC 活性变化并不显著,ODC 活性显著增至对照组的 1.29 倍 ( $P < 0.05$ ). 单一 Hg 处理组使 ADC 活性显著提高了 45.5%,但使 ODC 活性显著下降了 39.6%. 外添 Ca 使 Hg 胁迫

迫下的 ADC 活性较 Hg 处理组下降了 2.8%, 而 ODC 活性上升了 32.3% ( $P > 0.05$ ) (图 4).

### 2.8 菹草无菌苗体内 PAO 和 DAO 活性变化

与对照组相比, 外源 Ca 添加之后, PAO 和 DAO 活性均没有显著变化 (图 4). Hg 处理组使 PAO 和 DAO 活性显著提高了 1.37 倍和 2.42 倍 ( $P < 0.05$ ). 外源 Ca 添加使 PAO 活性下降至 Hg 处理组的 84.6% ( $P < 0.05$ ), 而对 DAO 活性无明显影响.

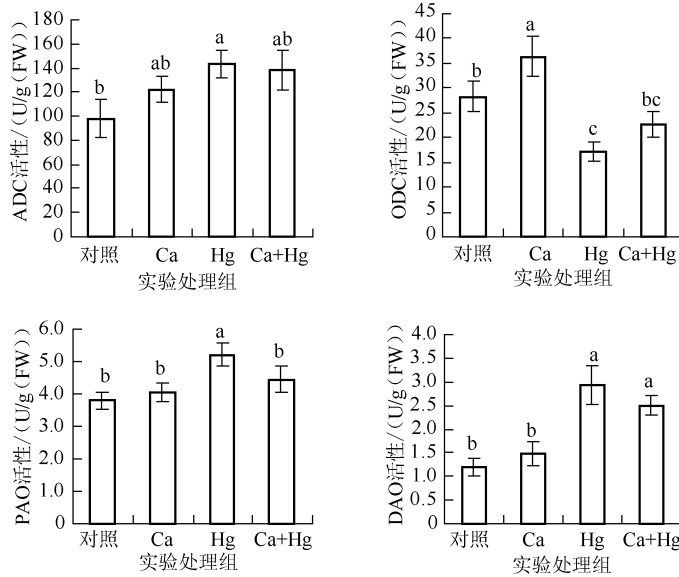


图 4 外源 Ca 对 Hg 胁迫下菹草 ADC、ODC、PAO 和 DAO 活性的影响

Fig. 4 Effects of exogenous Ca on changes of ADC, ODC, PAO and DAO activities in *P. crispus* under Hg stress

## 3 讨论

重金属胁迫对植物的重要毒害机制之一是影响植物对矿质营养元素的吸收, 从而对植物的生长发育产生不利影响<sup>[27-29]</sup>. 在生物体内, Ca 能降低膜表面电势的电负性, 减少其他阳离子在膜表面的活度, 降低植物对其的吸收, 从而缓解阳离子诸如  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  等的毒性<sup>[30]</sup>. Suzuki 认为重金属胁迫下植物增加 Ca 吸收并局域分布在细胞壁上, 有利于增加细胞壁的稳定性和完整性, 最大程度维持膜系统结构的完整性, 以提高植物耐重金属的能力<sup>[31]</sup>. 本实验结果表明, 添加外源 Ca 后, 菹草促进了对 Ca 的吸收并大幅减少对 Hg 的吸收, 由此证实外源 Ca 可以降低菹草对 Hg 的积累. 除此之外, 本实验中 Hg 胁迫也造成菹草体内矿质元素失衡, 主要表现为抑制 P、K、S、Fe、Na 等矿质元素的吸收, 这些变化都会导致植物细胞代谢紊乱, 不能提供足够的能量来满足其生长发育, 甚至伤害植物细胞的膜结构, 损伤膜上的 ATPase 和膜蛋白<sup>[32-33]</sup>. 此外, 外添 Ca 还能在一定程度上缓解菹草无菌苗对各矿质元素吸收能力的下降. 以上结果充分表明, Ca 和 Hg 在吸收和运输时存在一定的拮抗作用, 使菹草对 Hg 的吸收大幅下降并减弱胁迫毒性, 恢复菹草对各营养元素的正常吸收水平.

重金属胁迫下光合色素的变化能揭示光合作用能力的改变, 而 Hg 毒害的一个重要特征就是引起植物体内叶绿素减少, 使植物失绿产生毒害现象<sup>[8]</sup>. 本实验中菹草在单一 Hg 处理下叶绿素 (Chl. a、Chl. b) 及类胡萝卜素 (Car) 含量显著下降; 而 Ca + Hg 处理中, 外添 Ca 能不同程度缓解各光合色素含量的下降, 表明外源 Ca 能够增强菹草无菌苗光合作用系统的保护作用. 与此同时, 光合色素含量变化与外观生长结果相符. 此外, Car 还可以作为植物体内的内源抗氧化剂, 耗散过剩光能, 清除活性氧<sup>[34]</sup>. 本实验中, 相比于单一 Hg 胁迫, 外添 Ca 导致菹草体内 Car 含量上升, 也从一定程度上加强了抗氧化物质清除活性氧的能力.

重金属胁迫对植物的另一重要毒害机制是造成体内活性氧 (ROS) 的积累, 引发生物膜脂的过氧化, 从

而影响其正常代谢<sup>[35]</sup>.其中,MDA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<sup>[36]</sup>.而Hirschi认为Ca在植物体中具有防止膜损伤和渗漏、稳定细胞膜结构和维持膜完整性的作用<sup>[9]</sup>.本实验结果表明,外添Ca能显著抑制Hg胁迫诱导的 $O_2^-$ 产生速率增加、 $H_2O_2$ 大量积累,从而导致了MDA含量上升,这与Liu等对白车轴草及油菜等的研究结果一致<sup>[37]</sup>,证实外源Ca可以增强对膜的保护作用,进而保护植物细胞.正常生理条件下,植物体内活性氧代谢受酶促系统和非酶促系统调控而处于动态平衡, $V_C$ 、 $V_E$ 和GSH即为参与非酶促系统调控的3类抗氧化物质<sup>[38]</sup>.其中, $V_C$ 是植物体内一种普遍存在的高丰度小分子抗氧化物质,可以直接和活性氧作用将其还原. $V_E$ 不但是单线态氧和超氧阴离子自由基的清除剂,更重要的是脂质过氧化作用的阻断剂.GSH可以通过与 $V_C$ 的循环间接清除活性氧,自身转化为氧化型谷胱甘肽(GSSH).本实验中,单施Hg处理使菹草无菌苗体内的 $V_C$ 、 $V_E$ 和GSH含量明显升高,这表明Hg胁迫导致菹草体内抗氧化系统被启动,共同参与菹草体内ROS的清除.而加入外源Ca后,菹草体内的 $V_C$ 、 $V_E$ 和GSH含量反而降低,且都低于单一Hg处理组,说明Ca添加后,菹草体内的ROS并不是倚靠 $V_C$ 、 $V_E$ 和GSH来参与清除的,这可能与Ca削弱了菹草对Hg的蓄积以及通过其他途径降低了ROS有关.

多胺是一种类似“第二信使”的活性物质,研究表明,在植物体内多胺参与对逆境胁迫的抵抗作用,其代谢的紊乱会严重扰乱细胞的生长发育<sup>[35]</sup>.还有文献表明,带正电荷的PAs可与膜上带负电荷的基团结合,提高膜的稳定性,延缓Hg引起的类囊体膜的破坏,阻止叶绿素丧失<sup>[39]</sup>.作为 $H^+$ 的载体,PAs能够部分替代超氧化物歧化酶(SOD)的作用,通过歧化反应达到有效清除自由基的目的,除此之外PAs还可以提高植物体内抗氧化酶的活性,增强细胞自身的抗氧化能力<sup>[40]</sup>.本实验中,Hg胁迫扰乱PAs代谢,使菹草体内Put及Spm含量下降,这与Groppa等<sup>[41]</sup>对Cu胁迫下向日葵叶的研究结果一致.然而外源Ca的添加有效阻止了Put含量的下降,并大幅提高Spm的含量.在PAs合成代谢途径中,精氨酸、鸟氨酸分别在ADC、ODC的作用下合成Put,Put进一步转化为Spd和Spm;而在分解途径中,PAO和DAO调控着PAs的降解.本实验中,Hg胁迫增加了PAO、DAO及ADC的活性却抑制了ODC的活性,由此说明Put及Spm含量的下降是植物在逆境下细胞结构和功能遭受伤害时机体的应激反应,外源Ca主要是通过提高ADC活性的途径来增加Put的含量,这与Tarengi等的研究结果一致<sup>[42]</sup>.外添Ca后,PAO和DAO活性下降,Spm含量升高,Put含量恢复到对照水平.相关文献表明,Spm的增加可以阻止由盐胁迫诱导产生的电解质泄露,抑制叶绿素的丧失,一定程度上解除光反应的抑制<sup>[43]</sup>,同时也可以通过与膜表面带负电的分子作用,调控膜表面电荷,最终增强细胞膜系统的稳定性<sup>[40]</sup>.研究表明,Spm的氨基化程度最高,其清除氧自由基的能力也大于二胺(Put)和三胺(Spd)<sup>[40]</sup>.本实验结果表明,外源Ca处理并未提高Spd的含量,仅依靠于显著提高Spm含量来发挥作用,可能是植物更倾向于提高Spm来预防体内的氧化伤害.Yang等<sup>[35]</sup>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,有利于清除植物体内ROS.本实验中Hg处理组与对照组相比其游离态(Spd+Spm)/Put值有所提升,外源Ca的添加使其比值进一步升高,由此可见,Ca的加入可通过调节PAs来增强其适应机制,在一定程度上缓解了Hg的毒害.

综上所述,菹草无菌苗在受到Hg胁迫时体内光合色素发生分解,矿质元素平衡被破坏,抗氧化系统被诱导,正常生理代谢发生紊乱.外源Ca的添加主要通过抑制Hg的积累并参与调节多胺代谢,通过改变内源多胺含量来增加细胞膜的稳定性,降低活性氧水平和膜脂过氧化程度等多种途径激活植物体内抗胁迫机制,增加对Hg毒害的容忍性,从而帮助植物防御重金属胁迫.

#### 4 总结与展望

在全球范围内,水环境重金属污染中汞污染较为突出,这是由于汞污染物不仅不能被微生物分解,而且能在生物体内富集,并通过水生食物链的放大作用而对高营养级的生物甚至人类造成危害,因此引起研究者的特别关注.本文以太湖水系中分布广泛的水生植物菹草培育出的无菌苗为实验材料,对重金属胁迫以及添加外源钙的情况下植物体内抗氧化系统,PAs代谢、种类和含量以及相关酶的活性进行同步观测,进一步验证外源钙在植物胁迫环境适应中的积极作用,对湖泊生态修复有一定的指导意义.此外,钙的添加还可以抑制水体有害微生物的增长,有助于沉积物对水体磷的控制,降低水体富营养化,从而对维护水体的生态平衡起到重要作用.目前本文的研究只是初步结果,在野外是否能合理有效地以添加外源钙的方式来缓解

植物抗重金属胁迫的研究,还有待未来进一步的探索与分析.

## 5 参考文献

- [ 1 ] Evans AEV, Hanjrab MA, Jiang Y *et al.* Water quality: assessment of the current situation in Asia. *International Journal of Water Resources Development*, 2012, **28**(2): 195-216.
- [ 2 ] 李嗣新,汪红军,周连凤等. 流域水体污染的生态学效应及监测预警. *应用与环境生物学报*, 2011, **17**(2): 268-272.
- [ 3 ] 刘洪波,杨 健,甘居利. 太湖五里湖水域背角无齿蚌中汞的残留. *农业环境科学学报*, 2009, **28**(2): 411-415.
- [ 4 ] 刘恩峰,沈 吉,朱育新等. 太湖沉积物重金属及营养盐污染研究. *沉积学报*, 2004, **22**(3): 507-512.
- [ 5 ] Mor IR, Gokani SJ, Chanda SV. Effect of mercury toxicity on hypocotyl elongation and cell wall loosening in *Phaseolus* seedlings. *Journal of Plant Nutrition*, 2002, **25**(4): 843-860.
- [ 6 ] Shi GX, Xu QS, Xie KB *et al.* Physiology and ultrastructure of *Azolla imbricate* as affected by Hg and Cd toxicity. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(4): 437-444.
- [ 7 ] Ali MB, Vajpayee P, Tripathi RD *et al.* Mercury bioaccumulation induces oxidative stress and toxicity to submerged macrophyte *Potamogeton crispus* L. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 2000, **65**(5): 573-582.
- [ 8 ] 康宜宁,吴婷婷,施国新等. 汞对水生愈伤组织生理及超微结构的毒理性效应. *环境科学学报*, 2010, **30**(12): 2506-2511.
- [ 9 ] Hirschi KD. The calcium conundrum. both versatile nutrient and specific signal. *Plant Physiology*, 2004, **136**(1): 2438-2442.
- [ 10 ] Wang CQ, Song H. Calcium protects *Trifolium repens* L. seedlings against cadmium stress. *Plant Cell Reports*, 2009, **28**(9): 1341-1349.
- [ 11 ] Ouzounidou G, Moustakas M, Symeonidis L *et al.* Response of wheat seedlings to Ni stress: effects of supplemental calcium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, **50**(3): 346-352.
- [ 12 ] Durmu N, Kadioglu A. Spermine and putrescine enhance oxidative stress tolerance in maize leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2005, **27**(4A): 515-522.
- [ 13 ] Choudhary SP, Dral HV, Bhardwaj R *et al.* Interaction of brassinosteroids and polyamines enhances copper stress tolerance in *Raphanus sativus*. *Journal of Experimental Botany*, 2012, **63**(15): 5659-5675.
- [ 14 ] Xu XY, Shi GX, Ding CX *et al.* Regulation of exogenous spermidine on the reactive oxygen species level and polyamine metabolism in *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb under copper stress. *Plant Growth Regulation*, 2011, **63**(3): 251-258.
- [ 15 ] Yang HY, Shi GX, Qiao XQ *et al.* Exogenous spermidine and spermine enhance cadmium tolerance of *Potamogeton malayanus*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2011, **58**(4): 622-628.
- [ 16 ] 陈书霞,周 静,姜 芳等. 外源  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  对 NaCl 胁迫下番茄幼苗生理特征的影响. *西北植物学报*, 2009, **29**(9): 1867-1873.
- [ 17 ] Lu LL, Tian SK. The role of Ca pathway in Cd uptake and translocation by the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **183**(1/2/3): 22-28.
- [ 18 ] Zaki FT, Fathi AA. Impact of copper on some physiological aspects of *Nostoc muscorum* with special references to the detoxifying role of calcium. *Acta Botanica Hungarica*, 2004, **46**(3/4): 423-433.
- [ 19 ] 陈 因,方大惟. 钙对蓝藻固氮受氯化钠胁迫的缓解效应及其与生理条件的关系. *热带亚热带植物学报*, 1994, **2**(4): 88-94.
- [ 20 ] 高 健,杨 劭. 沉水植物菹草的组织培养和快速繁殖. *植物生理学通讯*, 2006, **42**(2): 251-252.
- [ 21 ] Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembrances. *Methods in Enzymology*, 1987, **148**: 350-382.
- [ 22 ] 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, **26**(6): 55-57.
- [ 23 ] 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: 122-126.
- [ 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**(2): 175-186.
- [ 25 ] Zhao FG, Sun C, Liu YL *et al.* Relationship between polyamine metabolism in roots and salt tolerance of barley seedlings.



- Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**(3): 295-300.
- [26] 汪天,郭世荣,刘俊等.多胺氧化酶检测方法的改进及其在低氧水培黄瓜根系中的应用.植物生理学通讯,2004,**40**(3):358-360.
- [27] Boussama N, Ouariti O, Ghorbal MH. Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition*, 1999, **22**(4/5):731-752.
- [28] Liu JG, Liang JS, Li KQ *et al.* Correlations between cadmium and mineral nutrients in absorption and accumulation in various genotypes of rice under cadmium stress. *Chemosphere*, 2003, **52**(9):1467-1473.
- [29] 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.
- [30] 周东美,汪鹏.基于细胞膜表面电势探讨Ca与毒性离子在植物根膜表面的相互作用.中国科学:化学,2011,**41**(7):1190-1197.
- [31] Suzuki N. Alleviation by calcium of cadmium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biotechnology*, 2005, **22**(1):19-25.
- [32] 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.生态学报,2007,**27**(7):2856-2863.
- [33] Monteiro MS, Santos C, Mann RM. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, **72**(3): 811-818.
- [34] Calleja MA, Vieites JM, Meterdez TM *et al.* The antioxidant effect of  $\beta$ -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *British Journal of Nutrition*, 2013, **109**(3): 394-401.
- [35] Yang HY, Shi GX, Wang HX *et al.* Involvement of polyamines in adaptation of *Potamogeton crispus* L. to cadmium stress. *Aquatic Toxicology*, 2010, **100**(3):282-288.
- [36] 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.
- [37] Lu LL, Tian SK. The role of Ca pathway in Cd uptake and translocation by the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, **183**(1/2/3): 22-28.
- [38] 徐勤松,施国新,杜开和.锌胁迫下水车前叶细胞自由基过氧化损伤与超微结构变化之间关系的研究.植物学通报,2001,**18**(5):597-604.
- [39] Tiburcio AF, Campos JL, Figueras X *et al.* Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant Growth Regulation*, 1993, **12**(3):331-340.
- [40] 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.
- [41] Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science*, 2001, **161**(3):481-488.
- [42] Tarengi E, Martin-Tanguy J. Polyamines, floral induction and floral development of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Plant Growth Regulation*, 1995, **17**(2):157-165.
- [43] Chattopadhyay MK, Tiwari BS, Chattopadhyay G *et al.* Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 2002, **116**(2):192-199.