

# Hg<sup>2+</sup> 对苜蓿叶片的毒害效应

张 健<sup>1</sup>, 刘美艳<sup>2</sup>, 肖 炜<sup>1</sup>

(1. 徐州师范大学生物系, 江苏徐州 221009; 2. 徐州农业学校, 江苏徐州 221006)

**摘 要:** 研究了 Hg<sup>2+</sup> 对苜蓿叶片的毒害效应。结果表明: 随着 Hg<sup>2+</sup> 浓度的增加和处理时间的延长, 叶绿素含量下降, 电导度上升; 低 Hg<sup>2+</sup> 浓度及短时间处理, 超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)和丙二醛(MDA)含量增加, SOD、POD 和 CAT 等保护酶活性升高, 表明膜系统受到了伤害; 高 Hg<sup>2+</sup> 浓度及长时间处理, O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 MDA 含量下降, SOD、POD 和 CAT 等保护酶活性降低, 表明细胞结构和功能受到了不可逆的伤害。

**关键词:** Hg<sup>2+</sup>; 苜蓿; 超氧阴离子自由基; 丙二醛; 保护酶

**中图分类号:** Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)06-0553-04

## The toxic effect of Hg<sup>2+</sup> on alfalfa leaves

ZHANG Jian<sup>1</sup>, LIU Mei-yan<sup>2</sup>, XIAO Wei<sup>1</sup>

(1. Department of Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221009, China;

2. Xuzhou Agricultural school, Xuzhou 221006, China)

**Abstract:** The toxic effect of Hg<sup>2+</sup> on alfalfa leaves was studied. The results showed that the content of chlorophyll decreased and the conductivity increased with Hg<sup>2+</sup> concentration's increase and the treated time's prolongation. In low Hg<sup>2+</sup> concentration and short treated time, the content of superoxide free radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and malondialdehyde(MDA) increased, the activity of protective enzyme such as SOD、POD and CAT increased too, which indicated that the membrane system had been damaged. However, in high Hg<sup>2+</sup> concentration and the treated time's prolonged, the content of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and MDA decreased and the activity of protective enzyme such as SOD、POD and CAT decreased too, which indicated that the construction and function of cells had been suffered irreversible damage.

**Key words:** Hg<sup>2+</sup>; alfalfa; superoxide free radical; malondialdehyde; protective enzyme

苜蓿不仅是一种优良的牧草,而且可以作为绿化城市的草坪草。作为草坪草种植时,不可避免地会受到城市工业废水、废气的污染。随着工业废水、废气的过度排放,使得大量重金属进入土壤—植物生态系统,使陆生生态系统受到污染, Hg<sup>2+</sup> 是主要重金属污染物之一<sup>[1]</sup>。以水生植物为材料,研究 Hg<sup>2+</sup> 污染对植物生长发育影响的报道较多<sup>[2,3]</sup>。本文以白花苜蓿为材料,研究了 Hg<sup>2+</sup> 对苜蓿叶片叶绿素含量、电导度、活性氧含量、膜脂过氧化及抗氧化酶活性的影响,旨在为苜蓿作为城市草坪草的种植提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

白花苜蓿(*Trifolium repens* L.)草籽采自徐州师范大学泉山校区绿化草坪内,草籽用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 15 min,经去离子水漂洗后点播于含有蛭石的培养皿中人工培养。培养条件为:光周期 12 : 12(L : D),光照强度 250 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>,温度 28 °C。用 1/2 Hoagland 培养液提供苜蓿幼苗生长所需的水分和养分,三叶期后,分别用含 Hg<sup>2+</sup> 为 0、

收稿日期: 2001-10-16

作者简介: 张 健(1966-),男,江苏沛县人,讲师,硕士,主要从事植物生理方面的教学与科研工作。

0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mmol/L 的 1/2 Hoagland 培养液处理苜蓿幼苗,从第 2 d 起,取苜蓿叶片进行各项分析测定。

### 1.2 方法

叶绿素含量按照张志良<sup>[4]</sup>的方法测定;电导度按照张志良<sup>[5]</sup>的方法测定:取 3 g 叶片,用自来水反复冲洗,蒸馏水漂洗 3 次,以 30 mL 蒸馏水浸泡 1 h,用 DDS-11A 型电导率仪测定电导度;超氧阴离子( $O_2^-$ )相对含量参照王爱国等<sup>[6]</sup>的方法测定;丙二醛(MDA)含量参照 Heath<sup>[7]</sup>的硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定;超氧化物歧化酶(SOD)活性参照 Stewart 和 Bewley<sup>[8]</sup>抑制 NBT 光还原的方法测定;过氧化物酶(POD)活性参照李瑞智<sup>[9]</sup>愈创木酚法测定;过氧化氢酶(CAT)活性按 Chance<sup>[10]</sup>方法测定;可溶性蛋白质含量按 Bradford<sup>[11]</sup>的考马斯亮

蓝 G-250 法测定。

## 2 结果分析

### 2.1 $Hg^{2+}$ 对苜蓿叶片叶绿素含量和电导度的影响

叶绿素是高等植物吸收光能的主要色素,它的含量高低是衡量叶片光合能力的重要指标。经  $Hg^{2+}$  处理后,苜蓿叶片叶绿素含量发生了变化(图 1)。结果表明,低浓度(0.01 和 0.02 mmol/L)  $Hg^{2+}$  及短时间(2 d 和 4 d)处理叶绿素含量下降不明显。随着  $Hg^{2+}$  处理浓度的增加和处理时间的延长,叶绿素含量呈明显下降趋势,经 0.05 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 8 d 后,叶绿素含量仅为处理前的 35%。表明经  $Hg^{2+}$  处理后,叶片的光合性能将会受到影响。

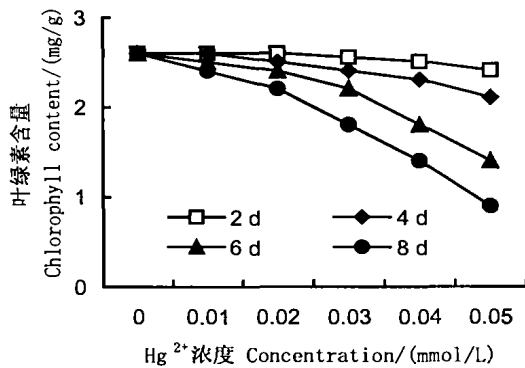


图 1  $Hg^{2+}$  对苜蓿叶片叶绿素含量的影响  
Fig. 1 Effects of  $Hg^{2+}$  on chlorophyll content

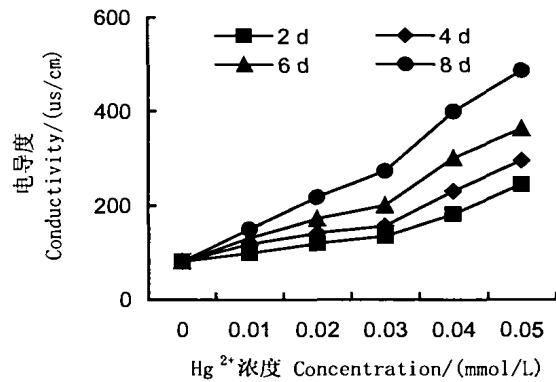


图 2  $Hg^{2+}$  对苜蓿叶片电导度的影响  
Fig. 2 Effects of  $Hg^{2+}$  on conductivity

苜蓿叶片经  $Hg^{2+}$  处理后,电导度逐步升高(图 2)。在本实验范围内,最大值出现在 0.05 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 8 d 时,和处理前相比,电导度上升了 5.9 倍。表明经  $Hg^{2+}$  处理后,苜蓿叶片膜结构受到损伤,细胞膜透性加大,电解质外渗。

### 2.2 $Hg^{2+}$ 对苜蓿叶片 $O_2^-$ 和 MDA 含量的影响

经  $Hg^{2+}$  处理后,苜蓿叶片  $O_2^-$  含量发生了明显变化(图 3)。在低浓度(0.01 和 0.02 mmol/L)  $Hg^{2+}$  处理时, $O_2^-$  含量明显增加,当 0.03 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 6 d 时,苜蓿叶片  $O_2^-$  含量达到最高值,是处理前的 260%,随着  $Hg^{2+}$  浓度的增大,处理时间的延长, $O_2^-$  又逐渐下降,当 0.05 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 8 d 时  $O_2^-$  含量仅相当于最高含量的 58%。MDA 含量的变化与  $O_2^-$  变化趋势相似(图 4),最大值出现在 0.03 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 6 d 的时候,是处

理前的 250%。当 0.05 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 8 d 时 MDA 含量仅相当于最高含量的 50%。

### 2.3 $Hg^{2+}$ 对苜蓿叶片活性氧清除酶活性的影响

超氧化物歧化酶(SOD)歧化  $O_2^-$  为  $H_2O_2$  和  $O_2$ ,过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)是植物体内  $H_2O_2$  的清除酶,这 3 种酶协同作用,组成一个有效的活性氧清除系统。经  $Hg^{2+}$  处理后,苜蓿叶片 SOD 活性(图 5)迅速升高,0.02 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 8 d 时,SOD 活性达到最大值,为处理前的 220%;0.03 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 6 d 时,SOD 活性开始下降,至 0.04 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 8 d 时,SOD 活性为处理前的 94%,0.05 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 8 d 时,SOD 活性仅为处理前的 58%。POD 活性(图 6)也随着  $Hg^{2+}$  处理浓度的增加和时间的延长而增大,最大值出现在 0.04 mmol/L  $Hg^{2+}$  处理 4 d 时,

当  $0.03 \text{ mmol/L Hg}^{2+}$  处理 8 d 时, POD 活性开始下降,  $0.05 \text{ mmol/L Hg}^{2+}$  处理 8 d 时, POD 活性仅为处理前的 66%。CAT 活性(图 7)的最大值出现的时间要比 SOD 和 POD 活性最大值出现的早, 出现在  $0.01 \text{ mmol/L Hg}^{2+}$  处理 8 d 时, 此后, 在

$0.02$ 、 $0.03$ 、 $0.04$  和  $0.05 \text{ mmol/L Hg}^{2+}$  处理 6 d、8 d 时, CAT 活性急剧下降,  $0.03 \text{ mmol/L Hg}^{2+}$  处理 8 d 时, CAT 活性为处理前的 92%,  $0.05 \text{ mmol/L Hg}^{2+}$  处理 8 d 时, CAT 活性仅为处理前的 67%。

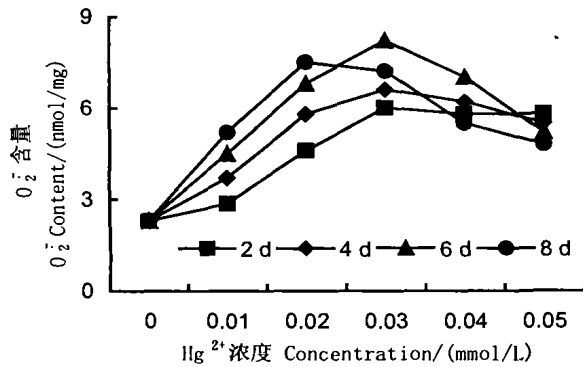


图 3  $\text{Hg}^{2+}$  对苜蓿叶片  $\text{O}_2^-$  含量的影响  
Fig. 3 Effects of  $\text{Hg}^{2+}$  on  $\text{O}_2^-$  content

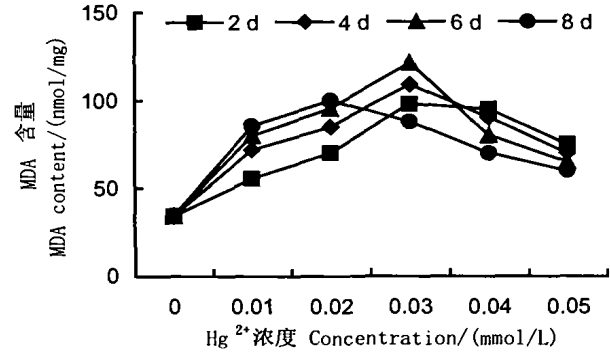


图 4  $\text{Hg}^{2+}$  对苜蓿叶片 MDA 含量的影响  
Fig. 4 Effects of  $\text{Hg}^{2+}$  on malondialdehyde content

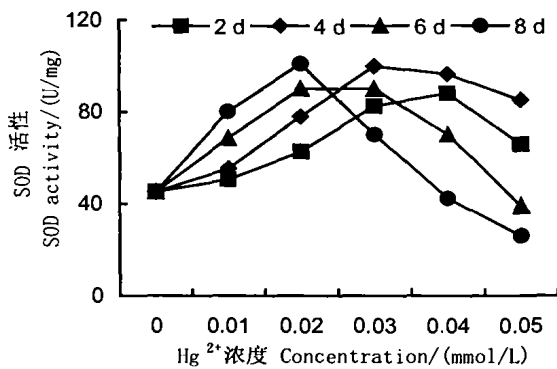


图 5  $\text{Hg}^{2+}$  对苜蓿叶片 SOD 活性的影响  
Fig. 5 Effects of  $\text{Hg}^{2+}$  on SOD activity

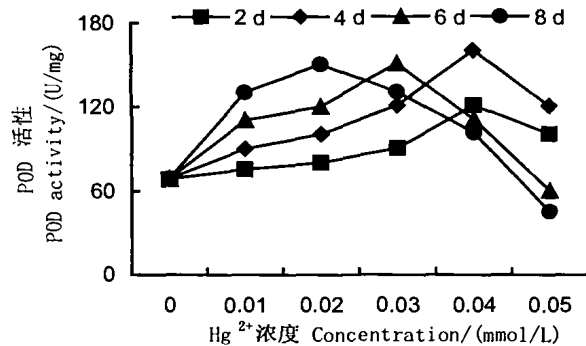


图 6  $\text{Hg}^{2+}$  对苜蓿叶片 POD 活性的影响  
Fig. 6 Effects of  $\text{Hg}^{2+}$  on POD activity

### 3 讨 论

苜蓿叶片对  $\text{Hg}^{2+}$  毒害反应敏感, 随着  $\text{Hg}^{2+}$  浓度的增加和处理时间的延长, 叶绿素含量呈下降趋势。Stobart A K<sup>[12]</sup> 等认为叶绿素降解的原因一方面是因为重金属离子抑制叶绿素酸酯还原酶活性并影响氨基- $\gamma$ -酮戊酸的合成从而影响叶绿素的合成; 另一方面与叶绿体中的蛋白质-SH 结合或取代  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  等破坏叶绿体的结构和功能, 从而导致叶绿素分解加快。

细胞膜透性是反映植物对污染物反应的生理指标之一。经  $\text{Hg}^{2+}$  处理后, 苜蓿叶片电导度升高, 说

明细胞膜结构受到损伤, 电解质外漏。

$\text{O}_2^-$  是机体代谢过程中产生的重要自由基, 在生物体内具有很强的毒害作用,  $\text{O}_2^-$  可以攻击蛋白质的氨基酸残基, 形成羰基衍生物, 另一方面  $\text{O}_2^-$  可通过酶促反应歧化成  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{O}_2$ , 而  $\text{H}_2\text{O}_2$  能够通过 Haber-Weiss 反应产生更为活跃、更有毒性的  $\text{OH}^\cdot$ , 导致膜脂过氧化, MDA 则是膜脂过氧化作用的产物, 二者存在相关关系<sup>[13]</sup>。经  $\text{Hg}^{2+}$  处理后, 苜蓿叶片  $\text{O}_2^-$  和 MDA 产生速率随  $\text{Hg}^{2+}$  浓度和时间的增加而增加, 这是生物体在逆境条件下细胞受损的最早反应, 反映了  $\text{Hg}^{2+}$  胁迫下苜蓿叶片细胞活性受到了伤害, 由于细胞机体的应激反应, 引起放大作用, 产生新的自由基, 形成新的脂质过氧化产

物,当  $\text{Hg}^{2+}$  浓度和处理时间增大到一定程度时,  $\text{O}_2^-$  和 MDA 下降是由于苜蓿叶片膜系统受到伤害,从而影响到苜蓿叶片的生理生化机能,使叶片的光合作用、呼吸作用等发生变化甚至紊乱,直至导致幼苗死亡。

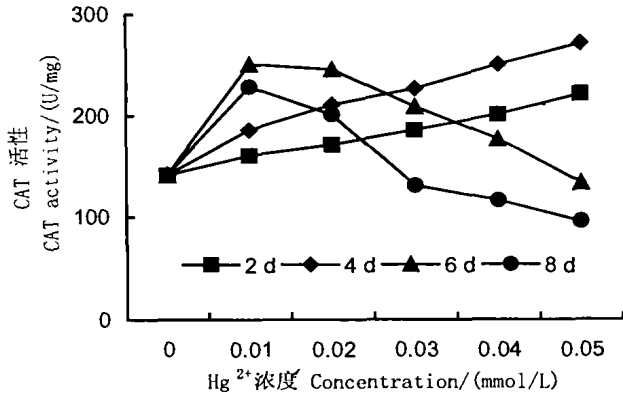


图 7  $\text{Hg}^{2+}$  对苜蓿叶片 CAT 活性的影响

Fig. 7 Effects of  $\text{Hg}^{2+}$  on CAT activity

正常条件下,植物体内活性氧的产生和清除处在一个动态平衡中,但在逆境下,植物体内活性氧自由基产生的速度超出了植物清除活性氧自由基的能力,便会引起伤害。植物体内活性氧的清除主要由某些酶系统和抗氧化物质来完成,SOD、POD 和 CAT 是一个重要的活性氧清除系统。SOD 能催化  $\text{O}_2^-$  发生歧化作用生成  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,再由 POD 和 CAT 将  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解成  $\text{H}_2\text{O}$ 。在低浓度  $\text{Hg}^{2+}$  短期处理时,随着  $\text{O}_2^-$  的增加,苜蓿叶片中 SOD、POD 和 CAT 活性都增强,这与罗立新<sup>[14]</sup>等在小麦叶片中得到的结果相同,这是植物叶片为了清除  $\text{O}_2^-$  的伤害而产生的一种积极的应激反应,但是随着  $\text{Hg}^{2+}$  浓度的增加和处理时间的延长,重金属对植物的毒害作用加深,引起细胞代谢失调,破坏了苜蓿叶片的保护酶系统,使 SOD、POD 和 CAT 活性下降,最终导致植物衰老死亡。CAT 活性下降较快,可能是苜蓿叶片的 CAT 对  $\text{Hg}^{2+}$  反应比较敏感。

#### 参考文献:

[1] 王定勇,牟树森,青长乐,等. 大气汞对土壤-植物

系统汞累积的影响[J]. 环境科学学报, 1998, 18(2): 194-198.

[2] 韩宏英. Hg 对斜生栅藻生长发育及光合作用的影响[J]. 环境科学学报, 1984, 4(2): 157-163.

[3] 郝怀庆,施国新,徐勤松. 汞污染对水鳖的毒害影响[J]. 南京师大学报, 2000, 23(3): 87-90.

[4] 张志良. 植物生理学实验指导(第 3 版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 88-91.

[5] 张志良. 植物生理学实验指导(第 3 版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997. 257-258.

[6] 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, 26(6): 55-57.

[7] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1968, 25: 189-198.

[8] Stewart R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes[J]. *Plant Physiol*, 1980, 65: 245-248.

[9] 李瑞智,黄林.  $\text{SO}_2$  对作物叶片过氧化物酶的影响[J]. 西南师范大学学报, 1984, 9(3): 380-385.

[10] Chance B, Maehly A C. Assay of catalases and peroxidases[J]. *Methods Enzymol*, 1955, 2: 764-775.

[11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.

[12] Stobart A k, Griffiths W T, Ameen-Bukhari I, et al. The effect of  $\text{Cd}^{2+}$  on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley[J]. *Physiol Plant*, 1985, 63: 293-298.

[13] 杜秀敏,殷文璇,赵彦修,等. 植物中活性氧的产生及清除机制[J]. 生物工程学报, 2001, 17(2): 121-125.

[14] 罗立新,孙铁珩,靳月华. 镉胁迫下小麦叶中超氧阴离子自由基的积累[J]. 环境科学学报, 1998, 18(5): 495-499.