

铬(Cr^{6+})对水花生愈伤组织的毒害效应

张乐乐, 施国新*, 王娟, 康宜宁, 徐小颖, 陈辉

(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: 研究了不同浓度的 Cr^{6+} (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对水花生愈伤组织内几种代表性生理生化指标的胁迫效应, 并对其进行了电镜观察。结果表明: (1) 随着 Cr^{6+} 浓度的增加, 总叶绿素、叶绿素 a/b 和可溶性蛋白含量, 均呈先升后降趋势。(2) 超氧阴离子($\text{O}_2^- \cdot$) 和过氧化氢(H_2O_2) 含量在 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时应激性地增加, 随后又呈先降后升趋势, 但始终高于对照。(3) 可溶性糖含量随 Cr^{6+} 浓度的升高逐渐升高。(4) 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)的活性以及抗坏血酸(ASA)和谷胱甘肽(GSH)含量均表现为先升后降。(5) 电镜观察发现, Cr^{6+} 使叶绿体类囊体片层扭曲, 被膜破损, 有巨大淀粉粒存在; 线粒体嵴突数目减少, 空泡化; 核仁松散、消失, 染色质凝集; 内质网以形成囊泡形式逐渐消失。可见, Cr^{6+} 胁迫破坏了水花生愈伤组织的正常生理生化活动, 对其细胞超微结构造成了不可逆的损伤。

关键词: Cr^{6+} ; 水花生; 愈伤组织; 生理生化

中图分类号: Q945.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)03-0377-06

Toxic of chromium(Cr^{6+}) on the callus of *Alternanthera philoxeroides*

ZHANG Le-Le, SHI Guo-Xin*, WANG Juan, KANG Yi-Ning,
XU Xiao-Ying, CHEN Hui

(Jiangsu Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract: This study focused on changes of several representative physiological characteristics and ultrastructure in the callus of *Alternanthera philoxeroides* under different concentrations of Cr^{6+} stress (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). The results showed that with the increasing of Cr^{6+} , (1) total chlorophyll (Chl), chlorophyll a/b (Chl a/b) and total soluble protein contents showed the same trend, which increased firstly and then decreased. (2) Superoxide anion ($\text{O}_2^- \cdot$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) content irritably increased compared to the control group, then decreased, however, it's always higher than that of control. (3) The soluble sugar content enhanced with the increasing of Cr^{6+} concentration. (4) Activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) and ASA and GSH contents all increased first and then decreased. (5) Transmission electron microscope observation indicated that Cr^{6+} also imposed injury action on ultrastructure of callus cells: thylakoid twisted, chloroplast envelope broke and large starch grain formed, mitochondria disappeared and formed vacuolization, nucleolus lost and chromatin condensed in nucleus, and endoplasmic reticulum vanished by means of vesiculation. The conclusion could be reached that toxic effects of Cr^{6+} on callus resulted in disorder of physiological and biochemical metabolism and destruction of ultrastructure of callus cells.

Key words: Cr^{6+} ; *Alternanthera philoxeroides*; callus; characteristics

收稿日期: 2010-11-14 修回日期: 2011-03-07

基金项目: 国家自然科学基金(30870139) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870139)]

作者简介: 张乐乐(1986-), 女, 安徽滁州人, 在读硕士研究生, 主要从事水生植物重金属毒害机制的研究, (E-mail) lele6331@yahoo.cn.

* 通讯作者: 施国新, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物学, (E-mail) gxshi@njnu.edu.cn.

在自然状态下,铬有 Cr^{3+} 和 Cr^{6+} 两种形态,其中 Cr^{6+} 是重要的环境污染物和生物致畸、致突变剂(顾公望等,1993)。 Cr^{6+} 更易溶于水,通过水生植物最终到达食物链的顶端,从而对人体健康造成伤害(Wang & Qin,2006)。因此,探讨 Cr^{6+} 对植物的作用和耐受机理有重要的意义。近年来,国内外对于水生环境 Cr^{6+} 污染有一定的研究,研究表明(Sheng等,2004;龚丽丽等,2010;Debasis等,2002;黄辉等,2007), Cr^{6+} 在植物体内积累过量,可在代谢过程中参与植物体内的氧化还原反应,产生大量活性氧,从而导致植物细胞膜透性增大,酶活性下降,叶绿体分解,抑制细胞分裂,诱发染色体畸变和微核的形成,并对蛋白质及 DNA 等生物大分子造成损伤。但以往对 Cr^{6+} 毒害作用的研究对象多为自然环境下生长的植物,对光照、温度、水分,及植物的不同生长发育阶段材料采集很难做到精确掌控,实验数据重复性差。如果采用植物的愈伤组织作为实验材料,则可以较好地解决这个问题,并可以在不同时期重复实验,不受植物生长季节限制。另外,同一植物的不同部位(根、茎、叶)对重金属的反应不同,而愈伤组织是各部分生长较为一致的细胞群,易于观察研究。

用水生植物愈伤组织进行重金属毒害研究是一种比较新的方法,目前国内外研究甚少。本文选取广布性挺水植物水花生的愈伤组织为实验材料,研究不同浓度的 Cr^{6+} 对其叶绿素、活性氧、可溶性蛋白及可溶性糖含量,抗氧化酶(超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT))活性,ASA 和 GSH 含量及细胞超微结构的影响,以期重金属污染的防治提供新的方法和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

水花生采自南京师范大学生命科学学院水生生物培育池,采集后置于大玻璃缸中,用自来水预培养 2 d 后,选取水花生幼嫩的茎段,在无菌条件下,接种于含有 6-BA 和 NAA(6-BA/NAA=3 mg · L⁻¹/0.2 mg · L⁻¹)的 1/2MS 固体培养基上,放入光照培养室中,培养室温度为 25 °C,每天光照 16 h,光照强度为 1 200~1 500 lx,培养出水花生愈伤组织(袁燕等,2004),选取呈青白色且生长致密的愈伤组织用于重金属毒害的实验材料。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 选取长势相同的水花生愈伤组织,转入加有不同 Cr^{6+} 浓度(0、0.1、0.2、0.5、1.5 mmol · L⁻¹)的液体培养基中,仍置于光照培养室中进行急性毒害。毒害 7 d 取出愈伤组织,去离子水洗净,吸水纸吸干,用于生理指标的测定。所有实验均进行 3 次重复。

1.2.2 生理指标测定 叶绿素含量测定采用 Arnon(1949)的分光光度法测定;超氧阴离子 O_2^- 含量采用王爱国等(1990)的羟胺氧化法测定; H_2O_2 含量采用一般的分光光度法,用从南京建成生物工程研究所购买的试剂盒测定;可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法(Bradford,1976),以牛血清蛋白为标准蛋白;可溶性糖含量采用李合生等(2000)的比色法测定;SOD 活性测定采用 NBT 光化还原法(Beyer & Frids ovich,1987);POD 活性测定采用愈创木酚方法(张志良等,2003);CAT 活性测定采用钼酸盐方法测定(Karsten 等,1998)。ASA 和 GSH 含量分别按照陈建勋等(2002)的比色法和 DTNB 法测定。

1.2.3 超微结构观察 取 Cr^{6+} 处理 7 d 的愈伤组织,迅速用 4%戊二醛和 2%锇酸双重固定,丙酮系列脱水,Epon812 包埋,LKB-V 超薄切片仪切片,柠檬酸铅-醋酸双氧铀染色,Hitachi-A-2 透射电镜(日本)观察,拍照。

1.3 统计分析

取 3 次重复实验的平均值 ± 标准差。数据的处理和制图采用 Excel 和 SPSS13.0 统计软件完成。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 Cr^{6+} 胁迫对水花生愈伤组织细胞总叶绿素(chl)含量和叶绿素 a/b(chla/b)的影响

从图 1、图 2 看出,水花生愈伤组织的 chl 和 chla/b 均在 Cr^{6+} 浓度为 0.1 mmol · L⁻¹ 时应激性地升高,而后随着 Cr^{6+} 毒害浓度的增加,chl 和 chla/b 都呈下降趋势,在 1.5 mmol · L⁻¹ 的 Cr^{6+} 浓度时降至最低值,且都与对照差异显著,分别为对照的 43.94%和 43.81%。

2.2 不同浓度 Cr^{6+} 胁迫对水花生愈伤组织细胞 O_2^- 、 H_2O_2 、ASA 和 GSH 含量的影响

从表 1 看出, O_2^- 含量先在 Cr^{6+} 浓度为 0.1 mmol · L⁻¹ 时有所上升,为对照的 1.82 倍,当 Cr^{6+}

浓度增至 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈下降

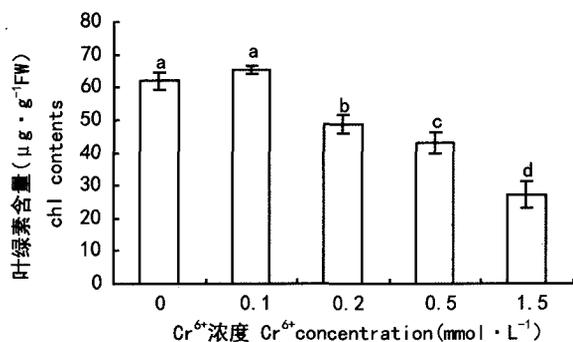


图 1 Cr^{6+} 对水花生愈伤组织叶绿素含量的影响
Fig. 1 Effects of Cr^{6+} on the chlorophyll contents in callus of *Alternanthera philoxeroides*

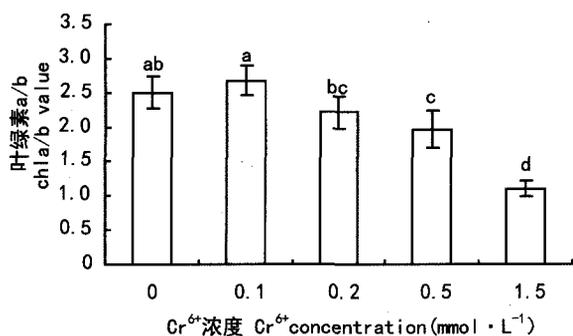


图 2 Cr^{6+} 对水花生愈伤组织叶绿素 a/b 的影响
Fig. 2 Effects of Cr^{6+} on the chl a/b value in the callus of *Alternanthera philoxeroides*

表 1 Cr^{6+} 胁迫对水花生愈伤组织细胞 O_2^- 含量、 H_2O_2 、ASA 和 GSH 含量的影响

Table 1 Effects of Cr^{6+} on O_2^- , H_2O_2 , ASA and GSH contents in the callus of *Alternanthera philoxeroides*

Cr ⁶⁺ 浓度 (mmol · L ⁻¹) Cr ⁶⁺ concentration	O_2^- 含量 (nmol · g ⁻¹ Fw)	H_2O_2 含量 (μmol · g ⁻¹ Fw)	ASA 含量 (mg · g ⁻¹ Fw)	GSH 含量 (mg · g ⁻¹ Fw)
0	8.37 ± 1.12 d	45.27 ± 8.69 d	2.98 ± 0.12 c	8.72 ± 1.09 e
0.1	15.2 ± 1.11 b	96.53 ± 4.85 b	3.25 ± 0.18 b	11.72 ± 0.90 d
0.2	12.0 ± 1.11 c	68.57 ± 4.63 c	4.19 ± 0.13 a	17.57 ± 0.88 a
0.5	10.53 ± 1.86 cd	55.03 ± 2.76 d	2.81 ± 0.17 cd	14.48 ± 1.00 bc
1.5	21.8 ± 1.51 a	119.27 ± 7.01 a	2.67 ± 0.15 d	12.73 ± 1.39 cd

注: 同列数据中不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different normal letters on the same line stand for differences at 0.05 level.

度的 Cr^{6+} 处理对蛋白质的合成和代谢有严重的破坏作用。而可溶性糖含量则随着 Cr^{6+} 胁迫浓度的增大逐渐增大, 与 Cr^{6+} 浓度呈极显著正相关性 ($r = 0.983, P < 0.01$)。在 Cr^{6+} 胁迫浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 可溶性糖的含量已增加为对照的 1.75 倍。

2.4 不同浓度 Cr^{6+} 胁迫对水花生愈伤组织细胞 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

由图 4 看出, 随着 Cr^{6+} 胁迫程度的增大, 三种

趋势, 但仍比对照高, 在最高浓度 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时又急剧增大, 达到对照的 2.6 倍, 且与对照差异显著。另外, H_2O_2 含量也呈现出与 O_2^- 相同的变化趋势, 即先在 Cr^{6+} 浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时上升为对照的 2.13 倍, 随后在 Cr^{6+} 浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 略有下降, 但 H_2O_2 含量均比对照高, 最后在 Cr^{6+} 浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到峰值, 是对照的 2.63 倍。

表 1 显示, ASA 和 GSH 含量均表现为先升后降, 都在 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr^{6+} 胁迫时达到最大值, 均与对照差异显著, 分别为对照的 1.41 倍和 2.02 倍。随着 Cr^{6+} 胁迫浓度的不断增大, 两者的含量都开始下降。不同的是, ASA 含量在 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cr^{6+} 浓度时略低于对照, 分别为对照的 94.35% 和 89.59%, 但毒害组的 GSH 含量始终高于对照, 在 Cr^{6+} 浓度达 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 仍是对照的 1.46 倍。

2.3 不同浓度 Cr^{6+} 胁迫对水花生愈伤组织细胞可溶性蛋白质和可溶性糖含量的影响

图 3 表明, 在 Cr^{6+} 胁迫浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 水花生愈伤组织中的可溶性蛋白质含量应激性增大, 与对照差异达到显著水平, 为对照的 2.03 倍。随着毒害浓度的增大, 可溶性蛋白质含量呈单峰下降变化, Cr^{6+} 胁迫浓度为 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 可溶性蛋白含量降至最低, 仅为对照的 56.8%, 说明高浓

酶均呈现先升后降的变化趋势。毒害组的 SOD 和 POD 活性均高于对照, SOD 在 Cr^{6+} 浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到峰值, 是对照的 1.21 倍, 与对照呈显著差异性, 而 SOD 的活性在整个过程中变化趋势较为缓慢, 在整个变化过程中与处理浓度之间呈显著正相关性 ($r = 0.8778, P < 0.05$); POD 的最大值出现在 Cr^{6+} $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处, 是对照的 2.51 倍; 随后 POD 的活性缓慢降低, 但活性均比对照高。

0.2 mmol · L⁻¹的 Cr⁶⁺使 CAT 活性达到峰值,与对照差异达到显著水平,为对照的 1.75 倍,随后 CAT 活性逐渐降低。

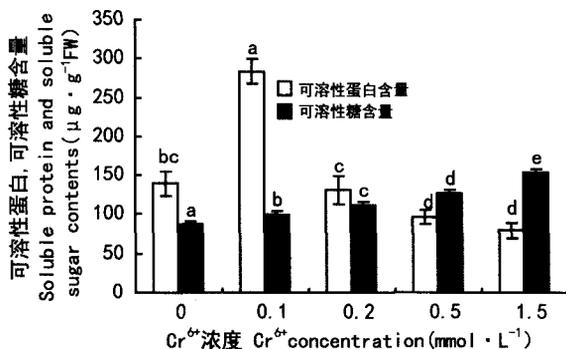


图 3 Cr⁶⁺对水花生愈伤组织可溶性蛋白和可溶性糖含量的影响

Fig. 3 Effects of Cr⁶⁺ on the soluble protein and soluble sugar contents in the callus of *Alternanthera philoxeroides*

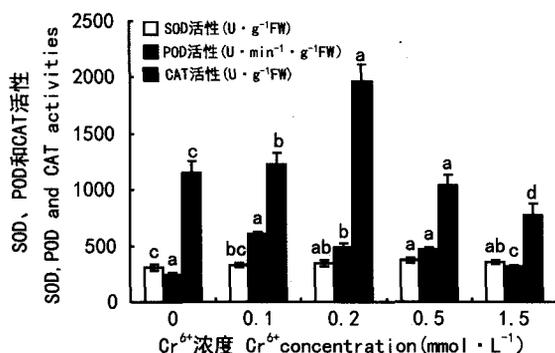


图 4 Cr⁶⁺对水花生愈伤组织 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

Fig. 4 Effects of Cr⁶⁺ on SOD, POD and CAT activities in the callus of *Alternanthera philoxeroides*

2.5 不同浓度 Cr⁶⁺ 胁迫对水花生愈伤组织细胞超微结构的影响

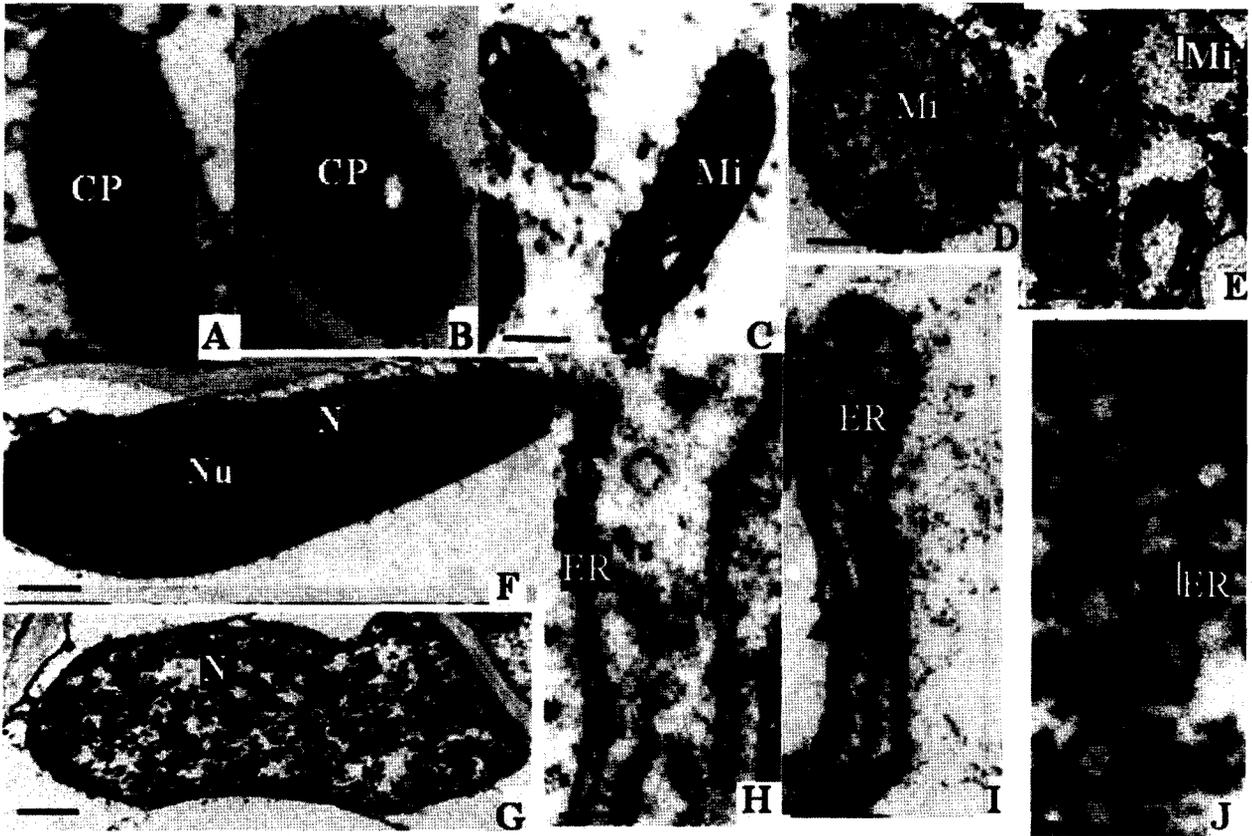
电镜观察发现, Cr⁶⁺ 胁迫对水花生愈伤组织细胞超微结构造成明显损伤, 随着 Cr⁶⁺ 处理浓度的增大, 其破坏程度加重。①正常的叶绿体为长椭圆形, 类囊体基粒和片层排列整齐(图版 I : A)。0.5 mmol · L⁻¹ Cr⁶⁺ 处理的愈伤组织细胞中, 叶绿体局部双层膜出现破损, 类囊体基粒和片层严重扭曲, 并可见到清晰的淀粉粒存在(图版 I : B)。②正常的线粒体嵴突呈管状, 间质浓密(图版 I : C)。0.1 mmol · L⁻¹的 Cr⁶⁺ 处理的细胞中, 线粒体嵴突遭到破坏, 呈凌乱状态(图版 I : D); 0.5 mmol · L⁻¹的

Cr⁶⁺ 处理的愈伤组织细胞的线粒体出现空泡化(图版 I : E)。③正常细胞的细胞核核仁完整, 染色质分布均匀(图版 I : F)。在 Cr⁶⁺ 浓度为 0.5 mmol · L⁻¹时, 核仁消失, 核内容物成无序状态, 核膜模糊, 部分破损(图版 I : G)。④正常的细胞中, 内质网多为粗面型(图版 I : H)。0.1 mmol · L⁻¹的 Cr⁶⁺ 处理的细胞中, 内质网开始形成小囊泡, 核糖体逐渐消失(图版 I : I); 在 0.2 mmol · L⁻¹的 Cr⁶⁺ 处理的细胞中, 只可见一些由内质网膨胀形成的小囊泡(图版 I : J)。

3 讨论

在研究中发现, 低浓度(0.1 mmol · L⁻¹)的 Cr⁶⁺ 处理时水花生愈伤组织叶绿素含量应激性地升高(图 1), 可能是低浓度 Cr⁶⁺ 可以刺激叶绿素的合成, 是愈伤组织的一种自我保护机制(胡金朝等, 2005; 丁晓辉等, 2007)。但随着 Cr⁶⁺ 胁迫浓度的逐渐增大, 总叶绿素含量和 Chl(a/b) 都开始下降, 可能是由于重金属抑制了原叶绿素酸酯还原酶的活性(Stobart 等, 1985), 并影响了氨基-r-酮戊酸的合成(Chris 等, 1992), 而这 2 种物质对于叶绿素的合成都是必需的。同时, 超微结构显示, 叶绿体类囊体片层扭曲、变形, 被膜模糊、破损, 因此认为叶绿素的降低还与叶绿体分子结合的叶绿体膜结构遭到破坏有关(施国新等, 2000)。

适当的 H₂O₂ 水平可促进植物的胚性愈伤组织诱导与分化(刘福平等, 2009), 低浓度的重金属胁迫可能在一定程度上起促进作用, 但当超过愈伤组织防御的阈值时就会导致活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的过量积累而影响其正常代谢。植物体内的 SOD、POD 和 CAT 三种酶组成了活性氧酶促清除系统(Chris 等, 1992), 其中 SOD 是含金属辅基的酶, 它催化 O₂⁻ 形成 H₂O₂, 抑制 Haber-Weiss 反应(Fecht-Christoffers & Horst, 2005)。POD 和 CAT 是清除 H₂O₂ 的重要保护酶, 能将 H₂O₂ 分解为 O₂⁻ 和 H₂O, 从而使机体免受 H₂O₂ 的毒害(Schitzendiibel 等, 2002)。本实验结果表明, 低浓度 Cr⁶⁺ 处理诱导愈伤组织体内的三大酶活性应激性地增大, 用于清除胁迫产生的过多活性氧, 在一定程度上减轻了对膜系统的伤害。其中, 当 SOD 活性逐渐增加到最大值时, O₂⁻ 产生速率下降至最小值, 但 SOD、POD 和 CAT 清除活性氧的能



图版 I Cr^{6+} 胁迫对水花生愈伤组织细胞超微结构的影响 CP. 叶绿体; Mi. 线粒体; N. 细胞核; Nu. 核仁; ER. 内质网。A. 对照叶绿体, Bar=2.0 μm ; B. 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$ 处理的愈伤组织细胞, 示叶绿体, 可见清晰的淀粉粒, Bar=1.0 μm ; C. 对照线粒体, Bar=2.0 μm ; D. 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$ 处理的愈伤组织细胞, 示线粒体, Bar=2.0 μm ; E. 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$ 处理的愈伤组织细胞, 示线粒体, Bar=2.0 μm ; F. 对照细胞核, Bar=5.0 μm ; G. 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$ 处理的愈伤组织细胞, 示细胞核, Bar=2.0 μm ; H. 对照内质网, Bar=1.0 μm ; I. 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$ 处理的愈伤组织细胞, 示内质网, Bar=2.0 μm ; J. 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$ 处理的愈伤组织细胞, 示内质网, bar=1.0 μm 。

Plate I Effects of Cr^{6+} on ultrastructure in the callus of *Alternanthera philoxeroides* CP. Chloroplast; Mi. Mitochondria; N. Nucleus; Nu. Nucleolus; ER. Endoplasmic Reticulum. A. Control chloroplast, bar=2.0 μm ; B. Treated with 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$, showing Chloroplast, bar=2.0 μm ; C. Control Mitochondria, bar=2.0 μm ; D. Treated with 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$, showing mitochondria, bar=1.0 μm ; E. Treated with 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$, showing mitochondria, bar=2.0 μm ; F. Control Nucleus, bar=5.0 μm ; G. Treated with 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$, showing nucleus, bar=2.0 μm ; H. Control Endoplasmic Reticulum, bar=1.0 μm ; I. Treated with 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$, showing Endoplasmic Reticulum, bar=2.0 μm ; J. Treated with 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Cr}^{6+}$, showing Endoplasmic Reticulum, bar=1.0 μm 。

力是有限的, 随着 Cr^{6+} 胁迫浓度的进一步增大, CAT 活性首先开始下降, 而 CAT 主要用于清除 H_2O_2 , 并与 SOD 协同清除 $\text{O}_2^- \cdot$ (Somashkaraiah 等, 1992), 其活性的降低势必会加速 $\text{O}_2^- \cdot$ 和 H_2O_2 的积累, 引起膜系统的损伤和生理代谢紊乱。

另外, 植物体内还存在 ASA 和 GSH 等非酶促清除系统。ASA 和 GSH 不仅可在 Halliwell-Asada 循环中分别作为 APX 和 GR 底物清除 H_2O_2 , 还可作为抗氧化剂直接清除活性氧 (Sun 等, 2010)。其中 ASA 是超氧自由基有效清除剂, 可还原 $\text{O}_2^- \cdot$, 清除 $\cdot\text{OH}$, 猝灭 $^1\text{O}_2$, 歧化 H_2O_2 , 再生为 α -生育酚 (Bartoli 等, 1999)。而还原型谷胱甘肽既是一种有效的酶活性调节物质, 又可以有效地清除过氧化物,

从而增强植物对环境胁迫的抵抗 (马玉华等, 2008)。然而随着 Cr^{6+} 毒害程度的加重, ASA 和 GSH 的含量都开始下降, 可见, 高浓度的 Cr^{6+} 已经超过其防御能力。最终, 高浓度的 $\text{O}_2^- \cdot$ 和 H_2O_2 启动并加剧了膜脂过氧化作用 (徐勤松等, 2002), 从而造成细胞膜系统的损伤。随着 Cr^{6+} 胁迫浓度的升高, 细胞膜系统损伤加重, 如叶绿体和细胞核被膜破损 (图版 I : B, G), 内质网逐渐解体消失 (图版 I : I, J), 线粒体嵴突膨胀, 直至空泡化 (图版 I : D, E)。 Cr^{6+} 对水花生愈伤组织细胞器的超微结构特别是叶绿体、线粒体和细胞核的超微结构造成不可逆损伤。而且在毒害组的叶绿体中可见到明显的淀粉粒的存在 (图版 I : B), 这可能与 Cr^{6+} 毒害引起愈伤组织内可溶性糖的积累有关: 可溶性糖含量的积累会导致合成

葡萄糖的途径受到抑制,这样光合作用产生的 ATP 就被用于将已合成的葡萄糖活化合成淀粉的前体 ATPG,促进了葡萄糖转化为淀粉(杨顶田等,2000),因而在图中受害组的叶绿体中可见到巨大淀粉粒的存在。

另外,电镜观察结果还表明了内质网的变化过程(图版 I:H,I,J),而这在使用植物体作为实验材料时是很难观察到的,可能与愈伤组织处于机体生长初期,需要合成大量蛋白质,各种细胞器生长旺盛有关。随着 Cr^{6+} 胁迫浓度的升高,水花生愈伤组织细胞中内质网逐渐以形成小囊泡的形式消失。而内质网的功能主要是与细胞合成蛋白质相关的,当它受到破坏甚至消失时,势必会影响到蛋白质的正常合成。实验结果证明, Cr^{6+} 抑制了抗氧化酶的活性,降低了可溶性蛋白的含量,这也充分证明了蛋白质合成受到影响。另外,内质网正常分泌囊泡与高尔基体的形成密切相关,电镜观察结果显示,高尔基体是较早消失的细胞器。

综上所述, Cr^{6+} 胁迫引起水花生愈伤组织内 $\text{O}_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 等活性氧的积累,产生膜脂过氧化作用,导致生理生化代谢紊乱,并造成细胞结构和功能的损伤,甚至最终导致水花生愈伤组织细胞的死亡。实验表明, Cr^{6+} 胁迫对水花生愈伤组织的致死浓度大致在 $0.5\sim 1.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

参考文献:

李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:北京高等教育出版社:164-165
 张志良,瞿伟菁. 2003. 植物生理学实验指导[M]. 第3版. 北京:高等教育出版社:67-69
 陈建勋,王晓峰. 2002. 植物生理学实验指导[M]. 广州:华南理工大学出版社:120-127
 顾公望,张宏伟. 1993. 微量元素与恶性肿瘤[M]. 上海:上海科学技术出版社:56-567
 Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in beta vulgaris[J]. *Plant Physiol*, **24**:1-5
 Bartoli CG, Simontacchi M, Tambussi E, et al. 1999. Drought and watering-dependent oxidative stress; Effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* leaves[J]. *J Exp Bot*, **50**:375-383
 Beyer WF, Frids ovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions [J]. *Anal Biochem*, **161**:559-566
 Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, **72**(1):248-254
 Chris B, Marc VH, Dirk I. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **43**(1):83-116

Debas B, Sidney JS, Bernard W, et al. 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium[J]. *Toxicology*, **180**:5-22
 Ding BZ, Shi GX, Xu Y, et al. 2007. Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* leaves to cadmium stress[J]. *Environ Poll*, **147**(3):800-803
 Ding XH(丁晓辉), Ren LP(任丽萍), Zhang CR(张春荣), et al. 2007. Effect of Cd^{2+} stress on the content of chlorophyll and soluble sugar of alfalfa(Cd^{2+} 胁迫对紫花苜蓿叶绿素和可溶性糖含量的影响)[J]. *Acta Agric Boreal-Sin*(华北农学报), 增刊(Sup.):64-66
 Fecht-Christoffers MM, Horst WJ. 2005. Does apoplastic ascorbic acid enhance manganese tolerance of *Vigna unguiculata* and *Phaseolus vulgaris*[J]. *Plant Nut Fertilizer Sci*, **168**:590-599
 Gong LL(龚丽丽), Guo JJ(郭晶晶), Xu XM(许晓明). 2010. Photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii* under Cr^{6+} stress(Cr^{6+} 胁迫对莱茵衣藻光合作用的影响)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报), **30**(6):1166-1172
 Huang H(黄辉), Tong L(童雷), Miao F(苗苒), et al. 2007. Physiological characteristics of *Phragmites australis* growing in chromium polluted area(铬污染地区芦苇生理特征分析)[J]. *J Agro-Environ Sci*(农业环境科学学报), **26**(4):1273-1276
 Hu JZ(胡金朝), Shi GX(施国新), Wang X(王学), et al. 2005. Physiological effect of cadmium on *Salvinia natans* and comparison of the detoxication of exogenous lanthanum and calcium against it(Cd 对槐叶苹的生理影响及外源 La, Ca 的缓解效应比较)[J]. *Guihaia*(广西植物), **25**(2):156-160
 Karsten U, Franklin LA, Lü ning K. 1998. Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporinelike amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta)[J]. *Planta*, **205**(2):257-262
 Liu FP(刘福平), Chen C(陈淳), Xu CJ(许传俊). 2009. H_2O_2 and embryogenic callus induction of *Phalaenopsis* spp. (过氧化氢与蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **36**(9):1339-1344
 Liu P(刘萍), Lv YN(吕艳娜), Zhang XB(张小冰), et al. 2010. Study of GSH and ASA on biological and physiological changes of the peony petals(GSH 与 ASA 对牡丹花瓣生理生化的调控研究)[J]. *Northern Hort*(北方园艺), **11**:107-109
 Ma YH(马玉华), Ma FW(马锋旺), Ma XW(马小卫), et al. 2008. Effects of drought stress on ascorbic acid contents and activities of related metabolic enzymes in apple leaves(干旱胁迫对苹果叶片抗坏血酸含量及其代谢相关酶活性的影响)[J]. *J Northwest A & F Univ: Nat Sci Edi*(西北农林科技大学学报·自然科学版), **3**(36):150-154
 Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends in Plant Science*, **7**:405-410
 Sheng PX, Tan LH, Chen JP, et al. 2004. Biosorption performance of two brown marine algae for removal of chromium and cadmium[J]. *J Disper Sci Tech*, **25**:681-688
 Wang XS, Qin Y. 2006. Removal of Ni(II), Zn(II) and Cr(VI) from aqueous solution by *Alternanthera philoxeroides* biomass [J]. *J Hazardous Materials*, **138**:582-588
 Xu QS(徐勤松), Shi GX(施国新), Du KH(杜开和). 2002. (下转第 421 页 Continue on page 421)

提取 3 次, 超声处理 60 min 以后目标组分含量无明显变化, 因此选择超声提取 60 min, 重复提取 3 次为试验条件。对样品提取目标组分后的残渣进行 HPLC 测定, 无待测组分特征峰出现, 说明样品中的牡荆素已提取完全。

3.5 流动相流速的优化

本实验对流动相的流速分别进行了比较, 在 $0.2 \sim 2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 范围内改变流动相流速, 发现在流速为 $0.6 \sim 1.20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时牡荆素出峰时间合适, 峰形较好; 然后从 $0.7, 0.9, 1.0, 1.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 四组实验条件下筛选最优条件, 经过实验筛选, 得出对其有效成分分离效果最恰当的流速是 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

参考文献:

Diaz F, Chavez D, Lee D, et al. 2003. Cytotoxic flavone analogues of vitexicarpin, a constituent of the leaves of *Vitex negundo* [J]. *J Nat Prod*, **66**(6): 865-867

Xie J(谢晶), Bai J(白军), Sheng XF(盛习锋), et al. 2010. Inhibition of proliferation of human cervical cancer HeLa cells by casticin in vitro(紫花牡荆素体外抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖的研究)[J]. *China Oncol*(中国癌症杂志), **20**(6): 406-410

Wang HY, Cai B, Cui CB, et al. 2005. Vitexicarpin, a flavonoid from *Vitex trifolia*, induces apoptosis in K562 cells via mitochondria controlled apoptotic pathway[J]. *Acta Pharm Sin*, **40**(1): 27-31

Haidara K, Zamir L, Shi QW, et al. 2006. The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action[J]. *Cancer Lett*, **242**(2): 180-190

Chen Z(陈钟), Lu SJ(卢树杰), Zhang WK(张维库), et al. 2009. Determination of vitexin-rhamnoside in total flavone of Hawthorn Leafon(TFHL) by HPLC(HPLC 测定山楂叶总黄酮中牡荆素鼠李糖苷含量)[J]. *Chin Trad Patent Med*(中成药), **31**(10): 1615-1616

Zhu SY(朱思遥), Yang SS(杨松松), Cai Q(才谦). 2006. The HPLC system column used for determination the content of vitexin in Yixintong Table(HPLC 法测定益心酮片中牡荆素的含量)[J]. *Chin Archives of Trad Chin Med*(中医药学刊), **24**(4): 680-681

Chen H(陈化), Chen MY(陈明颖), Liang B(梁斌). 2008. Content determination of vitexin in Xiaoyerong by HPLC(高效液相色谱法测定小叶榕中牡荆素的含量)[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*(时珍国医国药), **9**(9): 2122-2123

Ren BR(任冰如), Xia B(夏冰), Li WL(李维林), et al. 2007. Determination of orientin and vitexin in *Stenoloma chusanum* by HPLC(HPLC 法测定乌韭的荜草苷和牡荆素含量)[J]. *Chem Ind Fore Products*(林产化学与工业), **27**(5): 103-106

Tian ZK(田振坤), Wang LZ(王连芝), Yun YQ(尹永琴), et al. 2005. Determination of Casticin in *Vitex trifolia* var. *simplicifolia* cham by HPLC(HPLC 法测定蔓荆子中的紫花牡荆素)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药), **36**(5): 766-767

Tan RP(谭瑞璞), Liu HZ(刘海周), Liang XY(梁晓原). 2009. Determination of vitexin in *Stellaria yunnanensis* by HPLC(HPLC 法测定千针万线草中牡荆素的含量)[J]. *J Yunnan Univ Trad Chin Med*(云南中医学院学报), **32**(4): 29-32

(上接第 382 页 Continue from page 382)

Effects of Cr(VI) on physiological and ultrastructural changes in leaves of *Ottelia alismoides* Pers(六价铬污染对水车前叶片生理生化及细胞超微结构的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **22**(1): 92-96

Schitzendiibel A, Nikolova P, Rudolf C, et al. 2002. Cadmium and H_2O_2 -induced oxidative stress in *Populusx canescens* roots[J]. *Plant Physiol Biochem*, **40**: 577-584

Shi GX(施国新), Du KH(杜开和), Xie KB(解凯彬), et al. 2000. Ultrastructural study of leaf cells damaged from Hg^{2+} and Cd^{2+} pollution in *Hydrilla verticillata*(汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **42**(4): 373-378

Sun SQ, He M, Cao T, et al. 2010. Antioxidative responses related to H_2O_2 depletion in *Hypnum plumaeforme* under the combined stress induced by Pb and Ni[J]. *Environ Monit Assess*, **163**: 303-312

Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad Rk. 1992. Phytotoxicity of Cadmium ions on germination seedling of mung bean(*Phaseo-*

lus vulgarize): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation[J]. *Physiol Plant*, **85**: 85-89

Stobart AK, Griffiths WT, Ameen B. 1985. The effects of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley[J]. *Plant Physiol*, **63**: 293-298

Wang AG(王爱国), Luo GH(罗广华). 1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine superoxide anion radicals in plants(植物的超氧化物自由基与羟胺反应的定量关系)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), (6): 55-57

Yang DT(杨顶田), Shi GX(施国新), You WP(尤文鹏), et al. 2000. The effect of Cr^{6+} pollution on ultramicroscopic structure of top stem cell of *Brasenia schreberi* winter-bud(Cr^{6+} 污染对莼菜冬芽茎尖细胞超微结构的影响)[J]. *J Nanjing Normal Univ*(南京师大学报·自然科学版), **3**(23): 91-95

Yuan Y(袁燕), Sheng JY(生吉萍), Wang HD(王捍东), et al. 2004. Callus induction and root differentiation from *Alternanthera philoxeroides*(水花生愈伤组织的诱导及根的分化)[J]. *Acta Hydrobiol Sin*(水生生物学报), **28**(6): 622-628