

Zn对荇菜叶片保护酶活性、渗透调节物质含量和 Ca^{2+} 定位分布的影响

徐勤松 施国新 计汪栋 杜开和 许 晔

(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 210097)

摘要:本文以不同浓度 Zn(0、5、10、15、20mg/L)处理荇菜 (*Nymphoides peltatum* (Gmel.) O. Kuntze) 9d,分析了 Zn对叶片超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性、渗透调节物质(脯氨酸和可溶性糖)含量的影响,并用焦锑酸钙沉淀的细胞化学方法观察了 Zn胁迫条件下叶肉细胞内 Ca^{2+} 水平和分布的动态变化,以揭示水生植物对 Zn胁迫的应答机制。研究结果表明,Zn明显抑制了 SOD活性和刺激 POD活性上升;脯氨酸和可溶性糖积累显著。电镜观察发现,正常条件下叶细胞中的 Ca^{2+} 主要定位在胞间隙和液泡中,细胞基质和细胞核中较少。添加 Zn后,胞间隙和液泡中的 Ca^{2+} 逐渐进入细胞质,使细胞质中 Ca^{2+} 浓度明显升高,特别是在质膜内侧和细胞核中出现大量较大的呈圆环状的钙沉淀颗粒。作者认为与保护酶活性紊乱相比,脯氨酸和可溶性糖在荇菜对 Zn胁迫的适应中发挥更大的作用。同时细胞内 Ca^{2+} 水平的增加,可能与许多生理生化过程的改变有关,其在质膜和细胞核等局部区域的大量分布,将会引发对植物的伤害,直至最终死亡。由此可见,荇菜体内多种防御系统同时对 Zn胁迫做出反应,包括诱导胁迫相关酶(POD)活性,增加渗透调节物质(脯氨酸和可溶性糖)合成或含量以及改变疏松结合钙的亚细胞分布和含量等。

关键词: Zn;荇菜;SOD;POD;脯氨酸;可溶性糖; Ca^{2+} ;应答

中图分类号: Q945.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)04-0613-07

Zn是兼具营养和毒害双重效应的重金属元素:一方面,作为生物体正常生长发育必需的微量营养元素,对蛋白合成、碳水化合物、脂类和核酸代谢等起到重要作用^[4]。另一方面,高浓度情况下则抑制种子萌发、植物的生长、干物质积累,降低光合色素含量和破坏光合作用等生理活动,并最终导致植物死亡^[1,2,6]。我们的研究也表明 Zn胁迫导致沉水植物黑藻体内活性氧产生速率加快和保护酶系统活性紊乱^[21],细胞的表现形态和超微结构也遭到明显破坏,其毒理学影响显示出明显的剂量效应关系^[22]。

与此同时,越来越多的研究表明 Ca^{2+} 不仅能维持细胞壁、细胞膜及膜结合蛋白的稳定性,参与胞内稳态和生长发育的调节过程,还在胞内起到第二信使的作用^[3]。钙信使系统参与植物对非生物逆境的应答反应也被广泛证实,淹水^[9]、热激^[5]、干旱^[16]、低温^[7,24]等都可引起细胞内的 Ca^{2+} 水平和分布发生改变,这种变化通过启动胞内生理生化过程,起着传递和放大信号的作用^[3]。逆境下植物产生

的钙信号可通过调控基因表达或调节一些蛋白或酶活性而引发有利于植物适应逆境的生理生化反应,从而提高植物的逆境适应性^[27]。但目前就植物细胞如何感受、传递和响应外界重金属胁迫信号的研究报道则相对较少^[17]。

本文以高等浮水植物荇菜为实验材料,以 Zn为胁迫因子,主要研究了保护酶(SOD和POD)活性和渗透调节物质(脯氨酸和可溶性糖)含量对不同浓度 Zn处理的生理响应。同时采用细胞化学方法(焦锑酸钙沉淀法)在透射电镜下观察了叶细胞内 Ca^{2+} 亚细胞分布的变化情况,以期通过 Zn处理引起的荇菜叶细胞内 Ca^{2+} 水平变化的细胞化学观察,为进一步阐明 Ca^{2+} 在植物对重金属逆境反应和适应中的作用机制及为明确植物的重金属抗性机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料 荇菜 (*Nymphoides peltatum*)

收稿日期: 2007-01-29;修订日期: 2008-04-09

基金项目:国家自然科学基金(30800055);江苏省教育厅自然科学基金(05KJB180067);南京师范大学科研启动基金(2005104XGQ2B73);高等学校博士学科点专项科研基金课题(20050319005)资助

通讯作者:徐勤松(1976—),男,博士,副教授;主要研究重金属对水生植物的毒害机制。E-mail: xuqinsong@njnu.edu.cn

(Gmel) O. Kuntze)是龙胆科的多年生浮水草本植物。南北各省均有分布。材料采自江苏省苏州市东山镇太湖水域,后将其移种于南京师范大学水生植物培育池中。

1.2 实验处理 2006年5月中旬选取叶片大小和颜色较一致的健壮植株,先在实验室内无底泥的5个玻璃缸(2 L)中用1/10 Hoagland培养液预培养2d后,于上午8:00在4个玻璃缸中一次性施入5、10、15和20mg/L的 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (AR) (以纯 Zn^{2+} 计)。另以不额外加 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的作为对照。对照和实验组皆用1/10 Hoagland培养液配制。全部玻璃缸置于Foma 3744培养箱中,光周期:12h 12h,温度:25—18,光照强度为 $70\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 。每隔2天更换一次营养液,第9天上午8:00取叶片进行生理分析和电镜观察。

1.3 超氧化物歧化酶(SOD)的活性测定 参照文献[12]的氯化硝基氮蓝四唑(NBT)法,酶活性单位采用抑制NBT光化还原50%为一个酶活性单位,酶活性以U/g表示。

1.4 过氧化物酶(POD)的活性测定 采用愈创木酚法^[10],酶活性以“OD470nm/g·min”表示。

1.5 脯氨酸含量的测定 采用磺基水杨酸提取,酸性茚三酮比色法测定^[23]。

1.6 可溶性糖含量的测定 采用赵世杰^[26]的方法,可溶性糖=11.7×D450。

1.7 Ca^{2+} 细胞化学定位 参照文献[14]的焦锑酸盐法。样品用含1% $\text{K}_2\text{H}_2\text{Sb}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的2.5%的戊二醛和1%的锆酸低温双重固定2h,丙酮系列脱水,Epon 812树脂包埋,LKB超薄切片机切片,厚度为70nm,切片经柠檬酸铅—醋酸双氧铀双重染色

后,于Hitachi 600-A-2透射电镜(日本日立公司)下观察并拍照。该方法可显示细胞中的疏松结合钙^[19]。

对照为在电镜下已确定有焦锑酸钙沉淀的超薄切片铜网,用0.1mol/L EGTA (pH8.0),60 孵育1h,以除去切片上的钙沉淀,清洗后,再置于电镜下观察、拍照。

1.8 数据分析 实验重复3次,通过计算机系统自带软件(Microsoft excel 2003)对相关数据进行相关系数分析(R),以 $p < 0.05$ 为相关显著, $p < 0.01$ 为相关极显著。结果以均值±SD表示,以鲜重作为单位。

2 结果与分析

2.1 Zn对苻菜叶片SOD活性的影响

当培养液中添加不同浓度的Zn后,明显削弱了苻菜叶片中的SOD活性,表现为各处理浓度下的酶活性都低于对照值(图1)。其中,5mg/L处理浓度的活性比对照减少了11.46%,而更高剂量则分别比对照值丧失了72.52%(10 mg/L)、63.36%(15 mg/L)和68.70%(20 mg/L)。统计分析表明SOD活性与Zn浓度间达到显著负相关($R = -0.8642$, $p < 0.05$)。

2.2 Zn对苻菜叶片POD活性的影响

与SOD活性受抑制不同,如图2所示,Zn处理后,苻菜叶片内的POD活性迅速上升,各受试浓度对该酶活性的促进作用接近同一水平,分别达到正常水平的4.22倍(5mg/L)、4.89倍(10mg/L)、3.55倍(15mg/L)和4.00倍(20mg/L)。统计分析达到正相关水平。

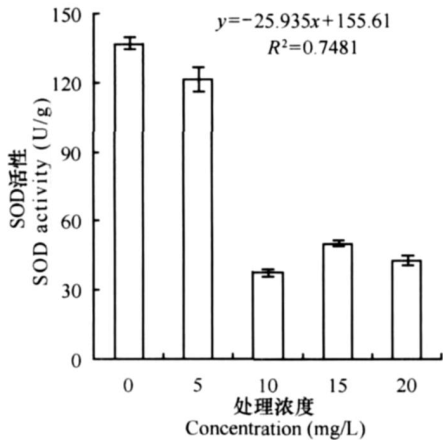


图1 Zn对SOD活性的影响
Fig.1 Effect of Zn on SOD activity

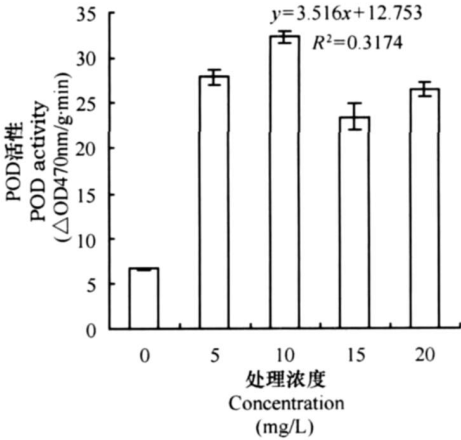


图2 Zn对POD活性的影响
Fig.2 Effect of Zn on POD activity

2.3 Zn对苜蓿叶片脯氨酸含量的影响

脯氨酸是植物体内一种重要的渗透调节物质,其含量变化可以作为植物对逆境胁迫的一种生理生化指标。由图 3 可见,不同浓度 Zn 处理后的苜蓿叶片中脯氨酸含量明显增多,与对照相比,增大的幅度从 49.93%到 142.31%不等。数据分析表明达到显著正相关 ($R = 0.8480, p < 0.05$)。

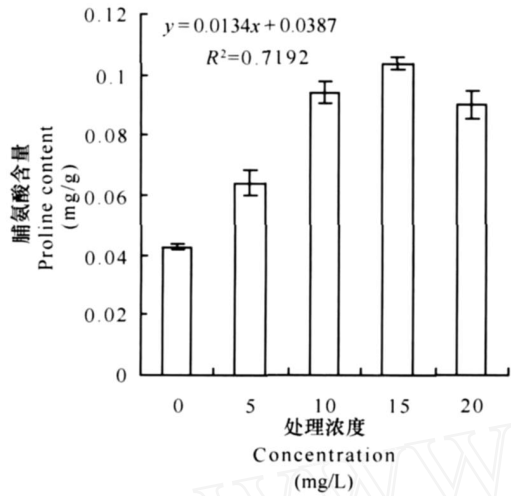


图 3 Zn对脯氨酸含量的影响
Fig.3 Effect of Zn on proline content

2.4 Zn对苜蓿叶片可溶性糖含量的影响

可溶性糖是植物光合作用的初级产物,也是植物体内的主要渗透调节物质。如图 4 所示, Zn 处理后苜蓿叶片中可溶性糖积累现象比较突出,一直随介质金属浓度的增大而呈上升趋势。其中 5 和 10mg/L、15 和 20mg/L 浓度范围内的增幅为同一平台。当 Zn 浓度为 5mg/L 时,可溶性糖含量是对照

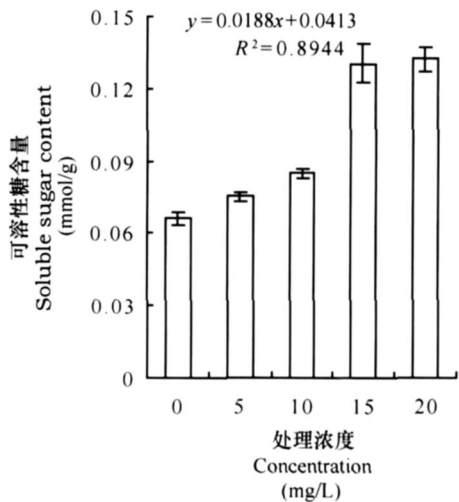


图 4 Zn对可溶性糖含量的影响
Fig.4 Effect of Zn on soluble sugar content

值的 1.14 倍。而最大浓度 (20mg/L) 时则达到了 2.01 倍。统计分析表明可溶性糖的积累和溶液 Zn 浓度间达到极显著正相关 ($R = 0.9457, p < 0.01$)。

2.5 Zn对苜蓿叶片 Ca^{2+} 水平的影响

2.5.1 正常培养条件下细胞内的 Ca^{2+} 分布

电镜观察结果表明,细胞中疏松结合态的 Ca^{2+} 经过与焦锑酸钾细胞化学反应后形成黑色颗粒状的焦锑酸钙沉淀 (图版)。在没有额外施加 Zn 的营养液中正常生长的苜蓿叶细胞中,显示 Ca^{2+} 定位分布的焦锑酸钙沉淀主要分布在液泡和细胞外的胞间隙中。相比之下,液泡中的颗粒较小,并大多贴液泡膜分布;而胞间隙中的数量则较多,体积较大。在线粒体、细胞核、细胞壁和细胞质基质中偶尔可以发现少量的钙沉淀存在。

2.5.2 Zn处理后细胞内的 Ca^{2+} 分布的变化

与正常情况相比, Zn 处理后导致苜蓿叶细胞内的 Ca^{2+} 的分布和数量都发生显著变化。当处理浓度为 5 mg/L 时,苜蓿叶片外部无明显可视毒害症状 (如黄斑等),但细胞内部 Ca^{2+} 分布却发生较大改变。最突出的是细胞间隙中的 Ca^{2+} 数量急剧减少,而在细胞壁和质膜之间以及质膜内侧都出现了许多大的 Ca^{2+} 沉淀颗粒,推测这些 Ca^{2+} 可能是在 Zn 胁迫的影响下通过位于质膜上的 Ca^{2+} 通道从胞外进入的。在细胞质基质和细胞核中也形成大量的体积较大的圆环状的 Ca^{2+} 沉淀颗粒。随处理浓度的增大,当外界浓度达到 15mg/L 时, Ca^{2+} 分布的最大特点是细胞核和细胞质基质中的数量明显增多,质膜两侧的数量则显著减少。显示出由外向内移动的趋势。EGTA 是 Ca^{2+} 的专一性螯合剂,本实验中,当把切片用 EGTA 处理后,原先形成的 Ca^{2+} 黑色沉淀颗粒即被消除,在原有 Ca^{2+} 分布的区域,如质膜等部位出现了与原来沉淀物形状和大小相似的电镜透明区域,这说明利用本方法反映的 Ca^{2+} 定位分布是真实的 (图版)。

3 讨论

研究表明 Zn 对植物毒害的一个重要方面是通过加速活性氧的产生^[2]和破坏或削弱抗氧化系统的保护作用^[21],从而诱导植物产生氧化胁迫。因此抗氧化系统灭活活性氧的有效性对于植物在逆境中能否存活至关重要^[20]。在逆境条件下,植物本身具有的一些防御机制能对胁迫造成的活性氧自由基积累做出积极反应,从而使其维持在一个较低的水平,防止细胞受到氧化伤害。其中, SOD 是植物活性氧

清除系统中的第一道防线,它将 O_2^- 歧化为 H_2O_2 ,并抑制 Haber-Weiss 反应,在保护酶系中处于核心地位,保持较高的酶活性对提高植物的抗逆性和适应性都极为重要。而本文研究结果显示出 Zn 胁迫对苜蓿叶片中 SOD 活性产生了较强的抑制作用,这意味着 Zn 削弱了它的歧化能力和增大了其他活性氧自由基对植物细胞伤害的可能性^[21]。POD 是植物体内另一种重要的对逆境胁迫反应非常敏感的抗氧化酶类,它能将 H_2O_2 分解成 H_2O 。本实验发现,与 SOD 活性一直呈下降趋势相反,苜蓿叶片中的 POD 活性受 Zn 的刺激而明显上升,这也是植物对污染胁迫的共同响应,毒害剂量的 Zn、Cd、Ni、Cu 和 Pb 等胁迫都能诱导植物体内 POD 总活性升高^[15, 18]。对离体水稻的研究结果表明其活性的上升是在转录水平上通过从头合成介导的,与自由基无关^[18]。但目前 POD 在适应胁迫中的作用还不清楚。

脯氨酸和可溶性糖是植物体内存在的两种重要的渗透条件物质。其中,脯氨酸含量的增加是植物对逆境胁迫的一种生理生化反应,是植物受到胁迫的一种信号,也是植物对各种逆境条件的适应表现^[1, 2]。Schat, *et al.*^[11]认为脯氨酸的积累取决于重金属胁迫诱导植物体内水分缺失的情况。丁海东等^[6]的研究指出 Zn 处理导致番茄幼苗体内发生水分胁迫,因此,脯氨酸积累的意义是作为渗透调节物质,使细胞和组织保持水平衡。也有研究表明,脯氨酸具有清除活性氧的功能^[2]。就对苜蓿而言,脯氨酸的明显积累表明本实验情况下 Zn 不再是作为营养元素发挥作用,而是构成了比较严重的逆境胁迫条件。作者认为在保护酶活性紊乱的情况下,这对保护膜结构的稳定性可能显得更加重要。与此同时,Zn 胁迫也极显著地诱导了苜蓿叶片中可溶性糖的积累,这表明 Zn 使苜蓿遭受了一定的水分胁迫,对番茄幼苗的研究也证明这一点^[6]。因此可溶性糖积累的重要意义是通过调节渗透压来增加植物的抗逆性,保护细胞免受伤害和维持原有的生理过程^[6]。重金属处理下水生植物体内可溶性糖含量增加的原因可能是叶片内不溶性糖降解以及光合产物运输受阻的结果,也有可能是葡萄糖酶、蔗糖酶活性异常所致^[13]。作者认为也可能与 Zn 胁迫损伤了叶绿体的结构有一定关系^[22]。

通常情况下,植物细胞内的钙(总钙)以结合态和自由离子(Ca^{2+})两种形式存在。焦磷酸钾沉淀法作为疏松结合态 Ca^{2+} 的定位方法被广泛应

用^[5, 9, 14, 16, 17, 19, 25]。该方法能客观的反映植物细胞内这些钙的含量及分布变化^[14, 19, 25]。大量研究表明,各种逆境因子(淹水^[9]、热激^[5]、干旱^[16]、低温^[7, 24]、Al^[17])等都能提高植物细胞内的 Ca^{2+} 水平。其来源一是细胞外质外体中的 Ca^{2+} ;二是细胞内细胞器中 Ca^{2+} 储存库^[27]。本文电镜观察结果表明,对苜蓿而言,液泡是其细胞内的主要钙库。Zn 胁迫与干旱和低温逆境引起的 Ca^{2+} 变化一致^[7, 16, 24],都表现为质膜内侧和细胞核中 Ca^{2+} 沉淀颗粒较正常情况下明显增多。这表明 Zn 胁迫条件下苜蓿叶细胞内 Ca^{2+} 水平的上升具有相同的来源,并且 Ca^{2+} 系统对 Zn 胁迫也有相似的调节机制^[7, 16, 24]。而为了维持细胞内较低的 Ca^{2+} 水平,需要质膜和液泡膜上的 Ca^{2+} -ATPase 不断把细胞质中的 Ca^{2+} 泵出去,现有研究表明胁迫明显降低了位于细胞质膜和其他膜结构上的 Ca^{2+} -ATPase 的活性,从而使细胞质中有过多的 Ca^{2+} 。细胞内 Ca^{2+} 水平的提高一方面可以通过诱导脯氨酸合成酶[二氢吡咯羧酸合成酶(P5CS)]的转录来增加脯氨酸的生物合成,控制植物细胞的渗透调节作用^[8],以对外界刺激做出积极响应。而另一方面高浓度的胞内钙会破坏膜结构、抑制能量代谢和破坏遗传物质的合成与表达,导致植物体内物质平衡的破坏及代谢的紊乱,最终引起植物逆境伤害和死亡^[24]。

本实验结果表明,在苜蓿叶片内的保护酶中,SOD 对 Zn 胁迫反应最敏感,遭受到严重的抑制作用,POD 活性则上升。相比之下,Zn 诱导渗透调节物质脯氨酸和可溶性糖显著增多,二者应该在苜蓿对 Zn 胁迫的适应中发挥更大的作用。Zn 胁迫也使叶细胞中 Ca^{2+} 数量、分布发生明显改变。这可能与一系列生理活动的改变有关,如促进脯氨酸合成等。但其在局部区域的明显富集和分布的明显改变最终会导致植物死亡。

参考文献:

- [1] Ali G, Srivastava P S, Iqbal M. Morphogenic and biochemical responses of *Bacopa monniera* cultures to zinc toxicity [J]. *Plant Science*, 1999, 143: 187—193
- [2] Alia K V S K Prasad and P. Pardha Saradhi. Effect of zinc on free radicals and proline in *Brassica* and *Cajanus* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39 (1): 45—47
- [3] Bush D S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 95—112
- [4] Cakmak I. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species [J]. *New Phytol*, 2000,

- 146: 185—205
- [5] Chun L Y, Jian B W, Rong Q L. Effect of heat stress on calcium ultrastructural distribution in pepper anther [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2002, **48**: 161—168
- [6] Ding H D, Zhu W M, Yang S J, *et al* Effects of cadmium and zinc stress on growth and content of proline and glutathione (GSH) in Tomato Seedlings [J]. *Jiangsu Journal of Agriculture Science*, 2005, **21** (3): 191—196 [丁海东, 朱为民, 杨少军, 等. 镉、锌胁迫对番茄幼苗生长及脯氨酸和谷胱甘肽含量的影响. 江苏农业学报, 2005, **21** (3): 191—196]
- [7] Knight H, Anthony J T, Knight M R. Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation [J]. *Plant Cell*, 1996, **8**: 489—503
- [8] Knight H, Trewas A J, Knight M R. Calcium signaling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity [J]. *Plant J*, 1997, **12**: 911—922
- [9] Li Y S, Wang J B. Distribution of Ca^{2+} and Ca^{2+} -ATPase in root apical cells of rice under submergence of stress [J]. *Chinese J Rice Sci*, 2001, **15** (3): 237—240 [李阳生, 王建波. 淹水胁迫下水稻根尖细胞中 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} -ATP酶的分布. 中国水稻科学, 2001, **15** (3): 237—240]
- [10] Maehly A C. Plant peroxidase [J]. *Methods Enzym.*, 1955, **2**: 801—813
- [11] Schat H, Shama S S, Vooijs R. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal tolerant and a non tolerant ecotype of *Silene vulgaris* [J]. *Physiol Plant*, 1997, **101**: 477—482
- [12] Stewart R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes [J]. *Plant Physiol*, 1980, **65**: 245—248
- [13] Sun S C, Wang H X, Li Q R. Preliminary studies on physiological changes and injury mechanism in aquatic vascular plants treated with cadmium [J]. *Acta Phytophysiol Sinica*, 1985, **11** (2): 113—121 [孙赛初, 王焕校, 李启任. 水生维管植物受镉污染后的生理变化及受害机制初探. 植物生理学报, 1985, **11** (2): 113—121]
- [14] Tian H Q, Kuang A X, Musgrave M E, *et al* Calcium distribution in fertile and sterile anthers of a photoperiod-sensitive genic male-sterile rice [J]. *Planta*, 1998, **204**: 183—192
- [15] Van Assche F, Clijsters H. Effects of metal on enzyme activity in plants [J]. *Plant Cell Environ*, 1990, **13**: 195—206
- [16] Wang F R, Zhang H, Shang Z Q, *et al* Ca^{2+} localization in wheat seedling leaves under water stress and during rewetting [J]. *Acta Phytophysiological Sinica*, 2000, **26** (4): 280—283 [王凤茹, 张红, 商振清, 等. 水分胁迫及复水过程中小麦幼苗叶片内的 Ca^{2+} 定位. 植物生理学报, 2000, **26** (4): 280—283]
- [17] Wang J B. Ultrastructural distribution of Ca^{2+} in root apical cells of wheat under aluminum stress [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2000, **65**: 222—227
- [18] Wei C F, Ching H K. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc [J]. *Plant Science*, 2000, **158**: 71—76
- [19] Wick S M, Hepler P K. Selective localization of intracellular Ca^{2+} with potassium antimonite [J]. *J Histochem Cytochem.*, 1982, **30**: 1190—1204
- [20] Willekens H, Vancamp W, Monnagu M V, *et al* Ozone, Sulfur dioxide and ultraviolet-B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. [J]. *Plant Physiol*, 1994, **106**: 1007—1014
- [21] Xu Q S, Shi G X, Wang X, *et al* Generation of activated oxygen and change of antioxidant enzyme activity in *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle under Cd, Cu and Zn stress [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (1): 107—112 [徐勤松, 施国新, 王学, 等. 镉、铜和锌胁迫下黑藻活性氧的产生及抗氧化酶活性的变化研究. 水生生物学报, 2006, **30** (1): 107—112]
- [22] Xu Q S, Shi G X, Xu B J, *et al* Bioaccumulation and toxicity of Cu and Zn in *Hydrilla verticillata* (Linn f.) Royle [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31** (1): 1—8 [徐勤松, 施国新, 许丙军, 等. Cu, Zn在黑藻叶片中的富集及其毒理学分析. 水生生物学报, 2007, **31** (1): 1—8]
- [23] Zhang D Z, Wang P H, Zhao H X. Determination of the content of free proline in wheat leaves [J]. *Plant Physiology Communication*, 1990, **26** (4): 62—65 [张殿忠, 汪沛洪, 赵会贤. 测定小麦叶片游离脯氨酸含量的方法. 植物生理学通讯, 1990, **26** (4): 62—65]
- [24] Zhang H, Jian L C, Li G M. The cytochemical studies on the changes of calcium level in cucumber seedling cells during chilling stress [J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 1995, **27** (4): 419—422 [张红, 简令成, 李广敏. 低温逆境中黄瓜幼苗细胞内钙离子水平变化的细胞学研究. 实验生物学报, 1995, **27** (4): 419—422]
- [25] Zhang J S, Yang H Y, Zhu L, *et al* Ultracytochemical localization of calcium in the stigma, style and micropyle of sunflower [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1995, **37** (9): 691—696 [张劲松, 杨弘远, 朱绫, 等. 向日葵花柱和珠孔中钙分布的细胞化学定位. 植物学报, 1995, **37** (9): 691—696]
- [26] Zhao S J, Xu C C, Zou Q, *et al* Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues [J]. *Plant Physiology Communication*, 1994, **30** (3): 207—210 [赵世杰, 许长成, 邹琦, 等. 植物中丙二醛测定方法的改进. 植物生理学通讯, 1994, **30** (3): 207—210]
- [27] Zong H, Li M Q. Role of calcium messenger in plant acclimation to abiotic stresses [J]. *Plant Physiology Communication*, 2001, **37** (4): 330—335 [宗会, 李明启. 钙信使在植物适应非生物逆境中的作用. 植物生理学通讯, 2001, **37** (4): 330—335]

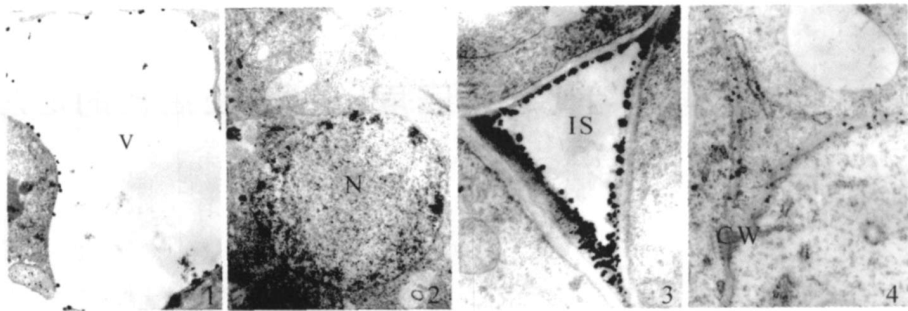
EFFECT OF ZN ON PROTECTIVE ENZYMES ACTIVITY, OSMOLYTES CONTENT AND Ca^{2+} DISTRIBUTION IN LEAVES OF *NYMPHOIDES PELTATUM*

XU Qin-Song, SHI Guo-Xin, JI Wang-Dong, DU Kai-He and XU Ye

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Lab of Biodiversity and Biotechnology, Nanjing 210097)

Abstract: Zinc (Zn) is an essential microelement for normal growth and development of plants at low concentration; however, it is also an important environmental pollutant due to anthropogenic pressure as well. In the present study, *Nymphaeoides peltatum*, a rooted-floating aquatic macrophyte, was cultivated with elevated concentration of Zn (0, 5, 10, 15 and 20 mg/L) for 9 d respectively. The response of activities of superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD), osmolytes (proline and soluble sugar) to Zn stress was investigated and Ca^{2+} ultrastructural distribution in leaf cells was examined with the cytochemical method of calcium antimonate precipitation. The results indicated that Zn decreased SOD activity by 11.46%—75.22% and the inhibition action reached significant level ($R = -0.8642$, $p < 0.05$) compared with that of control; while it stimulated POD activity and increased by 2.55—3.89 fold over that of control; in response to Zn pollution, *N. peltatum* exhibited an enhancement in proline level and increased by 49.93%—142.31% in comparison to control; the same tendency was also recorded in soluble sugar level under Zn stress, its accumulation showed progressive increase with the rise of external Zn concentration and enhanced by 13.83% to 100.64%, respectively. Electron microscope observation showed that Ca^{2+} mainly distributed within intercellular space and vacuole, some calcium deposits could be randomly found in cytoplasmic matrix and nucleus under normal conditions, when different dose of Zn was added into the culture solution, and the calcium level in these compartments lowered while that in cytoplasm increased remarkably, especially bigger particles of calcium deposits appeared at the inner aspect of plasmalemma and cell nucleus, which might be attributed to the opening of the calcium channels in plasmalemma and tonoplast and the loss of activity of the Ca^{2+} pump, this, in turn further enhanced the calcium level of cell interior. The rise of Ca^{2+} level in cytoplasm and cell nucleus maybe related to the changes of a series of physiological and biochemical processes. The dense distribution of Ca^{2+} in inner aspect of plasmalemma and in cell nucleus might lead to the damage to the plant cell or the death in the end. Based on observations in the present investigation, it can be concluded that several defense systems are activated simultaneously when affected by Zn, including the induction of stress enzymes (POD), increase of synthesis or content in osmolytes (proline and soluble sugar) and changes in the distribution and content of loosely-bound Ca^{2+} .

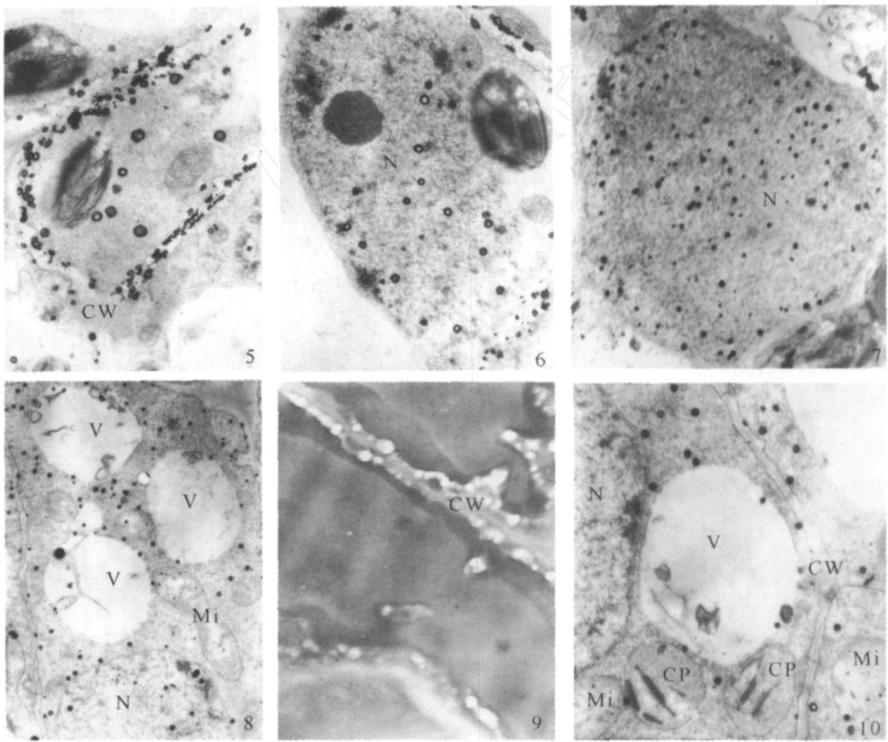
Key words: Zn; *Nymphaeoides peltatum*; SOD; POD; Proline; Soluble sugar; Calcium; Response



图版 正常条件下生长的苎菜叶细胞中的 Ca^{2+} 定位分布

Plate The localization of calcium in leaf cells of *N. peltatum* under normal condition

1. 细胞内 Ca^{2+} 定位分布的焦锇酸钙沉淀主要在液泡 (V) 内 ($\times 10000$); 2. 显示在细胞质基质和细胞核中只有少量的 Ca^{2+} 分布 ($\times 10000$); 3. 显示细胞间隙观察到大量分布 ($\times 15000$); 4. 显示少量 Ca^{2+} 分布在细胞壁 ($\times 17000$)
1. The calcium was localized mainly in vacuole (V, $\times 10000$); 2. Smaller amounts of calcium was seen in cytoplasm and nucleus; 3. A great amounts of calcium was distributed in intercellular spaces (IS, $\times 15000$); 4. Some calcium precipitates resided in cell wall (CW, $\times 17000$)



图版 苎菜经 Zn 处理后叶细胞内 Ca^{2+} 水平的变化

Plate The change of calcium level in leaf cells of *N. peltatum* treated with Zn

5. 5mg/L Zn 处理的叶细胞, 显示质膜内侧和细胞质基质出现大量较大的钙沉淀颗粒 ($\times 17000$); 6. 5mg/L Zn 处理的叶细胞, 显示细胞核 (N) 和质膜内侧内出现较大的同心圆钙颗粒沉淀 ($\times 15000$); 7. 15mg/L Zn 处理的叶细胞, 显示细胞核内 (N) 钙颗粒沉淀较胁迫前明显增多 ($\times 15000$); 8. 15mg/L Zn 处理的叶细胞, 显示细胞质基质中钙颗粒沉淀增多 ($\times 15000$); 9. 切片经过 EGTA 处理后, 在质膜内侧出现与原来沉淀物形状相似的电子透明区域 ($\times 17000$); 10. 15mg/L Zn 处理的叶细胞, 显示细胞质基质中钙颗粒沉淀增多 ($\times 17000$)
5. The bigger calcium precipitate particles appeared at the inner aspect of plasmalemma and cytoplasm in leaf cells treated with 5mg/L Zn ($\times 17000$); 6. The deposits with multiring structure exhibited at the inner aspect of plasmalemma and nucleus (N) in leaf cells treated with 5mg/L Zn ($\times 15000$); 7. The amounts of calcium particles increased obviously in nucleus (N) compared with normal condition and lower concentration in leaf cells treated with 15mg/L Zn ($\times 15000$); 8. The amounts of calcium precipitates increased remarkably in cytoplasm in leaf cells treated with 15mg/L Zn ($\times 15000$); 9. The transparent region with same shape similar to original precipitates appeared in inner aspect of plasmalemma after the sections were treated with EGTA ($\times 17000$); 10. The amounts of calcium precipitates increased remarkably in cytoplasm in leaf cells treated with 15mg/L Zn ($\times 17000$)