

水鳖叶片对不同浓度 Pb^{2+} 胁迫的生理和结构响应

丁春霞, 施国新*, 徐勤松, 杨海燕, 许 晔, 徐小颖

(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 Pb^{2+} 胁迫(0、10、20、30 和 50 $mg \cdot L^{-1}$)对水鳖叶绿素含量、可溶性蛋白含量、抗氧化系统、活性氧产生速率和细胞超微结构的影响。结果表明:随着 Pb^{2+} 浓度的增加,水鳖叶片总叶绿素、叶绿素 a/b 值、可溶性蛋白含量和 CAT 活性逐渐下降;SOD、POD、APX、GR 活性、抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)含量先升后降; $O_2^{\cdot -}$ 产生速率、 H_2O_2 、丙二醛(MDA)和可溶性糖含量呈上升趋势;不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)显示, Pb^{2+} 处理后,分子量为 16.3kDa、55.0kDa 的多肽含量减少,高浓度处理下分子量为 23.1kDa、75.8kDa、94.0kDa 的多肽条带消失;电镜观察发现, Pb^{2+} 对水鳖叶片细胞的叶绿体、线粒体和细胞核造成严重损伤。 Pb^{2+} 破坏了水鳖正常代谢所需的生理和结构基础,打乱了代谢平衡,最终导致植物的衰亡。

关键词: 水鳖; Pb^{2+} 胁迫; 抗氧化系统; 超微结构

中图分类号: Q945.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2009)06-0768-06

Physiological and structural responses of *Hydrocharis dubia* leaves to different concentrations of Pb^{2+} stress

DING Chun-Xia, SHI Guo-Xin*, XU Qin-Song,
YANG Hai-Yan, XU Ye, XU Xiao-Ying

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

Abstract: *Hydrocharis dubia* individuals were transplanted and cultured under different concentrations of Pb^{2+} stress (0, 10, 20, 30 and 50 $mg \cdot L^{-1}$) for 7 days. After that, the chlorophyll content, soluble protein content, antioxidant system, active oxygen generation and ultrastructural changes in leaves were investigated. The results showed that with increasing concentration of Pb^{2+} , the chlorophyll content, chlorophyll a/b, soluble protein content and CAT activity decreased; SOD, POD, APX, GR activities, AsA and GSH content increased at first and then decreased; $O_2^{\cdot -}$ generation rate, H_2O_2 , MDA and soluble sugar content increased; SDS-PAGE revealed that Pb^{2+} reduced the amounts of polypeptides with apparent molecular weights 16.3kDa and 55.0kDa, while three polypeptides with apparent molecular weights 23.1kDa, 75.8kDa and 94.0kDa disappeared with the increasing of Pb^{2+} concentration; transmission electron microscopy observation indicated that the higher Pb^{2+} concentration, the more serious damages the chloroplast, mitochondria and nucleus suffered. It was concluded that physiological and structural foundations in the normal metabolism of *Hydrocharis dubia* would be destructed by Pb^{2+} stresses, leading to the disorder of metabolic balance and finally causing the death of the plant.

Key words: *Hydrocharis dubia*; Pb^{2+} stress; antioxidant system; ultrastructure

收稿日期: 2008-10-20 修回日期: 2009-04-23

基金项目: 国家自然科学基金(30670121, 30870139); 高等学校博士学科点专项科研基金(20050319005)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670121, 30870139); Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education(20050319005)]

作者简介: 丁春霞(1985-), 女, 山西运城人, 硕士, 主要从事重金属对水生植物的毒害机制研究, (E-mail)dingchunxia2006@163.com。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: gxshi@njnu.edu.cn)

近年来陶瓷、冶金等工业废水的排放、城市生活垃圾、含铅化肥和农药的施用以及电子垃圾的丢弃,使含铅的污染物大量进入到水环境中,造成了严重的水环境铅污染。大量的铅直接或者通过食物链的富集进入人体会造成严重的危害(周守标等,2007)。目前,国内外研究 Pb^{2+} 毒害的受试材料主要是陆生植物(Intawongse & Dean,2006),且多是关于 Pb^{2+} 毒害对植物生理指标的影响(Chris 等,1992),而对水生植物在 Pb^{2+} 胁迫下的生理和结构响应尚少见报道。鉴于此,本研究以分布广泛的水生植物水鳖为材料,通过营养液培养试验,分析了其在不同 Pb^{2+} 浓度胁迫下,叶绿素、可溶性蛋白含量,抗氧化系统、活性氧产生速率和细胞超微结构的变化,旨在从不同角度全面揭示 Pb^{2+} 对水鳖的毒害机理,为筛选灵敏的水环境监测植物和指标提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

水鳖(*Hydrocharis dubia*)为多年生漂浮草本,叶肾形或圆形,中央部分膨胀成气室,我国南北均有分布。实验用水鳖于2008年5月中旬采自江苏太湖水域,后将其移植于南京师范大学水生植物培养池中驯养。于6月初($18\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)在无底泥玻璃缸中用10% Hoagland 营养液进行培养,选取生长状况一致的植株作为实验材料。

1.2 研究方法

1.2.1 试验设计 整个试验在 Forma 3744 全封闭培养箱(英国产)中完成,光照周期 L:D 为 12 h:12 h,光照强度为 $70\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光暗 L:D 温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}:18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。实验材料分别用含 0、10、20、30 和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $Pb(\text{NO}_3)_2$ (以纯 Pb^{2+} 计)的 10% Hoagland 培养液培养,第7天取相同部位叶片,去离子水洗净、揩干,进行生理指标测定。所有实验均进行3次重复。

1.2.2 生理指标测定 叶绿素含量按照 Arnon (1949)的方法测定;可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法(Bradford 等,1976)测定,以牛血清蛋白为标准蛋白,SDS-PAGE 蛋白电泳采用郭尧君(1999)的方法;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用 NBT 光化还原法(Beyer & Fridovich,1987);过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚方法(张志良等,2003);抗坏血酸过氧化物酶(APX)和谷胱甘

肽还原酶(GR)活性测定采用 Nakano(1981)的方法;过氧化氢酶(CAT)活性测定采用钼酸盐方法(Nakano & Asada,1981); $\text{O}_2^{\cdot-}$ 产生速率用王爱国等(1990)的方法测定; H_2O_2 含量用一般分光光度法,用从南京建成生物工程研究所购买的 H_2O_2 试剂盒测定;丙二醛(MDA)和可溶性糖含量按李合生等(2003)的方法测定;抗坏血酸(AsA)和谷胱甘肽(GSH)含量用陈建勋等(2002)的方法测定。

1.2.3 超微结构观察 在处理第7天,从各浓度梯度培养缸中取植株相同部位的叶片,洗净,切成 1 mm^3 大小的样块,置于 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,丙酮系列脱水,Epon812 浸透包埋,LEICA 超薄切片机钻石刀切片,切片经醋酸双氧铀—柠檬酸铅双重染色后,于 Hitachi H-7650 型透射电镜(日本)下观察并拍照。

1.3 统计分析

实验结果为3次实验的平均值,试验原始数据的处理和制图采用 Excel 和 SPSS 11.5 统计软件完成。将各生理指标与处理浓度作相关性分析,其中 $P\geq 0.05$, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 分别表示生理指标与处理浓度间无显著、有显著和极显著差异。

2 结果与分析

2.1 对水鳖叶片叶绿素含量的影响

叶绿素是植物进行光合作用的主要色素,叶绿素 a/b 值反映叶绿体将光能转化为生物化学能的效率(胡金朝等,2005)。如图1所示,水鳖叶片内叶绿素含量随着 Pb^{2+} 处理浓度的升高显著下降, $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,叶绿素含量降为对照的 49.92%;叶绿素 a/b 值随 Pb^{2+} 浓度的升高下降迅速,在 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,降为对照的 53.51%。统计分析表明:叶绿素含量和叶绿素 a/b 值均与 Pb^{2+} 浓度间达到极显著负相关($r_{\text{叶绿素}}=-0.9466$, $P<0.01$; $r_{\text{叶绿素 a/b}}=-0.9637$, $P<0.01$)。

2.2 对水鳖叶片可溶性蛋白及其 SDS-PAGE 电泳的影响

可溶性蛋白含量水平的高低体现植物生理活动的旺盛程度(王学等,2004)。水鳖叶片可溶性蛋白含量随 Pb^{2+} 处理浓度增加呈下降趋势(图2:A)。 Pb^{2+} 浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,蛋白含量降为对照的 63.09%,统计分析表明,其与 Pb^{2+} 处理浓度间达到极显著负相关($r=-0.9779$, $P<0.01$)。从 SDS-

PAGE 蛋白电泳图(图 2;B)也可以看出,随着 Pb^{2+} 处理浓度的增大,分子量为 16.3kDa、55.0kDa 的多

肽含量明显减少;至 $30\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,94.0kDa 的多肽条带消失;50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,23.1kDa、75.8kDa 的多肽

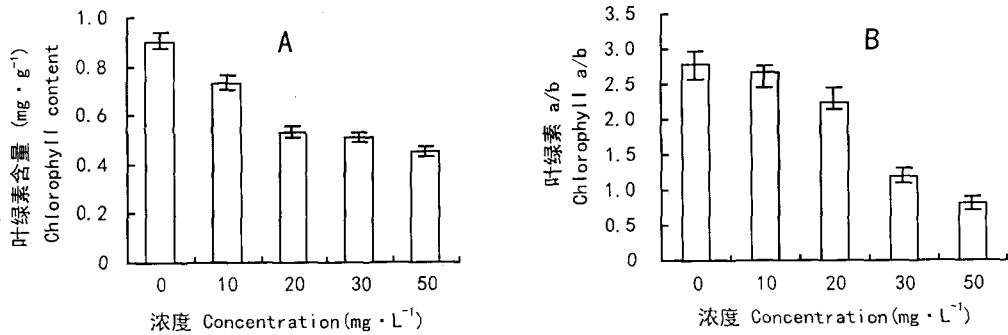


图 1 Pb^{2+} 对水鳖叶绿素含量(A)、叶绿素 a/b(B)的影响

Fig. 1 Effects of Pb^{2+} on chlorophyll content(A) and chlorophyll a/b(B) in *H. dubia*

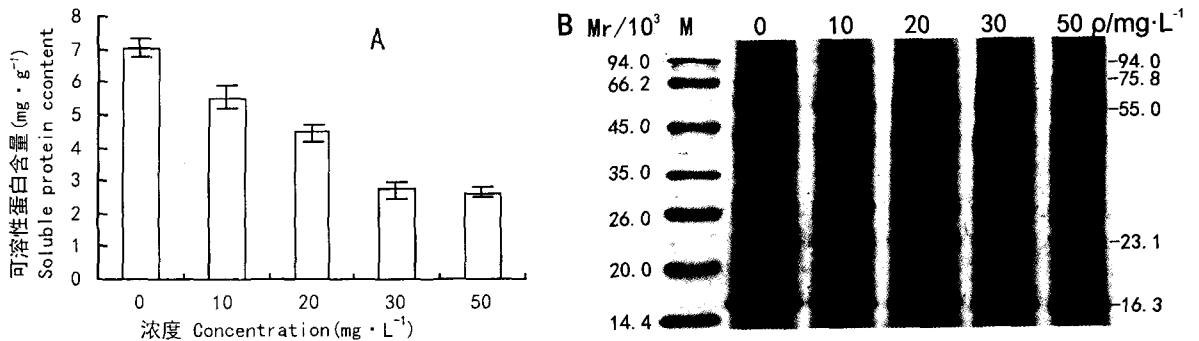


图 2 Pb^{2+} 胁迫对水鳖叶片可溶性蛋白含量(A)及其 SDS-PAGE 蛋白电泳(B)的影响

Fig. 2 Effects of Pb^{2+} addition on soluble protein content(A) and SDS-PAGE(B) in *H. dubia* leaves

条带消失。

2.3 对水鳖叶片 SOD、POD、APX、CAT 和 GR 活性的影响

SOD 将 $O_2^{\cdot -}$ 快速歧化为 H_2O_2 和 O_2 。POD 主要负责清除细胞质和质膜的 H_2O_2 (王学等, 2004); APX 是叶绿体中专一清除 H_2O_2 的关键酶; CAT 主要存在于过氧化物体, 清除 H_2O_2 不需底物; H_2O_2 在 POD、APX、CAT 等酶的作用下转变为 H_2O 和 O_2 (周长芳等, 2001)。GR 催化氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原为还原型谷胱甘肽(GSH), 参与清除活性氧(胡金朝等, 2005)。随着 Pb^{2+} 胁迫浓度的增加, 如表 1 所示, CAT 活性表现出持续下降的趋势, 在 $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 降为对照的 29.33%, 统计分析表明: CAT 活性与 Pb^{2+} 浓度间达到极显著负相关($r = -0.9936$, $P < 0.01$)。SOD、POD、APX 和 GR 活性都呈现先升后降的趋势, 其中 SOD 活性在 $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到峰值, 比对照增加了 15.15%, 然后开始下降, 至 $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其活性低于对照;

POD、APX 和 GR 活性在 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到峰值, 分别比对照增加了 54.8%、124% 和 73%, 然后开始下降, 至 $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 三者的活性仍高于对照。

2.4 对水鳖叶片 AsA、GSH 和可溶性糖含量的影响

AsA、GSH 和可溶性糖在植物遭受逆境胁迫均能起到保护作用(常福辰等, 2002), 本实验中 AsA、GSH 含量都随着 Pb^{2+} 处理浓度的增加先升后降。当处理浓度小于 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 两者含量都迅速上升, 在 $20\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大值, 此时 AsA 和 GSH 含量分别为对照的 142.20% 和 155.04%, 当 Pb^{2+} 浓度继续增大时, AsA 和 GSH 含量开始下降。可溶性糖对细胞质膜和原生质胶体有稳定作用(周长芳等, 2001), 本实验中可溶性糖含量一直呈上升趋势, 其变化与 Pb^{2+} 处理浓度间达到极显著正相关 [$r(\text{可溶性糖}) = 0.9820$, $P < 0.01$]。

2.5 对水鳖叶片 $O_2^{\cdot -}$ 产生速率、 H_2O_2 、MDA 含量的影响

$O_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 是代谢过程中产生的主要活性氧

自由基,对膜脂具有较强的氧化作用(徐卫红等, 2007);MDA 含量是反映细胞脂质过氧化程度的重要指标(Mittler 等,2002)。如表 2 所示,Pb²⁺ 胁迫下水鳖叶片 O₂⁻· 产生速率、H₂O₂ 和 MDA 含量均逐步上升。在最高浓度 50 mg · L⁻¹ 时,O₂⁻· 产生速率达到最大,为对照的 2.23 倍,H₂O₂ 含量最大值为对照的 3.05 倍。统计分析表明:三者的变化与 Pb²⁺ 处理浓度间均达到极显著正相关[*r*(O₂⁻·) =

0.9857,*P*<0.01;*r*(H₂O₂)=0.9947,*P*<0.01;*r*(MDA)=0.9755,*P*<0.01]。

2.6 对水鳖叶片超微结构的影响

Pb²⁺ 胁迫对叶肉细胞超微结构造成了明显损伤。①叶绿体:正常叶绿体呈长椭圆形,被膜和类囊体结构清楚,基质片层与叶绿体长轴平行排列(图 4:a)。20 mg · L⁻¹ Pb²⁺ 处理时,叶绿体基粒类囊体膨胀,间质片层空间增大,部分叶绿体内、外膜破裂

表 1 Pb²⁺ 胁迫对水鳖 SOD、POD、APX、CAT 和 GR 活性的影响
Table 1 Effects of Pb²⁺ on SOD,POD,APX,CAT and GR activity in *H. dubia*

浓度 Concentratin(mg · L ⁻¹)	SOD (U · g ⁻¹)	POD (U · g ⁻¹)	APX(U · g ⁻¹)	CAT (U · g ⁻¹)	GR (U · g ⁻¹)
0	243.16±12.14	4633.33±230.56	7.40±0.40	1218.75±60.38	1.50±0.07
10	280.00±14.00	6446.67±320.73	8.50±0.40	1088.75±54.39	2.10±0.10
20	222.11±12.08	7173.33±364.35	16.60±0.70	812.50±40.48	2.60±0.10
30	203.16±10.57	5973.33±304.38	12.30±0.60	536.25±28.93	2.30±0.10
50	109.47±6.02	4940.00±253.91	8.90±0.40	357.50±18.05	1.80±0.09

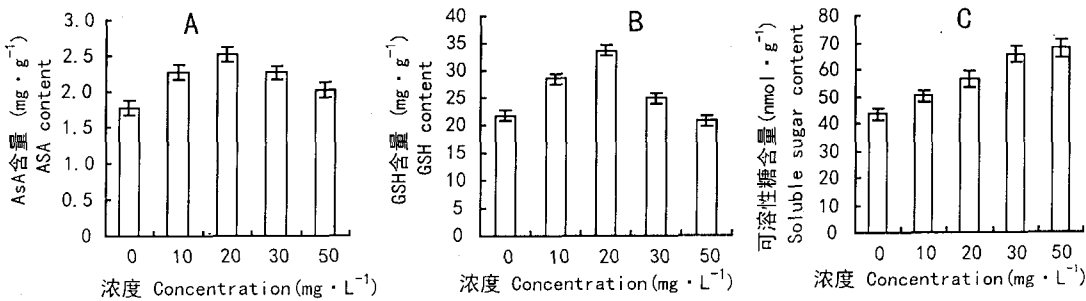


图 3 Pb²⁺ 胁迫下水鳖叶片 AsA(A)、GSH(B)和可溶性糖(C)含量的变化
Fig. 3 Change of AsA(A),GSH(B) and soluble sugar(C)contents in *H. dubia* under Pb²⁺ stress

表 2 Pb²⁺ 对水鳖叶片 O₂⁻· 产生速率、H₂O₂ 及 MDA 含量的影响
Table 2 Effects of Pb²⁺ on O₂⁻· generation rate, H₂O₂ and MDA content in *H. dubia*

项目 Item	浓度 Concentratin (mg · L ⁻¹)				
	0	10	20	30	50
O ₂ ⁻ · /nmol · mg ⁻¹	4.90±0.20	6.00±0.30	8.51±0.40	9.04±0.50	10.90±0.60
H ₂ O ₂ /mmol · g ⁻¹	0.70±0.04	1.00±0.04	1.59±0.05	1.71±0.06	2.15±0.07
MDA/nmol · g ⁻¹	7.28±0.40	8.24±0.40	10.18±0.50	12.69±0.60	16.45±0.80

(图 4:b)。②线粒体:正常线粒体脊突分布均匀,间质浓密(图 4:c)。20 mg · L⁻¹ Pb²⁺ 处理时,嵴突排列无序,出现空泡化现象(图 4:d)。③细胞核:正常细胞核核膜完整,核仁清晰,染色质分布均匀(图 4:e)。30 mg · L⁻¹ Pb²⁺ 处理时,细胞核膜破裂,核仁消失,染色质凝聚(图 4:f)。

3 讨论

叶绿素含量和叶绿素 a/b 值是反映光合器官生

理状况的重要指标(王学等,2004)。本实验中,叶绿素含量一直呈下降趋势,这一方面可能是由于 Pb²⁺ 抑制了叶绿素合成所必需的原叶绿素酸酯还原酶(Protochlophy reductase)的活性(Stobart 等,1985)和影响氨基-酮戊酸(Aminolaevulini acid)的生物合成(Chris 等,1992)。另一方面也可能由于 Pb²⁺ 在细胞内局部积累过多,与叶绿体蛋白质上的-SH 基结合,或取代其中的 Fe²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺ 等,破坏了叶绿体结构和功能有关(计汪栋等,2007)。随着叶绿素含量的下降,叶绿素 a/b 值也逐渐下降,说明叶

绿素 a 较绿素 b 对 Pb^{2+} 的毒害更敏感。也有研究认为:叶绿素 a/b 值代表类囊体垛叠程度,比值越小,说明类囊体垛叠程度越小,光抑制也越强(Maslenkora,1993)。植物叶片叶绿素含量和光合

强度降低,可能是重金属对植物毒害的普遍现象。

Pb^{2+} 胁迫处理也显著地降低了水鳖叶片可溶性蛋白质的含量,周长芳等(2001)的研究认为,这可能是由于其与-SH 基结合导致蛋白变性而降解,也



图版 I Pb^{2+} 胁迫下水鳖叶细胞超微结构 (a)对照叶绿体 $\times 12\ 000$; (b)20 $mg \cdot L^{-1}$ Pb^{2+} 处理,类囊体膨胀、破损 $\times 12\ 000$; (c)对照线粒体 $\times 25\ 000$; (d)20 $mg \cdot L^{-1}$ Pb^{2+} 处理,线粒体的嵴突无序,出现空泡化 $\times 25\ 000$; (e)对照细胞核 $\times 10\ 000$; (f)30 $mg \cdot L^{-1}$ Pb^{2+} 处理,核仁消失和染色质凝聚 $\times 15\ 000$ 。CP: 叶绿体(chloroplast); Mi: 线粒体(mitochondria); N: 细胞核(nucleus); Nu: 核仁(nucleolus); Nm: 核膜(nuclear membrane)。

Plate I Ultrastructure of leaf cells of *H. dubia* under Pb^{2+} stress (a)Chloroplast in control leaf cell $\times 12\ 000$; (b)Swollen or broken thylakoids in leaf cells treated with 20 $mg \cdot L^{-1}$ Pb^{2+} $\times 12\ 000$; (c)Mitochondria in control leaf cell $\times 25\ 000$; (d) leaf cells treated with 20 $mg \cdot L^{-1}$ Pb^{2+} , showing swollen cristae of mitochondria and disrupted mitochondrial membrane $\times 25\ 000$; (e) nucleus in control leaf cell $\times 10\ 000$; (f) leaf cells treated with 30 $mg \cdot L^{-1}$ Pb^{2+} , showing disappear of nucleolus and coagulation of chromatin $\times 15\ 000$.

可能是蛋白质合成酶的失活或 DNA 转录翻译途径受阻,影响了蛋白质的合成。SDS-PAGE 蛋白电泳结果也表明: Pb^{2+} 胁迫处理降低了分子量为 16.3 kDa、55.0 kDa 多肽的含量,高浓度下出现分子量为 23.1 kDa、75.8 kDa 和 94.0 kDa 多肽条带的消失。说明 Pb^{2+} 进入细胞后一方面抑制新蛋白的产生,另一方面促进原有蛋白的降解,改变蛋白的生物合成,破坏了水鳖的正常生理活动。

植物细胞中抗氧化系统的协调作用对维持正常生命活动至关重要。本实验中,存在于过氧化物体中负责清除 H_2O_2 的 CAT 活性首先受到抑制,且一直呈下降趋势,说明水鳖叶片内 CAT 对 Pb^{2+} 胁迫的阈值较低。SOD 和 POD 活性先升后降, Pb^{2+} 浓度为 20 $mg \cdot L^{-1}$ 时 SOD 活性开始下降,至 30 $mg \cdot L^{-1}$ 时 POD 活性开始下降,表明低浓度 Pb^{2+} 胁迫诱导了抗氧化酶活性升高,在一定程度上减轻了自由基对膜的伤害; Pb^{2+} 浓度继续增高,超过了防御反

应的限度,酶活性开始下降。叶绿体中的抗氧化系统也表现出相同的变化趋势,GR 催化 AsA-GSH 循环,使两种抗氧化剂——GSH、AsA 得以再生(汤春芳等,2004),GR 活性在 Pb^{2+} 浓度为 20 $mg \cdot L^{-1}$ 时达到最高,其后活性降低,导致了 AsA 和 GSH 含量的减少。AsA 作为 APX 在叶绿体中清除 H_2O_2 的电子供体(胡金朝等,2005),其含量变化直接导致 APX 活性也在 Pb^{2+} 浓度为 20 $mg \cdot L^{-1}$ 时出现峰值。 Pb^{2+} 浓度为 50 $mg \cdot L^{-1}$ 时,活性氧清除系统被严重破坏, $O_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 在细胞大量积累,最终使膜结构和功能受到破坏(徐卫红等,2007),这是重金属毒害植物的重要原因(徐勤松等,2002)。

MDA 是膜脂过氧化的主要产物之一(胡金朝等,2005),本实验中 MDA 含量随着 Pb^{2+} 胁迫浓度的加大而急剧升高,这与植物体内清除活性氧的能力减弱是一致的。可溶性糖是植物碳代谢的主要物质之一,与植物的抗性有密切关系(孙赛初等,

1985)。 Pb^{2+} 胁迫下水鳖叶片内可溶性糖含量显著上升, 这表明在重金属胁迫下, 水鳖通过调节其自身生理代谢, 增加叶片中可溶性糖含量来提高自身对逆境的适应能力。叶绿体和线粒体是两个能量转化细胞器, 提供细胞进行正常生命活动所必需的能量, 细胞核是细胞遗传代谢的调控中心(常福辰等, 2002)。 Pb^{2+} 胁迫作用下水鳖叶片细胞中叶绿体、线粒体和细胞核都遭受明显损伤, 因此严重影响水鳖的正常生命活动(赵春, 2008)。

综上所述, Pb^{2+} 对水鳖的毒害并不是破坏某一种酶或某一种物质的含量, 而是对水鳖体内生理生化 and 细胞结构造成整体伤害, 导致体内活性氧清除系统被破坏, 活性氧大量积累, 使植物的生理代谢失调并最终衰老和死亡。

参考文献:

- 李合生. 2003. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 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]. 北京: 高等教育出版社: 67—69, 268—269
- 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: 125—127
- 郭尧君. 1999. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社: 54—87, 123—126
- Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*[J]. *Plant Physiol*, **24**: 1—5
- Bradford MM. 1976. A 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
- Beyer WF, Fridovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions [J]. *Anal Biochem*, **161**: 559—566
- Chang FC(常福辰), Shi GX(施国新), Wu GR(吴国荣), et al. 2002. Effects of the combinative pollution of mercury and cadmium on *Ceratophyllum demersum* and preliminary studies of its mechanism(汞、镉复合污染对金鱼藻的影响及其抗性机制的探讨)[J]. *Guihaia*(广西植物), **22**(5): 453—457
- Chris B, Marc VM, Dirk I. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **43**: 83—116
- 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
- Intawongse M, Dean JR. 2006. Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract[J]. *Food Addit Contam*, **23**(1): 36—48
- Ji WD(计汪栋), Shi GX(施国新), Zhang H(张慧), et al. 2007. Physiological and ultrastructural responses of *Potamogeton crispus* to Hg^{2+} stress(菹草对 Hg^{2+} 胁迫的生理和结构应答反应)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), **27**(7): 2 856—2 863
- Maslenkora LT. 1993. Adaptation to salinity as monitored by PSII oxygen evolving reaction in barley thylakoids[J]. *J Plant Physiol*, **142**: 629—634
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends in Plant Sci*, **7**(1): 405—410
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiol*, **22**: 867—880
- Stobart AK, Griffiths WT, Ameen Bukhari. 1985. The effects of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley[J]. *Plant Physiol*, **63**: 293—298
- Sun SC(孙赛初), Wang HX(王焕校), Li QR(李启任). 1985. Preliminary studies on physiological changes and injury mechanism in aquatic vascular plants treated with cadmium(水生维管束植物受镉污染后的生理变化及受害机制初探)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **11**(2): 113—121
- Tang CF(汤春芳), Liu YG(刘云国), Zeng GM(曾光明), et al. 2004. Effects of cadmium stress on active oxygen generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in radish seedlings(镉胁迫对萝卜幼苗活性氧产生、脂质过氧化和抗氧化酶活性的影响)[J]. *J Plant Physiol Mol Biol*(植物生理与分子生物学学报), **30**(4): 469—474
- Ulf K, Linda AF, Klaus L, et al. 1998. Natural ultraviolet radiation and photosynthetically active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga [J]. *Chondrus crispus planta*, **205**(2): 257—262
- Wang AG(王爱国), Luo GH(罗广华). 1990. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine in 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
- Wang X(王学), Shi GX(施国新), Xu QS(徐勤松), et al. 2004. Toxic effects of lanthanum, cerium, chromium and zinc on *Potamogeton malaianus*(镧、铈及重金属元素铬、锌对竹叶眼子菜的毒害作用)[J]. *J Chin Rare Earth Society*(中国稀土学报), **22**(5): 682—686
- Xu QS(徐勤松), Shi GX(施国新), Du KH(杜开和). 2002. 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
- XU WH(徐卫红), Wang HX(王宏信), Liu H(刘怀), et al. 2007. Effects of individual and combined pollution of Cd and Zn on root exudates and rhizosphere Zn and Cd fractions in ryegrass (Zn、Cd 单一及复合污染对黑麦草根分泌物及根际 Zn、Cd 形态的影响)[J]. *Environ Sci*(环境科学), **8**(29): 2 090—2 095
- Zhao C(赵春). 2008. Effect of Cd^{2+} stress on ultrastructure of *Limnophila sessiliflora*(Cd^{2+} 胁迫对石龙尾超微结构的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物), **28**(5): 592—595
- Zhou CF(周长芳), Wu GR(吴国荣), Shi GX(施国新), et al. 2001. The role of antioxidant systems in Cu stress resistance in *Alternanthera philoxeroides*(水花生抗氧化系统在抵御 Cu^{2+} 胁迫中的作用)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **43**(4): 389—394
- Zhou SB(周守标), Wang CJ(王春景), Yang HJ(杨海军), et al. 2007. Stress responses and bioaccumulation of heavy metals by *Zizania latifolia* and *Acorus calamus*(菰和菖蒲对重金属的胁迫反应及其富集能力)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报), **27**(1): 281—287