

# 重金属结合蛋白基因 *hmbp* 在转基因拟南芥中的功能分析

周惠<sup>1,2</sup>, 辛培尧<sup>1,2</sup>, 赵丽华<sup>3</sup>, 原晓龙<sup>1,2</sup>, 陈杰<sup>1,2</sup>, 周军<sup>1,2\*</sup> (1. 西南林业大学林学院, 云南昆明 650224; 2. 西南林业大学西南山地森林保育与利用省部共建教育部重点实验室, 云南昆明 650224; 3. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

**摘要** [目的] 分析重金属结合蛋白基因 *hmbp* 在转基因拟南芥中的功能。[方法] 利用 PCR 方法从抗辐射奇异球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 中克隆 *hmbp* 基因, 并用沾花法转入拟南芥, 用氯化镉处理得到的阳性植株后, 检测转基因植株中的丙二醛、脯氨酸、可溶性糖、叶绿素含量、相对电导率及 SOD、POD 活性。[结果] 与野生型相比, 镉处理后的转基因拟南芥中脯氨酸、可溶性糖含量及 SOD、POD 活性增加较多, 丙二醛含量增加较少, 叶绿素含量减少较少。[结论] 研究表明 *hmbp* 转基因拟南芥对镉具有很高的抗性。

**关键词** 植物修复; 镉; 转基因拟南芥; *hmbp*

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)10-04255-04

## Functional Analysis of Heavy Metal Binding Protein Gene *hmbp* in Transgenic Arabidopsis

ZHOU Hui et al (Forestry College, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

**Abstract** [Objective] The paper was to analyze the function of heavy metal binding protein gene *hmbp* in transgenic Arabidopsis. [Method] The *hmbp* gene was cloned from *Deinococcus radiodurans* by the PCR method and was transferred into Arabidopsis by the means of floral dip method. The positive plants were obtained after cadmium chloride treatment, and the MDA content, proline content, soluble sugar content, chlorophyll content, relative conductivity, SOD activity, POD activity of transgenic plants were detected. [Result] Compared with the wild type, the transgenic Arabidopsis had more rise of proline content, soluble sugar content, SOD activity and POD activity of thaliana after CdCl<sub>2</sub> treatment, with less rise of MDA content and less abatement of chlorophyll content. [Conclusion] The study showed that the *hmbp* transgenic Arabidopsis had high resistance to cadmium.

**Key words** Phytoremediation; Cadmium; Transgenic Arabidopsis; *hmbp*

镉是属于 IIB 族的金属元素, 在化学性质上类似于其他 2 种稳定的金属锌和汞。磷酸盐化肥的大量使用、污水淤泥的扩散和大气沉降导致了农业土壤中镉含量严重超标。镉可被很多农作物吸收利用, 如谷类、马铃薯、蔬菜等。因此, 镉污染在人类食物和整个农业环境中越来越严重。

细菌和更高等生物已进化出对有毒金属的抗性机制, 使这些有毒金属对它们无毒害作用。生命体使用不同的防御机制来应对重金属压力, 如排除、细胞隔离、结合成复合物和重金属结合蛋白的合成, 其中重金属结合蛋白包括金属硫蛋白 (MTs) 和植物螯合肽 (PCs) 等<sup>[1]</sup>。在自然界, 生命体拥有独特的能力对重金属吸收、积累或抵抗。因此, 人们也可使用生物工程技术来利用这些防御机制对污水和重金属污染土壤进行修复。

植物修复是一项高效又经济的新型技术, 植物如同一个太阳能驱动的水泵, 能从土壤中提取并浓缩特定的元素。这类植物能吸收、浓缩、解毒或挥发土壤、水体、沉积物中的有机污染物和无机污染物。虽然植物拥有独特的能力来分解有害异物, 但与微生物相比, 它们缺少分解途径去彻底分解这些有毒复合物。人们可利用生物工程技术, 将其他生命体如细菌、哺乳动物的相关基因转入植物, 并且诱导或过表达该基因, 来加强植物修复的功效<sup>[2-4]</sup>。

据报道<sup>[5]</sup>, 已从活性污泥微生物中克隆到重金属结合基因 *hmbp*。据此, 笔者利用 PCR 技术, 从抗辐射奇异球菌 DNA

中克隆 *hmbp* 基因, 然后转入到拟南芥中, 并且过表达, 以评估 *hmbp* 对镉的植物修复功能。

## 1 材料与与方法

**1.1 试验材料和培养条件** 土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV310、大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  和拟南芥 Col-0 (*Arabidopsis thaliana*) 均由中国科学院植物生理生态研究所保存。

用 75% 乙醇消毒拟南芥种子 5 min, 再用质量浓度为 5% 的次氯酸钠消毒 30 min, 无菌水漂洗 3~4 次, 铺种于 MS 培养基上<sup>[6]</sup>, 置于 4 °C 冰箱内春化 3 d, 然后在 22 °C、100  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  光照、光暗比 = 16 h:8 h 的条件下培养。

**1.2 *hmbp* 基因的克隆及载体构建** *hmbp* 基因 (GenBank accession No. AB252419) 是通过 PCR 技术人工合成的, 其序列内所有密码子都被优化, 并对植物有很高的偏好性<sup>[7]</sup>。PCR 扩增条件为 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。将 *hmbp* 基因的 cDNA 克隆至克隆载体 pMD 18T Vector (Takara) 中, 送至上海英俊生物技术有限公司测序正确后, 用 *Sac*I 和 *Bam*HI (Takara) 酶切后, 插入表达载体 pCambia1301, 该载体包含潮霉素抗性基因和 CAMV 35S 二元启动子。

**1.3 *hmbp* 基因异源转化拟南芥及其鉴定** 使用电穿孔法, 将 pCambia1301/*hmbp* 表达载体质粒转化土壤农杆菌 GV3101, 然后用蘸花法浸染拟南芥 (Col)<sup>[8]</sup>。将转化后收获的 T<sub>1</sub> 代种子铺种于含 30 mg/L 潮霉素 (hygromycin) 的抗性 MS 平板上筛选抗性苗, 再将筛选到的抗性株系铺于潮霉素 (hygromycin) 抗性 MS 平板上。根据后用代是否分离得到纯合转基因株系 T<sub>2</sub> 代, 用 T<sub>2</sub> 代作为后期的试验材料。

**1.4 Gus 组织化学染色分析** 按 Jefferson 等的方法<sup>[9]</sup>, 将待测拟南芥叶片样品与 X-Gluc (X-glucuronide) 染色反应液

**基金项目** 上海市科技计划项目 (CIE01G1106) 资助。

**作者简介** 周惠 (1986 -), 男, 江苏南通人, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学与生物化学, E-mail: zhouhui19861012@126.com。  
\* 通讯作者, 教授, 从事林木、果树的遗传育种及生物化学和分子生物学研究, E-mail: zhoujunbo@163.com。

**收稿日期** 2013-03-09

[50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0), 0.5 mmol/L  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 0.1% Triton X-100, 20% 甲醇, 0.5 mg/ml X-Gluc] 于 37 °C 保温 2~4 h 后, 用 75% 乙醇脱色观察。

**1.5 总 RNA 提取和反转录 PCR 分析** 使用 RNA 提取试剂盒 (MBI Fermentas, Canada) 从转基因植株和野生型幼苗中提取总 RNA。以 5  $\mu\text{l}$  RNA 为模板, 用即用型反转录试剂盒 (Promega, Madison, WI, USA) 来合成第 1 条互补链 cDNA。用 DNase 去除总 RNA 中的基因组 DNA, 以 5  $\mu\text{l}$  总 RNA 为模板合成 cDNA 第 1 链。为保证 RT-PCR 结果的可靠性, 以一对引物合成 *actin* 基因 (GenBank: U41998) 作为内参。PCR 反应程序为 94 °C 40 s, 58 °C 30 s, 72 °C 20 s, 27 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离纯化。

**1.6 转基因株系对镉胁迫的抗性试验** 用 500  $\mu\text{mol}$  氯化镉处理生长四周的野生型 (wild-type) 和 *hmbp* 转基因株系, 再置于 22 °C 下生长 5 d。

**1.6.1 丙二醛 (MDA) 含量和相对电导率的测定。** 叶片中脂质过氧化的程度通过测定 MDA 的含量来确定。丙二醛是不饱和脂肪酸的氧化产物<sup>[10]</sup>。取 3 个转基因株系和野生型拟南芥镉处理前后叶片各 0.3 g 左右。加入 1.2 ml 5% TCA, 研磨后 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 800  $\mu\text{l}$ , 加 0.67% TBA 800  $\mu\text{l}$ , 混合均匀后 100 °C 水浴煮沸 30 min, 冷却后离心一次, 分别测定上清液在 450、532、600 nm 处的 OD 值。

将叶片样本分成等量的 2 组。第 1 组在 5 ml 无菌超纯水中, 25 °C、170 r/min 摇 2 h; 另一组在沸水中煮 30 min。按照 Tang 等的方法来测定电导率<sup>[11]</sup>。第 1 组测得的电导率标记为 R, 第 2 组中测得的电导率标记为 R'。相对电导率以 R/R' 的百分比为结果。

**1.6.2 可溶性糖和脯氨酸的含量测定。** 可溶性糖提取是通

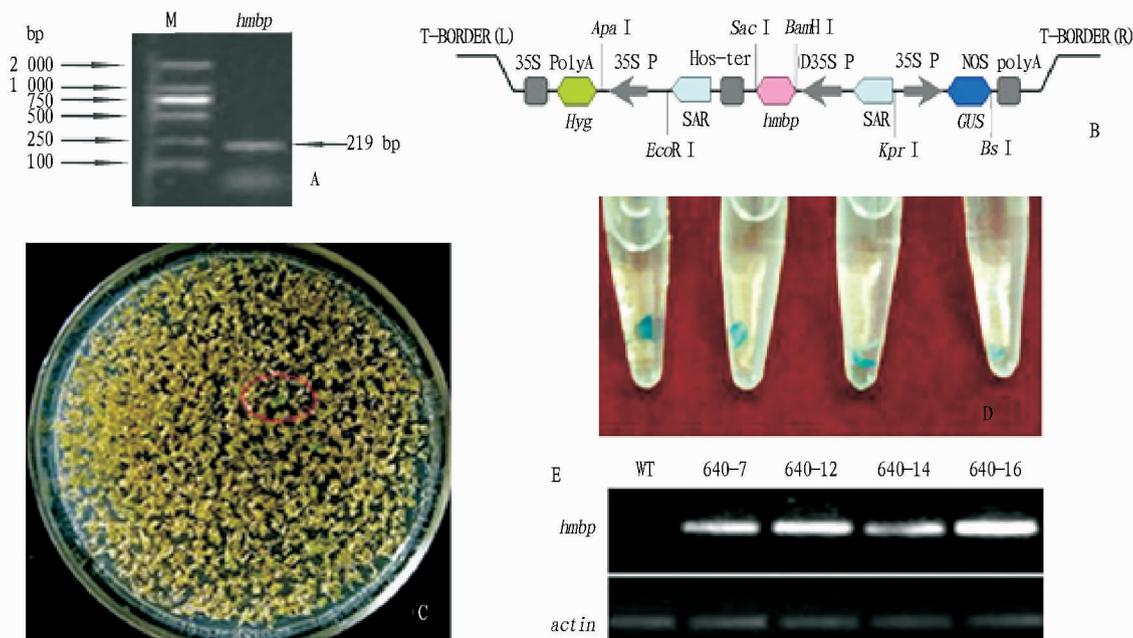
过将冷冻的叶片放入 90% 乙醇中, 应用苯酚-硫酸法来确定其含量<sup>[12]</sup>。

称取镉处理前后 3 个转基因株系和野生型的叶片各 0.3 g, 分别置于试管中, 各管中分别加入 5 ml 3% 磺基水杨酸溶液, 沸水浴中提取 10 min (需经常摇晃), 冷却后用滤纸过滤至干净的试管中, 该滤液为脯氨酸的提取液。吸 2 ml 提取液于 10 ml 离心管中, 然后加 2 ml 冰醋酸、2 ml 酸性茚三酮试剂, 100 °C 水浴煮沸 30 min, 所得溶液呈红色。冷却后加入 4 ml 甲苯, 混合 30 s, 静置 1 min, 吸取上层液至 10 ml 离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min。用移液枪吸取上层脯氨酸红色甲苯溶液至比色杯中, 以甲苯为空白对照, 在分光光度计 520 nm 处比色, 求得吸光度值。试验重复测定 3~5 次, 每次均以不同批次的拟南芥为材料。

**1.6.2 叶绿素含量的测定。** 取镉处理前后的拟南芥叶片组织各 0.5 g, 并剪成细丝条状, 置于装有 20 ml 叶绿素提取液的 50 ml 烧杯中, 用封口膜封口后放置 24 h, 测定叶绿素含量。

**1.6.4 超氧化歧化酶 (SOD) 提取与活性测定。** 取新鲜拟南芥叶片组织 0.5 g 于预冷的研钵中, 用预冷研棒研碎 (整个过程在冰上操作), 加入预冷的 2 ml 50 mmol/L 磷酸缓冲液, 4 °C、12 000 r/min 离心 12 min, 吸取上清液, 4 °C 保存, 2 h 之内使用。使用南京建成生物工程研究所的 SOD 活性测定试剂盒测定 SOD 活性, 操作步骤参照试剂盒的说明书。

**1.6.5 过氧化物酶 (POD) 的提取与活性测定。** 取新鲜拟南芥叶片组织 0.5 g 于研钵中, 加入适量水和少量石英砂, 研成匀浆后 4 °C、12 000 r/min 离心 12 min, 吸取上清液, 4 °C 保存, 2 h 之内使用。使用南京建成生物工程研究所的 POD 活性测定试剂盒测定 POD 活性, 操作步骤参照试剂盒的说明书。



注: A. *hmbp* 基因的 PCR 扩增, 其中 M 为 DNA Marker; B. pCambia1301 双元载体结构; C. 初次转化后得到的 T<sub>2</sub> 代; D. Gus 组织化学染色结果; E. 4 个转基因株系中的 *hmbp* 表达情况。

图 1 转基因拟南芥的构建及表达

## 2 结果与分析

**2.1 转基因拟南芥的构建** 测序分析数据表明合成的 *hmbp* 基因(图 1A)成功地克隆到 pCAMBIA1301 双元载体(图 1B)上。为进一步对 *hmbp* 基因进行功能分析,将该基因通过土壤农杆菌 GV1301 介导转入拟南芥。初次转化后,随机得到 20 个株系用于分离试验。在这些 T<sub>2</sub> 代(图 1C)中,选择 4 个 Gus 检测为阳性的 *hmbp* 株系(图 1D)用于进一步试验。

**2.2 *hmbp* 基因的稳定表达** 应用反转录 PCR 分析 T<sub>2</sub> 代中 *hmbp* 基因的表达,结果表明在这 4 个株系中都能扩增到 420 bp 的 DNA 片段,而在野生型中未扩增到该片段。以 actin 为对照,与 640-14 相比 640-7、640-12、640-16 转录水平较高。Real-time PCR 结果表明,插入的 *hmbp* 基因在转基因株系中稳定表达。定量 Real-time PCR 分析表明 *hmbp* 基因在 4 个转基因株系中转录水平存在一定差异(图 1E)。

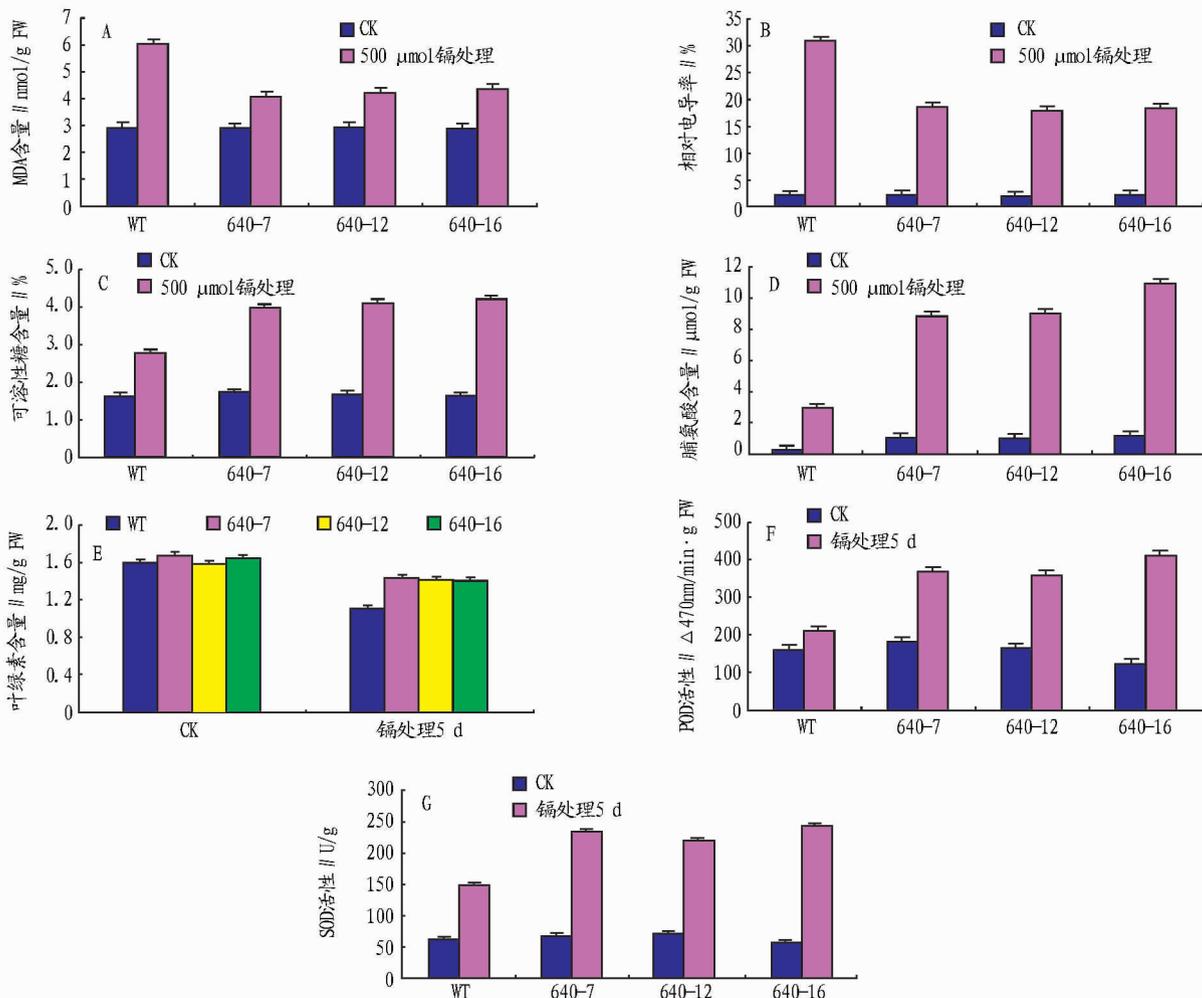
**2.3 丙二醛含量和相对电导率的测定** 野生型和转基因拟南芥的脂质过氧化程度通过 MDA 含量来确定,因为丙二醛是脂质过氧化反应的产物<sup>[13]</sup>。图 2A 中数据表明,在野生型和转基因植株中丙二醛含量差异较大。经过镉处理后,转基因拟南芥的相对电导率比野生型低很多,说明转基因拟南芥

膜受损程度较低(图 2B)。

**2.4 可溶性糖和脯氨酸的含量测定** 图 2C 为在正常条件和镉胁迫下,植株体内可溶性糖含量。经镉处理 5 d 后,640-7、640-12、640-16 转基因植株中可溶性糖含量明显高于野生型。在胁迫环境中,植物体内的脯氨酸含量会增加。为证实镉胁迫条件下植株体内氨基酸含量的变化,试验测定了野生型和转基因植株内脯氨酸含量。未处理条件下,植株体内脯氨酸含量显然很低,野生型为 0.259 8 μmol/g,转基因为 0.903 4 ~ 1.064 7 μmol/g;然而在镉胁迫处理下,脯氨酸含量比之前高很多,野生型为 2.995 1 μmol/g,野生型为 9.309 2 ~ 11.182 8 μmol/g。由此可见,转基因植株中脯氨酸含量明显比野生型高很多(图 2D)。

**2.5 镉离子胁迫对植株叶绿素及其生物合成途径的影响** 镉离子胁迫条件下,会引起植株叶片失去绿色,逐渐发黄。为研究镉胁迫条件下对植株光合作用的影响,试验测定了在镉胁迫条件下,植株叶绿素的总含量,结果表明,经镉处理之后,叶片中叶绿素含量均下降,但转基因植株的下降明显低于野生型(图 2E)。

**2.6 POD 与 SOD 分析** 植物在镉胁迫条件下,会产生大量



注:每个数据代表 3 次测量的平均值 ± 标准差。

图 2 镉离子胁迫对转基因 *hmbp* 植株与野生型拟南芥叶片 MDA、相对电导率、可溶性糖、脯氨酸含量、叶绿素、POD 和 SOD 的影响

超氧阴离子自由基,造成膜质过氧化和脱脂化,最终破坏生物膜系统的功能障碍。而 SOD 和 POD 能去除活性氧和过氧化物对植物的伤害,保证细胞膜的稳定<sup>[14-15]</sup>。因此试验测定了镉离子(500  $\mu\text{mol}$ )处理前和处理 5 d 后的野生型及转基因株系的 POD 与 SOD 酶活性,发现野生型中 POD 和 SOD 活性增加较少,而 3 个过表达转基因株系中增加较多,且差异较明显(图 2F 和 G)。

### 3 讨论

MDA 的积累通常被作为脂质过氧化的指示剂<sup>[16]</sup>。在镉胁迫条件下,该试验中野生型和转基因植株中 MDA 含量都增加。这是由于清除系统的故障导致膜脂质过氧化反应发生,对细胞内成分造成巨大伤害<sup>[17]</sup>。电导率和丙二醛是膜受到伤害的 2 个重要指标。然而,在镉胁迫条件下,转基因植株的电导率和丙二醛都比野生型中要低很多。这样说明转基因植株的膜损伤程度比野生型低,重金属结合蛋白 HMBP 可维持拟南芥细胞膜的完整性。

脯氨酸和可溶性糖积累是植物面临胁迫时 2 个很重要的因素,如同大多数的保护机制一样,在渗透协调方面有很多重要的作用。已有报道表明可溶性糖在增加膜稳定性方面有特定的作用<sup>[18]</sup>。该试验发现转基因株系中脯氨酸和可溶性糖含量都比野生型高很多(图 2D 和 C)。在镉胁迫条件下,拟南芥体内脯氨酸和可溶性糖同时增加,意味着脯氨酸和可溶性糖是植物面临胁迫时最根本的保护成分。然而在没有胁迫下,转基因株系的脯氨酸含量也比野生型高很多(图 2D)。

叶绿素是植物进行光合作用的重要成分。镉等重金属阻碍了植物体内铁的新陈代谢,引起植物铁缺乏,从而造成植物叶绿素合成的减少<sup>[19]</sup>。镉处理拟南芥后,野生型植株的叶绿素含量明显低于其正常水平,说明镉胁迫干扰了植物的铁新陈代谢。转基因株系对镉的亲合能力较强,因而对其叶绿素的伤害比较小。

重金属胁迫使植物体内产生大量的活性氧(ROS),ROS 基团会破坏细胞器结构<sup>[20-22]</sup>。大量文献表明,过量重金属如镉<sup>[23]</sup>、铁<sup>[24-26]</sup>、锌<sup>[22,26-28]</sup>、铜<sup>[26,29-30]</sup>、镍<sup>[28,31]</sup>引起植物面临氧化胁迫。该研究发现,镉胁迫会引起植株体内 SOD 和 POD 活性增强,而且转基因株系的活性明显比野生型高(图 2E 和图 2F)。SOD 清除氧化胁迫所产生的  $\cdot\text{O}_2^-$ ,POD 清除  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[25]</sup>。转基因株系的 SOD 和 POD 高活性会阻止 ROS 对细胞组分的伤害,故而使转基因植株能忍耐较高的镉胁迫。

总体来说,该试验表明过量表达的重金属结合蛋白基因 *hmbp* 拟南芥株系,在镉胁迫条件下,能够积累一系列保护因子如脯氨酸、可溶性糖、POD 和 SOD 等来保护植物。下一步笔者将做更多的工作来阐明在胁迫条件下 *hmbp* 基因的功能和调控机制。

### 参考文献

[1] COBBETT C, GOLDSBROUGH P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 159-182.

- [2] MISRA S, GEDAMU L. Heavy-metal tolerant transgenic *Brassica napus* L. and *Nicotiana tabacum* L. plants[J]. *Theor Appl Genet*, 1989, 78: 161-168.
- [3] GANDIA-HERRERO F, LORENZ A, LARSON T, et al. Detoxification of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene in *Arabidopsis*: discovery of bifunctional O- and C-glucosyltransferases[J]. *Plant J*, 2008, 56: 963-974.
- [4] NOVAKOVA M, MACKOVA M, CHRASTILOVA Z, et al. Cloning of the bacterial *bphC* gene into *Nicotiana tabacum* to improve the efficiency of PCB phytoremediation[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102: 29-37.
- [5] SANO D, MYOJO K, OMURA T. Cloning of a Heavy-Metal-Binding Protein Derived from Activated-Sludge Microorganisms[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(9): 6377-6380.
- [6] MURASHIGE S F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures[J]. *Plant Physiol*, 1962, 5: 473-497.
- [7] MURRAY E E, LOTZER J, EBERLE M. Codon usage in plant genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 477-498.
- [8] ZHANG X, HENRIQUES R, LIN S S, et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1: 641-646.
- [9] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *EMBO J*, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [10] HAVAUX M, LUTZ C, GRIMM B. Chloroplast membrane photostability in chlP transgenic tobacco plants deficient in tocopherols[J]. *Plant Physiol*, 2003, 132: 300-310.
- [11] TANG Z C. Modern experiment protocols in plant physiology[M]. Beijing: Science Press, 1999: 302-308.
- [12] FARRAR J F. Carbon partitioning[M]//HALL D O, SCURLOCK M J M O, BOLHÁR-NORDENKAMPF H R, et al. Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual. London: Chapman & Hall, 1993: 232-246.
- [13] ESTERBAUER H, SCHAUER R J, ZOLOLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes[J]. *Free Radical Bio Med*, 1991, 11: 81-128.
- [14] 王宝山. 植物自由基与植物膜伤害[J]. *植物生理学通讯*, 1986(2): 12-16.
- [15] WECKX J E J, CLIJSTERS H M M. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as result of root assimilation of toxic amounts of copper[J]. *Physiol Plant*, 2006, 96: 506-512.
- [16] SMIRNOFF N. Antioxidant systems and plant response to the environment[M]//SMIRNOFF N. Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers, 1995: 217-243.
- [17] MONK L S, FAGERSTEDT K V, CRAWFORD R M M. Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress[J]. *Plant Physiol*, 1989, 76: 456-459.
- [18] LESLIE A W, OLAVI J. Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1999, 120: 391-399.
- [19] SAMARKOON A B, RAUSER W E. Carbohydrate level and photoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc[J]. *Plant Physiol*, 1979, 63: 1165-1169.
- [20] SOMASHEKARIAH B V, PADMAJA K, PRASAD A R K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation[J]. *Physiol Plant*, 1992, 85: 85-89.
- [21] CHAOUI A, MAZHOUDI S, GHORBAL M N, et al. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzymes activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Plant Sci*, 1997, 127: 139-147.
- [22] WECKX J E J, CLIJSTERS H M M. Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1997, 35: 405-410.
- [23] GONZALEZ A, STEFFEN K L, LYNCH J P. Light and excess manganese: Implications for oxidative stress in common bean [J]. *Plant Physiol*, 1998, 118: 493-504.
- [24] KAMPFENKEL K, MONTAGU M V, INZE D. Effect of iron excess on *Nicotiana glauca* plants: implication to oxidative stress[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 725-735.
- [25] BECANA M, MORAN J F, ITURBE-ORMAETXE I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection[J]. *Plant Soil*, 1998, 201: 137-147.

表 3 顶冰花属植物叶表皮气孔器特征在扫描电镜下观察结果

种名	类型	长×宽// $\mu\text{m}$		形状	密度	指数	外拱盖内缘	角质层纹饰,附属物
		上	下					
黑鳞顶冰花	平列型	11.63×9.15	14.08×6.25	椭圆形,长椭圆形	92.110	7.40	近平滑、浅波状	具细小乳突和刺毛
腋球顶冰花	平列型	18.40×12.35	17.34×12.78	椭圆形	29.200	4.640	平滑、近平滑	具鳞片状蜡质和细小的刺毛
林生顶冰花	平列型	13.78×7.65	14.84×7.76	椭圆形,长椭圆形	41.700	6.000	平滑、浅波状	具大小不等的乳突
毛梗顶冰花	平列型	20.58×12.83	21.20×13.06	椭圆形	28.400	7.300	近平滑、浅波状	具较多的乳突和鳞片状蜡质、刺毛
镰叶顶冰花	平列型	12.62×9.03	16.85×7.86	椭圆形,长椭圆形	17.540	2.700	近平滑	具细小乳突,少量刺毛

该属植物生活周期短,证明顶冰花属植物归属早春短命植物<sup>[2-4]</sup>。而它们的叶表皮均具不同程度的乳突和刺毛、蜡质无定向拟晶体、发育较好的角质层和小的气孔开口。这可能是植物适应生存环境中的强光照射、加强自身保护、抵抗微生物侵袭的一种适应<sup>[6]</sup>。

**3.2 叶表皮微形态特征及亲缘关系** 无论是表皮细胞垂周壁式样,还是表皮细胞附属物特征和气孔器特征,所观察的 5 种顶冰花植物叶表皮光镜观察及电镜扫描特征均具一致性,其共同特征是表皮细胞和气孔器平行于长轴;表皮细胞垂周壁平直;表皮细胞端壁平直或倾斜;气孔器椭圆形;气孔外拱盖内缘浅波形。由此可知,顶冰花属是一个亲缘关系极亲近的自然类群<sup>[7]</sup>。

**3.3 植物叶表皮气孔器的分类学意义与系统进化** 植物的表皮、气孔器特征是同一属内植物相对稳定的共同性状,对于属级和大类群的划分往往是很有价值的。根据所观察结果,顶冰花属 5 种植物的表皮、气孔器结构具有差异。这在一定程度上说明这些特征在研究植物的种间分类上具有一定的科学意义。根据气孔特征,把气孔凹陷、气孔外拱盖无明显蜡质纹饰向气孔不凹陷、气孔外拱盖有明显蜡质纹饰演化的趋势看<sup>[10]</sup>,这 5 种顶冰花属植物的进化顺序可能为毛梗顶冰花→黑鳞顶冰花→林生顶冰花→镰叶顶冰花→腋球顶冰花。这与其花粉的演化趋势相同<sup>[19]</sup>。另外,从气孔器来看,普遍认为气孔器不具副卫细胞,开闭能力差或不能开闭的是较为原始的;而具副卫细胞,保卫细胞壁厚度差别大,特化程度高的则较为进化<sup>[5]</sup>。因此,顶冰花叶气孔器开闭能力弱,没有副卫细胞,保卫细胞内、外侧壁厚度差别明显,亦说明顶冰花属植物进化程度较低。

## 参考文献

- [1] 崔乃然,崔大方,刘国钧,等.新疆植物志(第六卷)[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1996:483-494.
- [2] 毛祖美,张佃民.新疆北部早春短命植物区系纲要[J].干旱区研究,1994,11(3):1-26.
- [3] 丁喜凤,李进.短命植物小甘菊营养器官解剖学研究[J].西北植物学报,1997,17(5):123-126.
- [4] 刘长娥,蒋瑞芬.短命植物三种旱麦形态学研究—营养器官的解剖构造[J].新疆畜牧业,1995(4):16-19.
- [5] 陆嘉惠,李学禹,周玲玲,等.甘草属植物叶表皮特征及其系统学意义[J].云南植物研究,2005,27(5):525-533.
- [6] 郑艳,王洋,周海滨,等.安徽黄精属植物叶表皮研究[J].广西植物,1999,19(3):263-266.
- [7] 邓传良,周坚.石蒜属植物叶微形态特征研究[J].西北植物学报,2005,25(2):355-362.
- [8] 蔡联炳.鹅观草属部分种的叶表皮微形态特征及其分类学意义[J].木本植物研究,2000,20(4):372-378.
- [9] 蔡秀珍,刘克明,龙春林.芋属 5 种植物叶表皮特征的扫描电镜观察[J].湖南师范大学自然科学学报,2004,27(4):58-62.
- [10] SHI J H, LI L Q. Leaf Epidermal Feature in Clematis (Ranunculaceae) with Reference to Its Systematic Significance [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(3): 257-268.
- [11] 邵邻相,张凤娟.6种松科植物叶表皮的扫描电镜观察[J].植物研究,2005,25(3):46-53.
- [12] 王任翔,梁盛业,李洁荣,等.金花茶组植物叶表皮特征的扫描电镜观察[J].广西林业科学,2003,32(1):521-526.
- [13] 任海燕,逢云莉,何兴金,等.中国梭子芹属植物叶表皮微形态特征及其系统学研究[J].西北植物学报,2009,29(1):49-60.
- [14] 高艳,崔洪霞,石雷,等.丁香属植物叶片表皮形态特征与环境适应及系统学关联[J].西北植物学报,2008,28(3):475-484.
- [15] 温洁.一种快速叶表皮离析法[J].植物学通报,1995,12(S1):77.
- [16] 洪亚平,陈之瑞.易卷曲叶表皮制片技术(NaOCl法)的改进[J].植物学通报,2002,1(6):746-748.
- [17] DILCHER D L. Approaches to the identification of angiosperm leaf remains [J]. Bot Rev, 1974, 40(1):1-157.
- [18] 王宇飞,陈君荣.植物角质层分析术语新体系[J].植物学通报,1991,8(4):6-13.
- [19] 王虹,杨凡,逯永满,等.新疆顶冰花属 5 种植物花粉微形态的比较研究[J].安徽农业科学,2013,41(5):1891-1893,2013.

(上接第 4258 页)

- [26] FANG W, KAO C H. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in responses to excess iron, copper and zinc [J]. Plant Sci, 2000, 158: 71-76.
- [27] PRASAD K V S K, SARADHI P P, SHARMILA P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in Brassica juncea [J]. Environ Exp Bot, 1999, 42: 1-10.
- [28] MADHAVA RAO K V, SREESTY T V. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses [J]. Plant Sci, 2000, 157: 113-128.

- [29] GUPTA M, CUYPERS A, VANGRONSVELD J, et al. Copper affects the enzymes of ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris* [J]. Physiol Plant, 1999, 106: 262-267.
- [30] TEISSEIRE H, GUY V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*) [J]. Plant Sci, 2000, 153: 65-72.
- [31] BACCOUCH S, CHAOUI A, FERJANI E E. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoot [J]. Plant Physiol Biochem, 1998, 36: 689-694.