

商陆和烟草对锰胁迫的抗氧化响应研究

张玉秀¹, 黄智博¹, 张红梅¹, 李林峰¹, 柴团耀^{2*}

(1. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院生物工程系, 北京 100083; 2. 中国科学院研究生院生命科学学院, 北京 100049)

摘要: 研究植物的重金属累积能力对于植物修复和植物冶金意义重大. Mn 超累积植物商陆 (*Phytolacca americana* L.) 的耐性/累积机制至今还不清楚, 为了研究商陆在 Mn 胁迫下的抗氧化酶作用, 将萌发 6 周的商陆和烟草幼苗分别放入 1 mmol·L⁻¹ 或 3 mmol·L⁻¹ 的 1/2 Hoagland 营养液处理 4 d, 实验表明商陆叶片光合速率降低幅度显著低于烟草, 而烟草 MDA 含量和电解质渗漏量增加幅度大于商陆. 如 1 mmol·L⁻¹ Mn 处理 4 d 后, 与对照相比, 商陆和烟草的光合速率分别降低 13.3% 和 75.5%; 烟草 MDA 含量和电解质渗漏量分别增加 347.3% 和 120.1%, 而商陆的 MDA 含量和电解质渗漏量没有明显增加, 表明 Mn 胁迫对超累积植物引起的氧化损伤明显低于非累积植物. 随着 Mn 处理浓度的提高和时间的延长, 2 种植物叶片 SOD 和 POD 活性均迅速增加, 其中商陆 SOD 活性的增加幅度大于烟草; 另外, 商陆 CAT 活性持续上升, 而烟草 CAT 活性显著下降. 如在 1 mmol·L⁻¹ Mn 处理下, 商陆 SOD、POD 和 CAT 活性分别提高 161.1%、111.3% 和 17.5%; 烟草 SOD 和 POD 提高 55.5% 和 206.0%, 而 CAT 下降 15.6%, 表明商陆的抗氧化酶, 特别是 CAT, 能够有效地清除 Mn 毒产生的自由基. 这些结果说明抗氧化酶的抗氧化能力是重金属累积植物商陆的 Mn 耐性机制之一.

关键词: 锰耐性; 抗氧化酶; 商陆; 烟草

中图分类号: X17 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)12-3676-08

Antioxidative Response of *Phytolacca americana* and *Nicotiana tabacum* to Manganese Stresses

ZHANG Yu-xiu¹, HUANG Zhi-bo¹, ZHANG Hong-mei¹, LI Lin-feng¹, CHAI Tuan-yao²

(1. Department of Bioengineering, School of Chemical and Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China; 2. College of Life Science, Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Plant species capable of accumulating heavy metals are of considerable interest for phytoremediation and phytomining. The mechanism of Mn tolerance/hyperaccumulate in *Phytolacca americana* L. is less known. To elucidate the role of antioxidative enzyme in response to Mn, the 6-week-old seedling of Mn hyperaccumulator *P. americana* and non-accumulator tobacco (*Nicotiana tabacum*) were exposed to half strength Hoagland solution with 1 mmol·L⁻¹ or 3 mmol·L⁻¹ MnCl₂ for 4 days. The photosynthetic rate in *P. americana* decreased more slowly than that in tobacco, while the MDA content and electrolyte leakage in tobacco increased more rapidly than that in *P. americana*. For example, after exposure to 1 mmol·L⁻¹ Mn for 4 days, the photosynthetic rates of *P. americana* and tobacco in comparison to the control reduced by 13.3% and 75.5%, respectively. The MDA content and electrolyte leakage in tobacco increased by 347.3% and 120.1%, respectively, whereas Mn had no marked effect on both of it in *P. americana*, indicated that the oxidative damage in tobacco was more serious than that in *P. americana*. The activities of SOD and POD of both species increased rapidly with elevated Mn concentration and exposure time in both species, the increase of SOD activity in *P. americana* was higher than that in tobacco. CAT activity in tobacco declined rapidly, while the activity of CAT in *P. americana* was increased. The activities of SOD, POD and CAT in *P. americana* upon 1 mmol·L⁻¹ Mn exposure increased by 161.1%, 111.3% and 17.5%, respectively. The activities of SOD and POD in tobacco increased by 55.5% and 206.0%, respectively, while CAT activity decreased by 15.6%, indicating that the antioxidative enzymes in *P. americana*, particularly in CAT, could fully scavenge the reactive oxygen species generated by Mn toxicity. These results collectively indicate that the enzymatic antioxidation capacity is one of the important mechanisms responsible for Mn tolerance in hyperaccumulator plant species.

Key words: manganese tolerance; antioxidative enzyme; *Phytolacca americana* L.; tobacco

地壳的锰(Mn)通过风化作用从原生矿物中不断地释放出来,与O₂、CO₃²⁻和SiO₂结合形成MnO₂、Mn₃O₄、MnCO₃和MnSiO₃等次生矿物.随着工业化进程的加速和耕作制度的改变,使土壤不断酸化,加速了土壤中有效Mn的释放,导致土壤可溶性锰的浓度过高.Mn是动植物生长的必需微量元素,参与植物光合电子传递链的氧化还原过程和及PS II系统

中水的光解^[1],对维持叶绿体正常结构有重要作用

收稿日期: 2009-01-23; 修订日期: 2009-04-15

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA021404, 2006AA10Z407, 2006AA06Z355); 2009年中国矿业大学(北京)大学生创新性实验计划项目(091209z)

作者简介: 张玉秀(1962-),女,博士,教授,主要研究方向为基因工程和环境生物学. E-mail: zhangyuxiu@cumb.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: zhangyuxiu@cumb.edu.cn, tydai@gucas.ac.cn

用^[2]; 同时, Mn 是 Mn 超氧化物歧化酶(MnSOD)的辅因子, 参与生物体内的抗氧化过程. 当土壤中有有效 Mn 的浓度超出一定范围时, Mn 毒导致植物叶片失绿, 形成黑褐色坏死斑点, 生长抑制, 最后死亡^[2]. 如菜豆在 Mn 胁迫初期成熟叶片发黄, 进而呈深褐色, 最后叶柄变黑、叶片脱落^[3]. 因此, 植物对 Mn 的耐性/富集能力和 Mn 污染土壤的治理研究已引起人们的高度重视.

重金属胁迫可诱导植物体内产生大量的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)^[4], 如超氧自由基($\cdot\text{O}_2^-$)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和 H_2O_2 自由基等, 导致活性氧代谢失调, 过量的活性氧自由基与脂膜、细胞色素和蛋白质发生反应, 致使蛋白质和核酸等生物大分子变性, 酶活性丧失, 膜系统破坏, 光合作用受抑制, 最终细胞凋亡. 植物体内的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)是抗氧化系统中重要的抗氧化酶, 在清除逆境诱导产生的活性氧自由基、抑制膜脂过氧化和减轻细胞伤害等方面起着重要作用. MDA 是膜脂质过氧化作用的产物, 其含量的高低反应膜脂质过氧化作用的程度. Cd 胁迫下, 重金属敏感植物菜豆^[5]和豌豆^[6]叶片 MDA 含量上升; 绿豆 POD 活性升高, 而 CAT 活性受抑制^[7]; Cd 累积植物龙葵和印度芥菜的抗氧化酶活性随 Cd 胁迫浓度增加而显著升高^[8,9]. 商陆(*Phytolacca americana* L.) 叶片 Mn 累积浓度高达 19 299 mg/kg, 地上部和根部锰累积量比值达 2.25, 是一种具有较强 Mn 耐性的 Mn 超累积植物^[10]. 商陆叶片 POD 同工酶活性随着 Mn^{2+} 浓度的增加而升高, 而 SOD 同工酶活性下降^[11], CAT 鲜见报道. 目前, 商陆对 Mn 胁迫的抗氧化响应研究报道很少, 其 Mn 耐性/累积机制尚不明确. 本实验比较研究了 Mn 超积累植物商陆和非积累植物烟草在不同浓度 Mn 处理下的抗氧化响应, 对于揭示 Mn 耐性和超积累机制具有重要意义.

1 材料与方 法

1.1 植物培养和处理

消毒的烟草(*Nicotiana tabacum*)和美洲商陆(*Phytolacca americana* L.)种子在 1/4 MS 培养基中萌发. 温室的相对湿度 70%~80%, 温度(22±3)℃, 光强 165 $\mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$, 每天照射 16 h. 种子萌发 4 周后, 将幼苗转入 1/2 Hoagland 培养液培养, 培养液每 4 d 更换 1 次, 并用气泵通气. 选取生长 6 周的烟草和商陆的幼苗, 转移至含有 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 3

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnCl_2 的 1/2 Hoagland 营养液中分别处理 1~4 d, 选取相同叶位的植物叶片进行生理指标测定, 每个实验设 3 次重复. 另外, 商陆种子分别在含有 1、2、3 和 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnCl_2 的 1/4 MS 培养基萌发, 6 周后观察 MnCl_2 对商陆萌发和幼苗生长的影响.

1.2 光合速率、蒸腾速率和气孔导度测定

用便携式智能光合仪(LCpro+, ADC, UK)分别测定 MnCl_2 溶液处理 0、1、2、3 和 4 d 时植株功能叶片的光合速率(P_n)、蒸腾速率(E)和气孔导度(G_s); 每个处理记录 3 株的数值.

1.3 丙二醛(MDA)含量测定

MDA 含量由硫代巴比妥酸反应测定.

1.4 相对电导率测定

取样品 0.5 g, 放入试管中, 加 10 mL 去离子水, 置 25℃下抽气渗入 1 h. 用玻璃棒搅拌均匀, 然后用电导仪测电导值 EC_1 . 再将试管放入沸水中 10 min, 待其冷却至 25℃时, 测定处理和对照电导值 EC_2 , 按下式计算电解质渗出率和伤害度:

$$\text{电解质渗出率}(\%) = (EC_1/EC_2) \times 100\%$$

1.5 抗氧化酶活性测定

取 0.5 g 叶片, 加入 5 mL 冰预冷的含有 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 和 1% polyvinylpyrrolidone (质量分数)的 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.0), 冰浴研磨, 4℃ 8 000 r/min 离心 20 min, 上清液用于酶活性测定.

SOD 活性: 通过对氮蓝四唑光化还原反应的抑制能力反映 SOD 的活性. 3 mL 反应液含有 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 1.5 mL, 750 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氮蓝四唑(NBT)溶液、130 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲硫氨酸(MET)溶液、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)液、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 核黄素各 0.3 mL、蒸馏水 0.25 mL 和 0.05 mL 酶液(对照加蒸馏水). 混匀后将对照管置暗处, 其它各管于 4 000 lx 日光灯下反应 20 min 后, 测定 560 nm 波长下的吸光值, 以抑制 NBT 光化还原的 50% 为一个酶活性单位(U), SOD 活性用 U/mg 蛋白表示.

POD 活性: 使用 Nickel 等^[12]的方法. 通过计算愈创木酚氧化引起的 470 nm 波长下吸光值的增加反映 POD 活性. 反应液含有愈创木酚 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 过氧化氢和 0.1 mL 酶提取液. 测定波长 470 nm 吸光度值, 每隔 1 min 读数 1 次, 以每 min 内 A_{470} 变化 0.01 为一个过氧化物酶活性单位(U),

POD 活性用 U/mg 蛋白表示.

CAT 活性: 通过计算过氧化氢分解引起的 240 nm 波长下吸光值的减小表示 CAT 的活性. 3 mL 反应液含有 2 mL $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.0)、800 μL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过氧化氢及 200 μL 酶液, 于 240 nm 波长下测定 A_{240} 的变化率, 以每 min 内 A_{240} 变化 0.01 为一个酶活性单位 (U), CAT 活性以 U/mg 蛋白表示.

1.6 可溶性蛋白测定

按照考马斯亮兰法测定可溶性蛋白含量.

1.7 统计学分析

结果是建立在至少 3 组独立的实验的基础之上的. 为证实数据变化和结果的有效性, 所有实验数据使用 SPSS 软件进行显著性分析.

2 结果与分析

2.1 Mn 胁迫对商陆和烟草幼苗生长的影响

植物能否在含有重金属的土壤中萌发和生长是植物耐性和植物修复的基础. 消毒的商陆种子在浓度为 $1 \sim 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MnCl_2 培养基萌发 4 周, 结果表明商陆在 $1 \sim 3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MnCl_2 培养基中均可萌发生长, 萌发率与对照相同 (83%), 幼苗叶片与对照相同无中毒现象, 但当浓度达到 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时几乎不萌发. 另外, 当幼苗继续生长到 6 周时 (图 1), 株高随 MnCl_2 浓度的升高而降低, 叶片不断黄化, 表明商陆幼苗能忍耐 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 处理. 为了研究商陆对 Mn 的耐性机制, 选择 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 这 2 个浓度处理商陆和烟草幼苗.

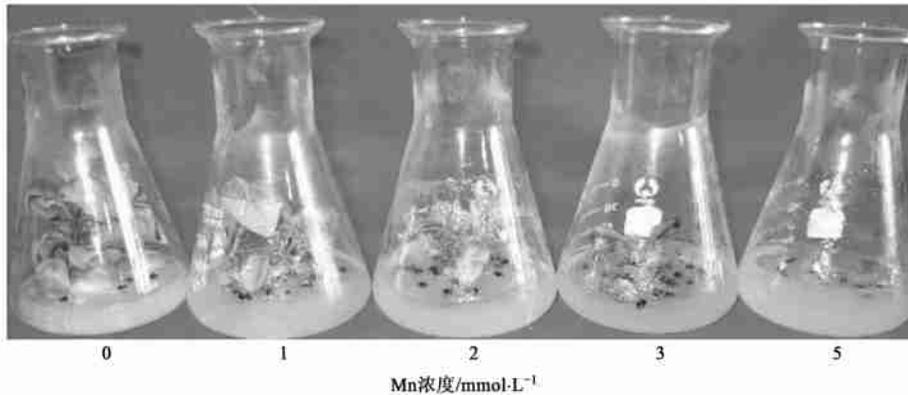


图 1 MnCl_2 胁迫对商陆种子萌发的影响

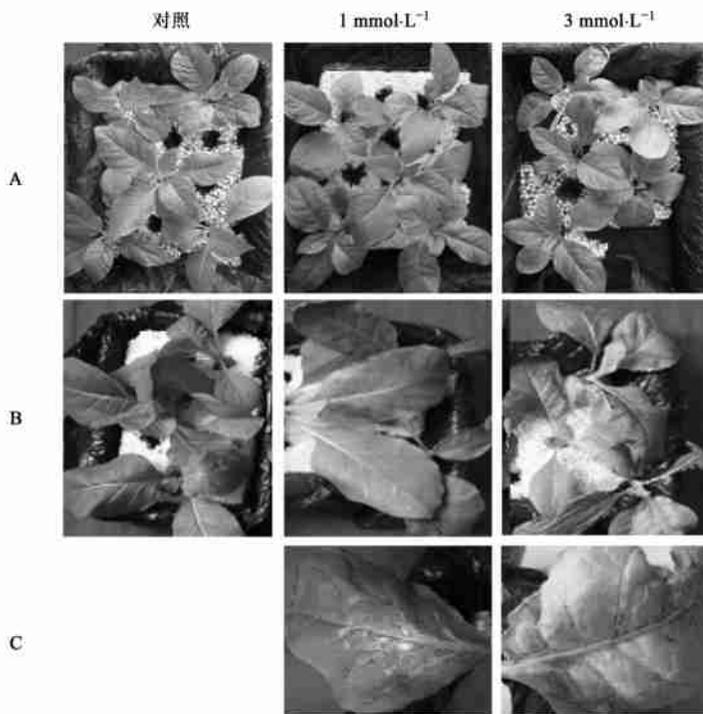
Fig. 1 Effects of MnCl_2 stress on the seed germinating of *P. americana* L.

萌发 6 周的烟草 (Nt) 和商陆 (Pa) 在分别 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 溶液处理 4 d, 结果表明, 与对照相比商陆幼苗在 2 个 MnCl_2 浓度胁迫下功能叶片没有明显的 Mn 中毒迹象 (图 2A), 幼叶有点黄, 而烟草分别在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 溶液处理 4 d 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 溶液处理 3 d 时, 老叶枯黄, 功能叶片表面出现明显的黑斑和组织坏死现象, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 处理时幼苗中毒现象尤为明显 (图 2C), 且根系变成黄褐色. $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 处理 4 d 后, 与生长 4 d 的对照相比, 烟草生物量分别减少了 25% 和 37% [图 3(a)]; 而商陆分别降低了 13% 和 15% [图 3(b)]. 表明 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 处理对烟草属于严重胁迫, 而对于商陆则为轻度胁迫, 商陆幼苗对 Mn 的耐性远高于烟草.

$1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 溶液处理幼苗

4 d 后, 商陆和烟草的光合速率均降低, 但商陆下降的幅度远小于烟草. $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 处理下, 同对照相比商陆和烟草的光和速率分别下降 13.3% 和 75.5%; $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 处理下, 商陆和烟草的光和速率分别降低 36.4% 和 89.8% (图 4). 同样, 2 种植物的蒸腾速率和气孔导度在 2 种浓度 MnCl_2 处理下均降低, 且商陆的降低幅度明显小于烟草. $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MnCl_2 处理下, 商陆蒸腾速率分别降低了 9.5% 和 32.1% (图 4), 气孔导度分别降低 32.4% 和 47.2% (图 4); 而烟草的蒸腾速率分别降低 69.7% 和 84.2%, 气孔导度分别降低 64.4% 和 78.3%. Mn 胁迫下气孔导度降低, 表明 CO_2 和水分子运输受影响, 导致蒸腾和光合作用降低.

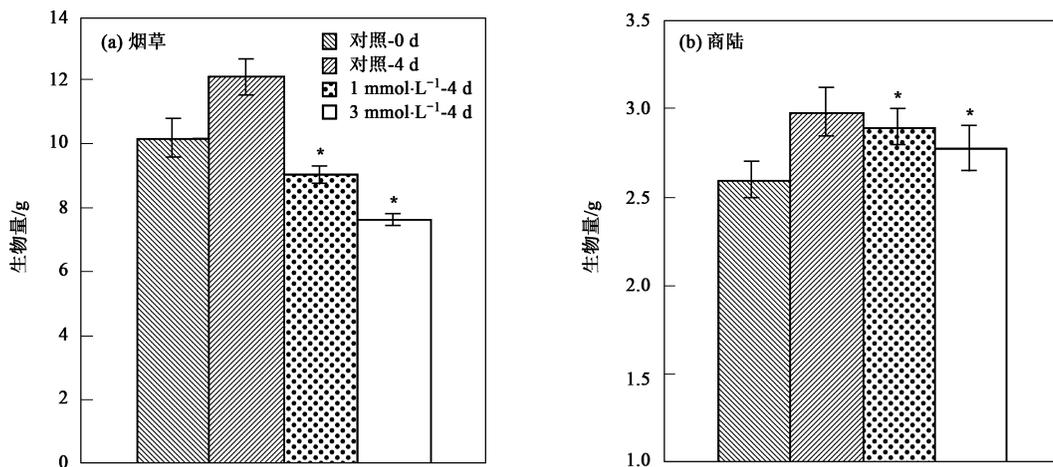
2.2 Mn 胁迫对商陆和烟草幼苗叶片细胞膜透性的影响



A. 商陆; B. 烟草; C. 烟草叶片

图 2 $MnCl_2$ 胁迫对幼苗生长的影响

Fig. 2 Effects of $MnCl_2$ stress on the growth of seedling



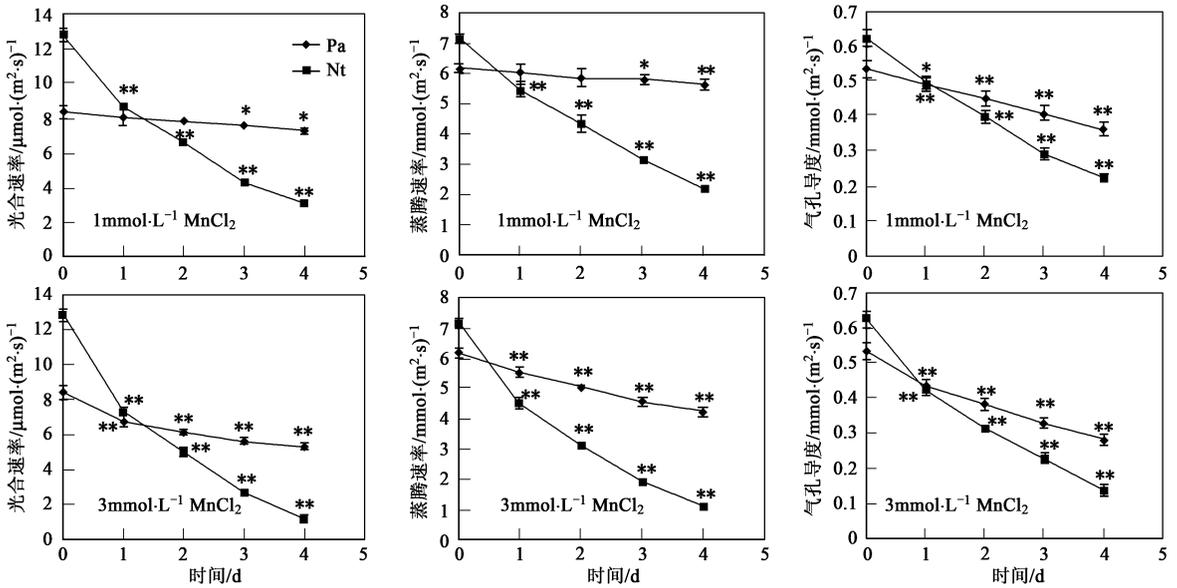
数据是平均值和标准差, 处理和对照之间在 $p < 0.05$ 水平的差异用* 表示

图 3 $MnCl_2$ 胁迫对幼苗生物量的影响

Fig. 3 Effects of $MnCl_2$ stress on the biomass of seedling

MDA 含量反映膜脂过氧化程度, 相对电导率可以反映细胞膜的完整性. 图 5 表明烟草幼苗叶片的 MDA 含量随 Mn 处理浓度的增加和时间的延长显著增加, 然而, 商陆 MDA 含量仅在 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MnCl}_2$ 处理 2 d 后才显著上升, 且上升幅度明显低于烟草. $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MnCl}_2$ 处理 4 d 后, 商陆

MDA 含量与对照相比分别增加了 17.4% 和 33.4%, 而烟草 MDA 含量分别增加了 347.3% 和 420.1%. 与 MDA 的变化趋势相似, 烟草电解质渗漏量随 Mn 处理浓度的增加和时间的延长显著增加, 而商陆没有明显增加. 2 种浓度的 Mn 胁迫使烟草相对电导率分别升高 120.1% 和 165.5% (图 5), 这表明 Mn 对烟草



数值是 3 次数据的平均值和标准差, 处理和对照之间在 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$ 水平的差异分别用 * 和 ** 表示, 下同

图 4 MnCl_2 对商陆 (Pa) 和烟草 (Nt) 光合速率、蒸腾速率和气孔导度的影响

Fig. 4 Effects of MnCl_2 on the photosynthetic rate, transpiration rate and stomatal conductance in *P. americana* (Pa) and tobacco (Nt)

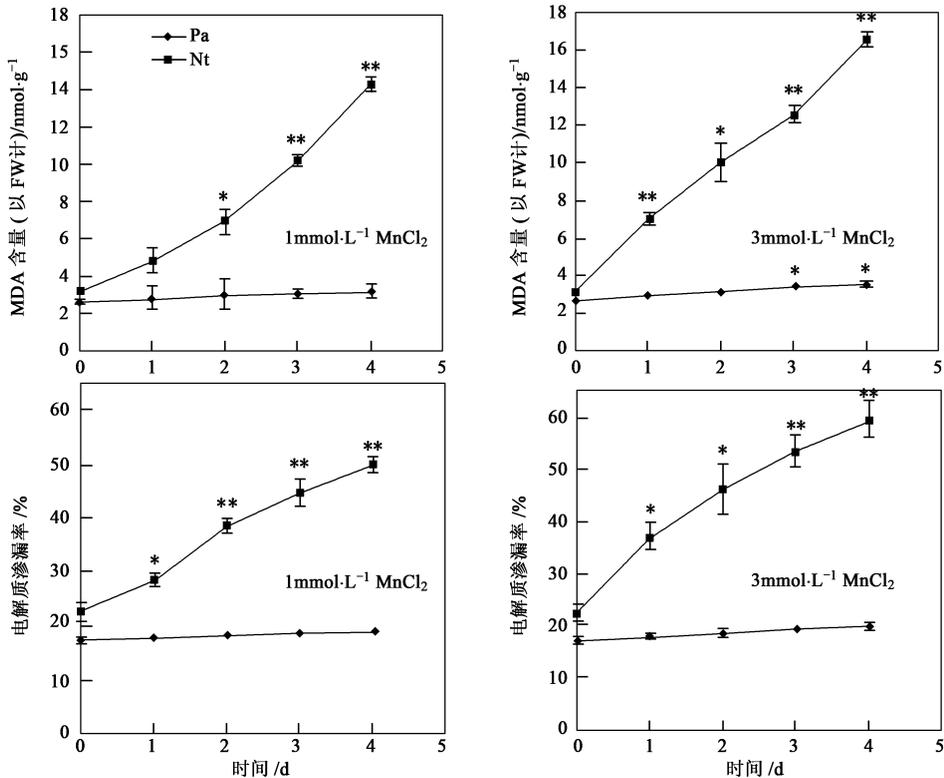


图 5 MnCl_2 对商陆 (Pa) 和烟草 (Nt) 叶片 MDA 含量和相对电导率的影响

Fig. 5 MDA content and Electrolyte leakage in leaves of *P. americana* (Pa) and tobacco (Nt) treated with different MnCl_2 concentrations

引起了严重的氧化损伤, 而对商陆的损伤很小。

2.3 Mn 胁迫对商陆和烟草抗氧化酶系统的影响

正常生长条件下烟草 SOD 活性高于商陆, 随

Mn 处理浓度的增加和时间的延长 2 种植物叶片中 SOD 活性均显著增加, 但商陆 SOD 活性增加的幅度大于烟草 (图 6)。1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnCl_2 处

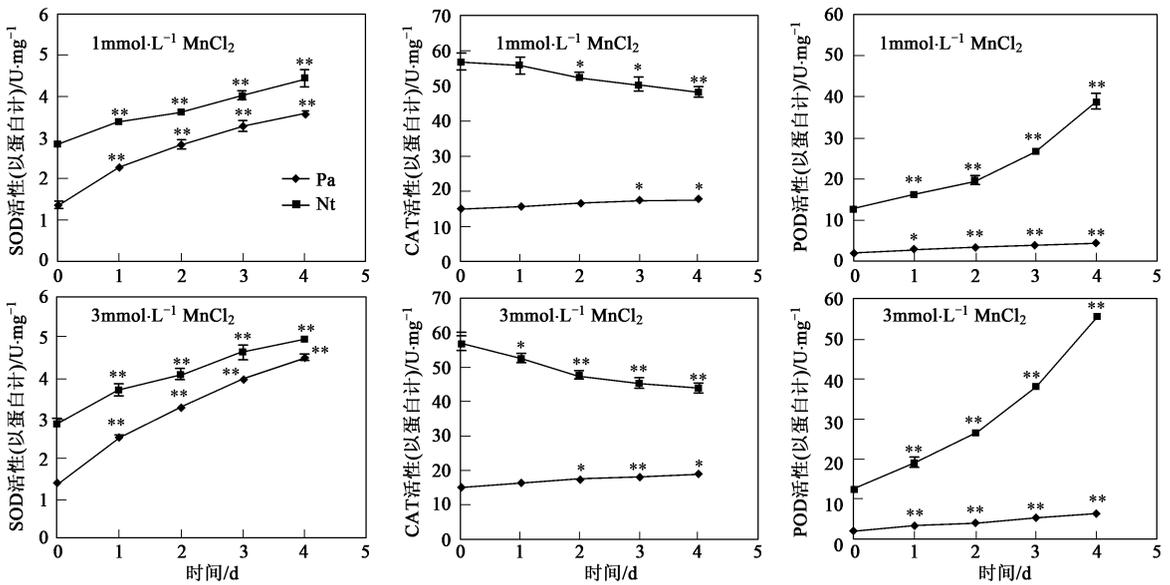


图6 MnCl₂ 处理时商陆和烟草叶片抗氧化酶活性的影响

Fig. 6 Activity of antioxidative enzymes in leaves of *P. americana* and tobacco treated with different MnCl₂ concentrations

理4 d后, 商陆叶片SOD活性分别提高了161.1%和227.9%, 而烟草叶片中SOD活性分别提高了55.5%和73.7%。

随Mn处理浓度的增加和时间的延长, 2种植物的CAT活性变化趋势截然相反(图6), 商陆叶片CAT活性缓慢上升, 而烟草CAT活性显著下降。1 mmol·L⁻¹和3 mmol·L⁻¹ MnCl₂处理4 d后, 同对照相比商陆CAT活性分别升高17.5%和20.5%, 而烟草CAT活性分别降低15.6%和23.1%。表明植物对Mn耐性不同, CAT活性响应也不同。

2种植物叶片POD活性随Mn处理浓度的增加和时间的延长显著增加, 烟草POD活性增加的幅度大于商陆。1 mmol·L⁻¹和3 mmol·L⁻¹ MnCl₂处理4 d, 商陆叶片POD活性分别提高了111.3%和207.3%, 而烟草叶片POD活性分别提高了206.0%和338.0%(图6)。

3 讨论

3.1 Mn毒抑制光合作用和诱导氧化胁迫

Mn是一种多价态的金属元素, Mn²⁺很容易被植物吸收并运输到地上部。Mg和Fe是叶绿素的重要组成部分, 在叶绿素的合成和光合电子传递过程中发挥重要作用^[13]。由于Mn²⁺与Mg²⁺、Fe²⁺在植物根部具有相同的结合位点, 并且Mn²⁺的结合能力较强^[14], 所以高浓度的Mn²⁺抑制Mg²⁺和Fe²⁺的吸收, 导致必需元素缺乏, 叶绿素合成减少, 进而影响光合

作用^[13]。同时, Mn²⁺在叶绿体中可被光激活的叶绿素氧化为Mn³⁺, 氧化还原电位提高, 致使活性氧大量累积, 叶绿素进一步遭破坏, 叶绿体功能不能正常发挥^[15]。如Mn处理可提高玉米地上部Mn含量, 叶绿素a/b含量和光合作用下降, 且Mn敏感品种较耐性品种降低更多^[16]。杨树幼苗在Mn胁迫下生物量、叶片数目和叶面积降低^[17]; 苜蓿属叶片出现的褐色斑点与Fe缺乏明显相关^[18]; 大麦在1.8 mmol·L⁻¹ MnCl₂处理5 d, 叶片Mn浓度提高22倍, 并且出现单个或成片的棕黑坏死斑^[19]。本实验表明1 mmol·L⁻¹和3 mmol·L⁻¹ MnCl₂处理后, 烟草叶片出现成群的黑斑症状, 与玉米和大麦对Mn毒响应结果一致, 光合速率显著下降, 生长严重受抑制; 但是2种浓度的Mn处理没有明显影响商陆的生长, 且光合速率下降幅度远不及烟草, 表明Mn超累积植物商陆具有较强的Mn耐性和解毒能力。推测Mn对商陆Mg和Fe元素的吸收影响较小, 或商陆具有较强的抗氧化活性和区域化能力使Mn离子失活, 从而减轻了Mn对商陆毒害作用。

细胞膜是重金属伤害的主要位点, Cd胁迫引起Cd敏感植物菜豆和豌豆等MDA含量上升^[5,6], Cd耐性/累积植物印度芥菜细胞电解质渗漏增加^[9]; Mn胁迫诱导黄瓜、大麦和杨树等叶片超氧自由基和H₂O₂自由基的累积^[18-20], 黄瓜MDA升高^[20]。本实验结果表明2种浓度MnCl₂胁迫均导致烟草叶片MDA含量和电解质渗漏显著增加, 电解质溶液渗漏

量与 MDA 含量累积呈正相关;而商陆电解质渗漏没有明显增加.表明 Mn 胁迫对烟草的氧化损伤程度明显大于商陆. Mn 胁迫下,烟草叶片膜脂过氧化水平和膜透性迅速升高,光合作用迅速下降,并出现坏死斑点和萎蔫现象,这可能是由于 Mn 毒诱导活性氧自由基水平的迅速升高导致膜系统破坏所致.推测商陆具有较高的抗氧化酶活性,能有效地清除 Mn 胁迫诱导的活性氧自由基.

3.2 Mn 超累积植物的 Mn 耐性机制

SOD 可将胞质、线粒体和叶绿体中的 $O_2^{\cdot-}$ 歧化为 H_2O_2 和 O_2 ,防止 $O_2^{\cdot-}$ 对细胞的破坏,其活性高低与植物抗逆性大小相关.在适度逆境诱导下,SOD 活性增加可以提高植物的适应能力^[8,9],但是当 $O_2^{\cdot-}$ 的增加速率远远超过酶的歧化能力时,细胞内多种功能酶及膜系统遭到破坏,代谢紊乱,SOD 活性反而受抑制. Cd 胁迫导致 Cd 非累积植物豌豆 SOD 活性降低^[6],而 Cd 累积植物印度芥菜 SOD 活性升高^[9]. 研究表明 $600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mn 处理 9 d 黄瓜幼苗 SOD 活性升高^[20];大麦幼苗在低浓度 $183 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mn 处理 5 d 后 SOD 活性不变, Mn 浓度提高 10 倍后 SOD 活性显著下降,提高 100 倍后 SOD 活性又回升^[19]. 由于该大麦品种能耐 $18 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mn 处理,推测可能是 Mn 耐性品种. 由于以上实验都是研究单一植物对 Mn 的响应,没有比较 Mn 敏感植物和耐性植物在同一处理浓度和时间下的酶活性响应,难以确定抗氧化酶在重金属耐性中的作用. 本实验表明商陆和烟草叶片 SOD 活性均随着处理浓度和时间的增加而显著升高,说明 SOD 对 Mn 胁迫引起的超氧自由基的清除具有重要作用;同时,由于商陆 SOD 活性增加的幅度大于烟草,表明商陆对 Mn 的抗氧化能力和解毒能力大于烟草.

CAT 可将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,清除体内累积的 H_2O_2 . 研究表明木豆 CAT 随着 Zn、Cd 和 Ni 等重金属胁迫强度的增加而下降^[22],而印度芥菜 CAT 活性升高^[9]. 高浓度 Mn ($1.8 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 使大麦的 H_2O_2 的大量积累, CAT 活性显著上升^[19],而黄瓜 CAT 活性 ($600 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mn) 显著下降^[20]. 本实验表明商陆 CAT 活性随着处理时间的延长和浓度的增加而上升,与之相反,烟草叶片 CAT 活性显著降低,表明植物对 Mn 耐性不同, CAT 活性响应不同,暗示 CAT 可能是 Mn 累积植物清除 Mn 毒产生的 H_2O_2 的关键酶. 另外, CAT 是一种含有 Fe 酶, Mn 处理没有降低商陆的 CAT 活性,表明没有明显影响其 Fe 的

吸收. 推测烟草 CAT 活性下降的原因可能是由于 Mn 导致 Fe 缺陷所致,当然,具体机制仍然需要进一步研究.

POD 是清除植物体内的过氧化物. 商陆和马齿苋的 POD 活性在 Mn、Cd 和 H_2O_2 胁迫下上升^[11,22],油菜 POD 活性随着 Mn 浓度的增加 ($0.5 \sim 30 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 而升高^[23],大麦叶片 POD 活性与累积的 Mn 浓度成正相关^[19]. 本实验表明商陆和烟草叶片 POD 活性均随着 Mn 处理浓度的增加和处理时间的延长而显著提高,说明 POD 在降低 Mn 毒引起的氧化胁迫方面具有重要作用. 但是,烟草 POD 活性增加的幅度明显大于商陆,推测 POD 活性的迅速增加能部分补偿 CAT 对 H_2O_2 的清除作用. 另外, POD 活性提高与叶片上棕色坏死斑的形成相关,而坏死斑则位于 Mn 氧化物和沉淀物的累积部位^[24]. 烟草叶片在 Mn 处理后出现成群的坏死斑,而商陆叶片正常,表明烟草 POD 活性的迅速升高与大量坏死斑的形成有关. Van Assche 等^[25] 报道植物对重金属的共同响应是 POD 活性升高,因此,认为 POD 活性变化可以作为植物对环境胁迫响应的灵敏指标^[26].

4 结论

(1) $MnCl_2$ 处理下,烟草光合作用降低的幅度明显高于商陆,表明 Mn 超累积植物商陆的 Mn 耐性明显高于烟草.

(2) $MnCl_2$ 处理下,烟草叶片 MDA 和电解质渗漏量迅速增加,商陆电解质渗漏量没有明显增加,表明 Mn 对烟草造成了严重的氧化损伤,而商陆没有明显受伤害.

(3) $MnCl_2$ 处理下,商陆和烟草叶片 SOD 和 POD 活性均呈增加趋势, CAT 活性变化趋势截然相反,表明商陆抗氧化酶的协同作用是其耐 Mn 的机制之一. POD 活性的变化可能是反映 Mn 毒的灵敏指标, CAT 活性响应不同可能是鉴定重金属累积植物与敏感植物的一个指标.

参考文献:

- [1] Shenker M, Plessner O E, Te-Or E. Manganese nutrition effects on tomato growth, chlorophyll concentration, and superoxide dismutase activity[J]. J Plant Physiol, 2004, 161: 197-202.
- [2] Mukhopadhyay M J, Shama A. Manganese in cell metabolism of higher Plants[J]. Bot Rev, 1991, 57(2): 117-149.
- [3] Giller K E, Amjee F, Brodrick S J, et al. Toxic concentration of iron and manganese in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. growing on freely drained soils of pH 6.5 in northern Tanzania [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 1992, 23(7/8):

- 787-792.
- [4] Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, *et al.* Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application[J]. *Plant Physiol Biochem* 2005, **43**(5): 437-444.
- [5] Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal M H, *et al.* Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean [J]. *Plant Sci*, 1997, **127**(2):139-147.
- [6] Sandalio L M, Daluzo H C, Gomez M, *et al.* Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants[J]. *J Exp Bot*, 2001, **52**(364): 2115-2126.
- [7] Shaw B P. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*[J]. *Bio Plant*, 1995, **37**(4): 587-596.
- [8] Sun R L, Zhou Q X, Sun F H, *et al.* Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. [J]. *Environ Exp Bot*, 2007, **60**(3): 468-476.
- [9] Mobin M, Khan N A. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress[J]. *Plant Physiol*, 2007, **164**(5): 601-610.
- [10] 薛生国, 陈英旭, 林琦, 等. 中国首次发现的锰超累积植物——商陆[J]. *生态学报*, 2003, **23**(5): 777-778.
- [11] 陈燕珍, 陶毅明, 梁振鑫, 等. 锰胁迫对商陆(*Phytolacca aconosa*)保护酶的影响[J]. *生物学杂志*, 2008, **25**(3): 44-47.
- [12] Nickel R S, Cunningham B A. Improved peroxidase assay method using leuco 2, 3, 6-trichloroindophenol and application to comparative measurements of peroxidase catalysis[J]. *Anal Biochem*, 1969, **27**: 292-299.
- [13] Sandmann C, Richard M. Iron-sulfur centers and activities of the photosynthetic electron transport chain in iron-deficient cultures of the blue-green Alga *Aphanocapsa* [J]. *Plant Physiol*, 1983, **73**(3): 724-728.
- [14] Heenan D P, Campbell L C. Influence of potassium and manganese on growth and uptake of magnesium by soybean (*Glycine max* L. Merr. cv Bragg)[J]. *Plant Soil*, 1981, **61**(3): 447-456.
- [15] Issa A A, Abdel-Basset R, Adam M S. Abolition of heavy metal toxicity on *Kirchneriella lunaris* (Chlorophyta) by calcium[J]. *Ann Bot*, 1995, **75**(2): 189-192.
- [16] Doncheva S, Posdenrieder C, Stoyanova Z, *et al.* Silicon amelioration of manganese toxicity in Mn-sensitive and Mn-tolerant maize varieties[J]. *Environ Exp Bot*, 2009, **65**(2-3): 189-197.
- [17] Lei Y, Chen K, Tian X, *et al.* Effect of Mn toxicity on morphological and physiological changes in two *Populus cathayana* populations originating from different habitats[J]. *Trees*, 2007, **21**: 569-580.
- [18] de Varennes A, Cameiro J P, Goss M J. Characterization of manganese toxicity in two species of annual medic[J]. *Plant Nutr*, 2001, **24**(12): 1947-1955.
- [19] Demirevska-Kepova K, Simova-Stoilova L, Stoyanova Z, *et al.* Biochemical changes in barley plants after excess supply of copper and manganese[J]. *Environ Exp Bot*, 2004, **52**(3): 253-266.
- [20] 史庆华, 朱祝军, 王永传, 等. 不同辐照度下高浓度锰对黄瓜叶片活性氧产生和抗氧化酶活性的影响[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2006, **32**(3): 325-329.
- [21] 严重玲, 洪业汤, 付舜珍. Cd、Pb 胁迫对烟草叶片中活性氧清除系统的影响[J]. *生态学报*, 1997, **17**(5), 488-491.
- [22] Madaga Rao K V, Sresty 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**(1): 113-128.
- [23] Zeng Q, Geng M J, Zhang Z J. Effects of Mn toxicity on the content of Mn, Ca, Fe and the Activities of POD and CAT in *Brassica napus* L. at seedling stage[J]. *Huazhong Agric Univ*, 2004, **23**(3): 300-303.
- [24] El-Jaoual T, Cox D A. Manganese toxicity in plants[J]. *J Plant Nutr*, 1998, **21**(2): 353-386.
- [25] Van Assche F V, Clijsters H. Effect of metals on enzyme activity in plants[J]. *Plant Cell Environment*, 2006, **13**(3): 195-206.
- [26] Koricheva J, Roy S, Vranjic J A, *et al.* Antioxidant responses to simulated acid rain and heavy metal deposition in birch seedlings[J]. *Environ Pollut*, 1997, **95**(2): 249-258.