

锰在商陆叶片的细胞分布及化学形态分析

徐向华^{1,2,3}, 施积炎², 陈新才², 陈英旭², 吴吉春¹, 王晓蓉³

(1.南京大学地球科学系, 江苏 南京 210093; 2.浙江大学环境工程系, 浙江 杭州 310029; 3.南京大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

摘要: 商陆 (*Phytolacca acinosa* Roxb.) 是在中国境内首次发现的锰超积累植物, 叶片是商陆积累锰的主要器官。本文主要采用化学分析、差速离心及色谱技术对商陆叶片锰的细胞分布和化学形态进行了研究并探讨了商陆超累积和解毒锰的机制。细胞分配的结果表明, 锰主要分布在商陆叶片的细胞质可溶性部分(含液泡), 含量高达 74%~82%, 细胞壁结合的锰占总锰的 15%~20%, 细胞器锰含量最少, 仅为 3%~6%。不同提取剂的实验结果表明, 商陆叶片中的 Mn 均以水提取态为主, 为总 Mn 含量的 83%~91%; 不同锰浓度处理下, 商陆叶片草酸含量高于 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (干重), 达到干重的 9%~11%, 但不同锰浓度处理下草酸的含量并无明显变化趋势, 表明高含量的草酸的累积是商陆本身具有的特性, 而非外界锰的诱导产生。

关键词: 锰; 超积累植物; 商陆; 分布; 形态

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-2043(2008)02-0515-06

Subcellular Distribution and Chemical Fractions of Manganese in Leaves of Hyperaccumulator *Phytolacca acinosa* Roxb.

XU Xiang-hua^{1,2,3}, SHI Ji-yan², CHEN Xin-cai², CHEN Ying-xu², WU Ji-Chun¹, WANG Xiao-rong³

(1. Department of Earth Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 3. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: *Phytolacca acinosa* Roxb. (*P. acinosa*) is a Mn hyperaccumulating plant firstly found in China. To understand the accumulation mechanism of Mn in leaves of *P. acinosa*, the distribution and species of Mn in *P. acinosa* leaves were investigated in this study. Results showed that Mn preferred to accumulate in the supernatant part, accounting for 74%~82% of the total Mn in the leaves. About 15%~20% of the total Mn combined with cell wall, while only 3%~6% of total Mn in organelles. 83%~91% Mn in the leaves was water extractable with different extracting agents. The oxalic acid concentration in the leaves was more than 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), contributing to 9%~11% of total dry weight of leaves. However, the oxalic acid concentration in leaves did not increase with the application of Mn, indicating that oxalic acid was not induced by exogenous Mn contents.

Keywords: manganese (Mn); hyperaccumulator; *Phytolacca acinosa* Roxb.; distribution; species

锰是植物和人体所必需的营养元素, 但过量摄入则会引起中毒。锰在化工行业的广泛应用、锰矿的开采以及污泥农用等人类活动所导致的土壤和水体污染也越来越引起人们的广泛关注^[1-3]。我国湖南、广西、贵州等省均存在大量的锰矿及锰污染地^[2,3], 因此锰

污染土壤的修复势在必行。污染土壤的植物修复是环境科学研究的热点问题, 超积累植物是植物修复的基础。目前已发现的超积累植物有 450 多种, 中国物种资源丰富, 但发现的超积累植物较少, 仅 5 种^[4]。商陆 (*Phytolacca acinosa* Roxb.) 是在中国境内首次发现的锰超积累植物, 且具有分布广、适应性强、生物量大等优点^[4,5]。锰超积累植物商陆的发现为锰污染土壤的植物修复提供了广阔的应用前景, 同时也为探讨重金属在植物体中的超积累机理提供了一种新的种质资源。

收稿日期: 2007-06-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40432004; 40271060)

作者简介: 徐向华 (1977—), 女, 博士, 主要研究方向为环境生物学和生态毒理学。E-mail: xianghua_xu@163.com

通讯联系人: 施积炎 E-mail: shijiyang@zju.edu.cn

目前对重金属超积累机理的研究主要集中在镍、锌、镉、砷、铜等元素,有关锰超积累机理的研究还未见系统报道,其相关研究仅限于野外植物样品和腊叶标本的含量分析^[6],主要原因是已发现的11种锰超积累植物都是木本植物,而商陆属于多年生草本植物,易于实验的开展。重金属在植物中的分布总是尽可能避免损伤功能相对重要的组织、细胞和细胞器,从而表现出选择性的分配^[6]。植物可以将重金属累积在不同组织和细胞器,也能通过有机酸或蛋白质螯合重金属而解毒^[7,8]。重金属在植物体内的分布及形态通常因植物种类和重金属类型的不同而存在差异。本实验采用化学分析,差速离心及色谱技术等研究了锰在商陆叶片的分布和形态特征,进而探讨商陆超积累和解毒锰的机制,以期对锰污染土壤的修复及锰毒土壤上的植物改良提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物培养

实验材料商陆种子采自湖南湘潭锰尾矿废弃地。将商陆种子播于湿沙,萌芽后分别依次在1/4和1/2 Hoagland 营养液中培养7 d,然后选择生长一致的商陆幼苗进行锰处理,分别为:5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (CK)、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、5 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnCl_2 ,28 d后收获,每个处理4个重复。实验在浙江大学环保楼人工智能温室内进行(14 h光照,25 $^{\circ}\text{C}$ 白天/20 $^{\circ}\text{C}$ 晚上,相对湿度55%~60%),每天用0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH或0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl调pH值至4.5,以维持生长介质中较高的 Mn^{2+} 浓度,同时保持连续通气,每3 d更换一次营养液,平时每天补充蒸馏水补偿由于吸收和蒸发所减少的体积。

1.2 锰在商陆叶片的细胞分配

采用差速离心法分离细胞不同组分^[9]。实验提取剂为:0.25 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖+50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5)+1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫赤藓糖醇(DTE)。叶片称重后置于离心管中,加入提取剂,叶片与提取剂的比例为1:3,研磨至匀浆,离心30 s(300 g)。重复3次。沉淀用作细胞壁组分Mn含量测定;3次上清液合并离心45 min(20 000 g),上清液用于细胞质可溶性组分(含液泡)Mn含量的测定,沉淀用于细胞器组分Mn含量的测定。所有的操作步骤都在4 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。上清液或沉淀分别移入150 mL三角瓶中,电热板上蒸发至近干,加入10 mL硝酸和8滴高氯酸,于砂浴中煮沸至澄清,定容,原子吸收测定。

1.3 商陆叶片 Mn 的化学形态分析

采用连续提取法提取商陆叶中的各种结合形态的重金属^[10]。提取剂及提取步骤具体如下:准确称取5.00 g新鲜植物样品,加入在20 mL去离子水,研磨至匀浆,振荡1 h后,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,上清液用于Mn含量分析。整个过程都在4 $^{\circ}\text{C}$ 下操作。重复操作数次,保留每次的上清液并分析其Mn含量,直至Mn浓度趋于稳定或浓度较小。残渣再用0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl以同样方式提取3次,每一次提取的上清液保留并测定其Mn含量。最后的残渣用 HNO_3 和 HClO_4 (2:1)混合酸消化定容后测定Mn含量。所有过程中的Mn含量分析都采用原子吸收分光光度计测定。

1.4 氨基酸有机酸分析

游离氨基酸分析:根据Schaeffer和Sharpe(1997)^[11]方法进行。取冷冻干燥样品0.2 g,在4 mL 3.5%(m/V)磺基水杨酸中充分研磨后以相同溶剂定容至10 mL,16 000 g离心15 min,取上清液,以Sep-pak C18过滤,滤液备测。氨基酸含量用氨基酸分析仪测定。

有机酸分析:将冷冻干燥的植物样品置于液氮中磨碎,称取一定量样品用0.025 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的稀HCl超声1 h,旋涡振荡1 min,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,提取3次,合并上清液。上清液依次过阳离子树脂(Amberlite IR-120, H^+ form, 16 mm \times 14 cm)、阴离子树脂(Dowex 1 \times 8, 100-200 mesh, formate form, 16 mm \times 14 cm),再用1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl洗脱,然后40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至干,用高纯水定容后备测^[12]。用高效液相色谱法测定有机酸含量,检测条件为:Shodex有机酸分析专用柱,柱温40 $^{\circ}\text{C}$,流动相为高纯水,流速0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长210 nm。

1.5 数据分析

数据采用SPSS(10.0)和EXCEL软件分析。

2 结果与分析

2.1 锰在商陆叶片的细胞分布

不同锰浓度处理下商陆叶片细胞内Mn含量及分配见表1。随锰处理浓度的增加,商陆叶片各亚细胞组分锰含量都有所增加,且细胞质可溶性部分锰含量增加最大,在锰处理浓度为5 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,叶片细胞质可溶性部分Mn含量为2 053 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW,是对照叶片细胞质可溶性部分的60多倍。从锰在叶片细胞内的分配比例来看,不同锰浓度处理下均以细胞

质可溶性部分锰的含量最高,其次是细胞壁部分,细胞器锰比例最少(表 1)。对照处理时,叶中大部分锰分配在细胞质可溶性部分,占总锰的 74%,随处理浓度的增加,细胞质可溶性部分锰百分含量继续增加,在 5 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 锰处理时,细胞质可溶性部分锰含量高达总锰的 82%;商陆叶片细胞壁结合的锰占总锰的 15%~20%,但却随锰处理浓度的增加其百分含量降低;商陆叶片细胞器中锰含量最少,只占总锰的 3%~6%。

2.2 Mn 在商陆叶片的化学提取态

不同提取剂可提取不同形态的化合物,因此采用不同提取剂顺序性提取植物中不同成份可以判断金

属在其组织中的化学结合形态。表 2 为不同浓度处理商陆叶片各种化学结合形态 Mn 含量。从表 2 可以看出,不同锰浓度处理下,商陆叶片中的 Mn 均以水提取态为主,为总 Mn 含量的 83%~91%;0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 提取态 Mn 占总 Mn 的 8%~14%;而残渣态的 Mn 则不足总 Mn 的 4%。随锰处理浓度的增加叶片中水提取态 Mn 的比例增加,而 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 提取态 Mn 的比例则随锰处理浓度的增加而降低。以上结果表明水提取态 Mn 是商陆叶片 Mn 的主要形式。不同的提取剂可提取不同形态的化合物,如去离子水主要提取与水溶性物质结合的部分如水溶性氨基酸、有机

表 1 Mn 在商陆叶片细胞内的分配 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)
Table 1 Subcellular distribution of Mn in the leaves of *P. acinosa*

处理 Mn 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞质内可溶性物质 (含液泡)		细胞壁		细胞器 (除液泡)		总量	
	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW	百分比/%						
5 (CK)	30.5	74.0	8.1	19.6	2.6	6.4	41.2	100
500	416.9	77.8	102.8	19.2	15.9	3.0	535.6	100
2 000	1 086.2	78.4	263.1	19.0	37.0	2.6	1 386.2	100
5 000	2 052.9	81.9	369.6	14.7	84.8	3.4	2 507.3	100

注:表中数字为 4 次的平均值,下同。

Note: Values in the table are means of four replicates, the same below.

表 2 商陆叶组织中各种化学结合态 Mn 的含量
Table 2 Concentrations of Mn in the chemical fractions in fresh leaf tissues of *P. acinosa* by successive extractions

处理	总锰含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW	提取次数	水提取态/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW	%	0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 提取态/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW	%	残渣态/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW	%
5(CK)	45.2	1	33.83	74.88	4.59	10.17	1.64	3.62
		2	1.82	4.04	0.75	1.67		
		3	0.71	1.57	0.65	1.43		
		4	0.52	1.15	0.23	0.52		
		5	0.43	0.95				
		合计	37.32	82.59	6.23	13.78	1.64	3.62
500	356.1	1	282.44	79.32	29.92	8.40	1.59	0.45
		2	22.83	6.41	5.46	1.53		
		3	5.58	1.57	1.80	0.50		
		4	3.56	1.00	0.35	0.10		
		5	2.56	0.72				
		合计	315.28	89.02	37.53	10.53	1.59	0.45
2 000	952.8	1	796.78	83.63	74.06	7.77	0.87	0.09
		2	39.53	4.15	7.50	0.79		
		3	15.78	1.66	2.32	0.24		
		4	9.70	1.01	0.44	0.05		
		5	5.1	0.61				
		合计	867.60	91.06	84.32	8.85	0.87	0.09
5 000	1 788.4	1	1 524.75	85.26	125.96	7.04	2.25	0.13
		2	81.87	4.58	20.13	1.13		
		3	17.97	1.01	3.79	0.21		
		4	7.43	0.42	0.66	0.04		
		5	3.56	0.20				
		合计	1 635.59	91.47	150.54	8.42	2.25	0.13

酸等,因此以下针对叶片中的氨基酸、有机酸进行分析。

2.3 商陆叶片中氨基酸和有机酸的积累

从表3商陆叶片游离氨基酸含量来看,谷氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、脯氨酸和精氨酸含量较高,达总氨基酸含量的70%以上。其中,谷氨酸含量最高,占总量的22%~26%,但不同Mn浓度处理对谷氨酸含量影响不大;另外,苏氨酸、天冬氨酸和脯氨酸含量也较高但不受Mn处理浓度的影响,这些氨基酸含量高可能是商陆叶片的组成特征,而不受外界供Mn供应的影响,也与其Mn累积量无关。在这些含量相对较高

的氨基酸中,高Mn(5 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理浓度下,丝氨酸和精氨酸含量减少;在含量相对较低的氨基酸中半胱氨酸、组氨酸和甲硫氨酸在高Mn处理下也有所降低。氨基酸与锰存在结合的可能性^[13],但我们的结果表明,从氨基酸和Mn的总量来看,氨基酸还没有足够多的量来螯合商陆叶片中的Mn,或者说Mn与氨基酸的结合不是其主要的解毒方式,氨基酸可能更多地生长在代谢上起调节作用。

有机酸分析的结果表明,不同锰浓度处理下,商陆叶片中的草酸含量占绝对优势,而其他有机酸含量较少,因此只对草酸进行了定量,见表4。从表4中可

表3 商陆叶片中游离氨基酸的含量

Table 3 The accumulation of free amino acids in the *P. acinosa* leaves

氨基酸/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ DW		Mn 处理/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
		CK	500	2 000	5 000
谷氨酸	Glu	44.87 \pm 2.12a (23.81)	42.58 \pm 0.48a (22.00)	41.51 \pm 1.15a (24.73)	45.96 \pm 2.61a (26.46)
苏氨酸	Thr	24.33 \pm 3.01a (12.91)	24.84 \pm 5.04a (13.17)	21.11 \pm 1.48a (12.26)	18.33 \pm 3.35a (10.55)
丝氨酸	Ser	18.48 \pm 0.91ab (9.81)	17.34 \pm 1.64a (9.19)	18.93 \pm 0.69ab (10.99)	20.78 \pm 0.24b (11.96)
天冬氨酸	Asp	14.88 \pm 2.38a (7.90)	17.13 \pm 1.36a (9.08)	14.90 \pm 2.07a (8.65)	16.64 \pm 4.11a (9.58)
脯氨酸	Pro	15.84 \pm 3.99a (8.40)	24.01 \pm 2.99a (12.73)	17.86 \pm 3.39a (10.37)	20.73 \pm 1.49a (11.93)
精氨酸	Arg	13.71 \pm 1.95a (7.28)	12.18 \pm 2.49a (6.46)	7.28 \pm 2.35ab (4.23)	5.44 \pm 2.52b (3.13)
缬氨酸	Val	9.23 \pm 1.74a (4.90)	7.74 \pm 0.67a (4.10)	8.00 \pm 1.24a (4.64)	6.18 \pm 0.92a (3.56)
亮氨酸	Leu	8.95 \pm 0.28a (4.75)	8.55 \pm 0.31a (4.53)	8.09 \pm 1.19a (4.70)	7.13 \pm 0.75a (4.11)
赖氨酸	Lys	8.54 \pm 0.20a (4.53)	7.88 \pm 0.08a (4.18)	7.55 \pm 1.06a (4.39)	7.02 \pm 1.45a (4.04)
苯丙氨酸	Phe	7.16 \pm 0.13a (3.80)	6.20 \pm 0.48a (3.29)	6.38 \pm 0.58a (3.71)	6.25 \pm 0.89a (3.60)
丙氨酸	Ala	5.98 \pm 0.06a (3.17)	6.40 \pm 1.32a (3.39)	6.17 \pm 0.03a (3.58)	7.30 \pm 0.05a (4.20)
酪氨酸	Tyr	4.66 \pm 0.30a (2.47)	4.09 \pm 0.48a (2.17)	4.36 \pm 0.06a (2.53)	4.39 \pm 0.33a (2.53)
异亮氨酸	Ile	4.21 \pm 0.32a (2.24)	4.28 \pm 0.29a (2.27)	3.63 \pm 0.50a (2.11)	3.45 \pm 0.51a (1.99)
半胱氨酸	Cys	3.54 \pm 0.99a (1.88)	3.01 \pm 0.68ab (1.59)	2.34 \pm 0.13ab (1.36)	1.40 \pm 0.15b (0.80)
组氨酸	His	2.51 \pm 0.09a (1.33)	2.49 \pm 0.24a (1.32)	2.12 \pm 0.18ab (1.23)	1.82 \pm 0.14b (1.05)
甲硫氨酸	Met	1.13 \pm 0.15a (0.60)	0.74 \pm 0.14ab (0.39)	0.65 \pm 0.06b (0.38)	0.58 \pm 0.25b (0.33)
甘氨酸	Gly	0.44 \pm 0.21a (0.24)	0.27 \pm 0.03a (0.14)	0.24 \pm 0.02a (0.14)	0.30 \pm 0.04a (0.17)
总和		188.46 \pm 13.23a (100%)	188.68 \pm 2.41a (100%)	172.19 \pm 12.58a (100%)	173.71 \pm 11.52a (100%)
总 Mn 含量		10.9 \pm 1.2	99.5 \pm 2.8	182.5 \pm 9.4	327.1 \pm 4.6

注:()内某种氨基酸占总氨基酸的百分比(%)。

Note: Values in () indicate the percentage of one amino acid to total amino acids (%).

以看出,草酸绝对含量较高,都在 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 以上,达到干重的 9%~11%,但不同锰处理下草酸的含量并无明显变化趋势,说明高含量的草酸的累积是商陆本身具有的特性,而非外界锰的诱导产生。不同锰浓度处理下,商陆叶片中草酸与锰的比例都大于 1,表明商陆叶片中有足够的草酸可以络合锰而起到解毒的作用。

3 讨论

重金属离子在细胞内的区室化是植物内部解毒的重要途径之一^[14]。液泡是重金属区室化的主要位点之一。Brooks 等^[15]用差速离心法研究表明,Ni 超积累植物 *A. serpyllifolium* 细胞中可溶性 Ni 主要分布在液泡。除液泡外,细胞壁也是重金属累积的一个主要位点,对铜耐性植物 *Athyriumyo koscense* 和 Zn 超富集植物的研究表明植物体内大约 60%~90% 的 Cu 和 Zn 分布在细胞壁上^[16,16]。重金属在非代谢活性组织的分布可减轻或避免重金属离子对功能性结构单位的损伤和代谢过程的干扰^[6]。从叶片中锰的亚细胞分配率来看,细胞质可溶性部分(包括液泡)锰的含量最高,占总锰的 74%~82% (表 1)。由于成熟细胞的 95% 体积都是液泡^[17],因此可以推测叶片中大部分锰都累积在液泡中。尽管在样品细胞质可溶性部分的分离过程中存在一些细胞器(如叶绿体、线粒体)的污染等问题,但由于细胞器中的锰含量较低(3%~6%)而被忽略。Memon 和 Yatazawa^[17]对锰在 *A. acadophylloides* 积累也有相似的报告。细胞壁是金属离子进入细胞的第一道屏障^[18],金属离子结合在细胞壁上,从而不能进入细胞质影响细胞内的代谢活动,只有当金属与细胞壁的结合量达到饱和时,过多的金属离子才会进入细胞质。商陆叶片细胞壁在累积锰的过程中也起了相当的作用,有 15%~20% 的锰与细胞壁结合。细胞器具有很多重要功能,一定含量的锰可维持细胞器的正常功能,但锰含量过高就会对其造成毒害。随锰处理浓度的增加细胞器中锰含量增加,但与对照比,锰处理后叶片细胞器中锰分配率降低,表明锰处理浓度增

加,叶片细胞器中的锰已部分向细胞壁和液泡转移,这可能是商陆对高锰的一种适应性保护机制。

重金属的形态是植物累积解毒的重要机制之一。许多研究者对植物体内重金属离子存在的化学形态的研究表明重金属离子在细胞内不能以游离态大量存在。在超富集植物体内,85%~90% 的重金属离子是与极性化合物相结合的,这些极性化合物一般是水溶性的、醇溶性的和酸溶性的低分子量的金属螯合物,它们含有大量的金属离子的配位基团,这些金属配位体在维持细胞金属离子的微量稳态方面起着重要作用^[18,19]。

不同的提取剂可提取不同形态的化合物,如去离子水主要提取与水溶性物质结合的部分如水溶性有机酸盐等,稀盐酸一般用来提取细胞壁的粘胶质成份。在商陆的叶片中,水提取态 Mn 占总锰的 83%~91%; 对其他锰富集植物叶片研究表明,54%~77% 的 Mn 可被水提取^[10],Kelly 等^[20]发现有 65%~94% 的 Ni 在 Ni 超富集植物体内极易被去离子水提取,去离子水主要提取与水溶性物质结合的部分如水溶性有机酸盐,因此商陆叶片中大部分 Mn 可能与有机酸结合。

有机酸与重金属络合解毒已有很长时间的研究了,早在 1961 年 Jones^[21]就提出了有机酸与重金属络合从而降低其植物毒性。有机酸与重金属结合常常累积在液泡中而不影响植物细胞的正常代谢活性。许多研究表明柠檬酸、苹果酸、丙二酸和草酸在一些超积累植物中与重金属络合解毒^[7,22],其中也包括 Mn 超积累植物^[17,23]。本研究通过化学提取和色谱分析对有机酸进行了定性定量,结果表明商陆叶片中有足够量草酸与锰络合,锰与草酸络合可能是商陆叶片中的锰的主要形态。草酸广泛存在于植物界中,一些植物中的草酸含量可达组织干重的 6%~10%,本研究表明商陆叶片中草酸高达 9%~11%。据不完全统计,在 113 种植物中,只有 8 种不含草酸,其余 105 种平均草酸含量占植物干重的 6.3%,个别含量高至 80%~90%^[24]。随着对草酸深入研究,越来越多的试验表明,草酸并不

表 4 不同锰浓度处理下商陆叶片草酸含量

Table 4 Oxalic acid content in *P. acinosa* leaves under different Mn treatments

Mn 处理/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	草酸含量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ DW	锰含量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ DW	草酸:锰
5	645.6±39.8 a	10.9±1.2 a	59.09
500	615.0±44.2 a	99.5±2.8 b	6.18
2 000	539.4±34.1 a	182.5±9.4 c	2.96
5 000	556.3±62.5 a	327.1±4.6 d	1.70

象人们长期认为的那样是一种没有任何生理意义的代谢副产物,而可能在植物生理或生态过程中均有重要作用。草酸在植物抗逆性中的作用引起了广泛关注。与其他有机酸比较草酸与锰形成的化合物更稳定,草酸在 Mn 解毒的过程中显得更为重要。由于商陆叶片样品中草酸含量过高而影响其他有机酸的检测和定量。在 Memon 和 Yatazawa^[17]与 Bidwell 等^[23]的研究中都提出草酸是 Mn 的最终受体,而苹果酸、丙二酸等这些与 Mn 结合的稳定性较弱的有机酸可能是 Mn 向液泡运输的载体。

4 结论

商陆叶片中有 74%~82%的锰贮存在细胞质可溶性部分(含液泡),叶细胞壁中锰含量占总锰的 15%~20%,叶细胞器中锰分配率最少,只占总锰的 3%~6%。商陆叶片草酸含量高达干重的 9%~11%,商陆叶片累积高浓度草酸是其本身固有的特性,与外界供应锰浓度无关。锰与草酸络合是商陆叶片中锰的主要形态。锰在商陆叶片非活性代谢部分(液泡和细胞壁)的积累及锰与草酸络合可能是商陆叶片累积解毒锰的主要机制之一。

参考文献:

- [1] Ramachandran V, D'Souza T J. Extractable zinc and manganese as related to applied cadmium in contrasting Indian soil [J]. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 1997, 9: 131-144.
- [2] 郭炎,王凯荣,胡荣桂. 湘中某锰矿区农田锰污染状况与改良途径[J]. *农业环境保护*, 1993,12(5): 230-232.
GUO Y, WANG K R, HU R G. The status and improvement on manganese contaminated farmland on manganese mine in Hunan Province (In Chinese) [J]. *Agro-environmental Protection*, 1993, 12(5): 230-232.
- [3] 万国江,胡其乐,曹龙.等.资源开发-环境灾害-地球化学--以贵州阿哈湖铁锰污染为例 [J]. *地学前缘*,2001,8(2): 353-35.
WAN G J, HU Q L, CAO L, et al. Resource exploitation-environmental disaster-Geochemistry: an example from Fe and Mn pollution in Lake Aha, Guizhou Province (In Chinese) [J]. *Earth Science Frontiers*, 2001,8(2): 353-358.
- [4] 薛生国,陈英旭,林琦.等.中国首次发现的锰超积累植物——商陆[J].*生态学报*, 2003, 23(5): 935-937.
XUE S G, Chen Y X, Lin Q, et al. *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae): A new manganese hyperaccumulator plant from Southern China (In Chinese) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(5): 935-937.
- [5] Xue S G, Chen Y X, Reeves R D, et al. Manganese uptake and accumulation by the hyperaccumulator plant *Phytolacca acinosa* Roxb. (Phytolaccaceae) [J]. *Environ Pollut*, 2004, 131: 393-399.
- [6] Küpper H, Zhao F J, McGrath S P. Cellular compartmentation of Zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. *Plant Physiol*, 1999, 119: 305-311.
- [7] Lee J, Reeves R D, Brooks R R, et al. Isolation and identification of a citrate-complex of nickel from nickel-accumulating plants [J]. *Phytochemistry*, 1977, 17: 1033-1035.
- [8] Cobbett CS. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification [J]. *Plant Physiology*, 2000, 123: 825-832.
- [9] Weigel H J, Jager H J. Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean [J]. *Plant Physiology*, 1980, 65: 480-482.
- [10] Memon A R, Yatazawa M. Chemical nature of manganese in the leaves of manganese accumulator plants [J]. *Soil Sci Plant Nutr*, 1982, 28: 401-412.
- [11] Schaffer G W, Sharpe F T. Free and bound amino acids and proteins in developing grains of rice with enhanced lysine/proteins [J]. *Ther Appl Genet*, 1997, 94: 878-881.
- [12] Ma J F, Hiradate S, Nomoto K, et al. Internal detoxification mechanism of Al in *hydrangea*: identification of Al form in the leaves [J]. *Plant Physiology*, 1997, 113: 1033-1039.
- [13] Höfner W. Eisen- und manganhaltige Verbindungen in Blutungssaft von *Helianthus annuus* [J]. *Physiol Plant*, 1970, 23: 673-677.
- [14] Sarret G, Saumitou-Laprade P, Bert V, et al. Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(4): 1815-1826.
- [15] Brooks R R, Shaw S, Marfil A A. The chemical form and physiological function of nickel in some Iberian *Alyssum* species [J]. *Physiol Plant*, 1981, 167-170.
- [16] Nnishizono H, Ichikawa S, Suzike S, et al. The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense* [J]. *Plant and Soil*, 1987, 101: 15-20.
- [17] Memon AR, Yatazawa M. Nature of manganese complexes in manganese accumulator plant-*Acanthopanax sciadophylloides* [J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1984, 7: 961-974.
- [18] Hayens R J. Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root POPLsm: Their role in ion accumulation by plants [J]. *Bot Rev*, 1980, 46: 75-99.
- [19] Rauser W E. Structure and function of metal chelators produced by plants [J]. *Cell Biochem and Biophys*, 1999, 31: 19-48.
- [20] Kelly P C, Brooks R R, Dilly S, et al. Preliminary observation on the ecology and plant chemistry of some Ni accumulation plant of the rural society of London [J]. *Section B*, 1975, 189: 69-80.
- [21] Jones L H. Aluminium uptake and toxicity in plants [J]. *Plant and Soil*, 1961, 13: 297-310.
- [22] Salt D E, Prince R C, Baker A J M, et al. Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy [J]. *Environ Sci Technol*, 1999, 33: 713-717.
- [23] Bidwell S D, Woodrow I E, Batiannoff G N, et al. Hyperaccumulation of manganese in the rainforest tree *Austromyrtus Bidwillii* (Myrtaceae) from Queensland, Australia [J]. *Funct Plant Biol*, 2002, 29: 899-905.
- [24] Zindler-Franwok E. Oxalate biosynthesis in relation to photosynthetic pathway and plant productivity: a survey [J]. *Z Pflanzenphysiol*, 1976, 80(1): 1-13.