

Mn 污染对木荷叶片抗氧化酶系统的影响

苏银萍¹, 刘 华¹, 于方明^{1,2*}, 李 艺^{1,2}, 陈孟林^{1,2}, 周振明^{1,2}, 李明顺^{1,2}

(1.广西师范大学环境与资源学院, 广西 桂林 541004; 2.广西环境污染控制与技术重点实验室, 广西 桂林 541004)

摘 要:采用土培方法,研究了广西桂林市未受污染土壤(对照)及贺州市某锰矿的未开采区、探矿区、恢复区、采矿区土壤和尾砂对 Mn 富集植物木荷(*Schima superba*)生长、Mn 吸收,叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性,抗坏血酸(AsA)、谷胱甘肽(GSH)、植物络合素(PCs)、巯基(-SH)、丙二醛(MDA)、过氧化氢(H₂O₂)含量,以及超氧阴离子自由基(O₂^{·-})产生速率的影响。结果表明,随着土壤 Mn 含量的增加,木荷根、茎、叶中 Mn 含量均显著增加($P<0.05$),株高及株重呈先上升后下降的趋势,表明一定程度的 Mn 能促进木荷的生长。土壤 Mn 含量的增加,使得叶片中 O₂^{·-}的产生速率及 H₂O₂ 的含量呈现不同程度的变化,采矿区土壤栽培的木荷叶片中 O₂^{·-}的产生速率显著高于对照($P<0.05$),开采区土壤和尾砂栽培的木荷叶片中 H₂O₂ 含量比对照分别提高了 65.7%、96.3%,矿区土壤栽培的木荷叶片中 MDA 的含量均显著高于对照($P<0.05$),表明叶片受到一定的胁迫。木荷叶片中抗氧化酶活性与非酶物质变化不尽相同,SOD、POD 酶活性、AsA、GSH 含量均随着土壤 Mn 浓度的增加而增加,CAT、APX 酶的活性呈先升后降趋势,其中尾砂栽培的木荷 POD 酶的活性最高,比对照提高了 1.62 倍,采矿区土壤和尾砂栽培的木荷 GSH 的含量显著高于对照($P<0.05$),分别比对照提高了 1.66 和 1.79 倍。

关键词: Mn 污染;木荷;抗氧化酶系统

中图分类号: X173 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2014)04-0680-07 doi:10.11654/jaes.2014.04.009

Effects of Manganese Contamination on Activities of Antioxidant Enzyme Systems in Leaves of *Schima superba*

SU Yin-ping¹, LIU Hua¹, YU Fang-ming^{1,2*}, LI Yi^{1,2}, CHEN Meng-lin^{1,2}, ZHOU Zhen-ming^{1,2}, LI Ming-shun^{1,2}

(1.School of Environment and Resource, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China; 2.Guangxi Key Laboratory of Environmental pollution control theory and technique, Guilin 541004, China)

Abstract: Manganese (Mn) is essential for plant growth, but excess Mn may impact antioxidant enzyme systems in plant. A soil culture experiment was performed to explore the effects of Mn contamination on various enzymatic antioxidants and non-enzymatic antioxidants in the leaves of *Schima superba*. Soil samples, collected from unmining section (WK), prospecting area (T), restored area (H), mining (K) and tailings (W) in a manganese mine of Hezhou, were used as Mn-polluted soils, and an unpolluted soil from Guilin, Guangxi was used as control (CK). After 145-d of culture, leaves of *S. superba* were sampled and analyzed for the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX) and the contents of ascorbic acid (AsA), glutathione (GSH), phytochelatin (PCs), total acid soluble SH, malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H₂O₂), and the produce rate of superoxide anion (O₂^{·-}). Concentrations of Mn in roots, stems, and leaves increased with soil Mn concentrations. Compared to the control, plant biomass increased in WK and T samples, whereas decreased in the other soils, indicating stimulation of *S. superba* growth by Mn at low concentrations. The rate of O₂^{·-} production in the leaves was significantly higher in H than in control ($P<0.05$). The contents of H₂O₂ in leaves were increased by 65.7% and 96.3% for K and W, respectively. The leaf MDA was significantly ($P<0.05$) higher in mineral soils than in control, showing that the leaves were damaged by Mn pollution. The activities or contents of SOD, POD, AsA and GSH increased in order of CK<WK<T<H<K<W, in consistency with soil Mn concentrations. The POD enzyme activity in leaves in W soil was 2.62 times as much as that of control. Both CAT and APX enzymatic activities increased in WK and T, but decreased in the others, as compared with the control. The contents of GSH in leaves in K and W were about 1.66 and 1.79 times higher than those of the control.

Keywords: manganese contamination; *Schima superba*; activity of antioxidant enzyme system

收稿日期: 2013-08-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(41161057); 广西科学研究与技术开发项目重大专项计划(桂科重 1298002-6); 广西教育厅项目(2013HZ003)

作者简介: 苏银萍(1989-), 女, 硕士研究生。E-mail: yinping11100@163.com

* 通信作者: 于方明 E-mail: fmyu1215@163.com

锰(Mn)是植物生长代谢所必需的微量元素之一^[1],是植物叶绿体结构参与光合作用所必需的元素,同时Mn还作为植物体内的一个重要的氧化还原剂参与植物体内许多氧化还原体系的活动。所以Mn在植物的光合放氧、维持细胞器的正常结构、活化酶活力等方面具有不可替代的作用。但过量的Mn会加速植物体内活性氧物质(Reactive oxygen species, ROS)的生成,从而破坏植物细胞的质膜、蛋白质和DNA,造成脂质过氧化,导致植物体内活性氧代谢失调^[2-3]。抗氧化系统是植物受逆境胁迫时抵抗不良影响的重要机制,通过抗氧化酶类如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽还原酶(GR)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽过氧化物酶,以及非酶性的抗氧化物质如抗坏血酸和谷胱甘肽(GSH)等消除或减少ROS带来的伤害^[4-6]。这些抗氧化剂在植物抵抗Mn胁迫中的作用,已为锰超富集植物如垂序商陆(*Phytolacca Americana*)^[7]、短毛蓼(*Polygonum pubescens* Blume)^[8]、水蓼(*Polygonum hydropiper* L.)^[9]等所证实。但不同超富集植物抗氧化系统对Mn的响应差异较大,且SOD、CAT、POD、GSH等抗氧化物质在Mn胁迫下的变化无明显规律性。

木荷(*Schima superba*),又名“荷木”,属山茶科常绿植物,具有生物量大、抗灾和观赏等多种优良性状^[10]。同时,木荷作为新的Mn富集植物,对Mn表现出较强的吸收和转移能力。但目前对于木荷的研究仅停留在作为锰超富集植物验证方面^[11],而Mn污染对其叶片抗氧化酶系统的影响尚未见报道。因此,本文采用土培的方法,研究了不同程度锰污染土壤对木荷叶片过氧化氢(H₂O₂)、超氧阴离子自由基(O₂^{·-})产生速率的影响以及抗氧化酶(SOD、CAT、POD、APX)的活性与非酶物质(-SH、GSH、PCs、AsA)在解毒ROS毒害过程中的作用,旨在探讨木荷对Mn胁迫的抗氧化响应机理及与其他富集植物的不同之处,为丰富锰

富集植物对Mn的耐性机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 土壤采集与处理

本研究共设CK、WK、T、H、K及W共6个处理(CK为对照),CK土壤采自广西桂林市未受污染的某菜地,WK、T、H、K及W区土壤分别采自广西贺州市某锰矿的未开采区、探矿区、恢复区、开采区和尾矿坝。在选定的区域内,按梅花型布点法随机采集5个0~20 cm平行样,带回实验室后,风干,混匀,去除杂草、草根、砾石等杂物,过4 mm筛。将混匀后的土壤装入直径为15 cm的塑料盆中,每盆5.0 kg。基肥标准:N 100 mg·kg⁻¹(以干土计,下同),以NH₄NO₃形式加入;P和K分别为80、100 mg·kg⁻¹,以KH₂PO₄形式加入。表1为土壤的基本性质。

1.1.2 植物培养

供试的木荷苗于2012年3月28日购于桂林市临桂县鸡笼山林场。选取长势基本一致的1年生木苗,种植于塑料盆中,每盆1株。每个处理3个重复,共18盆。植物在昼/夜温度为26/20℃、光照强度300 μmol·m⁻²·s⁻¹、平均相对湿度80%的温室中培养。生长期间内定期浇去离子水,每隔1周浇营养液50 mL。营养液组成:0.75 mmol·L⁻¹ K₂SO₄、0.25 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄、0.1 mmol·L⁻¹ KCl、2.0 mmol·L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O。于2012年8月21日收获。

1.2 实验方法

1.2.1 植株生物量的测定

将植株从土壤中取出,自来水冲洗干净后将根浸入20 mmol·L⁻¹ EDTA-Na₂溶液中交换20 min,以去除根系表面吸附的Mn²⁺,最后用去离子水洗净,吸水纸吸干表面水分,测其株高并称其鲜重。随后将根、茎、叶分开,并立即选取从顶到根部的第2、3片叶装入封口密封袋,放入-20℃冰箱保存供酶活性、-SH、

表1 供试土壤基本理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of soils examined

处理	Mn 含量/mg·kg ⁻¹	pH	EC/×10 ⁻² μS·cm ⁻¹	有效磷/mg·kg ⁻¹	硝态氮/mg·kg ⁻¹	全磷/mg·g ⁻¹	全氮/mg·kg ⁻¹	有机质/mg·g ⁻¹
CK	437.4±25.5	7.7	2.1	5.7	2.5	1.1	1 717.3	28.1
WK	2 615.4±35.5	7.9	1.8	3.9	1.8	0.8	1 673.7	19.8
T	4 948.8±33.2	7.9	1.8	3.1	1.5	0.9	922.8	18.5
H	6 134.1±35.3	8.0	1.8	3.7	1.6	0.9	1 186.2	17.7
K	18 537.9±456.2	7.6	2.6	1.3	0.04	0.9	414.8	9.0
W	28 009.5±355.7	7.5	1.1	0.4	0.03	0.7	109.4	0.9

GSH、PCs 等生理指标的测定, 其余放至烘箱内, 在 105 °C 下杀青 30 min, 然后在 70 °C 下烘 48 h 至恒重, 用不锈钢粉碎机磨碎, 过 60 目尼龙网筛用于 Mn 含量测定。同时, 土壤带回实验室, 自然风干研磨过 100 目筛待测。

1.2.2 木荷根、茎、叶中 Mn 含量的测定

首先采用湿式消解法^[12]进行消解, 然后用原子吸收分光光度计(WFX-110)测定植物各部分 Mn 含量。称取木荷干样约 0.25 g 于 100 mL 烧杯中, 加入 10 mL 浓硝酸消解液(HNO₃ 体积:HCl 体积=85:15), 在电热板上用 100 °C 消解 1 h, 160 °C 消解至植物样品完全溶解, 再将电热板升温到 240 °C, 赶尽多余的消解液, 近至蒸干转移至 50 mL 容量瓶中, 用去离子水稀释至刻度, 同时加标试验, 全程控制消解过程回收率, 3 次重复。

1.2.3 酶的提取与活性测定

称取木荷叶片 0.100 g, 加入 0.1 mmol·L⁻¹ 的磷酸缓冲液 8 mL (pH7.0, 内含 0.1 μmol·L⁻¹ 的乙二胺四乙酸(EDTA), 1% 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)) 和少量石英砂, 用玻璃研钵研磨成匀浆, 在 4 °C、10000×g 下离心 15 min, 得上清液为粗酶液^[13], 用于 SOD、CAT、POD、APX 酶活性的测定。SOD、POD、CAT 活性测定参照李合生^[14]的方法; APX 测定采用 Cao 等^[15]的方法。

1.2.4 MDA、H₂O₂、-SH、GSH、PCs、AsA 含量及 O₂^{·-} 产生速率的测定

MDA 含量测定参照中国科学院上海植物生理研究所介绍的方法^[16]; H₂O₂ 含量测定参照邹琦^[17]的方法; 酸溶性-SH 的提取和含量测定参照吴灵琼等^[18]介绍的方法; 植物体中 GSH 和 ASA 含量参照张宗申等^[19]介绍的方法测定; 采用羟胺法测定超氧阴离子(O₂^{·-}) 的产生速率^[20]。

1.2.5 土壤 Mn 含量、pH、EC、有机碳、硝态氮、有效磷、全氮和全磷的测定^[21]

土壤 Mn 含量采用王水-高氯酸法消解, WFX-110 测定; pH 和 EC 采用水土比 2.5:1; 有机碳采用重铬酸钾稀释外加加热法; 硝态氮采用蒸馏水提取, 酚二磺酸比色法测定; 有效磷采用 NaHCO₃ 提取, 硫酸-钼锑抗比色法测定; 全氮和全磷采用浓硫酸和过氧化氢消解, 全氮采用凯氏定氮法测定, 全磷采用硫酸-钼锑抗比色法测定。

1.2.6 转移系数(Transfer factor, TF)的计算

$$TF = \frac{\text{地上部分所累积的重金属含量}(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})}{\text{根部所累积的重金属含量}(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})}$$

以上所有测定至少重复 3 次, 所有数据用 Excel 处理, 并用 SPSS13.0 软件进行差异显著性检验及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 木荷对 Mn 的吸收

由表 2 可知, 木荷根、茎及叶中 Mn 含量均随土壤中 Mn 含量的增加而显著增加($P < 0.05$), 且 TF_{叶根} 及 TF_{茎根} 均大于 1。用 W 土处理时, 木荷根、茎、叶 Mn 含量分别达到 2 586.8、13 088.5、9 054.1 mg·kg⁻¹, 为对照的 20.1、66.5、12.2 倍, 从侧面证明了木荷为 Mn 富集植物。在这 6 个处理中, 随着土壤 Mn 含量的增加, 木荷株高及株重均呈现先升高后降低的趋势, 用 T 土处理时株高及株重达到最大, 分别为 46.4 cm·plant⁻¹ 和 31.2 g·plant⁻¹, 表明土壤中一定浓度的 Mn 有利于木荷的生长, 而过高的 Mn 含量抑制了其生长。

2.2 不同处理土壤对木荷叶片 O₂^{·-} 与 H₂O₂ 的产生及抗氧化酶活性的影响

由表 3 可知, 在这 6 个处理中, 随着土壤 Mn 含量的增加, 木荷叶中 O₂^{·-} 产生速率呈先上升后下降趋势,

表 2 不同处理对木荷 Mn 吸收及其生长的影响

Table 2 Biomass and Mn concentrations of *S. superba* grown in different Mn-polluted soils

处理	植株生长状况		Mn 含量/mg·kg ⁻¹			转移系数	
	株高/cm·plant ⁻¹	株重/g·plant ⁻¹	叶	茎	根	TF _{叶根}	TF _{茎根}
CK	40.4±1.7bc	21.2±0.3c	743.4±51.6f	196.9±19.2d	128.6±8.1f	5.8	1.5
WK	43.5±2.0ab	28.8±0.4ab	1 561.8±70.8e	478.2±47.6d	354.5±15.2e	4.4	1.3
T	46.4±3.0a	31.2±0.2a	2 754.2±95.0d	879.2±60.6d	555.4±23.4d	5	1.6
H	37.0±1.9c	28.2±0.8b	3 376.5±83.1c	3 012.9±87.0c	777.8±21.3c	4.3	3.9
K	31.8±1.8d	21.2±1.1c	8 075.3±203.2b	8 453.5±350.4b	1 837.6±140.4b	4.4	4.6
W	21.3±1.1e	15.5±3.5d	9 054.1±538.0a	13 088.5±1295.5a	2 586.8±158.9a	3.5	5.1

注: 数据=均值±标准误差(n=3)。同列的不同字母表示在 5% 水平差异显著。下同。

Notes: Data are means±SE(n=3). Different lowercase letters within a column denote significant differences at $P < 0.05$. The same below.

在用 H 土处理时达最大,为 $21.69 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; 叶中 H_2O_2 呈上升趋势, K 及 W 土处理比对照分别高 65.7% 及 96.3%。土壤中高浓度的 Mn 显著提高了木荷叶片中 SOD、POD 活性, 且在用 W 土处理时达到最大值, 分别为对照的 1.22、2.62 倍。与对照 CK 比较, WK 及 T 土处理显著 ($P < 0.05$) 提高了木荷叶片中 CAT 活性, K、H 及 W 土处理显著 ($P < 0.05$) 降低了 CAT 活性; WK 及 T 土处理对木荷叶片中 APX 活性无显著影响, 但 K、H 及 W 土处理显著 ($P < 0.05$) 抑制了 APX 活性。

2.3 不同处理土壤对木荷叶片非酶类物质及 MDA 含量的影响

由表 4 可知, 在这 6 个处理中, 随着土壤 Mn 含量的增加, 木荷叶中 AsA 的含量呈上升趋势, 其中 K、H 及 W 土处理时 AsA 的含量显著 ($P < 0.05$) 高于对照, 分别比对照提高了 33.7%、39.0% 及 38.9%。木荷叶中 GSH 含量的变化趋势与 AsA 含量的变化趋势相似, 均随着土壤中 Mn 浓度的增加而增加。土壤中高浓度的 Mn 显著提高了叶片中 -SH 含量 ($P < 0.05$), 但降低了 PCs 的含量。MDA 含量可看做是叶片膜脂过氧化程度的指标, 土壤中高浓度的 Mn 显著提高了 MDA 含量 ($P < 0.05$), WK、T、H、K 及 W 土处理时叶片中 MDA 含量依次比对照增加了 59.57%、68.41%、79.43%、73.65% 及 42.01%, 表明 Mn 污染引起了木荷叶片不同程度的膜脂过氧化。

2.4 抗氧化酶系统的敏感指标相关性分析

从表 5 可以看出, 木荷叶中 Mn 含量与土壤中 Mn 含量极显著相关 ($P < 0.01$), 相关系数为 0.981。木荷叶片抗氧化酶 SOD、POD 活性及 H_2O_2 、AsA、GSH 含量与叶片中 Mn 含量及土壤中 Mn 含量极显著正相关 ($P < 0.01$), 而 CAT 及 APX 与叶片中 Mn 含量及土壤中 Mn 含量极显著负相关 ($P < 0.01$)。木荷叶片中 AsA 与 GSH 含量相关系数为 0.903, 达到极显著水平 ($P < 0.01$), 而 PCs 与 GSH 的相关系数为 -0.769, 二者极显著负相关 ($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究结果表明, 木荷和其他锰富集植物一样, 对锰有较强的富集与耐受能力。采用尾砂培养时, 木荷叶、茎中 Mn 含量分别达 9054.1 、 $13088.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 接近 Baker 等^[22]提出的 Mn 超富集植物的参考值, 且所有处理 $\text{TF}_{\text{叶/根}}$ 及 $\text{TF}_{\text{茎/根}}$ 均大于 1, 表明木荷对锰有较强的富集和转移能力。未开采区、探矿区、恢复区土壤培养的木荷其株重明显高于对照, 而开采区、尾砂处理则抑制了木荷的生长, 这表明适量的 Mn 有利于木荷的生长, 而过高的 Mn 则抑制其生长, 这与其他重金属富集植物一样, 即适量的重金属能促进重金属富集植物的生长^[23]。

在正常的生长条件下, 植物体内活性氧物质的产

表 3 不同处理对木荷叶片中 O_2^- 与 H_2O_2 的生成及抗氧化酶活性的影响

Table 3 Generation of O_2^- and H_2O_2 and antioxidant enzyme activities in the leaves of *S. superba*

处理	$\text{O}_2^- / \text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$\text{H}_2\text{O}_2 / \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD 活性/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	POD 活性/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	CAT 活性/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	APX 活性/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
CK	$17.07 \pm 0.72\text{bc}$	$5.42 \pm 0.23\text{c}$	$316.94 \pm 15.26\text{c}$	$193.88 \pm 6.43\text{d}$	$99.62 \pm 3.25\text{c}$	$5.78 \pm 0.22\text{a}$
WK	$17.73 \pm 1.25\text{bc}$	$6.00 \pm 0.21\text{c}$	$356.57 \pm 5.88\text{b}$	$199.33 \pm 14.69\text{d}$	$122.47 \pm 4.72\text{b}$	$5.87 \pm 0.12\text{a}$
T	$18.62 \pm 0.85\text{b}$	$5.98 \pm 0.45\text{c}$	$358.46 \pm 2.35\text{b}$	$241.45 \pm 8.48\text{c}$	$135.80 \pm 6.3\text{a}$	$6.09 \pm 0.19\text{a}$
H	$21.69 \pm 1.16\text{a}$	$5.96 \pm 0.09\text{c}$	$378.88 \pm 8.08\text{b}$	$441.05 \pm 20.21\text{b}$	$91.41 \pm 1.56\text{d}$	$4.71 \pm 0.10\text{b}$
K	$16.08 \pm 0.83\text{c}$	$8.98 \pm 0.69\text{b}$	$375.05 \pm 11.92\text{ab}$	$442.33 \pm 29.04\text{b}$	$80.48 \pm 1.96\text{f}$	$3.64 \pm 0.06\text{c}$
W	$16.44 \pm 1.74\text{bc}$	$10.64 \pm 0.32\text{a}$	$387.08 \pm 13.65\text{a}$	$508.23 \pm 14.01\text{a}$	$80.10 \pm 1.64\text{f}$	$2.97 \pm 0.38\text{d}$

表 4 不同处理对木荷叶片中 AsA、GSH、PCs、-SH 及 MDA 含量的影响

Table 4 Concentrations of AsA, GSH, PCs, -SH, and MDA in the leaves of *S. superba*

处理	AsA/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	GSH/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	PCs/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	-SH/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$
CK	$71.16 \pm 1.95\text{c}$	$0.92 \pm 0.03\text{c}$	$1.52 \pm 0.20\text{a}$	$2.45 \pm 0.18\text{b}$	$42.94 \pm 6.20\text{c}$
WK	$75.09 \pm 6.42\text{c}$	$1.37 \pm 0.08\text{c}$	$1.61 \pm 0.31\text{a}$	$3.03 \pm 0.26\text{a}$	$68.51 \pm 8.03\text{ab}$
T	$83.89 \pm 2.42\text{b}$	$1.42 \pm 0.10\text{c}$	$1.70 \pm 0.12\text{a}$	$3.07 \pm 0.15\text{a}$	$72.31 \pm 1.04\text{a}$
H	$95.15 \pm 2.96\text{a}$	$2.12 \pm 0.03\text{b}$	$1.13 \pm 0.31\text{b}$	$3.25 \pm 0.29\text{a}$	$77.04 \pm 4.11\text{a}$
K	$98.92 \pm 3.80\text{a}$	$2.45 \pm 0.06\text{a}$	$0.42 \pm 0.14\text{c}$	$2.87 \pm 0.12\text{a}$	$74.56 \pm 1.85\text{a}$
W	$98.87 \pm 1.44\text{a}$	$2.57 \pm 0.28\text{a}$	$0.50 \pm 0.10\text{c}$	$3.06 \pm 0.19\text{a}$	$60.97 \pm 0.65\text{b}$

表5 各抗氧化酶系统的敏感指标之间的相关系数

Table 5 Correlation coefficients between enzyme system indexes

	Mn(土壤)	Mn(叶)	O ₂ ·	H ₂ O ₂	SOD	POD	CAT	APX	AsA	GSH	PCs	-SH
Mn(叶)	0.981**	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
O ₂ ·	-0.19	-0.196	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
H ₂ O ₂	0.876**	0.884**	-0.346	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SOD	0.901**	0.872**	0.116	0.742**	—	—	—	—	—	—	—	—
POD	0.922**	0.920**	-0.159	0.736**	0.789**	—	—	—	—	—	—	—
CAT	-0.717**	-0.721**	0.42	-0.657**	-0.628**	-0.699**	—	—	—	—	—	—
APX	-0.806**	-0.789**	0.394	-0.756**	-0.742**	-0.763**	0.917**	—	—	—	—	—
AsA	0.924**	0.882**	-0.14	0.798**	0.874**	0.866**	-0.692**	-0.775**	—	—	—	—
GSH	0.930**	0.926**	-0.167	0.841**	0.891**	0.847**	-0.742**	-0.829**	0.903**	—	—	—
PCs	-0.746**	-0.744**	0.391	-0.604**	-0.686**	-0.705**	0.806**	0.769**	-0.705**	-0.769**	—	—
-SH	0.282	0.304	0.416	0.395	0.331	0.228	0.067	-0.075	0.317	0.296	0.261	—
MDA	0.267	0.261	-0.31	0.197	0.381	0.189	-0.053	0.007	0.292	0.276	-0.086	0.465

注:**表示 $P \leq 0.01$ 水平上的显著性($n=18$)。Double asterisks denote statistical significance at $P \leq 0.01$ levels, $n=18$.

生和清除处于平衡状态,但在重金属胁迫下,这种平衡可能被打破。本研究结果发现,木荷叶片中 O₂· 的产生速率呈先上升后下降趋势,而 H₂O₂ 的含量随着锰处理浓度的增加而升高,且叶片中 H₂O₂ 的含量与叶片中 Mn 含量的相关系数为 0.884,达极显著相关 ($P < 0.01$),表明锰污染打破了木荷活性氧物质的代谢平衡。此时,木荷通过一系列的抗氧化酶类以及抗氧化剂等非酶物质(如 GSH、AsA 等)来消除体内过量 O₂·、H₂O₂ 等活性氧物质。SOD 是植物体内消除活性氧物质的第一道屏障,它与 O₂· 发生歧化反应生成 H₂O₂ 和 O₂^[24]。本研究结果表明,随着土壤 Mn 含量的增加,木荷叶片中 SOD 活性显著高于对照 ($P < 0.05$),而这有利于 SOD 对 O₂· 的消除。木荷叶中 O₂· 产生速率在 H 土处理时达最大,随后逐渐降低,K 及 W 土处理时均与对照无显著差异;叶中 H₂O₂ 在 WK、T、H 土处理时均与对照无显著差异,而 K 与 W 土处理均显著提高了其含量 ($P < 0.05$),这可能与 SOD 催化 O₂· 发生歧化反应生成 H₂O₂ 和 O₂ 导致的 H₂O₂ 增加有关。这与在 As 处理下,凤尾蕨属植物中 SOD 活性变化一致^[25]。叶片中 H₂O₂ 含量的增加将诱使 POD、CAT 及 APX 酶对其清除,因为它们是清除植物体内 H₂O₂ 的 3 种重要酶。在本研究中木荷叶片中 POD 活性随着土壤中 Mn 浓度的增加而增加,同时 CAT 及 APX 的活性均有不同程度增加,与很多其他重金属胁迫下植物体内 POD、CAT 及 APX 活性变化相似^[26-28]。

有研究表明,植物体内的 H₂O₂ 如得不到及时清除,将有部分被瞬时金属离子催化还原成更高毒性的羟自由基(·OH)^[23]。此时植物除提高 POD、CAT 及

APX 活性外,还可以通过抗坏血酸与谷胱甘肽组成的 AsA-GSH 循环系统(Halliwell-Asada 途径)来消除 H₂O₂^[22]。本研究发现木荷叶中 AsA 含量的变化趋势与 GSH 含量的变化趋势相似,均随着土壤 Mn 含量的增加而增加,且木荷叶片内 AsA 及 GSH 含量与叶片中 Mn 含量相关系数分别达 0.882 及 0.926,AsA 含量与 GSH 含量相关系数达 0.903,均达到极显著水平 ($P < 0.01$)。这可能意味着锰污染启动了木荷 AsA-GSH 循环系统。另外,从表征氧自由基对植物体伤害的指标 MDA^[24] 的含量来看,本研究中木荷叶片中 MDA 含量呈先上升后下降趋势,表明在高浓度锰胁迫下,木荷的膜脂过氧化得到有效的缓解,从而证明木荷叶片中的 AsA-GSH 循环系统在消除 H₂O₂ 解毒过程中起重要作用。GSH 是合成 PCs 的底物^[29],在木荷启动了 AsA-GSH 循环系统后,使得合成 PCs 的底物 GSH 被大量消耗,导致 PCs 含量随着土壤中 Mn 浓度的增加而降低(表 4),减少了木荷叶片中 PCs 的合成。此外,GSH 还可单独清除活性氧自由基,在本研究中,虽然木荷叶片中 GSH 随着土壤 Mn 浓度的增加而增加,但 PCs 含量却随着土壤中 Mn 浓度的增加而降低。此外,木荷叶中 Mn 含量与土壤中 Mn 含量呈极显著相关 ($P < 0.01$),相关系数达 0.981,且木荷叶片中 Mn 含量与抗氧化酶活性及 H₂O₂、AsA、GSH 及 PCs 含量亦极显著相关 ($P < 0.01$),表明土壤中 Mn 含量对木荷叶片抗氧化系统可造成一定程度的影响。

4 结论

(1)广西贺州市某锰矿的未开采区、探矿区、恢复

区、采矿区土壤和尾砂中土壤有机质、全氮、硝态氮、有效磷依次降低,但 Mn 含量则依次增加,其中尾砂 Mn 含量为 $28\ 009\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,木荷在尾砂中培养 145 d 之后,叶、茎中 Mn 含量分别达 $9\ 054.1$ 、 $13\ 088.5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,且各处理中 $\text{TF}_{\text{叶/根}}$ 及 $\text{TF}_{\text{茎/根}}$ 均大于 1,表明木荷对锰有较强的富集与转移能力,对锰污染土壤修复具有良好的应用前景。

(2)在 Mn 污染下,木荷叶片中 $\text{O}_2\cdot^-$ 以及 H_2O_2 等活性氧物质(ROS)的正常代谢平衡被打破,引起了 $\text{O}_2\cdot^-$ 及 H_2O_2 不同程度的累积, H_2O_2 含量均高于对照,其中恢复区土壤处理的木荷 $\text{O}_2\cdot^-$ 的产生速率最大,为 $21.7\ \text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,显著高于对照($P<0.05$),且 MDA 含量显著高于对照($P<0.05$),表明木荷受到了一定的胁迫。

(3)Mn 污染引起了木荷抗氧化酶(SOD、POD、CAT 及 APX)活性以及非酶类物质(AsA、GSH 等)含量的改变。SOD、POD 活性以及 AsA、GSH 含量随着土壤 Mn 浓度的增加而增加,但开采区土壤和尾砂栽培的木荷其 CAT、APX 活性($P<0.05$)显著低于对照,表明 Mn 污染启动了木荷抗氧化系统。

参考文献:

- [1] Birgit C H, Jonghan K, Marianne W R, et al. Associations of iron metabolism genes with blood manganese levels: A population-based study with validation data from animal models[J]. *Environmental Health*, 2011, 10: 97.
- [2] Yang G, Chi Y M, Jun X, et al. Effect of citric acid on phytoextraction and antioxidative defense in *Solanum nigrum* L. as a hyperaccumulator under Cd and Pb combined pollution[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2012, 65: 1923-1932.
- [3] Shi Y Y, Jian C X, Quan F L. Oxidative response and antioxidative mechanism in germinating soybean seeds exposed to cadmium[J]. *Public Health*, 2012, 9: 2827-2838.
- [4] 于方明,仇荣亮,胡鹏杰,等.不同 Cd 水平对小白菜叶片抗氧化酶系统的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(3): 950-954.
YU Fang-ming, QIU Rong-liang, HU Peng-jie, et al. Effects of different cadmium levels on the antioxidative enzymes activities of leaf in *Brassica chinensis*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(3): 950-954.
- [5] 赵天宏,孙加伟,付宇,等. CO_2 和 O_3 浓度升高对春小麦活性氧代谢及抗氧化酶活性的影响[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(1): 64-71.
ZHAO Tian-hong, SUN Jia-wei, FU Yu, et al. Effects of elevated CO_2 and O_3 concentration on active oxygen metabolism and anti-oxidative enzymes activities in spring wheat[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(1): 64-71.
- [6] 宰学明,郝振萍,张焕仕,等. NaCl 胁迫下 AM 真菌对滨梅叶片中抗坏血酸-谷胱甘肽循环的影响[J]. *植物生理学报*, 2013, 49(1): 41-46.
ZAI Xue-ming, HAO Zhen-ping, ZHANG Huan-shi, et al. Effects of AM fungi on Ascorbate-Glutathione cycle metabolism in leaves of *Prunus maritima* Marshall under NaCl stress[J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, 49(1): 41-46.
- [7] 沈吉红,梁文斌,薛生国,等. 锰胁迫对垂序商陆叶片抗氧化系统的影响[J]. *贵州科学*, 2009, 27(3): 58-61.
SHEN Ji-hong, LIANG Wen-bin, XUE Sheng-guo, et al. Effects of manganese stress on the activity of antioxidant enzymes in the leaves of *Phytolacca Americana*[J]. *Guizhou Science*, 2009, 27(3): 58-61.
- [8] 李燕,刘可慧,于方明,等. Mn 对超富集植物短毛蓼(*Polygonum pubescens* Blume)抗氧化机理的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(12): 2422-2427.
LI Yan, LIU Ke-hui, YU Fang-ming, et al. Effects of manganese on enzymatic and non-enzymatic antioxidative defenses of the hyperaccumulator *Polygonum pubescens* Blume[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(12): 2422-2427.
- [9] 任立民,刘鹏,蔡妙珍,等. 水蓼、小飞蓬、杠板归和美洲商陆对锰毒的生理响应[J]. *水土保持学报*, 2007, 21(3): 81-85.
REN Li-min, LIU Peng, CAI Miao-zhen, et al. Physiological response of *Polygonum hydropiper*, *Comniza canadensis*, *Polygonum perfoliatum* and *Phytolacca americana* to manganese toxicity[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2007, 21(3): 81-85.
- [10] 熊彩云,曾伟,肖复明,等. 木荷种源间光合作用参数分析[J]. *生态学报*, 2012, 32(11): 3628-3631.
XIONG Cai-yun, ZENG Wei, XIAO Fu-ming, et al. An analysis of photosynthetic parameters among *Schima superba* provenances[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32(11): 3628-3631.
- [11] Yang S X, Deng H, Li M S. Manganese up take and accumulation in a woody hyperaccumulator, *Schima superba*[J]. *Plant Soil and Environment*, 2008, 54(10): 441-446.
- [12] Rui L S, Qi X Z, Fu H S, et al. Antioxidative defense and praline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L.[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 60: 468-476.
- [13] Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44(1): 25-37.
- [14] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
LI He-sheng. Theory and technique of plant physiological and biochemical experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007.
- [15] Cao X D, Ma Q L, Tu C. Antioxidative responses to arsenic in the arsenic hyperaccumulator chinese brake fern (*Pteris vittata* L.)[J]. *Environmental Pollution*, 2004, 128(3): 317-325.
- [16] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 314-330.
Shanghai Institute of Plant Physiology Chinese Academy Science. Experimental guidebook of modern plant physiology[M]. Beijing: Science Press, 1999: 314-330.
- [17] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.

- ZOU Qi. Experimental guidebook of plant physiology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2008.
- [18] 吴灵琼, 成水平, 杨立华, 等. Cd²⁺和 Cu²⁺对美人蕉的氧化胁迫及抗性机理研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(4):1365-1369.
- WU Ling-qiong, CHENG Shui-ping, YANG Li-hua, et al. Stress responses and resistance mechanism of *Canna indica* Linn. to cadmium and copper[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(4): 1365-1369.
- [19] 张宗申, 利容千, 王建波. 草酸处理对热胁迫下辣椒叶片膜透性和钙分布的影响[J]. 植物生理学报, 2001, 27(2):109-113.
- ZHANG Zong-shen, LI Rong-qian, WANG Jian-bo. Effects of oxalate treatment on the membrane permeability and calcium distribution in pepper leaves under heat stress[J]. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 2001, 27(2):109-113.
- [20] 郝建军, 刘延吉. 植物生理学实验技术[M]. 二版. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2001:187-189.
- HAO Jian-jun, LIU Yan-ji. Experimental technique on plant physiology[M]. 2nd ed. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 2001:187-189.
- [21] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- BAO Shi-dan. Agricultural Soil Analysis[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000.
- [22] Baker A J M, Brooks P R, Pease A J, et al. Studies on copper and cobalt tolerance in three closely related taxa within the Genus *silence* L. (Caryophyllaceae) from Zaire[J]. *Plant and Soil*, 1983, 73:358-377.
- [23] 于方明, 仇荣亮, 周小勇, 等. 镉对超富集植物圆锥南芥氮素代谢的影响研究[J]. 土壤学报, 2008, 45(3):497-502.
- YU Fang-ming, QIU Rong-liang, ZHOU Xiao-yong, et al. Effects of cadmium on activities of key nitrogen metabolism enzymes in leaves of *Arabis paniculata* Franch[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(3): 497-502.
- [24] 于方明, 汤叶涛, 仇荣亮, 等. Cd胁迫下超富集植物圆锥南芥抗氧化机理[J]. 环境科学学报, 2010, 30(2):409-414.
- YU Fang-ming, TANG Ye-tao, QIU Rong-liang, et al. Antioxidative responses to cadmium stress in the hyperaccumulator *Arabis paniculata* Franch[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(2):409-414.
- [25] Liu Y, Wang H B, Wong M H, et al. The role of arsenate reductase and superoxide dismutase in As accumulation in four *Pteris* species[J]. *Environment International*, 2009, 35:491-495.
- [26] 郭艳杰, 李博文, 杨华, 等. Cd, Pb复合污染对印度芥菜抗氧化酶活性的影响[J]. 水土保持学报, 2011, 25(1):214-228.
- GUO Yan-jie, LI Bo-wen, YANG Hua, et al. Stress responses of *Brassica juncea* to Cd and Pb compound contamination in soil[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2011, 25(1):214-228.
- [27] 汤叶涛, 美丽捷, 仇荣亮, 等. 镉对超富集植物滇苦菜抗氧化系统的影响[J]. 生态学报, 2010, 30(2):0324-0332.
- TANG Ye-tao, GUAN Li-jie, QIU Rong-liang, et al. Antioxidative defense to cadmium in hyperaccumulator *Picris divaricata* V.[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(2):0324-0332.
- [28] 崔晓峰, 李淑仪, 丁效东, 等. 喷施硅铈溶胶缓解镉铅对小白菜毒害的研究[J]. 土壤学报, 2013, 50(1):171-177.
- CUI Xiao-feng, LI Shu-yi, DING Xiao-dong, et al. Effects of spraying silicon and cerium sols on relieving toxicity of Pb and Cd in the *Cabbage*[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2013, 50(1):171-177.
- [29] 吴惠芳, 龚春风, 刘鹏, 等. 锰胁迫下龙葵和小飞蓬根叶中植物螯合肽和类金属硫蛋白的变化[J]. 环境科学学报, 2010, 30(10):2058-2064.
- WU Hui-fang, GONG Chun-feng, LIU Peng, et al. Phytochelatins and metallothionein-like proteins in *Solanum nigrum* L. and *Conyza canadensis* L. roots and leaves under Mn stress[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2010, 30(10):2058-2064.