

锰胁迫对甘蓝型油菜 *Brassica napus* L. 种子活力和幼苗抗氧化系统的影响^①

田学军, 郭亚力, 李春燕, 袁寒

红河学院 生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661100

摘要: 用不同质量分数的锰溶液(0.2%, 0.4%, 0.8% 和 1.2% Mn^{2+})处理甘蓝型胜利油菜 *Brassica napus* cv. Shengli, 研究锰对其种子活力、幼苗细胞膜透性、脂质过氧化及抗氧化剂的影响。结果表明: 锰胁迫降低了种子活力、幼苗抗坏血酸(Vc)质量分数、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性, 破坏了细胞膜的完整性, 并使丙二醛(MDA)质量分数、脯氨酸(Pro)质量分数和过氧化物酶(POD)活性增加。

关键词: 甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.); 锰胁迫; 种子活力; 抗氧化剂

中图分类号: S635

文献标志码: A

土壤盐度(盐胁迫)是全世界半干旱和干旱地区作物减产的主要因子之一, 它抑制作物光合作用和新陈代谢过程的调节及渗透和离子变化的补偿^[1], 使作物细胞受损^[2], 阻碍作物生长。盐胁迫还通过增加超氧($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和氢氧自由基($OH\cdot$)等活性氧中间体(ROS)诱发氧化胁迫, 再通过对脂质、蛋白质和核酸的氧化损伤干扰正常的细胞代谢^[3]。丙二醛(MDA)则是脂质过氧化的产物, 为减轻 ROS 诱发的氧化伤害, 植物有一个复杂的包括低分子抗氧化剂和抗氧化酶的抗氧化防御系统。在受到胁迫时, 植物通过调节抗氧化系统的活性降低伤害程度^[4]。抗氧化酶包括过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、愈创木酚过氧化物酶(GPX)和谷胱甘肽还原酶(GR)等^[3]。脯氨酸(proline, Pro)也是植物重要的非酶抗氧化剂, 许多植物在受到重金属胁迫时积累高质量分数的 Pro, 其积累在抑制金属诱导的脂质过氧化中起重要作用^[5]。

锰(Mn)是植物生长必需的微量元素, 也是农业生产中常用的微肥。土壤缺锰会明显影响小麦等作物的产量^[6], 适量的锰能加强植物中氧化酶吸收氧的能力, 促进种子发芽和幼苗生长, 但过量的锰将污染土壤, 进而对植物造成胁迫^[7]。锰毒成了酸性土壤中限制植物生长的重要因子, 并使得土壤改良困难^[8]。我国设施栽培中大量酸性和生理酸性肥料的施用及环境污染引起的酸雨导致土壤酸化, 加剧了锰毒对作物的危害, 高锰毒害已成为阻碍设施农业发展的重要因素。

锰毒对芸苔属 *Brassica* L. 植物的影响已有学者做过一些研究。由于土壤中交换性锰增加, 造成油菜过量吸收锰, 使在不断轮作的土壤上种植的油菜幼苗生长缓慢, 新叶黄化, 成熟叶片失绿^[9]。锰毒先抑制油菜地上部分生长, 随着毒害加剧, 根系生长也受到明显伤害^[10]。Rout 等^[11]的研究表明, 从油菜 *B. campestris* var. M27 和芥菜 *B. juncea* L. var. Pusabold 愈伤组织获得的再生植株能在含 0.80 mM 锰的

① 收稿日期: 2010-09-02

基金项目: 红河学院科研基金资助项目(XJ1Y0805)。

作者简介: 田学军(1962-), 男, 云南泸西人, 教授, 主要从事植物逆境生理学和资源植物研究。

培养基上生长. 对高度锰敏感的甘蓝型油菜 *B. napus* L 能克服锰的影响^[8]. 但锰胁迫对油菜种子活力、幼苗质膜透性、脂质氧化、抗坏血酸(Vc), Pro, SOD, CAT 和 POD 等抗氧化剂的影响报道较少.

锰等有色金属是云南重要的支柱产业, 其污染将影响植物的生长发育, 加之锰是重要微肥, 过量使用也将对农作物造成胁迫. 因此, 研究锰胁迫对作物的影响有重要的现实意义.

1 材料和方法

1.1 油菜及胁迫处理

分别以胜利油菜 *B. napus* cv. Shengli 和 $MnSO_4$ 溶液为研究材料和锰胁迫剂.

1.1.1 种子胁迫处理与活力测定

种子用水润湿, 4 °C 纯化 24 h, 随机分成 5 组, 每组 50 粒, 分别放在内衬滤纸的培养皿(加盖)中, 置 22 °C 培养室避光胁迫培养. 每组每天分别用 2 mL 质量分数为 0.2%, 0.4%, 0.8% 和 1.2% (以 Mn^{2+} 计) 的 $MnSO_4$ 溶液胁迫处理(对照用去离子水), 连续 5 d, 记录每天萌发种子数. 胁迫期间, 胁迫溶液每天更换 1 次(通过将种子转入另一培养皿中完成), 以保证盐质量分数的稳定, 并测定下列指标:

$$\text{发芽指数}(GI) = \sum(Gt/Dt)$$

$$\text{活力指数}(VI) = GI \times S$$

式中 Gt 为每日发芽种子数, Dt 为相应的发芽日数, S 为观察结束时幼苗长度(根长+茎长).

1.1.2 幼苗胁迫处理

种子经纯化后在 22 °C 避光培养, 至下胚轴伸长约 1 mm 随机分成 5 组(5 个处理)进行胁迫, 每个处理 3 个重复. Mn^{2+} 的胁迫质量分数分别为 0(CK), 0.2%, 0.4%, 0.6% 和 0.8%. 胁迫溶液每天更换 1 次(通过将幼苗转入另一培养皿中完成, 2 mL/d), 以保证盐质量分数的稳定. 胁迫 48 h 后用于下列指标测定.

1.2 生理指标测定

1.2.1 质膜渗透性与 Vc 和 Pro 质量分数

渗透性用来表示质膜的受损程度, 通过测定植物组织介质电导率而获得, 参照 Hong 等^[12] 方法用电导率仪(JEY-45001, Jenway, England)测定. Vc 和 Pro 质量分数测定分别用二硝基苯肼法^[13] 和茚三酮比色法^[14].

1.2.2 MDA 质量分数及 SOD、POD 和 CAT 活性

MDA, SOD, POD 和 CAT 测定采用 Zhang 等^[15] 的方法. 各种酶的活力单位定义如下: 以抑制氮蓝四唑(NBT)还原的 50% 为 1 个 SOD 活力单位; 每分钟吸光度增加 0.01 为 POD 的 1 个活力单位; 每分钟吸光度减少 0.1 为 CAT 的 1 个活力单位.

1.3 统计分析

采用 SPSS10.0 统计软件.

2 结 果

2.1 锰胁迫对种子活力的影响

油菜种子经不同质量分数 Mn^{2+} 胁迫培养 5 d, 各质量分数及对照(CK)之间 GI 差异不具有统计学意义 ($p > 0.05$), 但 VI 随着胁迫质量分数的提高而降低 ($p < 0.05$) (表 1). 显然, Mn^{2+} 降低了油菜种子的活力. 就 GI 而言, 0.2% Mn^{2+} 胁迫的种子较对照和其他较高质量分数 Mn^{2+} 胁迫的稍高. 0.2% Mn^{2+} 溶液处理可能对种子发芽有一定的促进作用.

表 1 锰胁迫对油菜种子活力的影响 ($n=50$)

Mn^{2+} 质量分数/%	0(CK)	0.2	0.4	0.8	1.2
发芽指数(GI)	49.3	52.1	46.1	46.9	45.7
活力指数(VI)	2 193.9	2 087.2	1 055.8	737.4	358.2

2.2 锰胁迫对幼苗质膜透性和脂质过氧化的影响

质膜透性增加是细胞膜受损的表现, 质膜受损越大, 其组织环境介质的相对电导率越大. 在本研究中, 幼苗质膜的透性随 Mn^{2+} 质量分数的增加而增加, 且与 CK 的差异具有统计学意义 ($p < 0.05$) (表 2), 0.8% Mn^{2+} 胁迫的相对电导率是对照的 660 倍. MDA 是脂质过氧化的产物, 其积累量反映了脂质的过氧化程度. 在高质量分数 Mn^{2+} 胁迫下, 油菜幼苗的 MDA 质量分数明显提高 ($p < 0.05$), 0.8% 胁迫处理的 MDA 质量分数是对照的 4 倍 (表 2).

表 2 锰胁迫对油菜幼苗质膜渗透性和 MDA 质量分数的影响

Mn^{2+} 质量分数/%	0(CK)	0.2	0.4	0.6	0.8
相对电导率	0.03+0.01	0.06+0.01	0.09+0.02	0.14+0.04	19.8+0.10
MDA 质量分数/ $(\mu g \cdot g^{-1})$	0.000 8+0.000 2	0.000 9+0.000 2	0.001 5+0.000 3	0.002 3+0.000 5	0.003 2+0.000 3

2.3 锰胁迫对油菜幼苗 Vc 和 Pro 质量分数及 POD, SOD 和 CAT 活性的影响

Vc 质量分数及 SOD 和 CAT 活性因 Mn^{2+} 胁迫而降低, 且明显低于 CK ($p < 0.05$); Pro 质量分数和 POD 活性则升高 (表 3). 结果表明 Mn^{2+} 胁迫可能使油菜幼苗生理代谢紊乱, 致使 Vc 质量分数及 SOD 和 CAT 活性降低, 同时也使 Pro 质量分数和 POD 质量分数升高, 以抵御 Mn^{2+} 胁迫造成的氧化损伤.

表 3 锰胁迫对油菜幼苗 Vc 和 Pro 质量分数及 POD, SOD 和 CAT 活性的影响

Mn^{2+} 质量分数/%	0(CK)	0.2	0.4	0.6	0.8
Vc 质量分数/ $(\mu g \cdot g^{-1})$	398.7+33.4	336.8+41.7	298.0+51.3	303.8+4.5	289.3+10.2
Pro 质量分数/ $(\mu g \cdot g^{-1})$	88.4+5.1	93.7+2.7	95.3+3.2	101+9.4	100.9+8.6
POD 活性/ $[u \cdot (g \cdot min)^{-1}]$	133.9+7.1	2158.4+14.2	173.1+13.6	201.8+20.2	187.9+15.7
SOD 活性/ $[u \cdot (g \cdot min)^{-1}]$	299.8	163.3	152.9	151.1	126.8
CAT 活性/ $[u \cdot (g \cdot min)^{-1}]$	101.4	84.6	76.4	51.6	49.9

3 讨 论

$MnSO_4$ 是农业上常用的锰肥, 用作底肥、浸种和根外追肥, 浸种质量分数为 0.05%~0.1%. 苑丽霞等^[16]的研究表明, 低质量分数的锰溶液处理能促进油菜种子萌发. 本研究中, 用 0.2%~1.2% 的 Mn^{2+} 溶液浸泡油菜种子, 种子萌发指数与对照差异不明显, 但种子活力大大降低; 仅 0.2% 的处理发芽指数稍高于对照 (表 1). 用 0.2% Mn^{2+} 溶液处理幼苗, POD 活性也高于对照 (表 3).

Vc, Pro, POD, SOD 和 CAT 是植物的重要抗氧化剂. Vc 参与活性氧 (AOS) 代谢, 进而减轻 AOS 对植物的伤害^[17]. Pro 通过抑制脂质过氧化而使植物免于金属胁迫造成的毒害^[5]. SOD 是 O_2^- 的主要清除剂, 其酶反应导致 H_2O_2 和 O_2 形成, H_2O_2 再被 CAT 和 POD 等过氧化物酶清除 (CAT 将 H_2O_2 歧化为 H_2O 和 O_2)^[3], 降低了重金属胁迫诱发的氧化损伤. 锰对细胞膜的伤害可能破坏了细胞内保护酶系统代谢作用的原有区域性, 还可能直接取代某些酶中活性的微量元素而使酶活性发生变化甚至受到破坏^[7].

对锰胁迫下油菜幼苗 Vc 质量分数变化的研究不多. 有研究表明, 小白菜中 Vc 质量分数随铜胁迫质量分数的增加而下降^[18], 萝卜幼苗 Vc 质量分数也因 NaCl 的胁迫而下降^[19]. 在本研究中, 油菜幼苗 Vc 质量分数随 Mn^{2+} 质量分数的增加而逐渐下降, 这与其他金属对有关植物的胁迫效应相似.

盐胁迫下 Pro 质量分数升高, 其生物合成速度受双功能酶 P5CS (A'-二氢吡咯-5-羧酸合成酶) 控制^[20]. P5CS 基因可被高盐诱导, 促进 Pro 合成和积累^[21]. 在本研究中, Pro 质量分数随着 Mn^{2+} 质量分数的增加而增加. 显然, 油菜幼苗为了应对高质量分数 Mn^{2+} 的胁迫, 增加了 Pro 的合成, 以提高细胞质渗透压, 并增强抑制脂质过氧化能力.

POD 活性的高低与植物的耐锰能力密切相关^[22]. 在本研究中, POD 活性随 Mn^{2+} 质量分数的增加而明显增加, 其变化趋势与曾琦等^[10]对油菜和胡蕾等^[23]对大豆的研究结果相似, 表明 POD 在抵御锰诱发的氧化胁迫中起重要作用.

当植物组织中活性氧的增加超过 SOD 正常的歧化能力时, 细胞内多种功能酶和膜系统遭到破坏, 生

理代谢紊乱, SOD 活性反而受到抑制^[24]. 在水蓼叶片中 SOD 的活性随锰胁迫质量分数的增加而增加^[22]. 在本研究中, SOD 的活性随 Mn^{2+} 质量分数的增加而呈下降趋势, 说明 SOD 活性可能受到了锰的抑制.

锰胁迫对 CAT 活性的影响所报道的结果不一致, 有高有低, 其原因可能是植物物种间对锰胁迫响应的差异^[24]. 在本研究中, CAT 活性随 Mn^{2+} 质量分数的降低而明显降低, 其变化趋势与史庆华等^[4]在黄瓜根系的研究结合相似.

纵观本研究, 高质量分数 Mn^{2+} 胁迫降低了油菜种子活力, 破坏了细胞膜的完整性, 并使较多脂质过氧化. 除此之外, Mn^{2+} 胁迫使油菜组织中 Vc 质量分数及 SOD 和 CAT 活性下降. 这可能是高 Mn^{2+} 胁迫导致油菜生长受到抑制和产量降低的重要原因之一. 鉴于农业生产上低质量分数 Mn^{2+} 处理对油菜种子萌发有一定的促进作用, 使用锰肥要控制 Mn^{2+} 质量分数, 以减少其产生的不利影响.

参考文献:

- [1] KHOLOVA J, SAIRAM R K, MEENA R C, et al. Response of Maize Genotypes Salinity Tress in Relation To Osmolytes and Metal-Ions Contents, Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes Activity [J]. *Biologia Plantarum*, 2009, 53(2): 249-256.
- [2] YADAVA S K. Heavy Metals Toxicity in Plants: An Overview on The Role of Glutathione and Phytochelatins in Heavy Metal Stress Tolerance of Plants [J]. *South African Journal of Botany*, 2010, 76(2): 167-179.
- [3] DIASDE A N A, TARQUINIO P J, En'eas-Filho J, et al. Effect of Salt Stress on Antioxidative Enzymes and Lipid Peroxidation in Leaves and Roots of Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Maize Genotypes [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 56(1): 87-94.
- [4] 史庆华, 朱祝军, 李 娟, 等. 高锰胁迫与低 pH 对黄瓜根系氧化胁迫和抗氧化酶的复合效应 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(5): 999-1004.
- [5] MEHTA S K, GAUR J P. Heavy-Metal-Induced Proline Accumulation and Its Role in Ameliorating Metal Toxicity in *Chlorella Vulgaris* [J]. *New Phytol*, 1999, 143(2): 253-259.
- [6] JIANG Wen-zhi. Mn Use Efficiency in Different Wheat Cultivars [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 57(1-2): 41-50.
- [7] 任立民, 刘 鹏. 锰毒及植物耐性机理研究进展 [J]. *生态学报*, 2007, 27(1): 357-367.
- [8] MORONI J S, SCOTT B J, WRATTEN N. Differential Tolerance of High Manganese Among Rapeseed Genotype [J]. *Plant and Soil*, 2003, 253(2): 507-519.
- [9] ZHU D W, CHENG R X, LIU J F, et al. Study on Relationship Between Soil Acidification and Manganese Toxicity To Rape [J]. *Trop Sub Soil Sci*, 1998, 7(4): 280-283.
- [10] 曾 琦, 耿明建, 张志江, 等. 锰毒害对油菜苗期 Mn、Ca、Fe 含量及 POD、CAT 活性的影响 [J]. *华中农业大学学报: 自然科学版*, 2004, 23(3): 300-303.
- [11] ROUT G R, SAMANTARAY S, DAS P. In Vitro Selection and Biochemical Characterisation of Zinc and Manganese Adapted Callus Lines in *Brassica Spp* [J]. *Plant Science*, 1999, 146(2): 89-100.
- [12] HONG S, LEE U, VIERLING E. Arabidopsis Hot Mutants Define Multiple Functions Required for Acclimation to High Temperatures [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 757-767.
- [13] XU S, LI J, ZHANG X, et al. Effects of Heat Acclimation Pretreatment on Changes of Membrane Lipid Peroxidation, Antioxidant Metabolites, and Ultrastructure of Chloroplasts in Two Cool-Season Turfgrass Species Under Heat Stress [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 56(3): 274-285.
- [14] 张立军, 樊金娟. 植物生理学实验教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007.
- [15] ZHANG Jun-huan, HUANG Wei-dong, PAN Qiu-hong, et al. Improvement of Chilling Tolerance and Accumulation of Heat Shock Proteins in Grape Berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) By Heat Pretreatment [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2005, 38(1): 80-90.
- [16] 苑丽霞, 孙 毅. Cu、Zn、Mn 对油菜种子萌发及幼苗生长的影响 [J]. *晋中学院学报*, 2010, 27(3): 55-59.
- [17] 何文亮, 黄承红, 杨颖丽, 等. 盐胁迫过程中抗坏血酸对植物的保护功能 [J]. *西北植物学报*, 2004, 24(12):

2196—2201.

- [18] 徐 磊, 林义章. 铜胁迫对小白菜品质相关指标的影响 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(14): 161—163.
- [19] 吴能表, 何 凤, 杨丽萍, 等. NaCl 对萝卜幼苗逆境指标及蛋白激酶活性 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2004, 29(4): 651—654.
- [20] 毛桂莲, 许 兴, 徐兆桢. 植物耐盐生理生化研究进展 [J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(1): 43—46.
- [21] IGARASHI Y, YOSHIBA Y, SANADA Y, et al. Characterization of the Gene for Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase and Correlation Between the Expression of the Gene and Salt Tolerance in *Oryza sativa* L [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 33(5): 857—865.
- [22] 王 华, 唐树梅, 廖香俊, 等. 超积累植物水蓼吸收锰的生理与分子机制 [J]. 云南植物研究, 2008, 30(4): 489—495.
- [23] 胡 蕾, 施益华, 刘 鹏, 等. 锰对大豆膜脂过氧化及 POD 和 CAT 活性的影响研究 [J]. 金华职业技术学院学报, 2003, 3(1): 29—32.
- [24] 严重玲, 付舜珍, 方重华, 等. Hg、Cd 及其共同作用对烟草叶绿素含量及抗氧化酶系统的影响 [J]. 植物生态学报, 1997, 21(5): 468—473.

Effects of Manganese Stress on Seed Viability and Antioxidant System in Seedlings of *Brassica napus* L.

TIAN Xue-jun, GUO Ya-li, LI Chun-yan, YUAN Han

College of Biology and Technology, Honghe University, Mengzi Yunnan 661100, China

Abstract: The effects of manganese (Mn) stress on seed viability, and membrane permeability, lipid peroxidation and antioxidants in seedlings of rape (*Brassica napus* cv. Shengli) were studied under Mn stress (nutrient solution containing 0.2, 0.4, 0.8 and 1.2% Mn^{2+}). Mn stress resulted in a decrease in seed viability, content of ascorbic acid (Vc) and activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and in an increase in malondialdehyde (MDA) and proline (Pro) contents and peroxidase (POD) activity of the rape seedlings. The integrity of the cell membrane was destroyed under Mn stress.

Key words: *Brassica napus* L.; Mn stress; seed viability; antioxidant

责任编辑 夏 娟