

DOI: 10.11686/cyxb2017033

http://cyxb.lzu.edu.cn

潘高, 张合平, 刘鹏, 刘文胜. 锰胁迫对苍耳种子萌发及幼苗生理生化特性的影响. 草业学报, 2017, 26(11): 157-166.

PAN Gao, ZHANG He-Ping, LIU Peng, LIU Wen-Sheng. Effect of manganese stress on seed germination, seedling physiological and biochemical characteristics of *Xanthium sibiricum*. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(11): 157-166.

## 锰胁迫对苍耳种子萌发及幼苗生理生化特性的影响

潘高<sup>1,2</sup>, 张合平<sup>1</sup>, 刘鹏<sup>1,2</sup>, 刘文胜<sup>1\*</sup>

(1. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004; 2. 南方林业生态应用技术国家工程实验室, 湖南 长沙 410004)

**摘要:**为探明苍耳对锰胁迫适应的生理生化机制,以苍耳种子为试验材料,采用培养皿滤纸法,研究了不同浓度锰(0, 1000, 5000, 10000, 15000 和 20000  $\mu\text{mol/L}$ )胁迫对苍耳种子萌发、幼苗生长及生理生化特性的影响。结果表明: 1) 1000~5000  $\mu\text{mol/L}$  锰胁迫显著提高了苍耳种子的萌发率,增加了幼苗的芽长和根系活力;当浓度 $>5000 \mu\text{mol/L}$ 时,发芽势、发芽指数、活力指数以及根长、鲜重、干重、根冠比均显著降低;2)随着锰浓度的升高,苍耳幼苗叶片中可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量以及超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、愈创木酚过氧化物酶(GPX)、过氧化氢酶(CAT)活性均呈现先增加后下降的变化趋势;3)苍耳幼苗体内活性氧和膜脂过氧化物含量随着锰浓度的升高显著增加,超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )产生速率、羟自由基( $\text{OH}^{\cdot}$ )浓度、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 含量分别增加了 154.69%、47.29%、100.09%和 200.96%。研究结果显示,苍耳对锰胁迫具有较强的耐性,可作为锰矿废弃地修复的备选植物。

**关键词:** 锰胁迫; 苍耳; 种子萌发; 渗透调节; 抗氧化酶

### Effect of manganese stress on seed germination, seedling physiological and biochemical characteristics of *Xanthium sibiricum*

PAN Gao<sup>1,2</sup>, ZHANG He-Ping<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>1,2</sup>, LIU Wen-Sheng<sup>1\*</sup>

1. College of Life Science and Technology, Central-South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China; 2. National Engineering Laboratory for Applied Technology of Forestry & Ecology in South China, Changsha 410004, China

**Abstract:** To investigate the physiological and biochemical adaption mechanisms of *Xanthium sibiricum* to manganese (Mn) stress, *Xanthium sibiricum* seeds were treated with different concentrations of Mn (0, 1000, 5000, 10000, 15000 and 20000  $\mu\text{mol/L}$ ) and subsequently germinated on filter paper. Seed germination, seedling growth, physiological and biochemical characteristics of seedlings were examined. 1) Compared with the control, germination rate, bud length and root vigor increased significantly at 1000–5000  $\mu\text{mol/L}$  Mn. Germination potential, germination index, vigor index, root length, fresh weight, dry weight and root-shoot ratio significantly decreased with Mn concentrations over 5000  $\mu\text{mol/L}$ . 2) Soluble sugar, soluble protein, proline and superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and catalase (CAT) initially increased and then decreased with the rising Mn concentration. 3) Reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) in seedlings increased significantly with the increase in Mn concentration.

\* 收稿日期: 2017-01-19; 改回日期: 2017-03-31

基金项目: 湖南省教育厅重点项目(14A156), 湖南省研究生科研创新项目(CX2017B400)和中南林业科技大学研究生科技创新基金项目(CX2017A06)资助。

作者简介: 潘高(1991-), 男, 湖南岳阳人, 在读博士。E-mail: windypg@126.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 403493641@qq.com

The  $O_2^{\cdot -}$  (superoxide anion radical),  $OH^{\cdot}$  (hydroxyl radical),  $H_2O_2$  and MDA content increased by 154.69%, 47.29%, 100.09% and 200.96% at the highest Mn concentration, respectively. It showed that *X. sibiricum* has strong Mn tolerance and adaptability, and is potentially utilizable for phytoremediation.

**Key words:** Manganese stress; *Xanthium sibiricum*; seed germination; osmotic adjustment; antioxidant enzyme

锰(Mn)是维持植物正常生命活动所必需的微量营养元素,适量的锰能活化植物体内的酶系统,促进植物的生长;而过量的锰则会诱导活性氧合成积聚、破坏细胞结构,进而对植物产生毒性效应,甚至通过食物链危害人体健康<sup>[1-2]</sup>。当前,由于锰矿开采、冶炼等工业活动的增加,锰污染程度加深、面积扩大,这严重影响矿区人民的生产生活<sup>[3]</sup>。因此,降低矿区锰污染、修复矿区生态环境已成为当前亟须解决的问题。近年来,植物修复技术以其高效、廉价、环保等优点而受到国内外的广泛关注<sup>[4]</sup>。筛选和利用一些耐锰性强且具有较高经济价值的修复备选植物治理锰污染,已成为矿区废弃地较为理想的修复治理途径<sup>[5-6]</sup>。

揭示锰对植物的毒性效应以及植物的耐锰机理是有效开展植物修复和矿区污染治理的前提。例如,植物对锰的耐性与其抗氧化酶的活性密切相关。植物在锰胁迫时,体内的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)、愈创木酚过氧化物酶(guaiacol peroxidase, GPX)和过氧化氢酶(catalase, CAT)等抗氧化酶的活性被诱导以减少活性氧自由基对植物生理机能的损伤<sup>[1]</sup>。细胞膜作为植物体抵御锰毒害的第1道防线,其膜脂过氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量通常被用于揭示逆境胁迫对细胞膜过氧化作用强弱和植物受伤害程度<sup>[2]</sup>。

苍耳(*Xanthium sibiricum*)为菊科苍耳属一年生草本植物,广布于我国南北各省<sup>[7]</sup>。该植物生长速度快、生物量大,同时具有生态适应性广、耐瘠薄和繁殖力强等优点<sup>[8]</sup>。锰尾矿废弃地调研显示,该植物对锰污染具有较强的耐性,能在锰矿废弃地成片生长,是锰矿废弃地植物修复的理想材料。目前,对苍耳的研究主要集中在化学成分<sup>[9]</sup>、生物学特性<sup>[10]</sup>以及苍耳对水淹<sup>[11]</sup>和镉、盐胁迫<sup>[12-13]</sup>的响应等方面,关于锰胁迫下苍耳种子萌发、幼苗生长及生理特性的研究尚未见报道。本研究以苍耳为材料,研究不同锰胁迫水平对苍耳种子萌发、幼苗生长以及生理生化特性的影响,探明苍耳对锰污染的耐受性,研究结果可为深入认识锰污染条件下植物生长适应过程提供基础数据,同时为锰污染区域的植物修复提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 种子采集及萌发实验

供试苍耳种子于2016年11月下旬采自湖南省长沙市湘江风光带(112°94'26" E, 28°14'88" N),现场调查显示该地段苍耳分布面积大,且均为自然生长。选择100株长势一致的苍耳植株并采集成熟种子,用信封装好后带回实验室于室温保存。

选取籽粒饱满、均匀的苍耳种子,去除其总苞后进行萌发实验。首先用0.5%的NaClO溶液浸泡消毒30 min,去离子水冲洗5~6次;然后置于垫有双层滤纸、直径为120 mm的培养皿中,每皿30粒种子。根据预试验及参照马杰<sup>[13]</sup>的结论,将培养皿置于人工气候箱中,在(30±0.5) °C、12 h光照/12 h黑暗、相对湿度80%的条件下进行萌发。利用MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O设置0(对照)、1000、5000、10000、15000、20000 μmol/L 6个锰浓度,每个处理重复5次。为保持溶液浓度恒定,每隔24 h更换1次处理液。

每天观察并记录发芽种子数(以胚根伸出种皮作为发芽标准)。在第4天统计种子发芽势,测定种子萌发过程中的可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量。第10天时统计种子萌发率,测量苍耳幼苗的芽长、根长、鲜重、干重,计算发芽指数、活力指数、根冠比,并测定幼苗的根系活力、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)、过氧化氢酶(CAT)活性,超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot -}$ )产生速率、羟自由基( $OH^{\cdot}$ )浓度、过氧化氢( $H_2O_2$ )和丙二醛(MDA)含量。萌发试验结束后,对未萌发的种子采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法<sup>[14]</sup>测定其生活力,并按文献<sup>[15]</sup>描述的方法,将紧致新鲜和腐烂死亡的种子分别记录为新鲜未萌发

种子和死种子。

## 1.2 测定项目及方法

1.2.1 发芽指标的测定 苍耳种子萌发相关指标的测定参照张虎等<sup>[16]</sup>和赵傲雪等<sup>[17]</sup>的方法。

$$\text{发芽势} = 4 \text{ d 内正常发芽种子数} / \text{供试种子数} \times 100\%$$

$$\text{萌发率} = 10 \text{ d 内正常发芽的种子数} / \text{供试种子数} \times 100\%$$

$$\text{新鲜未萌发种子率} = \text{新鲜未萌发种子数} / \text{供试种子数} \times 100\%$$

$$\text{死种子率} = \text{死种子数} / \text{供试种子数} \times 100\%$$

$$\text{发芽指数 (GI)} = \sum (Gt/Dt)$$

$$\text{活力指数 (VI)} = GI \times S^{[18]}$$

式中:  $Gt$  为在  $t$  日的发芽种子数;  $Dt$  为发芽天数;  $S$  为单株鲜重。

1.2.2 生物量指标的测定 幼苗芽长、根长的测定: 萌发第 10 天时, 每处理随机选取 20 株幼苗, 采用精度为 0.1 mm 的游标卡尺分别测量幼苗芽长、根长, 求平均值。

幼苗鲜重、干重的测定: 萌发第 10 天时, 每处理随机选取 20 株幼苗, 先称鲜重, 然后再于 95 °C 下杀青 10 min, 65 °C 下烘至恒重。

$$\text{根冠比} = \text{根干重} / \text{地上部干重}^{[19]}$$

1.2.3 生理生化指标的测定 可溶性糖含量采用蒽酮比色法<sup>[14]</sup>; 可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 染色法<sup>[14]</sup>; 脯氨酸含量采用酸性茚三酮比色法<sup>[14]</sup>; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性采用氮蓝四唑 (NBT) 法<sup>[14]</sup>; 抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性参考孙云等<sup>[20]</sup>的方法; 愈创木酚过氧化物酶 (GPX) 活性采用愈创木酚法<sup>[14]</sup>; 过氧化氢酶 (CAT) 活性采用紫外吸收法<sup>[14]</sup>; 超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot-}$ ) 产生速率参考孙胜等<sup>[21]</sup>的方法; 羟自由基 ( $OH^{\cdot}$ ) 浓度参考 Halliwell 等<sup>[22]</sup>的方法; 过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 含量参考 Velikova 等<sup>[23]</sup>的方法; 丙二醛 (MDA) 含量采用硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法<sup>[14]</sup>; 根系活力采用氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法<sup>[14]</sup>。以上各指标均称取新鲜苍耳叶片 0.5 g, 重复 3 次。

## 1.3 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 并使用最小显著差数法 (LSD 法) 对每个指标不同处理间的差异显著性进行多重比较, 数据结果均以“平均值 ± 标准差”表示, 用 Sigma Plot 12.5 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 锰胁迫对苍耳种子萌发及幼苗生长的影响

锰作为植物生长所必需的微量元素, 对苍耳种子萌发有显著的影响。表 1 显示, 随着锰浓度的升高, 苍耳种子的发芽势、发芽指数和活力指数均逐渐降低。锰胁迫对苍耳种子发芽势的抑制程度大于萌发率, 当锰浓度达到 10000  $\mu\text{mol/L}$  时, 其发芽势低于 20.00%。从发芽指数和活力指数看, 表现出同发芽势类似的规律性, 当浓度达到 20000  $\mu\text{mol/L}$  时, 发芽指数、活力指数分别为对照的 35.55% 和 17.44%, 抑制作用最强。1000~10000  $\mu\text{mol/L}$  锰处理显著提高了苍耳种子的萌发率 ( $P < 0.05$ ) (表 1), 并在 10000  $\mu\text{mol/L}$  时达到最大值 (78.15%), 但仍分别有 27.73%、32.04% 和 18.52% 的新鲜种子未萌发; 15000~20000  $\mu\text{mol/L}$  锰浓度对萌发率影响不明显。与对照相比, 1000~15000  $\mu\text{mol/L}$  锰处理对苍耳种子的致死效果不明显 ( $P > 0.05$ ), 20000  $\mu\text{mol/L}$  锰胁迫显著增加了死亡种子数量 ( $P < 0.05$ )。苍耳幼苗的根系活力随锰浓度的升高逐渐增大, 当锰浓度超过 15000  $\mu\text{mol/L}$  时, 苍耳幼苗的根系活力随锰浓度的升高而显著降低。

锰胁迫下, 苍耳幼苗的芽长、根长和鲜重、根冠比均表现出明显的“低促高抑”现象 (表 2), 低浓度锰胁迫增加了苍耳幼苗的干重, 但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。5000  $\mu\text{mol/L}$  锰胁迫对幼苗的芽长、鲜重、干重无明显的抑制作用, 但显著降低了幼苗的根长和根冠比。当锰浓度超过 15000  $\mu\text{mol/L}$  时, 苍耳幼苗的芽长、根长和鲜重、干重、根冠比均呈显著下降趋势。20000  $\mu\text{mol/L}$  锰处理使幼苗的芽长、根长和鲜重、干重、根冠比分别比对照减少了

65.83%、24.52%、51.54%、68.94%和 51.52%，表明苍耳幼苗的生长易受锰胁迫影响，高浓度锰胁迫对幼苗的生长表现出明显的抑制效应。

表 1 锰胁迫对苍耳种子萌发及幼苗根系活力的影响

Table 1 Effect of manganese stress on seed germination and seedling root activity of *X. sibiricum*

浓度 Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	发芽势 Germination energy (%)	萌发率 Germination rate (%)	新鲜未萌发种子 Fresh seed (%)	死种子 Dead seed (%)	发芽指数 Germination index	活力指数 Vigor index	根系活力 Root activity [ $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ ]
0	44.25 $\pm$ 4.35a	57.76 $\pm$ 4.76c	40.02 $\pm$ 3.51a	2.22 $\pm$ 1.92b	40.39 $\pm$ 4.12a	15.65 $\pm$ 1.45a	430.07 $\pm$ 10.05f
1000	35.55 $\pm$ 3.85b	68.94 $\pm$ 6.20b	27.73 $\pm$ 6.20a	3.33 $\pm$ 0.00b	33.84 $\pm$ 3.18b	14.07 $\pm$ 1.32b	475.10 $\pm$ 13.61e
5000	21.11 $\pm$ 1.92c	66.85 $\pm$ 4.91b	32.04 $\pm$ 4.98a	1.11 $\pm$ 0.96b	19.63 $\pm$ 1.30d	6.34 $\pm$ 0.42c	653.21 $\pm$ 14.73c
10000	19.90 $\pm$ 2.33c	78.15 $\pm$ 6.03a	18.52 $\pm$ 6.03b	3.33 $\pm$ 0.00b	24.62 $\pm$ 2.40c	4.53 $\pm$ 0.44d	1059.71 $\pm$ 28.76a
15000	16.87 $\pm$ 2.36c	54.08 $\pm$ 3.94c	43.70 $\pm$ 4.14a	2.22 $\pm$ 1.92b	17.15 $\pm$ 1.61d	3.73 $\pm$ 0.35d	806.12 $\pm$ 17.72b
20000	15.56 $\pm$ 1.93c	57.73 $\pm$ 4.43c	35.60 $\pm$ 4.34a	6.67 $\pm$ 3.34a	14.36 $\pm$ 1.24d	2.73 $\pm$ 0.24d	585.18 $\pm$ 13.95d

注:同列不同小写字母表示处理间差异显著( $P<0.05$ ),下同。

Note: Different lowercase letters within the same column show significant difference ( $P<0.05$ ). The same below.

表 2 锰胁迫对苍耳幼苗生长的影响

Table 2 Effect of manganese stress on *X. sibiricum* seedling growth

浓度 Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	芽长 Shoot length (mm)	根长 Root length (mm)	鲜重 Fresh weight (mg/plant)	干重 Dry weight (mg/plant)	根冠比 Root-shoot ratio
0	35.15 $\pm$ 2.70c	46.82 $\pm$ 3.15b	335.95 $\pm$ 13.97b	31.26 $\pm$ 2.20a	0.198 $\pm$ 0.016b
1000	42.94 $\pm$ 2.23a	114.14 $\pm$ 5.57a	370.23 $\pm$ 9.47a	32.54 $\pm$ 2.10a	0.244 $\pm$ 0.036a
5000	39.04 $\pm$ 1.16b	38.02 $\pm$ 2.62c	321.28 $\pm$ 12.36b	30.78 $\pm$ 1.79a	0.168 $\pm$ 0.022c
10000	32.60 $\pm$ 1.54c	24.72 $\pm$ 2.72d	262.28 $\pm$ 10.87c	27.02 $\pm$ 1.75b	0.144 $\pm$ 0.019c
15000	28.19 $\pm$ 1.76d	15.48 $\pm$ 1.27e	213.03 $\pm$ 9.85d	24.62 $\pm$ 1.81b	0.110 $\pm$ 0.016d
20000	23.14 $\pm$ 2.15e	11.48 $\pm$ 1.34e	173.15 $\pm$ 12.43e	21.55 $\pm$ 1.98c	0.102 $\pm$ 0.015d

## 2.2 锰胁迫对苍耳种子萌发过程中可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量变化的影响

可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸不仅为植物的生长发育提供能量和代谢中间产物,同时作为植物在逆境胁迫下的渗透调节物质,在减少水分散失、维持细胞膜正常结构以及保护细胞代谢活动所需的酶类活性等方面发挥着不可替代的作用。由图 1 可知,锰胁迫下苍耳种子萌发过程中的可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量显著降低,并且随锰浓度的升高呈现先增加后下降的变化趋势。锰浓度为 1000  $\mu\text{mol/L}$  时,可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量分别比对照显著增加了 35.37%、6.75%和 15.38%。在胁迫浓度达到 10000  $\mu\text{mol/L}$  时,锰胁迫开始抑制种子萌发过程中可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量的增加。当锰浓度超过 15000  $\mu\text{mol/L}$  时,抑制作用显著增强,可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸的含量分别比对照减少了 39.97%、22.07%和 69.23%,表现出明显的抑制效应。

## 2.3 锰胁迫对苍耳幼苗抗氧化酶活性的影响

植物的保护酶体系能够及时抵制活性氧、清除自由基等有害物质,从而保护植物机体的生理机能。由图 2 可知,苍耳幼苗 4 种抗氧化酶活性的变化趋势大致一致,随着锰浓度的增大,均呈现先上升后下降的变化趋势。锰浓度为 1000  $\mu\text{mol/L}$  时,苍耳幼苗中 GPX 活性高于对照,但不显著,CAT 活性达到最大值,CAT、SOD 和 APX 活性分别比对照增加 19.63%、13.39%和 19.91%,达到显著水平。5000  $\mu\text{mol/L}$  锰处理后苍耳幼苗 SOD 活性显著高于对照,APX 和 GPX 活性最强,分别比对照高 37.61%和 76.71%,之后均呈下降趋势。苍耳幼苗中 SOD 活性在锰浓度为 10000  $\mu\text{mol/L}$  时达到最大值,比对照增加 65.49%,达到显著水平,随后逐渐下降。

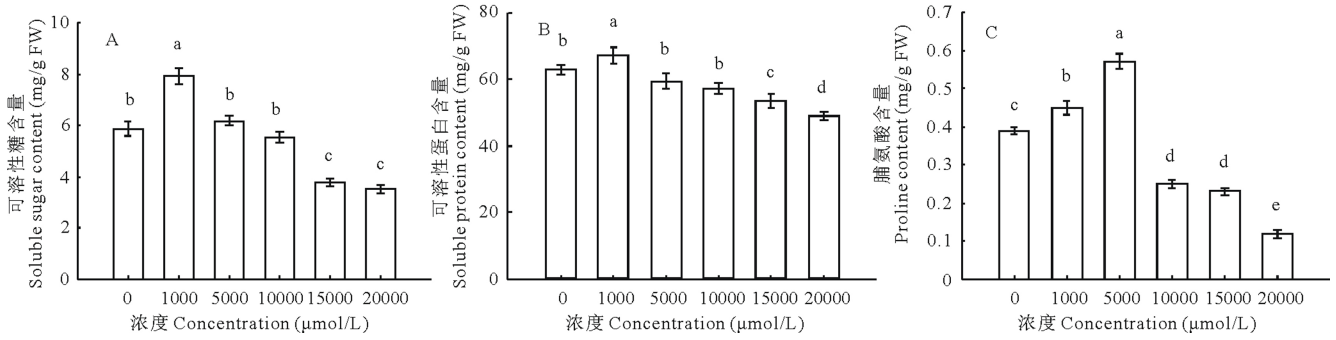


图 1 锰胁迫对苍耳种子萌发过程中可溶性糖(A)、可溶性蛋白(B)和脯氨酸(C)含量的影响

Fig. 1 Effect of manganese stress on the soluble sugar (A), protein (B) and proline (C) contents in germinating *X. sibiricum* seeds

不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05),下同。Different lowercase letters show significant difference (P<0.05). The same below.

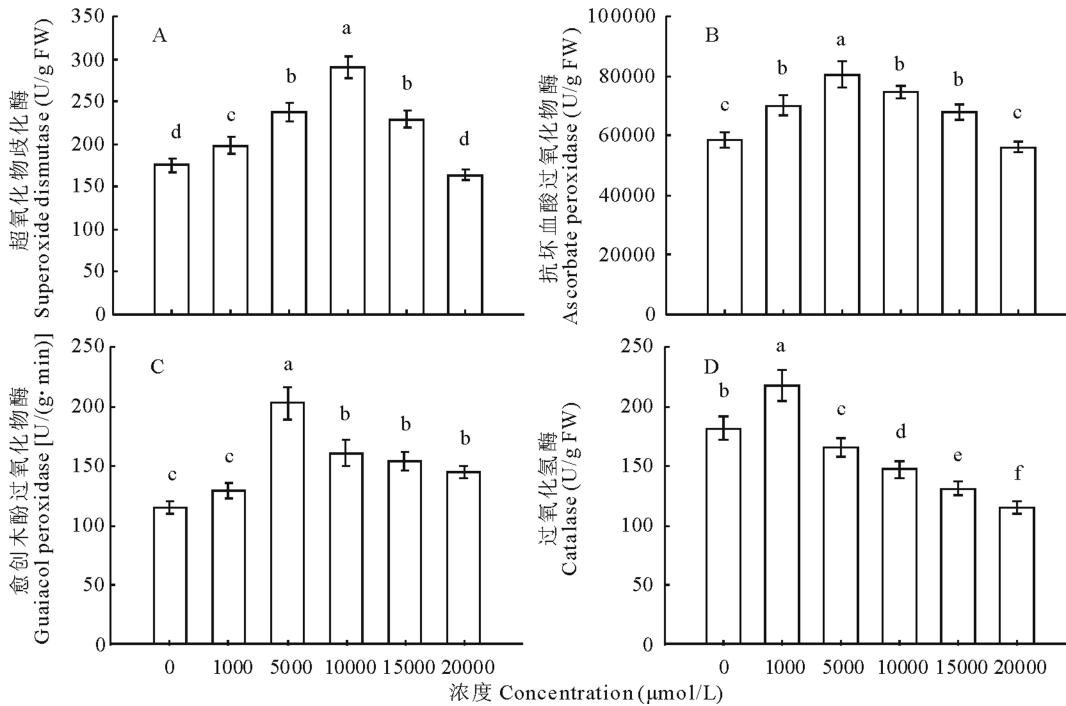


图 2 锰胁迫对苍耳幼苗超氧化物歧化酶(A)、抗坏血酸过氧化物酶(B)、愈创木酚过氧化物酶(C)和过氧化氢酶(D)活性的影响

Fig. 2 Effects of manganese stress on activities of superoxide dismutase (A), ascorbate peroxidase (B), guaiacol peroxidase (C) and catalase (D) in *X. sibiricum* seedlings

2.4 锰胁迫对苍耳幼苗活性氧积累及膜脂过氧化的影响

植物在受到逆境胁迫时体内积聚的活性氧(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、OH<sup>·</sup>等)会诱导细胞内膜脂发生氧化或脱脂作用,并对细胞膜系统造成损伤,MDA 作为细胞内膜脂过氧化或脱脂产物,其含量高低反映细胞膜脂过氧化作用强弱和质膜受损程度。随着锰浓度的升高,苍耳幼苗体内活性氧含量及膜脂过氧化产物 MDA 含量均显著增加(表 3)。锰浓度为 1000 μmol/L 时,苍耳幼苗体内的 O<sub>2</sub><sup>·-</sup>产生速率、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量、OH<sup>·</sup>浓度和 MDA 含量均与对照不显著。当胁迫浓度超过 5000 μmol/L 时,O<sub>2</sub><sup>·-</sup>产生速率、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量、OH<sup>·</sup>浓度和 MDA 含量随锰浓度的升高显著增加,且各处理间差异显著(除 5000 和 10000 μmol/L 处理间 OH<sup>·</sup>的浓度无显著差异),并均在 20000 μmol/L 时达到最大值,分别比对照增加 2.6、1.5、2.0 和 3.0 倍。

表3 锰胁迫对苍耳幼苗活性氧积累和膜脂过氧化的影响

Table 3 Effect of manganese stress on *X. sibiricum* seedling active oxygen accumulation and membrane lipid peroxidation

浓度 Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	超氧阴离子自由基 Superoxide anion free radical [ $\text{O}_2^{\cdot-}$ , $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{g FW})$ ]	羟自由基 Hydroxyl free radical ( $\text{OH}^{\cdot}$ , $\text{A} \cdot 1000/\text{g FW}$ )	过氧化氢 Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\mu\text{mol}/\text{g FW}$ )	丙二醛 Malondialdehyde (MDA, $\text{nmol}/\text{g FW}$ )
0	0.64 $\pm$ 0.09d	1106.29 $\pm$ 74.23d	10.75 $\pm$ 0.92e	3.12 $\pm$ 0.37e
1000	0.79 $\pm$ 0.07d	1048.71 $\pm$ 63.25d	11.53 $\pm$ 0.91e	3.69 $\pm$ 0.35e
5000	0.82 $\pm$ 0.11d	1224.35 $\pm$ 79.89c	13.85 $\pm$ 1.25d	4.70 $\pm$ 0.43d
10000	1.06 $\pm$ 0.11c	1315.46 $\pm$ 63.71c	16.12 $\pm$ 1.17c	5.79 $\pm$ 0.51c
15000	1.38 $\pm$ 0.09b	1482.64 $\pm$ 40.75b	18.53 $\pm$ 1.31b	7.51 $\pm$ 0.67b
20000	1.63 $\pm$ 0.12a	1629.48 $\pm$ 55.61a	21.51 $\pm$ 1.60a	9.39 $\pm$ 0.81a

### 3 讨论

#### 3.1 种子萌发及幼苗生长

种子萌发和幼苗生长是植物生活史中最脆弱的环节,对外界环境因子反应最敏感<sup>[24]</sup>。萌发率反映了种子的生命力,发芽势反映种子出苗快慢和整齐程度,两者均为鉴定种子质量最直接和稳定的指标。发芽指数反映了整个发芽期种子活力的综合特征。活力指数是对较广范围内种子能否迅速萌发、成苗及其生长整齐程度的综合体现。本研究中,当锰浓度超过 10000  $\mu\text{mol/L}$  时,种子的发芽势、发芽指数和活力指数均显著低于对照,说明锰胁迫降低了苍耳种子的发芽速度。与对照相比,1000、5000 和 10000  $\mu\text{mol/L}$  的锰胁迫均显著提高苍耳种子的萌发率,并在 10000  $\mu\text{mol/L}$  时达到最大值(78.15%);在高浓度时,萌发率与对照相比无显著差异。这说明一定浓度的锰刺激对苍耳种子的萌发产生促进作用,而高浓度锰胁迫则对种子萌发未表现出明显的抑制效应。

本研究结果显示,1000~10000  $\mu\text{mol/L}$  锰处理减少了新鲜未萌发种子数量,说明一定浓度的锰刺激有利于打破苍耳种子休眠。种子生理休眠的原因主要包括生理后熟和包被种胚的构造组织(如胚乳、种皮、果皮等)及其内含物的抑制作用。打破种子休眠的方法包括物理方法、化学方法等,化学方法在打破种子休眠上表现出良好的效果<sup>[25]</sup>。本研究中尽管苍耳种子休眠的机制尚不清楚,但锰可在一定程度打破其休眠。本研究还显示,当锰浓度达到 20000  $\mu\text{mol/L}$  时,死种子率较对照显著增加了 2.0 倍( $P < 0.05$ ),说明高浓度的锰提高了种子死亡率。这有可能是高浓度锰离子通过种皮渗透从而抑制胚的生长及其生理活动的某些代谢环节,并最终导致种子死亡。

幼苗的生长状况是植物对逆境胁迫适应的综合体现,胁迫环境对植物生长的抑制程度直观地反映了植物体的受伤程度<sup>[26]</sup>。本研究显示,低浓度锰(1000  $\mu\text{mol/L}$ )胁迫显著提高了苍耳幼苗的芽长、根长、鲜重、根系活力和根冠比,其中根系活力在胁迫浓度为 10000  $\mu\text{mol/L}$  时达到最大值[1059.71  $\mu\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ ],比对照提高了 146.40%;当锰浓度超过 10000  $\mu\text{mol/L}$  时,幼苗的芽长、根长、鲜重、干重、根冠比均显著低于对照(表 1 和表 2)。这说明高浓度锰胁迫对幼苗的生长有显著的抑制作用,这与王佳等<sup>[27]</sup>、刘建凤等<sup>[28]</sup>的研究结果一致。这说明锰胁迫对苍耳幼苗生长存在一个低浓度的刺激效应和高浓度的抑制效应。由于种子萌发后,胚根最先突破种皮吸水,受锰胁迫时间较胚芽长,且胚根是植物发芽过程中吸收水分和营养的主要器官,锰进入幼苗体内后,大多数积累在胚根,所以胚根受到的抑制程度大于胚芽。

#### 3.2 种子萌发中渗透调节物质含量的变化

逆境条件下,植物往往通过代谢调控在体内积累一些可溶性小分子物质进行渗透调节,以减轻逆境胁迫对植物造成的伤害<sup>[29]</sup>。可溶性糖作为组成细胞等生命结构的主要物质,直接为种子萌发和幼苗生长提供所需的碳架和初始能量,也是增加渗透性物质的重要组成成分<sup>[30]</sup>。蛋白质是生命活动的基础,在萌发过程中水解并转运到生长部位作为构成新组织的成分。其含量越高,种子在萌发时产生的脯氨酸也越多,从而增强植物的抗逆性<sup>[31]</sup>。本研究结果表明,与对照相比,可溶性糖和可溶性蛋白含量在较低锰浓度下(1000  $\mu\text{mol/L}$ )均显著增加,而后则随着锰浓度增加而逐渐下降。任立民等<sup>[32]</sup>研究表明随着锰浓度的升高,水蓼(*Polygonum hydropiper*)、杠板归

(*Polygonum perfoliatum*)的可溶性糖、可溶性蛋白含量呈先增加后下降的变化趋势,本研究结果与此一致。其原因可能是,糖、蛋白质、脂肪为三大营养物质,低浓度锰胁迫通过促进植物体内糖和蛋白质的合成代谢,以满足种子萌发和幼苗生长所需的营养物质,这也可从苍耳的芽长、根长、鲜重、干重得到印证(表 2);同时,这也可能是植物抵抗锰毒害的一种自我保护机制。当锰浓度增高时,由于锰在植物体内的过量积累,幼苗细胞结构遭到破坏,并引起蛋白质变性,正常蛋白合成受阻,导致可溶性蛋白含量逐渐下降。可溶性糖含量下降的原因可能是由于高浓度锰胁迫加快了植物的代谢速率,进而增加了幼苗对可溶性糖的需求和利用量,导致可溶性糖含量下降。

脯氨酸是植物体内分布最广泛的一种小分子渗透物质。很多植物在逆境胁迫下通过增加合成、减少降解,从而使大量脯氨酸在植物细胞内积聚,以缓解逆境造成的渗透胁迫<sup>[33]</sup>。本研究结果表明,脯氨酸含量在低浓度时显著升高以维持幼苗体内正常的渗透压;当锰浓度超过 10000  $\mu\text{mol/L}$  时,脯氨酸含量显著下降。马杰<sup>[13]</sup>研究了苍耳对 NaCl 胁迫的响应,发现随着 NaCl 浓度的升高,脯氨酸呈现出先增加后降低的趋势;杨善等<sup>[34]</sup>对锰胁迫下甘蔗(*Saccharum officinarum*)体内脯氨酸的含量呈现出同样的趋势,本研究结果与此基本一致。这说明较低浓度的锰促进了胁迫下脯氨酸的积累,缓解了锰胁迫对苍耳产生的抑制作用;而高浓度锰胁迫将打破植物体内的渗透调节平衡,脯氨酸合成受阻,从而对苍耳幼苗生长产生危害。

### 3.3 幼苗抗氧化酶活性、活性氧积累及膜脂过氧化产物含量

在正常生理条件下,植物体内活性氧的产生和清除之间存在一种动态平衡<sup>[35]</sup>。当植物遭受逆境胁迫时,体内细胞由于代谢受阻产生并积累大量活性氧,得不到有效清除的活性氧会对细胞膜脂产生过氧化反应,破坏细胞膜结构,导致膜脂过氧化物 MDA 大量累积,从而对植物产生毒害效应<sup>[36]</sup>。为有效清除逆境胁迫所产生的过氧化物和自由基,SOD、APX、GPX 和 CAT 共同组成了植物体内的保护酶系统,以维持细胞的正常代谢。本研究结果表明,在锰浓度为 1000  $\mu\text{mol/L}$  时,苍耳幼苗中 GPX 活性高于对照,CAT、SOD 和 APX 活性均显著提高;当锰浓度超过 5000  $\mu\text{mol/L}$  时,APX、GPX 和 CAT 活性呈下降趋势,之后随着锰浓度的上升,SOD 活性也开始下降。马杰<sup>[13]</sup>研究了苍耳对 NaCl 胁迫的响应,发现随着 NaCl 浓度的升高,MDA 含量不断增加;汪结明等<sup>[37]</sup>研究表明 0.4%、0.7% 和 1.0% 锰处理显著提高了粉背蕨(*Aleuritopteris pseudofarinosa*)、蜈蚣草(*Eremochloa ciliaris*)、井栏边草(*Pteris multifida*)的 SOD、CAT 等抗氧化酶活性和 MDA 含量,当锰处理浓度升高时相应酶活性开始下降。王海华等<sup>[38]</sup>研究表明锰胁迫增加了美洲商陆(*Phytolacca americana*)叶片中  $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 的积累,提高了 SOD、CAT 和 APX 活性。本研究结果均与这些研究基本一致。这说明在低浓度锰胁迫下,植物体内增加的活性氧启动了细胞的防御反应,SOD、APX、GPX 和 CAT 等抗氧化酶活性被激活,共同抵御活性氧对细胞膜结构造成的氧化损伤,以提高幼苗对锰胁迫的自我调节能力和耐性。但是,随着锰浓度的升高,膜脂过氧化作用不断增强,抗氧化酶系统受到抑制,SOD、APX、GPX 和 CAT 等酶活性下降,细胞膜结构和功能遭到破坏,严重阻碍了苍耳幼苗的正常生长。本研究结果显示,与对照相比,低浓度锰处理(1000  $\mu\text{mol/L}$ )对苍耳幼苗的活性氧积累和膜脂过氧化产物含量均无显著影响;当锰浓度达到 5000  $\mu\text{mol/L}$  时,苍耳幼苗体内的  $\text{O}_2^{\cdot -}$  产生速率、 $\text{OH}^{\cdot}$  浓度、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和 MDA 含量均显著增加。这说明锰胁迫诱导活性氧自由基在植物细胞内大量累积,进而导致苍耳受害。

## 4 结论

1) 一定浓度的锰可提高苍耳种子的萌发率;随着锰浓度的升高,苍耳种子的发芽势、发芽指数、活力指数均呈逐渐下降趋势。幼苗芽长、根长、鲜重、干重以及根冠比和根系活力均随锰浓度的升高呈现“先上升、后下降”的变化趋势,表现出明显的“低促高抑”现象。

2) 苍耳幼苗叶片可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸含量在生长过程中随着锰浓度的升高呈先增加后下降的变化趋势,低浓度(1000  $\mu\text{mol/L}$ )锰胁迫使苍耳幼苗中糖、蛋白质和脯氨酸的合成代谢显著增强。

3) 锰胁迫下,苍耳幼苗 SOD、APX、GPX 和 CAT 活性先升高后下降,其中,APX、GPX 活性在 5000  $\mu\text{mol/L}$  时达到最大值,SOD 和 CAT 分别在 10000 和 1000  $\mu\text{mol/L}$  时活性最强,表明低浓度锰胁迫引起了苍耳幼苗的抗性应激反应。

4)低浓度锰胁迫提高了苍耳幼苗中可溶性糖、可溶性蛋白和脯氨酸等渗透调节物质的含量,一定程度上缓解了锰胁迫对苍耳的毒害;同时,苍耳体内 SOD、APX、GPX 和 CAT 等抗氧化酶被激活,提高了苍耳幼苗的代谢活力,增强了苍耳对锰胁迫的耐性。

#### 参考文献 References:

- [1] Zhang Y X, Li L F, Chai T Y, *et al.* Mechanisms of manganese toxicity and manganese tolerance in plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 2010, 45(4): 506-520.  
张玉秀, 李林峰, 柴团耀, 等. 锰对植物毒害及植物耐锰机理研究进展. *植物学报*, 2010, 45(4): 506-520.
- [2] Ren L M, Liu P. Review of manganese toxicity and the mechanisms of plant tolerance. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(1): 357-367.  
任立民, 刘鹏. 锰毒及植物耐性机理研究进展. *生态学报*, 2007, 27(1): 357-367.
- [3] Li P, Song A L, Li Z J, *et al.* Silicon-mediated mineral elements in rice (*Oryza sativa* L.) under excess manganese stress. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(10): 3390-3398.  
李萍, 宋阿琳, 李兆君, 等. 硅对锰胁迫下水稻吸收矿质元素的影响. *环境科学学报*, 2015, 35(10): 3390-3398.
- [4] Glick B R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 2003, 21(5): 383-393.
- [5] Yang S X, Tian Q J, Liang S C, *et al.* Bioaccumulation of heavy metals by the dominant plants growing in Huayuan manganese and lead/zinc mineland, Xiangxi. *Environmental Science*, 2012, 33(6): 2038-2045.  
杨胜香, 田启建, 梁士楚, 等. 湘西花垣矿区主要植物种类及优势植物重金属蓄积特征. *环境科学*, 2012, 33(6): 2038-2045.
- [6] Becerra-Castro C, Monterroso C, Prieto-Fernández A, *et al.* Pseudometallophytes colonising Pb/Zn mine tailings: A description of the plant microorganism rhizosphere soil system and isolation of metal-tolerant bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 217(3): 350-359.
- [7] Gao X X, Li M, Gao Z J, *et al.* Allelopathic potential of *Xanthium sibiricum* on seeds germination and seedling growth of different plants. *Acta Prataculturae Sinica*, 2009, 18(2): 95-101.  
高兴祥, 李美, 高宗军, 等. 苍耳对不同植物幼苗的化感作用研究. *草业学报*, 2009, 18(2): 95-101.
- [8] Zhang J X, Zhang X H, Shen H M. A study on the mode of insecticidal action and the activity of detoxification enzyme in extracts of *Xanthium sibiricum* against *Lipaphis erysimi* and *Mythimna separate*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(4): 276-284.  
张君霞, 张新虎, 沈慧敏. 苍耳提取物对萝卜蚜和粘虫作用方式及解毒酶活性影响的研究. *草业学报*, 2014, 23(4): 276-284.
- [9] Hu D Y, Yang S Y, Yuan C S, *et al.* Isolation and identification of chemical constituents in *Xanthium sibiricum*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2012, 43(4): 640-644.  
胡冬燕, 杨顺义, 袁呈山, 等. 苍耳化学成分分离与鉴定. *中草药*, 2012, 43(4): 640-644.
- [10] Zhang Y Q. The Research on Biological Characteristics of Three Species of *Xanthium* in Hebei[D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science & Technology, 2013.  
张玉琴. 河北省分布的三种苍耳的生物学特性研究[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2013.
- [11] Wang Q, Yuan X Z, Liu H, *et al.* The effect of flooding on the germination of *Xanthium sibiricum* seed in the water-level fluctuation zone of the three Gorges Reservoir. *Wetland Science*, 2011, 9(4): 328-333.  
王强, 袁兴中, 刘红, 等. 水淹对三峡水库消落带苍耳种子萌发的影响. *湿地科学*, 2011, 9(4): 328-333.
- [12] Dong L L, Zhao X G, Wei L H. Sorption and accumulation of cadmium in the polluted soil of *Datura stramonium* and *Xanthium sibiricum*. *Biotechnology*, 2009, 19(2): 29-32.  
董林林, 赵先贵, 韦良焕. 曼陀罗和苍耳对污染土壤中镉的吸收与富集. *生物技术*, 2009, 19(2): 29-32.
- [13] Ma J. Responses of seed germination of *Xanthium sibiricum* to salt stress and various temperatures. *Journal of Chongqing University of Technology: Natural Science*, 2012, 26(12): 54-58.  
马杰. 苍耳种子萌发对盐胁迫和不同温度的响应. *重庆理工大学学报: 自然科学版*, 2012, 26(12): 54-58.
- [14] Li H S. *Plant Physiological and Biochemical Principle and Technology*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 169-184.  
李合生. *植物生理生化实验原理与技术*[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 169-184.
- [15] International Seed Testing Association (ISTA). International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, 1999, 27(Suppl1): 155-199.



- [16] Zhang H, Kou J T, Shi S L. Physiological and biochemical responses of *Medicago sativa* seed to cobalt stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(9): 146-153.  
张虎, 寇江涛, 师尚礼. 紫花苜蓿种子萌发对钴胁迫的生理生化响应. *草业学报*, 2015, 24(9): 146-153.
- [17] Zhao A X, Zhang X J, Liu H H, *et al.* Primary investigation on seed dormancy and dormancy breaking of *Hordeum jubatum*. *Pratacultural Science*, 2016, 33(11): 2248-2253.  
赵傲雪, 张晓娟, 刘慧慧, 等. 芒颖大麦草种子休眠类型及破除方法的初步研究. *草业科学*, 2016, 33(11): 2248-2253.
- [18] Huang Y M, Zhang Y X, Liu Q L, *et al.* Effects of salicylic acid on seed germination and seedling physiological characteristics of *Zinnia elegans* under salt stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(7): 97-105.  
黄玉梅, 张杨雪, 刘庆林, 等. 水杨酸对盐胁迫下百日草种子萌发及幼苗生理特性的影响. *草业学报*, 2015, 24(7): 97-105.
- [19] Zou Q. *Plant Physiology Experimental Guide*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 62-174.  
邹琦. *植物生理学实验指导*[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 62-174.
- [20] Sun Y, Jiang C L, Lai Z X, *et al.* Determination and observation of the changes of the ascorbate peroxidase activities in the fresh leaves of tea plants. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2008, 29(5): 562-566.  
孙云, 江春柳, 赖钟雄, 等. 茶树鲜叶抗坏血酸过氧化物酶活性的变化规律及测定方法. *热带作物学报*, 2008, 29(5): 562-566.
- [21] Sun S, Zhang Z, Lu M M, *et al.* Effects of cadmium stress on photosynthesis and active oxygen metabolism in the leaves of small watermelon seedlings. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 24(3): 389-393.  
孙胜, 张智, 卢敏敏, 等.  $Cd^{2+}$  胁迫对西瓜幼苗光合生理及活性氧代谢的影响. *核农学报*, 2010, 24(3): 389-393.
- [22] Halliwell B, Grootveld M, Cuttidge J M C. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biochemical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods of Biochemical Analysis*, 1988, 33(6): 59-90.
- [23] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Science*, 2000, 151(1): 59-66.
- [24] Rajjou L, Duval M, Gallardo K, *et al.* Seed germination and vigor. *Annual Review Plant Biology*, 2012, 63(3): 507-533.
- [25] Wu B, Zhang J H, Yang Q L, *et al.* Several chemical methods to break dormancy of *Aeluropus litoralis* seed. *Pratacultural Science*, 2015, 32(4): 601-605.  
吴波, 张进红, 杨秋玲, 等. 几种破除獐茅种子休眠的化学方法. *草业科学*, 2015, 32(4): 601-605.
- [26] Zimmer D, Kruse J, Baum C, *et al.* Spatial distribution of arsenic and heavy metals in willow roots from a contaminated flood plain soil measured by X-ray fluorescence spectroscopy. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(19): 4094-4100.
- [27] Wang J, Luo X G, Shi Y, *et al.* Manganese stress on seed germination and seedling growth of poke weed (*Phytolacca americana* L.). *Environmental Science & Technology*, 2014, 37(11): 47-52.  
王佳, 罗学刚, 石岩, 等. 锰胁迫对美洲商陆种子发芽及幼苗生长的影响. *环境科学与技术*, 2014, 37(11): 47-52.
- [28] Liu J F, Cui Y H, Wang R H. Effects of manganese on maize seed germination and physiological activities of seedlings. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2005, 11(2): 279-281.  
刘建凤, 崔彦宏, 王荣焕. 锰对玉米种子萌发及幼苗生理活性的影响. *植物营养与肥料学报*, 2005, 11(2): 279-281.
- [29] Sheokand S, Kumari A, Sawhney V. Effect of nitric oxide and putrescine on antioxidative responses under NaCl stress in chickpea plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2008, 14(4): 355-362.
- [30] Gegg M E, Beltran B, Salas-Pino S, *et al.* Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurons: implications for neuroprotection/neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 2003, 86(1): 228-237.
- [31] Liu W Y, Yang H W, Wei X H, *et al.* Effects of exogenous nitric oxide on seed germination, physiological characteristics and active oxygen metabolism of *Medicago truncatula* under NaCl stress. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(2): 85-95.  
刘文瑜, 杨宏伟, 魏小红, 等. 外源 NO 调控盐胁迫下蒺藜苜蓿种子萌发生理特性及抗氧化酶的研究. *草业学报*, 2015, 24(2): 85-95.
- [32] Ren L M, Liu P, Cai M Z, *et al.* Physiological response of *Polygonum hydropiper*, *Conyza canadensis*, *Polygonum perforatum* and *Phytolacca americana* to manganese toxicity. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2007, 21(3): 81-85.  
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. *水土保持学报*, 2007, 21(3): 81-85.
- [33] Poustini K, Siosemardeh A, Ranjbar M. Proline accumulation as a response to salt stress in 30 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salt tolerance. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2007, 54(5): 925-934.
- [34] Yang S, Xie P, Li G X, *et al.* Effects of manganese on proline biosynthesis and accumulation in sugarcane. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2016, 28(6): 915-921.  
杨善, 谢平, 李广翔, 等. 锰素对甘蔗脯氨酸合成积累的影响. *浙江农业学报*, 2016, 28(6): 915-921.

- [35] Parvanova D, Ivanov S, Konstantinova T, *et al.* Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2004, 42(1): 57-63.
- [36] Wang X, Peng Y H, Singer J W, *et al.* Seasonal changes in photosynthesis, antioxidant systems and ELIP expression in a thermonastic and non-thermonastic rhododendron species: A comparison of photoprotective strategies in overwintering plants. *Plant Science*, 2009, 177(6): 607-617.
- [37] Wang J M, Wang L G, Fan Y Z, *et al.* Physiological response and tolerance of three pteridophytes to soil by manganese contamination. *Journal of Fudan University: Natural Science*, 2016, 55(3): 397-403.  
汪结明, 王良桂, 樊亚珍, 等. 3种蕨类植物对锰污染土壤的耐受性及生理响应. *复旦学报: 自然科学版*, 2016, 55(3): 397-403.
- [38] Wang H H, Feng T, Peng X X, *et al.* Effects of manganese on antioxidant system of manganese hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(10): 2481-2486.  
王海华, 冯涛, 彭喜旭, 等. 锰对锰超积累植物美洲商陆抗氧化系统的影响. *应用生态学报*, 2009, 20(10): 2481-2486.