

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2022061302

刘佳, 黄哲旖, 胡馨月, 等. 微囊藻毒素与鱼腥藻毒素对生菜活性氧稳态的复合影响[J]. 环境化学, 2022, 41(11): 3738-3745.

LIU Jia, HUANG Zheyi, HU Xinyue, et al. Compound effects of microcystin and anatoxin on homeostasis of reactive oxygen species in lettuce[J]. Environmental Chemistry, 2022, 41 (11): 3738-3745.

微囊藻毒素与鱼腥藻毒素对生菜活性氧稳态的复合影响*

刘佳¹ 黄哲旖¹ 胡馨月¹ 梁婵娟^{1,2**}

(1. 江苏省厌氧生物技术重点实验室, 江南大学环境与土木工程学院, 无锡, 214122;
2. 江苏省水处理技术与材料协同创新中心, 无锡, 214122)

摘要 水体富营养化导致水体中蓝藻毒素浓度高于安全值. 为客观评价灌溉水中蓝藻毒素的生态风险, 本研究探讨了微囊藻毒素 (MCs) 和鱼腥藻毒素 (ANTXs) 对生菜生长和活性氧 (ROS) 稳态的复合影响. 采用 $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs、ANTXs 和 MCs+ANTXs ($(5+5) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $(100+100) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理生菜 7 d 后发现, 低浓度 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) MCs、ANTXs 或 MCs+ANTXs 促进生菜鲜重增加 63.3%—85.6%, 可能是低浓度毒素诱导 SOD 活性和总抗氧化能力 (FRAP) 上升以维持 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 平衡进而避免氧化损伤. 高浓度 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) MCs、ANTXs 或 MCs+ANTXs 抑制生菜生长, 降幅为 MCs(27.7%)>MCs+ANTXs(16.8%)>ANTXs(5.1%). 同时, MDA、 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量、NADPH 氧化酶活性及 *LsRbohA* 表达量、SOD 和 CAT 活性均升高, 增幅为 MCs>MCs+ANTXs>ANTXs, 而 FRAP 变化不一致. 推测高浓度藻毒素上调 *LsRbohA* 表达有助于增强 NADPH 氧化酶活性, 生成的 ROS 增多以刺激防御应激, 而 SOD 和 CAT 活性上升不足以维持 ROS 稳定, 导致氧化损伤而抑制生长. 进一步分析 MCs+ANTXs 对生菜中 ROS 稳态复合影响的作用特征发现, MCs+ANTXs ($5+5) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 MDA、 H_2O_2 、NADP 氧化酶与 CAT 活性影响呈现协同效应, 在 MCs+ANTXs ($100+100) \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下呈拮抗效应, 表明 MCs 和 ANTXs 对生菜 ROS 稳态的复合影响受毒素浓度的调控, 一定浓度的 ANTXs 共存减轻了 MCs 对生菜的氧化伤害, 为指导灌溉安全提供新的理论依据.

关键词 微囊藻毒素, 鱼腥藻毒素, NADPH 氧化酶, 抗氧化酶, 活性氧, 生菜.

Compound effects of microcystin and anatoxin on homeostasis of reactive oxygen species in lettuce

LIU Jia¹ HUANG Zheyi¹ HU Xinyue¹ LIANG Chanjuan^{1,2**}

(1. Jiangsu Province Key Laboratory of Anaerobic Biological Technology, School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi, 214122, China; 2. Jiangsu Cooperative Innovation Center of Technology and Material of Water Treatment, Wuxi, 214122, China)

Abstract The eutrophication of water leads to the increase of cyanobacteria toxin concentration in water. To objectively evaluate the ecological risk of cyanobacteria toxins in irrigation water, we studied compound effects of microcystin (MCs) and anatoxin (ANTXs) on growth and homeostasis of reactive oxygen species (ROS) in lettuce. After Hydroponic lettuce being treated with MCs

2022年6月13日收稿(Received: June 13, 2022).

* 国家自然科学基金(31971407, 31370517), 江苏省自然科学基金(BK20161131)和江苏省大学生实践创新项目(202110295053Z)资助.

Supported by The National Natural Science Foundation of China (31971407, 31370517), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20161131) and University Students Practice innovation Project of Jiangsu Province(202110295053Z).

** 通信联系人 **Corresponding author**, E-mail: liangchanjuan@jiangnan.edu.cn

(5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ or 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), ANTXs (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ or 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and MCs+ANTXs (5+5) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ or (100+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 7 d, we found that low concentration (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) of MCs, ANTXs or MCs+ANTXs increased fresh weight of lettuce by 63.3%—85.6%, indicating that the increase of SOD activity and total antioxidant capacity (FRAP) induced by low concentration of toxin can maintain H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$ balance and then avoid oxidative damage. However, high concentration (100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) of MCs, ANTXs or MCs+ANTXs inhibited lettuce growth, and the decreased degree of each treatment was MCs(27.7%)>MCs+ANTXs(16.8%)>ANTXs(5.1%). Meanwhile, MDA, H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$ contents, NADPH oxidase activity and *LsRbohA* expression, SOD and CAT activities were increased with the order for increased degree as MCs>MCs+ANTXs>ANTXs. In addition, FRAP showed different change among treatments. These results indicate that high concentration treatments up-regulated *LsRbohA* expression for contributing to enhancing NADPH oxidase activity to produce more ROS for stimulating defense systems. While the increase in SOD and CAT activities was not enough to maintain the stability of ROS, resulting in oxidative damage and inhibition on growth. Furthermore, characteristic analysis of compound effects of MCs+ANTXs on ROS homeostasis in lettuce showed that MCs+ANTXs (5+5) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ posed synergistic effects on MDA and H_2O_2 contents as well as NADPH oxidase and CAT activities in lettuce whereas MCs+ANTXs (100+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ showed antagonistic effects on them. It can be included that compound effects of MCs and ANTXs on homeostasis of ROS in lettuce was dependent on their concentrations, and the coexistence of ANTXs at a certain concentration could reduce the oxidative damage caused by MCs to lettuce, providing a new theoretical basis for guiding the safety of irrigation water.

Keywords microcystins, anatoxin, NADPH oxidase, antioxidant enzymes, reactive oxygen species, lettuce.

水体的富营养化加剧了蓝藻水华的频繁爆发. 这不但影响水体景观效果, 还会释放藻毒素, 严重威胁水生生态系统的稳定和公共卫生安全^[1]. 在众多藻毒素中, 微囊藻毒素 (microcystins, MCs) 是一种具有显著肝脏毒性的七肽环状毒素, 是世界各地水体中最为常见且危害最大的藻毒素. 微囊藻毒素-LR(MC-LR) 是 MCs 单体中分布最广毒性最强的一类, 世界卫生组织 (WHO) 规定其在饮用水中最高含量不得超过 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[2]. 鱼腥藻毒素 (anatoxin, ANTXs) 是一类毒性大、活性高的神经毒素, 不慎接触会导致人和动物迅速中毒死亡. 鱼腥藻毒素-a(ANTX-a) 是鱼腥藻毒素中含量最高的一种单体, 饮用水中最大安全剂量为 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[3]. 在蓝藻水华频发水域, 70% 以上监测水体中都同时检测到 MCs 与 ANTXs, 表明两种毒素时空共存已普遍存在, 且 MCs 或 ANTXs 浓度通常在 1—100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 极端状况下会在短时间内高达 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上^[4]. 这些藻毒素通过灌溉、溢流、打捞堆放、堆沤还田 (特别是蓝藻堆肥后施入农田) 等途径进入农田系统^[5-6]. 研究发现, MCs 被农作物吸收积累后, 不仅影响农作物生长发育, 如降低光合效率、破坏激素平衡、抑制抗氧化酶活性等^[7-8], 也会在植物可食部分积累并通过食物链传递威胁人体健康^[9-10]. 在调查 35 种农作物暴露于 MCs 的结果显示, MCs 残留量最高的是生菜 (*Lactuca sativa*)、欧芹 (*Petroselinum crispum*)、茴香 (*Foeniculum vulgare*) 和卷心菜 (*Brassica oleracea*) 等蔬菜, 其次是玉米 (*Zea mays*)、胡萝卜 (*Daucus carota*) 和小麦 (*Hordeum vulgare*) 等作物^[11]. 因而关于藻毒素的植物毒理学研究近年来也备受关注. 然而已有研究大多集中在 MCs 对植物生理生化代谢的影响, 关于 ANTXs 的研究多集中在水生植物^[12], 关于 MCs 和 ANTXs 对植物的复合影响却鲜有报道. 农作物在人类膳食结构中占有重要地位, 如能明确 MCs 和 ANTXs 对农作物的复合作用机制, 将为客观评价藻毒素的生态风险提供新依据, 也为保障食品安全提供新的数据.

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是植物有氧代谢中具有很强毒性的副产物, 主要包括过氧化氢 (H_2O_2)、超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 等^[13]. 作为信号分子, 逆境迫使植物细胞中积累大量 ROS 以诱导防御基因的表达, 进而调控植物对逆境的适应性. 同时大量积累的 ROS 会引发氧化损伤, 甚至导致细胞死亡^[14]. 因此, 逆境下植物维持胞内 ROS 稳态是提高植物耐受性的重要机制之一. 例如,

MCs 胁迫下水稻 (*Oryza sativa*) 中抗氧化酶清除 ROS 的能力强于黄瓜 (*Cucumis sativus*), 这也是水稻耐受 MCs 胁迫能力强于黄瓜的主要因素^[8]. 基于 ROS 水平与植物耐受环境胁迫机制的密切关系, 从活性氧稳态 (即产生与清除间的平衡) 的角度去理解 MCs 和 ANTXs 对植物生长影响的复合作用特征, 可为清晰植物耐受蓝藻毒素胁迫的适应机制提供新数据. 鉴于此, 本文选取广泛种植的生菜 (*Lactuca sativa*) 为研究对象, 以调控活性氧生成与去除的重要酶类为切入点, 探究 MCs 与 ANTXs 对生菜中活性氧稳态影响的内在机制, 为客观评价蓝藻毒素的生态风险提供新的数据.

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 藻毒素提取

本研究所采用的 MCs 和 ANTXs 均提取自蓝藻细胞. 用于提取微囊藻毒素 (MCs) 的新鲜蓝藻打捞自无锡太湖, 提取与分析方法参考文献 [9]. 通过酶联免疫 (ELISA) 测定总 MCs 浓度, 再通过高效液相色谱 (HPLC) 确定各 MC 变体占比 (其中 MC-LR、MC-RR 和 MC-YR 分别占 62.66%、28.48% 和 0.68%). 产生 ANTXs 的水华鱼腥藻 (FACHB-1255) 采购自中国科学院淡水藻种库 (FACHB), 提取与分析方法参考文献 [15]. 同样通过 ELISA 测定总 ANTXs 浓度, 再通过 HPLC 确定 ANTXs 各变体占比 (ANTX-a: HANTX-a=76.4%:23.6%).

1.2 植物培养与处理

将籽粒饱满的生菜 (*Lactuca sativa* L.) 种子用 0.1% HgCl₂ 去离子水浸泡 4 h, 在黑暗中发芽 (温度 20 °C; 相对湿度 70%). 待生菜长出两片真叶后移入含有营养液的 5 L 周转箱进行培养 (每箱 6 株), 培养条件为光强为 350 μmol·m⁻²·s⁻² (日/夜: 14 h/10 h), 温度为 25 °C/18 °C (日/夜), 相对湿度 80%. 营养液每 7 天更换 1 次, 培养 30 d 后处理. 参考自然水体中 MCs 与 ANTXs 出现频率较高的环境浓度范围, 将培养成熟的生菜移至含不同浓度 MCs、ANTXs 及 MCs+ANTXs 的营养液中进行处理. 实验对照 (CK, 营养液中无藻毒素), 单一 MCs 处理 (营养液中 MCs 浓度分别为 5 μg·L⁻¹ 和 100 μg·L⁻¹), 单一 ANTXs 处理 (营养液中 ANTXs 浓度分别为 5 μg·L⁻¹ 和 100 μg·L⁻¹) 和 MCs+ANTXs 复合处理 (营养液中 MCs 和 ANTXs 浓度为 (5+5) μg·L⁻¹ 和 (100+100) μg·L⁻¹). 每处理重复 3 次, 处理 7 d 后收获.

1.3 指标测定

采用电子天平测量生菜生物量. 参考张清航等^[16]的方法测定植物体内 MDA 含量, 采用硫酸钛法测定 H₂O₂ 含量^[17] 和羟氨氧化法测定 O₂⁻ 含量^[18]. 参照关美艳^[19]的方法测定 NADPH 氧化酶活性. 采用 Zhang 等^[20]的方法进行 *LsRbohA* 引物设计和扩增程序, 基因相对表达量采用 2-ΔΔCT 法进行计算. 采用 FRAP 法测定植株的总抗氧化能力^[21]. SOD 和 CAT 活性的测定参考顾艳芳等^[22]的方法并稍作改动. MCs 和 ANTXs 对生菜的复合影响作用使用 Abotts 公式^[23]进行具体评估.

$$C_{\text{exp}} = A + B - \frac{A \times B}{100} \quad (1)$$

$$\text{RI} = \frac{C}{C_{\text{exp}}} \quad (2)$$

其中, A 是单一 MCs 引起生菜指标的抑制程度; B 是单一 ANTXs 引起生菜指标的抑制程度; C 是 MCs+ANTXs 复合处理引起生菜指标的抑制程度; C_{exp} 是预期抑制率; RI 为抑制比率.

1.4 数据处理

所有数据均以 3 次独立试验的平均值±标准误差 (Mean±SD) 表示. 采用 Levene 检验分析各组方差的同质性, 组间差异通过 LSD 检验的单因素方差进行评估 ($P < 0.05$).

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 MCs 与 ANTXs 对生菜生物量、丙二醛与活性氧含量的复合影响

实验中以生物量 (FW) 表征生菜生长情况, 以丙二醛 (MDA) 含量衡量植物氧化损伤程度^[24], 结合

ROS 中重要成员 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量变化, 探究 MCs 与 ANTXs 对生菜中 ROS 稳态的影响. 如表 1 所示, 与 CK 相比, 低浓度 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) MCs、ANTXs 及 MCs+ANTXs($5+5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 复合处理分别促进生菜生物量增加 75.3%、85.6% 和 63.3% ($P<0.05$), 其中 MCs+ANTXs($5+5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组生物量低于单一 MCs($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 或 ANTXs($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). 同时, 低浓度 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) MCs 或 ANTXs 对叶片中 MDA、 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量无显著影响 ($P>0.05$), 其中 MCs+ANTXs($5+5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 复合处理诱导 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量小幅上升且 MDA 含量略高于 CK ($P<0.05$). 综上结果可知, 低浓度 MCs、ANTXs 及 MCs+ANTXs 复合处理促进生菜生长, 呈现 Hormesis 效应. 这种低浓度毒素促进作用可能与刺激植物体内生长促进型激素 (生长素 IAA、玉米素 ZT 和赤霉素 GA_3) 含量升高有关^[25]. 此外, 低浓度毒素未引起生菜活性氧大量积累, 也未引起脂膜过氧化损伤, 表明此时毒素胁迫强度未超出生菜的自调节范围, 这也可能是生菜生长仍能正常进行的又一原因. 与低浓度处理不同, 高浓度 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) MCs 与 MCs+ANTXs($100+100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 复合处理降低生菜生物量达 27.7%、5.1% 和 16.8% ($P<0.05$), 其中高浓度 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ANTXs 对生菜生物量无明显影响 ($P>0.05$), 这可能与毒素本身的理化性质, 如分子量、作用方式以及毒性差异等原因有关^[26]. Ariel 等^[12] 发现 ANTX-a 浓度高达 $5000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时才会严重抑制品藻的生长. 高浓度 MCs、ANTXs 及 MCs+ANTX 处理导致叶片中 MDA、 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量显著增加 ($P<0.05$), 其中 MDA、 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量增幅排序为 MCs>MCs+ANTXs>ANTXs. 以上结果说明 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 或 ANTXs 诱导了 ROS 含量升高而导致脂膜损伤, 这可能是导致高浓度 MCs 和 MCs+ANTX 抑制生菜生长的原因之一. 其中高浓度 MCs+ANTXs 抑制生菜生长的程度低于单一 MCs, 可能与 MCs+ANTXs 诱导生菜中产生 ROS 含量低于单一 MCs 有关. 前期研究也发现 MCs 对植物细胞中 ROS 平衡的影响程度受 MCs 浓度、暴露时间以及植物种类等因素调节, 可以反映植物耐受 MCs 的能力^[8]. 结合生物量、ROS 水平和 MDA 分析, 生菜能够耐受低浓度 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 毒素胁迫, 但不能耐受高浓度 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 胁迫, 且对高浓度 MCs+ANTXs 复合胁迫的耐受性强于单一 MCs 却弱于单一 ANTXs, 这可能与维持细胞内活性氧稳定的能力有关.

表 1 MCs 和 ANTXs 对生菜生物量、MDA、 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量的复合影响

Table 1 Combined effects of MCs and ANTXs on biomass and contents of MDA, H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ in lettuce leaves

处理组 Treatments	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Concentration	FW/g	MDA/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW})$	$H_2O_2/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW})$	$O_2^{\cdot-}/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW})$
CK	0	20.772±1.292c	0.74±0.06d	6.27±0.74e	4.18±0.07c
MCs	5	36.415±1.290a	0.75±0.06d	5.50±0.44e	4.25±0.14c
	100	15.093±0.791d	1.57±0.13a	15.83±0.66a	10.71±0.98a
ANTXs	5	38.552±0.888a	0.73±0.12d	5.47±0.29e	4.86±0.11c
	100	19.720±1.764c	1.24±0.10b	10.06±0.61c	8.57±0.53b
MCs+ANTX	5+5	33.913±1.158b	0.89±0.03c	8.83±1.00d	4.78±0.26c
	100+100	17.283±0.983d	1.37±0.08b	11.31±0.47b	8.97±0.49b

注: 不同字母表示各处理组间差异显著 ($P<0.05$). Note: Different letters represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

2.2 MCs 与 ANTXs 对生菜叶中活性氧生成的复合影响

质膜上的 NADPH 氧化酶是植物细胞活性氧产生的主要酶之一^[27], 它能够将 O_2 催化成 $O_2^{\cdot-}$, 因此可用来表征植物 ROS 生成能力^[28]. *LsRbohA* 是编码生菜 NADPH 氧化酶的关键基因. 与 CK 相比, 低浓度 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) MCs 或 ANTXs 处理对生菜叶片中 NADPH 氧化酶活性及 *LsRbohA* 相对表达量均无显著影响 ($P>0.05$) (图 1), MCs+ANTXs 复合处理显著提高了 NADPH 氧化酶活性, *LsRbohA* 的相对表达量上调 137.8% ($P<0.05$). 这表明低浓度 MCs 或 ANTXs 对生菜叶中 ROS 的生成无影响, 这是生菜叶片中 ROS 维持稳态的原因之一. 而低浓度 ($5+5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) MCs+ANTXs 复合下生菜叶片中 *LsRbohA* 表达量的上调可能是 NADPH 氧化酶活性上升的原因之一. 结合生菜生物量、ROS 含量和 MDA 含量 (表 1) 分析可知, 低浓度 MCs+ANTXs 复合处理通过促进 NADPH 氧化酶活性诱导 ROS 生成增多, 促使防御系统及时对外界环境变化做出适应性应激, 避免氧化损伤而不影响植物生长^[29]. 高浓度 MCs、ANTXs 和 MCs+ANTXs 复合处理显著上调 *LsRbohA* 表达 272%—657%, 且诱导 NADPH 氧化酶活性上升 ($P<0.05$),

其中酶活性增幅排序为 MCs>MCs+ANTXs>ANTXs. 表明高浓度 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)MCs、ANTXs 和 MCs+ANTXs 复合处理下生菜叶片中 *LsRbohA* 表达量大幅上升, 合成酶蛋白增多, 这可能是 NADPH 氧化酶活性上升的原因之一. NADPH 氧化酶催化生成大量 ROS, 促发防御系统应激, 但仍无法抵御高浓度毒素的伤害, 最终引起氧化损伤而抑制生长 (表 1). Pérez 等^[30] 也发现, NADPH 氧化酶是植物响应非生物胁迫下初始 ROS 升高的主要原因之一. 同时 H_2O_2 可以诱导 NADPH 氧化酶基因 *Rboh* 表达^[28], 这是植物遭受非生物逆境的威胁时, 信号分子 H_2O_2 启动一系列抗逆相关基因表达来缓解或抵御非生物逆境胁迫对植物造成的危害^[31-32]. 因而本实验中高浓度 MCs+ANTXs 复合处理下生菜 NADPH 氧化酶活性高于单一 ANTXs 却低于 MCs, 这可能是 MCs+ANTXs 处理组生菜中 ROS 含量高于单一 ANTXs 而低于单一 MCs 的主要因素之一.

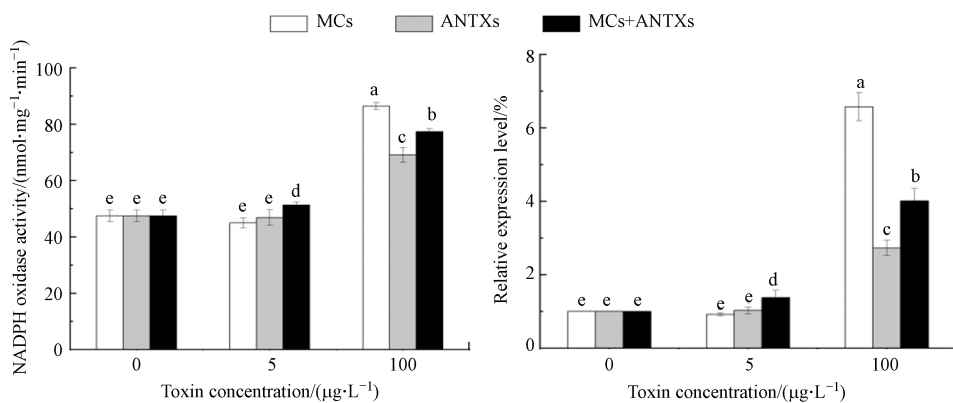


图 1 MCs 和 ANTXs 对生菜 NADPH 氧化酶活性和 *LsRbohA* 基因表达的复合影响
注: 不同字母表示各处理组间差异显著 ($P<0.05$)

Fig.1 Combined effects of MCs and ANTXs on NADPH oxidase activity and expression of *LsRbohA* in lettuce Note: Different letters represent significant differences between treatments ($P<0.05$)

2.3 MCs 与 ANTXs 对生菜活性氧清除能力的复合影响

植物细胞中 ROS 平衡也受抗氧化系统的调节. SOD 作为植物抗氧化系统的第一道防线, 将胁迫诱导的过量 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 歧化为 H_2O_2 和 O_2 . H_2O_2 在第二道防线 CAT 的催化下分解为 H_2O 和 O_2 . 考虑到植物拥有众多抗氧化酶类和非酶类, 将抗氧化酶活性与总抗氧化能力 (FRAP) 结合能更全面地反映植物细胞清除 ROS 的能力^[21]. 如图 2 所示, 与 CK 相比, 低浓度 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)MCs、ANTXs 和 MCs+ANTXs ($5+5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 复合处理显著提高生菜的 FRAP ($P<0.05$), 促进 SOD 活性上升 (除单一 ANTXs 处理组外), 而对 CAT 活性无显著影响 ($P>0.05$). 表明低浓度毒素处理组诱导 SOD 活性和 FRAP 上升, 维持胞内 ROS 稳定. 低浓度毒素处理下第二道防线的 CAT 未应激启动再次证实, 该强度胁迫未超出生菜耐受范围. 高浓度 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)MCs、ANTXs 和 MCs+ANTXs 显著促进生菜叶片中的 SOD 和 CAT 活性上升 ($P<0.05$), 增幅排序为 MCs>MCs+ANTXs>ANTXs. 生菜叶片的 FRAP 变化却不尽一致, 在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MCs 处理下降低 ($P<0.05$), 在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ANTXs 处理下上升 ($P<0.05$), 而在 MCs+ANTXs ($100+100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理下无显著变化 ($P>0.05$). 结合 FW、MDA 和 ROS 含量变化 (表 1) 分析发现, 高浓度 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 毒素促发 SOD 和 CAT 活性升高不足以清除过量生成的 ROS, 胞内 ROS 稳态被破坏, 氧化损伤发生, 这也是生长受抑制的原因之一. 不同高浓度毒素处理下生菜 FRAP 变化不一致, 这可能是由于植物体内抗氧化酶类和非酶类对不同毒素胁迫的响应程度有差异. 例如酸雨胁迫下水稻幼苗 SOD、CAT 和脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 活性增加, 而抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性降低^[33-34]. 此外, 酚类和类黄酮物质也属于植物的非酶抗氧化剂防御系统的成员, 其含量或状态变化也会影响细胞总抗氧化能力^[35]. 因此, 生菜叶中 SOD、CAT 和 FRAP 对高浓度 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) MCs、ANTXs 和 MCs+ANTXs 处理响应存在差异, 其中较高的 SOD 和 CAT 活性及 FRAP 有助于缓解高浓度毒素诱导的 ROS 过量积累, 对维持 ROS 稳态有利, 这也许是 MCs+ANTXs 组 ROS 含量高于单一 ANTXs 而低于单一 MCs 的又一原因.

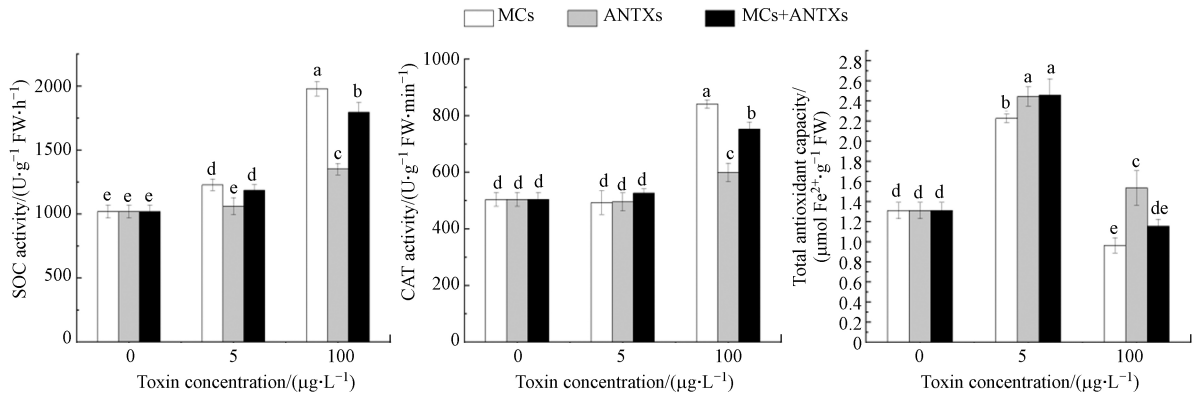


图2 MCs 和 ANTxs 对生菜 SOD 活性和 CAT 活性及总抗氧化能力的复合影响

注: 不同字母表示各处理组间差异显著 ($P<0.05$)

Fig.2 Combined effects of MCs and ANTxs on total antioxidant capacity, SOD and CAT activities in lettuce Note: Different letters represent significant differences between treatments ($P<0.05$)

2.4 MCs 与 ANTxs 对生菜活性氧稳态影响的复合作用特征分析

两种不同污染物对受试生物的影响可能呈现独立作用、协同作用、加和作用或者拮抗作用. 为客观评价 MCs 和 ANTxs 对生菜活性氧稳态的复合影响, 分析了 MCs+ANTxs 对生菜 ROS 稳态相关指标复合影响的特征 (表 2). 当 RI 值>1 时, 呈现协同效应; RI=1, 呈现加和效应; RI<1, 则呈现拮抗效应^[36].

表 2 MCs 和 ANTxs 对生菜 ROS 稳态影响的复合作用特征分析

Table 2 Characteristic analysis on combined effects of MCs and ANTxs on homeostasis of ROS in lettuce

指标 Index	MCs/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	A/%	ANTxs/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	B/%	MCs+ANTxs/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	C/%	$C_{\text{exp}}/\%$	RI
FW	5	-75.31	5	-85.60	5+5	-63.27	-225.36	0.28*
	100	27.34	100	5.06	100+100	16.80	31.02	0.54*
MDA	5	-2.22	5	1.31	5+5	-28.44	-0.88	32.44*
	100	-113.39	100	-68.59	100+100	-85.52	-259.74	0.33*
H_2O_2	5	12.24	5	12.77	5+5	-40.95	23.45	-1.75*
	100	-152.58	100	-60.54	100+100	-80.44	-305.49	0.26*
$\text{O}_2^{\cdot-}$	5	-1.63	5	-16.11	5+5	-14.13	-18.01	0.79*
	100	-155.90	100	-104.75	100+100	-114.31	-423.96	0.27*
NADPH	5	5.25	5	1.38	5+5	-8.09	6.56	-1.23*
	100	-81.90	100	-45.44	100+100	-62.80	-164.55	0.38*
SOD	5	-20.59	5	-4.22	5+5	-16.42	-25.67	0.64*
	100	-94.40	100	-32.65	100+100	-76.28	-157.86	0.48*
CAT	5	2.18	5	1.72	5+5	-4.43	3.87	-1.15*
	100	-66.98	100	-18.99	100+100	-49.37	-98.69	0.50*
FRAP	5	-70.13	5	-86.76	5+5	-87.78	-217.73	0.40*
	100	26.41	100	-17.14	100+100	11.89	13.80	0.86*

注: 数据为平均值±标准误差, *代表与1之间的显著性($P<0.05$).

Note: The data is denoted as mean±standard deviation, * represents the significance between RI and 1 ($P<0.05$).

如表 2 所示, MCs+ANTxs(5+5) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 MDA 含量、 H_2O_2 、NADPH 氧化酶与 CAT 活性抑制比率 RI 值均显著>1, 呈现协同效应; 而 MCs+ANTxs(100+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 MDA 含量、 H_2O_2 、NADPH 氧化酶与 CAT 活性抑制比率 RI 值均显著<1, 呈现拮抗效应. 表明随着 MCs 和 ANTxs 浓度升高, 两者间复合作用特征由协同作用转为拮抗作用. Wang 等^[36] 研究发现低浓度 MC-LR 和多环芳烃 (菲) 对浮萍生长和抗氧化系统产生协同作用, 而高浓度呈现拮抗或加和作用. 因此, MCs 与 ANTxs 对生菜生长与 ROS 稳态的复合作用特征受毒素浓度的影响. 其中, MCs+ANTxs(100+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对以上所有参数的抑制比

率(RI)均 <1 ,表明高浓度 MCs+ANTXs 对生菜复合作用特征主要呈拮抗效应,这与 Li 等研究结果一致^[37],他们也发现 MC-LR 和 ANTX-a 对苦草生长和蛋白质的复合作用呈现拮抗效应.这与 MCs 或 ANTXs 进入细胞存在竞争有关,也可能与铜绿微囊藻与水华鱼腥藻之间存在竞争关系有关.例如在共培养的条件下,水华鱼腥藻对铜绿微囊藻有显著的抑制作用^[38].以上可以推测,水体中一定浓度的 ANTXs 可以减轻 MCs 对生菜的氧化伤害.

3 结论(Conclusion)

(1) 低浓度 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)MCs、ANTXs 与 MCs+ANTXs 诱导生菜中 SOD 活性和总抗氧化能力 (FRAP) 上升,利于维持 ROS 平衡,避免了氧化损伤,促进生物量增加 63.3%—85.6%,表明低浓度 ($5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)MCs、ANTXs 和 MCs+ANTXs 对生菜生长有利.

(2) 高浓度 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)MCs、ANTXs 与 MCs+ANTXs 上调生菜叶片中 *LsRbohA* 表达并提高 NADPH 氧化酶活性,生成大量 ROS 促发防御系统应激,而 SOD 和 CAT 活性的上升不足以清除大量 ROS,诱发氧化损伤而抑制生菜生长,降幅为 MCs(27.7%)>MCs+ANTXs(16.8%)>ANTXs(5.1%).

(3) 复合特征分析发现,MCs+ANTXs($5+5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)对 MDA 含量、 H_2O_2 、NADP 氧化酶与 CAT 活性影响呈现协同效应,而 MCs+ANTXs($100+100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)则呈现拮抗效应.表明 MCs+ANTXs 对生菜复合作用受毒素浓度的影响,高浓度 ANTXs 共存在一定程度上减轻了 MCs 对生菜的氧化伤害.

参考文献 (References)

- [1] ZHANG Y F, LIANG J, ZENG G M, et al. How climate change and eutrophication interact with microplastic pollution and sediment resuspension in shallow lakes: A review [J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 705: 135979.
- [2] INGRID C, MARTIN W. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management [M]. CRC Press, 2021.
- [3] RELLÁN S, OSSWALD J, SAKER M, et al. First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47(9): 2189-2195.
- [4] SVIRČEV Z, LALIĆ D, BOJADŽIJA SAVIĆ G, et al. Global geographical and historical overview of cyanotoxin distribution and cyanobacterial poisonings [J]. *Archives of Toxicology*, 2019, 93(9): 2429-2481.
- [5] CHEN W, JIA Y L, LI E H, et al. Soil-based treatments of mechanically collected cyanobacterial blooms from Lake Taihu: Efficiencies and potential risks [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(24): 13370-13376.
- [6] AI Y H, LEE S, LEE J. Drinking water treatment residuals from cyanobacteria bloom-affected areas: Investigation of potential impact on agricultural land application [J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 706: 135756.
- [7] LIANG C J, WANG W M, WANG Y. Effect of irrigation with microcystins-contaminated water on growth, yield and grain quality of rice (*Oryza sativa*) [J]. *Environmental Earth Sciences*, 2016, 75(6): 1-10.
- [8] GU Y F, LIANG C J. Responses of antioxidative enzymes and gene expression in *Oryza sativa* L and *Cucumis sativus* L seedlings to microcystins stress [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 193: 110351.
- [9] ZHU J Z, REN X Q, LIU H Y, et al. Effect of irrigation with microcystins-contaminated water on growth and fruit quality of *Cucumis sativus* L. and the health risk [J]. *Agricultural Water Management*, 2018, 204: 91-99.
- [10] LIANG C J, MA X D, LIU H Y. Effect of microcystins at different rice growth stages on its yield, quality, and safety [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(11): 13942-13954.
- [11] ZHANG Y Y, WHALEN J K, SAUVÉ S. Phytotoxicity and bioconcentration of microcystins in agricultural plants: Meta-analysis and risk assessment [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 272: 115966.
- [12] KAMINSKI A, BOBER B, CHRAPUSTA E, et al. Phytoremediation of anatoxin-a by aquatic macrophyte *Lemna trisulca* L [J]. *Chemosphere*, 2014, 112: 305-310.
- [13] LIN Y F, LIN H T, ZHANG S, et al. The role of active oxygen metabolism in hydrogen peroxide-induced pericarp browning of harvested longan fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2014, 96: 42-48.
- [14] 孙亮亮. 镧对拟南芥种子萌发和早期根系发育影响的生理与分子机制研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2018.
SUN L L. Physiological and molecular mechanisms of La on seed germination and early root development of *Arabidopsis thaliana* [D]. Taihu: Shanxi Agricultural University, 2018(in Chinese).
- [15] MARTENS S. Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis [J]. *Advances in Oceanography and Limnology*, 2017, 8(2): 242.
- [16] 张清航, 张永涛. 植物体内丙二醛(MDA)含量对干旱的响应 [J]. *林业勘查设计*, 2019(1): 110-112.

- ZHANG Q H, ZHANG Y T. Study on response to drought stress of MDA content in plants [J]. *Forest Investigation Design*, 2019(1): 110-112(in Chinese).
- [17] 曹翠玲, 麻鹏达. 植物生理学教学实验指导 [M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2016.
- CAO C L, MA P D. Experimental Study on plant Physiology teaching [M]. Yangling: Northwest A&F University Press, 2016(in Chinese).
- [18] KUMAR A, PRASAD M N V, MOHAN MURALI ACHARY V, et al. Elucidation of lead-induced oxidative stress in *Talinum triangulare* roots by analysis of antioxidant responses and DNA damage at cellular level [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(7): 4551-4561.
- [19] 关美艳. 一氧化氮清除系统在拟南芥应答镉胁迫过程中的作用及其机制 [D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- GUAN M Y. The mechanisms of nitric oxide scavenging systems in regulating *Arabidopsis* response to cadmium stress [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018(in Chinese).
- [20] ZHANG B J, BU J J, LIANG C J. Regulation of nitrogen and phosphorus absorption by plasma membrane H⁺ ATPase in rice roots under simulated acid rain [J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2017, 14(1): 101-112.
- [21] STOJNIC S, KOVAČEVIĆ B, KEBERT M, et al. Genetic differentiation in functional traits among wild cherry (*Prunus avium* L.) half-sib lines [J]. *Journal of Forestry Research*, 2022, 33(3): 991-1003.
- [22] 顾艳芳, 邓媛, 梁婵娟. 微囊藻毒素对黄瓜幼苗抗氧化酶及其同工酶的影响 [J]. 环境化学, 2020, 39(12): 3402-3409.
- GU Y F, DENG Y, LIANG C J. Effect of microcystins on antioxidative enzymes activities and isozymes pattern in cucumber seedlings [J]. *Environmental Chemistry*, 2020, 39(12): 3402-3409(in Chinese).
- [23] CAO Q, STEINMAN A D, WAN X, et al. Combined toxicity of microcystin-LR and copper on lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. *Chemosphere*, 2018, 206: 474-482.
- [24] RASTOGI R P, SINHA R P, INCHAROENSAKDI A. The cyanotoxin-microcystins: Current overview [J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2014, 13(2): 215-249.
- [25] LIANG C J, LIU H Y. Response of hormone in rice seedlings to irrigation contaminated with cyanobacterial extract containing microcystins [J]. *Chemosphere*, 2020, 256: 127157.
- [26] CHRISTENSEN V G, KHAN E. Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin [J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 736: 139515.
- [27] 杨颖丽, 安黎哲, 张立新. NaCl对小麦根质膜NADPH氧化酶活性的影响 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(12): 2463-2467.
- YANG Y L, AN L Z, ZHANG L X. NaCl effect on plasmalemma NADPH oxidase activity of wheat roots [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, 26(12): 2463-2467(in Chinese).
- [28] 张腾国, 赖晶, 李萍, 等. 不同处理下油菜RbohA、RbohD基因的表达特性分析 [J]. 生态学杂志, 2019, 38(1): 173-180.
- ZHANG T G, LAI J, LI P, et al. Expression analysis of RbohA and RbohD genes in *Brassica campestris* under different treatments [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2019, 38(1): 173-180(in Chinese).
- [29] ZHANG J Z, WANG L H, ZHOU Q, et al. Reactive oxygen species initiate a protective response in plant roots to stress induced by environmental bisphenol A [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 154: 197-205.
- [30] PÉREZ-CHACA M V, RODRÍGUEZ-SERRANO M, MOLINA A S, et al. Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in *Glycine max* (L.) roots [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2014, 37(7): 1672-1687.
- [31] SHABIR H, VINAY K, VARSHA S, et al. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Crop Journal*, 2016, 4(3): 162-176.
- [32] 朱婷婷, 王彦霞, 裴丽丽, 等. 植物蛋白激酶与作物非生物胁迫抗性的研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(4): 763-770.
- ZHU T T, WANG Y X, PEI L L, et al. Research progress of plant protein kinase and abiotic stress resistance [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2017, 18(4): 763-770(in Chinese).
- [33] LIANG C J, ZHANG Y Q, REN X Q. Calcium regulates antioxidative isozyme activity for enhancing rice adaption to acid rain stress [J]. *Plant Science*, 2021, 306: 110876.
- [34] MA Y J, REN X Q, LIANG C J. Exogenous Ca²⁺ enhances antioxidant defense in rice to simulated acid rain by regulating ascorbate peroxidase and glutathione reductase [J]. *Planta*, 2021, 254(2): 41-44.
- [35] CHRISTINE H F, GRAHAM N. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria [J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 119(3): 355-364.
- [36] WANG Z, ZHANG J Q, LI E H, et al. Combined toxic effects and mechanisms of microcystin-LR and copper on *Vallisneria Natans* (Lour.) Hara seedlings [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 328: 108-116.
- [37] LI Q, GU P, ZHANG C, et al. Combined toxic effects of anatoxin-a and microcystin-LR on submerged macrophytes and biofilms [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 389: 122053.
- [38] 张雪薇. 铜绿微囊藻与水华鱼腥藻种间竞争机制的初步研究 [D]. 南京: 南京大学, 2012.
- ZHANG X W. The preliminary study of the mechanism of competition between *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae* [D]. Nanjing: Nanjing University, 2012(in Chinese).