

复合胁迫下茭白体内镉、铅的亚细胞分布和植物络合素的合成

黄凯丰^{1,2}, 江解增^{1*}

(1. 扬州大学水生蔬菜研究室, 江苏扬州 225009; 2. 贵州师范大学生命科学学院植物遗传育种研究所, 贵阳 550001)

摘要: 以茭白 (*Zizania latifolia* Turcz.) 的单季茭品种‘蒋墅茭’和双季茭品种‘蒋红早’为试材, 进行 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的单一及复合胁迫处理, 测定了茭白根系和叶片中的非蛋白巯基 (NPT)、谷胱甘肽 (GSH)、植物络合素 (PCs) 的含量, 同时测定了茭白植株各亚细胞组分中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的积累量, 以探讨茭白对重金属镉、铅胁迫的耐性机理。结果表明: Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的单一及其复合胁迫均能促进两茭白品种根系和叶片中 NPT、GSH、PCs 的含量及茭白各亚细胞组分中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 积累量的显著增加; 复合胁迫时两茭白品种的 NPT、GSH、PCs 含量及各亚细胞组分中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的积累量均高于单一胁迫, 茭白的不同部位间, 以根系中的 NPT、GSH、PCs 含量显著高于叶片; 茭白各亚细胞组分中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的积累量表现为: 细胞壁高于原生质体, 而可溶性部分高于细胞器。

关键词: 茭白; 胁迫; 植物络合素; 亚细胞组分; 耐性机理

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2011)04-0502-05

Sub-cellular Fraction of Heavy Metals and Production of Phytochelatins in *Zizania latifolia* Exposed to Cadmium and Lead

HUANG Kai-Feng^{1,2}, JIANG Jie-Zeng^{1*}

(1. Institute of Aquatic Vegetable Research, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China;

2. Institute of Plant Genetics and Breeding, School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: A single-harvested cultivar, ‘Jiangshujiao’, and a double-harvested cultivar, ‘Fenghongzao’, of *Zizania latifolia* were used as experimental materials to determine the content of non-protein-thiols (NPT), glutathione (GSH), and phytochelatins (PCs). To clarify the tolerance mechanism of *Zizania latifolia* to Cd^{2+} and Pb^{2+} stress, accumulation of Cd^{2+} and Pb^{2+} in subcellular fractions were also investigated. The results showed that content of NPT, GSH, and PCs and the accumulation of Cd^{2+} and Pb^{2+} in subcellular fractions increased significantly when treated with Cd^{2+} and Pb^{2+} stress. Content was higher when treated with combined stress than single stress. Content of NPT, GSH and PCs were significantly lower in leaves than in roots. The cell wall and the soluble fraction of cells had higher Cd^{2+} and Pb^{2+} accumulation levels than the protoplast and the organelles, respectively.

Key words: *Zizania latifolia*; Stress; Phytochelatins; Sub-cellular fraction; Tolerance mechanism

在重金属污染胁迫下, 植物会启动多种不同的防御机制来降低重金属离子对细胞的毒害。其中, 通过生物合成一种或几种配体化合物, 在细胞内络合重金属并以复合物的形式进行区域化隔离, 是在植物和其它一些生物中普遍存在的重金属解毒机

制^[1]。植物络合素 (phytochelatins, 简称 PCs) 是一种富含半胱氨酸的多肽物质, 其主要生理功能是络合金属 (植物微量营养和非必需重金属) 元素, 从而减轻或避免过量金属离子对植物体的伤害。除此之外, 植物体内的谷胱甘肽 (GSH)、非蛋白巯基

收稿日期: 2011-04-11, 修回日期: 2011-06-21。

基金项目: 国土资源部与江苏省政府合作项目 [(2003)019-01]。

作者简介: 黄凯丰 (1979-), 男, 副教授, 博士, 从事污染生态学研究 (E-mail: hkf1979@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: jzjiang@yzu.edu.cn)。

(NPT)也可能是植物消除重金属镉胁迫的主要成分之一,在非超积累植物对重金属的耐性中起着重要的作用^[2]。近年来,关于重金属离子在植物组织不同组分中分布的研究日益增多,同时,对重金属在细胞内的分布也有大量报道,且因植物对重金属耐性的差异而有不同。 Cd^{2+} 超积累植物天蓝遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens* L.)中绝大多数 Cd^{2+} 都位于细胞壁上^[3]。在许多植物中,相对高含量的 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 分布在细胞壁上^[4]。由此可见,细胞壁在植物的重金属耐性中起着重要作用。

前期通过对生长指标^[5]、生理生化指标^[6,7]、保护酶^[5]、DNA 伤害^[8]等方面的研究,发现茭白(*Zizania latifolia* Turcz.)对重金属镉、铅胁迫的耐性较强,本试验在此基础上进一步研究 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 及其复合胁迫处理下茭白体内镉、铅的亚细胞分布及植物络合素的合成,以探讨茭白对重金属污染的耐性机理,期望为我国特色水生蔬菜茭白的安全生产提供部分理论依据。

1 材料与方法

1.1 种植管理

试验于扬州大学水生蔬菜试验水池中进行。2007年4月24日,将取自扬州大学水生蔬菜试验田的土壤(Cd^{2+} 含量0.16 mg/kg; Pb^{2+} 含量0.17 mg/kg, pH 7.54)按20 cm的厚度,铺设到每个水泥池中,每个水池长1.5 m、宽1 m、深0.5 m,各水池以无机肥(N:P:K=15:15:15的三元复合肥)50 kg/667m²做基肥,灌水至30 cm,并在试验过程中通过不断灌自来水以保持该水位。试验材料为茭白(*Zizania latifolia* Turcz.)的单季茭品种‘蒋墅茭’和双季茭品种‘葑红早’。5月13日,选择大田中上年种植的、具有典型种性的茭墩分墩移栽,每墩带有3~5支新生分蘖并有少量老墩,均匀栽植于水池中,间距为30 cm×35 cm,每池中均栽种两个品种茭白各6墩,品种间用滤网分隔。

待茭白植株返青成活、长出新叶后,于5月25日,参考前期试验的研究结果^[5,8],按土壤和水的总体积为标准设置重金属浓度, Cd^{2+} :100 mg/L(以Cd 100表示); Pb^{2+} :1000 mg/L(以Pb 1000表示)、 Cd^{2+} - Pb^{2+} 复合污染(Cd^{2+} 100 mg/L、 Pb^{2+} 1000 mg/L,以Cd-Pb表示),向池中均匀投放高浓度的 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (分析

纯)母液,搅拌均匀,设空白对照,3次重复。保持水池中的水位,水池上方2.5~3.5 m覆盖塑料薄膜,以防雨水渗入。

1.2 样品处理及测定

于2007年6月2日,在各处理小区中随机选择长势较强的典型茭白植株及各处理植株的倒三片(以顶叶起)功能叶片及其白色根系,用蒸馏水冲洗干净后再用去离子水冲洗,吸干表面的水珠,剪碎混匀。

非蛋白巯基的测定参照Rama和Prasad的方法^[9]并略作修改:取液氮保存的茭白叶片和根系各1.00 g,分别加2.0 mL 5%(V/V)碘基水杨酸,再加入少许洗净的石英砂研磨混匀,冰浴30 min,在8000 g 4℃下离心15 min。取上清液200.0 μL 放入5 mL离心管中,加0.2 mmol/L的Tris-HCl 2.0 mL (pH 8.2)和10 mmol/L的2-硝基苯甲酸(DTNB) 0.15 mL,室温下放置20 min,然后在412 nm波长下用分光光度计比色测定。以等量的未加DTNB的溶液作空白调零点,用GSH作标准。

谷胱甘肽含量的测定参照文献^[10]的方法:取液氮保存的茭白叶片和根系各4.00 g,分别加2 mL 0.3 mol/L醋酸汞和2 mL 30%醋酸钠,研磨,将匀浆转移到离心管中,静置10 min,弃去上清液,向沉淀中加入1 mol/L盐酸10 mL,搅拌5 min后加入20%的碘化钾溶液1 mL,混匀,离心。用1 mmol/L碘酸钾滴定,直至出现不消失的蓝色为止。1 mL 1 mmol/L的碘酸钾相当于0.307 mg谷胱甘肽。

植物络合素含量的测定参考Keltjens和Beusichem的方法^[11]:植物络合素(PCs)=非蛋白巯基总量(NPT)-谷胱甘肽含量(GSH)。

茭白植株亚细胞成分的分离参考刘鸿先等的方法^[12]略作修改:在所取茭白样品中,加入提取介质20 mL (0.3 mol/L 甘露醇,1 mmol/L EDTA,20 mmol/L Hepes,0.2 mol/L KH_2PO_4 ,0.1% BSA,0.1% MSH, pH 7.2),于冷浴中研磨,经4层纱布过滤。滤液经300 g低温离心30 s,沉淀为细胞壁和未破碎细胞,对上清液再以20000 g低温离心45 min,沉淀为细胞器,上清液为可溶性细胞组分。按GB18406.1-2001的规定,用美国Thermo Elemental公司的“SOLAAR S4”型原子吸收光谱仪测定各处理及重复的茭白亚细胞组分中 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 的积累量。

采用Excel 2003软件进行数据处理,利用

SPSS 17.0 对数据进行显著性差异测验,结果用平均值±标准误表示。

2 结果与分析

2.1 镉铅胁迫对茭白非蛋白巯基、谷胱甘肽、植物络合素含量的影响

从试验结果可以看出,Cd²⁺、Pb²⁺的单一及其复合胁迫均能促进两茭白品种根系和叶片中非蛋白巯基、谷胱甘肽、植物络合素含量的显著增加(表1)。Cd²⁺胁迫时茭白非蛋白巯基、谷胱甘肽、植物络合素含量增加的幅度明显大于 Pb²⁺ 处理。复合胁迫处理时两茭白品种根系和叶片中的含量高于单一胁迫处理,差异达极显著水平。茭白的不同部位间以根系中的非蛋白巯基、谷胱甘肽、植物络合素含量同比显著高于叶片,分别约是其 2~3 倍左右,从根系和叶片的诱导比例来看,叶片中非蛋白巯基的诱导比例平均为 0.67、植物络合素平均为 0.46,远

远低于根系的 1.64 和 1.79,说明根系是 Cd²⁺、Pb²⁺胁迫时非蛋白巯基、谷胱甘肽、植物络合素合成的主要部位。品种间以‘蒋墅茭’同比较高。

2.2 茭白各亚细胞组分中 Cd²⁺、Pb²⁺ 积累量

从试验结果可以看出(表2),Cd²⁺在茭白各亚细胞组分中的积累量表现为:细胞壁高于原生质体,而可溶性部分高于细胞器,细胞壁约占吸收总量的 60%,说明细胞壁在茭白的 Cd²⁺吸收中占优势地位。复合胁迫处理时,茭白的细胞壁、可溶性部分、原生质体中 Cd²⁺含量为 Cd²⁺单一胁迫处理的 1.2~1.7 倍,而细胞器则达 2 倍以上。品种间存在差异,以‘蒋红早’各亚细胞组分中的 Cd²⁺积累量同比显著高于‘蒋墅茭’。

由表3可以看出,Pb²⁺在茭白各亚细胞组分中的积累量同样表现为:细胞壁高于原生质体,而可溶性部分高于细胞器,细胞壁约占吸收总量的 80%,说明 Pb²⁺主要沉淀于茭白的细胞壁中。复合

表 1 镉、铅胁迫对茭白非蛋白巯基、谷胱甘肽、植物络合素含量的影响
Table 1 Effect of Cd²⁺ and Pb²⁺ stress on content of NPT, GSH and PCs in *Zizania latifolia* (μg/g FW)

部位 Parts	浓度 Concentration (mg/L)	非蛋白巯基(NPT)		谷胱甘肽(GSH)		植物络合素(PCs)	
		蒋墅茭 Jiangshujiao	蒋红早 Fenghongzao	蒋墅茭 Jiangshujiao	蒋红早 Fenghongzao	蒋墅茭 Jiangshujiao	蒋红早 Fenghongzao
叶 Leaves	对照 Control	118.1±5.2D	121.2±4.9D	12.2±0.6D	25.2±1.0C	105.9±6.4D	96.0±4.1D
	Cd 100	187.5±7.3B	170.0±6.1B	51.3±3.4B	43.0±3.2B	136.2±7.9B	127.0±7.4B
	Pb 1000	180.4±6.1C	167.1±6.0C	49.8±3.1C	43.8±3.5B	130.6±7.5C	123.3±7.1C
	Cd-Pb	281.3±10.8A	212.4±9.8A	67.3±3.5A	59.5±3.7A	214.0±9.9A	152.9±7.4A
根 Roots	对照 Control	192.1±9.9D	238.4±10.2D	39.2±2.4D	32.4±1.1D	152.9±7.4D	206.0±9.8D
	Cd 100	598.2±14.1B	471.0±13.2B	71.0±3.7B	69.1±4.1B	527.2±14.5B	401.9±10.6C
	Pb 1000	478.3±12.9C	462.1±11.9C	59.9±3.1C	53.3±2.7C	418.4±11.4C	408.8±10.9B
	Cd-Pb	699.3±16.1A	639.3±15.4A	92.8±4.5A	87.4±4.1A	606.5±17.2A	551.9±15.7A

注:同一处理栏中不同字母表示差异达 1% 显著水平,下同。
Note: Different letters in the same treatment items means significant at 1% level, the same below.

表 2 茭白各亚细胞组分中的 Cd²⁺ 积累量
Table 2 Accumulation of Cd²⁺ in cellular fraction of *Zizania latifolia* (mg/kg FW)

浓度 Concentration (mg/L)	蒋墅茭 Jiangshujiao				蒋红早 Fenghongzao			
	细胞壁 Cell wall	细胞器 Organelles	可溶性部分 Soluble fraction	原生质体 Protoplast	细胞壁 Cell wall	细胞器 Organelles	可溶性部分 Soluble fraction	原生质体 Protoplast
0(CK)	0.5±0.0C	0±0.0C	0.2±0.0C	0.2±0.0C	1.4±0.1C	0.1±0.0C	0.3±0.0C	0.4±0.0C
Cd 100	58.3±5.1B	9.8±0.2B	32.1±2.1B	41.9±3.2B	90.8±6.1B	13.7±0.9B	47.6±3.1B	61.3±3.3B
Cd-Pb	70.0±6.4A	20.2±1.3A	44.4±2.9A	64.6±2.8A	108.6±6.9A	24.0±1.4A	66.7±5.0A	90.7±6.4A

表 3 茭白各亚细胞组分中的 Pb²⁺ 积累量
Table 3 Accumulation of Pb²⁺ in cellular fraction of *Zizania latifolia* (mg/kg FW)

浓度 Concentration (mg/L)	蒋墅茭 Jiangshujiao				蒋红早 Fenghongzao			
	细胞壁 Cell wall	细胞器 Organelles	可溶性部分 Soluble fraction	原生质体 Protoplast	细胞壁 Cell wall	细胞器 Organelles	可溶性部分 Soluble fraction	原生质体 Protoplast
0(CK)	0.6±0.0C	0±0.0C	0.1±0.0B	0.1±0.0C	0.7±0.0C	0±0.0C	0.1±0.0C	0.1±0.0C
Pb 1000	98.4±4.8B	8.4±0.4B	25.8±1.3A	34.2±2.1B	96.5±3.2B	6.7±0.3B	34.1±2.2B	40.8±3.1B
Cd-Pb	150.4±5.1A	13.1±0.9A	25.9±1.8A	39.0±2.5A	134.9±6.4A	10.9±0.8A	38.8±2.6A	49.7±3.5A

胁迫处理时,两茭白品种各亚细胞组分中 Pb^{2+} 积累量高于 Pb^{2+} 的单一胁迫处理,差异达极显著水平。品种间‘蒋墅茭’各亚细胞组分中 Pb^{2+} 积累量同比显著高于‘蒋红早’。

3 讨论

植物络合素、谷胱甘肽、非蛋白巯基是植物消除重金属镉胁迫的主要成分之一,在非超积累植物对重金属的耐性中起重要作用^[13-16]。植物体内植物络合素的产生与重金属的浓度有关,其合成水平的高低与细胞内胁迫金属的数量存在显著的正相关关系,胞内 PCs 的诱导量可反映金属的实际毒性^[17]。有学者发现麦瓶草(*Silene vulgaris*)体内 PCs 的诱导量与 Cd^{2+} 的短期暴露呈线性关系^[18];随后 Sneller 和 Noordover^[19] 进一步证实了上述观点。本试验通过不同的胁迫方式发现,单一胁迫处理时植物络合素的合成量显著低于复合胁迫处理,说明单一胁迫处理时茭白细胞内胁迫重金属离子的数量低于复合胁迫,即单一胁迫时茭白受重金属离子的胁迫伤害分别小于复合胁迫处理,这与我们前期研究结果相一致^[20],进一步从植物络合素合成的角度证实了茭白对重金属离子的耐性机制。同时从本试验的研究结果还可以看出, Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 胁迫诱导下产生的非蛋白质态巯基化合物绝大部分为 PCs, 约占 90%, 这与 Grill 等^[21]、孙琴等^[22] 的研究结果一致,而 GSH 的变化幅度以及含量远低于 PCs, 主要原因可能是由 GSH 的双重角色造成的,一方面是茭白细胞内一种强的抗氧化剂;另一方面是茭白细胞内 PCs 合成的底物^[23], 这还有待于进一步的试验来论证。

植物的细胞壁是污染物进入植物细胞的第一道屏障,在植物的重金属抗性中起重要作用。在细胞壁中的果胶成分为结合污染物提供了大量的交换位点。彭鸣和王焕校^[24] 的研究证明,玉米根吸收的铅大量沉淀于细胞壁。从本试验也得出了相似的研究结果, Cd^{2+} 在细胞壁中的积累量达总积累量的 60% 左右,而 Pb^{2+} 则明显高于 Cd^{2+} , 达 80%, 说明由于细胞壁的保护, Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 较难进入细胞内部,因而,这也是植物细胞对重金属的一种排斥机制,而细胞壁的金属沉淀作用可以阻止更多的重金属离子进入原生质体,并且结合到细胞壁上的这部分重金属对植物是没有毒性的,细胞壁通过避免过量的重金

属离子进入细胞质中影响细胞内的代谢活动,从而减轻重金属的毒害,证实了我们前期得出的茭白对重金属离子抗性较强的研究结果^[5,7]。同时,从本试验的结果还可以看出,复合胁迫能明显增加茭白原生质体中 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 含量占总吸收量的比率。有研究表明,植物吸收的重金属离子在原生质体中积累量的增加能导致其受毒害的可能性也增大^[25],说明复合胁迫相对于单一胁迫而言,能导致茭白植株受 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 胁迫伤害的增加,这与我们前期研究结果相一致^[20]。

参考文献:

- [1] Rauser W E. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins [J]. *Cell Biochem Biophys*, 1999, 31: 19-48.
- [2] 安志装,王校常,严蔚东,施卫明. 镉硫交互处理对水稻吸收累积镉及其蛋白巯基含量的影响[J]. *土壤学报*, 2004, 41(5): 728-734.
- [3] Boominathan R, Doran P M. Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species [J]. *J Biotechnol*, 2003, 101(2): 131-146.
- [4] Kocjan G, Samardakiewicz S, Wozny A. Regions of lead uptake in *Lemna minor* plants and localization of this metal within selected parts of the root [J]. *Biol Plant*, 1996, 38: 107-117.
- [5] 黄凯丰,杨凯,江解增,卞晓东,王东林,曹碛生. 镉胁迫对茭白生长及产品残留量的影响[J]. *中国蔬菜*, 2008(2): 12-14.
- [6] 黄凯丰,江解增,杨凯,卞晓东,王东林,曹碛生. 不同栽培介质中茭白对铅胁迫的反应[J]. *园艺学报*, 2008, 35(10): 1479-1483.
- [7] 江解增,黄凯丰,杨凯,卞晓东,王东林,郭世荣. 茭白对苇末基质中镉的生理反应及其镉的残留[J]. *园艺学报*, 2007, 34(2): 407-410.
- [8] 黄凯丰,江解增. 重金属镉、铅胁迫对茭白 DNA 交联的影响[J]. *长江蔬菜*, 2009(14): 39-41.
- [9] Rama Devi S, Prasad M N V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants [J]. *Plant Sci*, 1998, 138: 157-165.
- [10] 中国科学院上海植物生理研究所,上海市植物生理

- 学会. 谷胱甘肽含量的测定: 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [11] Keltjens W G, Beusichem M L. Phytochelatins as biomarkers for heavy metal toxicity in maize: single metal effects of copper and cadmium[J]. *J Plant Nutr*, 1998, 21(4): 635–648.
- [12] 刘鸿先, 曾韶西, 王以柔, 李平, 陈德峰, 郭俊彦. 低温对杂优水稻及其亲本幼苗中超氧化物歧化酶的影响[J]. 植物学报, 1987, 29(3): 262–267.
- [13] Cobbett C T. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification[J]. *Plant Physiol*, 2000, 123: 825–832.
- [14] 黄凯丰, 江解增. 肥料和硫处理对镉胁迫下茭白植物络合素(PCs)含量的影响[J]. 中国蔬菜, 2011(4): 39–43.
- [15] 李慧, 丛郁, 常有宏. 番茄植物络合素合酶基因全长cDNA的克隆及其表达特点[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(1): 136–142.
- [16] 冯倩, 台培东, 付莎莎, 张银秋, 陈扬. 巯基化合物在万寿菊镉解毒中的作用[J]. 环境工程学报, 2010(1): 214–218.
- [17] 安志装, 王校常, 严蔚东, 施为明. 植物螯合肽及其在重金属胁迫下的适应机制[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(5): 463–467.
- [18] De Knecht J A, Van Baren N, Ten Bookum W M, et al. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*[J]. *Plant Sci*, 1995, 106: 9–18.
- [19] Sneller F E C, Noordover E C M. Quantitative relationship between phytochelatin accumulation and growth inhibition during prolonged exposure to cadmium in *Silene vulgaris* [J]. *Ecotoxicology*, 1999, 8(3): 167–175.
- [20] 黄凯丰, 马红, 陈庆富, 江解增. 镉铅复合胁迫对茭白生理生化指标及产量的影响[J]. 北方园艺, 2009(8): 89–91.
- [21] Grill E, Winnacker E L, Zenk M H. Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants[J]. *Science*, 1985(230): 674–676.
- [22] 孙琴, 王晓蓉, 袁信芳, 丁士明. 有机酸存在下小麦体内Cd的生物毒性和植物络合素(PCs)合成的关系[J]. 生态学报, 2004, 24(12): 2804–2809.
- [23] Wu F B, Zhang G P. Phytochelatins and its function in heavy metal tolerance of higher plants[J]. *Chin J Appl Ecol*, 2003, 14(4): 632–636.
- [24] 彭鸣, 王焕校. 镉、铅在玉米幼苗中的积累和迁移——X射线显微分析[J]. 环境科学学报, 1989, 9(1): 61–67.
- [25] 徐勤松. 黑藻对水体Cd、Cu、Zn污染的反应机制研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2004.

(责任编辑: 张平)