

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2016.08.2015112009

秦丽, 何永美, 李元, 等. Cd 胁迫对续断菊 Cd 吸收分配及有机酸代谢的影响[J]. 环境化学, 2016, 35(8): 1592-1600
QIN Li, HE Yongmei, LI Yuan, et al. Effects of Cd stress on uptake and distribution of Cd and the low molecular weight organic acid metabolism in *Sonchus asper* L. Hill.[J]. Environmental Chemistry, 2016, 35(8): 1592-1600

Cd 胁迫对续断菊 Cd 吸收分配及有机酸代谢的影响*

秦 丽 何永美 李 元 李 博 祖艳群**

(云南农业大学资源与环境学院, 昆明, 650201)

摘 要 通过水培试验,研究了 Cd 在续断菊(*Sonchus asper* L. Hill.)体内的亚细胞分布、化学形态, Cd 对续断菊地上部和根部有机酸含量的影响,以及根系分泌低分子有机酸对 Cd 胁迫的响应.结果表明:(1)续断菊根部和地上部的 Cd 含量随 Cd 处理浓度增加而显著增加;(2)Cd 在续断菊体内的化学提取形态分布为:NaCl 提取态(F_{NaCl})> HAC 提取态(F_{HAC})> HCl 提取态(F_{HCl})> 残渣态(F_R)> 去离子水提取态(F_w)> 乙醇提取态(F_E);(3)续断菊体内的 Cd 主要分布在细胞壁中,占总 Cd 含量的 36%—47%,且随着 Cd 浓度的升高,细胞壁中的分布量增加;其次是细胞核中,占总含量的 20%—33%;(4)续断菊体内低分子有机酸含量大小为:酒石酸>苹果酸>柠檬酸>乙酸,酒石酸占有有机酸总量的 68%—96%,植株地上部和根部 Cd 含量均与体内苹果酸和柠檬酸含量显著正相关,相关系数为 0.993 和 0.994($P<0.01$)、0.953 和 0.982($P<0.05$);(5)不同 Cd 浓度下,续断菊根系分泌低分子有机酸主要为酒石酸,占有有机酸总量的 52%—89%,且在 30 d 时与植株地上部和根部 Cd 含量显著正相关,相关系数为 0.967 和 0.978($P<0.05$).根系分泌酒石酸和苹果酸促进了续断菊对 Cd 的吸收,续断菊体内的苹果酸和柠檬酸参与 Cd 的吸收、运输、积累,从而缓解了 Cd 的危害;同时,细胞壁固持和活性较强化学形态的减少是续断菊耐 Cd 胁迫的主要机制.

关键词 Cd, 续断菊, 亚细胞分布, 化学形态, 低分子有机酸.

Effects of Cd stress on uptake and distribution of Cd and the low molecular weight organic acid metabolism in *Sonchus asper* L. Hill.

QIN Li HE Yongmei LI Yuan LI Bo ZU Yanqun**

(College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201, China)

Abstract: A hydroponic experiment was applied to explore the subcellular distribution and chemical forms of Cd in hyperaccumulator *Sonchus asper* L. Hill. (*S. asper*), the effects of Cd on the contents of organic acids in shoots and roots, and the response of root exudates to Cd tolerance. The results showed that Cd contents in the shoot and root of *S. asper* increased with the increase of Cd concentrations in solution. The contents of Cd chemical forms upon Cd addition followed the order of NaCl extractable fraction (F_{NaCl}) > HAC extractable fraction (F_{HAC}) > HCl extractable fraction (F_{HCl}) > residual fraction(F_R) > water extractable fraction (F_w) > ethanol-extractable fraction (F_E). 36%—47% and 20%—33% of total Cd distributed in cell wall and nucleus, respectively. The subcellular distribution of Cd was mainly in cell wall and the percentage of Cd in cell wall increased with the increase of Cd concentration. The contents of organic acids in *S. asper* followed the tendency

2015 年 11 月 20 日收稿(Received: November 20, 2015).

* 国家自然科学基金云南联合项目(U1202236)和国家自然科学基金(31560163)资助.

Supported by Natural Science Foundation of China (U1202236, 31560163).

** 通讯联系人, Tel: 13099933096, E-mail: 649332092@qq.com

Corresponding author, Tel: 13099933096, E-mail: 649332092@qq.com

of tartaric acid > malic acid > citric acid > acetic acid. Tartaric acid was dominant, accounting for 68%—96% of total organic acids. Significantly positive correlations between shoot Cd and malic acid and citric acid were observed with correlation coefficients 0.993 ($P < 0.01$) and 0.953 ($P < 0.05$), and significantly positive correlations between root Cd and malic acid and citric acid were observed with correlation coefficients 0.994 ($P < 0.01$) and 0.982 ($P < 0.05$), respectively. With Cd concentrations in solution, low molecular weight organic acids of root exudates were mainly tartaric acid, which accounted for 52%—89%. Significantly positive correlation was observed between shoot Cd and root Cd with tartaric acid contents, and the correlation coefficient was 0.967 ($P < 0.05$) and 0.978 ($P < 0.05$), respectively. The results indicate that tartaric acid and malic acid in root exudates of *S. asper* facilitated the absorption and accumulation of Cd, and malic acid and citric acid participated in Cd absorption, transport and accumulation, which reduced the toxicity of Cd. At the same time, cell wall binding and reduction of total percentage in higher active chemical forms are the main tolerance mechanisms for Cd in *S. asper*.

Keywords: Cd, *Sonchus asper* L. Hill., subcellular distribution, chemical form, low molecular weight organic acids.

工矿企业排放的废渣、废水、废气及污水灌溉,以及磷肥的大量施用导致农田土壤 Cd 污染严重^[1]. Cd 在土壤中具有较强的化学活性,与其它重金属相比更易被植物根系吸收而积累在植物的籽粒和果实中,进而通过食物链进入人体,在人体中累积,直接威胁人类健康^[2-3].植物修复技术因其治理效果的永久性、治理过程的原位性、治理成本的低廉性、环境美学的兼容性等特点,受到人们普遍关注^[4].

为了免受 Cd^{2+} 的危害,植物体产生了多种限制 Cd^{2+} 吸收和转移的生理生化机制:(1) Cd^{2+} 与有机酸、氨基酸、蛋白质或其它配位体结合形成稳定化合物并区隔在液泡中;(2) Cd^{2+} 贮存在植物的不同部位或细胞器中^[5]. Cd 的亚细胞分布和化学存在形态是影响植物体内 Cd 迁移的主要原因之一^[6].植物体内 Cd 的化学提取形态也影响 Cd 的迁移和在整个植株体内的分布^[7-8].不同植物种类、相同植物不同吸收型体内 Cd 的化学提取态比例也有所不同. Cd 低积累水稻品种中去离子水提取态和乙醇提取态等活性 Cd 含量所占比例低于高积累品种,而活性弱的氯化钠提取态 Cd 含量相对较高^[9];在 *T. caerulea* 根中, Cd 的乙醇提取态和氯化钠提取态占总量比例高达 95%^[10].植物对 Cd 的吸收积累特性与体内 Cd 的亚细胞分布和化学提取态有关,因此,探讨在不同 Cd 胁迫强度下,富集植物续断菊 Cd 的亚细胞分布和化学提取态,以探明相关的 Cd 吸收-解毒机制.

植物体内有机酸代谢的调节对于植株抗重金属性亦具有重要意义.重金属胁迫下有机酸响应的解毒机制可以分为植物体内部解毒和外部解毒^[11].植物体内的有机酸、氨基酸等有机物含有羟基和羧基等功能基团,能与 Cd 形成金属配位体复合物,参与植物对 Cd 的吸收、运输、积累和解毒过程,从而也能降低其毒性^[12].植物体内的有机酸可促进重金属从根系到地上部的转运, Ni-柠檬酸复合物可能是 Ni 运输的主要形态^[13],同时,有机酸还参与重金属在植物体内的积累与贮存,在超积累植物体内,有 85%—90% 的重金属离子是与这些金属配位体结合形成螯合物^[14].根系分泌物的低分子量有机酸通过改变根际 pH 值、Eh 值、与重金属发生螯合、络合沉淀等化学反应、影响重金属在土壤中的结合形态以及生物活性^[15-16]. Cd 超积累植物龙葵根系分泌低分子有机酸可以活化土壤中的 Cd,促进了植物对 Cd 的吸收和积累^[17].

植物对 Cd 的耐性机理十分复杂,不同种类植物的 Cd 耐性和超富集机理有所差异,虽然目前对植物适应 Cd 胁迫的生理和分子生物学机理已取得较大进展,但有关 Cd 超富集植物吸收富集 Cd 的机理仍不十分清楚.续断菊 (*Sonchus asper* L. Hill.) 是一种云南本土的 Cd 富集植物,具有生长快、生物量大等特点,盆栽和大田试验均表明,续断菊对土壤 Cd 有较强的吸收和转运能力^[18-19],续断菊的发现为 Cd 污染土壤的植物修复提供了一种新材料.

本文模拟 Cd 胁迫条件下,研究续断菊吸收 Cd 后在体内的亚细胞分布,化学存在形态及其对根系分泌有机酸的响应,在揭示续断菊 Cd 耐性、吸收转运的内在机理,提高对 Cd 污染土壤的修复效率等方面具有重要的理论意义.

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试验材料和方法

供试材料采自云南省会泽县铅锌矿区野生续断菊种子.采用烤烟基质育苗,待植物长出 5 片真叶后,移栽到改良的霍格兰营养液中,每天用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 或 HCl 调节营养液 pH 值至 5.8,保持 24 h 连续通气,每 4 d 更换营养液 1 次.培养 12 d 后进行 Cd 处理,供试 Cd^{2+} 来源于药品 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯),设 4 个 Cd 处理水平 ($0, 5, 10, 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),每盆移栽续断菊 8 株,重复 3 次,处理 30 d 后收获植物.植株根系先用自来水冲洗,再用 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 交换 20 min,以去除根系表面吸附的 Cd,最后用去离子水洗净,吸干表面水分,备用.

1.2 有机酸的收集、提取和测定

1.2.1 根系分泌有机酸的收集

将 2 株大小一致的植株从营养液中取出,依次用去离子水、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 充分冲洗根系,最后放入装有 100 mL 去离子水的玻璃瓶中,连续曝气 6 h 收集根分泌物,收集液过 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜,滤液用真空旋转蒸发仪在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下浓缩,定容至 25 mL,于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存,用于分析有机酸.

1.2.2 叶片和根系有机酸的提取

准确称取植物叶片和根系各 0.5000 g ,加入 2 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 溶液充分研磨成匀浆,于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中提取 1 h,过滤,定容到 50 mL.

1.2.3 有机酸的测定

采用反相高效液相色谱法进行测定.仪器:Waters 2695,色谱柱:Waters C18, $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$;流动相: $18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 , pH 2.25(用 H_3PO_4 调);流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量: $20 \mu\text{L}$;检测波长: 210 nm ;柱温: $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.3 植物体内的亚细胞组分分离及 Cd 含量测定

亚细胞组分的提取采用差速离心法,在 Weigel^[20]的方法上适当调整:称取新鲜的续断菊叶片和根系各 0.5000 g 于研钵中,加入预冷的提取液充分研磨成匀浆液.提取液组成为: $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) + $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二硫赤鲜醇.将匀浆液用尼龙纱布过滤,滤渣为细胞壁部分(F1);滤液在 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,沉淀为细胞核部分(F2);上清液在 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 15 min,沉淀为叶绿体部分(F3);上清液在 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 20 min,沉淀为线粒体部分(F4),上清液为含核糖体的可溶部分(F5).每组两次离心,全部操作在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下进行.F1、F2、F3、F4 部分用少量去离子水转移至三角瓶中,于电热板蒸干,加入 2 mL 浓硝酸和几滴高氯酸,消煮至澄清,定容至 50 mL,用原子吸收法测定 Cd 含量.F5 部分以提取剂为本底对照,直接上机测定.

1.4 植物体内 Cd 的化学形态

采用化学试剂逐步提取法^[21],具体操作如下:准确称取鲜样 0.5000 g ,加入 20 mL 提取剂研磨匀浆后转入 50 mL 离心管中,在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温振荡 22 h 后, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,倒出上清液,再加入 10 mL 的提取剂, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温振荡 1 h, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,倒出上清液.合并两次上清液.采用下列 5 种提取剂依次逐步提取:80%乙醇(F_E)、去离子水(F_W)、 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠(F_{NaCl})、2%醋酸(F_{HAC})、 $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸(F_{HCl}),最后为残渣态(F_R).残渣态用硝酸和高氯酸消解,原子吸收法测定 Cd 含量.

1.5 数据处理

数据采用 Excel 进行常规分析,并利用 Duncan 新复极差法进行差异显著性测验.相关性分析采用 SPSS 软件分析.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 续断菊体内化学形态 Cd 含量

续断菊体内各种化学形态 Cd 的含量随着 Cd 处理浓度的增加而增加(图 1).与 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 处理相

比, 20 mg·L⁻¹ 处理下叶片中 NaCl 提取态、HAC 提取态和 HCl 提取态含量显著增加 ($P<0.05$), 分别增加了 154%、46.5% 和 310%; 3 个 Cd 浓度下续断菊体内 Cd 形态都以 NaCl 提取态占优, 分别占总 Cd 的 34.2%、29.4% 和 47.0%。

在 Cd 处理浓度为 5 mg·L⁻¹ 时, 续断菊茎叶中以残渣态最多, 占总 Cd 的 18.9%; 根系中 NaCl 提取态的 Cd 含量较高, 占总 Cd 的 25.8%, 其次是残渣态, 占总 Cd 的 16.3%。当 Cd 浓度为 10 mg·L⁻¹ 时, 续断菊叶片中 HCl 提取态的 Cd 含量较高, 为总 Cd 含量的 21.5%, 其次是残渣态, 占总 Cd 的 17.2%; 根系中 NaCl 提取态 Cd 的含量较高, 各种化学形态占总 Cd 含量为: $F_{NaCl}(29.4\%)>F_{HAC}(22.3\%)>F_R(14.2\%)>F_W(12.9\%)>F_{HCl}(11.3\%)>F_E(9.9\%)$ 。当 Cd 处理浓度为 20 mg·L⁻¹ 时, 植物叶片的化学形态以盐酸和氯化钠提取态为主, 二者占总量的 51.7%, 根系中以氯化钠和醋酸提取态为主, 二者占总量的 70.7%。

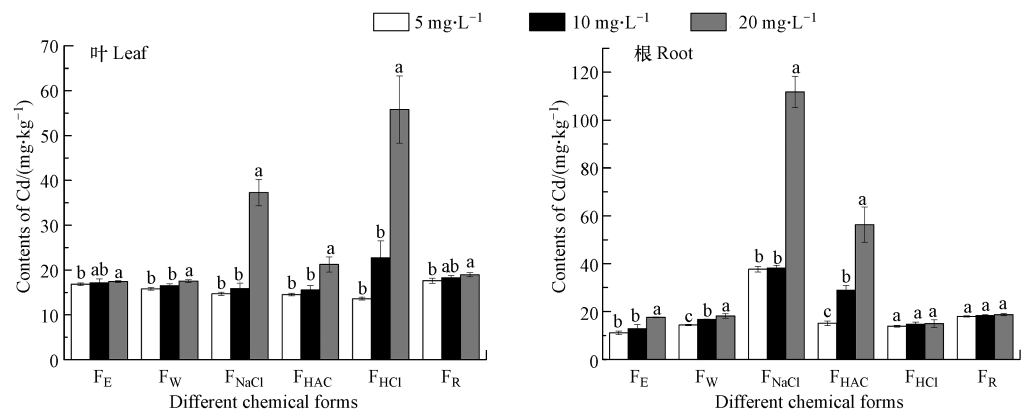


图 1 不同 Cd 处理下续断菊叶和根中 Cd 的化学形态
图中不同字母表示差异性显著 ($P<0.05$), 下同

Fig.1 Cd contents of different chemical forms in leaf and root of *S. asper*
Values with different letter indicate a significant difference ($P<0.05$), the same below

重金属在植物体内的活性、毒性和迁移能力与它们在植物体中的化学形态以及有机酸含量有关^[22-23]。采用乙醇、去离子水、NaCl、HAc 和 HCl, 顺序提取植物组织中不同结合形态的重金属, 随着上述提取剂极性的增强, 所提取出的重金属活性和在植物体内的迁移能力不断降低^[24-25]。在 5 mg·L⁻¹ Cd 处理时, 续断菊叶 Cd 的化学形态中活性最高的乙醇提取态含量较高, 乙醇提取剂主要浸提的是以 Cd(NO₃)₂、CdCl₂ 为主的无机盐及氨基酸盐^[26]。随着 Cd 浓度的增加, 续断菊叶片和根系中乙醇提取态和水提取态分配比例逐渐降低, 乙醇提取态的分配比例由 5 mg·L⁻¹ Cd 处理时的 18.1% 降低为 20 mg·L⁻¹ 处理下的 10.4%, 而活性较低的 HCl 提取态、HAc 提取态含量显著增加, 主要以 CdHPO₄、Cd₃(PO₄)₂ 以及草酸 Cd 的形态存在。Cd 对蛋白有很强的亲和性, Cd 与蛋白结合后容易引起其活性降低^[27], 本实验中, 与 5 mg·L⁻¹ Cd 处理相比, 20 mg·L⁻¹ Cd 处理下, 续断菊叶中乙醇提取态和水提取态 Cd 的分配比例分别降低了 7.7% 和 6.5%, 根中两种形态比例分别降低了 2.8% 和 4.3%; 叶中 HAc 提取态和 NaCl 提取态的分配比例增加了 10.0% 和 6.4%, 根中 HCl 提取态和 NaCl 提取态的分配比例增加了 18.6% 和 12.8%, HAc 提取态、HCl 提取态和 NaCl 提取态的分配比例增加了 7.0%—19.2%, 说明 Cd 在续断菊体内由活性较强的结合态向活性较弱的结合形态转移, 减少活性较强的形态对植物的毒害, 从而增强植物对 Cd 的耐性。

2.2 Cd 在续断菊中的亚细胞分布

在 Cd 处理浓度为 5 mg·L⁻¹ 时, 续断菊叶片中的 Cd 主要贮藏在叶绿体中, 占总 Cd 的 28.8%, 其次是细胞核, 占总 Cd 的 23.2%; 根系中的 Cd 主要贮藏在细胞壁, 占总 Cd 的 43.4%, 其次是细胞核, 占总 Cd 的 20.3% (表 1)。在 Cd 浓度为 10 mg·L⁻¹ 时, 续断菊叶片中和根系中的 Cd 均主要贮藏在细胞壁中, 分别占总 Cd 的 35.5% 和 39.3%, 其次是细胞核, 分别占总 Cd 的 22.0% 和 21.7%, 其后依次为叶绿体、线粒体和核糖体。20 mg·L⁻¹ Cd 处理时, 叶片和根系中的 Cd 主要贮存在细胞壁中, 均为总 Cd 含量的 46.7%, 其次是细胞核, 分别占总 Cd 的 32.8% 和 23.8%, 叶片和根系中 Cd 的分布顺序均为: F1>F2>F3>F4>F5。在

不同的 Cd 浓度下,续断菊叶片富集 Cd 的部位有所不同,低浓度时主要贮存在细胞核和叶绿体中,高浓度时与根系中富集部位相似,主要分布在细胞壁中.

由表 1 可知,当 Cd 处理浓度从 5 mg·L⁻¹ 提高到 20 mg·L⁻¹ 时,Cd 在续断菊体内的亚细胞分布含量显著升高($P<0.05$),其中在细胞壁中 Cd 含量有更多的增长,随着 Cd 浓度从 5 mg·L⁻¹ 增大到 20 mg·L⁻¹,续断菊体内细胞壁中 Cd 含量的分配比例增加,叶中的分配比例由 5 mg·L⁻¹ Cd 处理时的 15.6% 增大到 20 mg·L⁻¹ 时的 46.7%,增加了 31.1%;根部的分配比例由 5 mg·L⁻¹ Cd 处理时的 43.4% 增大到 20 mg·L⁻¹ 时的 46.7%,增加了 3.3%(图 2),说明细胞壁是续断菊应对 Cd 胁迫的第一道屏障.

表 1 Cd 在续断菊叶和根中的亚细胞分布
Table 1 Subcellular distribution of Cd in leaves and roots in *S. asper*

Cd 处理 Cd treatment/ (mg·L ⁻¹)	部位 Parts of plant	Cd 含量 Contents of Cd/(mg·kg ⁻¹)					总量 Total Cd contents/ (mg·kg ⁻¹)
		F1	F2	F3	F4	F5	
5	叶	1.29±0.78b	1.92±0.16ab	2.38±0.47a	1.32±0.3b	1.36±0.05b	8.27±1.85
	根	6.84±1.04a	3.19±1.05b	1.68±0.36c	2.28±0.19bc	1.75±0.09c	15.74±1.70
10	叶	10.21±2.39a	6.27±4.01b	6.25±1.04b	4.19±1.63bc	1.57±0.08c	28.49±5.47
	根	21.38±3.18a	11.83±1.74b	10.68±2.34b	8.05±1.08b	2.52±0.40c	54.46±9.81
20	叶	64.32±4.02a	45.17±10.24b	13.63±1.78c	12.16±2.32c	2.48±0.91d	137.75±16.67
	根	108.47±1.96a	55.31±2.42b	30.4±1.46d	35.23±1.60c	2.95±1.34e	232.36±19.78

注:表中数据为平均值±标准差($n=3$),同一行中不同字母表示差异显著($P<0.05$);下同.F1:细胞壁组分,F2:细胞核组分,F3:叶绿体组分,F4:线粒体组分,F5:含核糖体的可溶部分.

Note: Values are means±SD ($n=3$). Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level, the same below. F1: cell wall fraction, F2: nucleus fraction, F3: chloroplast fraction, F4: mitochondria fraction, F5: soluble fraction.

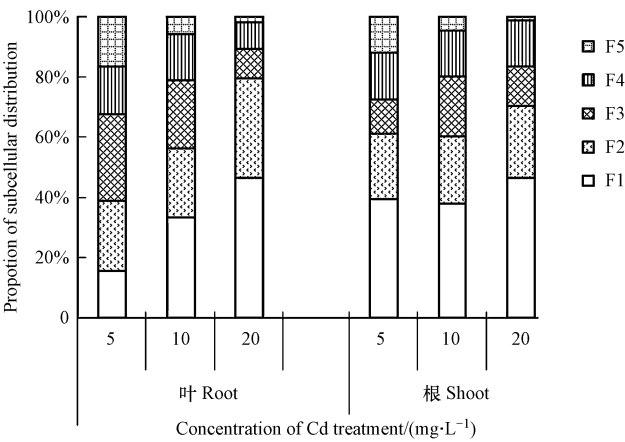


图 2 续断菊体内 Cd 亚细胞分布百分比
Fig.2 Proportion of subcellular distribution of Cd in *S. asper*

Cd 进入耐性植物体后,把 Cd 运输到代谢不活跃的细胞壁和液泡等亚细胞区域的区室化作用是一种有效的解毒途径^[28].如 *Thlaspi caerulescen*^[29]、玉米和大豆^[30] 中的 Cd、Pb 主要分布在植物的细胞壁和以液泡为主的可溶部分.本实验中,在低浓度 Cd 胁迫下,续断菊叶中的 Cd 主要分布在细胞器中,根部 Cd 主要分布在细胞壁,而在高浓度 Cd 胁迫下,无论是叶还是根部,续断菊体内的 Cd 均主要分布在细胞壁中,而在可溶部分中分布较少,表明细胞壁是续断菊贮存 Cd 的重要位点.同时,随着 Cd 处理浓度的增加,Cd 在细胞壁中的分布增加,表明细胞壁固持在续断菊对 Cd 的解毒、耐性和 Cd 的超富集方面也起着重要作用.

2.3 Cd 胁迫下续断菊地上部和根部有机酸的积累

随着 Cd 处理浓度的增加,续断菊根部 4 种低分子有机酸的含量显著增加,且在同一 Cd 浓度条件下,根部有机酸含量大小为:酒石酸>苹果酸 >柠檬酸>乙酸(表 2),4 个 Cd 浓度下,酒石酸分别占有机

酸总量的 86.8%、81.8%、80.1% 和 67.6%; 苹果酸分别占有机酸总量的 12%、17%、18% 和 31%。4 种低分子有机酸均在 Cd 处理浓度为 20 mg·L⁻¹ 时达到最大值, 分别比对照增加了 2.0 倍、6.7 倍、2.8 倍和 1.5 倍。

续断菊地上部 4 种低分子有机酸的含量随 Cd 处理浓度变化的趋势与根部相似(表 2)。续断菊地上部有机酸主要是酒石酸, 4 个 Cd 浓度下, 酒石酸占有机酸总量的 96.2%、96.3%、95.2% 和 93.0%, 乙酸含量在 5 mg·L⁻¹ 时显著高于其他处理。

续断菊根部酒石酸、苹果酸、柠檬酸含量与 Cd 处理浓度呈显著正相关, 相关系数分别为 0.989 ($P<0.05$)、0.957 ($P<0.05$)、0.999 ($P<0.01$), 续断菊叶片中的苹果酸和柠檬酸与 Cd 处理浓度呈极显著正相关, 相关系数都为 0.998 ($P<0.01$)。

表 2 Cd 胁迫下续断菊体内有机酸的积累

Table 2 The content of organic acid in *S. asper* under Cd stress

	Cd 浓度 Cd treatment/ (mg·L ⁻¹)	酒石酸 Tartaric acid/ (μmol·g ⁻¹)	苹果酸 Malic acid/ (μmol·g ⁻¹)	柠檬酸 Citric acid/ (μmol·g ⁻¹)	乙酸 Acetic acid/ (μmol·g ⁻¹)
根部 Root	0	324.8±13.4d (87%)	44.0±12.8d	5.0±1.3c	0.46±0.01b
	5	375.7±9.4c (82%)	76.5±8.1c	6.9±0.5c	0.45±0.02b
	10	446.2±39.3b (80%)	100.8±7.3b	9.4±1.1b	0.44±0.04b
	20	649.1±46.3a (67.6%)	297.2±20.7a	13.9±1.2a	0.70±0.03a
地上部 Shoot	0	1577.3±47.8d (96%)	55.2±13.0c	6.39±0.25c	0.44±0.02d
	5	2673.7±67.6c (96%)	88.1±7.4bc	14.25±2.76c	0.60±0.01a
	10	3018.0±208.9b (95%)	129.2±11.6b	23.37±4.13b	0.53±0.01b
	20	3525.1±91.0a (93%)	220.0±59.3a	44.53±7.18a	0.49±0.01c

注: 表中数据为平均值±标准差($n=3$), 同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$), 括号中数据表示酒石酸占总有机酸的百分比。
Note: Values are means±SD ($n=3$). Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level.

植物体内低分子质量有机酸主要来自光合作用和呼吸作用的中间产物, 受植株自身生长状况影响。有机酸在重金属的积累与贮存中发挥了较大作用。本实验中, 随着 Cd 处理浓度的增加, 续断菊地上部和根部苹果酸和柠檬酸含量显著增加, 且与植物续断菊地上部和根部 Cd 含量显著正相关, 与地上部 Cd 含量的相关系数为 0.993 ($P<0.01$) 和 0.994 ($P<0.01$), 与根部 Cd 含量的相关系数分别为 0.953 和 0.982 ($P<0.05$) (表 3)。可能是 Cd 胁迫导致了续断菊体内苹果酸和柠檬酸的积累, 同时苹果酸和柠檬酸与进入植物体内的 Cd 结合, 降低了 Cd 与细胞内重要的蛋白及酶结合的机会, 从而降低了 Cd 对植物的毒害。Zn 超富集植物遏蓝菜体内含较高的苹果酸, 吸收的 Zn 首先与苹果酸结合, 然后以苹果酸-Zn 盐形态转移入液泡后发生解离, 解离的 Zn 贮存于液泡中, 解离的苹果酸返回液泡外重新与其他 Zn 离子结合, 这是遏蓝菜耐 Zn 的机制^[31]。续断菊体内苹果酸和柠檬酸的积累, 也可能是其耐 Cd 的机制之一, 有关续断菊耐 Cd 的机制还有待进一步查明。

表 3 续断菊体内 Cd 含量与 4 种有机酸含量的相关性 ($n=4$)

Table 3 The correlations between the contents of Cd and the contents of organic acids in *S. asper* ($n=4$)

续断菊 Cd 含量 Cd contents of <i>S. asper</i>	酒石酸 Tartaric acid	苹果酸 Malic acid	柠檬酸 Citric acid	乙酸 Acetic acid
地上部 Shoot	0.909	0.993 **	0.994 **	0.384
根部 Root	0.975 *	0.953 *	0.982 *	0.843

注: * 显著水平 $P<0.05$, ** 极显著水平 $P<0.01$ 。Notes: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, the same below.

2.4 Cd 胁迫下续断菊根系分泌低分子有机酸的量

15 d 时不同 Cd 处理浓度对有机酸水平产生明显的影响。根系分泌低分子有机酸以酒石酸为主, 4 个 Cd 浓度处理下, 续断菊根系分泌酒石酸分别占总有机酸的 89.4%、77.9%、82.8% 和 52.0% (表 4)。当 Cd 浓度为 5 mg·L⁻¹ 时, 根系分泌物中这 4 种酸含量均显著高于对照水平; 当 Cd 浓度为 10 mg·L⁻¹ 时, 酒

石酸和柠檬酸含量均达到最高值,随后在 Cd 浓度为 20 mg·L⁻¹时,这两种酸含量有所下降;乙酸和苹果酸含量均随着 Cd 浓度的升高而增加.总的说来,15 d 时,续断菊根系分泌物中有机酸含量大小为酒石酸>苹果酸>柠檬酸>乙酸.

30 d 时续断菊根系分泌的 4 种低分子有机酸的量随着 Cd 处理浓度的增加而显著增加(表 4).续断菊根系分泌低分子有机酸仍以酒石酸为主,4 个 Cd 浓度处理下,根系分泌酒石酸分别占总有机酸的 72.9%、73.9%、72.6%和 68.3%.苹果酸、酒石酸与 Cd 处理浓度的相关系数分别为 0.996 ($P<0.01$) 和 0.988 ($P<0.05$).与 15 d 相比,30 d 时续断菊根系分泌物有机酸含量水平发生明显变化,酒石酸、苹果酸和柠檬酸含量显著增加,其中,酒石酸在 20 mg·L⁻¹ Cd 处理时增幅最大,占有机酸总量的 68.3%,苹果酸占 30.1%.而苹果酸和柠檬酸则在 Cd 处理浓度为 10 mg·L⁻¹时增幅最大,分别为 15 d 时的 7.0 倍和 11.6 倍.30 d 时根系分泌有机酸含量顺序和 15 d 时基本一致,表现为酒石酸>苹果酸>柠檬酸 >乙酸.

从有机酸总量来看,各 Cd 处理水平下,续断菊根系分泌物有机酸总量均表现为 30 d>15 d.另外,从表 4 还可以看出,随着时间的延长,4 种酸所占总量的比例有不同的变化.从 15 d 到 30 d,乙酸和柠檬酸所占总量的比例减小,酒石酸和苹果酸所占比例随着生育期的延长显著增加.

表 4 不同 Cd 浓度下续断菊根系分泌 4 种低分子有机酸的量

Table 4 The contents of four low-molecular-weight organic acids in root exudates of *S. asper* under Cd stress

Cd 浓度 Cd treatment/ (mg·L ⁻¹)	乙酸		酒石酸		苹果酸		柠檬酸	
	Acetic acid/(μmol·L ⁻¹)		Tartaric acid/(μmol·L ⁻¹)		Malic acid/(μmol·L ⁻¹)		Citric acid/(μmol·L ⁻¹)	
	15 d	30 d	15 d	30 d	15 d	30 d	15 d	30 d
0	0.11±0.02c	0.13±0.09c	37.2±2.9c	45.8±10.2d	3.2±0.6c	15.0±2.4d	1.10±0.11b	1.85±0.19d
5	0.40±0.01b	0.45±0.09b	59.8±2.6b	216.7±5.0c	15.4±4.1b	68.6±3.0c	1.14±0.19b	7.65±0.89c
10	0.42±0.02b	0.58±0.05b	88.1±19a	362.5±31.8b	15.7±1.1b	110.3±9.3b	2.22±0.42a	25.69±2.08a
20	0.47±0.04a	0.71±0.10a	69.7±8.0b	546.1±19.0a	62.8±4.2a	241.0±15.4a	1.16±0.22b	11.49±0.94b

注:表中数据为平均值±标准差(n=3),同一列中不同字母表示差异显著($P<0.05$).

Note: Values are means±SD (n=3). Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level.

Cd 胁迫下植物根系分泌的有机酸主要有草酸、柠檬酸、苹果酸、酒石酸、琥珀酸和乙酸等^[15].不同植物 Cd 胁迫下分泌有机酸不同,黑麦草的根系能分泌出草酸、苹果酸和柠檬酸 3 种有机酸^[32],东南景天超积累生态型能分泌苹果酸、酒石酸和草酸^[33],小麦根系能够分泌酒石酸、柠檬酸、乙酸和丙酸^[34].不同根系分泌有机酸的变化反映了不同植物通过改变根系分泌有机酸的组成或含量来耐受或超富集重金属 Cd 的可能的作用机制.本研究中,Cd 胁迫下续断菊根系分泌有机酸主要为酒石酸和苹果酸,随着生育期的延长含量显著增加,30 d 时根系分泌酒石酸含量与续断菊地上部和根部 Cd 含量显著正相关,相关系数分别为 0.967($P<0.05$)和 0.978($P<0.05$),15 d、30 d 时根系分泌苹果酸与植物地上部和根部 Cd 含量显著正相关,相关系数分别为 0.979($P<0.05$)、0.959($P<0.05$)、0.998($P<0.01$)和 0.990($P<0.05$)(表 5),说明根系分泌苹果酸促进了续断菊对 Cd 的吸收累积.可能的机理是超积累植物续断菊通过其根系分泌酒石酸和苹果酸改变了根际 Cd 形态,与 Cd 螯合形成“Cd-低分子量有机酸”复合物,从而促进了植物对 Cd 的吸收.根系分泌低分子有机酸对重金属在土壤中的溶解和向植物体内的迁移起重要作用,但是,生长在同一环境中的不同植物种类、品种,甚至同一植物的不同生长时期,其根系分泌有机酸水平均有差异,超富集植物如何调控有机酸的分泌,还有待于进一步研究.

表 5 续断菊体内 Cd 含量与根系分泌 4 种有机酸含量的相关性 (n=4)

Table 5 The correlations between the contents of Cd and organic acids of root exudates in *S. asper* (n=4)

续断菊 Cd 含量 Cd contents of <i>S. asper</i>	酒石酸 Tartaric acid		苹果酸 Malic acid		柠檬酸 Citric acid		乙酸 Acetic acid	
	15 d	30 d	15 d	30 d	15 d	30 d	15 d	30 d
地上部 Shoot	0.505	0.967 *	0.979 *	0.998 **	0.366	0.667	0.788	0.931
根部 Root	0.878	0.978 *	0.959 *	0.990 *	0.419	0.709	0.847	0.963 *

3 结论 (Conclusion)

(1) 续断菊体内 Cd 的化学形态主要以 NaCl、HAc 和 HCl 提取态为主, 随 Cd 处理浓度的增加 3 种提取形态 Cd 含量显著增加, 从而促进 Cd 向活性较弱的结合形态转移。

(2) 细胞壁是 Cd 在续断菊体内的主要结合位点, 占总 Cd 含量的 36%—47%, 且随着 Cd 浓度的升高, 细胞壁中的分布量增加。

(3) 续断菊体内低分子有机酸主要为酒石酸, 占有有机酸总量的 68%—96%。但是对 Cd 吸收、迁移和积累有关的主要是苹果酸和柠檬酸, 它们与植物地上部和根部 Cd 含量呈显著正相关。

(4) 续断菊根系分泌 4 种低分子有机酸顺序为: 酒石酸>苹果酸>柠檬酸>乙酸; 随着时间的延长乙酸和柠檬酸所占总量的比例减小, 酒石酸和苹果酸所占比例显著增加。两个时期根系分泌苹果酸均与植物地上部和根部 Cd 含量呈显著正相关。

参考文献 (References)

- [1] 秦丽, 祖艳群, 李元, 等. 会泽铅锌矿渣堆周边 7 种野生植物重金属含量及累积特征研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(8): 1558-1563.
QIN L, ZU Y Q, LI Y, et al. Heavy metal contents and accumulation characteristic of seven wild plants from the slagheap surrounding of Huize lead-zinc tailings[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(8): 1558-1563 (in Chinese).
- [2] 陈秀玲, 张磊. 小麦/花生不同间作方式对花生吸收积累 Cd 的影响[J]. 环境化学, 2014, 33(9): 1469-1475.
CHEN X L, ZHANG L. Influence on cadmium uptake by peanut of wheat /peanut intercropping modes[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(9): 1469-1475 (in Chinese).
- [3] ZU Y Q, LI Y, CHEN J J, et al. Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grown on lead-zinc mining area in Yunnan, China[J]. Environment International, 2005, 31(5): 755-762.
- [4] GAO B, ZHOU H, LIANG X, et al. Cd isotopes as a potential source tracer of metal pollution in river sediments[J]. Environmental pollution, 2013, 181: 340-343.
- [5] 王晓娟, 王文斌, 杨龙, 等. 重金属镉 (Cd) 在植物体内的转运途径及其调控机制[J]. 生态学报, 2015, 35(23): 7921-7929.
WANG X J, WANG W B, YANG L, et al. Transport pathways of cadmium (Cd) and its regulatory mechanisms in plant[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(23): 7921-7929 (in Chinese).
- [6] WANG P, DENG X, HUANG Y, et al. Comparison of subcellular distribution and chemical forms of cadmium among four soybean cultivars at young seedlings[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(24): 19584-19595.
- [7] ZHAO Y, WU J, SHANG D, et al. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in the edible seaweed, *Porphyra yezoensis*[J]. Food Chemistry, 2015, 168: 48-54.
- [8] LAI H Y. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *impatiens walleriana* in relation to its phytoextraction potential[J]. Chemosphere, 2015, 138: 370-376.
- [9] 于辉, 杨中艺, 杨知建, 等. 不同类型镉积累水稻细胞镉化学形态及亚细胞和分子分布[J]. 应用生态学报, 2008, 19(10): 2221-2226.
YU H, YANG Z Y, YANG Z J, et al. Chemical forms and subcellular and molecular distribution of Cd in two Cd-accumulation rice genotypes[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(10): 2221-2226 (in Chinese).
- [10] MA J F, UENO D, ZHAO F J, et al. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*[J]. Planta, 2005, 220(5): 731-736.
- [11] 张琼, 段罕慧, 汪文云, 等. Si 对 Cd 胁迫下白骨壤幼苗低分子质量有机酸代谢的影响[J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2013, 52(6): 866-875.
ZHANG Q, DUAN H H, WANG W Y, et al. Effects of Si on the low molecular weight organic acid metabolism of *Avicennia marina* under Cd stress[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2013, 52(6): 866-875 (in Chinese).
- [12] 朱艳霞, 魏幼璋, 叶正钱, 等. 有机酸在超积累植物重金属解毒机制中的作用[J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2006, 34(7): 121-126.
ZHU Y X, WEI Y Z, YE Z Q, et al. Function of organic acids in heavy metal tolerance mechanism in hyperaccumulator[J]. Jour of Northwest Sci-Tech Univ of Agri and For (Nat Sci Ed), 2006, 34(7): 121-126 (in Chinese).
- [13] KRAME U, PICKERING I J, PRINCE R C, et al. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species[J]. Plant Physiol, 2000, 122: 1343-1353.
- [14] SHANTI S, SHARMAL, KARL J D. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to

- heavy metal stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(4): 711-726.
- [15] LU H L, YAN C L, LIU J C. Low-molecular-weight organic acids exuded by Mangrove (*Kandelia candel* (L.) Druce) roots and their effect on cadmium species change in the rhizosphere[J]. Environmental and Experimental Botany, 2007, 61(2): 159-166.
- [16] LAKSHMANAN V, KITTO S L, CAPLAN J L, et al. Microbe-associated molecular patterns-triggered root responses mediate beneficial rhizobacterial recruitment in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2012, 160(3): 1642-1661.
- [17] TONG B, SUN T H, SUN L N. Low molecular weight organic acids in root exudates and cadmium accumulation in cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and nonhyperaccumulator *Solanum lycopersicum* L.[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(75): 17180-17185.
- [18] 秦丽, 祖艳群, 李元. Cd 对超累积植物续断菊生长生理的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29 (B10): 53-57.
QIN L, ZU Y Q, LI Y. Effects of Cd on the physiological characteristics and growth of the *Sonchus asper* (L.) Hill. [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29 (B10): 53-57 (in Chinese).
- [19] 谭建波, 陈兴, 郭先华, 等. 续断菊与玉米间作系统不同植物部位 Cd、Pb 分配特征[J]. 生态环境学报 2015, 24(4): 700-707.
TAN J B, CHEN X, GUO X H, et al. Distribution characteristics of Pb and Cd in different parts of *Sonchus asper* and *Zea mays* in an intercropping system [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2015, 24(4): 700-707 (in Chinese).
- [20] WEIGLE H J, JAGER H J. Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean [J]. Plant Physiology, 1980, 65: 480-482.
- [21] XU Q S, MIN H L, CAI S J, et al. Subcellular distribution and toxicity of cadmium in *Potamogeton crispus* L. [J]. Chemosphere, 2012, 89(1): 114-120.
- [22] KUANG Y W, WEN D Z, ZHONG C W, et al. Root exudates and their roles in phytoremediation[J]. Acta Phytocologica Sinica, 2003, 27(5): 709-717
- [23] 周小勇, 仇荣亮, 胡鹏杰等. 镉和铅对长柔毛委陵菜体内锌的亚细胞分布和化学形态的影响[J]. 环境科学, 2008, 29(7): 2028-2036.
ZHOU X Y, QIU R L, HU P J, et al. Effects of cadmium and lead on subcellular distribution and chemical form of zinc in *Potentilla griffithii* Var. *velutina* [J]. Environmental science, 2008, 29(7): 2028-2036 (in Chinese).
- [24] 白雪, 陈亚慧, 耿凯, 等. 镉在三色堇中的积累及亚细胞与化学形态分布[J]. 环境科学学报, 2014, 34(6): 1600-1605.
BAI X, CHEN Y H, GENG K, et al. Accumulation, subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Vionlarricolor* L. [J]. Acta Science Circumstantiae, 2014, 34(6): 1600-1605 (in Chinese).
- [25] ZU Y Q, LI Y, MIN H, et al. Subcellular distribution and chemical form of Pb in hyperaccumulator *Arenaria orbiculata* and response of root exudates to Pb addition[J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2015, 9: 250-258.
- [26] 许嘉琳, 鲍子平, 杨居荣, 等. 农作物体内铅、镉、铜的化学形态研究[J]. 应用生态学报, 1991, 2(3): 244-248.
XU J L, BAO Z P, YANG J R, et al. Chemical form of Pb, Cd and Cu in crops [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 1991, 2(3): 244-248 (in Chinese).
- [27] BIDWELL S D, CRAWFORD S A, WOODROW E, et al. Subcellular localization of Ni in the hyperaccumulator *Hybanthus floribundus* (Lindley) F. Muell [J]. Plant, Cell and Environment, 2004, 27: 705-716.
- [28] VAZQUEZ S, FERNANDEZ P M, SANCHEZ P B, et al. Subcellular compartmentalisation of cadmium in white lupins determined by energy-dispersive X-ray microanalysis[J]. Plant Physiol, 2007, 164(9): 1235-1238.
- [29] COSIO C, MARTINOIA E, KELLER C. Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caeratescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level[J]. Plant Physiology, 2004, 134: 716-725.
- [30] ALLEN D L, JARRELL W M. Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls[J]. Plants Physiology, 1989, 89(3): 823-832.
- [31] MATHYS W. The role of malate, oxalate and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants[J]. Physiol Plant, 1977, 40: 130-136.
- [32] 秦丽, 李元, 祖艳群等. 镉胁迫对续断菊 (*Sonchus asper* L. Hill.) 根系分泌物的影响[J]. 生态环境学报, 2012(3): 540-544.
QIN L, LI Y, ZU Y Q, et al. Effects of Cd Contamination on the Root Exudates of *Sonchus asper* L. Hill. [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2012(3): 540-544 (in Chinese).
- [33] XIE X Y, WEISS D J, WENG B S, et al. The short-term effect of cadmium on low molecular weight organic acid and amino acid exudation from mangrove (*Kandelia obovata* (S., L.) Yong) roots[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2012, 19: 1-12.
- [34] HAMMER D, KELLER C. Change in the rhizosphere of metal-accumulating plants evidenced by chemical extractants [J]. Journal of Environmental Quality, 2002, 31(5): 1561-1569.