

陈顺钰, 韩 航, 陈加松, 等. 柳叶箬对 Pb 胁迫的生理响应及其体内 Pb 的亚细胞分布研究[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(5): 884–890.

CHEN Shun-yu, HAN Hang, CHEN Jia-song, et al. Effects of Pb stress on physiological characteristics and subcellular distribution of Pb in *Isachne globosa* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(5): 884–890.

柳叶箬对 Pb 胁迫的生理响应及其体内 Pb 的亚细胞分布研究

陈顺钰^{1,2}, 韩 航^{1,2}, 陈加松^{1,2}, 蔡丽平^{1,2}, 侯晓龙^{1,2,3*}, 刘爱琴^{1,2}, 周垂帆^{1,2}

(1. 福建农林大学林学院, 福州 350002; 2. 海峡两岸红壤区水土保持协同创新中心, 福州 350002; 3. 福建农林大学资源与环境学院, 福州 350002)

摘 要:以 Pb 超富集植物柳叶箬(*Isachne globosa*)为研究对象,采用室内模拟 Pb 胁迫水培试验,设计不同 Pb 浓度(0、250、500、1000、1500 mg·L⁻¹)胁迫处理,测定柳叶箬体内不同化学形态 Pb、有机酸和非蛋白巯基含量,以及体内 Pb 的亚细胞分布,探讨柳叶箬对 Pb 胁迫的响应机理。结果表明:随 Pb 胁迫浓度的增大,柳叶箬体内各化学形态的 Pb 含量显著增大($P<0.05$);Pb 胁迫条件下,柳叶箬体内的 Pb 以盐酸提取态为主,其次为醋酸提取态、NaCl 提取态和乙醇提取态,去离子水提取态和残渣态含量较低;柳叶箬叶片的柠檬酸和苹果酸,以及体内非蛋白巯基含量均随 Pb 浓度的增加而显著增加($P<0.05$);电镜观察发现,大部分 Pb²⁺被束缚在细胞壁中,细胞区室化作用显著。以上结果表明,有机酸和非蛋白巯基的螯合作用以及 Pb 的细胞区室化作用对柳叶箬在 Pb 胁迫过程中具有重要解毒作用。

关键词: Pb 超富集植物;柳叶箬;有机酸;非蛋白巯基;细胞区室化

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2017)05-0884-07 doi:10.11654/jaes.2016-1575

Effects of Pb stress on physiological characteristics and subcellular distribution of Pb in *Isachne globosa*

CHEN Shun-yu^{1,2}, HAN Hang^{1,2}, CHEN Jia-song^{1,2}, CAI Li-ping^{1,2}, HOU Xiao-long^{1,2,3*}, LIU Ai-qin^{1,2}, ZHOU Chui-fan^{1,2}

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Co-innovation Center for Soil and Water Conservation in Red Soil Region of the Cross-straits, Fuzhou 350002, China; 3. College of Resource and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Isachne globosa*, a type of Pb hyperaccumulator, was selected as a study subject. An indoor hydroponic Pb stress experiment was designed and five different Pb concentrations (0, 250, 500, 1000, and 1500 mg·L⁻¹) were set to identify the concentrations of the different chemical forms of Pb, organic acids, and non-protein thiols (NPT) and the distribution of Pb, and then to reveal the response mechanism of *Isachne globosa* to high Pb stress. The results showed that with the increase in Pb concentration, the concentrations of Pb of different chemical forms in the shoot and root of *Isachne globosa* were significantly increased ($P<0.05$). Pb primarily existed in roots and leaves of *Isachne globosa* as HCl-extractable forms, secondly as HAc- and NaCl-extractable forms, and was barely found as H₂O-extractable and residual

收稿日期: 2016-12-09

作者简介: 陈顺钰(1993—), 女, 四川攀枝花人, 硕士研究生, 研究方向为退化地生态修复。E-mail: 1607236994@qq.com

* 通信作者: 侯晓龙 E-mail: xl.hou@fafu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(41401364); 国家科技支撑计划项目(2014BAD15B02); 国家林业局林业公益性行业科研项目(201304303); 福建省科技厅重点项目(2017Y0001)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(41401364); The National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China(2014BAD15B02); Special Fund for Forest Scientific Research in the Public Welfare(201304303); The Special Fund for Key Program of Science and Technology of Fujian Province, China(2017Y0001)

forms. In addition, the citric acid, malic acid, and NPT concentrations of *Isachne globosa* significantly increased ($P < 0.05$) along with the increase in Pb concentration. Observations through an electron microscope revealed that the most of Pb existed in the cell walls of the root and shoot of *Isachne globosa* and an obvious cell compartmentation was detected. We therefore concluded that the chelation of organic acids and NPT and the cell compartmentation of Pb played important roles in the adaptation of *Isachne globosa* to the high Pb stress environment.

Keywords: Pb hyperaccumulator; *Isachne globosa*; organic acid; non-protein thiols; cell compartmentation

随着我国工农业的快速发展,许多富含重金属的污染物通过地矿渗漏、工业废水、大气沉降、不合理施用农用物资等途径进入土壤,造成大面积土壤重金属污染。重金属具有难被植物吸收利用、不能被微生物降解和在土壤中难迁移等特征,对土壤环境造成严重破坏,并通过食物链威胁人类健康。因此,重金属污染土壤修复成为当前研究的热点^[1-2]。常见污染物中,Pb是对植物产生毒性、污染频率高的重金属之一,且具有导致人体疾病的潜质^[3]。土壤重金属污染治理的工程和物理化学方法一般都存在高能耗、费时、破坏土壤结构等缺点,影响修复效果^[4]。植物修复技术具有安全经济、绿色环保等优点而备受关注^[5]。植物修复技术的前提是筛选重金属的超富集植物。柳叶箬(*Isachne globosa*)是一种在南方矿区筛选出的Pb超富集植物,最高可在Pb含量超过土壤环境质量三级标准近34倍的福建尤溪铅锌矿正常生长,且在Pb浓度为1000 mg·L⁻¹处理下,其地上部Pb含量超过1000 mg·kg⁻¹,对Pb的转运系数达6.5,达到了Pb超富集植物的标准^[6-7]。柳叶箬对Pb的耐性和超富集能力是长期适应高浓度Pb胁迫环境而造就的,其中可能蕴藏着特殊的耐性策略和解毒机理。国内外学者在超富集植物对重金属的富集能力及解毒机制方面已有部分研究^[8-9],结果表明通过螯合作用固定重金属离子,在组织水平,细胞的区室化作用、细胞壁固定作用等在耐性植物消解重金属毒害方面发挥重要作用^[10]。但目前发现的Pb超富集植物种类较少,对Pb超富集植物的解毒机理尚不清楚。

鉴于此,通过室内模拟Pb胁迫水培试验,测定不同Pb浓度处理下,柳叶箬体内Pb的化学形态以及非蛋白巯基和有机酸含量,利用电泳分析其体内Pb的亚细胞分布,探讨柳叶箬如何通过生理调控来适应高浓度Pb胁迫的环境,研究其对Pb胁迫的响应策略,以期揭示Pb超富集植物的解毒机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养

以采自福建尤溪铅锌矿的柳叶箬种子为基础材

料,置于人工气候箱(温度27℃、湿度75%)中,待种子发芽后,选取长势较为一致的幼苗移栽于Hoagland营养液中培养,调节pH为6.0,每日蒸发的营养液用超纯水补足,每4d更换一次营养液。待种子生根并长出新叶,选取苗高为7~10cm的植株用于胁迫试验。

1.2 试验处理

将柳叶箬植株移入装有营养液的培养桶中,每桶5株,分别加入Pb胁迫浓度为0、250、500、1000、1500 mg·L⁻¹的溶液,每个处理3次重复。

在Pb胁迫第10d,制备柳叶箬电泳样品。从各组中随机取1株幼苗,依次用蒸馏水和去离子水将植株叶片表面和根系冲洗干净后,用锋利刀片截取植株顶端第三片叶和白色根尖,叶片取2mm×5mm的小块,根尖取2mm长,立即放入2.5%的戊二醛,在黑暗条件下固定6h。在试验第12d,采集鲜样进行有机酸和非蛋白巯基的测定,从培养桶中取出2株植株用去离子水反复冲洗后立即置于液氮中保存。试验进行15d后收获植株,用蒸馏水反复冲洗,再用20mmol·L⁻¹ Na₂EDTA浸泡15min,将吸附于根表面的Pb交换下来,用去离子水反复冲洗干净并擦干,将地上部与根分开,置于105℃烘箱中杀青10min,60℃烘干至恒重,经植物粉碎机磨碎处理后过0.5mm尼龙筛备用,作为柳叶箬体内Pb化学形态的待测样品。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 Pb在柳叶箬体内的化学形态

采用化学试剂逐步提取法测定Pb在柳叶箬体内的化学形态^[11],其中5种提取剂及提取顺序为:(1)FE为80%的乙醇提取态,提取醇溶性蛋白和硝酸盐、氨基酸盐等;(2)FW为去离子水提取态,提取水溶性有机盐;(3)FNaCl为1mol·L⁻¹的NaCl提取态,提取果胶酸盐、蛋白质结合态或吸附态重金属等;(4)FHAc为2%的醋酸提取态,提取难溶于水的重金属磷酸盐等;(5)FHCl为0.6mol·L⁻¹的盐酸提取态,提取草酸盐等;(6)FR为残渣态。

称取地上部和根各0.5g,加入20mL 80%的乙醇提取液,研磨匀浆后转入50mL离心管,在25℃恒温

振荡 2 h 后, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 倒出上清液回收; 再加入 20 mL 乙醇提取液, 浸泡 2 h 后回收。集中 2 次提取液于 250 mL 的三角瓶中, 将提取液蒸发至近干后, 用 8 mL 硝酸和 2 mL 高氯酸加热消煮至澄清, 放置过夜后加热, 直至三角瓶中溶液近干, 冷却至室温后用去离子水定容至 50 mL 容量瓶中, 作为待测液。将乙醇提取后的残渣用去离子水提取, 依次按以上方法继续提取直至所有提取剂都完成提取后, 残渣经消化后也定容至 50 mL 容量瓶中, 作为待测液。采用 SpectrAA-220 原子吸收分光光度计, 测定待测液中 Pb 的含量。

1.3.2 柳叶箬叶片有机酸含量

从液氮中取柳叶箬植株相同部位叶片 0.5 g 用超纯水冲洗干净, 吸净表面水分, 加入 2 mL $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 充分研磨成匀浆, 于 60°C 水浴中提取 1 h, 将样液转入离心管内振荡 15 min, 置于 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心 10 min, 过滤提取上清液, 用去离子水定容至 50 mL 容量瓶中, 取 1 mL 过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 放入 4°C 冰箱待测。

采用逐级提取-高效液相色谱法^[12], 测定待测液中草酸、柠檬酸、乙酸、苹果酸 4 种有机酸的含量。

1.3.3 柳叶箬体内非蛋白巯基(NPT)含量

NPT 含量的测定采用 DTNB 显色法^[13]。称取柳叶箬相同部位叶片 0.5 g 及 2 cm 长根尖 0.5 g, 加入 2 mL 预冷的 5% (W/V) 磺基水杨酸, 冰浴研磨, 冰浴 30 min 后转移到离心管, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min; 取上清液 0.4 mL, 依次加入 3.05 mL $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl (pH 8.3) 和 0.15 mL $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DTNB, 室温下放置 20 min, 然后用分光光度计 (波长 412 nm) 测定样品吸光度值。

1.3.4 亚细胞分布

采用电镜观察法对柳叶箬亚细胞的分布进行测定。将在黑暗条件下用 2.5% 的戊二醛固定 6 h 后的待测样品, 用 pH 7.2 的磷酸缓冲液冲洗 4 次 (每次 15 min); 洗涤后将样品用 2% 的锇酸浸泡过夜; 用梯度浓度酒精逐级脱水 (50%、70%、85%、90%、95% 各 5 min), 最后在 100% 酒精中脱水两次, 时长分别为 5、10 min; Spur 包埋, 70°C 聚合 8 h 后, 用 LKB8800 型超薄切片机切片, 在 JEM-100CX 型 (上海秉新生物科技有限公司) 透射电镜下观察并拍照。

1.4 数据处理方法

所有数据均采用 SPSS 19.0 进行统计分析, 图表中数据用平均值 $\pm$ 标准差表示 ($n=3$), 采用单因子方

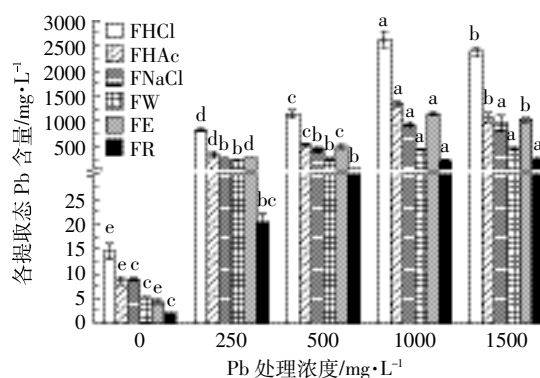
差分析 (One-way ANOVA) 和多重比较法进行统计分析, 用 Tukey HSD 法对处理数据进行差异显著性分析, 以 $P<0.05$ 表示处理间数据差异显著。

2 结果与分析

2.1 Pb 在柳叶箬体内的化学形态

2.1.1 Pb 在柳叶箬叶片中的化学形态

由图 1 可知, 随着 Pb 胁迫浓度的增加, 柳叶箬叶中各提取态 Pb 含量均显著增加 ($P<0.05$), 且均在 Pb 处理浓度为 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大, 之后略有下降, 说明 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Pb 处理可能是柳叶箬的耐受极限。各提取态 Pb 含量表现为盐酸提取态 > 醋酸提取态 > 乙醇提取态 > 氯化钠提取态 > 去离子水提取态 > 残渣态, 说明随 Pb 处理浓度的增大, 柳叶箬叶片醇溶性蛋白、氨基酸盐、磷酸盐等含量增加, 与 Pb^{2+} 螯合转化为蛋白质结合态、磷酸盐结合态等难迁移的化学形态。



不同字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。下同

图 1 Pb 胁迫下柳叶箬叶片中不同化学形态 Pb 含量

Figure 1 Concentrations of different chemical forms of Pb in leaves of *Isachne globosa* under Pb stress

由图 2 可知, 不同 Pb 浓度处理, 柳叶箬叶片中盐酸提取态 Pb 所占比例均最大, 达到 33% 以上, 其次是磷酸盐结合态 17.5%~22%、蛋白质结合态 12.5%~20.4% 和氨基酸盐 9.9%~17.1%, 水溶性有机盐 6.6%~11.8% 和残渣态 1.0%~4.5% 占比最低。

以上结果表明, Pb 胁迫条件下, 柳叶箬叶片中 Pb 主要与磷酸根离子、草酸根离子等形成稳定难容、难迁移的螯合物, 以此避免 Pb 对柳叶箬的毒性。

2.1.2 Pb 在柳叶箬根系中的化学形态

由图 3 可知, 随着 Pb 处理浓度的增加, 柳叶箬根系中各提取态 Pb 含量先呈显著增加的趋势 ($P<0.05$), 除残渣态以外, 其他提取态均在 Pb 浓度为 1000

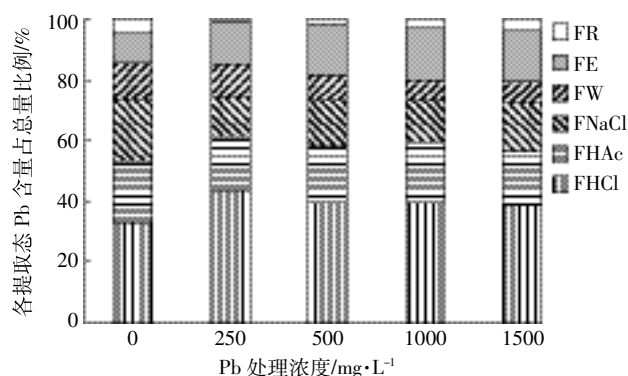


图 2 柳叶箬叶片中各提取态 Pb 占总量的比例

Figure 2 Percentage of each extractable forms of Pb in leaves
Isachne globosa in concentration

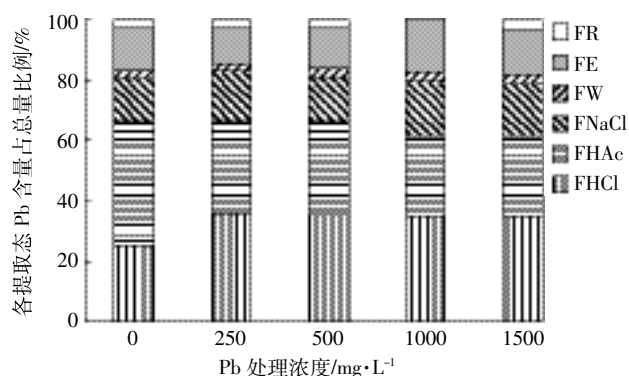


图 4 柳叶箬根部各提取态 Pb 占总量的比例

Figure 4 Percentage of each extractable forms of Pb in roots
Isachne globosa in concentration

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理时达到最大,然后有所下降;各提取态 Pb 含量表现为盐酸提取态>醋酸提取态>氯化钠提取态>乙醇提取态>去离子水提取态>残渣态,表明 Pb 在柳叶箬根系以盐酸提取态为主要存在形式。随着 Pb 胁迫浓度的增加,根系中草酸盐、果胶盐及蛋白质结合态的含量增加,与 Pb^{2+} 螯合形成难溶于水的盐酸提取态、氯化钠提取态。

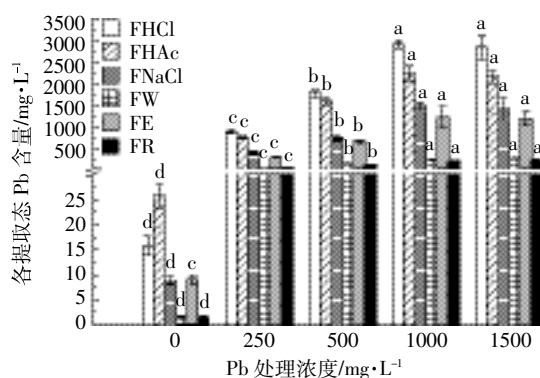


图 3 Pb 胁迫下柳叶箬根部各化学形态 Pb 含量

Figure 3 Concentrations of different chemical forms of Pb in roots
of *Isachne globosa* under Pb stress

由图 4 可知,不同 Pb 浓度处理,柳叶箬根系中醋酸提取态 Pb 所占比例最大,占 26.3%~41.1%,其次是盐酸提取态 25.4%~35.9%,氯化钠提取态 14.1%~17.7%和乙醇提取态 12.1%~17.8%,去离子水提取态 2.1%~3.4%和残渣态 2.5%~2.9%最低。这说明进入柳叶箬根系的 Pb 除磷酸盐形式外主要以草酸盐结合态、蛋白质结合态等迁移活性较弱的形态存在,从而避免 Pb 对柳叶箬根系的伤害。

2.2 Pb 胁迫下柳叶箬叶片中有机酸含量

由表 1 可得,随着 Pb 处理浓度的增加,柳叶箬叶

片中各有机酸的含量均呈增加的趋势。不同 Pb 胁迫处理下,柳叶箬叶片中苹果酸、草酸和柠檬酸含量均显著大于对照 ($P < 0.05$),而乙酸不同处理间均无显著差异 ($P > 0.05$);不同 Pb 胁迫处理下,柳叶箬叶片中的有机酸含量表现为草酸>苹果酸>柠檬酸>乙酸,说明 Pb 胁迫可促进柳叶箬叶片苹果酸、草酸和柠檬酸的分泌,螯合进入体内的 Pb,从而避免 Pb 的毒害作用。

2.3 Pb 胁迫下柳叶箬体内非蛋白巯基的含量

由表 2 可得,随着 Pb 处理浓度的增加,柳叶箬根部和叶片的 NPT 含量均呈逐渐增加的趋势,并在 Pb 处理浓度为 $1500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大,分别为对照的 2.76、3.06 倍;不同 Pb 胁迫条件下,柳叶箬根系和叶片的 NPT 含量差异达显著水平 ($P < 0.05$),且均显著大于对照 ($P < 0.05$)。

2.4 Pb 胁迫下柳叶箬亚细胞 Pb 的分布研究

2.4.1 Pb 在柳叶箬叶片细胞中的分布

由电镜图 5a 和图 5b 可以清楚的看到柳叶箬叶片中完好无损的各细胞器,在无 Pb 胁迫条件下细胞壁及细胞质膜表面清晰、光滑且连续,细胞核双层膜结构清晰,核仁完整,染色质均匀。从放大 1000 倍的图 5a 中没有看到黑色颗粒沉淀。在 Pb 处理浓度为 $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下,与图 5a 和图 5b 相比,图 5c 和图 5d 可以明显看出 Pb 胁迫对柳叶箬叶片的亚细胞结构产生了一定损伤,部分细胞壁细胞膜被破坏,在细胞间隙、细胞膜与细胞壁之间存在许多黑色颗粒,细胞中叶绿体基粒类囊体膨胀,基质片层排列无序,被膜结构模糊。黑色颗粒主要沉淀于细胞壁中,液泡、叶绿体中没有发现颗粒沉淀,表明大部分黑色颗粒被细胞壁固定。黄玫英等^[14]、徐劼^[15]通过 EDS 分别探讨 Pb 在类芦组织和茶树组织及亚细胞中的毒害效应,

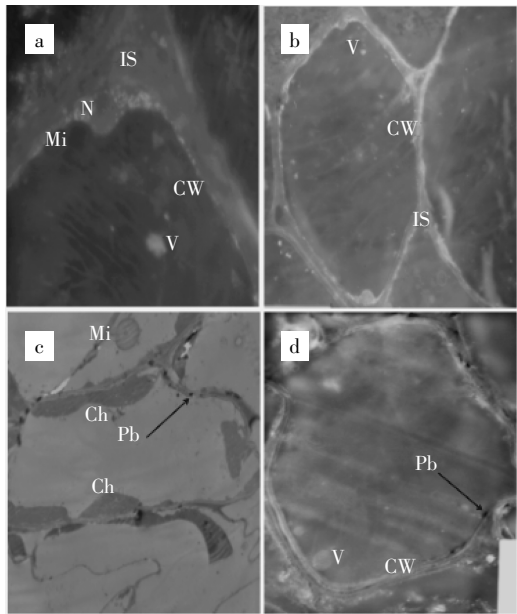
表 1 Pb 胁迫下柳叶箬叶片中有机酸含量
Table 1 The concentration of organic acid in the leaf of *Isachne globosa* under Pb stress

Pb 处理/mg·L ⁻¹	苹果酸/μmol·g ⁻¹	草酸/μmol·g ⁻¹	柠檬酸/μmol·g ⁻¹	乙酸/μmol·g ⁻¹
0	33.69±2.11b	122.72±1.13b	3.22±0.45c	2.16±0.13a
250	40.48±1.77a	126.30±1.00a	4.53±0.39b	2.33±0.17a
500	41.21±0.17a	125.12±1.08a	5.75±0.25a	2.47±0.18a
1000	42.80±0.45a	125.84±0.54a	5.98±0.19a	2.40±0.43a
1500	42.26±0.88a	124.14±0.51ab	6.09±0.20a	2.26±0.10a

注:平均值±标准差(n=3);同列不同字母表示处理间差异显著(P<0.05)。下同。

表 2 Pb 胁迫下柳叶箬体内非蛋白巯基含量
Table 2 The concentration of nonprotein thiols in *Isachne globosa* under Pb stress

Pb 处理/mg·L ⁻¹	柳叶箬体内非蛋白巯基含量/mmol·kg ⁻¹	
	根部	叶片
0	61.10±0.83e	67.55±0.83e
250	112.63±1.80d	142.64±2.30d
500	117.61±2.18c	152.66±0.83c
1000	159.09±0.41b	190.33±2.18b
1500	168.64±2.58a	206.55±2.58a



a×1000,b×1200,c×2500,d×1200
a,b 为对照;c,d 为 Pb 1000 mg·L⁻¹ 处理

CW.细胞壁 Cell Wall;Ch.叶绿体 Chloroplast;Mi.线粒体 Mitochondria;
N.细胞核 Nucleus;V.液泡 Vacuole;IS.细胞间隙Istercellular space。下同

图 5 不同处理下的柳叶箬叶细胞透射电镜图

Figure 5 Ultrastructure of leave cells of *Isachne globosa* in the different control treatment

证实了大量沉淀于类芦细胞壁以及叶绿体等细胞器中的黑色颗粒的主要成分是 Pb。因此,可以推断 Pb

胁迫条件下,柳叶箬叶可将 Pb²⁺固定在细胞壁,从而对减少 Pb 的毒害起到重要作用。

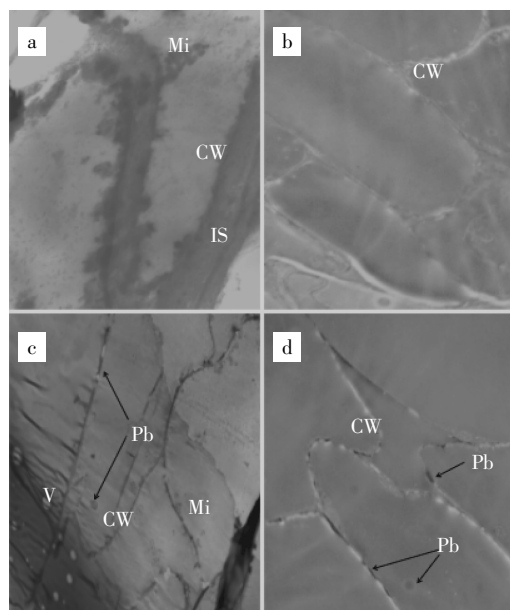
2.4.2 Pb 在柳叶箬根细胞中的分布

由电镜图 6a 和图 6b 中可以看出,在对照柳叶箬根细胞中细胞壁、线粒体、液泡清晰可见,各细胞器结构无损伤,从放大 2500 倍的图 6a 中没有发现黑色颗粒沉淀。与对照相比图 6c 和图 6d 明显可以看出线粒体被膜出现破裂,内部出现空泡化现象,脊突排列无序。细胞中有黑色颗粒沉淀,且沉积密集,形成黑斑。黑斑主要沉淀于细胞壁中,与叶片细胞相比,液泡、细胞质中含有少量的黑斑。这说明 Pb 胁迫条件下,柳叶箬根细胞壁对 Pb 的区室化作用在减轻 Pb 的毒害时有一定作用,但 Pb 胁迫也对柳叶箬根系产生了危害。

3 讨论

重金属对植物的毒害程度与重金属在植物体内的化学形态有密切关系^[16]。本试验发现,Pb 胁迫条件下,柳叶箬叶片和根系的 Pb 均以草酸结合态、磷酸盐结合态和蛋白质结合态等难溶、迁移能力弱、毒性低的结合态存在。杨素勤等^[17]研究发现,Pb 胁迫条件下,在小麦百农 160 和偃展 4110 体内 Pb 以醋酸提取态和盐酸提取态为主,其次是氯化钠提取态,并随 Pb 浓度增加难溶的草酸盐等含量增多,有效降低了 Pb 的毒害。崔研等^[18]研究证实了芦苇体内重金属以不同的化学形态存在,其迁移能力和从基质分离的难易程度及活性有明显差异,水溶性的有机酸盐、氯化物的迁移能力比难溶于水的重磷酸盐、草酸盐强,其毒性也更强。这些研究结果与本研究一致,说明将体内 Pb 转化为难溶性的结合态可能是柳叶箬耐 Pb 的重要机理之一。

NPT 是植物抵抗重金属胁迫的主要物质之一^[19],巯基(-SH)与重金属离子可以形成无毒或低毒的络合物存在于植物体内,是植物解毒机理之一^[20]。如 Cd



ax2500, bx1200, cx1500, dx1200
a、b 为对照; c、d 为 Pb1000 mg·L⁻¹ 处理

图 6 不同处理下的柳叶箬根细胞透射电镜图

Figure 6 Ultrastructure of root cells of *Isachne globosa* in the different control treatment

胁迫诱导了两个品种水稻体内 NPT 含量的增加,部分 Cd²⁺与大分子量蛋白质结合,大部分与植物螯合肽(PCs)结合,从而降低 Cd 的毒害性^[20]。本研究发现,随着 Pb 处理浓度的增大,柳叶箬根系和叶片的 NPT 含量显著增加,与前人的研究结果一致^[21]。同时,有机酸对重金属胁迫下植物抵抗重金属毒害具有重要意义,低分子有机酸与多种重金属离子形成不同的可溶性络合物,抑制重金属的跨膜运输,降低植物体内的重金属浓度,减轻伤害^[22-23]。在本研究中,Pb 胁迫下柳叶箬叶片中柠檬酸、苹果酸、草酸等有机酸含量增加,与 Pb²⁺发生螯合作用,形成可溶性的低毒或无毒性螯合态,此可能为柳叶箬耐 Pb 的重要机理之一。

细胞壁由含有负电基团(羧基、醛基、氨基及磷酸基)的纤维素、半纤维素和果胶组成,其代谢能力弱、活性低,并易与金属离子发生各种物理、化学反应,可有效防止植物体内重金属离子的跨膜转运^[24-25]。徐义昆等^[26]通过对 Pb 胁迫下香蒲细胞超微结构的观察发现,随着 Pb 胁迫的增加,其对香蒲亚细胞中各细胞器造成不可逆的损伤,叶绿体数目减少、线粒体结构破裂、核膜破损、核仁消失。从柳叶箬叶片和根部亚细胞结构中也发现,各细胞器在 Pb 处理下受到损伤以及大部分 Pb²⁺被束缚于细胞壁中,细胞壁中亲金属离子的配位基团与进入植物体内的 Pb²⁺相互作用形成稳

定的螯合物。这对提高柳叶箬对抗 Pb 毒害具有重要意义,其各细胞器沉积的 Pb 含量还有待进一步研究。

4 结论

Pb 胁迫条件下,柳叶箬体内的 Pb 主要以草酸盐结合态、磷酸盐结合态和蛋白质结合态等难迁移的形态存在。Pb 胁迫可诱导柳叶箬体内柠檬酸和苹果酸的增加,与 Pb²⁺发生螯合作用,以降低 Pb²⁺的毒害。Pb 胁迫显著增加了柳叶箬体内非蛋白巯基含量。柳叶箬叶片和根内大部分 Pb²⁺被束缚在细胞壁中,细胞区室化作用显著,避免了 Pb 对柳叶箬植株的进一步伤害。因此,有机酸和非蛋白巯基对 Pb 的螯合作用以及 Pb 的细胞区室化作用对柳叶箬在 Pb 胁迫过程中具有重要解毒作用。

参考文献:

- [1] 薛永,王苑嫒,姚泉洪,等. 植物对土壤重金属镉抗性的研究进展[J]. 生态环境学报, 2014, 23(3):528-534.
- [2] XUE Yong, WANG Yuan-yuan, YAO Quan-hong, et al. Research progress of plants resistance to heavy metal Cd in soil[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2014, 23(3):528-534.
- [3] 谭九洲,黄迎波. 植物重金属耐受分子机理的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(35):12782-12785.
- [4] TAN Jiu-zhou, HUANG Ying-bo. Research progress of the molecular mechanism of heavy metal tolerance of plants[J]. *Journal of Anhui Agriculture Sciences*, 2014, 42(35):12782-12785.
- [5] 乔绪强. 铅(Pb²⁺)胁迫下苕菜和菹草无菌苗的生理生化特性与容忍机制[D]. 南京:南京师范大学, 2014.
- [6] QIAO Xu-qiang. Under the lead stress physico-chemical responses and tolerance mechanism in *Nymphaea peltata* and *Potamogeton crispus* [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2014.
- [7] 肖青青,王宏斌,王海娟,等. 滇白前(*Silene viscidula*)对铅、锌、镉的共超富集特征[J]. 生态环境学报, 2009, 18(4):1299-1306.
- [8] XIAO Qing-qing, WANG Hong-bin, WANG Hai-juan, et al. Cophyper accumulative characteristics of lead, zinc and cadmium by *Silene viscidula* franch[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(4):1299-1306.
- [9] Insook L, Kyunghwa B, Hyunhee K, et al. Phytoremediation of soil co-contaminated with heavy metals and TNT using four plant species[J]. *Journal of Environmental Science and Health*, 2007, 42(3):2039-2045.
- [10] 侯晓龙,常青山,刘国锋,等. Pb 超富集植物金丝草(*Pogonatherum crinitum*), 柳叶箬(*Isachne globosa*)[J]. 环境工程学报, 2012, 6(3):889-995.
- [11] HOU Xiao-long, CHANG Qing-shan, LIU Guo-feng, et al. Two lead-hyperaccumulator: *Pogonatherum crinitum* and *Isachne globosa*[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6(3):889-995.
- [12] Liu J G, Dong Y, Xu H. Accumulation of Cd, Pb and Zn by 19 wetland plant species in constructed wetland[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 147(3):947-953.

- [8] 郭晓宏, 朱广龙, 魏学智. 5 种草本植物对土壤重金属铅的吸收、富集及转运[J]. 水土保持研究, 2016, 23(1): 183-186.
GUO Xiao-hong, ZHU Guang-long, WEI Xue-zhi. Characteristics of uptake, bioaccumulation and translocation of soil lead in five species of herbaceous plants[J]. *Research of Soil and Water Conservation*, 2016, 23(1): 183-186.
- [9] 张富运, 陈永华, 吴晓英, 等. 铅锌超富集植物及耐性植物筛选研究进展[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(12): 92-96.
ZHANG Fu-yun, CHEN Yong-hua, WU Xiao-fu, et al. Research advances on screening of hyperaccumulator and tolerant plant species of Pb-Zn[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2012, 32(12): 92-96.
- [10] 孙念礼, 陈琳煜, 丁培培, 等. 铅超富集植物筛选的研究进展[J]. 科学中国人, 2014, 14: 25-26.
SUN Nian-li, CHEN Lin-yu, DING Pei-pei, et al. The research progress of screening Pb hyperaccumulator[J]. *Scientific Chinese*, 2014, 14: 25-26.
- [11] Peronnet K, Schwartz C, Mbrel J L. Distribution of cadmium and zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown on multicontaminated soil[J]. *Plant and Soil*, 2003, 249(1): 19-25.
- [12] 黄天志, 王世杰, 刘秀明, 等. 逐级提取-高效液相色谱法快速测定植物组织中 8 种有机酸[J]. 色谱, 2014, 32(12): 1356-1361.
HUANG Tian-zhi, WANG Shi-jie, LIU Xiu-ming, et al. Rapid determination of eight organic acids in plant tissue by sequential extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2014, 32(12): 1356-1361.
- [13] 黄凯丰, 江解增. 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[J]. 植物科学学报, 2011, 29(4): 502-506.
HUANG Kai-feng, JIANG Jie-zeng. Sub-cellular fraction of heavy metals and production of phytochelatins in *Zizania latifolia* exposed to cadmium and lead[J]. *Plant Science Journal*, 2011, 29(4): 502-506.
- [14] 黄玫英, 罗洁文, 黄彩凤, 等. Pb 在类芦组织和亚细胞中的分布规律和毒害效应[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(11): 2077-2085.
HUANG Mei-ying, LUO Jie-wen, HUANG Cai-feng, et al. The distribution and toxic effects of Pb at the levels of the tissue and sub-cellular in *Neyraudia reynaudiana*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(11): 2077-2085.
- [15] 徐 劼. 茶树(*Camellia sinensis* L.)对铅的吸收累积及耐性机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
XU Jie. Mechanisms of lead uptake/accumulation and tolerance in tea plant(*Camellia sinensis* L.)[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011.
- [16] 梁 亮, 林 华, 田 静, 等. 多重金属富集植物李氏禾体内铜的化学形态研究[J]. 工业安全与环保, 2016, 42(3): 4-7.
LIANG Liang, LIN Hua, TIAN Jing, et al. Chemical forms of Cu in Co-accumulator *Leersia hexandra* Swartz[J]. *Industrial Safety and Environmental Protection*, 2016, 42(3): 4-7.
- [17] 杨素勤, 程海宽, 景鑫鑫, 等. 不同铅吸收特性小麦 Pb 的亚细胞分布和化学提取态[J]. 中国农业科学, 2015, 48(14): 2848-2856.
YANG Su-qin, CHENG Hai-kuan, JING Xin-xin, et al. Subcellular distribution and chemical-extraction of lead in wheat with different characteristics of lead absorption[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(14): 2848-2856.
- [18] 崔 妍, 丁永生, 公维民, 等. 土壤中重金属化学形态与植物吸收的关系[J]. 大连海事大学学报(自然科学版), 2005, 31(2): 59-63.
CUI Yan, DING Yong-sheng, GONG Wei-min, et al. Relations with chemical speciation of heavy metals in the soil and plant absorption[J]. *Journal of Dalian Maritime University(Natural Science)*, 2005, 31(2): 59-63.
- [19] 王 芳, 丁 杉, 张春华, 等. 不同镉耐性水稻非蛋白巯基及镉的亚细胞和分子分布[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(4): 625-629.
WANG Fang, DING Shan, ZHANG Chun-hua, et al. Non-protein thiols, subcellular and molecular distribution of cadmium in two rice cultivars with difference tolerance[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(4): 625-629.
- [20] 王 朋, 邓小娟, 黄益安, 等. 镉胁迫下不同大豆品种各器官中镉和非蛋白巯基物质的动态变化[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(2): 42-50.
WANG Peng, DENG Xiao-juan, HUANG Yi-an, et al. Dynamic changes of cadmium and non-protein thiol in different organs of different soybean genotypes under cadmium stress[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2016, 37(2): 42-50.
- [21] Sun R, Zhou Q. Heavy metal tolerance and hyperaccumulation of higher plants and their molecular mechanisms[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 29(3): 497-504.
- [22] 陈美静, 刘倩雯, 谭佳缘, 等. 重金属胁迫对植物有机酸代谢影响研究进展[J]. 广东农业科学, 2015, 42(24): 86-91.
CHEN Mei-jing, LIU Qian-wen, TAN Jia-yuan, et al. Research advance on effects of heavy metal stress on plant organic acid metabolism[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(24): 86-91.
- [23] 刘福春. 锌胁迫对互花米草生长、金属累积和有机酸变化的影响[J]. 安徽大学学报, 2016(4): 80-86.
LIU Fu-chun. Effects of zinc stress on growth, metal accumulation and organic acids changes of *Spartina alterniflora* Loisel[J]. *Journal of Anhui University*, 2016(4): 80-86.
- [24] 刘小文, 齐成媚, 李 园, 等. 不同铅水平下紫茎泽兰细胞内铅的分布和化学形态的分析[J]. 广西植物, 2016, 36(3): 335-341.
LIU Xiao-wen, QI Cheng-mei, LI Yuan, et al. Subcellular distribution and chemical forms of lead in *Eupatorium adenophorum* at different lead levels[J]. *Guihaia*, 2016, 36(3): 335-341.
- [25] 陈丽娟, 周冀衡, 李 强, 等. 镉对烟草的毒害及烟草抗镉机理研究进展[J]. 中国烟草科学, 2014, 35(6): 93-97.
CHEN Li-juan, ZHOU Ji-heng, LI Qiang, et al. Advance in cadmium toxicity to tobacco and its resistance mechanism[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2014, 35(6): 93-97.
- [26] 徐义昆, 徐小颖, 池 源, 等. 香蒲对不同浓度 Pb^{2+} 胁迫的生理应答及其细胞超微结构变化[J]. 西北植物学报, 2015, 35(10): 2018-2025.
XU Yi-kun, XU Xiao-ying, CHI Yuan, et al. Physiological responses and ultrastructural changes of *Typha orientalis* Presl under Pb^{2+} stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, 35(10): 2018-2025.