

锌对长柔毛委陵菜体内镉的亚细胞分布和化学形态的影响

周小勇¹, 仇荣亮^{1,2}, 应蓉蓉¹, 邹晓锦¹, 胡鹏杰¹, 李清飞¹, 于方明¹, 赵璇¹

(1. 中山大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510275; 2. 广东省环境污染控制与修复技术重点实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 为了解 Zn 对长柔毛委陵菜耐受 Cd 的影响, 通过营养液培养并采用差速离心技术和化学试剂逐步提取法研究了 Zn 对长柔毛委陵菜(*Potentilla griffithii* var. *velutina*) 体内 Cd 的亚细胞分布和化学形态的影响。结果表明, 长柔毛委陵菜体内 72%~95% 的 Cd 分布在细胞壁和可溶组分中, 这表明 Cd 主要分布在长柔毛委陵菜体内的细胞壁和可溶组分中, 而在叶绿体、细胞核和线粒体中分布较少。同时, 随 Cd 或 Zn 处理浓度的增加, 细胞壁对 Cd 的固持作用增强。长柔毛委陵菜体内的 Cd 以不同化学形态存在: 对照中 73%~93% 的 Cd 以水提取态和乙醇提取态存在, 在其他处理中主要以氯化钠提取态、水提取态和乙醇提取态为主, 三者占总量的 86%~96%; 其中在 Zn/Cd 复合处理中氯化钠提取态是含量最高的形态, 所占比例为 42%~78%; 而醋酸提取态、盐酸提取态和残留态的含量在所有处理中分布都较低, 只占总量的 3%~14%。另外, 随 Cd 或 Zn 处理浓度的增加, 活性较强的水提取态和乙醇提取态的分配比例总和减少, 而氯化钠提取态所占比例却增加, 这表明 Cd 向活性较弱的化学形态转移。因此, 细胞壁固持、可溶组分的液泡区隔化和向活性较弱的结合形态转移可能是长柔毛委陵菜耐 Cd 的主要机制。

关键词: 长柔毛委陵菜; 亚细胞分布; 化学形态; 镉

中图分类号: X503.233 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)03-1066-06

Effects of Zn on Subcellular Distribution and Chemical Forms of Cd in *Potentilla griffithii* var. *velutina*

ZHOU Xiao-yong¹, QIU Rong-liang^{1,2}, YING Rong-rong¹, ZOU Xiao-jin¹, HU Peng-jie¹, LI Qing-fei¹, YU Fang-ming¹, ZHAO Xuan¹

(1. School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory for Environmental Pollution Control and Remediation Technology, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Using the differential centrifugation technique and sequential chemical extraction methods, effects of Zn on subcellular distribution and chemical forms of Cd under nutrient solution culture were studied to understand the influence of Zn on Cd tolerance in Zn hyperaccumulator *Potentilla griffithii* var. *velutina*. The results showed that 72%~95% of total Cd were bound to cell wall and soluble fraction in the plant, and only a small quantity of Cd distributed in chloroplast, karyon and mitochondrion, which suggested that cell wall and soluble fraction in the plant were major storage sites for Cd. Moreover, cell wall binding Cd fraction increased with the increasing of Cd or Zn concentrations in the nutrient solution. As to Cd chemical forms, 73%~93% of total Cd existed as water- and ethanol-extractable forms in the plants under the control, and 86%~96% of total Cd existed as NaCl-, water- and ethanol-extractable Cd forms in other treatments. Whereas NaCl-extractable form, accounting for 42%~78% of total Cd, was dominant in Zn/Cd compound treatments. The percentage of NaCl-extractable Cd form increased but those of ethanol- and water-extractable Cd forms decreased with the increasing of Cd or Zn concentration, which indicated that Cd or Zn addition facilitated the transferring of Cd from relatively higher active chemical forms to less active ones. The results mentioned above indicate that cell wall binding, vacuolar compartmentalization in the soluble fraction and transferring to lower active chemical forms are main tolerance mechanisms for Cd in *Potentilla griffithii* var. *velutina*.

Keywords: *Potentilla griffithii* var. *velutina*; subcellular distribution; chemical form; cadmium

植物耐受重金属可以通过选择性吸收、金属排泄、根部滞留、细胞壁固定、植物络合素络合和酶系统的特殊耐性等不同策略来实现^[1-2]。超富集植物富集重金属的特殊能力与其在细胞和亚细胞水平上对有毒金属的区隔化密切相关^[3],因此亚细胞分布可为植物对重金属的解毒和生物富集机制提供必要信息^[4]。目前,人们就植物对重金属 Cd 的亚细胞分布进行较多研究,其研究表明 Cd 主要富集在植物细胞的液泡中^[5,6]或细胞壁中^[7,8]或两者兼而有之^[6,9-11]。同时植物体内重金属结合形态的研究对揭示植物对重金属的毒理和耐性也有重要意义^[12,13]。以往的研究多集中在单金属的耐性方面^[3,5,8,10],而重金属之间对彼此的亚细胞和化学形态影响的研究却鲜见报道。

长柔毛委陵菜(*Potentilla griffithii* var. *velutina*)是新发现的 Zn 超富集植物^[14];同时它对 Cd 也具有较强的吸收和富集能力,其叶片、叶柄和根在水培时分别富集 Cd 达到 1 604、6 145 和 7 671 mg·kg⁻¹。而 Cd 不是植物所需元素,即使在相对低浓度下也会对植物产生严重的危害^[9],这预示着长柔毛委陵菜体内存在一些 Cd 的解毒机制。前期曾对长柔毛委陵菜耐 Zn 机理作过报道^[15],但至今未对其富集 Cd 的耐性机理进行研究。同时,Zn 与 Cd 属于周期表中同族元素,化学性质相似,Zn 对超富集植物体内 Cd 的亚细胞分布和化学形态是否有影响,目前研究甚少。本研究采用差速离心技术和化学试剂逐步提取法研究长柔毛委陵菜体内 Cd 的分布和结合形态以及 Zn 对其影响,以揭示长柔毛委陵菜耐 Cd 机理。

1 材料与方法

1.1 植物培养

供试植物为 Zn 超富集植物长柔毛委陵菜。用采自云南铅锌矿区的种子在营养土中萌发,生长 100 d 后,选择长势良好和生长一致的植株,用自来水洗净后移至 Hogland 全营养液培养(其中 ZnSO₄·7H₂O 换成同浓度的 Zn(NO₃)₂·6H₂O),在温室预培养 4 d 后进行 Cd 和 Zn 处理。单 Cd 设置 3 个处理(mg·L⁻¹):0(对照)、5 和 20;Zn/Cd 设置 4 个处理(mg·L⁻¹):10 Zn+5 Cd、10 Zn+20 Cd、100 Zn+5 Cd 和 100 Zn+20 Cd;Cd 和 Zn 分别以 CdCl₂·2.5H₂O 和 Zn(NO₃)₂·6H₂O 的形式加入营养液中。每个处理 3 个重复,每个重复 3 株苗,连续通气,每 4 d 更换 1 次营养液;每天用 0.1 mol·L⁻¹ HCl 或 NaOH 调节 pH 至 5.6 左右,21 d 后收获。植株根系先用自来水冲洗,再用 20 mmol·L⁻¹ Na₂-EDTA

交换 20 min,去除根系表面吸附的 Cd²⁺和 Zn²⁺,最后用去离子水洗净,吸干表面水分,保存于-20℃冰箱内备用。每个处理的植物样品先分成叶片、叶柄和根 3 个部位,每个处理的植物样品分成 3 部分,分别用于测定亚细胞分布、化学形态和重金属全量。

1.2 植物亚细胞组分的分离

采用差速离心法分离不同的细胞组分。在 Weigel 等^[5]、Gabbrielli 等^[16]和吴箐等^[15]的方法基础上加以改进:准确称取鲜样 0.500 0 g,加入 20 mL 提取液[0.25 mol·L⁻¹ 蔗糖+50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)+1 mmol·L⁻¹ 二硫赤鲜糖醇],研磨匀浆,匀浆液在冷冻离心机 300×g 下离心 30 s,沉淀为细胞壁组分(F1);上清液在 2 000×g 下离心 15 min,沉淀为细胞核和叶绿体组分(F2);上清液在 10 000×g 下离心 20 min,沉淀为线粒体组分(F3);上清液为含核糖体的可溶组分(F4)。全部操作在 4℃下进行。

1.3 植物体内的化学形态分析

采用化学试剂逐步提取法^[12],具体操作如下:准确称取鲜样 0.500 0 g,加入 20 mL 提取剂研磨匀浆后转入 50 mL 的塑料离心管,在 25℃恒温振荡 22 h 后,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。倒出上清液,再加入 10 mL 的提取剂,25℃恒温振荡 1 h,5 000 r·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 mol·L⁻¹ NaCl 溶液(F_{NaCl}),2% HAc (F_{HAc}),0.6 mol·L⁻¹ HCl (F_{HCl}),最后为残留态(F_R)。

1.4 重金属含量的测定

以提取剂作为空白,上清液直接用 HITACHI 公司生产的原子吸收分光光度计(Z-5000)测定 Zn 和 Cd 含量;沉淀和残渣部分用去离子水多次冲洗转入 100 mL 三角瓶中,于电热板上蒸干,与测定植物重金属全量一样采用 HNO₃-HClO₄ 法,消煮至澄清,用去离子水定容后测定。采用 SPSS11.5 软件对数据进行方差分析,用 Dunan 新复极差法(SSR)在显著水平 0.05 时作多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 Cd 在长柔毛委陵菜中的亚细胞分布

在长柔毛委陵菜各部位的亚细胞组分分离过程中,Cd 的回收率达 89%~102%(表 1),说明差速离心法能较好地用于 Cd 的亚细胞水平分布研究。

从表 1 可知,在叶片的亚细胞分布中,单 Cd 处理的 Cd 主要分布在可溶组分 F4 中,占总量的 56%~

73%, 其次为含细胞壁的 F1 组分, 占总量的 21%~35%; 在 Zn/Cd 复合处理中, Zn 的添加使叶片中 Cd 在 F1 组分的分配比例升至 55%~65%, 而 F4 组分降至 19%~36%。在叶柄和根的亚细胞分布中, 单 Cd 处理的叶柄和根 Cd 主要分布在 F1 和 F4 组分中, 两者含量占总量的 72%~93%; 而在 Zn/Cd 复合处理中, Zn 的添加使叶柄和根中的 Cd 主要分布在 F1 组分中, 其分配比例分别达到 50%~61%和 45%~49%, 其次为 F4 组分, 其分配比例分别为 22%~30%和 36%~43%, 两个组分的含量占总量的 76%~90%。上述结果表明长柔毛委陵菜各部位的 Cd 主要富集在细胞壁和以液泡为主的可溶组分, 其他两个组分的分布较少。同时, 在 Zn/Cd 复合处理中, 根中 Cd 在 F1 组分的分配比例比叶片和叶柄低 3%~18%, 而使 F4 组分所占比例则比叶片和叶柄高 7%~17%, 这说明根中更多的 Cd 富集在可溶组分。

从表 1 还可知, 在单 Cd 处理中, Cd 在植物各部位的 F1 组分的分配比例随 Cd 处理浓度的增加而增

加, 而在 F4 组分的分配比例则减少。在 Zn/Cd 复合处理中, Zn 的添加使低 Cd 处理(5 mg·L⁻¹)的植物各部位和高 Cd 处理(20 mg·L⁻¹)的叶片中的 F1 和 F4 组分的分配比例出现与单 Cd 处理相同的变化趋势; 但 Zn 的添加使高 Cd 处理的叶柄和根的 F1 和 F4 组分的分配比例都增加。这表明随 Cd 或 Zn 处理浓度的增加, 细胞壁对 Cd 的滞留作用在增强。

2.2 Cd 在长柔毛委陵菜中的化学形态分布

在提取 Cd 的化学形态过程中, Cd 的回收率为 80%~99%(表 2), 说明化学试剂逐步提取法能较好地用于 Zn 化学形态分布的研究。

由表 2 可知, 在叶片中, 单 Cd 处理的植物叶片中的 Cd 都以水提取态的含量最高, 占总量的 44%~59%, 对照中乙醇提取态居其次; 而在低 Cd 和高 Cd 处理中, 氯化钠提取态升至第二位。在 Zn/Cd 复合处理中, Zn 的添加使 Cd 的氯化钠提取态的分配比例增加 10%~37%, 而 Cd 的水提取态所占比例下降 18%~42%, 即氯化钠提取态取代水提取态成为分配比例最

表 1 Cd 在长柔毛委陵菜叶片、叶柄和根中的亚细胞分布
Table 1 Subcellular distribution of Cd in leaves, leafstalks and roots of *Potentilla griffithii* var. *velutina*

处理 /mg · L ⁻¹		部位	Cd 含量 /mg · kg ⁻¹					回收率 / %	分配比例 / %			
Cd	Zn		F1	F2	F3	F4	全量		F1	F2	F3	F4
0	0	叶	2.83±0.63b	0.62±0.19c	0.29±0.11d	10.06±1.65a	14.20±1.00	97.18	20.51	4.52	2.08	72.90
		柄	1.70±0.47b	0.40±0.22c	0.20±0.20c	6.79±2.82a	8.92±1.92	102.03	18.68	4.43	2.23	74.65
		根	2.08±0.71b	0.90±0.32c	0.37±0.11c	7.30±3.78a	11.38±2.90	93.66	19.53	8.48	3.44	68.58
5	0	叶	14.73±6.97b	1.12±0.49c	1.14±0.55c	28.36±9.95a	44.57±12.70	101.75	32.49	2.47	2.51	62.54
		柄	23.23±10.45a	5.73±3.99b	3.29±1.59b	23.10±5.73a	60.44±21.42	91.58	41.97	10.36	5.95	41.73
		根	43.40±14.19b	30.34±15.91bc	6.98±4.13c	76.43±21.90a	163.13±28.52	96.33	27.61	19.31	4.44	48.64
	10	叶	43.30±6.32a	3.84±0.94c	3.90±1.41c	28.23±5.75b	85.87±8.64	92.75	54.73	4.81	4.87	35.59
		柄	57.24±17.39a	10.64±1.58c	11.72±2.93c	32.74±6.01b	120.93±10.49	93.07	50.32	9.45	10.65	29.58
		根	42.43±3.70a	6.23±2.37b	2.47±1.32b	38.12±6.99a	97.59±7.91	91.51	47.78	6.84	2.76	42.61
	100	叶	35.55±2.86a	4.00±1.84c	4.34±1.20c	12.64±3.01b	62.42±14.20	91.77	63.28	6.91	7.63	22.17
		柄	56.47±9.99a	10.68±3.91c	9.24±1.58c	21.86±1.13b	104.51±8.96	93.73	57.33	10.82	9.38	22.47
		根	32.74±4.27a	7.90±1.04b	3.53±1.14b	28.01±2.56a	74.81±7.84	96.74	45.34	10.93	4.82	38.90
20	0	叶	51.85±7.97b	7.59±1.26c	5.78±0.76c	82.32±12.70a	158.45±18.47	93.11	35.14	5.14	3.92	55.80
		柄	177.83±28.05a	59.30±10.87bc	31.29±6.04c	71.46±4.02b	343.88±25.34	98.84	52.32	17.45	9.21	21.03
		根	360.01±80.88a	178.80±20.27b	40.03±10.70c	194.36±32.32b	789.04±83.94	97.99	46.56	23.12	5.18	25.14
	10	叶	156.99±24.65a	17.64±0.82c	19.36±1.58c	45.91±1.61b	270.78±31.72	88.61	65.24	7.39	8.11	19.26
		柄	149.94±14.05a	41.69±3.23c	29.37±2.77c	70.90±11.15b	282.82±36.63	98.30	51.37	14.30	10.06	24.27
		根	230.65±26.86a	51.98±3.48c	22.60±3.44c	168.70±20.52b	532.86±35.66	92.60	48.60	10.96	4.76	35.68
	100	叶	88.02±11.37a	10.69±0.97c	10.14±1.17c	29.40±1.73b	141.17±15.39	97.95	63.58	7.74	7.33	21.35
		柄	143.18±17.30a	23.58±2.84c	14.38±2.09c	53.62±7.20b	249.34±15.83	94.11	60.89	10.13	6.19	22.78
		根	272.93±45.00a	52.26±15.41c	20.22±4.73c	214.19±13.24b	576.66±72.17	96.97	48.65	9.21	3.61	38.52

注: F1—细胞壁组分, F2—细胞核和叶绿体组分, F3—线粒体组分, F4—可溶组分, 表中 Cd 含量为植株鲜重含量; 表中数据为平均值±标准差(n=3), 同一行的各组分的 Cd 含量中不同字母表示有显著差异(P<0.05)。

Note: F1—cell wall fraction; F2—nucleus and chlorophyll fraction; F3—mitochondrion fraction; F4—soluble fraction. The content of Cd in the table is based on fresh weight of plant, values are means±SD(n=3), different letters in the same row denote significant difference(P<0.05).

高的形态(42%~57%),它们与乙醇提取态一起成为优势形态,三者占总量的 91%~94%。在叶柄和根中,对照中的 Cd 都以乙醇提取态的含量最高,分别占总量的 47%和 55%,其次为水提取态,两种形态的含量占总量的 84%和 73%;低 Cd 和高 Cd 处理使 Cd 的氯化钠提取态所占比例较对照增加 25%~58%,即占总量的 39%~64%,取代乙醇提取态成为含量最高的形态;在 Zn/Cd 复合处理中,叶柄和根中的 Cd 以氯化钠提取态的含量最高,占总量的 51%~78%,乙醇提取态和水提取态居其次,三者所占比例达 86%~96%。在所有处理中,Cd 的醋酸提取态、盐酸提取态和残留态所占比例都较低,三者只占总量的 3%~14%。

同时,在单 Cd 处理中,长柔毛委陵菜的叶片、叶柄和根中的水提取态和乙醇提取态的分配比例总和随 Cd 处理浓度的增加而显著减少,分别由对照的 93%、84%、73%下降到低 Cd 处理的 75%、54%、58%,直至高 Cd 处理的 56%、29%、26%,而各部位的氯化

钠提取态的分配比例则随 Cd 处理浓度的增加而大幅增加;与此类似,在 Zn/Cd 复合处理中,植物各部位 Cd 的水提取态和乙醇提取态的分配比例总和基本上也随 Zn 处理浓度的增加而减少。上述结果说明,随 Cd 或 Zn 处理浓度的增加,Cd 在植物各部位中活性较强的结合形态所占比例在减少,更多的 Cd 结合成活性较弱的形态。

3 讨论

细胞壁固持和液泡区隔化可能在植物对重金属的解毒、耐性和超富集方面起着主要作用^[9,17]。超富集植物 *Thlaspi caerulescens* 和 *Arabidopsis halleri* 中的 Cd 主要富集在根部表皮的细胞壁和叶肉细胞的液泡中^[9,18];超富集植物东南景天(*Sedum alfredii*)中的 Cd 也主要分布在细胞壁,其次在可溶部分中^[10]。非超富集植物大麦地上部、根部和玉米叶片中的 Cd 主要分布于细胞壁和可溶部分^[6,11]。本结果与上述研究结果

表 2 Cd 在长柔毛委陵菜叶片、叶柄和根中的化学形态分布
Table 2 Cd distribution of chemical forms in leaves, leafstalks and roots of *Potentilla griffithii* var. *velutina*

处理/ mg · L ⁻¹		部位	Cd 含量 / mg · kg ⁻¹						回收率/ %	分配比例 / %					
Cd	Zn		F _E	F _W	F _{NaCl}	F _{HAc}	F _{HCl}	F _R		F _E	F _W	F _{NaCl}	F _{HAc}	F _{HCl}	F _R
0	0	叶	4.23±0.54b	6.50±0.58a	0.25±0.07c	0.24±0.10c	0.07±0.01c	0.24±0.02c	81.23	36.72	56.37	2.17	2.08	0.58	2.11
		柄	3.39±1.28a	2.74±0.95a	0.44±0.26b	0.16±0.04b	0.29±0.09b	0.24±0.10b	81.29	46.71	37.75	6.02	2.21	4.00	3.26
		根	5.85±0.21a	2.01±0.47b	1.46±0.36b	0.53±0.26c	0.69±0.31c	0.17±0.08c	94.10	54.65	18.74	13.63	4.95	6.41	1.62
5	0	叶	6.43±1.32bc	23.99±7.35a	8.11±2.62b	1.53±0.64cd	0.31±0.11d	0.09±0.03d	90.79	15.89	59.29	20.04	3.79	0.77	0.22
		柄	8.66±0.74b	17.22±2.25a	19.74±10.55a	1.87±1.00bc	0.21±0.04c	0.13±0.05c	79.56	18.11	35.99	41.26	3.91	0.45	0.28
		根	62.50±6.54a	31.32±19.71b	63.13±13.22a	3.19±1.27c	0.57±0.27c	0.74±0.18c	98.97	38.71	19.40	39.10	1.98	0.35	0.46
	10	叶	14.39±2.94b	13.51±1.74b	44.29±7.03a	4.86±0.30c	0.40±0.01c	0.19±0.10c	91.33	18.68	17.43	56.82	6.30	0.52	0.26
		柄	30.44±2.78b	14.95±1.70c	64.92±7.81a	4.15±1.00d	0.33±0.03d	0.24±0.03d	95.64	26.53	13.00	56.35	3.63	0.28	0.21
		根	25.43±3.67b	8.93±1.31c	55.67±3.56a	3.23±0.08d	0.63±0.24d	0.71±0.31d	97.10	26.84	9.44	58.89	3.42	0.66	0.75
	100	叶	8.03±2.12c	13.07±0.76b	31.33±2.39a	2.45±0.70d	0.52±0.09d	0.28±0.15d	91.07	14.28	23.52	56.30	4.43	0.95	0.52
		柄	10.87±0.54c	25.26±3.65b	47.96±4.21a	8.17±2.28c	0.58±0.12d	0.71±0.29d	89.66	11.63	27.07	51.25	8.69	0.62	0.75
		根	3.94±1.00bc	6.51±2.01b	52.93±4.98a	3.88±1.64bc	2.34±0.34c	1.00±0.09c	94.45	5.66	9.17	75.03	5.39	3.32	1.42
20	0	叶	19.02±1.08c	68.88±9.92a	50.20±3.36b	16.04±1.98c	2.35±0.19d	0.22±0.07d	98.89	12.14	43.96	32.03	10.23	1.50	0.14
		柄	25.05±2.58c	55.34±5.15b	179.03±7.51a	19.59±1.71c	1.97±0.75d	0.23±0.08d	81.78	8.91	19.68	63.67	6.97	0.70	0.08
		根	105.86±15.68b	96.66±11.96b	496.67±67.61a	38.30±8.50c	34.85±4.29c	1.62±0.84d	98.09	13.68	12.49	64.17	4.95	4.50	0.21
	10	叶	62.06±10.98b	55.52±6.72b	96.91±8.73a	16.62±1.95c	1.17±0.34d	0.43±0.26d	85.91	26.55	23.86	41.75	7.15	0.50	0.19
		柄	54.51±6.41b	49.07±8.57b	145.16±15.57a	16.06±4.18c	6.20±2.22d	0.67±0.06d	96.55	20.10	18.02	53.41	5.93	2.30	0.25
		根	28.51±4.37b	27.30±4.98b	156.10±15.29a	25.69±5.91b	4.76±1.56c	3.64±0.94c	91.37	11.56	11.05	63.55	10.40	1.95	1.48
	100	叶	26.22±4.80b	31.06±3.28b	52.15±3.98a	8.60±0.41c	2.20±0.73d	0.16±0.03d	85.41	21.67	25.79	43.37	7.18	1.86	0.13
		柄	18.91±2.49b	25.29±9.09b	146.36±8.90a	17.49±2.50b	4.07±2.70c	0.25±0.15c	85.42	8.90	11.84	68.99	8.24	1.92	0.12
		根	26.24±5.46c	59.00±8.13b	388.61±35.57a	24.17±4.16c	1.11±0.31d	0.34±0.15d	86.79	5.22	11.79	77.88	4.82	0.22	0.07

注:F_E—乙醇提取态,F_W—水提取态,F_{NaCl}—氯化钠提取态,F_{HAc}—醋酸提取态,F_{HCl}—盐酸提取态,F_R—残留态;表中 Cd 含量为植株鲜重含量;表中数据为平均值±标准差(n=3),同一行中不同的字母表示有显著差异(P<0.05)。

Note: F_E—ethanol—extractable form; F_W—water extractable form; F_{NaCl}—NaCl extractable form; F_{HAc}—HAc extractable form; F_{HCl}—HCl extractable form; F_R—residual form. The content of Cd in the table is based on fresh weight of plant, values are means±SD(n=3), different letters in the same row denote significant difference(P<0.05).

类似,长柔毛委陵菜叶片、叶柄和根中 72%~95%的 Cd 分布在细胞壁和可溶部分中,即 Cd 在细胞核、叶绿体和线粒体等细胞器中只分布 5%~28%,这表明细胞壁和可溶组分中的液泡是长柔毛委陵菜的储存 Cd 的两个最重要位点。同时,除 Zn 的添加使高 Cd 处理的叶柄和根中的 Cd 在细胞壁和可溶组分的分配比例都增加外;其他处理中,植物叶片、叶柄和根中的 Cd 在细胞壁的分配比例都随 Cd 或 Zn 处理浓度的增加而增加,而 Cd 在可溶组分的所占比例却减少。这些结果说明随 Cd 和 Zn/Cd 复合胁迫的增加,长柔毛委陵菜各部位的细胞壁对 Cd 的滞留作用在增强,以阻止更多的 Cd 进入细胞内部,从而导致可溶组分中 Cd 的含量减少。细胞壁被认为是保护原生质体免受重金属毒害的第一道屏障,尤其在重金属低浓度和短时间的处理时^[18]。因为细胞壁的果胶酸、多糖和蛋白质等成分为结合重金属提供了大量的离子交换点,可将重金属固定而使其失去活性^[18,19];并且通过细胞壁延迟 Cd 经过膜进入细胞内,以激活细胞内对 Cd 的解毒机制^[20]。即当细胞壁的结合位点达到饱和时,进入细胞内的大部分重金属被转运到液泡中,与其中的柠檬酸、苹果酸和草酸等有机酸络合而达到区隔化作用^[21]。这就是高 Cd 处理时 Zn 的添加使叶柄和根中的 Cd 在细胞壁和以液泡为主的可溶组分的分配比例增加的原因。其他研究也得出相似结果,如农作物豆、豌豆和玉米细胞壁中 Cd 的分配比例随 Cd 处理浓度增加而增加^[6,7,22];Zn 的添加能显著降低 Cd 处理的大麦地上部可溶部分的 Cd 含量,而增加根部细胞壁的含量^[11]。因此,Cd 在细胞壁固持和可溶组分的液泡区隔化可能是长柔毛委陵菜耐 Cd 的机制之一。

采用乙醇、去离子水、氯化钠、醋酸和盐酸等不同提取剂,顺序性提取重金属离子在植物组织中的结合形态,随着上述提取剂极性的增强,所提取出的重金属在植物体内的活性、毒性和迁移能力不断降低^[12,23]。不同提取剂提取不同形态的化合物^[24];去离子水主要提取重金属与水溶性物质结合的形态如水溶性有机酸盐和一代磷酸盐等;80%乙醇提取以硝酸盐、氯化物为主的无机盐和氨基酸盐等;1 mol·L⁻¹ NaCl 溶液提取果胶酸盐和与蛋白质结合态或呈吸附态的重金属等;2% HAc 提取难溶于水的重金属磷酸盐;0.6 mol·L⁻¹ HCl 提取草酸盐等。有研究表明小麦和水稻的叶、根中的 Cd 都以氯化钠提取态为主^[12];大麦根部的 Cd 主要以醋酸提取态和盐酸提取态占优势,而地上部以氯化钠提取态和醋酸提取态为主要形态^[11];水

生植物黑藻(*Hydrilla verticillat*)和青菜中的 Cd 也主要以氯化钠提取态和醋酸提取态存在^[23,25]。从上面的结果可知,非超富集植物中的 Cd 主要以活性较低的氯化钠提取态、醋酸提取态或盐酸提取态为主导形态,而活性较强的乙醇提取态和水提取态含量都很低。这与本研究的结果有所不同:虽然长柔毛委陵菜各部位中大多以氯化钠提取态为首要形态,但是活性较强的乙醇提取态和水提取态所占比例也较高,而醋酸提取态、盐酸提取态和残留态的分配比例都较低。这说明 Cd 的化学形态分布与植物种类有关,也表明长柔毛委陵菜对 Cd 有较强的耐性。同时,对照中植物各部位的 Cd 都以水提取态和乙醇提取态占优势,这可能与植物体内 Cd 的绝对含量很低有关,即低含量的 Cd 对植物不会造成毒害。而低 Cd 和高 Cd 处理中,植物叶片中的 Cd 主要以水提取态占优势,并且乙醇提取态所占比例较高,这可能与叶片中的 Cd 主要分布在可溶组分有关。超富集植物 *T. caerulescens* 叶肉中的 Cd 是和水通过蒸腾作用从维管迁移到叶片表皮和气孔中^[18]。这说明单 Cd 处理的长柔毛委陵菜叶片中的 Cd 可能主要以活性和迁移能力较强的有机酸盐的形态迁移到叶片,并储存于液泡中。此外,植物各部位中的水提取态和乙醇提取态的分配比例总和基本上随 Cd 或 Zn 处理浓度的增加而减少,而氯化钠提取态所占比例则增加。这是因为 Cd 对蛋白质或其他有机化合物中的 SH 和蛋白质的侧链有很强的亲和力^[26],所以导致更多的 Cd²⁺与果胶酸和蛋白质等配位基团络合,滞留在植物的细胞壁中,这可能是随 Cd 或 Zn 处理浓度的增加导致细胞壁固持作用增强的原因,以此降低细胞内活性较强的结合形态的含量,减轻 Cd 对植物的毒害^[27,28]。这也可能是长柔毛委陵菜耐 Cd 的另一机制。

4 结论

(1)长柔毛委陵菜体内的 Cd 主要分布在细胞壁和可溶组分中,而在细胞核、叶绿体和线粒体中分布较少;细胞壁对 Cd 的滞留作用随 Cd 或 Zn 处理浓度的增加而增强。

(2)长柔毛委陵菜体内的 Cd 以不同的化学形态存在:植物各部位的 Cd 在对照中以水提取态和乙醇提取态占优势;在其他处理中以氯化钠提取态、水提取态和乙醇提取态为主;其中在 Zn/Cd 复合处理中,氯化钠提取态所占比例最高,而醋酸提取态、盐酸提取态和残留态的分配比例在所有处理中都较低。同

时,随 Cd 或 Zn 处理浓度的增加,水提取态和乙醇提取态的分配比例总和在减少,而氯化钠提取态所占比例却增加,导致 Cd 向活性较弱的结合形态转移。

参考文献:

[1] Barceló J, Poschenrieder C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados [J]. *Suelo Planta*, 1992, 2: 345–361.

[2] Sanità di Toppi L, Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1999, 41: 105–130.

[3] Küpper H, Zhao F J, McGrath S P. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119: 305–311.

[4] Liu D H, Kottke I. Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS) [J]. *Biore-source Technology*, 2004, 94: 153–158.

[5] Weigel H J, Jäger H J. Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean [J]. *Plant Physiology*, 1980, 65: 480–482.

[6] Lozano E, Hernández L E, Bonay P, et al. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1997, 48: 123–128.

[7] Lindsey P A, Lineberger R D. Toxicity, cadmium accumulation and ultrastructural alterations induced by exposure of *Phaseolus* seedlings to cadmium [J]. *Horticultural Science*, 1981, 16: 434.

[8] Ramos I, Esteban E, Lucena J J, et al. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd–Mn interaction [J]. *Plant Science*, 2002, 162: 761–767.

[9] Küpper H, Lombi E, Zhao F J, et al. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* [J]. *Planta*, 2000, 212: 75–84.

[10] Ni C Y, Chen Y X, Lin Q, et al. Subcellular localization of copper in tolerant and non-tolerant plant [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2005, 17(3): 452–456.

[11] Wu F B, Dong J, Qian Q Q, et al. Subcellular distribution and chemical form of Cd and Cd–Zn interaction in different barley genotypes [J]. *Chemosphere*, 2005, 60: 1437–1446.

[12] 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 forms of Pb, Cd and Cu in crops[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 1991, 2(3): 244–248.

[13] 杨居荣, 鲍子平, 张素芹. 镉、铅在植物体细胞内的分布和可溶性结合形态[J]. *中国环境科学*, 1993, 13(4): 263–268.

YANG J R, BAO Z P, ZHANG S Q. The distribution and binding of Cd and Pb in plant cell[J]. *China Environmental Science*, 1993, 13(4): 263–268.

[14] Qiu R L, Fang X H, Tang Y T, et al. Zinc hyperaccumulation and uptake by *Potentilla griffithii* hook[J]. *International Journal of Phytoreme-*

diation, 2006, 8(4): 299–310.

[15] 吴 箐, 杜锁军, 曾晓雯, 等. 锌在长柔毛委陵菜细胞内的分布和化学形态研究[J]. *生态环境*, 2006, 15(1): 40–44.

WU Q, DU S J, ZENG X W, et al. Subcellular distribution and chemical form of *Potentilla griffithii* hook [J]. *Ecology and Environment*, 2006, 15(1): 40–44.

[16] Gabbrielli R, Panddini T, Vergnano O, et al. Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies[J]. *Plant and Soil*, 1990, 22: 271–277.

[17] Cosio C, Martinoia E, Keller C. Hyperaccumulation of Cadmium and Zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134: 716–725.

[18] Wójcik M, Vangronsveld J, D’Haen J, et al. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens* [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2005, 53: 163–171.

[19] Allen D L, Jarrell W M. Proton and copper absorption to maize and soybean root cell walls [J]. *Plant Physiology*, 1989, 89: 823–832.

[20] Nedelkoska T V, Doran P M. Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 67: 607–615.

[21] Krämer U. Cadmium for all meals—plants with an unusual appetite [J]. *New Phytologist*, 2000, 145: 1–3.

[22] Khan D H, Duckett J G, Frankland B, et al. An X-ray microanalytical study of the distribution of cadmium in roots of *Zea mays* L. [J]. *Plant Physiology*, 1984, 115: 19–28.

[23] 王学锋, 杨艳琴. 重金属镉铜在蔬菜体内的形态分布研究[J]. *环境科学与技术*, 2005, 28(1): 34–35.

WANG X F, YANG Y Q. Chemical form and distribution of some heavy metals in vegetables [J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 28(1): 34–35, 60.

[24] 周建民, 党 志, 陈能场, 等. NTA 对玉米体内 Cu、Zn 的积累及化学形态的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(2): 453–457.

ZHOU J N, DANG Z, CHEN N C, et al. Influence of NTA on accumulation and chemical form of copper and zinc in maize[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2): 453–457.

[25] 徐勤松, 施国新, 周耀明, 等. 镉在黑藻叶细胞中的亚显微定位分布及毒害效应分析[J]. *实验生物学报*, 2004, 37(6): 461–468.

XU Q S, SHI G X, ZHOU Y M, et al. Distribution and toxicity of cadmium in *Hydrilla verticillata* (L.F.) royle[J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 2004, 37(6): 461–468.

[26] Braude G L. Cadmium and lead content of soybean products [J]. *Journal of Food Science*, 1980, 45: 1187.

[27] Rauser W E. Phytochelatins and related peptides [J]. *Plant Physiology*, 1995, 109: 1141–1149.

[28] Schmöger M E V, Oven M, Grill E. Detoxification of arsenic by phytochelatins in plants [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 793–801.