

铅胁迫下杨梅根系分泌有机酸的研究

张利, 何新华, 陈虎, 李一伟, 张超兰

(广西大学农学院, 广西南宁 530004)

摘要: 以1年生东魁杨梅 *Myrica rubra* ‘Dongkui’ 嫁接苗为材料, 采用简单溶液收集法收集杨梅根系分泌物, 用离子交换树脂从其中分离提取有机酸, 用高效液相色谱测定其组成和质量分数。结果表明, 在铅胁迫下能检测出酒石酸、草酸、柠檬酸和苹果酸, 而对照只检测到酒石酸。杨梅根系苹果酸的分泌量随着铅浓度的升高而逐步增加, 在 $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸铅时, 其根系分泌的苹果酸达到最高值 ($0.475 \pm 0.136 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), 表明铅胁迫能够持续刺激苹果酸的分泌, 因而杨梅根系分泌苹果酸可能是抗重金属铅的重要机制之一; 而杨梅根系酒石酸、柠檬酸和草酸的分泌量开始随硝酸铅浓度的升高而升高, 在硝酸铅浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 分泌量达到最大值, 随后随着硝酸铅浓度的升高, 分泌量逐渐下降, 特别是酒石酸的分泌量下降很快。表1参20

关键词: 植物学; 杨梅; 根系分泌物; 铅胁迫; 有机酸

中图分类号: S667.6 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2009)05-0663-04

Organic acid exudates from *Myrica rubra* roots with lead stress

ZHANG Li, HE Xin-hua, CHEN Hu, LI Yi-wei, ZHANG Chao-lan

(College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China)

Abstract: Organic acid exudates from one-year-old grafted *Myrica rubra* ‘Dongkui’ roots with lead stress ($0, 2, 4, 6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) was studied using a simple solution collection method to collect root exudates, ion exchange resin to extract organic acids from root exudates, and high performance liquid chromatography (HPLC) to detect organic acid types and concentrations. Results showed that tartaric acid, oxalate, citrate, and malate were detectable with lead stress, whereas tartaric acid was only detected in the control (no lead). Malate exudation increased as stress from $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ concentration increased with a maximum from stress of $6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. As $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ concentration increased, tartaric acid, oxalate, and citrate from root exudation also increased reaching a maximum with $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and then gradually declining. Overall, lead continuously stimulated malate exudation from *M. rubra* roots. So, increased malate was probably responsible for *M. rubra* tolerance to lead stress. [Ch, 1 tab. 20 ref.]

Key words: botany; *Myrica rubra*; root exudation; lead stress; organic acid

植物根系在生长发育过程中向周围释放大量的分泌物, 而根系分泌物的可溶性物质中各种有机酸占33%, 根系分泌的有机酸主要有琥珀酸、柠檬酸、苹果酸、草酸、乳酸和酒石酸等。研究发现, 根系分泌的有机酸通过络合、溶解作用影响重金属在土壤中的溶解性能和吸附性能, 植物耐或抗重金属的特性与根系分泌物的种类与数量相关^[1-2]。Jones等^[3]和 Krishnamurti等^[4]分别报道, 植物根系分泌的低分子量有机酸可以与土壤中的镉整合形成“镉-低分子量有机酸”复合物, 从而促进土壤中镉的释放和植物对镉的吸收。李瑛^[5]研究表明, 有机酸(柠檬酸和EDTA)可减轻镉对小麦 *Triticum aestivum*

收稿日期: 2008-10-20; 修回日期: 2009-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30560007); 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(桂科基 0731040)

作者简介: 张利, 从事杨梅生物固氮和环境修复研究。E-mail: zhangli0419@163.com。通信作者: 何新华, 教授, 博士生导师, 从事果树生物技术和生物固氮研究。E-mail: honest66222@163.com

的毒害,降低根部对镉的吸收,并促使镉从根部向地上部转移酒石酸对镉有较明显的解毒作用,可以减轻植株毒害。Angus等^[6]首次报道了 Cu^{2+} 可诱导拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 根系分泌柠檬酸。Yang等^[7]的研究表明, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的镍、镉、铜、铅均可诱导多年生草本 *Agropyron elongatum* 根系分泌草酸、苹果酸和柠檬酸等有机酸。目前,有关重金属与果树根系分泌有机酸的关系研究很少。杨梅 *Myrica rubra* 是一种结瘤固氮植物,能在贫瘠的土壤和恶劣的环境下生长。研究发现1年生杨梅幼苗对铅离子有较强的吸收能力和抗性^[8],但其机制尚不清楚,有待进一步研究。

1 材料与方 法

1.1 杨梅幼苗的准备

选取植株大小和根系生长发育基本一致的1年生东魁杨梅 *Myrica rubra* ‘Dongkui’ 嫁接苗,用水轻轻冲去所附细土,将其根系浸入 $1.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的升汞溶液中30 s,然后用无菌水冲洗,将它们移入盛有培养液的2 L黑色塑料桶中,用有孔的有机板做固定介质,种3株·板⁻¹,用干净的海绵夹好固定,板中央留一孔通气。在1/2 Hoagland不完全营养液中进行预培养。培养液的初始pH值为5.1~5.2。培养期间,每天用小气泵给营养液通气30 min,自然光照。待杨梅根系长出新的根尖的时候用不同浓度的硝酸铅进行处理,浓度分别设0(对照),2,4和 $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4个处理。重复3次·处理⁻¹,共3株苗。

1.2 根系分泌有机酸的收集

采用简单溶液收集法,待苗木培养10 d后,将苗木从盆中取出,先用自来水冲洗3~5次,然后用蒸馏水冲洗3~5次,再用 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液洗根30 min后,更换新的氯化钙溶液,收集其根系分泌物24 h,收集过程中加入少量的微生物抑制剂——百里香酚。

1.3 有机酸分离与提取

参照部红建^[9]的方法。

1.4 有机酸组成与质量分数测定

用Waters 600高效液相色谱仪测定分泌物中有机酸组成和质量分数。色谱条件为Bio-Rad Aminex HPX 287H色谱柱(300 mm × 718 mm i1d1);流动相为 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸水溶液,流速 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温 $50\text{ }^\circ\text{C}$;进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$;紫外检测波长210 nm。

2 结果与分析

2.1 铅胁迫下根系分泌有机酸的种类

Kramer等^[10]认为植物根际区域螯合重金属的有机酸主要包括柠檬酸、苹果酸和草酸等,范洪黎等^[11]研究也发现镉胁迫下镉超积累苋菜天星米 *Amaranthus mangostanus* ‘Tianxingmi’ 根系主要分泌苹果酸及柠檬酸,分泌量大大高于普通苋菜 *Amaranthus mangostanus*。本试验在总结前人试验结果的基础上,有选择地测定了杨梅根系分泌物中的草酸、柠檬酸、酒石酸和苹果酸。结果显示:对照除能检测到酒石酸外,草酸、柠檬酸和苹果酸都未检出;而在铅胁迫下,从杨梅根系分泌物中4种有机酸都能检测出来,其中酒石酸的分泌量高于其他3种酸。这表明,铅胁迫能刺激杨梅根系分泌草酸、柠檬酸、苹果酸和酒石酸,而且酒石酸的分泌量最多,是对照的1.6~2.9倍(表1)。

2.2 硝酸铅浓度与有机酸分泌量的关系

从表1可以看出,在同一硝酸铅浓度处理下,4种有机酸的分泌量存在较大差异。在 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸铅溶液中,杨梅根系分泌4种有机酸的大小顺序为:酒石酸>柠檬酸>草酸>苹果酸;在 $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸铅胁迫下,它们的顺序为酒石酸>柠檬酸>苹果酸>草酸。总的来看,在铅胁迫下,杨梅根系分泌的酒石酸多,草酸少。

在不同硝酸铅浓度下,只有苹果酸的分泌量随着铅浓度的升高而逐步增加, $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸铅处理时,其根系分泌的苹果酸最多,这表明铅胁迫能够持续刺激苹果酸的分泌;但更高浓度硝酸铅胁迫时,根系分泌的苹果酸是否继续增加,有待进一步试验。杨梅根系酒石酸、柠檬酸和草酸的分泌量开

始随硝酸铅浓度的升高而升高, 在硝酸铅浓度为 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 分泌量达到最大值, 随后随着硝酸铅浓度的升高, 它们的分泌量逐渐下降, 特别是酒石酸的分泌量下降很快。

用 SPSS 软件对硝酸铅浓度和杨梅根系分泌各有机酸之间进行皮尔逊相关性分析发现, 硝酸铅浓度与杨梅根系分泌的酒石酸、柠檬酸、草酸和苹果酸的质量分数成正相关, 而且硝酸铅浓度与苹果酸的分泌量在 0.05 水平显著相关。

表 1 硝酸铅浓度与杨梅根系有机酸分泌量的关系

Table 1 Relation between $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ concentration and organic acid exudation from *Myrica rubra* 'Dongkui' roots

硝酸铅浓度/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	不同处理下有机酸质量分数/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$			
	酒石酸	柠檬酸	草酸	苹果酸
0(对照)	1.800 ± 0.700 0 b	0.000 ± 0.000 0 bd	0.000 ± 0.000 0 c	0.000 ± 0.000 0 c
2	5.177 ± 0.674 3 a	0.646 ± 0.079 7 ab	0.214 ± 0.068 2 ab	0.157 ± 0.022 2 bc
4	5.233 ± 0.907 4 a	0.689 ± 0.400 0 a	0.276 ± 0.031 8 a	0.398 ± 0.038 1 ab
6	2.825 ± 0.620 7 ab	0.628 ± 0.104 2 abc	0.119 ± 0.031 4 bc	0.475 ± 0.136 0 a

说明: 表中同列相同字母表示经邓肯氏新复级差法检验在 0.05 水平上差异不显著。

3 讨论

杨梅在铅胁迫下, 能刺激其根系分泌出酒石酸、草酸、柠檬酸和苹果酸。在这 4 种有机酸中, 酒石酸、柠檬酸、草酸都是在 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时分泌量最多, 随后又呈下降的趋势, 这与林海涛等^[12]研究铅、镉胁迫对茶树 *Camellia sinensis* 根系分泌有机酸影响的结果不一致, 这种差异可能与不同植物的生理特性及其根系分泌的生理差异有关。刘雯^[13]在土壤中分别加入 4 种有机酸($0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草酸、酒石酸、柠檬酸和 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苹果酸), 探讨其对芥菜 *Brassica juncea* 由于镍毒造成生物量下降的影响, 结果柠檬酸、苹果酸在一定程度上缓解了镍对芥菜叶片的毒害, 酒石酸和草酸则没有效果。在本试验中, 苹果酸的分泌量随铅浓度的升高而增加, 且硝酸铅浓度与苹果酸的分泌量在 0.05 水平显著相关。

多数人认为, 根系分泌物和有机酸能减少土壤对铅的吸附, 促进铅由根部向地上部转移, 特别是柠檬酸能够减少土壤对铅的吸收达成共识^[5,14]。Huang 等^[15]和 Wu 等^[16]分别证实了柠檬酸可以增加玉米 *Zea mays* 和豌豆 *Pisum sativum* 等植物的重金属质量分数, 促进铅从根系向地上部运输。林琦等^[17]也证实柠檬酸可减轻铅对小麦和水稻 *Oryza sativum* 幼苗的毒害。本试验表明, 杨梅在铅胁迫下能刺激根系分泌柠檬酸, 但其根系柠檬酸分泌量与重金属铅之间是否存在相关性还有待进一步研究。

植物可通过根分泌的有机酸等物质来改变根际圈 pH、氧化还原电位、含水量、有机质和其他养分元素, 从而影响根际土壤中重金属的有效化和根系对重金属的吸收^[18], 或者通过分泌物中的螯合剂抑制重金属的跨膜运输。在铅胁迫下, 植物可反馈分泌一些物质, 如柠檬酸、苹果酸、乙酸、乳酸等, 这些物质与铅离子形成可溶性络合物抑制铅的跨膜运输, 增加铅在根际土壤中的移动性, 降低植物周围环境中铅离子的有效含量, 减少植物对铅的吸收, 避免受害。杨仁斌等^[19]指出, 有机酸和氨基酸对土壤中重金属铅具有较强的活化效应, 其中柠檬酸、酒石酸和草酸的活化能力最强。Tater 等^[20]用铅处理黄瓜 *Cucumis sativus* 幼苗, 其茎部柠檬酸、苹果酸、反丁烯二酸的含量发生变化, 说明这几种酸可能与铅结合并参与了铅的运输。我们的试验表明, 杨梅根系分泌的苹果酸对铅有较强的活化作用, 因而杨梅根系分泌苹果酸可能是抗重金属铅的重要机制之一。

参考文献:

- [1] CUNNINGHAM S D. Phytoremediation of contaminated soil [J]. *Trend Biotechnol*, 1995, **13** (9): 393 – 397.
- [2] 李花粉. 根际重金属污染[J]. 中国农业科技导报, 2000, **2** (4): 54 – 59.

- LI Huaifen. Heavy metal pollution rhizosphere[J]. *Rev China Agric Sci Technol*, 2000, **2** (4): 54 – 59.
- [3] JONES D L, DARRAH P R, DOCHIAN L V. Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron up take [J]. *Plant Soil*, 1996, **180**: 57 – 66.
- [4] KRISHNAMURTI G S R, CIESLINSKI G, HUANG P M, *et al.* Kinetics of cadmium released from soils as influenced by organic acids: Implication in cadmium availability [J]. *Environ Qual*, 1997, **26**: 271 – 277.
- [5] 李瑛. 镉铅和有机酸对根际土壤中镉铅形态转化及其毒性的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2003.
LI Ying. *Effects of Organic Acids on Speciation of Lead in Rhizosphere and Their Phytotoxicity* [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2003.
- [6] ANGUS S. Early copper-induced leakage of K⁺ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux [J]. *Plant Physiol*, 1999, **121**: 1375 – 1382.
- [7] YANG Hong, WONG J W C, YANG Zhimin, *et al.* Ability of *Agropyron elongatum* to accumulate the single metal of cadmium, copper, nickel and lead root exudation of organic acids [J]. *Environ Sci*, 2001, **13** (3): 368 – 375.
- [8] 何新华, 陈力耕, 何冰, 等. 铅对杨梅幼苗生长的影响[J]. 果树学报, 2004, **21** (1): 29 – 32.
HE Xinhua, CHEN Ligeng, HE Bing, *et al.* Effect of lead nitrate on the growth of *Myrica rubra* [J]. *J Fruit Sci*, 2004, **21** (1): 29 – 32.
- [9] 郇红建. 镧对水稻根系分泌物的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2002: 1 – 54.
GAO Hongjian. *The Effect of Lanthanum on Root Exudation of Rice* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2002: 1 – 54.
- [10] KRAMER U, COTTER-HOWELLS J D, CHARNOCK J M, *et al.* Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel [J]. *Nature*, 1996, **379**: 635 – 638.
- [11] 范洪黎, 王旭, 周卫. 不同镉积累型苋菜 *Amaranthus mangostanus* L. 根际低分子量有机酸与镉吸收的关系 [J]. 中国农业科学, 2007, **40** (12): 2727 – 2733.
FAN Hongli, WANG Xu, ZHOU Wei. Low molecular weight organic acids in rhizosphere and their effects on cadmium accumulation in two cultivars of amaranth (*Amaranthus mangostanus* L.) [J]. *Sci Agric Sin*, 2007, **40** (12): 2727 – 2733.
- [12] 林海涛, 史衍玺. 铅、镉胁迫对茶树根系分泌有机酸的影响[J]. 山东农业科学, 2005 (2): 32 – 34.
LIN Haitao, SHI Yanxi. Study on organic acid exudation from tea roots under lead and cadmium stress [J]. *Shandong Agric Sci*, 2005 (2): 32 – 34.
- [13] 刘雯. 外源有机酸对镍超富集植物和非富集植物吸收镍的影响[D]. 广州: 中山大学, 2005: 1 – 73.
LIU Wen. *Role of Exogenous Organic Acids in Nickel Uptake by Hyperaccumulator and Non-accumulator* [D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2005: 1 – 73.
- [14] 徐卫红, 黄河, 王爱华, 等. 根系分泌物对土壤重金属活化及其机理研究进展[J]. 生态环境, 2006, **15** (1): 184 – 189.
XU Weihong, HUANG He, WANG Aihua, *et al.* Advance in studies on activation of heavy metal by root exudates and mechanism [J]. *Ecol Environ*, 2006, **15** (1): 184 – 189.
- [15] HUANG Jianwei, CHEN Jianjun, BERTI W R, *et al.* Phytoremediation of lead contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction [J]. *Environ Sci Technol*, 1997, **31**: 800 – 805.
- [16] WU Jinglan, HSU F C, CUNNINGHAM S D. Chelate-Assisted Pb phytoextraction: Pb availability up take and translocation constraints [J]. *Environ Sci Technol*, 1999, **33**: 1898 – 1904.
- [17] 林琦, 陈英旭, 陈怀满, 等. 有机酸对 Pb、Cd 的土壤化学行为和植株效应的影响[J]. 应用生态学报, 2001, **12** (4): 619 – 622.
LIN Qi, CHEN Yingxu, CHEN Huaiman, *et al.* Effect of organic acids on soil chemical behavior of lead and cadmium and their toxicity to plants [J]. *J Appl Ecol*, 2001, **12** (4): 619 – 622.
- [18] Marschner H. *Mineral Nutrition of Higher Plants* [M]. San Diego: Academic Press, 1995: 140 – 189.
- [19] 杨仁斌, 曾清如, 周细红, 等. 植物根系分泌物对铅锌尾矿污染土壤中重金属的活化效应[J]. 农业环境保护, 2000, **19** (3): 152 – 155.
YANG Renbin, ZENG Qingru, ZHOU Xihong, *et al.* The activated impact of plant root exudates on heavy metals in soils contaminated by tailing of lead-zinc ore [J]. *Agro-environ Prot*, 2000, **19** (3): 152 – 155.
- [20] TATER E, MIHUCZ V G, VARGA A, *et al.* Determination of organic acids in xylem sap of cucumber: Effect of lead contamination [J]. *Microchem J*, 1998, **58**: 306 – 314.