



王摸云,郑婉铭,杨睿祺,等. 铊胁迫下甘蓝根系有机酸分泌特征及对铊吸收的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2020(5):47-50.

# 铊胁迫下甘蓝根系有机酸分泌特征及对铊吸收的影响

王摸云<sup>1</sup>,郑婉铭<sup>1</sup>,杨睿祺<sup>1</sup>,张平<sup>2</sup>,刘文峰<sup>2</sup>,姚焱<sup>1</sup>

(1. 广州大学 生命科学学院, 广东 广州 510006; 2. 广州大学 化学化工学院, 广东 广州 510006)

**摘要:**为促进食品安全评估,本研究采用火焰原子吸收分光光度法测定了甘蓝不同部位对重金属铊的吸收能力;并利用高效液相色谱法测定两种阴离子通道抑制剂 Niflumic acid(NIF)、Phenylglyoxal(PG)添加前后的甘蓝根系有机酸分泌特征及对铊吸收量的影响,探究甘蓝富集铊的吸收机制。结果表明:甘蓝在铊胁迫下根系分泌唯一有机酸-草酸,并随处理时间延长,草酸分泌量增大;阴离子通道抑制剂 NIF 明显抑制甘蓝根系内部有机酸分泌量,同时明显降低甘蓝根系对铊的吸收量,进而减少地上茎叶部的铊含量。铊胁迫下甘蓝根系草酸分泌模式初步确定为延迟分泌 II 型,根系有机酸含量将影响甘蓝对铊的吸收。

**关键词:**铊;甘蓝;阴离子通道抑制剂;草酸;吸收

高毒害的稀有金属元素铊(Thallium, Tl)及其化合物属于强蓄积性的神经毒物,毒性强于汞、镉、铅等重金属<sup>[1]</sup>,且更容易被农作物吸收,进而通过食物链进入人体并发生累积,对人体健康造成危害<sup>[2]</sup>。美国、欧盟以及我国将其列为重点防控污染源。

环境中的重金属铊可以通过植物根系吸收进入食物链,进而引发食品安全问题。十字花科植物在组织中易积累较高含量的铊,如羽衣甘蓝、油菜和白芥等<sup>[3]</sup>。羽衣甘蓝对重金属铊具有超富集作用<sup>[4]</sup>,其亲缘关系相近的芸苔属植物甘蓝也具有高的吸收和积累重金属铊的能力<sup>[5-6]</sup>。甘蓝也是我国广泛栽培的大众化蔬菜,研究甘蓝耐受重金属铊的机制,对于铊污染地区采取相应措施减少甘蓝对铊吸收,保证食品安全具有一定意义。

植物根系有机酸分泌是植物抵抗(耐受)重金属胁迫的重要机制之一。一些耐铝的植物可以特异性分泌有机酸<sup>[7-8]</sup>,如荞麦和芋分泌草酸<sup>[9-10]</sup>;玉米和大豆分泌柠檬酸<sup>[11-13]</sup>;有机酸可以与重金属进行螯合,生成无毒的化合物,以此来抵御重金属对植物的伤害。但重金属铊胁迫下植物根系抵抗(耐受)机制研究不多。本文研究水培条件铊胁迫

下甘蓝根系有机酸分泌的特征,通过添加阴离子通道抑制剂 Niflumic acid(NIF)、Phenylglyoxal(PG)研究抑制剂对铊胁迫下有机酸分泌的作用,以及对甘蓝植株中铊含量及分布的影响。为芸苔属植物富集耐受重金属铊的机理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为二号牛心甘蓝(北京市农林科学院培育品种)。

### 1.2 方法

1.2.1 试验设计 甘蓝种子经过表面灭菌后,无菌接种于 MS 培养基上离体培养。种子接种至幼苗萌发,萌发后 9~10 d 可以进行处理。

铊溶液处理:3 组重复,每重复取 30 mL 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{TlNO}_3$  溶液于培养瓶内,放入 10 株甘蓝幼苗,使培养液浸没根系,25  $^{\circ}\text{C}$  光照培养箱内培养,处理 6 和 24 h 后进行测定。

抑制剂处理组:25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Tl}^{+}$  + 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NIF 溶液及 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Tl}^{+}$  + 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PG 溶液,3 组重复。其他条件与铊处理一致。

空白处理:去离子水取代铊溶液,按照以上步骤进行处理。

1.2.2 有机酸标准曲线 利用高效液相色谱法(仪器型号:)分别测量浓度梯度为 5, 0.5, 0.05 和 0.005  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的草酸溶液的吸光度,绘制标准曲线。HPLC 色谱条件为检测波长 210 nm,色谱柱 C18(18  $\mu\text{m}$ ),流速 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,流动相 3% 甲醇 0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  在  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH2.7),柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,

收稿日期:2020-01-15

基金项目:国家自然科学基金项目(41373118);广州大学研究生基础创新项目(2017GZJC-M29,2018GDJC-M26)。

第一作者:王摸云(1994-),男,在读硕士,从事植物抗逆生理研究。E-mail:834055501@qq.com。

通信作者:姚焱(1972-),女,博士,副教授,从事植物抗逆生理研究。E-mail:yaoyannn@163.com。

进样体积 20  $\mu\text{L}$ 。

1.2.3 甘蓝根系内部及外泌有机酸种类及含量测定 根系外泌入培养液的有机酸测定:先采用真空冷冻干燥的方法对有机酸进行浓缩干燥,然后微膜过滤后,取 1 mL 进行 HPLC 测定;根系内泌有机酸测定:根系在添加液氮和研磨液下进行充分研磨,3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min,取上清液微膜过滤后,再取 1 mL 进行 HPLC 测定,方法同上。根据有机酸的标准曲线计算出相应浓度。

1.2.4 铊含量测定 待测植物根部铊含量测定:将植物地上部分和地下部分分开,吸干根部表面水分,测定各样本鲜重,后对根部进行稀酸浸泡处理 15 h 后过滤浸泡液。后加水至 4 mL。经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤 2 次后,用火焰原子吸收法(iCE 3500 火焰原子吸收分光光度计,Thermo Electron Corporation)测定植物样品中的铊离子浓度<sup>[14]</sup>。

培养液中铊含量测定方法:取植物水培溶液,经 0.45  $\mu\text{m}$  过滤后直接进行铊含量检测。

1.2.5 数据分析 数据用 Excel 2013 和 SPSS 22.0 软件进行统计分析及显著性检验。

2 结果与分析

2.1 甘蓝根系有机酸分泌类型

通过 HPLC 测定根系内外分泌有机酸,确定铊处理下甘蓝根系外泌和根系内有机酸的种类。甘蓝在铊胁迫下根系向外分泌唯一有机酸-草酸,根系内部产生的有机酸也主要是草酸(图 1)。

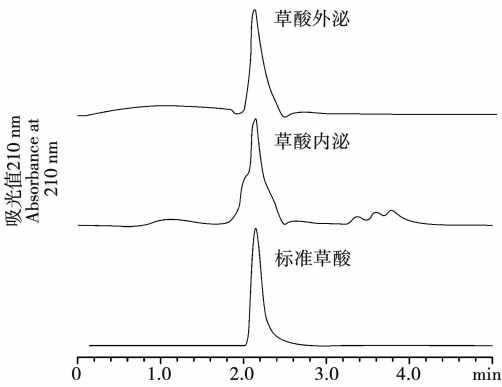


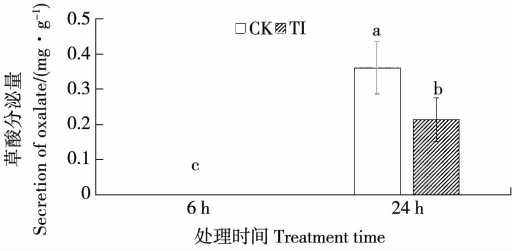
图 1 铊处理下甘蓝根系外泌及根内有机酸的种类  
Fig. 1 Types the exogenous and internal organic acid in cabbage root under thallium stress

2.2 铊胁迫对甘蓝根系分泌草酸的影响

2.2.1 铊胁迫时间对甘蓝根系分泌草酸的影响

由图 2 可知,铊胁迫 6 h,甘蓝分泌草酸量很少;

但随胁迫时间延长至 24 h,根系草酸分泌量明显增多。



不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著,下同。  
Different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level, the same below.

图 2 6 和 24 h 铊处理对甘蓝根系分泌草酸量的影响  
Fig. 2 Effects of thallium on the amount of oxalate secreted by cabbage roots after 6 h and 24 h treated

2.2.2 阴离子通道抑制剂对甘蓝根系外泌和内部草酸含量影响 由图 3 可知,铊处理中分别加入阴离子通道抑制剂 NIF 和 PG 处理甘蓝 24 h 后,铊胁迫下添加 PG 和 NIF,对根系分泌草酸量没有影响;PG 处理对根系内部草酸量与对照 Tl 处理也无显著差异;但 NIF 添加却显著抑制了根内部草酸的分泌,分泌量为 0.041 8  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,为 Tl 处理(2.0050  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )的 2.1%。因此,阴离子通道抑制剂 NIF 对铊胁迫下甘蓝根系内部的草酸含量抑制比较显著,而 PG 作用不大。

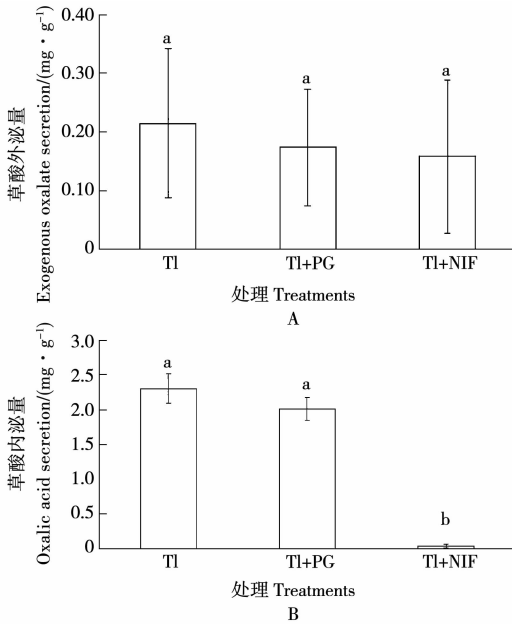


图 3 阴离子通道抑制剂对甘蓝根外泌和内部草酸含量影响  
Fig. 3 Effects of anion channel inhibitors on contents of exogenous and internal oxalate in cabbage root

2.3 阴离子通道抑制剂 NIF 对甘蓝铊吸收及分布的影响

2.3.1 阴离子通道抑制剂 NIF 对甘蓝植株铊吸收量的影响 由图 4 可知,NIF 显著抑制甘蓝根系对铊的吸收,Tl+NIF 处理植株中铊的吸收量较 Tl 处理减少 44%。

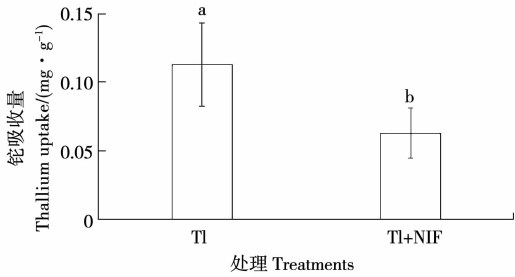


图 4 阴离子通道抑制剂 NIF 处理对甘蓝根系铊吸收量影响

Fig. 4 Effect of anion channel inhibitor NIF on thallium uptake in cabbage roots

2.3.2 阴离子通道抑制剂 NIF 对甘蓝植株铊分布的影响 进一步研究铊胁迫下添加 NIF 对甘蓝植株体内铊分布的影响,对甘蓝根和茎叶两部分的细胞壁和细胞液中的铊含量进行测定(图5)。结果表明:NIF 将明显减少铊在甘蓝根部的分布,其中根部细胞液及细胞壁内铊含量分别较 Tl 处理减少 49.1%和 66.1%;对地上茎叶内铊分布量也有所减少,但减少比例要低于根部减少量。

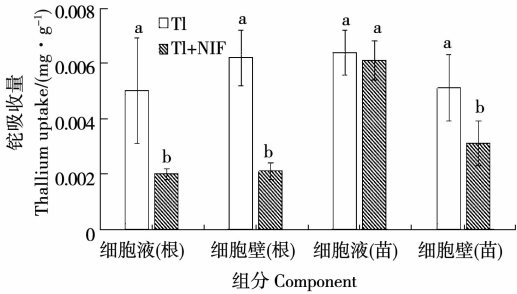


图 5 阴离子通道抑制剂 NIF 处理对甘蓝植株铊分布的影响

Fig. 5 Effects of anion channel inhibitor NIF on thallium distribution in cabbage

3 结论与讨论

本研究发现,甘蓝根部在铊胁迫下特异性分泌草酸,并随着胁迫时间的延长草酸的分泌量逐渐增加。依据重金属胁迫时间与根系有机酸分泌的关系,将有机酸分泌类型分为两类模式:一类是快速分泌 I 型模式:当植物根系受到重金属胁迫

时,根系立即分泌有机酸,另一类是延迟分泌 II 型模式:植物根系在受到重金属胁迫时,需要一定时间的诱导期,才能逐渐分泌有机酸<sup>[15-16]</sup>。本研究发现,甘蓝根系在铊胁迫并没有立即分泌草酸,而是在胁迫一段时间后才逐渐分泌草酸,呈明显的滞后现象。因此推断甘蓝在铊胁迫下草酸分泌属于延迟分泌模式 II 型。重金属胁迫下有机酸的分泌的影响因素主要两种:一是有机酸的代谢;二是有机酸的运输。有机酸的生物合成和降解均在生物的三羧酸循环中完成,I 型模式植物中有机酸的分泌与酶的活性没有直接相关的联系,在 II 型模式植物中根系的有机酸分泌与酶活关系密切。

有机酸分泌的过程与离子通道的开启有关<sup>[17]</sup>。本研究添加抑制剂 NIF 后,可以显著抑制甘蓝根系内部草酸的含量,但对根系外泌草酸含量无影响,这也可能表明根系内部有机酸含量与根系外泌有机酸含量不一定直接相关,这也揭示了重金属胁迫下有机酸分泌机制的复杂性。

阴离子通道抑制剂 NIF 不仅有效抑制了根系内有机酸的含量,也使甘蓝根系对铊的吸收显著性降低,并且根系降低幅度要高于地上的茎叶部位。一方面说明甘蓝对铊的吸收可能也受到阴离子通道的影响:细胞膜上的阴离子通道是控制细胞内有机酸外泌的通道,有机酸形成及分泌将影响重金属铊的吸收;另一方面也说明,NIF 对甘蓝吸收铊量的抑制首先从根部开始,进而减少抑制由根部转运至地上茎叶部分的铊含量。因此,通过影响甘蓝根系有机酸合成及分泌,进而影响抑制植物对环境铊重金属的吸收,可以有效降低甘蓝体内对铊的蓄积,降低食品安全风险。但植物根系有机酸与铊吸收之间的关系及相关机制还需进一步研究。

参考文献:

[1] Xiao T F, Jayanta G, Dan B, et al. Environmental concerns related to high thallium levels in soils and thallium uptake plants in southwest Guizhou, China[J]. The Science of the Total Environment, 2004, 318(1): 223-244.  
[2] 汪珍春, 姚淼, 张平, 等. 水体中铊对泥鳅外周血红细胞的遗传毒性的时效性[J]. 生态环境学报, 2009, 18(5):

- 1665-1668.
- [3] 张福祎,姚焱,张平,等. 常见植物对重金属铊吸收特征研究[J]. 广东农业科学,2018,45(4): 100-105.
- [4] 郭世佳,马健豪,吴启航,等. 蜈蚣草和羽衣甘蓝对铊的富集特征[J]. 广州化工,2013(6): 130-132.
- [5] Husam A N,Rudolf S,Volker R. Plant availability of thallium in the rhizosphere of hyperaccumulator plants: a key factor for assessment of phytoextraction[J]. Plant and Soil, 2003,249(1): 97-105.
- [6] 苏德纯,黄焕忠. 油菜作为超累积植物修复镉污染土壤的潜力[J]. 中国环境科学,2002,22(1): 48-51.
- [7] Ma J F,Ryan P R,Delhaize E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids[J]. Trends in Plant Science,2001,6(6): 273-278.
- [8] Ryan P R,Delhaize E,Jones D L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots[J]. Annual Review of Plant Biology,2001,52(1): 527-560.
- [9] Ma J F,Zheng S J,Matsumoto H,et al. Detoxifying aluminium with buckwheat [J]. Nature, 1997, 390 ( 6660 ): 569-570.
- [10] Ma Z. Oxalate exudation by taro in response to Al[J]. Plant Physiology,1998,118(3): 861-865.
- [11] Pineros M A. The physiology and biophysics of an aluminium tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize[J]. Plant Physiology,2002,129(3): 1194-1206.
- [12] Yang Z M,Nian H,Sivaguru M,et al. Characterization of aluminium-induced citrate secretion in aluminium-tolerant soybean (*Glycine max*) plants [J]. Physiologia Plantarum,2001,113(1): 64-71.
- [13] Yang Z M,Sivaguru M,Horst W J,et al. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*)[J]. Physiologia Plantarum,2001,110(1): 72-77.
- [14] 姚焱,张平,汪珍春,等. 重金属铊胁迫羽衣甘蓝的 in situ ATR-FTIR 表征[J]. 光谱学与光谱分析,2009,29(1): 119-121.
- [15] Yang J L,Li Y Y,Zhang Y J,et al. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex [J]. Plant Physiology, 2008, 146(2):602-611.
- [16] 陈海霞,胡春梅,彭尽晖,等. 铝胁迫诱导八仙花根系分泌有机酸的研究[J]. 天津农业科学,2017,23(2): 1-7.
- [17] 林亚蒙,王巧兰,王承潇,等. 铝胁迫诱导的植物有机酸分泌研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学),2015,30(4):634-641.

## Characteristics of Organic Acid Secretion in Cabbage Roots Under Thallium Stress and Its Effect on Thallium Absorption

WANG Mo-yun<sup>1</sup>, ZHENG Wan-ming<sup>1</sup>, YANG Rui-qi<sup>2</sup>, ZHANG Ping<sup>2</sup>, LIU Wen-feng<sup>2</sup>, YAO Yan<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 2. College of Chemical and Chemical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** In order to promote food safety assessment, the absorption capacity of thallium in different parts of cabbage was determined by flame atomic absorption spectrophotometry. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the characteristics of acid secretion in cabbage roots before and after the addition of two anionic channel inhibitors, niflumic acid (NIF) and phenylglyoxal Chinese (PG), and the effects on thallium absorption, the absorption mechanism of thallium in cabbage was explored. The results showed that the roots system secreted the unique organic acid-oxalate under thallium stress and the amount of oxalate increased accompanying with the treated time. Anion channel inhibitor NIF significantly inhibited the secretion of organic acids in cabbage roots and significantly decreased thallium uptake of cabbage roots, thereby reduced thallium contents in cabbage stems and leaves. Above all, the secretion pattern of oxalate in cabbage roots under thallium stress was the delayed secretion type II, and the content of organic acid in cabbage roots would affect the uptake of thallium in cabbage.

**Keywords:** thallium; cabbage; anion channel inhibitor; oxalate; uptake