

Zinc Forms and Root Exudation in Non-heading Chinese Cabbages under High Zinc Stress*

Xiuling Chen¹, Yanru Xu, Xiumin Cui^{2**}, Xiaobin Wu, Hong Jin

(College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

(1 enchxl@163.com, 2 xiumincui@sdau.edu.cn)

Abstracts: Two genotypes non-heading Chinese cabbage suzhouqing and nannongaijiaohuang were selected as materials. The chemical bound forms of Zn and root exudation under high Zn stress were studied by hydroponic experiment. The main results were as following: Under normal Zn level, the chemical forms of Zn in three organs were diverse in deferent organs between genotypes. HAc extractable-Zn, ethanol extractable-Zn and NaCl-extractable Zn were separately dominant in roots, petioles and leaves. Only four molecular weight organic acid could be detected. Under Zn stress(13 mg/L and 52 mg/L) NaCl-extractable Zn became a predominant form. Oxalic acid, tartaric acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid and amber acid were all detected. So we speculated that NaCl-extractable Zn and organic acid were related to Zn tolerance. Some organic ligands like proteins and pectinate which could form compound body with Zn were beneficial for alleviating zinc toxicity. And the variance of organic acid enhanced the adaptability to Zn stress by chelation.

Keywords: Non-heading Chinese cabbages; Zinc stress; Chemical forms; Root exudation

高锌胁迫对不结球白菜锌形态及根系分泌物的影响

陈秀灵¹ 徐艳如 崔秀敏^{2**} 吴小宾 金洪

(山东农业大学资源与环境学院, 山东泰安 271018)

(1 enchxl@163.com, 2 xiumincui@sdau.edu.cn)

摘要: 本文以苏州青和南农矮脚黄为供试材料, 采用水培的方法, 研究了高锌胁迫对不结球白菜体内锌形态分配情况和根系分泌物组成及含量的影响。研究表明: CK 处理下, 不结球白菜根系、叶柄及叶片中锌化学形态存在差异, 分别以醋酸提取态、乙醇提取态、氯化钠提取态为主, 根系分泌的有机酸种类也较少; 在 13 mg/L 和 52 mg/L 的锌胁迫下, 三种器官中, 氯化钠提取态为优势形态, 根系分泌物中可检测到七种有机酸, 即草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸、琥珀酸。因此, 氯化钠提取态及低分子量有机酸可能与不结球白菜对高锌胁迫的适应性有关。过量锌可与果胶酸盐、蛋白质态等有机配位体结合, 也可与有机酸发生螯合反应, 以此来降低锌在植物体内的毒性, 增强对高锌胁迫的适应性。

关键词: 不结球白菜; 锌胁迫; 化学形态; 有机酸

不结球白菜 (*Brassica campestris ssp.chinensis* Makino) 属十字花科芸薹属芸薹类蔬菜, 南北方普遍栽培。锌矿开采、冶炼、镀锌加工等含锌工业“三废”的不合理排放, 使土壤中锌超常积累, 污染土壤中锌易被植物吸收而造成毒害, 并可通过食物链污染农产品, 威胁人类健康^[1-2]。重金属污染问题已经引起人们的广泛关注。本文将对高锌胁迫下不结球白菜体内锌形态分配及根系分泌物组成作初步探讨, 为植物的锌毒害及耐性机制提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验设计

* 山东省中青年科学家科研奖励基金 (BS2009HZ016) 和山东省教育厅科技计划项目 (J06K04) 资助。

** 通讯作者

试验在山东农业大学温室进行, 不结球白菜品种为苏州青和南农矮脚黄。种子经 0.3% 的 NaClO 消毒 10 min, dH₂O 冲洗, 25℃ 催芽。种子露白后, 播于洗净蛭石中, 萌发后用 1/2 营养液浇灌。当幼苗具有 3~4 片真叶时, 挑选生长一致的植株洗净根部蛭石后, 移栽于 2.5 L 塑料盆中, 用厚度为 3 cm 的泡沫塑料板覆盖在塑料盆顶部, 每盆 5 株。1 周后换成完全营养液, 每 3 d 更换一次, 电动气泵 24 h 连续通气。

预培养 1 周后, 进行锌胁迫处理。Zn²⁺ 的浓度设为 0.43 mg/L、13 mg/L、52mg/L, 分别记为 CK、Zn1、Zn2, Zn²⁺ 以 ZnSO₄·7H₂O 形式添加。试验设三个重复, 随机排列。用低浓度 KOH 或 HCl 调节至 pH 5.5±0.2。温室内光照约 12 h, 白天最高温度 32℃, 夜间最低温度 15℃。处理 12 d 后, 收获植株用于分析测定。

1.2 指标及测定方法

1.2.1 植株中锌化学形态的提取

参照周守标等的方法^[3], 采用化学试剂逐步提取法。准确称取鲜样 4.0 g, 加入 40 ml 提取剂研磨匀浆后转入 100 ml 的塑料离心管中, 提取剂为: 80%乙醇、ddH₂O、1.0 mol/L 的 NaCl、2% HAC 和 0.6 mol/L HCl, 分别记为: F_E、F_{H₂O}、F_{NaCl}、F_{HAC}、F_{HCl}。25℃恒温振荡 22 h, 5000 r/min 离心 10 min, 倒出上清液, 再加入 20 ml 提取剂, 25℃恒温振荡 2 h, 5000 r/min 离心 10 min, 倒出上清液, 合并 2 次的上清液于 150 ml 的三角瓶中。最后为残留态 F_R, 回收的提取液电热板上蒸发至近干, 加入 4 ml HNO₃ 和 1 ml HClO₄ 消煮至澄清, 用 10% HNO₃ 定容, AA 370 MC 型原子吸收分光光度法测定 Zn 含量。

1.2.2 根系分泌物的收集与测定

参照 Rengel 等的方法^[4]。用 dH₂O 预先冲洗根

系 1min, 除去表面粘附的营养液。然后转入盛有 200 ml ddH₂O 的烧杯, 使根系全部浸入水中, 收集 4 h。取出植株, 向收集液迅速加入适量百里酚, 用真空旋转蒸发器将收集液在 40℃下浓缩至 5 ml, 用于分析有机酸的组成和含量。

采用高效液相色谱仪测定有机酸, 上机前过 0.45 μm 滤膜, 以除去杂质。色谱条件如下: 流动相为 KH₂PO₄ 缓冲溶液, 流速为 0.9 ml/min, 检测波长为 213 nm, 灵敏度为 0.8, 手动进样量为 10μl。标样均为色谱纯(美国 Sigma 公司产品)。标样测定时间为 20 min, 样品测定时间为 50 min。

1.3 数据处理

采用 DPS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 锌胁迫对不结球白菜体内锌形态的影响

Table 1. The content of zinc forms in in non-heading Chinese cabbage under zinc stress (mg/kg)

器官	基因型	处理	Zn content						锌总量
			F _E	F _{H₂O}	F _{NaCl}	F _{HAC}	F _{HCl}	F _R	
叶片 Leaves	苏州青 Suzhouqing	CK	16.63±0.58 c	12.89±1.79 c	1.90±0.57 c	5.93±1.36 cd	6.88±0.78 c	2.89±0.24 c	47.12
		Zn1	32.88±1.20 b	21.40±1.54 b	38.76±2.09 b	13.15±1.54 a	9.77±0.87 a	3.83±0.22 a	119.8
		Zn2	35.29±0.78 a	19.35±1.13 b	42.43±1.73 b	7.05±0.91 c	8.51±0.94 b	3.51±0.13 b	116.1
	南农矮脚黄 Aijiaohuang	CK	15.42±1.63 c	6.89±0.82 d	4.19±1.02 c	2.41±0.35 e	6.84±0.30 c	2.28±0.16 d	38.02
		Zn1	31.84±0.20 b	20.26±1.24 b	42.51±1.67 b	3.71±0.58 de	2.94±0.40 d	2.98±0.13 c	104.2
		Zn2	36.01±1.02 a	30.34±2.10 a	69.48±1.37 a	9.52±1.25 b	1.66±0.37 e	3.36±0.15 b	150.4
叶柄 Petioles	苏州青 Suzhouqing	CK	8.66±1.43 d	5.60±0.98 d	22.86±1.11 c	1.13±0.21 e	1.08±0.15 d	1.59±0.09 c	40.92
		Zn1	21.37±1.09 b	22.13±1.10 c	65.47±1.15 b	10.3±1.21 cd	1.65±0.29 c	2.24±0.10 b	123.2
		Zn2	30.75±0.47 a	29.16±1.20 b	93.79±1.91 a	27.5±1.97 b	4.84±0.21 b	2.67±0.26 a	188.7
	南农矮脚黄 Aijiaohuang	CK	8.09±1.81 d	6.03±0.93 d	13.98±1.33 c	7.58±0.77 d	1.77±0.25 c	1.24±0.09 d	38.69
		Zn1	18.60±1.81 c	22.77±1.59 c	65.09±2.80 b	10.91±0.91 c	1.96±0.27 c	2.19±0.09 b	121.5
		Zn2	31.24±1.58 a	33.64±0.66 a	98.16±2.35 a	31.64±1.54 a	6.21±0.56 a	2.73±0.25 a	203.6
根系 Roots	苏州青 Suzhouqing	CK	16.91±0.62 d	6.82±1.13 d	11.07±1.40 d	25.92±1.16 c	13.07±1.66 c	4.57±0.66 c	78.36
		Zn1	31.14±0.63 b	30.88±0.92 c	83.53±1.69 c	48.16±2.49 b	34.47±1.57 b	10.30±1.09 b	238.5
		Zn2	45.50±1.07 a	57.22±1.65 b	193.2±7.54 b	85.73±3.51 a	61.22±2.59 a	23.97±1.66 a	466.9
	南农矮脚黄 Aijiaohuang	CK	13.18±0.47 e	7.06±1.50 d	8.48±1.81 d	23.74±2.60 c	12.44±0.69 c	4.79±0.22 c	69.69
		Zn1	24.36±1.71 c	31.59±1.03 c	70.68±3.11 c	46.08±0.80 b	36.94±1.26 b	10.94±0.48 b	220.6
		Zn2	11.97±1.67 e	70.16±1.55 a	215.6±3.95 a	92.79±1.17 a	57.24±2.67 a	24.93±1.70 a	472.7

Note: Data followed by different letters in the same row are significant at 5% levels.

表 1 显示, 随着锌胁迫浓度的增加, 不结球白菜各器官中六种锌形态含量均逐渐升高。不同提取态含量在不同的品种不同器官间差异较大, 氯化钠提取态、水提取态和乙醇提取态含量较高, 残留态和盐酸提取

态含量最少。CK 水平下, 无论是从含量还是从分配比例来看, 苏州青叶片内的锌都以 80%乙醇提取态和水提取态为主, 叶柄内的锌以 NaCl 提取态为主, 其次是乙醇提取态; 根系与地上部不同, 以醋酸提取态

含量最高，在 23~26 mg/kg 之间，分配比例达 30%，为优势形态。南农矮脚黄可得出类似结论。

在 Zn1 和 Zn2 水平下，三种器官中的 NaCl 提取态均占主导地位。叶片中 NaCl 提取态分配比例在 32.36%~46.21%之间，其次是乙醇提取态，其它各形

态的分配比例均显著降低；叶柄中 NaCl 提取态含量显著增加，分配比例范围为 48.21%~53.56%；根系中 NaCl 提取态含量急剧上升，分配比例高达 40%以上，其次为 1%醋酸提取态，分配比例不足 20%。

Table 2. The allocation proportion of zinc forms in non-heading Chinese cabbage under zinc stress

器官 Organs	基因型 Genotype	处理 Treatments	分配比例 (%)					
			F _E	F _W	F _{NaCl}	F _{HAC}	F _{HCl}	F _R
叶片 Leaves	苏州青 Suzhouqing	CK	35.30	27.35	4.03	12.58	14.61	6.13
		Zn1	27.44	17.87	32.36	10.98	8.16	3.20
		Zn2	30.38	16.66	36.53	6.07	7.33	3.02
	南农矮黄 Aijiaohuang	CK	40.55	18.12	11.01	6.33	18.00	6.00
		Zn1	30.54	19.44	40.78	3.56	2.82	2.86
		Zn2	23.95	20.17	46.21	6.33	1.11	2.23
叶柄 Petioles	苏州青 Suzhouqing	CK	21.16	13.67	55.87	2.77	2.63	3.89
		Zn1	17.36	17.97	53.16	8.36	1.34	1.82
		Zn2	16.30	15.45	49.71	14.56	2.57	1.42
	南农矮黄 Aijiaohuang	CK	20.90	15.59	36.13	19.59	4.58	3.20
		Zn1	15.31	18.73	53.56	8.98	1.62	1.80
		Zn2	15.34	16.52	48.21	15.54	3.05	1.34
根系 Roots	苏州青 Suzhouqing	CK	21.58	8.70	14.12	33.08	16.68	5.83
		Zn1	13.06	12.95	35.03	20.19	14.45	4.32
		Zn2	9.75	12.26	41.39	18.36	13.11	5.13
	南农矮黄 Aijiaohuang	CK	18.92	10.13	12.17	34.06	17.84	6.88
		Zn1	11.04	14.32	32.04	20.89	16.75	4.96
		Zn2	2.53	14.84	45.61	19.63	12.11	5.27

2.2 锌胁迫对不结球白菜根系分泌有机酸的影响

Table 3. The content and composition of organic acid exudated by

有机酸 Organic Acid	苏州青 Suzhouqing			矮脚黄 Aijiaohuang		
	CK	Zn1	Zn2	CK	Zn1	Zn2
草酸 Oxalic acid	547.0	344.2	645.5	363.9	177.9	275.9
酒石酸 Tartaric acid	399.0	60.38	286.7	188.8	106.1	117.5
琥珀酸 Amber acid	41.15	9.18	50.22	48.60	115.0	22.81
苹果酸 Malic acid	158.6	52.03	174.9	—	94.24	57.55
柠檬酸 Citric acid	—	26.04	127.7	—	74.81	39.32
乙酸 Acetic acid	—	77.39	181.7	—	95.64	75.39
乳酸 Lactic acid	—	—	242.2	219.5	359.1	54.75
总量 Total content	1146	569.3	1709	820.7	1023	643.3

Note: “—” meant not detected

从表 3 可以看出，不结球白菜可以检测出的有机酸有 7 种：即草酸、酒石酸、琥珀酸、苹果酸、柠檬酸、乙酸和乳酸，低分子量有机酸总分泌量范围在

non-heading Chinese cabbage under zinc stress (μg/plant)

569.3~1709 μg/plant 之间。对照水平下，苏州青可以检测出草酸、酒石酸、苹果酸和琥珀酸四种有机酸，其中草酸最多，其次为酒石酸和苹果酸，琥珀酸最少；南农矮脚黄也检测出了四种有机酸，与苏州青不同的是乳酸代替了苹果酸。经过不同浓度的锌胁迫 12 天后，根系分泌有机酸的组成和含量均发生了变化。与 CK 相比，Zn1 的苏州青根系分泌有机酸增加了两种即：乙酸、柠檬酸，检测到的有机酸总量却减少了 50.32%；而在 Zn2 水平下，7 种有机酸均能够检测到，有机酸总量减少了 49.15%。对南农矮脚黄而言，CK 处理仅检测到 4 种有机酸，而 Zn1 和 Zn2 水平下，增加了苹果酸、柠檬酸和乙酸，7 种标样有机酸均能检测到。与苏州青不同的是，Zn1 水平下，有机酸总量

比 CK 提高了 24.61%，而 Zn²⁺ 水平下，有机酸总量却降低了 21.63%。

3 讨论与结论

3.1 锌胁迫对不结球白菜体内锌形态的影响

近年来，一些研究者采用连续提取的方法，对重金属在植物体内的各种化学结合形态的含量和分布特征进行了研究。吴箐等报道^[5]，锌在长柔毛委陵菜体内主要与水溶性和脂溶性的有机配位体结合。周守标等报道，皖景天植株中的锌主要以 H₂O、乙醇、NaCl 和 HAC 四种提取态存在，锌在植物体内与多种金属配位体结合^[3]。本研究也得到了类似的结果：不结球白菜体内的锌以乙醇、NaCl、HAC 提取态等多种化学形态存在，且不同品种与器官中锌的结合形态存在显著差异。锌胁迫下，三种器官中，NaCl 提取态为优势形态，同时叶片和叶柄中乙醇提取态、水提取态及根系中 HAC 提取态占有较大比例（表 2）。可以推测在不结球白菜体内，锌与多种金属配位体结合，它们联合协调，共同参与植物体内锌的分布（包括器官、组织和亚细胞水平）和解毒，其中果胶酸盐、蛋白质态等有机配位体在锌的吸收分配及解毒中起最关键的作用。

3.2 锌胁迫对不结球白菜根系分泌物的影响

根系分泌有机物是植物对外界环境的一种适应性反应。重金属胁迫条件下，植物可通过促进根系分泌柠檬酸、琥珀酸、苹果酸等有机酸来缓解重金属毒害^[6-7]。铝胁迫时，荞麦根系分泌大量的草酸和 Al³⁺ 形成草酸铝化合物，从而降低了铝对根系的毒害^[8]。大白菜在锌胁迫下可分泌草酸、酒石酸、苹果酸等有机酸，且存在基因型差异^[9]。本试验表明，锌胁迫促使不结球白菜根系分泌较多的草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、柠檬酸和琥珀酸。锌胁迫下，苏州青和南农矮脚黄分泌有机酸组成的差异主要是柠檬酸、苹果酸、乙酸、乳酸，这可能是二者对锌吸收及耐性存在显著差异的原因之一。

有机酸可参与金属离子的细胞区域化分布，通过与金属元素发生螯合，使离子态金属转变成低毒或无毒的螯合态，降低金属污染物的有效性和毒性。过量重金属元素胁迫下，植物分泌大量有机酸是植物抗重金属的机理之一^[10]。因此，推测不结球白菜体内也可能存在相似的机制，这有待于进一步研究。

References (参考文献)

- [1] Bi X.Y., Feng X.B., Yang Y. G., Qiu G. L., Li G. H. Environmental contamination of heavy metals from zinc smelting areas in Hezhang County, western Guizhou, China[J]. *Environment International*, 2006, 32(7), P883-890.
- [2] Broadley M. R., White P. J., Hammond J. P., Zelko I., Lux A. Zinc in plants[J]. *New Phytologist*, 2007, 173, P677-702.
- [3] Zhou Shoubiao, Xu Lisheng, Wu Longhua, Luo Yongming, Li Na, Cui Liqiang. Subcellular distribution and chemical forms of Cd and Zn in *Sedum jinianu*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(11), P2515-2520(Ch).
周守标, 徐礼生, 吴龙华, 骆永明, 李娜, 崔立强. 镉和锌在皖景天细胞内的分布及化学形态[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(11), P2515-2520.
- [4] Rengel Z., Romheld V., Marschner H. Uptake of zinc and iron by wheat genotypes differing in tolerance to zinc efficiency[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1998, 152(4-5), P433-438.
- [5] Wu Qing, Du Suojun, Zeng Xiaowen, Fang Xiaohang, Yu Fangming, Qiu Rongliang. Subcellular distribution and chemical forms of *Potentilla griffithii* Hook[J]. *Ecology and Environment*, 2006, 15(1), P40-44(Ch).
吴箐, 杜锁军, 曾晓雯, 方晓航, 于方明, 仇荣亮. 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), P40-44.
- [6] Pellet D. M., Papemik L. A., Kochian L.V. Multiple aluminum resistance mechanisms in wheat: the roles of root apical phosphate and malate exudation[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(2), P591-597.
- [7] Jones D. L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review[J]. *Plant and Soil*, 1998, 205(1), P25-44.
- [8] Ma J. F., Zheng S. J., Matsumoto H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L.[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1997, 38(9), P1019-1025.
- [9] Xu Weihong, Liu Jizhen, Huang He, Xiong Zhiting. Study of Zn Stress on Plant Growth, Zn uptake and Root Exudates in Different Cultivars of Chinese Cabbage[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2006, 22(8), P458-463(Ch).
徐卫红, 刘吉振, 黄河, 熊治庭. 高锌胁迫下不同大白菜品种生长、Zn 吸收及根系分泌物的研究[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(8), P458-463.
- [10] Lombi E., Zhao F. J., Dunham S. J., McGrath S. P. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*[J]. *New Phytologist*, 2000, 145(1), P11-20.