

重金属 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 胁迫对小白菜生理及其 *BcMT2a* 基因表达的影响

齐世静, 于星宇, 温友伟, 吴秀菊, 孙彦坤, 王丽娟

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为探明小白菜对 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 单一及其复合胁迫的响应机理, 以不同浓度 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 处理小白菜幼苗, 对其生物量、生理指标 (POD、SOD、CAT 活性及 MDA 含量) 及 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 在小白菜中的富集情况进行研究, 同时克隆与重金属富集相关的金属硫蛋白基因 *BcMT2a* 并对其表达特异性进行分析。结果表明: 除低浓度 Cd^{2+} (10 mg/L) 对小白菜的根长和地上部分生长有一定的促进作用外, Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 及 $Cd^{2+}-Pb^{2+}$ 处理对小白菜根长和地上部分生长均有一定的抑制作用, 且随着浓度的升高, 抑制作用逐渐增强; 抗氧化酶系统中, POD 与 SOD 活性较高, 且与 CAT 活性均呈现先升后降的趋势。 Cd^{2+} 浓度为 40 mg/L 时, MDA 含量达到最大值。 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 在小白菜各组织中的积累顺序依次为根 > 茎 > 叶, 且 Pb^{2+} 在一定程度上能够促进 Cd^{2+} 的吸收。 *BcMT2a* 基因编码的蛋白主要存在于细胞核中, 属于易突变亲水性蛋白, 该基因的相对表达量在一定浓度范围内可随着 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 及 $Cd^{2+}-Pb^{2+}$ 浓度的升高而增加, 且相对表达量的趋势与抗氧化酶系统结果基本一致, 说明小白菜在受到 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 及 $Cd^{2+}-Pb^{2+}$ 胁迫时, 抗氧化酶系统与 *BcMT2a* 基因有明显的应答, 可增加小白菜对 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的耐受性。

关键词: 小白菜; Cd^{2+} ; Pb^{2+} ; 富集; 基因克隆; 相对表达量

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 1009-2242(2018)02-0335-08

DOI: 10.13870/j.cnki.stbcbx.2018.02.049

Effects of Heavy Metal Cd^{2+} and Pb^{2+} Stress on Physiology and the Expression of *BcMT2a* Gene in *Brassica campestris* L.

QI Shijing, YU Xingyu, WEN Youwei, WU Xiuju, SUN Yankun, WANG Lijuan

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: In order to explore the response mechanism of *Brassica campestris* to the Cd^{2+} , Pb^{2+} single and combined stress ($Cd^{2+}-Pb^{2+}$), a culture room experiment was conducted, where the *Brassica campestris* seedlings were treated with different concentrations of Cd^{2+} and Pb^{2+} . The biomass, the content of antioxidant defense enzyme activities [i. e., peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activities] and malondialdehyde (MDA), and the enrichment of heavy metal ions were measured. In addition, the metallothionein gene *BcMT2a* which was associated with heavy metal enrichment was cloned and its expression was also analyzed. The results were as follows: except the low concentration of Cd^{2+} (10 mg/L), which could promote the root length and aboveground growth of *Brassica campestris*, both the Cd^{2+} and Pb^{2+} single and combined stress could inhibit the development of root length and the growth of aboveground of *Brassica campestris*. And with the increasing concentrations of heavy metal ion, the inhibition effects were gradually strengthened. The order of inhibition effects of heavy metal ions was $Pb^{2+} > Cd^{2+}-Pb^{2+} > Cd^{2+}$. In the antioxidant enzyme system, POD and SOD activity were higher, and showed a trend of increasing first and decreasing then, as well as CAT activity. MDA content reached the maximum when Cd^{2+} concentration was 40 mg/L. The order of heavy metal ions accumulation in the organs of *Brassica campestris* was root > stem > leaf. The protein encoded by *BcMT2a* gene is a hydrophathy and mutant protein predominantly present in the nucleus. In a certain concentration rage, the relative expression of *BcMT2a* increased with the increase of Cd^{2+} , Pb^{2+} and both combined concentrations, and the trend of relative expression was consistent with the

收稿日期: 2017-09-26

资助项目: 博士后落户黑龙江科研启动基金项目 (LBH-Q11153); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12531030)

第一作者: 齐世静 (1990—), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail: 1965459055@qq.com

通信作者: 王丽娟 (1967—), 女, 副研究员, 主要从事植物资源与分子生物学研究。E-mail: lj-wang@163.com

result of the antioxidant enzyme system. These findings indicate that the antioxidant enzyme system and *BcMT2a* have a clear response under the different concentrations of Cd^{2+} , Pb^{2+} and $Cd^{2+}-Pb^{2+}$ in *Brassica campestris*, and they can increase the tolerance of *Brassica campestris* to Cd^{2+} and Pb^{2+} stress.

Keywords: *Brassica campestris*; Cd^{2+} ; Pb^{2+} ; accumulation; clone; relative expression

伴随经济发展和技术进步,环境污染日益恶化的现象也随之产生,据 2014 年公布的《全国土壤污染状况调查公报》显示,全国土壤总污染超标率为 16.1%,无机污染物超标点位占全部超标点位的 82.8%,其中主要污染因子为重金属,Cd、Pb 污染最为常见^[1-2]。据统计,我国受 Cd、Pb 等重金属污染的土壤面积约为 0.2 亿 hm^2 ,其中菜园地的重金属污染相当严重^[3]。重金属胁迫不仅影响蔬菜的生长,同时还将在其中富集累积并伴随食物链进入人体,对身体健康构成严重威胁^[4]。因此,研究蔬菜在 Cd、Pb 胁迫下的响应机理,对增加食品安全性和重金属污染的植物修复具有重要意义。

重金属污染对叶菜类蔬菜生长影响最为严重,而叶菜类的小白菜(*Brassica campestris* L.)对 Cd、Pb 富集能力又较高^[5-6]。因此,本试验以小白菜为研究对象,对其进行 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 胁迫响应的研究。目前,在小白菜的重金属污染研究中,大多是关于小白菜生长、生理特性、重金属富集和迁移规律等方面的研究。李春燕等^[7]研究表明,低浓度的 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 复合胁迫对小白菜生长稍有促进作用,而高浓度的重金属对小白菜生长有明显抑制作用;王浩等^[8]研究表明,土壤中高浓度 Pb^{2+} 可促进小白菜对 Cd^{2+} 的积累,而 Cd^{2+} 对 Pb^{2+} 的影响不明显。金属硫蛋白(MTs)是一种富含半胱氨酸的低分子量蛋白,其功能主要是通过 Cys 上的巯基(-SH)与细胞内游离的重金属离子结合形成金属硫醇盐复合物,以减少细胞内可扩散的重金属离子,从而起到解毒的作用^[9-10]。Lv 等^[11]研究表明,小白菜金属硫蛋白基因 *BcMT1* 和 *BcMT2* 可以增加拟南芥对镉、铜的抗性和降低活性氧的产生。虽然目前有不少关于小白菜在重金属胁迫下生长状况、生理生化特性方面的研究^[7-8],但小白菜在重金属胁迫下 MT 基因如何发挥作用还需进一步研究。因此本研究将从分子和生理两方面,以生物量、生理生化特性、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 富集迁移规律及 *BcMT2a* 基因的相对表达分析,全面探究小白菜在重金属胁迫下的响应机理,以期为重金属污染的植物修复提供重要参考,为食品安全提供重要的经济价值。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

植物材料:春夏秋冬小白菜(购自黑龙江省哈尔滨市公滨路种子公 司)。

供试土壤:购于黑龙江省哈尔滨市花卉市场的普通花卉土壤,其基本理化性质为:pH 6.5,有机质含

量 7.35 g/kg,Cd 含量 0.42 mg/kg,Pb 含量 46.28 mg/kg,总 N 含量 19.52 mg/kg,总 P 含量 16.2 mg/kg,总 K 含量 35.23 mg/kg。

对购于黑龙江省哈尔滨市花卉市场的土壤进行灭菌处理(121 $^{\circ}C$,1 h),将小白菜种子用 75%的酒精进行消毒 1 min,用蒸馏水冲洗 7 次。

1.2 试验设计

将处理好的小白菜种子播种在预先高温灭菌的土壤中,在恒温培养室中进行培养(白天 16 h,25/20 $^{\circ}C$ 白天/夜晚温度,相对湿度分别为 65%,80%),在发芽初期用 hogland 营养液(下同)进行浇灌,待幼苗长到 2~3 叶期,用蒸馏水每天浇灌 1 次,直至 20 天左右对 4~5 叶期的小白菜用 1/2 的营养液水培 1 周,换全营养液平衡 1 周后,用含不同浓度 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的全营养液对其进行胁迫处理。以全营养液 300 mL 为对照, Cd^{2+} 处理(浓度分别为 10,20,40,60 mg/L)和 Pb^{2+} 处理(浓度分别为 300,600,900,1 200 mg/L)各 300 mL, $Cd^{2+}-Pb^{2+}$ 处理(浓度分别为 10 mg/L $Cd^{2+}+300$ mg/L Pb^{2+} ,20 mg/L $Cd^{2+}+600$ mg/L Pb^{2+} ,40 mg/L $Cd^{2+}+900$ mg/L Pb^{2+} ,60 mg/L $Cd^{2+}+1 200$ mg/L Pb^{2+})采用 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 处理液各 150 mL 混合而成。每个处理 3 次重复。每隔 2 天更换 1 次处理液,第 7 天对根和叶分别取样,进行后续试验。

1.3 试验方法

1.3.1 生物量的测定 将根用蒸馏水冲洗数次,去除根表面的重金属离子,用滤纸吸干多余的水分,测量根长与地上部分长度。

植物生长抑制率=(植物正常长度-处理后植物长度)/植物正常长度

1.3.2 小白菜抗氧化酶生理指标的测定 分别取小白菜的根和叶各 1 g,采用李合生^[12]的试验方法对过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量 4 种指标进行测定。

1.3.3 重金属含量的测定 样品采用 HNO_3-HClO_4 消化,火焰原子吸收光谱仪测定 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 含量,用国家环保总局 Cd、Pb 标准样品进行校正(参照 GB/T 5009.12-2003 及 GB/T 5009.15-2003 方法)^[13]。

1.3.4 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 使用全式金生物技术有限公司植物 RNA 试剂盒(Trans Zol Up Plus RNA Kit)提取总 RNA,使用同一公司的反转录试剂盒(Trans Script One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super Mix)进行 cDNA 第一条链的合成。

1.3.5 基因克隆与序列分析 以小白菜 cDNA 为模板进行基因克隆,依据表 1 进行 PCR 扩增。扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,38 个循环,72 ℃ 延伸 7 min。扩增产物回收后连接 T3 载体,挑取阳性克隆送生物公司测序。用 EXPASY(<http://expasy.org/tools/>) 中的 ProtParam、ProtScale、PredictProtein 及 Psort(<https://www.genscript.com/psort.html>) 工具对氨基酸序列进行生物信息学分析;用 SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质三级结构,Rasmol 进行结果处理。

1.3.6 *BcMT2a* 基因表达分析 将 1.3.4 中得到的 cDNA 进行梯度稀释,根据 C_t 值确定最佳反应浓度。以稀释好的最佳反应浓度为模板,以 β-ting-RT 为内参,采用全式金生物技术有限公司 SYBRGreen 荧光定量 PCR 试剂盒利用荧光引物(表 2)进行 RT-PCR 分析,3 次重复,反应程序为 94 ℃ 30 s,94 ℃ 5 s,58 ℃ 60 s,40 个循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s。采用比较 Ct 法对荧光定量 PCR 的扩增数据进行处理,利用 Excel 与 SPSS 17.0 对试验所得数据进行分析。

表 1 PCR 引物序列

扩增目的基因	引物名称	引物序列(5'—3')
<i>BcMT2a</i>	<i>BcMT2a</i> F	TGCTATTTCTTCGGTCTTTCTTGAG
	<i>BcMT2a</i> R	CCGTAACAAACCTAGAACATCG

表 2 RT-PCR 引物序列

扩增目的基因	引物名称	引物序列(5'—3')
<i>BcMT2a</i>	<i>BcMT2a</i> F	TGCTATTTCTTCGGTCTTTCTTGAG
	<i>BcMT2a</i> R	CCGTAACAAACCTAGAACATCG
β-ting-RT	β-ting-RT-F	GTTGCTATCCAGGCTGTTCT
	β-ting-RT-R	AAGCGTGAGGAAGAGCATAAC

2 结果与分析

2.1 Cd²⁺、Pb²⁺ 单一及其复合胁迫对小白菜生长的影响

由表 3 可以看出,Cd²⁺、Pb²⁺ 对小白菜地上部分生长和根长均有一定的抑制作用,且对地上部分抑制的强度小于根系,说明 Cd²⁺、Pb²⁺ 胁迫主要作用于根系。Pb²⁺ 处理下,随着 Pb²⁺ 浓度的升高,抑制率逐渐增大,当 Pb²⁺ 浓度达到 1 200 mg/L 时,抑制率最大,为 28.38%;而 Cd²⁺ 对小白菜的抑制作用较弱,当 Cd²⁺ 浓度为 10 mg/L 时,根抑制率为 -1.21%,地上部分的抑制率为 -32.79%,表明低浓度 Cd²⁺ 在一定程度上能够促进小白菜的生长,且在地上部分表现出显著促进;Cd²⁺—Pb²⁺ 共同处理下,随着处理浓度的

增加,抑制率逐渐增加,但抑制率大小介于单一的 Cd²⁺ 与 Pb²⁺ 之间。

表 3 不同处理对小白菜生长的影响

处理水平/ (mg·L ⁻¹)	根长/ cm	地上部分 长度/cm	植物生长抑制率/%	
			根	地上部分
0	8.28±0.11a	14.85±1.57bc	0	0
Cd ²⁺ 10	8.38±0.28a	19.69±1.07a	-1.21	-32.79
Cd ²⁺ 20	7.92±0.18b	16.69±1.20b	4.35	-12.39
Cd ²⁺ 40	7.89±1.20b	16.51±1.02b	4.43	-12.39
Cd ²⁺ 60	7.69±0.54b	14.02±1.08c	7.13	5.59
Pb ²⁺ 300	6.80±0.95bc	14.07±1.78bc	17.87	5.25
Pb ²⁺ 600	6.57±1.26bc	13.97±0.40c	20.65	5.93
Pb ²⁺ 900	6.20±0.87c	13.41±1.10c	25.12	9.97
Pb ²⁺ 1200	5.93±0.50c	12.57±1.45c	28.38	15.35
Cd ²⁺ —Pb ²⁺ 10+300	7.90±0.83b	14.11±1.79bc	4.59	4.99
Cd ²⁺ —Pb ²⁺ 20+600	7.60±0.52b	13.98±1.94c	8.21	5.85
Cd ²⁺ —Pb ²⁺ 40+900	7.49±1.21bc	13.62±2.41c	9.54	8.28
Cd ²⁺ —Pb ²⁺ 60+1200	7.17±0.70bc	13.40±1.45c	13.41	9.76

注:表中数据为平均值±标准差(n=3);不同字母表示各处理差异显著(P<0.05)。下同。

2.2 Cd²⁺、Pb²⁺ 单一及其复合胁迫对小白菜生理指标的影响

由图 1 和图 2 可知,小白菜根中 POD 含量显著高于叶中;当 Pb²⁺ 浓度为 900 mg/L 时,小白菜根中的 POD 活性达最大值,为 406 (U/g FW),推测 Cd²⁺、Pb²⁺ 胁迫下根比叶更敏感,且小白菜耐受 Pb²⁺ 胁迫的最大浓度为 900 mg/L。由图 3 和图 4 可知,当 Pb²⁺ 浓度为 900 mg/L 时,小白菜根和叶的 SOD 活性均达到最大值,分别为 54.44,58.20(U/g FW)。由图 5 和图 6 可知,当 Cd²⁺、Pb²⁺ 分别浓度为 40,900 mg/L 时,根中 CAT 活性达最大值,分别为 32.91,30.50 U/g FW;POD、SOD 及 CAT 活性(图 1~图 6)变化趋势总体一致,推测三者可能存在一定的协同作用,共同抵御 Cd²⁺、Pb²⁺ 对小白菜的毒害。由图 7 和图 8 可知,MDA 的含量随着处理浓度的增加呈先上升后降低的趋势,当 Cd²⁺ 的浓度为 40 mg/L 时,小白菜根与叶中的 MDA 含量达最大值,分别为 0.13,0.32 μmol/L,表明在此浓度下小白菜的膜脂过氧化程度最强。

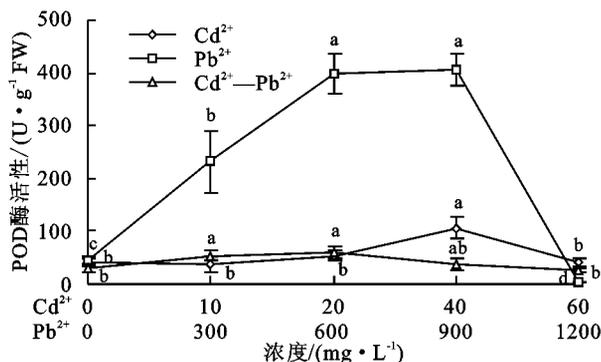


图 1 不同处理下小白菜根 POD 酶活性

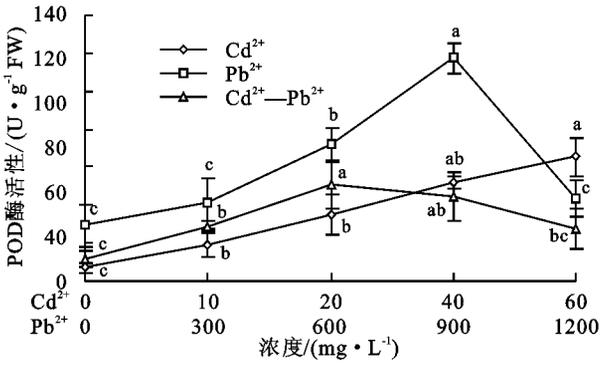


图 2 不同处理下小白菜叶 POD 酶活性

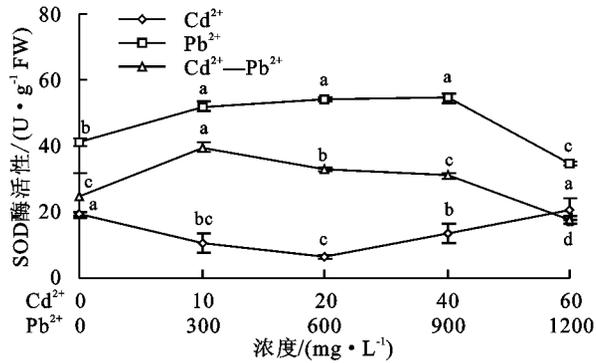


图 3 不同处理下小白菜根 SOD 酶活性

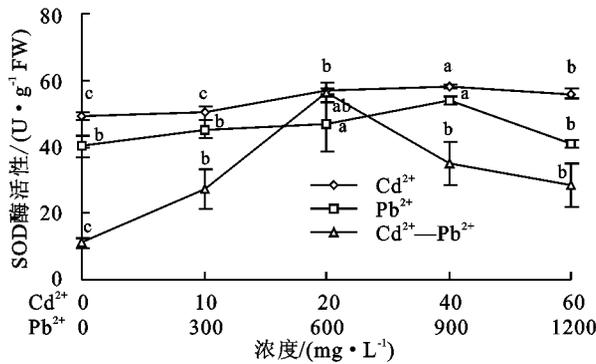


图 4 不同处理下小白菜叶 SOD 酶活性

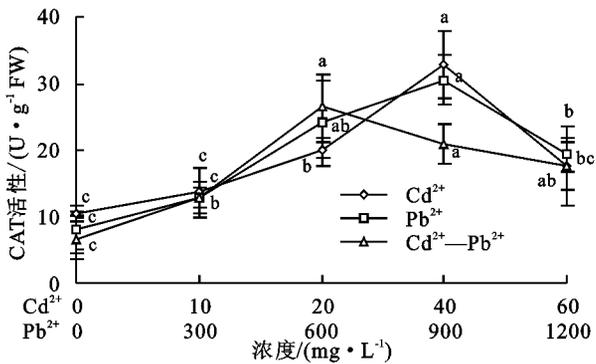


图 5 不同处理下小白菜根 CAT 活性

2.3 Cd²⁺、Pb²⁺ 单一及其复合胁迫下小白菜体内 Cd²⁺、Pb²⁺ 的积累与分布

由图 9 可知, Cd²⁺ 处理后, 小白菜根、茎中 Cd²⁺ 含量显著升高, 且茎中 Cd²⁺ 含量所占的比例显著高于 Pb²⁺ 与 Cd²⁺-Pb²⁺ 胁迫下 Cd²⁺、Pb²⁺ 含量所占的比例, 表明 Cd²⁺ 的转运能力较 Pb²⁺ 及 Cd²⁺-Pb²⁺ 更强。由图 10 可知, 随着 Pb²⁺ 浓度的增加, 小白菜根中 Pb²⁺ 含

量显著增加, 当 Pb²⁺ 浓度增加到 1 200 mg/L 时, 根中 Pb²⁺ 含量最高, 为 7 308.56 mg/kg。Cd²⁺-Pb²⁺ 处理时(图 11 和图 12), Pb²⁺ 含量约为单一 Pb²⁺ 处理时的 1/2, 而 Cd²⁺ 含量却与单一 Cd²⁺ 处理时无明显差异, 说明 Pb²⁺ 在一定程度上促进了 Cd²⁺ 的吸收。总体而言, Cd²⁺、Pb²⁺ 在小白菜中的积累顺序依次为根>茎>叶, 且主要集中在根中, 茎和叶中 Cd²⁺、Pb²⁺ 含量只占了很少一部分, 说明 Cd²⁺、Pb²⁺ 不易迁移, 小白菜吸收后主要积累在根部。

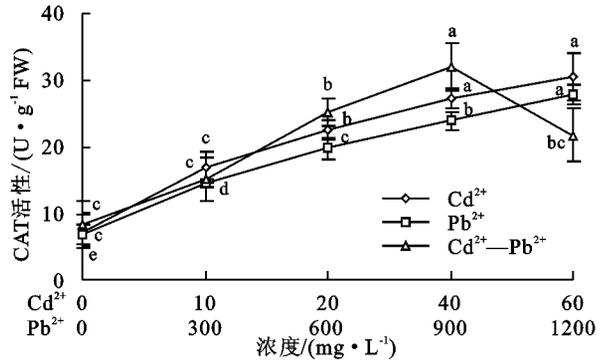


图 6 不同处理下小白菜叶 CAT 活性

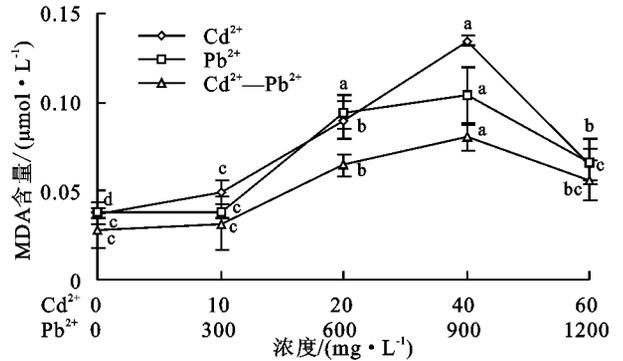


图 7 不同处理下小白菜根 MDA 含量

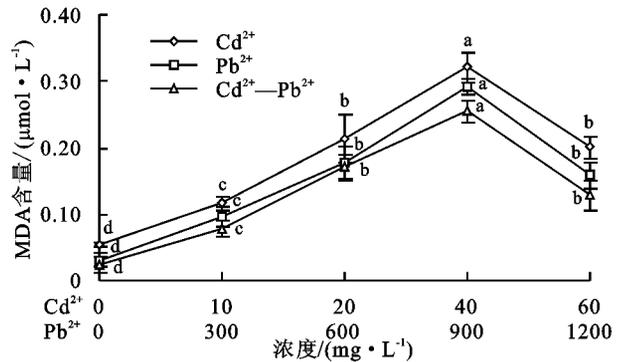


图 8 不同处理下小白菜叶 MDA 含量

2.4 耐重金属基因 BcMT2a 的克隆及其编码蛋白的结构功能分析

测序结果表明, BcMT2a 基因长度为 243 bp, 与目的条带结果一致且保守结构域完整。

2.4.1 蛋白质的理化性质(蛋白质的一级结构) 基因 BcMT2a 编码 80 个氨基酸, 相对分子量为 8 024.01, 等电点为 4.61, 负电荷的氨基酸残基数(Asp+Glu) 为 9, 正电荷的氨基酸残基数(Arg+Lys) 为 6。共有

319 个碳原子,497 个氢原子,91 个氮原子,117 个氧原子及 17 个硫原子。原子总数为 2 562,其分子结构简式为: C₃₁₉ H₄₉₇ N₉₁ O₁₁₇ S₁₇。该蛋白的不稳定系数为 43.29,表明此蛋白为不稳定蛋白;亲水性的总平均值为 -0.245,说明该蛋白为亲水性蛋白。

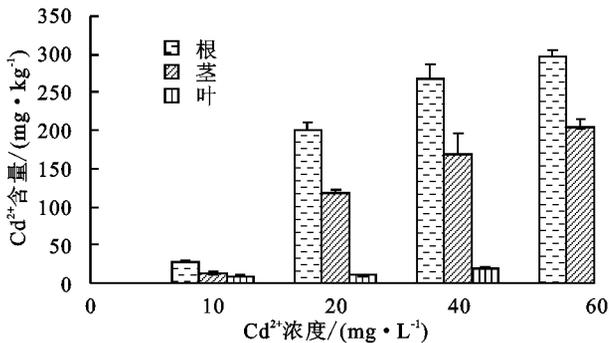


图9 Cd²⁺胁迫下小白菜各组织中 Cd²⁺ 积累及分布

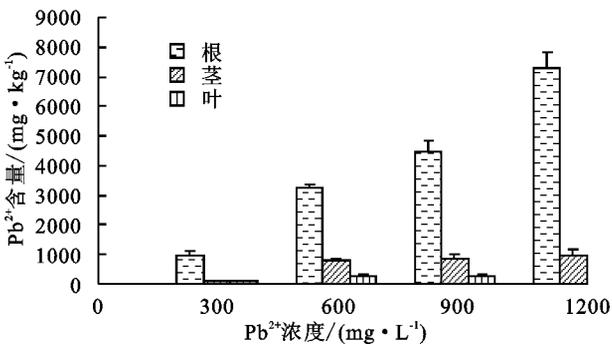


图10 Pb²⁺胁迫下小白菜各组织中 Pb²⁺ 积累及分布

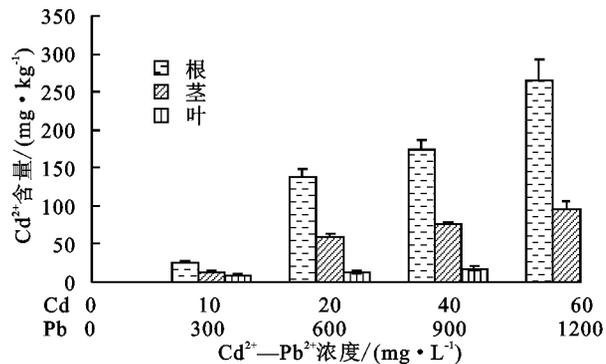


图11 Cd²⁺-Pb²⁺胁迫下小白菜各组织中 Cd²⁺ 积累及分布

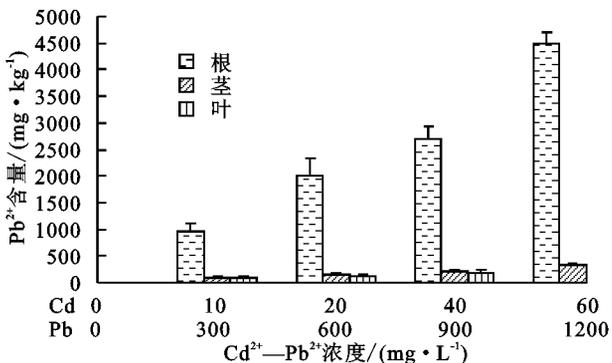


图12 Cd²⁺-Pb²⁺胁迫下小白菜各组织中 Pb²⁺ 积累及分布

2.4.2 蛋白质亚细胞定位分析 通过 Psort 软件进行 *BcMT2a* 编码蛋白的亚细胞定位预测分析,可知 *BcMT2a* 编码蛋白有 34.8% 存在于细胞核中,21.7% 存

在于细胞质中,13.0% 存在于高尔基体中,8.7% 存在于内质网中,8.7% 存在于线粒体中,8.7% 存在于囊泡中,4.3% 存在于过氧化物酶体,表明该基因主要存在于细胞核和叶绿体中。

2.4.3 蛋白质的二级结构及氨基酸可溶性预测 通过 PredictProtein 软件对基因 *BcMT2a* 编码的蛋白进行二级结构、氨基酸可溶性及基因突变预测,结果表明,β-折叠所占的比例为 13.75%,而无规则卷曲占 86.25%。因此该基因编码的蛋白为无规则卷曲型。对基因 *BcMT2a* 编码蛋白的残基可溶性分析可知,80% 的表面残基具有可溶性,2.5% 中间残基具有可溶性,17.5% 内部残基具有可溶性,因此该蛋白可溶性残基主要分布在表面。

2.4.4 蛋白质三级结构预测 通过运用 SWISS-MODEL 软件对 *BcMT2a* 编码蛋白进行三维模型的构建(图 13)。与蛋白质 1qjl.1.A 序列相似度为 52.63%。通过蛋白质的三级结构预测对该酶的结构和催化机制的认识有一定的指导意义。

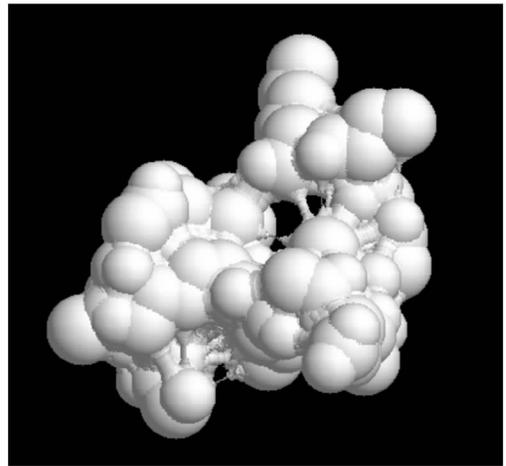


图13 基因 *BcMT2a* 编码蛋白的三级结构预测

2.5 *BcMT2a* 基因在小白菜不同部位的表达分析

2.5.1 Cd²⁺胁迫下 *BcMT2a* 基因在小白菜不同部位的表达 由图 14 可知,小白菜不同组织部位中 *BcMT2a* 基因呈现不同的表达模式。*BcMT2a* 基因在叶中的表达量显著高于根中,表明该基因主要在叶中表达。由图 15 可知,随着 Cd²⁺ 浓度的升高,根中 *BcMT2a* 基因的表达量逐渐升高;当 Cd²⁺ 浓度为 40 mg/L 时,其表达量达到最大值,随后下降;相比 CK 处理,*BcMT2a* 基因的表达量分别增加了 1,2,17,0.5 倍。在叶中,*BcMT2a* 基因的表达量同样在 Cd²⁺ 浓度为 40 mg/L 时达到最大值,随后略微下降;较之 CK 处理,*BcMT2a* 基因的表达量分别增加了 10,13,22,20 倍。除最大值外,叶中 *BcMT2a* 基因的表达量为根的 6 倍以上。推测 Cd²⁺ 主要影响 *BcMT2a* 基因在叶中的表达,Cd²⁺ 能够促

进 *BcMT2a* 基因的表达,且随着 Cd^{2+} 浓度的增加, *BcMT2a* 基因表达量增加,小白菜耐受 Cd^{2+} 浓度最高为 40 mg/L。

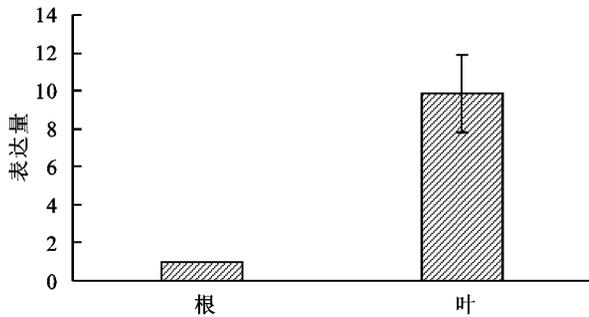


图 14 *BcMT2a* 基因的组织特异性分析

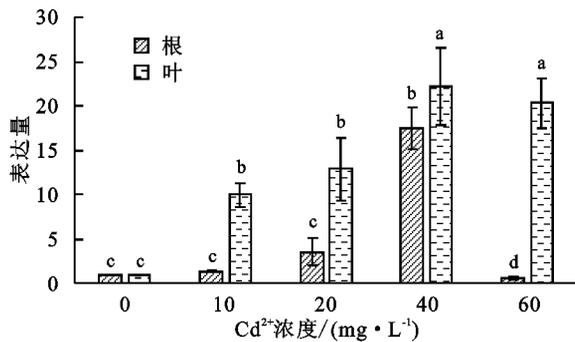


图 15 不同浓度 Cd^{2+} 胁迫下 *BcMT2a* 基因在小白菜根和叶的表达量

2.5.2 Pb^{2+} 胁迫下 *BcMT2a* 基因在小白菜不同部位的表达 从图 16 可以看出,随着 Pb^{2+} 浓度的升高,小白菜根和叶中 *BcMT2a* 基因的表达量逐渐升高,当浓度达到 900 mg/L 时,其含量均达到最大值,随后显著降低。较 CK 处理,根中 *BcMT2a* 基因的表达量分别增加了 4,6,25,3 倍;而在叶中其含量分别增加了 18,25,30,7 倍。除最大值外,叶中 *BcMT2a* 基因的表达量约为根中的 3~4 倍,说明 Pb^{2+} 能够促进小白菜 *BcMT2a* 的表达,且在叶中促进作用更显著,其耐受 Pb^{2+} 浓度最高为 900 mg/L。

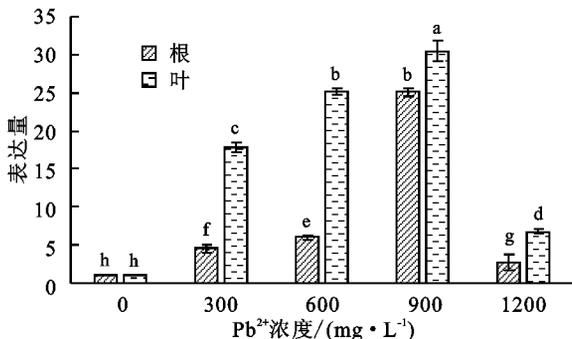


图 16 不同浓度 Pb^{2+} 胁迫下 *BcMT2a* 基因在小白菜根和叶中表达量

2.5.3 Cd^{2+} — Pb^{2+} 胁迫下 *BcMT2a* 基因在小白菜不同部位的表达量 从图 17 可以看出,随着 Cd^{2+} — Pb^{2+} 浓度的升高,小白菜根和叶中 *BcMT2a* 基因的

表达量逐渐升高,当浓度达到 40~900 mg/L 时,其含量均达到最大值,随后显著降低。较之 CK 处理,根中 *BcMT2a* 基因的表达量分别增加了 7,9,16,1 倍;而在叶中其含量分别增加了 17,23,29,10 倍。除最小值外,叶中 *BcMT2a* 基因的表达量约为根中的 2~3 倍,表明 Cd^{2+} — Pb^{2+} 能够促进 *BcMT2a* 基因的表达且主要影响其在叶中的表达,小白菜耐受 Cd^{2+} — Pb^{2+} 浓度最高为 40~900 mg/L。

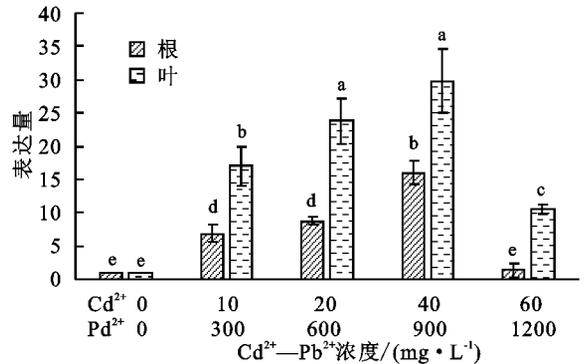


图 17 不同浓度 Cd^{2+} — Pb^{2+} 胁迫下 *BcMT2a* 基因在小白菜根和叶中表达量

3 讨论

徐澜等^[14]研究表明 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 胁迫会造成小麦叶绿素含量下降;本研究中,在 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 及 Cd^{2+} — Pb^{2+} 胁迫处理下,小白菜的根长受到了明显抑制,且随着处理浓度的升高,抑制作用增强,推测在 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 处理下,小白菜的光合作用可能受到抑制,进而使得有机物的产量降低,不能满足其生长过程中对营养物质的需要,从而导致表观的根、芽的生长受阻。而茎的抑制作用没有根明显,表明 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的迁移率较低,主要积累在根部;且低浓度 Cd^{2+} 具有一定的促进作用,当 Cd^{2+} 浓度为 10 mg/L 时,促进作用最为明显。推测可能是小白菜对 Cd^{2+} 耐受能力更强,10 mg/L 可能刚刚起到启动小白菜防御机制的作用,小白菜通过提高自身的激素水平来调节生长平衡。

植物在遭受逆境胁迫时,细胞内活性氧产生与清除的平衡会受到破坏,进而对植物的生长造成伤害,因而可以通过抗氧化酶活性的高低来判断植物受到逆境胁迫的程度。本试验为更直观地体现小白菜在 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 及 Cd^{2+} — Pb^{2+} 胁迫处理下每种指标变化趋势,进而将三者呈现在同一个折线图中,其中 Cd^{2+} — Pb^{2+} 的浓度为 Cd^{2+} 与 Pb^{2+} 一一对应的浓度和。本研究得知,在不同浓度 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 及 Cd^{2+} — Pb^{2+} 胁迫处理下,根中 POD 含量明显大于叶中,说明 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 对小白菜的毒害作用主要集中在根部,这可能与重金属离子难迁移有关;此外,POD、SOD 及 CAT 活性的趋势变化大体一致且活性较高,推测

这三者可能存在一定的协同关系。且小白菜叶中 CAT 活性表明,随着 Cd²⁺、Pb²⁺ 浓度的增加,CAT 活性一直呈上升趋势,推测高浓度下主要由 CAT 来调节小白菜对 Cd²⁺、Pb²⁺ 胁迫的耐性。MDA 含量都明显高于对照组,说明在一定浓度范围内,随着处理浓度的增加,重金属离子能够促进膜的过氧化。这与张家洋^[15]的研究结果一致,而与田小霞等^[16]的研究中 Cd、Zn 对长穗偃麦草 POD、SOD 及 MDA 的变化趋势有差异,推测抗氧化酶的变化可能与重金属离子和植物种类有关。

杨佳等^[17]研究认为,Cd²⁺ 或者与 OH⁻、Cl⁻ 络合,或者通过植物的吞吐作用转换为有机态,而 Pb²⁺ 则以 PbCO₃、PbSO₄ 及 Pb₃(PO₄)₂ 等形式沉积在植物的细胞壁中。本试验中,小白菜茎中 Cd²⁺ 含量显著高于 Pb²⁺ 含量,因而推测 Cd²⁺ 主要以离子态存在,进而迁移率大于 Pb²⁺,从而导致茎中 Cd²⁺ 含量更高。小白菜体内重金属含量大小为 Pb²⁺ > Cd²⁺ — Pb²⁺ > Cd²⁺,与刘小文等^[18]的研究结果不同,推测可能是品种间差异所致。不同重金属之间关系不同,本试验中 Pb²⁺ 的存在明显促进了 Cd²⁺ 的吸收,所以可能 Pb²⁺ 与 Cd²⁺ 存在协同关系,这与林大松等^[19]的试验结果一致。

植物金属硫蛋白参与重金属解毒以及非生物胁迫缓解(如活性氧清除)等重要的生理过程^[20]。本研究通过分析 *BcMT2a* 基因编码蛋白可知,该基因编码的蛋白主要存在于细胞核中,推测其对植物的生长发挥重要作用且可遗传。为了验证该基因在小白菜受重金属胁迫过程中是否发挥作用,本试验对其进行相对定量表达分析。结果表明 *BcMT2a* 基因在 Cd²⁺、Pb²⁺ 及 Cd²⁺—Pb²⁺ 不同浓度胁迫处理下的变化趋势与抗氧化酶的变化趋势总体一致,表明在重金属胁迫下,小白菜的 *BcMT2a* 基因与抗氧化酶共同作用来缓解其对小白菜的毒害作用,且二者之间可能存在一定的协同关系。Dundar 等^[21]认为 MT 之所以能够降低重金属的毒性是因为其富含的 Cys 可以将重金属区隔化。此外,本研究发现小白菜中, Cd²⁺、Pb²⁺ 及 Cd²⁺—Pb²⁺ 的存在可以使 *BcMT2a* 基因显著上调,这与贾鹏等^[22]研究结果一致。本研究表明,*BcMT2a* 基因在小白菜叶中特异性表达,这与徐玉凤等^[23]在水稻中结果不同,推测该基因的表达可能存在品种差异性。但目前对小白菜富集重金属后,抗氧化酶活性与 *BcMT2a* 基因之间的作用机理还有待进一步研究。

本试验在 Cd²⁺、Pb²⁺ 及 Cd²⁺—Pb²⁺ 胁迫处理下,从小白菜宏观的根长、地上部分生长,直至微观的分子生

物学层面金属硫蛋白基因 *BcMT2a* 编码蛋白的生物信息学分析及该基因的相对表达量进行了较为全面的剖析,力图能够更加透彻地明确重金属富集转移的过程及原理,为重金属污染的植物修复技术提供理论依据,也为小白菜等蔬菜的食用安全提供一定的解决思路。

4 结论

(1)低浓度 Cd²⁺ (10 mg/L)对小白菜的根长和地上部分有一定的促进作用,高浓度 Cd²⁺、Pb²⁺ 及 Cd²⁺—Pb²⁺ 对小白菜的生长产生一定的抑制作用;小白菜中重金属含量顺序依次为 Pb²⁺ > Cd²⁺—Pb²⁺ > Cd²⁺; Pb²⁺ 在一定程度上促进了 Cd²⁺ 的吸收。

(2)抗氧化酶系统中,POD、SOD 及 CAT 活性在 Cd²⁺、Pb²⁺ 胁迫下变化趋势明显且基本一致,推测 POD、SOD 及 CAT 在此过程中可能存在协同作用,共同发挥防御作用。

(3)*BcMT2a* 基因编码的蛋白在植物富集 Cd²⁺、Pb²⁺ 的过程中起不可替代作用,在一定浓度范围内,*BcMT2a* 基因的表达量随 Cd²⁺、Pb²⁺ 浓度的增加而升高。推测该基因的存在可在一定程度上提升小白菜对 Cd²⁺ 与 Pb²⁺ 的耐性。

参考文献:

- [1] 环境保护部,国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报[R]. 北京:环境保护部,国土资源部,2014.
- [2] 田向荣,吴昊,李菁,等. Cd、Pb 复合胁迫下湿地甸灯藓种金属累积效应及抗氧化系统响应[J]. 农业环境科学学报,2015,34(5):844-851.
- [3] 郭岩,杨国义,董巧香,等. 汕头市典型区域土壤重金属污染特征及评价[J]. 环境科学,2007,28(5):1067-1074.
- [4] 彭华,田发祥,魏维,等. 不同生育期施用硅肥对水稻吸收积累镉的影响[J]. 农业环境科学学报,2017,36(6):1027-1033.
- [5] 陈志良,黄玲,周存宇,等. 广州市蔬菜中重金属污染特征研究与评价[J]. 环境科学,2017,38(1):389-398.
- [6] 袁列江,杨梦昕,李萌立,等. 湘江长沙段叶菜类蔬菜重金属富集规律及污染评价[J]. 食品与机械,2015,31(1):59-63.
- [7] 李春燕,袁寒,沈云玫,等. 重金属复合污染对小白菜生长及生理生化的影响[J]. 广东农业科学,2013,40(19):55-56.
- [8] 王浩,顾国平,施彩仙,等. 土壤铅、镉污染对小白菜生长与积累的影响[J]. 浙江农业科学,2009,1(2):398-400.
- [9] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53(1):159.
- [10] 陈永快. 小白菜镉抗性形成代谢关键基因的克隆及肺

- 迫表达研究[D]. 福州:福建农林大学,2010.
- [11] Lv Y Y, Deng X P, Quan L T, et al. Metallothioneins *BcMT1* and *BcMT2* from *Brassica campestris* enhance tolerance to cadmium and copper and decrease production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant and Soil*, 2013, 367(1/2):507-519.
- [12] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:192.
- [13] 吴贤豪, 李建新, 王永川, 等. 超积累植物热解中重金属迁移及渗滤特性研究[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(7):2707-2712.
- [14] 徐澜, 杨锦忠, 安伟, 等. Cr、Pb 单一及其复合胁迫对小麦生理生化的影响[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(6):119-126.
- [15] 张家洋. 重金属铅镉短期胁迫对蓬莱蕉生理生化的影响[J]. *水土保持学报*, 2016, 30(2):340-345.
- [16] 田小霞, 孟林, 毛培春, 等. 重金属 Cd Zn 对长穗偃麦草生理生化特性的影响及其积累能力研究[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(8):1483-1490.
- [17] 杨佳, 王趁义, 陈翟, 等. 碱蓬对 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 单一及复合胁迫的反应及其吸收累积特征[J]. *水土保持学报*, 2016, 30(2):323-327.
- [18] 刘小文, 齐成媚, 欧阳灿斌, 等. Pb、Cd 及其复合污染对紫茎泽兰生长及吸收富集特征的影响[J]. *生态环境学报*, 2014, 23(5):876-883.
- [19] 林大松, 徐应明, 孙国红, 等. 土壤重金属污染复合效应对小白菜生长及重金属累积的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(增刊 1):72-75.
- [20] Mudalkar S, Golla R, Sengupta D, et al. Molecular cloning and characterisation of metallothionein type 2a gene from *Jatropha curcas* L., a promising biofuel plant[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(1):113-124.
- [21] Dunder E, Sonmez G D, Unver T. Isolation, molecular characterization and functional analysis of *OeMT2*, an olive metallothionein with a bioremediation potential [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290(1):187-199.
- [22] 贾鹏, 王媛, 陈涛, 等. 苦荞 *MT2* 基因的克隆及其对铜胁迫的响应[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(6):874-883.
- [23] 徐玉凤, 李一勤, 刘进元. 水稻新型 MT 基因的鉴定及其基因家族分子特征分析[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(26):12440-12442.
- (上接第 297 页)
- [18] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8):2351-2359.
- [19] 尹承苗, 王功帅, 李园园, 等. 连作苹果园土壤真菌的 T-RFLP 分析[J]. *生态学报*, 2014, 34(4):837-846.
- [20] 徐文凤. 环渤海湾地区重茬苹果园土壤真菌群落多样性及生防真菌的筛选[D]. 山东泰安:山东农业大学,2011.
- [21] Kelderer M, Manici L M, Caputo F, et al. Planting in the 'inter-row' to overcome replant disease in apple orchards: A study on the effectiveness of the practice based on microbial indicators[J]. *Plant and Soil*, 2012, 357(1/2):381-393.
- [22] 乔康. 1,3-D 防治蔬菜根结线虫病及其对土壤细菌多样性的影响[D]. 山东泰安:山东农业大学,2013.
- [23] 侯颖, 徐建强, 宋宇州, 等. 3 种杀菌剂对牡丹黑斑病菌菌丝生长及分生孢子萌发的影响[J]. *植物保护学报*, 2014, 41(3):367-372.
- [24] 沈宗专, 钟书堂, 赵建树, 等. 氨水熏蒸对高发枯萎病蕉园土壤微生物区系及发病率的影响[J]. *生态学报*, 2015, 35(9):2946-2953.
- [25] 刘国华, 叶正芳, 吴为中. 土壤微生物群落多样性解析法:从培养到非培养[J]. *生态学报*, 2012, 32(14):4421-4433.
- [26] Hartmann M, Frey B, Kölliker R, et al. Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: Comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 61(3):349-360.