

不同铁营养状态对小金海棠镉吸收的影响

高超 王忆 马丽 张柳霞 张新忠 韩振海*

(中国农业大学 园艺植物研究所/北京市果树逆境生理与分子生物学重点实验室,北京 100193)

摘要 采用非损伤微测技术对不同铁营养状态(正常供铁、缺铁和高铁)下苹果小金海棠(*Malus xiaojinensis*)水培苗根部镉吸收速率和植株不同部位镉含量进行了测定,并采用半定量 RT-PCR 研究 *MxIRT1* 在不同铁营养状态下的表达变化。结果表明:正常供铁培养条件下,小金海棠根部各区镉吸收速率有明显差异,分生区>伸长区>成熟区;缺铁培养条件下,小金海棠植株根部分生区和伸长区镉吸收速率明显增加,成熟区无明显变化,植株地上部和根部镉积累增加;高铁培养条件下,小金海棠植株根部分生区和伸长区镉吸收速率明显降低,成熟区无明显变化,植株地上部和根部镉积累减少。铁转运蛋白编码基因 *MxIRT1* 在不同铁营养状态下表达水平存在明显差异,推测铁营养可能通过调控基因 *MxIRT1* 的表达影响重金属镉的吸收。

关键词 小金海棠; 铁; 镉; 净吸收速率; 非损伤微测技术

中图分类号 S 601; S 661.1

文章编号 1007-4333(2011)06-0083-05

文献标志码 A

Effect of Fe nutrition status on Cd^{2+} influx on root surface of *Malus xiaojinensis*

GAO Chao, WANG Yi, Ma li, ZHANG Liu-xia, ZHANG Xin-zhong, HAN Zhen-hai*

(Institute for Horticultural Plants/Key Laboratory of Beijing Municipality of Stress Physiology and Molecular Biology for Fruit Trees, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The effect of iron nutrition on cadmium influx and accumulation in *Malus xiaojinensis* plants was studied using a hydroponic system. Net Cd^{2+} influx to the root was measured at six positions located 0.1mm to 3mm from the root tip using Cd^{2+} selective microelectrodes. The results showed that net Cd^{2+} influx decreased with increasing distance from the root tip under normal Fe level condition. In Fe deficiency, the net Cd^{2+} influx increased markedly in the meristematic zone and elongation zone, but changes in the maturation zone were not obvious, and the concentration of cadmium increased in shoots and roots. However, at high Fe level, the net Cd^{2+} influx decreased markedly in the meristematic zone and elongation zone, but also changes in the maturation zone were not obvious, and the concentration of cadmium decreased in shoots and roots. Expression studies of the Fe^{2+} transporter cloned from *Malus xiaojinensis*, *MxIRT1*, indicated that the expression of this transporter is distinct at different Fe levels, which might affect the transport of heavy-metal divalent cations such as Cd^{2+} .

Key words *malus xiaojinensis*; Fe; Cd^{2+} ; net influx; non-invasive micro-test technique

铁是植物必需微量营养元素,在植物的许多生理生化过程如呼吸作用和光合作用中都起着重要作用。镉是环境中毒性最强的重金属之一,由于其在

土壤中移动性较强,极易被植物体吸收,造成植物体内代谢紊乱,严重抑制植物生长发育^[1]。研究果树中铁营养和镉吸收之间的作用关系,对于提高果树

收稿日期: 2011-02-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30700545); 国家转基因专项课题(2009ZX08009-122B); 北京市科技新星项目(2008B74)

第一作者: 高超, 硕士研究生, E-mail: gsuperman114@163.com

通讯作者: 韩振海, 教授, 主要从事果树抗逆机理研究, E-mail: rschan@cau.edu.cn

对重金属镉的耐受性具有重要意义。研究表明,镉胁迫处理抑制铁的吸收利用,引起植物铁含量的下降或缺乏,导致铁参与生理过程的异常,呈现缺铁黄化症状^[2-4]。另外,铁营养状况也影响重金属镉的吸收和运输,但不同植物中研究结果不一。李元等研究证明施铁促进烟草中镉含量增加,即在吸收富集方面,铁协同镉^[5];相反,Chlopecka 和 Adriano 报道,土壤中添加 50 g/kg 的铁氧化物,将显著地降低玉米和大麦中镉的积累^[6];Cohen 等利用同位素示踪技术研究了豌豆在铁缺乏和充足供应条件下的镉吸收动力学,结果表明铁缺乏条件下镉最大初始吸收速率为充足条件下的近 7 倍^[7]。

MxIRT1 基因是本实验室从铁高效基因型苹果小金海棠中克隆到的第 1 个铁转运蛋白基因。在低铁胁迫时,*MxIRT1* 基因在小金海棠水培苗根部上调表达,序列分析表明该基因与 ZIP 家族蛋白基因具有高度同源性^[8],这就暗示着该基因可能在镉的吸收中具有重要作用^[9-10]。本试验拟采用非损伤微测技术,研究不同铁营养状态对铁高效基因型苹果砧木小金海棠(*Malus xiaojinensis*)植株不同部位镉含量及根部镉吸收速率的影响;分析小金海棠铁转运蛋白基因 *MxIRT1* 在不同铁营养状态下的表达情况,从分子水平初步探究引起该变化的原因。

1 材料与方法

1.1 植物材料

小金海棠组培苗在生长培养基(MS+0.5 mg/L IBA +0.2 mg/L 6-BA)生长到茎木质化后转移至生根培养基(1/2 MS+0.5 mg/L IBA),待长出白根,转移到半营养液练苗 2 周,然后移入完全营养液,每隔 1 周换 1 次 Hogland 标准营养液,pH 调整为 6.3,日光灯恒定光源,光强 1 500 lx,16 h 光照/8 h 黑暗,室温 23~26 °C,相对湿度 85%。方法参考 Han 等^[11]。

1.2 处理条件

待水培苗长出 10~12 片真叶时,取大小基本一致的植株进行处理。处理条件分别为:缺铁加镉(4 μmol/L EDTA-NaFe 和 80 μmol/L CdCl₂);高铁加镉(240 μmol/L EDTA-NaFe 和 80 μmol/L CdCl₂);正常铁加镉(40 μmol/L EDTA-NaFe 和 80

μmol/L CdCl₂)为对照,每个处理重复 3 次^[12-13]。

1.3 试验方法

1) 离子含量测定。用去离子水将处理的完整植株洗净后擦干。110 °C 杀青 10 min,将材料放入 65 °C 烘箱中烘干。分别剪取地上部和根部进行研磨,称取 0.1 g 于微波消解罐中,加入 10 mL HNO₃ 和 HF(V(HNO₃):V(HF)=4:1),静置 30 min,于微波消解仪中 180 °C 消解 1 h。将消解液于容量瓶中定容至 25 mL,等离子光谱分析仪(ICP)测定离子含量(方法参考 Hirota, Hodoshima 等^[12])。铁、镉的测定波长分别为 239.562 和 214.438 nm。每个处理重复 3 次,取平均值。试验数据采用 Microsoft Excel 2003 进行统计分析,LSD 法检验差异显著性。

2) 镉净吸收速率测定。采用镉选择性微电极,对小金海棠植株根部在不同铁营养状态下的镉净吸收速率进行非损伤测定(方法参考 Farrell 等^[14])。镉选择性微电极通过镉校正液进行电位校正。将植株根部放入含有约 30 mL 测试液的塑料培养皿中预处理 30 min,选择长度和粗度基本一致的根,测定根冠、分生区、伸长区、成熟区附近的电位和电压差,在根冠取 1 个点(0.1 mm(距根顶端距离,下同)),分生区(0.5、0.8 mm)、伸长区(1.0、1.5 mm)和成熟区(2.0、3.0 mm)各选 2 个点进行测定,每个点测定 5 min。将电脑测定的原始电位值和电压差输入 SIET 系统中的 ASET 分析软件,计算出镉净流速值。每个处理重复 3 次,取平均值,试验数据采用 Microsoft Excel (2003) 进行统计分析, LSD 法检验差异显著性。测试液成分为:0.1 mmol/L Cd(NO₃)₂,0.1 mmol/L KCl,0.5 mmol/L NaCl,0.3 mmol/L MES,0.2 mmol/L Na₂SO₄,0.1%蔗糖;校正液 1 成分:0.05 mmol/L Cd(NO₃)₂,其他成分和测试液相同;校正液 2 成分:0.5 mmol/L Cd(NO₃)₂,其他成分和测试液相同。

3) *MxIRT1* 半定量 RT-PCR 分析。分别在处理后第 0、2、4、6 和 8 天取白色初生根,液氮速冻后用 CTAB 法^[15]提取小金海棠根部总 RNA。DNaseI 消化 30 min,除去基因组 DNA,检测 OD 值和浓度后取 1 μg 进行反转录反应。以 *MxACT* 作为内参基因,PCR 反应调整模板量。反应程序为:94 °C 预

变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。RT-PCR 扩增引物序列为: *MxIRT1*: F, 5'-TGATCTGGAGCTTAATGCTGCGT-3'; R, 5'-GCCACCAAGTCACATTTGAAGCT-3'; *MxACT*: F, 5'-CTACAAAGTCATCGTCCAGACAT-3'; R, 5'-TGGGATGACATGGAGAAGATT-3'。

2 结果与分析

2.1 铁营养状态对小金海棠植株镉含量的影响

不同铁浓度处理 14 d 后小金海棠根部和地上部铁含量随着铁处理浓度变化而变化(表 1): 缺铁处理时, 铁含量减少; 高铁处理时, 铁含量增加; 而镉含量随着铁处理浓度变化表现出相反的趋势: 缺铁

表 1 不同铁浓度处理 14 d 后小金海棠地上部及根部铁和镉的质量分数

Table 1 Cd concentration in shoot and root of *Malus xiaojinensis* grown under different Fe concentration conditions after 14 days

c(Fe)/(μmol/L)	地上部		根部	
	w(Fe)/(mg/kg)	w(Cd)/(mg/kg)	w(Fe)/(mg/kg)	w(Cd)/(mg/kg)
40	195±15 b	17±2.6 b	1 700±26 b	2 240±137 b
4	109±35 b	33±7.8 a	855±249 c	3 600±529 a
240	275±16 a	11.8±3.5 b	2 370±11 a	1 100±76 c

注: 同列不同小写字母表示差异为 5% 显著水平。

处理时, 小金海棠植株地上部和根部镉含量显著增加, 约为对照的 1.8 倍; 高铁处理时, 根部镉含量明显减少, 减少为对照的 50%, 地上部镉含量也降低, 但差异不显著。

2.2 铁营养状态对小金海棠植株根部镉净吸收速率的影响

不同铁营养状态下小金海棠根部不同部位镉吸收速率有明显差异(图 1): 根冠吸收速率最小, 几乎

无吸收(数据略); 从分生区到成熟区吸收速率逐渐减弱: 分生区吸收速率约为 85 pmol/(cm²·s), 伸长区降低为 60 pmol/(cm²·s), 成熟区最低约为 40 pmol/(cm²·s)。

缺铁处理条件下, 分生区和伸长区镉吸收速率明显增加: 分生区增加为 110 pmol/(cm²·s), 约为对照的 1.4 倍; 伸长区增加为 74 pmol/(cm²·s), 较对照提高 33%; 根冠和成熟区无明显变化。高铁处理条件下, 分生区和伸长区镉吸收速率明显降低: 分生区降低为 42 pmol/(cm²·s), 约为对照的 50%; 伸长区降低为 45 pmol/(cm²·s), 约为对照的 70%; 根冠和成熟区同样没有明显变化。

2.3 *MxIRT1* 半定量 RT-PCR 分析

半定量 RT-PCR 检测了 *MxIRT1* 在正常铁(40 μmol/L EDTA-NaFe)、缺铁(4 μmol/L EDTA-NaFe)、高铁(240 μmol/L EDTA-NaFe)条件下的表达变化。在正常供铁时, *MxIRT1* 在不同天数均有微弱表达; 缺铁处理时, *MxIRT1* 在第 4 天表达量开始增加, 第 6 天表达最强; 高铁处理时, 第 4 天表达量减弱, 并随着处理时间的延长, 几乎检测不到该基因表达(图 2)。

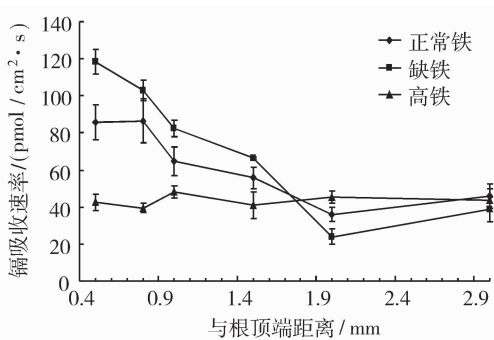


图 1 不同铁营养状态下小金海棠根部镉净吸收速率
Fig. 1 Net Cd²⁺ influx on the root surface of *Malus xiaojinensis* under different Fe nutrition conditions

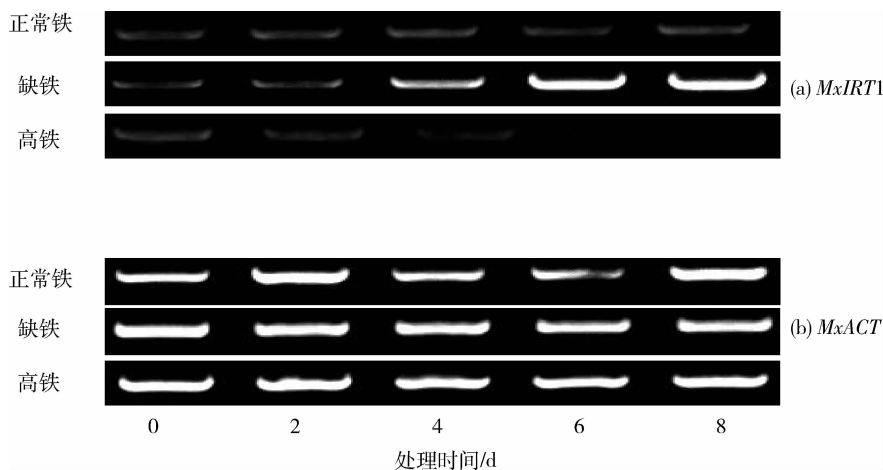


图2 不同铁营养状态下小金海棠根部 *MxIRT1* 基因表达分析

Fig. 2 Expression of *MxIRT1* in *Malus xiaojinensis* root under different Fe nutrition conditions

3 讨论

3.1 铁影响小金海棠对重金属镉的吸收及转运

非损伤微测技术是检测活体样品内部和外部的离子或分子浓度、流速及流向信息,对生命体没有任何损坏的新技术。试验采用该技术研究不同铁营养状态下小金海棠根部镉净吸收速率的变化,结果表明:缺铁处理促进小金海棠对重金属镉的吸收,植株根部和地上部镉含量比正常铁处理条件下明显增加;而高铁处理则明显抑制小金海棠对重金属镉的吸收,根部镉含量明显减少,地上部镉含量也出现降低,但差异不显著,这可能和地上部镉相对含量较少有关。通过测定不同部位镉净吸收速率,发现镉主要是在分生区和伸长区被吸收进入植物体,成熟区吸收较少。这一结果和小麦根部镉吸收速率随着距离根尖距离增加而降低的结果一致^[16]。

3.2 铁营养影响镉吸收的可能机理

镉的吸收与转运和铁吸收转运系统紧密相关,已证明定位于细胞质膜的铁转运蛋白在镉的吸收过程中起着重要作用^[17]。*IRT1* 属于 ZIP 家族,是非特异性蛋白,具有广谱的底物特异性,不仅能够结合铁,还能结合其他二价金属离子如锰、铜、锌、镉等^[9-10]。水稻中同样存在 IRT 转运系统,试验证明 *OsIRT1* 和 *OsIRT2* 能够直接结合镉,在镉的吸收和积累过程中具有重要作用^[18]。*AtIRT1* 在拟南芥中的表达受缺铁胁迫诱导,在转录水平上被调控,并在根部高水平表达^[19]。镉在不同铁营养状况下的吸收差异可能与 *IRT1* 转运蛋白基因的表达差异有

关。铁缺乏条件下,诱导铁转运蛋白基因 *IRT1* 表达增强,增强铁的吸收,同时也促进了镉的吸收和积累;而在铁过量供应条件下,铁吸收增加,铁转运蛋白基因 *IRT1* 关闭,镉的吸收速率下降,镉积量显著降低。铁缺乏条件下镉吸收速率的增大也可能与诱导质膜 H^+ -ATPase 的激活有关,这一推论有待于进一步的深入研究。

3.3 利用铁营养调控果树中镉的积累

植物对土壤中镉的吸收和积累受许多因素的影响,主要包括土壤 pH、土壤的物理化学特性、镉的形态和镉在介质中的浓度等^[20]。pH 越低,土壤中镉可移动性越强,有效态镉含量越高,越有利于镉的吸收和积累^[21]。为了降低植物对重金属镉的吸收与积累,农业生产中采用提高土壤 pH 和施加重金属螯合剂的方法降低土壤中有效镉的活性^[22]。然而,这些方法同时也改变了土壤中其他植物必需元素如铁、锰、铜、锌的活性状态,抑制了植物体对这些元素的吸收,不利于农作物生长和农业生产。因此,既要抑制植物对重金属镉的积累,又不影响植物对其他必需元素的吸收利用,或许调控植物体对镉的吸收和转运是解决这一问题的有效途径。

分子水平研究结果证明铁吸收和转运途径同样介导重金属镉的吸收和转移^[18-20,23],本试验结果又进一步表明无论是在植物体吸收镉的过程还是镉在植物体内的转运,铁营养都具有重要影响。因此,在农业生产中可以适当增加铁肥特别是二价铁的含量,一方面抑制二价金属离子转运蛋白的表达,另一方面增强铁在铁镉互作过程中的竞争性,从而抑制

植物体对镉的吸收和积累,减少重金属镉对植物体的毒害。

参 考 文 献

- [1] 黄益宗,朱永官,黄凤堂,等. 镉和铁及其交互作用对植物生长的影响[J]. 生态环境,2004,13(3):406-409
- [2] Yoshihara T, Hodoshima H, Miyano Y, et al. Cadmium inducible Fedeficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants[J]. Plant Cell Report,2006,25:365-373
- [3] Garty J,Karay Y,Harel J. Effect of low pH,heavy metals and anions on chlorophyll degradation in the lichen *Ramalina duriaei* (de not) Bagl[J]. Environ Exp Bot,1992,32:229-241
- [4] Clemens S. Developing tools for phytoremediation: towards a molecular understanding of plant metal tolerance and accumulation[J]. Int Occup Med Environ Health,2001,14:235-239
- [5] 李元,王焕校,吴玉树. Cd、Fe 及其复合污染对烟草叶片几项生理指标的影响[J]. 生态学报,1992,12(2):147-154
- [6] Chlopecka A,Adriano D C. Influence of zeolite,apatite and Fe-oxide on Cd and Pb uptake by crops[J]. Sci Total Environ,1997,207(2-3):195-206
- [7] Cohen C K, Fox T C, Garvin D F, et al. The role of iron-deficiency stress responses instimulating heavy-metal transport in plants[J]. Plant Physiol,1998,116:1063-1072
- [8] Li Peng,Qi Jin Liang,Wang Li,et al. Functional expression of *MxIRT1*, from *Malus xiaojinensis*, complements an iron uptake deficient yeast mutant for plasma membrane targeting via membrane vesicles trafficking process[J]. Plant Sci,2006,171:52-59
- [9] Cohen C K, Garvin D F, Kochian L V. Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil[J]. Planta,2004,218:784-792
- [10] Eide D, Broderius M, Fett J, et al. A Novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast[J]. Procnatl Acad Sci USA,1996,93:5624-5628
- [11] Han Zhen Hai, Wang Qing, Shen Jun. Comparison of some physiological and biochemical characteristics between Fe-efficient and Fe-inefficient species in the genus *Malus*[J]. J Plant Nutr,1994,17(7):1257-1264
- [12] 韩长青. 激素在苹果属植物吸收利用铁素机制中作用的研究[D]. 北京:中国农业大学,1999
- [13] Hirotaoka H, Yusuke E, Kazuhiro S, et al. Differential regulation of cadmium-inducible expression of iron-deficiency-responsive genes in tobacco and barley[J]. Plant Cell Rep,2006,27:375-383
- [14] Farrell R E,McArthur D F E, Van Rees K C J. Net Cd²⁺ flux at the root surface of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) cultivars in relation to cultivar differences in Cd accumulation[J]. Canadian Journal of Plant Science,2005,85:103-107
- [15] 张玉刚,成建红,韩振海,等. 小金海棠总 RNA 提取方法比较及 cDNA 的 LD-PCR 扩增[J]. 生物技术通报,2005,177(4):50-53
- [16] Pineros M A, Shaff J E, Kochian L V. Development, characterization and application of a Cadmium-selective microelectrode for the measurement of Cadmium fluxes in roots of *Thlaspi* species and wheat[J]. Plant Physiol,1998,116:1393-1401
- [17] Korshunova Y O,Eide D,Clark W G, et al. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range[J]. Plant Mol Biol,1999,40:37-44
- [18] Nakanishi H, Ogawa I, Ishimaru Y, et al. Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice[J]. Soil Sci Plant Nutrition,2006,52(4):464-469
- [19] Vert G,Grotz N,Dedaldechamp F, et al. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth[J]. Plant Cell,2002,14:1223-1233
- [20] Eriksson J E. A field study on factors influencing Cd levels in soil and in grain of oats and winter wheat[J]. Water Air Soil Pollution,1990,53:69-81
- [21] Wang A S, Angle J S, Chaney R L, et al. Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens* [J]. Plant Soil,2006,281(1-2):325-337
- [22] Shao Guo Sheng, Chen Ming Xue, Wang Dan Ying, et al. Using iron fertilizer to control Cd accumulation in rice plants: A new promising technology [J]. Science in China Series C: Life Sciences,2008,51:245-253
- [23] Thomine S, Wang R C, Ward J M, et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to *Nramp* genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97:4991-4996

(责任编辑:刘迎春)