

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2016.11.2016032204

罗庆, 孙丽娜, 王辉. 基于代谢组学方法的两种生态型东南景天根系分泌物差异研究[J]. 环境化学, 2016, 35(11): 2353-2361.

LUO Qing, SUN Lina, WANG Hui. Study on the differences of root exudates between two ecotypes of *Sedum alfredii* based on metabolomics[J]. Environmental Chemistry, 2016, 35(11): 2353-2361.

## 基于代谢组学方法的两种生态型 东南景天根系分泌物差异研究\*

罗 庆 孙丽娜\*\* 王 辉

(沈阳大学区域污染环境生态修复教育部重点实验室, 沈阳, 110044)

**摘 要** 利用气相色谱质谱联用技术(GC-MS)对东南景天根系分泌物进行近似全分析,采用代谢组学方法分析镉胁迫下两种生态型东南景天根系分泌物的差异,并探讨东南景天耐受或超富集镉的可能根际机制.收集 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理 4 d 后的超富集和非富集生态型东南景天根系分泌液,经冻干、甲醇洗脱、N-甲基-N-三甲基三氟乙酰胺(MSTFA)衍生化后进行 GC-MS 分析,共检测并定性出 69 个化合物.主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)结果表明,相同条件(镉处理水平、东南景天类型)下的样品能够明显地聚集在一起,不同条件下的样品能够显著的区分开来.运用 OPLS-DA 载荷图、模型的变量重要性因子和方差分析发现羟基乙酸、草酸、苯甲酸等 18 个根系分泌物在 4 组间存在显著差异.它们的相对含量在不同处理条件间的变化趋势明显不同,表明东南景天可通过调节它们的分泌来耐受或超富集镉.

**关键词** 东南景天, 代谢组学, 根系分泌物, 气相色谱质谱联用.

## Study on the differences of root exudates between two ecotypes of *Sedum alfredii* based on metabolomics

LUO Qing SUN Lina\*\* WANG Hui

(Key Laboratory of Regional Environment and Eco-Remediation of Ministry of Education, Shenyang University, Shenyang, 110044, China)

**Abstract:** Components of *Sedum alfredii* root exudates were surveyed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The variation of root exudates from two ecotypes of *S. alfredii* under Cd stress was explored by metabolomics analysis, and the probable effect mechanism of *S. alfredii* for tolerating or accumulating the heavy metal Cd was discussed. The root exudates were collected after 0 and 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd treatment for 4 days. The collected solution was lyophilized and eluted with methanol. After derivatization with methoxyamine hydrochloride and N-methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide, the samples were analyzed by GC-MS. Sixty-nine compounds were detected and identified. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squares discrimination analysis (OPLS-DA) were carried out for pattern recognition and a clear separation among the

2016 年 3 月 22 日收稿(Received: March 22, 2016).

\* 沈阳市科技计划(F14-133-9-00), 沈阳市科学事业费竞争性选择项目(城市生态风险管理及其修复技术研究), 973 项目(2014CB441100)资助.

**Supported by** the Shenyang Science and Technology Plan Project (F14-133-9-00), Competitive Selection Project of Shenyang Scientific Undertaking (Study on Risk Management and Restoration Technology of Urban Ecological Environment), and National Basic Research Program of China (2014CB441100).

\* 通讯联系人, Tel: 024-62266533, E-mail: sln629@163.com

**Corresponding author,** Tel: 024-62266533, E-mail: sln629@163.com

different treatments was achieved. Eighteen compounds which resulting in the separation among the different treatments were found and identified. The relative contents of these eighteen compounds varied under the different treatments. These results indicated that *S. alfredii* could be able to adjust the secretion of root exudates to tolerate or accumulate Cd.

**Keywords:** *sedum alfredii*, metabolomics, root exudates, GC-MS.

根系分泌物是植物在生长发育过程中通过根系向根际环境释放的低分子化合物(主要包括有机酸、糖类、酚类和各种氨基酸)和高分子化合物(主要包括黏胶和外酶等)的总称<sup>[1]</sup>.这些化合物是植物与土壤、土壤水、土壤空气进行物质和能量交换的载体,它们对植物根际物理、化学和生物学特性有重要的影响,能通过改变根际土壤的 pH 和 Eh 值、与重金属发生螯合或络合沉淀等化学反应、影响土壤微生物的数量和活性等,直接或间接地影响重金属在土壤中的结合形态及生物有效性<sup>[2]</sup>,在重金属污染土壤的植物修复过程中发挥着非常重要的作用.

东南景天(*Sedum alfredii*)是在我国首次发现的一种锌镉超富集植物,具有很强的耐高 Cd 胁迫、吸收和运输 Cd 的能力<sup>[3]</sup>.近年来,有关东南景天根系分泌物的研究已取得了不少进展,王艳红等<sup>[4]</sup>通过对 Zn 胁迫下两种生态型东南景天根系分泌物中可溶性糖、部分有机酸和氨基酸的分析发现,所测定的根系分泌物组分在不同的条件下表现出不同的变化趋势,其在东南景天超富集 Zn 的过程中并不起主导作用.李雪莲<sup>[5]</sup>发现镉胁迫下超富集东南景天营养液中可溶性糖的含量显著大于无镉处理,而氯化钙收集液中的含量却明显小于无镉处理;营养液中能检出乙酸、酒石酸、草酸、乳酸、苹果酸和柠檬酸等 6 种有机酸,而氯化钙收集液中只能检测出乳酸、苹果酸和柠檬酸.张奕斌<sup>[6]</sup>通过对 Zn/Cd/Pb 等 3 种重金属胁迫下两种生态型东南景天根系分泌物中草酸、酒石酸等 11 种有机酸和天冬氨酸、苏氨酸等 18 种氨基酸的分析发现,根系分泌物中有机酸和氨基酸的组成基本一致,但含量差异显著;重金属胁迫下,两种生态型东南景天草酸的分泌量均显著增加,而苹果酸和延胡索酸的分泌量却较低.上述研究均表明重金属胁迫下两种生态型东南景天根系分泌物的组成与含量有明显差异,但由于这些研究都是事先设定目标化合物的靶向分析,不利于系统研究根系分泌物的全组分以及基于此的差异识别.

本课题组已利用基于 GC-MS 的代谢组学方法,研究了不同镉处理条件下超富集生态型东南景天根系分泌物的组成,识别了差异显著的根系分泌物质<sup>[7]</sup>.因此,本研究将在前期的研究基础之上,通过对两种生态型东南景天根系分泌物的近似全分析,研究不同条件间根系分泌物的组成与含量差异,并探讨根系分泌物在东南景天超富集 Cd 过程中所起的作用,为东南景天修复 Cd 污染土壤的根际机理研究提供部分科学依据.

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 仪器与试剂

Trace GC Ultra-PolarisQ 气相色谱质谱联用仪(配 AI/AS 3000 自动进样器及 Xcalibur 1.4 工作站,美国 ThermoFisher 公司),MG-2200 氮气吹扫仪(日本东京理化公司),FDU-1100 真空冷冻干燥系统(日本东京理化公司).

甲醇(色谱纯,Fisher 公司),吡啶(色谱纯,国药集团),N-甲基-N-三甲基三氟乙酰胺(N-Methyl-N-Trimethylsilyl Trifluoroacetamide, MSTFA)、甲氧胺盐酸盐(Sigma 公司),营养液组成物质及 CdCl<sub>2</sub>(国药集团),实验用水均为 Milli-Q 去离子水.

### 1.2 植物材料和培养方法

以浙江省衢州市古银矿区的矿山生态型东南景天(超富集植物,HE)和辽宁省沈阳市郊区花卉园里的同属对照植物垂盆草(*Sedum sarmentosum* Bunge,非富集植物,NHE)为供试植物.选择生长良好、粗细基本一致的植物材料,截取含顶芽的 5 cm 长带叶枝条,减掉下部的叶片剩顶端的叶片(6—8 片左右),用 300 mL 的黑色塑料瓶培养.先用去离子水进行预培养(约 4 d 左右),然后转移至营养液培养(营养液组成参见文献[8]).培养期间,每 4 d 更换 1 次营养液,用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 或 0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 调节营

养液 pH 值至 5.5,同时保持 24 h 通气.连续培养 16 d,待长出旺盛根系后,开始进行 Cd 处理,设 2 个 Cd 水平:0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,以  $\text{CdCl}_2$  形态加入,每个水平重复 11 次.每盆 1 株,共 44 盆.Cd 处理 4 d 后收集根系分泌液.

### 1.3 根系分泌物的收集和测定

将东南景天从营养液中取出,去离子水冲洗根系 3 到 5 次后放入盛有 50 mL 去离子水的玻璃管(用黑色胶布包住遮光)中,连续收集 6 h 根系分泌液.根系分泌物的预处理、衍生化和 GC-MS 分析主要参考 Katsumasa 等和 Lisec 等的方法<sup>[9-10]</sup>.将收集的根系分泌液于真空冷冻干燥机上冻干,用预冷的 10 mL 甲醇将其转移至试管中,氮气吹干,加入 40  $\mu\text{L}$  20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的甲氧胺盐酸盐吡啶溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 2 h 并伴随振荡,最后加入 70  $\mu\text{L}$  MSTFA,37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min 并伴随振荡.反应完成后,0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤至 GC 进样小瓶,待 GC-MS 分析.

GC 分析条件:色谱柱 Thermo TR5-MS 毛细管柱(30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ );色谱柱升温程序:初始温度 70  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 1 min,以 1  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  升至 76  $^{\circ}\text{C}$ ,再以 5  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  升至 330  $^{\circ}\text{C}$  并保持 10 min;进样口温度:230  $^{\circ}\text{C}$ ;载气、辅助气:均为氦气,纯度为 99.999%,载气流速为 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (恒流);进样方式:不分流进样,不分流时间为 0.75 min,分流比为 50:1;进样量:1  $\mu\text{L}$ .

MS 分析条件:EI 离子源,电离电压 70 eV;离子源温度:250  $^{\circ}\text{C}$ ;传输线温度:250  $^{\circ}\text{C}$ ;质谱扫描方式:全扫描,扫描范围为 50—600;溶剂延迟时间:3 min.

### 1.4 数据处理与分析

GC-MS 原始数据采用 AMDIS 自动解卷积,并与植物代谢产物数据库 Fiehn 和 GMD 比对,对相似度大于 70%的化合物予以认定,然后利用 MET-IDEA 对 AMDIS 输出的结果进行提取和处理.MET-IDEA 的参数设置如下:(1) 色谱:GC;平均峰宽:0.1;最小峰宽:0.3;最大峰宽:6;峰起始/结束斜率:1.5;调整的保留时间精度:0.95;峰过载系数:0.3;(2) 质谱:离子阱;质量精度:0.1;质量范围:0.5;(3) AMDIS:排除离子列表,73、147、281、341、415;质量下限,50;组分离子数,1;(4) 用于校正的色谱峰保留时间:9.30 min.

将经 MET-IDEA 处理后的已鉴定的根系分泌物质的峰面积进行标准化处理,标准化处理的方法:以第一次出现该化合物的同一处理条件下的样品为基础,用后续其他处理条件下的样品中该化合物的峰面积除以第一次出现该化合物的同一处理条件下的所有样品中该化合物的平均峰面积.然后将标准化处理后的数据导入多元数据分析软件 SIMCA-P 13.0 进行数据分析,进行数据分析前首先进行了 Mean-centering 数据中值化和 Pareto-scaling 标度化,以清除噪音及假峰的影响.采用主成分分析(Principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(Orthogonal to partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)对数据进行了离群样本判断、聚类以及模型的判别分析,为了验证模型的可靠性,避免发生过拟合,采用 OPLS-DA 进行了交叉验证.通过 OPLS-DA 的载荷图和模型的变量重要性因子(Variable importance factor, VIP),以及两个独立样品的方差分析(Analysis of variance, ANOVA)来寻找胁迫下两种生态型东南景天差异显著的根系分泌物.

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

### 2.1 根系分泌物的 GC-MS 分析

通过 GC-MS 分别获得不同水平镉处理(0 和 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd)条件下超富集和非富集生态型东南景天根系分泌物的总离子流色谱图(TIC),见图 1.

将 GC-MS 获得的原始数据导入 AMDIS 进行解卷积分析,并与 Fiehn 和 GMD 数据库进行比对,共检测并定性出 69 个化合物.这些化合物包括草酸、乳酸、琥珀酸、富马酸等小分子有机酸,缬氨酸、亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸等氨基酸,木糖、果糖、葡萄糖、海藻糖等糖类,甘醇、丙三醇、十二烷醇、谷甾醇等醇类,以及乙酸、羟基乙酸、苯甲酸等小分子代谢物.

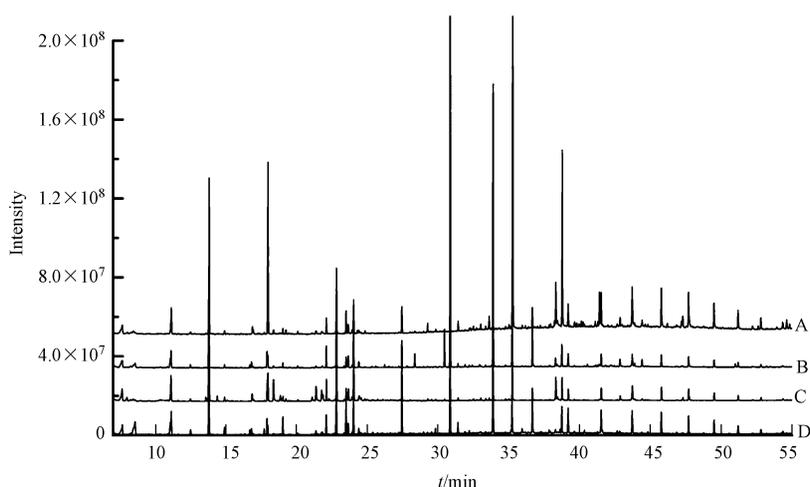


图1 不同镉处理条件下超富集和非富集生态型东南景天根系分泌物的 GC-MS TIC 图  
(A)  $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的超富集生态型东南景天 (B)  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的超富集生态型东南景天  
(C)  $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的非富集生态型东南景天 (D)  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的非富集生态型东南景天

Fig.1 The GC-MS TIC chromatograms of the root exudates from the hyperaccumulator and non- accumulator *S. alfredii* under different Cd stresses

(A) HE under  $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd (B) HE under  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd  
(C) NHE under  $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd (D) NHE under  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd

## 2.2 数据质量评价

为了获得可靠的数据,尽可能地减少在样品采集、前处理及分析测试过程中可能引入的各种操作和仪器误差,本研究主要从以下两个方面对分析过程进行控制与监测.

(1) 将质控样本(QC)均匀插入到检测序列中,每10个样品插入1个QC.

代谢组学分析是一个非靶向的代谢轮廓分析,没有具体的目标化合物,所以不能通过添加目标化合物的方式制备QC样本;同时,由于植物生长的不均一性导致了大量相同的根系分泌物样品(QC样本)难以获得,使得对方法的前处理过程进行QC样品监测较为困难.因此,在实际样品的分析过程中只对仪器的准确性、重复性、稳定性进行监测,并选择一个实际样品作为QC样本.本研究共44个根系分泌物样品,需进行5次QC样本的检测,加上QC样本作为实际样品分析的一次结果,总共获得6个QC样本的GC-MS数据.进行数据处理后获得6个QC样本的PCA得分图(图2),结果显示,所有的QC样本均处于95%置信区间内,差异在统计学可接受的范围内,说明该方法比较稳定.

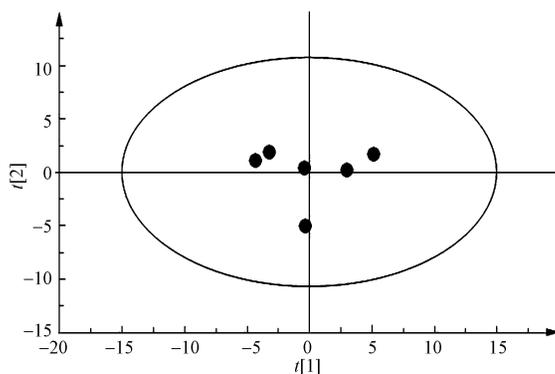


图2 QC样本的PCA得分图

Fig.2 Score plots of quality control (QC) samples generated by PCA

同时对所有QC样本色谱峰的保留时间进行分析, MET-IDEA 以一个样本的保留时间作为标准保留时间,其余样本的保留时间与标准保留时间校正,所有样本的保留时间偏差均小于  $0.3 \text{ min}$ .表明在批量分析过程中,色谱峰的重现性较好,保留时间的偏差较小.

(2)不同组别的样本交替进样、组内样本进行随机分析的检测方式,尽可能减少人为因素和检测序列不稳定引起的组间差异.

### 2.3 模式识别分析

采用非监督的 PCA 分析对不同水平镉处理条件(0 和 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd)下超富集和非富集生态型东南景天已鉴定的根系分泌物组成成分进行分析,结果见图 3.从图 3 可以看出,相同条件下(镉处理水平、东南景天类型)的样品由于差异较小、距离较近,能够明显聚集在一起;不同条件下的样品由于差异相对较大、距离较远,能够相互区分开来.此外,不同生态型东南景天的根系分泌物的差异较大,且这种差异比镉处理导致的差异明显;不同镉处理条件下的非富集生态型东南景天的根系分泌物的差异较超富集生态型东南景天的差异明显.植物根系分泌物的种类和含量受植物类型、外部环境胁迫等因素的影响<sup>[11-12]</sup>,本研究的结果表明不同生态型东南景天的根系分泌物差异显著、相同生态型东南景天在不同镉处理条件下的根系分泌物也存在差异,进一步验证了这一结论.

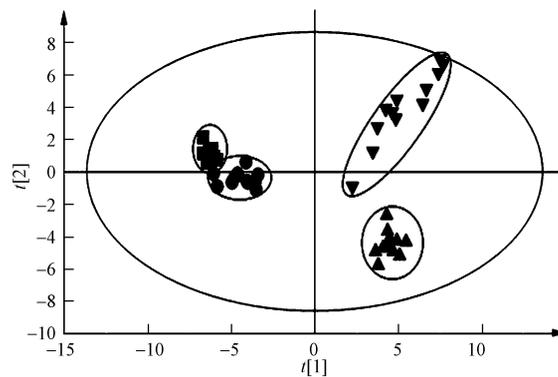


图 3 不同水平镉处理条件下超富集和非富集生态型东南景天已鉴定的根系分泌物的 PCA 得分图

(●) 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的超富集生态型东南景天 (■) 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的超富集生态型东南景天  
(▲) 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的非富集生态型东南景天 (▼) 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的非富集生态型东南景天

Fig.3 Sample scores from the principal component analysis for identified root exudates from the hyperaccumulator and non-accumulator *S. alfredii* under different Cd stresses

(●) HE under 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd (■) HE under 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd  
(▲) NHE under 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd (▼) NHE under 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd

为了进一步获得不同水平镉处理条件下超富集和非富集生态型东南景天根系分泌物样品间最大程度的分离,采用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对该数据进行处理,结果如图 4.

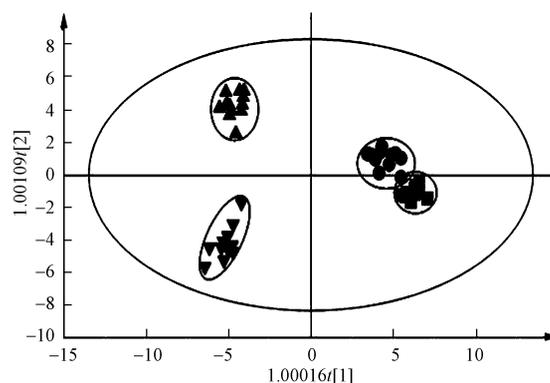


图 4 不同水平镉处理条件下超富集和非富集生态型东南景天已鉴定的根系分泌物的 OPLS-DA 得分图

(●) 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的超富集生态型东南景天 (■) 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的超富集生态型东南景天  
(▲) 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的非富集生态型东南景天 (▼) 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  镉处理下的非富集生态型东南景天

Fig.4 Sample scores of the orthogonal partial least-squares discrimination analysis for identified root exudates from the hyperaccumulator and non-accumulator *S. alfredii* under different Cd stresses

(●) HE under 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd (■) HE under 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd  
(▲) NHE under 0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd (▼) NHE under 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd

从图 4 可以看出,与 PCA 分析相比,相同条件(镉处理水平、东南景天类型)下的样品更加明显地聚集在一起,不同条件(镉处理水平、东南景天类型)下的样品也更加明显地区分开来.该模型的累计解释率为 95.5%,累计预测率为 92.7%,表明该模型稳定并能很好地解释模型差异,而且模型的预测能力也良好.

#### 2.4 差异显著根系分泌物质的识别

以 OPLS-DA 分析为基础,通过载荷图(离原点越远的点对组间区分的贡献越大)、VIP 值(重要变量因子, VIP>1 的变量表示它对于模型分组的贡献高于平均水平)、ANOVA 分析( $t$ -test,  $P<0.05$ ) 识别出不同水平镉处理条件下超富集和非富集生态型东南景天根系分泌物中含量有显著差异的组分,结果如图 5 所示.从中筛选出与模型分组高度相关的组分,然后结合 VIP list (VIP>1) 筛选出与模型分组更为可靠的组分,最后通过独立样本的 ANOVA 分析,最终确定了 18 个差异显著的根系分泌物,见表 1.

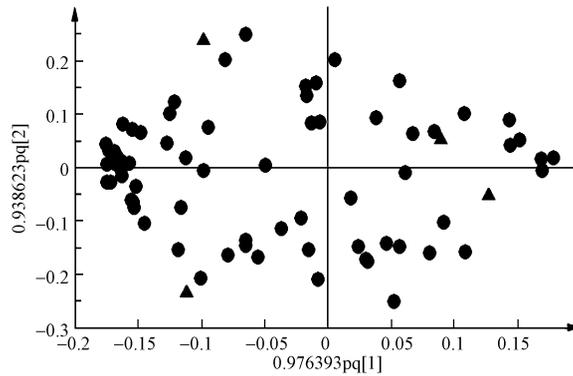


图 5 不同水平镉处理条件下超富集和非富集生态型东南景天已鉴定根系分泌物的 OPLS-DA 载荷图

(●)X,根系分泌物变量 (▲)Y,分组变量

Fig.5 Loadings plot of identified root exudates from *S. alfredii* for the OPLS-DA model

(●)X, the root exudate variable (▲)Y, the group variable

表 1 不同水平镉处理条件下两种生态型东南景天间差异显著的根系分泌物

Table 1 Potential biomarkers in root exudates of the two ecotypes of *S. alfredii* among different Cd stresses ( $n=11$ )

| 化合物 Compounds                       | 超富集生态型 HE                           |                                      | 非富集生态型 NHE                          |                                      |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
|                                     | 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| 羟基乙酸 2-Hydroxyacetic acid           | 1.00±0.13                           | 0.82±0.10                            | 0.00±0.00                           | 0.61±0.13                            |
| 草酸 Oxalic acid                      | 1.00±0.23                           | 0.00±0.00                            | 0.83±0.16                           | 0.13±0.04                            |
| 羟基丁酸 3-Hydroxybutanoic acid         | 1.00±0.38                           | 0.00±0.00                            | 0.16±0.04                           | 0.00±0.00                            |
| 苯甲酸 Benzoic acid                    | 0.00±0.00                           | 1.00±0.13                            | 1.31±0.07                           | 1.75±0.22                            |
| 亮氨酸 L-Leucine                       | 0.00±0.00                           | 0.00±0.00                            | 1.00±0.20                           | 0.00±0.00                            |
| 磷酸 Phosphoric acid                  | 1.00±0.13                           | 0.84±0.22                            | 0.08±0.01                           | 0.57±0.11                            |
| 丙三醇 Glycerol                        | 1.00±0.28                           | 0.33±0.06                            | 0.01±0.00                           | 0.01±0.00                            |
| 癸酸 Decanoic acid                    | 0.00±0.00                           | 1.00±0.14                            | 0.00±0.00                           | 1.09±0.55                            |
| 赤藓糖醇 Erythritol                     | 1.00±0.14                           | 0.00±0.00                            | 1.03±0.24                           | 0.00±0.00                            |
| 月桂酸 Dodecanoic acid                 | 1.00±0.09                           | 2.13±0.26                            | 0.71±0.17                           | 0.60±0.11                            |
| 壬二酸 Azelaic acid                    | 1.00±0.14                           | 0.00±0.00                            | 1.22±0.29                           | 0.00±0.00                            |
| 果糖 Fructose                         | 1.00±0.17                           | 0.00±0.00                            | 0.97±0.15                           | 1.15±0.35                            |
| 甘露醇 Mannitol                        | 1.00±0.18                           | 0.06±0.03                            | 0.22±0.03                           | 0.40±0.11                            |
| 二十八烷 n-Octacosane                   | 1.00±0.12                           | 0.59±0.10                            | 0.00±0.00                           | 0.79±0.21                            |
| 十八烷酸单甘油酯 1-Monooctadecanoylglycerol | 1.00±0.25                           | 1.16±0.49                            | 0.00±0.00                           | 0.78±0.17                            |
| 海藻糖 Trehalose                       | 1.00±0.15                           | 0.07±0.02                            | 0.45±0.10                           | 0.66±0.19                            |
| 二十八醇 Octacosanol                    | 1.00±0.25                           | 0.00±0.00                            | 0.00±0.00                           | 0.75±0.23                            |
| 胆固醇 Cholesterol                     | 0.00±0.00                           | 0.00±0.00                            | 1.00±0.18                           | 0.00±0.00                            |

## 2.5 差异显著根系分泌物质的含量变化及其可能作用

表 1 列出了 18 个差异显著根系分泌物在两种生态型东南景天于不同水平镉处理条件下的相对含量,通过对这些根系分泌物在不同条件(镉处理水平、东南景天类型)下的相对含量的变化趋势进行分析,初步探讨了这些根系分泌物质的可能潜在作用。

对超富集生态型东南景天来说,镉处理能够抑制羟基乙酸、磷酸、丙三醇、果糖、甘露醇、二十八烷、海藻糖和二十八烷醇等 8 个化合物的分泌,减少它们的分泌量。而对于非富集生态型东南景天而言,镉处理能够刺激这 8 个化合物的分泌,增加它们的分泌量。这一结果表明,这 8 个根系分泌物可能对镉有一定的钝化作用。在镉胁迫条件下,超富集生态型东南景天通过减少这些化合物的分泌来降低对根系周围有效性镉的钝化作用,进而增加根系周围有效性镉的含量,以促进超富集生态型东南景天对镉的吸收;而非富集生态型东南景天通过增加这些化合物的分泌来提高对根系周围有效性镉的钝化作用,进而降低根系周围有效性镉的含量,以缓解镉对非富集生态型东南景天的毒害效应。

目前已有研究表明,磷酸可以跟水洗后的粉煤灰进行反应,生成溶解性更差的磷酸盐重金属化合物,对重金属进行钝化,进而降低重金属的移动性和生物可利用性<sup>[13]</sup>。磷酸还能够与污染土壤中的 Pb 反应,生成溶解性差的铅的磷酸盐矿物,以降低铅的溶解性、植物可利用性和生物可得性;但是当磷酸加入到污染土壤中后,只能降低污染土壤中 Cu 和 Zn 的水溶性, Cu 和 Zn 的生物可得性却有所增加<sup>[14]</sup>。磷酸可以与水中或土壤中的铅反应生成难溶性的磷氯铅矿(一种铅的磷酸盐矿物),降低铅的溶解性和生物可得性<sup>[15-16]</sup>。这些研究都表明磷酸能够对铅或其他重金属有一定的钝化作用,但关于磷酸对镉的作用的单独研究还未见报道。

坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)分泌的多糖可以去除水相中重金属(Pb、Cu、Zn),在最优的 pH 条件下,它们的吸附效率分别为 98.3%、74.9%和 61.8%<sup>[17]</sup>。经过果糖改性的壳聚糖能有效提升它对重金属的吸附容量,并且增加了它在酸性条件下的稳定性<sup>[18]</sup>。这些研究表明,由众多单糖组成的多糖对重金属有一定的吸附能力,能够减少重金属的移动性和生物有效性,对重金属有一定的钝化作用,但目前关于果糖、海藻糖等小分子糖类对重金属的作用的研究还少见报道。

无论是超富集生态型东南景天还是非富集生态型东南景天,镉胁迫都导致了草酸、羟基丁酸、赤藓糖醇和壬二酸分泌量的减少,但苯甲酸、癸酸和十八烷酸单甘油酯的分泌量却在镉胁迫的条件下增加了。这些都是东南景天为适应镉胁迫而做出的反应,至于它们是起活化作用还是钝化作用,还需要做进一步的研究。

草酸能够增强针铁矿对 Cd 的吸附、解吸能力,并且能够通过草酸根桥联与重金属镉形成草酸镉螯合物<sup>[19]</sup>。同时,通过外源添加草酸能够显著提高苎麻(*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.)对重金属镉的富集能力,并且增加了镉从根系向地上部的转运效率<sup>[20]</sup>。这些研究表明草酸对重金属镉有着非常重要的作用,且其作用表现为对重金属镉的活化。本研究也得出草酸是超富集和非富集生态型东南景天在不同镉胁迫条件下具有显著差异的根系分泌物,是对超富集生态型东南景天耐受或富集重金属镉起重要作用的化合物,但根据本研究的实验结果未能给出其作用类型(活化或钝化)。

对于超富集生态型东南景天来说,镉胁迫能够刺激月桂酸的分泌,增加它的分泌量,而对于非富集生态型东南景天而言,镉胁迫抑制了它的分泌,与对照相比,它的分泌量减少了。这可能说明月桂酸可能对镉有一定的活化作用。在镉胁迫条件下,超富集生态型东南景天通过增加它的分泌来促进根系周围镉的活化,进而增加根系周围有效性镉的含量,以促进超富集生态型东南景天对镉的吸收;而非富集生态型东南景天通过减少这些化合物的分泌来降低根系周围镉的活化,进而减少根系周围有效性镉的含量,以降低镉对非富集生态型东南景天的毒害作用。现有研究表明,以月桂酸为主要组分的椰子油经过皂化处理后可选择性地萃取水中的 Cr、Cu、Fe、Mn、Ni 和 Pb 等重金属<sup>[21]</sup>,含有月桂酸结构的司班(山梨糖醇酐单月桂酸)可明显去除土壤中的重金属镉<sup>[22]</sup>,但单独对月桂酸去除重金属的研究目前还未见报道。

亮氨酸和胆甾醇只在非富集生态型东南景天于对照(无镉)条件下分泌,加镉处理后分泌量减少为零;而超富集生态型东南景天,无论是无镉处理还是加镉处理,这 2 个化合物都未分泌。这可能说明,亮氨酸和胆甾醇的分泌只与东南景天的类型有关,与是否加镉处理的关系较小。

羟基乙酸、苯甲酸、亮氨酸等根系分泌物都能出现在重金属富集植物或非富集植物在重金属胁迫

条件下的根系分泌物中<sup>[6,23-24]</sup>,但由于它们的含量较少或其它原因,未引起研究者的关注,所以目前关于它们对重金属的作用的研究较少.酒石酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸等小分子有机酸是植物根系分泌物中研究较多的组分,对其作用类型与机制也研究得较为透彻<sup>[6,25]</sup>.本研究也检测出了乳酸、琥珀酸等,但由于其相对含量在两种生态型东南景天于不同镉胁迫条件下的差异不显著,没有将其选为生物标志物;而酒石酸、苹果酸等在本研究中没有被识别为东南景天的根系分泌物,可能是由于 GC-MS 分析时其与其它化合物共流出,导致 AMDIS 解卷积后与数据库比对时的相似度小于 70% 而未被识别,亦或是其含量太低,这种 GC-MS 非靶向的分析方法未将其检出.

### 3 结论 (Conclusion)

本研究利用基于 GC-MS 技术的代谢组学方法研究了两种生态型东南景天在不同镉胁迫条件下根系分泌物的组成与含量差异.结果表明,GC-MS 分析技术检测并定性出 69 个根系分泌物,PCA 与 OPLS-DA 分析表明相同条件(东南景天类型、镉处理水平)下的根系分泌物样品可明显聚集在一起、不同条件下的根系分泌物样品可明显区分开来,OPLS-DA 载荷图、VIP 值和 ANOVA 分析识别出羟基乙酸、草酸、磷酸、苯甲酸等 18 个差异显著的根系分泌物,通过对这些根系分泌物的相对含量在两种生态型东南景天于不同镉胁迫条件下的变化情况分析表明,月桂酸可能对镉有一定的活化作用,羟基乙酸、磷酸、丙三醇、果糖、甘露醇、二十八烷、海藻糖和二十八烷醇可能对镉有一定的钝化作用.

#### 参考文献 (References)

- [ 1 ] MARSCHNER H. Mineral nutrition of higher plants [M]. London: Academic Press, 1995.
- [ 2 ] 旷远文,温达志,钟传文,等. 根系分泌物及其在植物修复中的作用[J]. 植物生态学报,2003, 27(5): 709-717.  
KUANG Y W, WEN D Z, ZHONG C W, et al. Root exudates and their roles in phytoremediation[J]. Acta Phytocologica Sinica, 2003, 27(5): 709-717 (in Chinese).
- [ 3 ] YANG X E, LONG X X, YE H B, et al. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance) [J]. Plant and Soil, 2004, 259: 181-189.
- [ 4 ] 王艳红,龙新宪,吴启堂. 两种生态型东南景天根系分泌物的差异性[J]. 生态环境,2008, 17(2): 751-757.  
WANG Y H, LONG X X, WU Q T. Differences of root exudates between two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance [J]. Ecology and Environment, 2008, 17(2): 751-757 (in Chinese).
- [ 5 ] 李雪莲. 东南景天镉超积累生态型根系分泌物的研究[D]. 杭州: 浙江大学,2011.  
LI X L. Studies on root exudates of the cadmium hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii* Hance [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011 (in Chinese).
- [ 6 ] 张奕斌. 东南景天根系分泌物组成和特性研究[D]. 杭州: 浙江大学,2014.  
ZHANG Y B. Research on the composition and characteristics of root exudates of *Sedum alfredii* Hance [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014 (in Chinese).
- [ 7 ] 罗庆,孙丽娜,胡筱敏. 镉超富集植物东南景天根系分泌物的代谢组学研究[J]. 分析化学,2015, 43(1): 7-12.  
LUO Q, SUN L N, HU X M. Metabonomics study on root exudates of cadmium hyperaccumulator *Sedum Alfredii* [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2015, 43(1): 7-12 (in Chinese).
- [ 8 ] HOAGLAND D R, AMON D I. The water-culture method for growing plants without soil[J]. Circular California Agricultural Experiment Station, 1950, 347(5406): 357-359.
- [ 9 ] KATSUMASA S, KEIKI O, KEITARO T, et al. Gas chromatography-mass spectrometry associated global analysis of rice root exudates under aseptical conditions [J]. Soil Science and Plant Nutrition, 2009, 55 (4): 505-513.
- [ 10 ] LISEC J, SCHAUER N, KOPKA J, et al. Gas chromatography mass spectrometry based metabolite profiling in plants [J]. Nat Protoc, 2006, 1(1): 387-396.
- [ 11 ] SELVAKUMAR G, PANNEERSELVAM P, GANESHAMURTHY A N, et al. Bacterial mediated alleviation of abiotic stress in crops [M]. New York: Springer, 2012: 205-224.
- [ 12 ] XIONG Y H, YANG X E, YE Z Q, et al. Characteristics of cadmium uptake and accumulation by two contrasting ecotypes of *Sedum alfredii* Hance [J]. Journal of Environmental Science and Health, 2004, A39 (11-12): 2925-2940.
- [ 13 ] BLANDINE B, ANGE N, PATRICK S, et al. Stabilisation of heavy metal containing dusts by reaction with phosphoric acid: Study of the reactivity of fly ash [J]. Journal of Hazardous Materials, 2004, B116: 65-74.
- [ 14 ] CAO X D, AMMAR W, MA L N, et al. Immobilization of Zn, Cu, and Pb in contaminated soils using phosphate rock and phosphoric acid

- [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 164: 555-564.
- [15] PATRICIA M, ALICIA F C. Phosphates for Pb immobilization in soils: A review[J]. *Environ Chem Lett*, 2008, 6: 121-133.
- [16] YANG J, MOSBY D E, CASTEEL S W, et al. Lead immobilization using phosphoric acid in a smelter-contaminated urban soil[J]. *Environ Sci Technol*, 2001, 35 (17): 3553-3559.
- [17] SALEHIZADEH H, SHOJAOSADATI S A. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus* [J]. *Water Research*, 2003, 37(17): 4231-4235.
- [18] WANG J W, KUO Y M. Preparation of fructose-mediated (polyethylene glycol/chitosan) membrane and adsorption of heavy metal ions[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, 105(3): 1480-1489.
- [19] LAMY I, DJAFER M, TERCE M. Influence of oxalic acid on the adsorption of cadmium at the goethite surface[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 1991, 57-58 (1):457-465.
- [20] LI H Y, LIU Y G, ZENG G M. Enhanced efficiency of cadmium removal by *Boehmeria nivea* (L.) Gaud. in the presence of exogenous citric and oxalic acids[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014, 26(12): 2508-2516.
- [21] CASTRO D T N, DANTAS N A A, MOURA M C P A, et al. Heavy metals extraction by microemulsions[J]. *Water Research*, 2003, 37: 2709-2717.
- [22] 胡随喜, 巴雅尔, 张建平, 等. 表面活性剂对土壤中镉的吸附解析的研究[J]. *江苏环境科技*, 2007, 20(2): 4-6.  
HU S X, BA Y E, ZHANG J P, et al. Study on cadmium absorption-extraction between surfactant and soil[J]. *Jiangsu Environmental Science and Technology*, 2007, 20(2): 4-6 (in Chinese).
- [23] CHIANG P N, WANG M K, CHIU C Y, et al. Effects of cadmium amendments on low-molecular-weight organic acid exudates in rhizosphere soils of tobacco and sunflower[J]. *Environmental Toxicology*, 2006, 21(5): 479-488.
- [24] GOMATHY M, SABARINATHAN K G, THANGARAJU M. The effect of *Mycorrhiza* inoculated maize root exudates in alleviation of chromium toxicity in chromium polluted environments[J]. *Insight Microbiology*, 2011, 1(2): 20-30.
- [25] 郑明霞, 冯流, 刘洁, 等. 螯合剂对土壤中镉赋存形态及其生物有效性的影响[J]. *环境化学*, 2007, 26(5): 606-609.  
ZHENG M X, FENG L, LIU J, et al. Effects of chelators on species and bioavailability of cadmium in soil[J]. *Environment Chemistry*, 2007, 26(5): 606-609 (in Chinese).