

铁和 ATP 酶抑制剂对鸭跖草 (*Commelina communis*) 铜吸收的影响*

施积炎 陈英旭 田光明 林琦 王远鹏

(浙江大学环境与资源学院环境工程系, 杭州 310029)

摘要 缺铁条件下研究了鸭跖草 (*Commelina communis*) 对不同浓度铜及不同形态铜的吸收和 P 型 ATP 酶抑制剂对铜吸收的影响。结果表明, 鸭跖草铜积累量随着营养液中铁浓度的下降而显著上升, 缺铁在不同铜浓度下都显著促进鸭跖草对铜的吸收, 说明鸭跖草铜吸收与铁元素关系密切。在缺铁条件下, EDTA-Cu、NTA-Cu、草酸-Cu、柠檬酸-Cu 处理鸭跖草的铜吸收量均低于单 Cu 处理, 但缺铁处理植株对不同形态铜的吸收量均高于完全培养液生长的植株。缺铁处理下鸭跖草会产生根际酸化效应。P 型 ATP 酶抑制剂钒酸钠对铜吸收有抑制作用, 缺铁对铜吸收的促进作用可能与 P 型 ATP 酶活性无关。

关键词 鸭跖草; 铜吸收; 缺铁; ATP 酶抑制剂

中图分类号 X714 文献标识码 A

铜是生物必需的营养元素, 适量的铜对人体和动植物都是有益的, 但过量的铜会对生物的生长发育造成危害。铜矿开发过程中产生的尾沙、矿石等不仅占用大量的土地, 而且对其所占土地及其周边环境产生严重破坏。另一方面, 随着工农业生产的发展, 铜用量不断增加, 对环境的污染也逐渐显现出来。通过超积累植物或富集植物吸收和积累从土壤中移走重金属即植物修复是近年来兴起的高效、廉价的绿色治理技术^[1]。近年来, 我国学者发现并报道了鸭跖草 (*Commelina communis*)、海州香薷 (*Elsholtzia splendens*) 等铜富集植物^[2,3], 为铜污染土壤植物修复提供了很好的植物材料。然而, 这些富集植物对铜吸收的机理研究还有待进一步深入。

研究表明缺铁可以诱导双子叶植物和非禾本科单子叶植物质子分泌增加, Fe^{3+} 螯合物还原酶活性升高, 并且可能对 Fe 以外的其他金属吸收有重要调节作用^[4,5]。缺铁诱导的铁通道蛋白 (ITR1) 以及相关诱导转运蛋白也可能为植物提供了积极的吸收有毒重金属离子的通道^[6]。然而, 有关铁对金属富集或超富集植物铜吸收的影响研究至今未见报道。本实验在缺铁条件下研究鸭跖草对不同浓度铜及不同形态铜的吸收和 P 型 ATP 酶抑制剂对铜吸收的影响, 从一个侧面探讨鸭跖草吸收铜的机理, 为植物修复重金属污染土壤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鸭跖草 (*Commelina communis*) 种子在 25 °C 和黑暗条件下萌发 5 d 后, 移到人工生长室。在培养液中生长, 每三天更换培养液, 保持通气。培养液成分如下^[7] ($\mu\text{mol L}^{-1}$): $Ca(NO_3)_2$ 600, $MgSO_4$ 300, K_2HPO_4 300, H_3BO_3 13.8, $MnSO_4$ 2.7, Na_2MoO_4 0.3, $CuSO_4$ 0.54, $Fe(III)-EDTA$ 16.2 和 $ZnSO_4$ 0.3, pH 6.0。生长室的昼夜温度为 26 °C/22 °C, 光照时间 16 h, 植物生长 45 d 后再行各种实验处理。

1.2 实验方法

1.2.1 铁营养状况对 Cu 累积影响实验 鸭跖草移入含 $20 \mu\text{mol L}^{-1} CuSO_4$ 的培养液中进行不同浓度铁处理, 铁以 $Fe(III)-EDTA$ 形式供应, 浓度分别为 0、5、20、50、100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 每个处理 3 次重复, 第 4、7 天各换一次培养液, 第 10 天分根和地上部收获。

收获时植物根系用冷冻的 $5 \text{ mmol L}^{-1} Pb(NO_3)_2$ 解析 30 min, 再用去离子水洗净, 地上部分直接用去离子水冲洗, 然后在 80 °C 下烘干样品。样品用浓 HNO_3 冷消化 1 d, 然后热消化, 溶液煮至近干后加 $HClO_4$ 彻底消化, 去离子水定容, 用原子吸收分光光度计 (Perkin Elmer Analyst 100) 测定 Cu 含量。以下

* 国家自然科学基金项目 (40271060)、国家高技术研究发展计划资助项目 (2001AA645010-2) 和浙江省自然科学基金项目 (402017) 资助
作者简介: 施积炎 (1976~), 男, 江西泰和人, 博士研究生, 主要从事污染环境修复及生物学机理研究

收稿日期: 2003-08-03; 收到修改稿日期: 2004-01-20

CuSO₄ 处理植株均按上述方法收获、消化和测定。

1.2.2 缺铁处理对 Cu 吸收的影响实验 将在完全培养液中生长的鸭跖草移入缺铁培养液(培养液中不加 Fe(III)-EDTA, 其他成分同完全培养液, pH 6.0)中培养 6 d 后, 再将缺铁培养植株分别移入含 2、20、50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CuSO₄ 的缺铁培养液中进行处理, 48 h 后分根和地上部收获, 每个处理三次重复。另外, 以完全培养液中生长的植株作为缺铁处理植株的对照, 分别在含 2、20、50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CuSO₄ 的含铁培养液(除 CuSO₄ 外, 其他成分同完全培养液, pH 6.0)中进行处理, 48 h 后分根和地上部收获, 每个处理 3 次重复。

1.2.3 缺铁处理下不同形态铜的吸收实验 以螯合物/CuSO₄ 按摩尔配比 10/1 的配制 EDTA-Cu、氨三乙酸(NTA)-Cu、草酸-Cu、柠檬酸-Cu 等不同形态 Cu 复合物。将 CuSO₄ 和上述不同 Cu 复合物分别加入培养液, 使每种形态的铜最终浓度为 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 并用 0.1 mol L⁻¹ NaOH 调节 pH 值至 6.0。将完全培养液生长的植株和缺铁培养液处理 6 d 后的植株分别移入上述不同形态 Cu 的培养液中, 其中缺铁处理植株的培养液继续保持缺铁, 48 h 后分根和地上部收获植株, 每个处理 3 次重复。

1.2.4 缺铁对培养液 pH 变化的影响实验 将在完全培养液生长的植株分别移入没有加缓冲剂调节 pH 的加铁(完全培养液)或缺铁培养液中生长 6 d, 每天测定培养液的 pH 值, 每个处理 3 次重复。

1.2.5 P 型 ATP 酶抑制剂对 Cu 吸收的影响实验

将完全培养液生长的植株和缺铁培养液处理 6 d 后的植株移入含 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Na₃VO₄(P 型 ATP 酶抑制)和 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CuSO₄ 的培养液中, 5 h 后分不同部分收获, 以不含 Na₃VO₄ 的培养液中处理的植株为对照, 每个处理 3 次重复。

2 结果与讨论

2.1 供铁水平对植物铜浓度的影响

在 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CuSO₄ 的营养液中鸭跖草根部和地上部的铜含量随着营养液中 Fe-EDTA 浓度的下降而显著上升($p < 0.01$, 图 1)。当营养液中 Fe-EDTA 浓度从 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 下降到 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时, 根部铜的浓度从 749.6 mg kg⁻¹ 增加至 1124.8 mg kg⁻¹, 上升幅度相对较小。而当营养液中 Fe-EDTA 浓度从 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 下降到 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时, 根部铜含量急剧上升, 从 1124.8 mg kg⁻¹ 增加至 4453.3 mg kg⁻¹, 是 Fe-EDTA 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时的 5.9 倍, 说明低铁和缺铁均可以大大提高鸭跖草根系对铜的吸收。当营养液中 Fe-EDTA 浓度从 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 下降到 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时, 地上部铜浓度从 89.5 mg kg⁻¹ 增加至 135.0 mg kg⁻¹, 上升幅度相对较小。而当 Fe-EDTA 浓度从 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 下降到 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时, 地上部铜的浓度从 135.0 mg kg⁻¹ 增加至 221.8 mg kg⁻¹, 是 Fe-EDTA 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时的 2.5 倍, 并且叶片没有出现明显的黄化现象。

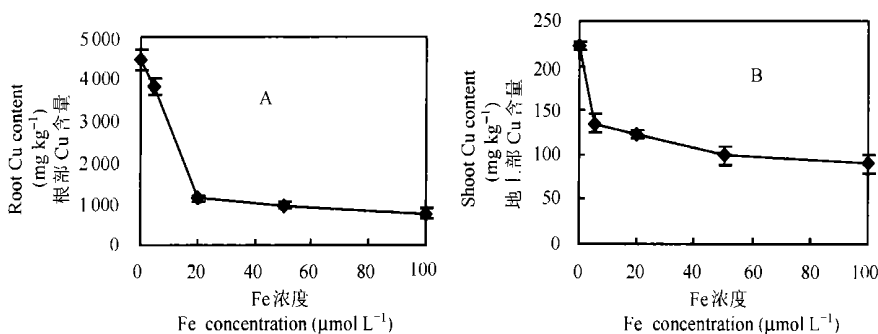


图 1 不同 Fe 浓度对鸭跖草铜累积的影响(A—根; B—地上部)

Fig. 1 Effect of Fe concentration on Cu accumulation in *C. communis* (A: root; B: shoot)

2.2 缺铁处理植物对不同浓度铜的吸收

研究发现在铁营养缺乏时, 豌豆幼苗内二价阳离子包括 Cu、Mn 和 Mg 离子含量提高^[2]。Rodecap 等也报道缺铁拟南芥比铁营养充分植株的花序和种子积累更多的 Cd 和 Mg^[5]。本实验表明在不同铜浓

度下, 缺铁处理都显著促进鸭跖草根系对铜的吸收($p < 0.01$, 图 2), 而且随着培养液中铜浓度的提高铜吸收的增加幅度越大, 当铜浓度为 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时, 缺铁处理植物根部铜吸收量是对照的 2.9 倍, 而铜浓度为 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时, 缺铁处理植物根部铜含量则

是对照的 5.9 倍。缺铁处理也提高了鸭跖草地上部铜含量, 进一步说明缺铁可以促进铜的转运。缺铁促进鸭跖草铜吸收的原因还有待进一步阐明。研究表明缺铁可以提高一些植物根细胞质膜上 H^+ -ATPase 酶和 $Fe(III)$ 螯合物还原酶(FCR) 的活性, 这

种作用可能促进这些植物对重金属离子的吸收^[4,5,8]。缺铁也可以诱导植物铁转运蛋白(ITR1) 的表达从而促进除 Fe 以外的重金属吸收转运^[5,6,8,9]。我们的研究也表明缺铁处理可以显著提高鸭跖草根质膜 FCR 活性(未发表结果)。

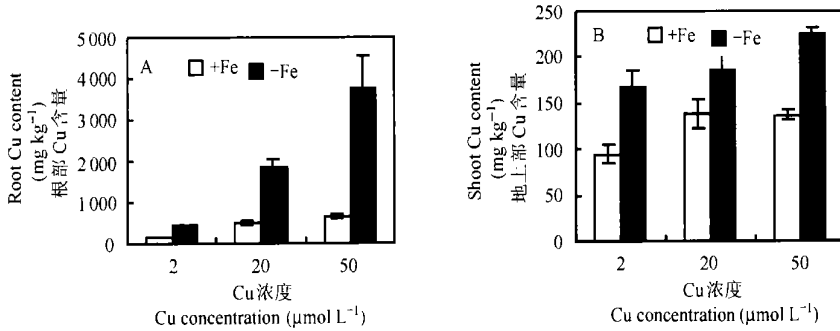


图 2 不同铜浓度下缺铁对鸭跖草铜吸收的影响(A—根; B—地上部)

Fig. 2 Cu concentration in *C. communis* related to Fe deficiency (A—root; B—shoot)

2.3 缺铁处理下植物对不同形态铜的吸收

前面的分析结果表明缺铁处理可以促进单 Cu 的吸收和转运。一些络合剂, 如 EDTA、氨三乙酸(NTA) 和柠檬酸等通过与重金属形成络合物, 已被证明可以提高土壤重金属的活性、提高重金属的植物可利用性^[10, 11]。因此, 本文在缺铁(-Fe) 与铁充足(+Fe) 条件下研究了鸭跖草对不同形态铜的吸收(图 3)。结果表明, 在铁充足条件下, 草酸-Cu 和柠檬酸-Cu 处理根的铜吸收量均远大于单 Cu 处理, 说明有机酸-铜络合物的形成对铜的吸收转运有促进作用; 鸭跖草根对 EDTA-Cu 的吸收量与单 Cu 处理的相当, 对氨三乙酸(NTA)-Cu 的吸收量则小于单

Cu 处理, 说明 EDTA 和 NTA 不能促进鸭跖草根对铜的吸收。在缺铁条件下, EDTA-Cu、NTA-Cu、草酸-Cu、柠檬酸-Cu 处理根的铜吸收量均低于单 Cu 处理。然而, 与完全培养液生长的植株相比, 缺铁处理鸭跖草根对 Cu、EDTA-Cu、NTA-Cu、草酸-Cu、柠檬酸-Cu 的吸收均有增加, 其根部铜含量分别是铁充足时的 8.6、1.1、2.8、1.5 和 2.0 倍, 其中以单 Cu 处理的提高幅度最大。从地上部铜含量可以看出, 缺铁增加了 Cu、EDTA-Cu、NTA-Cu 和柠檬酸-Cu 的转运, 增加幅度也以单 Cu 处理的最大。以上结果表明缺铁处理可以提高鸭跖草对不同形态铜的植物可利用性。

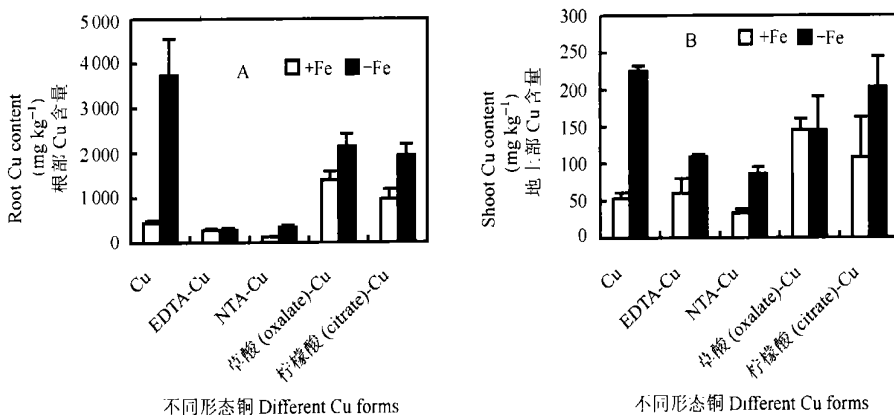


图 3 缺铁下鸭跖草对不同形态铜吸收的影响(A—根; B—地上部)

Fig. 3 Cu concentration in *C. communis* as influenced by form of Cu and Fe deficiency (A—root; B—shoot)

2.4 P型ATP酶抑制剂对植物铜吸收的影响

从图4可以发现,加铁和缺铁处理鸭跖草生长的培养液pH在6d内均呈先下降后上升的趋势,但缺铁处理培养液pH值比加铁培养液低,因此,缺铁处理会导致根际酸化效应。研究表明对于禾本科植物,在铁元素缺乏时其根系可分泌植物铁载体,能与 Fe^{3+} 形成稳定性很高的配位物,从而增加植物对铁的吸收^[12];而双子叶植物和非禾本科单子叶植物缺铁时可以通过细胞质膜上特异的 H^+ -ATPase的激活而产生根际酸化效应,或激活其他P型ATP酶促进植物对离子的吸收^[13]。

P型ATP酶则是通用的离子泵,起维持细胞内外离子平衡的作用,有 H^+ -ATP酶、 Ca^{2+} -ATP酶等,微量(μmol 级)的钒酸钠可抑制各种P型ATP酶的活性^[14]。实验表明,在2和 $20\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu处理下, Na_3VO_4 对完全培养液和缺铁处理培养液生长的鸭跖草铜吸收均有抑制作用(表1),说明鸭跖草根对铜可能存在主动吸收过程。然而,在 Na_3VO_4 处理下,

缺铁处理的鸭跖草在2和 $20\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu下对铜的吸收量都显著高于完全培养液生长的植株($p < 0.05$),说明缺铁对鸭跖草铜吸收的促进作用可能与P型ATP酶活性无关。这点与Cohen等人研究结果相似,他们认为缺铁诱导刺激Cd吸收的原因不是由于提高了P型ATP酶活性^[8]。

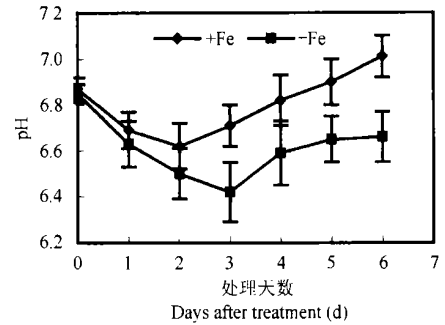


图4 缺铁对鸭跖草生长的培养液pH变化的影响

Fig. 4 Effect of Fe deficiency on pH of nutrient solution culturing *C. communis*

表1 Na_3VO_4 对鸭跖草铜吸收的影响

Table 1 Effect of Na_3VO_4 on Cu concentration in *C. communis*

处理 Treatment	植物铜浓度 Plant Cu concentration (mg kg^{-1})			
	$2\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu		$20\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu	
	+ Fe	- Fe	+ Fe	- Fe
对照 Control	220.3 ± 4.9 e	369.7 ± 79.5 cd	520.6 ± 27.1 bc	775.8 ± 86.6 a
Na_3VO_4	86.6 ± 15.6 f	314.8 ± 22.0 d	476.4 ± 23.0 c	584.5 ± 74.3 b

注: 数据为平均值 ± 标准差, $n = 3$ 。数据后的字母不同表明通过LSD检验差异显著($p \leq 0.05$)。Note: Values are means ± SD, $n = 3$. Data followed by different letters are significantly different ($p \leq 0.05$) according to LSD.

3 结论

1) 鸭跖草对铜的吸收与培养液中铁含量密切相关,缺铁处理可以显著促进鸭跖草对铜的吸收,同时也可以提高鸭跖草对不同形态铜的植物利用性。然而,缺铁促进鸭跖草铜吸收的原因还值得进一步研究。

2) 缺铁处理鸭跖草会产生根际酸化效应,这与根质膜 H^+ -ATPase的激活有密切关系。在P型ATP酶抑制剂处理下,缺铁处理鸭跖草对铜的吸收量仍显著高于完全培养液生长的植株,因此,缺铁对铜吸收的促进作用可能与P型ATP酶活性无关。

参考文献

- [1] Kumer P B A N, Dushenkov V, Raskin I. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Tech.*, 1995, 29: 1232~1239
- [2] Tang S R, Wilke B M, Huang C Y. The uptake of copper by plants dominantly growing on copper mining spoils along the Yangtze River, the People's Republic of China. *Plant and Soil*, 1999, 209: 225~232
- [3] 束文圣, 杨开颜, 张志权, 等. 湖北铜绿山古铜矿冶炼渣植被与优势植物的重金属含量研究. *应用与环境生物学报*, 2001, 7(1): 7~12. Shu W S, Yang K Y, Zhang Z Q, *et al.* Flora and heavy metals in dominant plants growing on an ancient copper spoil heap on Tonglushan in Hubei Province, China (In Chinese). *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 2001, 7(1): 7~12
- [4] Welch R M, Norvell W A, Schaefer S C, *et al.* Induction of iron

- (III) and copper(II) reduction in pea roots by Fe and Cu status: Does the root cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulation cation uptake? *Planta*, 1993, 190: 555~ 561
- [5] Rodecap K D, Tingey D T, Lee E H. Iron nutrition influence on cadmium accumulation by *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Environ. Qual.*, 1994, 23: 239~ 246
- [6] Meagher R B. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3: 153~ 162
- [7] 沈振国, 刘友良, 陈怀满. 整合剂对重金属超量积累植物 *Thlaspi caerulescens* 的锌、铜、锰和铁吸收的影响. *植物生理学报*, 1998, 24(4): 340~ 346. Shen Z G, Liu Y L, Chen H M. Effects of chelators EDTA and DPTA on the uptake of zinc, copper, manganese and iron by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (In Chinese). *Acta Phytophysiological Sinica*, 1998, 24(4): 340~ 346
- [8] Cohen C K, Fox T C, Garvin D F, *et al.* The role of iron deficiency stress responses in stimulating heavy metal transport in plants. *Plant Physiol.*, 1998, 116: 1 063~ 1 072
- [9] Lombi E, Tearall K L, Howarth J R, *et al.* Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.*, 2002, 128: 1 359~ 1 367
- [10] Mercer J F B. Menkes syndrome and animal models. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998, 67: 1 022s~ 1 028s
- [11] Blaylock M J, Salt D E, Dushenkov S, *et al.* Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil applied chelation agents. *Environ. Sci. Tech.*, 1997, 31(3): 860~ 865
- [12] 郭世伟, 邹春琴, 江荣凤, 等. 提高植物体内铁再利用效率的研究现状及进展. *中国农业大学学报*, 2000, 5(3): 80~ 86. Guo S W, Zou C Q, Jiang R F, *et al.* Effects of iron supply and exogenous hormone on iron remobilization and distribution in maize (In Chinese). *Journal of China Agricultural University*, 2000, 5(3): 80~ 86
- [13] 印莉萍, 孙铭明, 刘祥林, 等. 铁转运机制与相关基因的研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(6): 642~ 647. Yin L P, Sun M M, Liu X L, *et al.* Research progress in Fe acquisition mechanism and genes of Fe transport systems (In Chinese). *Chinese Bulletin of Botany*, 1999, 16(6): 642~ 647
- [14] Williams L E, Pittman J K, Hall J L. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Biomembranes*, 2000, 1465(1- 2): 104~ 126

EFFECTS OF Fe AND ATPase INHIBITOR ON Cu UPTAKE BY *COMMELINA COMMUNIS*

Shi Jiyan Chen Yingxu Tian Guangming Lin Qi Wang Yuanpeng

(*Department of Environmental Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract Effects of Fe deficiency and P-type ATPase inhibitor on Cu uptake by *C. communis* were investigated in this study. The results showed that Cu accumulation in *C. communis* was increased with the drop in Fe concentration in the nutrient solution. Cu uptake by *C. communis* was significantly enhanced by Fe deficiency in solutions with different Cu concentrations, which suggested that there was an inherent relationship between Cu uptake and element Fe. Cu concentrations in Fe deficient plants in Treatments EDTA-Cu, NTA-Cu, oxalate-Cu, and citrate-Cu, were lower than that in Treatment Cu. But Cu uptake, no matter what form of Cu, by Fe deficient plants was higher than that by Fe sufficient plants. Fe deficiency could lead to acidification of the rhizosphere of *C. communis*. Cu uptake was inhibited by P-type ATPase inhibitor Na_3VO_4 . The promotion of Cu uptake by Fe deficiency perhaps had nothing to do with the activity of P-type ATPase

Key words *Commelina communis*; Cu uptake; Fe deficiency; ATPase inhibitor