

# 镉超富集植物东南景天根系分泌物的代谢组学研究

罗 庆<sup>1 2</sup> 孙丽娜<sup>\* 2</sup> 胡筱敏<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( 东北大学资源与土木工程学院, 沈阳 110004)

<sup>2</sup>( 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** 利用基于气相色谱-质谱联用技术( GC-MS) 的代谢组学方法, 寻找不同处理条件间差异显著的镉超富集植物东南景天根系分泌物, 并探讨它们对东南景天耐受或超富集镉的可能作用机制。收集 0 和 40  $\mu\text{mol/L}$  镉分别处理 4 和 8 天后的东南景天根系分泌物样品, 通过样品冻干、甲醇溶解、甲氧胺盐酸盐和 *N*-甲基-*N*-( 三甲基硅烷) 三氟乙酰胺衍生化处理、GC-MS 检测的分析过程, 得到根系分泌物的表达谱。主成分分析和正交偏最小二乘判别分析( OPLS-DA) 得分图可将不同处理条件间东南景天的根系分泌物明显区分, 运用 OPLS-DA 载荷图、模型的变量重要性因子和方差分析发现 12 个根系分泌物在 4 组间存在显著性差异。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重金属镉。

**关键词** 超富集植物; 东南景天; 根系分泌物; 代谢组学; 气相色谱质谱联用

## 1 引 言

代谢组学是研究生物体受刺激或扰动而引起的体内代谢物动态变化的科学<sup>[1]</sup>, 广泛应用于疾病诊断、药物研发、毒理学及药物作用机制研究等领域<sup>[2~8]</sup>。目前, 代谢组学检测技术包括核磁共振技术和质谱技术, 其中气相色谱-质谱联用技术( GC-MS) 在代谢组学研究中有着非常重要的应用, 其方法成熟, 灵敏度高, 而且有许多数据检索库, 有助于代谢物的定性分析。

根系分泌物是植物为了增加营养物质的摄取或适应外界环境的胁迫而通过根系向周围环境分泌的小分子有机酸、氨基酸、脂肪酸、糖等物质, 它可通过改变根际土壤的 pH 值与氧化还原电位( 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>[9]</sup>。目前, 对超富集植物根系分泌物的研究主要集中在柠檬酸和草酸等小分子有机酸、总有机物或总有机碳上<sup>[10~13]</sup>, 而对超富集植物根系分泌物的组成成分分析及其在不同处理条件下的变化趋势的研究较少。

本研究应用基于 GC-MS 技术的代谢组学分析方法, 分析镉超富集植物东南景天在不同镉处理条件下其根系分泌物的变化特征, 寻找其可能的差异显著的根系分泌物, 通过这些物质的变化趋势来探索镉超富集植物东南景天耐受或超富集镉的可能作用机制。

## 2 实验部分

### 2.1 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、FDU-1100 真空冷冻干燥系统( Tokyo Rikakikai 公司)。

甲醇( 色谱纯, Fisher 公司); 吡啶( 色谱纯, 国药集团); *N*-甲基-*N*-( 三甲基硅烷) 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  $\text{CdCl}_2$ ( 国药集团); 实验用水为 Milli-Q 去离子水。

2014-05-04 收稿; 2014-07-07 接受

本文系国家自然科学基金( Nos. 21037002, 41071304, 21107075)、辽宁省创新团队项目( No. LT2011017) 资助

\* E-mail: sln0629@126.com

## 2.2 植物材料和培养方法

以浙江省衢州市古银矿生态型超富集型东南景天为供试植物。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,用 300 mL 黑色塑料瓶培养。先用去离子水进行预培养(约 4 天),然后转移至营养液培养(营养液组成参见文献[14])。培养期间,每 4 天更换 1 次营养液,用 0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 将营养液调至 pH 5.5,同时保持 24 h 通气。连续培养 16 天,待长出旺盛根系后,开始进行 Cd 处理,设 2 个 Cd 水平 0 和 40  $\mu\text{mol/L}$ ,每个水平重复 11 次。分别收集处理 4 和 8 d 后的根系分泌物。

## 2.3 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 3~5 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 分析主要参考文献[15,16]的方法。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,然后加入 40  $\mu\text{L}$  20 g/L 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  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 76  $^{\circ}\text{C}$ ,再以 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  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 mL/min(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  $m/z$  50~600;溶剂延迟时间:3 min。

## 2.4 数据分析

GC-MS 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 输出结果进行提取和处理,接着将已鉴定的根系分泌物质的峰面积进行标准化(不同处理间同一保留时间化合物的峰面积之比),然后导入统计软件 SIMCA-P 13.0 进行主成分分析(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),通过载荷图、模型的变量重要性因子(Variable importance factor, VIP)和方差分析(Analysis of variance, ANOVA)寻找超富集植物东南景天在不同镉处理条件下差异显著的根系分泌物。

# 3 结果与分析

## 3.1 GC-MS 分析结果

0 和 40  $\mu\text{mol/L}$  镉处理 4 天和 8 天后,超富集植物东南景天根系分泌物的 GC-MS 总离子流色谱图(TIC)见图 1。通过对 GC-MS 数据分析,共鉴定出其中 58 种化合物,包括乳酸、草酸、琥珀酸等一系列小分子有机酸,缬氨酸、丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸等一系列氨基酸,木糖、果糖、葡萄糖等糖类,十二烷醇、核糖醇、松醇、胆固醇等醇类,及磷酸、月桂酸、十八烯酸等小分子代谢物。

取同一样品连续进样 7 次,计算各色谱峰相对峰面积的相对标准偏差。结果表明,各色谱峰的相对标准偏差(RSD)低于 10%。

## 3.2 不同镉处理条件下东南景天根系分泌物的模式识别分析

将已鉴定的 58 种根系分泌物通过无监督的主成分分析(PCA)和有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),进行不同镉处理 4 天和 8 天间东南景天根系分泌物的模式识别,结果见图 2。

通过对已鉴定的 58 种根系分泌物质的 PCA 分析发现(图 2A),同一镉处理浓度下,不同镉处理时间东南景天根系分泌物样品能显著区分;而相同镉处理时间,不同镉处理浓度,东南景天根系分泌物样品也能区分,除了 0 与 40  $\mu\text{mol/L}$  镉处理 8 天后的样品有部分重叠。

通过进一步的 OPLS-DA 分析发现(图 2B),相同处理条件下东南景天根系分泌物样品能明显的聚

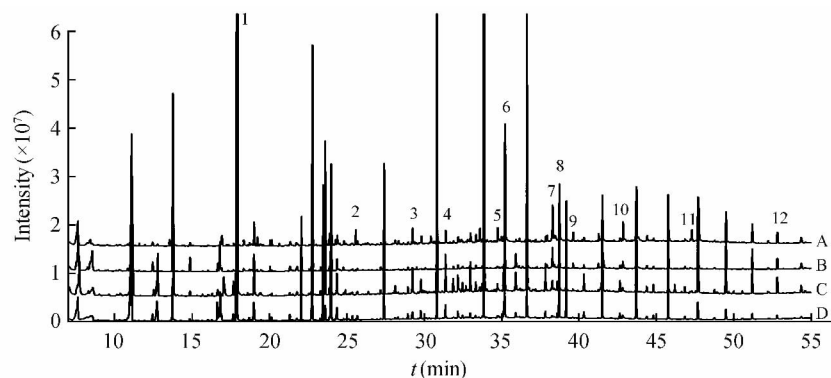


图 1 超富集植物东南景天根系分泌物的 GC-MS TIC 色谱图

Fig. 1 GC-MS TIC chromatograms of root exudates of the hyperaccumulator *S. alfredii*

A. 0  $\mu\text{mol/L}$  镉处理 4 天; B. 40  $\mu\text{mol/L}$  镉处理 4 天; C. 0  $\mu\text{mol/L}$  镉处理 8 天; D. 40  $\mu\text{mol/L}$  镉处理 8 天。

A. 0  $\mu\text{mol/L}$  Cd treatment for 4 days; B. 40  $\mu\text{mol/L}$  Cd treatment for 4 days; C. 0  $\mu\text{mol/L}$  Cd treatment for 8 days; D. 40  $\mu\text{mol/L}$  Cd treatment for 8 days.

部分已鉴定的根系分泌物: 1. 丙三醇 (Glycerol-3TMS); 2. 苏糖酸 (Threonic acid-4TMS); 3. 核糖醇 (Ribitol-5TMS); 4. 十四烷酸 (Tetradecanoic acid-1TMS); 5. 十六烯酸 (9-Hexadecenoic acid-1TMS); 6. 十六烷酸 (Hexadecanoic acid-1TMS); 7. 十八烯酸 (Oleic acid-1TMS); 8. 十八烷酸 (Octadecanoic acid-1TMS); 9. 二十二烷 (n-Docosane); 10. 单十六醛丙三醇 (1-Monohexadecanoylglycerol-2TMS); 11. 海藻糖 (Trehalose-8TMS); 12. 胆固醇 (Cholesterol-1TMS)。

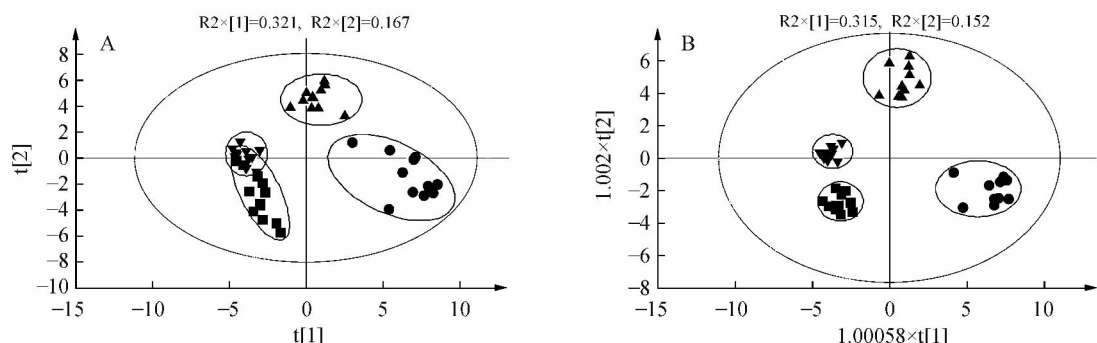


图 2 不同镉处理 4 天和 8 天后东南景天根系分泌物的 PCA 和 OPLS-DA 得分图

Fig. 2 Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squares discrimination analysis (OPLS-DA) scores plots of root exudates of the hyperaccumulator *S. alfredii*

A. PCA 得分图 (●) 0  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理 4 天 (▲) 40  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理 4 天 (■) 0  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理 8 天 (▼) 40  $\mu\text{mol/L}$  Cd 处理 8 天; B. OPLS-DA 得分图。

A. PCA scores plots (●) 0  $\mu\text{mol/L}$  Cd treatment for 4 days (▲) 40  $\mu\text{mol/L}$  Cd treatment for 4 days (■) 0  $\mu\text{mol/L}$  Cd treatment for 8 days (▼) 40  $\mu\text{mol/L}$  Cd treatment for 8 days; B. OPLS-DA scores plots.

集在一起,而不同处理条件间东南景天根系分泌物样品能显著区分。

PCA 和 OPLS-DA 的分析结果表明,东南景天根系分泌物的组成或含量在不同处理条件间明显不同。这一结果符合先前研究,土壤结构、植物种类、植物生长时期、营养水平和环境压力等因素能影响植物根系分泌物的组成成分和含量<sup>[17,18]</sup>。

为了进一步找到对上述区分做出主要贡献的差异根系分泌物,即可能导致镉超富集植物东南景天能耐受或超富集镉的优势根系分泌物,本研究通过 OPLS-DA 分析的载荷图(图 3,图中每一个 X 点代表一个根系分泌物变量,离原点距离较远的点可能为差异显著根系分泌物)、VIP 值(VIP > 1 的物质可能为差异显著的根系分泌物)和 ANOVA,最终确定其中 12 种根系分泌物的含量在不同镉处理条件间存在显著性差异( $p < 0.05$ ) (表 1)。

### 3.3 镉超富集植物东南景天耐受或超富集镉的作用机制分析

表 1 给出了差异显著的东南景天根系分泌物在不同处理条件下的相对含量,这些相对含量的变化可能是东南景天响应镉胁迫或植物生长时期的结果,可能与东南景天耐受或超富集镉的作用机制有关。

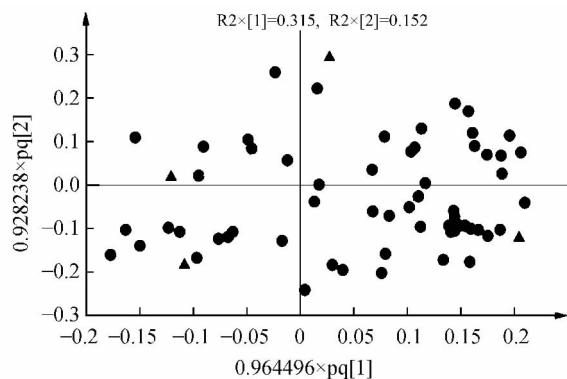


图3 不同镉处理4天和8天后东南景天根系分泌物的 OPLS-DA 载荷图

Fig. 3 Orthogonal partial least-squares discrimination analysis (OPLS-DA) loading plots of root exudates of the hyperaccumulator *S. alfredii*

(●) X 根系分泌物质变量 (the root exudate variable); (▲) Y, 分组变量 (the group variable)。

表1 不同处理条件间差异显著的东南景天根系分泌物质

Table 1 Potential biomarkers in root exudates of the hyperaccumulator *S. alfredii*

| 化合物<br>Compounds             | 0 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理 4 天<br>0 $\mu\text{mol/L}$ Cd<br>treatment for 4 days<br>( $n = 11$ ) | 40 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理 4 天<br>40 $\mu\text{mol/L}$ Cd<br>treatment for 4 days<br>( $n = 11$ ) | 0 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理 8 天<br>0 $\mu\text{mol/L}$ Cd<br>treatment for 8 days<br>( $n = 11$ ) | 40 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理 8 天<br>40 $\mu\text{mol/L}$ Cd<br>treatment for 8 days<br>( $n = 11$ ) |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 癸酸 Decanoic acid             | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                               | 1.00 $\pm$ 0.14                                                                                 | 0.61 $\pm$ 0.04                                                                               | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                                 |
| 苯甲酸 Benzoic acid             | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                               | 1.00 $\pm$ 0.06                                                                                 | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                               | 0.31 $\pm$ 0.02                                                                                 |
| 月桂酸 Dodecanoic acid          | 1.00 $\pm$ 0.09                                                                               | 2.13 $\pm$ 0.26                                                                                 | 2.13 $\pm$ 0.20                                                                               | 0.67 $\pm$ 0.12                                                                                 |
| 壬酸 Nonanoic acid             | 1.00 $\pm$ 0.09                                                                               | 1.10 $\pm$ 0.09                                                                                 | 0.41 $\pm$ 0.05                                                                               | 0.19 $\pm$ 0.03                                                                                 |
| 果糖 Fructose                  | 1.00 $\pm$ 0.17                                                                               | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                                 | 1.68 $\pm$ 0.43                                                                               | 0.33 $\pm$ 0.06                                                                                 |
| 赤藓糖醇 Erythritol              | 1.00 $\pm$ 0.14                                                                               | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                                 | 0.27 $\pm$ 0.05                                                                               | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                                 |
| 羟基乙酸<br>2-Hydroxyacetic acid | 1.00 $\pm$ 0.13                                                                               | 0.82 $\pm$ 0.10                                                                                 | 0.25 $\pm$ 0.03                                                                               | 0.13 $\pm$ 0.01                                                                                 |
| 甘露醇 Mannitol                 | 1.00 $\pm$ 0.18                                                                               | 0.06 $\pm$ 0.03                                                                                 | 0.08 $\pm$ 0.02                                                                               | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                                 |
| 海藻糖 Trehalose                | 1.00 $\pm$ 0.15                                                                               | 0.07 $\pm$ 0.02                                                                                 | 0.20 $\pm$ 0.04                                                                               | 0.07 $\pm$ 0.02                                                                                 |
| 核糖醇 Ribitol                  | 1.00 $\pm$ 0.14                                                                               | 0.09 $\pm$ 0.02                                                                                 | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                               | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                                 |
| 磷酸 Phosphoric acid           | 1.00 $\pm$ 0.13                                                                               | 0.84 $\pm$ 0.22                                                                                 | 7.78 $\pm$ 1.51                                                                               | 7.95 $\pm$ 1.96                                                                                 |
| 甘油 Glycerol                  | 1.00 $\pm$ 0.28                                                                               | 0.33 $\pm$ 0.06                                                                                 | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                               | 0.00 $\pm$ 0.00                                                                                 |

注: 数值为不同处理间同一保留时间化合物的峰面积的比值, 平均值  $\pm$  标准偏差。

The value is the ratio of the peak areas of the compounds which have the same retention time among the different treatments, mean  $\pm$  standard deviation.

癸酸和月桂酸在加镉处理4天时的分泌量较无镉处理有显著增加,8天时的分泌量较无镉处理有明显减少,表明在镉处理初期,东南景天可能通过根系分泌更多的癸酸和月桂酸来活化镉,以促进的镉的吸收;随着处理时间的增加,东南景天可能通过减少癸酸和月桂酸的分泌,进而减少镉的活化来耐受镉。

苯甲酸在加镉处理4天和8天时的分泌量较无镉处理都有明显增加,但镉处理8天的分泌量较4天时有显著减少,表明镉处理能促进东南景天根系分泌出更多的苯甲酸,苯甲酸可能有助于东南景天对镉的超富集。

壬酸在加镉处理和无镉处理中均有分泌,但在4天时镉能促进东南景天根系壬酸的分泌,8天时却抑制了其分泌,可能是由于壬酸能够活化重金属镉。在镉处理初期,东南景天为了吸收更多的镉而增加壬酸的分泌,随着处理时间的延长,东南景天通过减少壬酸的分泌来减少土壤中的有效性镉,以保护东南景天不受镉的毒害。

果糖、赤藓糖醇、羟基乙酸、甘露醇和海藻糖的分泌量在加镉处理后均较无镉处理减少,可能是东南景天通过减少这些物质的分泌来响应镉胁迫。

核糖醇和甘油在加镉处理和无镉处理4天时均有分泌,加镉处理的分泌量明显小于无镉处理,但加镉处理和无镉处理8天时均未分泌核糖醇和甘油,可能是东南景天通过减少这两种物质的分泌来响应镉胁迫和植物生长时期。

磷酸在镉处理和对照中均有分泌,在相同处理时间不同镉处理浓度下分泌量变化差异不明显,但在相同镉处理浓度不同处理时间下分泌量变化差异较明显,表明磷酸的分泌与植物生长时期有关,与镉处

理条件影响不大。

本研究利用基于 GC-MS 的代谢组学方法研究了镉超富集植物东南景天在镉胁迫下根系分泌物代谢谱变化。多元统计分析表明,不同处理条件间根系分泌物样品获得了很好的区分,并找出了 12 种在各处理间差异显著的根系分泌物质: 癸酸、苯甲酸、月桂酸、壬酸、果糖、赤藓糖醇、羟基乙酸、甘露醇、海藻糖、核糖醇、磷酸和甘油。这些差异显著的根系分泌物质的变化趋势反映了超富集植物东南景天通过改变根系分泌物质的组成或含量来耐受或超富集重金属镉的可能的作用机制。

## References

- Hong M, Jin Y, Mai Y Q. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **1992**, 101(12): 35–39
- Li L, Sun B, Zhang Q J. *Ethnopharmacol.*, **2008**, 116(3): 561–568
- Goldsmith P, Fenton H, Morris-Stiff G, Ahmad N, Fisher J, Prasad K R. *J. Surg. Res.*, **2010**, 160(1): 122–132
- GU Jin-Ning, NIU Jun, PI Zi-Feng, YUE Hao, WU Sui-Sheng, LIU Shu-Ying. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(3): 371–376
- 谷金宁, 牛俊, 皮子凤, 越皓, 吴绥生, 刘淑莹. *分析化学*, **2013**, 41(3): 371–376
- WU Hong-Wei, GAO Jian, LI Shao-Jing, TANG Li-Ying, XU Hai-Yu, TANG Shi-Huan, YANG Hong-Jun. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(3): 344–348
- 吴宏伟, 高健, 李韶菁, 唐力英, 许海玉, 唐仕欢, 杨洪军. *分析化学*, **2013**, 41(3): 344–348
- Zhang X X, Li Y B, Zhou H F, Fan S M, Zhang Z Z, Wang L, Zhang Y J. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **2014**, 97(11): 151–156
- Lu X Y, Tian Y, Lian X P, Jin Y C, Jin T T, Zhao Q Q, Hu B, Shen X P, Fan X H. *Food Chem. Toxicol.*, **2014**, 65(3): 343–355
- Dudka I, Kossowska B, Senhadri H, Latajka R, Hajek J, Andrzejak R, Antonowicz-Juchniewicz J, Gancarz R. *Environ. Int.*, **2014**, 68(7): 71–81
- KUANG Yuan-Wen, WEN Da-Zhi, ZHONG Chuan-Wen, ZHOU Guo-Yi. *Acta Phytocologica Sinica*, **2003**, 27(5): 709–717
- 旷远文, 温达志, 钟传文, 周国逸. *植物生态学报*, **2003**, 27(5): 709–717
- Liu D, Islam E, Li T Q, Yang X E, Jin X F, Mahmood Q. *J. Hazard Mater.*, **2008**, 153(1–2): 114–122
- Li T Q, Di Z Z, Yang X E, Sparks D L. *J. Hazard Mater.*, **2011**, 192(3): 1616–1622
- Jiang C A, Wu Q T, Zeng S C, Chen X, Wei Z B, Long X X. *J. Environ. Sci. (China)*, **2013**, 25(9): 1890–1896
- Yang J Y, Pan X L. *J. Plant Interactions*, **2013**, 8(3): 263–270
- Hoagland D R, Arnon D I. *Circular. California Agricultural Experiment Station*, 347: 1–32
- Suzuki K, Okazaki K, Tawaraya K, Osaki M, Shinano T. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **2009**, 55(4): 505–513
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie A R. *Nature Protocols*, **2006**, 1(1): 387–396
- Carvalhais L C, Dennis P G, Fedoseyenko D, Hajirezaei M R, Borriss R, von Wirén N. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, **2011**, 147(1): 3–11
- Selvakumar G, Panneerselvam P, Ganeshamurthy A N, Maheshwari D K. *Bacterial Mediated Alleviation of Abiotic Stress in Crops*. New York: Springer, **2012**: 205–224

## Metabonomics Study on Root Exudates of Cd Hyperaccumulator *Sedum Alfredii*

LUO Qing<sup>1,2</sup>, SUN Li-Na<sup>\*2</sup>, HU Xiao-Min<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(School of Resources and Civil Engineering, Northeast University, Shenyang 110004, China)

<sup>2</sup>(Key Laboratory of Regional Environment and Eco-Remediation of Ministry of Education, Shenyang University, Shenyang 110044, China)

**Abstract** A metabonomics method based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was developed

