

铅锌胁迫下蓖麻叶糖代谢规律及相关酶基因差异表达分析

高慧兵, 郁培义, 孙宇靖, 蒋丽娟*

中南林业科技大学生命科学与技术学院, 长沙410004

摘要: 以蓖麻为材料, 在现蕾期前持续铅锌胁迫, 分析此过程中植株叶片可溶性糖和淀粉含量变化及糖代谢关键酶基因表达特点。结果表明: 叶片可溶性糖含量在 $0.0015 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 单一 Pb^{2+} 胁迫处理植株中最高, 其次是 $0.0005 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ Pb}^{2+}+0.0015 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ Zn}^{2+}$ 复合胁迫处理植株; 叶片淀粉含量在 $0.0030 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 单一 Zn^{2+} 处理植株中最高, 其次是浓度 $0.0015 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 单一 Pb^{2+} 胁迫处理的植株。铅锌复合胁迫处理植株叶片中可溶性糖和淀粉累积量均高于对照, 且当铅锌单一胁迫浓度分别为 0.0020 和 $0.0060 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 可溶性糖含量较对照无显著差异, 淀粉含量较对照存在显著差异, 同时, 差异基因在淀粉和蔗糖代谢途径、糖酵解/糖异生途径中富集最多。铅胁迫下, 蔗糖磷酸合成酶(SPS)、 β -呋喃果糖苷酶(INV)、 β -淀粉酶、果糖-1,6-二磷酸酶I类(FBP)、6-磷酸果糖激酶-1 (PFK-1)、磷酸丙糖异构酶(TPI)等关键酶基因表达水平发生变化; 锌胁迫下1,4- α -葡聚糖分支酶(GBE1)、蔗糖合成酶(SS)、颗粒结合淀粉合成酶(WAXY)、 α -与 β -淀粉酶、果糖-1,6-二磷酸酶I类(FBP)、葡萄糖磷酸变位酶(PGM)、己糖激酶(HK)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)、丙酮酸脱羧酶(PDC)、丙酮酸激酶(PK)等关键酶基因表达水平发生变化。即铅、锌胁迫下糖代谢基因差异表达, 且此时可溶性糖含量较对照无显著差异, 淀粉含量较对照存在显著差异, 这也说明重金属铅锌胁迫影响糖代谢平衡使得植株生长期延长。

关键词: 蓖麻; Pb/Zn胁迫; 糖代谢; 基因差异表达

蓖麻(*Ricinus communis*)是大戟科蓖麻属一年生或多年生草本植物, 株型高大, 是重要的工业油料植物, 具有耐瘠薄、耐盐碱、生态适应性强等特点(孙振钧等2012)。蓖麻对多种重金属具有较强的耐受性和富集作用(陈亚慧等2014), 目前将其应用于重金属污染土壤修复成为研究热点, 对其在重金属污染胁迫下的生理生态适应性及适应机理研究也在不断深入(曾小龙2010)。研究发现, 重金属胁迫引起植株糖代谢水平紊乱。糖类不仅是植物生长发育的碳源、能源, 还能作为信号分子, 调节相关基因表达和酶活性(何亚飞等2016); 同时还可作为抗氧化剂调节逆性环境(杨勇等2016), 是影响蓖麻修复重金属污染土壤效益的关键因素。

我国农用地污染类型多样, 主要包括重金属污染、有机物污染、放射性污染等, 而重金属污染的主要污染物为镉(Cd)、汞(Hg)、砷(As)、铜(Cu)、铅(Pb)、铬(Cr)和锌(Zn)。Pb为植物非必需元素, 铅离子在植物体内长期大量的积累会影响植物的光合作用、抗氧化酶活性等一系列生理生化过程, 影响植物的生长发育(姚广等2009; 沙翠芸等2011)。Zn在自然界中广泛存在, 是植物生长的必需营养元素; 但过量的Zn会产生比较严重的植

物生态毒性问题, 对植物生长及产量品质产生不利影响(董璟琦等2018)。自然界中Pb、Zn常互为伴生, 形成铅锌复合污染。

近年来, 随着我国工农业迅速发展, 重金属污染物排放越发严重, 导致一系列农田土壤污染环境, 尤其Cd、Pb、Zn等有毒有害重金属可能被农作物吸收, 对食品安全和人体健康造成严重影响。土壤重金属污染修复迫在眉睫。重金属污染土壤修复主要通过物理修复、化学修复、生物修复和联合修复等途径, 其中生物修复具有成本低、不破坏土壤结构、无二次污染物产生等优势, 是目前最为主流的技术。尤其利用超积累植物进行的植物吸取修复表现出较好的前景(胡鹏杰等2014)。目前有关植物生长对重金属Pb/Zn的适应性与耐受性研究较多, 但植物应答重金属胁迫的糖代谢分子调控机制研究报道较少, 其作用机理尚未清楚。为此本文观测分析不同浓度铅锌胁迫下蓖麻叶片糖代谢相关酶基因的差异表达, 可溶

收稿 2018-11-07 修定 2019-02-25

资助 “十二五”国家科技支撑计划(2015BAD15B02)和湖南省重点研发项目(2016SK2031)。

* 通讯作者(505980271@qq.com)。

性糖与淀粉累积特征。探讨Pb/Zn胁迫下叶片糖代谢规律及作为信号分子参与分子调控机制,为重金属污染土壤栽种蓖麻提高产量和修复产出提供理论基础,也对了解在信号转导中糖如何参与分子调节从而影响基因的表达和植物代谢以及发育具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试材料为‘湘蓖9号’蓖麻(*Ricinus communis* L.)种子,由湖南省林业科学院生物能源研究所提供。

1.2 基质配制与植物栽种

将细沙与珍珠岩按5:4体积比混匀作为基质,分析纯 $Pb(NO_3)_2$ 和 $Zn(NO_3)_2 \cdot 5H_2O$ 分别作为 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 来源,溶解后混入基质中,调配成不同浓度梯度 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 单一和复合胁迫处理(表1),以加蒸馏水的基质为对照处理。平衡5 d,待用。将已消毒的种子播于盆中萌发,共计16组处理,每组处理5盆,3个重复,共计240盆,每盆保留3株幼苗。

1.3 实验方法

1.3.1 叶片碳水化合物含量的测定

选取现蕾期前蓖麻叶片进行可溶性糖和淀粉含量的测定,方法为蒽酮法(陈建勋和王晓峰2006)。

表1 不同基质处理配比

Table 1 Treatment of different substrates

处理方式	处理编号	Pb^{2+} 浓度/mol·kg ⁻¹	Zn^{2+} 浓度/mol·kg ⁻¹
对照	CK	0	0
单一胁迫	S1	0.0005	0
	S2	0.0010	0
	S3	0.0015	0
	S4	0.0020	0
	S5	0.0030	0
	S6	0.0040	0
	S7	0	0.0015
	S8	0	0.0030
	S9	0	0.0045
	S10	0	0.0060
复合胁迫	M1	0.00025	0.00075
	M2	0.0005	0.0015
	M3	0.0010	0.0030
	M4	0.0015	0.0045
	M5	0.0020	0.0060

1.3.2 重金属含量的测定

将烘干后的植株根系和叶片粉碎,分别准确称取0.3 g植物样品于消解罐中,加入8 mL HNO_3 和2 mL H_2O_2 ,置于微波消解仪中消化。消解程序为180°C, 10 min, 功率1 200 W; 150°C, 10 min, 功率1 200 W; 冷却后,样品溶液转移至50 mL容量瓶定容。根据元素含量进行不同级稀释,用电感耦合等离子体发射光谱仪(美国, ICAP6000)样品重复测定3次,取平均值。

1.3.3 基因差异表达分析

以分别经0.0020 mol·kg⁻¹ Pb^{2+} 和0.0060 mol·kg⁻¹ Zn^{2+} 胁迫处理苗木叶片和无胁迫处理(对照)叶片为RNA提取和转录组测序材料。基于Illumina平台进行转录组测序,将Clean Read与蓖麻参考基因组比对,利用DESeq软件筛选出差异基因并进行KEGG富集分析获得基因的注释信息及其参与的信号通路。

1.3.4 数据处理方法

采用Microsoft Excel 2007和SPSS 18分析软件进行原始数据处理分析和差异显著分析。

2 实验结果

2.1 Pb、Zn胁迫对叶片糖含量的影响

2.1.1 Pb、Zn胁迫对可溶性糖含量的影响

从图1可见,经不同浓度 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 单一和复合胁迫处理的植株叶片内可溶性糖含量有显著差异。随着处理浓度的升高,呈逐渐上升然后下降的趋势变化,其中S3胁迫处理(Pb^{2+} 浓度0.0015

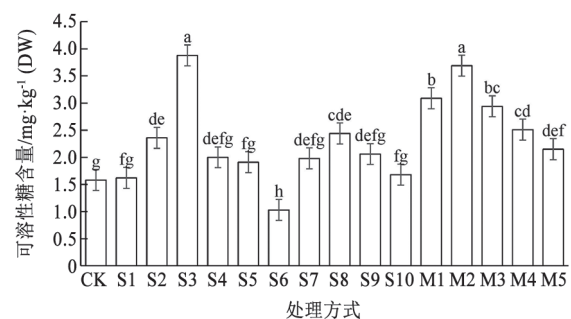


图1 Pb、Zn胁迫下现蕾期前蓖麻叶片可溶性糖含量变化
Fig.1 Changes of soluble sugar content in leaves of castor before bud stage under Pb and Zn stress

不同小写字母表示在0.05水平上有显著差异,图2和3同此。

$\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 植株叶片可溶性糖含量最高, 是对照(CK)的2.45倍; 而当 Pb^{2+} 达到 $0.0040\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 蓖麻叶片内可溶性糖含量显著低于CK。单一 Zn^{2+} 胁迫叶片可溶性糖含量均高于CK, 其中当 Zn^{2+} 浓度为 $0.0030\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 可溶性糖含量较CK高出54.43%。结果说明低浓度的 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 处理一定程度上促进了可溶性糖的累积, 高浓度对可溶性糖的累积有一定的抑制作用。

当 $\text{Pb}^{2+}+\text{Zn}^{2+}$ 复合胁迫时, 可溶性糖含量亦均高于CK, 其中M2处理植株可溶性糖含量最高; 当 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度分别为 0.0010 、 $0.0030\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 植株可溶性糖含量从高到低依次是复合胁迫 $>\text{Zn}^{2+}>\text{Pb}^{2+}$, 而当 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度分别为 0.0020 、 $0.0060\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 则是复合胁迫 $>\text{Pb}^{2+}>\text{Zn}^{2+}$ 。这说明蓖麻耐受 Pb^{2+} 的浓度高于 Zn^{2+} 的浓度, 而在浓度增加时, Pb^{2+} 可在一定程度上缓解 Zn^{2+} 对蓖麻的毒害作用, 其机理有待进一步研究。

2.1.2 Pb、Zn胁迫对淀粉含量的影响

经不同浓度 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 单一和复合胁迫处理, 蓖麻植株叶片内淀粉含量有显著差异(图2)。单一Pb胁迫时, 叶片内淀粉含量均较对照组植株高, 其中当 Pb^{2+} 浓度为 $0.0015\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时(S3)达到最大值, 其淀粉含量是CK的2.61倍; 单一 Zn^{2+} 胁迫时, 淀粉的累积随着浓度的上升先逐渐增加后下降, Zn^{2+} 为 $0.0030\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (S8)时淀粉含量达到最高且是CK含量的3.02倍。在本试验浓度范围内, 叶片中淀粉的累积量均高于对照, 表明低浓度铅锌能促进淀粉的累积, 但随着浓度逐渐增加会抑制淀粉的累积。

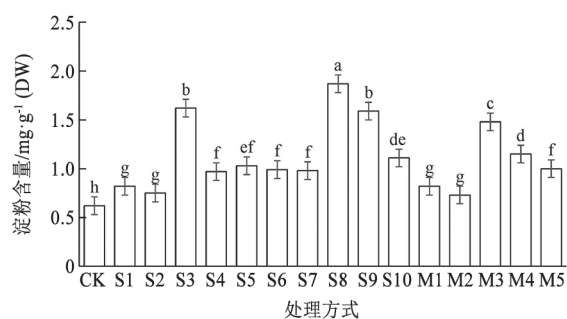


图2 Pb、Zn胁迫下现蕾期前蓖麻叶片淀粉含量变化
Fig.2 Changes of starch content in leaves of castor before bud stage under Pb and Zn stress

复合胁迫M3处理时淀粉含量达到最高, 是CK的2.39倍; M4、M5胁迫处理时, 叶片淀粉含量逐渐下降, 但仍分别高于对照组85.48%、61.29%。当 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 胁迫浓度分别为 0.0010 、 $0.0030\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或 0.0020 、 $0.0060\text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, 叶片淀粉含量从多到少均是 $\text{Zn}^{2+}>$ 复合胁迫 $>\text{Pb}^{2+}$, 说明 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 之间存在一定的互作作用可缓解重金属毒害作用, 使得单一 Zn^{2+} 胁迫下淀粉含量多于复合胁迫下淀粉含量, 其机理有待进一步研究。

2.1.3 Pb、Zn胁迫对叶片可溶性糖与淀粉相对含量的影响

分析不同浓度 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 单一和复合胁迫处理对蓖麻植株叶片内可溶性糖与淀粉含量的比值(图3)显示: 单一 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 处理组中, 除S2处理组叶片可溶性糖与淀粉含量的比值高于CK外, 其他处理均低于或显著(S6)低于CK; 而在 $\text{Pb}^{2+}+\text{Zn}^{2+}$ 复合胁迫下, 除M1和M2复合处理叶片可溶性糖与淀粉含量比值高于CK, 其他处理均低于CK。上述分析结果说明, Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 单一和复合胁迫影响植株体内可溶性糖和淀粉的相对含量, 影响糖代谢水平。

2.2 Pb、Zn胁迫对蓖麻 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 累积量的影响

不同含量 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 基质中的蓖麻 Pb^{2+} 的积累量存在差异(表2), 植株根系与叶片积累的 Pb^{2+} 含量随 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度的上升而增加, 单一处理时, S6中 Pb^{2+} 的积累量达到最大值, 分别为 692.52 和 $122.24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 与单一 Pb^{2+} 胁迫相比, 复合胁迫 Pb^{2+} 的积累量较低, 说明 Zn^{2+} 与 Pb^{2+} 可能存在竞争关系, Zn^{2+} 的存在可能抑制 Pb^{2+} 的吸收。从不同浓度 Pb^{2+} 、

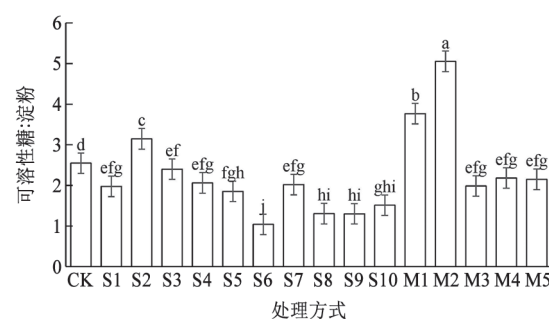


图3 Pb、Zn胁迫下蓖麻叶片可溶性糖与淀粉含量比值变化
Fig.3 Ratio of soluble sugar to starch content in castor leaves under Pb and Zn stress

表2 Pb、Zn胁迫对蓖麻各器官重金属积累量的影响
Table 2 Effects of Pb and Zn stress on the accumulation of heavy metals in various organs of castor

处理	铅元素含量/mg·kg ⁻¹	
	叶片	根系
CK	1.46±0.70 ^h	9.14±0.35 ⁿ
S1	15.14±0.38 ^h	176.46±1.82 ^j
S2	19.76±5.39 ^{gh}	338.54±3.70 ⁱ
S3	46.20±1.62 ^{gh}	398.63±11.61 ^h
S4	65.75±2.56 ^{fg}	550.85±11.72 ^e
S5	89.82±0.59 ^{ef}	610.85±8.42 ^f
S6	122.24±14.12 ^e	692.52±5.13 ^e
M1	3.39±0.14 ^h	83.60±3.48 ^m
M2	4.27±0.45 ^h	136.41±5.85 ^{kl}
M3	5.23±0.33 ^h	161.85±3.16 ^k
M4	13.68±1.73 ^h	320.06±19.54 ⁱ
M5	24.13±1.29 ^{gh}	122.76±3.77 ^l

处理	锌元素含量/mg·kg ⁻¹	
	叶片	根系
CK	34.46±1.45 ^{gh}	86.45±0.78 ^m
S7	282.46±29.79 ^{bc}	749.16±2.77 ^d
S8	310.48±4.24 ^{abc}	868.01±41.51 ^b
S9	315.84±28.90 ^{abc}	896.59±30.05 ^{ab}
S10	319.34±84.41 ^{ab}	929.34±29.13 ^a
M1	217.02±28.28 ^d	637.57±37.19 ^f
M2	229.17±20.10 ^d	801.26±17.52 ^c
M3	224.22±21.20 ^d	863.40±37.79 ^b
M4	272.01±50.38 ^c	866.83±40.76 ^b
M5	354.50±37.9 ^{da}	905.51±5.17 ^a

不同小写字母表示在0.05水平上有显著差异。

Zn²⁺胁迫对蓖麻积累Zn²⁺元素的影响来看,蓖麻根系与叶片积累的Zn²⁺随Zn²⁺浓度上升而增加,与Pb²⁺变化规律一致,其中叶片与根系Zn²⁺最大积累量在M5时达到最大值,分别为354.50和905.51 mg·kg⁻¹,分别是CK的10.29和10.47倍;对比单一和复合胁迫,Zn²⁺在复合胁迫的积累量大于单一胁迫,这与Pb²⁺的积累规律相反;说明蓖麻对Zn²⁺具有很强的富集作用。

2.3 Pb、Zn胁迫下蓖麻糖类合成代谢基因的差异表达分析

2.3.1 主要差异表达基因功能分析

将不同处理样品的差异基因通过KEGG进行功能注释分析,结果如表3和4所示: 相比对照,铅锌

胁迫下差异表达基因存在于5个大类中,其中环境信息处理过程差异基因数量最多的为信号转导(signal transduction, 分别是40和207条),在参与物质代谢途径的基因数目中,以影响碳水化合物代谢途径(carbohydrate metabolism, 分别是44和221条)基因最多,其次是影响次生代谢物生物合成的基因,表明这些过程在蓖麻受到重金属胁迫时起着显著的调控作用。在这两大类功能基因中,Zn胁迫产生的差异基因数远大于Pb胁迫。

2.3.2 糖类合成代谢途径统计分析

对参与糖类代谢信号通路的差异基因进行统

表3 Pb胁迫下差异表达基因的KEGG代谢通路分类
Table 3 KEGG metabolic pathways of differentially expressed genes under Pb stress

KEGG路径层次1	KEGG路径层次2	基因数目/条
细胞过程	细胞生长与死亡	12
	运输分解代谢	9
	细胞群落-真核生物	4
环境信息处理	细胞群落-原核生物	2
	细胞运动	1
	信号转导	40
遗传信息处理	膜转运	5
	折叠分类整理	5
	复制与修复	5
物质代谢	翻译	1
	碳水化合物代谢	44
	其他次生代谢产物的生物合成	36
	氨基酸代谢	21
	能量代谢	20
	脂质代谢	17
	萜类与多酮类化合物的代谢	17
	其他氨基酸代谢	15
	未注释基因	14
	外源物质的生物降解与代谢	8
	辅因子和维生素的代谢	7
	糖生物合成与代谢	5
	有机体系统	消化系统
免疫系统		13
神经系统		11
内分泌系统		8
环境适应		4
排泄系统		3
发展		2
感觉系统		2
循环系统	1	

表4 Zn胁迫下差异表达基因的KEGG代谢通路分类

Table 4 KEGG metabolic pathways of differentially expressed genes under Zn stress

KEGG路径层次1	KEGG路径层次2	基因数目/条	
细胞过程	运输分解代谢	86	
	细胞生长与死亡	65	
	细胞群落-真核生物	25	
	细胞群落-原核生物	21	
	细胞运动	15	
环境信息处理	信号转导	207	
	膜转运	14	
	信号分子与相互作用	2	
遗传信息处理	折叠分类整理	46	
	翻译	46	
	复制与修复	26	
	转录	17	
	物质代谢	碳水化合物代谢	221
	脂质代谢	134	
	氨基酸代谢	132	
	未注释基因	125	
	其他次生代谢产物的生物合成	121	
	能量代谢	94	
	辅因子和维生素的代谢	79	
	其他氨基酸代谢	75	
	萜类与多酮类化合物的代谢	67	
	外源物质的生物降解与代谢	49	
	核苷酸代谢	34	
	糖生物合成与代谢	26	
有机体系统	内分泌系统	90	
	免疫系统	70	
	神经系统	61	
	环境适应	56	
	消化系统	37	
	老化	25	
	排泄系统	15	
	循环系统	8	
	发展	7	
		感觉系统	7

计分析, 结果显示(表5), Pb胁迫与对照组之间糖代谢途径61条基因差异表达, 涉及到13条糖类代谢途径, 差异基因数量排前5位的依次是: 淀粉和蔗糖代谢途径(starch and sucrose metabolism, 9条)、氨基糖与核苷酸糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism, 8条)、果糖与甘露糖代谢(fructose and mannose metabolism, 7条)、糖酵解和糖异生途径(glycolysis and gluconeogenesis, 7条)、半乳糖代

表5 Pb、Zn胁迫下糖类相关代谢途径及差异基因

Table 5 Carbohydrate-related metabolic pathways and differential genes under Pb and Zn stress

糖类代谢途径	Pb胁迫差异基因数目/条	Zn胁迫差异基因数目/条
淀粉和蔗糖代谢	9	52
氨基糖和核苷酸糖代谢	8	37
果糖和甘露糖代谢	7	24
糖酵解/糖异生	7	39
半乳糖代谢	6	18
丙酮酸代谢	4	28
丙酸代谢	3	7
抗坏血酸和醛酸代谢	3	11
柠檬酸循环(TCA循环)	3	11
肌醇磷酸代谢	3	17
戊糖和葡萄糖醛酸盐相互转化	3	30
磷酸戊糖途径	3	14
乙醛酸和二羧酸代谢	2	17
丁酸代谢	/	8
C5-支链二元酸代谢	/	2

“/”表示未注释到该途径。

谢(galactose metabolism, 6条), 其他糖类代谢途径的差异基因从1到4条不等。

Zn胁迫与对照比较共315条基因差异表达, 涉及到15条糖类代谢途径, 基因差异数量排前5位从大到小依次是: 淀粉和蔗糖代谢途径(52条)、糖酵解和糖异生途径(39条)、氨基糖与核苷酸糖代谢(37条)、戊糖和葡萄糖醛酸盐相互转化(pentose and glucuronate interconversions, 30条)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism, 28条), 随后排第6位的是果糖与甘露糖代谢(24条), 其他糖类代谢途径的差异基因从1到18条不等。分析结果显示, Pb、Zn胁迫下, 差异基因涉及到的主要代谢途径基本相似。

2.3.3 糖类代谢过程差异基因表达调控分析

以差异基因KEGG注释结果为基础(表3、4), 进一步统计分析糖类代谢相关差异基因表达特点, 结果(图4)显示, 与CK相比, Pb胁迫的44条差异表达基因中, 下调基因(26条)多于上调基因(18条), Zn胁迫的221条差异表达基因中, 亦是下调基因(144条)多于上调基因(77条); 同时, Pb和Zn胁迫的148条差异表达基因, 下调基因(93条)多于上调基因(55条)。

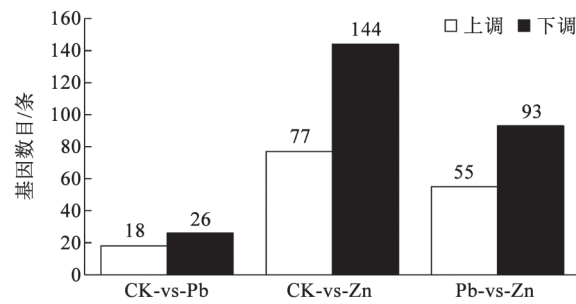


图4 不同胁迫处理糖代谢上下调差异基因分布

Fig.4 The distribution of up- and down-regulated genes on glucose metabolism under different stress treatments

CK-vs-Pb: 与对照相比, 铅胁迫处理差异表达基因数; CK-vs-Zn: 与对照相比, 锌胁迫处理差异表达基因数; Pb-vs-Zn: 与铅处理相比, 锌胁迫处理差异表达基因数。

2.3.4 糖类代谢过程关键酶基因注释

Pb、Zn胁迫下糖类代谢途径相关的差异基因涉及到最多的糖类代谢途径均为淀粉和蔗糖代谢途径和糖酵解/糖异生途径, 因此着重解析上述代谢途径中关键酶基因调节机制。

与对照相比, Pb胁迫下蓖麻糖类代谢信号通路中关键酶基因注释分布如表6, 与蔗糖合成相关的蔗糖磷酸合成酶(sucrose-phosphate synthase, SPS)基因表达上调, 参与蔗糖转化的 β -呋喃果糖苷酶(β -fructofuranosidase, INV)基因表达下调; 与此同时, 淀粉代谢过程中, 水解相关的 β -淀粉酶(β -amylase)基因上调。糖酵解过程中关键酶果糖-1,6-二磷酸

酶I类(fructose-1,6-bisphosphatase I, FBP)上调, 6-磷酸果糖激酶-1 (6-phosphofructokinase-1, PFK-1)、磷酸丙糖异构酶(triosephosphate isomerase, TPI)基因下调; 同时, 参与糖异生途径的磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, pckA)、乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)等基因上调, 乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase 1-7, ADH1-7)等基因下调。

受Zn胁迫(表7)时, 蔗糖代谢过程中, 蔗糖合成酶(sucrose synthase, SS)基因下调; 在淀粉代谢过程中, 与淀粉合成相关的1,4- α -葡聚糖分支酶(1,4- α -glucan branching enzyme, GBE1)基因上调, 但颗粒结合淀粉合成酶(granule-bound starch synthase, WAXY)基因表现为下调; 与淀粉水解相关的 β -淀粉酶(β -amylase)、 α -淀粉酶(α -amylase, AMY)基因均上调, 糖酵解过程的关键酶FBP、葡萄糖-6-磷酸-1-差向异构酶(glucose-6-phosphate-1-epimerase)基因上调, 而葡萄糖磷酸变位酶(phosphoglucomutase, PGM)、己糖激酶(hexokinase, HK)、磷酸丙糖异构酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)等基因均下调; 同时Zn胁迫下与糖异生相关的关键酶, 如丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase, PDC)、二磷酸依赖性磷酸果糖激酶(diphosphate-dependent phosphofructokinase, PFP)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、TPI、DLAT和ADH1-7等基因均下调, PFK和PK是糖酵

表6 Pb胁迫下蓖麻糖代谢途径酶基因注释

Table 6 Gene annotation of key enzymes in castor carbon metabolism pathway under lead stress

糖类代谢途径	酶名称	EC编号	酶数目/个	基因表达水平
糖酵解/糖异生	果糖-1,6-二磷酸酶I类(FBP)	3.1.3.11	1	上调
	磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶ATP (pckA)	4.1.1.49	1	上调
	乙醛脱氢酶(ALDH)	1.2.1.3	1	上调
	6-磷酸果糖激酶-1 (PFK-1/pfk-A)	2.7.1.11	1	下调
	磷酸丙糖异构酶(TIM) (TPI)	5.3.1.1	1	下调
	乙醇脱氢酶系统(ADH1-7)	1.1.1.1	1	下调
	淀粉和蔗糖代谢	蔗糖磷酸合成酶(SPS)	2.4.1.14	1
β -淀粉酶		3.2.1.2	2	上调
1,4- α -葡聚糖分支酶(淀粉分支酶) (GBE1)		2.4.1.18	1	上调
β -呋喃果糖苷酶(INV)		3.2.1.26	2	下调
内切葡聚糖酶		3.2.1.4	2	下调
β -葡萄糖苷酶		3.2.1.21	3	同时上下调

表7 Zn胁迫下蓖麻糖代谢途径酶基因注释

Table Gene annotation of key enzymes in castor carbon metabolism pathway under zinc stress

糖类代谢途径	酶名称	EC编号	酶数目/个	基因表达水平	
糖酵解/糖异生	果糖-1,6-二磷酸酶I类(FBP)	3.1.3.11	1	上调	
	葡萄糖-6-磷酸-1-差向异构酶	5.1.3.15	1	上调	
	葡萄糖磷酸变位酶(PGM)	5.4.2.2	1	下调	
	磷酸丙糖异构酶(TIM) (TPI)	5.3.1.1	1	下调	
	二磷酸依赖性磷酸果糖激酶(PFP)	2.7.1.90	1	下调	
	3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH/gapA)	1.2.1.12	1	下调	
	乙醇脱氢酶系统(ADH1-7)	1.1.1.1	1	下调	
	丙酮酸脱氢酶E2组分(二氢硫辛酸乙酰转移酶) (DLAT/pdhC)	2.3.1.12	1	下调	
	丙酮酸脱羧酶(PDC)	4.1.1.1	2	下调	
	丙酮酸激酶(PK)	2.7.1.40	1	下调	
	烯醇化酶(ENO)	4.2.1.11	1	下调	
	2,3-二磷酸甘油酯非依赖性磷酸甘油酸变位酶(gpm1)	5.4.2.12	1	下调	
	磷酸甘油酸激酶(PGK)	2.7.2.3	1	下调	
	磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶ATP (pckA)	4.1.1.49	1	同时上下调	
	乙醛脱氢酶(ALDH)	1.2.1.3	1	同时上下调	
	I类果糖二磷酸醛缩酶(ALDO)	4.1.2.13	1	同时上下调	
	己糖激酶(HK)	2.7.1.1	2	同时上下调	
	淀粉和蔗糖代谢	α -淀粉酶(AMY/amyA)	3.2.1.1	2	上调
		β -淀粉酶	3.2.1.2	2	上调
		1,4- α -葡聚糖分支酶(GBE1)	2.4.1.18	1	上调
颗粒结合淀粉合成酶(WAXY)		2.4.1.242	2	下调	
糖原磷酸化酶(PYG/glgp)		2.4.1.1	1	下调	
葡萄糖-1-磷酸腺苷酰基转移酶(glgC)		2.7.7.27	1	下调	
葡萄糖磷酸变位酶(PGM)		5.4.2.2	1	下调	
蔗糖合成酶(SS)		2.4.1.13	1	下调	
葡聚糖内酯-1,3- β -D-葡萄糖苷酶(EGLC)		3.2.1.39	1	下调	
果糖激酶(ScrK)		2.7.1.4	1	下调	
β -呋喃果糖苷酶(INV)		3.2.1.26	2	同时上下调	
己糖激酶(HK)		2.7.1.1	2	同时上下调	
蔗糖磷酸合成酶(SPS)		2.4.1.14	1	同时上下调	
海藻糖6-磷酸合成酶(otsA)		2.4.1.15	1	同时上下调	
海藻糖6-磷酸磷酸酶(otsB)		3.1.3.12	1	同时上下调	
β -葡萄糖苷酶		3.2.1.21	3	同时上下调	
内切葡聚糖酶		3.2.1.4	2	同时上下调	

解代谢过程最重要的两个不可逆反应中的关键酶,二者基因的下调限制糖酵解反应。结果说明糖酵解和糖异生代谢不活跃可能是导致锌胁迫下可溶性糖类含量累积的主要原因。

3 讨论

3.1 Pb、Zn胁迫对蓖麻叶片可溶性糖和淀粉含量的影响

可溶性糖是细胞重要的内渗透调节物质,当

植物受到胁迫时,可以通过提高可溶性糖的浓度来保护细胞免受伤害,维持正常的生理代谢(杜晓和申晓辉2010)。植物淀粉的生物合成和对其合成途径的调控是对环境变化和生理信号的响应(朱晔荣等2013),可溶性糖和淀粉的比值则体现了生命活动的状态(侯金锋2012)。在本试验设定的 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 单一和复合胁迫浓度范围内,可溶性糖和淀粉含量均出现“先升后降”趋势,在低 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 胁迫浓度时,可溶性糖含量增加调节细胞渗透压使其

免受伤害,维持原有的生理过程。但随着 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度的进一步增大,糖质量分数的增加已无法消除 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 对蓖麻的毒性,生长发育受到抑制,糖质量分数持续下降,说明铅锌重金属引起了植株糖代谢的紊乱,影响蓖麻正常的生长发育,出现叶片发黄易脱落植株矮小等症状。

3.2 不同浓度 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 胁迫下蓖麻对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 累积量的影响

铁、锌重金属元素在化学性质上有很多的相似性,常利用相同的转运系统进行吸收运输或储存(Chao等2012; Rogers等2000),表现出相互竞争关系。在研究蓖麻对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 吸收分配过程中发现, Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 在蓖麻不同器官的含量和累积量不同,且同浓度下,蓖麻对 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 的累积量为 $Zn^{2+} > Pb^{2+}$,原因可能是因为 Zn^{2+} 在植物代谢中较易转移,而 Pb^{2+} 迁移能力较差,也与蓖麻自身的耐性机制相关。植株根系与叶片积累的 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 含量随 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度的上升而增加。对比单一和复合胁迫, Zn^{2+} 在复合胁迫的累积量大于单一胁迫,这与 Pb^{2+} 的积累规律相反,说明蓖麻对 Zn^{2+} 具有很强的富集作用。

3.3 Pb 、 Zn 胁迫下蓖麻糖类合成代谢基因的差异表达分析

KEGG代谢途径富集分析结果表明 Pb 胁迫下在糖类相关代谢途径中差异基因共44个,涉及到13条糖类代谢途径,下调基因(26个)多于上调基因(18个); Zn 胁迫共221个差异基因,涉及到15条糖类代谢途径,下调基因(144个)多于上调基因(77个); Pb 、 Zn 胁迫下差异基因富集最多的均为淀粉和蔗糖代谢途径与糖酵解/糖异生途径。其中在 $0.0020 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ Pb^{2+} 胁迫下,淀粉和蔗糖代谢途径中的蔗糖磷酸合成酶基因(SPS)表达上调, β -呋喃果糖苷酶(INV)基因下调,同时, β -淀粉酶基因上调; $0.0060 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ Zn^{2+} 胁迫下 $1,4\text{-}\alpha$ -葡聚糖分支酶(GBE1)基因表达上调,蔗糖合成酶(SS)、颗粒结合淀粉合成酶(WAXY)基因均表达下调, α -与 β -淀粉酶基因均表达上调。 Pb 胁迫下糖酵解/糖异生途径关键酶果糖-1,6-二磷酸酶I类(FBP)基因上调,6-磷酸果糖激酶-1(PFK-1)、磷酸丙糖异构酶(TPI)基因下调,参与糖异生途径的磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶

(pckA)、乙醛脱氢酶(ALDH)等基因上调,乙醇脱氢酶(ADH1-7)等基因下调;在 Zn 胁迫下,FBP、葡萄糖-6-磷酸-1-差向异构酶基因上调,而葡萄糖磷酸变位酶(PGM)、己糖激酶(HK)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因均下调;丙酮酸脱羧酶(PDC)、丙酮酸激酶(PK)、TPI、DLAT和ADH1-7等基因均下调。且在此浓度下可溶性糖含量较对照无显著差异,淀粉含量较对照存在显著差异,这也说明重金属铅锌胁迫下影响糖代谢平衡使得植株生长期延长,开花推迟。

参考文献(References)

- Chao DY, Silva A, Baxter I, et al (2012). Genome-wide association studies identify heavy metal ATPase3 as the primary determinant of natural variation in leaf cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 8: e1002923
- Chen JX, Wang XF (2006). *Experimental Guidance of Plant Physiology*. 2nd ed. Guangzhou: South China University of Technology Press, 55-56 (in Chinese) [陈建勋, 王晓峰(2006). 植物生理学实验指导. 第2版. 广州: 华南理工大学出版社, 55-56]
- Chen YH, Liu XY, Wang MX, et al (2014). Cadmium tolerance, accumulation and relationship with Cd subcellular distribution in *Ricinus communis* L. *Acta Sci Circum*, 34: 2440-2446 (in Chinese with English abstract) [陈亚慧, 刘晓宇, 王明新等(2014). 蓖麻对镉的耐性, 积累及与镉亚细胞分布的关系. 环境科学学报, 34: 2440-2446]
- Dong JQ, Lei QS, Zhang HZ, et al (2018). Effects evaluation of phosphate stabilizes zinc contaminated soil in laboratory test and field remediation construction. *Chin J Environ Eng*, 12: 923-930 (in Chinese with English abstract) [董璟琦, 雷秋霜, 张红振等(2018). 磷酸盐稳定化修复锌污染土壤小试和工程效果评估. 环境工程学报, 12: 923-930]
- Du X, Shen XH (2010). Effects of cadmium stress on physiological and biochemical indices of *Viburnum odoratissimum* and *V. tinus* seedlings. *Chin J Ecol*, 29: 899-904 (in Chinese with English abstract) [杜晓, 申晓辉(2010). 镉胁迫对珊瑚树和地中海荚蒾生理生化指标的影响. 生态学杂志, 29: 899-904]
- He YF, Li X, Xie YF (2016). Research progress in sugar signal and its regulation of stress in plants. *Plant Physiol J*, 52 (3): 241-249 (in Chinese with English abstract) [何亚飞, 李霞, 谢寅峰(2016). 植物中糖信号及其对逆境调控的研究进展. 植物生理学报, 52 (3): 241-249]
- Hou JF (2012). Sucrose content in fresh soybean seeds and cloning and functional analysis of genes related to sugar

- metabolism (dissertation). Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [侯金锋(2012). 大豆鲜籽粒蔗糖含量的研究及糖代谢相关基因的克隆与功能分析(学位论文). 南京: 南京农业大学]
- Hu PJ, Li Z, Zhong DX, et al (2014). Research progress on the phytoextraction of heavy metal contaminated soils in China. *Plant Physiol J*, 50: 577–584 (in Chinese with English abstract) [胡鹏杰, 李柱, 钟道旭等(2014). 我国土壤重金属污染植物吸取修复研究进展. *植物生理学报*, 50: 577–584]
- Rogers EE, Eide DJ, Guerinot ML (2000). Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 12356–12360
- Sha CY, Meng QR, Wang J, et al (2011). Physiological responses of two colored-leaf species to Pb stress. *J Northwest For Univ*, 26: 36–40 (in Chinese with English abstract) [沙翠芸, 孟庆瑞, 王静等(2011). 两种彩叶植物对铅胁迫的生理响应. *西北林学院学报*, 26: 36–40]
- Sun ZJ, Lü LY, Wu YP (2012). Castor industry development: from cultivation to product exploitation. *J China Agric Univ*, 17: 204–214 (in Chinese with English abstract) [孙振钧, 吕丽媛, 伍玉鹏(2012). 蓖麻产业发展: 从种植到利用. *中国农业大学学报*, 17: 204–214]
- Yang Y, Lou YH, Yang ZJ, et al (2016). Effect of low temperature on phytohormones and carbohydrates metabolism in Bermuda grass. *Acta Pratac Sin*, 25: 205–215 (in Chinese with English abstract) [杨勇, 娄燕宏, 杨知建等(2016). 低温胁迫对狗牙根激素和碳水化合物代谢的影响. *草业学报*, 25: 205–215]
- Yao G, Gao HY, Wang WW, et al (2009). The effects of Pb-stress on functions of photosystems and photosynthetic rate in maize seedling leaves. *Acta Ecol Sin*, 29: 1162–1169 (in Chinese with English abstract) [姚广, 高辉远, 王未未等(2009). 铅胁迫对玉米幼苗叶片光系统功能及光合作用的影响. *生态学报*, 29: 1162–1169]
- Zeng XL (2010). Research progress for resistance and tolerance mechanism of castor. *Chin Agric Sci Bull*, 26: 123–125 (in Chinese with English abstract) [曾小龙(2010). 蓖麻在逆境胁迫下的抗性及其耐性机制研究进展. *中国农学通报*, 26: 123–125]
- Zhu YR, Liu MM, Li YH, et al (2013). Research advance in regulation mechanism of starch synthesis in plants. *Plant Physiol J*, 49: 1319–1325 (in Chinese with English abstract) [朱晔荣, 刘苗苗, 李亚辉等(2013). 植物淀粉生物合成调节机制的研究进展. *植物生理学报*, 49: 1319–1325]

Analysis of carbon metabolism and differential expression of related enzyme genes in castor leaves under Pb and Zn stress

GAO Hui-Bing, YU Pei-Yi, SUN Yu-Jing, JIANG Li-Juan*

College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

Abstract: The lead and zinc stress of castor was carried out before the bud stage. The changes of soluble sugar and starch content and the expression of key enzymes gene in carbon metabolism were analyzed. The results showed that the leaf soluble content was the highest in $0.0015 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ single Pb^{2+} stress treatment, followed by $0.0005 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1} \text{Pb}^{2+} + 0.0015 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1} \text{Zn}^{2+}$ combined stress treatment; the leaf starch content was the highest in $0.0030 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ among the Zn^{2+} treated plants, followed by the plants treated with a single Pb^{2+} stress at a concentration of $0.0015 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$. The accumulation of soluble sugar and starch in the leaves of Pb-Zn combined stress treatment was higher than that of the control. When the single stress concentration of lead and zinc was 0.0020 and $0.0060 \text{ mol}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively, the soluble sugar content was not significantly different from the control, but the starch content had significant differences. At the same time, differential genes were most abundant in starch and sucrose metabolic pathways, and glycolysis/gluconeogenesis pathways. Under lead stress, the expression levels of genes encoding sucrose phosphate synthase (SPS), β -fructofuranosidase (INV), β -amylase, fructose-1,6-bisphosphatase I (FBP), 6-phosphate fructokinase-1 (PFK-1), and triose phosphate isomerase (TPI) were changed; while under zinc stress expression levels of key genes such as 1,4- α -glucan branching enzyme (GBE1), sucrose synthase (SS), granule-bound starch synthase (WAXY), α - and β -amylase, FBP, phosphoglucomutase (PGM), hexokinase (HK), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), pyruvate decarboxylase (PDC), and pyruvate kinase (PK) were changed. The expression of sugar metabolism genes was differentially expressed under lead and zinc stress; and compared with control, the starch content was significantly different, while there was no evident difference in soluble sugar content. This result also indicates that heavy metal lead and zinc stress may affect the balance of sugar metabolism and prolongs the growth period of the plant.

Key words: *Ricinus communis*; Pb/Zn stress; carbon metabolism; gene differential expression

Received 2018-11-07 Accepted 2019-02-25

This work was supported by the Twelfth National Science and Technology Support Program (2015BAD15B02), and Hunan Provincial Key Research and Development Project (2016SK2031).

*Corresponding author (505980271@qq.com).