

过量铜在两个柑橘品种幼苗中的分布特征 及根细胞壁响应机制

李欣钰, 林妹兰, 卢 飞, 胡萍萍, 陈立松, 黄增荣*

(福建农林大学资源与环境学院, 福建福州 350002)

摘要:【目的】探究过量铜在两个柑橘品种幼苗组织水平和亚细胞水平上的分布特征以及根细胞壁对铜毒害的响应机制, 以揭示柑橘耐铜毒害机理, 为优化不同柑橘品种铜养分管理提供科学依据。【方法】以砂培的雪柑 (*Citrus sinensis*) 和沙田柚 (*Citrus grandis*) 实生苗为试验材料, 进行连续 18 周不同浓度铜处理, 即 Cu 0.5 $\mu\text{mol/L}$ (对照) 和 300 $\mu\text{mol/L}$ (过量铜)。处理结束后, 分析铜在柑橘幼苗不同组织水平 (主根、侧根、茎和叶)、侧根亚细胞水平 (细胞壁、细胞器和可溶性部分) 以及侧根细胞壁多糖组分 (果胶、半纤维素 I、半纤维素 II 和纤维素) 上的分布特征; 采用透射电镜 (TEM) 以及傅里叶变换红外光谱 (FTIR), 分析柑橘侧根细胞壁微结构变化 (厚度、化学基团构成等)。【结果】1) 组织水平上, 不论是对照还是过量铜处理的柑橘苗, 侧根是铜分布的主要部位, 且过量铜处理的沙田柚侧根铜含量显著高于雪柑。对照组的雪柑和沙田柚侧根铜分布率分别为 57.32% 和 51.31%; 过量铜处理后, 雪柑和沙田柚侧根铜分布率分别提高到 90.87% 和 91.99%。相反, 过量铜处理显著降低了两个柑橘品种幼苗茎和叶的铜分布率。2) 在侧根亚细胞水平上, 细胞器是铜在对照组柑橘苗的主要分布部位。对照组的雪柑和沙田柚侧根细胞器铜分布率分别为 58.61% 和 39.26%; 过量铜处理后, 雪柑和沙田柚侧根细胞器的铜分布率分别降低到 14.34% 和 11.49%。与对照相比, 过量铜处理显著提高了两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁和可溶性部分的铜含量, 且过量铜处理的沙田柚侧根细胞壁铜含量显著高于雪柑。3) 与对照相比, 过量铜处理显著提高了两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁各多糖组分的铜含量。其中, 对照组的雪柑和沙田柚侧根细胞壁果胶铜分布率分别为 44.69% 和 37.15%; 过量铜处理后, 雪柑和沙田柚侧根细胞壁果胶铜分布率分别提高到 98.45% 和 98.48%。但过量铜处理的两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁上的半纤维素 I、半纤维素 II 和纤维素中的铜分布率显著降低。4) 分级提取细胞壁并结合 TEM 分析表明, 过量铜处理显著提高两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁的提取率以及细胞壁厚度, 且过量铜处理的沙田柚细胞壁提取率与细胞壁厚度均显著高于雪柑。5) FTIR 分析表明, 沙田柚侧根细胞壁果胶、纤维素和蛋白质等成分上羟基、羧基和氨基官能团参与了铜的吸附和固定。【结论】亚细胞水平上, 300 $\mu\text{mol/L}$ 过量铜处理的柑橘苗侧根可溶性部分和细胞壁是铜的主要分布部位, 细胞壁果胶对铜的固定降低了铜向地上部的运输。提高细胞壁含量、增厚细胞壁以及促进细胞壁对铜的吸附可能是沙田柚幼苗耐铜性强于雪柑的主要原因。

关键词: 柑橘; 铜分布; 细胞壁; 透射电镜; 傅里叶红外光谱

The distribution pattern of copper and the responses of root cell wall to excessive copper in seedlings of two citrus species

LI Xin-yu, LIN Mei-lan, LU Fei, HU Ping-ping, CHEN Li-song, HUANG Zeng-rong*

(College of Resources and Environment, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: 【Objectives】We investigated the distribution pattern of excessive copper (Cu) at the tissue and subcellular levels of two citrus species and the responses of the root cell wall to Cu toxicity with the aims of providing theoretical evidence of citrus Cu-tolerance mechanisms and providing scientific instructions for an optimized Cu nutrient management of citrus species. 【Methods】Seedlings of ‘Xuegan’ [*Citrus sinensis* (L.)

收稿日期: 2021-10-14 接受日期: 2021-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31801950); 福建农林大学科技创新项目 (CXZX2019079S)。

联系方式: 李欣钰 E-mail: lixyazur@126.com; * 通信作者 黄增荣 E-mail: hzrapaul@126.com

Osbeck] and ‘Shatian pummelo’ [*Citrus grandis* (L.) Osbeck] were sandy cultured in 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Cu (control) or 300 $\mu\text{mol/L}$ Cu (excessive Cu treatment) nutrient solution for 18 weeks. At the end of treatments, the Cu concentration and the distribution pattern at the tissue level (the primary roots, lateral roots, stems and leaves), subcellular level (the cell wall, organells and soluble fractions) of lateral roots and the cell wall polysaccharides (the pectin, hemicellulose I, hemicellulose II and cellulose) of lateral roots were analyzed. The alterations of cell wall ultrastructure of lateral roots (the thickness and chemical group constituents) were investigated by transmission electron microscopy (TEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). **【 Results 】** 1) At the tissue level, the lateral roots of citrus seedlings were the primary sites of Cu distribution of citrus seedlings under control and excessive Cu treatment. Compared to control, the ratio of Cu distributed in the lateral roots increased from 57.32% to 90.87% and from 51.31% to 91.99% in *C. sinensis* and *C. grandis*, respectively. By contrast, the Cu distribution ratio decreased significantly in the stems and leaves of two citrus species by Cu treatment compared to control. 2) At the subcellular level of control seedlings, Cu was mainly distributed in the organells fractions of the lateral roots. However, the excessive Cu treatment decreased the Cu ratio of the control organells fractions from 58.61% to 14.34% and from 39.26% to 11.49% in *C. sinensis* and *C. grandis*, respectively. Compared to the control, the excessive Cu treatment increased the Cu concentration in the cell wall and soluble fractions of two citrus species. Strikingly, the Cu concentration was higher in the cell wall of *C. grandis* than *C. sinensis* under Cu toxicity. 3) The Cu concentration in the polysaccharides of lateral root cell wall was increased remarkably in both citrus species under excessive Cu compared to the control. Noticeably, the Cu ratio distributed in the pectin of lateral root cell wall increased from 44.69% (control) to 98.45% (excessive Cu treatment) in *C. sinensis* and from 37.15% (control) to 98.48% (excessive Cu treatment) in *C. grandis*. By contrast, excessive Cu treatment significantly decreased the Cu ratio distributed in the hemicellulose I, hemicellulose II and cellulose compared to the control. 4) The cell wall fractioning and TEM analysis revealed that the excessive Cu treatment increased the extraction rate of the lateral root cell wall and thickened the cell wall of two citrus species. Compared to *C. sinensis*, *C. grandis* had a remarkably higher cell wall extraction rate and cell wall thickness under Cu toxicity. 5) The results of FTIR analysis indicated that the chemical groups of hydroxy, carboxyl and amidogen of cell wall from *C. grandis* lateral roots contributed to Cu adsorption and immobilization. **【 Conclusions 】** At subcellular level, excessive Cu is mainly distributed in the soluble fraction and cell wall of lateral roots in seedlings of two citrus species under 300 $\mu\text{mol/L}$ Cu. The pectin of cell wall restricts the Cu translocation from roots to shoots. Compared to *C. sinensis*, a relatively higher Cu tolerance of *C. grandis* is attributed to an upregulated synthesis, increased thickness and higher Cu^{2+} adsorption of the cell wall.

Key words: citrus; copper distribution; cell wall; transmission electron microscope; FTIR

铜是高等植物生长发育必需的微量营养元素之一,参与了光合电子传递,抗氧化保护以及细胞壁修饰等生化反应^[1]。在柑橘生产中,含铜菌剂常用于叶片喷施防治柑橘疮痂病和黑斑病等^[2]。连年喷施造成铜在柑橘园土壤中逐年累积^[3-4]。土壤中的铜主要以正二价(Cu^{2+})形态存在。相比其他二价金属元素,土壤有机质对 Cu^{2+} 的结合能力最强^[5]。土壤有机质对铜的强烈吸附减少了铜向柑橘树体的迁移。但据本课题组对福建平和 300 多个琯溪蜜柚果园土壤和叶片的调查,仍有 70.3% 的叶片铜含量超过适宜浓度^[6]。铜超标蜜柚叶片占比高,一方面是由于在柑橘生产

中过多施用含铜杀菌剂(如波尔多液、蓝矾等)以及含铜微量元素肥料,导致喷落的铜逐年富集在果园土壤表层^[7-8];另一方面是由于果农在蜜柚园养分管理中偏施化肥,少施有机肥,造成果园土壤逐年酸化(300 多个琯溪蜜柚果园土壤 pH 平均值为 4.34,且 90.0% 的土壤样品 pH 小于 5.0^[6]),促进土壤中吸附性铜的解吸,提高土壤溶液中铜的活性。活化的铜通过根向柑橘体内迁移,增大柑橘铜中毒风险^[9]。因此,研究酸性条件下柑橘苗对过量铜的响应机制对于优化果园铜养分管理、防控柑橘园铜毒害、提高柑橘产量和品质具有重要意义。

铜的迁移与再分布是植物应答铜毒害最重要的机制之一^[10]。在组织水平上, 大量铜富集在多数植物的根中。铜在根中的固定直接减少了其向地上部的迁移。在细胞水平上, 植物可通过“拒铜”或“区隔化”抵抗铜毒害。例如, 植物可通过根系分泌的有机酸^[11-12]或通过质子泵的外排作用^[13]将铜拒之根表。对于进入细胞质的铜, 可通过铜转运蛋白将其转运到液泡中, 以降低对同化器官的破坏^[14]。在亚细胞水平上, 有关铜的主要分布部位目前仍存在争议。如 Mwamba 等^[15]研究表明, 过量铜主要结合在油菜根的可溶性成分。Wan 等^[16]研究表明, 过量铜主要富集在苹果根细胞壁上。由于植物细胞可溶性成分复杂, 近年来有关植物对铜区隔与固定的研究主要关注植物根细胞壁的多糖组分。植物根细胞壁主要由纤维素、半纤维素和果胶等多糖组分构成^[17-18]。各多糖组分富含带有负电荷的羟基和羧基等, 可通过配位吸附固定铜。目前, 有关过量重金属在细胞壁上的主要结合位点有不同的报道。如 Ren 等^[19]研究表明, 蓖麻根细胞壁的半纤维素组分是铜的主要结合位点。Yang 等^[20]研究表明, 甘蔗根细胞壁果胶组分是锰的主要累积部位。

根细胞壁对铜的固定与植物耐铜性相关。研究表明, 过量铜主要固定于苹果须根上, 在须根亚细胞水平铜分布特征表现为细胞壁>质体>可溶性部分>线粒体>细胞核, 且耐铜品种须根细胞壁铜累积量显著高于铜敏感品种^[21]。进一步研究表明, 根细胞壁对铜的固定与其微结构变化有关^[22-23]。例如, 经 200 $\mu\text{mol/L}$ 铜处理 30 天的毛竹根铜浓度可达 810 mg/kg , 而转移至地上部的铜浓度仅为 91.0 mg/kg , 且过量铜处理的细胞壁可见明显扭曲变形与增厚^[24]。根细胞壁增厚现象在受铜毒害影响的牛至^[25]和蓖麻幼苗中皆有报道^[26-27]。FTIR 分析显示, 大部分铜结合到细胞壁纤维素、半纤维素、果胶和蛋白质的羧基、羟基和氨基甲基等官能团上^[28-29]。Krzyszowska^[23]的研究结果显示, 含羧基的多糖数量决定了细胞壁结合金属离子的能力。张晓斌等^[30]的研究表明, 耐重金属植物根细胞壁相应基团表现出不同程度的位移或吸光度的差异。目前, 关于过量铜在柑橘树体中的迁移与微分布以及过量铜诱导的根细胞壁微结构变化的报道较少。

本研究以具有耐铜差异的雪柑和沙田柚实生苗^[31]为试验材料, 设置连续 18 周含铜浓度分别为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ (对照) 和 300 $\mu\text{mol/L}$ (铜过量) 的铜处理, 研究过量铜在雪柑和沙田柚实生苗中的分布特征以及

柑橘根细胞壁微观结构变化, 旨在进一步解析柑橘过量铜应答机制, 为优化柑橘铜养分管理, 实现高产优质栽培提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与处理

挑选饱满的沙田柚和雪柑种子, 播于含有干净河沙的黑色穴盘中。出芽 5 周后, 将长势一致的两个柑橘品种实生苗移栽到含有干净河沙的陶瓷花盆中, 沙田柚和雪柑各 24 盆, 每盆 2 株, 在福建农林大学金山校区的温室大棚内自然光下生长, 每两天浇一次营养液, 每盆 500 mL。营养液配方: KNO_3 2.5 mmol/L 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 2.5 mmol/L 、 KH_2PO_4 0.5 mmol/L 、 MgSO_4 1 mmol/L 、 H_3BO_3 10 $\mu\text{mol/L}$ 、 MnCl_2 2 $\mu\text{mol/L}$ 、 ZnSO_4 2 $\mu\text{mol/L}$ 、 CuCl_2 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.065 $\mu\text{mol/L}$ 和 Fe-EDTA 20 $\mu\text{mol/L}$ 。

移栽 6 周后, 对柑橘实生苗进行不同浓度铜处理, 铜浓度分别为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ (对照, Cu0.5) 和 300 $\mu\text{mol/L}$ (铜过量, Cu300), 营养液 pH 用 1 mol/L HCl 或 NaOH 调至 4.30~4.50。处理 18 周后, 柑橘苗按主根、侧根、茎和叶分类采集。其中, 柑橘根样品用自来水洗净沙粒后用预冷的 0.5 mol/L EDTA-Na_2 浸泡 10 min 再用蒸馏水清洗 3 次, 经吸水纸吸干后采集。取部分柑橘苗侧根样品立刻放入固定液中用于透射电镜观察; 另取部分柑橘苗侧根鲜样用液氮固定, 保存于 -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱, 用于亚细胞组分分离和铜含量测定。剩余侧根和主根鲜样放入 70 $^\circ\text{C}$ 烘箱烘干后, 用于粗细胞壁的提取及铜含量的测定。柑橘地上部样品用蒸馏水清洗 3 次, 表面干燥后放入 70 $^\circ\text{C}$ 烘箱烘干至恒重于铜含量的测定。

1.2 试验方法

1.2.1 柑橘幼苗主根、侧根、茎和叶中铜含量的测定

烘干至恒重的柑橘幼苗主根、侧根、茎和叶粉末, 经浓硝酸-浓高氯酸 (V:V=5:1) 过夜消化后, 用原子吸收光谱法 (PerkinElmer Singapore Pte Let., Singapore) 测定雪柑和沙田柚主根、侧根、茎和叶中的铜含量^[32], 每个样品 4 个重复。

1.2.2 亚细胞组分的分离与铜含量的测定

参考周丽珍等^[33]的方法分离亚细胞组分。称取适量柑橘根尖新鲜样品于预冷的匀浆液 (50 mmol/L 顺丁烯二酸盐缓冲液, pH 7.8; 250 mmol/L 蔗糖; 1 mmol/L 二硫赤藓糖醇) 中, 研磨成匀浆, 转入 50 mL 离心管; 于 4 $^\circ\text{C}$ 高速冷冻离心机 (Thermo Scientific Sorvall

Legend Micro 17R, USA) 中, 以 3000 r/min 离心 1 min, 底部沉淀为细胞壁组分; 上清液转入新的离心管后, 以 15000 r/min 离心 45 min, 底层为细胞器组分; 上清液转入新的离心管, 为可溶性部分(含细胞质及液泡), 所得所有组分均于 4℃ 保存。分离得到的亚细胞组分细胞壁、细胞器及可溶性部分, 经浓硝酸-浓高氯酸(V:V=5:1)消化后, 利用 NexION 300XICP-MS (PerkinElmer, Shelton, CT, USA) 测定 3 个组分的铜含量, 每个样品含 3 个重复。采用柑橘叶国家标准物质 GBW10020 (GSB-11) 进行分析质量控制。其中, 柑橘叶标准品铜含量为 6.6 ± 0.5 ($\mu\text{g/g}$, DW), 质控结果为 6.83 ± 0.48 ($\mu\text{g/g}$, DW)。

1.2.3 细胞壁的提取、多糖组分的分离与铜含量测定

参考 Zhong 等^[34]的方法, 提取细胞壁并分离细胞壁多糖组分。称取适量烘干并磨碎成粉末的柑橘侧根样品于离心管中, 采用 75% 乙醇、丙酮、甲醇-氯仿(V:V=1:1)和甲醇 4 种提取剂(固液比为 0.1 g:10 mL)依次分别提取。加入提取剂充分混匀后, 静置 20 min, 在 12000 r/min 的离心机中离心 10 min, 弃去上清液, 并加入去离子水清洗, 混匀并离心, 弃去上清液, 得到粗细胞壁。含粗细胞壁的离心管覆盖单层保鲜膜并扎孔, 于 55℃ 烘箱烘干至恒重, 称量粗细胞壁的质量, 计算细胞壁提取率。称取 0.01 g 干燥的细胞壁样品于离心管中, 加入 2 mL 0.5% 草酸铵(含 0.1% NaBH_4 , pH=4.00), 沸水浴 1 h 后 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液于新的离心管中, 重复 3 次合并上清液得到果胶组分。沉淀加入 4% KOH(含 0.1% NaBH_4), 并于室温下在 200 r/min 的摇床振荡 8 h 后 12000 r/min 离心 10 min, 取上清液于新的离心管中, 重复 3 次提取(共 24 h, 每次需 8 h), 合并上清液, 上清液即为半纤维素 I 类。沉淀加 24% KOH(含 0.1% NaBH_4)后重复上步提取操作得到半纤维素 II 类组分。最终沉淀为纤维素, 烘干至恒重并称重。得到的不同细胞壁多糖组分保存于 4℃ 冰箱备用。分离得到的 3 种细胞壁多糖组分和纤维素, 经浓硝酸-浓高氯酸(V:V=5:1)消化后, 用 ICP-MS 测定各组分中的铜含量, 每个样品 5 个重复。

1.2.4 侧根透射电镜的观察 参考 Huang 等^[35]的方法, 处理柑橘侧根根尖鲜样。柑橘侧根在装有 3% 戊二醛-1.5% 多聚甲醛固定液的注射器中抽真空, 并于 3% 戊二醛-1.5% 多聚甲醛的固定液中 4℃ 预固定 3 h, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.2)清洗 3 次, 每次间隔 15 min, 在 1% 锇酸-1.5% 亚铁氰化钾的固定

液中固定 2 h, 用蒸馏水清洗 3 次, 每次 15 min, 最后用 30%、50%、70%、80%、90%、95%、100% 的乙醇进行梯度脱水, 每级 15 min, 其中 100% 酒精清洗 3 次, 加丙酮清洗 2 次, 每次间隔 10 min, 加树脂-丙酮(V:V=1:1)的混合液置换 1 次, 在摇床上摇 2 h, 加树脂-丙酮(V:V=3:1)的混合液渗透 1 次, 在摇床上摇 2 h, 取出, 在滤纸上吸去残余丙酮, 加全树脂过夜。取出样品, 将单个样品分开放入含全树脂的 PCR 小管中, 用环氧树脂 618 包埋, 并做好标记, 凝固后用超薄切片机切片, 在日立 HT7700 透射电镜下观察并拍照, 每个样品 4 个重复。

1.2.5 FTIR 分析 参考 Liu 等^[36]的方法, 称取约 2 mg 干燥细胞壁与 200 mg KBr 放入玛瑙研钵中研磨混合均匀后倒入压模中, 在真空条件下得样品薄片, 放入 FTIR 采样器(Thermo Scientific Nicolet iS50, USA)测定红外光谱, 在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 光谱范围内, 分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描累加次数 32 次, 以各吸收峰的位置和吸收率为指标, 构建数据库, 即测得各组样品的原始红外光谱数据。在 OMNIC 8.0 软件上进行自动基线校正和平滑。为了提高谱图的分辨率, 以便减少谱图叠加, 对不同处理选择含有多糖、酰胺和酯等特征信息的 $1800 \sim 800 \text{ cm}^{-1}$ 光谱范围进行精细表征, 每个样品 3 个重复。

1.3 统计分析

采用完全随机进行试验设计, 4 个不同处理组合间采用 2 (柑橘品种) $\times$ 2 (铜处理水平) 双因素方差分析进行差异性检测, 利用 SPSS 16.0 软件(Chicago, USA)进行统计分析, 统计结果表示为平均数 $\pm$ 标准误差。利用 Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, USA) 软件处理透射电镜照片, 并使用 Origin 2018 软件(OriginLab, USA)制图。

2 结果与分析

2.1 过量铜在两个柑橘品种幼苗主根、侧根、茎和叶中的分布

如表 1 所示, 在柑橘幼苗的组织水平上, 不论是对照($\text{Cu } 0.5 \mu\text{mol/L}$)还是过量铜处理($\text{Cu } 300 \mu\text{mol/L}$), 侧根中的铜含量均最高。以含量最低的柑橘主根铜含量(雪柑和沙田柚分别为 4.46 和 $2.34 \mu\text{g/g}$, DW)作为标准(数值为 1), 对照组雪柑和沙田柚主根、侧根、茎和叶的铜含量相对值分别为 1、6.16、2.02、1.49 和 1、8.06、3.37、3.23。相比对照, $300 \mu\text{mol/L}$ 铜处理显著提高了两个柑橘品种幼

苗各部位的铜含量。以含量最低的柑橘叶铜含量(雪柑和沙田柚分别为 29.21 和 34.86 $\mu\text{g/g}$, DW)作为标准(数值为 1), 300 $\mu\text{mol/L}$ 铜处理的雪柑和沙田柚主根、侧根、茎和叶的铜浓度相对值分别为 16.3、190、1.18、1 和 14.7、194、1.26、1。对照组的雪柑和沙田柚侧根铜分布率分别为 57.32% 和 51.31%。300 $\mu\text{mol/L}$ 铜处理的雪柑和沙田柚侧根铜分布率分别提高到 90.87% 和 91.99%。但过量铜处理降低了铜在柑橘茎和叶的分布率。品种间比较结果显示, 铜处理下沙田柚侧根铜含量显著高于雪柑。

2.2 过量铜在两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁、细胞器和可溶性部分的分布

如表 2 所示, 对照组中的柑橘幼苗侧根细胞器铜浓度最高, 细胞壁中铜浓度最低。对照组的雪柑和沙田柚侧根细胞器铜分布率分别为 58.61% 和 39.26%; 300 $\mu\text{mol/L}$ 铜处理显著提高了两个柑橘品种幼苗侧根各亚细胞组分中的铜含量。过量铜处理的柑橘幼苗侧根亚细胞水平上可溶性部分铜浓度最高, 细胞器浓度最低, 过量铜处理的雪柑和沙田柚侧根细胞器的铜分布率分别为 14.34% 和 11.49%。相比对照, 过量铜处理提高了细胞壁和可溶性部分的铜分布率, 但显著降低了细胞器的铜分布率。过量铜处理的沙田柚细胞壁中的铜含量与分布率均显著高于雪柑。

2.3 过量铜在两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁果胶、半纤维素 I、半纤维素 II 和纤维素中的分布

由表 3 可知, 对照和过量铜处理, 铜在细胞壁多糖组分中的分布均为果胶>纤维素>半纤维素 I>半纤维素 II。与对照相比, 过量铜处理柑橘侧根细胞壁多糖组分中的铜含量均显著提高, 果胶铜含量上升尤为显著。对照组的雪柑和沙田柚侧根细胞壁果胶铜分布率分别为 44.69% 和 37.15%; 过量铜处理后, 雪柑和沙田柚侧根铜分布率分别提高到 98.45% 和 98.48%。过量铜处理的雪柑和沙田柚侧根细胞壁果胶铜含量较对照分别提高了 170 和 290 倍。品种间比较发现, 过量铜处理后的沙田柚侧根细胞壁果胶铜含量显著高于雪柑。从铜在柑橘侧根细胞壁多糖组分中的分布率来看, 过量铜处理的半纤维素 I、半纤维素 II 和纤维素中的铜分布率显著降低, 而果胶铜分布率显著提高。过量铜处理的两个柑橘品种侧根细胞壁果胶铜分布率均高于 98%。

2.4 过量铜对两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁的影响

相比对照, 过量铜处理显著提高了两个柑橘品

种幼苗的细胞壁提取率, 且过量铜处理的沙田柚细胞壁提取率显著高于雪柑(图 1)。透射电镜观察表明(图 2), 过量铜处理的雪柑侧根线粒体模糊, 但沙田柚侧根线粒体膜结构清晰可见。相比对照, 过量铜处理的两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁增厚。不论是对照还是过量铜处理, 沙田柚侧根细胞壁厚度均显著高于雪柑(图 3)。

2.5 铜处理的两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁 FTIR 分析

对照和过量铜处理后的雪柑和沙田柚幼苗侧根细胞壁的 FTIR 谱图如图 4 所示。3338 cm^{-1} (No.1) 附近的吸收峰为—OH 和—NH 伸缩振动峰的叠加, 主要来自于根细胞壁中脂肪酸、蛋白质和碳水化合物(果胶、半纤维素、纤维素、多糖), 2921 cm^{-1} (No.2) 附近的吸收峰为甲基 C—H 键的对称伸缩振动, 主要来自于细胞壁中亲水脂分子, 1736 cm^{-1} (No.3) 附近的吸收峰归属为酯化果胶中酯基 C=O 的伸缩振动, 1652 cm^{-1} (No.4) 处的吸收峰为酰胺 I 带 C—N 伸缩, 是细胞壁蛋白质上的特征峰, 1508 cm^{-1} (No.5) 附近的吸收峰为蛋白质上的酰胺 II 带 N—N 弯曲和伸缩特征吸收峰, 1423 cm^{-1} (No.6) 附近的吸收峰归属为果胶质糖醛酸中羧酸根离子 COO⁻的特征吸收峰, 1374 cm^{-1} (No.7) 附近的吸收峰为纤维素中甲基的伸缩振动吸收峰, 1337 cm^{-1} (No.8) 附近的吸收峰对应于纤维素中醇羟基的 C—O 弱吸收峰, 1247 cm^{-1} (No.9) 处对应硫酸盐 C—O—S 或羧基 C—O 或磷酸盐 C—O—P 的特征吸收峰, 1150 cm^{-1} (No.10) 左右为果胶的多糖环结构的 C—C 或 C—O 吸收峰, 1035 cm^{-1} (No.11) 附近的吸收峰主要为纤维素的多糖链 C—C 的特征吸收峰。

参考张虹等^[37]的方法, 以 2921 cm^{-1} 处—CH₃ 中 C—H 的特征吸收峰的吸光度 A_{2921} 为标准值, 计算其它特征峰的吸光值与 A_{2921} 的比值, 通过该比值的大小变化半定量分析过量铜处理的雪柑和沙田柚侧根细胞壁官能团特征峰变化(表 4)。雪柑和沙田柚幼苗经铜处理后, 根细胞壁上的官能团在 No.1 特征峰(—OH/—NH)、No.6 特征峰(羧酸盐 C=O 不对称伸缩振动)和 No.10 特征峰(果胶多糖环结构 C—C 或 C—O)发生了较明显的偏移, 且雪柑主要向高频偏移, 沙田柚主要向低频偏移。另外, 雪柑在 No.4 特征峰(酰胺 I 带 C—N)处向高频偏移了 3 cm^{-1} , 沙田柚在 No.3 特征峰(酯基 C=O)、No.5 特征峰(酰胺 II 带 N—N)及 No.9 特征峰(硫酸盐 C—O—S 或羧

表 1 不同铜处理的两个柑橘品种幼苗主根、侧根、茎和叶中的铜含量与分布率
Table 1 Cu content and distribution ratio in the primary roots, lateral roots, stems and leaves of two citrus species under different Cu concentrations

品种 Species	铜浓度 Cu concentration ($\mu\text{mol/L}$)	铜含量 Cu content ($\mu\text{g/g}$, DW)				铜分布率 Cu distribution ratio (%)			
		主根 Primary roots	侧根 Lateral roots	茎 Stems	叶 Leaves	主根 Primary roots	侧根 Lateral roots	茎 Stems	叶 Leaves
雪柑	0.5	4.46 $\pm$ 0.94 b	27.49 $\pm$ 3.63 c	8.99 $\pm$ 1.71 b	6.64 $\pm$ 0.92 b	9.54 $\pm$ 2.14 a	57.32 $\pm$ 6.17 b	19.01 $\pm$ 3.92 a	14.12 $\pm$ 2.27 b
<i>C. sinensis</i>	300	477.06 $\pm$ 110.67 a	5536.78 $\pm$ 508.86 b	34.58 $\pm$ 3.52 a	29.21 $\pm$ 3.68 a	8.08 $\pm$ 2.11 a	90.87 $\pm$ 2.04 a	0.57 $\pm$ 0.06 b	0.48 $\pm$ 0.05 c
沙田柚	0.5	2.34 $\pm$ 0.26 b	18.86 $\pm$ 1.25 c	7.89 $\pm$ 0.39 b	7.56 $\pm$ 0.64 b	6.45 $\pm$ 0.85 a	51.31 $\pm$ 1.97 b	21.62 $\pm$ 1.42 a	20.63 $\pm$ 1.56 a
<i>C. grandis</i>	300	511.55 $\pm$ 14.88 a	6777.13 $\pm$ 377.93 a	43.96 $\pm$ 8.05 a	34.86 $\pm$ 3.03 a	6.94 $\pm$ 0.38 a	91.99 $\pm$ 0.55 a	0.60 $\pm$ 0.15 b	0.47 $\pm$ 0.05 c

注：表中数值为平均值 $\pm$ 标准误。同列数据后不同字母表示不同处理间差异显著 ($P<0.05$)；铜分布率=(主根或侧根或茎或叶)的铜含量/(主根+侧根+茎+叶)的铜含量 $\times 100\%$ 。

Note: Data indicate $\bar{x} \pm S_x$. Values followed by different letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$). Cu distribution ratio = (Cu content in primary roots or lateral roots or stems or leaves) / (Cu content in primary roots + lateral roots + stems + leaves) $\times 100\%$.

表 2 不同铜处理的两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁、细胞器和可溶性部分的铜含量与铜分布率
Table 2 Cu content and distribution ratio in the cell wall, organelles and soluble fractions of lateral roots of two citrus species under different Cu concentrations

品种 Species	铜浓度 Cu concentration ($\mu\text{mol/L}$)	铜含量 Cu content ($\mu\text{g/g}$, FW)				铜分布率 Cu distribution ratio (%)			
		细胞壁 Cell wall	细胞器 Organelles	可溶性部分 Soluble fractions	细胞壁 Cell wall	细胞器 Organelles	可溶性部分 Soluble fractions	细胞壁 Cell wall	可溶性部分 Soluble fractions
雪柑	0.5	1.50 $\pm$ 0.02 c	6.30 $\pm$ 0.53 b	2.92 $\pm$ 0.13 b	14.10 $\pm$ 1.05 c	58.61 $\pm$ 1.63 a	27.29 $\pm$ 0.65 c		
<i>C. sinensis</i>	300	58.31 $\pm$ 4.28 b	30.94 $\pm$ 5.01 a	126.81 $\pm$ 8.60 a	27.03 $\pm$ 1.73 b	14.34 $\pm$ 2.26 c	58.63 $\pm$ 0.79 a		
沙田柚	0.5	2.27 $\pm$ 0.28 c	3.26 $\pm$ 0.88 b	2.60 $\pm$ 0.23 b	28.36 $\pm$ 4.73 ab	39.26 $\pm$ 8.87 b	32.38 $\pm$ 4.15 c		
<i>C. grandis</i>	300	103.68 $\pm$ 16.47 a	30.84 $\pm$ 1.80 a	133.89 $\pm$ 7.12 a	38.63 $\pm$ 3.13 a	11.49 $\pm$ 0.94 c	49.88 $\pm$ 2.19 b		

注：表中数值为平均值 $\pm$ 标准误。同列数据后不同字母表示不同处理差异显著 ($P<0.05$)；铜分布率=(细胞壁或细胞器或可溶性部分的铜含量/(细胞壁+细胞器+可溶性部分的铜含量 $\times 100\%$))。

Note: Data indicate $\bar{x} \pm S_x$. Values followed by different letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$). Cu distribution ratio = (Cu content in cell wall or organelles or soluble fractions) / (Cu content in cell wall + organelles + soluble fractions) $\times 100\%$.

表 3 不同铜处理的两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁多糖组分中铜含量与铜分布率
Table 3 Cu content and distribution ratio in polysaccharide compositions of lateral roots cell wall of two citrus species under different Cu concentrations

品种 Species	铜浓度 Cu concentration ($\mu\text{mol/L}$)	铜含量 Cu content ($\mu\text{g/g}$, cell wall)				铜分布率 Cu distribution ratio (%)			
		果胶 Pectin	半纤维素 I Hemicellulose I	半纤维素 II Hemicellulose II	纤维素 Cellulose	果胶 Pectin	半纤维素 I Hemicellulose I	半纤维素 II Hemicellulose II	纤维素 Cellulose
雪柑 <i>C. sinensis</i>	0.5	33.06 $\pm$ 1.18 c	13.22 $\pm$ 0.18 c	10.70 $\pm$ 0.69 b	16.97 $\pm$ 0.56 c	44.69 $\pm$ 1.06 b	17.89 $\pm$ 0.27 b	14.46 $\pm$ 0.84 b	22.96 $\pm$ 0.63 b
	300	5666.72 $\pm$ 258.35 b	28.64 $\pm$ 0.79 b	16.46 $\pm$ 1.14 a	43.37 $\pm$ 2.85 b	98.45 $\pm$ 0.10 a	0.50 $\pm$ 0.02 c	0.29 $\pm$ 0.03 c	0.76 $\pm$ 0.06 c
沙田柚 <i>C. grandis</i>	0.5	22.90 $\pm$ 0.95 c	11.89 $\pm$ 0.58 c	9.79 $\pm$ 0.46 b	17.14 $\pm$ 1.02 c	37.15 $\pm$ 0.94 c	19.28 $\pm$ 0.62 a	15.86 $\pm$ 0.36 a	27.72 $\pm$ 0.90 a
	300	6657.07 $\pm$ 333.30 a	37.24 $\pm$ 2.18 a	18.04 $\pm$ 2.11 a	57.45 $\pm$ 4.42 a	98.48 $\pm$ 0.09 a	0.55 $\pm$ 0.02 c	0.27 $\pm$ 0.03 c	0.85 $\pm$ 0.05 c

注: 表中数值为平均值 $\pm$ 标准误差。同列数据后不同字母表示不同处理差异显著 ($P<0.05$); 铜分布率=(果胶或半纤维素 I 或半纤维素 II)的铜含量/(果胶+半纤维素 I +半纤维素 II)的铜含量 $\times 100\%$ 。
Note: Data indicate $\bar{x} \pm S_x$. Values followed by different letters in the same column indicate significant difference among treatments ($P<0.05$). The Cu distribution ratio = (Cu content in pectin or hemicellulose I or hemicellulose II) / (Cu content in pectin + hemicellulose I + hemicellulose II) $\times 100\%$.

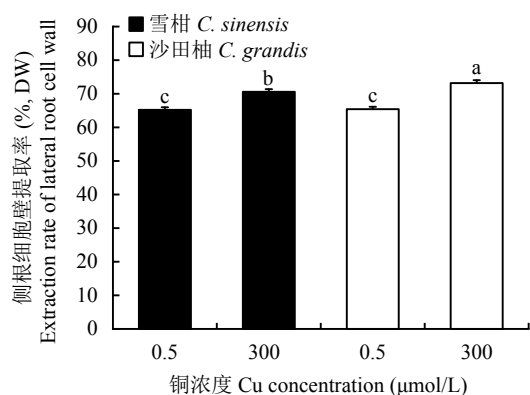


图1 不同铜浓度处理下两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁提取率

Fig. 1 The extraction rate of lateral roots cell wall of two citrus species under different Cu concentrations

注：方柱上不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

基 C—O 或磷酸盐 C—O—P) 处向低频偏移, 表明—OH、果胶、蛋白质、羧酸盐、硫酸盐、磷酸盐及纤维素在一定程度上参与了铜吸附。与对照相比, 过量铜处理后沙田柚 A_{1734}/A_{2921} 高于雪柑 A_{1737}/A_{2921} , 表明过量铜处理的沙田柚根细胞壁中果胶质甲

基酯化程度上升明显; 过量铜处理后, 沙田柚 A_{1653}/A_{2921} 和 A_{1509}/A_{2921} 上升值分别高于雪柑 A_{1655}/A_{2921} 和 A_{1509}/A_{2921} , 表明过量铜处理的沙田柚根细胞壁蛋白质含量升高显著; 与对照相比, 过量铜处理后, 沙田柚 A_{1373}/A_{2921} 和 A_{1244}/A_{2921} 比值升高, 而过量铜处理后雪柑的 A_{1373}/A_{2921} 和 A_{1247}/A_{2921} 比值较对照组降低, 可知过量铜使沙田柚根细胞壁中的纤维素、硫酸盐、羧酸盐及磷酸盐含量增加。过量铜处理后, 相比沙田柚, 雪柑根细胞壁 A_{3293}/A_{2921} 和 A_{1426}/A_{2921} 的比值有明显降低, 意味着其根细胞壁中—OH 和果胶在铜处理下显著减少; 过量铜处理后, 相比沙田柚, 雪柑的 A_{1337}/A_{2921} 、 A_{1156}/A_{2921} 和 A_{1035}/A_{2921} 的比值下降较大, 可能与过量铜处理后的雪柑根细胞壁中主要组分纤维素含量减少有关。

3 讨论

根是植物最早感知根际重金属浓度, 启动胁迫响应最关键的部位^[38]。铜在根中的固定, 减少了其向地上部的装载, 起到保护地上部同化器官的作用。如, Hippler 等^[39]研究表明, 24 μmol/L 铜处理 90 天后的水培甜橙幼苗根中累积的铜占植株吸收铜总量

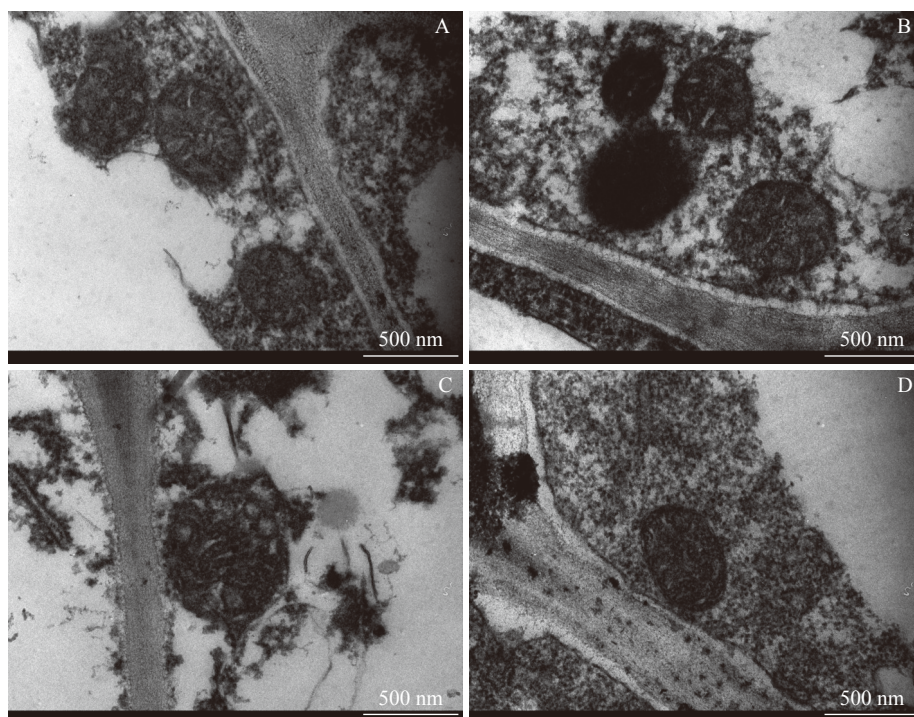


图2 不同铜浓度处理下两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁微观形态

Fig. 2 The micromorphology of lateral roots cell wall of two citrus species under different Cu concentrations

注：A—雪柑, Cu 0.5 μmol/L; B—雪柑, Cu 300 μmol/L; C—沙田柚, Cu 0.5 μmol/L; D—沙田柚, Cu 300 μmol/L。

Note: A—*C. sinensis*, Cu 0.5 μmol/L; B—*C. sinensis*, Cu 300 μmol/L; C—*C. grandis*, Cu 0.5 μmol/L; D—*C. grandis*, Cu 300 μmol/L.

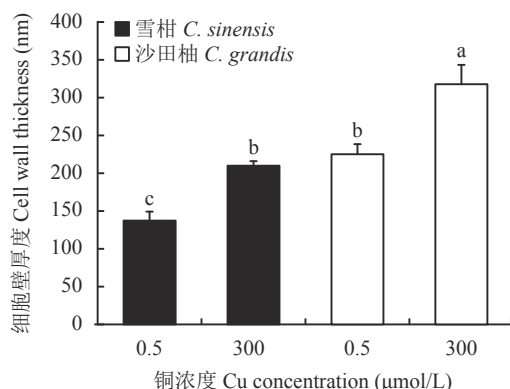


图3 不同铜浓度处理下两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁厚度

Fig. 3 The lateral root cell wall thickness of two citrus species under different Cu concentrations

注: 方柱上不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters above the bars indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).

的 80.0%。本研究结果进一步表明, 根际铜过量时, 柑橘苗侧根是铜主要的累积部位。这与史萍等^[40]在铜处理的牡丹根中的研究结果一致。相比铜处理的主根, 雪柑和沙田柚幼苗侧根的铜浓度分别提高了 10.6 和 13.2 倍。铜处理下, 柑橘苗组织水平上的铜分布特征表现为侧根>主根>茎>叶。相比对照, 过量铜处理显著提高了柑橘幼苗不同组织的铜浓度。300 μmol/L 砂培铜处理的沙田柚侧根铜浓度显著高于雪

柑可能与沙田柚侧根对铜的固定能力较强有关。

亚细胞组分中重金属的分布特征与植物耐性机制有关^[41]。本研究显示, 在亚细胞水平上, 铜主要分布在对照组柑橘幼苗侧根的细胞器组分。过量铜处理下, 细胞器中的铜相对含量显著降低, 但细胞壁和可溶性部分铜含量占比显著提高。这与柑橘铜响应机制有关。当柑橘幼苗根际铜浓度较低时, 铜主要存在于细胞器, 参与细胞代谢反应。当铜浓度过高时, 过量铜主要分布于细胞可溶性部分与细胞壁, 而细胞器铜相对浓度显著降低可以减少过量铜对细胞器的结构损伤和功能破坏。通常认为, 根细胞壁是植物响应重金属胁迫的“第一道屏障”^[42]。例如, 刘婷婷^[43]揭示了水培条件下, 铜浓度为 100 μmol/L 时, 耐铜植物海州香薷根细胞壁铜累积量在亚细胞水平占比高达 68.6%。类似的报道显示, 过量锌处理的栎树、臭椿和银杏根细胞壁中锌的累积量最高可占亚细胞锌含量的 82.6%^[44]。胡萝卜侧根细胞壁是过量铅富集的主要部位^[45]。玉米根细胞壁也是铜^[46]、镉^[47]和钒^[48]等重金属的主要分布区域。不同的是, 过量镉在油菜根中的分布特征表现为细胞液>细胞器>细胞壁^[49]。本研究结果显示, 尽管 300 μmol/L 砂培铜处理都显著提高了两个柑橘品种幼苗根细胞壁和可溶性部分的铜含量, 但相比细胞壁, 可溶性部分结合的铜含量占比更高。这与经铅、镉和锌处理的

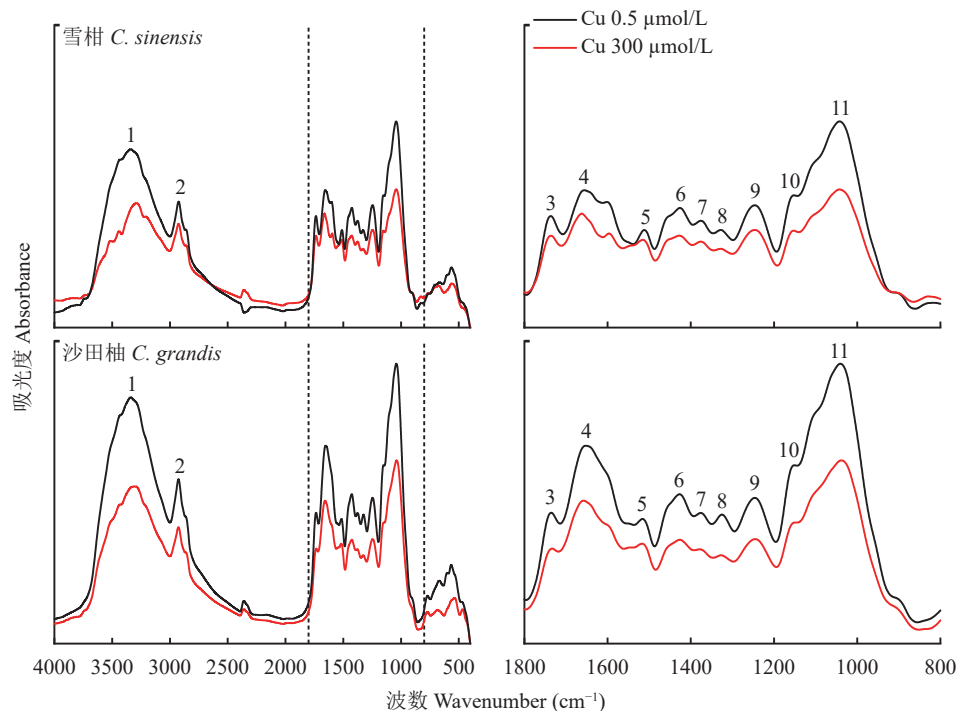


图4 不同铜浓度处理下的两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁红外光谱

Fig. 4 The FTIR spectra of Cu-treated lateral roots cell wall of two citrus species

表 4 不同铜浓度处理下两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁红外光谱特征峰的半定量分析

Table 4 The semi-quantitative analysis of FTIR spectra of Cu-treated lateral roots cell wall of two citrus species

序号 No.	官能团 Functional group	雪柑 <i>C. sinensis</i>				沙田柚 <i>C. grandis</i>			
		Cu 0.5 $\mu\text{mol/L}$		Cu 300 $\mu\text{mol/L}$		Cu 0.5 $\mu\text{mol/L}$		Cu 300 $\mu\text{mol/L}$	
		波数 (cm^{-1}) Wave number	A/A ₂₉₂₁	波数 (cm^{-1}) Wave number	A/A ₂₉₂₁	波数 (cm^{-1}) Wave number	A/A ₂₉₂₁	波数 (cm^{-1}) Wave number	偏移量 Offset (cm^{-1})
1	—OH/—NH	3338	1.40	3293	1.19	3338	1.49	3297	—42
2	—CH ₃	2920	1.00	2921	1.00	2921	1.00	2921	0
3	酯基C=O Ester C=O	1736	0.88	1737	0.89	1737	0.80	1734	—3
4	酰胺I带C—N Amide I band C—N	1652	1.09	1655	1.09	1652	1.20	1653	1
5	酰胺II带N—N Amide II band N—N	1508	0.80	1509	0.86	1512	0.77	1509	—3
6	羧酸盐C=O不对称伸缩振 Carboxylate C=O asymmetric stretching vibration	1423	0.94	1426	0.88	1425	0.91	1422	—3
7	—CH ₃	1374	0.85	1373	0.83	1373	0.80	1373	0
8	醇羟基C—O Alcohol hydroxyl C—O	1337	0.77	1337	0.76	1319	0.78	1319	0
9	硫酸盐C—O—S或羧基C—O或磷酸盐C—O—P Sulfate C—O—S or carboxyl C—O or phosphate C—O—P	1247	0.96	1247	0.93	1246	0.88	1244	—2
10	果胶多糖环结构C—C或C—O Pectin polysaccharide ring structure C—C or C—O	1150	1.03	1156	0.93	1154	1.08	1151	—3
11	O—H弯曲振动或多糖链C—C O—H bending vibration or polysaccharide chain C—C	1035	1.62	1035	1.32	1034	1.70	1033	—1

马缨丹^[41]以及经砷处理的狭叶香蒲^[50]上的研究结果一致。亚细胞可溶性部分富含小分子有机酸以及螯合态蛋白等,可以有效结合并固定铜,通过液泡对过量铜的区隔化作用降低细胞铜损伤^[51]。鉴于细胞可溶性成分种类多,成分杂,有待通过质谱分析与蛋白分离等技术进一步研究。

根细胞壁多糖组分由葡萄糖、阿拉伯糖以及半乳糖醛酸等单糖聚合而成^[52]。半乳糖醛酸富含半乳糖残基,可作为细胞壁阳离子吸附位点^[53]。报道显示,细胞壁各多糖组分的铜结合能力存在差异。例如,任超^[54]报道了铜主要结合于蓖麻根细胞壁的半纤维素上。李芹等^[55]的研究也表明,半纤维素 I 是水稻根细胞壁蓄积镉的主要场所。相反,周冉^[56]和张涵^[57]等分别报道了镉和铝主要结合在植物根细胞壁的果胶上。本研究通过差速离心法分离柑橘幼苗侧根细胞壁多糖组分并分析各多糖组分的铜累积量。铜在柑橘侧根细胞壁多糖组分的累积量表明,果胶是铜在柑橘侧根细胞壁的主要结合位点,其结合的铜浓度占细胞壁铜浓度的百分比高于 98%。

研究表明,不同重金属胁迫对细胞壁厚度的影响并不一致。例如,过量铅^[58]和镉^[59]使小麦根细胞壁变薄。相反,镉毒害引起苔藓^[60]和钩沙菜^[61]细胞壁增厚。本研究发现,过量铜处理的柑橘幼苗根细胞壁厚度显著增加。细胞壁多糖组分富含大量可与金属离子结合的官能团,细胞壁的增厚可结合更多的金属离子,从而降低重金属对植物的毒害。本研究还发现,过量铜处理的两个柑橘品种幼苗侧根细胞壁提取率(图 1)较对照组都显著提高。可见,细胞壁受过量铜影响做出了应激反应,通过增加细胞壁的量以结合更多的铜,对细胞内部进行保护。细胞壁含量提高且厚度增加可能是 Kulikova 等^[62]提出的过量铜引起植物根尖膨大的主要原因。两个柑橘品种比较发现,过量铜处理的沙田柚侧根细胞壁铜含量(表 2)、细胞壁提取率(图 1)与厚度(图 3)都显著高于雪柑。因此,柑橘幼苗侧根细胞壁特性可能是影响两个柑橘品种幼苗铜分布特征与耐铜差异的关键因素。

细胞壁果胶、纤维素和蛋白质等组分对铜具有较高的吸附和固定能力,主要源于羟基、羧基和氨基官能团^[63]。FTIR 谱图是植物细胞壁各主要化学成分的反映,可以根据相应红外光谱吸收峰找到对应的官能团。特征峰吸光度的比值越高,暗示该官能团的含量越高,当官能团参与铜的吸附时,根细胞壁上官能团的特征吸收峰会发生不同程度的位

移和强度的变化,官能团没有参与铜的吸附时,其特征吸收峰的位移不变或变化较小^[42]。在本研究中,两个柑橘品种的特征吸收峰向低频或高频的位移程度表明,果胶、纤维素和蛋白质处的吸光值与 A_{2921} 比值大小变化显著,这与刘思怡等^[64]和曹升等^[65]在茶树上的研究报道类似。

4 结论

相比对照,过量铜处理显著提高了两个柑橘品种幼苗各部位的铜含量。组织水平上,过量铜主要富集在柑橘苗侧根;亚细胞水平上,过量铜主要结合于侧根可溶性部分和细胞壁果胶组分。品种比较表明,过量铜处理的沙田柚侧根铜含量、侧根细胞壁铜含量以及侧根细胞壁果胶铜含量均显著高于雪柑。提高细胞壁含量、增厚细胞壁以及促进细胞壁官能团对铜的吸附可能是沙田柚耐铜性强于雪柑的主要原因。

参 考 文 献:

- [1] 王子诚,陈梦霞,杨毓贤,等.铜胁迫对植物生长发育影响与植物耐铜机制的研究进展[J].*植物营养与肥料学报*,2021,27(10):1849–1863.
Wang Z C, Chen M X, Yang Y X, *et al.* Effects of copper stress on plant growth and advances in the mechanisms of plant tolerance research[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, 27(10): 1849–1863.
- [2] Behlau F, Scandellai L H M, Junior G J D S, *et al.* Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of *Citrus* canker on sweet orange trees[J]. *Crop Protection*, 2017, 94: 185–191.
- [3] 刘春生,史衍玺,马丽,等.过量铜对苹果树生长及代谢的影响[J].*植物营养与肥料学报*,2000,6(4):451–456.
Liu C S, Shi Y X, Ma L, *et al.* Effect of excessive copper on growth and metabolism of apple trees[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2000, 6(4): 451–456.
- [4] Lamichhane J R, Osdaghi E, Behlau F, *et al.* Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture: A review[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2018, 38(3): 1–18.
- [5] Gwak J H, Jung M Y, Hong H, *et al.* Archaeal nitrification is constrained by copper complexation with organic matter in municipal wastewater treatment plants[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(2): 335–346.
- [6] Li Y, Han M Q, Lin F, *et al.* Soil chemical properties, 'Guanximiyou' pummelo leaf mineral nutrient status and fruit quality in the southern region of Fujian Province, China[J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2015, 15(3): 615–628.
- [7] 公勤,康群,王玲,等.重金属铜对植物毒害机理的研究现状及展望[J].*南方农业学报*,2018,49(3):469–475.
Gong Q, Kang Q, Wang L, *et al.* Toxicity mechanism of heavy metal

- copper to plants: A review[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, 49(3): 469–475.
- [8] 郑重禄. 过量铜胁迫对柑橘影响的研究进展(1)[J]. 浙江柑橘, 2018, 35(3): 2–7.
- Zheng Z L. Research progress on effects of excessive copper stress on *Citrus*(1)[J]. *Zhejiang Citrus*, 2018, 35(3): 2–7.
- [9] Vassilios T, Anastasios Z, Chariklia K, *et al.* Environmental implications from long-term *Citrus* cultivation and wide use of Cu fungicides in mediterranean soils[J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2020, 231(5): 218.
- [10] Yan A, Wang Y M, Tan S N, *et al.* Phytoremediation: A promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 359.
- [11] 陈奇, 陈丽梅, 武孔焕, 等. 植物铝胁迫响应基因的研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(5): 858–864.
- Chen Q, Chen L M, Wu K H, *et al.* Research progresses in plant aluminum-responsive genes[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(5): 858–864.
- [12] 刘利, 郝小花, 田连福, 等. 植物吸收、转运和积累镉的机理研究进展[J]. *生命科学研究*, 2015, 19(2): 176–184.
- Liu L, Hao X H, Tian L F, *et al.* Research progress on the mechanism of Cd absorption, transport and accumulation in plant[J]. *Life Science Research*, 2015, 19(2): 176–184.
- [13] Srivastava V, Sarkar A, Singh S, *et al.* Agroecological responses of heavy metal pollution with special emphasis on soil health and plant performances[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2017, 5: 64.
- [14] Klaumann S, Nickolaus S D, Fürst S H, *et al.* The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana*[J]. *New Phytologist*, 2011, 192(2): 393–404.
- [15] Mwamba T M, Li L, Gill R A, *et al.* Differential subcellular distribution and chemical forms of cadmium and copper in *Brassica napus*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 134: 239–249.
- [16] Wan H X, Du J Y, He J L, *et al.* Copper accumulation, subcellular partitioning and physiological and molecular responses in relation to different copper tolerance in apple rootstocks[J]. *Tree Physiology*, 2019, 39(7): 1215–1234.
- [17] 袁梦, 李有芳, 张超博, 等. 柑橘铜胁迫研究进展[J]. *果树学报*, 2018, 35(3): 347–357.
- Yuan M, Li Y F, Zhang C B, *et al.* Review of research on copper stress in *Citrus*[J]. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(3): 347–357.
- [18] 姚廷山, 周彦, 周常勇. 应用铜制剂防治柑橘溃疡病的研究进展[J]. *园艺学报*, 2016, 43(9): 1711–1718.
- Yao T S, Zhou Y, Zhou C Y. Advances in copper resistant mechanisms and control methods of *Citrus* canker[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(9): 1711–1718.
- [19] Ren C, Qi Y B, Huang G Y, *et al.* Contributions of root cell wall polysaccharides to Cu sequestration in castor (*Ricinus communis* L.) exposed to different Cu stresses[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2020, 88: 209–216.
- [20] Yang S, Yi K, Chang M M, *et al.* Sequestration of Mn into the cell wall contributes to Mn tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)[J]. *Plant and Soil*, 2019, 436(1): 475–487.
- [21] Wang Q Y, Liu J S, Hu B. Integration of copper subcellular distribution and chemical forms to understand copper toxicity in apple trees[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2016, 123: 125–131.
- [22] Wang P, Yang B, Wan H B, *et al.* The differences of cell wall in roots between two contrasting soybean cultivars exposed to cadmium at young seedlings[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(29): 29705–29714.
- [23] Krzesłowska M. The cell wall in plant cell response to trace metals: Polysaccharide remodeling and its role in defense strategy[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33(1): 35–51.
- [24] Chen J R, Peng D L, Shafi M, *et al.* Effect of copper toxicity on root morphology, ultrastructure, and copper accumulation in Moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*)[J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2014, 69(9–10): 399–406.
- [25] Mir A R, Pichtel J, Hayat S. Copper: Uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil[J]. *BioMetals*, 2021, 34: 737–759.
- [26] Kang W, Bao J G, Zheng J, *et al.* Distribution and chemical forms of copper in the root cells of castor seedlings and their tolerance to copper phytotoxicity in hydroponic culture[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(10): 7726–7734.
- [27] Huang G Y, Jin Y, Zheng J, *et al.* Accumulation and distribution of copper in castor bean (*Ricinus communis* L.) callus cultures: In vitro[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2017, 128(1): 177–186.
- [28] Wan H X, Yang F Y, Zhuang X L, *et al.* Malus rootstocks affect copper accumulation and tolerance in trees by regulating copper mobility, physiological responses, and gene expression patterns[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 287: 117610.
- [29] 付川, 余顺慧, 黄怡民, 等. 紫花苜蓿对铜胁迫生理响应的傅里叶变换红外光谱法研究[J]. *生态学报*, 2014, 34(5): 1149–1155.
- Fu C, Yu S H, Huang Y M, *et al.* Physiological response of *Medicago sativa* L. to copper stress by FTIR spectroscopy[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(5): 1149–1155.
- [30] 张晓斌, 刘鹏, 李丹婷, 等. 铬诱导植物根细胞壁化学成分变化的 FTIR 表征[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(5): 1067–1070.
- Zhang X B, Liu P, Li D T, *et al.* FTIR spectroscopic characterization of chromium-induced changes in root cell wall of plants[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, 28(5): 1067–1070.
- [31] Li X Y, Lin M L, Hu P P, *et al.* Copper toxicity differentially regulates the seedling growth, copper distribution, and photosynthetic performance of *Citrus sinensis* and *Citrus grandis*[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2021, : 1–12.
- [32] Li Q, Chen H H, Qi Y P, *et al.* Excess copper effects on growth, uptake of water and nutrients, carbohydrates, and PS II photochemistry revealed by OJIP transients in *Citrus* seedlings[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(29): 30188–30205.
- [33] 周丽珍, 罗璇, 何宝燕, 等. NaCl 胁迫下莧菜中镉的亚细胞分布及转运研究[J]. *生态环境学报*, 2015, 24(1): 139–145.
- Zhou L Z, Luo X, He B Y, *et al.* Subcellular distribution and translocation of Cd in amaranth under salinity stress[J]. *Ecology and*

- Environmental Sciences, 2015, 24(1): 139–145.
- [34] Zhong H L, Läuchli A. Changes of cell wall composition and polymer size in primary roots of cotton seedlings under high salinity[J]. Journal of Experimental Botany, 1993, 44(261): 773–778.
- [35] Huang J H, Cai Z J, Wen S X, *et al.* Effects of boron toxicity on root and leaf anatomy in two *Citrus* species differing in boron tolerance[J]. *Trees*, 2014, 28(6): 1653–1666.
- [36] Liu G D, Dong X C, Liu L C, *et al.* Boron deficiency is correlated with changes in cell wall structure that lead to growth defects in the leaves of navel orange plants[J]. *Scientia Horticulturae*, 2014, 176: 54–62.
- [37] 张虹, 罗洁文, 胡华英, 等. 基于细胞壁吸附固定特性的小飞蓬耐Cd机制研究[J]. *农业环境科学学报*, 2019, 38(5): 980–990.
- Zhang H, Luo J W, Hu H Y, *et al.* Cadmium tolerance mechanism of *Conyza canadensis* based on cell wall adsorption and fixation characteristics[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(5): 980–990.
- [38] 李希铭, 宋桂龙. 镉胁迫对紫花苜蓿镉吸收特征及根系形态影响[J]. *草业学报*, 2016, 25(2): 178–186.
- Li X M, Song G L. Cadmium uptake and root morphological changes in *Medicago sativa* under cadmium stress[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(2): 178–186.
- [39] Hippler F W R, Cipriano D O, Boaretto R M, *et al.* *Citrus* rootstocks regulate the nutritional status and antioxidant system of trees under copper stress[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2016, 130: 42–52.
- [40] 史萍, 刘雁丽, 徐迎春, 等. 铜处理对‘凤丹’根系丹皮酚积累与分布的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2012, 35(2): 76–80.
- Shi P, Liu Y L, Xu Y C, *et al.* Effect of copper on accumulation and distribution of paeonol in the roots of *Paeonia suffruticosa* ‘Fengdan’[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2012, 35(2): 76–80.
- [41] 谢倚慧, 张明华, 熊瑞, 等. 马缨丹在镉、铅、锌复合胁迫下的耐性和解毒机制[J]. *生态与农村环境学报*, 2021, 37(9): 1209–1217.
- Xie Y H, Zhang M H, Xiong R, *et al.* Study on the tolerance and detoxification mechanisms of *Lantana camara* under the combined stress of cadmium, lead and zinc[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2021, 37(9): 1209–1217.
- [42] 秦玉莹, 沈奕昕, 陈建军. 不同玉米(*Zea mays* L.)品种根细胞壁对Pb的吸附差异及FTIR表征[J]. *农业资源与环境学报*, 2020, 37(1): 115–122.
- Qin Y Y, Shen Y X, Chen J J. Differences in adsorption of Pb on root cell wall of diverse maize (*Zea mays* L.) cultivars and analysis of FTIR spectra[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2020, 37(1): 115–122.
- [43] 刘婷婷. 细胞壁在海州香薷铜耐性中的作用及解毒机理研究[D]. 浙江杭州: 浙江大学博士学位论文, 2014.
- Liu T T. The role of cell wall in copper tolerance of *Elsholtzia splendens* and their detoxification mechanisms[D]. Hangzhou, Zhejiang: PhD Dissertation of Zhejiang University, 2014.
- [44] 唐敏, 张欣, 谭欣蕊, 等. 锌在3种乔木中的积累及其亚细胞分布和化学形态[J]. *应用生态学报*, 2021, 41(6): 2440–2447.
- Tang M, Zhang X, Tan X R, *et al.* Accumulation, subcellular distribution and chemical forms of zinc in three tree species[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2021, 41(6): 2440–2447.
- [45] Wang Y, Shen H, Xu L, *et al.* Transport, ultrastructural localization, and distribution of chemical forms of lead in radish (*Raphanus sativus* L.)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 293.
- [46] 司江英, 赵海涛, 汪晓丽, 等. 不同铜水平下玉米细胞内铜的分布和化学形态的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(2): 452–456.
- Si J Y, Zhao H T, Wang X L, *et al.* Effects of different copper levels on subcellular distribution and chemical forms of copper in maize cells[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(2): 452–456.
- [47] Zhang X F, Hu Z H, Yan T X, *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate Cd phytotoxicity by altering Cd subcellular distribution and chemical forms in *Zea mays*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 171: 352–360.
- [48] 侯明, 霍岩, 张志专, 等. 土壤外源钒施加对玉米中钒积累、亚细胞分布和非蛋白巯基含量的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(5): 964–972.
- Hou M, Huo Y, Zhang Z Z, *et al.* Effects of exogenous vanadium stress on vanadium accumulation and subcellular distribution, and non-protein thiol content in maize (*Zea mays* L.) crops[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(5): 964–972.
- [49] 朱秀红, 韩晓雪, 温道远, 等. 镉胁迫对油菜亚细胞镉分布和镉化学形态的影响[J]. *北方园艺*, 2020, (10): 1–9.
- Zhu X H, Han X X, Wen D Y, *et al.* Influence of cadmium on the subcellular fractions and chemical forms of *Brassica napus* L.[J]. *Northern Horticulture*, 2020, (10): 1–9.
- [50] 张晋龙, 黄颖, 吴丽芳, 等. 砷胁迫对狭叶香蒲生理生态及砷亚细胞分布的影响[J]. *生态环境学报*, 2021, 30(5): 1042–1050.
- Zhang J L, Huang Y, Wu L F, *et al.* As subcellular distribution and physiological response of *Typha angustifolia* L. to As exposure[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2021, 30(5): 1042–1050.
- [51] Yang G Z, Fu S, Huang J J, *et al.* The tonoplast-localized transporter OsABCC9 is involved in cadmium tolerance and accumulation in rice[J]. *Plant Science*, 2021, 307: 110894.
- [52] 郑绍建. 细胞壁在植物抗营养逆境中的作用及其分子生理机制[J]. *中国科学(生命科学)*, 2014, 44(4): 334–341.
- Zheng S J. The role of cell wall in plant resistance to nutritional stresses and the underlying physiological and molecular mechanisms[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2014, 44(4): 334–341.
- [53] 刘亚林. 硼钙缺乏及外源L-纳米天冬氨酸钙对枳壳砧木根系生长影响的初步机制[D]. 湖北武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2020.
- Liu Y L. The preliminary mechanism of the effect of boron and calcium deficiency and exogenous calcium L-aspartate nanoparticles on the root growth of *Trifoliate orange*[D]. Wuhan, Hubei: MS Thesis of Huazhong Agricultural University, 2020.
- [54] 任超. 硫对铜污染土壤中蓖麻铜耐性的影响及机制[D]. 湖北武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2019.
- Ren C. Effects and mechanism of sulfur on castor tolerance to copper in contaminated soils[D]. Wuhan, Hubei: PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2019.
- [55] 李芹, 张曼, 张锡洲, 等. 水稻镉安全材料分蘖期根部镉积累分布特征[J]. *植物营养与肥料学报*, 2019, 25(3): 443–452.

- Li Q, Zhang M, Zhang X Z, *et al.* Accumulation and distribution characteristics of Cd in roots of cadmium-safe rice line at tillering stage[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2019, 25(3): 443–452.
- [56] 周冉. 番茄细胞壁果胶累积重金属Cd机制研究[D]. 陕西杨凌: 陕西科技大学硕士学位论文, 2018.
- Zhou R. Study of mechanism for cadmium accumulation by pectin in tomato cell wall[D]. Xi'an, Shaanxi: MS Thesis of Shaanxi University of Science and Technology, 2018.
- [57] 张涵. 柑橘耐铝光合响应及根细胞壁铝吸附机制研究[D]. 福建福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2020.
- Zhang H. A study on photosynthetic responses to aluminum adsorption by root cell wall of *Citrus* species[D]. Fuzhou, Fujian: MS Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2020.
- [58] Kaur G, Singh H P, Batish D R, *et al.* Lead (Pb)-induced biochemical and ultrastructural changes in wheat (*Triticum aestivum*) roots[J]. *Protoplasma*, 2013, 250(1): 53–62.
- [59] 肖昕. 重金属复合污染对小麦的毒理效应及其微观机制[D]. 北京: 中国矿业大学博士学位论文, 2009.
- Xiao X. Toxicological effects and micromechanism of heavy metals pollution on wheat[D]. Beijing: PhD Dissertation of China University of Mining and Technology, 2009.
- [60] 陈璇, 刘祥龙, 唐婷. 苔藓植物响应重金属胁迫的研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(10): 191–199.
- Chen X, Liu X L, Tang T. Advances of bryophytes in response to heavy metal stress[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(10): 191–199.
- [61] Bouzon Z L, Ferreira E C, Dos Santos R, *et al.* Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypnea musciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro[J]. *Protoplasma*, 2012, 249(3): 637–650.
- [62] Kulikova A L, Kuznetsova N A, Kholodova V P. Effect of copper excess in environment on soybean root viability and morphology[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2011, 58(5): 836–843.
- [63] 李芹. 水稻Cd安全材料根细胞壁Cd固持机理研究[D]. 四川成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2019.
- Li Q. Mechanisms of cadmium retention in the root cell wall of a cadmium-safe rice line (*Oryza sativa* L.) [D]. Chengdu, Sichuan: MS Thesis of Sichuan Agricultural University, 2019.
- [64] 刘思怡, 朱晓静, 房峰祥, 等. 茶叶叶片氟亚细胞分布及其与细胞壁结合特性的研究[J]. *茶叶科学*, 2018, 38(3): 305–312.
- Liu S Y, Zhu X J, Fang F X, *et al.* Fluorine subcellular distribution and its combining characteristics with cell wall in tea leaves (*Camellia sinensis*) [J]. *Journal of Tea Science*, 2018, 38(3): 305–312.
- [65] 曹升, 罗洁文, 胡华英, 等. 类芦根细胞壁对铅的吸附固定机制[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(3): 496–503.
- Cao S, Luo J W, Hu H Y, *et al.* Lead adsorption and fixation mechanisms in root cell walls of *Neyraudia reynaudiana* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(3): 496–503.