

分类号\_\_\_\_\_

密级\_\_\_\_\_

U D C\_\_\_\_\_

编号\_\_\_\_\_

# 中国科学院地球化学研究所 博士后研究工作报告

## 重金属镉污染水体生物修复及机制研究

合作导师： 冯新斌 研究员

博 士 后： 杨贵利

工作起止日期： 2022年01月-2023年11月

报告提交日期： 2023年11月

中国科学院地球化学研究所

2023年11月

# 重金属镉污染水体生物修复及机制研究

Study on bioremediation and mechanism of  
cadmium polluted water body

合作导师:	冯新斌 研究员
博士后姓名:	杨贵利
流动站(一级学科)名称:	环境科学与工程
专业(二级学科)名称:	环境科学

研究工作起始时间: 2022 年 01 月 21 日

研究工作期满时间: 2023 年 11 月 21 日

中国科学院地球化学研究所

环境地球化学国家重点实验室

## 原创性声明

本人声明所提交的博士后研究报告是在合作导师的指导下独立完成的。报告中取得的研究成果除加以标注的地方外，不包含其他人已经发表的研究成果，也不包含本人为获得其他学位而使用过的成果。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中进行了说明并表示谢意。本声明的法律后果由本人承担。

签名：\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

## 关于博士后出站报告使用授权说明

本人完全了解中国科学院地球化学研究所有关保留、使用博士后出站报告的规定，即中国科学院地球化学研究所有权保留送交博士后出站报告的复印件，允许博士后研究报告被查阅和借阅；中国科学院地球化学研究所可以公布博士后研究报告的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存研究报告。

公开 保密(\_\_\_\_年)(保密的论文在解密后应遵守此规定)

博士后签名：\_\_\_\_\_

合作导师签名：\_\_\_\_\_

日期：\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

## 摘要

随着工农业的发展,大量重金属污染水体产生,给环境和人体健康带来了极大的危害。其中,水体重金属镉(Cadium, Cd)污染已成为当今世界上最严重的生态环境问题之一。如何采用科学有效的生态修复方法,解决重金属 Cd 污染问题也逐渐引起环境科学和生态学研究工作者的关注。植物修复技术以其安全、廉价等众多优点已成为治理重金属污染的有效手段,而高等植物对重金属的耐性与富集性,也成为污染生态学研究的热点。但以往研究多集中于超富集陆生植物对土壤 Cd 的吸收、转运与解毒机制,有关 Cd 在水生植物体内存储过程的主控因子仍不清楚。本研究采用战略性能源植物浮萍为实验材料,综合运用金属组分与形态分析、高通量测序、基因工程等实验技术,重点研究浮萍调控重金属 Cd 超富集的分子机制。主要得到以下研究结果:

1. 利用高通量筛选方法获得了 Cd 富集含量近 2 835 mg/kg 的植物材料,远高于 Cd 超富集植物的标准。在极低 Cd 浓度条件下进行验证,也发现该材料依然具有非常高的生物富集系数,证明该材料是主动富集而非被动吸收。测定该材料在 Cd 超富集过程中的生理指标,发现 Cd 对植物的生长有不良影响主要表现为根系缩短。随着 Cd 胁迫时间的增加,Cd 从根系向叶片转移,并且在细胞器中的比例也逐渐增加。通过植物体内 Cd 形态的测定,证实植物体内 Cd 会以低毒复合物的形式与蛋白质结合。测定该植物在 Cd 胁迫条件下抗氧化系统以及根际微生物群落结构,初步从生理生化层面解释该材料富集 Cd 的原因。

2. 通过对两个 Cd 富集表型上呈现极端现象的植物材料响应 Cd 胁迫的规律研究,确定植物材料响应 Cd 胁迫的关键时间点。以此为基础进行了转录组测序,结合基础生理生化数据,发现超富集材料的谷胱甘肽代谢途径差异表达明显,其中 *GST* 基因家族作为谷胱甘肽巯基转移酶基因表达明显上调。通过数据库比对确定该材料共有 17 条 *GST* 基因序列,其中 4 个 *GST* 基因在 Cd 胁迫后表达显著上调。实时荧光定量 PCR 确定其中 3 个 *GST* 基因的表达受到 Cd 胁迫的强烈诱导,GST 酶活力测定结果的也证实了 Cd 胁迫下 *GST* 基因的上调和酶活性增强。

3. 以转录组数据为参考,设计引物成功克隆出一个 *GST* 基因,并构建原核表达载体进行原核表达分析。转基因微生物在 Cd 胁迫平板上形成菌落更多,生长得更好。并在转基因微生物体内检测到 GST 蛋白的表达,且在 Cd 胁迫下蛋白表达量进一步提高。对 Cd 的去除率也显著高于对照菌,说明 *GST* 基因可能与增

强 Cd 耐受性有关，从而提升去除率。同时，通过构建 GST-GFP 载体，瞬时转化烟草，检测到融合蛋白主要表达于细胞质、细胞核周围。

4. 针对 Cd 超富集植物材料，成功实现材料的组织培养，并且建立了愈伤组遗传转化体系，GUS 染色证明转化成功。将克隆的 *GST* 基因构建到单子叶植物表达载体，通过侵染愈伤组织，筛选，叶状体再生，PCR 验证等实验，确认 *GST* 基因成功转入了植物体内，初步发现转基因植物的生长在 Cd 胁迫条件下受到的影响更小。

5. 对 Cd 处理前后浮萍内生微生物群落结构进行了分析，发现 Cd 胁迫确实影响植物内生微生物结构，并且通过相关分析得出 Cd 胁迫条件下植物的优势微生物类群。通过微生物优化培养和富集培养，成功分离出 22 株内生微生物，并通过生理生化指标的测定，获得了一株耐高浓度 Cd，且促进植物生长的内生菌，为内生菌-植物联合修复环境 Cd 污染提供菌种资源

6. 为探究 Cd 超富集植物后续资源化利用研究，测定了 Cd 胁迫后浮萍的淀粉含量，发现淀粉作为一种储能物质，在胁迫含量明显增加。并且，通过生物质发酵获得生物乙醇，初步证实浮萍在富集 Cd 后可作为能源原料，为基因工程改造获得 Cd 富集能力和淀粉产量都高的修复材料提供可能。

综上，本研究结果为深入揭示水生植物超积累 Cd 的生理生化与分子机制，为利用浮萍进行水体重金属污染修复提供依据，对生物技术手段修复污染水体的应用具有重要意义。

**关键词：**植物修复技术；Cd 污染；*GST* 基因；植物内生菌；淀粉

## ABSTRACT

With the development of industry and agriculture, a large number of heavy metals have polluted water bodies, which has brought great harm to the environment and human health. Among them, water heavy metal Cd pollution has become one of the most serious ecological and environmental problems in the world. How to adopt scientific and effective ecological restoration methods to solve the problem of heavy metal Cd pollution has gradually attracted the attention of environmental science and ecology researchers. Phytoremediation technology has become an effective means to control heavy metal pollution due to its many advantages such as safety and low cost, and the tolerance and enrichment of higher plants to heavy metals have also become a hot spot in pollution ecology research. However, previous studies focused on the absorption, transport and detoxification mechanisms of soil Cd in hyperenriched terrestrial plants, and the controlling factors of Cd storage process in aquatic plants remained unclear. In this study, duckweed, a strategic energy plant, was used as the experimental material, and the molecular mechanism of duckweed regulation of heavy metal Cd superenrichment was studied by comprehensive application of metal composition and morphology analysis, high-throughput sequencing, genetic engineering and other experimental techniques. The main results are as follows:

1. A plant material with a Cd enrichment content of 2 835 mg/kg, was obtained by high-throughput screening method, which was much higher than the standard of Cd hyperenrichment plants. It is also found that the material still has a very high bioenrichment coefficient under very low Cd concentration conditions, which proves that the material is actively enriched rather than passively absorbed. The physiological indexes of the material in the process of Cd super-enrichment were determined. It was found that Cd had adverse effects on plant growth, mainly manifested as shortening of root system. With the increase of stress time, Cd was transferred from roots to leaves, and the proportion of Cd in organelles also increased gradually. Through the determination of Cd form in plants, it was confirmed that Cd in plants binds to proteins in the form of low toxic complex. The antioxidant system and rhizosphere microbial

community structure of the plant under Cd stress were determined, and the reason of Cd enrichment was explained from the physiological and biochemical level.

2. The key time points of plant materials' response to Cd stress were determined by studying the regularity of response to Cd stress of two plant materials with extreme Cd enrichment phenotypes. Then, transcriptome sequencing was conducted, and combined with basic physiological and biochemical data, it was found that the glutathione metabolic pathways of the hyperenriched materials were significantly differentially expressed, and the *GST* gene family as glutathione mercaptotransferase genes were significantly up-regulated. A total of 17 *GST* gene sequences were determined by database comparison, among which 4 *GST* genes were significantly up-regulated after Cd stress. Real-time fluorescence quantitative PCR confirmed that the expression of three *GST* genes was strongly induced by Cd stress. The results of GST enzyme activity determination also confirmed the up-regulation of *GST* gene and the enhancement of enzyme activity under Cd stress.

3. Based on transcriptome data, a *GST* gene was successfully cloned by designing primers, and a prokaryotic expression vector was constructed for prokaryotic expression analysis. Transgenic microorganisms formed more colonies and grew better on Cd stressed plates. The expression of GST protein was detected in transgenic microorganisms, and the expression of GST protein was further increased under Cd stress. The removal rate of Cd was also significantly higher than that of the control bacteria, indicating that *GST* gene may be related to enhancing Cd tolerance, thereby increasing the removal rate. At the same time, by constructing GST-GFP vector, tobacco was transformed instantaneously, and it was detected that the fusion protein was mainly expressed in cytoplasm and around the nucleus.

4. For Cd hyper-enriched plant materials, tissue culture of the materials was successfully realized, and the genetic transformation system of callus group was established, and GUS staining proved that the transformation was successful. Cloned *GST* gene was constructed into monocotyledonous plant expression vector, and the successful transfer of *GST* gene into plants was confirmed through callus infection, screening, thalloid regeneration and PCR verification. It was initially found that the

growth of transgenic plants was less affected under Cd stress.

5. The endophytic microbial community structure of plant was analyzed before and after Cd treatment, and it was found that the Cd did affect the endophytic microbial structure, and the dominant microbial groups of plants under Cd stress were obtained through correlation analysis. Through microbial optimization and enrichment culture, 22 strains of endophytic microorganisms were successfully isolated, and an endophytic bacterium that was resistant to high concentration Cd and promoted the growth of duckweed was obtained through the determination of physiological and biochemical indexes, which provided a strain resource for the endophyt-plant joint remediation of environmental Cd pollution

6. In order to explore the subsequent resource utilization of Cd hyperenriched plants, the starch content of duckweed was measured after Cd stress, and it was found that starch, as an energy storage substance, significantly increased the stress content. In addition, bioethanol was obtained by biomass fermentation, and it was preliminarily confirmed that duckweed can be used as energy raw material after Cd enrichment, which provides a possibility for genetic engineering to obtain repair materials with high Cd enrichment ability and high starch yield.

In summary, the results of this study provide a basis for the remediation of heavy metal pollution in water by duckweed, and are of great significance for the application of biotechnology to remediation of polluted water.

**Key words:** Phytoremediation, cadmium pollution, *GST* gene, endophyte



# 目录

<b>摘要</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>第一章 前言</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 选题背景</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 重金属 Cd 污染的严重危害和修复手段 .....	5
1.1.2 浮萍植物超富集重金属 Cd 的研究现状 .....	6
1.1.3 植物超富集重金属 Cd 的机制研究现状 .....	7
1.1.4 浮萍植物积累能源原料淀粉的研究 .....	10
<b>1.2. 研究目的及意义</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3. 技术路线</b> .....	<b>12</b>
<b>第二章 材料与方</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 实验材料</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 植株消毒 .....	13
2.1.2 材料鉴定 .....	13
2.1.3 模式材料 .....	13
2.1.4 菌种材料 .....	13
<b>2.2 实验试剂</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 实验试剂 .....	13
2.2.2 培养基质 .....	14
<b>2.3 实验仪器</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4 实验方法</b> .....	<b>15</b>
2.4.1 Cd 超富集植物的筛选和富集效应 .....	15
2.4.2 Cd 在植物体内的分布及储存形态 .....	16
2.4.3 转录组测序与基因克隆 .....	16
2.4.4 基因原核表达实验 .....	18
2.4.5 浮萍植物的稳定遗传转化 .....	19

2.4.6 过表达目的基因验证和检测.....	20
2.4.7 Cd 超富集植物内生菌分离和互作.....	21
2.4.8 生理生化指标的测定和分析.....	22
<b>2.5 数据分析.....</b>	<b>24</b>
<b>第三章 Cd 超富集植物材料筛选和生理响应分析 .....</b>	<b>25</b>
3.1 超富集植物筛选结果.....	25
3.2 超富集植物 Cd 胁迫生理响应及富集情况.....	26
3.3 Cd 在植物不同组织中的分布情况研究.....	30
3.4. Cd 在植物不同亚细胞分布情况研究.....	31
3.5 Cd 在植物体内的赋存形态研究.....	32
3.6 Cd 对植物叶片超微结构的影响.....	33
3.7 Cd 对植物根际微生物群落的影响.....	34
3.8 总结.....	36
<b>第四章 Cd 超富集植物转录分析和关键基因挖掘 .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Cd 胁迫 HCD 和 LCD 植物的生理响应比较.....</b>	<b>37</b>
4.1.1 Cd 对 HCD 和 LCD 植物生长的影响 .....	37
4.1.2 Cd 对 HCD 和 LCD Cd 含量及去除率的影响.....	38
4.1.3 Cd 对 HCD 和 LCD 抗氧化酶和谷胱甘肽巯基转移酶的影响 .....	39
<b>4.2 浮萍转录组测序和分析 .....</b>	<b>40</b>
4.2.1 Cd 胁迫下的转录组测序结果.....	40
4.2.2 Cd 胁迫下差异表达基因的鉴定.....	42
4.2.3 Unigenes 和 DEGs 的功能注释.....	43
4.2.4 Cd 胁迫下功能富集基因分析.....	44
4.2.5 Cd 胁迫下淀粉和细胞壁代谢途径响应.....	44
4.2.6 Cd 胁迫下的硫和谷胱甘肽代谢影响.....	44
4.2.7 Cd 胁迫下活性氧代谢响应.....	44
4.2.8 其他关键基因参与 Cd 的耐受.....	46

4.2.9 DNA 修复对 Cd 胁迫的响应 .....	46
4.2.10 RNA 和蛋白质相关生物学过程响应 .....	46
<b>4.3 浮萍转录组 GST 基因的筛选</b> .....	<b>47</b>
4.3.1 浮萍转录组 <i>LmGST</i> 生物信息学分析 .....	48
4.3.2 浮萍转录组上调的 <i>LmGST</i> 表达分析 .....	49
<b>4.4 总结</b> .....	<b>49</b>
<b>第五章 植物超富集 Cd 关键基因验证及遗传转化</b> .....	<b>51</b>
5.1 <i>LmGST</i> 基因的克隆和定量分析 .....	51
5.2 <i>LmGST</i> 基因的原核表达分析 .....	52
5.3 <i>LmGST</i> 基因的亚细胞定位分析 .....	53
5.4 浮萍稳定遗传转化体系的建立 .....	53
5.5 小结.....	54
<b>第六章 过表达 <i>LmGST</i> 对 Cd 胁迫下植物的影响</b> .....	<b>56</b>
6.1 过表达 <i>LmGST</i> 对 Cd 胁迫下植物根长的影响 .....	56
6.2 过表达 <i>LmGST</i> 对 Cd 胁迫下植物生长速率的影响 .....	57
6.3 过表达 <i>LmGST</i> 对 Cd 胁迫下植物叶绿素含量的影响 .....	58
6.4 过表达 <i>LmGST</i> 对 Cd 胁迫下植物抗氧化酶活性的影响 .....	58
6.5 过表达 <i>LmGST</i> 对 Cd 胁迫下植物富集量和去除率的影响 .....	59
6.6 小结.....	60
<b>第七章 Cd 超富集植物内生菌分离和互作机制</b> .....	<b>62</b>
<b>7.1 Cd 对植物内生细菌的影响</b> .....	<b>62</b>
7.1.1 高通量测序结果.....	62
7.1.2 Cd 处理下植物微生物群落多样性分析 .....	62
7.1.3 Cd 处理下微生物群落 OTUs 分布 .....	63
7.1.4 Cd 处理下微生物群落组成结构.....	64
7.1.5 Cd 处理对植物微生物群落结构的影响.....	64
7.1.6 Cd 处理植物中微生物的网络分析 .....	64

<b>7.2 植物内生细菌的分离与鉴定</b> .....	65
7.2.1 内生细菌生长受 Cd 胁迫的影响 .....	66
7.2.2 内生细菌对浮萍生长指标的影响 .....	66
7.2.3 内生细菌 16S rDNA 序列分析 .....	66
7.2.4 内生细菌培养条件优化 .....	67
<b>7.3 内生菌定殖对植物的影响</b> .....	68
7.3.1 内生菌定殖对植物生长速率的影响 .....	68
7.3.2 内生菌定殖对植物叶绿素含量的影响 .....	69
7.3.3 内生菌定殖对植物 Cd 去除率的影响 .....	70
<b>7.4 内生菌基因组测序与分析</b> .....	71
7.4.1 内生菌全基因组概况 .....	71
7.4.2 内生菌全基因组信息分析 .....	71
<b>7.4 小结</b> .....	73
<b>第八章 Cd 超富集植物的后续资源化利用研究</b> .....	74
8.1 Cd 超富集植物的水体 Cd 去除率 .....	74
8.2 Cd 超富集植物的淀粉积累能力 .....	75
8.3 Cd 超富集植物的乙醇发酵能力 .....	75
8.4 小结 .....	76
<b>第九章 结论与展望</b> .....	77
<b>参考文献</b> .....	78
<b>作者简历及博士后期间研究成果</b> .....	83
<b>致谢</b> .....	85

## 第一章 前言

### 1.1 选题背景

#### 1.1.1 重金属 Cd 污染的严重危害和修复手段

Cd(Cadmium, Cd)是一种剧毒的重金属,严重影响植物和动物的健康(Huff et al., 2007)。随着全球经济的快速发展, Cd 被广泛应用在电镀工业、化工业、电子业、核工业等领域,相当数量的 Cd 通过废气、废水、废渣进入自然环境中,导致了水生系统中重金属 Cd 的扩散污染(Dong et al., 2013)。进入 21 世纪以来,我国也相继发生了几次重大突发水体 Cd 污染事件,给当地人们的生产生活和身体健康带来了非常不利的影响(Wang et al., 2011)。水系统中的 Cd,可以通过饮用受 Cd 污染的水或摄入由 Cd 污染水体灌溉的大米或蔬菜(Song et al., 2023),由消化道进入人和动物体内,对人和动物的肾脏、肝脏、骨骼、生殖系统或免疫系统产生严重的损害(Godt et al., 2006)。因此,高效、经济地修复 Cd 污染水体,是保障水资源安全的必行之举。针对传统重金属水体修复技术存在费用高等问题,一种新的环保技术,即利用植物来处理污染物的植物修复技术逐渐受到广泛关注(Ali et al., 2013; Yang et al., 2023)。

浮萍,被称为“最简单最小的开花植物”,具有广泛的气候适应性。与其它植物相比,利用浮萍进行污水生物修复的优势在于: □浮萍主要采用无性繁殖的方式产生子代,生长速度快,周期短,大约 2 至 3 天繁殖一代(Oron, 1994; Ma et al., 2023); □整体结构简单,大部分浮萍仅由叶状体和根组成,并且叶状体和根能够吸收水体中的各种元素,避免了离子的长距离运输,从而提高了离子的转运效率(Olah, et al., 2015; Wang et al., 2023); □浮萍分布广泛,对自然环境的适应能力较强(Zhao et al., 2012); □建立了完善的浮萍遗传转化转基因体系(Yang et al., 2018),浮萍基因组测序也已经完成(Van Hoeck et al., 2015; Wang et al., 2014),这为浮萍品种的定向改良提供了坚实的技术支持; □其生长方式和无性繁殖的增殖方式,对污水治理过程中前期的育种扩繁、中期的污染物富集以及后期的收集处理带来了极大的便利,降低了运行成本,还可以有效地防止由物种种子扩散所引发的生态安全问题(Ekperusi et al., 2019); ⑥浮萍作为新一代新型能源植物,在净化污水的同时还能够积累大量淀粉,且浮萍纤维和木质素含量低,这使浮萍生物质可以更有效地向乙醇转化(Su et al., 2014),成为生产生物乙醇的理想原料(Cheng and Stomp., 2009),有效提高污水净化产生的经济效益。因此,浮萍有望打造成为能源和环境修复兼备的复合型资源植物,具有重要的理论价值和现实意义。

### 1.1.2 浮萍植物超富集重金属 Cd 的研究现状

浮萍科包括 5 个属，共有 36 个种(图 1.1)，分别为绿萍属(*Lemna*)、多根紫萍属(*Spirodela*)、少根紫萍属(*Landoltia*)、芜萍属(*Wolffia*)和扁平无根萍属(*Wolffiella*)，其中我国分布有 4 个属 8 个种(杨晶晶 et al., 2021)。浮萍通常采用无性繁殖的方式进行生长，在母体的分生区长出子叶。浮萍的生长速度极快，在营养充足的情况下呈现指数级增长，仅 1~2 d 即可实现生物量翻倍，年产量可达 17.6 t·hm<sup>-2</sup> (Yang et al., 2021)。浮萍是世界上最小的开花植物，整个植株只有几毫米到几十毫米。整个植株的形态退化严重，只有叶状体和根两部分组成，所以重金属离子的转运效率高，吸收重金属后无需经过长距离转运即可储存在叶状体中。浮萍具有很强的环境适应能力，在温度 2~35 °C、pH4.5~7.2 的条件下都能生存(冯丹 et al., 2022)。近年来，浮萍已逐渐作为毒性指示剂和生物质原料进行开发应用，也被应用于重金属污染修复、有机物污染修复等领域(Yang et al., 2021)。其中，已有研究证明浮萍能大量富集水中的 Cu、Cd 和 Pb 等重金属，具有极大应用潜力(Ekperusi et al., 2023; Lee et al., 2023)。

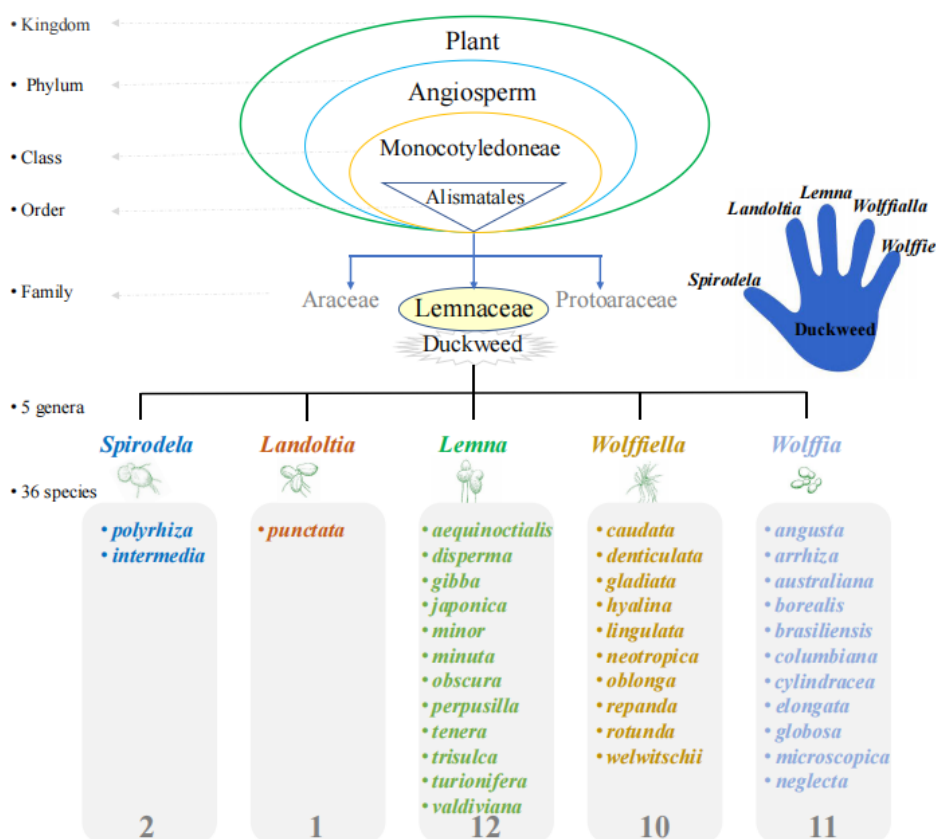


图 1.1 浮萍科植物家族

根据 Cd 超富集植物的定义,凡是能够吸收并富集超过  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (干重) Cd 且生物富集系数(Bioconcentration factor, BCF)超过 1 的植物都可称为 Cd 超富集植物(Liu et al., 2019)。已有证据表明浮萍的 Cd 富集量超过  $1200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , BCF 大于 120, 是一种理想的 Cd 超富集植物(郑萌盟 et al., 2022), 在修复水体 Cd 污染方面具有极大应用前景。然而,目前有关浮萍在重金属耐受和富集方面的研究主要集中在少数品种上,研究的结论也差异很大,缺乏高通量系统的研究(Khan et al., 2020; Wang et al., 2021)。多根紫萍对 Cd 胁迫非常敏感,在  $1 \mu\text{mol/L CdCl}_2$  胁迫 7 d 后相对生长速率和光合色素含量显著降低,被认为是一种具有开发应用价值的重金属指示剂(Chen et al., 2020)。少根紫萍在  $3 \text{ mg/L CdCl}_2$  下处理 10 d, 对 Cd 的吸收率、去除率以及富集系数可分别达到为 66.74%、72.43%和 770, 具有明显的高富集优势(唐利萍 et al., 2015)。绿萍对废水中的 Cd、Cu、Pb 和 Ni 具有修复潜力,计算了去除率、金属吸收率,结果显示绿萍对所有金属的去除率均大于 80% (Huma et al., 2016)。此外,现已有大量研究证明不同种属的浮萍在 Cd 污染水体中的应用前景(王兴利 et al., 2020; Chen et al., 2023; Ekta et al., 2019; Rai, 2019; Smain et al., 2009; Yang et al., 2023)。由此可见,不同种属的浮萍对 Cd 的富集能力由于其多样性不同、Cd 浓度不同和处理时长不同存在较大的差异。因此,研究不同种属浮萍对 Cd 的吸收富集能力差异并筛选出最优品种对将浮萍应用于植物修复技术具有现实意义。

### 1.1.3 植物超富集重金属 Cd 的机制研究现状

超富集植物具有复杂的 Cd 耐受、解毒和富集机制。Cd 进入植物的主要途径是通过植物的根系从土壤或水中吸收,也可以通过植物的叶片从大气中吸收(Cutler et al., 1974)。根系对 Cd 的吸收主要分为两个步骤。首先, Cd 与植物根分泌物和根细胞壁上带负电荷的羧基发生静电相互作用,从而吸附在植物根上(Meychik et al., 2006)。这一步是自发而迅速的。然后,被根吸附的 Cd 通过天然抗性相关巨噬细胞蛋白等质膜转运体穿过植物皮质,最终被植物根细胞吸收。这一步是通过 Cd 的高流动性和水溶性来实现的。研究表明,随着环境中 Cd 浓度的增加,植物中 Cd 的含量也会增加,但 Cd 从植物根到茎的运输速率会降低(Palusińska, et al., 2020)。在 Cd 胁迫下,植物会表现出一系列生理反应,以实现重金属的解毒和富集。目前的研究表明,植物在 Cd 胁迫下的主要响应机制是根的保留

效应、区隔化、螯合、抗氧化、胁迫和渗透调节(Zhu et al., 2021)。其中,植物的根功能、区隔化和螯合作用是 Cd 富集过程中的主导因素。其他植物的反应机制在植物体内富集 Cd、调节生理、维持生命活动等方面发挥重要作用(Yang et al., 2021)。

研究表明,少根紫萍在 Cd 胁迫初始阶段,部分参与植物 DNA 修复的差异表达基因表达上调,与 DNA 复制相关的复制蛋白 A 表达上调,表明在 Cd 胁迫下 DNA 修复系统可能发挥维持基因组稳定的作用。此外,部分参与硫酸盐同化和谷胱甘肽生物合成的酶在 Cd 胁迫下表达上调。定位于液泡膜的二价阳离子转运蛋白(如金属耐受蛋白)在 Cd 胁迫下表达上调,有利于将 Cd 转运至液泡中储存,发挥区隔化作用,从而降低 Cd 的迁移性和毒性(Xu et al., 2018),这与绿萍中 Cd 的亚细胞分布和化学形态研究结果一致(Zheng et al., 2023)。

### (1) Cd 在植物体内分布情况及储存形态

重金属通常从环境中吸收到植物根部,然后被运送到茎部,在茎部它们被分配到植物的各个组织。Cd 在植物中的分布随植物种类和品种的不同而不同。在不同类型的日常蔬菜中,Cd 积累能力的顺序为叶菜>茄类水果>豆类(2.1%)>瓜类>块茎(陈玉成 et al., 2003)。Cd 在植物不同组织中的分布通常表明,Cd 在植物根系的积累量最大,而在茎部的积累量小于根系,这与植物根系对 Cd 的保留有关(Cun et al., 2014)。在茶树研究中,Cd 的积累表现为茎>叶片>新芽。植物细胞壁由纤维素、半纤维素和果胶组成,可以固定 Cd 离子,从而增强植物对 Cd 的耐受,具有防御重金属胁迫的作用(Wang et al., 2022)。当 Cd 离子进入细胞壁会运输至细胞膜,通过膜上的金属离子转运蛋白进入细胞质。与细胞质中的氨基酸、植物螯合肽(PC)和金属硫蛋白(MT)等结合,形成稳定的金属螯合物,降低重金属对植物的毒害作用(Deng et al., 2018)。整体而言 Cd 主要分布在可溶性组分和细胞壁中,在低 Cd 浓度时细胞壁的保护作用最为重要,而高 Cd 浓度时可溶性组分则在减轻 Cd 毒性时更为重要(Yang et al., 2021)。重金属在进入到植物组织后,会转变为各种不同的化学形态。这些不同化学形态的重金属在不同极性提取剂中溶解度不同,且随着提取剂极性的增加其毒性和活性不断下降(Ismael et al., 2019)。因此,研究 Cd 在植物体内的亚细胞分布和化学形态,对阐明植物对 Cd 的耐受和解毒机制具有重要意义。



## (2) Cd 胁迫过程中植物和微生物的互作

Cd 胁迫过程中植物和微生物的相互作用主要体现在两方面，植物根际微生物和植物内生微生物与植物间互作。研究表明植物根部在受到重金属胁迫时，会后分泌大量有机质和一些质子，降低植物根际的 pH 值，提高重金属的生物利用度(Vives et al., 2020)。重金属胁迫也会改变植物根际的理化性质和微生物群落结构，改善根际微生物的生存环境，帮助其降低毒害作用，并提高植物吸收重金属的能力(Feng et al., 2021)。根际微生物虽然很小，但却在植物的生长过程中起到非常重要的作用，它们可以释放具螯合能力或者酸化的物质，促进重金属的固定或迁移。这种机制也能够促进宿主植物的生长，并增强宿主植物对当下逆境胁迫的适应能力(曾加会 et al., 2017)。因此，探究污染水体中重金属 Cd 对浮萍根际微生物群落组成和结构的影响，客观评价水体重金属污染造成的生态风险，不仅能解析浮萍超富集重金属的机制，也能为污染水体修复提供新的见解。

内生微生物与宿主植物长期协同进化的过程中，二者形成了互利共生的关系。植物为内生菌提供碳源和生存空间，内生微生物可促进植物生长发育，增强植物抗逆性，提高植物抗胁迫、抗病害性能。在重金属胁迫下，内生微生物与超富集植物相互作用表现出更强的耐受性：内生微生物通过产生金属螯合物质，激活抗氧化酶、降低脂质过氧化作用从而提高植物对重金属的耐受性；内生微生物能增强宿主植物的光合作用和吸收营养物质的能力，同时，分泌 ACC 脱氨酶减弱乙烯抑制作用及分泌 IAA 等植物生长激素促进宿主植物生长，从而降低植物组织中的重金属浓度，减弱重金属的毒性作用；内生菌分泌有机配体并使其与环境中的重金属离子结合，提高重金属的生物利用度，促进重金属从植物根部向地上部的运输(图 1.2)。例如，丛枝菌根真菌是一种能与 80%~90%的植物根系建立互惠共生关系的内生菌，在重金属污染下，接种 AMF 可显著改善宿主植物对矿物质养分的吸收，从而直接影响植物体内重金属的吸收与积累(何红君, 2020)。AMF 与植物的共生关系通过提高宿主植物体内抗氧化酶活性、调节渗透物质和产生植物激素等途径降低重金属毒性，增强植物对重金属的耐受性。AMF 还可以通过改变植物中重金属的亚细胞分布和化学形态来增强植物对重金属的抗性。

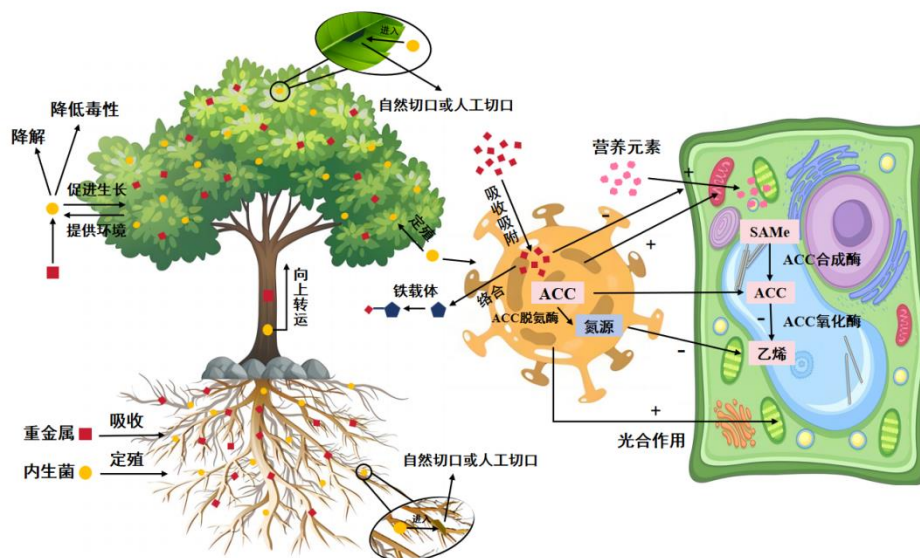


图 1.2 重金属胁迫下植物内生菌作用机理

### 1.1.4 浮萍植物积累能源原料淀粉的研究

近年来，传统能源日益短缺并伴随严重的环境问题，以生物质能为基础的生物能源被认为是最有前途的替代品，逐渐成为工业界和科学界的关注焦点和研发热点。已经大规模生产和广泛利用的传统能源，比如煤炭、石油、天然气等都属一次性非再生的常规能源，它们的原料是在地壳中经过很长时间形成的，所以在短期内不可能再生。然而，随着人们对能源需求的不断增长，传统能源日趋匮乏，生态环境问题也日益增多。在这样的情况下，可再生或可持续性清洁能源的开发与利用越来越受到研究者的关注(Dincer, 2011)。其中，生物质能作为仅次于煤炭、石油、天然气的第四大能源，直接或间接来源于绿色植物的光合作用，是一种将太阳能以化学能形式贮存在生物质中的能量形式(Field et al., 2008)。生物质能中的碳来自于大气中的  $\text{CO}_2$ ，其生产和消耗过程不会增加大气中的碳总量，是一种清洁可再生的能源形式，也是唯一可替代传统能源的碳资源(Moreira, 2006)。因此，生物质能被认为是应对全球气候变化、能源短缺和环境污染最有潜力的资源，越来越多的国家和地区通过立法鼓励甚至强制推广生物质能的使用(雪晶 et al., 2020)。

在生物质能生产过程中，原料的成本占到整个生产成本的 70%~80%，且目前主要以玉米、小麦、薯类等粮食作物为主(薛慧玲 et al., 2013)。尽管目前以玉米等淀粉资源为核心的能源生产技术体系已日趋完善，并且生产工艺也最为简单(Oladosu et al., 2021)。但由于该能源生产技术体系的原料是粮食作物，如果大规

模推广将导致“与人争粮、与粮争地”的困境，对全球的粮食安全构成威胁(Tenenbaum, 2008)，因而在产业化上面临着难以解决的原料来源问题。所以，生物质能产业的发展迫切地需要从“以粮食为主要原料”向“以非粮能源植物为主要原料”进行转型，促进了以非粮生物质资源为核心的“新一代生物燃料”的发展(Arefin et al., 2021)。因此，寻找适合新能源产业化和规模化发展的非粮能源植物资源，是解决生物质能进一步发展的关键。

浮萍，和其他高等植物一样，可以通过光合作用合成淀粉。合成的淀粉一部分进行物质代谢和能量代谢，剩余部分以淀粉颗粒的形式储存在叶绿体中。通常情况下，浮萍在光照条件下合成淀粉，在黑暗条件下将部分叶绿体中储存的淀粉分解，进行异养代谢。淀粉是浮萍的主要贮藏化合物之一，通常在逆境条件下积累。这是浮萍在漫长的进化过程中获得的适应策略，使其能够在恶劣的环境中生存(Yang et al., 2021)。根据浮萍种类和生长条件的不同，浮萍的淀粉含量由 2.14% 至 78% 不等。淀粉是浮萍生物质的核心资源，通过环境调控进一步提高浮萍淀粉含量，也是近年来浮萍研究的热点之一。然而，有关 Cd 胁迫对浮萍淀粉含量影响的研究还鲜见报道，因此揭示 Cd 胁迫下浮萍淀粉积累的机制，可为同步实现环境修复和能源原料生产提供理论依据，也为其它植物淀粉积累机理研究提供有益参考。

## 1.2. 研究目的及意义

水体重金属 Cd 污染已成为当今世界上最严重的生态环境问题之一，如何采用科学有效的生态修复方法，解决重金属 Cd 污染问题也逐渐引起环境科学和生态学研究工作者的关注。植物修复技术以其安全、廉价等众多优点已成为治理重金属污染的有效手段，而高等植物对重金属的耐性与富集性，也成为污染生态学研究的热点。因此，本研究的目的是获得 Cd 污染水体修复的植物材料，并解析该植物材料超富集 Cd 的内在机制，研究结果可为植物修复技术提供新材料和新思路。具体包括以下目的：

(1) 对不同地区采集的大量浮萍进行高通量筛选，获得高富集 Cd 的浮萍植株，检测浮萍在 Cd 胁迫下的生理响应及富集情况，浮萍对水体中 Cd 的富集率和去除率。为利用浮萍在修复 Cd 污染水体方面的应用提供理论依据。

(2) 检测 Cd 胁迫对浮萍根系微生物的影响，探究 Cd 在浮萍不同组织、亚细胞中分布情况以及浮萍体内的储存形态，验证浮萍富集机制。

(3) 结合转录组学分析从分子水平揭示浮萍超富集 Cd 的分子原因, 并结合 Cd 胁迫下基因表达情况, 挖掘 Cd 超富集过程中的关键基因并克隆该关键基因。

(4) 通过原核表达分析、生物信息学分析以及亚细胞定位分析, 初步揭示关键基因的生物学特性, 并探究其在 Cd 富集过程中的重要作用。

(5) 建立 Cd 超富集浮萍材料的遗传转化体系, 通过基因工程手段创制浮萍新种质, Cd 胁迫下的生理生化响应情况和 *GST* 及相关途径基因表达水平, 验证关键基因的生物学功能, 并创制过表达株系探究修复效果。

(6) 分离并鉴定超富集植物浮萍内生菌, 筛选出高 Cd 耐性的功能菌株, 探究其对浮萍生物量和耐 Cd 能力的影响, 探究功能菌株的最佳生长条件, 揭示浮萍和内生菌响应 Cd 的机制, 为内生菌-植物联合修复重金属污染提供理论依据。

(7) 初步探究富集 Cd 后浮萍材料发酵乙醇的产率, 为富集 Cd 后的浮萍开发利用提供理论依据。

### 1.3. 技术路线

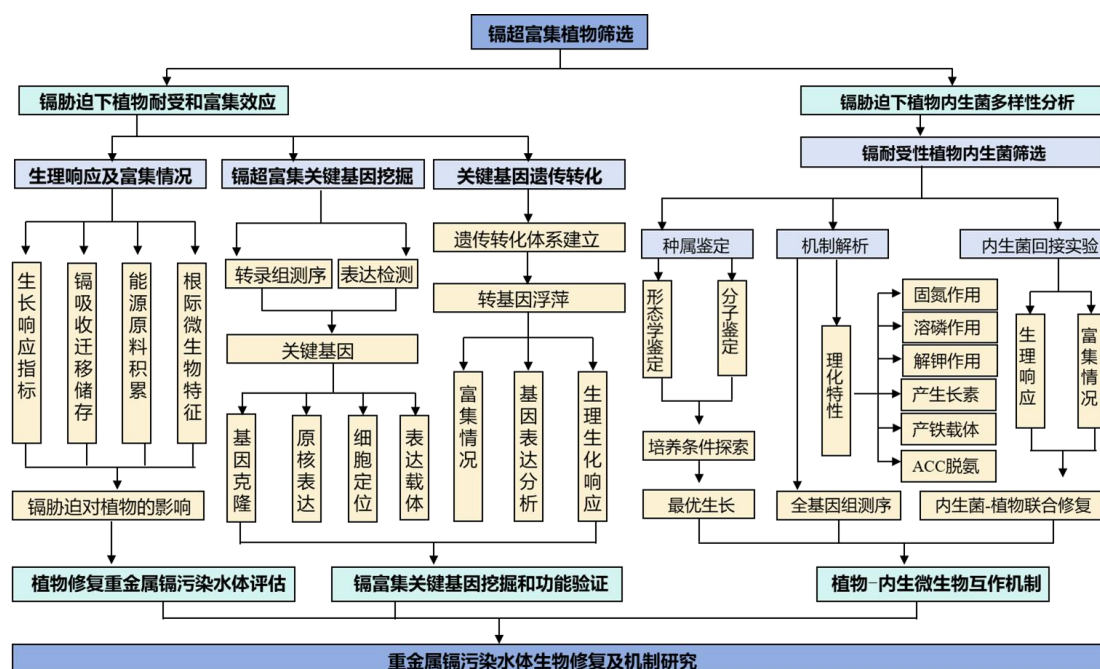


图 1.3 技术路线图

## 第二章 材料与方法

### 2.1 实验材料

本研究所用研究材料为贵州大学生命科学学院浮萍种质资源库所保存的无菌浮萍植株。在

#### 2.1.1 植株消毒

将野外采集的浮萍材料编号，采用 5%次氯酸钠和 75%乙醇消毒处理，接种于 MS 固体培养基，保存于种质资源库。实验材料使用前，从保存培养皿上接种约 10 片浮萍植株至 Hoagland 培养液进行扩大培养，培养条件为光照强度 5000 lx，温度 25 °C，光照周期 16 h/8 h (L/D)，湿度 75%，培养时间两周左右。

#### 2.1.2 材料鉴定

采用体视显微镜对浮萍进行形态学鉴定，通过根的数量、叶片的大小、颜色等形态，鉴定浮萍样品在属水平的分类。使用 CTAB 法提取浮萍 DNA，PCR 扩增浮萍的叶绿体 *atpF-atpH* 间隔序列 (ACTCGCACACACTCCCTTTCC 和 GCTTTTATGGAAGCTTAAACAAT)。在 NCBI 数据库中下载已知的浮萍物种的代表性序列，先用 BioEdit 软件进行测序序列比对和剪切，再分别采用 *atpF-atpH* 间隔序列在 Mega 6.0 软件中构建 NJ(Neighbor-joining Tree)型系统发育树，确定浮萍样品的种属分类。

#### 2.1.3 模式材料

亚细胞定位实验所用材料为模式物种本氏烟草。

#### 2.1.4 菌种材料

*E. coli* BL21、EHA105、GV3101、C58C1、LBA4404 等。

### 2.2 实验试剂

#### 2.2.1 实验试剂

NaClO (富宇; 天津)、75%乙醇(贵鑫; 贵州)、MS 培养基(Hopebio; 青岛)、头孢霉素(Ameresco; USA)、巯基乙醇(Aladdin; 上海)、CTAB(Coolaber; 北京)、核酸提取液(Acmec; 上海)、异丙醇(Aladdin; 上海)、Taq 酶(Trans Taq DNA Polymerase High Fidelity; 北京)、琼脂糖(Sigma-Aldrich; USA)、Cd 标准溶液(伟业计量; 北京)、三氯乙酸(Aladdin; 上海)、2-巯代巴比妥酸(Aladdin; 上海)、超氧化物歧化酶试剂盒(Solarbio; 北京)、过氧化物酶试剂盒(Solarbio; 北京)、过氧

化氢酶试剂盒(Solarbio; 北京)、戊二醛(Solarbio; 北京)、10×磷酸缓冲液(Solarbio; 北京)、氮蓝四唑 NBT(Solarbio; 北京)、98%硫酸(川东化工; 重庆)、浓硝酸(川东化工; 重庆)、重铬酸钾(富宇; 天津)、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(大茂; 天津)、二硫赤藓糖醇 DTE (Solarbio; 北京)、Tris-HCl (Solarbio; 北京)、醋酸(富宇; 天津)、盐酸(川东化工; 重庆)、Fast SYBR Mixture(康为世纪; 江苏)、Easstep Super 总 RNA 提取试剂盒(Promega; 上海)、TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(全式金; 北京)、TransTaq DNA Polymerase High Fidelity (HiFi)(全式金; 北京)、Mighty TA-cloning Kit (TaKaRa; 北京)、X-Gal (Solarbio; 北京)、IPTG (Solarbio; 北京)、氨苄霉素(Solarbio; 北京)、*E. coli* JM109 感受态细胞(TaKaRa; 北京)、琼脂粉(Solarbio; 北京)、酵母提取物(OXOID; Britain)、胰蛋白胨(Biosharp; 安徽)、噻苯隆(Solarbio; 北京)、2,4-二氯苯氧乙酸(Solarbio; 北京)、乙酰丁香酮(Solarbio; 北京)、头孢噻肟(Solarbio; 北京)、卡那霉素(Solarbio; 北京)、6-苄氨基嘌呤(Solarbio; 北京)、吡啶-3-乙酸(Solarbio; 北京)、X-gluc (Solarbio; 北京)、GUS Buffer (Leagene; 北京)、利福平(Solarbio; 北京)、链霉素(Solarbio; 北京)、庆大霉素(Solarbio; 北京)、20 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液(PERFEMIKER; 上海)、蔗糖(金山化学试剂; 成都)、NaCl (AR; 国药集团; 上海)、*E. coli* DH5α 感受态细胞(TaKaRa; 北京)、*E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞(TaKaRa; 北京)、pET-30a<sup>+</sup>质粒(Solarbio; 北京)、谷胱甘肽 S-转移酶活性检测试剂盒(Solarbio; 北京)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(增强型)(天根; 北京)、QuickCut *Bam*HI (TaKaRa; 北京)、QuickCut *Sac*I (TaKaRa; 北京)、质粒小提试剂盒(天根; 北京)、*Bsa*I (Solarbio; 北京)、pBWA(V)HS-Glosgfp 质粒(伯远; 武汉)、T4 DNA Ligase (Vazyme; 南京)、0.01N I<sub>2</sub>~KI(尚宝生物; 上海)、可溶性淀粉分析纯(诚泰化工; 山东)、100 μg/mL 淀粉标准液(河南标准物质研发中心; 河南)、还原型谷胱甘肽含量检测试剂盒(Solarbio; 北京)、ClonExpress II One Step Cloning Kit (Vazyme; 南京)、*Hind*III (TaKaRa; 北京)、*Kpn*I (TaKaRa; 北京)、Taq DNA 聚合酶(天根; 北京)、潮霉素 B(麦克林; 上海)、农杆菌 EHA105(华越洋; 北京)、CdCl<sub>2</sub> 固体(Aladin; 上海)、CdCl<sub>2</sub> 标准溶液(北京北方伟业; 北京)、无水乙醇(广宇化工; 山东)、细菌 DNA 提取试剂盒(艾普蒂; 湖北)、核酸染料(尚宝生物; 上海)等。

### 2.2.2 培养基质

LB 培养基、Hoagland 培养基、MS 培养基、B5 培养基、PDA 培养基、查氏培养基、脲盐淀粉培养基、马丁培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、放线菌培养基、酪朊琼脂培养基等。

## 2.3 实验仪器

体视显微镜(SMZ-171; Motic; 厦门)、人工气候培养箱(GXZ-80; Thermo; 美国)、超净台(SW-CJ-1D; 孚夏; 浙江)、灭菌锅(DR60DA; ZEALWAY; USA)、pH 仪(pHS-3C; 雷磁; 上海)、通风橱(TH-TFG-15; 天弘; 东台)、离心机(TGL-205; 蜀科; 四川)、PCR 仪(T100; Thermo; USA)、水平电泳仪(JY1600C; JUNYI; 北京)、凝胶电泳成像仪(biorad ChemiDoc MP; Bio-Rad; USA)、透射电子显微镜(JEM-1400FLASH; JEOL; 日本)、Multiskan FC 型全波长酶标仪(MULTISKAN; Thermo; 美国)、紫外分光光度计(7600SE; 上海)、超声波清洗机(RQ22-480J; 荣威; 上海)、循环水式真空泵(SHB-III; 长城科工贸; 郑州)、火焰原子分光光度计(NovaAA 400P; Analytik Jena AG; Germany)、控温式远红外消煮炉(LWY84B; 四平; 吉林)、移液枪(Research® plus; Eppendorf; Germany)、实时荧光定量 PCR 仪(CFX Connect; Bio-Rad; USA)、超微量紫外分光光度计(NanoDrop one; Thermo; USA)、电热恒温培养箱(HP-9065A; 亚泰科隆; 北京)、微型恒温金属浴(GL-120B; 其林贝尔; 海门)、水浴锅(600; 澳华; 常州)、制冰机(IMS-40; 雪科; 常熟)、恒温恒湿智能摇床(ZWY-C2112D; HUAPUDA; 常州)、激光共聚焦显微镜(C2 Plus; Nikon; Japan)、显微镜(SW380T; Motic; 厦门)、酸度计(PHBJ-260; 精密仪器; 上海)、电子天平(JA5003N; 菁海; 上海)等。

## 2.4 实验方法

### 2.4.1 Cd 超富集植物的筛选和富集效应

#### 2.4.1.1 超富集植物的筛选

将资源库保存浮萍植物材料用 30 mg/L Cd 处理 7 d, 以植物叶片颜色变化为指标进行初筛, 叶片颜色变化较小的植物为 Cd 耐受浮萍株系。再以 0.5 mg/L 和 10 mg/L Cd 处理 7 d 测定 Cd 富集相关指标, 分析筛选出优势超富集植物材料。

#### 2.4.1.2 Cd 富集效应的研究

在 pH 5.0 的 1/5 Hoagland 培养基中, 设置不同 Cd 浓度梯度处理, 接种相同质量植物, 培养一周, 按时间梯度记录生长状况及富集情况, 观察植物在不同 Cd

浓度处理下生长状况。

## 2.4.2 Cd 在植物体内的分布及储存形态

### 2.4.2.1 Cd 在植物不同组织中分布情况研究

将处理后的植物收集后分离成根、叶两部分，测定各个组织中 Cd 的含量。探索 Cd 处理下，植物根、叶积累的 Cd 的分布规律和转移情况。

### 2.4.2.2 Cd 在植物不同亚细胞分布情况研究

采用差速离心法分离植物叶状体的不同亚细胞组分，分别得到细胞壁、细胞器及细胞质等亚细胞组分，测定各个亚细胞组分的 Cd 含量。

### 2.4.2.3 Cd 在植物体内的赋存形态

按极性升高顺序依次用 5 种提取剂(80%乙醇、去离子水、1 mol/L 氯化钠、2%醋酸、0.6 mol/L 盐酸)对植物材料进行浸提。取 2 g 植物于烧杯中，加入 37.5 mL 提取剂浸泡，30 °C 恒温过夜，5000×g 离心 10 min，回收上清液，加入等量的新鲜的提取剂浸泡 2 h，重复 3 次后合提取剂待测。

## 2.4.3 转录组测序与基因克隆

### 2.4.3.1 植物转录组测序

采集处理前和 0.5 mg/L Cd 处理 12 h 后的新鲜植物样品，液氮速冻 30 s，保存于-80 °C 送至上海生工公司进行转录组测序。采用 Illumina 平台进行测序，对原始数据进行质量评估和过滤，得到 Clean 数据，与 *Lemna minor* 参考基因组 (Genome ID: 27408) 进行比对分析。

### 2.4.3.2 植物 RNA 的提取

取生长状态良好的 0.1 g 新鲜植物样品至研钵中，加入液氮研磨成粉末，将粉末转移至离心管中，采用 Eastep Super 总 RNA 提取试剂盒进行 RNA 的提取。提取的 RNA 保存于-80 °C。利用超微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度， $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  超过 1.8 方可用作后续研究。

### 2.4.3.3 cDNA 的合成

使用 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 将 RNA 反转录为 cDNA，合成的 cDNA 保存于-20 °C。

### 2.4.3.4 扩增引物设计

根据浮萍转录组筛选得到的 *GST* 基因序列，采用 Primer Premier 5.0 和 Oligo



7 进行扩增引物的设计(表 2.1)。同时,设计了在编码区内的特异性引物用于实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR),采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行相对定量的计算。

表 2.1 扩增和定量引物信息

Primer name	Sequence(5'-3')	Usage
LmGSTF-F	ATGGCTCCGATGAAGCTGTACGG	<i>LmGSTF</i> amplification
LmGSTF-R	CTAGGCATCCAACACAGATGCGT	<i>LmGSTF</i> amplification
M13-F	AGGGTTTCCCAGTCACG	TA clone universal primer
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	TA clone universal primer
18S-F	CGCTCCTACCGATTGAATGG	Reference gene
18S-R	TGTTACGACTTCTCCTTCCTCTAA	Reference gene
GSTF-rt-F	ACTGGCGAGCACAAGAGC	qRT-PCR
GSTF-rt-R	CGTGGGTAAGGTCAGCAAG	qRT-PCR

#### 2.4.3.4 目的基因克隆

##### (1) 目的基因 PCR 扩增

以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,以 *LmGSTF-F* 和 *LmGSTF-R* 为引物扩增 *LmGSTF* 编码区。参照 TransTaq DNA Polymerase High Fidelity (HiFi)(全式金;北京)使用说明配制反应体系并进行 PCR 反应。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测是否扩增出正确条带。

##### (2) 目的基因 TA 克隆

取 1  $\mu$ L PCR 产物、1  $\mu$ L pMD20-T vector、5  $\mu$ L Ligation Mighty Mix 和 3  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 混匀,16  $^{\circ}$ C 连接反应 30 min。将连接产物通过热激法转入 100  $\mu$ L *E. coli* JM109 感受态细胞,涂布于含 0.04 mg/L X-Gal、100 mg/L IPTG 和 100 mg/L 氨苄霉素的 LB 培养皿,37  $^{\circ}$ C 倒置过夜培养。挑选白色菌落于 LB 液体培养基中以 220 rpm、37  $^{\circ}$ C 进行振荡培养,PCR 检测有目的基因条带菌落送北京擎科公司进行测序。

#### 2.4.3.5 实时荧光定量 PCR

提取新鲜植物样品 RNA 后,反转录得到浓度一致的 cDNA。进行 qRT-PCR,以 18S 作为内参基因,以 *LmGSTF-rt-F* 和 *LmGSTF-rt-R* 为引物进行 *LmGSTF* 的相对定量检测。qRT-PCR 体系配制和反应条件设置参考 Fast SYBR Mixture(康为

世纪；江苏)说明书。

## 2.4.4 基因原核表达实验

### 2.4.4.1 原核表达引物设计

原核表达载体选择，双酶切位点选择 *Bam*HI和 *Sac*I。根据重组试剂盒说明书，设计合成重组引物(表 2.2)。通过 PCR 扩增出带重组臂和酶切位点的 *LmGSTF* 基因。

表 2.2 原核表达引物信息

Primer name	Sequence(5'-3')	Usage
CZ-pet30-GSTF-F	GCCATGGCTGATATC GGATCC ATGGCTCCGATGAAGCTGTAC	<i>LmGSTF3</i> prokaryotic expression
CZ-pet30-GSTF-R	GCAAGCTTGTGCGACG GAGCTC CTAGGCATCCAACACAGATGC	<i>LmGSTF3</i> prokaryotic expression
T7-F	TAATACGACTCACTATAGG	Prokaryotic expression Universal primers

### 2.4.4.2 原核表达载体的构建

利用 *Bam*HI和 *Sac*I双酶切原核表达载体 pET30a 后，通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测是否酶切成功，并将酶切后载体片段进行胶回收。回收产物按照重组试剂盒说明书，与 PCR 产物进行重组。重组载体通过热激法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞，取 100  $\mu$ L 菌液涂布含有 50 mg/L 卡那霉素 LB 平板，37  $^{\circ}$ C 过夜培养。挑选单克隆菌落，37  $^{\circ}$ C 过夜振荡培养后进行菌落 PCR，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测是否扩增出正确条带。

将验证正确的菌液振荡培养，提取质粒后用 *Bam*HI和 *Sac*I双酶切验证重组质粒构建是否正确，正确的质粒送至上海生工公司进行测序。将测序正确后将质粒通过热激法转入 *E. coli* BL21，再通过菌落 PCR 和 1%琼脂糖凝胶电泳验证。

### 2.4.4.3 生长曲线的测定

在 0、200、400、600 和 800 mg/LCd 胁迫条件下，37  $^{\circ}$ C、220 rpm 振荡培养重组菌和对照菌，每小时测定一次 OD<sub>600</sub>，绘制重组菌和对照菌的生长曲线。

### 2.4.4.4 滴板试验检测

取稀释 10<sup>-1</sup> 倍、10<sup>-2</sup> 倍和 10<sup>-3</sup> 倍的对照菌和重组菌分别滴在含 0、200、400、600 和 800 mg/LCd 的 LB 培养基上。37  $^{\circ}$ C 倒置过夜培养 4 d，观察不同处理下菌

落的数量和形态。

#### 2.4.4.5 GST 酶活的测定

离心收集 0、200、400、600 和 800 mg/L Cd 胁迫处理的菌体，加入 1 mL 提取液，冰浴条件下超声提取后离心收集上清液，使用 GST 酶活性试剂盒测定上清液 GST 的酶活性。

#### 2.4.4.6 Cd 去除率测定

离心收集 0、200、400、600 和 800 mg/L CdCl<sub>2</sub> Cd 胁迫处理后的上清液，测定培养液中的 Cd 含量，按照下式计算培养液中 Cd 去除率：

$$R = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\%$$

式中， $R$  为 Cd 去除率(%)； $C_0$  为培养液中的初始 Cd 含量(mg/L)； $C_t$  为培养液中残留的 Cd 含量(mg/L)。

#### 2.4.4.7 亚细胞定位

亚细胞定位载体选用 pBWA(V)HS-Glosgfp，该载体含 GFP 荧光蛋白和 35S 强启动子。构建好的载体转化农杆菌 GV3101，瞬时转化本氏烟草，通过激光共聚焦显微镜观察亚细胞定位结果。

### 2.4.5 浮萍植物的稳定遗传转化

#### 2.4.5.1 浮萍愈伤组织的诱导

将无菌浮萍接种至含 5 μM TDZ 和 45 μM 2,4-D 的愈伤组织诱导培养基进行愈伤组织诱导，7 d 继代一次，培养条件为光照强度 5 000 lx，温度 25 °C，光周期 24 h/0 h (L/D)，湿度 75%。

#### 2.4.5.2 愈伤组织的遗传转化

将目的基因表达载体通过冻融法转入 EHA105、GV3101、C58C1 和 LBA4404 农杆菌，于 200 rpm、28 °C 培养至 OD<sub>600</sub>=0.5，转至无菌离心管离心去上清，将菌体用 50 mL 含 100 μM As 的 B5 液体培养液重悬；用重悬液浸没愈伤组织，28 °C 黑暗条件下 80 rpm 侵染 20 min；弃去菌液后用滤纸吸干愈伤组织表面水分，接种至共培养培养基，黑暗条件下 28 °C 共培养 3 d；共培养结束后，用无菌水清洗。转移至筛选培养基，光照培养 7 d，将存活的愈伤组织移至再生培养基。

#### 2.4.5.3 浮萍叶状体的再生

通过在再生培养基诱导浮萍叶状体再生，培养条件为光照强度 5000 lx，温

度 25 °C，光周期 16 h/8 h(L/D)，湿度 75%。每 7 d 继代一次，直至长出新的叶状体。

#### 2.4.5.4 再生叶状体的筛选

将再生叶状体接种至含 cef 和 kan 的筛选培养基中，培养条件为光照强度 5000 lx，温度 25 °C，光周期 16 h/8 h(L/D)，湿度 75%，筛选时间为 7 d。

#### 2.4.5.6 再生叶状体 GUS 染色

将带 GUS 基因的 pCambia2301 载体转入农杆菌，制备菌悬液对愈伤组织进行侵染和共培养，共培养后可将愈伤组织进行染色，诱导再生叶状体后可对再生的叶状体进行 GUS 染色。将愈伤组织或叶状体放入装有 GUS 染液的离心管中，37 °C 暗置过夜即可染色。

### 2.4.6 过表达目的基因验证和检测

#### 2.4.6.1 载体信息和引物设计

植物表达载体选择实验室保存的 pCAMBIA-Ubi-1300，该载体携带 kan 和潮霉素 B 双标记，启动子为 Ubi 强启动子。根据载体多克隆位点序列，选择 *Hind*III 和 *Kpn*I 双酶切位点。根据重组试剂盒说明书，设计 CZ-UBI-LmGSTF-F (TGTTTGGTGTACTTAAGCTTATGGCTCCGATGAAG) 和 CZ-UBI-LmGSTF-R (GTCTTTGTAGTCCATGGTACCCTAGGCATCCAACAC) 引物扩增带重组臂和酶切位点的 *LmGSTF* 基因，再通过 PCR 进行扩增。

#### 2.4.6.2 植物表达载体的构建

对 pCAMBIA-Ubi-1300 载体进行双酶切，通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测成功后胶回收载体片段。通过重组的方法构建重组表达载体，重组后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。挑选单克隆菌落，培养菌液进行菌落 PCR，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增正确条带。提取条带位置正确的菌液质粒，用 *Hind*III 和 *Kpn*I 双酶切验证，验证正确的质粒或菌液送至上海生工公司进行测序。将测序正确的重组质粒转入农杆菌 EHA105，进行菌落 PCR 和 1% 琼脂糖凝胶电泳。

#### 2.4.6.3 农杆菌介导的遗传转化

农杆菌介导的遗传转化方法同 2.4.5.2。

#### 2.4.6.4 阳性转基因植株的验证

使用 CTAB 法提取转基因浮萍和野生型浮萍的基因组 DNA，通过 PCR 验证

*LmGST* 基因是否成功转入。

#### 2.4.6.5 实时荧光定量 PCR 检测

提取浮萍总 RNA，反转录为 cDNA，然后进行 qRT-PCR。设计特异性引物(表 2.3)以 18S 作为内参基因，测定 *LmGSTF*、编码谷胱甘肽还原酶(Gluathione reductase, GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶(Gamma-glutamyl transferase, GGT)、亮氨酰氨肽酶 A (Aminopeptidase A, pepA) 和氨肽酶 N(Aminopeptidase N, pepN)的基因相对表达水平。

表 2.3 相关基因引物信息

Primer name	Sequence(5'-3')	Usage
GR-F	GAAACCCAAGAAATACTTAGAC	GR qRT-PCR
GR-R	CCCATTCCACGCCATA	GR qRT-PCR
GPX-F	GACATCAACCTCGGCATTT	GPX qRT-PCR
GPX-R	TCCACGACTTTCCTTC	GPX qRT-PCR
GGT-F	TCGTCCTGTTCGTGCTT	GGT qRT-PCR
GGT-R	AGAGTGGTGCCGTTGG	GGT qRT-PCR
pepA-F	GTGTCTGCGTGCTCTACTT	pepA qRT-PCR
pepA-R	CGTCTGTGCCCTTTGTC	pepA qRT-PCR
pepN-F	AAATCCCTCTACCCTGTT	pepN qRT-PCR
pepN-R	CTCTTCATCCCACTTCAT	pepN qRT-PCR

#### 2.4.7 Cd 超富集植物内生菌分离和互作

##### 2.4.7.1 Cd 超富集植物微生物多样性的分析

将消毒保存于无菌固体培养基的 Cd 超富集植物接种到无菌的 pH 5.5 Hoagland 全营养培养液中进行复苏扩培，放置在 25℃光照培养箱中培养一周。以 0 mg/L Cd 和 0.1 mg/L Cd 分别处理浮萍 15 d，生物学重复 3 次。取浮萍样品 1~3 g，液氮速冻，储存于-80 ℃冰箱中备用，送美吉生物公司进行微生物多样性分析。

##### 2.4.7.2 Cd 超富集植物抗 Cd 促生内生菌的分离

将经过无菌处理的浮萍样本使用研磨棒充分研磨，静置一定时间，取上清液于无菌水中进行  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  的梯度稀释。取 200  $\mu$ L 稀释液与 LB 培养基或牛肉膏蛋白胨培养基进行涂布，生物学重复 3 次。静置 30 min 后，28℃倒置于恒温培养箱中暗培养 72 h。根据菌落形态、颜色等特征初步判断处理分离出内生菌的种类，并按常规方法挑取菌落纯化，并加甘油于-80 ℃冰箱中保存备用。

### 2.4.7.3 Cd 超富集植物内生菌的种属鉴定

使用 16S rDNA 序列分析法对浮萍内生菌进行种属鉴定, 内生菌 DNA 提取的采用天根细菌基因组提取试剂盒。通过细菌通用引物 27F 和 1492R 对目的菌株保守序列进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物进行测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 搜索, 下载相似度 99% 以上的菌株序列, 与本实验所测序列共同进行系统发育树的构建, 分析内生菌之间的亲缘关系, 确定内生菌的种属。

### 2.4.7.4 响应面法优化内生菌的生长条件与定植条件

通过单因素实验确定内生菌的最佳培养温度、pH、接种量、装样量、胰蛋白胍含量; 通过 Plackett-Burman 实验设计确定对菌种生物量有显著影响的主要因素; Central Composite Design 中心组合试验设计优化培养条件, 并进行模型验证, 以确定内生菌的最佳生长条件。

### 2.4.7.5 Cd 胁迫下植物接种内生菌的生理响应及富集情况

将内生菌接种到浮萍上, 生物学重复 4 次, 培养液中添加 0 或 1 mg/L Cd、收集处理 24 h, 3 d, 7 d 后的浮萍样本。收集生物质和水样, 测定接种内生菌后浮萍的生理响应指标及富集情况。

## 2.4.8 生理生化指标的测定和分析

### 2.4.8.1 植物生理生化指标的测定

#### (1) 植物的生长速率

用小漏勺将植物材料打捞起来, 用蒸馏水冲洗两遍, 甩干水分, 用电子天平称取鲜重, 按照下式计算植物的生长速率:

$$GR = \frac{m_t - m_0}{t}$$

式中,  $GR$  为  $t$  时的生长速率(g/d);  $m_t$  为  $t$  时的植物样品鲜重(g);  $m_0$  为植物样品的初始鲜重(g)。

#### (2) 植物的根脱落率

测量植物的根长, 按照下式计算根脱落率:

$$RA = \frac{R_t}{R_0} \times 100\%$$

式中,  $RA$  为  $t$  时植物的根脱落率(%);  $R_t$  为  $t$  时植物脱落根的数量;  $R_0$  为  $t$  时植物根的总数量。

#### (3) 植物的叶绿素含量

取 0.3 g 新鲜植物样品置于 10 mL 离心管，于 -20 °C 冷冻 1 h。加入 6 mL 95% 乙醇(50 °C 预热)，振摇混匀，黑暗环境下静置 3 h。离心收集上清液，用酶标仪测定上清液 663 nm 和 645 nm 波长下的吸光度。按照下式分别计算浮萍的各类型叶绿素含量：

$$Chla = \frac{12.7 A_{663} - 2.69 A_{645}}{m} \times 0.006$$

$$Chlb = \frac{22.9 A_{645} - 4.68 A_{663}}{m} \times 0.006$$

$$Chl = \frac{20.21 A_{645} + 8.02 A_{663}}{m} \times 0.006$$

式中，*Chla* 为植物样品叶绿素 a 的含量(mg/g)；*Chlb* 为植物样品叶绿素 bDE 含量(mg/g)；*Chl* 为植物样品总叶绿素含量(mg/g)；*A*<sub>663</sub> 和 *A*<sub>645</sub> 分别为 663 nm 和 645 nm 波长下的吸光度；*m* 为植物样品的鲜重(g)。

#### (4) 植物酶活的测定

取 0.1 g 植物样品组织，液氮冷冻后加入 1 mL 提取液进行冰浴匀浆。8000 ×g，4 °C 离心 10 min，提取上清液，置于冰上待测。使用试剂盒检测 1 mL 上清液的 SOD、POD 和 CAT 活性。丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸法测定。取植物叶片 1 片浸泡于 0.1 mg/mL 的 NBT(pH 7.6)中，暗处理 25 °C 温育 2 h，再加入 90% 沸乙醇脱色 6 h，最后置于体式显微镜进行观察并分析。

#### (5) 植物淀粉含量的测定

$$\text{Starch content (mg/g)} = \frac{1000 \times 2.1 \times A \times B}{C \times D}$$

式中：A 为淀粉标准曲线上查的浓度(μg/mL)；B 为样品的总体积(mL)，本实验为 7.5 mL；C 为称取的待测样品的质量(g)；D 为比色皿中加入的待测样品的体积，本实验中为 1 mL；2.1 为每支比色皿中的总体积；1000 为将微克转化为毫克的数量级。

#### 2.4.8.2 植物组织 Cd 含量的测定

将浮萍置于 60 °C 烘箱中烘干至恒重，用研钵进行研磨，将浮萍粗粉进行过筛，称量干重。采用 lwy848 型控温式远红外消煮炉煮浮萍样品，准确称取样品 0.1 g 于消煮管中，加入 6 mL HNO<sub>3</sub>，260 °C 消煮 2 h，每次消煮均做一个空白对照以消除消煮时所带来的误差。消煮好的样品应为无色透明液体，用去离子水将

消解液定容至 50 mL。使用火焰原子吸收分光光度法测定溶液和培养液中的 Cd 含量。按照下式计算植物样品中的 Cd 富集量：

$$C_p = \frac{50C}{m_d}$$

式中， $C_p$  为植物样品中的 Cd 含量(mg/kg)； $C$  为待测液 Cd 含量(mg/L)； $m_d$  为植物样品干重(g)。

按照下式计算植物样品的 BCF 值：

$$BCF = \frac{C_p}{C_t}$$

式中， $C_p$  为植物样品中的 Cd 含量(mg/kg)； $C_t$  为培养液残留的 Cd 含量(mg/L)。

#### 2.4.8.3 水体 Cd 去除率的测定

按照下式计算培养液中 Cd 去除率：

$$R = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\%$$

式中， $C_0$  为培养液中的初始 Cd 含量； $C_t$  为培养液中残留的 Cd 含量(mg/L)。

### 2.5 数据分析

本实验采用 Excel 和 GraphPad Prism 6.0 软件进行整理分析，采用 Multiple t tests 法进行分析比较。图片数据以平均值 $\pm$ SD 表示，重复三次，与对照组进行比较，显著性差异水平\* $P < 0.05$ ，极显著差异水平\*\* $P < 0.01$ 。



### 第三章 Cd 超富集植物材料筛选和生理响应分析

本研究为筛选最适用于治理水体 Cd 污染的浮萍株系,通过高通量筛选方法,以 30 mg/L Cd 处理 7 d 后叶片颜色变化为判断标准,筛选出 Cd 耐受植物材料。再以 0.5 mg/L 和 10 mg/L Cd 浓度下处理 7 d,比较耐受植物材料的生长速率、叶绿素含量、对 Cd 的富集能力和去除率,复筛出对 Cd 富集效果最佳的 Cd 超富集植物材料。再以最优 Cd 超富集植物材料品种为实验材料进行 Cd 浓度梯度和 Cd 胁迫时间梯度下的生理响应及富集情况,测定该植物在 Cd 胁迫条件下抗氧化系统以及根际微生物群落结构,初步从生理生化层面解释该植物材料富集 Cd 的原因,为今后利用最佳 Cd 超富集植物材料治理重金属污染水体提供理论依据。

#### 3.1 超富集植物筛选结果

对保存于资源库的 100 余个浮萍植物材料经过 30 mg/L Cd 处理 7 d 后,有 12 个植物材料叶片颜色变化较小,仍然保持绿色,生长状况受 Cd 胁迫影响较小。因此,初步确定 12 个浮萍植物材料为 Cd 耐受优势植物材料(图 3.1)。

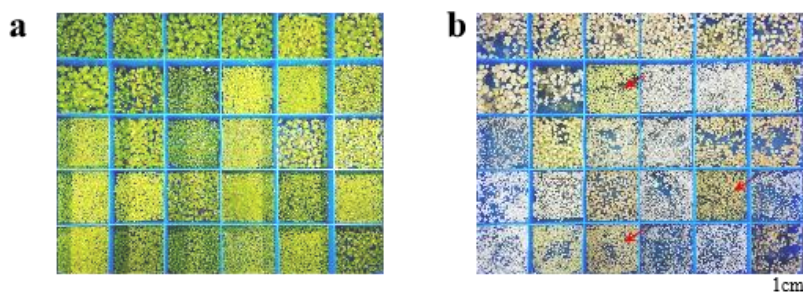


图 3.1 耐 Cd 植物材料筛选结果

注: (a)为 Cd 胁迫处理前植物样品的生长观察; (b) Cd 胁迫处理 7 d 后植物样品的生长观察。红色箭头标注材料为 Cd 耐受植物材料。

随后,对 Cd 耐受植物材料进行进一步生长和富集效果研究,0.5 mg/L Cd 浓度处理,所有植物材料都正常生长,0009、0014、0046 和 0107 植物材料的生长速率高于对照组,其中 0014、0107、0112 叶绿素总含量高于对照组。在 10 mg/L Cd 浓度条件下,所有植物材料的生长均受到严重抑制,其中 0014 生长速率最高,所有植物材料的叶绿素 a、b 及总含量均受到抑制,其中 0014、0031 含量较高。在 Cd 胁迫处理下 0010、0014、0107 体内 Cd 含量较高,Cd 富集量均大于 100 mg/kg,10mg/L Cd 胁迫 7d,0014 的富集量达到 2834.30 mg/kg,对水体中 Cd 的

去除率达到 82.50% (图 3.2)。因此, *Lemna minor* 0014 浮萍植物是本实验筛选出的用于修复水体 Cd 污染的最优植物材料。

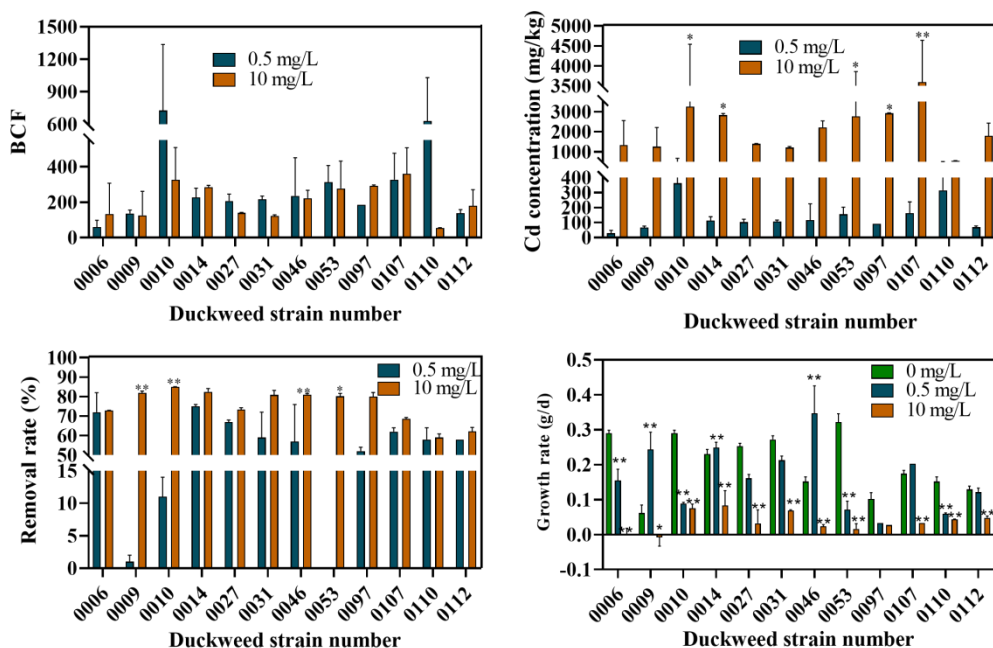


图 3.2 不同 Cd 浓度处理下对 Cd 耐受植物的影响

注: (a)为为生长速率(FW); (b)为为叶绿素含量; (c)为为 Cd 富集量; (d)为去除率。用 *t* 检验进行分析。

重复三次, 与对照组进行比较, \*表示差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

### 3.2 超富集植物 Cd 胁迫生理响应及富集情况

#### 3.2.1 Cd 胁迫下超富集植物的生长情况

随着 Cd 浓度的增加, 浮萍的生长速率减少; 而在 0~5.0 mg/L Cd 胁迫下, 浮萍可以正常生长。0.1~0.3 mg/L Cd 对浮萍生长无显著抑制作用, 0.5~5.0 mg/L Cd 对浮萍生长有显著抑制作用。0~0.3 mg/L Cd 处理 1 d 生长最快。0.5~5.0 mg/L 处理 1 d, 浮萍生长速率约为 0.5 g/d, 0~0.3 mg/L 处理 3~7 d, 浮萍生长速率约为 0.5 g/d, 0.5~5.0 mg/L 处理 3 d, 浮萍生长速率接近 0.2 g/d (表 3.1)。

表 3.1 不同 Cd 浓度和时间下超富集植物的生长速率

Cd (mg/L)	Growth rate (g/d)			
	1 d	3 d	5 d	7 d
0	0.91±0.11	0.52±0.02	0.39±0.06	0.67±0.26
0.1	1.22±0.07	0.47±0.02	0.47±0.03	0.46±0.22
0.3	0.86±0.23	0.40±0.08	0.38±0.05	0.37±0.07*
0.5	0.30±0.43**	0.18±0.15**	0.26±0.08**	0.26±0.03**

<b>0.7</b>	0.67±0.05	0.30±0.11*	0.30±0.06*	0.30±0.03**
<b>1</b>	0.52±0.11*	0.16±0.13**	0.37±0.02	0.39±1.03*
<b>2</b>	0.51±0.11*	0.15±0.05**	0.15±0.04**	0.24±2.11**
<b>3</b>	0.42±0.07**	0.17±0.08**	0.05±0.01**	0.25±3.12**
<b>4</b>	0.64±0.06	0.21±0.01**	0.10±0.01**	0.22±4.02**
<b>5</b>	0.28±0.09**	0.12±0.04**	0.07±0.05**	0.13±5.05**

注：用 *t* 检验进行分析。重复三次，与对照组进行比较，\*表示差异显著(P<0.05)；\*\*表示差异极显著(P<0.01)。

随着 Cd 浓度的增加，叶绿素含量增加；随着 Cd 胁迫持续时间的增加，浮萍叶绿素含量呈现先降低后升高的趋势，在 0.1~0.3 mg/L Cd 胁迫 7 d 时，浮萍叶绿素含量最高(表 3.2)。

表 3.2 不同 Cd 浓度和时间下超富集植物的叶绿素含量

Cd (mg/L)	Chlorophyll content (mg/g)			
	1 d	3 d	5 d	7 d
<b>0</b>	1.47±0.12	0.94±0.16	2.96±0.05	2.93±0.18
<b>0.1</b>	1.19±0.01	0.84±0.21	2.33±0.74	2.72±0.15
<b>0.3</b>	1.34±0.18	0.72±0.17	2.69±0.70	2.86±0.91
<b>0.5</b>	1.16±0.22*	0.92±0.19	2.50±0.70	2.39±0.29
<b>0.7</b>	0.82±0.39**	0.74±0.08	2.58±0.86	2.72±0.20
<b>1</b>	0.84±0.09**	1.00±0.18	2.31±0.53	2.82±0.30
<b>2</b>	0.89±0.05**	0.72±0.18	2.07±0.46	2.64±0.61
<b>3</b>	1.27±0.08	0.49±0.10**	2.46±0.33	2.76±0.06
<b>4</b>	0.90±0.12**	0.34±0.03**	2.21±0.61	2.26±0.12*
<b>5</b>	0.80±0.19**	0.29±0.06**	2.09±0.64	2.20±0.17*

注：用 *t* 检验进行分析。重复三次，与对照组进行比较，\*表示差异显著(P<0.05)；\*\*表示差异极显著(P<0.01)。

### 3.2.2 Cd 胁迫下超富集植物抗氧化酶活性

在 Cd 胁迫时会引起浮萍氧化应激，产生和积累 ROS。抗氧化防御系统被激活，包括 SOD、POD 和 CAT 在内的抗氧化酶在清除 ROS 中发挥作用。图 3.3 a~c 显示了浮萍的抗氧化酶活性。浮萍的 POD 活性随着胁迫时间的延长而逐渐降低。在处理 1 d 和 7 d 时，POD 活性随 Cd 浓度的增加呈先升高后降低的趋势，在 0.7~1.0 mg/L 时达到峰值。在处理第 3 d 和第 5 d，POD 活性随 Cd 浓度的增加而增加。胁迫第 3 d 时，POD 活性最低，为 0.3 mg/L Cd, 163.3 U/g。在胁迫第 5 天，POD 活性在 0.1 mg/L Cd (130.7 U/g) 时最低(图 3.3 a)。浮萍的 SOD 活性随

胁迫时间的增加呈先升后降的趋势，在胁迫第 3 天 SOD 活性最高(446.6 U/g)，在 0.1 mg/L Cd 胁迫第 5 天 SOD 活性最低，为 8.7 U/g (图 3.3 b)。随着胁迫时间的延长，浮萍的 CAT 活性逐渐降低。胁迫 1~5 d，CAT 活性随 Cd 浓度的增加先升高后降低，在 1.0 mg/L 时达到峰值(图 3.3 c)。植物产生的 ROS 可引起脂质过氧化，产生醛类物质，包括 MDA，醛类物质可与 DNA 和膜蛋白交联，增加细胞膜通透性，造成细胞损伤。MDA 含量反映了植物脂质过氧化程度。浮萍中 MDA 含量随着 Cd 胁迫的增加而增加，如图 3.3 d 在胁迫 5~7 d 时所示。胁迫第 3 d，Cd 浓度为 0.3 mg/L 时 MDA 含量最低，为 0.27  $\mu\text{mol/g}$ ；Cd 浓度为 2.0 mg/L 时 MDA 含量最高，为 0.82  $\mu\text{mol/g}$  (图 3.3 d)。超氧阴离子( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )是一种 ROS，可以将 NBT 还原为不溶于水的蓝色物质。通过 NBT 染色叶片组织，观察浮萍产生的  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ，以确定损害程度。如图 3.4 所示，叶片中出现的蓝色部分随着 Cd 浓度的增加而增加，表明浮萍产生的  $\text{O}_2^{\cdot-}$  随着 Cd 浓度的增加而增加，损害程度也随之增加。

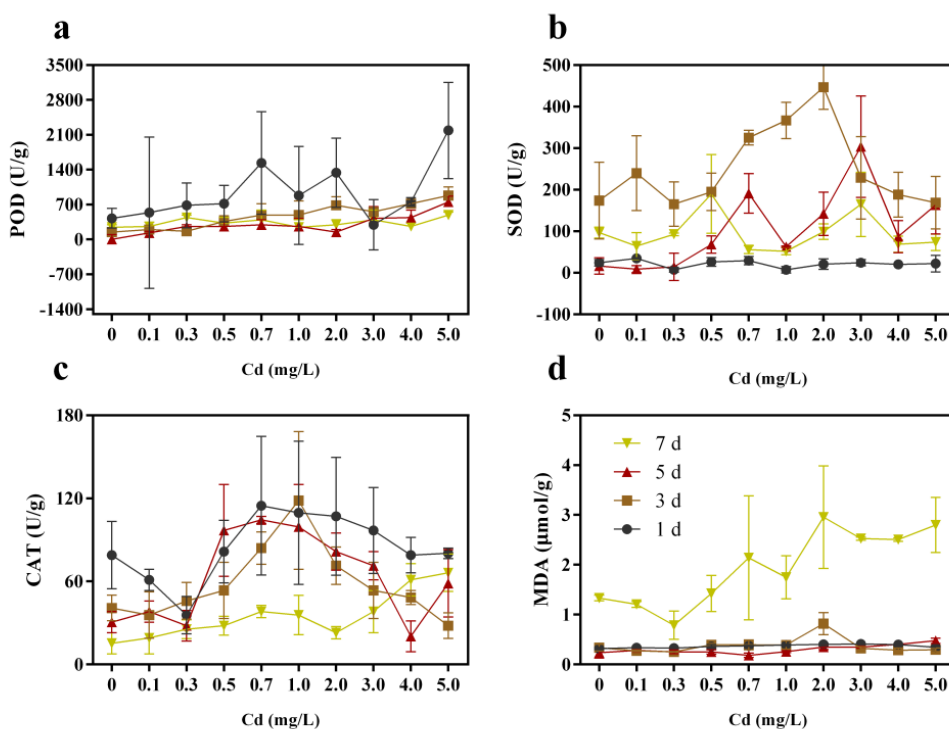


图 3.3 超富集植物在不同浓度、不同时间的抗氧化活性及氧化损伤

注：(b) POD 活性；(b) SOD 活性；(c) CAT 活性；(d) MDA 含量用  $t$  检验进行分析。重复三次，与对照组进行比较，\*表示差异显著( $P < 0.05$ )；\*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )。



图 3.4 超富集植物在不同 Cd 浓度处理下的  $O_2^-$  组织染色

### 3.2.3 Cd 胁迫下超富集植物的 Cd 富集情况

浮萍中 Cd 的含量可以直接反映浮萍对其富集程度。浮萍 Cd 富集量增加随 Cd 胁迫时间和浓度的增加而显著增加。1.0~5.0 mg/L Cd 胁迫 7 d 后, 浮萍的 Cd 富集量超过 100 mg/kg, 达到超富集植物标准, 最大值为 264.6 mg/kg(图 3.5 a)。BCF 是评价植物富集能力的重要指标, 用植物体内重金属浓度除以环境中重金属浓度计算得到。随着 Cd 浓度的增加, BCF 呈现先升高(0.1~0.5 mg/L)后降低(0.5~5.0 mg/L)的趋势。在 1.0 mg/L Cd 胁迫 7 d 后, 浮萍的 BCF 最高达到 115.97, 表明其在处理 Cd 污染水体方面具有很大的应用潜力(图 3.5 b)。水中 Cd 的去除效果可以直接用去除率来表示。如图 3.5 c 所示, 随着处理时间的延长, Cd 去除率普遍增加。胁迫 1 d 后, 除 0.1 mg/L 的 Cd 去除率为 40% 外, 其余 0.3~5.0 mg/L 的 Cd 去除率均达到 62%~76%, 说明浮萍能在短时间内达到满意的 Cd 去除率。0.1~1.0 mg/L Cd 处理 3 d 后, 浮萍对 Cd 的去除率为 60%~68%, 7 d 后去除率提高到 70% 以上, 说明其在低浓度下也有良好的去除率。0.1~5.0 mg/L Cd 处理 5~7 d 后, 浮萍的 Cd 去除率可达 70%~90%, 表明该水生植物可用于去除水中重金属污染, 去除效果较好。

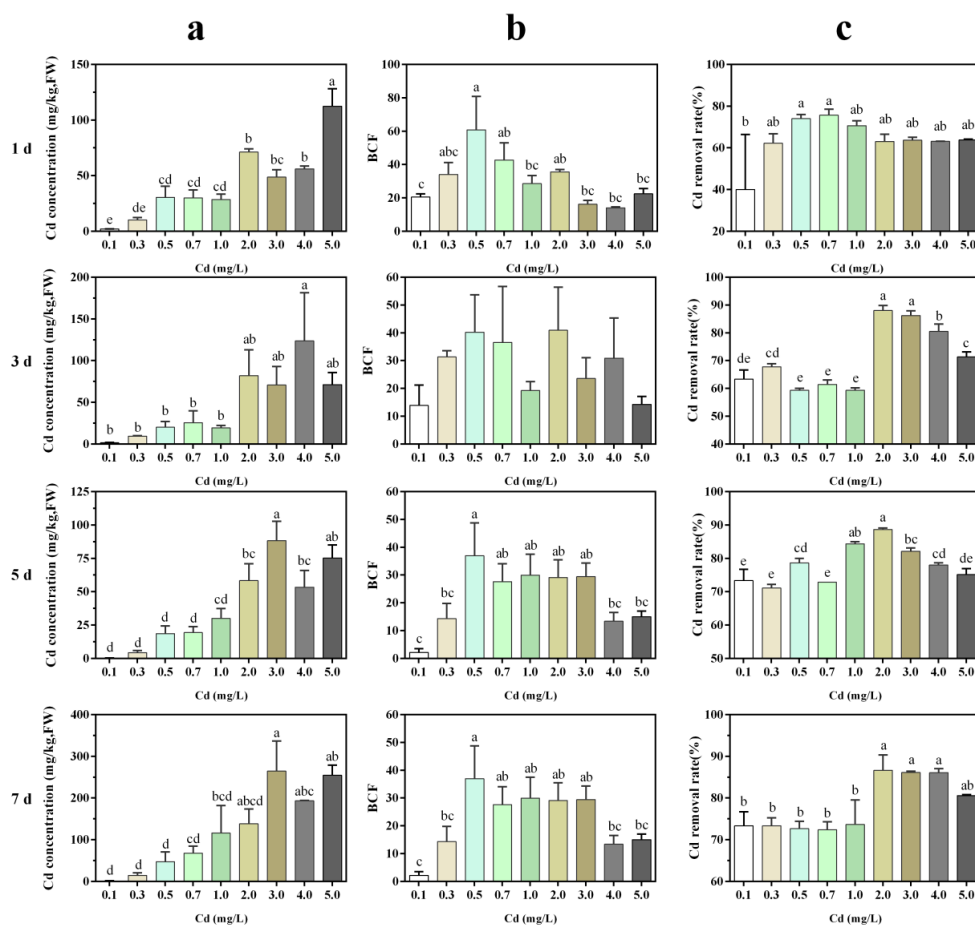


图 3.5 不同 Cd 浓度和时间下超富集植物对 Cd 的富集和去除率

注：(a) Cd 含量；(b) BCF；(c) Cd 去除率。t 检验进行分析。重复三次，不同小写字母表示两者间具有显著性差异( $P < 0.05$ )。

### 3.3 Cd 在植物不同组织中的分布情况研究

如图 3.6 所示，随着处理时间的延长和 Cd 浓度的增加，浮萍根部和叶片中 Cd 含量也有所增加，说明 Cd 在浮萍体内随时间积累。Cd 胁迫 12~24 h 后，Cd 主要在根内积累。0.1 和 0.5 mg/L Cd 处理 12 h 后，根 Cd 含量高于叶 Cd 含量。随着处理时间延长至 7 d，根、叶 Cd 含量无显著性差异(图 3.6 a、b)。0.5、1.0 mg/L Cd 处理 3 d 后，叶片中 Cd 含量超过根中 Cd 含量(图 3.6 b、c)，说明随着处理时间的延长，Cd 逐渐从根转运到叶中。环境中的 Cd 可以与植物根系分泌物形成络合物或沉淀。根细胞壁由纤维素、半纤维素和果胶组成，含有丰富的羟基、巯基和羧基官能团，还可以与 Cd 结合(Yang et al., 2021)。因此，Cd 主要是固定在植物的根部。然而，随着胁迫时间的延长或胁迫浓度的增加，根系的屏障作用

可能减弱,更多的 Cd 通过转运体转运到叶片中,这在众多研究中得到了证实(Yu et al., 2021)。

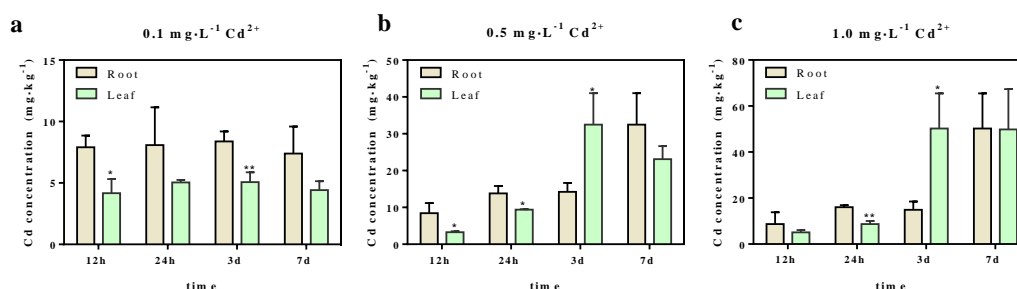


图 3.6 超富集植物不同组织中 Cd 含量

注: 用 *t* 检验进行分析。重复三次, Root 与 Leaf 组进行比较, \*表示差异显著( $P < 0.05$ ); \*\*表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

### 3.4. Cd 在植物不同亚细胞分布情况研究

如图 3.7 所示, 在 0.5~1.0 mg/L Cd 胁迫 12 h 后, Cd 在细胞壁组分中的含量为 4.36~6.06 mg/kg, 百分比为 39.59%~91.56%, 说明 Cd 在胁迫开始(12~24 h)主要集中在细胞壁组分(2.05%~95.52%)和细胞器组分(5.03%~97.80%)中, 最后集中在可溶性组分(0.14%~16.98%)中。Cd 浓度为 0.5~1.0 mg/L 时, 细胞壁组分的比例为 6.79%~21.34%, 显著低于浓度为 12 h 时的 39.59%~91.56%。细胞器组分由 5.03%~55.03%增加到 63.68%~92.83%。胁迫 3~7 d 后, Cd 主要存在于细胞器部分(46.64%~92.83%), 其次是细胞壁部分(6.79%~51.42%), 最后是可溶性部分(0.22%~12.76%), 表明 Cd 随胁迫时间的增加从细胞壁转移到细胞器。

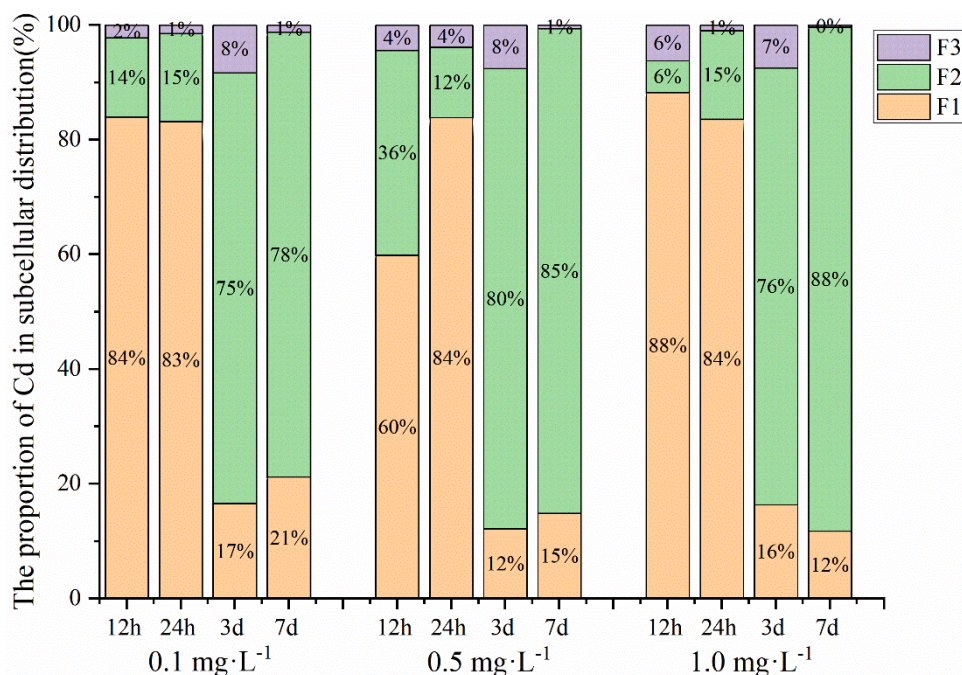


图 3.7 超富集植物各亚细胞组分 Cd 含量

注：F1 为细胞壁及破碎残渣；F2 为细胞器；F3 为细胞质。重复三次，各提取态间进行比较。

### 3.5 Cd 在植物体内的赋存形态研究

Cd 的化学形态与其毒性直接相关。极性越小，迁移能力越强，毒性越大。例如，80%乙醇以硝酸盐/亚硝酸盐、氯化物和氨基酚的形式提取 Cd，这些物质极性较小，毒性更大。Cd 毒性的五种化学形式，由高到低依次为 FE、FW、FNaCl、FHAc 和 FHCl。图 3.8 a~b 和图 3.8 b~c 分别为化学形态分布中 Cd 的比例和含量。在浮萍根和叶中，Cd 以 FNaCl 提取态为主(30.15%~88.66%)，其次为 FHAc (1.44%~32.25%)和 FHCl (2.06%~35.69%)。FW (1.34%~18.68%)和 FW (1.66%~7.43%) (图 4 a-b)萃取状态的比例最低。NaCl 萃取主要由果胶和蛋白整合 Cd 组成，这部分 Cd 可能与根细胞壁上的有机基团形成配合物，毒性较小(Huang et al., 2018)。研究表明，Cd 对富含羟基和羧基的蛋白质或含有巯基的侧链基团具有很强的亲和力，容易结合成配合物(Huang et al., 2022)。植物中较大比例的 Cd 处于 NaCl 萃取状态可能会减轻 Cd 毒性(Li et al., 2019)。



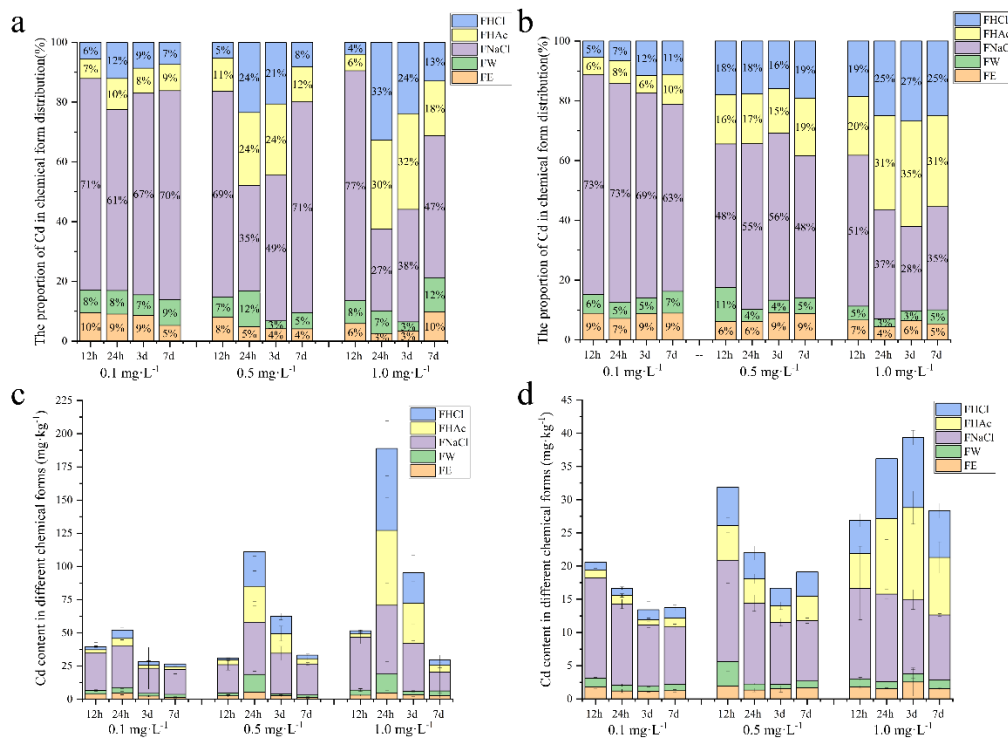


图 3.8 Cd 在植物不同组织中的化学形式。

注：浮萍(a)根和(b)叶中 Cd 化学形态的比例。浮萍(c)根和(d)叶中不同化学形态的 Cd 含量。FE：乙醇萃取状态；FW：去离子水萃取状态；FNaCl：氯化钠萃取状态；FHAc：醋酸萃取状态；FHCl：盐酸萃取状态。

### 3.6 Cd 对植物叶片超微结构的影响

Cd 对浮萍细胞水平的影响可以通过观察其超微结构来探讨,如图 3.9 所示。正常浮萍叶绿体呈卵形, 基质类囊体排列整齐致密, 细胞膜、细胞壁、叶绿体膜清晰。线粒体清晰, 说明线粒体和叶绿体能够很好地配合, 持续为光合物质的运输和积累提供能量(图 3.9 a、c、e)。10  $\mu\text{g/L}$  Cd 处理 15 d 后, 叶绿体呈带状, 基质类囊体结构疏松, 部分基质类囊体消失, 说明叶绿体在 Cd 胁迫下受到损伤。细胞膜与细胞壁之间的边界略模糊, 叶绿体膜模糊。线粒体膜部分受损, 出现空洞, 表明线粒体在 Cd 胁迫下受损(图 3.9 b、d、f)。植物受到重金属胁迫时, 细胞内部结构发生变化, 细胞的生理生化功能也受到影响。当重金属进入植物体内时, 细胞膜首先受到影响。细胞膜是植物细胞与外界环境进行物质交换和信息传递的介质和屏障, 主要由磷脂分子和蛋白质组成。植物在受到胁迫时, 会产生大量的活性氧, 这些活性氧可以攻击细胞膜, 破坏细胞膜中的不饱和脂肪酸和蛋白

质，导致细胞膜结构松散，膜通透性增加，细胞外物质更容易进入细胞，细胞内可溶性成分更容易外渗(Haider et al., 2021)。当重金属进入细胞内部时，对叶绿体、线粒体和其他细胞器的损伤加剧，表现为叶绿体膜和类囊体的消失，而叶绿体膜和类囊体是光反应的场所。因此，叶绿体光合作用中维持光能转换的重要结构完整性和秩序以及重金属对类囊体的损害会影响植物的光合作用(Wang et al., 2022)。此外，由于膜通透性增加，细胞色素 C 从线粒体膜间隙释放到细胞质中，激活 caspase-8 通路，引起细胞凋亡，影响植物生长和生理功能(Genchi et al., 2020)。

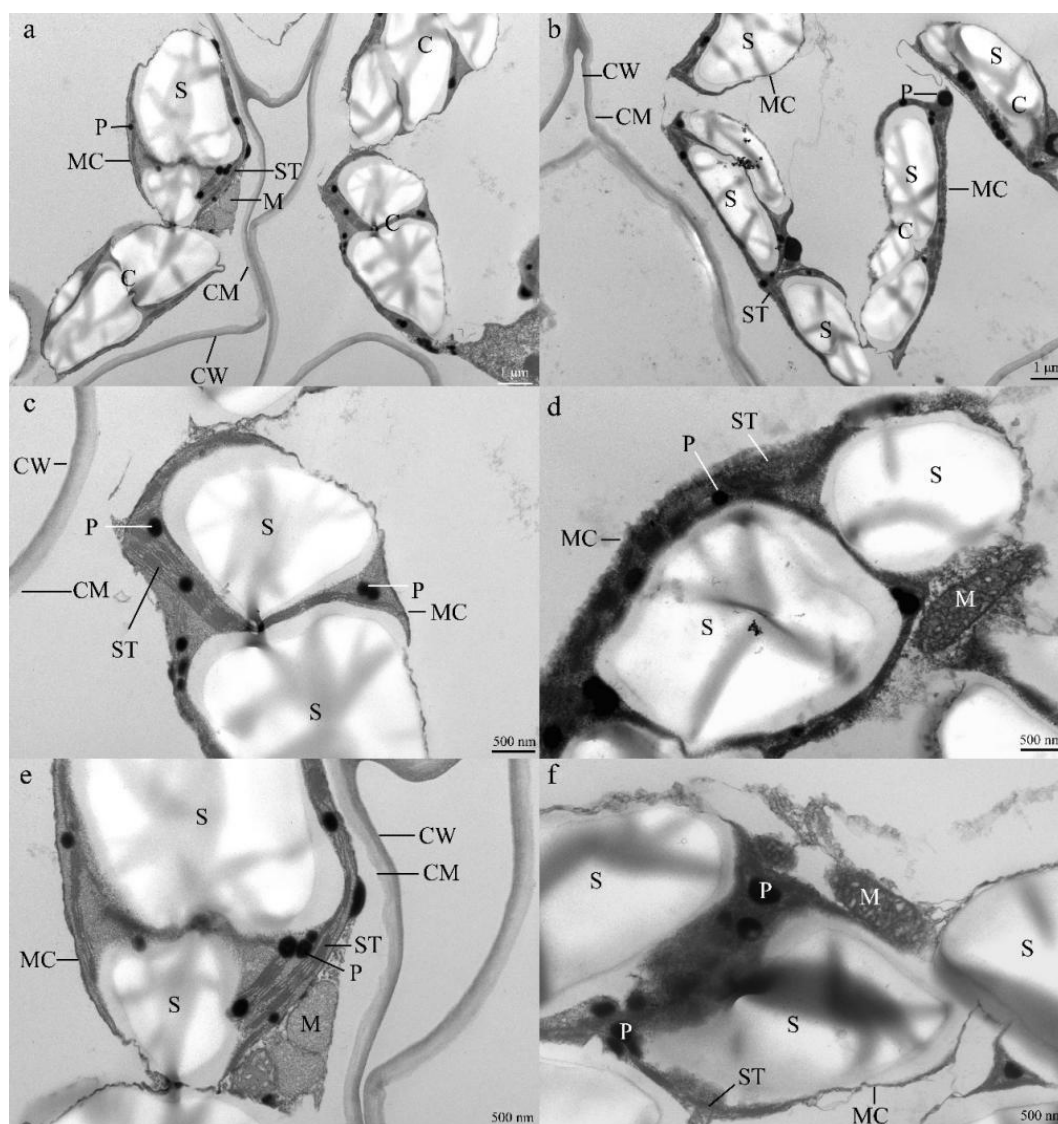


图 3.9 浮萍叶片的超微结构

注：(a、c、e)对照组和(b、d、f)Cd 处理组浮萍叶片超微结构。CW：细胞壁；CM：细胞膜；P：质体；S：淀粉粒；M：线粒体；ST：基质类囊体；C：叶绿体；MC：叶绿体膜。

### 3.7 Cd 对植物根际微生物群落的影响

研究表明浮萍根际微生物群落的组成随着环境的变化而变化,浮萍根际微生物群落可能参与去除环境中的污染物和浮萍的解毒(O'Brien et al., 2022)。 $\alpha$ -多样性是指特定区域生态系统内的多样性。微生物群落多样性指数越高,表明微生物群落的丰度和多样性越高;常用的指数有 Chao、Shannon、ACE 和 Simpson。Shannon 指数越高,群落物种丰富度越高,分布均匀;Chao 指数和 ACE 指数越高,群落丰富度越高,Simpson 指数响应群落均匀性,覆盖度指数响应可信度;覆盖度指数越高,表明测序结果能更准确地反映样品的真实情况和物种丰富度。结果如表 3.3 所示。Cd 处理后,Shannon 指数从 5.57 下降到 5.34,Chao 和 ACE 指数下降,Simpson 指数上升,覆盖指数为 0.98,表明结果具有较高的可靠性。应力暴露后,OTU 数量从 1982 年下降到 1901 年。Cd 胁迫后,浮萍根际微生物群落多样性下降,表明 Cd 可以影响浮萍根际微生物。

表 3.3 微生物多样性指数

Groups	shannon	simpson	ace	chao	coverage	OTUs
CK	5.57	0.013	1854.50	1901.23	0.98	1982
Cd	5.34	0.021	1690.84	1703.99	0.98	1901

图 3.10 a 为对照组和 Cd 处理组浮萍根际微生物群落在科水平上的组成。对照处理组优势菌群相似,但比例不同。在对照组中,微生物群落丰度最高的前 3 个科是 Comamonadaceae、Rhodobacteraceae 和 Saprospiraceae。Cd 胁迫下,植物微生物群落丰度最高的 3 个科依次为 Commonadaceae、Rhodobacteraceae 和 norank\_o\_Chloroplast。Cd 处理后,Comamonadaceae 和 norank\_o\_chloroplastaceae 的比例增加。*Comamonas sp.* XL8 是 Comamonadaceae 的一员,具有耐 Cd 和 Cd 积累能力。XL8 注入水稻可降低 Cd 毒性(Shi et al., 2021)。耐 Cd 微生物群落比例的增加可能有利于浮萍提高 Cd 耐受性,这也可能是浮萍耐 Cd 的潜在机制。图 3.10 b 是对照和 Cd 处理的根际微生物群落在门水平的热图,直观地显示了微生物的种类和丰度。在浮萍根际微生物样品中共检出 30 个门。Cd 胁迫后,黏菌群和脱球菌群增加,放线菌群、疣菌群和酸性菌群丰度减少。Cd 处理组的变形菌门、拟杆菌门和蓝藻门丰度较高,Cd 胁迫后蓝藻门丰度增加,说明 Cd 对浮萍根际微生物有影响。



## 第四章 Cd 超富集植物转录分析和关键基因挖掘

Cd 是环境中毒性最大的金属之一，对植物的生长和生产产生有害影响。浮萍是一种很有前途的 Cd 修复植物。本研究对浮萍的生长、Cd 富集和抗氧化酶活性进行了研究。本研究选择对 Cd 耐受性表型极端差异的同一品种的高 Cd 耐受性浮萍(HCD)和低 Cd 耐受性浮萍(LCD)植株，进行了全基因组转录组分析，探索其潜在的分子机制，研究人员结果表明 Cd 胁迫对浮萍生长速率、叶绿素含量和抗氧化酶活性均有显著影响，且两品系间存在差异。在全基因组转录组分析中，RNA-seq 文库产生了 544, 347, 670 个 clean reads，HCD 和 LCD 之间分别鉴定出 1608 和 2045 个差异表达基因。抗氧化系统在 HCD 的核糖体生物合成过程中显著表达，而在 LCD 中没有。脂肪酸代谢和乙醇产量显著增加。 $\alpha$ -亚麻酸代谢可能在浮萍的 Cd 解毒中起重要作用。这些发现有助于了解高积累植物的 Cd 耐受机制，并为未来植物修复研究奠定基础。

### 4.1 Cd 胁迫 HCD 和 LCD 植物的生理响应比较

#### 4.1.1 Cd 对 HCD 和 LCD 植物生长的影响

为了比较 HCD 和 LCD 在 Cd 胁迫下的明显差异，我们在 Cd 处理开始后 12 h、24 h、3 d 和 7 d 观察了两个品种的生长情况。HCD 和 LCD 的生物量均有所下降，以第 3 天和第 7 天的生物量下降最为明显，生长速度明显下降(图 4.1 a, b)。Cd 胁迫 12 h 和 24 h 后，对照和 Cd 处理组浮萍的生长速率差异不显著，说明 Cd 毒性对浮萍的影响需要一定的响应时间才能显现表型。Cd 胁迫下 LCD 的生长速率比 HCD 的生长速率明显高 3 d(图 4.1 c)。说明浮萍对 Cd 的耐受性存在较大的种内差异，且品系间差异较大。处理后，cd 处理组浮萍叶绿素含量与对照组相比有一定程度的下降。随着 Cd 处理时间的增加，叶片逐渐变黄(图 4.1 g, h)。HCD 处理 7 d 后，叶绿素含量显著下降 52.87% (0.20 mg/g) (图 4.1 d)。在 LCD 中，叶绿素含量在 3d 后显著下降(图 4.1 e)。结果表明，随着 Cd 处理时间的延长，叶绿素含量逐渐降低。在 Cd 胁迫的不同时间，HCD 材料的叶绿素含量总体上高于 LCD 材料，且在第 3 d 时显著高于 LCD 材料，最高可达 0.24 mg/g (图 4.1 f)。

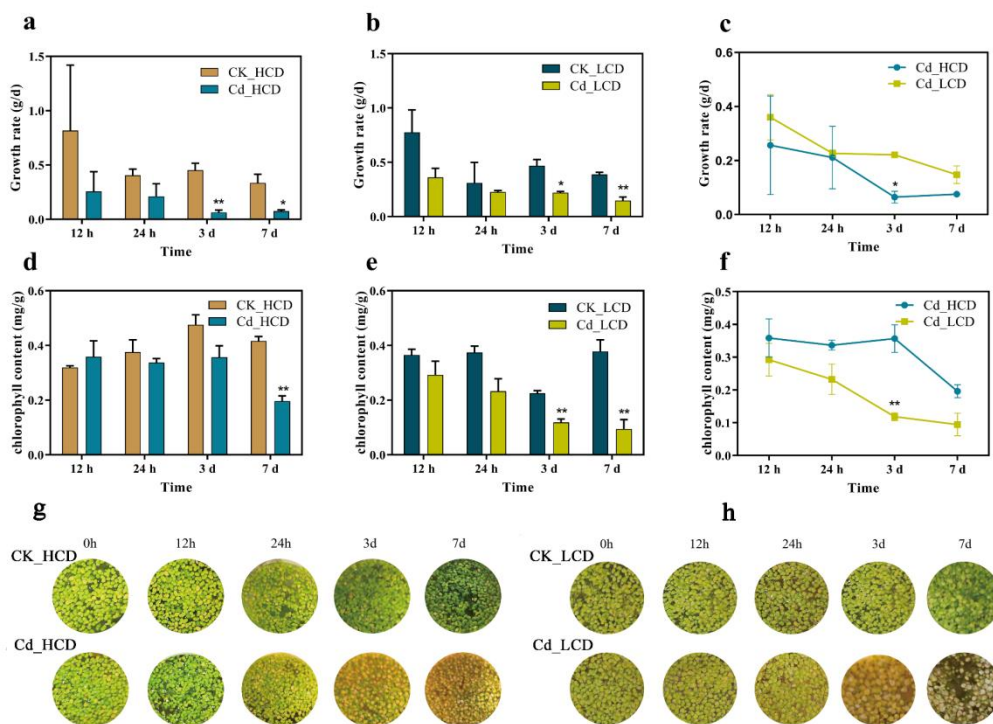


图 4.1 不同时间点 Cd 胁迫下植物的生长指标

注：(a)低耐 Cd 材料(HCD)生长速率；(b)高耐 Cd 材料(LCD)生长速率；(c)HCD 与 LCD 生长速率比较；(d) HCD 叶绿素含量变化；(e) LCD 叶绿素含量变化；(f) HCD 与 LCD 叶绿素含量比较；(g) HCD 生长情况；(h) Cd 胁迫下 HCD 生长情况。条形图表示平均值±SE (n=3)。星号表示 Cd 处理样本与对照样本在每个时间点的显著差异(\*P<0.05, \*\*P<0.01)。

#### 4.1.2 Cd 对 HCD 和 LCD Cd 含量及去除率的影响

为了进一步研究 HCD 和 LCD 的 Cd 耐受特性，我们测定了 HCD 的 Cd 浓度、BCF 和 Cd 去除效率(图 4.2)。HCD 的 Cd 浓度随着 Cd 处理时间的增加逐渐降低，在 24 h 达到峰值(238.06 mg/kg (DW))。而 LCD 的 Cd 浓度随着 Cd 处理时间的增加逐渐增加，在 7 d 达到峰值(127.63 mg/kg (DW))(图 4.2 a)。BCF 是衡量植物富集污染物能力的重要指标。HCD 的 BCF 在 24 h 达到峰值(640.45)，随着 Cd 处理时间的延长逐渐降低。LCD 的 BCF 从 12 h 开始随着 Cd 处理时间的增加逐渐增加，并在 7 d 达到峰值(329.78) (图 4.2 b)。结果表明，Cd 处理后 HCD 和 LCD 的 BCF 发生了变化。不同浮萍品系的去除率存在差异。HCD 材料表现出去除效率显著高于 LCD 应变。两种浮萍材料的 Cd 去除效率都随着处理时间的增加而增加(图 4.2 c)。结果表明，HCD 的去除率大于 LCD，并且在环境修复中，可以通过延长 Cd 浓度的时间来提高 Cd 浓度的效果。

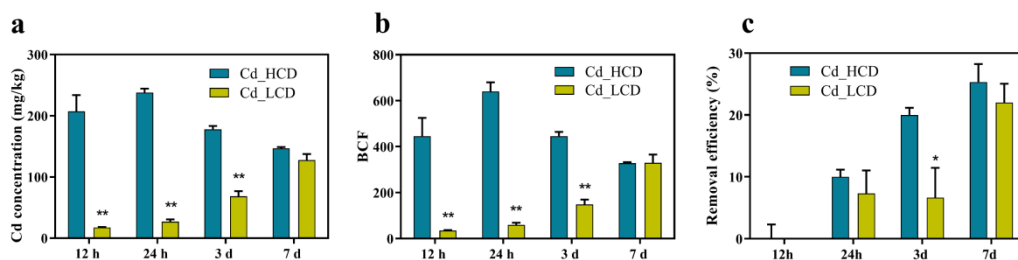


图 4.2 Cd 胁迫不同时期浮萍 Cd 相关指标的变化

注：(a)Cd 浓度变化，(b)BCF 变化，(c)HCD 和 LCD 在 Cd 胁迫下去除效率的变化。条形图表示平均值±SE (n = 3)。星号表示 cd 处理样本与对照样本在每个时间点的显著差异(\*P<0.05, \*\*P<0.01)。

### 4.1.3 Cd 对 HCD 和 LCD 抗氧化酶和谷胱甘肽巯基转移酶的影响

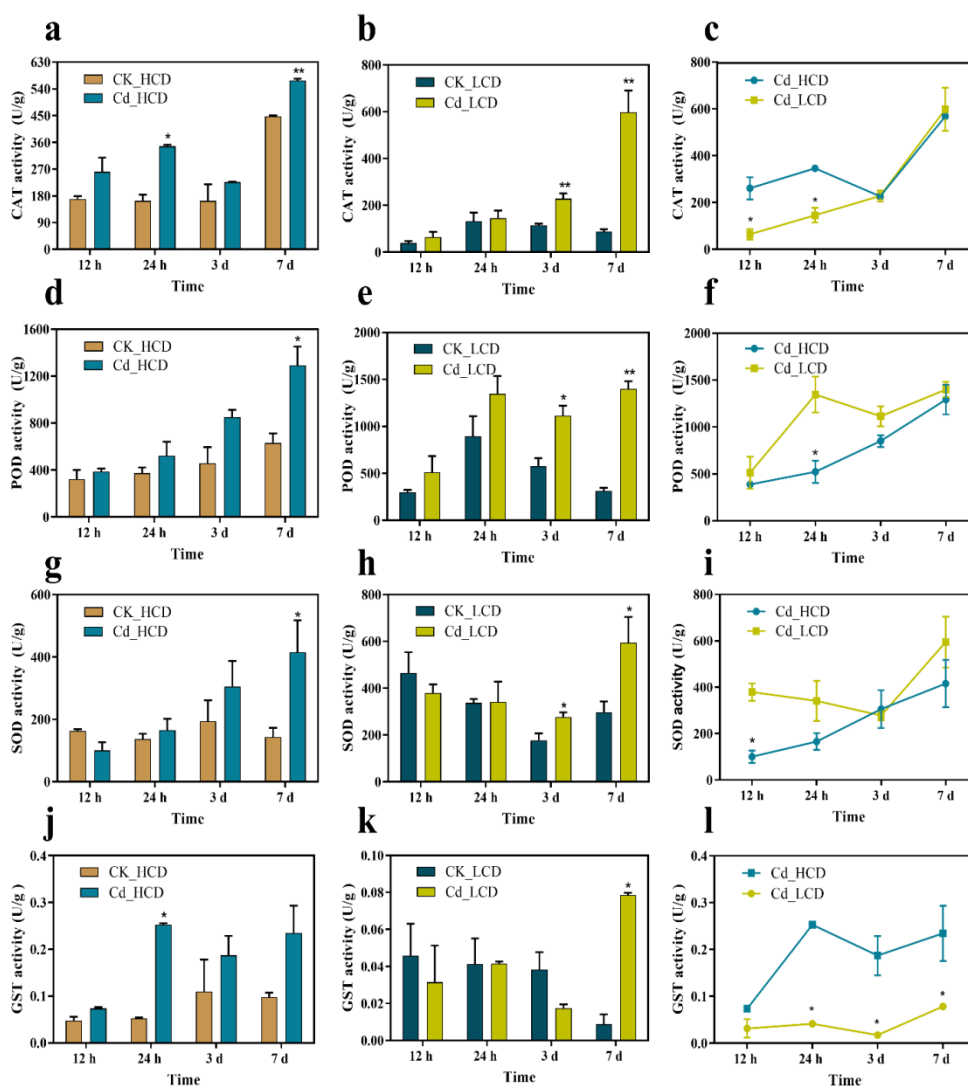


图 4.3 Cd 胁迫不同时期浮萍抗氧化酶和谷胱甘肽硫转移酶的变化

注: (a) HCD 的 CAT 活性, (b) LCD 的 CAT 活性, (c) HCD 和 LCD 的 CAT 活性比较, (d) HCD 的 POD 活性, (e) LCD 的 POD 活性, (f) HCD 和 LCD 的 POD 活性比较, (g) HCD 的 SOD 活性, (h) LCD 的 SOD 活性, (i) HCD 和 LCD 的 SOD 活性比较, (j) HCD 的 GST 活性, (k) LCD 的 GST 活性, (l) Cd 处理下 HCD 和 LCD 的 GST 活性比较。条形图表示平均值±SE (n = 3)。U/g 是一个酶活性单位, 表示在最佳温度下, 1g 组织在 1min 内转化 1μmol 底物的能力。星号表示 Cd 处理样品与对照样品在每个时间点的显著差异 (\*P<0.05, \*\*P<0.01)。

图 4.3 a~i 显示了两种浮萍材料的抗氧化酶活性。随着 Cd 胁迫时间的延长, 两种浮萍品系的 POD、CAT 和 SOD 活性逐渐升高。处理 7 d 后, POD、CAT 和 SOD 活性显著高于对照组(图 4.3 a、b、d、e、g、h)。LCD 材料的 POD 活性高于 HCD 株系(图 4.3 f)。这可能表明 LCD 需要产生更多的 POD 来响应 Cd 应力。谷胱甘肽 s-转移酶(GST)是植物外源解毒和细胞抗损伤的主要系统, 与对照相比添加 0.5 mg/L Cd 处理后, 两种浮萍的 GST 活性总体上有所增加(图 4.3 j,k)。在 Cd 胁迫 24 h 时, HCD 材料的 GST 活性峰值为 0.2528 U/g(图 4.3 j)。LCD 在 Cd 胁迫下 7 d 达到最高活性(0.0786 U/g), 仅为 HCD 材料最高活性的四分之一。HCD 材料在不同时间点的 GST 活性均高于 LCD 材料(图 4.3 k)。

## 4.2 浮萍转录组测序和分析

### 4.2.1 Cd 胁迫下的转录组测序结果

为了进一步了解浮萍耐 Cd 的分子机制, 我们对两个浮萍品系暴露于 0.5 mg/L Cd 浓度下 12 h 的样本进行了转录组分析。经过原始数据过滤后, 总共生成了 544, 347, 670 个 clean reads。每个样品的 clean reads 约为 41, 233, 077~54, 521, 819, 平均 GC 含量为 54.18~55.00%。HCD 和 LCD 的 Q20 和 Q30 值分别超过 97.26%和 89.59%。参考基因组的 clean read 定位率为 52.13%~59.18%, 唯一定位率为 46.64%~53.03%(表 4.1)。所有生物重复均表现出很强的相关性(图 4.4 a)。r 值为 0.91, 组间差异大于组内差异(图 4.4 b)。大多数 unigenes (45.89~64.79%) 的差异表达水平在 0 和 5 之间(图 4.4 c)。

表 4.1 浮萍 HCD 和 LCD 基因型转录组数据的质量

Group	CK_HCD	Cd_HCD	CK_LCD	Cd_LCD
Raw Reads Count	43835874	43830797	46377103	57237400



Clean Reads Count	41233077	41778800	43915528	54521819
Q20 Bases Ratio	97.28%	97.58%	97.26%	98.06%
Q30 Bases Ratio	89.87%	90.36%	89.59%	92.60%
GC Bases Ratio	55.00%	54.71%	54.18%	54.41%
Total mapped	20812521 (52.13%)	22147187 (54.56%)	24396197 (56.99%)	31782882 (59.18%)
Uniquely mapped	18634487 (46.64%)	19784897 (48.76%)	21864070 (51.08%)	28483426 (53.03%)

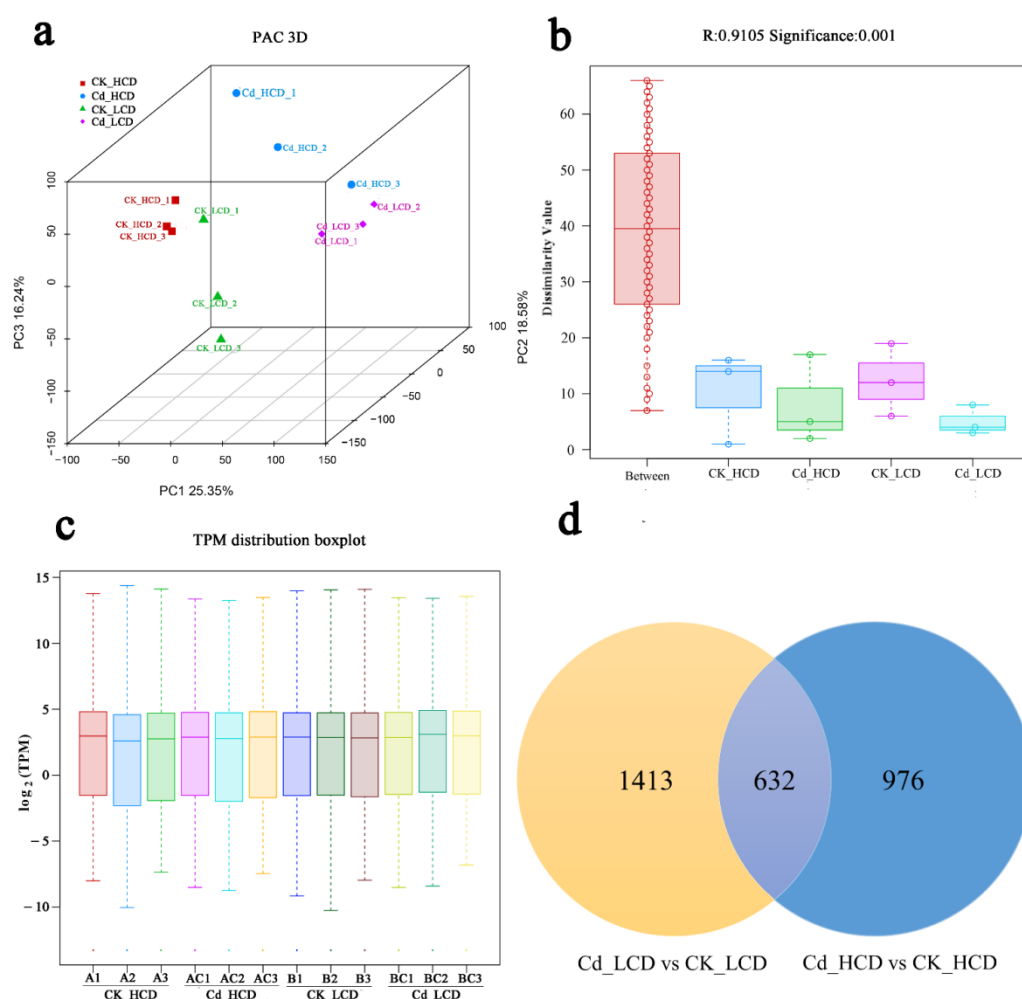


图 4.4 Cd 胁迫下浮萍的转录组学分析

注：(a)主成分分析图，不同颜色或形状的点代表不同环境或条件下的样本组；(b)组间相似性分析箱形图。r 值越接近 1 组间差异越大，r 值越接近 0 组间和组内差异越不显著；(c)基因表达箱形图。每个区域的箱形图从上到下分别有 5 个统计量(最大值、上四分位数、中位数、下四分位数和最小值)；(d) 差异表达基因维恩图。

### 4.2.2 Cd 胁迫下差异表达基因的鉴定

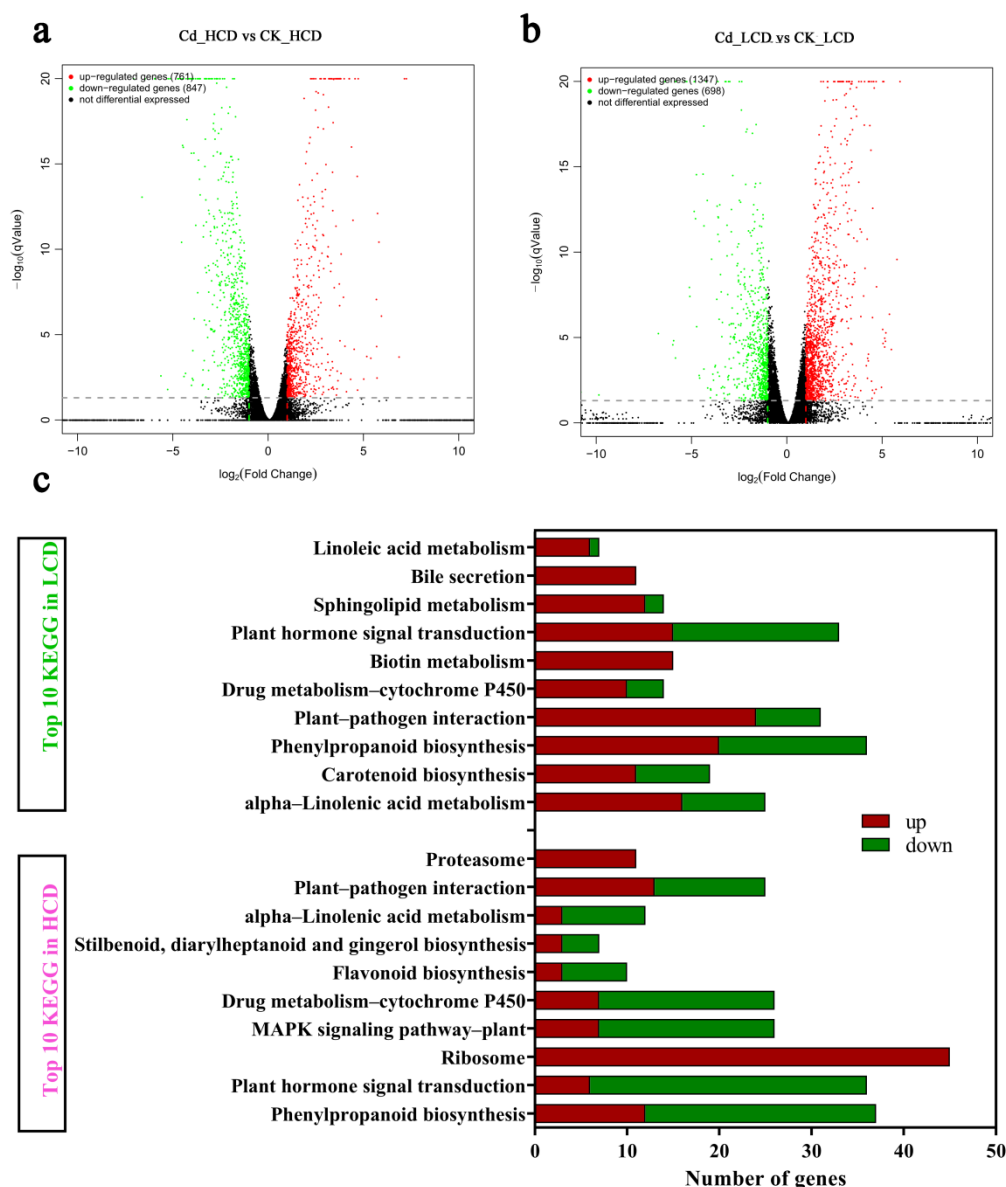


图 4.5 Cd 处理下浮萍转录组差异表达基因

注：(a)HCD 和(b)LCD 表达差异火山图。横轴为基因在不同样本组间的表达差倍数变化。纵轴表示基因表达变化的统计显著性 p 值。图中每个点代表一个基因，红色表示上调基因，绿色表示下调基因，黑色表示无差异基因。(c) Cd\_HCD 对 CK\_HCD 和 Cd\_LCD 对 CK\_LCD 的 KEGG 富集前 10 个 DEGs。

为了进一步研究不同植物材料对 Cd 耐受的分子机制，我们在整个 Cd 处理过程中鉴定了差异表达基因(DEGs)。如图 4.5 a 所示，Cd 处理后的 HCD 与对照(Cd\_HCD vs. CK\_HCD)相比，共发现 1608 个 DEGs，其中 761 个 DEGs 显著上调，847 个 DEGs 显著下调。对于 LCD 株系，Cd 处理后与对照(Cd\_LCD vs.

CK\_LCD)相比,共鉴定出 2045 个 DEGs,其中 1347 个 DEGs 显著上调,698 个 DEGs 显著下调(图 4.5 b)。最明显的是,HCD 和 LCD 在上调和下调基因数量上存在较大差异(约 2 倍差异)。Cd 处理后 HCD 和 LCD 产生 632 个 DEGs(图 4.4 d)。KEGG 富集分析显示,HCD 和 LCD 样品中分别有 16 条和 23 条代谢途径对 Cd 胁迫有显著响应。 $\alpha$ -亚麻酸(ALA)代谢、苯丙素生物合成、植物激素信号转导和药物代谢-p450 途径在两个浮萍品系中都有显著的注释。例如,在植物激素信号转导中,Cd\_HCD 和 CK\_HCD 分别显著标注了 36 个 DEGs (6 个上调,30 个下调),Cd\_LCD 和 CK\_LCD 分别显著标注了 33 个 DEGs (15 个上调,18 个下调)(图 4.5 c)。因此,信号转导可能在浮萍对 Cd 胁迫的响应中起重要作用。这些研究结果进一步表明,单基因的功能注释有助于探索浮萍 Cd 吸收基因型差异的潜在机制。

### 4.2.3 Unigenes 和 DEGs 的功能注释

为阐明 DEGs 的潜在生物学功能,进行了 GO 富集分析。GO 富集分析显示,54 个 GO 在 HCD 中显著富集,40 个 GO 在 LCD 中显著富集。为了了解这些 DEGs 的功能,我们使用 GO 注释对 Cd 胁迫下浮萍中预测的 DEGs 的功能进行了分类,包括分子功能(MF)、细胞成分(CC)和生物过程(BP) (图 4.6)。此外,研究发现对刺激的响应、液泡和单加氧酶活性等可能在非生物胁迫中起关键作用的 GO 在两个材料之间存在差异(图 4.6)。

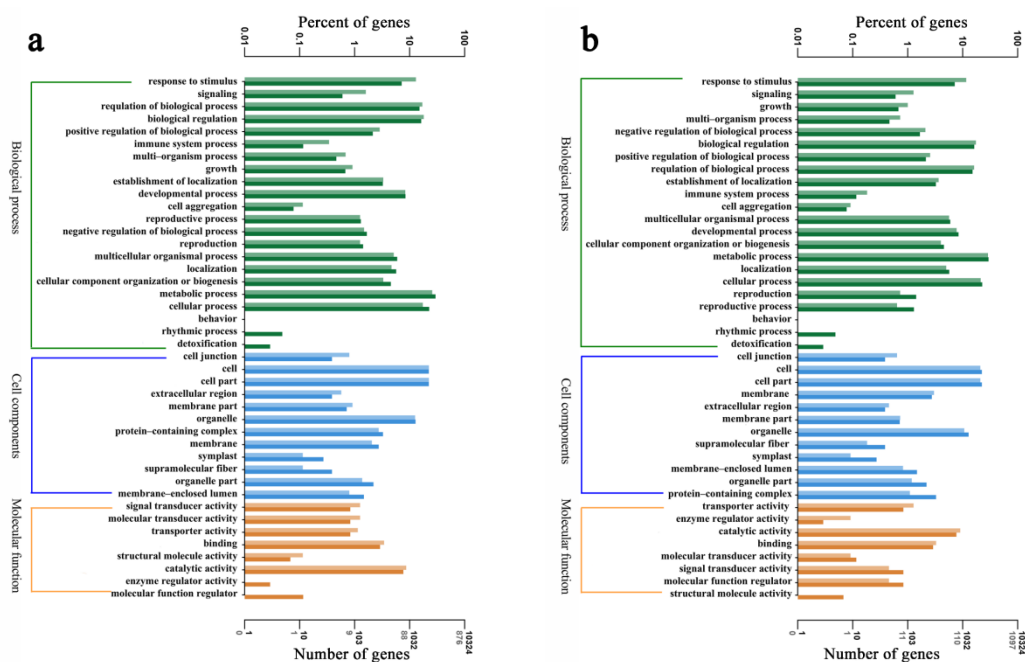


图 4.6 (a) HCD 和(b) LCD 的 GO 功能分类

注：较浅的颜色代表不同的基因；深色代表所有的基因。

#### 4.2.4 Cd 胁迫下功能富集基因分析

检测到功能富集的基因(图 4.7)，耐 Cd 材料主要富集在信号转运机制、次生金属生物合成转运代谢、碳水化合物转运代谢、氨基酸转运代谢等方面。Cd 敏感的 LCD 株系主要富集于次生金属的合成、转运和分解代谢(图 4.7)。这些结果表明信号转运机制、次生金属的生物合成转运和代谢、碳水化合物转运和代谢、氨基酸转运和代谢途径在 HCD 的 Cd 耐受中起重要作用。

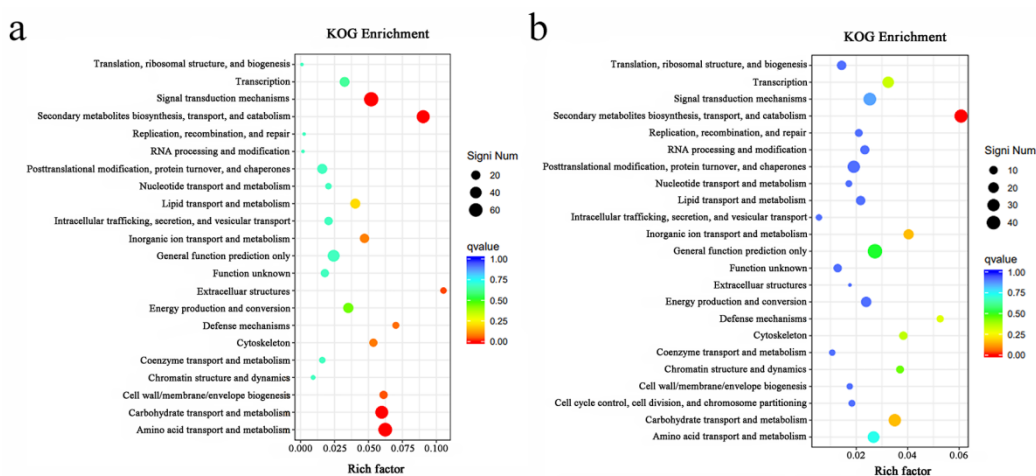


图 4.7 (a) HCD 和(b) LCD 浮萍转录组差异表达基因 KOG 富集

#### 4.2.5 Cd 胁迫下淀粉和细胞壁代谢途径响应

研究分析了参与淀粉和蔗糖代谢、细胞壁合成和其他聚糖降解途径的基因谱。Cd 胁迫下苯丙氨酸氨基水解酶(PAL)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)和肉桂酰辅酶 A 还原酶(CCR)下调。此外，两种浮萍材料在 Cd 处理下，纤维素降解途径的酶表达均下调(图 4.8)。

#### 4.2.6 Cd 胁迫下的硫和谷胱甘肽代谢影响

Cd 影响了两个浮萍品系硫和谷胱甘肽代谢相关基因的表达。在 Cd 胁迫下，3 酰-磷酸腺苷-5 酰-硫酸磷酸合成酶和硫酸腺苷酸还原酶(谷胱甘肽)(APR)的表达均上调。此外，Cd 胁迫下，半胱氨酸合成酶(cysK)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)表达上调(图 4.8)。

#### 4.2.7 Cd 胁迫下活性氧代谢响应

在 HCD 中，编码 CAT 和过氧化物酶(PRX)的基因表达增强。抗氧化酶编

码基因的表达在 LCD 材料中没有变化。此外，编码 2-羟基酰基辅酶 A 分解酶 (HACL1)、酰基辅酶 A 氧化酶(ACOX)、2,4-二烯基辅酶 A 还原酶(PDCR)和长链酰基辅酶 A 合成酶(ACSL)的基因在脂肪酸氧化过程中表达增强(图 4.8)。这些结果表明，不同浮萍品系在 Cd 胁迫下的基因表达可能存在差异。

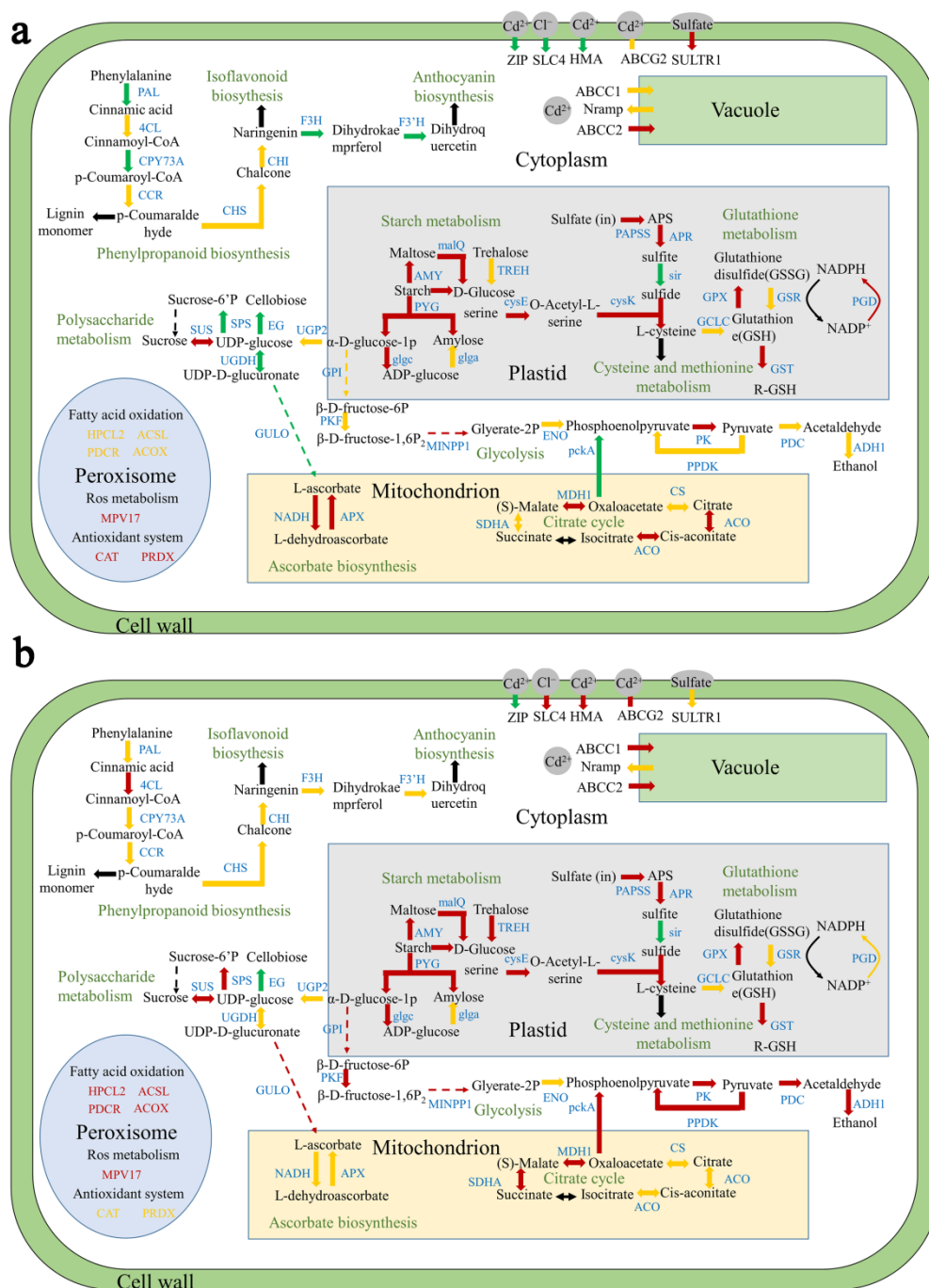


图 4.8 浮萍对 Cd 的解毒机制

注：(a)HCD 和(b)LCD 的代谢途径。红色箭头表示上调，绿色箭头表示下调，黄色箭头表示混合调节。虚线表示在该途径中表达未改变或在本研究中未涉及的基因被省略。本研究未涉及黑色箭头表示的代谢通量。

### 4.2.8 其他关键基因参与 Cd 的耐受

每个材料 Cd 耐受相关基因在 Cd 处理反应中有差异表达(图 4.7 和图 4.8)。碳酸酐酶(CA)和溶质载体 SLC26、ABCB1、ABCC2 以及 WRKY 转录因子在 Cd 胁迫下显著上调。在 LCD 中, SLC4、SLC26、ABCA3、ABCC1 和 ABCG2 表达上调。此外, 在 LCD 中, WRKY 表达下调。此外, 许多伴侣蛋白在 LCD 和 HCD 中都有注释, 表明这些伴侣蛋白在 Cd 胁迫响应中很重要。

### 4.2.9 DNA 修复对 Cd 胁迫的响应

为了探究浮萍对 Cd 耐受的可能分子机制, 我们研究了参与复制、转录和翻译的基因的表达(图 4.9)。增殖细胞核抗原(PCNA)在浮萍中表达上调, 而在浮萍中表达不变。皮瓣内切酶-1(Fen1)在 LCD 中表达下调。此外, 参与 DNA 复制的 DNA 连接酶 1 的表达在 LCD 中上调。

### 4.2.10 RNA 和蛋白质相关生物学过程响应

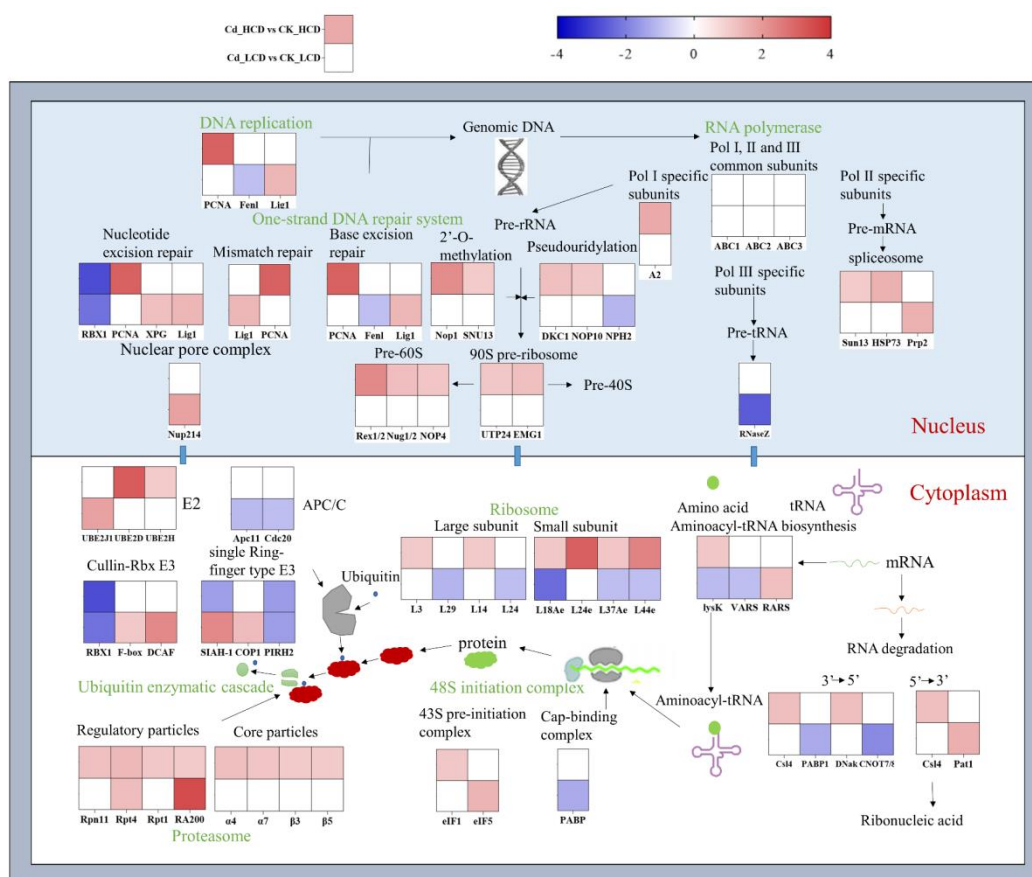


图 4.9 Cd 胁迫下浮萍基础生物过程的响应

注: 几个生物过程以及相关的蛋白质复合物响应 Cd 在图中提出。在图中, 上面是细胞核, 下面是细胞质。

Cd\_HCD 与 CK\_HCD、Cd\_LCD 与 CK\_LCD 分别代表 0.5 mg/L Cd 处理 12 h 时 HCD 和 LCD 的基因表达



Lminor_014643	<i>LmGSTU1</i>	96.58	248.37	2.26E-07	up ↑	KOG0406
Lminor_017249	<i>LmGSTU2</i>	813.16	2319.93	6.29E-05	up ↑	KOG0406

### 4.3.1 浮萍转录组 *LmGST* 生物信息学分析

通过转录组筛选得到的 *LmGST* 基因序列，结合系统该基因家族的系统发育树(图 4.11)和基因家族基序分析结果(图 4.12)，对 17 个 *LmGST* 基因进行了命名和分类。分析结果表明在 17 个 *LmGST* 基因中，共有 5 种 *GST* 基因类型，包括 8 个 U 型 *GST*，4 个 F 型 *GST*，3 个 L 型 *GST*，1 个 T 型 *GST* 和 1 个 Z 型 *GST*。*LmGST* 基因序列的开放阅读框长度为 468~2043 bp，主要长度集中在 648~699 bp。编码蛋白的氨基酸数量为 156~681 个，主要数量在 216~233 个。结果表明，在浮萍的转录组中，*GST* 基因家族的类型大部分为 U 型 *GST*，其次为 F 型 *GST* 和 L 型 *GST*，T 型 *GST* 和 Z 型 *GST* 较少，ORF 长度约为 640~700 bp。

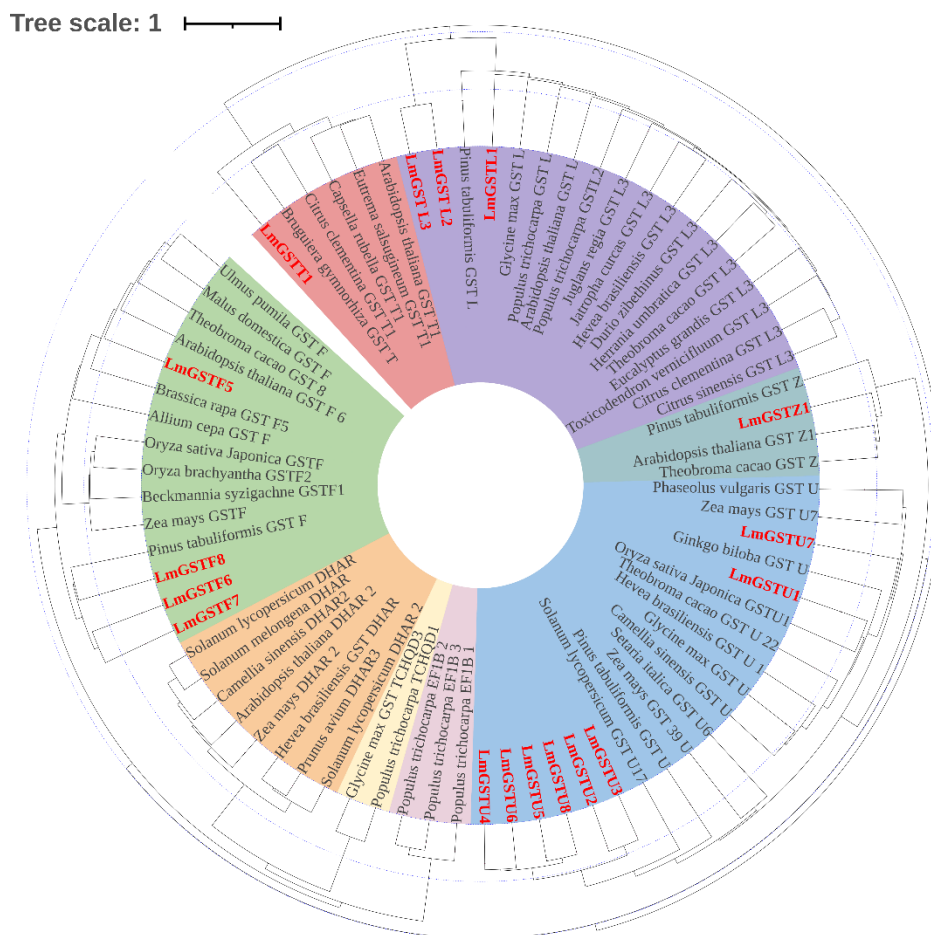


图 4.11 浮萍 *LmGST* 基因家族系统发育树

注：红色标出的为筛选得到的 *LmGST* 基因





萍品系在 Cd 胁迫下分别有 1608 和 2045 个 DEG，基因型差异显著。淀粉代谢、硫代谢和 ROS 通路被激活，谷胱甘肽合成相关基因表达上调，以消除 cd 诱导的 ROS 的影响。遗传中心教条的基因表达在 Cd 暴露后 12 h 内被触发。在 Cd 胁迫下，参与 Cd 吸收和转运的基因如 ABC 转运蛋白被积极表达。同时，通过 KEGG 代谢通路分析发现 GSH 代谢通路中 *GST* 基因表达明显上调。基于转录组数据，筛选并检测了 3 个基因在 Cd 胁迫下表达明显上调。这些结果提高了我们对浮萍在转录组水平上对 Cd 耐受的潜在机制的理解，以及未来对 Cd 耐受相关通路和基因的研究奠定了基础。

## 第五章 植物超富集 Cd 关键基因验证及遗传转化

本研究在课转录组基础上，对 Cd 胁迫后表达量显著增加的 *LmGST* 进行基因克隆，成功克隆得到 1 个 *LmGST* 基因(*LmGSTF3*)，蛋白编码区(Coding sequence, CDS)为 561bp，编码 186 个氨基酸。并对浮萍 *LmGST* 基因相对表达量进行检测，探索在 Cd 胁迫下随着 Cd 胁迫时间的延长，*LmGST* 基因相对表达水平的变化。本研究进一步对克隆得到的 *LmGST* 基因进行功能验证，验证在 Cd 胁迫下在原核表达系统中表达该基因是否能增强大肠杆菌的 Cd 耐受性。首先，将 *LmGST* 基因构建至原核表达载体，转化大肠杆菌，然后在不同浓度 Cd 胁迫下研究转基因大肠杆菌与对照菌相比，其生长状态、菌落形成情况和对培养液中 Cd 的去除率。同时，通过亚细胞定位分析 *LmGST* 基因编码蛋白在细胞发挥功能的表达位置。此外，还建立了浮萍稳定遗传转化体系，为后续关键基因的功能验证奠定基础。

### 5.1 *LmGST* 基因的克隆和定量分析

成功克隆得到 *LmGSTF3*，蛋白编码区(Coding sequence, CDS)为 561bp(图 5.1)，编码 186 个氨基酸。本研究进一步对相对表达量进行检测，发现在 Cd 胁迫 12h 时，*LmGST* 基因表达量显著增加；随后 *LmGSTF* 基因表达量比对照组降低；但在 Cd 胁迫 7d 时，*LmGST* 基因表达量显著高于对照组。基因定量表达分析结果表明，*LmGST* 基因可能在最初响应 Cd 胁迫和最终适应 Cd 胁迫过程中发挥重要作用。

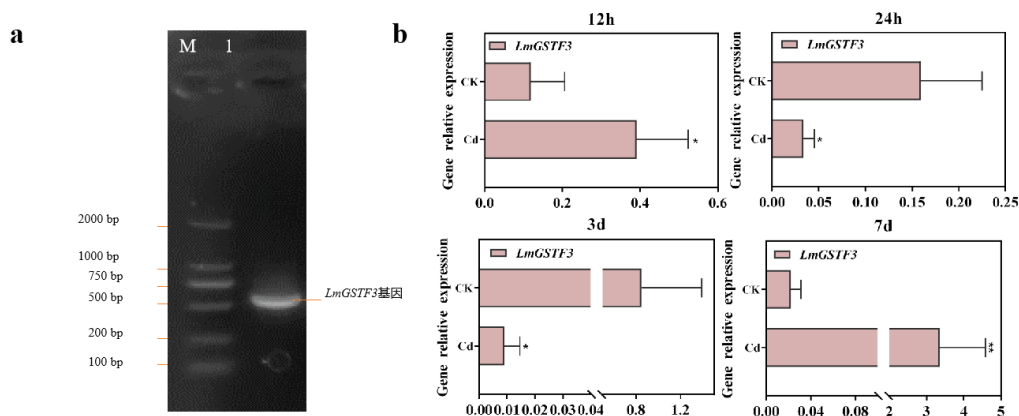


图 5.1 *LmGST* 扩增和定量表达结果

注：(a) *LmGST* 扩增电泳图；(b) *LmGST* 基因相对表达水平。M：DNA Marker；1：PCR 扩增产物。

## 5.2 *LmGST* 基因的原核表达分析

通过 *Bam*HI和 *Sac*I双酶切构建 *LmGST* 基因重组原核表达载体, 转化大肠杆菌, 成功获得转入 *LmGST* 基因的重组菌(图 5.2 a 和 b)。滴板试验结果发现, 重组菌和对照菌在正常平板上的菌落形态一致, 而在 200 mg/L Cd 胁迫平板上对照菌和重组菌的菌落数量明显减少, 但转基因 *LmGST* 大肠杆菌形成菌落更多(图 5.2 c)。生长曲线测定结果显示, 在不加 Cd 胁迫情况下, 对照菌的生长优于重组菌。但在不同 Cd 浓度处理下, 重组菌优于对照菌, 且随着 Cd 浓度的增加, 重组菌的生长优势逐渐显现。在 600 mg/L 高浓度 Cd 胁迫下, 微生物的生长趋于平缓, 但重组菌依然略优于对照菌(图 5.2 d)。研究结果表明 *LmGST* 基因的转入, 能够明显提高大肠杆菌对 Cd 的耐受性。

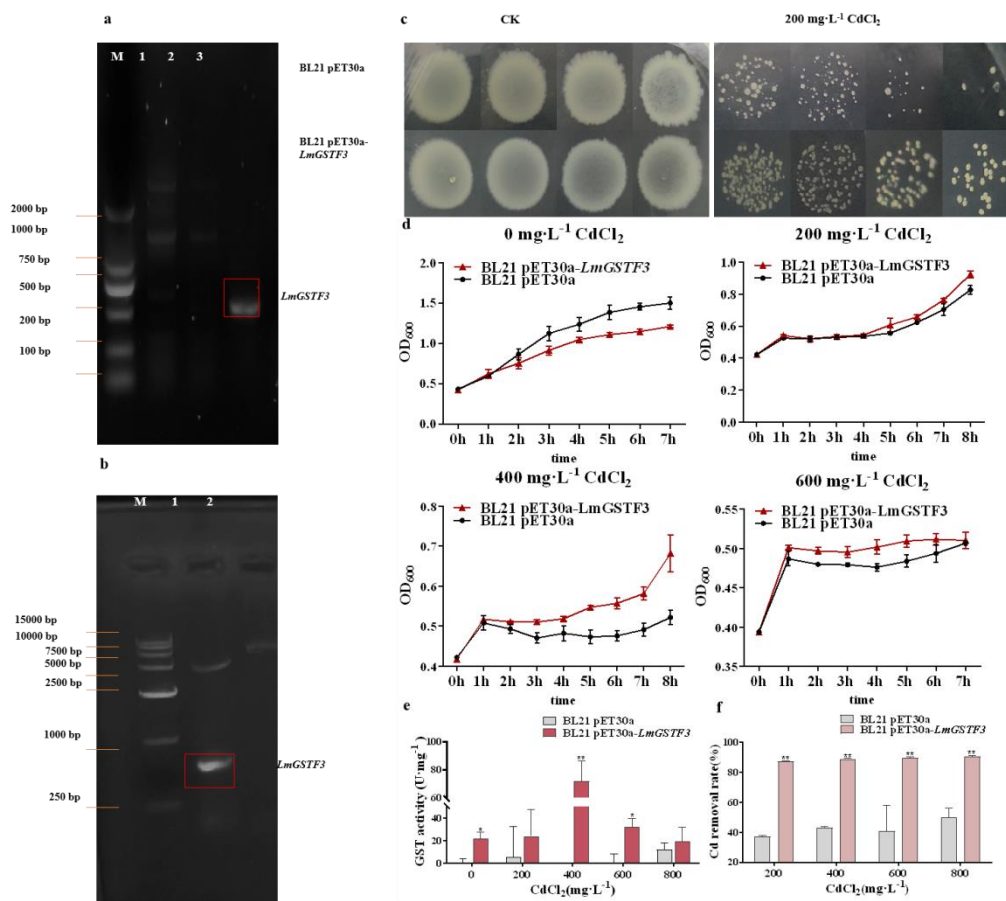


图 5.2 *LmGST* 基因原核表达结果

注: (a)菌落 PCR 图; (b)双酶切图(*Bam*HI 和 *Sac*I 双酶切); (c) Cd 胁迫平板上菌落形成图; (d)不同 Cd 浓度下大肠杆菌生长曲线; (e)不同 Cd 浓度下大肠杆菌 GST 酶活性; (f)不同 Cd 浓度下大肠杆菌 Cd 去除率。

不同 Cd 浓度下测定 GST 酶活性显示, 转基因 *LmGST* 重组菌 GST 酶活性在

正常生长情况下高于对照菌，表明即使没有 Cd 胁迫，IPTG 也能启动原核表达系统 GST 的表达。在 Cd 胁迫条件下，重组菌 GST 酶活性依然显著高于对照菌，在 400 mg/L Cd 胁迫时 GST 酶活性达到最高(图 5.2 e)。此外，检测培养液残留 Cd 含量结果显示，转基因 *LmGST* 重组菌的 Cd 去除率在所有 Cd 浓度处理条件下均高于对照菌。转基因 *LmGST* 重组菌的 Cd 去除率均高于 85%，比对照菌提高约两倍(图 5.2 f)。以上结果表明，*LmGST* 基因可能与增强 Cd 的耐受性有关，使转入 *LmGST* 基因的重组菌在 Cd 胁迫时维持生长，从而提升培养液中 Cd 的去除率。

### 5.3 *LmGST* 基因的亚细胞定位分析

构建 *LmGST* 亚细胞定位植物表达载体，通过 35S 强启动子启动 *LmGST* 和 *GFP* 融合基因的表达。转化农杆菌后瞬时转化本氏烟草叶片，在荧光显微镜下观察 GFP 荧光蛋白。结果如图 5.3 所示，在细胞质、细胞核周围观察到融合蛋白的表达，表明 *LmGST* 基因编码的 *LmGST* 蛋白定位于细胞质和核膜。

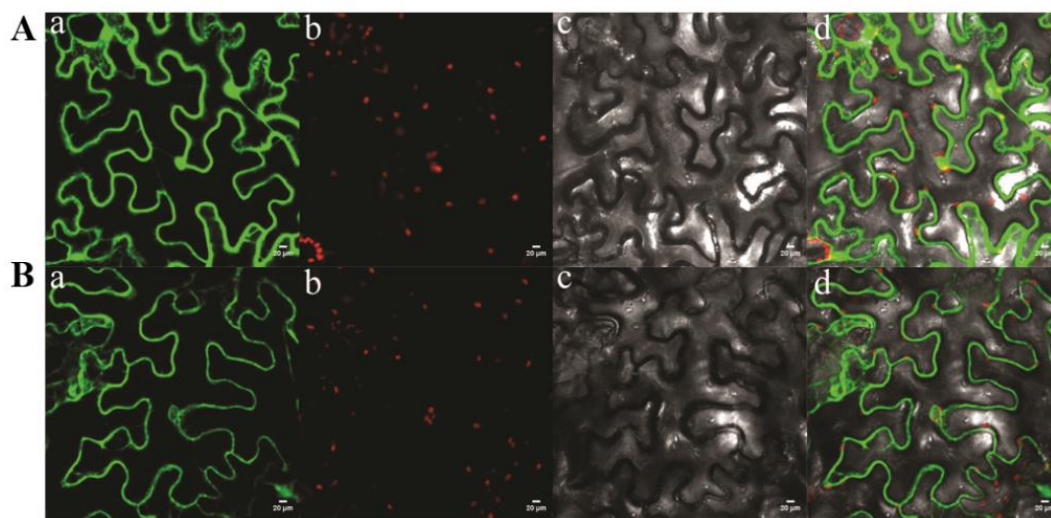


图 5.3 *LmGST* 基因亚细胞定位分析

注：A：GFP 空载；B：GSTU1-GFP 重组载体。a：荧光通道；b：叶绿体荧光通道；c：明场；d：叠加图。

### 5.4 浮萍稳定遗传转化体系的建立

本研究通过组织培养成功实现了浮萍植物愈伤组织诱导和叶状体再生诱导(图 5.4)，建立了稳定的遗传转化体系，并通过筛选获得了转基因株系。筛选的愈伤组织再生成为叶状体后，也能成功染上蓝色，说明愈伤组织遗传转化体系也是能够稳定表达的(图 5.5)。



图 5.4 浮萍的组织培养过程图

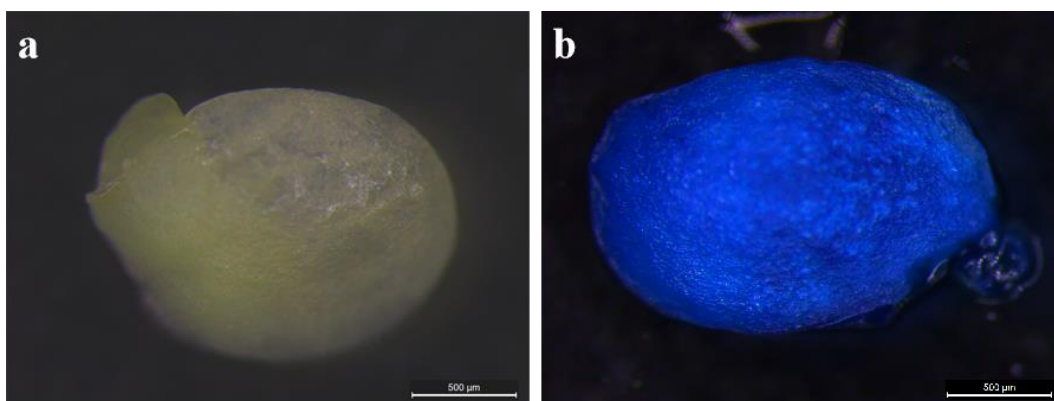


图 5.5 转基因植物 GUS 染色结果

注：(a)野生型对照组和(b)阳性转基因叶状体 GUS 染色结果。

## 5.5 小结

本研究克隆得到 1 个 *LmGST* 基因的 CDS 序列，并构建了 *LmGST* 基因原核表达载体成功转化大肠杆菌。通过 *LmGST* 基因的原核表达发现，在 400~800 mg/L  $\text{CdCl}_2$  胁迫下，转基因 *LmGST* 肠杆菌比对照菌生长更好，在 Cd 胁迫平板上重组

菌形成的菌落更多，表明 *LmGST* 的转入，能够显著提高大肠杆菌对 Cd 的耐受性。通过测定重组菌和对照菌的 GST 酶活性，发现转 *LmGST* 基因的重组菌在 IPTG 诱导下可以成功表达具有催化活性的 GST 蛋白，且 Cd 胁迫下 GST 酶活性显著上调。此外，通过测定培养液中残留的 Cd 含量，发现转 *LmGST* 基因的重组菌的 Cd 去除率显著高于对照菌，Cd 去除率高达 85% 以上，比对照菌 Cd 去除率提高 1.8~2.3 倍，表明 *LmGST* 基因的转入显著促进了重组菌 Cd 的去除。本研究还对 *LmGST* 进行了亚细胞的定位研究，通过构建植物表达载体转化农杆菌，再以农杆菌瞬时转化本氏烟草叶片，发现 *LmGST* 融合蛋白在烟草叶肉细胞的细胞质和核膜中表达，验证了 *LmGST* 主要是通过细胞质发挥催化转运等功能。最后，本研究针对所用的浮萍材料，建立了稳定的愈伤组织遗传转化体系，转化效率达到 75%，GUS 染色结果证实遗传转化体系稳定高效，表明该遗传转化系统可用于目的基因的转基因验证。

## 第六章 过表达 *LmGST* 对 Cd 胁迫下植物的影响

本研究将 *LmGST* 基因构建至植物表达载体中，根据建立的浮萍遗传转化体系，将 *LmGST* 基因在浮萍中进行过表达，得到转 *LmGST* 基因新的浮萍种质资源。测定在 0、0.5 和 10 mg/L Cd 胁迫下过表达 *LmGST* 基因浮萍和野生型浮萍的生理生化指标，包括根长、生长速率、叶绿素含量和抗氧化酶酶活的研究，比较转基因前后的差异。进一步研究过表达 *LmGST* 基因浮萍与野生型浮萍在 Cd 富集量和 Cd 去除率上的差异，为验证浮萍中的 GST 解毒功能的机制提供理论依据，创制的转基因浮萍株系也可为 Cd 污染水体提供新的植物材料。

### 6.1 过表达 *LmGST* 对 Cd 胁迫下植物根长的影响

浮萍根中的 Cd 主要分布在根冠和根伸长区的表皮和管胞中，抑制浮萍根的伸长，导致浮萍根长变短。在 0.5 mg/L Cd 胁迫后，转入了 *LmGST* 基因的 OE-1，OE-2，OE-4 株系的根长明显长于 WT；在 10 mg/L Cd 胁迫 7 d 后，OE-2，OE-3，OE-4 株系平均根长分别为 3.9、2.6 和 4.1 cm，是 WT 根长的 3.2、2.2 和 3.4 倍，表明转入 *LmGST* 基因明显减弱了 Cd 对根长的抑制作用(图 6.1)。

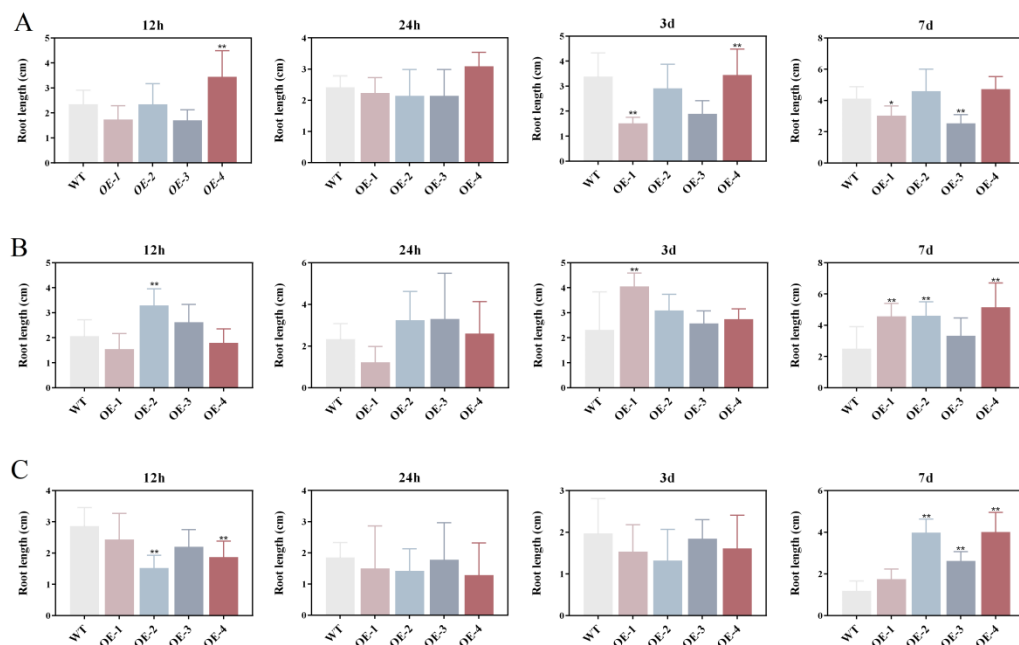


图 6.1 Cd 对过表达 *LmGST* 浮萍根长的影响

注：A：CK 处理组，B：0.5mg/L Cd 处理组，C：10 mg/L Cd 处理组。每个组重复三次，以平均值±SD 表示。用 t 检验进行分析，与 WT 进行比较，\*p<0.05，\*\*p<0.01。

进一步在 10 mg/L Cd 胁迫下测定转基因株系的脱落率，发现第 7 d 时，OE-



2 和 OE-4 株系根脱落率分别为 43.3 和 43%，低于 WT 的根脱落率(60%)，表明过表达 *LmGST* 对缓解根脱落的效果良好(图 6.2)。

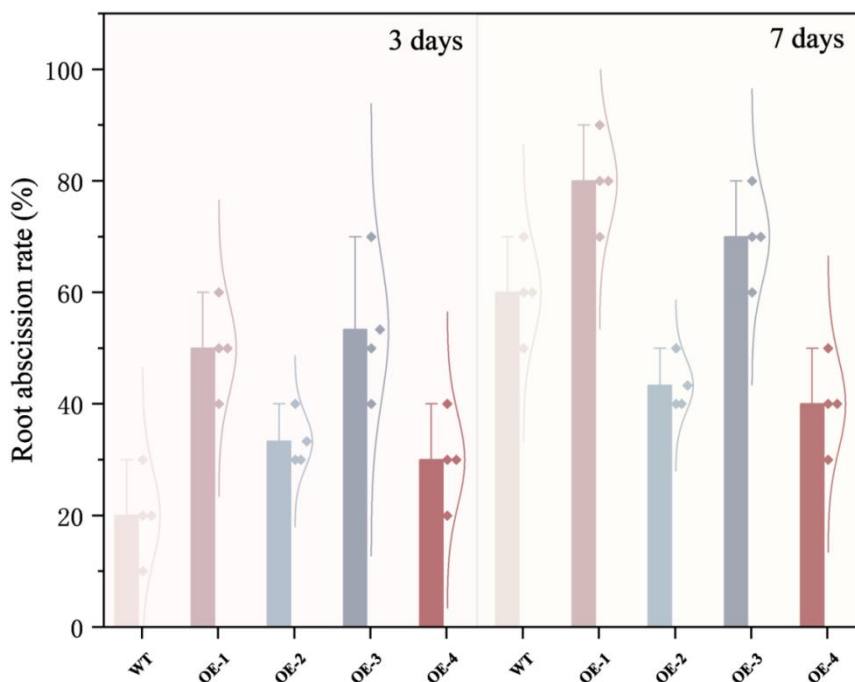


图 6.2 Cd 对过表达 *LmGST* 浮萍根长的影响

### 6.2 过表达 *LmGST* 对 Cd 胁迫下植物生长速率的影响

在 10 mg/L Cd 胁迫 24h 后，OE-2，OE-4 株系的生长速率显著高于 WT，表明 *LmGST* 能提升浮萍对于高浓度 Cd 的耐受性。

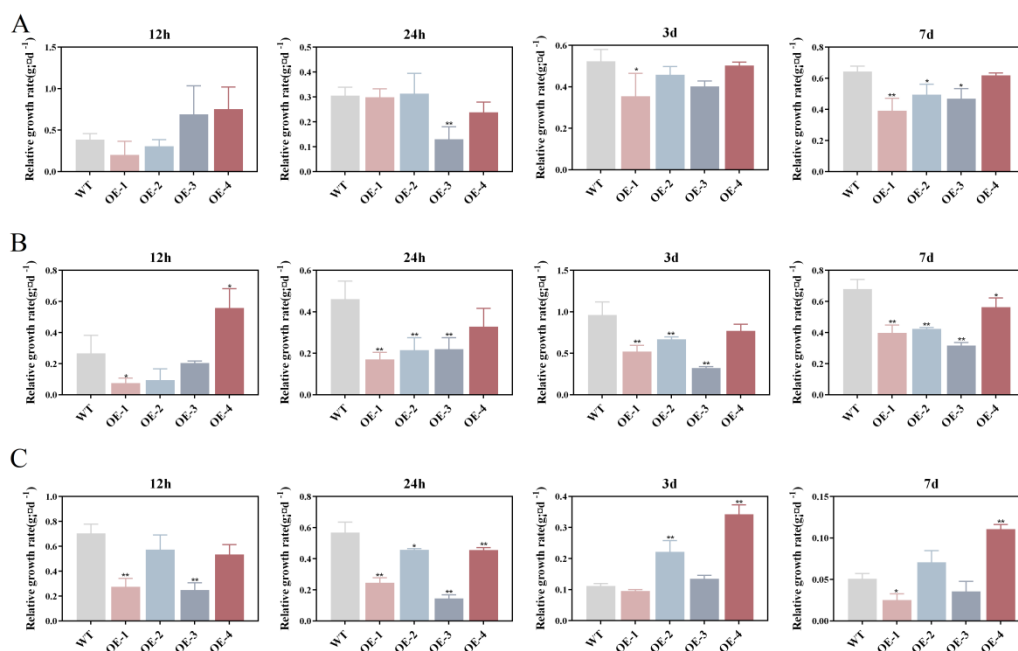


图 6.3 Cd 对过表达 *LmGST* 浮萍生长速率的影响

注：A：CK 处理组，B：0.5mg/L Cd 处理组，C：10 mg/L Cd 处理组。每个组重复三次，以平均值±SD 表示。用 t 检验进行分析，与 WT 进行比较，\*p<0.05，\*\*p<0.01。

### 6.3 过表达 *LmGST* 对 Cd 胁迫下植物叶绿素含量的影响

过表达 *LmGST* 基因对 10 mg/L Cd 胁迫 3 d 后的叶绿素毒害的缓解效果最为明显，与浮萍生长速率结果一致。

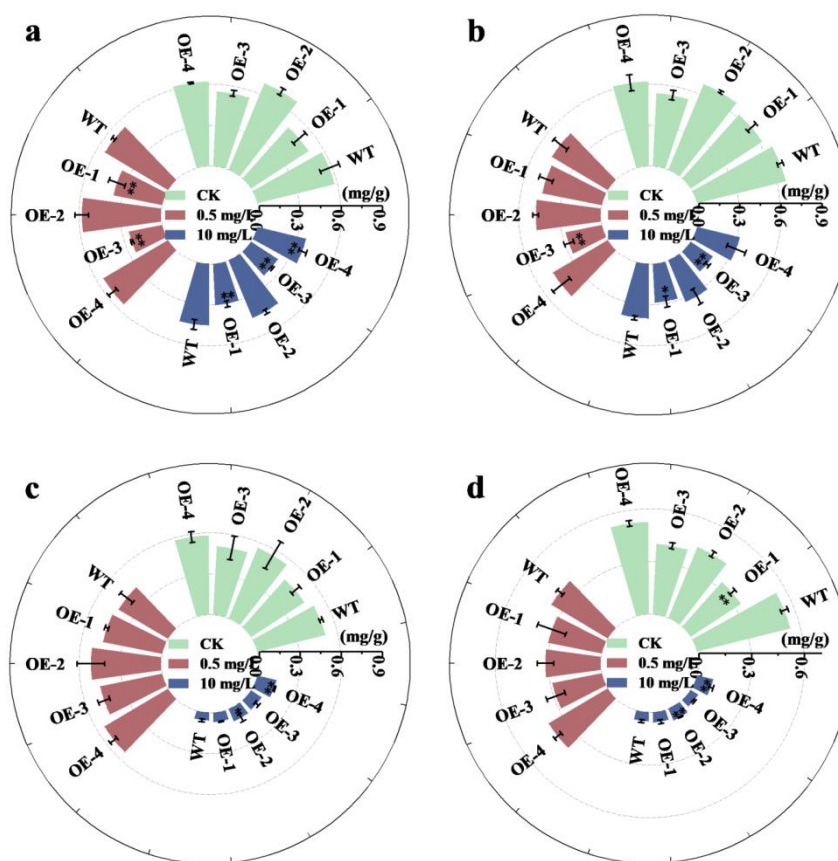


图 6.4 Cd 对过表达 *LmGST* 浮萍总叶绿素含量的影响

注：A：处理 12 h；B：处理 24 h；C：处理 3 d；D：处理 7 d

### 6.4 过表达 *LmGST* 对 Cd 胁迫下植物抗氧化酶活性的影响

抗氧化酶是植物抗氧化防御系统中的重要成员，主要包括 CAT、SOD 等。图 6.5 a 和 6.5 b 说明了 Cd 胁迫对过表达株系抗氧化酶活性的影响。在 0.5~10 mg/L Cd 胁迫下，CAT 和 SOD 等抗氧化酶较正常条件下酶活性增加，随着 Cd 浓度的增加，CAT 和 SO 酶活性呈现先升高后降低的趋势，而 SOD 酶活性显著高于对照组。GSH 在植物外源性解毒过程发挥重要作用，因此本研究也对在 Cd 胁迫

胁迫下对照组和转基因株系该物质的含量进行检测。研究发现与对照组相比, 转 *LmGST* 基因所有株系的 GSH 含量出现上调, 表明过表达 *LmGST* 基因还能增加 GSH 含量, 增强浮萍抗氧化能力(图 6.5 c), 在 10 mg/L Cd 胁迫下 OE-4 增强效果最明显, GSH 含量分别提升 1.76 倍。

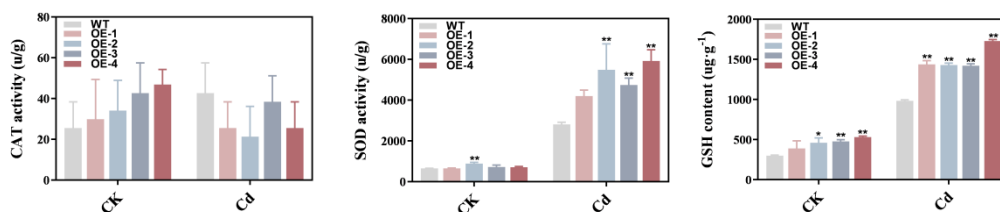


图 6.5 Cd 对过表达 *LmGST* 浮萍抗氧化酶活性的影响

### 6.5 过表达 *LmGST* 对 Cd 胁迫下植物富集量和去除率的影响

在 10 mg/L Cd 处理 7d 后, 转基因株系的 Cd 富集量达到了 3 197~3901 mg/kg, 为野生型的 1.2~1.3 倍。按照 1 m<sup>2</sup> 接种 110 g 浮萍进行理论计算, 转基因株系分别可吸收超过 300 mg Cd, 比野生型富集量高。同时转基因株系达到了最高 1800 的 BCF 值, 为野生型的 4.2 倍。且平均 Cd 去除率最高达到 81.72%, 远高于野生型(37.58%), 为野生型的 2.2 倍。经过研究比较后发现, 转基因株系对 Cd 耐受性和富集效果较好。

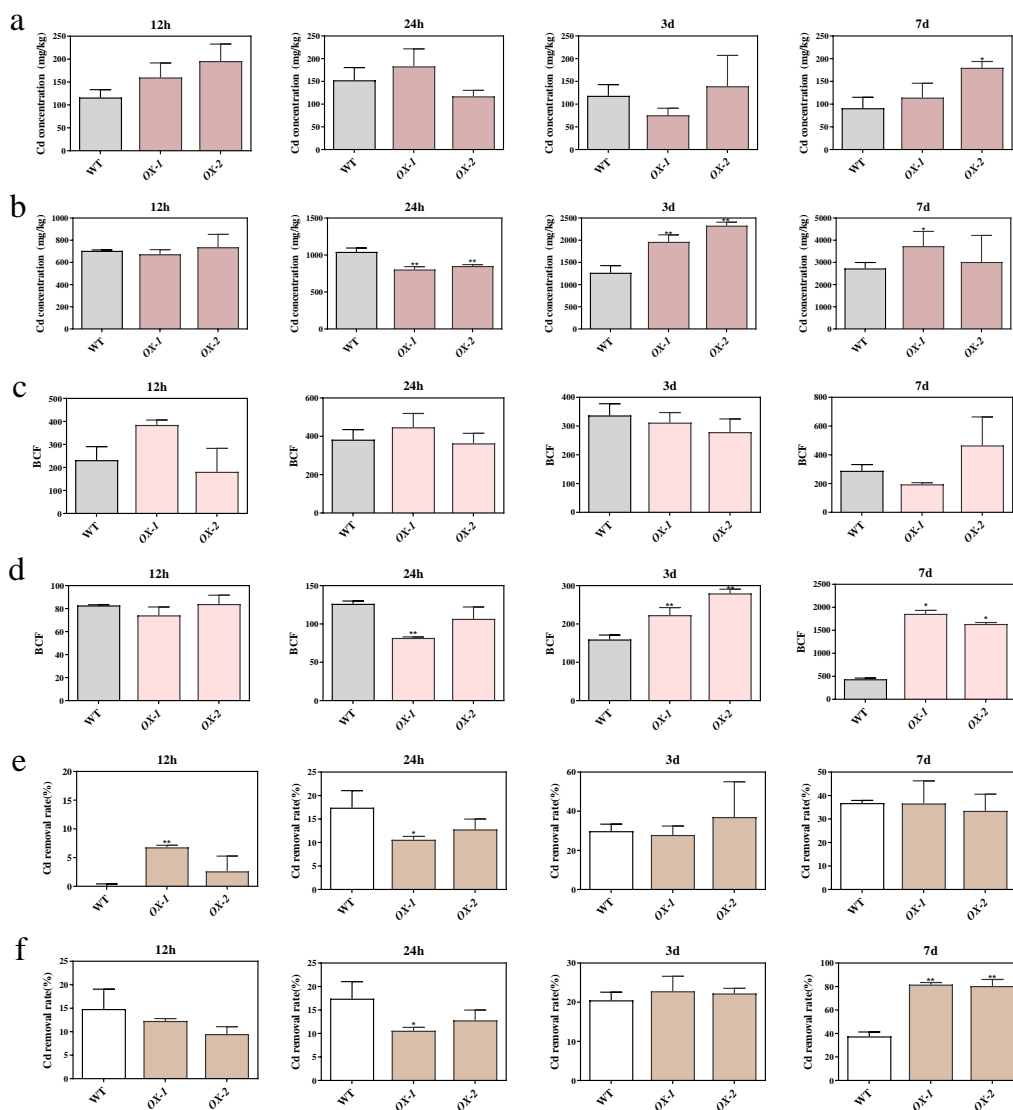


图 1 Cd 胁迫对过表达 *LmGST* 浮萍 Cd 相关指标的影响

注：(a、b)：Cd 对过表达浮萍富集量的影响，(c、d)：Cd 对过表达浮萍 BCF 的影响，(e、f)：Cd 对过表达浮萍去除率的影响。用 t 检验进行分析，与 WT 进行比较，\*p < 0.05，\*\*p < 0.01。

## 6.6 小结

本研究将 *LmGST* 基因构建至植物表达载体中，根据建立的浮萍遗传转化体系，将 *LmGST* 基因在浮萍中进行过表达，得到转 *LmGST* 基因新的浮萍种质资源。测定在 0、0.5 和 10 mg/L Cd 胁迫下过表达 *LmGST* 基因浮萍和野生型浮萍的生理生化指标，包括根长、生长速率、叶绿素含量和抗氧化酶酶活的研究，比较转基因前后的差异。进一步研究过表达 *LmGST* 基因浮萍与野生型浮萍在 Cd 富集量和 Cd 去除率上的差异。经过研究比较后发现，*LmGSTF* 株系对 Cd 耐受

性和富集效果较好，Cd 去除率分别达到了 80.50%，为 WT 的 2.0~2.2 倍。说明 *LmGST* 基因的过量表达加快 Cd 解毒过程，缓解 Cd 对植物的毒害作用，进一步利用转运蛋白将解毒后的 Cd 转运至液泡等位置进行固定化作用，使浮萍在耐受高浓度 Cd 胁迫的同时将更多的 Cd 富集在体内。过表达 *LmGST* 浮萍具有广阔的应用开发潜力，可应用于治理重金属水体污染，效果比普通野生型浮萍更好，本研究为 *LmGST* 转基因浮萍的实际开发应用提供进一步理论支撑。

## 第七章 Cd 超富集植物内生菌分离和互作机制

本研究以 Cd 超富集植物浮萍为实验材料,以浮萍内生菌群落与水体中典型重金属 Cd 为研究对象。在浮萍内生菌群落多样性数据的基础上,通过对超富集植物浮萍内生菌的分离及鉴定,筛选出具有良好促生作用以及高重金属 Cd 耐性的功能菌株,结合 16S rDNA 序列分析对筛选出的菌株进行鉴定;菌株生长条件和接种时的生长状态对浮萍生物量和耐 Cd 能力具有一定的影响,探究功能菌株的最佳生长条件和最佳接种状态;研究最佳接种状态下,功能菌株对浮萍植物生物量、理化性质、Cd 积累量及 Cd 去除能力的影响。通过对浮萍内生菌的分离结果,为内生菌-植物联合修复环境 Cd 污染提供菌种资源。

### 7.1 Cd 对植物内生细菌的影响

#### 7.1.1 高通量测序结果

采用高通量测序分析,不同处理共测序 387,094 条有效序列,碱基 145,803,731 个,每个样品的序列编号为 59,081~631,159,平均序列长度为 376 bp。6 个类群共检出 22 门,43 纲,101 目,180 科,302 属,405 种,488 个操作分类单位(OTUs)。所有样品的覆盖率均超过 98%,说明测序结果真实反映了不同处理下微生物群落的种类和丰度(图 7.1)。

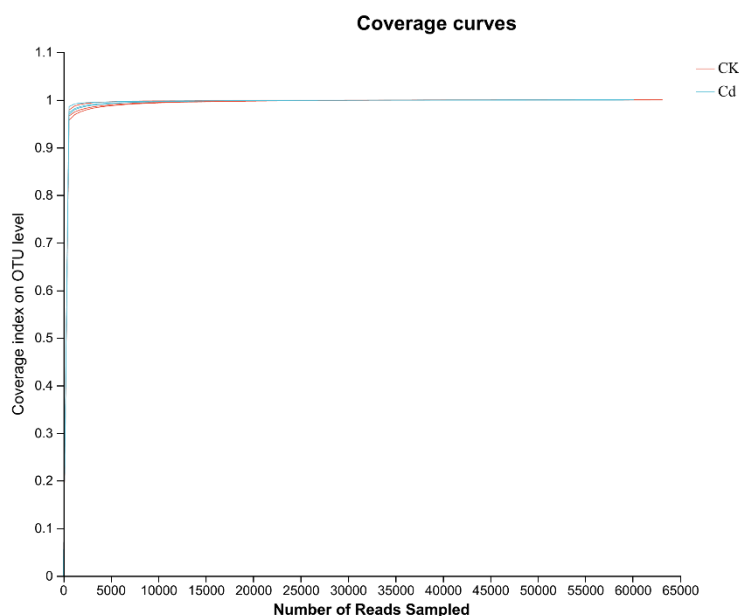


图 7.1 Cd 处理下微生物稀释曲线

#### 7.1.2 Cd 处理下植物微生物群落多样性分析

本研究的高覆盖度指数表明测序结果准确反映了样品的真实情况和物种丰富度(图 7.1)。测定了不同处理下浮萍体内微生物群落的丰度和多样性，结果表明，Cd 处理使浮萍体内内生细菌的丰度和多样性下降；Cd 处理组的 chao 和 ace 指数均低于对照组，说明 Cd 处理降低了浮萍内生细菌的丰度。Cd 处理组的 Shannon 指数小于对照组，说明 Cd 处理降低了浮萍内生细菌的多样性。同样，Cd 处理组的 Simpson 指数高于对照组，进一步说明 Cd 处理降低了浮萍内生细菌的多样性(表 7.1)。

表 7.1 微生物多样性指数

Groups	ace	chao	coverage	shannon	simpson
CK	211.226645	210.1944443	0.999827667	2.516008333	0.172342333
Cd	168.817971	165.789855	0.999686	2.043871667	0.267884333

### 7.1.3 Cd 处理下微生物群落 OTUs 分布

为了探究 Cd 处理对浮萍内生群落的影响，我们利用 16S rRNA 序列对不同条件下浮萍样品的内生群落进行了研究，不同处理下微生物群落 OTU 组成的变异性百分比如图 7.2 所示。在相似度 $\geq 97\%$ 的基础上，共得到 488 个物种分类 otu，其中 CK 组和 Cd 组微生物群落特异性 otu 分别为 210 和 80(图 7.2 a)。不同的 OTU 有不同的百分比(图 7.2 b)。结果表明，Cd 处理下浮萍微生物群落组成存在差异。

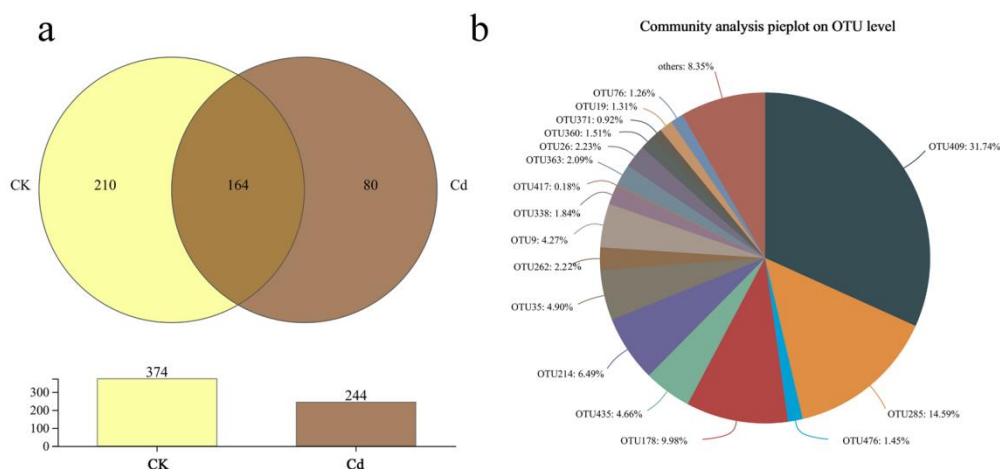


图 7.2 Cd 处理下微生物群落 OTUs 分布

注：(a)不同分类群 OUT 分布的维恩图；(b) OTU 水平的微生物群落占用率。CK 为空白对照，Cd 为 Cd 处理组。

#### 7.1.4 Cd 处理下微生物群落组成结构

图 7.3 a 显示了在门水平上微生物分布的差异，所有样品都具有相似的优势菌群，但丰度略有不同。Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria 等优势菌常见，其中 Proteobacteria 为优势菌群。Cd 处理下变形菌的丰度高于对照组(图 7.3 a)。在科分类水平上，Cd 处理下的萍属内生细菌存在差异(图 7.3 b)，对照中内生细菌群落丰度最高的 3 个科分别是 Comamonadaceae、Paenibacillaceae 和 Caulobacteraceae。Cd 处理组内生细菌群落丰度最高的 3 个科是 Comamonadaceae、Paenibacillaceae 和 Enterobacteriaceae。Cd 处理组 Enterobacteriaceae 的丰度高于对照组。这些结果表明，Cd 胁迫影响了浮萍内生细菌群落的丰度。微生物组成分析显示，浮萍样品中有 22 门，其中包括变形菌门。在对照组和 Cd 处理组中，Comamonadaceae, Paenibacillaceae 和 Enterobacteriaceae 的丰度都很高(图 7.3 c)。这进一步证实了浮萍内生细菌在 Cd 胁迫下可以存在，并受到 Cd 胁迫的影响。

#### 7.1.5 Cd 处理对植物微生物群落结构的影响

样本组相似性分析结果显示，Cd 处理的浮萍样品与对照组样品的图上的点有较大的分离(图 7.3 d)，说明未处理的浮萍与不同处理条件下的浮萍根间菌群存在显著差异，可以区分对照和 Cd 胁迫的浮萍菌群。

#### 7.1.6 Cd 处理植物中微生物的网络分析

共现网络分析显示，32 个丰度为 50 的细菌属与 Cd 处理后的 Cd 浓度显著相关。*Delftia* 菌不仅与 Cd 胁迫相关，而且丰度最高(34, 225.66)。物种共现网络分析显示，与 *Escherichia-shigella* 菌相关的 4 种细菌属呈负相关，而其他所有细菌属之间均呈正相关(图 7.3 e)。



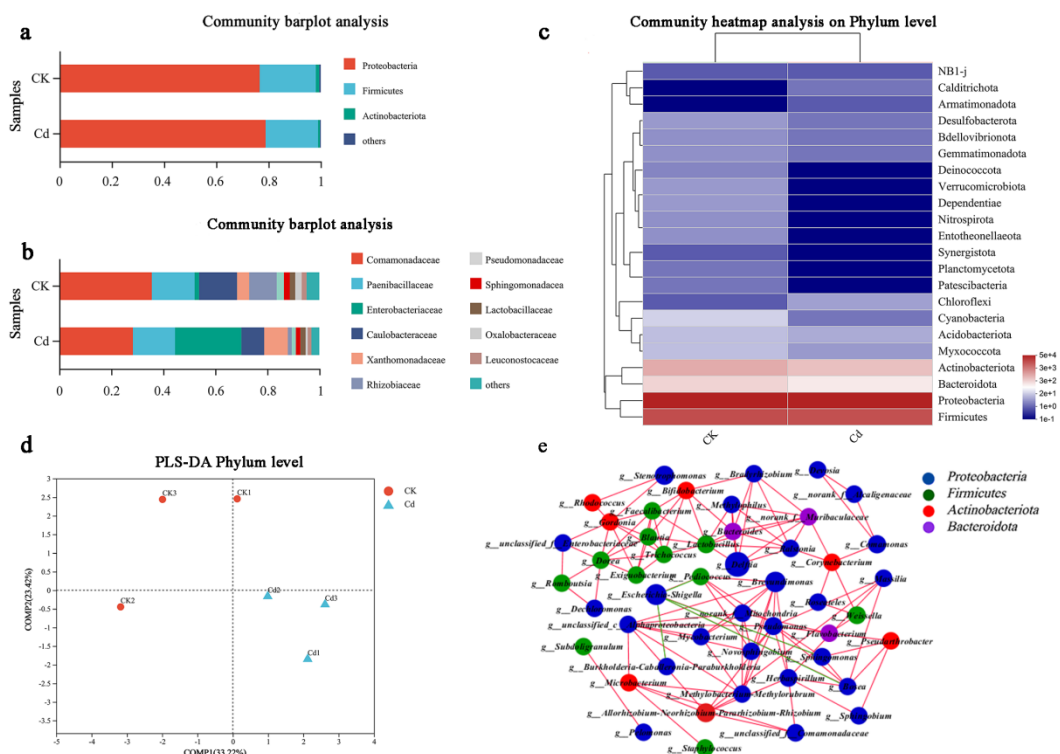


图 7.3 Cd 处理下浮萍内生微生物群落分析

注：(a)门水平的群落丰度百分比；(b)科水平的群落丰度百分比。(c)门水平不同样品丰度的热图。样品中不同物种的丰度变化是通过色块的颜色梯度来表现的。颜色梯度所代表的值显示在图的右侧，红色和蓝色分别代表高丰度门和低丰度门；(d)细菌群落结构差异分析。X 轴和 Y 轴的尺度是相对距离。红色和蓝色分别表示对照组和 Cd 处理组；(e)物种相关网络图。

### 7.2 植物内生细菌的分离与鉴定

从浮萍植物样品中分离到 22 株内生菌株，编号为 Y1~Y22。表 7.2 总结了分离出内生菌的表型。

表 7.2 Cd 处理对内生细菌生长的影响

Strain number	Cd	Strain number	Cd
Y1	-	Y12	-
Y2	+	Y13	-
Y3	+	Y14	-
Y4	-	Y15	-
Y5	-	Y16	-

Y6	-	Y17	-
Y7	+	Y18	-
Y8	-	Y19	-
Y9	-	Y20	-
Y10	-	Y21	-
Y11	+	Y22	-

+表示 Cd 耐受型菌株；-表示 Cd 敏感型菌株。

### 7.2.1 内生细菌生长受 Cd 胁迫的影响

低浓度 Cd (10 mg/L)处理后分离出内生细菌。结果表明，菌株 Y2、Y3、Y7 和 Y11 可以在低浓度 Cd 环境下生长(表 7.2)。此外，用高浓度 Cd 处理内生细菌，所有四种菌株都在高浓度 Cd 下生长(图 7.4 a)。不同菌株对 Cd 的反应时间不同；其中，Y3 的生物量在 Cd 处理 72 h 后显著增加，而 Y2 的生物量在 24 h 后显著增加，Y11 的生物量在 48 h 时显著高于其他菌株。因此，选择 Y11 进行进一步系统的耐 Cd 试验。菌株 Y11 的生物量随着 Cd 浓度的增加逐渐降低(图 7.4 b)。

### 7.2.2 内生细菌对浮萍生长指标的影响

在不添加 Cd 或添加 1 mg/L Cd 的情况下，将耐 Cd 内生菌移入含有相同浮萍量的液体培养基中，观察其对浮萍生长指标的影响。结果表明，在不添加 Cd 的情况下，将内生细菌重新添加到浮萍中，菌株 Y7 显著抑制了浮萍的生长。Y11 显著提高了浮萍的鲜重，而其他菌株对浮萍的鲜重没有影响。Y11 也显著增加了浮萍的根长(图 7.4 c)。当将内生细菌重新添加到添加了 Cd 的浮萍中，Y11 显著增加了浮萍的鲜重和根长。此外，Y3 显著提高了 Cd 胁迫下浮萍的鲜重。在添加和不添加 Cd 的情况下，Y3 和 Y11 的叶绿素含量显著降低，其原因可能是叶绿素含量高与浮萍争夺养分的菌株的生物量(图 7.4 c)。

### 7.2.3 内生细菌 16S rDNA 序列分析

将内生细菌 Y11 的 16S rDNA 序列扩增至 1455 bp(图 7.4 d)。计算内生菌 Y11 的 16S rDNA 序列与同源性最高的 17 株细菌的 16S rDNA 全序列的遗传距离，并根据遗传距离构建系统发育树(图 7.4 e)。如图 7.4 e 所示，内生细菌与几株芽孢杆菌具有密切的同源性。这些结果结果表明，分离得到的菌株为芽孢杆菌 Y11。

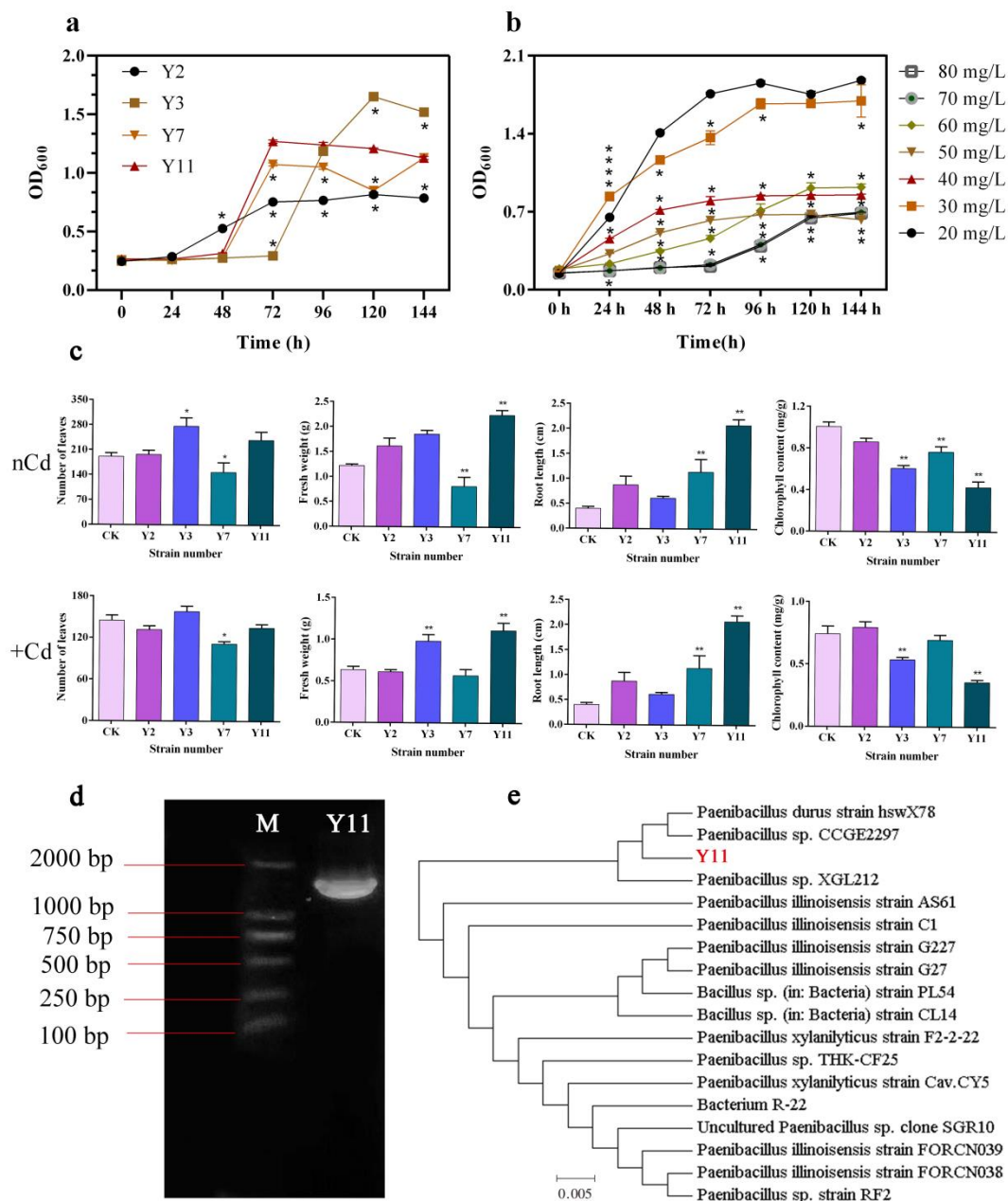


图 7.4 浮萍相关生长指标及内生种鉴定

注：(a) Cd 处理下不同菌种的生长情况；(b)不同 Cd 浓度处理下 Y11 的生长情况；(c)浮萍内生细菌的生长指标；(d)内生菌 Y11 的 16S rDNA 扩增结果；(e)内生菌 Y11 16S rDNA 序列的系统发育树。M 为 2 kb 标记，Y11 为菌株 Y11 的扩增产物。

### 7.2.4 内生细菌培养条件优化

本研究对内生菌芽孢杆菌 Y11 的培养条件进行优化，首先进行单因素实验，探索了温度、pH、接种量、装样量、胰蛋白胨含量对内生菌生长的影响，确定各

因素的最优条件(图 7.5)。根据单因素实验结果, 设置了 CCD 响应面法进一步优化内生菌培养条件, 最终显著提高了内生菌的生物量(图 7.6)。

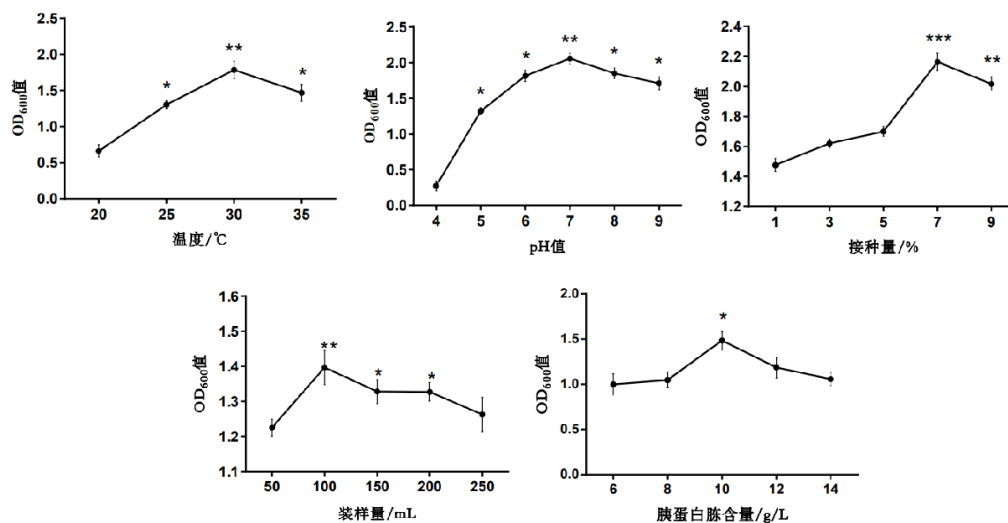


图 7.5 培养条件优化单因素实验

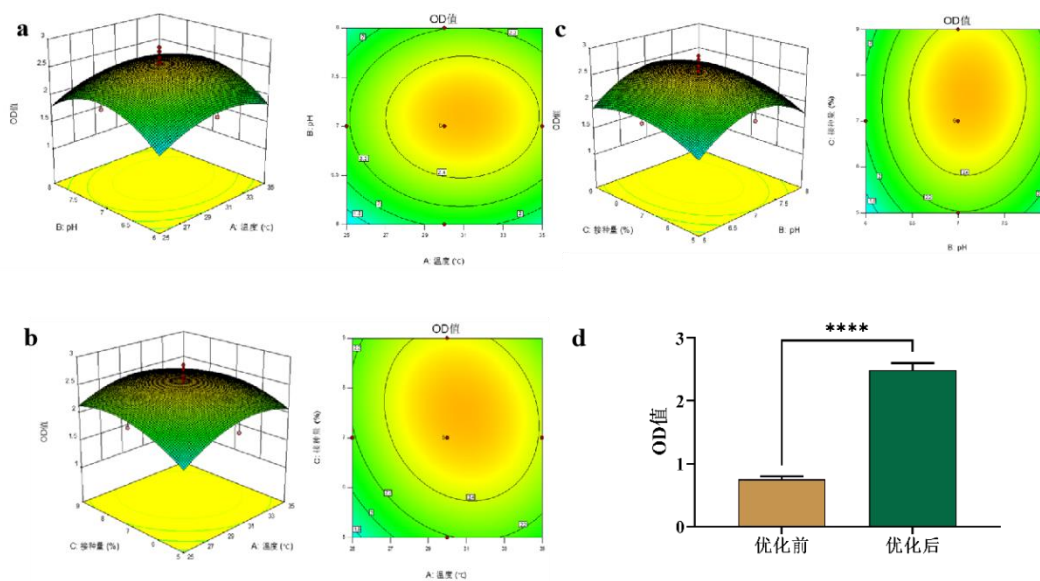


图 7.6 CCD 响应面法优化内生菌培养条件

注: (a)温度和 pH 对菌株生物量 OD<sub>600</sub> 的响应图和等高线图; (b)温度和接种量对菌株生物量 OD<sub>600</sub> 的响应图和等高线图; (c)接种量和 pH 对菌株生物量 OD<sub>600</sub> 的响应图和等高线图; (d)响应面优化前后菌种生物量 OD<sub>600</sub> 对比。

### 7.3 内生菌定殖对植物的影响

#### 7.3.1 内生菌定殖对植物生长速率的影响

为了直观地比较内生菌定殖对不同浓度 Cd 胁迫下浮萍的影响, 采用 0.1 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L、3 mg/L、4 mg/L 及 5 mg/L Cd 处理 3 d、5 d、

7 d、14 d, 测定其对浮萍生长速率、叶绿素含量、Cd 去除率、Cd 富集量及富集系数的影响。由图 7.7 看出, 内生菌 Y11 定殖后在不同浓度 Cd 胁迫下浮萍的生长速率呈现整体上升的趋势。在不加入 Cd 胁迫和 4 mg/L Cd 胁迫 3 d, 定殖内生菌 Y11 的浮萍生长速率显著高于未定殖内生菌 Y11 的浮萍(图 7.7 a)。在 Y11 定殖 5 天时, 生长速率同对照一样, 表现为, 随着 Cd 浓度增加生长速率逐渐下降(图 7.7 b)。在内生菌定殖 7 天时, 接种内生菌生长速率显著高于对照组, 在 0.5 mg/L Cd 胁迫下对照组与处理组达到最大差值(0.22 g/d)。结果表明, 内生菌的定殖将显著促进浮萍的生长。

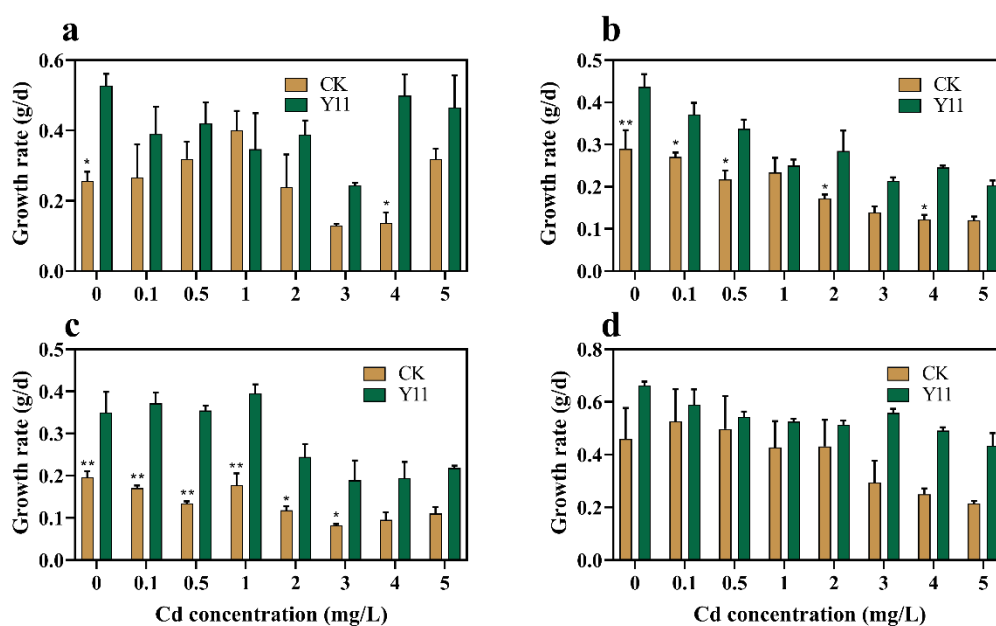


图 7.7 内生菌定殖不同时间对不同 Cd 胁迫下浮萍生长速率的影响

注: 内生菌定殖(a) 3 d, (b) 5 d, (c) 7 d 及 (d) 14 d 对不同浓度 Cd 胁迫下浮萍生长速率的影响

### 7.3.2 内生菌定殖对植物叶绿素含量的影响

在第 3 天时, 随着 Cd 浓度增加, 叶绿素含量逐渐下降, 内生菌定殖与否无显著差异(图 7.8 a)。在第 5、7 d 时, 随着 Cd 浓度增加, 叶绿素含量逐渐下降, 在无 Cd 胁迫的条件下, 未定殖内生菌浮萍叶绿素含量显著大于定殖内生菌的浮萍叶绿素含量(图 7.8 b, c)。第 14 d 时, 随着 Cd 浓度增加, 叶绿素含量也呈现逐渐下降的趋势, 未定殖内生菌组叶绿素含量显著高于定殖内生菌组, 可能是由于内生菌的定殖促进了浮萍的生长后, 产生了生长竞争, 导致浮萍受损, 叶绿素含量

降低(图 7.8 d)。结果表明, 该内生菌的定殖在一定时间对浮萍的叶绿素含量没有显著的影响, 当定殖时间过长时, 可能会导致浮萍生长过快、进而受损、叶绿素含量下降。

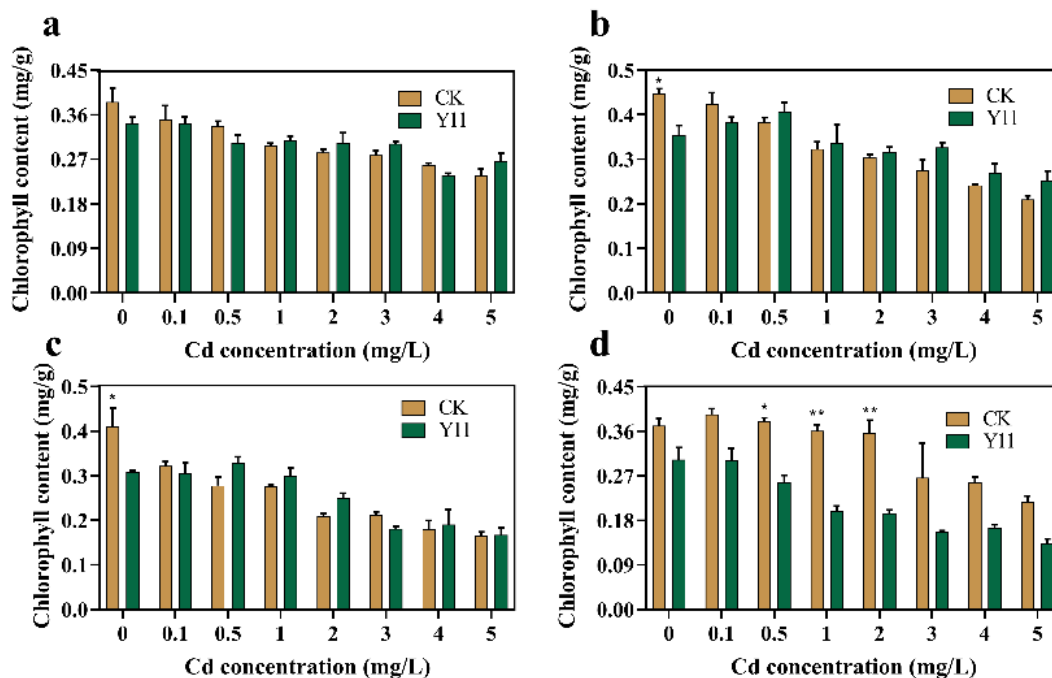


图 7.8 内生菌定殖不同时间对不同 Cd 胁迫下浮萍叶绿素含量的影响

注: 内生菌定殖(a) 3 d, (b) 5 d, (c) 7 d 及 (d) 14 d 对不同浓度 Cd 胁迫下浮萍叶绿素含量的影响

### 7.3.3 内生菌定殖对植物 Cd 去除率的影响

不同 Cd 浓度处理不同时间后, 内生菌的定殖对 Cd 去除产生了显著影响(图 7.9)。第 5 d 时, 在 3、4 及 5 mg/L Cd 下内生菌定殖将显著提高 Cd 在水体中的去除率(图 7.9 c)。随着胁迫时间增加, 未定殖内生菌组的 Cd 去除率显著高于定殖内生菌组, 可能是由于接种了内生菌的浮萍生长速度过快, 产生了生长竞争, 导致浮萍受损, Cd 离子溢出(图 7.9 d)。因此, 在实际应用于治理环境污染时, 要及时打捞浮萍, 该结果为植物-微生物联合修复环境污染奠定了坚实的基础。

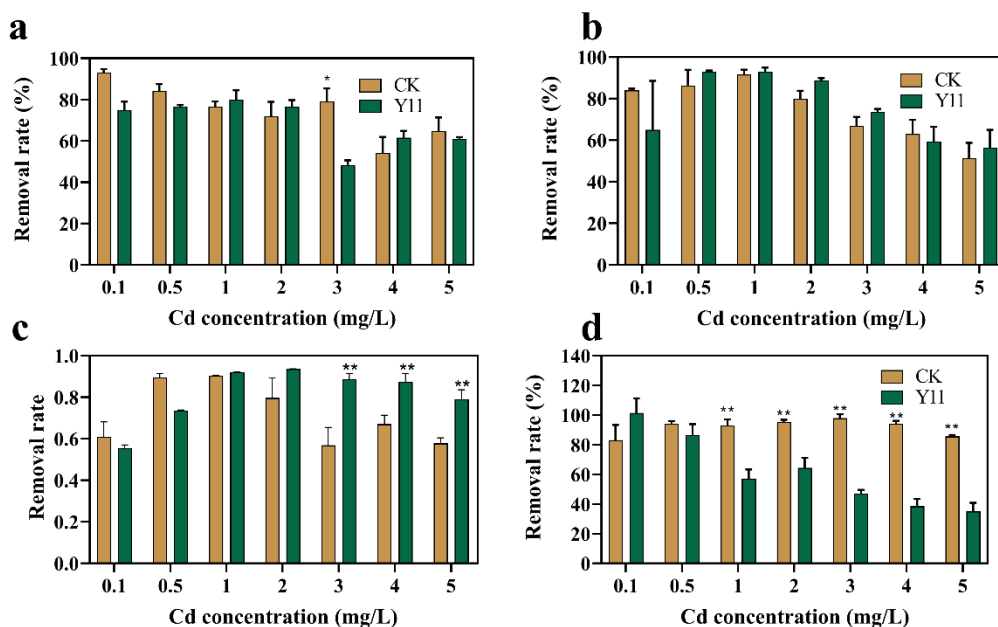


图 7.9 内生菌定殖不同时间对不同 Cd 胁迫下浮萍 Cd 去除率的影响

注：内生菌定殖(a) 3 d, (b) 5 d, (c) 7 d 及 (d) 14 d 对不同浓度 Cd 胁迫下浮萍 Cd 去除率的影响

## 7.4 内生菌基因组测序与分析

### 7.4.1 内生菌全基因组概况

为了进一步了解内生菌基因组对内生菌本身以及宿主植物在逆境中的影响，对该内生菌进行了全基因组测序。结果表明，该菌株全基因组大小为 565, 0245 bp，包括两条染色体和两个质粒，大小分别为 2.84 Mb、2.07 Mb、0.18 Mb、0.54 Mb (表 7.3)。不同染色体不同质粒 GC 含量不同，两条染色体的 GC 含量(59.37%、59.28%)高于两个质粒的 GC 含量(56.06%、57.34%)。两个质粒的 A 含量高于两个染色体的 A 含量，T 含量同样如此。结果表明，不同的基因结构在同一基因组中数量与含量也不相同。

表 7.3 全基因组概况

Tape	Size (bp)	GC	A	T	G	C
Chromosome I	2843782	59.37%	20.17%	20.45%	29.97%	29.40%
Chromosome II	2074521	59.28%	20.38%	20.34%	29.71%	29.57%
Plasmid	187749	56.06%	21.81%	22.14%	27.67%	28.39%
Plasmid	544193	57.34%	21.11%	21.55%	28.82%	28.51%
Total	5650245	59.03%	20.39%	20.57%	29.69%	29.34%

### 7.4.2 内生菌全基因组信息分析

典型的细菌基因组一直被认为包含一个染色体和几个携带非必需基因的小质粒。然而，越来越多的次生染色体已经在各种细菌中被报道。本研究发现，该菌含有第二条染色体，且第二条染色体大小远大于两个质粒的大小。该基因组富含参与无机离子和碳水化合物运输和代谢的基因，特别是富含糖苷水解酶、多糖裂解酶及糖基转移酶，表明该菌株有利用多糖的优良能力的遗传基础(图 7.10)。基因岛是基因水平转移的重要载体，可移动的基因岛能够整合到宿主的染色体上，并在特定的条件下切除，进而通过转化、接合或转导等方式转移到新的宿主中，具有多种生物学功能，如抗生素抗性、重金属抗性等(郭瑞亮 et al., 2018)。全基因组数据分析发现，该菌富含基因岛，这可能与改进能够耐受高浓度 Cd 胁迫相关(表 7.4)。

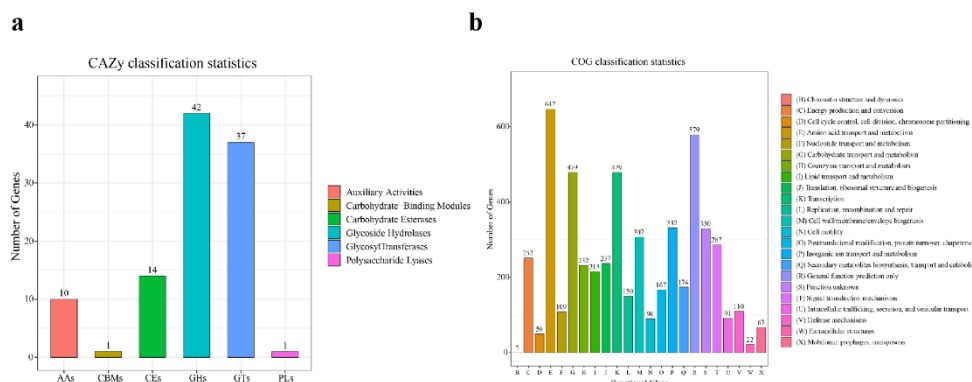


图 7.10 内生菌全基因组结构分析

注：(a)CAZy 为碳水化合物酶相关的专业数据库；(b)COG 功能分析。

表 7.4 基因组不同结构概况

	tRNA	rRNA	RNA	TRF	SSR	CRISPR	Islands	Prophage
Number	55	12	125	65	4	0	8	3
Total_len(bp)	4378	17597	29314	7522	5650245	0	16958	50727

有研究表明，硫代谢和谷胱甘肽代谢相关的基因表达与植物的镉耐受性相关(Cui et al., 2020)。酚类化合物(如酚酸和类黄酮)是一类重要的植物次生代谢产物，具有清除活性氧的潜力(Sharma et al., 2019)。苯丙素生物合成途径在重金属胁迫条件下被激活，导致各种酚类化合物的积累(Sharma et al., 2019)。有研究表明，ABC 转运蛋白(ATP-binding cassette transporter)与水稻镉耐受性相关，短暂镉暴露后水稻根中该蛋白表达显著上调(Fu et al., 2019)。该菌全基因组检测到含有谷胱



甘肽代谢相关基因、硫代谢相关基因、苯丙素生物合成相关基因、ABC 转运蛋白家族相关基因等，这些基因基础对该菌耐受 Cd 胁迫至关重要(表 7.5)。

表 7.5 与 Cd 耐受相关代谢途径注释结果

KEGG 代谢通路	被注释基因数量
谷胱甘肽代谢	27
硫代谢	32
苯丙素生物合成途径	3
ABC 转运蛋白家族	32
过氧化物酶体	4
植物病原体相互作用	6

#### 7.4 小结

在本研究中，高 Cd 浓度显著抑制浮萍生长，并伴有叶绿素含量降低。较低 Cd 浓度(0.1~0.5 mg/L)对浮萍的生长抑制作用不大，高浓度(0.7~5.0 mg/L)对浮萍的生长抑制作用较强。随着 Cd 胁迫持续时间和浓度的增加，浮萍中 Cd 含量最高可达 264.6 mg/kg，而 Cd 的去除则逐渐累积，且对浮萍的危害越严重去除率提高到 70~90%。0.1~1.0 mg/L Cd 处理 3 d，浮萍对 Cd 的去除率为 60~68%，7 天后去除率达到 70%，说明浮萍对低浓度 Cd 也有很好的去除效果。通过对浮萍内生细菌的高通量测序，共鉴定出 488 个 OTUs，优势类群为 Proteobacteria、Firmicutes 和 Actinobacteria。Cd 处理对浮萍微生物群落多样性也有影响。分离得到 22 株内生细菌，其中 4 株对 Cd 耐受。分离得到的耐 Cd 内生菌株 *Paenibacillus* sp. Y11 显著提高了浮萍生物量。研究结果表明，内生菌的定植可以帮助植物有效地响应 Cd 胁迫，为未来植物—微生物联合修复重金属污染奠定基础。

## 第八章 Cd 超富集植物的后续资源化利用研究

随着重金属污染水体问题日益严重,如何修复和安全有效地利用重金属污染水体成为当今社会亟待解决的现实问题。植物修复因其绿色、经济,原位修复及边修复边利用等众多优势成为重金属污染水体主要的修复途径之一,但植物修复技术会产生大量富集重金属的生物物质。为探究超富集植物富集重金属之后的利用价值,本研究设置不同浓度 Cd 胁迫和不同 Cd 胁迫时间处理条件,研究了浮萍对水体中 Cd 的去除效果及积累能源原料淀粉的能力。并选择 Cd 处理后的高淀粉浮萍作为乙醇生产的原料,成功发酵为生物乙醇,对修复重金属 Cd 污染水体后的植物材料的进一步资源化利用具有重要意义。

### 8.1 Cd 超富集植物的水体 Cd 去除率

由图 8.1 可以看出, Cd 超富集浮萍在处理 5~7 d 时,浮萍对水体中 Cd 的去除率最高; 0~2 mg/L Cd 胁迫处理时,浮萍的 Cd 去除率逐渐增加, 2~5 mg/L Cd 胁迫处理时, Cd 去除率略微下降。0.1~0.7 mg/L Cd 处理 24 h 时, Cd 去除率随着 Cd 浓度的增加而增加(40%~80%), 5~7 d 时 Cd 去除率进一步增加(70%~90%); 1~2 mg/L 处理 24 h 时, Cd 去除率随 Cd 浓度的增加而下降(70%~60%), 3~7 d 时水体 Cd 去除率进一步下降(90%~70%)。Cd 胁迫处理 5~7 d 时,水体 Cd 去除率可以达到 70%~90%,表明前期筛选获得的 Cd 超富集浮萍是可用于去除水体重金属 Cd 污染且效果理想的一种水生植物材料。

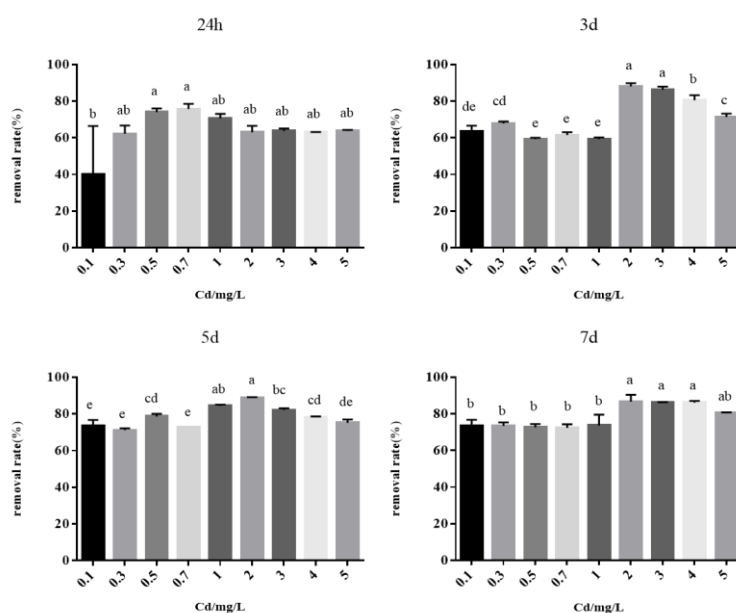


图 8.1 Cd 超富集浮萍的水体 Cd 去除率

注：用  $t$  检验进行分析，重复三次，组间进行比较，不同小写字母表示差异显著。

### 8.2 Cd 超富集植物的淀粉积累能力

浮萍可用于生产乙醇、丁醇和沼气，这些都是很有前途的替代能源。先前的研究已经观察到，营养饥饿、激素处理以及盐胁迫等能使浮萍大量积累淀粉。浮萍是一种 Cd 超富集植物，但 Cd 处理对浮萍淀粉的影响还未知。如图 8.2 所示，7 d 内，三种 Cd 胁迫条件下，浮萍的淀粉含量相比对照组都显著增加，并且浮萍的淀粉含量呈现先上升后下降的趋势。5 d 时，浮萍的淀粉含量增加最多，在 0.5 mg/L、1 mg/L 和 1.5 mg/L Cd 浓度时，浮萍的淀粉含量分别比对照组增加了 1.48、1.7 和 1.76 倍。这些结果表明，Cd 胁迫处理也能促使浮萍淀粉的积累，可以利用浮萍进行 Cd 污染修复后再进行生物能源的生产。

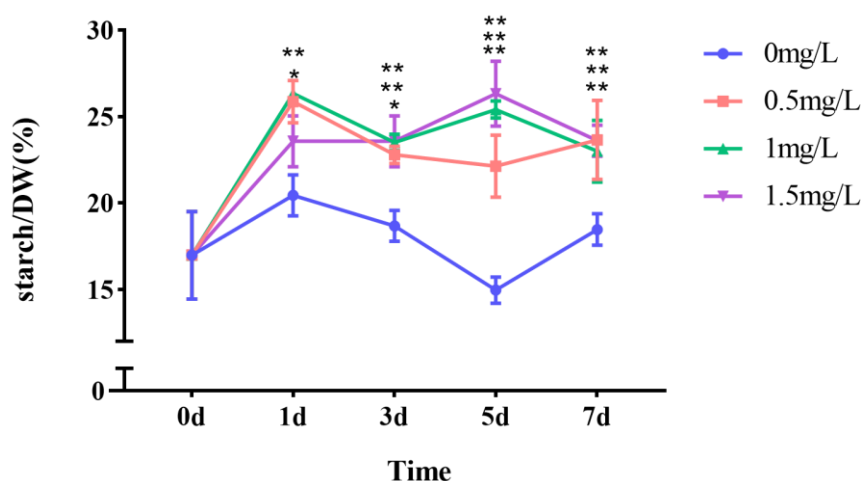


图 8.2 Cd 超富集浮萍的淀粉积累能力

### 8.3 Cd 超富集植物的乙醇发酵能力

为了探究 Cd 胁迫处理后浮萍淀粉的发酵潜力，本研究利用 Cd 处理和不经 Cd 处理的浮萍材料作为原料发酵生物乙醇。实验结果表明，不经 Cd 处理的对照组发酵的生物乙醇含量为 1.09%，乙醇产量为 430 mg；在 0.1 mg/L Cd 胁迫 3 d 后的 Cd 超富集浮萍发酵乙醇含量为 1.16%，发酵产量为 458 mg，比对照组显著提高了 28 mg (图 8.3)。以上结果表明，Cd 处理不仅能显著提高浮萍淀粉积累量，这些积累的淀粉也能顺利发酵为生物乙醇，为 Cd 超富集浮萍材料的后续资源化利用提供参考。

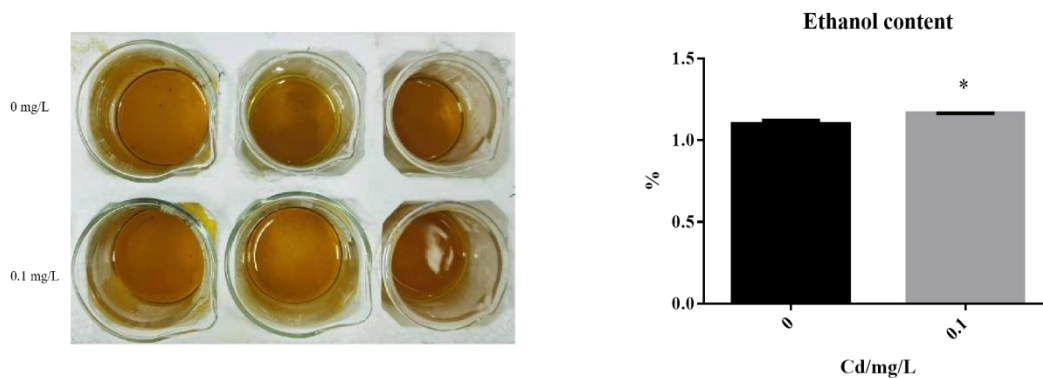


图 8.3 浮萍淀粉发酵和乙醇含量

#### 8.4 小结

我国污水排放标准指出，水体重金属 Cd 的最高排放为 0.1 mg/L。野外水体 Cd 污染大多属于中度污染(0.3~1 mg/L)。本实验通过筛选获得的 Cd 超富集浮萍，不仅能在低浓度 Cd 胁迫下正常生长，还具有较高的水体 Cd 的去除率。同时，本研究还评价了在不同 Cd 浓度、不同胁迫时间处理下，Cd 胁迫对浮萍淀粉积累能力的影响，结果显示 Cd 超富集浮萍在 0.1 mg/L Cd 浓度胁迫 3 d，Cd 超富集浮萍淀粉积累量最高达到干重的 5.14%。因此，Cd 超富集浮萍是一种极具应用潜力的生产生物燃料的非粮淀粉原料。此外，浮萍不仅是重金属 Cd 超富集植物，对水体 Cd 富集和去除效果显著，且淀粉含量高、纤维素和半纤维素含量低，是理想的淀粉类乙醇发酵原料。因此，Cd 超富集浮萍在 0.1 mg/L Cd 处理 3 d 后，自身受损伤程度较小，对水体中 Cd 去除效果最优，富集 Cd 后淀粉积累量增多，可以成功发酵更高产量的生物乙醇。本研究结果证实 Cd 超富集浮萍既能修复 Cd 污染水体，又为能源的生产提供生物质原料，是一种可持续的能实现能源生产和环境治理相结合的新手段。

## 第九章 结论与展望

随着工农业的发展,大量重金属污染水体产生,给环境和人体健康带来了极大的危害。其中,水体重金属 Cd 污染已成为当今世界上最严重的生态环境问题之一。如何采用科学有效的生态修复方法,解决重金属 Cd 污染问题也逐渐引起环境科学和生态学研究工作者的关注。植物修复技术以其安全、廉价等众多优点已成为治理重金属污染的有效手段,而高等植物对重金属的耐性与富集性,也成为污染生态学研究的热点。但以往研究多集中于超富集陆生植物对土壤 Cd 的吸收、转运与解毒机制,有关 Cd 在水生植物体内存储过程的主控因子仍不清楚。本研究采用战略性能源植物浮萍为实验材料,综合运用金属组分与形态分析、高通量测序、基因工程等实验技术,重点研究浮萍调控重金属 Cd 超富集的分子机制。主要得到以下结论:

(1) 筛选得到的 Cd 超富集植物材料,能主动富集水体中的 Cd 而非被动吸收。Cd 对植物生长的影响,主要表现为根系缩短和改变根际微生物群落结果。Cd 随着胁迫时间的增加,从植物根系向叶片转移,在细胞器中的比例也逐渐增加,最后植物体内 Cd 以低毒复合物的形式与蛋白质结合。

(2) 谷胱甘肽代谢途径在 LCD 和 HCD 差异表达明显,其中 *GST* 基因家族作为谷胱甘肽巯基转移酶基因表达明显上调。*GST* 基因的表达和 *GST* 酶活力受到 Cd 胁迫的强烈诱导。

(3) *GST* 基因可能与增强 Cd 耐受性有关,主要表达于细胞质、细胞核周围,转 *GST* 基因植物的生长在 Cd 胁迫条件下受到的影响更小。

(4) Cd 胁迫影响内生微生物结构,分离获得的 Cd 耐受型内生菌可以耐受高浓度 Cd,且能促进浮萍生长,是内生菌—植物联合修复环境 Cd 污染的菌种资源。

(5) Cd 胁迫后浮萍的淀粉含量,通过生物质发酵获得生物乙醇。浮萍在富集 Cd 后可作为能源原料,为基因工程改造获得 Cd 富集能力和淀粉产量都高的修复材料提供可能。

本研究结果为深入揭示水生植物超积累 Cd 的生理生化与分子机制,为利用浮萍进行水体重金属污染修复提供依据,对生物技术手段修复污染水体的应用具有重要意义。今后利用转基因技术等现代化手段可以进一步提升浮萍富集重金属和能源原料淀粉积累的能力,从而更广泛地应用于实际。

## 参考文献

- Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications[J]. Chemosphere, 2013, 91(7): 869-881.
- Arefin MA, Rashid F, Islam A. A review of biofuel production from floating aquatic plants: an emerging source of bio-renewable energy[J]. Biofuels Bioproducts and Biorefining, 2021, 15: 574-591.
- Bokhari SH, Iftikhar A, Mahmood-Ul-Hassan M, Mohammad A. Phytoremediation potential of *Lemna minor* for heavy metals[J]. International Journal of Phytoremediation, 2016, 18(1): 25-32.
- Chen DQ, Zhang H, Wang QL, Shao M, Li XY, Chen DM, Zeng RS, Song YY. Intraspecific variations in cadmium tolerance and phytoaccumulation in giant duckweed (*Spirodela polyrhiza*)[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 395: 122672.
- Chen SN, Xu JH, Peng L, Cheng ZY, Kuang XL, Li D, Peng C, Song HJ. Cadmium accumulation in rice grains is mitigated by duckweed-like hydrophyte through adsorption and increased ammonia nitrogen[J]. Science of the Total Environment, 2023, 890: 164510.
- Cheng JJ, Stomp AM. Growing duckweed to recover nutrients from wastewaters and for production of fuel ethanol and animal feed[J]. Clean, 2009, 37(1): 17-26.
- Cun P, Sarrobert C, Richaud P, Chevalier A, Soreau P, Auroy P, Gravot A, Baltz A, Leonhardt N, Vavasseur A. Modulation of Zn/Cd P (1B2)-ATPase activities in Arabidopsis impacts differently on Zn and Cd contents in shoots and seed[J]. Metallomics, 2014, 6(11), 2109-2116.
- Cui WT, Yao P, Pan JC, Dai C, Cao H, Chen ZY, Zhang ST, Xu S, Shen WB. Transcriptome analysis reveals insight into molecular hydrogen-induced cadmium tolerance in alfalfa: the prominent role of sulfur and (homo) glutathione metabolism[J]. BMC Plant Biology, 2022, 20(1): 58.
- Cutler JM, Rains DW. Characterization of cadmium uptake by plant tissue[J]. Plant Physiology, 1974, 54(1): 67-71.
- Deng THB, Van DEA, Tang YT, Sterckeman T, Echevarria G, Morel JL, Qiu RL. Nickel hyperaccumulation mechanisms: a review on the current state of knowledge[J]. Plant and Soil, 2018, 423: 1-11.
- Dincer I. Renewable energy and sustainable development: a crucial review[J]. Renewable and Sustainable Energy reviews, 2000, 4: 157-175.
- Dong CQ, Chen GW, Wei WY, Wu QF. Study on sudden cadmium pollution emergency treatment tests of drinking water source of cities[J]. Advanced Materials Research, 2013, 779-780: 1490-1493.
- Ekperusi AO, Sikoki FD, Nwachukwu EO. Application of common duckweed (*Lemna minor*) in phytoremediation of chemicals in the environment: state and future perspective[J].

- Chemosphere, 2019, 223: 285-309.
- Ekperusi AO, Sikoki FD, Nwachukwu EO. Sorption of cadmium, chromium, lead, and vanadium from artificial wetlands using *Lemna aequinoctialis*[J]. International Journal of Phytoremediation, 2023, 28: 1-9.
- Ekta C, Praveen S. Chromium and cadmium removal from wastewater using duckweed - *Lemna gibba* L. and ultrastructural deformation due to metal toxicity[J]. International Journal of Phytoremediation, 2019, 21(3): 279-286.
- Feng HC, Fu RX, Hou XQ, Lv Y, Zhang N, Liu YP, Xu ZH, Miao YZ, Krell T, Shen QR, Zhang RF. Chemotaxis of beneficial rhizobacteria to root exudates: The first step towards root-microbe rhizosphere interactions[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(13): 6655.
- Field CB, Campbell JE, Lobell DB. Biomass energy: the scale of the potential resource. Trends Ecology and Evolution[J]. 2008, 23(2): 65-72.
- Fu S, Lu Y, Zhang X, Yang G, Chao D, Wang Z, Shi M, Chen J, Chao DY, Li R., Ma JF, Xia J.. The ABC transporter ABCG36 is required for cadmium tolerance in rice. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(20), 5909-5918.
- Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalan A. The effects of cadmium toxicity[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2000, 17 (11): 3782.
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health[J]. Journal of Occupational Medicine and Toxicology, 2006, 1: 22.
- Huang RZ, Jiang YB, Jia CH, Jiang SM, Yan XP. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Morus alba* L[J]. International Journal of Phytoremediation, 2018, 20 (5); 448-453.
- Huang W, Niu Y, Li Y, Zhang D, Jiang Y, Zhang H, Deng C, Yang X, Wang W, Song X. Effects of free amino acids, metallothionein, and chemical forms of heavy metals on the accumulation and detoxification of cadmium and chromium in Chinese goldthread (*Coptis chinensis* Franch.)[J]. Journal of Sensors, 2022, 2022, 15.
- Haider FU, Liqun C, Coulter JA, Cheema SA, Wu J, Zhang RZ, Wenjun M, Farooq M. Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 211: 111887.
- Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF. Cadmium-induced cancers in animals and in humans[J]. International Journal of Occupational and Environmental Health, 2007, 13(2): 202-212.
- Ismael MA, Elyamine A.M, Moussa MG, Cai M, Zhao X, Hu C. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers[J]. Metallomics, 11 (2), 255-277.
- Khan K, Mohsin A, Sharif HMA, Maryam A, Ali J, Li X, Ibrahim SM, Ayaz M, Zhou YQ, Younas M. Heavy metal pollution in the soil of a riverine basin: distribution, source, and potential

- hazards [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2022, 194: 618.
- Lee H, Saeger JD, Bae S, Kim M, Depuydt S, Heynderickx PM, Wu D, Han T, Park J. Giant duckweed (*Spirodela polyrhiza*) root growth as a simple and sensitive indicator of copper and chromium contamination[J]. *Toxics*, 2023, 11(9): 788.
- Li GX, Li QS, Wang L, Chen GY, Zhang DD. Subcellular distribution, chemical forms, and physiological response to cadmium stress in *Hydrilla verticillata*[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 21 (3): 230-239.
- Liu SL, Ali S, Yang RG, Tao JJ, Ren B. A newly discovered Cd-hyperaccumulator *Lantana camara* L[J], *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 371: 233-242.
- Ma X, Zeng JY, Li N, He YM, Xu ZY, Wang WQ, Yang YW, Yang L. Cadmium accumulation in duckweed relates to pH and oxalate synthesis in Cd shock[J]. *Journal of Aquatic Plant Management*, 2023, 61: 55-62.
- Meychik NR, Nikolaeva YI, Yermakov IP. Ion-exchange properties of cell walls of *Spinacia oleracea* L. roots under different environmental salt conditions[J]. *Biochemistry*, 2006, 71(7): 781-789.
- Moreira JR. Global biomass energy potential[J]. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 2006, 11: 313-342.
- O'Brien AM, Yu ZH, Pencer C, Frederickson ME, LeFevre GH, Passeur E. Harnessing plant-microbiome interactions for bioremediation across a freshwater urbanization gradient[J], *Water Research*, 2022, 223: 118926.
- Oladosu GA, Kline KL, Langeveld JWA.. Structural break and causal analyses of U.S. corn use for ethanol and other corn market variables[J]. *Agriculture*, 2021, 11(3): 267.
- Olah V, Hepp A, Meszaros I. Comparative study on the sensitivity of turions and active fronds of giant duckweed (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden) to heavy metal treatments[J]. *Chemosphere*, 2015, 132: 40-46.
- Oron G. Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production[J]. *Agricultural Water Management*, 1994, 26(1-2): 27-40.
- Palusinska M, Barabasz A, Kozak K, Papierniak A, Maslinska K, Antosiewicz DM. Zn/Cd status-dependent accumulation of Zn and Cd in root parts in tobacco is accompanied by specific expression of ZIP genes[J]. *BMC Plant Biology*. 2020, 20(1): 37.
- Rai PK. Heavy metals/metalloids remediation from wastewater using free floating macrophytes of a natural wetland[J]. *Environmental Technology and Innovation*, 2019, 15: 100393.
- Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng BS. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress[J]. *Molecules*, 2019, 24(13): 2452.
- Shi ZJ, Qi XL, Zeng XA, Lu YJ, Zhou JL, Cui KH, Zhang LM. A newly isolated bacterium *Comamonas* sp. XL8 alleviates the toxicity of cadmium exposure in rice seedlings by accumulating cadmium[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 403: 123824.



- Smain M, Saida S, Michel C. Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72(6): 1774-1780.
- Song J, Song QC, Wang D, Liu YH. Mitigation strategies for excessive cadmium in rice[J]. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2023, 22(5): 3847-3869.
- Su HF, Zhao Y, Jiang J, Lu QL, Li Q, Luo Y, Zhao H, Wang ML. Use of duckweed (*Landoltia punctata*) as a fermentation substrate for the production of higher alcohols as biofuels[J]. *Energy and Fuels*, 2014, 28(5): 3206-3216.
- Tenenbaum DJ. Food vs. fuel: diversion of crops could cause more hunger[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116(6): 254-257.
- Van HA, Horemans N, Monsieurs P, Cao H, Vandenhove H, Blust R. The first draft genome of the aquatic model plant *Lemna minor* opens the route for future stress physiology research and biotechnological applications[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 188.
- Vives-Peris V, de Ollas C, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond[J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(1): 3-17.
- Wang WQ, Yang YW, Ma X, He YM, Ren QT, Huang YD, Wang J, Xue Y, Yang R, Guo YH. New Insight into the function of dopamine (DA) during Cd Stress in duckweed (*Lemna turionifera* 5511)[J]. *Plants*, 2023, 12(10): 1996.
- Wang ZX, Chai LY, Wang YY, Yang ZH, Wang HY, Wu X. Potential health risk of arsenic and cadmium in groundwater near Xiangjiang River, China: a case study for risk assessment and management of toxic substances[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011, 175(1-4): 167-173.
- Wang XL, Hu L, Wu DS, Huang T, Zhang BJ, Cai GJ, Gao GQ, Liu ZM, Huang XP, Zhong ZY. Large-scale screening and characterization of Cd accumulation and ultrastructural deformation in duckweed[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 832: 154948.
- Xu H, Yu CJ, Xia XL, Li ML, Li HG, Wang Y, Wang SM, Wang CP, Ma YB, Zhou GK. Comparative transcriptome analysis of duckweed (*Landoltia punctata*) in response to cadmium provides insights into molecular mechanisms underlying hyperaccumulation [J]. *Chemosphere*, 2017, 190: 154-165.
- Yang GL, Fang Y, Xu YL, Tan L, Liu Y, Lai F, Jin YL, Du AP, He KZ, Ma XR, Zhao H. Frond transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* for *Lemna minor*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2018, 98(4-5): 319–331.
- Yang GL, Feng D, Liu YT, Lv SM, Zheng MM, Tan AJ. Research progress of a potential bioreactor: duckweed[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(1): 93.
- Yang GL, Zheng MM, Tan AJ, Liu YT, Feng D, Lv SM. Research on the mechanisms of plant enrichment and detoxification of cadmium [J]. *Biology*, 2021, 10(6): 544.
- Yang L, Ma X, Guo YH, He YM, Yang YW, Wang WQ, Xu ZY, Zuo ZJ, Xue Y, Yang R, Han B, Sun JS. Acetylcholine (ACh) enhances Cd tolerance through transporting ACh in vesicles and modifying Cd absorption in duckweed (*Lemna turionifera* 5511)[J]. *Environmental Pollution*,

- 2023, 335: 122305.
- Yu BH, Peng YJ, Xu JR, Qin D, Gao TC, Zhu HY, Zuo SH, Song HC, Dong, JY. Phytoremediation potential of *Youngia japonica* (L.) DC: a newly discovered cadmium hyperaccumulator[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(5): 6044-6057.
- Zhao H, Appenroth K, Landesman L, Salmean AA, Lam E. Duckweed rising at Chengdu: summary of the 1st International Conference on Duckweed Application and Research[J]. Plant Molecular Biology, 2012, 78(6): 627-632.
- Zhu TT, L LY, Duan QX, Liu XL, Chen M. Progress in our understanding of plant responses to the stress of heavy metal cadmium[J]. Plant Signal and Behavior, 2021, 16(1): 1836884.
- Zheng MM, Feng D, Liu HJ, Yang GL. Subcellular distribution, chemical forms of cadmium and rhizosphere microbial community in the process of cadmium hyperaccumulation in duckweed[J]. Science of the Total Environment, 2023, 859(2): 160389.
- 陈玉成, 赵中金, 孙彭寿, 周虹, 欧阳东, 陈宏, 张秀, 殷捷. 重庆市土壤-蔬菜系统中重金属的分布特征及其化学调控研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 01: 45-48.
- 冯丹, 谭艾娟, 吕世明, 郑萌盟, 杨贵利. 贵州省浮萍形态学鉴定与遗传多样性分析[J]. 水生生物学报, 2022, 46(07): 974-982.
- 何红君. 丛枝菌根真菌接种对 Cd 胁迫下芹菜生理及富集特征的影响[J]. 东北农业科学, 2020, 45(3): 70-75+102.
- 郭瑞亮, 张刚, 崔钦娜, 冯婕, 陈继峰. 细菌中基因组岛的转移与调控机制研究进展. 微生物学通报, 2018, 45(10), 2234-2242.
- 唐利萍, 方扬, 靳艳玲, 陈夏媛, 赵海. 重金属镉超富集浮萍品种筛选及其对水体中镉的去除效果[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(05): 830-836.
- 王兴利, 吴晓晨, 王晨野, 穆晓东, 王晶博, 杨晓姝, 胡小飞, 郑晓秋. 水生植物生态修复重金属污染水体研究进展[J]. 环境污染与防治, 2020, 42(01): 107-112.
- 薛慧玲, 董志红, 方杨, 靳艳玲, 赵海. 水生能源植物浮萍生产燃料乙醇[J]. 可再生能源, 2013, 31(07): 55-59.
- 雪晶, 侯丹, 王旻烜, 张佳, 张家仁. 世界生物质能产业与技术发展现状及趋势研究[J]. 石油科技论坛, 2020, 39(03): 25-35.
- 杨晶晶, 赵旭耀, 李高洁, 胡诗琦, 陈艳, 孙作亮, 侯宏伟. 浮萍的研究及应用[J]. 科学通报, 2021, 66(09): 1026-1045.
- 曾加会, 李元媛, 阮迪申, 晁元卿, 仇荣亮, 杨燕花, 王诗忠. 植物根际促生菌及丛枝菌根真菌协助植物修复重金属污染土壤的机制[J]. 微生物学通报, 2017, 44(05): 1214-1221.
- 郑萌盟, 谭艾娟, 吕世明, 冯丹, 杨潇, 罗菲, 杨贵利. 耐镉浮萍筛选、鉴定及其对镉的富集效果[J]. 环境工程学报, 2022, 16(02): 471-480.

## 作者简介及博士后期间研究成果

### 作者简介:

杨贵利, 女, 重庆人

2010年09月-2014年06月, 吉林大学, 学士学位

2014年09月-2019年06月, 中国科学院成都生物研究所, 博士学位

2019年09月-2021年09月, 贵州大学生命科学学院, 讲师

2020年09月-2020年12月, 四川外国语大学, 出国培训部, 高级英语进修

2021年12月至今, 贵州大学生命科学学院, 副教授, 生物科学系主任

2022年03月至今, 贵州大学生命科学学院, 特聘教授

2023年01月至今, 贵州大学学术学科带头人培育对象

2023年10月, 贵州大学教学名师

2022年01月-2023年11月, 中国科学院地球化研究所, 博士后研究

### 博士后期间发表的学术论文:

Lei D, Cao HR, Zhang KK, Mao K, Guo YK, Huang JH, **Yang GL**, Zhang H\*, Feng XB\*. Coupling of different antioxidative systems in rice under the simultaneous influence of selenium and cadmium. *Environmental Pollution*. 2023, 337: 122526.

**Yang GL**, Huang L, Yang X, Li Z, Liao HM, Mao K, Liu ZJ, Geng HY, Cao Q, Tan AJ\*. Transcriptomic and functional analyses of two cadmium hyper-enriched duckweed strains reveal putative cadmium tolerance mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24: 12157.

Zheng MM, Feng D, Liu HJ, **Yang GL**\*. Subcellular distribution, chemical forms of cadmium and rhizosphere microbial community in the process of cadmium hyperaccumulation in duckweed. *Science of the Total Environment*, 2023, 859: 160389.

Yang X, Liao HM, Tan AJ, Gan SX, **Yang GL**\*. Effects of microplastics and cadmium on growth rate, photosynthetic pigment content and antioxidant enzymes of duckweed (*Lemna minor*). *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30, 96181 – 96190.

Yang X, Tan AJ, Zheng MM, Feng D, Mao K, **Yang GL**\*. Physiological response, microbial diversity characterization, and endophytic bacteria isolation of duckweed under cadmium stress. *Science of the Total Environment*, 2023, 902: 166056.

**Yang GL**\*. Duckweed is a promising feedstock of biofuels: advantages and approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23: 15231.

**Yang GL**\*, Zheng MM, Liao HM, Tan AJ, Feng D, Lv SM. Influence of cadmium and microplastics on physiological responses, ultrastructure and rhizosphere microbial

community of duckweed. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 243: 114011.

**博士后期间申请的发明专利:**

杨贵利, 曹琴, 娄遵义, 郑萌盟, 谭艾娟. 一种浮萍 *LmGST* 基因及其在改善水体环境中的应用, 专利申请号: 202310847497X.

**博士后期间出版的学术专著:**

杨贵利. 浮萍科植物生物系统研究及应用. 重庆出版社. 2023.05

**博士后期间主持的科学研究:**

- (1) 国家自然科学基金委员会, 青年科学基金项目, 32001203, 浮萍 GST 基因调控重金属 Cd 超富集分子机制, 2021-01 至 2023-12, 在研, 主持。
- (2) 贵州省科技厅, 基础研究重点项目, 黔科合基础-ZK[2022]重点 021, 内生菌协同调控浮萍超富集重金属 Cd 的机理研究, 2022-04 至 2026-03, 在研, 主持。
- (3) 贵州大学, 2023 年“学科倍增提升”行动专项国际影响力提升计划, 2023-05 至 2024-05 在研, 主持。
- (4) 贵州大学, 贵州大学实验室开放项目, SYSKF2023-079, 抗 Cd 促生内生菌的分离及生化机制的研究, 2023-01 至 2023-11, 在研, 主持。
- (5) 贵州大学, 贵州大学实验室开放项目, SYSKF2022-088, Cd 在植物体内的分布与赋存形态研究, 2022-04 至 2022-11, 结题, 主持。

## 致谢

2019年05月，那是我第一次来到贵阳这个城市。走出车站那一刻，这里的蓝天白云便深深地吸引了我。心想贵州贵阳贵大，或许就是贵利梦想起航的地方。转眼已经参加工作四年，这四年的每一天都过得异常地充实，似乎每一天都能有新的收获。在工作后的第二年，也终于等来了到所里开展博士后研究工作的机会。光阴荏苒，转眼就到了博士后出站时刻，真的感触良多！

漫漫人生路，师恩深似海。首先特别感谢我的导师冯新斌研究员，我们的缘分始于一封邮件，回想当初等待回信时忐忑不安的心情，以及获得冯老师认可后激动的心情，能成为冯老师的一名学生，我想我是幸运的！后来进入课题组，感受到冯老师不仅仅是一位优秀的学者，更是一位平易近人、多才多艺的老师 and 引路人，我想我是幸福的！入站两年来，冯老师在工作和生活方面对我的帮助颇多，把我带领到了更高的层面，让我在思想和看待事物的角度上有了很大的提升，此刻即将出站，我是即幸运又幸福的！我很想做一些力所能及的事情来报答这份师生情谊，但又不知道做什么能帮到冯老师，只能是把这份恩情牢牢地记在心里，真心的做冯老师永远的“粉丝”，希望在未来的日子里冯老师身体健康，万事如意！师者如光，微以致远。回首博士后学习生涯，我也要感谢冯老师的和蔼可亲，冯老师的鼓励和支持总是让我倍感温暖，当我因为工作评定遭受挫折，您“卧薪尝胆”的安慰让我的信念更加坚定。一时的失败并不等于永远的失败，相信只要我心中有信念，坚持下去，终能苦尽甘来。其次，我要感谢冯老师在学术方面的卓越成就，每每看到冯老师的科研报道和获奖消息，我总是无比地骄傲和自豪，同时作为冯老师学生的压力也让我一定要更严格的要求自己，这才使我能够在博士后期间取得一些研究成果。此外，我更要感谢冯老师在运动方面的专长，冯老师似乎无所不能，看过冯老师踢足球、打羽毛球，真的很难想象冯老师已经年过五旬，但他却在生活中用行动激励我们积极参与运动。冯老师的人格和修养润物无声洒春晖，照亮了我的拼搏前进之路和为师为学之路，衷心感恩冯老师的指导。

同时，我也要郑重感谢另外一位老师——张华研究员。一直认为张老师的身上既有一种学者的风范，又有一种文人的风骨。我感觉我认识的张老师是一位比较感性的老师，但他却有着最理性的执着。至今我依然清晰地记得，与张老师的第一次见面，他就向我无私地分享了很多他的科研资料，并毫无保留地分享他对

于科研工作的认识，特别是对于在竞争激烈的环境下，如何通过学科交叉另辟蹊径的创新看法。张老师考虑问题也总是会更多地站在学生的角度，是他一开始就鼓励我一定要跟着冯老师好好学习才会有更大的进步，也是他鼓励我可以尽快地申请博士后出站答辩，就像张老师说的那样，用最短的时间完成博士后的研究工作，似乎也是一件在简历上很牛逼的事情。张老师还不止一次结合他自己的人生经历，对我今后的职业生涯规划提出建设性的意见，这些宝贵的意见常常会使我豁然开朗。从张老师的人生经历中，也不难发现他真的无论在哪个岗位上无论做着什么工作都是比较突出的。张老师这样优秀的人总是自带光芒和吸引力，所以才能如此年轻就可以作为首席拿下国家重点研发项目。张老师的组会也经常会上头脑风暴到很晚，他对学生们的进步永远都是鼓励的，对学生们的不足永远都是包容的。记得一次为了修订一本专著，与张老师讨论到很晚，但他依然会为了突然迸发的新想法而眼里有光，这样的科研热情真的很能感染人。张老师年轻有为，但却非常地谦虚，对科研事业始终充满激情，相信正是张老师这种捧着真心认真做事的人生态度，才让团队的人安心，才能凝聚了一批优秀的师生攻克一个又一个课题。在此，对张老师对我一直以来的支持和帮助表示最诚挚地感谢！

另外，我也要感谢我的硕士导师、博士导师以及人生路上的每一位老师，他们或严厉或慈祥，但他们都在我人生的旅途中，为我写下了生命的成长和陪伴，没有他们中的任何一位，也就没有我的今天。还有不能不感谢的是家人长期以来支持、关心与帮助，无论何时何地，你们的关爱永远都是我前进的动力！此外，特别感谢我的爱人，付林先生，转眼已到了我们相识的第12个年头，一路走来，从长春到北京到成都再到贵阳，从本科到硕士到博士再到博士后。每当我逆水行舟，你总在我的左右，给我追求梦想的勇气和底气。我始终一如既往地相信，一切都是最好的安排，所有的美好和期待都会如约而至！

最后，也感谢努力拼搏的自己，命运垂青执着的人，工作这几年保持了读博期间的作息和工作习惯，虽然也经历很多的挫折，但每一天都异常的充实也获得了很多成长的机会。生活总是起起落落，但人生就是不断修行的过程。慢慢地突然之间，我开始可以平常心接受生活的一切好与坏，但却依然选择勇往直前，这或许就是人生的真谛。

——杨贵利 2023年11月