

芦苇抗镉污染机理研究

江行玉¹, 王长海², 赵可夫^{1*}

(1. 山东师范大学逆境植物研究所, 济南 250014, 2. 烟台大学海洋生化工程研究所, 烟台 264005)

摘要:研究了芦苇幼苗体内 Cd 的积累、亚细胞微区分布、存在形态和其诱导蛋白以及植物络合素合成抑制剂(BSO)对芦苇光合作用和生长的影响。在 Cd 污染条件下, 芦苇幼苗植株和根皮层细胞中可积累大量的 Cd, 但 Cd 在芦苇各器官和根皮层细胞亚细胞结构中的分布显著不均; Cd 在芦苇幼苗体内的分配为: 根 > 叶片 > 茎 > 地下茎, 在根皮层细胞中的分布为: 细胞间隙 > 细胞壁 > 液泡 > 细胞质。受 Cd 污染的芦苇幼苗体内的 Cd 以不同化学形态存在, 其中 NaCl 提取态的 Cd 在根和叶片中占的比例均为最大, 其次为根内的醋酸提取态; 在叶片中以水提取态为主, 其它形态的含量相对较低。层析结果表明, 根和叶片中各存在一种 Cd 结合蛋白, 其中根内的 Cd 结合蛋白可能是一种植物络合素聚合体。受 Cd 诱导, 芦苇幼苗根中还新合成了一种小分子蛋白或多肽, 但另有一种蛋白因 Cd 影响而消失。此外, BSO 实验证明了植物络合素对 Cd 的解毒作用。可见, 芦苇的抗 Cd 机理与以下几个方面有关: 根部截留, 细胞间隙积累, 细胞壁沉淀, 液泡区域化, 形成活性较低的难溶化合物, 形成 Cd 结合蛋白。

关键词: 芦苇; 镉污染; 镉的积累; 镉的亚细胞分布; 镉的化学形态; 镉诱导蛋白

Study on the mechanism of cadmium resistance in *Phragmites australis*

JIANG Xing-Yu¹, WANG Chang-Hai², ZHAO Ke-Fu^{1*} (1. Institute of Plant Stress, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China; 2. Institute of Marine Biochemical Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2003, 23(5): 856~862.

Abstract: The influence of Cadmium (Cd) on physiological and biochemical growth parameters was studied to elucidate the mechanism of cadmium resistance in *Phragmites australis*. Cd levels in roots, rhizomes, stems and leaves increased with Cd pollution. The levels in roots were the highest, while that in leaves were the lowest. Using X-ray microanalysis revealed that Cd accumulated markedly in cell wall, cytoplasm, vacuole and intercellular space. A gradient of Cd levels occurred in different parts of root cortex cell with the sequence: intercellular > cell wall > vacuole > cytoplasm. Sequential extraction revealed that the ratio of Cd extracted from different extraction media was markedly different, of which NaCl extractable-Cd was dominant in both roots and leaves of *P. australis*. Cd-binding proteins were found in both; root and leaf after gel filtration chromatograph. The Cd-binding protein in root might be a polymer of phytochelatins. In addition, a new polypeptides was found under Cd pollution, and at the same time the other protein disappeared. And the experiments of BSO also proved the detoxification of Cd by

基金项目: 国家重点基础发展规划资助项目(G1999011700)

收稿日期: 2002-04-24; 修订日期: 2002-10-30

作者简介: 江行玉(1973~), 男, 河南人, 博士, 主要从事植物生理生化研究。

* 通讯作者: Author for correspondence

Foundation item: The state key foundation development program (No. G1999011700)

Received date: 2002-04-24; Accepted date: 2002-04-24

Biography: JIANG Xing-Yu, Ph. D., mainly engaged in the plant physiology and biochemistry.

phytochelatin. All the above results suggested that detoxification of Cd in *P. australis* may involve different strategies: retention in root, accumulation in intercellular, deposition on cell wall, compartmentalization in vacuole, insoluble Cd-binding components and Cd-binding protein.

Key words: *Pragmites australis*; Cd; accumulation; subcellular distribution; chemical forms; Cd-inducing proteins

文章编号:1000-0933(2003)05-0856-07 中图分类号:Q948.116.X171.5 文献标识码:A

镉是一种土壤中天然存在的痕量元素^[1],由于工业“三废”的排放、污水灌溉及农药、除草剂和化肥的使用,使土壤中镉等重金属的含量显著增加^[2,3];并且与其它重金属元素相比,土壤中的镉相对容易被植物吸收^[4,5]。研究证明,被植物体吸收后镉可通过使膜脂过氧化和膜电位去极化影响细胞质膜的组成、结构和透性^[1,6~9]使细胞质膜的完整性受到伤害,导致细胞内重要的物质大量外渗,外界环境中有毒的物质进入细胞,使细胞内的一系列新陈代谢过程发生紊乱^[10]使植物的生长发育受到抑制。如,镉能通过破坏叶绿体的结构,抑制光合酶的活性和叶绿素的合成降低植物的光合作用^[11,12];损伤线粒体的结构和抑制 ATPase 等其它呼吸酶的活性干扰植物的呼吸作用^[1,11];通过与蛋白质上 SH 基团结合破坏蛋白质的结构,进一步影响蛋白质的活性,干扰 N 素代谢^[13,14];与 DNA 结合干扰核酸代谢^[15];镉还能干扰 C 素和激素的代谢^[16,17]。此外,镉还能影响植物对其他养分元素的吸收及其在器官中的分布,间接地影响植物的生长发育^[18,19]。但是,在自然界有不少种类的植物可在高浓度的镉环境中生长,表明在长期的进化中植物亦相应地产生了多种抵抗重金属镉毒害的防御机制^[20,21]。尤其是,但当镉浓度较低时可增加植物的产量,说明低浓度的镉对某些植物的生长发育可能有一定的“促进”作用^[22]。

镉在植物体内被限制运输到茎叶,绝大部分保留在根部,一定程度上提高了植物的耐性^[13]。但也有些镉超量富集植物能通过把镉贮存在叶片的表皮毛中而达到解毒作用^[23]。作为镉进入细胞内部的第一道屏障,细胞壁的镉沉淀作用可能是一些植物抗镉的原因,这种沉淀作用可以阻止过多的镉进入原生质,免受其毒害^[24]。液泡也能通过区域化作用积累大量的镉,使原生质中的镉含量有所降低,使植物对镉表现出抗性^[25,26]。镉进入原生质体后,细胞内的一些化合物如谷胱甘肽、草酸、组氨酸和柠檬酸盐等一些小分子物质以及金属螯合蛋白和植物络合素可以通过与镉反应形成沉淀(磷酸镉沉淀)和螯合物降低自由态的镉,一定程度上使一些重要的物质和代谢过程免受镉毒害。

总之,镉对植物造成的伤害是多方面的,而植物对镉胁迫也有多方面的防卫机制。但何为关键因素至今还不清楚。基于此,本工作以对重金属污染抗性较强的芦苇为材料,研究其镉的吸收、亚细胞分布、化学形态和其诱导蛋白以及 BSO 对芦苇光合作用和生长的影响来进一步探讨芦苇的抗镉性。

1 材料与方 法

1.1 植物材料和污染处理

1.1.1 溶液培养 选择均匀健壮的芦苇(*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel)种子(采自山东省寿光市),播种于装有洗净细砂的塑料盆(长 30 cm,宽 20 cm,高 25cm)中。萌发后,每天浇灌 Hoagland 营养液。4 叶期选择生长一致的健壮幼苗移栽到盛有 Hoagland 营养液的小塑料盆中,盆口用打孔的塑料泡沫固定植株,每板 5 个孔,每孔植株一株,根侵入营养液中,苗基部用脱脂棉固定,每隔 1h 通气 2h。在第 8 片叶出现时,用含 0.5 mmol/L CdCl₂ Hoagland 溶液和含 0.1 mmol/L BSO (buthionine sulfoximine, 一种植物络合素合成的抑制剂)与 0.5 mmol/L CdCl₂的 Hoagland 混合溶液分别处理芦苇幼苗,以不含 CdCl₂的两种处理作对照。每个处理 3 个重复。处理 7 d 后,测定芦苇植株的光合速率,14 d 后,测定芦苇植株的干重。

1.1.2 砂基培养 芦苇种子(采自山东省寿光市)播种于装有洗净细砂的花盆(直径 20 cm,高 25cm)中。萌发后,每天浇灌 Hoagland 营养液。2 叶期选择生长一致的健壮幼苗每盆保留 5 株。在第 8 片叶出现时,用 3 mmol/L CdCl₂溶液处理芦苇幼苗,每天换 2 次溶液。每个处理 5 个重复。处理 7 d 后,取样测定各项指标。

1.2 测试内容及数据

1.2.1 光合速率的测定 用美国产 Li-6400 光合测定一测定叶片的净光合速率,光强为 1200 lx,温度为

28 C。

1. 2. 2 Cd 含量测定 收获整株植物,用蒸馏水冲洗干净,吸水纸吸干表面水分,小心分成根、地下茎、茎以及叶片 4 部分,放入 85 C 烘箱中烘干,称重后放入马伏炉中 510 C 灰化 48h,室温冷却后用 1ml 浓 HNO₃ 消化,去离子水定容后,用日立 Z-8000 原子吸收光谱仪测定 Cd 含量。

1. 2. 3 Cd 分布的电镜观察 在离根尖 1.5 cm 处切取 0.5 cm 长的根段,放入一个铝网制成的小袋中,迅速投入用液氮冷却的异戊烷和丙烷(体积比为 1:3)中快速冷却,然后转入冷却干燥机中进行冷冻干燥。将干燥好的根段转入 T 型真空渗透管中,用乙醚在真空中 27 C 下进行渗透 24h。然后再将材料用苯乙烯-甲基丙烯酸丁酯在常压下渗透后,转入小胶囊中在 60 C 下聚合 7d。包埋后的材料用超薄切片机干刀切片,切片厚度为 1μm。切片在喷碳后在配有 EDAX-9100 能谱仪的日立 H-800 型透射电镜下进行测定,加速电压为 150 KV,取出角为 25°,样品的测量计数时间为 60s,测出的数值分别表示扣除背底后的每种元素的 X-ray 计数值(CPS)。在检测时,对每一组织区域所测定的微区,至少测试 7 个点,求出其平均值^[27]。

1. 2. 4 Cd 的化学形态分析 用逐步提取法研究芦苇幼苗根部和叶片内 Cd 的化学形态^[13, 28],提取剂及提取顺序为 80%乙醇、去离子水、1 mol/L NaCl 溶液、2%(V/V)醋酸、0.6 mol/L 盐酸。

分别称取 2.000 g 芦苇幼苗根和叶片新鲜样品,剪成 1~2 mm² 的碎片,置于烧杯中,加入 37.5ml 提取剂,在 30 C 恒温箱中放置过夜(17~18 h),次日回收提取液,再加入同样体积该提取液,浸取 2 h 后再回收提取液,重复 2 次,即在 24 h 内提取 4 次,集 4 次提取液(共 150 ml)于烧杯中。提取液经蒸发近干后,用一定比例硝酸-高氯酸消化,用 10%硝酸定容,用日立 Z-8000 原子吸收光谱仪测定溶液中 Cd 的含量。

1. 2. 5 蛋白的层析分离 芦苇幼苗用 3mmol/L CdCl₂ 溶液培养 7d 后,分别取根和叶片,用蒸馏水冲洗干净,吸水纸吸干表面水分,称重,用 10mmol/L Tris-HCl(pH8.6)缓冲液在研钵中磨成匀浆(材料与缓冲液的比为 1:2),匀浆在 4 C 低温下 12000g 离心 45min。上清液经 Sephadex G-75 柱(1.5×100)分离,上柱样品为 3ml,流速为 40ml/h,按 6.67ml/管分部收集洗脱液,平衡及洗脱液为 10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)。洗脱液中 Cd 含量用日立 Z-8000 原子吸收光谱仪测定。分子量鉴别用标准蛋白质为牛血清蛋白(67000)、卵清蛋白(44000)、胰蛋白酶(23500)细胞色素 C(12300)和胰岛素(6000)^[29]。

2 实验结果

2.1 Cd 污染对芦苇幼苗体内 Cd 水平的影响

在 CdCl₂ 污染条件下,芦苇幼苗根、地下茎、茎以及叶片内的 Cd 水平极显著升高。但其不同器官吸收和积累 Cd 的能力明显不同,Cd 在根中的分布高于其它部位,具体地说,根中 Cd 水平分别是地下茎的 18.84 倍,茎的 17.46 倍,叶片的 8.93 倍(表 1)。

2.2 Cd 在芦苇幼苗根皮层细胞中的微区分布

用 X-ray 分别测定了芦苇幼苗根皮层细胞的细胞壁、细胞质、液泡以及细胞间隙中的 Cd 含量。结果表明,对照植株根细胞及细胞间隙中的 Cd 含量可能太低而没有测出。但是 Cd 处理的芦苇幼苗根细胞的细胞壁、细胞质、液泡和细胞间隙中积累了大量的 Cd,但各部分中的 Cd 含量明显不同,大小顺序为:细胞间隙>细胞壁>液泡>细胞质,具体来讲,细胞间隙、细胞壁和液泡中的 Cd 含量分别是细胞质中的 2.65、1.79 和 1.47 倍(表 2)。

2.3 Cd 污染对芦苇幼苗根和叶片内 Cd 化学形态的影响

表 1 Cd 在芦苇不同部位中的含量

Table 1 Cd levels in different parts of *P. australis* seedlings

处理 Experiments	芦苇不同部位中的 Cd 含量(μg/g DW) Content of Cd in different parts of <i>P. australis</i> seedlings			
	根 Roots	地下茎 under earth	茎 Stems	叶 Leaves
	对照 Control	13.35	7.24	8.11
3mmol/LCd	1926.08	102.24	110.31	215.62

表 2 Cd 在芦苇幼苗根皮层细胞中的微区分布

Table 2 Cd compartmentalization in root cortex cells of *P. australis* seedlings

处理 Experiments	芦苇幼苗根皮层细胞不同部位中的 Cd 含量 Content of Cd in different parts of root cortex cells (CPS)			
	细胞壁 Cell wall	细胞质 Cytoplasm	液泡 Vacuole	细胞间隙 Intercellular
	对照 Control	0	0	0
3mmol/LCd	50.10	28.02	40.80	74.33

* CPS X-ray 计数单位 Count per second 的缩写 CPS is the abbreviate of X-ray count per second

镉污染的芦苇幼苗根和叶片内 Cd 化学形态的实验结果表明,从不同形态镉含量占总量的比例来看,根和叶片内均以 NaCl 提取态镉占绝对优势,根内所占的百分比为 53.02%,叶片内占 60.28%。其次在根内为醋酸提取态,占总镉量的 25.80%,在叶片内为水提取态,占总镉量的 18.62%。其它形态的含量相对较低,它们的大小顺序在根内为: $F_{\text{Water}} > F_{\text{HCl}} > F_{\text{Ethanol}} > F_{\text{Residue}}$,在叶片内为 $F_{\text{HAc}} > F_{\text{HCl}} > F_{\text{Ethanol}} > F_{\text{Residue}}$ (表 3)。

表 3 芦苇幼苗根和叶片内不同 Cd 化学形态的含量

Table 3 Contents of different Cd chemical forms in *P. australis* seedling leaves and roots

器官 Orgnisms	处理 Experiments	不同 Cd 化学形态的含量 ($\mu\text{g/g DW}$) Contents of different chemical Cd forms in leaves and roots					
		F_{Ethanol}	F_{Water}	F_{NaCl}	F_{HAc}	F_{HCl}	F_{Residue}
根 Roots	对照 Control	0	0.57	2.43	4.51	2.85	1.04
	3mmol/LCd	69.15	231.94	990.95	482.20	84.48	9.16
叶 Leaves	对照 Control	0	0.08	0.79	2.16	0.47	0.53
	3mmol/LCd	6.85	42.83	138.64	27.60	10.86	3.24

* F 是状态(form)的英文缩写 CPS is the abbreviate of form

2.4 蛋白质凝胶层析

利用 Sephadex G-75 凝胶柱层析分离的结果表明,Cd 污染的芦苇幼苗根提取液的 Sephadex G-75 凝胶柱层析在层析分离的第 65 分钟出现一个含 Cd 的蛋白质峰,与相同条件下标准蛋白质层析曲线对照,该蛋白质的分子量大约为 14000 左右;在同等条件下,叶片提取液在第 210 分钟处出现一个分子量大约为 87000 的含 Cd 蛋白质峰。与正常对照芦苇根的分层结果相比,还发现在 Cd 胁迫下的芦苇根在层析分离的第 275 分钟处出现了一种由 Cd 诱导而合成的分子量分别约为 1000 的新蛋白质或多肽,而分子量为 72000 的另一种蛋白质可能是受 Cd 影响而消失。

2.5 BSO 对 Cd 胁迫下芦苇幼苗光合作用和生长的影响

从图 1 和表 4 可以看出,0.5 mmol/L Cd 处理后,芦苇幼苗光合速率和生长明显下降。BSO 对正常生长芦苇的光合作用和生长影响不显著,却能进一步抑制 Cd 胁迫下芦苇的光合作用和生长。

表 4 BSO 对 Cd 胁迫下芦苇幼苗生长的影响

Table 4 Effect of BSO on the growth of *P. australis* seedlings under Cd stress

不同处理条件下每株芦苇的干重(g/plant) Dry weight of <i>P. australis</i> seedlings under Cd stress			
0mmol/L Cd	0mmol/L Cd+BSO	3mmol/L Cd	3mmol/L Cd+BSO
0.32	0.33	0.24	0.19

* 处理 2 周后的数据 The culture time was two weeks

3 讨论

重金属对植物的毒害作用及植物的耐受性,主要与植物对重金属的吸收与运输、在植物体内各部位的分配以及与植物体内物质的结合形态等因素有关^[29]。本实验结果表明,在 Cd 胁迫下,进入芦苇幼苗体内的绝大部分 Cd 被富集在根部,而迁移至其它部位的较少;该结果与 Ye 的研究结果相似^[30]。由于大部分 Cd 积累在芦苇根部,从而减轻了地上部分各器官的毒害作用,一定程度上提高了芦苇的耐 Cd 性。根据 Brooks 对超富集植物(accumulator plant)的定义,地上部分能富集 100 mg/kg DW 以上镉的植物为超富集植物^[31]。本文研究表明镉在芦苇叶片中的水平可达 215.62 mg/kg DW,在 3 mmol/L 镉污染条件下,芦苇

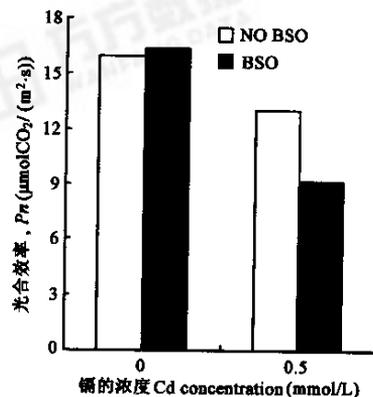


图 1 BSO 对 Cd 胁迫下芦苇幼苗光合作用的影响
Fig.1 Effect of BSO on photosynthesis of *P. australis* seedlings under Cd stress

幼苗除了生长稍下降外,没有表现出明显受害症状,故芦苇对处理镉含量较高的工业污水具有很大的应用价值。

从 X-ray 微区分析结果可见,Cd 在芦苇幼苗根皮层细胞内的微区分布明显不同。绝大部分的 Cd 都沉积在质外体中,表明在 Cd 胁迫下芦苇根部细胞的质外体是 Cd 离子重要的贮存场所。由于 Cd 被局限在活性较低的区域,阻止其过多地 Cd 进入原生质体,从而使细胞质内的一些重要物质和代谢活动在一定程度上免受 Cd 的毒害,使芦苇对 Cd 表现出耐性。

Cd 污染条件下芦苇幼苗体内 Cd 的存在形态分析显示,在芦苇的根部和叶片内,镉都以 NaCl 提取态占绝对优势,表明进入芦苇体内的 Cd 多聚集在蛋白质周围。这是因为 Cd 对蛋白质的巯基和其它一些侧链有很强的亲和力,在植物体内 Cd 常与蛋白质发生结合^[13,32]。这种结合形态一方面可减少游离 Cd 的含量,使其有效性和移动性降低,从而避免其对植物产生伤害;但另一方面,Cd 可能与体内的酶和功能蛋白结合,干扰它们的功能,造成生理生化代谢过程紊乱,而影响植物的生长发育。在根内,醋酸提取态 Cd 占的比例也相当大,仅次于 NaCl 提取态,为根部总 Cd 量的 25.80%,也就是说,芦苇根内相当大一部分 Cd 能与一些物质结合形成活性较低的难溶性化合物,相应地自由态的 Cd 含量相对较低,以致它的毒害作用也比较小。另外,由于富集在芦苇根部的 Cd 有一部分是以难溶的形态存在,所以它就不容易由根部向地上部分迁移,这也可能是芦苇根部积累 Cd 的机制之一。因为不同形态重金属镉的溶解度差异很大,所以芦苇的耐 Cd 性和 Cd 在芦苇体内的移动性也与 Cd 在其体内的存在形态密切相关。

在重金属镉胁迫下,植物能迅速合成类金属螯合蛋白(Metallothionein-Like)和植物络合素(Phytochelatin)^[21,33]。研究表明,金属螯合蛋白和植物络合素能通过多个重金属结合位点与镉离子螯合,形成无毒的化合物,降低了细胞内游离的镉离子浓度,防止镉敏感酶变性失活,从而能够减轻镉对植物的毒害作用^[34,35]。尤其是植物络合素可以作为载体把细胞质中的镉转运到液泡中,降低了细胞质中镉的浓度,达到解毒的目的^[36],同时它还能保护细胞内一些酶的活性,间接地提高植物的抗性^[37]。本实验的结果也表明,Cd 处理的芦苇根和叶片内分别各存在一种 Cd 结合蛋白,但是它们是芦苇本身就有的蛋白质还是受 Cd 诱导产生的还需要进一步研究。据报道,类金属结合蛋白的分子量大约是 10000,Grill 用高压液相色谱法分析了从 red cabbage 叶片中得到的分子量大约为 10000 的 Cd 结合物,该物质是由几种植物络合素组成的聚合体^[38]。本实验用 Sephadex G-75 层析分析了被 Cd 污染的芦苇幼苗根提取液中的蛋白质,得到了一个分子量为 14000 左右含大量 Cd 的蛋白质,因此,被认为它也可能是一类植物络合素的聚合体。但从 Cd 处理芦苇幼苗叶片提取液中用 Sephadex G-75 凝胶柱并没有分离出这种蛋白质,这也可能与植物络合素是在根部合成有关^[39]。因为该物质具有结合大量 Cd 的能力,所以它能在一定程度上解除 Cd 对芦苇的毒害作用。同时还发现植物络合素的合成抑制剂(BSO)能进一步抑制 Cd 胁迫下芦苇幼苗的光合作用和生长,这也暗示植物络合素能提高芦苇耐 Cd 的作用。叶片提取液中得到的分子量为 87 KD 蛋白质就不可能是重金属结合蛋白或植物络合素,其性质和作用还有待进一步研究。

重金属不仅能诱导植物合成类金属结合蛋白或植物络合素,而且还能诱导其它不结合重金属的胁迫相关蛋白合成。研究表明,重金属能诱导 Proline-rich protein、Pathogenesis-related protein 和 Glycine-rich protein 等一些蛋白合成,并且一些专家还认为这些重金属胁迫诱导蛋白可能具有保护植物细胞免受重金属毒害的作用^[40~42]。本实验结果表明,镉胁迫诱导芦苇合成一种新的不结合镉的分子量约为 1000 的小蛋白质或多肽外,还导致一种分子量大约为 72000 的蛋白质消失。这两种蛋白质至今还未见报道,所以它们的物理和化学性质也不清楚,尚需进一步研究。

总之,芦苇耐 Cd 的手段很多,导致它的耐 Cd 机理也十分复杂,并且可能是由多基因控制的。所以不能用单一的耐性机理来解释芦苇对 Cd 的耐性,只有全面考虑重金属离子在细胞内的活动,才能弄清楚它的耐性机理。

References: 万方数据

[1] Llamas A, Ullrich CI, Sanz A. Cd²⁺ effects on transmembrane electrical potential difference, respiration and

- membrane permeability of rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Plant and Soil*, 2000, **219**:21~28.
- [2] Nriagu J O, Pacyna JM. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 1988, **333**(12):134~139.
- [3] Koeppel D E. The uptake, distribution and effect of cadmium and lead in plant. *Sci. Tot. Environ.*, 1977, **7**:197~206.
- [4] Andreu V, Boluda R. Application of contamination indexes on different farming soiling. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 1995, **54**:228~236.
- [5] Lee JS, Chon HT, Kim KW. Migration and dispersion of trace elements in the rock-soil-plant system in areas underlain by black shale and slates of the Okchon Zone. *Korea J. Geochem. Explor*, 1998, **65**:61~78.
- [6] Obata H, Inoue N, Umebayashi M. Effect of Cd on plasma membrane ATPase from plant roots differing in tolerance to Cd. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1996, **42**:361~366.
- [7] Hendry GAF, Baker AJM, Ewart CF. Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive clones of *Holcus lanatus* L. *Acta Bot. Neerl.*, 1992, **41**:271~281.
- [8] Bowler C, Montagu MV. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Boil.*, 1992, **43**:83~116.
- [9] Ouariti O, Boussama N, Zarrouk M, Cherif A, Ghorbal MH. Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry*, 1997, **45**:1343~1350.
- [10] Zhang J B, Huang W N. Advances on physiological and ecological effects of cadmium on plants. *Acta Ecologica Sinica*, 2000, **20**(3):514~523.
- [11] Peng M, Wang H X, Wu Y S. Ultrastructural changes induced by cadmium and lead in corn seedling cell. *China Environmental Science*, 1991, **11**(6):426~431.
- [12] Klobus G, Buczek J. Chlorophyll content, cells and chloroplast number and cadmium distribution in Cd-treated cucumber plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 1985, **7**(3):139~147.
- [13] Yang JR, He JQ, Zhang GX. Tolerance mechanism of crops to Cd pollution. *Chinese J. Applied Ecology*, 1995, **6**(1):87~91.
- [14] Chien HF, Kao CH. Accumulation of ammonium in rice leaves in response to excess cadmium. *Plant Sci.*, 2000, **156**:111~115.
- [15] Zhang Y X. Toxicity of heavy metals to rice (*Hordeum vulgare*). *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1997, **17**(2):199~201.
- [16] Zhou J H, Wang Y R. Physiological studies on poisoning effects of Cd and Cr on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings through inhibition of Si nutrition. *Chinese J. Appl. Environ. Biol.*, 1999, **5**(1):11~15.
- [17] Ji Y M, Li Z G. The relation between the generation of stress ethylene induced by cadmium and the uptake and distribution of cadmium in wheat seedlings. *Acta Phytophysiological Sinica*, 1989, **15**(2):159~166.
- [18] Ouariti O, Gouia H, Ghorbal MH. Response of bean and tomato plants to cadmium: Growth, mineral nutrition and nitrate reduction. *Plant Physiol. Biochem.*, 1997, **35**:347~354.
- [19] Moral R, Gomez I. Effect of cadmium on nutrient distribution yield and growth of tomato grown in soilless culture. *J. Plant Nutrition*, 1994, **17**(6):953~962.
- [20] Tomsett A B, Thurman D A. Molecular biology of metal tolerance of plants. *Plant Cell Environ.*, 1988, **11**:383~394.
- [21] Zhang Y X, Chai T Y, Burkard G. Research advances on the mechanisms of heavy metal tolerance in plants. *Acta Botanica Sinica*, 1999, **41**(5):453~457.
- [22] Greger M, Lindberg S. Effects of Cd²⁺ and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*) I. Cd²⁺ uptake and sugar accumulation. *Physiol. Plant*, 1986, **66**:69~74.
- [23] Salt D E, Prince R, Pickering I J, et al. Mechanism of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol.*, 1995, **109**:1427~1433.
- [24] Nishizono H. The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*. *Plant and Soil*, 1987, **101**:15~20.
- [25] Wang J. Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for quenching heavy metal ion activity in plant vacuoles. *Plant Physiol.*, 1991, **97**:1154~1160.
- [26] Rauser W E, Acker C A. Localization of cadmium in granules within differentiating and mature root cells. *Can.*

- J. Bot.*, 1987, **65**:643~646.
- [27] Fritz E. X-ray microanalysis of diffusible elements in plant cells after freeze-drying, pressure infiltration with ether and embedding plastic. *Scanning Microsc.*, 1989, **3**:517~526.
- [28] Antonovilles I, Bradshaw AD, Turner RG. Heavy metal tolerance in plants. *Adv. Ecol. Res.*, 1971, **7**:1~11.
- [29] Yang J R, Z P, Zhang S Q. The distribution and binding of Cd and Pb in plant cell. *China Environmental Science*, 1993, **13**(4):263~268.
- [30] Ye Z H, Baker A J M, Wong M H, *et al.* Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by the common reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Annals of Botany*, 1997, **80**:363~370.
- [31] Brooks RR. Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. Wallingford: CBA International, 1998.
- [32] Braude GL. Cadmium and lead content of soybean products. *J. Food Sci.*, 1981, **45**:1187.
- [33] Cobbett C S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.*, 2000, **123**:825~832.
- [34] Rauser WE. Phytochelatins. *Ann. Rev. Biochem.*, 1990, **59**:61~86.
- [35] Robinson N J, Tommey A M, Kusle C, *et al.* Plant metallothioneins. *Biochem. J.*, 1993, **295**:1~10.
- [36] Rauser W E. Phytochelatins and related peptides. *Plant Physiol.*, 1995, **109**:1141~1149.
- [37] Kneer R, Zenk M H. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochem.*, 1992, **31**(8):2663~2667.
- [38] Grill E. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides of from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1987, **84**:439~443.
- [39] He Y Q, Tao Q N, Obata H. Distribution of Cd in soybean and quality of soybean seed under Cd stress. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2000, **20**(4):500~512.
- [40] Chai T Y, Zhang Y X, Gérard B. Heavy metal-responsive genes in kidney bean: Cloning of cDNA and gene expression analysis. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 1998, **24**(4):399~404.
- [41] Didierjean L, Frenedo P, Nasser W, *et al.* Heavy-metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. *Planta.*, 1996, **199**:1~8.
- [42] Chai TY, Didierjean L, Burkard, *et al.* Expression of a green tissue-specific 11 KDa proline-rich protein gene in bean in response to heavy metals. *Plant Sci.*, 1998, **133**:47~56.

参考文献:

- [10] 张金彪, 黄维南. 镉对植物生理和生态效应的研究进展影响. *生态学报*, 2000, **20**(3):514~523.
- [11] 彭鸣, 王焕校, 吴玉树. 镉、铅诱导的玉米 (*Zea mays* L.) 幼苗细胞超微结构的变化. *中国环境科学*, 1991, **11**(6):426~431.
- [13] 杨居荣, 贺建群, 张国祥, 毛显强. 农作物对镉毒害的耐性机理探讨. *应用生态学报*, 1995, **6**(1):87~91.
- [15] 张义贤. 重金属对大米 (*Hordeum vulgare*) 毒性的研究. *环境科学学报*, 1997, **17**(2):199~201.
- [16] 周建华, 王永锐. 硅营养缓解水稻幼苗 Cd、Cr 毒害的生理研究. *应用与环境生物学报*, 1999, **5**(1):11~15.
- [17] 季玉鸣, 李振国. 镉引起小麦幼苗逆境乙烯的产生及其和镉的吸收、分布的关系. *植物生理学报*, 1989, **15**(2):159~166.
- [21] 张玉秀, 柴团耀, Burkard G. 植物耐重金属机理研究进展. *植物学报*, 1999, **41**(5):453~457.
- [29] 杨居荣, 鲍子平, 张素芹. 镉、铅在植物细胞内的分布及其可溶性结合形态. *中国环境科学*, 1993, **13**(4):263~268.
- [39] 何勇强, 陶勤南, Obata H. 镉胁迫下大豆中镉的分布状况及其子粒品质. *环境科学学报*, 2000, **20**(4):500~512.
- [40] 柴团耀, 张玉秀, Gérard B. 菜豆中的重金属胁迫响应基因: cDNA 克隆和基因表达分析. *植物生理学报*, 1998, **24**(4):399~404.