

有机酸存在下小麦体内 Cd 的生物毒性和植物络合素(PCs)合成的关系

孙 琴¹, 王晓蓉^{1*}, 袁信芳¹, 丁士明²

(1. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京 210093; 2. 中国科学院地理科学与资源研究所, 北京 100101)

摘要:采用溶液培养方式,研究了有机酸存在下小麦体内 Cd 的生物毒性和植物络合素(PCs)合成的相关关系,试图寻求一种与小麦体内 Cd 的生物毒性高度相关的评价指标。结果显示, Cd 胁迫对小麦产生明显的毒害效应并诱导小麦根系内 PCs 的大量合成。EDTA、DTPA、柠檬酸、苹果酸和草酸的适量供应可不同程度减轻或消除 Cd 的生物毒性,其强弱顺序为 EDTA > DTPA >> 柠檬酸 > 苹果酸 ≈ 草酸。与此同时,小麦根系内 PCs 的诱导量也有明显下降,与 Cd 的生物毒性保持一定的线性关系,且在 EDTA、DTPA 和柠檬酸供应下尤为显著。表明 PCs 可以作为一项敏感的生化指标(biochemical indicator)用来评价和预测环境中 Cd 的污染,并有望成为重金属生物有效性评价系统中一种新的补充方法。

关键词:有机酸;植物络合素(PCs);Cd;生物毒性;小麦

Correlations between Cd toxicity and production of phytochelatins (PCs) in wheat (*Triticum aestivum* L.) exposed to Cd added with various organic acids

SUN Qin¹, WANG Xiao-Rong¹, YUAN Xin-Fang¹, DING Shi-Ming² (1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Institute of Geographical Sciences and Natural Resources Research, CAS, Beijing 100101, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(12): 2804~2809.

Abstract: Phytochelatins (PCs) have been suggested as a potential biomarker for evaluating metal phytotoxicity. However, most previous studies on metal toxicity and PCs production in higher plants were conducted in metal-defined medium without differentiating possible changes of metal speciation in this complex system. This study aimed to investigate the correlations between Cd toxicity and production of phytochelatins (PCs) in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in Cd solutions buffered by various organic acids. Results showed that single Cd stress significantly inhibited wheat growth, coinciding with the overproduction of PCs in roots, but not in leaves of wheat. After the application of organic acids, Cd toxicity in wheat reduced with the effectiveness in descending order: EDTA > DTPA >> citric acid > malic acid ≈ oxalic acid. Simultaneously, the levels of PCs in roots were also decreased. A linear relationship between Cd toxicity, estimated as the inhibition rate of the root elongation, and PC contents in roots under the influence of various organic acids, especially EDTA, DTPA and citric acid was observed. The findings obtained in this study further confirm that the production of PCs is highly associated with the internal Cd level in higher plants, suggesting that PCs can be regarded as a potential biochemical indicator to reflect Cd toxicity and is an alternative tool for estimation of metal bioavailability.

Key words: organic acids; phytochelatins (PCs); Cd toxicity; wheat (*Triticum aestivum* L.)

文章编号:1000-0933(2004)12-2804-06 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(20237010);江苏省高等学校研究生创新基金资助项目

收稿日期:2004-04-21; **修订日期:**2004-10-13

作者简介:孙琴(1976~),女,博士生,主要从事重金属污染与生物可利用性研究。E-mail: sunqinhf@sohu.com

* 通讯作者 Author for correspondence.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(No. 20237010), Innovation Foundation of Advanced Universities's Graduate of Jiangsu Province

Received date: 2004-04-21; **Accepted date:** 2004-10-13

Biography: SUN Qin, Ph. D. candidate, mainly engaged in contamination of heavy metals and its bioavailability. E-mail: sunqinhf@sohu.com

Cd 因其在土壤中的高度移动性和对作物的高度毒害性,被视为重金属中最具有危害性的一种污染元素^[1]。植物根系吸收的 Cd 最易向籽粒中转移^[2],并通过食物链引起人类和动物的慢性中毒,对农业生产的可持续发展和人们的生存环境质量构成严重的威胁。因此,降低植物体内重金属含量,确保食品的安全性成为急待解决的问题。迄今,对土壤重金属污染的研究,主要集中在土壤重金属污染的环境质量评价及重金属的生物有效性等方面,尚未获得一种理想的评价土壤重金属污染的指标^[3]。因此,尽快寻求一种与重金属生物毒性高度相关的评价指标,用于预测并控制污染面积的扩展,是目前面临的一项重要课题。

植物络合素(phytochelatin, PCs)是重金属胁迫诱导下植物体内产生的一类低分子量非蛋白质态富含巯基的螯合多肽,广泛存在于植物界、藻类、真菌和部分动物体内。多种金属(如 Ni、Cd、Zn、Ag、Sn、Te、W、Au、Hg、Pb、As 和 Se 等,其中 Cd 是最强的体内诱导因子)^[4]能够诱导 PCs 的产生,且发挥诱导作用的是游离的金属离子^[5]。研究表明,生物体内 PCs 的合成与金属的暴露几乎同步出现,一旦金属离子被形成的 PCs 螯合,PCs 的合成就会终止^[6]。因此,PCs 作为金属胁迫下细胞内一项反应敏感的生化指标受到国际上众多学者的极大关注,并建议用 PCs 标记重金属的毒害效应。Rauser^[4]提出胞内 PCs 含量作为环境中重金属污染的定量指标,同时 Keltjens 等^[7]则将 PCs 的激增作为植物遭受重金属胁迫的早期预警指标。但也有研究者认为 PCs 并不能反映重金属的污染程度。如 Katja 等^[8]研究发现天然湖泊中一些浮游植物细胞内 PCs 与 Cd、Cu、Mn 和 Zn 等重金属的浓度并不存在明确的关系。因此 PCs 能否作为一项敏感指标用于指示环境中重金属的污染仍值得进一步深入研究和探索,而目前国内这方面的研究却鲜见报道。

高等植物吸收 Cd 的数量依赖于土壤中 Cd 的浓度和它的生物可利用性。其中有机配体与 Cd 作用形成配合物,能显著影响 Cd 的环境化学行为,在控制 Cd 的生物可利用性方面起到重要的作用。本文采用溶液培养方式,加入五种有机酸,研究其对小麦生长发育和 Cd 毒害的调控作用,并在此基础上探索了 Cd 的吸收及其生物毒性与 PCs 合成的相关关系,试图从细胞水平上寻找一种与 Cd 的毒性高度相关的评价指标,为预测和评价环境中 Cd 的污染提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

J2-HS 高速冷冻离心机(Beckman 公司);850 型光栅荧光分光光度计(Hitachi 公司);Z-81001 型原子吸收分光光度计(Hitachi 公司);岛津 UV-220 型分光光度计。磺基水杨酸(SSA,纯度>99%)、谷胱甘肽(GSH,纯度>98%)和 Ellman 试剂(DTNB)购自 Sigma 公司;供试有机酸和其它试剂均为国产分析纯。

1.2 幼苗的培养

选择均匀、饱满一致的小麦(*Triticum aestivum* L.)种子,扬麦 10 号品系,用 75%酒精消毒 10min,然后用蒸馏水清洗数次,再用蒸馏水浸种 24h,将种子放入铺有消毒纱布的白瓷盘,置于(25±1)℃恒温培养箱中,保持纱布湿润。2d 后小麦长出小芽及根,转移至尼龙网上,先用蒸馏水培养 2d,再用 1/2 Hoagland 和 Arnon 营养液培养 2d,作为供试材料备用。该实验在植物生长室(光暗比 14h/10h,光强为 700~800 μmol/(m²·s),温度为自然室温)内进行。

1.3 实验设计及处理

将大小、长短一致的小麦幼苗转移至 Hoagland 和 Arnon 完全营养液中培养,3d(即 4 叶 1 心期)后暴露于 Cd 和不同水平的有机酸(下面缩写为 OA)中,分别如下:20μmol/L Cd + 0μmol/L OA(T₀)、20μmol/L Cd + 10μmol/L OA(T₁)、20μmol/L Cd + 50μmol/L OA(T₂)、20μmol/L Cd + 100μmol/L OA(T₃)和 20μmol/L Cd + 500μmol/L OA(T₄),另加一个对照(CK),每处理重复 3 次。供试有机酸为苹果酸、柠檬酸、草酸、二乙三胺五乙酸(DTPA)和乙二胺四乙酸(EDTA)。其中 Cd 以 CdCl₂·2.5H₂O 水溶液加入,苹果酸、柠檬酸、草酸和 DTPA 均以纯酸水溶液加入,EDTA 以 Na₂-EDTA 水溶液加入。胁迫液中其它营养元素和浓度均保持不变。幼苗培养、预培养和暴露期间均保持 24h 通气,暴露期间每 2d 更换 1 次营养液,每天用 0.1mol/L NaOH 或 0.1mol/L HCl 调节营养液 pH 至 6.0,处理 9d 后收获,收获时先反复用自来水冲洗根系,再用冷的 10mmol/L CaCl₂ 交换 10min,去除根表和自由空间吸附的 Cd,最后用去离子水冲洗干净,用吸水纸将植株根表水吸干,记录主根系的长度,测定叶片、茎和根鲜重。将新鲜样品分成叶片、茎和根 3 部分。参照 Gupta 等^[9]的方法,分别称取一定的鲜样组织(非蛋白质态巯基总量为 0.5g,谷胱甘肽为 0.7g)用液氮迅速固定,放在-50℃冰柜中储存,用于非蛋白质态巯基总量和谷胱甘肽分析测定。另外,分别称取叶片、茎和根鲜样组织 1g,然后在 70℃烘箱中烘干,供分析 1g 鲜样组织中 Cd 的含量。

1.4 测定方法

1.4.1 根系容忍指数(IT, Index of Tolerance) 收获完好的根,直接测量最长根的长度,求单株根长平均值,单位为 cm。根据 Wilkins 的方法^[10]计算根系 IT 值。 $IT = (\text{处理根系的平均长度} / \text{对照根系的平均长度}) \times 100\%$,根系伸长抑制率 = 1 - IT。

1.4.2 PCs 的测定 采用差减法测定植物组织内 PCs 的诱导合成量^[11],即 PCs-SH = 非蛋白质态巯基总量(TNP-SH) - 谷胱甘肽含量(GSH)。

(1)非蛋白质态巯基总量(TNP-SH)的测定 TNP-SH 测定液的制备 将液氮固定的鲜样组织放于研钵中,加入 2ml 5%

SSA(含 6.3mmol/L DTPA)(pH<1)和少量石英砂,冰浴上充分研磨,离心(4℃,10000g,10min),上清液冷藏用于 TNP-SH 的测定。TNP-SH 的测定采用分光光度法,参照^[11]的方法。

(2)谷胱甘肽(GSH)的测定 GSH 测定液的制备:将液氮固定的鲜样组织放于研钵中,加入一定量的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液(含 0.005 mol/L EDTA)(pH=8.0)和 25% 偏磷酸(HPO₃),并加少量石英砂,冰浴上充分研磨,冷冻离心(4℃,18000g,15min),上清液冷藏用于 GSH 的测定。GSH 测定采用荧光分光光度法,参照 Gupta 等^[9]和 Hissin 等^[12]的方法。

1.4.3 植物 Cd 的测定 植株先用 HNO₃-HClO₄ 湿灰化消解后,用原子吸收分光光度法测定其 Cd 含量。

2 结果与分析

2.1 有机酸对 Cd 胁迫下小麦生长发育的影响

2.1.1 根长 重金属对植物的毒害通常是首先表现在根部,再蔓延到地上部分。因此,根系长度是反映小麦受重金属胁迫程度的重要依据^[13]。本实验依据 Wilkins 的方法^[10]利用容忍指数(IT, Index of Tolerance)衡量根系的生长发育状况。由图 1 可见,20μmol/L Cd 处理(T₀)明显抑制了小麦根系的伸长,比对照(CK)下降了约 40%。添加有机酸可促进小麦根系的伸长,其 IT 值高于没有添加有机酸的 Cd 处理(T₀),并随浓度的增加而增加,其中 EDTA 的效果最强,其次是 DTPA,而柠檬酸 苹果酸和草酸的作用较弱。以上表明,添加有机酸可缓解或消除了小麦体内 Cd 的毒害效应,使根系的伸长得到不同程度的恢复。

2.1.2 生物产量 从表 1 可看出,在 Cd 胁迫下,小麦地上部和根系的鲜重分别比对照(CK)下降了 27.6%和 38%。加入不同有机酸后,无论地上部和根系的生物量,均有不同程度的增加。进一步表明,加入有机酸可缓解或消除 Cd 的生物毒性,其强弱顺序为 EDTA>DTPA>>柠檬酸>苹果酸≈草酸。

从表 1 和图 1 还可看出,DTPA 虽有较强的解 Cd 毒能力,但较高浓度的 DTPA 抑制了小麦的生长,叶片出现严重的失绿症状,叶绿素含量剧烈下降,表明 DTPA 过量介入干扰了小麦对其它营养元素,尤其是 Fe 的正常需求,因而不利于小麦的正常生长。

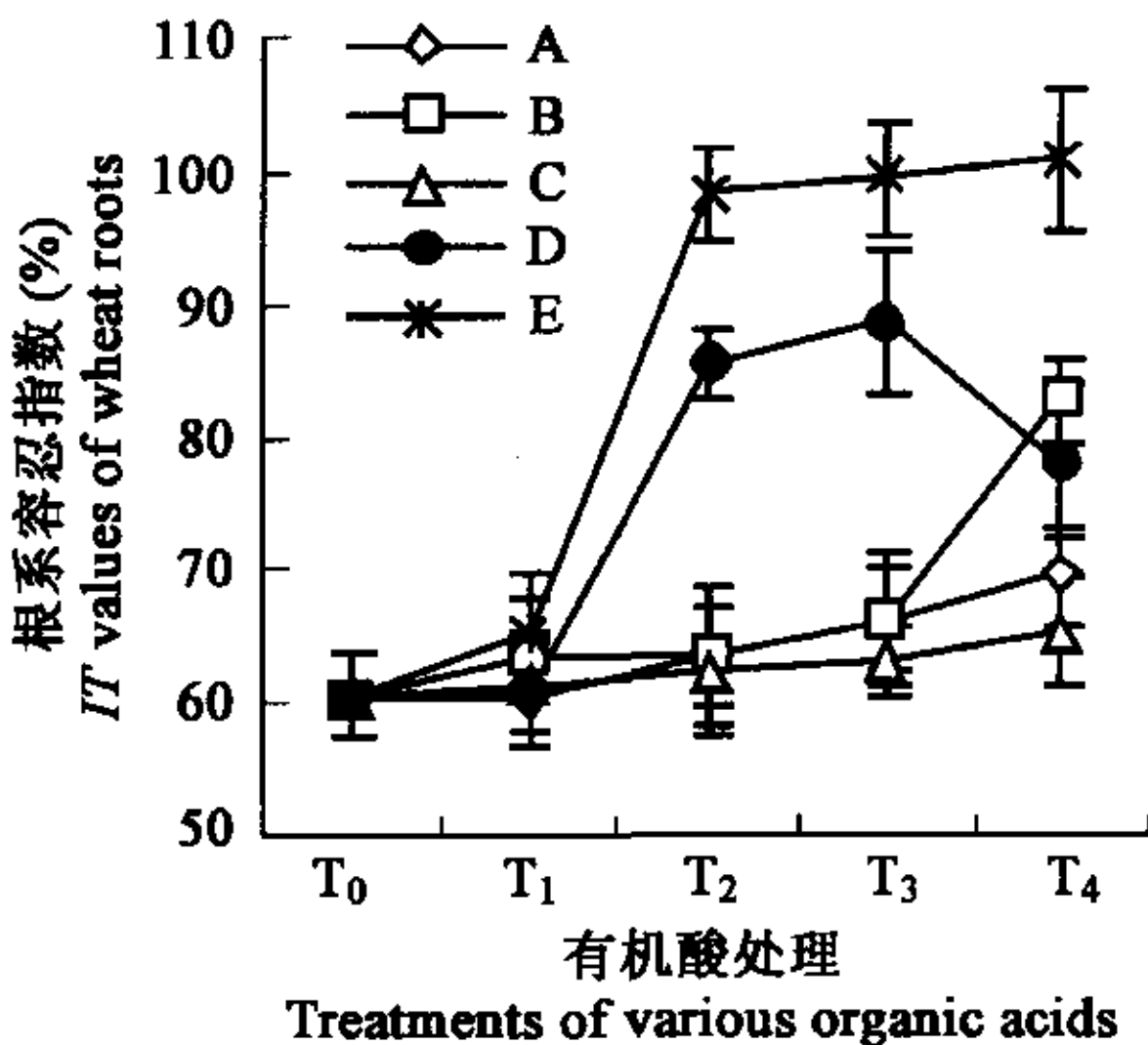


图 1 Cd 胁迫有机酸供应下小麦根系的容忍指数(IT)
Fig. 1 The IT values of wheat roots exposed to 20μmol/L Cd with the application of various organic acids.
A 苹果酸 malic acid; B 柠檬酸 citric acid; C 草酸 oxalic acid; D DTPA; E EDTA

表 1 有机酸对 Cd 胁迫下小麦生物产量的影响(mg/plant FW)

Table 1 Effects of the application of various organic acids on the biomass of wheat exposed to 20μmol/L Cd										
处理 Treatments	苹果酸 Malic acid		柠檬酸 Citric acid		草酸 Oxalic acid		DTPA		EDTA	
	地上部	根系	地上部	根系	地上部	根系	地上部	根系	地上部	根系
	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots	Shoots	Roots
CK	517aA	265aA	517aA	265bB	517aA	265aA	517cB	265bB	517bB	265bB
T ₀	375bB	163cC	375cC	163cC	375bB	163cC	375dC	163cC	375dD	163dD
T ₁	373bB	172cC	364cC	182cC	356cB	175cBC	373dC	160cC	461cC	203cC
T ₂	372bB	177cBC	363cC	175cC	357cB	185bcBC	647aA	316aA	697aA	402aA
T ₃	368bB	183cBC	377cC	179cC	370bB	188bcBC	543bB	305aAB	717aA	382aA
T ₄	389bB	213bB	417bB	296aA	384bB	206bB	388dC	270bAB	701aA	396aA
ANOVA F	64.79**	17.37**	55.37**	37.20**	54.87**	22.27**	220.47**	57.95**	406.29**	105.73**

同一列中标有不同小写和大写字母的数值表示存在 5%和 1%差异; ** 代表处理达 1%显著 Different lower and capital letters in the same column indicate significant difference at *p*=0.05 and *p*=0.01, respectively; F values followed by ** represent significant difference at *p*=0.01

2.2 有机酸对 Cd 胁迫下小麦体内 Cd 富集量的影响

小麦不同组织 Cd 含量的变化如表 2 所示。营养液中加镉(T₀)后,小麦植株中镉含量显著增加,其根部明显高于地上部(叶片和茎)。添加一定浓度(50~500μmol/L)的 EDTA 和 DTPA 可降低小麦叶片、茎和根系 Cd 的富集量,并达到极显著水平(*p*<0.01),且 DTPA 作用优于 EDTA。苹果酸和草酸也能降低小麦对 Cd 的富集量,但其作用浓度高于 EDTA 和 DTPA。添加柠檬酸可降低叶片和茎中 Cd 量,但却增加根系 Cd 的富集量,并随浓度的增加而增加,可能是 Cd 与柠檬酸形成相应的复合物,促进 Cd 的吸收并固定在根部,起到缓解 Cd 的毒害作用。结果表明,添加有机酸显著影响植物对 Cd 的吸收,且有机酸之间的差异甚大,其主要原因是不同有机酸和 Cd 的配合能力及形成的配合物的迁移能力不同所致。DTPA 和 EDTA 与 Cd 形成高稳定

性复合物,而高稳定性复合物在溶液中抑制植物对其金属复合物的吸收^[14],导致小麦体内 Cd 量剧烈下降,进而消除 Cd 的毒性效应。而柠檬酸、苹果酸和草酸与 Cd 形成复合物的稳定性低于 EDTA-和 DTPA-Cd 复合物,在溶液中容易解络,易于重新为植物吸收,因此对 Cd 的生物毒性表现出较弱的影响。

表 2 有机酸对 Cd 胁迫下小麦体内 Cd 含量的影响(μmol/g FW)
Table 2 Effects of the application of various organic acids on the contents of Cd in leaves, stems and roots of wheat exposed to 20μmol/L Cd

处理 Treatments	苹果酸 Malic acid			柠檬酸 Citric acid			草酸 Oxalic acid		
	叶片 Leaves	茎 Stems	根系 Roots	叶片 Leaves	茎 Stems	根系 Roots	叶片 Leaves	茎 Stems	根系 Roots
T ₀	0.167bB	0.282bAB	1.44bB	0.167abA	0.282aA	1.44cC	0.167aA	0.282abB	1.44bA
T ₁	0.195aA	0.315aA	1.67aA	0.176aA	0.240 bB	1.37 cC	0.159aA	0.275bB	1.58aA
T ₂	0.178bAB	0.263bB	1.40bB	0.159bA	0.267 aA	1.48 cBC	0.172aA	0.261bB	1.50abA
T ₃	0.146cC	0.221cC	1.25cC	0.128cB	0.233 bB	1.69 bB	0.156bA	0.297aA	1.53abA
T ₄	0.127dC	0.174dD	1.16dD	0.077dC	0.076 cC	2.08 aA	0.125cB	0.170cC	0.94cB
ANOVA F	33.19**	61.57**	302.83**	97.26**	222.01**	35.712**	15.23**	94.06**	61.82**

处理 Treatments	DTPA			EDTA		
	叶片 Leaves	茎 Stems	根系 Roots	叶片 Leaves	茎 Stems	根系 Roots
T ₀	0.167aA	0.282aA	1.44aA	0.167aA	0.282aA	1.44aA
T ₁	0.151bA	0.229bB	1.25bB	0.158bB	0.229bB	1.32bB
T ₂	0.008cC	0.019cC	0.02cC	0.020cC	0.034cC	0.13cC
T ₃	0.004cC	0.014cC	0.02cC	0.012dD	0.020dD	0.06dD
T ₄	0.003cC	0.011cC	0.01cC	0.001eE	0.002eE	0.02eE
ANOVA F	721.85**	1310.03**	9504.46**	1273.67**	1121.56**	10101.05**

同一列中标有不同小写和大写字母的数值表示存在 5%和 1%差异; ** 代表处理达到 1%显著 Different lower and capital letters in the same column indicate significant difference at $p=0.05$ and $p=0.01$, respectively; F values followed by ** represent significant difference at $p=0.01$

2.3 有机酸对 Cd 胁迫下小麦体内 PCs 诱导量和 GSH 含量的影响

Scheller 等^[15]建立了使用 Ellman 试剂测定生物体内非蛋白质态(即酸溶性的)巯基总量的测定方法,Grill 等^[16]认为 Cd 暴露下 *Rauvolfia serpentina* 细胞内约 90%的非蛋白质态巯基是 PCs 态巯基(即 PCs-SH),并直接用非蛋白质态巯基含量来衡量重金属胁迫下 PCs 的诱导量。谷胱甘肽的结构类似于 PCs 的结构,属于非蛋白质态(即酸溶性的)巯基化合物范畴,国际上众多学者普遍运用差减法(即 PCs-SH=非蛋白质态巯基总量(TNP-SH)-谷胱甘肽(GSH))来判断生物体内 PCs 的诱导量。本文采用此方法计算 Cd 胁迫下 PCs 的诱导量,由图 2 可看出,Cd 胁迫诱导下产生的非蛋白质态巯基化合物绝大部分为 PCs,约占 90%,这与 Grill^[16]的研究结果相当一致。

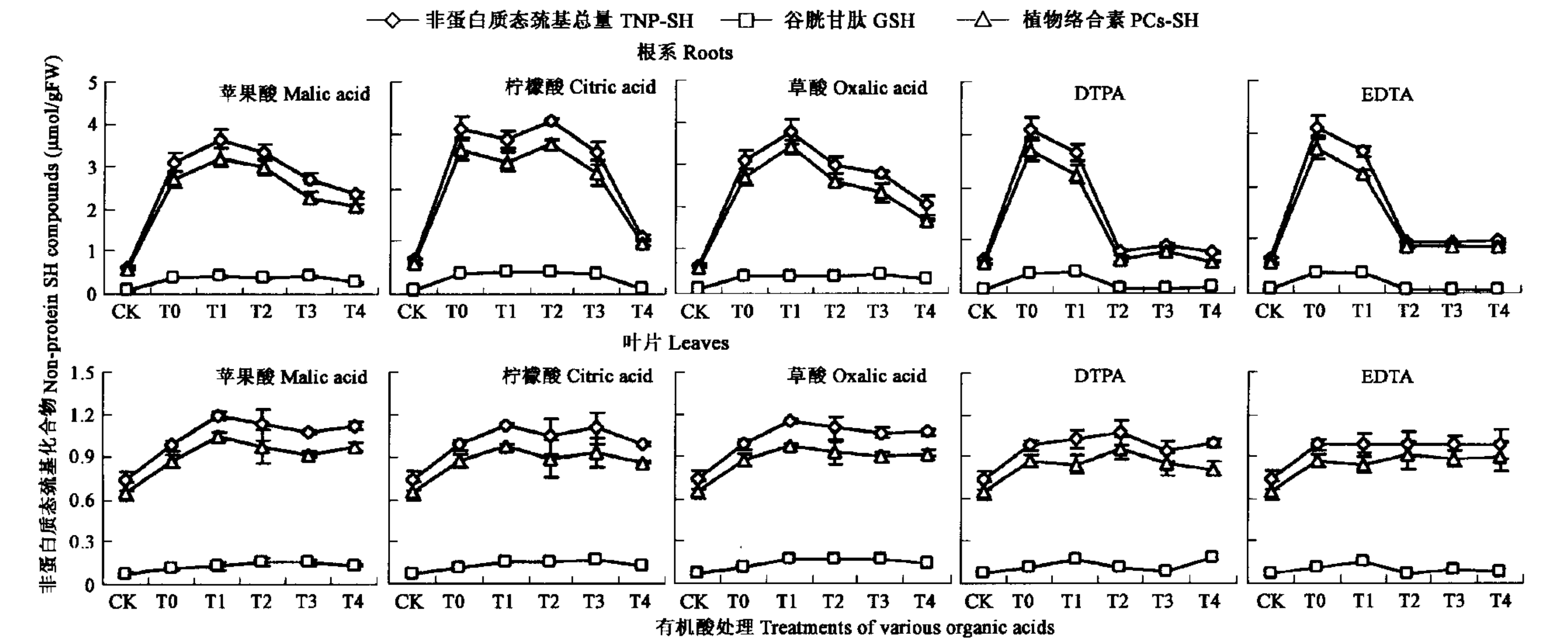


图 2 有机酸对 Cd 胁迫下小麦根系(左)和叶片(右)内 PCs 诱导量和 GSH 含量的影响

Fig. 2 Effects of the application of various organic acids on the concentrations of PCs and GSH in roots(L)and leaves(R)of wheat exposed to 20μmol/L Cd

由图 2 可见,Cd 暴露可显著诱导小麦根系内 PCs 的合成,约是对照(CK)的 5 倍,并达到极显著水平($p<0.01$),但对叶片

内 PCs 的诱导效果较弱,表明根系是 Cd 胁迫下 PCs 合成的主要部位。添加一定浓度(50~500 μ mol/L)的 EDTA 和 DTPA 明显降低小麦根系内 PCs 的诱导量,并达到极显著水平($p<0.01$)。而苹果酸、草酸和柠檬酸仅在高浓度(500 μ mol/L)供应下对小麦根系内 PCs 的诱导量表现出极显著($p<0.01$)的降低作用,且柠檬酸的效应大于苹果酸和草酸,但三者和低浓度(10~100 μ mol/L)供应下均无显著影响。已有研究表明,PCs 的合成水平与植物体内金属的浓度有关^[4,6,11,16]。因此 PCs 诱导量的下降可能主要来源于苹果酸、草酸、EDTA 和 DTPA 供应下 Cd 吸收量及柠檬酸供应下有效 Cd 水平的降低。同时该结果进一步证明,有机酸的介入影响了营养液中 Cd 的生物可利用性、植物对 Cd 的吸收数量和植物体内 Cd 的有效水平,影响程度与有机酸的种类和浓度有关,并以 EDTA 和 DTPA 的作用最为明显。

Cd 胁迫也刺激了小麦根系和叶片内 GSH 含量的增加,表现为根系>叶片。有机酸供应下其小麦体内的变化趋势类似于 PCs(见图 2),但其变化幅度远低于 PCs。主要原因可能是由 GSH 的双重角色造成,一方面是细胞内一种强的抗氧化剂;另一方面是 PCs 合成的底物^[4,17]。其中加入高浓度 DTPA(500 μ mol/L)使 GSH 出现明显反弹,推测可能是由于高浓度 DTPA 强的螯合作用引起小麦体内营养元素缺乏的缘故。

2.4 小麦根系内 PCs 的诱导量与 Cd 的吸收量和生物毒性的关系

小麦根系内 PCs 的诱导量与根系 Cd 的含量和 Cd 的生物毒性(以根系伸长抑制率表示 Cd 的生物毒性)存在一定的线性关系(见表 3),且 EDTA、DTPA 和柠檬酸效果更为显著,表明 PCs 的诱导量与 Cd 的内在生物毒性具有一定的相关性。

3 讨论

植物体内 PCs 的产生与金属的浓度有关,其合成水平的高低与细胞内胁迫金属的数量存在显著的正相关关系,认为胞内 PCs 的诱导量可反映金属的实际毒性^[7,11,18,19]。如 De Knecht 等^[18]报道麦瓶草(*Silene vulgaris*)体内 PCs 的诱导量与 Cd 和 Cu 的短期暴露呈线性关系;随后 Sneller 等^[19]发现麦瓶草(*Silene vulgaris*)体内 PCs 的积累和低浓度 Cd 的长期暴露也存在线性相关。本研究采用多种有机酸缓冲的复杂体系进一步证实了上述观点。从实验结果可以看出,添加一定浓度的苹果酸、草酸、EDTA 和 DTPA 可缓解或消除 Cd 的生物毒性(图 1 和表 1),抑制小麦对 Cd 的吸收和积累(表 2),同时伴随 PCs 诱导量的降低,并与 Cd 的生物毒性保持一定的线性关系(表 3),其中 EDTA 和 DTPA 供应下相关性更为明显。

另有研究表明,PCs 的产生与金属的存在形态(游离态)有关。如 Ahner 等^[5]人对海生的矽藻进行研究,发现 PC₂₋₄的产生主要取决于胞内 Cd²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺和 Pb²⁺的自由离子的浓度,而不是金属的总浓度。本实验结果显示添加适量浓度的柠檬酸促进小麦根系对 Cd 的吸收和积累,但 Cd 的生物毒性依然得到缓解(图 1 和表 1),相应地,PCs 的诱导量有明显下降,与 Cd 毒性的变化保持一致趋势(表 3),表明植物体内 PCs 的产生同样依赖于细胞内游离 Cd²⁺离子的浓度(即生物毒性的 Cd 浓度),而与金属的总浓度无关,这与 Ahner 等^[5]对藻类的研究结果相当一致。柠檬酸的加入导致 PCs 合成水平的降低,可能与其自身的生物合成过程有关。已有资料显示:PCs 的生物合成过程是在细胞质中完成的,重金属离子经细胞壁和细胞膜,进入细胞质并激活 PCS(PCs 合成酶),在胞质中以谷胱甘肽(GSH)或 PCn 为底物酶促合成 PCn(或 PCn+1),当激活剂 Cd 离子被合成的 PCs 或外加金属螯合剂如 EDTA 螯合时 PCs 合成就会停止^[6,17]。因此,外加柠檬酸络合 Cd 离子也可能代替 PCs 终止 PCs 反应,导致 PCs 合成水平的下降。Maier 等研究^[20]也发现 EDTA 促进莴苣对 Cd 的吸收和积累,但 PCs 的合成量并没有增加,反而有所降低。以上结果进一步证明,PCs 对 Cd 暴露反映相当灵敏,其合成水平的高低与生物体内 Cd 的实际胁迫水平(即生物毒性)存在紧密的内在联系,两者保持一定的正相关关系。重金属的毒性效应主要取决于细胞质中游离金属离子的数量^[19],因此与植物体内 Cd 总量相比,细胞水平上 PCs 的响应能客观反映 Cd 的毒害水平,可以用于早期预测环境中 Cd 的污染。

表 3 小麦根系内 PCs 的诱导量与 Cd 的含量和根系伸长抑制率之间的相关性

Table 3 Correlations between PCs concentrations and Cd contents, inhibition rate of root elongation in roots of wheat, respectively				
有机酸 Organic acids	Cd 含量 Cd contents		根系伸长抑制率 Inhibition rate of root elongation	
	回归方程	相关系数	回归方程	相关系数
	Regressive eq.	Regression coefficient	Regressive eq.	Regression coefficient
苹果酸 Malic acid	$y=2.29 x_1-0.512$	$r^2=0.9348^{**}$	$y=1.07 x_2^2-1.182$	$r^2=0.7927$
柠檬酸 Citric acid	$y=-2.47 x_1+6.233$	$r^2=0.883^{*}$	$y=0.085 x_2^2-0.511$	$r^2=0.9679^{**}$
草酸 Oxalic acid	$y=2.08 x_1-0.278$	$r^2=0.7892$	$y=0.268 x_2-7.404$	$r^2=0.6509$
DTPA	$y=1.34 x_1+0.704$	$r^2=0.9898^{**}$	$y=0.069 x_2-0.302$	$r^2=0.857^{*}$
EDTA	$y=1.20 x_1+0.841$	$r^2=0.9717^{**}$	$y=0.043 x_2+0.903$	$r_2=0.9782^{**}$

回归方程中 y 与 x₁, x₂ 分别代表 PCs 的诱导量(μ mol/g FW), Cd 含量(μ mol/g FW)和根系伸长抑制率(%);标注 * 和 ** 表示相关系数达到统计显著($\alpha=0.05$)和极显著($\alpha=0.01$)水平 In the regressive eq. y, x₁ and x₂ indicate the PCs concentrations (μ mol/g FW), Cd contents (μ mol/g FW) and inhibition rate of root elongation (%), respectively; r² labeled by * and ** indicate significant difference at $p=0.05$ and $p=0.01$, respectively

References:

- [1] Li K Q, Liu Z G, Lu X L, *et al.* Uptake and distribution of cadmium in different rice cultivars. *Journal of Agro-environment Science*, 2003, **22**(5): 529~532.
- [2] Obata H, Umebayashi M. Effects of cadmium on mineral nutrient concentration in plant differing in tolerance for cadmium. *J. Plant Nutr.*, 1997, **20**: 97~105.
- [3] Wang H K. Advance of metals pollution in soil. *Environmental Chemistry*, 1991, **10**(5): 35~42.
- [4] Rauser W E. Phytochelatin and related peptides. *Plant Physiol.*, 1995, **109**: 1141~1149.
- [5] Ahner B A, Price N M, Morel F M M, *et al.* Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentration: laboratory studies and field data from Massachusetts Bay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994, **91**: 8433~8436.
- [6] Löffler S, Hochberger A, Grill E, *et al.* Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Lett.*, 1989, **258**: 42~46.
- [7] Keltjens W G, Beusichem M L. Phytochelatin as biomarkers for heavy metal toxicity in maize: single metal effects of copper and cadmium. *J. Plant Nutr.*, 1998a, **21** (4): 635~648.
- [8] Katja K, Ahner B, Xue H B, *et al.* Metals and phytochelatin content in phytoplankton from freshwater lakes with different metal concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1998, **17**: 2444~2452.
- [9] Gupta M, Tripathi R D, Rai U N, *et al.* Role of glutathione and phytochelatin in *Hydrilla Verticillata* (l. f.) Royle and *Vallisneria Spiralis* L. under mercury stress. *Chemosphere*, 1998, **37**(4): 785~800.
- [10] Wilkins D A. A technique for the measurement of lead tolerance in plants. *Nature*, 1957, **180**: 37~38.
- [11] Keltjens W G, Beusichem M L. Phytochelatin as biomarker for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.): combined effects of copper and cadmium. *Plant Soil*, 1998b, **203**: 119~126.
- [12] Hissin P J, Hilf R. A fluorometric method for the direct determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.*, 1976, **74**: 214~226.
- [13] Baker A J M, Walker P L. Physiological responses of plants to heavy metal and the quantification of tolerance and toxicity. *Chem. Spec. Bioavailab.*, 1989, **1**: 7~17.
- [14] Delhaize E, Ryan P R, Randall P J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.*, 1993, **103**: 695~702.
- [15] Scheller H V, Huang B, Hatch E, *et al.* Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.*, 1987, **85**: 1031~1035.
- [16] Grill E, Winnacker E L, Zenk M H. Phytochelatin: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 1985, **230**: 674~676.
- [17] Wu F B, Zhang G P. Phytochelatin and its function in heavy metal tolerance of higher plants. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, **14**(4): 632~636.
- [18] De Knecht J A, Van Baren N, Ten Bookum W M, *et al.* Synthesis and degradation of phytochelatin in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Sci.*, 1995, **106**: 9~18.
- [19] Sneller F E C, Noordover E C M, Ten Bookum W M, *et al.* Quantitative relationship between phytochelatin accumulation and growth inhibition during prolonged exposure to cadmium in *Silene vulgaris*. *Ecotoxicology*, 1999, **8**(3): 167~175.
- [20] Maier A E, Rosalyn D, Matthews J A, *et al.* Environmental cadmium levels increase phytochelatin and glutathione in Lettuce grown in a chelator-buffered nutrient solution. *J. Environ. Qual.*, 2003, **32**: 1356~1364.

参考文献:

- [1] 李坤权, 刘建国, 陆小龙, 等. 水稻不同品种对镉吸收及分配的差异. 农业环境科学学报, 2003, **22** (5): 529~532.
- [3] 王宏康. 土壤中金属污染的研究展望. 环境化学, 1991, **10**(5): 35~42.
- [17] 邬飞波, 张国平. 植物螯合肽及其在重金属耐性中的作用. 应用生态学报, 2003, **14** (4): 632~636.