

低浓度 Cd 暴露对金鱼藻营养元素吸收与植物络合素(PCs)合成的影响

王超^{1,2}, 王丽娅², 孙琴^{2*}

(1. 河海大学水文水资源与水利工程科学国家重点实验室, 南京 210098; 2. 河海大学环境科学与工程学院, 浅水湖泊资源与综合整治教育部重点实验室, 南京 210098)

摘要:采用溶液培养方式,研究了水环境低浓度 Cd(0.01 ~ 0.64 $\mu\text{mol/L}$)不同暴露时间段下,金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)体内营养元素的吸收状况和植物络合素(PCs)的响应规律.结果表明, Cd 促进了微量营养元素 Cu、Zn 的吸收,抑制了 Mn 的吸收,对 Fe 的吸收无明显影响.金鱼藻对 Cd 表现出明显的吸收和积累效应,0.08 $\mu\text{mol/L}$ Cd 胁迫对金鱼藻生长产生了抑制作用. Cd 暴露期间各处理组 PCs 诱导量与 Cd 处理浓度存在显著的响应关系,处理前期(7 d)当 Cd 浓度 $\geq 0.02 \mu\text{mol/L}$ 时,表现为显著的诱导效应($p < 0.05$).随着暴露时间的延长,PCs 诱导量有下降趋势,但仍明显高于对照.各不同处理时间段下 PCs 诱导量与 Cd 处理浓度存在良好的剂量效应关系.胁迫 7 d 时呈线性关系,胁迫 14 d 和 21 d 均表现为抛物线型.回归分析显示金鱼藻体内 PCs 的合成水平与 Cd 的生物毒性存在极显著的正相关关系.表明 PCs 可作为 Cd 胁迫的一项敏感的生化指标(biochemical indicator)用来评价和预测实际水环境中 Cd 的污染.

关键词:植物络合素(PCs); 镉(Cd); 生物标记物; 金鱼藻

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)04-1179-06

Effects of Lower Concentrations of Cd on Micronutrients Uptake and Production of Phytochelatins(PCs) in *Ceratophyllum demersum*

WANG Chao^{1,2}, WANG Li-ya², SUN Qin²

(1. State Key Laboratory of Hydrology-Water Resources and Hydraulic Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China; 2. Key Laboratory of Integrated and Resource Development on Shallow Lakes, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: A solution experiment with a range of lower cadmium concentrations (0.01-0.64 $\mu\text{mol/L}$) was conducted to study micronutrients uptake and production of phytochelatins (PCs) in a submerged aquatic plant *Ceratophyllum demersum* after exposure for 7 d, 14 d, 21 d. The results showed the uptake of Cu, Zn in *Ceratophyllum demersum* was promoted when exposed to lower concentrations of cadmium, whereas Mn uptake was inhibited. Unlike Cu, Zn and Mn, the content of Fe was unaffected by Cd uptake. Our data showed that *Ceratophyllum demersum* had stronger Cd tolerance and obvious absorption and cumulative effects to external lower concentrations of Cd exposure. The inhibition of growth was observed after 21 d in 0.08 $\mu\text{mol/L}$ Cd. The production of PCs was significantly induced by 0.02-0.64 $\mu\text{mol/L}$ Cd for 7 d ($p < 0.05$), while declined after exposure for 14 d, 21 d. The good dose-related response of PCs was observed in manner of linear for 7 d and parabola for 14 d and 21 d. Regressive analysis showed that there was a significantly positive correlation between PC contents and Cd toxicity in *Ceratophyllum demersum*. The results suggested that PCs could be a sensitive biomarker for estimating Cd phytotoxicity and subsequently a qualitative tool for studies on Cd contamination.

Key words: phytochelatins(PCs); cadmium; biomarker; *Ceratophyllum demersum*

Cd 是环境中毒性最强的重金属元素之一,比其它重金属元素(Zn、Pb 和 Cu 等)对植物产生毒害作用的临界浓度更低^[1,2]. Cd 抑制植物的光合与蒸腾作用,破坏细胞生长保护酶活性,并影响植物对其它营养元素的吸收,进而影响植物的生长代谢^[3,4]. 近年来随着矿产大规模开发利用和工业“三废”的大量排放,进入水体中 Cd 等重金属含量显著增加,如何对水环境中的 Cd 污染进行污染监测和生态安全评价已越来越受到人们的重视.

植物络合素(植络素, phytochelatins, PCs)是重金

属胁迫诱导下细胞质液中快速合成的金属螯合多肽,广泛存在于植物界、藻类和真菌体内. PCs 的合成水平随细胞中游离金属离子数量,即金属的实际

收稿日期: 2008-04-16; 修订日期: 2008-06-12

基金项目: 河海大学引进人才创新基金项目(2006402911); 河海大学浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室开放研究基金项目(2006KJ007); 河海大学自然科学基金项目(理科类)(2008433311); 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2008CB418203); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-07-0254)

作者简介: 王超(1958 ~), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为水资源保护与污染控制工程.

* 通讯联系人, E-mail: sunqinnj@hhu.edu.cn

胁迫水平的变化而变化.因此,PCs 作为金属胁迫下一项反应敏感的生化指标(biochemical indicator)已受到国内外学者的广泛关注,在众多可诱导 PCs 产生的金属中,Cd 是最强的体内诱导因子.自 1985 年发现 PCs 以来,对 PCs 的研究结果多来源于陆生植物及藻类,对水生植物体内 PCs 的作用及机制的认识还远远不够,少数被研究的水生植物也多集中在高剂量效应研究中^[5-9].例如,先前在研究细脉浮萍、黑藻、水浮莲等水生植物体内 PCs 合成时,Cd 的处理浓度为 2.5~200 $\mu\text{mol/L}$ ^[5,6,9],远高于实际水体中 Cd 污染的浓度.而实际污染环境中,低水平、长期、慢性接触才是重金属污染物对生态系统影响的基本方式.低浓度污染因接近实际环境更应受到关注,但目前有关低浓度重金属污染对水生植物的影响却鲜见报道.

鉴于此,本研究通过水培实验,分析了水环境低浓度 Cd 不同暴露时间段下,沉水植物金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)体内微量营养元素的吸收状况及 PCs 的响应规律,并进一步揭示了 PCs 的合成水平与 Cd 的生物毒性的内在关系.通过反映低浓度 Cd 胁迫对水生植物生长的影响,以期在水环境中 Cd 污染的早期防治提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 植物材料与主要的仪器和试剂

金鱼藻采于江苏省南京市江心洲.主要仪器:美国 HP1100 高效液相色谱系统,包括自动脱气系统(G1322a)、四元泵系统(G1311A)、自动进样系统(G1313A)和 HP 荧光检测器(1046A).色谱柱为 Vydac C18 柱(250 mm×4.6 mm,粒径为 5 μm).美国公司生产的 5510E-DTH 型超声波清洗器.德国公司生产的 5417R 型低温离心机.电感耦合等离子体发射光谱仪:ICP-AES(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry)(Leeman-LABS, Prodigy, USA).主要试剂:*N*-(2-羟乙基)哌嗪-*N*-3-丙磺酸(HEPPS, >99.5%)、谷胱甘肽(GSH, >98%)、半胱氨酸(Cys, >98%)和三氟乙酸(TFA, >99%)为 Sigma 产品.衍生试剂 monobromobimane (mBBR, >95%)、甲磺酸(MSA, >99%)和二乙烯三胺五乙酸(DTPA, >99%)为 Fluka 产品.乙腈(ACN, HPLC 级)为 Lab-Scan 产品.PC₂、PC₃ 和 PC₄ 标准品为美国多肽合成公司产品.实验用水均为 Mill-Q 水(18.3 M Ω).

1.2 植物材料培养与 Cd 处理

金鱼藻放入装满澄清自来水的大水槽于露天驯

化 2 周,2 周后选取长势良好且植株大小较一致的移至含 3 L 10% Hoagland 营养液的塑料桶中.为防止藻类滋生,塑料桶均经过浓硝酸消毒杀菌,桶壁用黑色胶袋包裹.每桶放置 15 g 金鱼藻.Cd 处理浓度分别设置为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32 和 0.64 $\mu\text{mol/L}$,另加 1 个空白对照(CK),每个处理重复 4 次,其中 Cd 以 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 加入溶液.植物暴露期间保持 24 h 通气,自然光照,温度(25 ± 1) $^\circ\text{C}$.暴露期间每 2 d 更换 1 次营养液,每天用 0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 调节营养液 pH 至 6.5 左右.分别在暴露 7、14、21 d 后收集植株,收获时先用自来水冲洗,再用去离子水冲洗 2 次,用吸水纸将植株表面水分吸干,称取一定的新鲜组织用液氮迅速固定,放入 -80 $^\circ\text{C}$ 冰柜中储存,以作 PCs 等巯基化合物的分析.此外,称取一定的鲜样组织于 70 $^\circ\text{C}$ 烘箱中烘干,供分析鲜样组织中 Cd 及其它微量营养元素的含量.

1.3 测定方法

1.3.1 PCs 等巯基化合物的分析测定

PCs 等巯基化合物的提取:参照 Sneller 等^[10]的方法.将液氮固定的鲜样组织放于研钵中,加入 2 mL 0.1% TFA(含 6.3 mmol/L DTPA)(pH < 1)和少量石英砂,冰浴上充分研磨离心(4 $^\circ\text{C}$, 17 000 r/min, 10 min),上清液冷藏用于 PCs 等巯基化合物的分析测定.为避免巯基化合物接触空气的氧化损失,立即进行柱前衍生化反应.

PCs 等巯基化合物的衍生化:以 0.1% TFA(内含 6.3 mmol/L DTPA)配制一定浓度的 Cys、GSH、PC₂、PC₃ 和 PC₄ 5 种巯基化合物的储备液,4 $^\circ\text{C}$ 保存.以 GSH 为例,用 0.1% TFA(内含 6.3 mmol/L DTPA)稀释成 1.25~160 ng/ μL 的标准系列作为标准曲线确定植物组织中 Cys、GSH、PC₂、PC₃ 和 PC₄ 的含量.标准样品和植物组织的衍生化反应相同:即向 250 μL 标准液或植物组织上清液中加入 450 μL 200 mmol/L HEPPS(内含 6.3 mmol/L DTPA, pH = 8.2)和 10 μL 25 mmol/L mBBR(100% ACN 准确配制),充分混合 45 $^\circ\text{C}$ 反应,30 min 后加入 300 μL 1 mmol/L MSA 终止反应,摇匀转移至 Agilent 棕色顶空瓶内,4 $^\circ\text{C}$ 保存,直到 HPLC 分析测定.同时作试剂空白衍生化反应,确定试剂空白杂质峰.

PCs 等巯基化合物的色谱分离条件:参照 Sneller 等^[10]和 Tang 等^[11]的分离方法和条件,稍作改进.采用二元的梯度洗脱系统室温下分离 mBBR 衍生物.荧光检测器条件为: λ_{ex} (激发波长)380 nm, λ_{em} (发射

波长)470 nm;流动相 A 为 0.1% TFA,流动相 B 为 100% ACN;流速为 0.5 mL/min;进样量为 50 μ L;梯度洗脱程序:12% ~ 25% B(15 min),25% ~ 35% B(14 min),35% ~ 50% B(21 min);洗柱:100% B(5 min);柱平衡:12% B(10 min)和柱后流动时间:5 min.由 HP 工作站对峰面积积分,以标准的 GSH 浓度对峰面积作标准曲线.参照 Sneller 等^[10]的方法,将测得的 PCs 等巯基化合物的峰面积,代入相应的 GSH 标准曲线方程,以外标法计算植物样品中 PCs 等巯基化合物的浓度,并按相应的衍生效率进行校正,表示方法(以 SH 计)为 nmol/g.

1.3.2 Cd 及其它微量营养元素的测定方法

植株中 Cd 及其它微量营养元素的含量采用 HNO₃-HClO₄ 湿灰化消解后,ICP-AES 测定 Cd 及其它微量营养元素的含量.

1.3.3 数据统计分析

采用 SPSS 统计分析软件包对实验数据进行单因素方差分析,并用采用 Excel 2000 制图.

2 结果与讨论

2.1 低浓度 Cd 暴露 21 d 后对金鱼藻生长的影响

从图 1 可看出,暴露了 21 d 后的金鱼藻鲜重总体呈下降趋势,但略有波动.在 Cd 浓度为 0.01 和 0.02 μ mol/L 时,金鱼藻出现微弱的增长趋势.其原因可能是由于低浓度 Cd 刺激了植物体内 RNA 和蛋白质合成酶的活性,从而促进了植物的生长,这与 Hirt 等^[12]研究烟草细胞悬浮液的结果相似.Cd 浓度为 0.08 μ mol/L 时,对金鱼藻生长产生抑制效果,随着 Cd 浓度的升高,抑制效果开始增强.当 Cd 浓度为 0.64 μ mol/L 时,生物鲜重与对照(CK)相比下降了 50%,整个处理期间金鱼藻除外部形态上有轻微褪绿、发黄现象外,较高处理组间(≥ 0.08 μ mol/L)外观差异并不明显.

2.2 低浓度 Cd 不同暴露时间段下金鱼藻对 Cd 的吸收和积累

由表 1 可看出,金鱼藻对 Cd 有较强的吸收和积累效应,体内 Cd 的含量随 Cd 的处理浓度及暴露时间的增加而明显增加.各处理中的 Cd 积累量与对照相比,均达到显著差异($p < 0.05$).暴露 7 d 后,0.64 μ mol/L Cd 胁迫时金鱼藻体内的 Cd 含量为 0.01 μ mol/L Cd 胁迫时的 44.5 倍.0.64 μ mol/L Cd 暴露 21 d 后金鱼藻体内 Cd 的含量达到峰值,分别为同浓度胁迫下 7、14 d 的 2.2 和 1.4 倍.Cd 积累量与 Cd 处理浓度之间存在良好的线性关系,第 7、14、21 d, R^2

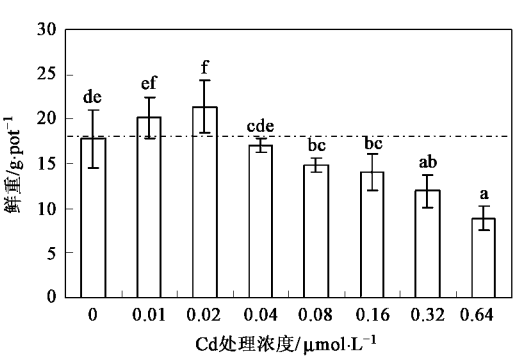


图 1 低浓度 Cd 暴露 21 d 后金鱼藻的生物量

Fig.1 Fresh weights of *Ceratophyllum demersum* exposed to a range of Cd for 21 d

分别为0.967 7、0.981 8、0.993 3.

表 1 低浓度 Cd 不同暴露时间段下金鱼藻体内 Cd 的含量

Table 1 Cd uptake and accumulation in *Ceratophyllum demersum* with the increase of Cd exposure concentration and time

Cd 处理浓度 μ mol·L ⁻¹	Cd 的含量(FW) ¹⁾ /mg·kg ⁻¹		
	7 d	14 d	21 d
0	0.04 ± 0.00a	0.07 ± 0.001a	0.08 ± 0.01a
0.01	2.93 ± 0.14b	4.98 ± 0.87b	4.66 ± 0.33b
0.02	5.97 ± 0.30c	12.26 ± 1.59c	14.03 ± 1.88c
0.04	11.08 ± 1.64d	11.34 ± 1.02c	18.96 ± 0.90d
0.08	15.73 ± 1.78e	48.60 ± 3.59d	53.05 ± 1.76e
0.16	24.15 ± 1.87f	64.90 ± 2.50e	66.92 ± 4.21f
0.32	43.65 ± 4.73g	96.93 ± 10.19f	131.02 ± 28.48f
0.64	130.42 ± 6.78h	198.56 ± 8.60g	286.35 ± 74.20g

1)数据为均值 ± 标准差;同一列中不同小写字母表示不同处理间达 5% 显著水平,下同

2.3 低浓度 Cd 胁迫对金鱼藻体内微量营养元素吸收的影响

Fe、Cu、Zn、Mn 是植物的必需微量营养元素,由表 2 可看出,不同浓度的 Cd 胁迫对金鱼藻体内不同微量元素的吸收产生了不同的影响.Cd 对金鱼藻体内 Fe 的吸收无明显影响,对 Mn 的吸收起抑制作用,Mn 的含量随着处理浓度的升高及处理时间的延长而逐渐降低,0.64 μ mol/L Cd 暴露 21 d 后,Mn 的含量仅为对照的 48.86%,可见 Cd 对 Mn 的吸收存在拮抗效应.先前在对番茄、黑麦草、玉米、白三叶草和卷心菜的研究中也发现了 Cd 抑制了 Mn 的吸收^[13、14].其原因可能是 Mn 与 Cd 有类似的吸收位点^[15],Cd 竞争性地抑制植株吸收 Mn.

不同浓度的 Cd 胁迫提高了金鱼藻体内 Cu、Zn 的含量,Cd 对 Cu、Zn 的吸收表现出协同效应.0.64 μ mol/L Cd 胁迫 14 d 时,金鱼藻体内 Cu 的含量达到

峰值,为对照的 3.4 倍,随着处理时间的延长,第 21 d 时 Cu 的吸收出现轻微下降的趋势,但各浓度下 Cu 含量仍高于对照. Zn 的含量在 Cd 暴露第 7 d 时,并未受到明显影响,随着处理时间的延长,第 14 d、21 d 时金鱼藻体内 Zn 的含量随着 Cd 浓度的升高而逐渐升高,0.64 $\mu\text{mol/L}$ Cd 暴露 21 d 时,金鱼藻体内 Zn 的含量达到峰值,为对照的 2.8 倍. Cu、Zn 营养元素与植物蒸腾作用有关, Zn 也是某些酶的活化剂,有关 Cd 与 Zn 的交互作用前人研究很多,人们在对金

鱼藻,小麦的研究中发现 Zn 降低了植物体内 Cd 的吸收量^[16,17];在对燕麦水培实验中发现,100 mg/L Cd 促进了 Zn 的吸收,但过高浓度的 Cd 又使 Zn 的吸收量下降^[18]. 由此可见 Zn、Cd 之间相互作用性质的不同似乎与培养液中 Zn、Cd 含量的高低及比例有关. Cd 对微量营养元素的影响较复杂,抑制或促进可能因植物种类与 Cd 浓度的不同而不同. Cd 对金鱼藻吸收 Mn、Fe、Cu、Zn 的影响包括了十分复杂的生理、生化过程,其机制需进一步研究.

表 2 低浓度 Cd 不同暴露时间段下金鱼藻体内微量营养元素的含量/mg·kg⁻¹

Table 2 Micronutrient uptake and accumulation in *Ceratophyllum demersum* with the increase of Cd exposure concentration and time/mg·kg⁻¹

时间/d	Cd 处理浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Fe	Cu	Zn	Mn
7	0	32.65 ± 6.52a	0.56 ± 0.07a	9.74 ± 2.37a	94.32 ± 8.84c
	0.01	35.93 ± 7.26a	0.73 ± 0.05ab	10.98 ± 1.72a	91.24 ± 13.13bc
	0.02	33.11 ± 5.42a	0.76 ± 0.08ab	10.36 ± 1.50a	84.76 ± 14.83bc
	0.04	29.42 ± 4.93a	0.79 ± 0.09b	10.12 ± 0.69a	87.37 ± 14.55bc
	0.08	30.77 ± 7.49a	0.71 ± 0.12ab	9.71 ± 0.38a	83.43 ± 13.59bc
	0.16	32.29 ± 4.36a	0.84 ± 0.17b	9.76 ± 1.32a	80.72 ± 16.75bc
	0.32	27.18 ± 5.25a	0.84 ± 0.15b	8.59 ± 1.02a	66.49 ± 11.46ab
	0.64	29.88 ± 5.29a	0.93 ± 0.16b	8.92 ± 1.40a	53.04 ± 6.64a
14	0	30.57 ± 4.18a	0.56 ± 0.10a	10.52 ± 1.39a	92.04 ± 4.63c
	0.01	34.99 ± 6.96a	0.73 ± 0.12ab	10.23 ± 2.47a	87.62 ± 9.23bc
	0.02	37.26 ± 5.78a	0.93 ± 0.17bc	11.26 ± 1.18a	89.25 ± 6.07c
	0.04	33.60 ± 7.28a	1.01 ± 0.19bc	13.66 ± 2.59ab	80.33 ± 10.65abc
	0.08	31.09 ± 4.22a	1.21 ± 0.05cd	14.67 ± 0.42ab	79.68 ± 9.32abc
	0.16	33.33 ± 6.40a	1.15 ± 0.24cd	16.86 ± 2.81bc	69.98 ± 11.76ab
	0.32	32.75 ± 2.47a	1.40 ± 0.19d	16.42 ± 2.84b	69.66 ± 11.05ab
	0.64	27.41 ± 3.74a	1.86 ± 0.34e	20.93 ± 3.88c	65.77 ± 13.28a
21	0	36.09 ± 6.96a	0.70 ± 0.06a	8.81 ± 1.57a	83.16 ± 14.37c
	0.01	35.65 ± 7.51a	0.70 ± 0.02a	9.54 ± 0.53ab	79.57 ± 7.19bc
	0.02	33.81 ± 6.37a	0.81 ± 0.09ab	11.24 ± 1.07ab	79.03 ± 11.44bc
	0.04	37.97 ± 1.77a	0.74 ± 0.05a	9.27 ± 0.99ab	74.97 ± 5.08bc
	0.08	33.31 ± 6.51a	0.89 ± 0.07ab	10.64 ± 2.60ab	73.85 ± 13.22bc
	0.16	37.93 ± 6.37a	0.96 ± 0.13b	11.87 ± 1.32b	61.85 ± 4.71b
	0.32	34.78 ± 3.23a	1.01 ± 0.13b	18.00 ± 1.30c	41.97 ± 5.85a
	0.64	38.60 ± 4.27a	1.54 ± 0.20c	24.68 ± 4.61d	40.63 ± 7.40a

2.4 低浓度 Cd 不同暴露时间段下金鱼藻体内 PCs 和 GSH 的合成情况

PCs 的诱导合成是高等植物对重金属胁迫的一种响应机制,具有双重作用:一是植物在逆境下的适应表现,对植物体内的重金属起解毒作用,可作为鉴定植物相对抗性的指标;二是细胞结构和功能遭受伤害的反应,用于指示金属的胁迫程度. 本实验采用 mBBr 柱前衍生 RP-HPLC 分析显示,金鱼藻在空白对照中也合成了低量的 PCs(见表 3),进一步表明了 PCs 在维持胞内金属的动态平衡(homeostasis)过程中具有一定作用^[19,20]. 本实验选用的 Cd 处理浓度(0.01 ~ 0.64 $\mu\text{mol/L}$)具有一定代表性,涵盖了地表

Ⅱ ~ V 类水,根据地表水质环境质量标准(GB 3838-2002),Cd 浓度为 0.01 ~ 0.04 $\mu\text{mol/L}$ 时,相当于Ⅱ ~ Ⅳ类水,Cd 浓度为 0.08 $\mu\text{mol/L}$ 时,相当于Ⅳ ~ V 类水,Cd 浓度为 0.16 ~ 0.64 $\mu\text{mol/L}$ 时,相当于劣 V 类水.而前人所选用的 Cd 处理浓度(2.5 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$)高出地表水 Cd 浓度(0.009 ~ 0.09 $\mu\text{mol/L}$,GB 3838-2002)277 ~ 22 221 倍. 研究结果显示,本实验所选接近实际环境浓度的 Cd 胁迫明显诱导了金鱼藻体内 PCs 的合成. 当 0.02 $\mu\text{mol/L}$ Cd 暴露 7 d 后,金鱼藻体内的 PCs 含量与对照相比已有显著表达($p < 0.05$),表明金鱼藻体内 PCs 对 Cd 污染胁迫的反应敏感、迅速. 当 Cd 浓度 $\geq 0.04 \mu\text{mol/L}$ 时,不同暴露时

间段下金鱼藻内 PCs 含量与对照相比均呈显著增加 ($p < 0.05$). 在第 7 d 时 PCs 含量增幅最大, $0.64 \mu\text{mol/L}$ Cd 暴露 7 d 后, 金鱼藻体内 PCs 含量达到峰值, 约为对照的 63 倍. 随着暴露时间的增加, PCs 含量有下降趋势, 但与对照相比, 7 d、14 d 金鱼藻体内的 PCs 含量仍有明显表达.

研究结果表明, 金鱼藻体内 PCs 诱导量与处理 Cd 浓度存在良好的剂量效应关系. 胁迫 7 d 时呈线性关系, $R^2 = 0.9034$, 胁迫 14 d 和 21 d 均表现为抛物线型 (第 14 d, $R^2 = 0.9959$; 第 21 d, $R^2 = 0.9783$). 抛物线型剂量效应关系是生物对污染胁迫反应的常见形式之一, 其顶点所对应的污染浓度可认为是生物对污染从适应性反应到中毒性反应的阈值. 暴露第 7 d, PCs 诱导量随 Cd 浓度的升高呈显著升高 ($p < 0.05$), 可认为是金鱼藻对 Cd 污染产生的应激保护措施. 随着暴露时间的增加, 金鱼藻体内 Cd 含量持续上升, 但 PCs 诱导量却开始呈下降趋势. $0.08 \mu\text{mol/L}$ Cd 暴露 21 d 后, PCs 诱导量仅为同浓度下暴露 7、14 d 时的 23.2%、48.4%. 前人在研究 PCs 时, 也发现 PCs 诱导量下降甚至消失的情况,

推测其原因可能是 Cd 离子被区隔化入液泡, 降低了胞质中的游离 Cd 离子, 从而 PCs 含量开始降低; 或是暴露后期 PCs 在液泡的酸性条件下开始降解, 降解产物即各种氨基酸分子又返回到细胞质中^[19, 21, 22]. 本研究显示, PCs 含量的下降似乎和植物的耐性降低有关, $0.08 \mu\text{mol/L}$ Cd 暴露 21 d 后, 伴随着 PCs 诱导量的下降, 金鱼藻的生长出现了抑制效果. 可见 PCs 在金鱼藻体内确实起着重要的解毒作用. 有关后期 PCs 降解机制还需进一步研究.

本研究发现 Cd 胁迫在诱导 PCs 大量合成的同时, 也刺激了金鱼藻体内 GSH 含量的增加, GSH 的含量随 Cd 暴露的浓度及时间的增长而增长. 回归分析显示, 金鱼藻体内 GSH 的含量与 Cd 处理浓度呈良好的线性关系, 第 7、14、21 d 的 R^2 分别为 0.7566、0.8839、0.9701.

在整个处理期间, GSH 的含量增长趋势较缓, 变化幅度明显低于 PCs. 主要原因可能是由 GSH 的双重角色所致: 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^[20, 23].

2.5 Cd 胁迫与 PCs 合成的相关关系

表 3 低浓度 Cd 不同暴露时间段下金鱼藻体内 PCs 和 GSH 的含量

Table 3 Phytochelatin and glutathione contents in <i>Ceratophyllum demersum</i> with the increase of Cd exposure concentration and time						
Cd 处理浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	7 d 含量(FW)/ $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$		14 d 含量(FW)/ $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$		21 d 含量(FW)/ $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$	
	PCs-SH	GSH	PCs-SH	GSH	PCs-SH	GSH
0	$7.38 \pm 0.51\text{a}$	$10.04 \pm 1.77\text{a}$	$6.33 \pm 1.18\text{a}$	$13.16 \pm 1.86\text{a}$	$6.43 \pm 0.86\text{ab}$	$22.18 \pm 3.53\text{a}$
0.01	$8.76 \pm 0.87\text{a}$	$10.61 \pm 1.88\text{a}$	$7.03 \pm 1.61\text{a}$	$14.13 \pm 0.94\text{a}$	$5.47 \pm 1.25\text{a}$	$34.54 \pm 2.28\text{b}$
0.02	$20.82 \pm 1.09\text{b}$	$11.24 \pm 1.61\text{a}$	$12.77 \pm 1.97\text{b}$	$19.17 \pm 1.00\text{b}$	$8.09 \pm 1.28\text{b}$	$35.78 \pm 6.46\text{b}$
0.04	$120.51 \pm 17.09\text{c}$	$18.28 \pm 1.23\text{b}$	$39.92 \pm 6.43\text{c}$	$24.85 \pm 1.54\text{c}$	$32.70 \pm 7.66\text{c}$	$39.92 \pm 8.69\text{b}$
0.08	$181.62 \pm 16.72\text{d}$	$12.67 \pm 1.35\text{a}$	$87.07 \pm 7.31\text{d}$	$40.85 \pm 4.04\text{d}$	$42.13 \pm 8.04\text{c}$	$40.31 \pm 2.84\text{b}$
0.16	$169.80 \pm 15.03\text{d}$	$16.36 \pm 1.23\text{b}$	$133.13 \pm 27.27\text{e}$	$25.50 \pm 1.51\text{c}$	$66.62 \pm 9.51\text{d}$	$45.65 \pm 5.70\text{b}$
0.32	$257.75 \pm 51.19\text{e}$	$25.89 \pm 3.54\text{c}$	$244.07 \pm 36.79\text{f}$	$42.49 \pm 8.07\text{d}$	$175.69 \pm 32.1\text{e}$	$119.24 \pm 9.40\text{c}$
0.64	$441.23 \pm 35.27\text{f}$	$26.20 \pm 2.51\text{c}$	$267.81 \pm 52.63\text{f}$	$77.70 \pm 8.74\text{e}$	$222.67 \pm 5.96\text{f}$	$188.74 \pm 44.37\text{d}$

众多研究表明植物体内 PCs 的合成水平与细胞内胁迫金属的数量存在密切联系, 认为胞内 PCs 诱导量可反映金属的生物毒性^[22, 24~28]. 如 Keltjens 等^[25]在对玉米小麦的研究中发现, 2 种作物体内的 PCs 含量与作物生物量降低程度密切相关, 认为 PCs 可指示重金属的实际胁迫水平. Sneller 等^[22]在研究麦瓶草 (*Silene vulgaris*) 时发现, 植物体内 PCs 的诱导量与低浓度 Cd 长期暴露存在线性相关. 本研究通过回归分析显示, 低浓度 Cd 暴露 21 d 后, 金鱼藻体内 PCs 的诱导量与 Cd 的生物毒性 (以生物鲜重的降低率表示 Cd 的生物毒性) 呈极显著正相关 ($R^2 = 0.9088$, $p < 0.01$, 图 2), 进一步表明 PCs 可作为 Cd

的生物标记物指示重金属 Cd 的毒害程度.

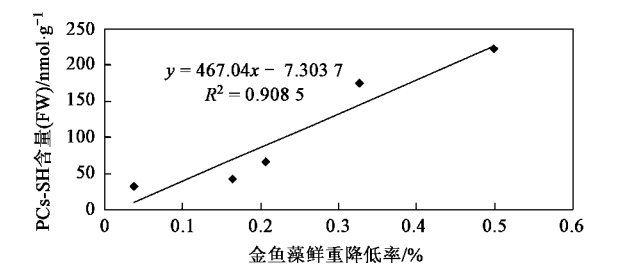


图 2 金鱼藻体内 Cd 的生物毒性和 PCs 诱导量之间的相关关系
Fig.2 Relationship between Cd toxicity, quantified by the relative inhibition (RIR) of fresh weights and PCs concentrations in *Ceratophyllum demersum* exposed to a range of Cd

3 结 论

(1)研究结果表明金鱼藻对环境中的 Cd 表现出很强的积累能力,体内 Cd 含量随着处理浓度和处理时间的增加而明显增加. Cd 对金鱼藻体内 Mn、Fe、Cu、Zn 微量元素产生了不同的胁迫效应,对 Mn 的吸收表现为拮抗效应,对 Cu、Zn 的吸收表现出协同效应,对 Fe 的吸收无明显影响.

(2)低浓度 Cd 不同暴露时间段下金鱼藻体内 PCs 和 GSH 含量与对照相比均明显增加,且 PCs 含量变化的进程显著早于 GSH 的变化. 金鱼藻体内 PCs 对 Cd 的胁迫表现出相当的敏感性,且和处理浓度呈良好的剂量效应关系,表明 PCs 诱导量的变化是金鱼藻遭受 Cd 胁迫时较敏感的生物标记物. 金鱼藻体内 PCs 诱导量与 Cd 的生物毒性存在明显的正相关关系,进一步表明 PCs 可作为 Cd 的生物标记物指示重金属 Cd 的毒害程度.

参考文献:

[1] 王云,魏复盛.土壤环境化学元素[M]. 北京:中国环境科学出版社,1995.

[2] 黄运湘,廖柏寒,肖浪涛,等.镉处理对大豆幼苗生长及激素含量的影响[J].环境科学, 2006, 27(7): 1398-1401.

[3] 关伟,王有年,师光禄,等.两个桃树品种对土壤中不同镉水平的响应[J].生态学杂志, 2007, 26(6): 859-864.

[4] 江行玉,王长海,赵可夫.芦苇抗镉污染机理研究[J].生态学报, 2003, 23(5): 856-862.

[5] Yin L, Zhou Y, Fan X, *et al.* Induction of phytochelatin in *Lemna aquinoctialis* in response to cadmium exposure[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2002, 68(4): 561-568.

[6] Sanit  di Toppi L, Vurro E, Rossi L, *et al.* Different compensatory mechanisms in two metal-accumulating aquatic macrophytes exposed to acute cadmium stress in outdoor artificial lakes[J]. Chemosphere, 2007, 68(4): 769-780.

[7] Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, *et al.* Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatin and antioxidant system in response to its accumulation [J]. Chemosphere, 2006, 65(6): 1027-1039.

[8] Srivastava S, Mishra S, Tripathi R D, *et al.* Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle[J]. Aquat Toxicol, 2006, 80(4): 405-415.

[9] Tripathi R D, Rai U N, Gupta M, *et al.* Induction of phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle under cadmium stress[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1996, 56(3): 505-512.

[10] Sneller F E C, Van Heerwaarden L M, Koevoets P L M, *et al.* Derivatization of phytochelatin from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane[J]. J Agric Food Chem,

2000, 48(9): 4014-4019.

[11] Tang D G, Schfer M M, Vang K, *et al.* Determination of dissolved thiols using solid-phase extraction and liquid chromatographic determination of fluorescently derivatized thiolic compounds[J]. J Chromatogr, 2003, 998(1): 31-40.

[12] Hirt H, Casarl G, Barra A. Cadmium-enhanced gene expression in suspension-culture cells of tobacco[J]. Planta, 1989, 179(3): 414-420.

[13] 廖自基.微量元素的环境化学及生物效应[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1993.

[14] 杨明杰,林咸永,杨肖娥. Cd 对不同种类植物生长和养分积累的影响[J]. 应用生态学报, 1998, 9(1): 89-94.

[15] Jarvis J C, Jones L H P, Hopper M J. Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots[J]. Plant Soil, 1976, 44(1): 179-191.

[16] Sun Q, Wang X R, Ding S M, *et al.* Effects of interactions between cadmium and zinc on the phytochelatin and glutathione production in wheat(*Triticum aestivum* L.)[J]. Environ Toxicol, 2005, 20(2): 195-201.

[17] Aravind P, Prasad M N V. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte[J]. Plant Physiol Biochem, 2003, 41(4): 391-397.

[18] 许嘉林,杨居荣.陆地生态系统中的重金属[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1995.

[19] Zenk M H. Heavy metal detoxification in higher plants: a review[J]. Gene, 1996, 179(1): 21-30.

[20] Rauser W E. Phytochelatin and related peptides[J]. Plant Physiol, 1995, 109: 1141-1149.

[21] 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*[J]. Plant Sci, 1995, 106(1): 9-18.

[22] 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*[J]. Ecotoxicology, 1999, 8(3): 167-175.

[23] 郭飞波,张国平.植物螯合肽及其在重金属耐性中的作用[J]. 应用生态学报, 2003, 14 (4): 632-636.

[24] Inoue M. Phytochelatin[J]. Braz J Plant Physiol, 2005, 17(1): 65-78.

[25] Keltjens W G, Beusichem M L. Phytochelatin as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.): combined effects of copper and cadmium[J]. Plant Soil, 1998, 203: 119-126.

[26] Keltjens W G, Beusichem M L. Phytochelatin as biomarkers for heavy metal toxicity in maize: Single metal effects of copper and cadmium[J]. J Plant Nutri, 1998, 21(4): 635-648.

[27] 孙琴,袁信芳,王晓蓉.环境因子对小麦体内镉的生物毒性和植物络合素合成的影响[J]. 应用生态学报, 2005, 16(17): 1360-1365.

[28] Pawlik-Skowrońska B. Correlations between toxic Pb effects and production of Pb-induced thiol peptides in the microalga *Stichococcus bacillaris*[J]. Environ Pollut, 2002, 119(1): 119-127.