

S 元素对水稻耐重金属 Cu 毒性的影响

王海鸥, 钟广蓉, 徐海洋, 吕俊君, 洪敏杰

(北京科技大学生物科学与技术系, 北京 100083)

摘要:将水稻幼苗置于含有不同浓度硫元素(S, 1、10 mmol·L⁻¹)和铜元素(Cu, 0.16、100 μmol·L⁻¹ 和 1 mmol·L⁻¹)的培养液中培养, 12 h 后测定植物体内的 Cu 含量、叶绿素含量、抗坏血酸含量和抗氧化酶活性的变化。结果表明, 施加较高浓度的 S(10 mmol·L⁻¹)能抑制植物根部对 Cu 的吸收和积累, 但能促进根部 Cu 元素向地上部的运输。本研究还表明, Cu 处理后的 0~3 h, S 能促成抗坏血酸含量的提高; 并且 S 可以激活抗氧化酶类活性迅速增加消除胁迫产生的膜脂过氧化胁迫, 但是不同浓度的 S 和 Cu 对叶绿素含量的影响效果不明显。

关键词:水稻幼苗; S; Cu; 叶绿素; 抗氧化反应

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)06-2319-06

Effect of Sulfate on Copper Toxicity to Rice Seedlings

WANG Hai-ou, ZHONG Guang-rong, XU Hai-yang, LV Jun-jun, HONG Min-jie

(Department of biological Science & Technology, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: Rice seedlings were cultivated in hydroponic culture solution with supplies of copper ((Cu) 0.16, 100 μmol·L⁻¹, and 1 mmol·L⁻¹) and sulfate ((S) 1 and 10 mmol·L⁻¹) under controlled growth conditions. The copper concentrations of leaves and roots, the pigments, ascorbate acid (AsA) contents and enzymes (dehydroascorbate reductase (DHAR) and ascorbate peroxidase (APX)) activities were investigated during 12 h treatment. The result indicated, the sulfate (10 mmol·L⁻¹) which exerts higher concentration could suppress the plant root absorption and accumulation of Cu, but could promote the transportation and accumulation of Cu to shoots. This research still indicated, 0~3 hours when Cu is treated, the sulfate could facilitate the improvement of the content of AsA, and no significant difference was observed between two sulfate concentration treatments. Furthermore, sulfate could activate antioxidative enzymes and reduce toxic effect by Cu stress. In detail, the higher sulfate concentration could more rapidly induce to the increase of DHAR and APX activity than lower sulfate concentration. However, the sulfate or Cu of different concentrations impact on content of chlorophyll was not obvious. All experiment results suggested that sulfate could effectively reduce copper toxicity to seedlings.

Keywords: rice seedling; S; Cu; chlorophyll; anti-oxidative reaction

污染土壤中的重金属(Cd、Cu、Zn 等)已经进入食物链从而影响人类健康, 因此对重金属毒理学研究已经成为热点问题^[1]。植物通常是通过根部从土壤中以离子形式吸收 Cu。尽管 Cu 元素是植物生长发育所必需的微量元素之一, 但由于绝大多数植物对 Cu 过量有较高的敏感性, 因此 Cu 吸收量一旦超过正常量即可造成许多生理毒害(如引起体内的自由基的损伤等)。Cu 毒害往往造成植物生长缓慢或停止生长, 甚

至死亡。Cu 通过 Fenton 型反应诱导活性氧(ROS)产生^[2]。ROS 可以氧化蛋白质、脂类、多糖和核酸等生物大分子, 造成生物膜透性增大、酶失活及基因突变等伤害。植物细胞在长期进化过程中形成两种主要的解毒系统, 两者分别以超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)等抗氧化酶或以谷胱甘肽(GSH)、抗坏血酸(AsA)等小分子物质为主^[3-4]。

S 是植物必需的 6 种大量元素之一, 在植物体内的含量为 3%~5%, 主要以半胱氨酸和甲硫氨酸残基形式存在于蛋白质中^[5]。此外, S 元素还存在于许多小分子代谢物如半胱氨酸(cysteine)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、植物螯合肽(PC)及类金属硫蛋白等。

收稿日期: 2007-12-14

基金项目: 北京科技大学科研专项发展基金(200306020990, 20050602990)

作者简介: 王海鸥(1975—), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物修复方面的研究。E-mail: wanghaiou@sas.ustb.edu.cn

近年来,在国内外对 S 的吸收和代谢研究给予很大的关注。部分原因是人们对植物重金属抗性机制研究涉及到与 S 同化有关的 PC 合成途径^[6-10]。大量研究证明,GSH 和 Cys 等小分子巯基化合物的存在也可以缓解重金属毒害。同时,GSH-AsA 循环途径可以降低植物体内重金属引起的活性氧。GSH 可作为一种重要的巯基化合物结合细胞内的重金属,减轻重金属对植物的毒害。因此,S 素营养供应状况可能影响到植物对过量 Cu 的耐性。

本研究以水稻为材料,探讨外源 S 对水稻幼苗生长过程中 Cu 毒害的缓解效应,为进一步阐明水稻耐 Cu 毒性机理提供依据,以期能够为防止作物吸收重金属并找到相应解毒途径。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

将水稻种子在 5% NaClO 中消毒 10 min,用去离子水冲洗干净。然后将种子包在纱布中置于 (25 ± 2)℃培养箱内催芽后,播种于营养钵内(基质为石英砂),调 pH 至 6.0。每隔 3 d 更换 1 次 1/4 强度的 Hoagland 营养液,苗高 10 cm 左右后移栽至 1 L 的塑料培养槽中每槽种 6 株进行处理。

用 Cu(NO₃)₂ 和硫酸二氢钾配制成浓度分别为(前为 Cu 浓度,后为 S 浓度):(1)0.16 μmol·L⁻¹,1 mmol·L⁻¹; (2)0.16 μmol·L⁻¹,10 mmol·L⁻¹; (3)100 μmol·L⁻¹,1 mmol·L⁻¹; (4)100 μmol·L⁻¹,10 mmol·L⁻¹; (5)1 mmol·L⁻¹,1 mmol·L⁻¹; (6)1 mmol·L⁻¹,10 mmol·L⁻¹ 的 1/4 强度的 Hoagland 培养液。每个处理设 3 个重复。分别处理 0、3、6、9 和 12 h 后收集根和叶,用液氮速冻保存待用。

1.2 叶绿素测定

叶绿素含量测定采用 Arnon^[10]方法。

1.3 抗坏血酸含量及酶活性测定

1 g 叶片加 5 mL 的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol·L⁻¹

pH 8.0, 内含 0.1 mmol·L⁻¹ 的 EDTA 和 2%的 PVP-40)。在冰浴中研磨匀浆,然后过 4 层纱布。滤液于 4℃、10 000×g 离心 20 min,上清液即为酶提取液。抗坏血酸过氧化物酶 (APX,E.C.1.11.1.11.) 活性测定用 Nakano 和 Asada^[11]方法。按 Miyake 和 Asada^[12]方法在 265 nm 处测定吸光度,计算抗坏血酸还原酶(DHAR, EC1.8.5.1)活性。按 Wang 等^[13]方法测定抗坏血酸(AsA)的含量。

1.4 数据统计

实验数据用 SPSS12.0 软件分析。本实验每处理至少重复 3 次,取平均值,数据统计采用 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 S 元素对水稻叶、根中积累 Cu 的影响

由表 1 可见,无论在低浓度 S 还是高浓度 S 的处理下,生长在不同浓度 Cu 培养液中的水稻叶片的含 Cu 量随着处理时间的延长都呈现增加的趋势,叶片含 Cu 量增加较快出现在 Cu 处理后 9 h。另外,实验结果还显示叶片的含 Cu 量与培养液中 Cu 元素的含量成正比。进一步比较 S 元素对 Cu 积累的影响时发现,较高浓度的 S 元素(10 mmol·L⁻¹)施加对水稻叶片积累 Cu 的量有一定促进作用。具体表现为处理 12 h 后,当培养液中的 Cu 浓度分别为 0.16 μmol·L⁻¹,100 μmol·L⁻¹ 和 1 mmol·L⁻¹ 时,水稻叶片 Cu 含量比对照(S,1 mmol·L⁻¹)分别增加 0.2、0.9 和 0.7 倍。

由表 2 的数据显示,根部的 Cu 含量与培养液中 Cu 处理浓度呈显著正相关 (*P*<0.05)。0.16 μmol·L⁻¹ 浓度的 Cu 处理时,两种浓度 S 处理的水稻根部的含 Cu 量的增长趋势相同,都表现为缓慢增加的趋势。而在 100 μmol·L⁻¹ 和 1 mmol·L⁻¹Cu 处理下,处理 3 h 后根部的 Cu 含量大幅增加。施加高浓度的 S(10 mmol·L⁻¹)对水稻根积累和吸收 Cu 有轻微抑制作用;另外,处理 12 h,当培养液中的 Cu 浓度分别为 0.16 μmol·L⁻¹、100 μmol·L⁻¹ 和 1 mmol·L⁻¹ 时,低浓度 S(1 mmol·

表 1 S 对水稻叶片 Cu 积累的影响(mg·g⁻¹ 干重)

Table 1 Copper concentrations in leaves of rice as affected by different sulfate and copper concentrations in solution (mg·g ⁻¹ DW)						
时间/h	0.16 μmol·L ⁻¹ (Cu)		100 μmol·L ⁻¹ (Cu)		1 mmol·L ⁻¹ (Cu)	
	1 mmol·L ⁻¹ (S)	10 mmol·L ⁻¹ (S)	1 mmol·L ⁻¹ (S)	10 mmol·L ⁻¹ (S)	1 mmol·L ⁻¹ (S)	10 mmol·L ⁻¹ (S)
0	0.19	0.24	0.14	0.14	0.18	0.19
3	0.41	0.70	0.77	0.98	0.71	0.70
6	0.46	0.87	0.78	1.07	1.18	1.01
9	0.47	0.90	0.78	1.48	1.27	1.69
12	0.76	0.91	0.84	1.63	1.40	2.41

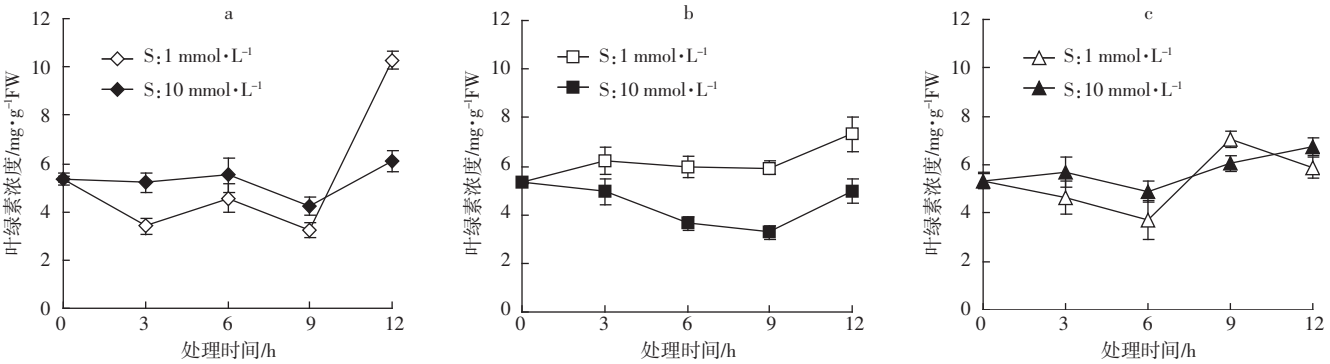
表 2 S 对水稻根部 Cu 积累的影响($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重)

时间/h	0.16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cu)		100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cu)		1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cu)	
	1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (S)	10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (S)	1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (S)	10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (S)	1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (S)	10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (S)
0	2.27	2.14	1.98	2.03	2.44	2.75
3	3.61	3.03	19.01	18.10	56.96	55.91
6	4.05	3.48	26.73	26.97	68.37	66.75
9	4.41	4.55	34.33	30.04	77.13	76.50
12	4.67	4.58	38.13	33.35	116.53	104.65

L^{-1})处理比高浓度 S 处理的水稻根部 Cu 含量高 2%、20.3%和 10.1%。

2.2 S 元素影响水稻总叶绿素含量

图 1 的实验结果表明,在低浓度的 S 溶液处理下,水稻叶片中的叶绿素含量随 Cu 处理时间的延长呈缓慢上升趋势。在较高浓度 S 处理下,植物叶片中的叶绿素含量基本保持恒定。

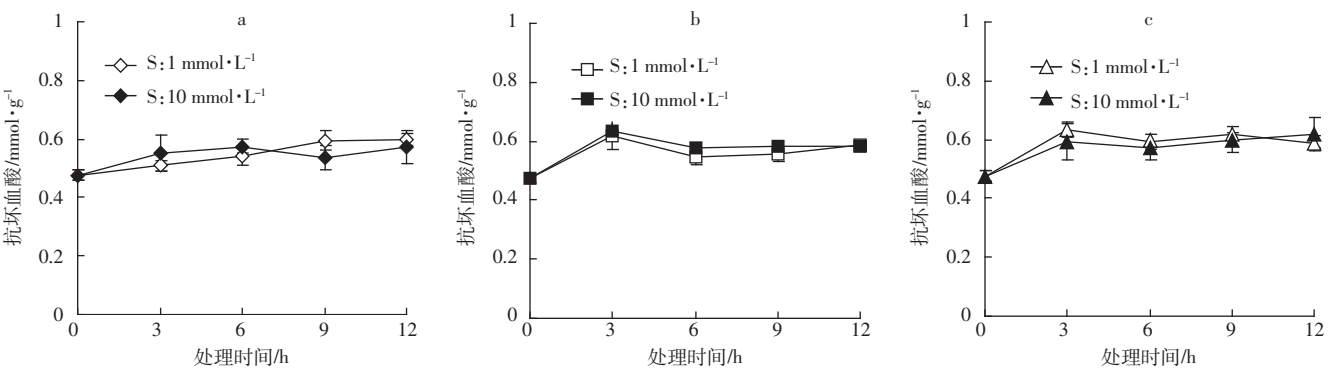


a: Cu 浓度 $0.16\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, b: Cu 浓度 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, c: Cu 浓度 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 1 S、Cu 浓度对水稻叶片的叶绿素含量的影响

Figure 1 Effect of sulfate and copper concentrations on the contents of the chlorophyll in rice leaves

(a) $0.16\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu, (b) $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu, (c) $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu



a: Cu 浓度 $0.16\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, b: Cu 浓度 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, c: Cu 浓度 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 2 S、Cu 浓度对水稻叶片抗坏血酸含量变化的影响

Figure 2 Effect of sulfate and copper concentrations on the contents of ascorbate acid in rice leaves

(a) $0.16\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu, (b) $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu, (c) $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu

2.3 S 元素对水稻叶片抗坏血酸循环的影响

由图 2 可见, S 的浓度对抗坏血酸含量的影响没有显著区别,处理的初期 0~3 h 抗坏血酸含量均有一个明显的上升趋势,随着处理时间的延长抗坏血酸的含量基本保持恒定。

由图 3 可见,在两种浓度的硫处理下,叶片中 DHAR 活性变化趋势略有不同。处理初期 0~3 h,所有

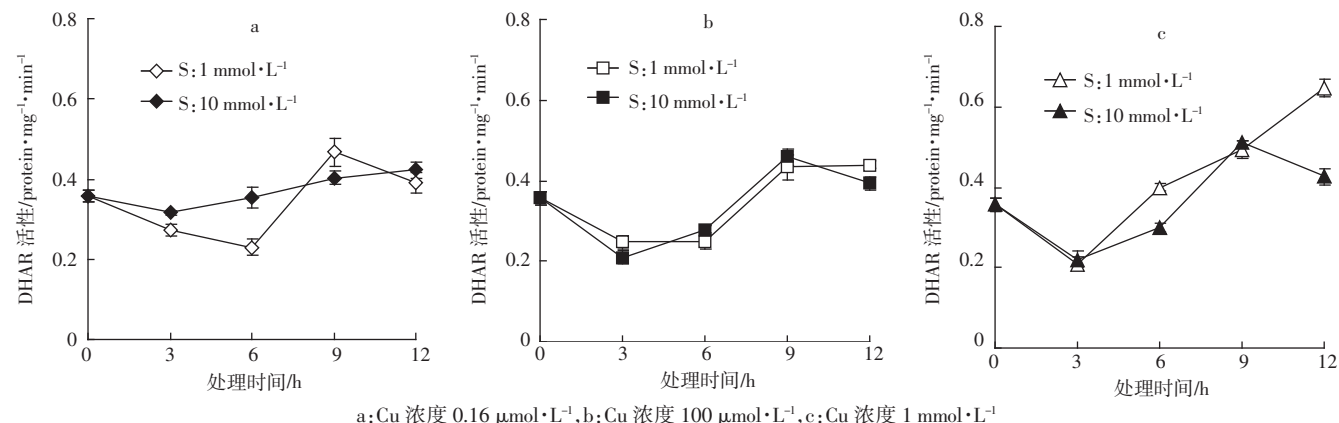


图 3 S、Cu 浓度对水稻叶片抗坏血酸还原酶含量变化的影响

Figure 3 Effect of sulfate and copper concentrations on the contents of DHAR activities in rice leaves

(a) 0.16 μmol·L⁻¹ Cu, (b) 100 μmol·L⁻¹ Cu, (c) 1 mmol·L⁻¹ Cu

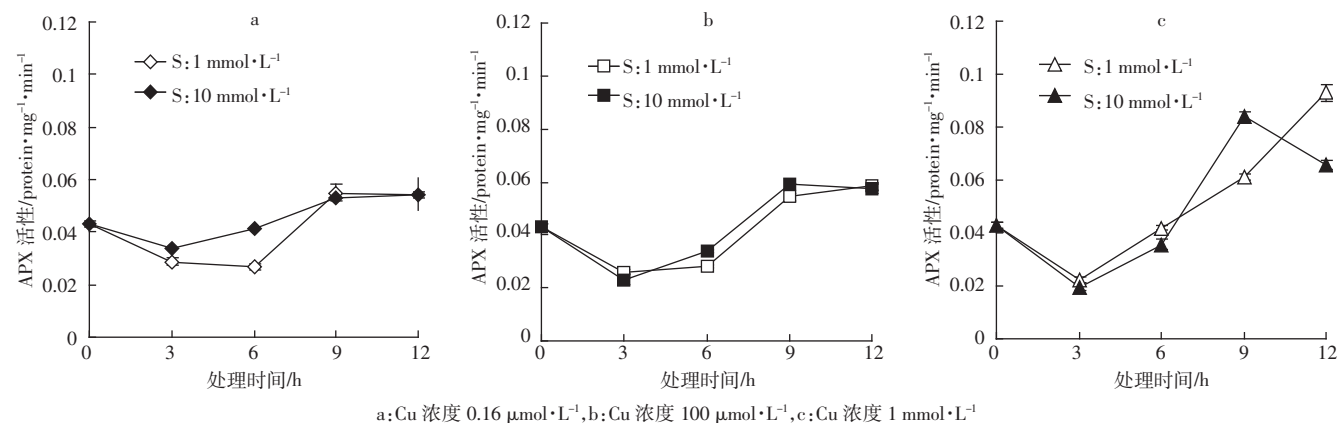


图 4 S、Cu 浓度对水稻叶片抗坏血酸过氧化物酶含量变化的影响

Figure 4 Effect of sulfate and copper concentrations on the contents of APX activities in rice leaves

(a) 0.16 μmol·L⁻¹ Cu, (b) 100 μmol·L⁻¹ Cu, (c) 1 mmol·L⁻¹ Cu

的处理下的幼苗体内 DHAR 活性均有下降趋势。同时比较 Cu 浓度的对酶活性影响时发现,在较低浓度 S 处理下,0.16 μmol·L⁻¹ 和 100 μmol·L⁻¹ 的 Cu 处理促使幼苗体内的 DHAR 活性在 6 h 后又有明显的上升趋势,而 Cu 浓度为 1 mmol·L⁻¹ 处理下的幼苗体内的酶活性在 3 h 后就有出现迅速地、明显地上升趋势;而在较高浓度硫处理下,不同的 Cu 浓度对 DHAR 活性影响区别不明显,具体表现为幼苗体内的 DHAR 活性在处理 3 h 后,均表现为上升趋势,但是实验结果也表明处理 9 h 后,因为高浓度的存在使植物叶片中积累过高的浓度 Cu 离子,使酶活性出现下降趋势。

由图 4 可见,S 影响 APX 活性变化的趋势与 DHAR 相似。在高浓度 Cu(1 mmol·L⁻¹)处理中,较低浓度的 S 处理使幼苗体内酶活性升高较为明显。并且发

现高浓度 Cu(1 mmol·L⁻¹)对叶片中的 APX 活性有较强地激活作用,并随着 Cu 处理时间的延长而增高。

3 讨论

高等植物体内含 Cu 量因种属而异,一般占植物干重的 1 mg·kg⁻¹,含量极微,就某种植物而言,老的部位较幼嫩部位为多。Cu 是一种可产生跃迁的金属,因此可以引起非酶促反应的催化过氧化物和 H₂O₂ 产生 OH·自由基(Haber-Weiss 反应)。因此,植物体内积累大量的 Cu 可能引起植物中毒反应^[4]。

S 作为植物生长必需元素,有研究发现在植物对 Cd²⁺的耐受机制中也起着十分重要的作用^[8,14]。S 的吸收、还原、同化途径中关键酶的表达量响应 Cd²⁺胁迫,硫代谢产物如金属硫蛋白(metallothionein, MT)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和植物络合素(phytochelatins, PC)等,在植物体内起着重要的作用。

PC)在植物对 Cd 的解毒过程中起着关键作用。过量表达 S 代谢途径相关酶基因也可以提高植物对 Cd²⁺ 的耐性。S 主要以 SO₄²⁻ 的形式被植物吸收。SO₄²⁻ 的跨细胞膜吸收主要受一个编码不同亲和性 S 转运体基因家族的表达调控。经 Cd²⁺ 胁迫后,印度芥菜根部的低亲和性 S 转运体基因的转录水平明显降低,叶中的转录水平没有变化,玉米则通过高亲和性 S 转运体表达的上调,增加 S 的吸收。高亲和性 S 转运体在 Cd²⁺ 胁迫下的上调表达,可能确保了植物体内与 Cd²⁺ 解毒机制密切相关的 S 供应。ATP 硫化酶(APS)和磷酸腺苷还原酶(APR)是 SO₄²⁻ 还原为 H₂S 的过程中的两个关键酶,其表达量响应 Cd²⁺ 胁迫。经 25 μmol·L⁻¹ 的 Cd²⁺ 处理后的印度芥菜中,APS 和 APR 的转录水平强烈增加。在过量表达 APS 的印度芥菜中,S 和硫醇含量增加,幼苗期植物比野生型具有更高 Cd²⁺ 耐性,成体植物地上部分 Cd²⁺ 含量则比野生型高 2.5 倍以上。

本实验数据也支持以上的观点。由表 1~2 实验数据可见,水稻叶片和根部最初含 Cu 量经过含有不同浓度的 Cu 和 S 的培养液的处理后,生长在不同浓度 Cu 的培养液中的水稻叶片 Cu 含量随着处理时间的延长呈现增加的趋势,远超过正常含 Cu 量。在较高浓度的 S(10 mmol·L⁻¹)的处理条件下,对水稻叶片积累 Cu 的能力有一定促进作用,而对根部积累 Cu 的能力有一定抑制作用。这可能是在高浓度 S 存在,植物根部形成较多的 H₂S,Cu 可与 S 形成难溶沉淀物 CuS,从而降低了 Cu 的生物可给性,不利于被根吸收。此外较高浓度的 S 元素的吸收可以帮助植物在体内形成较多的植物络合素或金属硫蛋白,这两种物质的解毒作用是植物最重要的解毒机制之一。目前已知重金属离子只有形成非离子态的螯合物后才能更有效向上运输。因此,Cu 离子在体内与金属硫蛋白及植物络合素等金属结合蛋白络合为复合物并降低金属对植物细胞的毒害,后随着这些蛋白一起被转运,最终在植物体的叶片中沉积,并通过这些组织细胞内液泡膜上的转运蛋白的跨液泡膜转运作用而进一步在液泡中富集,从而发挥抗重金属毒害作用。

处理 12 h 后,叶片中 Cu 的含量是正常浓度的 4~13 倍,而根中的 Cu 浓度是正常浓度的 2~48 倍。因此,植物体内积累的高浓度的 Cu 已经能引起植物体内的氧化胁迫。植物体内存在着酶促和非酶促两类活性氧自由基清除系统。活性氧(activated oxygen species,AOS)是激活抗氧化系统的信号分子。抗坏血酸是植物体内一种重要的还原剂,通过抗坏血酸-谷

胱甘肽-NADPH 循环(Halliwell-Asada 途径)直接清除 H₂O₂,而中间产物脱氢抗坏血酸经 DHAR 催化还原^[4]。APX 是负责 H₂O₂ 的清除的主要酶之一,通过催化使抗坏血酸氧化成氧化态,清除 H₂O₂。从而防止氧化伤害或毒性更强的自由基·OH 的形成^[15]。

植物细胞中酶促和非酶促两类活性氧自由基清除系统的协同反应在本实验中得到反映。Schutzen-dubel 和 Polle 认为^[16],重金属进入细胞溶质后首先引起细胞抗氧化能力瞬时缺失,如引起 AsA-GSH 循环两个关键酶 DHAR 和 APX 的瞬时失活,启动 H₂O₂ 的积累,进而诱导抗氧化系统的二次防御作用植物细胞内的 APX 等抗氧化酶可以在一定程度上抵御各种环境因子造成的氧化胁迫。本实验中当叶片中开始积累超过正常值的 Cu 时,植物体内的 Halliwell-Asada 循环被启动,抗坏血酸在处理 3 h 后含量升高直接参与到清除自由基的反应中,但观察 APX 和 DHAR 活性变化趋势时发现,在最初 3 h 内出现两种酶活性的暂时下降,出现瞬时失活,紧接着出现了酶活性的急速上升趋势,启动抗氧化系统的二次防御作用,从而维持了体内抗坏血酸含量的稳定,有效的降低体内的氧化胁迫,降低了 Cu 离子毒性。

在供高浓度 S(10 mmol·L⁻¹)情况下,水稻在施加较高 Cu 浓度 100 μmol·L⁻¹、1 mmol·L⁻¹ 时叶片 Cu 浓度显著增加,植物体内高浓度的 Cu 引起植物体内的自由基产生氧化胁迫,特别发现施加较高浓度的 S 可以刺激高浓度 Cu 处理下叶片的抗氧化酶类活性迅速增加,因此能够较快地降低了 Cu 离子毒性,可能是植物体因为 S 元素供给的更为充分,可以合成较多还原性的硫代谢物 GSH 和 PC,有利于重金属的固定而减弱毒性并同时诱导激活酶的活性来消除胁迫产生的膜脂过氧化胁迫,因此较高浓度的 S 可以保护植物并减轻自由基产生的氧化胁迫。

叶绿素是植物进行光合作用的色素,叶绿素含量在一定程度上反映了光合作用的水平。一般认为重金属离子 Cu 使高等植物的叶绿素总量降低^[17]。这是由于 Cu 离子直接引起植物体内氧化胁迫从而干扰了叶绿素的生物合成。植物体内积累的 Cu 还引起植物体内防御系统的破坏,引起叶绿体内氧自由基自由基增多,叶绿体膜系统受损,而使叶绿素降解^[18]。在本实验中发现植物细胞内叶绿素含量基本保持恒定。这说明施加 S 元素都很可以有效地降低体内由于 Cu 离子浓度增加所带来的毒性影响,从而保护叶绿素不受破坏。

4 结论

本实验结果表明,当培养液中施加的 Cu 元素浓度相同时,较高浓度的 S($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)能抑制植物根部吸收和积累 Cu, 但能促进 Cu 元素从根部向地上部运输。此外,比较 S 浓度对植物体内生理反应的影响时,发现 Cu 处理后的 0~3 h, S 能促成抗坏血酸含量的提高。S 可以激活抗氧化酶类活性迅速增加消除胁迫产生的膜脂过氧化胁迫, 因此能够较快地降低了 Cu 离子毒性, 不同 S 浓度和 Cu 浓度对叶绿素含量的影响效果不明显。因此,较高浓度 S 的存在总的来讲可以缓解植物的氧化胁迫, 减轻植物受到重金属的毒害。

参考文献:

- [1] 张丽娜, 宗良纲, 任 隰, 等. 硅对低镉污染水平下水稻幼苗生长及吸收镉的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(2):494-499.
ZHANG Li-na, ZONG Liang-gang, REN Si, et al. Effects of Si on rice seedling growth and uptake of Cd in the low level of Cd pollution[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(2):494-499.
- [2] Briat L R, Lebrun M. Plant responses to metal toxicity[J]. *Plant Biology and Pathology*, 1999, 322:43-54.
- [3] Dirk I, Marc V M. Oxidative stress in plants[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6:153-158.
- [4] Drajćkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z. Response of the ascorbate/glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana*(L.)[J]. *Plant Science*, 2003, 164:195-202.
- [5] Leustek T, Saito K. Sulfate transport and assimilation in plants [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120:637-643.
- [6] Lee S, Leustek T. The affect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*[J]. *Plant Science*, 1999, 141:201-207.
- [7] Di Toppi S D, Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1999, 41:105-130.
- [8] Nocito F F, Pirovano L M, Cocucci Sacchi G A. Cadmium induced sulfate uptake in maize roots[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129:1872-1879.

- [9] Heiss S, Schafer J, Haag-Kerwer A, et al. Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L. :Cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transport and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase[J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 39:847-857.
- [10] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta Vulgaris*[J]. *Plant Physiology*, 1949, 24:1-15.
- [11] Nakano Y, Asada K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1987, 28:131-140.
- [12] Miyake C, Asada K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1992, 33:541-553.
- [13] Wan S Y, Jiao H J, Faust M. Changes in ascorbate, glutathione, and related enzyme activities during thidiazuron induced bud break of apple[J]. *Physiologia Plantarum*, 1991, 82:231-236.
- [14] 张 军, 束文圣. 植物对重金属镉的耐受机制[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(1):1-8.
ZHANG Jun, SHU Wen-sheng. Mechanisms of heavy metal cadmium tolerance in plants[J]. *Journal of Plant Physiology Molecular Biology*, 2006, 32(1):1-8.
- [15] Pätsikkä E, Kairavuo M, Seren F, et al. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by out competing iron and causing decrease in leaf chlorophyll [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129:1359-1367.
- [16] Schützendubel A, Polle A. Plant responses to abiotic stresses:heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization[J]. *Journal Experiment Botany*, 2002, 53:1351-1365.
- [17] 祝沛平, 李凤玉, 梁海曼. Cu 对植物器官分化的影响 [J]. 植物生理学通讯, 1999, 35:332-336.
ZHU Pei-ping, LI Feng-yu, LIANG Hai-man. Effect of copper on organ differentiation in plant[J]. *Plant Physiology Communications*, 1999, 35:332-336.
- [18] Shimazaki K, Sakaki T, Kondo N, et al. Active oxygen participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO₂ fumigated leaves of spinach[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1980, 21:1193-1204.