

张静, 常青晓, 孙传范, 等. 2011. HPLC 法测定镉、砷胁迫下水稻根系的植物螯合肽[J]. 环境科学学报, 31(7): 1550-1555
Zhang J, Chang Q X, Sun C F, et al. 2011. HPLC assay of phytochelatin in rice root under cadmium or arsenic stress [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 31(7): 1550-1555

HPLC 法测定镉、砷胁迫下水稻根系的植物螯合肽

张静^{1,2}, 常青晓¹, 孙传范³, 段桂兰², 赵全志^{1,*}

1. 河南农业大学水稻工程技术研究中心, 河南省粮食作物生理生态与遗传改良重点实验室, 郑州 450002
2. 中国科学院生态环境研究中心土壤环境室, 北京 100085
3. 中国农村技术开发中心, 北京 100045

收稿日期: 2010-09-21 修回日期: 2010-10-20 录用日期: 2010-11-01

摘要: 利用 monobromobimane 衍生试剂, 通过反相高效液相色谱-荧光检测体系对镉、砷胁迫下水稻根系内的植物螯合肽(PCs)等巯基化合物进行形态和含量的分析测定. 结果表明, 采用乙腈和 0.1% 三氟乙酸组成的二元梯度流动相, 可以将标准样品中的谷胱甘肽(GSH)和 PCs 等巯基化合物很好地分离. 利用上述方法, 能较好地分离 Cd、As 处理下溶液培养的水稻幼苗根系内的 PCs 形态. Cd 处理下, 根系内合成 PC2、PC3、PC4, 其中以 PC3 的含量最大. As 处理下, PCs 的形态除 PC2 和 PC3 外, 其它 PC_n 的形态有待进一步定性.

关键词: 植物螯合肽; 非蛋白巯基; 反相高效液相色谱; 柱前衍生; 水稻

文章编号: 0253-2468(2011)07-1550-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

HPLC assay of phytochelatin in rice root under cadmium or arsenic stress

ZHANG Jing^{1,2}, CHANG Qingxiao¹, SUN Chuanfan³, DUAN Guilan², ZHAO Quanzhi^{1,*}

1. Rice Engineering Research Center, Key Laboratory of Physiology Ecology and Genetic Improvement of Food Crops in Henan Province, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002
2. Department of Soil Environmental Sciences, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085
3. China Rural Technology Development Center, Beijing 100045

Received 21 September 2010; received in revised form 20 October 2010; accepted 1 November 2010

Abstract: Phytochelatin (PCs) and other thiol-containing compounds in rice roots exposed to cadmium (Cd) and arsenic (As) were analyzed by RP-HPLC separation and fluorescence detection with monobromobimane pre-column derivatization. The results showed that GSH and PCs in the mixed standard solutions and rice roots can be separated by using ACN-0.1% TFA binary gradient elution. PC2, PC3 and PC4 were found in the rice roots that were exposed to Cd, and the concentrations of PC3 were the highest. In response to As stress, PCs in rice roots were complicated. In addition to PC2 and PC3, there are other forms of PC_n that need further identification.

Keywords: phytochelatin; non-protein thiol; RP-HPLC; pre-column derivatization; rice

1 引言(Introduction)

植物螯合肽(phytochelatin, PCs)是一种富含半胱氨酸(cysteine, Cys)的多肽. 这类化合物的结构主要是(γ -Glu-Cys)_n-Gly($n=2\sim 11$), 在一些植物和有机体中还存在(γ -Glu-Cys)_n- β -Ala, (γ -Glu-Cys)_n-Ser, (γ -Glu-Cys)_n-Glu 等变型. 生物细胞内的 PCs 是由组成型表达的植物螯合肽合成酶(phytochelatin synthase, PCS)在经重金属或类金属诱导后以 GSH

为前体合成的富含巯基的一系列多肽. 将 AtPCS1 和 TaPCS1 基因在不能合成 PCs 的酿酒酵母中进行异源表达后, 增加了酵母对重金属的抗性, PCs 也在细胞内累积(Vatamaniuk *et al.*, 1999; Clemens *et al.*, 1999). 将 PCS 基因转入 PCS 缺失突变体后发现, 拟南芥(Gong *et al.*, 2003)对重金属镉的耐性显著提高. 因此, 存在于在酵母、植物和其它有机体中的 PCs 在重金属的解毒方面起着重要作用.

大多数重金属离子都可以诱导并激活 PCS 的

基金项目: 河南省高校科技创新团队支持计划项目(No. 2010IRTSTHN005)

Supported by the Program for the Innovation Team of Science and Technology in University of Henan(No. 2010IRTSTHN005)

作者简介: 张静(1980—), 女, 博士, E-mail: zhjing98@126.com; * 通讯作者(责任作者), E-mail: qzhaoh@126.com

Biography: ZHANG Jing (1980—), female, Ph. D., E-mail: zhjing98@126.com; * Corresponding author, E-mail: qzhaoh@126.com

表达和活性,但不同重金属的激活效果存在差异,其中 Cd 的诱导能力最强(Zenk, 1996)。在从 Cd 处理下提取的烟草的叶肉原生质中发现,几乎所有的 Cd 和 PCs 都位于液泡中(Vögeli-Lange & Wagner, 1990)。尽管 Zhao 等(2003)研究发现,在 As 超积累植物——蜈蚣草中只有 1%~3% 的 As 与 PCs 形成络合物,而在非砷超积累植物中与 PCs 结合的 As 占很大比例(Karimi *et al.*, 2009)。Pickering 等(2000)和 Dhankher 等(2002)对在非 As 超积累植物 *B. juncea* 和拟南芥的研究中发现根系和地上部中的 As 几乎 96%~100% 是与巯基结合的;向日葵和 *Thunbergia alata* 中分别有约 40% 和 55%~64% 的 As 与巯基结合形成了络合物。PCs 对重金属或类金属解毒机制就在于 PCs 和重金属络合物被转入液泡,使得部分重金属或类金属被区隔在液泡内,不仅减少了自由离子对细胞质的危害(Grill *et al.*, 1989; Cobbett, 2000a; 2000b),也在一定条件下降低了重金属如 As 由根系向地上部转运的数量(Liu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010);另一方面,很多金属离子也可以诱导激活 PCS 合成 PCs 来暂时结合过量的营养金属离子,如 Cu,因此,PCs 对细胞内的金属离子也起着一定的稳态作用(Cobbett & Goldsbrough, 2002)。

Li 等(2007)曾利用 RNAi 方法使水稻子粒中 OsPCS1 的表达量降低,发现子粒中的 Cd 含量也随之减少,证明了水稻中 PCS 的存在及 PCs 在 Cd 积累方面的作用。前人对于 PCs 在重金属方面的研究多集中于植物修复方向,如 Cd 超积累植物东南景田(孙琴等 2005),PCs 在中低污染农田的农作物如水稻重(类)金属污染控制方面研究较少,有关水稻中植物螯合肽与镉或砷的络合物具体形态及测定方法也鲜见报道。本研究利用 HPLC 测定了镉、砷胁迫下水稻根系中的 PCs,以期为进一步分析和评价水稻根系内 PCs 对 As 或 Cd 的积累和解毒作用等研究提供分析参考。

2 材料与方法(Materials and methods)

2.1 水稻植株的溶液培养

水稻种子经 10% H_2O_2 (质量分数) 的溶液浸泡 15 min 消毒,去离子水冲洗干净后,在 1.5 L 盛有干净珍珠岩的塑料花盆中发芽。18d 后,挑选长势一致的幼苗移至 PVC 罐(直径为 7.5 cm,高 14 cm),每罐一株苗。用 1/3 强度的营养液培养。营养液配方

(Hewitt, 1966; Liu *et al.*, 2004) 如下: $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4\text{NO}_3$, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{K}_2\text{SO}_4$, $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$, $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fe(II)-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_4$, $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。培养所用营养液每周换两次,并用 KOH 或 HCl 调 pH 至 5.5。水稻培养在每天 14 h 光照($260 \sim 350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$),相对湿度为 60%~70%,白天 28℃,夜晚 20℃ 的光照培养室内。移苗 2 周后,在水稻营养液中分别加入 Cd ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) 或 As ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$),并以未添加镉、砷的苗为对照,每个处理重复 3 次,每 3d 换 1 次营养液,幼苗处理 6d 后收获。

2.2 植物螯合肽及非蛋白巯基(Non-protein thiol, NPT)的提取与测定

2.2.1 植物组织中 PCs 等巯基化合物的提取 参照 Sneller 等(2000)的方法,将植物鲜样放于研钵中加入液氮磨碎后,冷冻干燥 72 h。称取约 0.1 g 冷干后的植物样,加入 10 mL 0.1% TFA (含 $6.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA) ($\text{pH} < 1$) 和少量石英砂,冰上充分研磨后离心 10000 g , 4°C , 离心 10 min,上清液过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜后,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。

2.2.2 标准品的配制 以 0.1% TFA (内含 $6.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA) 配置浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4 种巯基化合物储备液,分别为: PCn 和 Cd-PC 标准品(由 Meinhart H. Zenk 教授实验室提供)、Cys、GSH 4°C 保存。GSH 的储备液用 0.1% TFA (内含 $6.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA) 稀释成 $0 \sim 500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准系列,并在测定前和 Cys、PCn 及 Cd-PC 标准品一起进行柱前衍生化和巯基显色反应。

2.2.3 植物组织中非蛋白巯基(non-protein thiol, NPT)总量的测定 配置 $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTNB (Ellman 试剂) 显色剂(以内含 $6.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA 的 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPPS 缓冲液配置, $\text{pH} = 7.8$) 避光保存。取组织提取液 250 μL 加入 250 μL DTNB 显色剂,混合后 30°C 反应 2 min。NPT 与 DTNB 发生反应后生成黄色的化合物,其含量与 NPT 是 1:1 的关系,可以根据不同样品在 412 nm 下的吸光度值计算出样品中巯基含量(Gasic & Korban 2007)。

2.2.4 mBBr 衍生试剂的配制及其柱前衍生化反应

用 100% 乙腈准确配制 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ mBBr 衍生化试剂,振荡混匀后 4°C 避光保存,现配现用.柱前衍生化反应参照孙琴等(2005)和 Sneller 等(2000)的方法,即向 $250 \mu\text{L}$ 4 种巯基化合物标准液或植物组织上清液中加入 $450 \mu\text{L}$ $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HEPPS(内含 $6.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTPA, $\text{pH} = 8.2$) 和 $10 \mu\text{L}$ $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ mBBr,充分混匀 45°C 反应 30 min 后,加入 $300 \mu\text{L}$ $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MSA 漩涡震荡摇匀,终止反应,并同时作试剂空白衍生化反应.反应液 4°C 避光保存,直到 HPLC 分析测定.

2.2.5 色谱条件 分析仪器为 RP-HPLC (1200 Series, Agilent technologies), 柱子型号为: SB-C18 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $3.5 \mu\text{m}$, Agilent, USAWX1230), 参照孙琴等(2005)的分离方法和条件.

2.3 统计分析

试验数据采用 SPSS11.5 进行单因素方差分析和多重比较(Student-Newman-keuls 检验) ($p < 0.05$) 采用 SigmaPlot 9.0 软件作图.

3 结果(Results)

3.1 镉、砷胁迫对水稻根系非蛋白巯基含量的影响 从图 1 可以看出,在 Cd 或 As 的胁迫下,水稻根

系内(干重,下同)的 NPT 含量均显著高于对照.在相同浓度($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 Cd 和 As 胁迫下,根系产生的 NPT 含量存在显著差异,As 诱导产生的 NPT 含量显著高于 Cd 处理.

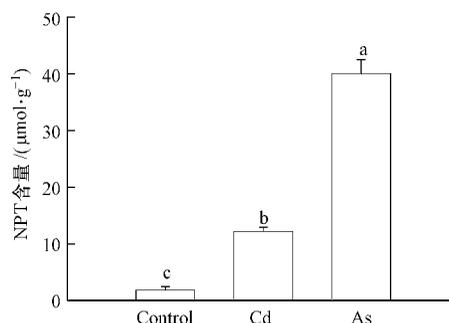


图 1 Cd、As 胁迫下 水稻根部诱导产生的 NPT 含量

Fig. 1 NPT concentrations in rice roots under Cd or As stress

3.2 PCs 混合标准样品的色谱分离

酸性介质提取的 PCs、GSH 等非蛋白巯基化合物与 mBBr 经 45°C 和 30 min 的衍生反应后,形成带强荧光的衍生物 mBSR. 在 ACN ~ 0.1% TFA 组合的流动体系中,浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合样品 PCs、Cd-PC 中的 GSH 和 PCs 等 4 种化合物的分离清晰,样品的分离顺序为 $\text{GSH} > \text{PC2} > \text{PC3} > \text{PC4}$ (见图 2).

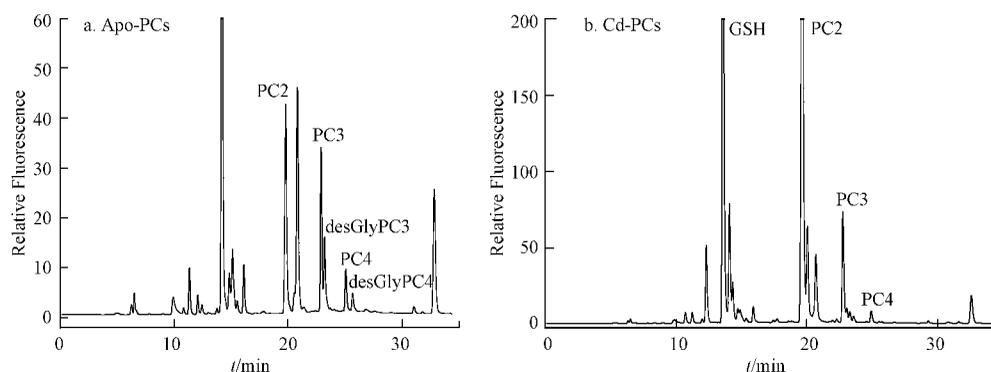


图 2 混合标准样品中 PCs 和 GSH 等化合物的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of phytochelatin and GSH compounds in mixed standard solution

3.3 镉、砷胁迫对水稻根系内 GSH 含量和 PCs 含量及形态的影响

由图 3 可见,在浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd 或 As 的外界环境胁迫下,水稻根系 GSH 含量与未加毒的对照相比没有显著差异.由于采用溶液培养,营养液中存在的 Zn、Cu 或 Fe 离子使得在未加 As 或 Cd 的空白对照中也检测到 PC2 的存在.通过对不同处

理的多重比较分析显示,加 As 处理中的 PC2 的含量显著高于加 Cd 和未加毒的对照.同等浓度的 Cd 与 As 处理中,水稻根系内 PC3 含量之间无显著差异;加 Cd 处理还诱导了 PC4 的产生.在 Cd 处理中,水稻根系诱导产生的 PC3 的量最大,PC2 和 PC4 的含量之间无显著差异;在 As 浓度处理下,水稻根细胞内产生的 PC2 和 PC3 含量之间无显著差异(图 3、

图 4), 并有一些未知峰.

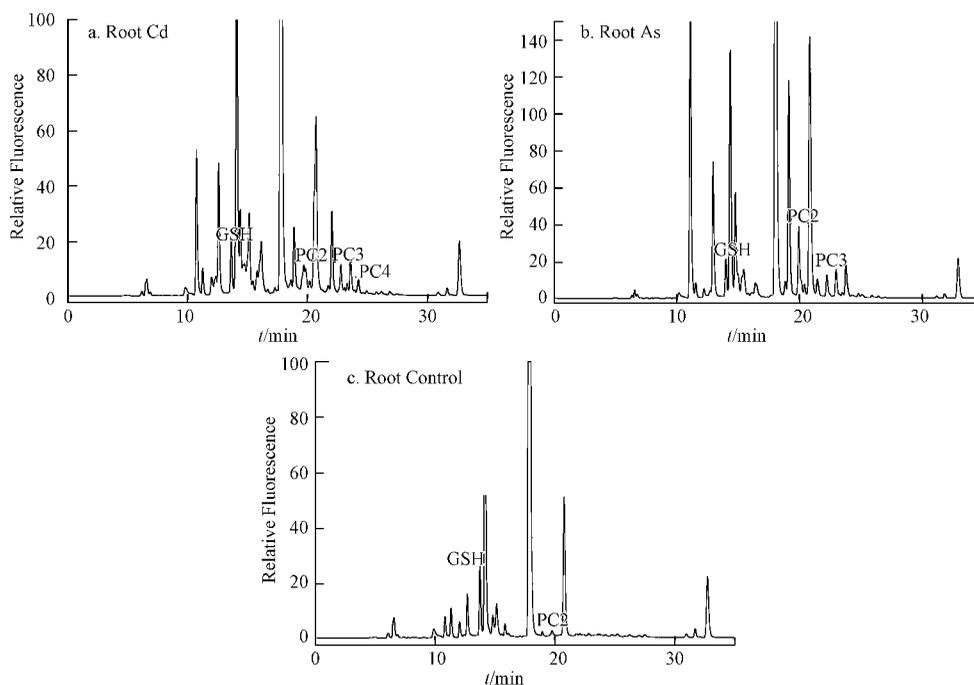


图 3 水稻根系中 GSH 和 PCs 等化合物的分离色谱图

Fig. 3 Chromatogram of phytochelatin and GSH compounds in the solution extracted from rice root

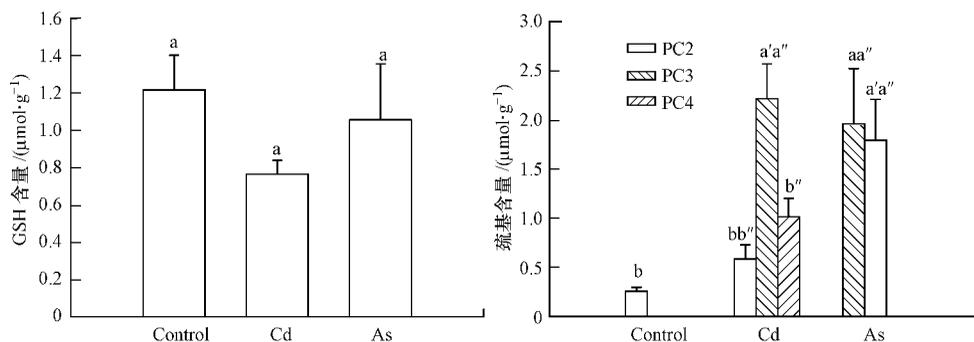


图 4 Cd、As 胁迫下, 水稻根系中 GSH 和 PCs 化合物的含量

Fig. 4 GSH and PCs concentrations in rice roots under Cd or As stress

4 讨论 (Discussion)

重金属 Cd 和类金属 As 都不是植物必需元素, 对生物有机体来讲, 即使有很低浓度的积累都是有害的. 在 Cd 胁迫条件下, 植物细胞内会合成以 PC2、PC3 和 PC4 为主的 PCs (Lima, 2006). 本试验也证实了这一结果, 发现在 Cd 处理后的水稻根系中 PCs 形态也是以 PC2、PC3 和 PC4 为主. 经 Cd 处理后白羽扇豆植株中检测到高水平的 PCs, 其中以 PC3 形态最多 (Vázquez, 2006; Lima, 2006). Stolt 等 (2003) 对小麦根系的 PCs 进行了定量分析, 并通过 PC-SH 和 Cd 的理论摩尔比为 2 或 4 计算发现根系

的 PCs 可以分别螯合 55% ~ 79% 或 27% ~ 40% 的 Cd. 玉米幼苗根系中由 PC 合成的 HMW 和 LMW 化合物则可以固定 84% ~ 88% 的 Cd (Rauser, 2003). 因此, 在 Cd 胁迫条件下检测到的水稻根系中的 PCs 也将影响到 Cd 在水稻中的积累和转运. 与 Cd 处理相比, 相同浓度的 As (V) 胁迫下水稻根系诱导产生的 PCs 在形态和含量上均存在差异. 已有的研究还发现不同形态的 As 诱导产生的 PCs 与 As 的络合物含量也略有不同: 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 As (III) 处理的植物中 39% 的 As 与 PCs 络合, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (V) 处理中与 PC 络合的 As 占 35% (Srivastava *et al.*, 2007), 而在超积累 As 的植物——蜈蚣草中, 与 PCs

结合的 As 只占体内总 As 量的 1~3% ,且以 PC2 为主 (Zhao *et al.* , 2003) . 本试验在 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As (V) 处理后的水稻根系中不仅检测到 PC2 和 PC3 的存在 ,与 PCs 标准样品比对后发现 ,As 胁迫诱导还产生了其他未知化合物峰. 因此 ,不同植物种类、不同 As 处理形态均能影响到细胞中 PCs 的形态和含量.

有关 PCs 的测定方法包括有分光光度计比色法、凝胶过滤法、液相色谱法和毛细管电泳法等. 其中以液相色谱法测定技术最成熟、应用也比较广 (赵迪等 2005) . 采用 mBBr 柱前衍生 ,通过反相高效液相色谱-荧光检测测定 PCs 的方法 ,具有简单、灵敏度高、重现性好、易于操作及较好的分离能力等特点 (孙琴等 2005) . 本试验结果表明 HPLC 法也可用来分离 Cd 胁迫下诱导水稻根系产生的 PCs 等巯基化合物 ,并能进行定量. 虽然 As 与非蛋白类巯基多肽形成的络合物比 Cd 复杂 ,但本试验条件可清晰的分离水稻中 As 诱导产生的 PCs 各形态; 同时随着 LC-ICP-MS 和 LC-ES-MS/ICP-MS 等方法对 As 和 PCs 结合物形态的分析鉴定日趋明确 (Bluemlein *et al.* , 2008; Liu *et al.* , 2010) ,未来如能获得适合的标准样品 ,利用 HPLC 法来分析测定 As 诱导产生的 PCs 不失为一个经济、简单、快速的方法.

5 结论 (Conclusions)

1) 反相高效液相色谱结合 mBBr 衍生柱后分析法可以分离和定量 Cd 处理后水稻根系内合成的 PCs 形态和含量.

2) 相同浓度 Cd 或 As 处理诱导产生的 PCs 的形态和含量在水稻根系中存在差异.

致谢:感谢 Ralf Kneer 博士和 Meinhart H. Zenk 教授提供的 PCs 标准品及在数据分析方面的帮助 ,同时也感谢张淑珍研究员和黄红林博士在分析测定过程中的支持和帮助.

责任作者简介:赵全志 男 ,博士 ,教授. 目前主要从事水稻生理生态学方面的研究工作. E-mail: qzhaoh@126.com.

参考文献 (References):

Bluemlein K , Raab A , Meharg A A , *et al.* 2008. Can we trust mass spectrometry for determination of arsenic peptides in plants: comparison of LC-ICP-MS and LC-ES-MS/ICP-MS with XANES/EXAFS in analysis of *Thunbergia alata*? [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 390: 1739-1751

Clemens S , Kim E J , Neumann D , *et al.* 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast [J]. *The EMBO Journal* , 18: 325-333

Cobbett C , Goldsbrough P. 2002. Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis [J]. *Annual Review of Plant Biology* , 53: 159-182

Cobbett C S. 2000a. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification [J]. *Plant Physiology* , 123: 825-832

Cobbett C S. 2000b. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification [J]. *Current Opinion in Plant Biology* , 3: 211-216

Dhankher O P , Li Y J , Rosen B P , *et al.* 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression [J]. *Nature Biotechnology* , 20: 1140-1145

Gasic K , Korban S S. 2007. Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn [J]. *Planta* , 225: 1277-1285

Gong J M , Lee D A , Schroeder J I. 2003. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and Cadmium in Arabidopsis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* , 100(17): 10118-10123

Grill E , Löffler S , Winnacker E L , *et al.* 1989. Phytochelatin, the heavy metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 86: 6838-6842

Hewitt E J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition (2nd ed) [M]. Technical Communication No. 22. Commonwealth Bureau of Horticulture and Plantation Crops. The Eastern Press.

Karimi N , Ghaderian S M , Raab A , *et al.* 2009. An arsenic-accumulating, hypertolerant brassica, *Isatis capadocia* [J]. *New Phytologist* 184: 41-47

Li J C , Guo J B , Xu W Z , *et al.* 2007. RNA Interference-mediated silencing of phytochelatin synthase gene reduce cadmium accumulation in rice seeds [J]. *Journal of Integrative Plant Biology* , 49(7): 1032-1037

Lima A I G , Pereira S I A , Figueira E , *et al.* 2006. Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth [J]. *Environmental and Experimental Botany* , 55: 149-162

Liu W J , Wood B A , Raab A *et al.* 2010. Complexation of arsenite with phytochelatin reduces arsenite efflux and translocation from roots to shoots in Arabidopsis [J]. *Plant Physiology* , 152: 2211-2221

Liu W J , Zhu Y G , Smith F A , *et al.* 2004. Do iron plaque and genotypes affect arsenate uptake and translocation by rice seedlings (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture? [J]. *Journal of Experimental Botany* , 55: 1703-1713

Pickering I J , Prince R C , George M J , *et al.* 2000. Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard [J]. *Plant Physiology* , 122: 1171-1177

- Rausser W E. 2003. Phytochelatin-based complexes bind various amounts of cadmium in maize seedlings depending on the time of exposure, the concentration of cadmium and the tissue [J]. *New Phytologist*, 158: 269-278
- Sneller F E C, Heerwaarden L M V, Koevoets P L M, *et al.* 2000. Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: Comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4014-4019
- Srivastava S, Mishra S, Tripathi R D, *et al.* 2007. Phytochelatins and antioxidant systems respond differentially during arsenite and arsenate stress in *Hydrilla verticillata* (L. f) Royle [J]. *Environmental Science and Technology*, 41: 2930-2936
- 孙琴, 叶志鸿, 王晓蓉, 等. 2005. 柱前衍生反相高效液相色谱法同时测定植物络合素(PCn)等巯基化合物[J]. *南京大学学报(自然科学)*, 41(3): 304-310
- Sun Q, Ye Z H, Wang X R *et al.* 2005. Analysis of phytochelatins and other thiol-containing compound by RP-HPLC with Monobromobimane pre-column derivatization [J]. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 41(3): 304-310 (in Chinese)
- Stolt J P, Sneller F E C, Bryngelsson T, *et al.* 2003. Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat [J]. *Environmental and Experimental Botany* 49: 21-28
- Vatamaniuk O K, Mari S, Lu Y P, *et al.* 1999. AtPCS1, a phytochelatin synthase from Arabidopsis: Isolation and in vitro reconstitution [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 7110-7115
- Vázquez S, Goldsbrough P, Carpena R O. 2006. Assessing the relative contributions of phytochelatins and the cell wall to cadmium resistance in white lupin [J]. *Physiologia Plantarum*, 128: 487-495
- Vögeli-Lange R, Wagner G J. 1990. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implication of a transport function for cadmium-binding peptides [J]. *Plant Physiology*, 92: 1086-1093
- Zhang J, Zhao Q Z, Duan G L, *et al.* 2010. Influence of sulphur on arsenic accumulation and metabolism in rice seedlings [J]. *Environmental and Experimental Botany*. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.05.007
- Zenk M H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants—a review [J]. *Gene*, 179: 21-30
- Zhao F J, Wang J R, Barker J H A, *et al.* 2003. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata* [J]. *New Phytologist*, 159: 403-410
- 赵迪, 夏立江, 朱永官. 2005. 植物络合素的测定方法 [J]. *生态学杂志*, 24(3): 330-334
- Zhao D, Xia L J, Zhu Y G. 2005. Analysis methods of phytochelatins [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 24(3): 330-334 (in Chinese)