

EDDS 对印度芥菜 Cu 积累的影响 及与 P-ATPase 的关系研究*

朱毅勇¹ 曾后清¹ 包勇¹ 郭凯¹ 宋静^{2†}

(1 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

(2 中国科学院南京土壤研究所土壤环境与污染修复重点实验室, 南京 210008)

摘要 通过水培的方法研究了可降解螯合剂 EDDS 对印度芥菜对 Cu 积累的影响, 分析了根系中与 Cu 主动排出有关的 P 型 ATPase 的活性及其基因表达。结果表明: 根系中 Cu 的积累量随外界浓度的升高而升高, 但 Cu 在茎秆与叶片中的积累量则变化不大。随着外加 EDDS 浓度的增加, 根、茎、叶中的 Cu 的积累量均出现下降的趋势。上述结果表明, 根系以 Cu 离子为主要的吸收形式, 而不是 EDDS-Cu。通过对印度芥菜根系细胞膜上 P 型 ATPase 活性及基因表达分析后发现, 不加 EDDS 时, 随着外界 Cu 浓度的升高, ATPase 活性增强, 而当 Cu 达到 $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ 时出现降低的趋势。但是, ATPase 活性随着外加 EDDS 的浓度增加而降低, 这是因为 EDDS 降低了外界的 Cu 活度。RT-PCR 分析结果表明, 该 ATPase 的基因 (*BjHMA*) 在转录水平上的表达与活性变化一致。由于 P 型 ATPase 的作用是将 Cu 排出细胞, 因此上述结果说明, 其活性大小以及转录水平的变化受到外界 Cu 离子活度的影响, 在一定的范围内可以调节植物对 Cu 的积累。

关键词 铜; EDDS; 质膜 ATP 酶; 印度芥菜; 离子活度

中图分类号 Q148; S154; X53 **文献标识码** A

土壤重金属污染是我国目前突出的环境问题之一, 不仅影响农产品品质和产量, 还可能通过食物链危害人类健康^[1]。植物修复技术是近十年来受到广泛关注的一种污染土壤生物修复技术^[2-5], 但是往往由于土壤重金属溶解度低或迁移能力差而影响了植物吸取修复的效率^[5]。近年来的一些研究表明, 通过向土壤中施加螯合剂, 如 EDTA、EDDS 等可提高植物对重金属的吸收与积累^[6-10]。相对于 EDTA 等螯合剂而言, EDDS 生物可降解性强, 对土壤微生物和植物的毒性较低, 被认为是环境友好的 EDTA 替代物而用于螯合诱导植物吸取修复研究中^[11-14]。但是在研究中发现, 尽管在土壤中施用 EDDS 可提高植物对重金属的吸收与积累, 但在水培条件下效果又大不相同^[15-19]。研究认为^[20-22], 在重金属污染严重的土壤中施用 EDTA 或 EDDS 后, 少量的 EDTA-和 EDDS-重金属螯合物可能通过植物皮层组织的凯氏带, 经质外体途径进入木质部, 在蒸腾作用下随水分运输至地上部分, 但是在正常情况下, 重金属离子本身无法通过凯氏

带, 只有经过共质体途径才能到达植物根系的木质部。而且, 重金属离子的吸收需要经过根系细胞膜上相应的重金属转运蛋白的作用, 动力学研究表明, 各种重金属的吸收均具有饱和性, 可见植物本身对重金属吸收具有一定的调控能力^[23-25]。大多数螯合诱导植物吸取修复研究主要关注的是植物地上部重金属的积累量, 而对螯合诱导植物修复过程中根系吸收或排出重金属的生理机制研究较少^[6-13, 15-21]。

金属冶炼是造成土壤重金属污染的重要原因之一, 铜是一种常见的重金属污染物^[26-28]。作为植物营养的必需元素, Cu 在一定浓度范围内对植物是有益的。但是超过一定的范围则对植物造成生理毒害^[29], 因此植物会通过一系列的生理机制对铜的吸收加以调控^[30]。最近在拟南芥的根系中确认了一个专一性运输铜离子的细胞膜转运蛋白 HMA5 (heavy metal ATPase), 即重金属转运蛋白 5, 这是一种 P 型 ATPase, 其通过水解 ATP 获得能量, 将 Cu 离子逆电势差排出细胞, 其在外界

* 国家自然科学基金青年科学基金项目 (40301046)、南京市留学人员科技活动项目资助

† 通讯作者, E-mail: jingsong@issas.ac.cn

作者简介: 朱毅勇 (1973—), 男, 博士, 主要研究领域为植物营养生理与分子生物学。Tel: 025-84396393

收稿日期: 2009-07-18; 收到修改稿日期: 2009-10-25

铜胁迫时增强表达,将过多的 Cu 泵出植物体外,从而降低细胞内 Cu 的积累^[31]。印度芥菜是一种用于研究植物对重金属吸收的模式作物,不仅生长迅速、生物量较大,并且对于重金属具有较高的耐性与富集能力,经常用于重金属污染土壤的植物修复^[6-7,15,20,32]。印度芥菜与拟南芥同属十字花科植物,在印度芥菜中也发现了类似的基因,并且其同源性与拟南芥中的 HMA5 高达 90% 以上^[32],因此本研究选用印度芥菜作为研究对象,在水培条件下比较了 EDDS 处理对印度芥菜吸收与积累 Cu 的差异,同时运用生理生化与分子生物学方法研究了根系中能主动排出 Cu 离子的 BjHMA (*Brassica juncea* heavy metal ATPase) 的生理活性与基因表达的变化,旨在探讨植物调控重金属 Cu 吸收的生理与分子机制,为合理利用螯合诱导植物吸收修复技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物培养与处理

将印度芥菜 (*Brassica juncea* L.) 种子消毒后置 24℃ 培养箱中催芽 3 d, 选取根长在 6~8 cm 的幼苗移栽至 1 L 的塑料烧杯中,用 1/4 Hoagland 营养液进行水培, pH 为 5.5。植物在温室中培养,每 3 d 更换一次营养液,从第 5 次起使用 1/2 Hoagland 营养液。水培 24~28 d 后,即幼苗长至八叶一心至九叶时进行处理。处理时将营养液重新更换,分别加入 2、4、8、12、16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CuSO_4 。另一组处理为:在每盆均加入 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CuSO_4 的基础上,分别加入 0、4、8、12、16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EDDS,营养液中的 Fe-EDTA 用 FeSO_4 代替。每 2 d 更换一次培养液,处理时间为 8 d。

1.2 样品采集与分析

处理结束后,一部分植物用去离子水冲洗干净,将根、茎、叶分开取样,105℃ 杀青 30 min,70℃ 烘干。样品磨碎后称取 0.25 g 用 HNO_3 - HClO_4 (85:15) 消煮,原子吸收光谱仪 (Varian FS) 检测 Cu 含量。

1.3 根系细胞膜分离

根系细胞膜分离方法参照 Yan 等^[33] 的方法。称取根系 5 g 左右,加入 4 倍体积 (w/v) 的研磨液 (含 50 mmol L^{-1} BTP-MES (pH 7.8)、2 mmol L^{-1} EGTA、0.5% (w/v) BSA、0.25 mmol L^{-1} KI、250 mmol L^{-1} 蔗糖、0.6% (w/v) PVP K-30、10% (v/v)

甘油、5 mmol L^{-1} 2-巯基乙醇、2 mmol L^{-1} DTT (二硫苏糖醇)、1 mmol L^{-1} PMSF (苯甲基磺酰氟)),冰浴中研磨,匀浆过滤后,11 500 g 离心 10 min,弃沉淀;上清液于 87 000 g 下离心 35 min,弃去上清液。用 6 ml 磷酸缓冲液 (含 5 mmol L^{-1} KH_2PO_4 (pH 7.8)、100 mmol L^{-1} KCl、250 mmol L^{-1} 蔗糖) 悬浮沉淀后,加入右旋糖苷 (Dextran T-500) 和聚乙二醇 (PEG 3350) 水溶液组成的两相分离系统 (含 6.1% (w/w) Dextran 和 PEG, 5 mmol L^{-1} KH_2PO_4 (pH 7.8)、100 mmol L^{-1} KCl、250 mmol L^{-1} 蔗糖)。4℃ 720 g 离心,每次离心后将分层后的上相转移至新的两相系统中,离心时间依次为 23、15、10、5 min,最后将上相中收集到的膜蛋白用磷酸缓冲液稀释 6 倍,151 200 g 下离心 40 min。将沉淀用 BTP 缓冲液 (含 5 mmol L^{-1} BTP/MES (pH 7.8)、250 mmol L^{-1} 蔗糖、3 mmol L^{-1} KCl) 溶解后再次于 151 200 g 下离心 40 min,收集到的膜蛋白用 1~2 ml BTP 缓冲液溶解后分装,液氮速冻,置于 -80℃ 中保存。所用离心机为 BECKMAN COULTER OptimumTM L-80 XP,转头为 SW32 Ti。

细胞膜蛋白质含量用 Bradford (G250) 比色法测定^[34]。细胞膜 ATPase 水解活性测定时,反应体系建立参照 Yan 等^[33] 的方法。由于植物细胞膜上最多的蛋白就是 ATPase,其专一性抑制剂为钒酸盐,因此在反应体系中加入钒酸盐后即可抑制其活性,通过测定受钒酸盐抑制的活性与总活性,并计算两种之间的比值,即可得出细胞膜的纯度^[33]。反应体系体积为 0.50 ml,含有 30 mmol L^{-1} BTP/MES 缓冲液 (pH 6.5)、5 mmol L^{-1} MgSO_4 、50 mmol L^{-1} KCl、50 mmol L^{-1} KNO_3 、1 mmol L^{-1} Na_2MoO_4 、1 mmol L^{-1} NaN_3 、0.02% (w/v) Brij 58、5 mmol L^{-1} Na_2 -ATP。同时根据植物样品的处理方式,分别在反应体系中加入 2、4、8、12、16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu, 或加入 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu^{2+} 不同浓度的 EDDS。反应开始时加入 30 μl 膜蛋白 (蛋白含量 1~2 μg),37℃ 下保温 30 min;然后加入中止液 2.5 ml,2 min 后再加入 0.5 ml 显色液,用波长 720 nm 进行比色测定。在相同的条件下,以测定煮沸 30 min 后失去活性的膜蛋白作为空白。ATPase 水解活性根据单位时间内每 mg 膜蛋白释放的磷含量减去空白值计算所得。

1.4 印度芥菜 P-ATPase 基因 (*BjHMA*) 表达分析

根系 RNA 用 Trizol (Invitrogen) 提取后直接进行反转录,得到 cDNA,反转录方法参照 TaKaRa 公司反转录酶说明书。以 18S RNA 作为内参基因,其引

物序列为 F: 5'-TGGGATATCCTGCCAGTAGTCAT-3'; R: 5'-CTGGATCCAATTACCAGACTCAA-3'。扩增 *BjHMA* 基因的引物, 参照 Andrés-Colás^[31] 报道 *HMA5* 基因所用, 引物序列为 F: 5'-GGCTATCAAAGCGTCTCCCTGG-3', R: 5'-CCTCCAATAGTC-TATCATAGC-3'。所有 PCR 反应体系均为 25 μl , 扩增 18S 的循环数为 22, 扩增 *BjHMA* 的循环数为 35。

2 结果与讨论

2.1 外界铜浓度对印度芥菜各组织中铜积累的影响

在采用不同铜浓度培养印度芥菜 8 d 后发现, 随着外界 Cu 浓度的提高, 印度芥菜根部的 Cu 含量也随之升高, 在外界 Cu 浓度与根部 Cu 含量之间存在着很好的线性相关 ($y = 981.19x + 895.9$, $R^2 = 0.978$) (图 1A)。茎杆中的铜含量在 4 ~ 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu 处理后较 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu 处理有一定提高, 但相互

之间差异不显著。但是当外界 Cu 达到 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时, 茎杆中的铜含量显著升高 (图 1B)。与此相对应的是, 叶片中铜含量在外界 Cu 浓度 2 ~ 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 范围内也均没有显著差异, 也仅在外界 Cu 浓度为 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时显著升高 (图 1C)。从不同组织中的铜含量来看, 根系 > 茎杆 > 叶片, 且根系中的铜含量是茎杆的 20 倍 ~ 30 倍, 是叶片的 30 倍 ~ 70 倍。这说明, 根系组织中大量的铜并未转移至地上部分。由于铜离子可被细胞壁所吸附^[22], 因此本试验中测定到的根部铜含量并不完全代表根系细胞中实际存在的铜含量。由根部的铜含量与外界浓度之间具有线性相关性来看, 很可能存在这种吸附作用。而地上部分铜含量不仅远低于根系, 且在一定的外界浓度范围内 (2 ~ 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu) 保持相对稳定。但是当外界铜浓度达到一个较高的水平时, 铜离子会对细胞膜造成伤害, 导致细胞膜透性增加^[30], 从而使大量的铜离子顺着浓度梯度进入根部, 并向地上部分转移。

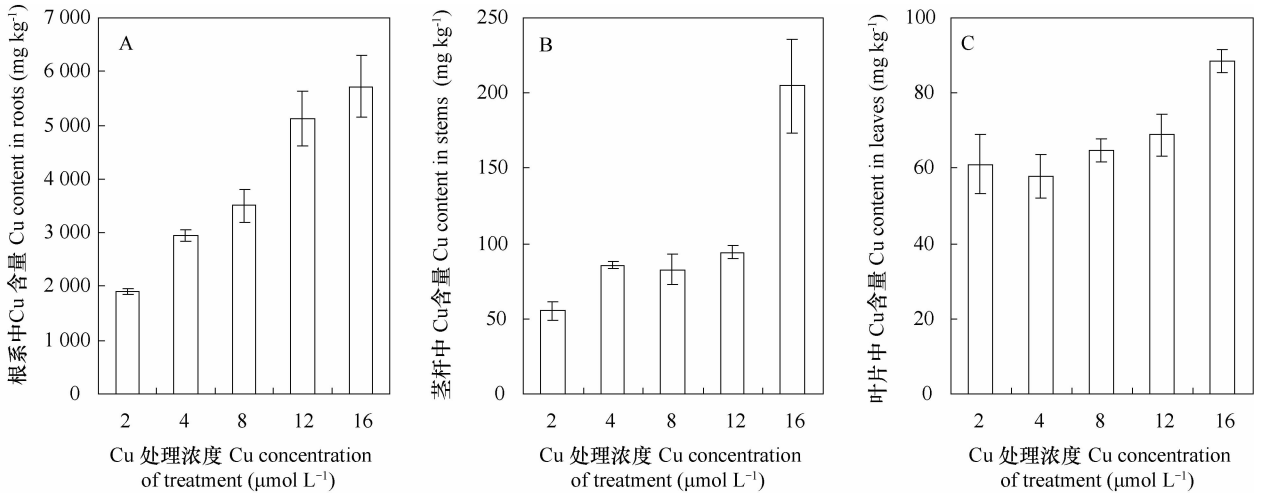


图 1 不同 Cu 浓度处理后印度芥菜各组织中 Cu 含量

Fig. 1 Cu content in various tissues of Indian mustard treated with different concentration of Cu

2.2 外加 EDDS 对印度芥菜各组织中铜积累的影响

EDDS 是一种生物可降解的螯合剂, 可以增加土壤中重金属的溶解度, 有利于植物对重金属的吸收。因此有研究认为, Cu 主要以配位复合体形式被植物根系吸收^[34]。在本试验中选取了 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu 来研究 EDDS 对铜吸收的影响。在

各处理中分别加入了相当于 Cu 浓度与 EDDS 浓度为 0.5/1、1/1、1.5/1 与 2/1 的 EDDS, 对应于 4、8、12、16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ EDDS。结果发现, 随着 EDDS 浓度的升高, 根系中的铜含量急骤降低 (图 2A), 被 EDDS 所螯合的这部分铜显然不易被根系所吸附。茎与叶中的铜含量随 EDDS 浓度的增加也有降低的趋势 (图 2B, 2C)。

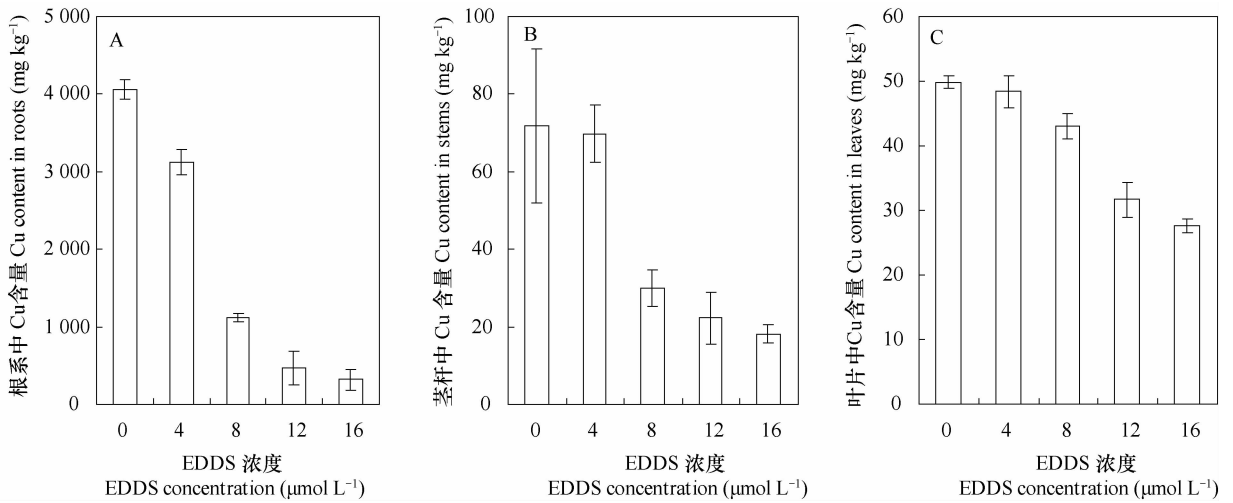


图 2 在 $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cu 的基础上,经不同浓度 EDDS 处理后印度芥菜各组织中 Cu 含量

Fig. 2 Cu content in various tissues of Indian mustard treated with different concentrations of EDDS in addition to $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cu

本研究进一步采用荷兰瓦赫宁根大学设计的形态分析软件 ECOSAT (ver. 4. 8) 对营养液中的 Cu 及 EDDS 的赋存形态进行了计算^[35]。从表 1 中可

以看出,随 EDDS/Cu 摩尔比的增加,营养液中自由铜离子(Cu^{2+})占总铜的比例急剧下降,当 EDDS/Cu 摩尔比 > 1 时,90% 以上的 Cu 是与 EDDS 结合的。

表 1 不同 EDDS/Cu 摩尔比处理溶液中 Cu 及 EDDS 的赋存形态估算

Table 1 Estimated percentage of Cu and EDDS-Cu in treatments different in molar ratio of EDDS/Cu

EDDS/Cu 摩尔比 Molar ratio of EDDS/Cu	Cu^{2+}/Cu (%)	Cu^{2+} 总活度 Total activity of Cu^{2+} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	EDDS-Cu/Cu (%)
0	89.7	7.176	0
0.5	45.1	3.608	48.7
1.0	4.8	0.384	92.9
1.5	0.3	0.024	97.7
2.0	0.0	0.001	98.0

将不同 EDDS 浓度处理下计算所得的 Cu^{2+} 活度与根系 Cu 含量作图后发现,两者之间存在着较好的线性相关(图 3)。这说明溶液中游离的 Cu^{2+} 活度越高,根系中积累的(主要是被细胞壁所吸附)铜就越多。大量研究表明,在重金属污染的土壤中,加入 EDDS 后可增加土壤中重金属的溶解度,并引起植物对 EDDS-重金属螯合态的吸收,从而达到修复被污染土壤的目的^[11-19]。但是在实践中也发现,这种吸收是在蒸腾作用下的被动吸收,在高浓度下,Cu 引起细胞膜脂过氧化、增加细胞膜的透性^[36],对植物本身的伤害很大,大多数植物在大量吸收 EDDS-重金属螯合物后发生萎蔫,甚至死亡^[21,31,36]。在这种情况下,植物对重金属及其螯合物的吸收已经失去了原有的调控功能。在低浓度下,植物体内铜的积累在 EDDS 增加后反而降低(图 2B,图 2C),这说明植物并没有被动地吸收 EDDS-Cu。

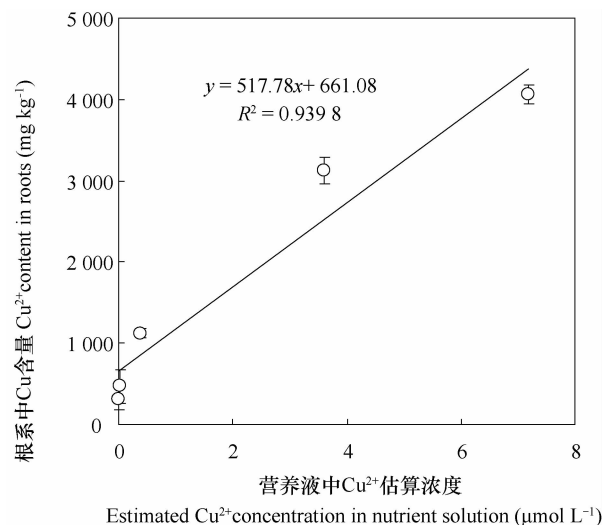


图 3 加入不同浓度的 EDDS 后 Cu^{2+} 活度与根系中 Cu 含量之间的关系

Fig. 3 Relationship between content of Cu in roots and Cu^{2+} activity in nutrient solution amended with different concentrations of EDDS

相反,由于细胞膜表面带负电,EDDS-Cu 反而不如带正电荷的 Cu^{2+} 易被吸附,这可能也是降低了根系对其吸收的一个重要原因。

2.3 P-ATPase 活性变化

为了研究植物对铜积累的调控机制,本试验分离了根系细胞膜,这种由葡聚糖两相系统组成的分离方法可以获得纯度在 90% 以上的细胞膜蛋白^[33]。通过测定细胞膜上 P-ATPase 的活性,发现随外界 Cu 浓度的升高 ATPase 活性也随之上调(图 4A),由于该 ATPase 与主动排出 Cu^{2+} 有关,因此其活性的上调,意味着根系排出的 Cu 可能会增加,从而在外界铜浓度升高时可以保持细胞内 Cu 含量的稳定。当外界铜浓度在 2 ~ 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时,印度芥

菜地上部分的铜含量基本上未发生显著变化(图 1B,图 1C),这很可能与该 ATPase 的作用有关。类似的结果也在拟南芥等植物中报道过^[31-32]。但是当外界铜浓度超出一定的范围后,很可能对细胞膜产生伤害^[31],在本试验中表现为 P-ATPase 活性在外界铜浓度达到 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时受到抑制而降低(图 4A),这可能导致了铜²⁺ 的主动排出受阻,因此造成植物体内铜含量急骤上升(图 1)。相反当外界不断升高的 EDDS 浓度整合了大量的铜离子之后,如图 4B 所示,细胞膜上该 ATPase 活性反而降低,这说明当外界游离态铜减少时,该酶活性能够下调以利于铜在细胞内的积累,因为铜本身也是植物的一种必需营养元素。

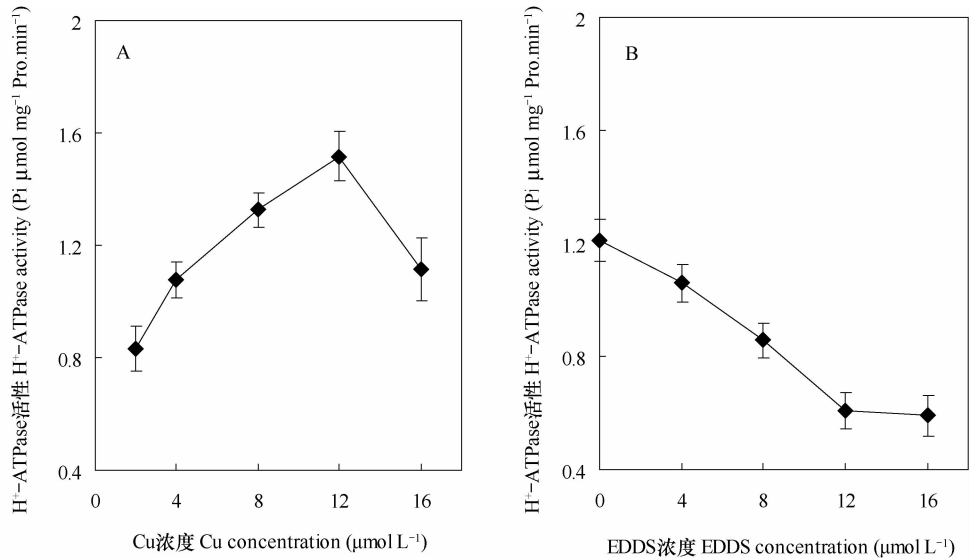


图 4 不同 Cu 浓度处理及不同浓度 EDDS(+8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu) 处理后印度芥菜根系细胞膜 ATPase 活性比较

Fig. 4 Comparison in plasma membrane ATPase activity of roots of Indian mustard between treatments of different concentrations of Cu and treatments of different concentrations of EDDS (+8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu)

2.4 P-ATPase 基因 *BjHMA* 在转录水平上的变化

由于十字花科植物中编码与 Cu 排出有关的 P-ATPase 的基因之间的同源性高达 90% 以上^[24,31-32], 因此直接参照拟南芥 *HMA5* 基因序列设计引物, 并通过 RT-PCR 在印度芥菜根系中扩增出相应的片段。结果表明(图 5), 随着外界铜浓度的升高, 其表达量也有所上升, 并且在铜浓度达到 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 时最强, 而在 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu 处理后有所降低。在 EDDS 处理后, 其在转录水平的变化也随着溶液中 EDDS 浓度的升高而减弱, 这些结果说明其在转录水平的变化与其活性变化是一致的(图 4), 很显然这个基因的表达水平受到外界铜离子活度的影响, 而与螯合态的 EDDS-Cu 关系不大。

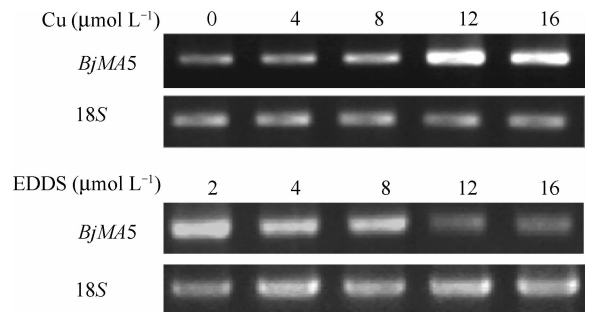


图 5 不同 Cu 浓度处理及不同浓度 EDDS(+8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu) 处理后印度芥菜根系 P-ATPase (*BjMA5*) 表达差异比较

Fig. 5 Expression of P-ATPase of Indian mustard (*BjMA5*) in roots in treatments different in concentrations of Cu and EDDS (+8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Cu)

3 结 论

水培试验表明,印度芥菜对铜的吸收主要是以离子的形式为主。在水培情况下,植物修复螯合剂在一定程度上降低了铜对植物的有效性。植物生理与分子生物学研究结果表明,铜离子的吸收与积累与根系细胞膜上负责铜离子排出的 P 型 ATPase 互相关联,该基因在转录水平与蛋白水平的变化在一定程度上可以控制植物体内铜含量的稳定。在采用植物修复技术时可以考虑采用转基因技术改造的超表达 P 型 ATPase 基因的植物以提高植物对铜的抗性。

参 考 文 献

- [1] Nriagu J O, Pacyna J M. Quantitative assessment of world-wide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 1988, 333: 134—139
- [2] Chaney R L, Malik M, Li Y M, et al. Phytoremediation of soil metals. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, 8: 278
- [3] Salt D E, Smith R D, Raskin I. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 643—668
- [4] Meagher R B. Phytoremediation of toxic elemental and Cu organic pollutants. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3: 153—162
- [5] McGrath S P, Zhao F J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14: 1—6
- [6] Vassil A D, Kapulnik Y, Raskin I, et al. The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiol*, 1998, 117: 447—453
- [7] Blaylock M J, Salt D E, Dushenkov S, et al. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil applied chelating agents. *Environ Sci Technol*, 1997, 31: 860—865
- [8] Cooper E M, Sims J T, Cunningham S D, et al. Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *J Environ Qual*, 1999, 28: 1 709—1 719
- [9] Kayser A, Wenger K, Keller A, et al. Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd and Cu from calcareous soil: The use of NTA and sulfur amendments. *Environ Sci Technol*, 2000, 34: 1 778—1 783
- [10] Song J, Luo Y M, Wu L H. Chelate enhanced phyto-remediation of heavy metal contaminated soil//van Briesen J M, Nowack B. *Biogeochemistry of chelating agents*. Washington DC: American Chemical Society, 2005
- [11] Jones P W, Williams D R. Chemical speciation used to assess [s, s/]-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS) as a readily-biodegradable replacement for EDTA in radiochemical decontamination formulations. *Applied Radiation and Isotopes*, 2001, 54: 587—593
- [12] Schowanek D, Feijtel T C J, Perkins C M, et al. Biodegradation of [S,S], [R,R] and mixed stereoisomers of ethylene diamine disuccinic acid (EDDS), a transition metal chelator. *Chemosphere*, 1997, 11: 2 375—2 391
- [13] Vandevivere P C, Saveyn H, Verstraete W, et al. Biodegradation of metal-[S, S]-EDDS complexes. *Environ Sci Technol*, 2001, 35: 1 765—1 770
- [14] Jaworska J S, Schowanek D, Feijtel T C J. Environmental risk assessment for trisodium[S,S]-ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent applications. *Chemosphere*, 1999, 15: 3 597—3 625
- [15] 宋静, 钟继承, 吴龙华, 等. EDTA 与 EDDS 螯合诱导印度芥菜吸取修复重金属复合污染土壤的研究. *土壤*, 2006, 38 (5): 619—625. Song J, Zhong J C, Wu L H, et al. Chelate-induced extraction and remediation of Brassica juncea on heavy metals mix-polluted soils by EDTA and EDDS (In Chinese). *Soils*, 2006, 38 (5): 619—625
- [16] Meers E, Ruttens A, Hopgood M J, et al. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere*, 2005, 58: 1 011—1 022
- [17] Luo C L, Shen Z G, Luo L Q, et al. EDDS and EDTA-enhanced phytoextraction of metals from artificially contaminated soil and residual effects of chelant compounds. *Chemosphere*, 2005, 59: 1—11
- [18] Tandy S, Schulin R, Nowack B. Uptake of metals during chelant-assisted phytoextraction with EDDS related to the solubilized metal concentration. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 2 753—2 758
- [19] 王国庆, 李敏, 骆永明, 等. 红麻对 Cu 和 Cu-EDDS 的吸收和富集. *土壤*. 2006, 38 (5): 626—631. Wang G Q, Li M, Luo Y M, et al. Plant uptake and accumulation of Cu and Cu-EDDS by kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) (In Chinese). *Soils*, 2006, 38 (5): 626—631
- [20] Epstein A L, Gussman C D, Blaylock M J, et al. EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant Soil*, 1999, 208: 87—94
- [21] Tandy S, Schulin R, Nowack B. The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemosphere*, 2006, 62: 1 454—1 463
- [22] Clarkson D T. Roots structure and sites of ion uptake// Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U. *Plant roots: The hidden half*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1996: 483—510
- [23] 田生科, 李廷轩, 杨肖娥, 等. 植物对铜的吸收运输及毒害机理研究进展. *土壤通报*. 2006, 37 (2): 387—394. Tian S K, Li T X, Yang X X, et al. Mechanisms of copper uptake, transportation and detoxification in Plants (In Chinese). *Chinese Journal of Soil Science*, 2006, 37 (2): 387—394
- [24] Sancenon V, Puig S, Mira H, et al. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 2003, 51: 577—587
- [25] Krämer U, Clemens S. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants//Tamás M J and Martinoia E. *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2005
- [26] Shuman L M. Chemical forms of micronutrients in soils// Mortv-

- edt J J, Cox F X, Shuman L M, et al. Micro-nutrients in Agriculture. 2nd ed. SSSA Book Series: 4. Madison, WI: Soil Science Society of America, 1991: 113—144
- [27] Moore J W, Ramamoorthy S. Heavy metals in natural waters-Allied monitoring and impact assessment. New York: Springer-Verlag, 1984
- [28] Freedman B, Hutchinson T C. Effects of smelter pollutants on forest leaf litter decomposition near a nickel-copper smelter at Sudbry, Ontario. *Can J Bot*, 2000, 58: 1 722—1 736
- [29] Marschner H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, 1995
- [30] Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 2001, 212: 475—486
- [31] Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, et al. The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J*, 2006, 45: 225—236
- [32] Muthukumar B, Yakubov B, Salt D E. Transcriptional activation and localization of expression of *Brassica juncea* putative metal transport protein BjMTP1. *BMC Plant Biology*, 2007, 7: 32
- [33] Yan F, Zhu Y, Müller C, et al. Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiology*, 2002, 129: 50—63
- [34] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248—254
- [35] Keizer M G, van Riemsdijk W H. ECOSAT: Technical report of the department of soil science and plant nutrition. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Agricultural University, 1994
- [36] Graham R D. Absorption of copper by plant roots//Loneragan J F, Robson A D, Graham R D. Copper in soils and plants. Sydney: Academic Press, 1981: 141—163

EFFECT OF EDDS ON THE ACCUMULATION OF Cu IN INDIAN MUSTARD AND ITS RELATIONSHIP WITH P-TYPE ATPase

Zhu Yiyong¹ Zeng Houqing¹ Bao Yong¹ Guo Kai¹ Song Jing^{2†}

(1 College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(2 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract Indian mustard (*Brassica juncea* L.) is a model of plant used to investigate accumulation of heavy metals. In this study, a hydroponics experiment was conducted to investigate accumulation of Cu by Indian mustard applied with EDDS, a biodegradable chelator for phytoremediation. Activity of P-type ATPase, a heavy metal ATPase (HMA) responsible for Cu export, and its transcriptional expression in roots was analyzed. Results showed that increased accumulation of Cu with elevated Cu concentration in the medium was only found in roots, but not in stems or leaves. The accumulation of Cu in roots, stems and leaves decreased with elevated EDDS concentration. The results indicated that the uptake of Cu, mainly in the form of ions rather than Cu-EDDS chelator complexes, was controlled by plasma membrane of roots, where P-type ATPase increased its activity with elevated Cu concentration, but decreased with elevated EDDS concentration. The expression pattern of P-type ATPase gene (*BjHMA*) varied similarly as its activity did. The above listed findings indicate that as P-type ATPase plays the role of actively exporting Cu out of root cells, it may regulate Cu accumulation by plants within a certain range of ambient Cu concentration.

Key words Cu; EDDS; P-type ATPase; Indian mustard (*Brassica juncea* L.)