

紫鸭跖草细胞中铜的分配和化学形态特征研究

黄长干^{1,2}, 付凌, 梁英, 魏国清, 邱业先³

(1. 江西农业大学, 江西南昌330045; 2. 湖南农业大学, 湖南长沙460128; 3. 苏州科技大学, 江苏苏州215011)

摘要 [目的] 为从Cu在组织细胞中的分配特征和结合形态的角度揭示紫鸭跖草超积累Cu的机理。[方法] 利用差速离心技术研究Cu在紫鸭跖草中的亚细胞分配特征,并运用化学试剂顺序提取法和酶解法研究Cu在紫鸭跖草根和叶中的赋存形态。[结果] 根部Cu的分布位点主要是细胞壁,占根部全Cu的1/3以上;而叶部以叶绿体中的Cu占叶片全Cu的比例较大,约为1/4。在高浓度Cu处理或处理时间延长的情况下,根细胞中Cu向细胞壁的分配增多,向质体中的分配减少;而叶细胞中Cu向叶绿体中的分配增多,向细胞壁的分配减少。叶片中Cu主要与氨基酸、小分子色素、蛋白质、多糖等结合;而根部Cu主要与纤维素、膜结合蛋白等细胞壁物质结合。[结论] Cu在细胞内的分配和存在形态可能是紫鸭跖草超积累Cu的重要机理之一。

关键词 铜;紫鸭跖草;分配;形态

中图分类号 S312 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)33-14499-04

Study on Distribution and Chemical Characteristics of Copper in Cells of *Setcreasea purpurea* Boom.

HUANG Chang-gan et al (Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045)

Abstract [Objective] The aim of this study was to reveal the mechanism of copper hyper-accumulator in *Setcreasea purpurea* Boom. from the angle of distribution characteristics and binding form of copper in tissue cells. [Method] The subcellular distribution characteristics of copper in *S. purpurea* was studied by the technique of differential centrifugation, and the binding form of copper in roots and leaves of *S. purpurea* was also investigated by the sequential chemical extraction method and the enzymolysis method. [Result] copper in roots mainly distributed in the cell wall which was accounting for one third of the total copper in roots, while copper in leaves mainly distributed in the chloroplast which was accounting for a quarter to the total copper in leaves. Under the high concentration of copper or the extended treatment duration, the translocation of copper in root cells into the cell wall increased but the translocation of copper in root cells into the plastid decreased, while the translocation of copper in leaf cells into the chloroplast increased but the translocation of copper in leaf cells into the cell wall decreased. copper in leaves was mainly combined with amino acid, small molecular polymeric pigments, protein and polysaccharide, while copper in roots was mainly combined with cell wall substances such as cellulose and membrane-bound protein. [Conclusion] The distribution characteristics and binding form of copper in cells is possibly one of the dominant mechanisms for copper hyper-accumulator in *S. purpurea*.

Key words Copper; *Setcreasea purpurea* Boom.; Distribution; Form

植物正常的生长发育取决于维持细胞内的必需元素浓度处于缺乏和中毒水平之间以及使非必需元素浓度低于中毒水平的能力。超积累植物中重金属元素的分布总是尽量避免损伤功能相对重要的组织、细胞和细胞器,从而表现出选择性的分配^[1]。杨居荣等用差速离心法研究表明,重金属Cd和Pb主要分布在植物的细胞壁和液泡中^[2]。N超积累植物庭荠属植物 *Alyssum serpyllifolium* 细胞中可溶性N主要分布在液泡。在非致死的N供应水平下,N超积累的遏蓝菜属植物 *Thlaspi goesingense* 比非超积累的 *Thlaspi arvense* L. (荥葵遏蓝菜)液泡中N浓度高2倍以上^[3]。采用X射线衍射技术研究发现,天蓝遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens*)叶片表皮细胞和亚表皮细胞液泡中的Zn占总Zn的80%^[4]。除液泡外,其他细胞器如白色体和核糖体等均可作为重金属离子沉积部位^[5]。

Cu作为植物生长的必需元素,可以解离状态被吸收,且可由根细胞分泌进入疏导组织的浆液中进行迁移^[6]。研究表明,在植物体内,低分子量的有机络合态Cu占有重要地位,其配位基可以是氨基酸或其他有机酸,且往往可溶于乙醇或水。王友保等的研究结果显示,以醋酸和盐酸提取时,难溶于水的磷酸盐或草酸盐及残渣等活性较低的Cu是结缕草和三叶草中Cu的主要存在形式^[7]。

紫鸭跖草(*Setcreasea purpurea* Boom.)对Cu有很高的耐性,可用于Cu污染土壤的生态修复,但目前对其耐铜机制的研究鲜有报道。该试验利用差速离心技术研究Cu在紫鸭跖草中的亚细胞分配,并运用化学试剂顺序提取法和酶解法研究Cu在紫鸭跖草根和叶中的赋存形态,试图从Cu在组织细胞中的分配特征和结合形态的角度揭示紫鸭跖草超积累Cu的机理。

1 材料与方法

1.1 植物培养 从苗圃园里截剪紫鸭跖草枝条,洗净,在自来水中培养1周后转至Hoagland溶液中培养1周,此时已有1cm左右的新根长出。随机分成8组,第1组为对照组(营养液组),CuSO₄浓度为0.25 μmol/L,第2~8组于1 μmol/L CuSO₄的营养液中培育3d后把3~8组转移到10 μmol/L CuSO₄的营养液中,3d后再把4~8组转移到50 μmol/L CuSO₄的营养液中培养3d,依此类推,直到第8组的CuSO₄浓度达到1000 μmol/L,然后维持不同的CuSO₄浓度梯度(分别为0.25、1、10、50、100、250、500、1000 μmol/L)。在培育30、60d时,对对照组(0.25 μmol/L)和最高浓度组(1000 μmol/L)进行取样分析^[8]。

根系以5 μmol/L冷Pb(NO₃)₂溶液通气解吸15min,以除去根表吸附的Cu,随后以蒸馏水漂洗3次(各5min),以无灰吸水纸吸干。分离叶片和根,一部分直接烘干测定Cu含量,其余鲜样按下述方法分析。所有数据为3次重复试验的平均值。

1.2 测定项目和分析方法

1.2.1 Cu在紫鸭跖草根和叶片中的亚细胞分配。采用分级

基金项目 国家自然科学基金(30760021);江西省自然科学基金(0530016);江西省教育厅资助项目(赣教技字[2007]151号)。

作者简介 黄长干(1964-),男,江西九江人,博士,副教授,从事有机化学、植物生物化学的教学与研究。

收稿日期 2008-09-30

离心法分离不同细胞组分。具体方法如下:新鲜叶片 2 g 加入 10 ml 2 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4, 含 2.5% 抗坏血酸), 迅速研磨, 得匀浆液, 经过滤离心(J2-HS, BECKMAN) 等程序分离各细胞组分。每次离心前补充缓冲液至同一体积, 所有离心操作均在 4℃ 下完成。所得各组分均测量鲜重, 真空冷冻干燥后称重, 干灰化后 ICP-AES^[9] 测定 Cu 含量。

1.2.2 Cu 的化学形态(结合形态)分析。采用 Morrison 等^[10] 和 Iwasaki 等^[11] 的方法修改后进行。叶片中 Cu 的化学形态分析。2 g 叶片加入 10 ml 95% 乙醇研磨, 得匀浆液, 后者依次采用水、乙醇、HCl、HClO₄、NaOH 等提取剂逐级提取分离含 Cu 的不同成分, 各溶剂提取时均采用 25℃ 恒温振荡 6 h 后离心分离的方法。根组织中 Cu 的化学形态分析。采用不同提取剂逐级提取分离含 Cu 的不同成分。5 g 根组织以 20 ml 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4, 含 2.5% 抗坏血酸), 充分匀浆后 5 000 r/min 离心, 所得沉淀留待后面提取。上清液中加入 100 ml 丙酮使可溶性蛋白沉淀, 再次离心, 取上清液冷冻干燥浓缩至 20 ml, 得丙酮可溶性组分 D1; 沉淀用 1:1 (V/V) 乙醇乙醚洗涤, 真空干燥, 得组分 D2; 第 1 次离心所得沉淀用 20 ml 1% SDS(含 6 mol/L 脲)沸水浴中消化 15 min, 冷却后 3 500 r/min 离心, 取上清液, 为含结合蛋白质的组分 D3; 沉淀依次用蒸馏水和 1:1 (V/V) 乙醇乙醚洗涤, 真空冷冻干燥得含细胞壁的组分 D4。所得 D4 再用 10% 纤维素酶或离析酶(Cellulase or Macerozyme, Sigma Co.) 30℃ 水解 24 h, 缓冲液为 5 ml 0.2 mol/L 醋酸钠(pH 5.5), 同时作空白(不含酶液水解)。另用 5 ml 0.01 mol/L HCl 提取组分 D4, 酶水解或 HCl 提取后均离心, 测定上清液和沉淀中的 Cu 含量。

2 结果与讨论

2.1 Cu 在紫鸭跖草中的亚细胞分配 重金属离子在细胞内的区域化是植物内部解毒的重要途径之一, 可大幅度减轻或避免重金属离子对功能性结构单位的损伤和代谢过程的干扰^[12]。Cu 在紫鸭跖草叶片细胞中的分配情况见表 1。

表 1 Cu²⁺ 在紫鸭跖草叶片中的亚细胞分配

Table 1 Subcellular distribution of Cu²⁺ in leaves of *Setcreasea purpurea* Boom

组分 Component	细胞器 Organelle	Cu ²⁺ 处理浓度 $\mu\text{mol/L}$ Cu ²⁺ treatment concentration			
		0.25		1 000	
		30 d	60 d	30 d	60 d
A1	细胞壁 Cell wall	22.5 (26.5)	34.0 (31.2)	135.0 (14.0)	143.0 (13.0)
A2	叶绿体 Chloroplast	20.0 (23.5)	23.0 (21.1)	232.0 (24.0)	275.0 (25.0)
A3	细胞核 Cell nuclear	7.5 (8.9)	11.0 (10.1)	48.0 (5.0)	48.0 (4.4)
A4	线粒体 Mitochondrial	10.0 (11.8)	10.0 (9.2)	39.0 (4.0)	35.0 (3.2)
A5	核糖体 Ribosome	7.0 (8.2)	7.0 (6.4)	77.0 (8.0)	85.0 (7.7)
A6	细胞基质 Cell matrix	18.0 (21.2)	24.0 (22.0)	434.0 (45.0)	517.0 (47.0)
总 Cu ²⁺ 回收率	ng/kg DW Total Cu ²⁺ % Recovery rate	85.0	109.0	965.0	1 100.0
		89.0	90.0	88.0	92.0

注: 括号外的数据为绝对浓度 (ng/kg DW), 括号内的数据为分配率 (%), 下同。

Note: Data outside the brackets were absolute concentration (ng/kg DW) and the data in the brackets were distribution rate (%). The same as follows.

紫鸭跖草根细胞中 Cu 的分配情况见表 2。Cu 处理水平和处理时间对其在各细胞器中的绝对浓度和分配率的影响模式与叶片中比较有所不同。首先表现在 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Cu 培养时, 根细胞中核糖体内 Cu 的分配率最高, 其次是细胞壁和质体; 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu 培养时, 细胞壁中和可溶性 Cu 的分配率最高, 各占总 Cu 量的 1/3 以上, 而核糖体中 Cu 的分配率

0.25 $\mu\text{mol/L}$ Cu 处理时, Cu 的绝对浓度在线粒体和核糖体中保持不变, 其余细胞组分中的 Cu 绝对浓度均为 60 d > 30 d。1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu 处理时, 细胞核中 Cu 绝对浓度几乎不变, 线粒体中 Cu 绝对浓度略有减少, 其余各细胞器 Cu 的绝对浓度均为 60 d > 30 d。然而, Cu 在各细胞组分中的分配率显示: 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Cu 处理时, Cu 在叶绿体、线粒体和核糖体中的分配率均表现为 60 d < 30 d; 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu 处理时, Cu 在各细胞器中的分配率随处理时间的延长变化很小, 其中细胞壁、细胞核、线粒体中 Cu 分配率随时间延长略有降低, 但叶绿体中 Cu 的分配率随时间延长略有升高。从 Cu 处理浓度对各细胞器中 Cu 分配的影响看, 绝对浓度均是 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu 处理时高于 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Cu 处理时; 但 Cu 的分配率在细胞壁、细胞核、线粒体、核糖体中呈下降趋势, 而叶绿体中的 Cu 分配率却呈上升趋势。细胞核、线粒体、核糖体和叶绿体这 4 个细胞器是细胞中最核心的细胞器, 承担着细胞生命活动的主要功能。叶绿体中 Cu 分配率的上升, 可能导致叶绿素中的 Mg²⁺ 部分被 Cu²⁺ 取代而失绿, 这与前期研究结果得到了相互印证, 即茎和叶中的 Mg²⁺ 浓度在 500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu 处理时比对照组(0.25 $\mu\text{mol/L}$ Cu) 要低 30% 左右, 也就是说 Cu 盐胁迫阻碍了 Mg²⁺ 向地上部分的运输^[8]。Cu 与细胞器包膜上的 -SH 等配位基团具有强烈的亲和力, 在适量浓度时, 具有维持细胞器结构稳定的功能, 但在过量时则破坏膜结构的完整性^[13]。在高 Cu 处理时, Cu 在这些细胞器中的分配率下降可能是一种适应性保护机制, 以维持它们的正常功能。同一处理条件下(相同 Cu 浓度和处理时间), Cu 主要分配在细胞壁、叶绿体和细胞基质的可溶性成分中。在 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Cu 处理时以细胞壁中 Cu 分配率最高, 其次是叶绿体; 而 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu 处理时, 叶绿体中的 Cu 分配率最高, 细胞壁中 Cu 分配率次之。因此叶绿体是叶片中 Cu 的主要分配位点^[14]。高 Cu 处理时细胞核、线粒体和核糖体均维持在较低的铜水平, 说明所受毒害较小。

大幅度下降。根细胞壁具有大量的阳离子配位基团, 是重金属的重要停留部位, 也是 Cu 分布的重要部位^[15]。有报道认为根系中 1/2 以上的 Cu 结合在细胞壁上^[11]。该试验结果也证实了这一点。质体是叶绿体的前体, 在根中主要作为储藏细胞器, 在功能上的重要性不能与叶绿体相提并论^[16-17], 故 Cu 的分配率明显下降。无论是低铜还是高铜培养, 根细胞核

中Cu的分配率始终维持在同一水平;细胞基质中可溶性Cu成分大幅增加可能与某些低分子量Cu的配位体合成增加有关^[18]。

表2 Cu²⁺在紫鸭跖草根中的亚细胞分配Table 2 Subcellular distribution of Cu²⁺ in the roots of *Setcreasea purpurea* Boom.

组分 Component	细胞器 Organelle	Cu ²⁺ 处理浓度 $\mu\text{mol/L}$ Cu ²⁺ treatment concentration			
		0.25		1 000	
		30 d	60 d	30 d	60 d
B1	细胞壁	17.0(16.2)	17.0(15.2)	345.0(34.0)	381.0(35.0)
B2	质体	14.0(13.3)	13.0(11.4)	142.0(14.0)	138.0(12.7)
B3	细胞核	6.0(5.8)	8.0(7.0)	66.0(6.5)	72.0(6.6)
B4	线粒体	9.0(8.6)	11.0(9.6)	41.0(4.0)	44.0(4.0)
B5	核糖体	21.0(20.0)	22.0(19.3)	35.0(3.5)	34.0(3.1)
B6	细胞基质	38.0(36.5)	43.0(37.7)	385.0(38.0)	415.0(38.1)
总Cu ²⁺ 回收率	ng/kg DW/t/d % Recovery rate	105.0 89.0	114.0 88.0	1014.0 89.0	1089.0 90.0

2.2 Cu在紫鸭跖草中的化学形态 采用不同浸提剂顺序性提取紫鸭跖草中不同成分可以判断Cu的化学形态(结合形态),叶片中的Cu形态如表3所示。无论是高铜还是低铜供应时,30和60d处理各相应组分间绝对浓度和分配率没有明显差异。0.25 $\mu\text{mol/L}$ Cu供应时,与蛋白质、多糖结合的Cu超过40%,60d处理时高达46.7%,这些Cu结合蛋白一部分是Cu的运输蛋白,另一部分则是与Cu结合的酶蛋白如超氧化物歧化酶(SOD)和多酚氧化酶(PPO)等^[19];与细胞壁上惰性物质结合的Cu以及与纤维素、木质素结合的Cu总计约占总Cu的1/3,其余各组分均不足10%。随着Cu供应量的

增加及供应时间的延长,与小分子色素和氨基酸结合的Cu显著增加,达到了30%左右。色素分子和氨基酸分子均能与Cu螯合,这是紫鸭跖草解除铜毒而具有耐铜性的机制之一。另外,与酸溶性极性化合物类、蛋白质/果胶类以及细胞壁上惰性物质结合的Cu均超过10%,与水溶性极性化合物类、纤维素/木质素类、蛋白质/多糖类以及核酸类物质结合的Cu均低于10%,其中与核酸类物质结合的Cu量最低,只有3%。这再一次证明Cu的积累并没有危害到紫鸭跖草的细胞核和遗传功能。总体而言,随着叶片中Cu浓度的提高,Cu与氨基酸、小分子色素、蛋白质、果胶等物质的结合量提高。

表3 Cu²⁺在紫鸭跖草叶片中的化学形态Table 3 Chemical form of Cu²⁺ in leaves of *Setcreasea purpurea* Boom.

组分 Component	化学形态 Chemical form	Cu ²⁺ 处理浓度 $\mu\text{mol/L}$ Cu ²⁺ treatment concentration			
		0.25		1 000	
		30 d	60 d	30 d	60 d
C1	小分子色素和氨基酸	4.3(5.0)	5.3(4.8)	276.0(29.0)	346.0(32.0)
C2	水溶性极性化合物类	4.5(5.3)	5.9(5.4)	86.0(9.1)	85.0(7.9)
C3	酸溶性极性化合物类	6.0(7.0)	7.9(7.2)	143.0(15.1)	151.0(14.0)
C4	蛋白质、果胶类	2.6(3.0)	3.3(3.0)	124.0(13.0)	138.0(12.8)
C5	纤维素、木质素类	12.0(14.1)	17.1(15.5)	71.0(7.5)	84.0(7.8)
C6	核酸类	4.3(5.0)	5.2(4.7)	29.0(3.0)	27.0(2.5)
C7	蛋白质、多糖类	35.7(41.9)	51.4(46.7)	90.0(9.5)	102.0(9.4)
C8	细胞壁上惰性物质	15.7(18.4)	15.2(13.8)	133.0(14.0)	146.0(13.5)
总Cu ²⁺ 回收率	ng/kg DW/t/d % Recovery rate	85.1 89.5	110.0 92.0	950.0 86.0	1080.0 90.0

表4 Cu²⁺在紫鸭跖草根中的化学形态Table 4 Chemical form of Cu²⁺ in roots of *Setcreasea purpurea* Boom. under the treatment of 1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu²⁺

组分 Component	化学形态 Chemical form	Cu ²⁺ 处理浓度 $\mu\text{mol/L}$ Cu ²⁺ treatment concentration			
		0.25		1 000	
		30 d	60 d	30 d	60 d
D1	丙酮和缓冲液可溶性组分Cu	37(36)	44(38)	163(16)	174(16)
D2	丙酮不可溶缓冲液可溶组分Cu	33(32)	38(33)	184(18)	164(15)
D3	细胞壁结合蛋白和膜结合蛋白Cu	15(14)	14(12)	275(27)	305(28)
D4	细胞壁结合Cu	19(18)	19(17)	398(39)	447(41)
总Cu ²⁺ 回收率	ng/kg DW/t/d % Recovery rate	104 88	115 89	1 020 88	1 090 89

在该试验提取条件下,Cu在根组织中的化学形态可区分为4个组分(表4)。在0.25和1 000 $\mu\text{mol/L}$ Cu供应时,30、60d处理各相应组分中Cu的分配率没有明显差异。0.25

$\mu\text{mol/L}$ Cu供应时,丙酮和缓冲液均可溶性组分Cu以及丙酮不可溶而缓冲液可溶组分Cu(D1和D2)占绝对优势,接近70%,其余30%为蛋白结合Cu和细胞壁结合Cu。与0.25

$\mu\text{mol/L}$ Cu 处理相反,在 $1\ 000\ \mu\text{mol/L}$ Cu 供应时,细胞壁结合态 Cu 分配率(D4)最高,其次是蛋白结合态 Cu(D3),二者合计达65%。因此,Cu 浓度对各组分 Cu 分配率的影响情况是:高铜培养使丙酮和缓冲液可溶态 Cu(D1)、丙酮不可溶而缓冲液可溶态 Cu(D2)分配率降低,而细胞壁结合态 Cu(D4)和蛋白质结合态 Cu(D3)分配率增加。

对细胞壁结合态 Cu 做进一步分析发现,60%左右的 Cu 是与纤维素或果胶等相结合的,能够被纤维素酶或离析酶所

溶解(表5)。用 $0.05\ \text{mol/L}$ HCl 水解后,80%~90%的 Cu 被从细胞壁上溶解下来,高于用酶解离的 Cu,这与 HCl 的浸提能力较强有关,这部分 Cu 的差额可能也是与纤维素等细胞壁物质结合的。组分 D3 主要是细胞壁结合蛋白或膜结合蛋白,由于提取程序的缘故,这部分所含有的 Cu 也可能包含少量本属于组分 D4 的 Cu,即 Cu 在组分 D4 中的分配率实际上高于表4中所示的39%和41%。

表5 $1\ 000\ \mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 处理下紫鸭跖草根细胞壁不同组分中 Cu^{2+} 含量

Table 5 Cu^{2+} content in different components of the cell wall of roots in *Setcreasea purpurea* Boom under the treatment of $1\ 000\ \mu\text{mol/L}$ Cu^{2+}

提取剂 Extraction agent	处理时间 d Treatment time	Cu^{2+} 含量 Cu^{2+} content		回收率 % Recovery rate
		可溶性成分 Soluble component	不可溶性成分 Insoluble component	
纤维素酶 Cellulase	30	261(63)	146(37)	92
	60	278(62)	170(38)	99
离析酶 Micerzyme	30	226(58)	164(42)	95
	60	267(59)	185(41)	98
空白 Blank	30	44(11)	354(89)	97
	60	40(9)	410(91)	99
HCl	30	353(88)	48(12)	97
	60	380(85)	67(15)	101

3 结论

研究结果表明,在叶片和根系中,细胞壁均是 Cu 在紫鸭跖草中分布的主要位点之一。叶绿体是重要的功能细胞器,其所含 Cu 占叶片全 Cu 的比例较大,是叶片中除细胞壁外的另一重要 Cu 分布位点。在高铜处理或处理时间延长的情况下,根细胞中 Cu 向细胞壁的分配增加,向质体中的分配减少,而叶细胞中 Cu 向叶绿体中的分配增多,向细胞壁的分配减少。运用化学试剂顺序提取法和酶解法研究了 Cu 在紫鸭跖草根和叶片中的赋存形态,结果显示,叶片中 Cu 主要与氨基酸和小分子色素、蛋白质、多糖等结合,而根中 Cu 则主要与纤维素、膜结合蛋白等细胞壁物质相结合。Cu 在细胞内的分配和存在形态可能是紫鸭跖草超积累 Cu 的重要机理之一。

参考文献

- [1] 孙建云,沈振国.铜胁迫下甘蓝幼苗生长和铜吸收的基因型差异[J].西北植物学报,2005,25(10):2003-2009.
- [2] YANG J R,BAO Z P,ZHANG S Q. Distribution and chemical binding forms of Cd,Pb in plant [J]. *Chin Environ Sci*,1993,13(4):263-268.
- [3] KUPPER H,ZHAO F J,MCGATH S P. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. *Plant Physiol*,1999,119:305-311.
- [4] MEHARG A A. The role of the plasma membrane in metal tolerance in angiosperms [J]. *Plant Physiol*,1993,88:191-198.
- [5] HARRISON S I,LEPP N W,PHIPPS D A. Uptake of copper by excised roots. Copper desorption from free space [J]. *Z Pflanzenernahr Bodenkd*,1979,94:27-34.

- [6] ALLAN D L,JARRELL W M. Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls [J]. *Plant Physiol*,1989,89:823-832.
- [7] 王友保,张莉,沈章军,等.铜尾矿库区土壤与植物中重金属形态分析[J].应用生态学报,2005,16(12):2418-2422.
- [8] 黄长干,陈,邱业先.铜盐毒害对紫鸭跖草养分吸收和生长的影响[J].中国生态农业学报,2008,16(1):190-194.
- [9] ALLENS E. *Chemical analysis of Ecological Materials* [M]. 2nd edn. Oxford: Backwell Science Publishers,1989.
- [10] MORRISON R S,BROOKS R R,REEVES R D,et al. The diverse chemical forms of heavy metals in tissue extract of some metallophytes from Shaba province,Zaire [J]. *Phytochem*,1981,20:455-458.
- [11] IWASAKI K,SAKURA K,TAKAHASHI E. Copper binding in the root cell walls of Italian ryegrass and red clover [J]. *Soil Sci Soc Am*,1990,36(3):431-439.
- [12] ERNST WHO,VERKLEIJ A C,SHAF H. Metal tolerance in plants [J]. *Acta Bot Neerl*,1992,41(3):229-248.
- [13] HENRIQUES F S. Effects of copper deficiency on the photosynthetic apparatus of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) [J]. *Plant Physiol*,1989,135:453-458.
- [14] LASTRA O,CHUECA A,GONZALEZ C,et al. Hierro como nutriente de la planta Andes Ecol [J]. *Agrobiol*,1987,46:1005-1020.
- [15] LIHTA L,NOBILI M D,CESCO S. Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean [J]. *J Plant Nutr*,1996,19(3/4):527-533.
- [16] HUANG C G,FULIANG Y,et al. Studies on distribution and chemical characteristics of copper in cells of *Setcreasea purpurea* Boom [J]. *Agricultural Science & Technology*,2008,9(5):81-87.
- [17] CLARKSON D T,HANSON J B. The mineral nutrition of higher plants [J]. *Annual Rev Plant Physiol*,1980,31:239-298.
- [18] WAGNER G J,KROIZ R M. Perspectives on Cd and Zn accumulation, accommodation and tolerance in plant cells: The role of Cd-binding peptide versus other mechanisms [J]. *Molecular Biology and Chemistry (Metal Ion Homeostasis)*,1989,98:325-336.
- [19] 周云龙. 植物生物学 [M]. 北京:高等教育出版社,1999:11.

(上接第14367页)

- [16] 程积民.黄土丘陵半干旱区几种牧草蒸腾作用的研究[J].干旱区研究,1989(2):62-65.
- [17] 王根绪,沈永平,钱鞠,等.高寒草地植被覆盖变化对土壤水分循环影响研究[J].冰川冻土,2003,25(6):653-659.
- [18] 宋克超,康尔泗,金博文,等.黑河流域山区植被带草地蒸散发试验研究[J].冰川冻土,2004,26(3):349-356.

- [19] ALLEN R G,PEREIRA L S,RAES D,et al. FAO irrigation and drainage paper no. 56, crop evapotranspiration [M]. Rome, Italy: FAO,1998.
- [20] 吴锦奎,丁永建,沈永平,等.黑河中游地区湿草地蒸散量试验研究[J].冰川冻土,2005,27(4):582-590.
- [21] 张富仓,张一平,张君常.温度对土壤水分保持影响的研究[J].土壤学报,1997,34(2):160-169.
- [22] 曹红霞,栗晓玲,康绍忠,等.陕西关中地区参考作物蒸发蒸腾量变化及原因[J].农业工程学报,2007,23(11):8-16.