

锌在超积累植物东南景天叶片 细胞水平的吸收积累特征

李廷强, 杨肖娥, 卢玲丽, 孟凡花

(教育部污染环境修复与生态健康重点实验室, 浙江大学环境与资源学院, 浙江杭州 310029)

摘要: 利用同位素示踪技术研究锌在两种生态型东南景天叶片及叶片原生质体的吸收积累特征。结果表明, 锌在东南景天叶片及叶片原生质体中的积累过程分为开始的快速吸收和随后的缓慢吸收两个阶段, 超积累生态型东南景天吸收的⁶⁵Zn明显高于非超积累生态型。两种生态型东南景天叶片及叶片原生质体吸收锌的浓度动力学均为平滑的非饱和曲线, 可分为饱和部分和直线部分, 其中饱和部分可以用 Michaelis-Menten 方程拟合。两种生态型东南景天的米氏常数(K_m)差异不显著, 而超积累生态型的最大吸收速率(V_{max})显著高于非超积累生态型。代谢抑制剂(CCCP)处理显著抑制了超积累生态型东南景天叶片原生质体对锌的吸收。研究表明, 在超积累生态型东南景天叶片细胞膜上存在锌载体调控体系, 能够促进锌跨叶细胞膜运输并储藏到液泡中, 降低对细胞的毒害, 是东南景天超积累锌的重要机制之一。

关键词: 东南景天; 原生质体; 吸收; 锌

中图分类号: Q946.91; X173

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2008)04-0706-07

Uptake kinetics of zinc in hyper-accumulating species of *Sedum alfredii* Hance at the leaf cellular level

LI Ting-qiang, YANG Xiao-e, LU Ling-li, MENG Fan-hua

(MOE Key Laboratory of Environmental Remediation and Ecosystem Health, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Vacuolar compartmentalization in leaves could play a major role in hyper-accumulation of heavy metals. However, little is known about the physiology of intracellular zinc (Zn) sequestration in plants. Radiotracer techniques were employed to characterize ⁶⁵Zn uptake kinetics in leaf sections and leaf protoplasts of hyper-accumulating ecotype (HE) and non-hyper-accumulating ecotype (NHE) species of *Sedum alfredii* Hance. The time-dependent kinetics of ⁶⁵Zn uptake in leaf of *S. alfredii* Hance consisted of two stages with an initial rapid stage followed by a longer but slower stage. Zn accumulation in leaf sections and leaf protoplasts of the HE was much higher than that of the NHE. Concentration-dependent kinetics of ⁶⁵Zn uptake in leaf sections and leaf protoplasts of *S. alfredii* Hance yielded non-saturating kinetic curves that could be divided into linear and saturable components. This saturable component could be characterized by Michaelis-Menten equation, and there were no significant differences in the calculated K_m between the two ecotypes, whereas V_{max} values for HE were much higher than for NHE. Carbonyl cyanide- β -chlorophenylhydrazone (CCCP) treatment strongly inhibited ⁶⁵Zn transport into protoplasts, especially in HE, indicating that we were measuring primarily true transmembrane Zn that was transported into *S. alfredii* Hance. These findings indicate that there was a carrier-mediated system in plasma membrane which could effectively move cytoplasmic Zn into the vacuole, and this carrier-mediated system play a role in the dramatic Zn hyper-accumulation expressed in *Sedum alfredii* Hance.

Key words: *Sedum alfredii* Hance; protoplasts; uptake; zinc

收稿日期: 2007-08-17

接受日期: 2007-11-22

基金项目: 国家自然科学基金(40701074); 教育部长江学者与创新团队发展计划(IRT0536); 中国博士后科学基金(2005038285)资助。

作者简介: 李廷强(1976—)男, 四川德阳人, 博士, 副教授, 主要从事植物营养与污染环境生物修复研究。

Tel: 0571-86971907, E-mail: litq@zju.edu.cn.

锌是植物必须的微量元素,但土壤锌过多也会对作物造成严重危害^[1]。利用超积累植物进行植物提取被认为是一种费用低廉、环境友好的治理重金属污染土壤的全新技术^[2-4]。但是,对植物超积累重金属的生理及分子机理认识的不足限制了该技术的应用和改良^[5-6]。超积累植物最大的特点在于能够将吸收的重金属转运到植物地上部(叶片)并区隔在细胞质外体中,如液泡、细胞壁和细胞间隙等。在超积累植物 *Thlaspi caerulescens* 中,Zn、Cd 主要富集在叶片表皮细胞中,且大部分以可溶态 Zn、Cd 分布在液泡中^[7-10]。在超积累植物 *Arabidopsis halleri* 叶片中,Zn 主要与苹果酸结合存在于叶肉细胞中^[11-13]。Küpper 等^[14]研究发现,Ni 主要分布在超积累植物 *Alyssum bertolonii* 叶片表皮细胞的液泡中,而 *Berkheya coddii* 则主要分布在叶片上表皮细胞中。从已有的研究可以看出,叶片在植物超积累重金属中具有重要作用,参与了重金属的吸收和贮存。然而,有关超积累植物叶片对重金属吸收转运特征的研究并不多。Lasat 等^[15]采用同位素示踪技术研究发现,高浓度 Zn 条件下 *Thlaspi caerulescens* 叶片对 Zn 的吸收能力远大于非超积累植物 *Thlaspi arvense*,同时发现 *Thlaspi caerulescens* 叶片原生质体对 Zn 的吸收受 Zn 浓度的调控,表明 *Thlaspi caerulescens* 对 Zn 的超积累作用与叶片对 Zn 的吸收和转运密切相关。在此基础上,Kochian 等^[16]推测,在 *Thlaspi caerulescens* 叶片质膜上可能存在 Zn 的转运体系,参与锌的跨膜运输及在液泡中的贮存。迄今,有关叶片液泡膜和质膜转运体系的研究在谷类作物上有很多,而在超积累植物重金属吸收和转运中的作用研究很少^[9,17]。

东南景天(*Sedum alfredii* Hance)是我国首次发现的锌超积累植物,它不仅具有很强的超积累锌的能力,同时具有生物量大、生长快、容易繁殖及多年生等特点,因此是用于超积累机制研究和植物修复实践的理想材料^[18-19]。目前对东南景天锌超积累机理的研究主要围绕根系锌的吸收转运、区隔化特征等方面,有关叶片对锌的吸收及转运特征的研究不多^[20-22]。本试验通过对东南景天叶片原生质体的提取分离,研究其对锌的吸收动力学特征,探讨叶片转运体系在东南景天锌吸收和转运中的作用,为揭示东南景天锌超积累的生理及分子机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物培养

植物材料为两种生态型东南景天(*S. alfredii* Hance),一种取自浙江省衢州市的一个古老铅锌矿,前期研究表明其具有超积累锌的特性^[18],称为超积累生态型(Hyper-accumulating ecotype, HE);另一种取自浙江省杭州市郊茶园地,称为非超积累生态型(Non-hyper-accumulating ecotype, NHE)。

两种生态型东南景天,用自来水冲洗干净,剪成 2~3 cm 大小均匀一致的枝条,用营养液预培养。营养液组成为:Ca(NO₃)₂·4H₂O 2.00 mmol/L、KH₂PO₄ 0.10 mmol/L、MgSO₄·7H₂O 0.50 mmol/L、KCl 0.10 mmol/L、K₂SO₄ 0.70 mmol/L、H₃BO₃ 10.00 μmol/L、MnSO₄·H₂O 0.50 μmol/L、ZnSO₄·7H₂O 1.0 μmol/L、CuSO₄·5H₂O 0.20 μmol/L、(NH₄)₆Mo₇O₂₄ 0.01 μmol/L、Fe-EDTA 100 μmol/L。每天用 pH 计测定营养液 pH 值,并用 0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 调节营养液 pH 至 5.5,保持 24 h 连续通气,每 4 d 更换一次营养液。试验在人工气候室控制条件下进行,光照和黑暗时间分别为 14 h 和 10 h,昼夜温度分别为 26℃和 20℃,湿度分别为 70%和 85%。植物预培养 28 d 后进行下面的试验。

1.2 试验内容

1.2.1 叶片⁶⁵Zn 吸收积累特征 叶片⁶⁵Zn 吸收试验参考 Lasat 等^[15]的方法进行。分别将两种生态型东南景天的叶片用少许石英砂轻轻研磨,使其容易在放射吸收液中渗透,之后用去离子水冲洗粘附在叶片表面的石英砂,将叶片剪成 10~20 mm² 大小。将叶片浸入 100 mL 连续通气的吸收液中,吸收液锌浓度为 100 μmol/L ⁶⁵ZnCl₂(45 kBq/L),吸收液组成:2 mmol/L Mes-Tris 缓冲液(pH 6.0),0.5 mmol/L CaCl₂。在不同的时间段 0、2、4、8、12、16、24 h 将吸收液用 100 mL 解吸液替换。解吸液组成:5 mmol/L CaCl₂、5 mmol/L Mes-Tris(pH 6.0)、100 μmol/L Zn-Cl₂。在解吸液中解吸 15 min 后收获叶片,冲洗吸干称重,测定⁶⁵Zn 放射强度,每处理重复 4 次。

1.2.2 叶片吸收 ⁶⁵Zn 的浓度动力学 将剪成 10~20 mm² 大小叶片浸入连续通气的 100 mL 吸收液中,吸收液锌浓度为 0、5、10、25、50、100、250、500 μmol/L ⁶⁵ZnCl₂(45 kBq/L)。吸收液组成:2 mmol/L Mes-Tris 缓冲液(pH 6.0)、0.5 mmol/L CaCl₂。在吸收 12 h 后将吸收液用 100 mL 解吸液替换,解吸液组

成为 5 mmol/L CaCl_2 、5 mmol/L Mes-Tris(pH 6.0)、100 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 。在解吸液中解吸 15 min 后收获叶片,冲洗吸干称重,测定 ^{65}Zn 放射强度,每处理重复 4 次。

1.2.3 叶片原生质体的分离 5 g 新鲜的叶片用石英砂轻轻研磨,去离子水冲洗粘附在叶片表面的石英砂,用刀片切成小块。将叶片碎片悬浮于 30 mL 细胞壁去除液中,细胞壁去除液组成为 600 mmol/L 甘露醇、pH 5.5 的 3 mmol/L Mes-Tris、2 mmol/L CaCl_2 、1 mmol/L DTT、0.7 mmol/L KH_2PO_4 、0.1% (w/v) BSA、1% (w/v) 纤维素酶、0.1% (w/v) 果胶酶。在黑暗中 25 $^\circ\text{C}$ 间歇震荡培养 1~2 h,将剩余悬浮物用 0.15 mm 尼龙网过滤,原生质体在 2 $^\circ\text{C}$ 、60 \times g 离心 5 min,去上清液,原生质体重新在 20 mL 原生质体悬浮液 [600 mmol/L 甘露醇、pH 5.5 的 3 mmol/L Mes-Tris、2 mmol/L CaCl_2 、1 mmol/L DTT、0.7 mmol/L KH_2PO_4 、0.1% (w/v) BSA] 中悬浮,再在 2 $^\circ\text{C}$ 、60 \times g 离心 5 min,反复 3 次。最后将原生质体悬浮在 1 mL 预吸收溶液中 (500 mmol/L 甘露醇、50 mmol/L Suc、pH 5.5 的 3 mmol/L Mes-Tris、0.05 mmol/L CaCl_2 、1 mmol/L DTT、0.7 mmol/L KH_2PO_4)。用血球计数板统计原生质体产量。用 36 $\mu\text{mol/L}$ 荧光素双醋酸酯 (FDA) 染色 (用 0.5% 丙酮溶解 FDA) 培养 10 min 后用荧光发生器测定活性原生质体比例分别为 80% (HE) 和 78% (NHE),试验前用预吸收溶液将两种生态型东南景天叶片活性原生质体数量调整为 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 。

1.2.4 叶片原生质体对 ^{65}Zn 吸收的时间动力学 取 900 μL 原生质体加到 1.5 mL 的离心管中,离心管加有 100 μL 1 mmol/L $^{65}\text{ZnCl}_2$ (25 kBq/mL) 预吸收液,最后 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。在吸收 0、2、4、6、8、12、20、30、60 min 后将 100 μL 原生质体取出置于 1.5 mL 离心管,离心管为不连续梯度的 10% HClO_4 (50 μL) (离心管顶部) 和 400 μL 硅胶油 ($\rho = 1.06$ 、25 $^\circ\text{C}$) (离心管底部)。离心管立刻高速离心 1 min 使原生质体穿过硅胶油层 (model 5417, Eppendorf)。离心后将离心管放入液氮,切下固定的原生质体放入计数瓶,测定放射强度。每处理重复 4 次。

1.2.5 叶片原生质体对 ^{65}Zn 吸收的浓度动力学 取 900 μL 原生质体加到 1.5 mL 的离心管中,离心管分别加有 100 μL 含 0、0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5 mmol/L $^{65}\text{ZnCl}_2$ (25 kBq/mL) 的预吸收液,最后 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 浓度为 0、5、10、25、50、100、250、500 $\mu\text{mol/L}$ 。在吸收 12 min 后将 100 μL 原生质体取出置于 1.5 mL 离心

管中,离心管为不连续梯度的 10% HClO_4 (50 μL) (离心管顶部) 和 400 μL 硅胶油 ($\rho = 1.06$ 、25 $^\circ\text{C}$) (离心管底部)。离心管立刻高速离心 1 min 使原生质体穿过硅胶油层 (model 5417, Eppendorf)。离心后将离心管放入液氮,切下固定的原生质体放入计数瓶,测定放射强度。每处理重复 4 次。

1.2.6 代谢抑制剂对叶片原生质体 ^{65}Zn 吸收的影响 取 900 μL 原生质体加到 1.5 mL 的离心管中,离心管加有 100 μL 含 1 mmol/L $^{65}\text{ZnCl}_2$ (25 kBq/L) 的预吸收液,最后 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。分别在 0、1、2、4、6、8、12、16 min 将 100 μL 原生质体取出置于 1.5 mL 离心管中,离心、测定放射强度。同时在吸收实验前 30 min 将 10 $\mu\text{mol/L}$ CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone, 氰氯苯腈) 加入原生质体中,按 1.2.4 方法进行吸收动力学研究,每处理重复 4 次。

试验数据采用 SPSS11.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 锌在叶片部分的积累

当吸收液中 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,Zn 在东南景天叶片中的积累过程在开始 2 h 是一个快速的阶段,随后相对缓慢,到 24 h 含量变化很小 (图 1)。推测开始的快速阶段可能是 Zn 从叶边缘或切口部分进入叶片。在 0~8 h 内,Zn 在两种生态型东南景天叶片的积累没有明显差异,随着吸收时间的延长,超积累生态型东南景天叶片积累的 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 明显高于非超积累生态型,经过 24 h 的吸收,超积累生态型东南景天叶片 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 含量比非超积累生态型高 40.8%。

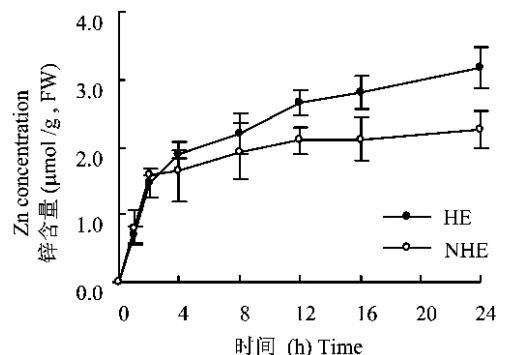


图 1 锌在东南景天叶片内积累的动力学

Fig. 1 Time course of ^{65}Zn accumulation in leaf sections of two ecotypes of *S. alfredii* Hance

2.2 叶片吸收锌的浓度动力学

根据时间动力学试验结果,选择 8 h 为浓度动力学吸收时间。结果(图 2)表明,随着溶液中 Zn 浓度的提高,东南景天叶片对 Zn 的吸收速率不断增大。两种生态型东南景天叶片对 Zn 的吸收浓度动力学曲线可划分为饱和部分和直线部分,其中饱和部分(0~50 $\mu\text{mol/L}$)可用 Michaelis-Menten 方程拟合(表 1)。超积累生态型和非超积累生态型东南景天的米氏常数 K_m 分别为 17.46 和 13.85 $\mu\text{mol/L}$,差异不显著($P < 0.05$),而超积累生态型东南景天叶片锌最大吸收速率 V_{\max} 为非超积累生态型的 2 倍。

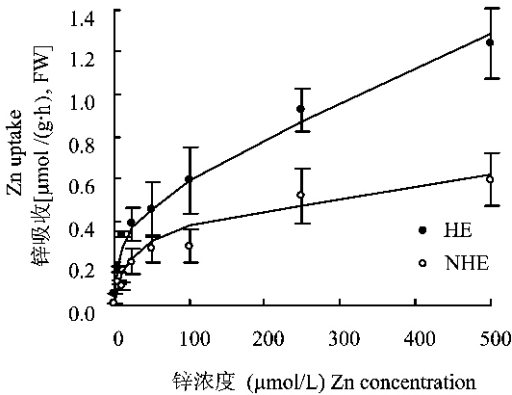


图 2 东南景天叶片吸收锌的浓度动力学

Fig.2 Concentration-dependent kinetics of ^{65}Zn accumulation in leaf sections of two ecotypes of *S. alfredii* Hance

表 1 两生态型东南景天叶片吸收锌的动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of ^{65}Zn absorption by leaf sections of two ecotypes of *S. alfredii* Hance

生态类型 Ecotype	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	V_{\max} ($\mu\text{mol/g, FW}\cdot\text{h}$)	R^2 ($n = 7$)
HE	17.46	0.79	0.9356**
NHE	13.85	0.34	0.6918*

注: ** 和 * 分别表示在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平上显著。

Note: ** and * mean significant at $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

2.3 锌在叶片原生质体的积累

和叶片 Zn 吸收相似, Zn 在东南景天叶片原生质体的积累过程也分为两个阶段,在开始 0~12 min 是一个快速阶段,而 10~60 min 阶段积累量变化很小(图 3)。推测开始的快速阶段代表 Zn^{2+} 的吸收并与质膜表面带负电荷基团的快速结合,而缓慢阶段为跨质膜运输过程。值得注意的是,超积累生态型东南景天叶片原生质体吸收的 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 明显高于非超积累生态型,经过 60 min 的处理,超积累生态型东

南景天叶片原生质体吸收的 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 是非超积累生态型的 2.2 倍。

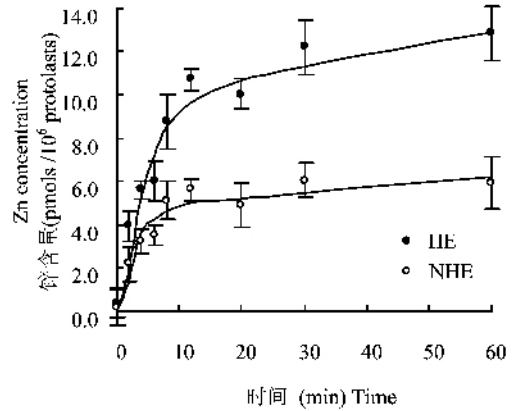


图 3 锌在东南景天叶片原生质体积累的动力学

Fig.3 Time course of ^{65}Zn accumulation in mesophyll protoplasts of two ecotypes of *S. alfredii* Hance

2.4 叶片原生质体吸收锌浓度动力学

根据时间动力学试验结果,选择 12 min 进行浓度动力学研究。图 4 表明,两种生态型东南景天叶片原生质体对 Zn 的吸收浓度动力学为非饱和曲线,可以划分为饱和部分和直线部分,其中饱和部分(0~100 $\mu\text{mol/L}$)可以用 Michaelis-Menten 方程拟合。超积累生态型和非超积累生态型东南景天的米氏常数 K_m 分别为 44.03 $\mu\text{mol/L}$ 和 49.96 $\mu\text{mol/L}$,差异不显著($P < 0.05$),而超积累生态型的最大吸收速率 V_{\max} 为非超积累生态型的 4 倍(表 2)。

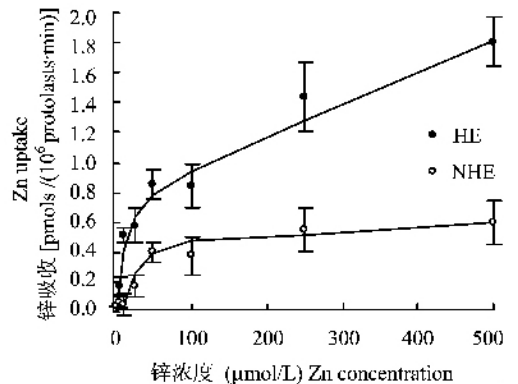


图 4 东南景天叶片原生质体吸收锌的浓度动力学

Fig.4 Concentration-dependent kinetics of ^{65}Zn accumulation in mesophyll protoplasts of two ecotypes of *S. alfredii* Hance

2.5 代谢抑制剂对叶片原生质体锌吸收的影响

将原生质体用代谢抑制剂 CCCP (10 $\mu\text{mol/L}$) 处

理后, $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 的吸收受到明显抑制(图 5)。和对照相比, CCCP 处理 16 min 后, 两种生态型 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 的吸收分别降低了 71.7% 和 56.6%, 超积累生态型受到的抑制更明显。值得注意的是, 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 条件下, 超积累生态型叶片原生质体积累的 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 明显高于非超积累生态型, 而 CCCP 处理后两种生态型叶片原生质体对 Zn 的吸收没有差异。

表 2 两生态型东南景天叶片原生质体吸收锌的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of Zn absorption by mesophyll protoplasts of two ecotypes of *S. alfredii* Hance

生态型 Ecotype	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	V_{\max} [pmols/(10^6 protoplasts·min)]	R^2 (n = 7)
HE	44.03	1.79	0.9241**
NHE	49.96	0.42	0.7459**

注: ** 和 * 分别表示在 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平上显著。

Note: ** and * mean significant at $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively.

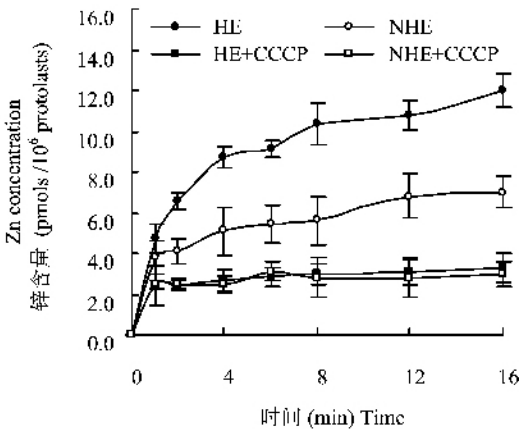


图 5 CCCP 对东南景天叶片原生质体锌吸收的影响

Fig.5 Effect of CCCP on ^{65}Zn accumulation in mesophyll protoplasts of two ecotypes of *S. alfredii* Hance

3 讨论

叶片在植物超积累重金属中具有重要作用, 参与了重金属的吸收和贮存, 而这一过程又受重金属跨叶细胞膜运输和跨液泡膜运输等过程调控^[23-24]。目前对超积累植物叶片 Zn 吸收转运特征的研究主要集中在模式植物 *Thlaspi caerulescens* 上, 对其他超积累植物叶片液泡膜和质膜转运体系的研究不多。利用放射性同位素 ^{65}Zn 示踪技术, 发现东南景天吸收的 Zn 主要贮存在叶片部分, 在 500 $\mu\text{mol/L}$ Zn 条件下, 有 54% 的 Zn 贮存在细胞壁, 而 40% 的 Zn 贮存在液泡部分^[21]。我们推测, 东南景天叶片对 Zn

的吸收转运存在特殊性, Zn 在叶片的促进吸收是东南景天超积累 Zn 的一个重要机制。本试验中, 两种生态型东南景天叶片对 Zn 的吸收浓度动力学为非饱和曲线, 从方程的决定系数看, 超积累生态型叶片对 Zn 的吸收曲线饱和部分更适合用 Michaelis-Menten 方程拟合。超积累生态型和非超积累生态型东南景天的米氏常数分别为 17.46 $\mu\text{mol/L}$ 和 13.85 $\mu\text{mol/L}$, 而超积累生态型东南景天叶片最大吸收速率 V_{\max} 为非超积累生态型的 2 倍(表 1)。这表明在东南景天叶片 Zn 的跨膜转运受载体调控, 而两种生态型的调控载体对 Zn 的亲合力没有显著差异。值得注意的是, 不管在低 Zn 浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)还是高 Zn 浓度(1000 $\mu\text{mol/L}$)下, 超积累生态型东南景天叶片积累的 $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 明显高于非超积累生态型, 表明东南景天叶片 Zn 调控载体不受锌浓度的影响, 不管是低 Zn 还是高 Zn 条件下, 叶片 Zn 调控载体的数量变化不大。而 Lasat 等^[15]研究发现, 在低 Zn 浓度下(10 和 100 $\mu\text{mol/L}$), 超积累植物 *Thlaspi caerulescens* 和非超积累植物 *Thlaspi arvense* 的叶片对 Zn 的吸收没有差异, 而当介质中 Zn 浓度为 1 mmol/L 时, 显著促进了前者叶片对 Zn 的吸收。这表明在 *Thlaspi caerulescens* 中, 叶片 Zn 调控载体的数量受到 Zn 浓度的影响; 在高 Zn 条件下, 诱导了调控载体的合成, 促进了 Zn 的吸收。

为了避免表皮和细胞壁的影响, 我们提取了东南景天的叶片原生质体, 进一步研究离体叶细胞原生质体对锌的吸收转运特点。Cosio 等^[25]研究了 Zn 在 *Thlaspi caerulescens* 和 *Arabidopsis halleri* 叶片原生质体的吸收时间动力学特征, 发现开始 5 min 是快速的直线吸收阶段, 而 30 min 后是平缓的吸收过程。推测开始的快速阶段代表 Zn 离子的吸收并与质膜表面带负电荷基团的快速结合, 而缓慢阶段为跨质膜运输过程。在本试验中, Zn 在东南景天叶片原生质体的积累时间动力学过程也分为两个阶段, $^{65}\text{Zn}^{2+}$ 在开始 10 min 内的吸收是快速的直线性的, 而随后的 50 min 是一个缓慢的直线阶段(图 3)。同时可以看出, 在 12 min 的时候, 两种生态型叶片原生质体对 Zn 的吸收差异明显, 因此我们选择了 12 min 的吸收时间研究叶片原生质体 Zn 吸收的浓度动力学, 这一相对较短的吸收时间也保证了叶片原生质体的生理活性^[9]。从试验结果看, 与叶片部分吸收相似, 两种生态型东南景天叶片原生质体吸收 Zn 的浓度动力学也为平滑的非饱和曲线, 该曲线可以划分为饱和部分和直线部分, 而饱和部分可以用

Michaelis-Menten 方程拟合(图 4),表明东南景天叶片原生质体对 Zn 的吸收受载体系统调控^[26]。这一结果和 Cosio 等^[25]研究相似,他们发现 *Thlaspi caerulescens* 和 *Arabidopsis halleri* 叶片原生质体对 Zn 的吸收都受载体系统调控。值得提出的是,*Thlaspi caerulescens* 和 *Arabidopsis halleri* 的动力学参数(K_m 和 V_{max})均没有显著差异,因此 Cosio 等认为质膜和液泡膜转运体系的不同并不是二者 Zn 吸收积累差异的唯一因子,推测在跨质膜运输前还有其他调控机制。而对于东南景天,两种生态型东南景天的米氏常数(K_m)差异不显著,而超积累生态型的最大吸收速率(V_{max})为非超积累生态型的 4 倍(表 2)。表明两种生态型的调控载体对 Zn 的亲合力相近,但在超积累生态型东南景天叶肉细胞质膜单位面积内的载体数量比非超积累生态型多,这可能是其对 Zn 的转运能力显著高于非超积累生态型的主要原因^[26]。CCCP 是一种代谢抑制剂,CCCP 处理能够显著地降低植物细胞的跨膜电势,抑制二价离子的吸收。从已有的研究结果看,CCCP 不会与 Zn 发生络合反应,因而不会对 Zn 的吸收产生干扰^[27]。本研究结果看出,CCCP 处理抑制了叶片原生质体对 Zn 的吸收,其中对超积累生态型的抑制更明显(图 5),表明在原生质体吸收试验中,测定的 Zn^{2+} 主要是跨膜运输部分,进一步证明东南景天叶片原生质体对 Zn 的吸收受质膜载体系统调控。

综上所述,在超积累生态型东南景天叶片细胞膜上存在一个不同的转运体系,能够促进 Zn 跨叶细胞膜运输并储藏到液泡中,降低对细胞的毒害,这也是东南景天超积累锌的一个重要机制。但 Zn 以何种形态、方式跨叶细胞质膜和液泡膜运输,其在液泡中储藏形态等方面,尚待进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] Broadley M R, White P J, Hammond J P *et al.* Zinc in plants [J]. *New Phytol.*, 2007, 173: 677–702.
- [2] Salt D E, Blaylock M, Kumar N. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants [J]. *Biotechnology*, 1995, 13: 468–474.
- [3] Krämer U. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils [J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005, 16(2): 133–141.
- [4] 黄铭洪, 骆永明. 矿区土地修复与生态恢复 [J]. *土壤学报*, 2003, 140(12): 162–170.
Huang M H, Luo Y M. Land remediation and ecological restoration of mined land [J]. *Acta Pedol. Sin.*, 2003, 140(12): 162–170.
- [5] 杨肖娥, 龙新究, 倪吾钟. 超积累植物吸收重金属的生理及分子机制 [J]. *植物营养与肥科学报*, 2002, 8(1): 8–15.
Yang X E, Long X X, Ni W Z. Physiological and molecular mechanisms of heavy metal uptake by hyper-accumulating plants [J]. *Plant Nutr. Fert. Sci.*, 2002, 8(1): 8–15.
- [6] McGrath S P, Zhao F J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils [J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, 14: 277–282.
- [7] Küpper H, Zhao F J, McGrath S P. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. *Plant Physiol.*, 1999, 119: 305–311.
- [8] Frey B, Keller C, Zierold K, Schulin R. Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. *Plant Cell Environ.*, 2000, 23: 675–687.
- [9] Ma J F, Ueno D, Zhao F J, McGrath S P. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* [J]. *Planta*, 2005, 220: 731–736.
- [10] Cosio C, DeSantis L, Frey B *et al.* Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens* [J]. *J. Exp. Bot.*, 2005, 56(412): 765–775.
- [11] Küpper H, Lombi E, Zhao F J, McGrath S P. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* [J]. *Planta*, 2000, 212: 75–84.
- [12] Zhao F J, Lombi E, Breedon T, McGrath S P. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri* [J]. *Plant Cell Environ.*, 2000, 23: 507–514.
- [13] Sarret G, Saumitou-Laprade P, Bert V *et al.* Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* [J]. *Plant Physiol.*, 2002, 130: 1815–1826.
- [14] Küpper H, Lombi E, Zhao F J *et al.* Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense* [J]. *J. Exp. Bot.*, 2001, 52: 2291–2300.
- [15] Lasat M M, Baker A J M, Kochian L V. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens* [J]. *Plant Physiol.*, 1998, 118: 875–883.
- [16] Kochian L, Pence N S, Letham D L D *et al.* Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals [J]. *Plant Soil*, 2002, 247: 109–119.
- [17] Dietz K J, Schramm M, Lang B *et al.* Characterization of the epidermis from barley primary leaves: II. The role of the epidermis in ion compartmentation [J]. *Planta*, 1992, 187: 431–437.
- [18] 杨肖娥, 龙新究, 倪吾钟, 等. 东南景天 (*Sedum alfredii* Hance) — 一种新的超积累植物 [J]. *科学通报*, 2002, 47(13): 1003–1006.
Yang X E, Long X X, Ni W Z *et al.* *Sedum alfredii* Hance — a new ecotype of Zn-hyperaccumulator plant species native to China [J]. *Chin. Sci. Bull.*, 2002, 47(13): 1003–1006.
- [19] Yang X E, Long X X, Ye H B *et al.* Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species *Sedum alfredii* Hance [J]. *Plant Soil*, 2004, 259: 181–189.
- [20] Li T Q, Yang X E, Yang J Y, He Z L. Zinc accumulation and subcellular distribution in leaves of the hyperaccumulating species *Sedum*

- alfredii* Hance [J]. *Pedosphere* , 2006 , 16 : 616–623.
- [21] Yang X E , Li T Q , Yang J C *et al.* Zinc compartmentation in root , transport into xylem , and absorption into leaf cells in the hyperaccumulating species of *Sedum alfredii* Hance [J]. *Planta* , 2006 , 224 : 185–195.
- [22] Deng D M , Shu W S , Zhang J *et al.* Zinc and cadmium accumulation and tolerance in populations of *Sedum alfredii* [J]. *Environ. Poll.* , 2007 , 147(2) : 381–386.
- [23] Lombi E , Zhao F J , McGrath S P *et al.* Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype [J]. *New Phytol.* , 2001 , 149 : 53–60.
- [24] Krämer U , Pickering I J , Prince R C *et al.* Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species [J]. *Plant Physiol.* , 2000 , 122 : 1343–1353.
- [25] Cosio C , Martinoia E , Keller C. Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level [J]. *Plant Physiol.* , 2004 , 134 : 716–725.
- [26] Lasat M M , Baker A J M , Kochian L V. Physiological characterisation of root Zn^{2+} absorption and translocation to shoots in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator species of *Thlaspi* [J]. *Plant Physiol.* , 1996 , 112 : 1715–1722.
- [27] DiTomaso J M , Hart J J , Linscott D L , Kochian L V. Effect of inorganic cations and metabolic inhibitors on putrescine transport in roots of intact maize seedlings [J]. *Plant Physiol.* , 1992 , 99 : 508–514.