

# Pb 在豌豆幼苗细胞中的超微结构分布与毒性研究

刘延盛<sup>1</sup> 鲁家米<sup>2</sup> 周晓阳<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院上海生命科学研究院研发中心 上海 200031; <sup>2</sup> 北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083)

**摘要** 伴随日趋严重的重金属环境污染问题,植物修复的可能机制及重金属胁迫下植物的损伤与抗性机理成为研究热点.采用透射电子显微镜和X-射线微区分析技术,研究了中度(50 mg/L)和严重(200 mg/L) Pb<sup>2+</sup>胁迫下豌豆幼苗根叶细胞的超微结构损伤和铅在植物器官和细胞器水平的区域化分布情况.结果显示,重金属对植物的毒害表现为对细胞的膜结构和各种细胞器的整体性伤害,且各细胞器的受损程度不同;豌豆对铅的相对耐性机理可能包括重金属胁迫下不同细胞器的差异反应、根系富集、细胞壁结合和液泡的区隔化作用等.图6参24

**关键词** Pb<sup>2+</sup>; 重金属污染; 植物修复; 豌豆; 超微结构; X-射线微区分析

CLC X173

## Cellular Damages and Accumulation of Pb Polluted *Pisum sativum* L. : Implication for Phytoremediation

LIU Yansheng<sup>1</sup>, LU Jiami<sup>2</sup> & ZHOU Xiaoyang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Research and Development Centre, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

(<sup>2</sup> School of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract** A growing concern over the issues of phytoremediation and its possible mechanisms towards increasingly serious heavy metal pollution makes this study to deal with some important questions focused on the mechanisms of Pb tolerance and hyperaccumulation in *Pisum sativum* L. Transmission electron microscopy (TEM) and TEM X-ray microanalysis were tandem used to analyze ultrastructural toxic effects and distribution pattern of Pb in organs and organelles of peas at concentrations of 50 mg/L and 200 mg/L Pb<sup>2+</sup> as modest and serious stress, respectively. The results indicated that Pb might injure the membranous structures and all the organelles at different extents. The mechanisms of heavy metal resistance to some extent of *Pisum sativum* might involve the endurance of organelles, accumulation of roots, binding to cell walls, distribution in vacuoles and other possible behaviors at different levels. Fig 6, Ref 24

**Keywords** Pb<sup>2+</sup>; heavy metal pollution; phytoremediation; *Pisum sativum* L.; ultrastructure; X-ray microanalysis

CLC X173

自20世纪30年代以来,随着工农业的迅速发展,大量的污染物尤其是重金属污染物引起环境质量的严重恶化.铅(Pb)对于植物或动物的代谢和生存是非必须元素,但却是危害最大的重金属之一.铅对人体的毒害作用具有潜伏性和长期性的特点,有研究表明,人体血铅水平和土壤铅含量之间存在直接关系<sup>[1]</sup>,铅在环境中的含量已经开始达到致毒水平,严重威胁着人类健康<sup>[2]</sup>.

自Brooks等人1977年最早提出超积累植物这一概念<sup>[3]</sup>,植物修复成为环境污染治理研究领域的一个前沿性课题.植物修复(Phytoremediation)是指利用绿色植物来转移、容纳或转化污染物使其对环境无害.植物修复的对象是重金属、有机物或放射性元素污染的土壤及水体,而植物修复的重要主体即超积累植物.研究表明,通过植物的吸收、挥发、根滤、降解、稳定等作用,可以净化土壤或水体中的污染物,达到净化环境的目的,但这些作用的细胞学和分子生物学机理仍不明确<sup>[4]</sup>.豌豆作为一种传统作物种苗,显示出具有“重金属超量积累倾向”的

特性<sup>[5]</sup>,但其关键机制尚不清楚.前人研究大多集中于重金属污染的植株亚细胞水平的损伤上<sup>[6-8]</sup>,但目前对这种损伤与重金属渗入植株的过程之间相互联系的了解仍相当缺乏,迫切需要开拓性研究.本实验采用透射电子显微镜和X-射线微区分析技术研究了铅对豌豆幼苗细胞超微结构毒性机理和植物对重金属的吸收过程,并创造性地将两方面结合,分析探讨了重金属在植物中的积累与分布模式,对阐明植物修复的内在机制有重要理论意义.

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料培养与处理

豌豆(*Pisum sativum* L.)品种为白豌.挑取饱满的豌豆种子播种于湿润的蛭石和珍珠岩中,浇水催苗并培养4 wk,待豌豆幼苗长至约10 cm时分别移栽至装有500 g蛭石的盆中,对照植株继续浇水培养,其余豌豆幼苗分中度和高度胁迫两组,每日分别以50 mg/L、200 mg/L的Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>浇灌培养14 d.

### 1.2 透射电镜样品制备与观察

用锋利刀片从各组豌豆幼苗的顶端第三片叶和根上切取2 mm×2 mm的叶片小块和2 mm长的根段, pH 7.2 磷酸缓冲

液洗净后用 2.5% 戊二醛固定、2% 锇酸固定过夜, 50%、70%、85%、90%、95%、100% 乙醇逐级脱水, Spurr 包埋, 70℃ 聚合 8 h 后在 LKB 8800 型超薄切片机切片, JEM 100CX 型透射电镜下观察、照相<sup>[9]</sup>。

### 1.3 X-射线微区分析样品制备与测定

针对严重胁迫(200 mg/L)组幼苗, 用锋利刀片切取 2 mm × 2 mm 的叶片小块和 2 mm 长的根段, 迅速投入到液氮中进行冷冻固定, 样品经冷冻干燥, 乙醚真空渗透, 塑料包埋后制成 1 μm 厚的半薄切片, 喷碳后备用。

将制备好的切片在配有 EDAX-9100 能谱仪的日立 H-800 型透射电镜下进行测定。加速电压 150 keV, 取出角 25°, 样品的测量计数时间 60 s, 测出的数值分别表示每种元素的峰值减去其背景值后的每秒脉冲数(CPS)。重复检测每一组织区域的微区至少 7 个测试点<sup>[10, 11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 豌豆苗表现伤害

用 50 mg/L 和 200 mg/L 不同浓度的  $Pb^{2+}$  培养 14 d 后, 植物表现不同程度的伤害症状, 对照处理的豌豆苗目测不到伤害症状(即正常健康生长); 中等浓度抑制培养后部分幼苗失绿变黄, 植株生长受到抑制, 地上长度明显短于对照(约 25%); 高  $Pb^{2+}$  胁迫下植株大部分黄化萎蔫, 部分死亡。考虑到实验中采用较高的铅处理浓度, 豌豆在重金属铅污染下体现出一种相对耐性。

### 2.2 豌豆苗超微结构损伤

**2.2.1 叶绿体** 叶绿体是叶细胞中最明显的细胞器, 一般在一个细胞切面上可见到 5~8 个, 呈椭圆形, 类囊体基粒和片层排列整齐, 被膜清晰(图 1-a, b)。

在不同的  $Pb^{2+}$  胁迫下, 叶绿体不同程度受损, 50 mg/L 的  $Pb^{2+}$  处理下, 类囊体排列紊乱, 基粒片层出现扭曲、膨大(图 1-c), 叶绿体外膜局部不完整, 被膜渐渐散开并伴随类囊体数目的减少内部膜结构逐渐模糊(图 1-d)。在高抑制浓度即 200 mg/L 的  $Pb^{2+}$  处理下, 大部分叶绿体依然可以分辨, 一些叶绿体以双层膜结构局部破裂、内含基粒散出的方式解体(图 1-e), 而另一些小的叶绿体则以整体膨胀的方式解体, 具体过程是内部类囊体膨大, 整体被膜结构严重受损甚至消失, 使内部基粒片层散于细胞内(图 1-f)。

叶绿体对重金属胁迫比较敏感, 叶绿体的超微结构包括类囊体结构的完整性和有序性对光合作用正常进行非常必要。叶绿体的破坏将直接影响光合电子传递链的正常功能<sup>[12]</sup>。豌豆叶细胞在重金属毒害下表现出的上述超微结构损伤, 意味着叶绿体逐步丧失光合功能。

**2.2.2 线粒体** 正常叶细胞中的线粒体为椭圆形, 脊突明显, 分布均匀, 间质浓密(图 2-a)。50 mg/L 的  $Pb^{2+}$  中度抑制处理下, 线粒体脊突膨胀, 数目减少, 线粒体空泡化的趋势明显, 外膜破损不连续, 脊突排列紊乱(图 2-b)。200 mg/L 的  $Pb^{2+}$  胁迫下的线粒体数量与对照和中度抑制相比大幅减少, 且受损程度剧烈: 部分脊突严重膨胀, 致使线粒体只残存一个或极少数脊突或几乎成为空泡(图 2-c), 不少线粒体呈空泡的集合态(图 2-d), 这种集合态又逐渐消失或散开。

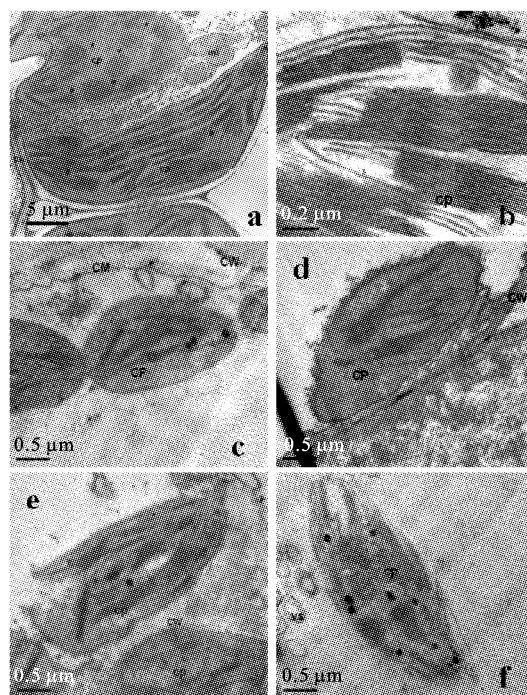


图 1 豌豆叶细胞叶绿体超微结构的逐步损伤  
Fig. 1 Gradual ultrastructure damages of chloroplasts of *P. sativum* under Pb stress

CP, 叶绿体; CW, 细胞壁; Mi, 线粒体; N, 细胞核; Nu, 核仁; V, 液泡; Nm, 核基质; Cy, 细胞质; CM, 细胞膜系统。下同  
CP, chloroplasts; CW, cell wall; Mi, mitochondria; N, nuclear; Nu, nucleolus; V, vacuole; Nm, nuclear matrix; Cy, cytoplasm; CM, membranous structures in cells. The same below

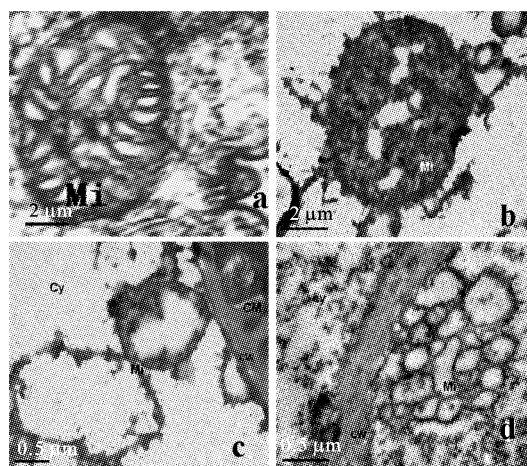


图 2 线粒体的超微结构损伤  
Fig. 2 Gradual ultrastructure damages of mitochondria

作为有氧呼吸的中心细胞器, 植物细胞线粒体内膜脂脂肪酸不饱和程度较高, 部分基态分子氧在线粒体内膜进行单电子还原成超氧物自由基。受铅毒害的叶细胞中线粒体脊突膨胀、外膜破裂和内容物减少, 将使主要集中在可溶性衬质中的三羧酸循环所需酶的附着面减少, 造成细胞呼吸减弱, 导致有氧糖代谢受阻、叶片呼吸功能下降。徐勤松等指出重金属胁迫严重破坏了体内抗氧化酶系统<sup>[5]</sup>, 尤其是 SOD 的活性, 而植物体内高度积累的  $O_2$  启动并加剧了膜脂过氧化作用, 从而破坏膜的

通透性,导致线粒体脊突的膨胀和空泡化等致死性损伤。

**2.2.3 细胞核** 对照叶细胞中的细胞核双层膜结构清楚,核仁致密与核质界限分明,染色质均匀,核仁完整(图 3-a)。50 mg/L 的  $Pb^{2+}$  处理时细胞核出现的最显著特征是染色质凝聚,且十分普遍(图 2-b),这可能是重金属铅对细胞核中等程度损伤的主要特点。200 mg/L 的  $Pb^{2+}$  抑制下,细胞核明显受损,在一个出现空泡化的细胞核内观察到明显的黑色颗粒的沉积(图 3-c)。不少细胞核的核仁分散为多个小核仁(图 3-d),核膜严重扭曲。

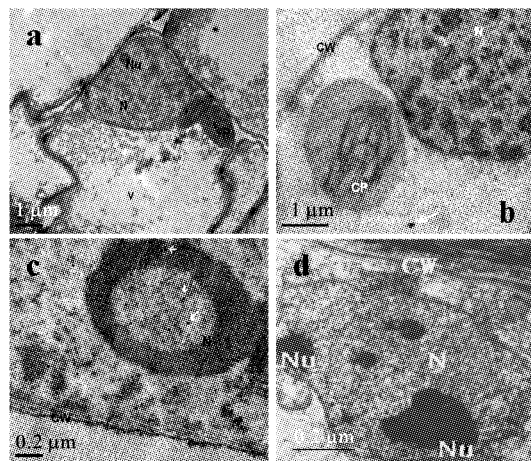


图 3 细胞核的超微结构损伤  
Fig. 3 Gradual ultrastructure damages of nucleus

细胞核是细胞遗传代谢的调控中心,豌豆染色质的凝集和核仁解体可能是土壤中重金属离子渗入细胞后与细胞核内的核酸等大分子物质结合,从而使 DNA 凝集,导致染色体断裂和畸变,核酸代谢失常,是对细胞核的不可逆损伤<sup>[13]</sup>,细胞核的空泡或解体也将造成细胞不能复活,这些细胞核损伤必然严重影响植物正常基因的调控及细胞分化。

**2.2.4 细胞壁与膜系统** 细胞壁具有很强的积累阳离子的能力,是重金属进入细胞的第一道屏障<sup>[14]</sup>。正常的叶细胞中质膜紧贴细胞壁,细胞膜连续清楚(图 4-a),细胞内膜结构正常,存在些胞间连丝。50 mg/L 的  $Pb^{2+}$  处理下细胞壁部分加厚(图 4-b),有质壁分离的现象,在拉断的胞间连丝处,可见细胞壁边缘的壁物质松散化并向细胞腔游离的现象,同时一些铅颗粒在细胞内壁附近沉积;这和人观察到的花粉管壁层中微纤丝排列混乱的现象是一致的。施国新等认为细胞壁上离子的大量存在导致了细胞壁边缘的壁物质松散现象<sup>[6]</sup>。但直至细胞濒临死亡状态时(200 mg/L  $Pb^{2+}$  处理 14 d),始终没有观察到细胞壁在某一部位完全损坏(图 4-c)。

然而与细胞壁相贴细胞的膜结构则受到更严重的伤害,高尔基体是最早消失的细胞器,而高尔基体是制造和运送造壁物质如多糖等的主要细胞器,在新壁形成时,没有其参与就不能形成正常的壁层。内质网在 50 mg/L  $Pb^{2+}$  处理中基本都成为囊泡状,在 200 mg/L  $Pb^{2+}$  下则基本消失,细胞内的膜系统空泡化逐渐严重,膜层游离,膜结构逐渐模糊(图 4-d)。其机制可能是由于重金属离子主要与膜蛋白相结合并使其部分变性,从而以蛋白质为主要成分的膜结构发生改变,导致功能丧失<sup>[15]</sup>,如叶绿素生物合成不能正常进行使植物叶片的褪绿。

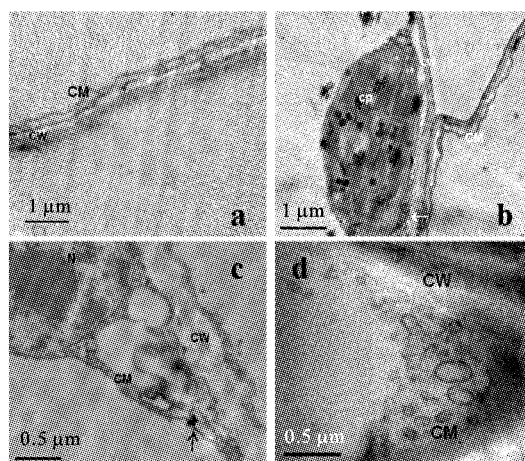


图 4 细胞的壁与膜系统超微结构损伤  
Fig. 4 Ultrastructure damages of cell walls and membranous structures

**2.2.5 根细胞中的铅积累** 中度胁迫下,许多铅在根细胞的细胞壁和细胞膜附近沉积(图 5-a),不少根尖细胞内仍可以观察到脊突层次清晰的线粒体的存在(图 5-b),而重度铅胁迫下,大部分细胞空泡化程度提高,线粒体数量急剧减少,细胞质中大小液泡周围沉积许多电子致密颗粒(图 5-c),表现出  $Pb^{2+}$  逐渐渗入细胞结构而沉积的过程。

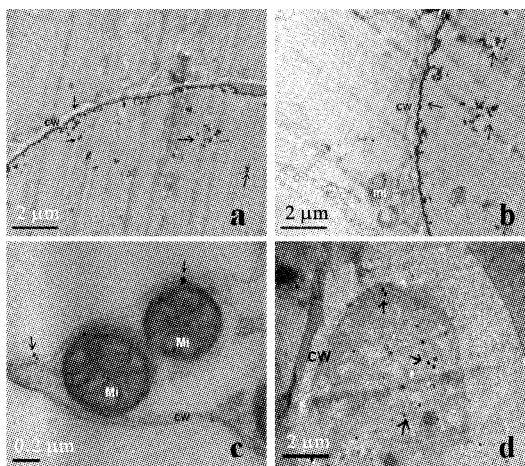


图 5 豌豆根细胞的 Pb 积累和分布  
Fig. 5 Accumulation and distribution of Pb in root cells of *P. sativum*

## 2.3 X-射线微区分析结果

根据 X-射线微区分析的能谱谱图,半定量地分析了严重胁迫(200 mg/L)下豌豆苗根表皮、皮层、中柱细胞与叶表皮、叶肉和微管细胞中铅在细胞壁、细胞质和液泡等亚细胞微区的含量与分布,发现显著差异( $P < 0.05$ ),结果如图 6。

## 3 讨论

### 3.1 重金属对植物毒害作用的内在机制

铅对豌豆幼苗的毒害源于重金属对植物细胞超微结构损伤,主要是叶绿体、线粒体、细胞核、细胞壁和细胞膜系统的结

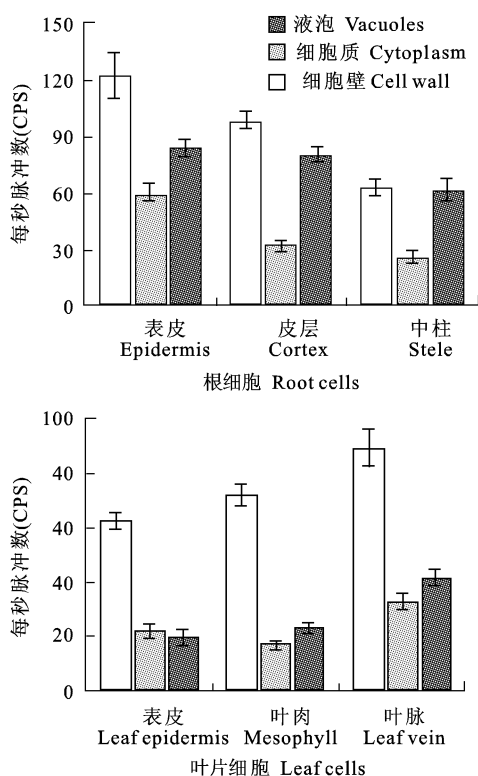


图6 Pb 区域化分布的能谱分析结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $N=7$ )

Fig. 6 Pb distribution pattern by X-ray microanalysis ( $\bar{x} \pm s$ ,  $N=7$ )

构遭到整体性破坏,而并非只破坏某一个酶或某一个细胞器.当细胞器遭到严重损伤时,可溶性蛋白含量下降,使受破坏的叶绿体被膜、类囊体膜和核膜无法得到及时修复,各细胞器功能分别不同程度受损,最终将影响植物的光合作用、呼吸作用、蛋白合成等的正常进行,导致细胞生理功能紊乱,甚至细胞死亡.超微结构的变化与培养浓度(危害的不同程度)具有密切相关性,中度抑制和高度抑制下豌豆根叶细胞的超微结构受损程度差异较大,对于不同植物来说,这种差异尤其显著<sup>[16]</sup>,这也是寻找重金属超积累植物的理论基础.

### 3.2 植物对重金属的区域化分布与耐性机制

与其他植物相比<sup>[5]</sup>,豌豆在较高的铅浓度处理下依然能维持一定的生长与代谢,体现了一种重金属超量积累的倾向和对铅污染胁迫的相对耐受性.

**3.2.1 根系富集作用** 由图6半定量结果,铅在在豌豆根与叶中的分布差异显著,根中积累的铅总量约为叶中的1.7倍,其中,根表皮中的铅总量甚至是叶表皮的2.6倍,根系富集重金属的作用十分明显.前人研究中,遭受锌、铅和镉污染的芦苇根部这些离子的含量比地上部分高10倍多<sup>[17]</sup>.0.5  $\mu\text{mol/L}$  镉胁迫下,镉在大豆根和叶中的积累比例为32.10:1.69<sup>[18]</sup>.对不同的有毒金属来说,植物根系或幼苗清除机理不尽相同.黄长干等<sup>[7]</sup>认为清除铅的机理包括沉淀和离子交换吸附,如铅在印度芥菜的根系细胞壁上形成沉淀(一般为碳酸铅),也可交换性吸附到细胞壁的负电荷点上(如与羧基相结合).

铅胁迫下,进入豌豆幼苗体内的大部分铅被保留在根部而

迁移至其它地上部位的较少,从而减轻了对地上部分各器官的毒害,一定程度上提高了豌豆的耐铅性.因此我们推测,根系富集作用是植物对重金属可能的耐性机制之一,也应是重金属“超积累植物”的广泛属性之一.豌豆苗的根系比较发达,甚至可将蛭石包裹,植物根系的这种吸收能力和巨大的表面积可以有效去除废水中的重金属,而水生植物、半水生植物和陆生植物均可作为根系过滤的材料.

**3.2.2 重金属元素与细胞壁结合** 如图6,在细胞器水平上,细胞壁比细胞质和液泡积累了更多的铅(分别为2.8倍和1.7倍),这一点在根叶中是一致的.透射电镜结果也显示豌豆根部的大部分铅是以难溶的状态存在,并沉淀在细胞细胞壁上(图4-c、图5-a),有研究认为这是因为细胞质中的物质主动将 $\text{Pb}^{2+}$ 在膜系统外沉淀(主要以碳酸铅沉淀形式)而造成的<sup>[19]</sup>.

我们认为,细胞壁对铅的大量积累阻止了过多的重金属进入细胞原生质体,使其免遭毒害.但不是所有的耐性植物都表现为重金属在细胞壁物质上的特定积累<sup>[16]</sup>.所以重金属与细胞壁的结合作用可能是豌豆一定程度上耐铅的机制之一,而未来的植物修复相关研究需要针对这种超积累植物潜在的细胞壁结合作用,并综合其他耐性机制,具体研究不同重金属污染下的植物修复效率,力争使其大化.

**3.2.3 液泡的区域化作用** 液泡里含有的各种蛋白质、糖、有机酸、有机碱等都能与重金属结合而解毒,而液泡膜上的 $\text{H}^+$ -ATP酶和 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶也可以有效地转运金属离子<sup>[20]</sup>.因此液泡常被认为是分隔重金属元素的机构.Wang等<sup>[21]</sup>曾在烟草液泡中镉的化学状态模拟中发现,液泡内镉与无机磷酸根能形成磷酸盐沉淀,降低了镉的毒性.我们的X-射线微区分析结果与此十分一致:虽然液泡在细胞质中,却比细胞质多积累了约60%的铅,在根中这个数字高达80%.液泡区隔化重金属可能的生理意义是,铅被局限在液泡这种活性较低的区域,阻止了过多的铅进入原生质体,使细胞质内的细胞器和一些重要代谢活动可少受铅毒害,因此液泡区域化作用可能是植物耐重金属的机制之一,也是筛选超积累植物的重要标准.

**3.2.4 不同细胞器的差异反应** 透射电镜观察(例如如图1-d、3-b、4-b、4-c等)发现,不同细胞器对重金属铅的耐受程度和受伤状况不同.经对多组电镜照片的观察和仔细分析,我们认为耐受性从弱到强的主要细胞器依次是:高尔基体、内质网及膜泡结构、线粒体、细胞核、叶绿体.此外在同一个细胞中,即使是同一细胞器对同一种逆境胁迫的反应也不同(例如如图1-e、2-c),植物细胞的各种细胞器在重金属胁迫下受损害的情况体现出这种时间上的先后次序和程度上的强弱差别,可保证细胞在逆境下同时进行适应性生理调节和正常生理功能,细胞可能通过逐步关闭某些细胞器的功能,利用不同细胞器的差异反应维持对植物生存更为基本的物质和能量条件,这对提高植物对逆境的抵抗力有重要意义.

**3.2.5 植物对重金属吸收与积累的可能过程** 我们认为,植物通过对重金属进行在不同的结构层次上的区域化积累使重金属毒害作用最小化.具体来说,对根的显微结构而言,铅的积累能力依次是表皮>皮层>中柱,而在叶中则是叶脉>叶肉>表皮(图6);推测在植株器官水平上,植物对重金属的吸收与积累过程是一种“输导组织依赖型”的区域化分布模式,即吸收能力强的根表皮与皮层细胞中积累了较多的铅,一定程度

上减轻了铅对植物地上部分的毒害,在根的这种防御性积累上限达到之后,铅一方面在中柱及其外层继续沉积,另一方面铅从根部运输到植株茎叶;叶脉作为输导组织的延续积累了比叶表皮和叶肉细胞更多的铅,延缓了重金属在叶表皮和叶肉细胞中的积累,而叶表皮和叶肉细胞承担了与植物存活密切相关的呼吸作用、蒸腾作用和光合作用。总体而言,地下部分的根系有显著的积累重金属的作用,而地上部分则具有一定的拒铅能力或把吸收到的铅重新运回根部的能力<sup>[22]</sup>等。而在细胞和亚细胞水平上,植物对重金属的吸收与积累过程是:重金属首先在细胞壁上沉积掉很大部分,再通过细胞壁和细胞膜进入原生质体,此时剩下的绝大部分重金属经液泡膜上酶转运进入液泡,这种区域化分布导致最终存在于细胞质中的重金属含量相对较低。

## 4 结论

豌豆幼苗在重金属重度胁迫下的表观伤害源于植物细胞超微结构上不同细胞器和膜系统的整体性损伤;而植物通过对重金属在不同的结构层次上的区域化积累使重金属毒害作用最小化。在植株器官水平上,植物对重金属的吸收与积累过程可能是一种“输导组织依赖型”的区域化分布模式,在细胞和亚细胞水平上则采取细胞壁沉积、液泡区域化和逐级关闭不同细胞器的等方式减轻重金属的整体性毒害作用。

到目前为止,电镜技术仍然是观测细胞超微变化最为有力的手段<sup>[23]</sup>,而 X-射线能谱微区分析技术是亚细胞水平进行元素分析的最有效的方法之一<sup>[24]</sup>。本研究将这两种技术有效结合,使亚细胞水平的形态学分析和元素半定量分析得以有效结合,可以综合研究重金属区域化的积累效应和毒害作用,为植物修复的细胞学机理研究提供了一种新的实验策略。

## References

- Bi J (毕静), Xu SY (徐士雅), Ni L (倪蕾), Hu LY (胡莲英), Sun H (孙浩), Wu J (吴静). Detect Pb concentration in blood from 180 children samples and its clinical meaning. *Chin J Nat Med* (中国自然医学杂志), 2005, **7** (2): 136 ~ 137
- Intawongse M, Dean JR. Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Addit Contam*, 2006, **23** (1): 36 ~ 48
- Brooks RR, Lee J, Reeves RD, Jaffre T. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium species of indicator plants. *J Geochem Explor*, 1977, **7**: 49 ~ 57
- Cheng S. Heavy metals in plants and phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2003, **10** (5): 335 ~ 340
- Liang RL (梁荣遴), Li DS (李德森), Du RQ (杜荣骞), Ji MY (纪明耀). Phytoremediation for heavy metal pollution in water II. The blastofiltration of Pb from water. *Agro-environ Prot* (农业环境保护), 2002, **21** (6): 499 ~ 501
- Xu QS (徐勤松), Shi GX (施国新), Du KH (杜开和), Zhang XL (张小兰), Zeng XM (曾晓敏). Toxic effect of Cd<sup>2+</sup> treatment on protective enzyme activity and ultrastructure in leaf cells of *Potamogeton crispus*. *Acta Hydrobiol Sin* (水生生物学报), 2003, **27** (6): 584 ~ 589
- Shi GX (施国新), Xie KB (解凯彬), Du KH (杜开和), Ding XY (丁小余), Chang FC (常福辰). Ultrastructural study of leaf cells damages from cr<sup>6+</sup> and as<sup>3+</sup> pollution in *Hydrilla verticillata*. *J Nanjing Norm Univ Nat Sci* (南京师大学报自然科学版), 2000, **24** (4): 93 ~ 97
- Huang CG (黄长干), Qiu YX (邱业先). Research progress in phytoremediation of polluted environment by heavy metal. *Acta Agric Univ Jiangxiensis* (江西农业大学学报), 2003, **25** (5): 676 ~ 680
- Basile A, Giordano S, Cafiero G, Spagnuolo V, Castaldo CR. Tissue and cell localization of experimentally supplied Pb in *F. hygrometrica* using X-ray SEM and TEM microanalysis. *J Bryol*, 1994, **18**: 69 ~ 81
- Fritz E. X-ray microanalysis of diffusible elements in plant cells after freeze - drying, pressure infiltration with ether and embedding in plastic. *Scanning Microsc*, 1989, **3**: 517 ~ 526
- Li Q, Fritz E. X-ray microanalysis of ion contents in roots of *Populus maximowiczii* grown under potassium and phosphorus deficiency. *J Plant Physiol*, 1991, **138**: 180 ~ 185
- Trebst A. Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts. *Annu Rev Plant Physiol*, 1974, **26**: 423 ~ 458
- Jiang XY (江行玉), Zhao KF (赵可夫). Mechanism of heavy metal injury and resistance of plants. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2001, **7** (1): 92 ~ 99
- Poulter A, Collin HA, Thurman DA. The role of cell wall in mechanism of lead and zinc tolerance in *Anthoxanthum odoratum*. *Plant Sci*, 1985, **42**: 61 ~ 66
- Sharma RK, Agrawal M. Biological effects of heavy metals: an overview. *J Environ Biol*, 2005, **26** (2 Suppl): 301 ~ 313
- Cao A, Cappai G, Carucci A, Muntoni A. Selection of plants for zinc and lead phytoremediation. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2004, **39** (4): 1011 ~ 1024
- Ye ZH, Baker AJM, Wong MH, Willis AJ. Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by the common reed *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steudel. *Ann Bot*, 1997, **80**: 363 ~ 370
- He YQ (何勇强), Tao QN (陶勤南), Hirose W, Obata H. The distribution of cadmium and several micronutrients in matured soybean plants under cadmium stress. *J Zhejiang Univ Agric & Life Sci* (浙江大学学报农业与生命科学版), 2000, **26** (2): 155 ~ 156
- Molone C, Koeppel DE, Miller RJ. Localization of lead accumulation by corn plants. *Plant Physiol*, 1974, **3**: 388 ~ 394
- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol*, 2005, **18** (4): 339 ~ 353
- Wang J. Computer-simulated evaluation of possible mechanisms for quenching heavy metal ion activity in plant vacuoles. *Plant Physiol*, 1991, **97**: 1154 ~ 1160
- Page V, Weisskopf L, Feller U. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytol*, 2006, **171** (2): 329 ~ 341
- Koster AJ, Klumperman J. Electron microscopy in cell biology: integrating structure and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **Suppl**: S56 ~ 10
- Hendrik K, Fang JZ, Steve PM. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol*, 1999, **119** (1): 305 ~ 311