

文章编号: 0254-5357(2014)05-0723-07

胁迫时间和胁迫浓度对超积累植物印度芥菜细胞中镉分布的影响

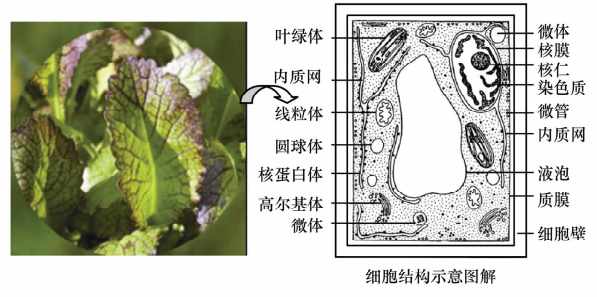
杨红霞¹, 张惠娟², 高津旭¹, 刘 崑¹, 李 冰¹

(1. 国家地质实验测试中心, 北京 100037; 2. 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 230026)

摘要: 超积累植物对重金属的区隔化作用能有效降低细胞质内金属离子的浓度, 是对重金属重要的解毒机制之一, 而细胞内各组织的区隔化作用大小并未取得一致性结论。本文研究了胁迫浓度和胁迫时间对超积累植物印度芥菜(*Brassica Juncea*) 细胞及亚细胞中镉分布的影响。印度芥菜幼苗分别用 0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 mg/L 镉胁迫 1、5、7、10、14 天后收获, 采用电感耦合等离子体质谱法测定印度芥菜根系和叶片亚细胞中镉的含量。结果表明: 镉在细胞壁中的比例占 50%~64%, 细胞液占 22%~38%, 细胞器占 7%~17%, 镉在细胞壁中所占比例显著高于细胞液和细胞器, 证明细胞壁区隔化在镉的解毒机制中具有重要的作用。随着胁迫时间和胁迫浓度的增加, 根系和叶片中亚细胞各组织中镉含量持续增加, 超过 7 天, 镉含量显著升高, 说明镉对植物的危害是一个缓慢过程。印度芥菜对镉胁迫浓度的最大耐受量为 1.0 mg/L, 超过此浓度, 植物细胞的破坏症状加重; 细胞超微结构研究也表明, 镉胁迫浓度超过 1 mg/L 后, 细胞结构发生了不同程度的损坏, 出现质壁分离、液泡增大甚至空泡化、质膜粗糙等现象, 继而影响到细胞的正常功能。因此, 在考察重金属对植物的危害时, 要充分考虑时间和浓度梯度两个参数的协同作用。

关键词: 镉; 亚细胞; 胁迫时间; 胁迫浓度; 电感耦合等离子体质谱法; 扫描透射电镜

中图分类号: O614.242; O657.63; P575.2 **文献标识码:** A



近年来, 研究重金属在植物细胞中的微区分布渐渐成为探索植物耐性机理的热点, 一方面有利于在细胞水平上揭示重金属毒害植物机理, 在重金属胁迫条件下, 植物细胞结构会发生不同程度的损伤, 主要在细胞膜、细胞核、内质网、高尔基体、叶绿体、线粒体、液泡等细胞器异常变化中体现出来^[1]; 另一方面可通过植物细胞器的损害程度来作为一种监测手段, 为以后可能将植物作为重金属污染指示者奠定理论基础。

大量研究表明, 超积累植物(如印度芥菜、遏蓝菜、东南景天、美洲商陆等)对镉的区隔化作用能有效降低细胞质内金属离子的浓度, 是对重金属重要的耐受机制之一^[2-4]。已有的研究表明, 细胞壁作

为重金属进入植物体的第一道屏障, 在植物重金属耐受机理中的作用倍受关注^[5-8]。由于细胞壁含有大量配体残基, 对金属阳离子有高亲和力, 通过包括离子交换、吸附、配位络合等作用结合重金属, 进而影响重金属离子向细胞内扩散速率及吸收, 以达到解毒的作用^[9]。而液泡里富含各种蛋白质、糖、有机酸和有机碱等, 都能与重金属结合耐受, 常被认为是重金属离子贮存的主要场所^[10-11]。通常采用扫描透射电镜(SEM)观察植物细胞超微结构的变化, 反映重金属对植物细胞的危害程度。不同的研究者对戊二醛、锇酸采用不同的浓度, 并用不同的试剂进行逐级脱水和染色, 透射电镜扫描结果显示, 在 Cd 胁迫下, 植物细胞形成空的液泡, 膜系统遭损坏, 细

收稿日期: 2013-10-08; 修回日期: 2014-02-21; 接受日期: 2014-06-04
基金项目: 国土资源部公益性行业科研专项(200911043-26); 中国地质大调查项目(12120113015400)
作者简介: 杨红霞, 副研究员, 博士, 地球化学专业。E-mail: yanghongxial@sina.com。

胞线粒体和叶绿体也出现不同程度变化,高浓度下,导致细胞死亡^[12-18]。由此可见,重金属对植物的毒害与其在植物体内各组织中的分布有关。同时,不同植物对镉的耐受程度也不同,胁迫时间和胁迫浓度是研究重金属毒害效应的两个重要参数。

本研究选取印度芥菜(*Brassica Juncea*)为研究对象,进行室内植物培养,采用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)对印度芥菜根系和叶片细胞不同部位中的镉含量进行了测定,初步探讨了胁迫时间和胁迫浓度对镉在细胞中分布的影响。并借助扫描透射电镜技术观察了不同镉胁迫浓度下,根系和叶片细胞超微结构的变化,为进一步研究重金属对植物的毒害机理提供依据。

1 实验方法

1.1 仪器及主要试剂

Agilent 7500a 电感耦合等离子体质谱仪(美国 Agilent 公司)。工作参数:射频功率 1350 W;采样深度 5.7 mm;雾化器类型 Babinton 型;载气流速 1.10 L/min。

透射电镜型号为 TEM-1200EX(日本 JEOL 公司)。

镉标准储备液:1.0 mL/mg Cd。准确称取高纯 0.1142 g 氧化镉于烧杯中,加入 50% 的硝酸 20 mL,加热溶解。冷却后移入 100 mL 容量瓶中。以水定容,摇匀。使用时按需要逐级稀释。

实验中所用的硝酸、高氯酸、磷酸、钼酸、柠檬酸、醋酸均为优级纯试剂。

水:去离子水再经 Milli-Q 装置纯化(>18 MΩ·cm)。所有标准溶液和样品制备全部用 Milli-Q 纯化水。

1.2 植物培养

参照文献[19-20]的方法,选取积累型印度芥菜种子在培养箱中进行植物预培养。植株长成后分别用 0、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 mg/L 镉胁迫 1、5、7、10、14 天。处理溶液的 pH=5.8。

1.3 细胞分离

采用 Wang 等^[21]建立的方法处理样品。称取适量植物根系或叶片,与 10 mL 预冷的提取液(内含 pH=7.5 的 50 mmol/L Tris-HCl、250 μmol/L 蔗糖及 1.0 mmol/L 二硫代苏糖醇混合后加入少量液氮研磨成匀浆。匀浆于超高速冷冻离心机(Sigma 3K30)在 3000 r/min 下离心 15 min,所得沉淀物即为细胞壁组分,其主要成分为细胞壁及其残渣。上

清液在 15000 r/min 下离心 30 min,最后所得上清液为细胞液(主要为液泡部分)及沉淀物(细胞器部分,主要为线粒体、叶绿体等)。整个过程全部在 4℃ 条件下操作。分离后的各部分提取物用 3~5 mL 硝酸-高氯酸(体积比 4:1)消解后,用 2% 的硝酸定容至 10 mL,然后用 ICP-MS 测定 Cd 含量。

1.4 透射电镜切片处理

取 1~3 mm 根尖,叶片取从顶部往下第 5 片叶子去叶柄并切成约 1 mm(1 mm 大小,包埋在 2.5% 的戊二醛溶液中,4℃ 固定过夜,然后按下列步骤处理样品:倒掉固定液,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH=7.0)漂洗样品三次,每次 15 min;用 1% 的钼酸溶液固定样品 1~2 h;倒掉固定液,再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH=7.0)漂洗样品三次,每次 15 min;之后用 5 种梯度浓度(50%、70%、80%、90% 和 95%)的乙醇溶液对样品进行脱水处理,每种浓度处理 15 min,再用 100% 的乙醇处理一次,每次 20 min;最后过渡到纯丙酮处理 20 min;用包埋剂(2.5% 戊二醛)与丙酮的混合液(体积比 1:1)浸泡 1 h;用包埋剂与丙酮的混合液(体积比 3:1)浸泡 3 h;纯包埋剂处理样品过夜;将经过渗透处理的样品包埋起来,70℃ 加热过夜,即得到包埋好的样品。样品在 Reichert 超薄切片机中切片,获得 70~90 nm 的切片,该切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀-50% 乙醇饱和溶液各染色 15 min,电镜观察。

2 结果与讨论

2.1 胁迫时间和胁迫浓度对亚细胞中镉分布的影响

为了研究镉在根系和叶片亚细胞各组织中的分布,考察胁迫时间和胁迫浓度对亚细胞各组织的区隔化作用大小的影响,印度芥菜分别用 0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 mg/L Cd 标准溶液胁迫 1、5、7、10、14 天后收割,进行亚细胞组织分离后,观察亚细胞各组织中 Cd 的分布比例。随着胁迫时间的变化,各组织中 Cd 的含量差别不大,但随着胁迫浓度的变化,根系和叶片中 Cd 的含量都有变化。以刺激时间 1 天为例,结果见图 1,随着胁迫浓度的增加,镉含量在根系细胞壁中占 50%~62%,细胞液占 22%~32%,细胞器占 10%~17%。而在叶片中,镉含量在细胞壁中 53%~64%,细胞液占 27%~38%,细胞器占 6.9%~9.0%,可以看出,镉含量在根系和叶片的细胞壁中所占比例显著高于细胞液和细胞器,随着胁迫浓度的增加,在细胞器中的比例反而降低,减少了对细胞的毒害。

本研究结果表明细胞壁作为重金属进入植物体的第一道屏障,在植物重金属耐受机制中起重要作用。但细胞壁对金属的固定作用不是一个普遍的抗金属毒害的机制。例如抗 Zn 毒和 Zn 敏感型菜豆的细胞壁物质表现出相似的亲和力^[22],而在对黄瓜、菠菜为材料研究发现,Cd 在细胞壁上结合的量较少,而主要与细胞内成分结合^[23]。因而细胞壁在超积累植物起多大作用,有待于进一步研究。

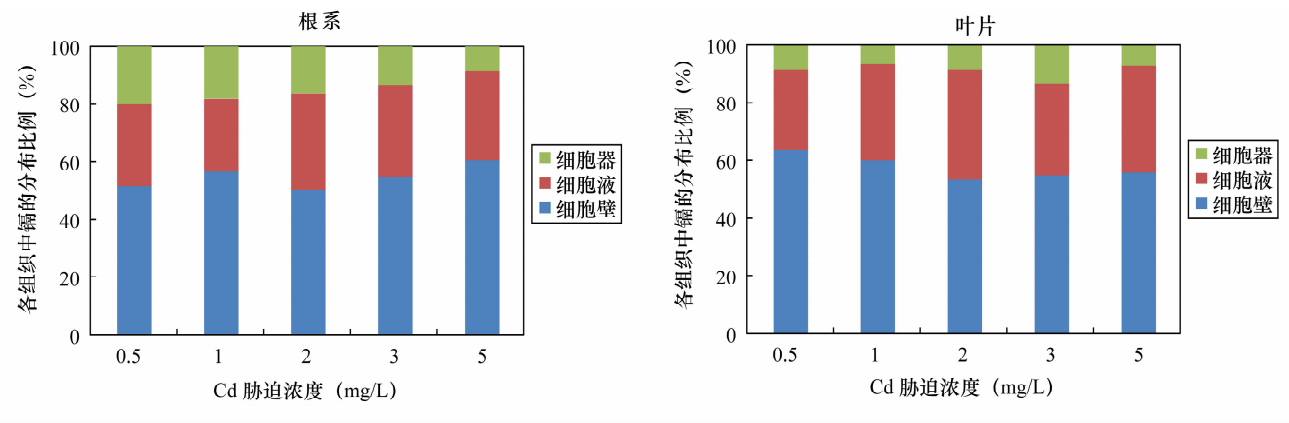


图 1 胁迫浓度对细胞不同组织中镉分布的影响
Fig. 1 Effect of exposure concentration on cadmium distribution in different tissues of cells

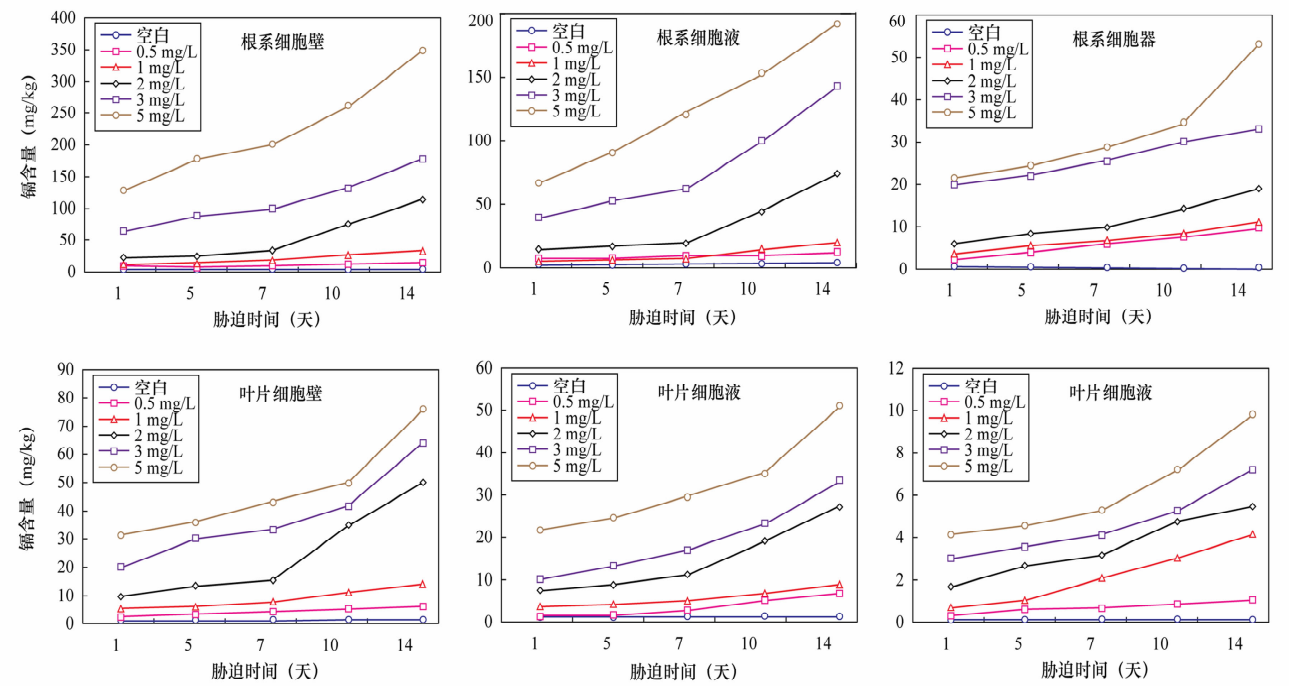


图 2 不同镉刺激浓度和时间下根系和叶片细胞中镉含量分布规律
Fig. 2 Subcellular distribution of cadmium in root and leaf samples

胁迫时间和胁迫浓度对亚细胞中 Cd 含量的影响如下:胁迫时间低于 7 天时,亚细胞中镉含量缓慢上升,超过 7 天,亚细胞中镉含量显著升高,说明镉对植物的危害是一个缓慢过程。而且胁迫浓度低于 1.0 mg/L 时,根和叶片的亚细胞中镉含量相差不大,结合植物生物量在 1.0 mg/L 时最大的结果,推断植物对 Cd 的最大耐受量为 1.0 mg/L,超过此浓度植物的正常生长将受到影响^[16]。

2.3 胁迫浓度对细胞超微结构的影响

为了研究镉胁迫浓度对细胞超微结构的影响,对根和叶片用透射电镜分析,结果见图 3 和图 4。图 3 结果表明,对照组(胁迫浓度 0 mg/L)印度芥菜根细胞的细胞器没有明显的损伤,植物细胞质膜及细胞壁表面光滑、清晰、连续,细胞质和细胞器丰富并基本充满整个细胞。不同浓度镉处理后,相比于

对照组均出现了不同程度的结构破坏症状,随着胁迫浓度的增加,细胞破坏症状加重。1 mg/L 镉溶液处理后,根细胞的细胞质明显减少,细胞出现空泡化。5 mg/L 镉溶液处理后,症状进一步加重,并且发生了严重的质壁分离,质膜变得粗糙,出现许多沉积物。

图 4 结果表明,在未经 Cd 处理的对照组(胁迫浓度 0 mg/L)叶片样品中,细胞完整,叶绿体片层结构清晰,叶绿体呈椭圆形并有着规则的类囊体膜(对照)。Cd 处理以后,印度芥菜叶片细胞出现了一些结构变化。1 mg/L 镉处理时,细胞结构有轻微的变化,到 5 mg/L 镉处理时,开始出现质壁分离,液泡增大,叶绿体略微肿胀,基粒减少,片层结构松散,并且出现了一些嗜饿颗粒。随着镉胁迫浓度的增加,叶片细胞破坏症状表现与根系细胞类似。

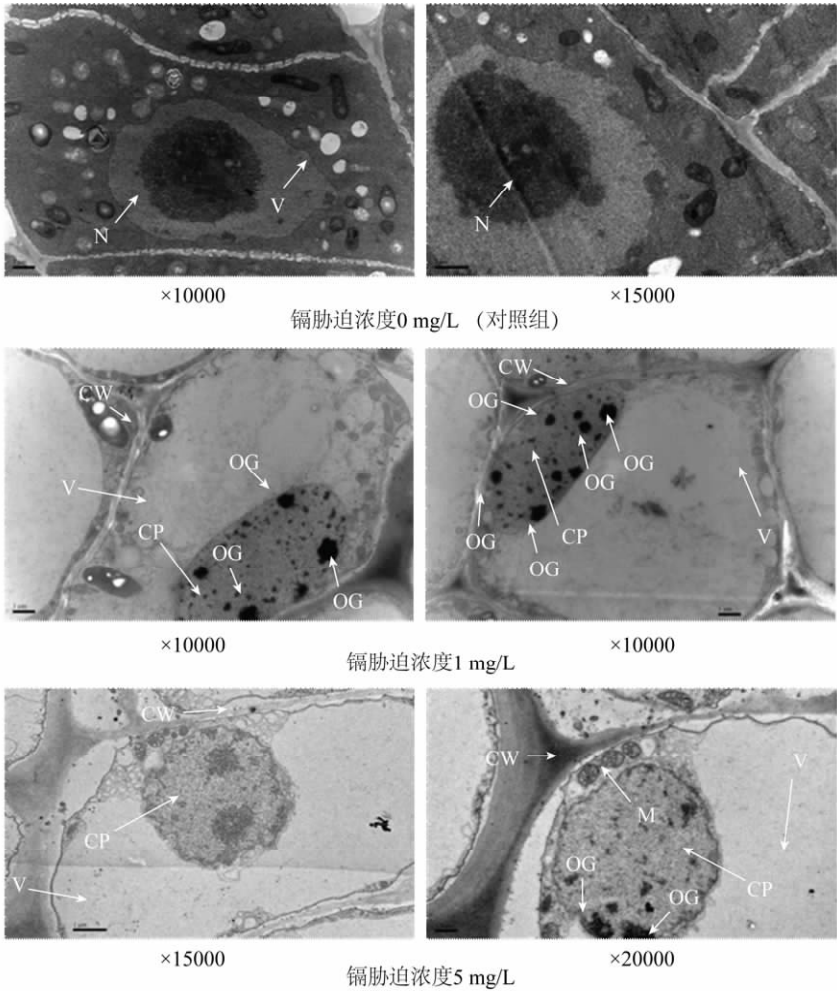


图 3 不同镉浓度下印度芥菜根系的显微结构
Fig. 3 SEM maps of subcellular under different cadmium disposal in root samples
Chl—叶绿体;CP—细胞质;V—液泡;CW—细胞壁;M—线粒体;PM—细胞质膜;SG—淀粉粒;OG—嗜饿颗粒;N—细胞核。

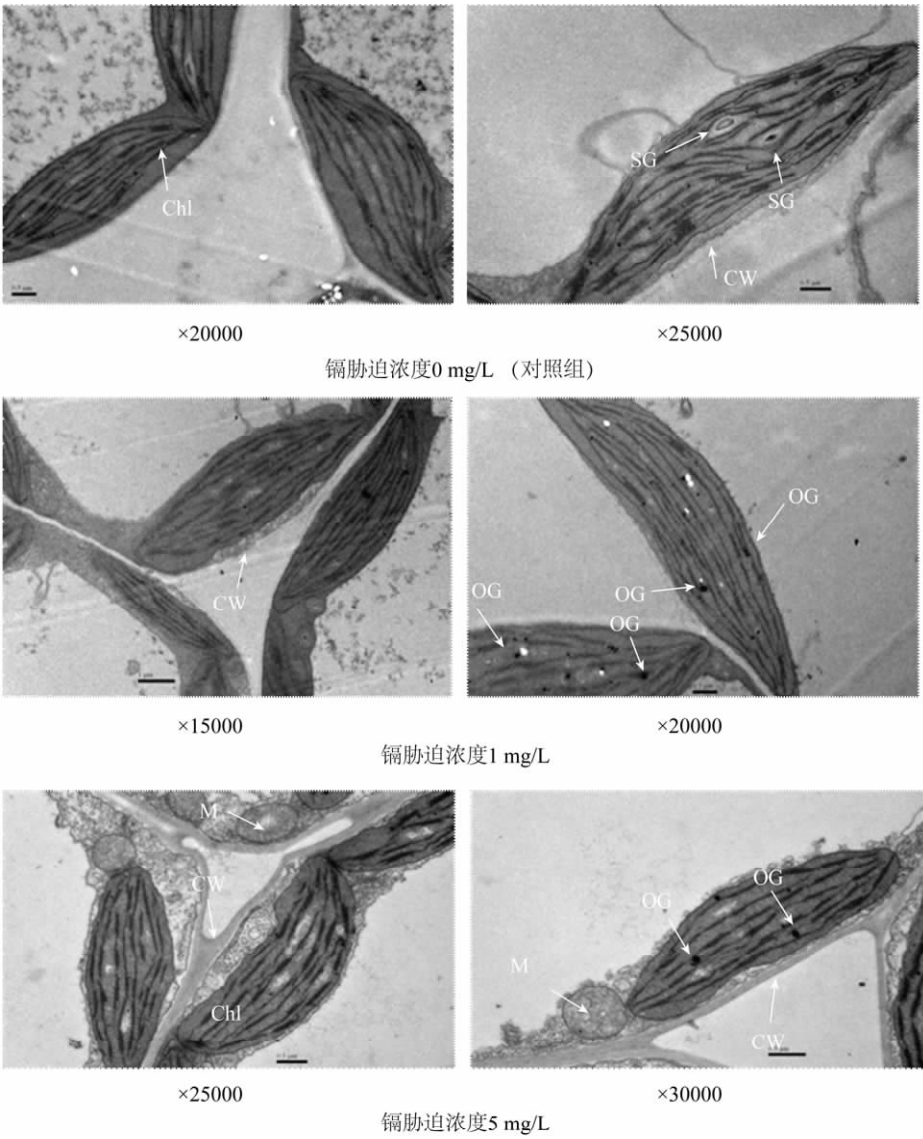


图 4 不同镉浓度下印度芥菜叶片的显微结构

Fig. 4 SEM maps of subcelluar under different cadmium disposal in leaf samples

3 结语

本文研究不同镉胁迫时间和胁迫浓度条件下镉在亚细胞中的分布比例和规律,结果表明随着胁迫时间的变化,各组织中 Cd 的含量变化不大;随着胁迫浓度增加,镉在根系和叶片细胞壁中所占比例显著高于细胞液及细胞器,而随着胁迫浓度的增加,镉在细胞器中的比例有所降低,减少了对细胞的毒害。说明细胞壁作为重金属进入植物体的第一道屏障,在植物重金属耐受机制中起重要作用。

胁迫时间和胁迫浓度对植物亚细胞中镉含量的影响说明镉对植物的危害是一个缓慢过程。超微结构研究也表明,镉胁迫浓度超过 1 mg/L 后,细胞结构发生了不同程度的损坏;随着胁迫浓度的增加,细

胞破坏症状加重。由此,在考察重金属对植物的危害时,要充分考虑时间和浓度梯度两个参数。重金属的亚细胞水平相关研究的深入,可望为揭示超积累植物中重金属的区隔化作用进一步提供理论参考。然而由于实验条件的限制,对于这些重金属如何进入相应组织(细胞)以获得区隔或解毒作用仍缺乏了解。

4 参考文献

[1] Krupa Z, Skorzynska E, Maksymiec W, Baszynski T. Effect of cadmium treatment on the photosynthetic apparatus and its photochemical activities in greening radish seedlings[J]. *Photosynthetica*, 1987, 21:156 – 164.

- [2] Tian S K, Lu L L, Yang X E, Labavitch J M, Huang Y Y, Brown P. Stem and leaf sequestration of zinc at the cellular level in the hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance[J]. *New Phytologist*, 2009, 182: 116 – 126.
- [3] 刘威, 束文圣, 蓝崇枉. 宝山堇菜 (*Viola baoshanensis*)——一种新的镉超富集植物[J]. 科学通报, 2003, 48(19): 2046 – 2049.
- [4] Jin X F, Yang X E, Islam E, Liu D, Mahmood Q. Effects of cadmium on ultrastructure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* Hance[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 156(1 – 3): 387 – 397.
- [5] 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.
- [6] Turnau K, Kottke I, Dexheimer J, Botton B. Element distribution in *Pisolithus tinctorius* mycelium treated with cadmium dust[J]. *Annals of Botany*, 1994, 74: 137 – 142.
- [7] Vollenweider P, Cosio C, Gunthardt-Goerg M S, Keller C. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*salix viminalis* L.) part ii microlocalization and cellular effects of cadmium[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 58: 25 – 40.
- [8] Cosio C, DeSantis L, Frey B, Diallo S, Keller C. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56: 765 – 775.
- [9] Meychik N R, Yermakov I P. Ion exchange properties of plant root cell walls[J]. *Plant and Soil*, 2001, 234: 181 – 193.
- [10] Salt D E, Rauser W E. Mg ATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots[J]. *Plant Physiology*, 1995, 107: 1293 – 1301.
- [11] Xiao X, Feng Q Y, Ding Y, Zhang S, Jia H X. The effect of Cd on ultrastructure of wheat [J]. *Procedia Earth and Planetary Science*, 2009, 1: 1253 – 1257.
- [12] Jin X F, Yang X E, Islam E, Liu D, Mahmood Q. Effects of cadmium on ultrastructure and antioxidative defense system in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* Hance[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 156: 387 – 397.
- [13] 施国新, 杜开和, 解凯彬, 丁小余, 常福辰, 陈国祥. 汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究[J]. 植物学报, 2000, 42(4): 373 – 378.
- [14] 彭鸣, 王焕校, 吴玉树. 镉、铅诱导的玉米 (*Zeamays L.*) 幼苗细胞超微结构的变化[J]. 中国环境科学, 1991, 11(6): 426 – 431.
- [15] 倪才英, 李华, 骆永明, 陈英旭. 铜、镉及其交互作用对泡泡草细胞超微结构的影响[J]. 环境科学学报, 2004, 24(2): 343 – 348.
- [16] 徐勤松, 施国新, 杜开和. 重金属镉、锌在苎草叶细胞中的超微定位观测[J]. 云南植物研究, 2002, 24(2): 241 – 245.
- [17] 李大辉, 施国新. Cd^{2+} 或 Hg^{2+} 水污染对菱体细胞的细胞核及叶绿体超微结构的影响[J]. 植物资源与环境, 1999, 8(2): 43 – 48.
- [18] Tian S K, Lu L L, Zhang J, Wang K, Brown P, He Z L, Liang J, Yang X. Calcium protects roots of *Sedum alfredii* H. against cadmium-induced oxidative stress [J]. *Chemosphere*, 2011, 84: 63 – 69.
- [19] Yang H X, Liu W, Li B, Wei W, Zhang H J, Chen D Y. Speciation analysis of Cadmium in Indian mustard (*Brassica Juncea*) by size exclusion chromatography-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (SEC-HPLC-ICP-MS)[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 37(10): 1511 – 1514.
- [20] 杨红霞, 刘崴, 李冰, 魏巍, 张惠娟. 胁迫时间和胁迫浓度对镉形态分布的影响[J]. 岩矿测试, 2013, 32(2): 306 – 310.
- [21] Wang X, Liu Y G, Zeng G M, Chai L Y, Song X C, Min Z Y, Xiao X. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Bechmeria nivea* (L.) Gaud[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2008, 62: 389 – 395.
- [22] 李文学, 陈同斌. 超富集植物吸收富集重金属的生理和分子生物学机制[J]. 应用生态学报, 2003, 14(4): 627 – 631.
- [23] 杨居荣, 蒋婉茹. 不同耐镉作物体内镉结合体的对比研究[J]. 作物学报, 1995, 21(5): 605 – 611.

Effect of Exposure Levels and Exposure Time on Subcellular Distribution of Cadmium in Indian Mustard (*Brassica juncea*)

YANG Hong-xia^{1*}, ZHANG Hui-juan², GAO Jin-xu¹, LIU Wei¹, LI Bing¹

(1. National Research Center for Geoanalysis, Beijing 100037, China;

2. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agriculture University, Nanjing 230026, China)

Abstract: Segmentation effect of super accumulation of heavy metals in plants which can reduce the concentration of metal ions in the cytoplasm of a cell is one of the important mechanisms of heavy metal detoxification. However, the compartmentalization effect from different tissues of a cell does not get a consistent conclusion. In order to evaluate whether intracellular compartmentalization could explain Cd detoxification mechanisms, the work described in this paper was designed to study the effect of exposure time and levels on Cd distribution of Indian mustard (*Brassica juncea*) at the cell and sub-cell level. Root and leaf samples were exposed to 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 5.0 mg/L and harvested after 1, 5, 7, 10 and 14 days exposure. Cells were separated into three fractions: cytoderm, soluble fraction and organelle containing fraction using differential centrifugation technique, then Cr from all three fractions was determined by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS). Results showed that Cr in cytoderm, cytoplasm and organelles accounted for 50% –64%, 22% –38% and 7% –17% of total cadmium, respectively. It can be clearly indicated that the proportion of Cr in cytoderm is significantly higher than that in cytoplasm and organelles, indicating that compartmentalization of cytoderm plays a prominent role in Cd detoxification. As the exposure concentration and time increases, the content of Cd in cell fraction increases significantly especially after 7 days, which demonstrates that the effect of Cd on plant development is a slow process. Moreover, the excess of Cr stress concentration (>1.0 mg/L) would lead to deteriorative damage on plant cells, which was visually identified by TEM research, demonstrating different degrees of damages-plasmolysis, vacuolization and plasmalemma roughness, thus affecting the normal function of cells. These results suggest exposure time and levels are important parameters that must be taken into consideration in the study of the toxicity of heavy metals in plants.

Key words: cadmium; subcellular distribution; exposture time; exposure levels; Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry; Scanning Transmission Electron Microscopy

《分析试验室》2015 年征订启事

国内统一刊号: CN11 – 2017/TF 国际标准刊号: ISSN 1000 – 0720 国内邮发代号: 82 – 431
国际 CODEN 码: FENSE4 国外代号: M848 广告经营许可证: 京西工商广字第 0441 号
《分析试验室》是中文核心期刊,月刊,大 16 开,128 页,国内外公开发行。
《分析试验室》1982 年创刊,目前已成为我国著名的分析化学专业刊物。影响遍及冶金、地质、石油化工、环保、药物、食品、农业、商品检验和海关等社会各行业及各学科领域。《分析试验室》以突出创新性和实用性为办刊宗旨,作者来自全国各行业的生产、科研第一线;已被列为全国中文核心期刊、中国科技论文统计用期刊、美国“CA 千种表”中我国化学化工类核心期刊、中国学术期刊(光盘版)和中国期刊网全文数据库等国内外多家检索数据库、文摘收录,影响因子连续多年列化学类前列。本刊常设研究报告、研究简报、仪器装置与设备等栏目。“定期评述”栏目系统发布特邀知名专家学者撰写的国内外分析化学各领域的综合评述,连续跟踪学术发展前沿。

2015 年《分析试验室》每期定价 18 元,全年 12 期,216 元。
全国各地邮局征订,邮发代号 82 – 431。漏订的读者可直接与编辑部联系。
编辑部地址:北京新街口外大街 2 号(邮编:100088)
电话: 010 – 82013328 E – mail: analysislab@ 263. net; ana – info@ 263. net