

镉在圆锥南芥 (*Arabis paniculata* Franch.) 中的 亚细胞分布及其化学形态^{*}

于方明¹, 汤叶涛^{1,2}, 周小勇¹, 胡鹏杰¹, 曾晓雯¹, 赵璇¹, 仇荣亮^{1,2}

(1. 中山大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510275;

2. 广东省环境污染控制与修复技术重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 通过水培的方式, 采用差速离心技术和化学试剂逐步提取法研究了 Cd 在圆锥南芥 (*Arabis paniculata* Franch.) 叶片和根中的亚细胞分布和化学形态。研究表明, 在 Cd 处理浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 圆锥南芥叶片中的 Cd 主要贮藏在细胞壁和细胞核中, 而根系中 Cd 的分布顺序为: 细胞壁 > 核糖体 > 细胞核 > 叶绿体 > 线粒体; $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 处理时, 叶片中的 Cd 主要集中在细胞壁以及细胞核中, 根系中核糖体含量最高, 占全量的 53.92%。这说明圆锥南芥叶片富集的 Cd 主要贮存在细胞壁以及细胞核中, 而根系富集的 Cd 主要分布在核糖体与细胞壁中。化学形态结果表明 Cd 处理水平的变化对圆锥南芥 Cd 的化学形态有明显的影响。 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 处理时, 圆锥南芥叶片中以水提取态 Cd 为主, 根系中乙醇提取态 Cd 的含量最高; 当 Cd 提高到 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 叶片和根系中 Cd 均以 NaCl 提取态含量最高, 说明随着 Cd 浓度的增加, Cd 与蛋白质、果胶酸等形态结合是圆锥南芥减轻 Cd 毒害的主要机制。

关键词: 圆锥南芥; 镉; 化学形态; 亚细胞分布

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) 06-0088-05

镉元素 (Cd) 为植物的非必需元素, 植物对 Cd 的过量吸收将对植物本身造成严重伤害。但 Cd 超富集植物能够从土壤中吸收大量的 Cd 贮藏于体内, 而不会对植物本身造成任何毒害, 这与其超强的解毒机制密不可分, 但目前对相关机制尚存不同看法。植物类型不同, 对 Cd 的解毒机理可能存在很大差异, 液泡被认为是多数植物体中贮存 Cd 的主要器官^[1], 而 Cd 超富集植物东南景天吸收的绝大部分 Cd 贮存在细胞壁中, 可溶态以及细胞器中所含的 Cd 较少^[2], 金属与有机酸、蛋白质间的络合也被认为是很多植物减少金属对植物毒性的重要途径^[3]。同时不同类型金属的解毒机制可能也存在差别, Perronne 等^[4]通过土培发现锌 (Zn) 在 *Thlaspi caerulescens* 主要集中在老叶, 而 Cd 主要集中在新叶; Zn 超富集植物长柔毛委陵菜 (*Potentilla griffithii* Hook.) 中 Zn 以氯化钠提取态和水提取态为主导赋存形态^[5]。而不同基因型大麦中植物地上部分的 Cd 主要以 HA 和 HCl NaCl 提取态为主^[6]。新发现的多金属超富集植物圆锥南芥^[7] (*Arabis paniculata* Franch.) 对 Cd 有较强的富集能力, 但对其机理的探讨较少。本文通过差速离心技

术和化学试剂逐步提取法对 Cd 在圆锥南芥细胞内的亚细胞分布特征和结合形态以及不同叶龄中的富集量进行了研究, 试图揭示其对 Cd 的耐性和解毒机理, 从而为研究超积累植物耐 Cd 的生理和分子生物学机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物培养

圆锥南芥植物种子取自云南省兰坪县金顶镇的架崖山铅锌矿区。在温室中播种于无重金属污染的菜园土中 (采自华南农业大学教学菜园), 生长 3 个月后, 选择长势良好, 大小一致的幼苗, 进行 $1/8$ Hoagland 营养液培养实验, 营养液组成为: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KCl $0.10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2SO_4 $0.70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, H_3BO_3 $10.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0.20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_6\text{MgO}_{24}$ $0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Fe-EDTA $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。设置低 Cd ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和高 Cd

* 收稿日期: 2006-12-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40571144); 广东省自然科学基金重点项目 (05101824) 和团队资助项目; 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NCET-04-0790); 国家“985”二期“环境与污染控制技术创新平台”基金资助项目

通讯联系人: 仇荣亮; E-mail: eeslrn@mail.sysu.edu.cn

(10.0 mg L⁻¹) 两个处理水平 (以 CdCl₂·2.5H₂O 加入, 单 Cd 计算), 3 个重复, 每重复 4 株, 营养液连续通气, 每 3 天更换一次, 并用 0.1 mmol L⁻¹ NaOH 调节 pH 至 5.8 左右, 处理 21 d 后收获。植株根系先用自来水冲洗, 再用 20 mmol L⁻¹ Na₂-EDTA 交换 20 min 以去除根系表面吸附的 Cd, 最后用去离子水洗净, 吸干表面水分, 置于 -20℃ 冰箱内供分析测定用。

1.2 试验方法

1.2.1 植物不同叶龄的区分 圆锥南芥属于十字花科南芥属植物, 呈莲座状外形, 在本实验的生长期 (3 个月), 叶片从里到外, 明显分为内、中、外 3 层。在本实验中将位于圆锥形内层的叶子归为嫩叶, 中间层的为中叶, 外层的视为老叶。

1.2.2 植物体内的亚细胞组分分离 按文献 [8-9] 的方法改进后进行, 具体为: 准确称取鲜样 0.5000 g 加入 20 mL 提取液 (0.25 mmol L⁻¹ 蔗糖 + 50 mol L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5)), 研磨匀浆, 用尼龙纱布过滤, 滤渣为细胞壁部分; 滤液在 600×g 下离心 10 min 沉淀为细胞核部分; 上清液在 2 000×g 下离心 15 min 沉淀为叶绿体部分; 上清液在 10 000×g 下离心 20 min 沉淀为线粒体部分; 上清液为含核糖体的可溶部分, 每组两次离心, 全部操作在 4℃ 下进行。

1.2.3 Cd 在植物体内的化学形态分析 采用化学试剂逐步提取法^[4], 具体操作如下: 准确称取鲜样 0.5000 g 加入 20 mL 提取剂研磨匀浆后转入 50 mL 的塑料离心管, 在 25℃ 恒温振荡 22 h 后, 5000 rpm 离心 10 min 倒出上清液, 再加入 10 mL 的提取剂, 25℃ 恒温振荡 1 h 5000 rpm 离心 10 min 倒出上清液。合并两次上清液。采用下列 5 种提取剂依次逐步提取: 80% 乙醇 (主要提取醇溶性蛋白质、氨基酸盐等为主的物质); 去离子水 (主要提取水溶性有机酸盐); 1 mol L⁻¹ 氯化钠溶液 (主要提取果胶酸盐、与蛋白质结合态或吸附态的重金属等); 2% 醋酸 (主要提取难溶于水的重金属磷酸盐); 0.6 mol L⁻¹ 盐酸 (主要提取草酸盐等); 最后为残留态。

1.2.4 Cd 含量的测定 以提取剂作为空白, 上清液用原子吸收分光光度计 (AAS HITACHE-5000) 直接测定 Cd 含量; 残渣部分分别用去离子水多次转入 100 mL 三角瓶中, 于电热板上蒸干,

加入 5 mL 浓 HNO₃, 消煮至澄清, 用去离子水定容后测定。不同叶龄叶片中 Cd 用 HNO₃-HClO₄ 消化, 过滤, 去离子水定容, AAS 测定, 同时加做标准样。所有数据用 SPSS1.5 软件处理。

2 结果与分析

2.1 Cd 在不同叶龄中的分布

从表 1 可以看出, Cd 浓度在圆锥南芥中的分布规律是, 幼叶>中叶>老叶, 方差分析与多重比较结果表明, 在 Cd 处理浓度为 1.0-10.0 mg L⁻¹ 时, 幼叶与中叶, 中叶与老叶之间的差异不显著, 但是幼叶与老叶之间的差异达到显著水平 (P<0.05)。

表 1 Cd 在圆锥南芥不同叶龄中的分布

Tab 1 Distribution of Cd in young mature and senescing leaves of *A. paniculata*

Cd mg L ⁻¹	幼叶	中叶	老叶
	mg kg ⁻¹		
1.0	64.70 ± 6.17 ^a	49.45 ± 10.25 ^{ab}	43.89 ± 9.31 ^b
10.0	174.51 ± 41.66 ^a	119.75 ± 14.08 ^{ab}	105.01 ± 33.67 ^b

注: 同行不同字母表示用 LSD 方法测试时在 5% 水平上的差异显著性

2.2 Cd 在圆锥南芥中的化学形态

从表 2 和图 1 中可以看出, 在低 Cd 或高 Cd 处理下, HC 提取态和残渣态的绝对含量以及所占的比例均较低 (所占的比例均低于 4%)。在 Cd 的处理浓度为 1.0 mg L⁻¹ 时, 圆锥南芥叶片中水提取态 Cd 含量最高, 达到 18.8 mg kg⁻¹, 占全量的 36.62%; 根系中, 乙醇提取态的含量最高, 为 39.0 mg kg⁻¹, 占全量的 44.34%。提高 Cd 的处理水平, Cd 含量显著提高, Cd 的比例分配有明显的变化。当 Cd 的浓度提高到 10.0 mg L⁻¹ 时, 叶片中 NaCl 提取态 Cd 含量最高, 为 61.9 mg kg⁻¹, 占全量的 37.98%, 同时, 醋酸提取态以及盐酸提取态百分比含量也有所提高; 根系中, 也以 NaCl 提取态 Cd 含量最高, 达到 118.5 mg kg⁻¹, 占全量的 35.76%。同时, 水提取态有所提高, 但乙醇提取态、醋酸提取态和盐酸提取态降低。因此, 圆锥南芥中富集的 Cd 主要以 NaCl 提取态为主, 即主要是果胶酸、蛋白质结合态和吸附态 Cd

表 2 不同 Cd 处理下圆锥南芥中 Cd 的化学形态
Tab 2 Chemical forms of Cd in *A. paniculata* at different Cd treatments

Cd (mg·L ⁻¹)	部位	Cd含量 / (mg·kg ⁻¹)						总量实测值 (mg·kg ⁻¹)	回收率 ¹⁾ %
		乙醇	水	氯化钠	醋酸	盐酸	残渣态		
1.0	叶	11.2±1.3	18.8±0.3	8.7±1.5	11.5±1.5	1.1±0.1	0.1±0.1	54.4±12.1	94.4
10.0	叶	12.5±1.1	41.9±3.6	61.9±4.6	40.6±1.4	5.7±0.6	0.2±0.0	176.1±20.3	92.5
1.0	根	39.0±3.3	12.5±0.4	25.1±6.5	8.0±1.3	3.2±0.2	0.1±0.1	97.2±11.8	90.3
10.0	根	79.9±11.0	99.8±6.0	118.5±19.0	26.6±1.5	6.5±0.7	0.2±0.2	361.2±26.6	91.8

1)回收率为各提取态的总和与总量实测值的百分比

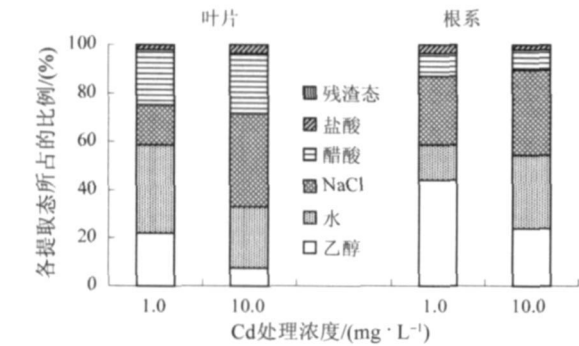


图 1 不同 Cd 处理下圆锥南芥中 Cd 的形态分配比例
Fig 1 Forms proportion of Cd in *A. paniculata* at different Cd treatments

2.3 Cd在圆锥南芥中的亚细胞分布

在不同浓度的 Cd 处理下，圆锥南芥的亚细胞分布及各部位所占比例如图 2 和图 3（回收率为 87% ~

92%）。在 Cd 处理浓度为 1.0 mg L⁻¹ 时，圆锥南芥叶片中的 Cd 主要贮藏在细胞壁和细胞核中，两者之和占全量的 78%，在叶绿体、线粒体以及核糖体中的分布较均匀，维持在 7% 左右；根系中的分布顺序为：细胞壁>核糖体>细胞核>叶绿体>线粒体，其中细胞壁占全量的 39.34%，细胞壁和核糖体占全部的 73.68%。当 Cd 浓度提高到 10.0 mg L⁻¹ 时，圆锥南芥 Cd 的亚细胞分布发生一定的改变。叶片的分布规律与低 Cd 浓度分布规律差别不大，主要集中在细胞壁以及细胞核中；但根系中核糖体含量最高，占全量的 53.92%，其次分别为细胞壁、核糖体、叶绿体和线粒体。表明圆锥南芥叶片富集的 Cd 主要分布在细胞壁以及细胞核中，根系中富集的 Cd 主要分布在核糖体与细胞壁中。

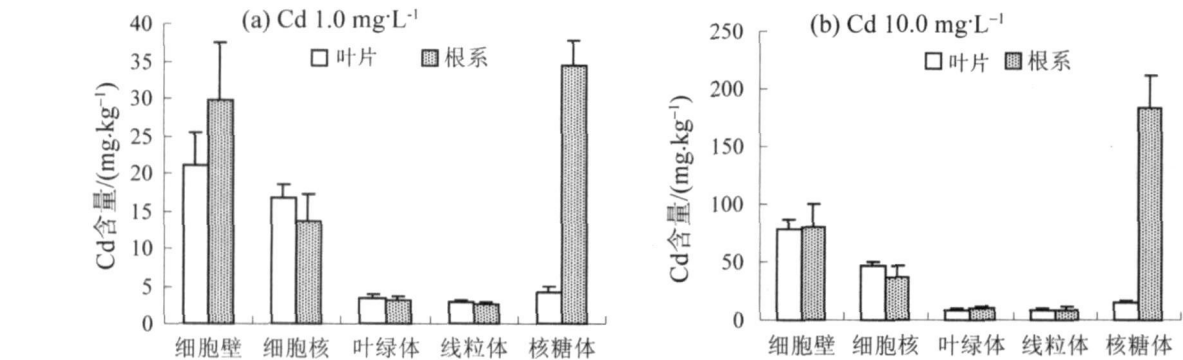


图 2 不同 Cd 处理下圆锥南芥中 Cd 的亚细胞分布
Fig 2 Subcellular distribution of Cd in *A. paniculata* at different Cd treatments

3 讨论

不同的金属在植株的不同部位贮藏量大不相同，Cd 的分布因植物种类的不同而不同，Davies^[10]对几种草本植物的研究结果发现，65% ~ 90% 的 Cd 贮存在根部；Perronet 等^[9]对 *T. caerulea* 的研究结果表明，94% 的 Cd 分布在地上部，90% 的 Zn 分布在地上部，且老叶中 Cd

和 Zn 的含量高于成熟叶片与嫩叶，*T. caerulea* 中老叶中 Cd 的浓度比新叶中的高，这与本研究的结果相反（表 1）。

对于超富集植物来说，液泡被认为是植物体中贮存 Cd 的主要器官^[11]，细胞壁是重金属进入细胞内部的第一道屏障^[12-13]。细胞壁属于细胞内的非原生质部分，细胞壁上的多糖分子（包括纤维素、半纤维素、木质素和粘胶等）和蛋白质分子

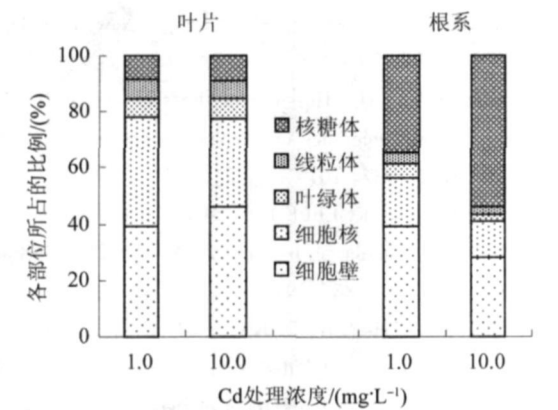


图 3 不同 Cd 处理下圆锥南芥 Cd 的亚细胞分配比例
Fig 3 Subcellular Proportion of Cd in *A. paniculata* at different Cd treatments

具有大量的羟基、羧基、醛基、氨基等亲金属离子的配位基团，这些金属配位体能与进入细胞的金属离子结合，从而减少金属离子的跨膜运输，降低细胞原生质体内金属离子的浓度，维持植物细胞的正常生理代谢^[12-14]，在超积累植物体内，有 85% ~ 90% 的重金属离子是与这些金属配位体结合形成螯合物^[15]。因此，重金属在植物体内的分布和存在形态是与多种金属配位体综合反应的结果。有研究表明，在 *Berkheya coddii* 叶片的上表皮中贮存的 Ni 比其他任何地方都高^[16]，Nishizono^[17]发现，*Athyrium yokoscense* 细胞壁中积累大量 Cd 并占整个细胞总量的 70% ~ 90%。Mopene 等^[18]在电子显微镜下证明了细胞壁有沉淀重金属的作用。N 等^[2]发现东南景天 (*Sedum alfredii* Hance) 吸收的绝大部分 Cd 贮存在细胞壁中，可溶态以及细胞器中所含的 Cd 较少。Wu 等^[9]对不同植物研究的结果表明，植物地上部分的 Cd 主要存在于细胞壁中。本实验研究结果表明，细胞壁是圆锥南芥贮藏 Cd 的重要部位 (图 2 图 3)，占 39% ~ 46%，叶绿体和线粒体中 Cd 的含量较低，这保证了圆锥南芥光合作用和呼吸作用的正常进行；在根系中，除细胞壁外，核糖体也成为贮藏 Cd 的重要部位，占 34% ~ 54%，这与叶片贮存 Cd 的方式不太一样，这可能是圆锥南芥叶片和根系解毒 Cd 毒害的机理不同之所在。

通过不同提取剂，研究 Cd 在植物体内的存在状态，对植物富集重金属的机理有一定的揭示作用。重金属水提取态主要是水溶性有机酸结合的 Cd，乙醇主要提取与醇溶性蛋白质、氨基酸盐等结合的 Cd，NaC 提取态则是与果胶酸、蛋白质结合或吸附的 Cd。本研究表明，低浓度 Cd (1.00 mg·L⁻¹) 处理时圆锥南芥叶片中以水提取

态 Cd 为主，根系中乙醇提取态的含量最高。当 Cd 提高到 10.0 mg·L⁻¹ 时，叶片和根系中 Cd 均以 NaC 提取态含量最高；在低 Cd 或高 Cd 处理下，HC 提取态和残渣态 Cd 所占的比例均低于 4% (表 2 图 1)，这与吴箐等^[5]对长柔毛委陵菜 (*P. Griffithii*) 的研究结果相似，说明有机酸、蛋白质以及氨基酸等配体分子在圆锥南芥减轻 Cd 毒害起重要作用。Cd 与有机酸结合形成的螯合物可限制金属在体内的移动性，减轻毒害^[19]，植物不同，有机酸的作用效果不同，用 20 mg·L⁻¹ Cd 处理过的超富集植物 *Thlaspi caerulescens* 在根部有 13% 的 Cd 与有机酸结合，25 mg·L⁻¹ N 处理过的 *Alyssum bertolonii* 28% 与有机酸结合^[19]。在 Cd 胁迫下，植物诱导出特定的蛋白质 (多肽)，并与之结合，从而减轻毒害。植物螯合肽 (Phytochelatin) 便是富含半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸的多肽^[20]，由 GSH 经酶促合成^[21]，金属硫蛋白 (Metallothioneins, MT) 也是富含半胱氨酸的蛋白质^[22]，这些物质在圆锥南芥对 Cd 的解毒过程中的作用尚需进一步研究。

参考文献:

[1] VOGELI L R, WAGNER G J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves [J]. *Plant Physiology* 1990, 92: 1086-1093.
[2] NI T H, WEI Y Z. Subcellular distribution of cadmium in mining ecotype *Sedum alfredii* [J]. *Acta Botanica Sinica* 2003, 45(5): 925-928.
[3] BAKER A J M. Metal tolerance [J]. *New Phytologist* 1987, 106: 93-111.
[4] PERRONNET K, SCHWARTZ C, GERARD E, et al. Distribution of cadmium and zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown on multiconaminated soil [J]. *Plant and Soil* 2003, 249: 19-25.
[5] 吴箐, 杜锁军, 曾晓雯, 等. 锌在长柔毛委陵菜细胞内的分布和化学形态研究 [J]. *生态环境* 2006, 15(1): 40-44.
[6] WU F B, DONG J, QIAN Q Q, et al. Subcellular distribution and chemical form of Cd and Cd-Zn interaction in different barley genotypes [J]. *Chemosphere* 2005, 60: 1437-1446.
[7] 汤叶涛, 仇荣亮, 曾晓雯, 等. 一种新发现的多金属超富集植物——圆锥南芥 [J]. *中山大学学报: 自然科学版* 2005, 44(4): 135-136.
[8] WEIGEL H J, JAGER H J. Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean [J]. *Plant Physiology* 1980, 65: 480-482.
[9] GABRIELLI R, PANDOLFINI T, VERGNANO O, et al.

- Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies J. Plant and Soil 1990 22: 271—277
- [10] DAVIES B E 1980 Applied Soil Trace Elements Mj. New York: John Wiley & Sons p 482
- [11] 仇荣亮, 汤叶涛, 方晓航, 等. Phytoremediation of heavy metal contaminated soil and its mechanism J. 中山大学学报: 自然科学版, 2004 43(6): 144—149
- [12] ALLEN D L, JARRELL W M Proton and copper adsorption to maize and soybean root cell walls J. Plant Physiology 1989 89: 823—832
- [13] RAUSER W E Structure and function of metal chelators produced by plants J. Cell Biochem and Biophys 1999 31: 19—48
- [14] HAYENS R J Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root POPLM. Their role in ion accumulation by plants J. Botanical Review 1980 46: 75—99
- [15] SALT D E, PRINCE R C, BAKER A J et al Zinc legends in the metal hyperaccumulator Thlaspi caerulescens as determined using X-ray absorption spectroscopy J. Environmental Science and Technology 1999 33: 713—717
- [16] ROBINSON B H, LOMBIE ZHAO F J et al Uptake and distribution of nickel and other metals in the hyper accumulator Berhaya oddii J. New Phytologist 2003 158: 279—285
- [17] NISHIZONO H The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense* J. Plant and Soil 1987 101: 15—20
- [18] MOLONO C, KOEPPE D E, MILLER R J Localization of lead accumulation by com plants J. Plant Physiology 1974 3: 388—394
- [19] BOOMNATHAN R, DORAN P M Organic acid complexation heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species J. Journal of Biotechnology 2003 101: 131—146
- [20] GRILLIE W, NACKER E L, ZENK M H Synthesis of seven different homologous phytochelatins in metal exposed *Schizosaccharomyces pombe* cells J. Federation of European Biochemical Societies 1986 197: 115—120
- [21] LEUCHTER R, WOLF K, ZIMMERMANN M Isolation of an arabidopsis thaliana cDNA complementing a *Schizosaccharomyces pombe* mutant which is deficient in phytochelatins synthesis J. Plant Physiology 1998 117: 1526
- [22] KAGI J H R, SCHAFFER A Biochemistry of metallo-thionein J. Biochemistry 1988 27: 8509—8551

Subcellular Distribution and Chemical Forms of Cd in *Arabis paniculata* Franch

YU Fangming¹, TANG Yetao², ZHOU Xiaoyong²,

HU Pengjie¹, ZENG Xiaowei¹, ZHAO Xuan¹, QU Rongliang²

(1. School of Environmental Science and Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory for Environmental Pollution Control and

Remediation Technology, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Differential centrifugation and sequential chemical extraction were carried out to study the subcellular distribution and chemical form of Cd in the leaves and roots of *Arabis paniculata* Franch. The results showed that in *A. paniculata*, most of the Cd was bound to the cell wall, but Cd distribution in the leaves and roots was different. In the leaves, most of Cd stored in the cell wall and karyon, whereas in the roots most of Cd stored in the ribosome and cell wall. The chemical forms of Cd changed with increasing Cd concentration. When Cd concentration in solution was 1 mg L^{-1} , water extractable and ethanol extractable Cd predominated in the shoots and roots, respectively. When Cd supply level was up to 10 mg L^{-1} , the NaCl extractable Cd was the highest form both in leaves and roots, which indicated that the combination of Cd with protein and pectate may play a role in Cd detoxification of *A. paniculata* under high Cd stress.

Key words: *Arabis paniculata* Franch.; Cd; chemical forms; subcellular distribution