植物营养与肥料学报 1999,5(4):335～340
Plant Nutrition and Fertilizer Science

文章编号:1008－505X(1999)04－0335－06

镉胁迫下钙对镉在玉米细胞中分布及对叶绿体结构与酶活性的影响

周　卫,汪　洪,林　葆
(中国农业科学院土壤肥料研究所,北京 100081)

摘要:采用溶液培养试验、亚细胞组分分级分离技术、透射电子显微镜观察及生化分析等方法研究钙对镉胁迫下玉米根、叶组织镉的亚细胞分布、叶绿体超微结构及叶片 RuBP 羧化酶和 PEP 羧化酶活性的影响。结果表明,与缺钙加镉处理比较,镉毒害下添加钙,玉米根、叶细胞器和细胞质 Cd 组分均显著下降,相应 Ca 组分则显著增加,而细胞壁 Cd、Ca 含量各处理间均十分接近;镉毒害下添加钙,维管束鞘细胞基质片层及叶肉细胞基粒和基粒片层排列较好,维管束鞘细胞嗜锇粒大为减少,叶片 RuBP 和 PEP 羧化酶活性显著增加。说明 Ca 对于 Cd 胁迫下玉米叶片正常结构与功能的保持具有十分重要的意义。

关键词:钙;镉;玉米;亚细胞分布;叶绿体超微结构;RuBP 和 PEP 羧化酶
中图分类号:Q946.5;TG146　　**文献标识码**:A

镉是植物的有害元素,利用钙镉颉颃修复植物镉毒害已受到重视[1,2]。以往该方面的研究大多集中在施用 $CaCO_3$ 对土壤中 Cd 形态转化与植物镉吸收的影响方面[3,4],有关植物体内的钙镉颉颃则研究较少。一些研究认为,镉的毒害在于干扰了植物钙代谢[5];溶液培养中发现钙具有缓解植物镉毒害的直接作用[6],组织镉含量下降[7]。但是,有关植物体内亚细胞水平及生理生化水平钙镉互作的工作尚未开展。为此,开展钙对镉胁迫下玉米根、叶组织镉的亚细胞分布、叶绿体超微结构及叶片光合作用关键酶:RuBP 羧化酶和 PEP 羧化酶活性影响的研究,以期揭示土壤-植物体系钙降低镉毒害的机理。

1　材料与方法

1.1　植物培养与试验处理

玉米种子(丹早 208)在酸洗石英砂中发芽出苗后,取生长一致的幼苗,用缺钙的霍格兰营养液培养。设置 4 个处理:(1)－Ca－Cd:不加钙,不加镉;(2)＋Ca－Cd:加钙,不加镉;(3)－Ca＋Cd:不加钙,加镉;(4)＋Ca＋Cd:加钙,加镉。重复 4 次。营养液镉处理以 $CdCl_2$ 形态加入,Cd 浓度为 5mg/L;钙以 $Ca(NO_3)_2$ 形态供应,Ca 浓度为 40mg/L。各处理供氮浓度相同,不加 Ca 的处理,以 $NaNO_3$ 补充氮素。培养在温室内进行,采用容积为 1.8L 的白瓷盆培养,每盆栽 4 株幼苗,每周换 2 次营养液,培养温度 18～30℃。植株生长 20d 后,取样进行以下研究。

1.2　玉米根系和叶片 Cd 和 Ca 的亚细胞分布研究

参照 Hans[8]方法,分别将玉米根系和叶片采用预冷的匀浆液匀浆化。匀浆液组成(mmol/L):蔗糖

收稿日期:1998-07-08
基金项目:国家自然科学基金资助项目(49671044)。试验在农业部植物营养学重点开放实验室中完成。

250, Tris-HCl(pH7.5)50 和 $C_4H_{10}O_2S_2$(Sigma 产品号:D8255)1。将组织匀浆在 300g 下离心 30s,底层碎片为细胞壁组分;将上层悬浮液在 20000g 下离心 45min,底层碎片为细胞器组分;上层悬浮液为细胞质组分(含胞质及液泡内高分子和大分子有机物质及无机离子)。根、叶样品及其细胞壁和细胞器组分采用 HNO_3-$HClO_4$ 混合消化,原子吸收分光光度计测定 Cd 和 Ca 含量;细胞质组分悬浮液 Cd 和 Ca 由原子吸收分光光度计直接测定。

1.3 玉米叶片维管束鞘细胞和叶肉细胞叶绿体超微结构观察

分别取玉米第 5 叶含维管束鞘细胞和叶肉细胞部位,经戊二醛-锇酸双固定,丙酮系列脱水,Epon 812 包埋,切成厚度为 50nm 的超薄切片,再经醋酸铀和柠檬酸铅双染色后,用日立 H-500 型透射电子显微镜观察和摄影,电压 60kV。

1.4 玉米叶片 RuBP 羧化酶(RuBPC)与 PEP 羧化酶(PEPC)活性的测定

酶液的制备 取第 3～5 叶混合样品 0.5g 放入预冷的研钵中,加入 3mL 预冷的 100mmol/L Tris-H_2SO_4 缓冲液(内含 7mmol/L 巯基乙醇,1mmol/L EDTA,50% 甘油和 1% PVP,pH8.2),迅速研磨,匀浆液于 4℃下 15000g 离心 20min,取上清液备用。

RuBPC 活性测定 按 Racker[9]方法略有改动。反应混合液组成:1mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)、0.1mol/L $MgCl_2$、50mmol/L ATP、50mmol/L DTT、2mmol/L NADH 和 1mmol/L EDTA 各 0.3mL,200μmol/L $NaHCO_3$ 0.1mL,蒸馏水 1mL,3-磷酸甘油酸激酶/3-磷酸甘油醛脱氢酶(15U/15U)0.1mL,30℃恒温水浴 10min,加入 9mmol/L RuBP 0.1mL,最后加入 RuBPC 提取液 0.1mL 启动反应,立刻于 340nm 下测吸光度的减少。

PEPC 活性测定 按施教耐等[10]的方法。反应液总体积 3.2mL,内含 1mL 100mmol/L Tris-H_2SO_4 缓冲液(pH9.2),1mL 酶提取缓冲液,0.1mL 10mmol/L $MgCl_2$,0.1mL 10mmol/L $NaHCO_3$,0.2mL 40mmol/L PEP,0.3mL 1mg NADH,过量的苹果酸脱氢酶(约 10.5U),于 28℃水浴 10min,用 200μL PEP 启动反应,迅速在 340nm 下测吸光度的下降。

1.5 可溶蛋白

采用考马斯亮蓝法测定[11],蛋白质含量用于计算酶活性。

2 结果与讨论

2.1 不同钙镉处理玉米根系 Cd 和 Ca 的亚细胞分布

亚细胞水平元素的定位对于认识其在细胞活动中的作用是十分重要的。以往有关该方面的研究主要采用电镜放射自显影和 X-射线能谱分析等方法,但这些方法操作极为繁琐,且难以准确定量估测[12]。Rathore 和 Hans 等采用亚细胞组分分级分离技术研究大豆根、叶组织 Ca、Zn 和 Cd 等元素的亚细胞分布已取得完全的成功[8,12]。本研究中借鉴 Hans 所采用的方法,将玉米根、叶分为细胞壁、细胞器和细胞质等组分。结果表明 Cd 和 Ca 回收率(即此三种组分 Cd 和 Ca 之和分别与全 Cd 和全 Ca 之比)均为 95% 以上(表 1 和 2),说明该方法可基本无损地用于亚细胞水平 Cd 和 Ca 组分的研究。

有关研究表明,元素的亚细胞分布与作物的生长时期及其本身的生化或结构功能有关。Rathore 得出,生长 15d 的大豆根系细胞壁 Ca 约占全 Ca 的 57%,而细胞器和细胞质组分 Ca 约占 43%[12];Hans 试验显示,生长 12d 的大豆叶片和根系中,大约 70% 以上的 Cd 分布于细胞质中,仅有 8%～14% 分布于细胞壁或细胞器中[8]。本项研究显示,无论加钙与否,生长 20d 的玉米根、叶各组分 Cd 分布的百分比与大豆上的研究结果相似,但 Ca 则因溶液供钙状况而异。根、叶缺钙时细胞壁 Ca 占全 Ca 的比例分别为 84.9%～87.1% 和 61.3%～

67.1%,而供钙时二者比例分别为44.3%～44.7%和21.6%～27.3%。随着钙的加入,细胞壁Cd、Ca含量各处理间均十分接近,而根、叶细胞器和细胞质Cd组分均显著下降,相应Ca组分则显著增加(表1,2)。表明作物钙、镉吸收似乎是优先满足细胞壁的需求,细胞壁上不会发生钙镉互作,缺镉下添加钙将有利于细胞器(叶绿体、细胞核等)及液泡中保持较高Ca浓度,以维持其正常的结构和功能。

表1　不同钙镉处理玉米根系Cd和Ca的亚细胞分布

Table 1　Cd and Ca distribution in subcellular fractions from roots of maize with different Ca and Cd treatment

处　理 Treatment	细胞壁组分 Cell wall	细胞器组分 Organelles	细胞质组分 Cytoplastic fraction	全　量 Total	回收率(%) Recovery
			Cd, μg/g DW		
−Ca−Cd	—*	—	—	—	—
+Ca−Cd	—	—	—	—	—
−Ca+Cd	34.8a	44.6a	234.6a	314.0a	100.0
+Ca+Cd	33.0a	38.4b	208.6b	284.3b	98.5
$LSD_{0.05}$	2.6	3.8	9.8	15.2	
			Ca, mg/g DW		
−Ca−Cd	1.55a	0.17b	0.06b	1.78b	95.4
+Ca−Cd	1.59a	0.67a	1.19a	3.56a	96.8
−Ca+Cd	1.58a	0.18b	0.11b	1.86b	98.3
+Ca+Cd	1.58a	0.69a	1.35a	3.65a	99.2
$LSD_{0.05}$	0.14	0.05	0.28	0.31	

* 未测出　Not detected

表2　不同钙镉处理玉米叶片Cd和Ca的亚细胞分布

Table 2　Cd and Ca distribution in subcellular fractions from leaves of maize with different Ca and Cd treatment

处　理 Treatment	细胞壁组分 Cell wall	细胞器组分 Organelles	细胞质组分 Cytoplastic fraction	全　量 Total	回收率(%) Recovery
			Cd, μg/g DW		
−Ca−Cd	—*	—	—	—	—
+Ca−Cd	—	—	—	—	—
−Ca+Cd	12.2a	9.8a	64.2a	88.3a	97.6
+Ca+Cd	12.0a	6.0b	40.7b	61.5b	95.4
$LSD_{0.05}$	1.5	2.1	8.2	8.7	
			Ca, mg/g DW		
−Ca−Cd	0.71a	0.16b	0.19b	1.06b	100.0
+Ca−Cd	0.73a	0.55a	1.36a	2.67a	99.0
−Ca+Cd	0.73a	0.17b	0.24b	1.19b	95.8
+Ca+Cd	0.75a	0.56a	1.44a	2.87a	95.7
$LSD_{0.05}$	0.10	0.08	0.21	0.26	

* 未测出　Not detected

2.2 不同钙镉处理玉米维管束鞘细胞和叶肉细胞的叶绿体超微结构

试验表明,镉毒害下植物叶片黄化[13]。Lagriffoul 认为叶绿体是最易积累 Cd 的细胞器[14];Van Assche 指出,镉可通过抑制叶绿素的生物合成及光系统Ⅱ中水裂解酶的光合电子传递而影响到叶绿体的正常功能[15],但目前尚缺乏 Cd 对超微结构损伤的直观证据。事实上,玉米光合作用是由维管束鞘细胞和叶肉细胞共同完成的[16]。用透射电镜观察玉米第5叶维管束鞘细胞叶绿体的超微结构,可见 - Ca - Cd 处理有较多的嗜锇粒存在,基质片层的连续性受到破坏;+ Ca - Cd 处理基质片层排列紧密,嗜锇粒较少出现;- Ca + Cd 处理则嗜锇粒大量发生,基质片层已严重破坏;而 + Ca + Cd 处理除基质片层排列较松弛外,在外观上无其它明显变化(见图版,封三)。显示 Cd 胁迫下添加 Ca 有利于维持叶片维管束鞘细胞叶绿体结构正常。

观察玉米叶肉细胞叶绿体的超微结构,可见 + Ca - Cd 处理基粒多而发达,基粒片层排列整齐紧密,无嗜锇粒出现;- Ca - Cd 处理则有较多的嗜锇粒出现,基粒数量较少,基粒片层排列松弛;- Ca + Cd 处理则无基粒出现,基粒片层排列紊乱,嗜锇粒发生较多;而 + Ca + Cd 处理虽有较多的嗜锇粒出现,但基粒完整,基粒片层排列紧密,显示 Cd 胁迫下添加 Ca 也有利于维持叶肉细胞叶绿体结构正常(见图版)。

2.3 不同钙镉处理玉米叶片 RuBP 和 PEP 羧化酶活性

RuBP 和 PEP 羧化酶(RuBPC 和 PEPC)是玉米叶片光合作用的关键酶,前者主要分布于维管束鞘细胞,后者则存在于叶肉细胞,二者共同协作方可完成叶片的光合作用过程[16]。表3显示,不同 Ca、Cd 处理对此两种酶活性有显著影响,无论以叶鲜重还是以膜蛋白含量为计算基础,RuBPC 和 PEPC 活性的顺序均表现为 + Ca - Cd > + Ca + Cd、- Ca - Cd > - Ca + Cd。其中以叶膜蛋白含量为计算基础,RuBPC 和 PEPC 活性 + Ca + Cd 处理分别为 - Ca + Cd 处理的 2.97 和 2.79 倍,可见 Ca 有利于维持 Cd 胁迫下玉米叶片的正常功能。

表3 不同钙镉处理玉米叶片 RuBP 和 PEP 羧化酶活性

Table 3 RuBPC and PEPC activity in leaves of maize with different Ca and Cd treatment

处理 treatment	RuBPC		PEPC	
	CO_2 μmol·g^{-1}·h^{-1}·FW	CO_2 μmol·mg$^{-1}_{protein}$·h^{-1}	CO_2 μmol·g^{-1}·h^{-1} FW	CO_2 μmol·mg$^{-1}_{protein}$·h^{-1}
- Ca - Cd	102b	14.4a	234b	33.4a
+ Ca - Cd	154a	15.2a	364a	36.0a
- Ca + Cd	51c	3.9c	118c	8.9c
+ Ca + Cd	106b	11.6b	226b	24.8b
$LSD_{0.05}$	10.5	1.2	14.6	2.8

Van Assche[14]指出,金属对酶作用主要包括四个方面:(1)叶绿素的生物合成;(2)光合电子传递;(3)光合 CO_2 固定;(4)抗氧化性。RuBPC 活化中心存在2个游离的 - SH,Cd 对光合 CO_2 固定的影响主要是与该酶活性中心的 - SH 结合,改变 RuBPC 的结构,并使该酶分裂成若干个亚单位而失活[14]。本研究中 Cd 毒害下添加钙此两种酶活性显著增加。这可能与供钙条件下进入叶绿体 Cd 的数量较少;或者 Cd 毒害下叶绿体高钙抑制了 RuBPC 和

PEPC 的分解有关。

参 考 文 献

[1] 陈怀满.土壤-植物系统中的重金属污染[M].北京:科学出版社.1996,115～125.

[2] Hooda P S, Alloway B J. The effect of liming on heavy metal concentrations in wheat, carrots and spinach grown on previously sludge-applied soils [J]. J. Agric. Sci. (Cambridge), 1996, 127:289～294.

[3] 吴留松等.添加物对土壤提取液中铜、镉生物毒性的影响[J].土壤学报,1992, 29(4):377～382.

[4] Ma YB, Uren NC. Transformations of heavy metals added to soil-application of a new sequential extraction procedure [J]. Geoderma, 1998, 84:157～168.

[5] 牟树森,环境土壤学[M].北京:农业出版社,1993.

[6] 细野道明.培养液中钙对水稻、番茄生长发育的影响[J].日本土壤肥料学杂志.1979, 50(4):353～357.

[7] Zhou W and Lin B. Alleviation of Cd toxicity by Ca for maize (*Zea Mays* L.) and its mechanism [A]. *In*:Cao zhi-hong (eds). International Symposium on Soil, Human and Environment Interactions [C]. China Science & Technology Press. 1998, 267～271.

[8] Hans JW, Hans JJ. Subcellular distribution and chemical form of cadmium in bean plants [J]. Plant Physiology, 1980, 65:480～482.

[9] 施教耐,吴敏贤,查静娟.植物磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的研究Ⅰ.羧化酶同工酶的分离和变构特性的比较[J].植物生理学报,1979,5:225～236.

[10] Racke E. Ribulose diphophate carboxylase from spinach leaves [A]. *In*:Colowick SP. Kaplan NO(eds). Methods in Enzymology. [M] Academic Press, 1962, 266～278.

[11] 张志良.植物生理学实验指导(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1990.

[12] Rathore VS, Bajaj YPS, Wittwer SH. Subcellular localication of zinc and calcium in bean tissues [J]. Plant Physiology, 1972, 49:207～211.

[13] Woolhouse HW. Toxicity and tolerance in the responses of plant to metals [A]. *In*:Lange OL et al. (eds). Encyclopaedia of plant physiology. Vol. 12C. Physiological plant ecology [C]. Springer-Verlag, Berlin. 1983, 245～300.

[14] Lagriffoul A, Mocquot B, Mench M and Vangronsveld J. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants(*Zeea mays* L.) [J]. Plant and Soil, 1998, 200: 241～250.

[15] Van Assche F and Clijsters C. Effects of metals on enzyme activity in plants [J]. Plant Cell Environ., 1990, 13:195～206.

[16] 山东省农业科学院玉米研究所.玉米生理[M].北京:农业出版社,1987.

EFECTS OF CALCIUM SUPPLY ON SUBCELLULAR DISTRIBUTION OF CADMIUM, CHLOROPLAST ULTRASTRUCTURE, RuBPC AND PEPC ACTIVITY IN MAIZE UNDER CADMIUM STRESS

ZHOU Wei, WANG Hong, LIN Bao
(*Soil and Fertilizer Institute, CAAS, Beijing* 100081)

Abstract: Solution culture, subcellular fractionating procedure, electron microscopy examination and biochemical analysis were used to study the effects of calcium supply on subcellular distribution of cadmium, chloroplast ultrastructure and RuBPC and PEPC activity in maize seedlings under cadmium stress. Compared to no calcium supply under cadmium stress, calcium supply could significantly lower Cd content and increase Ca content in both organelles and cytoplastic fraction in roots and leaves of maize, while no such sighs were observed with cell wall fraction. In calcium supply treatment under cadmium stress, stroma lamellae in chloroplast of mestome sheath and grana and grana lamellae in mesophyll were better arranged, and much less osmiophilics appeared in chloroplast of mestome sheath, compared to that of no calcium supply treatment. It was also found that RuBPC and PEPC activity in leaves of maize under cadmium stress significantly increased by supplying Ca. It was concluded that calcium play a very important role in maintaning normal structure and function for plants under cadmium stress.

Key words: calcium; cadmium; maize; subcellular distribution; chloroplast ultrastructure; RuBPC and PEPC activity