

铅(Pb)在凤眼莲(*Eichhornia Crassipes* Solms) 体细胞中分布的电镜观察

徐勤松 施国新 王学 丁秉中 陈苏雅 许丙军 赵娟

(南京师范大学生命科学学院 江苏 南京 210097)

[摘要] 用 10 mg/L 和 100 mg/L 浓度的 $Pb(NO_3)_2$ 培养 10 d 的凤眼莲为实验材料 ,用透射电镜观察了重金属 Pb 在其细胞内的分布及造成的结构损伤情况. 定位结果显示 :在 10 mg/L 浓度处理的凤眼莲植株中 ,Pb 颗粒主要沉积在根上 :根的表面、胞间隙、细胞壁、细胞膜和液泡 ,没有观察到明显的细胞器超微结构损伤 ,而在叶细胞中则没有观察到颗粒分布. 随处理浓度增大(100 mg/L) ,Pb 在根细胞各细胞组分中明显增多 ,对细胞的损伤亦加剧 ,表现为 :质体解体 and 染色质凝集. 同时 ,一部分 Pb 被运输到茎叶部分 ,主要分布在叶细胞的细胞膜、液泡内和叶绿体上 ,而在根和叶的其它细胞器都没有观察到颗粒分布. 同时 ,各 Pb 处理浓度都没对叶细胞超微结构产生破坏. 我们的观察结果证明凤眼莲抗重金属 Pb 的重要耐性机制是 :根对重金属的积累 ,细胞壁的金属沉淀作用和液泡的区域化作用等.

[关键词] 重金属 ,Pb 凤眼莲 亚细胞定位

[中图分类号] Q944 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2006)03-0081-05

Subcellular Localization of Pb in Cells of *Eichhornia Crassipes* Solms by Electron Microscopy

Xu Qinsong , Shi Guoxin , Wang Xue , Ding Bingzhong , Chen Suya , Xu Bingjun , Zhao Juan

(School of Life Sciences , Nanjing Normal University , Nanjing 210097 , China)

Abstract Distribution of Pb in leaf and root tip cells of *Eichhornia Crassipes* Solms treated with Pb (NO_3)₂ for 10 is observed by transmission electron microscope. Localization results show that when treated with 10mg/L Pb , Pb deposit is mainly accumulated in the root : on the root surface , in intracellular space , cell membrane , vacuole , and no perceptible ultrastructural damages are induced by Pb , while a negative phenomenon is observed in leaf cells. With increasing pollutant concentration (100 mg/L) , the content of Pb in every cellular component of root tip cell increases markedly , the injury to root cell is more serious compared with low concentration , such as disintegration of plasmid and agglutination of chromatin. Meanwhile , a little portion of Pb is transported to stem and leaf , and the granule of Pb mainly is distributed in cell membrane , vacuole and chloroplasts , and no injury to leaf cell is induced by the exposing concentration of Pb. No particle is distributed in other cell organelles. The important resistance mechanism of plants confirmed by our observation results is accumulation of heavy metal in root , deposit of heavy metal in cell wall and compartment of heavy metal in vacuole etc.

Key words heavy metal , Pb , *Eichhornia Crassipes* Solms , subcellular localization

0 引言

大量研究资料表明 ,重金属污染对水生植物的生长发育、生理代谢和形态结构等都造成明显毒害^[1,2].

收稿日期 : 2005-09-28.
基金项目 : 国家自然科学基金(30370083)、江苏省教育厅自然科学基金(05KJB180067、03KJB180062)、江苏省重点实验室开放基金和南京师范大学科研启动基金资助项目.
作者简介 : 徐勤松 , 1976—, 博士 , 助理研究员 , 主要从事重金属对水生高等维管束植物的生态效应的教学与研究.
E-mail : xuqinsong@njnu.edu.cn

另一方面,作为生态系统的初级生产者,水生植物能够大量吸收和积累环境中的有毒金属元素^[3].由于它们对重金属元素有很高的富集作用^[4-5],使利用水生植物净化水污染成为一种有潜力并且经济可行的方法^[4-6].

凤眼莲(*Eichhornia Crassipes* Solms)是雨久花科的一种生长速度和适应性都很强的浮水植物,也是世界各国用于净化污水的一种常见水生植物,它对水体中的 Pb、Cd、Cu、Hg 及 As 等都有较高的积累能力,尤其以 Pb 的积累效果最好,浓缩系数达到 16 190^[7].林毅雄等的研究认为这是由于凤眼莲有发达的根系(须根),与水面接触面积大,同时其根际还附着不少微生物,进一步加强了积累作用^[7].我们认为凤眼莲能忍耐体内积累高浓度的重金属更与其内部抗性机制密切相关,但目前对其耐性机制则鲜有报道,并且多采用 X-射线扫描能谱的方法^[8-9].Antosiewicz 等认为对植物耐 Pb 机制的研究有必要通过电子显微镜观察 Pb 在细胞中的亚显微分布,但传统的电镜制片方法不能满足该要求^[10].为此,我们以凤眼莲为实验材料,以 Pb 为胁迫因子,参考 Antosiewicz 等^[10]所改进的操作方法,通过透射电子显微镜,对其在凤眼莲不同营养器官及细胞内不同组分中的分布进行观察,以期从超微结构的角度揭示凤眼莲对重金属 Pb 的耐性机制.

1 材料和方法

1.1 实验材料

材料采自南京江心洲无污染水域,后将其移种在南京师范大学水生植物培育池中,2001 年 9 月上旬,选取生长状态一致的幼嫩植株培养在实验室的无底泥玻璃缸中,先用蒸馏水驯化 7 d,后于上午 10 00 分在各玻璃缸中施入浓度为 10 mg/L、100 mg/L 的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (AR)水溶液(以纯 Pb^{2+} 计),另以在不含 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 的蒸馏水中生长的植株作为对照.隔日更换水溶液.将玻璃缸置于 Forma-3744 型(英国产)全封闭光照培养箱中培养,培养温度为 25℃,光周期为 12 h(D):12 h(N),光照强度为 70 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$.培养第 10 天取材作电镜观察.

1.2 定位方法

参考 Antosiewicz^[10]的方法,并作稍许改动:取根尖(去根冠)和相同部位的叶片用 2.5% 戊二醛(用 0.1M pH7.3 的磷酸缓冲液配制)和 1% 锇酸 4℃ 双重固定 2 h,丙酮系列脱水,Epon812 包埋,LKB 超薄切片机(奥地利产),钻石刀切片,厚度为 70 nm,每样品切片捞 2 个铜网,一个不染色;另一个柠檬酸铅-醋酸双氧铀染色(染色时间分别为 5 min 和 2 min),然后在 Hitachi 600-A-2 透射电镜(日本产)下观察并拍照.

2 观察结果

2.1 外部形态观察

培养第 10 天,10 mg/L Pb 处理的植株,叶片没有明显毒害症状,根尖淡黄色,100 mg/L Pb 处理的植株外围的叶片有黄斑,根尖变成黑褐色.而对照植株的叶片碧绿,根尖银白色,生长状态良好.30 d 后,10 mg/L Pb 处理的植株成熟叶死亡,幼叶正常.而 100 mg/L 则使植株完全死亡,由此可看出 Pb 对植物的损伤显示出明显的剂量效应.凤眼莲不同器官受影响的顺序依次为根尖、成熟叶、幼叶.

2.2 Pb 在根尖细胞中的分布

对照根细胞中没有观察到 Pb 颗粒沉积(图版 I.1),Pb 处理后,10 mg/L 浓度对细胞超微结构的损伤较小.在根尖的表面粘附一层细小颗粒(图版 I.4),在细胞壁的胞间联丝位置的颗粒突出(图版 I.2),液泡的中央集中分布有晶体状颗粒(图版 I.3),而在各细胞器中,细胞核上可看到分布有细小的 Pb 颗粒(图版 I.5),随处理浓度增大,Pb 对细胞超微结构的损伤程度加剧,可以看到细胞核染色质凝集,质体解体.Pb 颗粒亦沉积在凝胶状的染色质边缘(图版 I.6),少量分布于解体的质体上(图版 I.8),在细胞壁和细胞膜间隙密集细小颗粒(图版 I.5、6、7、9),细胞壁(图版 I.3、8)和胞间隙(图版 I.2、7)也能观察到.另外,在一些小囊泡上可看到 Pb 颗粒(图版 I.9).

2.3 Pb 在叶细胞中的分布

各处理浓度对叶细胞的超微结构都没有产生明显伤害.与根不同的是,在 10 mg/L Pb 处理的叶细胞各组分(未出示图版)中同对照(图版 I.10)一样没有观察到 Pb 颗粒,随处理浓度的增大,少量 Pb 向茎叶

部分运输,在 100 mg/L Pb 处理的叶细胞中,可以看到细胞壁和细胞膜间隙有颗粒沉积,但比根细胞少(图版 I. 11, 13),小囊泡膜上吸附有许多颗粒(图版 I. 12),明显的现象是在液泡中充满 Pb 颗粒,有的液泡膜破裂,颗粒散到细胞质中. 在叶绿体的被膜和内部也分布有一些颗粒(图版 I. 13).

3 讨论

研究表明,植物对重金属的耐受性,与植物对重金属的吸收与运输、在植物体内各部位的分配以及与植物体内物质的结合状态等密切相关^[2,11]. 就凤眼莲而言,从器官水平分析,它能将吸收的重金属离子绝大多数保留在根中^[12],积累的重金属比茎叶要高出几倍、甚至几十倍^[7]. 本实验中,尤其是在低浓度(10 mg/L)处理下,我们注意到进入凤眼莲体内的 Pb 主要是分布在根中. 而在叶片中则观察不到. 这也更直观的证明水葫芦能将大部分的金属富集在根部,很少迁移到茎叶等器官. 从而在一定程度上减轻了重金属 Pb 对茎叶部分的毒害. 这首先与凤眼莲具有发达的根系有关^[7],而 Pb 在植物体内主要是以难溶态存在可能也是根部积累的 Pb 不容易向茎叶部分转移的重要原因之一^[9]. 我们还观察到凤眼莲最后出现毒害症状的是嫩叶. 成熟叶在此以前已经出现黄斑,直至死亡,说明水葫芦能将体内的有害物质先转移到老叶中,然后通过叶片脱落等方式来降低体内的含量,从而减少对幼嫩器官的毒害. 这可能是水葫芦适应能力强,能在污染环境中长期生存的重要原因^[12].

王焕校等认为,重金属离子进入植物细胞的过程主要有两种方式:一种是细胞壁等质外空间的吸收;一种是污染物透过细胞质膜进入细胞的生物过程^[13]. 对 Pb 而言,由于它的离子半径较大,配位能力弱,不易透过细胞壁和质膜进入细胞液中,因此水葫芦对 Pb 的吸收主要靠细胞内自由空间的非代谢性扩散运动,即细胞壁的吸附、非共质体沉积等方式获得,只有当这种结合达到饱和后才开始透过细胞壁和质膜进入细胞质中^[12]. 我们的电镜观察发现,在凤眼莲根系富集的 Pb 中,首先是根表面吸附了相当一部分 Pb. 林崎等^[14]的研究认为 Pb 胁迫能使根系分泌的糖含量增加,Yang 等^[15]发现对 Pb 耐性强的水稻根系能分泌草酸盐. 而凤眼莲根表面富集的 Pb 是与何种物质结合尚需进一步研究,这避免使更多的 Pb 进入细胞内部. 而当环境介质中的 Pb 超出根系分泌物的络合能力后,Pb 即进入细胞内,细胞各部分分布的 Pb 不同. 无论是根还是叶凤眼莲细胞所积累的 Pb 都主要是沉积在细胞壁、胞间隙、细胞壁和细胞膜之间. 由此可看出 Pb 在凤眼莲体内主要是分布在细胞的非活性位点,这种分布最大限度的减轻了重金属对细胞原生质体的危害. 这也与江行玉等^[9]的研究结论一致. 而随 Pb 浓度的增大和处理时间的延长,当细胞壁沉淀达到饱和及细胞质膜断裂后,多余的 Pb 即进入原生质体内,我们观察到在凤眼莲根和叶细胞质中的 Pb 主要是积累在液泡中,而其它细胞组分中则分布较少,尤其是在叶中表现的更明显. 液泡通常被认为是分隔重金属元素的场所,它所含有的蛋白质、糖、有机酸、有机碱能与重金属结合而解毒^[16],从而大大降低了细胞质中游离金属浓度. 导致最终存在于细胞质中的 Pb 含量相对很低. Pb 的区域化运输到液泡内也可能与植物络和素有关.

凤眼莲虽具备一系列的重金属抗性机制,但它们的保护作用是有限的. 正如本文看到的,随 Pb 浓度的增加和时间的延长,凤眼莲从表现形态和内部结构都有明显的中毒表现,如叶片出现黄斑,质体解体,细胞核染色质凝集和空泡化等.

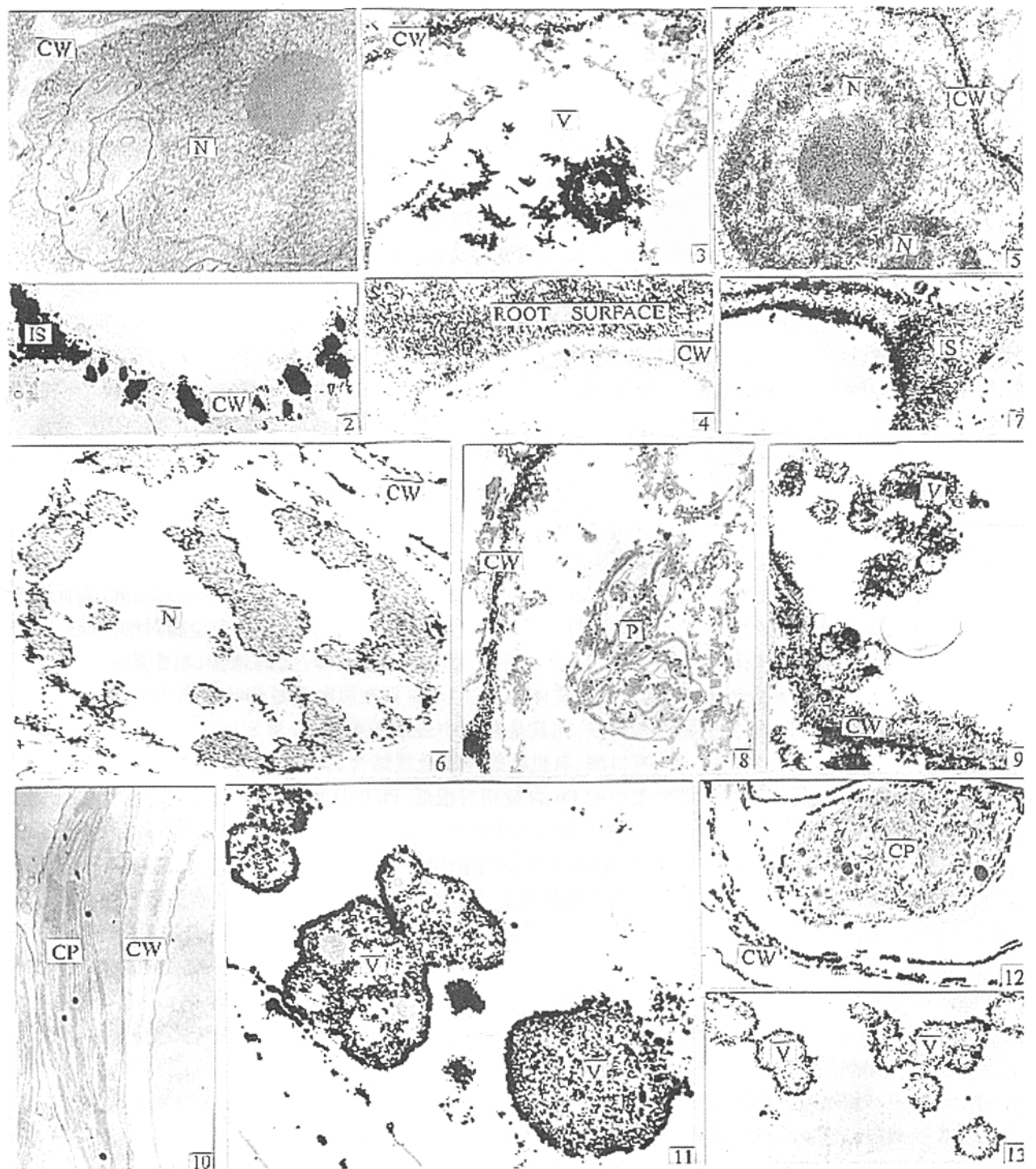
4 图版 I 说明

CP. 叶绿体;CW. 细胞壁;IS. 胞间隙;P. 质体;N. 细胞核;ROOT SURFACE. 根表面;V. 液泡

1. 对照根细胞的超微结构,示无 Pb 颗粒分布. $\times 12\,000$;
2. 10 mg/L Pb 处理的根细胞,示细胞壁胞间联丝位置的颗粒明显. $\times 17\,000$;
3. 10 mg/L Pb 处理的根细胞,示 Pb 位于液泡中央(染色). $\times 20\,000$;
4. 100 mg/L Pb 处理的根细胞,示大量颗粒吸附在根表面. $\times 15\,000$;
5. 100 mg/L Pb 处理的根细胞,示 Pb 沉积在细胞核和细胞膜上(染色). $\times 8\,000$;
6. 100 mg/L Pb 处理的根细胞,示 Pb 颗粒分布在凝胶状的细胞核染色质和细胞膜上(染色). $\times 17\,000$;
7. 100 mg/L Pb 处理的根细胞,示胞间隙和细胞膜上的 Pb 颗粒. $\times 17\,000$;
8. 100 mg/L Pb 处理的根细胞,示 Pb 颗粒位于解体的质体和细胞壁(染色). $\times 17\,000$;

万方数据

9. 100 mg/L Pb 处理的根细胞, 示 Pb 细胞壁和囊泡上的颗粒(染色). $\times 20\,000$;
10. 对照叶细胞的超微结构, 无 Pb 颗粒. $\times 17\,000$;
11. 100 mg/L Pb 处理的叶细胞, 示液泡中充满 Pb 颗粒. $\times 17\,000$;
12. 100 mg/L Pb 处理的叶细胞, 示分布在囊泡膜上的 Pb 颗粒. $\times 15\,000$;
13. 100 mg/L Pb 处理的叶细胞, 示叶绿体和细胞膜上的 Pb 颗粒. $\times 17\,000$.



图版 I

[参考文献]

[1] Dalla V F , La R N , Moro I , et al. Morphogenetic , ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea Canadensis* exposed to cadmium[J]. *Plant Science* , 2005 , 168 : 329 - 338.

[2] 徐勤松 施国新 周耀明 等. 镉在黑藻叶细胞中的亚显微定位分布及其毒害效应分析[J]. *实验生物学报* , 2004 , 37(6) : 461 - 468.

[3] Outridge P M , Noller B N. Accumulation of toxic trace elements by freshwater vascular plants[J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* , 1991 , 121 : 2 - 63.

[4] Kamala M , Ghalya A E , Mahmouda N , et al. Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants[J]. *Environment International* , 2004 , 29 : 1029 - 1039.

[5] Keskinan O , Goksu M Z L , Basibuyuk M , et al. Heavy metal adsorption properties of a submerged aquatic plant (*Ceratophyllum demersum*) [J]. *Bioresource Technology* , 2004 , 92 : 197 - 200.

[6] Ellis J B , Shutes R B , Revitt D M , et al. Use of macrophytes for pollution treatment in urban wetlands [J]. *Resources , Conservation and Recycling* , 1994 , 11 : 1 - 12.

[7] 林毅雄 张秀敏. 凤眼莲对滇池水体中重金属的积累作用及其蛋白质、氨基酸含量的变化[J]. *海洋与湖沼* , 1990 , 21(2) : 179 - 184.

[8] Vesik P A , Nockolds C E Allaway W G. Metal localization in water hyacinth roots from an urban wetland[J]. *Plant , Cell and Environment* , 1999 , 22 : 149 - 158.

[9] 江行玉 赵可夫. 铅污染下芦苇体内铅的分布和铅胁迫相关蛋白[J]. *植物生理与分子生物学报* , 2002 , 28(3) : 169 - 174.

[10] Antosiewicz D , Wierzbicka M. Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy [J]. *Journal of Microscopy* , 1999 , 195 : 139 - 146.

[11] 杨居荣 鲍子平 张素芹. 镉、铅在植物细胞内的分布及其可溶性结合形态[J]. *中国环境科学* , 1993 , 13(4) : 263 - 268.

[12] 蔡成翔 王华敏 张宗明. 水葫芦对五种重金属离子的去除速率与富集机制研究[J]. *广西右江民族师专学报* , 2002 , 15(6) : 48 - 51.

[13] 王焕校. *污染生态学* [M]. 北京 : 高等教育出版社 , 2000.

[14] 林崎 陈英旭 陈怀满 等. 小麦根际铅、镉的生态效应[J]. *生态学报* , 2000 , 20(4) : 634 - 638.

[15] Yang Y Y , Jung J Y , Song W Y , et al. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance [J]. *Plant Physiol* , 2000 , 124(3) : 1019 - 1026.

[16] 江行玉 赵可夫. 植物重金属伤害及其抗性机理[J]. *应用与环境生物学报* , 2001 , 7(1) : 92 - 99.

[责任编辑 孙德泉]