

# 镉对油菜花粉细胞内钙离子浓度的影响\*

胡金朝

(西昌学院 农业科学学院,四川 西昌 615013)

**【摘要】**应用激光扫描共聚焦显微系统(LSCM)和fluo-3 AM荧光探针标记技术,观察了不同浓度 $Cd^{2+}$ 对油菜花粉细胞内游离 $Ca^{2+}$ 的影响。发现油菜花粉经水合培养后,胞内 $Ca^{2+}$ 呈极性分布,萌发沟附近浓度较高,花粉管萌生部位浓度最高;胞外环境中 $Cd^{2+}$ 可使细胞内游离 $Ca^{2+}$ 的浓度升高,表明油菜花粉受重金属 $Cd^{2+}$ 毒害后,可通过调动胞质内游离 $Ca^{2+}$ 的变化而做出对外界刺激的应答。这一实验结果为探索重金属对植物的毒害机理提供了新的证据。

**【关键词】**油菜;花粉; $Cd^{2+}$ ;低温装载;激光共聚焦显微技术

**【中图分类号】**S565.4 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2010)04-0001-03

作为细胞内重要的第二信使和营养元素,钙在花粉萌发和花粉管伸长过程中发挥重要作用。近年来人们发现多种刺激因素,如植物激素、水分胁迫、低温、缺氧、红光及各种机械刺激均能通过改变细胞内游离 $Ca^{2+}$ ,介导一系列依赖 $Ca^{2+}$ 的细胞适应性反应<sup>[1,2]</sup>。镉是环境中主要的重金属污染物之一,它蓄积性强,易进入食物链,危及人类健康<sup>[3,4]</sup>。近年来,国内外有关 $Cd^{2+}$ 对植物的影响已有大量报道<sup>[5-8]</sup>,但对 $Cd^{2+}$ 毒害植物的作用机理仍不十分清楚。 $Cd^{2+}$ 毒害下植物花粉细胞中 $Ca^{2+}$ 浓度的变化尚未见报道。本文以重要的油脂植物油菜(*Brassica campestris* L)为材料,探讨了不同浓度 $Cd^{2+}$ 对油菜花粉胞质中游离 $Ca^{2+}$ 浓度的影响,以期揭示 $Cd^{2+}$ 对植物的毒害机理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 油菜(*Brassica campestris* L.)花粉

花粉于每天上午9:30采自商丘市郊区大田,均以花开但未散粉的花药收集,-75℃冰箱中干燥保存。

### 1.2 花粉处理

实验前3d从-75℃冰箱中取出花粉放置在-20℃冰箱内备用。先将花粉置于4℃恒温箱中12h,然后分3组分别移入含5mg/L、10mg/L  $Cd^{2+}$ 及不含 $Cd^{2+}$ 的萌发介质中,25℃水合1h。再分别播种在含5mg/L、10mg/L  $Cd^{2+}$ 及不含 $Cd^{2+}$ 培养基的1.5mL EP管中,25℃培养1h。所用 $Cd^{2+}$ 为 $CdCl_2$ (AR)配制,浓度以纯 $Cd^{2+}$ 计。萌发介质与培养基主要成分分别参照尚忠林<sup>[9]</sup>和郭光明<sup>[10]</sup>的配方。

### 1.3 花粉细胞Fluo-3AM的装载

采用Zhang等<sup>[11]</sup>改进的低温孵育装载方法,分别取50  $\mu$ L花粉培养液,加入1mmol/L Fluo-3AM母液(Molecular Probes产品,无水DMSO溶解)至终浓

度为10  $\mu$ mol/L,混匀后置于4℃冰箱孵育2h,然后用原培养基离心洗涤3次,以去除未装载进细胞内的Fluo-3AM,25℃静置1h,使进入细胞内的fluo-3AM在胞内酯酶的作用下充分水解为离子形式以与 $Ca^{2+}$ 结合。

### 1.4 激光共聚焦显微镜观察

将装载有 $Ca^{2+}$ 荧光探针fluo-3AM的油菜花粉培养液滴加在载玻片上,盖盖玻片并在激光共聚焦显微镜(Bio-Rad MRC-1024型)下观察。激光共聚焦显微镜采用15mW Kr/Ar激光器,激发波长488nm,发射波长用522/35nm滤镜,使用Lasersharp/Timecourse软件获取实时监测原始图像及数据,系统参数为Laser30%,以连续采集光学图像中像素荧光强度最大值作为细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度的表征值,重复3次,测细胞内荧光强度的时间进程参数为:取样时间间隔2s,采样周期180s。

## 2 试验结果

油菜花粉水合后细胞内 $Ca^{2+}$ 呈极性分布,花粉粒的萌发沟附近浓度较高,花粉管萌生部位浓度最高(图1);在刚刚萌发的花粉粒中, $Ca^{2+}$ 在萌发沟中浓度很高,而刚刚长出的花粉管中 $Ca^{2+}$ 浓度最高(图2)。

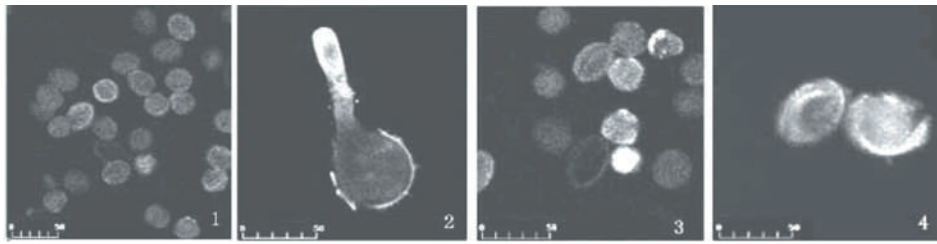
油菜花粉经5mg/L  $Cd^{2+}$ 处理后,细胞膜系统受到不同程度的损伤,一些花粉粒细胞壁遭受伤害而破裂;胞质中 $Ca^{2+}$ 浓度已明显高于对照,进一步观察发现 $Ca^{2+}$ 浓度升高是从原来浓度较高的一端开始逐渐向另一端推进,最终引起细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度的提高,而在相对的另一端, $Ca^{2+}$ 浓度的变化较小(图3)。

经10mg/L  $Cd^{2+}$ 处理后,油菜花粉粒细胞膜系统受损伤程度进一步加剧,花粉粒细胞壁破裂明显,有细胞内含物外渗;花粉胞质中 $Ca^{2+}$ 浓度继续升高,且原来 $Ca^{2+}$ 浓度较高的一端升高明显(图4)。

收稿日期:2010-11-10

\*基金资助:河南省科技厅科技攻关项目(NO.92102310130);河南省教育厅自然科学基金项目(NO.2008A180021)。

作者简介:胡金朝(1972-),男,河南兰考人,副教授,博士,主要从事细胞生物学教学与研究。



外源  $\text{Cd}^{2+}$  处理对油菜花粉粒细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响

### 3 讨论

细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化与调控对参与维持存在于细胞质膜或细胞器膜两侧的跨膜  $\text{Ca}^{2+}$  浓度梯度差,介导细胞对外界刺激的应答反应,实现信息跨膜转导具有重要的调节作用<sup>[12,13]</sup>。许多研究表明,花粉细胞质中游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度与花粉萌发和花粉管伸长密切相关<sup>[14-16]</sup>,因此在完整油菜花粉细胞中测定胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度及分布方式具有重要意义。在使用激光共聚焦显微镜测定植物细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度和分布时,能否将荧光指示剂成功装载到细胞内部是决定实验成败的关键步骤。Zhang 和 Rengel 利用低温条件抑制细胞壁中的酯酶,将酯化型钙离子荧光指示剂导入了完整植物细胞<sup>[11]</sup>。参照这一方法,笔者在低温下将  $\text{Ca}^{2+}$  探针 fluo-3AM 成功地导入完整油菜花粉粒细胞。用激光共聚焦显微术观察结果显示,油菜花粉经水合培养后,胞质内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光分布不均匀,荧光强度表明萌发沟附近

细胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度较高,花粉管萌生部位  $\text{Ca}^{2+}$  浓度最高,这可能与花粉管伸长生长过程中需要大量  $\text{Ca}^{2+}$  参与重建细胞壁并调控复杂的代谢过程有关<sup>[17]</sup>。因此,一般认为花粉萌发沟和萌发孔部位的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高有利于启动并促进花粉萌发<sup>[18]</sup>。在培养基中加入  $\text{Cd}^{2+}$  后,花粉粒细胞壁受到一定程度的伤害,且受伤害的程度与  $\text{Cd}^{2+}$  存在明显的剂量关系,说明油菜花粉受镉毒害后在细胞壁上大量富集  $\text{Cd}^{2+}$ ,从而导致细胞壁边缘的壁物质松散<sup>[19,20]</sup>。笔者在实验中发现,在培养基中加入  $\text{Cd}^{2+}$  后花粉细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显升高,表明胞外环境中的  $\text{Cd}^{2+}$  可使花粉细胞调动胞内钙库中的  $\text{Ca}^{2+}$  进入胞质,因而推测花粉粒细胞受到  $\text{Cd}^{2+}$  毒害后是通过升高胞质内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,诱发一系列依赖  $\text{Ca}^{2+}$  的生理生化反应,从而引起细胞对重金属毒害的适应性应答,这一实验结果为探索重金属对植物的毒害机理提供了新的证据。

### 注释及参考文献:

- [1] Bush DS. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 95-122.
- [2] Sanders D, Brownlee C, Harper J F. Communicating with calcium[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 691-706.
- [3] Sugiyama M. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage [J]. *Cell Biol Toxicol*, 1994, 10: 1-22.
- [4] 黄银晓, 林禹华, 任继凯, 等. 北京东郊作物土壤系统中重金属的迁移、分布、积累[J]. *植物生态学与地植物学丛刊*, 1986, 10(2): 131-144.
- [5] Bingzhong Ding, Guoxin Shi, Ye Xu, Jinzhao Hu, Qinsong Xu. Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb leaves to cadmium stress[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 147: 800-803.
- [6] Bindhu SJ, Bera AK. Impact of cadmium toxicity on leaf area, stomatal frequency, stomatal index and pigment content in mungbean seedlings[J]. *Environ Biol*, 2001, 22(4): 307-309.
- [7] Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status[J]. *Plant J*, 2002, 32(4): 539-548.
- [8] Jinzhao Hu, Dongli Pei, Feng Liang and Guoxin Shi. Growth responses of *Sagittaria sagittifolia* L. plants to water contamination with cadmium [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2009, 56(5): 686-694.
- [9] 尚忠林, 王永飞, 钱洪, 等. 百合花粉细胞中钙离子的荧光测定法[J]. *植物生理学通讯*, 2001, 37(4): 319-322.
- [10] 郭光明, 张福锁, 尚忠林, 等. 硼对百合花粉萌发过程中细胞内游离钙离子的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2002, 7(5): 32-37.
- [11] Zhang WH, Rengel Z. Determination of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in cells of intact wheat roots: loading of acetoxymethyl ester of fluo-3 under low temperature[J]. *Plant J*, 1998, 15: 147-151.
- [12] Fan, G.F., Huang, Y.G., Bai, Y.H., and Yang, F.Y. (1994) Effect of transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$  gradient on Gs function[J]. *FEBS Lett*, 1994, 357: 13-15.

- [13]Yang, X.Y., Fan, G.F., Huang, Y.G., and Yang, F.Y. (1996) Effect of transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$  gradient on ligand binding of reconstituted  $\beta$ -adrenergic receptors[J]. Chinese Science Bulletin 41: 1214-1218.
- [14]Miller DD, Callaham DA, Gross DJ et al. Free  $\text{Ca}^{2+}$  gradient in growing pollen tubes of *Lilium*[J]. J Cell Sci, 1992, 101: 7-12.
- [15]Malho R, Trewavas AJ. Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation[J]. Plant Cell, 1996, 8: 1935-1949.
- [16]Pierson ES, Miller DD, Callaham DA et al. Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: Effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media[J]. Plant Cell, 1994, 6: 1815-1828.
- [17]杨弘远. 钙在有花植物受精过程中的作用[J]. 植物学报, 1999, 41: 10-27.
- [18]Feijo J A, Malho R, Obermeyer G. Ion dynamics and its role during in vitro pollen germination and tube growth[J]. Protoplasma. 1995, 197: 155-167.
- [19]徐勤松, 施国新, 杜开和. 重金属镉、锌在苜蓿叶细胞中的超微定位观察[J]. 云南植物研究, 2002, 24(2): 241-244.
- [20]Shi GX, Du KH, Xie KB et al. Ultrastructural study of leaf cells damaged from  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  pollution in *Hydrilla verticillata*[J]. Acta Bot Sin. 2000, 42(4): 373-378.

## Effect of Cadmium on the Cytosolic $\text{Ca}^{2+}$ Concentration in *Brassica campestris* L. Pollen

HU Jin-zhao

(School of Agricultural Sciences, Xichang College, Xichang, Sichuan 615013)

**Abstract:** Effects of different concentrations of  $\text{Cd}^{2+}$  on the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in *Brassica campestris* L. pollen were investigated via laser scanning confocal microscopy and the calcium ion-fluorescence indicator fluo-3AM. It is found that the Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  distributed polarly in *Brassica campestris* L. pollen after water culture. The cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was higher near the germ furrow and the highest at pollen tube germinating site. The exogenous  $\text{Cd}^{2+}$  could elevate the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, showing that the *Brassica campestris* L. pollen made the response to exoteric stimulative factor by regulating the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The results provide a new evidence for exploring the toxic mechanism of heavy metal to plant.

**Key words:** *Brassica campestris* L.; Pollen;  $\text{Cd}^{2+}$ ; Low temperature loading; Confocal laser scanning microscopy