



绝对印度芥菜幼苗生长的影响及其亚细胞分布和化学形态

付 倩¹, 赖金龙¹, 尹 焰¹, 陶宗娅^{1*}, 卢 红¹, 吴 国¹, 罗学刚²

(1 四川师范大学 生命科学学院, 成都 610101; 2 生物质材料教育部工程研究中心, 西南科技大学, 四川绵阳 621010)

摘要: 以印度芥菜为材料, 用含铯(Cs^+) $[8.24(\text{CK}), 25, 50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}]$ 的 Hoagland 营养液培养印度芥菜种子和幼苗, 采用 IMAGE-J 软件测定根、茎长度, 通过差速离心法、化学试剂提取法分别提取幼苗根、茎、叶各亚细胞组分及不同化学形态的 Cs^+ , 并用火焰原子分光光度计测定 Cs^+ 含量, 分析 Cs^+ 对幼苗生长的影响及其亚细胞分布和化学形态, 进而探讨 Cs^+ 对植物的伤害机理。结果显示:(1) Cs^+ 对印度芥菜幼苗生长具有明显的抑制作用, 根、茎的 EC_{50} (相对抑制率达到 50% 的 Cs^+ 浓度) 分别为 112.09 和 118.42 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;(2)各器官中 Cs^+ 的积累量总体表现为叶>根>茎; Cs^+ 在印度芥菜中的亚细胞分布呈现为可溶性组分>细胞壁组分>细胞器组分, 三者所占比例分别为 52.86%~79.19%、20.81%~45.05% 和 1.43%~9.00%;(3) Cs^+ 在印度芥菜各器官中主要以无机盐和水溶态赋存, 两种形态根、茎、叶占比分别达到 88.02%~92.20%、97.33%~100% 和 95.06%~100%。研究表明:印度芥菜积累过量的 Cs^+ 可抑制其根、茎生长, 导致叶片枯萎, 主要是因为 Cs^+ 在印度芥菜体内大部分以无机盐态和水溶态形式存在, 使 Cs^+ 在植物体内具有较强迁移能力和毒理生物有效性, 更易分布到重金属的毒性敏感区(如细胞器), 导致细胞器受到功能性损伤, 从而使植物表现出明显中毒症状。

关键词: 铯; 积累; 亚细胞分布; 化学形态; 印度芥菜

中图分类号: Q945.12; Q948.116

文献标志码: A

Effect of Cesium on Seedling Growth, Its Subcellular Distribution and Chemical Forms in *Brassica juncea* L.

FU Qian¹, LAI Jinlong¹, YIN Yi¹, TAO Zongya^{1*}, LU Hong¹, WU Guo¹, LUO Xuegang²

(1 Life Science College, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China; 2 Engineering Research Center of Biomass Materials (SWUST), Ministry of Education, Mianyang, Sichuan 621010, China)

Abstract: This study examined the influence of cesium on seedling growth, its subcellular distribution, chemical forms and the damage mechanism adopted by *Brassica juncea* which cultured by Hoagland nutrient solution with varying doses of Cs^+ [$\rho(\text{Cs}^+) 8.24(\text{control}), 25, 50, 100 \text{ and } 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$]. Determined the root, stem length by IMAGE-J; abstract subcellular components, and chemical forms of Cs^+ by differential centrifugation, the chemical reagent extraction-test, then determined by atomic absorption spectroscopy. The results showed that: (1) Cs^+ possesses strongly inhibitory effect on the growth of seedling. The root, and stem EC_{50} (concentration for 50% of maximal effect) were 112.09 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and 118.42 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. (2) The accumulation of Cs^+ in plant organs overall displayed the following sequence: leaf >root>stem. The subcellular components of Cs^+ in *Brassica juncea* displayed the following sequence: soluble fraction> cell wall>organelles, which proportion was 52.86%~79.19%, 20.81%~45.05% and

收稿日期:2015-07-12; 修改稿收到日期:2015-09-06

基金项目:国家核设施退役及放射性废物治理科研重点项目(14ZG6101);四川省教育厅重点课题(14ZA0030);四川省教育厅大学生创新创业训练计划项目(201510636001)

作者简介:付 倩(1991—),女,在读硕士研究生,主要从事植物生态毒理学研究。E-mail:cherishfu@foxmail.com

*通信作者:陶宗娅,教授,主要从事植物逆境生理生化与分子生物学研究。E-mail:t89807596@163.com

1.43%—9.00%, respectively. (3) The greatest amount of Cs^+ was found in inorganic salt and the soluble, the two chemical forms relative contents in percentage were 88.02%—92.20% (in root), 97.33%—100% (in stem) and 95.06%—100% (in leaf). Research shows that over dose of Cs^+ showed toxic effects on *Brassica juncea*, such as inhibiting root and stem development, leading the leaf perished. The analysis indicated that Cs^+ was mainly present in inorganic salt, and the soluble, and the two chemical forms have strong migration behavior and toxicology bio-availability and therefore can lead Cs^+ transferred to the heavy metal toxicity sensitive area (such as organelles) more easily, causing cytoplasmic organelle functional damage, thus can lead plants show symptoms of poisoning obviously.

Key words: cesium; accumulation; subcellular distribution; chemical forms; *Brassica juncea* L.

铯(Cs)为第一主族碱金属元素,化学性质与钾(K)相似,在地壳中的含量范围为 $0\sim 26\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[1],在中国无污染土壤中的平均含量约为 $8.24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[2]。Cs的稳定同位素¹³³Cs是制造真空器件、光电管等的重要材料,广泛应用于电子产品、催化剂和医学等领域^[3]。同时,随着核工业的发展、核设施的运行及突发性核事故(如切尔诺贝利核事故和日本福岛核事故),导致大量核废弃物进入土壤和水体^[4-5],其中Cs的放射性同位素¹³⁴Cs和¹³⁷Cs为铀的核裂变废弃物,裂变量大、易扩散、半衰期长(分别为30.17年和2.07年)^[6]。当大量的¹³³Cs、¹³⁴Cs和¹³⁷Cs进入环境,导致土壤和水体中Cs含量升高,对生态系统造成严重污染^[7],尤其是农作物可能受到污染,目前已受到广泛关注。

近年来,利用植物修复技术,筛选超富集植物种植于重度污染区,通过植物根系吸收 Cs^+ 并向地上部分转移,达到对 Cs^+ 的吸收和积累,清除土壤中放射性核素的应用研究已取得一些成果,如水培条件下,蚕豆^[8]、甘蓝型油菜^[9]和转 $pprI$ (与电离辐射相关的抗性基因)油菜幼苗^[10]的根是 Cs^+ 的主要积累器官;向日葵^[11]、紫狼尾草^[12]和苋菜^[13]等植物的叶是 Cs^+ 的主要积累器官。然而, Cs^+ 为植物的非必需元素,其环境生物学效应具有双重性,少量的 Cs^+ 可维持植物细胞内电解质平衡,过量的 Cs^+ 进入细胞后可取代 K^+ ,导致代谢过程中需要 K^+ 起作用的关键组分失去活性,严重影响植物的正常生长代谢,甚至导致植物 Cs^+ 中毒^[14-15],但迄今关于 Cs^+ 对植物的毒性机理知之甚少。

研究表明,重金属在毒性敏感区(如细胞器和热应激蛋白组分)的百分比保持不变或增加,但对生物的毒性作用却增强;重金属在生物解毒区(如微粒体和热稳定蛋白组分)的百分比增加,对生物的毒性作用则减弱^[16],表明重金属对植物的毒害与重金属在植物细胞及亚细胞水平上区域化分布紧密相关^[17]。同时,重金属在生物体内的积累效应(即毒理生物有

效性)与重金属在植物体内的结合形态密切相关^[18]。因此,研究金属(如 Cs^+)在植物体内的亚细胞分布和赋存形态,是探索金属离子在植物体内积累机理的有效途径之一。

印度芥菜(*Brassica juncea* L.)属十字花科芸薹属一年生植物,生长快,具有高效的抗氧化系统、损伤修复系统和转运系统,对多种金属(如: Cd、Zn、Cu 等)具有较强的耐受及积累特性^[19],已成为研究超富集植物积累机理的模式植物,但目前关于 Cs^+ 对印度芥菜的毒理效应鲜有报道。本研究以印度芥菜为试材,以稳定同位素¹³³Cs为外源处理因素,采用水培法模拟放射性核素¹³⁴Cs和¹³⁷Cs污染,探讨铯(Cs^+)对印度芥菜幼苗生长的影响及其亚细胞分布和赋存形态,揭示 Cs^+ 对植物的伤害机理。

1 材料和方法

1.1 试材及处理

印度芥菜种子购于湖北武汉安谷农业科技有限公司。目前中国土壤中 Cs^+ 的背景值为 $8.24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[2],土壤中 Cs^+ 污染水平约为 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[20]。据此,本研究 Cs^+ 处理溶液的浓度(ρ)梯度设计为25、50、100和200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,以 $\rho(\text{Cs}^+)$ 8.24 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为对照(CK),均采用1/6改良霍格兰营养液进行溶液配制。

印度芥菜种子经浸种、萌发至露白,将露白的种子移栽至纸杯中(纸杯去底,用1层纱布包裹底部),20粒/杯,纸杯置于一次性塑料杯上,加入上述浓度梯度的 Cs^+ 处理液,使纱布刚接触到处理液,每2d更换1次处理液(培养条件:25℃,光强3500lx,光/暗比为12 h/12 h),待幼苗长出2片真叶后终止培养,取出幼苗,其根系用去离子水冲洗,采用IM-AGE-J软件测定根、茎伸长量,以评价 Cs^+ 对印度芥菜毒理效应。

另外,采用上述培养方法和条件,先使用营养液将露白的种子培养至长出2片真叶,再挑选长势一

致的幼苗用上述 Cs^+ 处理液培养 7 d 后,取出幼苗,其根系依次用自来水冲洗、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 处理 20 min 和去离子水冲洗,再将幼苗分为根、茎和叶三部分,液氮冷冻后,−80 °C 保存,用于测试分析 Cs^+ 在印度芥菜各营养器官(根、茎和叶)中的积累量、亚细胞分布及贮存形态。

1.2 测定指标及方法

采用 IMAGE-J 软件测定印度芥菜幼苗根、茎的伸长量;根(茎)伸长相对抑制率(RI)定义为:

$$RI(\%) = [(RT - RC)/RC] \times 100\%$$

式中,RT 代表处理组根(茎)长度,RC 代表对照组根(茎)长度。

亚细胞组分的分离采用差速离心法^[21],略作改进。称取冷冻保存的样品 1.000 g,加入 10 mL STM 提取液[包含 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫基乙醇],冰浴,研磨匀浆后,4 °C 下采用不同转速依次离心,得到的沉淀即为不同的细胞组分。①研磨匀浆置 $300 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s,沉淀为细胞壁组分(F_1);②将①的上清液置 $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,沉淀为细胞核与叶绿体组分(F_2);③将②的上清液置 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,沉淀为线粒体组分(F_3),上清液为含核糖体、液泡内的细胞液、胞质溶胶及内含物中的可溶性组分(F_4)。

Cs^+ 的不同化学形态的提取采用化学试剂逐步提取法^[22],略做改进。称取冷冻保存的样品 1.000 g,加入 10 mL 提取剂①,冰浴,研磨匀浆后,转入离心管,25 °C 恒温振荡 24 h 后, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清液①。沉淀中依次加入 10 mL 提取剂②~⑤,恒温振荡 24 h 后, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,依次收集各提取态的上清液②~⑤,最后沉淀为残渣态。各提取剂及提取形态依次为:提取剂①:80%乙醇(主要提取以硝酸盐、氯化物为主的无机盐以及氨基盐等物质,记作 F_E);提取剂②:蒸馏水(主要提取水溶性有机酸盐、重金属的一代磷酸盐等,记作 F_W);提取剂③: $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 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有机结合态重金属等,记作 F_{NaCl});提取剂④:2%醋酸(主要提取难溶于水的重金属磷酸盐,包括二代磷酸盐、亚磷酸盐等,记作 F_{HAc});提取剂⑤: $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸(主要提取草酸盐等,记作 F_{HCl})。

采用湿法消解法($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4 = 3 : 1$),将组分 F_1 、 F_2 、 F_3 、残渣态及植物根、茎、叶进行消解至澄清,消解液用去离子水定容至 50 mL;将各化学形

态的提取液①~⑤和 F_4 组分(均为上清液)定容至 50 mL。不同亚细胞组分 Cs^+ 含量的测定均以 STM 提取液进行空白校零,不同化学形态 Cs^+ 含量的测定以各提取剂进行空白校零,用火焰原子吸收分光光度计(北京普析, TAS-990 型)测定 Cs^+ 含量。测试结果均为 3 次独立重复试验的平均值。

1.3 数据分析与处理

采用 Origin 9.0 对 Cs^+ 处理浓度(X)与相应的根(茎)伸长相对抑制率(RI)进行非线性回归拟合,根据拟合方差计算获得 EC_{50} (即半数有效浓度:暴露后导致根(茎)伸长的相对抑制率达到 50% 的 Cs^+ 浓度)。采用 SPSS 18.0 软件对数据进行方差分析(Duncan 法多重比较)、相关性分析和回归分析,用 Origin 9.0 作图。

2 结果与分析

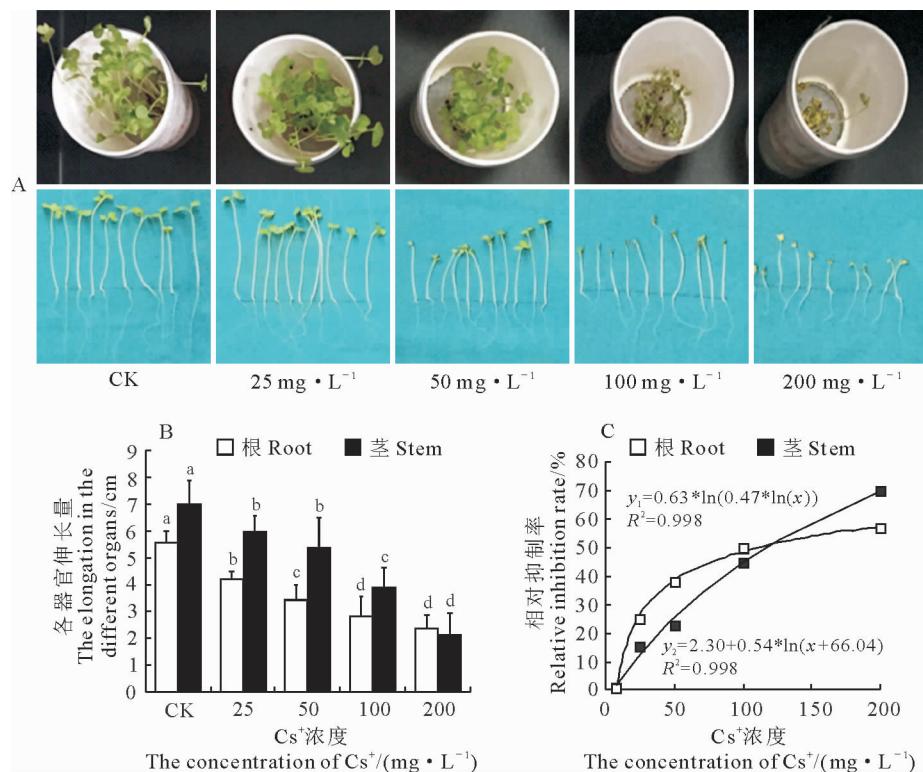
2.1 Cs^+ 对印度芥菜生长的影响

随处理液中 Cs^+ 浓度的增加($25 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),印度芥菜幼苗的长势逐渐变弱, Cs^+ 的毒害效应愈加明显,主要表现为根、茎生长受到抑制,叶部呈现枯萎的症状(图 1,A)。同时,根、茎伸长量测定结果(图 1,B)显示,随处理液中 Cs^+ 浓度的增加,印度芥菜幼苗根长和茎长均显著降低($P < 0.05$)。分析显示, Cs^+ 对根、茎伸长抑制率分别达到 25.21%~56.82% 和 15.31%~69.72%,存在显著的剂量效应关系(R^2 分别为 0.998 和 0.988, $P < 0.05$);且通过剂量效应曲线计算得 EC_{50} 分别为 112.09 和 118.42 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 1,C)。以上结果表明,当 $\rho(\text{Cs}^+) \geq 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Cs^+ 对印度芥菜的生长具有显著的抑制作用。

2.2 Cs^+ 在印度芥菜幼苗中的积累量及亚细胞分布特征

2.2.1 Cs^+ 的积累量

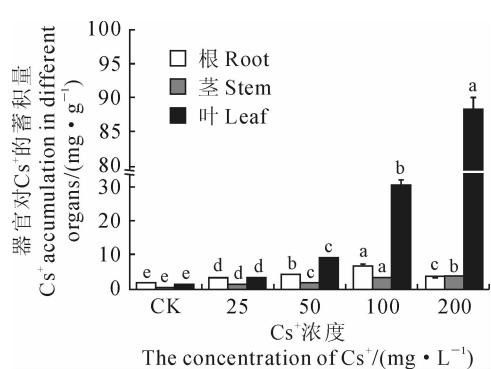
图 2 显示,印度芥菜幼苗各营养器官 Cs^+ 积累量在不同浓度处理下均呈现为叶>根>茎的趋势,且各处理器官 Cs^+ 积累量均显著高于相对对照(CK)($P < 0.05$)。随 Cs^+ 处理浓度的增加,根中 Cs^+ 积累量呈先升后降的变化趋势,当 $\rho(\text{Cs}^+)$ 为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最高值($6.95 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$),比对照组显著提高 2.68 倍($P < 0.05$);茎、叶中 Cs^+ 的积累量则呈显著上升的趋势,当 $\rho(\text{Cs}^+)$ 为 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时分别达到 3.72 和 $88.23 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,分别比对照显著提高 7.70 倍和 69.67 倍。可见,印度芥菜幼苗各营养器官 Cs^+ 的积累量在不同浓度处理下均显著提高,并以叶片增加幅度最大。

图1 不同Cs⁺浓度胁迫下印度芥菜幼苗的生长状况

不同字母表示处理浓度间在0.05水平存在显著性差异;下同

Fig. 1 The growth of *B. juncea* seedling under different Cs⁺ concentrations

The different normal letters indicate significant difference among treatments at 0.05 level; the same as below

图2 不同浓度下印度芥菜根、茎和叶中Cs⁺的积累量Fig. 2 Accumulation of Cs⁺ in roots, stems, and leaves of *B. juncea* under different concentrations

2.2.2 Cs⁺的亚细胞分布 表1可知,Cs⁺在印度芥菜根、茎和叶中的亚细胞分布呈现为可溶性组分(F_4)>细胞壁(F_1)>>细胞核/前质体和线粒体(F_2+F_3),即绝大部分Cs⁺分布在细胞壁和可溶性组分中,二者比例高达91.00%~100%。随Cs⁺浓度的增加,根的细胞壁(F_1)和可溶性组分(F_4)中Cs⁺的积累量呈先升后降的变化趋势,并均显著高于CK($P<0.05$);当 $\rho(\text{Cs}^+)$ 为50~100 mg·L⁻¹

时,根的细胞壁(F_1)和可溶性组分(F_4)中Cs⁺的积累量均达到最高,分别为1.860和4.58 mg·g⁻¹。在印度芥菜茎、叶的各亚细胞组分中,Cs⁺的积累量随Cs⁺浓度的增加而显著逐渐上升,均显著高于CK($P<0.05$);当 $\rho(\text{Cs}^+)$ 为200 mg·L⁻¹时,茎的细胞壁(F_1)、细胞核/前质体(F_2)和可溶组分(F_4)中Cs⁺的积累量分别达到0.954、0.080和3.085 mg·g⁻¹;叶的细胞壁(F_1)、细胞核/前质体(F_2)、线粒体(F_3)和可溶组分(F_4)中Cs⁺的积累量分别达到27.290、1.453、0.304和36.010 mg·g⁻¹。

Cs⁺在各亚细胞组分中的相对含量结果(图3)显示,20.81%~45.05%的Cs⁺积累在细胞壁(F_1)中,52.86%~79.19%的Cs⁺积累在可溶组分(F_4)中,仅1.43%~9.00%的Cs⁺分布细胞器(F_2 、 F_3)中。以上结果表明,印度芥菜中绝大部分的Cs⁺积累在细胞壁(F_1)和可溶组分(F_4)中,但细胞器(叶绿体、线粒体和细胞核)中低剂量的Cs⁺可能导致植物细胞器受到了功能性损伤,造成印度芥菜的根、茎生长受到抑制,叶出现枯萎症状。

2.3 Cs⁺在印度芥菜中的贮存形态

表2显示,经不同化学试剂逐步提取后,印度芥

表 1 印度芥菜各器官中 Cs^+ 的亚细胞分布
Table 1 Subcellular distribution of Cs^+ in roots, stems, and leaves of *B. juncea*

器官 Organ	Cs^+ 浓度 Cs^+ concentration $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Cs^+ 亚细胞组分的 Cs^+ 含量 Cs^+ content in subcellular fractions/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$			
		细胞壁 Cell wall(F_1)	细胞核/前质体 Nucleus and proplastid(F_2)	线粒体 Mitochondrion(F_3)	可溶性组分 Soluble fraction(F_4)
根 Root	CK	0.166±0.015e	—*	—	0.562±0.049e
	25	0.899±0.121d	—	—	2.382±0.059d
	50	1.204±0.026c	—	—	4.583±0.134a
	100	1.860±0.055a	—	—	4.065±0.186c
	200	1.466±0.013b	—	—	4.296±0.121b
茎 Stem	CK	0.075±0.007e	—	—	0.180±0.008e
	25	0.136±0.010d	—	—	0.342±0.001d
	50	0.443±0.015c	0.058±0.004b	—	1.141±0.053c
	100	0.516±0.002b	0.066±0.004b	—	1.649±0.026b
	200	0.954±0.009a	0.080±0.010a	—	3.085±0.149a
叶 Leaf	CK	0.236±0.008e	0.016±0.002e	—	0.382±0.005e
	25	1.361±0.060d	0.070±0.004d	—	1.759±0.114d
	50	4.366±0.010c	0.253±0.001b	0.023±0.001c	5.201±0.003c
	100	9.638±0.234b	0.217±0.021b	0.090±0.031b	11.449±0.196b
	200	27.290±1.161a	1.453±0.010a	0.304±0.025a	36.010±0.319a

注:同列不同小写字母表示处理浓度间在 0.05 水平存在显著性差异($P<0.05$);—表示低于检出下限(未检出);下同。

Note: Different letters in the same column indicate a significant difference at the 0.05 level; — indicate below detection limits of Cs^+ contents(not detected), the same as below.

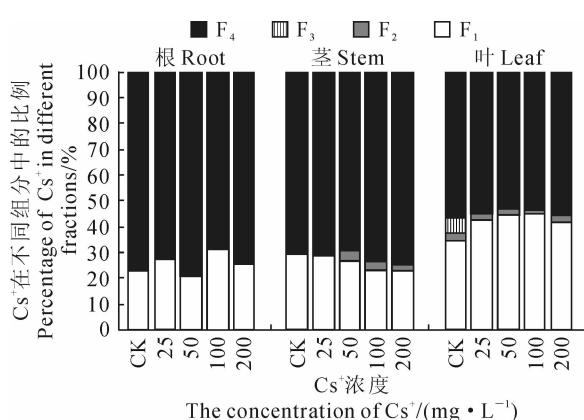


图 3 印度芥菜根、茎和叶亚细胞组分中 Cs^+ 的相对含量
F₁~F₄ 分别为细胞壁、细胞核/前质体、线粒体和可溶性组分

Fig. 3 Relative content of Cs^+ in subcellular fractions

within roots, stems, and leaves of *B. juncea*,

F₁~F₄ indicate the cell wall, nucleus and proplastid,

mitochondrion, and soluble fraction, respectively

菜根、茎和叶中未检出草酸盐态(F_{HCl})和残渣态 Cs^+ , 而根、茎和叶中 Cs^+ 在其余各赋存形态的提取量均呈现为无机盐态(F_E)>水溶态(F_W)>有机结合态(F_{NaCl})>难溶磷酸盐态(F_{HAc}), 即 Cs^+ 在根、茎和叶中主要以硝酸盐、氯化物为主的无机盐以及氨基盐等提取态(F_E)存在。同时, 随着处理液 Cs^+ 浓度的增加, 根中各提取态的 Cs^+ 含量均表现出先升

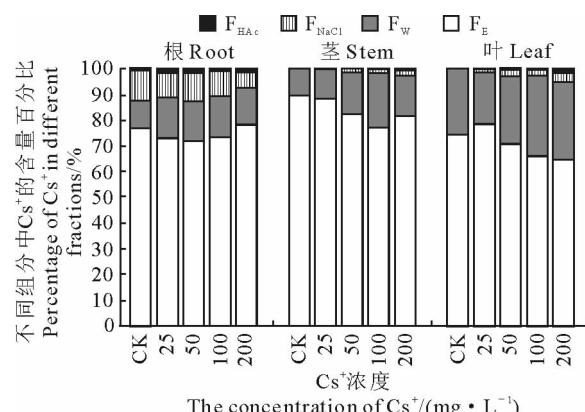


图 4 印度芥菜根、茎和叶中各种 Cs^+ 赋存形态的相对含量

Fig. 4 Relative contents of Cs^+ in different chemicals extracting agents within roots, stems, and leaves of *B. juncea* 高后降低的趋势, 但各处理均显著高于相应回对照(CK), 并均在 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时达到最大值, 是 CK 的 3.29~7.00 倍($P<0.05$); 茎、叶中各提取态 Cs^+ 含量随着 Cs^+ 处理液浓度的增加而逐渐升高, 且均显著高于对照(CK)。

从图 4 可知, 根、茎和叶各器官中 F_E 形态 Cs^+ 的相对含量占比分别为 72.03%~78.74%、77.40%~89.37% 和 64.82%~78.72%; 其次, Cs^+ 以水溶性有机酸盐和一代磷酸盐(F_W)形态存在, 相对含量分别达到 10.69%~16.21%(根)、10.63%

表2 Cs^+ 在印度芥菜根、茎和叶中的赋存形态Table 2 The content of Cs^+ within different chemicals extracting agents in roots, stems, and leaves of *B. juncea*

器官 Organ	处理浓度 Treatment concentration (mg · L ⁻¹)	各提取态中 Cs^+ 的含量 Cs^+ content extracted in different chemical agents/(mg · g ⁻¹)			
		无机盐态 Inorganic salt form(F _E)3.60	水溶态 Water soluble form(F _w)6.26	有机结合态 Organically bound form(F _{NaCl})3.29	难溶磷酸盐态 Sparingly soluble phosphate form(F _{HAc})
根 Root	CK	0.243±0.001e	0.034±0.002d	0.035±0.001e	0.002±0.001d
	25	0.427±0.017d	0.091±0.003c	0.054±0.002d	0.012±0.001c
	50	0.726±0.027c	0.156±0.001b	0.110±0.006b	0.016±0.000a
	100	1.118±0.007a	0.247±0.008a	0.150±0.003a	0.011±0.001c
	200	0.901±0.025b	0.154±0.004b	0.075±0.004c	0.014±0.001b
茎 Stem	CK	0.043±0.002e	0.005±0.000e	—	—
	25	0.144±0.004d	0.019±0.001d	—	—
	50	0.279±0.009c	0.055±0.001c	0.003±0.001c	—
	100	0.398±0.003b	0.018±0.001b	0.008±0.001b	—
	200	0.624±0.014a	0.117±0.001a	0.015±0.000a	—
叶 Leaf	CK	0.038±0.002e	0.013±0.000e	—	—
	25	0.363±0.008d	0.092±0.002d	0.006±0.000d	—
	50	0.594±0.016c	0.218±0.010c	0.024±0.001c	0.004±0.000bc
	100	1.088±0.016b	0.513±0.006b	0.035±0.001b	0.007±0.000b
	200	2.237±0.161a	1.044±0.018a	0.114±0.022a	0.053±0.005c

~21.07%(茎)和19.93%~31.24%(叶);根中以果胶酸盐、蛋白质结合态或吸附态存在的 Cs^+ 相对含量达到6.57%~11.25%,明显高于茎($\leq 2.02\%$)和叶($\leq 3.29\%$)中。以上结果表明,印度芥菜各器官中赋存的 Cs^+ 主要以 CsNO_3 、 CsCl 为主的无机盐及氨基盐等物质存在,根中果胶酸盐、蛋白质结合态或吸附态含量较高,可能与 Cs^+ 的吸收途径和方式有关;器官中各赋存形态 Cs^+ 的含量与环境中 Cs^+ 浓度密切相关。

3 讨论

Cs 是植物的非必需元素,理化性质与 K^+ 相似,其吸收方式主要依赖于 K^+ 运输系统。目前认为,植物根系吸收 K^+ 的途径主要有二条,其一是依赖细胞膜上转运载体介导的高亲和吸收途径(外界 K^+ 浓度在0~1 mmol · L⁻¹)^[23],如 K^+ 吸收通透酶(K^+ uptake permeases, KUPs)^[24],拟南芥对 Cs^+ 的吸收积累涉及KUPs家族成员,如 K^+ 高亲和转运载体5(high affinity K^+ transporter 5, HAK5)和KUP9^[25-26]。其二是由离子通道介导的低亲和吸收途径(外界 K^+ 浓度在1~50 mmol · L⁻¹),如电压不敏感阳离子通道(voltage-insensitive cation channels, VICCs)^[24]和环核苷酸门控通道1(cyclic nucleotide-gated ion channels 1, CNGC1)^[27]。本研究设置的 Cs^+ 处理浓度为25~200 mg · L⁻¹,约合

0.19~1.50 mmol · L⁻¹,推测印度芥菜对 Cs^+ 的吸收方式主要由KUPs介导,通过竞争高亲和转运载体上的 K^+ 结合位点进入根系,即KUPs家族介导的跨膜运输是印度芥菜吸收 Cs^+ 的主要途径。同时,在 Cs^+ 胁迫条件下,茉莉酮酸酯可抑制基因HAK5的表达,改变植物对 K^+ 的吸收方式,导致植物体内 K^+ 含量降低^[28]。当印度芥菜体内积累过量的 Cs^+ ,导致其 Cs^+/K^+ 失衡^[29],过量的 Cs^+ 与 K^+ 的竞争性作用干扰了需 K^+ 的代谢,进一步导致印度芥菜根、茎生长受到抑制、叶片枯萎。因此,其毒理机制可能与 Cs^+ 胁迫条件下激活了由茉莉酮酸酯介导的植物激素响应途径有关。

基于亚细胞分室模型,本研究采用连续差速离心将植物细胞分为五组分:细胞壁组分、细胞核与叶绿体组分、线粒体组分和可溶性组分。其中细胞器组分(细胞核、叶绿体和线粒体)为重金属的毒性敏感区(metal-sensitive fractions, MSF);细胞壁组分和可溶性组分(含核糖体、液泡的细胞液、胞质溶胶及内含物)为重金属的生物解毒区(biologically detoxified metal, BDM)^[16]。通常,(重)金属在植物中的亚细胞分布表现为“细胞壁>可溶组分>>细胞器”或“可溶组分>细胞壁>>细胞器”^[30],即(重)金属主要分布在重金属的生物解毒区(BDM)。本研究结果与此类似,印度芥菜体内 Cs^+ 的亚细胞分布表现为“可溶组分>细胞壁>>细胞器”,其中

91.00%~100%集中在BDM,究其原因,主要是构成植物细胞壁的结构组分具有多样性,大多含有多糖、蛋白质及羟基、羧基、氨基、醛基等基团^[31~32],可与Cs⁺以配位键的方式结合,有效阻止Cs⁺进入细胞,体现细胞壁作为细胞与环境进行物质交换时的第一道屏障的防卫作用。当细胞壁结合位点达饱和后,Cs⁺可经高亲和转运载体进入细胞,再由植物SNARE蛋白(介导真核生物细胞囊泡运输过程中的膜融合,可促进植物细胞板形成,能与离子通道蛋白相互作用)介导进入液泡^[33],细胞液中存在多种蛋白质、有机酸和有机碱^[34],其负电荷基团可与Cs⁺以化学键的方式结合,使Cs⁺主要被限制在液泡内,暂时或永久贮存。随Cs⁺处理浓度的增加,Cs⁺在茎、叶的BDM的百分比逐渐降低,在重金属的毒性敏感区(MSF)中百分比逐渐增加,达到1.43%~9.00%,表现为Cs⁺对印度芥菜茎、叶的毒性作用增强,细胞器中积累的少量Cs⁺已严重影响了细胞器的正常功能,是植物表现出明显中毒症状的主要原因之一,其作用机理有待进一步研究。

采用化学试剂逐步提取法可分离得到植物体内不同赋存形态的Cs⁺^[22]。研究表明,植物体内重金属(如Cd、Pb)的生物学活性与其赋存的化学形态紧密相关,以无机盐态(F_E,80%乙醇提取)和水溶态(F_w,如蒸馏水提取)赋存的金属离子比另外4种化学形态的金属迁移能力更强,更易对植物细胞造

成损伤^[35]。本研究结果与此类似,Cs⁺在印度芥菜各营养器官以无机盐态(F_E)和水溶态(F_w)赋存形态占比达到88.02%~100%,表明Cs⁺在印度芥菜体内迁移能力和毒理生物有效性较强,极易在生物体内积累,并对细胞造成损伤,导致植物出现中毒症状。印度芥菜根内以果胶酸盐、蛋白质结合态或吸附态赋存的Cs⁺明显高于茎和叶,主要是由于外源Cs⁺可诱导植物细胞分泌果胶酸、植物螯合肽(PCs)等物质,果胶酸的羧基(-COOH)及PCs的游离巯基(-SH)可与Cs⁺以离子键的方式结合,形成果胶酸盐和低分子量PC-Cs复合物^[30]。果胶酸盐可沉积在细胞壁,低分子量PC-Cs复合物可转移进入液泡并与还原态含硫化合物(S²⁻)共价连接形成高分子量复合物赋存在液泡中,形成区域化分布,这是根部细胞器中Cs⁺积累量较低的原因之一。

综上所述,Cs⁺通过竞争高亲和转运载体上的K⁺结合位点进入根系,即KUPs家族介导的跨膜运输是印度芥菜吸收Cs⁺的主要途径。当印度芥菜积累过量的Cs⁺可导致根、茎生长受到抑制以及叶片枯萎;其毒理机理主要是Cs⁺在印度芥菜体内大部分以无机盐态(F_E)和水溶态(F_w)形式存在,使Cs⁺在植物体内具有较强迁移能力和毒理生物有效性,更易分布到重金属的毒性敏感区(如细胞器),导致细胞器受到功能性损伤,从而造成植物表现出明显中毒症状。

参考文献:

- [1] KABATA-PENDIAS A,PENDIAS H. Trace elements in soils and plants[J]. *Trace Elements in Soils & Plants*,1992,**34**(4):951~974.
- [2] 中国环境监测总站.中国土壤元素背景值[M].北京:中国环境科学出版社,1990:84.
- [3] DONG P(董 普),XIAO R G(肖荣阁).Cesium application and Cesium (alkali metals) resource evaluation[J]. *China Mining Magazine* (中国矿业),2005,**14**(2):30~34(in Chinese).
- [4] SHI L(石 雷),DING B J(丁保君).Impact of the chernobyl nuclear accident on the ecological environment in Belarus[J]. *Environment and Sustainable Development*(环境与可持续发展),2012,**37**(1):93~96(in Chinese).
- [5] SHENG L(盛 黎),ZHOU B(周 斌),SUN M H(孙明华),et al. Atmospheric radioactive fallout in China due to the Fukushima nuclear plant accident[J]. *Meteorological Monthly*(气象),2013,**39**(11):1 490~1 499(in Chinese).
- [6] ISAURE M P,FRAYSSSE A,DEVÉS G,et al. Micro-chemical imaging of cesium distribution in *Arabidopsis thaliana* plant and its interaction with potassium and essential trace elements[J]. *Biochimie*,2006,**88**(11):1 583~1 590.
- [7] ZHANG Q(张 琼),CHEN J R(陈金融),ZHANG CH M(张春明) et al. Research progress of remediation contaminated soil by radioactive Cs[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*(核农学报),2014,**28**(10):1 924~1 931(in Chinese).
- [8] ZHANG X X(张晓雪),WANG D(王 丹),LI W F(李卫锋),et al. Studies on accumulation of ¹³³Cs and ⁸⁸Sr in *Vicia faba* L. and irradiation damage effect[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*(辐射研究与辐射工艺学报),2010,**28**(1):48~52(in Chinese).
- [9] GUO M L(郭梦露),WANG D(王 丹),XUE CH H(徐长合),et al. The effect of phytohormones on the ¹³³Cs and ⁸⁸Sr accumulation in oilseed rape[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*(辐射研究与辐射工艺学报),2011,**29**(5):314~320(in Chinese).
- [10] FENG D Y(冯德玉),DAI Q L(代其林),CUI G Y(崔广艳),et al. Responses of *pprI*-transgenic rape seedlings to the ¹³³Cs or ⁸⁸Sr stress [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*(核农学报),2014,**28**(7):1 298~1 305(in Chinese).
- [11] SOUDEK P,VALENOVÁ S,VAVRÍKOVÁ Z,et al. ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr uptake by sunflower cultivated under hydroponic conditions[J]. *Journal of Environmental Radioactivity*,2006,**88**(3):236~250.

- [12] KANG D J, SEO Y J, SAITO T, et al. Uptake and translocation of cesium-133 in napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) under hydroponic conditions[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, **82**(1): 122—126.
- [13] CHEN M(陈梅), AN B(安冰), TANG Y L(唐运来). Difference in uptake and accumulation of cesium between amaranth, wheat and maize[J]. *Crop Research*(作物研究), 2012, **26**(5): 512—517(in Chinese).
- [14] LU J(卢靖), WANG Y S(王颖松), JIANG Y CH(蒋育澄), et al. Progress in biochemical studies on metal cesium[J]. *Chinese Journal of Rare Metals*(稀有金属), 2006, **30**(5): 682—687(in Chinese).
- [15] IVSHINA I B, PESHKUR T A, KOROBON V P. The efficient accumulation of cesium ions by Rhodococcus cells[J]. *Mikrobiologija*, 2002, **71**(3): 418—423.
- [16] 李丹丹. 影响镉生物有效性及其对小麦毒性的机理研究——亚细胞分室模型的应用[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2012.
- [17] ZHOU X Y(周小勇), QIU R L(仇荣亮), HU P J(胡鹏杰), et al. Effects of cadmium and lead on subcellular distribution and chemical form of Zinc in *Potentilla griffithii* var. *velutina*[J]. *Environmental Science*(环境科学), 2008, **29**(7): 2 028—2 036(in Chinese).
- [18] CHENG H K(程海宽), ZHANG B(张彪), JING X X(景鑫鑫), et al. Response of maize to lead stress and relevant chemical forms of lead[J]. *Environmental Science*(环境科学), 2015, **36**(4): 1 468—1 473(in Chinese).
- [19] SUN T(孙涛), ZHANG Y X(张玉秀), CHAI T Y(柴团耀). Research progress on tolerance of indian mustard (*Brassica juncea* L.) to heavy metal[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*(中国生态农业学报), 2011, **19**(1): 226—234(in Chinese).
- [20] WEN F P(闻方平), WANG D(王丹), XU CH H(徐长合), et al. Study on the stress responses and the characteristics of uptake and accumulation of Sorghum sudanense to ¹³³Cs and ⁸⁸Sr[J]. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*(辐射研究与辐射工艺学报), 2009, **27**(4): 213—217(in Chinese).
- [21] HOU M, HU C, XIONG L, et al. Tissue accumulation and subcellular distribution of vanadium in *Brassica juncea* and *Brassica chinensis* [J]. *Microchemical Journal*, 2013, **110**(9): 575—578.
- [22] FU X. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Phytolacca americana* L. [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, **186**(1): 103—107.
- [23] LI W L(李万良), LI SH Q(李时群), ZHANG Y(张英). A review on the potassium uptake mechanism in higher plants[J]. *Journal of Maize Sciences*(玉米科学), 2010, **18**(2): 149—152(in Chinese).
- [24] WHITE P J, BROADLEY M R. Mechanisms of caesium uptake by plants[J]. *New Phytologist*, 2000, **147**(2): 241—256.
- [25] QI ZH, HAMPTON C R, RYOUNG S, et al. The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a cesium uptake pathway in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, **59**(3): 595—607(13).
- [26] KOBAYASHI D, UOZUMI N, HISAMATSU S, et al. At KUP/HAK/KT9, a K⁺ transporter from *Arabidopsis thaliana* mediates Cs⁺ uptake in *Escherichia coli*[J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2010, **74**(1): 203—205.
- [27] KANTER U, HAUSER A, MICHALKE B, et al. Caesium and strontium accumulation in shoots of *Arabidopsis thaliana*: genetic and physiological aspects[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, **61**(14): 3 995—4 009.
- [28] ADAMS E. Cesium inhibits plant growth through Jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, **14**(3): 4 545—4 559.
- [29] HAMPTON C R, BOWEN H C, BROADLEY M R, et al. Cesium toxicity in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2004, **136**(3): 3 824—3 837.
- [30] WENG B, XIE X, WEISS D J, et al. *Kandelia obovata* (S. L.) Yong tolerance mechanisms to Cadmium: subcellular distribution, chemical forms and thiol pools[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, **64**(11): 2 453—2 460.
- [31] HERNANDEZ A J, GARBISU C J M, BARRUTIA O, et al. Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*[J]. *Plant Cell & Environment*, 2006, **29**(7): 1 422—1 429.
- [32] KÜPPER H, LOMBI E, ZHAO F J, et al. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*[J]. *Planta*, 2000, **212**(1): 75—84.
- [33] DRÄXL S L, MÜLLER J, LI W B, et al. Caesium accumulation in yeast and plants is selectively repressed by loss of the SNARE Sec22p/SEC22[J]. *Nature Communications*, 2013, **4**: 2 092.
- [34] ZHAO Y F, WU J, SHANG D, et al. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in the edible seaweed, *Porphyra yezoensis* [J]. *Food Chemistry*, 2015, **168**: 48—54.
- [35] WANG X, LIU Y, ZENG G, et al. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Bechmeria nivea* (L.) Gaud[J]. *Environmental & Experimental Botany*, 2008, **62**(3): 389—395.

(编辑:裴阿卫)