

Cd、Pb对银杏根系离子微域分布影响研究

朱宇林¹, 曹福亮², 汪贵斌², 谭萍¹

(1. 玉林师范学院, 广西 玉林 537000; 2. 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要:为阐明重金属在银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 根尖微区中的富集特性及对其它选择性吸收离子的作用机理, 采用 X 线电子探针技术研究 Cd、Pb 对银杏根系中离子微域分布的影响。结果表明, Cd、Pb 处理后在表皮、皮层、韧皮部和木质部细胞中均可发现 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的积累。Cd、Pb 胁迫显著地影响了根系微区的离子分布, 使细胞中大多离子的稳态受到破坏, 是 Cd、Pb 对植物产生毒害的机制之一。同时 Ca^{2+} 和 K^+ 在根系微区不同组织中均呈现出较强的峰, Ca^{2+} 和 K^+ 稳态的维持显示银杏对 Cd、Pb 胁迫可能具有较强的耐性机制。

关键词: 银杏; Cd; Pb; X 线电子探针; 离子微域分布

中图分类号: S792.95.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)02-0345-05

Effects of Cd and Pb Stress on the Micro-distribution Analysis of the Across Sections of Ginkgo Root

ZHU Yu-lin¹, CAO Fu-liang², WANG Gui-bin², TAN Ping¹

(1. Yulin Normal University, Yulin 537000, China; 2. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In order to elucidate deeply and systematically the toxicity and tolerance mechanisms of *Ginkgo* to heavy metals stress, the micro-distribution analysis of the across sections of *Ginkgo* root with X-ray microanalysis was studied under cadmium and lead stress. The micro-distribution analysis of the across sections of *Ginkgo* root with X-ray microanalysis indicated that ion micro-distribution of root was significantly affected by cadmium and lead single and combined pollution. Cd^{2+} and Pb^{2+} accumulation in the epidermis, cortex, phloem and xylem cell of *Ginkgo* roots was observed. The disrupted balances of most elements of different tissues were one of the pivotal toxicity mechanisms by cadmium and lead stress. Meanwhile the peaks of Ca^{2+} and K^+ appeared obviously in different tissues. The maintenance of homeostasis of Ca^{2+} and K^+ revealed that *Ginkgo* had strong resistance against cadmium and lead stress.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; Cd; Pb; X-ray electron probe microanalysis; ion micro-distribution

Cd、Pb 是环境中最普遍和最受关注的有毒重金属, 其毒性仅次于 Hg 而分居第二、三位。进入生物圈的 Cd、Pb 通过迁移、转化和富集过程以及食物链的“生物放大”作用, 对动植物等产生极大的危害性。根系作为植物与土壤环境接触的重要界面, 是与不同重金属发生作用的最直接器官。毒害水平的重金属可引起植物根系伸长严重受抑制, 活力下降^[1]、生长发育严重受阻^[2], 导致根尖细胞中的高尔基体消失, 线粒体肿胀呈空泡化, 染色质凝聚, 染色体发生畸变, 微核分裂异常等毒害症状^[3-5]。近年来, 利用

收稿日期: 2009-11-24 修回日期: 2010-01-14

基金项目: 江苏省高科技项目 (BG2004314)

作者简介: 朱宇林 (1975-), 男, 副教授, 博士, 主要从事森林生态学和植物生理学研究, E-mail: gxzy1@163.com.

X线能谱分析技术研究植物在盐胁迫^[6-7]、重金属胁迫^[8-9]等逆境中的适应机制已有报道,在组织水平上探讨根系微区细胞吸收积累毒害离子的变化能较好揭示植物对逆境的适应机理。如 Kupper等^[10]、Alexander等^[11]和 Mazen等^[12]研究指出,植物使重金属离子在细胞壁和液泡内的区室化可能是减轻该重金属的毒害重要机理之一。银杏(*Ginkgo biloba* L.)是古老的孑遗木本植物,在漫长的生物进化及地球气候环境变迁的种种生境中兴而不衰,在多样性的生态系统中表现出特殊的生态位,对重金属具有潜在的吸收和积累能力,在改善生态环境、园林绿化中具有不可替代的作用,发展前景广阔。为阐明重金属在银杏根系微区各组织中的富集特性及对其它选择性吸收离子的作用机理,本文采用 X线电子探针技术探讨 Cd、Pb对银杏根系中离子微域分布的影响,以期对重金属污染环境植物修复研究和银杏抗性品种的综合开发提供必要的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与处理

选用生长均匀的 2 年生无污染的大佛指银杏品种实生苗为供试材料。参照我国土壤环境质量标准^[13],设置的处理浓度为(以干土重计算纯 Cd、Pb 含量): Cd 150 mg/kg, Pb 1 000 mg/kg (Cd 以 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 盐溶液的形式加入, Pb 以 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 盐溶液的形式加入);对照组用不含 Cd 或 Pb 的水溶液均匀加入,每盆 2 株,每个处理 7 个重复。采用温室盆栽控制方法,试验在南京林业大学树木园温室进行,选用沙壤土作为盆栽基质,土样风干过筛后充分混匀,每盆 [25 cm (径) × 30 cm (高)] 装土为 10 kg (干重),施基肥: $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 0.5 mg/kg, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 0.4 mg/kg, K_2SO_4 0.5 mg/kg。经测试分析,基质土壤速效 N 为 8.6 mg/kg,速效 P 为 4.5 mg/kg,速效 K 为 11.3 mg/kg,有机质含量为 35 g/kg, pH 值为 6.2,全 Cd 含量为 0.04 mg/kg,全 Pb 含量为 0.57 mg/kg。自处理后,根据每盆土壤水分状况,每隔 3~5 d 等量地浇入淡水 1 次,使土壤的田间持水量保持在 70% 左右。胁迫处理 140 d 后把银杏苗从盆中取出立即制样以分析根系离子微域分布特点。

1.2 测定方法

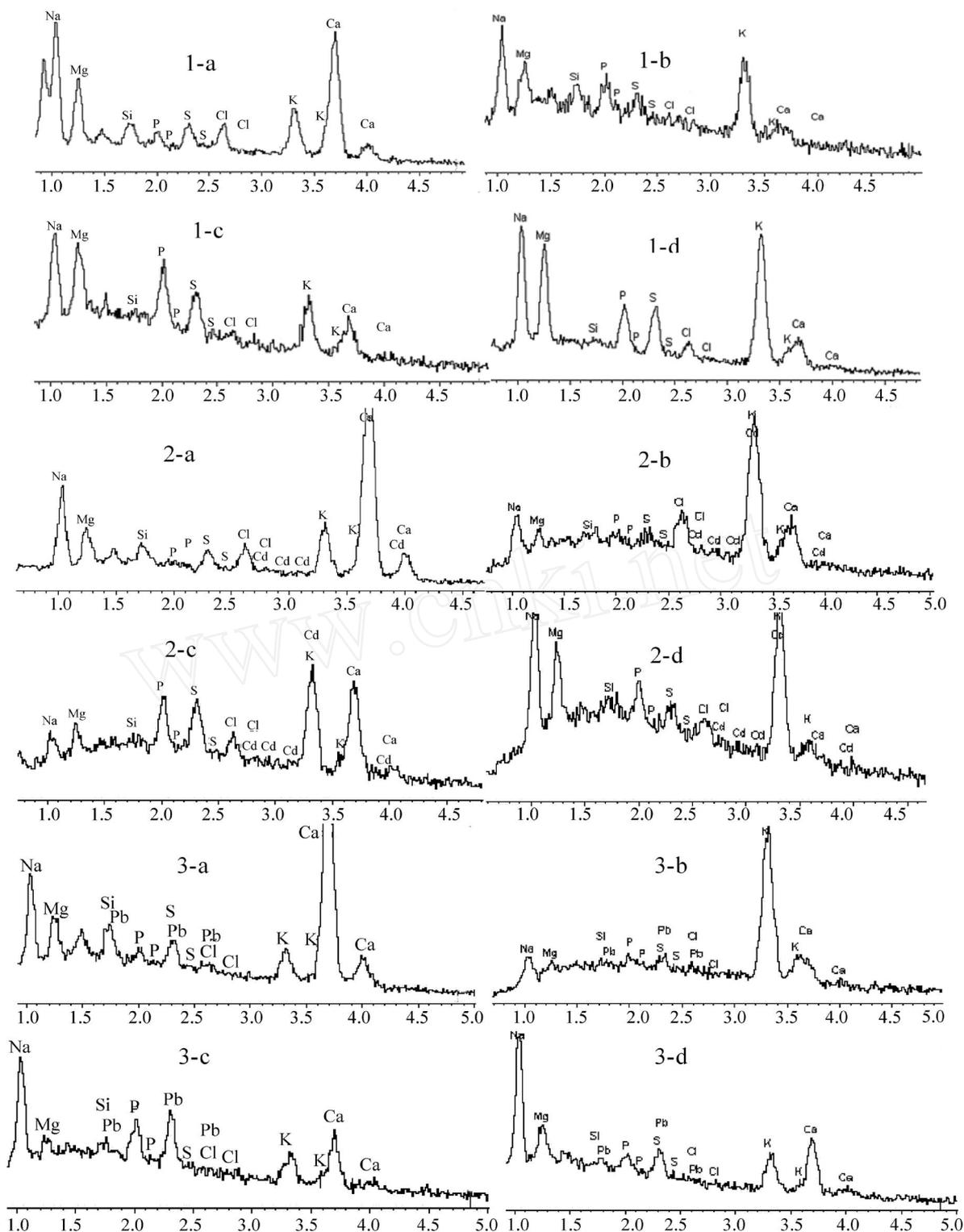
参照施卫明^[14]的方法进行样品制备,用双面刀片取距根尖 4~7 cm 的根段,迅速投入液氮(约 -196 ℃)冷冻。然后经 LGJ-25 型冷冻干燥机(北京)冷冻真空干燥、喷镀碳膜后,在 LEO1530VP 型可变压场发射扫描电子显微镜下观察,EDS 型 X 线能谱仪(英国 OXFORD 牛津公司),加速电压 15.00 kV,样品倾斜角 0°;样品与探针间的角度为 35°。计算机附带软件自动判断各元素峰值,并依据点分析图谱中的元素峰谱计算出各元素相对百分含量。

2 结果与分析

2.1 Cd 污染的银杏根系离子微域分布

图 1(1-a, 1-b, 1-c, 1-d)是无重金属污染的银杏根细胞微区 X 线电子探针各元素点分析结果。由图 1 可知,在各层中均观察不到 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 峰;在表皮细胞中 Ca^{2+} 峰最高,随后趋于下降; K^+ 在皮层、木质部、韧皮部的峰值则大幅上升并高于其他元素;而各层中 Si 和 Cl^- 峰均表现最弱。经方差分析与多重比较表明, K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、P、S、 Cl^- 在各层中的相对含量差异不显著($P > 0.05$); Ca^{2+} 和 Si 差异明显($F_{\text{Ca}^{2+}} = 5.58, P < 0.05$; $F_{\text{Si}} = 15.10, P < 0.01$),均在表皮和韧皮部分布最多,在皮层和木质部分布最少。

经 Cd 处理后,银杏根系微区细胞中各离子分布发生了明显的变化。Cd 150 mg/kg 处理的表皮、皮层、韧皮部和木质部细胞中均发现有 Cd^{2+} 的积累,其相对含量由大到小依次为韧皮部、木质部、皮层、表皮。经方差分析与多重比较表明, Mg^{2+} 、S 在表皮、皮层、韧皮部和木质部细胞中分布的差异性水平均未达显著,但对 K^+ ($F_{\text{Cd150}} = 25.71, P < 0.01$)、 Na^+ ($F_{\text{Cd150}} = 22.07, P < 0.01$)、 Ca^{2+} ($F_{\text{Cd150}} = 43.82, P < 0.01$)、 Cl^- ($F_{\text{Cd150}} = 16.01, P < 0.01$)、 Cd^{2+} ($F_{\text{Cd150}} = 109.51, P < 0.01$) 的影响达到极显著水平。这表明 Cd 可以影响银杏根系微区中各离子的吸收和转运效率,导致微区中离子分布不均匀,可能是 Cd 对植物产生毒害作用的机理之一。银杏经 Cd 处理后,与对照相比,根系微区中 Na^+ 随浓度的增加由外向内表现为先下降后升高; Cl^- 则趋于上升,在韧皮部和木质部分布最多; Cd^{2+} 也在韧皮部和木质部细胞中出现最大峰值[图 1(2-a, 2-b, 2-c, 2-d)]。从表 1 还可看出,在随 Cd^{2+} 上升的同时 Ca^{2+} 和 K^+ 也呈现



1, 2, 3分别为对照 (CK), Cd 150 mg/kg, Pb 1 000 mg/kg处理 (a, b, c, d则分别代表表皮、皮层、韧皮部、木质部)。

1, 2, 3 denoted in control, Cd 150 and Pb 1 000 mg/kg treatment, respectively (a, b, c, d were epidermis, cortex, phloem and xylem cell respectively).

图 1 银杏根系微区 X线电子探针元素点分析图谱

Fig 1 The typical spectrum of X - ray electron probe microanalysis of *Ginkgo* roots

大幅上升的趋势, Si也表现出不同程度的增加。Cd处理后显著地影响了根系微区的离子分布, 使细胞中大多离子的稳态受到破坏, 同时也相应地增强其渗透调节机制, 说明银杏对 Cd胁迫表现出较强的抗性。

2.2 Pb污染的银杏根系离子微域分布

从图 1(3 - a, 3 - b, 3 - c, 3 - d)和表 1 可看出, Pb处理后, 银杏根表皮细胞、皮层细胞、韧皮部和木质部细胞均有 Pb^{2+} 的积累, 且均在韧皮部细胞中积累最高, 皮层次之, 木质部相对含量最低。随 Pb处理浓度的增加, 在表皮和木质部细胞中 Pb^{2+} 的积累差异不明显, 但在韧皮部 ($F_{Pb1000} = 9.17, P < 0.05$) 和皮层 ($F_{Pb1000} = 49.74, P < 0.01$) 则分别达到显著和极显著水平。方差分析与多重比较表明, 除 Cl^- 外, K^+ ($F_{Pb1000} = 61.57, P < 0.01$)、 Na^+ ($F_{Pb1000} = 547.47, P < 0.01$)、 Ca^{2+} ($F_{Pb1000} = 73.72, P < 0.01$)、S ($F_{Pb1000} = 6.48, P < 0.01$)、 Pb^{2+} ($F_{Pb1000} = 67.08, P < 0.01$)、Si ($F_{Pb1000} = 63.03, P < 0.01$)、P ($F_{Pb1000} = 19.42, P < 0.01$) 均达到极显著水平。显然, Pb处理后也能显著地影响根系微区各组织中离子的分布, 使不同 Pb水平各组织中细胞的稳态受到破坏, 从而使银杏表现出受 Pb伤害症状。比较不同处理间根系微区各离子的分布特点, Na^+ 有向根系内层组织累积的趋势; Si和 Mg^{2+} 则显示出逐渐下降的现象, 在韧皮部和木质部细胞中下降尤为显著; 但同时 Ca^{2+} 和 K^+ 明显上升, 表明银杏对 Pb有较强的耐性。

表 1 Cd、Pb处理银杏根微区细胞中各元素的相对含量

Tab 1 Relative element content in epidermal, cortex, phloem and xylem cell in roots of Ginkgo under Cd and Pb treatment

处理 Treatment	组织 Tissue	元素相对含量 Relative element content/%								
		Na	Mg	Si	P	S	Cl	K	Ca	Cd(Pb)
CK	表皮 Epidermis	15.7	210.61	3.86	3.82	5.00	5.73	20.50	34.77	a_
	皮层 Cortex	17.20	12.29	1.14	10.80	9.02	3.69	34.68	11.17	a_
	韧皮部 Phloem	18.19	11.88	3.85	8.94	6.85	2.34	27.87	20.08	a_
	木质部 Xylem	18.13	14.95	0.72	7.90	9.57	4.03	36.10	8.61	a_
Cd 150 ($mg \cdot kg^{-1}$)	表皮 Epidermis	13.86	6.60	3.00	1.41	4.55	4.49	13.60	51.70	0.81
	皮层 Cortex	11.82	5.49	2.15	2.16	4.07	3.16	40.98	29.79	0.38
	韧皮部 Phloem	7.61	6.08	3.32	11.73	9.81	7.82	26.46	22.78	4.41
	木质部 Xylem	20.38	7.74	2.33	5.78	11.45	6.34	35.55	8.84	1.58
Pb 1 000 ($mg \cdot kg^{-1}$)	表皮 Epidermis	13.45	7.32	4.46	2.53	5.06	1.66	9.36	55.93	0.24
	皮层 Cortex	12.85	3.61	1.37	2.71	3.36	1.47	61.34	10.89	1.90
	韧皮部 Phloem	22.22	4.42	1.79	9.31	10.87	1.01	21.45	25.12	3.83
	木质部 Xylem	31.27	8.30	0.94	5.74	11.20	1.69	17.81	22.82	0.25

3 结论与讨论

根系作为植物与土壤环境接触的界面, 是感受逆境信号最直接的器官, 重金属对植物产生毒害作用必须通过根系的吸收和转运等过程。有研究表明, 在 Cd、Pb胁迫下, 植物根系可以富集较多的 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} , 而迁移至其它部位较少, 有利于提高植物的耐性^[7-8]。杨居荣等^[15]研究认为, 重金属对植物的毒害作用及植物的耐受性, 与植物对重金属的吸收和运输及其在植物体内各部位的分配等有关。根系中积累过多的 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 会对根系产生破坏性的作用, 如导致根系活力下降, 根系生长发育受阻, 从而引起吸收其它矿质元素的能力下降, 使植物体内元素平衡被打破, 植物受到伤害^[2]。

一般来说, 正常生长的植物体内各离子总处在一个相对平衡的稳态水平。通过 X线能谱分析技术研究 Cd、Pb处理对银杏根系微区中主要离子的微域分布特点, 结果表明, Cd、Pb处理后在表皮、皮层、韧皮部和木质部细胞中均可发现 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 的积累, 并导致根系微区中 Na^+ 由外向内逐渐富积, 使大多离子平衡受到破坏, 导致微区中的离子分布不均匀, 是 Cd、Pb对植物产生毒害作用的机理之一。Cd处理的银杏根系各组织细胞中的 Cl^- 呈现上升的趋势, 并与 Cd^{2+} 在韧皮部和木质部细胞中表现出最大峰值, Cl^- 与 Cd^{2+} 显示出协同性, 其原因可能是 Cl^- 易与 Cd^{2+} 络合成 $CdCl_n^{2-n}$, 有效地提高了 Cd^{2+} 的有效态^[16]。江行玉等^[9]研究也表明, Cd污染的芦苇幼苗体内的 Cd主要以 NaCl提取化学态存在。此外, 根系微区中 Si随 Cd浓度的上升表现出不同程度的增加趋势。据报道, Si可使过量的 Mn在水稻叶片中均匀分布, 进而提高水稻的耐 Mn性^[17]。Si能与重金属在介质和植物体内形成共沉淀并钝化, 从而提高作物对重金属胁迫的抗性机制^[18], Cd处理后, 根系 Si的提高, 可能是银杏对 Cd胁迫的耐性机制之一。但 Pb可引起 Si和 Mg^{2+} 的下降, Mg^{2+} 是植物光合色素的重要组成, 参与激活光合作用和呼吸作用

酶的活化、氮代谢、核酸代谢及蛋白质代谢等重要生理过程, Pb胁迫引起根系微区 Si和 Mg^{2+} 的下降可能是 Pb对银杏产生伤害的机理之一。Cd、Pb处理后, Ca^{2+} 和 K^+ 在不同根系微区中均呈现出较高的峰值, 这说明重金属处理后显著地影响了银杏根系的离子微区分布, 使细胞中大多离子的稳态受到破坏, 同时也相应地增强其渗透调节机制, 但银杏对 Cd、Pb胁迫也可能表现出较强的抗性。

参考文献:

- [1] 于拴仓, 刘立功. Cd、Pb及其相互作用对 3种主要蔬菜胚根伸长的影响 [J]. 种子, 2005, 24(1): 61 - 63.
- [2] 秦天才, 吴玉树, 王焕校, 等. 镉、锌及其交互作用对小白菜根系生理生态效应的研究 [J]. 生态学报, 1998, 18(3): 320 - 325.
- [3] 周红卫, 施国新, 徐勤松. Cd^{2+} 污染水质对水生根系抗氧化酶活性和超微结构的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(3): 211 - 214.
- [4] 曹德菊, 汤斌. 铅、镉及其复合污染对蚕豆根尖细胞的诱变效应 [J]. 激光生物学报, 2004, 13(4): 302 - 305.
- [5] 徐东, 许家辉, 邱栋梁, 等. Cd胁迫对枇杷根、茎、叶细胞结构的影响 [J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(2): 237 - 241.
- [6] 陈少良, 李金克, 尹伟伦, 等. 盐胁迫条件下杨树组织及细胞中钾、钙、镁的变化 [J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(5): 84 - 88.
- [7] 徐呈祥. 硅缓解金丝小枣盐胁迫的效应与机制 [D]. 南京: 南京林业大学, 2005.
- [8] 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.
- [9] 江行玉, 王长海, 赵可夫. 芦苇抗镉污染机理研究 [J]. 生态学报, 2003, 23(5): 856 - 862.
- [10] Kupper J, Zhao F J, McGrath S P. Cellular compartmentation of Zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* [J]. Plant Physiology, 1999, 119(8): 305 - 311.
- [11] Alexander P, Markus H, Eberhard F. Effects of manganese on element distribution and structure in thalli of the epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Lecanora conizaeoides* [J]. Environmental and Experimental Botany, 2003, 50(2): 113 - 124.
- [12] Mazon A M, Magherby O M. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance [J]. Biologia Plantarum, 1997, 40(3): 411 - 417.
- [13] 国家环保局. 中华人民共和国土壤环境质量标准 (GB 15618 - 1995) [S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.
- [14] 施卫明. 根际养分的电子探针研究法 [M] / 刘芷宇, 李良谟, 施卫明. 根际研究法. 南京: 江苏科学技术出版社, 1997: 30 - 49.
- [15] 杨居荣, 贺建群, 蒋婉茹. Cd污染对植物生理生化的影响 [J]. 农业环境保护, 1995, 14(5): 193 - 197.
- [16] Smolders E, McLaughlin M J. Chloride increases cadmium uptake in Swiss chard in a resin - buffered nutrient solution [J]. Soil Sci Soc Amer, 1996, 60(5): 1443 - 1447.
- [17] Horiguchi T, Mortia S. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants VI Effect of silicon on alleviation of manganese toxicity of barley [J]. Plant Nutr, 1987, 10(12): 2299 - 2310.
- [18] 梁永超, 丁瑞兴. 硅对大麦根系中离子的微域分布的影响及其与大麦耐性的关系 [J]. 中国科学: C辑, 2002, 32(2): 113 - 121.