

红壤模拟铜污染下紫云英根表形态及其组织和细胞结构变化

倪才英^{1,3}, 陈英旭¹, 骆永明² (1. 浙江大学环境资源学院环境工程系, 杭州 310029, E-mail: nicaiying@zju.edu.cn or ncy68@163.net; 2. 中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008; 3. 江西师范大学城环学院地理系, 南昌 330027)

摘要: 采用根形态研究、显微镜观察和透射电子显微镜观察, 研究了红壤模拟铜污染下紫云英根表形态及其组织、细胞结构变化。结果表明: 当污染铜为 $0 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 紫云英生长发育正常, 根形态完好, 功能正常。当污染铜水平在 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时, 紫云英根开始出现受害症状: 表现在根粗短呈淡褐色, 根毛少且短, 主根弯曲, 并分出较短的叉根; 表皮层出现皱缩; 细胞壁略呈波浪形, 厚薄不均, 质膜界线不明显。紫云英地上部分生长发育受影响, 产量开始下降。铜污染水平达到 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 根腐烂、组织黑色化、细胞壁断裂, 胞质严重收缩解离, 紫云英死亡, 表明供试红壤临界铜污染浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 并且紫云英根对土壤铜污染的耐性随生育期延长而增强, 根细胞壁是根耐毒的主要部位。

关键词: 紫云英; 模拟污染; 根组织; 细胞结构; 土壤铜污染

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2003)03-06-0116

Change of Superficial Shape and Cell Microstructure of Milk-vetch (*Astragalus L.*) Root under Simulated Cu Pollution in a Red Soil

Ni Caiying^{1,3}, Chen Yingxu¹, Luo Yongming² (1. Department of Environment Engineering, School of Environment and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China E-mail: nicaiying@zju.edu.cn or ncy68@163.net; 2. Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3. Dept. of Geography, Jiangxi Normal University, Nanchang 330027, China)

Abstract: This study carried out experiments to investigate changes of shape, inter-structures and cell microstructures of milk-vetch root under simulated Cu stress at non- or contaminated levels in a red soil using observation and bio-microscopic technique. It resulted that when Cu concentration ranged from 0 to $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil, the milk-vetch grew well and it had a whole root which worked normally. When Cu concentration reached $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil, the growth of milk-vetch began to get influence with decline of biomass, the taproot crooked and was less branched, root became short and hazel and had fewer shorter hairs, tubby appeared, epidermis began to shrink and cell wall cockled slightly and unevenly, the boundary between plasma membrane and organelle blurred as well. When treatment concentration reaching to $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil, milk-vetch roots became rotted and black, the cell wall broke and cytoplasm shrank so severely that plasmolysis happened and the plant died. So the critical Cu concentration in experimented soil was $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil, and the resistance of milk-vetch root to Cu contamination buildup with the growth of aboveground part, and cell wall was the main part to Cu tolerance.

Key words: cell structure; milk-vetch; root tissue; simulated pollution; soil Cu pollution

在土壤重金属污染条件下,生长的植物不仅会发生体内重金属的大量累积,并影响植物的生长和发育,而且会通过食物链,危及人类的食物安全与健康^[1-3]。污染累积的重金属离子(如 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Hg^{2+}) 在细胞内不仅能与酶活性中心或蛋白质中的巯基结合,而且还

能取代金属蛋白中的必需元素(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+}),导致生物大分子构象改变、酶活性

基金项目: 国家863项目(2001 AA645010-2); 国家自然科学基金项目(39460021); 南京土壤研究所开放实验室项目

作者简介: 倪才英(1968~),女,江西余江人,江西师范大学副教授,博士生,主要研究方向为环境污染控制与模拟。

收稿日期: 2002-12-11; 修订日期: 2003-01-02

丧失或必需元素缺乏,干扰细胞的正常代谢过程^[4];另外,重金属能干扰物质在细胞中的运输过程,并能通过氧化还原反应产生自由基而导致细胞氧化损伤^[5,6].本试验试图通过研究紫云英根在重金属铜胁迫下的生长状况及根皮层组织和细胞结构的变化,来探讨紫云英对铜离子的耐性及其与污染铜离子剂量之间的关系.

1 材料与方法

1.1 试验材料

(1) Cu 用硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 分析纯)配成所需浓度,一次性拌入供试土壤.

(2) 供试作物和土壤 紫云英(余江大叶籽)和未受铜污染的红壤性水稻土.采自江西省东乡县某水稻田 0~20cm 表土.土壤有机质 $23.4\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 碱解 N $81.50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 有效 P $5.50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效 K $48.03\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, pH (H_2O) 5.40, CEC (pH 7) $8.40\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, 有效 Cu $2.88\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全 Cu $9.46\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

1.2 试验方法

(1) 水培试验 试验设 Cu 浓度分别为 0 (CK)、2、4、6、8、10、20、30、40、50、60、80、100、150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 14 个处理,3 次重复.每个处理的培养皿中放入紫云英种子 40 颗于滤纸上发芽,定期观察根系生长情况.

(2) 盆栽试验 设 12 个处理,每处理重复 5 次,各处理投加的铜量(以纯 Cu 计)分别为 0 (CK)、10、20、30、40、50、60、70、80、100、150、200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,投加的硫酸铜用水溶解成所需浓度,播种前 20d 一次性施入装有 8kg 土的盆钵中.盆底放置一塑料小桶承接渗漏水,漏水及时倒回盆中.在不同生育期采集紫云英根并观察根形态及结构的变化.

1.3 研究方法

(1) 根长观察 于水培的第 12 天和土培的苗期、伸长期、盛花期分别采样,每处理取 6 株长势一致的植株,用直尺量主根长,6 个重复的平均数作为该处理的根长值.

(2) 显微镜观察 在紫云英的伸长期采集 0 (CK)、30、50、60、100、200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 铜处理的紫云英根清洗干净,实验样品取自不同处理的同

一部位(根尖成熟区),取样后立即用 FAA 固定液固定,固定 24 h 后经排气、脱水、透明、渗蜡等步骤,经石蜡制片法制作成永久切片(厚度 8~12 μm),番红-固绿二重染色法染色.根用体视解剖镜观察摄影,根切片在 OLYMPUS-BH 显微镜下观察摄影^[7].

(3) 电镜观察 在盛花期采集 0 (CK)、50、60、100、200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理的根,超声波清洗干净,在紫云英根的同部位(同上)切 1~2 mm^2 小块,依次进行如下处理:①用 4%戊二醛抽真空于 4℃固定 30~60 min,换新鲜戊二醛固定 6~8 h;②用磷酸缓冲液(pH 7.2 PBS)洗涤 3 次,每次 20~30 min;③用 1% OsO_4 (锇酸)固定 1 h;④用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 20~30 min;⑤用不同浓度的乙醇(50%、60%、70%、80%、90%、95%)逐级脱水,每级脱水 15 min,100%乙醇再脱水 20 min 2 次;⑥用乙醇与环氧丙烷置换乙醇,再换纯环氧丙烷放置 1 h;⑦进行环氧树脂包埋渗透.经 70℃聚合 48 h 后用超薄切片机切成 80nm 的薄片,双重染色后供 JEOL TEM1200EX 电镜观察拍片.

2 结果与分析

2.1 铜对紫云英根系表观形态的影响

VOIGT, Astrid 等人^[8]认为可以用根的生长情况(elongation)来评价溶液中重金属离子的生物有效性. Donghua Liu 等^[9]用根长和根重来衡量铅的毒性.宋玉芳等^[10]也曾利用根伸长抑制率来表示重金属铜、锌、铅、镉的生态毒性及生物可利用性.本试验不同铜浓度处理中生长初期紫云英根的生长状况和表观形态变化结果见表 1.由表 1 可见,低浓度铜($2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对紫云英主胚根伸长有促进作用,但随铜浓度升高主胚根长比对照均有不同程度的缩短,且当铜浓度为 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时主胚根长度是对照的 8.8%,只有 0.21cm.宋玉芳等人认为用根长抑制率能较好地反映溶液和土壤中重金属的毒性水平,两者之间有较好的线性关系^[10].在本试验中,溶液中铜浓度与根长抑制率之间的关系并不是直线,而呈现在 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后的平台效应.但土壤中铜浓度与根长抑制率之间有较好

的线性关系(图1).若以 IR_{50} (根长抑制率为50%时的铜浓度)表示紫云英根对土壤中铜污染的耐受能力,则图1结果显示,不同生育期紫云英根的耐性大小为:盛花期>伸长期>苗期,即紫云英发育愈成熟,其根耐铜性愈强.

除根长外,侧根数、主根的生长方式和根的颜色也是常用来表示重金属植物毒性的生物指标.水培试验中所有用铜处理的紫云英侧根数均比对照少,总趋势是培养液中铜浓度越大则侧根越少,当铜浓度为 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时侧根数是对照的2.2%,大于或等于 $80\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时紫云英基本上没有侧根(表1).但主胚根上有多处小突

起,这说明铜虽然抑制了侧根的生长,但并未完全抑制根原基的发生.重金属对侧根数的发生抑制大于主根的伸长,这与 Donghua Liu^[9]的结果相似.由表1还可以看出主根的生长方式从低浓度铜处理的直立生长状态,到大于等于 $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的弯曲或歪斜,说明铜不但影响根分生区细胞的分裂导致根的伸长受阻,而且还可能影响细胞质和细胞壁的正常生理功能,尤其是渗透压的改变,影响了细胞对水分的吸收,使细胞内膨压降低,细胞支撑力下降.铜对根颜色的影响表明,随铜浓度升高,由乳白、棕红到褐红,再逐渐转为褐色,这种颜色的变化原因有

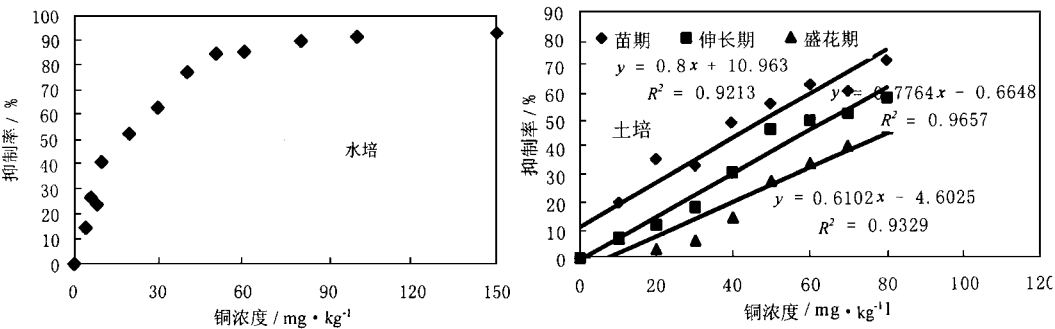


图1 不同铜水平下根长的抑制率

Fig.1 Inhibition of Cu on length of milk-vetch root

表1 不同铜浓度对紫云英根形态的影响(水培试验)

Table 1 Influence of Cu concentration on root growth in hydroponic culture

铜浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	CK	2	4	6	8	10	20	30	40	50	60	80	100	150
主根长/cm	2.38	2.40	2.04	1.75	1.82	1.41	1.14	0.89	0.55	0.37	0.35	0.25	0.21	0.17
侧根数/根·株 ⁻¹	5	3.34	3.78	4.30	4.56	4.78	3.22	3.67	1.78	2.00	0.11	0.00	0.00	0.00
生长方式	直	直	直	稍弯	弯	弯	弯	斜	斜	弯	歪斜	弯	歪斜	歪斜
颜色	白	白	白	棕红	棕红	棕红	褐红	褐红	褐	褐	褐	褐	褐	深褐

待进一步研究.

根尖是根最活跃也最敏感的部位,铜污染毒害下紫云英根受害症状首先出现在根尖.图2是盆栽试验的解剖镜观察照片.结果显示,随着铜浓度增加,紫云英根的生长有明显变化. CK和 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 铜处理根毛多且长,根呈乳白色,根尖生长良好; $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 铜处理时,根毛开始变少且短,根系呈淡褐色,主根弯曲,并分出较短的叉根; $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 铜处理时根毛极少,根系呈褐色,从主根分出较多短粗的叉根,整个根呈现珊瑚状; $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 铜处理时无根毛,根系呈褐色,主根凸凹不平,从主根分出数枝叉

根,整个根呈树枝状; $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 铜处理时无根毛,根系呈深褐色,主根分出叉根,根冠腐烂,此时紫云英成活率极低.说明当土壤中Cu浓度大于 $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,根毛停止生长.

水培下侧根数均比对照减少, $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上处理无侧根;而土培试验 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理开始有叉根发生,并随着铜水平提高,叉根愈来愈多.这进一步说明铜虽然抑制侧根的生长,但不影响侧根根原基的发生,而且还有促进作用.图2显示根原基形成叉根之后,不久便因为与主根一样的原因不能伸长形成侧根,所以肉眼可见的侧根越来越少.

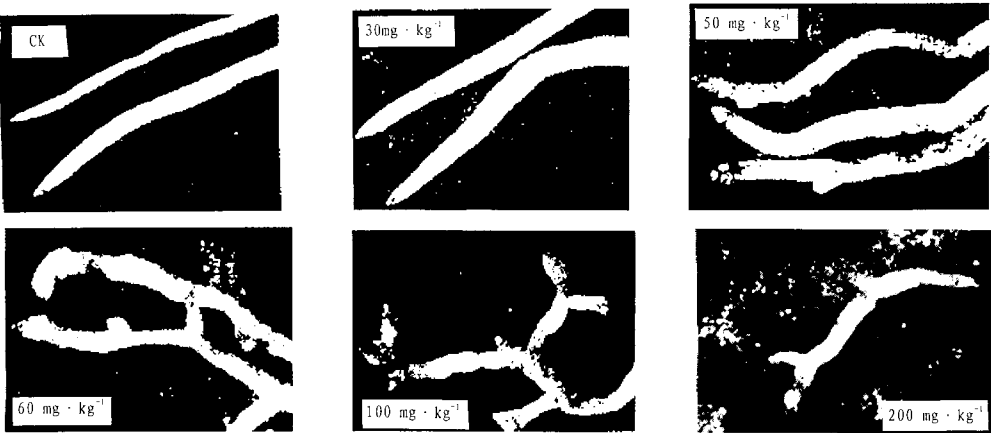


图 2 不同浓度土壤 Cu 污染下根尖的形态变化 (× 50)

Fig.2 Root apex changes under soil Cu pollution at different concentrations(× 50)

2.2 铜对紫云英根皮层组织结构的影响

根的表皮层主要起吸收作用和保护作用^[11],少量的铜作为植物的营养成分,可维持植物的正常生理活动;过量的铜却对植物皮层组织和细胞的代谢活动有破坏作用.显微镜观察结果显示:当铜浓度低于 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 铜处理时,根组织结构与对照相似,外皮层完好、光洁,皮层、中柱鞘、输导组织清晰可见(图 3).铜浓度为 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时表皮层开始出现皱缩现象,输导组织依然可见,中柱鞘周围颜色变深.铜浓度为 $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时表皮层凸凹不平变黑,表皮细胞部分解体死亡,根横切面积明显缩小; $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,表皮层断裂变黑,表皮细胞大部分解体,薄壁细胞、筛管细胞部分死亡,皮层部分变黑; $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,表皮细胞、薄壁细胞、维

管细胞、筛管细胞等均大量解体死亡,除能见到模糊的导管外,表皮层、皮层、中柱几乎全部破碎、变黑,根横切面已不成形.不过,观察到的这些黑粒是因为铜污染引起,还是植株个体差异,尚有待进一步研究.

从相应部位的纵切面图(图 4)可见:对照紫云英根尖成熟区细胞大小均匀,细胞质浓厚,呈较规则的矩形或长方形.排列整齐、紧密,细胞核分布于每个细胞的一侧,在光镜下较均匀地分布.而高铜时细胞膨大、崩解,失去了规则的形状,细胞核极少,根外表皮颜色加深,根内亦有数团深色区域,根直径几乎只有对照的 $1/3$.因此,铜对根组织结构的破坏是由外皮层开始至内皮层,再至中柱和输导组织.这种由外及里的顺序与 Hendrik küpper(1999)结果相同.

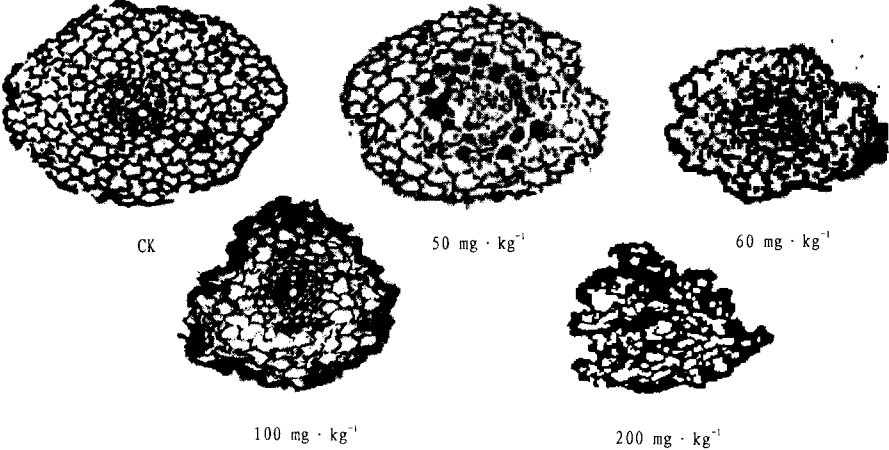


图 3 不同浓度铜污染下根尖横切面 (× 100, 土培)

Fig.3 Crosscut picture of root apex under Cu pollution of different concentrations(× 100)

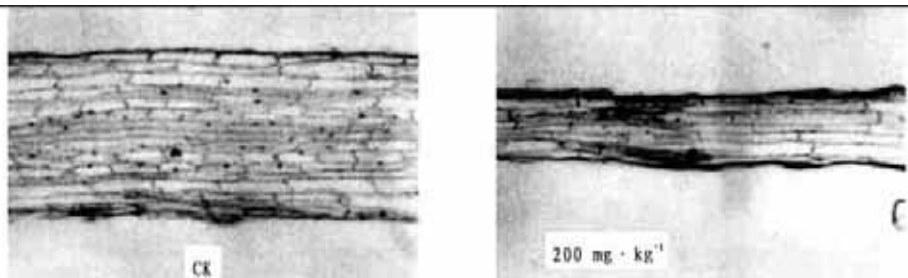


图 4 根尖纵切面图 (× 100)

Fig. 4 Straight-cut picture of root apex (× 100)

2.3 铜对根细胞结构变化的影响

根外观形态及组织结构的变化与细胞结构和生理功能的改变密不可分.由电镜观察结果可见,对照细胞壁平整,厚薄均匀,质膜、细胞器清晰可见,细胞核完整,处于一侧(图 5a),紫云英生长发育正常. $50\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 铜处理时细胞壁略呈波浪形,厚薄不均,质膜与细胞壁之间颜色加深,有黑色颗粒物沉积,细胞器与细胞质之间区分不十分明显(图 5b).此时,紫云英生长受到抑制,产量开始下降. $60\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 铜处理时细胞壁厚薄变化明显,细胞壁、质膜上黑色沉积物增多,并出现质壁分离现象(图 5c),此时紫云英产量明显降低. $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 铜处理时质壁分离明显,细胞质收缩呈凸凹不平的黑色团状(图 5d),紫云英成活率低. $200\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 铜处理时细胞壁断裂,胞质严重收缩崩解,壁内几成空腔

(图 5e),此时紫云英成活率极低,濒临绝产.当细胞壁形态和结构变化,直接影响到细胞的分化、组织形成和植物体的生长发育^[12].质膜是细胞内外物质流、信息流、能量流进出的通道和屏障,质膜上含有多种酶,是生化反应的场所.当质膜遭受到破坏后,植物对养分的吸收、体内氧化磷酸化和光合磷酸化等一系列生化反应均受严重干扰.细胞质包容悬浮于其中的全部细胞器,包括细胞核和许多体积较小的叶绿体、线粒体等.如果土壤中铜含量过高,紫云英吸收过量的铜,会使紫云英外观上表现为植株矮小、无分枝、叶片枯黄、根系粗短呈褐色、根毛少^[13].通过本试验研究可知,以上变化的实质是紫云英根细胞受损,细胞壁变黑增厚,细胞质收缩,以至发生质壁分离,细胞壁断离,细胞解体死亡,最终导致根组织中表皮、皮层以及

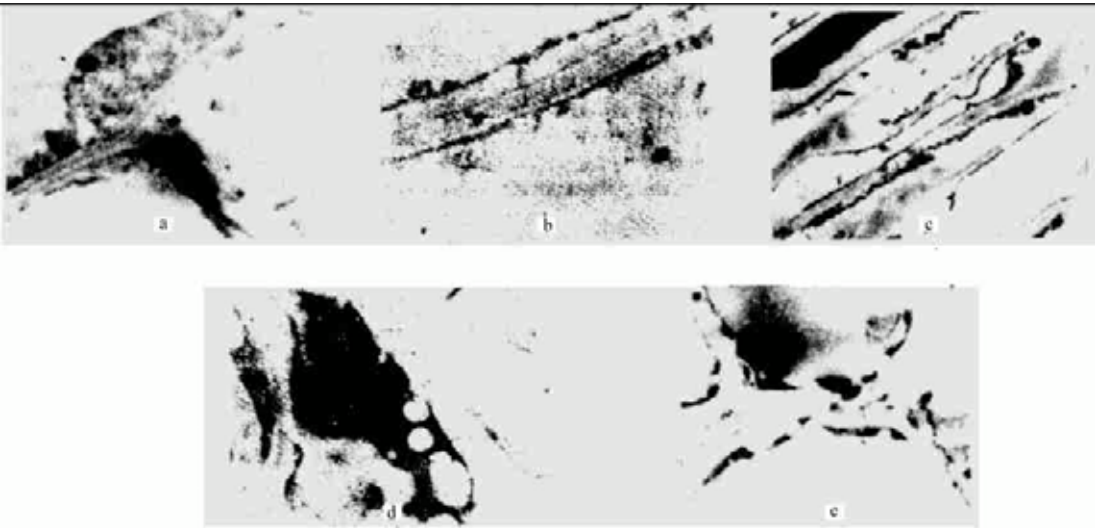


图 5 铜污染土壤中紫云英根细胞结构的破坏

Fig. 5 Damage of cell structure of milk-vetch root grown in Cu polluted soil

中柱坏死,根系无法为植株输送养分和水分,从而影响植株的正常生长发育。

在细胞的各组成部分中,细胞壁和液泡是重要的铜积累部位。现普遍认为络合于细胞壁上或积累于液泡的这部分铜对植物是没有毒性的。细胞壁是铜进入细胞内的第一道屏障,细胞壁的金属沉淀作用可以阻止过量的铜进入原生质体,例如,蹄盖蕨(*Athyrium yokoscense*)吸收的铜中约有 70%~90%位于细胞壁。随植物根部吸收铜总量的增加,细胞壁上铜的浓度也随之增加,而细胞质中铜的浓度却变化很小,铜大部分以离子形式存在或络合到细胞壁结构质如木质素、纤维素上。铜离子被局限于细胞壁,避免进入细胞质影响细胞内的代谢活动,使植物对铜表现出耐性^[14,15]。因此,在植物对 Cu 的耐性中,细胞壁起着重要作用。本试验的结果与此相似,当大量铜进入紫云英根细胞时,细胞壁将其吸附或结合以阻止铜进入细胞质影响细胞的正常生理功能;只有细胞壁上铜达到饱和时,铜才会透过细胞壁达到细胞质膜(图 5b),使质膜强度下降,透性增加,导致铜可渗入细胞而产生毒害作用,进而影响细胞器的结构与功能^[16,17];铜大量进入细胞质后,细胞质的正常形态和功能遭到破坏,质壁分离开始发生(图 5c);当介质铜浓度继续提高到细胞壁受损断裂时,细胞质早已解离成小团粒状,细胞解体死亡(图 5d、图 5e)。在电镜观察时,未发现紫云英根对铜的耐性中有液泡化现象,因此细胞壁是主要的耐铜部位。

3 结论

(1) 铜污染对紫云英根生长的抑制因介质污染程度提高而增强,但水培下出现平台效应。在污染下,主根伸长、侧根的生长受阻,根褐色化,组织坏死。

(2) 紫云英根系对土壤铜污染的耐性随生育期而提高,盛花期可达苗期的 1 倍。

(3) 当土壤铜污染浓度大于 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,根根组织结构由表皮层出现皱缩、凸凹不平变黑、断裂,发展到皮层部分变黑、表皮层破碎、皮层和中柱细胞逐渐死亡,紫云英生长发育受到明

显抑制;细胞开始变形缩小,细胞壁变厚不均,细胞质出现黑色颗粒;污染加剧时,则出现质壁分离、细胞壁断裂、胞质严重收缩乃至解体消失,壁内呈空腔的现象。

(4) 紫云英的临界土壤(红壤)铜浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;并且根细胞壁是细胞抗铜毒的主要部位。

致谢 对黄昌勇教授和刘永厚、赵振纪、姚益云、李琳、王海飞、张美凤等的合作谨表谢意。

参考文献:

- 1 陈怀满,郑荣春,涂从等. 中国土壤重金属污染现状与防治对策. 人类环境杂志,1999,28(2):130~134.
- 2 常学秀,文传浩,王煥校. 重金属污染与人体健康. 云南环境科学,2000,19(1):59~61.
- 3 吴燕玉,王新,梁仁禄. 重金属复合污染对土壤-植物系统的生态效应 II 对作物、紫花苜蓿、树木元素吸收的影响. 应用生态学报,1997,8(4):545~552.
- 4 Sugiyama M. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. Cell Biol. Toxicol., 1994,51:173~212.
- 5 Van Assche F, Clijsters H. Effects of metal on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ., 1990,13:195~206.
- 6 Luna C M, Gonzalez C A, Trippi V S. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. Plant Cell Physiol., 1994,35:11~15.
- 7 徐是雄. 植物材料的薄片切片超薄切片技术. 北京:北京大学出版社,1981.1~29.
- 8 VOIGT Astrid, HENDERSHOT William H, RENOUX Agnes Use of the Root Elongation Bioassay to Determine Bioavailable Amounts of Trace Metals in Solutions. Proc. 6th international conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Guelph'01, 2001. 458.
- 9 Donghua Liu, Wusheng Jiang, Changjun Liu et al. Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]. Bioresource Technology, 2000,71:273~277.
- 10 宋玉芳,许华夏,任丽萍等. 土壤重金属对白菜种子发芽与根伸长抑制的生态毒性效应. 环境科学,23(1):103~107.
- 11 刘捷平. 植物形态解剖学. 北京:北京师范大学出版社,1991.142~143.
- 12 周佩珍. 植物生理. 合肥:安徽科学技术出版社,1987.25~27.
- 13 赵振纪,姚益云,黄细花等. 铜对土壤-植物系统的影响及其临界值指标的研究. 环境与开发,1993,8:4~9.
- 14 Nishizono H et al. The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*. Plant and Soil, 1987,101:15~20.
- 15 Branquinho C, Brown D H, Catarino F. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence. Environ. Exper. Botany, 1997,38:165~179.
- 16 Strange J, Macbaur M R. Evidence for a role for the cell membrane in copper tolerance. New phytol., 1991,119:383~388.
- 17 Clijsters H, Van Assche F. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. Photosyn. Res., 1985,7:31~40.