

# 多氯联苯暴露对绦柳初生根及显微结构的影响

李 叶<sup>1,2</sup>, 张 爽<sup>1,2</sup>, 李玉灵<sup>1,2</sup>, 杜克久<sup>1,2</sup>

(1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省林木种子资源与森林保护重点实验室, 河北 保定 071000)

**摘 要:**以绦柳为试材, 采用加入不同浓度的多氯联苯单独使用(MS)和协同使用(MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA)暴露培养绦柳组培苗, 观察其外部形态、不定根形成及显微组织结构受到的影响。结果表明: 较高浓度多氯联苯试剂(Aroclor 1242)可使绦柳叶片白化, 单独暴露较协同暴露白化现象严重; 协同暴露时绦柳的初根时间及生根数均未受显著影响, 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 浓度下地下生物量较阳性对照有显著增高, 20.0 mg·L<sup>-1</sup> 时大幅降低; 单独暴露 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 浓度时不定根达 100% 时间较阴性对照提前 1.2 d, 20.0 mg·L<sup>-1</sup> 时地下生物量降低, 为阴性对照的 5.4%, 单独暴露对其它发根指标无影响; 培养基中添加激素可大大减弱 Aroclor 1242 的毒害作用, 同浓度下的发根量协同较单独分别高出 158.6%、228.3%、263.9%、161.8%, 单独和协同不定根生物量比值分别为 1:2.9、1:10.4、1:12.1; 协同暴露中, 根部细胞的内含物随着 Aroclor 1242 浓度的增加而逐渐减少; 茎横切图中, 与阳性对照相比, Aroclor 1242 处理后的绦柳组培苗茎的次生结构形成受到抑制, 单独暴露时根和叶部结构无明显变化, 茎部变化与协同时一致。2 组中根的组织均有不同程度损坏。

**关键词:**多氯联苯; 绦柳; 生长发育; 显微结构

**中图分类号:**S 792.12 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)24-0055-06

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)是一类具有 2 个相联苯环结构的含氯化合物, 因氯原子取代的数量和位置的不同, 理论上共有 209 种同系物<sup>[1]</sup>。多氯联苯具有热化学性质稳定、阻燃性和绝缘性良好等特性, 被广泛应用于工业生产的多个领域<sup>[2]</sup>。然而, 多氯联苯存在着致畸、致癌、致突变效应, 极小剂量下就会对生态环境产生危害<sup>[3-4]</sup>, 是被列入斯德哥尔摩公约首批控制名单的持久性有机污染物之一<sup>[5]</sup>。虽然已经被国

际上明令禁止使用, 但仍有部分含 PCBs 工业用品在使用, 相当数量的 PCBs 进入环境中, 尤其是沉积物和土壤中的 PCBs, 仍是长期污染的主要来源, 对人类和自然环境依然存在着较大的潜在伤害<sup>[6-9]</sup>。PCBs 污染对自然环境和人类健康都是较大的隐患, 治理和修复 PCBs 污染任重道远<sup>[10]</sup>。

植物修复(Phytoremediation)是指利用植物去除、转化和固持土壤、底泥、地下水、地表水以及大气中的有毒化合物的一种新兴技术<sup>[11-13]</sup>。植物修复具有操作简单、投资少、风险低等特点, 且植物具有利用光合作用获取能量、生长量大等特点, 植物修复 PCBs 是当前生物修复研究领域的一个热点, 具有极大潜力和广阔的前景。

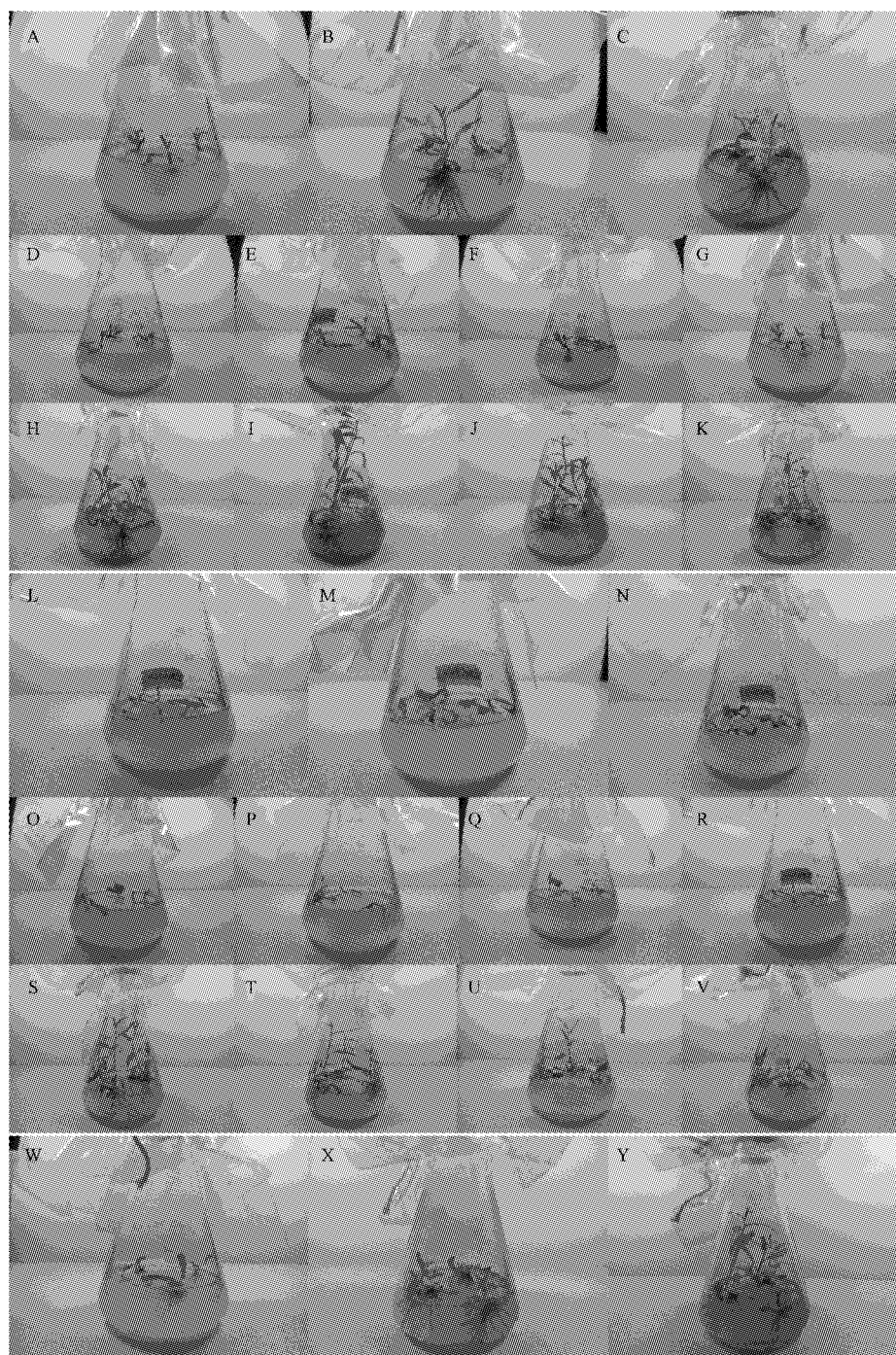
绦柳(*Salix matsudana* f. *pendula* Schneid.)分布范围广、生长迅速、抗性强。将绦柳作为靶试植物对环境中的主要 PCBs 进行降解修复机制方面研究, 观测其对植物生长发育的影响, 可以进一步了解 PCBs 的环境行为以及为环境中其它 POPs 的植物修复机制提供理论依据, 探索其实际应用价值。

**第一作者简介:**李叶(1990-), 女, 河北邢台人, 硕士研究生, 研究方向为持久性有机污染物的植物修复。E-mail: hgyncnsul80@126.com.

**责任作者:**杜克久(1965-), 男, 河北抚宁人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事植物生物技术等研究工作。E-mail: dukejiu@126.com.

**基金项目:**国家高技术研究发展计划课题“863 计划”资助项目(2012AA101403); 国家自然科学基金资助项目(30972384); 中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金课题资助项目(KF2009-03)。

**收稿日期:**2016-09-27



注: A~C. 分别为 21、46、83 d 时  $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  协同暴露组的叶色变化; D~G. 分别为 21 d 时阳性对照和  $0.2, 2.0, 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理浓度下的缘柳组育苗; H~K. 分别为 83 d 时阳性对照和  $0.2, 2.0, 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理浓度下的缘柳组育苗; L~N. 分别为 17、47、83 d 时  $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  阴性对照苗的叶色变化; O~R. 分别为 17 d 时阴性对照和  $0.2, 2.0, 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理浓度下的缘柳组育苗; S~V. 分别为 83 d 时阴性对照和  $0.2, 2.0, 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理浓度下的缘柳组育苗; W~Y. 分别为 30、68、82 d 时  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理浓度下的缘柳组育苗。

Note: A~C. Leaves color change of separately at the concentration of  $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  at 21, 46, 83 days; D~G. The *Salix matsudana* seedlings under collaboratively treatments of  $0, 0.2, 2.0, 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  at 21 days; H~K. The *Salix matsudana* seedlings under collaboratively treatments of  $0, 0.2, 2.0, 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  at 83 days; L~N. Leaves color change of separately at the concentration of  $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  at 17, 47, 83 days; O~R. The *Salix matsudana* seedlings under separately treatments of  $0, 0.2, 2.0, 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  at 17 days; S~V. The *Salix matsudana* seedlings under separately treatments of  $0, 0.2, 2.0, 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  at 83 days; W~Y. Leaves color change of collaboratively at the concentration of  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  at 30, 68, 82 days.

图 1 不同处理下缘柳组育苗叶片颜色的变化

Fig. 1 Change in the leaf color of *Salix matsudana* seedlings under different treatments

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用苗来自河北农业大学植物修复研究室的绦柳组培苗。

多氯联苯试剂 Aroclor 1242 为一系列多氯联苯异构体和同族体的混合物,其中‘12’表示氯代联苯,‘42’表示含氯量为 42%<sup>[14]</sup>。

### 1.2 试验方法

试验前先将研究室的绦柳组培苗在空白 MS 培养基中继代 1 次,消耗其体内积累的外源激素,提高试验的一致性和无干扰性。试验设置 2 个处理,协同暴露组(MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.2、2.0、20.0 mg·L<sup>-1</sup> Aroclor 1242)、单独暴露组(MS+0.2、2.0、20.0 mg·L<sup>-1</sup> Aroclor 1242)。为便于分析,设定 Aroclor 1242 浓度为 0 时的 2 个处理 MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA 及 MS 分别为阳性对照和阴性对照,pH 7.0,每处理重复 5 次。控制试验条件的一致性,包括同样大小的三角瓶和塑料膜、同样长短的捆绑绳、对诱导后的组培苗进行同样培养条件,温度为(25±2)℃,光照强度为 250 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>,光源波长大于 450 nm,光暗周期为 16 h/8 h。尽量选择长势相似的组培苗,去掉顶芽,选用下方长约 2 cm 的茎段作为诱导材料,保持试验用材的长度、粗细、叶片、芽的数量相等或相近。

### 1.3 项目测定

每日观察绦柳的不定根发生和植物生长状况,拍照并记录,30 d 后统计绦柳不定根的生根数量和生根率。初根时间为绦柳处理中茎段形成不定根萌蘖的初始时间;不定根分化率达 100% 的时间为绦柳处理中所有茎段均形成不定根的时间。培养 82 d 时取材,随机选 3 个重复,以瓶为单位用天平称量统计其地下生物量(鲜质量)。余下 2 个重复取试验苗苗根、茎段及叶片,放入 70% 的酒精中固定 24 h 后,用常规方法进行石蜡包埋,用切片机切成厚度 10 μm 薄片,固绿染色,加拿大树胶封片。在 ZEN lite 2012 显微镜下观察并照相。

### 1.4 数据分析

试验数据的统计分析采用 SPSS 17.0 和 Excel 软件,方差分析是在显著性  $P < 0.05$  水平下进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 Aroclor 1242 暴露下绦柳组培苗的形态变化

由图 1 可看出,2 组绦柳组培苗在 20.0 mg·L<sup>-1</sup> 处理条件下均出现叶片白化的现象(图 1-B、M),且单独暴

露组试验苗出现白化现象的时间早于加激素组 5 d,白化现象也更加严重(图 1-A、L)。

协同暴露组绦柳组培苗地上生物量的增长幅度明显大于单独暴露组(图 1-D~K, Q~V),且单独暴露组与阴性对照相比,其地上生长量依次递减,协同暴露组则变化不大,0.2 mg·L<sup>-1</sup> 低浓度下的生长量高于阳性对照和 20.0 mg·L<sup>-1</sup> 浓度,这与其地下生物量的变化趋势一致(图 1)。0.2 mg·L<sup>-1</sup> 协同处理下绦柳的叶色深浅有变化,差异不明显(图 1-W~Y)。

### 2.2 Aroclor 1242 暴露对绦柳不定根分化的影响

2.2.1 对生根时间的影响 由图 2 可知,在 MS 培养基中添加不同浓度 Aroclor 1242 协同暴露和单独暴露对绦柳带芽茎段的初根时间均无明显影响;但 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 条件下单独暴露时较激素协同暴露的初根时间显著提前约 1.2 d,表明激素协同暴露下中浓度 Aroclor 1242 可促进绦柳组培苗不定根的萌发。

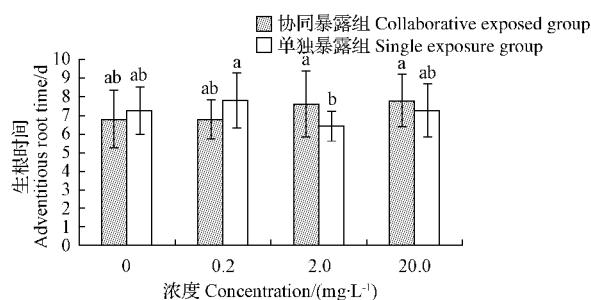


图 2 不同处理对绦柳不定根分化的影响

Fig. 2 Effect of different treatments on adventitious roots of *Salix matsudana*

2.2.2 对不定根生根率达 100% 时间的影响 由图 3 可知,一定浓度的 Aroclor 1242 单独暴露可缩短绦柳组培苗不定根生根率达 100% 时间。Aroclor 1242 协同暴露时对绦柳不定根生根率达 100% 时间虽无明显影响,但单独暴露组中浓度 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 时绦柳生根率达

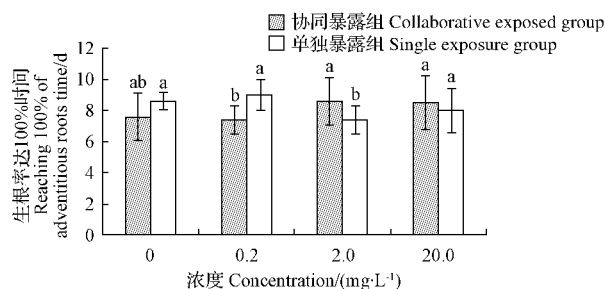


图 3 不同处理对绦柳不定根生根率达 100% 时间的影响

Fig. 3 Effect of different treatments on period reaching 100% of adventitious roots differentiation rate of *Salix matsudana*

100%时间较阴性对照却明显提前 1.2 d。低浓度时单独暴露比协同显著提前 1.6 d,而中浓度时协同暴露比单独暴露显著提前 1.2 d。

2.2.3 对不定根数量影响 由图 4 可知,不同浓度的 Aroclor 1242 单独暴露或协同激素暴露下绦柳无明显差别;对照与各处理下,协同暴露不定根数量比单独暴露分别高出 158.6%、228.3%、263.9% 和 161.8%,且均存在显著差异。说明在激素的作用下,协同暴露可显著增强单独暴露时组培苗对 Aroclor 1242 的耐受性。

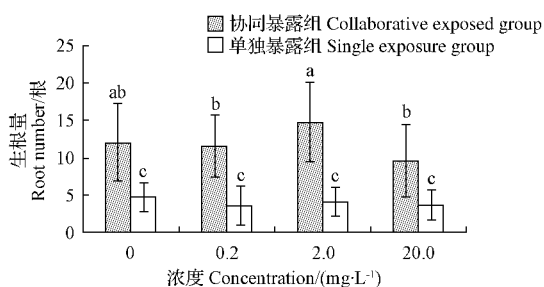


图 4 不同处理对绦柳不定根生根量的影响

Fig. 4 Effect of different treatments on roots number of *Salix matsudana*

2.3 Aroclor 1242 暴露对绦柳地下不定根生物量的影响

由图 5 可知,Aroclor 1242 暴露对绦柳地下不定根生物量有较大影响。MS 培养基中添加不同浓度 Aroclor 1242 协同激素暴露时,在设定剂量的不同处理条件下,协同暴露剂量为 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 绦柳不定根的生物量显著高于阳性对照,表现出较强的促进作用,高出阳性对照 46.1%;2.0 mg · L<sup>-1</sup> 时与对照无差别;20.0 mg · L<sup>-1</sup> 时则显著降低,仅为阳性对照的 25.2%,表明该浓度下绦柳组培苗受害严重,地下生物量明显减少。单独暴露时绦柳不定根的生物量随着暴露剂量的增加而递减,但组内差异不明显,20.0 mg · L<sup>-1</sup> 时有较强的毒害作用,仅占阴性对照的 5.4%;中低浓度 Aroclor 1242 协同暴露和单独暴露时,阳性对照也显著高于阴性对照,0.2、2.0、

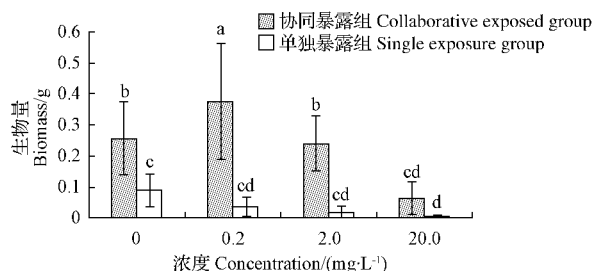


图 5 不同处理对绦柳不定根生物量的影响

Fig. 5 Effect of different treatments on biomass of adventitious roots of *Salix matsudana*

20.0 mg · L<sup>-1</sup> 协同暴露组与单独暴露组生物量比值分别为 1 : 2.9、1 : 10.4 和 1 : 12.1。

2.4 Aroclor 1242 暴露下绦柳组培苗的显微结构变化

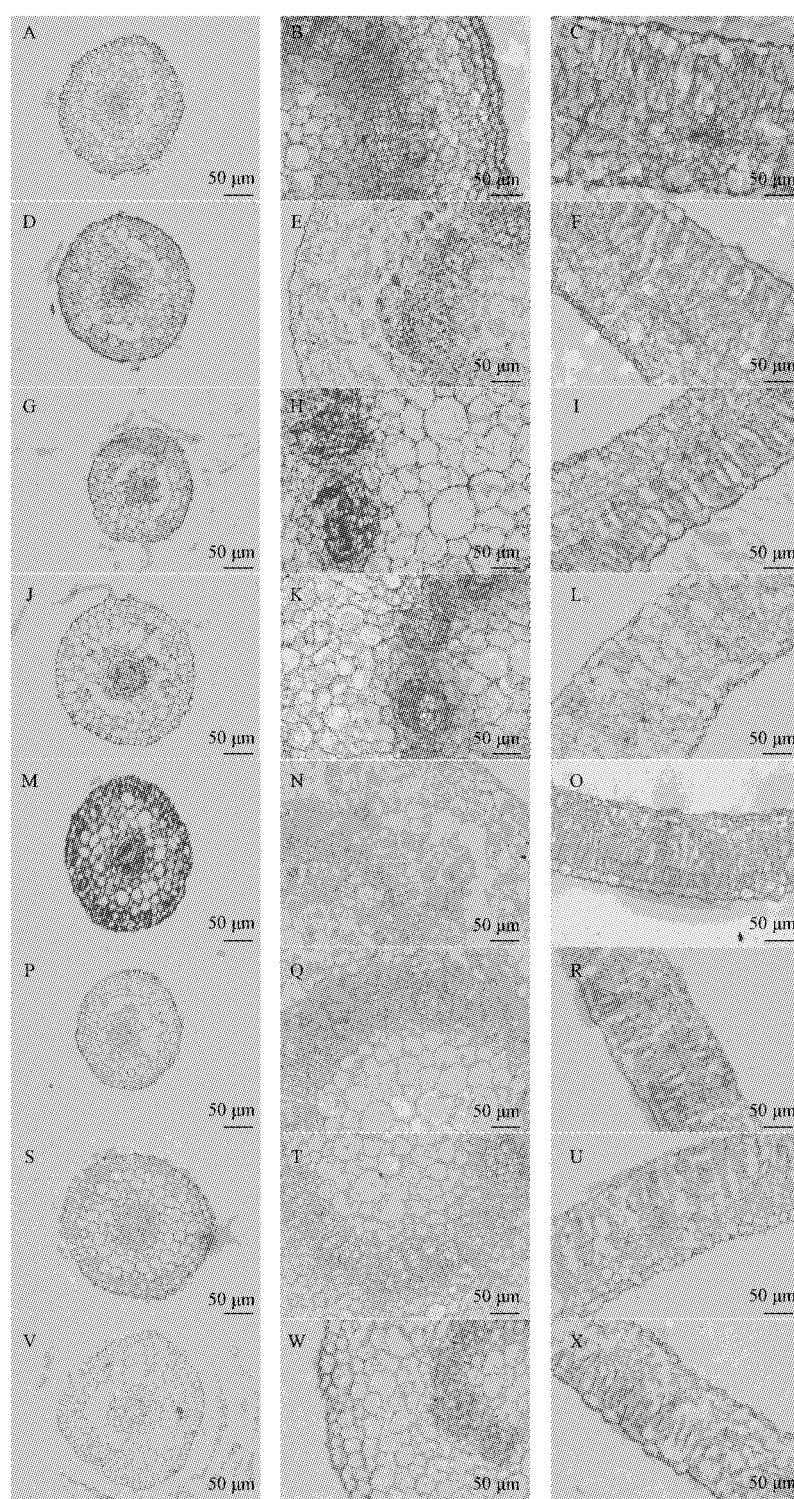
由图 6 可知,协同暴露组中,组培苗根部细胞的内含物随着 Aroclor 1242 浓度的增加而逐渐减少(图 6-A、D、G、J);茎横切图中,与阳性对照相比,Aroclor 1242 处理后的绦柳组培苗茎的次生结构受到抑制,表现为对照中初生韧皮部排列呈环状(图 6-B),Aroclor 1242 处理后的其韧皮部呈松散的束状(图 6-B、E、H、K);叶部结构中变化不明显(图 6-C、F、I、L)。单独暴露组中,组培苗根部细胞无规律性变化(图 6-M、P、S、V);由绦柳组培苗茎横切图可看出,其变化方式与协同暴露组一致,Aroclor 1242 处理抑制其次生结构的发生(图 6-N、Q、T、W);叶部结构的变化也不明显(图 6-O、R、U、X)。

### 3 结论与讨论

绦柳组培苗受多氯联苯毒害的直观表现为叶片白化失绿现象,培养 20 d 左右,20.0 mg · L<sup>-1</sup> 处理下的组培苗开始出现白化现象,协同暴露组出现白化现象的时间晚于单独暴露组 4~5 d,单独暴露组叶片白化后无复绿现象,而协同暴露组 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 处理下 1 个月之后有复绿现象,说明绦柳对 PCBs 有一定的修复作用。

低浓度的有机污染对植物生长有显著影响,较高浓度则产生毒害<sup>[15-17]</sup>。该研究中,Aroclor 1242 暴露对绦柳的不定根形成的影响表现为:2.0 mg · L<sup>-1</sup> 浓度下,单独比协同暴露初根时间和不定根达 100% 时间显著提前,0.2 mg · L<sup>-1</sup> 浓度下,协同暴露较单独暴露不定根达 100% 时间显著提前。推测原因可能为:对绦柳组培苗初生根系的形成遵循浓度效应原理,即特定浓度范围内促进不定根的形成,超过临界浓度后才对植物有明显的毒害作用,0.2 mg · L<sup>-1</sup> 协同暴露时不定根生物量显著高于阳性对照,说明 Aroclor 1242 可促进根系的生长发育,因此,Aroclor 1242 对绦柳组培苗的生长发育有促进作用,加上协同暴露与阳性对照、单独暴露和阴性对照之间,不定根的发生和数量都无显著差异,也反向证明绦柳组培苗对 Aroclor 1242 具有一定的耐受能力。较高浓度的暴露则会不同程度抑制不定根的形成发育。

不同种类 PCBs 在植物体内不同部位的积累趋势相同,均是根>叶>茎<sup>[18]</sup>。该试验中,而从绦柳组培苗各部位组织的显微结构来看,茎部受到的影响大于根部与叶部,茎部次生结构的形成受到抑制,根部和叶部则不明显。积累趋势与受影响程度并不相同,可能存在取材部位不同等问题,其原因有待进一步研究。



注:A~C. 阳性对照苗的根横切、茎横切和叶横切;D~L. 协同暴露组不同 Aroclor 1242 浓度处理苗的根横切、茎横切和叶横切;M~O. 阴性对照组的根横切、茎横切和叶横切;P~X. 单独暴露组不同 Aroclor 1242 浓度处理苗的根横切、茎横切和叶横切。比例尺均为 50  $\mu\text{m}$ 。

Note: A~C. Positive control seedlings' crosscutting of root, stem, leaf; D~L. Seedlings' crosscutting of root, stem, leaf at different concentrations, collaboratively; M~O. Negative control seedlings' crosscutting of root, stem, leaf; P~X. Seedlings' crosscutting of root, stem, leaf at different concentrations, separately. All of scale was 50  $\mu\text{m}$ .

图 6 不同 Aroclor 1242 浓度处理下绿柳组培苗形态及显微结构的差异

Fig. 6 Difference in the morphology structure and microstructure in tissue-cultured seedling of *Salix matsudana* under different concentrations of Aroclor 1242

## 参考文献

- [1] SAFE S H. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment[J]. Critical Reviews in Toxicology, 1994, 24(2): 87-149.
- [2] BROWN J F, BEDARD D L, BRENNAN M J, et al. Polychlorinated biphenyl dechlorination in aquatic sediments[J]. Science, 1987, 236(4802): 709-712.
- [3] SAFE S. Polychlorinated biphenyls (PCBs): Mutagenicity and carcinogenicity[J]. Mutat Res, 1989, 220(1): 31-47.
- [4] XU Y, YU R, ZHANG X, et al. Effects of PCBs and MeSO<sub>2</sub>-PCBs on adrenocortical steroidogenesis in H295R human adrenocortical carcinoma cells[J]. Chemosphere, 2006, 63(5): 772-784.
- [5] UNEP. The stockholm convention on persistent organic pollutants (POPs)[Z]. Sweden: Stockholm, 2001.
- [6] MEEKER J D, HAUSER R. Exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and male reproduction[J]. Syst Biol Reprod Med, 2010, 56(2): 122-131.
- [7] DRINKER C K, WARREN M F, BENNETT G A. The problem of possible systemic effects from certain chlorinated hydrocarbons[J]. J Ind Hyg Toxicol, 1937, 19(7): 283-311.
- [8] STAREK A. Polychlorinated biphenyls—toxicology and health risk[J]. Rocz Panstw Zakl Hig, 2001, 52(3): 187-201.
- [9] CARPENTER D O. Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health[J]. Rev Environ Health, 2006, 21(1): 1-23.
- [10] 帅建军, 熊飞, 彭日荷, 等. 多氯联苯的生物修复[J]. 遗传, 2011(3): 219-227.
- [11] CAO B, NAGARAJAN K, LOH K C. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 85(2): 207-228.
- [12] SUSARLA S, MEDINA V F, MCCUTCHEON S C. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination[J]. Ecol Eng, 2002, 18(5): 647-658.
- [13] 唐红卫, 吴师剑, 钱瑾. 关于多氯联苯测定的探讨[J]. 上海环境科学, 2010, 29(3): 132-136.
- [14] van AKEN B, CORREA P A, SCHNOOR J L. Phytoremediation of polychlorinated biphenyls, new trends and promises[J]. Environ Sci Technol, 2010, 44(8): 2767-2776.
- [15] BAKER. The effects of oils on plant physiology[M]//The ecological effects of oil pollution on littoral communities. Essex, England Applied Science Publishers, 1973.
- [16] CHEKOL T, VOUGH L R, CHANEY R L. Phytoremediation of polychlorinated biphenyl contaminated soils: The rhizosphere effect[J]. Environment International, 2004, 30: 799-804.
- [17] 王冬. 多氯联苯(PCBs)的环境生态毒性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [18] 刘亚云, 孙红斌, 陈桂珠, 等. 红树植物秋茄对 PCBs 污染沉积物的修复[J]. 生态学报, 2009, 29(11): 6002-6009.

## Effects of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) on the Initial Roots and Microstructure of *Salix matsudana* f. *pendula* Schneid

LI Ye<sup>1,2</sup>, ZHANG Shuang<sup>1,2</sup>, LI Yuling<sup>1,2</sup>, DU Kejiu<sup>1,2</sup>

(1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001; 2. Key Laboratory of Tree Species Germplasm Resource and Forest Protection of Hebei Province, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** *Salix matsudana* was used as test material, plantlets of *Salix matsudana* was cultured separately (MS) or collaboratively (MS+0.1 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA) in medium of containing various concentrations of PCBs, to study the effects of PCBs on external morphology, adventitious root formation and microstructures. The results showed that high levels of PCBs could make the plant albino, exposure separately was more serious than collaboratively, the color of leaves returned green when cultured collaboratively; exposure collaboratively had no significant influence on the time of initial roots and number of *Salix matsudana* at the concentration of 0.2 mg · L<sup>-1</sup> below-ground biomass increased obviously compared with positive control, while 20.0 mg · L<sup>-1</sup> showed a marked reduction; exposure separately period reaching 100% of adventitious roots differentiation rate of *Salix matsudana* at the concentration of 2.0 mg · L<sup>-1</sup> was 1.2 days earlier than negative control, 20.0 mg · L<sup>-1</sup> was the lowest, which accounts for 5.4% of negative control, exposure separately had no effect on other indicator of roots. Adding hormone to medium could be greatly reduced the toxicity of PCBs, for exposure collaboratively the root number were 158.6%, 161.8%, 263.9% and 161.8% more exposure separately at the same concentration, the ratio of adventitious roots biomass were 1:2.9, 1:10.4, 1:12.1. Exposure collaboratively, the cell inclusion of root decreases with PCBs concentration increasing, compared with the positive control, the transects of stem showed secondary structure was restrained when treated with PCBs, the roots and the leaves structure showed no significant change when the stem had same change with exposure collaboratively; the root cells of tow groups were damaged in different degree.

**Keywords:** polychlorinated biphenyls; *Salix matsudana*; growing development; microstructure