

DOI: 10.5846/stxb201401260191

王丽华, 王发园, 景新新, 李帅, 刘雪琴. 纳米氧化锌和接种丛枝菌根真菌对大豆生长及营养吸收的影响. 生态学报, 2015, 35(15): 5254-5261.
Wang L H, Wang F Y, Jing X X, Li S, Liu X Q. Effect of ZnO nanoparticles and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus on growth and nutrient uptake of soybean. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(15): 5254-5261.

纳米氧化锌和接种丛枝菌根真菌对大豆生长及营养吸收的影响

王丽华¹, 王发园^{1,*}, 景新新¹, 李 帅¹, 刘雪琴^{2,3}

1 河南科技大学农学院, 洛阳 471003

2 洛阳师范学院生命科学系, 洛阳 471022

3 西南大学资源环境学院, 重庆 400716

摘要: 纳米氧化锌是应用最广的人工纳米颗粒(nanoparticles, NPs)之一, 具有一定生物毒性。丛枝菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌能与陆地上 80% 以上的高等植物形成丛枝菌根共生体, 并能改善宿主植物矿质营养, 提高其抗逆性。然而纳米 ZnO 与丛枝菌根的关系尚不清楚。通过温室沙培盆栽试验, 研究了施加不同水平纳米 ZnO (0、500、1000、2000、3000 mg/kg) 和接种 AM 真菌 *Acaulospora mellea* 对大豆生长及营养状况的影响。结果表明, 3000 mg/kg 的纳米 ZnO 显著抑制大豆植株生长, 表现出植物毒性, 在其他水平时没有显著影响。纳米 ZnO 在施加水平 500、1000 mg/kg 时没有抑制 AM 真菌对大豆根系的侵染, 但是高施加水平(>2000 mg/kg)时对 AM 真菌产生毒害, 几乎完全抑制大豆根系菌根侵染。接种 AM 真菌仅在 500 mg/kg 纳米 ZnO 时显著促进大豆生长, 增加大豆植株对 P、K、N 的吸收, 降低根系 Zn 含量。纳米 ZnO 可能会持续释放锌离子, 并抑制大豆根系对矿质营养元素的吸收, 从而产生生物毒性, 而 AM 真菌与大豆根系的共生可起到有益作用。

关键词: 人工纳米颗粒; 纳米 ZnO; 丛枝菌根真菌; 大豆; 营养状况

Effect of ZnO nanoparticles and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus on growth and nutrient uptake of soybean

WANG Lihua¹, WANG Fayuan^{1,*}, JING Xinxin¹, LI Shuai¹, LIU Xueqin^{2,3}

1 Agricultural College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China

2 Life Science Department, Luoyang Normal University, Luoyang 471022, China

3 College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: ZnO nanoparticles (NPs) are widely used in cosmetics, personal care products, paints, electronic devices, catalysts, anti-microbial agents, etc. These compounds enter aquatic and terrestrial environments and the atmosphere through direct application, accidental release, contaminated soil/sediments, or atmospheric fallouts. Increasing attention has been directed toward their environmental fate and behavior, and especially their biological effects on crops and microorganisms in agricultural ecosystems. Recent studies have shown that, when in excess, ZnO NPs can cause phytotoxicity and declines in soil quality, reduce plant biomass and yields, result in excess Zn accumulation in plants, especially in edible parts of food crops, and subsequently enter human bodies through the food chain, posing a health risk. Therefore, techniques to reduce the potential toxicity and risk caused by ZnO NPs need to be explored. Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi represent a group of soil microorganisms widely associated with plant roots, forming a mutualistic

基金项目: 国家自然科学基金项目(41171369); 河南省高校科技创新人才支持计划(2012HASTIT014); 河南省高校青年骨干教师资助计划(2012GGJS-079)

收稿日期: 2014-01-26; **网络出版日期:** 2014-07-11

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wfy1975@163.com

symbiosis with more than 80% of higher plants in terrestrial ecosystems. They play important roles in improving mineral nutrition and resistance of host plants to environmental stress, contribute to nutrient cycling of C, N, P, and other elements, and maintain soil health and plant community stability and productivity. AM fungi have positive effects on the tolerance of host plants to heavy metal stress through direct and indirect mechanisms. Therefore, arbuscular mycorrhizae could putatively contribute to reducing phytotoxicity induced by metal or metal oxide NPs. However, the interactions between NPs and arbuscular mycorrhizae remain unclear. A sand culture pot experiment was conducted to study the effects of inoculation with or without the AM fungus *Acaulospora mellea* on growth and nutritional status of soybean plants under different ZnO NPs addition levels (0, 500, 1000, 2000, and 3000 mg/kg). Shoots and roots were harvested separately after 12 weeks of growth in a greenhouse. Mycorrhizal colonization, plant dry weights, P, K, N, and Zn concentrations and uptake were determined. Results showed that ZnO NPs at 3000 mg/kg addition level significantly inhibited the growth of soybean plants, displaying a substantial phytotoxicity but had no significant effect at other addition levels. AM colonization in soybean roots was not inhibited by ZnO NPs at the 500 and 1000 mg/kg addition levels, but it was almost completely inhibited at the 2000 mg/kg addition levels and higher, indicating a marked toxicity of ZnO NPs to AM fungi. Addition of ZnO NPs led to significant Zn accumulation in plant tissues, especially in roots. Compared to non-inoculation control, AM fungal inoculation significantly promoted soybean growth only at the 500 mg/kg addition level. Inoculation also increased P, K, and N uptake, and reduced root Zn concentration at low ZnO NPs addition levels. ZnO NPs could continually release zinc ions with toxic effects and inhibit the uptake of mineral nutrients by soybean roots, which may be one of the main toxicity mechanisms of ZnO NPs. Our results reveal that AM symbiosis can attenuate ZnO NPs-induced toxicity in plants and symbiotic fungi, which will aid in understanding of the interactions of engineered nanomaterials with plants and soil microorganisms in terrestrial ecosystems.

Key Words: engineered nanoparticle; ZnO nanoparticle; arbuscular mycorrhizal fungi; soybean; nutritional status

人工纳米颗粒(Nanoparticles, NPs)因为其小尺寸效应、大比表面积等特殊性质被广泛应用,但 NPs 会通过种种途径进入生态环境中,对生态系统产生潜在危害,因此其生物效应受到广泛关注^[1-3]。纳米氧化锌(ZnO)是应用最广泛的 NPs 之一,被广泛使用于个人护理产品、化妆品、涂料、抗微生物制剂、电子设备及催化剂等产品中^[4-5]。纳米 ZnO 能随产品的使用、运输、储存、泄露及废物处理等途径进入水体和土壤等环境^[4]。近期有研究发现,纳米 ZnO 会产生植物毒性^[6-7]、降低小麦生物量^[8],造成 Zn 在黄瓜植株体内的过量积累^[9],也可对大豆产生基因毒性^[10],甚至不能产生大豆籽粒^[11],并引起 Zn 在大豆叶片、籽粒等器官中的积累^[12]。因此,其生物效应和毒性受到广泛重视^[13-15]。

丛枝菌根(Arbuscular mycorrhizal, AM)真菌能够与陆地上 80%以上的高等植物形成共生体系,是与植物关系最密切的土壤微生物之一^[16]。AM 真菌除大量存在于农田等土壤中外,还存在于各逆境环境中,能够提高宿主植物的抗逆性,改善宿主植物的矿质营养(尤其是磷)^[16-17]。纳米 ZnO 作为潜在的污染物,其与丛枝菌根的相互关系及其对植物生长和营养状况的影响值得深入研究,然而目前尚不清楚。基于此,本试验以常见作物大豆为供试植物,在温室盆栽条件下研究施加不同水平纳米 ZnO 和接种 AM 真菌对大豆生长和营养状况的影响,为了解纳米 ZnO 和丛枝菌根的相互关系提供一些支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物为大豆(品种为国审郑 196),选用大小形状一致的种子,播种前用温水置于 25°C 恒温培养箱中浸泡 8h。供试 AM 真菌为 *Acaulospora mellea* ZZ,菌剂基质为河沙,使用前去除宿主植物地上部分,将根剪碎,与含有真菌孢子的基质混匀,风干后作为接种所用菌剂。供试材料为纳米 ZnO(粒径(90±10) nm,纯度

99.9%)。供试基质为普通河沙,使用前过 20 目筛,用高温高压蒸汽灭菌法(121°C,1.05kPa)连续灭菌 3h 后风干备用。

1.2 试验设计

试验设置不接菌处理(-M)和接菌处理(+M),每个处理分别施加不同水平纳米 ZnO(0、500、1000、2000、3000 mg/kg),共 10 个处理,每个处理重复 3 次。选用 230 号塑料花盆(上口直径 18cm,高 12cm),每盆装 2kg 河沙,基质分装采用逐级混匀的方法施加纳米 ZnO。接菌处理每盆按照混施法接种风干菌剂 200 克,不接菌处理加入等量灭菌菌剂,并浇 100 mL 过 500 目筛的菌剂滤液,以保证不接菌处理与接菌处理在其它微生物区系尽量一致。

2013 年 3 月 28 日播种,每盆均匀播种 6 颗大豆,深度约 2cm,播种后每盆浇 500mL 水,出苗一周后开始浇 1/3 强度的 Hoagland 营养液(其中磷含量为正常含量的 50%),之后每 7d 浇 1 次,每次 100 mL/盆,生长期间按照正常栽培管理措施管理,12 周后收获。

1.3 测定指标及方法

大豆植株收获后将植株地上部分和根部分开,先后用自来水、去离子水清洗干净,用吸水纸擦干,再用不锈钢剪刀剪碎后装入信封置烘箱中,105 °C 杀青 30min 后 70 °C 烘干至恒重,用万分之一电子天平称取干重。选取新鲜毛细根段,用 KOH 溶液脱色、酸性品红染色,然后用方格交差法测定菌根侵染率。剩余植物样经烘干、研钵磨细、过 0.5 mm 筛后用 H₂SO₄-H₂O₂法消煮,用凯氏定氮仪测定 N,钼锑抗比色法测 P,原子吸收分光光度计测定 Zn、K 含量。同时用标准物质以校准测定的准确性。根据植株干重及其元素含量计算植株对此元素的吸收量。

1.4 数据分析

利用 Excel 2010 和 SPSS 16.0 等统计软件对数据进行单因素方差分析,Duncan 多重比较各处理之间的差异显著性($P<0.05$),双因素方差分析纳米 ZnO 施加水平和接种 AM 真菌之间的交互作用。

2 结果与讨论

2.1 菌根侵染率

对照处理大豆根系未被 AM 真菌侵染。接菌处理条件下,未施加纳米 ZnO 时,大豆根系侵染良好,施加 500、1000 mg/kg 的纳米 ZnO 没有抑制菌根侵染,甚至略有刺激作用(图 1)。但在 2000、3000 mg/kg 时,没有发现菌根侵染或仅有零星侵染(低于 1%)。这证明纳米 ZnO 在施加量 500—1000 mg/kg 时没有影响菌根侵染能力,高施加量则几乎完全抑制菌根侵染。

已经证实纳米 ZnO 具有抗真菌活性^[18]。纳米 Ag/Ti 能降低向日葵的菌根侵染率^[19]。本研究则发现,高浓度的纳米 ZnO 对 AM 真菌也有一定毒性。但 NPs 剂量与菌根毒性之间的关系可能较为复杂,例如土壤中施加 0.032—3.2 mg/kg 的纳米 FeO、0.01—1 mg/kg 的纳米 Ag 没有降低甚至增加了 *Glomus caledonium* 对三叶草的菌根侵染率^[20]。Zn 污染较重时一般会对菌根侵染产生抑制作用,但只要宿主植物能够生长,一般不会完全消除菌根侵染,土壤中施加 Zn 的浓度 50—400 mg/kg 时没有降低白三叶的菌根侵染率,甚至还随着 Zn 浓度的增加略有升高^[21]。500—1000 mg/kg 的纳米

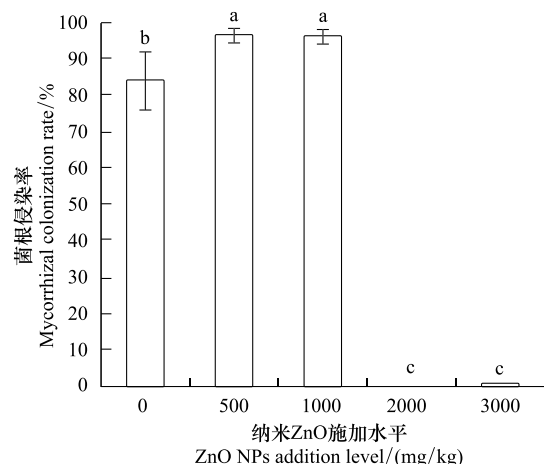


图 1 不同纳米 ZnO 施加水平下大豆菌根侵染率(平均值±标准偏差)

Fig.1 Mycorrhizal colonization rate (mean ± SD) of soybean plants under different ZnO NPs addition levels

a, b 不同字母间表示各处理在 $P<0.05$ 水平差异显著

ZnO 甚至刺激 AM 真菌对大豆根系的侵染,而高剂量的纳米 ZnO 菌根毒性显著,但从图 1 看出,纳米 ZnO 剂量与菌根侵染率之间的关系并非简单的线性关系,可能存在一个临界值,能够对菌根侵染产生抑制甚至致死作用。纳米 ZnO 的菌根毒性可能与其自身的性质(如粒径)和剂量、植物和 AM 真菌种类等密切相关,尚需深入探讨。

2.2 大豆生物量

表 1 显示,与不施加纳米 ZnO 相比,500—2000 mg/kg 没有影响植株地上部或根系干重(500 mg/kg 接菌处理除外),3000 mg/kg 的纳米 ZnO 显著降低植株干重。有研究证实纳米 ZnO 具有植物毒性,1000 mg/L 的纳米 ZnO 使黑麦草根尖缩窄,表皮和皮层细胞空泡化甚至崩解,从而降低生物量^[7]。纳米 ZnO 的植物毒性与粒径有关,甚至强于同等浓度的 Zn²⁺^[22]。随着纳米 ZnO 浓度(25—100 μg/mL)的升高,洋葱有丝分裂指数降低、染色体畸变指数增加、微核细胞率增加,并伴有膜脂过氧化现象和细胞内化作用^[23]。但土壤中添加 500 mg/kg 的纳米 ZnO 甚至略促进大豆植株的生长^[12],说明在土壤环境中纳米 ZnO 对大豆的植物毒性较弱。本结果证实,2000 mg/kg 以下纳米 ZnO 对大豆生长几乎没有抑制作用,3000 mg/kg 时则具有显著植物毒性,但根冠比无显著变化。

表 1 不同处理对大豆干重和根冠比(平均值±标准偏差)的影响

Table 1 Dry weight and root/shoot ratio (mean±SD) of soybean plants under different treatments

纳米 ZnO 施加水平/(mg/kg) ZnO NPs addition level	接菌处理 Inoculation treatment	干重 Dry weight/(g/株)		总干重/(g/株) Total dry weight	根冠比 Root/shoot ratio
		地上部分 Shoot	根系 Root		
0	-M	1.03±0.23b	0.24±0.07bc	1.27±0.29bc	0.23±0.02bc
	+M	1.21±0.09b	0.30±0.01b	1.51±0.10b	0.24±0.01bc
500	-M	1.05±0.08b	0.29±0.01b	1.34±0.07bc	0.28±0.03a
	+M	1.62±0.08a	0.43±0.03a	2.05±0.11a	0.27±0.00ab
1000	-M	1.05±0.15b	0.25±0.04b	1.31±0.19bc	0.24±0.02bc
	+M	1.11±0.13b	0.28±0.03b	1.40±0.16bc	0.25±0.00abc
2000	-M	1.03±0.15b	0.19±0.03cde	1.22±0.18c	0.18±0.00d
	+M	1.07±0.19b	0.23±0.03bcd	1.30±0.21bc	0.22±0.03c
3000	-M	0.74±0.06c	0.18±0.03de	0.92±0.09d	0.24±0.02bc
	+M	0.64±0.07c	0.16±0.02e	0.79±0.09d	0.24±0.02bc
接种 AM 真菌 AM inoculation		9.418 **	16.354 **	11.205 **	2.419 ^{ns}
纳米 ZnO 施加水平 ZnO NPs addition level		17.853 ***	29.466 ***	20.458 ***	11.239 ***
纳米 ZnO 施加水平×接菌 ZnO NPs addition level × AM inoculation		5.472 **	4.430 *	5.489 **	1.562 ^{ns}

-M 和 +M 分别表示不接种和接种 *A. mellea* 处理; 同列数据后不同字母表示各处理在 $P<0.05$ 水平差异显著; 双因素方差分析结果为 F 值, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: 差异不显著

接种 AM 真菌仅在 500 mg/kg 时显著促进植物生长,在其他水平没有显著作用。胁迫条件下 AM 真菌对宿主植物的保护作用已经被诸多研究证实^[17,24],但是在沙培或水培条件下,速效营养物质比较充分,其保护效应一般并不显著,此时其促生作用往往通过缓解逆境胁迫来实现。尽管 AM 真菌在 1000 mg/kg 侵染良好,其促生作用并没有体现出来。双因素方差分析显示,纳米 ZnO 施加水平和接菌处理对植株干重有显著交互作用。菌根化三叶草的生长受到高剂量纳米 FeO(3.2 mg/kg)的抑制,但高剂量纳米 Ag(1 mg/kg)反而促进其生长^[20],这说明不同 NPs 的毒性与剂量及菌根之间的关系较为复杂,尚需要进一步探讨。

2.3 大豆氮、磷、钾含量

在探讨 AM 真菌对营养和有害元素的作用时,吸收量比含量更能说明接菌的作用,因为其克服了接菌而引起生物量不一致而造成的影响^[25]。由表 2 可以看出,随着纳米 ZnO 施加水平的增加,植株地上部分和根系 N、P、K 吸收量在 500 mg/kg 时最高,在 3000 mg/kg 时最低。这说明低浓度的纳米 ZnO 促进植株对 N、P、K 吸

收,但高施加量时,显著抑制对营养元素的吸收。

纳米 ZnO 颗粒具有粒径小、比表面积大、吸附能力强等 NPs 的通性,附着在根系表面后聚集在一起,抑制细胞对营养元素吸收,从而影响植物生长^[7,14]。本结果证实高施加量的纳米 ZnO 抑制了植物营养吸收。纳米 ZnO 颗粒在黑麦草根部分存在吸附并被吸收至内皮层和中柱^[7],可能会影响植物对营养物质的运输。此外,NPs 毒性与剂量之间的关系颇为复杂,因为 NPs 毒性与表面积密切相关,而在大剂量的情况下,NPs 可能会凝聚成大的颗粒,反而导致其生物有效性和毒性降低,因此 NPs 毒性与剂量之间的关系并不总是线性相关^[26],但本研究证实纳米 ZnO 对大豆生长的影响较为复杂,并非线性负相关。

表 2 不同处理对大豆 N、P、K 吸收量(平均值±标准偏差)的影响

Table 2 N, P and K uptake (mean±SD) by soybean plants under different treatments

纳米 ZnO 施加水平/(mg/kg) ZnO NPs addition level	接种处理 Inoculation treatment	N 吸收量/(mg/株) N uptake		P 吸收量/(mg/株) P uptake		K 吸收量/(mg/株) K uptake	
		地上部分 Shoot	根系 Root	地上部分 Shoot	根系 Root	地上部分 Shoot	根系 Root
0	-M	27.23±1.56bc	5.50±0.93bc	1.92±0.06cd	0.15±0.02d	10.99±2.52cd	1.38±0.07c
	+M	30.94±1.57ab	6.59±0.96ab	2.65±0.56b	0.46±0.01b	15.32±0.96b	1.08±0.06de
500	-M	29.24±2.13bc	6.57±0.68ab	1.96±0.17cd	0.23±0.01c	11.90±0.88cd	2.29±0.13a
	+M	35.15±0.86a	7.67±0.92a	3.80±0.09a	0.63±0.00a	21.04±0.38a	1.21±0.03cd
1000	-M	25.14±3.40cd	6.06±0.40bc	1.82±0.17def	0.23±0.01c	10.82±2.05d	2.12±0.13ab
	+M	30.14±5.36abc	6.33±0.67b	2.48±0.38bc	0.51±0.06b	12.74±0.31cd	1.02±0.10de
2000	-M	20.46±2.90de	5.96±0.43bc	1.44±0.51def	0.18±0.04cd	11.33±1.69cd	1.97±0.22b
	+M	20.92±2.96de	5.01±0.82cd	1.87±0.37de	0.20±0.03cd	13.53±0.92bc	1.13±0.26cd
3000	-M	15.06±0.50f	4.16±0.46de	1.24±0.27f	0.16±0.02d	7.57±0.40e	1.02±0.18de
	+M	16.93±1.28ef	3.50±0.27e	1.29±0.00ef	0.18±0.01cd	8.26±1.11e	0.82±0.12e
接种 AM 真菌 AM inoculation		12.414 **	0.439ns	41.291 ***	395.113 ***	56.877 ***	175.545 ***
纳米 ZnO 施加水平 ZnO NPs addition level		37.786 ***	18.327 ***	22.998 ***	91.419 ***	32.019 ***	30.449 ***
纳米 ZnO 施加水平×接种 ZnO NPs addition level × AM inoculation		1.074 ^{ns}	2.861 ^{ns}	6.821 **	55.249 ***	9.463 ***	13.030 ***

不施加纳米 ZnO 时,接种 AM 真菌显著增加了地上部分和根系 P 吸收量及地上部分 K 吸收量,对 N 吸收量没有显著作用(表 2)。在施加纳米 ZnO 时,接种 AM 真菌在 500 和 1000 mg/kg 时显著增加 P 吸收量,但在 2000、3000 mg/kg 时没有显著作用。接种 AM 真菌仅在 500 mg/kg 时增加地上部分 N、K 吸收量,其他多数情况下降低根系 K 吸收量。双因素方差分析显示,纳米 ZnO 施加水平、接种 AM 真菌及其交互作用对 P、K 作用较显著,但对 N 的影响较弱。

在重金属等环境胁迫条件下或贫瘠土壤中,对宿主植物的营养改善作用(尤其是磷)是 AM 真菌促进植物生长和提高耐性的重要机制之一^[16,24]。某些条件下 AM 真菌对宿主植物的其他必需营养元素也具有一定的改善作用^[27]。本研究首次证实,在 500 mg/kg 纳米 ZnO 条件下,接种显著促进了大豆生长,并能够改善 P、K、N 等矿质营养,而在 1000 mg/kg 纳米 ZnO 时,接种虽然没有促生作用,但对 P 的吸收仍有积极作用。Smith 等^[28]认为,即使接种 AM 真菌不能促进植物生长,但 AM 真菌磷吸收途径仍对植物磷总量有重要贡献。在 2000、3000 mg/kg 时,纳米 ZnO 对 AM 真菌毒性显著,这显然是 AM 真菌未能发挥显著作用的主要原因。

2.4 大豆锌含量与吸收量

由图 2、图 3 可知,随着纳米 ZnO 施加水平的升高,所有处理植株地上部分和根系 Zn 含量、Zn 吸收量均呈现显著上升趋势,但从 2000 mg/kg 到 3000 mg/kg 时,地上部分和根系 Zn 含量不再增加,Zn 吸收量甚至反而降低。有研究发现,水培条件下黑麦草根系 Zn 含量随纳米 ZnO 浓度升高而增加,但是地上部分 Zn 含量很低(仅 0.25—1.36 mg/kg),认为纳米 ZnO 很难被运输到地上部分^[7]。土壤中添加 500 mg/kg 的纳米 ZnO 时大

豆茎、叶片中的 Zn 含量分别达 126.23、344.07 mg/kg^[12],本结果中大豆地上部分 Zn 含量与之接近,而且在一定范围内与纳米 ZnO 施加水平显著正相关,一种原因可能是纳米 ZnO 易于被大豆植株吸收并转运到地上部分,另一种可能是纳米 ZnO 易于释放出 Zn²⁺,被大豆吸收并转运,也可能二者兼而有之。鉴于纳米 ZnO 颗粒不易在植物体内迁移,地上部分的 Zn 很可能是以 Zn²⁺ 的形态被吸收,然后被转运到地上部分。但无论哪种形态,Zn 在大豆植株内尤其是地上部分的积累很可能会进入食物链产生一定健康风险。需要利用同位素等试验进一步明确植物体内 Zn 的形态和来源。

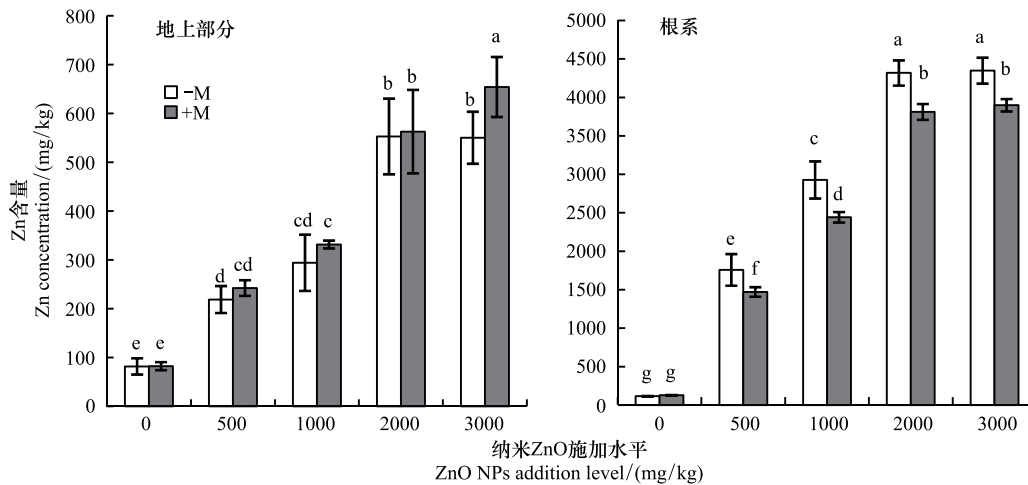


图2 不同处理对大豆地上部分和根系 Zn 含量(平均值±标准偏差)的影响

Fig.2 Zn concentration (mean±SD) in shoots and roots of soybean plants under different treatments

-M 和 +M 分别表示不接种和接种 *A. mellea* 处理;双因素方差分析结果(F 值):地上部分 Zn 含量,纳米 ZnO $F=4.899^*$,接菌 $F=89.671^{***}$,纳米 ZnO×接菌 $F=2.010^{ns}$;根系 Zn 含量,纳米 ZnO $F=42.708^{***}$,接菌 $F=978.383^{***}$,纳米 ZnO×接菌 $F=5.711^{**}$

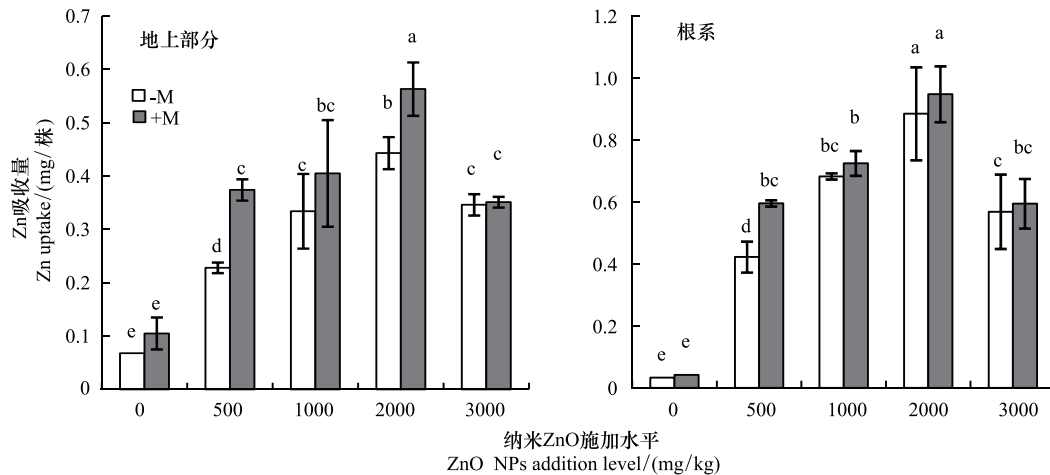


图3 不同处理对大豆地上部分和根系 Zn 吸收量(平均值±标准偏差)的影响

Fig.3 Zn uptake (mean±SD) by shoots and roots of soybean plants under different treatments

双因素方差分析结果(F 值):地上部分 Zn 吸收量,纳米 ZnO $F=20.104^{***}$,接菌 $F=64.188^{**}$,纳米 ZnO×接菌 $F=2.341^{ns}$;根系 Zn 吸收量,纳米 ZnO $F=6.350^*$,接菌 $F=118.386^{***}$,纳米 ZnO×接菌 $F=0.961^{ns}$

与对照处理相比,纳米 ZnO 0 水平时,接菌对植株 Zn 含量和吸收量均没有显著影响,其他施加水平时,接菌降低了根系 Zn 含量,并在 500 mg/kg 时增加了地上部分和根系 Zn 吸收量。Zn 是植物必需营养元素,但过多时又能产生毒害作用。一般认为植物体内 Zn 含量高于 400 mg/kg 时,就会出现中毒症状。诸多研究表明,在 Zn 毒害条件下,能够降低植物中 Zn 含量以减轻其毒害作用,而且往往增加 Zn 在根系中的分配比例^[24,29]。

本研究结果发现,接种 AM 真菌降低了根系 Zn 含量,但 Zn 吸收量反而增加(500 mg/kg),地上部分 Zn 分配比例也没有显著降低。Jamal 等^[30]发现接种 AM 真菌提高了污染土壤中大豆对 Zn 的吸收,与本试验结果部分一致。值得关注的是,在 2000、3000 mg/kg 纳米 ZnO 时,接种 AM 真菌没有侵染根系,但对植株 Zn 含量也有一定影响,这可能是施加的 AM 真菌菌剂自身对纳米 ZnO 的化学行为发挥了一定作用,也可能 AM 真菌前期能与根系共生,但随着时间推移,菌根共生体中的 AM 真菌被高剂量纳米 ZnO 致死。因此未来需要研究纳米 ZnO 存在时菌根侵染的动态变化。双因素方差分析显示,纳米 ZnO 施加水平和接菌仅对根系 Zn 含量有显著交互作用,显然纳米 ZnO 与 AM 真菌的关系较为复杂,尚需深入研究。

释放 Zn^{2+} 是纳米 ZnO 的生物毒性机制之一^[31]。有研究发现,1000 mg/L 的纳米 ZnO 溶解释放的 Zn^{2+} 不超过 8 mg/L^[7]。纳米 ZnO 浓度在 400mg/L 时,释放的 Zn^{2+} 浓度为 14.6 mg/L,在 4000 mg/L 时 Zn^{2+} 浓度为 96.9 mg/L^[22]。纳米 ZnO 的植物毒性甚至强于同等浓度的 Zn^{2+} ^[22],因此推测纳米 ZnO 的毒性机制可能有多种。沙培条件下基质中的矿质元素多为自由移动状态,跟水溶液类似。我们把沙培试验中一系列相同含量的纳米 ZnO 施加于水后,发现其水相中的 Zn 含量在 6 mg/L 左右,这证明本试验中的纳米 ZnO 在水相中具有一定的溶解性,但溶解度较低,而且在 500—3000 mg/L 浓度范围内并没有显著增加。显然这个 Zn 含量不可能对植物或 AM 真菌产生太强的毒害,也不大可能产生急性毒性,纳米 ZnO 的菌根毒性可能是一个缓慢过程。但纳米 ZnO 很可能作为 Zn^{2+} “源”而存在,一旦基质中的 Zn^{2+} 减少(如被植物吸收或者菌根固定),纳米 ZnO 与 Zn^{2+} 间的平衡被打破,继而向环境中释放 Zn^{2+} 。由于纳米 ZnO 易于附着在根系表面,结合大豆植株营养状况,推测纳米 ZnO 抑制根系营养吸收是其对大豆植株和菌根产生毒性的另一个机制。综合当前的研究,NPs 对丛枝菌根的宏观、微观影响研究均很少,两方面的作用机制认识都不很透彻,均需要加强研究。

3 结论

(1) 纳米 ZnO 在 500—1000 mg/kg 施加水平时没有影响 AM 真菌对大豆的侵染能力,但是高施加水平(>2000 mg/kg)时对 AM 真菌具有一定毒性,几乎完全抑制大豆根系的菌根侵染。

(2) 纳米 ZnO 在 3000 mg/kg 显著抑制大豆植株生长,表现出植物毒性,在其他施加水平时没有影响植物生长。

(3) 接种 AM 真菌仅在 500 mg/kg 纳米 ZnO 施加水平时显著促进大豆生长,在其他施加水平下没有显著作用。

(4) 在施加纳米 ZnO 时,接种 AM 真菌可以增加大豆对 P、K 的吸收量,降低根系 Zn 含量,这可能是 AM 真菌发挥有益作用的机制之一。

(5) 纳米 ZnO 可能会持续向外释放 Zn^{2+} 对大豆产生毒害作用,并聚集在根系表面抑制其对营养元素的吸收,进而影响大豆植株营养状况和生长。

致谢: 哈佛大学 Cat Adams 帮助润色英文摘要,特此感谢。

参考文献(References):

- [1] Service R F. Nanomaterials show signs of toxicity. *Science*, 2003, 300(5617): 243.
- [2] Maynard A D, Aitken R J, Butz T, Colvin V, Donaldson K, Oberdörster G, Philbert M A, Ryan J, Seaton A, Stone V, Tinkle S S, Tran L, Walker N J, Warheit D B. Safe handling of nanotechnology. *Nature*, 2006, 444(7117): 267-269.
- [3] Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 2006, 311(5761): 622-627.
- [4] Mukherjee A, Peralta-Videa J R, Bandyopadhyay S, Rico C M, Zhao L J, Gardea-Torresdey J L. Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil. *Metallomics*, 2014, 6(1): 132-138.
- [5] Vandebriel R J, De Jong W H. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2012, 5: 61-71.
- [6] Lin D H, Xing B S. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 2007, 150(2): 243-250.
- [7] Lin D H, Xing B S. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(15): 5580-5585.

- [8] De La Rosa G, López-Moreno M L, Hernandez-Viezcas J A, Montes M O, Peralta-Videa J R, Gardea-Torresdey J L. Toxicity and biotransformation of ZnO nanoparticles in the desert plants *Prosopis juliflora-velutina*, *Salsola tragus* and *Parkinsonia florida*. International Journal of Nanotechnology, 2011, 8(6/7): 492-506.
- [9] Kim S, Kim J, Lee I. Effects of Zn and ZnO nanoparticles and Zn^{2+} on soil enzyme activity and bioaccumulation of Zn in *Cucumis sativus*. Chemistry and Ecology, 2011, 27(1): 49-55.
- [10] López-Moreno M L, de la Rosa G, Hernández-Viezcas J Á, Castillo-Michel H, Botez C E, Peralta-Videa J R, Gardea-Torresdey J L. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO_2 nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. Environmental Science and Technology, 2010, 44(19): 7315-7320.
- [11] Yoon S J, Kwak J I, Lee W M, Holden P A, An Y J. Zinc oxide nanoparticles delay soybean development: a standard soil microcosm study. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 100: 131-137.
- [12] Priester J H, Ge Y, Mielke R E, Horst A M, Moritz S C, Espinosa K, Gelb J, Walker S L, Nisbet R M, An Y J, Schimel J P, Palmer R G, Hernandez-Viezcas J A, Zhao L J, Gardea-Torresdey J L, Holden P A. Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(37): E2451-E2456.
- [13] Klaine S J, Alvarez P J J, Batley G E, Fernandes T F, Handy R D, Lyon D Y, Mahendra S, McLaughlin M J, Lead J R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(9): 1825-1851.
- [14] 王发园. 人工纳米颗粒的植物毒性及其在植物中的吸收和累积. 生态毒理学报, 2012, 7(2): 140-147.
- [15] 张海, 彭程, 杨建军, 施积炎. 金属型纳米颗粒对植物的生态毒理效应研究进展. 应用生态学报, 2013, 24(3): 885-892.
- [16] Smith S E, Read D J. Mycorrhizal Symbiosis. New York: Academic Press, 2010.
- [17] 李晓林, 冯固. 丛枝菌根生理生态. 北京: 华文出版社, 2001.
- [18] Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A, Lubart R. Antifungal activity of ZnO nanoparticles-the role of ROS mediated cell injury. Nanotechnology, 2011, 22(10): 105101.
- [19] Dubchak S, Ogar A, Mietelski J W, Turnau K. Influence of silver and titanium nanoparticles on arbuscular mycorrhiza colonization and accumulation of radiocaesium in *Helianthus annuus*. Spanish Journal of Agricultural Research, 2010, 8: 103-108.
- [20] Feng Y Z, Cui X C, He S Y, Dong G, Chen M, Wang J H, Lin X G. The role of metal nanoparticles in influencing arbuscular mycorrhizal fungi effects on plant growth. Environmental Science and Technology, 2013, 47(16): 9496-9504.
- [21] Zhu Y G, Christie P, Laidlaw A S. Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. Chemosphere, 2001, 42(2): 193-199.
- [22] Lee C W, Mahendra S, Zodrow K, Li D, Tsai Y C, Braam J, Alvarez P J J. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2010, 29(3): 669-675.
- [23] Kumari M, Khan S S, Pakrashi S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. Journal of Hazardous Materials, 2011, 190(1/3): 613-621.
- [24] 王发园, 林先贵. 丛枝菌根在植物修复重金属污染土壤中的作用. 生态学报, 2007, 27(2): 793-801.
- [25] Smith S E, Christophersen H M, Pope S, Smith F A. Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences. Plant and Soil, 2010, 327(1/2): 1-21.
- [26] Bernhardt E S, Colman B P, Hochella M F, Cardinale B J, Nisbet R M, Richardson C J, Yin L Y. An ecological perspective on nanomaterial impacts in the environment. Journal of Environmental Quality, 2010, 39(6): 1954-1965.
- [27] Miransari M. Arbuscular mycorrhizal fungi and uptake of nutrients // Aroca R. Symbiotic Endophytes, Soil Biology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013: 253-270.
- [28] Smith S E, Jakobsen I, Grønlund M, Smith F A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. Plant Physiology, 2011, 156(3): 1050-1057.
- [29] Cavagnaro T R, Dickson S, Smith F A. Arbuscular mycorrhizas modify plant responses to soil zinc addition. Plant and Soil, 2010, 329(1/2): 307-313.
- [30] Jamal A, Ayub N, Usman M, Khan A G. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance zinc and nickel uptake from contaminated soil by soybean and lentil. International Journal of Phytoremediation, 2002, 4(3): 205-221.
- [31] Franklin N M, Rogers N J, Apte S C, Batley G E, Gadd G E, Casey P S. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and $ZnCl_2$ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. Environmental Science and Technology, 2007, 41(24): 8484-8490.