

多氯联苯在紫花苜蓿体内的积累、分布及形态^①

孙向辉^{1,2}, 滕应¹, 骆永明^{1*}, 涂晨^{1,2}, 李振高¹

(1 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 以紫花苜蓿为材料, 研究了多氯联苯(PCBs)在植物根、根瘤、地上部中的积累、分布及存在形态。结果表明, PCBs在紫花苜蓿根、根瘤和茎叶部均有不同程度的积累, 其含量为根瘤>根>茎叶, 而积累量则表现为根>茎叶>根瘤, 其差异均达极显著水平($p<0.01$), 根系表现为主要富集部位。化学连续提取法结果表明, 紫花苜蓿根中PCBs可分为根表弱吸着态、根表强吸着态和根内吸收态等3种形态, 根系中富集的PCBs约78%为根表强吸着态, 被植物组织紧密吸附; 仅2%左右可以进入根系内部被根吸收(即根内吸收态), 且全部为2氯代的PCB8, 低氯代PCBs组分更易被植物吸收转运。

关键词: 多氯联苯; 土壤; 紫花苜蓿; 富集; 化学形态

中图分类号: X171.5; X5

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)是土壤中典型的持久性有机污染物之一^[1-3], 可通过食物链进入人体, 进而危害人类健康。有机污染土壤的修复技术包括生物修复、物理修复、化学修复及其联合修复^[4-5]。植物修复作为土壤有机污染生物修复的经济、有效途径之一, 是当前生物修复研究领域中的热点, 如豆科植物紫花苜蓿已被广泛应用于PCBs污染土壤的植物修复技术中^[6-7]。植物对PCBs污染土壤的修复是多种机制协同作用的结果, 植物的直接吸收作用是其修复PCBs污染土壤的重要机制之一^[8-9]。因此, 研究PCBs在植物体内中的富集、分配及其存在形态, 对深入了解PCBs污染土壤的植物修复过程具有重要意义。

有机污染物在植物体内的富集途径主要有根部吸收和叶面吸收^[10], 高脂溶性有机污染物如PCBs可以在植物根部强烈富集^[11], 植物根部吸收是其进入植物体内的一个重要途径。土壤溶液中的化合物在进入植物根系的过程中, 首先与根表分泌物结合, 然后到达细胞外胞壁内的根部自由空间, 进入根部自由空间水溶液中的化合物会被植物细胞壁吸附, 之后跨过质膜, 进入细胞质通道, 真正被植物根系吸收^[12]。Schwab等^[13]采用CaCl₂溶液和甲醇溶剂连续提取法, 来区分植物根系对PAHs的吸着和吸收, 认为CaCl₂溶液提取的

是与植物根表分泌物结合及处于根表自由空间水溶液中的PAHs, 甲醇溶剂提取的是处于根表自由空间, 与植物细胞壁紧密结合, 但未能进入植物组织内部的PAHs。Jiao等^[14]在此基础上对该提取方法进行改进, 认为经前2步提取后根系中的PAHs为进入植物组织内部的PAHs。那么, 对于强疏水性有机物PCBs, 植物根系对其的吸着与吸收关系如何? 植物体内PCBs的化学形态如何? 目前国内外尚未见报道。鉴此, 拟以紫花苜蓿为供试植物, 研究土壤中PCBs在植物体内的富集规律, 并首次采用改进的连续提取方法, 探讨紫花苜蓿地下部根和根瘤中PCBs的分布形态, 为进一步认识植物对PCBs的吸收和富集过程提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验区概况

试验地位于长江三角洲某典型PCBs复合污染农田, 土壤类型为水稻土, 成土母质为海相沉积物, 系统分类属铁聚水耕人为土。供试土壤的PCBs浓度为624.7~666.9 μg/kg。土壤pH值为5.50, 有机质含量为63.8 g/kg, 全N、全P、全K分别为4.19、1.96、22.2 g/kg。

1.2 土壤和植物样品的采集

①基金项目: 国家自然科学基金项目(40921061, 40701080)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(kzcx2-yw-404)和农业部公益性行业科技专项(200803034)资助。

* 通讯作者(ymluo@issas.ac.cn)

作者简介: 孙向辉(1980—), 女, 河南洛阳人, 博士研究生, 主要研究方向为土壤环境生物修复。E-mail: xhsun@issas.ac.cn

试验区紫花苜蓿于 2007 年 5 月 20 日播种, 播种方式为穴播, 株距为 20 cm × 20 cm。试验过程中采用常规田间管理模式, 分别于 2007 年 9 月 20 日和 2008 年 5 月 20 日刈割两次, 每次留茬 10 ~ 15 cm。本研究中的土壤和植物样品于 2008 年 7 月 20 日采集, 试验区内随机设 4 个采样点, 每个采样点采集 5 株植物, 并采用抖动法获得根际土壤。土壤样品室温风干, 过 60 目筛, 冷冻干燥后待测。植物样品整株带回实验室, 用蒸馏水洗净, 分成根、根瘤、茎叶 3 部分, 样品用吸水纸擦干, 称鲜重, 50℃烘干称干重, 粉碎待测。

1.3 土壤和植物样品中 PCBs 组分及含量分析

称取样品(土壤样品 10 g, 植物样品 2 g)放入玻璃离心管, 用 30 ml 正己烷-丙酮提取液(v/v = 1:1)浸提过夜后, 25℃超声提取 15 min, 1500 r/min 离心 5 min, 收集提取液。再分别用 20 ml 同样的提取液超声提取两次, 每次 15 min, 合并 3 次提取液, 旋转蒸发至近干, 加入 5 ml 正己烷进行溶液替换, 浓缩至 2 ml 后转入复合硅胶柱进行纯化。复合硅胶柱(长 250 mm, 内径 10 mm)内依次装填硅胶、中性氧化铝、酸性硅胶和无水硫酸钠(w/w = 2:2:1:1)。用 10 ml 正己烷淋洗该柱, 弃去淋洗液, 然后加入处理后的样品提取液, 用 25 ml 正己烷洗脱, 洗脱液旋转蒸发浓缩, 用正己烷定容至 5 ml 备测^[15]。

色谱条件: 采用带有电子俘获检测器和自动进样器的 Varian 3800 型气相色谱仪分析。色谱柱: CP-sil24CB (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 进样温度为 260℃, 检测器温度为 300℃。程序升温: 初始温度为 180℃, 保留 0.5 min, 30℃/min 梯度升温至 260℃, 持续 18 min, 然后 15℃/min 梯度升温至 270℃, 持续 2 min。无分流进样 1 μl, 载气为高纯氮, 流速为 1.0 ml/min。

质量控制: 在样品分析过程中进行方法空白、基质加标、平行样以及加标回收率测定。21 种 PCBs 混标(10 μg/kg)的基质加标平均回收率是 72.0% ~ 109.8%, 相对标准偏差是 3.13% ~ 57.3%, 仪器检测限为 1.43 ~ 5.10 μg/kg, 方法检出限为 1.33 ~ 3.45 μg/kg。采用七点校正法得到标准物质的校正曲线, 根据保留时间对目标化合物进行定性分析, 采用峰面积积分法进行定量计算。

1.4 植物根和根瘤中不同形态 PCBs 的连续化学提取

根据 Schwab 等^[13]和 Jiao 等^[14]的提取方法, 同时考虑到 PCBs 的强疏水性, 本研究采用丙酮和正己烷的混合溶液代替第 2 步中的甲醇溶剂, 用于提取与植物组织表面强吸着态 PCBs, 具体方法如下: ①取 5 g

左右新鲜植物样品, 去离子水清洗表面土壤颗粒, 用 15 ml 0.01 mol/L CaCl₂ 溶液浸泡, 以 25℃和 150 r/min 振荡 10 min, 用 0.45 μm 滤膜抽滤, 过滤液用 15 ml 正己烷分 3 次萃取, 萃取液浓缩定容后用于 PCBs 测定; ②经第一步处理的根浸泡在 20 ml 丙酮和正己烷的混合提取溶液(v/v = 1:1)中, 以 25℃和 150 r/min 振荡 3 min, 用 0.45 μm 滤膜抽滤, 过滤液用 20 ml 正己烷分 3 次萃取, 萃取液浓缩定容后用于 PCBs 测定; ③将经过前面两步处理的根剪碎, 冷冻干燥后对植物样品中的 PCBs 含量进行测定。

1.5 土壤基本理化性质分析

土壤 pH 为 1:2.5 土液比浸提, pH 计测定; 土壤有机质含量采用重铬酸钾外加热法测定; 全 N 含量采用半微量开氏法测定; 全 P 含量采用 HClO₄-HF 消解土壤, 钼锑抗比色法测定; 全 K 含量火焰光度计法测定, 具体方法参见文献^[16]。

2 结果与分析

2.1 紫花苜蓿各部位 PCBs 及其同系物的含量

图 1 表示紫花苜蓿各部位的 PCBs 含量和积累量。从图 1 可以看出, 紫花苜蓿植株地上部、根、根瘤均对 PCBs 存在不同程度上的富集作用, 不同组织部位中 PCBs 的含量呈现极显著差异(p < 0.01), 表现为根瘤 > 根 > 地上部。徐莉等^[17]和 Åslund 等^[18]研究结果也表明, 植物根部 PCBs 含量远高于茎叶, 这可能与 PCBs 为疏水性有机污染物, 易被植物地下部组织表面强烈吸附而难以被植物吸收转运有关。由于土壤中存在土著根瘤菌^[19], 本试验还发现紫花苜蓿根部生长有大量的根瘤, 植物根、根瘤中 PCBs 含量分析结果表明, 紫花苜蓿根瘤中 PCBs 含量可达 713.0 μg/kg, 显著高于根部 PCBs 含量 249.7 μg/kg。这可能与植物组织中脂类物质的不均一分布有关。有研究表明, 植物组织中有机污染物的积累浓度与其脂类物质含量呈正相关关系^[20-21]。本研究通过对紫花苜蓿根、根瘤中脂质含量进行分析, 结果发现紫花苜蓿根、根瘤中脂类物质含量分别为 3.95% 和 7.04%, 与其对 PCBs 的富集浓度表现出相同趋势。可见, 脂质含量是影响植物组织吸收富集 PCBs 的一个主要因素。

从图 1 还可知, 紫花苜蓿不同组织部位对 PCBs 的积累量也具有极显著差异(p < 0.01), 表现为根 > 地上部 > 根瘤。但是, 根瘤中 PCBs 的积累量仅为 0.05 μg/株, 这主要与紫花苜蓿单株根瘤生物量低, 仅 0.064 g/株, 只占植物单株根生物量的 0.4% 有关。可见, 紫花苜蓿根瘤对于 PCBs 具有很强的富集能力, 但由于

其生物量较低，而根部仍是紫花苜蓿富集 PCBs 的主要部位。

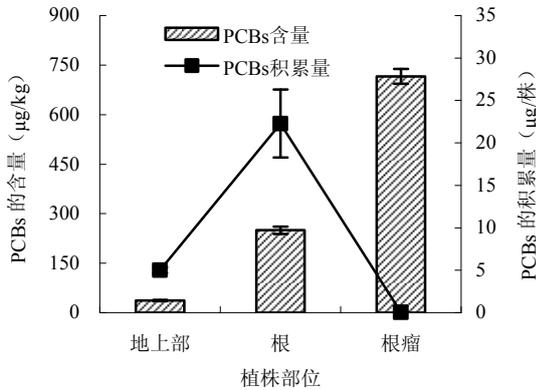


图 1 紫花苜蓿各部位对 PCBs 的富集作用

Fig. 1 Bioconcentration of PCBs in shoots, roots and root nodules of alfalfa

图 2 表示紫花苜蓿各部位及土壤中 PCBs 同系物的分布特征。从图 2 可知，紫花苜蓿根、根瘤与土壤中 PCBs 组分形式相似，其中 PCBs 组分约 70% 左右为低氯组分 (<6 个氯原子的 PCBs 组分)，且主要以 4 氯和 5 氯组分为主，4 氯以下组分仅占根、根瘤中 PCBs 组分的 9.0% 和 9.2%。但与紫花苜蓿地上部茎叶中 PCBs 组分分布有明显不同，茎叶中 PCBs 组分约 97.5% 为低氯组分，以 2 氯和 3 氯 PCBs 组分为主，分别占地上部 PCBs 组分的 39.8% 和 40.9%。这一方面可能是由于低氯代的 PCBs 组分溶解度相对较高，更容易被植物所吸收代谢，并随植物体内的蒸腾流或汁液向上迁移；另一方面可能是由于低氯代的 PCBs 蒸汽压相对较高，土壤中低氯代 PCBs 易挥发至空气中被植物地上部分吸收。

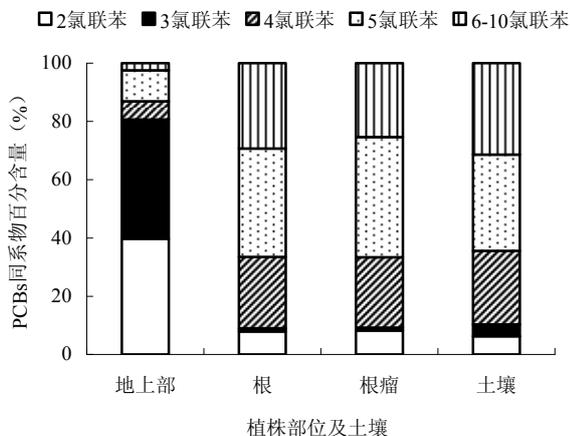


图 2 紫花苜蓿各部位及土壤中 PCBs 同系物百分含量

Fig. 2 Percents of PCBs congeners in soils and shoots, roots, root nodules of alfalfa

2.2 紫花苜蓿根和根瘤中 PCBs 的形态分布

采用改进的 3 步连续提取方法，研究了紫花苜蓿地下部根、根瘤对土壤中 PCBs 的吸着和吸收。该连续提取获得的 3 个操作定义的组分分别代表：①松散附着在植物组织表面及处于植物组织自由空间水溶液中的 PCBs；②与植物组织牢固吸着的 PCBs；③进入植物组织内部中的 PCBs。CaCl₂ 溶液能够洗脱根表的弱吸着部分^[13,22]，如与根表分泌物结合和易溶于水相的 PCBs^[12]，本研究用来洗脱结合于植物组织表面分泌物中和处于植物组织自由空间水溶液中的 PCBs。朱樱等^[23]认为，中等极性的甲醇溶剂是从亲水的生物组织表面洗脱亲脂性强的萘或其他类似化合物的理想选择，可以用于洗脱与鱼鳃表皮牢固吸着的萘 (LogK_{ow}=5.18)。Schwab 等^[13]、Jiao 等^[14]也认为甲醇溶剂可以洗脱与植物组织表面紧密吸着的 PAHs。考虑到 PCBs 为一类具有强亲脂能力的化合物 (LogK_{ow}=4.30~8.26)，而丙酮和正己烷混合溶液是常用 PCBs 提取溶剂，本研究采用中等极性的丙酮与非极性的正己烷体积比为 1:1 的混合溶液，3 min 的提取时间，用于洗脱与植物组织牢固吸着的 PCBs。而进入植物组织内部的 PCBs 则采用常规植物组织中 PCBs 的提取方法。因而，该连续提取方法为典型的操作定义，其测定结果在一定程度上可反映 PCBs 在植物组织表面的大致结合状况及相对结合强度。

图 3 显示了紫花苜蓿根和根瘤中 PCBs 的形态分布。由图 3 可知，紫花苜蓿根和根瘤中 PCBs 形态分布相似，它们中的 PCBs 形态约有 78% 表现为强吸着态，19% 左右表现为弱吸着态，仅 2% 左右的 PCBs 进入植物组织内部，表现为强吸着态 PCBs 组分 > 弱吸着态 PCBs 组分 > 进入植物组织内部 PCBs 组分。可见，大部分 PCBs 只是被植物组织紧密吸附，而很难穿越内皮层的障碍，进入植物组织内部。这与以前 Schwab 等^[13]的研究结果不相一致。Schwab 等^[13]采用 CaCl₂ 溶液和甲醇溶剂连续提取来区分紫花苜蓿和牛毛草对溶液中萘的 2 种吸着态，结果表明除了挥发损失和残留在溶液中的萘以外，其余均以吸着态在根表富集，且 CaCl₂ 溶液提取的弱吸着态高于甲醇溶剂提取的强吸着态。这种结果上的差异，一方面可能是由于与溶液培养研究不同，对于土壤中采集得到的样品，必须在样品预处理过程中用蒸馏水洗净与根系黏连的土壤颗粒，而这样的清洗过程不可避免地去除了大量根表分泌物以及与此分泌物结合的 PCBs，从而导致 CaCl₂ 提取的根表弱结合态 PCBs 的减少。而焦杏春等^[12]也发现相似结果。另一方面可能是由于 PCBs 疏

水性更强,因此更易被根表紧密吸附, Dietz 等^[24]和 Wild 等^[25]研究也发现,疏水性有机污染物主要吸附于植物根系表面或与根表细胞壁紧密结合,很难进入植物细胞内部。

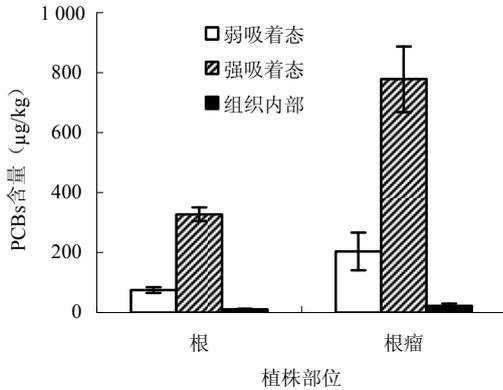


图 3 紫花苜蓿根和根瘤中 PCBs 的形态分布

Fig. 3 Fractionation of PCBs in roots and root nodules of alfalfa derived from the sequential extraction

进一步对紫花苜蓿根和根瘤中不同形态 PCBs 的同系物组成进行分析,发现紫花苜蓿根和根瘤中不同形态 PCBs 的同系物组成相似。为此,以紫花苜蓿根为例,说明不同形态 PCBs 的同系物组成,其结果如图 4 所示。由图 4 可知,通过 CaCl_2 溶液提取所得到的弱吸附态 PCBs 均为 4 氯以下(含 4 氯)的 PCBs 组分,大约 50% 左右为 2 氯代 PCBs 组分,第 2 步经过丙酮和正己烷混合溶液提取得到的强吸附态 PCBs 中约 40% 为高氯 PCBs 组分(≥ 6 个氯原子的 PCBs 组分),且高氯 PCBs 组分仅在强吸附态 PCBs 中出现,而经过第 3 步提取得到的进入植物根组织内部的 PCBs 组分中则仅出现 2 氯代的 PCB8。可见,随 PCBs 氯代数目的增加,其亲脂性与疏水性逐渐增强,更易被植

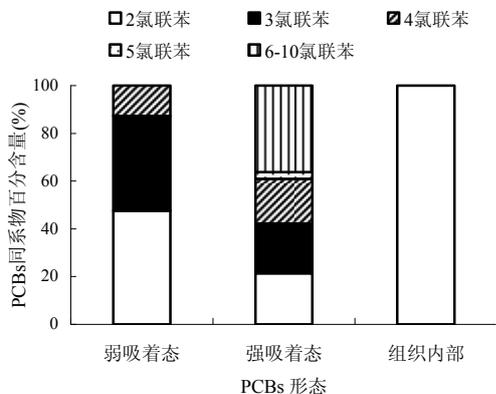


图 4 紫花苜蓿根中不同形态 PCBs 的同系物组成

Fig. 4 Percents of PCBs congeners in different PCBs fractionation of roots

物组织紧密吸附,而水溶性相对较高的 2 氯代组分可能进入植物组织内部,随植物体内的蒸腾流或汁液向上迁移。Wang 等^[26]也发现,除 2 氯苯外,其他氯苯化合物均被胡萝卜表皮紧密吸附,不能进入胡萝卜内部。

3 结论

(1) 紫花苜蓿各组织部位对土壤中 PCBs 的吸收富集能力不同,植物地下部根和根瘤显著高于地上部茎叶。脂质含量高的根瘤对土壤中 PCBs 的积累浓度显著高于根,但由于根瘤生物量低,根部仍是土壤中 PCBs 在植物体内富集的主要部位。

(2) 采用改进的化学连续提取法把紫花苜蓿根系中 PCBs 分为根表弱吸附态、根表强吸附态和根内吸收态 3 种形态,紫花苜蓿根系中可提取 PCBs 约 19% 为弱吸附态,78% 为强吸附态,仅 2% 左右表现为根内吸收态,且进入植物根系内部的 PCBs 组分仅有 2 氯代的 PCB8。

参考文献:

- [1] Rezek J, Macek T, Mackova M, Triska J, Ruzickova K. Hydroxy-PCBs, methoxy-PCBs and hydroxy-methoxy-PCBs: Metabolites of polychlorinated biphenyls formed in vitro by tobacco cells. *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42: 5 746-5 751
- [2] Campfens J, Mackay D. Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31: 577-583
- [3] Valle MD, Jurado E, Dachs J, Sweetman AJ, Jones KC. The maximum reservoir capacity of soils for persistent organic pollutants: Implications for global cycling. *Environ. Pollut.*, 2005, 134(1): 153-164
- [4] 骆永明. 污染土壤修复技术研究现状与趋势. *化学进展*, 2009, 21(2/3): 558-565
- [5] 郑海龙, 陈杰, 邓文靖. 土壤环境中的多氯联苯及其修复技术. *土壤*, 2004, 36(1): 16-20
- [6] Mehmannaavaz R, Prasher SO, Ahmad D. Rhizospheric effects of alfalfa on biotransformation of polychlorinated biphenyls in a contaminated soil augmented with *Sinorhizobium meliloti*. *Process Biochem.*, 2002, 37(9): 955-963
- [7] Chekol T, Vough LR. A study of the use of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) for the phytoremediation of organic contaminants in soil. *Remediation*, 2001, 11(4): 89-101
- [8] Åslund MLW, Rutter A, Reimer KJ, Zeeb BA. The effects of repeated planting, planting density, and specific transfer pathways on PCB uptake by *Cucurbita pepo* grown in field conditions. *Sci.*

- Total Environ., 2008, 405(1): 14-25
- [9] Barber JL, Thomas GO, Kerstiens G, Jones KC. Current issues and uncertainties in the measurement and modeling of air-vegetation exchange and within-plant processing of POPs. Environ. Pollut., 2004, 128: 99-138
- [10] Müller JF, Hawker DW, McLachlan MS, Connell DW. PAHs, PCDD/ Fs, PCBs and HCB in leaves from Brisbane, Australia. Chemosphere, 2001, 43(5): 507-515
- [11] Davidson RD, Jones KC. Screening the environmental fate of organic contaminants in sewage sludge applied to agricultural soils: II. The potential for transfers to plants and grazing animals. Sci. Total Environ., 1996, 185(1/3): 59-70
- [12] 焦杏春, 陈素华, 沈伟然, 陶澍. 水稻根系对多环芳烃的吸着与吸收. 环境科学, 2006, 27(4): 760-764
- [13] Schwab AP, Al-Assi AA, Banks MK. Adsorption of naphthalene onto plant roots. J. Environ. Qual., 1998, 27: 220-224
- [14] Jiao XC, Xu FL, Dawson R, Chen SH, Tao S. Adsorption and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to rice roots. Environ. Pollut., 2007, 148: 230-235
- [15] 滕应, 骆永明, 李振高, 邹德勋. 多氯联苯复合污染土壤的土著微生物修复强化措施研究. 土壤, 2006, 38(5): 645-651
- [16] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999, 107-240
- [17] 徐莉, 滕应, 张雪莲, 王家嘉, 李振高, 刘五星, 骆永明. 多氯联苯污染土壤的植物-微生物联合田间原位修复. 中国环境科学, 2008, 28(7): 646-650
- [18] Åslund MLW, Zeeb BA, Rutter A, Reimer KJ. In situ phytoextraction of polychlorinated biphenyl(PCB) contaminated soil. Sci. Total Environ., 2007, 374(1): 1-12
- [19] 谢小保, 杨苏声. 光敏生物素标记总 DNA 探针针对大豆根瘤菌的检测. 微生物学杂志, 2003, 23(5): 9-11
- [20] Barbour JP, Smith JA, Chiou CT. Sorption of aromatic organic pollutants to grasses from water. Environ. Sci. Technol., 2005, 39: 8 369-8 373
- [21] 林道辉, 朱利中, 高彦征. 土壤有机污染植物修复的机理与影响因素. 应用生态学报, 2003, 14(10): 1 799-1 803
- [22] Binet P, Portal JM, Leyval C. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass of ryegrass. Plant Soil, 2000, 227: 207-213
- [23] 朱樱, 薛蓓, 谢彦佼, 刘先利, 陶澍. 用连续提取法研究莖在鱼鳃表面的结合形态. 生态毒理学报, 2006, 1(1): 75-79
- [24] Dietz AC, Schnoor JL. Advances in phytoremediation. Environ. Health Perspect., 2001, 109: 163-168
- [25] Wild E, Dent J, Thomas GO, Jones KC. Direct observation of organic contaminant uptake, storage, and metabolism within plant roots. Environ. Sci. Technol., 2005, 39: 3 695-3 702
- [26] Wang MJ, Jones KC. Uptake of chlorobenzenes by carrots from spiked and sewage sludge-amended soil. Environ. Sci. Technol., 1994, 26: 1 260-1 267

Accumulation, Distribution and Chemical Speciation of PCBs in Different Parts of Alfalfa

SUN Xiang-hui^{1,2}, TENG Ying¹, LUO Yong-ming¹, TU Chen^{1,2}, LI Zhen-gao¹

(¹ Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China;

² Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The accumulation, distribution and chemical speciation of PCBs by different parts of alfalfa from soil were investigated. The results indicated that the total PCBs concentrations in the different parts of alfalfa can be arranged as root nodules>roots>shoots, however, the amounts of total PCBs accumulated in the different parts of alfalfa were in the order of roots>shoots>root nodules, and the difference reached significant level, alfalfa roots were the main enrichment parts of PCBs in plant. A chemical sequential extraction procedure was developed to measure the adsorbed, strongly adsorbed and interior absorbed fractions of PCBs in alfalfa roots. The results showed that about 78% of the total PCBs detected was strongly adsorbed in the root tissues, only around 2% of the PCBs detected were absorbed by interior alfalfa roots and which all were dichlorobiphenyl (PCB8), low chlorinated PCB congeners were easily absorbed by plant tissues.

Key words: PCBs, Soils, Alfalfa, Accumulation, Chemical speciation