不同 pH 与重金属 Cd 胁迫对紫穗槐萌发和幼苗生长的影响*

张玉秀** 张 倩 李 霞 倪晓棠 张 敏

(中国矿业大学(北京), 北京, 100083)

摘 要 为了探索紫穗槐修复酸性矸石山的机制,研究了含有 0—20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂ 的不同 pH (3.0—7.5) 溶液对紫穗槐种子萌发和幼苗生长的影响. 种子萌发结果表明,不同 pH 溶液处理对紫穗槐萌发率 (约 62%) 和发芽势 (约 48%) 无显著影响;当在不同 pH (3.0—7.5) 溶液中添加 10—20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂时,10 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺可促进种子萌发,20 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺则抑制种子萌发。萌发露白的紫穗槐种子在不同 pH 溶液处理 10 d时,幼苗的根长和株高在 pH 4.5—5.0 的酸性溶液最大,而在 pH 3.0 溶液中最小. 添加 CdCl₂后,幼苗的根长变化趋势与单一 pH 结果一致,但均低于相应的 pH. 紫穗槐幼苗在单一 pH 与 pH +10 μ mol·L⁻¹ CdCl₂联合处理 20 d时,株高和根长在 pH 4.5—5.0 溶液中最大,Cd 可显著抑制幼苗根的生长。研究结果说明,pH 3.0—5.0 酸性水不影响紫穗槐种子萌发,20 μ mol·L⁻¹ Cd 显著抑制种子萌发;紫穗槐幼苗能耐 pH 3.5—5.0 酸性和 10 μ mol·L⁻¹ Cd 胁迫,为紫穗槐修复酸性矸石山提供了理论依据.

关键词 紫穗槐, 重金属, pH, 萌发.

煤矸石是采煤和洗煤过程中排放的固体废物,由于历年的积存,形成了一座座矸石山,给矿区周边带来一系列生态环境问题,如空气质量下降、土壤和水体重金属污染、物种多样性减少、生态系统退化、自然景观的破坏和作物产量减少等[1-2].因此,煤矸石绿化和植被恢复是矿山生态环境恢复的关键环节.紫穗槐是抗逆性极强的灌木,具有耐盐碱性,可固氮改良土壤,能在荒坡、道旁和河岸生长,藤条具有较高的经济价值[3-4].鸡西和阜新煤矿区矸石山绿化实验初步表明紫穗槐在矸石山定植成活率高,生长良好,可快速覆盖地表,是防止矸石山水土流失的优选物种[5-6],但该研究未说明矸石山风化层的 pH 和有效重金属含量.高硫煤矸石自然风化后,经雨水淋溶产生 pH3.0—6.0 酸性废水,导致煤矸石中的有毒重金属被淋溶出来,如 Cd、Mn 和 Pb等,致使煤矸石风化层和周边土壤严重酸化与重金属复合污染[1-2,7].由于矸石山缺乏土壤基本结构、养分贫瘠以及持水能力差,加之严重的酸性和重金属污染,所以矸石山植被修复研究一直是矿区生态修复领域的难题[8-9].耐酸和耐重金属污染物种在矸石山的种植繁衍是酸性矸石山植被恢复的基础,紫穗槐虽然抗逆性强,但是不是重金属耐性/累积植物,能否在酸性矸石山风化物中萌发和生长未见报道,所以揭示紫穗槐对酸和重金属复合污染的适应机制具有重要理论意义和潜在的应用价值.

种子萌发期和幼苗生长期是植物对逆境胁迫较敏感的时期^[10],所以胁迫条件下种子萌发和幼苗生长状况可以反映植物的耐逆性. 重金属 Cd 是酸性煤矸石淋浴的主要重金属之一^[2],本文利用模拟矸石山酸性废水,研究不同 pH 与 pH + $CdCl_2$ 溶液联合处理对紫穗槐种子萌发及其幼苗生长的影响,为酸性矸石山的治理和植被恢复提供科学依据.

1 材料与方法

1 1 材料

供试材料紫穗槐种子于陕西省榆林市购买.

²⁰¹¹年12月20日收稿.

^{*}国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-130B);中央高校基本科研业务费专项资金(2010YH05);大学生创新性实验计划(110309z)项目资助.

^{* *} 通讯联系人, Tel/Fax: 010-62331792; E-mail: zhangyuxiu@ cumtb. edu. cn

1.2 实验方法

1.2.1 紫穗槐在不同 pH 和重金属 Cd 胁迫下的萌发

矸石山酸性废水配制:用分析纯的硫酸和磷酸氢二钾按物质的量之比 1:4 配制母液,用去离子水将母液稀释成 pH 值为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.74(去离子水,CK)、7.5 的不同溶液,然后加入 1 mol·L⁻¹ CdCl₂溶液,使酸性废水中 Cd²⁺浓度分别为 0、10 或 20 μmol·L⁻¹ (pH + CdCl₂处理).

紫穗槐种子萌发:实验前用 60 ℃水浸泡 24 h,自然冷却,进行打破休眠处理^[11]. 用 10% H₂O₂溶液 消毒 15 min 左右,经灭菌水冲洗干净,置于 4 ℃冰箱中低温处理 4 d(提高萌发势),然后在 30 ℃温箱中 萌发. 50 粒种子放入培养皿中,加入 10 mL 含有 0、10 或 20 μ mol·L⁻¹CdCl₂的不同 pH 处理液,每个处理 设 3 个重复. 为保证培养皿中湿润,每天添加 3 mL 相应处理液.实验记录天数根据 GB2772—1999《林木种子检验方法》^[12]确定,计算萌发率和发芽势.

萌发率(%)=总发芽数/供试种子数×100%

发芽势(%)=日发芽种子数达到最高峰时发芽的种子数/供试种子数×100%

1.2.2 不同 pH 值和重金属 Cd 胁迫处理萌发露白种子

消毒的种子在无菌水中萌发, 萌发方法同前. 取 10 个露白种子(胚根 1—2 mm)置于 10 mL 0—20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂的不同 pH 水溶液(同萌发实验)中, 30 ℃ 温室中光照培养, 光照强度 165 μ mol·m⁻²·s⁻¹, 每天光照 14 h, 7 d 后测株高和根长.

1.2.3 不同 pH 值和重金属 Cd 胁迫下的紫穗槐幼苗生长

消毒的种子在水中萌发,生长至根长 2 cm 时,将其置于 1/2 Hoagland 植物营养液中培养 3 d. 挑选大小一致的幼苗(根长约 2.5 cm、株高约 3 cm) 200 棵,置于含有 0—20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂的不同 pH(3.0 、 3.5 、4.0 、4.5 、5.0 、5.5 、6.0 、6.74 (去离子水,CK) 、7.5) 的 1/2 Hoagland 植物营养液中处理 20 d,每盆 6 棵,每 5 d 换一次处理液. 测根长、株高、鲜重及叶绿素含量,叶绿素含量采用分光光度计法 [13] 测定.

1.2.4 统计与分析

实验室所用数据均采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS19.0 软件数据分析和显著性检验.

2 结果与讨论

2.1 不同 pH 和不同浓度 Cd 离子对紫穗槐种子萌发的影响

消毒的紫穗槐种子在 pH 3.0—7.5 溶液或添加 10—20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂的不同 pH 溶液 (pH + CdCl₂)中萌发 14 d,结果见图 1.由图 1 可见,在 pH 3.0—7.5 条件下紫穗槐种子的萌发率约 62%,不同 pH 之间无显著性差异.在 pH 3.0—7.5 溶液添加 $10~\mu$ mol·L⁻¹ CdCl₂时,萌发率虽均高于相应的单一 pH 溶液,但均无显著性差异.当 CdCl₂浓度提高到 $20~\mu$ mol·L⁻¹时,其萌发率均低于相应的单一 pH. 说明 pH 3.0—5.0 的酸性条件下不影响紫穗槐种子萌发, $10~\mu$ mol·L⁻¹ CdCl₂低浓度可促进萌发,而 $20~\mu$ mol·L⁻¹ CdCl₂高浓度则抑制萌发。随 Cd²⁺浓度的提高,过多的 Cd²⁺进入细胞与核酸相结合,降低了 RNA 和 DNA 的活性,引起核酸裂解,影响了有丝分裂,从而抑制了种子的萌发^[14].

发芽势高表示种子活力强、发芽整齐和出苗一致. 不同 pH 溶液处理 7 d 时紫穗槐发芽势约达 48%,无显著性差异;当添加 10 μ mol·L⁻¹ CdCl₂时,其发芽势均高于相应的单一 pH,且在 pH 3.0 时其发芽势显著高于相应的单一 pH;当 CdCl₂浓度提高到 20 μ mol·L⁻¹时,其发芽势均低于单一 pH 溶液处理,且在 pH 3.0—4.0 时显著低于单一 pH 溶液处理. 表明 pH 3.0—5.0 的酸性条件下不影响紫穗槐种子活力;而在 pH 3.0 时,10 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺可显著提高种子萌发势,而 20 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺则显著降低萌发势. 结果说明,低浓度 Cd²⁺可促进种子破皮和萌发,高浓度 Cd²⁺则因毒害作用抑制萌发,特别是pH 3.0—4.0 的酸性条件下 Cd²⁺的抑制作用加强.

2.2 不同 pH 和重金属 Cd 胁迫下对紫穗槐露白种子根伸长的影响

根对外界刺激敏感,所以根伸长变化可作为植物耐酸和重金属的一个重要指标. 胚根露出 1—2 mm (露白)的紫穗槐种子在单一 pH 3.0—7.5 溶液、或添加 10—20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂的不同 pH 溶液中处理 10 d. 根长测定结果(图 2a)表明,在不同 pH 条件下,根伸长量在 pH 3.0—4.5 时迅速提高,pH 4.5—

5.0 达到最大值 4.5 cm(与对照 pH 6.74 相比增长了 50.84%,与 pH 3.0 相比增长了 175.51%),然后随着 pH 的升高逐渐下降,根长在 pH 6.0—7.5 与 pH 3.5—4.5 时无显著性差异,但明显高于 pH 3.0. 说明 pH 4.5—5.0 酸性条件有利于紫穗槐根伸长,而 pH 3.0 的酸性条件明显抑制根生长. 当添加 10 μ mol·L⁻¹或 20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂时,根伸长变化趋势与单一 pH 溶液处理相似,根长在 pH 4.5 时达最大值,但均显著低于相应的单一 pH 溶液处理,说明 10—20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂处理能明显抑制根的生长,这可能是由于 Cd²⁺在根部的积累破坏了细胞内染色体和核仁,细胞分裂和根伸长被抑制所致^[15]. 由于 pH 4.5 + 10 μ mol·L⁻¹ CdCl₂处理的根长显著高于 pH 3.0,而 pH 4.5 + 20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂处理与 pH 3.0 无明显差异,表明紫穗槐幼苗可在 pH 4.5 + 10 μ mol·L⁻¹ CdCl₂的复合污染条件下存活生长.与种子发芽率和发芽势相比,紫穗槐根对单一 pH 3.0—5.0 和 pH 3.0—5.0 + Cd 胁迫处理影响更敏感,与杉木和拟南芥种子萌发对重金属胁迫的研究结果一致^[16-17],表明根伸长可作为鉴定植物耐酸性和重金属复合污染的一个指标.

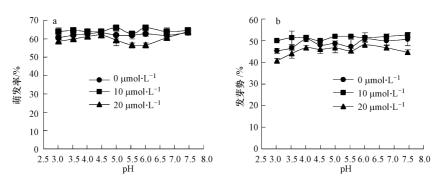


图 1 不同 pH 和不同浓度 CdCl₂ 处理对紫穗槐萌发率(a) 和发芽势(b) 的影响

Fig. 1 Effects of solution pH and Cd concentration on the germination percentage(a) and germination energy (b) of *Amorpha fruticosa L*.

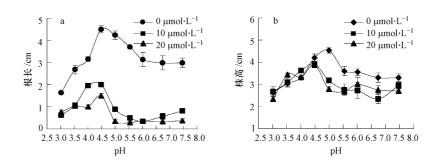


图 2 不同 pH 和不同浓度 CdCl₂ 胁迫对紫穗槐根伸长(a) 和株高(b) 的影响

Fig. 2 Effects of solution pH and Cd concentration on the root elongation (a) and embryo of (b) Amorpha fruticosa L.

株高分析结果(图 2b) 表明,在不同 pH 条件下,株高变化趋势与根伸长的变化一致,在 pH 3.0—5.0 时逐渐提高,pH 4.5—5.0 达到最大值(4.53 cm,比对照 pH 6.7 相比增长了 37.37%,比 pH 3.0 相比增长了 72.15%),pH 5.5 时迅速下降;由于株高在 pH 5.5—7.5 时与 pH 3.5—4.5 无显著性差异,但明显高于 pH 3.0. 说明 pH 5.0 时有利于紫穗槐地上部的生长,而 pH 3.0 的酸性条件可明显抑制其生长. 当添加 10 μ mol·L⁻¹或 20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂时,株高在 pH 3.0—4.5 时持续上升,pH 4.5 时达到最大值,然后迅速下降. pH 3.0—4.5 + CdCl₂联合处理的株高与相应的 pH 无显著性差异,可能是由于 Cd²⁺主要累积在根部,所以对地上部生长影响较小. 在 pH 5.0 时,Cd²⁺处理显著降低根长和株高,可能是Cd²⁺的毒害作用严重影响了根的生长,进而影响对营养物质的吸收和转运,导致地上部生长降低. 与根伸长变化相比,株高变化对 pH 3.0—5.0 酸性与重金属处理的影响较缓慢.

2.3 不同 pH 和重金属 Cd 胁迫下对紫穗槐幼苗生长的影响

植物幼苗根系能否延伸生长直接影响其在环境中的生存. 不同 pH 值与 pH + CdCl₂处理紫穗槐幼苗 20 d,分析其根长、株高、鲜重和叶绿素变化(图 3a). 根长结果表明,在不同 pH 条件下,根长在 pH 3.0—4.5 时逐渐提高,pH 4.5—5.0 达到最大值(11.58 cm);根长在 pH 5.5—7.5 与 pH 3.5—4.5 时无显著性差异,但显著高于 pH 3.0. 说明 pH 4.5—5.0 是有利于紫穗槐根生长,pH 3.0 的酸性条件明显抑制根的生长. 当添加 10 μ mol·L⁻¹ CdCl₂时,根长变化趋势与单一 pH 溶液一致,除 pH 3.0 外,pH + CdCl₂处理的根长均显著低于单一 pH;同时,pH 4.5—5.0 + CdCl₂与单一 pH 3.5 无显著性差异. 添加 20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂时,根长随 pH 增大逐渐增大,且在 pH 3.0—5.0 时显著低于10 μ mol·L⁻¹ CdCl₂相应的 pH,特别是在 pH 3.0—3.5 时根几乎没有生长. 说明紫穗槐可在 pH 4.5—5.0 + 10 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺复合污染下生长,与露白种子生长结果相似.

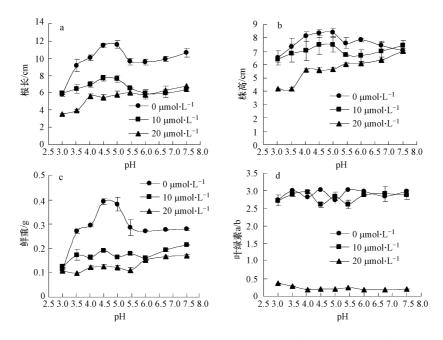


图 3 不同 pH 和不同浓度 CdCl₂ 胁迫下对紫穗槐幼苗根长、株高、生物量和叶绿素 a/b 比率的影响 **Fig. 3** Effect of the pH value and Cd concentration on the root length, plant height, biomass and chlorophyll a/chlorophyll b ratio of *Amorpha fruticosa* L.

株高结果(图 3b)表明,在不同 pH 条件下,株高的变化趋势与根长相似,在 pH 3.0—4.0 时逐渐提高,pH 4.0—5.0 达到最大值,然后随着 pH 的升高有逐渐下降,但是株高在单一 pH 3.0—5.0 处理下无显著性差异,说明 pH 3.0—5.0 酸性对紫穗槐株高生长影响小. 当添加 10 μ mol·L⁻¹ CdCl₂时,株高变化趋势与单一 pH 结果一致,在 pH 3.0—5.0 时株高与相应 pH 无显著性差异;添加 20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂时,株高随 pH 增大而增大,在 pH 3.0—5.0 时株高显著低于 pH 3.0—5.0 + 10 μ mol·L⁻¹ CdCl₂处理,且在 pH 3.0—3.5 株高几乎没有增加,与根长变化趋势一致. 表明 pH 3.0—5.0 + 10 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺复合污染对紫穗槐地上部的生长影响较小,而 20 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺可显著抑制植株的生长.

根生长直接影响其对营养物质的吸收,进而影响生物量. 生物量分析(图 3c)表明,在不同 pH 条件下,生物量变化趋势与根长一致,pH 3.0—4.5 时逐渐提高,pH 4.5—5.0 达到最大值(0.3939 g),然后随着 pH 的升高逐渐下降;生物量在 pH 5.5—7.5 与 pH 3.5—4.5 时无显著性差异,但显著高于pH 3.0. 说明 pH 4.5—5.0 是有利于紫穗槐生长,pH 3.0 的酸性条件明显抑制紫穗槐生长,与根长分析结果一致. 添加 10 μ mol·L⁻¹或 20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂时,除 pH 3.0 外,生物量显著低于相应的单一 pH,不同 pH 之间的无显著性差异,表明 Cd²⁺对幼苗生长的抑制作用大于 pH 的作用,进一步证实紫穗槐是 Cd 敏感植物. 10 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺可显著抑制紫穗槐的根伸长,降低其吸收能力,进而影响其生物量的累积.

叶绿素是植物光合作用的主要色素,其含量的变化可反映植物叶片光合功能的强弱,也可表征逆境

胁迫下植物组织、器官的衰老状况^[18]. 叶绿素 a/b 反映了类囊体膜的垛叠程度,垛叠程度越高,膜的稳定性越高,也反映光能转化效率^[19]. 叶绿素 a/b(图 3d)分析表明,单一不同 pH 处理幼苗 20 d 时叶绿素 a/b 约 2.8,不同 pH 处理间无显著性差异(p > 0.05),这说明 pH 3.0—5.0 的酸性条件下不影响紫穗槐光合效率. 添加 10 μ mol·L⁻¹ CdCl₂时,叶绿素 a/b 与相应 pH 溶液处理无显著性差异;当添加 CdCl₂浓度提高到 20 μ mol·L⁻¹,叶绿素 a/b 均显著低于相应的单一 pH 和 pH + 10 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺处理,说明 20 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺严重影响紫穗槐光合效率,最终导致株高和生物量显著降低,所以,紫穗槐不能在 20 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺处理环境中生存.

3 结论

- (1)pH 3.0—5.0 酸性条件对紫穗槐种子的萌发影响较小;pH 3.0 明显抑制紫穗槐幼苗根长和株高的生长,而 pH 4.5—5.0 的酸性条件有利于其生长.
 - (2)10 μmol·L⁻¹ Cd²⁺可促进紫穗槐种子萌发, 而 20 μmol·L⁻¹ Cd²⁺可抑制其萌发.
 - (3) 紫穗槐幼苗可在 pH 4.5—5.0 + 10 μ mol·L⁻¹ CdCl₂的复合污染条件下存活生长.

参考文献

- [1] 葛林瀚, 杜慧, 周春侠. 煤矸石的危害性及其资源化利用进展[J]. 煤炭技术, 2010, 29(7): 9-11
- [2] Li Yibao, Kang Tianhe, Wang Dong. Gangue harmful to environment and integrated control measures [A]. Germany: VDE VERLAG, 2011:231-233
- [3] 徐开未,张小平,陈远学,等. 刺槐、紫穗槐、黄檀根瘤菌抗逆性的初步研究[J]. 湖北农业科学,2009,48(2);321-323
- [4] 冯永刚. 四种土壤对紫穗槐萌发及生长的影响[J]. 安徽农业科学,2008,36(26):11446-11448
- [5] 温利春,王笑峰,杨中波,等. 矸石山水土保持植物种优选研究[J]. 黑龙江水专学报,2009,36(3):64-67
- [6] 杨传兴. 半干旱地区矸石山造林绿化的优良树种——紫穗槐[J]. 林业科技情报,2008(3):30-31
- [7] 张明亮, 胡振琪. 煤矸石山酸性矿山废水的控制研究综述[J]. 有色金属, 2008, 60(4):150-153
- [8] Zuo Junjie, Fan Jinshuan, Huo Feng. Vegetation restoration of gangue wastelands with particular reference to climax communities [A]. Germany: VDE VERLAG, 2009;2204-2208
- [9] 张成梁,杜永吉. 自然矸石山植被修复与生态构建影响因素分析[J]. 煤炭科学技术,2009,37(7):120-125
- [10] 李敏,骆永明,宋静,等, 污泥-铜尾矿体系下 pH-盐分和重金属对大麦根伸长的牛态毒性效应[J]. 土壤,2006,38(5);578-583
- [11] 张军,李金龙. 紫穗槐在公路绿化中的应用与栽培技术[J]. 防护林科技,2010,(1):121-122
- [12] 国家质量技术监督局. GB2772—1999 林木种子检验方法[S]. 1999
- [13] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社,1990;88-91,154-155
- [14] 陈坤,徐龙君,袁智,等. 水溶态 Cd、Zn 及其复合污染对 3 种豆类胚根生长的影响[J]. 环境化学,2011,30(10):1758-1763
- [15] 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
- [16] 游秀花,何海斌,聂丽华. 重金属对杉木种子发芽与根长伸长抑制的生态效应[J]. 东北林业大学学报. 2006,34(1): 7-8
- [17] Li W Q, Mohammad A K, Yamaguchi S J, et al. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Growth Regulation, 2005, 46: 45-50
- [18] 计汪栋,施国新,杨海燕,等. 铜胁迫对竹叶眼子菜叶生理指标和超微结构的影响[J]. 应用生态学报,2007,18(12):2727-2732
- [19] 王瑞刚, 唐世荣, 郭军康, 等. 铜胁迫对高丹草和紫花苜蓿生长和光和特性的影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(12): 2922-2928

Effects of pH and cadmium on the seed germination and seedling growth of *Amorpha fruticosa* L.

ZHANG Yuxiu* ZHANG Qian LI Xia NI Xiaotang ZHANG Min (School of Chemical and Environmental Engineering of China University of Mining & Technology (Beijing), Beijing, 100083, China)

ABSTRACT

In order to understand the mechanism of remediation of acid coal gangue pile by Amorpha fruticosa L., the effects of pH 3.0—7.5 solution supplied with 0, 10 or 20 μ mol·L⁻¹ CdCl₂ on the seed germination and seedling growth of A. fruticosa were investigated. The results showed that the single pH treatment (3.0—7.5) had no significant effect on the germination rate (62%) and germination energy (48%) of A. fruticosa. Addition of 10 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺ increased seed germination, while 20 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺ inhibited seed germination. The germinating seeds were exposed to the solution with different pH values for 10 d, and the root length and shoot height were the highest at pH 4.5—5.0, while it was the smallest at pH 3.0; The change of root length under pH + CdCl₂ stress was similar to the pH alone. However, the root length was remarkably smaller than pH stress. The root length and shoot height were highest at pH 4.5—5.0 when the seedling was exposed to pH solutions for 20 d, and the root growth was notablely inhibited by Cd²⁺ under pH + CdCl₂ stress. All these results indicated that the germination of A. fruticosa was not affected by the acidic water of pH 3.0—5.0, and 20 μ mol·L⁻¹ Cd significantly inhibited seed germination. A. fruticosa seedlings was resistant to the pH 3.5—5.0 stress and 10 μ mol·L⁻¹ Cd²⁺ treatment. A. fruticosa could be used for the vegetation restoration of the acid coal gangue pile.

Keywords: Amorpha fruticosa L., heavy metal, pH, germination.