

根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶生长和 Cu 含量的影响

邹萌萌¹, 周卫红^{1,2}, 张静静¹, 陶春柳³, 刘晓青⁴, 李建龙^{1,①}

(1. 南京大学生命科学学院, 江苏 南京 210093; 2. 江苏科技大学苏州理工学院, 江苏 张家港 215600;
3. 苏州健雄职业技术学院, 江苏 苏州 215411; 4. 南京农业大学草业学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 采用盆栽法研究了根瘤菌 *Rhizobium trifolii* ACCC18017 对 Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中白三叶 (*Trifolium repens* Linn.) 的株高、主根长、地上部和地下部的鲜质量和干质量、叶片叶绿素含量以及地上部和地下部的 Cu 含量的影响。结果表明: Cu 添加量为 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组 (接种灭菌的 2.7 × 10⁹ CFU · mL⁻¹ 菌悬液) 白三叶的株高、地上部和地下部的鲜质量及地上部干质量均显著 ($P < 0.05$) 高于 Cu 添加量为 0 mg · kg⁻¹ 的土壤; Cu 添加量为 1 000 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组白三叶的株高、地上部鲜质量及地上部和地下部的干质量与 Cu 添加量为 0 mg · kg⁻¹ 的土壤无显著差异; 并且, Cu 添加量为 500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组白三叶的主根长和叶片叶绿素含量与 Cu 添加量为 0 mg · kg⁻¹ 的土壤无显著差异。上述结果表明白三叶对一定程度的 Cu 污染土壤具有适应性。不同 Cu 添加量土壤中接菌组 (先后接种 2.7 × 10⁹ 和 2.3 × 10⁹ CFU · mL⁻¹ 菌悬液) 白三叶供试所有指标基本上均高于对照组; 其中, Cu 添加量为 0、500 和 1 000 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的株高及地上部和地下部的鲜质量和干质量基本上显著高于对照组。并且, Cu 添加量为 500 和 1 000 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶地上部和地下部的 Cu 含量显著高于对照组。本研究结果显示: 根瘤菌 *R. trifolii* ACCC18017 能够促进白三叶生长及其对土壤中 Cu 的吸收, 利于白三叶修复一定程度的 Cu 污染土壤。

关键词: 根瘤菌; 白三叶; Cu 胁迫; 生长; Cu 含量; 植物修复

中图分类号: Q945.78; Q948.12².3; S541 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2019)01-0062-09
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2019.01.08

Effects of rhizobium on growth and Cu content in *Trifolium repens* under Cu stress ZOU Mengmeng¹, ZHOU Weihong^{1,2}, ZHANG Jingjing¹, TAO Chunliu³, LIU Xiaoqing⁴, LI Jianlong^{1,①}
(1. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Suzhou Institute of Technology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhangjiagang 215600, China; 3. Suzhou Chien-Shiung Institute of Technology, Suzhou 215411, China; 4. Grass Industry College, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2019, 28(1): 62-70

Abstract: Effects of *Rhizobium trifolii* ACCC18017 on height, main root length, fresh and dry masses of above- and under-ground parts, chlorophyll content in leaf, and Cu content in above- and under-ground parts of *Trifolium repens* Linn. in soil with Cu additions of 0, 500, 1 000, and 1 500 mg · kg⁻¹ were studied by using pot-culture method. The results show that height, fresh masses of above- and under-ground parts, and dry mass of above-ground part of *T. repens* in the control group (inoculated with sterilized 2.7 × 10⁹ CFU · mL⁻¹ suspension) in soil with Cu addition of 500 mg · kg⁻¹ are significantly ($P < 0.05$) higher than those of *T. repens* in soil with Cu addition of 0 mg · kg⁻¹; height, fresh mass of above-ground part, and dry masses of above- and under-ground parts of *T. repens* in the control group in soil with Cu addition of 1 000 mg · kg⁻¹ have no significant difference with those of *T. repens* in soil with Cu addition of 0 mg · kg⁻¹; in addition, main root length and chlorophyll content in leaf of *T. repens* in the control group in soil with Cu additions of 500, 1 000, and 1 500 mg · kg⁻¹ have no significant

收稿日期: 2018-07-31

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0800201); 国际 APN 全球变化项目(ARCP2015-03CMY-Li)

作者简介: 邹萌萌(1992—), 女, 河南许昌人, 硕士研究生, 主要从事土壤重金属污染监测、治理和修复方面的研究。

①通信作者 E-mail: jlli2008@nju.edu.cn

difference with those in *T. repens* in soil with Cu addition of $0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The above results indicate that *T. repens* is adaptable to Cu-contaminated soil with a certain degree. All tested indexes of *T. repens* in inoculation group (successively inoculated with 2.7×10^9 and $2.3 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ suspensions) in soil with different Cu additions are basically higher than those of *T. repens* in the control group; in which, height and fresh and dry masses of above- and under-ground parts of *T. repens* in inoculation group are basically significantly higher than those of *T. repens* in the control group in soil with Cu additions of 0, 500, and $1\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. In addition, Cu content in above- and under-ground parts of *T. repens* in inoculation group is significantly higher than that of *T. repens* in the control group in soil with Cu additions of 500 and $1\ 000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. It is suggested that *R. trifolii* ACCC18017 can promote growth of *T. repens* and its absorption of Cu in soil, which is beneficial to remediation of Cu-contaminated soil with a certain degree.

Key words: rhizobium; *Trifolium repens* Linn.; Cu stress; growth; Cu content; phytoremediation

Cu 是植物生长发育必需的微量元素,能够影响植物蛋白质结构,参与细胞氧化还原反应,并调节植物体重要代谢过程;Cu 还是叶绿体中质体蓝素的组成成分,参与光电子传递过程,利于叶绿素的合成和稳定。然而,随着中国工业化和城市化进程的快速推进,土壤 Cu 污染问题日益突出。在农业生产过程中,大量或长期使用含 Cu 杀菌剂导致土壤 Cu 含量急剧升高,远远超过植物生长需要的土壤 Cu 含量的阈值,致使植物叶片光合作用受阻,不利于植株生长^[1-3],因此,亟待修复 Cu 污染土壤。

植物修复技术是指利用重金属超积累或耐受植物修复重金属污染土壤,具有成本低廉、美化环境、提高土壤有机质含量和土壤肥力等优点,受到国内外学者的广泛关注^[4]。但是,目前发现的耐受植物对土壤重金属污染的耐受性均较低,而超富集植物又存在植株矮小、生长缓慢和修复土壤周期长等问题,均难以满足修复高污染土壤和快速修复污染土壤的需要^[5-6]。牧草具有生长快、生物量大、重金属吸收量多且易于栽培管理等特点,近年来成为修复重金属污染土壤的研究热点^[7]。白三叶 (*Trifolium repens* Linn.) 又名白车轴草,为普遍栽种的豆科 (Fabaceae) 多年生优良牧草,对土壤 Cu 污染具有一定的耐受性和富集能力^[8-9]。

根瘤菌是广泛分布于土壤中的革兰氏阴性杆状细菌,常与豆科植物共生,形成根瘤并固定空气中的氮,从而促进植物生长,增强植物的抗病性和抗逆性。根瘤菌与豆科植物形成的共生体系在重金属污染土壤修复中的应用及潜力逐渐受到研究者的关注^[10]。研究发现,接种根瘤菌 *Bradyrhizobium* sp. (*vigna*) 能显著提高绿豆 [*Vigna radiata* (Linn.) Wilczek] 的产

量及 N 和 P 的吸收量^[11];接种根瘤菌 *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 使天蓝苜蓿 (*Medicago lupulina* Linn.) 的生物量和 Cu 含量分别增加了 78.2% 和 39.3%^[12]。

为了探究根瘤菌对 Cu 污染土壤中白三叶 Cu 耐受性的影响,作者采用盆栽法比较了 Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中对照组 (接种灭菌的 $2.7 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Rhizobium trifolii* ACCC18017 菌悬液) 和接种组 (先后接种 2.7×10^9 和 $2.3 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *R. trifolii* ACCC18017 菌悬液) 白三叶的株高、根长、地上部和地下部的鲜质量和干质量、叶片叶绿素含量及地上部和地下部的 Cu 含量,以期明确根瘤菌对 Cu 污染土壤中白三叶生长和 Cu 吸收的影响,为利用根瘤菌-白三叶共生体系修复 Cu 污染土壤提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验使用的白三叶种子购自北京百绿集团。挑选籽粒饱满、大小均匀的种子,先用蒸馏水浸泡 24 h,再用体积分数 75% 乙醇灭菌 3~5 min,最后用无菌水冲洗 3 次,备用。

实验使用的根瘤菌为三叶草根瘤菌 *R. trifolii* ACCC18017,由中国农业微生物菌种保藏管理中心提供。实验前,对根瘤菌的耐 Cu 能力进行检测,该菌株在 Cu 浓度为 $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酵母甘露醇 (YMA) 固体培养基上能够正常生长。

实验使用的土壤取自南京大学生命科学学院后山。取 0~20 cm 土层的土壤,过筛 (孔径 0.8 mm),

室温放置 3~4 d,待土壤自然风干后,将其与营养土(购自南京斑马实验耗材有限公司)按照质量比 2:1 的比例混合均匀后作为栽培基质。栽培基质中有机质含量为 $32.70 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,全氮含量为 $2.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,碱解氮含量为 $74.26 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效磷含量为 $0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效钾含量为 $0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,Cu 含量为 $33.36 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,pH 7.15。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液制备 使用 YMA 固体培养基先将三叶草根瘤菌 *R. trifolii* ACCC18017 活化,再将活化的根瘤菌接种至 YMA 液体培养基中,置于 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养至对数生长期,分别获得浓度为 2.7×10^9 和 $2.3 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液。

1.2.2 盆栽实验 于 2017 年 9 月 5 日在南京大学生命科学学院露天阳台进行盆栽实验。称取适量 CuSO_4 固体粉末,加水制成浓度分别为 0.011 8 、 0.023 6 和 $0.035 \text{ 4 mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CuSO_4 溶液;分别取上述 CuSO_4 溶液各 200 mL,逐层喷洒到栽培基质中,并搅拌均匀,使栽培基质中的 Cu 添加量分别为 500 、 1 000 和 $1 \text{ 500 mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,Cu 添加量为 $0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的栽培基质喷洒 200 mL 蒸馏水。将各组栽培基质分别装入直径 16 cm、高 20 cm 的塑料花盆中,每盆装入栽培基质 1.5 kg,室温下静置 2 周。将供试白三叶种子平均分成 2 组,一组置于 $2.7 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液中浸泡 10 min,作为接菌组;另一组用灭菌的 $2.7 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液浸泡 10 min,作为对照组。将白三叶种子均匀撒播在栽培基质中,覆土厚度 0.5~1.0 cm,每组播种 6 盆,每盆 30 粒种子,各 3 个重复。待幼苗高 2~3 cm 时,对接菌组幼苗进行 2 次接菌,用注射器沿植株根部注入 $2.3 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液,每盆注入 8 mL。待幼苗高 10 cm 时,每盆保留长势良好的幼苗 15 株。实验期间定期浇水,保持栽培基质的含水量为田间最大持水量的 60%~70%。用托盘收集渗出的水,将渗出的水重新浇入花盆中。

1.2.3 根瘤菌-白三叶共生体系检测 为了确保接菌组白三叶植株根部接种上根瘤菌,培养结束后,每盆选取 1 株白三叶植株,采集植株根部根瘤,先用无菌水冲洗干净,再用体积分数 95% 乙醇浸泡 30 s,接着用质量体积分数 0.1% AgCl_2 溶液杀菌 5 min,最后用无菌水冲洗 6 次。将灭菌的根瘤置于 2 片无菌载玻片之间,用力挤压使根瘤破碎,用接种环沾取适量汁液,在 YMA 固体培养基上划线,置于 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下

培养 2 d;待长出菌落后,将培养基上的菌落与 *R. trifolii* ACCC18017 进行形态学对比。此外,对接菌组白三叶根部的根瘤菌进行耐 Cu 能力检测,比较该根瘤菌的耐 Cu 能力与 *R. trifolii* ACCC18017 的耐 Cu 能力是否相同。若培养菌落的形态特征和耐 Cu 能力与 *R. trifolii* ACCC18017 均相同,则认为培养出的菌株为 *R. trifolii* ACCC18017。

1.2.4 生长指标测定 种植 12 周后,每盆随机选取 6 株白三叶植株,使用直尺(精度 1 mm)测量植株的株高,结果取平均值;挖出完整植株,尽量避免破坏根瘤,先用自来水轻轻冲洗,洗净根瘤和根部表面的泥土和杂质,再用去离子水浸泡 30 min,使用直尺测量植株的主根长度,结果取平均值。

将每盆的所有植株挖出,自来水冲洗干净,吸水纸吸干表面水分,将植株分成地上部和地下部 2 个部分,使用电子天平(精度 0.01 g)分别称量每盆所有植株地上部和地下部的总质量,即地上部和地下部的鲜质量;分别将每盆所有植株地上部和地下部装入信封中,先在 $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下杀青 30 min,再在 $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干至恒质量,分别称量每盆所有植株地上部和地下部的总质量,即地上部和地下部的干质量。

1.2.5 叶片叶绿素含量测定 随机选取白三叶成熟叶片,每盆约 0.1 g,准确称量后剪碎,放入具塞玻璃试管中;加入 10 mL 丙酮-乙醇混合液,黑暗条件下提取 14 h;用 756MC 紫外-可见分光光度计(上海菁华仪器科技有限公司)测定提取液在波长 645 和 663 nm 下的 OD 值。参照文献[13],根据公式“叶绿素 a 含量 = $(12.70\text{OD}_{663} - 2.69\text{OD}_{645}) \cdot (V/1 \text{ 000}m)$ ”、“叶绿素 b 含量 = $(22.99\text{OD}_{645} - 4.68\text{OD}_{663}) \cdot (V/1 \text{ 000}m)$ ”和“总叶绿素含量 = $(20.20\text{OD}_{645} + 8.02\text{OD}_{663}) \cdot (V/1 \text{ 000}m)$ ”分别计算叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素的含量。式中, OD_{645} 和 OD_{663} 分别为提取液在波长 645 和 663 nm 下的 OD 值, V 为提取液体积, m 为叶片鲜质量。并且,计算叶绿素 a 含量与叶绿素 b 含量的比值。

1.2.6 Cu 含量测定 将烘干的地上部和地下部样品粉碎,分别取 0.2 g 样品,放入聚四氟乙烯消解罐中;依次加入 5 mL 浓 HNO_3 和 2 mL H_2O_2 ,微波(功率 1 600 W)消解 20 min;待溶液澄清后,定容至 50 mL;过滤,使用 ICAP6300 电感耦合等离子体发射光谱仪(美国 Thermo Fisher 公司)测定地上部和地下部的 Cu 含量。

1.3 数据处理和统计分析

采用 EXCEL 2010 软件计算相关数据的平均值和标准差,采用 SPSS 20.0 软件进行 LSD 单因素方差分析,采用 Origin Pro 9.1 软件绘图。

2 结果和分析

2.1 根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶生长的影响

2.1.1 对株高和根长的影响 根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶株高和主根长的影响见表 1。由表 1 可以看出:Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组(先后接种 2.7×10⁹ 和 2.3×10⁹ CFU · mL⁻¹ *R. trifolii* ACCC18017 菌悬液)白三叶的株高均高于对照组(接种灭菌的 2.7×10⁹ CFU · mL⁻¹ *R. trifolii* ACCC18017 菌悬液),分别较对照组增加了 19.5%、12.6%、27.7% 和 14.1%;其中,Cu 添加量为 0 和 1 000 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的株高显著 ($P < 0.05$) 高于对照组。Cu 添加量为 500 mg · kg⁻¹ 土壤

中对对照组和接菌组白三叶的株高显著高于 Cu 添加量为 0 mg · kg⁻¹ 的土壤;Cu 添加量为 500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对对照组白三叶的株高随着 Cu 添加量提高而显著降低,而 Cu 添加量为 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的株高显著高于 Cu 添加量为 1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 的土壤,但 Cu 添加量为 1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的株高差异不显著。

由表 1 还可以看出:Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的主根长均大于对照组,分别较对照组增加了 2.0%、7.3%、9.7% 和 12.4%,但不同 Cu 添加量土壤中对对照组和接菌组白三叶的主根长差异均不显著。Cu 添加量为 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对对照组和接菌组白三叶的主根长均最长,Cu 添加量为 500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对对照组和接菌组白三叶的主根长均随着 Cu 添加量提高而降低,且不同 Cu 添加量土壤中对对照组和接菌组白三叶的主根长差异均不显著。

表 1 根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶株高和主根长的影响 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 1 Effect of rhizobium on height and main root length of *Trifolium repens* Linn. under Cu stress ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

土壤 Cu 添加量/(mg · kg ⁻¹) Cu addition in soil	株高/cm Height		主根长/cm Main root length	
	CK	T	CK	T
0	8.95±0.50Bb	10.66±0.73Ab	17.03±1.78Aa	17.33±2.43Aa
500	12.04±1.07Aa	13.56±1.07Aa	19.61±0.40Aa	21.03±2.50Aa
1 000	9.03±0.65Bb	11.53±0.63Ab	17.22±1.57Aa	18.89±1.05Aa
1 500	6.95±0.41Ac	10.22±0.79Ab	14.73±1.40Aa	16.57±0.41Aa

¹⁾ CK: 对照组(接种灭菌的 2.7×10⁹ CFU · mL⁻¹ *Rhizobium trifolii* ACCC18017 菌悬液) The control group (inoculated with sterilized 2.7×10⁹ CFU · mL⁻¹ *Rhizobium trifolii* ACCC18017 suspension); T: 接菌组(先后接种 2.7×10⁹ 和 2.3×10⁹ CFU · mL⁻¹ *R. trifolii* ACCC18017 菌悬液) Inoculation group (successively inoculated with 2.7×10⁹ and 2.3×10⁹ CFU · mL⁻¹ *R. trifolii* ACCC18017 suspensions). 同行中不同大写字母表示同一指标在对照组和接菌组间差异显著 ($P < 0.05$) Different capitals in the same row indicate the significant ($P < 0.05$) difference in the same index between the control group and inoculation group; 同列中不同小写字母表示同一指标在不同 Cu 添加量土壤间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) difference in the same index among soils with different Cu additions.

2.1.2 对鲜质量和干质量的影响 根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶地上部和地下部的鲜质量和干质量的影响见图 1。由图 1 可以看出:Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的地上部鲜质量均高于对照组,分别较对照组增加了 28.8%、32.1%、29.0% 和 7.2%;其中,Cu 添加量为 0、500 和 1 000 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的地上部鲜质量显著高于对照组。Cu 添加量为 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对对照组和接菌组白三叶的地上部鲜质量显著高于 Cu 添加量为 0 mg · kg⁻¹ 的土壤;Cu 添加量为 500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对对照组和

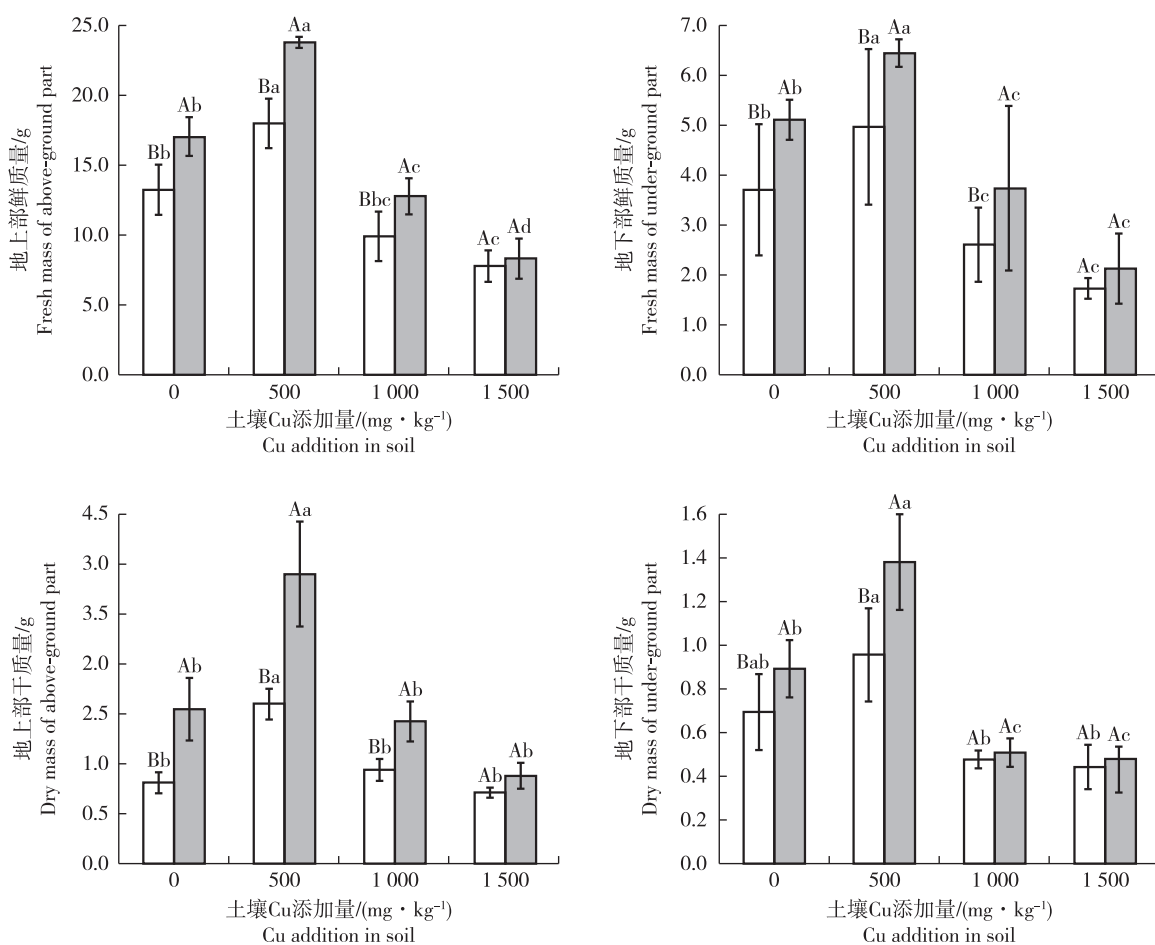
接菌组白三叶的地上部鲜质量随着 Cu 添加量提高而降低,其中,Cu 添加量为 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对对照组和接菌组白三叶的地上部鲜质量显著高于 Cu 添加量为 1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 的土壤,Cu 添加量为 1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对对照组白三叶的地上部鲜质量则低于或显著低于 Cu 添加量为 0 mg · kg⁻¹ 的土壤,而 Cu 添加量为 1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的地上部鲜质量显著低于 Cu 添加量为 0 mg · kg⁻¹ 的土壤。

由图 1 还可以看出:Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的地下部鲜质量

均高于对照组,分别较对照组增加了 37.8%、29.8%、43.5%和 22.8%;其中,Cu 添加量为 0、500 和 1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中接菌组白三叶的地下部鲜质量显著高于对照组。Cu 添加量为 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中对照组和接菌组白三叶的地下部鲜质量显著高于 Cu 添加量为 0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤;Cu 添加量为 500、1 000 和 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中对照组和接菌组白三叶的地下部鲜质量随着 Cu 添加量提高而降低,其中,Cu 添加量为 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中对照组和接菌组白三叶的地下部鲜质量显著高于 Cu 添加量为 1 000 和 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤,Cu 添加量为 1 000 和 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中对照组白三叶的地下部鲜质量显著

低于 Cu 添加量为 0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤,而 Cu 添加量为 1 000 和 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中接菌组白三叶的地下部鲜质量则低于或显著低于 Cu 添加量为 0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤。

由图 1 还可以看出;Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中接菌组白三叶的地上部干质量均高于对照组,分别较对照组增加了 91.3%、81.8%、52.1%和 24.1%;其中,Cu 添加量为 0、500 和 1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中接菌组白三叶的地上部干质量显著高于对照组。Cu 添加量为 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中对照组和接菌组白三叶的地上部干质量显著高于 Cu 添加量为 0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤;Cu 添加量为 500、1 000 和



□: 对照组 (接种灭菌的 $2.7 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Rhizobium trifolii* ACCC18017 菌悬液) The control group (inoculated with sterilized $2.7 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Rhizobium trifolii* ACCC18017 suspension); ■: 接菌组 (先后接种 2.7×10^9 和 $2.3 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *R. trifolii* ACCC18017 菌悬液) Inoculation group (successively inoculated with 2.7×10^9 and $2.3 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *R. trifolii* ACCC18017 suspensions). 不同大写字母表示同一指标在对照组和接菌组间差异显著 ($P < 0.05$) Different capitals indicate the significant ($P < 0.05$) difference in the same index between the control group and inoculation group; 不同小写字母表示同一指标在不同 Cu 添加量土壤间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) difference in the same index among soils with different Cu additions.

图 1 根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶地上部和地下部的鲜质量和干质量的影响

Fig. 1 Effect of rhizobium on fresh and dry masses of above- and under-ground parts of *Trifolium repens* Linn. under Cu stress

1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组和接菌组白三叶的地上部干质量随着 Cu 添加量提高而降低, 其中, Cu 添加量为 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组和接菌组白三叶的地上部干质量显著高于 Cu 添加量为 1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 的土壤, 而 Cu 添加量为 1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组和接菌组的白三叶地上部干质量与 Cu 添加量为 0 mg · kg⁻¹ 的土壤差异不显著。

由图 1 还可以看出: Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的地下部干质量均高于对照组, 分别较对照组增加了 29.0%、44.4%、6.3% 和 8.3%; 其中, Cu 添加量为 0 和 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的地下部干质量显著高于对照组。Cu 添加量为 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组和接菌组白三叶的地下部干质量高于或显著高于 Cu 添加量为 0 mg · kg⁻¹ 的土壤; Cu 添加量为 500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组和接菌组白三叶的地下部干质量随着 Cu 添加量提高而降低, 而 Cu 添加量为 1 000 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组和接菌组白三叶的地下部干质量与 Cu 添加量为 1 500 mg · kg⁻¹ 的土壤差异不显著。

2.1.3 对叶片叶绿素含量的影响 根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶叶片叶绿素含量的影响见表 2。由表 2 可以看出: Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500

mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶叶片的叶绿素 a 含量均高于对照组, 分别较对照组增加了 33.0%、12.7%、4.3% 和 27.4%, 但无显著差异。Cu 添加量为 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组和接菌组白三叶叶片的叶绿素 a 含量最高, Cu 添加量为 500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组和接菌组白三叶叶片的叶绿素 a 含量基本上随着 Cu 添加量提高而降低, 并且, 对照组和接菌组白三叶叶片的叶绿素 a 含量在不同 Cu 添加量土壤中无显著差异。

由表 2 还可以看出: Cu 添加量为 0 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组和接菌组白三叶叶片的叶绿素 b 含量相同; Cu 添加量为 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶叶片的叶绿素 b 含量低于对照组; 而 Cu 添加量为 1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶叶片的叶绿素 b 含量均高于对照组, 分别较对照组增加了 39.3% 和 16.7%。对照组和接菌组白三叶叶片的叶绿素 b 含量随 Cu 添加量提高而波动。不同 Cu 添加量土壤中对对照组和接菌组间白三叶叶片的叶绿素 b 含量差异均不显著。

由表 2 还可以看出: Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500 mg · kg⁻¹ 土壤中对照组和接菌组白三叶叶片的总叶绿素含量和叶绿素 a 含量与叶绿素 b 含量的比值 (Chla/Chlb) 的变化趋势与叶绿素 a 含量变化基本一致, 并且, 不同 Cu 添加量土壤中对对照组和接菌

表 2 根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶叶片叶绿素含量的影响 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 2 Effect of rhizobium on chlorophyll content in leaf of *Trifolium repens* Linn. under Cu stress ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

土壤 Cu 添加量/(mg · kg ⁻¹) Cu addition in soil	叶绿素 a 含量/(mg · kg ⁻¹) Content of chlorophyll a		叶绿素 b 含量/(mg · kg ⁻¹) Content of chlorophyll b	
	CK	T	CK	T
0	1.09±0.08Aa	1.45±0.10Aa	0.27±0.02Aa	0.27±0.05Aa
500	1.42±0.12Aa	1.60±0.09Aa	0.41±0.05Aa	0.38±0.03Aa
1 000	1.38±0.12Aa	1.44±0.12Aa	0.28±0.04Aa	0.39±0.04Aa
1 500	1.13±0.08Aa	1.44±0.11Aa	0.30±0.04Aa	0.35±0.02Aa

土壤 Cu 添加量/(mg · kg ⁻¹) Cu addition in soil	总叶绿素含量/(mg · kg ⁻¹) Content of total chlorophyll		Chla/Chlb	
	CK	T	CK	T
0	1.37±0.10Aa	1.73±0.05Aa	3.68±0.20Aa	3.97±0.12Aa
500	1.67±0.11Aa	1.98±0.09Aa	4.02±0.33Aa	4.26±0.35Aa
1 000	1.67±0.09Aa	1.83±0.12Aa	3.86±0.24Aa	4.18±0.70Aa
1 500	1.43±0.12Aa	1.79±0.10Aa	3.49±0.12Aa	3.75±0.37Aa

¹⁾ CK: 对照组 (接种灭菌的 2.7×10^9 CFU · mL⁻¹ *Rhizobium trifolii* ACCC18017 菌悬液) The control group (inoculated with sterilized 2.7×10^9 CFU · mL⁻¹ *Rhizobium trifolii* ACCC18017 suspension); T: 接菌组 (先后接种 2.7×10^9 和 2.3×10^9 CFU · mL⁻¹ *R. trifolii* ACCC18017 菌悬液) Inoculation group (successively inoculated with 2.7×10^9 and 2.3×10^9 CFU · mL⁻¹ *R. trifolii* ACCC18017 suspensions); Chla/Chlb: 叶绿素 a 含量与叶绿素 b 含量的比值 Ratio of content of chlorophyll a to content of chlorophyll b. 同行中不同大写字母表示同一指标在对照组和接菌组间差异显著 ($P < 0.05$) Different capitals in the same row indicate the significant ($P < 0.05$) difference in the same index between the control group and inoculation group; 同列中不同小写字母表示同一指标在不同 Cu 添加量土壤间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) difference in the same index among soils with different Cu additions.

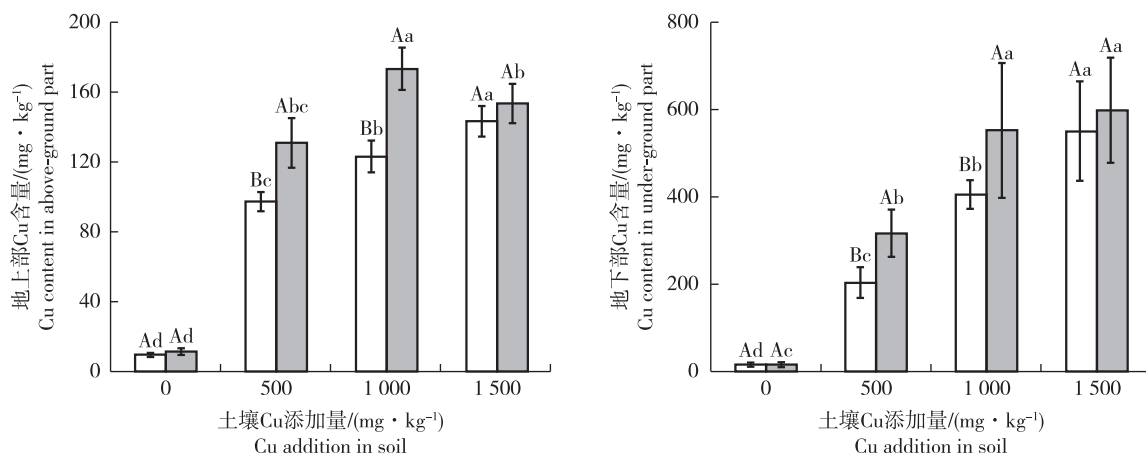
组白三叶叶片的总叶绿素含量和 Chla/Chlb 值差异均不显著。

2.2 根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶 Cu 含量的影响

根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶地上部和地下部 Cu 含量的影响见图 2。由图 2 可以看出: Cu 添加量为 0、500、1 000 和 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中接菌组(先后接种 2.7×10^9 和 2.3×10^9 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *R. trifolii* ACCC18017 菌悬液)白三叶的地上部 Cu 含量均高于对照组(接种灭菌的 2.7×10^9 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *R. trifolii* ACCC18017 菌悬液),分别较对照组增加了 19.9%、34.5%、40.1% 和 7.0%;其中, Cu 添加量为 500 和 1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中接菌组白三叶的地上部 Cu 含量显著($P < 0.05$)高于对照组。对照组白三叶的地上部 Cu 含量随着 Cu 添加量提高而显著升高;接菌组白三叶的地上部 Cu 含量在 Cu 添加量为 0~1 000

$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中随着 Cu 添加量提高而显著升高,在 Cu 添加量为 1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中达到最大值,但在 Cu 添加量为 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中显著降低。

由图 2 还可以看出: Cu 添加量为 500、1 000 和 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中接菌组白三叶的地下部 Cu 含量均高于对照组,分别较对照组增加了 55.4%、36.4% 和 8.5%;其中, Cu 添加量为 500 和 1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中接菌组白三叶的地下部 Cu 含量显著高于对照组。对照组和接菌组白三叶的地下部 Cu 含量基本上随着 Cu 添加量提高而升高; Cu 添加量为 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中对对照组白三叶的地下部 Cu 含量显著高于其他 Cu 添加量土壤,而接菌组白三叶的地下部 Cu 含量显著高于 Cu 添加量为 0 和 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤,但不显著高于 Cu 添加量为 1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤。



□: 对照组(接种灭菌的 2.7×10^9 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Rhizobium trifolii* ACCC18017 菌悬液) The control group (inoculated with sterilized 2.7×10^9 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Rhizobium trifolii* ACCC18017 suspension); ■: 接菌组(先后接种 2.7×10^9 和 2.3×10^9 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *R. trifolii* ACCC18017 菌悬液) Inoculation group (successively inoculated with 2.7×10^9 and 2.3×10^9 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ *R. trifolii* ACCC18017 suspensions). 不同大写字母表示同一指标在对照组和接菌组间差异显著($P < 0.05$) Different capitals indicate the significant ($P < 0.05$) difference in the same index between the control group and inoculation group; 不同小写字母表示同一指标在不同 Cu 添加量土壤间差异显著($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) difference in the same index among soils with different Cu additions.

图 2 根瘤菌对 Cu 胁迫下白三叶地上部和地下部 Cu 含量的影响

Fig. 2 Effect of rhizobium on Cu content in above- and under-ground parts of *Trifolium repens* Linn. under Cu stress

3 讨论和结论

本研究结果显示: Cu 添加量为 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中对对照组白三叶的株高、地上部和地下部的鲜质量及地上部干质量均显著($P < 0.05$)高于 Cu 添加量为 0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤,其主根长和地下部干质量也高于

Cu 添加量为 0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤; Cu 添加量为 1 000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中不接菌白三叶的株高、地上部鲜质量及地上部和地下部干质量与 Cu 添加量为 0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤无显著差异。另外, Cu 添加量为 500、1 000 和 1 500 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤中对对照组白三叶的主根长,叶片的叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量及 Chla/Chlb 值与 Cu 添加量为 0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的土壤无显著差异;对

照组白三叶的地上部和地下部 Cu 含量均随着 Cu 添加量提高而显著升高。说明白三叶对 Cu 胁迫具有较好的耐受性,能够适应一定程度的 Cu 污染土壤环境,因此,可将白三叶作为修复 Cu 污染土壤的备选植物。

相关研究结果^[14-16]表明:适量的 Cu 能够促进植物生长,但当植物体内 Cu 含量过高时,Cu²⁺将替代叶绿素中心的 Mg²⁺,破坏植物的光合作用,干扰植物体内的营养平衡,对植物产生毒害作用。本研究中,Cu 添加量为 500 mg·kg⁻¹ Cu 土壤中对照组白三叶的株高、主根长、地上部和地下部的鲜质量和干质量以及叶片叶绿素含量(包括叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量及 Chla/Chlb 值)均最高,说明在该 Cu 胁迫条件下白三叶生长良好,很可能是 Cu 对白三叶生长起到了一定的促进作用,具体作用机制有待深入研究。

根瘤菌能够通过多种方式促进植物生长,包括通过固氮作用提供植物生长所需的 N、促进植物对 P 及其他营养元素的吸收^[9]、分泌植物激素(如 IAA)和特异性酶及改变土壤理化性质等^[17-18]。本研究中,不同 Cu 添加量土壤中接菌组白三叶的株高、主根长、地上部和地下部的鲜质量和干质量均高于对照组,尤其是 Cu 添加量为 0、500 和 1 000 mg·kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的株高及地上部和地下部的鲜质量和干质量基本上显著高于对照组,说明根瘤菌 *R. trifolii* ACCC18017 能够促进白三叶生长。

植物中的重金属含量是评价植物修复重金属污染土壤能力及其对重金属胁迫耐受性的重要指标。本研究中,Cu 添加量为 500 和 1 000 mg·kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶的地上部和地下部 Cu 含量较对照组显著升高,说明根瘤菌 *R. trifolii* ACCC18017 能够促进 Cu 添加量为 500 和 1 000 mg·kg⁻¹ 土壤中白三叶对 Cu 的吸收。韦革宏等^[19]认为,根瘤菌不但能通过促进共生植物生长、提高共生植物生物量的方式增强植物对重金属污染土壤的修复,还能通过分泌有机酸和酶等改变土壤中重金属元素的生物有效性,促进植物对重金属元素的吸收和累积。植物对土壤中重金属元素的去除率主要取决于体内重金属元素的总量,即植株干质量与重金属含量的乘积^[20]。总体来看,Cu 添加量为 500 和 1 000 mg·kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶地上部和地下部的干质量及 Cu 含量显著高于对照组,并且 Cu 添加量为 500 mg·kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶地上部和地下部的干质量显著高于 Cu 添

加量为 1 000 mg·kg⁻¹ 的土壤,而 Cu 添加量为 500 mg·kg⁻¹ 土壤中接菌组白三叶地上部和地下部的 Cu 含量显著低于 Cu 添加量为 1 000 mg·kg⁻¹ 的土壤,说明根瘤菌 *R. trifolii* ACCC18017 利于白三叶修复一定程度的 Cu 污染土壤。

通常情况下,重金属元素对植物的毒害作用主要表现为植物体内的活性氧和膜脂过氧化物等理化指标的变化^[21-22],而本研究仅对 Cu 胁迫下白三叶的株高、主根长、地上部和地下部的鲜质量和干质量、叶片叶绿素含量及地上部和地下部的 Cu 含量进行了研究,并未研究 Cu 胁迫对白三叶抗氧化系统的影响,因此,本研究结果并不能全面反映白三叶对 Cu 胁迫的响应,有待后续深入研究。此外,本研究土壤中 Cu 添加量的最大值为 1 500 mg·kg⁻¹,远远高于 GB 15618—2018《土壤环境质量农用地土壤污染风险管控标准(试行)》中农用地土壤污染风险 Cu 筛选值的最大值(200 mg·kg⁻¹),因此,本研究模拟的 Cu 污染土壤与实际 Cu 污染土壤差异明显,研究结果在实际 Cu 污染土壤修复中具有局限性。

综上所述,接种根瘤菌 *R. trifolii* ACCC18017 能够促进白三叶生长及其对土壤中 Cu 的吸收,利于白三叶修复一定程度的 Cu 污染土壤。

参考文献:

- [1] 韩玉林. Pb-Cu 复合胁迫对马蔺幼苗生长和生理指标的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(4): 24-30.
- [2] LOLAND J Ø, SINGH B R. Copper contamination of soil and vegetation in coffee orchards after long-term use of Cu fungicides[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2004, 69(3): 203-211.
- [3] WILCKE W, KRETZSCHMAR S, BUNDT M, et al. Depth distribution of aluminum and heavy metals in soils of Costa Rican coffee cultivation areas[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2000, 163(5): 499-502.
- [4] 黄益宗, 郝晓伟, 雷鸣, 等. 重金属污染土壤修复技术及其修复实践[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(3): 409-417.
- [5] 孙雨亮, 黄苏珍, 原海燕. Cu 污染土壤中溪荪和花菖蒲的生长状况及对 Cu 的积累及转运能力[J]. 植物资源与环境学报, 2011, 20(2): 49-55.
- [6] 安 婧, 宫晓双, 魏树和. 重金属污染土壤超积累植物修复关键技术的发展[J]. 生态学杂志, 2015, 34(11): 3261-3270.
- [7] 张杏锋, 夏汉平, 李志安, 等. 牧草对重金属污染土壤的植物修复综述[J]. 生态学杂志, 2009, 28(8): 1640-1646.
- [8] 王友保, 张 莉, 刘登义, 等. 铜陵铜尾矿库植被状况分析[J]. 生态学杂志, 2004, 23(1): 135-139.
- [9] 尹春芹, 孙清斌, 刘先利, 等. 典型草坪植物对铜的积累及其耐性差异研究[J]. 湖北理工学院学报, 2018, 34(2): 8-13.

- [10] 黄兴如, 张彩文, 张晓霞. 根瘤菌在污染土壤修复中的地位和作用[J]. 中国土壤与肥料, 2016(5): 5-10.
- [11] ZAIDI A, KHAN M S, AAMIL M. Bioassociative effect of rhizospheric microorganisms on growth, yield, and nutrient uptake of greengram [J]. Journal of Plant Nutrition, 2004, 27(4): 601-612.
- [12] FAN L M, MA Z Q, LIANG J Q, et al. Characterization of a copper-resistant symbiotic bacterium isolated from *Medicago lupulina* growing in mine tailings [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 703-709.
- [13] 张宪政. 植物叶绿素含量测定: 丙酮乙醇混合液法[J]. 辽宁农业科学, 1986(3): 26-28.
- [14] 张国军, 邱栋梁, 刘星辉. Cu 对植物毒害研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2004, 33(3): 289-294.
- [15] SCHMIDT W, BARTELS M, TITTEL J, et al. Physiological effects of copper on iron acquisition processes in *Plantago* [J]. New Phytologist, 1997, 135(4): 659-666.
- [16] YRUELA I. Copper in plants [J]. Brazilian Journal of Plant Physiology, 2005, 17(1): 145-156.
- [17] WANI P A, KHAN M S, ZAIDI A. Effect of metal-tolerant plant growth-promoting *Rhizobium* on the performance of pea grown in metal-amended soil [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2008, 55(1): 33-42.
- [18] ABRIL A, ZURDO-PIÑEIRO J L, PEIX A, et al. Solubilization of phosphate by a strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii isolated from *Phaseolus vulgaris* in El Chaco Arido soil (Argentina) [M] // VELÁZQUEZ E, RODRIGUEZ-BARRUECO C. Developments in Plant and Soil Sciences: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca: Springer, 2007, 102: 135-138.
- [19] 韦革宏, 马占强. 根瘤菌-豆科植物共生体系在重金属污染环境修复中的地位、应用及潜力[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1421-1430.
- [20] 李文学, 陈同斌, 刘颖茹. 刈割对蜈蚣草的砷吸收和植物修复效率的影响[J]. 生态学报, 2004, 125(3): 538-542.
- [21] SCHÜTZENDÜBEL A, SCHWANZ P, TEICHMANN T, et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots [J]. Plant Physiology, 2001, 127(3): 887-898.
- [22] 许桂芳, 张朝阳. 高温胁迫对4种珍珠菜属植物抗性生理生化指标的影响[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(3): 565-569.

(责任编辑: 佟金凤)

《植物资源与环境学报》启事

为了扩大科技期刊的信息交流、充分实现信息资源共享,《植物资源与环境学报》已先后加入“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据——数字化期刊群”和“中文科技期刊数据库”等网络文献资源数据库,凡在本刊发表的论文将编入数据库供上网交流、查阅及检索,作者的著作权使用费与本刊稿酬一次性给付,不再另付。如作者不同意将文章收编入数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《植物资源与环境学报》编辑部目前仅接受网上投稿,投稿网址为 <http://zwzy.cnbg.net>; 投稿咨询电话: 025-84347014; QQ: 2219161478; E-mail: zwzybjb@163.com。

《植物资源与环境学报》编辑部

2019-02