

曹书苗, 王文科, 王非, 等. 放线菌 Act12 对 Pb 胁迫下黑麦草根系生长及抗性生理的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(10): 1881-1887.  
CAO Shu-miao, WANG Wen-ke, WANG Fei, et al. Effects of actinomycetes Act12 on the root growth and resistant physiology of perennial ryegrass under Pb stress[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(10): 1881-1887.

## 放线菌 Act12 对 Pb 胁迫下黑麦草根系生长及抗性生理的影响

曹书苗<sup>1</sup>, 王文科<sup>1</sup>, 王非<sup>2</sup>, 张军<sup>1</sup>

(1. 长安大学 旱区水文与生态效应教育部重点实验室, 西安 710054; 2. 空军工程大学理学院, 西安 710054)

**摘要:** 采用菌剂接种及盆栽实验, 研究了不同水平 Pb 胁迫条件下放线菌 Act12 对黑麦草根系生长和抗性生理的影响。结果显示, 土壤 Pb 胁迫水平不同, 对黑麦草根系生长和生理特性的影响不同。接入放线菌后, 黑麦草根分蘖和根鲜重较对照增加了 12.3%~44.2% 和 19.2%~94.6%, 对根系生长有显著的促进作用; 接菌后根系过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)活性较对照也有所增加, 尤其在高浓度 Pb 胁迫下(500~1000 mg·kg<sup>-1</sup>)对 3 种酶的促进作用最显著; 接菌显著降低了根系丙二醛(MDA)含量, 显著增加了根系活力。研究表明, Pb 胁迫下, 放线菌 Act12 的接入可增强根系抗氧化酶活性, 降低质膜过氧化损伤, 提高根系活力和根系对 Pb 胁迫的耐受性, 进而显著促进黑麦草根系生长。

**关键词:** Pb 胁迫; 放线菌; 黑麦草; 根系生长; 抗性生理

中图分类号: X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2016)10-1881-07 doi:10.11654/jaes.2016-0302

### Effects of actinomycetes Act12 on the root growth and resistant physiology of perennial ryegrass under Pb stress

CAO Shu-miao<sup>1</sup>, WANG Wen-ke<sup>1</sup>, WANG Fei<sup>2</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Subsurface Hydrology and Ecological Effects in Arid Region (Ministry of Education), Chang'an University, Xi'an 710054, China; 2. College of Science, Air Force Engineering University, Xi'an 710054, China)

**Abstract:** An inoculation pot experiment was conducted to investigate the effects of actinomycetes Act12 on the growth and resistant physiology of perennial ryegrass under Pb stress. Results showed that different levels of Pb stress affected the growth and physiological characteristics of ryegrass roots to various degrees. However, when inoculated with actinomycetes the root tiller number and root fresh weight were increased by 12.3%~44.2% and 19.2%~94.6%, respectively compared to control, indicating that actinomycetes could significantly promote root growth. Actinomycetes-inoculation increased root enzyme activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD) compared to control as well particularly in high level Pb stress (500~1000 mg·kg<sup>-1</sup>). Moreover, actinomycetes-inoculation decreased root malondialdehyde (MDA) content and increased root activity significantly. The study indicates that inoculation with Act12 could increase root antioxidant enzyme activities, reduce peroxidation damage of plasma membrane, improve root activity and Pb tolerance, and thus significantly promote root growth of ryegrass under Pb stress.

**Keywords:** Pb stress; actinomycetes; perennial ryegrass; root growth; resistant physiology

收稿日期: 2016-03-09

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(41230314); 长江学者与中国教育部创新团队项目(IRT0811); 教育部重点实验室和陕西省地下水与生态环境工程中心开放基金(310829151146)

作者简介: 曹书苗(1984—), 女, 在读博士, 主要从事水土污染修复研究。E-mail: shumiaocao@163.com

黑麦草(*Lolium perenne* L.)因生长迅速、生物量大、再生能力强等特点,被认为是适合普遍种植的优质牧草和草坪草。研究报道,黑麦草是一种相对耐重金属的代表植物,可在Pb、Cd、Cu等重金属污染土壤中生长和吸收重金属,并对Pb有一定的富集能力<sup>[1-2]</sup>。因其生物量高且有较强的重金属耐性,被认为是一种很有潜力的重金属修复植物。然而,植物对重金属表现出富集能力的同时,也会引起植物体内一系列生理生化过程的紊乱。研究发现,高浓度Pb可降低黑麦草各项生理指标,如光合色素含量、植物抗性酶活性等<sup>[3-4]</sup>,使其生长受阻,对黑麦草具有很强的毒性效应。因此,研究缓解Pb胁迫对植物毒性效应的方法,促进植物在含Pb土壤中生长,对植物修复效率的提高具有重要意义。

目前,利用有益菌来提高植物的耐Pb特性已有相关报道。扁豆根部接种4种耐Pb细菌可提高植物在Pb胁迫下叶片的3种抗氧化酶(CAT、SOD和POD)活性,促进植物生长<sup>[5]</sup>;含Pb土壤种植的水稻接种一株内生真菌(EF0801),可增强Pb胁迫下叶片的抗氧化酶活性,降低Pb胁迫产生的丙二醛的含量,缓解Pb胁迫对植物的伤害<sup>[6]</sup>。然而,关于利用放线菌增强植物在Pb胁迫下的耐受性的研究很少,尤其对黑麦草在Pb污染土壤中的抗性生理罕有报道。而放线菌是土壤中三大类微生物之一,是抗生素的主要产生菌,其中密旋链霉菌具有促进植物根系发育、抗病促生等多种功能<sup>[7-8]</sup>。

本文以耐Pb性植物黑麦草为研究对象,采用盆栽试验,探索不同水平Pb胁迫下,一株放线菌对黑麦草根生长和根系抗性生理的影响。通过测定在不同Pb胁迫下的根系生长情况,分析根系抗氧化酶活性、丙二醛含量和根系活力,阐明放线菌提高植物对Pb的耐受性机理,从而为提高植物修复Pb污染的效率提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试放线菌为一株密旋链霉菌(*Streptomyces pactum*, Act12),是由西北农林科技大学微生物资源研究室从青藏高原、黄土高原土壤极端生境下的近万株微生物中分离筛选而来,该放线菌具有防病、促生、抗旱等多种功能<sup>[8]</sup>。将该菌通过固态发酵制成菌粉,用于本研究的盆栽试验,其活菌数量为 $4.6 \times 10^{10}$  CFU·g<sup>-1</sup>。

黑麦草种子千粒重2.2 g,出苗率90%,在种植前先用0.5% NaClO室温下消毒10 min,再用蒸馏水冲洗后,均匀种植在花盆中,种子覆土约1 cm厚。

供试土壤采自长安区农田表层30 cm土壤,农田当季作物为小麦,风干后过5 mm尼龙筛备用。参照鲍士旦<sup>[9]</sup>的方法测定土壤基本理化性状,详见表1<sup>[10]</sup>。

表1 土壤基本理化性状

Table 1 The basic physico-chemical properties of soil

| 指标 Properties                         | 数值 Values  |
|---------------------------------------|------------|
| pH                                    | 6.77±0.35  |
| 总氮 Total N/g·kg <sup>-1</sup>         | 1.27±0.10  |
| 总磷 Total P/g·kg <sup>-1</sup>         | 0.49±0.01  |
| 总钾 Total K/g·kg <sup>-1</sup>         | 0.24±0.01  |
| 有机质 Organic matter/g·kg <sup>-1</sup> | 14.57±0.95 |
| Pb/mg·kg <sup>-1</sup>                | 85.62±7.23 |
| Cd/mg·kg <sup>-1</sup>                | 0.33±0.03  |
| 含水率 Water content/%                   | 20.56±1.23 |

### 1.2 试验装置

选用直径23 cm、高度21 cm的塑料花盆,为防止花盆底部小孔漏水,装土前盆内套两层塑料薄膜。每盆装土3 kg(风干土),土层填充高度约19 cm。

### 1.3 试验设计

试验设2个处理:不接菌对照(CK)、菌剂接种。根据中国土壤Pb含量及分布情况、中国土壤环境质量标准(GB 15618—1995),并结合黑麦草对修复Pb污染的相关文献,每个处理设5个Pb胁迫浓度梯度,分别为0、200、300、500、1000 mg·kg<sup>-1</sup>,每个浓度水平设置3个重复。用硝酸铅[Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]配制10 g·L<sup>-1</sup>的Pb原液,分别向5个大烧杯中加入0、360、540、900、1800 mL的Pb原液,补充蒸馏水至3600 mL。然后将烧杯中的Pb溶液分别均匀喷洒在5堆风干土壤中(每堆土重18 kg),搅拌均匀,使土壤与Pb溶液充分混匀(预试验中3600 mL的溶液加入18 kg风干土中,土壤湿度约为20%,接近田间土壤含水率),即得到实验设计所需的5堆Pb浓度梯度的土壤。用塑料薄膜密封,置于黑暗处保存3个月,使金属与土壤平衡稳定。装盆前将土样风干,每个Pb浓度土样等分成两份,不接菌对照按试验设计称重装盆,每盆装土3 kg;接菌处理5个Pb胁迫水平土样中,分别按1.5 g·kg<sup>-1</sup>干土的量加入菌剂,使菌剂与土样充分混匀后称重装盆。

黑麦草种子每盆种50粒,出苗后每盆统一保留

15 株。试验在日光温室进行,温度控制在 22~25 ℃,每天夜间浇水一次(用称重法计算水分差),保持土壤湿度约为 20%,观察记录生长情况,60 d 后将地上部分和根系分开收获。植物根系先用自来水反复冲洗干净后,再用去离子水冲洗 3 遍,最后用吸水纸吸干根系表面的游离水,称总重。根鲜样保存在液氮中用于测定根系生理生化指标。

#### 1.4 测试指标和方法

**超氧化物歧化酶(SOD)活性:**参照 Marklund 等<sup>[11]</sup>的方法,由抑制氮蓝四唑(NBT)在光下的还原作用来确定,一个酶活单位以抑制 NBT 光还原的 50% 表示。

**过氧化氢酶(CAT)活性:**根据测量 240 nm 下吸光率的变化速度来反映过氧化氢分解,以 1 min 内减少 0.1 的酶量为 1 个酶活单位<sup>[12]</sup>。

**过氧化物酶(POD)活性:**按照 Polle 等<sup>[13]</sup>的方法测定。

**丙二醛(MDA)含量:**利用硫代巴比妥酸(TBA)在酸性条件下加热与组织中的丙二醛发生显色反应,生成红棕色的三甲川,分别在 532、600、450 nm 波长处测定其吸光度,计算出丙二醛的含量<sup>[12]</sup>。

**根系活力:**称取根尖样品 0.5 g,加入 0.4% TTC 溶液和磷酸缓冲液,37 ℃暗保温约 2 h,加 1 mol·L<sup>-1</sup> 硫酸停止反应,将根取出,吸干水分后加 4 mL 乙酸乙酯

研磨,提取液在 485 nm 测定吸光度,求出 TTC 还原量,用四氮唑还原强度表示根系活力<sup>[14]</sup>。

#### 1.5 数据处理

相对增率( $\Delta_{\text{ctrl}}\%$ )是表示接菌处理与不接菌对照的差值占不接菌对照比值的百分数。

数据统计分析采用 SPSS20.0(IBM, USA)软件,用 Duncan 法做差异显著性检验,在  $P < 0.05$  水平(表示差异达显著性水平)下进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 Pb 胁迫下放线菌对黑麦草根系生长的影响

由表 2 可知,随着土壤 Pb 胁迫水平的升高,对照和接菌处理黑麦草根分蘖数和根鲜重均呈先增加后降低的趋势,在 Pb 含量为 300~500 mg·kg<sup>-1</sup> 时测定值最大。然而不同 Pb 胁迫水平下,土壤接入放线菌后,黑麦草根分蘖和根鲜重较对照分别增加了 12.3%~44.2% 和 19.2%~94.6%,其中根分蘖数在土壤 Pb 加入量为 200 mg·kg<sup>-1</sup> 时增率最大,根鲜重在土壤 Pb 加入量为 300 mg·kg<sup>-1</sup> 时增率达最大。方差分析结果显示,放线菌 Act12、Pb 处理及其交互作用对黑麦草分蘖和根鲜重都有显著性影响,根分蘖除了 500 mg·kg<sup>-1</sup> 处理,其他 Pb 胁迫水平处理加菌均显著高于对照,根鲜重不同 Pb 胁迫下接菌均显著高于对照( $P < 0.05$ )。这表明不同 Pb 胁迫下,土壤接入放线菌 Act12 增加了

表 2 Pb 胁迫下放线菌对黑麦草根系生长的影响

Table 2 Effects of inoculation with actinomycetes on root growth of ryegrass under Pb stress

| Pb/mg·kg <sup>-1</sup>           | 处理 Treatment   | 分蘖 Tiller/plant <sup>-1</sup> | $\Delta\text{CK}/\%$ | 鲜重 Fresh weight/g·pot <sup>-1</sup> | $\Delta\text{CK}/\%$ |
|----------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|
| 0                                | 对照 Control     | 2.0±0.1a                      | 33.3*                | 45.36±1.98a                         | 53.1*                |
|                                  | 接菌 Inoculation | 2.7±0.1a                      |                      | 69.43±1.76a                         |                      |
| 200                              | 对照 Control     | 2.1±0.1ab                     | 44.2*                | 47.38±1.54a                         | 61.9*                |
|                                  | 接菌 Inoculation | 3.1±0.2b                      |                      | 76.74±1.88b                         |                      |
| 300                              | 对照 Control     | 2.6±0.1c                      | 42.4*                | 63.40±1.28c                         | 94.6*                |
|                                  | 接菌 Inoculation | 3.7±0.2c                      |                      | 123.39±1.69e                        |                      |
| 500                              | 对照 Control     | 3.0±0.2d                      | 12.3                 | 73.45±1.49d                         | 19.2*                |
|                                  | 接菌 Inoculation | 3.4±0.2bc                     |                      | 109.57±2.22d                        |                      |
| 1000                             | 对照 Control     | 2.3±0.1b                      | 40.1*                | 53.74±1.83b                         | 52.6*                |
|                                  | 接菌 Inoculation | 3.2±0.3b                      |                      | 82.03±2.09c                         |                      |
| Pb(df=4)                         |                | s                             | —                    | s                                   | —                    |
| 接种处理 Inoculation treatment(df=1) |                | s                             |                      | s                                   |                      |
| 交互作用 Interaction(df=4)           |                | s                             |                      | s                                   |                      |

注:\*表示同一 Pb 水平下接菌值与对照值差异显著( $P < 0.05$ ),不同的小写字母表示对照或接菌处理下不同浓度间的值有显著性差异( $P < 0.05$ );df 表示自由度,s 表示主效应和交互效应有显著性差异( $P < 0.05$ )。下同。

Note:\*Denotes significant difference between Act12 inoculation and uninoculated control within the same soil Pb treatments ( $P < 0.05$ ),different lower-case letters indicate significant difference of Act12 inoculation or uninoculated control between different soil Pb treatments ( $P < 0.05$ ). df denotes degree of freedom,s means significant main and interactive effects at( $P < 0.05$ ). The same below.

黑麦草根分蘖和根鲜重,对根系生长有显著的促进作用。

## 2.2 Pb胁迫下放线菌对黑麦草根系抗氧化酶活性的影响

由表3可知,对照和加菌处理下,黑麦草根系抗氧化酶CAT和POD的活性随Pb胁迫水平的升高而呈降低趋势,而SOD的活性呈先升高后降低的趋势。但土壤接入放线菌Act12后,在不同的Pb胁迫下3种抗氧化酶活性较对照都有一定程度的增加,CAT增加了13.0%~49.1%,SOD增加了14.6%~61.3%,POD增加了11.6%~50.6%;在土壤Pb加入量为500 mg·kg<sup>-1</sup>和1000 mg·kg<sup>-1</sup>时,3种抗氧化酶活性的增加均

达显著性水平( $P<0.05$ )。方差分析显示,放线菌Act12、Pb处理及其交互作用对黑麦草根系3种抗氧化酶活性都有显著性影响( $P<0.05$ ),表明根系抗氧化酶活性的变化与Pb胁迫水平有关,Pb胁迫增大可降低部分抗氧化酶活性。然而,放线菌Act12加入土壤后,不同程度地增强了抗氧化酶活性,特别是在高浓度Pb胁迫下,放线菌Act12对抗氧化酶活性作用明显,对缓解胁迫带来的氧化伤害非常重要。

## 2.3 Pb胁迫下放线菌对黑麦草根系MDA含量和根系活力的影响

由表4可知,放线菌Act12、Pb处理及其交互作用对黑麦草根系MDA含量和根系活力都有显著性

表3 Pb胁迫下放线菌对黑麦草根系抗氧化酶活性的影响

Table 3 Effects of inoculation with actinomyces on antioxidant enzyme activities of ryegrass root under Pb stress

| Pb/mg·kg <sup>-1</sup>           | 处理 Treatment   | CAT/U·g <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> | ΔCK/% | SOD/U·g <sup>-1</sup> | ΔCK/% | POD/U·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> | ΔCK/% |
|----------------------------------|----------------|--|-------|-----------------------|-------|---|-------|
| 0                                | 对照 Control     | 0.221±0.021c                             | 23.0  | 49.82±3.08ab          | 14.6  | 68.03±4.81d                               | 17.3* |
|                                  | 接菌 Inoculation | 0.271±0.028c                             |       | 57.08±3.71a           |       | 79.77±4.76d                               |       |
| 200                              | 对照 Control     | 0.208±0.016bc                            | 13.0  | 57.37±5.19bc          | 23.8* | 63.11±3.32d                               | 11.6  |
|                                  | 接菌 Inoculation | 0.236±0.030bc                            |       | 71.00±6.89b           |       | 70.41±4.06c                               |       |
| 300                              | 对照 Control     | 0.189±0.016b                             | 17.1  | 65.01±5.96c           | 16.3  | 50.73±3.46c                               | 27.6* |
|                                  | 接菌 Inoculation | 0.222±0.023ab                            |       | 75.61±6.11b           |       | 64.72±3.79bc                              |       |
| 500                              | 对照 Control     | 0.134±0.011a                             | 42.9* | 80.82±6.56d           | 33.9* | 38.93±2.89b                               | 50.6* |
|                                  | 接菌 Inoculation | 0.191±0.016ab                            |       | 108.24±8.01c          |       | 58.65±3.94b                               |       |
| 1000                             | 对照 Control     | 0.120±0.016a                             | 49.1* | 43.92±3.43a           | 61.3* | 32.12±2.14a                               | 44.3* |
|                                  | 接菌 Inoculation | 0.178±0.022a*                            |       | 70.82±5.64b           |       | 46.33±2.95a                               |       |
| Pb(df=4)                         |                | s  | —     | s                     | —     | s   | —     |
| 接种处理 Inoculation treatment(df=1) |                | s  |       | s                     |       | s   |       |
| 交互作用 Interaction(df=4)           |                | s  |       | s                     |       | s   |       |

表4 Pb胁迫下放线菌对黑麦草根系MDA含量和活力的影响

Table 4 Effects of inoculation with actinomyces on root MDA content and activity of ryegrass under Pb stress

| Pb/mg·kg <sup>-1</sup>           | 处理 Treatment   | MAD/μmol·g <sup>-1</sup> | ΔCK/%  | 根系活力 Root activity/μg·g <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> | ΔCK/%  |
|----------------------------------|----------------|--------------------------|--------|--|--------|
| 0                                | 对照 Control     | 3.19±0.21a               | -35.3* | 51.02±2.39b  | 116.1* |
|                                  | 接菌 Inoculation | 2.01±0.18a               |        | 110.24±6.22c   |        |
| 200                              | 对照 Control     | 3.50±0.24a               | -28.1* | 61.02±2.64c  | 166.8* |
|                                  | 接菌 Inoculation | 2.51±0.20b               |        | 162.79±7.88e   |        |
| 300                              | 对照 Control     | 4.29±0.28b               | -19.2* | 92.01±3.52e  | 44.0*  |
|                                  | 接菌 Inoculation | 3.47±0.26c               |        | 132.45±6.50d   |        |
| 500                              | 对照 Control     | 5.15±0.43c               | -32.7* | 71.34±3.17d  | 30.9*  |
|                                  | 接菌 Inoculation | 3.46±0.51c               |        | 93.39±4.33b  |        |
| 1000                             | 对照 Control     | 6.59±0.61d               | -20.9* | 48.90±3.55a  | 43.1*  |
|                                  | 接菌 Inoculation | 5.21±0.55d               |        | 70.00±4.04a  |        |
| Pb(df=4)                         |                | s                        | —      | s  | —      |
| 接种处理 Inoculation treatment(df=1) |                | s                        |        | s  |        |
| 交互作用 Interaction(df=4)           |                | s                        |        | s  |        |

影响( $P<0.05$ )。随着 Pb 胁迫水平的升高,对照和接菌处理黑麦草根系中 MDA 含量均呈增加的趋势。与对照相比,接菌显著降低了根系 MDA 含量,降幅达 19.2%~35.3% ( $P<0.05$ )。说明了 Pb 胁迫能引起细胞脂质过氧化,胁迫程度越大,脂质过氧化产生的 MDA 量越大,而土壤加入放线菌 Act12 能极大地降低这种脂质过氧化作用。

由表 4 可知,对照处理黑麦草根系活力在低水平 Pb 胁迫下呈增加趋势,在高水平 Pb 胁迫下降低,300  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Pb 胁迫时根系活力达最大;接菌处理也呈类似的变化趋势,但在 200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Pb 胁迫下达最大值。与对照相比,接菌显著增加了黑麦草根系活力( $P<0.05$ ),增幅达 30.9%~166.8%,且在 Pb 加入量为 200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  时增幅最大。说明了根系活力受 Pb 胁迫程度的影响很大,低水平 Pb 胁迫能刺激根系生长,但超过根系的耐受性后生长受阻,而放线菌 Act12 加入土壤后,对提高根系活力有积极的作用。

### 3 讨论

Pb 是植物生长的非必需元素,与根系作用直接影响植物的生长和生理状态。研究发现 Pb 易于在黑麦草根部分吸收和积累,根中 Pb 浓度和积累均大于地上部<sup>[2]</sup>。因此,Pb 对黑麦草根系的胁迫强度大于地上部,研究 Pb 胁迫下根系的生长和抗性生理具有重要意义。已有研究表明,低浓度 Pb( $<500 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )对黑麦草生长有促进作用,高浓度时有显著的抑制作用<sup>[3]</sup>,与本研究结果一致。这可能与黑麦草对 Pb 胁迫的耐受性有关。

Pb 胁迫下土壤接入放线菌 Act12 后,促进了黑麦草根的分蘖,显著增加了根鲜重,对根系生长表现出明显的促进作用。这可能与该菌首先具有较强的 Pb 耐受性,能在含 Pb 土壤中良好繁殖有关;其次,放线菌在繁殖时,可能会产生如抗生素、有机酸、氨基酸、维生素、酶等代谢产物,分枝状的菌丝体能够产生各种胞外水解酶<sup>[8]</sup>,这些物质本身可刺激植物根系发育及养分吸收。此外,放线菌 Act12 可调整植物根域土壤微生态平衡,抑制有害微生物的生长,促进有益微生物的繁殖,改善微生物区系<sup>[7,15]</sup>。以往的研究中放线菌 Act12 对多种作物如甜瓜、黄瓜等均表现出良好的促生效果<sup>[8,14]</sup>,进一步证实 Act12 可能是一种广谱的促生菌。然而,在 Pb 胁迫下放线菌 Act12 对黑麦草生长的影响没有报道,我们将进一步深入研究该菌在 Pb 胁迫下的促生理理。

植物抗氧化酶(POD、SOD、CAT)能够维持自由基在植物体内产生和清除的动态平衡,它们是维持和提高植物耐重金属胁迫的物质基础之一,SOD 可以将有活性和有毒性的超氧自由基转化成  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,随后  $\text{H}_2\text{O}_2$  可被 CAT 和 POD 转化为  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$  而清除<sup>[16-17]</sup>。本研究中黑麦草 CAT 和 POD 活性随着 Pb 胁迫水平增加而降低,而 SOD 活性呈先增加后降低。这表明 CAT 和 POD 活性受到 Pb 胁迫的抑制,其活性降低主要由 Pb 胁迫增强引起,这种抑制作用导致了黑麦草体内受 Pb 胁迫产生超氧自由基的积累。在低浓度 Pb( $<500 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )胁迫下,黑麦草的抗氧化系统可产生适应性诱导反应,Pb 能激活 SOD 活性和促使 SOD 活性快速升高,以减缓或消除 Pb 污染引起的氧化胁迫,使黑麦草对铅胁迫产生了一定的耐受性;然而当 Pb 胁迫强度增加,Pb 在黑麦草体内的积累超过一定量时,细胞内的抗氧化防御系统就遭到了破坏,SOD 活性降低,其防御功能也会下降。这与刘慧芹等<sup>[18]</sup>对黑麦草,刘碧英等<sup>[19]</sup>对沿阶草受到铅胁迫后 SOD 活性变化的研究结果一致。

土壤加入放线菌后提高了 Pb 胁迫下黑麦草体内 3 种抗氧化酶活性,尤其是在高浓度 Pb 胁迫下(500~1000  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),放线菌的增强作用显著。其可能的作用机理是:放线菌的代谢产物含有有机酸、氨基酸等小分子化合物,能以与根系中游离态的 Pb 形成螯合物的方式解毒<sup>[20]</sup>,或者放线菌的加入促进了 Pb 从黑麦草根系向地上部转移,来缓解 Pb 胁迫对根系的毒害作用,因此 CAT 和 POD 活性受 Pb 胁迫的抑制程度降低;此外,放线菌在促进黑麦草在 Pb 污染土中生长时,也可能提高了黑麦草自身对 Pb 的耐受性,增强了抗氧化酶系统,使 3 种抗氧化酶活性均提高。Li 等<sup>[6]</sup>对水稻接种内生真菌(EF0801),Jebara 等<sup>[21]</sup>对扁豆(*Lens culinaris*)联合接种 3 种细菌,在 Pb 污染土壤中,提高了植物体内 3 种抗氧化酶活性,与本研究结果一致。而阎岩等<sup>[22]</sup>报道,4%的 Act12 可显著提高丹参毛状根中活性氧的含量,对丹参毛状根生物量产生抑制作用,与本研究中 Act12 对黑麦草的作用结果相反。这可能与植物的种类和根际土壤环境有关。本研究 Act12 的加入促进了黑麦草根系生长,而黑麦草根系在 Pb 的刺激下有机酸的分泌量增加<sup>[23]</sup>,这种弱酸性环境能缓解 Pb 胁迫下活性氧的积累;而丹参受 Act12 刺激,培养基中 pH 上升,表现为细胞外碱化,进而引起了细胞内活性氧的积累,这种积累诱导了丹参酮的合成。

本研究中,Pb胁迫水平越高,黑麦草根系中MDA积累越多。MDA是质膜过氧化损伤的产物,是反映逆境胁迫下细胞膜受伤害程度的一个重要指标,其含量的高低可反映出细胞质膜过氧化的水平,重金属离子浓度越高,MDA积累越多,对植物毒害效应越强<sup>[24]</sup>。放线菌加入缓解了植株膜脂过氧化,可能是因为放线菌增强了黑麦草根系抗氧化系统,对Pb胁迫产生的自由基的清除能力增强,中断了自由基链式反应,降低了细胞质膜氧化损伤。

植物根系是活跃的吸收器官和合成器官,根系活力是根系生理的主要指标之一,直接影响地上部的生长和营养状况及产量水平。本研究中,低水平Pb( $<500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )胁迫对黑麦草根系有刺激作用,高水平Pb( $1000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )胁迫下根系活力降低。放线菌Act12加入土壤对提高根系活力有显著的作用。这可能与放线菌既能促进根系养分吸收,又能改善根际环境有关,如调整根域微生态环境<sup>[7]</sup>;另外,与根系抗氧化系统的增强和MDA积累降低直接相关。已有研究表明,根系活力的增加对根系生长和提高根系对Pb的吸收能力具有重要的贡献<sup>[25]</sup>。

#### 4 结论

(1)随着土壤Pb胁迫水平的升高,黑麦草根分蘖数和根鲜重呈先增加后降低的趋势,而土壤接入放线菌Act12后,增加了黑麦草根分蘖和根鲜重,对根系生长有显著的促进作用。

(2)黑麦草根系抗氧化酶CAT和POD的活性随Pb胁迫水平的升高而呈降低趋势,而SOD活性在低水平Pb胁迫的增加可能是植物应对胁迫自身的应答机制。但土壤接入放线菌Act12后,通过提高抗氧化酶活性,清除了Pb胁迫所产生氧自由基,增强根系耐受性。

(3)随着Pb胁迫水平的升高,黑麦草根系中MDA积累增加,放线菌Act12接入显著降低了MDA含量。放线菌接入提高了根系活力,是放线菌接入引起根系抗性生理增强的综合体现。

#### 参考文献:

- [1] Bidar G, Pruvot C, Garçon G, et al. Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2009, 16(1):42-53.
- [2] Lou Y, Luo H, Hu T, et al. Toxic effects, uptake, and translocation of Cd and Pb in perennial ryegrass[J]. *Ecotoxicology*, 2013, 22(2):207-214.
- [3] 姚 娟, 王友保, 李文良, 等. 黑麦草对土壤中Pb的富集作用及耐

受性研究[J]. 水土保持通报, 2008, 28(2):17-21.

- YAO Jing, WANG You-bao, LI Wen-liang, et al. A study on Pb accumulation and tolerance of *Lolium perenne* L. in soil[J]. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2008, 28(2):17-21.
- [4] 沈高峰. 模拟酸雨和Pb复合胁迫对2种草坪草生长及抗氧化生理的影响[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(22):11283-11286.
- SHEN Gao-feng. Effects of simulated acid rain and Pb combined stress on growth and antioxidative physiology of two kinds of turf grass[J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2012, 40(22):11283-11286.
- [5] Jebara S H, Saadani O, Fatnassi I C, et al. Inoculation of *Lens culinaris* with Pb-resistant bacteria shows potential for phytostabilization[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(4):2537-2545.
- [6] Li X, Bu N, Li Y, et al. Growth, photosynthesis and antioxidant responses of endophyte infected and non-infected rice under lead stress conditions[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 213/214:55-61.
- [7] 张鸿雁, 薛泉宏, 申光辉, 等. 放线菌制剂对人参生长及根域土壤微生物区系的影响[J]. 应用生态学报, 2013, 24(8):2287-2293.
- ZHANG Hong-yan, XUE Quan-hong, SHEN Guang-hui, et al. Effects of actinomycetes agent on ginseng growth and rhizosphere soil microflora[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(8):2287-2293.
- [8] Zhao J, Xue Q H, Shen G H, et al. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biocontrol of gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) and growth promotion of *Cucumis melo* L.[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2012, 22(1):23-37.
- [9] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- BAO Shi-dan. Soil agro-chemical analysis[M]. Beijing: Agriculture Press, 2000.
- [10] 曹书苗, 王文科, 王 非, 等. 放线菌对干旱胁迫下黑麦草生长及抗氧化特性的影响[J]. 西北植物学报, 2016, 36(4):751-756.
- CAO Shu-miao, WANG Wen-ke, WANG Fei, et al. Effects of actinomycetes on the growth and antioxidative characteristics of perennial ryegrass under drought stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, 36(4):751-756.
- [11] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47(3):469-474.
- [12] Li Y, Zhang S, Jiang W, et al. Cadmium accumulation, activities of antioxidant enzymes, and malondialdehyde(MDA) content in *Pistia stratiotes* L.[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(2):1117-1123.
- [13] Polle A, Otter T, Seifert F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce(*Picea abies* L. )[J]. *Plant Physiology*, 1994, 106(1):53-60.
- [14] 段春梅, 薛泉宏, 赵 娟, 等. 放线菌剂对黄瓜幼苗生长及叶片PPO活性的影响[J]. 西北农业学报, 2010, 19(9):48-54.
- DUAN Chun-mei, XUE Quan-hong, ZHAO Juan, et al. Effects of antimicrobial actinomycetes on growth and PPO activity in cucumber[J]. *Acta Agriculture Boreali-occidentalis Sinica*, 2010, 19(9):48-54.
- [15] 何 斐, 张忠良, 崔 鸣, 等. 生防放线菌剂对魔芋根域微生物区系的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(2):221-227.

- HE Fei, ZHANG Zhong-liang, CUI Ming, et al. Effect of biocontrol actinomycetes agents on microflora in the root-zone of *Amorphophallus konjac* K. Koch ex N. E. Br[J]. *Chinese Journal of Environmental Biology*, 2015, 21(2):221-227.
- [16] 尹永强, 胡建斌, 邓明军. 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1):105-110.  
YIN Yong-qiang, HU Jian-bin, DENG Ming-jun. Latest development of antioxidant system and responses to stress in plant leaves[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(1):105-110.
- [17] Duman F, Kar M. Evaluation of effects of exposure conditions on the biological responses of *Gammarus pulex* exposed to cadmium[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2015, 12(2):437-444.
- [18] 刘慧芹, 韩巨才, 刘慧平, 等. 铅梯度胁迫对多年生黑麦草幼苗生理生化特性影响[J]. 草业学报, 2012, 21(6):57-63.  
LIU Hui-qin, HAN Ju-cai, LIU Hui-ping, et al. Influence of lead gradient stress on the physiological and biochemical characteristics of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) seedlings[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2012, 21(6):57-63.
- [19] 刘碧英, 潘远智, 赵杨迪. 沿阶草不同叶片对土壤铅胁迫的生理生化响应[J]. 草业学报, 2011, 20(4):123-128.  
LIU Bi-ying, PAN Yuan-zhi, ZHAO Yang-di. Physiology & biochemical responses of different leaves of *Ophiopogon bodinieri* to soil lead stress[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2011, 20(4):123-128.
- [20] Hall J L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(366):1-11.
- [21] Jebara S H, Saadani O, Fatnassi I C, et al. Inoculation of *Lens culinaris* with Pb-resistant bacteria shows potential for phytostabilization[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(4):2537-2545.
- [22] 阎岩, 赵欣, 张顺仓, 等. 活性氧在密旋链霉菌 Act12 诱导丹参毛状根中丹参酮积累中的作用[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11):1985-1991.  
YAN Yan, ZHAO Xin, ZHANG Shun-cang, et al. Roles of reactive oxygen species in *Streptomyces pactum* Act12-induced tanshinone production in salvia miltirrhiza hairy roots[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39(11):1985-1991.
- [23] 乔冬梅, 庞鸿宾, 齐学斌, 等. 黑麦草分泌有机酸的生物特性对铅污染修复的影响[J]. 农业工程学报, 2011, 27(12):195-199.  
QIAO Dong-mei, PANG Hong-bin, QI Xue-bin, et al. Effect of biological nature of organic acid exudation from ryegrass on phytoremediation of lead pollution[J]. *Transactions of the CSAE*, 2011, 27(12):195-199.
- [24] Li Y, Zhang S, Jiang W, et al. Cadmium accumulation, activities of antioxidant enzymes, and malondialdehyde(MDA) content in *Pistia stratiotes* L. [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(2):1117-1123.
- [25] Islam E, Yang X, Li T, et al. Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 147(3):806-816.