

文章编号: 1001-7380(2020)02-0035-05

铅胁迫下柳树 4 个无性系生长和生理特性的变化

黄瑞芳^{1,2}, 张 忠³, 曹 瑶³, 教忠意^{1,2}, 施士争^{1,2*}

(1. 江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153; 2. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014;
3. 沭阳县生产力促进中心, 江苏 沭阳 223600)

摘要: 该研究以 4 个灌木柳树无性系为试验材料, 采用水培法进行铅胁迫处理[0, 20, 40, 80 mg/L Pb(NO₃)₂], 测定其生物量及部分生理指标的变化, 以明确不同无性系用于铅修复的潜力。结果显示: 4 个灌木柳树的变化整体趋势一致。随着铅质量浓度的升高, 各柳树无性系的生物量呈下降趋势, SOD 酶活性呈增加趋势, POD 酶活性呈先增加后降低的趋势, MDA 含量呈增加趋势, 可溶性蛋白含量呈降低趋势。采用主成分分析法和加权隶属函数法进行分析, 得出 4 个无性系耐铅能力强弱的顺序为 P336>P63>P1024>P61。

关键词: 铅; 胁迫; 柳树; 无性系; 生理特性

中图分类号: Q945.78; S792.12; X173

文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1001-7380.2020.02.007

Growth and physiological traits of four *Salix* clones under lead stress

Huang Ruifang^{1,2}, Zhang Zhong³, Cao Yao³, Jiao Zhongyi^{1,2}, Shi Shizheng^{1,2*}

(1. Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China;
2. The Jiangsu Provincial Infrastructure for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China;
3. Productivity Center of Shuyang County, Shuyang 223600, China)

Abstract: Four shrub willow clones by hydroponics were selected to study the physiological change under different Pb stress [0, 20, 40 and 80 mg/L Pb(NO₃)₂]. The change in biomass and other physiological indexes were used to determine the potential of different clones for Pb restoration. The results showed almost consistent in the rule of physiological change overall trend of the four clones. With the increase of Pb concentration, the biomass of all willow clones decreased, SOD enzyme activity increased, POD enzyme activity increased first and then decreased, MDA content increased, and soluble protein content decreased. By principal component analysis and weighted membership function analysis, it was concluded that the capacity of Pb endurance of the four clones was ranked as P336>P63>P1024>P61.

Key words: Pb; Stress; *Salix* sp.; Clone; Physiological trait

蓄电池的制造以及其他涉铅工矿企业的发展, 由于工艺、设备落后, 管理不善等原因, 造成了较重的铅污染。而铅污染不能被生物代谢所分解, 在环境中滞留的时间较长, 积累到一定程度就会对植物造成毒害, 且能通过食物链在动物和人体内富集, 对人体的肾脏、血液、神经系统等危害极大^[1-2]。近年来, 越来越多的研究用近超积累植物或速生、生物量大的植物来进行铅污染的修复。柳树, 尤其是

灌木柳, 其根系发达, 适应性强, 耐水湿, 生物量大, 生长速度快, 用作生物能源, 不直接与食物链相联系。与草本相比, 因其高积累性而金属污染修复能力强^[3], 有研究甚至认为柳树是重金属的超积累植物^[4-5]。因此柳树是土壤污染生物修复的理想材料^[6], 适合用于修复低、中浓度重金属污染^[7]。

植物的生长和各生理指标的变化是植物在受到铅胁迫时的自我防御机制, 是判断其植物对铅胁迫耐

收稿日期: 2020-02-27; 修回日期: 2020-02-28

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目“灌木柳树修复铅污染土壤的专用品种选育”[CX(19)3044]; 江苏省林业科技创新与推广项目“抗逆速生灌木柳新品种区域性试验与示范”(LYKJ[2019]43)

作者简介: 黄瑞芳(1987-), 女, 安徽合肥人, 助理研究员, 硕士。主要研究方向为植物修复技术。E-mail: aion126@126.com。

* 通信作者: 施士争(1968-), 男, 江苏宿迁人, 研究员, 学士。主要从事林木遗传育种方面的研究。E-mail: shshzn@163.com。

受性的依据之一。植物的生物量是其受生长环境影响后最直观、最全面的反应,是耐铅性的重要评价因子之一^[8]。生物量越大,植物的盖度越大,吸收的重金属量也越多,修复受污染土壤的效果越好^[9]。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(Peroxidase, POD)是植物抗氧化酶系统中的重要组成成员,对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,可以清除超氧阴离子自由基,抑制膜脂过氧化,在植物的抗逆过程中扮演着重要角色^[10-11]。丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)是细胞膜脂质过氧化的产物,其含量能够反映出机体内脂质过氧化的程度,可作为细胞损伤的指标之一。可溶性蛋白是重要的渗透调节物质和营养物质,其含量与细胞内溶质的渗透势以及原生质体内外的渗透度等都有很密切的关系,经常用作筛选抗性的指标之一。

本文研究了不同铅胁迫浓度下柳树4个无性系的生物量、SOD酶活性、POD酶活性、MDA含量和可溶性蛋白含量的变化,旨在了解铅胁迫对柳树的生长和生理特性的影响,了解柳树对铅胁迫的生理适应机制,为进一步筛选耐铅柳树品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

杞柳(*Salix integra*)、簸箕柳(*S. suchowensis*)的4个无性系(见表1),来自于江苏省林业科学研究院国家柳树良种基地柳树种质资源圃。

表1 供试无性系

种	系号	性别	特点
簸箕柳	P61	♀	产地江苏,枝条较粗壮,萌蘖能力强
	P63	♂	产地哈尔滨,传统编织柳品种
	P1024	♀	产地山东,生长较快,可用于编织柳造林或生物能源林
杞柳	P336	♀	产地日本,叶片长圆形,基部截形或微心形

1.2 试验方法

采取水培法。将挑选的柳树苗置于定植篮中,每篮10株。营养液为改良Hogland。水培瓶200 mL,插穗3株/瓶, Pb^{2+} 以 $Pb(NO_3)_2$ 的形式加入,处理为0(CK),20(处理1),40(处理2),80 mg/L(处理3)^[12]。

1.3 测定方法

胁迫实验结束后收获植株,进行超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)的活性测定,以及丙二醛(MDA)和可溶性蛋白质含量的测定。所有生理指标均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行

测定。SOD酶活性采用羟胺法测定(试剂盒编号:A001-1-1),SOD酶活性采用比色法进行测定(试剂盒编号:A084-3),MDA含量采用TBA法进行测定(试剂盒编号:A003-1-1),可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝法进行测定(试剂盒编号:A045-2),柳树各无性系的耐铅能力选择加权隶属函数法进行计算。得到的数据利用Excel 2010和IBM SPSS Statistics 19进行分析。其中隶属函数的计算方法如下:

$$U(X_i) = (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}) \quad (1)$$

$$U(X_i) = 1 - (X_i - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min}) \quad (2)$$

$$X_i = \sum X_{ij} / n \quad (3)$$

其中,(1)用于某指标与重金属抗性呈正相关,(2)用于呈负相关。 X_i 为第*i*个指标的测定值, X_{\max} 为所有参试无性系中该指标测定值中的最大值, X_{\min} 为最小值。

2 结果与分析

2.1 不同质量浓度铅胁迫对无性系生物量的影响

从图1可以看出,随着铅胁迫质量浓度的增加,柳树4个无性系的生物量(g)呈降低趋势。CK(5.41 ± 0.83) > 处理1(3.19 ± 0.75) > 处理2(2.77 ± 0.42) > 处理3(2.46 ± 0.34)。在铅胁迫质量浓度为20 mg/L时,4个无性系的生物量均极显著低于对照组($P < 0.01$),分别是对照的42.96%,55.17%,71.23%,69.92%,表明已经对柳树的生长产生了明显的胁迫效应。在铅胁迫质量浓度为80 mg/L时,4个柳树无性系的生物量高于对照50%的只有P63和P1024,表明高质量浓度的铅胁迫处理抑制生长的能力增强。

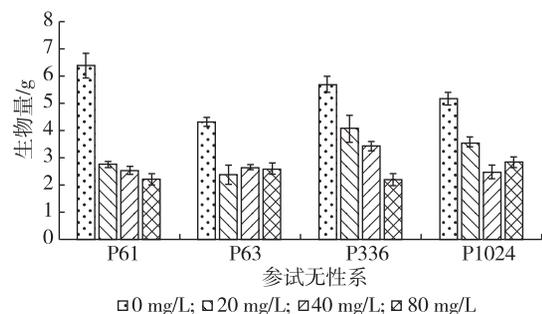


图1 不同铅胁迫质量浓度下参试无性系生物量的变化

2.2 不同质量浓度铅胁迫对无性系SOD酶活性的影响

从图2可以看出,随着铅胁迫质量浓度的增加,4个柳树无性系SOD酶活性(U/g)呈现增高的趋势。处理3(92.74 ± 7.31) > 处理2(87.95 ± 7.57) >

处理 1 (83.02 ± 12.19) > CK (77.18 ± 9.46)。在铅处理质量浓度为 80 mg/L 时, SOD 活性最高, 分别比对照增加了 18.99%, 12.99%, 43.08%, 11.75%。

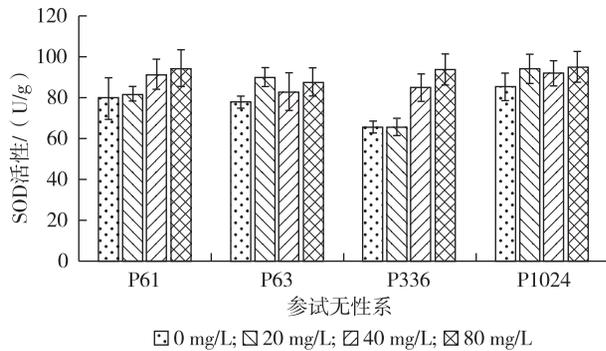


图 2 不同铅胁迫质量浓度下参试无性系 SOD 酶活性的变化

2.3 不同质量浓度铅胁迫对无性系 POD 酶活性的影响

由图 3 可看出, 随着铅胁迫质量浓度的增加, 4 个柳树无性系 POD 酶活性 (U/g) 均呈现先增加后减低的趋势。处理 2 (196.99 ± 63.98) > 处理 1 (177.66 ± 49.34) > 处理 3 (169.24 ± 72.41) > CK (111.06 ± 25.04)。P61 和 P63 在铅质量浓度为 40 mg/L 时, 达到最高值, P61 比对照高 110.25%, P63 比对照高 191.67%。P336 和 P1024 均在铅质量浓度为 20 mg/L 时达到最高, P336 比对照高 18.75%, P1024 比对照高 261.76%。在铅质量浓度达到 80 mg/L 时, P63 比对照高 155.20%, P1024 比对照高 99.04%, 而 P61 与对照无显著差异。

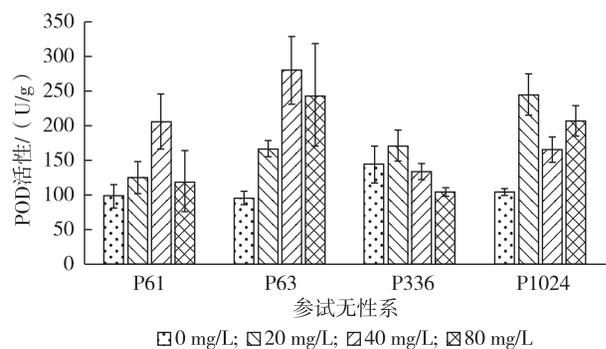


图 3 不同铅胁迫质量浓度下参试无性系 POD 酶活性的变化

2.4 不同质量浓度铅胁迫对无性系 MDA 含量的影响

由图 4 可看出, 随着铅胁迫质量浓度的增加, 4

个柳树无性系 MDA 含量 (nmol/g) 均呈整体升高趋势, 且均显著高于对照。处理 3 (39.52 ± 9.57) > 处理 2 (24.58 ± 5.29) > 处理 1 (18.17 ± 5.72) > CK (13.67 ± 3.49)。在铅质量浓度达到 80 mg/L 时, P61, P63, P336, P1024 分别比对照高 206.52%, 318.74%, 174.38%, 98.83%。

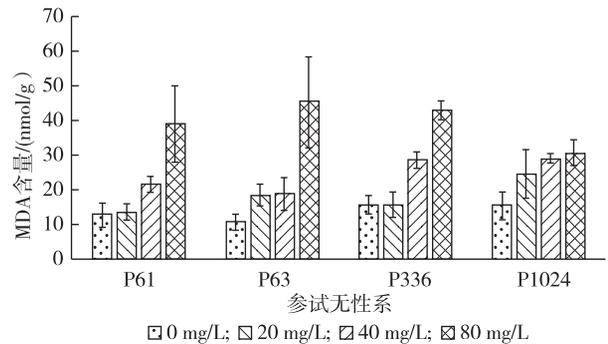


图 4 不同铅胁迫质量浓度下参试无性系 MDA 含量的变化

2.5 不同质量浓度铅胁迫对无性系可溶性蛋白含量的影响

由图 5 可看出, 4 个柳树无性系可溶性蛋白含量 (mg/kg) 随着铅胁迫质量浓度的增加均呈现下降的趋势。在质量铅浓度达到 80 mg/L 时, P61, P63, P336, P1024 分别是对照的 62.26%, 58.61%, 79.98%, 61.88%, P63 的变化最大, P336 的变化最小。

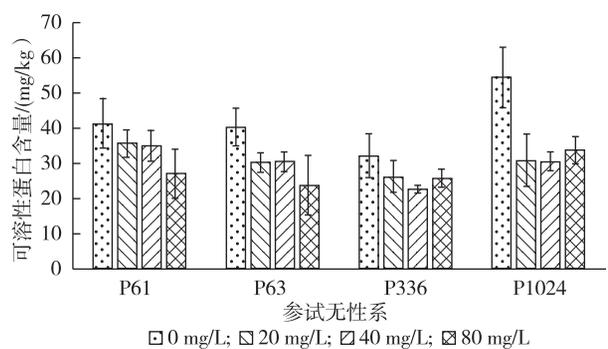


图 5 不同铅胁迫质量浓度下参试无性系可溶性蛋白含量的变化

2.6 柳树各无性系耐铅能力比较

对植物的抗逆性状进行综合评价时, 加权隶属函数法是常用也是较为认可的综合评价方法^[13]。一般采用主成分分析法来筛选综合指标。再依据各综合指标的贡献率来确定各自的权重, 进而利用

加权隶属函数法算出每个参试无性系的抗逆性综合评价价值(D 值),据此对参试无性系的抗逆性进行排序。

对参试无性系的5个指标进行了主成分分析,共提取了2个主成分,第1主成分贡献率为47.89%,第2主成分贡献率为23.49%。其中主成分1= $-0.77 \times$ 生物量 $+0.17 \times$ SOD酶活性 $+0.59 \times$ POD酶活性 $+0.85 \times$ MDA含量 $-0.84 \times$ 可溶性蛋白含量;主成分2= $0.10 \times$ 生物量 $+0.91 \times$ SOD酶活性 $-0.50 \times$ POD酶活性 $+0.31 \times$ MDA含量 $+0.05 \times$ 可溶性蛋白含量;综合主成分= $-0.34 \times$ 生物量 $+0.29 \times$ SOD酶活性 $+0.17 \times$ POD酶活性 $+0.48 \times$ MDA含量 $-0.39 \times$ 可溶性蛋白含量。

根据主成分分析确定的各指标贡献值进行加权隶属函数分析,根据式(1)(2)(3)得出各无性系耐铅性的综合评价价值,结果(见表2)表明4个无性系耐铅能力的强弱顺序为P336>P63>P1024>P61。

表2 参试无性系可各指标的隶属函数值比较

参试无性系	生物量	SOD酶活性	POD酶活性	MDA含量	可溶性蛋白含量	D 值	排名
P61	0.21	0.14	0.04	0.16	0.15	0.14	4
P63	0.25	0.15	0.09	0.18	0.22	0.17	2
P336	0.13	0.15	0.06	0.27	0.30	0.18	1
P1024	0.18	0.15	0.08	0.27	0.13	0.16	3

3 讨论与结论

铅是植物的非必需元素,植物在受到铅胁迫时,其生长受到抑制,表现为植株矮小,生物量下降,甚至出现死亡。本研究中随着铅胁迫浓度的增加,柳树无性系的生物量呈降低趋势,这是因为铅胁迫抑制了柳树的生长。P61在铅质量浓度为20 mg/L时生物量下降程度最高,可能说明P61的生长受到铅胁迫的抑制较为明显。

植物在正常生长条件下,其体内活性氧的产生和清除处于动态平衡,而在逆境胁迫下,平衡被打破,体内积累大量的活性氧,从而使植物细胞受到氧化胁迫,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)为抗氧化防御系统的重要组成成员,可清除活性氧^[14-15]。本研究中随着铅胁迫质量浓度的增加,柳树无性系的SOD酶活性呈增高趋势,而POD酶活性呈先增高后下降的趋势,这可能是因为铅胁迫刺激导致体内活性氧的动态平衡遭到破坏,从而导致抗氧化酶活性发生改变^[16-17],从而提高植物的

抗逆能力^[18]。P336的SOD酶活性的上升程度显著高于其他3个无性系,说明P336的SOD酶对铅胁迫的敏感程度较其他3个无性系高。而P1024在铅质量浓度为20 mg/L时极显著增高,达到最高值,这可能说明P1024的POD酶对铅胁迫较为敏感。

生物体内的自由基作用于脂质发生过氧化反应,产生丙二醛,可使蛋白质、核酸等交联聚合,产生细胞毒性。若丙二醛过多,会引发膜脂过氧化^[19],因此MDA含量能间接反映植物的衰老生理和抗性生理。本研究中柳树在受到铅胁迫后,MDA含量显著上升,这说明柳树在受到铅胁迫以后导致了膜脂过氧化,植物受到损伤。P1024在铅质量浓度为20 mg/L时MDA含量即显著增加,可能是因为P1024的MDA对铅胁迫较为敏感。值得一提的是,P1024在铅胁迫3个质量浓度处理下的MDA的含量并无显著差异,这可能说明随着铅胁迫质量浓度的有限增加,P1024受损伤的程度并无增加,而其余3个无性系都有显著增加。

植物在逆境下会主动进行渗透调节,积累各种有机或无机物质来降低渗透势,从而抵抗逆境胁迫。但不同植物其溶质的累积程度也不同,主要是由于他们的基因表达不同,而基因表达的产物——蛋白质也会不同,因此可溶性蛋白也是植物抗性指标之一^[20]。本研究中,随着铅胁迫质量浓度的增加,柳树无性系的可溶性蛋白含量呈下降趋势。P1024的下降程度显著高于其他3个无性系,且P1024在铅质量浓度为20 mg/L时可溶性蛋白即显著降低,而4个柳树无性系在铅胁迫3个质量浓度处理下的可溶性蛋白含量并无显著差异,这可能说明随着铅胁迫质量浓度的有限增加,铅进入细胞后对蛋白水解酶的活性以及蛋白合成相关酶的毒害和钝化作用并无显著增加。

综上所述,本研究中设计的铅质量浓度严重抑制了柳树的生长和生物量,并且破坏了体内抗氧化系统,造成了植物细胞膜损伤,渗透调节能力降低,对柳树的生理活动产生了严重的胁迫效应。

植物对重金属的耐受性与许多细胞活动都有关,如金属离子的螯合、运输、富集等^[21-22],虽然利用生理生化指标可以一定程度上评价植物的耐铅性,相对缩短林木耐重金属新品种的选育过程,但单纯的用生理指标进行植物的耐铅性评价还不够,要想全面反映植物的耐铅性,还需综合考虑各项指标。

参考文献:

- [1] LAIDLAW M, FILIPPELLI G. Resuspension of urban soils as a persistent source of lead poisoning in children; a review and new directions[J]. *Applied Geochemistry*, 2008, 23(8): 2021-2039.
- [2] 肖承坤. 我国铅污染现状分析[J]. *环境与可持续发展*, 2017, 42(5): 91-92.
- [3] YANG X E, LONG X X, HE H B, et al. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance) [J]. *Plant and Soil*, 2004, 259(1-2): 181-189.
- [4] KLANG-WESTIN E, ERIKSSON J. Potential of *Salix* as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils[J]. *Plant and soil*, 2003, 249(1): 127-137.
- [5] KUZOVKINA Y A, QUIGLEY M F. Willows beyond wetlands: uses of *Salix* L. species for environmental projects[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2005, 162(1-4): 183-204.
- [6] GREGER M, LANDBERG T. Use of willow in phytoextraction[J]. *International Journal of Phytoremediation*, 1999, 1(2): 115-123.
- [7] COSIO C, VOLLENWEIDER P, KELLER C. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 58(1): 64-74.
- [8] 汪有良, 王宝松, 李荣锦, 等. 柳树在环境污染生物修复中的应用[J]. *江苏林业科技*, 2006, 33(2): 40-44.
- [9] 何新华, 陈力耕, 何冰, 等. 铅对杨梅幼苗生长的影响[J]. *果树学报*, 2004, 21(1): 29-32.
- [10] 晋海军, 王海霞. 植物对重金属镉的吸收与耐受机制研究进展[J]. *中国农学通报*, 2019, 35(24): 52-57.
- [11] 朱成豪, 唐健民, 高丽梅, 等. 重金属铜、锌、镉复合胁迫对麻疯树幼苗生理生化的影响[J]. *广西植物*, 2019, 39(6): 752-760.
- [12] 黄瑞芳, 王红玲, 施士争. 7 个灌木柳无性系铅富集能力比较[J]. *江苏林业科技*, 2020, 47(1): 11-16.
- [13] 徐爱春, 陈益泰, 王树凤, 等. 镉胁迫下柳树 5 个无性系生理特性的变化[J]. *生态环境学报*, 2007, 16(2): 150-155.
- [14] FAROOQ M, WAHID A, KOBAYASHI N, et al. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management [J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2009, 29(1): 185-212.
- [15] GRIFFITHS H, PARRY M A J. Plant responses to water stress [J]. *Annals of Botany*, 2002, 89(7): 801-802.
- [16] 魏志琴, 陈志勇, 秦蓉, 等. Cu^{2+} 对拟南芥根的局部毒性及诱导 DNA 损伤、细胞死亡[J]. *植物学报*, 2013, 48(3): 303-312.
- [17] GONALVES J F, BECKER A G, CARGNELUTTI D, et al. Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings[J]. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 2007, 19(3): 156-163.
- [18] 房娟, 陈光才, 楼崇, 等. Pb 胁迫对柳树根系形态和生理特性的影响[J]. *安徽农业科学*, 2011(15): 143-145, 181.
- [19] 林艳, 郭伟珍, 徐振华, 等. 大叶女贞抗寒性及冬季叶片丙二醛和可溶性糖含量的变化[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(25): 68-72.
- [20] 张翠梅, 师尚礼, 吴芳, 等. 干旱胁迫对不同抗旱性苜蓿品种根系生长及生理特性影响[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(5): 868-882.
- [21] 杨卫东. 柳树对镉积累、忍耐与解毒生理机制初步研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2008.
- [22] 王树凤. 柳树对重金属铅、镉响应的基因型差异及其耐性机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [9] GE J, ZHAO D, HAN C, et al. Cloning and expression of floral organ development-related genes in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41: 6493-6503.
- [10] LILJEGREN S J, DITTA G S, ESHED Y, et al. Shatter proof MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2000, 404(6779): 766-770.
- [11] ZHANG L, XU Y, MA R. Molecular cloning, identification, and chromosomal localization of two MADS box genes in peach (*Prunus persica*) [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008, 35(6): 365-372.
- [12] RIPOLL J J, ROEDER A H, DITTA G S, et al. A novel role for the floral homeotic gene APETALA2 during *Arabidopsis* fruit development [J]. *Development*, 2011, 138(23): 5167-5176.
- [13] KATAHATA S I, FUTAMURA N, IGASAKI T, et al. Functional analysis of SOC1-like and AGL6-like MADS-box genes of the gymnosperm *Cryptomeria japonica* [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, 10(2): 317-327.
- [14] SHINO S, ITO M, UEDA K, et al. Characterization of MADS genes in gymnosperm *Gnetum parvifolium* and its implication on the evolution of reproductive organs in seed plants [J]. *Evolution & Development*, 1999, 1(3): 180-190.
- [15] 孙崇波, 向林, 施季森, 等. 春兰 AGL6 基因的克隆及实时定量表达分析[J]. *分子植物育种*, 2010, 5(8): 939-944.
- [16] LI H F, LIANG W Q, JIA R D, et al. The AGL6-like gene OsMADS6 regulates floral organ and meristem identities in rice [J]. *Cell Research*, 2009, 20(3): 299-313.
- [17] 敬帆, 罗登攀, 马婧, 等. 蜡梅 CpAGL6 基因启动子的克隆及功能初步分析[J]. *园艺学报*, 2015, 42(6): 1139-1149.
- [18] 唐文龙, 赵鹏飞, 李永华, 等. 牡丹 PsAGL6 基因克隆与表达分析[J]. *西北植物学报*, 2018, 38(3): 439-444.
- [19] LEE H S, CHUNG Y Y, CHANDREYEE D, et al. Embryo sac development is affected in *Petunia inflata* plants transformed with an antisense gene encoding the extracellular domain of receptor kinase PRK1 [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1997, 10(6): 341-350.

(上接第 10 页)