

低磷胁迫对雷公藤幼苗叶片生理生化特性的影响

李 键^{1,3}, 黄锦湖^{2,3}, 洪 滔^{1,3}, 吴承祯^{1,3*}, 洪 伟^{1,3}

(1. 福建农林大学林学院, 福州 350002; 2. 福建农林大学植物保护学院, 福州 350002;

3. 福建省高校森林生态系统过程与经营重点实验室, 福州 350002)

摘 要: 为研究雷公藤的耐磷胁迫性, 对雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 一年生和三年生同一无性系扦插苗采用土培的方法进行了控制条件下的低磷胁迫实验, 以 KH_2PO_4 为磷源, 土壤中 P_2O_5 浓度为 0、5、10、15、20、25 (CK) mg/kg, 低磷胁迫 3 个月和 6 个月 after 取叶片测定其丙二醛 (MDA)、脯氨酸 (Pro) 含量以及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性和酸性磷酸酶 (APA) 活性的变化。实验结果表明: 低磷胁迫下一年生和三年生雷公藤叶片 SOD、APA 活性升高, MDA、Pro 含量增加, 并呈现随低磷胁迫加重和胁迫时间延长而上升趋势, 低磷胁迫下各处理的一年生和三年生雷公藤叶片 CAT、POD 活性普遍低于对照, 并随着低磷胁迫程度的加重而呈下降趋势。低磷胁迫下雷公藤幼苗叶片的几种保护酶活性、MDA、Pro 含量以及 APA 活性响应都较为灵敏, 保护酶系统在 15、20 mg/kg 处理下能够起到较好保护作用, 表明雷公藤能通过自身生理调节来适应中度和轻度缺磷环境; 综合各项生理指标, 三年生雷公藤相对于一年生雷公藤显示了较强的抗氧化能力和渗透调节能力, 具有较强的耐低磷能力, 对磷较为缺乏的林地下套种雷公藤的苗龄选择有参考价值。

关键词: 低磷胁迫; 雷公藤; 保护酶; 膜质过氧化; 渗透调节

中图分类号: Q945.78

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)03-0286-11

Effects of Low Phosphorus Stress on Leaf Physiological and Biochemical Characteristics of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. Seedlings

LI Jian^{1,3}, HUANG Jin-Hu^{2,3}, HONG Tao^{1,3}, WU Cheng-Zhen^{1,3*}, HONG Wei^{1,3}

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

2. College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3. Key Laboratory for Forest Ecosystem Process and Management of Fujian Province, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Phosphorus (P) is a very important element that controls the processes of plant life, especially during its growth phase. Low-P in the soil usually leads to adaptive changes in plants in aspects such as photosynthesis, respiration and biosynthesis, and low available P is one of the major limitations to plant production. *Tripterygium wilfordii* Hook. f. is an important traditional Chinese medicine, widely used in medical treatment of diabetes, rheumatism, and nephropathy. *Tripterygium wilfordii* is distributed in southeastern China in poor P and available P red soil. Low-P in the soil may lead to reduced *T. wilfordii* production. Usually, chemical fertilization and soil improvement are the primary measures used to meet the P demands of crops in traditional agriculture and trees in forestry management, but these measures still fail to increase *T. wilfordii* yield to meet good manufacturing practice (GAP) standards. Recently, plants with high P use efficiency have been discovered and used to replace traditional

收稿日期: 2012-08-31, 修回日期: 2012-12-20。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30901131, 31070606); 教育部博士学科点专项基金项目 (20093515110006); 福建省科技重大专项 (2006NZ0001A) 资助。

作者简介: 李键 (1982 -), 男, 博士研究生, 讲师, 主要从事植物生理生态和海岸带森林与环境方面的研究 (E-mail: hmilycau@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: fjwcz@126.com)。

measures for improving P use efficiency of plants. Therefore, studying the effect of different P stresses on *T. wilfordii* will help to reveal the mechanism of low-P adaptation, and breed *T. wilfordii* with high-P use efficiency. Therefore, we analyzed the physiological and biochemical responses (such as peroxidase (POD), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), acid phosphatase (APA), and proline (Pro)) during one growing season of one-year-old and three-year-old seedlings (*T. wilfordii* clones) to six P stresses under soil culture: normal P supply (25 mg/kg, CK), slight P deficiency (20 mg/kg), medium P deficiency (15 mg/kg, 10 mg/kg), and heavy P deficiency (5 mg/kg, 0 mg/kg). The results indicated that under low phosphorus stress, the leaves of both seedling types were higher in SOD, MDA, Pro, APA than in CK, and these values increased with concentration and time of stress. In contrast, CAT and POD values were lower than CK values in the leaves of both seedling types, and decreased with the concentration of low P stress. The protective enzymes, MDA, Pro and APA of seedling leaves were sensitive to low-P stress and worked well, especially at the treatments of 15 and 20 mg/kg. As mentioned above, *T. wilfordii* was adapted well in the environments of slight and medium P deficiency by self physiological regulation. The adaptability of three-year-old *T. wilfordii* seedlings was better than that of one-year-old seedlings in oxidation resistance, osmoregulation and low-P tolerance. Consequently, the three-year-old seedlings were preferred for interplantation in low P conditions. The APA levels can serve as a reference to the breeding of *T. wilfordii* with low P tolerance, but more research is needed to determine whether APA levels are an important index for evaluating and selecting *T. wilfordii* clones with high P use efficiency.

Key words: Low phosphorus stress; *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; Protective enzymes; Membrane lipid peroxidation; Osmotic regulation

磷参与植物细胞膜磷脂的合成,与植物体内蛋白质、糖类和脂类的循环代谢有密切的联系,同时磷又是光合磷酸化、电子传递、卡尔文循环、二氧化碳固定、淀粉合成的重要结构组分,磷元素的供给对植物的生长发育起着重要作用^[1-3]。在低磷胁迫条件下,植物在形态、生理、生化等方面都会发生显著变化进而影响植物的生长与繁殖,最终影响植物的产量^[4-12]。

植物在逆境条件下的膜脂过氧化反应和保护酶系统活性的变化已广泛用于植物适应逆境机理的研究^[13-15],逆境胁迫会导致植物细胞内活性氧生成和清除的动态平衡遭到破坏而出现活性氧的积累^[16-19],同时也会导致植物体内的保护酶系统,如过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)及超氧化物歧化酶(SOD)等活性提高^[20-22],从而清除植物细胞内过多的活性氧并降低膜质过氧化作用,减缓逆境胁迫对植物细胞的膜系统^[23]、色素^[24-25]、蛋白质^[26]及核酸^[27]的损伤。因此对植物活性氧代

谢清除系统的研究对于揭示植物的逆境适应机制有重要意义。

我国传统重要中药材雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.),主产区主要分布南方红壤山地丘陵地区^[28],该区域土壤中活性铝、铁含量高,易将土壤中的有效磷固定转化为非有效磷,使得磷肥的使用效率低下,大大降低雷公藤对磷素的吸收,使得雷公藤产量一直无法满足药用市场需求。磷作为植物生长限制因子一直为人们所重视,在植物生产实践中对磷素的施用比率和高效转化已开展了深入的研究,但是由于不同种植区域土地立地条件的差异以及施肥的不确定性^[29,30],使得增施土壤中磷肥的经济效益不够明显,因此选育耐低磷型雷公藤以适应林地中磷素的缺乏,提高雷公藤产量从而满足药用市场的生产需求亟为迫切。有关磷胁迫对雷公藤的影响的研究至今未见报道,本研究着重从保护酶活性、膜脂过氧化产物和渗透调节物质含量角度探讨低磷胁迫对雷公藤幼苗的影响,为揭

示雷公藤幼苗耐低磷胁迫机理积累基础数据,为耐低磷雷公藤品种的选育及丰产栽培技术的研究提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用一年生和三年生雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 幼苗均由泰宁杉阳雷公藤公司提供,均来自同一无性系同一母株扦插苗,采用盆栽形式培养试验材料,盆栽土为低磷黄土(每盆10 kg,过筛去除沙石及植物枯落物),有机质含量为0.322 g/kg,全氮为0.060 g/kg,全钾为3.010 g/kg,全磷为0.180 mg/kg,有效磷为0.099 mg/kg。

1.2 处理方法

于2008年2月在福建农林大学森林生态研究所实验苗圃中对雷公藤进行盆栽定植,2008年4月15日以 KH_2PO_4 作为磷源进行5个磷胁迫处理,其中重度胁迫的施磷水平为土壤中含 P_2O_5 0、5 mg/kg,中度胁迫的施磷水平为10、15 mg/kg,轻度胁迫的施磷水平为20 mg/kg,以泰宁长势良好的雷公藤纯林圃地磷素水平(25 mg/kg)为对照,每个处理设6个重复,取长势接近的3株进行指标测定。胁迫期间对幼苗定期管理,避免造成干旱胁迫,7月份(胁迫3个月)和10月份(胁迫6个月)分别进行保护酶活性、膜脂过氧化产物和渗透调节物质的测定。

1.3 测定方法

过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、脯氨酸(Pro)的测定参考章家恩^[31]的方法,丙二醛(MDA)的测定参考赵世杰等^[32]的方法,酸性磷酸酶(APA)的测定采用林启美等^[33]的叶饼法。

1.4 数据处理

采用SPSS18.0进行方差分析及最小差异显著性检验(LSD, $p < 0.05$),采用Microsoft Excel 2003作图。

2 结果与分析

2.1 低磷胁迫对雷公藤幼苗叶片几种保护酶的影响

经多因素方差分析(表1),低磷胁迫下不同年

龄雷公藤SOD含量存在显著差异;三年生雷公藤不同月份SOD含量存在显著差异,不同处理之间SOD含量也存在显著差异;低磷胁迫下各处理的三年生雷公藤叶片SOD活性均高于对照,并呈现随磷胁迫加重而上升趋势(图1:A)。三年生雷公藤叶片7月份(胁迫3个月)SOD活性介于3.75~7.63 U/mg protein之间,各胁迫处理与对照均差异显著;三年生雷公藤各处理10月份(胁迫6个月)SOD活性均高于7月份,介于6.25~10.68 U/mg protein之间,各胁迫处理与对照均差异显著。

低磷胁迫下一年生雷公藤不同月份SOD含量存在显著差异,不同处理之间SOD含量也存在显著差异。低磷胁迫下各处理的一年生雷公藤叶片SOD活性呈现随磷胁迫加重而上升的趋势(图1:B)。一年生雷公藤叶片7月份SOD活性介于4.61~7.80 U/mg protein之间,0、5 mg/kg处理与对照差异显著;一年生雷公藤各处理10月份SOD活性均高于7月份,介于5.41~9.41 U/mg protein之间,各胁迫处理与对照均差异显著。

经多因素方差分析(表1),低磷胁迫下不同年龄雷公藤CAT含量存在显著差异;三年生雷公藤不同月份CAT含量存在显著差异,不同处理之间CAT含量也存在显著差异;低磷胁迫下各处理的三年生雷公藤叶片CAT活性均低于对照,并呈现随磷胁迫加重而下降的趋势(图1:C)。三年生雷公藤叶片7月份CAT活性介于17.06~25.53 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ protein之间,各胁迫处理均与对照差异显著;10月份CAT活性介于5.20~23.96 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ protein之间,0、5、10、15 mg/kg处理与对照差异显著。低磷胁迫下一年生雷公藤不同月份CAT含量存在显著差异,不同处理之间CAT含量也存在显著差异。低磷胁迫下各处理的一年生雷公藤叶片CAT活性均低于对照,并呈现随磷胁迫加重而下降的趋势(图1:D)。一年生雷公藤叶片7月份CAT活性介于18.81~31.93 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ protein之间,0、5、10、15 mg/kg处理与对照差异显著;一年生雷公藤各处理10月份CAT活性均低于7月份,介于11.67~23.96 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ protein之间,0、5、10、15 mg/kg处理与对照差异显著。

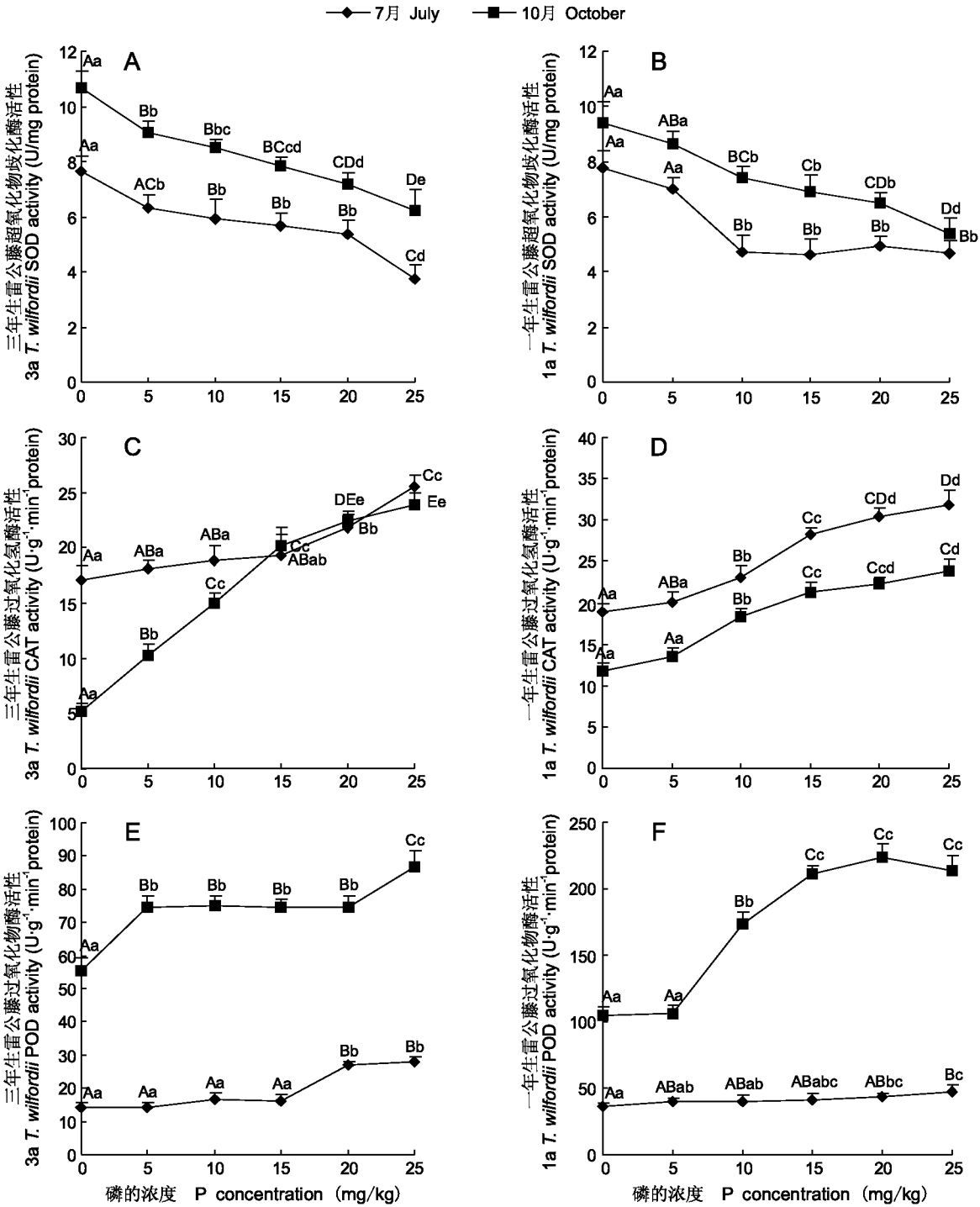
表 1 不同年龄雷公藤不同取样月份和不同处理间方差分析
Table1 Analysis of variance between age, dispose and sampling time of *T. wilfordii*

指标 Index	变异来源 Source of variation	Ⅲ型平方和 Type Ⅲ sum of square	自由度 Freedom	均方 Mean square	F值 F value
SOD	校正模型 Corrected model	196. 991 ^a	7	28. 142	75. 423 **
	截距 Intercept	3296. 449	1	3 296. 449	8 834. 937 **
	年龄 Age	4. 733	1	4. 733	12. 685 **
	月份 Month	80. 096	1	80. 096	214. 667 **
	处理 Dispose	112. 162	5	22. 432	60. 122 **
	误差 Error	23. 879	64	0. 373	
	总计 Total	3517. 320	72		
	校正总计 Correct total	220. 870	71		
POD	校正模型 Corrected model	238677. 974 ^b	7	34 096. 853	38. 923 **
	截距 Intercept	423249. 068	1	423 249. 068	483. 153 **
	年龄 Age	65978. 914	1	65 978. 914	75. 317 **
	月份 Month	154299. 383	1	154 299. 383	176. 138 **
	处理 Dispose	18399. 677	5	3 679. 935	4. 201 **
	误差 Error	56064. 890	64	876. 014	
	总计 Total	717991. 932	72		
	校正总计 Correct total	294742. 864	71		
CAT	校正模型 Corrected model	2372. 509 ^c	7	338. 930	67. 829 **
	截距 Intercept	29002. 756	1	29 002. 756	5 804. 271 **
	年龄 Age	262. 740	1	262. 740	52. 582 **
	月份 Month	535. 517	1	535. 517	107. 172 **
	处理 Dispose	1574. 252	5	314. 850	63. 010 **
	误差 Error	319. 795	64	4. 997	
	总计 Total	31695. 060	72		
	校正总计 Correct total	2692. 304	71		
MDA	校正模型 Corrected model	2370. 401 ^d	7	338. 629	105. 336 **
	截距 Intercept	11190. 579	1	11 190. 579	3 481. 026 **
	年龄 Age	1713. 076	1	1 713. 076	532. 882 **
	月份 Month	543. 181	1	543. 181	168. 966 **
	处理 Dispose	114. 145	5	22. 829	7. 101 **
	误差 Error	205. 743	64	3. 215	
	总计 Total	13766. 723	72		
	校正总计 Correct total	2576. 144	71		
POR	校正模型 Corrected model	784. 923 ^e	7	112. 132	84. 489 **
	截距 Intercept	4712. 263	1	4 712. 263	3 550. 584 **
	年龄 Age	428. 854	1	428. 854	323. 132 **
	月份 Month	286. 322	1	286. 322	215. 737 **
	处理 Dispose	69. 747	5	13. 949	10. 510 **
	误差 Error	84. 940	64	1. 327	
	总计 Total	5582. 126	72		
	校正总计 Correct total	869. 863	71		
APA	校正模型 Corrected model	1. 008 ^f	7	0. 144	7. 261 **
	截距 Intercept	20. 320	1	20. 320	1 024. 549 **
	年龄 Age	0. 010	1	0. 010	0. 482
	月份 Month	0. 134	1	0. 134	6. 773 *
	处理 Dispose	0. 864	5	0. 173	8. 714 **
	误差 Error	1. 269	64	0. 020	
	总计 Total	22. 598	72		
	校正总计 Correct total	2. 277	71		

注：* 和 ** 分别表示差异达显著($p < 0. 05$)和极显著($p < 0. 01$)。

Notes: * and ** indicate significant difference at $p < 0. 05$ and $p < 0. 01$.

a. R Squared =0. 892 (Adjusted R Squared =0. 880); b. R Squared =0. 810 (Adjusted R Squared =0. 789); c. R Squared =0. 881 (Adjusted R Squared =0. 868); d. R Squared =0. 920 (Adjusted R Squared =0. 911); e. R Squared =0. 902 (Adjusted R Squared =0. 892); f. R Squared =0. 443 (Adjusted R Squared =0. 382).



同一苗龄同一月份各处理间有一个相同字母的为差异不显著，无相同字母的为差异显著；小写字母表示显著水平 $p < 0.05$ ，大写字母表示显著水平 $p < 0.01$ 。下同。
Different small letters in same age and month mean significant difference among treatments at 5%, different capital letters in same age and month mean significant difference among treatments at 1%. The same below.

图 1 低磷胁迫对雷公藤幼苗叶片 SOD、CAT 及 POD 活性的影响

Fig. 1 Effect of low P deficiency stress on SOD, CAT and POD activity of *T. wilfordii* seedling leaves

经多因素方差分析(表1)，低磷胁迫下不同年龄雷公藤 POD 含量存在显著差异；三年生雷公藤不同月份 POD 含量存在显著差异，不同处理之间 POD 含量也存在显著差异；低磷胁迫下各处理的三年生雷公藤叶片 POD 活性均低于对照，并呈现随磷胁迫加重而下降的趋势(图1：E)，但这种趋势较一年生雷公藤更为平缓。三年生雷公藤叶片7月份 POD 活性介于 $14.10 \sim 27.90 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \text{ protein}$ 之间，0、5、10、15 mg/kg 处理与对照差异显著；三年生雷公藤各处理10月份 POD 活性均高于7月份，介于 $55.37 \sim 86.77 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \text{ protein}$ 之间，各胁迫处理与对照均差异显著。低磷胁迫下各处理的一年生雷公藤叶片 POD 活性除10月份的20 mg/kg 处理外均低于对照，并呈现随磷胁迫加重而下降的趋势(图1：F)。低磷胁迫下一年生雷公藤不同月份 POD 含量存在显著差异，不同处理之间 POD 含量也存在显著差异；一年生雷公藤叶片7月份 POD 活性介于 $35.81 \sim 47.90 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \text{ protein}$ 之间，0、5、

10 mg/kg 处理与对照差异显著；一年生雷公藤各处理10月份 POD 活性均高于7月份，介于 $105.11 \sim 213.61 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \text{ protein}$ 之间，0、5、10 mg/kg 处理与对照差异显著。

2.2 低磷胁迫对雷公藤幼苗叶片 MDA、Pro 的影响

经多因素方差分析(表1)，低磷胁迫下不同年龄雷公藤 MDA 含量存在显著差异；三年生雷公藤不同月份 MDA 含量存在显著差异，不同处理之间 MDA 含量也存在显著差异；低磷胁迫下各处理的三年生雷公藤幼苗叶片 MDA 含量均高于对照，并呈现随磷胁迫加重而总体上升的趋势(图2：A)。三年生雷公藤7月份叶片 MDA 含量介于 $5.13 \sim 8.43 \text{ } \mu\text{mol/g FW}$ 之间，0、5、15 mg/kg 处理与对照相比差异显著；三年生雷公藤各处理10月份 MDA 含量均高于7月份，介于 $7.44 \sim 10.44 \text{ } \mu\text{mol/g FW}$ 之间，0、5、15、20 mg/kg 处理与对照相比差异显著；低磷胁迫下一年生雷公藤不同月份 MDA 含量存在显著差异，不同处理之间 MDA 含量也存在显著差异。低磷胁迫下各处理的一年生雷

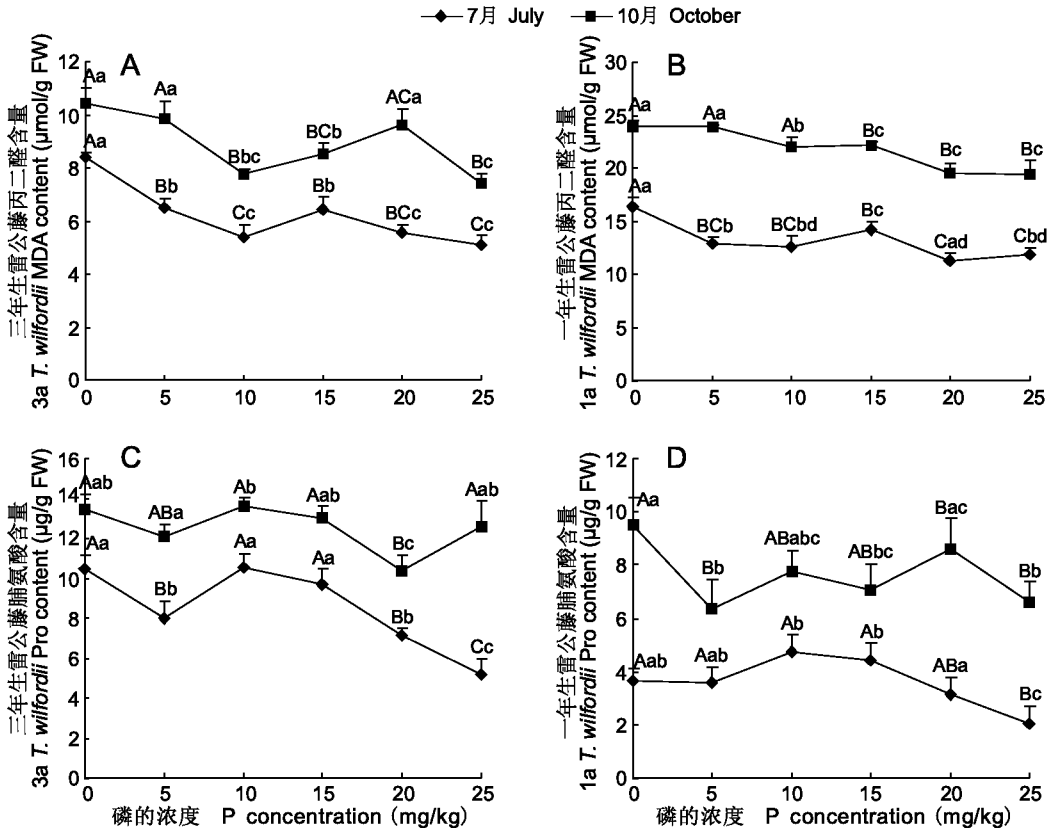


图2 低磷胁迫对雷公藤幼苗叶片 MDA 及 Pro 含量的影响

Fig. 2 Effect of low P deficiency stress on MDA and Pro content of *T. wilfordii* seedling leaves

公藤幼苗叶片 MDA 含量除 7 月份 20 mg/kg 处理外, 其它均高于对照, 并呈现随磷胁迫加重而上升的趋势(图 2: B)。一年生雷公藤 7 月份叶片 MDA 含量介于 11.32 ~ 16.36 $\mu\text{mol/g}$ FW 之间, 且 0、15 mg/kg 处理与对照相比差异显著; 一年生雷公藤各处理 10 月份 MDA 含量均高于 7 月份, 介于 19.45 ~ 23.98 $\mu\text{mol/g}$ FW 之间, 0、5、10 mg/kg 处理与对照相比均差异显著。

经多因素方差分析(表 1), 低磷胁迫下不同年龄雷公藤 Pro 含量存在显著差异; 三年生雷公藤不同月份 Pro 含量存在显著差异, 不同处理之间 Pro 含量也存在显著差异; 低磷胁迫下各处理的三年生雷公藤叶片 Pro 含量除 10 月份的 5、20 mg/kg 处理外, 其它均高于对照, 并呈现随磷胁迫加重而上升的趋势(图 2: C)。三年生雷公藤 7 月份叶片 Pro 含量介于 5.23 ~ 10.59 $\mu\text{g/g}$ FW 之间, 各胁迫处理与对照相比差异显著; 三年生雷公藤各处理 10 月份 Pro 含量均高于 7 月份, 10 月份叶片 Pro 含量介于 10.37 ~ 13.6 $\mu\text{g/g}$ FW 之间, 20 mg/kg 处理与对照相比差异显著。低磷胁迫下一年生雷公藤不同月份 Pro 含量存在显著差异, 不同处理之间 Pro 含量也存在显著差异。低磷胁迫下各处理的一年生雷公藤叶片 Pro 含量除 10 月份的 5 mg/kg 处理外, 其它均高于对照, 并呈现随磷胁迫加重而上升的趋势(图 2: D)。一年生雷公藤 7 月份叶片 Pro 含量介于 2.03 ~ 4.73 $\mu\text{g/g}$ FW 之间, 各胁迫

处理与对照相比差异显著; 一年生雷公藤各处理 10 月份 Pro 含量均高于 7 月份, 10 月份叶片 Pro 含量介于 6.37 ~ 9.48 $\mu\text{g/g}$ FW 之间, 0、20 mg/kg 处理与对照相比差异显著。

2.3 低磷胁迫对雷公藤幼苗叶片 APA 活性的影响

经多因素方差分析(表 1), 低磷胁迫下不同年龄雷公藤 APA 含量差异不显著; 三年生雷公藤不同月份 APA 含量存在显著差异, 不同处理之间 APA 含量也存在显著差异; 低磷胁迫下各处理三年生雷公藤叶片 APA 活性均高于对照, 并呈现随磷胁迫加重而呈上升趋势(图 3: A)。三年生雷公藤 7 月份叶片 APA 活性介于 0.33 ~ 0.61 $\text{OD} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 之间, 0、5、10 mg/kg 处理与对照相比差异显著; 三年生雷公藤各处理 10 月份 APA 活性均高于 7 月份, 介于 0.40 ~ 0.78 $\text{OD} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 之间, 0、5、10、15 mg/kg 处理与对照相比差异显著。低磷胁迫下一年生雷公藤不同月份 APA 含量存在显著差异, 不同处理之间 APA 含量也存在显著差异。低磷胁迫下各处理一年生雷公藤叶片 APA 活性均高于对照, 并呈现随磷胁迫加重而上升的趋势(图 3: B)。一年生雷公藤 7 月份叶片 APA 活性介于 0.53 ~ 0.86 $\text{OD} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 之间, 0、5、10 mg/kg 处理与对照相比差异显著; 一年生雷公藤各处理 10 月份 APA 活性均低于 7 月份, 介于 0.23 ~ 0.62 $\text{OD} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 之间, 0、5、10 mg/kg 处理与对照相比差异显著。

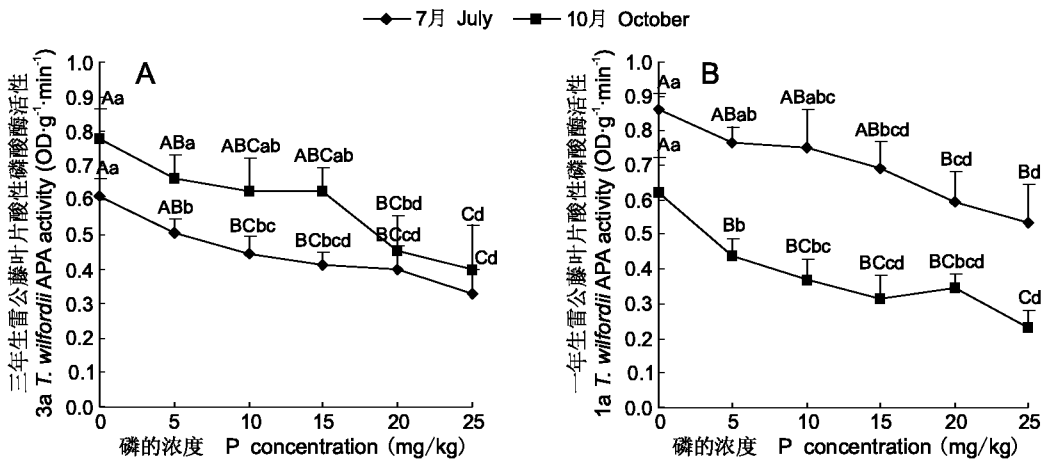


图 3 低磷胁迫对雷公藤幼苗叶片 APA 活性的影响
Fig. 3 Effect of low P deficiency stress on APA activity of *T. wilfordii* seedling leaves

3 讨论

磷的高效利用对于植物的生长具有重要意义,利用植物自身潜力提高土壤中磷的生物有效性一直是这一领域的研究重点。在磷胁迫下植物根系的形态变化、植物酶活性的变化,磷在植物体内的转运机制等诸多方面前人已做了系统的研究,近年来对植物适应低磷胁迫的分子机制的研究已经取得长足进步,但是较多集中在对拟南芥、豆科植物、禾本科植物^[4-8,10-12,34-37]的研究,而乔灌木因为更为复杂的基因型和遗传多样性,使之分子水平上的研究与拟南芥等模式植物还有很大差距,迫于生产实践的需要,耐低磷的林木品种的选育短期内还是要依靠传统的选育技术。植物体内保护酶的活性和含量会因逆境胁迫而发生改变^[13-15,20-22],这是植物在长期进化过程中所形成的抗性机制,而植物保护酶的协同作用机制往往是良种选育过程中的一个重要参考依据。

正常代谢的植物细胞其活性氧的产生和清除处于一个动态平衡的状态,活性氧保持一个较低水平不伤及细胞,而逆境导致植物体内活性氧含量的上升会伤害植物膜系统,引起植物生理生化系统的紊乱,严重时会导致植物死亡^[38]。MDA是活性氧自由基对细胞膜脂质过氧化伤害的产物,其含量的高低表明了膜脂氧化的程度。本实验结果表明雷公藤叶片内MDA含量随磷胁迫加重和时间延长而呈上升趋势,表明低磷胁迫会引起雷公藤叶片细胞活性氧自由基代谢失衡进而造成细胞伤害。活性氧含量的上升是植物化学防御的信号分子,通过诱导植物体内其他信号进而启动抗氧化系统^[39],即导致活性氧清除系统中的主要保护酶SOD、CAT、POD活性在低磷胁迫下均发生变化,其中SOD呈上升趋势,这与陈隆生等^[13]对油茶、王晶等^[14]对番茄的研究结果一致。前人研究表明,低磷胁迫下保护酶活性调节存在不同步现象^[2],本研究中CAT、POD活性即与SOD活性变化趋势相反,呈下降趋势,保护酶活性调节的不同步表明细胞功能出现紊乱^[2],低磷胁迫已经开始对雷公藤叶片产生伤害,但在15、20 mg/kg处理下CAT、POD活性与对照差异并不显著,表明轻度的磷胁迫下雷

公藤保护酶系统还是有效的,而磷胁迫下雷公藤叶片保护酶活性调节不同步的结果,与前人在研究关于植物体在逆境胁迫下保护酶的作用可能是通过它们之间相互协调且保持一个稳定的平衡态的结果相吻合^[2,40,41]。由此推测低磷胁迫导致雷公藤叶片MDA含量、SOD活性增加而CAT、POD活性下降,这两方面形成一个动态平衡是雷公藤适应低磷胁迫的主要生理响应机制之一。前人关于不同磷效率基因型植物的研究结果亦表明,随着磷胁迫时间的延长和程度的加重会导致植物保护酶活性下降,但磷高效基因型品种保护酶活性降低的幅度小于磷低效基因型品种^[14,15,42,43]。本研究发现25、20 mg/kg处理下三年生雷公藤SOD活性上升幅度高于一年生雷公藤,CAT、POD活性下降幅度小于一年生雷公藤,表明三年生雷公藤的活性氧清除能力优于一年生雷公藤。一年生和三年生雷公藤在15、20 mg/kg处理下MDA含量与对照差异不显著,表明雷公藤保护酶系统在中轻度低磷胁迫下能够起到保护作用,且随着胁迫时间的延长,相同处理下一年生雷公藤MDA含量均高于三年生雷公藤,表明一年生雷公藤受到低磷胁迫的危害更大。除了保护酶活性的增强外,具有较强抗逆性的植物可以通过提高细胞膜的渗透能力来减轻逆境对细胞膜的损害^[44]。随着胁迫时间的延长,相同处理下三年生雷公藤Pro含量均高于一年生雷公藤,表明三年生雷公藤具有更好的渗透调节能力。APA活性的提高被认为对提高植物体内磷利用效率有重要作用^[45-47]的研究结果表明,缺磷可诱导植物根系APA活性显著提高,建议将根系分泌APA活性的高低作为筛选磷高效型植物的一个重要指标。Nanamori等^[48]对水稻和牧草的研究表明,叶片APA能够被低磷胁迫诱导且与磷利用效率显著相关。张海伟等^[49]对甘蓝型油菜的研究表明土壤条件下,由于影响APA的有效性因素较多,植物的磷营养及吸收效率与根系分泌的APA活性相关性较低,而低磷诱导的植株叶片APA活性提高能够提升植株体内磷的利用效率。本研究中雷公藤叶片APA活性在低磷胁迫下明显上升,这种上升趋势是雷公藤对磷缺乏的响应,有助于增强缺磷环境下雷公藤植株体内有机磷的利用效率,同时也发现相

同处理下,三年生雷公藤 APA 活性随着低磷胁迫时间的延长而上升,而一年生雷公藤 APA 活性随着低磷胁迫时间的延长而下降,不同苗龄雷公藤其 APA 活性对磷胁迫的响应机制不同。因此雷公藤叶片 APA 活性的高低和变化规律有可能作为筛选耐低磷雷公藤品种的参考。

综上所述,低磷胁迫下雷公藤幼苗叶片的几种保护酶活性、MDA、Pro 含量以及 APA 活性发生了显著变化以对应外界环境的变化,表明雷公藤可通过自身生理调节来适应中度和轻度缺磷环境,且三年生雷公藤的适应能力优于一年生雷公藤,故在磷素较为缺乏的林地下套种雷公藤时应尽可能选择苗龄较大的幼苗。本研究因为实验之时项目组同期进行的雷公藤组培苗技术还未成熟,适宜的水培方案还未得出,固只能采用传统的土培和同一无性系同一母株扦插供苗,因为苗木之间本身存在差异并缺乏根系相关数据,因而,能否将雷公藤叶片 APA 活性的高低作为筛选耐低磷雷公藤品种的一个重要指标,还需获得其根系酸性磷酸酶的实验数据后再做进一步探讨。

参考文献:

- [1] Epstein E. Mineral Nutrition of Plants [M]. New York: J Wiley and Sons, Inc, 1972: 51–56.
- [2] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59(2): 315–318.
- [3] 万美亮, 邝炎化, 陈建勋. 缺磷胁迫对甘蔗过氧化及保护酶系统活性的影响 [J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(2): 131–135.
- [4] 周志春, 谢钰容, 金国庆, 吴吉富, 陈跃. 马尾松种源对磷肥的遗传反应及根际土壤营养差异 [J]. 林业科学, 2003, 39(6): 62–67.
- [5] Grierson P F. Organic acids in the rhizosphere of *Banksia interfolia* L. F. [J]. *Plant Soil*, 1992, 44(2): 259–265.
- [6] Ran I M, Freedman A L, Terry N. Influence of phosphorus limitation on photosynthesis, carbon allocation and partitioning in sugar beet soybean grown with a short photoperiod [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1993, 31(2): 223–231.
- [7] Mitsukawa N, Okumura S, Shirano Y, Sato S, Kato T, Harashima S, Shibata D. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate limited conditions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(13): 7098–7102.
- [8] Whitehead S J, Caporn S J M, Press M C. Effects of elevated CO₂, nitrogen and phosphorus on the growth and photosynthesis of two upland perennials: *Calluna vulgaris* and *Pteridium aquilinum* [J]. *New Phytol*, 1997, 135(2): 201–211.
- [9] Smith F W, Ealing P M, Dong B, Delhaize E. The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate [J]. *Transporter Family Plant J*, 1997, 11(1): 83–92.
- [10] Gilbert G A, Knight D, Vance C P. Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate [J]. *Ann Bot*, 2000, 85(6): 921–928.
- [11] Neumann G, Massonneau A, Langlade N, Dinkelaker B, Hengeler C, Romheld V, Martinoia E. Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus—deficient white lupin (*Lupinus albus* L.) [J]. *Ann Bot*, 2000, 85(6): 909–919.
- [12] Baldwin J C, Katlikeyan A S, Raghotharao K G. *LEPS₂*, a phosphorus starvation induced novel acid phosphatase from tomato [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125(2): 728–737.
- [13] 陈隆升, 陈永忠, 彭邵锋, 马力, 王瑞, 王湘南. 油茶对低磷胁迫的生理生化效应研究 [J]. 林业科学研究, 2010, 23(5): 782–786.
- [14] 王晶, 韩晓日, 战秀梅, 侯玉慧, 赵伟力. 低磷胁迫对番茄叶片膜脂过氧化及保护酶活性的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2005, 11(6): 851–854.
- [15] 韩胜芳, 邓若磊, 徐海荣, 曹云飞, 王笑颖, 肖凯. 缺磷条件下不同磷效率水稻品种光合特性和细胞保护酶活性 [J]. 应用生态学报, 2007, 18(11): 2462–2467.
- [16] 李兆佳, 喻杰, 樊大勇, 谢宗强, 熊高明, 张想英. 克隆整合提高淹水胁迫下狗牙根根部的活性氧清除能力 [J]. 生态学报, 2011, 31(17): 4992–4999.
- [17] 钱永强, 孙振元, 韩蕾, 巨关升, 刘俊祥, 曹丽.

- 野牛草叶片活性氧及其清除系统对水分胁迫的响应[J]. 生态学报, 2010, 30(7): 1920–1926.
- [18] 冯佰利, 高小丽, 王长发, 张嵩午, 李生秀. 干旱条件下不同温型小麦叶片衰老与活性氧代谢特性的研究[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(4): 74–76.
- [19] 樊怀福, 郭世荣, 焦彦生, 张润花, 李娟. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗生长、活性氧代谢和光合特性的影响[J]. 生态学报, 2007, 27(2): 546–553.
- [20] 王鑫, 郭平毅, 原向阳, 姚满生. 2,4-D 丁酯对罂粟(*Papaver somniferum* L.) 保护酶活性及脂质过氧化作用的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(3): 1098–1103.
- [21] 曹光球, 杨梅, 林思祖, 黄燕华. 邻羟基苯甲酸对不同程度感型杉木无性系抗氧化酶活性的化感效应[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(6): 1267–1271.
- [22] 丁国昌, 林思祖, 王爱萍, 曹光球. 邻羟基苯甲酸对干旱胁迫下杉木幼苗保护酶的影响[J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(5): 1183–1187.
- [23] Foyer C H, Noctor G. Oxygen processing in photosynthesis: Regulation and signaling [J]. *New Phytol*, 2000, 146(3): 359–388.
- [24] Amalo K, Chen G X, Asade K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase implants [J]. *Plant Cell Physiol*, 1994, 35(3): 497–504.
- [25] Salin M L. Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast [J]. *Physiol Plant*, 1987, 72(3): 681–689.
- [26] Shah K, Kumar R G, Verma S, Dubey R S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings[J]. *Plant Sci*, 2001, 161(6): 1135–1144.
- [27] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants[J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(10): 490–498.
- [28] 洪伟, 李键, 吴承祯, 洪滔, 范海兰, 唐佳栋, 陈灿. 雷公藤栽培及利用研究综述[J]. 福建林学院学报, 2007, 27(1): 92–96.
- [29] 徐向华, 丁贵杰. 马尾松适应低磷胁迫的生理生化响应[J]. 林业科学, 2006, 42(9): 24–28.
- [30] 何方, 何柏. 油茶栽培分布与立地分类的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(5): 64–73.
- [31] 章家恩. 生态学常用实验研究方法与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 40–60.
- [32] 赵世杰, 许长成, 邹琦, 孟庆伟. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207–210.
- [33] 林启美, 黄德明. 应用酸性磷酸酶进行番茄磷素诊断[J]. 华北农学报, 1991, 6(2): 78–93.
- [34] Li M, Shinano T, Tadano T. Distribution of exudates of lupin roots in the rhizosphere under phosphorus deficient conditions[J]. *Soil Sci Plant Nutr*, 1997, 43(1): 237–245.
- [35] Diem H G, Duhoux E, Zaid H, Arahou M. Cluster roots in Casuarinaceae: Role and relationship to soil nutrient factors [J]. *Ann Bot*, 2000, 85(6): 929–936.
- [36] Liu Y, Mi G H, Chen F J, Zhang J H, Zhang F S. Rhizosphere effect and root growth of two maize (*Zea mays* L.) genotypes with contrasting P efficiency at low P availability [J]. *Plant Sci*, 2004, 167(2): 217–223.
- [37] Chen Y F, Li L Q, Xu Q, Kong Y H, Wang H, Wei H W. The WRKY6 transcription factor modulates *PHOSPHATE1* expression in response to low Pi stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(11): 3554–3566.
- [38] 王忠. 植物生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 422–439.
- [39] Jiang M Y, Zhang J H. Water stress induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves[J]. *J of Exp Bot*, 2002, 53(379): 2401–2410.
- [40] 蒋明义, 荆家海, 王韶唐. 渗透胁迫对水稻膜脂过氧化及体内保护酶系统的影响[J]. 植物生理学报, 1991, 17(1): 80–84.
- [41] 刘雪超, 齐红岩, 陈岩, 华利静. AgNO₃对网纹甜瓜试管苗糖代谢及抗氧化酶活性的影响[J]. 植物生理学报, 2011, 47(3): 286–292.
- [42] 李志玉, 郭庆元, 伍晓明, 王汉中, 廖星, 涂学

- 文. 油菜不同类型品种磷效率特性研究[J]. 中国油料作物学报, 2001, 21(4): 57–61.
- [43] 张瑞敏, 王三根, 黄爱缨, 杨观友. 施磷水平对不同基因型玉米生理特性及膜保护酶的比较研究[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(6): 60–63.
- [44] Demiral T, Türkan I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance[J]. *Environ Exp Bot*, 2005, 53(3): 247–257.
- [45] Vincent J B, Crowder M W, Averill B A. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions[J]. *Trends Biochem Sci*, 1992, 17(3): 105–110.
- [46] Helal H M Varietal difference in roots phosphatase activity as related to the utilization of organic phosphates[J]. *Plant and Soil*, 1990, 123(2): 161–163.
- [47] 李红, 邝炎化, 彭新湘. 缺磷胁迫对甘蔗悬浮细胞磷素吸收特性和相关酶活性的影响[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(4): 427–430.
- [48] Nanamori M, Shinano T, Wasaki J. Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthate partitioning in the tropical forage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar mulato compared with rice[J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(4): 460–469.
- [49] 张海伟, 黄宇, 叶祥盛, 徐芳森. 低磷胁迫下甘蓝型油菜酸性磷酸酶对磷效率的贡献分析[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(5): 418–427.

(责任编辑: 张平)