

丛枝菌根真菌预处理对铅胁迫下美洲黑杨雌雄株 生理生化特征的影响

谭灵杰, 胡相伟, 王小军, 陈良华*

(四川农业大学 生态林业研究所, 长江上游生态安全协同创新中心, 林业生态工程四川省重点实验室, 成都 611130)

摘 要: 该研究以美洲黑杨(*Populus deltoides*)雌、雄株为对象, 采用盆栽实验方法, 通过接种丛枝菌根真菌(AMF)预处理美洲黑杨雌雄株后再进行铅(Pb)胁迫(200 mg/kg)处理, 雌、雄株分别设置 4 个处理(对照、只接种 AMF 处理、只进行 Pb 污染处理、接种 AMF 后进行 Pb 污染处理), 分析不同处理下美洲黑杨雌、雄株生物量积累与分配、叶铅浓度、抗氧化酶活性、氧化还原平衡、活性氧分子(ROS)含量的变化, 以明确接种 AMF 预处理对美洲黑杨雌雄株 Pb 耐受性差异的影响并探讨其生理机制, 为美洲黑杨在重金属污染区的性别选择推广提供理论依据。结果显示: (1) Pb 污染对美洲黑杨的生物量积累与分配、叶铅浓度、抗氧化能力等方面具有显著影响且存在性别差异, 雄株根冠比和 ROS 含量的变化幅度显著低于雌株, SOD 和 APX 活性显著高于雌株, 表现出更高的耐受性, 而雌株对 Pb 胁迫更敏感。(2) 接种 AMF 能显著提高美洲黑杨雌株抗氧化酶活性和氧化还原平衡能力, 促进抗氧化物的合成, 抑制 ROS 产生, 缓解膜脂过氧化程度, 减轻 Pb 离子的毒害作用, 但菌根对雄株的影响不显著。(3) 相关分析显示, 除总生物量、TG 含量、ASA/DHA 比值和 POD 活性外, 性别差异对美洲黑杨其他指标均有显著影响; Pb 处理极显著地影响除 SOD 和 GR 活性以外的所有指标; 接种 AMF 对美洲黑杨总生物量、根冠比与 GR 活性影响显著, 对叶铅浓度、TG 含量、ASA/DHA 比值、H₂O₂ 与 MDA 含量、SOD 和 APX 活性影响极显著。研究表明, 美洲黑杨雄株比雌株对 Pb 胁迫的耐受性更强, 而雌株更敏感, 与 AMF 的共生可提高雌株对于 Pb 污染土壤的适应性, 缓解雌株受 Pb 胁迫的影响, 但菌根与雄株的共生不利于雄株适应 Pb 污染环境, 这可能与接种 AMF 促进雄株叶片的 Pb 含量有关; 在 Pb 污染较严重的区域(Pb>200 mg/kg)推广种植美洲黑杨雄株更为适宜。

关键词: 丛枝菌根真菌; 美洲黑杨; 铅胁迫; 雌雄异株; 生理生化

中图分类号: Q945.79

文献标志码: A

Effects of AMF on Physiological and Biochemistry Characteristics of Male and Female *Populus deltoides* under Lead Stress

TAN Lingjie, HU Xiangwei, WANG Xiaojun, CHEN Lianghua*

(Institute of Ecology & Forestry, Sichuan Agricultural University, Collaborative Innovation Center of Ecological Security in the Upper Reaches of Yangtze River, Key Laboratory of Ecological Forestry Engineering, Chengdu 611130, China)

Abstract: Pb (200 mg/kg) was put in soil where male and female *Populus deltoides* were planted after arbuscular mycorrhizae fungi (AMF) inoculation. Four treatments (check, only AMF pretreatment, only Pb treatment, AMF pretreatment and Pb treatment) were arranged to study responses in total biomass accu-

收稿日期: 2017-04-12; 修改稿收到日期: 2017-07-03

基金项目: 国家自然科学基金(31300513); 长江上游生态安全协同创新中心开往基金项目

作者简介: 谭灵杰(1992—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事林木生理生态学研究。E-mail: Vivian_ling@yeah.net

* 通信作者: 陈良华, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事林木生理生态学研究。E-mail: chenlh@sicau.edu.cn

mulation and distribution, Pb concentration, antioxidant enzyme activities, redox equilibrium, variation of ROS contents in leaves of male and female *P. deltoides*. Our aim was to understand the effects of AMF inoculation on physiology of male and female *P. deltoides* in response to Pb pollution, which is helpful for the selection and promotion of *P. deltoides* in heavy metal polluted areas. The results showed that: (1) Pb pollution exerted a significant influence on the biomass accumulation and distribution, Pb concentration in leaves, activities of antioxidant enzymes, and there were sex-specific differences. Comparing to females, there were lower changes in both root-shoot ratio and ROS content, but a greater increase in activities of both SOD and APX in males. The males exhibited a higher tolerance to Pb stress, while females were more sensitive; (2) The antioxidant enzyme activities and the redox equilibrium in leaves of females were improved by means of AMF inoculation. Symbiosis with AMF promoted the synthesis of antioxidants, but decreased toxic ion accumulation in leaves, the ROS content, and thus the extent of membrane lipid peroxidation in leaves. However, such beneficial effect from mycorrhiza was not obvious in males; (3) The correlation analysis showed that sex as a factor significantly affected all the indexes except total biomass, TG, ASA/DHA, and POD activity. All indexes in our study are affected by Pb pollution very significantly excepting activities of SOD and GR. AMF inoculation highly significantly affected Pb concentration in leaves, TG, ASA/DHA, H₂O₂ content, MDA content, and the activities of SOD and APX. Meanwhile, AMF inoculation as a factor also significantly influenced the total biomass, root-shoot ratio and GR activity. In conclusion, the male *P. deltoides* are more tolerate to Pb stress than the female. However, the adaptation to Pb pollution of female *P. deltoides* could be improved by symbiosis with AMF, and the negative effect from Pb stress in females was alleviated by the mutualism with AMF. Due to the increase of Pb accumulating in leaves of males, it seemed that the Pb stress became more severe when inoculated with AMF. The increase of toxic ion accumulation may cover the positive effect of mycorrhiza on males. Therefore, our results suggested that male *P. deltoides* might be a proper selection for phytoremediation of Pb polluted area severely (Pb>200 mg/kg).

Key words: arbuscular mycorrhizae fungi; *Populus deltoides*; lead stress; dioecy; physiology and biochemistry.

土壤重金属污染问题在中国广泛存在,不同来源的重金属污染物正随着工业化、城市化、农业集约化的快速发展不断地进入土壤环境,对饮用水源和人居环境造成严重破坏。铅(Pb)作为对环境最具威胁的重金属之一,因为其高毒性和不可逆性一直备受关注,当土壤中 Pb 元素含量过高,将会影响到土壤微环境和植物生长发育。大量研究表明,Pb 污染会影响植物的光合作用、生物量积累与产量形成,还会影响植物的养分吸收和利用效率,扰乱活性氧代谢和胞内氧化还原平衡,引起膜脂过氧化,破坏细胞的生物大分子(细胞膜、核酸和蛋白质)结构等^[1-4],从而对植物正常生长发育造成干扰。

杨树被应用于防护林、植被修复、工业用材林等多个方面,在中国种植历史悠久且分布广泛^[5]。美洲黑杨(*Populus deltoides*)属于引进种,因其速生、优质、高产、适应性强等优点^[6-7],被广泛种植于长江中下游和江淮平原地区,用于工业用材和生态防护林建设。长江中下游地区工业发展迅速,重金属污染严重,美洲黑杨由于其抗逆性强、生物量大、生长迅速等优点,是重要的短轮伐期树种,且因不会进入

食物链等特点,具有修复和改良重金属污染土壤的潜力。目前,在该区域栽培的美洲黑杨既有雌株品系,又有雄株品系^[8],但缺乏雌雄品系间耐受性和重金属积累能力差异的研究^[9],不利于重金属污染区美洲黑杨品系的筛选和应用。

丛枝菌根(arbuscular mycorrhizae, AM)是土壤中真菌与高等植物根系的共生体,广泛存在于自然界,宿主植物与丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizae fungi, AMF)的共生有助于提高植物对重金属胁迫的耐受性和重金属积累能力。接种 AMF 能够促进植物各部分生物量的积累^[10],增强植物重金属的吸存能力,并能改变植物对重金属的吸收、转运和分配模式,降低其毒害性^[11-12]。菌根能提高植物对 N、P 的吸收和同化能力,促进养分吸收^[13-14],间接提高宿主植物的抗逆性。此外,接种 AMF 会影响宿主植物的信号转导和抗逆基因的表达,如编码植物螯合素合酶(PCS)、金属离子运输体(NRAMP)等基因的表达^[15]。目前,对重金属胁迫下植物的抗逆生理学研究非常多,但接种 AMF 对木本植物重金属生理适应性影响的研究相对较少,

不利于速生木本植物-菌根真菌复合模式的筛选及在污染区域的推广应用。因此,本试验以美洲黑杨雌雄株为对象,研究 Pb 胁迫对美洲黑杨雌雄株生物量积累、抗氧化能力、重金属吸收的影响,关注接种根内球囊霉菌(*Glomus intraradices*)对美洲黑杨雌雄株 Pb 耐受性影响的生理机制,为美洲黑杨在重金属污染区的性别选择和应用推广提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料与处理

实验材料为美洲黑杨一年生枝条,取自江苏镇江京口区共青团农场种质资源圃,是中国在“六五”期间经过人工授粉的美洲黑杨杂交种 F₁ 代。实验所用 AMF 为 *G. intraradices*,购买于北京市农林科学院植物营养与资源研究所中国丛枝菌根真菌种质研究库。

将美洲黑杨扦插条(雌雄各 300 支)用 0.5% NaClO 溶液灭菌 30 min 后用无菌水清洗,用 Hoagland 营养液水培系统培养 45 d,雌雄各取 100 株具有相似高度(约 10 cm)和相似根长(最长的根约为 10 cm)的幼苗用于沙培。

沙培基质(粗砂:蛭石:珍珠岩=3:1:1)通过 0.11 MPa、121 ℃ 高压蒸汽处理 2 h 后,取 12 kg 放入圆台形花盆中(容积 7.32 L,高 20 cm,上下口径分别是 25 和 18 cm)。扦插苗移栽时,雌雄各取 50 株进行接种菌根真菌处理。菌种分离自重金属污染区先锋草本植物双穗雀稗(*Paspalum paspaloides*)和狗牙根(*Cynodon dactylon*)的根际土壤,通过单孢培养扩繁到高粱的根系,接种物是含有孢子、侵染根段、外生菌丝和培养基质的混合繁殖物(每克菌剂含约 50 个真菌孢子)。每株美洲黑杨幼苗根部接种 20 g 菌剂,为减小对照处理与接种菌根处理的环境差异,使用等量灭活菌剂放置于对照植株根部,并浇入 50 mL 不含 AMF 繁殖体滤液。为补充沙培基质中原有的微生物群落,所有的盆中浇入 150 mL 滤去 AMF 繁殖体的沙培基质滤液。以上 2 种滤液均通过湿筛倾析法获得,接种物(或培养基质)与蒸馏水的质量比为 1:20,上层土壤筛为 200 目,下层土壤筛为 400 目。每周每盆加入 100~200 mL 营养液,每天浇入适量无菌水,保证基质内营养和水分的充分供给。

接种 AMF1 个月后,取未接种和已接种 AMF 的雌雄株各 25 株进行 Pb 污染处理,均匀施加 2 mmol·L⁻¹ 的 Pb(NO₃)₂,污染物分 10 次添加,每 3

d 1 次,每次约 500 mL,最终达到每千克基质 200 mg Pb 的污染水平。总体来看,成都平原农田土壤受 Pb 污染较严重,有些地方的土壤 Pb 含量超过了 200 mg·kg⁻¹ 土壤^[16],因此本研究 Pb 污染水平设置为 200 mg·kg⁻¹ 土壤。根据中国 GB15618-1995《土壤环境质量标准》,对于 I 类土壤环境质量标准,这一 Pb 污染水平属重度污染,但未达到 II 类污染水平。每个处理 5 次重复,每个重复包含 5 株幼苗。实验处理为:(1)雌雄株未接种 AMF 且未进行 Pb 污染处理,作为对照,分别标记为 W1-F 和 W1-M;(2)雌雄株只接种 AMF,分别标记为 J1-F 和 J1-M;(3)雌雄株只进行 Pb 污染处理,分别标记为 W2-F 和 W2-M;(4)雌雄株接种 AMF 且进行 Pb 污染的交互处理,分别标记为 J2-F 和 J2-M。处理开始于 2014 年 6 月 15 日,结束于 2014 年 9 月 30 日。实验在半控制状态下的温室大棚中进行(仅遮雨)。实验期间月平均气温和相对湿度分别为 21~25 ℃ 和 45%~87%。

1.2 指标测定

1.2.1 生物量 每个性别每个处理随机选择 5 株幼苗,根、茎、叶分别收获,105 ℃ 杀青 30 min 后,65 ℃ 烘干至恒重,分别称重,计算总生物量和根冠比。

1.2.2 叶铅含量 将收获植株的叶片充分研磨过 100 目筛,使用微波消解仪(CEM, Matthews, NC)进行消解和火焰原子吸收分光光度计(AA7000, Shimadzu, Japan)测定溶液 Pb 含量。

1.2.3 活性氧(ROS)含量和脂质过氧化程度 将新鲜叶片(0.3 g)于 4 ℃ 用 6 mL 提取液[含 0.6 mmol·L⁻¹ EDTA、2% PVP、0.3% Triton X100、2 mmol·L⁻¹ 二硫代苏糖醇(DTT)的 50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH=7.8)]充分研磨后,低温离心 15 min(4 ℃, 12 000 r·min⁻¹)后取上清液,使用羟胺氧化法测定超氧阴离子的产生速率,利用 H₂O₂ 和 TiCl₄ 反应生成过氧化物-钛复合物的原理测定叶片中的 H₂O₂ 的含量,使用硫代巴比妥酸加热显色法来测定丙二醛(MDA)的含量,详细方法参见 Chen 等的研究^[17]。

1.2.4 小分子抗氧化物含量 参考 Kampfenkel 等^[18] 的研究并稍加改进,采用 DTNB-GR 酶促反应测定氧化型谷胱甘肽(GSSG)和谷胱甘肽总量(TG),采用钼蓝比色法测定还原型抗坏血酸(ASA)和抗坏血酸总量(TA)。

1.2.5 抗氧化酶活性 采用 NBT 光化还原法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性、愈创木酚法测定过

氧化物酶(POD)活性、ASA-H₂O₂ 氧化还原法测定抗坏血酸过氧化物酶(APX)和 NADPH 氧化法测定谷胱甘肽还原酶(GR)活性,详细方法参考 Chen 等的研究^[19]。

1.3 数据整理与分析

采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 20.0 for windows 软件对以上参数指标进行整理与统计分析,处理间采用单因素方差分析与多重比较(Tukey 法,α=0.05),OriginPro 9.0 作图。

2 结果与分析

2.1 不同处理下美洲黑杨雌雄株的总生物量和根冠比

图 1 表明,Pb 污染对美洲黑杨雌雄株根冠比有显著抑制作用,但对总生物量无显著影响。Pb 处理条件下,接种 AMF 均能促进受 Pb 胁迫美洲黑杨雌雄株总生物量积累和根冠比增大,但未达显著水平。

2.2 不同处理下美洲黑杨雌雄株叶铅浓度

图 2 所示,与对照相比,Pb 处理显著增加美洲黑杨雌雄株叶铅浓度,雌雄株分别增加 48.49 和 80.82 mg·kg⁻¹,接种 AMF 能显著促进 Pb 污染条件下美洲黑杨叶铅浓度的提高,且雄株显著高于雌株。

2.3 不同处理下美洲黑杨雌雄株叶片内 ROS 含量

通过多重比较发现(表 1),单独 Pb 处理时,雌株叶片内超氧阴离子、H₂O₂、MDA 含量显著升高,增幅分别为 61%、122% 和 249%;雄株叶片内仅 H₂O₂ 含量显著升高,增幅为 45%。因此,Pb 污染

条件下雌株具有比雄株更高的超氧阴离子、H₂O₂ 和 MDA 含量,而这些参数在对照条件下无显著的性别差异。与单独 Pb 污染处理相比,接种 AMF 能提高受 Pb 胁迫雄株叶片内 ROS 含量,尤其是 H₂O₂ 和 MDA,而雌株叶片内 ROS 含量均显著降低。

2.4 不同处理下美洲黑杨雌雄株叶片内氧化还原平衡特征

图 3 表明,单独接种 AMF 和单独 Pb 处理均增加了 2 种性别叶片中 TG 总量,但未达显著水平。单独 Pb 污染条件下,雄株叶片内 GSH/GSSG 值显著增加,而雌株叶片内无显著变化,且雄株显著高于雌株;接种 AMF 能显著提高受 Pb 胁迫雌株叶片内 GSH/GSSG 值。

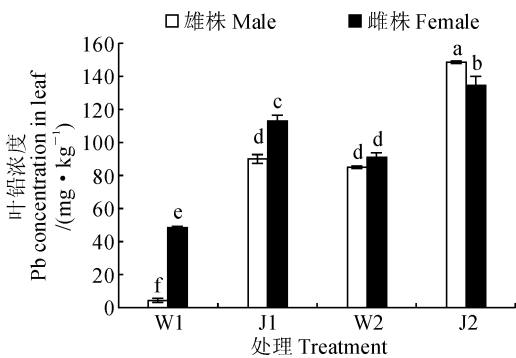
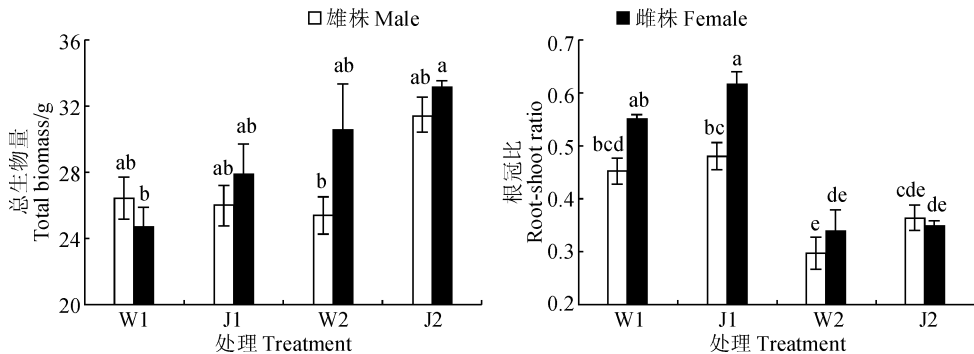


图 2 接种 AMF 对受 Pb 污染美洲黑杨雌雄株叶铅浓度的影响

Fig. 2 The effects of AMF inoculation on Pb concentration in leaves of females and males of *P. deltoides* under control and Pb-polluted conditions



图中不同字母表示处理间差异显著(P<0.05)。W1. 对照;J1. 只接种 AMF 处理;W2. 只进行 Pb 污染处理;J2. 接种 AMF 后进行 Pb 污染处理;下同

图 1 接种 AMF 对受 Pb 污染美洲黑杨雌雄株总生物量与根冠比的影响

The values above the columns with different letters indicate significant differences among different treatments (P<0.05).

W1. Non-inoculation + non-Pb polluted; J1. Inoculation + non-Pb polluted; W2. Non-inoculation + Pb polluted; J2. Inoculation + Pb polluted; The same as below

Fig. 1 The effects of AMF inoculation on total biomass and root-shoot ratio of females and males of *P. deltoides* under control and Pb-polluted conditions

表 1 AMF 对 Pb 污染下的美洲黑杨雌雄株叶片内 ROS 含量的影响

Table 1 The effects of AMF inoculation on ROS content in the leaves of female and male *P. deltoides* exposed to Pb pollution

处理 Treatment	性别 Sex	超氧阴离子 O ₂ ⁻ Superoxide anion/(μmol · g ⁻¹ · min ⁻¹)	过氧化氢 H ₂ O ₂ /(mmol · g ⁻¹)	丙二醛 MDA/(nmol · g ⁻¹)
W ₁	雄株 Male	28.03±0.02bc	0.60±0.01c	8.69±0.38cd
W ₁	雌株 Female	31.02±1.51bc	0.49±0.03c	8.77±0.08cd
J ₁	雄株 Male	26.73±1.41c	0.55±0.04c	7.40±0.25d
J ₁	雌株 Female	35.38±1.79bc	0.33±0.02d	8.27±0.66d
W ₂	雄株 Male	36.15±2.61bc	0.87±0.03b	12.91±1.47c
W ₂	雌株 Female	49.95±2.47a	1.09±0.04a	30.62±1.48a
J ₂	雄株 Male	36.87±1.91b	1.04±0.02a	23.37±0.52b
J ₂	雌株 Female	34.35±1.95bc	0.57±0.01c	12.94±1.07c

注:同列不同字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下同

Note: The different letters in the same column indicate significant differences among different treatments ($P < 0.05$). The same as below

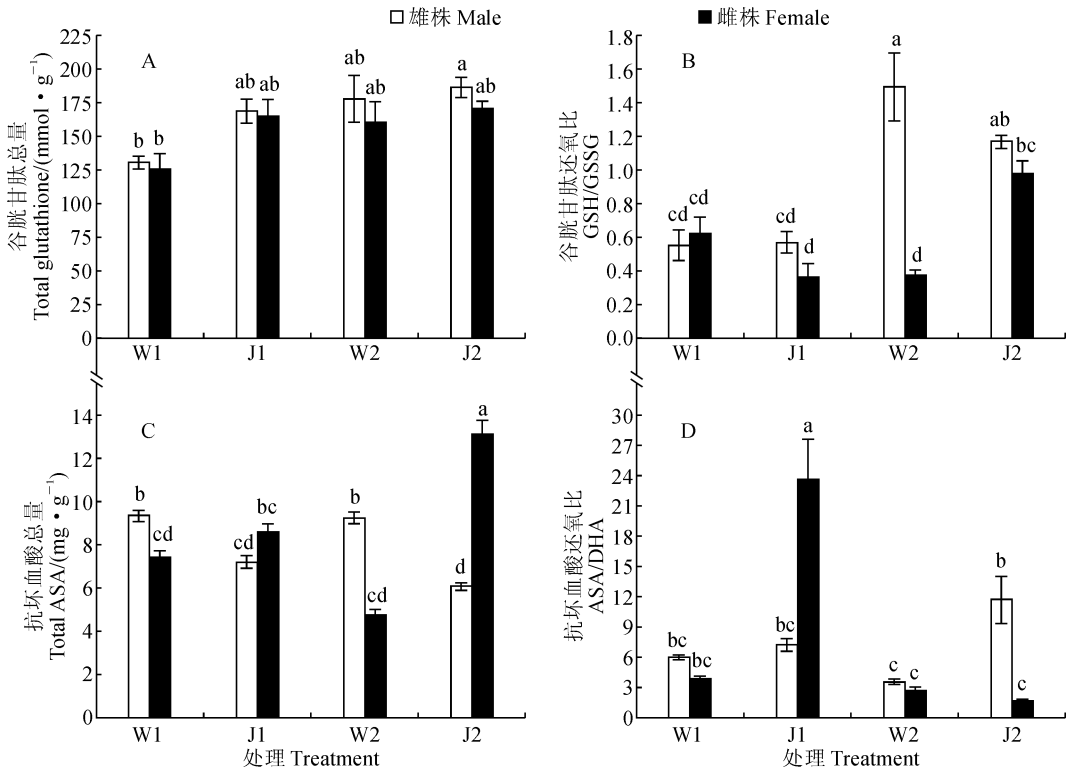


图 3 接种 AMF 对受 Pb 污染美洲黑杨雌雄株叶片内抗氧化物及其还原比的影响

Fig. 3 The effects of AMF inoculation on the content and reduced-oxidized ratio of antioxidant in leaves of female and male *P. deltoides* under control and Pb-polluted conditions

对照和单独 Pb 处理条件下,雄株叶片内 TA 含量和 ASA/DHA 值均显著高于雌株;与对照相比,Pb 处理对 2 种性别的 TA 含量无显著影响,但 ASA/DHA 值有一定程度降低;Pb 污染条件下,接种 AMF 显著降低了雄株的 TA 含量,但显著增加了 ASA/DHA 值,而接种 AMF 对雌株的效应相反,TA 含量显著升高,对 ASA/DHA 的影响不

显著。

2.5 不同处理下美洲黑杨雌雄株叶片内抗氧化酶活性

如图 4 所示,单独 Pb 污染条件下,美洲黑杨雄株叶片内 SOD、POD 和 APX 的活性显著增加,增幅分别为 38%、83%、795%,GR 活性变化不显著;单独 Pb 污染仅显著增加了雌株叶片的 POD 活性,

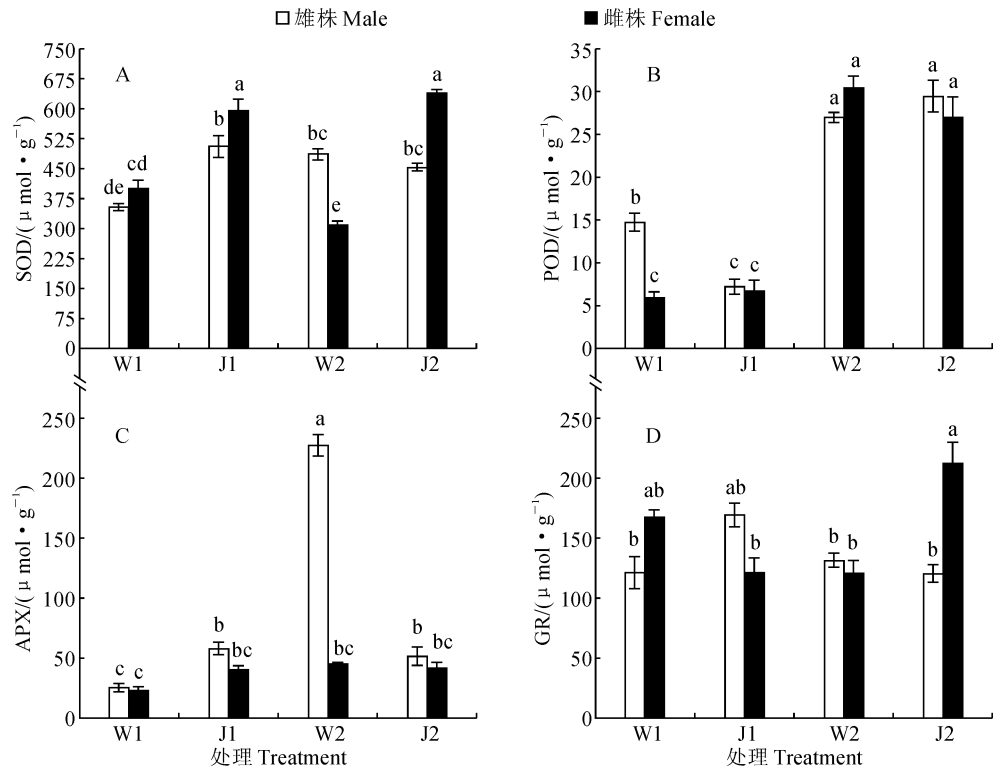


图 4 接种 AMF 对受 Pb 污染美洲黑杨雌雄株叶片内抗氧化酶活性的影响

Fig. 4 The effects of AMF inoculation on the activities of antioxidant enzymes in leaves of female and male *P. deltoides* under control and Pb-polluted conditions

表 2 美洲黑杨性别、Pb 污染、接种丛植菌根真菌及其交互作用对各指标影响的显著性分析

Table 2 The significance testing for the effects of sex, Pb treatment, AMF inoculation and the interaction on parameters of *P. deltoides*

指标 Index	F _S	F _P	F _A	F _{S×P}	F _{S×A}	F _{P×A}	F _{S×P×A}
总生物量 Total biomass	0.119	0.002**	0.016*	0.135	0.977	0.187	0.113
叶铅浓度 Pb concentration in leaf	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.890
根冠比 Root-shoot ratio	0.002**	0.000***	0.026*	0.009**	0.769	0.829	0.198
TG	0.204	0.004**	0.008**	0.444	0.928	0.084	0.988
GSH/GSSG	0.000***	0.000***	0.908	0.001***	0.032*	0.080	0.000***
TA	0.001***	0.001***	0.334	0.000***	0.000***	0.008**	0.000***
ASA/DHA	0.474	0.000***	0.000***	0.000***	0.063	0.01**	0.000***
O ₂	0.001***	0.000***	0.053	0.950	0.077	0.006**	0.001***
H ₂ O ₂	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***
MDA	0.005**	0.000***	0.003**	0.024*	0.000***	0.048*	0.000***
SOD	0.011*	0.523	0.000***	0.021*	0.000***	0.352	0.000***
POD	0.051	0.000***	0.064	0.018*	0.561	0.165	0.002**
APX	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***	0.000***
GR	0.021*	0.863	0.017*	0.016*	0.769	0.022*	0.000***

注：*、**、*** 分别代表 $0.01 < P \leq 0.05$, $0.001 < P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$ 。F_S, 性别效应; F_P, Pb 效应; F_A, 菌根效应; F_{S×P}, 性别与 Pb 的交互效应; F_{S×A}, 性别与菌根的交互效应; F_{P×A}, Pb 与菌根的交互效应; F_{S×P×A}, 性别、Pb 和菌根三者的交互效应

Note: *, **, *** represent for $0.01 < P \leq 0.05$, $0.001 < P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$, respectively. F_S, Sex effect; F_P, Pb effect; F_A, AMF effect; F_{S×P}, The interactive effect of Pb and sex; F_{S×A}, The interactive effect of sex and AMF; F_{P×A}, The interactive effect of Pb and AMF; F_{S×P×A}, The interactive effect of sex, Pb and AMF

表 3 美洲黑杨不同指标间相关性分析

Table 3 The correlation between different indexes of *P. deltoides*

指标 Index	Pb	T	R/S	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	MDA	TG	GSH /GSSG	TA	ASA /DHA	SOD	POD	APX
GR	0.173	0.089	-0.099	-0.26	-0.359	-0.284	0.003	0.076	0.487*	-0.394	0.526**	-0.102	-0.117
APX	0.085	-0.24	-0.514*	0.093	0.312	0.007	0.393	0.682**	0.187	-0.177	0.119	0.346	
POD	0.420*	0.499*	-0.869**	0.582**	0.821**	0.761**	0.426*	0.495*	0.173	-0.368	-0.122		
SOD	0.586**	0.193	0.137	-0.234	-0.489*	-0.420*	0.397	0.238	0.539**	0.309			
ASA /DHA	0.252	0.002	0.566**	-0.042	-0.363	-0.205	0.121	-0.291	-0.295				
TA	0.056	0.254	-0.226	-0.129	-0.293	-0.289	0.061	0.247					
GSH /GSSG	0.316	0.085	-0.539**	-0.009	0.382	0.047	0.366						
TG	0.690**	0.151	-0.416*	0.155	0.353	0.331							
MDA	0.383	0.439*	-0.588**	0.817**	0.863**								
H ₂ O ₂	0.252	0.314	-0.746**	0.605**									
O ₂ ⁻	0.342	0.346	-0.405*										
根冠比 Root-shoot ratio	-0.239	-0.275											
总生物量 Total biomass	0.575**												

注: Pb. 叶铅浓度; T. 总生物量; R/S. 根冠比; O₂⁻. 超氧阴离子; *, **, *** 分别表示 0.01 < P < 0.05 和 P ≤ 0.01

Note: Pb. Pb concentration in leaf; T. Total biomass; R/S. Root-shoot ratio; O₂⁻. Superoxide anion; *, **, *** represent for 0.01 < P < 0.05 and P ≤ 0.01, respectively

抑制了 SOD 活性,对 APX 和 GR 活性无显著影响;接种 AMF 显著抑制受 Pb 胁迫雌株叶片的 APX 活性,对雌株 SOD 和 GR 活性有显著促进作用。此外,单独 Pb 处理条件下,雄株叶片 SOD 和 APX 活性显著高于雌株,而交互作用下雌株叶片 SOD 和 GR 活性显著高于雄株。

2.6 美洲黑杨不同因子影响显著性和相关性分析

由表 2 可知,除总生物量、TG 含量、ASA/DHA 比值和 POD 活性外,性别差异对美洲黑杨其他指标均有显著影响;Pb 处理极显著地影响除 SOD 和 GR 活性以外的所有指标;接种 AMF 对美洲黑杨总生物量、根冠比与 GR 活性影响显著,对叶铅浓度、TG 含量、ASA/DHA 比值、H₂O₂ 与 MDA 含量、SOD 和 APX 活性影响极显著。另外,表 3 显示,美洲黑杨叶片内超氧阴离子、H₂O₂ 和 MDA 含量两两间均呈极显著正相关关系,SOD、POD 活性与叶铅浓度呈显著正相关关系。

3 讨 论

大量研究表明,木本植物雌雄株在形态生长、资源分配、空间分布等方面存在一定的性别二态性,大多数情况下雌株对于逆境条件的反应更敏感^[20-23],比如青杨雌雄植株的干物质积累受叶面喷撒 Pb、土壤添加 Pb 以及干旱胁迫等的负面影响差异显著,

雌株对重金属胁迫更敏感,干旱增加了青杨雌株对 Pb 的敏感性^[24]。本研究发现 Pb 污染对美洲黑杨干物质积累无显著影响,相近水平的 Pb 污染也并没有显著影响巨桉(*Eucalyptus grandis*)^[25]、盐肤木(*Rhus chinensis*)^[26]、侧柏(*Platycladus orientalis*)^[27]等木本植物的生物量积累,但却显著减缓了大叶黄杨(*Euonymus japonicus*)^[28]等木本植物的生长,表明树种间对 Pb 胁迫的耐受性存在差异。在本研究 Pb 污染条件下,美洲黑杨雌雄株根冠比下降(雌株下降幅度更大),表明重金属污染影响了美洲黑杨雌雄株有机物向根系的分配,秦芳^[1]也发现土壤重金属污染会降低桑树的根冠比。根系直接与重金属污染物接触,同时也是积累重金属污染物的主要器官^[4],因而根系细胞受到的伤害可能大于其他器官,重金属污染影响了根系细胞的正常分裂、增殖和发育,根系作为植物吸收水分和矿质营养的主要器官,根系生长受阻将会影响美洲黑杨雌雄株的正常生长发育,尤其是雌株。此外,接种 AMF 对于 Pb 污染下美洲黑杨雌雄株总生物量和根冠比均有一定程度促进作用,表明 AMF 能够减轻 Pb 污染对美洲黑杨生物量积累与分配的负面影响,仝瑞建和刘雪琴也获得了相似的实验结果^[29],证明 AMF 能够在一定程度上缓解 Pb 污染对植物生长造成的伤害。

Pb 作为植物的非必需元素,对其生长发育有显著的毒害作用,会导致植物细胞内 ROS 的产生和清除不平衡,ROS 大量积累。ROS 会破坏细胞膜结构^[30],造成膜脂过氧化产物(如 MDA)的增加,ROS 和 MDA 是衡量植物细胞在逆境条件下受伤害程度的重要指标。本研究表明,Pb 污染下美洲黑杨雌株超氧阴离子、过氧化氢和丙二醛含量均显著增加,雄株仅过氧化氢含量显著增加,表明 Pb 对美洲黑杨雌雄株叶片均发生了氧化胁迫,雌株受到的氧化胁迫更严重,桑树^[1]和青杨^[4]的雌株在 Pb 污染条件下也受到了更强的氧化胁迫。接种 AMF 能显著减少雌株叶片的 ROS 含量,却一定程度增加了雄株叶片的 ROS 含量,说明接种 AMF 能显著提高雌株对 Pb 胁迫的耐受度,对雄株却产生了相反的效应,可能与交互条件下雄株叶铅浓度显著高于雌株有关。

植物抗氧化系统由抗氧化酶(SOD、POD、APX、GR 等)与抗氧化物(谷胱甘肽、抗坏血酸等)两部分构成。其中谷胱甘肽与抗坏血酸形成循环,参与植物细胞内 H₂O₂ 的清除过程,此外谷胱甘肽还可以直接与重金属离子络合,形成无毒化合物以降低毒性^[31-32]。前人研究表明,植物体内抗坏血酸含量与其抗逆性有密切联系,增加抗坏血酸含量或促进 DHA 还原,提高 ASA/DHA 值都能增强植物的抗逆性^[33-34]。本研究发现,虽然单独 Pb 污染对美洲黑杨雌雄株叶片内 TG、TA 和 ASA/DHA 影响均不显著,但能显著增加雄株叶片的 GSH/GSSG,且雄株显著高于雌株,说明 Pb 处理条件下雄株叶片内谷胱甘肽还原效率显著提高,有利于雄株的胞内脱毒。接种 AMF 对 Pb 处理下美洲黑杨叶片内 TG 和雄株叶片内 GSH/GSSG 值无显著影响,但雌株叶片内 GSH/GSSG 值明显增大,说明菌根效应对受 Pb 胁迫雌株叶片内谷胱甘肽还原效率有显著促进作用,有利于雌株适应 Pb 污染环境。此外,接种 AMF 处理还能显著增加受 Pb 胁迫雌株的 TA 含量,说明接种 AMF 能一定程度上增加雌株的抗氧化能力。另一方面,抗氧化酶系统在维持细胞内 ROS 代谢平衡、保护细胞膜和减轻细胞膜损伤等方面具有重要作用^[35-37],许多研究表明,Pb 污

染条件下,树木叶片内的抗氧化系统酶活性常常表现出“低促高抑”的规律^[27-28]。本研究表明,单独 Pb 污染能不同程度提高雄株叶片内抗氧化酶活性,而雌株叶片内仅 POD 显著升高,SOD 活性却显著下降,说明在该浓度的 Pb 处理下,雄株能够有效激活细胞内的抗氧化酶活性,提高淬灭胞内活性氧分子的能力,然而,单独 Pb 污染条件下,与雌株相比,雄株叶片内积累了较高的 Pb 离子,说明雄株具有更强的 Pb 胁迫耐受性,与胡相伟等对于青杨受 Pb 污染下离子富集以及抗逆性的性别差异相似^[4]。接种 AMF 条件下,雌株的抗氧化酶活性(SOD 和 GR)显著升高,加之 TA 含量及 GSH/GSSG 的升高,有利于受 Pb 胁迫雌株的胞内脱毒,降低受 Pb 胁迫条件下的活性氧分子含量。但菌根的正面效应并没有在雄株上观察到。

本研究通过接种外源 AMF,研究菌根对受 Pb 污染的美洲黑杨雌雄株生物量、根冠比、ROS 和 MDA 含量、抗氧化酶活性、抗氧化物及其氧化还原平衡的影响,关注了不同性别美洲黑杨对 Pb 污染的耐受性差异。在 200 mg/kg 的 Pb 污染条件下,美洲黑杨雌雄株的生长和生物量没有受到明显的负面影响,但雌雄植株叶片内活性氧含量有不同程度升高,氧化还原平衡受到显著影响,抗氧化酶活性显著升高,表明美洲黑杨雌雄株不同程度地受到了 Pb 污染引起氧化胁迫,这种胁迫可能会影响美洲黑杨雌雄株的后续生长和发育。单独 Pb 污染条件下,与雌株相比,雄株抗氧化酶活性更强,谷胱甘肽和抗坏血酸总量及其还原比更高,ROS 和 MDA 含量更低,表现出了更强的 Pb 胁迫耐受性,雌株表现更敏感。另一方面,接种 AMF 提高了雌株抗氧化酶的活性,增加了 GSH/GSSG 比值,有效降低了雌株的 ROS 含量,但菌根的正面效应并没有表现在雄株中,这些结果表明 AMF 可以提高雌株对于 Pb 污染土壤的适应性,而与菌根的共生不利于雄株适应 Pb 污染环境。因此,在 Pb 污染较严重的区域(>200 mg/kg),在营造人工林或园林绿化时,选用美洲黑杨雄株品系更为适合。

参考文献:

[1] 秦芳,胥晓,刘刚,等. 桑树(*Morus alba*)幼苗对铅污染的生理耐性和积累能力的性别差异[J]. 环境科学学报, 2014,

34(10): 2 615-2 623.
QIN F, XU X, LIU G, *et al.* Sexual differences in physiological tolerance and accumulation capacity against lead pollution in *Morus alba* seedlings[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*,

2014, **34**(10): 2 615-2 623.

[2] 庞欣,王东红,彭安. 铅胁迫对小麦幼苗抗氧化酶活性的影响[J]. 环境科学, 2001, **22**(5): 108-111.
PANG X, WANG D H, PENG A. Effect of lead stress on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedling[J]. *Environmental Science*, 2001, **22**(5): 108-111.

[3] XU Z Y, BAN Y H, YANG R, *et al.* Impact of *Funneliformis mosseae* on the growth, lead uptake, and localization of *Sophora viciifolia* [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2016, **62**(4): 361-373.

[4] 胡相伟,张明锦,徐睿,等. 铅污染对青杨雌雄幼苗铅富集和营养特征的影响[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(4): 809-815.
HU X W, ZHANG M J, XU R, *et al.* Effect of Pb pollution on accumulation of Pb and nutrient status of female and male cuttings of *Populus cathayana* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(4): 809-815.

[5] CHEN J, DONG T, DUAN B, *et al.* Sexual competition and N supply interactively affect the dimorphism and competitiveness of opposite sexes in *Populus cathayana* [J]. *Plant Cell & Environment*, 2015, **38**(7): 1 285-1 298.

[6] 江锡兵,宋跃朋,马开峰,等. 杨树杂种无性系生长与光合生理遗传变异研究[J]. 西北植物学报, 2011, **31**(9): 1 779-1 785.
JIANG X B, SONG Y P, MA K F, *et al.* Genetic variation of growth traits and photosynthetic physiology of *Populus* hybrid clones[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, **31**(9): 1 779-1 785.

[7] 丁昌俊,黄秦军,张冰玉,等. 北方型美洲黑杨不同无性系重要性状评价[J]. 林业科学研究, 2016, **29**(3): 331-339.
DING C J, HUANG Q J, ZHANG B Y, *et al.* Evaluation of important traits of different clones of North-typed of *Populus deltoides* [J]. *Forest Research*, 2016, **29**(3): 331-339.

[8] YANG L, DUAN B, CHEN J, *et al.* Males exhibit competitive advantages over females of *Populus deltoides* under salinity stress[J]. *Tree Physiology*, 2016, **36**(12): 1 573-1 584.

[9] YANG Y, JIANG H, WANG M, *et al.* Male poplars have a stronger ability to balance growth and carbohydrate accumulation than do females in response to a short-term potassium deficiency[J]. *Physiologia Plantarum*, 2015, **155**(4): 400.

[10] 刘婷,唐明. 丛植菌根真菌对杨树生长、气孔和木质部微观结构的影响[J]. 植物生态学报, 2014, **38**(9): 1 001-1 007.
LIU T, TANG M. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and anatomical properties of stomata and xylem in poplars[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2014, **38**(9): 1 001-1 007.

[11] CITTERIO S, PRATO N, FUMAGALLI P. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa* L. [J]. *Chemosphere*, 2005, **59**(1): 21-29.

[12] YANG Y R, LIANG Y, HAN X Z, *et al.* The roles of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in phytoremediation and tree-herb interactions in Pb contaminated soil[J]. *Scientific Reports*, 2016, **6**(12): 20 469.

[13] 刘洁,刘静,金海如. 丛植菌根真菌 N 代谢与 C 代谢研究进展[J]. 微生物学杂志, 2011, **31**(6): 70-75.
LIU J, LIU J, JIN H R. Advancement in arbuscular mycorrhizal fungi's N metabolic and C metabolic[J]. *Journal of Microbiology*, 2011, **31**(6): 70-75.

[14] GARG N, CHANDER S. Arbuscular mycorrhizal networks: Process and functions. A review[J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2010, **30**(3): 581-599.

[15] HILDEBRANDT U, HOEF-EMDEN K, BACKHAUSEN S, *et al.* The rare, endemic zinc violets of Central Europe originate from *Viola lutea* Huds [J]. *Plant Systematics & Evolution*, 2006, **257**(3): 205-222.

[16] 谭婷,王昌全,李冰,等. 成都平原土壤铅污染及其评价[J]. 长江流域资源与环境, 2005, **14**(1): 71-75.
TANG T, WANG C Q, LI B, *et al.* Pollution and evaluation of Pb in soil in Chengdu plain[J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2005, **14**(1): 71-75.

[17] CHEN L H, HU X W, YANG W Q, *et al.* The effects of arbuscular mycorrhizal fungi on sex-specific responses to Pb pollution in *Populus cathayana* [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2015, **113**: 460-468.

[18] KAMPFENKEL K, VANMONTAGU M, INZE D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue[J]. *Analytical Biochemistry*, 1995, **225**(1): 165-167.

[19] CHEN L, HAN Y, JIANG H, *et al.* Nitrogen nutrient status induces sexual differences in responses to cadmium in *Populus yunnanensis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, **62**(14): 5 037-5 050.

[20] LI Z, WU N, LIU T, *et al.* Effect of arbuscular mycorrhizal inoculation on water status and photosynthesis of *Populus cathayana* males and females under water stress[J]. *Physiol Plant*, 2015, **155**(2): 192-204.

[21] ZHANG S, JIANG H, ZHAO H, *et al.* Sexually different physiological responses of *Populus cathayana* to nitrogen and phosphorus deficiencies[J]. *Tree Physiology*, 2014, **34**(4): 343-354.

[22] 翟飞飞,孙振元. 木本植物雌雄株生物学差异研究进展[J]. 林业科学, 2015, **51**(10): 110-116.
ZHAI F F, SUN Z Y. Progress in study on sexual differences of woody dioecious plants[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, **51**(10): 110-116.

[23] XU Z F, CHEN L H, TANG S S, *et al.* Sex-specific responses to Pb stress in *Populus deltoides*: Root architecture and Pb translocation[J]. *Trees*, 2016: 1-9.

[24] HAN Y, WANG L, ZHANG X, *et al.* Sexually different in photosynthetic activity, ultrastructure and phytoremediation potential of *Populus cathayana* exposed to lead and drought [J]. *Tree Physiology*, 2013, **33**(10): 1 043-1 060.

[25] 林晓倩,张健,杨万勤,等. 3 种土壤类型下铅胁迫对巨桉幼苗的影响[J]. 林业科学, 2013, **49**(1): 1-6.

LIN X Q, ZHANG J, YANG W Q, *et al.* Effects of Pb stress on *Eucalyptus grandis* seedlings in three types of soil [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2013, **49**(1): 1-6.

[26] 施 翔,王树凤,潘红伟,等. 盐肤木幼苗对盐胁迫的生理响应[J]. 林业科学研究, 2016, **29**(1): 147-153.

SHI X, WANG S F, PAN H W, *et al.* Physiological responses of *Rhus chinensis* under lead stress[J]. *Forest Research*, **29**(1): 147-153.

[27] 周芙蓉,王进鑫,杨 楠,等. 干旱和铅交互作用对侧柏幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 林业科学, 2013, **49**(6): 172-177.

ZHOU F R, WANG J X, YANG N, *et al.* Interaction of drought and Pb on growth and antioxidant enzyme activities of *Platycladus orientalis* seedlings[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2013, **49**(6): 172-177.

[28] 李永杰,李吉跃,蔡 囊,等. 铅胁迫对大叶黄杨铅积累量及叶片生理特性的影响[J]. 水土保持学报, 2009, **23**(5): 257-260.

LI Y J, LI J Y, CAI N, *et al.* Effects of lead stress on the concentraion of lead accumulated and leaf physiological characteristics of *Euonymus japonicus* [J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2009, **23**(5): 257-260.

[29] 全瑞建,刘雪琴. AM 真菌对铅胁迫下小麦生长和生化特征的影响[J]. 西南农业学报, 2015, **28**(4): 1 578-1 581.

TONG J R, LIU X Q. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on growth and biochemical characteristics of wheat under Pb stress[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2015, **28**(4): 1 578-1 581.

[30] 杨 斌,张文辉,高建欣. 5 种速生柳无性系对 Pb²⁺胁迫的生理抗性比较[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(6): 1 182-1 189.

YANG B, ZHANG W H, GAO J X. Physiological resistance of five fast-growing willow clones to lead (Pb) stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(6): 1 182-1 189.

[31] 闫慧芳,毛培胜,夏方山. 植物抗氧化剂谷胱甘肽研究进展[J]. 草地学报, 2013, **21**(3): 428-434.

YAN H F, MAO P S, XIA F S. Research progress in plant antioxidant glutathione (Review)[J]. *Acta Agrectir Sinica*, 2013, **21**(3): 428-434.

[32] 王欣欣,邓明华,龚 明,等. Cd²⁺胁迫对小桐子幼苗叶片抗氧化系统的影响[J]. 西北植物学报, 2016, **36**(3): 527-533.

WANG X X, DENG M H, GONG M, *et al.* Effect of Cd²⁺ stress on antioxidant system in the leaves of *Jatropha curcas* seedlings[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2016, **36**(3): 527-533.

[33] GALLIE D R. The role of L-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, **64**(2): 433-443.

[34] 石永春,杨永银,薛瑞丽,等. 植物中抗坏血酸的生物学功能研究进展[J]. 植物生理学报, 2015,(1): 1-8.

SHI Y C, YANG Y Y, XUE R L, *et al.* Research advance of biological function of ascorbic acid in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2015,(1): 1-8.

[35] 刘拥海,俞 乐,陈奕斌,等. 不同荞麦品种对铅胁迫的耐性差异[J]. 生态学杂志, 2006, 25(11): 1344-1347.

LIU Y H, YU L, CHEN Y B, *et al.* Lead tolerance of different fagopyrum esculentum cultivars[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2006, **25**(11): 1 344-1 347.

[36] 原海燕,郭 智,黄苏珍. Pb 污染对马蔺生长、体内重金属元素积累以及叶绿体超微结构的影响[J]. 生态学报, 2011, **31**(12): 3 350-3 357.

YUAN H Y, GUO Z, HUANG S Z. Effects of Pb on growth, heavy metals accumulation and chloroplast ultra-structure of *Iris lactea* var. *Chinensis* [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, **31**(12): 3 350-3 357.

[37] YANG Y R, HAN X Z, LIANG Y. The combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and lead (Pb) stress on Pb accumulation, plant growth parameters, photosynthesis, and antioxidant enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(12): e0145726.

(编辑:宋亚珍)