

淹水胁迫下北美鹅掌楸无性系生理生化响应差异

孙小艳¹, 陈铭², 李彦强¹, 吴照祥¹, 钟永达¹, 余发新^{1*}

¹江西省科学院生物资源研究所, 南昌330096

²南昌大学江西医学院, 南昌330006

摘要: 北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*)是优良用材和绿化树种, 但极不耐涝, 阻碍了其广泛应用。本研究以前期试验筛选出的3个耐淹无性系(T4、T27和T37)和3个不耐淹无性系(S5、S9和S20)为实验材料, 开展温室盆栽模拟淹水胁迫实验, 通过比较丙二醛(MDA)含量、相对电导率(EL)、叶绿素含量, 以及酶活性等生理生化指标的差异, 探索不同无性系对淹水胁迫的响应和抗性差异。结果显示: 北美鹅掌楸对淹水胁迫反应敏感, 淹水4 d时, 耐淹无性系和敏感无性系均呈现下部老叶黄花, 上部嫩叶、顶芽萎蔫现象, 叶绿素含量减少, MDA、EL显著增加, 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(POD)等酶活性极显著增加。淹水6 d后, 敏感无性系受到的胁迫伤害进一步加剧, 叶片萎蔫脱落, MDA、EL持续增加, 叶绿素含量极显著降低, SOD和POD总体呈下降趋势; 而耐淹无性系顶芽缓慢恢复, 在叶片脱落后幼叶展开, 叶绿素含量下降幅度较小, MDA和EL缓慢下降, SOD和POD持续升高, 淹水20 d左右近水面的茎端形成不定根和大量膨大皮孔。研究表明: 耐淹型北美鹅掌楸可通过形成不定根和肥大的皮孔、保持较高的抗氧化酶活性等方式增强其抗涝能力; EL、叶绿素含量、SOD活性可作为北美鹅掌楸耐淹无性系中期选育指标。

关键词: 北美鹅掌楸; 淹水胁迫; 生理响应差异; 抗氧化酶活性

全球气候的剧烈变化和环境条件的不断恶化给植物的正常生长带来不同程度的影响。其中, 局部地区暴雨、洪涝灾害频繁发生, 使土壤水分长时间处于饱和状态或淹水状态, 渍涝成为绝大多数陆生植物生长的主要逆境因子之一。淹水胁迫对植物的损害主要是由土壤水分过多造成的缺氧或厌氧的次生胁迫引起的, 不仅限制了植物的光合作用与有氧呼吸, 还诱导植物体的无氧呼吸, 产生乳酸、乙醇、乙醛等有毒中间产物, 从而对细胞产生毒害, 影响植物正常生长发育和生理代谢(潘澜和薛立2012)。

在自然界中, 植物经常受到多种生物和非生物胁迫, 提高植物对逆境胁迫的耐性, 是适应未来气候变化的关键。国内外学者对植物在淹水胁迫下的形态、生长、生理、分子调控等特征变化进行了深入研究, 但主要集中于水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、芝麻(*Sesamum indicum*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)等农作物(Ahsan等2007; Keith等1986; Thomas等2005), 以及苹果(*Malus pumila*)、樱桃(*Prunus pseudocerasus*)、芒果(*Mangifera indica*)等经济林果树方面(Schaffer等2006), 对土壤渍涝状态下林木生长和生理变化的研究相对较少。目前, 我国学者正在逐步开展杨树(*Populus*) (李环等2010; 唐罗忠等1998)、柳树(*Salix variegata*)

(李娅等2008)、乌桕(*Sapium sebiferum*) (曹福亮等2010)、朴树(*Celtis sinensis*) (王哲宇等2013)、喜树(*Camptotheca acuminata*) (汪贵斌等2009)等木本植物的抗涝性研究, 揭示了林木树种在淹水胁迫下的形态结构和生理代谢的适应机制, 选育出林木优良高抗品种或基因型。大量研究显示, 不同植物对淹水胁迫的响应机制和耐淹性能有很大不同, 同一植物不同种源、家系和无性系间耐淹性能也存在显著差异(卓仁英和陈益泰2001)。但由于淹水条件的多样性以及植物对淹水胁迫反应的复杂性, 各种植物抗逆生理指标的选择和应用受到限制。所以, 通过研究淹水胁迫下植物不同家系/无性系的形态结构、生长和生理代谢响应的不同变化, 建立简单、稳定的抗逆性生理选育指标体系, 培育耐新涝无性系/品种是改善植物耐淹最有效的途径之一。

北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*)作为木兰科(Magnoliaceae)鹅掌楸属仅存的两个种之一, 广

收稿 2017-08-14 修定 2018-01-15

资助 江西省学术带头人培养计划项目(20133BCB22012)、江西省优势科技创新团队计划项目(20161BCB24008)、江西省科技支撑计划项目(20123BBF60179和20132BBF60032)和江西省科学院普惠项目(2013-XTPH2-8)。

* 通讯作者(yufaxin@jxas.ac.cn)。

泛分布于北美东南部,虽然在密西西比河流域季节性淹水地段部分种源表现出较好的适应性,但大部分种源、无性系在排水不畅或在地下水位高的地方栽植时根系容易发黑腐烂,生长严重受阻,这种不耐渍涝性状成为其大范围推广应用的主要障碍。张晓平等(2006)从生理生化特征以及显微和超微结构角度探讨了不同种源鹅掌楸和杂交鹅掌楸对淹水逆境的响应,发现浙江种源鹅掌楸和杂交鹅掌楸具有较强的耐淹能力。潘向艳等(2007)对不同杂交鹅掌楸无性系进行淹水胁迫,发现抗性强的无性系淹水8 d后超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(hydrogenperoxidase, CAT)、乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)、苯丙氨酸解氨酶(L-phenylalanin ammonia-lyase, PAL)等活性较高且维持时间长。李彦强等(2015)从形态和生长角度研究了不同北美鹅掌楸无性系的淹水响应差异,发现耐性无性系通过形成膝根、皮孔增大等方式提高其耐淹性,质膜相对透性、存活率和叶夹角等指标可作为快速鉴定苗木早期耐淹性的指标(李彦强2011),但北美鹅掌楸在淹水逆境下的生理生化响应特征还未见报道。所以本项目以前期引种选择的3个耐淹和3个不耐淹的北美鹅掌楸无性系为材料,通过抗氧化酶活性、叶绿素含量、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、相对电导率(electrolyte leakage, EL)等指标的测定,比较分析不同无性系对淹水胁迫的响应差异及其生理原因,探讨北美鹅掌楸的耐淹机制,以期为进一步选育耐淹的北美鹅掌楸品种及其抗逆育种提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

淹水实验于2016年在江西省科学院玻璃温室中进行。根据前期实验,分别从北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera* L.)耐淹Louisiana种源中筛选出3个耐淹无性系(分别命名为T4、T27、T37),从不耐淹的Missouri种源中筛选出3个淹水敏感型无性系(分别命名为S5、S9、S20),利用扦插繁殖获得无性繁殖苗。将扦插苗培育1年后,于次年2月未抽新叶时移植到盆栽中,盆栽规格为25 cm×30 cm,培养基质由南方红壤、粗砂和蛭石按体积比3:2:1混和而成,日常管理保持一致。等长出8~10片新

叶后,选取生长较一致(高度50~60 cm)且发育健康的扦插幼苗进行淹水实验。

1.2 实验方法

采用温室盆栽法进行淹水实验。根据实验室前期预试验结果,将容器钵置于塑料箱内,每个淹水塑料箱处理4盆,每个无性系5个重复。盆高30 cm,淹水处理时保持水面高于容器钵3 cm左右。玻璃温室中昼夜温度分别为(32±1)°C和(27±1)°C,光照强度范围为1 000~2 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$,每天浇水;昼夜湿度(60±5)%,淹水处理30 d。因淹水敏感性材料在4 d取样点取样时叶片逐渐卷曲、变黄、脱落,在6 d取样时大部分叶片黄花,很多叶片脱落,所以结束取样,因此本实验的取样时间设置为处理前(0 d),以及处理后4和6 d,每次选择最下面倒数第7~8片完全展开叶取样。但取样后淹水处理持续,直至30 d后将淹水盆栽从塑料箱中取出。

1.3 测定指标

叶绿素含量测定:取0.1 g新鲜叶片,放入15 mL离心管中,加入10 mL二甲亚砜,振荡并在黑暗中保持72 h。取1 mL浸提液用分光光度计检测663和645 nm下的吸光度。叶绿素a (chlorophyll a, Chl a)、叶绿素b (chlorophyll b, Chl b)、总叶绿素(chlorophyll total, Chl t)含量的计算方程参阅Hiscox和Israelstam (1979)。

电导率测定参照Sun等(2014)。取0.1 g叶片,裁成0.5~1 cm左右的小片,用去离子水漂洗3次,再放入15 mL去离子水中。试管放入摇床中200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡24 h,用电导仪检测初始电导率(C1)。叶片随后用高压灭菌锅121°C处理15 min,液体冷却24 h后检测电导率最大值(C2)。相对电导率的计算公式: $(C1/C2)\times 100\%$ 。

粗酶液提取:准确称取北美鹅掌楸叶片0.25 g,将叶片置于预冷的研钵中,加入液氮迅速研磨成粉末状,加入4 mL 4°C预冷的150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.0的磷酸缓冲溶液,将匀浆转入10 mL离心管中,12 000×g、4°C离心20 min,上清液即为粗酶提取液。可溶性蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝(G-250)法(南京建成, A045-2),MDA含量利用丙二醛测试盒(南京建成, A003-1)的硫代巴比妥酸法(TBA法)测定, SOD活性利用超氧化物歧化酶测定试剂盒(南京建成, A001-3)的水溶性四唑盐法(WST-1

法)测定, 过氧化物酶(peroxidase, POD)活性利用过氧化物酶试剂盒(南京建成, A084-3)测定。

1.4 数据分析及作图

实验数据利用SPSS 20.0软件进行平均值、标准误、单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA), 用Duncan法进行均数差异显著性检验及多重比较, 差异显著水平为0.05。

2 实验结果

2.1 淹水胁迫状态下不同鹅掌楸无性系形态变异

北美鹅掌楸不同无性系对淹水反应敏感, 淹水3~4 d后, 所有植株均出现下部老叶黄花、顶芽萎蔫、幼叶失绿卷曲现象。但淹水6~7 d不同无性系表型出现差异。敏感无性系近基部叶片呈黄褐色, 逐渐干枯、脱落, 顶端嫩梢变黑, 中部叶片也出现黄花萎蔫, 30 d后将盆栽移除淹水塑料箱时, 叶片全部脱落, 大部分无性系根系腐烂, 排水恢复后成活率不到10%。耐淹北美鹅掌楸在淹水后5~6 d老叶脱落, 顶梢慢慢恢复, 幼叶展开, 随着胁迫时间的延长, 虽然整体叶片颜色失绿, 但叶片不断在老叶脱落、幼叶展开的动态平衡中保持相对稳定。耐淹无性系在15~17 d出现膨大白色皮孔, 21 d左右开始出现不定根, 实验结束时, 在茎基部产生大量皮孔组织, 特别是在近水面的茎部皮孔数量集中, 其中T27无性系在近水面的茎基部还形成明显的膨胀, 实验结束排水后恢复正常生长状态, 存活率达到100%。

2.2 淹水胁迫状态下不同鹅掌楸无性系叶绿素含量变化

逆境胁迫下, 植物体内的叶绿素受到不同程度的破坏。在淹水胁迫下北美鹅掌楸无性系的叶绿素含量均有一定程度的下降(图1-A), 说明在淹水条件下, 叶绿素合成受阻, 叶绿素降解, 这与淹水后北美鹅掌楸叶片形态的变化较为一致。在淹水4 d时不同无性系的叶片都发生了由绿变黄的现象, 敏感型的无性系在淹水持续到6 d时叶片变黄褐色, 对应这个时间点, 叶片的叶绿素含量也显著降低; 而耐淹鹅掌楸叶绿素含量下降幅度较缓慢。

叶绿素a与叶绿素b的比值(Chl a/b)在淹水胁迫下发生变化(图1-B)。未淹水时, 不同无性系Chl a/b具有显著差异, 耐淹无性系的Chl a/b的比率较

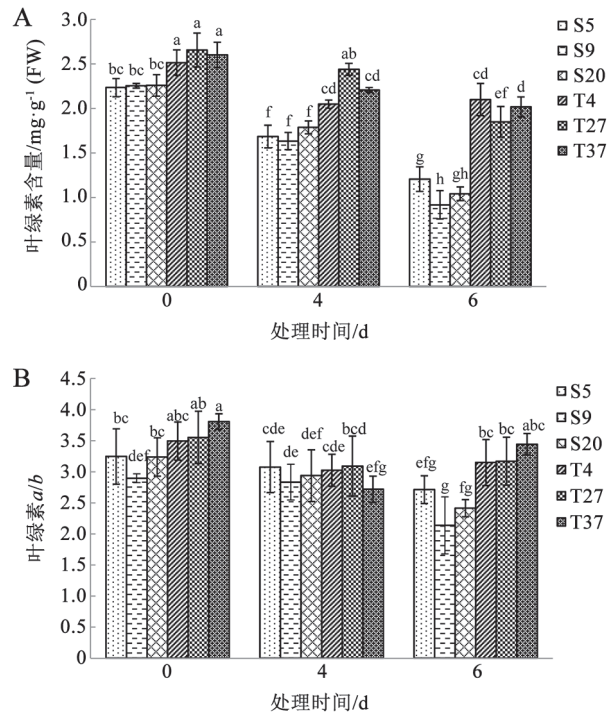


图1 淹水胁迫下不同无性系叶片叶绿素变化

Fig.1 Changes in chlorophyll in different clones under flooding stress

图中数据表示为平均值±标准误, 同一指标各柱形上用不同小写字母标识表示差异显著($P < 0.05$)。图2~5同。

淹水敏感无性系高。淹水4 d时, Chl a/b呈下降趋势, 但不同无性系间没有显著差异。淹水6 d时, 不同无性系间Chl a/b又呈显著差异, 耐淹无性系Chl a/b比值开始回升, 敏感无性系Chl a/b比值持续下降, 特别是无性系S9, 与淹水4 d相比降低24.54%, 达极显著水平。

2.3 淹水胁迫状态下不同鹅掌楸无性系细胞膜变化

MDA作为逆境下叶片衰老的标志其含量是衡量植物耐淹能力强弱的指标之一。淹水胁迫下, 植物细胞膜透性增加, 大量电解质渗漏, EL也是衡量在逆境胁迫条件下植物受伤害程度的重要指标之一。图2结果表明, 淹水4 d时, 北美鹅掌楸不同无性系其MDA含量均显著增加, 与未淹水相比, 敏感无性系平均增幅为31.39%, 耐淹无性系增幅为12.90%, 说明淹水胁迫对北美鹅掌楸产生了一定程度的伤害。随着淹水时间延长, 敏感型无性系MDA含量持续增加, 在淹水6 d时其增幅达到56.91%, 但耐淹无性系的MDA含量有所下降, 接近未淹水时水平。

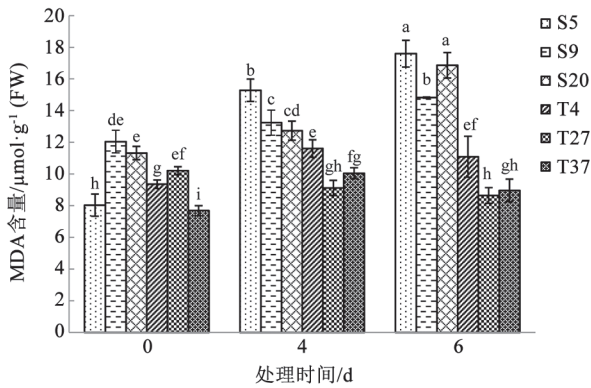


图2 淹水胁迫下不同无性系叶片MDA含量变化
Fig.2 Changes in MDA content in different clones under flooding stress

图3表明, 北美鹅掌楸各无性系EL在淹水初期明显提高, 耐淹无性系的EL均值较胁迫前上升了2.8倍, 而敏感型无性系EL较胁迫前提高了4倍, 说明北美鹅掌楸对淹水胁迫反应非常敏感, 各无性系在淹水胁迫下受到不同程度的脱脂过氧化伤害, 导致细胞外渗物质增加。但随着处理时间延长, 不同无性系出现了差异。敏感型无性系随着淹水实验的延长, EL持续增加, 均值从初始的9.43%提高到72.31%。而耐淹的北美鹅掌楸无性系EL却出现小幅度的下降, 3个耐淹无性系的EL均值从淹水4 d时的26.31%降至20.66%, 可能是耐淹无性系通过激活抗氧化酶系统清除或减少淹水胁迫过程中产生的活性氧等, 保护了叶片膜系统, 从而减轻植株受到的低氧伤害。

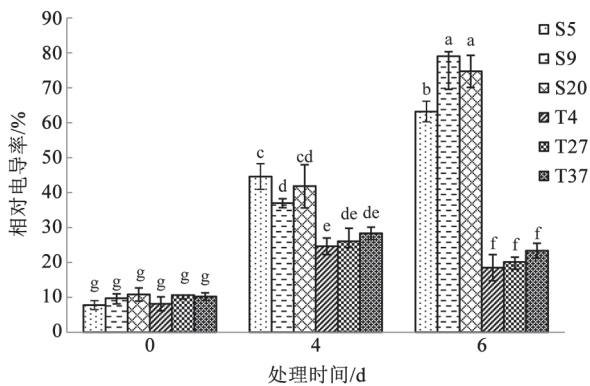


图3 淹水胁迫下不同无性系叶片相对电导率变化
Fig.3 Changes in electrolyte leakage in different clones under flooding stress

2.4 淹水胁迫状态下不同鹅掌楸无性系酶活性变化

大量研究表明, 抗氧化酶活性高低与植物抗逆能力密切相关。SOD是重要的植物系统抗性酶, 其活性特征与植物对逆境的耐受性密切相关。由图4可以看出, 在淹水胁迫前, 北美鹅掌楸各无性系的SOD活性存在差异, 总体而言, 敏感型无性系比耐淹无性系初始酶活性更高。淹水处理使各无性系的酶活性变化产生较大差异。在淹水4 d时, 所有无性系的SOD酶都显著提高, 淹水敏感型无性系SOD活性较初始值上升63.11%, 耐淹无性系提高了105.55%; 但随着胁迫的持续进行, 淹水敏感品种的SOD活性又显著下降, 同时, 耐淹无性系的SOD活性仍持续增高, 虽然T4和T27无性系的酶活性在胁迫4 d时低于敏感品种, 但胁迫6 d时SOD活性依然处于增加状态, 特别是T4无性系的SOD活性增加幅度达极显著水平。

POD是活性较强的适应性酶, 能够反映植物体内代谢状况和对外界环境变化的适应性。图5结果显示, 在淹水4 d时, 北美鹅掌楸各无性系的POD活性均显著增加, 耐淹无性系和敏感无性系的POD活性分别是未淹水时的2.69倍和1.90倍。在淹水6 d时, 敏感无性系S5的POD活性小幅度增加, 但无性系S9和S20总体呈下降趋势。随淹水时间延长, 耐淹无性系POD活性总体呈持续增加趋势, T4和T37分别较淹水4 d时分别增加39%和13%左右, 而耐淹无性系T27的POD活性却有所下降。这一结果说明虽然SOD、POD等抗氧化酶是北美

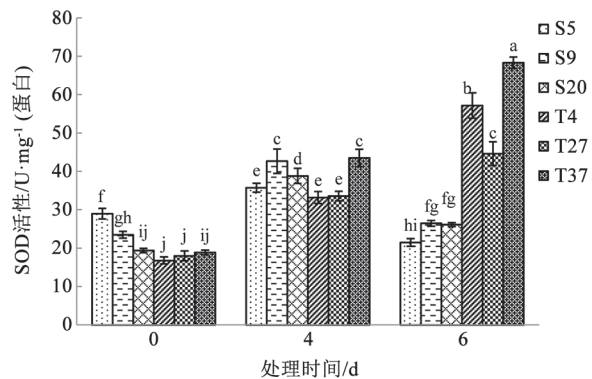


图4 淹水胁迫下不同无性系叶片SOD活性变化
Fig.4 Changes in SOD activity in different clones under flooding stress

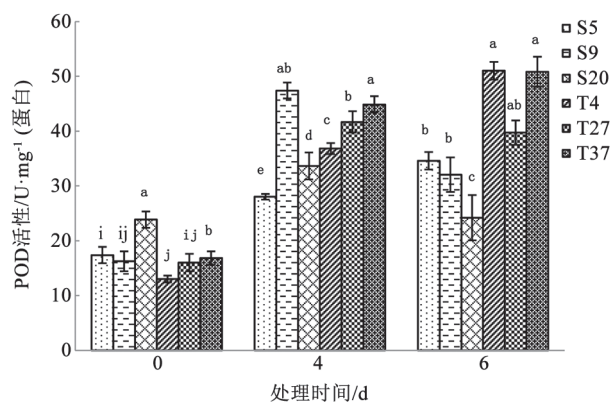


图5 淹水胁迫下不同无性系叶片POD活性变化
Fig.5 Changes in POD activity in different clones under flooding stress

鹅掌楸遭受淹水胁迫时重要的防御机制, 但北美鹅掌楸不同种源、无性系间遗传背景的差异导致其抗逆机制的复杂性, 使研究胁迫环境下SOD、POD等抗氧化酶作用机制变得复杂。

2.5 逆境生理生化参数相关性分析

Pearson相关性分析结果表明, 淹水胁迫下不同生理生化指标之间都存在极显著的相关性(表1)。其中, MDA含量和EL之间存在极显著正相关, 这两个细胞膜系统损伤相关指标与叶绿素含量、叶绿素a/b、SOD活性与POD活性呈极显著负相关。植物对淹水胁迫的响应不是由单个代谢途径决定的, 而是一个相互关联的网状的复杂的系统反应。

3 讨论

不同植物耐淹性存在显著差异, 同一植物不同种源、家系、无性系间耐淹性能也有较大差异。在淹水胁迫下不同植物或同一植物不同种源其生物量和根系生长情况差异巨大, 抗淹能力强

的植物其生长和生物量几乎不受影响, 不定根增长较多, 存活率较高, 而敏感品种生长严重影响甚至全部死亡(Colmer和Flowers 2008)。本研究中, 因北美鹅掌楸对淹水胁迫反应敏感, 在淹水早期不同无性系应激反应差异不显著, 均表现出下部叶片失绿、变黄、脱落, 顶芽干枯萎蔫, 叶绿素含量降低等现象, 但在淹水适应后期不同无性系在形态、生理代谢等方面出现较大差异。淹水敏感无性系在淹水响应初期抗氧化酶活性诱导升高后, 又开始显著降低, 叶片持续萎蔫、脱落, 顶芽不能回活性, 代谢持续紊乱, 植物未能诱导有效的防御机制, 植物损伤加剧, 在30 d后植物根系腐烂, 死亡。而耐淹鹅掌楸虽然在早期出现了下部叶片黄化脱落的现象, 但在积极主动的适应过程中, 顶芽慢慢恢复活性, 且在老叶脱落、嫩叶展开的动态平衡中保持叶片相对稳定的光合作用。

大量研究表明, 在长期淹水胁迫下, 植物通过通气组织的形成和外延, 促进植物根茎部产生不定根、气生根以及根的向氧性生长、根系孔隙度的调整、皮孔膨大和增生等方式完成地表层氧气向地下根际的输送, 从而在一定程度上缓解淹水胁迫导致的低氧损害(Sauter 2013; Thomas等2005)。在淹水情况下, 植物根系乙烯合成量增加, 促进纤维素酶活性增加, 皮层小的胞壁溶解, 最后形成通气组织, 这是植物耐淹的重要机制之一(Colmer等2006; Bailey-Serres和Chang 2008)。Schaffer等(2006)发现, 淹水引起杨桃(*Averrhoa carambola*)、鳄梨(*Persea americana*)、芒果等茎部皮孔增生, 淹水茎部增粗。淹水胁迫下存活的芒果树形成了过度生长的皮孔, 而淹水死亡的芒果树没有肥大的皮孔, 当皮孔被硅脂或矿脂密封后, 芒果淹水3 d后死亡(Ye等2003)。Jones和Sharitz (1990)指出, 乌柏

表1 不同生理指标在淹水胁迫下的Pearson相关系数

Table 1 Pearson correlation coefficient between different physiological traits under flooding stress

	POD活性	SOD活性	MDA含量	叶绿素含量	叶绿素a/b
相对电导率	-0.84**	-0.79**	0.81**	-0.65**	-0.66**
叶绿素a/b	0.46**	0.54**	-0.54**	0.48**	—
叶绿素含量	0.57**	0.51**	-0.74**	—	—
MDA含量	-0.77**	-0.70**	—	—	—
SOD活性	0.78**	—	—	—	—

*和**分别表示在P<0.05和P<0.01下的显著相关性。

幼苗在淹水胁迫下形成不定根、肥厚的皮孔以及粗大的吸收根是其耐淹的重要原因。同样的淹水形态变化出现在很多林木树种中,杨树、柳树、落羽杉(*Taxodium distichum*)、池杉(*T. ascendens*)等木本植物在淹水胁迫下也出现茎端近淹水部位的皮孔增生和不定根形成,表明植物耐淹能力与通气组织的发达程度呈正相关(唐罗忠等2008)。在本研究中,为了抵抗淹水带来的缺氧胁迫,耐性北美鹅掌楸无性系通过皮孔增大、茎段变粗等方式,实现了与茎叶间细胞空隙的连通,增加植物吸氧面积,有利于氧气向内扩散,从而尽量减轻缺氧带来的次生伤害。这一观察结果与李彦强等(2015)的研究结果一致,这种通气组织形成、老叶的主动性死亡可能是由植物细胞凋亡途径调控,是植物抵抗逆境的一种能动生理响应(詹洁等2006; Drew等2000),可能也是耐性鹅掌楸抵抗淹水低氧胁迫的重要机制。这种主动性的叶片和根系细胞凋亡与敏感无性系的叶片黄化萎蔫、根系腐烂虽然在表型上相似,但其涉及的生理、生化反应过程存在一定差异,这也为我们研究淹水胁迫下植物耐性机制提供了新的研究思路。

叶绿素作为反映植物叶片光合性能、衰老程度和营养状况的重要因素,其含量变化是植物应答水分胁迫较为敏感的生理指标之一。叶绿体色素包括叶绿素 a 、叶绿素 b 和类胡萝卜素,叶绿素 a 主要结合在光系统反应中心,而叶绿素 b 主要结合在捕光色素蛋白复合体上(陈芳清等2008),在环境变化过程中,植物通过动态调节它们的比例有效分配和耗散光能,以保障其光合系统的正常功能。本研究结果表明,在淹水胁迫4 d时,北美鹅掌楸不同无性系叶片中的叶绿素含量以及叶绿素 a/b 均呈下降趋势,表明淹水胁迫下叶绿素 a 受影响程度大于叶绿素 b ,这一结果可能是由淹水时累积的活性氧直接引发叶绿素的破坏及部分特异性地破坏叶绿素 a ,使叶绿素 a 对活性氧的反应较叶绿素 b 敏感导致的(伍泽堂1991; 张明生和谈峰2001)。但卢从明等(1995)研究表明,小麦在水分胁迫后叶绿素 a/b 比值上升,叶绿素 b 比叶绿素 a 对胁迫更敏感,这些结果说明不同植物光合特征差异较大,其叶绿素等色素对水分胁迫的敏感程度也存在较大差异。此外,淹水胁迫4 d时,北美鹅掌楸不同无性系

叶绿素 a/b 不存在显著差异,淹水对叶绿素 a 和叶绿素 b 的影响是同步的,这一结果与潘向艳等(2006)对杂交鹅掌楸不同无性系的淹水实验结果一致。但到淹水6 d时,不同耐性北美鹅掌楸叶绿素含量以及叶绿素 a/b 出现显著差异。淹水敏感无性系叶绿素 a/b 持续降低,而耐淹北美鹅掌楸无性系叶绿素 a/b 比值较4 d时呈现小幅度的升高。因捕光色素蛋白复合体降解比光系统反应中心慢,北美鹅掌楸可能通过调节其叶绿素 a/b 来维持较高的光合能力,这可能是耐性北美鹅掌楸受到淹水胁迫时的一种适应和保护机制。类似的结果也出现在一些耐淹植物研究中,如互花米草(*Spartina alterniflora*) (古志钦等2009)、秋华柳(*Salix variegata*) (陈芳清等2008)等。

为了抵御淹水胁迫下活性氧自由基的毒害作用,植物还形成了复杂的抗氧化防御系统,如非酶清除剂(抗坏血酸、谷胱甘肽、维生素E等)和活性氧清除酶类[SOD、POD、CAT、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽还原酶(GR)等],以及使还原态抗氧化剂再生的酶的活性等,可以缓解淹水胁迫时活性氧自由基对植物的伤害(Thirunavukkarasu等2013)。Kumutha等(2009)表明,耐淹的木豆(*Cajanus cajan*)基因型抗氧化酶活性在淹水条件下持续增加,而敏感基因型在淹水2 d后抗氧化酶活性开始下降。抗氧化酶类能使细胞内的活性氧的产生和清除处于动态平衡状态,其酶活性的维持与植物的抗逆性密切相关。其中,SOD、POD是植物酶促防御体系主要的保护酶,其酶活性高低可以体现植物在困境中的应激本领。SOD是过氧化物超氧阴离子的主要清除剂,可将超氧阴离子歧化成 O_2 和 H_2O_2 ,保持活性氧代谢平衡,在各种环境胁迫下保护植物膜系统,在一定程度上减轻植物伤害,所以SOD活性的加强对植物抵御淹水胁迫非常重要(谭淑端等2009)。在大量淹水胁迫研究中发现,植物体内的SOD活性都伴随淹水程度加强而逐渐提升,随着淹水时间的延长而增强(何嵩涛等2000)。但是 H_2O_2 也会对植物产生毒害作用,而POD可以催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,是细胞内 H_2O_2 的重要清除剂,所以保护酶系统的协调一致对降低活性氧对植物的伤害具有非常重要的意义(Ahmed等2002)。本研究中,淹水胁迫初期,北

美鹅掌楸各无性系SOD和POD活性都呈显著增加趋势,到淹水6 d时,淹水敏感的北美鹅掌楸无性系SOD和POD活性总体上呈下降趋势,而耐淹无性系SOD和POD活性持续增加。这种酶活性的变化可能是因为淹水时植物体内活性氧含量的增加不断激活保护酶体系的表达,以此帮助植物适应环境,但随着胁迫时间的延长,SOD和POD不断被消耗,敏感型无性系活性氧不断增加,酶保护系统遭到一定程度的破坏,膜系统破坏不能恢复,导致SOD和POD活性降低。而耐淹无性系可通过形成通气组织、老叶程序性凋亡等形态方面的调整,缓解低氧胁迫产生的活性氧自由基的伤害,使SOD和POD活性持续升高。潘向艳等(2007)发现,在淹水状态下不同杂交鹅掌楸无性系间的SOD、CAT等活性存在极显著差异,抗性强的无性系其酶活性比淹水敏感的无性系高且持续的时间长,活性酶随时间活性下降幅度小,这一结果与银杏(*Ginkgo biloba*) (何嵩涛等2000)、芝麻(刘华山等2005)、秋华柳(陈芳清等2008)等的研究结果一致。王哲宇等(2013)研究表明,淹水条件下,朴树POD活性一直处于较低的状态,这种POD活性与SOD活性上升不同步的情况与乌桕(曹福亮等2010)和鹅掌楸(张晓平等2006)等的研究结果较相似。所以,在淹水胁迫时,不同的植物抗氧化酶活性的变化差异相对较大,这也反映出不同植物抗氧化防御机制存在较大差异。

通过对北美鹅掌楸不同无性系在淹水胁迫下的生理生化变化差异研究,本研究发现因北美鹅掌楸对淹水胁迫的敏感性,通过叶绿素含量、MDA含量、质膜相对透性、SOD活性、POD活性等指标在淹水早期(4 d)不能完全评价不同无性系的耐淹性能,在淹水早中期(6 d)这些指标出现较大的表达差异,可以反映北美鹅掌楸无性系在淹水胁迫时期耐淹性的整体水平。此外,在淹水胁迫下,质膜相对透性、MDA含量以及叶绿素含量等指标极显著相关,POD活性与SOD活性极显著相关,基于指标的准确、经济、稳定性考虑,本研究认为质膜相对透性、叶绿素含量、SOD活性在胁迫中后期可以作为耐淹性的选择指标。本研究主要从淹水胁迫下生理生化响应差异解释北美鹅掌楸不同无性系耐淹能力存在差异的可能机制,而

植物耐淹性能的差异表现还与根系构型、植物激素、厌氧代谢等一系列适应性策略相关,有大量的抗逆相关基因参与其中。为了深入研究北美鹅掌楸的耐淹机制,后续还将进一步开展北美鹅掌楸耐淹分子转录组、蛋白质组以及代谢组方面的研究,为其抗逆育种提供参考。

参考文献(References)

- Ahmed S, Nawata E, Hosokawa M, et al (2002). Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Sci*, 163 (1): 117–123
- Ahsan N, Lee DG, Lee SH, et al (2007). A proteomic screen and identification of waterlogging-regulated proteins in tomato roots. *Plant Soil*, 295 (1–2): 37–51
- Bailey-Serres J, Chang R (2005). Sensing and signaling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. *Ann Bot*, 96 (4): 507–518
- Cao F, Cai J, Wang G, et al (2010). Effects of waterlogging stress on the growth and photosynthesis of *Sapium sebiferum*. *Sci Silv Sin*, 46 (10): 57–61 (in Chinese with English abstract) [曹福亮, 蔡金峰, 汪贵斌等(2010). 淹水胁迫对乌桕生长及光合作用的影响. *林业科学*, 46 (10): 57–61]
- Chen FQ, Guo CY, Wang CH, et al (2008). Effects of waterlogging on eco-physiological characteristics of *Salix variegata* seedlings. *Chin J Appl Ecol*, 19 (6): 1229–1233 (in Chinese with English abstract) [陈芳清, 郭成圆, 王传华等(2008). 水淹对秋华柳幼苗生理生态特征的影响. *应用生态学报*, 19 (6): 1229–1233]
- Colmer TD, Cox MCH, Voesenek LACJ (2006). Root aeration in rice (*Oryza sativa*): evaluation of oxygen, carbon dioxide, and ethylene as possible regulators of root acclimatizations. *New Phytol*, 170 (4): 767–778
- Colmer TD, Flowers TJ (2008). Flooding tolerance in halophytes. *New Phytol*, 179 (4): 964–974
- Drew MC, He CJ, Morgan PW (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trend Plant Sci*, 5 (3): 123–127
- Gu ZQ, Zhang LQ, Yuan L (2009). Responses of photosynthetic pigments of *Spartina alterniflora* and *Phragmites australis* to durative waterlogging. *Chin J Appl Ecol*, 20 (10): 2365–2369 (in Chinese with English abstract) [古志钦, 张利权, 袁琳(2009). 互花米草与芦苇光合色素含量对淹水措施响应. *应用生态学报*, 20 (10): 2365–2369]
- He S, Liu G, Fan W (2000). Physiological response to flooding stress on ginkgo (I)—A study on membrane lipid peroxidation and cell protective enzyme activity effects of ginkgo under flooding stress. *J Mount Agr Biol*, 19

- (4): 272–275 (in Chinese with English abstract) [何嵩涛, 刘国琴, 樊卫国(2000). 银杏对水涝胁迫的生理反应(I)——水涝胁迫对银杏膜脂过氧化作用及保护酶活性的影响. 山地农业生物学报, 19 (4): 272–275]
- Hiscox JD, Israelstam GF (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J Bot*, 57 (12): 1332–1334
- Jones RH, Sharitz RR (1990). Effects of root competition and flooding on growth of Chinese tallow tree seedlings. *Can J For Res*, 20 (5): 573–578
- Keith KA, Raskin I, Kende, H (1986). A comparison of the submergence response of deepwater and non-deepwater rice. *Plant Physiol*, 80 (2): 479–482
- Kumutha D, Ezhilmathi K, Sairam RK, et al (2009). Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes. *Biol Plant*, 53 (1): 75–84
- Li H, Ding CJ, Su XH, et al (2010). Effects of waterlogging stress on growth and physiological characters in multiple transgenic *Populus × euramericana* ‘Guariento’. *For Res*, 23 (1): 44–52 (in Chinese with English abstract) [李环, 丁昌俊, 苏晓华等(2010). 涝渍胁迫对转基因库安托杨生长及生理性状的影响. 林业科学研究, 23 (1): 44–52]
- Li Y, Zeng B, Ye XQ, et al (2008). The effects of flooding on survival and recovery growth of the riparian plant *Salix variegata* Franch. in Three Gorges reservoir region. *Acta Ecol Sin*, 28 (5): 1923–1930 (in Chinese with English abstract) [李娅, 曾波, 叶小齐等(2008). 水淹对三峡库区岸生植物秋华柳(*Salix variegata* Franch.)存活和恢复生长的影响. 生态学报, 28 (5): 1923–1930]
- Li YQ, Gao Z, Sun XY, et al (2015). Response on morphology and growth of seedlings of *Liriodendron tulipifera* under submergence. *J Southwest For Univ*, 35 (3): 8–13 (in Chinese with English abstract) [李彦强, 高柱, 孙小艳等(2015). 淹水胁迫下北美鹅掌楸幼苗形态和生长的响应. 西南林业大学学报, 35 (3): 8–13]
- Li YQ, Gao Z, Zhou H, et al (2011). A comparison of resistance to different partly-submerged treatments on *Liriodendron tulipifera* family seedlings. *J For Eng*, 25 (6): 28–31 (in Chinese with English abstract) [李彦强, 高柱, 周华等(2011). 北美鹅掌楸家系幼苗耐淹性的比较. 林业工程学报, 25 (6): 28–31]
- Liu H, Meng F, Yang Q, et al (2005). Effect of waterlogging on the growth and anti-oxidative enzyme activity of sesame root system. *Plant Physiol Commun*, 41 (1): 45–47 (in Chinese with English abstract) [刘华山, 孟凡庭, 杨青华等(2005). 土壤渍涝对芝麻根系生长及抗氧化酶活性的影响. 植物生理学通讯, 41 (1): 45–47]
- Lu CM, Tang CQ, Zhang QD, et al (1995). Effects of water stress on chlorophyll-protein complexes in wheat chloroplasts. *Acta Bot Sin*, 37 (12): 951–955 (in Chinese with English abstract) [卢从明, 唐崇钦, 张其德等(1995). 水分胁迫对小麦叶绿体色素蛋白复合体的影响. 植物学报, 37 (12): 951–955]
- Pan L, Xue L (2012). Plant physiological mechanisms in adapting to waterlogging stress. *Chin J Ecol*, 31 (10): 2662–2672 (in Chinese with English abstract) [潘澜, 薛立(2012). 植物淹水胁迫的生理机制研究进展. 生态学杂志, 31 (10): 2662–2672]
- Pan XY, Ji KS, Fang Y (2007). Changes in enzyme activities in different clones of *Liriodendron chinense × L. tulipifera* under flooding stress. *J Northwest For Univ*, 22 (3): 43–46 (in Chinese with English abstract) [潘向艳, 季孔庶, 方彦(2007). 淹水胁迫下杂交鹅掌楸无性系几种酶活性的变化. 西北林学院学报, 22 (3): 43–46]
- Sauter M (2013). Root responses to flooding. *Curr Opin Plant Biol*, 16 (3): 282–286
- Schaffer B, Davies FS, Crane JH (2006). Responses of subtropical and tropical fruit trees to flooding in calcareous soil. *HortScience*, 41 (3): 549–555
- Sun X, Hu L, Xie Y, et al (2014). Evaluation of genotypic variation in heat tolerance of tall fescue by functional traits. *Euphytica*, 199 (3): 247–260
- Tan SD, Zhu MY, Zhang KR, et al (2009). Response and adaptation of plants to submergence stress. *Chin J Ecol*, 28 (9): 1871–1877 (in Chinese with English abstract) [谭淑端, 朱明勇, 张克荣等(2009). 植物对水淹胁迫的响应与适应. 生态学杂志, 28 (9): 1871–1877]
- Tang L, Xu X, Fang S (1998). Influence of soil waterlogging on growth and physiological properties of poplar and willow seedlings. *Chin J Appl Ecol*, 9 (5): 471–474 (in Chinese with English abstract) [唐罗忠, 徐锡增, 方升佐(1998). 土壤渍涝对杨树和柳树苗期生长及生理性状影响的研究. 应用生态学报, 9 (5): 471–474]
- Tang LZ, Huang BL, Haibara K, et al (2008). Ecological adaptation mechanisms of roots to flooded soil and respiration characteristics of knee roots of *Taxodium ascendens*. *J Plant Ecol*, 32 (6): 1258–1267 (in Chinese with English abstract) [唐罗忠, 黄宝龙, 生原喜久雄等(2008). 高水位条件下池杉根系的生态适应机制和膝根的呼吸特性. 植物生态学报, 32 (6): 1258–1262]
- Thirunavukkarasu N, Hossain F, Mohan S, et al (2013). Genome-wide expression of transcriptomes and their co-expression pattern in subtropical maize (*Zea mays* L.) under waterlogging stress. *PLoS ONE*, 8 (8): e70433
- Thomas AL, Guerreiro SMC, Sodek L (2005). Aerenchyma formation and recovery from hypoxia of the flooded root system of nodulated soybean. *Ann Bot*, 97 (7): 1191–1198
- Wang GB, Cai JF, He XH (2009). Effects of waterlogging stress on morphology and physiology of *Camptotheca acuminata*. *Chin J Plant Ecol*, 33 (1): 134–140 (in Chinese with English abstract) [汪贵斌, 蔡金峰, 何肖华(2009). 涝渍胁迫对喜树幼苗形态和生理的影响. 植物

- 生态学报, 33 (1): 134–140]
- Wang ZY, Tong LL, Tang GG (2013). Effects of waterlogging stress on the morphological and physiological of *Celtis sinensis*. Chin For Sci Technol, 27 (4): 44–47 (in Chinese with English abstract) [王哲宇, 童丽丽, 汤庚国(2013). 淹水胁迫对朴树幼苗形态及生理特性的影响. 林业科技开发, 27 (4): 44–47]
- Wu ZT (1991). Relationship between superoxide radical and destruction of chlorophyll during leaf senescence. Plant Physiol Commun, 27 (4): 277–279 (in Chinese with English abstract) [伍泽堂(1991). 超氧自由基与叶片衰老时叶绿素破坏的关系. 植物生理学通讯, 27 (4): 277–279]
- Ye Y, Tam NFY, Wong YS (2003). Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. Environ Exp Bot, 49 (3): 209–221
- Zhan J, Yu YC, He LF (2006). Programmed cell death of plant in adversity conditions. Guangxi Agr Sci, 37 (1): 13–16 (in Chinese with English abstract) [詹洁, 余永昌, 何龙飞(2006). 逆境条件下的植物细胞程序性死亡. 广西农业科学, 37 (1): 13–16]
- Zhang MS, Tan F (2001). Relationship between ratio of chlorophyll a and b under water stress and drought resistance of different sweet potato varieties. Seed, (4): 23–25 (in Chinese with English abstract) [张明生, 谈锋(2001). 水分胁迫下甘薯叶绿素a/b比值的变化及其与抗旱性的关系. 种子, (4): 23–25]
- Zhang XP, Fang YM, Chen YJ (2006). Effect of waterlogging stress on physiological indexes of *Liriodendron* seedlings. J Plant Res Environ, 15 (1): 41–44 (in Chinese with English abstract) [张晓平, 方炎明, 陈永江(2006). 淹涝胁迫对鹅掌楸属植物叶片部分生理指标的影响. 植物资源与环境学报, 15 (1): 41–44]
- Zhou RY, Chen YT (2001). Advance in waterlogging-resistance of woody plants. For Res, 14 (2): 215–222 (in Chinese with English abstract) [卓仁英, 陈益泰(2001). 木本植物抗涝性研究进展. 林业科学研究, 14 (2): 215–222]

Variations in physiological and biochemical responses in clones of *Liriodendron tulipifera* under flooding stress

SUN Xiao-Yan¹, CHEN Ming², LI Yan-Qiang¹, WU Zhao-Xiang¹, ZHONG Yong-Da¹, YU Fa-Xin^{1,*}

¹*Institute of Biology and Resources, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China*

²*Jiangxi Medical School, Nanchang University, Nanchang 330006, China*

Abstract: Yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) is a good timber and landscape tree species. However, its widespread planting is hindered because it is sensitive to flooding. Three tolerant clones (T4, T27 and T37) and three sensitive clones (S5, S9 and S20) were selected and a potted experiment of flooding stress in greenhouse was conducted. Physiological and biochemical properties, including malondialdehyde (MDA) content, electrolyte leakage (EL), chlorophyll content and enzyme activities were applied to explore the different flooding responses in yellow poplar clones and tolerant mechanism under flooding stress. The results show that flooding stress seriously inhibited the growth of yellow poplar. All experimental seedlings presented damaged phenotype (old leaf yellowing, apical bud and young leaf wilting), meanwhile chlorophyll content decreased, MDA content and EL increased significantly, and SOD and POD activities motivated at flooding for 4 d. After 6 d, the sensitive clones were furtherly damaged with MDA content and EL dramatically increasing, while SOD and POD activities decreasing. On the contrast, the tolerant clones began to grow new leaves after yellow leaves falling off. Meanwhile, the MDA content and EL decreased, the decreasing of chlorophyll content was inhibited, and SOD and POD activities constantly increased. Moreover, the tolerant clones formatted adventitious roots and massive stem hypertrophic lenticels around 20 d. The results indicate that formation of adventitious roots and hypertrophic lenticels, and maintenance of antioxidant activity could contribute to better flooding tolerance of yellow poplar. EL, chlorophyll content, and SOD activity would be used as rapid and simple indexes for selecting flooding-tolerant genotypes.

Key words: *Liriodendron tulipifera*; flooding stress; variation of physiological response; antioxidant enzyme activity

Received 2017-08-14 Accepted 2018-01-15

This work was supported by the Academic Leaders Training Program of Jiangxi Province (20133BCB22012), Superior Science and Technology Innovation Team Plan (20161BCB24008), Science and Technology Support Plan of Jiangxi Province (20123BBF60179 and 20132BBF60032), and the Puhui Program of Jiangxi Province (2013-XTPH2-8).

*Corresponding author (yufaxin@jxas.ac.cn).