

铜胁迫下链格孢菌对白车轴草生理生化特性的影响

刘登义, 李 晶, 王兴明, 李 征, 黄永杰

(安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241000)

摘要:通过盆栽实验研究了 Cu 胁迫下接种链格孢菌(*Alternaria tenuis* Nees)对源自 Cu 污染区(记作种群 I)和非污染区(记作种群 II)白车轴草(*Trifolium repens* L)生理生化特性的影响。结果表明,两种群白车轴草在 Cu 处理后接种链格孢菌, 0 ~ 1500 mg·kg⁻¹时叶片电导率、MDA 含量均高于未接种组,且随浓度增加而升高,2000mg·kg⁻¹时电导率低于未接种组,MDA 含量降低但仍高于未接种组。两种群接种后叶绿素、蛋白质含量较未接种组下降,且随 Cu 浓度增加而降低,其中叶绿素含量与浓度呈显著或极显著负相关,种群 I 和种群 II 相关系数分别为 -0.954* 和 -0.961**。链格孢菌使白车轴草 SOD 活性低浓度(0 和 500 mg·kg⁻¹)高于未接种组,高浓度则降低。接种后 POD 活性随 Cu 浓度增加先增后减,500mg·kg⁻¹浓度下接种组 POD 高于未接种组,而在其他浓度下,显著低于未接种组。0 ~ 1000mg·kg⁻¹时接种组 CAT 活性高于未接种组,随土壤 Cu 浓度增加先增后减。3 种保护酶对胁迫的敏感性为 POD > SOD > CAT。高浓度 Cu(2000 mg·kg⁻¹)胁迫下,白车轴草保护酶系统的受损打破了体内活性氧产生与清除之间的正常平衡状态,积累了过量的活性氧,膜脂过氧化程度加重,对白车轴草产生毒害,且这种毒害在接种链格孢菌后表现更为严重。两种群白车轴草相比,种群 I 植物在土壤 Cu < 2000mg·kg⁻¹时可生存,感染链格孢菌后生长土壤 Cu 浓度应控制在 1500mg·kg⁻¹以内;种群 II 在 Cu 胁迫浓度不超过 1500mg·kg⁻¹,链格孢菌和 Cu 双重胁迫时不超过 1000mg·kg⁻¹可生长。种群 I 在 Cu 处理、链格孢菌单一或双重胁迫下表现的抗逆性较 II 强。

关键词:白车轴草;链格孢菌;酶活性;Cu

文章编号:1000-0933(2006)05-1396-09 **中图分类号:**Q143, Q938, S432 **文献标识码:**A

Effects of *Alternaria tenuis* Nees on physiological and biochemical characteristics of *Trifolium repens* L. under Cu stress

LIU Deng-Yi, LI Jing, WANG Xing-Ming, LI Zheng, HUANG Yong-Jie (College of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(5): 1396 ~ 1404.

Abstract: Through pot cultivation experiments of *Trifolium repens* L under Cu stress, we studied the effects of *Alternaria tenuis* Nees on the physiological and biochemical characteristics of two different populations of *Trifolium repens* L selected from a Cu-polluted area (marked as population I) and a non-polluted area (marked as population II). The results showed that with Cu treatment, the infection of *A. tenuis* increased leaves' electric conductivity and MDA content of two populations with Cu concentrations from 0 ~ 1500mg·kg⁻¹, while electric conductivity was lower and MDA content higher than that of population II when Cu concentration was 2000mg·kg⁻¹. The infection also decreased chlorophyll and protein contents. In two inoculated populations, chlorophyll and protein contents declined with the increasing concentration, and chlorophyll content was negatively related to Cu concentration (correlation coefficients of population I and II were -0.954* and -0.961**). When Cu concentration was low (0 and 500 mg·kg⁻¹), the SOD activity in two populations of inoculated plants was higher than that of non-

基金项目:国家重点基础研究发展计划资助项目(2004CB418503);国家自然科学基金资助项目(30470270);国家人事部留学回国人员科研择优重点资助项目

收稿日期:2005-09-12; **修订日期:**2006-02-09

作者简介:刘登义(1958 ~),男,安徽凤台人,博士,教授,主要从事种群生态学和污染生态学研究. E-mail: ldy@mail.ahnu.edu.cn

Foundation item: The project was supported by National Key Basic Research Plan of China (No. 2004CB418503), National Natural Science Foundation of China (No. 30470270) and Grant from the National Ministry of Personnel

Received date: 2005-09-12; **Accepted date:** 2006-02-09

Biography: LIU Deng-Yi, Ph.D., Professor, mainly engaged in population ecology and pollution ecology. E-mail: ldy@mail.ahnu.edu.cn

inoculated plants. But when Cu concentration was high the inoculated plants' SOD activity was lower than that of non-inoculated plants. Similarly, under low levels of Cu ($< 500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) POD activity was higher of inoculated plants than that of non-inoculated plants. After the increase of Cu concentration POD activity declined rapidly and was lower than that of non-inoculated plants. Finally, CAT in two inoculated populations was higher than in non-inoculated ones from $0\sim 1000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, but lower from $1500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in population I, whereas in population II it was lower at $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. The sensibilities of the protective enzyme also differed from each other according to the Cu stress. The order was $\text{POD} > \text{SOD} > \text{CAT}$. The results also indicated that under the stress of a high Cu level ($2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), the decline of antioxidative enzyme activities broke the normal balance between production and elimination of active oxygen, resulting in the accumulation of excessive active oxygen which aggravated lipid peroxidation, thereby causing toxic effects on *T. repens*. And within the inoculation with *A. tenuis*, these toxic effects were more serious. Population I could subsist within $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cu in soil, but when infected with *A. tenuis* the concentration should be less than $1500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. In comparison, population II could subsist within $1500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cu in soil but within $1000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ under the stress of Cu together with *A. tenuis*. However, compared with population II from the non-polluted area, the *T. repens* in population I from the Cu-polluted area showed more resistance to the stress of Cu and *A. tenuis*.

Key words: *Trifolium repens* L.; *Alternaria tenuis* Nees; enzyme activities; Cu

病原菌与寄主植物的相互作用广泛存在于自然界。研究表明,自然植物种群中,病害的发生和表现,寄主植物的抗病性和感受性,病原菌的致病力和非致病力均受环境因素(如土壤、光照、温度、营养等)影响,环境胁迫会使寄主对病原菌的敏感程度发生变化,病原菌及其寄主植物之间相互作用的宏观表现及结果与环境因子密切相关^[1-5]。近年来,随着矿产开采和冶金工业的迅速发展,大量重金属如 Cu、Pb、Zn、As 等进入环境,造成严重污染。其中 Cu 污染已成为世界性难题,关于 Cu 对植物的毒害的研究也与日俱增^[6]。

在安徽铜陵铜尾矿场的自然恢复植被中,豆科植物白车轴草(*Trifolium repens* L.)为优势种之一^[7]。链格孢菌(*Alternaria tenuis* Nees)是白车轴草的一种常见病原真菌,长期以来在自然种群中与白车轴草有稳定的相互作用。野外调查发现,铜陵铜尾矿场白车轴草种群中有链格孢菌菌病发生,可引起寄主植物体内发生一系列生理生化变化。一般情况下,病原菌侵染不立即杀死寄主植物,常使寄主植物光合速率下降,呼吸速率上升,膜脂过氧化加强,防御酶体系发生相应的变化^[8]。其中与植物抗病性有关的酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等已是许多学者研究的热点^[9,10],但这些研究大部分局限于病原菌与寄主植物的单纯相互作用。

有研究结果指出,环境压力下,病原菌对白车轴草的伤害程度加重^[1,11]。而在铜尾矿场,在重金属污染条件下,白车轴草虽然受病原菌侵染,但仍能生长代谢,生长发育未受到严重影响。铜污染胁迫下,白车轴草受链格孢菌侵染后生理生化特性的变化规律尚未见报道。本文分别测定了在不同 Cu 浓度处理下,安徽铜陵 5km 铜尾矿场(Cu 污染区)和安徽芜湖神山(非污染区)两个种群的白车轴草种群接种链格孢菌后叶片的生理指标,进而揭示不同 Cu 浓度胁迫下,Cu 污染区和非污染区白车轴草感染链格孢菌后有关生理生化变化,为研究白车轴草对链格孢菌的防病战略、抗性机制以及豆科植物的抗病遗传育种提供依据,同时也为研究重金属污染胁迫下,植物对其病原菌抗病机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试植物 寄主白车轴草分别采于安徽铜陵五公里铜尾矿场(Cu 污染区),记作种群 I;和芜湖神山(非污染区),记作种群 II,两个地区的土壤背景值如表 1。分别在同一易感型繁殖系内选取植株高度、生物量大致相同的健康的白车轴草幼苗,带回温室。于实验前剪取长 3cm 具 3 叶 3 腋芽的匍匐茎用于盆栽培养。

1.1.2 供试菌种 链格孢菌为在上述易感型繁殖系内采集的白车轴草病叶的病斑上分离纯化而得。

1.2 实验设计

1.2.1 盆栽实验 以安徽师范大学后山田园土为供试土样,背景值见表 1。实验每种群设 5 个 Cu 处理浓度,

分别为 0(CK), 500, 1000, 1500, 2000 mg·kg⁻¹ (以纯 Cu 计)。将 CuSO₄·5H₂O 以去离子水配成母液, 再逐级稀释成处理浓度并且与过 2mm 筛的土壤反复混合均匀, 然后在温室中稳定 7d, 每盆装土 1.5kg, 栽入上述 3cm 长的白车轴草匍匐茎, 每盆 10 株, 每个处理设 4 次重复。培养 40d 后接种。植物生长过程中用自来水浇灌, 每天 1~2 次, 同时每 3d 记录 1 次生长状况。

表 1 两实验种群自然生长环境及实验土壤基本性质

Table 1 Some physical and properties of the soils of two populations and used for pot experiment

种群 Population	pH	有机质 O.M. (g·kg ⁻¹)	总氮 Total N (g·kg ⁻¹)	总磷 Total P (g·kg ⁻¹)	总钾 Total K (g·kg ⁻¹)	电导率 EC (μs·cm ⁻¹)	Cu 含量 Total Cu (mg·kg ⁻¹)
I	8.27	4.83	0.011	4.29	2.15	360.23	872.27
II	7.31	12.7	0.478	3.73	2.83	150.52	25.16
实验土壤 The soil for experiment	7.26	13.6	0.506	3.26	3.45	134.67	25.46

1.2.2 接种实验 将链格孢菌的分生孢子悬浮液以叶片针刺法接种到上述培养 40d 的白车轴草(3 叶期)叶片上, 以接种无菌水作对照。分别将种群 I、II 接种链格孢菌和接种无菌水的植物记做 I(+)、I(-) 和 II(+), II(-)。接种后分别隔离培养 9d 后取样, 按下述方法测定不同指标变化情况, 各处理重复 4 次。

1.3 测试指标和方法

1.3.1 盆栽实验中植物的外表伤害症状 参考秦天才^[12]的方法, 目测估计, 将白车轴草外伤症状分为 4 级: 正常生长(无伤害), 目测不到伤害症状; 轻度伤害, 仅中心部分失绿; 中度伤害, 中心及外围叶不同程度失绿; 重度伤害, 叶片缩小、植株矮小。

1.3.2 叶片细胞膜透性测定 取白车轴草叶片 0.2g, 剪成碎片, 加入装有 20ml 双蒸水的三角瓶中, 于电动振荡机上以 400 次 min⁻¹ 的振荡速度振荡 1h, 过滤后用 DDS-307 型电导仪测定电导率(μs·cm⁻¹)^[13]。

1.3.3 MDA 水平测定 按林植芳的硫代巴比妥酸(TBA)法测定(μmol·g⁻¹ FW)^[14]。

1.3.4 叶片光合色素含量测定 分别取鲜叶 0.2 g 加入 80% 的丙酮研磨提取后, 采用 752A 型分光光度计, 分别测定 663nm, 645nm 和 440nm 的光密度(mg·g⁻¹ FW)^[15]。

1.3.5 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝 G-250 染料结合法测定^[16]。

1.3.6 SOD 活性测定 采用氮蓝四唑(NBT)光还原法, 利用其对 NBT 的光抑制作用, 采鲜样以预冷研钵、pH7.8 磷酸缓冲液及 3000g·min⁻¹ 冷冻离心机离心 20min 提取酶液, 于 25℃, 4000lx 的光照进行反应, 20min 后测定 560nm 处的光密度, 再计算出酶活性(U·g⁻¹ FW·min⁻¹)^[17]。

1.3.7 POD 活性测定 采用 X. H. 波钦诺克方法, 酶活性单位用 1g 植物材料在 1min 内氧化愈创木酚的微克数来表示(U·g⁻¹ FW·min⁻¹)^[18]。

1.3.8 CAT 活性测定 采用高锰酸钾滴定法, 酶活性以每克鲜重样品 1min 内分解 H₂O₂ 的毫克数表示(mg/min)^[16]。

1.4 数据处理

采用 SPSS 软件进行方差分析、t 检验、多重比较、相关与回归运算。所有数据均为 4 次重复均值。

2 结果与分析

2.1 Cu 处理对白车轴草外表伤害症状的影响

从表 2 看出, Cu 对白车轴草外表伤害与土壤中 Cu 含量有关。对照和低浓度处理组植物外表伤害症状不明显, 植物正常生长。而高浓度(1500、2000mg·kg⁻¹)处理组植物叶片略有失绿, 2000mg·kg⁻¹ 处理组植株长势较弱, 几乎停止生长, 茎秆纤细, 有的甚至萎蔫。对于两种群白车轴草, 对照和 500mg·kg⁻¹ 处理组中, 种群 II 长势好于 I, 而 1000、1500、2000mg·kg⁻¹ Cu 浓度中, 种群 I 长势普遍好于 II。可见, 低浓度 Cu 对植物生长无明显不良影响, 但当土壤中 Cu 浓度增加到一定程度, 会对植株产生明显影响。并且, 源自 Cu 污染区的白车轴草种群在 Cu 处理下长势好于源自非污染区的。

表 2 Cu 处理对白车轴草外表伤害的影响

Table 2 Effect of Cu treatments on the harm symptom of *Trifolium repens* L.

种群	Cu(mg·kg ⁻¹)									
Population	0	500	1000	1500	2000					
I	正常生长 Normal growth	正常生长 Normal growth	正常生长 Normal growth	轻度伤害 Light injury	中度伤害 Secondary injury					
II	正常生长 Normal growth	正常生长 Normal growth	轻度伤害 Light injury	中度伤害 Secondary injury	重度伤害 Serious injury					

2.2 不同 Cu 浓度胁迫下接种链格孢菌对白车轴草叶片电导率影响

由图 1,除 2000mg·kg⁻¹ Cu 处理外,两种群接种组叶片电导率高于未接种组。1000mg·kg⁻¹ Cu 浓度处理时 I (+)比 I (-)高 54.77% ($p < 0.05$),2000 mg·kg⁻¹ 时, I (+)比 I (-)下降 23.88% ($p < 0.05$)。I (+)、I (-)和 II (-)叶片外渗液电导率均随土壤 Cu 浓度增加而增大,呈显著正相关,相关系数分别为 0.924*、0.948* 和 0.940*。II (+)电导率先随 Cu 浓度增加增大,到 1500mg·kg⁻¹ 达到峰值,是对照的 2.94 倍 ($p < 0.05$),2000mg·kg⁻¹ 时又迅速下降,较 1500mg·kg⁻¹ 下降 44.47% ($p < 0.05$)。此外,两种群植物相比,无论接种链格孢菌与否,在 0~1500mg·kg⁻¹,种群 I 电导率小于种群 II,且在高浓度(1000、1500mg·kg⁻¹)下两者有显著差异($p < 0.05$)。其中,1500mg·kg⁻¹ Cu 浓度 II (+)比 I (+)、II (-)比 I (-)电导率分别高 32.67% 和 18.57% ($p < 0.05$),而在 2000mg·kg⁻¹ Cu 浓度下,II (+)比 I (+)、II (-)比 I (-)的电导率分别降低 19.03% ($p < 0.05$)和 11.33%。 ($p < 0.05$)。

2.3 不同 Cu 浓度胁迫下接种链格孢菌对白车轴草叶片膜脂过氧化水平的影响

环境胁迫诱发的活性氧自由基伤害生物膜过程中,最主要的膜脂过氧化产物是丙二醛(MDA)。它的浓度表示膜脂过氧化强度和膜系统受伤害程度,可作为膜脂过氧化程度的一种指标^[19]。两种群在各 Cu 处理中(图 2),接种后植物的 MDA 含量均显著高于未接种组($p < 0.05$)。1500mg·kg⁻¹ 时, I (+)MDA 含量是 I (-)的 1.64 倍($p < 0.05$), II (+)是 II (-)含量的 1.69 倍($p < 0.05$)。I (-)、II (-)叶片的 MDA 含量均与土壤 Cu 含量呈显著或极显著正相关,相关系数分别为 0.962* 和 0.969** ,这一变化趋势与其叶片电导率的变化一致。

I (+)、II (+)叶片的 MDA 含量随 Cu 浓度增加而升高,到 1500mg·kg⁻¹ Cu 处理时达峰值,分别是其对照的 2.41 倍、3.03 倍($p < 0.05$)。到 2000mg·kg⁻¹ Cu 浓度 MDA 含量又下降,但均高于对照。两种群植物比较,低浓度(500mg·kg⁻¹) II (+)比 I (+)高 10.08% ($p < 0.05$),当 Cu 浓度 1500mg·kg⁻¹ 时,种群 II 比 I 高 20.48% ($p < 0.05$)。可见,接种链格孢菌后种群 II 比 I 膜脂过氧化水平高,并在高浓度下表现下更为明显。此外,由于 MDA 与植物叶片外渗液电导率均是细胞膜受伤害程度的指标,而本研究结果发现二者变化规律相似,因此,对 MDA 和电导率做相关性分析,得出二者极显著相关,相关系数为 0.861**。

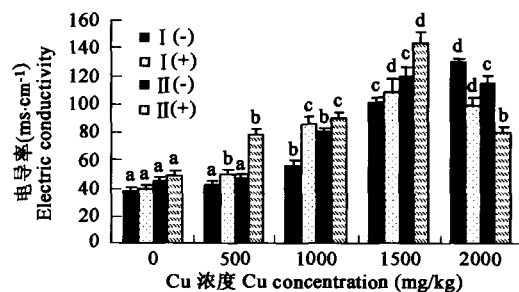


图 1 Cu 胁迫下链格孢菌对白车轴草叶片电导率影响

Fig.1 Effect of *A. tenuis* on electric conductivity of *T. repens* leaves under Cu stress

I (-): 种群 I 未接种 Non-inoculated of population I; I (+): 种群 I 接种 Inoculated of population I; II (-): 种群 II 未接种 Non-inoculated of population II; II (+): 种群 II 接种 Inoculated of population II; 同一图例不同字母表示不同 Cu 处理间植物叶片指标差异显著(下同) Values within the same column followed by different letters are statistically significantly different among Cu treatments; $p < 0.05$; the same below

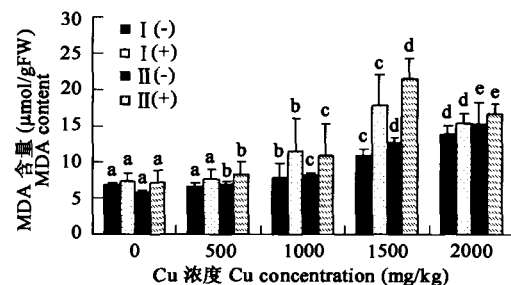


图 2 Cu 胁迫下链格孢菌对白车轴草叶片 MDA 影响

Fig.2 Effect of *A. tenuis* on the MDA content of *T. repens* leaves under Cu stress

2.4 不同 Cu 浓度胁迫下接种链格孢菌对白车轴草叶片叶绿素含量的影响

由表 3 可以看出,除了种群 II (+) 叶片叶绿素含量一直随 Cu 浓度增加而降低外,其余 3 组处理叶片叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素 a + b 含量均在低 Cu 浓度 ($< 500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 略增加,随后随 Cu 浓度增加而降低,总体呈下降趋势,各色素含量与土壤 Cu 浓度呈显著或极显著负相关,相关系数及回归方程见表 4。两种群白车轴草比较,接种链格孢菌的叶片叶绿素含量均显著低于未接种组 (p 值均小于 0.05)。这种显著差异在高浓度 (1500 和 $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 表现的尤为明显。对种群 I 植物,在 Cu 浓度为 $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,接种链格孢菌对叶绿素 a、叶绿素 a + b 含量影响最为明显,比未接种组分别降低 27.19% ($p < 0.05$)、24.53% ($p < 0.05$); 对于种群 II 植物,在 Cu 浓度为 $1500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,接种比未接种组分别下降 28.15% ($p < 0.05$) 和 29.36% ($p < 0.05$),差异最明显。而接种链格孢菌对叶绿素 b 含量的影响,种群 I 和 II 分别在 1500 和 $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cu 浓度最明显,接种比未接种组分别下降 32.30% ($p < 0.05$) 和 35.09% ($p < 0.05$)。各 Cu 浓度下,两个种群相比较,无论接种与否,种群 I 叶绿素含量均高于种群 II。随着 Cu 浓度增加,种群 II 白车轴草叶绿素含量变化幅度更大。

表 3 Cu 胁迫下链格孢菌对白车轴草叶片叶绿素含量的影响 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Table 3 Effect of *A. tenuis* on chlorophyll content of *T. repens* leaves under Cu stress

色素含量 Content of pigment ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Cu 浓度 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	I (-)	I (+)	II (-)	II (+)
叶绿素 a Chlorophyll a	0(CK)	$0.8850 \pm 0.12a$	$0.8434 \pm 0.09a$	$0.8769 \pm 0.09a$	$0.8439 \pm 0.06a$
	500	$0.9096 \pm 0.09b$	$0.8543 \pm 0.13a$	$0.8950 \pm 0.13a$	$0.8407 \pm 0.11a$
	1000	$0.8656 \pm 0.04c$	$0.7852 \pm 0.01b$	$0.7910 \pm 0.01b$	$0.6357 \pm 0.01b$
	1500	$0.7809 \pm 0.01d$	$0.6165 \pm 0.09c$	$0.7514 \pm 0.09c$	$0.5398 \pm 0.01c$
	2000	$0.7579 \pm 0.01e$	$0.5518 \pm 0.01d$	$0.6874 \pm 0.01d$	$0.5020 \pm 0.09d$
叶绿素 b Chlorophyll b	0(CK)	$0.4850 \pm 0.01a$	$0.4194 \pm 0.02a$	$0.4666 \pm 0.09a$	$0.4456 \pm 0.15a$
	500	$0.4872 \pm 0.07a$	$0.4252 \pm 0.09a$	$0.4761 \pm 0.06a$	$0.4062 \pm 0.07b$
	1000	$0.4374 \pm 0.05b$	$0.3262 \pm 0.13b$	$0.3963 \pm 0.03b$	$0.2572 \pm 0.04c$
	1500	$0.3363 \pm 0.10c$	$0.2277 \pm 0.06c$	$0.2805 \pm 0.06c$	$0.1891 \pm 0.01d$
	2000	$0.2479 \pm 0.05d$	$0.2073 \pm 0.05c$	$0.2277 \pm 0.02d$	$0.1779 \pm 0.03d$
叶绿素 a + b Chlorophyll a + b	0(CK)	$1.3516 \pm 0.13a$	$1.2628 \pm 0.11a$	$1.3435 \pm 0.17a$	$1.2895 \pm 0.25a$
	500	$1.3968 \pm 0.16b$	$1.2795 \pm 0.23a$	$1.3711 \pm 0.13a$	$1.2470 \pm 0.11b$
	1000	$1.3030 \pm 0.04c$	$1.1114 \pm 0.13b$	$1.1872 \pm 0.03b$	$0.8929 \pm 0.07c$
	1500	$1.1173 \pm 0.12d$	$0.8442 \pm 0.15c$	$1.0319 \pm 0.11c$	$0.7289 \pm 0.02d$
	2000	$1.0058 \pm 0.05e$	$0.7591 \pm 0.06d$	$0.9151 \pm 0.03d$	$0.6798 \pm 0.12e$

表 4 白车轴草叶片叶绿素含量与土壤 Cu 浓度回归方程

Table 4 The interrelation among the chlorophyll content of *T. repens* and Cu concentration

种群 Population	项目 Item	回归方程 Regression equation	R
I (-)	叶绿素 a Chlorophyll a	$Y = -0.000077X + 0.916$	-0.909*
	叶绿素 b Chlorophyll b	$Y = -0.00012X + 0.521$	-0.943*
	叶绿素 a + b Chlorophyll a + b	$Y = -0.0002X + 1.438$	-0.935*
I (+)	叶绿素 a Chlorophyll a	$Y = -0.00016X + 0.894$	-0.942*
	叶绿素 b Chlorophyll b	$Y = -0.00012X + 0.446$	-0.957*
	叶绿素 a + b Chlorophyll a + b	$Y = -0.00029X + 1.340$	-0.954*
II (-)	叶绿素 a Chlorophyll a	$Y = -0.001X + 0.905$	-0.953*
	叶绿素 b Chlorophyll b	$Y = -0.00013X + 0.5041$	-0.957*
	叶绿素 a + b Chlorophyll a + b	$Y = -0.00024X + 1.409$	-0.966**
II (+)	叶绿素 a Chlorophyll a	$Y = -0.0002X + 0.869$	-0.958*
	叶绿素 b Chlorophyll b	$Y = -0.00015X + 0.446$	-0.960**
	叶绿素 a + b Chlorophyll a + b	$Y = -0.00035X + 1.315$	-0.961**

2.5 不同 Cu 浓度胁迫下接种链格孢菌对白车轴草叶片蛋白质含量的影响

不同 Cu 浓度处理下,接种链格孢菌对两种群白车轴草叶片蛋白质含量影响不同(图 3)。接种处理白车轴草叶片蛋白质含量均低于未接种处理,且统计结果表明,各浓度下,II (+) 与 II (-) 含量均有显著差异,而

种群 I 仅在 $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度下接种与未接种有显著差异。在低浓度 ($500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 下, 仅 II (+) 比不加 Cu 处理的对照低, 其他 3 处理组均比对照略高。随后, 随土壤 Cu 浓度增加, 两种群叶片蛋白质含量均呈下降趋势。II (+)、II (-) 蛋白质含量与土壤 Cu 浓度均显著负相关, 相关系数分别为 -0.965^* 和 -0.903^* 。而种群 I 植物则没表现显著相关性 ($p > 0.05$)。

两种群叶片蛋白质含量相比较, 仅在对照组 I (-) < II (-), 其余各浓度下, 无论接种与否, 叶片蛋白质含量均是种群 I > II。由此可见, Cu 处理下, 接种链格孢菌对种群 II 植物叶片蛋白质含量影响更大, 这与叶绿素变化规律一致。

2.6 不同 Cu 浓度胁迫下接种链格孢菌对白车轴草叶片 SOD、POD、CAT 活性的影响

Cu 胁迫下, 接种链格孢菌对白车轴草叶片 SOD、POD 和 CAT 影响分别见图 4、图 5 和图 6。无论接种与否, 两种群白车轴草叶片在 $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cu 浓度下 3 种酶活性均比对照略增加, 随着 Cu 浓度增加, 各种酶活性变化不同。

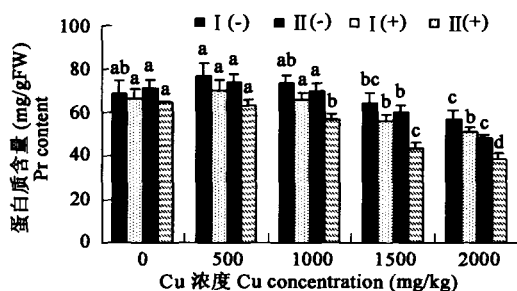


图 3 Cu 胁迫下链格孢菌对白车轴草叶片蛋白质含量的影响

Fig.3 Effect of *A. tenuis* on the protein content of *T. repens* leaves under Cu stress

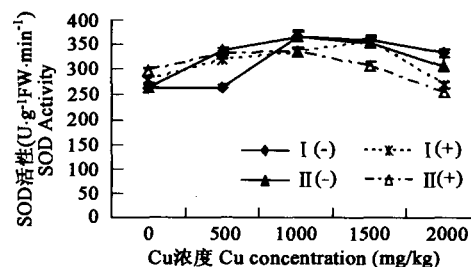


图 4 Cu 胁迫下链格孢菌对白车轴草叶片 SOD 活性的影响

Fig.4 Effect of *A. tenuis* on the activities of SOD in *T. repens* leaves under Cu stress

图 4 中, 在高 Cu 浓度时, 两种群接种链格孢菌处理组的 SOD 活性均低于未接种组, 而在低浓度 (0 和 $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 接种组均大于未接种组。I (-) 和 II (-) SOD 活性在 $1000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时达最大值, 随后下降。I (+) 叶片 SOD 值随 Cu 浓度增加到 $1500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 达到最高值, 比对照增加 26.70% ($p < 0.05$), 随后迅速下降, 在 $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时比对照组低 4.29% 。II (+) 的 SOD 活性到 $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时已达到最大值, 随后随 Cu 浓度增加而降低, 到 $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时比对照低 14.25% ($p < 0.05$)。

图 5 表明, Cu 胁迫下, 接种链格孢菌对 POD 影响最为明显。 $500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度下, 两种群接种组 POD 高于未接种组, 而其他浓度下, 接种组显著低于未接种组, 且 $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度时, I (+) 比 I (-)、II (+) 比 II (-) 活性分别下降 54.92% ($p < 0.05$)、 57.33% ($p < 0.05$)。接种后, 两种群植物 POD 活性均随 Cu 浓度增加先增后减, 种群 II 变化幅度 > I。未接种组 POD 活性与 Cu 浓度显著正相关, 相关系数 I (-) 和 II (-) 分别为 0.958^* 、 0.915^* 。由图还可得, 无论接种与否, 种群 I 变化幅度小于 II。

两种群植物接种链格孢菌后, $0 \sim 1000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, CAT 活性均高于未接种组, 但这种差异无显著性, 在 $2000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度接种组 CAT 活性均小于未接种组, 这与 POD、SOD 的变化一致 (图 6)。I (+) 随 Cu 浓度增加活性逐渐升高, 到 $1500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 达最大值比对照高 47.53% ($p < 0.05$), 接着又迅速下降。该变化趋势和 SOD 一致; II (+) 活性则在低浓度时升高, 到 $1000\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时达到最大值随后随 Cu 浓度增加活性降低。I (-) 和 II (-) CAT 活性随 Cu 浓度增加总趋势为逐渐升高, 到 $1500\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后下降, 但总体变化趋势不如 POD 明显。由此可得, Cu 胁迫下, 接种链格孢菌后, 白车轴草叶片 3 种保护酶的敏感性为 $\text{POD} > \text{SOD} > \text{CAT}$ 。

3 讨论

叶绿素是植物光合作用的物质基础。叶绿素的破坏与降解会直接导致光合作用速率的降低, 进而使植物

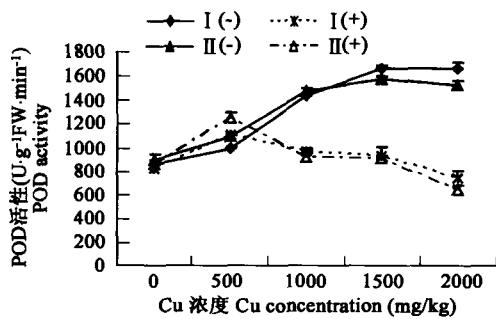


图5 Cu胁迫下链格孢菌对白车轴草叶片 POD 活性的影响

Fig.5 Effect of *A. tenuis* on the activities of POD in *T. repens* leaves under Cu stress

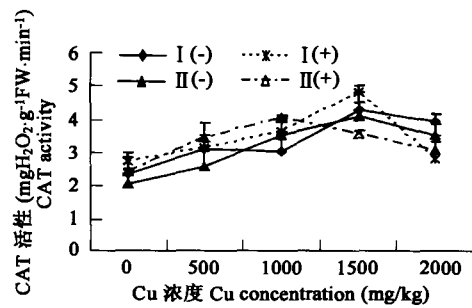


图6 Cu胁迫下链格孢菌对白车轴草叶片 CAT 活性的影响

Fig.6 Effect of *A. tenuis* on the activities of CAT in *T. repens* leaves under Cu stress

长势减弱,植物生长量减少^[20]。储玲等^[21]发现 Cu 胁迫下,低浓度促使植物叶绿素含量微增,高浓度使其下降。本研究中 I(-)与 II(-)植株叶绿素含量也经历了“先增后降”的过程。植物在感染病原菌后,叶绿体受到破坏,叶绿素合成受阻,光合速率下降甚至完全失去同化 CO₂ 的能力^[22]。实验中,(+)含量均显著低于(-),表明链格孢菌对白车轴草叶绿体结构和叶绿素合成造成严重破坏。且在高 Cu 浓度下,叶片受 Cu 和链格孢菌双重毒害,这种受伤害的程度进一步加深,植物的生长受到严重影响。此外,II(+)植物的叶绿素含量一直随 Cu 的增加而下降,原因可能是其原生长于土壤 Cu 含量远小于实验处理浓度的非污染区,即使在加入 Cu500mg·kg⁻¹时,也已超出其叶绿体对 Cu 的耐性,加之链格孢菌的侵入,导致其叶绿素合成受到破坏,从而含量下降。

实验中叶片蛋白质含量的变化趋势与叶绿素相似,也是低 Cu 促使植物生长;而 Cu 过量后与-SH 结合导致蛋白质变性降解。也可能是蛋白质合成酶失活或 DNA 转录翻译途径受阻影响了蛋白质的合成^[21]。病原菌可对寄主植物氮素代谢进行干扰,降低氮素的吸收和硝酸还原酶的活性,改变氨基酸组成,阻碍蛋白质合成及加速其分解^[23]。本实验接种组蛋白质含量低于未接种组,也进一步证实了这一观点。并且,随 Cu 浓度增加对植物生理代谢破坏的加重,接种链格孢菌的植物蛋白质代谢失调表现更为严重。

细胞膜透性是评价植物对逆境反应的指标之一,有研究表明^[20],重金属胁迫下,细胞外渗液电导率随与污染物浓度呈正相关。本实验中,两个种群未接种组电导率变化结果与之一致。病原菌侵入植物后,会破坏寄主植物细胞膜结构,造成电解质外漏,从而使电导率增大^[11,12]。实验中接种链格孢菌后,0~1500mg·kg⁻¹时,细胞膜透性是(+)>(-),且随 Cu 浓度增加而增大。这表明链格孢菌破坏了细胞膜结构、细胞内酶及代谢作用原有区域,增大了膜透性。MDA 含量在 0~1500mg·kg⁻¹时升高,且(+)>(-)。高浓度 Cu 处理使植物体内 MDA 高度积累,接种链格孢菌后更加速其积累,而 MDA 含量的增加显示膜脂过氧化水平的升高,使得细胞膜系统中不饱和脂肪酸组分含量降低,膜结构破坏,并使膜电势去极化,从而导致膜透性增大,细胞内电解质大量渗漏,使得电导率也增大,植物抗逆性减弱^[24]。实验中 MDA 含量与叶片电导率呈极显著正相关,也进一步支持以上观点。另外,Cu2000mg·kg⁻¹时,电导率、MDA 均成下降趋势但(+)>(-)且都高于不加 Cu 对照,推测这并不是表明此时植物受伤有所缓解,相反的,更可能是由于植物在受到远大于其原生长环境的 Cu 浓度胁迫时,细胞膜结构及多种细胞器早已经被损坏^[25],接种链格孢菌后,更使得植物细胞整体功能在短时间内遭到严重破坏,部分细胞死亡、组织坏死,以致无较多的外渗物质,从而电导率偏低;同时,在这样严重胁迫下,膜脂过氧化的酶也遭到破坏,产生 MDA 含量低于前几个 Cu 浓度处理。

在病原菌、重金属离子、机械胁迫以及伤口等情况下,植物体内都能诱导大量活性氧产生^[26],影响植物正常生理活动。SOD、POD 和 CAT 共同组成植物体内一个有效的活性氧清除系统,三者协调一致的共同作用,能有效清除植物体内的自由基和过氧化物^[27]。逆境诱导下,植物体能启动自身的保护机制,来最大限度减少伤害^[28]。这应该是实验中 Cu 浓度增加,SOD、CAT、POD 升高的原因之一。Cu 浓度增大到一定程度,使功能蛋白

变构失活,诱导 tRNA 水解,导致蛋白质合成受阻的毒性效应越来越显著,表现为 SOD、CAT 降低。可见,重金属胁迫下,活性氧清除系统对植物细胞的保护是有一定限度的,超过这个阈值植物就会受到伤害。

Buonaria^[29]认为,受病害感染后,感病品种(发生亲和反应)的 SOD、CAT 活性基本不变甚至升高。在 POD 研究中,许多学者认为接种后,POD 活性显著升高,且速度很快^[30]。实验中,SOD、POD 在低 Cu 浓度下(+) > (-),而在高浓度下(+)活性下降且低于(-)。推测这样变化的原因是,低浓度 Cu 对植物生长略有促进作用,植物长势较好,受病原菌侵染后,体内迅速产生大量活性氧,可限制病原菌生存和扩散,从而抵制病害,同时,一系列保护酶活性也上升,故活性较未接种高,多余的活性氧也可有效被清除,使植物免受伤害。盆栽实验结果显示,仅高浓度 Cu 一个因素对白车轴草生长影响已经很大,可诱发大量的活性氧产生,已经影响到保护酶系统的平衡。此时接种链格孢菌后,植物可能在短时间内也有大量活性氧产生以抵制病害,但实验结果中显示的酶活性结果却是(+) < (-),原因可能是该数据是在接种 9d 天后测得的,此时病原菌已成功侵入寄主植物并使其表现出明显的感病症状(病斑、局部组织坏死等),寄主病情趋于稳定。而保护酶活性的变化非常敏感而短暂,与活性氧自由基反应的速度也很快^[31],大量资料显示了保护酶活性随染病时间的延长而下降^[9,10,30]。所以接种 9d 后的指标看不出最初接种时活性氧和保护酶活性的变化。植物在重金属和病原菌双重的压力下,体内保护酶系统平衡被打破,自身调节系统受破坏,导致代谢紊乱,生长受阻,这和前面白车轴草叶片膜透性、膜脂过氧化水平、叶绿素、蛋白质含量受的影响基本一致。此外,比较三种保护酶在同等的逆境胁迫下,敏感度为 POD > SOD > CAT。这比较符合“CAT 对 H₂O₂ 亲和性低,在清除病原物与植物作用过程中产生的 H₂O₂ 作用可能有限,不如 POD 对 H₂O₂ 亲和性高”的观点^[31]。

综上,比较两种群植物各生理生化指标,初步得出种群 I 白车轴草在土壤 Cu 低于 2000mg·kg⁻¹时可生存,在感染链格孢菌和 Cu 双重胁迫,生长的土壤 Cu 浓度应控制在 1500mg·kg⁻¹以内;种群 II 在单一 Cu 浓度不超过 1500mg·kg⁻¹,链格孢菌和 Cu 双重胁迫时土壤 Cu 浓度不超过 1000mg·kg⁻¹可生长。实验中,Cu 和病原菌的单一或双重胁迫下,种群 I 的电导率、MDA 含量小于 II,叶绿素、蛋白质含量高于 II,保护酶的变化幅度也小于 II,可见种群 I 植物比 II 有更高的耐性。I 植物生长于铜尾矿区,已经适应有 Cu 的环境,对逆境的耐性机制也相应发生改变以适应环境压力,因此即使受到链格孢菌的侵染,生长也未受到明显影响。而关于 Cu 胁迫下,白车轴草受病原菌侵染的初期体内生理生化变化情况及其与病程的关系还有待于进一步研究,以进一步揭示 Cu 污染下,白车轴草的抗病机制,对以后研究重金属污染胁迫下,植物对其病原菌的抗病机制提供参考。

References:

- [1] Burdon J J. Diseases and plant population biology. Cambridge University Press, 1987.
- [2] Ericson L&A. Wennstrom. The effect of herbivory on the interaction between the clonal plant *Trientalis europaea* and its sinut fungus *Urocystis trientalis*. *Oikos*. 1997, 80:107 ~ 111.
- [3] Marvier M A. Parasite impacts on host communities: plant parasitism in a California coastal prairie. *Ecology*, 1998, 79:2616 ~ 2623.
- [4] Liu D Y, Lars Ericson. Effects of an interspecific competition gradient on the interactions between *Trifolium repens* and its pathogenic rust fungus *Uromyces trifolii-repentis*. *Acta Phytocologica Sinica*, 2001, 25(3):344 ~ 350.
- [5] Thrall P H, Godfree R, Burdon J J. Influence of spatial structure on pathogen colonization and extinction: a test using an experimental metapopulation. *Plant Pathology*, 2003, 52(3): 350 ~ 361.
- [6] Wang S H, Yang Z M, Xu L L. Mechanisms of copper toxicity and resistance of plants. *Ecology and Environment*, 2003, 12(3):336 ~ 341.
- [7] Wang Y B, Liu D Y, Zhang L, et al. Patterns of vegetation succession in the process of ecological restoration on the deserted land of Shizishan copper tailings in Tongling city. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(7):780 ~ 787.
- [8] Li Z, Liu D Y, Ding J H, et al. Effect of *A. azukiae* on physiological metabolism and active oxygen-eliminating acyivitues of *Trifolium repens*. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2005, 16(3):529 ~ 532.
- [9] Dong J G, Fan M Z, Han J M, et al. The effect of AB-Toxin from *Alternaria brassicae* on membrane permeability and the activities of SOD and POD in cell of Chinese cabbage leaves. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1999, 29(2):138 ~ 141.
- [10] Wan Z X, Zhu J J, Qiang S. The pathogenic mechanism of toxin of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler to *Eupatorium Spreng*. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2001, 10(3):47 ~ 50.
- [11] Thrall P H, Burdon J J. and Young A. Variation in resistance and virulence among demes of a plant host-pathogen metapopulation. *Journal of Ecology*, 2001, 89(5):736 ~ 748.

- [12] Qin T C, Wu Y S. Effects of cadmium, lead single and combination pollution on the contents of ascorbic acid and in *Brassica chinese* L. *Chin J Ecol*, 1997,16(3):31~34.
- [13] Zhang Z L. The Experimental Guide for Plant Physiology (Third Edition). Beijing: Higher Education Press, 2003.
- [14] Lin Z F, Li S S, Lin G Z. The relationship between the dec-repitude of leaf of ripe and the enzyme activity of SOD and peroxidation of lipid. *Acta Botanica Sinica*, 1984,26(6):605~615.
- [15] Chen J X, Wang X F. Plant Physiology Experimentation. Guangzhou: South China Science and Engineering University Press, 2002.
- [16] Li H S. Principle and Technologies to Plant Physiological and Biochemical Experiment. Beijing: Higher Education Press, 2000. 165~167.
- [17] Zhu G L, Zhong W H, Zhang A Q. Plant Physiology Experimentation. Beijing: Peking University Press, 1990. 51~53, 126~130.
- [18] Proinok X H. The analysis methods of biochemistry of plants. Beijing: Science Press, 1981. 197~200
- [19] Wang A G. The discussion of MDA be as the index of superoxide of plants. *Plant Physiology Communications*, 1986, 6(2):55~58.
- [20] Liu D Y, Wang Y B, Zhang X X, et al. Effect of sewage irrigation on wheat growth and its activate oxygen metabolism. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2002, 13(10): 1319~1322.
- [21] Chu L, Liu D Y, Wang Y B, et al. Effect of copper pollution on seedling growth and activate oxgen metabolism of *Trifolium pretense*. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2004, 15(1): 119~122.
- [22] Zhao F G, et al. Plant stress physiological ecology. Beijing: Chemical Industry Press, 2004. 96~98.
- [23] Liu D Y, Li Z, Li J, et al. Effect of *Alternaria azukiae* on the physiological and biochemical characteristics of *Trifolium repens* under different light intensities. *Acta Ecological Sinica*, 2005, 25(8): 1874~1880.
- [24] Song F M, Zheng Z, Ge X C. Role of active oxygen and membrane lipid peroxidation in plant-pathogen interactions. *Plant Physiology Communications*, 1996, 32(5): 377~385.
- [25] Ni C Y, Chen Y X, Luo Y M, et al. Change of superficial shape and cell microstructure of milk-vetch (*Astragalus* L.) root under simulated Cu pollution in a Red soil. *Environmental Science*, 2003, 24(3): 116~120.
- [26] Lamb C, Dixon R A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 251~275.
- [27] Lin K F, Xu X Q, Jin X. Eco-toxicological effects of germanium stress on rice (*Oryza sativa* L.) and their critical value. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(1): 108~114.
- [28] Pang X, Wang D H, Peng A. Effect of lead stress on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedling. *Environmental Science*, 2001, 22(5): 108~111.
- [29] Yuan Q H, Gui Z, Zhang W S. Comparison of the activities of SOD, POD and PPO within alfalfa cultivars resistant and susceptible to alfalfa common leaf. *Acta Prataculturae Sinica*, 2002, 11(2): 100~104.
- [30] Buonario R, Torre G D, Montalbini P. Soluble superoxide dismutase (SOD) in suscepible and resistant host-parasite complex of *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. *Physiol Plant Pathol*, 1987, 31: 173~184.
- [31] Guo Z J, Li D B. Active oxygen species in plant disease resistance. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(9): 881~891.

参考文献:

- [4] 刘登义, Lars Ericson. 种间竞争梯度对白车轴草及其病原菌白车轴草单孢锈菌相互作用的影响. *植物生态学报*, 2001, 25(3): 344~350.
- [6] 王松化, 杨志敏, 徐荣莱. 植物铜毒害及其抗性机制研究进展. *生态环境*, 2003, 12(3): 336~341.
- [8] 李征, 刘登义, 丁佳红, 等. 豆链格孢菌对白车轴草生理代谢及活性氧清除系统酶的影响. *应用生态学报*, 2005, 16(3): 529~532.
- [9] 董金皋, 樊慕贞, 韩建民, 等. 芸薹链格孢菌毒素对白菜细胞膜透性、SOD 酶和 POD 酶活性的影响. *植物病理学报*, 1999, 29(2): 138~141.
- [10] 万佐玺, 朱晶晶, 强胜. 链格孢菌毒素对紫茎泽兰的致病机制. *植物资源与环境学报*, 2001, 10(3): 47~50.
- [12] 秦天才, 吴玉树. 铅镉单一和复合污染对小白菜抗坏血酸含量的影响. *生态学杂志*, 1997, 16(3): 31~34.
- [13] 张志良. 植物生理学实验指导. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [14] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系. *植物学报*, 1984, 26(6): 605~615.
- [15] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导. 广州: 华南理工大学出版社, 2002.
- [16] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000. 165~167.
- [17] 朱广廉, 钟文海, 张爱琴. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社, 1990. 126~130.
- [18] X. H. 波钦诺克著. 荆家海, 等译. 植物生理生化分析方法. 北京: 科学出版社, 1981. 197~200.
- [19] 王爱国. 丙二醛作为植物过氧化指标的探讨. *植物生理学通讯*, 1986, 6(2): 55~58.
- [20] 刘登义, 王友保, 张徐祥, 等. 污灌对小麦幼苗生长及活性氧代谢的影响. *应用生态学报*, 2002, 13(10): 1319~1322.
- [21] 储玲, 刘登义, 王友保, 等. 铜污染对三叶草幼苗生长及活性氧代谢影响的研究. *应用生态学报*, 2004, 15(1): 119~122.
- [22] 赵福庚, 等. 植物逆境生理生态学. 化学工业出版社, 2004. 96~98.
- [23] 刘登义, 李征, 李晶, 等. 不同光照强度下豆链格孢菌对白车轴草生理生化特性的影响. *生态学报*, 2005, 25(8): 1874~1880.
- [24] 宋凤鸣, 郑重, 葛秀春. 活性氧及膜脂过氧化在植物-病原体互作中的作用. *植物生理学通讯*, 1996, 32(5): 377~385.
- [25] 倪才英, 陈英旭, 骆永明. 红壤模拟铜污染下紫云英根表形态及其组织和细胞结构变化. *环境科学*, 2003, 24(3): 116~120.
- [27] 林匡飞, 徐小清, 金霞. 镉对水稻的生态毒理效应及临界指标. *生态学报*, 2005, 25(1): 108~114.
- [28] 庞欣, 王东红, 彭安, 等. 铅胁迫对小麦幼苗抗氧化酶活性的影响. *环境科学*, 2001, 22(5): 108~111.
- [29] 袁庆华, 桂枝, 张文淑. 苜蓿抗褐斑病品种内超氧化物歧化酶、过氧化物酶和多酚氧化酶活性的比较. *草业学报*, 2002, 11(2): 100~104.
- [31] 郭泽建, 李德葆. 活性氧与植物抗病性. *植物学报*, 2000, 42(9): 881~891.