

四季竹对大气臭氧体积分数倍增的生理响应

庄明浩¹, 李迎春¹, 陈双林¹, 李 应^{1,2}, 顾大彤¹

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 贵州大学 林学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为了给气候变化背景下的竹林培育应对策略提供理论依据, 以四季竹 *Oligostachyum lubricum* 为材料, 运用开顶式气室 (OTCs) 模拟当前环境背景大气臭氧 (O_3) 体积分数 (NF, 40~45 $nL \cdot L^{-1}$) 倍增 1 倍 (TR-1, 92~106 $nL \cdot L^{-1}$) 和倍增 2 倍 (TR-2, 142~160 $nL \cdot L^{-1}$) 情景, 分析叶片光合色素、可溶性蛋白、可溶性糖和脂质过氧化及抗氧化酶等生理指标的变化。结果表明: 大气臭氧体积分数倍增 90 d 时, 与 NF 比较, TR-1 和 TR-2 处理的四季竹叶片叶绿素、类胡萝卜素、可溶性蛋白和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性均显著降低, 而叶片相对电导率、丙二醛 (MDA) 和过氧化物酶 (POD) 活性均显著升高, 而叶片可溶性糖仅 TR-2 较 NF 显著下降; 叶片相对电导率和丙二醛 TR-2 显著高于 TR-1, 而叶片可溶性糖 TR-2 显著低于 TR-1。说明大气臭氧体积分数倍增能引起四季竹叶片细胞膜脂过氧化, 膜结构遭到破坏, 影响四季竹的正常生长, 表现出伤害效应。图 2 表 1 参 22

关键词: 植物学; 四季竹; 臭氧体积分数倍增; 光合色素; 膜脂过氧化; 抗氧化酶

中图分类号: S718.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2012)01-0012-05

Physiological responses of *Oligostachyum lubricum* with elevated atmospheric ozone concentrations

ZHUANG Ming-hao¹, LI Ying-chun¹, CHEN Shuang-lin¹, LI Ying^{1,2}, GU Da-xing¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;

2. Forestry College, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: This research was conducted to provide theoretical evidence for bamboo cultivation during this time of possible climate change. Open-top chambers (OTCs) were employed to determine the effects of elevated ozone on photosynthetic pigment content, soluble protein content, soluble sugar content, lipid peroxidation, and anti-oxidation enzymes in the leaves of *Oligostachyum lubricum* using a split-plot design with treatments of Control (NF), 92–106 $nL \cdot L^{-1}$ of O_3 concentration (TR-1), and 142–160 $nL \cdot L^{-1}$ of O_3 concentration (TR-2), three replications. Results showed that, after 90 d, compared with NF, in treatments TR-1 and TR-2 there were significant decreases in the contents of chlorophyll ($P = 0.002\ 4$), carotenoids ($P = 0.049\ 4$), and soluble protein ($P = 0.031\ 5$), as well as superoxide dismutase (SOD) activity ($P = 0.033\ 0$) with significant increases in relative electrical conductivity ($P = 0.013\ 5$), peroxidase (POD) activity ($P = 0.039\ 6$), and malondialdehyde (MDA) content ($P = 0.000\ 4$). Soluble sugar content decreased significantly ($P = 0.003\ 7$) only in treatment TR-2. Also, in leaves of TR-2 compared to TR-1, there was a significant increase in electrical conductivity ($P = 0.044\ 8$) and MDA content ($P = 0.000\ 2$), but a significant decrease in soluble sugar content ($P = 0.001\ 5$). Thus, elevated ozone concentrations intensified the damage to membrane lipids and destroyed the structure of cell membranes, thereby affecting normal growth of *O. lubricum*. [Ch, 2 fig. 1 tab. 22 ref.]

收稿日期: 2011-04-14; 修回日期: 2011-06-20

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (RISF6915); 国家林业公益性行业科研专项 (201004008); 浙江省省院合作项目 (2010SY01)

作者简介: 庄明浩, 从事竹林生理生态研究。E-mail: zhuangminghao3@163.com。通信作者: 陈双林, 研究员, 博士, 从事竹林生态与培育研究。E-mail: cslbamboo@126.com

Key words: botany; *Oligostachyum lubricum*; elevated ozone concentration; photosynthetic pigment; membrane lipid peroxidation; antioxidant enzymes

对流层中臭氧(O₃)是由光化学反应产生的二次污染产物,是温室气体和光化学烟雾的主要成分。由于工业的迅速发展,氮氧化物(NO_x)和氧有机挥发物(VOCs)等臭氧前体物排放量大幅度增加,导致近地表臭氧体积分数以 1%~2%·a⁻¹ 的速率增长^[1]。地处长江三角洲的浙江省是中国经济快速发展的地区之一,也是中国竹产业最为发达的省份,大气臭氧污染已成为该地区的突出环境问题^[2]。大气臭氧体积分数升高对植物的影响已成为当今世界研究者及公众密切关注的重要环境问题。已有研究表明:臭氧体积分数升高可使植物出现明显的伤害症状,如叶片出现气斑,严重时萎蔫状枯死^[3],叶面积减小^[4],株高下降^[5],叶绿素降低^[6]等,影响植物的正常生长和生理代谢进程。当然,植物也能通过自身的抗氧化系统清除植物体内过量的活性氧,抵御一定浓度条件下臭氧对植物的伤害^[7]。四季竹 *Oligostachyum lubricum*, 成林速度快,笋期长(5~10月),生态适应性强,具有较强的耐干旱、耐盐碱和耐土壤贫瘠的能力,竹笋产量高,具有清热解毒之功效,是优良的夏秋季笋用竹种^[8]。在全球气候变化的大背景下,开展臭氧体积分数倍增对竹子生长发育和生理代谢的影响研究,是维护竹业可持续发展的现实需要,但目前相关方面的研究还未有涉及。本研究以四季竹为材料,运用开顶式同化箱(OTCs)模拟大气臭氧体积分数倍增,分析臭氧体积分数倍增对四季竹叶片光合色素、脂质过氧化和抗氧化系统等的影响,旨在为气候变化背景下的竹林高效培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验于 2009~2010 年在浙江省临安市(29°56'~30°23'N, 118°51'~119°72'E)太湖源镇太湖源观赏竹种园中进行。2009 年 11 月在四季竹林中选取地径(12.15 ± 1.25) mm,全高 2.5~3.0 m,生长健壮的 2 年生立竹,进行不带宿土的全稍竹盆栽。栽植盆上端直径为 38 cm,下端直径 32 cm,高 35 cm。栽植 1 株·盆⁻¹。盆栽基质为红壤与细沙 3:1 均匀混合而成,pH 5.8,碱解氮为 198.47 mg·kg⁻¹,速效磷 67.25 mg·kg⁻¹,速效钾 74.16 mg·kg⁻¹。盆栽实验竹苗经定期人工水分补充,及时去除笋芽等管护,至 2010 年 8 月开始进行臭氧体积分数倍增处理实验。

1.2 实验设计

OTCs 由不锈钢管和白色的聚乙烯塑料板构建,主要包括过滤系统、通风及布气系统和框架等,气室边长为 1.5 m,高 4.0 m,室壁上部向内部倾斜 45°成斜面,玻璃室壁为正八边形。臭氧由 CFG-20 型臭氧发生器产生。OTCs 内臭氧体积分数用美国产的 Model 205 双光束紫外臭氧分析仪监测。

实验共设 3 个臭氧体积分数处理水平,分别为环境背景大气(NF,臭氧体积分数为 40~45 nL·L⁻¹),大气臭氧体积分数倍增 1 倍(TR-1,臭氧体积分数为 92~106 nL·L⁻¹)和大气臭氧体积分数倍增 2 倍(TR-2,臭氧体积分数为 142~160 nL·L⁻¹)。每个处理各 3 次重复。2010 年 8 月 6 日开始熏气,每天熏气时间为 7:00~17:00,于 2010 年 11 月 8 日停止熏气。熏气 90 d 时取成熟的竹叶样品 6~8 片,测定叶片主要生理生化指标。

1.3 叶片光合色素和抗性生理指标测定

用改良过的光合色素浸提法^[9]测定叶片叶绿素(chlorophyll)和类胡萝卜素(carotenoid);超氧化物歧化酶(SOD)活性用氮蓝四唑(NBT)光化还原法测定,以每单位时间内抑制 NBT 光化还原 50%为一个酶活性单位;过氧化物酶(POD)活性用愈创木酚氧化法测定,以吸光度 $D(\lambda)_{470}$ 升高 0.01 为一个酶活性单位;丙二醛(MDA)用硫代巴比妥酸法测定;可溶性糖采用蒽酮比色法测定;可溶性蛋白质采用考马斯亮蓝法测定;相对电导率用初始电导率与煮沸后电导率的比值表示,用 DDSJ-308A 型电导仪测定^[10]。

1.4 数据处理与分析

在 Excel 2003 统计软件中进行实验数据整理和图表处理,在 SPSS 17.0 统计软件中进行单因素方差分析和最小显著差法(LSD)多重比较。实验数据为各个处理的均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 大气臭氧体积分数倍增对四季竹叶片叶绿素和类胡萝卜素的影响

从图 1 分析可知：臭氧处理 90 d 时，随着大气臭氧体积分数的升高，四季竹叶片叶绿素和类胡萝卜素呈下降趋势。与 NF 处理比较，TR-1 和 TR-2 处理叶片叶绿素和类胡萝卜素均有显著降低，降幅分别为 37.13% 和 15.44%，41.55% 和 27.97%，而 TR-2 处理的叶片叶绿素和类胡萝卜素仅较 TR-1 处理降低 7.03% 和 14.82%，之间均无显著差异。表明较目前环境背景大气的臭氧体积分数倍增 1 倍能引起四季竹叶片光合色素降解或合成受阻，而臭氧体积分数倍增 2 倍，叶片光合色素则趋于相对稳定。

2.2 大气臭氧体积分数倍增对四季竹叶片相对电导率和丙二醛、可溶性糖、可溶性蛋白质的影响

由表 1 分析可知：大气臭氧体积分数倍增 90 d 时，与 NF 处理比较，TR-1 和 TR-2 处理的四季竹叶片相对电导率和丙二醛均有显著提高，增幅分别为 39.59% 和 18.64%，75.63% 和 71.19%。叶片可溶性糖 TR-1 较 NF 处理仅下降 8.55%，并无显著差异，而 TR-2 较 NF 处理有显著下降，降幅为 22.86%。叶片可溶性蛋白质 TR-1 和 TR-2 较 NF 处理均有显著降低，降幅分别为 35.34% 和 38.98%。TR-2 与 TR-1 比较，叶片相对电导率和丙二醛显著提高，增幅分别为 25.82% 和 44.29%。

表 1 臭氧体积分数倍增对四季竹叶片相对电导率和丙二醛、可溶性糖、可溶性蛋白质的影响

Table 1 Relative electrical conductivity and contents of MDA, soluble sugar, soluble protein in leaves of *Oligostachyum lubricum* with the elevated ozone concentrations

处理	相对电导率/%	丙二醛/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	可溶性糖/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	可溶性蛋白质/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
NF	11.82 \pm 0.73 c	0.59 \pm 0.01 c	5.38 \pm 0.12 a	29.68 \pm 2.61 a
TR-1	16.50 \pm 2.27 b	0.70 \pm 0.06 b	4.92 \pm 0.09 a	19.19 \pm 1.54 b
TR-2	20.76 \pm 0.06 a	1.01 \pm 0.08 a	4.15 \pm 0.16 b	18.11 \pm 2.79 b

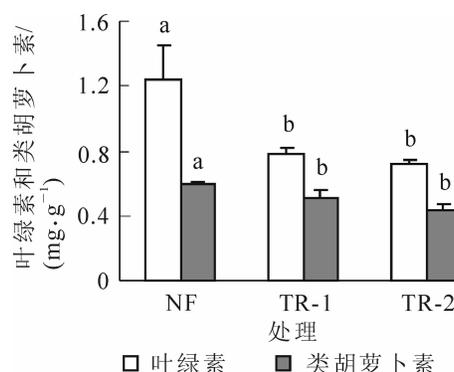
说明：同列不同小写字母示差异显著 ($P < 0.05$)，相同小写字母示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 大气臭氧体积分数倍增对四季竹叶片超氧化物歧化酶活性和过氧化物酶活性的影响

如图 2 所示：大气臭氧体积分数倍增 90 d 时，与 NF 处理比较，四季竹叶片超氧化物歧化酶和过氧化物酶活性表现出不同的变化规律。TR-1 和 TR-2 处理叶片超氧化物歧化酶活性显著下降，降幅分别为 43.52% 和 51.21%，且 TR-1 与 TR-2 处理间无显著差异(图 2-A)。而叶片过氧化物酶活性显著升高，增幅分别为 20.35% 和 26.40%，TR-1 与 TR-2 处理间也无显著差异(图 2-B)。

3 讨论

叶绿素是高等植物叶绿体内重要光合色素，是植物光合作用的关键物质和有机营养的基础，叶绿素下降被认为是植物叶片受到伤害的重要指标^[11]。而类胡萝卜素是植物体内最重要的¹O₂猝灭剂，可以阻止¹O₂诱发不饱和脂肪酸过氧化作用，降低膜受损害的程度^[12]，从而保护膜系统，特别是叶绿体光合膜系统。本实验表明：大气臭氧体积分数倍增显著降低了四季竹叶片叶绿素和类胡萝卜素，说明大气臭氧体积分数倍增能导致四季竹叶片光合色素的降解或合成受阻，引起叶片衰老加快，与地中海松 *Pinus halepensis*^[13] 和白杨 *Populus bonatii*^[14] 等的研究结果一致。



同一指标不同处理间比较。不同小写字母示差异显著 ($P < 0.05$)，相同小写字母示差异不显著 ($P > 0.05$)。

图 1 臭氧倍增四季竹叶片叶绿素和类胡萝卜素

Figure 1 Contents of Chl and Car in leaves of *Oligostachyum lubricum* with the elevated ozone concentrations

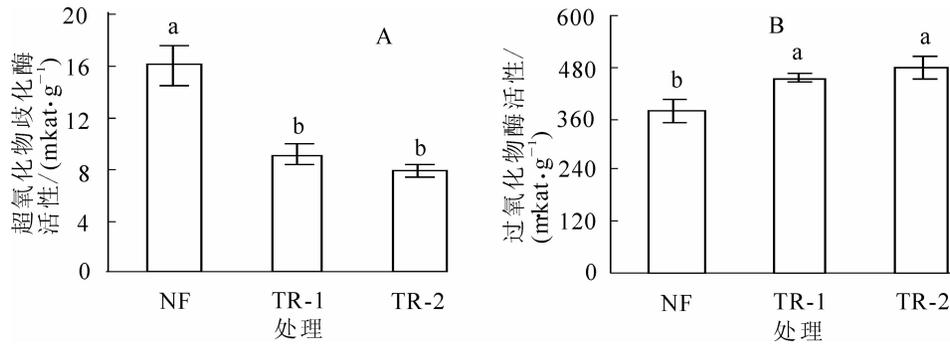


图 2 臭氧体积分数倍增四季竹叶片超氧化物歧化酶(A)和过氧化物酶(B)活性

Figure 2 SOD activity (A) and POD activity (B) in leaves of *Oligostachyum lubricicum* with the elevated ozone concentrations

相对电导率可以反映植物细胞膜的破损程度，而丙二醛是植物膜脂过氧化作用的最终产物，是衡量植物细胞膜脂过氧化程度大小最常用的指标。与环境背景大气相比，大气臭氧体积分数倍增，四季竹叶片相对电导率和丙二醛都有显著升高，与油松 *Pinus tabulaeformis*，银杏 *Ginkgo biloba*^[15]，水稻 *Oryza sativa*^[16]和小麦 *Triticum aestivum*^[17]的研究结果一致。表明大气臭氧体积分数倍增，能使四季竹细胞膜脂过氧化作用增强，膜透性增大，致使膜结构遭到破坏，电解质大量外渗，影响四季竹的正常生理代谢。

一般认为，臭氧通过气孔扩散到细胞间，达到细胞后在质外体或其他部位分解为活性氧(氧离子 O_2^- 和过氧化氢 H_2O_2)。超氧化物歧化酶用于清除植物体内 O_2^- ，避免 O_2^- 对膜的伤害^[18]，且清除 O_2^- 的能力与胁迫的强度和时间的长短有关。臭氧体积分数越高，处理时间越长，对植物叶片超氧化物歧化酶活性抑制越大^[19]。在本实验中，大气臭氧体积分数倍增，四季竹叶片超氧化物歧化酶活性显著下降，这可能与大气臭氧体积分数倍增导致四季竹叶片活性氧大量积累，超出了超氧化物歧化酶清除自由氧的能力，而且过量的 O_2^- 与 H_2O_2 发生 Haber-Weiss 反应或者与过渡族金属离子($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ， $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ 等)发生 Fenton 反应生成了更具生物毒性的羟自由基，有害自由基的大量积累直接或间接地启动膜脂过氧化，致使丙二醛增加，丙二醛的积累又反过来抑制了超氧化物歧化酶活性甚至使其失活，导致超氧化物歧化酶清除活性氧保护膜系统的功能遭到破坏，促使膜系统受损加重^[20]等有关。过氧化物酶在保护植株免受氧化损伤方面起着重要作用。通常认为过氧化物酶具有参与催化反应的电子供体的氧化产物和清除过氧化氢的能力^[21]。本实验结果中，大气臭氧体积分数倍增，四季竹叶片过氧化物酶活性显著提高，结合叶片相对电导率和丙二醛、光合色素的变化规律分析，四季竹叶片膜结构和抗氧化系统已遭到破坏，发生膜脂过氧化，加剧了植物衰老进程。

植物可溶性糖作为结构物质和代谢产物参与多种胁迫反应，并作为渗透调节物质对植物起到一定的保护作用。臭氧胁迫下植物叶片可溶性糖升高，可起到渗透调节作用^[22]。本实验表明，大气臭氧体积分数倍增会引起四季竹叶片可溶性糖质量分数的显著下降。说明臭氧胁迫对四季竹产生了伤害，可溶性糖作为渗透调节物质用于抵抗臭氧胁迫所消耗导致其质量分数的下降。植物体内可溶性蛋白质既是氮素吸收同化的产物，又是植物体内可转运氮的储存物，是构成光合与其他生理生化过程的活性基础，其质量分数高低可以反映植株叶片生理生化作用状态。大气臭氧体积分数倍增，四季竹叶片可溶性蛋白质质量分数显著降低。

本实验表明：在长时间(90 d)大气臭氧体积分数倍增条件下，四季竹叶片活性氧大量积累，抗氧化防御体系遭到破坏，加剧了膜脂过氧化程度，膜结构及其功能受损，引起光合色素降解或合成受阻，加速叶片衰老，影响四季竹正常的生理代谢和生长发育。可见，在大气臭氧体积分数逐渐升高的背景下，臭氧胁迫对竹类植物生长的影响及其应对经营策略等需进一步开展相关研究。

参考文献：

- [1] IPCC. *Climate Change* [EB/OL]. [2011-04-11] <http://www.ipcc.ch/pub/spm22-01>.
- [2] 周秀骥. 长江三角洲地区近地层大气和生态系统的互作研究[M]. 北京：气象出版社，2004：175 - 185.
- [3] 周康群，冯岩. 臭氧对广州主要栽培蔬菜生长的影响[J]. 华中农业大学学报，2001，20(4)：344 - 347.

ZHOU Kangqun, FENG Yan. Influence of ozone to the growth of cultivating vegetables in Guangzhou [J]. *J Huazhong*

- Agric Univ*, 2001, **20** (4): 344 – 347.
- [4] 白月明, 王春乙, 温民, 等. 臭氧浓度和熏气时间对菠菜生长和产量的影响[J]. 中国农业科学, 2004, **37** (12): 1971 – 1975.
BAI Yueming, WANG Chunyi, WEN Min, *et al.* Influences of different ozone concentrations and fumigation days on spinach growth and yield [J]. *Sci Agric Sin*, 2004, **37** (12): 1971 – 1975.
- [5] ISEBRANDS J G, MCDONALD E P, KRUGER E, *et al.* Growth response of *Populus tremuloides* clones to interacting elevated carbon dioxide and tropospheric ozone [J]. *Environ Poll*, 2001, **115**: 359 – 371.
- [6] REICH P B. Effects of low concentration of O₃ on net photosynthesis, dark respiration, and chlorophyll contents in aging hybrid poplar leaves [J]. *Plant Physiol*, 1983, **73**: 291 – 296.
- [7] TAUSZ M, GRULKE N E, WIESER A, *et al.* Defense and avoidance of ozone under global change [J]. *Environ Pollu*, 2007, **147**: 525 – 531.
- [8] 何元荪, 魏建勇, 陆晓友. 四季竹栽培管理和笋期调控技术[J]. 浙江林业科技, 2004, **24** (6): 34 – 36.
HE Yuansun, WEI Jianyong, LU Xiaoyou. Preliminary study on shooting time control and cultivation management of *Oligostachyon lubricum* stand [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2004, **24** (6): 34 – 36.
- [9] 张宪政, 陈凤玉. 植物生理学试验技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1994: 164 – 165.
- [10] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2006: 54 – 124.
- [11] 刘道宏. 植物叶片衰老[J]. 植物生理学通讯, 1983 (2): 14 – 19.
LIU Daohong. Plant leaf senescence [J]. *Plant Physiol Commun*, 1983 (2): 14 – 19.
- [12] 张其德, 卢从明, 刘丽娜, 等. CO₂浓度倍增对垂柳和杜仲叶绿体吸收光能和激发能分配的影响[J]. 植物学报, 1997, **39** (10): 946 – 950.
ZHANG Qide, LU Congming, LIU Lina, *et al.* Effects of doubled CO₂ on contents of photosynthetic and on kinetic parameters of fluorescence induction in different genotypes of soybean [J]. *Acta Bot Sin*, 1997, **39** (10): 946 – 950.
- [13] SUSANA E, ROCIO A, FEDERICO J, *et al.* On the response of pigments and antioxidants of *Pinus halepensis* seedlings to mediterranean climatic factors and long-term ozone exposure [J]. *New Phytol*, 1998, **138**: 419 – 432
- [14] WUSTMAN B A, OKSANEN E, KAMOSKY D F, *et al.* Effects of elevated CO₂ and O₃ on aspen clones varying in O₃ sensitivity: can CO₂ ameliorate the harmful effects of O₃ [J]. *Environ Poll*, 2001, **115**: 473 – 481.
- [15] 张巍巍. 臭氧浓度升高对对银杏与油松活性氧及抗氧化系统的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2007.
ZHANG Weiwei. *Effects of Elevated Ozone on Active Oxygen Species and Anti-Oxidative System in Ginkgo biloba L. and Pinus tabulaeformis* Carr. [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2007.
- [16] 金明红, 冯宗炜, 张福珠. 臭氧对水稻叶片膜脂过氧化和抗氧化系统的影响[J]. 环境科学, 2000, **21** (3): 3 – 5.
JIN Minghong, FENG Zongwei, ZHANG Fuzhu. Effects of ozone on membrane lipid peroxidation and antioxidation system of rice leaves [J]. *Environ Sci*, 2000, **21** (3): 3 – 5.
- [17] 金明红, 冯宗炜. 臭氧对冬小麦叶片膜保护系统的影响[J]. 生态学报, 2000, **20** (4): 444 – 447.
JIN Minghong, FENG Zongwei. Effects of ozone on membrane protective system of winter wheat leaves [J]. *Acta Ecol Sin*, 2000, **20** (4): 444 – 447.
- [18] NEILL S J, DESIKAN R, CLARKE A, *et al.* Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plant [J]. *J Exper Bota*, 2002, **53**: 1237 – 1247.
- [19] 卢涛, 何兴元, 陈炜. O₃和CO₂浓度升高对油松针叶抗氧化系统的影响[J]. 生态学杂志, 2009, **28** (7): 1316 – 1323.
LU Tao, HE Xingyuan, CHEN Wei. Effects of elevated O₃ and CO₂ on *Pinus tabulaeformis* antioxidant system [J]. *Chin J Ecol*, 2009, **28** (7): 1316 – 1323.
- [20] BHATTACHARYA J, GHOSHASTIDAR K, CHATTERJEE A, *et al.* Synechocystis Fe superoxide dismutase gene confers oxidative stress tolerance to *Escherichia coli* [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2004, **316**: 540 – 54.
- [21] ASADA K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plant [J]. *Physiol Plantarum*, 1992, **85**: 235 – 241.
- [22] 杨玉珍. 植物受氟化物污染后糖代谢及叶汁pH值的变化研究[J]. 河南农业大学学报, 1995, **29** (1): 95 – 97.
YANG Yuzhen. Change of plants sugar metabolism and pH value of leaf extract fluid after fluoride pollution [J]. *Acta Agric Univ Henan*, 1995, **29** (1): 95 – 97.