

模拟酸雨高温胁迫对桂花品种‘杭州黄’抗氧化酶活性和非结构性碳代谢的影响

王小东, 汪俊宇, 周欢欢, 傅卢成, 王 彬, 张汝民, 高 岩

(浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 为了揭示桂花品种‘杭州黄’ *Osmanthus fragrans* ‘Hangzhou Huang’ 抵御酸雨高温胁迫的生理生化机制, 以‘杭州黄’叶片为材料, 采用盆栽人工模拟酸雨胁迫(pH 5.6, pH 4.0, pH 3.0, pH 2.0)和高温胁迫(40 ℃)进行处理, 测定了叶片光合色素, 活性氧(ROS), 丙二醛(MDA)质量摩尔浓度, 抗氧化酶活性和非结构性碳的变化。结果表明: ①酸雨或高温单一胁迫后, 叶绿素a(Chl a)质量分数、总叶绿素(Chl t)质量分数和 Chl a/b 均呈降低趋势。酸雨高温协同胁迫后, 叶绿素 a 和总叶绿素质量分数及 Chl a/b 进一步降低, pH 2.0 处理分别比对照降低了 27.7%, 23.8%和 19.5% ($P < 0.05$)。②ROS 和 MDA 质量摩尔浓度在酸雨或高温胁迫后均显著增加; 协同胁迫后, 随着 pH 值的降低, O_2^- 和 MDA 质量摩尔浓度显著增加, pH 2.0 处理分别比对照增加了 158.3%和 142.0% ($P < 0.05$), 过氧化氢(H_2O_2)质量摩尔浓度在 pH 3.0 时达最大, 比对照增加了 180.0% ($P < 0.05$)。③酸雨及高温胁迫后保护酶超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性均显著增加, 3 种酶共同作用抵御胁迫造成的伤害; 协同胁迫后, SOD 和 CAT 活性先升高后下降, 而 POD 仍保持较高活性, pH 2.0 处理比对照增加了 107.3% ($P < 0.05$)。④酸雨胁迫后, 葡萄糖和果糖质量分数相对稳定, 蔗糖和淀粉质量分数显著降低; 高温胁迫后, 非结构性碳质量分数均显著降低; 协同胁迫后, 非结构性碳质量分数进一步降低, 其中协同 pH 2.0 胁迫后果糖、蔗糖和淀粉质量分数分别比对照降低了 38.1%~41.6%, 葡萄糖质量分数比对照降低了 22.4%。研究表明: ‘杭州黄’在酸雨高温胁迫后通过调节保护酶活性和非结构性碳代谢减轻胁迫造成的伤害, 增强机体还原力, 表现出较强的抵御酸雨高温胁迫的能力。图 2 表 2 参 35

关键词: 植物生理学; 桂花; 酸雨高温胁迫; 抗氧化防御系统; 非结构性碳

中图分类号: S685.13; Q945.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2019)01-0054-08

Effects of simulated acid rain and heat stress on antioxidant enzyme activities and non-structural carbon metabolism of *Osmanthus fragrans* ‘Hangzhou Huang’

WANG Xiaodong, WANG Junyu, ZHOU Huanhuan, FU Lucheng, WANG Bin, ZHANG Rumin, GAO Yan

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To reveal the physiological and biochemical mechanisms of *Osmanthus fragrans*, regarding the resistance to acid rain and heat stress, this study used the leaves of *O. fragrans* (cultivar ‘Hangzhou Huang’) as the material. Plants grown in pots treated with simulated acid rain stress [pH 5.6(ck), 4.0, 3.0, and 2.0] and heat stress (40 ℃) treatments were analyzed. Photosynthetic pigment content, active oxygen (ROS), malondialdehyde (MDA) content, antioxidant enzyme activity, and non-structural carbon changes in composition and content were measured. Results showed that (1) generally, the contents of chlorophyll a (Chl a), total chlorophyll (Chl t), and the ratio of Chl a/b ratio decreased after acid rain and heat as individual stresses. After the

收稿日期: 2018-01-19; 修回日期: 2018-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270756, 31470704)

作者简介: 王小东, 从事植物生理学研究。E-mail: 864611626@qq.com。通信作者: 高岩, 教授, 博士, 从事植物生理生态研究。E-mail: gaoyan1960@sohu.com

co-stresses of acid rain and heat, there is significant decreases ($P<0.05$) of Chl a (27.7%), Chl t (23.8%), and the Chl a/b (19.5%) compared to the control of pH 2.0. (2) ROS and MDA increased significantly ($P<0.05$) after acid rain or heat as individual stress. After co-stresses, the content of $O_2^{\cdot-}$ and MDA increased significantly ($P<0.05$) as pH decreased, and increased 158.3% ($O_2^{\cdot-}$) and 142.0% (MDA) compared to the control of pH 2.0. The content of H_2O_2 significantly increased ($P<0.05$) and reached a maximum of 180.0% compared to the control of pH 3.0. (3) Superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT) activities increased significantly ($P<0.05$) with individual acid rain or heat stresses, and the three enzymes cooperated to resist stress damage. After co-stresses, the SOD and CAT activities firstly increased and then decreased; whereas, POD still maintained a high activity and increased 107.3% compared to the control of pH 2.0. (4) After acid rain stress, the contents of glucose and fructose were relatively stable, but sucrose and starch decreased significantly ($P<0.05$). Non-structural carbon contents decreased significantly after heat stress ($P<0.05$). After co-stresses, non-structural carbon content decreased even further: among them, fructose, sucrose, and starch content decreased 38.1%–41.6% ($P<0.05$); and glucose content decreased 22.4% compared to the control of pH 2.0 ($P<0.05$). The results indicate that *O. fragrans* ‘Hangzhou Huang’ could reduce the damages of acid rain and heat stresses by regulating activities of protective enzymes and non-structural carbon metabolism. [Ch, 2 fig. 2 tab. 35 ref.]

Key words: plant physiology; *Osmanthus fragrans*; acid rain and heat stresses; antioxidant defense system; non-structural carbon

叶绿素是光合作用中支持植物生长的必需物质,也是各种环境胁迫对叶片功能和健康损害的敏感指标^[1-2]。酸雨直接通过破坏质膜、降解叶绿素、破坏叶绿体超微结构和使植物关键酶失活而抑制植物的生长发育^[3]。酸雨可使植物细胞中氢离子(H^+)浓度升高^[4],引起过氧化氢(H_2O_2)和超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)等活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过度积累,高水平的 ROS 会对细胞结构造成包括脂质过氧化在内的显著损害^[5-6]。植物抗氧化系统,包括抗氧化酶和非酶抗氧化剂,是 ROS 的清除和细胞膜稳定性的维持重要的防御机制^[7]。其中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是抗氧化的第 1 道防线,它催化超氧阴离子歧化生成过氧化氢和氧气,过氧化氢酶(catalase, CAT)是公认的第 2 道防线,能够清除细胞中产生的过氧化氢^[8],过氧化物酶(peroxidase, POD)能在高浓度氧的情况下保持较高的氧化还原活性,保护细胞免受高浓度氧的伤害^[9]。非结构性碳水化合物(nonstructural carbohydrate, NSC)主要包括果糖、葡萄糖、蔗糖和淀粉等,是重要的渗透调节物质和能量物质^[10]。李天红等^[11]对苹果 *Malus domestica* 研究发现:适度水分胁迫处理使叶片和根系中蔗糖含量升高,淀粉含量显著降低;BOLOURI-MOGHADDAM 等^[12]研究认为葡萄糖代谢可以通过清除 ROS 从而防止细胞程序性死亡。环境胁迫导致初级代谢紊乱,影响可溶性糖的积累。可溶性糖除了作为代谢物质和能量来源外,还充当信号分子,协调合成代谢和分解代谢过程,促进植物生长发育。酸雨被认为是一种世界性的污染物,尤其是在北欧、北美和中国。中国酸雨污染面积占国土面积的 40%以上,强酸雨区($pH\leq 4.5$)面积居世界三大酸雨区之首,其中长江以南地区已成为全球强酸雨中心^[13-14]。长江中下游地区受副热带高压影响,梅雨季节过后常常伴随着高温,导致该地区植物易遭受酸雨和高温双重胁迫。桂花品种‘杭州黄’*Osmanthus fragrans* ‘Hangzhou Huang’是木犀科 Oleaceae 木犀属 *Osmanthus* 的常绿乔木,是新培育的珍贵品种。为了研究‘杭州黄’对酸雨高温双重胁迫的响应,模拟酸雨高温胁迫对非结构性碳质量分数、ROS 及抗氧化酶活性的影响,揭示‘杭州黄’抵御酸雨高温胁迫的生理生化指标响应机制,以及‘杭州黄’抗酸雨高温胁迫的适应对策,同时为植物多样性保护、园林植物合理利用及可持续发展提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2016 年 6 月,将生长良好、长势基本一致的 2 年生‘杭州黄’实生苗(购于浙江杭州画境种业有限公司,苗高约 50 cm)栽植于盛有培养土[V(泥炭):V(沙土):V(蛭石)=1:2:1,干质量为 1.5 kg]花盆中($\varphi=$

25 cm, $h=30$ cm), 1 株·盆⁻¹, 共计 40 盆。盆栽苗常规管理, 光照条件为自然光, 缓苗期间, 用自来水进行浇灌。充分缓苗 1 个月, 再实施酸雨高温处理。

1.2 试验处理

选取盆栽苗 40 盆, 随机分为 8 组, 其中 4 组用作酸雨处理, 另 4 组酸雨处理后再进行高温处理。酸雨处理: 母液根据浙江省杭州市临安区酸雨监测分析资料, 按照酸雨中 $x[\text{硫酸根离子}(\text{SO}_4^{2-})]:x[\text{硝酸根离子}(\text{NO}_3^-)]=4:1$ (摩尔比) 的比例配制。设置 pH 5.6 (对照), pH 4.0, pH 3.0, pH 2.0 等 4 个处理梯度, 酸雨喷施量根据临安区月均降水量, 5 d 喷施 1 次, 喷施 5 mm·次⁻¹, 连续处理 40 d。处理结束后, 选取桂花枝条从上至下第 3 对完整的功能叶片, 取样 3.0 g·盆⁻¹ (约 10 个叶片), 一部分新鲜叶片立即用做光合色素的测定, 另一部分样品用液氮迅速冷冻后保存于 -80 °C 超低温冰箱中待测定。高温处理: 将对照组和每个酸雨处理后的苗木, 放入人工气候箱 (昼/夜为 40 °C/28 °C, 湿度为 40%, 光合光子照度为 400.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 胁迫 2 d。将对照组进行高温胁迫作为高温组, 其他作为酸雨高温协同处理组。5 盆·处理⁻¹, 每盆作为 1 个独立实验, 共 5 次重复。

1.3 试验方法

1.3.1 光合色素质量分数的测定 光合色素的测定参照 ARNON^[15]的方法并略作改进, 根据 LICHTE-NTHALER^[16]的方法分别计算。

1.3.2 ROS 和丙二醛(MDA)质量摩尔浓度的测定 O_2^- 测定参照李忠光等^[17]的研究方法并稍作改进。过氧化氢测定参照 CHANDRA 等^[18]的方法并略作改进。MDA 测定参照 HODGES 等^[19]的方法。

1.3.3 抗氧化酶活性的测定 酶液提取方法: 称取 0.5 g 冷冻样品, 用液氮磨碎, 加入 9.0 mL 磷酸缓冲溶液 (0.1 mol·L⁻¹, pH 7.4) 研磨成匀浆, 10 000 $\times g$ 离心 15 min (4 °C)。取上清液用于 SOD, POD 和 CAT 活性的测定。SOD 活性测定参照南京建成生物科技有限公司生产的 A001-1 型 SOD 试剂盒进行测定和计算。CAT 和 POD 活性测定参照 KUMARI 等^[20]的方法。

1.3.4 非结构性碳质量分数的测定 取植物材料 0.5 g, 用液氮磨碎, 加入 10.0 mL 蒸馏水研磨成匀浆, 100 °C 水浴 10 min, 冷却, 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 上清液为可溶性糖提取液。向沉淀中加体积分数为 80% 乙醇冲洗 1 遍, 加蒸馏水 3.0 mL, 搅拌均匀, 放入沸水浴中糊化 15 min。冷却后, 加入 4.0 mL 冷的 9.2 mol·L⁻¹ 高氯酸, 搅拌, 提取 20 min 后加蒸馏水至 25.0 mL, 混匀, 离心 10 min, 上清液为淀粉提取液。蔗糖、果糖和葡萄糖参照南京建成生物科技有限公司生产的试剂盒进行测定和计算。淀粉采用蒽酮比色法测定。

1.4 数据处理

所有数据均为 5 次重复的平均值 $\pm$ 标准误, 利用 Origin 9.0 软件进行数据处理、图表制作和统计分析, 统计方法采用单因素方差分析 (one way ANOVA) 进行 Turkey 多重比较。

2 结果与分析

2.1 酸雨高温胁迫对‘杭州黄’光合色素的影响

由表 1 看出: 随着酸雨强度的增加, 叶绿素 a (Chl a) 质量分数, 总叶绿素 (Chl t) 质量分数和 Chl a/b 均呈降低趋势, pH 2.0 处理分别比对照降低了 16.9%, 16.0% 和 4.8% ($P<0.05$)。高温胁迫后, 叶绿素 a 质量分数, 总叶绿素质量分数和 Chl a/b 分别比对照降低了 12.4%, 10.8% 和 7.7% ($P<0.05$)。酸雨高温协同胁迫后, 叶绿素 a 质量分数, 总叶绿素质量分数和 Chl a/b 进一步降低, pH 2.0 时分别比对照降低了 27.7%, 23.8% 和 19.5% ($P<0.05$)。

2.2 酸雨高温胁迫对‘杭州黄’ROS 和 MDA 质量摩尔浓度的影响

由表 2 可见: 随着酸雨强度的增加, 过氧化氢和 O_2^- 质量摩尔浓度逐渐增加, 在 pH 2.0 时分别比对照增加了 94.5% 和 140.9% ($P<0.05$); MDA 先增加后降低, pH 3.0 时比对照增加了 75.0% ($P<0.05$)。高温胁迫后, 过氧化氢、 O_2^- 和 MDA 质量摩尔浓度分别比对照增加了 87.3%, 120.9% 和 75.8% ($P<0.05$)。酸雨高温协同胁迫后, 随着 pH 值的增加, 过氧化氢质量摩尔浓度呈先增加后降低的趋势, 在 pH 3.0 时达最大值, 比对照增加了 180.1% ($P<0.05$); O_2^- 和 MDA 质量摩尔浓度呈上升趋势, pH 2.0 时分别比对照增加了 158.3% 和 142.0% ($P<0.05$)。

表 1 酸雨高温胁迫对‘杭州黄’光合色素的影响

Table 1 Effects of acid rain and heat stress on pigment contents in leaves of <i>Osmanthus fragrans</i> ‘Hangzhou Huang’					
<i>T</i> /℃	pH 值	$w_{\text{Chl } a}/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$w_{\text{Chl } b}/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$w_{\text{Chl } a+b}/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	Chl <i>a/b</i>
28	5.6(ck)	1.24 ± 0.03 A	0.36 ± 0.05 A	1.60 ± 0.07 A	3.49 ± 0.37 A
	4.0	1.17 ± 0.10 A	0.35 ± 0.02 A	1.52 ± 0.12 AB	3.30 ± 0.20 B
	3.0	1.09 ± 0.11 B	0.33 ± 0.09 A	1.42 ± 0.16 AB	3.50 ± 0.81 B
	2.0	1.03 ± 0.04 B	0.31 ± 0.01 A	1.33 ± 0.05 B	3.36 ± 0.04 B
40	5.6(ck)	1.09 ± 0.04 a	0.34 ± 0.01 a	1.43 ± 0.04 a	3.21 ± 0.16 a
	4.0	0.98 ± 0.03 ab	0.31 ± 0.03 a	1.29 ± 0.03 ab	3.17 ± 0.34 a
	3.0	0.97 ± 0.01 ab	0.32 ± 0.02 a	1.29 ± 0.02 ab	3.06 ± 0.15 a
	2.0	0.90 ± 0.03 b	0.32 ± 0.03 a	1.22 ± 0.04 b	2.81 ± 0.25 b

说明：不同大写字母表示 28 ℃时不同处理差异显著；不同小写字母表示 40 ℃时不同处理差异显著

表 2 酸雨高温胁迫对‘杭州黄’叶片 ROS 和 MDA 质量摩尔浓度的影响

Table 2 Effects of acid rain and heat stress on ROS and MDA contents in leaves of <i>O. fragrans</i> ‘Hangzhou Huang’				
<i>T</i> /℃	pH 值	$b_{\text{O}_2\cdot}/(\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$	$b_{\text{H}_2\text{O}_2}/(\text{mol} \cdot \text{g}^{-1})$	$b_{\text{MDA}}/(\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1})$
28	5.6(ck)	0.48 ± 0.06 C	24.36 ± 2.90 D	3.29 ± 0.25 C
	4.0	0.55 ± 0.05 C	30.32 ± 1.03 C	4.00 ± 0.35 B
	3.0	0.67 ± 0.07 B	42.48 ± 2.23 B	5.76 ± 0.28 A
	2.0	1.17 ± 0.04 A	47.32 ± 3.17 A	5.62 ± 0.39 A
40	5.6(ck)	1.07 ± 0.07 b	45.61 ± 5.15 c	5.78 ± 0.25 c
	4.0	1.13 ± 0.05 b	53.36 ± 7.67 b	7.05 ± 0.42 b
	3.0	1.24 ± 0.07 a	68.16 ± 6.10 a	7.26 ± 0.35 b
	2.0	1.28 ± 0.09 a	27.18 ± 2.10 d	7.96 ± 0.21 a

说明：不同大写字母表示 28 ℃时不同处理差异显著；不同小写字母表示 40 ℃时不同处理差异显著

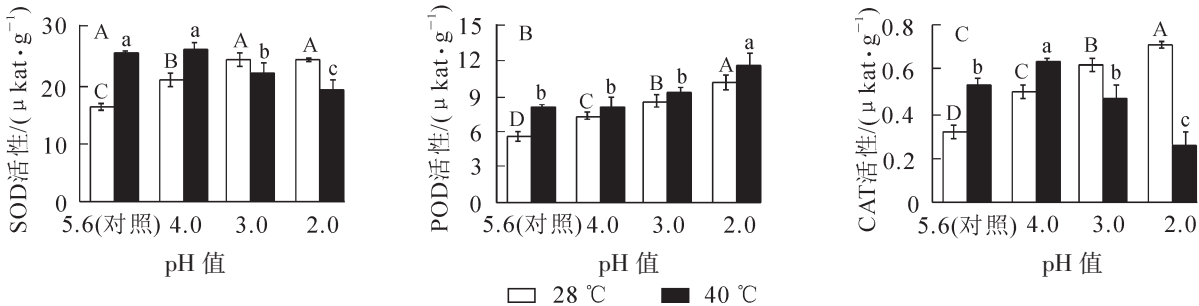
2.3 酸雨高温胁迫对‘杭州黄’抗氧化酶活性的影响

从图 1A 可以看出：随着酸雨强度的增加，‘杭州黄’叶片的 SOD 活性先增加后降低，在 pH 3.0 时比对照增加了 48.9% ($P<0.05$)，随后略微降低。由图 1B 和图 1C 可知：POD 和 CAT 活性随酸雨胁迫强度加强均逐渐增加，pH 2.0 处理分别比对照增长了 79.6% 和 118.2% ($P<0.05$)。高温胁迫后 SOD、CAT 和 POD 活性分别比对照增加了 54.5%，64.1% 和 43.8% ($P<0.05$)。

酸雨高温协同胁迫下，随胁迫强度的增加，SOD 和 CAT 活性呈先增加后降低趋势，均在 pH 4.0 处理达最大值，分别比对照增加了 60.3% 和 92.9% ($P<0.05$)；POD 活性仍逐渐增强，pH 2.0 处理比对照增加了 107.3% ($P<0.05$)，说明酸雨高温胁迫后主要靠 POD 发挥抗氧化作用减少自由基对植物造成的伤害。

2.4 酸雨高温胁迫对‘杭州黄’非结构性碳质量分数的影响

由图 2 可见：‘杭州黄’叶片葡萄糖质量分数在酸雨胁迫后变化不显著；高温胁迫后，葡萄糖质量分数比对照降低了 10.2% ($P<0.05$)；酸雨高温协同胁迫后，葡萄糖质量分数随着酸雨强度的增加而减



不同大写字母表示 28 ℃时不同处理差异显著；不同小写字母表示 40 ℃时不同处理差异显著

图 1 酸雨高温胁迫对‘杭州黄’叶片抗氧化酶活性的影响

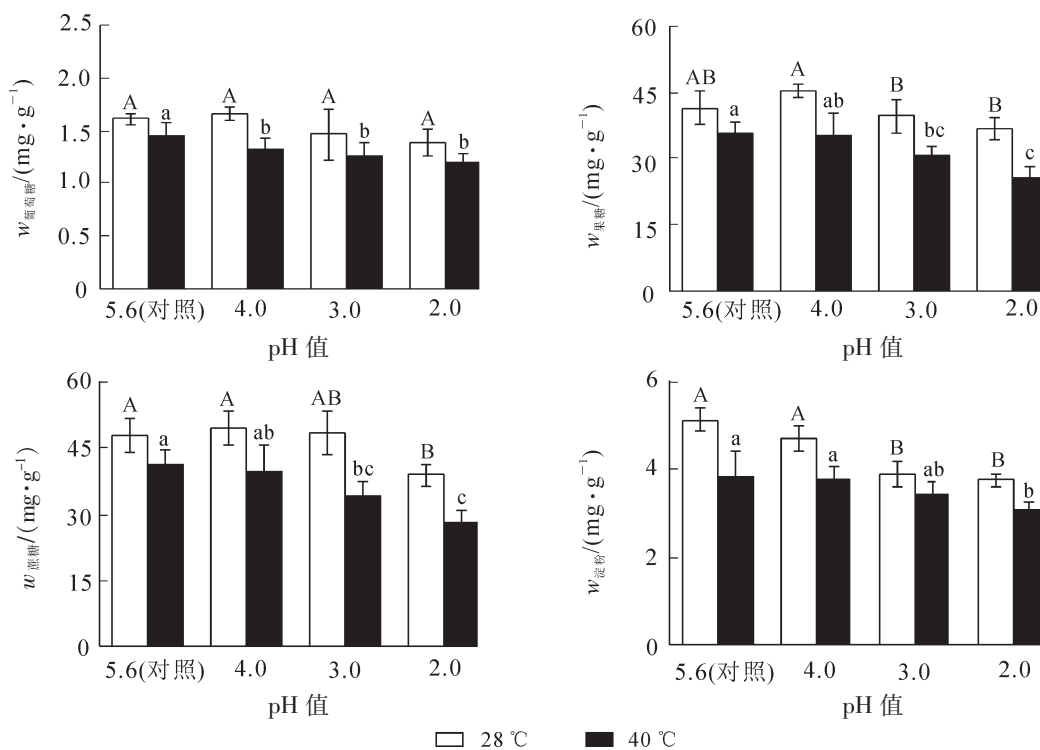
Figure 1 Effects of acid rain and heat stress on activity of antioxidant enzymes in leaves of *O. fragrans* ‘Hangzhou Huang’

小, pH 2.0 处理比对照降低了 22.4% ($P < 0.05$)。

果糖质量分数随着 pH 值的降低呈先升高后降低趋势, pH 2.0 处理较 pH 4.0 降低了 18.6% ($P < 0.05$); 高温胁迫后, 果糖质量分数比对照降低了 13.5% ($P < 0.05$); 酸雨高温协同胁迫后, 果糖质量分数随着酸雨强度的增加而减小, pH 2.0 处理比对照降低了 38.1% ($P < 0.05$)。可以看出, 胁迫程度较轻时, 果糖质量分数较稳定, 重度胁迫后则显著降低。

蔗糖质量分数在 pH 2.0 胁迫后显著降低, 比对照减少了 18.9% ($P < 0.05$); 高温胁迫后, 蔗糖质量分数比对照降低了 13.8% ($P < 0.05$); 酸雨高温协同胁迫后, 蔗糖质量分数随着 pH 值的降低而减少, pH 2.0 处理比对照降低了 41.6% ($P < 0.05$)。由此可见, 单一酸雨和高温胁迫时, 蔗糖质量分数降幅较低; 随着协同胁迫程度的加深, 蔗糖质量分数显著降低。

淀粉质量分数随 pH 值的降低呈下降趋势, pH 2.0 处理比对照减少了 26.8% ($P < 0.05$); 高温胁迫后, 淀粉质量分数比对照降低了 25.3% ($P < 0.05$)。酸雨高温协同胁迫后, 淀粉质量分数逐渐减少, pH 2.0 处理比对照降低了 40.1% ($P < 0.05$)。



不同大写字母表示 28 °C 不同处理间差异显著; 不同小写字母表示 40 °C 时不同处理类型间差异显著

图 2 酸雨高温胁迫对‘杭州黄’叶片非结构性碳质量分数的影响

Figure 2 Effects of acid rain and heat stress on non-structural carbohydrate contents in leaves of *Osmanthus fragrans* ‘Hangzhou Huang’

3 讨论与结论

植物叶片是捕获转换光能和制造有机物的最重要器官^[21], 植物叶绿素含量变化直接影响其光合作用过程^[22]。干旱^[23]、高温和酸雨^[24]等非生物胁迫导致植物叶绿素减少。在酸雨 pH ≤ 3.5 的环境条件下, 龙眼 *Dimorcarpus longana* ‘Wulongling’ 叶片总色素含量和 Chl a/b 均下降^[25]。本研究结果显示: ‘杭州黄’叶片叶绿素 a 质量分数及 Chl a/b 在酸雨或高温单一胁迫后均明显下降, 协同胁迫后进一步降低, 说明酸雨高温胁迫导致叶片光合色素结构破坏, 影响植物光合作用能力, 协同胁迫对叶绿素破坏更大。

植物受到伤害时会导致细胞内 ROS 大量积累^[26], 促进膜脂过氧化作用加强, 产生大量 MDA, 最终导致细胞膜功能受损, 质膜透性增加^[27], 因此 MDA 质量摩尔浓度的高低可迅速反映出植物受逆境伤害的程度^[28]。吴永波等^[29]研究发现: 高温或干旱胁迫后构树 *Broussonetia papyrifera* 幼苗 ROS 和 MDA 质量摩尔浓度增加, 复合胁迫后 ROS 和 MDA 质量摩尔浓度均显著高于单一胁迫。本实验结果表明: 酸雨或

高温单一胁迫后 ROS 和 MDA 质量摩尔浓度均显著增加, 说明受到酸雨及高温不同胁迫后, ‘杭州黄’体内产生大量的 ROS 对细胞膜造成伤害。酸雨高温协同胁迫后, $O_2^{\cdot-}$ 和 MDA 质量摩尔浓度进一步增加, 过氧化氢质量摩尔浓度先增加后减少, 说明协同胁迫加剧对植物的伤害, 与前人研究结果一致。

植物体内的 SOD, CAT 和 POD 等 3 种酶是细胞抵御活性氧伤害的重要保护性酶。它们在清除 $O_2^{\cdot-}$, 过氧化氢和过氧化物, 阻止和减少自由基的形成, 从而保护膜系统免受损伤方面起着重要作用。研究表明: 酸雨胁迫后, 茶梅 *Camellia sasanqua* 叶片 SOD, POD 和 CAT 活性提高^[30], 以消除 ROS 维持体内的氧化还原平衡; 牛远等^[31]研究发现高温胁迫后华北落叶松 *Larix principis-rupprechtii* 幼苗 SOD 和 POD 活性呈先上升后下降的趋势, CAT 活性呈降低趋势。本研究结果显示: 随酸雨胁迫处理强度的增加, SOD, CAT 和 POD 活性逐渐增强; 高温胁迫后, 3 种酶活性显著增加, 但 SOD 活性高于 pH 2.0 处理, CAT 和 POD 低于 pH 2.0 处理。协同胁迫后, POD 活性进一步增强, SOD 和 CAT 活性先升高后降低, 说明协同胁迫初期 3 种酶共同作用, 使植物体内 ROS 代谢平衡维持在正常水平, 防止发生进一步氧化损伤; POD 活性在协同作用后期对过氧化氢清除起主导作用, 在高强度的酸雨高温条件下, POD 清除 ROS 的效率更高, 而 pH 3.0 处理下 SOD 和 CAT 活性表达受到抑制, 且过度胁迫导致一部分已经表达的 CAT 失活, 说明抗氧化酶减轻膜脂过氧化伤害的作用是有限的。

植物光合作用产生的非结构性碳水化合物, 既是植物生长发育必需的能量物质, 也是细胞内重要的渗透调节物质^[10]。近年来越来越多的研究表明碳水化合物也是一种信号分子, 通过光合氮同化形成复杂的信号网络, 对植物的基因表达、逆境响应、生长发育进行调控^[32]。已有研究表明: 各种胁迫引起的糖限制可能是 ROS 积累的重要基础^[12,33], BOLOURI-MOGHADDAM 等^[12]发现葡萄糖能够通过磷酸戊糖途径和产生非酶性抗氧化剂, 有效清除活性氧, 提高植物抵抗能力; 蔗糖代谢不仅为植物发育提供能量和碳骨架, 还通过提供己糖作为必需代谢物和信号分子来调节它们对非生物胁迫的响应^[34]; 童贯和等^[35]指出: 5 种不同酸雨处理下的小麦 *Triticum aestivum* 幼苗茎叶可溶性糖含量分别下降 15.4%~29.4%, 差异达极显著水平。本实验结果显示: 酸雨胁迫后‘杭州黄’蔗糖和淀粉质量分数显著降低, 而葡萄糖和果糖质量分数相对稳定, 可能是因为植物遭受胁迫时呼吸代谢增强, 蔗糖和淀粉分解为葡萄糖和果糖提供能量物质, 增加抵抗能力。高温胁迫后非结构性碳质量分数均显著降低, 可能是因为高温促使植物呼吸代谢加速, 叶片非结构性碳消耗速率大于合成速率。协同胁迫后非结构性碳质量分数进一步降低, 一方面因为叶绿体膜结构受损, 光合作用能力下降, 引起植物体内非结构性碳积累速度降低, 另一方面有些糖类通过代谢途径和产生非酶抗氧化剂, 清除过量的 ROS, 减轻胁迫造成的伤害。

综上所述, 在酸雨胁迫后, ‘杭州黄’叶片内产生大量 ROS 对细胞膜及光合能力造成伤害, 植物抗氧化酶活性提高有效清除 ROS, 减轻胁迫造成的伤害; 高温胁迫后呼吸作用加快, 可溶性糖和淀粉降解, 为抵御胁迫提供能量和碳源; 协同胁迫后伤害进一步加深, SOD 和 CAT 活性逐渐降低, POD 保持较高活性继续发挥抗氧化功能, 同时通过调节非结构性碳代谢参与应激反应, 提供能量并消除过量的 ROS, 表现出较强的抵御酸雨高温胁迫的能力。

4 参考文献

- [1] ADAMS W W, DEMMIG-ADAMS B. Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment [C]//PAPAGEORGIOU G C, GOVINDJEE. *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Dordrecht Netherlands: Springer, 2004: 583 – 604.
- [2] CARTER G A, KNAPP A K. Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration [J]. *Am J Bot*, 2001, **88**(4): 677 – 684.
- [3] WEN Kejia, LIANG Chanjuan, WANG Lihong, *et al.* Combined effects of lanthanum and acid rain on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in soybean seedlings [J]. *Chemosphere*, 2011, **84**(5): 601 – 608.
- [4] LIANG Chanjuan, GE Yuqing, SU Lei, *et al.* Response of plasma membrane H^+ -ATPase in rice (*Oryza sativa*) seedlings to simulated acid rain [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2015, **22**(1): 535 – 545.
- [5] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, **48**(12): 909 – 930.
- [6] AHMAD P, JALEEL C A, SALEM M A, *et al.* Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abi-

- otic stress [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2010, **30**(3): 161 – 175.
- [7] BEZERRIL FONTENELE N M, OTOCH M D L O, GOMES-ROCHETTE N F, *et al.* Effect of lead on physiological and antioxidant responses in two *Vigna unguiculata* cultivars differing in Pb-accumulation [J]. *Chemosphere*, 2017, **176**: 397 – 404.
- [8] GAJEWSKA E, SKŁODOWSKA M. Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation [J]. *Plant Growth Regul*, 2008, **54**(2): 179 – 188.
- [9] JU Shuming, YIN Ningning, WANG Liping, *et al.* Effects of silicon on *Oryza sativa* L. seedling roots under simulated acid rain stress [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(3): e0173378. doi: 10.1371/journal.pone.0173378.
- [10] OHTO M, ONAI K, FURUKAWA Y, *et al.* Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2001, **127**(1): 252 – 261.
- [11] 李天红, 李绍华. 水分胁迫对苹果苗非结构性碳水化合物组分及含量的影响[J]. 中国农学通报, 2002, **18**(4): 35 – 39.
- LI Tianhong, LI Shaohua. Effects of water deficiency stresses on components and contents of the non-structured carbohydrates in the tissue-cultured apple seedlings [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2002, **18**(4): 35 – 39.
- [12] BOLOURI-MOGHADDAM M R, ROY K L, XIANG L, *et al.* Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells [J]. *Febs J*, 2010, **277**(9): 2022 – 2037.
- [13] 张新民, 柴发合, 王淑兰, 等. 中国酸雨研究现状[J]. 环境科学研究, 2010, **23**(5): 527 – 532.
- ZHANG Xinmin, CHAI Fahe, WANG Shulan, *et al.* Research progress of acid precipitation in China [J]. *Res Environ Sci*, 2010, **23**(5): 527 – 532.
- [14] YOU Shijun. *Improvement of China's Air Pollution (Sulphur Dioxide and Acid Rain) Control and Countermeasures by Introducing Emissions Trading System* [D]. Vancouver: The University of British Columbia, 2010.
- [15] ARNON D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. *Plant Physiol*, 1949, **24**(1): 1 – 15.
- [16] LICHTENTHALER H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes [J]. *Methods Enzymol*, 1987, **148**(1): 350 – 382.
- [17] 李忠光, 龚明. 植物中超氧阴离子自由基测定方法的改进[J]. 云南植物研究, 2005, **27**(2): 211 – 216.
- LI Zhongguang, GONG Ming. Improvement of measurement method for superoxide anion radical in plant[J]. *Acta Bot Yunnan*, 2005, **27**(2): 211 – 216.
- [18] CHANDRA R A, SINGH M, SHAH K. Effect of water withdrawal on formation of free radical, proline accumulation and activities of antioxidant enzymes in ZAT12-transformed transgenic tomato plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, **61**(4): 108 – 114.
- [19] HODGES D M, DELONG J M, FORNEY C F, *et al.* Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds [J]. *Planta*, 1999, **207**(4): 604 – 611.
- [20] KUMARI G J, REDDY A M, NAIK S T, *et al.* Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings [J]. *Biol Plant*, 2006, **50**(2): 219 – 226.
- [21] FUNK J L, CORNWELL W K. Leaf traits within communities: context may affect the mapping of traits to function [J]. *Ecology*, 2013, **94**(9): 1893 – 1897.
- [22] 尹华军. 增温对川西亚高山针叶林不同光环境下几种幼苗生长的影响[D]. 成都: 中国科学院研究生院, 2007.
- YIN Huajun. *Effects of Experimental Warming on Growth of Several Species Seedlings under Two Contrasting Light Conditions in Subalpine Coniferous Forest of Western Sichuan, China* [D]. Chengdu: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2007.
- [23] FU Jinmin, HUANG Bingru. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress [J]. *Environ Exp Bot*, 2001, **45**(2): 105 – 114.
- [24] 王玉魁, 郭慧媛, 阎艳霞, 等. 酸雨胁迫对毛竹叶片光合速率和叶绿素荧光参数的影响[J]. 生态环境学报, 2015, **24**(9): 1425 – 1433.
- WANG Yukui, GUO Huiyuan, YAN Yanxia, *et al.* Effect of acid rain stress on photosynthetic rate and chlorophyll

- fluorescence parameters in leaves of *Phyllostachys pubescens* [J]. *Ecol Environ Sci*, 2015, **24**(9): 1425 – 1433.
- [25] 邱栋梁, 刘星辉. 模拟酸雨对龙眼叶绿体活性的影响[J]. 应用生态学报, 2002, **13**(12): 1559 – 1562.
 QIU Dongliang, LIU Xinghui. Effects of simulated acid rain on chloroplast activity in *Dimorcarpus longana* Lour.cv. Wulongling leaves [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2002, **13**(12): 1559 – 1562.
- [26] OKTYABRSKY O N, SMIRNOVA G V. Redox regulation of cellular functions [J]. *Biochem Biokhim*, 2007, **72**(2): 132 – 145.
- [27] 贾丽, 刘盟盟, 张洪芹, 等. 冷蒿抗氧化防御系统对机械损伤的响应[J]. 浙江农林大学学报, 2016, **33**(3): 462 – 470.
 JIA Li, LIU Mengmeng, ZHANG Hongqin, *et al.* Antioxidant defense system responses of *Artemisia frigida* to mechanical damage [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2016, **33**(3): 462 – 470.
- [28] LIU E U, LIU C P. Effects of simulated acid rain on the antioxidative system in *Cinnamomum philippinense* seedlings [J]. *Water Air Soil Pollut*, 2011, **215**(1/4): 127 – 135.
- [29] 吴永波, 叶波. 高温干旱复合胁迫对构树幼苗抗氧化酶活性和活性氧代谢的影响[J]. 生态学报, 2016, **36**(2): 403 – 410.
 WU Yongbo, YE Bo. Effects of combined elevated temperature and drought stress on anti-oxidative enzyme activities and reactive oxygen species metabolism of *Broussonetia papyrifera* seedlings [J]. *Acta Ecol Sin*, 2016, **36**(2): 403 – 410.
- [30] 赵栋, 潘远智, 邓仕槐, 等. 模拟酸雨对茶梅生理生态特性的影响[J]. 中国农业科学, 2010, **43**(15): 3191 – 3198.
 ZHAO Dong, PAN Yuanzhi, DENG Shihuai, *et al.* Effects of simulated acid rain on physiological and ecological characteristics of *Camellia sasanqua* [J]. *Sci Agric Sin*, 2010, **43**(15): 3191 – 3198.
- [31] 牛远, 梁建萍, 张建达, 等. 高温胁迫对华北落叶松幼苗抗氧化酶的影响[J]. 山西农业科学, 2008, **36**(10): 47 – 49.
 NIU Yuan, LIANG Jianping, ZHANG Jianda, *et al.* Antioxidant enzymes response of *Larix principis-rupprechtii* seedlings under high temperature stress [J]. *J Shanxi Agric Sci*, 2008, **36**(10): 47 – 49.
- [32] FOYER C H, NOCTOR G. *Photosynthetic Nitrogen Assimilation: Inter-Pathway Control and Signaling* [M]. Dordrecht Netherlands: Springer, 2002.
- [33] COUÉE I, SULMON C, GOUESBET G, *et al.* Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants [J]. *J Exp Bot*, 2006, **57**(3): 449 – 459.
- [34] RUAN Yongling. Signaling role of sucrose metabolism in development [J]. *Mol Plant*, 2012, **5**(4): 763 – 765.
- [35] 童贯和, 梁惠玲. 模拟酸雨及其酸化土壤对小麦幼苗体内可溶性糖和含氮量的影响[J]. 应用生态学报, 2005, **16**(8): 1487 – 1492.
 TONG Guanhe, LIANG Huiling. Effects of simulated acid rain and its acidified soil on soluble sugar and nitrogen contents of wheat seedlings [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2005, **16**(8): 1487 – 1492.