

臭氧胁迫对冬小麦光合作用、膜脂过氧化和抗氧化系统的影响

郑有飞^{1,2}, 胡程达^{2*}, 吴荣军², 刘瑞娜², 赵泽², 张金恩²

(1. 南京信息工程大学江苏省气象灾害重点实验室, 南京 210044; 2. 南京信息工程大学环境科学与工程学院, 南京 210044)

摘要:在大田试验的条件下,利用开顶式气室(OTC)研究了臭氧胁迫对冬小麦不同生育期(拔节期、孕穗期、扬花期和灌浆期)光合作用、膜脂过氧化以及抗氧化系统的影响.结果表明,在150 nmol·mol⁻¹ O₃浓度范围内,随着O₃浓度的升高和熏气时间的增加,冬小麦叶片总叶绿素、叶绿素a和b含量总体降低,但孕穗和扬花期T1处理组总叶绿素和叶绿素a含量较CK组有所升高;气孔导度(G_s)开放受到影响,单位叶片面积活性降低,胞间CO₂浓度(c_i)和气孔限制值(L_s)呈波动变化.同时,冬小麦启动了自我保护机制,具体表现为SOD(超氧化物歧化酶)活性先快速升高而后逐渐下降,POD(过氧化物酶)活性呈先下降而后快速升高的变化趋势;从拔节期到扬花期以及从灌浆期1到灌浆期2,CAT(过氧化氢酶)活性表现为先快速升高而后“相对降低”,MDA(丙二醛)含量则持续升高;类胡萝卜素含量先升高后下降,单位叶片面积热耗散增加.结果表明,抗氧化酶并不能完全消除冬小麦体内过多的活性氧,造成活性氧积累,进一步加剧了膜脂过氧化作用,导致膜透性增加,叶绿素降解,净光合速率降低,加速冬小麦叶片的老化.

关键词:臭氧;气孔导度;净光合速率;膜脂过氧化;抗氧化系统

中图分类号:X171 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)07-1643-09

Effects of Ozone Stress upon Winter Wheat Photosynthesis, Lipid Peroxidation and Antioxidant Systems

ZHENG You-fei^{1,2}, HU Cheng-da², WU Rong-jun², LIU Rui-na², ZHAO Ze², ZHANG Jin-en²

(1. Jiangsu Key Laboratory for Meteorological Disasters, Nanjing University of Information Science & Technology, Nanjing 210044, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Nanjing University of Information Science & Technology, Nanjing 210044, China)

Abstract: Stress effects of surface increased ozone concentration on winter wheat photosynthesis, lipid peroxidation and antioxidant systems in varied growth stages (jointing stage, booting stage, blooming stage and grain filling stage) were studied, the winter wheat was exposed to open top chambers (OTCs) in an open field conditions to three levels ozone concentrations (CK, 100 nmol·mol⁻¹, 150 nmol·mol⁻¹). The results revealed that within 150 nmol·mol⁻¹ ozone concentration, as the ozone concentration and time increased, total chlorophyll content, chlorophyll a and b contents of winter wheat leaves were general declined, but compared to CK, the total chlorophyll and chlorophyll a content of T1 treatment groups were a little higher at booting and blooming stage; the conductance of stomatal was affected, the activation of unit leaf area decreased, intercellular CO₂ concentration and stomatal limitation value showed a fluctuation change tendency. At the same time, a self-protective mechanism of winter wheat were launched. Concrete expression of SOD activity first increased rapidly and then gradually decreased, the activity of POD showed a decrease firstly and then rapidly increased. From the jointing stage to the blooming stage and from the grain filling stage one to grain filling stage two, the activity of CAT rapidly increased first and then comparatively decreased, but the content of MDA kept steadily rising. The carotenoid content increased first and then decreased, heat dissipation of unit leaf area increased. These results indicate that antioxidant enzymes can not completely eliminate excessive reactive oxygen species *in vivo* of winter wheat, then lead to accumulation of reactive oxygen species, further exacerbate the lipid peroxidation, that result in the increase of membrane permeability, degradation of chlorophyll, reduction of net photosynthetic rate, imposing on the winter wheat leaves senescence process.

Key words: ozone; stomatal conductance; net photosynthetic rate; membrane lipid peroxidation; antioxidant system

最近几十年来,化石燃料大量燃烧和含氮化肥的大量使用,造成地表O₃浓度迅速升高^[1].国际气候变化专门委员会预测未来大气中O₃浓度将以每年约0.5%速度继续升高^[2,3].同时,O₃对农作物造成的负面影响已经引起人们的广泛关注,研究表明,

收稿日期:2009-09-1;修订日期:2009-12-15

基金项目:国家自然科学基金项目(40775072);中国气象局农业气象保障与应用技术重点开放实验室开放基金项目(AMF200904);江苏省高校自然科学基金重大项目(09KJA170004);南京信息工程大学科研基金项目(90215)

作者简介:郑有飞(1959~),男,教授,博士生导师,主要研究方向为农业气象与气候变化, E-mail: zhengyf@nuist.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: huchengda62@163.com

地表 O_3 浓度升高会使植株叶片出现可视化伤害^[4,5],抑制植株生长^[6],降低产量^[7],同时还能加速作物衰老以及改变作物对生物和非生物胁迫的敏感性^[8].

O_3 通过叶片气孔进入作物体内, O_3 毒性可能取决于它与质外体组分反应的能力,反应能产生活性氧,如超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、羟基自由基($\cdot OH$)、单态氧(1O_2)、过氧化氢(H_2O_2)等,这些活性氧可能才是 O_3 对作物产生负面影响的真正的原因^[9]. 然而作物也可以利用多种抗氧化机制来清除多余的活性氧来抵抗 O_3 胁迫^[10,11]. 如抗氧化系统的酶促子系统,主要包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)3种保护酶^[12]. 一般情况下,作物体内抗氧化酶活性越高,抵抗 O_3 胁迫的能力越强^[13]. 然而关于 O_3 胁迫对作物抗氧化系统以及膜脂过氧化作用的影响,国内外却出现了许多相互冲突的报道^[10,14-17].

光合作用作为植物生理功能的核心,因此当植物受到胁迫时,检测其运转状态被视为一种理想的反映植物生长与活力的标准^[18]. 同时它对大气 O_3 非常敏感^[19]. O_3 可以通过各种机制对光合作用产生影响. 如影响植物叶片气孔开放、破坏光合色素、降低羧化速率、阻碍光合电子传递速率、降低光能利用效率等^[20-25]. 虽然在 O_3 对冬小麦生理生化变化方面已经取得了较多的研究成果,但有关 O_3 胁迫对冬小麦整个生育期光合作用的影响机制研究仍有待进一步的深入研究.

本试验在 O_3 浓度相对较高的南京地区,开展了开顶式气室内(open top chambers) O_3 浓度增加对冬小麦的影响研究,主要通过研究冬小麦不同生育期(拔节期、孕穗期、扬花期、成熟期)的气体交换参数、叶绿素含量及其荧光参数、膜脂过氧化作用以及抗氧化酶系统等几方面来深入分析 O_3 浓度升高对冬小麦光合作用的影响机制.

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验用 O_3 由空气经 WJ-H-Y5 型高频 O_3 发生器生成,然后与背景大气混合,分别配制成 O_3 浓度为 $100\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (T1) 和 $150\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (T2) 的混合气体,再分别用轴流风机输入 OTC-1 型开顶式气室内,经“米”字形布气盘进入室内,保证室内 O_3 均匀分布,保持布气盘比小麦冠层高 50 cm(每周依据

小麦冠层高度调节一次布气盘高度). 此气室主体由不锈钢框架构成,下部为边长 1.15 m、高 1.9 m 的正八棱体,上部为高 0.25 m、上台面为下台面面积的 30% 的正八棱台,外包聚乙烯塑料膜. 另外还设置了开顶式气室作为对照处理(除无 O_3 通入外,其余均与处理相同,以下称 CK),共 3 个处理,每一处理 3 个重复.

气室东西方向一字排开,间距为 4 m. 用新西兰 AeroQual 公司的 Series200 手持式 O_3 检测仪每隔 1 h 对冬小麦冠层处的 O_3 浓度检测并调节一次,保证 OCT 室内臭氧浓度相对稳定. 气室内放置自动气象站观测数据,主要包括空气温度、湿度以及辐射等,气室外气象数据由南京信息工程大学农业气象观测站提供. 对比发现,OTC 室内日平均气温和日平均相对湿度比室外分别提高了 8.9% 和 3.3%,总辐射下降了 20.4%. 以上数据表明,研究设计的 OTC 达到了可以用来模拟研究 O_3 浓度升高对农业生产影响的标准^[26].

试验在南京信息工程大学农业气象试验站($32^{\circ}03'N$, $118^{\circ}51'E$)开展. 土壤为潮土,质地均匀,肥力中等. 供试作物为冬小麦(扬麦 16),为当地主栽品种之一. 于 2008-11-10 大田播种,2009-03-10(拔节初期)起开始对气室内冬小麦进行臭氧熏蒸处理,每日熏气时段为 08:00~16:00(雨天停止通气),5月10日(成熟期)停止通气. 气室内水肥条件和田间管理与气室外大田保持一致,使得水肥条件不成为冬小麦生长的限制因子.

1.2 指标测定及方法

实验分别于拔节期、孕穗期、扬花期随机选取第二倒叶进行相关生理生化指标的测定,而灌浆期 2 次实验选取的则是旗叶叶片.

1.2.1 光合色素含量、酶活性以及丙二醛含量的测定方法

叶绿素以及类胡萝卜素含量测定采用 Arnon 方法^[27];SOD 活性测定采用氮蓝四唑法^[28];POD 活性测定采用愈创木酚法^[28];CAT 活性测定采用高锰酸钾滴定法^[28];丙二醛含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法^[29].

1.2.2 气体交换参数的测量

利用英国 ADC 公司的 LC pro + 光合仪,在设定了恒定的光照强度、温度、 CO_2 浓度、空气湿度的条件下,原位测定冬小麦不同生育期(拔节期、孕穗期、扬花期、灌浆期)的气体交换参数^[30],得到净光合速率(net photosynthetic rate, P_n)、气孔导度

(stomatal conductance, G_s) 与胞间 CO_2 浓度 (intercellular CO_2 concentration, c_i), 并用 c_i 及设定的 CO_2 浓度 (c_a) 计算气孔限制值 (stomatal limitation value, L_s). 具体测量条件如下: 叶片表面光合有效辐射 (PAR) 为 $1\,320\ \mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$, 叶室温度为 $25^\circ\text{C}\pm 0.4^\circ\text{C}$, CO_2 浓度为 $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$, 空气相对湿度为 $60\%\pm 5\%$. 为进一步减少外界环境因子的干扰, 均于 09:00 开始测量, 叶片在叶室中适应 10 min 进入稳定状态后每隔 20 s 记录一次数据, 重复 3 次, 每个处理水平共测量 9 次.

1.2.3 叶绿素荧光动力学参数测定

利用陆上荧光仪 (OPTI-SCIENCE OS-5P, 美国) 于 4 月 15 日 (扬花期) 和 5 月 3 日 (灌浆期) 天黑后 2 h 分别对冬小麦叶绿素荧光动力学参数进行了测定, 为使叶片能够进行充分的暗适应, 于测量前 20 min 先用暗适应叶夹夹住待测叶片. 不同处理的每个水平重复测定 10 次, 然后利用 Strasser 的 OJIP test 分析方法计算出荧光参数^[31].

1.3 数据分析

所有数据利用 EXCEL 进行作图, 利用 Origin 的 oneway-anova 方法进行平均数差异显著性检验.

2 结果与分析

2.1 O_3 对冬小麦叶片光合色素含量的影响

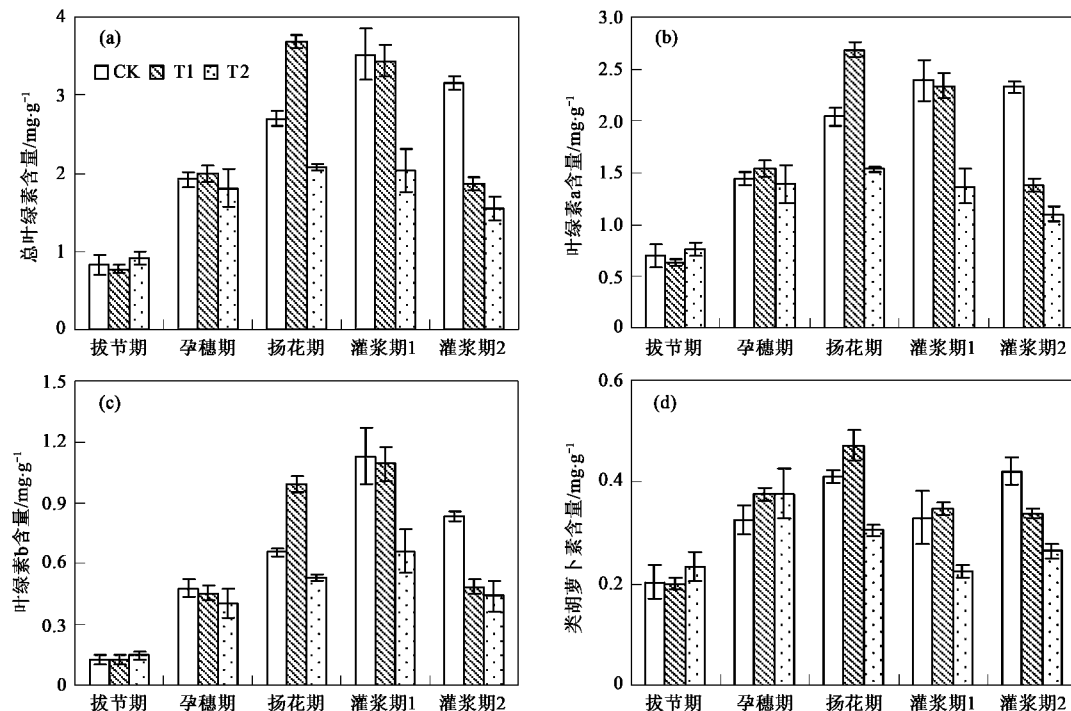


图1 O_3 对冬小麦各生育期的光合色素含量的影响

Fig.1 Effects of ozone on photosynthetic pigment contents of winter wheat leaves in varied growth stages

随着 O_3 熏气时间的增加, 冬小麦叶片光合色素含量总体上呈单峰的变化趋势 (图 1). T1 处理组的总叶绿素和叶绿素 a 的含量在孕穗期和扬花期较 CK 组有所升高, 两者的最大升幅均在扬花期, 分别上升了 36.4% ($p < 0.01$) 和 31.5% ($p < 0.01$), 在孕穗期差异没有达到显著 ($p > 0.05$), 分别升高了 3.6% 和 6.5%; 其余所观测的生育期两者含量均低 CK 组, 其中在灌浆期 2 差异极显著 ($p < 0.01$), 在拔节期和灌浆期 1 差异不显著 ($p > 0.05$); 叶绿素 b 含量在扬花期较 CK 组显著 ($p < 0.01$) 升高, 升幅为 51.9%, 其余生育期均低于 CK 组, 其中在灌浆期 2 差异显著 ($p < 0.01$), 在拔节和关键期 1 差异不显著 ($p > 0.05$); 类胡萝卜素含量在孕穗期、扬花期和灌浆期 1 均高于 CK 组, 其中在孕穗和扬花期差异显著 ($p < 0.05$), 在灌浆期 1 差异不显著 ($p > 0.05$), 其余生育期均低于 CK 组, 其中在拔节期差异不显著 ($p > 0.05$), 在灌浆期 2 差异显著 ($p < 0.01$). T2 处理组的总叶绿素、叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量在拔节期均高于 CK 组, 差异不显著 ($p > 0.05$), 其余几个生育期均低于 CK 组, 其中在扬花期、灌浆期 1 和灌浆期 2 差异均达到极显著 ($p < 0.01$), 在孕穗期差异不显著 ($p > 0.05$); 类胡萝卜素含量在拔节期和孕穗期高于 CK 组, 差异不显著, 其余几个生育期显著低于 CK 组, 其中在灌浆期 2

降幅最大,为 37.3% [图 1(d)]. 以上研究表明,熏气初期 $100 \text{ nmol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的 O_3 能诱导冬小麦叶绿素和类胡萝卜素含量升高,而到后期又迫使其降低; $150 \text{ nmol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的 O_3 导致了叶绿素含量持续降低,类胡萝卜素含量先升高后降低.

2.2 O_3 对冬小麦叶片气体交换参数的影响

随着 O_3 熏气时间的增加,冬小麦叶片的气体交换参数呈动态变化(图 2). T1 组的 P_n 和 G_s 在拔节期和孕穗期与对照差异不显著 ($p > 0.05$),在扬花期和灌浆期均显著低于对照 ($p < 0.05$); c_i 在扬花期

和灌浆期 2 较对照组有显著的升高 ($p < 0.01$) [图 2(c)],分别升高了 11.3% 和 15.4%,其余生育期均低于 CK 组,但差异不显著 ($p > 0.05$) 而 L_s 则与 c_i 变化趋势完全相反[图 2(d)]. 而 T2 组的 P_n 和 G_s 在这几个生育期中均显著低于对照 ($p < 0.01$), P_n 在灌浆期 1 降幅最大,减少了 30.3% [图 2(a)], G_s 在灌浆期 2 降幅最大,减少了 29.5% [图 2(b)]; c_i 在拔节期、孕穗期和灌浆期 1 较对照有显著上升 ($p < 0.01$),而在其余生育时期则有显著下降 ($p < 0.01$); L_s 变化趋势与 c_i 仍是相反. 由 G_s 和 c_i 以及

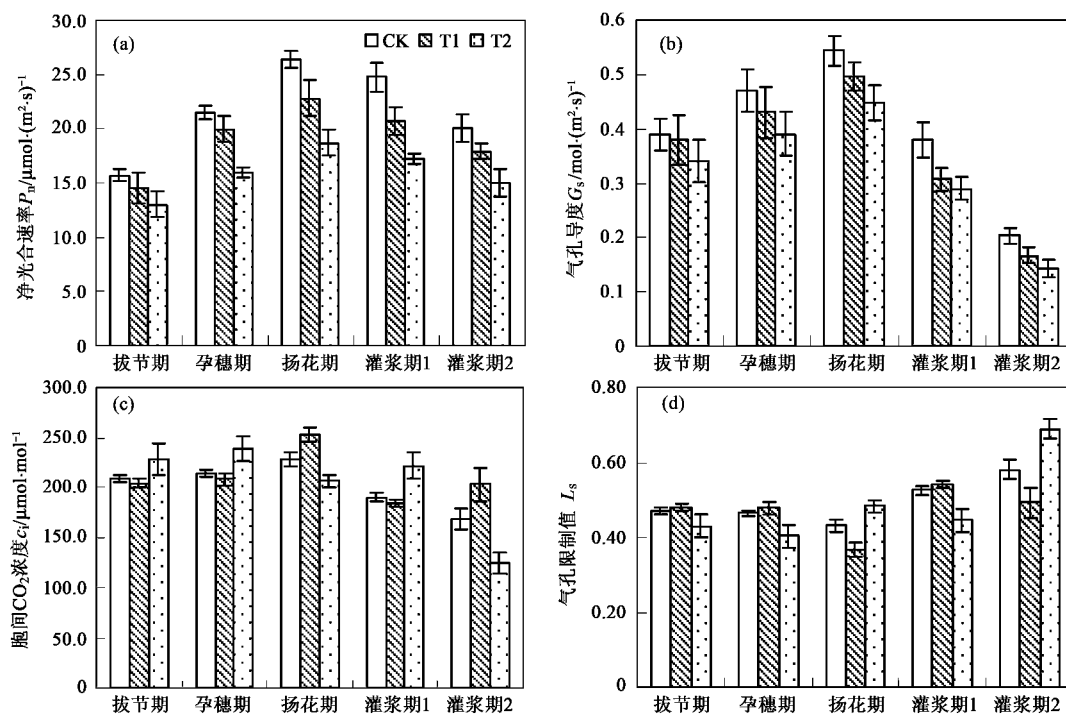


图 2 O_3 对冬小麦不同生育期气体交换参数的影响

Fig. 2 Effects of ozone on gas exchange parameters of winter wheat leaves in varied growth stages

L_s 的变化趋势可知, O_3 胁迫造成冬小麦叶片 P_n 下降是气孔因素与非气孔因素共同作用的结果,且各因素的影响程度在整个生育期内呈动态变化.

2.3 O_3 对冬小麦抗氧化系统的影响

2.3.1 O_3 对 SOD 活性的影响

随着 O_3 浓度的升高和熏气时间的增加, SOD 活性先迅速增加,到达某一峰值后而逐渐下降(图 3). 在所测定的几个生育期中, T1 处理组的 SOD 活性均高于 CK 组,差异显著 ($p < 0.05$),在拔节期和灌浆期 1 升幅相对较大,差异均达到极显著 ($p < 0.01$); T2 处理组 SOD 活性也均高于 CK 组,差异均达到极显著 ($p < 0.01$),其中在孕穗期和灌浆期 1 升幅相对较大. 以上研究表明, SOD 活性变化与冬

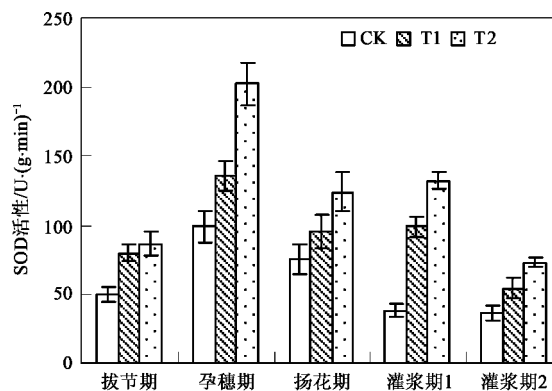


图 3 O_3 对冬小麦不同生育期叶片 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effects of ozone on SOD activity of winter wheat leaves in varied growth stages

小麦不同叶龄、不同生育期生理活动以及抗逆性的强弱有关,且在 $150 \text{ nmol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的 O_3 浓度范围内,随着 O_3 浓度的升高, SOD 活性增强.

2.3.2 O_3 对 POD 和 CAT 活性的影响

POD、CAT 是植物主要的抗氧化酶之一,它们都能够将 SOD 代谢的产物 H_2O_2 进一步催化产生 O_2 和 H_2O ^[8]. 由图 4(a)可以看出,随着 O_3 浓度的升高和熏气时间的增加,不同处理组 POD 活性变化趋势不同. T1 处理组 POD 活性在整个观测的生育期中呈现单峰的变化趋势;在拔节期 POD 活性较 CK 组有显著降低($p < 0.01$),其余几个生育期均高于 CK 组,且在扬花期、灌浆期 1 和灌浆期 2 均差异均达到极显著($p < 0.01$). T2 处理组 POD 活性则呈现先快速升高后平缓的变化趋势;在拔节期 POD 活性较 CK 组也有显著降低($p < 0.01$),其余几个生育期均显著($p < 0.01$)高于 CK 组. CAT 活性总体上变化较为平缓[图 4(b)],从拔节期到扬花期和从灌浆期 1 到灌浆期 2 不同处理间的变化幅度均是由大到小.

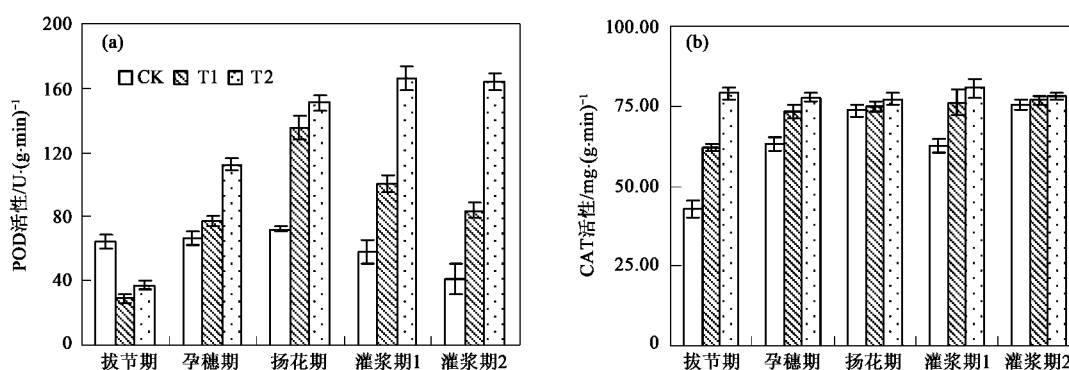


图 4 O_3 对冬小麦不同生育期叶片 POD、CAT 活性的影响

Fig. 4 Effects of ozone on SOD, CAT activity of winter wheat leaves in varied growth stages

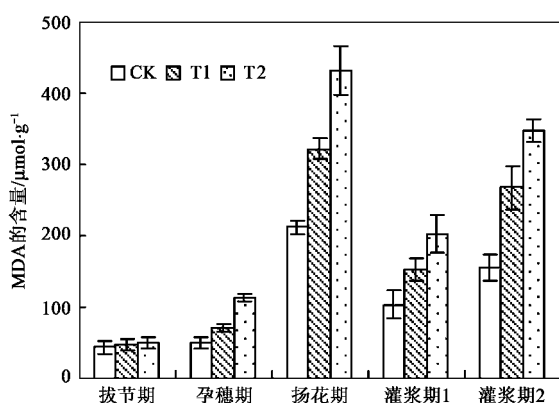


图 5 O_3 对冬小麦不同生育期叶片 MDA 含量的影响

Fig. 5 Effects of ozone on MDA contents of winter wheat leaves in varied growth stages

T1 和 T2 处理组 CAT 活性在整个观测的生育期内均高于 CK 组,其中在拔节期、孕穗期和灌浆期 1 差异均极显著($p < 0.01$),其余几个生育期(T2 在扬花期除外)差异不显著($p > 0.05$). 以上研究表明, POD、CAT 活性与 O_3 浓度、熏气时间、叶龄以及其自身的特点有关.

2.4 O_3 对冬小麦膜脂过氧化作用的影响

随着 O_3 浓度的升高和熏气时间增加,冬小麦叶片丙二醛(MDA)含量呈上升趋势(图 5). T1 处理组的丙二醛含量较 CK 组从拔节到灌浆期 2 均有不同程度的升高,在拔节期差异不显著($p > 0.05$),在孕穗期和灌浆期 1 差异显著($p < 0.05$),在扬花和灌浆期 2,差异极显著($p < 0.01$),升幅最大在灌浆期 2,升高了 71.6%. T2 处理组的丙二醛含量在拔节期较 CK 组升高 14.1%,差异不显著($p > 0.05$),其余生育期均显著($p < 0.01$)高于 CK 组. 以上研究表明, O_3 浓度增加能导致冬小麦叶片的丙二醛含量升高,也反映出了膜脂过氧化程度的加深.

2.5 O_3 对叶绿素荧光参数的影响

PS II 最大光化学效率 F_v/F_m 为暗适应后反应中心的内禀光能转换效率,表征光合系统原初光能转换效率的高低. 而 ABS/CS_0 、 TR_0/CS_0 、 ET_0/CS_0 和 DI_0/CS_0 则是可以反映光合机构单位面积的比活性^[31],比活性能更加深入地反映植物对光能的利用状况. 由表 1 可见,在扬花期, T1 处理组的 F_v/F_m 与 CK 组相比下降了 1.7%,差异显著($p < 0.05$);而在反映冬小麦单位面积比活性的几个参数中,除单位面积的热耗散较 CK 组升高外,其余均有不同程度的降低,差异均显著($p < 0.05$);T2 组的上述几个参数中,除冬小麦单叶片单位面积叶耗散较 CK 升高了 8.7% ($p < 0.05$)外,其余均较 CK 有所下降,差异

表 1 O_3 对冬小麦叶片叶绿素荧光参数的影响¹⁾

Table 1 Effects of ozone on chlorophyll fluorescence parameters of winter wheat leaves

生育期	处理组	PSII 最大光化学效率 F_v/F_m	单位面积吸收的能量 (ABS/CSO)	单位面积捕获的能量 (TRo/CSO)	单位面积用于电子传递的能量 (ETo/CSO)	单位面积的热耗散 (Dio/CSO)
扬花期	CK	0.8287 ± 0.0140a	204.0 ± 10.34a	173.18 ± 10.68a	112.56 ± 10.17a	30.82 ± 6.65a
	T1	0.8154 ± 0.0084b	195.78 ± 11.31b	158.03 ± 11.01b	105.73 ± 9.38b	37.74 ± 8.24b
	T2	0.7806 ± 0.0197b*	173.78 ± 9.01b*	135.65 ± 12.92b*	95.81 ± 16.71b	38.13 ± 5.69b
灌浆期	CK	0.8126 ± 0.0184a	364.78 ± 27.81a	309.54 ± 21.78a	241.00 ± 14.06a	55.24 ± 10.39a
	T1	0.8012 ± 0.0153a	344.22 ± 25.36a	275.72 ± 20.73a	229.63 ± 20.08a	68.50 ± 9.98b
	T2	0.7852 ± 0.0109b*	320.67 ± 20.61b*	251.79 ± 19.04b*	191.94 ± 16.76b*	68.88 ± 9.63b

1) 处理组 (T1、T2) 只与对照组 (CK) 比较差异性; aa: 差异性未通过显著性检验, ab: 差异性在 5% 水平上差异显著, ab*: 差异性在 1% 水平上差异显著

均达到显著水平 ($p < 0.05$), 且 F_v/F_m 差异达极显著 ($p < 0.01$). 在灌浆期, T1 处理组的 F_v/F_m 和反映冬小麦叶片比活性的参数与 CK 组相比除单位面积热耗散略有升高外 ($p > 0.05$), 其余参数都有所下降, 但差异不显著 ($p > 0.05$); T2 处理组的 F_v/F_m 与 CK 组相比下降了 3.4%, 差异极显著 ($p < 0.01$), 反映比活性的参数中, 单位面积热耗散差异显著 ($p < 0.05$), 其余参数差异均达极显著 ($p < 0.01$). 这表明, $150 \text{ nmol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的 O_3 浓度能显著降低冬小麦单位面积叶片活性和光能利用效率, 而在 $100 \text{ nmol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 处理在扬花期差异显著, 灌浆期差异不显著, 这可能与所取叶片的部位有关.

3 讨论

本研究在测定了冬小麦叶绿素含量以及其荧光动力学参数和气体交换参数的同时, 还对冬小麦的抗氧化系统以及膜脂过氧化系统的相关参数进行了长期的测定, 这样就能较为全面地了解 O_3 对冬小麦造成损伤的动态机制过程^[32-35]. 大量试验研究表明, 高浓度的 O_3 能较大幅度的降低冬小麦叶片的净光合速率^[23,36]. 本研究表明, 不同 O_3 浓度熏蒸、不同生育期, 引起冬小麦净光合速率变化的关键因子有所不同. 具体表现如下, O_3 胁迫下, T1 处理组拔节期和孕穗期光合速率没有显著下降, 原因可能是由于气孔导度 (G_s) 没有显著降低, 保证了二氧化碳供应, 这一点可以由 c_i 和 L_s 变化状况得到验证, 产生这种状况的原因可能是与冬小麦的自我调节有关^[8], 如提高类胡萝卜素含量^[37] [图 1(d)]、增加单位面积热耗散等^[17] (表 1); 扬花期冬小麦光合速率显著下降, 这可能主要是由冬小麦单位叶片面积活性的下降 (表 1) 造成的, 而并非气孔导度的降低 [图 2(b)], 因为此时 c_i 较 CK 组有显著的升高 ($p < 0.05$) [图 2(c)]; 在灌浆期 1 造成光合速率下降的

原因可能是由于 G_s 的下降造成的, 因为冬小麦单位面积活性没有显著降低, c_i 和 L_s 与对照差异不显著; 在灌浆期 2 造成 P_n 下降的主要原因可能是单位叶片面积活性的降低, 因为虽然 G_s 显著的降低, 但 c_i 却有大幅的上升, 因此造成 P_n 下降并不是因为 c_i 的降低引起二氧化碳供给不足造成的. T2 处理组 P_n 较 CK 组显著降低, 由 c_i 和 L_s 的变化方向可知, 在拔节期、孕穗期和灌浆期 1 可能是由于单位面积冬小麦叶片光合活性的降低造成的, 在扬花期和灌浆期 2 则可能是由冬小麦单位面积活性和气孔导度共同作用的结果. 以上研究结果与 PSII 最大化学效率 F_v/F_m (表 1) 变化规律基本一致. 同时 P_n 的变化也与作物叶光合色素含量、抗氧化系统以及膜脂过氧化作用相关^[32,38], 以下就 O_3 对此方面的影响作进一步的探讨.

在 O_3 胁迫下, 植物体内的活性氧增加, 进而能破坏活性氧代谢系统平衡, 对植物造成严重伤害. 然而植物可以利用长期进化过程中形成的酶促系统和非酶促系统两大类保护系统来保护自身免受活性氧的伤害^[39]. SOD、POD 和 CAT 是植物体内酶促子系统重要组成酶类, 其中 SOD 可以将植物叶片正常生理活动过程中和 O_3 胁迫下产生的 $O_2^{\cdot -}$ 代谢为 H_2O_2 ^[10,40,41], POD 和 CAT 可以进一步将 H_2O_2 代谢生成水而消除生物毒性^[42], 这样也能减缓光合色素的降解和膜脂过氧化作用的加剧^[43,44], 为光合作用的进行起一定的保护作用. 本试验研究表明, 在 $150 \text{ nmol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 的 O_3 浓度范围内, SOD 活性随 O_3 浓度的增加而迅速升高, 随着熏气时间的增加而先升高而后降低. 这说明高浓度的 O_3 能使冬小麦产生较多的活性氧, 当活性氧积累到超过正常状况下 SOD 有效控制的范围时, 细胞会增加对 SOD 酶的合成^[45], 以便为消除活性氧做好前提准备. 而对于 POD 和 CAT 来讲, 首先可以把它们看作一个整体来分析,

总体上这 2 种酶活性是增强的,这样能在一定程度上消除冬小麦体内的活性氧,具体表现为拔节期 POD 活性虽然较对照有所下降,但是 CAT 活性却又大幅的上升,随着时间的增加,POD 活性出现大幅的上升,而 CAT 活性与 CK 组相比升幅减小.这里再分开来分析,由于 POD 具有 IAA 氧化酶的性质^[46],因此 POD 的上升和 CAT 活性的下降均不利于活性氧的清除,造成活性氧的增加,加速使 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 等向毒性更强的 $\cdot OH$ 转化,进一步加速叶绿素的降解,膜脂的过氧化作用和膜透性的增强^[47].本试验研究发现在 O_3 熏蒸初期 POD 活性相对较低,叶绿素含量较 CK 组也没有明显的降低,T1 处理组反而有所升高;但随着熏气时间的增加,POD 活性迅速升高,叶绿素含量也急剧下降.这说明 POD 活性在达到一定高度以前,可能主要表现为对活性氧消除这一特性,而达到某一阈值后则主要表现为加速叶绿素的降解,加剧冬小麦叶片的衰老. CAT 活性变化状况如下,T1 组从拔节期到扬花期和从灌浆期 1 到灌浆期 2 均表现为先快速上升,而后与 CK 组一起逐渐升高到 T2 处理组的相对稳定的水平.其中在扬花期和灌浆期 2, CAT 活性并不足以消除过多的活性氧,这里可以说其为“相对下降”.这表明熏气初期造成 CAT 活性快速升高以便消除过多的活性氧,但对不同功能叶熏蒸一段时间后,均能体现出抗氧化系统的局限性.因此,POD 的持续升高和 CAT 的“相对下降”都能造成活性氧的积累,这样就能导致膜脂过氧化作用加剧,进而影响膜的结构^[11,33].MDA 含量代表膜脂过氧化的程度,且被证明与 O_3 接触的程度有关^[35,48].本实验研究发现,MDA 含量从拔节期到扬花期和从灌浆期 1 到灌浆期 2,均随着 O_3 浓度升高和熏气时间的增加而迅速增加(图 5),表明在经受 O_3 胁迫一段时间后,冬小麦不同功能叶片膜脂过氧化作用均较为严重.这一点也说明了冬小麦抗氧化系统能在一定程度上缓解其膜脂过氧化作用^[49],但却无法阻止.这与 Angeles 等^[50]的研究结果基本一致.

综上所述,可以发现,冬小麦在受到 O_3 胁迫的同时,冬小麦自身不是被动的接受这种变化了的状况,而是激发了自身的保护机制,积极主动的适应这种变化了的新的状况.如在 $150\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 O_3 浓度范围内,随着 O_3 浓度升高和熏气时间的增加, O_3 造成了冬小麦叶片抗氧化系统抗氧化酶 POD、SOD 和 CAT 活性总体上升高,类胡萝卜素含量先升高而后下降,单位叶片面积热耗散增加等,激发了冬小麦

的保护机制.这样就能在一定程度上缓解 O_3 胁迫对冬小麦叶片的伤害.然而在经 O_3 熏蒸一段时间后,仍然造成了冬小麦的不同功能叶片膜脂过氧化作用加剧,膜透性增强,净光合速率降低等状况.因此可以说明上述这些保护机制并不足以完全阻止 O_3 胁迫冬小麦叶片的影响,这与 Calatayud 等^[32]的研究结果基本一致.

4 结论

(1)在 $150\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 O_3 浓度范围内,随 O_3 浓度升高和熏气时间的增加,冬小麦叶绿素含量、类胡萝卜素含量呈现先升高后下降的变化趋势,气孔限制值呈波动变化,气孔导度和净光合速率则均变现为持续下降.

(2)在 O_3 浓度为 $100\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时,与对照相比,SOD 活性总体较高,升幅呈波动变化;POD 活性先降低而后快速升高,而其总体变化趋势呈单峰状;CAT 活性先快速升高而后出现“相对下降”.在 O_3 浓度为 $150\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时,SOD 和 CAT 活性变化趋势均与 O_3 浓度为 $100\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时的变化趋势相同,只是升幅有所增大;POD 活性较对照组 CK 持续升高.

(3)在 $150\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 O_3 范围内,随 O_3 浓度升高和熏气时间的增加,冬小麦叶片 MDA 含量迅速升高.

(4)在 O_3 浓度为 $100\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时,与对照相比,冬小麦叶片单位面积活性和 PS II 最大光化学效率在扬花期显著降低($p < 0.05$),而在灌浆期差异均没有达到显著水平($p > 0.05$);在 O_3 浓度为 $150\text{ nmol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时,冬小麦单位面积活性和 PS II 最大光化学效率均显著降低($p < 0.01$).

(5)冬小麦叶片 SOD、POD 和 CAT 活性、MDA 含量、单位面积活性和 PS II 最大光化学效率等变化状况均与其不同功能叶关系密切.

参考文献:

- [1] Fuhrer J, Booker F. Ecological issues related to ozone: agricultural issues[J]. Environ Inter, 2003, 29: 141-154.
- [2] Hertstein U, Grunhage L, Jäger H J. Assessment of past, present and future impacts of ozone and carbon dioxide on crop yields[J]. Atmos Environ, 1995, 29(16): 2031-2039.
- [3] IPCC. Climate Changes 2001 [R]. Cambridge, UK and New York, USA: Cambridge University Press, 2002.
- [4] Bender J, Weigel H J, Wegner U, et al. Response of cellular antioxidants to ozone in wheat flag leaves at different stages of

- plant development[J]. Environ Pollut, 1994, **84**:15-21.
- [5] 郑启伟,王效科,冯兆忠,等. 不同臭氧熏气方式对油菜光合速率、生物量和产量的影响[J]. 生态毒理学报, 2006, **12**(4): 323-329.
- [6] Grulke N E, Paoletti E, Heath R L. Comparison of calculated and measured foliar O₃ flux in crop and forest species [J]. Environ Pollut, 2007, **146**:640-647.
- [7] Nali C, Pucciarriello C, Lorenzini G. Ozone distribution in central Italy and its effect on crop productivity [J]. Agr Eco Env, 2002, **90**:277-289.
- [8] Sandermann J H. Ozone and plant health [J]. Ann Rev Phytopathol, 1996, **34**:347-366.
- [9] Hippeli S, Elstner E F. Mechanisms of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants [J]. Plant Physiol, 1996, **148**:249-257.
- [10] Calatayud A, Barreno E. Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl [J]. Environ Pollut, 2001, **115**:283-289.
- [11] Calatayud A, Alvarado J W, Barreno E. Differences in ozone sensitivity in three varieties of cabbage (*Brassica oleracea* L.) in rural Mediterranean area [J]. J Plant Physiol, 2002, **159**: 863-868.
- [12] Lyons T, Ollerenshaw J H, Barnes J D. Impacts of ozone on plantago major apoplastic and symplastic antioxidant status [J]. New Phytol, 1999, **141**:253-263.
- [13] Pasqualini S, Batini P, Ederlina L, *et al.* Effects of short-term ozone fumigation on tobacco plants: response of the scavenging system and expression of the glutathione reductase [J]. Plant Cell Environ, 2001, **24**:245-252.
- [14] Saxe H. Photosynthesis and stomatal response to pollution air, and the use of physiological and biochemical responses for early detection and diagnostic tool [J]. Adv In Bot Res, 1991, **18**: 1-128.
- [15] Luwe M. Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentrations in air [J]. Plant Cell Environ, 1996, **19**:321-328.
- [16] Tang Y, Chevone B I, Hess J L. Ozone-responsive protein in a tolerant and sensitive clone of white clove [J]. Environ Pollut, 1999, **104**:89-98.
- [17] Demmig-Adams B, Barker D H, Logan B A, *et al.* Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation [J]. Physiol Plant, 1996, **98**:253-264.
- [18] Calatayud A, Iglesias D J, Talón M, *et al.* Effects of long-term ozone exposure on citrus: chlorophyll a fluorescence and gas exchange [J]. Photosynthe, 2006, **44**(4): 548-554.
- [19] 冯兆忠,小林和彦,王效科,等. 小麦产量形成对大气臭氧浓度升高响应的整合分析 [J]. 科学通报, 2008, **53**(24): 3080-3085.
- [20] Moldau H, Sober J, Sober A. Impact of acute exposure on CO₂ uptake by two cultivars of *Phaseolus vulgaris* [J]. Photosynthetica, 1993, **28**:133-141.
- [21] Guidi L, Bongi G, Ciompi S. In vicia faba leaves photoinhibition from ozone fumigation in light precedes a decrease in quantum yield of functional PS II centres [J]. J Plant Physiol, 1999, **154**: 167-172.
- [22] Pleijel H, Eriksen A B, Danielsson H, *et al.* Differential ozone sensitivity in an old and a modern Swedish wheat cultivar-grain yield and quality, leaf chlorophyll and stomatal conductance [J]. Environ Exp Botany, 2006, **56**:63-71.
- [23] Gerosa G, Marzuoli R, Rossini M, *et al.* A flux-based assessment of the effects of ozone on foliar injury, photosynthesis, and yield of bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Borlotto Nano Lingua di Fuoco) in open-top chambers [J]. Environ Pollut, 2009, **157**:1727-1736.
- [24] Calatayud A, Ramirez J W, Iglesias D J, *et al.* Effects of ozone on photosynthetic CO₂ exchange, chlorophyll a fluorescence and antioxidant systems in lettuce leaves [J]. Physiol Plant, 2002, **116**:308-316.
- [25] Guidi L, Nali C, Lorenzini G, *et al.* Effect of chronic ozone fumigation on the photosynthetic process of poplar clones showing different sensitivity [J]. Environ Pollut, 2001, **113**:245-254.
- [26] Jetten T H. Physical description of transport processes inside an open top chamber in relation to field conditions [D]. The Netherlands: Agricultural University Wageningen, 1992.
- [27] 张立军,樊金娟. 植物生理学实验教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007. 96 - 98.
- [28] 李合生,孙群,赵世杰,等. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [29] 张立军,樊金娟. 植物生理学实验教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2007. 98 - 101.
- [30] 许大全. 光合作用效率 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002. 57-61.
- [31] Strasser R J, Srivastava A, Govindjee. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyan bacteria [J]. Photochem Photobiol, 1995, **61**:32-42.
- [32] Calatayud A, Iglesias D J, Talón M, *et al.* Effects of 2-month ozone exposure in spinach leaves on photosynthesis, antioxidant systems and lipid peroxidation [J]. Plant Physiol Biochem, 2003, **41**:839-845.
- [33] Guidi L, Tonini M, Soldatini G F. Effects of high light and ozone fumigation on photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* [J]. Plant Physiol Biochem, 2000, **38**:717-725.
- [34] Clark A J, Landolt W, Bucher J B, *et al.* Beech response to ozone exposure assessed with a chlorophyll a fluorescence performance index [J]. Environ Pollut, 2000, **109**:501-507.
- [35] Ranieri A, Nali C, Lorenzini G, *et al.* Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves [J]. Physiol Plant, 1996, **97**:381-387.
- [36] Guidi L, Degl'innocenti E. Ozone effects on high light-induced photoinhibition in *Phaseolus vulgaris* [J]. Plant Science, 2008, **174**:590-596.
- [37] 张其德,卢从明,刘丽娜,等. CO₂倍增对不同基因型大豆光合色素含量和荧光诱导动力学参数的影响 [J]. 植物学报, 1997, **39**(10): 946 - 950.

- [38] 郑启伟,王效科,冯兆忠,等. 臭氧对原位条件下冬小麦叶片光合色素、脂质过氧化的影响[J]. 西北植物学报,2005,**25**(11):2240-2244.
- [39] Noctor G, Foyer C H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol,1998,**49**:249-279.
- [40] Alonso R, Elvira S, Castillo F J, *et al.* Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*[J]. Plant Cell Environ,2001,**24**:905-916.
- [41] Calatayud A, Barreno E. Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl[J]. Environ Pollut,2001,**115**:283-289.
- [42] Yoshida M, Nouchi Y, Toyama S. Studies on the role of active oxygen in ozone injury to plant cells. Generation of active oxygen in rice protoplast exposed to ozone[J]. Plant Sci,1994,**95**:197-205.
- [43] Dhindsa R S, Plumb-Dhindsa P, Thorpe T A. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. J Exp Bot,1981,**32**(126):93-101.
- [44] Yamauchi N, Minamide T. Chlorophyll degradation by peroxidase in parsley leaves[J]. Jap Soc Hort Sci,1985,**54**:265.
- [45] Matters G L, Scandalios J G. Synthesis of isozymes of superoxide dismutase in maize leaves in response to O₃, SO₂, and elevated O₂[J]. Env Exp Botany,1987,**38**:842-852.
- [46] Bandurski R S, Nonhebel H, Auxins M. In wilkins advanced plantphysiology[M]. London: Pitman Press,1984. 1-16.
- [47] 金红明,冯宗炜. 臭氧对冬小麦叶片保护膜系统的影响[J]. 生态学报,2000,**20**(3):444-447.
- [48] Willekens H, Inés D, Van Montagu M, *et al.* Catalases in plants[J]. Mol Breed,1995,**1**:207-228.
- [49] Demmig-adam S B. Carotenoids and photoprotection in plants; a role for the xanthophylls zeaxanthin[J]. Biochem Biophys Act, 1990,**1020**:1-24.
- [50] Calatayud A, Barreno E. Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments and lipid per oxidation[J]. Plant Physiol Biochem,2004,**30**:549-555.