

全缘冬青幼苗 (*Ilex integra* Thunb.) 对大气 O₃ 浓度升高的响应

张巍巍¹, 牛俊峰¹, 冯兆忠^{1*}, 王效科^{1*}, 田媛², 姚芳芳³

(1. 中国科学院生态环境研究中心城市与区域生态国家重点实验室, 北京 100085; 2. 北京工商大学化学与环境工程学院 北京 100048; 3. 华东师范大学资源与环境科学学院, 上海 200062)

摘要:采用开顶式气室(open top chambers, OTCs)装置,研究 O₃ 浓度升高(E-O₃, 约 150 μL·L⁻¹)对常绿阔叶树种全缘冬青幼苗的影响,主要包括伤害症状、植株生长、光合色素含量、气体交换速率与叶绿素荧光、丙二醛含量以及主要抗氧化剂含量变化. 经过高浓度 O₃ 处理一个生长季后,当年生全展叶片表面分布着大量的黑褐色斑点与斑块,呈腐蚀状凹陷于叶片表面. O₃ 引起茎百分比显著降低 7%,但对株高与基径生长、生物量累积与比叶重无显著性影响;与 CF 处理相比,O₃ 处理下全缘冬青幼苗当年生全展叶片净光合速率、叶绿素 a/b 值与总酚含量分别显著降低 19%、9% 与 36%. 气孔导度、胞间 CO₂ 浓度、叶绿素荧光参数、光合色素含量、叶片丙二醛含量、总还原能力以及抗坏血酸含量的变化均不显著. 结果表明,O₃ 对全缘冬青幼苗的光合作用具有一定的抑制作用,叶绿素含量组成发生变化是引起净光合速率下降的主要原因;O₃ 对植株总的抗氧化能力未产生明显影响,尚未引起膜脂过氧化程度加剧;虽然全缘冬青幼苗叶片呈现伤害症状,但植株生长指标未受到 O₃ 的显著影响.

关键词:臭氧; 全缘冬青; 生长; 光合作用; 抗性系统

中图分类号:X171.5 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2011)08-2414-08

Responses of *Ilex integra* Thunb. Seedlings to Elevated Air Ozone Concentration

ZHANG Wei-wei¹, NIU Jun-feng¹, FENG Zhao-zhong¹, WANG Xiao-ke¹, TIAN Yan², YAO Fang-fang³

(1. State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. School of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 3. School of Resources and Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract:One-year-old *Ilex integra* seedlings were exposed to charcoal-filtered (CF) and elevated ozone (E-O₃, ~150 μL·L⁻¹) for 84 days in six open-top chambers. Visible injury, growth parameters, pigments content, gas exchange, chlorophyll a fluorescence and antioxidant system were investigated during the growing season. At the end of experiment, foliage showed remarkable visible symptoms with dark-brown necrotic spots and patches which were concaved on the upper surface of the current-year leaves. Although relative height and diameter increment, total biomass and specific leaf weight (SLW) remained unaffected, E-O₃ significantly decreased the percentage of stem biomass in total biomass. E-O₃ induced significant decrease in net photosynthetic rate, chlorophyll a/b ratio and total phenolic compound content by 19%, 9% and 36%, respectively. However, stomatal conductance, intercellular CO₂ concentration, chlorophyll a fluorescence parameters, pigment contents, MDA contents, total antioxidant capacity and total ascorbate content remained unaffected by E-O₃. The results suggested that E-O₃-induced change in components of chlorophyll contributed to the reduction of photosynthesis in *Ilex integra* seedlings. In addition, although visible symptom was found during the experiment, antioxidant system, most of the physiological parameters and growth were not significantly affected by E-O₃.

Key words:ozone; *Ilex integra*; growth; photosynthesis; antioxidant system

近地层臭氧(O₃)既是重要的温室气体之一,也是对植物产生伤害最为严重的氧化剂之一^[1,2]. 目前,北半球 O₃ 浓度较工业革命时期之前增加 2 ~ 4.5 倍,并且正以每年 0.5% ~ 2.0% 的速度增加^[3]. 在我国,化石燃料的大量燃烧与城市化进程的加快已经导致城市近地层 O₃ 浓度大幅度升高^[4],同时实际监测数据显示郊区 O₃ 浓度经常高于城市,因此城市周边的森林将会受到不同程度的 O₃ 伤害^[5]. 根据模型据预测,2100 年近 50% 的世界森林将受到

O₃ 的影响^[6].

以往的大量试验以北美与欧洲的温性针叶树(云杉^[7]、地中海白松^[8]、美国白松^[9],火炬松^[10])和落叶阔叶树种(如,欧洲山毛榉^[11]与杂白杨^[12])为研究对象;对亚洲森林树种的研究仅仅涉及北方

收稿日期:2010-09-14;修订日期:2010-11-10
基金项目:国家自然科学基金项目(30700086)
作者简介:张巍巍(1982~),女,博士研究生,主要研究方向为污染生态学与植物生理生态学,E-mail:zwwno_1@163.com
* 通讯联系人,E-mail:fzz@rcees.ac.cn; wangxk@rcees.ac.cn

落叶树种与针叶树:鹅掌楸^[13]、水青冈^[14]、银杏^[15]与油松^[16]。研究内容主要以伤害症状、个体生长、光合作用及抗性等方面为主^[17]。尽管 O_3 暴露时间、浓度与其他环境因素的影响各个试验结果不尽相同,但 O_3 对这些树种均在一定程度上产生负作用: O_3 浓度达到 $92 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ 时植物净光合作用下降 18%,总生物量降低 17%,叶绿素 a 与 b 含量下降引起总叶绿素含量降低,叶绿素 a/b 值不变^[18]。以常绿阔叶树种为试验对象的研究报道较少,已知的研究以地中海硬叶阔叶树种与常绿灌木为主,研究结果表明由于硬叶阔叶树种特有的叶片结构,通常对 O_3 具有相对较强的忍耐力^[19],以亚热带常绿阔叶树种为对象开展的研究几近空白。

全缘冬青 (*Ilex integra* Thunb.) 为冬青科冬青属常绿乔木,阳性树种,由于抗风力强,耐干旱瘠薄,适应性广等特点被广泛用于行道树、庭院树、风景林与防护林,已被列为浙江省珍稀濒危植物。本研究以北亚热带常绿阔叶树种全缘冬青幼苗为试验对象,采用开顶式气室法 (OTCs),研究近地层 O_3 浓度升高对全缘冬青幼苗个体生长、气体交换速率与叶绿素荧光参数、光合色素含量以及抗氧化系统的影响,通过评价冬青对 O_3 响应敏感性,较全面探讨与揭示全缘冬青幼苗对 O_3 胁迫的生理生化响应机制,以期为选育较强抵抗 O_3 胁迫的树种提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验区位于华东师范大学天童森林生态系统国家野外监测站 ($29^{\circ}48'N$, $121^{\circ}47'E$), 气候温暖湿润,为典型的亚热带季风气候。年均温度为 16.2°C , 年平均降雨量为 $1\,374.7\text{ mm}$, 多集中在夏季 6~8 月梅雨和台风季节。土壤主要为山地红黄壤,土质偏酸, pH 约在 4.75~4.85 之间。

试验材料为一年生全缘冬青 (*Ilex integra* Thunb.) 实生幼苗,由浙江省宁波市特种苗繁育中心购得。选取长势较为一致的幼苗,于 2008 年 2 月 21 日统一植入直径 20 cm,高 20 cm 圆形花盆中,当地山地红黄壤与树皮腐殖质按体积比 1:1 混匀后装盆作为栽培基质。经过冬季育苗,2008 年 4 月初将长势一致的幼苗 (株高约为 80 cm,基径约为 8.0 mm) 全部移入自制 OTC-1 型开顶式气室内 (边长为 1 m 的正八边形,高 2.4 m) 缓苗。有关 OTC 的结构与通风系统见文献^[20]。

试验设 2 个处理:活性炭过滤的大气 (CF, <20

$\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$) 与 O_3 浓度升高 ($E-O_3$, $\sim 150 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$), 每个处理有 3 个气室,每个气室内 4 株植株。OTC 内 O_3 浓度由 i49 型臭氧分析仪 (Themofisher 公司) 进行即时监测与记录。熏气时间从 2008 年 7 月 6 日开始至 2008 年 9 月 28 日结束,每日熏气 8 h (09:00~17:00), 阴雨天气停止。试验期间遇到 3 次较大台风 (8 月 21~26 日, 8 月 31 日~9 月 7 日, 9 月 9~17 日), 实际 O_3 熏蒸天数为 47 d。试验期间小时 O_3 浓度高于 $40 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 的累积总和 (AOT40) 为 $38.24 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, 每日 8 h O_3 浓度 (M8) 的平均值为 $68.7 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 。E- O_3 处理下,熏气 44 d (8 月 18 日)、66 d (9 月 8 日)、84 d (9 月 28 日) 时的 AOT40 值分别为 30.2、34.5、38.2 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$ 。试验期内未对植株进行施肥,保证各植株充足且等量的水分供应,光强、温度和病虫害等不成为限制因子。

1.2 指标测定

1.2.1 生长指标测定

处理前测定各株幼苗株高与基径,试验收获时再次测定植株株高与基径,同时将试验植株分割为根、茎枝与叶三部分, 80°C 烘至恒重后称重。

1.2.2 比叶重测定

试验收获时选取当年生成熟叶片,用蒸馏水洗净、擦干、采用直径为 1 cm 圆形打孔器避开叶脉打孔。每个处理 12 株幼苗,每株幼苗 3~5 片叶子,每片叶子 8~10 个圆孔 (0.36 cm^2)。取样后于 80°C 烘至恒重后称重。

1.2.3 气体交换与叶绿素荧光参数

于熏气后 44、66 与 84 d 上午 09:00~11:00, 选取每气室 3~4 株幼苗作为待测植株,每株选取中上部当年生成熟叶片 3 片,共 9~12 个重复,用 Li-6400 便携式光合测定仪荧光叶室 (Li-Cor, Inc, 美国) 进行测定。光强为 $1\,000 \mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$, CO_2 浓度为 $380 \text{ mmol}\cdot\text{mol}^{-1}$, 空气流速为 $0.5 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$, 气温控制在 $(33\pm 1)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $60\% \pm 5\%$ 。

1.2.4 光合色素含量

采用相同面积 (0.36 cm^2) 打孔器打孔后,用体积分数为 95% 的乙醇浸泡提取,于 664 nm, 648 nm、470 nm 处测定吸光度,根据 Yamaguchi 等^[14] 的修正公式计算叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量和类胡萝卜素含量。

1.2.5 丙二醛含量测定

参照文献^[21]的方法。

1.2.6 总还原能力 (TAC) 测定

采用 FRAP 法^[22, 23] 稍加改进。实际加样量为 10

μL 样品 + 90 μL 水 + 900 μL 预热至 37℃ 的 FRAP 反应液 (10 mmol·L⁻¹ TPTZ、20 mmol·L⁻¹ FeCl₃、0.3 mmol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液以 1:1:10 的比例混合), 摇匀后放置 40 min 后 593 nm 测定吸光值; 另以 10 ~ 1 000 μmol·L⁻¹ (NH₄) Fe(SO₄)₂ 的标准溶液代替样品作标准曲线. 样品的总抗氧化能力以毫摩尔 Fe²⁺ 每克提取物表示, 单位为 mmol·g⁻¹.

1.2.7 抗坏血酸含量测定

参照文献[24]的还原 Fe³⁺ 方法.

1.2.8 总酚含量测定

Folin Ciocaitau’s 酚试剂显色法^[25]. 30 μL 样品, 加入 60 μL 10% Folin Ciocaitau’s 试剂和 240 μL 700 mmol/L 的 Na₂CO₃ 溶液, 于空白酶标板中振荡, 置于暗处室温反应 30 min 后测 A₇₆₅. 以没食子酸 (Gallic acid) 作标准品代替样品作标准曲线, 样品中的总酚以没食子酸的含量表示, 单位为 mg·g⁻¹.

1.3 数据分析

所有试验数据以 OTC 为重复单元, 即 3 个重复. 采用 SPSS16.0 统计软件对处理间数据进行差异显著性检验 (Student’s t-test), 同时采用一般线性模

型 (General Linear Model) 进行双因素方差分析, $P \leq 0.05$ 表示显著差异 (叶绿素 a/b 值不满足方差齐性, 未进行相应分析). 文中数据均为平均值 ± 标准差.

2 结果与分析

2.1 O₃ 浓度升高对全缘冬青幼苗伤害症状的影响

试验中发现, E-O₃ 下暴露 22 d 时 (7 月 27 日), 当年生全展叶片上表面中部沿叶脉分布方向小面积变黄褪绿, 少部分叶片伴随出现红褐色与黑褐色斑点, 下表面未出现明显症状. 暴露 50 d 时 (8 月 23 日), 观察到 2 种主要伤害症状: 部分叶片变黄褪绿面积变大, 叶片褐色斑点变大相连, 呈现坏死干枯小斑块; 部分叶片上表面出现腐蚀状凹陷, 较为均匀分布于叶片各个部分; 下表面出现少量黄色斑点. 试验过程中嫩叶在展开过程中也出现以上症状, 但仍可不断成长, 主茎与分枝生长仍能继续进行. 试验结束时, 大部分当年生的全展叶片表面大面积分布着黑褐色斑点与斑块, 呈腐蚀状凹陷于叶片表面; 少量叶片下表面分布灰褐色斑点 (图 1).



图 1 O₃ 浓度升高下全缘冬青幼苗伤害症状
Fig.1 Visible ozone injury of *Ilex integra* seedlings

2.2 O₃ 浓度升高对全缘冬青幼苗生长的影响

熏气前, CF 与 E-O₃ 下全缘冬青幼苗株高分别为 (76.7 ± 6.2) cm 与 (80.7 ± 2.0) cm; 基径分别为 (7.93 ± 0.15) mm 与 (8.25 ± 0.50) mm, 处理间差异均不显著. 试验收获后, 与 CF 相比, E-O₃ 处理下全缘冬青幼苗株高相对增加量、基径相对增加量与总生物量分别下降 41%、3% 与 7%. 叶生物量与茎生物量分别降低 7% 与 13%, 根冠比增加 11%, 比叶重保持不变. *T*-检验结果表明, E-O₃ 使茎生物量占总生物量百分比显著降低 7%, 而对幼苗株高

相对增加量、基径相对增加量、生物量的累积与分配没有显著影响 (表 1).

2.3 O₃ 浓度升高对全缘冬青幼苗叶片光合特性的影响

E-O₃ 对全缘冬青幼苗光合作用产生一定的抑制作用. 与 CF 相比, E-O₃ 下净光合速率在熏蒸 84 d 时显著降低 19%, 蒸腾速率在处理 42 d 时显著下降 13%. E-O₃ 对叶片的气孔导度、胞间 CO₂ 浓度, 气孔限制值及水分利用效率没有显著影响. 同时, E-O₃ 对气体交换参数的影响不随熏气时间的延长发生变化 (图 2).

表 1 O ₃ 浓度升高对全缘冬青幼苗株高、基径、 生物量累积与分配、比叶重的影响			
Table 1 Effects of elevated ozone concentration on height growth , diameter increment, biomass partition and specific leaf weight of <i>Ilex integra</i> seedlings			
测定指标	处理		T-检验 (P 值)
	CF	E-O ₃	
株高相对增加量/%	26.1 ± 11.7	15.4 ± 1.5	0.226
基茎相对增加量/%	22.5 ± 6.1	20.8 ± 8.0	0.864
总生物量/g	68.4 ± 3.4	63.3 ± 10.7	0.497
叶生物量/g	20.0 ± 0.8	18.5 ± 3.8	0.574
根生物量/g	20.7 ± 1.2	21.1 ± 4.2	0.890
茎生物量/g	27.8 ± 2.1	24.0 ± 3.5	0.187
茎百分比/%	40.5 ± 1.1	37.7 ± 1.2	0.044
根百分比/%	30.1 ± 1.1	33.2 ± 3.6	0.231
叶百分比/%	29.4 ± 0.7	29.1 ± 2.6	0.847
根冠比	0.43 ± 0.03	0.50 ± 0.08	0.278
比叶重/g·m ⁻²	141.8 ± 1.8	143.2 ± 14.3	0.882

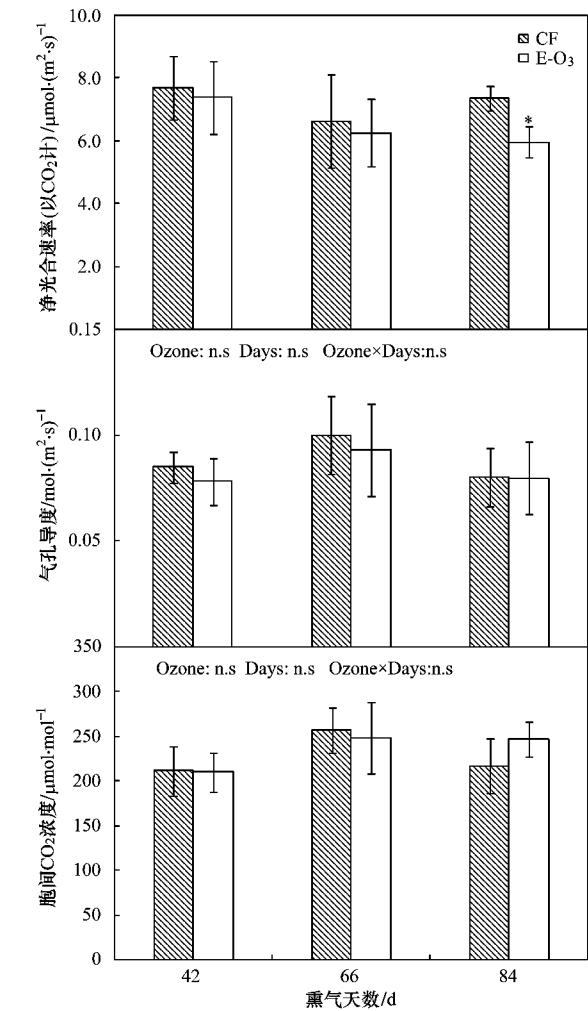


图 2 O₃ 浓度升高对全缘冬青幼苗叶片气体交换参数的影响
Fig. 2 Effect of elevated ozone concentration on gas exchange parameters in *Ilex integra* seedlings

与 CF 相比,E-O₃ 处理下叶片开放的光系统 II 光化学有效量子产量 (F_v'/F_m') 呈现升高-降低-升高的趋势,但均未达到显著水平. E-O₃ 降低了各个取样时期光化学猝灭系数 (q_p) 和光系统 II 的实际光量子效率 (Φ_{PSII}),但均未达到显著水平. 与气体交换参数相似,叶绿素荧光参数未受到 O₃ 与熏气天数交互作用的影响(图 3).

2.4 O₃ 浓度升高对全缘冬青幼苗叶片光合色素含量的影响

从平均效果来看,E-O₃ 显著降低了叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量,但这些指标未受到 O₃ 与熏气天数交互作用的影响(图 4). 类胡萝卜素含量与类胡萝卜素/叶绿素比值未受到 O₃、O₃ 与熏气天数交互作用的影响. 与 CF 相比, E-O₃ 处理 84 d 引起叶绿素 a/b 比值显著降低 8%,表明 O₃ 已经影响叶片中叶绿素组成比例.

2.5 O₃ 浓度升高对全缘冬青幼苗叶片丙二醛含量与抗氧化剂的影响

与 CF 相比,E-O₃ 下全缘冬青幼苗叶片丙二醛含量未发生变化,总还原能力降低 15%,总抗坏血酸含量与还原型抗坏血酸比例分别降低 7%与 2%,均未达到显著水平. 但 E-O₃ 引起总酚含量显著降低 36%(表 2). 上述结果表明,E-O₃ 处理 84 d 后并未加剧全缘冬青幼苗叶片膜质过氧化程度,而对抗氧化剂总酚的影响较大.

3 讨论

本研究中,AOT40 值达到 16.9 μL·L⁻¹·h 时全缘冬青幼苗出现受害症状,并且随着暴露时间的延长受害程度加重,受害面积增大. 处理 84 d 后(AOT40 值达到 38.2 μL·L⁻¹·h)大多数当年生全缘叶片的上表面呈现出腐蚀状凹陷,说明试验设定的 O₃ 浓度已经对全缘冬青幼苗造成了严重伤害. 这与以欧洲山毛榉为试验对象的研究结果相似:150 ~ 190 nL·L⁻¹ O₃ 处理下山毛榉叶片上表面出现典型伤害症状,并且随着处理时间延长损害逐步加剧^[26]. 同样,对地中海常绿阔叶林树种进行的研究也表明,110 nL·L⁻¹ O₃ 处理 3 个月后(AOT40 值达到 31.5 μL·L⁻¹·h),月桂(*Laurus nobilis* L.)、木犀(*Phillyrea latifolia* L.)与杨梅(*Arbutus unedo* L.)叶片均出现伤害症状^[27]. 通常情况下,在可见伤害症状出现之前,碳同化与以此为基础的新陈代谢过程会降低,分解代谢会加剧,用以供给足够的用于解毒作用过程必须的还原力^[28]. 但本研究中,全缘冬青

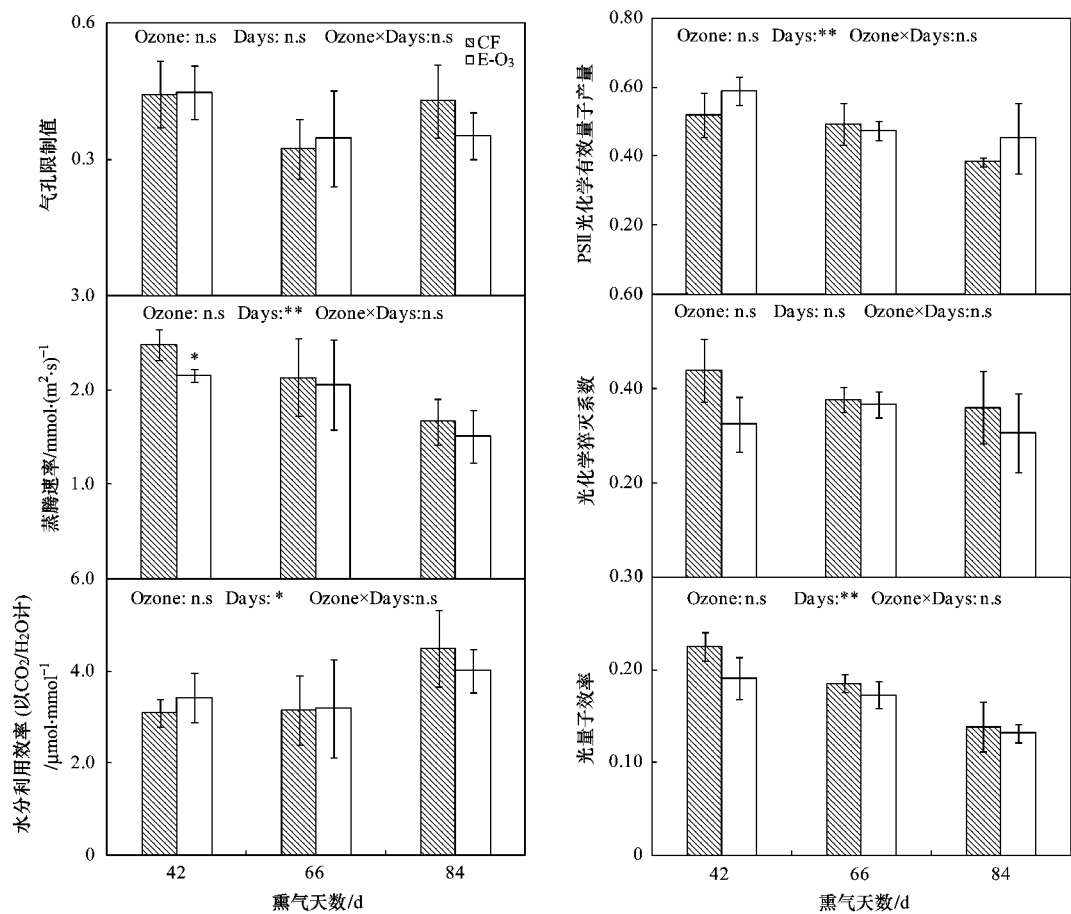


图3 O₃ 浓度升高对全缘冬青幼苗叶片叶绿素荧光参数的影响

Fig. 3 Effect of elevated ozone concentration on chlorophyll a fluoescence parameters in *Ilex integra* seedlings

表2 O₃ 浓度升高对全缘冬青幼苗叶片丙二醛含量与抗氧化剂的影响

Table 2 Effect of elevated ozone concentration on contents of MDA and antioxidants in *Ilex integra* seedlings

测定指标	处理		T-检验 (P 值)
	CF	E-O ₃	
丙二醛含量/nmolg ⁻¹	43.0 ± 10.3	43.2 ± 10.2	0.983
总还原能力/μmol·g ⁻¹	15.2 ± 3.1	13.0 ± 1.2	0.305
总抗坏血酸含量/μmol·g ⁻¹	5.21 ± 1.27	4.85 ± 1.60	0.772
还原型抗坏血酸含量/μmol·g ⁻¹	3.46 ± 1.27	3.38 ± 0.85	0.932
总酚含量/mg·g ⁻¹	7.0 ± 0.8	4.5 ± 1.1	0.031

幼苗叶片伤害症状出现较早,净光合速率的显著降低发生相对较迟.这可能是由于全缘冬青幼苗叶片自身的特点造成——表皮革质化、较厚,比叶重较大,并且气孔小而密. Paoletti 等^[19]认为地中海常绿硬叶植物具有较强 O₃ 抗性的主要原因是由于其自身较厚的细胞壁和较大的比叶重.硬叶植物具有革质化叶片,包含 2~3 层栅栏层,几乎没有细胞间隙,厚厚的表皮和细胞壁,高气孔密度、叶表叶脉发育发达,气孔较小等特点,被认为是对 O₃ 抗性较强的主要原因之一^[29]. 尽管气孔是 O₃ 进去植物叶片最有

效的入口,但 O₃ 也可以直接侵袭植物表面(更多时候是表皮和树脂)^[30],同时叶片表皮细胞、气孔细胞与叶脉组织可以忍受 O₃ 的伤害直至整个叶片出现坏死^[31]. 其次,细胞壁上的突起包括胶质、多酚或者蛋白材料很可能与质外体的氧化应激(oxidative stress)反应^[19],尤其是酚类化合物会在细胞壁处沉积^[26]. 这些可能有助于理解本试验中所出现的现象:尽管全缘冬青幼苗叶片出现了伤害症状、总酚含量显著降低,但净光合速率降低出现较晚,丙二醛含量、总的抗氧化能力以及部分生理指标并未受到

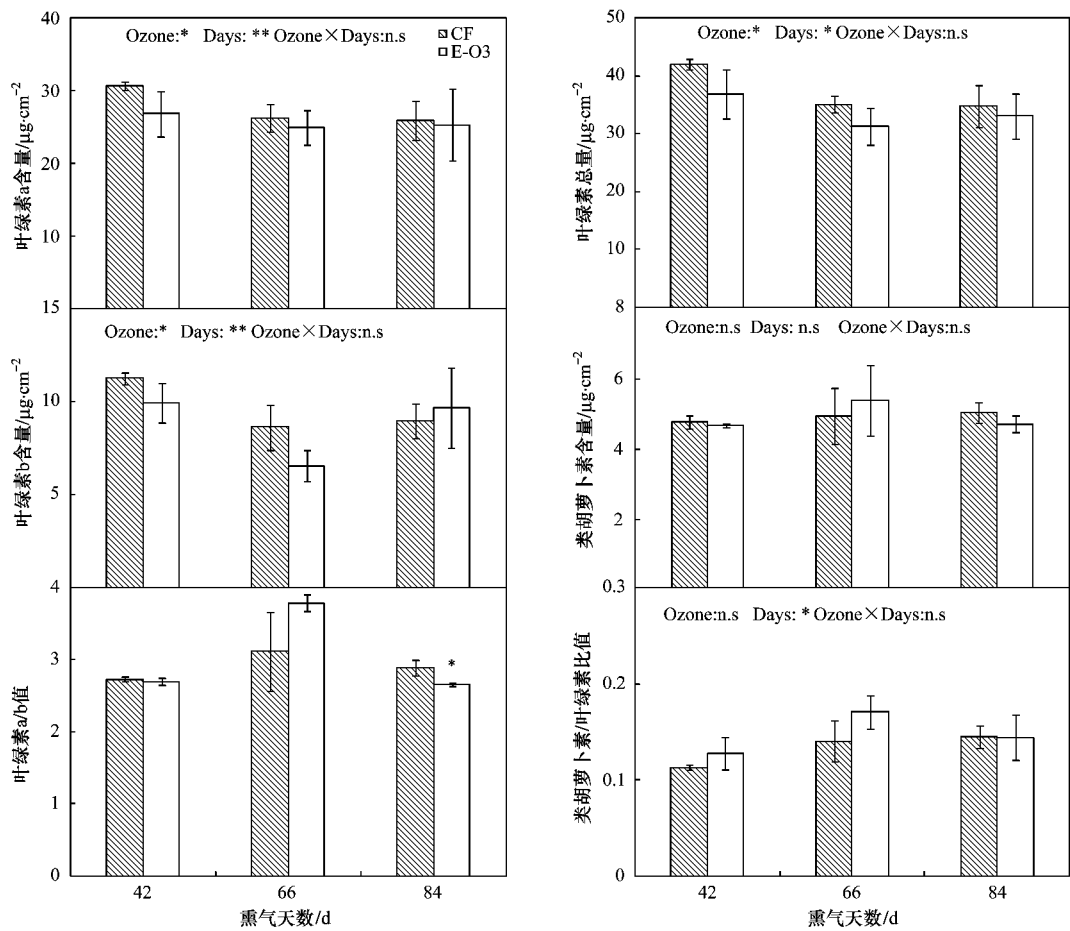


图 4 O₃ 浓度升高对全缘冬青幼苗叶片光合色素含量的影响

Fig. 4 Effect of elevated ozone concentration on contents of photosynthetic pigments in *Ilex integra* seedlings

影响.

O₃ 会导致净光合速率降低, 气孔导度下降、叶绿素含量降低、光合电子传递链受阻^[17,32]. 100 和 200 nL·L⁻¹ O₃ 处理下, 两年生水杉幼苗叶片长度、冠幅宽度、叶绿素 a/b 值, 净光合速率, 气孔导度与蒸腾速率均显著降低^[33]. 气孔限制被认为是树木对臭氧的生理响应差异的关键因子, 大多数试验中 O₃ 浓度升高对诱导植物气孔关闭, 减少进入叶肉内的 O₃ 剂量, 但同时也阻碍了 CO₂ 进入细胞, 并由此导致净光合速率的降低. 本研究中, E-O₃ 下全缘冬青幼苗叶片气孔导度与胞间 CO₂ 浓度未发生显著变化, 叶绿素 a 荧光参数也未受到明显影响, 净光合速率的降低主要是叶绿素比例发生变化引起. Chl a/b 比值降低说明 O₃ 可以影响湿地松幼苗针叶叶绿素组成, 对偏向吸收短波光的 Chl b 比偏向吸收长波光的 Chl a 影响更大些. 另外, 叶片呈现黑褐色斑点与斑块、出现腐蚀状凹陷表明光和器官受损、进行光合作用的有效叶面积降低.

本试验中, AOT40 值累积为 38.2 µL·L⁻¹·h, 远远大于 10 µL·L⁻¹·h 的理论值^[34], 但从收获时全缘冬青幼苗株高与基径生长、生物量累积等指标来看, 高浓度 O₃ 暴露均未引起显著性差异, 但改变了植株生物量的分配, 使茎百分比显著下降. 通常认为, O₃ 增加了植物在解毒修复过程中碳的需求、阻断植物叶片同化物向其余部分的转移, 因此树木非绿色器官的碳固定就会降低^[35]; 同时, 地上部分的碳分配受到影响: 可能出现利用即将衰落的老叶和储藏物质以补偿性的方式供新叶生长, 而抑制了茎的横向和纵向生长、侧枝生长、单个叶片质量与大小^[35]. O₃ 处理未能对全缘冬青幼苗产生明显的抑制作用, 这说明全缘冬青幼苗对 O₃ 暴露具有一定的抗性; 另外, 由于试验期间受到台风影响, 实际熏气天数减少为 47 d, 阴雨天气停止熏气可能会在一定程度上缓解 O₃ 的作用^[36], 植物可能需要更长的时间才会出现生物量的变化, 正如大部分报道 O₃ 显著抑制树的生长都是经过较长期处理^[37,38].

目前,臭氧模拟控制实验设备主要包括开顶式气室(OTC)与FACE系统(free-air concentration enrichment).FACE由于其内部气候条件与自然环境更为接近被认为是最理想的方法,然而由于其成本高、易受到风的影响,且易造成污染等原因,本研究仍采用目前最为常用的开顶式气室进行模拟研究.改进后的气室内空间更大、控制精度更好,光照、温度等更接近自然状态,但无法控制湿度和风速的影响.尽管试验中选取的测定指标涵盖生长指标、气体交换速率、光和色素含量与抗性生理指标,在一定程度上可以较全面地反映O₃浓度增加对全缘冬青幼苗的影响,但是由于植物对O₃暴露的响应取决于暴露浓度、时间、叶龄、基因型,植物的营养状态以及环境因子等的影响,因此在今后的试验中还需加强多方面更深入的研究以期能全面评价树种的敏感性,在此基础上开展如何减缓O₃对植物影响.根据已有的研究成果,应加强臭氧与其他环境因子交互作用的研究,寻找外源臭氧防护剂及确定植物在臭氧浓度升高后的最佳生长环境是最为重要的.另外,还需根据现有的研究结果积极开展抗性基因筛选和抗性品种选育工作,尽可能地减轻植物因O₃体积分数持续升高带来的负面影响.

4 结论

(1)AOT40 值达到 16.9 μL·L⁻¹·h 时,全缘冬青幼苗叶片出现伤害症状,并且随着暴露时间的延长受害程度加重、受害面积增大.

(2)O₃ 对全缘冬青幼苗的光合作用具有一定的抑制作用.叶绿素含量组成发生变化是引起净光合速率下降的主要原因.从抗性系统的变化趋势来看,植株体内主要抗氧化剂总酚含量显著降低,总还原能力并未发生显著变化,尚未引起膜脂过氧化程度加剧.

(3)一个生长季的 O₃ 熏气处理(AOT40 值达到 38.2 μL·L⁻¹·h),全缘冬青幼苗茎生物量占总生物量百分比显著降低 7%,但株高与基径生长、总生物量下降不显著,根冠比不变.总的来看,全缘冬青幼苗对 O₃ 的耐受水平较高.

参考文献:

[1] UNECE convention on long range transboundary air pollution (LRTAP). 2004. Manual on Methodologies and Criteria for Modeling and Mapping Critical Loads and Levels and Air Pollution Effects, Risks and Trends[EB/OL]. <http://icpmapping.org/cms/zeigeBereich/11/manual-english.html>chapter 3 > .

[2] EPA. Review of the National Ambient Air Quality Standards for Ozone: Policy Assessment of Scientific and Technical Information [R]. OAQPS Staff Paper. Publication No. EPA-452/R-7-03. US Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards, Research Triangle Park, NC; 2007. 603.

[3] Vingarzan R. A review of surface O₃ background levels and trends[J]. Atmospheric Environment, 2004, **38** (21): 3431-3442.

[4] 殷永泉,单文坡,纪霞,等. 济南市区近地面臭氧浓度变化特征[J]. 环境科学与技术,2006, **29** (10): 49-51.

[5] Gregg J W, Jones C G, Dawson T E. Urbanization effects on tree growth in the vicinity of New York City[J]. Nature, 2003, **42** (4):183-187.

[6] Fowler D, Cape J N, Coyle M, *et al.* The global exposure of forest ecosystems to air pollutants [J]. Water Air and Soil Pollution, 1999, **116**(1):5-32.

[7] Karlssona P E, Medinb E L, Ottossonb S, *et al.* A cumulative ozone uptake-response relationship for the growth of Norway spruce saplings[J]. Environmental Pollution, 2004, **128** (3): 405-417.

[8] Elvira S, Alonso R, Castillo F 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 Phytologist, 1998, **138**(3): 419-432.

[9] Miller P R. Extent of ozone injury to trees in the Western United States[A]. In: Miller P R, Stolte K W, Duriscoe D M, *et al.* Evaluating ozone air pollution effects on pines in the Western United States[M]. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-155 [Albany, CA]; U. S. Department of Agriculture, Forest Service, [Pacific Northwest Research Station]; 1996. 1-6.

[10] Then C H, Herbingen K, Luis V C, *et al.* Photosynthesis, chloroplast pigments, and antioxidants in *Pinus canariensis* under free-air ozone fumigation[J]. Environmental Pollution, 2009, **157**(2): 392-395.

[11] Herbingen K, Then C H, Löw C, *et al.* Tree age dependence and within-canopy variation of leaf gas exchange and antioxidative defence in *Fagus sylvatica* under experimental free-air ozone exposure[J]. Environmental Pollution, 2005, **137** (3): 476-482.

[12] Orendovici-Best T, Skelly J M, Davis D D, *et al.* Ozone uptake (flux) as it relates to ozone-induced foliar symptoms of *Prunus serotina* and *Populus maximowizii* × *trichocarpa* [J]. Environmental Pollution, 2008, **151**(1): 79-92.

[13] Ryang S Z, Woo S Y, Kwon S Y, *et al.* Changes of net photosynthesis, antioxidant enzyme activities, and antioxidant contents of *Liriodendron tulipifera* under elevated ozone [J]. Photosynthetica, 2009, **47**(1): 19-25.

[14] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes [J]. Methods in Enzymology, 1987, **148**: 350-382.

[15] 李德文,史奕,何兴元. O₃ 浓度升高对银杏及油松 BVOCs 排

放的影响[J]. 环境科学, 2008, **29**(2):300-304.

[16] 张巍巍,赵天宏,王美玉,等. O₃ 浓度升高对油松光合作用的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, **26**(3):1024-1028.

[17] Wittig V E, Ainsworth E A, Long S P. To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 30 decades of experiments [J]. Plant, Cell and Environment, 2007, **30**(9): 1150-1162.

[18] Witing V E, Ainsworth E A, Naidu S N, *et al.* Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis [J]. Global Change Biology, 2009, **15**(2): 396-424.

[19] Paoletti E, Nali C, Lorenzini G. Gas exchange and ozone visible injury in Mediterranean evergreen broadleaved seedlings [A]. In: Kinnunen H, Huttunen S, (Eds). Proceedings of the Meeting Forest under Changing Climate, Enhanced UV and Air Pollution [M]. Dept Biology, Thule Institute, Univ. Oulu, Oulu, Finland, 2004. 85-101.

[20] 张巍巍,牛俊峰,王效科,等. 大气臭氧浓度增加对湿地松幼苗的影响[J]. 环境科学, 2010, **32**(6):1710-1716.

[21] Heath R L, Parker L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968, **125**(1): 189-198.

[22] Benzie I F F, Strain J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, **239**(1): 70-76.

[23] Sean P G, Ranjeet B. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, **302**(2): 201-211.

[24] Okamura M. An improved method for determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in blood plasma [J]. Clinica Chimica Acta, 1980, **103**(3): 259-268.

[25] Kähkönen M P, Hopia A I, Vuorela H J, *et al.* Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, **47**(10): 3954-3962.

[26] Gunter A B, Elke G, Susanne S, *et al.* Ozone affects shikimate pathway genes and secondary metabolites in saplings of European beech (*Fagus sylvatica* L.) grown under greenhouse conditions [J]. Trees, 2009, **23**(3):539-553.

[27] Nali C, Paoletti E, Marabottini R, *et al.* Ecophysiological and biochemical strategies of response to ozone in Mediterranean evergreen broadleaf species [J]. Atmospheric Environment, 2004, **38**(15): 2247-2257.

[28] Dizengremel P, Petrini M. Effects of air pollutants on the pathways of carbohydrate breakdown [A]. In: Alscher R G, Wellburn A R, (Eds.). Plant Response to the Gaseous Environment [C]. Molecular, Metabolic and Physiological Aspects, Chapman and Hall, London, 1994. 255-278.

[29] De Lillis M. An ecomorphological study of the evergreen leaf[J]. Braun-Blanquetia, 1991, **7**: 1-127.

[30] Maðkovská B, Percy K E, Kernosky D F. Impacts of greenhouse gases on epicuticular waxes of *Populus tremuloides* Michx. : Results from an open-air exposure and a natural O₃ gradient[J]. Environmental Pollution, 2005, **137**(3): 580-586.

[31] Günthardt-Goerg M S, Vollenweider P. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: new diagnostic perspectives[J]. Environmental Pollution, 2007, **147**(3): 467-488.

[32] Riikonen J, Mäenpää M, Alavillamo M, *et al.* Interactive effect of elevated temperature and O₃ on antioxidant capacity and gas exchange in *Betula pendula* saplings [J]. Planta, 2009, **230**(2):419-427.

[33] Feng Z Z, Zeng H Q, Wang X K, *et al.* Sensitivity of *Metasequoia glyptostroboides* to ozone stress[J]. Photosynthetica, 2008, **46**(3): 463-465.

[34] Bull K. Workshop summary[A]. In: Karenlampi L, Skarby L, (Eds). Critical Level for Ozone in Europe: Testing and Finalizing the Concepts (UN-ECE Workshop Report) [C]. Finland: University of Kuopio, 1996. 7-8.

[35] Matyssek R, Sandermann J H. Impact of ozone on trees: an ecophysiological perspective [A]. In: Esser K, Luttge U, Beyschlag W, *et al.* Progress in Botany [C]. Heidelberg: Springer Verlag, 2003. 349-404.

[36] Reich P B. Quantifying plant response to ozone: a unifying theory [J]. Tree Physiology, 1987, **3**: 63-91.

[37] Rebbbeck J, Scherzer A J. Growth responses of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) exposed to 5 years of O₃ alone or combined with elevated CO₂ [J]. Plant, Cell and Environment, 2002, **25**(11):1527-1537.

[38] Karnosky D F, Pregitzer K S, Zak D R, *et al.* Scaling ozone responses of forest trees to the ecosystem level in a changing climate[J]. Plant, Cell and Environment, 2005, **28**(8): 965-981.