

臭氧对冬小麦叶片膜保护系统的影响

金明红, 冯宗炜

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100080)

摘要:通过开顶式气室(OTCs)研究臭氧对冬小麦不同发育时期(拔节期、抽穗期、灌浆期)的叶片膜保护系统的影响。实验结果表明,在臭氧胁迫下,小麦叶片叶绿素 a 、 b 含量明显下降,膜透性增加,丙二醛(MDA)含量上升,过氧化氢酶(CAT)活性开始上升后转为逐渐下降,过氧化物(POD)活性逐渐或急剧上升。臭氧诱导了活性氧生成,影响了抗氧化酶的活性,造成活性氧产生和清除之间的不平衡,促进了膜脂过氧化,对叶片膜保护系统产生危害,加速了叶片衰老进程。

关键词:臭氧;冬小麦;膜保护系统;抗氧化酶

Effects of ozone on membrane protective system of winter wheat leaves

JIN Ming-Hong, FENG Zong-Wei (Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Winter wheat leaves were used to investigate effects of Ozone (O_3) on membrane protective system in varied growth stages (jointing stage, heading stage, grain filling stage). The plants were exposed in open top chambers (OTCs) in the field conditions for five levels of O_3 concentration (ambient level, charcoal filtered air, 50 nl/L, 100 nl/L, 200 nl/L) from 1999-04-04 ~ 1999-06-06. Under O_3 exposure condition, chlorophyll a content and chlorophyll b content in winter wheat leaves were significantly declined; Membrane permeability and lipid peroxidation (MDA) content were significantly increased; the activity of catalase (CAT) increased first and decreased afterward; the activity of peroxidase (POD) increased gradually. Those observations indicated that the O_3 stress induce *in vivo* oxidative injury and affect the activities of antioxidant enzymes. The effects resulted in imbalance of activated oxygen production, accelerated process of lipid peroxidation, and damaged membrane protective system.

Key words: ozone; winter wheat; membrane protective system; antioxidant enzymes; lipid peroxidation.

文章编号: 1000-0933(2000)03-0444-04 中图分类号: Q143, S181 文献标识码: A

对流层特别是近地层臭氧(O_3)作为光化学氧化剂的主要成分是一种广泛分布和危害严重的大气污染。现在,在中北美、欧洲、远东、中国的一些城市及其工业区周围的农村,近地层臭氧浓度可达 100 ~ 200 nl/L^[1,2],野外臭氧浓度已足以造成农作物的减产和森林的衰亡^[3]。近 20 年来,臭氧对植物危害以及生理生化影响在国外已有了不少的实验和报道^[4,5],而我国在这方面研究还很少^[6,7]。

高浓度臭氧可对植物产生急性伤害(可见叶面伤害症状),而在长时间低浓度的暴露中也可产生慢性伤害。植物可通过忍耐、适应等一系列生理、生化机制来克服臭氧的危害;然而,迄今为止,还没有建立任何一种植物对臭氧敏感性及其抗性的完整、清晰生物化学机制^[8]。臭氧通过张开的气孔进入植物体内,从而影响植物体内活性氧代谢系统的平衡,即增加植物体内的活性氧,如超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、氢氧自由基($\cdot OH$)、

基金项目:国家自然科学基金重大资助项目(49899270)

收稿日期:1999-11-23;修订日期:1999-12-30

作者简介:金明红(1974-),男,博士研究生。

单态氧($^1\text{O}_2$)、过氧化氢(H_2O_2)等。这些自由基十分活跃,能对生物体膜系统产生危害。但植物膜保护系统在活性氧胁迫下的生化响应机制特别是对内源抗氧化酶的诱导或抑制作用还不甚清楚,已有的文献表达也不尽一致^[4,5]。本文通过开顶式气室(OTCs)研究臭氧对冬小麦叶片膜保护系统的影响。

1 材料与方法

选择我国主要农作物冬小麦(*Triticum aestivum*, L)——京冬6号为实验材料,种子由北京农业科学院提供。实验是在中国气象局农业气象试验基地进行,开顶式气室由过滤器、风机、通风管路、框架与室壁5部分组成,具体结构见文献^[9]。臭氧由清华大学生产的QHG-1型高频臭氧发生器产生,采用日本堀场(HORIBA)公司的臭氧监测器对各气室中的臭氧浓度进行监控。

冬小麦于1998年10月3日播种于顶口直径36cm、深26cm的瓦盆,土壤为大田表土,各盆之间土壤质地相同。每盆定株为10株,将瓦盆埋入大田土壤中。1999年3月31日移入气室适应,4月4日开始通气,6月6日停止通气,一共5个处理,臭氧浓度依次为:处理1,环境(仅通风不通臭氧)(25~48nl/L);处理2,活性炭过滤(2~8nl/L);处理3,50nl/L;处理4,100nl/L;处理5,200nl/L。气室内臭氧浓度变异系数小于5%。每天通气时间为9:00~16:00,其中11:00~11:15,14:00~14:15停止通气半小时,下雨天停止通气。对冬小麦的施肥、浇水以及防病虫害措施各气室保持一致,并使水肥条件不成为限制因子。

实验分别于拔节普遍期(4月14日)、抽穗普遍期(4月29日)、灌浆普遍期(5月15日)对各处理的冬小麦叶片进行取样;随机取同一叶位的叶子数片,取叶片中部作实验测定用,每个实验4个重复。测定方法:叶绿素用80%丙酮提取,采用Arnon D. I法测定;膜透性、丙二醛(MDA)含量、过氧化氢酶(CAT)及过氧化物酶(POD)活性测定方法见文献^[10]。

2 结果与讨论

2.1 臭氧对冬小麦叶绿素含量、膜透性、MDA含量的影响

试验表明,臭氧使冬小麦叶片在各生育时期的叶绿素a、叶绿素b含量显著降低,并且随着生长发育的进程而降低的幅度剧增(表1);其中灌浆期臭氧浓度为200nl/L和100nl/L处理的叶片叶绿素a含量仅分别为过滤处理的19.4%、54.5%,叶绿素b含量仅分别为16.3%、53.7%。叶片中叶绿素含量的下降必然影响作物的光合作用,从而影响了作物的生物量和产量。图1表明,不论哪个生育期200nl/L和100nl/L处理的小麦叶片膜透性都和其它处理的膜透性差异十分显著($p < 0.01$);其中臭氧浓度为200nl/L处理的叶片膜透性极高,其电解质渗出率(浸泡液电导率值/煮沸后电导率)达25%左右,这与在200nl/L浓度暴露下,几天后冬小麦叶表面即出现水渍斑的可见伤害的情况相符。细胞膜的选择透性是植物最重要的功能之一,在逆境条件下膜选择透性的改变和丧失会造成植物伤害。MDA是衰老生理的重要指标,其含量的高低说明了脂质过氧化的程度。从图2可看出,臭氧浓度为200nl/L处理的小麦3个生育期的叶片MDA含量与其它4个处理差异都十分显著($p < 0.01$),分别高于过滤气室的118%(拔节期)、193%(抽穗期)、256%(灌浆期)。臭氧浓度为100nl/L处理的小麦3个生育期的叶片MDA含量与过滤处理的小麦叶片也差异十分显著($p < 0.01$)。同时也看出,每个处理的叶片中MDA的含量均随小麦的生长发育的进程而上升,其中臭氧浓度为200nl/L、100nl/L处理的上升趋势极明显。

细胞膜是臭氧胁迫危害的原初反应基地。如果在胁迫下,细胞膜的性质和结构不受危害,保持其稳定性,即使内部发生变化也是相对较轻的,并且危害往往是可逆的。如果膜的性质和结构遭到严重破坏,不仅其局部,甚至整体都要受害,最后可以达到死亡。细胞膜系统有一定的抗性,只有臭氧浓度超过它们的伤害阈值时,才表现出透性的变化(图1)。膜透性的增加和机体内MDA的增加有密切的关系(图1、图2),这是因为活性氧很容易使膜脂发生过氧化作用或脂膜脱脂作用(形成MDA),由此引起膜透性的增加,甚至启动叶绿素膜脂过氧化、破坏叶绿素,使叶片叶绿素含量下降(表1)。目前普遍认为,质膜内的氨基酸、蛋白质、不饱和脂肪酸和硫氢残基是臭氧的潜在作用位点,臭氧可以氧化、改变这些物质,臭氧首先与膜内不饱和脂肪酸的双键反应,破坏硫氢基,从而阻止新脂类的合成,使膜的一定部位受到损伤,抑制了细胞膜上的 K^+ -ATPase(离子泵),细胞膜上的 K^+ -通道由此打开,从而增加膜透性,使植物发生伤害^[11]。

2.2 臭氧对冬小麦CAT、POD活性的影响

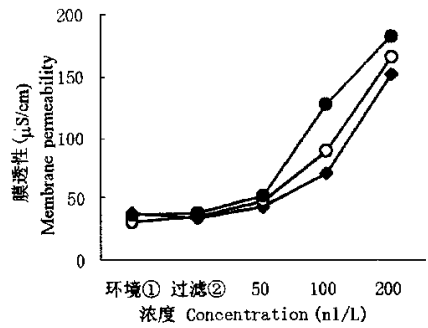


图 1 臭氧对冬小麦叶片膜透性的影响

Fig. 1 Membrane permeability of winter wheat leaves under exposure to ozone

◆拔节期 Jointing stage; ○抽穗期 Heading stage; ●灌浆期 Grain filling stage;

①Ambient level; ②Charcoal filtered

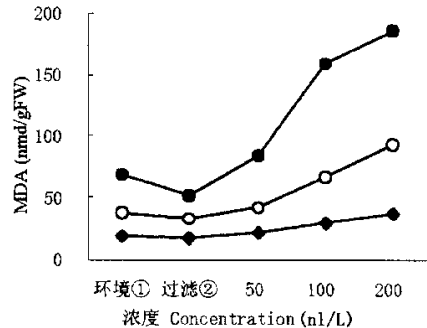


图 2 臭氧对冬小麦叶片 MDA 含量的影响

Fig. 2 MDA contents of winter wheat leaves under exposure to ozone

图例同图 1 Legend see Fig. 1

在臭氧胁迫下,冬小麦 CAT 活性有所增加,随着胁迫强度的进一步增加,其活性受到抑制而逐渐下降(图 3),当臭氧浓度较大时(200nl/L),CAT 活性迅速下降。伴随小麦的生长发育,从拔节期到灌浆期,其抗逆能力下降,CAT 活性也减弱^[12]。试验还表明(图 3),叶片的 POD 活性随着臭氧胁迫强度的增大而增加,在臭氧浓度为 200nl/L 时急剧上升。POD 活性的增加是受植物体内过氧化物(POD 底物)的增加而诱导。同时 POD 活性与器官幼嫩、老化有关^[13],小麦从拔节期到灌浆期,POD 的活性增加。

CAT、POD 是植物主要的抗氧化酶之一^[14],这些内源活性氧清除剂能够在逆境胁迫和衰老过程中清除植物内过量的活性氧,维持活性氧的代谢平衡,保护膜结构,从而增强植物对臭氧危害的抗性。 H_2O_2 可由 POD 催化产生 O_2 和 H_2O , H_2O_2 也可由 CAT 催化生成 O_2 而得到清除。当机体内活性氧的累积超过正常状态下 CAT、POD 等抗氧化酶能有效控制的范围,细胞会要求增加对这些酶的合成^[15]。这些酶活性的增加、机体内膜保护系统被诱导而加强生理活动,是对空气污染的胁迫响应。另一方面,在较强臭氧胁迫下,叶片 CAT 活性下降。这表明当臭氧浓度较大,此种酶系统可能被破坏。同时由于 POD 具有 IAA 氧化酶的性质^[13],在臭氧胁迫下 CAT 活性的降低和 POD 活性的增加都不利于对活性氧的清除,造成机体内活性氧增加,加速了 O_2^- 、 1O_2 、 H_2O_2 向毒性更强的 $\cdot OH$ 转化,从而将加速膜脂过氧化作用,增加膜透性,降解叶绿素,破坏膜保护系统,导致细胞器官的破坏,代谢的失调,加剧植物的衰老进程。

表 1 臭氧对冬小麦叶片叶绿素含量的影响(mg/g FW)

Table 1 Chlorophyll contents of winter wheat leaves under exposure to ozone

处理	拔节期	Jointing stage	抽穗期	Heading stage	灌浆期	Grain filling stage
Treatment	叶绿素 a	叶绿素 b	叶绿素 a	叶绿素 b	叶绿素 a	叶绿素 b
(nl/L)	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Chlorophyll a	Chlorophyll b
环境①	0.33±0.01	0.57±0.03	0.57±0.02	0.93±0.03	0.67±0.02	1.10±0.03
过滤②	0.31±0.01	0.51±0.02	0.64±0.02	1.06±0.03	0.71±0.03	1.16±0.04
50	0.31±0.01	0.52±0.02	0.57±0.02	0.93±0.03	0.70±0.03	1.16±0.04
100	0.29±0.01	0.47±0.01	0.44±0.01	0.70±0.03	0.39±0.02	0.63±0.03
200	0.22±0.02	0.33±0.02	0.37±0.02	0.46±0.02	0.14±0.03	0.20±0.02

①Ambient level; ②Charcoal filtered

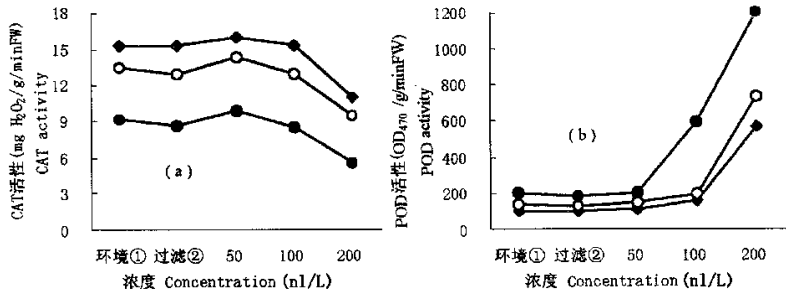


图 3 臭氧对冬小麦叶片 CAT(a)、POD(b)活性的影响

Fig. 3 CAT and POD activity of winter wheat leaves under exposure to ozone

图例同图 1 Legend see Fig. 1

3 结论

植物在正常条件下,植物体内活性氧的产生和清除维持动态平衡。臭氧既诱导了活性氧的产生,又使 CAT 活性总体水平下降,POD 活性逐渐增加,这将影响活性氧清除系统对活性氧的清除能力,从而破坏了植物体内活性氧的代谢平衡。在臭氧的胁迫下,植物膜保护系统受到伤害,膜脂过氧化进程加剧,叶片叶绿素含量下降,膜透性增加,细胞膜功能紊乱。

参考文献

[1] Altshuller A P. In assessment of crop loss from air pollution. Heck W W, Taylor O C and Tingey D T, ed. London. Elsevier Applied Science. 1988, 65~89.

[2] Reich P B. Quantifying plant response to ozone: unifying theory. *Tree Physiol.* 1987, **3**: 63~91.

[3] Krupa S V, Nosal M, Legge AH. Ambient Ozone and crop loss: Establishing a cause-effect relationship. *Environmental Pollution.* 1994, **83**: 269~276.

[4] Saxe H. Photosynthesis and stomatal response to pollution air, and the use of physiological and biochemical responses for early detection and diagnostic tool. *Adv In Bot. Res.* 1991, **18**: 1~128.

[5] Tang Y, Chevone B I, Hess J L. Ozone-responsive protein in a tolerant and sensitive clone of white clove (*Trifolium repens*). *Environmental Pollution.* 1999, **104**: 89~98.

[6] 黄韵珠, 王勋陵. 臭氧对辣椒不同发育时期光合作用的影响, 农业环境保护, 1991, **10**(2): 60~63.

[7] Shan Yunfeng, Feng Zongwei, et al. The individual and combined effects of Ozone and simulated acid rain on growth, gas exchange rain and water-use efficiency of *Pinus armandi* Franch. *Environmental Pollution.* 1996, **91** (3): 355~361.

[8] Tang T, Chevone B I, Hess j L. Ozone-responsive proteins in a tolerant and sensitive clone of white clove (*Trifolium repens*). *Environmental Pollution.* 1999, **104**: 89~98.

[9] 王春乙, 高素华, 等. OTC-1 型开顶式气室的结构和数据采集系统. 气象, 1993, **19**(4): 15~31.

[10] 张宪政. 作物生理研究法. 北京. 农业出版社, 1992.

[11] Tester M. Plant ion channel: Whole cell and single channel studies. *New Phytol.* 1990, **114**: 305~340.

[12] 严重玲, 洪业汤, 等. 稀土元素对酸雨胁迫小麦抗氧化酶的生物学效应. 科学通报, 1998, **43**(20): 2206~2209.

[13] Bandurski R S, nonhebel H M Auxins. In wilkins advanced plant physiology. London: Pitman Press. 1984. 1~16.

[14] Winston G W. Physicochemical basis for free radical formation in cell: Production and defenses. In: Alscher, R. G. Cumming, J. G. eds. *Stress Response in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanism*. Wiley-Liss, New York. 1990. 57~86.

[15] Matters G L, Scandalios J G. Synthesis of isozymes of superoxide dismutase in maize leaves in response to O₃, SO₂, and elevated O₂. *Journal of Experimental Botany.* 1986, **38**: 842~852.