

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20120324001

黄益宗, 隋立华. 臭氧污染胁迫下植物的抗氧化系统调节机制 [J]. 生态毒理学报, 2013, 8(4): 456-464

Huang Y Z, Sui L H. Antioxidant Mechanism of Plants under Ozone Stress [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(4): 456-464 (in Chinese)

臭氧污染胁迫下植物的抗氧化系统调节机制

黄益宗*, 隋立华

中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

摘要: 工业和农业的快速发展导致近地层 O_3 浓度不断提高, 这对陆地生态系统的动物、植物、微生物和人类健康造成伤害。 O_3 对植物的影响尤其是对农作物的影响将关系到世界粮食的安全生产。 O_3 污染胁迫可诱导植物产生活性氧物质, 破坏植物的膜系统, 影响植物的光合作用等正常生理功能。植物在自然适应过程中, 可形成一套抗氧化机制来缓解 O_3 胁迫伤害。综述了国内外近年来有关 O_3 胁迫下植物抗氧化系统调节机制的研究进展, 包括植物通过调节体内的抗氧化酶活性和非酶类物质含量来缓解 O_3 对植物伤害的机制。 O_3 污染胁迫下植物可调节其叶片超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)等抗氧化酶的活性。抗坏血酸(AsA)、类胡萝卜素(Car)和谷胱甘肽(GSH)等非酶类物质在清除 O_3 胁迫产生活性氧方面具有重要的作用。另外, 根据目前的研究进展, 提出了一些需要继续深入探讨的问题。

关键词: 臭氧; 植物; 抗氧化系统; 胁迫; 调节

文章编号: 1673-5897(2013)4-456-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Antioxidant Mechanism of Plants under Ozone Stress

Huang Yizong*, Sui Lihua

Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Received 24 March 2013 accepted 28 May 2013

Abstract: As a result of the rapid development of industry and agriculture, the concentration of global tropospheric ozone (O_3) is increasing continuously, which has detrimental influence on animals, plants and microbes in terrestrial ecosystem, as well as is harmful to human health. Effects of O_3 on plants especially on crops which relate to food safety have recently been increasingly reported. Ozone enters plant tissue through the opening stomata, and induces plant to produce active oxidant species (AOS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide ($O_2^- \cdot$), hydroxyl radicals ($\cdot OH$) and etc., which can damage membrane system of plant and reduce net photosynthesis. At the same time plants have the ability to scavenge AOS through closing the stomata to reduce the input of O_3 or increasing the activities of the antioxidant enzymes and the content of non-enzymatic, which enhance plant defending O_3 stress. Non-enzymatic, including ascorbic acid, carotenoid, some low molecular thiol-containing compounds (such as glutathione) and etc., can scavenge AOS through some chemical reactions. Ascorbic acid can remove AOS by reacting with superoxide, single oxygen, ozone and hydroxide. Carotenoids are effective in scavenging AOS to pro-

收稿日期: 2013-03-24 录用日期: 2013-05-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(41071336); 国家环保公益性行业科研专项(200809152)

作者简介: 黄益宗(1970-), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为农林生态环境保护, E-mail: hyz@rcees.ac.cn

tect chlorophyll from ozone damage. As an important part of ascorbic-glutathione system, glutathione plays an important role in scavenging AOS. Antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), dehydroascorbate reductase (DHAR), and mono-dehydroascorbate reductase (MDAR) also play an important role in scavenging AOS. The mechanism of the O_3 -induced damage to plant and their antioxidant system is complicated. On the basis of the summation of antioxidant mechanism of plants under ozone stress, some problems and suggestions are discussed in this paper.

Keywords: ozone; plants; antioxidant system; stress; regulation

臭氧(O_3)是构成地球大气圈的一种微量气体,它是由 3 个氧原子组成的有特殊刺鼻臭味的强氧化剂。平流层(约海平面至距离地面 15~50 km 范围内)大气中的 O_3 ,也就是我们常说的 O_3 层,具有吸收太阳有害紫外线的功能,但对流层(在海平面至距离地面 15 km 范围内)大气中的 O_3 是一种对地球上生命有害的主要气体污染物。对流层的 O_3 并非直接被排入大气中,而是来自于次级污染或传输污染物,其主要来源有 2 个:1)对流层上层 O_3 主要来源于平流层 O_3 的侵入,侵入总量约占对流层 O_3 总量的 20%^[1];2)对流层下层 O_3 主要由光化学反应产生,在太阳光照射和氮氧化物(NO_x ,包括 NO 和 NO_2)气体存在的情况下,有机挥发物(VOCs)和一氧化碳(CO)被光化学氧化产生 O_3 。近地层大气 O_3 自然本底浓度较低,大约为 $20\text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[2]。近几十年来,由于化石燃料和含 N 化肥的大量使用,以及汽车尾气的排放,大气中 NO_x 和 VOCs 浓度剧增,导致近地层 O_3 污染事件频度增加且持续时间延长,如 1943 年美国洛杉矶和 1952 年英国伦敦的“光化学烟雾事件”。目前,地球对流层大气平均 O_3 浓度已经从工业革命前的 $38\text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ ($25\sim 45\text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$,夏季每天 8 h 平均)上升到 2000 年的 $50\text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$,这个浓度已经超过了敏感作物 O_3 伤害阈值的 25%^[3],预计到 2050 年,近地层的平均 O_3 浓度将高达 $70\text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$,这显然高于 $40\text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 O_3 伤害临界值^[4]。悲观估计到 2100 年大气 O_3 浓度将达到 $80\text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上^[5-6]。随着工业化进程的加快,我国近地层 O_3 浓度明显增加,大气 O_3 污染也日益严重,特别是长江三角洲、北京地区的近地层 O_3 浓度最高值已达到 $150\text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上^[7-8]。不断上升的 O_3 浓度已经成为全球科学家和公众密切关注的重要问题。

作为近地层最重要的大气二次污染物, O_3 会对作物、森林和人类健康造成极大的伤害,其中 O_3 污染对农作物的影响是大气环境、农业和生态环境科学家们关注和研究的重要领域之一。据报道, O_3 污

染可导致农作物减产 5%~15%,西红柿、西瓜和大豆等作物减产超过 20%以上^[9]。美国每年因 O_3 污染造成的农作物经济损失达 20~40 亿美元^[10],欧洲地区也高达 40 亿欧元^[11],而我国长江三角洲地区因 O_3 浓度过高造成的农业经济损失为 14.75 亿元人民币^[12]。 O_3 作用于植物有 2 个途径:一是直接作用,即 O_3 与植物组织直接作用;二是通过气孔进入植物体内后诱导产生活性氧物质(AOS),包括过氧化氢(H_2O_2)、超氧自由基($O_2^{\cdot-}$)、羟基($\cdot OH$)等,这些活性氧物质破坏植物的膜系统,加剧了膜脂过氧化程度,影响植物的光合作用等正常生理功能。植物在自然适应过程中,也形成了自身的一套抗氧化的机制:通过气孔的关闭来阻止 O_3 等氧化气体的进入;通过增加自身抗氧化系统活性来提高抗逆性,从而减轻氧化伤害^[13]。抗氧化系统包括抗氧化酶和具有高度还原性的非酶成分,非酶成分包括抗坏血酸(AsA)、类胡萝卜素(Car)和谷胱甘肽(GSH)等,抗氧化酶主要包括对于清除活性氧发挥重要作用的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD),以及在 AsA-GSH 循环(又称 Halliwell-Ashada 途径)中起主要作用的谷胱甘肽还原酶(GR)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)等。植物抗氧化系统在抵御由高浓度 O_3 引起的氧化胁迫过程中发挥着主要作用。 O_3 污染胁迫下有关植物非酶促物质和酶促物质含量变化的抗氧化系统调节机制的综述文章比较少见,下文主要对这方面工作进行系统的讨论,为将来开展相类似研究提供借鉴。

1 非酶促物质对 O_3 胁迫的调节作用

非酶促清除系统主要指 AsA 和 Car 以及一些含巯基的低分子化合物(如还原型谷胱甘肽)等,它们通过多条途径直接或间接地猝灭活性氧。

1.1 抗坏血酸

抗坏血酸存在于叶绿体基质中,是 $O_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot OH$ 的有效清除剂,同时也是单线态氧(1O_2)的猝灭剂。它可以清除膜脂过氧化过程中产生的多聚不饱和脂

肪酸自由基^[14]。一方面它可以作为 Halliwell—Asada 循环中 APX 的底物,另一方面它又可以作为抗氧化剂直接清除活性氧。由于抗坏血酸有多种抗氧化功能,故有学者认为抗坏血酸水平的降低可作为植物抗氧化能力总体衰退的指标。

活细胞内抗坏血酸存在 3 种不同氧化还原态:还原型抗坏血酸(AsA)、半还原型即单脱氢抗坏血酸(MDHA)和氧化型即脱氢抗坏血酸(DHA)。抗坏血酸是非常重要的抗氧化物质,它的生物化学功能可以分为 4 类:(1)抗氧化物质。它可以同超氧化物、单氧、O₃ 和氢氧化物发生反应,去除机体内的活性氧物质,而自身则由还原态转化为氧化态^[15]。(2)辅酶。它是许多羟化酶的辅酶。(3)电子转移体。抗坏血酸是熟知的光合作用和线粒体电子转移的电子供体,而 MDHA 则常常扮演着电子受体的角色^[16]。(4)参与物质的合成。抗坏血酸可以断裂产生草酸和酒石酸^[17]。在胞内环境,众多酶循环途径可使 AsA 库保持在相当高的还原水平;而在胞外环境,AsA 的氧化还原状态更多地依赖于物种差异和植株所处的生理状态。AsA 库在植物细胞的胞内和胞外环境中所处的相对氧化还原状态以及维持该状态所涉及的代谢物质或酶活性的改变,对植物抵抗一系列环境胁迫非常重要。

有文献报道,75 nL·L⁻¹ O₃ 胁迫 6 周末导致水稻叶片 AsA 含量有显著变化,但是胁迫 8 周和 9 周时 AsA 含量呈升高趋势,分别比 20 nL·L⁻¹ O₃ 处理时提高 79.4% 和 67.7%^[18]。拟南芥经 300 nL·L⁻¹ O₃ 处理后^[19],其体内 AsA 含量呈现出先升高后降低的趋势,且二者含量最大值和最小值分别在处理 4 h 和 16 h 后出现,而活性氧自由基含量的变化趋势恰好与此相反。这可能是由于在处理初期,O₃ 胁迫强度较低,为抵御活性氧自由基的伤害,拟南芥自身的保护机制发挥着作用,通过提高 AsA 含量来增强其清除活性氧自由基的效率,从而减轻活性氧自由基的伤害作用。随着 O₃ 胁迫时间的延长,胁迫强度不断加重,拟南芥自身抗氧化物质结构遭到破坏,抗氧化物质含量降低,造成体内活性氧自由基的快速积累。Burkey 等^[20]发现,在 O₃ 浓度升高条件下,耐受品种食荚菜豆(*Phaseolus vulgaris* L. var. *chinensis*)叶片中总 AsA 含量高于敏感品种,且耐受品种能在一定程度上维持相对较高的 AsA 水平。由此说明,AsA 可以帮助豆科植物提高对高浓度 O₃ 胁迫的耐受力,但不同品种植物对相同条件

的 O₃ 胁迫有着不同的生理反应。Conklin 等^[21]报道,高浓度 O₃ 处理后,拟南芥变种 vtcl 的 AsA 合成能力明显下降的同时,还伴随着 APX 活性的显著降低,说明高 AsA 合成能力与高 APX 活性有关联性,且 O₃ 胁迫诱导植物抗氧化酶活性和非酶成分含量的变化是同时进行的。由于 AsA 可直接参与细胞壁的伸长和木质化过程,因而植物体内 AsA 在 O₃ 胁迫下维持较高水平和高还原性有助于缓解膜脂过氧化伤害,同时 AsA 还可以与 O₃ 直接发生化学分解反应:O₃ + AsA + H⁺ → DHA + H₂O + O₂,从而保证了植物细胞内 O₃ 浓度维持较低水平^[22]。另外,有报道发现外源喷施抗坏血酸可显著地提高 O₃ 污染胁迫下水稻叶片的叶绿素含量、光合速率和蒸腾速率^[23]。

1.2 谷胱甘肽

谷胱甘肽由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸形成的三肽化合物,广泛存在于动、植物细胞中,并于细胞内合成,作为抗坏血酸—谷胱甘肽体系中重要的组成部分,在清除活性氧自由基方面发挥了重要的作用^[24]。谷胱甘肽分为还原型谷胱甘肽(GSH)及氧化型谷胱甘肽(GSSG)两类,其中 GSH 含量占到约 99.5%。谷胱甘肽是一种非常特殊的氨基酸衍生物,它的活性成分是半胱氨酸中的巯基,在谷氨酸与半胱氨酸之间存在一个不多见的 γ -肽键,从而保护了 GSH 被许多肽酶的水解。GSH 不仅可以作为 GR 的底物通过 Halliwell—Asada 途径清除 H₂O₂,也可以作为抗氧化剂直接清除活性氧,在此过程中自身被氧化为氧化型谷胱甘肽^[25]。

Luwe 等^[26]研究发现,O₃ 熏蒸 24 h 后,植物体内大约有 89% GSH 转化为 GSSG,但是总的谷胱甘肽量变化不大,这与部分研究者的结果相似^[27]。但是,也有研究得出不一致的结论,认为 O₃ 熏蒸会造成植物叶片的总谷胱甘肽含量,特别是叶尖的总谷胱甘肽含量减少^[28]。Mahalingam 等^[19]的试验得出 O₃ 胁迫下拟南芥 GSH 含量呈现出先升高后降低的趋势,这与 AsA 含量的变化趋势一致,原因可能是由于在 O₃ 处理初期,GSH 含量的增加对于提高拟南芥清除活性氧自由基、抵御自由基伤害等方面起到了积极的作用。O₃ 胁迫后期 GSH 含量的减少可能与 O₃ 长时间的胁迫使拟南芥自身抗氧化物质结构遭到破坏,从而造成拟南芥体内活性氧自由基的快速积累有关。隋立华等^[29]研究 O₃ 浓度升高对不同生长期冬小麦叶片抗氧化系统的影响,发现冬

小麦拔节期叶片 GSH 含量随着 O_3 浓度的升高而显著提高,而冬小麦抽穗期 80 和 120 $nL \cdot L^{-1}$ O_3 胁迫均导致 GSH 含量比对照处理显著降低,说明在冬小麦拔节期 GSH 作为电子供体在清除活性氧自由基方面发挥了重要的作用。

对于 GSH 的保护作用,一种观点认为,环境胁迫可导致氧化型和还原型谷胱甘肽总量下降,但保持较高的 GSH/GSSG 比值;另一种观点则认为,在水分胁迫下 GSH 含量可增加至 50 倍以上,从而提高植物的抗氧化能力。但也有研究指出,GSH 的大量增加可进一步造成植物更大程度的氧化伤害^[30]。叶绿体可通过 AsA-GSH 循环来清除 H_2O_2 和 O_2^- ·,在该循环中 GSH 和 AsA 一起清除叶绿体中的 H_2O_2 ^[31]。GSH 可与包括·OH 在内的多种自由基直接发生反应,并将有机自由基 R·还原为 RH。GSH 对稳定多种酶起着重要作用,作为自由基清除剂它有时可代替双脱氢抗坏血酸还原酶来行使功能。有研究者在抗旱苔藓中发现 GSSG 含量与膜脂过氧化作用有关联,并建议用 GSSG 水平作为氧化胁迫的指示指标^[32]。GSH 可将系统中产生的双脱氢抗坏血酸还原成 AsA,GSSG 在 GR 作用下又还原成 GSH。GSH 还可以与 α -生育酚协同作用,来清除细胞内积累的自由基。

1.3 类胡萝卜素

类胡萝卜素(Car)在¹ O_2 猝灭系统中具有比较重要的生物学意义,包括 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素与叶黄素 3 种形式,以 β -胡萝卜素含量最高。Car 存在于叶绿体内,一方面它可阻止激发态叶绿素分子的激发能从反应中心向外传递;另一方面,它也保护叶绿素分子免遭光氧化损伤。另外,Car 在吸收光能方面也起着重要的作用。作为 Car 的重要组成部分, β -胡萝卜素具有非常有效的¹ O_2 清除作用,它可直接猝灭¹ O_2 或通过猝灭三线态叶绿素(3Chl)而阻止¹ O_2 的形成,从而保护叶绿素免受活性氧伤害,减少活性氧对光合作用组织的伤害。但 β -胡萝卜素的抗氧化作用受氧浓度的影响,低氧压下有良好的抗氧化作用,而高氧压下它会转化成自由基形式来加速氧化进程。Wustman 等^[33]的研究表明, O_3 浓度升高降低了白杨叶片中 Car 的含量,并且使得欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)和挪威云杉(*Picea abies*)叶片中的脯氨酸(proline, Pro)含量降低^[34]。高浓度 O_3 在一定程度上降低了木本植物抵御抗氧化损伤的能力,原因是 Car 和脯氨酸等植

物体内重要的抗氧化物质减少了。

1.4 其他非酶促物质

此外,二甲基亚砷、苯甲酸、异丙醇、硫脲与尿素可直接清除·OH,次生代谢物质多酚、单宁与黄酮类物质可直接清除 O_2^- ·,其中没食子酸丙酯清除 O_2^- ·的能力与 SOD 十分接近^[35]。一些渗透调节物质如脯氨酸、甜菜碱与甘露醇等同样具有清除活性氧的能力。 O_3 浓度升高对这些物质含量变化的报道比较少。

2 酶促物质对 O_3 胁迫的调节作用

2.1 超氧化物歧化酶(SOD)

SOD 是植物体内发现的唯一专职清除 O_2^- ·的抗氧化酶,是清除活性氧自由基的关键酶,能把 O_2^- ·还原成 H_2O_2 ^[36]。SOD 是一种含金属的酶,根据金属辅助因子的不同,植物体内的 SOD 可分为 Cu/Zn-SOD、Fe-SOD、Mn-SOD 3 种类型,可以统称为 SODs。其中,Mn-SOD 主要存在于线粒体中,叶绿体中也有发现;Fe-SOD 主要分布于基质中,少量存在于膜间介质中,在部分植物的叶绿体中也存在;Cu/Zn-SOD 主要存在于细胞溶质中^[37-38]。线粒体内膜呼吸链是植物体内产生 O_2^- ·的重要来源,包围在线粒体内膜两侧的基质和膜间介质存在着大量的 SOD,它可以使内膜产生的 O_2^- ·及时得到清除。植物幼叶中 Cu/Zn-SOD 较为丰富,其活性随叶龄增加而下降;而老叶中主要为 Fe-SOD 和 Mn-SOD^[39]。一般认为,这 3 种酶都是核编码的,如果细胞某个部位需要,就通过-NH₂末端定位顺序运至该细胞中而起作用^[40]。SOD 可以催化 2 个 O_2^- ·发生歧化反应,生成 H_2O_2 和 O_2 ,反应式为: $O_2^- \cdot + O_2^- \cdot + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ^[41],产生的 H_2O_2 再继续被其他相关酶类清除。 H_2O_2 虽然是一种比 O_2^- ·毒性低的活性氧,但在 O_2^- ·存在条件下 H_2O_2 会生成毒性非常强的·OH^[42]。SOD 可清除 O_2^- ·并同时阻止 Fe^{3+} 受 O_2^- ·作用还原生成 Fe^{2+} ,而 Fe^{2+} 是 Fenton 反应(该反应可以产生·OH)重要的催化剂。

SOD 的活性水平受 O_3 胁迫时间和胁迫强度影响。从胁迫时间看,大致呈现出在胁迫初期 SOD 活性增加,但随着胁迫时间的延长 SOD 活性逐渐下降。玉米的研究发现, O_3 胁迫初期植物叶片 SOD 活性增强,但在玉米小花分化期、抽雄期和灌浆期其叶片 SOD 活性在 O_3 胁迫下较对照分别减少了 28.3%、10.7%和 32.6%^[43]。从胁迫强度看,当 O_3 浓

度低于 $100 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,小麦叶片 SOD 活性随 O_3 值升高呈增加的趋势,但是当 O_3 值大于 $100 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,SOD 活性随 O_3 浓度升高而急剧下降^[44]。这也可以说明为什么不同实验会得出的 SOD 活性随时间变化趋势不一样的原因,在不考虑作物品种的条件下,如果作物受到的胁迫时间不够长,较低的 O_3 浓度可能会导致 SOD 活性随胁迫时间的延长而增加,这也与孙加伟的结论^[43] 相一致。过高的 O_3 浓度可能严重破坏 SOD 的结构而使植物 SOD 活性水平随着 O_3 胁迫时间的延长而呈现降低的趋势。此外,SOD 活性还与所选择的叶片的位置有关,例如嫩叶的 SOD 活性高于老叶的活性^[45]。早期的试验表明^[46],细胞间硫醇类抗氧化物质含量的提高促进了 SOD 基因的表达,这对于阐明 SOD 在保护植物抵御 O_3 伤害是十分必要的。

2.2 过氧化物酶(POD)

POD 是一种氧化还原酶,属植物的呼吸功能酶,它在抑制植物膜脂过氧化方面发挥着重要的作用。POD 广泛地存在于植物体内的不同组织中,它作为活性较高的适应性酶,能够反映植物生长发育的特点、体内代谢状况以及对外界环境的适应性。POD 的作用具有双重性,一方面,POD 可在逆境或衰老初期表达,以 SOD 的反应产物 H_2O_2 为反应底物,经过一系列的反应,最终将过氧化氢转化为 H_2O 从而起到解毒的作用,表现为保护效应^[47]。有研究发现,在 O_3 熏蒸初期 POD 活性是增加的,植物通过这种自身的调节起到抗氧化作用,从而降低氧化胁迫伤害^[19];另一方面,POD 也可在逆境环境或植物衰老后期表达,参与活性氧的生成、叶绿素的降解,并能引发膜脂过氧化作用,表现为伤害效应,是植物体衰老到一定阶段的产物,甚至可作为植物衰老的指标,POD 活性表现出下降的趋势^[47]。其他的一些研究也发现,植物通过提高体内的 POD 活性来缓解 O_3 污染胁迫的伤害^[48-51]。

除此之外,不同的植物品种,POD 活性水平和对 O_3 的响应情况差异很大。黄玉源等^[52] 对南方 3 种木本植物米兰、尾叶桉和马尾松研究发现,在正常情况下,米兰叶片中 POD 的活性是尾叶桉的 64.3 倍,是马尾松的 6.4 倍;在 $400 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ O_3 熏蒸胁迫下,米兰中 POD 活性急剧增加,但尾叶桉和马尾松却变化不大。

2.3 过氧化氢酶(CAT)

CAT 是一种包含血红素的四聚体酶,存在于所

有的植物细胞中,同 POD 一样,CAT 的反应底物也是 H_2O_2 ,它可将 H_2O_2 迅速分解为 H_2O 和 O_2 。CAT 在细胞中主要存在于过氧化体中,负责清除过氧化体中产生的 H_2O_2 。乙醛酸体中也发现 CAT 的存在,其功能主要是清除光呼吸过程或脂肪酸 β -氧化反应过程形成的 H_2O_2 ^[53]。CAT 有多种基因编码,因此存在多个同系物。全先庆和高文的研究^[54] 确证了烟草中存在 3 种 CAT 基因编码的蛋白质:CAT1 基因产物,主要清除光呼吸过程中产生的 H_2O_2 ;CAT2 基因产物,可特异性地清除活性氧胁迫过程中产生的 H_2O_2 ;CAT3 基因产物,主要清除乙醛酸循环体中脂肪酸 β -氧化产生的 H_2O_2 。CAT 对 O_3 的响应规律大致同 POD 一样,低浓度的 O_3 会使得植物体内 CAT 活性增加^[18],过高的 O_3 浓度和较长的胁迫时间会导致 CAT 活性的下降^[43,51,55]。研究 O_3 浓度升高对冬小麦叶片 CAT 活性的影响时,发现在冬小麦拔节期,低浓度 O_3 处理下($40 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$)冬小麦叶片 CAT 活性与对照相比差别不明显,但是 80 和 $120 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ O_3 浓度导致 CAT 活性分别比对照显著降低 57.1% 和 64.9%;在抽穗期,随着 O_3 浓度的升高冬小麦叶片 CAT 活性呈现出一个显著降低的趋势($P < 0.05$);当 O_3 浓度为 40、80 和 $120 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,冬小麦叶片 CAT 活性分别比对照降低 37.6%、35.7% 和 60.4%^[29]。此外,CAT 活性还受植物品种的影响^[52]。

2.4 抗坏血酸过氧化物酶(APX)

在植物细胞中,APX 以 AsA 为底物,清除 H_2O_2 ,而 AsA 转化成氧化态的 MDHA、DHA,在清除活性氧物质方面也起到重要的作用。目前已知的 APX 至少存在于细胞的 4 个不同组织:叶绿体基质(sAPX)、类囊体膜(tAPX)、线粒体(mAPX)和细胞质(cAPX)^[16,56-57]。

O_3 熏蒸下 APX 活性变化大致会呈现初期增加,后期降低的趋势。在水稻^[18]、油松^[58]、银杏^[59] 实验中都发现具有此规律。高浓度 O_3 处理前期,银杏叶片 APX 活性显著高于对照($P < 0.05$),随着处理时间的延长,植株体内 APX 活性逐渐降低, O_3 处理后期 APX 活性显著低于对照。隋立华等^[29] 研究表明,在冬小麦拔节期,低浓度的 O_3 ($40 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$) 导致叶片 APX 活性显著提高,但是随着 O_3 浓度的不断升高,APX 活性呈现出降低的趋势。当 O_3 浓度为 $120 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,冬小麦叶片 APX 活性比对照降低 75.5%。但在冬小麦抽穗期, $80 \text{ nL}\cdot\text{L}^{-1}$ O_3 浓度

却导致冬小麦叶片 APX 活性比对照提高 104.5%。

2.5 抗坏血酸还原酶

抗坏血酸还原酶根据作用底物的不同,分为脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)和单脱氢抗坏血酸还原酶(MDAR)。与 APX 相对应,DHAR 和 MDAR 可将氧化态的 MDHA 和 DHA 转化成还原态的 AsA。DHAR、MDAR 作为 Halliwell—Asada 循环中重要的酶类,一般在 O₃ 胁迫初期,DHAR 和 MDAR 活性增强,生成 AsA 的量较多。随着 O₃ 胁迫时间的延长,DHAR 和 MDAR 的活性逐渐降低,还原能力不断下降,从而导致植物 AsA 含量减少^[59-60]。这是因为在 O₃ 胁迫初期,APX 以 AsA 为底物清除 H₂O₂ 的速率加快,生成了大量的 MDHA 和 DHA,同时 MDAR(以 MDHA 为反应底物)和 DHAR(以 DHA 为反应底物)活性被刺激提高,通过反应产生大量的 AsA,从而保证了植物体内 AsA 的含量维持在一定的水平,这与 Batestrasse^[60] 等的结果一致。但随着 O₃ 胁迫时间的延长,MDAR 和 DHAR 的还原能力下降,从而导致 AsA 的产生量显著减少。

3 问题与展望

植物在长期进化过程中形成了独特的抗氧化机制,但是植物忍耐 O₃ 胁迫的能力是有限的,当细胞中 O₂⁻ 与 H₂O₂ 等有害物质的累积超出其忍耐范围时,其保护体系功能就受到影响,膜脂过氧化程度加剧,酶活性降低,非酶物质含量减少,生理结构遭到破坏。但是植物应答环境胁迫是一个涉及多基因种类、多信号途径、多基因产物的复杂过程。这些基因及其表达产物包括 MAP 激酶、SOS 激酶、磷脂酶、转录因子以及一些与保护生物膜、清除自由基、水通道和离子通道相关的蛋白^[61]。植物受到 O₃ 污染等外界胁迫时,胁迫信号在植物细胞内通过不断传递激发转录因子的表达,转录因子与相应的顺式作用元件结合后,特异性地启动应答基因的转录表达,从而对内、外界信号做出调节反应。尽管国内外有关 O₃ 污染胁迫下植物的抗氧化调节机制研究开展得不少,但是许多问题仍需要加强研究:1)关于 O₃ 胁迫对植物抗氧化系统的影响方面,人们往往侧重于研究 O₃ 对 SOD、POD、CAT、APX 等常见酶活性以及 AsA、GSH 等非酶物质的影响,但是对一些能起抗氧化作用的物质如 DHAR、MDAR、GR、二甲基亚砷、苯甲酸、异丙醇、硫脲、多酚、单宁、黄酮类物质、脯氨酸、甜菜碱和甘露醇等的影响研究较少,因

此有必要加强这方面的工作;2)O₃ 浓度升高将导致植物非酶物质含量和酶活性发生变化,人们可以通过筛选出一些可靠的指示指标来监测大气 O₃ 的污染状况;3)O₃ 胁迫下植物抗氧化系统非酶促物质和酶促物质的变化不是单独发生的,它必然会引起植物体内其他物质代谢的变化以及能量的转化,研究 O₃ 浓度升高对植物能量转化、物质代谢和抗氧化系统物质变化的影响将对人们深入了解 O₃ 污染胁迫的机制非常有帮助;4)可结合筛选 O₃ 抗氧化剂的工作来阐明 O₃ 污染胁迫对植物抗氧化系统的影响机理;5)从分子水平上研究 O₃ 胁迫对植物抗氧化系统的影响将是一个新的研究方向,而这方面工作目前国内报道较少。

通讯作者简介:黄益宗(1970—),男,博士,副研究员,主要研究方向为农林生态环境保护,近年来在国内外核心期刊发表论文 120 多篇。

参考文献:

- [1] Bridgman H A. Global Air Pollution: Problems for the 1990s [M]. London: Belhaven Press, 1990: 33—44
 - [2] Puxbaum H, Gabler K, Smidt S, et al. A one-year record of ozone profiles in an Alpine valley (Zillertal/Tyrol, Austria, 600–2000 m a. s. l.) [J]. Atmospheric Environment. Part A. General Topics, 1991, 25(9): 1759–1765
 - [3] Fuhrer J, Skärby L, Ashmore M R. Critical levels for ozone effects on vegetation in Europe [J]. Environmental Pollution, 1997, 97(1–2): 91–106
 - [4] Vingarzan R. A review of surface ozone background levels and trends [J]. Atmospheric Environment, 2004, 38(21): 3431–3442
 - [5] Fiscus E L, Booker F L, Burkey K O. Crop responses to ozone: Uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning [J]. Plant, Cell & Environment, 2005, 28(8): 997–1011
 - [6] Sitch S, Cox P M, Collins W J, et al. Indirect radiative forcing of climate change through ozone effects on the land—carbon sink [J]. Nature, 2007, 448: 791–794
 - [7] Shao M, Tang X, Zhang Y, et al. City clusters in China: Air and surface water pollution [J]. Frontiers in Ecology and the Environment, 2006, 4(7): 353–361
 - [8] 张文方. 北京城区臭氧浓度变化规律及预测方法研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010: 24–37
- Zhang W F. Study on the variation and prediction method of ozone concentration in Beijing urban area [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2010: 24

- 37 (in Chinese)
- [9] Cho K, Tiwari S, Agrawal S B, et al. Tropospheric Ozone and Plants: Absorption, Responses, and Consequences [M]// Whitacre D M. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2011, 212: 61—111
- [10] Adams R M, Glycer J, Mccarl B. The NCLAN Economic Assessment: Approach, Findings and Implications [M]// Heck W W, Taylor O C, Tingey D T. Assessment of Crop Loss from Air Pollutants, 1988: 473—504
- [11] Holland M, Mills G, Hayes F. Economic Assessment of Crop Yield Losses from Ozone Exposure. Part of the UNECE International Cooperative Programme on Vegetation. Progress Report (April 2001 ~ March 2002) [R]. [S. l.]: Centre for Ecology and Hydrology, 2002
- [12] Feng Z, Jin M, Zhang F Z, et al. Effects of ground-level ozone (O_3) pollution on the yields of rice and winter wheat in the Yangtze River Delta [J]. Journal of Environmental Sciences, 2003, 15(3): 360—362
- [13] Hofer N, Alexou M, Heerdt C, et al. Seasonal differences and within-canopy variations of antioxidants in mature spruce (*Picea abies*) trees under elevated ozone in a free-air exposure system [J]. Environmental Pollution, 2008, 154(2): 241—253
- [14] 吴杏春, 林文雄, 郭玉春, 等. UV-B 辐射增强对水稻叶片抗氧化系统的影响 [J]. 福建农业学报, 2001, 16(3): 51—55
Wu X C, Lin W X, Guo Y C, et al. Effect of enhancing ultraviolet-B radiation on antioxidant systems in rice seedling leaves [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2001, 16(3): 51—55 (in Chinese)
- [15] Smirnoff N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants [J]. Annals of Botany, 1996, 78(6): 661—669
- [16] Miyake C, Asada K. Thylakoid-Bound ascorbate peroxidase in spinach-chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation-product monodehydroascorbate radicals in thylakoids [J]. Plant and Cell Physiology, 1992, 33(5): 541—553
- [17] Saito K. Formation of ascorbic acid and oxalic acid from glucosone in *Lemna minor* [J]. Phytochemistry, 1996, 41(1): 145—149
- [18] 张巍巍, 郑飞翔, 王效科, 等. 大气臭氧浓度升高对水稻叶片膜脂过氧化及保护酶活性的影响 [J]. 应用生态学报, 2008, 19(11): 2485—2489
Zhang W W, Zheng F X, Wang X K, et al. Effects of elevated ozone on rice (*Oryza sativa* L.) leaf lipid peroxidation and antioxidant system [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(11): 2485—2489 (in Chinese)
- [19] Mahalingam R, Jambunathan N, Gunjan S, et al. Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant, Cell & Environment, 2006, 29(7): 1357—1371
- [20] Burkey K, Eason G, Fiscus E. Factors that affect leaf extracellular ascorbic acid content and redox status [J]. Physiologia Plantarum, 2003, 117(1): 51—57
- [21] Conklin P, Barth C. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence [J]. Plant, Cell & Environment, 2004, 27(8): 959—970
- [22] Van Hove L, Bossen M, San Gabino B, et al. The ability of apoplastic ascorbate to protect poplar leaves against ambient ozone concentrations: A quantitative approach [J]. Environmental Pollution, 2001, 114(3): 371—382
- [23] 谢居清, 李国学, 王效科, 等. 外源抗坏血酸对臭氧胁迫下水稻光合及生长参数的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(6): 1176—1181
Xie J Q, Li G X, Wang X K, et al. Effect of exogenous ascorbic acid on photosynthesis and growth of rice under O_3 stress [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17(6): 1176—1181 (in Chinese)
- [24] Tanaka K, Suda Y, Kondo N, et al. O_3 Tolerance and the ascorbate-dependent H_2O_2 decomposing system in chloroplasts [J]. Plant and Cell Physiology, 1985, 26(7): 1425—1431
- [25] Price A H, Atherton N M, Hendry G A F. Plants under drought-stress generate activated oxygen [J]. Free Radical Research Communications, 1989, 8(1): 61—66
- [26] Luwe M W F, Takahama U, Heber U. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia-oleracea* L) leaves [J]. Plant Physiology, 1993, 101(3): 969—976
- [27] Castillo F J, Greppin H. Extracellular ascorbic-acid and enzyme-activities related to ascorbic-acid metabolism in *sedum album* L. leaves after ozone exposure [J]. Environmental and Experimental Botany, 1988, 28(3): 231—238
- [28] Tanaka K, Saji H, Kondo N. Immunological properties of spinach glutathione-reductase and inductive biosynthesis of the enzyme with ozone [J]. Plant and Cell Physiology, 1988, 29(4): 637—642
- [29] 隋立华, 黄益宗, 王玮, 等. O_3 浓度升高对不同生长期冬小麦叶片抗氧化系统的影响 [J]. 生态毒理学报, 2011, 6(5): 507—514
Sui L H, Huang Y Z, Wang W, et al. Effects of elevated ozone on antioxidant system of winter wheat leaf in varied growth stages [J]. Asian Journal of Ec-

- otoxicology, 2011, 6(5): 507—514 (in Chinese)
- [30] Maria Sgherri C, Loggini B, Puliga S, et al. Antioxidant system in *sporobolus stapfianus*: Changes in response to desiccation and rehydration [J]. *Phytochemistry*, 1994, 35(3): 561—565
- [31] Aravind P, Prasad M N V. Modulation of cadmium—induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate—glutathione cycle and glutathione metabolism [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43(2): 107—116
- [32] Dhindsa R S. Drought stress, enzymes of glutathione metabolism, oxidation injury, and protein synthesis in *Tortula ruralis* [J]. *Plant Physiology*, 1991, 95(2): 648—651
- [33] Wustman B, Oksanen E, Karnosky D, et al. Effects of elevated CO₂ and O₃ on aspen clones varying in O₃ sensitivity: Can CO₂ ameliorate the harmful effects of O₃ [J]. *Environmental Pollution*, 2001, 115(3): 473—481
- [34] Holopainen J, Kainulainen P. Growth and reproduction of aphids and levels of free amino acids in Scots pine and Norway spruce in an open—air fumigation with ozone [J]. *Global Change Biology*, 1997, 3(2): 139—147
- [35] 闫成仕. 水分胁迫下植物叶片抗氧化系统的响应研究进展[J]. *烟台师范学院学报: 自然科学版*, 2002, 18(3): 220—225
- Yan C S. Antioxidant responses to water stress in plant leaves [J]. *Yantai Normal University Journal: Natural Science Edition*, 2002, 18(3): 220—225 (in Chinese)
- [36] Asada K. The water—water cycle as alternative photon and electron sinks [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2000, 355(1402): 1419—1431
- [37] Hayakawa T, Kanematsu S, Asada K. Occurrence of Cu, Zn—superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach—chloroplasts [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1984, 25(6): 883—889
- [38] Donahue J L, Okpodu C M, Cramer C L, et al. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves (Relationships to resistance) [J]. *Plant Physiology*, 1997, 113(1): 249—257
- [39] Escuredo P, Minchin F, Gogorcena Y, et al. Involvement of activated oxygen in nitrate—induced senescence of pea root nodules [J]. *Plant Physiology*, 1996, 110(4): 1187—1195
- [40] 宋纯鹏. *植物衰老生物学* [M]. 北京: 北京大学出版社, 1998: 43
- Song S P. *Plant Biology of Senescence* [M]. Beijing: Beijing University Press, 1998: 43 (in Chinese)
- [41] Lee E, Bennett J. Superoxide dismutase: A possible protective enzyme against ozone injury in snap beans (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Plant Physiology*, 1982, 69(6): 1444—1449
- [42] 瓜谷郁三著. 谢国生, 李合生, 译. *植物逆境生物化学及分子生物学* [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 1—269
- Uritani I (Writer). Xie G S, Li H S (Translator). *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Stress* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 1—269 (in Chinese)
- [43] 孙加伟, 赵天宏, 付宇, 等. 臭氧浓度升高对玉米活性氧代谢及抗氧化酶活性的影响 [J]. *农业环境科学学报*, 2008, 28(5): 1929—1934
- Sun J W, Zhao T H, Fu Y, et al. Effects of elevated O₃ concentration on maize active oxygen species metabolism and antioxidative enzymes activities [J]. *Journal of Agro—Environment Science*, 2008, 28(5): 1929—1934 (in Chinese)
- [44] 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
- Zheng Q W, Wang X K, Feng Z Z, et al. Ozone effects on chlorophyll content and lipid peroxidation in the in situ leaves of winter wheat [J]. *Acta Botanica Boreali—Occidentalia Sinica*, 2005, 25(11): 2240—2244 (in Chinese)
- [45] 严重玲, 洪业汤, 付舜珍, 等. Cd、Pb胁迫对烟草叶片中活性氧清除系统的影响 [J]. *生态学报*, 1997, 17(5): 488—492
- Yan C G, Hong Y T, Fu S Z, et al. Effect of Cd, Pb stress on scavenging system of activated oxygen in leaves of tobacco [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1997, 17(5): 488—492 (in Chinese)
- [46] Bowler C, Montagu M V, Inz D. Superoxide—dismutase and stress tolerance [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1992, 43(1): 83—116
- [47] 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): 1—5
- Jin M H, Feng Z W, Zhang F Z. Effects of ozone on membrane lipid peroxidation and antioxidant system of rice leaves [J]. *Environmental Science*, 2000, 21(3): 1—5 (in Chinese)
- [48] Iriti M, Faoro F. Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals [J]. *Water Air Soil Pollution*, 2008, 187(1—4): 285—301
- [49] Sant'Anna S M R, Esposito M P, Domingos M, et al. Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for bio-monitoring ozone in São Paulo, SE-Brazil [J]. *Envi-*

- ronmental Pollution, 2008, 151(2): 389-394
- [50] Esposito M P, Ferreira M L, Sant'Anna S M R, et al. Relationship between leaf antioxidants and ozone injury in *Nicotiana tabacum* 'Bel-W3' under environmental conditions in São Paulo, SE-Brazil [J]. Atmospheric Environment, 2009, 43(3): 619-623
- [51] Singh E, Tiwari S, Agrawal M. Variability in antioxidant and metabolite levels, growth and yield of two soybean varieties: An assessment of anticipated yield losses under projected elevation of ozone [J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2010, 135(3): 168-177
- [52] 黄玉源, 黄益宗, 李秋霞, 等. 臭氧对南方3种木本植物的急性伤害症状及其生理指标变化[J]. 生态环境, 2006, 15(4): 674-681
Huang Y Y, Huang Y Z, Li Q X, et al. Physiological and foliar symptom response of *Pinus massoniana*, *Eucalyptus urophylla* and *Aglaia odorata* to ozone in southern China [J]. Ecology and Environment, 2006, 15(4): 674-681 (in Chinese)
- [53] Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, et al. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants [J]. The EMBO Journal, 1997, 16(16): 4806-4816
- [54] 全先庆, 高文. 盐生植物活性氧的酶促清除机制[J]. 安徽农业科学, 2003, 43(2): 320-322
Quan X Q, Gao W. Enzymatic mechanism of scavenging reactive oxygen species of euhalophytes [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2003, 43(2): 320-322 (in Chinese)
- [55] Sakaki T, Kondo N, Sugahara K. Breakdown of photosynthetic pigments and lipids in spinach leaves with ozone fumigation - role of active oxygens [J]. Physiologia Plantarum, 1983, 59(1): 28-34
- [56] Asada K. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants [J]. Physiologia Plantarum, 1992, 85(2): 235-241
- [57] Ishikawa T, Yoshimura K, Sakai K, et al. Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach [J]. Plant and Cell Physiology, 1998, 39(1): 23-34
- [58] 阮亚男, 何兴元, 陈玮, 等. 臭氧浓度升高对油松抗氧化系统活性的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(5): 1032-1037
Ruan Y N, He X Y, Chen W, et al. Effects of elevated O₃ concentration on anti-oxidative enzyme activities in *Pinus tabulaeformis* [J]. Chinese Journal Applied Ecology, 2009, 20(5): 1032-1037 (in Chinese)
- [59] 张巍巍. 臭氧浓度升高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: 21-34
Zhang W W. 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: 21-34 (in Chinese)
- [60] Balestrasse K B, Gardey L, Gallego S M, et al. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress [J]. Australian Journal of Plant Physiology, 2001, 28(6): 497-504
- [61] 李书粉, 孙富丛, 肖理慧, 等. 植物对非生物胁迫应答的转录因子及调控机制[J]. 西北植物学报, 2006, 26(6): 1295-1300
Li S F, Sun F C, Xiao L H, et al. Transcriptional factors and their regulation mechanisms in plant responses to abiotic stresses [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(6): 1295-1300 (in Chinese)

