分类号	密级	
UDC	编号	2008180128018

中国科学院研究生院

博士学位论文

<u>中国热带北缘一西双版纳三叶橡胶(Hevea brasiliensis)</u> 的水分关系、光合特征以及生理学保护机制

<u>陈军文</u>

指导教师 <u></u>	曹坤芳	研究员 博士					
中国科学院西双版纳热带植物园							
申请学位级别	理学博士	学科专业名称	生态学				
论文提交日期_2(008. 04. 23	论文答辩日期_2	008.06.05				
培养单位 一	中国科学		勿园				
学位授予单位	中国科	学院研究生院					

答辩委员会主席 陈善娜 教授

博士学位论文(生态学)

A dissertation submitted to Graduate School of Chinese Academy of Sciences for the degree of Ph.D. (Ecology)

<u>中国热带北缘一西双版纳三叶橡胶(Hevea brasiliensis)</u> <u>的水分关系、光合特征以及生理学保护机制</u>

<u>Water relations, photosynthetic performance and</u> <u>physiological protection in Hevea brasiliensis in the</u> <u>marginal tropical area, Xishuangbanna, SW China</u>

陈军文

Jun-Wen CHEN

导师: 曹坤芳 博士 研究员 Supervisor: Prof. Dr. Kun-Fang CAO

中国科学院西双版纳热带植物园 Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences

二零零八年六月 June, 2008

缩写

Abbreviations

- K_s, Sapwood area specific hydraulic conductivity, 边材导水率。
- *K*_L, Leaf area specific hydraulic conductivity, 叶导水率。
- *D*_{m-v}, Mean vessel diameter, 平均导管直径。
- ρ, Sapwood density, 边材密度。
- PLC, Percentage loss of hydraulic conductivity, 水分传导丧失百分率即栓塞化比率。
- *K*_{leaf}, Leaf hydraulic conductivity, 叶片水力导度。
- Ψ_{pd}, Predawn water potential, 凌晨水势。
- RWC, Relative water content, 相对含水量。
- Ψ_{P50}, Water potential at 50% loss of hydraulic conductivity, 失去 50%水分传导力的水势。
- Ψ_{P88}, Water potential at 88% loss of hydraulic conductivity, 失去 88%水分传导力的水势。
- Ψ_{P12}, Water potential at 12% loss of hydraulic conductivity, 失去 12%水分传导力的水势。
- Ψ_{tlp}, water potential at turgor loss point, 丧失膨压点的水势。
- Ψ_{RWC70%}, Water potential at which RWC is 70%, 相对含水量为 70%时的水势。
- Ttlp, Time of water loss when turgor loss point occurs, 失水到丧失膨压点所需的时间。
- T_{RWC70%}, Time of water loss when leaf RWC is 70%, 失水到相对含水量为 70%时所需的时间。
- PPFD, Photosynthetic photon flux density, 光合光量子通量密度。
- Amax, Maximum net photosynthetic rate at saturating light, 饱和光照下的最大净光合速率。
- g_{smax}, Maximum stomatal conductance, 最大气孔导度。
- WUE, Photosynthetic water use efficiency, 光合水分利用效率。
- *E*_{max}, Maximum transpiration rate, 最大蒸腾速率。
- Chl, Chlorophyll, 叶绿素。
- Chla, Chlorophyll a, 叶绿素 a。
- Chlb, Chlorophyll b, 叶绿素 b。
- Car, Carotenoids, 类胡萝卜素。
- PSII, Photosystem II, 光系统 II。
- F₀, Minimum fluorescence of PSII, 光系统 II 初始荧光。
- F_m, Maximum fluorescence of PSII, 光系统 II 最大荧光。

缩写(续)

Abbreviations (continued)

- F_v/F_m, Maximum photochemical efficiency of PSII, 光系统 II 最大光化学效率。
- $\Delta F/F_{\rm m}$, Actual photochemical efficiency of PSII, 光系统 II 实际光化学效率。
- NPQ, Non-photochemical quenching of PSII, 光系统 II 非化学淬灭。
- SOD, Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1), 超氧化物歧化酶。
- CAT, Catalase (EC 1.11.1.6), 过氧化氢酶。
- POD, Guaiacol peroxidese (EC 1.11.1.7), 过氧化物酶。
- APX, Ascorbate peroxidese (EC 1.11.1.11), 抗坏血酸过氧化物酶。
- GR, Glutathione reducetase (EC 1.6.4.2), 谷胱甘肽还原酶。
- AsA, Reduced ascorbate, 还原型抗坏血酸。
- DHA, Oxidized ascorbate, 氧化型抗坏血酸。
- GSH, Reduced glutathione, 还原型谷胱甘肽。
- GSSG, Oxidized glutathione, 氧化型谷胱甘肽。
- H₂O₂, Hydrogen peroxide, 过氧化氢。
- ·OH, Hydroxyl radicals, 羟氢氧基。
- ¹O₂, Singlet oxygen, 单线态氧。
- ROS, Reactive oxygen species, 活性氧化物。
- MDA, Malondialdehyde, 丙二醛。
- ML, Mature leaf, 成熟叶。
- SL, Senescent leaf, 衰老叶。
- JA, Jasmine acid, 茉莉酸。

目 录

摘到	要	I
Ab	ostract	III
第−	一章 绪论	1
第_	二章 三叶橡胶与五种大戟科植物水力结构和光合特征的比较一常绿与落叶树种	的差异…7
2.1] 引言	7
2.2	2 实验材料与方法	9
2.3	3 实验结果	12
2.4	1 讨论	18
2.5	5 小结	20
第三	三章 三叶橡胶和核实木两种大戟科植物的水分关系和光合特征在雨季和旱季的	变化…23
3.1] 引言	23
3.2	2 实验材料与方法	25
3.3	3 实验结果	27
3.4	1 讨论	
3.5	5 小结	34
第	四章 三叶橡胶光合特征、水分关系以及抗氧化系统对干旱处理和随后复水的响应	<u>v</u> 35
4.1	引言	
4.2	2 实验材料与方法	
4.3	3 实验结果	42
4.4	1 讨论	49
4.5	5 小结	55
第三	五章 三叶橡胶对夜间低温的适应性	57
5.1] 引言	57
5.2	2 实验材料与方法	59
5.3	3 实验结果	61
5.4	↓ 讨论	68
5.5	5 小结	72
第7	六章 一种新的抗氧化物一单萜类化合物在三叶橡胶叶片中的抗氧化特性	73
6.1	」引言	73

6.3	实验结果77
6.4	讨论82
6.5	小结84
第十	□章 光系统 II 光化学效率、抗氧化系统以及单萜类化合物在三叶橡胶季节性衰老过程中
	的变化特征
7.1	引言85
7.2	实验材料与方法
7.3	实验结果89
7.4	讨论94
7.5	小结97
第/	【章 三叶橡胶对外源性茉莉酸诱导的衰老的响应······99
8.1	引言
8.2	实验材料与方法101
8.3	实验结果
8.4	讨论108
8.5	小结111
第ナ	113 结论
参考	与文献117
在攻	文读博士学位期间发表论文情况
致说	137

中国热带北缘一西双版纳三叶橡胶(Hevea brasiliensis)的水分关系、光

合特征以及生理学保护机制

摘要

三叶橡胶(Hevea brasiliensis)属于大戟科常绿植物,起源于南美洲亚马逊河流 域,是一种重要的热带经济植物。在经济利益的驱动下,三叶橡胶在中国热带的 北缘一西双版纳得到了广泛的栽培。由于环境因素的变化,在引种地三叶橡胶的 生理生态习性也相应地发生了一系列的变化。例如,在西双版纳地区,三叶橡胶 从常绿植物变成了落叶植物。本论文研究与分析了三叶橡胶水分关系和光合作用 特征以及生理学保护机制对环境的响应,研究结果发现:

(1) 三叶橡胶木质部导管直径较大,水分传导效率较高;但导管水分传导对水势的降低较敏感,导管失去50%水分传导能力的水势为-1.27 MPa。三叶橡胶的最大净光合速率(A_{max})和气孔导度(g_{smax})较高;不过,光合的水分利用效率较低。 三叶橡胶的这些水力结构和光合特征与同属于大戟科的落叶树种一中平树和重阳木相似,而与同属于大戟科的常绿树种核实木、变叶木以及石栗显著的不同。

(2) 与常绿树种核实木相比,三叶橡胶叶片水力导度(K_{leaf})对水势的降低较敏感;叶片失去细胞膨压和失水到相对含水量为 70%的生理危险值较容易,叶片相对含水量为 70%时的水势也比较高(-3.0 MPa)。这样在干季叶片脱落的原因可能是,导管栓塞化(PLC)增加,水分传导能力下降,叶片得不到及时的水分补充。

(3) 三叶橡胶对土壤水分的亏缺比较敏感。当土壤含水量为田间最大持水量的 45%左右时,g_{smax}和 A_{max}迅速地下降,非化学淬灭(NPQ)值增加;当土壤含水量为 35%左右时,光系统 II(PSII)遭受不可逆的损伤, NPQ 散热能力下降。当土壤含水量小于 35%时,g_{smax}下降到 100 mmol m⁻² s⁻¹以下;此时,抗氧化酶活性迅速升高,而抗坏血酸一谷胱甘肽循环在干旱和复水阶段都比较活跃。在 g_{smax}下降的同时,木质部导管 PLC 增加,而 K_{leaf}下降;气孔的关闭有利于避免导管进一步的栓塞化。水分短缺使导管抗栓塞化的能力得到了加强,并使 K_{leaf}对水势的响应变得迟缓。当土壤含水量接近 30%时,复水之后,A_{max}和 PSII 光化学效率不能完全恢复到对照的水平,而 NPQ 值维持在与对照相同的水平,这样在复

I

水之后,三叶橡胶依然维持抗氧化系统较高的活力可能有助于减轻氧化胁迫的压力。即使三叶橡胶遭受严重的水分短缺,水力结构特征受到的伤害在复水之后都 能迅速地恢复,水力结构特征并不是遭受水分胁迫的三叶橡胶复水后,其恢复正 常生理功能的限制性因素。

(4) 三叶橡胶对夜间低温异常敏感,5 ℃夜间低温处理 12 h 后, A_{max} 大约降低 50%, g_{smax} 下降到 50 mmol m⁻² s⁻¹ 左右,并且随着处理时间的延长,两者的值越来越低。光合作用下降主要原因是夜间低温处理导致了 PSII 的失活和破坏。此外,夜间低温使三叶橡胶的抗氧化保护系统不能有效地保护其免受氧化胁迫的伤害,因此,可溶性蛋白以及叶绿素(Chl)和类胡萝卜素(Car)降解。另一方面,虽然 NPQ 和 Car/Chl 的增加以及 Chl a/b 的下降在一定程度上起着光保护的作用,但并不能阻止过氧化氢和丙二醛含量的增加和避免叶片的衰老。

(5) 三叶橡胶叶片中的内源性单萜类化合物扮演着重要的抗氧化生理功能, 在一定程度上能保护在高温和高光照条件下的叶片维持正常的光化学效率;单萜 类化合物抗氧化功能的缺失,将使抗氧化系统中其它成分对过氧化氢的响应更迅 速和有效,这可能有利于弥补前者抗氧化功能的缺失。

(6) 与成熟叶相比,三叶橡胶衰老叶能通过更进一步地激活抗氧化酶促系统中的过氧化物酶和抗坏血酸过氧化物酶的活性,加强抗坏血酸—谷胱甘肽循环来抵抗氧化胁迫,虽然这并不能阻止三叶橡胶最终的落叶,但可能有利于延迟叶片的衰老;在衰老叶片中,由于光合作用能力下降,单萜类化合物的合成受到限制,此时,类胡萝卜素在光保护和抗氧化过程中扮演更加相对重要的作用。

(7) 喷施茉莉酸后,三叶橡胶的 A_{max} 和 g_{smax} 逐渐下降,并且 g_{smax} 对茉莉酸 的处理相当敏感; 茉莉酸能诱导与叶片衰老特征相似的变化,即 Chl、Car 和蛋 白质降解以及过氧化氢和丙二醛积累; 喷施茉莉酸后,超氧化物歧化酶、过氧化 氢酶、过氧化物酶活性升高,抗坏血酸一谷胱甘肽循环途径加强; 在茉莉酸诱导 光合作用能力下降到一定程度之前,茉莉酸能诱导单萜类化合物的生化合成增 加,这也说明单萜类化合物生化合成和抗氧化功能的光合作用依赖性。

关键词:光合作用;水力导度;抗氧化;干旱;低温。

II

Water relations, photosynthetic performance and physiological protection in *Hevea brasiliensis* in the marginal tropical area, Xishuangbanna, SW China

Jun-Wen CHEN (Ecology)

Directed by Prof. Dr. Kun-Fang CAO

Abstract: Hevea brasiliensis is widely cultivated in tropical areas for economical purpose, including the marginal tropical areas of China. It is an evergreen tree species (Euphorbiaceae) in its native habitats of South America, but, interestingly, deciduous in the marginal tropical areas, Xishuangbanna, SW China. Up to date, the reasons for the change in leaf-habit of *H. brasiliensis* in the marginal tropical areas of China are not well known. In the present study, water relations, photosynthetic performance and physiological protection were examined in *H. brasiliensis* in relation to low temperature and drought. The results were as follows:

(1) A wider vessel diameter of xylem and higher hydraulic conductivity were observed in *H. brasiliensis*. However, the hydraulic conductivity was more vulnerable to water stress-induced embolisms, and water potential at 50% loss of hydraulic conductivity occurs was -1.27 MPa. On the other hand, *H. brasiliensis* displayed higher maximum photosynthetic rate (A_{max}) and stomatal conductance (g_{smax}) and, lower photosynthetic water use efficiency (*WUE*). These hydraulic and photosynthetic traits observed in *H. brasiliensis* are similar to those observed in two deciduous Euphorbiaceae tree species of

Macaranga denticulate and *Bischofia javantica*, and significantly differed from those observed in three evergreen Euphorbiaceae tree species of *Drypetes indica*, *Aleurites moluccana* and *Codiaeum variegateum*.

(2) Compared with the evergreen tree species of *D. indica*, leaf hydraulic conductivity (K_{leaf}) of *H. brasiliensis* was more susceptible to the decline in leaf water potential. Leaf of H. brasiliensis readily lost turgor point and, during the periods of leaf water loss, its leaf relative water content (RWC) rapidly attained the value of 70%, which indicate the irreversible damage of photosynthetic apparatus, and the water potential for RWC of 70% was -3.0 MPa. These results indicate that the reasons for the shedding of leaves of *H. brasiliensis* during dry season may be the embolisms-induced decline in hydraulic conductivity and the consequent decease in water supply to leaves.

(3) Saplings of *H. brasiliensis* were very sensitive to soil water shortage. When soil water content (SWC) was about 45% of field capacity, A_{max} and g_{smax} sharply declined, and non-photochemical quenching (NPQ) gradually increased; SWC being about 35% of field capacity, photosystem II (PSII) was irreversibly damaged, and NPQ was elevated. SWC being below 30% of field capacity, g_{smax} declined to 100 mmol m⁻² s⁻¹, and the activities of antioxidant enzyme were enhanced, however, the ascorbate - glutathione cycle was still active during the periods of drought and rewatering. The decline in g_{smax} was accompanied with the increment in embolisms and the drop of K_{leaf} , and the closure of stomatal allow plants to prevent more embolisms. Water shortage enhanced the resistance of xylem vessel to cavitations, and caused K_{leaf} to be insensitive to leaf water potential. When SWC approached 30% of field capacity, A_{max} and photochemical efficiency of PSII of the water-stressed plants upon rewatering could not recover the values of control plants, and however, NPQ did not display significant difference between previously water-stressed plants and control plants. Accordingly, the maintained higher

IV

activities of antioxidant system may help previously water-stressed plants minimize the damage of photosynthetic apparatus. Even if the saplings of *H. brasiliensis* suffered from severe drought, hydraulic performance of water-stressed plants upon rewatering cloud completely restored to the levels of control plants, indicating that hydraulic traits is not factor to be limit the recovery of physiological function in water-stressed plants upon rewatering.

(4) The saplings of *H. brasiliensis* were very susceptible to night chilling. After the saplings were treated with 5 °C night temperature for 12 h, A_{max} of night chilling-treated plants decreased to 50% of control plants, and the value of g_{smax} dropped to 50 mmol m⁻² s⁻¹. The decline in photosynthesis might result from the night chilling-induced inactivation or damage of PSII. In addition, night chilling-treated plants from photodamage. Therefore, the loss of soluble protein, chlorophyll (Chl) and carotenoid (Car) were observed in night chilling-treated plants. The elevated *NPQ* and Car/Chl as well as the decreased Chl a/b, at least in part, photosynthetically protected PSII from damage, but it could yet not prevent the accumulations of hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA), and accordingly it never avoid the shedding of leaves.

(5) Monoterpene in leaves of *H. brasiliensis* plays an important role in antioxidant function, and may maintain the photochemical efficiency of PSII when the leaves being subjected to high temperature and light. Furthermore, the absence of monoterpene antioxidant leaded to the enhanced activities of other components of antioxidant system, the elevated activities of the latter might compensate for the absence of monoterpene antioxidant.

(6) Compared with mature leaves of *H. brasiliensis*, senescent leaves might activate guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase and enhance the

V

ascorbate-glutathione cycle to resist oxidative stress, this could not prevent the shedding of leaves, but it possibly postpone senescing process. In addition, due to the decline in photosynthesis in senescent leaves, monoterpene biosynthesis was suppressed, but carotenoids may in turn confer further photoprotection at this stage.

(7) After Jasmonic acid (JA) were sprayed on leaves of *H. brasiliensis*, A_{max} and g_{smax} gradually declined, and g_{smax} was very sensitive to JA. On the other hand, JA might induce the loss of soluble protein, ChI and Car, and the accumulations of H_2O_2 and MDA. JA enhanced the activities of superoxide dismutase, catalase and guaiacol peroxidease and activated ascorbate – glutathione cycle. Before JA induced the considerable decrease in A_{max} , it might enhance biosynthesis of monoterpene, indicating that monoterpene biosynthesis and antioxidant are photosynthesis dependent.

Keywords: Photosynthesis, hydraulic conductivity, antioxidant, drought, low temperature.

第一章 绪 论

1 三叶橡胶树生态环境和生态习性

三叶橡胶(Hevea brasiliensis)属于大戟科常绿木本植物,是重要的热带经济 植物,其韧皮部流出的乳胶汁,是制造业的重要原料。它原产于南美洲北纬 5° 至南纬 15°,西经 48°至 78°之间的亚马逊河流域(Wycherley, 1992)。亚马逊河流 域分布着广阔的热带雨林,植物种类繁多,无数的乔木、灌木以及草木、藤本、 附生植物组成了多层次的郁闭热带雨林,橡胶树就混杂其中。目前,橡胶树主 要种植的国家包括南美洲的巴西和巴拿马和亚洲的泰国、印尼、马来西亚、中 国、印度、斯里兰卡以及非洲的尼日利亚。我国是 1904 年开始引种巴西橡胶树; 目前,云南、广东、广西三省的南部以及海南省和台湾省等在海拔 500 m 以下 的避风地带均有栽培(Feng, 2007)。

1.1 三叶橡胶树原产地气候特征

橡胶树的原产地位于赤道附近,太阳辐射强烈,全年温度高,年较差小。 在亚马逊河流域中下游地区,年平均气温 25-27 ℃,全年最冷月平均气温 24-26 ℃,最热月平均气温 25.3-27.9 ℃。年较差不到 3 ℃,极端最高气温 39 ℃,极 端最低气温 16.0 ℃,日较差 7.0-10.6 ℃,明显大于年较差。总的来看,橡胶树 原产地的温度高而稳定。另一方面,橡胶树原产地的降雨量充沛,雨日多,旱 季短。全年降雨量 1900-2900 mm,雨量充沛且分布较均匀,月降雨量除 7-9 月少于 100 mm 外,其它月份均在 100 mm 或 200 mm 以上。7-9 月间,有 1-3 个月少雨期,月降雨量在 100 mm 或 50 mm 以下;而由于此时的平均气温多在 25-26 ℃,蒸发旺盛,形成一个短期的旱季。年雨日在 170-253 日之间波动, 月雨日最多为 28 日,最少为 6 日,旱季期间月雨日少于 10 日。终年潮湿,大 多数月份相对湿度在 80%以上。此外,橡胶树原产地日照适中,年日照数在 1966-2513 小时之间。亚马逊河流域西部日照较少,在 2000 小时以下;向东逐 新增加,亚马逊河口处达 2400 小时以上;一般 1-3 月份云量多,降水也多,日 照时数少; 7-9 月份云量少,日照时数高。

- 1 -

1.2 三叶橡胶树的生态习性

橡胶树在亚马逊河流域的生态环境中长期生长,并适应了那里的生长环境 条件,因而表现出下列基本生态习性(Feng, 2007): (1)要求温度较高、降水充 沛且分布均匀以及微风的气候环境; (2)土壤条件为热带雨林下的红壤或砖红 壤,土壤酸碱度为 pH 3.8-7.0,土壤有机质较多、疏松、肥沃; (3)幼苗较耐荫, 橡胶树的幼苗在郁闭的林下发芽生长因而具有一定的耐荫性,但幼树的生长需 要较强的阳光并最终生长成为热带雨林的上层乔木; (4)根系较浅,在热带雨林 中,土壤湿度经常较高,土壤下层通气不良,而表层土壤由于枯枝落叶的积累 与分解,显得疏松、通气、肥沃以及湿润,橡胶树在这种环境下发育成了浅根 性植物; (5)茎脆而易断,热带雨林生境优越,橡胶树生长迅速,木材密度低, 机械组织不发达,材质疏松,加上树干高,树冠大而重,易被风折断; (6) 具 有较强的生态适应性,除在高温多湿的地区生长茂盛外,在距赤道远些的较干 旱地区也能生长。

2 不同外界环境因素对三叶橡胶树的影响

2.1 温度

温度直接影响到橡胶的生长、发育、产胶以至存亡等等,因此是限制橡胶 树地理分布的主要因素(Feng, 2007)。在原产地或纬度较低的植胶国家,温度条 件均较优越,特别是没有低温的出现;而在我国植胶区,由于纬度较高(北纬 18°-21°),冬季风强烈,每年都有不同程度的低温伤害。不同程度的低温对橡 胶树生长发育有不同的影响(Lin & Yang, 1994):(1)橡胶树生长发育的温度指标 以平均气温计量,10℃时细胞可进行有丝分裂,15℃为组织分化的临界温度, 18℃为正常生长的临界温度,20-30℃适宜生长和产胶,其中26-27℃时橡胶 树生长最旺盛;(2)橡胶树光合作用的温度指标以实际温度计量,小于10℃时 对苗木的新陈代谢产生有害影响,10℃以下时橡胶树光合作用停止,25-30℃ 为光合作用最适温度,当大于40℃时橡胶树的呼吸作用超过光合作用从而生长 受到抑制;(3)当林间气温小于5℃时,橡胶树便会出现不同程度的寒害;当 低于-2℃时,橡胶树出现严重寒害。综合以上温度指标表明,橡胶树速生、高 产以及光合作用适宜的温度范围为 18-28 ℃。

2.2 水分

橡胶树生长和产胶的降水指标以年降雨量在 1500 mm 以上为宜。年降雨量 在 1500–2000 mm 之间,相对湿度在 80%以上,年降雨日大于 150 天,最适宜 于橡胶树的生长和产胶。如以月降雨量衡量水分条件,一般认为月降雨量大于 100 mm,月雨日大于 10 天适宜橡胶树生长;而月降雨量大于 150 mm 最适宜橡 胶树生长;橡胶树在遇到干旱时,会落花、落果或甚至被迫落叶(Feng, 2007)。

2.3 光照

橡胶树是一种耐荫性植物,但是在全光照下也生长良好(Senevirathna *et al.*, 2003)。虽然橡胶树幼苗即使在 50%-80%的荫蔽度情况下也能正常生长,但随着树龄增长而逐渐要求更多的日光。适宜的光照条件有利于增强橡胶树的抗逆性,以抗寒来讲,充足的光照有利于橡胶树进行糖的代谢和养分的积累,促进细胞木栓化,从而抗寒能力较强;光照不足时,植株机械组织发育不全,细胞壁较薄,木质化程度较差,因而抗寒能力较差(Lin & Yang, 1994)。

3 三叶橡胶树引种地西双版纳地区气候特征

西双版纳 (20°08′-22°36′ N, 99°56′-101°50′ E) 位于云南西南部,地处亚洲热 带北缘,海拔550-2429.5 m。终年受西南季风影响,一年分为明显的三个季节, 3-4月为干热季,气温回升,降雨较少; 5-10月为湿热季,气温全年最高,降雨 比较多;每年11月至次年2月为雾凉季,气温全年最低,降雨较少。年平均气温 为21.8 ℃,最热6月气温为25.7 ℃,最冷月1月气温为16.0 ℃;年最高气温为29.8 ℃,年极端最高气温为40.5℃;年最低气温为17.9 ℃,年极端最低气温为2.0 ℃; Σ≥10 ℃ 积温为7959 ℃,Σ≥18 ℃积温为6638 ℃;年均降雨1560 mm,但降雨 分布不均,其中85%集中在雨季(5-10月);年日照时数1858.7小时;土壤属于砖 红壤。在本地区,海拔1000 m以下都有橡胶树栽培,并能够正常生长。但是,在 冬季发生严重冷害的年份,橡胶树有可能发生寒害,树干冻裂。本论文实验研究 地点—云南省西双版纳州勐腊县勐仑镇(21°41′ N, 101°25′ E)的部分气象特征如图1.1所示。



图 1.1 实验地点的部分气象数据。方条形柱代表月降水,实心圆代表月均温(数据来源于中国科学院 西双版纳热带植物园勐仑气象站)。

Fig. 1.1 The monthly rainfall (*bars*) and mean monthly temperature (*closed circles*) in the experimental site, recorded by the Menglun Meteorological Station of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences.

4 本论文的科学假设以及研究的内容和目的

叶片是植物进行光合作用的重要器官,环境因子影响叶片的面积和数量以 及叶片的习性。例如,三叶橡胶在典型的热带高温高湿地区一巴西亚马逊河流 域、马来西亚、印度尼西亚是常绿植物,而引种到云南西双版纳后,在海拔 600 米左右的地区栽培,如果冬季低温少雨,三月初就会发生大量落叶,变成了落 叶树种;如果当年冬季是暖冬,又加上二三月份有一定量的降雨或人工灌溉, 这时的橡胶树依然保持了它原有的常绿树种的本色,不见有明显的落叶;随着 海拔的上升,由于冬季温度的降低,橡胶树就会提前到十二月或一月开始落叶, 变成了典型的落叶树种(Feng, 2007)。从上述的报道可以知道,在起源地是常绿 植物的三叶橡胶引种到西双版纳地区后,它的叶片习性发生改变的原因可能与 西双版纳地区季节性干旱和低温有关系。遗憾的是,上述研究只是观察到了干 旱和低温诱导三叶橡胶落叶的现象,但并不知道产生这种现象的具体生理原因。 另一方面,虽然有少量的研究报道了三叶橡胶的光合特性(Senevirthna *et al.*, 2003),但对其生理性保护机制的研究还相当少;甚至,到目前为止,还没有关于三叶橡胶水分关系特征的研究报道。然而,对植物的水分关系和光合特征以及生理学保护机制进行研究能帮助我们很好地理解植物对环境的适应性。

因此,本论文提出了四点科学假说:(1) 在引种地西双版纳三叶橡胶叶片生态习性的改变可能与其枝条和叶片的水力结构特征有关;(2) 三叶橡胶的水力结构特征将决定其光合特征,并且三叶橡胶的水力结构特征和光合特征可能与落叶树种更加相似;(3) 版纳地区季节性干旱和低温可能是导致三叶橡胶叶片生态习性发生改变的主要原因;(4) 三叶橡胶落叶可能与其生理学保护机制(光保护和抗氧化保护)失调有关。

植物叶片对环境变化的"感知"是相当灵敏的。如图 1.2 所示,干旱和低温 以及化学制品(例如,茉莉酸)对植物的影响都可以通过叶片生理生态指标的变 化灵敏地反应出来。例如,土壤水分亏缺将立即导致植物木质部导管栓塞化和 水分传导效率下降,结果叶片水力导度下降,并直接诱导叶片气孔关闭;气孔 关闭后,光合速率将下降,结果产生光抑制甚至光氧化损伤;在这个时候,植 物不得不启动生理学保护机制来减轻甚至消除光氧化伤害;如果生理性保护机 制不能充分有效地发挥作用,叶片将会受到不可恢复的伤害,结果叶片将发生 衰老和脱落。

本论文研究了三叶橡胶水分关系和光合特征以及生理学保护机制对环境的 响应,研究的内容和目的主要包括以下几个方面。

1 三叶橡胶与五种大戟科植物水力结构和叶片光合特征的比较;研究目的
是,分析三叶橡胶木质部水力结构和叶片光合特征与同属于大戟科的常绿和落
叶树种的异同,初步了解三叶橡胶叶片光合特征和木质部水力结构特征。

2 三叶橡胶与大戟科常绿树种核实木水分关系和光合特征在雨季和旱季的 差异;研究目的是,分析两种植物叶片水分关系的差异,探讨两种植物水分传 导特征的季节性变化的差异;初步分析上述两种差异对三叶橡胶叶片在干季的 脱落而核实木的叶片却能维持正常光合作用可能产生的影响。 3 三叶橡胶水分关系、光合特征以及抗氧化系统对干旱和随后复水的响应; 研究目的是,探讨三叶橡胶对水分短缺的适应性;分析干旱复水之后,三叶橡 胶生理功能恢复的限制性因素;分析在干旱和复水过程中三叶橡胶光保护和抗 氧化保护机制的响应;分析渗透调节对增强三叶橡胶抗旱性可能的作用。

4 三叶橡胶光合特征和抗氧化系统对夜间低温的响应;研究目的是,分析 三叶橡胶对夜间低温的敏感性;探讨夜间低温处理对三叶橡胶的光保护机制以 及抗氧化保护机制的影响。



图 1.2 植物对外界不利环境因子的响应。

Fig. 1.2 Responses of plants to stressed environmental variables.

5 单萜类化合物对三叶橡胶的抗氧化保护作用;研究目的是,近一步确认 单萜类化合物在三叶橡胶叶片中可能扮演的抗氧化的生理功能。

6 三叶橡胶季节性落叶过程中抗氧化系统、光系统 Ⅱ 光化学效率以及单萜 类化合物的变化;研究目的是,分析氧化胁迫对三叶橡胶季节性落叶可能产生 的影响。

7 外源性茉莉酸诱导的三叶橡胶叶片衰老过程中抗氧化系统、光合特征以 及单萜类化合物的变化;研究目的是,探讨三叶橡胶的光合作用、抗氧化系统 以及单萜类化合物对外源性茉莉酸诱导的衰老的响应机制,分析生理性保护机 制对茉莉酸诱导的衰老和季节性干旱和低温诱导的衰老的响应有何异同。

注: 三叶橡胶原产地气候特征数据引自<u>http://en.wikipedia.org/wiki/Amazon-Rainforest;</u> 三叶橡胶引种地西 双版纳的气候特征数据由中国科学院西双版纳热带植物园勐仑气象站提供。

第二章 三叶橡胶与五种大戟科植物水力结构和光合特征的比较—常 绿与落叶树种的差异

2.1 引言

高等植物拥有发达的维管系统,能够把土壤中的水高效地运输到叶片,从而 维持叶片的正常的水分供应。因此,人们普遍地认为植物维管系统的水分运输能 力决定了叶片的水分供应状况,并且影响植物叶片的光合和蒸腾速率。然而,木 质部导管的水分运输并不总是有效的,因为水力通路(hydraulic pathway)对导管空 穴化(Cavitations)是相当敏感的。空穴化是气泡进入木质部导管后,从而产生栓 塞化的过程(Choat *et al.*, 2003)。因为气泡不能传导水压,结果影响了水分在木质 部导管中的流动与运输(Meinzer *et al.*, 2001)。一旦栓塞化形成之后,导管传导水 分的能力下降,结果木质部导管的水分运输效率将不可避免地下降。另一方面, 导管水力导度(hydraulic conductivity)的下降将限制植物的光合作用和生长速率, 因为植物的光合作用和生长速率受限于水分的有效供应(Brodribb & Field, 2000; Hubbard *et al.*, 2001)。

据报道,落叶树种往往木材密度较低,木质部导管孔径较大,并具有较高的 水分运输效率(Gartner *et al.*, 1990; Sobrado, 1993; Sobrado, 1997; Choat *et al.*, 2005),不过,这并不意味着常绿树种的水分运输效率总是很低(Brodribb *et al.*, 2003)。另一方面,有研究报道证实落叶树种水力导度对水分胁迫引起的栓塞化 比常绿树种要敏感(Choat *et al.*, 2003)。不过也有研究证实木质部导管抵抗栓塞化 的能力与叶片习性无关(Brodribb *et al.*, 2003; Choat *et al.*, 2007)。因此,人们普遍 地认为木质部导管对栓塞化的脆弱性受其结构特征的影响(Hacke *et al.*, 2001; Domec & Gartner, 2002)。落叶树种和常绿树种不同的水力结构(hydraulic architecture)特征使它们采用不同策略来适应相同的环境。例如,热带落叶树在干 季将脱落部分或全部的叶片以适应干旱的环境,而伴生的常绿树种不得不保持足 够的水分运输以避免叶片由于干旱而受到永久的伤害(Holbrook *et al.*, 1995)。 有趣的是,有研究证明植物水力导度与光合作用有功能上的协调性 (Brodribb & Field, 2000; Meinzer, 2002)。而且,植物的光合特征与植物许多整体 组织结构特征相关,而这些组织结构特征又可以用水力结构特征来衡量(Santiago *et al.*, 2004)。因此,这样可以推测植物的光合作用强烈地受限于植物的水力导度, 因为水力导度状况决定叶片的水分供应状况。更确切地说,应该是木质部的结构 特征有影响叶片水分状况的潜力,从而限制植物光合速率和生长状况(Sperry & Saliendra, 1994; Brodribb & Field, 2000; Santiago *et al.*, 2004)。当然,应该强调的 是,在大多数的维管植物中光合作用是一个独立的碳吸收过程,水力导度状况的 变化只是在时间尺度上影响光合速度。因此,人们认为水力导度直接调控叶片的 气孔导度,而非光合速度。

本研究分析了三种落叶树种三叶橡胶(Hevea brasiliensis)、中平树(Mscaranga denticulata)、重阳木(Bischofia javantica)以及三种常绿树种核实木(Drypetes indica)、石栗(Alearites moluclana)、变叶木(Codiaeum Variegatum)水力结构特征 和光合特征。这六种树种都属于大戟科植物,因此实验的结果可以在一定程度上 消除植物系统发育史差异的影响。通过比较,了解三叶橡胶木质部输导组织水分运输效率和抗干旱的能力。本研究有三个假设,一是植物的水分运输效率性与安 全性在功能上存在着协调统一的关系,即落叶树种与常绿树种相比,水分运输效 率较高,但对水分胁迫引起的栓塞化更敏感;二是常绿树种与落叶树种这种水力 结构特征的差异更多地依赖于木质部结构而不是叶片物候的不同;三是落叶树种

- 8 -

2.2 实验材料与方法

2.2.1 实验地点

实验在中国科学院西双版纳热带植物园(21°41′N, 101°25′E, 570 m a.s.l.)进行。这里的气候特征是,年均温为 21.7℃,年降雨量为 1560 mm。且干湿季节明显,5月到 10月为雨季,雨季降雨量占全年降雨量的 85%以上,11月至次年的4月为干季。本研究的所有测定都在雨季的 7-8月完成。

2.2.2 实验材料

本研究选取三种落叶树种三叶橡胶(H. brasiliensis)、中平树(M. denticulata)、 重阳木(B. javantica)和三种常绿树种核实木(D. indica)、石栗(A. moluccana)、变叶 木(C. variegateum)作为实验材料。三叶橡胶在起源地南美洲亚马逊河流域,属于 常绿植物,而在引种地西双版纳地区叶片习性发生了改变,在每年的二月底至三 月初,它的叶片会全部地脱落,而新叶将在两周后开始萌发,中平树和重阳木植 物属于本地的落叶树种。相对应地,核实木、石栗、变叶木植物属于常绿树种。 实验所选用的变叶木树高在 2-3 m, 胸径 3-4 cm。其它树种的高度在 5-7 m, 胸 径在 15-20 cm。选取 3-5 颗植株作为取样的对象,并且,这些取样的树种光照 条件都较好。

2.2.3 枝条的脆弱曲线

导管水分传导丧失百分率即栓塞化比率的测定在雨季的 7-8 月间进行。测定 过程参考 Sperry et al. (1988)提供的方法。在凌晨剪取每个树种 7-9 根长而分枝 较少的枝条,然后将枝条放入有湿毛巾的黑色塑料袋内密封,防止枝条进一步失 水。到达实验室后,把枝条取出,使枝条在不同时间内自然失水(0 分钟到几天不 等),从而降低到不同的水势,然后将枝条密封在有湿毛巾的黑色塑料袋内 1-2 个小时,枝条的各个部分水势达到平衡后,选取 3-5 根带有叶片的小枝,用压力 室法测定其水势并计算其平均值,在本研究中,把此时测定的水势默认为枝条木 质部的水势。若叶片间水势之差最大超过 0.2 MPa,则放回塑料袋内重新平衡。 然后,在水中剪取一小段无分枝的茎段连接到测定水分传导速率的装置上,测定 该水势下该茎段的初始自然水流速率(J_i)。该步骤完成后,用 0.10-0.15 MPa 压力 的水"冲洗"该段枝条 10-30 分钟,目的是将枝条木质部导管内的气泡全部清除, 使水流速度达到一个平衡的状态。"冲洗"过程结束后,如同测(J_i)过程一样,测 定此时该枝条的自然水流速率,由于导管中的气泡全部被清除,此时的自然水流 速率将达到最大值(J_{max})。由于水分传导速率(K_h)与水流速率成正比,所以在实际 操作时为避免测定木质部边材面积的麻烦,用水流速率代替 Kh 计算水分传导丧 失百分率。枝条水分传导丧失百分率(Percentage of Loss Conductivity, PLC)通过以 下公式计算, PLC = 100×(J_{max} - J_i)/J_{max}。然后用方程 PLC = 100/[1+exp(a(Ψ-b))]来 拟合 PLC 与木质部水势Ψ的关系(Pammenter & Vander Willigen, 1998),得到的曲 线即为枝条木质部导管水分传导的脆弱曲线。其中, b 为失去 50%水分传导率时 的木质部水势(Ψ_{P50}),此外,利用拟合的脆弱曲线方程将计算出失去 88%和 12% 水分传导率时的水势ΨP88 和ΨP12。ΨP88 定义为枝条的木质部导管完全栓塞化即失 去水分传导能力时的木质部水势(Domec & Gartner, 2001), 而 Ψ_{P12} 定义为枝条的 木质部发生失控(runaway)栓塞化时的水势(Sperry & Tyree, 1988; Sparks & Black, 1999)。在本研究中, Ψ_{P88-12} 即Ψ_{P88} 减去 Ψ_{P12} 的水势定义为木质部维持水分传导 的能力,Ψ_{P88-12}的值越小,木质部维持水分传导的能力越强。

2.2.4 枝条的导水率

在凌晨(06:00-07:00)用高枝剪剪取植株阳生的长度约 1.0-1.5 m 的末端枝条, 立即将枝条插入水中, 然后在水下剪掉切口端约 10 cm, 目的是防止空气进入枝条木质部导管。枝条上的叶片用黑色塑料袋密封, 防止蒸腾失水。在 3-5 棵样树上剪取 12-15 根枝条带回实验室测定枝条的导水率。

具体的测定方法如下,在水中截取约 20 cm 左右的无分枝的枝条小段,用刀 片削去枝条两端的树皮,但不伤害枝条的木质部;然后,把枝条连接到测定导水 率的装置上,测定枝条的水分传导速率 *K*_h。*K*_h的含义为单位时间内通过一个离 体茎段的水流量(F, kg/s)与离体茎段两端的压力梯度(dp/dx, MPa.m⁻¹)的比值,即 *K*_h = F/(dp/dx)。最后,利用重力使亚甲基兰染色液流经离体茎段,使边材染色。 截取染色枝条末端的一小段,用刀片切割平整后,测定整个枝条和心材(未染色部分)直径,然后计算边材面积(Sapwood Area, SA)。边材导水率(K_S) = K_h /SA,单位为 kg H₂O m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹。用 LI-3000A 叶面积仪(LI-COR, USA)测定枝条上的叶片总面积(Leaf Area, LA)。叶导水率(K_L) = K_h /LA, K_L 为枝条用叶面积标准化后的导水率。

2.2.5 木材解剖和边材的密度

用手动式切片机做厚度为 50-80 µm 的横切片,用番红染色,中型树脂固定, 在光学显微镜下观测木质部导管的直径。边材密度的测定,一小段新鲜边材侵在 水中至饱和,擦干边材表面的水迹,用排水测定新鲜边材的体积(*V*_f),然后在 80℃ 的烘箱中干燥 72 小时,称重得到边材的干重(*M*_d),边材密度ρ = *M*_d/*V*_f。

2.2.6 光合速率的测定

在晴好的天气情况下,用便携式光合作用分析仪(Li-6400, LICOR, Lincoln, Neb.)测定阳生叶片的光合作用响应曲线。测定时,叶室中的二氧化碳浓度在 365-380 µmol mol⁻¹之间,叶室中的温度控制在 20-25 ℃范围内,叶片到空气的 水分亏缺压为 0.8-1.1 KPa,叶室中的光合光量子通量密度(PPFD)逐步升高至饱 和光照,在每一步相关光合参数变化较稳定的时候测定光合速率。每一步光通量 密度的变化可能要 5-15 分钟才能使相关光合参数达到稳态。光响应曲线的模拟 用 *A*(PPFD) = *A*_{max} - *C*₀e^{-b*PPFD} 方程进行(Webb *et al.*, 1974),其中 *A*_{max} 是饱和光照 下的最大净光合速率。另外,在上述的测定过程中也将得到最大气孔导度(g_{smax}) 和水分利用效率(*WUE*)。

2.3 实验结果

2.3.1 木质部导管水分传导的脆弱性

如图 2.1 所示,从木质部导管水分传导的脆弱性曲线判断,常绿树种的Ψ_{P50} 比落叶树种的Ψ_{P50} 低得多。三种常绿树种核实木、石栗、变叶木的Ψ_{P50} 分别是 -2.32、-2.17、-2.23 MPa; 而三种落叶树种三叶橡胶、中平树、重阳木的Ψ_{P50} 分别是:-1.27、-1.14、-1.27 MPa; 此外,三种常绿树种的Ψ_{P12} 和Ψ_{P88} 与落叶 树种相比也要小一些(表 1)。总的来看,落叶树种Ψ_{P12}大于-0.5 MPa,例如,重 阳木的Ψ_{P12}甚至达到-0.10 MPa; 相对应地,常绿树种的Ψ_{P12}小于-0.5 MPa。落 叶树种的Ψ_{P88}在-1.86 到-2.40 MPa之间变化; 然而,常绿树种的Ψ_{P88}在-3.27 和 -4.00 MPa之间波动。此外,与落叶树种相比,常绿树种有较低的Ψ_{P88-12}值,即 常绿树种维持导管水分传导能力较强。



图 2.1 六种树种木质部导管水分传导的脆弱曲线。垂直虚线代表丧失 50%水分传导速率时的水势。 Fig. 2.1 Vulnerability to water stress-induced embolism in six tree species; *Hevea brasiliensis*, *Macaranga denticulata*, *Bischofia javanica*, *Drypetes indica*, *Aleurites moluccana* and *Codiaeum variegateum*. Percentage loss of hydraulic conductivity (*PLC*) is plotted against xylem tension for each tree species. The *vertical dashed lines* indicate the xylem tension at which 50% loss of hydraulic conductivity occurs.

表 1 六种树种三叶橡胶(Hevea brasiliensis)、中平树(Macaranga denticulate)、重阳木(Bischofia javanica)、核实木(Drypetes indica)、石栗(Aleurites moluccana)以及变叶木(Codiaeum variegatum)的光合和水力结构特征。 A_{max} :最大净光合速率(µmol m⁻² s⁻¹); g_{smax} :最大气孔导度(mol m⁻² s⁻¹); WUE:光合的水分利用效率(µmol mol⁻¹); K_L :叶导水率(10⁻⁴×kg m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹); K_S :边材导水率(kg m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹); Ψ_{P12} :导管发生不可控制的栓塞化时的木质部水势(MPa); Ψ_{P88} :导管失去水分传导能力时的木质部水势(MPa); Ψ_{P88-12} : $\Psi_{P88} - \Psi_{P12}$ (MPa); Ψ_{P50} :导管失去 50% 水分传导能力时的木质部水势(MPa); ρ :边材密度(g cm⁻³); D_{m-v} :木质部导管平均直径(µm)。数据除 Ψ_{P12} 、 Ψ_{P88} 、 Ψ_{P88-12} 以及 Ψ_{P50} 给出的是平均数外,其它的数据给出的是平均数±标准差。

Table 1 Photosynthetic and hydraulic traits in six study tree species, *Hevea brasiliensis*, *Macaranga denticulate*, *Bischofia javanica*, *Drypetes indica*, *Aleurites moluccana*, *Codiaeum variegatum*. A_{max} : maximum net photosynthetic rates (µmol m⁻² s⁻¹), g_{smax} : maximum stromatal conductance (mol m⁻² s⁻¹), *WUE*: instantaneous water use efficiency (µmol mol⁻¹), K_L : leaf area specific hydraulic conductivity (10⁻⁴ × kg m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹), K_S : sapwood area specific hydraulic conductivity (kg m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹), Ψ_{P88} : xylem tension at which the xylem becomes non-conductive (MPa), Ψ_{P88-12} : Ψ_{P88} subtracted from Ψ_{P12} (MPa), Ψ_{P50} : xylem tension at 50% loss of hydraulic conductivity (MPa), ρ : sapwood density (g cm⁻³), D_{m-v} : mean vessel diameter (µm). Except for Ψ_{P12} , Ψ_{P88} , Ψ_{P88-12} and Ψ_{P50} which are shown as means, the other variables are given as mean ± SD.

Tree species	Leaf phenology	A_{\max}	g _{smax}	WUE	$K_{\rm L}$	K _S	Ψ_{P12}	Ψ_{P88}	Ψ _{P88-12}	Ψ_{P50}	ρ	$D_{\mathrm{m-v}}$
H. brasiliensis	Deciduous	14.18 ± 1.29	$0.34~\pm~0.01$	50 ± 3.11	4.08 ± 1.02	4.38 ± 1.28	-0.16	-2.38	-2.23	-1.27	0.48 ± 0.04	80.9 ± 12.6
M. denticulata	Deciduous	16.72 ± 1.26	$0.29~\pm~0.02$	54 ± 2.42	3.64 ± 1.38	4.41 ± 1.14	-0.42	-1.86	-1.45	-1.14	0.41 ± 0.03	97.3 ± 10.9
B. javanica	Deciduous	14.35 ± 1.42	$0.28~\pm~0.02$	50 ± 3.28	4.50 ± 1.12	6.16 ± 1.58	-0.10	-2.40	-2.35	-1.27	0.43 ± 0.04	85.4 ± 13.9
D. indica	Evergreen	4.29 ± 0.62	$0.09~\pm~0.01$	58 ± 2.16	0.56 ± 0.26	0.60 ± 0.46	-0.64	-4.00	-3.35	-2.32	0.67 ± 0.04	33.6 ± 4.5
A. moluccana	Evergreen	11.79 ± 1.20	$0.20~\pm~0.01$	54 ± 3.67	4.27 ± 1.55	3.57 ± 1.33	-0.59	-3.74	-3.15	-2.17	0.52 ± 0.03	49.2 ± 3.2
C. variegatum	Evergreen	7.22 ± 0.72	$0.13~\pm~0.01$	56 ± 2.09	1.71 ± 0.92	0.86 ± 0.48	-1.20	-3.27	-2.07	-2.23	0.49 ± 0.05	38.0 ± 5.6

2.3.2 水分传导效率

总的来看, 落叶树种具有明显较高的叶导水率 *K*_L 和边材导水率 *K*_S(表 1)。 不过, 常绿树种石粟的 *K*_L 也比较高, 它的 *K*_L 值达到 4.27 ± 1.55×10⁻⁴ kg m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹, 甚至超过落叶树种中平树的 *K*_L 值 3.64 ± 1.38×10⁻⁴ kg m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹。当然, 落叶树种 *K*_L 值是另外两种常绿树种核实和变叶木的 *K*_L 值的 2 至 8 倍; 相对应地, 前者的 *K*_S 是后者的 5 至 10 倍。

2.3.3 木质部结构特征

常绿树种木质部导管的平均直径(*D*_{m-v})比落叶树种小得多(表 1),总的来看,落叶树种的 *D*_{m-v}是常绿树种的 2 至 3 倍。此外,常绿树种边材密度比落叶树种大一些(表 1)。

2.3.4 光合特征

如表 1 所示,三种落叶树种的 A_{max} 大于 14.0 µmol m⁻² s⁻¹,而三种常绿树种的 A_{max} 小于 12.0 µmol m⁻² s⁻¹。相应地,三种落叶树种的 g_{smax} 在 0.28 ± 0.02 至 0.34 ± 0.01 mol m⁻² s⁻¹之间变化,而常绿树种 g_{smax} 小于或等于 0.20 ± 0.01 mol m⁻² s⁻¹;其中,常绿树种核实木的 g_{smax} 最小,其 A_{max} 也最低。但是,另一方面,与落叶树种相比,常绿树种具有较高的光合水分利用 WUE (表 1)。

2.3.5 相关参数的回归关系

在六种树种之间, Ψ_{P12} ($R^2 = 0.20$, P = 0.37)、 Ψ_{P88} ($R^2 = 0.78$, P < 0.05)、 Ψ_{P88-12} ($R^2 = 0.72$, P < 0.05)以及 Ψ_{P50} ($R^2 = 0.63$, P = 0.06)都与边材密度负相关(图 2.2); 而 Ψ_{P12} ($R^2 = 0.59$, P = 0.07)、 Ψ_{P88} ($R^2 = 0.90$, P < 0.01)、 Ψ_{P88-12} ($R^2 = 0.49$, P = 0.12) 以及 Ψ_{P50} ($R^2 = 0.97$, P < 0.01)都与木质部导管直径正相关(图 2.3)。如图 2.4 所示, K_S 值与 Ψ_{P12} ($R^2 = 0.75$, P < 0.05)、 Ψ_{P88} ($R^2 = 0.53$, P < 0.1)以及 Ψ_{P50} ($R^2 = 0.73$, P < 0.05)正相关。 K_L ($R^2 = 0.62$, P = 0.07)和 K_S ($R^2 = 0.73$, P < 0.05)与边材密度负相关 (图 2.5a & 2.5b), 而 K_L ($R^2 = 0.83$, P < 0.05)和 K_S ($R^2 = 0.64$, P = 0.05)与木质部导 管直径 D_{m-v} 正相关(图 2.5c & 2.5d)。此外, K_S 和 K_L 分别与 A_{max} 和 g_{smax} 显著正相 关(图 2.6a-d);相反地是, K_L 和 K_S 都与 WUE 显著负相关(图 2.6e & 2.6f)。



图 2.2 水力特征与边材密度的关系。 Ψ_{P12} :导管发生不可控制的栓塞化时的木质部水势; Ψ_{P88} :导管 失去水分传导能力时的木质部水势; Ψ_{P88-12} : $\Psi_{P88} - \Psi_{P12}$; Ψ_{P50} :导管失去 50% 水分传导能力时的木质部水势; ρ :边材密度。实心圆代表三叶橡胶(*Hevea brasiliensis*),实心三角形代表中平树(*Macaranga denticulate*),实心正方形代表重阳木(*Bischofia javantica*),空心圆代表核实木(*Drypetes indica*),空心三角形代表石栗 (*Aleurites moluccana*),空心正方形代表变叶木(*Codiaeum variegatum*),以下相同(图 2.3–2.6)。

Fig. 2.2 Correlations between hydraulic traits and sapwood density across the deciduous and evergreen Euphorbiaceae tree species. The deciduous tree species: *Hevea brasiliensis (filled circle), Macaranga denticulate (filled triangle)*, and *Bischofia javantica (filled square)*; the evergreen tree species: *Drypetes indica (open circle), Aleurites moluccana (open triangle)*, and *Codiaeum variegatum (open square)*. Ψ_{P12} : xylem tension at which the runaway cavitation and embolism begin, Ψ_{P88} : xylem tension at which the xylem becomes non-conductive, Ψ_{P88-12} : Ψ_{P88} subtracted from Ψ_{P12} , Ψ_{P50} : xylem tension at 50% loss of hydraulic conductivity. Values are species means. Mean \pm SD (n = 3–5) was shown for each point. The *solid lines* represent best-fit linear and non-linear regressions.



图 2.3 水力特征与导管直径的关系。 Ψ_{P12} : 导管发生不可控制的栓塞化时的木质部水势; Ψ_{P88} : 导管 失去水分传导能力时的木质部水势; Ψ_{P88-12} : $\Psi_{P88} - \Psi_{P12}$; Ψ_{P50} : 导管失去 50% 水分传导能力时的木质部水 势; D_{mv} : 导管平均直径。

Fig. 2.3 Correlations between hydraulic traits and D_{m-v} across the deciduous and evergreen Euphorbiaceae tree species. See Fig. 2.2 for a description of the figure annotations.



图 2.4 水分传导效率与安全性的关系。K_S: 边材导水率; Ψ_{P12}: 导管发生不可控制的栓塞化时的木质 部水势; Ψ_{P88}: 导管完全失去水分传导能力时的木质部水势; Ψ_{P50}: 导管失去 50% 水分传导能力时的木质 部水势。

Fig. 2.4 Correlations of K_S with Ψ_{P12} , Ψ_{P88} , and Ψ_{P50} across the deciduous and evergreen Euphorbiaceae tree species. See Fig. 2.2 for a description of the figure annotations.



图 2.5 水分传导效率与边材密度和导管直径的关系。 K_{S} : 边材导水率; K_{L} : 叶导水率; ρ : 边材密度; D_{m-v} : 导管平均直径。

Fig. 2.5 Hydraulic conductivity as a function of sapwood density and mean vessel diameter across the deciduous and evergreen Euphorbiaceae tree species. See Fig. 2.2 for a description of the figure annotations.



图 2.6 光合特征与水力特征的关系。K_S: 边材导水率; K_L: 叶导水率; A_{max}: 最大净光合速率; g_{smax}: 最大气孔导度; WUE: 光合的水分利用效率。

Fig. 2.6 Correlations between hydraulic and photosynthetic traits across the deciduous and evergreen Euphorbiaceae tree species. See Fig. 2.2 for a description of the figure annotations.

2.4 讨论

本研究的木质部导管水分传导的脆弱性曲线证实落叶树种比常绿树种对流 水分胁迫诱导的栓塞化更敏感。这一结果与早先的相关报道一致。例如, Choat et al. (2003)报道,两种落叶树种(Brachchiton australis & Cochlospermum gillivaei)比 伴生的两种常绿树种(Alphitinia excelsa & Austromyriws bidwillii) 对水分胁迫诱 导的栓塞化更敏感。同时,三种落叶树种的Ψ_{P12}和Ψ_{P88}较高,这也进一步证实了 落叶树种水分传导对栓塞化的敏感性。然而,应该指出的是,其中常绿树种变叶 木的Ψ_{P88-12} 比落叶树种三叶橡胶和重阳木的Ψ_{P88-12} 更大一些,按着本研究对 Ψ_{P88-12} 的定义似乎很难解释。不过,值得注意的是,变叶木的Ψ_{P12}是所有研究的 六种树中最小的;因此,可以推测变叶木较小的Ψ_{P12}有可能对较高的Ψ_{P88-12} 在功 能上是一种补偿。总的来说,在所研究的六种树种中,常绿树种木质部导管抵抗 栓塞化的能力较强,因而保持木质部导管正常水分传导的能力也较强。

然而,有人认为木质部导管结构的特征决定着导管抵抗栓塞化的能力 (Zimmermann, 1983)。更有人认为木质部导管反栓塞化的能力与导管之间纹孔大 小相关(Choat *et al.* 2003)在本研究中,虽然没有分析导管之间纹孔的特征,不过 从导管直径的大小来看,常绿树种和落叶树种之间有显著的差异,但三种常绿或 三种落叶树种内部之间导管直径的大小并没有显著的差异。这一特征与上述树种 之间的抗栓塞化的特征一致,即常绿树种与落叶树种抗栓塞化的能力有显著差 异,但三种常绿树种或三种落叶树种内部之间抗栓塞化的能力并没有显著差异。 当然,导管直径的差异并不能单独完全地解释植物导管反栓塞化能力的不同。

在许多来自不同生态系统的树种中,木材密度与一系列水力结构特征相关 联,例如,枝条的储水能力、木质部的水分运输效率、叶片水分状况的调控以及 叶片细胞膨压的维持等等(Meinzer, 2003; Bucci *et al.*, 2004; Gartner & Meinzer, 2005)。有研究证实,随着木材密度的增大,木质部抗栓塞化的能力将增强(Hacke *et al.*, 2001; Hao *et al.*, 2008)。然而,在本研究中,导管的直径 *D*_{m-v}的大小比木材 密度的大小更加能影响木质部抗栓塞化能力的大小。最近有研究报道证实Ψ_{P12} 与木质部导管的直径和管胞的长度显著地正相负(Rosner *et al.*, 2007);稍早也有 报道证实,Ψ_{P50}与平均的导管直径正相关(Maheral *et al.*, 2006)。此外,本研究分

18

析了 Choat *et al.* (2003)报道的数据,也发现Ψ_{P50}显著相关于平均导管直径。因此,本研究推断,木质部导管抗栓塞化的能力大小可能与边材的一系列的结构特征相关。例如,导管的直径和长度、纹孔的强度和耐性以及木材密度的大小。

有很多研究都发现在植物种间(Gartner, 1995; Kavanagh *et al.*, 1999; Domec & Gartner, 2002; Rosner *et al.*, 2006)和种内(Piňol & Sala, 2000; Maherali *et al.*, 2004) 木质部水分运输的效率和安全性在功能上是协调统一的。本研究的结果,即 K_S 值分别与Ψ_{P12} 和Ψ_{P50} 值正相关也证明了在落叶和常绿树种之间水分运输效率和 安全性的协调统一。总的来说,木质部水分运输效率较高的植物其导管的直径较 大,而导管的直径越大,越容易发生栓塞化。本研究结果也证实了这一推论,即 水分运输的效率与导管直径正相关,而木质部水分传导反栓塞化的能力与导管的 直径负相关。基于水分运输效率和安全性协调统一,这样可以推测水力结构特征 不同的植物可以通过两种战略措施获得足够的水分满足自身的需要。一是水分 运输效率较高的植物能够确保在栓塞化发生之前就获得足够的水分;二是抗栓塞

本研究结果证实在所研究的六种树种中,总的来看,落叶树种具有较高的水 分传导效率,特别是 K_S的值较高,这一结论与早前的相关报道结果一致。例如, Sobrado (1993)报道,在南美洲委内瑞拉的季节性干旱森林中,落叶树种的 K_L比 常绿树种的 K_L高 2-4 倍,而 K_S高 2-6 倍。另一方面,有人研究了南美洲委内瑞 拉热带萨王纳地区两种常绿和落叶植物的水分传导效率,结果却发现两种常绿植 物与伴生的两种落叶植物相比其 K_S和 K_L值都较高(Goldstein *et al.*, 1989)。最近, 又有人研究了哥斯达黎加干性森林常绿和落叶树种的水分传导效率,结果发现, 虽然最大的水分传导效率依然是落叶植物,但在大多数情况下,常绿和落叶植物 的 K_S和 K_L值在相同的范围内波动(Brodribb *et al.*, 2002)。这些研究结果说明落叶 和常绿树种水分传导效率随着具体树种和空间的变化而变化,落叶树种比常绿树 种具有较高的水分传导效率并不是一成不变的。本研究的结果也有例外,例如, 常绿树种石栗的 K_L值就比落叶树种三叶橡胶和中平树的 K_L值要高一些,并且前 者的 K_S与后者的 K_S也比较接近。结合本研究的结果和相关的报道,可以推测常 绿和落叶树种水分传导效率的差异可能源于木质部导管结构的不同,而与叶片的 习性可能无关。根据 Hagen-Poiseuille 定律,可以知道,在相同的压力梯度下导

19

管直径大的水分传导效率高,本研究的结果,即 K_s和 K_L与导管直径 D_{m-v}正相 关似乎也证明了这一点。

在所研究的六种树种中,落叶树种具有较高的 A_{max} 和 g_{smax},早先已有了关于 落叶树种比常绿树种具有较高的光合速率和气孔导度的报道(Reich *et al.*, 1992; Villar *et al.*, 1995; Cornelissen *et al.*, 1996)。在六种树种之间, A_{max} 和 g_{max} 都分别 与 K_L和 K_S 正相关。实际上,水分传导与光合作用的关系反映的是植物木质部水 分传导能力和植物叶片碳获得能力的相互关系。当然,应该强调的是,水分传导 直接影响的是叶片的气孔导度,进而影响胞间二氧化碳的浓度,最后通过胞间二 氧化碳浓度的变化来影响光合碳吸收。这样可以认为,气孔起着居间调控的角色, 气孔关闭后, 胞间 CO₂ 浓度降低,结果光合速率降低;另一方面,气孔关闭减 少了水分损失,降低了导管发生栓塞化的危险,从而能确保较高的水分传导效率 (Katul *et al.*, 2003; Santiago *et al.*, 2004)。

在所研究的六种树种中,光合速率和水分传导能力较低的植物表现出较高的 光合水分利用效率 WUE,并且 WUE 与 K_L和 K_s显著负相关。这意味着具有较低 水分传导能力的植物倾向于优先利用限制性资源水分来加强光合的水分利用效 率,结果导致了较高的 WUE;另一方面,具有较高水分传导效率的植物由于水 分已经不是限制性资源,结果倾向于优先利用其它限制性资源来加强光合速率。 这样的解释已经得到了相关研究报道的证实,例如,Santiago *et al.* (2004)研究 发现具有较高 K_L的植物光合水分利用效率较低,但是这种植物光合氮利用效率 较高。

2.5 小结

总之,本章研究结果证实,在所研究的六种大戟科植物中,与常绿树种相比, 落叶树种水分传导效率较高,但落叶树种水分传导对水分胁迫诱导的栓塞化比较 敏感;然而,落叶与常绿树种的这种水力特征的差异应该更多的归因于它们木质 部结构特征的不同,与叶片习性可能无关;此外,本研究还发现,在常绿树种和 落叶树种之间水分传导的效率和安全性存在着相互平衡的关系;并且,水分传导 效率还与光合作用能力在功能上相互协调统一。

20

在这里还要特别指出的是,在本研究所选用的六种树种中,三叶橡胶在起源 地南美洲亚马逊河流域属于常绿树种,而在西双版纳地区它的叶片习性发生了改 变,在每年的干季二月底至三月初,它的叶片会全部地脱落。至于其中的原因, 到目前为止还不是很清楚。但从本研究的结果来看,三叶橡胶的光合特征和水力 结构特征更加地与本地的落叶树种中平树和重阳木相似,即它们都具有较高的光 合速率和蒸腾速率,它们木质部导管的直径较大、水分传导能力较强,但它们木 质部水分传导对水分胁迫诱导的栓塞化特别敏感,因而抗栓塞化的能力较差。也 许正是因为三叶橡胶的木质部输导组织相对不耐干旱所引起的气穴化栓塞才导 致它在西双版纳地区旱季后期的落叶。这样,西双版纳地区季节性干旱对三叶橡 胶水分和光合的影响值得进一步的研究。
第三章 三叶橡胶和核实木两种大戟科植物的水分关系和光合特征在 雨季和旱季的变化

3.1 引言

有研究证明,随着降雨量的减少以及降雨量季节性差异的增强该地区落叶树种的比例将会相对地增加(Frankie et al., 1974)。然而,在大多数地区落叶树种和常绿树种可以共生,这又说明在季节性干旱存在的情况下,植物落叶的习性并不是在该环境下生存的必不可少的适应措施。实际上,落叶和常绿植物会采取不同的策略来适应相同的环境。例如,热带的落叶植物以叶片脱落来适应干季的高温少雨环境,而伴生的常绿植物不得不对叶片保持充分有效的水分供应,以避免叶片失水造成自身永久性地伤害(Holbrook et al., 1995)。落叶和常绿植物对季节性干旱采用不同适应策略的原因可能是它们具有不同的水力结构(hydraulic architecture)。当然,还有研究证实有些植物具有较强的气孔调控能力和发达的深根系统,这有利于它们度过季节性水分短缺(Cao, 2000)。

干旱将导致植物的水分运输与传导能力下降,主要原因是植物在遭受干旱胁 迫时,导管内的水势将降低,水柱受到的张力增加,气态的水进入导管形成气泡, 从而在导管内产生栓塞(Choat et al., 2003)。由于栓塞不能传导水压,这样导管内 气泡的存在将限制水分在导管内有效的运输(Meinzer et al., 2001)。因此,植物抵 抗栓塞化能力的大小对其在干旱环境条件下的生存至关重要。当然,在水分条件 较好的环境中,植物抗栓塞化能力的大小似乎并不重要。但是,当植物的栖息地 的环境从多雨变成少雨,或植物从多雨且无明显干湿季之分的地区引种到虽多雨 但有明显干湿季之分的地区,那么这种植物木质部导管反栓塞化能力的大小就显 得特别重要,甚至有可能的是,原本常绿植物由于不能有效反栓塞化而导致落叶。

木质部导管的栓塞化将造成叶片水分供应不足,而叶片对水分胁迫的第一反 应是关闭气孔,以减少水分的损失(Ghannoum et al., 2003)。气孔的关闭有利于减 少水分的损失,但同时也降低了光合速率。当然,另一方面,值得强调的是,如 果木质部导管的栓塞化不能得到有效的控制,而使气孔长期处在关闭状态,这对 植物来说是比较危险的。一是植物的光合作用受到限制,植物对碳水化合物的需求得不到满足;二是气孔的关闭导致光合速率的下降,从而植物吸收的光能将大幅度地超过光合作用的需要,过剩的光能将诱导大量活性氧化物的产生,结果引起叶片衰老脱落。

西双版纳地处热带北缘,年降雨量约为 1560 mm,但五月至十月的降雨量占 年降雨量 85%以上(Liu et al., 2004)。因此,西双版纳地区存在着明显的干湿季节, 在每年十一月至次年的四月该地区处在干旱少雨的时期。三叶橡胶(Hevea brasiliensis)起源于南美洲,在亚马逊河流域热带雨林中叶片寿命较长,属于常绿 植物。但是,在引种到西双版纳地区后,三叶橡胶的叶片习性发生了改变,在每 年的二月底至三月初它的叶片会全部脱落。遗憾的是,至今还不清楚三叶橡胶叶 片习性发生变化的具体原因。从上面章节的研究结果来看,三叶橡胶木质部导管 对水分胁迫诱导的栓塞化相当敏感,也就说,三叶橡胶木质部的导管抵抗栓塞化 的能力较差,而同属大戟科的常绿植物核实木(Drypetes indica)反栓塞化能力较强 (Chen et al., 2008)。

本章实验研究了三叶橡胶和常绿植物核实木在雨季和干季水力结构特征和 光合参数的变化,研究目的是,(1)分析两种植物叶片供水和保水能力的差异;(2) 探讨两种植物水分传导特征的季节性变化的差异;(3)初步分析上述两种差异对 三叶橡胶在干季叶片的脱落而核实木的叶片却能维持正常光合作用可能产生的 影响。

- 24 -

3.2 实验材料与方法

3.2.1 实验材料

本实验在中国科学院西双版纳热带植物园进行,西双版纳地区的地理位置和 气候状况如第一章所述。三叶橡胶(H. brasiliensis)和核实木(D. indica)叶片物候特 征如第二章所描述。三叶橡胶树来自中国科学院西双版纳热带植物园的胶一茶混 交林中。核实木植物材料选自中国科学院西双版纳热带植物园的沟谷雨林。雨季 的测定在 2007 年 7-8 月进行,干季的测定在 2008 年的 3 月初进行。

3.2.2 枝条导水率的测定

分别在雨季和旱季进行,取样和具体的测定以及计算方法如第二章所描述。

3.2.3 叶片 P-V (Pressure - Volume)曲线的测定

叶片 P-V 曲线测定只在雨季进行。取样和测定过程如下,在晚上 19:00-20:00 之间,采集阳生的带有叶片的小枝条,迅速放入水桶内,在水中剪掉切口端约 10 cm。然后迅速带回实验室,在实验室用黑色塑料袋套住枝条上的所有叶片部 分,防止蒸腾失水,让叶片吸水至饱和,第二天上午进行叶片 P-V 曲线的测定。 取生长状况良好的叶片迅速测定其饱和鲜重(Saturating Weight, SW)。用压力室法 测定其水势,其后立即测定该水势下的相对应的鲜重(Fresh Weight, FW)。然后将 叶片放置在塑封袋中待水势下降 0.3 MPa 左右(需 1 分钟至几十分钟不等),再次 测定完成后将叶片放到 80℃的烘箱中干燥 48 小时,测其干重(Dry Weight, DW)。 叶片的相对含水量(Relative water content, RWC) = 100×(FW-DW)/(SW-DW)。通 过拟合叶片水势和相对含水量的方程(Schulte & Hinckley, 1985),计算叶片膨压丧 失点的水势(Ψ_{thp})以及叶片相对含水量为 70%时的水势(Ψ_{RWC70%})。 3.2.4 叶片失水曲线的测定

用来测定失水曲线的叶片的取样和前期处理与测定 P-V 曲线的一致。首先称 饱和叶片的重,此时叶片 RWC 设定为 100%,失水时间设定为零。在前三十分 钟内,每隔 2 分钟称一次叶片的鲜重,并且同时记下从零时起到称重时的失水时 间。以后每隔 5-15 分钟称一次鲜重,并记下失水时间。整个实验过程的失水时 间在 6-7 小时之间。

3.2.5 叶片水力导度(Kleaf)与叶片水势脆弱曲线的测定

叶片水力导度(K_{leaf})的测定参考 Franks (2006)提供的方法。 $K_{\text{leaf}} = \Delta v$ /(10× A_{leaf} ×($\Psi_1 - \Psi_2$)),其中 Δv 为从压力势(Ψ_1)迅速升高到压力势(Ψ_2)时前 10 秒的水流量, Ψ_1 等于叶片的水势; A_{leaf} 是叶片的面积。水势饱和的枝条在实验内不断地失水,然后得到一系列不同水势(Ψ_1)的叶片;相对应地,在测定中将得到一系列不同 Ψ_2 。在测定时,压力势 Ψ_2 比压力势 Ψ_1 高 0.4–0.5 MPa。按上述公式计算 K_{leaf} ,然后 K_{leaf} 与 Ψ_2 的关系曲线用方程 y = $a/[1+\exp(-b(\Psi_2 - c))]$ 来拟合,其中 a 为叶片的最大水力导度,c为失去最大叶片水力导度 50%时的水势,b为方程的拟合度。

3.2.6 叶片光响应曲线的测定

分别在雨季和干季晴好的天气情况下,用便携式光合作用分析仪(Li-6400, LICOR, Lincoln, Neb.)测定阳生叶片的光合作用响应曲线。测定过程和相关参数的计算与第二章相同。

3.2.7 枝条栓塞化比率的测定

枝条木质部导管水分传导丧失百分率 (Percentage loss of hydraulic conductivity, *PLC*)即栓塞化比率的测定分别在雨季的 7-8 月和干季的 3 月初进行。测定过程和相关参数计算与第二章相同。

3.3 实验结果

3.3.1 两种植物的 P-V 曲线和失水曲线特征

如图 3.1 所示,三叶橡胶和核实木两种植物叶片水势Ψ_{leaf}对叶片的 RWC 变 化具有相同的响应特征。两者膨压丧失点的水势Ψ_{tb}没有显著差异,但核实木的 Ψ_{RWC70%}比三叶橡胶低得多(表 3.1)。三叶橡胶和核实木叶片失水曲线特征如图 3.2 所示,核实木叶片 RWC 随着失水时间的延长缓慢地直线下降,而三叶橡胶叶片 前二十分钟的失水速率明显快于二十分钟后的失水速率。三叶橡胶失水到丧失膨 压点的叶片 RWC 所需的时间小于 10 分钟,而核实木所需的时间接近 50 分钟; 另外,三叶橡胶叶片失水到 RWC 为 70%所需要的时间大约是 200 分钟,而核实 木在给定的失水时间 7 小时内,叶片 RWC 还没有达到 70% (表 3.1)。



图 3.1 三叶橡胶和核实木的 P-V 曲线。垂直的虚线代表叶片丧失膨压点的水势。

Fig. 3.1 The P-V curves for *H. brasiliensis* and *D. indica*. The *dashed lines* indicate the leaf water potential at which turgor loss point occurred.



图 3.2 三叶橡胶和核实木叶片失水曲线。垂直虚线代表叶片失水到丧失膨压点的相对含水量(RWC)所需的时间;垂直实线为叶片失水到相对含水量为 70%所需要的时间。数据为平均数±标准差(n = 5-7)。

Fig. 3.2 The water loss curves for leaves of *H. brasiliensis* and *D. indica*. The *dashed lines* and *solid lines* indicate the needed time at which leaf relative water content (RWC) declined to leaf RWC for turgor loss point and 70%, respectively. The data are Means \pm SD (n = 5–7).

3.3.2 叶片水力导度(Kleaf)与水势的脆弱曲线

如图 3.3 所示, 在Ψ_{leaf}下降到某一临界值时, 三叶橡胶和核实木的 K_{leaf}都将 迅速地下降。而两种植物叶片水力导度的脆弱曲线的差异在于最大 K_{leaf} 与最小 K_{leaf}之间曲线的斜率。从图 3.3 可以看出, 核实木的脆弱曲线相对平缓一些, 而 三叶橡胶的脆弱曲线要陡峭一些。在水势为-2.0 MPa 左右时, 核实木叶片还能 维持一定的供水量, 三叶橡胶 K_{leaf} 的值却很低(图 3.3), 而两种植物的膨压丧失 点的水势也在-2.0 MPa 左右。此外, 三叶橡胶失去 50%最大 K_{leaf} 的水势(Ψ_{P50}) 明显高于核实木的Ψ_{P50}, 且两者的Ψ_{P50}都高于它们膨压丧失点的水势(表 3.1)。





Fig. 3.3 Response of leaf hydraulic conductivity (K_{leaf}) to leaf water potential (Ψ_{leaf}) in both *H. brasiliensis* and *D. indica*. The *dashed lines* indicate the Ψ_{leaf} at 50% of maximum K_{leafs} the solid line indicate the Ψ_{leaf} at which turgor loss occurred. The data are Means ± SD (n = 5–7).

3.3.3 两种植物光合特征和导水率的季节性变化

两种植物的光响应曲线如图 3.4 所示。总的来看,三叶橡胶比核实木植物具 有较高的光合能力。在雨季,三叶橡胶的 A_{max}、g_{smax}、E_{max}都比核实木高;但在 干季核实木的 A_{max}、g_{smax}、E_{max}降低得较少,而三叶橡胶的叶片已经脱落(表 3.1)。 三叶橡胶的边材导水率 K_S在两个季节都比核实木高,且两种植物的 K_S在干季都 大幅度地降低(图 3.5a)。另外,两种植物在雨季木质部栓塞化的比率 PLC 没有明 显的差异,在干季两者的 PLC 都大幅度地增加,但核实木导管的 PLC 稍微小于 三叶橡胶的 PLC (图 3.5b)。



图 3.4 三叶橡胶和核实木的光合速率一光响应曲线。空心圆代表雨季,实心圆代表干季。数据为平均数±标准差(n = 3-5)。

Fig. 3.4 The light response curves for *H. brasiliensis* and *D. indica* in rainy (*open circles*) and dry (*closed circles*) season. The data are Means \pm SD (n = 3–5).



图 3.5 三叶橡胶和核实木边材导水率(K_S)和木质部导管栓塞化比率(PLC)的季节性变化。数据为平均数 土标准差(n = 7-9)。

Fig. 3.5 Changes in sapwood area specific hydraulic conductivity (K_S , a) and percentage loss of hydraulic conductivity (*PLC*, b) in rainy (*closed bars*) and dry (*open bars*) season. The data are Means \pm SD (n = 7–9).

	三叶橡胶 H. brasiliensis	核实木 D. indica
最大净光合速率 A _{max} (μmol m ⁻² s ⁻¹)	12.8±0.22(雨季)	4.29±0.14(雨季)
	no data (干季)	3.68±0.15(干季)
最大气孔导度 g _{smax} (mol m ⁻² s ⁻¹)	0.27±0.02(雨季)	0.10±0.05(雨季)
	no data (干季)	0.09±0.09(干季)
最大蒸腾速率 E _{max} (mol m ⁻² s ⁻¹)	3.03±0.29(雨季)	1.21±0.08(雨季)
	no data (干季)	1.09±0.11(干季)
失水到丧失膨压点的时间 T _{up} (min)	7.0 ± 1.0	48.0 ± 5.0
失水到 RWC 为 70%的时间 T _{RWC70%} (min)	198.0 ± 9.0	> 400
失去最大导水 50%的水势Ψ _{P50} (MPa)	-1.06 ± 0.06	-1.68 ± 0.10
丧失膨压点的水势Ψ _{th} (MPa)	-2.11 ± 0.10	-2.26 ± 0.09
RWC 为 70%时的水势Ψ _{RWC70%} (MPa)	-3.00 ± 0.15	-5.70 ± 0.08

表 3.1 三叶橡胶(*H. brasiliensis*)和核实木(*D. indica*)光合特征和水分关系的相关指标。数据为平均数标 准差(n = 3-7)。

Table 3.1 The photosynthetic and hydraulic related parameters in *H. brasiliensis* and *D. indica.* A_{max} : maximum photosynthetic at saturating light; g_{smax} : maximum stomatal conductance; E_{max} : maximum transpiration rate; T_{tlp} : the needed time at which leaf relative water content (RWC) declined to leaf RWC for turgor loss point; $T_{RWC70\%}$: the needed time at which leaf RWC declined to leaf RWC for 70%; Ψ_{P50} : leaf water potential at 50% of maximum leaf hydraulic conductivity; Ψ_{tlp} : leaf water potential at turgor loss point. The data are Means \pm SD (n = 3–7).

3.4 讨论

三叶橡胶和核实木叶片Ψtu 没有明显差异。到目前为止,以比较常绿树种和 落叶树种 P-V 曲线特征差异的研究很少。因此,关于常绿与落叶树种在叶片失 水的过程中,Ψ_{tb}是落叶树种比较低还是常绿树种比较低并没有统一的结论。但 从 Brodribb & Holbrook (2003)研究的两种落叶树种(Gliricidia sepium & Rhedera trinervis)以及两种常绿树种(Simarouba glauca & Quercus oleoides)水力结构和光 合作用特征关系的结果中,可以发现在他们研究的四种树种中,落叶树种的 Ψ_{tw} 大于-2.0 MPa, 而常绿树种Ψ_{th}小于-2.0 MPa。然而, 在本研究中三叶橡胶和核 实木的Ψtup分别是-2.11和-2.26 MPa,两者的Ψtup都小于-2.0 MPa。从 Chen et al. (2008)的研究结果来看,三叶橡胶和核实木枝条失去 50%水分传导能力的水势分 别是-1.27 和-2.32 MPa。这样,可以推测三叶橡胶叶片失去膨压点的时候,枝条 木质部的导管可能已经高度栓塞化,枝条对叶片的水分供应量相应地也就很少 了: 如果枝条的栓塞化不能及时地恢复, 叶片继续地失水, 那么叶片的水势就有 可能降到叶片相对含水量为 70%时的水势-3.0 MPa 左右。然而,有报道大多数 植物在叶片相对含水量降低到70%左右时,它们的光合作用以及光合器官将受到 不可恢复地损伤(Lawlor & Cornic, 2002)。相对应地,核实木叶片相对含水量为 70%时的水势是-5.70 MPa 左右,在西双版纳地区即使在干季,植物的水势也不 可能降到-5.70 MPa 左右。因此核实木叶片不太可能因为西双版纳地区的季节性 干旱,光合器官受到不可逆地损伤,而三叶橡胶存在这种可能。

单从Ψ_{tp}值来判断,三叶橡胶和核实木并没有明显的差异。如果把两种植物 叶片的 P-V 曲线和失水曲线综合来考虑,就会发现两种植物虽然丧失膨压的水 势接近,但三叶橡胶比核实木叶片细胞失去膨压要容易的多。三叶橡胶叶片失水 到丧失膨压点的时间为7分钟左右;相应地,核实木需要50分钟左右;叶片相 对含水量降到70%时,三叶橡胶需要的时间不到200分钟,而核实木需要的时间 至少大于7小时。这些结果暗示在相同的水分胁迫环境条件下,当三叶橡胶的叶 片细胞丧失膨压时,核实木叶片却还能很好地维持细胞的膨压;随着干旱时间的 延长,当三叶橡胶叶片的相对含水量降低到70%,濒临危险的生理值时,核实木 叶片的相对含水量可能大大高于70%,而远离危险的生理值。从失水曲线结果来 看,核实木叶片失水到相对含水量为 70%所需要的时间大于 7 小时,这么长的时间叶片可能已经躲过了白天高失水量的危险。至于三叶橡胶比常绿树种核实木叶 片失水速率快得多的具体原因不是很清楚,推测可能与它们的叶片结构特征有关 系,有研究报道证实常绿树种的叶片比落叶树种的叶片要厚一些(Cao, 2001)。

气孔关闭是叶片防止水分损失的一种非常有效的策略。然而气孔关闭主要受 来自两个方面的信号诱导调节。一是化学信号,例如脱落酸的增加诱导气孔的关 闭(Loewenstein & Pallardy, 2002); 二是水力导度(hydraulic conductivity)信号, 在 土壤并不缺水的情况下,气孔的关闭主要是由于叶片水力导度的下降(Brodribb & Holbrook, 2003; Brodribb et al., 2003)。然而, 目前还没有在土壤水分条件良好的 情况下植物叶片水力导度的下降是怎么调控气孔关闭的研究报道。实际上,水力 导度直接地反映了叶片的供水状况,而气孔导度并不能。因此,叶片水力导度 Kleaf 与叶片水势的关系即 Kleaf 脆弱曲线得到了广泛地研究(Brodribb & Holbrook, 2003, 2004a, 2004b & 2007; Hao et al., 2008)。从本研究的 Kleaf 脆弱曲线来看,核 实木叶片失去 50%最大 K_{leaf} 的水势 Ψ_{P50} 比三叶橡胶低得多,这说明三叶橡胶的 Kleaf对水势的变化较敏感。这也意味着当两种植物处在相同水势的水分胁迫环境 中,三叶橡胶 Kleaf 可能变得很低从而叶片供水受到相当大的限制;相对应地,核 实木 Kleaf 可能没有受到显著影响因而叶片供水依然维持在一个良好的水平。在这 里要特别指出的是,当两种植物都达到细胞丧失膨压点的水势时,从 Kleaf 脆弱曲 线来判断,核实木的 K_{leaf} 还能维持在 2.0 mmol m⁻² s⁻¹ MPa⁻¹ 左右,而三叶橡胶的 K_{leaf} 接近零。这说明细胞膨压丧失后,核实木叶片还能得到一定水分的供应,这 可能对它减缓水分进一步的损失从而避免叶片相对含水量降低危险的生理值有 一定的作用;相对应地,三叶橡胶叶片到达膨压丧失点水势之后,叶片几乎得不 到一定量的水分供应,再加上它的叶片失水速度快而保水能力差,这样如果水分 胁迫不及时地解除,三叶橡胶叶片的相对含水量就有可能降到危险的生理值,造 成不可恢复的生理破坏。

叶片光合速率和气孔导度与 K_{leaf} 紧密相关(Brodribb & Holbrook, 2004b; Franks, 2006; Otieno *et al.*, 2007)。不过应该强调的是, K_{leaf} 对光合速率的调控是

- 32 -

通过调控气孔导度而实现的。有报道证实落叶树种比常绿树种具有较高的 A_{max} 和 g_{smax},不过落叶树种的高光合速率是以高蒸腾速率为代价的(Reich *et al.*, 1992; Villar *et al.*, 1995, Cornelissen *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2008)。此外,很容易理解的 是,高蒸腾速率需要高 K_{leaf}来支持。在本研究中,虽然三叶橡胶在雨季的 A_{max}、g_{smax} 以及 E_{max}确实比核实木高得多,但是本研究并没有发现三叶橡胶的最大 K_{leaf} 比核实木高一些,从 K_{leaf}曲线来判断反而要低一些。不过,到目前为止,还没有 研究报道证明落叶树种的最大 K_{leaf} 一定比常绿树种要高一些。Brodribb & Holbrook (2003)研究了两种常绿树种和两种落叶树种的最大 K_{leaf},结果发现落 叶与常绿树种之间最大 K_{leaf}并没有显著的差异。因此,可以推测植物最大 K_{leaf} 值可能对叶片的意义不大,满足叶片正常的水分需求可能不需要很高的 K_{leaf} die 相反地,对叶片有重要影响的可能是在低水势下 K_{leaf} 值的大小以及 K_{leaf} 对叶片 水势降低的响应特征。本研究结果表明,三叶橡胶 K_{leaf} 值对叶片水势的降低响应 较快,而核实木 K_{leaf} 值对叶片水势的降低响应较慢,这与已报道的实验结果相类 似,即落叶树种 K_{leaf} 值对叶片水势降低的响应要比常绿树种较快一些(Brodribb & Holbrook, 2003)。

另一方面,有研究报道证实叶片的光合速率和气孔导度与边材导水率 Ks 正 相关(Santiago et al., 2004; Chen et al., 2008)。三叶橡胶 Ks 在雨季显著比核实木高, 而在雨季三叶橡胶的光合速率和气孔导度显著比核实木高一些,因此,本研究结 果与上述的报道似乎一致。然而到了干季,虽然三叶橡胶的 Ks 依然比核实木高 一些,但是两种植物的 Ks 与雨季相比都大幅度地降低了。在干季 Ks 的降低直接 原因可能就是两种植物木质部导管栓塞化比率 PLC 的增加。在干季,虽然核实 木 PLC 稍微低于三叶橡胶,这种差异可以归结于前者的反栓塞化能力大于后者 (Chen et al., 2008),但两种植物 PLC 都在 60%以上,说明三叶橡胶和核实木都受 到了西双版纳地区季节性干旱的影响。在干季三月初测定的时候,三叶橡胶叶片 已经全部脱落,然而令人费解的是,核实木的 A_{max}、g_{smax} 以及 E_{max}与雨季相比 并没有如期待的那样显著的降低,这与 Elsheery et al. (2008)报道的西双版纳地区 季节性干旱对芒果光合速率的影响的实验结果相反,他们的研究结果显示芒果在 干季的光合速率显著地比雨季低。关于这一现象,可以这样解释,一是在干季虽 然 PLC 增加而 K_s下降,但木质部导管并没有完全失去水分传导能力,K_s仍然维持在 0.18 kg m⁻¹ s⁻¹ MPa⁻¹ 左右,这对核实木植物来说可能已经足够,因为它的叶片蒸腾速率很小。二是核实木叶片失水较慢而保水能力较强,再加上即使在干季 木质部导管依然能够向叶片"泵出"一定量的水。因此,有可能即使在干季,核 实木叶片的光合器官并没有受到水分胁迫的伤害,从而光合作用没有受到季节性 干旱的影响。

3.5 小结

三叶橡胶叶片的水力导度对叶片水势的降低比常绿树种核实木敏感得多,虽 然两者具有非常接近的膨压丧失点的水势,但三叶橡胶比核实木失去叶片细胞膨 压要容易得多,因为前者比后者失水速率快。正因为三叶橡胶叶片失水速率快, 所以叶片很容易失水到相对含水量为 70%的生理危险值,并且叶片相对含水量为 70%时的水势也比较高(-3.0 MPa);相对应地,核实木叶片失水速率慢,叶片相 对含水量为 70%时的水势是-5.7 MPa,这一水势在热带西双版纳地区不可能达 到,因而叶片的光合器官不可能由于干旱而受到不可逆的损伤,而三叶橡胶有这 种可能。此外,三叶橡胶比核实木具有较高的光合速率和蒸腾速率,这样在干季 由于木质部导管栓塞化,导管的水分传导能力下降,三叶橡胶叶片得不到及时和 充足的水分补给,最后叶片脱落;而核实木叶片需水量少,在干季即使导管水分 传导能力较低也能满足其需要,因而光合作用并没有受到很大的限制。

在西双版纳地区,除了季节性干旱之外,低温特别是 12 月至次年 1 月的夜 间低温也可能对三叶橡胶叶片产生不可恢复的生理伤害。上述分析只考虑了季节 性干旱的影响,而没有考虑季节性低温的影响。因此,非常有必要把季节性干旱 和低温对三叶橡胶的影响分开来研究,但在西双版纳地区季节性干旱和低温是相 伴相随的,很难在自然状况下单独研究干旱或低温的影响。所以,进行人为地处 理来研究干旱或低温对三叶橡胶的影响就非常有必要了。

第四章 三叶橡胶光合特征、水分关系以及抗氧化系统对干旱处理和 随后复水的响应

4.1 引言

三叶橡胶(Hevea brasiliensis)属于大戟科植物,起源于亚马逊河热带雨林,是 一种重要的热带经济植物(Wycherley, 1992)。因此,在经济利益的驱动下,三叶 橡胶在热带地区得到了广泛地推广与栽培,在中国热带的北缘西双版纳地区也不 例外。非常有趣的是,三叶橡胶在起源地南美洲属于常绿植物,而在引种地西双 版纳地区,它的叶片习性发生了改变,在每年的二月底至三月初三叶橡胶的叶片 会全部的脱落(Feng, 2007; Chen & Cao, 2008)。在西双版纳地区每年的十一月至 次年的四月是一个少雨干旱的季节(Liu et al., 2004)。有研究报道证实热带落叶植 物为了更好地适应少雨缺水的干旱季节,它们的叶片在干旱季节会脱落 (Holbrook et al., 1995)。但是,三叶橡胶在干旱季节叶片的脱落是不是对西双版 纳地区季节干旱的一种适应策略?目前还不是很清楚。

伴随高温和强光的水分短缺被认为是影响植物生长和正常生命活动的主要 因素(Boyer, 1982)。在干旱的过程中,植物对水分短缺的第一反应是气孔关闭 (Ghannoum et al., 2003),气孔的关闭将直接导致胞间 CO₂浓度的降低,从而植物 光合速率将逐渐的下降。另一方面,干旱诱导的光合器官的损伤被认为是植物在 遭受严重水分短缺时光合速率降低的主要原因(Tezara et al., 1999; Lawlor, 2002)。 不管气孔或非气孔的限制,人们普遍认为水分的短缺将直接导致植物的光合速率 下降。因此,与在水分条件较好的环境下的植物相比,处在水分短缺环境下的植 物其饱和光照要低一些(Cornic, 1994; Lawlor, 1995)。这样,遭受水分胁迫的植物 吸收的光能有可能超过其自身光合作用的需要,如果这部分多余的光能不及时耗 散掉,有可能导致植物遭受光氧化伤害(Osmond, 1994)。

植物的光氧化损伤主要源于光电子的产生和利用的失衡。不过,植物过剩的 光能可以通过非光化学淬灭(Non-photochemical quenching)安全地耗散,以避免活 性氧化物(Reactive oxygen species, ROS)的产生(Szabo *et al.*, 2005)。当然,在长期 的进化过程中,植物已经具备了清除 ROS,以减轻它们对光合器官伤害的内在 机制和系统(Alscher et al., 1997; Noctor & Foyer, 1998)。目前,研究得比较多的是, 植物清除 ROS 的酶促系统和非酶促系统,酶促系统主要包括超物氧化歧化酶 (SOD)、过氧化物酶(POD)以及过氧化氢酶(CAT);非酶促系统主要包括抗坏血酸、 谷胱甘肽、维生素 E 以及类胡萝卜素。然而,在遭受严重干旱胁迫的时候,ROS 的产生与 ROS 的清除可能失衡,植物就不可避免地发生光氧化损伤。

另一方面,严重的水分短缺将大幅度地增加植物木质部导管发生栓塞化的危险,甚至有可能使导管完全失去水分传导的功能。为了适应水分短缺的环境,植物可以调整自身的水分关系特征来维持水分供应的平衡(Tyree & Ewers, 1991)。 已有大量的研究报道证实诱导气孔关闭的水势与导致枝条木质部导管空穴化 (Cavitations)的水势紧密相关(Jones & Sutherland, 1991; Sperry & Saliendra, 1994; Brodribb & Hill, 1999)。在一些植物中,水分传导效率的下降将直接导致叶片气 孔的关闭(Cochard, 2002; Brodribb *et al.*, 2003; Nardini *et al.*, 2003); 然而,在另外 一些特别是对水分短缺比较敏感的植物中,叶片气孔提前关闭有利于减少损失, 延缓导管栓塞化的形成(Pockman & Sperry, 2000; Martinez-Vilalta *et al.*, 2002; Froux *et al.*, 2005)。此外,应该强调的是,植物叶片渗透调节能够使植物忍受较 长和较严重的水分短缺(Vivin et al., 1996; Chaves *et al.*, 2003)。

到目前为止,已经有很多关于植物对水分短缺的响应以及在干旱过程中植物 生理性保护机制保护作用的研究;但是,关于干旱胁迫解除后植物生理功能的恢 复以及恢复的限制性因素的研究相对来说很少(Flexas *et al.*, 2006)。到目前为止, 只有为数不多的几篇以干旱胁迫结束后植物生理功能的恢复为研究目的的报道 (Kirschbaum, 1988; Souza *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2005; Gallé *et al.*, 2007)。并且,这 些研究要么关注的是光合特征,要么关注的是氧化和抗氧化的特征,很少关注水 分胁迫后植物水力结构特征的恢复。有可能的是,干旱胁迫解除后植物的水力结 构特征的恢复程度决定着光合以及氧化和抗氧化特征的恢复程度。不过,比较困 难的事情是,人们很难确切地掌握植物到底遭受到什么程度的干旱(即干旱的临 界点),即使在复水后,它的生理功能也很难完全恢复。 在众多的干旱研究报道中,很多相同植物经常在不同的研究中作为研究的材料。但是,到目前为止,三叶橡胶作为一种重要的经济植物,人们对其生理功能以及对逆境的响应特点还了解得比较少。最近,我们的研究报道表明成年三叶橡胶枝条木质部的导管失去 50%水分传导能力的水势是-1.27 MPa (Chen *et al.*, 2008),因此可以推测三叶橡胶应该是一种对水分亏缺比较敏感的植物。本研究分析了在干旱处理以及随后的复水处理过程中光合特征、抗氧化系统以及水力结构特征的变化,因此,本章研究的目的是:(1)探讨三叶橡胶对水分短缺的适应性;(2)研究干旱复水之后,三叶橡胶生理功能恢复的限制性因素;(3)分析在干旱和复水的过程中三叶橡胶光保护和抗氧化保护机制;(4)分析渗透调节对增强三叶橡胶抗旱性可能的作用。

4.2 实验材料与方法

4.2.1 研究地点

实验在中国科学院西双版纳热带植物园(21°41′N, 101°25′E, 570 m a.s.l.)进行,这里的气候特征如第一章所描述。

4.2.2 实验材料与实验设计

在 2007 年 4 月初从勐仑镇当地的苗木基地购买 2 年生的三叶橡胶幼苗,种 植在塑料花盆中。土壤为橡胶园 15 cm 以上的表层土(砖红壤)。塑料盆深 50 cm, 内径 50 cm,并且底部有空洞,这样在浇水的时候塑料盆内不会积水。塑料盆置 于自然光照条件下,除雨天外,每隔一天在太阳落山后浇水一次;在移栽一个月 后,施复合肥一次;并且随时除掉塑料盆中的杂草。在2007年11月初选取大小 相对一致、长势良好的树苗作为干旱处理的材料移到用无色透明塑料薄膜搭建的 遮挡雨水及雾水的棚中。树苗适应棚中环境一段时间后,开始干旱处理实验。在 实验开始时,这些树苗的高度在 75-85 cm 之间, 胸径在 11-13 mm 之间。实验 材料随机地分为两组,其中一组停止浇水作为干旱处理组,另一组照常浇水作为 对照组,对照组的土壤含水量保持在田间持水量(field capacity)。并且,土表覆盖 黑色的塑料布,目的是减少土壤水分蒸发。当处理组植物叶片凌晨水势达到-3.0 MPa 左右时,再对其进行复水处理。之所以选择此时复水是根据第一章的研究 结果得知,当三叶橡胶木质部水势达到-3.0 MPa 左右时,此时导管几乎完全失 去了水分传导的能力。在实验期间,遮雨棚内的日间大气温度为 27 ± 3℃,夜间 温度为 17 ± 2℃,相对湿度为 75 ± 5%,光照强度相当于自然光照强度的 65%左 右。停水处理 1、6、11、17、21、25、28、32、35 天后以及复水处理 1、3、5 天后,在处理组和对照组同时进行相关指标的测定和分析。

4.2.3 土壤与叶片的水分状况

土壤含水量(Soil water content, SWC)按下列公式计算, SWC = 100×(土壤鲜重 -土壤干重)/土壤干重。取土表以下 20-25 cm 的土壤称鲜重, 然后在 105 ℃烘 箱中干燥 24 h, 称干重。参照 Scholander *et al.* (1965)提供的压力室法用水势仪

- 38 -

(SKPM 1400, Skye, UK)测叶片凌晨水势(Ψ_{pd})。凌晨叶片相对含水量(Relative water content, RWC)按下列公式计算, RWC = 100×(鲜重一干重)/(饱和重一干重), 具体的操作过程与 Galmés *et al.* (2007)提供的方法一致。

4.2.4 木质部栓塞化比率与脆弱性曲线

枝条木质部导管水分传导丧失百分率(Percentage of Loss Conductivity, PLC) 即栓塞化比率的测定参考 Sperry et al. (1988)提供的方法。在干旱处理前,凌晨剪 取整株树苗,然后将树苗放入有湿毛巾的黑色塑料袋内密封,防止枝条进一步失 水,然后立即带回实验室。具体的测定过程和相关参数的计算与第二章相同。

在本实验中,另一水分传导的脆弱曲线来自干旱处理,即水势的降低通过在 遮雨棚内停止浇水造成的。具体的取样过程如下,在停止浇水的过程中,在不同 的时间内,凌晨测定叶片的水势,此时的水势即默认为木质部的水势,然后剪取 整株树苗,立即带回实验室测定 PLC,测定过程和脆弱曲线的拟合如第二章所述。

4.2.5 叶片的水力导度与脆弱性曲线

叶片水力导度(*K*_{leaf})的测定和脆弱曲线的拟合与第三章相同。本实验的另一条 *K*_{leaf} 脆弱曲线的叶片一系列不同水势(Ψ₁)源于干旱处理,Ψ₁为叶片的凌晨水势。 *K*_{leaf} 的测定以及脆弱曲线拟合与第三章相同。

4.2.6 光合作用的测定

用便携式光合作用分析仪(Li-6400, LICOR, Lincoln, Neb.)测定叶片的光响应曲线。具体的测定方法和光响应曲线拟合以及相关参数的获得与第二章相同。

4.2.7 叶绿素荧光的测定

叶绿素荧光的测定用 FMS2 便携式荧光仪(Hansatech 公司)完成。光系统 II(PSII)的内在光化学效($\Delta F/F_m$ ')按着下列公式计算: $\Delta F/F_m$ '=(F_m ' - F_s)/ F_m ', 其中 F_s 是稳定态荧光, F_m '是光适应下的最大荧光(Genty *et al.*, 1989)。非化学淬灭

(Non-photochemical quenching, *NPQ*)根据 Stern–Volmer 方程计算(Bilger & Björkman, 1990),即 *NPQ* = $(F_m - F_m')/F_m'$,其中 F_m 是暗适应下的最大荧光。在本章实验中, F_m 为在凌晨测定的最大荧光。凌晨和正午光系统 II 最大光量子效率 $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Schreiber *et al.*, 1994),其中在正午测定的时候,叶片至少暗适应 20 分钟。

4.2.8 取样方法以及生化指标的分析

在凌晨,采集用来分析光合色素、可溶性蛋白以及脯氨酸的叶片样品;在正午,采集用来分析其它生化指标的叶片样品。样品的采集分别在两组的 5-7 颗树苗上进行,对象是健康向阳的完全成熟叶。采集的样品立即带回实验,保存在-80℃冰箱中。在干旱和复水处理结束之后,一起进行相关生化指标的分析。

4.2.9 光合色素、脯氨酸以及可溶性糖和蛋白质的测定

叶绿素和类胡萝卜素分析参考 Lichtenthaler & Wellburn (1983)提供的方法; 蛋白质分析参考 Lowry *et al.* (1951)提供的方法;可溶性糖的分析参考 David *et al.* (1998)提供的方法; 脯氨酸的分析参考 Monreal *et al.* (2007)提供的方法。

4.2.10 抗坏血酸和谷胱甘肽的测定

抗坏血酸的分析参考 Arakawa et al. (1981)提供的方法;谷胱甘肽的分析参考 Doulis et al. (1997)提供的方法。

4.2.11 酶活性的分析

超氧化物歧化酶(SOD, EC 1.15.1.1)活性的测定参考 Giannopolitis & Ries (1977)提供的 NBT 法,以能抑制反应 50%的酶量为一个 SOD 酶单位。

过氧化氢酶(CAT, EC 1.11.1.6)活性的测定参考 Aebi (1984)提供方法, 酶活性 单位表示为: μmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹蛋白。

过氧化物酶(POD, EC 1.11.1.7)活性的测定参考 Pole *et al.* (1994)提供的方法, 酶活性单位表示为: μmol 愈创木酚 min⁻¹ mg⁻¹蛋白。

抗坏血酸过氧化物酶(APX, EC 1.11.1.11)活性的测定参照 Nakano & Asada (1981)提供的方法,酶活性单位表示为: μmol 还原型抗坏血酸 min⁻¹ mg⁻¹蛋白。

谷胱甘肽还原酶(GR, EC 1.6.4.2)活性的测定参考 Schaedle & Bassham (1977) 提供的方法, 酶活性单位表示为: µmol NADH min⁻¹ mg⁻¹蛋白。

4.3 实验结果

4.3.1 植物的水分状况

停止浇水后, 土壤水分含量迅速下降(图 4.1a)。在停止浇水 11 天后, 处理的 土壤含水量大约只有对照的 50%; 在停止浇水 21 天后,含水量还不到对照的 40%; 在干旱处理结束前(35 天),大约是 30%; 复水后,处理和对照的含水量相 当。叶片凌晨水势(Ψ_{pd})在停止浇水 11 天时,处理和对照都没有明显的差异; 但 此后,处理的叶片Ψ_{pd}迅速地下降,到干旱处理结束前,Ψ_{pd}为-3.0 MPa 左右(图 4.1b)。叶片的相对含水量(RWC)对土壤水分短缺的反应要迟后一些。与对照相比, 在停止浇水 21 天时,处理的叶片 RWC 开始下降,在干旱处理结束前,叶片 RWC 接近 70% (图 4.1c)。干旱处理叶片的Ψ_{pd}和 RWC 分别在干旱复水 3 天和 5 天之 后,完全恢复到对照的水平(图 4.1b & 4.1c)。



图 4.1 在干旱和随后复水处理过程中,土壤含水量(a)、叶片凌晨水势(b)以及叶片相对含水量(c)的变化。空心圆代表对照值,实心圆代表处理值。数据是平均数土标准误(n = 5-7)。

Fig. 4.1 Changes in the water status of *Hevea brasiliensis* during withholding water and subsequent rewatering. Leaf predawn water potential (Ψ_{pd} , b) and leaf relative water content (RWC, c) of well-watered (*open circles*) and water-stressed (*closed circles*) plants were determined before sunrise (06:00–07:00). Means ± SE are shown for data (n = 5–7).

4.3.2 水力特征的变化

如图 4.2a 所示,在干旱处理 11 天后,木质部导管栓塞化比率 PLC 逐渐增加, 在干旱处理结束时, PLC 接近 70%。叶片的水力导度(K_{leaf})在停止浇水 21 天后开 始下降(图 4.2b)。PLC 和 K_{leaf} 在复水 3 天后,都能恢复到对照的水平。



图 4.2 在干旱和随后复水处理过程中,木质部导管栓塞化比率 *PLC* (a) 和叶片水力导度 *K*_{leaf} (b) 的变化。空心圆代表对照值,实心圆代表处理值。数据是平均数±标准误(n = 5–7)。

Fig. 4.2 Changes in stems percentages of loss conductivity (*PLC*, a) and leaf hydraulic conductivity (K_{leaf} , b) of *Hevea brasiliensis* during withholding water and subsequently rewatering. *PLC* and K_{leaf} were measured in well-watered (*open circles*) and water-stressed (*closed circles*) plants. Data are the means \pm SE (n = 5 – 7).

4.3.3 光合色素的变化

如图 4.3 所示,在干旱处理的过程中,处理的类胡萝卜素(Car)、叶绿素(Chl) 以及 Car/Chl 与对照相比没有明显的差异。因此,干旱复水后,处理和对照的光 合色素值同样没有显著的差异。



图 4.3 在干旱和随后复水处理过程中,类胡萝卜素(Car, a)、叶绿素(Chl, b)以及 Car/Chl (c)的变化。空 心圆代表对照值,实心圆代表处理值。数据是平均数±标准误(n = 5-7)。

Fig. 4.3 Effects of withholding water and subsequent rewatering on photosynthetic pigments of *Hevea* brasiliensis. Carotenoids (Car, a), chlorophyll (Chl, b), and Car/Chl (C) were measured in well-watered (*open* circles) and water-stressed (*closed circles*) plants. Data are the mean \pm SE (n = 5–7).

4.3.4 光合作用变化

A_{max}从停止浇水 11 天的 12 μmol m⁻² s⁻¹ 开始降低,在干旱处理结束前达到 2.0 μmol m⁻² s⁻¹ (图 4.4a);相应地,g_{smax}从 480 mmol m⁻² s⁻¹ 降到 50 mmol m⁻² s⁻¹ (图 4.4b);相反地是,处理与对照相比,WUE 随着干旱逐渐严重而不断地增加(图 4.4c)。复水之后,A_{max}不能完全回复到对照的水平;而 g_{smax} 三天后基本恢复到 对照水平。复水后,WUE 立即下降到比对照稍微低一点水平。



图 4.4 在干旱和随后复水处理过程中,最大净光合速率(a)、气孔导度(b)以及水分利用效率(c)的变化。 空心圆代表对照值,实心圆代表处理值。数据是平均数标准误(n = 5-7)。

Fig. 4.4 Gas exchange parameters in *Hevea brasiliensis* during withholding water and subsequently rewatering. Maximum net photosynthetic rate (A_{max} , a), stomata conductance (g_{smax} , b), and water use efficiency (*WUE*, c) were measured in well-watered (*open circles*) and water-stressed (*closed circles*) plants. Data are the mean \pm SE (n = 3–5).

4.3.5 叶绿素荧光的变化

如图 4.5a、4.5b 以及 4.5c 所示,与对照相比,处理的凌晨和正午光系统 II 最大光量子效率(*F*_v/*F*_{m-pd} & *F*_v/*F*_{m-md})以及正午光系统 II 实际光量子效率(Δ*F*/*F*_m') 在停止浇水 21 或 17 天开始下降;复水之后,它们都不能完全恢复到对照的水平。 如图 4.5d 所示,光系统 II 的非化学淬灭 *NPQ* 在停止浇水 11 天后开始上升,在 停止浇水 21 天后达到最大值,然后逐渐下降到对照的水平;复水之后,处理与 对照的 *NPQ* 没有显著的差异。



图 4.5 凌晨光系统 II 最大光量子效率 F_{v}/F_{m-pd} (a)、正午光系统 II 最大光量子效率 F_{v}/F_{m-md} (b)、正午光 系统 II 实际光量子效率 F_{v}/F_{m-pd} (c)以及光系统 II 非化学淬灭 NPQ (d)的变化。空心圆代表对照值,实心圆 代表处理值。数据是平均数土标准误(n = 5–7)。Fig. 4.5 Predawn maximum photochemical efficiency of PSII (F_{v}/F_{m-pd} , a), midday F_{v}/F_{m} (F_{v}/F_{m-md} , b), actual photochemical efficiency of PSII ($\Delta F/F_{m}$ ', c), and non-photochemical quenching (NPQ, d) were measured in well-watered (*open circles*) and water stressed (*closed circles*) plants of *Hevea brasiliensis* during withholding water and subsequently rewatering. Data are the mean ± SE (n = 5–7).



图 4.6 在干旱和随后复水处理过程中, 超氧化物歧化酶 (SOD, a)、过氧化氢酶 (CAT, b)、过氧化物酶 (POD, c)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX, d) 以及谷胱甘肽还原酶 (GR, e) 活性)的变化。空心圆代表对照值, 实心圆代表处理值。WW: 干旱阶段 RW: 复水阶段。酶活性单位见材料与方法部分。数据是平均数标准 误(n = 5-7)。Fig. 4.6 Activities of antioxidant enzymes in *Hevea brasiliensis* during withholding water and subsequently rewatering. Superoxide dismutase (SOD, a), catalase (CAT, b), guaiacol peroxide (POD, c), ascorbate peroxide (APX, d), and glutathione reductase (GR, e) were measured in well-watered (*open circles*) and water-stressed (*closed circles*) plants. WW: Withholding water; RW: Rewatering. Data are the mean ± SE (n = 5-7). See "Material & Method" for the expression of enzyme activities

4.3.6 抗氧化系统活性的变化

如图 4.6 所示,抗氧化酶 SOD、CAT、POD、APX 以及 GR 的活性在停止浇水 17 或 25 天,与对照相比,明显开始逐渐地上升;而且,在复水之后,抗氧 化酶的活性并没有明显的下降。还原型抗坏血酸和谷胱甘肽在整个实验期间处理 和对照之间都没有明显的差异(图 4.7a & 4.7d)。总抗坏血酸在停止浇水 21 天后,与对照相比,开始逐渐地增加;同时,还原型抗坏血酸与总抗坏血酸比值逐渐下降(图 4.7b & 4.7c);谷胱甘肽的变化趋势与抗坏血酸相同(图 4.7e & 4.7f)。在干 旱复水之后,总抗坏血酸和谷胱甘肽含量以及还原型抗坏血酸与总抗坏血酸和还 原型谷胱甘肽与总谷胱甘肽的比值几乎都能恢复到对照的水平。



图 4.7 在干旱和随后复水处理过程中,还原型抗坏血酸 (AsA, a)、总抗坏血酸 (b)、AsA/总抗坏血酸(c)、 还原型谷胱甘肽 (GSH, d)、总谷胱甘肽(e) 以及 GSH/总谷胱甘肽 (f) 活性的变化。空心圆代表对照值,实 心圆代表处理值。数据是平均数标准误(n = 5-7)。

Fig. 4.7 Effects of withholding water and subsequently rewatering on antioxidant metabolites of ascorbate and glutathione of *Hevea brasiliensis*. Reduced ascorbate (a), total ascorbate (b), AsA/ (AsA + DHA) (c), reduced glutathione (d), total glutathione (d), and GSH/ (GSH + GSSG) (f) were measured in well-watered (*open circles*) and water stressed (*closed circles*) plants. Reduced ascorbate: AsA; oxidized ascorbate: DHA; total ascorbate: AsA + DHA; reduced glutathione: GSH; oxidized glutathione: GSSG; total glutathione: GSH + GSSG. Data are the mean \pm SE (n = 5–7).

4.3.7 水分关系的变化

在停止浇水 11 天后,与对照相比,处理的可溶性糖和脯氨酸含量迅速地增加;并且在复水之后,处理的可溶性糖和脯氨酸含量依然比对照的含量高得多(图4.8a & 4.8b)。计算叶片失去 *K*_{leaf} 50%时的水势(Ψ_{P50}),结果发现在实验室离体叶自然失水得到的Ψ_{P50} 为-0.98 MPa;而原位干旱处理得到的Ψ_{P50} 为-1.67 MPa (图4.9a & 4.9b)。同样地,计算枝条导管失去 50%和 88%水分传导能力时的水势Ψ_{P50} 和Ψ_{P88},在实验室离体枝条失水得到的Ψ_{P50} 和Ψ_{P88} 分别是-1.5 和-2.7 MPa;而在野外干旱处理得到的Ψ_{P50} 和Ψ_{P88} 分别是-2.5 和-4.2 MPa (图 4.10a & 4.10b)。如图 4.11 所示,叶片的气孔导度对叶片Ψ_{pd}、*K*_{leaf}以及木质部导管的 *PLC* 都相当敏感,但当Ψ_{pd}、*K*_{leaf}以及 *PLC* 到达某一阀值之后,气孔导度随着上述参数值的变化要缓和得多,而Ψ_{pd}、*K*_{leaf} 以及 *PLC* 的阀值都出现在木质部导管发生不可控制的栓塞化的时候。



图 4.8 在干旱和随后复水处理过程中,可溶性总糖含量(a)和脯氨酸含量(b)的变化。空心圆代表对照值, 实心圆代表处理值。数据是平均数标准误(n = 5-7)。

Fig. 4.8 Changes in total soluble sugar and proline of *Hevea brasiliensis* during withholding water and subsequently rewatering. Contents of total soluble sugar (a) and proline (b) were measure in well-watered (*open circles*) and water-stressed (*closed circles*) plants. Data are the mean \pm SE (n = 5–7).



图 4.9 叶片水力导度 K_{leaf} 与叶片水势的脆弱曲线,曲线 a 叶片水势的降低源于叶片在实验室自然失水,曲线 b 叶片水势的降低源于野外干旱处理。垂直虚线代表叶片达到最大 K_{leaf} 50%时的叶片水势。

Fig. 4.9 Vulnerability of leaf hydraulic conductivity (K_{leaf}) to water potential in *Hevea brasiliensis*. The vulnerability curves were derived from the slowly bench dark-dried leaves (a) and field water-stressed leaves (b), respectively. Vertical dashed lines indicate water potential at which 50% loss of K_{leaf} occurred.



图 4.10 木质部导管栓塞化比率与水势的脆弱曲线,曲线 a 木质部水势的降低源于在实验室叶片自然 失水,曲线 b 木质部水势的降低源于野外干旱处理。垂直实现代表导管失去 50%水分传导能力时的水势, 垂直虚线代表导管完全失去水分传导能力时的水势。

Fig. 4.10 Vulnerability of stem percentages of loss conductivity (*PLC*) to water potential in *Hevea* brasiliensis. The vulnerability curves were derived from the slowly bench dark-dried stems (a) and field water-stressed stems (b), respectively. The vertical solid and dashed lines indicate water potential at which 50% *PLC* and full-embolisms occurred, respectively.



图 4.11 叶片最大气孔导度(g_{smax})与叶片凌晨水势Ψ_{pd} (a)、叶片水力导度 K_{leaf} (b) 以及木质部导管栓塞 比率 *PLC* (c) 的关系。垂直虚线代表木质部导管发生不可控制的栓塞化时的叶片水势、叶片水力导度以及 栓塞化比率。

Fig. 4.11 The relationships between maximum stomatal conductance (g_{smax}) of leaf (n = 3 - 5) and predawn water potential (Ψ_{pd}) of leaf (n = 5 - 7), predawn conductivity (K_l, b) of leaf (n = 5 - 7), and predawn percentages of loss conductivity (*PLC*, c) of stems (n = 5 - 7) in *Hevea brasiliensis* during withholding water. Standard error bars are shown for each point. Vertical dashed lines indicate water potential, K_l , and *PLC* at which stem runaway cavitations occurred, respectively.

4.4 讨论

4.4.1 干旱处理对光合作用的影响

本研究结果表明,当土壤的含水量低于田间持水量的50%时,叶片Ψ_{pd}和RWC 开始下降(图 4.1),这说明田间持水量的50%是三叶橡胶对土壤水分短缺开始响 应的一个临界值,土壤含水量低于这个值,三叶橡胶将对土壤水分的短缺表现出 一系列的生理、生态以及形态结构上的适应性。有证据表明气孔的关闭是植物对 水分短缺最早的响应(Cornic, 2000),但气孔的关闭将直接导致光合速率下降。因 此,气孔导度和光合速率的下降是植物遭受水分短缺的时候发生的必然现象,本 研究也不例外。当然,气孔的关闭并不是干旱处理过程中植物光合速率下降的唯 一原因。有研究认为气孔限制和非气孔限制共同的作用导致了从轻度干旱到重度 干旱过程中植物光合速率的下降(Johnson *et al.*, 1987; Gimenez *et al.*, 1992)。水分 的短缺将使植物不得不加强水分的光合利用效率以获得足够的碳源,结果植物的 *WUE* 较高。本研究的结果(图 4.4c)和其它的研究结果(Rouhi *et al.*, 2007)都证实了 遭受水分短缺时植物具有较高的光合水分利用效率。总之,干旱的过程中,气孔 的关闭有利于减少水分的损失,但同时也导致了植物光合速率的降低。

植物光合速率的降低使其吸收的光能超过了自身光合作用的需要,从而发生 光抑制。*F*_v/*F*_m的降低常常作为光抑制发生的标志,在光系统 II 遭受不可逆的损 伤之前,*F*_v/*F*_m的降低实际上是一种光保护策略,它的下降加强了 *NPQ* 散热效率。 但是,如果凌晨 *F*_v/*F*_m发生了明显的降低,则可以视为植物的光系统 II 遭受到了 不可逆的损伤。在本研究中,光系统 II 发生不可恢复的损伤发生在停止浇水 25 天后,这暗示着在停止浇水 21 天之前光合速率的下降可能主要是由于气孔的关 闭所引起的,在这之后,光系统 II 遭受的不可逆的损伤成为光合速率下降的主 要原因。光系统 II 受损伤一个主要的起因是受到活性氧化物 ROS 的攻击。

4.4.2 光保护机制对干旱处理的响应

植物有一整套的避免 ROS 的产生以及及时清除 ROS 的保护机制。在干旱的 处理过程中,植物的叶绿素会降解,这被认为有利于减少光能的吸收从而起光保 护的作用(Munné-Bosch & Alegre, 2000)。令人意外的是,在本干旱处理研究中并 没有发现叶绿素的降解(图 4.3b),不过已有干旱处理的实验研究报告了相同的结 果(Hernández *et al.*, 2004; Gallé *et al.*, 2007),其中的原因可能是植物的光保护是 通过减小光系统 II 天线的体积以及改变其结构来实现的(Gallé *et al.*, 2007)。越来 越多的证据表明随着土壤水分的逐渐短缺,植物叶片 Car/Chl 比值逐渐升高 (Munné-Bosch & Alegre, 2000; Sánchez-Diaz *et al.*, 2007)。然而,在本研究中,并 没有发现这一结果(图 4.3c),这说明三叶橡胶对水分的短缺采取的是一种被动的 调整策略(down-regulation),而不是主动的调整策略(up-regulation)。

除了减少光能的吸收外,植物另一光保护策略是加强 NPQ 散热,因此,较高的 NPQ 值在干旱处理的植物中经常被发现。然而,在本研究中,NPQ 在停止 浇水的 21 天后到达最大值,然后逐渐下降到对照的水平(图 4.5d)。有证据表明 NPQ 值与叶黄素去环氧化的状态直线正相关 (Qiu et al., 2003)。一般来说,植物 在正午叶黄素去环氧化的水平较高,因此,在正午 NPQ 值也较高;而在夜间, 去环氧化的水平较低。然而,在植物遭受严重的水分短缺的时候,即使在夜间, 叶黄素去环氧化的水平也较高,以保证较高含量的玉米黄质来清除 ROS,减轻氧化胁迫的压力(Augusti et al., 2001),这样在正午叶黄素循环将减弱, NPQ 值下 降。当然,NPQ 值的下降也有可能是由于光系统 II 遭受到了不可逆的损伤的结 果,因为在本研究中 NPQ 值在停止浇水的 25 天后开始下降,而那时正是光系统 II 遭受不可逆损伤的时间。但不管原因是什么,NPQ 值的下降表明干旱处理已 使植物面临了较严重的光氧化胁迫的压力。

不过,抗氧化酶活性的增加也可以在一定程度上减轻氧化胁迫的压力。在干旱的环境条件下,抗氧化酶活性的增加对 ROS 的清除是非常迅速和及时的,这一点已经在相关的研究中得到了证实(Munné-Bosch & Penuelas, 2004; Sofo *et al.*, 2005)。相同的是,随着干旱处理的进行,本研究也发现了抗氧化酶活性将逐渐地增加(图 4.6)。这说明抗氧化酶活性的增加使三叶橡胶有可能通过加强 ROS 的清除而提高自身抵抗干旱的能力。此外,应该指出的是,在本研究中抗氧化酶活性的增加至少发生在停止浇水 21 天后,而那时叶片的气孔导度在 100 mmol m⁻²

s⁻¹ 以下;这与大量的研究报道结果一致,即在干旱处理过程中当叶片的气孔导度下降到 100 mmol m⁻² s⁻¹ 以下时,抗氧化酶活性将迅速增加(Flexa *et al.*, 2006)。

另一方面, 据报道 AsA 和 GSH 可以通过抗坏血酸一谷胱甘肽循环直接清除 ROS、维持叶绿体内氧化还原态势平衡、保护植物免受氧化胁迫的伤害(Neubauer & Yamamoto, 1994; Asada, 1999)。不过, 植物叶片中的 AsA 和 GSH 对干旱的响 应是充满争议的, 并且随着树种和所处环境的变化而变化, 它们的调控机制目前 还不是很清楚。例如, 当还魂植物(*Sporobolus stapfianus*)遭受水分短缺时, AsA 和 GSH 并没有明显的增加(Sgherri *et al.*, 1994; Loggini *et al.*, 1999)。相反的是, 当另一些植物特别是水生植物遭受水分胁迫时, AsA 和 GSH 将显著的增加 (Buckland *et al.*, 1991; Navari-Izzo *et al.*, 1997; Augusti *et al.*, 2001)。在本研究中, 虽然处理和对照之间的 AsA 和 GSH 没有显著差异, 但是两者的 AsA 和 GSH 含 量都较高, 这说明三叶橡胶的 AsA 和 GSH 具有强大的抗氧化的保护作用, 可以 减轻三叶橡胶氧化胁迫的压力和光系统 II 的氧化伤害。

4.4.3 水分关系对干旱处理的响应

到目前为止,虽然关于人为模拟干旱对植物木质部导管栓塞化比率 *PLC* 和 叶片水力导度 K_{leaf} 的影响的研究还不多。不过,可以肯定的是,当植物遭受严重 的水分短缺的时候,导管的空穴化和栓塞化的发生将不可避免。在本研究中,木 质部导管 *PLC*的增加以及 K_{leaf} 的下降分别发生在停止浇水 17和21天后(图 4.2)。 当植物的水力导度下降时,气孔必然会作出相关的响应。本研究发现,当木质部 的导管发生不可控制的空穴化(runaway cavitations)的时候,气孔导度迅速地从 480 mmol m⁻² s⁻¹ 左右降到 100 mmol m⁻² s⁻¹ 左右(图 4.11c)。此外,本研还发现, 诱导叶片气孔导度大幅度下降的叶片水势和 K_{leaf} 两者都与木质部导管发生不可 控制的栓塞化时的叶片 Ψ_{pd} 和 K_{leaf} 接近(图 4.11a & 4.11b)。气孔大幅度关闭可以 避免导管栓塞化进一步发展,因而被认为是植物对水分短缺的一种适应策略,已 有相当多的证据表明了这一点(Tyree & Ewers, 1991; Cochard, 1992)。因此,本研 究结果暗示不可控制的栓塞化作为一种水力信号诱导了气孔大幅度的关闭,同时 气孔的关闭有利于避免栓塞化进一步的发生。

野外干旱处理导致了 *K*_{leaf} 对叶片水势降低的响应变得迟缓(图 4.9), 其中的原因可能是渗透调节的结果, 因为干旱处理导致了渗透调节物可溶性糖和脯氨酸大幅度的增加(图 4.8)。然而, 渗透调节存在与否随植物种类和栖息地的变化而变化(Chaves *et al.*, 2003)。由于本研究并没有分析干旱处理是否导致了三叶橡胶渗透势发生了变化, 因此并不能确定渗透调节在三叶橡胶的叶片中真的存在。所以, 能否从 *K*_{leaf} 的脆弱曲线来判断渗透调节的存在还有待进一步的研究。

另一方面,野外干旱处理导致了导管抗栓塞化的能力得到了加强(图 4.10)。 当然有一种可能是,在植物遭受比较严重干旱的时候,叶片的凌晨水势低于木质 部导管的水势,而本研究一直把叶片的凌晨水势默认为木质部导管的水势,这样 就有可能低估了Ψ_{P50}值。不过幸运地是,已有了同一种植物的处在不同的水分条 件下,导管失去 50%水分传导能力时的水势发生较显著变化的报道。例如,地中 海雪松科植物(*Cedrus atlantica*),当水分条件较好时,Ψ_{P50}为-4.4 MPa;当处在 中度干旱时,它的Ψ_{P50}降到-6.7 MPa (Ladial *et al.*, 2005)。研究者认为,在两种 水分条件下产生的Ψ_{P50}差异主要是由于干旱诱导了筛管直径变小。实际上,最近 已有了很多研究报道证实干旱处理将使植物导管直径变小,并且改变导管径级的 分布特征(Lovisolo & Schubert, 1998; Arnold & Mauseth, 1999; Schume *et al.*, 2004)。本研究虽然没有分析土壤水分逐渐的短缺对三叶橡胶木质部导管形态结 构产生的影响,但是应该可以认为本研究的干旱处理对木质部形态结构的影响将 会与上述的相关报道一致。因此,这说明三叶橡胶木质部形态结构对水分短缺的 适应,结果导致了导管抗栓塞化能力的增强。

4.4.4 复水后的生理响应

在复水之后,光合速率不能恢复到对照的水平,即使气孔导度能够完全的恢复(图 4.4a & 4.4b)。这种光合速率的不完全恢复的原因应该是非气孔因素造成的,这意味着干旱处理已经对光合器官造成了不可恢复的损伤。遭受干旱的植物的非

气孔限制除了是因为核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶受到伤害外,还包括光合作用过程中的生物化学和光化学活力受到的干旱的影响(Lopez et al., 1987)。如果遭受干旱的植物在复水之后,它的光合速率能快速的恢复说明该植物的光合作用过程中的生物化学和光化学代谢途径没有受到伤害(Cornic, 2000)。最近有人认为遭受干旱的植物复水之后生理功能能否完全恢复与一系列复杂的因素相关,包括干旱对光系统 II 电子传递以及叶绿体和线粒体结构的伤害(Miyashita et al., 2005)。本研究结果表明,即使在复水 5 天后,处理的凌晨 *F*_v/*F*_m也没能恢复到对照的水平,这说明干旱处理至少对光系统 II 造成了不可逆的伤害。

然而,有研究报道证实遭受干旱胁迫的植物在复水后光合速率不能完全的恢 复源于光合作用的终端产物一碳水化合物的积累而产生的反馈抑制(Souza et al., 2004)。实际上,在这之前已有研究报到了碳水化合物的积累对光合速率的反馈 抑制作用(Goldschmidt & Huber, 1992)。在复水后,处理的可溶性糖含量比对照明 显的高一些(图 4.7a),但本研究并不能确定光合速率的不完全恢复就是反馈抑制 的结果。相反地,有研究认为可溶性糖的积累标志着一些生化代谢途径受到了伤 害(Campos et al., 1999)。此外,尽管脯胺酸被认为有渗透调节的功能,但有研究 认为它也是植物受到水分胁迫伤害的标志(Irigoyen et al., 1992)。虽然本研究不能 确认可溶糖和脯胺酸对光合速率不能完全的恢复起了什么作用,但可以认为干旱 处理对植物的正常生理代谢已经产生了不可逆的伤害,这样复水只后,植物的光 合速率也就无法完全恢复。

本研究发现遭受干旱处理的植物复水之后,其水分的光合利用效率 WUE 较低(图 4.4c)。这与 Miyashita et al. (2005)和 Gallé et al. (2007)报道的结果相反,他 们认为遭受干旱胁迫的植物复水后,光合速率比气孔导度对复水反应更快,这样 导致了较高的 WUE。不过,在有些研究中,对干旱处理过的植物进行复水后, 并没有发现植物的 WUE 升高(Cai et al., 2005; Ennahli & Earl, 2005)。关于复水之 后植物的 WUE 在不同的研究中有不同的结果,Gallé et al. (2007)认为是因为不同 的实验材料和不同的干旱处理强度造成的。在本研究中,WUE 降低的原因可能 是复水之后气孔导度能完全恢复,而光合速率则不能完全恢复造成的。

- 53 -

光合速率不完全的恢复将使曾经遭受干旱胁迫的植物面临更大的散热压力。 不过,本研究并没有发现遭受水分短缺的三叶橡胶复水之后,NPQ 值增加(图 4.5d),这与 Gallé et al. (2007)研究报道的结果一致,但在他们的实验中,遭受水 分短缺的植物在复水之后光合速率能完全恢复,而在本研究中光合速率并没有完 全恢复。有趣的是,本研究发现,在复水之后三叶橡胶抗氧化酶的活性依然保持 着较高的水平,这说明虽然 NPQ 值没有增加,但是活性较高的抗氧化酶能有效 地清除 ROS,从而有利于减轻光氧化损伤的压力。此外,AsA 和 GSH 的含量在 整个实验期间都维持在一个较高的水平,它们在植物复水之后所起的作用可能与 抗氧化酶一致。有研究证实遭受干旱的植物复水之后,抗氧化系统维持较高的活 性是相当必要的,因为复水之后光合作用的恢复可能需要相当长的一段时间,从 而散热压力比较大(Augusti et al., 2001)。最近又有报道证实,在复水之后,较高 的抗氧化酶活性在曾经遭受干旱胁迫的植物恢复正常生长的过程中扮演着重要 的角色(Upadhyaya et al., 2008)。总之,在复水之后,抗氧化系统的活性较高有助 于减轻植物光氧化损伤的压力。

遭受水分胁迫的植物在复水之后,其叶片Ψ_{pd}和 RWC 能迅速地恢复到对照的 水平(图 4.1b & 4.1c),在很多的干旱复水的研究中都报道了这一结果 (Sánchez-Blanco *et al.*, 2002; Gallé *et al.*, 2007),其中的原因可能是干旱诱导的栓 塞化在复水之后能迅速被清除。这一解释得到了本研究结果的佐证,即导管栓塞 化比率 *PLC*在复水之后迅速地下降(图 4.2a)。*K*_{leaf}在复水之后能迅速恢复(图 4.2b) 原因可能也是导管栓塞化能被迅速的清除的结果。*K*_{leaf}完全的恢复也至少部分解 释了为什么在复水之后气孔导度能完全的恢复(图 4.5c)。然而,应该重点指出的 是,在本研究中,即使三叶橡胶遭受了严重的干旱胁迫,造成了某些生理功能不 可恢复的伤害,它的水力结构特征都能迅速而完全地恢复到对照的水平。这些结 果说明干旱处理对植物水力结构特征造成的伤害并不是复水之后植物生理功能

4.5 小结

本章研究结果发现,(1) 三叶橡胶对土壤水分短缺的第一反应是叶片气孔关 闭;当土壤含水量为田间最大持水量的45%左右时,气孔大幅度地关闭;气孔关 闭在减少水分损失同时,导致了光合速率下降,光合速率的下降使三叶橡胶面临 更大的散热压力,*NPQ*值增加。(2)随着水分亏缺到达严重程度,当土壤含水量 为田间最大持水量的35%左右时,光系统 II 遭受不可逆的损伤;同时,要么是 叶黄素循环的减弱,要么是光系统 II 受到了破坏,*NPQ*散热能力下降。(3)当 土壤含水量为田间最大持水量的35%以下时,气孔导度下降到100 mmol m⁻² s⁻¹ 以下,此时,抗氧化酶活性迅速升高,而抗坏血酸一谷胱甘肽循环在整个实验期 间都比较活跃。(4)就在叶片气孔大幅度关闭的同时,木质部导管栓塞化比率 *PLC*增加,而叶片水力导度*K*leaf 下降,气孔的关闭有利于避免导管进一步的栓 塞化。(5)水分短缺可能促使三叶橡胶的导管发生形态结构上的适应,结果导管 抗栓塞化的能力得到了加强;此外,可能是由于可溶性糖和脯胺酸渗透调节的作 用,干旱处理使*K*leaf 对叶片水势的响应变得迟缓。

本研究结果还发现,(1)当土壤含水量接近田间最大持水量的30%时,可能 是由于光合器官受到了不可逆伤害,也可能是由于其它一些生物化学和光化学代 谢途径受到了永久性的伤害,复水之后,三叶橡胶的光合速率和光系统 II 光化 学效率不能完全恢复到对照的水平。(2)光合速率和光系统 II 光化学效率的不完 全的恢复使光系统 II 面临更大散热压力,因为叶绿素和类胡萝卜素在整个实验 期间没有显著的变化;复水后 NPQ 值维持在与对照相同的水平,这样在复水之 后,三叶橡胶依然维持抗氧化系统较高的活力可能有助于减轻氧化胁迫的压力。 (3)即使三叶橡胶遭受严重的水分短缺,水力结构特征受到的伤害在复水之后都 能迅速地恢复,这说明水力结构特征并不是遭受水分胁迫的三叶橡胶复水后,其 恢复正常生理功能的限制性因素。

第五章 三叶橡胶对夜间低温的适应性

5.1 引言

滇南地处热带北缘,由于横断山脉、哀牢山和云贵高原的屏障,该地区分布 和保存着较大面积的热带雨林,具有很高的生物多样性(Zhu,1997; Cao & Zhang, 1997)。近40年来,若干重要的热带经济植物如橡胶、咖啡、芒果等在该地区相 继引种成功并获得大面积的发展,是我国仅次于海南的热带经济植物的生产基 地,这对当地少数民族地区经济的发展起了重要的作用。但是,有时北方寒流顺 着南北走向的河谷侵入,加上剧烈的辐射降温,使引种的和当地土著热带植物发 生冷害,结果导致了热带经济植物大面积减产,严重年份甚至使其大面积冻死, 给当地的农林生产造成重大损失。

低温是植物向高纬度和高海拔分布的主要限制因子(Sakai & Larcher, 1987; Woodward, 1987)。6-10 ℃ 的低温就可以使有些热带植物遭受冷害,导致其组织 结构伤害以及生理上的失调(Crawford, 1989)。1999 年底滇南地区发生了一场严 重的冷害,版纳热带雨林保护区极端低温曾达到 2℃。在低温条件下,植物的光 合能力会大大减弱,而叶片对光能的吸收却很少受温度的影响(Baker, 1994),从 而产生光抑制的现象。光抑制是由于叶片吸收的光能超过了植物进行最大光合作 用的需要,结果使其光合机构的光化学效率降低。过剩的光能如果不能及时而安 全地耗散,就会通过多种途径产生活性氧化物(Reactive oxygen species, ROS),引 起膜脂过氧化、损伤光合机构(Verhoeven *et al.*, 1998 & 1999; Huner *et al.*, 1998)。

植物有两个主要的生理保护性机制可以减轻低温引起的光氧化损伤,(1)通过 叶黄素循环耗散一部分多余的非辐射能量(Demmig-Adams, 2003);(2)通过抗氧化 系统清除活性氧物 ROS (Asada, 1994)。抗氧化系统包括活性氧酶清除系统和非 酶清除系统,前者主要有超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物 酶(POD)等等,后者主要包括抗坏血酸、谷胱甘肽、类胡萝卜素等等。最近研究 发现,低温使有些冷敏感植物叶黄素循环受阻,降低其热耗散效率;而冷冻锻炼 促进耐冷植物叶黄素循环,结果提高了热耗散效率(Koroleva *et al.*, 1994)。另一方面,低温对抗氧化系统的影响有不同的报道,总的来说,随着树种和冷害程度的变化而变化(Zhao & Blumwald, 1998; Walker & McKersie, 1993)。

在版纳地区,低温主要出现在夜间,而白天的温度依然较高,对植物的光合作用不会产生低温抑制(Feng & Cao, 2005)。即使在干冷季节,正常年份最低夜间 温度一般在6℃左右,而白天的温度在20℃以上。这种低温的类型不同于温带 地区的低温类型,在温带地区低温不但出现在夜间,也出现在白天,并且白天伴 随着较强的光照。尽管关于温带、寒温带植物的耐寒性及其机理已有了大量研究 (Sakai & Larcher, 1987),但热带植物的冷敏感性及其机理的研究还比较少。

三叶橡胶(Hevea brasiliensis)属于大戟科植物,起源于南美洲亚马逊河流域热 带雨林(Wycherley, 1992)。在起源地,三叶橡胶属于常绿植物,然而引种到西双 版纳地区后,叶片习性发生了变化,在每年的二月底至三月初,三叶橡胶的叶片 会全部脱落(Feng, 2007; Chen & Cao, 2008)。三叶橡胶叶片习性的这种转变,除 了版纳地区季节性干旱是可能的原因之一外,该地区干冷季的夜间低温可能也会 对三叶橡胶某些生理功能造成不可恢复的损伤。因此,本章的研究目的是,(1) 研究三叶橡胶对夜间低温的敏感性;(2)探讨经夜间低温处理后,三叶橡胶的光 保护机制以及抗氧化保护机制。
5.2 实验材料与方法

5.2.1 实验材料

实验材料为三叶橡胶树苗。2007年4月初从当地苗木基地购买50棵两年生 橡胶树苗,种植在塑料盆中。塑料盆置于自然光照条件下,除雨天外,每隔一天 在太阳落山后浇水一次;在移栽一个月后,施复合肥一次;并且随时除掉塑料盆 中的杂草。塑料盆深50 cm,内直径50 cm,并且底部有空洞,这样在浇水的时候 塑料盆内不会积水。在2007年11月选取大小相对一致、长势良好的树苗作为夜 间低温处理的材料。这些树苗的高度在75-85 cm之间,胸径在11-13 mm之间。 处理时把实验材料分为两组,每一组包括10-13颗树苗,其中一组置于5 ℃夜 间温度的冷库中,另一组置于15℃夜间温度的冷库中。由于15℃夜间温度与当 地自然夜间温度接近,因此可以把这一组的处理作为对照。不同的夜间温度处理 按如下方法进行,每天晚上19:00点左右,把植物分别移到5℃和15℃夜间温度 的冷库中,在第二天早上07:00点左右,又放回自然光照下,连续处理7天,每 天进行相关指标的分析,测定和取样时选取的都是完全展开的成熟叶。另外,在 本研究中,低温处理时间为零时的各种参数是在低温处理前测定的相关指标。

5.2.2 测定和取样时间

凌晨的荧光测定在 06:00-07:00 之间进行;正午的荧光测定在 14:30-15:30 之间进行。光合参数的测定在 10:00-11:30 之间进行。相关生化指标分析的取样 在正午的荧光测定结束之后进行,分析样品首先置于冷藏箱中,然后立即带回实 验室保存在-80℃冰箱中。

5.2.3 实验方法

(1) 叶绿素荧光的测定用 FMS2 型脉冲调制荧光仪(英国 Hansatech 公司)完成。 非化学淬灭 $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ (Bilger & Björkman, 1990), F_m' 为光适应下的 最大荧光, F_m 为暗适应下的最大荧光, 在本研究中为凌晨的 F_m 。光系统 II 的内

- 59 -

在光化学效率 $\Delta F/F_{m}' = (F_{m}' - F_{s})/F_{m}'$ (Genty *et al.*, 1989), F_{s} 为光适应下的稳定 态荧光。光系统 II 的最大光化学效率 $F_{v}/F_{m} = (F_{m} - F_{0})/F_{m}$ (Schreiber *et al.*, 1994), 其中正午 F_{v}/F_{m} 的测定在叶片至少暗适应 20 分钟之后进行。

(2) 用 LI-6400 便携式光合仪(LI-COR, Lincoln, Nebraska, UAS)测定饱和光照下的最大净光合速率(A_{max})以及最大气孔导度(g_{smax})。测定时使用开放气路系统,空气流速为 0.5 L/min,相对湿度为 60%, CO₂ 浓度为 380 μmol/mol,测定光强

(LED 光源)随着植物受伤害程度加重而不断地变小。

(3) 叶绿素(Chl)和类胡萝卜素(Car)分析方法与第四章相同。

(4) 蛋白质分析方法与第四章相同。

(5) 过氧化氢(H₂O₂)含量的测定参考 Velikova et al. (2000)提供的方法。

(6) 丙二醛(MDA)含量的测定参考 Hodges et al. (1999)提供的方法。

(7) 抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD, EC 1.15.1.1)、过氧化氢酶(CAT, EC 1.11.1.6)、 过氧化物酶(POD, EC 1.11.1.7)、抗坏血酸过氧化物酶(APX, EC 1.11.1.11)、谷胱 甘肽还原酶(GR, EC 1.6.4.2)活性以及抗坏血酸和谷胱甘肽含量的测定方法与第 四章相同

5.3 实验结果

5.3.1 夜间低温对光合特征参数的影响

如图 4.1 所示,处理前两组材料的 A_{max}和 g_{smax} 没有显著差异,但是三叶橡胶的 A_{max}和 g_{smax}对 5℃夜间温度处理相当敏感,而对 15℃夜间温度处理不敏感。 无论处理时间的长短,15℃夜间温度处理的三叶橡胶 A_{max}和 g_{smax}与处理前相比都没有明显的变化,其 A_{max} 保持在 9.0-11.0 µmol m⁻² s⁻¹之间,g_{smax} 保持在 0.20 - 0.25 mol m⁻² s⁻¹之间。这说明 15℃夜间温度处理,从光合角度来衡量,对植物没有造成任何伤害。因此,在本研究中把 15℃夜间温度处理的材料作为 5℃夜间温度处理的材料的对照。而 5℃夜间温度处理三叶橡胶 12 h 后,与处理前和对照相比较,其 A_{max} 降低了 50%左右。处理前三叶橡胶最大气孔导度是 0.25 mol m⁻² s⁻¹ 左右,而 5℃夜间温度处理 12 h 后,最大气孔导度下降到 0.05 mol m⁻² s⁻¹ 左右, 而 5℃夜间温度处理 12 h 后,最大气孔导度下降到 0.05 mol m⁻² s⁻¹ 左右, 大约相当于对照的 20%。随着 5℃夜间温度处理时间的延长,A_{max}和 g_{smax} 呈下降的趋势,在试验结束时(第 7 天),两者的值接近零。



图 5.1 不同夜间温度处理对三叶橡胶光合特征参数的影响。*A*_{max} (maximum photosynthetic rate at saturating light):最大净光合速率(a); g_{smax} (maximum stomatal conductance):最大气孔导度(b)。空心圆代表 15 ℃夜间温度处理;实心圆代表 5 ℃夜间温度处理。数据为平均数±标准误(n = 3-5)。

Fig. 5.1 The effects of 5 °C (*closed circles*) and 15 °C (*open circles*) night temperature on photosynthetic parameters in leaves of *Hevea brasiliensis* trees. A_{max} : maximum photosynthetic rate at saturating light (a); g_{smax} : maximum stomatal conductance (b). Data are the means ± SE (n = 3–5).

5.3.2 荧光参数对夜间低温的响应

如图 5.2a 所示,与对照相比,5℃夜间温度处理三叶橡胶 12 h 后,其凌晨 F_v/F_m 并没有明显的变化;但此后随着低温处理时间的延长,其凌晨 F_v/F_m 与对照相比,显著降低(P < 0.05)。如图 5.2b 所示,正午 F_v/F_m 对 5℃夜间温度处理较敏感,处理 12 h 后,其值就显著地低于对照(P < 0.05)。夜间低温处理对 $\Delta F/F_m$ '影响也较明显(图 5.2c),总的来看,对照的 $\Delta F/F_m$ '明显高于 5℃夜间低温处理的,但 $\Delta F/F_m$ '受天气变化的影响较大,因此对照与低温处理之间的 $\Delta F/F_m$ '的差值除受低温伤害的影响,还受到天气状况的影响。夜间低温处理对三叶橡胶的非化学淬灭 NPQ的影响也较显著(图 5.2d),夜间低温处理 12 h 后,与对照相比,处理的散热压力较大,因此 NPQ显著地增加。与 $\Delta F/F_m$ '受到天气的变化影响一样,NPQ也受天气状况的影响,所以对照与低温处理之间 NPQ的差值除受到低温伤害的影响,也受到天气状况的影响,但 NPQ与 $\Delta F/F_m$ '呈相反的变化趋势。



图 5.2 不同夜间温度处理对三叶橡胶光系统 II (Photosystem II, PSII)光化学效率的影响。Predawn F_v/F_m : 凌晨 PSII 的最大光化学效率(a); Midday F_v/F_m : 正午 PSII 的最大光化学效率(b); $\Delta F/F_m$ ': 正午 PSII 的内在 光化学效率(c); *NPQ* (Non-photochemical quenching): 非化学淬灭(d)。空心圆代表 15 ℃夜间温度处理; 实 心圆代表 5 ℃夜间温度处理。数据为平均数土标准误(n = 7–9)。

Fig. 5.2 The effects of 5 °C (*closed circles*) and 15 °C (*open circles*) night temperature on photochemical efficiency of photosystem II (PSII) in leaves of *Hevea brasiliensis* trees. Predawn F_v/F_m : predawn maximum photochemical efficiency of PSII (a); Midday F_v/F_m : midday maximum photochemical efficiency of PSII (b); $\Delta F/F_m$ ': actual photochemical efficiency of PSII (c); *NPQ*: non-photochemical quenching (d). Data are the means \pm SE (n = 7–9).



图 5.3 不同夜间温度处理对三叶橡胶荧光参数的影响。Predawn F_0 : 凌晨初始荧光(a); Predawn F_m : 凌 晨最大荧光(b); Midday F_0 : 正午初始荧光(c); Midday F_m : 正午最大荧光(d)。空心圆代表 15 ℃夜间温度 处理; 实心圆代表 5 ℃夜间温度处理。数据为平均数±标准误(n = 7–9)。

Fig. 5.3 The effects of 5 °C (*closed circles*) and 15 °C (*open circles*) night temperature on chlorophyll fluorescence parameters in leaves of *Hevea brasiliensis* trees. Predawn F_0 : predawn minimum fluorescence (a); Predawn F_m : predawn maximum fluorescence (b); Midday F_0 : midday minimum fluorescence (c); Midday F_m : midday maximum fluorescence (d). Data are the means \pm SE (n = 7–9).

如图 5.3a 所示,随着 5℃夜间低温处理时间的延长,凌晨初始荧光 F_0 逐渐增加,但在夜间低温处理 60 h 后,凌晨 F_0 又突然下降;不过在低温处理 24 h 之后,与对照相比,处理的凌晨 F_0 总是较高。另外,与对照相比,夜间低温处理后,无论处理时间的长短,处理的凌晨最大荧光 F_m 总是较低(图 5.3b)。另一方面,夜间低温处理后,与对照相比,处理的正午 F_0 总是较高(图 5.3c)。而在夜间低温处理 24 h 之后,处理的正午 F_m 总是比对照低一些(图 5.3d)。

5.3.3 夜间低温对光合色素的影响

夜间低温处理 24 h 之后,与对照相比,处理的光合色素并没有发生明显的变化(图 5.4)。在夜间低温处理 36 h 后,叶绿素(Chl)才开始逐渐地下降(图 5.4a)。 而 Chl a/b 的下降发生在夜间低温处理 48 h 之后(图 5.4b)。与对照相比,在夜间 低温处理 36 h 之后,处理的类胡萝卜素(Car)才发生明显的降低(图 5.4c)。同样地, Car/Chl 比值的增加也发生在夜间低温处理 36 h 之后(图 5.4d)。这些结果表明, 与光合和荧光参数对夜间低温的响应相比较,光合色素对夜间低温处理的响应要 慢一些。



图 5.4 不同夜间温度处理对三叶橡胶叶绿素(a)、叶绿素 a/b (b)、类胡萝卜素(c)以及类胡萝卜素 / 叶绿素(d)的影响。空心圆代表 15 ℃夜间温度处理;实心圆代表 5 ℃夜间温度处理。数据为平均数±标准误(n = 7)。

Fig. 5.4 The effects of 5 °C (*closed circles*) and 15 °C (*open circles*) night temperature on photosynthetic pigments in leaves of *Hevea brasiliensis* trees. Chl: chlorophyll (a); Chl a/b: chlorophyll a/b (b); Car: caroteneoids (c) and Car/Chl: carteneoids/chlorophyll (d). Data are the mean \pm SE (n = 7).

5.3.4 夜间低温处理对植物的伤害

如图 5.5a 所示,在夜间低温处理 36 h之后,可溶性蛋白开始逐渐地降解; 在夜间低温处理 48 h之后,与对照相比,处理的可溶性蛋白含量显著地降低(*P* < 0.05);此外,可溶性蛋白对夜间低温的响应与光合色素相比较在时间上有同步性。 夜间低温处理 12 h之后,过氧化氢(H₂O₂)的积累明显地增加,并且随着夜间低温 处理时间的延长,处理的 H₂O₂ 的含量在逐渐地增加(图 5.5b)。丙二醛是膜脂过 氧化的终端产物之一,而膜脂过氧化是由于受到 H₂O₂之类活性氧化物攻击的结 果。所以,MDA 的积累与 H₂O₂ 在时间上有同步性,在夜间低温处理 12 h之后, MDA 就开始积累,并且随着低温处理时间的延长,与对照相比,处理的 MDA 的 积累越来越多(图 5.5c)

5.3.5 夜间低温对抗氧化酶活性的影响

夜间低温处理对抗氧化酶活性的影响如图 5.6 所示,其中 SOD 和 CAT 对夜 间低温处理具有相同的响应趋势,在夜间低温处理 12、24、36 h 的时候,与对 照相比,处理的 SOD 和 CAT 抗氧化酶的活性较高;而在夜间低温处理 48 h 及 其之后,与对照相比,处理的 SOD 和 CAT 的抗氧化酶活性反而逐渐下降(图 5.6a & 5.6b)。而 POD 对夜间低温处理的响应则与 SOD 和 CAT 不同,在夜间低温处 理 12 和 24 h 的时候,与对照相比,处理的 POD 抗氧化酶的活性没有显著的变 化;但在夜间低温处理 36 h 及其之后,与对照相比,低温处理的 POD 抗氧化酶 的活性逐渐地上升(图 5.6c)。应该值得强调的是,SOD 和 CAT 抗氧化酶活性开 始下降以及 POD 抗氧化酶活性上升的拐点都大约出现在光合色素明显对夜间开 始响应的时候。



图 5.5 不同夜间温度处理对三叶橡胶可溶性蛋白(a)、过氧化氢(b)以及丙二醛(c)含量的影响。空心圆 代表 15 ℃夜间温度处理;实心圆代表 5 ℃夜间温度处理。数据为平均数±标准误(n = 7)。

Fig. 5.5 The effects of 5 °C (*closed circles*) and 15 °C (*open circles*) night temperature on soluble protein (a), hydrogen peroxide (H₂O₂, b) and malondiadehyde (MDA, c) in leaves of *Hevea brasiliensis* trees. Data are the mean \pm SE (n = 7).



图 5.6 不同夜间温度处理对三叶橡胶抗氧化酶活性的影响。SOD (superoxide dismutase): 超氧物岐化 酶; CAT (catalase): 过氧化氢酶; POD (guaiacol peroxidase): 过氧化物酶。空心圆代表 15 °C 夜间温度处理; 实心圆代表 5 °C 夜间温度处理。数据为平均数±标准误(n = 7)。

Fig. 5.6 The effects of 5 °C (*closed circles*) and 15 °C (*open circles*) night temperature on the activities of SOD (superoxide dismutase, a), CAT (catalase, b) and POD (guaiacol peroxidase, c) in leaves of *Hevea* brasiliensis trees. Data are the mean \pm SE (n = 7).

5.3.6 夜间低温对抗坏血酸一谷胱甘肽循环的影响

如图 5.7 所示,夜间低温处理 12 h 及其之后,与对照相比,低温处理的还原型抗坏血酸和还原型谷胱甘肽含量以及 APX 和 GR 活性明显较低,并且逐渐下降。这说明夜间低温处理抑制了抗坏血酸一谷胱甘肽循环的活力,细胞通过此循环途径清除活性氧化物的能力下降。



图 5.7 不同夜间温度处理对三叶橡胶还原型抗坏血酸(a)和还原型谷胱甘肽(b)以及抗坏血酸过氧化物 酶(c)和谷胱甘肽还原酶(d)活性的影响。AsA (reduced ascorbate):还原型抗坏血酸; GSH (reduced glutathione):还原型谷胱甘肽; APX (ascorbate peroxidease):抗坏血酸过氧化物酶; GR (glutathione reductase):谷胱甘肽还原酶。空心圆代表 15 ℃夜间温度处理;实心圆代表 5 ℃夜间温度处理。数据为平均 数±标准误(n = 7)。

Fig. 5.7 The effects of 5 °C (*closed circles*) and 15 °C (*open circles*) night temperature on the content of AsA (reduced ascorbate, a) and GSH (reduced glutathione, b) as well as the activities of APX (ascorbate peroxidease, c) and GR (glutathione reductase, d) in leaves of *Hevea brasiliensis* trees. Data are the mean \pm SE (n = 7).

5.4 讨论

5.4.1 夜间低温诱导光合作用能力下降

在处理前,两组三叶橡胶的最大净光合速率(A_{max})和气孔导度(g_{smax})没有明显 差异,但在5℃夜间低温处理后,三叶橡胶的A_{max}和g_{smax}发生了较大程度的降低。 已有很多研究报道证实夜间低温处理热带植物将导致植物的光合速率和气孔导 度下降(Feng *et al.*, 2002; Guo & Cao, 2004; Guo *et al.*, 2005; Feng & Cao, 2005)。本 研究结果也与Martin *et al.* (1981)、F1exas *et al.* (1999)以及Allen *et al.*(2000)分别对 冷敏感植物蕃茄、葡萄以及芒果的研究结果相同。植物光合速率对夜间低温的反 应有两种类型(Feng *et al.*, 2002): 一种是,第2天光照后,低温处理的植株光合速 率就低于对照,如番茄(Martin *et al.*, 1981); 另一种是,第2天光照后,低温处理 植株的光合速率保持稳定一段时间,再后来显著低于对照,对夜间低温的反应表 现出迟滞性,如芒果(Allen *et al.*, 2000)。在本研究中,无论自然光照还是人工光 源照射不同夜间温度处理过的三叶橡胶,发现低温处理的光合速率总是比对照 低,表明三叶橡胶对夜间低温的反应属第一种类型,这也同时暗示三叶橡胶可能 是冷敏感性植物。

很多冷敏感植物在经低温处理后,光合作用的气孔限制均增大,如番茄 (Martin et al., 1981)、葡萄(Flexas et al., 1999)和芒果(Allen et al., 2000)等。在本研 究中,经夜间低温处理后,三叶橡胶的气孔导度大幅度地下降(图5.1b),说明三 叶橡胶的气孔导度对夜间低温处理相当的敏感。到目前为止,夜间低温处理导致 气孔导度低于对照植株的机理还不清楚,但推测可能与低温诱导某些化学物质的 积累有关;例如,脱落酸的积累将引起气孔的关闭。另一方面,夜间低温能干扰 番茄蔗糖磷酸合成酶和硝酸还原酶活性的昼夜节律性(Jones et al., 1998)和叶绿 素结合蛋白及核酮糖1,5二磷酸羧化加氧酶 (Rubisco)活化酶基因表达的昼夜节 律性(Martino-Cart & Ort 1992);夜间低温还能抑制淀粉的转移(Leegood & Edwards, 1996),使从细胞质返回到叶绿体的无机磷减少(Stitt, 1991),导致光合 作用终产物的反馈抑制。此外,活性氧化物和膜脂过氧化产物MDA均能抑制光 合酶活性(Lin et al., 1989 & 2000)。夜间低温处理导致了H₂O₂和MDA迅速地积累 (图5.5b & 5.5c),这可能也是5 ℃夜间低温处理后三叶橡胶光合速率迅速降低的 原因之一。

夜间低温的处理并没有立即导致光合色素的下降,而是至少在低温处理 36 h 之后, Chl 和 Car 才发生明显的降解(图 5.4a & 5.4c),这一结果与 Cai *et al.* (2003) 和 Guo *et al.* (2005)报道的结果一致。夜间低温处理后,虽然 Chl 和 Car 含量均下 降,但 Car/Chl 增大, Chl a/b 变小(图 5.4b & 5.4d),这种变化可以降低光能的吸 收,实际上也是增强光保护能力的一种策略(Kyparissis *et al.*, 2000)。

5.4.2 夜间低温对光系统 II 的光化学效率和热耗散的影响

光系统II最大光化学效率(F_v/F_m)降低是光合作用发生光抑制的显著特征,常常被作为判断植物是否发生光抑制的指标(Demmig-Adams & Adams III, 1992; Demmig-Adams, 2003);此外,最大荧光(F_m)降低也是植物发生光抑制的一个特征(Demmig & Björkman, 1987)。白天F_v/F_m降低表明发生了日间光抑制,凌晨 F_v/F_m降低表明发生了长期光抑制(chronic photoinhibition)或胁迫诱导的光抑制 (Long *et al.*, 1994)。三叶橡胶夜间低温处理12 h后,凌晨F_v/F_m与对照相比并没有 发生明显的降低(图5.2a),这说明夜间低温处理12 h后三叶橡胶光系统II并没有发 生长期光抑制。但本研究无法很好地解释在夜间低温处理12 h后凌晨F_v/F_m没有发 生明显变化,而凌晨F_m发生明显的降低(图5.3b)。有可能的是,用F_v/F_m比用F_m 能更好地判断植物是否受到了光抑制。夜间低温处理12 h后,正午F_v/F_m和ΔF/Fm^{*} 发生明显的降低(图5.2b & 5.2c),这说明与对照相比,低温处理的三叶橡胶发生 了更加明显的日间光抑制。随着低温处理时间的延长,三叶橡胶凌晨F_v/F_m发生 了明显的降低,结果日间光抑制就更加明显。在光系统II遭受不可恢复的破坏之 前,日间光抑制是植物光保护的一种策略,它将加强光系统II的NPQ散热的效率。

初始荧光(F₀)的升高,表明光系统II反应中心发生了可逆失活或破坏 (Demmig-Adams& Adams III, 1992; Krause & Weis, 1991)。低温处理12 h后,三叶 橡胶的凌晨F₀与处理前相比并没有发生明显的变化(图5.3a),表明光系统II没有发 生可逆失活或破坏,从凌晨F_v/F_m值的变化来看,似乎也证实了这一点。但无论 低温处理时间的长短,处理的正午 F_0 总是比对照要高(图5.3c),这说明低温处理 的三叶橡胶光系统II反应中心失活或受到的伤害要严重一些。失活但未被破坏的 光系统II反应中心可作为激发能的猝灭器而耗散掉多余的光能,从而保护反应中 心免遭光破坏,这可能是植物避免反应中心光系统II过度破坏而进行的功能上的 自我调节(Krause & Weis, 1991)。热耗散可以防御光抑制的破坏(Xu & Shen, 1997), 热耗散的程度通常可用 NPQ 的大小来衡量 (Krause & Weis, 1991; Demmig-Adams & Adams III, 1992; Long et al., 1994)。夜间低温处理后, 三叶橡 胶光系统II的NPO明显增加(图5.2d)。虽然夜间低温处理后热耗散增加,但随着低 温处理时间的延长,它并不能防止光系统II反应中心的可逆失活或破坏(图5.2a & 5.3a),表明增加的热耗散量不足以耗散掉夜间低温处理造成的过剩光能。研究表 明, 4-6 ℃夜间低温可使某些植物光合作用大幅度地降低(Flexas et al., 1999; Allen et a1., 2000; Feng et al., 2002), 这样植物吸收的光能就可能大量地超过了光 合作用的需要。如果NPQ不足以耗散掉多余的能量,吸收的光能可以通过电子传 递链产生活性氧化物(ROS),这个时候植物就不得不启动另外一套保护系统来及 时地清除这些ROS,免遭其伤害。

5.4.3 夜间低温与活性氧代谢

在正常的生理条件下,植物的抗氧化系统能够及时地清除细胞内多余的活性 氧化物,维持细胞内ROS的生理代谢平衡,避免由于过多ROS的积累引起的生理 失调,从而保护细胞正常生理功能的进行(Salin, 1988; Demming-Adams & Adams III, 1992)。本研究表明,在夜间低温处理下,虽然在处理的早期,三叶橡胶叶片 细胞内抗氧化保护酶SOD和CAT活性上升,但同时H₂O₂和MDA的含量一直上升, 这一现象与Cao *et al.*(2006)报道的结果相似。这说明抗氧化酶SOD和CAT并没有 完全有效清除细胞内的活性氧化物,植物细胞内活性氧的产生与清除可能已经失 衡。有报道也认为细胞内ROS的积累可能是由于ROS的产生速率超过了抗氧化保 护酶清除的能力(Droillard *et al.*, 1989; Pastori & Trippi, 1993; Cai *et al.*, 2003)。另 外,随着夜间低温处理时间的延长,SOD和CAT的活性反而下降,原因可能是由 于叶绿体受到了低温破坏,叶绿素发生了降解,SOD和CAT失去了生化合成位点。 有研究认为这也是在植物叶片自然衰老而叶绿素降解的过程中抗氧化酶SOD和 CAT活性下降的原因(Dhindsa *et al.*, 1981; Hurng & Kao, 1994)。除了抗氧化酶 SOD和CAT能有效地清除ROS外,抗氧化酶POD在清除ROS保护细胞免受活性氧 化物的伤害等方面也扮演重要的角色。不过有研究报道认为POD活性的上升一般 发生在细胞受到严重氧化胁迫的时候,它的作用是阻止H₂O₂进一步的积累,因 此POD活性的上升也常常被视为细胞受到了不可逆的氧化伤害(Kang *et al.*, 2003a & b; Chen & Cao, 2008)。在本研究中,POD活性的上升发生在低温处理36 h 之后,在这个时候光合色素发生了明显的降解,这也说明光合器官可能受到了活 性氧化物的不可逆的伤害,此时POD活性的上升加强了酶促系统清除活性氧化物 的能力,可能有助于减轻光合器官进一步受到氧化胁迫伤害。

在植物清除体内过多活性氧化物的过程中,抗坏血酸一谷胱甘肽循环起重要 作用(Foyer & Halliwell, 1976; Noctor & Foyer, 1998)。在本研究中,夜间低温处理 之后以及随着处理时间的延长,抗坏血酸一谷胱甘肽循环活力不断地下降,说明 通过这一途径来清除细胞内活性氧化物的能力在下降。特别有研究认为在植物遭 受严重氧化胁迫的时候细胞内的活性氧化物主要是通过抗坏血酸一谷胱甘肽循 环来清除的(Noctor & Foyer, 1998)。因此,可以推测在低温处理的后期,细胞内 H₂O₂的积累主要原因可能是由于抗坏血酸一谷胱甘肽循环清除ROS能力的减弱。 关于低温对抗坏血酸—谷胱甘肽循环的影响的报道很多,有报道认为低温促进抗 坏血酸—谷胱甘肽循环(Kocsy *et al.*, 2000);有报道认为低温抑制抗坏血酸—谷胱 甘肽循环(Walker & McKersie, 1993; Zhao & Blumwald, 1998);另一方面,有研究 认为低温促进耐冷害植物的抗坏血酸—谷胱甘肽循环取决于植物材料对低温的敏感 性,低温促进耐冷害植物的抗坏血酸—谷胱甘肽循环,而抑制冷敏感植物的抗坏 血酸—谷胱甘肽循环(Huang & Guo, 2005)。从前面的分析结果和起源地来看,三 叶橡胶应属于冷敏感性植物,而本研究结果表明,夜间低温处理抑制了三叶橡胶 抗坏血酸—谷胱甘肽循环,这与上述的研究报道相一致。

低温胁迫下,活性氧化物的清除以及膜脂过氧化涉及到多种活性氧以及酶促

- 71 -

和非酶促保护系统复杂的平衡关系,活性氧化物的清除需要整个防御系统的协调 作用。因此,叶片部分保护酶活性临时性上升并不意味着活性氧化物的积累立即 下降。另外,低温胁迫下活性氧化物过量的生成可能超过了整个防御系统的清除 能力,相当一部分来不及清除的活性氧化物逐渐积累,它们不断地攻击细胞膜, 加剧了膜脂的过氧化,从而引起膜系统的损伤,结果导致植物依赖于细胞膜完整 性的生理功能的下降。

5.5 小结

三叶橡胶对 5℃夜间低温异常敏感,低温处理 12 h 后,其 A_{max}大约降低到处 理前和对照的 50%,气孔导度下降到 50 mmol m⁻² s⁻¹ 左右,并且随着处理时间的 延长,两者的值越来越低。光合作用能力的下降主要原因是夜间低温处理导致了 光系统 II 的失活和破坏。此外,夜间低温处理使三叶橡胶的抗氧化保护系统不 能有效地保护其免受氧化胁迫的伤害,因此,可溶性蛋白以及叶绿素和类胡萝卜 素降解。虽然 Car/Chl 比值增加以及 Chl a/b 比值下降在一定程度上起着光保护的 作用,但并不能阻止过氧化氢和丙二醛含量的增加以及氧化胁迫伤害的加重。

第六章 一种新的抗氧化物—单萜类化合物在三叶橡胶叶片中的抗氧 化特性

6.1 引言

单萜类或者异戊二烯类化合物是自然界最丰富多样的一类化学产物,它们的 化学分子结构有直线型的,有环聚型的,最简单的是由五个碳原子组成的萜类化 合物,最复杂的是天然橡胶,它包括成千上万异戊二烯单元(Mahmoud & Croteau, 2002)。其中,一些异戊二烯类化合物,例如类胡萝卜素和 α-生育酚,具有光保 护的生理作用;然而,异戊二烯(Isoprene)和一些单萜类(Monoterpene)化合物虽然 在一些植物中不存在,但它们也可能具有光保护的生理功能(Peňuelas & Munné-Bosch, 2005)。据研究报道,单萜类化合物的形成依赖于光呼吸的活力, 在非光呼吸的条件下:单萜类化合物的产生似乎可以代替光呼吸过程,保护植物 免受高温的伤害(Peňuelas & Llusià, 2002)。此外,有研究研究证实,在温度升高 的情况下,单萜类化合物有增强植物叶片热忍耐性的生理作用(Loreto et al., 1998);还有研究报道证实单萜类化合物具有清除活性氧化物(Reactive oxygen species, ROS)的能力,从而起抗氧化胁迫的作用(Loreto et al., 2004)。因此,关于 异戊二烯和单萜类化合物的生理功能人们提出了两个假说,一是稳定和保护植物 细胞膜免受高温的伤害,具有增强植物热忍耐性的作用(Sharkey & Singsaas, 1995; Singsaas et al., 1997; Loreto et al., 1998); 二是能清除叶绿体中 ROS, 因此具有抗 氧化的生理功能(Loreto et al., 2001; Affek & Yakir, 2002)。

有研究报道,产生异戊二烯和一些特殊的单萜类化合物(例如,柠檬烯、α和 β-蒎烯)的植物叶片比上述化合物被抑制的植物叶片能忍受更高的温度(Sharkey & Yeh 2001; Peňuelas & Llusià, 2002; Peňuelas *et al.*, 2005)。到目前为止,在所有 的研究中,异戊二烯生化合成的抑制都是通过对叶片"喂施"膦胺霉素来实现的, 并且所有的研究报道都证实膦胺霉素能专一性地抑制异戊二烯的生化合成 (Zeidler *et al.*, 1998; Loreto & Velikova, 2001; Sharkey *et al.*, 2001)。除此之外,最 近,有人对不产生异戊二烯只产生单萜类化合物植物叶片"喂施"膦胺酶素,结 果发现膦胺霉素也能专一性地抑制单萜类化合物的生化合成(Loreto et al., 2004)。

在自然环境条件下,植物经常会面临强光和高温的不利环境。结果植物叶片将不可避免地导致光氧化胁迫,甚至包括光氧化损伤。氧化胁迫源于 ROS 的产生和清除的失衡。不过,植物本身具有一系列的光保护和抗氧化保护机制,可以减少 ROS 的产生,清除细胞内过多的 ROS。目前,所知道的细胞内的 ROS 主要是由酶促和非酶促系统来清除(Noctor & Foyer, 1998)。例如,过氧化氢酶(Catalase, CAT)和过氧化物酶(Peroxidase, POD)就是植物细胞内清除 ROS 两种主要的酶(Willckens *et al.*, 1995)。

三叶橡胶(Hevea brasiliensis)能产生大量的单萜类化合物(主要是 α 和 β-蒎烯 以及桧烯),但产生的异戊二烯却很少,以至无法检测出其具体含量(Kliger et al., 2002)。本实验把通过蒸腾作用"喂施" 膦胺霉素的三叶橡胶叶片置于高光照和 中等强度的温度下,本研究的预测是,与异戊二烯合成能被膦胺霉素专一性地抑 制一样,单萜的合成也能被膦胺酶素专一性地抑制;结果由于单萜类化合物的缺 失将导致植物叶片中其它的酶和非酶保护机制更活跃。

因此,本章的研究目的是,(1)确认单萜类化合物的合成能否被膦胺酶素专一 性地抑制;(2)如果能,那单萜类化合物的缺失能否引起其它酶和非酶抗氧化系 统更有效;(3)近一步确认单萜类化合物在三叶橡胶叶片中可能扮演的抗氧化的 生理功能。

- 74 -

6.2 实验材料与方法

6.2.1 实验材料

实验在 2006 年 9 月进行。光照条件较好的成年三叶橡胶树作为本研究的取 样对象。具体的取样过程如下,橡胶树的枝条部分地浸入盛有水的水桶中,在水 中用枝剪剪断枝条,带叶的枝条末端始终浸在水中。选择叶龄、叶位、照光情况 相似的叶片作为通过蒸腾作用"喂施"30 μM 膦胺酶素的材料,其中"喂施"蒸 馏水的为对照。"喂施"实验在实验室内进行,在"喂施"过程中,保持室温和 弱光照(10 μmol m⁻² s⁻¹),电风扇提供均匀的微风,以加强蒸腾作用,"喂施"时 间为 2-3 小时。"喂施"结束后,置于强光照(1500 μmol m⁻² s⁻¹)下,温度保持在 30 ± 1℃,而叶片的末端始终保持在"喂施"的溶液中。每隔十分钟测一次光系 统 II (PSII)的光化学效率。一小时后,样品立即置入超低温冰箱(-80 ℃)保存,作 为进一步分析其它生化指标的样品。

6.2.2 分析方法

(1) 叶绿素荧光的测定用 FMS2 便携式荧光仪(Hansatech 公司)完成。PSII 的内在 光化学效($\Delta F/F_{m}$ ')按着下列公试计算: $\Delta F/F_{m}$ '=(F_{m} ' – F_{s})/ F_{m} ', 其中 F_{s} 是稳定态 荧光, F_{m} ' 是光适应下的最大荧光(Genty *et al.*, 1989)。PSII 非化学淬灭 (Non-photochemical quenching, *NPQ*)根据 Stern–Volmer 方程计算(Schreiber *et al.*, 1994), 即 *NPQ* = ($F_{m} - F_{m}$ ')/ F_{m} ', 其中 F_{m} 是暗适应下的最大荧光。在本章实验 中, F_{m} 为高光照处理前暗适应 20 min 后所测定的最大荧光。

(2) 叶绿素和类胡萝卜素分析方法与第四章相同。

(3) 蛋白质分析方法与第四章相同。

(4) 过氧化氢(H₂O₂)分析方法与第五章相同。

(5) 丙二醛(MDA)分析方法与第五章相同。

(6) 单萜的分析参考 Llusià & Peňuelas (2000)提供的方法,由中国科学院昆明植物研究所植化分析测试中心帮助分析完成。

(7) 抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD, EC 1.15.1.1)、过氧化氢酶(CAT, EC 1.11.1.6)、 过氧化物酶(POD, EC 1.11.1.7)、抗坏血酸过氧化物酶(APX, EC 1.11.1.11)、谷胱 甘肽还原酶(GR, EC 1.6.4.2)活性以及抗坏血酸和谷胱甘肽含量的测定方法与第 四章相同。但其中, CAT 酶活性表示为ΔA₂₄₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白; POD 酶活性表示 为ΔA₄₇₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白; APX 酶活性表示为ΔA₂₉₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白; GR 酶活性表 示为ΔA₃₄₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白。

6.3 实验结果

6.3.1 "喂施" 膦胺霉素后单萜类化合物的变化

叶片"喂施"膦胺霉素 2-3 小时导致单萜类化合物含量显著降低(图 6.1)。与
对照(CK)相比,叶片"喂施"膦胺霉素(Leaves Fed with Fosmidomycin, LFF)后,
α-蒎烯、β-蒎烯、桧烯以及总单萜含量分别减少了 87% (P < 0.01)、88% (P < 0.01)、
83% (P < 0.01)以及 88% (P < 0.01)。



图 6.1 "喂施" 膦胺霉素对桧烯、蒎烯、蒎烯以及总单萜含量的影响。数据为平均数±标准误(n = 6-8)。 用 t 检验分析对照(CK)与处理(LFF)之间小于 5% 的显著水平。

Fig. 6.1 Effects of fosmidomycin feedings on concentrations of sabinene, α -pinene, β -pinene and total monoterpene. Means (n = 6–8) ± SE are shown for controls (CK) and leaves fed with fosmidomycin (LFF). Significant differences (P < 0.05) were confirmed by Student's *t*-test.



图 6.2 "喂施" 膦胺霉素对叶绿素(Chl)和类胡萝卜素(Car)的影响。数据为平均数±标准误(n = 5-7)。用 t 检验分析对照(CK)与处理(LFF)之间小于 5% 的显著水平。

Fig. 6.2 Effects of fosmidomycin feedings on contents of chlorophylls (Chl, a) and carotenoids (Car, b). Means (n = 5–7) \pm SE are shown for controls (CK) and leaves fed with fosmidomycin (LFF). Significant differences (P < 0.05) were confirmed by Student's *t*-test.

6.3.2 "喂施" 膦胺霉素对光合色素的影响

如图 6.2 所示,与 CK 相比,LFF 的叶绿素和类胡萝卜素含量没有显著变化, 这说明膦胺霉素对叶绿素和类胡萝卜素的生化合成和更新没有产生显著的影响。

6.3.3 "喂施" 膦胺霉素对 PSII 光合效率的影响

随着置于强光下的时间的延长,LFF 和 CK 的 PSII 内在光化学效率 $\Delta F/F_m$,明显下降,而非化学淬灭效率 NPQ 增加(图 6.3)。与 CK 相比,当暴露于强光下的时间分别为 10 分钟和 20 分钟时,LFF 的 $\Delta F/F_m$,下降明显,但随着暴露于强光下的时间进一步延长,LFF 和 CK 都遭受严重的光抑制,两者的 $\Delta F/F_m$,的差异逐渐消失(图 6.3a)。另一方面,暴露于强光下时,LFF 的非化学淬灭 NPQ 与 CK 相比,两者没有明显的差异(图 6.3b)。



图 6.3 "喂施" 膦胺霉素对光系统 II 内在光合效率(ΔF/F_m')和非化学淬灭(NPQ)的影响。数据为平均数 土标准误(n = 5-7)。用 t 检验分析对照(空心三角形)与处理(空心圆形)之间小于 5% 的显著水平。

Fig. 6.3 Effects of fosmidomycin feedings on actual photochemical efficiency $(\Delta F/F_m)$, a) and non-photochemical quenching (*NPQ*, b) of photosystem II. Means (n = 5–7) ± SE are shown for controls (CK, *Open triangles*) and leaves fed with fosmidomycin (LFF, *Open circles*). Significant differences (P < 0.05) were confirmed by Student's *t*-test.

6.3.4 "喂施" 膦胺霉素对抗氧化酶活性的影响

在暴露于强光下1小时之后,分析抗氧化酶活性变化,发现LFF与CK相比, LFF的抗氧化酶活性明显增高(图 6.4)。与CK相比,LFF的SOD、CAT、POD、 APX以及GR活性分别增加了66%(P<0.05)、102%(P<0.05)、80%(P<0.05)、 51%(P<0.05)以及21%(P<0.1)。



图 6.4 "喂施" 膦胺霉素对超氧化物歧化酶(SOD, a)、过氧化氢酶(CAT, b)、过氧化物酶(POD, c)、抗坏 血酸过物氧化酶(APX, d)以及谷胱甘肽还原酶(GR, e)活性的影响。数据为平均数±标准误(n = 5–7)。用 t 检验分析对照(CK)与处理(LFF)之间小于 5% 的显著水平。

Fig. 6.4 Effects of fosmidomycin feedings on activities of antioxidant enzyme of superoxide dismutases (SOD, a), catalase (CAT, b), guaiacol peroxidase (POD, c), ascorbate peroxidase (APX, d), and glutathione reductase (GR, e). Means (n = 5–7) \pm SE are shown for controls (CK) and leaves fed with fosmidomycin (LFF). Significant differences (*P* < 0.05) were confirmed by Student's *t*-test.



图 6.5 "喂施" 膦胺霉素对还原型抗坏血酸 (AsA, a)、氧化型抗坏血酸 (DHA, b)、抗坏血酸库 (AsA + DHA, c) 以及还原型抗坏血酸与抗坏血酸库比值(d) 的影响。数据为平均数±标准误(n = 5–7)。用 t 检验 分析对照(CK)与处理(LFF)之间小于 5% 的显著水平。

Fig. 6.5 Effects of fosmidomycin feedings on contents of reduced ascorbate (AsA, a), oxidized ascorbate (DHA, b) and ascorbate pool (AsA+DHA) (c) as well as AsA/ (AsA + HAD) (d). Means (n = 5-7) ± SE are shown for controls (CK) and leaves fed with fosmidomycin (LFF). Significant differences (P < 0.05) were confirmed by Student's *t*-test.

6.3.5"喂施" 膦胺霉素对抗坏血酸的影响

如图 6.5 所示,与 CK 相比,LFF 中的还原型、氧化型以及总抗坏血酸分别 增加了 12% (P < 0.1)、134% (P < 0.05)、63% (P < 0.05),而还原型与总抗坏血酸 的比值下降了 34% (P < 0.05)。

6.3.6"喂施"膦胺霉素对谷胱甘肽的影响

如图 6.6 所示,与 CK 相比,LFF 的还原型谷胱甘肽几乎没有变化,而氧化型和总谷胱甘肽分别增加了 34% (*P* < 0.05)和 11% (*P* < 0.1),还原型与总谷胱甘肽的比值下降了 12% (*P* < 0.1)。



图 6.6 "喂施" 膦胺霉素对还原型谷胱甘肽 (GSH, a)、氧化型谷胱甘肽 (GSSG, b)、谷胱甘肽库 (GSH + GSSG, c) 以及还原型与谷胱甘肽库比值(d) 的影响。数据为平均数±标准误(n = 5-7)。用 t 检验分析对照 (CK)与处理(LFF)之间小于 5% 的显著水平。

Fig. 6.6 Effects of fosmidomycin feedings on contents of reduced glutathione (GSH, a), oxidized glutathione (GSSG, b), and glutathione pool (GSH + GSSG) (c) as well as GSH/ (GSH + GSSG) (d). Means (n = 5-7) \pm SE are shown for controls (CK) and leaves fed with fosmidomycin (LFF). Significant differences (P < 0.05) were confirmed by Student's *t*-test.

6.3.7 "喂施" 膦胺霉素对过氧化氢和丙二醛含量的影响

如图 6.7 所示,与 CK 相比,LFF 的过氧化氢(H₂O₂)含量增加了 68% (P < 0.05); 而丙二醛(MDA)含量增加了 32% (P < 0.05)。



图 6.7 "喂施" 膦胺霉素对过氧化氢(H₂O₂, a)和丙二醛(MDA, b)含量的影响。数据为平均数±标准误(n = 5-7)。用 t 检验分析对照(CK)与处理(LFF)之间小于 5% 的显著水平。

Fig. 6.7 Effects of fosmidomycin feedings on contents of hydrogen peroxide (H₂O₂, a) and malonyldiadehyde (MDA, b). Means (n = 5–7) \pm SE are shown for controls (CK) and leaves fed with fosmidomycin (LFF). Significant differences (P < 0.05) were confirmed by Student's *t*-test.

6.4 讨论

单萜类化合物生化合成几乎能被瞵胺酶素完全的抑制(图 6.1)。这与已有的报 道结果完全一致。例如, Loreto et al. (2004) 报道,"喂施" 瞵胺酶素给冬青栎 (Quercus iles)的叶片,结果发现瞵胺酶素能迅速而完全地抑制单萜类化合物的生 化合成。在这里需要强调的是,瞵胺酶素对其它类异戊二烯化合物,例如类胡萝 卜素的生化合成也是有抑制作用的(Laule et al., 2003)。而本研究的实验结果表 明,"喂施" 瞵胺酶素对叶绿素和类胡萝卜素的含量没有显著的影响(图 6.2)。此 外,"喂施" 瞵胺酶素对光系统 II 非光化学淬灭 NPO 也没有显著的影响(图 6.3b), 而 NPO 散热程度高度地依赖于叶黄素的循环(Horton, 1994), NPO 值没有变化意 味着叶黄素循环状态可能没有发生变化,进而可以推测"喂施"瞵胺酶素给三叶 橡胶叶片对其内在的叶黄素循环没有产生显著影响。虽然本研究没有直接分析 "喂施" 瞵胺酶素对叶黄素循环的影响, 但本研究的推测得到了相关实验结果的 佐证。因为有研究报道,在单萜类化合物的生化合成被瞵胺酶素抑制的几个小时 之内,叶黄素的去环氧化状态没有发生显著的变化,并且类胡萝卜素的含量保持 相对稳定(Loreto et al., 2004)。然而, 怎么解释"喂施" 膦胺酶素抑制单萜类化合 物的生化合成,而对类胡萝卜素没有产生影响呢?因为前者和后者具有相同的生 化合成途径和生化合成位点(Logan et al., 2002; Affeck & Yakir, 2002)。首先必须肯 定的是, 瞵胺酶素最终将抑制类胡萝卜素的生化合成, 但在本研究所"喂施"的 瞵胺酶素浓度下以及"喂施"的时间内, 瞵胺酶素对类胡萝卜素生化合成和更新 不能产生抑制的作用。这意味着与结构相对简单的单萜类化合物相比,结构复杂 的类胡萝卜素的更新(turn-over)更慢(Laule et al., 2003; Loreto et al., 2004)。因此, 可以初步地认为在本研究的实验中瞵胺酶素专一性地抑制了单萜类化合物的生 化合成,而对类胡萝卜素的合成和更新以及生理功能不产生影响。

"喂施"瞵胺酶素专一性地抑制单萜类化合物的生化合成,导致叶片中的单萜类化合物的缺失,同时,"喂施"瞵胺酶素的叶片的 H₂O₂ 含量较高(图 6.7a),这意味着单萜类化合物可能具有强大的抗氧化的生理功能(Loreto *et al.*, 2004)。这样由于单萜类化合物抗氧化功能的缺失导致细胞内累积了较高浓度的 H₂O₂,结

- 82 -

果植物将面临较严重地氧化胁迫压力。据研究报道,细胞膜的变性(denaturation) 源于 H₂O₂ 以及其它 ROS 的攻击从而膜脂发生过氧化,膜脂过氧化的终端产物之 — MDA 在细胞内就会积累(Heath & Parker, 1968), MDA 积累的越多,说明植物 受到的氧化伤害越严重。"喂施" 膦胺酶素将导致积累较多的 MDA(图 6.7b),这 说明,较高浓度的 MDA 的积累可能是由于单萜类化合物抗氧化功能的缺失所造 成的;同时,从另一个方面也说明单萜类化合物具有抗氧化从而保护细胞膜的生 理功能。总之,H₂O₂ 和 MDA 积累可能就是由于"喂施"膦胺酶素导致的单萜 类化合物抗氧化功能的缺失。

本研究发现,单萜类化合物的生化合成被瞵胺酶素抑制的叶片对高光照和中 等强度温度的不利环境较敏感。据报道,中等强度的高温将导致内囊体膜离子的 通透性变大,这样不容易形成跨膜离子浓度梯度,三腺苷磷酸(ATP)的合成将减 少,光化学效率将降低(Pastenes & Horton, 1996; Bukhov *et al.*, 1999)。虽然随着 置于高光照和中等强度温度的时间延长, Δ*F*/*F*_m'在处理和对照之间没有显著的 差异,但在头 20 分钟时间内,"喂施"瞵胺酶素叶片的Δ*F*/*F*_m'明显较低(图 6.3a)。 这一结果的可能原因是,与对照相比,由于单萜类化合物的缺乏,导致了 H₂O₂ 的积累和膜的损伤,膜的损伤直接导致了光化学效率的降低。这也从另一个方面 证实了单萜类化合物抗氧化的生理功能。

当遭受氧化胁迫不利环境的时候, H₂O₂ 作为信号分子能激活植物细胞内一系列的分子、生化以及生理的响应机制(Neill *et al.*, 2002)。因此,可以认为"喂施" 膦胺酶素导致的 H₂O₂ 的增加有可能作为信号分子激活其它抗氧化系统的活性。 这样,在本研究中,与对照相比,处理的抗氧化酶活性较高(图 6.4),这应该可以视为是对"喂施" 膦胺酶素导致的 H₂O₂ 过多积累的一种响应,相同的响应也出现在非酶促抗氧化系统中(图 6.5 & 6.6)。Tichy & Vermaas (1999)研究发现,抗氧化酶 CAT 和 POD 活性较高对维护正常的生长发育并不是至关重要的,但当H₂O₂ 的积累达到亚致死浓度时,CAT 和 POD 清除 ROS 的功能就显得非常关键。 此外,还有研究发现,在保护性生理反应过程中 H₂O₂ 能调节基因的表达(Levine *et al.*, 1994; Foyer *et al.*, 1997; Etienne *et al.*, 2000)。因此,人们认为 H₂O₂ 有双重 的角色。在低浓度的时候,它起信号传导的作用,激活生理性保护机制以抵抗不利的外界环境;而在高浓度的时候,它将破坏细胞膜并且诱导细胞程序性死亡 (Dat et al., 2000)。在"喂施"瞵胺酶素的叶片中 H₂O₂含量较高,这可能加强了 某些生理保护性基因的表达,结果抗氧化酶促和非酶促系统的活性增加。在本研 究中,"喂施"瞵胺酶素后,抗氧化系统活性的增加,这可能有利于弥补单萜类 化合物抗氧化功能的缺失。这一推测已经得到相关研究结果的佐证。用外源性异 戊二烯熏蒸高温下的冬青栎(Quercus ilex),结果发现,与对照相比,处理的非酶 促系统的活性相对较低,原因可能是外源性异戊二烯替代了部分抗氧化的功能 (Peňuelas et al., 2005),这也说明前者和后者在抗氧化功能之间有相互弥补和替代 的关系。另一类似的报道是,"喂施"瞵胺酶素(方法与本研究一致)给芦苇 (Phragmites australis),然后置于高光照的条件下,结果发现异戊二烯生化合成几 乎被完全抑制,并且"喂施"瞵胺酶素的叶片的抗氧化酶 CAT 和 POD 活性较高 (Velikova & Loreto, 2005)。总之,本研究结果可以初步地认为单萜类化合物的缺 乏导致了其它抗氧化系统对光氧化胁迫的反应更迅速和有效。

6.5 小结

从本研究的结果可以得到如下一些结论,三叶橡胶叶片中的内源性单萜类化 合物扮演着重要的抗氧化的生理作用,一定程度上能保护在高光照下的叶片维持 较高的光化学效率;单萜类化合物的生化合成被抑制之后,细胞内积累了较高浓 度的过氧化氢和丙二醛;单萜类化合物抗氧化功能的缺失,导致了其它抗氧化系 统对过氧化氢的响应更迅速和有效,这可能有利于弥补前者抗氧化功能的缺失。

第七章 光系统 II 光化学效率、抗氧化系统以及单萜类化合物在三叶 橡胶季节性衰老过程中的变化特征

7.1 引言

叶片衰老进程伴随着一系列的生理生化以及形态指标的变化,例如: 膜脂的 过氧化;叶绿素、蛋白质以及其它大分子的快速地降解;过氧物酶体(peroxisomes) 转变成乙醛酸循环体(gloxysomes);活性氧化物(Reactive Oxygen Species, ROS)过 度地增加等等(Buchanan-Wollaston, 1997; Gan & Amasino, 1997; Pastori & del Río, 1997; Corpas *et al.*, 2001; Procházková *et al.*, 2001)。叶片的衰老也被视为是氧化胁 迫的结果(Piquery *et al.*, 2000; Scebba *et al.*, 2004),而氧化胁迫主要原因是由于 ROS 过多的积累。在植物体内 ROS 主要指的是过氧化氢(Hydrogen peroxide, H₂O₂)、羟氢氧基(Hydroxyl radicals, ·OH)以及单线态氧(Singlet oxygen, ¹O₂)等等。

另一方面,经过长期的进化,植物已经具备了清除 ROS 从而减轻甚至消除 ROS 对自身不利的影响的生理保护性机制。一般地来说,植物主要有两个系统 来清除 ROS (Alscher *et al.*, 1997; Noctor & Foyer, 1998),一是酶促系统,例如, 超氧化物岐化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(Guaiacol peroxidase, POD)以及过氧化氢酶(Catalase, CAT);另一是非酶促系统,例如,抗坏血酸、谷 胱甘肽以及类胡萝卜素。关于抗氧化酶促系统的活性在植物叶片衰老过程中的变 化的报道很多,但结果很不统一,有的报道抗氧化酶活性升高(Bueno & del Río 1992; Procházkvá *et al.*, 2001),而有的报道则相反(Dhindsa *et al.*, 1981; Hurng & Kao, 1994)。关于非酶促系统的变化,有研究报道,在豌豆叶片衰老过程中线粒 体中的抗坏血酸—谷胱甘肽循坏途径中的各种成分的含量都将下降(Pastori & del Río, 1997)。

虽然目前关于挥发性类异戊二烯的生理功能还不十分清楚,但有研究报道证 实产生异戊二烯和一些特殊的单萜类化合(例如α-蒎烯和β-蒎烯)的叶片比上述 化合物被抑制的叶片具有较强的高温和氧化胁迫忍耐性(Sharkey & Singsaas,

- 85 -

1995; Sharkey & Yeh, 2001; Loreto *et al.*, 2004; Peňuelas & Munné-Bosch, 2005)。然 而,有人认为挥发性类异戊二烯参与了 ROS 的清除,从而具有抗氧化的生理功能(Zeidler *et al.*, 1997; Loreto *et al.*, 2001; Loreto *et al.*, 2004)。相应地,非挥发性类异戊二烯(主要是类胡萝卜素)被认为在衰老叶片中扮演着重要的光保护的作用(Merzlyak & Solovchenko, 2002)。挥发性类异戊二烯的生化合成高度依赖光合作用提供的碳源(Sharkey & Yeh, 2001),并且与非挥发性类异戊二烯具有相同的生化合成途径和生化合成位点(Logan *et al.*, 2002; Affeck & Yakir, 2002)。然而,到目前为止,关于在植物叶片衰老过程中挥发性类异戊二烯清除 ROS 从而保护光合作用器官的研究非常之少。

最近研究发现三叶橡胶能产生和排放大量的单萜类化合物(Klinger et al., 2002)。因为经济的利益驱动,三叶橡胶在热带地区得到了广泛地栽培。在中国 热带的北缘—西双版纳早在五六十年代就开始种植了橡胶(Feng, 2007)。有趣的 是,三叶橡胶在南美洲的起源地亚马逊河流域的热带雨林中是常绿植物,而引种 到西双版纳地区之后,叶片的习性发生了改变。在每年的二月底至三月初,三叶 橡胶树会脱落全部的叶片。为什么三叶橡胶在起源地是常绿植物而在西双版纳地 区变成了落叶植物,其中具体的原因至今还不十分清楚,但本研究推测可能是西 双版纳特殊的气候条件造成的,在西双版纳存在着一个明显的干冷季节(12 月初 至次年的 2 月底)。在干冷季节,三叶橡胶可能在生理上受到了不可逆的损伤, 从而最终导致了叶片的衰老和脱落。

本章试验的目的是:(1)探讨在三叶橡胶叶片季节性衰老过程中抗氧化系统活性的变化;(2)分析抗氧化酶 SOD、CAT、POD 和抗氧化代谢物抗坏血酸、谷胱 甘肽以及类异戊二烯化合物在延迟叶片衰老过程中可能扮演的角色;(3)研究氧 化胁迫对三叶橡胶季节性落叶可能产生的影响。

7.2 实验材料与方法

7.2.1 研究地点以及实验期间的气候特征

实验在中国科学院西双版纳热带植物园(21°41′N, 101°25′E)进行,在本实验进 行期间(2005 年 8 月至 2006 年 2 月)的部分气象数据如图 7.1 所示。月均最高温 (mean maximum monthly temperature, MAT)从 8 月到 10 月保持相对稳定,然后在 12 月下降到最低值 23.9 ℃。月均温(mean monthly temperature, MMT)从 8 月持续 下降,至 12 月达到最低值 16.7 ℃。12 月之后,MAT 快速地上升,而 MMT 缓 慢地上升。月均最低温(mean minimum monthly temperature)从 8 月起逐渐地下降, 在 1 月达到最低值 13.1 ℃,在 2 月有所轻微地回升。从 9 月至 12 月,月降水保 持相对稳定,而在 1 月突然下降到最低值 4 mm,然后在 2 月上升到 16.6 mm。 上述资料表明在 12 月至次年的 1 月西双版纳地区植物可能处在低温和少雨的不 利环境中。



图 7.1 在实验期间 2005 年 8 月到 2006 年 2 月部分气象数据。方条形柱代表月降水,空心圆代表月均 最高温,实心圆代表月均温,实心三角形代表月均最低温(数据来源于中国科学院西双版纳热带植物园勐仑 气象站)。

Fig. 7.1 The monthly rainfall (*bars*), mean maximum monthly temperature (*open circles*), mean monthly temperature (*closed circles*) and mean minimum monthly temperature (*closed triangle*) during the experimental period from August 2005 to February 2006, recorded by the Menglun Meteorological Station of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences.

7.2.2 实验材料

成年橡胶树是本研究的实验材料,其树高在 20-30 m。在雨季结束后,天气 晴好时,分别在 2005 年 11 月中旬、12 月中旬以及 2006 年 1 月中旬、2 月上旬 和中下旬各选 2-3 天,通过茶胶混交林中的铁塔,用 FMS2 便携式荧光仪 (Hansatech 公司)测定橡胶林冠层叶片正午光系统 II (PSII)的最大光化学效率 (*F*_v/*F*_m)和内在光化学效率(Δ*F*/*F*_m')。然后剪取叶片,置于冷藏箱中,立即带回实 验室,保存在-80℃冰箱中,分析其它生化指标的样品。

7.2.3 分析方法

- (1) 叶绿素和类胡萝卜素分析方法与第四章相同。
- (2) 蛋白质分析方法与第四章相同。
- (3) 过氧化氢(H₂O₂)分析方法与第五章相同。
- (4) 丙二醛(MDA)分析方法与第五章相同。
- (5) 单萜类化合物分析方法与第六章相同。

(6) 抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD, EC 1.15.1.1)、过氧化氢酶(CAT, EC 1.11.1.6)、 过氧化物酶(POD, EC 1.11.1.7)、抗坏血酸过氧化物酶(APX, EC 1.11.1.11)、谷胱 甘肽还原酶(GR, EC 1.6.4.2)活性以及抗坏血酸和谷胱甘肽含量的测定方法与第 四章相同。但其中, CAT 酶活性表示为ΔA₂₄₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白; POD 酶活性表示 为ΔA₄₇₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白; APX 酶活性表示为ΔA₂₉₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白; GR 酶活性表 示为ΔA₃₄₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白。

7.3 实验结果

7.3.1 季节性衰老过程中光合色素和可溶蛋白的变化

如图 7.2 所示,在前三次的取样分析中发现(时间跨度为:2005 年 11 月至 2006 年 1 月),叶绿素(Chl)和类胡萝卜素(Car)含量以及 Car/Chl 和 Chl a/b 变化较小;随后,Chl 和 Car 的含量以及 Chl a/b 逐渐下降,而 Car/Chl 逐渐增加。最后一次的取样分析发现,与前三次相比,叶绿素降低了大约 80% (*P* < 0.01),类胡萝卜 素减少了 35-49% (*P* < 0.05), Chla/b 下降了 18% (*P* < 0.05),而 Car/Chl 增加了大约 2 倍(*P* < 0.01)。此外,在前三次取样分析中发现,蛋白质含量呈现一定程度的上升,而后急剧下降(图 7.3a)。后两次(2006 年 2 月)与前三次(2005 年 11 月至 2006 年 1 月)相比,蛋白质含量下降了 60-70% (*P* < 0.01)。基于叶片光合色素和蛋白质含量变化趋势和降解特征,本研究把实验期间取的五次试验样品视为两个发育阶段的叶片:成熟叶(mature leaf,ML, 2005.11-2006.01)和衰老叶(senescent leaf,SL, 2006.02.20)。



图 7.2 三叶橡胶 2005 年 11 月至 2006 年 2 月叶绿素(Chl, ●) 和类胡萝卜素(Car, ○)含量以及 Chla/b(Δ) 和 Car/Chl (▲)比值的变化。数据为平均数±标准误(n = 6)。用单因素方差分析最小显著差异法分析在不同 测定时期同一参数之间小于 5%的显著水平。

Fig. 7.2 Chlorophyll (Chl, *closed circles*) and Carotenoids (Car, *open circles*) levels as well as Chla/b (*open triangle*) and Car/Chl (*closed triangle*) in leaves of *Hevea brasiliensis* trees collected from November 2005 to February 2006. Data are the means \pm SE (n = 6). Significant differences (P < 0.05) among the same parameters measured at the different seasons were confirmed by One-Way ANOVA (least-significant difference, *LSD*).

7.3.2 过氧化氢和丙二醛含量以及 PSII 光化学效率的变化

随着植物叶片的衰老, H₂O₂和 MDA 含量逐渐升高(图 7.3b & 7.3c)。SL 的 H₂O₂含量比 ML 大约高 20% (P < 0.05)。此外,与 ML 相比,SL 的 MAD 含量增 加了 2-4 倍 (P < 0.01)。另一方面,与 ML 相比,SL 的正午 F_v/F_m 和 $\Delta F/F_m$ '分别 下降了 20%和 30% (P < 0.01) (图 7.4)。此外,蛋白含量和 F_v/F_m 与 MDA 含量负 相关,而 F_v/F_m 与蛋白含量正相关(图 7.5)



图 7.3 三叶橡胶 2005 年 11 月至 2006 年 2 月蛋白质(a)、过氧化氢(b)以及丙二醛(c)含量的变化。ML (Mature leaves): 成熟叶; SL (Senescent leaves): 衰老叶。数据为平均数±标准误(n = 6)。用单因素方差分 析最小显著差异法分析在不同测定时期同一参数之间小于 5%的显著水平。

Fig. 7.3 Contents of total protein content (a), hydrogen peroxide (H₂O₂, b) and malonyldiadehyde (MDA, c) in leaves of *Hevea brasiliensis* trees collected from November 2005 to February 2006. ML: Mature Leaves, SL: Senescent leaves. Data are the means \pm SE (n = 6). Significant differences (P < 0.05) among the same parameters measured at the different seasons were confirmed by One-Way ANOVA (least-significant difference, *LSD*).



图 7.4 三叶橡胶 2005 年 11 月至 2006 年 2 月光系统 II (PS II)最大光化学效率(F_v/F_m , •)和内在光化学 效率($\Delta F/F_m$ ', •) 的变化。ML (Mature leaves):成熟叶; SL (Senescent leaves): 衰老叶。数据为平均数±标 准误(n=6)。用单因素方差分析最小显著差异法分析在不同测定时期同一参数之间小于 5%的显著水平。

Fig. 7.4 Variations in F_v/F_m (closed circles) and $\Delta F/F_m$ ' (open circles) in leaves of Hevea brasiliensis trees measured at midday from November 2005 to February 2006. ML: Mature Leaves, SL: Senescent leaves. Data are the means ±SE (n = 6). Significant differences (P < 0.05) among the same parameters measured at the different seasons were confirmed by One-Way ANOVA (least-significant difference, LSD).



图 7.5 丙二醛(MDA)含量与总蛋白含量和光系统 II 最大光化学效率(F_v/F_m)以及总蛋白含量与 F_v/F_m 的回归关系。

Fig. 7.5 The correlation of malondiadehyde (MDA) with total protein (a) and maximum photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m , b) as well as the correlation of total protein with F_v/F_m (c).

7.3.3 抗氧化酶活性的变化

随着植物叶片的衰老,SOD 和 CAT 以及 GR 活性下降,而 POD 和 APX 活性增加(图 7.6)。与 ML 相比,SL 的 SOD、CAT、GR 的活性下降了 71%、54%、58% (*P* < 0.01);与上述情况相反的是,SL 的 POD 和 APX 的活性与 ML 相比,分别增加了 60-96%和 1.41-1.96 倍(*P* < 0.01)。



图 7.6 三叶橡胶 2005 年 11 月至 2006 年 2 月超氧化物歧化酶(SOD, a)、过氧化氢酶(CAT, b)、过氧化 物酶(POD, c)、抗坏血酸过氧化物酶(APX, d)以及谷胱甘肽还原酶(GR, e)活性的变化。ML (Mature leaves): 成熟叶; SL (Senescent leaves): 衰老叶。数据为平均数±标准误 (n = 6)。用单因素方差分析最小显著差异法 分析在不同测定时期同一参数之间小于 5%的显著水平。

Fig. 7.6 Changes in activities of antioxidant enzymes of superoxide dismutases (SOD, a), catalase (CAT, b), peroxidase (POD, c), ascorbate peroxidase (APX, d), and glutathione reductase (GR, e) in leaves of *Hevea* brasiliensis trees collected from November 2005 to February 2006. ML: Mature Leaves, SL: Senescent leaves. Data are the means \pm SE (n = 6). Significant differences (P < 0.05) among the same parameters measured at the different seasons were confirmed by One-Way ANOVA (least-significant difference, *LSD*).

7.3.4 抗坏血酸和谷胱甘肽的变化

如图 7.7a 所示, SL 中的还原型抗坏血酸含量与 ML 相比增加了 43-69% (P < 0.01);同时总抗坏血酸含量增加 37-71% (P < 0.05)。另一方面,与 ML 相比, SL 的还原型谷胱甘肽和总谷胱甘肽含量分别增加了 7.2-35.3%和 10-22% (图 7.7b)。原始实验数据还表明,SL 和 ML 之间的氧化型抗坏血酸与还原型抗坏血酸的比值以及氧化型谷胱甘肽与还原型谷胱甘肽的比值没有显著变化。此外,与 ML 相比,SL 的过氧化氢含量与还原型抗坏血酸含量的比值显著较低(图 7.7c, P < 0.05)。



图 7.7 三叶橡胶 2005 年 11 月至 2006 年 2 月还原型抗坏血酸(AsA, ●)和总抗坏血酸(▲) (a)、还原型谷 胱甘肽(GSH, \circ)和总谷胱甘肽(Δ) (b)含量以及 H₂O₂/AsA 比值(c)的变化。ML (Mature leaves): 成熟叶; SL (Senescent leaves): 衰老叶。数据为平均数±标准误(n = 6)。用单因素方差分析最小显著差异法分析在不同 测定时期同一参数之间小于 5% 的显著水平。

Fig. 7.7 Contents of reduced ascorbate (AsA, *closed circles*), total ascorbate (*closed triangle*) (a), reduced glutathione (GSH, *open circles*) and total glutathione (*open triangle*) (b) as well as hydrogen peroxide/reduced ascorbate (H₂O₂/AsA, c) in leaves of *Hevea brasiliensis* trees collected from November 2005 to February 2006. ML: Mature Leaves, SL: Senescent leaves. Data are the means \pm SE (n = 6). Significant differences (*P* < 0.05) among the same parameters measured at the different seasons were confirmed by One-Way ANOVA (least-significant difference, *LSD*).

7.3.5 季节性衰老过程中单萜类化合物的变化

随着植物叶片的衰老,单萜类化合物含量急剧下降(图 7.8)。与 ML 相比, SL 中的 α-蒎烯大约下降了 98% (P < 0.01),β-蒎烯下降 94% (P < 0.01),桧烯下降 80% (P < 0.01),总单萜含量下降 94% (P < 0.01)。



图 7.8 三叶橡胶 2005 年 11 月至 2006 年 2 月 α -蒎烯(a)、 β -蒎烯(b)、桧烯(c)以及总单萜(d)含量的变 化。ML (Mature leaves): 成熟叶; SL (Senescent leaves): 衰老叶。数据为平均数±标准误 (n = 6)。用单因 素方差分析最小显著差异法分析在不同测定时期同一参数之间小于 5% 的显著水平。

Fig. 7.8 The concentrations of α -pinene (a), β -pinene (b), sabinene (c), and total monoterpene (d) in leaves of *Hevea brasiliensis* trees collected from November 2005 to February 2006. ML: Mature Leaves, SL: Senescent leaves. Data are the means \pm SE (n = 4–6). Significant differences (P < 0.05) among the same parameters measured at the different seasons were confirmed by One-Way ANOVA (least-significant difference, *LSD*).

7.4 讨论

7.4.1 光合色素和蛋白质的降解

在衰老的进程中,叶绿体是发生分解代谢最早的细胞器,而线粒体是发生分 解代谢最晚的细胞器(Smart, 1994)。SL的叶绿素和类胡萝卜素以及蛋白质含量与 ML相比显著降低(图 7.2 & 7.3a),这说明在衰老的过程中,叶绿素和类胡萝卜素 以及蛋白质发生了降解。已有研究报道证实,叶片衰老的过程就是蛋白质、核酸、 细胞膜、叶绿素降解的过程(Trippi & Thimann, 1983; Smart, 1994; Lutts *et al.*, 1996; Buchanan-Wollaston, 1997),本研究与上述一系列的研究报道结果相一致。另一 方面,与 ML 相比, SL 的过氧化氢和丙二醛的含量显著增加(图 7.3b & 7.3c),相 似的研究报道结果已有很多(Dhindsa *et al.*, 1981; Hurng & Kao, 1994; Marie, 1995; Ye *et al.*, 2000)。此外,从总的趋势来看,过氧化氢和丙二醛的增加伴随着光合 色素和蛋白质的降低(图 7.2 & 7.3a)。因此,可以推测随着植物叶片衰老的进行, 氧化胁迫压力加大,从而导致膜脂过氧化以及蛋白质和光合色素降解。

7.4.2 光系统 II 光化学效率的变化

氧化胁迫压力的增加,即过氧化氢含量的增加(图 7.3b),同时伴随着光系统 II 光化学效率降低(图 7.4)。与 ML 相比,SL 正午的 F_v/F_m 和 $\Delta F/F_m$ '明显降低,这可以视为 SL 的光合反应中心对氧化胁迫的一种被动适应(Someralo & Krause 1989)。当然, F_v/F_m 和 $\Delta F/F_m$ '的降低也可能意味着光合反应中心遭受到不可修复 的损伤。已有研究报道,丙二醛的积累与光系统 II 的光化学效率降低,即 F_v/F_m 和 $\Delta F/F_m$ '下降有关,因为膜脂是维持稳定蛋白质构象所必需的,而蛋白质构象 的稳定对维持最佳电子传递效率十分重要(Mishra & Singhal, 1992)。 F_v/F_m 与 MDA 含量负相关,而与蛋白质含量正相关以及蛋白质含量与 MDA 含量负相关 (图 7.5),这些相关关系可能间接地证实了上述研究报道的结果。此外,与 ML 相比,SL 的 MDA 含量显著增加(图 7.3c),说明 SL 膜脂遭受了氧化伤害,从而 破坏了蛋白质稳定的构象。这可能就是 SL 的 F_v/F_m 和 $\Delta F/F_m$ '下降的原因。因此,

- 94 -
根据本研究的结果可以推测,与 ML 相比, SL 不能有效地减少膜脂的过氧化从 而保护具有特殊功能的蛋白质,导致光系统 II 的光化学效率降低,结果 SL 积累 了较高的过氧化氢和丙二醛。

7.4.3 抗氧化酶促系统的变化

低含量的活性氧特别是过氧化氢能扮演信号分子的角色,能激活抗氧化保护 系统的活性。然而,过氧化氢的过多积累,例如在本研究中,SL的过氧化氢含 量显著高于 ML (图 7.3b),这有可能导致光合膜遭受不可修复的损伤(Rao *et al.*, 1997)。因此,在这种情况下,植物必须激活抗氧化保护机制用以抵抗氧化胁迫 压力的增加。与 ML 相比,SL 的 SOD 活性虽然显著下降(图 7.6a),但过氧化氢 的含量却增加(图 7.3b),原因可能是由于 CAT 活性显著的下降(图 7.6b)。有研究 报道认为,在植物衰老的过程中,活性氧的积累是由于抗氧化酶活性的下降 (Droillard *et al.*, 1989; Pastori & Trippi, 1993),因此,本研究结果与上述的报道相 一致。除了抗氧化酶 SOD 和 CAT,抗氧化酶 POD 和 APX 在清除活性氧的过程 中也扮演着重要作用。不过,有研究报道指出,较高浓度的过氧化氢才能激活 POD 和 APX 的活性,这两种酶的作用是阻止植物体内的活性氧进一步的增加 (Kang *et al.*, 2003a & b)。与 ML 相比,SL 中的 POD 和 APX 的活性显著升高(图 7.6c & 7.6d),如上所述,它们的作用可能就是阻止 SL 体内的过氧化氢继续增加, 因为 SL 比 ML 的过氧化氢含量显著增加(图 7.3b)。

7.4.4 抗坏血酸一谷胱甘肽循环的季节性变化

在遭受严重的氧化胁迫的情况下,有研究认为植物主要是通过抗坏血酸—谷 胱甘肽循环途径清除 ROS (Noctor & Foyer, 1998)。与 ML 相比, SL 的还原型抗 坏血酸和还原型谷胱甘肽含量增加(图 7.7a & 7.7b),同时 APX 活性升高(图 7.6d)。 这说明 SL 的抗坏血酸—谷胱甘肽循环较活跃,通过此途径清除 ROS 的能力得 到了加强。如果这样,为什么 SL 比 ML 中的过氧化氢含量更高?因此,有人建 议把过氧化氢与还原型抗坏血酸的比值而不是过氧化氢的绝对含量作为判断细 胞面临氧化胁迫压力大小的指标(Kingston-Smith *et al.*, 1997)。如果这样的话,与 ML相比, SL的过氧化氢与还原型抗坏血酸的比值反而降低了(图 7.7c),这表明 虽然过氧化氢含量增加,但由于抗氧化酶活性升高以及抗坏血酸—谷胱甘肽循环 途径的加强, SL反而能忍受较高含量的活性氧化物。

7.4.5 类异戊二烯的变化

植物体内其它的非酶类抗氧化物质,例如类异戊二烯也扮演着重要的光保护 的作用,这是因为它们可以淬灭激发态能量,甚至有些可以直接清除活性氧从而 减轻膜脂的氧化伤害。随着植物叶片衰老的进行,叶绿素和非挥发性类异戊二烯 类胡萝卜素含量下降,但 Car/Chl 的比值显著增加(图 7.2),这表明与 ML 相比, SL 光系统中心叶绿素吸收的光能相对减少, 而类胡萝卜素淬灭激发态能量和清 除活性氧化物的能力相对加强。Car/Chl 比值的升高常常被视为植物对环境胁迫 的一种被动调节(down-regulation)适应。另一方面,有研究认为,挥发性类异戊 二烯,例如,异戊二烯和单萜类化合物,能清除活性氧从而具有抗氧化和光保护 生理作用(Singaas et al., 1997; Loreto et al., 1998; Peňuelas & Llusià, 1999; Sharkey et al., 2001; Loreto & Velikova, 2001; Peňuelas & Munné-Bosch, 2005)。又有研究表 明,单萜类化合物清除活性氧化物能力的大小依赖于其自身在细胞中的浓度 (Affek & Yakir, 2002)。在本研究中,与 ML 相比, SL 的单萜类化合物的含量极 显著地降低(图 7.8), SL 单萜类化合物含量的降低可能主要与 SL 光合作用能力 下降有关,因为已有研究证实挥发性类异戊二烯的生化合成所需要的碳源高度依 赖光合作用固定的碳(Sharkey & Yeh, 2001)。此外,挥发性与非挥发性类异戊二 烯都是在叶绿体中合成并且具有相同的生化合成途径(Logan et al., 2002; Affeck & Yakir, 2002)。因此,可以推测,随着叶片衰老的进行,叶绿体逐渐受到破坏, 光合色素大量降解,单萜化合物的合成和积累必然下降,结果导致单萜类化合物 清除活性氧化物的能力也逐渐丧失。

7.5 小结

本章研究结果证实,与成熟叶片相比,三叶橡胶衰老叶片面临的氧化胁迫的 压力更大,但它们能通过更进一步地激活抗氧化酶促系统中 POD 和 APX 的活性, 加强抗坏血酸—谷胱甘肽循环来抵抗氧化胁迫,虽然这并不能阻止三叶橡胶的落 叶,但可能有利于延迟叶片的衰老;在衰老叶片中,由于光合能力下降,挥发性 类异戊二烯(单萜类化合物)的合成受到限制,此时,非挥发性类异戊二烯(类胡萝 卜素)在光保护和抗氧化过程中扮演更加相对重要的作用。

第八章 三叶橡胶对外源性茉莉酸诱导的衰老的响应

8.1 引言

以茉莉酸(JA)和茉莉酸酯(MeJA)为代表的茉莉酸类物质(JAs)是广泛存在于 植物体内的一类信号化合物。据报道,JA 能调节许多次生代谢物的合成,并且 在增强植物的抗逆性和加速植物发育等方面扮演着重要的角色(Creelman & Mullet, 1997; Gfeller & Fanmer 2004)。外源性 JAs 的应用可以诱导一系列基因的 表达(Wasternack & Hause, 2002; Farmer *et al.*, 2003)。相反的报道是,外源性 JAs 应用于大麦的叶片将降低与光合作用相关的基因的表达,例如不利于核酮糖-1, 5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶(Rubisco)小亚基的表达,降低了 Rubisco 的转译速 度,加快了其降解的速度;此外,JAs 的应用还能诱导大麦叶绿素的快速降解 (Weidhase *et al.*, 1987; Parthier, 1990)。还有报道,植物在遭受水分胁迫(Creelman & Mullet, 1997; Gao *et al.*, 2004)、盐胁迫(Mopper *et al.*, 2004)、低温(Kondo *et al.*, 2004)以及臭氧胁迫(Koch *et al.*, 2000)的时候,植物内源性JA 的含量将增加。因 此,有人认为JAs 介导了植物对环境胁迫的保护性反应(Wilen *et al.*, 1994; Tsonev *et al.*, 1998)。

外源性茉莉酸类物质的应用除了能增加次生代谢物的积累(Aerts *et al.*, 1994; Blée, 2002),还能加速植物叶片的衰老进程(Hung & Kao, 1996; Beltrano *et al.*, 1998)。茉莉酸诱导植物叶片的衰老可能与茉莉酸的应用将导致活性氧化物 (Reactive Oxygen Species, ROS)的积累有一定的关联(Maksymiec & Krupa, 2006)。 另一方面,JA 的应用将诱导抗坏血酸和谷胱甘肽的合成,同时抗坏血酸-谷胱甘 肽循环过程中两种重要的酶抗坏血酸过氧化物酶(Ascorbate peroxidase; APX)和 谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase; GR)活性升高(Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2005);用 JA 处理拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)还能提高其超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase; SOD)和过氧化氢酶(Catalase; CAT)的活性(Jung, 2004)。这 些结果表明茉莉酸类化合物参与了生理保护性物质生化合成途径的激活,这有利 于植物忍耐和适应胁迫环境。 近年来,已有很多报道,JAs 可以诱导异戊二烯类化合物的生化合成(Hopke et al., 1994; Boland et al., 1995; Rodriguez-Saona et al., 2001; van Poecke & Dicke, 2004)。并且,新近的报道证实 JAs 诱导的异戊二烯生化合成的增加所需要的碳 源主要来自于当天光合作用所固定的碳(Ferrieri et al., 2005)。还有报道,外源性 JAs 的应用将增加玉米(Zea mays)挥发性倍半萜以及利马豆(Lima bean)挥发性化 合物的排放速率(Schmelz et al., 2001; Heil, 2004)。Halitschlke et al. (2000)报道: 外源性 JAs 应用于烟草(Nicotiana attenuate)之后,单萜和倍半萜的积累增加了 2 倍,而总单萜排放速率增加了 5 倍。到目前为止,关于类异戊二烯化合物的生理 功能,基于它们所拥有的双键结构,人们认为类异戊二烯化合物具有增加植物热 忍耐性(Skarkey & Singsaas, 1995; Singsaas et al., 1997; Skarkey et al., 2001)以及增 强植物抵抗氧化胁迫的能力(Loreto et al., 2001; Affek & Yakir, 2002)。

三叶橡胶(Hevea brasiliensis)能产生大量的单萜,主要是 α-蒎烯和 β-蒎烯以 及桧烯(Kliger et al., 2002)。本章研究以三叶橡胶为试验材料,在喷施 JA 之后连 续 5 天每隔 24 小时测量与分析叶片光合作用能力和抗氧化系统活性以及单萜类 化合物生化合成的变化,研究目的是,(1)探讨外源性 JA 的应用能否诱导三叶橡 胶叶片的衰老;(2)如果能,探讨三叶橡胶的光合作用、抗氧化系统以及单萜类 化合物对外源性 JA 诱导的衰老的响应机制。

8.2 实验材料与方法

8.2.1 实验材料

在 2006 年 10 月,选择健康的株高在 1.5-2.0 m 三叶橡胶树作为 JA 处理材料。 JA 在丙酮中溶解,用蒸馏水稀释成 0.5 mmol·L⁻¹处理液,据报道此浓度对植物不 会产生强烈的毒害作用(Filella *et al.*, 2006),含相同量丙酮而不含 JA 的溶液作为 对照液。选择叶龄、叶位、光照相似的叶片,一片喷施 JA 处理液,另一片喷施 对照液,实验在 10-15 棵树苗上重复。在喷施溶液 1、24、48、72、96、120 小 时后,用 FMS2 便携式荧光仪(Hansatech 公司)测光系统 II(PSII)最大光化学效率 (*F*_v/*F*_m)和实际光化学效率(Δ*F*/*F*_m[']),测定方法与第 7 章相同。在饱和光照下稳定 5-7 分钟,用便携式光合仪(LI-6400, LI-COR, USA)测定最大净光合速率(*A*_{max})和 气孔导度(*g*_{smax});测定方法与第五章相同。然后剪取叶片置入液氮罐中保存,进 行下列生化指标的分析。

8.2.2 分析方法

- (1) 叶绿素和类胡萝卜素分析方法与第四章相同。
- (2) 蛋白质分析方法与第四章相同。
- (3) 过氧化氢(H₂O₂)分析方法与第五章相同。
- (4) 丙二醛(MDA)分析方法与第五章相同。
- (5) 单萜类化合物分析方法与第六章相同。

(6) 抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD, EC 1.15.1.1)、过氧化氢酶(CAT, EC 1.11.1.6)、 过氧化物酶(POD, EC 1.11.1.7)、抗坏血酸过氧化物酶(APX, EC 1.11.1.11)、谷胱 甘肽还原酶(GR, EC 1.6.4.2)活性以及抗坏血酸和谷胱甘肽含量的测定方法与第 四章相同。但其中, CAT 酶活性表示为ΔA₂₄₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白; POD 酶活性表示 为ΔA₄₇₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白; APX 酶活性表示为ΔA₂₉₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白; GR 酶活性表 示为ΔA₃₄₀ min⁻¹ mg⁻¹蛋白。

8.3 实验结果



8.3.1 喷施茉莉酸后 Amax 和 gsmax 以及 PSII 光化学效率的变化

图 8.1 茉莉酸处理后,最大净光合速率(A_{max}, a)和气孔导度(g_{smax}, b)的变化。实心圆代表茉莉酸处理, 空心圆代表对照。数据为平均数±标准误(n = 10)。用独立样本 t 检验分析处理与对照之间小于 5%的显著水 平。星号表示处理与对照之间差异显著(P < 0.05)。

Fig. 8.1 Maximum net photosynthetic rates (A_{max} , a) and stomata conductance (g_{smax} , b) in jasmonic acid (JA)-treated *Hevea brasiliensis*. Solid lines and solid circles, JA-treatment; solid lines and open circles, control. Asterisks indicate significant differences (P < 0.05) between control and JA treatment data confirmed by independent-samples *t* test. Data are the means \pm SE (n = 10).



图 8.2 茉莉酸处理后,光系统 II 潜在光化学效率(F_v/F_m , a)和内在光化学效率($\Delta F/F_m$ ', b)的变化。实心 圆圈代表茉莉酸处理,空心圆圈代表对照。数据为平均数±标准误(n = 6)。用独立样本 t 检验分析处理与对 照之间小于 5%的显著水平。星号表示处理与对照之间差异显著(P < 0.05)。

Fig. 8.2 Photosynthetic efficiency of *Hevea brasiliensis* trees treated with jasmonic acid (JA). Solid lines and solid circles, JA-treatment; solid lines and open circles, control. Asterisks indicate significant differences (P<0.05) between control and JA treatment data confirmed by independent-samples t test. F_v/F_m (a) and $\Delta F/Fm'$ ($\Delta F/F_m'$ = $(F_m'-F_s)/F_m'$, b) indicate maximum and actual photochemistry efficiency of photosystem II, respectively. Data are the means ± SE (n = 6).

喷施茉莉酸(Sprayed with JA, JA-S)的叶片与对照相比,最大净光合速率(A_{max}) 和气孔导度(g_{smax})明显下降(Fig. 8.1)。与对照相比,在JA 喷施 1、24、48、72、 96 以及 120 小时后,JA-S 叶片的 A_{max}分别下降了 5.7% (*P* > 0.05)、15.1% (*P* < 0.01)、19.1% (*P* < 0.01)、32.8% (*P* < 0.01)、41.8% (*P* < 0.01)、44.4% (*P* < 0.01); 相对应地,g_{smax}分别下降了 9.7%、8.6%、18.7%、48.7%、49.8%、53.3% (*P* < 0.01)。 如图 8.2 所示,与对照相比,在JA 喷施 24,48,72,96,120 小时后,JA-S 叶 片的 *F*_v/*F*_m和 Δ*F*/*F*_m'明显下降(*P* < 0.05)。



图 8.3 茉莉酸处理后,叶绿素(Chl, a)、类胡萝卜素(Car, b)、蛋白质(d)含量以及 Car/Chl 比值的变化。 实心圆代表茉莉酸处理,空心圆代表对照。数据为平均数±标准误(n = 6)。用独立样本 *t* 检验分析处理与对 照之间小于 5%的显著水平。星号表示处理与对照之间差异显著(*P* < 0.05)。

Fig. 8.3 Photosynthetic pigments and soluble protein in jasmonic acid (JA)-treated *Hevea brasiliensis*. Solid lines and solid circles, JA-treatment; solid lines and open circles, control. Asterisks indicate significant differences (P<0.05) between control and JA treatment data confirmed by independent-samples *t* test. The contents of chlorophyll (Chl, a), carotenoids (Car, b) and soluble protein (d) as well as the ratio of Car/Chl (c) were shown after JA treatment. Data are the means ± SE (n = 6).

8.3.2 光合色素和蛋白质变化

喷施茉莉酸后, JA-S 叶片中的 Chl 和 Car 含量逐渐降低(图 8.3a & 8.3b)。在 喷施茉莉酸 48,72,96,120 小时后, JA-S 叶片中的 Chl 显著降低,分别降到

对照的 76.3%、77.1%、54.9%、54.4%;相对应地,JA-S 叶片中的 Car 分别降到 对照的 80.1%、74.3%、69.1%、72.3%;而 Car/Chl 直到茉莉酸喷施 120 小时之 后,才显著增高(图 8.3c)。此外,与对照相比,在喷施茉莉酸 72,96,120 小时后,JA-S 叶片的蛋白质含量显著降低,分别降到对照的 72.5%、62.3%、51.5%。

8.3.3 过氧化氢(H₂O₂)和丙二醛(MDA)含量的变化

与对照相比, JA-S 叶片中的 H₂O₂ 和 MDA 含量逐渐增加(图 8.4a)。在茉莉酸 喷施的 24 和 48 小时后, H₂O₂ 含量虽有增加, 但并不显著。而在茉莉酸喷施 72、 96、120 小时后,与对照相比, JA-S 叶片中 H₂O₂ 的含量分别增加 10.1% (*P* < 0.05)、 20.7% (*P* < 0.01)、21.3% (*P* < 0.01)。相同的是, MDA 的含量也在茉莉酸喷施 72 小时后,显著地增加(*P* < 0.05; 图 8.4b)。



图 8.4 茉莉酸处理后,过氧化氢含量的变化。实心圆代表茉莉酸处理,空心圆代表对照。数据为平均数±标准误(n = 6)。用独立样本 t 检验分析处理与对照之间小于 5%的显著水平。星号表示处理与对照之间 差异显著(P < 0.05)。

Fig. 8.4 Hydrogen peroxide (H₂O₂) in jasmonic acid (JA)-treated *Hevea brasiliensis*. Solid lines and solid circles, JA-treatment; solid lines and open circles, control. Asterisks indicate significant differences (P < 0.05) between control and JA treatment data confirmed by independent-samples T test. Data are the means ± SE (n = 6).

8.3.4 抗氧化酶活性的变化

在喷施茉莉酸 1 小时之后, SOD 和 CAT 活性, 没有显著变化(图 8.5a & 8.5b)。 而在茉莉酸喷施 24、48、72、96、120 小时之后, 与对照相比, JA-S 叶片中的 SOD 活性分别增加 26.6% (*P* < 0.05)、24.2% (*P* < 0.05)、40.9% (*P* < 0.05)、37.4% (P < 0.05)、39.3% (P < 0.01);相对应地,CAT 活性增加 22.9% (P < 0.01)、40.4% (P < 0.01)、34.5% (P < 0.05)、40.5% (P < 0.01)、39.6% (P < 0.01)。喷施茉莉酸之后,POD 活性也增加(图 8.5c),在喷施茉莉酸 1、24、48、72、96、120小时后,POD 活性分别增加了 6.6% (P > 0.05)、15.3% (P > 0.05)、21.7% (P > 0.05)、29.5% (P < 0.05)、30.6% (P < 0.05)、31.1% (P < 0.05)。



图 8.5 茉莉酸处理后,超氧化物歧化酶(SOD, a)、过氧化氢酶(CAT, b)、过物氧化酶(POD, c)活性的变化。实心圆代表茉莉酸处理,空心圆代表对照。数据为平均数±标准误(n=6)。用独立样本 t 检验分析处理与对照之间小于 5%的显著水平。星号表示处理与对照之间差异显著(P<0.05)。

Fig. 8.5 Effects of jasmonic acid (JA) treatment on antioxidant enzymes activities of superoxide dismutases (SOD, a), catalase (CAT, b), guaiacol peroxidase (POD, c). Solid lines and solid circles, JA-treatment; solid lines and open circles, control. Asterisks indicate significant differences (P < 0.05) between control and JA treatment data confirmed by independent-samples *t* test. Data are the means ± SE (n = 6).

8.3.5 抗坏血酸—谷胱甘肽循环

喷施茉莉酸后,抗坏血酸含量增加(图 8.6a)。与对照相比,在喷施茉莉酸1、24、48、72、96、120小时之后,JA-S叶片中的抗坏血酸含量分别增加了9.2%(P>0.05)、16.3%(P>0.05)、45.5%(P<0.01)、60.5%(P<0.01)、56.1%(P<0.05)、68.5%(P<0.01);相对应地,如图 8.6b所示,谷胱甘肽含量分别增加了4.8%(P>0.05)、11.4%(P>0.05)、20.0%(P<0.05)、36.5%(P<0.01)、40.5%(P<0.01)、35.4%(P<0.01)。在喷施茉莉酸后,抗氧化酶 APX 和 GR 活性明显升高(图 8.6c & 8.6d)。与对照相比,在喷施茉莉酸后1、24、48、72、96、120小时,JA-S叶片中 APX 活性分别增加了15.8%(P>0.05)、15.0%(P>0.05)、27.6%(P=0.05)、55.6%(P<0.01)、73.3%(P<0.01)、63.1%(P<0.01);相对应地,GR 活性分别增加了21.0%(P>0.05)、34.3%(P<0.05)、35.6%(P<0.01)、80.1%(P<0.01)、63.2%(P<0.01)、66.4%(P<0.01)。



图 8.6 茉莉酸处理后,还原型抗坏血酸(AsA, a)和谷胱甘肽(GSH, b)含量以及抗坏血酸过氧化物酶 (APX, c)和谷胱甘肽还原酶(GR, d)活性的变化。实心圆代表茉莉酸处理,空心圆代表对照。数据为平均数 土标准误(n=6)。用独立样本 t 检验分析处理与对照之间小于 5%的显著水平。星号表示处理与对照之间差 异显著(P<0.05)。

Fig. 8.6 Effects of jasmonic acid (JA) treatment on the activities of ascorbate (AsA)-glutathione (GSH) recycle. Solid lines and solid circles, JA-treatment; solid lines and open circles, control. Asterisks indicate significant differences (P < 0.05) between control and JA treatment data confirmed by independent-samples T test. The contents of AsA (a) and GSH (b), activities of ascorbate peroxidase (APX, c) and glutathione reductase (GR, d) were shown after JA treatment. Data are the means \pm SE (n = 6).

8.3.6 喷施茉莉酸后单萜类化合物的生化合成

与对照相比,在喷施茉莉酸后 1、24、48 小时,单萜含量增加;而在喷施茉 莉酸 72、96、120 小时后,单萜含量反而下降(图 8.7)。在喷施茉莉酸后 1、24、 48 小时, JA-S 叶片与对照相比,α-蒎烯分别增加 18.0%、66.6% (*P* < 0.01)、34.6% (*P* < 0.01);β-蒎烯分别增加 16.6%、74.1% (*P* < 0.01)、77.9% (*P* < 0.01); 桧烯分 别增加 14.6%、87.1% (*P* < 0.01)、96.9% (*P* < 0.01);总单萜分别增加 17.1% (*P* < 0.05)、71.9% (*P* < 0.01)、61.7% (*P* < 0.01)。然而,在喷施茉莉酸后 72、96、120 小时,与对照相比, JA-S 叶片中的α-蒎烯分别降低 9.4%、35.0% (*P* < 0.05)、60.0% (*P* < 0.01);β-蒎烯分别降低 17.1%、33.6% (*P* < 0.01)、55.5% (*P* < 0.01);桧烯分 别降低 16.1%、23.5%、46.4% (*P* < 0.01);总单萜分别降低 14.1%、33.7% (*P* < 0.01)、 56.9% (*P* < 0.01)。



图 8.7 茉莉酸处理后, α-蒎烯(a)、β-蒎烯(b)、桧烯(c) 以及总单萜(d)含量的变化。实心圆代表茉莉酸 处理,空心圆代表对照。数据为平均数±标准误(n = 6)。用独立样本 t 检验分析处理与对照之间小于 5%的显 著水平。星号表示处理与对照之间差异显著(P < 0.05)。

Fig. 8.7 Effects of jasmonic acid (JA) treatment on the content monoterpene. Solid lines and solid circles, JA-treatment; solid lines and open circles, control. Asterisks indicate significant differences (P<0.05) between control and JA treatment data confirmed by independent-samples T test. The content of α -pinene (a), β -pinene (b), sabinene (c), and total monoterpene (d) after JA treatment. Data are the means ± SE (n=6).

8.4 讨论

8.4.1 茉莉酸诱导光合作用能力下降

喷施茉莉酸后,最大净光合速率 A_{max} 和气孔导度 g_{smax} 明显下降(图 8.1a & 8.1b)。已有报道,外源性 JA 的应用可以使 Rubisco 活性降低和加速叶绿素的降 解(Weidhase et al., 1987; Parthier, 1990),在本研究中,虽然没有分析 Rubisco 活 性的变化,但在喷施 JA 后,叶绿素含量迅速下降(图 8.3a),因此,在研究中观 察到的Amax的下降可能就是由于 JA 诱导的 Rubisco 活性的降低和叶绿素的降解。 当然, JA 诱导 Amax 下降的确切机理还不非常清楚, 不过, 用 JA 或者 MeJA 处理 植物之后,发现下列一些特有现象, Rubisco 合成中断、Hill 反应活力下降、光 合膜重组以及闪光诱导的放氧速率的动力学特征发生改变(Weidhase et al., 1987; Maslenkova et al., 1990; Maslenkova et al., 1995; Popova & Vakinova, 1998)。另外, Amax 的下降,可能也受到气孔关闭的限制;甚至可以推测,在叶绿素和蛋白质显 著降低以前,气孔关闭可能是主要原因。因为气孔导度对茉莉酸相当敏感,喷施 茉莉酸后, g_{smax} 显著下降(图 8.1b)。据研究报道, 茉莉酸诱导气孔的关闭具有浓 度依赖性特征,并且有研究认为茉莉酸是通过影响保卫细胞的钾离子通道和钾离 子的流量来促使气孔关闭(Sanz et al., 1993; Creelman & Mullet, 1997; Evans, 2003)。在本研究中观察到,在喷施茉莉酸之后,蛋白质含量下降(图 8.3d),至少 可以把产生这种现象的原因归结为 JA 诱导 Rubisco 加速降解(Weidhase et al., 1987)。茉莉酸处理之后,叶片更容易发生光抑制(图 8.2),这可以视为植物对 JA 诱导的光合作用能力下降的一种主动适应; Car/Chl 比值的增高, 也常常被认为 是植物对环境胁迫的一种被动适应。在本研究中,喷施茉莉酸后, Car/Chl 比值 变化先不明显,后显著增高(图 8.3c),这说明植物对喷施 JA 诱导的胁迫经历了 一个从主动到被动的适应过程。这个过程的出现可能意味着 JA 的应用导致了光 合膜发生不可修复的损伤。总之,不管机理如何,JA 作为一种胁迫分子,可以 诱导植物发生一系列的反应,其中最明显的是光合作用能力下降以及光合色素和 蛋白质的降解。另一方面,本研究也证实,外源性 JA 的应用能诱导三叶橡胶的 叶片发生衰老。

8.4.2 茉莉酸对抗氧化酶促系统的影响

当植物遭受逆境时,细胞内会产生一定浓度的活性氧化物 ROS, ROS 起着 信号传导的作用。植物细胞内 H₂O2浓度通常与体内的氧化还原态势相联系,它 的变化可以灵敏地反应植物细胞遭受逆境的状况(Lamb & Dixon, 1997; Ghoshroy et al., 1998; Orozco-cárdenas et al., 2001; Foyer & Noctor, 2003; Rentel & Knight, 2004)。然而,如果H2O2浓度过度的增加,例如在本研究中,在喷施茉莉酸72、 96、120小时后,H2O2含量显著增加(图 8.4a),它往往可以导致细胞膜不可修复 的损伤(Rao et al., 1997),从而发生膜脂过氧化,导致 MDA 含量的增加(图 8.4b)。 因此在这种情况下,植物必修激活抗氧化系统活性,来抵抗氧化胁迫,减轻氧化 胁迫的伤害。抗氧化酶 SOD 催化其它 ROS 产生 H_2O_2 , 而 CAT 催化 H_2O_2 产生 H₂O,结果解除了 ROS 对植物的伤害,因此 SOD 和 CAT 在植物抵抗氧化胁迫 的过程中扮演重要的作用(Scandalios, 1993)。在本研究中,在喷施茉莉酸 24、48、 72、96、120小时后, 抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性显著升高(图 8.5a & 8.5b), 这 说明 SOD 和 CAT 活性的升高对抵抗 JA 诱导的 ROS 增加有重要作用;同时, JA 诱导的 ROS 增加也可能是诱导 SOD 和 CAT 活性的升高的原因。然而,从本研 究的结果来看(图 8.4 & 8.5),与抗氧化酶 SOD 和 CAT 相比,要使抗氧化酶 POD 的活性得到显著的提高,需要较高的H2O2浓度,也就是说抗氧化酶SOD和CAT 比 POD 对 H₂O₂ 更敏感。这样的结果与 Kang et al. (2003a & b)的研究结论一致, 他们也认为 POD 活性需要在较高 H_2O_2 浓度下才能被激活,它的作用是阻止 H_2O_2 浓度进一步升高。至于 JA 激活抗氧化酶的活性是通过何种途径来实现的,目前 还不清楚。不过,从本研究中至少可以得到这样的结论,JA 可以诱导抗氧化酶 SOD、CAT、POD 活性升高,这样的结果对植物抵抗氧化胁迫有着重要作用。

8.4.3 茉莉酸对抗坏血酸谷胱甘肽循环和代谢的影响

植物清除体内过多的 ROS,常常通过两种途径来实现,一是酶促系统,另一 是非酶促系统。在非酶促系统中,抗坏血酸一谷胱甘肽循环起重要作用。还原型 抗坏血酸(AsA)是一种重要抗氧化物,当细胞内产生 ROS 时,在 APX 作用下 AsA 还原 ROS, 而本身变成氧化型抗坏血酸(DHA), DHA 以还原型谷胱甘肽(GSH) 为电子供体,再转变成 AsA, GR 催化氧化型(GSSG)转变成 GSH, 这就是抗坏 血酸一谷胱甘肽循环(Foyer & Halliwell, 1976; Noctor & Foyer, 1998)。其中, GR 是抗坏血酸一谷胱甘肽循环的限速酶,它在氧化胁迫的条件下被激活(Chaoui et al., 1997)。在本研究中,喷施茉莉酸后,GR活性显著增加(图 8.6d),这表明JA 对解除抗坏血酸--谷胱甘肽循环中的酶速限制有明显作用;同时,也意味着 JA 有激活抗坏血酸一谷胱甘肽循环作用。在抗氧化系统中, AsA 和 GSH 是两种重 要的化合物,抗坏血酸一谷胱甘肽循环的激活有利于细胞内 AsA 和 GSH 含量增 加(Chen et al., 2003);如果 AsA 和 GSH 含量增加是由于抗坏血酸一谷胱甘肽循 环途径的激活,本研究似乎也证实了这一结论(图 6)。当然, AsA 和 GSH 代谢途 径的基因调控机制相当复杂,对于控制它们合成的因素,目前还知之甚少。不过, 在本研究中,喷施茉莉酸后, AsA 和 GSH 含量明显增加(图 8.6a & 8.6b),这说 明 JA 除了能激活抗坏血酸—谷胱甘肽循环途径,同时也能激活抗坏血酸和谷胱 甘肽代谢途径。另有研究证实, 在逆境中植物需要增加防御性化合物的合成来忍 受环境胁迫,而 JA 介导了这些化合物生化合成途径转录水平的激活 (Sasaki-Sekimoto et al., 2005)。因此,可以推测在本研究中 AsA 和 GSH 含量的增 加可能是由于 JA 介导了 AsA 和 GSH 生化合成途径转录水平的激活。总之,本 研究结果表明,喷施茉莉酸后,抗坏血酸一谷胱甘肽循环以及抗坏血酸和谷胱甘 肽代谢途径的激活提高了植物忍受氧化胁迫的能力。

8.4.4 茉莉酸诱导单萜类化合物生化合成增加

喷施茉莉酸 1、24、48 小时后,单萜含量明显增加(图 8.7),表明喷施 JA 诱导类异戊二烯的生化合成,这与已报道的结果相同(Halitschlke *et al.*, 2000; Ferrieri *et al.*, 2005)。然而,喷施茉莉酸 72、96、120 小时后,单萜含量逐渐降低 (图 8.7),原因可能是由于在喷施茉莉酸 72、96、120 小时后光合速率的显著下 降(图 8.1a),因为单萜的生化合成是在叶绿体中完成的,并且高度依赖光合作用 固定的碳(Sharkey & Yeh, 2001)。虽然 JA 影响单萜类化合物的生化合成的确切机 制至今还不清楚,但有证据表明 JA 能诱导类似单萜合成酶基因的表达。用 JA 处理拟南芥(Arabidopsis thaliana),编码 β-罗勒烯(β-ocimene)合成酶的基因 AtTPS03 转录物含量增加;另外,用 MeJA 处理挪威杉(Norway spruce),单萜和 倍半萜合成酶的活性升高以及转录物含量增加(Martin et al., 2002; Fäld et al., 2003a & b)。单萜类化合物是一种抗氧化次生代谢物,能保护植物细胞膜免受过 氧化反应以及清除 ROS,例如单线态氧(Loreto et al., 2004)。另一方面,它们大 多数是亲脂的化合物,因此单萜类化合物具有稳定光合膜的作用(Havaux, 1998; Munné-Bosch & Alegre 2003; Velikova et al., 2004)。总之,在本研究中,可以推测 在喷施茉莉酸 1、24、48 小时后单萜含量的增加可能起增强植物抵抗氧化胁迫的 能力。

8.5 小结

本章研究结果证实, (1) 喷施茉莉酸后, 三叶橡胶的最大净光合速率和气孔 导度逐渐下降, 并且气孔导度对茉莉酸的处理相当敏感; (2) 茉莉酸能诱导与叶 片衰老的特征相似的变化, 即叶绿素、类胡罗卜素和蛋白质降解以及过氧化氢和 丙二醛积累; (3) 喷施茉莉酸后, 抗氧化酶超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧 化物酶活性升高, 抗坏血酸一谷胱甘肽循环以及抗坏血酸一谷胱甘肽代谢途径加 强; (4)不管机理如何, 在茉莉酸诱导光合作用能力下降到一定程度之前, 茉莉 酸能诱导单萜类化合物的生化合成增加, 这也说明单萜类化合物生化合成的光合 作用依赖性。

第九章 结 论

三叶橡胶(Hevea brasiliensis) 属于大戟科常绿植物,起源于南美洲亚马逊河 流域热带雨林,是一种重要的热带经济植物。在经济利益的驱动下,三叶橡胶在 很多国家的热带地区得到了广泛的推广和栽培,甚至在中国热带的北缘一西双版 纳地区也不例外。由于环境因素的变化,三叶橡胶在引种地生理生态习性也相应 地发生了一系列的变化。例如,在西双版纳地区,三叶橡胶的叶片习性发生了变 化,从常绿变成了落叶植物;在有些干旱地区,虽然能引种成功,但并不能产胶, 因而不能带来经济效益;甚至在有些地区,经多年的努力也没能引种成功。要使 三叶橡胶的推广和栽培带来良好的经济效益,需要全面地了解和研究其生理生态 习性和特征。

本论文研究与分析了三叶橡胶水分关系和光合作用特征以及生理学保护机 制对环境的响应,研究结果发现:

(1) 三叶橡胶木质部导管直径较大,水分传导效率较高;但导管水分传导对 水势的降低较敏感,其导管失去 50%水分传导能力的水势为-1.27 MPa。三叶橡 胶的光合速率和气孔导度较高,不过,光合的水分利用效率较低。三叶橡胶的这 些水力结构和光合特征与同属于大戟科的落叶树种中平树和重阳木相似,而与同 属于大戟科的常绿树种核实木、变叶木以及石栗显著的不同。此外,水分传导效 率还与光合作用能力在功能上相互协调统一。

(2) 三叶橡胶叶片水力导度对叶片水势的降低比常绿树种核实木敏感;并且, 三叶橡胶比核实木失去叶片细胞膨压要容易得多,因为前者比后者失水速率快。 三叶橡胶叶片很容易失水到相对含水量为 70%的生理危险值,并且叶片相对含水 量为 70%时的水势也比较高(-3.0 MPa);相对应地,核实木叶片失水速率慢,叶 片相对含水量为 70%时的水势是-5.7 MPa。此外,三叶橡胶叶片具有较高的光合 速率和蒸腾速率,这样在干季由于木质部导管栓塞化,导管的水分传导能力下降, 叶片得不到及时的水分补充,这可能导致了叶片在干季的脱落。

(3) 三叶橡胶对土壤水分的亏缺比较敏感; 当土壤含水量为田间最大持水量 的 45%左右时, 气孔就大幅度地关闭, 气孔的关闭在减少水分损失同时, 导致了 光合速率下降,光合速率的下降使三叶橡胶面临更大的散热压力,NPO 值增加: 随着水分亏缺到达严重程度,当土壤含水量为田间最大持水量的35%左右时,光 系统 II 遭受不可逆的损伤;同时, NPO 散热能力下降。当土壤含水量小于田间 最大持水量的 35%时, 气孔导度下降到 100 mmol m⁻² s⁻¹ 以下, 此时, 抗氧化酶 活性迅速升高,而抗坏血酸--谷胱甘肽循环在干旱和复水阶段都比较活跃。就在 叶片气孔大幅度关闭的同时,木质部导管栓塞化比率 PLC 增加,而叶片水力导 度下降, 气孔的关闭有利于避免导管进一步的栓塞化。水分短缺使三叶橡胶导管 抗栓塞化的能力得到了加强,并使叶片水力导度对水势的响应变得迟缓。当土壤 含水量接近田间最大持水量的30%时,复水之后,三叶橡胶的光合速率和光系统 II 光化学效率不能完全恢复到对照的水平, 而 NPQ 值维持在与对照相同的水平, 这样在复水之后,三叶橡胶依然维持抗氧化系统较高的活力可能有助于减轻氧化 胁迫的压力。即使三叶橡胶遭受严重的水分短缺,水力结构特征受到的伤害在复 水之后都能迅速地恢复,水力结构特征并不是遭受水分胁迫的三叶橡胶复水后, 其恢复正常生理功能的限制性因素。

(4) 三叶橡胶对夜间低温异常敏感,5℃夜间低温处理12h后,其A_{max}大约降低50%,气孔导度下降到50mmolm⁻²s⁻¹左右,并且随着处理时间的延长,两者的值越来越低。光合作用能力的下降主要原因是夜间低温处理导致了光系统Ⅱ的失活和破坏。此外,夜间低温处理使三叶橡胶的抗氧化保护系统不能有效地保护其免受氧化胁迫的伤害,因此,可溶性蛋白以及Chl和Car降解。另一方面,虽然*NPQ*和Car/Chl的增加以及Chla/b的下降在一定程度上起着光保护的作用,但并不能阻止过氧化氢和丙二醛含量的增加和避免叶片的衰老。

(5) 三叶橡胶叶片中的内源性单萜类化合物扮演着重要的抗氧化的生理功 能,在一定程度上能保护在高温和高光照条件下的叶片维持正常的光化学效率; 单萜类化合物抗氧化功能的缺失,导致了抗氧化系统中其它成分对过氧化氢的响 应更迅速和有效,这可能有利于弥补前者抗氧化功能的缺失。

- 114 -

(6) 与成熟叶片相比, 三叶橡胶衰老叶片面临氧化胁迫的压力更大, 但它们 能通过更进一步地激活抗氧化酶促系统中的过氧化物酶和抗坏血酸过氧化物酶 的活性,加强抗坏血酸—谷胱甘肽循环来抵抗氧化胁迫,虽然这并不能阻止三叶 橡胶最终的落叶, 但可能有利于延迟叶片的衰老; 在衰老叶片中, 由于光合作用 能力下降, 单萜类化合物的合成受到限制, 此时, 类胡萝卜素在光保护和抗氧化 过程中扮演更加相对重要的作用。

(7)喷施茉莉酸后,三叶橡胶的最大净光合速率和气孔导度逐渐下降,并且 气孔导度对茉莉酸的处理相当敏感;茉莉酸能诱导与叶片衰老特征相似的变化, 即叶绿素、类胡罗卜素和蛋白质降解以及过氧化氢和丙二醛积累;喷施茉莉酸后, 抗氧化酶超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶活性升高,抗坏血酸一谷胱 甘肽循环以及抗坏血酸—谷胱甘肽代谢途径加强;在茉莉酸诱导光合作用能力下 降到一定程度之前,茉莉酸能诱导单萜类化合物的生化合成增加,这也说明单萜 类化合物生化合成和抗氧化功能的光合作用依赖性。

三叶橡胶在高温高湿的原产地是常绿植物,在引种地西双版纳叶片习性发生 了变化。在每年的二月底至三月初,三叶橡胶开始落叶,一到两周内叶片全部脱 落,新叶在两周后开始萌发。关于三叶橡胶在西双版纳地区叶片习性发生变化的 原因,基于本论文的研究结果可以作如下解释。

(1)从水分关系特征来看,三叶橡胶木材密度较小,导管孔径较大,导管水 分运输橡胶较高。不过,在水分亏缺的时候,导管容易发生栓塞化,水分传导能 力将大幅度地下降。另一方面,三叶橡胶叶片光合速率和蒸腾速率较高,这意味 着叶片需要较大量的水分供应,一旦导管的水分传导能力下降,将不能对叶片提 供充足的水分。而在西双版纳地区干季长达五个月之久,长时间的缺水会对三叶 橡胶叶片造成永久的伤害,最终衰老而脱落。

(2) 在每年的 12 月至次年的 2 月,西双版纳地区降雨较少,但雾水较大(Liu et al., 2004),一般认为这有利于缓解旱情。但对三叶橡胶来说,意义可能不大。

- 115 -

因为这个时候正是西双版纳地区出现夜间低温的时期,温度时常在6℃左右。而 早就有报道,三叶橡胶在遇到零上低温(5℃左右)时,植物体内就会发生水分亏 缺(Wu,1982)。这就意味着,雾水虽能对植物补充一定的水分,但对三叶橡胶来 说,体内的水分亏缺依然存在。另一方面,三叶橡胶叶片的保水能力较差,所以 即使在有雾水补给的期间,三叶橡胶的叶片还是会处在水分胁迫的状态,外加低 温的伤害,落叶将不可避免。

(3) 从本研究的模拟干旱和夜间低温的实验结果来看,三叶橡胶对低温异常 敏感,低温主要造成了三叶橡胶生理学保护机制的崩溃,使三叶橡胶的抗逆性减 弱。虽然模拟夜间低温处理的三叶橡胶没有得到冷冻锻炼,实验结果不能直接外 推到自然环境条件下的三叶橡胶上,但从本研究的三叶橡胶季节性衰老和茉莉酸 诱导的衰老的实验结果来看,低温和干旱共同的作用导致了三叶橡胶生理学保护 机制的崩溃,结果叶片发生了衰老和脱落。

参考文献

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121–126.
- Aerts RJ, Gisi D, De Carolis E, De Luca V, Baumann TW. 1994. Methyl jasmonate vapour increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. *Plant Journal* 5: 635–643.
- Affeck HP, Yakir D. 2002. Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. *Plant Physiology* 129: 269–277.
- Allen DJ, Ratner K, Giller YE, Gussakovsky EE, Shahak Y, Ort DR. 2000. An overnight chill induces a delayed inhibition of photosynthesis at midday in mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Experimental Botany* **51**: 1893–1902.
- Alscher R, Donahue J, Cramer CL. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells. *Physiologia Plantarum* 100: 224–233.
- Arakawa N, Tsutsumi K, Sanceda, NG, Kurata T, Inagaki C. 1981. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. *Agricultural and Biological Chemistry* 45: 1289–1290.
- Arnold DH, Mauseth JD. 1999. Effects of environmental factors on development of wood. American Journal of Botany 86: 367–371.
- Asada K. 1994. Mechanism for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In: Baker NR, Bowyer JR. (eds) Photoinhibition of photosynthesis from molecular to the field. Bios, Oxfors, pp 129–142.
- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplast: Scavening of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601–639.
- Augusti A, Scartazza A, Navari-Izzo F, Sgherri CLM, Stevanovic B, Brugnoli E.
 2001. Photosystem II photochemical efficency, zeaxanthin and antioxidant contents in the poikilohydric Ramonda serbica during dehydration and rehydration. *Photosynthesis Research* 67: 79 –88.
- **Baker NR.** 1994. Chilling stress and photosynthesis. In: Foyer CH, Mullineaux PM. (eds) Causes of photo-oxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CrC Press, Boca Raton, pp 127–154.
- Beltrano J, Ronco MG, Montaldi ER, Carborne A. 1998. Senescence of flag leaves and ears of wheat hastened by methyl jasmonate. *Journal of Plant Growth Regulation* 17: 53–57.
- **Bilger W, Björkman O. 1990.** Role of xanthophylls cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* **25**: 173–185.
- Blée E. 2002. Impact of phyto-oxylipins in plants defense. *Trends in Plant Science* 7: 315–321.
- Boland W, Hopke J, Donath J, Nüske J, Bublitz F. 1995. Jasmonic acid and coronatin induce odor production in plants. *Angewandte Chemie–International*

Edition **34**: 1600–1602.

Boyer JS. 1982. Plant productivity and environment. Science 218: 443-448.

- Brodribb T, Hill RS. 1999. The importance of xylem constraints in the distribution of conifer species. *New Phytologist* 143: 365–372.
- Brodribb TJ, Field TS. 2000. Stem hydraulic supply is linked to leaf photosynthetic capacity: evidence from new Caledonian and Tasmanian rainforest. *Plant, Cell and Environment* 23: 1381–1388.
- **Brodribb TJ, Holbrook NM, Edwards EJ, Gutierrez MV. 2003.** Relations between stomatal closure and, leaf turgor and xylem vulnerability in eight tropical dry forest trees. *Plant, Cell and Environment* **26**: 443–450.
- **Brodribb TJ, Holbrook NM, Gutiérrez MV. 2002.** Hydraulic and photosynthetic co-ordination in seasonally dry tropical forest trees. *Plant, Cell and Environment* **25**: 1435–1444.
- Brodribb TJ, Holbrook NM. 2003. Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf photosynthetic traits. *Plant Physiology* 132: 2166–2173.
- Brodribb TJ, Holbrook NM. 2004a. Diurnal depression of hydraulic conductance in a tropical tree species. *Tree Physiology* 27: 820–827.
- Brodribb TJ, Holbrook NM. 2004b. Stomatal protection against hydraulic failure: a comparison of coexisting ferns and angiosperms. *New Phytologist* 162: 663–670.
- **Brodribb TJ, Holbrook NM. 2007.** Forced depression of leaf hydraulic conductance in situ: effects on the leaf gas exchange of forest trees. *Functional Ecology* **21**: 705–712.
- **Bucci SJ, Goldstein G, Meinzer FC, Scholz FG, Franco AC, Bustamante M. 2004.** Functional convergence in hydraulic architecture and water relations of tropical savanna trees: from leaf to whole plant. *Tree Physiology* **24**: 891–899.
- **Buchanan-Wollaston V. 1997.** The molecular biology of leaf senescence. *Journal of Experimental and Botany* **48**: 181–199.
- **Buckland SM, Price AH, Hendry GAF. 1991.** The role of ascrobate in drought-treated Cochlearia atlantica Probed. and Armeria maritime (Mill.) Willd. *New Phytologist* **119**: 155–160.
- Bueno P, del Rio LA. 1992. Purification and properties of glyoxysomal cuperozinc superoxide dismutases from watermelon (*Citrullus vulgaris* Scrad). *Plant Physiology* 98: 331–336.
- **Bukhov HG, Wiese C, Neimanis S, Heber U. 1999.** Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport. *Photosynthesis Research* **59**: 81–83.
- Cai ZQ, Cao KF, Feng YL, Feng ZL. 2003. Effects of low nocturnal temperature stress on fluorescence characteristics and active oxygen metabolism in leaves of Garcinia hanburyi seedlings grown under two levels of irradiance. *Chinese Journal of Applied Ecology* 14: 326–331.
- Cai ZQ, Chen YJ, Guo YH, Cao K. 2005. Responses of two field-grown coffee species to drought and re-hydration. *Photosynthetica* **43**: 187–193.
- Campos PS, Ramalho JC, Lauriano JA, Silva MJ, Matos MC. 1999. Effects of

drought on photosynthetic performance and water relations of four *Vigna* genotypes. *Photosynthetica* **36**: 79–87.

- Cao KF, Guo YH, Cai, ZQ. 2006. Photosynthesis and antioxidant enzyme activity in breadfruit, jackfruit and mangosteen in southern Yunnan, China. *Journal of Horticultural Sciences & Biotechnology* 81:168–172.
- Cao KF. 2000. Water relations and gas exchange of tropical saplings during a prolonged drought in a Bornean heath forest, with reference to root architecture. *Journal of Tropical Ecology* **16**:101–116.
- Cao KF. 2001. Morphology and growth of evergreen and deciduous saplings under different light conditions in a Chinese beech forest with dense bamboo undergrowth. *Ecological Research* 16: 509–517.
- Cao M. Zhang JH. 1997. Tree species diversity of tropical forest vegetation in Xishuangbanna, SW China. *Biodiversity and Conservation* 6: 995–1006.
- Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH, Ferjani EE. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127: 39–147.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003. Understanding plant responses to drought: from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**: 239–264.
- Chen JW, Cao KF. 2008. Changes in activities of antioxidative system and monoterpene and photochemical efficiency during seasonal leaf senescence in Hevea brasiliensis trees. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 1–9.
- **Chen JW, Zhang Q, Cao KF. 2008.** Inter-species variation of photosynthetic and xylem hydraulic traits in the deciduous and evergreen Euphorbiaceae tree species from a seasonally tropical forest in south-western China. *Ecological Research* **doi**: 10.1007/s11284-008-0482-4.
- Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR. 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings National Acadademy of Science* 100: 3525–3530.
- Choat B, Ball M, Luly J, Holtum J. 2003. Pit membrane porosity and water stress-induced cavitation in four co-existing dry rainforest tree species. *Plant Physiology* 131: 41–48.
- Choat B, Ball MC, Luly JG, Holtum JAM. 2005. Hydraulic architecture of deciduous and evergreen dry rainforest tree species from north-eastern Australia. *Trees-Structure and Function* 19: 305–311.
- Choat B, Sack L, Holbrook NM. 2007. Diversity of hydraulic traits in nine Cordia species growing in tropical forest with contrasting precipitation. *New Phytologist* 175: 686–698.
- Cochard H. 1992. Vulnerability of several conifers to air embolism. *Tree Physiology* 11: 73 –83.
- **Cochard H. 2002.** Xylem embolism and drought-induced stomatal closure in maize. *Planta* **215**: 466–471.
- **Cornelissen JHC, Castro DP, Hunt R. 1996.** Seedling growth, allocation and leaf attributes in a wide range of woody plant species and types. *Journal of Ecology* **84**: 755–765.

Cornic G. 1994. Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. In: Baker NR, Bowyer JR (eds). *Photoinhibition of photosynthesis. From Molecular Mechanisms to the field.* BIOS Scientific, Oxford, England, pp. 279–313.

Cornic G. 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5: 187–188.

Corpas FJ, Barroso JB, del Río LA. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 145–150.

Crawford RMM. 1989. Studies in plant survival, ecological case histories of plant adaptation to adversity. Blackwell Scientific Publications, Melbourne.

Creelman RA, Mullet JE. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48: 355–381.

Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the reactive oxygen species during plant stress responses. *Cell Molecular Life Science* 57: 779–795.

David MM, Coelho D, Barrote I, Correia MJ. 1998. Leaf age effects on photosynthetic activity and sugar accumulation in droughted and rewatered *Lupinus albus* plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **25**: 299–306.

Demmig B, Björkman O.1987. Camparision of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77K) and photon yield of evolution in leaves of higher plants. *Planta* **171**: 171–184.

Demmig-Adams B, Adams III WW. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599–626.

Demmig-Adams B. 2003. Linking the xanthophylls cycle with thermal energy dissipation. *Photosynthesis Research* **76**: 73–80.

Dhindsa RA, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA. 1981. Leaf senescence: correlated with increased permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxidase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 126: 93–101.

Domec JC, Gartner BL. 2001. Embolism and water storage capacity in bole xylem segments of mature and young Douglas-fir trees. *Trees-Structure and Function* **15**: 204–214.

Domec JC, Gartner BL. 2002. Age and position-related changes in hydraulic vs. mechanical dysfunction of xylem: inferring the design criteria for Douglas-fir wood structure. *Tree Physiology* **22**: 91–104.

Doulis A, Debian N, Kingston-Smith AH, Foyer CH. 1997. Characterization of chilling sensitivity in maize. I. Differential localization of antioxidants in maize leaves. *Plant Physiology* 114: 1031–1037.

Droillard MJ, Bureau D, Paulin A. 1989. Changes in activities of superoxide dismutases during aging of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Physiologia Plantarum* 76: 149–154.

Elsheery N, Wilske B, Cao KF. 2007. Seasonal variation in photosynthesis and chlorophyll fluorescence in leaves of five mango cultivars in southern Yunnan, China. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **82**: 855–862.

- Ennahli S, Earl HJ. 2005. Physiological limitations to photosynthetic carbon assimilation in cotton under water stress. *Crop Science* **45**: 2347 –2382.
- Etienne P, Petitot AS, Houot V, Blein JP, Suty L. 2000. Induction of *tcl* 7, a gene encloding a β -subunit of proteasome, in tobacco plants treated with elicitin, salicylic acid or hydrogen peroxide. *FEBS Letters* **466**: 213–218.
- Evans NH. 2003. Modulation of guard cell plasma membrane potassium currents by methyl jasmonate. *Plant Physiology* 131: 8–11.
- **Fäldt J, Arimura G, Gershenzon J, Takabayashi J, Bohlmann J. 2003a.** Functional identification of *AtTPS03* as (E)-β-ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 745–751.
- Fäldt J, Martin D, Miller B, Rawat S, Bohlmann J. 2003b. Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase. *Plant Molecular Biology* **51**: 119–133.
- Farmer EE, Alméras E, Krishnamurthy V. 2003. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 372–378.
- Feng YL, Cao KF, Feng ZL, Cai ZQ. 2002. Effects of nocturnal chilling temperature on photosynthesis in seedlings of two tropical tree species grown under different light intensities. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 28: 433–440.
- Feng YL, Cao KF. 2005. Photosynthesis and phoinhibition after night chilling in seedlings of two tropical tree species grown under three irradiances. *Photosynthetica* 43: 567–574.
- Feng YZ. 2007. Man–made community. Yunnnan Science and Technology Press, Kunimg, China.
- Ferrieri RA, Gray DW, Babst BA, Schueller MJ, Schlyer DJ, Thorpe MR, Orians CM, Lerdau M. 2005. Use of carbon-11 in *Populus* shows that exogenous jasmonic acid increases biosynthesis of isoprene from recently fixed carbon. *Plant, Cell and Environment* 28: 591–602.
- Filella I, Peňuelas J, Llusià J. 2006. Dynamics of the enhanced emsissions of monoterpenes and methyl salicylate, and decreased uptake of formaldehyde, by Quercus ilex leaves after application of jasmonic acid. *New Phytologist* 169: 135–144.
- Flexas J, Badger M, Chow WS, Medrano H, Osmond CB. 1999. Analysis of relative increase in photosynthetic O₂ uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night and/or water stress. *Plant Physiology* 121: 675–684.
- Flexas J, Bota J, Galmes J, Medrano H, Ribas-Carbo M. 2006. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* 127: 343–352.
- **Foyer CH, Halliwell B. 1976.** The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21–25.

- **Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM. 1997.** Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signals. *Physiologia Plantarum* **100**: 241–254.
- Foyer CH, Noctor G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355–364.
- Frankie GW, Baker HG, Opler PA. 1974. Comparative phenological studies of trees in tropical wet and dry forests in lowlands of Costa Rica. *Journal of Ecology* 62: 881–919.
- Franks PJ. 2006. Higher rates of leaf gas exchange are associated with higher leaf hydrodynamic pressure gradients. *Plant, Cell and Environment* 29: 584–592.
- Froux F, Huc R, Ducrey M, Dreyer E. 2002. Xylem hydraulic efficiency versus vulnerability in seedlings of four contrasting Mediterranean tree species (*Cedrus atlantica*, *Cupressus sempervirens*, *Pinus halepensis* and *Pinus nigra*). Annual of Forest Science 59: 409–418.
- Gallé A, Haldimann P, Feller U. 2007. Photosynthetic performance and water relations in young pubescent oak (*Quercus pubescens*) trees during drought stress and recovery. *New Phytologist* 174: 799–810.
- Galmés J, Abadía A, Medrano H, Flexas J. 2007. Photosynthesis and photoprotection responses to water stress in the wild-extinct plant *Lysimachia minoricensis*. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 308–317.
- Gan S, Amasino RM. 1997. Making sense of senescence. *Plant Physiology* 113: 313–319.
- Gao XP, Wang XF, Lu YF, Zhang LY, Shen YY, Liang Z, Zhang DP. 2004. Jasmonic acid is involved in the water-stress-induced betaine accumulation in pear leaves. *Plant, Cell and Environment* 27: 497–507.
- Gartner BL, Bullock SH, Mooney HA, Brown VB, Whitbeck JL. 1990. Water transport properties of vine and tree stems in a tropical deciduous forest. *American Journal of Botany* 77: 742–749.
- Gartner BL, Meinzer FC. 2005. Structure-function relationships in sapwood water transport and storage. In: Holbrook NM, Zwieniecki MA (eds) Vascular Transport in Plants. Elsevier, Boston, pp 307–331
- **Gartner BL. 1995.** Patterns of xylem variation within a tree and their hydraulic and mechanical consequences. In: Gartner BL (eds) Plant Stems: Physiology and Functional Morphology. Academic Press, New York, pp 125–149
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87–92.
- **Gfeller A, Farmer EE. 2004.** Keeping the leaves green above us. *Science* **306**: 1515–1516.
- **Ghannoum O, Conroy JP, Driscoll SP, Paul MJ, Foyer CH, Lawlor DW. 2003.** Nonstomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C₄ grasses. *New Phytologist* **159**: 599–608.
- Ghoshroy S, Freedman K, Lartey R, Citovsky V. 1998. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentration of cadmium. *Plant Journal* 13:

591-602.

- **Giannopolitis CN, Ries SK. 1977.** Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. *Plant Physiology* **59**: 309–314.
- Gimenez C, Mitchell VJ, Lawlor DW. 1992. Regulation of photosynthetic rate of two sunflowers hybrids under water stress. *Plant Physiology* **96**: 635–643.
- **Goldschmidt EE, Huber SC. 1992.** Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiology* **99**: 1443–1448.
- **Goldstein G, Rada F, Rundel P, Azocar A, Orozco, A. 1989.** Gas exchange and water relations of evergreen and deciduous tropical savanna trees. *Annals of Forest Science* **46**: 448–453
- Guo YH, Cai ZQ, Cao KF. 2005. Effects of nocturnal low temperature on photosynthesis of seedlings of two coffee species. *Chinese Journal of Ecology* 24: 478–482.
- **Guo YH, Cao KF. 2004.** Effect of night chilling on photosynthesis of two coffee species grown under different irradiances. *Journal of Horticultural Sciences & Biotechnology* **79**: 713–716.
- Hacke UG, Sperry JS, Pockman WT, Davis SD, McCulloh KA. 2001. Trends in wood density and structure are linked to prevention of xylem implosion by negative pressure. *Oecologia* 126: 457–461.
- Halitschke R, Keßler A, Kahl J, Lornez A, Baldwin IT 2000. Ecophysiological comparison of direct and indirect defenses in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 124: 408–417.
- Hao GY, Hoffmann WA, Scholz FG, Bucci SJ, Meinzer FC, Franco AC, Cao KF, Goldstein G. 2008. Stem and leaf hydraulics of congeneric tree species from adjacent tropical savanna and forest ecosystems. *Oecologia*. 155: 405–415.
- Havaux M. 1998. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. Trends in *Plant Science* **3**: 147–151.
- Heath RL, Parker L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189–198.
- Heil M. 2004. Induction of two indirect defences benefits Lima bean (*Phaseolus lunatus*, Fabaceae) in nature. *Journal of Ecology* 92: 527–536.
- Hernández I, Alegre L, Munné-Bosch S. 2004. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiology* 24: 1303–1311.
- Hodges DM, Delong JM, Forney CF, Prange PK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and interfering compounds. *Planta* 207: 604–611.
- Holbrook NM, Whitbeck JL, Mooney HA. 1995. Drought responses of neotropical dry forest trees. In: Bullock SH, Mooney HA, Medina E (eds) Seasonally dry tropical forests. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 121–136
- Hopke J, Donath J, Blechert S, Boland W. 1994. Herbivore-induced volatiles the

emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a beta-Glucosidase and jasmonic acid. *FEBS Letters* **352**: 146–150.

- Horton P, Ruban AV, Walters RG. 1994. Regulation of light harvesting in green plants. *Plant Physiology* 106: 415–420.
- Huang M, Guo Z. 2005. Responses of antioxidantive system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitiveity. *Biologia Plantarum* **49**: 81–84.
- Hubbard R, Ryan M, Stiller V, Sperry J. 2001. Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. *Plant, Cell and Environment* 24: 113–121.
- Huner NPA, Öquist G, Sarhan F. 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* **3**: 224–230.
- Hung KT, Kao C.H. 1996. Promotive effects of jasmonates on the senescence of detached maize leaves. *Plant Growth Regulation* 19: 77–83.
- Hurng WP, Kao CH. 1994. Lipid peroxisomes and antioxidative enzymes in senescing tobacco leaves during post flooding. *Plant Science* 96: 41–44.
- Irigoyen JJ, Emerich DW, Sánchez-Dias M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfafa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 84: 55–60.
- Johnson RC. Mornhinweg DW, Ferris DM, Heitholt JJ. 1987. Leaf photosynthesis and conductance of selected Triticum species at different water potential. *Plant Physiology* 83: 1014–1017.
- Jones HG, Sutherland RA. 1991. Stomatal control of xylem embolism. *Plant, Cell* and Environment 14: 607–612.
- Jones TL, Tucker DE, Ort DR. 1998. Chilling delays circadian pattern of sucrose phosphate synthase and nitrate reducetase activity in tomato. *Plant Physiology* 118: 149–158.
- Jung S. 2004. Effect of chlorophyll reduction in Arabidopsis thaliana by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 225–231.
- **Kang GZ, Wang CH, Sun GC, Wang ZX. 2003a.** Salicylic acid changes activities of H₂O₂-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **50**: 9–15.
- Kang GZ, Wang ZX, Sun GC. 2003b. Participation of H₂O₂ in enhancement of cold chilling hardening by salicylic acid in banana seedlings. *Acta Botanica Sinica* 45: 567–573.
- Katul G, Leuning R, Oren R. 2003. Relationship between plant hydraulic and biochemical properties derived from a steady-state coupled water and carbon transport model. *Plant, Cell and Environment* **26**: 339–350.
- Kavanagh KL, Bond BJ, Aitken SN, Gartner BL, Knowe S. 1999. Shoot and root vulnerability to xylem cavitation in four populations of Douglas-fir seedlings. *Tree Physiology* 19: 31–37.
- Kingston-Smith AH, Thomas H, Foyer CH. 1997. Chlorophyll *a* fluorescence, enzyme and antioxidant analyses provide evidence for the operation of

alternative electron sinks during leaf senescence in a stay-green mutant of *Festuca pratensis*. *Plant, Cell and Environment* **20**: 1323–1337.

- Kirschbaum MUF. 1988. Recovery of photosynthesis from water-stress in *Eucalyptus pauciflora* a process in two stages. *Plant, Cell and Environment* 11: 685–694.
- Klinger LF, Li QJ, Guenther AB, Greenberg JP, Baker B, Bai JH. 2002. Assessment of volatile organic compound emissions from ecosystems of China. *Journal of Geophysics Research* 107: 4603–4624.
- Koch JR, Creelman RA, Eshita SM, Seskar M, Mullet J, Davis KR. 2000. Ozone sensitivity in hybrid poplar correlates with insensitivity to both salicylic acid and jasmonic acid: the role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* 123: 487–496.
- Kocsy G, von Ballmoos P, Suter M, Regsegger A, Galli U, Szalai G, Galiba G, Brunold C. 2000. Inhition of glutathione synthesis reduces chilling tolerance in maize. *Planta* 211: 528–536.
- Kondo S, Jitratham A, Kittikorn M, Kanlayanarat S. 2004. Relationships between jasmonates and chilling injury in mangosteens are affected by spermine. *Hortscience* **39**: 1346–1348.
- Koroleva OY, Brüggemann W, Krause GH. 1994. Photoinhibition, xanthophylls cycle and in vivo chlorophyll fluorescence quenching of chilling-tolerant *Oxyria digyna* and chilling-sensitive *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* 92: 577–584.
- Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Physiology and Plan t Molecular Biology 42: 313–349.
- Kyparissis A, Drilias P, Manetas Y. 2000. Seasonal fluctuation in photoprotective (xanthophylls cycle) and photoselective (chlorophylls) capacity in eight Mediterranean plant species belonging to two different growth forms. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 265–272.
- Ladjal M, Huc R, Ducrey M. 2005. Drought effects on hydraulic conductivity and xylem vulnerability to embolism in diverse species and provenances of Mediterranean cedars. *Tree Physiology* 25: 1109–1117.
- Lamb C, Dixon R. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251–275.
- Laule O, Fuerholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Gruissen W, Lange BM. 2003. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 6866–6871.
- Lawlor DW. 1995. The effects of water deficit on photosynthesis. In: Smirnoff N (eds). Environment and Plant Metabolism. Flexibility and Acclimatation. BIOS Scientific, Oxford, England, pp. 129–160.
- Lawlor DW, Cornic G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Enviormnent* 25: 275–295.
- Leegood RC, Edwards GE. 1996. Carbon metabolism and photorespiration: temperature dependence in relation to environmental factors. In: Baker NR (eds).

Photosynthesis and the environment. Dordrecht: Kluwer Academic, pp 191–221.

- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583–593.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophyll and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 603: 591–592.
- Lin MX, Yang HJ. 1994. Physiological responses of Hevea brasiliensis during the chilling injury. *Chinese Journal of Tropical Crops* 15: 7–11.
- Lin ZF, Li SS, Lin GS. 1989. Effect of malondialdehyde on activities of some carboxylases and cell protective enzymes in spinach leaves. *Acta Botanica Sinica* 31: 860–866.
- Lin ZF,Peng CL,Lin GZ. 2000. Efect of active oxygen on activity of phosphoenolpyru vate carboxylase from *Amaranthus tricolor*. *Acta Phytophysiologica Sinica* 26: 27–32.
- Liu WJ, Meng FR, Zhang YP, Liu YH, Li HM. 2004. Water input from fog drip in the tropical seasonal rain forest of Xishuangbanna, Southwest China. *Journal of Tropical Ecology* 20: 517–524.
- Llusià J, Peňuelas J. 2000. Seasonal patterns of terpene content and emission from seven Mediterranean woody species in field conditions. *American Journal of Botany* 87: 133–140.
- Loewenstein NJ, Pallardy SG. 2002. Influence of a drying cycle on post-drought xylem sap abscisic acid and stomatal response in young temperate deciduous angiosperms. *New Phytologist* **156**: 351–361.
- Logan BA, Monson RK, Potosnak MJ. 2002. Biochemistry and physiology of foliar isoprene production. *Trends in Plant Science* **5**: 477–481.
- Loggini B, Scartazza A, Brugnoli E, Navari-Izzo F. 1999. Antioxidative defense system, pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology* **119**: 1091–1099.
- Long SP, Humphries S, Folkowski PG. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 633–662.
- Lopez FB, Setter TL, MeDavid CR. 1987. Carbon dioxide and light responses of photosynthesis in cowpea and pigeonpea during water deficit and recovery. *Plant Physiology* 85: 990–995.
- Loreto F, Förster A, Dürr M, Csiky O, Seufert G. 1998. On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes. *Plant, Cell and Environment* 21: 101–107.
- Loreto F, Mannozzi M, Maris C, Nascetti P, Ferranti F, Pasqualini S. 2001. Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiology* 126: 993–1000.
- Loreto F, Pinelli P, Manes F, Kollist H. 2004. Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiology* 24: 361–367.

- Loreto F, Velikova V. 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* **127**: 1781–1787.
- **Lovisolo C, Schubert A. 1998.** Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in *Vitis vinifera*. *Journal of Experimental Botany* **49**: 693–700.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275.
- Lutts S, Kinet JM, Bouharmount J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annuals of Botany* 78: 389–398.
- Maherali H, Moura CF, Caldeira MC, Willson CJ, Jackson RB. 2006. Functional coordination between leaf gas exchange and vulnerability to xylem cavitation in temperate forest trees. *Plant, Cell and Environment* **29**: 571–583.
- Maherali H, Pockman WT, Jackson GE. 2004. Adaptive variation in the vulnerability of wood plants to xylem cavitation. *Ecology* **85**: 2184–2199.
- Mahmoud SS, Croteau BR. 2002. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **7**: 366–373.
- Maksymiec W, Krupa Z. 2006. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in Arabidopsis thaliana. *Environmental and Experimental Botany* **57**: 187–194.
- Marie O. 1995. Alteration in lipid composition and antioxidative protection during senescence in drought stressed plants and non-drought stressed plants of *Pisum sativum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 33: 547–553.
- Martin B, Ort DR, Boyer JS. 1981. Impairment of photosynthesis by chilling-temperature in tomato (*Lycopersicon esculentum* cultivar Rutgers). *Plant Physiology* 68: 329–334.
- Martin D, Tholl D, Gershenzon J, Bohlmann J. 2002. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of *norway spruce* stems. *Plant Physiology* **129**: 1003–1018.
- Martinez-Vilalta J, Prat E, Oliveras I, Piňol J. 2002. Xylem hydraulic properties of roots and stems of nine Mediterranean woody species. *Oecologia* 133: 19–29.
- Martino-Cart S, Ort DR. 1992. Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling sensitive plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 3731–3735
- Maslenkova L, Toncheva S, Zeinalov Y. 1995. Effect of abcisic acid and jasmonic acid (or JA-Me) on the photosynthetic electron transport and oxygen evolving reactions in pea plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 21: 48–55
- Maslenkova LT, Zanev Y, Popova LP. 1990. Oxygen evolving activity of thylakoids from barley plants cultivated on different concentrations of jasmonic acid. *Plant Physiology* 93: 1316–1320.
- Meinzer FC, Clearwater MJ, Goldstein G. 2001. Water transport in trees: current perspectives, new insights and some controversies. *Environmental and Experimental Botany* **45**: 239–262.

- Meinzer FC. 2002. Coordination of vapour and liquid phase water transport properties in plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 265–274.
- Meinzer FC. 2003. Functional convergence in plant responses to the environment. *Oecologia* 134: 1–11.
- Merzlyak MN, Solovchenko AE. 2002. Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. *Plant Science* 163: 881–888.
- Mishra RK, Singhal GS. 1992. Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoids. *Plant Physiology* **98**: 1–6.
- Miyashita K, Tanakamaru S, Maitani T, Kimura K. 2005. Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. *Environmental and Experimental Botany* **53**: 205–214.
- Monreal JA, Jiménez ET, Remesal E, Morillo-Velarde R, García-Maurino S, Echevarría C. 2007. Proline content of sugar beet storage roots: Responses to water deficit and nitrogen fertilization at field conditions. *Environmental and Experimental Botany* 60: 257–267.
- Mopper S, Wang Y, Criner C, Hasenstein K. 2004. *Iris hexagona* hormonal responses to salinity stress, leafminer herbivory, and phenology. *Ecology* 85: 38–47.
- Munné-Bosch S, Alegre L. 2000. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* 210: 925–931.
- Munné-Bosch S, Alegre L. 2003. Drought-induced changes in the redox state of α-tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiology* 131: 1816–1825.
- Munné-Bosch S, Peňuelas J. 2004. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. *Plant Science* 166: 1105–1110.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascrobate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867–880.
- Nardini A, Salleo S, Raimondo F. 2003. Changes in leaf hydraulic conductance correlate with leaf vein embolism in *Cercis siliquastrum* L. *Trees* 17: 529–534.
- Navari-Izzo F, Meneguzzo S, Loggini B, Vazzana C, Sgherri CLM. 1997. The role of glutathione system during dehydration of Boea hygroscopeica. *Physiologia Plantarum* **99**: 23–30.
- Neaubauer C, Yamamoto HY. 1994. Membrane barriers and Mehler-peroxidase reaction limit the ascorbate available for violaxanthin de-epoxidase activity in intact chloroplasts. *Photosynthesis Research* **39**: 137–147.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD Hancock JT. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1237–1247.
- Noctor G, Foyer C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under

control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249–279.

- Orozco-Cárdenas ML, Narváez-Vásquez J, Ryan CA. 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**: 179–191.
- **Osmond CB. 1994.** What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR (eds). Photoinhibition of photosynthesis. From Molecular Mechanisms to the field. BIOS Scientific, Oxford, England, pp. 1–24.
- Otieno DO, Schmidt MWT, Kurz-Besson C, Lobo Do Vale R, Pereira JS, Tenhunen JD. 2007. Regulation of transpirational water loss in Quercus suber trees in a Mediterranean-type ecosystem. *Tree Physiology* 27: 1179–1187.
- Pammenter NW, Vander Willigen C. 1998. A mathematical and statistical analysis of the curves illustrating vulnerability of xylem to cavitation. *Tree Physiology* 18: 589–593.
- **Parthier B. 1990.** Jasmonates: hormonal regulators or stress factors in leaf senescence? *Journal of Plant Growth Regulation* **9**: 57–63.
- Pastenes C, Horton P. 1996. Effects of high temperature on photosynthesis in beans.

 Oxygen evolution and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology* 112: 1245–1251.
- **Pastori GM, del Río RA. 1997.** Natural senescence of pea leaves: an activated oxygen-mediated function for peroxisomes. *Plant Physiology* **113**: 411–418.
- Pastori GM, Trippi VS. 1993. Antioxidative protection in a drought-resistant strain during leaf senescence. *Physiologia Plantarum* 87: 227–231.
- Peňuelas J, Llusià J, Asensio D, Munné-Bosch S. 2005. Linking isoprene with plant monoterpene, antioxidanrs and monoterpene emissions. *Plant, Cell and Environment* 28: 278–286.
- Peňuelas J, Llusià J. 1999. Seasonal emission of monoterpenes by the Mediterranean tree *Quercus ilex* in field conditions: Relations with photosynthetic rates, temperature and volatility. *Physiologia Plantarum* 105: 641–647.
- **Peňuelas J, Llusià J. 2002.** Linking photorespiration, monoterpenes and thermotolerance in *Quercus*. *New Phytologist* **155**: 227–237.
- Peňuelas J, Munné-Bosch S. 2005. Isoprenoids: an evolutionary pool for photoprotection. *Trends in Plant Science* 10: 166–169.
- **Piňol J, Sala A. 2000.** Ecological implications of xylem cavitation for several Pinaceae in the Pacific Northern USA. *Functional Ecology* **14**: 538–545.
- Piquery L, Davoine C, Huault C, Billard JP. 2000. Senescence of leaf sheats of ryegrass stuble: changes in enzymes activities related to H₂O₂ metabolism. *Plant Growth Regulation* **30**: 71–77.
- Pockman WT, Sperry JS. 2000. Vulnerability to xylem cavitation and the distribution of Sonoran desert vegetation. *American Journal of Botany* 87: 1287–1299.
- **Polle A., Otter T, Seifert F. 1994.** Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (Picea abies L.). *Plant Physiology* **106**: 53–60.

Popova LP, Vaklinova SG. 1988. Effect of jasmonic acid on the synthesis of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in barley. *Journal of Plant Physiology* 133: 210–215.

Procházková D, Sairam RK, Srivastava GC, Singh DV. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science* 161: 765–771

- Qiu N, Lu Q, Lu C. 2003. Photosynthesis, photosystem II efficiency and the xanthophyll cycle in the salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica*. *New Phytologist* **159**: 479–486.
- **Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, Murr DP, Watkins CB. 1997.** Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes: salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiology* **155**: 137–149.
- **Reich PB, Walters MB, Ellsworth DS. 1992.** Leaf lifespan in relation to leaf, plant and stand characteristics among diverse ecosystems. *Ecological Monographs* **62**: 365–392.
- **Rentel M, Knight MR. 2004.** Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis. Plant Physiology.* **135**: 1471–1479.
- Rodriguez-Saona C, Crafts-Brander SJ, Paré PW, Henneberry TJ. 2001. Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants. *Journal* of Chemical Ecology 27: 679–695.
- **Rosner S, Klein A, Müller U, Karlsson B. 2007.** Hydraulic and mechanical properties of young Norway spruce clones related to growth and wood structure. *Tree Physiology* **27**: 1165–1178.
- Rosner S, Klein A, Wimmer R, Karlsson B. 2006. Extraction of features from ultrasound acoustic emissions: a tool to assess the hydraulic vulnerability of Norway spruce trunkwood? *New Phytologist* **171**: 105–116.
- Rouhi V, Samson R, Lemeur R, Van Damme P. 2007. Phtosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 117–129.
- Sakai A, Larcher W. 1987. Frost survival of plants, responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin.
- Salin ML. 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* 72: 681–689.
- Sánchez-Blanco MJ, Rodríguez P, Morales MA, Ortuňo MF, Torrecillas A. 2002. Comparative growth and water relations of *Cistus albidus* and *Cistus monspeliensis* plants during water deficit conditions and recovery. *Plant Science* 162: 107–113.
- Sánchez-Díaz M, Tapia C, Antolín MC. 2007. Drought-induced oxidative stress in Canarian laurel forest tree species growing under controlled conditions. *Tree Physiology* 27: 1415–1422.
- Santiago LS, Goldstein G, Meinzer FC, Fisher JB, Machado K, Woodruff D, Jones T. 2004. Leaf photosynthetic traits scale with hydraulic conductivity and wood density in Panamanian forest canopy trees. *Oecologia* 140: 543–550.
- Sanz LC, Fernandez-Maculet JC, Gomez E, Vioque B, Olias JM. 1993. Effect of methyl jasmonate on ethylene biosynthesis and stomatal closure in olive leaves. *Phytochemistry* 33: 285–289.
- Sasaki-Sekimoto Y, Taki N, Obayashi T, Aono M, Matsumoto F, Sakural N, Suzuki H, Hiral MY, Noji M, Saito K, Tatsuru M, Takamiya K, Shibata D, Ohta H. 2005. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defense compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 44: 653–668.
- Scandalios JG. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7–12
- Scebba F, Sebastiani L, Vitaglian C. 2004. Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunnus armeniaca* leaves. *Plant Biology* 44: 41–46.
- Schaedle M, Bassham JA. 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiology* 59: 1011–1012.
- Schmelz EA, Alborn HT, Tumlinson JH. 2001. The influence of intact-plant and excised-leaf bioassay designs on volicitin- and jasmonic acid-induced sesquiterpene volatile release in *Zea mays*. *Planta* **214**: 171–179.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. 1965. Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148: 339–346.
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indictor for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze DD, Caldwell MM (eds). Ecophysiology of Photosynthesis. Springer-Verlag, Berlin, pp 49–70
- Schulte PJ, Hinckley TM. 1985. A comparison of pressure-Volume curve data analysis techniques. *Journal of Experimental Botany* 36: 1590–1602.
- Schume H, Grabner M, Eckmullner O. 2004. The influence of an altered groundwater regime on vessel propertyes of hybrid poplar. *Trees-Structure and Function* 18: 184–194.
- Senevirathna AMWK, Stirling CM, Rodrigo VHL. 2003. Growth, photosynthetic performance and shade adaptation of rubber (*Hevea brasiliensis*) grown in natural shade. *Tree Physiology* 23: 705–712.
- Sgherri LM, Loggini B, Bochicchio A, Navari-Izzo F. 1994. Antioxidant system in Boea higroscopica: Changes in responses to desiccation and rehydration. *Photochemistry* 37: 377–381.
- Sharkey TD, Chen X, Yeh S. 2001. Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiology* 125: 2001–2006.
- Sharkey TD, Singsaas EL. 1995. Why plants emit isoprene? Nature 374: 769.
- Sharkey TD, Yeh S. 2001. Isoprene emission from plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 407–436.
- Singsaas EL, Lerdau MT, Winter K, Sharkey TD. 1997. Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species. *Plant Physiology* 115: 1413–1420.
- Smart CM. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* 126: 419–448.

- **Sobrado MA. 1993.** Trade-off between water transport efficiency and leaf life span in tropical dry forest. *Oecologia* **96**: 19–23.
- **Sobrado MA. 1997.** Embolism vulnerability in drought-deciduous and evergreen species of a tropical dry forest. *Acta Oecologia* **18**: 383–391.
- **Sofo A, Tuzio AC, Dichio B, Xiloyannis C. 2005.** Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. *Plant Science* **169**: 403–412.
- **Somersalo A, Krause GH. 1989.** Photoinhibition at chilling temperature. Fluorescence characteristics of unhardened and cold acclimated spinach leaves. *Planta* **177**: 409–416.
- Souza RP, Machado EC, Silva JAB, Lagoa A, Silveira JAG. 2004. Photosynthetic gas exchanges, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany* **51**: 45–56.
- **Sparks JP, Black A. 1999.** Regulation of water loss in populations of *Populus trichocarpa*: the role of stomatal control in preventing xylem embolism. *Tree Physiology* **19**: 453–459.
- Sperry JS, Donnelly JR, Tyree MT. 1988. A method for measuring hydraulic conductivity and embolism in xylem. *Plant, Cell and Environment* 11: 35–40.
- Sperry JS, Saliendra NZ. 1994. Intra- and inter-plant variation in xylem cavitation in *Betula occidentalis*. *Plant, Cell and Environment* 17: 1233–1241.
- Sperry JS, Tyree MT. 1988. Mechanism of water stress-induced xylem embolism. *Plant Physiology* 88: 581–587.
- Stitt M. 1991. Rising carbon dioxide levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* 14: 741–762.
- Szabo I, Bergantino E, Giacometti GM. 2005. Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *Embo Reports* 6: 629–634.
- **Tezara W, Mitchell VJ, Driscoll SD, Lawlor DW. 1999.** Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* **401**: 914 –917.
- Tichy M, Vermaas V. 1999. In vivo role of catalase-peroxidase in Synechocystis sp. Strain PCC6803. *Journal of Bacteriology* 181: 1875–1882.
- Trippi S, Thimann KV. 1983. The exudation of solutes during senescence of oat leaves. *Physiologia Plantarum* 58: 21–28.
- **Tsonev TD, Lazova GN, Stoinova ZHG, Popova LP. 1998.** A possible role for jasmonic acid in adaptation of barley seedlings to salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation* **17**: 153–159.
- Tyree MT, Ewers FW. 1991. The hydraulic architecture of trees and other woody plants. *New Phytologist* 119: 345–360.
- **Upadhyaya H, Panda SK, Dutta BK. 2008.** Variation of Physiological and antioxidative responses in tea cultivars subjected to elevated water stress followed by rehydration recovery. *Acta Physiologiae Plantarum*. **doi**: 10.1007/s11738-008-0413-9.
- van Poecke RMP, Dicke M. 2004. Indirect defence of plants against herbivores:

using Arabidopsis thaliana as a model plant. Plant Biology 6: 387-401.

- Velikova V, Edreva A, Loreto F. 2004. Endogenous isoprene protects *Phragmites australis* leaves against singlet oxygen. *Physiologia Plantarum* 122: 219–225.
- Velikova V, Loreto F. 2005. On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant, Cell and Environment* 28: 318–327.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polymines. *Plant Science* 151: 59–66.
- Verhoeven AS, Adams III WW, Demming-Adams B. 1998. Two forms of sustained xanthophylls cycle-dependent energy dissipation in overwintering *Euonymus kiautschovicus*. *Plant, Cell and Environment* **21**: 893–903.
- Verhoeven AS, Adams III WW, Demming-Adams B. 1999. The xanthophyll cycle and acclimation of Pinus ponderosa and Malva neglecta to winter stress. *Oecologia* 118: 277–287.
- Villar R, Held AA, Merino J. 1995. Dark leaf respiration in light and darkness of an evergreen and a deciduous plant species. *Plant Physiology* 107: 421–427.
- **Vivin P, Guehl JM, Clément A, Aussenac G. 1996.** The effects of elevated CO₂ and water stress on whole plant CO2 exchange, carbon allocation, and osmoregulation in oak seedlings. *Annual of Forest Science* **53**: 447–459.
- Walker MA, McKersie BD. 1993. Role of the ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. *Journal of Plant Physiology* 141: 234–239.
- Wasternack C, Hause B. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 72: 165–221.
- Webb WL, Newton M, Starr D. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: A mathematical model. *Oecologia* 17: 281–291.
- Weidhase RA, Lehmann J, Kramell H, Sembdner G, Parthier B. 1987. Degradation of ribulose-1-5-bisphosphate-carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methyl ester and counteraction by cytokinin. *Physiologia Plantarum* **69**: 161–166.
- Wilen RW, Ewan BE, Gusta LV. 1994. Interaction of abscisic acid and jasmonic acid on the inhibition of seed germination and the induction of freezing tolerance. *Canadian Journal of Botany* 72: 1009–1017.
- Willekens H, Inze D, van Montagu M, van Camp W. 1995. Catalases in plants. Molecular Breeding 1: 207–222.
- Woodward FI. 1987. Climate and plant distribution. Cambridge University Press, Cambridge.
- **Wu YD. 1982.** The change of water in the rubber tree on chilling. *Acta Phytophysiologia Sinica* **8**: 17–25.
- Wycherley PR. 1992. The genus Hevea–botanical aspects. In: Sethuraj MR, Mathew NM (eds). Natural Rubber: Biology, Cultivation and Technology. Elsevier, Amsterdam, pp 200 238.

Xu DQ, Shen YG. 1997. Diurnal variations in the photosynthetic efficiency in plants. *Acta Phytophysiologica Sinica* 23: 410–416.

Ye Z, Rodriguez R, Tran A, Hoang H, des los Santos D, Brown S, Vellanoweth RL. 2000. The developmental transition to flowering repress ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **158**: 115–127.

Zeidler J, Schwender J, Müller C, Wiesner J, Weidemeyer C, Back E, Jomaa H, Lichtenthaler HK. 1998. Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. Zeitschrift Naturforsch Teil C 53c: 980–986.

Zeidler JG, Lichtenthaler HK, May HU, Lichtenthaler FW. 1997. Is isoprene emitted by plants synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway? *Zeitschrift Naturforsch Teil C* **52c**: 15–23.

Zhao S, Blumwald E. 1998. Changes in oxidation-reduction state and antioxidant enzymes in the roots of jack pine seedlings during cold acclimation. *Physiologia Plantarum* **104**: 134–142.

- Zhu H. 1997. Ecological and biogeographical studies on the tropical rain forest of south Yunnan, SW China, with special reference to its relation with rain forests of tropical Asia. *Journal of Biogeography* 24: 647–662.
- Zimmermann MH. 1983. Xylem structure and the ascent of sap. Springer-Verlag, New York.

在攻读博士学位期间发表论文情况

- **Chen JW, Cao KF. 2005.** Plant VOCs emission: a new strategy of thermoloterance. *Journal of Forestry Research* **16**: 323–326.
- **Chen JW, Cao KF. 2008.** Changes in activities of antioxidative system and monoterpene and photochemical efficiency during seasonal leaf senescence in *Hevea brasiliensis* trees. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 1–9.
- **Chen JW, Zhang Q, Cao KF. 2008.** Inter-specific variation of photosynthetic and xylem hydraulic traits in the deciduous and evergreen Euphorbiaceae tree species from a tropical rainforest in south-western China. *Ecological Research* doi: 10.1007/s11284-008-0482-4.
- Chen JW, Bai KD, Cao KF. 2008. Inhibition of monoterpene biosynthesis accelerates oxidative stress and leads to enhancement of antioxidant defenses in leaves of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Acta Physiologiae Plantarum* (In Press).
- Wilske B, Cao KF, Schebeske G, Chen JW, Wang A, Kesselmeier J. 2007. Isoprenoid emissions of trees in a tropical rainforest in Xishuangbanna, SW China. *Atmospheric Environment* **41**: 3748–3757.
- **陈军文**, 曹坤芳. 2008. 三叶橡胶光合作用能力和抗氧化系统以及单萜类物质对 茉莉酸的响应. 《植物研究》**28(1)**: 47-53.
- **陈军文**, 曹坤芳. 植物挥发性化合物排放的生理生态学意义.《生态科学进展》. 科学出版社. 北京. 2005.
- 陈亚军. **陈军文**. 蔡志全. 2007. 木质藤本及其在热带树林中的作用和功能. 《植物学通报》24:127-136.

已投稿论文

- **Chen JW, Cao KF.** Responses of photosynthetic performance and antioxidants defense and water relations in *Hevea brasiliensis* trees to dehydration and rehydration (submitted to *Tree Physiology*).
- **Chen JW, Cao KF.** The effects of night chilling on *Hevea brasiliensis* in the marginal tropical area, Xishuanbanna, SW China (submitted to *Environmental & Experimental Botany*).

- **Chen JW, Cao KF.** The different photosynthetic and hydraulic performance between *Hevea brasiliensis* and *Drypetes indica* during rainy and dry season (submitted to *Physiologia Plantarum*).
- Qiang Zhang, **Jun-Wen Chen**, Bao-Gui Li, Kun-Fang Cao. Effects of drought on photosynthesis in two epiphytic and two terrestrial fern species (Submitted to *Photosynthetica*).

致 谢

神秘的西双版纳, 茫茫的热带雨林, 清澈的罗梭江, 宁静的勐仑小镇, 如诗 如画的葫芦岛, 还有那凤尾竹和椰子树掩映的傣家村寨, 热情奔放的傣家小伙子, 水一样的傣家姑娘, 这些西双版纳独具特色的风土人情伴随我度过了一段难忘的 人生岁月一博士研究生生活。人人都说, 西双版纳总有忘归的感觉, 西双版纳总 有收获的季节。说起要离开版纳, 心里真的有些依依不舍; 说起收获, 博士论文 的完成算是我在西双版纳最大的收获了。

本论文研究是在我的导师曹坤芳研究员指导下完成的。这篇博士论文的完成 凝聚了导师太多的心血,深表感谢。导师对科研事业的执着和献身精神以及一丝 不苟的科研态度,令人敬佩,也是我一生学习的典范。此外,还要感谢师母王玲 老师在学习和生活上的关心和帮助。

本博士论文的完成还离不开无数其它人的帮助和支持。尤其要感谢植物生理 生态组的马宏同志,他几乎参与了本论文研究的全部过程,是我最得力的助手, 对他的付出和辛勤劳动,我将一生无法忘怀;感谢本研究组的张教林博士对我研 究工作多方面地帮助和支持;感谢本研究组实验员姜艳娟同志在试验测定和仪器 调试方面提供的大量帮助;本研究组己毕业的蔡志全博士、朱俊杰博士、范泽鑫 博士、Elsheery 博士以及陈亚军硕士和李伟硕士在诸多方面也提供了大量的帮 助;与来自德国马普科学院的 Wilske 博士后合作研究了相当长的一段时间,收 获颇多;师弟师妹一朱师丹、付培立、王爱英、刘智慧、刘金玉以及本研究组的 新任实验员付学伟同志在实验测定方面的鼎力相助,使我圆满地完成了博士论文 最后的分析测定工作;思茅师专多届的实习生也协助我完成了大量实验测定任 务;郝广友博士在水分传导的分析与测定过程中提供了非常及时而重要的帮助; 中国科学院昆明植物研究所分析测试中心的余珍老师对本论文研究中的单萜类 化合物的分析付出了辛勤的劳动。攻读博士学位期间,一起共同生活和学习的张 强博士和白坤栋博士还有章永江博士在很多方面也提供了帮助。来昆明之后,与 硕士朝夕相处,一起相互帮助和学习,度过了一段愉快的时光。在这里,对上述 提及的和未提及的诸多热心人的帮助和支持,表示深深地感谢。

在这里,还要特别感谢我的父亲陈梅初、母亲梁学秀、哥哥陈德龙和陈德飞、 妹妹陈小华,他们的关爱和鼓励以及多年来默默的支持使我克服了求学生涯中遇 到的无数的困难,跨越了前进道路上一个又一个的障碍,迈向了人生事业的康庄 大道。另外,对女友向慧女士在生活上无微不至的照顾表示深深的感谢!

我来自湖南的一个偏远的农村,是本村的第一个本科生,也是第一个硕士生, 带着无数人的期望和重托,开始了博士研究生的奋斗历程。这几年的付出和努力, 本研究论文虽不是收获的全部,但它是在众多人的帮助和支持下,我本人主要的 奋斗结果。攻读博士学位时间,学到了大量的专业知识和为人处世的道理,甚感 欣慰和满足。在这里,我要骄傲地告诉父老乡亲和曾经教育过我的老师以及无数 的亲朋好友,这几年我确实努力了!

博士毕业后,我将走向新的工作岗位,面临新的挑战。此时此刻的心情,可 以用两句伟人的诗来形容,一是毛泽东的,雄关漫道真如铁,而今迈步从头越; 一是屈原的,路漫漫其修远兮,吾将上下而求索。过去的努力和成就已成为历史, 未来的人生道路还漫长。惟有踏踏实实地工作,一步一步地前进,梦想才会成为 现实。当然,前进的道路上,困难和挫折难免。但不管多大的困难和挫折,只要 蓝图还存在,只要梦想还存在,只要我们还是向前方走去,梦想总会有实现的那 一刻,成功将最终属于我们。

最后, 谨以此论文献给所有给与我关心、支持和帮助的人!

本论文研究得到了国家自然科学基金项目(90302013)资助,特此 致谢。