

O_3 污染胁迫下冬小麦的伤害症状及其对叶片氮代谢脯氨酸和谷胱甘肽含量的影响

黄益宗¹, 钟敏¹, 隋立华¹, 王玮², 耿春梅², 殷宝辉²

(1.中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085; 2.中国环境科学研究院, 北京 100012)

摘要:采用开顶式气室模拟研究 O_3 污染胁迫对冬小麦叶片可见伤害症状、氮代谢、脯氨酸和谷胱甘肽含量的影响,结果表明冬小麦在 O_3 胁迫下表现出明显的受害症状,且 O_3 浓度越高受害症状越严重。 O_3 浓度升高导致不同生长期冬小麦叶片硝酸还原酶活性显著降低,当 O_3 浓度为 40~120 $nL \cdot L^{-1}$ 时,拔节期、抽穗期和乳熟期的叶片硝酸还原酶活性分别比对照处理降低 45.4%~92.9%、58.0%~93.5%和 90.0%~93.2%。 O_3 污染胁迫对冬小麦叶片硝态氮和铵态氮含量也有影响,但是随着 O_3 浓度、冬小麦生长期的不同影响不一样;冬小麦叶片脯氨酸和谷胱甘肽含量在 O_3 污染胁迫下变化也各异。在冬小麦抽穗期,当 O_3 浓度为 40、80 $nL \cdot L^{-1}$ 时,脯氨酸含量分别比对照处理提高 163.9%和 173.2%,但是在 O_3 浓度为 120 $nL \cdot L^{-1}$ 时却降低 42.4%。 O_3 污染胁迫下拔节期冬小麦叶片还原型谷胱甘肽(GSH)含量显著比对照处理增加,而抽穗期 GSH 含量在较高 O_3 浓度胁迫下却显著地比对照处理降低,说明植物在 O_3 胁迫下表现出不同的调节和适应机制。

关键词:臭氧;冬小麦;氮代谢;硝酸还原酶;脯氨酸;谷胱甘肽

中图分类号:Q945.78 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)08-1461-06

Effects of Ozone Stress on Visible Injury Symptom, Nitrogen Metabolism, and the Contents of Proline and Glutathione in Winter Wheat Leaves

HUANG Yi-zong¹, ZHONG Min¹, SUI Li-hua¹, WANG Wei², GENG Chun-mei², YIN Bao-hui²

(1.Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2.Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: Effects of O_3 stress on visible injury symptom, nitrogen metabolism, and the contents of proline and glutathione of winter wheat leaves were studied by open top chambers (OTC). The results showed that O_3 stress could induce significant damage to winter wheat leaves and the injury symptom was more serious under higher concentration of O_3 . The activities of nitrate reductase in leaves of winter wheat reduced with increasing the concentration of O_3 . Compared to the control treatment, at the O_3 concentrations of 40~120 $nL \cdot L^{-1}$, the activities of nitrate reductase decreased respectively by 45.4%~92.9%, 58.0%~93.5% and 90.0%~93.2% in the jointing stage, the heading stage and the milk stage of winter wheat. O_3 stress also had significant effects on the contents of NH_4^+-N and NO_3^--N in winter wheat leaves, but the effects were different under different O_3 concentrations or different growth stages. The contents of proline and glutathione varied under different O_3 concentrations. Compared to the control treatment, proline contents in leaves of winter wheat in the heading stage increased respectively by 163.9% and 173.2% at the O_3 concentrations of 40 $nL \cdot L^{-1}$ and 80 $nL \cdot L^{-1}$, while decreased by 42.4% at the O_3 concentration of 120 $nL \cdot L^{-1}$. O_3 stress resulted in increase of GSH contents in leaves of winter wheat in the jointing stage, while GSH contents in leaves of winter wheat in the heading stage decreased significantly compared with the control group under elevated O_3 . This study suggests that plants show different adjustment and adaptation mechanism under O_3 stress.

Keywords: ozone; winter wheat; nitrogen metabolism; nitrate reductase; proline; glutathione

收稿日期:2012-03-16

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

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

近几十年来,由于人类大量使用化石燃料、含N化肥,使大气中NO_x、VOCs剧增,导致大气中O₃浓度日益增加,而且污染范围越来越大^[1]。近地层O₃作为最重要的大气污染物之一,已成为当今世界研究者及公众密切关注的重要问题^[2-4]。在我国,由于经济的快速发展,人口的不断增加,土地利用方式发生了前所未有的变化,近地层O₃浓度增加较快,尤其在人口密集的城市和地区其O₃浓度已达到相当高的水平。比如长江三角洲地区6个O₃监测点(余山、常熟、建湖、句容、临安和嘉兴)1999—2000年日7-h平均O₃浓度为34.7~47.7 nL·L⁻¹,最大1-h O₃浓度为114.2~196.2 nL·L⁻¹^[5]。2008年春天和2009年夏天北京城区开阔型道路平均O₃浓度已超130 nL·L⁻¹以上,交叉路口道路平均O₃浓度超过150 nL·L⁻¹以上^[6]。

O₃对农业生产影响较大,欧洲、北美和许多发展中国家已有报道,O₃对植物具有伤害作用,并导致农作物减产。根据美国全国农作物产量损失评估网络(NCLAN)研究,由于O₃的污染,美国每年农作物经济损失超过30亿美元^[7]。在英国,O₃污染导致农作物产量损失达5%~15%,仅小麦损失就达2亿英镑^[8]。我国也有报道,O₃对作物的危害作用以及对农业生态系统的影响^[9-14]。但是有关O₃污染胁迫对冬小麦氮代谢的影响研究较少有报道,O₃污染胁迫对冬小麦体内的脯氨酸和谷胱甘肽含量的影响也较少有研究。在逆境条件下(干旱、盐碱、热、冷、冻)植物体内的脯氨酸含量将显著提高,因此脯氨酸可作为植物抗逆性的一个重要指标,通过监测植物体内的脯氨酸含量可以看出逆境下植物的生长状况,并为作物的抗逆育种提供依据。谷胱甘肽分为还原型谷胱甘肽(GSH)及氧化型谷胱甘肽(GSSG)两类,作为抗坏血酸-谷胱甘肽体系中重要的组成部分,谷胱甘肽在清除活性氧自由基方面发挥了重要的作用。本文在大田生长条件下采用开顶式气室(OTC)法研究模拟O₃浓度升高对冬小麦伤害症状、叶片氮代谢、脯氨酸和谷胱甘肽含量的影响,为我国O₃污染防治、提高粮食产量和品质提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验地点和材料

实验地点位于北京市西北部昌平区种子管理站(40°12'N,116°8'E),属暖温带大陆性季风气候,全年四季分明,年均降水量为550.3 mm,雨量集中在6—8月,雨热同期,年均温为11.8℃,年均日照时数

2684 h,无霜期为200 d左右。

实验用作物冬小麦品种为北农9549(*Triticum aestivum* L. Beinong 9549),由北京农学院提供。2009年9月28日播种,2010年4月26日追施尿素(225 kg·hm⁻²)。整个生长期田间管理方式与当地保持一致。

1.2 实验设计

大田实验条件下建立开顶式气室进行模拟实验。开顶式气室模拟系统主要由框架和室壁构成的气室、通风系统、过滤系统、O₃发生系统、O₃浓度控制系统、O₃浓度自动采集监测系统等组成。开顶式气室主体为正八面柱体,底边长1.0 m、总高2.7 m,覆盖面积约为4.8 m²。气室框架由钢筋构成,室壁材质为聚乙烯塑料膜。系统内O₃通过医用纯氧(99.5%)经O₃发生器(SK-CFG-3,济南)高压放电作用产生。通过质量流量计(GFC17, Aalborg Industries, Inc., Carson, CA)和组态王工控软件(MCGS 6.2, 北京)调节流量,进而控制系统内O₃浓度。箱内和自然大气O₃浓度通过2台O₃分析仪(Model 49c, Thermo Electron Co., Franklin, MA)进行连续监测。O₃浓度设4个处理:不熏O₃(CK)和40、80、120 nL·L⁻¹ O₃。每个处理3次重复。实验从2010年4月5日开始,每日熏气9 h(8:00—17:00),6月12日停止熏气,共熏气50 d。

1.3 测定方法

参考Taohibana和Konishi的方法^[15]采用活体法测定硝酸还原酶活性;铵态氮和硝态氮的测定参考吕伟仙等的方法^[16];采用酸性茚三酮法测定脯氨酸含量^[17];GSH含量参照Brehe和Burch的方法测定^[18]。

1.4 数据统计和处理

采用SPSS 13.0和Origin 8.0软件对数据进行分析、统计和绘图。

2 结果与分析

2.1 冬小麦叶片的可见伤害症状

在高浓度O₃(120 nL·L⁻¹)熏蒸下,冬小麦最先表现出受害症状的是叶片,先是叶片叶脉两侧、叶尖出现褐色斑点,然后斑点面积逐渐扩大,叶片出现锈斑。在O₃熏气后期,冬小麦整个植株呈枯黄状,说明冬小麦受到O₃的严重伤害。低浓度O₃(40 nL·L⁻¹)熏蒸导致冬小麦叶片出现受害症状的时间比高浓度时晚15 d左右,试验中直到冬小麦抽穗期才出现受害症状,且其症状明显轻于120 nL·L⁻¹ O₃处理组。

O₃熏气使冬小麦出穗延迟,成熟提前。图1是冬

小麦乳熟期时拍摄的照片,从图中可以看出,80、120 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ O_3 浓度处理组冬小麦叶片已经出现干枯现象,40 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ O_3 处理组受害症状明显轻于高浓度 O_3 处理组,而对照组无明显受害症状,冬小麦长势明显好于 O_3 处理组。

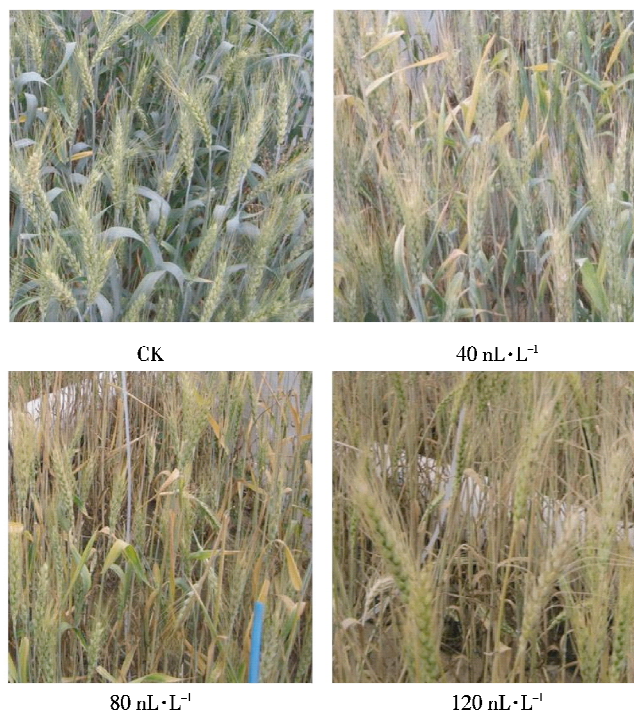


图1 O_3 浓度升高对冬小麦叶片的可见伤害症状(乳熟期)

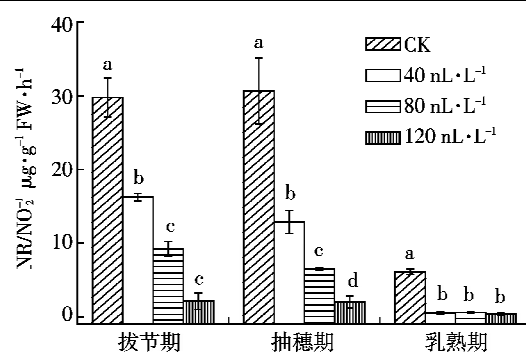
Figure 1 Effects of elevated ozone concentrations on foliar symptom of winter wheat(milk stage)

2.2 对冬小麦叶片硝酸还原酶活性的影响

图2为 O_3 熏蒸条件下不同生长期冬小麦叶片硝酸还原酶活性的变化规律。 O_3 污染胁迫导致冬小麦叶片硝酸还原酶活性显著低于没有受到 O_3 胁迫的对照处理,且随着 O_3 浓度的提高而不断地降低。当 O_3 浓度为40、80、120 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,冬小麦叶片硝酸还原酶活性分别比对照处理降低45.4%、68.9%和92.9%(拔节期);58.0%、78.8%和93.5%(抽穗期);90.9%、90.0%和93.2%(乳熟期)。

2.3 对冬小麦叶片铵态氮和硝态氮含量的影响

图3和图4分别为 O_3 熏蒸下冬小麦叶片硝态氮和铵态氮含量的变化情况。可以看出,在不同的生长期(拔节期、抽穗期和乳熟期), O_3 浓度为40、80 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时冬小麦叶片硝态氮含量与对照处理相比变化不大,但是当 O_3 浓度提高到120 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,冬小麦叶片硝态氮含量分别比对照处理显著降低18.7%、10.1%和17.0%。



不同小写字母表示 Duncan's 检验中 $P < 0.05$, 下同

图2 O_3 浓度升高对冬小麦叶片硝酸还原酶活性(NR)的影响

Figure 2 Effect of ozone on NR activities in leaves of winter wheat

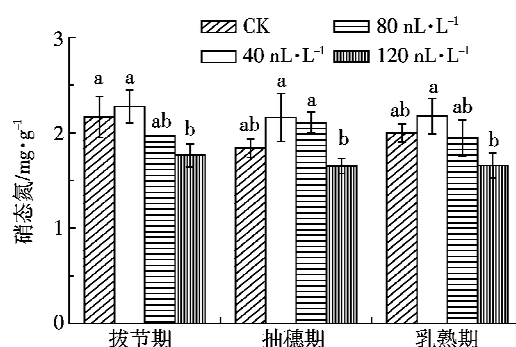


图3 O_3 浓度升高对冬小麦叶片硝态氮含量的影响

Figure 3 Effect of ozone on $\text{NO}_3\text{-N}$ contents in leaves of winter wheat

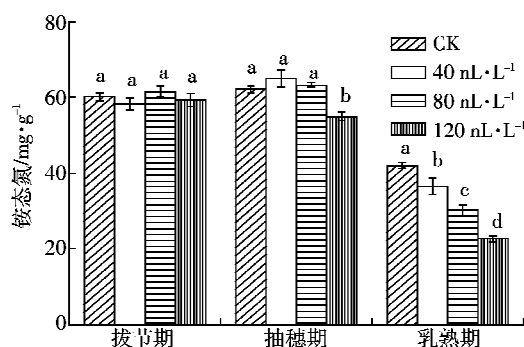


图4 O_3 浓度升高对冬小麦叶片铵态氮含量的影响

Figure 4 Effect of ozone on $\text{NH}_4\text{-N}$ contents in leaves of winter wheat

在冬小麦拔节期,其叶片铵态氮含量在不同 O_3 处理间差异不明显;抽穗期除了120 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ O_3 胁迫显著地降低冬小麦叶片铵态氮含量以外,其他 O_3 浓度处理影响不大;乳熟期 O_3 熏蒸均导致冬小麦叶片铵态氮含量显著降低,当 O_3 浓度为40、80、120 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,冬小麦叶片铵态氮含量分别比对照处理降低13.1%、28.0%和46.0%。

2.4 O₃ 浓度升高对冬小麦叶片脯氨酸含量的影响

图5为O₃浓度升高对冬小麦叶片脯氨酸含量的影响,可以看出,O₃熏蒸条件下脯氨酸含量呈现出不同的变化趋势。O₃熏蒸初期(冬小麦拔节期),脯氨酸含量随O₃浓度的提高而呈现出增加的趋势,80、120 nL·L⁻¹ O₃浓度时脯氨酸含量分别比对照处理提高13.0%和26.8%;在冬小麦抽穗期,脯氨酸含量从(对照处理)228.0 μg Pro·g⁻¹ FW 提高到601.6 μg Pro·g⁻¹ FW (O₃浓度40 nL·L⁻¹)和622.8 μg Pro·g⁻¹ FW (O₃浓度80 nL·L⁻¹),分别提高163.9%和173.2%,然后急剧降低到131.4 μg Pro·g⁻¹ FW,降低42.4%(O₃浓度120 nL·L⁻¹);在冬小麦乳熟期,O₃胁迫下的脯氨酸含量均明显低于对照处理,当O₃浓度为40、80、120 nL·L⁻¹时,脯氨酸含量分别比对照处理降低44.0%、24.5%和42.9%。抽穗期冬小麦叶片脯氨酸含量均明显高于抽穗期和乳熟期,有的处理甚至高达数倍。

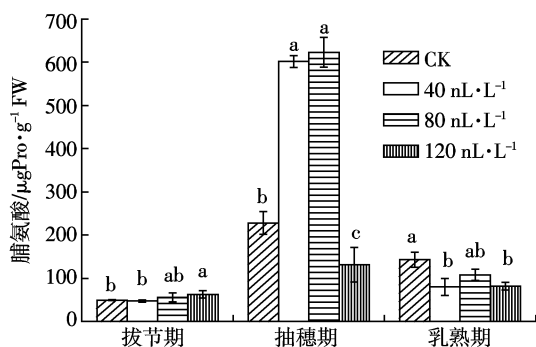


图5 O₃浓度升高对冬小麦叶片脯氨酸含量的影响

Figure 5 Effect of ozone on proline contents in leaves of winter wheat

2.5 O₃ 浓度升高对冬小麦叶片谷胱甘肽含量的影响

图6为O₃浓度升高对冬小麦叶片GSH含量的影响。在冬小麦拔节期,O₃污染胁迫导致GSH含量显著提高($P < 0.05$),当O₃浓度为40、80、120 nL·L⁻¹时,冬小麦叶片GSH含量分别比对照提高49.7%、48.1%和31.7%。在冬小麦抽穗期,除了O₃浓度为40 nL·L⁻¹时冬小麦叶片GSH含量与对照相比有所提高外,80、120 nL·L⁻¹ O₃胁迫均导致GSH含量与对照相比有显著降低,降低幅度分别为14.2%和27.9%。

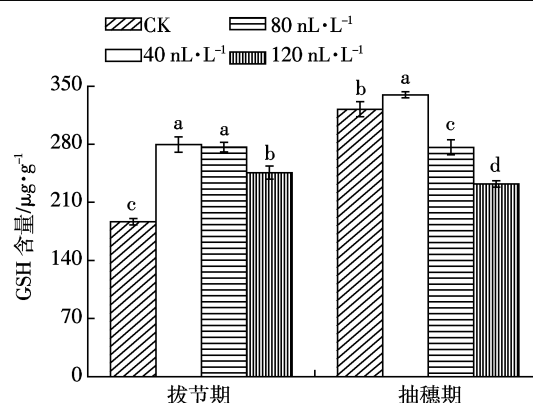


图6 O₃浓度升高对冬小麦叶片GSH含量的影响

Figure 6 Effect of elevated ozone on GSH content in leaves of winter wheat

染胁迫对作物和林木有伤害影响^[19-21]。研究O₃浓度升高对南方35种植物(包括树木、花卉、蔬菜和室内植物)生长的影响,发现植物受害症状有:叶片散布细密点状斑,斑点的颜色呈白色、黄色、棕褐色,也有褪绿斑等^[19]。尾叶桉、米兰和马尾松叶片在O₃胁迫下出现褐斑、卷曲、变薄和干枯等现象^[20]。O₃胁迫导致菠菜叶片出现淡黄色和深褐色斑点、嫩叶的叶尖卷曲、叶片变薄变软、脱水、枯黄等受害症状^[21]。

硝酸还原酶是高等植物氮素同化的限速酶,可直接调节硝酸盐的还原,从而调节氮代谢,并影响到植物的光合碳代谢。本研究中O₃污染胁迫导致冬小麦叶片硝酸还原酶活性降低,硝态氮和铵态氮含量发生变化,这可能是因为O₃污染导致冬小麦植株生长发育受阻,各种代谢功能受到影响,从而影响植物体内硝酸还原酶的合成,进而影响植株铵态氮和硝态氮的含量。O₃污染胁迫对植物硝酸还原酶活性的影响较少有报道,但是有人研究了CO₂浓度升高对冬小麦氮代谢的影响,发现CO₂浓度升高可导致冬小麦地上部硝酸还原酶活性、铵态氮和硝态氮含量降低,这种结果是由于植物硝态氮代谢过程增强、形成更多的含氮有机化合物所引起的^[22]。

脯氨酸在植物细胞适应环境胁迫的过程中起着重要的作用,它是细胞内的渗透调节剂、羟基自由基清除剂、细胞内酶的保护剂、N素储藏物质等,因此脯氨酸可作为植物抗逆性的一个重要指标。许多研究发现植物在逆境胁迫下,其体内的游离脯氨酸含量将急剧上升,比胁迫前增加数倍到数十倍^[23-24],脯氨酸的大量积累可增强植物对逆境环境的适应,因为脯氨酸可作为碳源和氮源为细胞的生长提供大量的能量。本文研究发现冬小麦叶片的脯氨酸含量,在拔节期随O₃

3 讨论

O₃污染胁迫导致冬小麦产生严重的伤害症状:叶脉两侧与叶尖出现褐色斑点、叶枯黄、出穗延迟、成熟提前等。O₃浓度越高以及O₃处理时间越长,冬小麦受害症状越严重。其他的一些研究者也报道O₃污

浓度的增加有略微增加的趋势;抽穗期冬小麦叶片脯氨酸含量在 40、80 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ O_3 浓度下比对照急剧增加了数倍,说明作物为了抵抗和适应 O_3 胁迫,在生理生化方面做出了积极的响应。但是当 O_3 浓度提高到 120 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时脯氨酸含量又迅速下降,这可能是由于 O_3 浓度过高导致植物细胞和酶结构受到破坏,使脯氨酸的合成途径受阻所致。同样,到了乳熟期,冬小麦叶片脯氨酸含量随着 O_3 浓度的增加而显著地降低,这是由于 O_3 的长时间胁迫使冬小麦受到严重的伤害,脯氨酸的合成受阻引起的。

谷胱甘肽作为抗坏血酸-谷胱甘肽体系的重要组成部分,在清除活性氧自由基方面发挥着重要的作用^[25]。谷胱甘肽分为还原型谷胱甘肽(GSH)及氧化型谷胱甘肽(GSSG)两类,其中 GSH 含量约占 99.5%。谷胱甘肽作为植物体内主要的还原态硫之一,在植物抵抗各种环境胁迫方面起着重要的作用,其含量水平的高低与植物抵抗环境胁迫的能力密切相关。本研究中,冬小麦拔节期叶片 GSH 含量随着 O_3 浓度的升高而显著提高,说明在冬小麦拔节期,GSH 作为电子供体在清除活性氧自由基方面发挥了重要的作用。冬小麦抽穗期,80、120 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ O_3 胁迫均导致 GSH 含量比对照显著降低,这可能是由于长时间、高浓度的 O_3 胁迫使冬小麦受到严重伤害,导致 GSH 合成受阻。有人研究 O_3 浓度升高对拟南芥 GSH 含量的影响,也得出 GSH 含量表现出先升高后降低的趋势^[26]。但是一些研究报道, O_3 污染胁迫下植物体内大部分 GSH 转化成为 GSSG,而总的谷胱甘肽含量变化却不大^[27-28]。

4 小结

(1) O_3 污染胁迫下冬小麦产生诸如叶脉两侧与叶尖出现褐色斑点、叶枯黄、出穗延迟、成熟提前等伤害症状。

(2)当 O_3 浓度为 40、80、120 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,冬小麦拔节期叶片硝酸还原酶活性分别比对照处理降低 45.4%、68.9% 和 92.9%;抽穗期分别降低 58.0%、78.8% 和 93.5%;乳熟期分别降低 90.9%、90.0% 和 93.2%。不同 O_3 浓度、不同冬小麦生长期的叶片硝态氮和铵态氮含量变化不一样。

(3) O_3 污染胁迫对冬小麦叶片脯氨酸和 GSH 含量也有影响。在冬小麦拔节期和抽穗期,脯氨酸含量基本上随着 O_3 浓度的增加而提高,但是抽穗期当 O_3 浓度达到 120 $\text{nL}\cdot\text{L}^{-1}$ 时脯氨酸含量却显著降低,乳熟期脯氨酸含量均随着 O_3 浓度的增加而降低。拔节期

冬小麦叶片 GSH 含量在 O_3 胁迫下比对照处理提高,而抽穗期 GSH 含量比对照处理降低。

参考文献:

- [1] Fishman J. The global consequence of increasing tropospheric ozone concentration[J]. *Chemosphere*, 1991, 22:685-695.
- [2] Vingarzan R. A review of surface ozone background levels and trends[J]. *Atmospheric Environment*, 2004, 38:3431-3442.
- [3] Ariyaphanphitak W, Chidthaisong A, Sarobol E. Effects of elevated O_3 concentrations on Thai jasmine rice cultivars (*Oryza sativa* L.)[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2005, 167:179-200.
- [4] Selin N E, Wu S, Nam K M, et al. Global health and economic impacts of future ozone pollution[J]. *Environmental Research Letters*, 2009, 4:1-9.
- [5] 金明红. 大气 O_3 浓度变化对农作物影响的试验研究[D]. 北京:中国科学院生态环境研究中心博士学位论文, 2001.
JIN Ming-hong. Experimental study on the impacts of O_3 concentration change on crops[D]. Beijing: Research Center for Eco-Environmental Sciences, CAS Doctor Thesis, 2001.
- [6] 张文方. 北京城区臭氧浓度变化规律及预测方法研究[D]. 北京:北京林业大学硕士学位论文, 2010.
ZHANG Wen-fang. Study on the variation and prediction method of O_3 concentration in Beijing urban area[D]. Beijing: Beijing Forestry University Master Thesis, 2010.
- [7] Adams R M, Glyer J D, McCarl B A. The NCLAN economic assessment: Approach, findings and implications[C]//Heck W W, Taylor O C, Tingey D T (Eds.). *Assessment of Crop Loss from Air Pollutants*, Elsevier, London, 1988:473-504.
- [8] Brown M, Cox R, Bull K R, et al. Quantifying the fine scale (1 km $\times$ 1 km) exposure, dose and effects of ozone: Part 2 estimating yield losses for agricultural crops[J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 1995, 85:1485-1490.
- [9] 白月明, 郭建平, 王春乙, 等. 水稻与冬小麦对臭氧的反应及敏感性试验研究[J]. 中国生态农业学报, 2002, 10(1):13-16.
BAI Yue-ming, GUO Jian-ping, WANG Chun-yi, et al. The reaction and sensitivity experiment of O_3 on rice and winter wheat[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2002, 10(1):13-16.
- [10] 金明红, 黄益宗. 臭氧污染胁迫对农作物生长与产量的影响 [J]. 生态环境, 2003, 12(4):482-486.
JIN Ming-hong, HUANG Yi-zong. Review of crops damaged and yield loss by ozone stress[J]. *Ecology and Environment*, 2003, 12(4):482-486.
- [11] Feng Z W, Jin M H, Zhang F Z, et al. Effects of ground-level ozone (O_3) pollution on the yields of rice and winter wheat in the Yangtze River delta[J]. *Journal of Environmental Science*, 2003, 15(3):360-362.
- [12] 姚芳芳, 王效科, 陈展, 等. 农田冬小麦生长和产量对臭氧动态暴露的响应[J]. 植物生态学报, 2008, 32(1):212-219.
YAO Fang-fang, WANG Xiao-ke, CHEN Zhan, et al. Response of photosynthesis, growth and yield of field-grown winter wheat to ozone exposure[J]. *Acta Phytocologica Sinica*, 2008, 32(1):212-219.

- [13] 金东艳, 赵天宏, 付宇, 等. 臭氧浓度升高对大豆光合作用及产量的影响[J]. 大豆科学, 2009, 28(4): 632–635.
JIN Dong-yan, ZHAO Tian-hong, FU Yu, et al. Effects of elevated ozone concentration on soybean photosynthesis and yield[J]. *Soybean Science*, 2009, 28(4): 632–635.
- [14] 石春红, 郑有飞, 吴芳芳, 等. 大气中臭氧浓度增加对根际和非根际土壤微生物的影响[J]. 土壤学报, 2009, 46(5): 894–898.
SHI Chun-hong, ZHENG You-fei, WU Fang-fang, et al. Effects of simulated elevated atmospheric O₃ concentration on the quantity of microorganisms in winter wheat rhizospheric and non-rhizospheric soils[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(5): 894–898.
- [15] Taehibana S, Konishi N. Diurnal variation of in vivo and in vitro reductase activity in cucumber plants[J]. *Japan Soc Hort Sci*, 1991, 60: 593–599.
- [16] 吕伟仙, 葛滢, 吴建之, 等. 植物中硝态氮、氨态氮、总氮测定方法的比较研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(2): 204–206.
LU Wei-xian, GE Ying, WU Jian-zhi, et al. Study on the method for the determination of nitric nitrogen, ammoniacal nitrogen and total nitrogen in plant[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2004, 24(2): 204–206.
- [17] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
LI He-sheng, SUN Qun, ZHAO Shi-jie. The principle and technology of plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- [18] Brehe J, Burch H. Enzymatic assay for glutathione[J]. *Anal Biochem*, 1976, 74(1): 189–197.
- [19] 刘启明, 方月敏, 黄志勇, 等. 大气臭氧污染的生物学指标监测评价[J]. 生态环境学报, 2011, 20(4): 612–615.
LIU Qi-ming, FANG Yue-min, HUANG Zhi-yong, et al. Biological indicators for air quality assessment effects of ozone[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(4): 612–615.
- [20] 黄玉源, 黄益宗, 李秋霞, 等. 臭氧对南方3种木本植物的伤害症状及生理指标变化研究[J]. 生态环境, 2006, 15(4): 674–681.
HUANG Yu-yuan, HUANG Yi-zong, LI Qiu-xia, et al. Physiological and foliar symptom response of *Pinus massoniana*, *Eucalyptus urophylla* and *Aglaia odorata* to ozone in southern China[J]. *Ecology and Environment*, 2006, 15(4): 674–681.
- [21] 姚芳芳, 王效科, 冯兆忠, 等. EDU对臭氧胁迫下菠菜急性伤害症状和光合特性的影响[J]. 生态环境, 2007, 16(5): 1399–1405.
YAO Fang-fang, WANG Xiao-ke, FENG Zhao-zhong, et al. Influence of ozone and ethylenediurea(EDU) on physiological characters and foliar symptom of spinach(*Spinacia oleracea* L.) in open-top chambers[J]. *Ecology and Environment*, 2007, 16(5): 1399–1405.
- [22] 门中华, 李生秀. CO₂浓度对冬小麦氮代谢的影响[J]. 中国农业科学, 2005, 38(2): 320–326.
MEN Zhong-hua, LI Sheng-xiu. Effect of CO₂ concentration on nitrogen metabolism of winter wheat[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(2): 320–326.
- [23] Hare P D, Cress W A. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants[J]. *Plant Growth Regul*, 1997, 21: 79–102.
- [24] Guerrier G. Proline accumulation in leaves of NaCl-sensitive and NaCl-tolerant tomatoes[J]. *Biologia Plantarum*, 1997, 40: 623–628.
- [25] Tanaka K, Suda Y, Kondo N, et al. O₃ tolerance and the ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1985, 26(7): 1425–1431.
- [26] Mahalingam R, Jambunathan N, Gunjan S, et al. Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2006, 29(7): 1357–1371.
- [27] Luwe M W F, Takahama U, Heber U. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach(*Spinacia-oleracea* L.) leaves[J]. *Plant Physiology*, 1993, 101(3): 969–976.
- [28] Castillo F J, Greppin H. Extracellular ascorbic-acid and enzyme-activities related to ascorbic-acid metabolism in sedum-album leaves after ozone exposure[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 1988, 28(3): 231–238.