



三叶木通叶片解剖结构和生理特征对酸雨胁迫的响应和钛的缓解效应

王凯, 陶兴梅, 李小琴, 谯祖勤, 刘朝, 张永福

引用本文:

王凯, 陶兴梅, 李小琴, 等. 三叶木通叶片解剖结构和生理特征对酸雨胁迫的响应和钛的缓解效应[J]. 热带亚热带植物学报, 2025, 33(1): 15-24.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4851>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

热带植物海巴戟抗寒株系选育

Selective Breeding of Cold-resistant Strain for Tropical Plant *Morinda citrifolia*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(6): 634-641 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4373>

混合中性盐胁迫对金盏菊幼苗生长及光合生理的影响

Effects of Mixed Neutral Salt Stress on Growth and Photosynthetic Physiology of *Calendula officinalis* Seedlings

热带亚热带植物学报. 2018, 26(4): 391-398 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3863>

水淹对消落带水生苔藓植物优势种生理生态特征的影响及耐水淹评价

Effects of Waterlogging on Eco-physiological Characteristics of Aquatic Bryophytes and Their Comprehensive Evaluation of Water Tolerance in Hydro-fluctuation Belt

热带亚热带植物学报. 2017, 25(1): 65-72 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3626>

遮阴对四季桂生理生态特性的影响

Effect of Shading on Physiological and Ecological Characteristics of *Osmanthus fragrans*

热带亚热带植物学报. 2017, 25(1): 57-64 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3634>

盐胁迫对竹柳幼苗生理响应及结构解剖的研究

Effect of NaCl Stress on Physiological Responses and Anatomical Structure of *Salix* spp. Seedlings

热带亚热带植物学报. 2017, 25(5): 489-496 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3741>

向下翻页, 浏览PDF全文

三叶木通叶片解剖结构和生理特征对酸雨胁迫的响应和钛的缓解效应

王凯, 陶兴梅*, 李小琴, 譙祖勤, 刘朝, 张永福**

(昆明学院农学与生命科学学院, 昆明 650214)

摘要: 为探讨三叶木通(*Akebia trifoliata*)对酸雨胁迫的响应机制和外源钛[Ti(SO₄)₂]对其耐酸性的影响, 经模拟酸雨和外源钛处理, 对叶片解剖结构和生理特征的变化进行了研究, 并进行主成分分析和相关性分析。结果表明, 与对照相比, 模拟酸雨(T0)处理的叶片侧脉及表皮结构受损严重, 叶主脉、主脉维管束、叶片和栅栏组织加厚, 叶绿素含量显著降低, 氧自由基产生速率、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性均显著升高, 而外源钛处理(T1~T3)均有效缓解叶侧脉和表皮的受损情况, 并显著提高了叶绿素含量、SOD、POD和CAT活性, 且氧自由基产生速率维持在较低水平。主成分分析表明, 主脉、主脉维管束和叶厚等指标在三叶木通对酸雨胁迫逆境应答的机制中起关键作用。相关性分析表明, 主脉维管束厚度、栅栏组织厚度、叶片组织结构紧密度、SOD、POD和CAT活性间呈极显著正相关关系。三叶木通幼苗通过改变叶片解剖结构、提高SOD、POD和CAT活性等方式来适应酸雨胁迫, 且适当的Ti能够有效缓解酸雨胁迫造成的损伤, 以0.2 mmol/L Ti效果最好。

关键词: 三叶木通; 酸雨胁迫; 解剖结构; 生理特征; 耐酸性; 钛

doi: 10.11926/jtsb.4851

CSTR:32235.14.jtsb.4851

Response of Anatomical Structure and Physiological Characteristics of *Akebia trifoliata* Leaves to Acid Rain Stress and Relieving Effect of Titanium

WANG Kai, TAO Xingmei*, LI Xiaoqin, QIAO Zuqin, LIU Zhao, ZHANG Yongfu**

(School of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214, China)

Abstract: To explore the response mechanism of *Akebia trifoliata* to acid rain stress and the effect of exogenous titanium [Ti(SO₄)₂] on its acid resistance, the changes in leaf anatomy and physiological characteristics were studied after simulated acid rain and exogenous titanium treatment, and the principal component analysis and correlation analysis were performed. The results showed that compared with the control, the lateral vein and epidermal structure of leaves were seriously damaged under simulated acid rain (T0) treatment, the main vein, main vein vascular bundle, leaf and palisade tissues were thickening, the chlorophyll content was significantly decreased, the oxygen free radical production rate, the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) were significantly increased. Exogenous titanium treatments (T1–T3) effectively alleviated the damage of lateral vein and epidermal of leaves, significantly increased chlorophyll content, SOD, POD and CAT

收稿日期: 2023-10-05 接受日期: 2023-12-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060645); 云南省地方本科高校基础研究联合专项(202101BA070001-036, 202101BA070001-172); 云南省科技厅基础研究专项(202301AU070137); 云南省教育厅科学研究基金项目(2023Y0876)资助

This work was supported by the National Natural Sciences Foundation of China (Grant No. 32060645); the Joint Special Project for Basic Research of Local Undergraduate University in Yunnan (Grant No. 202101BA070001-036, 202101BA070001-172); the Program for Basic Research of Department of Science and Technology in Yunnan (Grant No. 202301AU070137); and the Program for Basic Research of Department of Education in Yunnan (Grant No. 2023Y0876).

作者简介: 王凯(1996年生), 男, 硕士, 研究方向为植物生理生化。E-mail: 941815382@qq.com

* 共同第一作者

** 通讯作者 Corresponding author. E-mail: 123017360@qq.com

activities, and maintained a low rate of oxygen free radical production. Principal component analysis showed that main vein, vascular bundle and leaf thickness played a key role in response mechanism to acid rain stress. Correlation analysis showed that there were significantly positive correlations among vascular bundle thickness, palisade tissue thickness, leaf tissue structure tightness, activities of SOD, POD and CAT. Therefore, the seedlings of *A. trifoliata* could adapt to acid rain stress by changing the leaf anatomical structure and increasing the activities of SOD, POD and CAT. Appropriate Ti could effectively alleviate the damage caused by acid rain stress, and 0.2 mmol/L Ti had the best effect.

Key words: *Akebia trifoliata*; Acid rain stress; Anatomic structure; Physiological characteristics; Acid resistance; Titanium

酸雨通常是指 pH<5.6 的雨、雾、冰雹或雪等大气降水, 又名酸沉降, 其产生的主要原因是由于化石燃料的大量消耗, 排放进入大气中的 NO_x 和 SO₂ 增多, 这些氮硫氧化物在对流层中被氧化成酸, 最终形成酸雨^[1]。在我国南方许多地区, 酸雨一度成为一个重要的环境问题^[2], 是限制植物生长和生物量生产的主要非生物胁迫之一^[3]。植物在生长和发育过程中遭遇酸雨胁迫后会出现斑点状坏死、解剖结构的改变、叶绿素含量降低等叶片损伤症状^[4-5]。此外, 酸雨胁迫会导致植物细胞氧化损伤, 从而诱导一系列的生理变化, 如膜脂过氧化产物的积累; 而另一方面, 一些植物在酸雨胁迫下通过增强机体抗氧化系统, 以减缓活性氧(ROS)对自身的氧化损伤^[6-7]。

三叶木通(*Akebia trifoliata*)俗称八月瓜、八月炸等, 为木通科(Lardizabalaceae)木通属的木质藤本植物, 在我国南方拥有丰富的种质资源^[8]。三叶木通全株均可用药, 在解毒利尿、舒经活络、安胎、补虚、止咳、调经和抗癌等方面均有不俗的效果^[9-10]; 同时, 其果实为优质保健型的第三代水果, 味甜爽口, 风味独特, 富含氨基酸、维生素 C 等多种营养成分, 已在我国多地规模化种植^[11]。此外, 三叶木通已被用于西南喀斯特石漠化地区的生态修复, 在面对逆境时, 能通过改变形态和生理生化形成特定的生存策略, 以此来防御氧化损伤^[12], 其中包括栅栏组织层数增加, 栅海比(P/S)、叶片组织结构紧密度(CTR)和抗氧化酶活性提高以及叶片组织结构疏松度(SR)降低等变化^[13]。由此可见, 三叶木通作为药用植物和新型果树以及在植物生态修复方面均具有广阔的应用和推广价值。

随着三叶木通在不同地区进行推广种植, 发生酸雨胁迫在所难免。因此, 提高三叶木通的耐酸性, 更有利于保育和推广。研究表明可通过外源钙、硅

以及水杨酸处理来提高植物的耐酸性^[14-16]。钛(Ti)作为植物生长的有益元素, 不仅能参与植物体内一系列生理生化反应, 促进叶绿素的合成, 增强光合速率^[17], 提高超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等多种酶的活性^[18], 还能增加碳水化合物的积累、提高作物产量和品质^[19]。目前, 鲜有 Ti 缓解植物免受非生物胁迫方面的研究, 而三叶木通如何适应酸雨胁迫也未见报道, 机理也并不清楚。因此, 本研究以三叶木通实生苗为材料, 对其根部进行不同浓度的 Ti 处理后喷洒人工模拟酸雨, 观察叶片受害情况, 观测横切结构, 测定叶绿素含量、氧自由基产生速率、SOD、POD 和 CAT 活性, 并对各指标进行主成分和相关性分析, 探究其响应酸雨胁迫的机制和 Ti 的缓解效应, 为防御酸雨对三叶木通的毒害提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验在昆明学院温室大棚中进行, 棚内温湿度一致。于 2021 年 9 月上旬采摘来自云南省弥勒市东风农场管理局的三叶木通(*Akebia trifoliata*)上的健康、成熟果实, 取出种子用清水进行多次漂洗后立即播种于口径 20 cm、深度 22 cm 的营养钵中, 基质为草炭土:园土=1:1 (pH 5.5~6.5), 每个营养钵播 20 粒种子。2022 年 4 月中旬, 每个营养钵选留 1 株生长健壮的实生苗, 其余全部拔除, 所有苗均进行水肥一体化管理。硫酸钛[Ti(SO₄)₂]购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

将三叶木通植株连同营养钵一起放入长 100 cm、宽 30 cm、深 25 cm 的白色、底面不漏水的条盆中, 每盆放入 4 个营养钵。根据我国西南地区酸雨的主

要降雨成分, 选用硫酸和硝酸按照摩尔比 $\text{SO}_4^{2-}:\text{NO}_3^- = 5:1$ [16-20] 混合配制模拟酸雨, 用蒸馏水调节 pH 至 2.0, pH 值用 PHS-25 型酸度计测定; $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ 作为 Ti 的供体, 参考范秀菊 [17] 的方法分别设置 0 (T0)、0.1 (T1)、0.2 (T2) 和 0.4 mmol/L (T3) 处理, 先给三叶木通根部浇灌不同浓度的 $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ 溶液, 每个营养钵浇 500 mL, 对照植株 (CK) 浇等量蒸馏水, 之后每隔 2 d 重复浇灌 1 次, 然后于浇 $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ 溶液当日下午 18:00 喷施 pH 2.0 的模拟酸雨, 以所有叶片均有液体下滴为度, CK 喷等量蒸馏水, 即 CK 为蒸馏水处理、T0 为喷洒 pH 值 2.0 模拟酸雨、T1 为喷洒 pH 值 2.0 模拟酸雨+0.1 mmol/L Ti、T2 为喷洒 pH 值 2.0 模拟酸雨+0.2 mmol/L Ti、T3 为喷洒 pH 值 2.0 模拟酸雨+0.4 mmol/L Ti, 每处理 4 株重复。28 d 后停止处理, 于 3 d 后的上午 6:00 采集从植株底部往上的第 10~15 片叶。叶片采集后沿其主脉两侧剪取中部 0.6 cm² 的小片迅速置于 FAA (90 mL 70%酒精+5 mL 甲醛+5 mL 冰乙酸) 中固定, 用于解剖结构的观察; 剩余样品用锡纸包裹并用液氮速冻后放入 -80 °C 超低温冰箱保存, 用于测定生理指标。试验重复 4 次。

1.3 指标测定

叶片解剖结构的观察 取出固定好的叶片样品, 对其进行脱水、透明、浸蜡、包埋, 然后经 KD-2258 型轮转切片器切片 (厚度为 8 μm), 切片后进行粘片、烘片、脱蜡、番红-固绿染色、中性树脂胶封片。每个处理制作 20 张切片, 并用 Olympus CX41 型光学显微镜观察并拍照, 同时用 Image J 软件对其主脉、主脉维管束、上表皮、下表皮、叶片、栅栏组织和海绵组织厚度进行测量, 取 20 张切片的平均值。参考周雨珩等 [21] 的方法计算叶片栅海比 (P/S)、紧密度 (CTR) 和疏松度 (SR), $P/S = \text{栅栏组织厚度} / \text{海绵组织厚度}$, $\text{CTR} = (\text{栅栏组织厚度} / \text{叶片厚度}) \times 100\%$, $\text{SR} = (\text{海绵组织厚度} / \text{叶片厚度}) \times 100\%$ 。

生理指标的测定 叶绿素含量、氧自由基产生速率、SOD、POD 和 CAT 活性均参考邹琦 [22] 的方法用 C-7100 紫外可见分光光度计测定吸光度。每个指标 3 次技术重复, 取平均值。

1.4 数据的统计分析

所有数据用 Microsoft Excel 2019 软件录入和整理, 利用 SPSS 27.0 软件进行统计分析, 以平均值 ± 标准差表示。采用单因素 ANOVA 检验分析不同处理间各项指标的差异显著性, $P < 0.05$ 表示具有

统计学意义。采用降维法进行解剖结构和生理指标的主成分分析, 并通过双变量相关分析法计算各指标间的 Pearson 相关系数。

2 结果和分析

2.1 对叶片形态和解剖结构的影响

在外观形态上, 与 CK 相比, T0 叶片出现了大量白色至褐色的斑点, 并且有明显的褪绿现象 (图 1: B), 而 T1~T3 处理能有效缓解此损伤症状, 斑点明显减少 (图 1: C, D, E)。其中, T2 处理下叶片生长状态明显好转, 叶片形态也更接近于 CK。

从图 1: F, K 可见, 叶片分别由叶脉、表皮和叶肉组成。叶脉分为主脉和侧脉, 包括薄壁组织、机械组织和维管束; 且主脉维管束木质部导管发达, 呈整齐排列的束状, 并向下以辐射状展开。表皮由 1 层排列紧密、无胞间隙、且形状规则的扁平状细胞构成, 有上、下表皮之分。叶肉由栅栏组织和海绵组织构成, 为典型异面叶, 其中分布有侧脉; 栅栏组织由 1~2 层长柱形或椭圆形细胞构成, 细胞排列紧密, 且与上表皮细胞垂直; 海绵组织位于栅栏组织下方, 紧靠下表皮, 细胞形状不规则, 相互之间连接成网状, 排列较疏松, 状如海绵。各处理在叶结构上存在一定的差异, 与 CK 相比, T0 植株叶侧脉及叶表皮受损严重, 结构不完整, 叶肉栅栏组织多数呈 2 层长柱形细胞紧密排列而成, 海绵组织相对减少, 细胞紧实、空隙较小, 但叶主脉更大; 而 T1~T3 处理明显改善了叶侧脉及叶表皮细胞的受损程度, 同时叶主脉变化程度也有所降低。

从图 2 可见, 与 CK 相比, T0 处理的叶片上、下表皮显著变薄, 厚度分别减少了 60.69% 和 32.54%; 而 T1~T3 处理后, 上下表皮均比 T0 显著增厚, 上表皮厚度分别增加了 130.99%、159.43% 和 67.59%, 下表皮厚度分别增加了 21.40%、30.49% 和 14.98%, 其中, T2 处理的上表皮厚度与 CK 的差异不显著。与 CK 相比, T0 处理的叶片、主脉、主脉维管束和栅栏组织和海绵组织厚度分别显著增加了 22.52%、72.24%、48.51%、18.19% 和 16.53%。与 T0 相比, T1~T3 处理的叶片和主脉显著变薄, 叶片厚度分别减少了 10.93%、6.54% 和 12.30%, 主脉厚度分别减少了 24.98%、26.95% 和 21.79%, 且均显著厚于 CK; 而主脉维管束厚度与 T0 的变化不显著, 但比 CK 显著增厚。此外, T1 和 T2 处理后, 栅栏组织显著厚

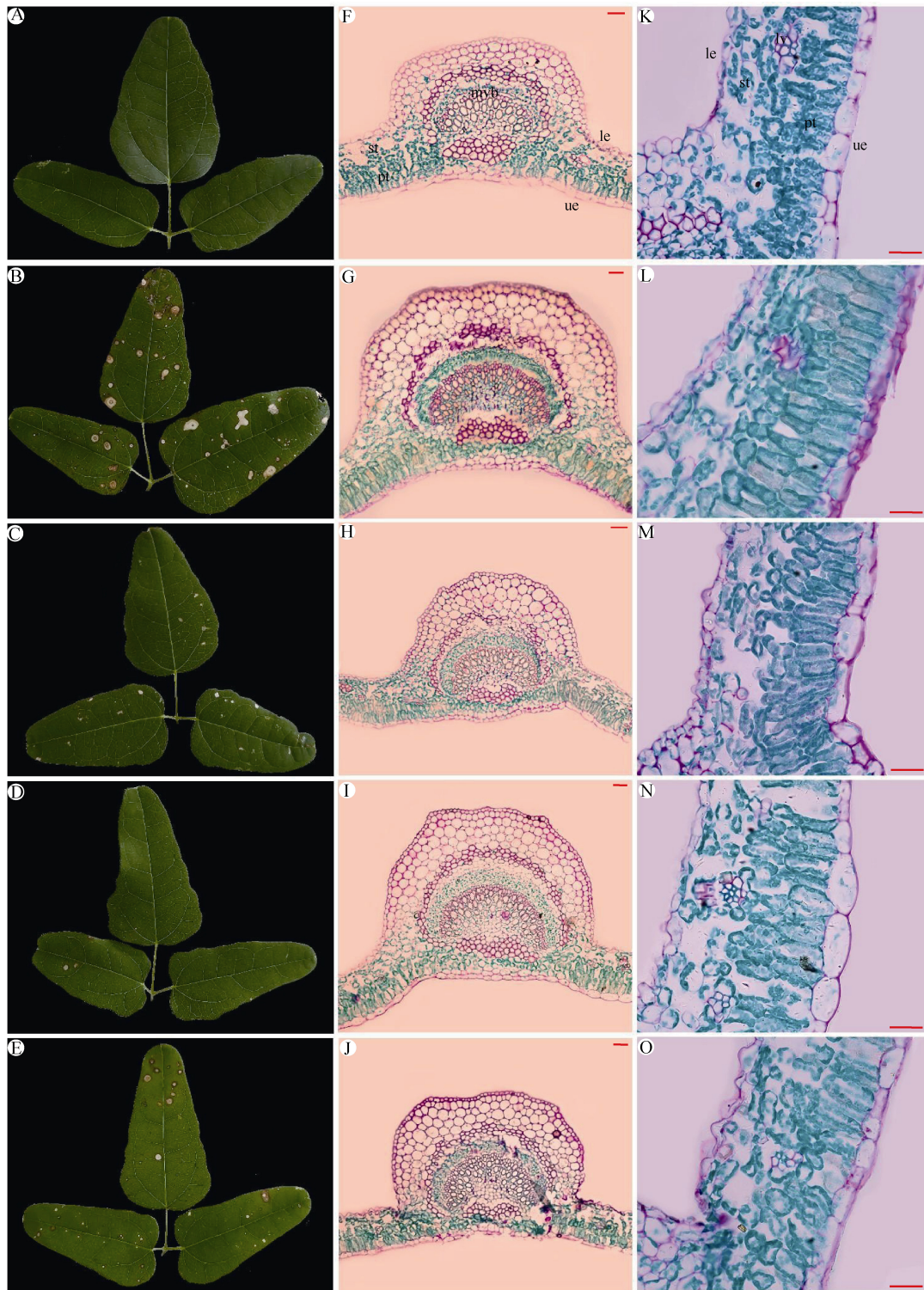


图 1 酸雨胁迫下三叶木通叶片解剖结构的变化。A~E: 形态; F~J: 主脉; K~O: 叶肉组织; mvb: 主脉维管束; ue: 上表皮; le: 下表皮; lv: 侧脉; pt: 栅栏组织; st: 海绵组织。标尺: F~J=50 μm ; K~O=30 μm

Fig. 1 Change in anatomical structure of *Akebia trifoliata* leaves under acid rain stress. A~E: Morphology; F~J: Main vein; K~O: Mesophyll tissue; mvb: Main vein vascular bundles; ue: Upper epidermis; le: Lower epidermis; lv: Lateral veins; pt: Palisade tissue; st: Spongy tissue. Bars: F~J=50 μm ; K~O=30 μm

厚于 CK 和 T0, 且 T2 处理的海绵组织显著厚于 CK。各处理的 P/S 为 1.76~2.18, CTR 为 40.60%~50.92%、

SR 为 23.18%~25.55%, T1~T3 的 P/S 和 CTR 均显著大于 CK 和 T0。可见, 三叶木通叶片、主脉、主脉

维管束以及栅栏组织和海绵组织结构的改变可能是对酸雨胁迫的抵御和适应变化, 而一定浓度的 Ti 能够有效缓解酸雨胁迫对三叶木通叶片表皮和叶脉的损伤。

2.2 对叶片生理特征的影响

由表 1 可知, 与 CK 相比, T0 处理的叶片叶绿素含量显著降低了 65.91%, 而氧自由基产生速率、SOD、POD 和 CAT 活性则分别显著上升了 340.95%、66.66%、33.76%和 43.61%。与 T0 处理相比, T1 处

理的叶绿素含量、SOD、POD 和 CAT 活性分别显著提高了 79.90%、89.00%、248.57%和 137.49%, T2 处理的分别提高了 136.84%、114.00%、306.67%和 162.30%, T3 处理的分别提高了 59.81%、86.00%、153.81%和 127.12%。T1、T2 和 T3 的氧自由基产生速率分别比 T0 降低了 55.91%、66.18%和 53.35%。可见, 酸雨胁迫抑制了三叶木通叶片叶绿素的合成, 加强了膜脂过氧化作用, 同时通过提高 SOD、POD 和 CAT 等抗氧化酶活性来抵御伤害; 而一定

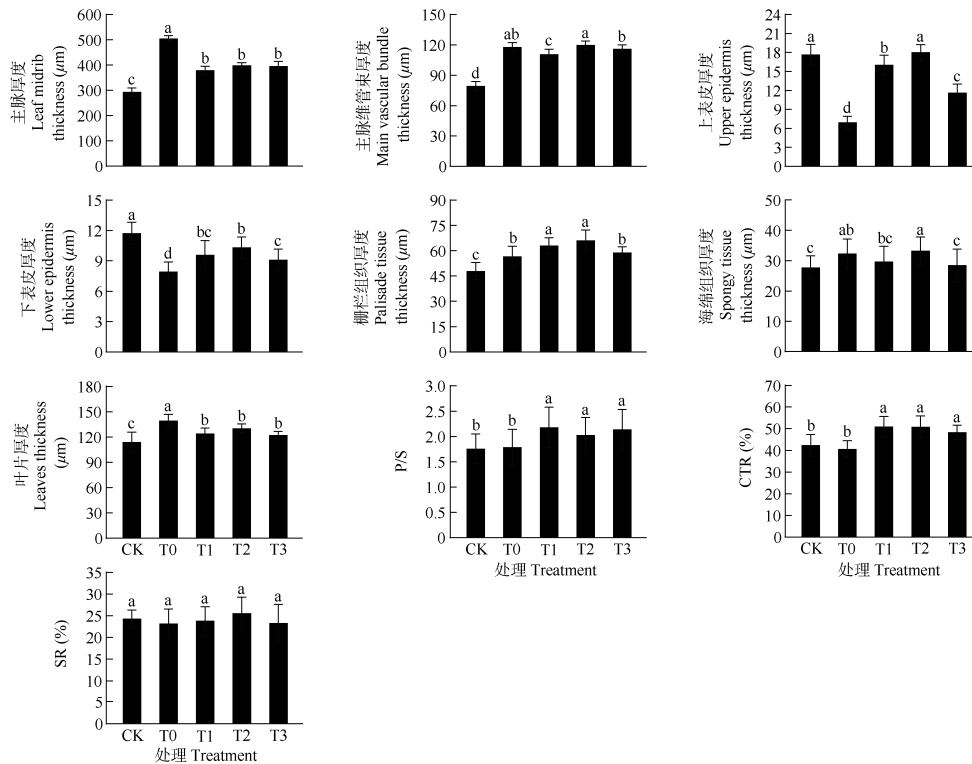


图 2 三叶木通叶片的解剖结构。CK: 对照; T0: 酸雨; T1: 酸雨+0.1 mmol/L Ti; T2: 酸雨+0.2 mmol/L Ti; T3: 酸雨+0.4 mmol/L Ti; P/S: 栅栏组织与海绵组织比; CTR: 紧密度; SR: 疏松度; 柱上不同字母表示差异显著(P<0.05)。下同

Fig. 2 Anatomical structure of *Akebia trifoliata* leaves. CK: Control; T0: Acid rain; T1: Acid rain+0.1 mmol/L Ti; T2: Acid rain+0.2 mmol/L Ti; T3: Acid rain+0.4 mmol/L Ti; P/S: Ratio of palisade tissue to spongy tissue; CTR: Tightness; SR: Looseness. Different letters upon column indicate significant differences at 0.05 level. The same below

表 1 酸雨和 Ti 对三叶木通叶片生理指标的影响

Table 1 Effect of acid rain and Ti on physiological indicators of *Akebia trifoliata* leaves

处理 Treatment	CC (mg/g)	OFRP (nmol/g·min)	SOD (U/g)	POD (U/g)	CAT (U/g)
CK	6.13±0.30a	11.60±0.65d	108.70±5.92d	327.08±26.82e	61.64±5.31e
T0	2.09±0.27d	51.15±2.01a	181.16±5.92c	437.50±17.02d	88.52±4.11d
T1	3.76±0.36c	22.55±1.62b	342.39±9.12b	1 525.00±39.67b	210.23±4.52b
T2	4.95±0.41b	17.30±1.55c	387.68±4.18a	1 779.17±15.96a	232.19±2.82a
T3	3.34±0.31c	23.86±1.74b	336.96±7.25b	1 110.42±31.28c	201.05±6.83c

CC: 叶绿素含量; OFRP: 氧自由基产生速率; SOD: 超氧化物歧化酶; POD: 过氧化物酶; CAT: 过氧化氢酶。下同

CC: Chlorophyll content; OFRP: Oxygen free radical production rate; SOD: Superoxide dismutase; POD: Peroxidase; CAT: Catalase. The same below

浓度的 Ti 可有效降低叶片氧自由基产生速率, 提高叶绿素含量、SOD、POD 和 CAT 活性, 从而减轻膜脂过氧化作用, 增强光合能力, 缓解酸雨胁迫下产生的氧自由基伤害, 其中以 T2 处理效果最明显。

2.3 主成分分析

由表 2 可知, 解剖结构参数依据特征值>1 保留了 3 个主成分, 累计贡献率达 84.189%。第一主成分主要受主脉厚度、主脉维管束厚度和叶片厚度的

表 2 三叶木通叶片解剖结构和生理指标的主成分特征值矩阵

Table 2 Principal component eigenvalue matrix of anatomical structure and physiological indicators of *Akebia trifoliata* leaves

参数 Parameter	主成分 Principal component		
	1	2	3
LMT	0.890	0.128	-0.254
MVBT	0.823	0.329	0.147
UET	-0.676	0.032	0.555
LET	-0.679	-0.009	0.195
LT	0.815	-0.087	-0.086
PTT	0.459	0.600	0.623
STT	0.549	-0.598	0.569
P/S	-0.127	0.978	-0.086
CTR	-0.040	0.684	0.681
SR	0.145	-0.649	0.702
特征值 Eigenvalue	3.606	2.698	2.115
贡献率 Contribution rate /%	36.058	26.978	21.153
累计贡献率 Accumulative contribution rate /%	36.058	63.036	84.189
CC	0.073	-0.983	
OFRP	-0.404	0.895	
SOD	0.967	0.242	
POD	0.985	0.048	
CAT	0.984	0.155	
特征值 Eigenvalue	3.043	1.852	
贡献率 Contribution rate (%)	60.851	37.042	
累计贡献率 Accumulative contribution rate /%	60.851	97.893	

LMT: 主脉厚度; MVBT: 主脉维管束厚度; UET: 上表皮厚度; LET: 下表皮厚度; LT: 叶片厚度; PTT: 栅栏组织厚度; STT: 海绵组织厚度; 粗体表示载荷量占比最重。下同

LMT: Leaf midrib thickness; MVBT: Main vascular bundle thickness; UET: Upper epidermis thickness; LET: Lower epidermis thickness; LT: Leaf thickness; PTT: Palisade tissue thickness; STT: Spongy tissue thickness; Bold indicates the index with the heaviest load proportion. The same below

影响, 一定程度上反映叶片支撑和输导水分特征; 第二主成分和第三主成分主要受 P/S、SR、CTR 和栅栏组织厚度的影响, 这主要表现在叶肉组织结构特征上。生理指标依据特征值>1 保留了 2 个主成分, 累计贡献率高达 97.893%。第一主成分主要受 SOD、POD 和 CAT 活性的影响, 主要反映叶片抗氧化酶的变化; 第二主成分主要受叶绿素含量和氧自由基产生速率的影响, 主要揭示叶片的光合生理和膜脂过氧化程度。

由图 3 可知, 在三叶木通叶片解剖结构指标中, CK 的点多数聚集在上、下表皮周围, 这表明上、下表皮厚度是衡量酸雨胁迫下叶片受损程度较低的关键指标; 而 T0 的点主要集中在主脉、主脉维管束、

叶片和海绵组织厚度周围, 表明叶片可能通过这些指标的变化来抵御和适应酸雨胁迫。此外, T1、T2 和 T3 的点均彼此分离, 除了散乱分布于主脉、主脉维管束、叶片和海绵组织厚度周围外, 还在栅栏组织厚度、P/S、CTR 和 SR 周围有分布, 尤其是 P/S 和 CTR; 同时, 许多点均在上、下表皮周围有分布, 说明施加一定浓度的 Ti 后, 除了能够改善上、下表皮受损以外, 还可能趋向于构建一定程度的 P/S 和 CTR, 以便应对酸雨胁迫。此外, 在不同处理的叶片生理指标中, T1、T2 和 T3 的点均在 SOD、POD 和 CAT 活性周围集中分布, 说明施加一定浓度的 Ti 能够明显提高 SOD、POD 和 CAT 活性, 进而提高其抗酸性。

2.4 相关性分析

对叶片解剖结构指标和生理指标进行相关性分析, 结果表明, 上、下表皮厚度与叶绿素含量呈极显著正相关关系, 而与氧自由基产生速率呈显

著负相关关系; 主脉维管束厚度、栅栏组织厚度、CTR、SOD、POD 和 CAT 活性之间呈极显著正相关关系(图 4)。可见, 不同处理间三叶木通叶片解剖结构与生理指标之间存在相互影响。

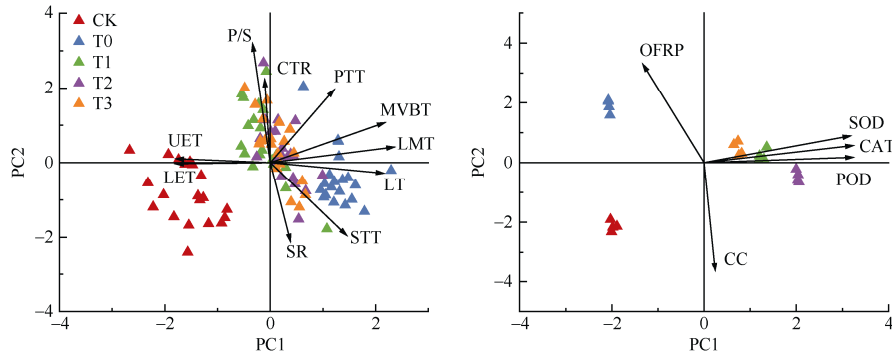


图 3 不同处理下三叶木通叶片解剖结构和生理指标的主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis of anatomical structure and physiological indicators of *Akebia trifoliata* leaf

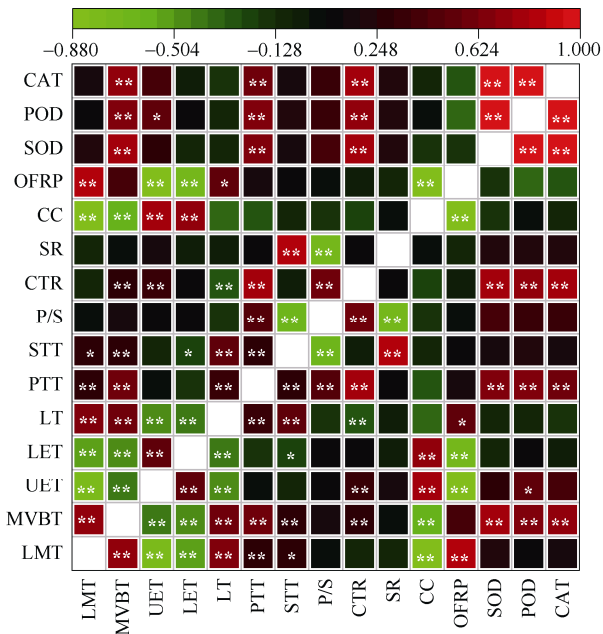


图 4 相关性热图。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Heat map of correlation. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论和结论

叶片易受环境影响, 且具有较大的可塑性^[23]。酸雨不仅能腐蚀叶表面, 还会对其解剖结构和生理生化造成影响, 而植物对待酸雨的表现通常是一个复杂的综合性状^[24]。叶片损伤是植物遭受酸害时典型的特征性状。本研究结果表明, 酸雨胁迫下, 三叶木通叶片褪绿并出现大量白色至褐色

的坏死伤斑, 且多数症状出现在叶上部和叶边缘。这可能是由于这些部位水膜张力或叶片粗糙不平, 导致酸雨易蓄积在叶面造成叶绿素降解或叶组织细胞死亡^[25]。而 0.1~0.4 mmol/L 的 Ti 能有效缓解酸雨胁迫下叶片的形态损伤, 其中, 0.1~0.2 mmol/L 的 Ti 处理能够大幅度减少叶片的坏死伤斑数, 并以 0.2 mmol/L 的 Ti 处理效果最佳, 但 0.4 mmol/L 的 Ti 处理下坏死伤斑数明显要高于前者。可见, Ti 作为植物生长的有益元素可能具有两重性, 即适当外施 Ti 能缓解酸雨胁迫下三叶木通叶片的形态损伤, 并能维持生长, 而高浓度下会抑制植物的生长, 甚至产生毒性效应。这与含 Ti 试剂对生菜(*Lactuca sativa*)低促高抑的生长效应^[26]相似。

植物在逆境下可通过组织结构的变化来选择需要适应的环境类型, 是探明植物生态适应性的基础^[27]。酸雨淋溶叶片后会增大细胞膜透性, 加剧叶片失水^[28]。本研究中, 酸雨胁迫下三叶木通叶片显著加厚, 叶肉栅栏组织多为 2 层长柱形细胞紧密排列, 海绵组织相对变少。有研究表明, 叶片增厚、栅栏组织层数增加、海绵组织变少和缩短细胞间隙等特征性变化有助于提高植物的水分利用率^[29], 同时叶厚度的增加也有利于减少水分过度蒸腾^[30]。可见, 酸雨胁迫会对三叶木通造成严重的生理缺水, 而三叶木通则通过增加叶片厚度以减少水分消耗, 并使栅栏组织变厚、细胞间隙变小, 从而提高水分

运输效率。当添加 0.1~0.2 mmol/L 的 Ti 后可以看到栅栏组织厚度均显著高于单独酸雨胁迫, 这可能是栅栏组织作为植物进行光合作用的重要场所^[31], 而 Ti 的添加提高了光合速率, 进而改变了栅栏组织的形态。由此可见, 一定浓度的 Ti 可有效保护叶组织结构免受酸雨的损害。

叶片为适应水分短缺而演化出多种多样的对策, 其中包括逃避型、强壮型、忍耐型、保护型和节约型等 5 种策略^[32]。本研究表明, 酸雨胁迫下三叶木通叶片的主脉和主脉维管束均显著增厚, 其厚度的增加有利于植物水分及养分运输能力和支撑叶片能力提高, 这也是植物适应环境变化的体现^[33]; 同时, 机械组织更为发达, 已知机械组织的强弱也与植物缺水后的适应变化密切相关^[31]。因此, 从叶片在酸雨胁迫下的解剖结构变化可以看出, 其叶厚的增加, 是以减少水分过度蒸腾、削弱阳光的照射来适应环境, 属于典型的保护型策略; 然而其主脉、主脉维管束和机械组织的增强及叶肉栅栏组织层数的增加, 是其增强叶肉组织和其他器官的支持, 在蒸腾强度不降低的条件下通过提高光合效率来强壮自身, 以达到抵抗逆境胁迫的目的, 表现出强壮型适应特征^[32]。

叶绿素含量是衡量酸雨对植物伤害的重要指标之一^[34]。本研究表明酸雨胁迫明显抑制了三叶木通叶绿素的合成。酸雨胁迫下, 氧自由基积累易破坏细胞内活性氧(ROS)代谢平衡, 大量积累的 ROS 对细胞造成严重的质膜过氧化损伤^[16]。而 SOD、POD 和 CAT 是衡量植物抗逆性的关键指标^[35]。本研究表明, 与 CK 相比, 单独酸雨胁迫下叶片氧自由基产生速率显著升高, 说明酸雨胁迫会引起细胞膜的氧化损伤。与 CK 相比, 单独酸雨胁迫下叶片 SOD、POD 和 CAT 活性均显著升高, 尤其是 SOD 活性变幅最大, 已知 SOD 能够猝灭超氧负离子的毒性^[12]。由此可知, 三叶木通可通过提高 SOD、POD 和 CAT 活性, 尤其是 SOD 活性, 协同作用共同抵御 ROS 造成的伤害。添加 0.1~0.4 mmol/L 的 Ti 后可以看到叶绿素含量显著高于单独酸雨胁迫, 这可能是 Ti 具有光催化特性, 催化光能向电能的转化和光电子传递, 从而促进了水的光解, 光合作用活性增加^[36], 进而促进叶绿素的合成; 同时 SOD、POD 和 CAT 活性均显著高于单独酸雨胁迫, 而氧自由基产生速率与之相反, 这与前人^[37]的研究结果相似。

主成分分析法可通过减少响应变量的维数, 这

样能综合反映植物的抗逆性^[12]。本研究中, 解剖结构指标的 3 个主成分涵盖了大部分信息, 其中, 单独酸雨胁迫下, 主脉、主脉维管束、叶厚和海绵组织是各因子中最主要的指标, 能够反映出三叶木通叶片遭受逆境胁迫时的选择潜力。因此, 综合考虑可将主脉、主脉维管束、叶厚和海绵组织作为单独酸雨胁迫下三叶木通耐酸性评价的参考指标。主成分分析还揭示了施加一定浓度的 Ti 后, 除了能够改善上、下表皮受损以外, 还可能趋向于构建一定程度的 P/S 和 CTR, 而进行不同浓度 Ti 处理的解剖结构差异性分析时发现海绵组织差异不明显, 因此也可将叶厚以及栅栏组织作为施 Ti 后三叶木通耐酸性评价的关键指标。同样的, 施 Ti 后可将 SOD、POD 和 CAT 作为三叶木通耐酸性评价的关键指标。此外, 相关性分析表明, 主脉维管束厚度、栅栏组织厚度、CTR、SOD、POD 和 CAT 活性之间呈极显著正相关关系, 说明三叶木通叶片活性氧清除酶的改变易引起关键解剖结构的变化; 不同处理下叶片厚度与主脉维管束厚度之间具有极显著正相关关系, 表明叶片在增厚的同时, 还趋向于构建发达的维管组织, 以便尽量多的将水分运输至叶肉组织, 从而提高叶片水分运输效率^[38]。

综上, 酸雨胁迫导致三叶木通叶片褪绿和出现大量伤斑, 破坏叶片上、下表皮和叶侧脉结构的完整性, 促进叶绿素的降解和氧自由基的生成; 而三叶木通叶片通过加厚主脉、主脉维管束、栅栏组织和叶厚等解剖结构特征; 通过提高 SOD、POD 和 CAT 活性等生理生化措施, 进而适应酸雨胁迫。通过主成分分析发现, 主脉、主脉维管束和叶厚等指标在三叶木通对酸雨胁迫逆境应答的机制中起关键作用; 此外, 一定浓度的 Ti 能够改善叶片生长, 维持解剖结构的完整性, 通过有效抑制叶绿素的降解来维持三叶木通的光合速率, 提高 SOD、POD 和 CAT 活性来减少大量积累的氧自由基对细胞的氧化损伤, 且以 0.2 mmol/L 的 Ti 效果最好。

参考文献

- [1] CALVERT J G, LAZRUS A, KOK G L, et al. Chemical mechanisms of acid generation in the troposphere [J]. *Nature*, 1985, 317(6032): 27-35. doi: 10.1038/317027a0.
- [2] MA Y D, WANG B, ZHANG R M, et al. Initial simulated acid rain impacts reactive oxygen species metabolism and photosynthetic abilities in *Cinnamomum camphora* undergoing high temperature [J].

- Ind Crops Prod, 2019, 135: 352–361. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.04.050.
- [3] DOLATABADIAN A, SANAVY S A M M, GHOLAMHOSEINI M, et al. The role of calcium in improving photosynthesis and related physiological and biochemical attributes of spring wheat subjected to simulated acid rain [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2013, 19(2): 189–198. doi: 10.1007/s12298-013-0165-7.
- [4] POLISHCHUK O V, VODKA M V, BELYAVSKAYA N A, et al. The effect of acid rain on ultrastructure and functional parameters of photosynthetic apparatus in pea leaves [J]. *Cell Tiss Biol*, 2016, 10(3): 250–257. doi: 10.1134/S1990519X16030093.
- [5] SUN Z G, WANG L H, CHEN M M, et al. Interactive effects of cadmium and acid rain on photosynthetic light reaction in soybean seedlings [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2012, 79: 62–68. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.12.004.
- [6] BOUWMAN A F, VAN VUUREN D P, DERWENT R G, et al. A global analysis of acidification and eutrophication of terrestrial ecosystems [J]. *Water Air Soil Pollut*, 2002, 141(1): 349–382. doi: 10.1023/A:1021398008726.
- [7] KOVÁČIK J, KLEJDUS B, BAČKOR M, et al. Physiological responses of root-less epiphytic plants to acid rain [J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(2): 348–357. doi: 10.1007/s10646-010-0585-x.
- [8] ZHONG W M, MA Y H. Analysis and evaluation of nutritional components in *Akebia trifoliata* seeds [J]. *SW China J Agric Sci*, 2016, 29(1): 169–173. [仲伟敏, 马玉华. 三叶木通种子的营养成分分析与评价 [J]. *西南农业学报*, 2016, 29(1): 169–173. doi: 10.16213/j.cnki.scjas.2016.01.033.]
- [9] JIA Y X, YANG Q X, ZENG L, et al. Triterpenes from stems of *Akebia trifoliata* and their antibacterial activities [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2022, 30(1): 144–150. [贾永霞, 杨秋霞, 曾雷, 等. 三叶木通藤茎的三萜成分及其抗菌活性研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2022, 30(1): 144–150. doi: 10.11926/jtsb.4489.]
- [10] ZHANG Y J, DANG H S, YANG L L, et al. Geographical distribution and resource survey of wild medicinal plant *Akebia trifoliata* subsp. *trifoliata* [J]. *Chin Wild Plant Res*, 2013, 32(3): 58–62. [张燕君, 党海山, 杨路路, 等. 药用植物三叶木通(*Akebia trifoliata* subsp. *trifoliata*)野生资源的地理分布与调查 [J]. *中国野生植物资源*, 2013, 32(3): 58–62. doi: 10.3969/j.issn.1006-9690.2013.03.016.]
- [11] CAI F L, ZOU S Y, GAO P X, et al. Analysis on quality variations of *Akebia trifoliata* fruit at different harvesting times [J]. *J Plant Res Environ*, 2022, 31(1): 83–85. [蔡芳丽, 邹帅宇, 高浦新, 等. 不同采收时间三叶木通果实品质变化分析 [J]. *植物资源与环境学报*, 2022, 31(1): 83–85. doi: 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.01.10.]
- [12] YU X S, WANG X H, LI L, et al. Effects of rocky desertification habitat on growth and physiological characteristics of *Akebia trifoliata* [J]. *Acta Ecol Sin*, 2022, 42(6): 2382–2393. [于晓松, 王晓红, 李林, 等. 石漠化生境对三叶木通生长及生理特性的影响 [J]. *生态学报*, 2022, 42(6): 2382–2393. doi: 10.5846/stxb202102250522.]
- [13] YU X S. Study on the adaptability of *Akebia trifoliata* to rocky desertification habitat [D]. Guiyang: Guizhou University, 2021. [于晓松. 三叶木通对石漠化生境的适应性研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.]
- [14] HU W J, LIU T W, ZHU C Q, et al. Physiological, proteomic analysis, and calcium-related gene expression reveal *Taxus wallichiana* var. *mairei* adaptability to acid rain stress under various calcium levels [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 845107. doi: 10.3389/fpls.2022.845107.
- [15] JU S M, WANG L P, CHEN J Y. Effects of silicon on the growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure of *Oryza sativa* L. seedlings under acid rain stress [J]. *Silicon*, 2020, 12(3): 655–664. doi: 10.1007/s12633-019-00176-8.
- [16] WANG K, TAO X M, LIU Z, et al. Salicylic acid regulates the physiological mechanism of acid rain stress tolerance in *Loropetalum chinense* var. *rubrum* [J]. *N Hort*, 2023(12): 51–58. [王凯, 陶兴梅, 刘朝, 等. 水杨酸调控红花檵木耐酸雨胁迫的生理机制 [J]. *北方园艺*, 2023(12): 51–58. doi: 10.11937/bfy.20224277.]
- [17] FAN X J. Redox properties of titanium and its action on biochemical process in plants [J]. *Soils Fert Sci China*, 2012(5): 1–4. [范秀菊. 钛的氧化还原特性及其在植物生化过程中的作用 [J]. *中国土壤与肥料*, 2012(5): 1–4.]
- [18] PAIS P. The biological importance of titanium [J]. *J Plant Nutr*, 1983, 6(1): 3–131. doi: 10.1080/01904168309363075.
- [19] YAN X, TU C, WANG M R. Plant nutrition of beneficial element titanium: Research progress [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2017, 33(27): 33–36. [闫湘, 涂成, 王曼如. 有益元素钛的植物营养学研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2017, 33(27): 33–36. doi: 10.11924/j.issn.1000-6850.casb17050030.]
- [20] ZHOU X D, XU Z F, LIU W J, et al. Progress in the studies of precipitation chemistry in acid rain areas of southwest China [J]. *Environ Sci*, 2017, 38(10): 4438–4446. [周晓得, 徐志方, 刘文景, 等. 中国西南酸雨区降水化学特征研究进展 [J]. *环境科学*, 2017, 38(10): 4438–4446. doi: 10.13227/j.hjkk.201702069.]
- [21] ZHOU Y H, LIU H, ZHANG S K, et al. Adaptation strategies of 29 species to tropical coral islands based on leaf anatomical traits [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2023, 31(6): 747–756. [周雨珩, 刘慧, 张世柯, 等. 基于叶片解剖性状探究 29 种植物对热带珊瑚岛的适应策略 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2023, 31(6): 747–756. doi: 10.11926/jtsb.4735.]
- [22] ZOU Q. *Plant Physiology Experiment Guidance* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003. [邹琦. *植物生理学实验指导* [M]. 北京: 中

- 国农业出版社, 2003.]
- [23] JI Z J, QUAN X K, WANG C K. Variations in leaf anatomy of *Larix gmelinii* reflect adaptation of its photosynthetic capacity to climate changes [J]. *Acta Ecol Sin*, 2013, 33(21): 6967–6974. [季子敬, 全先奎, 王传宽. 兴安落叶松针叶解剖结构变化及其光合能力对气候变化的适应性 [J]. *生态学报*, 2013, 33(21): 6967–6974. doi: 10.5846/stxb201301150103.]
- [24] REN X Q, ZHANG J E, XIANG H M, et al. Research advances and prospects for effects of acid rain on aboveground physiology of plants and related alleviation countermeasures [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2021, 27(6): 1716–1724. [任晓巧, 章家恩, 向慧敏, 等. 酸雨对植物地上部生理生态的影响研究进展与展望 [J]. *应用与环境生物学报*, 2021, 27(6): 1716–1724. doi: 10.19675/j.cnki.1006-687x.2020.07054.]
- [25] FENG Z W, ZHANG J W, CHEN C Y, et al. Injuries to tree leaves by simulated acid rain and resistant nature of the trees [J]. *Environ Sci*, 1988, 9(5): 30–33. [冯宗炜, 张家武, 陈楚莹, 等. 模拟酸雨对树木叶片的伤害和树木抗性的研究 [J]. *环境科学*, 1988, 9(5): 30–33. doi: 10.13227/j.hjlx.1988.05.008.]
- [26] LIU X Y, ZHANG X W, DAI H M, et al. Analysis on the growth effect of nano titanium dioxide on *Lactuca sativa* [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2023, 31(5): 679–685. [刘晓宇, 张雪薇, 戴昊鸣, 等. 纳米二氧化钛对生菜的生长效应分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2023, 31(5): 679–685. doi: 10.11926/jtsb.4685.]
- [27] LI R Q, WANG Y X, SUN Y L, et al. Effects of salt stress on leaf morphology and anatomical structure of *Bromus inermis* seedlings [J]. *Acta Agrest Sin*, 2022, 30(6): 1450–1459. [李瑞强, 王玉祥, 孙玉兰, 等. 盐胁迫对无芒雀麦幼苗叶片形态及解剖结构的影响 [J]. *草地学报*, 2022, 30(6): 1450–1459. doi: 10.11733/j.issn.1007-0435.2022.06.016.]
- [28] WANG L Y, FENG J X, CHEN Z C, et al. Differences in physiological characteristics of *Populus×euramericana* varieties ‘Purui’ and ‘107’ under simulated acid rain stresses [J]. *Plant Sci J*, 2018, 36(4): 586–594. [王璐怡, 冯锦霞, 陈志成, 等. 杨品种‘普瑞’和‘107’对模拟酸雨胁迫的生理响应 [J]. *植物科学学报*, 2018, 36(4): 586–594. doi: 10.11913/PSJ.2095-0837.2018.40586.]
- [29] LI F L, BAO W K. Responses of the morphological and anatomical structure of the plant leaf to environmental change [J]. *Chin Bull Bot*, 2005, 22(S1): 118–127. [李芳兰, 包维楷. 植物叶片形态解剖结构对环境变化的响应与适应 [J]. *植物学通报*, 2005, 22(S1): 118–127.]
- [30] DONG X J, ZHANG X S. Some observations of the adaptations of sandy shrubs to the arid environment in the Mu Us sandland: Leaf water relations and anatomic features [J]. *J Arid Environ*, 2001, 48(1): 41–48. doi: 10.1006/jare.2000.0700.
- [31] WANG Y, LIANG Z S, GONG C M, et al. Effect of drought on leaf anatomical characteristics of four *Artemisia* species in the Loess Plateau [J]. *Acta Ecol Sin*, 2014, 34(16): 4535–4548. [王勇, 梁宗锁, 龚春梅, 等. 干旱胁迫对黄土高原 4 种蒿属植物叶形态解剖学特征的影响 [J]. *生态学报*, 2014, 34(16): 4535–4548. doi: 10.5846/stxb201306301802.]
- [32] WANG X L, MA J. A study on leaf-structure and the diversity of xerophytes ecology adaptation [J]. *Acta Ecol Sin*, 1999, 19(6): 787–792. [王勋陵, 马骥. 从旱生植物叶结构探讨其生态适应的多样性 [J]. *生态学报*, 1999, 19(6): 787–792. doi: 10.3321/j.issn:1000-0933.1999.06.004.]
- [33] QIU J, GAO C, LUO H F. Leaf anatomical structure and drought resistance evaluation of ancient tea trees in karst area of northwest Guizhou [J]. *Acta Bot Boreali-Occid Sin*, 2023, 43(7): 1170–1184. [仇杰, 高超, 罗洪发. 贵州西北喀斯特区古茶树叶片解剖结构及抗旱性评价 [J]. *西北植物学报*, 2023, 43(7): 1170–1184. doi: 10.7606/j.issn.1000-4025.2023.07.1170.]
- [34] ZHONG J W, SHAN X R, ZHANG J E, et al. Study on the effects of acid rain on the photosynthetic and antioxidant systems and yield of lettuce [J]. *Ecol Environ Sci*, 2021, 30(3): 532–540. [钟嘉文, 单晓冉, 章家恩, 等. 酸雨对生菜的光合、抗氧化系统和产量的影响研究 [J]. *生态环境学报*, 2021, 30(3): 532–540. doi: 10.16258/j.cnki.1674-5906.2021.03.011.]
- [35] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 48(12): 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.
- [36] BHARTI A S, SHARMA S, SHUKLA N, et al. Steady state and time resolved laser-induced fluorescence of garlic plants treated with titanium dioxide nanoparticles [J]. *Spectrosc Lett*, 2018, 51(1): 45–54. doi: 10.1080/00387010.2017.1417871.
- [37] KARAMIAN R, GHASEMLOU F, AMIRI H. Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in *Verbascum sinuatum* plants treated with methyl jasmonate, salicylic acid and titanium dioxide nanoparticles [J]. *Plant Biosyst-Int J Deal All Aspects Plant Biol*, 2020, 154(3): 277–287. doi: 10.1080/11263504.2019.1591535.
- [38] LI L X, TAO C Z, LIN J Q, et al. Response of needle anatomical structure of different Chinese fir clones to atmospheric warming [J]. *Acta Ecol Sin*, 2022, 42(20): 8385–8397. [李林鑫, 陶长铸, 林景泉, 等. 不同杉木无性系叶片解剖结构对大气增温的响应 [J]. *生态学报*, 2022, 42(20): 8385–8397. doi: 10.5846/stxb202109152590.]