

doi: 10.11707/j.1001-7488.20210606

氟离子和碳酸氢根对构树幼苗生长和碳代谢的影响*

姚 凯¹ 吴沿友²

(1. 贵州师范大学生命科学学院 贵阳 550025;

2. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室 贵阳 550081)

摘 要: 【目的】通过研究氟离子和碳酸氢根添加对构树幼苗生长和碳代谢的影响,探讨喀斯特生态区域内的氟离子对植物光合作用和糖代谢过程的影响机制,以期为氟富集地区的森林植被管理和修复提供理论依据。【方法】以喀斯特适生植物构树幼苗为研究对象,通过在 Hoagland 营养液中加入 NaF 和 NaHCO₃ 制成处理液。试验共设置 4 个处理组,即对照组、3 mmol·L⁻¹ NaF 处理组、3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组和 3 mmol·L⁻¹ NaF+3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组。测定构树幼苗在处理条件下的生长指标、光合指标、磷酸果糖激酶(PFK)活性、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)活性和碳酸酐酶(CA)活性。【结果】1) F⁻ 添加显著抑制了构树幼苗的生长和光合能力,并且使葡萄糖代谢从糖酵解途径转移到磷酸戊糖途径。在不同时添加 HCO₃⁻ 的情况下,F⁻ 对叶片内的 CA 酶活性不产生显著影响,但在同时添加 HCO₃⁻ 时,F⁻ 显著抑制叶片内的 CA 酶活性。2) 根际 HCO₃⁻ 添加能够显著促进构树幼苗的生长和光合能力,提高葡萄糖代谢总量和 CA 酶活性。而同时添加 F⁻ 能抑制 HCO₃⁻ 添加对植株产生的正面效应,使植株的生长、光合、葡萄糖代谢总量都显著下降,而 G6PDH 酶活性显著上升。【结论】环境中较高浓度的 F⁻ 能够显著抑制构树的生长,具体体现在对光合过程的抑制和把过多的糖代谢底物分配到 PPP 途径上。而在根际添加适量的 HCO₃⁻ 能够为植株的生长提供额外的光合代谢底物,提高植株的糖代谢水平,从而对植物的抗逆性和生长都产生有利的影响。在同时添加 HCO₃⁻ 和 F⁻ 条件下,HCO₃⁻ 对植物生长的增益效果被 F⁻ 的作用所削减,这主要是因为 F⁻ 对植物光合系统中各种酶结构和活性的破坏和抑制作用,也可能与 F⁻ 和 HCO₃⁻ 在根系吸收时存在竞争关系有关。

关键词: 构树; F⁻; HCO₃⁻; 光合作用; 葡萄糖代谢; 碳酸酐酶; 磷酸果糖激酶; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

中图分类号: S718.43 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2021)06-0056-08

Effects of Fluoride and Bicarbonate on Growth and Carbon Metabolism of

Broussonetia papyrifera Seedlings

Yao Kai¹ Wu Yanyou²

(1. School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang 550025;

2. State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550081)

Abstract: 【Objective】The study was aimed to investigate the effects of fluoride and bicarbonate on the growth and carbon metabolism of *Broussonetia papyrifera* seedlings, and to reveal the mechanism of the effects of fluoride ions on plant photosynthesis and sugar metabolism in karst ecological region, in order to provide a theoretical basis for forest vegetation management and restoration in fluorine rich areas. 【Method】*B. papyrifera* seedlings were treated with Hoagland nutrient solution added with NaF and NaHCO₃ in 4 ways: control, 3 mmol·L⁻¹ NaF, 3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ and 3 mmol·L⁻¹ NaF+3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃. The growth parameters, photosynthetic parameters, phosphofructokinase (PFK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and carbonic anhydrase (CA) enzyme activities of *B. papyrifera* seedlings were measured. 【Result】1) Addition of F⁻ significantly inhibited the growth and photosynthetic capacity of plants, and transferred glucose metabolism from glycolysis pathway to pentose phosphate pathway. When HCO₃⁻ was not added at the same time, F⁻ had no significant effect on CA activity in leaves; but when HCO₃⁻ was added at the same time, F⁻

收稿日期: 2020-07-22; 修回日期: 2020-10-17。

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1612441); 国家重点研究发展计划(2016YFC0502602); 贵州师范大学资助博士科研项目(11904/0517067)。

* 吴沿友为通讯作者。

significantly inhibited CA activity in leaves. 2) Rhizospheric HCO_3^- significantly promoted plant growth and photosynthetic capacity, increased total glucose metabolism and CA enzyme activity. However, F^- inhibited the positive effects of HCO_3^- on plants, consequently significantly reduced growth, photosynthesis and glucose metabolism, but significantly increased G6PDH activity. 【Conclusion】In conclusion, the higher concentration of F^- in the environment significantly inhibits the growth of *B. papyrifera* seedlings, and its adverse effects on the growth of *B. papyrifera* are reflected in the inhibition of photosynthetic process and the distribution of excessive carbohydrate metabolic substrates to pentose phosphate pathway. The appropriate amount of rhizospheric HCO_3^- provides additional photosynthetic metabolic substrate for plant growth, and improves the glucose metabolism level of plants, which improves the stress resistance and growth ability of plants. Under the HCO_3^- and F^- treatment, the favorable effect of HCO_3^- on plant growth was reduced by F^- , mainly due to the destruction and inhibition of the structure and activity of various enzymes in plant photosynthetic system, and it may also be related to the competition between HCO_3^- and F^- during root absorption.

Key words: *Broussonetia papyrifera*; F^- ; HCO_3^- ; photosynthesis; glucose metabolism; carbonic anhydrase; phosphofructokinase; glucose-6-phosphate dehydrogenase

氟离子主要通过植物根系吸收,并在木质部随蒸腾流向上运输,最后储藏积累在各器官(主要为叶片)中,抑制光合作用、呼吸作用以及其他代谢过程关键酶,影响植物生长代谢并最终导致植物死亡(Miller, 1993; Fornasiero, 2003; Elloumi *et al.*, 2005),对早期幼苗的伤害作用尤为强烈(利锋, 2004; Weinstein *et al.*, 2004)。此外,氟中毒引起机体显著的氧化应激反应,产生大量自由基和活性氧(ROS)增加膜脂质过氧化,并破坏胞内蛋白酶的结构(Izquierdo-Vega *et al.*, 2008; Barbier *et al.*, 2010; Gutowska *et al.*, 2010)。而各种蛋白酶在植物光合、清除 ROS 系统和糖代谢过程中具有重要作用。在光合系统中,除核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco, EC 4.1.1.39)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPC, EC 4.1.1.31)等固定 CO_2 的羧化酶以外,碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA, EC 4.2.1.1)等非直接固碳的酶也是不可或缺的。CA 是催化 CO_2 可逆水合反应的一类含锌金属酶。在光合过程中,CA 加速无机碳向羧化酶活性部位扩散以增强 CO_2 的固定速率(蒋春云等, 2013)。CA 对陆地植物利用碳酸氢盐具有重要的作用,特别是植物气孔开放受环境因子限制时,CA 被迅速激活(吴沿友等, 2011)。逆境中的植物可通过葡萄糖代谢途径的调控来响应环境变化,并保持生长生理活性。植物葡萄糖代谢途径的调控可体现在葡萄糖通过磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)和糖酵解途径(glycolytic pathway, EMP)代谢的份额变化。PPP 途径和 EMP 途径是生物体糖代谢系统的核心。已有研究表明,在非生物胁迫下,葡萄糖代谢从 EMP

途径转移到 PPP 途径(Yu *et al.*, 1967; Li *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013)。PPP 途径的激活可产生大量 NADPH,为维持抗氧化酶活性提供还原力;同时增强核酮糖-5-磷酸(Ru5P)的再生以促进 Calvin-Benson 循环。磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK, EC 2.7.1.11)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH, EC 1.1.1.49)分别是 EMP 途径和 PPP 途径的限速酶,控制着葡萄糖通过这 2 种途径的代谢份额。

金属离子是金属酶活性中心的重要组成部分,氟元素易与带正电的金属离子形成不溶络合物,所以能抑制许多金属酶的活性。长时间高浓度的氟处理可强烈抑制植物呼吸作用过程中的酶活性,并不可逆地损害线粒体的结构甚至使其功能完全丧失(Yu *et al.*, 1967; Li *et al.*, 2011);另一方面,氟离子能与围绕酶活性中心的氨基酸官能团结合,使酶的构象发生变化而失活(Chlubek *et al.*, 2003; Chlubek, 2003)。NaF 也常被用为 EMP 途径的抑制剂。

构树(*Broussonetia papyrifera*)是中等海拔次生喀斯特森林中常见的喜钙植物,抗逆性强(Chang *et al.*, 2015),广泛应用于绿化和石漠化防治。构树皮富含纤维,可用于造纸和纺织;叶富含粗蛋白,是理想的木本饲料(Sun *et al.*, 2014)。国内外已对不同植物吸收富集氟能力的差异、氟在植物不同组织中的富集规律、环境因素对植物吸收富集氟的影响开展了一定的研究,但是氟对植物的代谢调控和对植物利用碳源的影响机制还尚未阐明。此外,喀斯特土壤中富含碳酸氢根离子(HCO_3^-),其浓度在 $1 \sim 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (McCray *et al.*, 1992; Stokes *et al.*, 2019)。 HCO_3^- 可作为根际碳源提高植物的光合能

力;同时 因为同属单价阴离子 HCO_3^- 和 F^- 被植物根系吸收时存在潜在的竞争关系。本试验选取构树为试验材料 研究 F^- 和 HCO_3^- 单独和共同作用下其叶片中 EMP 途径和 PPP 途径代谢份额的变化、光合作用和生长的变化,以期为进一步阐明喀斯特生境中氟离子对植物生长的影响机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与培养

选取喀斯特适生树种构树为研究对象,种子收集于中国科学院地球化学研究所老园区。选取籽粒饱满的种子,置于盛有珍珠岩的育苗盒中,种子上覆盖薄层珍珠岩,育苗盒中注入适量的蒸馏水,以不浸泡种子为宜。光照培养箱的温度设置为 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 、光周期为 12 h。种子在播种后 12 天开始萌发,幼苗出现 4 片真叶后,选取健壮的幼苗移栽。移栽后每个育苗盒栽培 2 株幼苗,并保持适当间距以保证幼苗生

长至适合试验大小时不互相遮盖光照。将移苗后的育苗盒置于人工气候室内,设置光周期为 12 h,光照强度为 $300\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,日间气温为 $25\text{ }^\circ\text{C}$,夜间气温为 $20\text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度为 55%~65%。添加 1/2 浓度的 Hoagland 营养液为构树幼苗提供营养和水分。

1.2 试验处理

待植株高度达到 12~13 cm 时,选取生长均一的幼苗进行试验(表 1)。在营养液中加入 NaF 和 NaHCO_3 制成处理液,本试验共有 4 个处理组,即对照组、 $3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF 处理组、 $3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 处理组和 $3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF+ $3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 处理组。因试验大背景为喀斯特生境,故各组处理液的 pH 值均调为 7.8。隔天在固定时间更换处理液。第 0 天和第 6 天时,测量植株的各项生长指标。因宽度在 70 mm 左右的叶片生长活性较强且数量较多,故以此标准采集叶片为样品, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻保存,用于测试植株叶片各项生理生化指标。所有指标均设置 5 个重复。

表 1 处理前构树的生长指标^①

Tab.1 The growth parameters of *Broussonetia papyrifera* before treatments

生长指标 Growth parameters	对照 Control	$3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCO_3^-	$3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ F^-	$3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ F^- + $3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCO_3^-
株高 Height (H) /cm	12.73±0.15 b	13.07±0.31 a	12.30±0.26 b	12.60±0.06 b
基径 Basal diameter (D_b) /mm	1.58±0.01 ab	1.43±0.03 b	1.52±0.02 ab	1.66±0.02 a
叶片数 Number of leaves (N)	8.33±0.58 a	8.67±0.58 a	8.00±0 a	7.66±0.58 a
叶宽≥70 mm 的叶片数 Number of blades more than 70 mm wide (N_{70})	2.33±0.58 b	3.00±0 a	2.67±0.58 a	3.00±0 a

①数据为平均值±标准差;同行不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下同。Data are mean ± standard deviation. Different letters in the same row indicate significant differences between treatments ($P<0.05$). The same below.

1.3 植株生长参数测定

处理后,分别于第 0 天和第 6 天测量植株的生长指标。选取株高(H)、基径(D_b)、叶片数(N)和叶宽≥70 mm 的叶片数(N_{70})作为衡量植物生长的指标。

1.4 构树叶片中酶液的提取

根据 Liu 等(2013)的方法并稍作修改,提取叶片中的酶。取 0.1 g 的构树叶片置于冰浴研钵中并加入液氮研磨。待液氮挥发后,加入 1 mL 酶提取液,其中含有 $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES Tris-HCl (pH7.8), $3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇和 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟。把研磨后的匀浆移入离心管中,在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下, $12\ 000\times g$ 离心 20 min,取上清液冷藏待测。

1.5 构树叶片中 G6PDH 酶活性测定

根据 Tian 等(1998)的方法并稍作修改,测定 G6PDH 酶活性。首先测定 G6PDH 和 6-磷酸葡萄

糖酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGDH, EC 1.1.1.44)的总活性,把 200 μL 酶提取液加入到 1.8 mL G6PDH 和 6PGDH 总酶活性分析液中以测定 G6PDH 和 6PGDH 的总活性。G6PDH 和 6PGDH 总酶活性分析液中含有 $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES Tris-HCl (pH7.8), $3.3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖酸酯二钠盐, $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖酸酯和 $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPNa_2 。把 200 μL 酶提取液加入到 1.8 mL 6PGDH 酶活性分析液中以测定 6PGDH 的酶活性。6PGDH 酶活性分析液中含有 $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES Tris-HCl (pH7.8), $3.3\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-磷酸葡萄糖酸酯和 $0.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADPNa_2 。用紫外分光光度计测定反应混合液在 340 nm 处的光吸收,以测量反应混合液中 NADP^+ 还原为 NADPH 的速率的变化。G6PDH 酶活性的值等于 G6PDH 和 6PGDH 总酶活性值减去 6PGDH 酶活性值。

1.6 构树叶片中 PFK 酶活性测定

根据 Carnal 和 Black(1983) 的方法并稍作修改测定 PFK 的活性。PFK 酶活性等于 ATP-PFK 酶活性加上焦磷酸(PPi)-PFK 酶活性。为测定 ATP-PFK 酶活性,把 200 μL 酶提取液加入到 1.8 mL ATP-PFK 酶活性分析液中,分析液中含有 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES Tris-HCl(pH7.8), 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADH, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 果糖-6-磷酸, 2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 醛缩酶(aldolase, EC 4.1.2.13), 1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丙糖磷酸异构酶(triose-phosphate isomerase, TPI, EC 5.3.1.1), 2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, EC 1.2.1.12) 和 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP; 为测定 PPi-PFK 酶活性,把 200 μL 酶提取液加入到 1.8 mL PPi-PFK 酶活性分析液中,分析液中含有 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES Tris-HCl(pH7.8), 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADH, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 果糖-6-磷酸, 2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 醛缩酶, 1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ TPI, 2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ GAPD 和 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PPi。用紫外分光光度计测定反应混合液在 340 nm 处的光吸收,以测量反应混合液中 NADH 氧化为 NAD^+ 的速率的变化。

1.7 葡萄糖通过 EMP 途径和 PPP 途径代谢的比例计算

计算出 PFK 酶活性为 EA_{pfk} , G6PDH 酶活性为 EA_{g6pdh} , 同时假设生物体内参与葡萄糖代谢的代谢途径的关键酶的总活性为 EA_{Σ} , 除 EMP 途径和 PPP 途径之外参与葡萄糖代谢的各途径的限速酶活性为 EA_{else} , 且各途径的限速酶的活性代表了各途径葡萄糖代谢的份额。则生物体内葡萄糖通过 EMP 途径代谢的占比 P_{EMP} 可表示为:

$$P_{\text{EMP}} = EA_{\text{pfk}} / (EA_{\text{pfk}} + EA_{\text{g6pdh}} + EA_{\text{else}}) \times 100\% \quad (1)$$

同理, PPP 途径在葡萄糖代谢中的占比 P_{PPP} 可表示为:

$$P_{\text{PPP}} = EA_{\text{g6pdh}} / (EA_{\text{pfk}} + EA_{\text{g6pdh}} + EA_{\text{else}}) \times 100\% \quad (2)$$

在植物细胞中,约 75% 的葡萄糖通过 EMP 代谢, 15%~30% 的葡萄糖通过 PPP 代谢(Copeland *et al.*, 1987; Debnam *et al.*, 2004), EA_{else} 的占比很小; 且在本文中只研究 PFK 和 G6PDH 的酶活性关系, 所以在式 1 和式 2 中, EA_{else} 可忽略。葡萄糖通过 EMP 途径代谢与通过 PPP 途径代谢的份额比可简单表示为:

$$P = P_{\text{EMP}} : P_{\text{PPP}} = EA_{\text{pfk}} : EA_{\text{g6pdh}} \quad (3)$$

1.8 构树叶片中 CA 的提取及活性测定

按照吴沿友等(2011)的方法测定 CA 的活性。称取 0.1 g 左右鲜质量的构树叶片,置于冰浴的研钵中并加入液氮研磨,再加入 3 mL 的 CA 提取液(pH8.30),其中含有 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 巴比妥钠、0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 巯基乙醇,持续研磨至匀浆。把叶片匀浆转移到 5 mL 的离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下,12 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清液置于离心管中,冷藏待测。CA 活性的测定方法如下:将测定的反应系统置于 0~2 $^{\circ}\text{C}$ 的低温环境中,取 CA 提取液 400 μL ,加入到反应液中,反应液为 4.5 mL 巴比妥钠缓冲液(20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH8.30),同时加入 3 mL 预冷温度为 0~2 $^{\circ}\text{C}$ 的饱和 CO_2 蒸馏水。用 pH 铂电极测量整个反应体系中的电位变化并记录电位随时间变化的过程曲线,根据该时间-电位曲线得到添加 CA 提取液和空白条件下反应体系内单位电位值下降的时间 t 和 t_0 。 t_0 为空白处理所需的时间, t 为样品所需的时间。CA 活性单位为 $\text{WAU}\cdot\text{g}^{-1}$,其计算公式为 $\text{WA} = (t/t_0 - 1)$ 。

1.9 数据统计与分析

利用统计分析软件 SPSS(20.0 版本)对不同处理水平间试验数据进行单因子显著性差异分析($P \leq 0.05$)。插图均用 Origin(9.0 版本)软件绘制。

2 结果与分析

2.1 NaF 和 NaHCO_3 处理对构树生长指标的影响

测量植株地上部分的各项生长指标以评估构树在 NaF 和 NaHCO_3 处理下的生长情况(表 2)。较之对照组,营养液中添加 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF 的处理下构树的 H 和 D_b 的增长均受严重抑制, N 和 N_{70} 也停止增长。在添加 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF + 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 处理组中,植株的各项生长指标也受到严重抑制,但抑制程度与单独添加 NaF 组相比较低。4 个处理组中,植株的生长情况在添加 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 处理组最好,各项生长指标均略高于对照组。

2.2 NaF 和 NaHCO_3 处理对 PFK 酶活性的影响

处理 6 天后,各处理组 ATP-PFK 和 PPi-PFK 的酶活性及 PFK 酶的总活性如图 1 所示。在 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF 处理组,构树叶片中 ATP-PFK 酶活性下降到对照组的 66% 左右,而 PPi-PFK 的酶活性下降到对照组的 16% 左右;在 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 处理组,ATP-PFK 酶活性为对照组的 110%,PPi-PFK 酶

表 2 NaF 和 NaHCO₃ 处理下构树的生长和光合指标Tab.2 The growth and photosynthetic parameters of *Broussonetia papyrifera* under NaF and NaHCO₃ treatments

生长指标 Growth parameters	对照 Control	3 mmol·L ⁻¹ HCO ₃ ⁻	3 mmol·L ⁻¹ F ⁻	3 mmol·L ⁻¹ F ⁻ + 3 mmol·L ⁻¹ HCO ₃ ⁻
株高 Height(<i>H</i>) / cm	16.92±0.68 b	18.41±0.82 a	13.75±0.88 d	15.03±0.79 c
基径 Basal diameter (<i>D_b</i>) / mm	2.01±0.04 b	2.11±0.03 a	1.65±0.04 d	1.87±0.06 c
叶片数 Number of leaves (<i>N</i>)	9.80±0.40 b	11.00±0.63 a	7.80±0.40 c	8.00±0.00 c
叶宽≥70 mm 的叶片数 Number of blades more than 70 mm wide (<i>N₇₀</i>)	4.00±0.00 b	5.20±0.40 a	2.60±0.40 c	4.20±0.40 b
气孔导度 Stomatal conductance (<i>g_s</i>) / (mol·m ⁻² ·s ⁻¹)	0.16±0.02 a	0.15±0.01 a	0.11±0.02 b	0.11±0.01 b
净光合速率 Net photosynthetic rate (<i>P_n</i>) / (μmol·m ⁻² ·s ⁻¹)	5.87±0.04 b	6.12±0.03 a	2.73±0.07 d	3.39±0.06 c

活性上升到对照组的 161% 左右; 在 3 mmol·L⁻¹ NaF+3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组, ATP-PFK 和 PPi-PFK 的酶活性分别为对照组的 122% 和 39%, 为 NaHCO₃ 处理组的 111% 和 24%, 为 NaF 处理组的 185% 和 241%。

PFK 酶总活性在 3 mmol·L⁻¹ NaF 处理组仅为对照组的 47% 左右; 在 3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组, PFK 酶活性最高, 为对照组的 129% 左右。而在 3 mmol·L⁻¹ NaF+3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组中, PFK 的酶活性分别为对照组的 90%、NaHCO₃ 处理组的 70%、NaF 处理组的 193%。

2.3 NaF 和 NaHCO₃ 处理对 G6PDH 酶活性的影响

由图 2 可知, 在 3 mmol·L⁻¹ NaF 处理组, 构树叶片中 G6PDH 酶活性上升为对照组的 157%; 3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组 G6PDH 酶活性为对照组的 87%; 3 mmol·L⁻¹ NaF+3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组的 G6PDH 酶活性分别为对照组的 145%、NaHCO₃ 处理组的 167%、NaF 处理组的 92%。

2.4 NaF 和 NaHCO₃ 处理下构树叶片中葡萄糖代谢途径的转移

如图 3 所示, 在对照组中, 葡萄糖通过 EMP 途径代谢所占的比例 (*P_{EMP}*) 为 70%, 通过 PPP 途径代谢的比例 (*P_{PPP}*) 为 30%; 3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组 *P_{EMP}* 和 *P_{PPP}* 分别为 78% 和 22%; 3 mmol·L⁻¹ NaF 的处理组 *P_{EMP}* 下降到 42%, *P_{PPP}* 上升为 58%; 而在 3 mmol·L⁻¹ NaF+3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组, *P_{EMP}* 和 *P_{PPP}* 分别为 60% 和 40%。同时, 各处理组的糖代谢总量排序为: NaF 处理组 < 对照组 < NaF+NaHCO₃ 处理组 < NaHCO₃ 处理组。

2.5 NaF 和 NaHCO₃ 处理对 CA 酶活性的影响

各处理组 CA 酶活性如图 4 所示。在 3 mmol·L⁻¹ NaF 处理组, 构树叶片中 CA 酶活性为对照组的 98%; 3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组中叶片 CA 酶活性为对照组的 287%; 3 mmol·L⁻¹ NaF+3 mmol·L⁻¹

NaHCO₃ 处理组 CA 酶活性分别为对照组的 107%、NaHCO₃ 处理组的 37%、NaF 处理组的 109%。

3 讨论

本试验研究了环境中 F⁻ 和 HCO₃⁻ 对构树生长和代谢的作用。营养液中添加 3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 对植株的生长有一定的促进作用, 而添加 3 mmol·L⁻¹ NaF 对构树的生长产生显著的抑制作用, 同时添加 3 mmol·L⁻¹ NaF 和 3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃, 植株的生长优于添加 NaF 处理组。

在 3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 处理组, 构树幼苗的株高、基径和叶片数等指标均显著优于对照组。这得益于在根际添加的 HCO₃⁻ 给光合作用提供了额外的碳源, 提高了植株的光合效率 (Keeley *et al.*, 1984; Rao *et al.*, 2017), 该处理组的 *P_n* 值最高也印证了此结果。同时, 该处理组的代谢总量和 PFK 酶活性都显著高于对照组, 都证明营养液中添加 3 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 对构树幼苗的生长具有促进作用。

在营养液中添加 3 mmol·L⁻¹ NaF 对构树生长产生显著的抑制作用, 株高、基径和叶片数等指标均显著低于对照组。与环境因子胁迫会诱导植株某些器官生长增加不同, F⁻ 对植株各部分生长都显著抑制, 且叶片颜色较对照组明显偏黄。有研究表明, F⁻ 在植物叶片中易与 Mg²⁺ 结合形成 MgF⁺ 络合物从而显著降低光合色素 (特别是叶绿素) 的浓度 (Trapp *et al.*, 1995; Dey *et al.*, 2012), 导致叶片颜色偏黄并使植物的光合能力显著下降, 因此植株各个器官的生物量积累和生长都会受到抑制。通过对植株光合指标的研究也发现, F⁻ 处理显著抑制植株的 *P_n* 和 *g_s*。此前也有研究报道, 氟化物能够通过抑制 Rubisco 酶活性使植物的碳同化能力受到抑制 (徐丽珊等, 2003)。通过研究构树叶片中 PFK 酶活性发现, F⁻ 对 ATP-PFK 和 PPi-PFK 的活性都产生了抑制作用, 其中, 对 PPi-PFK 的抑制作用尤为强烈。同时, G6PDH 酶活性受到 F⁻ 处理激活。NaF 处理抑制 EMP 途径并激活 PPP 途径现象与其他学者

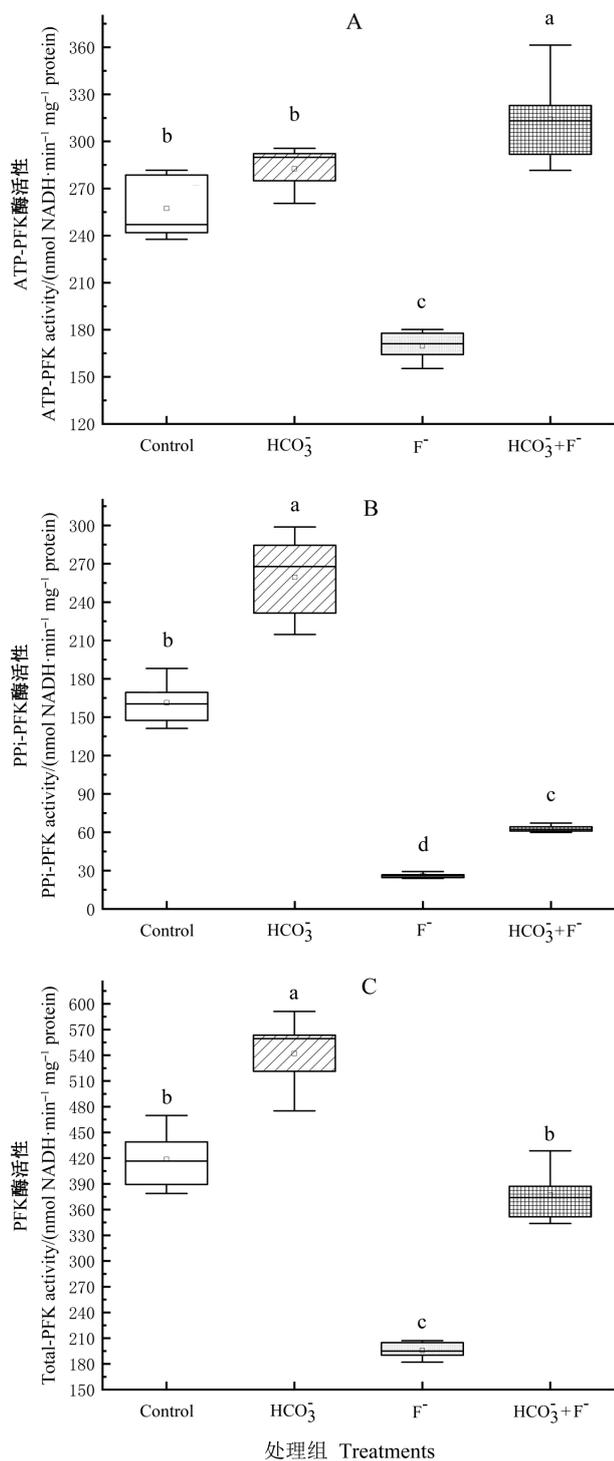


图1 不同处理组构树叶片中 ATP-PFK (A)、PPi-PFK (B) 和 PFK (C) 酶活性的变化

Fig. 1 The activities of ATP-PFK (A), PPi-PFK (B) and PFK (C) in leaves of *Broussonetia papyrifera* seedlings under different treatments

不同字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。Different letters indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$). The same below.

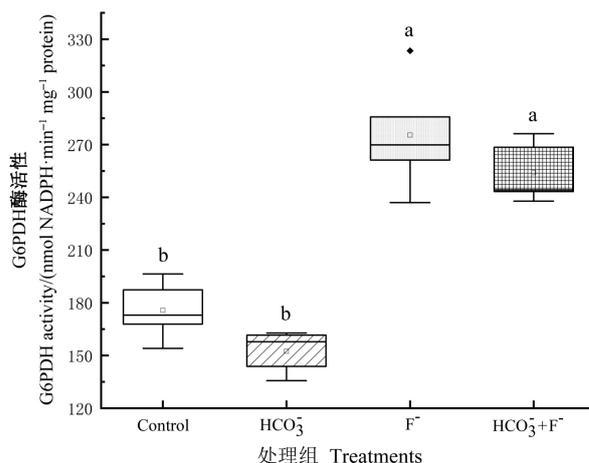


图2 不同处理组构树叶片中 G6PDH 酶活性的变化

Fig. 2 The activities of G6PDH in leaves of *B. papyrifera* seedlings under different treatments

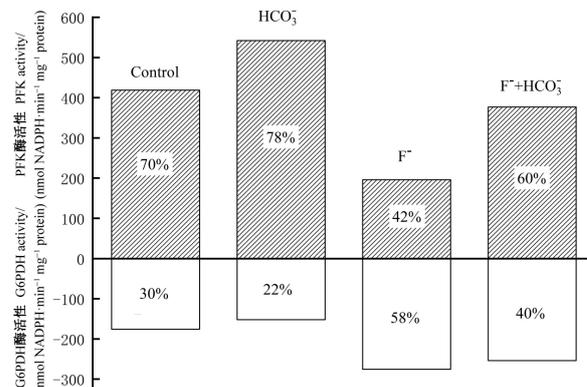


图3 不同处理组构树叶片中葡萄糖代谢途径的歧化状况

Fig. 3 Disproportionation of glucose metabolism in leaves of *B. papyrifera* seedlings under different treatments

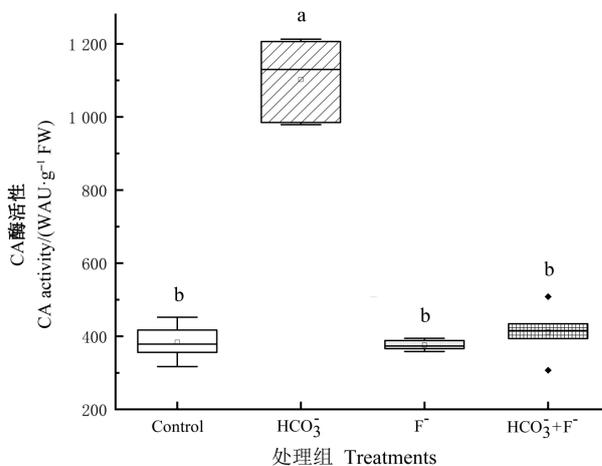


图4 不同处理组构树叶片中 CA 酶活性的变化

Fig. 4 The activities of CA in leaves of *B. papyrifera* seedlings under different treatments

的研究结果(Yu *et al.*, 1967; Li *et al.*, 2011) 一致。PPP 途径的激活可为清除 F^- 胁迫下植物产生的过量 ROS 物质提供更多的还原力,对维持细胞结构的完整和代谢酶的活性具有重要的作用。

在 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaF}$ 和 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ 同时处理组,植株的生长情况要好于单独 NaF 处理组, P_n 值也要显著高于单独 NaF 处理组,表明根际低浓度的 HCO_3^- 能有限缓解 F^- 对植株生长的抑制作用。同时,PFK 和 G6PDH 的酶活性较单独 NaF 处理组也有一定提高,这应该与根际 HCO_3^- 的添加增强了光合作用有关。CA 对陆地植物利用碳酸氢盐具有非常重要的作用,环境中的 HCO_3^- 也能够激活植株的 CA(吴沿友等,2011)。值得注意的是,单独添加 NaF 处理对植株叶片中的 CA 并没有产生显著的影响;而在根际添加 NaHCO_3 时, NaF 能够显著抑制叶片中 CA 酶活性,这应该与 F^- 能够抑制根系对 HCO_3^- 吸收有关。 HCO_3^- 对 F^- 胁迫植物生长的缓解作用一方面与 HCO_3^- 能作为根际碳源提高植物的光合能力有关(Keeley *et al.*, 1984; Rao *et al.*, 2017; Rubio *et al.*, 2017); 另一方面,推测 HCO_3^- 与 F^- 在被植物根系吸收时存在竞争关系,从而可抑制植株对 F^- 的吸收,但还有待进一步研究。目前,仅有 F^- 与某些金属元素对植物共同作用的报道,如 Bustingorri 等(2015)研究了氟砷互作对大豆(*Glycine max*)生长的影响,钟秋生等(2019)研究了氟铝互作对茶树(*Camellia sinensis*)光合的影响;而 F^- 与阴离子对植物的相互作用还未见报道。

4 结 论

环境中较高浓度的 F^- 能够显著抑制构树的生长,可具体体现在对光合过程的抑制和把过多的糖代谢底物分配到 PPP 途径上。而在根际添加适量的 HCO_3^- 能够为植株的生长提供额外的光合代谢底物,提高植株的糖代谢水平,从而对植物的抗逆性和生长都产生有利的影响。在同时添加 HCO_3^- 和 F^- 条件下, HCO_3^- 对植物生长的增益效果被 F^- 的作用所削减,这主要是因为 F^- 对植物光合系统中各种酶结构和活性的破坏和抑制作用,也可能与 F^- 和 HCO_3^- 在根系吸收时存在竞争关系有关。

参 考 文 献

蒋春云,马秀灵,沈晓艳,等. 2013. 植物碳酸酐酶的研究进展. 植物生理学报, 49(6): 545-550.
(Jiang C Y, Ma X L, Shen X Y, *et al.* 2013. Progress in research on plant carbonic anhydrase. Plant Physiology Journal, 49(6): 545-

550. [in Chinese]
利 锋. 2004. 土壤氟与植物. 广东微量元素科学, 11(5): 6-11.
(Li F. 2004. Soil fluorine and plants. Guangdong Trace Elements Science, 11(5): 6-11. [in Chinese]
吴沿友,邢德科,刘 莹. 2011. 植物利用重碳酸根离子的特征分析. 地球与环境, 39(2): 273-277.
(Wu Y Y, Xing D K, Liu Y. 2011. The characteristics of bicarbonate used by plants. Earth and Environment, 39(2): 273-277. [in Chinese]
徐丽珊,申秀英,许晓路,等. 2003. 氟化物对金华佛手碳代谢及花粉的影响. 农业环境科学学报, 22(4): 474-476.
(Xu L S, Shen X Y, Xu X L, *et al.* 2003. Effect of fluoride on metabolism of carbohydrate and pollens of Jinhua fingered citron. Journal of Agro-Environment Science, 22(4): 474-476. [in Chinese]
钟秋生,林郑和,郝志龙,等. 2019. 氟铝互作对茶树叶片叶绿素荧光特性的影响. 茶叶科学, 39(5): 537-546.
(Zhong Q S, Lin Z H, Hao Z L, *et al.* 2019. Effect of fluoride and aluminum interaction on the chlorophyll fluorescence characteristics of tea leaves. Journal of Tea Science, 39(5): 537-546. [in Chinese]
Barbier O, Arreola-Mendoza L, DelRazo L M. 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. Chemico-Biological Interactions, 188(2): 319-333.
Bustingorri C, Balestrasse K, Lavado R S. 2015. Effects of high arsenic and fluoride soil concentrations on soybean plants. Phytom-International Journal of Experimental Botany, 84(2): 407-416.
Carnal N W, Black C C. 1983. Phosphofructokinase activities in photosynthetic organisms: the occurrence of pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase in plants and algae. Plant Physiology, 71(1): 150-155.
Chang C S, Liu H L, Moncada X, *et al.* 2015. A holistic picture of Austronesian migrations revealed by phylogeography of Pacific paper mulberry. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(44): 13537-13542.
Chlubek D. 2003. Fluoride and oxidative stress. Fluoride, 36(4): 217-228.
Chlubek D, Grucka-Mamczar E, Birkner E, *et al.* 2003. Hyperglycemia caused by fluoride intoxication. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 17(1): 57-60.
Copeland L, Turner J F. 1980. The regulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. The Biochemistry of Plants, 11: 107-125.
Debnam P M, Fernie A R, Loisse A. 2004. Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. The Plant Journal, 38(1): 49-59.
Dey U, Naba Kumar M, Kousik D, *et al.* 2012. Dual effect of fluoride and calcium on the uptake of fluoride, growth physiology, pigmentation and biochemistry of Bengal gram seedlings (*Cicer arietinum* L.). Fluoride, 45(4): 389-393.
Elloumi N, Abdallah F B, Mezghani I, *et al.* 2005. Effect of fluoride on

- almond seedlings in culture solution. *Fluoride* ,38(3) : 193-198.
- Fornasiero R B. 2003. Fluorides effects on *Hypericum perforatum* plants: first field observations. *Plant Science* , 165(3) : 507-513.
- Gutowska I , Baranowska-Bosiacka I , Bańkiewicz M , *et al.* 2010. Fluoride as a proinflammatory factor and inhibitor of ATP bioavailability in differentiated human THP1 monocytic cells. *Toxicology Letters* , 196(2) : 74-79.
- Izquierdo-Vega J A , Sanchez-Gutierrez M , DelRazo L. 2008. Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicology and Applied Pharmacology* , 230(180) : 352-357.
- Keeley J E , Osmond C B , Raven J A. 1984. Stylites , a vascular land plant without stomata absorbs CO₂ via its roots. *Nature* , 310(23) : 694-695.
- Li C , Zheng Y , Zhou J , *et al.* 2011. Changes of antioxidant system , photosynthesis and ultrastructure in tea plant under the stress of fluorine. *Biologia Plantarum* , 55(3) : 563-566.
- Liu J , Wang X M , Hu Y F , *et al.* 2013. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in tolerance to drought stress in soybean roots. *Plant Cell Reports* , 32(3) : 415-429.
- McCray J M , Matocha J E. 1992. Effects of soil water levels on solution bicarbonate , chlorosis and growth of sorghum. *Journal of Plant Nutrition* , 15(10) : 1877-1890.
- Miller G. 1993. The effect of fluoride on higher plants: with special emphasis on early physiological and biochemical disorders. *Fluoride* , 26: 3-22.
- Rao S , Wu Y Y. 2017. Root-derived bicarbonate assimilation in response to variable water deficit in *Camptotheca acuminata* seedlings. *Photosynthesis Research* , 134(1) : 59-70.
- Rubio L , Garca D , Garca-Sánchez M J , *et al.* 2017. Direct uptake of HCO₃⁻ in the marine angiosperm *Posidonia oceanica* (L.) Delile driven by a plasma membrane H⁺ economy. *Plant Cell and Environment* , 40(11) : 2820-2830.
- Stokes T R , Griffiths P A. 2019. An overview of the Karst areas in British Columbia. *Geoscience Canada* , 46(1) : 49-66.
- Sun J W , Peng X J , Fan W H. 2014. Functional analysis of *BpDREB2* gene involved in salt and drought response from a woody plant *Broussonetia papyrifera*. *Gene* , 535(2) : 140-149.
- Tian W N , Braunstein L D , Pang J , *et al.* 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *The Journal of Biological Chemistry* , 273(17) : 10609-10617.
- Trapp S , McFarlane J C. 1995. Plant contamination: modelling and simulation of organic chemical processes. Boca Raton: Lewis.
- Weinstein L H , Davison A W. 2004. Fluorides in the environment. Wallingford , Oxon , UK: CABI Publishing.
- Yu M , Miller G. 1967. Effect of fluoride on the respiration of leaves from higher plants. *Plant and Cell Physiology* , 8(3) : 483-493.

(责任编辑 徐红)