

欧洲垂枝桦对 PEG 诱导干旱胁迫的响应机制

摘要:【目的】干旱是限制植物生长发育的重要非生物因素之一, 欧洲垂枝桦 (*Betula pendula* Roth) 原产欧洲, 1981年引种到辽东山区, 为探讨欧洲垂枝桦在干旱胁迫下的生理响应机制, 明确欧洲垂枝桦幼苗在干旱胁迫下各生长生理参数与光合特性的变化, 以综合评价欧洲垂枝桦幼苗对干旱胁迫的响应。【方法】本研究采用不同浓度的PEG-6000处理模拟干旱胁迫, 对胁迫后与复水后欧洲垂枝桦幼苗进行生长生理指标的测定和叶片解剖结构、气孔结构以及细胞器超微结构观察, 探寻欧洲垂枝桦对PEG浓度的最大阈值和抗旱能力。【结果】PEG浓度和胁迫时间的增加, 对欧洲垂枝桦幼苗的生长特性具有极显著影响 ($p < 0.01$); 抗氧化酶活性、膜脂过氧化与渗透调节物质浓度随胁迫浓度增加和胁迫时间的延长而增加且具极显著差异 ($p < 0.01$); 光合参数与光合色素随胁迫浓度增加和胁迫时间的延长而极显著降低 ($p < 0.01$); 不同PEG浓度处理下幼苗叶片解剖结构变化较为明显, 并且幼苗叶片平均气孔长度变化具有显著影响 ($p < 0.05$), 对气孔平均结构变化具有极显著影响 ($p < 0.01$)。【结论】欧洲垂枝桦从生长生理响应到解剖结构, 气孔结构以及细胞器超微结构的变化中不难体现其对于干旱环境做出的积极响应, 具有极高的可塑性, 也预示着欧洲垂枝桦在干旱环境下具有良好的驯化能力, 未来对于欧洲垂枝桦的抗性研究与造林技术推广, 都可以使其更好的适应极大部分地区, 为当地带来更大的经济价值和发展可持续林业奠定基础。

关键词: 欧洲垂枝桦; PEG 处理; 干旱胁迫; 生理响应机制

Response mechanism of European birch to PEG-induced drought stress

Abstract: 【Objective】 Drought is one of the important abiotic factors limiting plant growth and development, *Betula pendula* Roth is native to Europe and introduced to the mountains of eastern Liaoning in 1981, in order to explore the physiological response mechanism of European weeping birch under drought stress, to clarify the changes of growth physiological parameters and photosynthetic characteristics of European weeping birch seedlings under drought stress, so as to comprehensively evaluate the response of European weeping birch seedlings to drought stress. 【Methods】 In this study, different concentrations of PEG-6000 were used to simulate drought stress, and the growth physiological indexes and leaf anatomy, stomatal structure and organelle ultrastructure of European weeping birch seedlings after stress and rehydration were determined, and the maximum threshold value and drought resistance of European weeping birch on PEG concentration were explored. 【Results】 The increase of PEG concentration and stress time had a significant effect on the growth characteristics of European weeping birch seedlings ($p < 0.01$). The activity of antioxidant enzymes, membrane lipid peroxidation and osmomodulator concentrations increased with the increase of stress concentration and the prolongation of stress time, and there were significant differences ($P < 0.01$). The photosynthetic parameters and photosynthetic pigments decreased significantly with the increase of stress concentration and the extension of stress time ($P < 0.01$). The changes in leaf anatomy were obvious under different PEG concentration treatments, and the change of average stomatal length of seedling leaves had a significant effect ($p < 0.05$) and a significant effect on the average stomatal structure change ($p < 0.01$). 【Conclusion】 It is not difficult to reflect its positive response to arid environment from the physiological response of growth to the changes of anatomical structure, stomatal structure and organelle ultrastructure, with extremely high plasticity, and also indicates that European birch has good training ability in arid environment, and the future research on resistance and afforestation technology promotion of European weeping birch can make it better adapt to most areas, and lay the foundation for the local area to bring greater

economic value and develop sustainable forestry.

Keywords: European weeping birch; PEG treatment; drought stress; Physiological response mechanisms

干旱胁迫是限制植物生长发育重要的非生物因素之一,随着全球气温逐年上升导致陆地大部分森林经历干旱环境,并持续影响树木的生长发育和繁殖(Li et al., 2022; Semerci et al., 2017; Bréda et al., 2006)。此外,干旱也会影响森林更新,干旱环境会加剧树木的非生物性应激,使其更容易受到水分缺失而死亡(Ruehr et al., 2016; Anderegg, 2015)。近些年来,人们为改善干旱半干旱地区环境,大规模的进行抗旱树种选择培育与推广,因此抗旱林木新品种的选育迫在眉睫,这也是成功推广应用抗旱树种的关键(Wang et al., 2012; Jacobs et al., 2015; Lu et al., 2018; McDowell et al., 2013)。

树木在胁迫环境下能够通过自身对环境的响应建立起抗氧化防御系统(Ahmad et al., 2019; Wang et al., 2019)。由于干旱会加快植物细胞内自由基的积累,产生更高浓度的活性氧加快植物衰老死亡(Yang et al., 2021; Nadarajah, 2020),而植物体内叶绿素含量也会因胁迫导致其合成速度减慢或分解速度加快而迅速降低(Lourkisti et al., 2021; Ashraf, 2013)。为了抵御逆境带来的伤害,植物会激活自身反应机制,调整其生理活动以应对缺水环境(Ruehr et al., 2014; Berner et al., 2017),从而对所处的胁迫环境做出一系列响应,如水分转移,渗透调节物质合成(Li et al., 2022; Liu et al., 2011; Lei et al., 2006),抗氧化酶活性增高,抗旱基因的表达以缓解干旱胁迫所导致的伤害(Ahmed et al., 2009; Basu et al., 2016; Bhusal et al., 2020),植物叶片的光化学反应也会进行相应的下调(Ameye et al., 2012; Baquedano et al., 2006)。除此之外,干旱胁迫的环境下会对植物的生长性状造成影响(Anjum et al., 2011),在超微结构下可见植物叶片细胞器结构逐渐变形裂解并且数量和 也会有所改变(Shao et al., 2016; Oustric et al., 2019)。

欧洲垂枝桦具有较强的适应性,可作为园林绿化观赏林(Tabatskaya et al., 2020; Giagli et al., 2019)、防风驻沙、水土保持防护林大范围推广应用,但目前对欧洲垂枝桦及其干旱胁迫的研究相对较少,很多干旱半干旱地区没有关于欧洲垂枝桦的引种和实际应用,导致欧洲垂枝桦种质资源的发展和推广应用受到限制(Pääkkönen et al., 1998)。因此,本研究利用 PEG 模拟自然干旱法对欧洲垂枝桦幼苗进行干旱胁迫和复水试验,探讨欧洲垂枝桦幼苗在经受干旱胁迫和复水后,幼苗生长与抗逆生理、光合特性和叶片解剖结构、微结构、超微结构特征,进一步明确欧洲垂枝桦苗木在经历干旱胁迫过程中做出的一系列生理响应机制。该研究成果为欧洲垂枝桦的抗旱新品种选育奠定研究基础,为该树种的园林绿化应用和全国抗旱新品种推广提供理论依据。

1 研究方法

1.1 材料

试验所需欧洲垂枝桦幼苗为实生播种繁殖获得。将种子播种在经高温高压灭菌后的营养土:珍珠岩:蛭石=4:1:1 的基质中,约 2 周左右发芽长出 2-3 片嫩叶后将其移栽至口径 15cm×12cm×13cm 的育苗钵中,钵内土壤重量统一控制在 400g,并且在具有恒定气温(25℃)湿度(60%)和 12h 光照的育苗室中继续培养。

1.2 方法

欧洲垂枝桦幼苗长至 20cm 以上高时进行 PEG 模拟干旱胁迫试验。实验设计 6 组 0%、5%、10%、15%、20%、25%不同浓度的 PEG 溶液进行胁迫处理,其中 0%PEG 浓度为对照组,其余 5 组为胁迫处理

组, 每个处理生物学重复 3 次, 每个重复 10 株幼苗, 试验共需 180 株欧洲垂枝桦幼苗。自 2022 年 10 月-12 月进行胁迫实验, 配制 5 种浓度 PEG 溶液, 每日浇 50mL 至相对应浓度的欧洲垂枝桦幼苗钵中, 对照组浇 50mL 水, 及时记录幼苗生长与叶片形态变化并拍照, 在胁迫实验的第 10d 和第 20d 采集各处理苗木相同位置的叶片, 锡箔纸包裹后放入液氮速冻至-80℃冰箱中保存, 备用。胁迫 20d 后, 进行复水实验。胁迫实验结束后, 将所有处理组的复水量恢复至与对照组相同, 在复水后的第 10d 和 20d 取样, 方法同上。

1.3 生长参数测定

在胁迫开始前一天对 6 组处理的欧洲垂枝桦幼苗进行生长量测定, 胁迫后在每次取样前再次测量, 共测量四次。根据 Han et al. (2022) 的方法记录苗高、地径与生物量并计算出根冠比。

1.4 抗氧化酶活性测定

利用不同浓度 PEG 溶液处理后的第 10d、20d 和复水后的第 10d、20d 所取的叶片混合样本进行抗氧化酶活性测定, 称取约 0.1g 叶片混合样品, 用 0.05mol/L 预冷的磷酸缓冲溶液在冰浴下研磨匀浆, 15000rpm 离心 15mins, 上清液为酶粗提取液。根据 Giannopolitis et al. (1977) 的方法在 560nm 处测定 SOD 活性, 根据 Nakano et al. (1981) 的方法在 470nm 测定 POD 活性, 根据 Zeng et al. (2019) 的方法在 240nm 处测定 CAT 活性。

1.5 光合性状测定

采用便携式光合作用系统(型号 LI-6400, LI-COR 股份有限公司, Lincoln, NE)通过光合成光子通量密度确定最大光合速率 (Giannakoula et al., 2021), 在 8:00-12:00 之间测定净光合速率 (Pn)、气孔导度 (Gs)、蒸腾速率 (Tr)、胞间 CO₂ 浓度 (Ci) (Iqbal et al., 2019)。

光合色素含量测定方法参照 Wilson et al. (2000) 的方法。

1.6 膜脂过氧化与渗透调节物质测定

MDA 含量测定参考 Johnston J W et al. (2007) 的方法进行测定。

游离脯氨酸测定参考 Bates L S et al. (1973) 的方法进行测定。

1.7 叶片解剖结构、气孔形态、细胞器观察

叶片解剖结构采集不同浓度 PEG 处理 10d 后的欧洲垂枝桦幼苗叶片, 将叶片切成约 5mm×5mm 的小块, 用 FAA 固定 24h 以上, 酒精梯度脱水并包埋石蜡制作切片, 显微镜下观察胁迫后叶片解剖结构。

叶片气孔形态观测样品的处理方法参照 Raza et al. (2020) 的方法, 略作修改, 最后利用 Regulus8100 扫描电镜进行气孔观察。

叶片细胞器结构参照 Kong et al. (2013) 的方法制备叶片样品, 并略作修改, 最后利用 Hitachi TEM system 进行细胞器观察。

1.8 数据处理与分析

所有获得的数据采用 Microsoft Excel 2010 进行分类统计与多项式分析, SPSS22.0 软件进行差异显著性检验与相关性分析, 显著水平设为 $p < 0.05$, 极显著水平设为 $p < 0.01$, 表中所有数据均以平均值±标准差的形式展现。

2 结果与分析

2.1 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗生长性状的影响

表 1 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗高生长的影响

Table 1 Effects of Different PEG Concentrations on the Height Growth of European *Betula platyphylla* Seedlings

Treatment concentration	Seedling Height /cm				Relative Increase	Relative Increase	Relative Increase
	10d	20d	30d	40d	20d	30d	40d
CK	27.73±0.45a	37.56±2.25a	45.67±1.12a	48.33±1.20a	34.36%	64.69%	74.28%
T1	25.63±1.47b	34.53±0.97b	40.50±0.79b	44.21±1.63b	34.72%	58.00%	72.49%
T2	24.17±0.43bc	32.00±1.68c	37.97±0.56c	40.30±0.75c	32.39%	57.09%	66.73%
T3	23.36±0.82cd	29.64±1.42c	33.67±1.85d	38.06±0.49d	26.88%	44.13%	62.29%
T4	22.23±0.73d	25.68±0.41d	30.43±0.76e	33.33±1.84e	15.52%	36.88%	49.93%
T5	22.36±0.70d	23.67±0.85d	28.52±1.21e	32.26±0.35e	5.86%	27.54%	44.27%

注：同一列小写字母不同表示相同时间下不同处理浓度的极显著差异（ $p < 0.01$ ）。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate highly significant differences between treatment concentrations at the same time ($p < 0.01$).

表 2 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗地径生长的影响

Table 2 Effects of Different PEG Concentrations on the Ground Diameter Growth of European *Betula platyphylla*

Treatment concentration	Diameter /mm				Relative Increase	Relative Increase	Relative Increase
	10d	20d	30d	40d	20d	30d	40d
CK	2.85±0.13a	4.49±0.16a	5.99±0.15a	7.03±0.11a	57.54%	110.17%	146.66%
T1	2.76±0.04ab	4.14±0.11b	5.54±0.11b	6.76±0.23b	50.00%	100.07%	144.92%
T2	2.59±0.07bc	3.74±0.12c	4.86±0.12c	5.85±0.15c	44.40%	87.64%	125.87%
T3	2.58±0.21bc	3.21±0.14d	4.14±0.14d	5.07±0.06d	24.42%	60.47%	96.51%
T4	2.37±0.12cd	2.94±0.09e	3.55±0.17e	4.49±0.13e	24.05%	49.78%	89.45%
T5	2.24±0.07d	2.56±0.07f	3.23±0.16f	4.08±0.04f	14.28%	44.19%	82.14%

注：同一列小写字母不同表示相同时间下不同处理浓度的极显著差异（ $p < 0.01$ ）。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate highly significant differences in the concentrations of different treatments at the same time ($p < 0.01$).

表 3 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗生物量的影响

Table 3 Effects of Different PEG Concentrations on the Biomass of European Betula platyphylla

C	Biomass/g·Plant-1							
	The Aboveground Part/g·Plant-1				The Underground Part/g·Plant-1			
	10D	20D	30D	40D	10D	20D	30D	40D
	5.619	6.646	7.249	8.201±0	3.010±0	3.616±	4.161±	4.565±0.12
K	±0.124a	±0.486a	±0.345a	.305a	.319b	0.273a	0.127a	1a
	5.870	5.524	6.256	7.975±0	2.379±0	2.719±	4.233±	4.480±0
1	±0.262a	±0.303b	±0.341b	.911a	.164d	0.234b	0.123a	.017a
	4.452	4.206	5.853	6.222±0	2.611±0	2.886±	2.709±	4.455±0
2	±0.211b	±0.563c	±0.169b	.198b	.833cd	0.034b	0.287b	.106a
	4.697	2.719	3.755	5.682±0	3.473±0	2.338±	2.579±	3.691±0
3	±0.214b	±0.155d	±0.236c	.141c	.107a	0.155c	0.081b	.148b
	3.703	2.195	2.223	4.383±0	2.892±0	2.029±	1.352±	2.637±0
4	±0.236c	±0.170d	±0.127d	.188d	.013bc	0.136c	0.075c	.087c
	2.793	2.181	3.119	3.871±0	2.426±0	2.275±	2.492±	3.200±0
5	±0.208d	±0.176d	±0.225e	.141e	.081d	0.085c	0.167b	.265d

注：同一列小写字母不同表示相同时间下不同处理浓度的极显著差异（ $p < 0.01$ ）。TC：处理时间

Note: Different lowercase letters in the same column indicate highly significant differences between treatment concentrations at the same time ($p < 0.01$). TC: treatment time

表 4 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗根冠比的影响

Table 4 Effects of different PEG concentration treatments on root crown ratio of European weeping birch

Treatment concentration	Root-Crown Ratio			
	10	20	30	40
CK	0.535±0.04c	0.544±0.005c	0.575±0.037c	0.557±0.035d
TI	0.406±0.03d	0.492±0.043c	0.677±0.028bc	0.563±0.043cd
T2	0.599±0.05c	0.694±0.092b	0.462±0.037d	0.716±0.036b
T3	0.740±0.02b	0.860±0.049a	0.689±0.063b	0.649±0.024bc
T4	0.783±0.05b	0.927±0.091a	0.610±0.060bc	0.602±0.042cd
T5	0.871±0.06a	0.923±0.076a	0.802±0.086a	0.827±0.085a

注：同一列小写字母不同表示相同时间下不同处理浓度的极显著差异（ $p < 0.01$ ）。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate highly significant differences between treatment concentrations at the same time ($p < 0.01$).

通过对植物在经历干旱胁迫时的生长变化分析，为了解植物在全株水平上对水分亏缺所做出的响应具有重要意义。由于干旱使植物体内水分紧张，从而导致植物叶片的碳同化速率降低，不能正常为植物生长提供养分，因此降低了植物的生长速度。大多数研究表明，树木生长随着干旱胁迫时间和程度的增加，其苗高、地径、生物量都会受到显著影响而逐渐降低，但根冠比会相对增加。由于干旱使植物体内水分紧张，从而导致植物叶片的碳同化速率降低，欧洲垂枝桦幼苗将大部分的能量和养分供应集中于对干旱环境的抵抗中，因此不能正常为植物生长提供养分，从而降低了植物的生长速度。欧洲垂枝桦幼苗的苗高(Table 1)地径(Table 2)的生长量、生物量(Table 3)的积累量都会随胁迫浓度增大和胁迫时间的延长而逐渐减小，水分的亏缺，会使幼苗的根茎不断向土壤深处生长以获得更多的水分供其存活，同时苗高的生长限制使地上部分的生物量积累逐渐减小，因此干旱胁迫会使幼苗的根冠比(Table 4)增加。相同胁迫时间不同 PEG 处理浓度对幼苗的苗高、地径、生物量和根冠比都具有极显著影响（ $p < 0.01$ ）。

2.2 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗抗氧化酶活性的影响

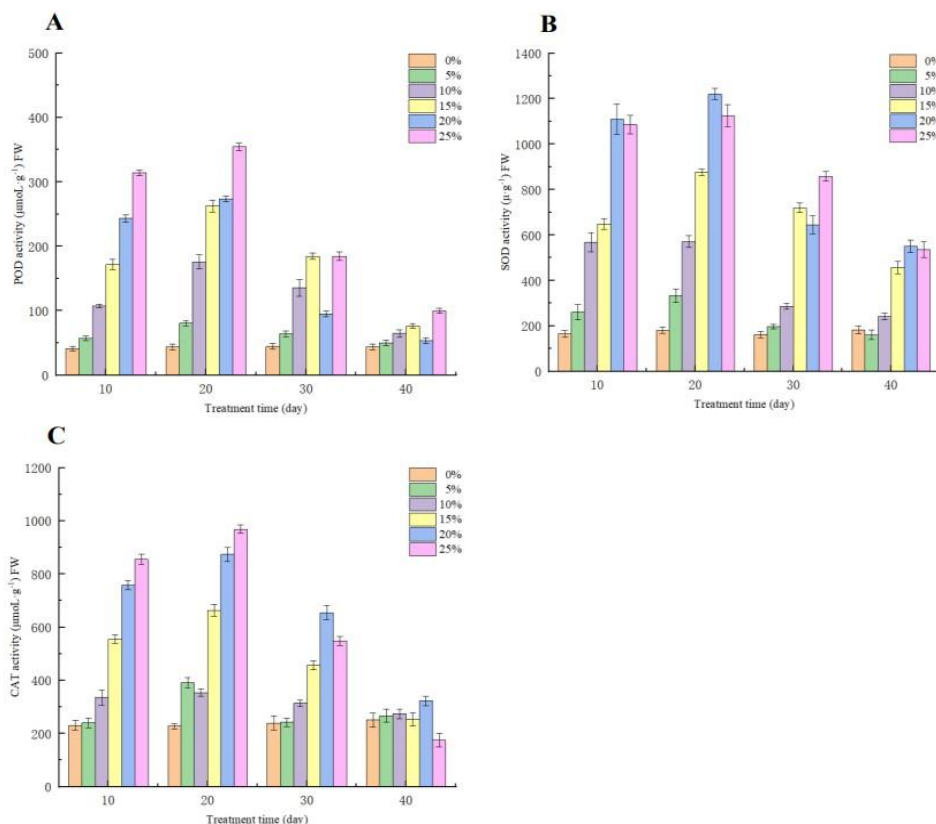


图1 不同PEG浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗抗氧化酶活性的影响

Figure 1 Effect of Different PEG Concentrations on Antioxidant Enzyme Activity of European *Betula platyphylla*

A: POD B: SOD C: CAT

植物在经历干旱环境时会在叶绿体内大量积累活性氧，从而引起氧化应激反应，为了防止其进一步对细胞氧化，植物会合成大量抗氧化酶来清除活性氧，因此，具有高抗氧化酶诱导能力的植物就会表现出更高的抗旱能力。不同浓度PEG诱导的干旱胁迫在不同处理时间对幼苗抗氧化酶活性具有极显著影响 ($p < 0.01$)，在处理10d后，POD活性随着PEG浓度的增加而呈升高，T5处理组在第20d时达到最大354.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (见图1A)。同样，在胁迫处理的第10d和第20d，所有PEG诱导的干旱处理幼苗的SOD和CAT活性均呈增加趋势 (图1B, C)。在胁迫第20d时T4组幼苗的SOD活性达到最高为1219.89 $\mu\cdot\text{g}^{-1}$ ；T5处理组的CAT活性达到最高为968.97 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 。从图1中也可以看出在最高浓度 (25%PEG) 处理组胁迫的第20d时，POD与CAT的活性仍成上升趋势，说明幼苗可以承受更高的胁迫浓度，具有较强的抗旱性；随着复水实验的进行，幼苗可以对干旱引起的一系列问题进行自我修复，体内氧化物的合成与积累也逐渐降低，所以在复水后的第10d开始各处理组幼苗的抗氧化酶活性开始呈现降低趋势。在复水第20d时，T5处理组幼苗的抗氧化酶活性与其最高时相比，其POD、CAT和SOD酶活性分别下降了254.79、794.12 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ 和588.79 $\mu\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.3 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗光合参数的影响

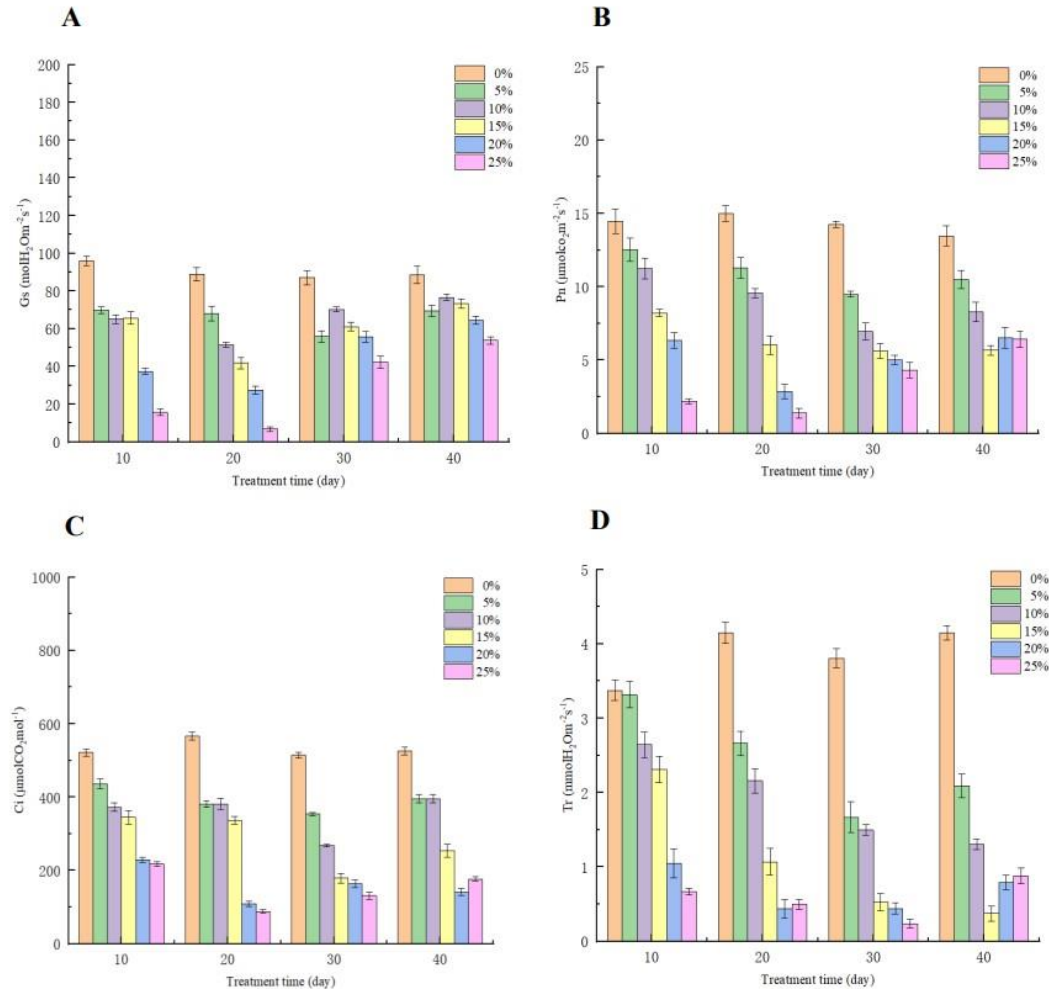


图 2 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗光合参数的影响

Figure 2 Effect of Different PEG Concentrations on Photosynthetic Parameters of European *Betula platyphylla*

A: 气孔导度 B: 净光合速率 C: 胞间 CO_2 浓度 D: 蒸腾速率

光合作用对植物的整个生长发育繁殖过程都极为重要，它是植物进行生理活动与生化反应的能量供应所，干旱胁迫导致叶片受损，气孔闭合，因此植物的光合作用也会受到抑制，光合参数的数值也会降低。干旱胁迫下光合参数的变化可以反映幼苗在胁迫环境下对光合作用不同环节的调节与分配。干旱环境下幼苗叶片内所有细胞器均会受到不同程度的损伤，而叶片最重要的功能便是进行光合作用，这使得欧洲垂枝桦幼苗的光合作用会受到影响，由于胁迫的浓度越大，叶片受损程度越严重，因此气孔导度（图 2A）、净光合速率（图 2B）、胞间 CO_2 浓度（图 2C）和蒸腾速率（图 2D）都会随其逐渐降低，并且因为细胞器的损伤是不可逆的，在对幼苗进行复水实验后，光合参数在一定程度上有所恢复，但并没有恢复至原始水平。不同 PEG 浓度胁迫对幼苗光合参数的影响具有极显著差异（ $p<0.01$ ）。

2.4 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗光合色素的影响

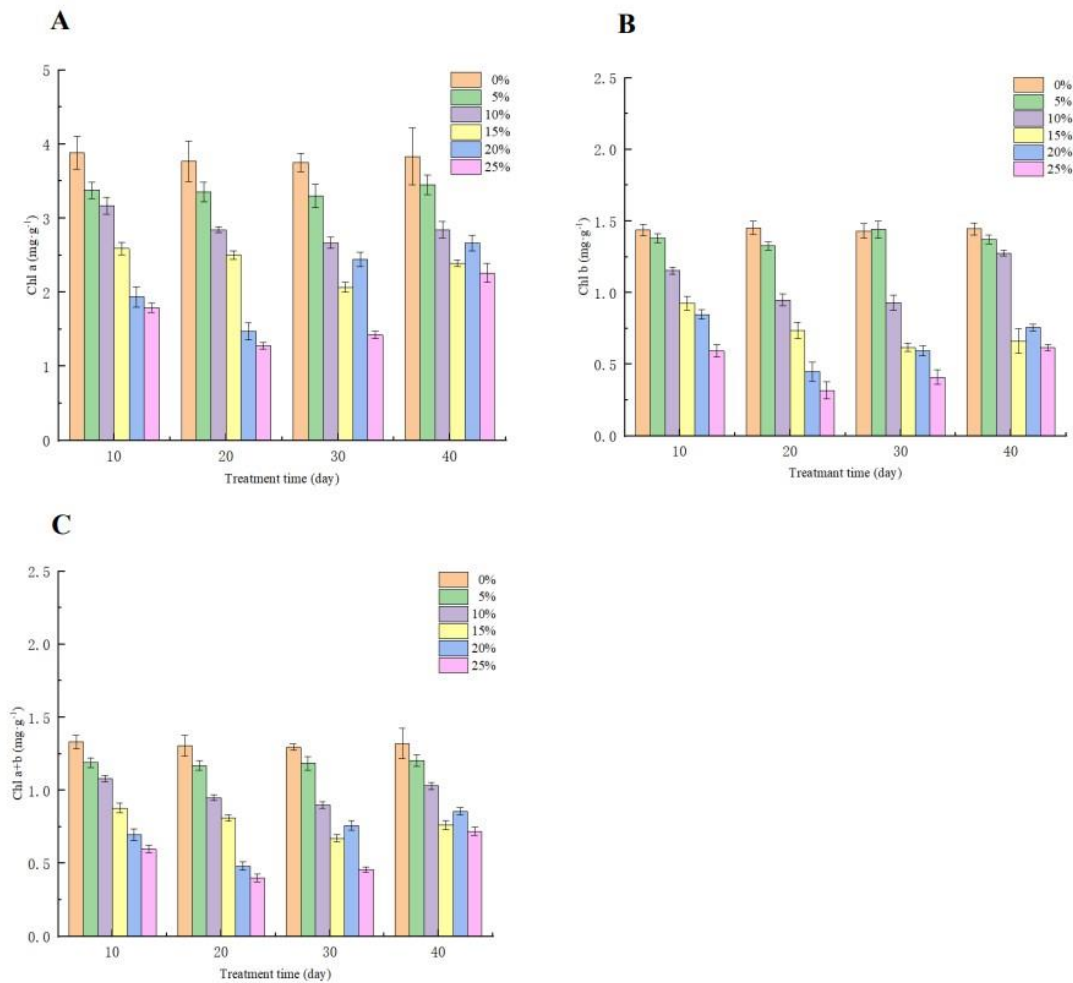


图 3 不同 PEG 浓度对欧洲垂枝桦幼苗光合色素的影响

Figure 3 Effect of Different PEG Concentrations on Photosynthetic Pigments of European *Betula platyphylla*

A: 叶绿素 a 含量 B: 叶绿素 b 含量 C: 叶绿素含量

欧洲垂枝桦幼苗的生长与代谢需要大量功能物质，而养分的积累又与光合作用密切相关，光合色素是幼苗吸收光能并对其进行转化与利用，参与光合作用的重要成分，光合色素含量的多少以及在幼苗经历逆境胁迫时含量的变化，决定其能否为植株提供能量转化和利用的关键，本实验研究结果表明 PEG 诱导干旱胁迫对欧洲垂枝桦幼苗的光合色素具有极显著影响 ($p < 0.01$)。叶绿素 a (图 3A)、叶绿素 b (图 3b)、叶绿素含量 (图 3c) 在相同时间不同处理浓度下，PEG 浓度越高，含量越低并且下降值越大；值得注意的是，在复水第 10d 时 5%PEG 处理下叶绿素 b 含量较对照组有所升高，说明轻度的干旱胁迫可以促进叶绿素 b 的合成。

2.5 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗渗透调节物质的影响

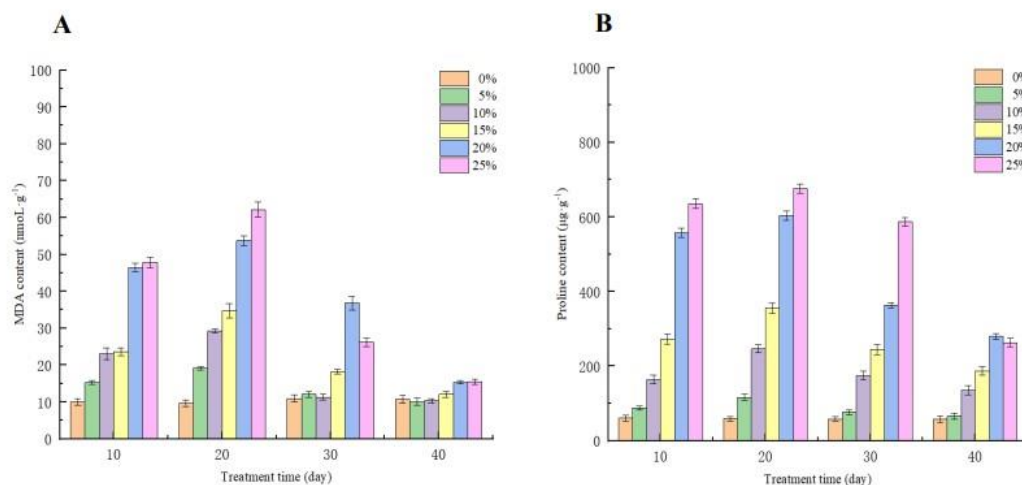


图4 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗渗透调节物质的影响

Figure 4 Effect of Different PEG Concentrations on Osmotic Regulating Substances in European *Betula platyphylla*

A: MDA 含量 B: 游离脯氨酸含量

细胞内自由基的产生与消除在正常情况下处于动态平衡状态,但由于干旱胁迫或其他逆境影响,植物叶片细胞受损,细胞膜的渗透性增加,这种动态平衡会被打破,导致植物细胞体发生过氧化反应,MDA 是植物过氧化反应的最终产物,它会使植物细胞内的蛋白质等大分子物质交联聚合,因此其含量的变化常被用作植物衰老生理和抗性生理的研究。从图 4 可以看出:不同 PEG 浓度处理干旱胁迫后对幼苗 MDA 和脯氨酸含量的变化具有极显著的影响 ($p < 0.01$),丙二醛为膜脂过氧化产物,脯氨酸作为渗透调节物质,PEG 干旱胁迫处理后,这两种物质的含量均有所增加(图 4A、B);胁迫第 10d 时除对照组外两种物质含量随 PEG 浓度的增加而增加,T4 处理组幼苗的 MDA 含量较 T3 组增加了 $22.85\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$,游离脯氨酸含量增加了 $285.98\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。T5 处理组幼苗的 MDA 含量在经历复水后迅速下降,并在复水后第 20d 时各处理组较对照组含量趋于稳定,接近对照组水平,而游离脯氨酸含量却在复水 10d 时下降的较少,但在 20d 时下降至 $263.41\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.6 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗叶片解剖结构的影响



图5 不同 PEG 浓度处理 20d 后幼苗叶片形态特征

Figure 5 Morphological characteristics of leaves treated with different PEG concentrations for 20 days

从图 5 可以看出,不同浓度的 PEG 干旱胁迫对欧洲垂枝桦幼苗的叶片形态产生了明显影响。PEG 处理 20d 后,与 CK 组相比,幼苗叶片颜色和形状都发生了变化。在 T2 处理组中叶缘颜色开始变浅,叶脉延伸的周围出现褶皱收缩,T3 处理组下叶缘开始变为褐色,叶片颜色由深变浅并且逐渐向内部延伸,

更高浓度的 PEG 处理下，上述症状更加严重，特别是 T5 处理组幼苗的叶片表现出干枯卷曲接近死亡边缘。

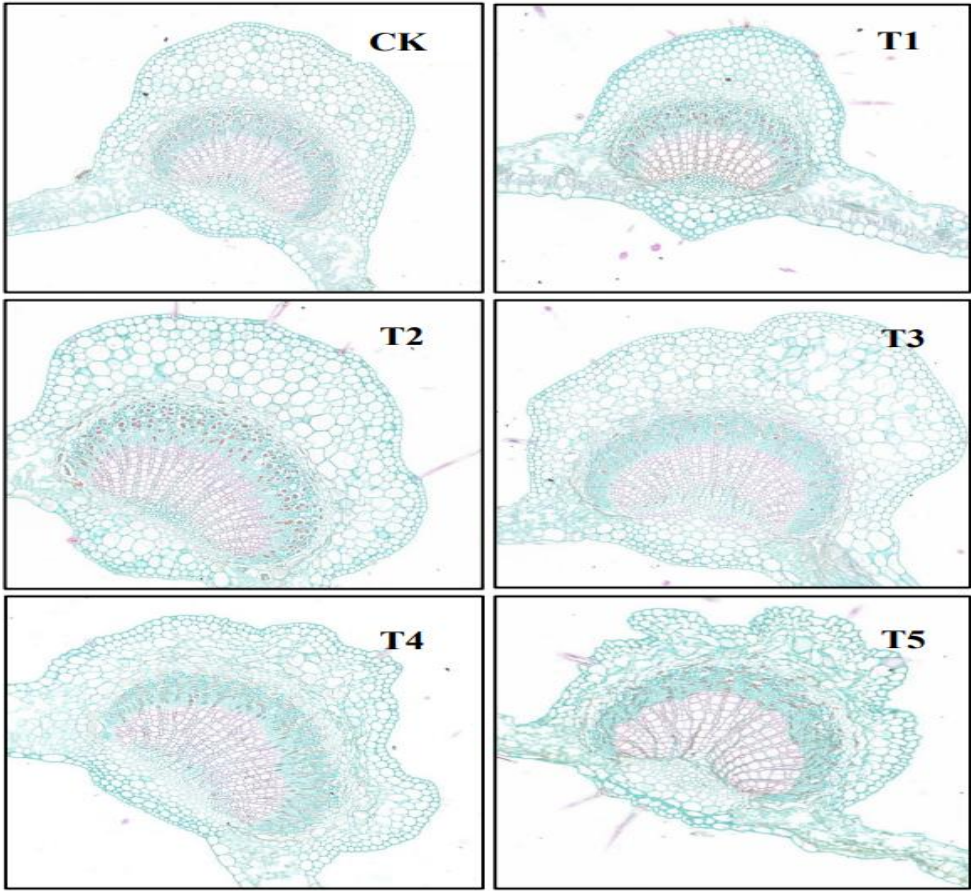


图 6 不同 PEG 浓度处理 20d 后幼苗叶片解剖结构特征

Figure 6 Anatomical structural characteristics of leaves treated with different PEG concentrations for 20 days

从图 6 幼苗叶片解剖结构图可以看出：对照组中幼苗叶片解剖结构的表皮细胞排列紧密，形态饱满完整，随着 PEG 浓度的增加，叶片皮层细胞开始出现褶皱，形成层细胞形态逐渐被压缩堆叠，在 T5 处理组中很难区分形成层细胞。

表5 不同PEG浓度处理20d后幼苗叶片解剖结构参数变化特征

Table 5 Changes in leaf anatomical structure parameters after 20 days of treatment with different PEG concentrations

Anatomical Structure Index	PEG Concentrations					
	CK	T1 (5%)	T2	T3	T4	T5
	(0%)		(10%)	(15%)	(20%)	(25%)
UE/ μ	25.64 $\pm$ 0.86	23.17 $\pm$ 0.5	20.08 $\pm$ 0.7	19.28 $\pm$ 0.4	16.19 $\pm$ 0.2	13.07 $\pm$ 0.
m	a	3b	8c	8c	6d	65e
LT/ μ	11.78 $\pm$ 0.35	10.48 $\pm$ 0.5	9.24 $\pm$ 0.45	7.24 $\pm$ 0.53	5.50 $\pm$ 0.44	4.84 $\pm$ 0.2
m	a	8b	c	d	e	0e
PT/ μ	22.99 $\pm$ 0.61	21.90 $\pm$ 0.7	19.30 $\pm$ 1.2	17.94 $\pm$ 0.4	15.02 $\pm$ 0.7	13.03 $\pm$ 0.
m	a	6a	1b	3b	0c	84d
ST/ μ	46.60 $\pm$ 0.73	42.71 $\pm$ 0.5	37.55 $\pm$ 0.9	35.53 $\pm$ 0.7	30.59 $\pm$ 0.8	28.18 $\pm$ 0.
m	a	4b	6c	2d	4e	68f

P/S/ μm	0.49±0.01a b	0.51±0.01 a	0.51±0.02 a	0.50±0.02 ab	0.49±0.03 ab	0.46±0.0 2b
LT/μ m	105.25±0.7 7a	98.38±0.4 5b	87.94±0.5 3c	78.92±0.5 1d	66.64±0.6 3e	58.72±0. 365f
VD/ μm	436.90±0.1. 47a	426.35±2. 46b	406.32±2. 02c	376.37±2. 00d	340.66±1. 54e	310.32±1 .03f

注：UE：上表皮；LE：下表皮；PT：栅栏组织；ST：海绵组织；LT：叶片厚度；VD：静脉直径（ $p<0.01$ ）。

Note: UE: upper epidermis; LE: lower epidermis; PT: fenestrated tissue; ST: spongy tissue; LT: leaf thickness; VD: vein diameter ($p < 0.01$).

从表5可以看出：不同PEG浓度处理与欧洲垂枝桦幼苗叶片栅栏组织与海绵组织比无显著差异。但PEG诱导的干旱胁迫极显著降低了上表皮厚度、海绵组织厚度、叶片厚度、叶脉直径（ $p<0.01$ ）。与CK组相比，T1、T2、T3和T4处理组的叶片厚度分别降低了6.87μm、17.31μm、26.22μm、38.61μm和46.53μm。

2.7 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗叶片气孔形态的影响

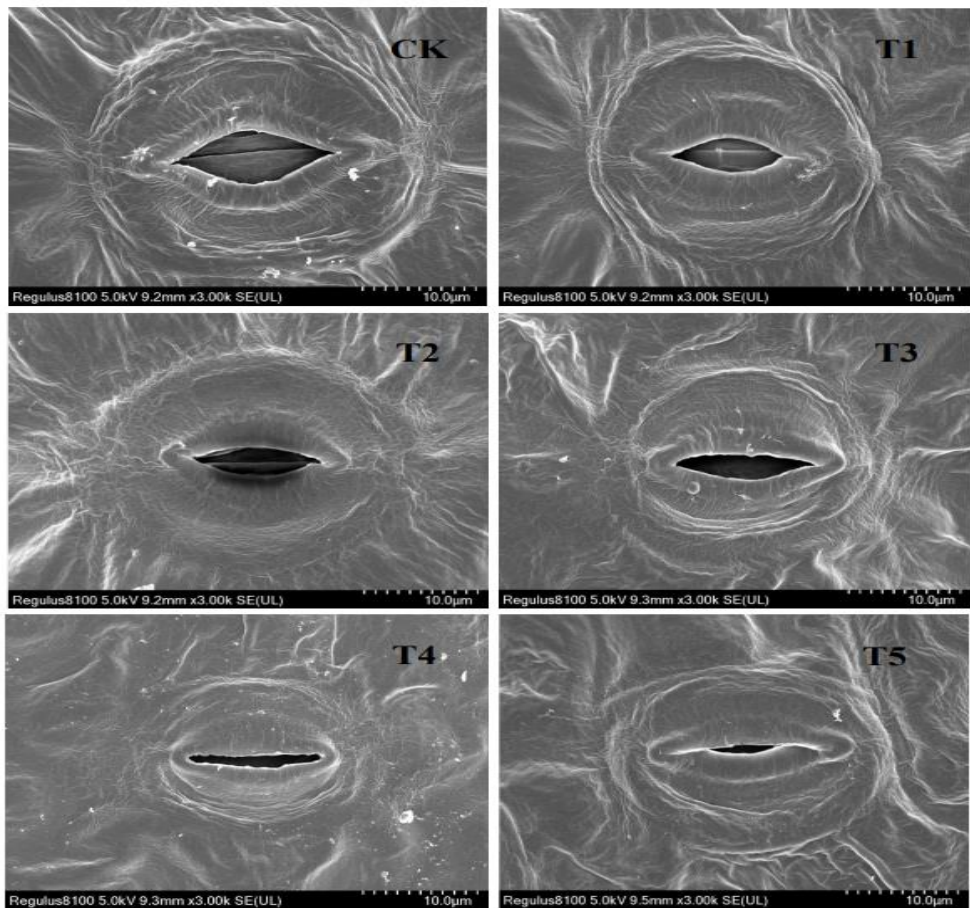


图 7 不同 PEG 浓度处理 20d 后幼苗叶片气孔特征

Figure 7 Stomatal characteristics after 20 days of treatment with different PEG concentrations

从图7可以看出：不同浓度PEG诱导的干旱胁迫影响了欧洲垂枝桦幼苗叶片的气孔特征，气孔仅出现在幼苗的下表皮，较高浓度的PEG处理导致幼苗叶片气孔几乎闭合。

表6 不同PEG浓度处理20d后幼苗叶间平均气孔结构变化特征

Table 6 Characteristics of changes in average stomatal structure between leaves after 20 days of treatment with different PEG

Treatment concentration	concentrations			
	Stomatal Structure			
	Stomatal Length (μm)	Stomatal Width (μm)	Stomatal Aperture (μm)	Stomatal Density (NO·mm ⁻²)
CK	44.33±0.75ab	36.53±1.35ab	5.71±0.38a	56.33±1.52e
T1	43.53±0.92ab	37.56±0.70a	5.25±0.41ab	65.00±3.00d
T2	41.60±0.81bc	35.54±1.32b	5.04±0.10bc	75.67±1.53c
T3	44.23±1.42a	36.56±0.94ab	4.72±0.11c	86.67±2.08b
T4	42.6±1.05ab	33.60±0.95c	3.74±0.17d	92.33±1.52a
T5	39.96±1.35c	32.67±0.93c	1.75±0.22e	73.00±1.73c

注：Stomatal Length: 气孔长度 (p<0.05) Stomatal Width: 气孔宽度 (p<0.01) Stomatal Aperture: 气孔孔径 (p<0.01) Stomatal Density: 气孔密度 (p<0.01)。

Stomatal Length (p<0.05) ;Stomatal Width (p<0.01) ;Stomatal Aperture (p<0.01) ;Stomatal Density (p<0.01) .

从表 6 可以看出：不同 PEG 浓度处理对幼苗叶片间平均气孔长度具有显著性影响 (p < 0.05)，气孔宽度、气孔孔径与气孔密度呈极显著差异 (p < 0.01)。其中变化最明显的是叶片气孔孔径，与对照相比，不同胁迫处理的幼苗叶片气孔孔径随着 PEG 处理浓度的增加呈现逐渐下降趋势，在 T5 处理组时下降最大为 3.96μm。

2.8 不同 PEG 浓度处理对欧洲垂枝桦幼苗叶片细胞器超微结构的影响

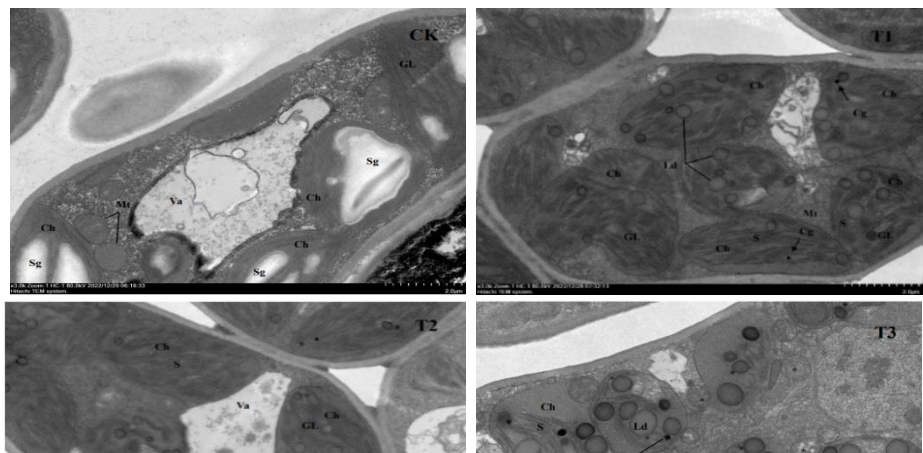


图 8 不同 PEG 浓度处理 20d 后幼苗叶片细胞器超微结构特征

Figure 8 Ultrastructural characteristics of organelle after 20 days of treatment with different PEG concentrations

Va: 液泡 Ch: 叶绿体 Sg: 淀粉粒 Mt: 线粒体 GL: 基粒片层 Cg: 噬饿颗粒 Ld: 脂滴 S: 基质片层 *: 裂解的线粒体

细胞器的结构和数量与植物的生长代谢密切相关，不同浓度的 PEG 处理会影响细胞器的结构和数量。从图 8 可以看出：对照组幼苗叶片的栅栏组织叶肉细胞形态完整，液泡充盈；叶绿体体积较大，成扁平或椭圆状，在叶绿体内部有较多类囊体分布且形态清晰，排列有序，图中也可以看到很多淀粉粒分布在叶绿体中；线粒体呈现圆球状，形态完整规则。而经过 PEG 干旱胁迫后发现，随着 PEG 处理浓度的增加，幼苗叶片的叶绿体形态逐渐变为球形，在 T2 到 T3 处理中，线粒体的数量明显增加，叶绿体内产生了更多的脂滴与噬饿颗粒，并且从 T3 组开始线粒体开始逐渐解体，在 T4 和 T5 处理组中可以明显观察到细胞膜萎缩，叶绿体和线粒体已经完全裂解，细胞内视野模糊，观察不到完整的细胞器结构。

2. 9 幼苗抗氧化酶与叶片解剖结构参数的相关性分析

表7 抗氧化酶活性与幼苗叶片解剖结构的Pearson相关系数

Table 7 Pearson correlation coefficient between antioxidant enzyme activity and leaf anatomical structure

Enzyme Activity	Anatomical Structure Index (n = 18)						
	UE	LE	PT	ST	P/S	LT	VD
POD	-	-	-	-	-	-	-
	0.959**	0.969**	0.960**	0.971**	0.428ns	0.978**	0.962**
SOD	-	-	-	-	-	-	-
	0.936**	0.975**	0.945**	0.966**	0.366ns	0.972**	0.952**
CAT	-	-	-	-	-	-	-
	0.933**	0.968**	0.942**	0.942**	0.460ns	0.969**	0.977**

注: **表示p<0.01时显著, ns表示不显著。SOD: 超氧化物歧化酶; POD: 过氧化物酶; CAT: 过氧化氢酶; UE: 上表皮; LE: 下表皮; PT: 栅栏组织; ST: 海绵组织; P/S: 栅栏组织/海绵组织; LT: 叶厚; VD: 静脉直径

Note: ** indicates significant at p < 0.01, ns indicates not significant. SOD: superoxide dismutase; POD: peroxidase; CAT: catalase; UE: upper epidermis; LE: lower epidermis; PT: fenestrated tissue; ST: spongy tissue; P/S: fenestrated tissue/spongy tissue; LT: leaf thickness; VD: vein diameter

对抗氧化酶活性和叶片解剖结构参数进行Pearson相关性分析，从表7可以看出：胁迫后20d幼苗的

POD、SOD与CAT活性与叶片的上表皮、下表皮、栅栏组织、海绵组织、叶片厚度和静脉直径呈极显著负相关；与栅栏组织和海绵组织比不相关。

4 结论

PEG诱导的干旱胁迫对欧洲垂枝桦幼苗生长、生理、叶片解剖结构以及平均气孔结构具有极显著影响 ($p < 0.01$)。且随着PEG浓度的增加,欧洲垂枝桦主要通过减缓苗高地径的生长量、生物量,降低光合与蒸腾速率、叶片厚度和栅栏海绵组织比,增加根冠比、抗氧化酶活性、游离脯氨酸含量来适应干旱胁迫。在高浓度PEG处理下,叶片形态发生了改变,Pearson相关性分析表明,欧洲垂枝桦叶片结构与抗氧化酶活性存在极显著负相关。研究表明,不同物种间植物抗旱性会有所差异,并且各物种对干旱胁迫的反应也有所不同,但绝大多数耐旱性植物的抗氧化酶活性的显著增加是其抗旱能力强的表现,在干旱环境下抗氧化酶的变化也会更为活跃。近些年来通过对欧洲垂枝桦的基因、遗传组学以及生物和非生物胁迫的广泛研究,欧洲垂枝桦成为适应北方地区环境的模型树种,欧洲垂枝桦与绒桦在北欧都是极具商业价值的树种,但相较于绒桦,欧洲垂枝桦更适应于土壤较干燥的地区生长,其最佳生境是粉质土壤和细砂质土壤,因此欧洲垂枝桦具有较强的抗旱性。欧洲垂枝桦从生长生理响应到解剖结构,气孔结构以及细胞器超微结构的变化中不难体现其对干旱环境做出的积极响应,具有极高的可塑性,也预示着欧洲垂枝桦在干旱环境下具有良好的驯化能力,未来对于欧洲垂枝桦的抗性研究与造林技术推广,都可以使其更好的适应极大部分地区,为当地带来更大的经济价值和发展可持续林业奠定基础。

参 考 文 献

- Li C, Wan Y, Shang X et al. Responses of microstructure, ultrastructure and antioxidant enzyme activity to PEG-induced drought stress in *Cyclocarya paliurus* seedlings[J]. *Forests*, 2022, 13(6): 836.
- Semerci A, Semerci H, Çalışkan B, et al. Morphological and physiological responses to drought stress of European provenances of Scots pine[J]. *European journal of forest research*, 2017, 136: 91-104.
- Bréda N, Huc R, Granier A, et al. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences[J]. *Annals of Forest Science*, 2006, 63(6): 625-644.
- Ruehr N K, Gast A, Weber C, et al. Water availability as dominant control of heat stress responses in two contrasting tree species[J]. *Tree Physiology*, 2016, 36(2): 164-178.
- Anderegg W R L. Spatial and temporal variation in plant hydraulic traits and their relevance for climate change impacts on vegetation[J]. *New Phytologist*, 2015, 205(3): 1008-1014.
- Wang P, Yin L, Liang D, et al. Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate-glutathione cycle[J]. *Journal of pineal research*, 2012, 53(1): 11-20.
- Jacobs D F, Oliet J A, Aronson J, et al. Restoring forests: what constitutes success in the twenty-first century[J]. *New Forests*, 2015, 46: 601-614.
- Lu C, Zhao T, Shi X, et al. Ecological restoration by afforestation may increase groundwater depth and create potentially large ecological and water opportunity costs in arid and semiarid China[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 176: 1213-1222.
- McDowell N G, Ryan M G, Zeppel M J B, et al. Improving our knowledge of drought-induced forest mortality through experiments, observations, and modeling[J]. *New Phytologist*, 2013, 200(2): 289-293.
- Ahmad S, Kamran M, Ding R, et al. Exogenous melatonin confers drought stress by promoting plant growth, photosynthetic capacity and antioxidant defense system of maize seedlings[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7793.
- Wang X, Liu H, Yu F, et al. Differential activity of the antioxidant defence system and alterations in the accumulation of osmolyte and reactive oxygen species under drought stress and recovery in rice (*Oryza sativa* L.) tillering[J]. *Scientific reports*, 2019, 9(1): 1-11.

- Yang X, Lu M, Wang Y, et al. Response mechanism of plants to drought stress[J]. *Horticulturae*, 2021, 7(3): 50.
- Nadarajah K K. ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants[J]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(15): 5208.
- Lourkisti R, Oustric J, Quilichini Y, et al. Improved response of triploid citrus varieties to water deficit is related to anatomical and cytological properties[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 162: 762-775.
- Ashraf M. Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of Blue panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.) under salinity or waterlogging[J]. *Plant science*, 2003, 165(1): 69-75.
- Ruehr N K, Law B E, Quandt D, et al. Effects of heat and drought on carbon and water dynamics in a regenerating semi-arid pine forest: a combined experimental and modeling approach[J]. *Biogeosciences*, 2014, 11(15): 4139-4156.
- Berner L T, Law B E, Hudiburg T W. Water availability limits tree productivity, carbon stocks, and carbon residence time in mature forests across the western US[J]. *Biogeosciences*, 2017, 14(2): 365-378.
- Li Z, Wang X, Liu Y, et al. Water uptake and hormone modulation responses to nitrogen supply in *Populus simonii* under PEG-induced drought stress[J]. *Forests*, 2022, 13(6): 907.
- Liu C, Liu Y, Guo K, et al. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, 71(2): 174-183.
- Lei Y, Yin C, Li C. Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, 127(2): 182-191.
- Ahmed C B, Rouina B B, Sensoy S, et al. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes[J]. *Environmental and experimental botany*, 2009, 67(2): 345-352.
- Basu S, Ramegowda V, Kumar A, et al. Plant adaptation to drought stress[J]. *F1000Research*, 2016, 5.
- Bhusal N, Lee M, Han A R, et al. Responses to drought stress in *Prunus sargentii* and *Larix kaempferi* seedlings using morphological and physiological parameters[J]. *Forest Ecology and Management*, 2020, 465: 118099.
- Ameye M, Wertin T M, Bauweraerts I, et al. The effect of induced heat waves on *Pinus taeda* and *Quercus rubra* seedlings in ambient and elevated CO₂ atmospheres[J]. *New Phytologist*, 2012, 196(2): 448-461.
- Baquadano F J, Castillo F J. Comparative ecophysiological effects of drought on seedlings of the Mediterranean water-saver *Pinus halepensis* and water-spenders *Quercus coccifera* and *Quercus ilex*[J]. *Trees*, 2006, 20(6): 689-700.
- Anjum S A, Xie X Y, Wang L C, et al. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress[J]. *African journal of agricultural research*, 2011, 6(9): 2026-2032.
- Shao R X, Xin L F, Zheng H F, et al. Changes in chloroplast ultrastructure in leaves of drought-stressed maize inbred lines[J]. *Photosynthetica*, 2016, 54(1): 74-80.
- Oustric J, Quilichini Y, Morillon R, et al. Tetraploid citrus seedlings subjected to long-term nutrient deficiency are less affected at the ultrastructural, physiological and biochemical levels than diploid ones[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 135: 372-384.
- Tabatskaya T M, Mashkina O S, Korchagin O M. In vitro modelling of salinity stress for the selection of stress-tolerant birch lines[C]//E3S Web of Conferences. EDP Sciences, 2020, 224: 04013.
- Giagli K, Vavřík H, Fajstavr M, et al. Stand factors affecting the wood density of naturally regenerated young silver birch growing at the lower altitude of the Czech Republic region[J]. *Wood Research*, 2019.
- Pääkkönen E, Vahala J, Pohjola M, et al. Physiological, stomatal and ultrastructural ozone responses in birch (*Betula pendula* Roth.) are modified by water stress[J]. *Plant, Cell & Environment*, 1998, 21(7): 671-684.
- Han C, Chen J, Liu Z, et al. Morphological and Physiological Responses of *Melia azedarach* Seedlings of Different Provenances to Drought Stress[J]. *Agronomy*, 2022, 12(6): 1461.
- Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants[J]. *Plant physiology*, 1977, 59(2): 309-314.
- Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant and cell physiology*, 1981, 22(5): 867-880.
- Zeng C Q, Liu W X, Hao J Y, et al. Measuring the expression and activity of the CAT enzyme to determine Al resistance in soybean[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 144: 254-263.
- Giannakoula A, Therios I, Chatzissavvidis C. Effect of lead and copper on photosynthetic apparatus in citrus (*Citrus aurantium* L.) plants. The role of antioxidants in oxidative damage as a response to heavy metal stress[J]. *Plants*, 2021, 10(1): 155.
- Iqbal N, Hussain S, Raza M A, et al. Drought tolerance of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by improved photosynthetic characteristics and an efficient antioxidant enzyme activities under a split-root system[J]. *Frontiers in physiology*, 2019, 10: 786.
- Wilson, Keith, John Walker, et al. Principles and techniques of practical biochemistry [M]. Cambridge University Press, 2000.
- Johnston J W, Horne S, Harding K, et al. Evaluation of the 1-methyl-2-phenylindole colorimetric assay for aldehydic lipid peroxidation products in plants: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45(2): 108-112.

- Bates L S, Waldren R P, Teare I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies[J]. Plant and soil, 1973, 39: 205-207.
- Raza J, Ahmad M, Zafar M, et al. Comparative foliar anatomical and pollen morphological studies of Acanthaceae using light microscope and scanning electron microscope for effective microteaching in community[J]. Microscopy Research and Technique, 2020, 83(9): 1103-1117.
- Kong Y, Xu X, Zhu L. Cyanobactericidal effect of *Streptomyces* sp. HJC-D1 on *Microcystis aeruginosa*[J]. PloS one, 2013, 8(2): e57654.