

Ca²⁺ 处理对秦岭高山杜鹃耐热性的影响

赵冰, 付玉梅, 丁惠惠, 张欣欣, 杜宇科

(西北农林科技大学, 陕西 杨陵 712100)

摘要:分别以清水、5、10、20 mmol·L⁻¹的CaCl₂溶液喷洒高山杜鹃幼苗叶片10 d后,将其幼苗置于人工气候箱进行96 h 40℃昼/夜32℃的温度处理,每隔24 h进行一次热害指数的测定,前48 h内每隔24 h测定幼叶相关的生理指标。结果表明:Ca²⁺处理20 mmol·L⁻¹能有效抑制高温胁迫引起的秦岭高山杜鹃幼苗叶片内丙二醛含量的快速积累,促进叶片内游离脯氨酸含量的积累,延缓叶绿素含量的降低,并使热害指数降低约75%,Ca²⁺处理能一定程度提高高山杜鹃的耐热性。

关键词:高山杜鹃;Ca²⁺;生理指标;热害指数;耐热性

中图分类号:S685.210.1

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2010)06-0029-04

Effects of Ca²⁺ on Tolerance of *Rhododendron lapponicum* in Qinling to Heat Stress

ZHAO Bing, FU Yu-mei, DING Hui-hui, ZHANG Xin-xin, DU Yu-ke

(Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: After foliar sprayed with 5, 10, and 20 mmol·L⁻¹ CaCl₂ solution and water each day for 10 days, the alpine *Rhododendron lapponicum* seedlings were moved into an incubator controlled at 40℃ day/32℃ night for 96 hours. In this high period, heat harm index was calculated every 24 hours, related physiological indices of young leaves were monitored every 24 hours in the first 48 hours. The results showed that Ca²⁺ could inhibit the increase of MDA in the young leaves, and improve the accumulation of free proline. In addition, Ca²⁺ also could delay the decrease of chlorophyll content, decrease the heat injury index 75%. So Ca²⁺ could improve the tolerance of the alpine *R. lapponicum* to heat stress in some extents.

Key words: *Rhododendron lapponicum*; Ca²⁺; physiological index; heat injury index; heat tolerance

杜鹃花一般是指杜鹃花科杜鹃属(*Rhododendron*)的所有种类,它与报春、龙胆并称为世界三大高山野生花卉,同时也是世界园林最为著名的观赏植物和中国十大传统名花之一。陕西秦岭地区共有野生杜鹃花资源28种,占我国杜鹃花种类的5.1%。虽在种类方面不及云南、西藏和四川等省区多,但在该区植被中占有一定的地位,在森林生态系统中不仅具有极重要的生态、区系意义,对当地水土保持和生态系统的稳定也具有十分重要的作用。杜鹃属含陕西特有种较多,是西北木本植物区系中比较重要的属之一;另外秦岭野生杜鹃的单种蕴藏量大,抗寒性极强,观赏价值和药用价值高的种类较多,优势明

显,因而成为这一地区最具开发潜力的野生植物资源之一。

杜鹃属植物主要分布在高海拔地区,生长发育要求冷凉的环境条件,对高温的忍耐力不强,在人们对该属植物的引种栽培及育种中,耐热性是引种及育种成功的关键。近年来研究发现,Ca²⁺参与多种逆境胁迫过程如低温、盐胁迫、氧胁迫,施用外源钙能提高植物的抗逆性^[1-3]。在植物耐受高温胁迫研究方面,张宗申等认为Ca²⁺处理能增强植物的抗热性^[4]。本试验用不同浓度的CaCl₂溶液处理秦岭高山杜鹃(*Rhododendron lapponicum*)幼苗,测定其相关的生理指标和热害指数的变化,研究其耐热性,

收稿日期:2009-10-27 修回日期:2009-12-29

基金项目:西北农林科技大学人才引进科研启动基金资助(Z111020821)

作者简介:赵冰,女,博士,讲师,主要从事园林植物种质资源的教学和研究工作。

从而为杜鹃属植物的引种栽培、耐热育种和耐热材料的筛选及园林应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用的高山杜鹃是 2009 年 5 月初从国家木王森林公园移栽的野生幼苗,将幼苗移栽至直径 15 cm 左右的盆中,在西北农林科技大学实验楼内进行培养,并给予适宜的条件,盆基质为腐叶土:松针土=1:2,期间每天傍晚喷施 0.1%~0.5% 硫酸亚铁水溶液以增加空气湿度和幼苗对水分的需要,水分管理以见干见湿为主。6 月中旬选取有 6~10 片真叶的幼苗用于试验。

1.2 方法

1.2.1 处理方法和取样 用清水(对照)和 3 种不同浓度的 CaCl_2 溶液于每天 19:00 进行叶面喷施。连续喷施 10 d。第 11 天各选取生长状态一致的 3 株幼苗置于人工气候箱中进行高温胁迫。设置温度 40℃ 昼/夜 32℃,光照强度 10 000 lx,处理时间 132 h。前 48 h 每间隔 24 h 取幼嫩的叶片进行 1 次相关生理指标的测定,每次 3 株。期间每间隔 24 h 进行一次热害指数的统计和计算。3 种溶液的 CaCl_2 浓度分别为 5、10、20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6.5。

1.2.2 脯氨酸含量测定 采用茚三酮比色法测定^[5]。称取不同处理的待测植物叶片各 0.5 g,分别置于大试管中,然后向各试管分别加入 5 mL 3% 的磺基水杨酸溶液,在沸水浴中提取 10 min(提取过程中要经常摇动),冷却后过滤于干净的试管中,滤液即为脯氨酸的提取液。吸取 2 mL 提取液于另一干净的带玻塞试管中,加入 2 mL 冰醋酸及 2 mL 酸性茚三酮试剂,在沸水浴中加热 30 min,溶液即呈红色。冷却后加入 4 mL 甲苯,摇荡 30 s,静置片刻,取上清液至 10 mL 离心管中,在 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5 min。用吸管轻轻吸取上层脯氨酸红色甲苯溶液于比色杯中,以甲苯为空白对照,在分光光度计上 520 nm 波长处比色,求得吸光度值。

1.2.3 丙二醛含量的测定^[5] 取 0.5 g 幼苗叶片,加 5% TCA 5 mL,研磨后所得匀浆在 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min。然后取上清液 2 mL,加 0.67% TBA 2 mL,混合后在 100℃ 水浴上煮沸 30 min,冷却后再离心一次。分别测定上清液在 450、532、600 nm 处的吸光度值,并按公式 $C(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = 6.45(A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$ 计算 MDA 浓度,再算出单位鲜重组组织中的 MDA 含量($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)。

1.2.4 叶绿素含量测定^[5] 取不同处理的待测新

鲜植物叶片,擦净组织表面污物,剪碎(去掉中脉),混匀。称取剪碎的新鲜样品 0.2 g,分别放入研钵中,加入少量石英砂和碳酸钙粉及 2~3 mL 95% 乙醇,研成匀浆,再加乙醇 10 mL,继续研钵至组织变白,静置 3~5 min。取滤纸 1 张,置漏斗中,用乙醇润湿,沿玻棒把提取液倒入漏斗中,过滤至 25 mL 棕色容量瓶中,用少量乙醇冲洗研钵、玻棒及残渣数次,最后,连同残渣一起倒入漏斗中。用滴管吸取乙醇,将滤纸上的叶绿体色素全部洗入容量瓶中,直至滤纸和残渣中无绿色为止。最后用乙醇定容至 25 mL,摇匀。把叶绿体色素提取液倒入光径 1 cm 的比色杯内。以 95% 乙醇为空白,在波长 665、649、470 nm 处测定吸光度。

1.2.5 热害指数的计算 温度处理期间每天对高山杜鹃生长状况进行观察,并对幼苗的高温伤害程度进行分级记录。高温伤害程度分级为 0 级:无热伤害症状;1 级:1~2 片叶开始变黄枯萎;2 级:2~4 片叶变黄,1 片叶枯死;3 级:2 片叶枯死;4 级:2 片叶以上枯死;5 级:整株枯死。通过公式计算热害指数。

热害指数 = $(\sum \text{热害级数} \times \text{相应株数}) / (\text{最高级数} \times \text{总株数})$ 。

2 结果与分析

2.1 Ca^{2+} 处理对高山杜鹃叶片游离脯氨酸含量的影响

植物在逆境条件下脯氨酸的积累会提高植物对逆境的忍耐力或适应性,抗逆性强的品种脯氨酸的积累量较大。图 1 表明,高温胁迫下,高山杜鹃叶片中的游离脯氨酸含量呈上升趋势。高温胁迫开始时,对照和 3 种处理的脯氨酸含量集中在较低水平(10 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),48 h 后,对照、处理 1、处理 2、处理 3 分别上升至 19.50、20.06、22.99、26.90 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,其中处理 3 的增幅最大,与对照差异显著($p < 0.05$)。外源 Ca^{2+} 处理(20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)能有效促进高山杜鹃叶片脯氨酸的积累,提高植株的耐热性。

2.2 Ca^{2+} 处理对高山杜鹃叶片丙二醛含量的影响

图 2 表明,在连续 48 h 的高温胁迫中,对照丙二醛含量增幅近 100%,而处理 2 和处理 3 的增幅分别为 65% 和 40%。在整个处理过程中,处理 1(5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和对照的结果非常接近,不能抑制丙二醛的快速积累。 Ca^{2+} 处理 2(10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和处理 3(20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)能从一定程度上抑制丙二醛的快速积累,处理 3(20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)与对照的差异显著($p < 0.05$)。

图1 Ca^{2+} 处理对高山杜鹃叶片游离脯氨酸含量的影响

Fig. 1 Effects of Ca^{2+} on the free praline content of the *R. lapponicum*

图2 Ca^{2+} 处理对高山杜鹃叶片丙二醛含量的影响

Fig. 2 Effects of Ca^{2+} on the MDA content of the *R. lapponicum*

2.3 Ca^{2+} 处理对高山杜鹃叶片叶绿素含量的影响

图3表明,在连续48 h高温胁迫中,不同处理的高山杜鹃叶片中的叶绿素含量呈现先下降后上升的趋势。在高温胁迫的前24 h,对照叶绿素含量下降幅度达53%,处理1、处理2、处理3的降幅分别为30%、27%、16%,对照的叶绿素含量下降幅度较大,而处理1和处理2的下降幅度接近,处理3下降幅度最小,表明 Ca^{2+} 处理能从一定程度上抑制叶绿素含量的下降。48 h后,对照和处理1、2、3的叶绿素含量都有一定幅度的上升,分别为40%、26%、60%,尤其是处理3叶绿素含量超过了处理前。

2.4 高温胁迫下 Ca^{2+} 处理高山杜鹃对热害指数的影响

高温情况下,植株的外部形态发生的一系列变化是植物对高温胁迫最直接的反应。对多数植物而言,植株或叶片失绿变黄乃至萎蔫枯萎是高温热害的主要症状。高温胁迫处理时随着时间的延长,高山杜鹃外部形态呈现明显的变化,而且3种处理的变化趋势一致,只是出现症状的深浅程度不同,以处理1的热害程度最深,而处理3的热害程度最浅。以处理1为例,当高温胁迫24 h时,首先表现为叶片失水;48 h时基部叶片边缘和叶片尖端开始变黄;72 h时蔓延到整个叶片;96 h时有半数以上的叶片出现萎蔫,同时部分萎蔫的叶片枯死;随着时间的继续延长,最严重时甚至整株枯死。随着高温胁迫持续时间的累积,秦岭高山杜鹃的热害指数呈现逐渐上升的趋势。

高山杜鹃在高温胁迫下热害指数变化的结果

(图4)表明,在处理24 h后,对照和3种不同的 Ca^{2+} 处理的热害指数分别为0.09、0.087、0.080、0.066,差异不明显。整个过程中对照和处理1的热害指数上升程度基本一致,上升较快,而处理2和处理3的上升程度较对照和处理1缓慢。整个观测过程中,对照的热害指数从开始的0.090增至0.635,处理3从0.066增至0.140,热害指数降低近75%。方差分析表明,处理3和对照差异显著($p < 0.05$),表明外源 Ca^{2+} 处理($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)能有效降低植株的热害指数,提高植株的耐热性。

图3 Ca^{2+} 处理对高山杜鹃叶片叶绿素含量的影响

Fig. 3 Effects of Ca^{2+} on the leaf chlorophyll content of the *R. lapponicum*

图4 Ca^{2+} 处理对高山杜鹃热害指数的影响

Fig. 4 Effects of Ca^{2+} on the heat injury index of the *R. lapponicum*

3 结论与讨论

植物的耐热性是植物适应高温条件的一种生理反应。在植物体中, Ca^{2+} 不仅是一种重要的矿质营养元素,还可以作为偶联胞外号与胞内生理生化反应的第二信使^[6]。已知胞质中 Ca^{2+} 浓度改变是植物细胞感受并传导外界逆境信号的一个中心环节^[7-8]。本试验利用人工模拟气候法,从叶片脯氨酸含量、丙二醛含量、叶绿素含量、热害指数等4方面对不同 Ca^{2+} 浓度处理的高山杜鹃的耐热性进行评价。研究表明,上述4项指标在高温胁迫下均有一定的变化趋势,且不同处理植株的差异较为明显,其中外源 Ca^{2+} 处理($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)能有效降低植株的热害指数,显著提高植株的耐热性。

脯氨酸是一种渗透调节的物质,其与植物的抗

逆能力有着密切的关系。脯氨酸可以防止植物水分散失和提高原生质胶体的稳定性,环境胁迫下耐热的植物品种比不耐热的品种体内积累较多的脯氨酸,并且耐热性强的植物脯氨酸维持积累时间长,维持积累量大;而耐热性弱的植物积累维持时间短,维持积累量也少^[9-11]。推测外源 Ca^{2+} 处理可能通过调节植物细胞水分的变化来增强植物的耐热性。

植物器官在逆境条件下遭受伤害时,往往发生膜脂过氧化作用而产生丙二醛(MDA),其含量高低常用来说明过氧化作用的程度。常温下高山杜鹃叶片的丙二醛含量较低,高温胁迫引起高山杜鹃叶片中丙二醛的积累,且随着处理时间的延续,丙二醛含量逐渐升高。说明外源 Ca^{2+} 处理能从一定程度上抑制丙二醛的快速积累,降低高温下膜脂的过氧化程度。

高温胁迫下叶绿素含量逐渐减少的主要原因有2个,一是高温影响了植物叶绿素生物合成的中间产物氨基酮戊酸和原卟啉IX的生物合成,从而减少和降低了叶绿素的生成量^[12];二是高温胁迫下植物体内活性氧产生量上升,易发生氧化破坏,导致叶绿素含量减少^[13]。外源 Ca^{2+} 处理能从一定程度上延缓叶绿素含量的下降,而叶绿素含量呈先下降后上升的趋势可能是由于在一定时间内机体经历了一个逐渐适应高温环境的过程,其确切原因还有待进一步研究和论证。

本研究在室内进行了杜鹃热害指数的测定和计算,由于室内是可控的环境,不像田间试验结果容易受年份和地点的影响,因此能保证较强的重复性,在多组重复处理的前提下,热害指数能较为全面的评价杜鹃的耐热性。研究结果表明,在高温胁迫下,杜鹃幼苗受到不同程度伤害,而外源钙处理能够降低高温胁迫造成的伤害,从而提高杜鹃的耐热性。

参考文献:

[1] 李卫,孙中海,章文才,等. 钙和钙调素对柑橘原生质抗冻性的影响[J]. 植物生理学报,1997,23(3):262-266.
LI W, SUN Z H, ZHANG W C, *et al.* Role of Ca^{2+} and calmodulin on freezing tolerance of *Citrus protoplasts* [J]. Acta Phytophysiological Sinica, 1997, 23(3): 262-266.

[2] 赵可夫,卢元芳,张宝泽,等. Ca^{2+} 对小麦幼苗降低盐害效应的研究[J]. 植物学报,1993,35(1):51-56.
ZHAO K F, LU Y F, ZHANG B Z, *et al.* Influence of calcium on alleviating NaCl-induced injury effects in wheat seedlings [J]. Acta Botanica Sinica, 1993, 35(1): 51-56.

[3] 袁清昌,许长成,邹琦. 钙信使系统在百草枯诱导小麦幼苗膜脂过氧化中的作用[J]. 植物生理学通讯,1996,32(1):13-16.
YUAN Q C, XU C C, ZOU Q. The role of calcium messenger system in membrane lipid peroxidation induced by paraquat in wheat seedlings [J]. Plant Physiology Communications, 1996, 32(1): 13-16.

[4] 张宗申,利容千,王建波. 外源 Ca^{2+} 预处理对高温胁迫下辣椒叶片细胞膜透性和 GSH、ASA 含量及 Ca^{2+} 分布的影响[J]. 植物生态学报,2001,25(2):230-234.
ZHANG Z S, LI R Q, WANG J B. Effects of Ca^{2+} pretreatment on plasmalemma permeability, GSH and ASA contents, and calcium distribution in pepper mesophyll cells under heat stress [J]. Acta Phytocologica Sinica, 2001, 25(2): 230-234.

[5] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000. 7

[6] 龚明,李英. 植物体内的钙信使系统[J]. 植物学通报,1990,7(3):19-29.
GONG M, LI Y. Calcium messenger system in plants [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1990, 7(3): 19-29.

[7] KLEIN J D, FERGUSON I B. Effect of high temperature on calcium uptake by suspension-cultural pear fruit cells [J]. Plant Physiol, 1987, 84: 1853-1856.

[8] GONG M, VANDERLUIT A H, KNIGHT M R, *et al.* Heat-shock induced changes in intracellular Ca^{2+} level in tobacco seedlings in regulation to thermotolerance [J]. Plant Physiol, 1998, 116: 429-437.

[9] 张昭其,段学武,庞学群,等. 冷激对采后香蕉几个与耐热性有关的生理指标的影响[J]. 植物生理学通讯,2002,38(4):333-335.
ZHANG Z Q, DUAN X W, PANG X Q, *et al.* The effects of cold shock on some physiological changes related to thermotolerance of postharvest bananas [J]. Plant Physiology Communications, 2002, 38(4): 333-335.

[10] 柳小妮,曹致中. 几种早熟禾耐热性的研究[J]. 中国草地,2002,24(3):40-45.
LIU X N, CAO Z Z. Studies on bluegrass tolerance to heat [J]. Grassland of China, 2002, 24(3): 40-45.

[11] 张朝阳,许桂芳. 两种地被植物的耐热性生理特性研究[J]. 西北林学院学报,2009,24(1):49-52.
ZHANG Z Y, XU G F. Physiological characteristics of heat tolerance in two ground covering plants [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(1): 49-52.

[12] TEWARI A K, TRIPATHY B C. Temperature-stress-induced impairment of chlorophyll biosynthetic reactions in cucumber and wheat [J]. Plant Physiol, 1998, 117: 851-858.

[13] 郭培国,李荣华. 夜间高温胁迫对水稻叶片光合机构的影响[J]. 植物学报,2000,42(7):673-678.
GUO P G, LI R H. Effects of high nocturnal temperature on photosynthetic organization in rice leaves [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(7): 673-678.