

网络出版时间:2019-07-22 13:51 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.02.009
网络出版地址:<http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190722.1350.018.html>

干旱胁迫下外源钙对桂西北喀斯特地区青冈栎种子萌发的影响

邓 平^{1,2},吴 敏¹,赵 英¹,赵仕花¹,邓 雯¹,张风远¹,韦银霞³

(1 玉林师范学院 桂东南珍稀经济物种保护利用重点实验室培育基地,广西 玉林 537000;

2 西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100;3 广西大学 林学院,广西 南宁 530004)

[摘要] 【目的】研究喀斯特地区土壤中交换性钙离子对干旱胁迫条件下青冈栎种子萌发特性以及有机渗透调节物质、抗氧化酶活性的影响,探明青冈栎种子在干旱胁迫条件下萌发所需的最佳外源钙浓度,为在喀斯特地区进行青冈栎的推广造林、植被恢复与重建提供理论参考。【方法】以大小相近、饱满的青冈栎种子为供试对象,采用双因素设计试验,即干旱胁迫和添加 CaCl_2 2个因素,其中干旱胁迫共设6个水平,环境水势分别为0, -0.1, -0.3, -0.6, -0.9, -1.2 MPa, 对应 PEG-6000 质量浓度分别为0, 50, 125, 200, 250 和 300 g/L; 添加 CaCl_2 共设4个水平, 对应 CaCl_2 浓度分别为0, 10, 20, 30 mmol/L, 进行完全组合设计, 共设24个处理, 测定不同处理青冈栎种子萌发参数(萌发率、萌发势、萌发指数和活性指数),丙二醛(MDA)和有机渗透调节物质(可溶性糖、可溶性蛋白、游离脯氨酸)含量以及抗氧化酶(SOD、POD、CAT、APX)活性,用隶属函数法对不同处理青冈栎种子的耐旱性进行综合评价。【结果】(1)外源 CaCl_2 、干旱胁迫及其交互作用对青冈栎种子各萌发参数均有极显著影响。在环境水势为-0.3 MPa、 CaCl_2 浓度为10 mmol/L 组合处理下,各萌发参数值均达到最大;在环境水势为-1.2 MPa、 CaCl_2 浓度为30 mmol/L 组合处理下,种子停止萌发。(2)外源 CaCl_2 、干旱胁迫及其交互作用对青冈栎种子萌发生理生化参数及抗氧化酶活性均有显著影响。同一外源 CaCl_2 下,MDA 含量随干旱胁迫的加剧而显著增加;在同一环境水势下,随着 CaCl_2 浓度的增加,MDA 含量呈先下降后上升的趋势。当环境水势为0 MPa 时,随着 CaCl_2 浓度的增大,有机渗透调节物质含量总体呈增加趋势;当环境水势为-0.1~-1.2 MPa 时,在同一环境水势下,随 CaCl_2 浓度的增大,有机渗透调节物质含量均呈先增加后减少的趋势。当环境水势为0 MPa 时,与无钙组相比, CaCl_2 处理组的 SOD 活性无明显变化,而 POD、CAT、APX 活性则明显升高;当环境水势为-0.1~-1.2 MPa 时,在同一环境水势下,随 CaCl_2 浓度的增大,抗氧化酶(SOD、POD、CAT、APX)活性均呈现先升高后降低的趋势。(3)利用隶属函数法计算可知,当环境水势为-0.3 MPa、 CaCl_2 浓度为10 mmol/L 时,对应隶属函数加权平均值最高,青冈栎种子的耐旱性得以有效提高。【结论】在喀斯特地区利用青冈栎种子播种育苗时,播种前用10 mmol/L CaCl_2 浸种可以提高种子的耐旱性。

[关键词] 青冈栎;种子萌发;干旱胁迫;外源钙;喀斯特地区

[中图分类号] S792.18

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2020)02-0069-11

Effects of exogenous calcium on seed germination of *Cyclobalanopsis glauca* in Karst area of Northwestern Guangxi under draught stress

DENG Ping^{1,2}, WU Min¹, ZHAO Ying¹, ZHAO Shihua¹, DENG Wen¹,
ZHANG Fengyuan¹, WEI Yinxia³

(1 Key Laboratory Breeding Base for the Protection and Utilization of Rare Economic Species in Southeastern Guangxi, Yulin Normal University, Yulin, Guangxi 537000, China; 2 College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 3 College of Forestry, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

[收稿日期] 2019-01-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31560124, 31800205);广西自然科学基金项目(2015GXNSFBA13913);广西高校科学技术研究项目(KY2015YB246, 2017KY0539);大学生创新创业训练计划项目(20170606128, 20170606246)

[作者简介] 邓 平(1983—),男,新疆库车人,在读博士,主要从事植物生理生化研究。E-mail:yier253160@126.com

[通信作者] 吴 敏(1983—),女,河南郑州人,副教授,博士,主要从事森林生态研究。E-mail:wumin63843@126.com

Abstract: 【Objective】 The effects of exchangeable calcium ions in soils of Karst area on seed germination characteristics, organic osmotic adjustment substances and antioxidant enzyme activities of *Cyclobalanopsis glauca* under drought stress were studied, and the optimal exogenous Ca^{2+} concentration for germination of *Cyclobalanopsis glauca* seeds was investigated. The research would provide reference for the promotion of afforestation, vegetation restoration and reconstruction in Karst areas. 【Method】 The *Cyclobalanopsis glauca* seeds with similar size and fullness were selected for two-factor experiment including drought stress and addition of CaCl_2 . Six environmental water potentials ($0, -0.1, -0.3, -0.6, -0.9$ and -1.2 MPa) were simulated using different concentrations of polyethylene glycol (PEG)-6000 ($0, 50, 125, 200, 250$ and 300 g/L), and exogenous calcium with four different concentrations ($0, 10, 20$ and 30 mmol/L CaCl_2) was installed to simulate calcium-rich soil environment. A total of 24 treatments were conducted to determine germination characteristics (germination rate, germination potential, germination index and vigor index), contents of malondialdehyde (MDA) and organic osmotic adjustment substances (free proline, soluble sugar and soluble protein) and activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX)). Subordinate function analysis was also carried out for comprehensive evaluation of drought tolerance of *Cyclobalanopsis glauca* seeds in different treatments. 【Result】 (1) Exogenous CaCl_2 , drought stress and their interactions had significant effects on germination parameters of *Cyclobalanopsis glauca* seeds. All the germination parameters reached maximum when environmental water potential was -0.3 MPa and CaCl_2 concentration was 10 mmol/L . Seeds stopped germination when the environmental water potential was -1.2 MPa and CaCl_2 concentration was 30 mmol/L . (2) Exogenous CaCl_2 , drought stress and their interactions had significant effects on physiology and biochemistry parameters and antioxidant protective enzymes of *Cyclobalanopsis glauca* seeds. MDA content increased significantly with increase of drought stress under same exogenous CaCl_2 . MDA content decreased first and then increased with the increase of CaCl_2 concentration under same environmental water potential. When environmental water potential was 0 MPa , the contents of organic osmotic adjustment substances tended to increase with the increase of CaCl_2 concentration. When environmental water potential was -0.1 — -1.2 MPa , the contents of osmotic adjustment substances increased first and then decreased with the increase of CaCl_2 concentration under same environmental water potential. When environmental water potential was 0 MPa , POD, CAT and APX activities in CaCl_2 treatment groups increased significantly compared with calcium-free groups, while there was no significant change in SOD activity. When environmental water potential was -0.1 — -1.2 MPa , the activities of antioxidant protective enzymes (SOD, POD, CAT and APX) increased first and then decreased with the increase of CaCl_2 concentration under same environmental water potential. (3) The result of subordinate function analysis showed that the weighted average of subordinate function was the highest when environmental water potential was -0.3 MPa and CaCl_2 concentration was 10 mmol/L , and the drought tolerance of *Cyclobalanopsis glauca* seeds was effectively improved. 【Conclusion】 Soaking seeds with 10 mmol/L CaCl_2 before sowing can increase drought tolerance of *Cyclobalanopsis glauca* seeds in Karst areas.

Key words: *Cyclobalanopsis glauca*; seed germination; drought stress; exogenous Ca^{2+} ; Karst area

喀斯特地貌为岩溶地貌，在我国分布广、面积大，占我国国土面积的 $1/7$ ，其中西南地区连片分布着世界上面积最大的岩溶区，是中国四大生态环境脆弱区之一^[1]。广西喀斯特地貌主要分布在桂西北，是中国乃至世界亚热带岩溶典型地区，碳酸盐岩裸露面积 8.95 万 km^2 ^[2]。该区域是典型峰丛洼地，

虽降雨丰富，但其时空分布不均，且土层浅薄、岩石渗透性高，仅能维持雨后数日，植物频繁遭受干旱胁迫，其干旱程度不亚于长期干旱地区^[3]。脆弱的地质条件以及人类活动的干扰，使得该地区原生森林退化，石漠化加剧，且严重制约了当地经济和社会发展。石漠化治理的关键是植被恢复重建，而频繁的

干旱胁迫限制了该地区植物的生长与分布^[4]。因此,开展喀斯特地区植物抗旱机理研究,提高植物抗旱性为当前石漠化地区研究的重要方向。

喀斯特地貌土壤中富含交换性钙离子,在生态系统恢复与重建过程中,所选的树种须普遍具有耐旱性和嗜钙性特征^[5]。目前国内外学者从不同角度研究了喀斯特植物对干旱环境的形态和生理生态适应性,如喀斯特植物水分利用效率与抗旱策略^[3,6]、叶片解剖结构和光合特性^[7-8]、树干液流与水力结构特征^[9-10]以及喀斯特植物幼苗应对干旱的形态与生理可塑性等研究^[11-13]。但对喀斯特植物适应钙的机制,特别是关于喀斯特地区土壤钙离子对适生树种抗旱性作用的研究鲜有报道^[14-15]。

青冈栎(*Cyclobalanopsis glauca*)为壳斗科青冈属常绿阔叶树种,是喀斯特地区常绿落叶阔叶混交林常见树种之一,为喀斯特生态系统顶极群落的建群种^[16]。青冈栎对石漠化环境具有较强的适应性,是石漠化地区植被恢复的优良造林树种^[17]。喀斯特地区植被恢复成败在于幼苗的建立,成苗的前提是种子萌发,而萌发期是植物整个生活史中最重要、对土壤环境反应最敏感、抗逆性最为脆弱的发育阶段^[18]。野外调查发现,青冈栎林虽结实量大,但其生境土层浅薄、富钙、干旱,导致其种子萌发率低,幼苗定居困难,影响种群自然更新。目前,针对青冈栎的研究主要集中在种群生殖生态、人工林培育、幼苗抗性等方面^[13,19-21],从生理生态学角度系统研究外源钙和干旱胁迫对青冈栎种子萌发影响的报道尚为少见。故本试验通过配制不同浓度的PEG-6000和CaCl₂溶液模拟干旱和钙离子胁迫处理,研究喀斯特地区土壤中交换性钙离子对干旱条件下青冈栎种子萌发特性以及体内各种有机渗透调节物质含量、抗氧化保护酶活性变化的影响,以期阐明钙离子对青冈栎种子萌发过程中耐旱性的影响,了解种子萌发的土壤条件,为喀斯特地区青冈栎的推广造林、植被恢复与重建提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于2016年11月中旬,在青冈栎分布核心区桂林市雁山区大埠乡甘棠村后山、阳朔县葡萄镇轭头、白沙镇富里湾和高田镇白沟、碑头的“风水山”,采用优势木对比法^[22],从保护较好的天然林和散生木中选取优良母树,分别标记、采种,带回实验室将种子处理干净,筛选出下沉健康饱满种子,阴干后4℃低

温保存备用。

1.2 试验设计

试验于2016年12月12日开始,供试青冈栎种子平均纵径为(1.98±0.32)cm,横径为(2.186±0.28)cm,百粒质量为(428.03±18.79)g,种子活性为91.83%。最终选取大小相近、饱满的青冈栎种子洗净后于水中浸泡48 h,使种子充分吸水膨胀,然后用质量分数0.5%高锰酸钾溶液消毒30 min,再用蒸馏水冲洗3次,表面用滤纸吸干备用。

试验采用双因素设计,即干旱胁迫和添加CaCl₂2个因素。根据测定采种区旱、雨季表层土壤(0~10 cm)环境水势,干旱胁迫处理共设6个水平,对应环境水势分别为0,-0.1,-0.3,-0.6,-0.9,-1.2 MPa,对应的PEG-6000质量浓度分别为0,50,125,200,250和300 g/L^[23];添加CaCl₂处理共设4个水平,对应的CaCl₂浓度分别为0,10,20,30 mmol/L,双因素不同水平进行完全组合设计,共计24个处理,每处理4个重复。试验开始前,将培养皿(20 cm×20 cm)和培养基(珍珠盐)在105℃烘箱消毒2 h;然后将种子播于3层医用脱脂纱布下铺有珍珠盐(厚度2 cm)的培养皿中,每皿摆放20粒青冈栎种子,每处理共计80粒种子;最后向培养皿中加入预先配制好的不同质量浓度PEG-6000和不同浓度CaCl₂溶液各20 mL,每3 d更换1次培养基,置于恒温25℃智能人工气候箱内,周期性光照:白天12 h/夜晚12 h,光照强度200 μmol/(m²·s),试验共进行28 d。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 萌发指标 从试验开始的第2天起,观察记录各组处理种子萌发的起始日期,每天定时记录萌发种子数量,试验末期当连续3 d发芽粒数不足供试种子总数的1%时,视为发芽结束^[24]。按下列公式计算种子萌发率、萌发势、萌发指数、活性指数^[25]。

$$\text{萌发率} = \text{种子萌发数}/\text{供测种子数} \times 100\%;$$

萌发势 = 最大萌发数/供测种子数×100%,其中最大萌发数是试验期间任意一天中达到的最多种子萌发数量;

$$\text{萌发指数} = (\text{逐日萌发数}/\text{相应的发芽天数});$$

$$\text{活性指数} = \text{萌发指数} \times \text{幼苗鲜质量}.$$

1.3.2 生理生化指标 待种子萌发试验结束后,统一进行种子生理指标的测定。其中,丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量采用硫代巴比妥酸法测定,可溶性糖含量采用蒽酮法测定,可溶性蛋白含量采

用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定,游离脯氨酸含量采用磺基水杨酸-酸性茚三酮显色法测定,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性采用氮蓝四唑法测定,过氧化氢酶(catalase, CAT)活性采用紫外吸收法测定,过氧化物酶(peroxidase, POD)活性采用愈创木酚氧化法测定,抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)活性采用抗坏血酸氧化法测定。以上指标的测定均参考文献[26]的方法,每个指标重复测定 3 次,取其平均值。

1.4 数据统计与分析

采用隶属函数值评价施加外源钙对青冈栎种子耐旱性的影响,若所测指标与青冈栎种子的耐旱性呈正相关,则隶属函数值计算公式为: $U = (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$;若所测指标与干旱胁迫耐性呈负相关,可通过反隶属函数计算其隶属函数值: $U = 1 - (X - X_{\min}) / (X_{\max} - X_{\min})$;其中 U 为某处理下该指标的隶属值, X 为某处理的萌发和生理生化指标

参数测定值, X_{\min} 为该指标的最小测定值, X_{\max} 为最大测定值^[27]。

采用双因素方差(Two-way ANOVA)分析干旱胁迫、外源钙以及二者的交互作用对青冈栎种子萌发和生理生化参数的影响;采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 LSD(Least significant difference)检验单一干旱胁迫和单一外源钙处理种子萌发及生理生化参数的差异性。数据处理与统计使用 SPSS 18.0 软件进行,采用 Origin 9.0 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 外源钙对干旱胁迫下青冈栎种子萌发特征的影响

方差分析结果显示,外源钙、干旱胁迫及其二者交互作用对青冈栎种子萌发参数均有极显著影响($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$)。

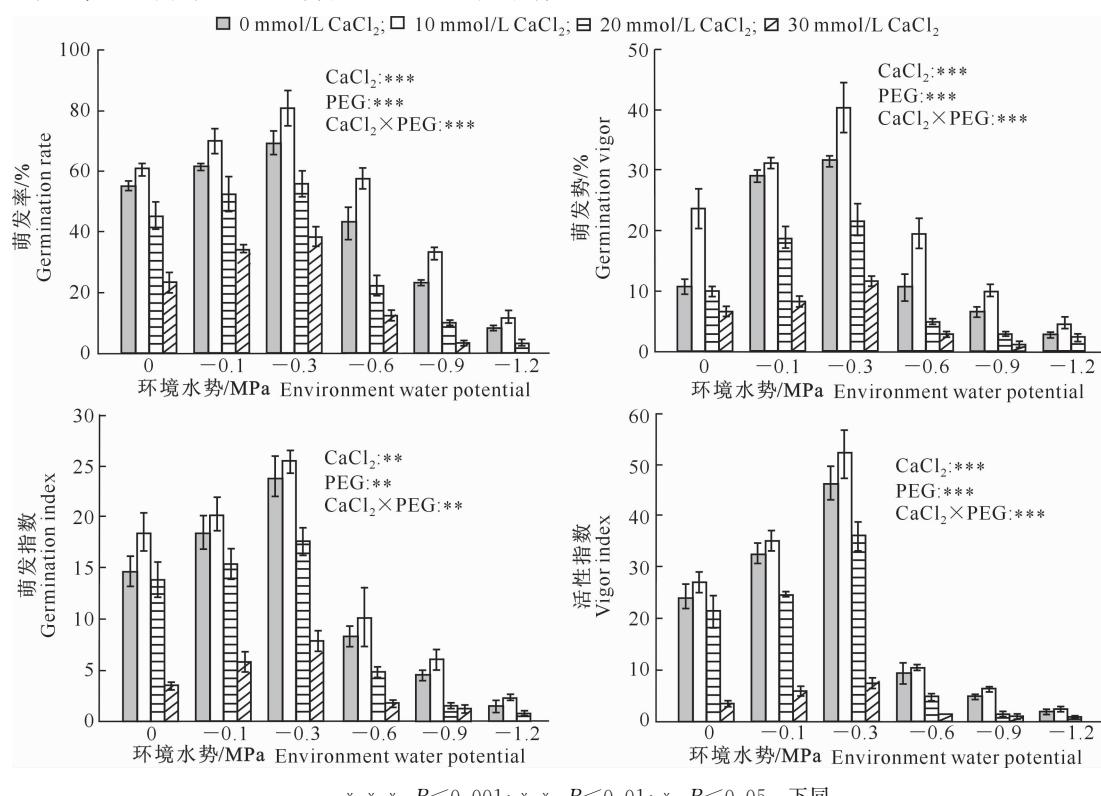


图 1 外源钙对干旱胁迫下青冈栎种子萌发特征的影响($n=4$)

Fig. 1 Effects of drought stress with exogenous calcium on germination parameters of *Cyclobalanopsis glauca* seeds ($n=4$)

由图 1 可以看出,同一外源 CaCl_2 处理,青冈栎种子萌发参数(萌发率、萌发势、萌发指数和活性指数)均随干旱胁迫的加剧呈现出先增加后降低的趋势,即 $-1.2 \text{ MPa} < -0.9 \text{ MPa} < -0.6 \text{ MPa} < 0$

$\text{MPa} < -0.1 \text{ MPa} < -0.3 \text{ MPa}$ 。在同一环境水势下,不同浓度外源 CaCl_2 处理青冈栎种子萌发参数均表现为 $10 \text{ mmol/L} > 0 \text{ mmol/L} > 20 \text{ mmol/L} > 30 \text{ mmol/L}$ 。当 CaCl_2 浓度为 10 mmol/L 、环境水

势为 -0.3 MPa时,萌发率、萌发势、萌发指数和活性指数均达到最大值,分别为80.67%,40.37%,25.3和52.15;当 CaCl_2 浓度为30 mmol/L、环境水势为 -1.2 MPa时,青冈栎种子停止萌发。

2.2 外源钙和干旱胁迫对青冈栎种子萌发生理生化指标的影响

2.2.1 MDA含量 方差分析结果显示,外源钙、干旱胁迫对青冈栎种子MDA含量有极显著影响($P<0.001$),二者交互作用对青冈栎种子MDA含量有显著影响($P<0.05$)。由图2可以看出,同一外源 CaCl_2 下,MDA含量随干旱胁迫的加剧而极显著增加($P<0.001$)。当环境水势为 $0\sim-0.3$ MPa时,不同浓度 CaCl_2 处理青冈栎种子MDA含量表现为 $10 \text{ mmol/L} < 20 \text{ mmol/L} < 0 \text{ mmol/L} < 30 \text{ mmol/L}$;当环境水势为 $-0.6\sim-1.2$ MPa时,不同浓度 CaCl_2 处理MDA含量表现为 $10 \text{ mmol/L} < 0 \text{ mmol/L} < 20 \text{ mmol/L} < 30 \text{ mmol/L}$ 。在同一环境水势下,随着 CaCl_2 浓度的增大,MDA含量呈先下降后上升的趋势。当 CaCl_2 浓度为30 mmol/L、环境水势为 -1.2 MPa时,MDA含量最高,可达38.82 nmol/g。

2.2.2 有机渗透调节物含量 方差分析结果显示,

外源钙对青冈栎种子可溶性蛋白质含量有极显著影响($P<0.001$),干旱胁迫及其与外源钙的交互作用对可溶性蛋白质含量均有显著影响($P<0.05$)。由图3可见,当 CaCl_2 浓度为0 mmol/L时,可溶性蛋白含量随干旱胁迫的加剧呈先增后降的趋势;当 CaCl_2 浓度为10 mmol/L时,可溶性蛋白质含量随干旱胁迫的加剧而总体增加,当环境水势为 -1.2 MPa时,可溶性蛋白质含量最高为0.22 mg/g;当 CaCl_2 浓度为20和30 mmol/L时,可溶性蛋白质含量随干旱胁迫的加剧总体呈降低趋势,当 CaCl_2 浓度为30 mmol/L、环境水势为 -1.2 MPa时,可溶性蛋白质含量最低,仅为0.05 mg/g。

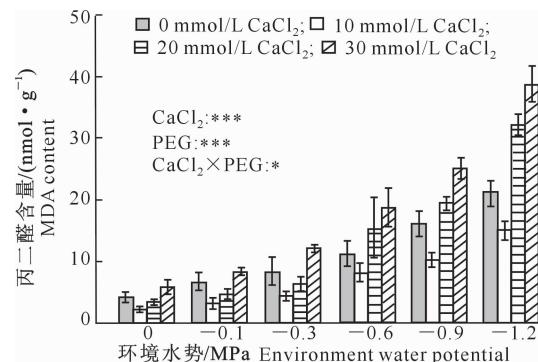
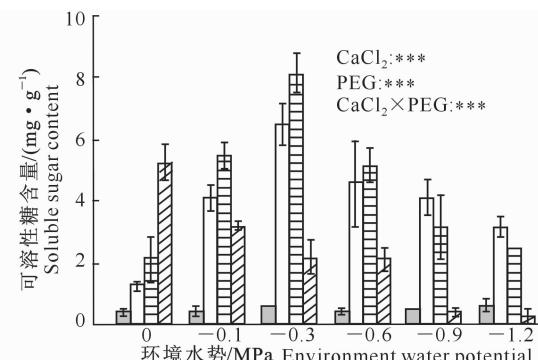


图2 外源钙对干旱胁迫下青冈栎种子丙二醛含量的影响($n=3$)

Fig. 2 Effects of drought stress with exogenous calcium on MDA content of *Cyclobalanopsis glauca* seeds ($n=3$)



CaCl₂:***
PEG:***
CaCl₂×PEG:***

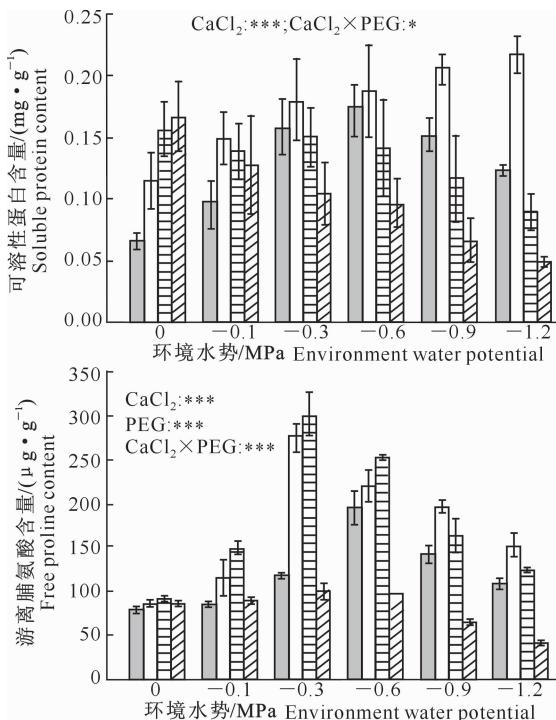


图3 外源钙对干旱胁迫下青冈栎种子可溶性蛋白、可溶性糖和游离脯氨酸含量的影响($n=3$)

Fig. 3 Effects of drought stress with exogenous calcium on soluble protein, soluble sugar and free proline content of *Cyclobalanopsis glauca* seeds ($n=3$)

方差分析结果显示,干旱胁迫和外源钙及其交互作用对可溶性糖和游离脯氨酸含量均有极显著影响($P<0.001$)。由图 3 可以看出,当 CaCl_2 浓度为 0 mmol/L 时,干旱胁迫处理种子可溶性糖含量均高于对照(0 MPa),但各处理间无显著差异($P>0.05$);当 CaCl_2 浓度分别为 10 和 20 mmol/L 时,可溶性糖含量随着干旱胁迫程度的加剧呈先增后减的趋势,其中当 CaCl_2 浓度为 20 mmol/L、环境水势为 -0.3 MPa 时,可溶性糖含量最高,为 8.13 mg/g;当 CaCl_2 浓度为 30 mmol/L 时,可溶性糖含量随干旱胁迫的加剧而总体减少,且环境水势为 -1.2 MPa 时,可溶性糖含量最低,仅为 0.26 mg/g。

由图 3 还可以看出,当环境水势为 0 MPa 时,施加外源 CaCl_2 对游离脯氨酸含量无显著影响($P>0.05$);当 CaCl_2 浓度为 0~30 mmol/L 时,游离脯氨酸含量随干旱胁迫程度加剧呈先增后减的趋势,其中当 CaCl_2 浓度为 20 mmol/L、环境水势为

-0.3 MPa 时,游离脯氨酸含量最高为 301.13 $\mu\text{g}/\text{g}$;当 CaCl_2 浓度为 30 mmol/L、环境水势为 -1.2 MPa 时,游离脯氨酸含量最低,仅为 40.16 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。当环境水势相同时,随 CaCl_2 浓度的增大,游离脯氨酸含量也呈先增后减的趋势。

2.2.3 抗氧化酶活性

方差分析结果表明,外源钙、干旱胁迫及其交互作用均对 SOD 活力有极显著影响($P<0.001$)。由图 4 可知,当 CaCl_2 浓度为 0 mmol/L,各干旱胁迫处理下青冈栎种子 SOD 活力均低于对照组;当 CaCl_2 浓度为 10,20 mmol/L 时,SOD 活力随干旱胁迫程度的加剧呈先升后降的趋势,且当 CaCl_2 浓度为 10 mmol/L、环境水势为 -0.3 MPa 时 SOD 活力达到峰值(15 237.98 U/(min·g));当 CaCl_2 浓度为 30 mmol/L 时,SOD 活力随干旱胁迫的加剧而降低,当环境水势为 -1.2 MPa 时,SOD 活力最低,仅为 4 834.74 U/(min·g)。

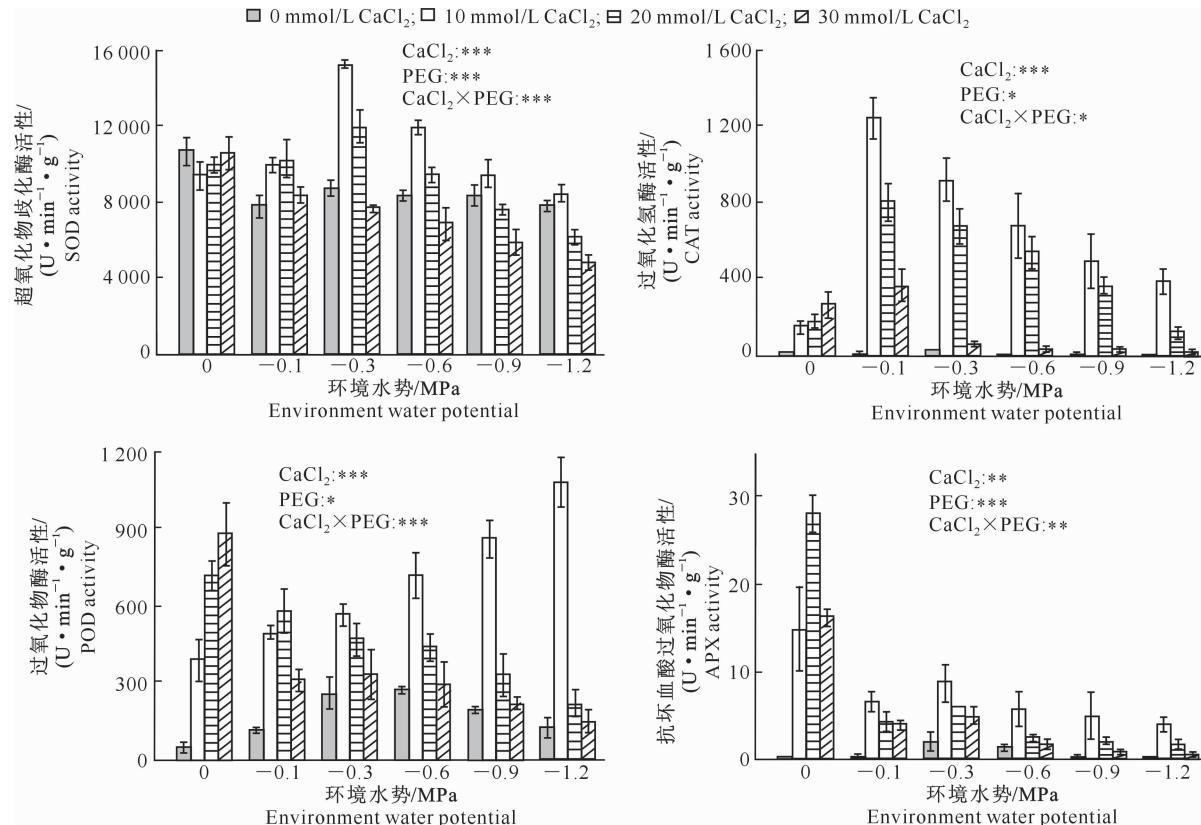


图 4 外源钙对干旱胁迫下青冈栎种子抗氧化酶活性的影响($n=3$)

Fig. 4 Effects of drought stress with exogenous calcium on antioxidant enzymes activities of *Cyclobalanopsis glauca* seeds ($n=3$)

方差分析结果表明,外源钙对 CAT 活力有极显著影响($P<0.001$),而干旱胁迫及其与外源钙交互作用对 CAT 活力均有显著影响($P<0.05$)。由

图 4 可知,当外源 CaCl_2 浓度相同时,随着干旱胁迫程度的加剧,青冈栎种子 CAT 活力呈先升高后降低的趋势,即 0 MPa < -1.2 MPa < -0.9 MPa <

-0.6 MPa < -0.3 MPa < -0.1 MPa。当环境水势为0 MPa时,CAT活性随 CaCl_2 浓度增大而显著升高($P<0.05$);当环境水势为-0.1~-1.2 MPa时,在同一环境水势下,随着 CaCl_2 浓度的增大,CAT活性呈先升后降趋势,且当 CaCl_2 浓度为10 mmol/L、环境水势为-0.1 MPa时,CAT活性最高,为1240.13 U/(min·g)。

方差分析结果表明,干旱胁迫处理对青冈栎种子 POD 活性有显著影响($P<0.05$),而外源钙及其与干旱胁迫交互作用对 POD 活性均有极显著影响($P<0.001$)。由图 4 可以看出,无论干旱胁迫与否,施钙组 POD 活性均高于无钙组。当 CaCl_2 浓度为 0 mmol/L 时,随干旱胁迫强度的加大,POD 活性呈先升后降的趋势;当 CaCl_2 浓度为 10 mmol/L,随干旱胁迫加剧 POD 活性呈持续升高趋势,且当环境水势为 -1.2 MPa 时,POD 活性达到峰值(1084.44 U/(min · g));当 CaCl_2 浓度分别为 20

和 30 mmol/L 时,随干旱胁迫加剧 POD 活性整体呈递减趋势。

方差分析表明,外源钙、干旱胁迫及其交互作用均对 APX 活性有极显著影响($P<0.01$)。由图 4 可以看出,在同一浓度 CaCl_2 处理下,随干旱胁迫加剧,APX 活性总体呈降低趋势。单一干旱胁迫处理下种子 APX 活性排序为: $-1.2 \text{ MPa} < 0 \text{ MPa} < -0.9 \text{ MPa} < -0.1 \text{ MPa} < -0.6 \text{ MPa} < -0.3 \text{ MPa}$, 当环境水势为 -1.2 MPa 时,APX 活性最低,仅为 $0.21 \text{ U}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 。当环境水势相同时,施加外源钙处理组 APX 活性均高于无钙组,其中当环境水势为 0 MPa 、 CaCl_2 浓度为 20 mmol/L 活性最高,为 $28.11 \text{ U}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 。

2.3 外源钙对青冈栎耐旱性影响的综合评价

根据 12 个萌发和生理生化指标的隶属函数加权平均值,综合评价外源钙对耐旱性的影响,结果见表 1。

表 1 不同处理下青冈栎种子耐旱指标隶属值及耐旱性综合评价

Table 1 Subordinate function value of drought resistant and comprehensive evaluation of *Cyclobalanopsis glauca* seeds in different treatments

表 1(续) Continued table 1

处理 Treatment	环境水势/MPa Environment water potential	外源钙/ CaCl ₂ (mmol·L ⁻¹)	隶属函数值 Subordinate function value				平均值 Mean value	排序 Sort	
			游离脯氨酸 Free proline	SOD	CAT	POD			
0	0	0	0.150	0.565	0.006	0.000	0.002	0.315	4
	10	0.175	0.437	0.115	0.327	0.521	0.473	2	
	20	0.192	0.490	0.138	0.645	1.000	0.505	1	
	30	0.171	0.548	0.211	0.804	0.574	0.433	3	
-0.1	0	0.172	0.284	0.009	0.069	0.005	0.381	3	
	10	0.287	0.493	1.000	0.430	0.225	0.634	1	
	20	0.419	0.520	0.647	0.514	0.146	0.547	2	
	30	0.181	0.339	0.289	0.251	0.133	0.318	4	
-0.3	0	0.302	0.381	0.021	0.202	0.063	0.495	3	
	10	0.902	1.000	0.741	0.506	0.306	0.830	1	
	20	1.000	0.685	0.542	0.403	0.204	0.662	2	
	30	0.232	0.270	0.045	0.274	0.166	0.291	4	
-0.6	0	0.595	0.344	0.002	0.214	0.042	0.343	3	
	10	0.686	0.682	0.543	0.645	0.194	0.534	1	
	20	0.817	0.444	0.432	0.375	0.078	0.385	2	
	30	0.220	0.198	0.026	0.236	0.052	0.165	4	
-0.9	0	0.390	0.338	0.002	0.140	0.002	0.237	3	
	10	0.601	0.444	0.392	0.783	0.170	0.454	1	
	20	0.470	0.263	0.294	0.270	0.067	0.245	2	
	30	0.095	0.102	0.020	0.164	0.017	0.084	4	
-1.2	0	0.270	0.294	0.000	0.076	0.000	0.156	2	
	10	0.428	0.344	0.310	1.000	0.135	0.377	1	
	20	0.321	0.127	0.092	0.163	0.052	0.143	3	
	30	0.000	0.000	0.015	0.095	0.008	0.011	4	

表 1 显示,在正常供水条件下(0 MPa),不同浓度 CaCl₂ 处理种子的耐旱性综合排名为 0 mmol/L < 30 mmol/L < 10 mmol/L < 20 mmol/L; 在轻度(-0.1 和 -0.3 MPa)和中度干旱胁迫(-0.6 和 -0.9 MPa)下,不同浓度 CaCl₂ 处理种子的耐旱性综合排名均为 30 mmol/L < 0 mmol/L < 20 mmol/L < 10 mmol/L; 在重度干旱胁迫下(-1.2 MPa),不同浓度 CaCl₂ 处理种子的耐旱性综合排名为 30 mmol/L < 20 mmol/L < 0 mmol/L < 10 mmol/L。综合其整体加权得分情况可知,当环境水势为 -0.3 MPa、CaCl₂ 浓度为 10 mmol/L 时得分最高,为最适宜的青冈栎种子萌发条件,能提高种子的耐旱性。

3 讨论与结论

桂西北喀斯特地区石漠化日趋严重,对植物种群定居及繁衍扩展影响重大,筛选适于石漠化地区生长的高抗植物已成为当前石漠化生态治理的热点问题^[1]。种子萌发阶段是被子植物生活史中的关键阶段,此阶段种子对环境胁迫最为敏感,是评价种子

抗逆性的重要时期^[24]。在喀斯特石漠化环境中,富钙和干旱是影响种子萌发的关键因素。外源钙与干旱胁迫会引发种子内一系列生理生化反应,进而影响种子萌发,其主要表现在萌发率、萌发势、萌发指数与活性指数等方面^[15]。本试验结果显示,外源钙、干旱胁迫及其交互作用均对青冈栎种子萌发能力和生理生化指标产生了不同程度的影响,从而导致青冈栎种子萌发时对周围土壤的水分条件需求发生了改变。

本研究发现,轻度干旱胁迫(环境水势为 -0.1 和 -0.3 MPa)时,青冈栎种子萌发参数(萌发率、萌发势、萌发指数和活性指数)均高于对照(环境水势为 0 MPa);之后随着干旱胁迫加剧(环境水势为 -0.6 ~ -1.2 MPa),萌发参数与对照相比均明显降低。由此可知,轻度干旱胁迫对青冈栎种子萌发具有促进作用,能够促使其提前萌动,完成种子萌发前相应的生理生化准备,能利用有限的水资源快速萌发,提高发芽质量。钙是高等植物生长所必需的元素之一,参与植物生长发育以及种子萌发等生理过程^[28]。在环境胁迫下,钙离子参与胁迫信号的感

受、传递、响应与表达,提高植物的抗逆性^[15]。本研究认为,在相同干旱胁迫梯度下,施加低浓度(10 mmol/L)CaCl₂能明显增加种子的萌发率、萌发势、萌发指数及活性指数,且当环境水势为-0.3 MPa时,各萌发参数均达到峰值;当CaCl₂浓度为20~30 mmol/L时,随着CaCl₂浓度的升高,各萌发参数值均下降,其中当CaCl₂浓度达30 mmol/L、环境水势为-1.2 MPa时,青冈栎种子停止萌发。说明在干旱胁迫特别是轻度干旱胁迫下,低浓度外源钙能更有效地提高种子发芽的速率和整齐度,可能是因为种子在萌发过程中低浓度钙离子可通过不同的信号转导途径对干旱胁迫信号进行转导,促使特异基因的表达和代谢反应使植物抗旱性增强,进而影响种子萌发和幼苗生长^[29]。但是钙离子过多积累可能使细胞内渗透平衡和营养平衡被打破,从而使干旱胁迫信号转导受阻并产生毒素作用,抑制种子萌发和生长^[30]。这与蔡喜悦等^[15]对复羽叶亲树(*Koelreuteria paniculata*)种子萌发的研究结果相似。但是赵丽丽等^[29]研究发现,中低浓度外源钙对二色胡枝子(*Lespedeza bicolor*)种子萌发无明显促进作用,而高浓度外源钙对其萌发有明显抑制作用。说明不同种类植物对外源钙的耐受力与生理反应并不相同。

MDA是植物细胞膜脂过氧化最主要的产物之一,通常用其含量评价膜脂过氧化的程度,是评价植物受伤害程度的重要生理指标,MDA含量越高,说明植物受伤害的程度越严重^[31]。本研究中,同一浓度CaCl₂下,青冈栎种子MDA含量随干旱胁迫加剧而显著增加;在相同干旱胁迫梯度下,低浓度(10 mmol/L)CaCl₂可以有效地抑制MDA含量的增加;施加中浓度(20 mmol/L)CaCl₂仅在轻度干旱胁迫(-0.1~-0.3 MPa)时抑制了MDA含量的增加,但在中度(-0.6 MPa)和重度干旱胁迫(-1.2 MPa)下,MDA含量迅速增加;高浓度(30 mmol/L)CaCl₂处理MDA含量随干旱胁迫的加剧而迅速增加,且在重度干旱胁迫(-1.2 MPa)时,MDA含量到达了峰值。说明施加低浓度CaCl₂可以有效地抑制干旱环境下青冈栎种子萌发时膜脂过氧化的过程,对细胞膜具有保护和修复作用,可减轻或防止膜系统的过氧化伤害,而高浓度CaCl₂则不能有效缓解细胞膜脂所受的过氧化伤害。这与李苗苗^[32]对沙地云杉(*Picea mongolica*)的研究结果一致。

干旱环境下植物会通过主动积累渗透调节物质,如可溶性蛋白质、可溶性糖和游离脯氨酸,提高

细胞液浓度,维持细胞膨压,防止原生质过度脱水,为正常生命活动创造条件^[33]。本研究发现,当CaCl₂浓度为0 mmol/L时,干旱胁迫处理可溶性蛋白质、可溶性糖和游离脯氨酸含量均比对照有不同程度增加,说明在干旱环境下青冈栎种子可以通过主动积累有机渗透调节物质,来维持正常的生理代谢。在相同干旱胁迫梯度下,施加低浓度(10 mmol/L)CaCl₂,其有机渗透调节物质含量总是高于无钙处理,且可溶性蛋白质含量随干旱胁迫加剧而迅速增加;施加中浓度(20 mmol/L)CaCl₂后可溶性糖和游离脯氨酸含量均高于无钙组,且当环境水势为-0.3 MPa时,可溶性蛋白和游离脯氨酸含量达到最高,之后随着干旱胁迫程度的加剧,可溶性蛋白和游离脯氨酸含量均呈迅速减少的趋势;而当用高浓度(30 mmol/L)CaCl₂处理时,随干旱胁迫程度加剧,有机渗透调节物质含量总体均呈下降趋势,且在环境水势为-1.2 MPa时下降到最低值。说明施加低浓度CaCl₂更有利于Ca²⁺参与干旱胁迫的信号传导,并诱导更多蛋白质合成及氨基酸转化,从而增加渗透性物质。随着CaCl₂浓度的增大及干旱胁迫的加剧,可溶性蛋白质合成开始受阻,游离脯氨酸与可溶性糖积累合成也因此受阻,最终导致不能有效降低细胞水势,细胞迅速失水,阻碍了种子的萌发^[32]。Güler等^[34]也认为,低浓度Ca²⁺可促进干旱胁迫条件下植物渗透调节物质的积累,特别是可以通过延缓蛋白质的降解,保持蛋白质正常代谢,减少其体内过多的氨类物质的毒害,从而减少干旱胁迫的伤害,提高其抗旱性。

研究表明,SOD、CAT、POD和APX是重要的抗氧化保护酶,可以清除植物体内产生的活性氧(O₂⁻、O₂^{·-}、H₂O₂和HO[·]);其中SOD清除O₂^{·-},生成O₂和H₂O₂,再通过CAT、POD、APX共同作用清除H₂O₂,可以清除植物体内过多的活性氧,能有效阻止活性氧在植物体内的积累,维持活性氧的代谢平衡、保护膜结构,从而增强植物抗性^[35]。本研究显示,当CaCl₂浓度为0 mmol/L时,在不同干旱胁迫条件下,种子SOD活性略低于对照;POD、CAT、APX活性随干旱胁迫强度的加大呈先增后减的趋势。说明轻度干旱胁迫下,青冈栎种子可以保持相对较高的抗氧化酶活性,随着干旱胁迫加剧其抗氧化保护酶活性降低,清除自由基能力减弱。在施加不同浓度CaCl₂后,可总体提高各干旱胁迫处理青冈栎种子SOD、CAT、POD和APX活性,其中低浓度(10 mmol/L)CaCl₂作用效果最明显。说明

低浓度钙离子可使干旱胁迫下青冈栎抗氧化保护酶活性得到改善与增强,从而清除植物在逆境中产生的过量活性氧,在一定程度上忍耐、减缓或抵御逆境胁迫的伤害。Gong 等^[36]的研究也证实,适宜浓度的外源 Ca^{2+} 通过调节 Ca^{2+} -CaM 信使系统提高植物的抗氧化酶活性。

本研究采用萌发指标和生理生化指标对青冈栎种子耐旱性的综合评价显示,青冈栎种子经低浓度(10 mmol/L)外源 CaCl_2 处理后可明显降低干旱胁迫对青冈栎种子萌发造成的伤害,提高种子的抗旱性,促进种子萌发,在轻度干旱胁迫环境下,特别是当环境水势为-0.3 MPa 时作用最显著。因此,在喀斯特地区进行青冈栎实生苗繁殖过程中,可以在播种前用 10 mmol/L 外源 CaCl_2 浸种,以提高种子萌发率。

[参考文献]

- [1] 郭柯,刘长成,董鸣.我国西南喀斯特植物生态适应性与石漠化治理[J].植物生态学报,2011,35(10):991-999.
Guo K,Liu C C,Dong M. Ecological adaptation of plants and control of rocky-desertification on Karst region of Southwest China [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2011, 35 (10): 991-999.
- [2] 陈洪松,傅伟,王克林,等.桂西北岩溶山区峰丛洼地土壤水分动态变化初探[J].水土保持学报,2006,20(4):136-139.
Chen H S,Fu W,Wang K L,et al. Dynamic change of soil water in peak-cluster depression areas of Karst mountainous region in Northwest Guangxi [J]. Journal of Soil Water Conservation, 2006, 20(4):136-139.
- [3] McCole A A,Stern L A. Seasonal water use patterns of *Juniperus ashei* on the Edwards Plateau, Texas, based on stable isotopes in water [J]. Journal of Hydrology, 2007, 342:238-248.
- [4] Nie Y P,Chen H S,Wang K L,et al. Water source utilization by woody plants growing on dolomite outcrops and nearby soils during dry seasons in Karst region of Southwest China [J]. Journal of Hydrology, 2011, 420(14):264-274.
- [5] 姬飞腾,李楠,邓馨.喀斯特地区植物钙含量特征与高钙适应方式分析[J].植物生态学报,2009,33(5):926-935.
Ji F T,Li N,Deng X. Calcium contents and high calcium adaptation of plants in Karst areas of China [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2009, 33(5):926-935.
- [6] Schwinnung S. The water relations of two evergreen tree species in a Karst savanna [J]. Oecologia, 2008, 158:373-383.
- [7] Zhu J J,Zhang J L,Liu H C,et al. Photosynthesis, non-photochemical pathways and activities of antioxidant enzymes in a resilient evergreen oak under different climatic conditions from a valley-savanna in Southwest China [J]. Physiologia Plantarum, 2009, 135:62-72.
- [8] 李周,赵雅洁,宋海燕,等.不同水分处理下喀斯特土层厚度异质性对两种草本叶片解剖结构和光合特性的影响[J].生态学报,2018,38(2):721-732.
Li Z,Zhao Y J,Song H Y,et al. Effects of soil thickness heterogeneity on the leaf anatomical structure and photosynthetic traits of two grasses under different water treatments [J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(2):721-732.
- [9] 刘金玉,付培立,王玉杰,等.热带喀斯特森林常绿和落叶榕树的水力特征和水分关系与抗旱策略[J].植物科学学报,2012,30(5):484-493.
Liu J Y,Fu P L,Wang Y J,et al. Different drought-adaptation strategies as characterized by hydraulic and water-relations traits of evergreen and deciduous figs in a Tropical Karst forest [J]. Plant Science Journal, 2012, 30(5):484-493.
- [10] 张慧玲,丁亚丽,陈洪松,等.出露基岩生境典型植物树干液流对自然降水和连续干旱的响应特征[J].应用生态学报,2018,29(4):1117-1124.
Zhang H L,Ding Y L,Chen H S,et al. Responses of sap flow to natural rainfall and continuous drought of tree species growing on bedrock outcrops [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2018, 29(4):1117-1124.
- [11] Liu C C,Liu Y G,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.
- [12] 刘锦春,钟章成,何跃军.干旱胁迫及复水对喀斯特地区柏木幼苗活性氧清除系统的影响[J].应用生态学报,2011,22(11):2836-2840.
Liu J C,Zhong Z C,He Y J. Effects of drought stress and re-watering on the active oxygen scavenging system of *Cupressus funerbris* seedlings in Karst area [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(11):2836-2840.
- [13] 程彩芳,陆爱云,李正才,等.不同林龄木荷-青冈栎混交林幼林碳储量[J].生态学杂志,2015,34(10):2705-2710.
Cheng C F,Lu A Y,Li Z C,et al. Carbon storage in mixed *Schima superba* Gardn. et Champ.-*Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst. young plantations at different stand ages [J]. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(10):2705-2710.
- [14] Chan C W M,Wohlbach D J,Rodesch M J,et al. Transcriptional changes in response to growth of *Arabidopsis* in high external calcium [J]. FEBS Letters, 2008, 582(6):967-976.
- [15] 蔡喜悦,陈晓德,李朝政,等.干旱胁迫下外源钙对石灰岩地区复羽叶亲树种子萌发的影响[J].应用生态学报,2013,24(5):1341-1346.
Cai X Y,Chen X D,Li C Z,et al. Effects of exogenous Ca^{2+} on the seed germination of *Koelreuteria* in limestone area of Southwest China under drought stress [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(5):1341-1346.
- [16] 苏宗明,李先琨.广西岩溶植被类型及其分类系统[J].广西植物,2003,23(4):289-293.
Su Z M,Li X K. The types of natural vegetation in Karst region of Guangxi and its classified system [J]. Guihaia, 2003,

- 23(4):289-293.
- [17] 黄甫昭,韦春强,李先琨,等.不同水分条件下黄荆条对其冠下青冈栎和茶条木幼苗生长的影响[J].生态学杂志,2017,36(2):389-395.
Huang F Z,Wei C Q,Li X K,et al.The effects of *Vitex negundo* on seedling of *Cyclobalanopsis glauca* and *Delavaya toxocarpa* with different moisture conditions [J]. Chinese Journal of Ecology,2017,36(2):389-395.
- [18] Siam A M J,Radoglou K M,Noitsakis B,et al.Differences in ecophysiological responses to summer drought between seedlings of three deciduous oak species [J]. Forest Ecology and Management,2009,258(1):35-42.
- [19] 程彩芳,李正才,周君刚,等.树种组成对北亚热带11年生常绿阔叶人工林碳储量的影响[J].西北植物学报,2015,35(5):1037-1043.
Cheng C F,Li Z C,Zhou J G,et al.Effects of tree species composition on carbon storage of 11 years old evergreen broad-leaved plantations in north subtropical areas of China [J]. Acta Bot Bor-Occid Sin,2015,35(5):1037-1043.
- [20] 张中峰,尤业明,黄玉清,等.模拟喀斯特生境条件下干旱胁迫对青冈栎苗木的影响[J].生态学报,2012,32(20):6318-6325.
Zhang Z F,You Y M,Huang Y Q,et al.Effects of drought stress on *Cyclobalanopsis glauca* seedlings under simulating Karst environment condition [J]. Acta Ecologica Sinica,2012,32(20):6318-6325.
- [21] Huang Y Q,Zhao P,Zhang Z F,et al.Transpiration of *Cyclobalanopsis glauca* (syn. *Quercus glauca*) stand measured by sap-flow method in a Karst rocky terrain during dry season [J]. Ecological Research,2009,24(4):791-801.
- [22] 沈熙环.林木育种学[M].北京:中国林业出版社,1990.
Shen X H.Forest tree breeding [M]. Beijing: China Forestry Publishing House,1990.
- [23] Michel B E,Kaufmann M R.The osmotic potential of polyethylene glycol 6000 [J]. Plant Physiol,1973,51:914-916.
- [24] 吴敏,张文辉,马闯,等.干旱胁迫对栓皮栎种子萌发能力的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2017,45(5):91-100.
Wu M,Zhang W H,Ma C,et al.Effect of drought stress on seed germination ability of *Quercus variabilis* Bl [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed),2017,45(5):91-100.
- [25] Boscagli A,Sette B.Seed germination enhancement in *Satureja montana* L. ssp. *Montana* [J]. Seed Science and Technology,2001,29(2):347-355.
- [26] 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.
- Li H S.Plant physiology and biochemistry experimental principles and techniques [M]. Beijing: Higher Education Press,2000.
- [27] 高婷,张文辉.不同瑞典能源柳无性系对干旱胁迫的生理响应[J].西北植物学报,2012,32(4):739-744.
Gao T,Zhang W H.Physiological responses of different energy willow clones under drought stress [J]. Acta Bot Broeali-Occident Sin,2012,32(4):739-744.
- [28] Kudla J,Batistic O,Hashimoto K.Calcium signals: the lead currency of plant information processing [J]. The Plant Cell,2010,22:541-563.
- [29] 赵丽丽,王普昶,陈超,等.干旱胁迫下外源钙对二色胡枝子种子萌发的影响[J].草地学报,2015,23(1):120-123.
Zhao L L,Wang P C,Chen C,et al.Effects of exogenous calcium on the seed germination of *Lespedeza bicolor* under drought stress [J]. Acta Agrestia Sinica,2015,23(1):120-123.
- [30] 陈莹,王普昶,赵丽丽,等.外源钙对干旱胁迫下木豆种苗生理特性的影响[J].草地学报,2014,22(5):1051-1055.
Chen Y,Wang P C,Zhao L L,et al.Effects of exogenous calcium on the physiological characters of *Cajanus cajan* under drought stress [J]. Acta Agrestia Sinica,2014,22(5):1051-1055.
- [31] 郭郁频,任永霞,刘贵河,等.外源钙和赤霉素对干旱胁迫下苜蓿幼苗生理特性的影响[J].草业学报,2015,24(7):89-96.
Guo Y P,Ren Y X,Liu G H,et al.Effects of calcium (CaCl_2), GA_3 and complex liquid on the physiological characteristics of alfalfa seedlings under drought stress [J]. Acta Agrestia Sinica,2015,24(7):89-96.
- [32] 李苗苗.外源钙对不同生态型沙地云杉(*Picea mongolica*)幼苗抗旱性影响的研究[D].上海:华东师范大学,2013.
Li M M.Effects of exogenous calcium on the drought resistance of different ecotype of *Picea mongolica* seedlings [D]. Shanghai: East China Normal University,2013.
- [33] Silva E N,Ferreira-Silva S L,Viégas R A,et al.The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants [J]. Environmental and Experimental Botany,2010,69(3):279-285.
- [34] Güler N S,Saglam A,Demiralay M,et al.Apoplastic and symplastic solute concentrations contribute to osmotic adjustment in bean genotypes during drought stress [J]. Turk J Biol,2012,36:151-160.
- [35] Ushimaru T,Kanematsu S,Katayama M,et al.Antioxidative enzymes in seedlings of *Nelumbo nucifera* germinated under water [J]. Physiologia Plantarum,2001,112:39-46.
- [36] Gong M,Li Z G.Calmodulin-binding protein from *Zea mays* germs [J]. Phytochemistry,1995,40(5):1335-1339.