

氯胁迫对幼龄茶树叶绿素含量及抗氧化系统的影响

李春雷

(潍坊科技学院,山东 寿光 262700)

摘要: 为探讨氯胁迫对茶树的伤害机制,为幼龄茶园合理施用氯肥提供科学的理论依据,以1年生龙井43茶苗为材料,采用水培法研究了不同浓度氯离子对茶树叶片叶绿素含量、抗氧化系统的影响。结果表明:随着氯离子浓度的升高,叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量均显著降低,在氯浓度为100 mmol/L时,分别比CK(0 mmol/L)下降了36.2%、22.7%、33.1%;SOD、POD活性均表现为先升高后降低,在氯离子浓度为40 mmol/L时达到最大值,比CK分别升高10.8%和9.2%;CAT活性持续下降,最大降幅为45.4%;脯氨酸含量、过氧化氢含量及丙二醛含量均显著升高。这说明高浓度氯离子对细胞质膜系统及细胞器结构和功能产生了破坏,而在低浓度氯离子(20 mmol/L)胁迫下MDA含量与CK差异不显著,说明低浓度氯未对茶树造成伤害。因此,对于幼龄茶园冲施氯肥以氯离子浓度不超过20 mmol/L为宜。

关键词: 茶树; 氯胁迫; 保护酶; 脯氨酸; 丙二醛

中图分类号: S571.1 Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)09-0056-05

Effects of Chloride Stress on Chlorophyll Content and Antioxidant System in Leaves of Young Tea Plant

LI Chun-lei

(Weifang University of Science & Technology, Shouguang 262700, China)

Abstract: In order to investigate the injury mechanism of chlorine stress to tea plant and provide the scientific reference for reasonable application of chlorine fertilizer to young tea plant, 1-year-old seedlings of the Longjing 43 variety of tea (*Camellia sinensis* L.) were grown hydroponically to study the effect on chlorophyll content and antioxidant system at different concentrations of chlorine (Cl). The results showed that the content of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll decreased significantly with Cl concentration increasing; their contents decreased by 36.2%, 22.7% and 33.1% compared to CK (0 mmol/L) respectively at 100 mmol/L Cl. SOD, POD activities showed an initial increase followed by a decrease with Cl concentration increasing, reached their peaks when the Cl concentration was 40 mmol/L, and their activities increased by 10.8% and 9.2% compared to CK respectively. CAT activity decreased continuously with Cl concentration increasing and it decreased largest by 45.4% compared with the control at 100 mmol/L Cl. At the same time, the contents of MDA, H_2O_2 and proline increased obviously with the increasing of Cl concentration. These results suggested that at higher Cl concentrations, the Cl stress could mangle the cytomembrane system, and functions of the major organelles of tea plant. However, slight Cl stress hardly damaged young tea plant because MDA content had not significant difference at low Cl concentration (20 mmol/L) compared to CK. Therefore, Cl fertilizer concentration applied to young tea plant should be less than 20 mmol/L.

Key words: *Camellia sinensis* L.; chlorine stress; antioxidant enzyme; proline; malondialdehyde

收稿日期:2014-02-28

基金项目:潍坊市科技发展计划项目(2013YD181)

作者简介:李春雷(1979-),男,山东潍坊人,副教授,博士,主要从事茶树栽培生理研究。E-mail:lclxhm@aliyun.com

氯对茶树有重要影响,一方面作为茶树的必需元素,直接参与茶树的生理代谢过程;另一方面茶树又属于忌氯植物,土壤中氯过多或者施氮肥过多(使茶树叶片中氯含量超过0.4%以上时),将对茶树造成危害^[1-2]。20世纪八九十年代,前人关于茶树中氯的研究多集中在茶树氯害的症状、氯对茶树产量及品质的影响等方面^[3-5]。如茶树氯害的症状与其他胁迫(干旱、病害、冻害、缺素等)症状相似,叶尖、叶缘出现枯焦、蜷缩,严重者扩展至全叶,叶片发黄脱落,根系腐烂脱皮^[3]。过多施用含氯肥料还将影响酶活性,抑制P、Mn的吸收,影响茶树正常的生理机能^[4]。茹国敏等^[5]研究发现,施用氯化钾对茶叶品质的香气、滋味、汤色、叶底等未产生不良影响,产量与施用硫酸钾差异也不显著。近年来,有关氯对茶树影响的研究鲜见报道,茶树氯害的机制也不清楚。抗氧化系统是植物抵抗逆境、保护自身不受伤害的一个重要的平衡系统,能够抵御和清除因逆境造成的活性氧,从而保护植物本身不受伤害。目前,有关氯对茶树抗氧化系统的影响以及抗氧化系统在茶树氯害中的作用尚未见报道。

茶树是一种经济作物,增施钾肥对提高茶叶品质和产量已日趋重要,茶园常用的钾肥主要有硫酸钾和氯化钾,以硫酸钾的效果较好,但是硫酸钾价格较贵,目前市场上硫酸钾肥料价格约为3600元/t,而氯化钾肥料仅为2000元/t左右,价格差别较大,若能用氯化钾代替部分硫酸钾肥料而不影响茶树的生长、产量及品质,将起到节省成本、提高经济效益的作用。茶树虽是忌氯植物,但不同于典型的忌氯植物,幼龄茶树对氯较为敏感,而成龄茶树尤其是老茶树耐氯能力比较强,因此认为茶树是一种“亚忌氯植物”。含氯肥料对成龄茶树的危害基本不大,甚至能起到硫酸钾的效果,但对于幼龄茶园,含氯肥料是否能用、如何用以及用量多少为宜等问题还不得而知。鉴于此,以龙井43幼龄茶苗为材料,研究了不同浓度氯对其抗氧化系统及叶绿素含量的影响,旨在探讨氯胁迫对茶树的伤害机制,为幼龄茶园合理施用氮肥提供科学的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试茶苗为1年生龙井43扦插苗。

1.2 试验设计

试验在潍坊科技学院基地冬暖式大棚内进行,

随机区组设计。采用水培法,营养液配方为1/2Hoagland+Arnon^[6]。栽植前,洗净茶苗根部。培养期间每天用HCl和NaOH调整营养液pH值为5.5±0.1,每盆均用压力泵通气,每4h通气1h,每7d换1次营养液。缓苗10d后,采用Kingsbury等^[7]的方法,以MgCl₂:KCl:CaCl₂:NH₄Cl=38:54:36:9(摩尔比)配置Cl⁻,分别设5个氯处理,即0(CK)、20、40、60、100mmol/L,每处理重复5次,每盆栽植10株苗,处理50d后,采集第三功能叶位叶片,于-70℃超低温冰箱贮存备用。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 酶液提取 取第三叶位叶片,去其主脉,称取0.5000g鲜叶研钵,加入0.5g石英砂和10mL预冷的50mmol/L磷酸缓冲液(pH值7.8,含有0.1mmol/L EDTA、5%PVP),置于冰上研磨至匀浆,匀浆液于12000g(4℃)离心15min,上清液用于测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性^[8]。

1.3.2 叶绿素含量 称取0.1000g鲜叶,剪碎放入研钵中,加2mL80%预冷的丙酮研磨,再加5mL丙酮继续研磨至组织变白,过滤到25mL容量瓶中,用丙酮冲洗滤纸及残渣,直至无绿色为止,用丙酮定容至25mL,663、645nm处比色^[14],计算叶绿素含量。

1.3.3 抗氧化酶活性 SOD活性采用氮蓝四唑比色法测定^[9];POD活性采用愈创木酚氧化法测定^[10],以1minOD₄₇₀值增加0.01为1个酶活性单位[U/(g·min)];CAT活性采用分光光度法^[11]测定,以1minOD₂₄₀值减少0.1为1个酶活力单位[U/(g·min)];

1.3.4 脯氨酸、过氧化氢(H₂O₂)、丙二醛(MDA)含量 脯氨酸含量采用酸性茚三酮法^[12]测定;H₂O₂含量测定采用试剂盒,称取0.5000g茶树鲜叶,加5mL预冷(-20℃)丙酮及少量石英砂研磨成匀浆后,转入离心管,4℃、10000g/min下离心10min,弃去残渣,上清液定容到10mL;MDA含量采用硫代巴比妥酸法^[13]测定。

1.4 数据分析

采用Excel 2003进行数据统计和SAS分析软件进行LSD显著性检验。

2 结果与分析

2.1 氯胁迫对幼龄茶树叶片叶绿素含量的影响

由表1可知,随着氯离子浓度的增大,茶树叶片叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素含量均呈下降趋势,且与氯

离子浓度呈极显著负相关(r 分别为 -0.992^{**} 、 -0.928^{**} 、 -0.994^{**})。氯离子浓度为 100 mmol/L 时,叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量分别较 CK 下降 36.2%、22.7%、33.1%。叶绿素 a/b 随着氯离子浓度的增加呈先升高后降低趋势,其与氯离子浓度 r 为

-0.861 。氯离子浓度为 20 mmol/L 时,叶绿素 a/b 比 CK 升高 8.6%;氯离子浓度达到 100 mmol/L 时,叶绿素 a/b 比 CK 下降 17.5%,说明氯离子低浓度胁迫下,叶绿素 b 受到的影响大于叶绿素 a;而在氯离子高浓度胁迫下,叶绿素 a 所受影响大于叶绿素 b。

表 1 氯胁迫对幼龄茶树叶片叶绿素含量的影响

氯离子浓度/(mmol/L)	叶绿素 a/(mg/g)	叶绿素 b/(mg/g)	叶绿素 a+b/(mg/g)	叶绿素 a/b
0(CK)	2.159±0.048a	0.642±0.009a	2.801±0.057a	3.364±0.065b
20	2.067±0.044b	0.566±0.010b	2.633±0.054b	3.653±0.064a
40	1.800±0.022c	0.551±0.006b	2.351±0.029c	3.266±0.035bc
60	1.677±0.007d	0.523±0.06c	2.200±0.013d	3.204±0.019c
100	1.378±0.013e	0.496±0.05d	1.874±0.019e	2.777±0.024d

注:表中数据为平均值±标准偏差,同列不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平,下同。

2.2 氯胁迫对幼龄茶树叶片抗氧化酶的影响

由表 2 可知,随着氯离子浓度的增加,SOD、POD 活性均呈先升高后降低的趋势,且均是在氯离子浓度为 40 mmol/L 时达到最大值,分别比 CK 增加 10.8% 和 9.2%,而后,随着氯离子浓度增加,SOD、POD 活性均降低,当浓度为 100 mmol/L 时,达到最小值,分别比 CK 降低 21.4%、12.2%,这说明在氯离子浓度小于 40 mmol/L 时,SOD、POD 在清除活性氧方面均表现出了积极作用。CAT 活性随着氯离子浓度的增加显著降低,最大降幅为 45.4%,由此可见,氯离子对 CAT 的影响更大。低浓度下(20 mmol/L),SOD、POD 活性较 CK 略升高,CAT 较 CK 略降低,但与 CK 相比差异均不显著,说明低浓度氯离子对这 SOD、POD、CAT 影响不大。因此,在幼龄茶园施氯肥时,氯离子浓度不宜超 20 mmol/L。

表 2 氯胁迫对幼龄茶树叶片 SOD、CAT、POD 活性的影响

氯离子浓度/ (mmol/L)	SOD/ (U/g)	CAT/ [U/(g·min)]	POD/ [U/(g·min)]
0(CK)	553.61±13.02b	285.42±11.32a	444.60±10.75b
20	570.96±10.29b	268.09±10.61a	461.44±6.93b
40	613.31±9.86a	233.41±8.48b	485.36±13.08a
60	515.73±6.81c	188.87±10.58c	449.49±6.19b
100	435.17±11.56d	155.81±9.29d	390.38±11.13c

2.3 氯胁迫对幼龄茶树叶片脯氨酸、H₂O₂、MDA 含量的影响

由表 3 可见,脯氨酸含量随氯离子浓度增加呈显著升高趋势,与氯离子浓度极显著正相关($r=0.930^{**}$)。20、40、60、100 mmol/L 氯离子胁迫下,脯氨酸含量分别比 CK 增加 32.3%、68.0%、95.0%、101.0%。随着氯离子浓度的增加,茶树

H₂O₂、MDA 含量均显著升高,说明氯离子浓度增加使茶树膜脂质氧化程度越来越严重,细胞膜损伤加重。与 CK 相比,20、40、60、100 mmol/L 氯离子胁迫下 H₂O₂ 含量依次增加 9.9%、26.6%、36.4%、49.1%,且各处理间差异显著;MDA 含量依次增加 7.1%、10.6%、28.2%、47.2%,其中 20 mmol/L 处理与 CK 处理下 MDA 含量差异不显著,这说明在氯离子低浓度胁迫下保护性酶能清除过多的活性氧,从而阻止膜脂过氧化反应。因此,在幼龄茶园少施氯肥不会对茶树造成伤害。

表 3 氯胁迫对幼龄茶树叶片脯氨酸、H₂O₂、MDA 含量影响

氯离子浓度/ (mmol/L)	脯氨酸/ (μg/g)	H ₂ O ₂ / (μmol/g)	MDA/ (nmol/g)
0(CK)	23.38±0.77d	25.92±1.42e	7.74±0.09d
20	30.93±1.45c	28.51±0.47d	8.29±0.07dc
40	39.28±1.69b	32.82±0.66c	8.56±0.08c
60	45.60±0.56a	35.35±0.47b	9.92±0.14b
100	47.00±1.05a	38.65±0.36a	11.39±0.78a

3 结论与讨论

叶绿素是光合作用的主要色素,其含量高低直接反映光合作用的强弱。肖丽等^[15]和胡小碗等^[16]分别研究了氯对大白菜和油菜叶绿素含量的影响,发现低浓度氯提高或者维持叶绿素含量,而高浓度氯显著降低叶绿素含量、光合作用及蒸腾作用等。本试验中,随着氯离子浓度的增加,幼龄茶树叶片的叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素含量均显著降低,表明氯离子抑制了叶绿素的合成,这与前人研究并不完全一致,可能是所用材料不同造成的。

H₂O₂、MDA 含量是衡量氧化胁迫程度的重要

指标。本试验结果表明,随氯离子浓度增加, H_2O_2 、MDA 含量升高,说明茶树细胞发生了膜质过氧化反应,受到了氧化胁迫,从而造成了对茶树的伤害。但在氯离子低浓度(20 mmol/L)胁迫时,MDA 含量与 CK 差异不显著,说明此时膜质过氧化反应发生程度较轻,即低浓度氯对幼龄茶树不会造成伤害。因此,幼龄茶园也可以施用含氯肥料,但氯离子浓度不能超过 20 mmol/L。前人研究表明,幼龄茶园施氯肥控制在 150~225 kg/hm² 不会对茶树造成伤害^[17];超过 300 kg/hm² 时,对红茶发酵有一定影响,表现为随着施氯化钾肥量的增加,发酵速度渐次减缓^[5]。

植物在长期进化过程中,形成了一套有效的酶促和非酶促清除活性氧的系统,酶促系统包括 SOD、POD、CAT 等保护性酶,非酶促系统包括脯氨酸等物质。正常情况下,植物体内这 2 套系统使活性氧的产生和消除处在一个动态平衡中,使植物的膜系统免受伤害。SOD 存在于细胞的叶绿体、细胞核、线粒体和过氧化物酶体中,是植物细胞免受活性氧伤害的第一道防线^[18-19],主要将 O_2^- 歧化为 H_2O_2 。植物体内积累的过量的 H_2O_2 ,还需 POD、CAT 等进一步催化形成水,才能彻底清除自由基的伤害。本研究中,随着氯离子浓度的升高,SOD、POD 活性先升高后降低,说明氯离子低浓度胁迫下,SOD、POD 表现出积极的作用,但随着氯离子浓度的增加,茶树体内积累的活性氧超出了其清除能力,SOD、POD 活性也随之降低,CAT 活性持续降低说明了茶树体内清除过氧化氢能力的递降,这样势必造成过氧化氢的积累,研究中 H_2O_2 含量持续升高也验证了这一点。 H_2O_2 含量的持续升高将加剧膜质过氧化物反应,使 MDA 含量升高,造成膜损伤。这也正是氯离子对茶树造成伤害的原因。

脯氨酸是植物细胞抗氧化系统中重要的非酶类物质,在清除 $\cdot OH$ 方面起着关键作用,其还是抗逆境的重要抗性指标^[21-23]。在本研究中,随着氯离子浓度的增加,脯氨酸含量显著升高,说明脯氨酸在清除 $\cdot OH$ 方面起到了重要作用。

由以上试验可知:茶树受氯害是因为氯离子影响了保护性酶活性,打破了活性氧产生与清除的动态平衡,造成活性氧大量积累,引起了膜质过氧化反应,进而破坏细胞结构;对于幼龄茶园来说,含氯肥料并不是不可用,但应注意冲施含氯肥料时应该控制氯离子浓度在 20 mmol/L 以下。

参考文献:

- [1] 毛知耘,李家康,何光安,等. 中国含氯化肥[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [2] Moya J L, Gomez-Cadenas A, Primo-Millo E, et al. Chloride absorption in salt-sensitive Carrizo citrange and salt-tolerant Cleopatra mandarin citrus rootstocks is linked to water use[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54: 825-833.
- [3] 何金旺. 茶树氯中毒症状及预防措施[J]. 科学种养, 2008(10): 30-31.
- [4] 毛平生. 浅谈氯对茶树生理的影响[J]. 蚕桑茶叶通讯, 1993(4): 21.
- [5] 茹国敏, 吴洵. 氯化钾在茶园中的肥效和“氯害”试验[J]. 土壤肥料, 1985(4): 11-14.
- [6] Hoagland D R, Aronson D I. The water culture method for growing plants without soil[J]. Calif Agric Exp Stn Circ, 1950, 347(2): 32.
- [7] Kingsbury R W, Epstein E. Salt sensitivity in wheat[J]. Plant Physiology, 1986, 80: 651-654.
- [8] Pereira G, Molina S, Lea P, et al. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*[J]. Plant Soil, 2002, 239: 123-132.
- [9] 熊庆娥. 植物生理学实验教程[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2003: 72, 122-126.
- [10] Ramiro D, Guerreiro-Filho O, Mazzafera P. Phenol contents, oxidase activities, and the resistance of coffee to the leaf miner *Leucoptera coffeella*[J]. J Chem Ecol, 2006, 32: 1977-1988.
- [11] 王晶英. 植物生理生化实验技术与原理[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003: 82-83.
- [12] Khedr A, Abbas M, Wahid A, et al. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress[J]. J Exp Bot, 2003, 54: 2553-2562.
- [13] Dhindsa R, Plumb-Dhindsa P, Thorpe T. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. J Exp Bot, 1981, 32: 93-101.
- [14] Jiang H, Yang J, Zhang J. Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and zinc stress[J]. Environ Pollut, 2007, 147: 750-756.
- [15] 肖丽, 高瑞凤, 隋方功. 氯胁迫对大白菜幼苗叶绿素含量及光合作用的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2008(2): 44-47.

(下转第 65 页)

- (2):237-240.
- [17] 韩烁,夏冬亮,李潞滨,等.毛竹根部解磷细菌的筛选及多样性研究[J].河北农业大学学报,2010,33(2):26-31.
- [18] 刘超良,吴克宁,吕巧灵,等.信阳毛尖茶生长环境的土壤特性分析[J].河南农业大学学报,2006,40(3):274-278.
- [19] Nautiyal C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170(1): 265-270.
- [20] 郑传进,黄林,龚明.巨大芽孢杆菌解磷能力的研究[J].江西农业大学学报:自然科学版,2002,24(2):190-192.
- [21] Weisburg W G, Bams S M, Pelletier D A, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [22] 鲁如坤.土壤农业化学分析方法[M].北京:中国农业科技出版社,2000:180-181.
- [23] 王光华,赵英,周德瑞,等.解磷菌的研究现状与展望[J].生态环境,2003,12(1):96-101.
- [24] 尹瑞玲.我国旱地土壤溶磷微生物[J].土壤,1988,20(5):243-246.
- [25] Benitez M, Mespaden G B. Linking sequence to function in soil bacteria: Sequence-directed isolation of novel bacteria contributing to soilborne plant disease suppression[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75: 915-924.
- [26] Jesus C M, Janette O L, Paulina E S, *et al.* The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73: 5308-5319.
- [27] Canamas T P, Vinas J, Usall J, *et al.* Impact of mild heat treatments on induction of thermotolerance in the biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 and viability after spray-drying[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104: 767-775.
- [28] Frenandez L A, Zalba P, Gomez M A, *et al.* Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions[J]. Biology and Fertility of Soils, 2007, 43: 805-809.

(上接第 59 页)

- [16] 胡小婉,刘兆普,郑青松,等.外施氯对油菜幼苗生长和光合特征影响的研究[J].植物营养与肥料学报,2012,18(4):932-940.
- [17] 浙江农业大学茶叶系工农兵学员科学实验小组.也谈茶树的氯害及氯化铵施用[J].茶叶科技简报,1971(10):13-14.
- [18] Moran J F,James E K,Rubio M C,*et al.* Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules[J]. Plant Physiol,2003,133:773-782.
- [19] Liao Y J,Wen L,Shaw J F,*et al.* A highly stable cambialistic-superoxide dismutase from *Antrodia* ties[J]. J Biotechnol,2007,31:84-91.
- [20] 张兆辉.西瓜种质资源耐氯力鉴定及 Cl⁻胁迫下生理生化特性研究[D].武汉:华中农业大学,2009.
- [21] Smirnoff N,Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry,1989,28:1057-1060.
- [22] 罗玉鸿.植物抗逆性研究进展[J].现代农业科技,2013(7):226-227.
- [23] 刘建宁,赵美清,王运琦,等.水分胁迫对2种牧草幼苗脯氨酸及过氧化氢酶活性的影响[J].山西农业科学,2009,37(6):27-29.