

# 水分胁迫下几种冷季型草坪草抗旱性研究

杨国伟<sup>1</sup>, 张秀清<sup>1</sup>, 苏东海<sup>2</sup>, 王 力<sup>1</sup>, 张 静<sup>1</sup>, 孙君社<sup>1</sup>

(1 中国农业大学, 北京 100083; 2 河南省农业科学院)

**摘要:** 研究了 3 种冷季型草坪草的 4 个品种在聚乙二醇渗透胁迫下叶片游离脯氨酸含量、过氧化物酶活性、过氧化氢酶活性随胁迫强度和胁迫时间的变化。结果表明: 随着聚乙二醇胁迫的加深, 4 个品种的游离脯氨酸含量比对照都有显著增加, 过氧化物酶活性增大, 而过氧化氢酶活性先上升后下降。其中 *Di-eagle* 游离脯氨酸积累时间长, 维持积累量大, 并且能保持较高的活性, 表明其具有强的渗透调节能力和自由基清除能力, 因而具有最强的抗旱性。

**关键词:** 冷季型草坪草; 水分胁迫; 酶活性; 抗旱性

中图分类号: S688.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2004)02-0038-05

## Studies on Drought Tolerance of Four Cool-season Turfgrass at Water Stress

YANG Guo-wei<sup>1</sup>, ZHANG Xiu-qing<sup>1</sup>, SU Dong-hai<sup>2</sup>,  
WANG Li<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, SUN Jun-she<sup>1</sup>

(1 China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2 Henan Academy of Agricultural Sciences)

**Abstract:** In the test with four varieties of three species of cool-season turfgrass. The activities of peroxidase(POD), catalase(CAT) and free proline content of the leaf were measured under the stress of different consistency PEG and different stress time. The results showed that the free proline content in all the cultivars increased, the activities of POD went up, while CAT increased first but then decreased. *Di-eagle* exhibited the high activities of POD and CAT as well as the largest accumulation of free proline, which indicated that it had the strongest drought tolerance.

**Key words:** Cool-season turfgrass; Water stress; Enzyme activity; Drought tolerance

植物在遭受到干旱胁迫时, 植物体内累积大量的脯氨酸, 脯氨酸起着渗透调节的作用。其积累量的大小影响着渗透调节能力, 而渗透调节能力的大小与抗旱性之间有着密切的关系。因此脯氨酸可以反应出草坪草的抗旱性<sup>[1]</sup>。此外, 植物在遭受到干旱胁迫时, 细胞中生物活性氧的积累是造成细胞伤害乃至死亡的主要原因, 而细胞中清除活性氧的保护酶系统的存在和活性的增强, 是细胞免于伤害或抗性增强的主要原因之一<sup>[2]</sup>。

细胞内的保护酶系统主要有超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等。酶活性越高, 消除自由基的能力也越强, 植物的抗逆性也越强<sup>[3]</sup>。试验以高羊茅、黑麦草、翦股颖草为冷季型草的代表, 通过在不同时间内、在不同浓度的聚乙二醇(PEG)胁迫处理下, 对草坪草叶片的游离脯氨酸含量、保护酶(POD、CAT)活性进行了测定, 从而对不同品种的抗旱性进行了比较。

收稿日期: 2003-09-20

作者简介: 杨国伟(1974-), 男, 北京人, 在读硕士研究生, 主要从事植物组织培养研究。

\* 孙君社为通讯作者。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用从美国进口的高羊茅品种热浪 (Southeast)、双鹰 (Di-eagle)、黑麦草品种爱森特 (Asecnd) 以及翦股颖品种克罗米 (Kromi) 共 4 种冷季型草坪草种。将草种置于铺有多层纱布的 90 mm 的平皿中, 室温下发芽, 发芽过程中, 每天浇水 2 次以保证纱布湿润和种子可以充分吸水。等种子发芽 2~3 d 后, 用 Hoagland 营养液培养, 每次换营养液前用蒸馏水冲洗, 以防止由于水分蒸发使营养液浓度增大而造成渗透胁迫。

1.2 试验方法

1.2.1 水分胁迫 分别从生长 18~20 d 的 4 个品种的草坪草中挑选生长良好的幼苗, 连同固着物纱布一起放入盛有 15~20 ml 0 (ck), 15%, 25% PGE 溶液的小烧杯内, 室温下放置于柔和日

光灯下 (光照 16 h/d, 黑暗 8 h/d) 进行胁迫处理。分别胁迫 12 h、24 h、36 h 后, 称取各样品叶片, 测定脯氨酸含量、POD 活性、CAT 活性等指标。

1.2.2 游离脯氨酸含量的测定 采用磺基水杨酸法<sup>[4]</sup>。在酸性条件下, 脯氨酸与茚三酮反应生成稳定的红色缩合物, 此缩合物在波长 515 nm 处有一最大吸收峰<sup>[5]</sup>。脯氨酸浓度在一定范围内与其吸光值成正比。

1.2.2.1 脯氨酸标准曲线的制作 取 7 支 25 ml 试管按附表依次加入各试剂, 混匀后用玻璃球将试管口盖上, 在沸水浴中加热 40 min。取出冷却后, 以 0 号管为对照, 用 722 s 分光光度计在 515 nm 下测定 OD 值。以脯氨酸的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制脯氨酸标准曲线, 求出线形回归方程 (重复实验, 直至相关度 R<sup>2</sup> 达到 0.99 以上)。

1.2.2.2 样品中脯氨酸的提取和测定 取均匀

附表 脯氨酸标准曲线制作各个试管试剂加入量

试剂	试管号						
	0(ck)	1	2	3	4	5	6
标准脯氨酸(ml)	0	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2.0
H <sub>2</sub> O(ml)	2.0	1.8	1.6	1.2	0.8	0.4	0
冰乙酸(ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
显色液(ml)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
脯氨酸含量(μg)	0	2	4	8	12	16	20

剪碎的各个样品的叶片 0.2 g, 置于 25 ml 大试管中, 加入 5 ml 3% 磺基水杨酸溶液, 管口加盖玻璃球, 于沸水浴中浸提 10 min; 然后取出试管, 冷却后备用。取上述浸提液的上清液 2 ml, 加 2 ml 冰乙酸和 2 ml 茚三酮显色液, 于沸水浴中显色 40 min (对照加入 2 ml 3% 磺基水杨酸代替提取液), 在 515 nm 下测定 OD 值。每个样品 3 次重复。

从标准曲线查出脯氨酸浓度, 计算样品中脯氨酸含量:

脯氨酸含量(μg/g)=(c×V/a)/W

c 为提取液中脯氨酸浓度; V 为提取液总体积(ml); a 为测定时所吸取的体积(ml); W 为样品重(g)。

注意, 如果样品吸光值过大, 不落在标准曲线内, 应将提取液或显色反应液稀释。

1.2.3 粗酶液的提取与酶活测定 取 0.5 g 叶片, 剪碎置于预冷的研钵中, 分 2 次加入 5 ml 预

冷的粗酶提取液 (50 mmol/L pH 7.8PBS, 内含 1%PVP, PVP 作为吸附剂可防止酶液在提取过程中发生褐变), 研磨成匀浆, 再加入 5 ml 提取液冲洗研钵, 将 2 次得到的匀浆共 10 ml, 在 4℃, 13 000×g 冷冻离心 20 min, 然后吸取上清液低温保存作为测定 POD、CAT 活性之用。

按照朱广廉的方法<sup>[5]</sup>测定 POD 活性。POD 催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化酚类。实验中以愈创木酚为 POD 的底物, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 将愈创木酚氧化生成茶褐色产物, 此产物在 470 nm 有最大吸光值, 故可以通过测 470 nm 下吸光值的变化来测定 POD 活性。在 3 ml POD 反应液中加入 30 μl 酶液启动反应, 立即计时, 摇匀后迅速倒入比色皿中, 在 722 s 型分光光度计上, 于 470 nm 处作时间扫描, 每隔 10 s 读数 1 次, 读数至 4 min 左右停止。每个样品作 3 次重复。POD 反应液和酶液先在 25℃水浴中加热, 以 100 mmol/L pH6.0 PBS 为空白对照, 以 1

min 内 OD 值增加 0.1 定义为一个 POD 活力单位。

CAT 活性测定参照邹琦的方法。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在 240 nm 波长下有强吸收, CAT 能分解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 使反应溶液吸光值随反应时间而降低。根据测量吸光值的变化速率即可测出 CAT 活性。在 2.9 ml CAT 反应液中加入 0.1 ml 酶液启动反应, 立即计时, 摇匀后迅速倒入比色皿中, 在 Spectrumlab 52 型紫外分光光度计上, 于 240 nm 处作时间扫描, 每隔 10 s 读数 1 次, 读数至 3 min 左右停止。每个样品作 3 次重复。CAT 反应液和酶液先在 25 °C 水浴中加热, 以煮沸的酶液做空白对照, 以 1 min 内 OD 值减小 0.1 定义为 1 个 CAT 活力单位。

2 结果与分析

2.1 脯氨酸标准曲线

脯氨酸标准曲线如图 1, 其线性回归方程为:  $y=0.0165x+0.0082$ 。

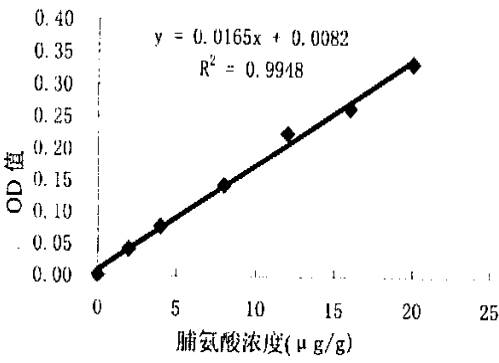


图 1 脯氨酸标准曲线

2.2 PEG 渗透胁迫对游离脯氨酸积累的影响

由试验结果可见(图 2~5), 4 个品种草坪草的游离脯氨酸含量均随着胁迫强度和胁迫时间的不同而变化。

由图 2 知, 在 15%PEG 和 25%PEG 渗透胁迫下, *Asecnd* 游离脯氨酸含量在 12 h 和 24 h 都表现出上升的趋势, 在 24 h 前后达到了峰值, 36 h 表现为下降。由图 3, 4, 5 可见, 对于其他 3 种草来说, 脯氨酸含量表现为随胁迫时间增加而增加, 较长的胁迫时间内没有下降; 其中 *Di-eagle* 的脯氨酸的绝对含量和增加量为最大, 其绝对含量是其他 3 个品种的 5~9 倍。对照, 由于环境温度较高引起营养液中水分蒸发, 造成了一定程度的

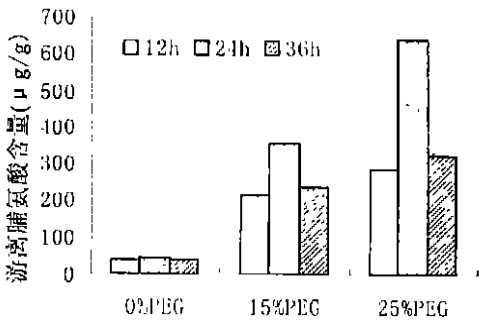


图 2 不同 PEG 浓度胁迫下 *Asecnd* 脯氨酸含量的变化

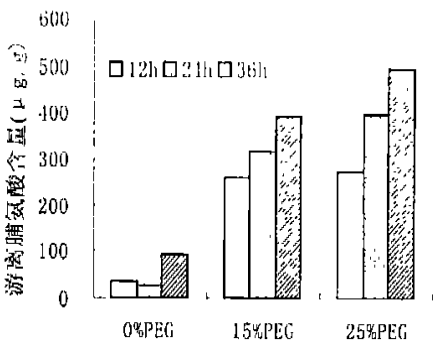


图 3 不同 PEG 浓度胁迫下 *Southeast* 脯氨酸含量的变化

胁迫, 使 *Kromi*、*Southeast*、*Di-eagle* 游离脯氨酸含量都表现为随时间变化而小幅度增加。

在相同胁迫时间内, 随着 PEG 浓度增大, 4 种草坪草的游离脯氨酸含量比对照都有显著提高, 其中以 *Di-eagle* 的增量为最大。

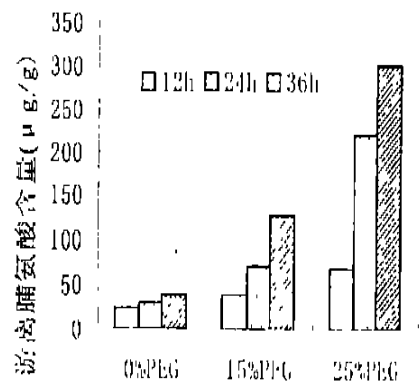


图 4 不同 PEG 浓度胁迫下 *Kromi* 脯氨酸含量的变化

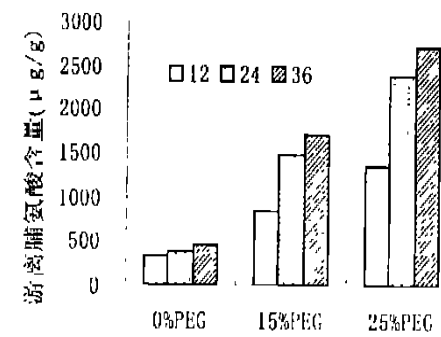


图 5 不同 PEG 浓度胁迫下 *Di-eagle* 脯氨酸含量的变化

2.3 酶活性的变化

2.3.1 POD 活性的变化 由图 6 和图 7 知, *Di-eagle* 和 *Kromi* 一直维持较高的 POD 活性, 并且在 15%PEG 和 25%PEG 胁迫下, 酶活性都随着胁迫时间的延长而增大。在相同的胁迫时间下, POD 活性随 PEG 浓度增大而有较小幅度的增加。 *Asecnd* (图 8) 在 15%PEG 和 25%PEG 胁迫下, POD 活性变化趋势与 *Di-eagle* 和 *Kromi* 一致, 但其酶活绝对值低于二者。 *Southeast* (图 9)

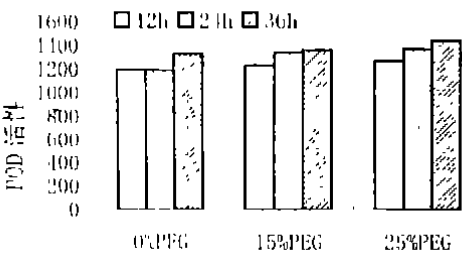


图 6 不同 PEG 浓度胁迫下 *Kromi* POD 的活性变化

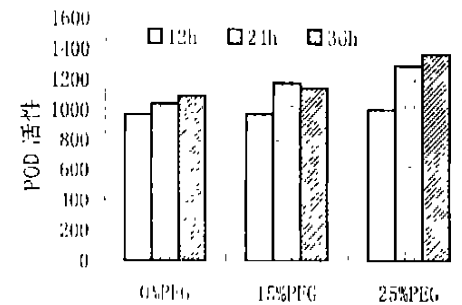


图 7 不同 PEG 浓度胁迫下 *Di-eagle* POD 的活性变化

在 15%PEG 和 25%PEG 胁迫下, POD 活性先上升后下降, 但变化幅度不大。POD 活性的变化随品种的不同而有差异, 这可能与 POD 功能的多样性有关<sup>[6]</sup>。

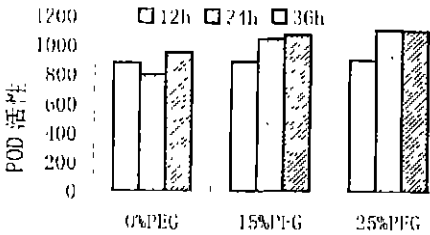


图 8 不同 PEG 浓度胁迫下 *Asecnd* POD 的活性变化

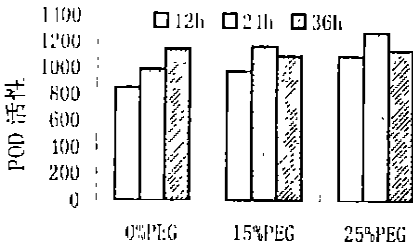


图 9 不同 PEG 浓度胁迫下 *Southeast* POD 的活性变化

2.3.2 CAT 活性的变化 由图 10~13 可见, 在 PEG 胁迫下, CAT 活性变化趋势不如 POD 显著。在 15%PEG 胁迫下, *Di-eagle* (图 10) 的 CAT 活性在 12 h 出现最高值, 以后随胁迫时间延长不断下降; 在 25%PEG 胁迫下, *Di-eagle* 的 CAT 活性随时间延长而增大, 处理 24 h 时酶活比 12 h 有较大提高, 但 36 h 时酶活不再继续增大。 *Southeast* (图 11) 的 CAT 活性有起伏但变化幅度小, 与对照没有显著差异。 *Southeast* 与 *Di-eagle* 的 CAT

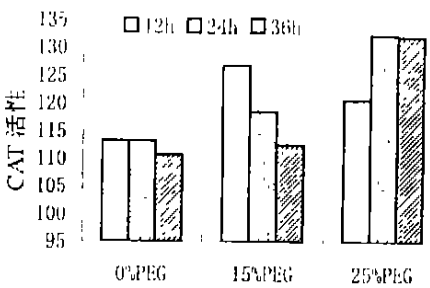


图 10 不同 PEG 浓度胁迫下 *Di-eagle* CAT 活性变化

活性总体水平高于 *Kromi* 和 *Asecnd*。*Kromi* (图 12) 在 15%PEG 和 25%PEG 胁迫下都表现先上升后下降的趋势。*Asecnd* (图 13) 在 15%PEG 胁迫下, CAT 则一直上升, 但与对照相比, 无提高; 在 25%PEG 胁迫下, CAT 先上升后下降。

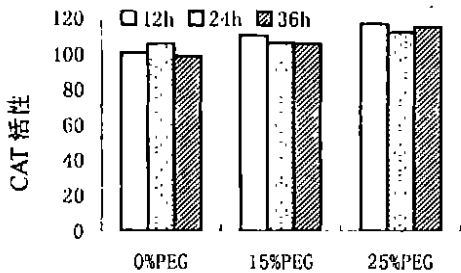


图 11 不同 PEG 浓度胁迫下 *Southeast* 的 CAT 活性变化

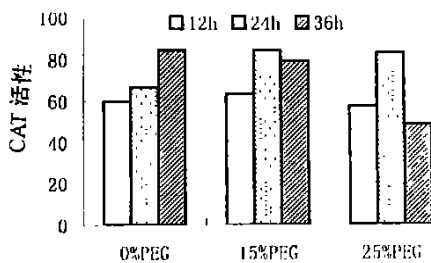


图 12 不同 PEG 浓度胁迫下 *Kromi* CAT 活性变化

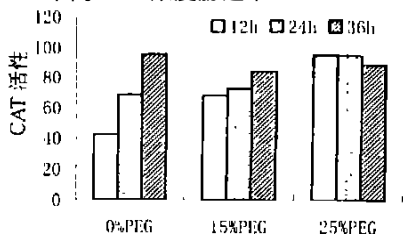


图 13 不同 PEG 浓度胁迫下 *Asecnd* CAT 活性变化

### 3 结论与讨论

通常认为 PEG 渗透势为  $-0.2\text{ MPa}$  时对植物产生轻度胁迫,  $-0.5\text{ MPa}$  时对植物产生中度胁迫,  $-1\text{ MPa}$  时对植物产生重度胁迫<sup>[7]</sup>。有研究表明<sup>[8]</sup>, 15%PEG 溶液可造成中度胁迫, 25%PEG 溶液可造成重度胁迫。试验结果表明, 干旱胁迫使 4 个品种的冷季型草坪草游离脯氨酸含量在中度胁迫和重度胁迫时都有显著增加, 不同品种敏感性不同。脯氨酸的积累说明脯氨酸的含量与干旱程度呈正相关, 即水分胁迫越大, 脯氨酸含量越高, 这是植物对干旱胁迫的适应性反应。

由结果知, 随着水分胁迫的加深, *Di-eagle* 的脯氨酸积累量显著大于其他 3 个品种, 且脯氨酸积累的维持时间长, 因此可以认为 *Di-eagle* 在干旱胁迫中渗透调节能力最强。*Asecnd* 虽然对水分胁迫的反应来得快, 但反应持续时间短, 因此可以认为其抗旱性弱。

在通常情况下, 植物体内具有较高的保护酶活性, 可以有效清除细胞内各种活性氧自由基。POD 和 CAT 都可以清除  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。水分胁迫初期, POD、CAT 活性升高可能是因为适应  $\text{H}_2\text{O}_2$  生成的一种调节反应, 但是持续干旱积累起来的  $\text{H}_2\text{O}_2$  可能造成了对酶的伤害<sup>[9]</sup>。

试验结果表明, *Di-eagle* 在受到中度水分胁迫(15%PEG)和重度水分胁迫(25%PEG)时, 其较高的 POD、CAT 活性可以保证其有较强的自由基清除能力, 减轻了细胞膜和细胞生物大分子如核酸、蛋白质、脂肪酸的伤害, 增强了抗旱能力。

由游离脯氨酸的积累情况和 POD、CAT 的活性变化状况表明, *Di-eagle* 具有强的渗透调节能力和活性氧自由基清除能力, 因此抗旱性强。

需要指出的是, 抗旱性是一个受多种因子影响的性状。一个草种的抗旱性较强, 并不能说明它在所有与抗旱性有关的性状指标方面都优于某个抗旱性较弱的草种。

#### 参考文献:

- [1] 王代军, 温洋. 温度胁迫下几种冷季型草坪草抗性机制的研究[J]. 草业学报, 1998, 7(1): 75—80.
- [2] 夏汉平, 敖慧修, 刘世忠. 南方草坪冬季枯黄原因及改进对策[J]. 中国草地, 2000(5): 64—67.
- [3] 林植芳, 李双顺. 水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J]. 植物学报, 1984, 26(6): 605—615.
- [4] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [5] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990.
- [6] 王俊刚, 陈昌国, 张承烈. 水分胁迫对 2 种生态型芦苇(*Phragmites communis*)的可溶性蛋白含量、SOD、POD、CAT 活性的影响[J]. 西北植物学报, 2002, 22(3): 561—565.
- [7] 李敏, 徐琳, 赵美琦. 冷季型草草坪建植与管理指南[M]. 北京: 中国林业出版社, 2002.
- [8] 王邦锡, 黄久常, 王辉, 等. 不同植物在水分胁迫条件下脯氨酸的积累与抗旱性的关系[J]. 植物生理学, 1989, 15(1): 46—51.
- [9] 时忠杰, 胡哲森, 李荣生. 水分胁迫与活性氧代谢[J]. 贵州大学学报, 2002, 21(2): 140—145.