

NaCl和温度双重胁迫对黑麦草幼苗叶绿素及相关酶活性的影响研究

刘月敏^{1,3}, 孙贻超², 邵晓龙²

(1.天津大学环境科学与工程学院, 天津 300372; 2.天津市环境保护科学研究院, 天津 300191; 3.天津城市建设学院环境与市政工程系, 天津 300384)

摘要:控制黑麦草萌发时的 NaCl 浓度和温度,研究其幼苗叶片中的抗氧化酶活性、丙二醛和叶绿素含量的变化。研究发现,所测指标对温度和 NaCl 的综合反应差异很大。适量 NaCl 对所测指标均有一定促进作用;不同温度条件下叶绿素含量、SOD 酶、POD 酶和 CAT 酶的活性随 NaCl 浓度增大均表现为先升高后降低的趋势。但各指标对温度反应的差异却很大,20℃时黑麦草的叶绿素含量最高,SOD 酶与 CAT 酶的活性在相同 NaCl 浓度下,均为 10℃>20℃>30℃。POD 酶在低 NaCl 浓度时,其活性为 30℃>20℃>10℃,但 NaCl 浓度大于等于 0.9%时,30℃的 POD 酶活性受抑明显,其活性最低。指示细胞受氧化损伤程度的 MDA 含量随温度和 NaCl 浓度的升高而增大。

关键词:NaCl; 温度; 黑麦草; 抗氧化酶; 叶绿素; 丙二醛

中图分类号:Q945.78 文献标识码:A 文章编号:1672-2043(2008)01-0111-05

Chlorophyll and Enzymes in Ryegrass (*Lolium perenne* L.) Seedlings Under Temperature and NaCl Stress

LIU Yue-min^{1,3}, SUN Yi-chao², SHAO Xiao-long²

(1.School of Environment Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2.Tianjin Academy of Environment Science, Tianjin 300191, China; 3.Department of Municipal and Environment Engineering, Tianjin Institute of Urban Construction Tianjin 300384, China)

Abstract: Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) is one of the most important grass species in temperate climates. It is not only a kind of forage with high yield and good quality, but also a kind of turfgrass suitable for home lawns, parks, cemeteries, roadsides, golf courses and other places. The studies on ryegrass were focused on the characteristics of growth and development, the technology of seed yield and the salt tolerance, and very few attentions were placed on the ryegrass's response to NaCl and temperature. An experiment was conducted to study the effect of temperature and NaCl on the antioxidant enzyme activity, MDA and chlorophyll in ryegrass (*Lolium perenne* L.) leaves, controlling NaCl concentration and temperature during germinating period. Increasing before decreasing was observed in antioxidant enzyme activity and chlorophyll content with increasing NaCl content. The responses of the measured indexes to temperature were significantly different from one another. The chlorophyll concentration in ryegrass leaves was the highest under 20℃ at all NaCl stress. The activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) showed similar trend, which was illustrated as the activity decreased with increasing temperature. The activity of peroxidase (POD) was increasing with temperature increasing under lower NaCl concentration. The malondialdehyde (MDA) showed increasing with both NaCl concentration and temperature increasing.

Keywords: NaCl; temperature; ryegrass; antioxidant enzyme; chlorophyll; malondialdehyde

随着我国城市化进程的加快,城市生态系统中生产者所占比例减少,呈倒金字塔的趋势也愈加明显。因此增加城市生态系统中生产者的种类和数量,是优

化调控城市生态系统,提高人居环境质量的一个重要途径。草坪建植体系是城市社会-经济-自然复合生态系统的重要组成部分,对城市复合生态系统具有巨大的调控能力和服务功能^[1]。草坪草是城市植被的重要组成部分之一,具有重要的生态功能,在改善城市生态环境方面发挥着重要且不可替代的作用^[2]。因此草坪绿化面积及其质量已经成为评价现代城市环境质量

收稿日期:2007-03-02

基金项目:天津市高等学校科技发展基金(20040703)国家 863 项目,
(2002AA648010)

作者简介:刘月敏(1976—),女,河北石家庄人,博士生,讲师,主要从事生态工程学等方面的研究。E-mail: lyuemn@126.com

的重要客观标准^[1]。但是我国北方地区土壤盐渍化严重^[2],淡水资源缺乏(为了节约用水,大多数城市用于浇灌树木、花卉和草坪绿地的城市园林绿化用水采用循环水维持,更加重了土壤的次生盐渍化^[4]),季节间温差较大^[5],极大地限制了我国北方地区草坪建植的发展。因此研究草坪草的耐盐、抗高热、低温性能,培育优良耐盐草种已经显得十分必要。

温度和盐分影响到植物的生存和分布,高温、低温、盐分过高等环境胁迫均会影响到植物正常的生理过程,产生和积累活性氧组分(ROS),引起植物损伤^[6]。为了消除氧化损伤,植物体内产生一系列抗氧化酶以分解有毒的活性氧组分,如 SOD 酶、POD 酶、CAT 酶、PAX 酶等^[7]。活性氧清除酶系统各种酶的活性可基本反映出植物体内抗氧化能力的强弱,各种酶的活性变化已广泛用于对植物耐盐性能、抗高温、低温性能的评价。

多年生黑麦草(*Lolium perenne* L.)是一种冷季型草坪草^[8],耐寒、耐湿性强,亦较耐盐碱,是具有世界栽培意义的禾本科牧草和草坪草^[9]。由于其耐盐性强,在我国过渡地带以北的广大温带地区是建坪的重要材料。国内外对多年生黑麦草的研究较多,主要集中在黑麦草的生长发育特性^[8],种子生产技术^[9],耐盐性^[10-12]等。但是关于温度和 NaCl 共同影响下黑麦草的变化研究较少。本文控制黑麦草萌发时的 NaCl 浓度和温度,研究其幼苗叶片中的抗氧化酶活性、丙二醛及叶绿素含量的变化,探讨黑麦草的抗逆境机理,为黑麦草进一步在北方盐渍化地区推广和应用提供理论依据,推进北方地区城市生态系统的优化。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料选用多年生黑麦草(每 1 000 粒种子 2.0073 ± 0.034 g; $n=5$)。种子用 75%乙醇消毒 1~2 min 后,分别取 100 粒种子加入不同的培养液中培养。以 10 mL Hoagland^[13]营养液作对照,NaCl 作为惟一单盐加入 Hoagland 营养液中,设置以下浓度水平:0.3%、0.6%、0.9%、1.2%、1.5%。种子在直径 9 cm 的培养皿中发芽,用双层滤纸做发芽床,种子之间保持一定的间隔,尽量减少相邻种子对发芽的影响和病菌的相互感染。试验在培养箱中持续黑暗进行,各组恒定温度分别为 10℃、20℃、30℃,各个温度和 NaCl 浓度均 5 个

重复(培养皿总数=3×6×5=90)。每天称重用去离子水补充所失水份,以保持浓度恒定。种子发芽后转入室温下装有石英砂的营养钵中生长,16 d 后各取生长状况一致的黑麦草,取其叶片测定。(30℃时,NaCl 浓度为 1.2%和 1.5%的黑麦草由于发芽率很低,而且发芽后植株死亡状况很严重,所以部分数据短缺。)

1.2 测定方法

1.2.1 叶绿素测定

叶绿素测定采用 95%乙醇提取,在波长 665 nm、649 nm 下测定吸光度。

1.2.2 丙二醛及抗氧化酶测定

酶液提取:称取新鲜叶片 0.5 g 放入研钵中,加 5 mL pH=7.8 的磷酸缓冲液,冰浴研磨,匀浆倒入离心管中,冷冻离心 20 min(10 000×g),上清液(酶液)倒入试管中,置于 0~4℃下保存待用。

SOD 酶测定:3 mL 反应液(15 mL 0.5 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH=7.8)+3 mL 130 mmol·L⁻¹ Met+3 mL 750 μmol·L⁻¹ NBT+3 mL 100 μmol·L⁻¹ EDTA-Na₂+2.5 mL 20 μmol·L⁻¹ FD 核黄素)+20 μL 酶液,4 000 Lx 光照 30 min,取出后迅速测定 560 nm 的 OD 值,以不加酶液的照光管为对照。

POD 酶测定:20 μL 酶液+3 mL 反应液(0.1 mol·L⁻¹ pH 6.0 磷酸缓冲液 50 mL+愈创木酚 28 μL, +30% H₂O₂ 19 μL 混合),470 nm 比色,每隔 1 min 读数 1 次,共读 3 次。

CAT 酶测定:0.1 mL 酶液+2.5 mL 反应液(0.1 mol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 与 0.1 mol·L⁻¹ pH7.0 的磷酸缓冲液按 1:4 的比例混匀),240 nm 比色,每隔 1 min 读数 1 次,共读数 3 次。

MDA 测定:1 mL 酶液+2 mL 0.6%的 TBA,封口沸水浴 15 min,迅速冷却后再离心,取上清液,分别在 600、532、450 nm 3 个波长下比色。

1.2.3 试验主要仪器

上海安亭 TGL-16G 高速冷冻台式离心机;SHIMADZU-UV 2550 紫外可见分光光度计。

2 结果与讨论

2.1 不同温度和 NaCl 浓度对叶绿素的影响

叶绿素含量的高低在一定程度上可以反映植物利用光能及制造有机物的能力,在环境胁迫下叶绿素的含量会发生一定变化。国内外对逆境胁迫下植物体内叶绿素含量的变化做了大量研究。翁森红^[14]研究了

牧草叶片叶绿素含量与牧草耐盐性的关系,发现叶绿素含量变化的总趋势是随土壤盐分的增加而降低,且在同一盐分条件下,较耐盐品种比不耐盐品种的叶绿素含量高。杨晓英等^[45]对黑麦草的研究发现,盐胁迫下随着盐浓度增加叶绿素总量呈下降趋势。

本研究发现(图 1 所示),不同温度条件下,叶绿素含量随 NaCl 浓度的变化趋势基本相同,即低 NaCl 浓度下,叶绿素含量随 NaCl 浓度升高而增加,但当 NaCl 浓度达到一定水平后,叶绿素含量随 NaCl 浓度的增加而下降。20 °C 时,NaCl 对叶绿素的促进作用最明显,其浓度为 0.9% 时,叶绿素含量是对照的 1.75 倍,达到所有组合的最高值。虽然 30 °C 和 10 °C 时对照组的叶绿素含量均高于 20 °C,但两者对 NaCl 的抗性明显低于 20 °C。两温度最大叶绿素含量对应的 NaCl 浓度分别为 0.3% 和 0.6%,此后随 NaCl 浓度增大而迅速减少。因此温度过高或过低均不利于叶绿素合成,黑麦草叶片中叶绿素合成的最适温度为 20 °C;适量 NaCl 可增加各种温度下黑麦草的叶绿素含量。当温度和 NaCl 两因素共同作用于黑麦草时,其叶片中叶绿素含量受到两者共同影响,10 °C、20 °C、30 °C 最高叶绿素含量对应的 NaCl 浓度分别为 0.3%、0.9% 和 0.6%。

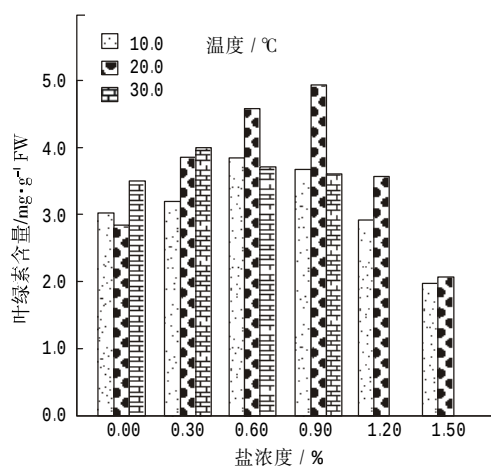


图 1 不同温度和 NaCl 浓度下黑麦草叶片中叶绿素含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)

Figure 1 Effects of temperature and NaCl on chlorophyll content in leaves ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)

2.2 不同温度和 NaCl 浓度对 MDA 的影响

活性氧的积累能启动膜脂中不饱和脂肪酸的过氧化,最终损伤膜脂和膜蛋白,破坏膜结构和功能的稳定性,引起植物伤害^[46]。丙二醛(MDA)是活性氧启动膜脂过氧化过程中的主要产物之一,其含量高低是人们用来衡量植物在逆境胁迫下活性氧伤害程度的

常用指标^[47]。

本研究(见图 2)发现,不同温度条件下,MDA 含量均随 NaCl 浓度增大而增大。10 °C 和 20 °C 时,NaCl 浓度为 1.5% 时的 MDA 含量分别为对照的 2.09 和 2.46 倍。30 °C 时,NaCl 浓度为 0.9% 时的 MDA 含量为对照的 1.28 倍。而在各 NaCl 浓度下,MDA 含量均随温度升高而增大。所以种子萌发时的环境条件会影响到其幼苗的生理状况,高 NaCl 浓度和高温均会促使幼苗膜脂损伤,导致 MDA 含量升高。

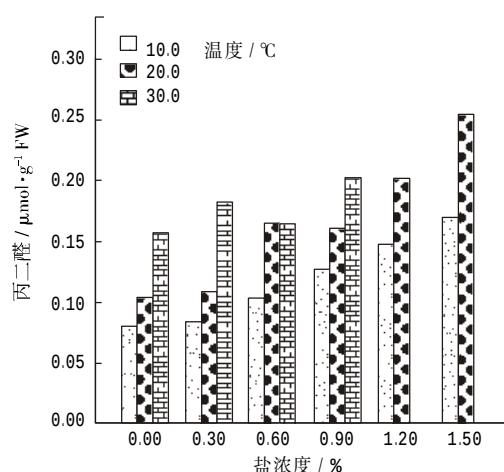


图 2 不同温度和 NaCl 浓度下黑麦草叶片中丙二醛含量($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)

Figure 2 Effects of temperature and NaCl on MDA content in leaves ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)

2.3 不同温度和 NaCl 浓度对抗氧化酶活性的影响

组成抗氧化酶系统的各种酶的活性高低,可基本反映出植物体内活性氧清除或抗氧化能力的强弱。有关逆境下活性氧积累、伤害及其清除的研究在许多植物中已有报道,但对于温度和 NaCl 浓度两个生态因子综合作用下对植物抗氧化酶活性影响的报道很少。

2.3.1 对 SOD 酶活性的影响

SOD 酶是植物抵御活性氧伤害的重要酶类,此酶是已知酶中速率最快的酶之一。陈一舞等^[48]研究指出,SOD 酶在植物抗盐害过程中,起防止中断膜脂过氧化,对细胞膜系统损伤起保护作用。詹妍妮等^[49]研究发现热锻炼和喷施水杨酸后葡萄叶肉细胞的保护酶系如 SOD 酶、CAT 酶活性明显提高。

本研究结果(图 3)表明,不同温度条件下,SOD 酶活性随 NaCl 浓度升高的变化趋势基本一致,低 NaCl 浓度会激活其活性,高 NaCl 浓度却又抑制其活性。各温度条件下最大 SOD 酶活性对应的 NaCl 浓度差异明显,10 °C 为 0.3% 或 0.6%,30 °C 为 0.6%,20 °C 时 SOD 酶适应的 NaCl 范围较广,0.6%、0.9% 和 1.2%

的 SOD 酶活性与对照无明显差异,只是 NaCl 浓度为 1.5% 时 SOD 酶活性才明显下降。然而,当 NaCl 浓度相同时,SOD 酶的活性均为 $10\text{ }^{\circ}\text{C} > 20\text{ }^{\circ}\text{C} > 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。因此在一定温度和 NaCl 浓度范围内,高温和高 NaCl 均会抑制黑麦草叶片中 SOD 酶的活性。

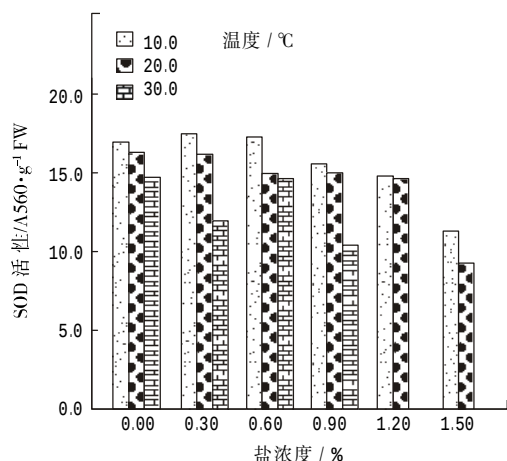


图 3 不同温度和 NaCl 浓度下黑麦草叶片中 SOD 酶的活性(A560·g⁻¹FW)

Figure 3 Effects of temperature and NaCl on SOD activity in leaves(A560·g⁻¹FW)

2.3.2 对 POD 酶活性的影响

POD 酶(过氧化物酶)是植物体内普遍存在的、活性较高的一种酶。Schnbein 于 1855 年发现植物组织和动物组织因 H₂O₂ 或 CH₃OOH 的存在可氧化愈创木酚,以后 Linossier M G(1898 年)将此酶命名为过氧化物酶。此酶因 H₂O₂(或 CH₃OOH)的存在能催化一元胺类、多元胺类、一元酚类、多元酚类、白色素、抗坏血酸、细胞色素 C、HI、HNO₂ 等。它与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有密切关系,关于过氧化物酶在植物中变化的生理意义的研究越来越多。Ishida 等^[20]报道,随着植物细胞的衰老,过氧化物酶的活性总是显著地增加。酢浆草叶 POD 酶活性比红花酢浆草高得多,显然与两种植物叶组织细胞的生理特性有关。丁文明等^[21]认为 POD 酶参与了叶绿素的降解。

本研究发现(图 4)不同温度条件下,POD 酶活性随 NaCl 浓度增大均表现为先升后降,这一趋势与 SOD 酶的变化基本相同。但当 NaCl 浓度相同时,POD 酶的活性随温度变化却无明显规律。NaCl 浓度为 0、0.3% 及 0.6% 时,30 °C 的 POD 酶活性表现为最高;NaCl 浓度为 0.9% 时,10 °C 和 20 °C 的 POD 酶活性均有所升高,但 30 °C 的 POD 酶活性却开始降低,成为本 NaCl 浓度条件下的最低值。另外,在所有

NaCl 浓度中,10 °C 时的酶活性,均小于 20 °C。由此可知,在温度和 NaCl 交互影响下,高温(30 °C)在低 NaCl 浓度时可促进 POD 酶活性,在高 NaCl 浓度下却抑制其活性。中温(20 °C)在所有 NaCl 浓度均可促进其活性。

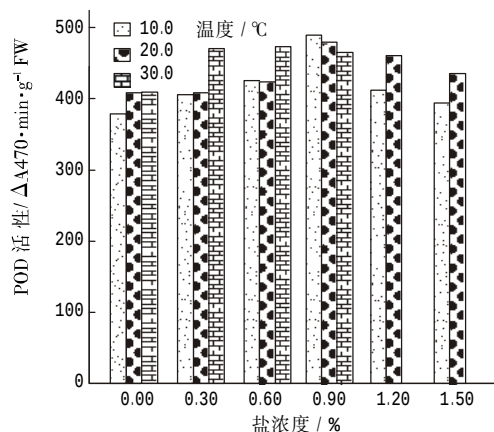


图 4 不同温度和 NaCl 浓度下黑麦草叶片中 POD 酶的活性(ΔA470·min⁻¹g⁻¹FW)

Figure 4 Effects of temperature and NaCl on POD activity in leaves (ΔA470·min⁻¹g⁻¹FW)

2.3.3 对 CAT 酶活性的影响

CAT 酶(过氧化氢酶)能催化过氧化氢分解为水和分子氧,其活性与植物的代谢强度及抗寒、抗病能力有一定关系。如图 5 所示,与其他酶相比,CAT 酶对温度和 NaCl 的反应更敏感。10 °C 时,NaCl 浓度为 0.3% 和 0.6% 的 CAT 酶活性基本相同,高于对照。当 NaCl 浓度达到 0.9% 时,CAT 酶活性随 NaCl 浓度升高而下降。20 °C 时,NaCl 浓度为 0.3%、0.6% 和 0.9% 的 CAT 酶活性相差不大,但均低于对照,1.2% 和 1.5% 的 CAT 酶活性迅速下降。30 °C 时,NaCl 浓度为 0.3% 的 CAT 酶活性达到最高值,0.6% 时便迅速下降。综合比较,不同 NaCl 浓度水平下 CAT 酶的活性基本为 $10\text{ }^{\circ}\text{C} > 20\text{ }^{\circ}\text{C} > 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。因此,高温和高 NaCl 浓度也会抑制 CAT 酶的活性。

2.3.4 对生长状况的影响

植物的生长状况受到外界环境条件的综合影响,本试验中 NaCl 浓度低于 0.9% 时,10 °C 和 20 °C 的黑麦草生长状况与对照均没有明显差异,但 30 °C 黑麦草的生长状况明显不好,发芽率明显降低,而且株型变小,叶子变细。

3 结论

植物体是一个开放体系,生存于自然环境。植物与自然环境间有着相辅相成的关系。环境因子会影响

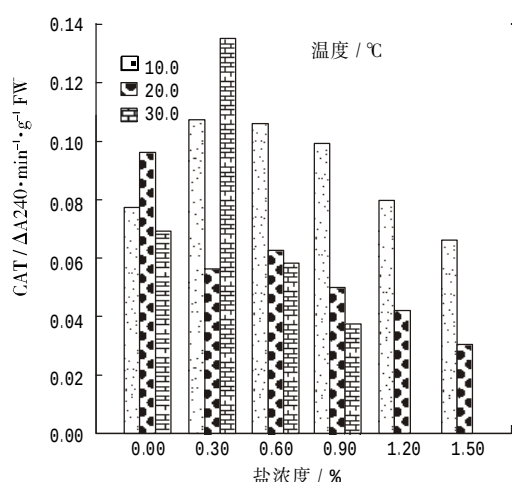


图 5 不同温度和 NaCl 浓度下黑麦草叶片中 CAT 酶的活性
Figure 5 Effects of temperature and NaCl on CAT activity in leaves ($\Delta A_{240} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$)

到植物的生存和分布,而植物本身也会对周围环境产生重大影响。在生物成分相对单一的城市生态系统,周边的温度和土壤条件决定草坪草能否生存和发展。本文研究表明,黑麦草种子萌发阶段的环境条件会影响到幼苗叶片中叶绿素、MDA 含量及抗氧化酶活性的变化,在温度和 NaCl 两因子的协同影响下,上述指标的变化与单因素影响下的变化有所差异。

(1) 温度和 NaCl 均会影响到黑麦草的正常生理活动。但是对各个指标的影响却不尽相同。

(2) 适量 NaCl 对各指标均有一定促进作用。不同温度时叶绿素含量、SOD 酶、POD 酶和 CAT 酶活性随 NaCl 浓度的增大均表现为先升高后降低的趋势。

(3) 所测指标对温度和 NaCl 的综合反应差异很大。20 °C 时,NaCl 对叶绿素合成的促进作用最明显;NaCl 浓度相同时,SOD 酶的活性为 10 °C>20 °C>30 °C。POD 酶对温度的反应又有所不同,NaCl 浓度较低时,POD 酶活性为 30 °C>20 °C>10 °C;但高 NaCl 浓度在 30 °C 时对 POD 酶的活性抑制程度最大。不同 NaCl 浓度水平下 CAT 酶的活性基本为 10 °C>20 °C>30 °C。

(4) 指示细胞受氧化损伤程度的 MDA 含量表现为随温度和 NaCl 浓度的升高而增高。但是 NaCl 浓度低于 0.9% 时,MDA 含量升高程度相对缓慢。

(5) 黑麦草叶片中抗氧化酶活性及叶绿素、MDA 含量的变化与其生长状况基本一致。当 NaCl 浓度低于 0.9% 时,10 °C 和 20 °C 的黑麦草生长状况与对照均无明显差异,但 30 °C 的黑麦草却表现出株型变小,叶子变细等特征。由此可见,温度为 30 °C 时黑麦草的抗

NaCl 性能明显下降。

参考文献:

- [1] 多立安.生活垃圾及其他固体废弃物—城市草坪复合体系构建的环境植物学基础[D].天津:南开大学博士学位论文,2005.
- [2] 汤巧香,张冬梅.天津滨海地区草坪建植技术[A]// 陈佐忠主编.面向 21 世纪的中国草坪科学与草坪业[C].北京:中国农业出版社,1999.170.
- [3] 赵可夫,李法曾.中国盐生植物[M].北京:科学出版社,1999.1-10.
- [4] Rose-Fricker C.李保军编译.耐盐草坪草育种[J].草业科学,2005,22(3):102-106.
- [5] 韦志刚,董文杰,范丽军.80 年代以来华北地区气候和水量变化的分析研究[J].高原气象,1999,18(4):525-534.
- [6] Nguyen HT, Joshi C P. Molecular strategies for the genetic dissection of water and high temperature stress adaptation in cereal crops, in: G. Kuo (Ed.), Proceedings of international symposium on adaptation of food crops to temperature and water stress, Taipei, Taiwan, AVRDC, Taiwan, AVRDC, Taiwan, 1993. 3-19.
- [7] Larkindale J, Huang B. Thermo-tolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene[J]. J Plant Physiol, 2004, 161: 405-413.
- [8] 兰 剑,张丽霞.草坪型多年生黑麦草主要生长发育特性的研究[J].草业科学,2003,5:43-45.
- [9] 鄢 燕.黑麦草种子生产技术研究及种子质量综合评价[D].四川雅安:四川农业大学硕士学位论文,2003.
- [10] 卢静君,多立安,刘祥君.盐胁迫下两草种 SOD 和 POD 及脯氨酸动态研究[J].植物研究,2004,24(1):115-119.
- [11] 于 辉,沈益新.苇状羊茅与多花黑麦草苗期耐盐性的差异[J].南京农业大学学报,2003,26(3):14-17.
- [12] 于 辉,沈益新.海盐胁迫对苇状羊茅和多花黑麦草种子发芽的影响[J].草业科学,2004,21(10):41-43.
- [13] 林栖凤.耐盐植物研究[M].北京:科学出版社,2004.8.
- [14] 翁森红.牧草耐盐性鉴定指标和方法的初步研究[D].北京:中国科学院硕士研究生论文,1990.
- [15] 杨晓英,杨劲松.盐胁迫对黑麦草幼苗生长的影响及磷肥的缓解作用[J].土壤通报,2005,36(6):899-902.
- [16] 宋福南,等.盐胁迫对柽柳超氧化物歧化酶活性的影响[J].东北林业大学学报,2006,34(3):54-56.
- [17] 许明丽,孙晓艳,文江祁.水杨酸对水分胁迫下小麦幼苗叶片膜损伤的保护作用[J].植物生理学通讯,2000,36(1):35-36.
- [18] 陈一舞,邵桂花,常汝镇.盐胁迫下大豆子叶细胞器超氧化物歧化酶的影响[J].作物学报,1997,23: 214-219.
- [19] 詹妍妮,等.热锻炼与外源水杨酸对葡萄叶肉细胞膜脂过氧化的影响[J].石河子大学学报(自然科学版),2005,23(5):597-600.
- [20] Ishida A, Ono K, Matsusaka T. Cell wall-associated peroxidase in cultured cells of liverwort, *Marchantia polymorpha* L. changes of peroxidase level and its localization in the cell wall[J]. Plant Cell Rep, 1985, 4: 54.
- [21] 丁文明,赵毓橘.表油菜素内脂对黄瓜子叶过氧化物酶活性和可溶性蛋白质含量的影响[J].植物生理学报,1995,21(3):259-264.