

# 高寒草甸矮嵩草对氮肥的生理响应

李以康<sup>1</sup>, 冉飞<sup>2,3</sup>, 包苏科<sup>1,3</sup>, 韩发<sup>1\*</sup>, 周华坤<sup>1</sup>, 林丽<sup>1</sup>, 张法伟<sup>1</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要:**通过叶面喷施尿素处理,研究了自然生长状态下矮嵩草生长季节生理特性的变化动态,以深入了解高寒植物对氮肥的生理响应。结果表明,施肥处理显著提高了生长初期和生长后期矮嵩草叶内超氧化物歧化酶(SOD)活性( $P < 0.05$ );谷胱甘肽(GSH)含量变化没有表现出明显的规律性;处理和对照样地可溶性糖含量都呈“U”字形变化,在6和9月含量高,多数时间处理样地叶内可溶性糖含量显著高于对照;可溶性蛋白的含量在7和8月显著高于对照样地,在6和9月显著低于对照样地;处理样地叶绿素a、b和总叶绿素含量高于对照样地(除8月外);超氧阴离子( $O_2^{\cdot-}$ )产生速率除7月外,其他月份都低于对照样地。处理总体上提高了矮嵩草叶抗氧化能力和渗透调节能力,促进了矮嵩草的生长。

**关键词:**氮肥;抗氧化系统;矮嵩草

**中图分类号:** S543+.906; Q945; S143.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2010)03-0240-05

\* 青藏高原地域广阔,是许多江河的发源地,也是我国重要的畜牧业基地之一。多年的超载过牧导致草甸不断退化,草畜之间的矛盾成了影响高原农牧业发展的重要瓶颈。恢复退化草甸、提高牧草产量是三江源区草地畜牧业生产面临的一道难题。高寒草甸速效氮和速效磷等有效养分缺乏,是限制草甸生物量的重要因素<sup>[1,2]</sup>,并成为高寒草甸植被演替与草场退化的重要驱动因子之一。施肥能够显著提高草地生物量,是提高牧草产量的有效方式<sup>[3-5]</sup>。

抗氧化系统和可溶性糖、可溶性蛋白等物质是植物抵抗外界环境胁迫和进行渗透调节的重要手段。抗氧化系统对于清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)的伤害具有重要作用,而可溶性糖和可溶性蛋白等物质的积累被认为至少是提高环境胁迫耐受力的一种策略<sup>[6]</sup>。植物对外界环境的变化具有不同的生理反应(如盐胁迫<sup>[7]</sup>、干旱胁迫<sup>[8]</sup>、UV-B辐射增加<sup>[9]</sup>、重金属胁迫<sup>[10]</sup>等),但是很少涉及到施肥对植物生理生态影响的研究。矮嵩草(*Kobresia humilis*)在青藏高原广泛分布,耐牧,是一种重要而优良的牧草,本研究以矮嵩草为对象,试图揭示矮嵩草对氮肥的生理生态响应,了解在高寒生态环境条件下氮肥对植物生长影响的内在机制。

## 1 材料与方法

矮嵩草为莎草科多年生草本植物,是典型的密丛型草类,以无性繁殖为主。一般在4月下旬返青,5月上、中旬抽穗开花,6月下旬到7月上旬结果,此后便进入果后营养期。

### 1.1 研究区概况

试验样地位于三江源区的青海省果洛藏族自治州玛沁县境内军牧场地区。试验区自然概况见文献[11]。

### 1.2 试验设置

试验选择在军牧场附近退化的嵩草草甸。试验样地的群落优势种主要是矮嵩草和小嵩草(*K. pygmaea*)等,草甸植被旺盛生长期的盖度在90%左右,其中优良牧草比例在80%以上。在高寒草甸试验样地上修建网围栏禁牧践踏,在围栏内地势平缓、肥力均匀的土地上划分出10 m × 15 m的区域作为样地,然后将该区域划分为6个5 m × 5 m的小区。于2006年5、6和7月25日进行3次喷施,具体处理措施如下:每次施用7.5 kg/hm<sup>2</sup>尿素[CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>],溶于375 kg水中,进行叶面喷洒;以与处理相同剂量的清水同步喷洒对照样地作为对照。

\* 收稿日期:2009-04-28;改回日期:2009-06-17

基金项目:国家科技攻关计划项目(2005BA901A20)和国家重点基础研究发展计划(973计划)(2009CB421102)资助。

作者简介:李以康(1973-),男,山东临沂人,助理研究员。E-mail:liyikang501@163.com

\*通讯作者。E-mail:hanfa@nwipb.ac.cn

6 - 9 月 23 日 ,进行植物样品的采集工作。

### 1.3 植物材料的测定

酶液的提取 :酶提取液为 5 mL 0.15 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0, 含 0.3 % PVP) ,将矮蒿草叶子于冰浴中研磨至匀浆 ,滤液在 15 000 r/min 下离心 10 min ,取上清液用于酶活性的测定。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定按 Giannopolitis 和 Ries<sup>[12]</sup> 方法 ;谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 测定参见 Ellman<sup>[13]</sup> 方法 ;叶绿素含量的测定参照 Arnon<sup>[14]</sup> 和朱广廉等<sup>[15]</sup> 方法 ;可溶性蛋白含量测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法<sup>[16]</sup> ;可溶性糖含量的测定采用蒽酮法<sup>[17]</sup> ;超氧阴离子自由基 ( $O_2^{\cdot -}$ ) 的测定按照《现代植物生理学实验指南》<sup>[18]</sup> 方法进行。

用岛津 UV1601 紫外和可见光分光光度计进行测定。数据处理使用 SPSS 13.0 软件 , SigmaPlot v 10.0 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 氮肥对矮蒿草叶中 SOD 活性和 GSH 含量的影响

氮肥能够促进植物的生长 ,对矮蒿草叶内 SOD 活性影响较大 (图 1A) 。6 和 9 月 ,处理的矮蒿草叶内 SOD 活性显著高于对照 ( $P < 0.05$ ) ;7 和 8 月活性相差不大。施氮肥处理提高了矮蒿草生长初期和生长后期的叶内 SOD 活性 ,对于及时清除恶劣环境下产生的 ROS 有重要作用。7 和 8 月是植物旺盛生长的时期 ,SOD 活性也保持了较高的水平 ,但是处理和对照之间相差不大 ,与这一时期外界环境条件好 ,矮蒿草受到的环境胁迫较轻有关。

GSH 的含量 (图 1B) 变化不相同。在 6 和 7 月 ,处理的矮蒿草叶中 GSH 含量显著高于对照样地的含量 ,在 8 月相反 ,在 9 月含量差异不明显。GSH 的含量总体上表现为在生长初期 (6 月) 和生长后期 (9 月) 含量高。

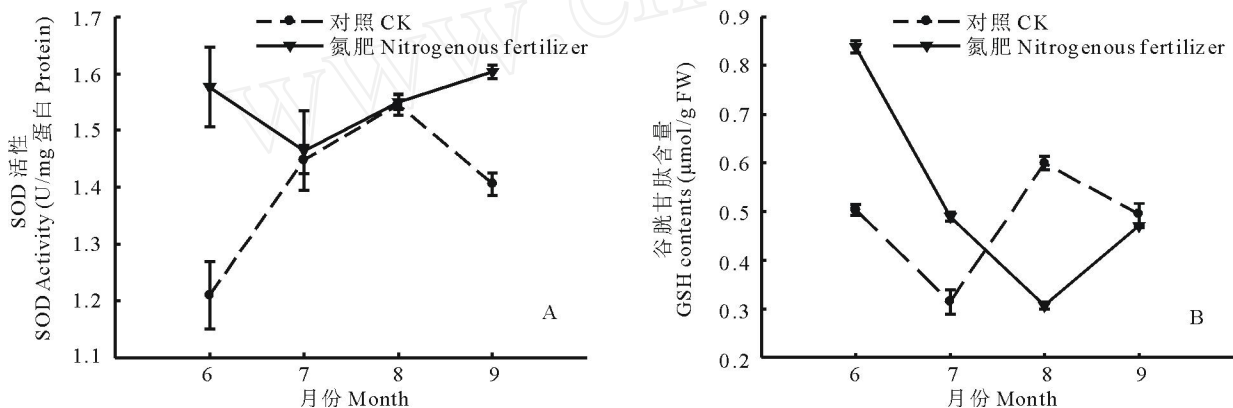


图 1 氮肥对矮蒿草叶中 SOD 活性和 GSH 含量的影响

Fig. 1 Effect of nitrogenous fertilizer on the activity of SOD and contents of GSH of *K. humilis* leaves

### 2.2 氮肥对矮蒿草叶中可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响

可溶性糖含量随生长进程表现出了相同的变化趋势 (图 2A) ,都呈“U”字形变化。除在 8 月相差不明显外 ,其他 3 个月份处理样地矮蒿草叶中可溶性糖含量显著高于对照。同一样地表现为在黄枯期的 6 和 9 月含量高 ,显著高于生长旺盛期的 7 和 8 月。

可溶性蛋白的含量在整个生长季的变化不尽相同 (图 2B) ,对对照样地矮蒿草叶中可溶性蛋白含量呈先降低后升高的“U”字形变化 ,而处理样地则呈弓形变化。分析表明 ,处理样地矮蒿草叶中可溶性蛋白含量在 6 和 9 月显著低于对照 ,而在生长旺盛期的 7 和 8 月则显著高于对照。

### 2.3 氮肥对矮蒿草叶中叶绿素含量的影响

矮蒿草叶中的叶绿素 a、b 和总叶绿素含量随生长进程表现出了大致相同的变化趋势 (图 3) ,对对照样地叶绿素含量随时间进程呈倒“U”字形变化 ,处理样地叶绿素含量先升高后降低然后稍微升高 ,近似倾斜的“Z”字形变化。生长初期叶绿素含量低 ,在 7 月达到最高 ,9 月含量基本最低。处理样地叶绿素含量在 8 月降低后 ,9 月又稍

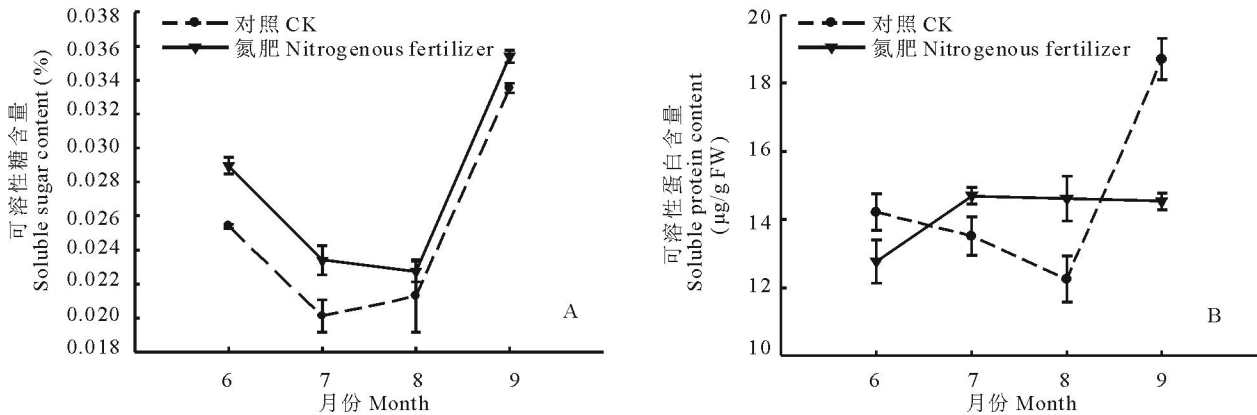


图2 氮肥对矮蒿草叶中可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响

Fig. 2 Effect of nitrogenous fertilizer on the contents of soluble sugar and soluble protein of *K. humilis* leaves

微有点升高,高于对照样地的含量。除8月外,其他月的叶绿素 a、b 和总叶绿素含量处理都高于对照的含量。8月施肥样地叶绿素含量的降低,是取样因素还是什么原因造成的,需要以后作进一步研究。

2.4 氮肥对矮蒿草叶中 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 的影响

O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 的产生速率都是在6月最高(图4),处理样地矮蒿草叶中 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 产生速率随着生长进程逐渐降低,这可能与 SOD 活性从7月开始逐渐升高有关;对照样地矮蒿草叶中 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 产生速率在7月最低,8月随着生长环境的恶劣升高,9月稍微有些降低。处理样地除了7月的产生速率高于对照外,其他月份都低于对照样地。

3 讨论

青藏高原高寒草甸速效养分的缺乏和资源异质性的分布格局,使植物生长处于紧张的资源竞争状态。矮蒿草为密集型克隆生长植物,生长较慢,对环境变化的反应多为生理上的<sup>[19]</sup>。

抗氧化系统是植物体清除 ROS 伤害,维持正常生长的重要机制。在植物体几乎所有的细胞组分存在的主要活性氧清除途径中 SOD 都起着重要作用<sup>[20]</sup>。SOD 可将 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 歧化为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 O<sub>2</sub>,是 O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 的主要清除剂<sup>[21]</sup>。孙群等<sup>[22]</sup>的研究表明,适宜的氮水平能够提高水分胁迫下叶片中 SOD 活性和叶绿素含量,与本研究结果相一致。GSH 通过抗坏血酸-谷胱甘肽循环清除活性氧。陈雄等<sup>[23]</sup>研究表明,海拔高的大车前 (*Plantago major*) 叶和根中的 GSH 含量较高,可以起到更好的抗氧化保护作用。施氮肥使生长初期和后期的 GSH 含量相对较高,对及时清除活性氧具有积极作用,施肥处理对矮蒿草生长前期 GSH 含量的提高

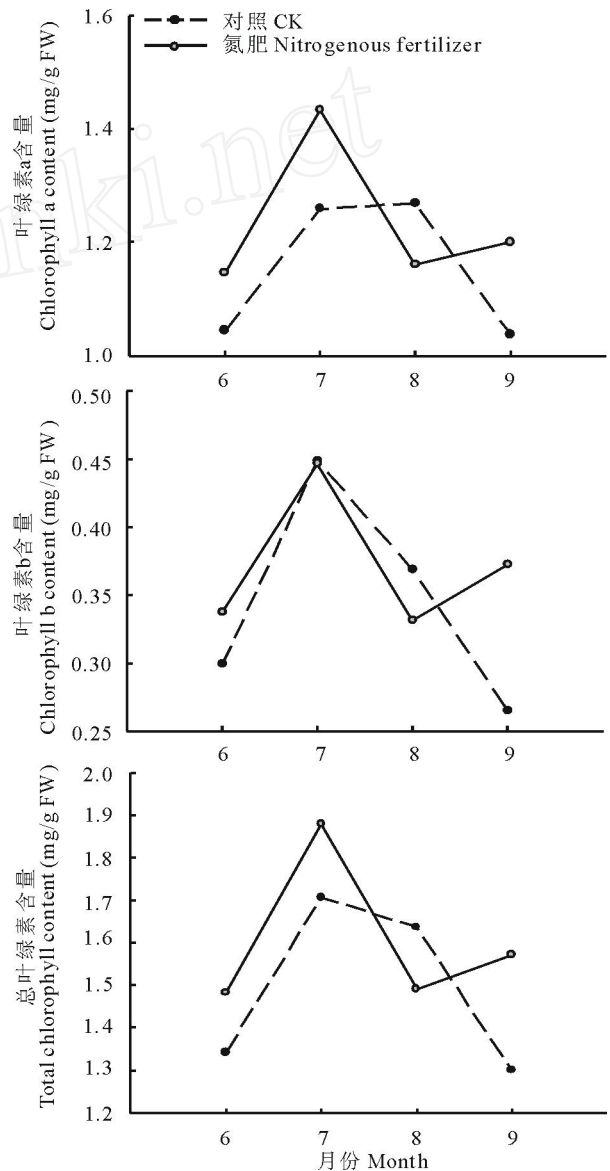


图3 氮肥对矮蒿草叶中叶绿素含量的影响

Fig. 3 Effect of nitrogenous fertilizer on the chlorophyll contents of *K. humilis* leaves

效果明显,可能与矮嵩草不同时期的活性氧清除机制有关<sup>[24]</sup>。

可溶性糖、脯氨酸、可溶性蛋白等物质积累是植物体平衡渗透势保护细胞的重要措施<sup>[25]</sup>。翟桂玉等<sup>[26]</sup>的研究表明,施肥显著提高了大豆(*Glycine max*)结荚期的蛋白质含量;唐湘如和官春云<sup>[27]</sup>的研究也表明施氮能够提高油菜(*Brassica campestris*)的蛋白质含量,但是施肥量的大小和时间对可溶性糖的含量影响较大。下一步需要对施肥次数的效果做进一步的深入研究。植物体内的碳氮代谢关系密切,蛋白质和可溶性糖含量的提高,提高了植物的代谢水平,增加了矮嵩草体内有机化合物的产生和代谢能力。可溶性糖和蛋白质在植物缺水干旱、低温等环境胁迫发生时的渗透胁迫中作用重要,可以降低细胞的水势,大大增强植物体抵抗外界环境胁迫的能力。

施氮能促进植物叶片叶绿素的合成。施肥导致的叶绿素含量提高,特别是后期叶绿素含量高,叶片衰老慢,延长叶片功能期,提高光能利用率。 $O_2^{\cdot -}$ 既能与体内的蛋白质和核酸等活性物质直接作用,又能衍生为  $H_2O_2$ , 羟自由基( $\cdot OH$ )和单线态氧( $^1O_2$ )等。施肥措施降低了  $O_2^{\cdot -}$ 的产生速率,特别是在黄枯期的 9 月,这与施肥促进矮嵩草生长、SOD 活性增强、可溶性糖含量提高等有关。施肥处理使矮嵩草得到了更好的生长,提高了抗氧化能力和渗透调节能力,增强了矮嵩草抵抗外界不良生长环境的能力。

#### 参考文献:

- [1] 曹广民, 张金霞, 鲍新奎, 等. 高寒草甸生态系统磷素循环[J]. 生态学报, 1999, 19(4): 514-518.
- [2] 曹广民, 吴琴, 李东, 等. 土壤-牧草氮素供需状况变化对高寒草甸植被演替与草地退化的影响[J]. 生态学杂志, 2004, 23(6): 25-28.
- [3] 顾梦鹤, 杜小光, 文淑均, 等. 施肥和刈割对垂穗披碱草(*Elymus nutans*)、中华羊茅(*Festuca sinensis*)和羊茅(*Festuca ovina*)种间竞争力的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(6): 2472-2479.
- [4] 周青平, 金继运, 德科加, 等. 不同施氮水平对高寒草地牧草增产效益的研究[J]. 土壤肥料, 2005, 3: 29-31.
- [5] 马玉寿, 郎百宁, 李青云, 等. 施氮量与施氮时间对小嵩草草甸草地的影响[J]. 草业科学, 2003, 20(3): 47-50.
- [6] Hare P D, Cress W A, Staden J V. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress[J]. Plant, Cell and Environment, 1998, 21(6): 535-553.
- [7] 房朋, 任丽丽, 张立涛, 等. 盐胁迫对杂交酸模叶片光合活性的抑制作用[J]. 应用生态学报, 2008, 19(10): 2137-2142.
- [8] 刘世鹏, 刘济明, 陈宗礼, 等. 模拟干旱胁迫对早熟幼苗的抗氧化系统和渗透调节的影响[J]. 西北植物学报, 2006, 26(9): 1781-1787.
- [9] 张道勇, 邓春暖, 潘响亮. 三种植物对 UV-B 辐射和臭氧污染的电生理响应[J]. 地球与环境, 2008, 36(3): 213-217.
- [10] 严重玲, 洪业汤, 付舜珍, 等. Cd、Pb 胁迫对烟草叶片中活性氧清除系统的影响[J]. 生态学报, 1997, 17(5): 488-492.
- [11] 冉飞, 李以康, 周华坤, 等. 三江源区高寒草甸退化草地植被恢复试验研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(27): 8639-8641.
- [12] Giannopolitis C N, Ries S K. Superoxide dismutase II. Purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedlings[J]. Plant Physiology, 1997, 59(2): 315-318.
- [13] Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups[J]. Archives of Biochemistry Biophysics, 1959, 82(1): 70-77.
- [14] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. Plant Physiology, 1949, 24: 1-15.
- [15] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学试验[M]. 北京: 北京大学出版社, 1990: 46.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

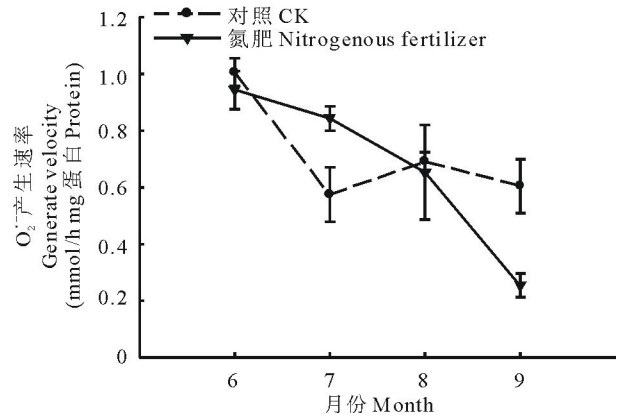


图 4 氮肥对矮嵩草叶中  $O_2^{\cdot -}$  产生速率的影响

Fig. 4 Effect of nitrogenous fertilizer on the  $O_2^{\cdot -}$  generate velocity of *K. humilis* leaves

- protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [17] 张治安, 张美善, 蔚荣海. 植物生理学试验指导[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004: 65-67.
- [18] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 308-309.
- [19] Harper J L. Modules, branches and the capture of resources[A]. In: Jackson J B C, Buss L W, Cook R E, *et al.* Population Biology and Evolution of Clonal Organisms[M]. New Haven: Yale University Press, 1985: 1-33.
- [20] Ron M. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(9): 405-410.
- [21] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzyme function for erythrocyte (HEMOCUPREIN) [J]. Journal of Biological Chemistry, 1969, 244(22): 6049-6055.
- [22] 孙群, 梁宗锁, 王渭玲, 等. 氮对水分亏缺下玉米幼苗膜脂过氧化及光合速率的影响[J]. 西北农业学报, 2001, 10(1): 7-10.
- [23] 陈雄, 王宗灵, 任红旭. 海拔高度对大车前叶和根中抗氧化系统的影响[J]. 植物学报, 1999, 41(8): 846-850.
- [24] 韩发, 周党卫, 滕中华, 等. 青藏高原不同海拔矮嵩草抗氧化系统的比较[J]. 西北植物学报, 2003, 23(9): 1491-1496.
- [25] Hellebust J A. Osmoregulation[J]. Annual Review of Plant Physiology, 1976, 27: 485-505.
- [26] 翟桂玉, 沈益新, 刘信宝, 等. 施肥对野生大豆饲草产量和品质的影响[J]. 草地学报, 2008, 16(5): 448-452.
- [27] 唐湘如, 官春云. 施氮对油菜几种酶活性的影响及其与产量和品质的关系[J]. 中国油料作物学报, 2001, 23(4): 32-37.

#### Physiological response of *Kobresia humilis* to nitrogenous fertilizer in an alpine meadow

LI Yi-kang<sup>1</sup>, RAN Fei<sup>2,3</sup>, BAO Su-ke<sup>1,3</sup>, HAN Fa<sup>1</sup>, ZHOU Hua-kun<sup>1</sup>, LIN Li<sup>1</sup>, ZHANG Fa-wei<sup>1</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xi 'ning 810008, China;

2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;

3. Graduated University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** Fertilization is a major measure to enhance the biomass of plants. The physiological response of *Kobresia humilis* to nitrogenous fertilizer in an alpine meadow was studied. The fertilization treatment significantly enhanced the activity of SOD, while there was no obvious change trend of GSH content and a "U" change of the soluble sugar content under the treatment and control. The soluble sugar content was highest in June and September, being significantly higher in the treatment than in the control for most of the time. The soluble protein content in the treatment was greater than that in the control during July and August, and less in June and September. The contents of chlorophyll a and b, and of total chlorophyll were also greater than those in the controls (except in August). The generation velocity of O<sub>2</sub><sup>·-</sup> was lower in the treatment than in the control (except in July). The treatment also led to an increase in biomass, height, and coverage of the community. In conclusion, nitrogenous fertilizer treatment enhanced antioxidant capacity and osmo-adjustment, resulting in growth promotion of *K. humilis*.

**Key words:** nitrogenous fertilizer; antioxidant system; *Kobresia humilis*