



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102986519 A

(43) 申请公布日 2013.03.27

(21) 申请号 201210524854.0

(22) 申请日 2012.12.10

(71) 申请人 中国科学院地球化学研究所

地址 550002 贵州省贵阳市观水路 46 号

(72) 发明人 吴沿友 赵宽 牛慧样 邢德科

杭红涛 赵玉国 刘丛强 刘莹

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所

52100

代理人 吴无惧

(51) Int. Cl.

A01G 31/00(2006.01)

A01G 7/00(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

## (54) 发明名称

利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的方法

## (57) 摘要

本发明公开一种利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的方法,包含以下步骤:第一、选择生长状况相似的植物幼苗,用常规配方的营养液培养植物 30 天后随机进行分组;一组继续在常规配方的营养液中培养;另一组是在模拟干旱胁迫环境下培养;第二、收集不同培养液培养后两组植物的根系分泌物,测定根系分泌物中苹果酸含量;第三、将在常规配方的营养液中培养的植物根系分泌的苹果酸含量记为 Mn,模拟干旱胁迫环境下培养的植物根系分泌的苹果酸含量记为 Ms;由此得到干旱胁迫处理的植物根系分泌苹果酸含量比常规配方的营养液中培养的植物根系分泌苹果酸含量的增加比记为

$\Delta Msn = \frac{Ms - Mn}{Mn}$ , 由此可判断出不同植物抗干旱

能力大小。

1. 一种利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的方法,其特征在于:包含以下步骤:

第一、选择生长状况相似的植物幼苗,用常规配方的营养液培养植物 30 天后随机进行分组;一组继续在常规配方的营养液中培养;另一组是在常规配方的营养液中添加聚乙二醇 6000—PEG 6000 后模拟干旱胁迫环境下的培养液中培养;

第二、收集不同培养液培养后的两组植物的根系分泌物,测定根系分泌物中的苹果酸含量;

第三、将在常规配方的营养液中培养的植物根系分泌的苹果酸含量记为  $M_n$ ,模拟干旱胁迫环境下培养的植物根系分泌的苹果酸含量记为  $M_s$ ;由此得到干旱胁迫处理的植物根系分泌苹果酸含量比常规配方的营养液中培养的植物根系分泌苹果酸含量的增加比记为

$\Delta M_{sn} = \frac{M_s - M_n}{M_n}$ ,由此可判断出不同植物抗干旱能力大小。

2. 根据权利要求 1 所述的一种利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的方法,其特征在于:不同培养液条件下两组植物的培养时间为 15 天。

3. 根据权利要求 1 所述的一种利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的方法,其特征在于:聚乙二醇 6000—PEG 6000 的添加量为每升常规配方的营养液中添加 50 克。

4. 根据权利要求 1 所述的一种利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的方法,其特征在于:测定根系分泌物中的苹果酸含量的方法为生物酶电极方法。

5. 根据权利要求 1 所述的一种利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的方法,其特征在于:利用  $\text{CaCl}_2$  溶液收集不同培养液培养后两组植物的根系分泌物。

## 利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及到一种利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的方法，属于农业生物技术和农作物抗干旱能力的监测领域。

### 背景技术

[0002] 干旱是影响植物生长发育的重要因素。植物抗干旱逆境能力的鉴定，对准确判断植物的抗逆性以及筛选抗性品种，为植物的环境适应性以及不同生态系统植物的选择与配置具有一定的理论意义与应用价值。

[0003] 干旱胁迫下植物会产生一系列生理反应来适应这种环境胁迫，如根系分泌物增多、脱落酸的增加，叶片水势的增加及水分利用率的增高等。苹果酸是植物根系分泌物中最常见的低分子量有机酸之一。苹果酸是光呼吸代谢过程中最活跃的中间代谢物，根系分泌物中苹果酸的含量与光呼吸代谢有直接的关系。苹果酸含量越多表明光呼吸代谢越活跃。在干旱胁迫下，植物气孔关闭，植物可通过加强光呼吸途径为叶绿体补充水和二氧化碳进行光合作用，从而避免干旱胁迫下光合器官的伤害。

[0004] 目前检测植物逆境生理及抗逆性的常用方法有以下四种：

1. 叶片观察法。这是一种最直观、最简便的方法，作物受逆境胁迫后也会引起特有的生理病征，许多植物直接表现在叶片上，该方法主要应用于矿质元素引起的逆境生理胁迫，但是每种植物某种元素的病征不完全一致，而缺乏元素的程度不同，表现程度也不同。因此，该方法过于局限性，准确性较差。

[0005] 2. 红外线气体分析法。红外线分析仪对双元素组成的气体有强烈的吸收能力，该方法是利用二氧化碳对红外线的吸收率检测红外光能量的被吸收量来实现逆境胁迫下光合能力检测的方法。这种检测方法具有一定的特殊性，目前应用较多的该类仪器有Li-6400型，Ciras-1型，Ciras-2型，Ci-340型，GFS-3000型便携式光合测量系统。该方法所使用的仪器过于昂贵，且操作起来较为繁琐，仪器本身受外界环境因素影响大、测量时间长、成本过高等。

[0006] 3. 叶绿素荧光动力学技术分析。叶绿素荧光动力学技术被称为研究植物光合功能的快速、无损伤探针，目前广泛应用于植物逆境生理、产量预测、环境污染的检测、遥感遥测等方面的研究，是一种较为理想的研究植物对环境胁迫的即时性方法，与红外线气体分析法一起用于表征植物的抗逆性强弱。该方法是现今用得最多的逆境生理与抗逆性的检测方法，但仪器成本较高、参数较多且易于混淆、受外界环境影响大等问题。

[0007] 4. 植物理化实验指标分析法。该方法主要包括植物体内各种常见抗性指标的测定如丙二醛、脯氨酸含量的测定，各种酶如过氧化物酶，过氧化氢酶，抗坏血酸氧化酶以及多酚氧化酶等活性的测定。该方法能充分的反映植物对逆境生理胁迫的影响，但存在实验周期长、实验步骤较繁琐、工作量大、灵敏度较低等缺点。

[0008] 上述方法都存在着各种不同的缺点，在实际应用中不利于推广与普及。

## 发明内容

[0009] 本发明要解决的技术问题是,提供了一种植物抗干旱胁迫能力的定量测定方法,为不同植物的抗干旱能力提供了可比性。

[0010] 本发明采取以下技术方案:一种利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的方法,包含以下步骤:

第一、选择生长状况相似的植物幼苗,用常规配方的营养液培养植物 30 天后随机进行分组;一组继续在常规配方的营养液中培养;另一组是在常规配方的营养液中添加聚乙二醇 6000—PEG 6000 后模拟干旱胁迫环境下的培养液中培养,

第二、收集不同培养液培养后两组植物的根系分泌物,测定根系分泌物中的苹果酸含量;

第三、将在常规配方的营养液中培养的植物根系分泌的苹果酸含量记为  $M_n$ ,模拟干旱胁迫环境下培养的植物根系分泌的苹果酸含量记为  $M_s$ ;由此得到干旱胁迫处理的植物根系分泌苹果酸含量比常规配方的营养液中培养的植物根系分泌苹果酸含量的增加比记为

$\Delta M_{sn} = \frac{M_s - M_n}{M_n}$ ,由此可判断出不同植物抗干旱能力大小。

[0011] 所述的不同培养液的条件两组植物的培养时间为 15 天。

[0012] 所述的聚乙二醇 6000—PEG 6000 的添加量为每升常规配方的营养液中添加 50 克。

[0013] 所述的测定根系分泌物中的苹果酸含量的方法为生物酶电极方法。

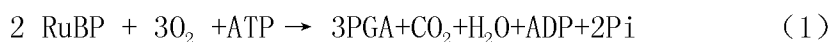
[0014] 所述的利用  $\text{CaCl}_2$  溶液收集不同培养液培养后两组植物的根系分泌物。

[0015] 本发明的优点如下:

利用根系分泌的苹果酸含量表征植物抗干旱胁迫能力的原理:

聚乙二醇 6000 (PEG 6000) 标示分子量为 6000,是一种惰性的、非离子的不能渗透细胞的大分子。聚乙二醇 6000 小到足以影响渗透压,也大到足以不被植物吸收。因此,它们经常被用于模拟生理干旱。用统一的、固定浓度的化学试剂来模拟生理干旱,可使对不同植物的检测结果具有可比性。

[0016] 苹果酸是光呼吸代谢过程中最活跃的中间代谢物,根系分泌物中苹果酸的含量与光呼吸代谢有直接的关系。光呼吸代谢的总反应可表示为:



(1) 式中 RuBP 为 1,5-二磷酸核酮糖,PGA 为三磷酸甘油酸。每 2 RuBP (10C) 被氧化,生成 3PGA (9C),放出 1 个  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$ 。也就是说有 1/10 的  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  可以在干旱时被回用,从而避免了干旱胁迫下光合器官的伤害。所以,根系分泌的苹果酸的多少,决定了循环使用的  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}$  的多少,因此,可以用根系分泌的苹果酸的量来表征植物的抗干旱能力。

由于人为添加聚乙二醇 6000 (PEG 6000) 到营养液中制造生理干旱,因此根系分泌物中有大量的 PEG 6000。PEG 6000 影响到用诸如高效液相色谱法、毛细管电泳法、气相色谱法等方法苹果酸测定。因此,选用生物酶电极方法测定根系分泌物中的苹果酸含量,灵敏度高、检测限低、特异性好、仪器简单便宜、操作简便快速。

[0017] 营养液中加入 50g/L 的聚乙二醇 6000 (PEG 6000),营养液的水势达到  $-0.58 \text{ MPa}$ ,

可以起到中度干旱的效果,15 天的处理,抗干旱品种和干旱敏感品种的根系分泌的苹果酸增加量有显著的差异。抗干旱品种根系分泌苹果酸含量的增加都超过 80%,而干旱敏感品种根系分泌苹果酸含量的增加都小于 80%。

[0018] 本发明的优点如下:

- 1) 本方法能定量检测植物的抗干旱能力,不同植物的检测结果具有可比性;
- 2) 根系分泌物中苹果酸的收集采用  $\text{CaCl}_2$  溶液收集,该方法是一种最为经济可行的有效途径;
- 3) 用生物酶电极方法可以直接测定根系分泌物中苹果酸,无需分离纯化和浓缩过程,技术成熟,操作简单,成本较低,工作量小,灵敏度高;
- 4) 本方法既可以表征植物的即时抗干旱能力,也可以表征植物的中长期抗干旱能力;
- 5) 本方法不受季节和土壤的影响,在实验室中就可以实现植物抗干旱能力的检测,具有较好的可控性。

### 具体实施方式

[0019] 本发明的实施例:第一步骤,选择生长状况相似的植物幼苗,用常规配方的营养液培养植物 30 天后随机进行分组。每组各 12 株植株;一组是继续在常规配方的营养液中培养;另一组是在每升常规配方的营养液添加 50 克聚乙二醇 6000 (PEG 6000)后的模拟干旱胁迫环境的培养液;培养时间为 15 天;

第二步骤,利用  $\text{CaCl}_2$  溶液收集培养 15 天后两组植物的根系分泌物,采用生物酶电极方法测定根系分泌物中的苹果酸含量;

第三步骤,将在常规配方的营养液中培养的植物根系分泌的苹果酸含量记为  $M_n$ ,模拟干旱胁迫环境下培养的植物根系分泌的苹果酸含量记为  $M_s$ ;由此得到干旱胁迫处理的植物根系分泌苹果酸含量比常规配方的营养液培养植物根系分泌苹果酸含量的增加比记为

$\Delta M_{sn} = \frac{M_s - M_n}{M_n}$ ,选择  $\Delta M_{sn}$  大于 80% 的植物作为抗干旱材料,由此也可以判断出不同植物抗干旱能力大小。

[0020] 构树抗干旱胁迫能力的测定

将构树幼苗置于有托底的穴盘中,用霍格兰(Hoagland)营养液培养,30 天后随机进行分组。每组各 12 株植株。一组是在常规配方的霍格兰营养液培养(对照组,水势: -0.08 MPa);另一组是模拟干旱胁迫环境下培养,干旱胁迫处理的营养液为含有浓度为 50g/L 聚乙二醇 6000 (PEG 6000)的霍格兰营养液(干旱胁迫处理组,水势: -0.58 MPa)。

[0021] 培养 15 天后,分别同时收集两组构树的根系分泌物。加入 200 mL 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液于穴盘的托底中,于上午 10 时至下午 14 时收集 4 小时,将穴盘里的溶液收集并用去离子水冲洗植物的根部所得的滤液,即为构树的根系分泌物。构树根系分泌物中的苹果酸含量采用生物酶电极方法测定。

[0022] 将在常规配方的营养液中培养的构树根系分泌的苹果酸含量记为  $M_n$ ,干旱胁迫处理条件下培养的构树根系分泌的苹果酸含量记为  $M_s$ ,由此得到干旱胁迫处理下的构树根系分泌苹果酸含量比常规配方的营养液中培养的构树根系分泌苹果酸含量的增加比记为

$\Delta M_{sn} = \frac{M_s - M_n}{M_n}$ , 其结果见表 1。

#### [0023] 桑树抗干旱胁迫能力的测定

将桑树幼苗置于有托底的穴盘中,用霍格兰(Hoagland)营养液培养,30 天后随机进行分组。每组各 12 株植株。一组是在常规配方的霍格兰营养液培养(对照组,水势:-0.08 MPa);另一组是模拟干旱胁迫环境下培养,干旱胁迫处理的营养液为含有浓度为 50g/L 聚乙二醇 6000 (PEG 6000)的霍格兰营养液(干旱胁迫处理组,水势:-0.58 MPa)。

[0024] 培养 15 天后,分别同时收集两组桑树的根系分泌物。加入 200 mL 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液于穴盘的托底中,于上午 10 时至下午 14 时收集 4 小时,将穴盘里的溶液收集并用去离子水冲洗植物的根部所得的滤液,即为桑树的根系分泌物。桑树根系分泌物中的苹果酸含量采用生物酶电极方法测定。

[0025] 将在常规配方的营养液中培养的桑树根系分泌的苹果酸含量记为  $M_n$ ,干旱胁迫环境下的桑树根系分泌的苹果酸含量记为  $M_s$ ,由此得到干旱胁迫处理下培养的桑树根系分泌苹果酸含量比常规配方的营养液中培养的桑树根系分泌苹果酸含量的增加比记为

$\Delta M_{sn} = \frac{M_s - M_n}{M_n}$ , 其结果见表 1。

#### [0026] 诸葛菜抗干旱胁迫能力的测定

将诸葛菜幼苗置于有托底的穴盘中,用霍格兰(Hoagland)营养液培养,30 天后随机进行分组。每组各 12 株植株。一组是在常规配方的霍格兰营养液培养(对照组,水势:-0.08 MPa);另一组是模拟干旱胁迫环境下培养,干旱胁迫处理的营养液为含有浓度为 50g/L 聚乙二醇 6000 (PEG 6000)的霍格兰营养液(干旱胁迫处理组,水势:-0.58 MPa)。

[0027] 培养 15 天后,分别同时收集两组诸葛菜的根系分泌物。加入 200 mL 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液于穴盘的托底中,于上午 10 时至下午 14 时收集 4 小时,将穴盘里的溶液收集并用去离子水冲洗植物的根部所得的滤液,即为诸葛菜的根系分泌物。诸葛菜根系分泌物中的苹果酸含量采用生物酶电极方法测定。

[0028] 将在常规配方的营养液中培养的诸葛菜根系分泌的苹果酸含量记为  $M_n$ ,干旱胁迫处理条件下培养的诸葛菜根系分泌的苹果酸含量记为  $M_s$ ,由此得到干旱胁迫处理下培养的诸葛菜根系分泌苹果酸含量比常规配方的营养液中培养的诸葛菜根系分泌苹果酸含量的

增加比记为  $\Delta M_{sn} = \frac{M_s - M_n}{M_n}$ , 其结果见表 1。

#### [0029] 油菜抗干旱胁迫能力的测定

将油菜幼苗置于有托底的穴盘中,用霍格兰(Hoagland)营养液培养,30 天后随机进行分组。每组各 12 株植株。一组是在常规配方的霍格兰营养液培养(对照组,水势:-0.08 MPa);另一组是模拟干旱胁迫环境下培养,干旱胁迫处理的营养液为含有浓度为 50g/L 聚乙二醇 6000 (PEG 6000)的霍格兰营养液(干旱胁迫处理组,水势:-0.58 MPa)。

[0030] 培养 15 天后,分别同时收集两组油菜的根系分泌物。加入 200 mL 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  溶液于穴盘的托底中,于上午 10 时至下午 14 时收集 4 小时,将穴盘里的溶液收集并用去离子水冲洗植物的根部所得的滤液,即为油菜的根系分泌物。油菜根系分泌物中的苹果酸含量采用生物酶电极方法测定。

[0031] 将在常规配方的营养液中培养的油菜根系分泌的苹果酸含量记为  $M_n$ , 干旱胁迫处理下培养的油菜根系分泌的苹果酸含量记为  $M_s$ , 由此得到干旱胁迫处理下培养的油菜根系分泌苹果酸含量比常规配方的营养液中培养油菜根系分泌苹果酸含量的增加比记为

$$\Delta M_{sn} = \frac{M_s - M_n}{M_n}, \text{ 其结果见表 1。}$$

[0032] 实施效果

四种植物在模拟干旱胁迫处理下的  $\Delta M_{sn}$  见表 1。由表 1 可知, 在模拟干旱胁迫处理下, 四种植物根系分泌的苹果酸含量均显著高于常规配方的营养液中培养的植物根系分泌的苹果酸含量。四种植物  $\Delta M_{sn}$  为构树 > 诸葛菜 > 桑树 > 油菜, 且油菜和桑树的  $\Delta M_{sn}$  小于 50%, 因此, 油菜和桑树的抗干旱胁迫能力较差, 为干旱敏感植物。构树和诸葛菜在干旱逆境下根系分泌的苹果酸急剧增多, 光呼吸代谢活跃, 被循环使用的  $CO_2$  和  $H_2O$  多。因此, 它们是抗干旱植物, 更能适应在干旱地区的土壤中生长。这与我们在关于这几种植物的其他研究及实际情况相符合, 为选择抗干旱植物以及喀斯特地区树种的配置和生态修复提供了重要的理论支撑。同时利用根系分泌的苹果酸含量作为一种检验植物抗干旱胁迫能力的方法, 也为植物逆境生理学研究提出了一种新的手段。

表 1 四种植物在缺磷胁迫处理下的  $\Delta M_{sn}$

植物种类	构树	桑树	诸葛菜	油菜
$\Delta M_{sn}$ (%)	180.6±10.3	42.7±3.9	112.4±7.4	35.1±2.4