

DOI:10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0678

董靖,李红丽,董智,白文华.H₂S对NaCl胁迫下草木樨幼苗生理指标及抗氧化酶活性的影响.草业科学,2018,35(10):2430-2437.
DONG J,LI H L,DONG Z,BAI W H.Effect of H₂S on physiological indexes and antioxidant activity of sweet clover seedlings under NaCl stress.Pratacultural Science,2018,35(10):2430-2437.

H₂S对NaCl胁迫下草木樨幼苗生理指标及 抗氧化酶活性的影响

董靖,李红丽,董智,白文华

(山东省土壤侵蚀与生态修复重点实验室,泰山森林生态站,山东泰安271018)

摘要:为了探究硫化氢(H₂S)增强牧草抗NaCl胁迫的能力及剂量效应,筛选适宜的喷施浓度。以草木樨(*Melilotus suaveolens*)为材料,采用水培的方法,用H₂S供体硫氢化钠(NaHS)处理NaCl胁迫下的草木樨幼苗,研分析H₂S对NaCl胁迫下草木樨幼苗叶片相对含水量、相对电导率、渗透调节物质、抗氧化酶活性、丙二醛(MDA)含量以及叶绿素含量的影响,研究H₂S对NaCl胁迫下草木樨幼苗的缓解效应机制。结果表明,适宜浓度NaHS处理提高了NaCl胁迫下草木樨幼苗叶片相对含水量,降低了叶片相对电导率;缓解了游离脯氨酸、可溶性糖含量的升高,促进可溶性蛋白含量增加;增强超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性,降低丙二醛含量,增加叶片中的叶绿素含量。不同浓度NaHS处理对缓解草木樨的NaCl盐胁迫效果差异显著($P < 0.05$),随浓度的增加,各指标均显示出一定的剂量效应,采用隶属函数法综合比较不同浓度NaHS处理后草木樨的生理及酶活性响应,0.1 mmol·L⁻¹的NaHS处理对NaCl胁迫的缓解效果最佳。

关键词:牧草;硫氢化钠;喷施浓度;缓解效应;渗透调节;剂量效应;隶属函数法

中图分类号:S551+.601;Q945.78 文献标志码:A 文章编号:1001-0629(2018)10-2430-08*

Effect of H₂S on physiological indexes and antioxidant activity of sweet clover seedlings under NaCl stress

DONG Jing, LI Hongli, DONG Zhi, BAI Wenhua

(1.Shandong Provincial Key Laboratory of Soil Erosion and Ecological Restoration, Taishan Forestry Ecosystem Research Station, College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong, China)

Abstract: In order to examine the potential use and optimal dose of hydrogen sulfide (H₂S) to ameliorate NaCl stress in forage, the adequate treatment concentration was determined. Sweet clover (*Melilotus suaveolens*) was used in this study by applying a hydroponic method. Seedlings under NaCl stress were treated with NaHS to assess the effect of H₂S treatments on relative water content, relative conductivity, osmotic substance, antioxidant enzyme activity, and malondialdehyde (MDA) content of sweet clover seedlings leaves under NaCl stress to examine the relief mechanisms in sweet clover seedlings under NaCl stress treated with H₂S. The results showed that the relative water content of sweet clover seedling leaves under NaCl stress increased following NaHS treatment, whereas relative conductivity decreased; the increase of free proline and soluble sugar content was mitigated, and the content of soluble protein increased; the activities of superoxide dismutase

* 收稿日期:2017-12-08 接受日期:2018-02-12

基金项目:十三五国家重点研发计划——中温性荒漠草原区退化草地修复与家庭牧草精准管理技术研发与示范(2016YFC0500504);欧洲投资银行贷款山东沿海防护林建设项目效益监测与评价(SCSFP-JC)

第一作者:董靖(1992-),女,山东聊城人,在读硕士生,主要从事水土流失防治研究。E-mail:dongjing93@sina.com

通信作者:李红丽(1972-),女,内蒙古赤峰人,副教授,博士,主要从事荒漠化防治与盐碱地治理研究。E-mail:hlh@sdau.edu.cn

<http://cykx.lzu.edu.cn>

(SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT) increased, the MDA content decreased, and leaf chlorophyll content increased following the treatment. The observed changes in the tested indexes showed a certain dose effect. A comprehensive comparison of different physiological responses and enzymatic activities in sweet clover after NaHS treatment was performed using a membership function, and indicated that $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS treatment produced the best effect in NaCl-stressed plants.

Keywords: pasture; sodium bisulfide; spray concentration; alleviative effect; osmotic regulation; dosage effect; subordinate function

Corresponding author: LI Hongli E-mail: lhl@sda.u.edu.cn

盐胁迫是影响植物生存、生长和生产力的主要环境因素之一^[1-2]。盐碱土中的氯化物、硫酸盐及含盐量导致的盐胁迫不仅直接影响植物种子的萌发、植物的生长和产量^[3],而且影响植物的抗氧化系统,破坏细胞的结构和功能,影响光合作用等代谢活动,使植物的正常生命活动受到影响^[4-6],不同的植物可以通过内部调节或外源物质调节而减缓盐胁迫对植物体内生理生化、氧化损伤、膜透性、叶绿素等的伤害^[7-10]。因此,深入了解植物对盐胁迫的各种信号响应机制以及抵御盐胁迫的各种途径具有十分重要的价值^[11]。

H_2S 是生物体内继 NO 和 CO 后的第 3 种气体信号分子^[12],在生物生长发育及非生物应答胁迫等方面具有重要作用,已成为生物学研究的热点^[13]。已有的研究表明, H_2S 可以促进种子萌发,根的发生,调节光合作用、气孔运动,并参与抵抗重金属、盐、干旱、高温等胁迫^[14-17]。

草木樨 (*Melilotus suaveolens*) 为豆科草木樨属一、二年生草本植物,其根系发达,固土与改良土壤能力强,防风固沙效果好,营养丰富,适口性好,是优良的保持水土、防风固沙和改良土壤用牧草,也是山东省当家牧草之一。草木樨抗盐能力较强,也是改良土壤盐碱化的理想牧草^[18]。尽管草木樨的耐盐能力较一般植物强,但盐胁迫依然会使其产量显著下降,研究草木樨的抗盐特性及机制可以提高其在盐碱地改良中的应用价值。尽管汪永平等^[19]比较研究了不同品种草木樨的抗盐性,然而在外源物质对草木樨抗盐性的研究方面尚未见报道,外源物质对其生理生化作用的机制尚不清晰。为阐明外源 H_2S 在草木樨抗盐性中的作用,本研究通过外源 H_2S 处理 NaCl 胁迫下的草木樨幼苗,对草木樨幼苗生长过程中的生理生化指标及抗氧化酶活性变化进行研究,旨在探索外源 H_2S 对盐胁迫下草木樨幼苗生长的缓解效应,并筛选出缓解 NaCl 盐胁迫的适宜 H_2S 浓度,为提高草木樨耐盐性及揭示其耐盐机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验地概况

试验于 2017 年 4—7 月在山东农业大学林学试验站的全日光温室内 ($36^{\circ}16' \text{ N}$, $117^{\circ}11' \text{ E}$) 进行,试验期间日照时间平均为 10 h,日均温在 $20 \sim 25^{\circ} \text{ C}$,相对湿度 65%, CO_2 浓度基本与大气浓度持平。

1.2 材料与处理

试验所用草种采自内蒙古草木樨栽培草地,发芽率 95% 以上。挑选种粒饱满、大小均匀的草木樨种子,用 3% 的 H_2O_2 消毒 10 min,蒸馏水冲洗 3~4 次,浸种催芽后播种于装有蛭石的花盆中。花盆高 35 cm、上口径 35 cm,下口径 30 cm,花盆底部开孔,并用无纺布遮盖,保证盆内基质不外流,且可通过底部开孔吸水。种子萌发后浇灌 1/2 Hoagland 完全营养液,生长 40 d 后选择长势良好的植株进行水培处理。取幼苗用海绵条包裹好,固定在泡沫板的孔内,每个孔固定幼苗 4 株,然后将固定有幼苗的泡沫板转移到装有完全营养液的塑料盆(高 13 cm,宽 28 cm,长 35 cm)中进行培养(为了避免光照使营养液的温度升高和营养液表面生长绿藻,试验用铝箔纸将塑料盆紧密包裹),每个塑料盆内装有 4.4 L 营养液。共分为 8 个处理(表 1),分别为:对照 [CK_n 和 CK_p ($150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的确定是在预试验中完成的,该 NaCl 浓度处理幼苗 15 d 后多个指标均为空白对照的 50% 左右,且其他指标与对照差异极显著,故选用此浓度)]; I, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + $0.025 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS; II, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS; III, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS; IV, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS; V, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS; VI, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl + $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS。试验中先将 NaHS 按处理浓度配制成溶液后直接喷施在草木樨叶面,以叶片布满液滴为准,每天喷施 1 次,获得不同的 H_2S 处理,NaCl 直接配制在营养液中,每个处

理3次重复。处理15 d后取样测定各个指标。为保证NaCl浓度稳定,每2 d换1次营养液,并且每天向营养液中通入空气,以保证氧气的供应充足。

表1 试验处理编号
Table 1 Experimental design

编号 Treatment number	NaCl 浓度 NaCl concentration/ (mmol · L ⁻¹)	NaHS 浓度 NaHS concentration/ (mmol · L ⁻¹)
CK _n	0	0
CK _p	150	0
I	150	0.025
II	150	0.05
III	150	0.1
IV	150	0.2
V	150	0.4
VI	150	0.8

1.3 测定指标及方法

叶片相对含水量采用蒸馏水浸泡及烘干称重法测定;细胞膜相对透性用电导法测定;采用水合茚三酮法测定游离脯氨酸含量;采用蒽酮法测定可溶性糖含量;采用考马斯亮蓝 G-250 法测定可溶性蛋白含量^[20];采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛含量;酶液的提取参考 de Azevedo 等^[21]的方法,SOD 活性采用邻苯三酚自氧化速率法测定,POD 活性采用愈创木酚法测定,CAT 活性采用紫外吸收法测定;叶绿素含量采用丙酮乙醇混合液提取,然后用分光光度计测定^[20]。

所有数据均用3个重复的平均值±标准误表示,SPSS(16.0)软件进行单因素方差(ANOVA)统计分析,Duncan 法多重比较,差异显著定义为 $P < 0.05$,利用隶属函数法^[22]对各指标进行综合比较,Excel 2010 制作相应图表。

2 结果与分析

2.1 外源 H₂S 对盐胁迫下草木樨幼苗叶片相对含水量及相对电导率的影响

150 mmol · L⁻¹ 盐胁迫下(CK_p)草木樨幼苗叶片相对含水量显著降低,较 CK_n 下降了 20.99% ($P < 0.05$) (表 2);而相对电导率显著升高,较 CK_n 上升了 139.97% ($P < 0.05$)。不同浓度的 NaHS 缓解了盐胁迫对叶片相对含水量及相对电导率的影响,随 NaHS 浓度的增加,叶片相对含水量呈先升高后降低的趋势,而相对电导率则呈先降低后升高的变化,各 NaHS 浓度下叶片相对含水量与相对电导率差异显著 ($P < 0.05$)。NaHS 处理

中,叶片相对含水量在 0.8 mmol · L⁻¹ 时最低,0.1 mmol · L⁻¹ 时最高;叶片相对电导率则正好相反,在 0.1 mmol · L⁻¹ 时最低,在 0.8 mmol · L⁻¹ 时最高。可以看出,0.1 mmol · L⁻¹ 的 NaHS 显著缓解了盐胁迫对草木樨幼苗叶片相对含水量和相对电导率的影响 ($P < 0.05$),相对含水量较 CK_p 增加了 26.85%,相对电导率减少了 57.54%;与 CK_n 相比较,相对含水量和相对电导率的差异均不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 外源 H₂S 对盐胁迫下草木樨幼苗叶片渗透调节物质含量的影响

盐胁迫引起了游离脯氨酸含量的增加,150 mmol · L⁻¹ NaCl 盐处理的草木樨幼苗游离脯氨酸含量为 299.52 μg · g⁻¹,是空白对照 CK_n 的 379.57% (表 2)。在 NaCl 盐处理中喷施不同浓度的 NaHS 后,均显著地抑制了盐胁迫造成的游离脯氨酸含量的升高 ($P < 0.05$)。NaHS 处理浓度从小到大的草木樨幼苗的游离脯氨酸含量分别为 CK_p 的 84.29%、55.77%、26.80%、26.52%、45.14% 和 70.99%。各处理以 0.1 和 0.2 mmol · L⁻¹ 的 NaHS 对盐胁迫造成游离脯氨酸含量升高的抑制效果最佳,其脯氨酸含量分别为未受胁迫的 CK_n 的 1.02 倍和 1.01 倍,三者间差异不显著 ($P > 0.05$)。

空白对照 CK_n 草木樨幼苗的可溶性糖含量为 6.21 mg · g⁻¹,150 mmol · L⁻¹ NaCl 处理的为 3.65 mg · g⁻¹,盐胁迫使得草木樨幼苗体内可溶性糖含量显著下降 ($P < 0.05$) (表 2)。喷施 NaHS 后可以增加草木樨幼苗体内可溶性糖的积累,不同浓度 NaHS 处理的效果不同,总体上随着浓度的增加呈先升高后降低的趋势。各浓度处理条件下,0.1 mmol · L⁻¹ 时草木樨体内可溶性糖含量最高,为 6.10 mg · g⁻¹;而 0.8 mmol · L⁻¹ 时最低,为 3.32 mg · g⁻¹,是单纯盐胁迫的 90.96%,且可溶性糖从 0.4 mmol · L⁻¹ 时即开始低于 CK_p。说明适宜浓度的 NaHS 可以缓解盐胁迫造成的可溶性糖含量的下降,但是施用 NaHS 的浓度过高,会使可溶性糖的含量降得更低。

盐胁迫降低了草木樨幼苗中的可溶性蛋白含量,150 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫下可溶性蛋白含量是未受胁迫的对照 CK_n 的 52.79% (表 2);施加 NaHS 可以抑制盐胁迫造成的草木樨可溶性蛋白含量的降低,但浓度达到 0.8 mmol · L⁻¹ 时,可溶性蛋白含量降至最低,与单纯盐处理间差异不显著 ($P > 0.05$),说明该浓度未能减缓盐胁迫对可溶性蛋白含量的作用。不同浓度 NaHS 处理的草木樨幼苗的可溶性蛋白含量在 62.42~108.12 mg · g⁻¹,总体上随浓度增大表现为先升高后降低的趋势;除 0.8 mmol · L⁻¹ NaHS 处理

外,其余浓度均显著高于单纯 NaCl 盐处理 ($P < 0.05$),各浓度处理下以 0.1 mmol · L⁻¹ 的 NaHS 处理对可溶性蛋白含量降低的抑制效果最好。

2.3 外源 H₂S 对盐胁迫下草木樨幼苗叶片抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响

与正常条件下的草木樨幼苗相比,盐胁迫使得草木樨幼苗中的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性均发生不同程度的降低,且降低程度显著($P < 0.05$)(图 1)。喷施 NaHS 可

以明显缓解抗氧化酶活性的降低($P < 0.05$),NaHS 浓度为 0.025、0.05、0.1 mmol · L⁻¹ 时,SOD、POD、CAT 活性都逐渐升高,当浓度到达 0.1 mmol · L⁻¹ (POD 是在 0.2 mmol · L⁻¹)之后,抗氧化酶活性开始逐渐下降,但均高于 CK_p 或与 CK_p 接近。这说明 150 mmol · L⁻¹ 的 NaCl 使草木樨幼苗的 SOD、POD、CAT 活性下降,而喷施 0.025~0.8 mmol · L⁻¹ 的 NaHS 均能使抗氧化酶活性有所升高,提高其抗盐能力,不同浓度处理以 0.1 mmol · L⁻¹ 左右时的作用效果最好。

表 2 H₂S 对盐胁迫下草木樨幼苗相对含水量、相对电导率及渗透调节物质含量的影响
Table 2 Effect of sodium hydrogen sulfide on relative water content, relative electrical conductivity, and osmotic adjustment content in sweet clover seedling under salt stress

处理 Treatment	相对含水量 Relative water content/%	相对电导率 Relative electrical conductivity/%	游离脯氨酸 Free proline content/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	可溶性糖 Soluble sugar content/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	可溶性蛋白 Soluble protein content/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
CK _n	90.50±1.24a	13.56±1.01g	78.91±4.83f	6.21±0.17a	127.78±2.30a
CK _p	71.53±1.77g	32.54±2.11a	299.52±5.33a	3.65±0.28c	67.45±1.56e
I	75.38±2.13e	30.66±1.30c	252.47±3.67b	3.94±0.15c	79.31±3.54d
II	78.06±1.39c	25.89±0.73e	167.05±3.17d	4.96±0.19b	88.67±1.12c
III	90.72±0.81a	13.78±0.89g	80.26±2.14f	6.10±0.31a	108.12±3.09b
IV	80.25±1.74b	20.41±1.37f	79.43±4.56f	5.23±0.24b	102.45±2.67b
V	76.44±0.53d	26.51±2.56d	135.19±3.34e	3.55±0.27c	80.33±2.21d
VI	72.46±2.72f	31.43±1.54b	212.62±4.11c	3.32±0.39c	62.42±3.56e

同列不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

Different lowercase letters within the same column indicate significant difference between different treatments at the 0.05 level.

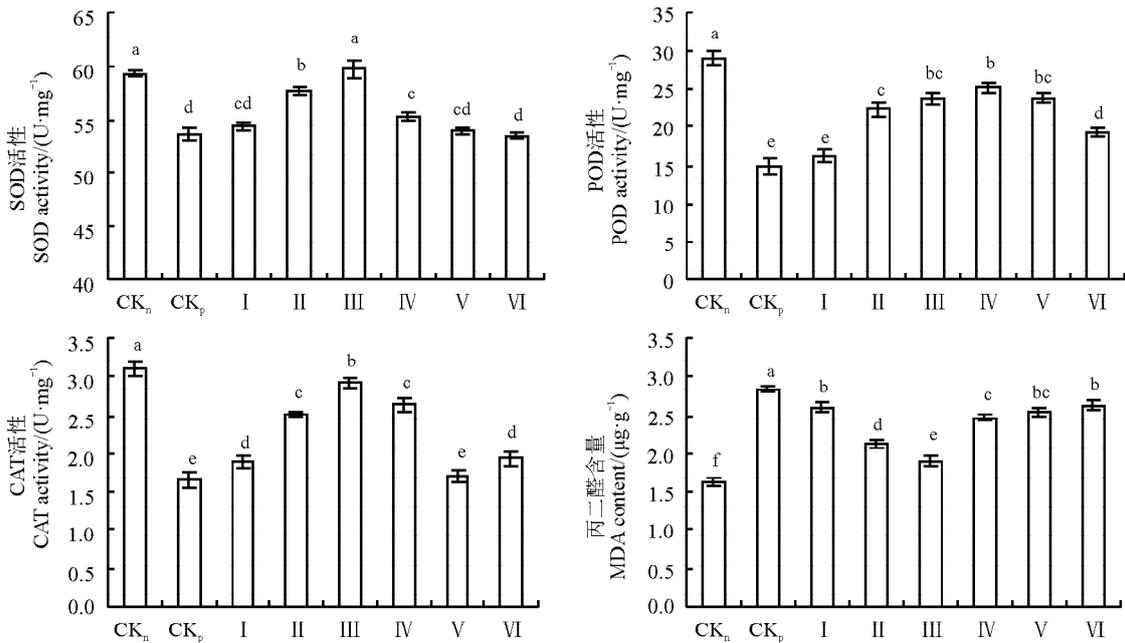


图 1 H₂S 对盐胁迫下草木樨幼苗抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响

Fig. 1 Effect of sodium hydrogen sulfide on antioxidant enzyme activity and MDA content in sweet clover seedling under salt stress

不同字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$),图 2 同。

Different lowercase letters indicate significant difference between different treatments at the 0.05 level; similarly for the figure 2.

未经 NaCl 胁迫的草木樨幼苗中丙二醛(MDA)含量为 $1.65 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 经 NaCl 胁迫后其 MDA 含量则升高到 $2.83 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 是前者的 1.72 倍。对 NaCl 胁迫下的草木樨幼苗喷施不同浓度 NaHS, MDA 含量呈先降低后升高的趋势; 其中喷施 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaHS, 其 MDA 含量在经 NaCl 处理的草木樨幼苗中最低, 说明 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaHS 能较好缓解 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 造成的 MDA 含量的升高(图 1)。

2.4 外源 H₂S 对盐胁迫下草木樨幼苗叶片叶绿素含量的影响

未受盐胁迫的草木樨幼苗叶绿素 a、b 含量最高, 其次为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS 处理, 最低的则是 0.8

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS 处理。单纯 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 胁迫使草木樨幼苗的叶绿素 a 含量和叶绿素 b 含量显著降低 ($P < 0.05$), 分别为 CK_n 的 54.11% 和 54.22%(图 2)。外源 NaHS 的添加有利于叶绿素 a、b 的合成, 缓减盐胁迫引起的叶绿素 a、b 含量的降低。不同浓度 NaHS 处理下叶绿素 a、b 含量间差异明显, 随浓度增加呈现先升高后降低的变化趋势, 其中 III 处理和 IV 处理中叶绿素 a 的含量分别是 CK_n 的 87.78%、68.30%, 叶绿素 b 的含量分别是 CK_n 的 87.45%、68.05%。因此, 0.1 和 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaHS 处理可以显著缓解盐胁迫, 增加草木樨幼苗的叶绿素 a 和叶绿素 b 含量。

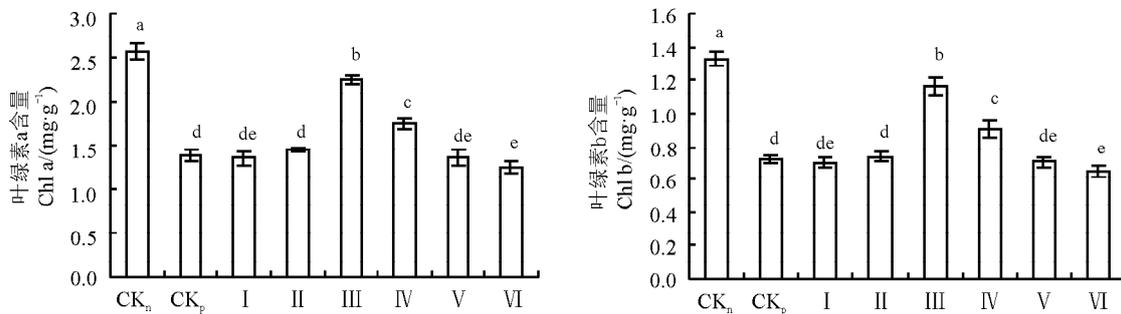


图 2 H₂S 对盐胁迫下草木樨幼苗叶绿素含量的影响

Fig. 2 Effect of sodium hydrogen sulfide on chlorophyll content in sweet clover seedling under salt stress

2.5 隶属函数法对盐胁迫下草木樨幼苗的综合评价

利用隶属函数法, 对 8 个处理草木樨幼苗的生理及抗氧化酶活性等 12 个指标进行综合评价。各指标中除相对电导率、游离脯氨酸和丙二醛与幼苗生长状况呈负相关关系外, 其余指标与幼苗生长状况均为正相关关系, 带入计算公式得出表 3, 表中数值越高幼苗

生长状况越好。从表中可以看出 CK_n 组幼苗生长状况最好, 其次为 III 组, 最差的为 CK_p 组, VI 组接近于 CK_p。说明盐胁迫严重危害了草木樨幼苗的正常生长, 而 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHS 处理极大地缓解了盐胁迫对幼苗各指标造成的影响, 使得幼苗能够正常生长, 但是浓度过高或过低时, 缓解效果都会大大减弱。

表 3 各指标的隶属函数值及综合排序

Table 3 The membership function of each index value and comprehensive ranking

指标 Index	处理 Treatment							
	CK _n	CK _p	I	II	III	IV	V	VI
相对含水量 Relative water content	0.990	0.000	0.203	0.344	1.000	0.458	0.255	0.052
相对电导率 Relative electrical conductivity	1.000	0.000	0.095	0.349	0.989	0.640	0.317	0.058
游离脯氨酸 Free proline	1.000	0.000	0.213	0.600	0.994	0.998	0.745	0.394
可溶性糖 Soluble sugar	1.000	0.114	0.215	0.567	0.962	0.661	0.080	0.000
可溶性蛋白 Soluble protein	1.000	0.078	0.258	0.402	0.699	0.613	0.274	0.000
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	0.926	0.022	0.147	0.677	1.000	0.299	0.072	0.000
过氧化物酶 Peroxidase	1.000	0.000	0.099	0.528	0.979	0.732	0.634	0.310
过氧化氢酶 Catalase	1.000	0.000	0.165	0.598	0.875	0.679	0.311	0.194
丙二醛 Malondialdehyde	1.000	0.000	0.192	0.583	0.942	0.300	0.242	0.175
叶绿素 a Chlorophyll a	1.000	0.099	0.079	0.149	0.760	0.378	0.081	0.000
叶绿素 b Chlorophyll b	1.000	0.105	0.079	0.130	0.755	0.376	0.081	0.000
平均值 Average value	0.992	0.038	0.159	0.448	0.905	0.558	0.281	0.108
顺序 Sequencing	1	8	6	4	2	3	5	7

3 讨论与结论

细胞膜是活细胞和环境之间的界面和屏障,各种不良环境对细胞的影响往往首先作用于细胞膜^[23]。相对电导率反映了植物细胞膜透性的大小,植物受到的损伤越严重叶片相对电导率值越大,反之则越小^[24]。本研究中,草木樨幼苗在 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $NaCl$ 处理下相对含水量下降、相对电导率升高,说明此时草木樨受到了盐胁迫,细胞失水,细胞膜结构和功能受损,膜透性增大;而不同浓度的 $NaHS$ 处理使得叶片相对水量增大,相对电导率下降,因而,可以认为信号分子 H_2S 可以在一定程度上帮助草木樨对抗盐胁迫,并通过维持较高相对含水量和减小细胞膜透性的方式缓解盐胁迫造成的伤害。

渗透调节是植物在逆境条件下,通过代谢活动增加细胞内溶质浓度,降低其渗透势而保持继续吸水,维持较正常的代谢活动^[25]。植物体内的渗透调节物质很多,本研究主要研究了游离脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白的含量变化。游离脯氨酸含量的积累是植物渗透调节的重要部分,当植物遭受非生物胁迫时,会产生比平时更多的脯氨酸用以维持细胞渗透平衡^[26]和抵抗逆境胁迫^[27]。从研究结果来看, $NaCl$ 胁迫使草木樨幼苗中游离脯氨酸含量显著增加, $NaHS$ 处理则能降低其含量的增加,说明 H_2S 缓解了盐胁迫造成的伤害,草木樨用来抵抗盐胁迫而产生的脯氨酸含量减少(表 2)。可溶性糖是植物体内主要的储能物质,是植物生长发育的基础,对逆境条件下的植物细胞起渗透调节作用^[27]。研究表明,在胁迫环境下,植物所含的可溶性糖含量会大幅降低,可溶性糖含量越低植物所受胁迫越严重^[28]。本研究中 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $NaCl$ 胁迫使草木樨幼苗中可溶性糖含量显著降低,这与前人研究^[27-28] 结果相同,盐胁迫的同时外施 $NaHS$ 又可提高其含量,说明植物受胁迫程度可以通过施用 $NaHS$ 得到缓解。可溶性蛋白含量也是渗透调节的重要指标之一^[29],当盐浓度达到一定值时,植物体内的可溶性蛋白含量降低^[30]。本研究中,单纯盐处理的草木樨幼苗中可溶性蛋白含量最低, $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $NaHS$ 处理中含量则接近于未受盐胁迫的含量,这可能是由于 H_2S 解除了盐胁迫对某些蛋白质合成途径的抑制,同时降低了蛋白质的水解,使可溶性蛋白含量

保持较高水平。

抗氧化酶活性及丙二醛含量的变化显示了植物抗氧化损伤程度,是研究植物非生物胁迫的重要指标^[31]。盐胁迫条件下,植物细胞线粒体和叶绿体电子传递中的泄露电子积累,刺激活性氧大量产生,过量的活性氧使蛋白质、脂质等生物分子氧化降解,导致酶失活,使细胞内产生氧化损伤和膜结构损伤^[32]。膜脂过氧化产生的丙二醛则可通过与蛋白质、核酸反应或影响纤维素分子间的桥键而抑制蛋白质的合成^[33]。研究中, $NaHS$ 在溶液中分解为 Na^+ 和 HS^- , HS^- 结合 H^+ 形成 H_2S , H_2S 透过细胞膜扩散,迅速到达线粒体和叶绿体基质作用于草木樨的抗氧化酶体系,提高抗氧化酶活性。这恰是 H_2S 作用并提高抗氧化酶活性的本质^[34-36]。在抗氧化酶体系中, SOD 以 O_2^- 为基质进行歧化反应,将毒性较强的 O_2^- 转化为毒性较轻的 H_2O_2 ,然后 CAT 将 H_2O_2 歧化为 H_2O 和 O_2 ,同时 POD 利用各种基质作为电子供体将 H_2O_2 还原为 H_2O ^[37]。正是通过这一系列的过程,草木樨幼苗中的过量活性氧被清除,细胞膜结构和功能的损伤降低,膜脂氧化的产物丙二醛含量降低。从试验结果来看, $NaHS$ 对抗氧化酶活性的提高是有剂量效应的,随浓度的增大先升高后降低,当喷施浓度过高时反而抑制了草木樨抗氧化酶活性, MDA 含量又有所增加(图 1),使得细胞内产生氧化损伤和膜结构损伤,这一点可为试验中 $0.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $NaHS$ 处理下相对电导率增大,且与盐胁迫处理相近所证实(表 2)。

因此可以得出结论,1) $NaHS$ 处理可提高 $NaCl$ 胁迫下草木樨幼苗叶片相对含水量,降低叶片相对电导率,以此缓解对草木樨细胞膜的危害; $NaHS$ 处理可降低因盐胁迫而造成的游离脯氨酸的积累,促进可溶性糖含量与可溶性蛋白含量的增加,增强抗氧化酶活性,降低丙二醛含量,增加叶片中的叶绿素含量;2) 不同浓度 $NaHS$ 处理对缓解草木樨的 $NaCl$ 盐胁迫效果差异显著,随浓度的增加,各指标的变化并不相同,但各指标均显示出一定的剂量效应。采用隶属函数法对不同处理的综合评价表明,对于 $NaCl$ 盐胁迫 ($150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的草木樨幼苗,6 种 $NaHS$ 缓解盐胁迫浓度处理,以 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的缓解效果最好,其次为 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,而 $0.8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 缓解效果最差。

参考文献 References:

- [1] SHI Q, DING F, WANG X. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant*

- Physiology & Biochemistry, 2007, 45(8): 542-550.
- [2] FERREIRA-SILVA S L, VOIGT E L, SILVA E N. Partial oxidative protection by enzymatic and non-enzymatic components in cashew leaves under high salinity. *Biologia Plantarum*, 2012, 56(1): 172-176.
- [3] MUNNS R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 2002, 25(2): 239-250.
- [4] ZHENG Q S, LIU L, LIU Y L. Effects of salt and water stresses on osmotic adjustment and osmotic accumulation in *Aloe vera* seedlings. *Acta Photophysiological Sinica*, 2003, 29(6): 585-588.
- [5] SAIED A S, KEUTGEN A J, NOGA G. The influence of NaCl salinity on growth, yield and fruit quality of strawberry cvs. 'El-santa' and 'Korona'. *Scientia Horticulturae*, 2005, 103(3): 289-303.
- [6] 慕德宇, 董智, 李周岐. 优良组培白榆无性系对盐分响应的差异性. *林业科学*, 2016, 52(3): 36-46.
- MU D Y, DONG Z, LI Z Q. Responses of siberia elm clones to salt stress. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016, 52(3): 36-46.
- [7] 周万海, 冯瑞章, 师尚礼, 寇江涛. NO 对盐胁迫下苜蓿根系生长抑制及氧化损伤的缓解效应. *生态学报*, 2015, 35(11): 3606-3614.
- ZHOU W H, FENG R Z, SHI S L, KOU J T. Nitric oxide protection of alfalfa seedling roots against salt-induced inhibition of growth and oxidative damage. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(11): 3606-3614.
- [8] CORREA-ARAGUBDE N, GRAZIANO M, LAMATTINA L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 2004, 218(6): 900-905.
- [9] 黄雍容, 林武星, 聂森, 朱炜. 盐胁迫下台湾海桐和台湾栎树抗氧化代谢和有机溶质积累的变化. *生态学杂志*, 2014, 33(12): 3176-3183.
- HUANG Y R, LIN W X, NIE S, ZHU W. Changes of antioxidant metabolism and organic solute accumulation of *Pittosporum pentandrum* and *Koelreuteria elegans* seedlings under salt stress. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(12): 3176-3183.
- [10] 鲁艳, 雷加强, 曾凡江, 徐立帅, 刘国军, 彭守兰, 黄彩变. NaCl 胁迫对大果白刺幼苗生长和抗逆生理特性的影响. *应用生态学报*, 2014, 25(3): 711-717.
- LU Y, LEI J Q, ZENG F J, XU L S, LIU G J, PENG S L, HUANG C B. Effects of salt stress on *Nitraria roborowskii* growth and physiological characteristics of stress resistance. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(3): 711-717.
- [11] CHINNUSAMY V, JAGENDORF A, ZHU J K. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 2005, 45(2): 437-448.
- [12] HOSOKI R, MATSUKI N, KIMURA H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 237(3): 527-531.
- [13] ZHANG H, TANG J, LIU X P. Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2009, 51(12): 1086-1094.
- [14] ZHANG H, TAN Z, HU L, WANG S, LUO J, Russell L J. Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(6): 556-567.
- [15] 陈花, 王建武, 王建军, 王富刚. 外源 NO 对盐胁迫下沙打旺种子萌发和幼苗生长的影响. *草业科学*, 2017, 34(7): 1459-1468.
- CHEN H, WANG J W, WANG J J, WANG F G. Effect of nitric oxide on seed germination and seedling growth of *Astragalus adsurgens* under NaCl stress. *Pratacultural Science*, 2017, 34(7): 1459-1468.
- [16] 单长卷, 赵元增. 外源硫化氢对干旱胁迫下玉米幼苗水分生理特性的影响. *干旱地区农业研究*, 2015, 33(5): 80-84.
- SHAN C J, ZHAO Y Z. Effects of exogenous hydrogen sulfide on water physiological characteristics of maize seedling under drought stress. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2015, 33(5): 80-84.
- [17] WANG Y, LI L, CUI W. Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant & Soil*, 2012, 351(1/2): 107-119.
- [18] 汤洁, 季月芬, 林年丰, 郭平, 杨有德. 应用生物技术改良退化土壤的效果: 以黄花草木樨改良盐碱化土壤为例. *生态环境学报*, 2004, 13(1): 51-53.
- TANG J, LI Y F, LIN N F, GUO P, YANG Y D. Effects of biotechnology on improving the degraded soil: An example of planting *Melilotus officinalis* for improving saline-alkaline soil. *Ecology and Environmental Sciences*, 2004, 13(1): 51-53.
- [19] 汪永平, 骆凯, 胡小文, 马福成, 田小飞, 张宝林, 塔拉腾, 刘晓燕, 张吉宇. PEG 和 NaCl 胁迫对草木樨种子萌发和幼苗生长的影响. *草业科学*, 2016, 33(6): 1174-1182.
- WANG Y P, LUO K, HU X W, MA F C, TIAN X F, ZHANG B L, Talateng, LIU X Y, ZHANG J Y. Effects of PEG and NaCl stress on seed germination, seedling growth of *Melilotus accessio*. *Pratacultural Science*, 2016, 33(6): 1174-1182.

- [20] 李忠光.植物生理学综合性和设计性实验教程.武汉:华中科技大学出版社,2014.
LI Z G,Comprehensive and Designed Experiment Course for Plant Physiology,Wuhan:Huazhong University of Science and Technology Press,2014.
- [21] DE AZEVEDO N A,PRISCOB J T,ENEAS-Filho J,ROLIM Medeiros J V,GOMES-FIHO E.Hydrogen peroxide pretreatment induces salt-stress acclimation in maize plants,Journal of Plant Physiology,2005,162(10):1114-1122.
- [22] 张朝阳,许桂芳.利用隶属函数法对 4 种地被植物的耐热性综合评价.草业科学,2009,26(2):57-60.
ZHANG Z Y,XU G F.Comprehensive evaluation of heat tolerance of four ground covering plants by subordinate function values analysis,Pratacultural Science,2009,26(2):57-60.
- [23] WANG J K,YU S Q.Studies on resistance and membrane lipid fluidity of various breeds of cold-resistant wheat,Biotechnology,1998,8(2):28-30.
- [24] 李善家,韩多红,王恩军,武燕.外源甜菜碱对盐胁迫下黑果枸杞种子萌发和幼苗保护酶活性的影响.草业科学,2016,33(4):674-680.
LI S J,HAN D H,WANG E J,WU Y.Effects of exogenous betaine on seed germination and antioxidase activities of *Lycium ruthenium* seedlings under NaCl stress,Pratacultural Science,2016,33(4):674-680.
- [25] AHMAD I,HELLEBUST J A.Effects of methionine sulfoximine on growth and nitrogen assimilation of the marine microalga *Chlorella autotrophica*,Marine Biology,1985,86(1):85-91.
- [26] LEVITT J.Responses of plants to environmental stress,2nd edition,volume 1:chilling,freezing,and high temperature stresses.Physiological Ecology,1980.
- [27] 谢振宇,杨光穗.牧草耐盐性研究进展.草业科学,2003,20(8):11-17.
XIE Z Y,YANG G S.Advances in salt tolerance of forage plants,Pratacultural Science,2003,20(8):11-17.
- [28] 刘华,舒孝喜,赵银,王锁民.盐胁迫对碱茅生长及碳水化合物含量的影响.草业科学,1997(1):18-19.
LIU H,SHU X X,ZHAO Y,WANG S M.A preliminary study on *Descurainia sophia* an oil plant with high lionlenic acid contents,Pratacultural Science,1997(1):18-19.
- [29] SADEGHIPOUR O,MONEM R,TAJALI A A.Production of mungbean (*Vigna radiata* L.) as affected by nitrogen and phosphorus fertilizer application,Journal of Applied Sciences,2010,10(10):843-847.
- [30] 赵可夫,范海,江行玉,宋杰.盐生植物在盐渍土壤改良中的作用.应用与环境生物学报,2002,8(1):31-35.
ZHAO K F,FAN H,JIANG X Y,SONG J.Improvement and utilization of saline soil by planting halophytes,Chinese Journal of Applied and Environmental Biology,2002,8(1):31-35.
- [31] DEINLEIN U,STEPHAN A B,HORIE T.Plant salt-tolerance mechanisms.Trends in Plant Science,2014,19(6):371.
- [32] SCANDALIOS J G.Oxygen stress and superoxide dismutases,Plant Physiology,1993,101(1):7.
- [33] 焦浩.硫化氢调控胁迫条件下植物种子萌发及幼苗生长的信号机制.合肥:合肥工业大学硕士学位论文,2010.
JIAO H.Signaling mechanism of hydrogen sulfide regulating seed germination and seedling growth in plant under cadmium and drought stresses.Master Thesis,Hefei:Hefei University of Technology,2010.
- [34] YANG G,WU L,JIANG B. H_2S as a physiologic vasorelaxant; Hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. Science,2008,322:587-590.
- [35] KIMURA H,SHIBUYA N,KIMURA Y.Hydrogen sulfide is a signaling molecule and a cytoprotectant.Antioxidants & Redox Signaling,2012,17(1):45-57.
- [36] TAO B B,LIU S Y,ZHANG C C.VEGFR2 functions as an H_2S -targeting receptor protein kinase with its novel cys1045-cys1024 disulfide bond serving as a specific molecular switch for hydrogen sulfide actions in vascular endothelial cells.Antioxidants & Redox Signaling,2013,19(5):448-464.
- [37] 刘文瑜,杨宏伟,魏小红,刘博,王高强,吴伟涛.外源 NO 调控盐胁迫下蒺藜苜蓿种子萌发生理特性及抗氧化酶的研究.草业学报,2015,24(2):85-95.
LIU W Y,YANG H W,WEI X H,LIU B,WANG G Q,WU W T.Effects of exogenous nitric oxide on seed germination,physiological characteristics and active oxygen metabolism of *Medicago truncatula* under NaCl stress.Acta Prataculturae Sinica,2015,24(2):85-95.

(责任编辑 张瑾)