

硝普钠(SNP)浸种对渗透胁迫下不同紫花苜蓿种子萌发生理特性的影响

赵颖,魏小红,马文静,骆巧娟,宿梅飞

(甘肃农业大学生命科学技术学院,甘肃兰州730070)

摘要:以紫花苜蓿阿尔岗金(*Medicago sativa* 'Algonquin')、金皇后(*M. sativa* 'Golden empress')和三得利(*M. sativa* 'Sanditi')为材料,探讨外源一氧化氮(NO)对PEG胁迫下紫花苜蓿种子萌发期丙二醛和渗透调节物质含量及抗氧化酶活性的影响。结果表明:(1)SNP浸种能有效缓解PEG胁迫下紫花苜蓿萌发期MDA含量的积累,在第6d SNP+PEG与PEG处理相比,阿尔岗金、金皇后和三得利种子MDA含量分别降低了23.11%、21.81%和30.38%。(2)随PEG胁迫时间延长,3个苜蓿品种渗透调节物质含量呈先增后降趋势。SNP+PEG与PEG处理相比,阿尔岗金中脯氨酸、可溶性糖和可溶性蛋白含量分别在处理第4d,第2d和第4d达到最大值,分别提高了13.71%、18.57%和9.23%;金皇后各含量均在第2d有最大值,分别提高了20.96%、16.84%和5.48%;三得利各含量分别在第4d,第2d和第2d达到最大值,分别提高了17.87%、17.52%和13.40%。(3)3个品种紫花苜蓿SOD、POD、CAT、APX活性表现为先升后降趋势,且均在第4d活性最大。与PEG处理相比,SNP+PEG处理下三得利SOD、POD活性增加率是阿尔岗金的2.76倍和1.21倍,是金皇后的4.10倍和1.21倍。渗透调节物质含量增加和抗氧化酶活性增强是紫花苜蓿适应干旱的生理基础,外源NO可提高紫花苜蓿对干旱的防御,3个品种紫花苜蓿受外源NO调节强弱顺序为:三得利>金皇后>阿尔岗金。

关键词:紫花苜蓿;外源一氧化氮(NO);干旱胁迫;渗透调节物质;氧化损伤

中图分类号:S551+.7;Q945.78 **文献标志码:**A

Effects of sodium nitroprusside (SNP) on physiological characteristics of alfalfa seed germination under osmotic stress

ZHAO Ying, WEI Xiao-hong, MA Wen-jing, LUO Qiao-juan, SU Mei-fei

(College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: The aim of this research was to investigate the effects of exogenous nitric oxide on malondialdehyde (MDA), osmoregulation compounds, and antioxidase activity of alfalfa seed germination under polyethylene glycol (PEG) stress. Three alfalfa varieties were selected, Algonquin, Golden empress, and Sanditi. The seeds were placed in Petri dishes with filter paper soaked with PEG for germination. We measured concentrations of malondialdehyde and osmoregulation compounds, and antioxidase activity. Our results showed that SNP+PEG treatment significantly decreased MDA content of the seeds compared to PEG treatment. MDA content in the seeds at the sixth day of germination decreased by 23.11% in Algonquin, 21.81% in Golden empress, and 30.38% in Sanditi. Compared to PEG stress, exogenous application of SNP+PEG increased proline by 13.71% at the fourth day, soluble sugar by 18.57% at the second day, and soluble protein content by 9.23% at the fourth day in Algonquin seeds and they reached the peak values at those time. Those 3 compounds in Golden empress peaked at the second day by 20.96%, 16.84%, and 5.48%, respectively and peaked in Sanditi seeds at fourth day by 17.87%, 17.52%, at the second day, and 13.40% at the second day, respectively. Furthermore, the activities of 4 antioxidases, superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD), catalase (CAT), and ascorbate peroxidase (APX), increased

first and then decreased and peaked at the fourth day. Compared to PEG stress, we noticed that SOD and POD activities of Sanditi seeds were 2.76 and 1.21 times of that of Algonquin, 4.10 and 1.21 times of that of the *golden empress*, respectively. Our results suggested that, under osmotic stress generated by PEG, the enhancement of exogenous SNP on alfalfa was mainly embodied in the osmoregulation substances and antioxidase activity. The sensitivity of Sanditi to NO impact was greater than that of Golden empress and Algonquin.

Keywords: alfalfa; exogenous nitric oxide; drought stress; osmoregulation substances; oxidative damage

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是我国西北地区广泛种植的优质豆科牧草, 具有广泛的生态适应性, 被誉为“牧草之王”^[1], 对我国畜牧业的可持续发展起到重要作用^[2-3]。尽管紫花苜蓿对水分适应性强, 但在种子萌发期干旱会抑制其萌发^[4], 进而对生长发育后期的生物量造成严重的影响。因此, 探讨紫花苜蓿种子萌发过程中的适应机制显得至关重要。

NO 是一种重要的信号分子, 可以缓解非生物胁迫下植物体内 ROS 的积累, 减少各种胁迫造成的氧化损伤, 从而增强植物的适应能力^[5]; 同时还可以促进种子萌发、下胚轴伸长^[6], 影响植物组织的生长^[7], 并参与调节干旱胁迫、盐害及抗病能力^[8], 对植物的生长发育具有重要影响。在植物体内 NO 主要通过一氧化氮合酶 (NOS, EC1.6.6.1/2) 和硝酸还原酶 (NR, EC1.6.6.1/2) 催化形成^[9-10], 内源 NO 的产生受植物物种、组织、细胞类型及环境条件等多种因素影响^[11]。硝普钠 (SNP) 是一种重要的 NO 供体, Delledonne 等^[12] 报告 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 释放约 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NO。增施外源 NO 可提高内源 NO 水平, 有关研究表明外源 NO 对细胞凋亡、激素调控、光合作用和各种胁迫响应等许多重要生理过程具有调节作用^[13-15], 同时还可以诱导抗氧化活性, 增加相关基因的转录本^[16]。

植物的抗逆能力随个体发育阶段不同而发生变化^[17], 种子萌发期往往是对逆境胁迫十分敏感的时期^[18], 这一时期的特性决定了该植物在某一地区是否能够成功建苗。有关苜蓿生态适应性的研究和报道已有很多, 研究方向也逐渐从形态水平过渡到生理生化及分子水平^[19-22]。研究表明植物胁迫耐受性幅度与内源性 NO 的水平呈正相关, 抗性强的品种 PEG 胁迫后 NO 产生量较大, 而抗旱敏感型相反^[23]。目前, 渗透胁迫下外源 NO 对不同品种紫花苜蓿萌发的影响还未见报道。本研究以紫花苜蓿品种阿尔冈金、金皇后和三得利为材料, 研究外源 NO 对干旱胁迫下紫花苜蓿种子萌发过程中渗透调节物质、抗氧化酶活性的变化规律, 探讨干旱胁迫下 NO 对苜蓿种子萌发的调控机制, 以期为干

旱地区紫花苜蓿的选种栽培、应用化学途径提高耐旱性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 with 处理

供试材料为紫花苜蓿, 分别为品种 A: 阿尔冈金, 品种 B: 金皇后, 品种 C: 三得利, 购于甘肃省农业科学院。

试验选取均匀饱满的苜蓿种子, 用 20% NaClO 溶液消毒 10 min, 去离子水冲洗 5 次, 分别用去离子水和 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 溶液在黑暗条件下浸泡 48 h。将预处理后的种子置于垫有双层滤纸的培养皿 ($\phi=9 \text{ cm}$) 中, 每皿 50 粒种子, 每处理重复三次, 2 d 后进行干旱胁迫, 共设置以下 4 个处理: 蒸馏水为空白对照 (CK); $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP (SNP); 10% PEG-6000 (PEG); $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP + 10% PEG-6000 (SNP+PEG)。按试验设计每天 10:00 更换 4 mL 处理液以确保浓度一致。所有培养皿培养条件为: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$; 80% 相对湿度; 光照/黑暗: 12 h/12 h; 光照强度 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。分别在处理的 0、2、4、6 d 测定相关生理指标。

1.2 测定指标与方法

1.2.1 丙二醛 (MDA) 含量 采用硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法测定^[24]。

1.2.2 渗透调节物质 脯氨酸 (Pro) 含量采用酸性水合茚三酮法^[25], 可溶性糖含量采用蒽酮比色法^[24], 可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法^[26]测定。

1.2.3 抗氧化酶的活性 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性参照 Liu 等^[27] 的方法测定; 过氧化物酶 (POD) 活性参照 Shi 等^[28] 的方法测定; 抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 活性参照 Nakano 和 Asada^[29] 的方法测定; 过氧化氢酶 (CAT) 活性参照 Aebi^[30] 的方法测定。

1.3 数据分析

试验数据采用 Microsoft Excel 2010 进行处理及作图, 用 SPSS 19.0 软件 Duncan 法进行统计学分析, 数据显示均为“平均值 $\pm$ SE”表示, 字母不同表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 SNP 溶液浸种对 PEG 胁迫下紫花苜蓿种子 MDA 含量的影响

如图 1 所示,PEG 胁迫下 3 个品种紫花苜蓿种子中 MDA 含量随着胁迫时间的延长均逐渐升高,SNP+PEG 能有效抑制 MDA 的增加。在第 6 d 时,C 品种 MDA 含量有最大值 $14.35\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$,是品种 A 和 B 的 1.32 倍,与 PEG 处理相比,SNP+PEG 处理下 A、B、C 品种 MDA 含量分别下降了 23.11%、21.81%和 30.38%。由此可见,渗透胁迫下品种 C 中 MDA 积累量最大,抵御渗透胁迫能力较弱,但 SNP 浸种对其氧化损伤的缓解作用最强。

2.2 SNP 溶液浸种对 PEG 胁迫下紫花苜蓿种子渗透调节物质含量的影响

由表 1 可知,0 d 时各处理之间脯氨酸含量无显著差异,随 PEG 胁迫时间的延长,3 品种紫花苜蓿种子萌发过程中脯氨酸含量先增后降。处理第 4 d 时,脯氨酸含量达到最大值,A、B 和 C 含量分别为 460.95 、 $262.68\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $277.18\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,SNP+PEG 比 PEG 处理 A、B、C 品种脯氨酸分别增加了 13.71%、16.46% 和 17.87%。

从表 1 可知,与 CK 相比,PEG 胁迫下可溶性糖含量降低,紫花苜蓿种子萌发过程中可溶性糖含量呈先增后降的变化趋势。SNP 浸种提高了紫花苜蓿种子中可溶性糖含量。处理第 2 d 时,品种 A 可溶性糖含量最高,为 $27.48\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,分别是品种 B 和 C 的 4.82 倍和 2.42 倍,SNP+PEG 与 PEG 处理相比,A、B、C 品种可溶性糖含量分别增加了 15.78%、16.84%和 17.52%。处理第 6 d 时,SNP+PEG 比 PEG 处理使 A、B、C 3 个品种可溶性糖含量分别提高了 40.24%、20.34%和 14.24%。

可溶性蛋白含量的变化与可溶性糖相似。由表 1 可知,各品种紫花苜蓿种子萌发过程中可溶性

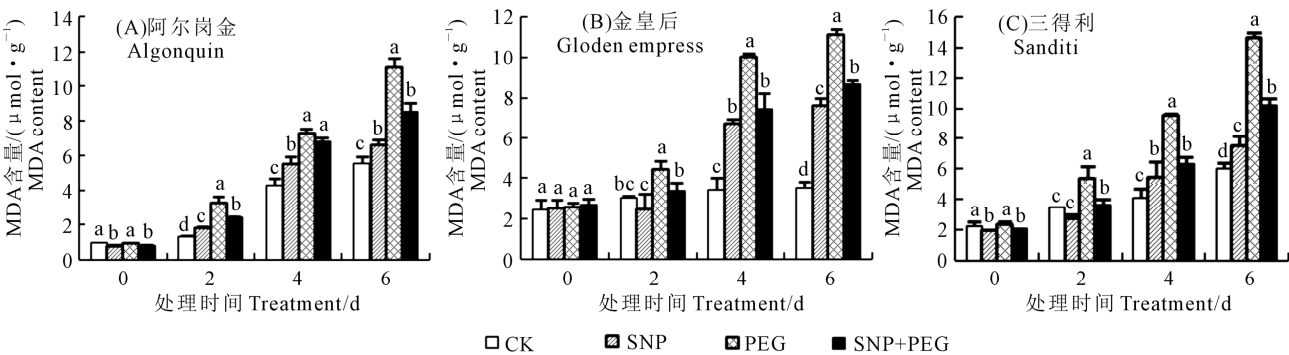
蛋白含量呈先增后降趋势,金皇后与三得利在第 2 d 达到最大值,阿尔岗金在第 4 d 达到最大值。PEG 胁迫比 CK 可溶性蛋白含量显著降低,在第 2、4、6 d 的下降幅度均为品种 A>品种 B>品种 C。SNP+PEG 与 PEG 处理相比显著增加了可溶性蛋白的含量,且在第 6 d 增加量最大,A、B、C 品种可溶性蛋白含量在 SNP+PEG 处理下分别是 PEG 处理下的 2.25、1.31、1.16 倍。

2.3 SNP 溶液浸种对 PEG 胁迫下紫花苜蓿种子抗氧化酶活性的影响

2.3.1 SOD 活性 如图 2 所示,苜蓿种子萌发期 SOD 活性随干旱胁迫时间的延长呈先增后降趋势,且在处理第 4 d 活性最大。SNP 处理下苜蓿种子萌发过程中 SOD 活性最大,SNP+PEG 比 PEG 处理显著提高了 SOD 活性。在处理第 4 d,A、B、C 品种 SNP+PEG 比 PEG 处理 SOD 活性分别显著提高了 12.84%、8.65%和 35.49%,说明品种 C 中 SOD 活性受外源 NO 影响较大。

2.3.2 POD 活性 如图 3 所示,苜蓿种子 POD 活性变化趋势与 SOD 活性相似,呈先升后降趋势且于处理第 4 d 达到最大值。与 CK 相比,PEG 处理使 POD 活性降低,施加外源 NO 缓解了该抑制作用。处理第 4 d,A、B、C 品种 POD 活性分别较 CK 增加了 53.99%、54.24%和 65.56%,说明 SNP 对 POD 活性调控作用较大。

2.3.3 CAT 活性 如图 4 所示,CAT 活性随着发芽时间的延长逐渐升高,在处理第 4 d 达到最大值。品种 A 在第 2 d 和 6 d 时处理间无差异,在处理第 4 d,SNP+PEG 处理与 CK 相比无显著差异,但较 PEG 处理 CAT 活性提高了 17.31%。品种 B 在处理第 2 d 和第 4 d SNP+PEG 与 SNP 处理 CAT 活性差异不显著,与 PEG 处理相比分别提高了 19.96% 和 17.35%。品种 C 在处理第 4 d 和第 6 d SNP+PEG 比 PEG 处理 CAT 活性提高了 12.80%和 40.86%。



注:同一处理时间不同字母表示差异显著($P<0.05$),下同。
Note:The different letters in the same treatment time group mean significant difference at $P<0.05$,the same below.

图 1 SNP 溶液浸种对 PEG 胁迫下紫花苜蓿种子萌发过程中 MDA 含量的影响

Fig.1 Effects of SNP acid on MDA contents during seed germination of alfalfa under PEG stress

表 1 SNP 溶液浸种对 PEG 胁迫下紫花苜蓿种子萌发过程中脯氨酸、可溶性糖及可溶性蛋白含量的影响
Table 1 Effects of SNP acid on the activities of proline, soluble sugar, and soluble protein content during seed germination of alfalfa under PEG stress

处理时间/d Treatment time	处理 Treatment	阿尔岗金 Algonquin				金皇后 Golden empress				三得利 Sanditi			
		脯氨酸 Proline $/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	可溶性糖 Soluble sugar $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	可溶性蛋白 Soluble protein $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	脯氨酸 Proline $/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	可溶性糖 Soluble sugar $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	可溶性蛋白 Soluble protein $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	脯氨酸 Proline $/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	可溶性糖 Soluble sugar $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	可溶性蛋白 Soluble protein $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	脯氨酸 Proline $/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	可溶性糖 Soluble sugar $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	可溶性蛋白 Soluble protein $/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
0	CK	108.27±3.91a	6.08±0.34b	23.68±0.45a	104.88±1.56a	2.11±0.14a	35.05±0.61c	102.60±2.38a	2.460±0.08a	41.51±0.33b			
	SNP	107.84±3.75a	7.67±0.49a	25.06±1.19a	99.55±2.92b	2.42±0.24a	37.19±1.05a	103.50±2.56a	2.53±0.16a	41.51±1.21a			
	PEG	108.51±1.35a	6.34±0.53ab	23.68±1.55a	99.55±1.96b	2.23±0.11a	35.03±1.32c	102.44±2.84a	2.42±0.36a	42.09±0.80b			
	SNP+PEG	107.94±3.42a	7.41±1.25ab	23.72±1.41a	104.11±2.99a	2.08±0.18a	36.52±0.49ab	102.62±1.74a	2.341±0.18a	45.53±0.69a			
2	CK	194.61±1.18c	27.48±1.99a	28.46±3.26b	161.16±3.85d	4.52±0.06b	62.32±0.29a	153.17±1.86c	8.21±0.62b	60.38±0.99b			
	SNP	219.86±3.38b	27.29±1.08a	35.15±2.05a	189.29±3.48c	5.70±0.04a	63.47±0.41a	156.47±5.57c	11.38±0.98a	63.69±0.28a			
	PEG	221.19±3.70b	15.12±0.73c	20.91±2.59c	193.01±4.42b	2.85±0.11d	55.98±1.68c	174.45±2.30b	5.42±0.36c	50.51±0.45d			
	SNP+PEG	341.07±5.94a	18.52±0.72b	31.88±0.83ab	233.46±1.91a	3.33±0.11c	59.05±2.18b	192.40±2.19a	6.37±0.34c	57.35±1.08c			
4	CK	218.66±1.62d	21.38±1.20b	49.13±1.30b	152.79±2.85d	3.27±0.56b	54.70±2.18a	161.47±1.98d	4.81±0.37b	54.93±0.65b			
	SNP	231.86±3.20c	24.42±0.52a	52.69±0.96a	176.70±2.42c	5.41±0.51a	56.43±0.42a	175.53±1.55c	6.21±0.18a	61.26±1.55a			
	PEG	405.39±1.09b	14.98±1.25c	42.77±0.40d	225.55±5.53b	2.10±0.77b	42.65±1.18b	235.15±1.96b	3.96±0.08c	46.56±0.26d			
	SNP+PEG	460.95±4.89a	15.65±0.63c	46.72±1.95c	262.68±2.69a	2.39±0.82b	44.65±1.04b	277.18±2.28a	4.38±0.44bc	52.74±0.68c			
6	CK	170.97±1.15d	14.70±0.56b	28.84±0.44b	143.04±2.14d	2.90±0.20b	35.72±0.06c	136.61±1.60d	4.18±0.21b	37.53±1.52b			
	SNP	191.43±2.38c	20.67±2.03a	35.47±1.14a	154.04±6.96c	4.73±1.28a	39.48±0.52a	166.26±1.06c	5.44±0.23a	39.29±0.27a			
	PEG	332.77±1.66b	11.01±0.73c	11.49±0.15d	186.09±2.72b	2.31±0.30b	25.88±1.20d	196.99±1.58b	3.23±0.11c	27.83±0.34d			
	SNP+PEG	375.66±3.72a	15.44±0.77b	25.90±0.50c	195.70±2.69a	2.78±0.34b	37.89±0.97b	241.19±2.95a	3.69±0.35b	32.34±0.27c			

注:同列数值不同小写字母表示差异达 5%显著水平,下同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P=5\%$ level, the same below.

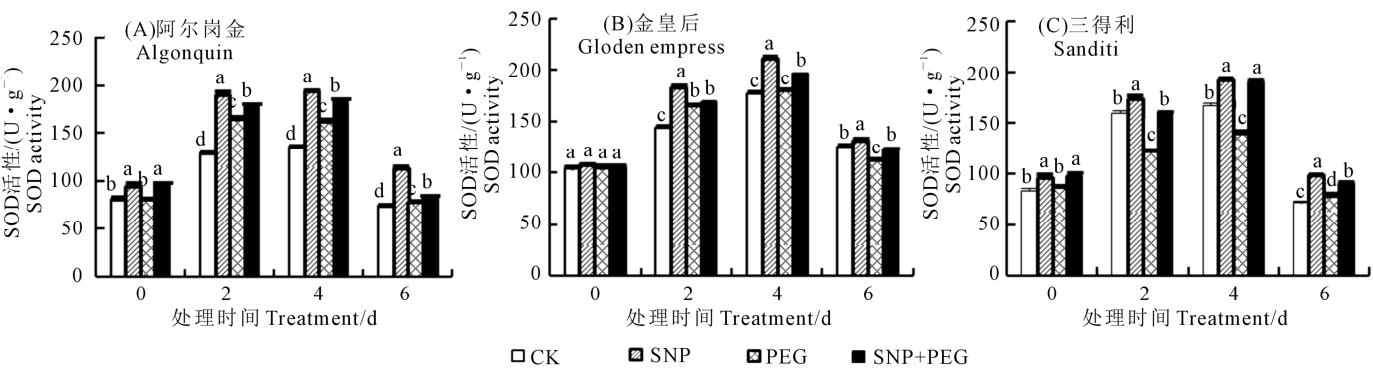


图 2 SNP 溶液浸种对 PEG 胁迫下紫花苜蓿种子萌发过程中 SOD 活性的影响
Fig.2 Effects of SNP acid on SOD activity during seed germination of alfalfa under PEG stress

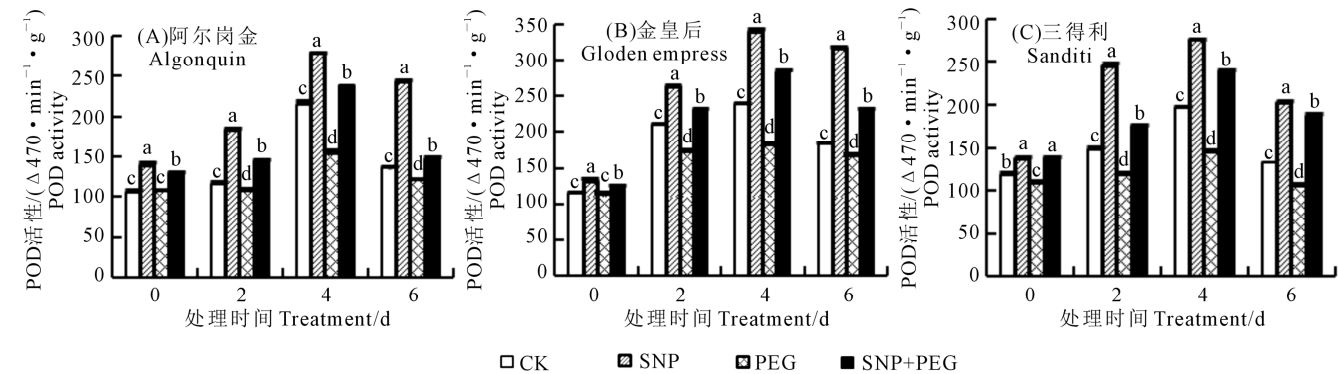


图 3 SNP 溶液浸种对 PEG 胁迫下紫花苜蓿种子萌发过程中 POD 活性的影响
Fig.3 Effects of SNP acid on POD activity during seed germination of alfalfa under PEG stress

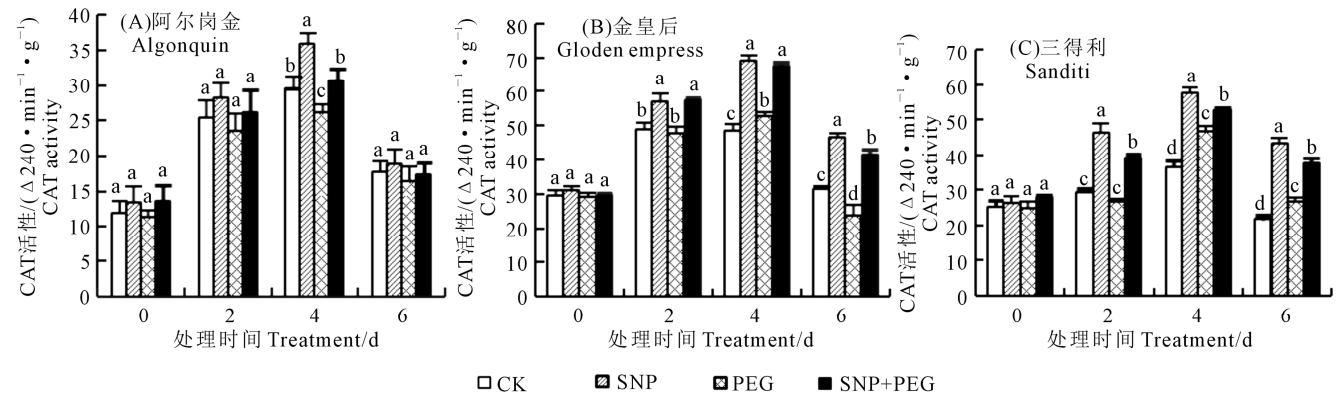


图 4 SNP 溶液浸种对 PEG 胁迫下紫花苜蓿种子萌发过程中 CAT 活性的影响
Fig.4 Effects of SNP acid on CAT activity during seed germination of alfalfa under PEG stress

2.3.4 APX 活性 由图 5 可知,紫花苜蓿种子萌发过程中 APX 活性呈先增高后降低的变化趋势,CK 除外,SNP+PEG 处理 APX 活性最高。在处理第 2 d,品种 A 中 APX 活性在 SNP、PEG、SNP+PEG 处理下是 CK 的 1.58、2.16 倍和 2.33 倍,处理第 4 d,SNP+PEG 较 PEG 处理 APX 活性提高了 37.72%。品种 B 在处理第 4 d SNP+PEG 比 PEG 处理 APX 活性提高了 47.09%。品种 C 在处理第 4 d SNP 与 PEG 处理间差异不显著,SNP+PEG 比 PEG 处理 APX 活性提高了 34.87%。

2.4 不同处理及不同 PEG 胁迫时间对 3 个品种紫花苜蓿抗性的影响
通过对各品种紫花苜蓿不同处理、不同 PEG 胁迫时间下各生理指标进行多因素方差分析可知,在紫花苜蓿种子萌发过程中经 SNP 处理后,3 个苜蓿品种中可溶性糖、可溶性蛋白含量及 SOD、POD、CAT 活性最高。SNP+PEG 较 SNP 处理,可溶性蛋白含量、SOD、POD、CAT 活性均显著下降;MDA 含量变化表现为:阿尔岗金和三得利品种为 PEG>SNP+PEG>SNP,且差异显著;而金皇后品种表现为 PEG 处理时 MDA 含量最高,施加外源 NO 缓解了 MDA 积

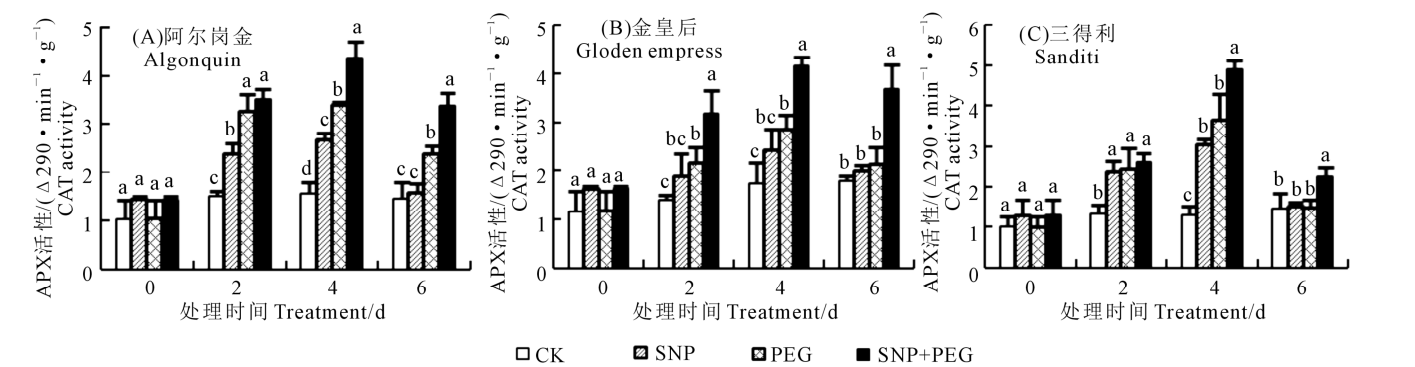


图 5 SNP 溶液浸种对 PEG 胁迫下紫花苜蓿种子萌发过程中 APX 活性的影响
Fig.5 Effects of SNP acid on APX activity during seed germination of alfalfa under PEG stress

表 2 不同处理、不同 PEG 胁迫时间对紫花苜蓿种子萌发期抗性的影响

Table 2 Effect of different treatments and PEG stress time on alfalfa resistance during seed germination

品种 Variety	生理指标 Physiological index	处理 Treatment				时间 Time/d		
		CK	SNP	PEG	SNP+PEG	2	4	6
阿尔 岗金 Algonquin	MDA 含量 MDA content	3.02c	3.70c	5.65a	4.64b	2.21c	5.96b	7.95a
	脯氨酸含量 Proline content	146.06d	186.95c	222.45b	347.74a	267.34a	287.06a	267.71a
	可溶性糖含量 Soluble sugar content	17.41b	20.01a	11.11d	12.40c	22.10a	19.11b	12.85c
	可溶性蛋白含量 Soluble protein content	35.03b	40.09a	24.21c	34.06b	29.10b	54.83a	25.43b
	SOD 活性 SOD activity	104.58d	147.32a	121.57c	134.79b	165.00a	168.17a	87.40b
	POD 活性 POD activity	143.44c	210.89a	118.21d	169.54b	138.25c	221.67a	161.68b
	CAT 活性 CAT activity	21.18b	24.05a	19.30c	21.99b	25.86b	30.60a	17.57c
	APX 活性 APX activity	1.39d	2.01c	2.50b	3.42a	2.65b	3.24a	2.19b
金皇后 Golden empress	MDA 含量 MDA content	3.11c	4.83b	7.04a	5.52b	3.33b	6.9a	7.74a
	脯氨酸含量 Proline content	140.47d	154.98c	176.05b	198.99a	194.23a	204.43a	169.80b
	可溶性糖含量 Soluble sugar content	3.20b	4.56a	2.30d	2.64c	4.03a	3.29b	3.17b
	可溶性蛋白含量 Soluble protein content	46.95ab	49.14a	39.88c	44.53b	60.21a	49.61b	34.74c
	SOD 活性 SOD activity	137.37d	157.95a	140.72c	148.10b	165.07b	191.05a	105.44c
	POD 活性 POD activity	187.73c	264.06a	160.54d	217.58b	220.49b	262.67a	224.89b
	CAT 活性 CAT activity	39.66b	51.02a	38.36b	49.07a	52.82b	59.55a	35.81c
	APX 活性 APX activity	1.53c	1.99b	2.08b	3.41a	2.16c	3.04a	2.40b
三得利 Sanditi	MDA 含量 MDA content	3.96c	4.40c	7.95a	5.58b	3.81c	6.37b	9.61a
	脯氨酸含量 Proline content	138.46c	150.44c	177.26b	203.35a	169.12b	212.33a	185.26b
	可溶性糖含量 Soluble sugar content	4.91b	6.39a	3.76d	4.22bc	7.85a	4.84b	4.13b
	可溶性蛋白含量 Soluble protein content	48.57b	52.60a	41.75c	46.99b	57.98a	53.87b	34.25c
	SOD 活性 SOD activity	120.31b	140.29a	106.70c	133.99a	84.57c	153.79b	172.13a
	POD 活性 POD activity	148.47c	215.24a	119.27d	184.51b	171.23b	213.87a	156.91b
	CAT 活性 CAT activity	28.16d	43.63a	31.37c	39.33b	35.41b	48.37a	32.49b
	APX 活性 APX activity	1.28c	2.05b	2.13b	2.77a	2.18b	3.22a	1.68c

累。阿尔岗金与金皇后中脯氨酸含量各处理间差异显著,而三得利中脯氨酸含量与前两种含量变化趋势相同。APX 酶活性在 SNP+PEG 处理下最高。通过以上分析可知,施加外源 NO 能够显著提高干旱胁迫下紫花苜蓿种子抗氧化酶活性,缓解膜脂过氧化,提高种子的抗旱性。

对处理时间进行多因素方差分析可知,3 品种紫花苜蓿种子 SOD、POD、CAT 和 APX 酶活性均在第 4 d 时最强,而三得利种子 SOD 活性在萌发的第 6 d 表现最强;MDA 含量随着干旱胁迫时间增加而逐渐增大,不同时间点差异显著,三得利品种 MDA 含量最大。脯氨酸含量变化表现为:3 个品种都在

第 4 d 时有最大值,但阿尔岗金在各时间点无差异显著性。金皇后和三得利品种在可溶性糖和可溶性蛋白含量上差异显著性表现相同,在处理第 2 d 值最大。

3 讨 论

本试验研究外源 NO 对于干旱胁迫下不同紫花苜蓿的调控及其与抗性的关系。结果表明,0.1 mmol · L⁻¹ SNP 浸种可明显降低干旱胁迫下紫花苜蓿种子萌发过程中 MDA 的含量,且随着干旱胁迫时间的增加 MDA 含量增大,各处理 MDA 含量差异增大。三得利品种 MDA 含量最大,说明其抗旱性最

弱,阿尔岗金抗旱性最强,这与穆怀彬等^[31]的研究一致。在萌发的第4 d三个品种各处理间均差异显著,渗透胁迫下施加 SNP 对三得利 MDA 含量缓解作用最强。综上所述,三得利比其他两个品种能更加敏感地感知外源 NO。脯氨酸的积累是植物对逆境胁迫的一种重要保护机制,能够清除 ROS 并提高抗氧化能力^[32]。刘文瑜等^[5]研究表明盐胁迫下蒺藜苜蓿种子萌发过程中脯氨酸含量显著上升,不同浓度 SNP 处理能够缓解盐胁迫对种子的伤害,提高脯氨酸含量,其中以 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 缓解效果最佳。本试验 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SNP 能显著缓解干旱胁迫下紫花苜蓿萌发过程中的氧化损伤,干旱胁迫下阿尔岗金品种脯氨酸含量最多,金皇后次之,三得利最少,但 PEG 胁迫下施加 SNP 后脯氨酸含量的提高率相反。这说明阿尔岗金自身渗透调节能力较强,能够很好地抵御外界环境伤害。三得利自身调节能力弱于阿尔岗金,但其渗透调节物质受外源 SNP 影响较大,此结果与 MDA 含量变化相一致。

种子萌发的过程需要大量的能量维持其生命活动^[33],种子的营养成分主要包括糖类、脂肪和蛋白质,当种子发芽时这些贮藏物质转化为小分子物质,为胚的生长发育提供所必须的养料和能量^[34-36]。本试验中可溶性糖和可溶性蛋白含量呈先增后降趋势,反映了种子萌发过程中消耗能量的过程,不同品种紫花苜蓿萌发过程中可溶性糖和可溶性蛋白所占比例不同,阿尔岗金种子可溶性糖含量是另两个品种的 3~4 倍,可能与种子自身营养物质组成有关,但可溶性蛋白含量相比较低,这说明种子萌发过程中先消耗糖类物质,能量不足时才会消耗蛋白质。可溶性糖和可溶性蛋白作为渗透调节物质其含量变化在一定程度上反映了植物体内代谢变化情况,逆境胁迫下可溶性糖和可溶性蛋白含量的增加有利于植物抵御胁迫造成的伤害。干旱胁迫下施加 SNP 后,阿尔岗金可溶性蛋白含量增加的最多,可溶性糖含量增幅少;金皇后品种可溶性蛋白含量增幅少,但可溶性糖含量增幅最多;三得利品种的变化均介于其它两个品种之间。说明 SNP 调节种子萌发过程中抵御逆境的能力受品种自身营养成分构成的影响。

植物细胞代谢过程中会产生活性氧,在正常生长情况下,细胞内活性氧的产生和清除处于动态平衡,SOD、POD、CAT、APX 则是植物体内重要的酶促防御系统^[37],可清除体内的活性氧,以避免活性氧对植物的伤害^[38]。Qu 等^[39]研究表明,SNP 处理小麦种子能够显著提高小麦叶中 SOD、CAT、APX 活

性。刘文瑜等^[5]研究表明不同浓度 SNP 预处理蒺藜苜蓿种子后,在种子萌发过程中 MDA 含量和 O_2^- 产生速率受到不同程度的降低和抑制,并且 SOD、POD、CAT 和 APX 活性显著增强。但 Liu 等^[40]认为 SNP 处理对胁迫下 SOD 的影响不显著,却显著增加了 POD、CAT 活性。本试验中外源 NO 提高了干旱胁迫下各抗氧化酶的活性,且在萌发的第 4 d 活性达到最大值,这与可溶性糖与可溶性蛋白含量的变化趋势一致。

综上所述,紫花苜蓿种子的萌发过程 MDA、Pro、可溶性糖和蛋白质、抗氧化酶的变化证明了种子萌发的系统性。SNP 浸种能够在一定程度上拮抗 PEG,减少逆境伤害,但不同品种紫花苜蓿对 SNP 的敏感性存在一定的差异。SNP 对种子萌发过程的影响是一个复杂的体系,单一指标很难说明某个品种对 NO 信号的敏感性,对此本研究综合多个与抗旱性密切相关的指标做多因素方差分析,结果表明阿尔岗金抗旱性最强,但其对外源 NO 的响应能力最弱,三得利品种抗旱性最弱,其对 NO 的感知敏感性最强。推测这是因为不同品种对干旱作出应答的灵敏度和准确性不同,而植物细胞中内源 NO 的产生水平也会干扰外源 NO 信号的传递。本研究初步确定外源 NO 对紫花苜蓿萌发期抗性的调控作用与品种自身特性有关,但各品种在不同生育阶段对某一具体指标的耐性反应不一定相同,今后可对各品种不同生育期外源 NO 的调控机理进行研究和探讨,为旱区紫花苜蓿栽培提供理论依据。

参考文献:

- [1] 曹致中. 优质苜蓿栽培与利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] 孙建华, 王彦荣, 余玲. 紫花苜蓿生长特性及产量性状相关性研究[J]. 草业学报, 2004, 13 (4): 80-86.
- [3] 孙建华, 王彦荣, 余玲. 紫花苜蓿品种间产量性状评价[J]. 西北植物学报, 2004, 24 (10): 1837-1844.
- [4] 伏兵哲, 兰剑, 李小伟, 等. PEG-6000 干旱胁迫对 16 个苜蓿品种种子萌发的影响[J]. 种子, 2012, 31(4): 10-14.
- [5] 刘文瑜, 杨宏伟, 魏小红, 等. 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[J]. 草业学报, 2015, 24 (2): 85-95.
- [6] Zhang W L, Shen W B, Xu L L. Signal functions of nitric oxide in plants[J]. Chemistry of Life, 2002, 22 (1): 61-62.
- [7] Beligni M V, Lamattina L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light inducible responses in plants[J]. Planta, 2000, 210: 215-221.
- [8] Durner J, Klessing D F. Nitric oxide as a signal in plants[J]. Current Opinion Plant Biology, 1999, 2(5): 369-374.
- [9] Wendehenne D, Pugin A, Klessig D F. Nitric oxide: comparative

- synthesis and signaling in animal and plant cells [J]. Trends in Plant Science, 2001, 6 (4): 177-183.
- [10] Yamacaki H, Shanihi S Y, Takahashi S. An alternative pathway for nitric oxide production in plant: New feature of and old enzyme[J]. Trends in Plant Science, 1999, 4 (4): 128-129.
- [11] Moreau M, Lindermayr C, Durner J, et al. NO synthesis and signaling in plant-where do we stand[J]. Physiologia Plantarum, 2010, 138 (4): 372-383.
- [12] Delledonne M, Xia Y J, Dixon R A. Nitric oxide function as a signal in plant disease resistance [J]. Nature, 1998, 394 (6693): 585-588.
- [13] Delledom M. NO news is good news for plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8(4): 390-396.
- [14] Corpas F J, Barroso J B, Carreras A, et al. Constitutive arginine dependent nitric oxide syntheses activity in different organs of pea seedlings during plant development[J]. Planta, 2006, 224 (2): 246-254.
- [15] 冯瑞章, 魏琴. 外源 NO 对 NaCl 胁迫下燕麦幼苗氧化损伤的缓解效应[J]. 草原与草坪, 2012, (6): 7-10.
- [16] Uchida A, Jagendorf A T, Hibino T, et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice[J]. Plant Science, 2002, 163(3): 515-523.
- [17] 王榕凯, 丁小球, 胡玉伟. 三种草坪草的耐寒性及其超氧化物歧化酶作用关系初步研究[J]. 中国草地, 2001, 23 (1): 46-150.
- [18] Alkhatib M, Neneilly T, Collins J C. The potential of selection and breeding for improved salt tolerance in Lucerne [J]. Ephytica, 1993, 65(1): 43-51.
- [19] Zeid I M, Shedeed Z A. Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress [J]. Biologia Plantarum, 2006, 50 (4): 635-640.
- [20] Lindsay W B, Aleida H W, Mengan H R, et al. Water relations and adaptations to increasing water deficit in three perennial legumes, *Medicago sativa*, *Dorycnium hirsutum* and *Dorycnium rec-tum*[J]. Plant & Soil, 2007, 290(1-2): 231-243.
- [21] 姜义宝, 李建华, 方云丽, 等. 钙处理对苜蓿幼苗抗旱性的影响[J]. 中国草地学报, 2008, 30 (1): 117-120.
- [22] 徐向南, 易津, 于林清, 等. 紫花苜蓿抗旱型研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25 (21): 180-184.
- [23] Fan Q J, Liu J H. Nitric oxide is involved in dehydration drought tolerance in *Poncirus trifoliata* seedlings through regulation of antioxidant systems and stomatal response[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(1): 145-154.
- [24] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 62-174.
- [25] 姜义宝, 杨玉容, 郑秋红. 外源一氧化氮对干旱胁迫下苜蓿幼苗抗氧化酶活性和叶绿素荧光特性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2008, 26 (2): 65-68.
- [26] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 169-184.
- [27] Liu J H, Huang X S, Chen X J. Overexpression of *PtrABF* gene, a bZIP transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10 (1): 230.
- [28] Shi S, Fu X Z, Peng T, et al. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response[J]. Tree Physiology, 2010, 30(7): 914-922.
- [29] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts [J]. Plant Cell Physiology, 1981, 22 (5): 867-880.
- [30] Aebi H. Catalase in vitro [J]. Methods in Enzymology, 1984, 105: 121-126.
- [31] 穆怀彬, 伏兵哲, 德英. PEG-6000 胁迫下 10 个苜蓿品种幼苗期抗旱性比较[J]. 草业科学, 2011, 28 (10): 1809-1814.
- [32] 高海宁, 马国泰, 陈慧萍, 等. 菌剂对铬(VI)污染土壤中坪草幼苗生理生化的影响[J]. 草业学报, 2014, 23 (4): 189-194.
- [33] 柴家荣. 不同烟草类型种子萌发期淀粉酶及糖类物质动态研究[J]. 种子, 2006, 25 (10): 9-12.
- [34] 傅家瑞. 种子生理[M]. 北京: 农业出版社, 1992: 55-59.
- [35] Citharel L, Citharel J. Protein bodies from the cotyledons of *Cytisus scoparius*[J]. Planta, 1985, 166: 39-45.
- [36] 计巧灵. 植物细胞中的蛋白体[J]. 植物学通报, 1992 (9): 27-29.
- [37] Liu X, Huang B. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass[J]. Crop Science, 2000, 40 (2): 503-513.
- [38] 张怀山, 赵桂琴, 栗孟飞, 等. 中型狼尾草幼苗对 PEG、低温和盐胁迫的生理应答[J]. 草业学报, 2014, 23 (2): 180-188.
- [39] Qu X F, Lu S M, Wang L H, et al. The response of different drought-resistance of wheat varieties under drought stress and the regulating role of nitric oxygen[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 11 (4): 30-33.
- [40] Liu S, Dong Y J, Kong J, et al. Effects of foliar applications of nitric oxide and salicylic acid on salt-induced changes in photosynthesis and antioxidative metabolism of cotton seedlings [J]. Plant Growth Regulation, 2014, 73(1): 67-78.