



H₂S 对干旱胁迫下白三叶幼苗 抗氧化防御能力的影响

何小双, 蒋晓琪, 彭丹丹, 彭 燕*

(草业科学重点实验室 四川农业大学 动物科技学院, 成都 611130)

摘 要:以‘拉丁诺’白三叶(*Trifolium repens* cv. ‘Ladino’)为试验材料, 研究外源 H₂S 处理对 PEG6 000(聚乙二醇)模拟干旱胁迫下白三叶叶片相对含水量(RWC)、膜脂过氧化、活性氧成分、抗氧化酶、抗坏血酸-谷胱甘肽循环代谢和非酶抗氧化物质的影响, 以揭示 H₂S 调控白三叶抗旱性的生理机制。结果显示: (1) 0.2 mmol/L 的外源 NaHS(H₂S 供体)能显著提高干旱胁迫下白三叶的叶片相对含水量, 维持显著较低的电解质渗透率(EL)和丙二醛(MDA)含量。(2) 与直接干旱胁迫相比, 干旱胁迫下外源添加 NaHS 处理的白三叶叶片内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性显著增强, 抗坏血酸-谷胱甘肽循环代谢中关键酶抗坏血酸过氧化物酶(APX)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)、单脱水抗坏血酸还原酶(MDHAR)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性及其抗氧化中间产物抗坏血酸(AsA)、谷胱甘肽(GSH)含量也显著提高。(3) 叶片类黄酮、总酚和原花青素的含量在一定的胁迫时间范围内亦显著增加, 并伴随着活性氧成分 O₂⁻ 产生速率和 H₂O₂ 水平降低。研究认为, 外源 H₂S 能通过促进干旱胁迫下白三叶体内的多重抗氧化防御能力来提高其幼苗的抗旱性。

关键词: 白三叶; 干旱胁迫; H₂S; 抗氧化保护

中图分类号: Q945.78

文献标志码: A

Effects of Hydrogen Sulfide on Antioxidant Defense of White Clover Leaves in Response to Drought Stress

HE Xiaoshuang, JIANG Xiaoqi, PENG Dandan, PENG Yan*

(Key Laboratory of Grass and Science, Faculty of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: The effects of exogenous hydrogen sulfide (H₂S) on relative water content, membrane lipid peroxidation, reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities, AsA-GSH cycle metabolism, and antioxidants were investigated with white clover (*Trifolium repens*) under drought stress induced by PEG-6000, which reveals the physiological mechanism of H₂S-regulated drought tolerance in white clover. The results showed that: (1) the plants treated with 0.2 mmol/L sodium hydrosulfide (NaHS), a H₂S donor, maintained higher leaf relative water content and lower electrolyte leakage and MDA content under drought stress as compared to the plants without the pretreatment with NaHS. (2) Similarly, the exogenous NaHS effectively improved SOD, CAT, POD activities and accelerated AsA-GSH cycle metabolism via the improvement of the key enzyme activities (APX, DHAR, MDHAR and GR), AsA and GSH content. (3)

收稿日期: 2016-09-08; 修改稿收到日期: 2016-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372371); 农业部牧草产业技术体系项目(CARS-35)

作者简介: 何小双(1990—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事草坪草逆境生理与分子机制研究。E-mail: hexiaoshuangdwb@163.com

* 通信作者: 彭 燕, 博士, 教授, 主要从事草坪草、牧草逆境生理及种质资源方面的研究。E-mail: Pengyanlee@163.com

The application of NaHS also increased flavonoid, total phenols and proanthocyanidins contents in leaves of white clover in a period of time, followed by decreases in the generation rate of O₂⁻ and H₂O₂ content in response to drought stress. Therefore, this study suggests that exogenous H₂S can improve drought tolerance of white clover seedlings through enhancing the leaf antioxidant defense system.

Key words: white clover; drought stress; H₂S; antioxidant defense

随着全球性的气候异常和生态平衡的破坏,干旱已成为全人类面临的严重生态问题之一,作物耐旱性研究因此显得尤为重要^[1]。白三叶(*Trifolium repens*)属于豆科(Leguminosae)三叶草属,是中国发展畜牧业的重要豆科牧草之一,具有高产、高营养价值、适口性良好、各种禽畜都喜食等特点^[2]。但白三叶喜欢生长于温暖湿润地区,不耐干旱,因此干旱成为限制其发展的重要逆境因子。

近年来研究发现,硫化氢(H₂S)作为一种新型的内源性气体信号分子在植物的生长、发育过程中起重要作用。丁香酚通过控制 H₂S 信号来诱导根细胞内 Ca²⁺ 的积累,最终促进番茄(*Lycopersicon esculentum*)侧根的生长^[3];H₂S 提高了萌发期 β-淀粉酶的活性,从而促进小麦(*Triticum aestivum*)种子的萌发^[4];H₂S 烟熏草莓(*Fragaria* × *ananassa* Duch.)可降低草莓的腐烂指数、呼吸密度和聚半乳糖醛酸酶活性,提高果实硬度,从而延长采摘后的保鲜期^[5];H₂S 介导 ABA 诱导的蚕豆(*Vicia faba*)气孔运动,ABA 可通过增强 L-/D-半胱氨酸脱巯基酶活性,促进 L-/D-半胱氨酸分解生成 H₂S,进而诱导蚕豆气孔关闭^[6];H₂S 也可能作为 H₂O₂ 的下游信号介导茉莉酸诱导的蚕豆气孔关闭,并有 H₂S 参与乙烯诱导的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)气孔关闭的报道^[7-10];H₂S 可能通过调节 Rubisco 活性和巯基化合物的氧化还原修饰来增加菠菜(*Spinacia oleracea*)叶片的光合作用^[11]。在应答非生物胁迫方面,H₂S 促进过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)的同工酶活性和相应转录物,减轻了盐胁迫对苜蓿(*Medicago sativa*)种子萌发的抑制作用^[12];H₂S 可能作为 NO 的下游信号分子诱导玉米(*Zea mays*)耐热性,提高热胁迫下玉米的存活率^[13];H₂S 供体(NaHS)可缓解镉胁迫对狗牙根(*Cynodon dactylon*)生长的抑制^[14];H₂S 熏蒸拟南芥通过刺激干旱相关转录因子的表达,可提高拟南芥的抗旱性^[15];H₂S 预处理通过上调甘薯(*Pachyrhizus erosus*)叶片的抗氧化酶活性来降低体内 H₂O₂ 和 MDA 的积累,增强甘薯幼苗的抗旱性^[16]。

然而,H₂S 是否在豆科牧草应对干旱胁迫中发挥作用却鲜有报道。

干旱等逆境胁迫会导致植物体内的活性氧(ROS)大量积累,而积累过多的 ROS 会使细胞发生过氧化反应,细胞膜系统遭到破坏,植物加快衰老,严重影响植物的生长发育^[17]。为了维持细胞内 ROS 的代谢平衡,有效减弱胁迫诱导的细胞损伤,植物体内形成了完整的酶类和非酶类抗氧化保护系统。迄今,很多关于 H₂S 缓解逆境胁迫下植物抗氧化保护的研究仅单一涉及到对 SOD、CAT 和 POD 等抗氧化酶的影响,而对抗坏血酸-谷胱甘肽循环代谢及总酚、类黄酮和原花青素等非酶类抗氧化物质的影响仍不清楚。因此,本试验通过对白三叶幼苗添加适宜浓度的 NaHS 来探究干旱胁迫下外源 H₂S 是否提高白三叶的抗旱性以及对白三叶整个抗氧化防御系统的影响,以期深入揭示 H₂S 调控白三叶抗旱性的生理机制,也为探寻提高白三叶抗旱性的栽培措施提供新途径。

1 材料和方法

1.1 材料培养

白三叶品种‘拉丁诺’(Ladino)的种子经 10% NaClO 消毒后播种在石英砂培养盆内,放置于昼夜温度为 23 ℃/19 ℃、光照时长为 12 h/12 h、相对湿度为 80% 的光照培养箱中,先用蒸馏水进行培养,当发芽至第 7 天后换用 Hoagland 营养液,幼苗生长至 30 d 后选取长势一致的培养盆进行试验处理。

1.2 试验设计

本试验采用根施法进行处理,设有 4 个处理,每个处理重复 4 次。处理分别为:(1)CK(对照,Hoagland 营养液);(2)NaHS(用 Hoagland 营养液配制 0.2 mmol/L 的 NaHS 溶液,为预试验得出的最适宜浓度);(3)PEG(用 Hoagland 营养液配制 20% (w/v) 的 PEG-6000 溶液);(4)PEG + NaHS(在含有 20% (w/v) PEG-6000 的 Hoagland 营养液中加入 0.2 mmol/L 的 NaHS 溶液)。在胁迫处理的第 0、8 和 16 天分别进行叶片取样,测定相关生理指标。

1.3 指标测定

1.3.1 相对含水量 采用烘干法^[18]测定。剪取新鲜叶片 0.3 g, 用纱布包裹好, 放入 50 mL 离心管中并装满蒸馏水, 放于避光处静置 24 h, 然后擦干叶片表面水分, 称取饱和鲜叶重; 再用牛皮纸袋装好, 放入烘箱中 105 ℃ 下杀青 45 min, 再调到 75 ℃ 下继续烘干至恒重, 称取干叶重。相对含水量 (RWC, %) = (新鲜叶重 - 干叶重) / (饱和鲜叶重 - 干叶重) × 100%。

1.3.2 电解质渗透率 电解质渗透率用相对电导率表示, 相对电导率采用电导率仪法^[19]测定。称取 0.1 g 叶片 (叶龄、叶位、长势一致), 用蒸馏水冲洗 4 次, 再用吸水纸吸去浮水, 然后用纱布包好放入装有 10 mL 去离子水的玻璃试管中, 静置 24 h, 然后用电导仪测其初电导率 (S_1), 再将玻璃试管放入沸水中煮大约 15 min, 叶片变黄后, 冷却测其终电导率 (S_2)。相对电导率 (EL, %) = (初电导率 S_1 / 终电导率 S_2) × 100%。

1.3.3 超氧阴离子产生速率和过氧化氢含量 超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 产生速率参照郝建军等^[20]的方法测定。剪取 0.3 g 叶片, 加入 3 mL 磷酸缓冲液 (pH 7.8), 进行研磨, 离心后取上清液 1 mL, 加入 0.9 mL 磷酸缓冲液和盐酸羟胺 0.1 mL, 保温 20 min; 再加入 1 mL 对氨基苯磺酸和 α -萘胺, 保温 20 min; 最后加入 3 mL 乙醚, 摇匀, 静置分层, 吸取下层水相, 在 530 nm 下测定吸光值。过氧化氢 (H_2O_2) 含量采用 Uchida 等^[21]的方法进行测定。称取鲜叶 0.2 g, 加入 1:1 比例的丙酮, 研磨成匀浆, 离心, 分层吸取上清液; 取 1 mL 上清液, 加入 0.2 mL 硫酸钛和 0.1 mL 浓氨水, 形成沉淀后离心, 去掉上清液; 沉淀用丙酮洗涤 3—5 次后加入 5 mL 硫酸, 溶解, 于 415 nm 进行比色; 用公式计算植物叶片中 H_2O_2 含量。 H_2O_2 含量 ($\mu\text{mol/g}$) = $(C \times Vt) / (Fw \times V1)$ 。[C: 标准曲线上查得样品中 H_2O_2 浓度 (μmol); Vt: 样品提取液总体积 (mL); V1: 测定时用样品提取液体积 (mL); F: 植物叶片鲜重 (g)]

1.3.4 抗氧化酶活性和丙二醛含量 取叶片 0.4 g 于研钵中, 加入 2 mL 预冷的磷酸缓冲液和 0.1 g PVP 在冰上充分研磨, 转入离心管中; 在 4 ℃ 下 15 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为粗酶提取液。将粗酶液分装进行丙二醛 (MDA) 含量和抗氧化酶的活性测定。MDA 含量采用硫代巴比妥酸法^[22]测定; 过氧化氢酶 (CAT) 活性采用紫外吸收法^[23]测定; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性采用核黄素-NBT

法^[24]测定; 过氧化物酶 (POD) 活性采用愈创木酚显色法^[25]测定; 参照 Nakano 等^[26]的方法测定抗坏血酸-谷胱甘肽循环中的关键酶抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 和单脱水抗坏血酸还原酶 (MDHAR) 活性。

1.3.5 抗氧化物质含量 抗坏血酸 (AsA) 和谷胱甘肽 (GSH) 含量参照 Gossett 等^[27]的方法测定; 类黄酮含量采用铝盐显色法^[28]测定; 总酚含量采用 Folin-Ciocalteu 比色法^[29]测定; 原花青素含量采用香草醛-盐酸法^[30]测定。

1.4 数据统计

采用 Excel 2003 进行数据统计; SAS 9.1 进行方差和显著性分析。

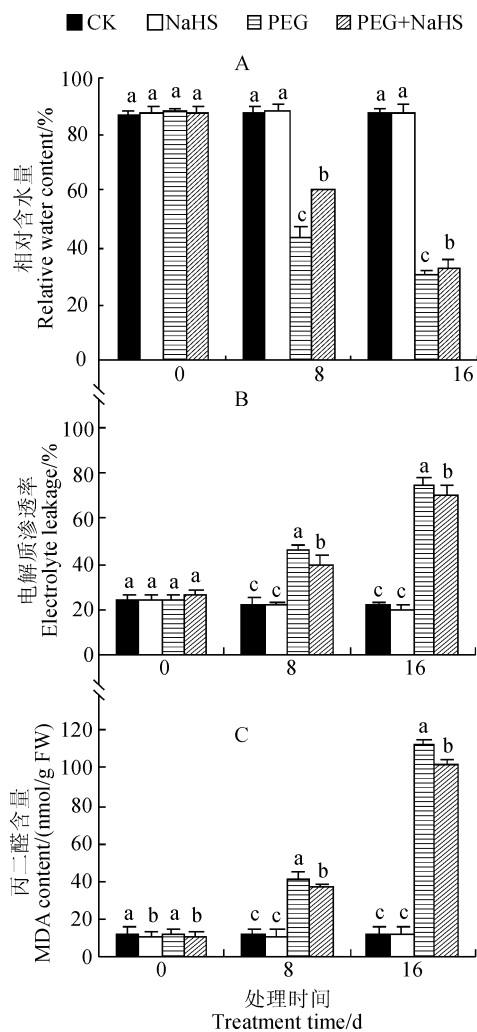
2 结果与分析

2.1 NaHS 对干旱胁迫下白三叶叶片相对含水量、电解质渗透率和丙二醛的影响

如图 1 所示, 正常水分条件下, NaHS 处理对白三叶叶片的相对含水量、电解质渗透率和 MDA 含量没有产生显著影响; PEG 处理下, 白三叶叶片相对含水量随胁迫时间的延长不断下降, 其电解质渗透率和 MDA 含量持续增加, 且与同期对照存在显著性差异 ($P < 0.05$); 但是, PEG + NaHS 处理有效减缓了干旱胁迫下叶片的水分流失, 降低了干旱胁迫下叶片电解质渗透率的上升和 MDA 的积累, 且仍与同期对照存在显著性差异 ($P < 0.05$)。其中, PEG + NaHS 处理的白三叶叶片相对含水量在干旱胁迫的第 8 天和第 16 天比 PEG 处理分别显著提高了 37.44% 和 8.07% (图 1, A), 其电解质渗透率分别显著降低了 14.65% 和 5.61% (图 1, B), 而 MDA 含量分别显著降低 9.55% 和 10.21% (图 1, C)。

2.2 NaHS 对干旱胁迫下白三叶叶片 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率和 H_2O_2 含量的影响

如图 2 所示, 正常水分 (CK) 和 NaHS 处理条件下, 白三叶叶片的 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率和 H_2O_2 含量随处理时间无明显变化, 且 NaHS 处理与 CK 间始终差异不显著; PEG 处理使白三叶叶片内 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率和 H_2O_2 含量比同期 CK 显著大幅提高 ($P < 0.05$); 与 PEG 处理相比, PEG + NaHS 处理使得叶片内 $O_2^{\cdot-}$ 产生速率在干旱胁迫的第 8 天和第 16 天分别显著降低 51.34% 和 12.51%, H_2O_2 含量则分别显著降低了 46.33% 和 7.82% (图 2, A、B)。即外源 NaHS 有效抑制了干旱胁迫下白三叶叶片活性氧的



同小字母表示同期处理间在 0.05 水平上差异显著 ($P<0.05$).
下同

图 1 NaHS 与干旱处理下白三叶叶片的相对含水量、电解质渗透率和 MDA 含量

Different letters within the same time indicate significant differences among treatments at 0.05 level. The same as below
Fig. 1 Effect of NaHS on relative water content, electrolyte leakage and MDA content in white clover under drought stress

产生,缓解了过氧化伤害。

2.3 NaHS 对干旱胁迫下白三叶叶片抗氧化酶活性的影响

正常水分条件下,NaHS 处理显著地上调了白三叶叶片中的 POD 活性,但对 CAT 活性和 SOD 活性没有产生明显影响;干旱胁迫时,PEG 处理叶片中的 SOD、POD 和 CAT 活性逐渐提高,并显著高于同期对照 ($P<0.05$);PEG+NaHS 处理使干旱胁迫下植株叶片的 SOD、POD 和 CAT 活性进一步显著提高(图 3)。其中,在干旱胁迫的第 8 天和第 16 天,PEG+NaHS 处理的植株叶片 CAT 活性

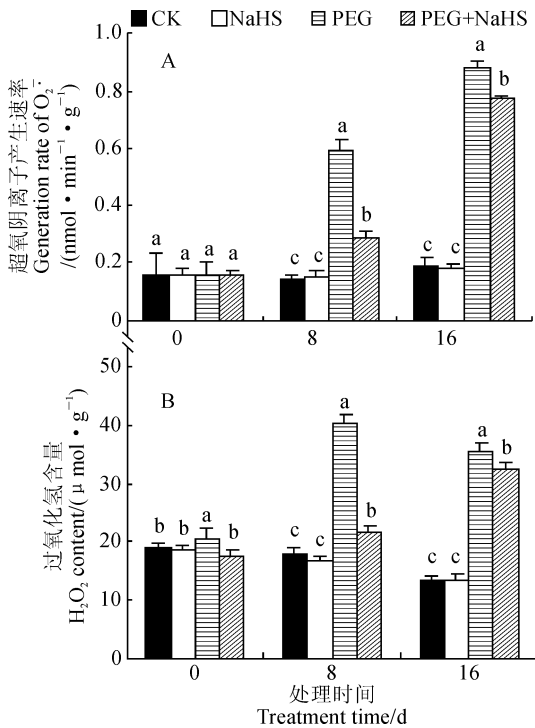


图 2 NaHS 与干旱处理下白三叶叶片的 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率和 H_2O_2 含量

Fig. 2 Effect of NaHS on generation rate of $\text{O}_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 content of white clover under drought stress

分别比 PEG 处理显著提高 19.66%和 15.24%(图 3, A),其 POD 活性则分别显著提高 11.24%和 11.91%(图 3, B),而其 SOD 活性则分别显著提高 24.97%和 7.62%(图 3, C)。可见,外源 NaHS 能显著提高干旱胁迫下白三叶植株抗氧化酶活性,增强其清除活性氧能力。

2.4 NaHS 对干旱胁迫下白三叶叶片抗坏血酸-谷胱甘肽循环代谢的影响

图 4 显示,NaHS 处理显著提高了正常水分条件下白三叶叶片的 APX 活性,但对 DHAR、MDHAR 和 GR 活性没有显著影响;PEG 处理能提高白三叶叶片内 APX 活性,但却显著抑制了叶片内 DHAR、MDHAR 和 GR 活性;PEG+NaHS 处理叶片的 APX 活性在干旱胁迫第 8 天比 PEG 处理显著提高 17.25%,但在第 16 天却与 PEG 处理没有显著差异(图 4, A),其 DHAR 活性在第 8 天和第 16 天分别比 PEG 处理显著上调 6.37%和 17.59%(图 4, B),MDHAR 活性分别显著上调 6.24%和 8.41%(图 4, C),而 GR 活性则分别显著上调 13.77%和 15.05%(图 4, D)。因此,外源 NaHS 处理既进一步增强了干旱胁迫下白三叶叶片中 APX 活性,又显著缓解了干旱胁迫对叶片 DHAR、

MDHAR 和 GR 活性的抑制作用。

由表 1 可以看出,在正常水分条件下,NaHS 处理显著提高白三叶叶片的 AsA 和 GSH 含量,但对 DHA 和 GSSG 含量没有显著影响,从而导致 AsA/DHA 和 GSH/GSSG 比值显著上升;随着干旱胁迫时间的延长,PEG 处理的白三叶叶片内 AsA 和 GSH 含量显著下降,而 DHA 和 GSSG 含量显著增加($P<0.05$),但 PEG+NaHS 处理则减缓了干旱胁迫下叶片内 AsA 和 GSH 含量不断下降的趋势,维持了显著较低的 DHA 含量,而对 GSSG 含量没有显著影响。其中,与 PEG 处理相比,PEG+NaHS 处理的叶片中 AsA 含量在胁迫第 8 天和第 16 天分别显著提高了 20.51%和 21.45%,GSH 含量则分

别显著提高 20.12%和 39.99%,而 DHA 含量分别显著降低了 18.77%和 11.76%,从而使得其同期的 AsA/DHA 和 GSH/GSSG 比值显著上升(表 1)。

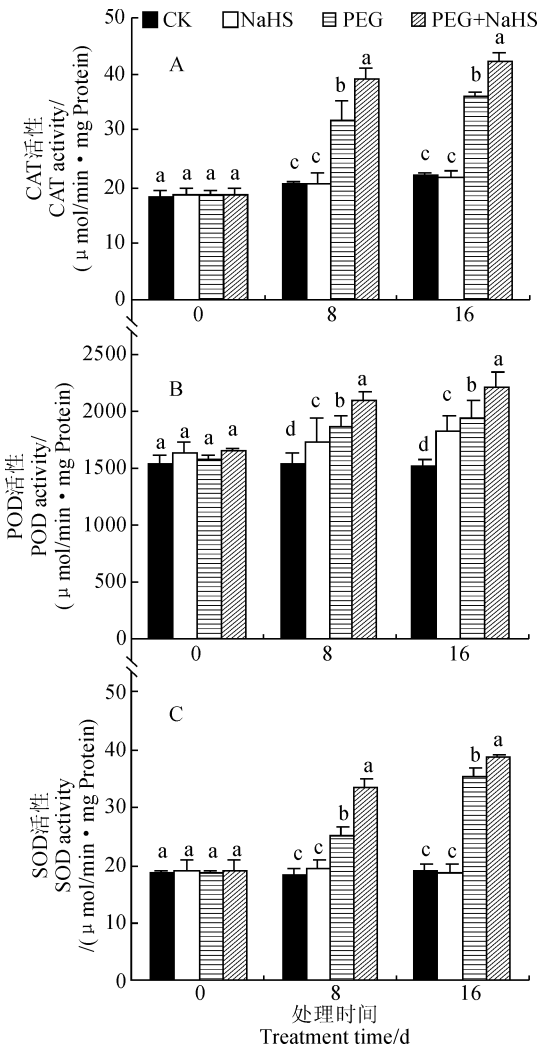


图 3 NaHS 与干旱处理下白三叶叶片的抗氧化酶 (SOD、CAT、POD) 活性

Fig. 3 Effect of NaHS on antioxidant enzyme (SOD, CAT, POD) activities of white clover under drought stress

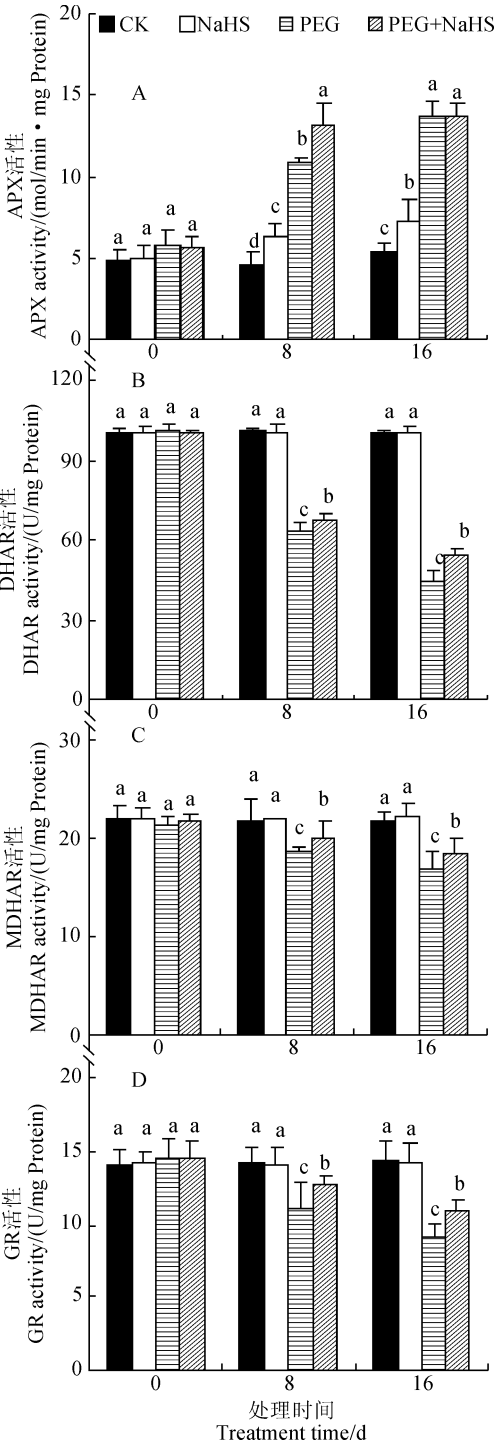


图 4 NaHS 与干旱处理下白三叶叶片的抗坏血酸-谷胱甘肽循环关键酶 (APX、DHAR、MDHAR、GR) 活性

Fig. 4 Effect of NaHS on AsA-GSH cycle key enzyme (APX, DHAR, MDHAR, GR) activities of white clover under drought stress

表 1 NaHS 与干旱处理下白三叶叶片的抗坏血酸和谷胱甘肽含量

		抗坏血酸和谷胱甘肽含量 Ascorbic acid and glutathione content/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)					
时间 Time/d	处理 Treatment	还原型抗坏血酸 AsA	氧化型抗坏血酸 DHA	还原型抗坏血酸/ 氧化型抗坏血酸 AsA/DHA	还原型谷胱甘肽 GSH	氧化型谷胱甘肽 GSSG	还原型谷胱甘肽/ 氧化型谷胱甘肽 GSH/GSSG
0	CK	304.24 $\pm$ 4.15a	49.51 $\pm$ 1.67a	6.15 $\pm$ 0.26a	31.34 $\pm$ 9.13a	42.31 $\pm$ 3.74a	0.74 $\pm$ 0.27a
	NaHS	305.65 $\pm$ 1.64a	49.29 $\pm$ 0.76a	6.20 $\pm$ 0.12a	31.75 $\pm$ 10.26a	42.26 $\pm$ 1.24a	0.75 $\pm$ 0.23a
	PEG	304.55 $\pm$ 1.59a	48.69 $\pm$ 2.3ab	6.25 $\pm$ 0.28a	31.74 $\pm$ 4.12a	42.25 $\pm$ 2.57a	0.75 $\pm$ 0.13a
	PEG+NaHS	305.61 $\pm$ 2.48a	49.69 $\pm$ 0.86a	6.15 $\pm$ 0.11a	31.11 $\pm$ 5.91a	42.39 $\pm$ 1.23a	0.73 $\pm$ 0.16a
8	CK	299.09 $\pm$ 22.57b	47.62 $\pm$ 1.57c	6.28 $\pm$ 0.29b	30.99 $\pm$ 2.15b	41.64 $\pm$ 1.09b	0.73 $\pm$ 0.07b
	NaHS	337.89 $\pm$ 14.89a	48.32 $\pm$ 3.09c	6.99 $\pm$ 0.73a	36.60 $\pm$ 1.93a	41.13 $\pm$ 0.99b	0.89 $\pm$ 0.06a
	PEG	98.81 $\pm$ 7.43d	363.56 $\pm$ 6.06a	0.27 $\pm$ 0.01d	18.61 $\pm$ 0.34d	50.16 $\pm$ 0.65a	0.37 $\pm$ 0.02d
	PEG+NaHS	124.30 $\pm$ 16.73c	306.11 $\pm$ 5.74b	0.41 $\pm$ 0.04c	23.30 $\pm$ 1.48c	50.05 $\pm$ 0.82a	0.47 $\pm$ 0.03c
16	CK	300.78 $\pm$ 4.07b	48.21 $\pm$ 2.05c	6.24 $\pm$ 0.18b	30.53 $\pm$ 1.67b	43.88 $\pm$ 1.56b	0.73 $\pm$ 0.06b
	NaHS	339.13 $\pm$ 7.71a	48.18 $\pm$ 1.92c	7.04 $\pm$ 0.43a	48.74 $\pm$ 5.54a	43.79 $\pm$ 1.21b	1.11 $\pm$ 0.11a
	PEG	63.08 $\pm$ 1.45d	443.37 $\pm$ 9.82a	0.14 $\pm$ 0.01d	10.35 $\pm$ 0.71d	60.37 $\pm$ 1.66a	0.17 $\pm$ 0.16d
	PEG+NaHS	80.30 $\pm$ 7.70c	396.71 $\pm$ 7.32b	0.20 $\pm$ 0.02c	17.24 $\pm$ 2.34c	59.04 $\pm$ 1.17a	0.29 $\pm$ 0.04c

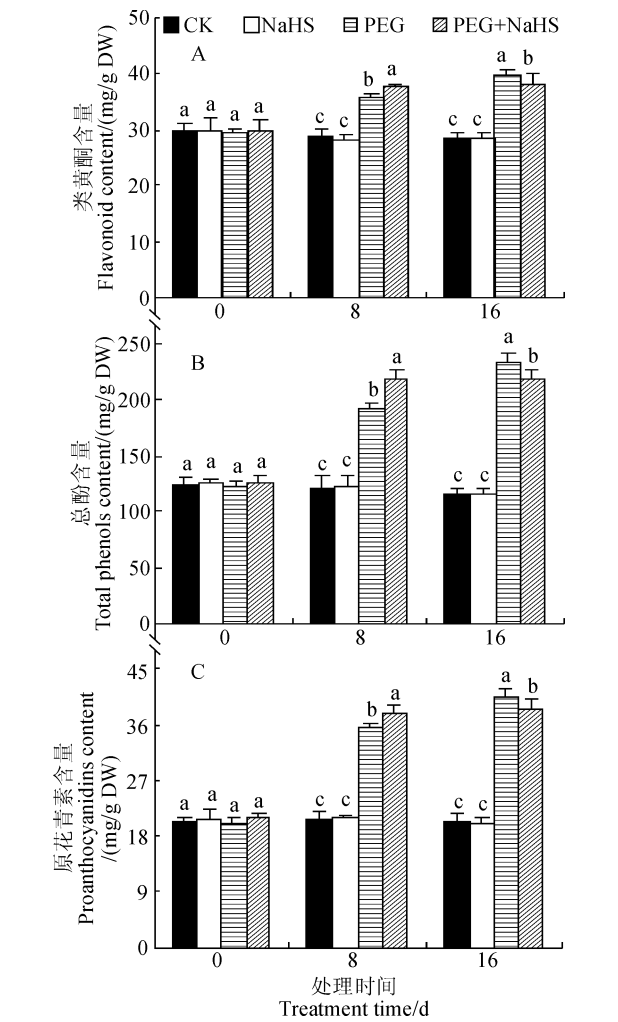


图 5 NaHS 与干旱处理下白三叶叶片的类黄酮、总酚和原花青素含量

Fig. 5 Effect of NaHS on flavonoid, total phenols and proanthocyanidins contents of white clover under drought stress

2.5 NaHS 对干旱胁迫下白三叶叶片非酶抗氧化物质的影响

各处理的白三叶叶片中非酶抗氧化成分类黄酮、总酚和原花青素的含量测定结果(图 5)显示, NaHS 处理对正常水分条件下白三叶叶片的类黄酮、总酚和原花青素含量没有显著影响;单独干旱胁迫期间,叶片的类黄酮、总酚和原花青素含量与对照相比呈显著大幅增加趋势($P<0.05$);PEG+NaHS 处理后,叶片的类黄酮、总酚和原花青素含量在干旱胁迫第 8 天时比 PEG 处理分别显著提高了 5.1%、11.52%和 5.11%,而在胁迫第 16 天时反而分别显著降低 3.52%、6.73%和 4.53%(图 5, A~C)。可见,外源 NaHS 在一定的胁迫时间范围内能提高白三叶叶片的非酶抗氧化物质含量。

3 讨论

干旱逆境下,植物细胞内 ROS 迅速积累, $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 大量产生,膜脂发生氧化损伤,使细胞膜结构和稳定性遭到破坏,电解质渗透率和 MDA 含量是显示细胞膜受损伤程度的重要指标^[31]。金忠民等^[32]研究发现,干旱胁迫程度越大,白三叶叶片电解质渗透率越大, $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率越快, H_2O_2 积累越多,MDA 含量越高。本试验结果显示,随着干旱时间的延长,白三叶幼苗叶片的电解质渗透率、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 产生速率以及 MDA 和 H_2O_2 含量不断增加,这与 Li^[33]等的结果也一致,但外源添加 NaHS 后,叶片 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 H_2O_2 的产生被抑制,电解质渗透率和 MDA

含量明显降低,膜脂过氧化程度下降。表明 H₂S 能提高干旱胁迫下白三叶幼苗细胞膜结构的稳定性,有效缓解干旱胁迫诱导的过氧化伤害。

为了抵抗外界的不良环境,植物进化出一套完整的抗氧化防御体系,包括 SOD、CAT、POD 等抗氧化酶和 AsA-GSH 循环代谢以及类黄酮、总酚、原花青素等非酶抗氧化物质。孟丹等^[34]和何庆元等^[35]的研究表明,H₂S 作为信号分子可以调节植物在非生物胁迫中的抗氧化反应,外源 NaHS 处理能提高逆境胁迫下水稻(*Oryza sativa*)和大豆(*Glycine max*)中 SOD、CAT 和 POD 等抗氧化酶的活性,本试验中 NaHS 同样能提高干旱胁迫下白三叶叶片的 SOD、CAT 和 POD 活性。AsA-GSH 循环对植物中 AsA 和 GSH 的含量起重要调节作用,APX、MDHAR、DHAR 和 GR 是这个循环中的关键酶。有研究发现,NaHS 能提高正常水分条件下小麦幼苗的 GR 和 DHAR 活性,而对 APX 和 MDHAR 的活性没有影响^[36]。但 Shan^[37]研究得出,正常水分条件下外源 NaHS 对玉米幼苗的 AsA-GSH 循环关键酶都没有作用。本试验中,NaHS 提高了正常条件下白三叶幼苗 APX 的活性,却对 DHAR、MDHAR 和 GR 的活性没有影响。出现结果不统一的原因可能是研究的植物种类不同。此外,干旱胁迫下外源添加 NaHS 可增强白三叶叶片 APX、DHAR、MDHAR 和 GR 的活性,提高 AsA、GSH 的含量和 AsA/DHA、GSH/GSSG 的比值。这些结果表明 H₂S 通过提高 AsA-GSH 循环关键酶活性,以及 AsA、GSH 含量和 AsA/DHA、GSH/GSSG 比值来调节 AsA-GSH 循环代谢,增强干旱胁迫下抗氧化保护能力,从而保护白三叶幼苗,减轻干旱胁迫诱导的氧化损伤。

类黄酮是一种重要的多酚化合物,原花青素属于类黄酮家族,这些多酚化合物在逆境胁迫中也有

清除 ROS 的作用^[38]。有研究发现,干旱胁迫下拟南芥叶片中类黄酮含量显著增加^[39],茶树(*Camellia sinensis*)叶片大量积累原花青素^[40],这些物质有效抑制了活性氧的产生,减轻了细胞氧化伤害。Krol^[41]等发现葡萄(*Vitis vinifera*)叶片中类黄酮、原花青素和总酚等多酚化合物的含量在干旱条件下显著下降,Amarowicz^[42]等也得出相似的结果。但是,Chung^[43]等研究发现,冷胁迫提高了地黄(*Rehmannia glutinosa*)中这些多酚化合物的含量。这些研究报道表明,逆境胁迫下,不同植物体内类黄酮、原花青素和总酚含量的变化既可能是胁迫伤害的结果,也可能是一种应激反应,试验结果出现差异可能是因为非生物胁迫和植物种类的不同所致。本试验中发现,干旱胁迫条件下白三叶叶片中类黄酮、原花青素和总酚的含量显著增加,外源添加 NaHS 处理在一定时间内进一步提高了干旱胁迫下白三叶叶片类黄酮、原花青素和总酚的含量,但胁迫后期这种提高的效应消失,NaHS 调节这些非酶类抗氧化物质产生和代谢是否与提高白三叶的抗氧化防御能力和抗旱性有关,均值得进一步探究。

综上所述,干旱逆境下白三叶叶片的相对含水量显著下降,膜脂发生过氧化,活性氧成分明显增高,植株枯萎严重,但外源添加 NaHS 处理显著缓解了干旱诱导的胁迫伤害。干旱胁迫下 NaHS 处理显著提高了 SOD、CAT 和 POD 抗氧化酶活性,增强了 AsA-GSH 循环代谢中关键酶活性,从而提高了 AsA 与 GSH 水平,而活性氧水平显著降低,这些结果表明 H₂S 提高白三叶的抗旱性与诱导多重抗氧化保护系统活性,以减轻过氧化伤害密切相关,但是否有其它非酶类的抗氧化物质,如类黄酮、总酚、原花青素参与了 H₂S 对白三叶抗旱性的调节尚待进一步研究。

参考文献:

[1] 邵艳军,山 仑.植物耐旱机制研究进展[J].中国生态农业学报,2006,14(4):16-20.
SHAO Y J, SHAN L. Advances in the studies on drought tolerance mechanism of plants[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2006, 14(4): 16-20.
[2] 金忠民,沙 伟.白三叶抗旱性生理的研究[J].北方园艺,2010,(18):50-52.
JIN Z M, SHA W. Study on drought resistance of *Trifolium*

repens Linn seedlings [J]. Northern Horticulture, 2010,(18):50-52.
[3] 徐庆宣,陈 健,黄晓芳,等.丁香酚与硫化氢钠促进番茄幼苗侧根生长[J].江苏农业学报,2013,29(5):1120-1124.
XU Q X, CHEN J, HUANG X F, et al. Promoting effect of eugenol and NaHS on growth of tomato lateral root[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2013, 29(5): 1120-1124.
[4] ZHANG H, DOU W, JIANG C X, et al. Hydrogen sulfide

- stimulates β -amylase activity during early stages of wheat grain germination[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, **5**(8): 1 031-1 033.
- [5] HU L Y, HU S L, WU J, *et al.* Hydrogen sulfide prolongs postharvest shelf life of strawberry and plays an antioxidative role in fruits[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2012, **60**(35): 8 684-8 693.
- [6] 刘 菁,侯智慧,赵方贵,等. H₂S介导 ABA 诱导蚕豆气孔运动的生理机制研究[J]. 西北植物学报, 2011, **31**(2): 289-304.
- LIU Q, HOU Z H, ZHAO F G, *et al.* Hydrogen sulfide mediates ABA-induced stomatal closure of *Vicia faba* L. [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, **31**(2): 289-304.
- [7] 侯智慧,刘 菁,侯丽霞,等. H₂S可能作为 H₂O₂ 的下游信号介导茉莉酸诱导的蚕豆气孔关闭[J]. 植物学报, 2011, **46**(4): 396-406.
- HOU Z H, LIU Q, HOU L X, *et al.* H₂S may function downstream of H₂O₂ in Jasmonic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba* [J]. *Bulletin of Botany*, 2011, **46**(4): 396-406.
- [8] 刘 菁,侯丽霞,刘国华. NO 介导的 H₂S 合成参与乙烯诱导的拟南芥气孔关闭[J]. 科学通报, 2011, **56**(30): 2 511-2 522.
- LIU Q, HOU L X, LIU G H. Hydrogen sulfide induced by nitric oxide mediates ethylene-induced stomatal closure of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, **56**(30): 2 511-2 522.
- [9] HOU Z H, WANG L X, LIU J, *et al.* Hydrogen sulfide regulates ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, **55**(3): 277-289.
- [10] LIU J, HOU Z H, LIU G H, *et al.* Hydrogen sulfide may function downstream of nitric oxide in ethylene-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2012, **11**(10): 1 644-1 653.
- [11] CHEN J, WU F H, WANG W H, *et al.* Hydrogen sulfide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, **62**(13): 4 481-4 492.
- [12] WANG Y Q, LI L, CUI W T, *et al.* Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway[J]. *Plant & Soil*, 2012, **351**(1): 107-119.
- [13] LI Z G, YANG S Z, LONG W B, *et al.* Hydrogen sulfide may be a novel downstream signal molecule in nitric oxide-induced heat tolerance of maize (*Zea mays*) seedlings[J]. *Plant Cell & Environment*, 2013, **36**(8): 1 564-1 572.
- [14] SHI H T, YE T T, CHAN Z L. Nitric oxide-activated hydrogen sulfide is essential for cadmium stress response in bermudagrass[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2014, **74**(136): 99-107.
- [15] JIN Z P, SHEN J J, QIAO Z J, *et al.* Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2011, **414**(3): 481-486.
- [16] ZHANG H, YE Y K, WANG S H, *et al.* Hydrogen sulfide counteracts chlorophyll loss in sweetpotato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress[J]. *Plant Growth Regulation*, 2009, **58**(3): 243-250.
- [17] MILLER G, SHULAEV V, MITTLER R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress [J]. *Physiologia Plantarum*, 2008, **133**(3): 481-489.
- [18] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [19] BLUM A, EBERCON A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat[J]. *Crop Science*, 1981, **21**(1): 43-47.
- [20] 郝建军,康宗利,于洋. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [21] UCHIDA A, ANDRE T I, TAKASHI H. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice[J]. *Plant Science*, 2002, **163**(3): 515-523.
- [22] BATES S, WALDREN R P, TEARE I D. Rapid determination of the free proline in water stress studies[J]. *Plant and Soil*, 1973, **39**(1): 205-208.
- [23] DHINDSA R S, DHINDSA P P, THORPE T A. Leaf Senescence; Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase[J]. *Journal of Experimental Botany*, 1981, **32**(1): 93-101.
- [24] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutase: occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiology*, 1977, **59**(2): 309-314.
- [25] MAEHLY A C, CHANCE B. The assay of catalases and peroxidases[J]. *Methods in Enzymology*, 1954, **1**(55): 764-775.
- [26] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts[J]. *Plant Cell Physiology*, 1981, **22**(5): 867-880.
- [27] GOSSETT D R, MILLHOLLON E P, LUCAS M C. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton[J]. *Crop Science*, 1994, **34**(3): 706-714.
- [28] ZANG L M, LI C L. Study on separation and purification of total flavones of Hawthorn leaves by macroporous adsorption resins[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2006, **12**(23): 15-20.
- [29] SINGLETON V L, ORTHOFER R, LAMUELA R, *et al.*

Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent[J]. *Methods in Enzymology*, 1999, **29**(9): 152-178.

[30] NICOLAS V, MARIE F N, NATHALIE V D G. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chimica Acta*, 2004, **513**(1): 247-256.

[31] 柏素花. 外源亚精胺对大豆离体叶片衰老的影响[J]. 中国农学通报, 2008, **24**(6): 243-246.

BAI S H. Effects of exogenous spermine on senescence of detached soybean leaves[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2008, **24**(6): 243-246.

[32] 金忠民, 沙 伟, 臧 威, 等. 干旱胁迫对白三叶幼苗保护酶的影响[J]. 东北林业大学学报, 2010, **38**(7): 52-53.

JIN Z M, SHA W, ZANG W, *et al.* Effects of drought stress on protective enzymes of *Trifolium repens* seedlings[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2010, **38**(7): 52-53.

[33] LI Z, PENG Y, ZHANG X Q, *et al.* Exogenous spermidine improves seed germination of white clover under water stress via involvement in starch metabolism, antioxidant defenses and relevant gene expression[J]. *Molecules*, 2014, **19**(11): 18 003-18 024.

[34] 孟 丹, 安敏敏, 杨立明. 硫化氢缓解铝胁迫对水稻幼苗叶片抗氧化系统的调控[J]. 淮阴师范学院学报, 2015, **14**(1): 52-54.

MENG D, AN M M, YANG L M. Alleviation of exogenous hydrogen sulfide on rice seedlings to aluminum stress[J]. *Journal of Huaiyin Teachers College*, 2015, **14**(1): 52-54.

[35] 何庆元, 向仕华, 吴 萍, 等. 硫化氢对盐胁迫条件下大豆抗氧化酶活性的影响[J]. 大豆科学, 2015, **43**(3): 428-431.

HE Q Y, XIANG S H, WU P, *et al.* Effects of hydrogen sulfide alleviates salt stress in soybean(*Glycine max*) antioxidative system[J]. *Soybean Science*, 2015, **43**(3): 428-431.

[36] SHAN C J, DAI H P, SUN Y F. Hydrogen sulfide protects wheat seedlings against copper stress by regulating the ascorbate and glutathione metabolism in leaves[J]. *Australian Journal of Crop Science*, 2012, **6**(2): 248-254.

[37] SHAN C, ZHAO H, WANG X. Effects of exogenous hydrogen sulfide on the redox states of ascorbate and glutathione in maize leaves under salt stress[J]. *Biologia Plantarum*, 2014, **58**(1): 169-173.

[38] NAKABAYASHI R, MORI T, SAITO K. Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2014, **9**(8): e29518.

[39] NAKABAYASHI R, YONEKURA S K, URANO K, *et al.* Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids[J]. *Plant Journal*, 2014, **77**(3): 367-379.

[40] HERNANDEZ I, ALEGRE L, MUNNE B S. Enhanced oxidation of flavan-3-ols and proanthocyanidin accumulation in water-stressed tea plants[J]. *Phytochemistry*, 2006, **67**(11): 1 120-1 126.

[41] KROL A, AMAROWICZ R, WEIDNER S. Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera*) under continuous of long-term drought stress[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2014, **36**(6): 1 491-1 499.

[42] AMAROWICZ R, WEIDNER S, WOJTOWICZ I, *et al.* Influence of low-temperature stress on changes in the composition of grapevine leaf phenolic compounds and their antioxidant properties[J]. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 2010, **4**(1): 90-96.

[43] CHUNG I M, KIM J J, LIM J D, *et al.* Comparison of resveratrol, SOD activity, phenolic compounds and free amino acids in *Rehmannia glutinosa* under temperature and water stress[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, **56**(1): 44-53.

(编辑: 裴阿卫)