

DOI: 10.5846/stxb201801140105

韩厅,魏小红,辛夏青,岳凯,赵颖,宿梅飞,马文静,骆巧娟.外源 cGMP 调控盐胁迫下黑麦草种子萌发的机制.生态学报,2018,38(19): - .  
Han T, Wei X H, Yue K, Xin X Q, Zhao Y, Sui M F, Ma W J, Luo Q J.Exogenous cGMP regulates seed germination of ryegrass under salt stress.Acta Ecologica Sinica,2018,38(19): - .

## 外源 cGMP 调控盐胁迫下黑麦草种子萌发的机制

韩 厅,魏小红\*,辛夏青,岳 凯,赵 颖,宿梅飞,马文静,骆巧娟

甘肃农业大学生命科学技术学院,兰州 730070

**摘要:** cGMP (cyclic guanosine-3',5'-monophosphate) 是一类环化核苷酸,能响应植物非生物胁迫的信号分子。以 cGMP 的膜透性类似物 8-Br-cGMP 为供体,研究 cGMP 对盐胁迫下黑麦草种子萌发及生理指标的影响。通过计算萌发指标、测定种子萌发过程中各项生理指标,探讨 cGMP 对黑麦草种子萌发时耐盐机制的作用。结果表明:低浓度(50 mmol/L)盐胁迫能促进黑麦草种子的萌发,随着盐浓度(100、150、200、250 mmol/L)的增加黑麦草种子的萌发率逐渐降低甚至抑制其萌发。而加入 20  $\mu\text{mol/L}$  LcGMP 能缓解 100 mmol/L NaCl 胁迫对黑麦草种子造成的伤害,使黑麦草种子的发芽率、发芽势、发芽指数、活力指数分别提高了 7.4%、133.3%、52.1%、104.2%。此外,研究发现加入 20  $\mu\text{mol/L}$  LcGMP 能够促进 100 mmol/L NaCl 盐胁迫下黑麦草萌发期根的生长,比单独 100 mmol/L NaCl 盐胁迫处理下的黑麦草植株全长、根长、叶长分别提高了 2.5、2.8 倍和 2.6 倍,种子在萌发过程中可溶性糖、可溶性蛋白含量、淀粉酶活性,脯氨酸含量分别提高了 47.9%、15.7%、94.3%、117.4%,而淀粉含量、MDA 含量、电导率,  $\text{O}_2^-$  产生速率分别降低了 40.9%、128.7%、88.6%、211.9%。说明 20  $\mu\text{mol/L}$  LcGMP 通过提高可溶性糖,可溶性蛋白含量及脯氨酸含量,同时减少 MDA、 $\text{O}_2^-$  的产生,以此缓解盐胁迫对黑麦草种子的伤害、同时促进淀粉水解,从而加速种子萌发。

**关键词:** cGMP;盐胁迫;黑麦草;种子萌发;生理指标

## Exogenous cGMP regulates seed germination of ryegrass under salt stress

HAN Ting, WEI Xiaohong\*, YUE Kai, XIN Xiaqing, ZHAO Ying, SUI Meifei, MA Wenjing, LUO Qiaojuan

College of life science and technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

**Abstract:** cGMP (cyclic guanosine-3',5'-monophosphate) is a type of cyclic nucleotide and signaling molecule that can be responsive to plant abiotic stress. Using cGMP membrane permeability analog 8-Br-cGMP as a donor, this study investigated the effects of cGMP on seed germination and physiological indicators of ryegrass under salt stress. The effects of cGMP on the salt tolerance mechanism during the germination of ryegrass were determined through calculating the germination index and determining the physiological indicators in the process of seed germination. The results showed that a low concentration (50 mmol/L) of salt stress could promote the germination of ryegrass seeds. With increasing salt concentrations (100, 150, 200, and 250 mmol/L), the germination rate of ryegrass seeds gradually decreased and was even inhibited. Adding 20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP can relieve the damage caused by 100 mmol/L NaCl stress on ryegrass seed, increasing the germination rate, germination potential, germination index, and vigor index of ryegrass seed by 7.4%, 133.3%, 52.1%, and 104.2%, respectively. In addition, compared to the 100 mmol/L NaCl stress condition alone, the growth of roots of ryegrass could be promoted and the total length, root length, and leaf length of ryegrass plants increased, by 2.5, 2.8, and 2.6 times, respectively, when 20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP was added. The soluble sugar, soluble protein content, amylase activity, and proline content of seeds increased by 47.9%, 15.7%, 94.3%, and 117.4%, respectively, while starch content, MDA content, conductivity, and  $\text{O}_2^-$  production rate were reduced by 40.9%, 128.7%, 88.6%, and 211.9%, respectively. The results

基金项目:国家自然科学基金项目(31560663)

收稿日期:2018-01-14; 网络出版日期:2018-07-05

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: weixh@gsau.edu.cn

showed that 20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP could increase the contents of soluble sugar, soluble protein, and proline, and reduce the production of MDA and  $\text{O}_2^-$ , so as to relieve the damage caused by salt stress on ryegrass seed and promote the hydrolysis of starch, which accelerated seed germination.

**Key Words:** cGMP; salt stress; ryegrass; seed germination; physiological index

环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)是一种具有细胞内信息传递作用的第二信使(second messenger),可被G蛋白偶联受体(G-protein linked receptor)激活的蛋白激酶(protein kinases)所活化<sup>[1]</sup>,进而将胞外信号转至细胞核,是一种具有广泛生物学活性的环核苷酸。cGMP在生物、非生物胁迫及激素响应等众多的植物生理过程中起着非常重要的调节作用<sup>[2]</sup>,其信号通路以及它的反馈调节是通过cGMP合成和降解的相互作用来控制,其合成和降解分别是由鸟苷酸环化酶(GC)和磷酸二酯酶(PDE)完成的<sup>[3]</sup>。GC能催化GTP形成cGMP,使其发挥生物学功能,而PDE能使cGMP变成5'GMP而失活。因此,植物能准确调控体内的cGMP含量,进而参与各种生理过程<sup>[4]</sup>。目前关于cGMP在植物信号转导中的作用正在逐渐被揭示<sup>[2]</sup>。研究发现,在一些植物材料中每克新鲜样品中含有1—10 pmolcGMP<sup>[5]</sup>。通过施加外源cGMP的膜透性类似物8-Br-cGMP能增强拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)对盐胁迫的耐受性<sup>[6]</sup>。此外,还发现在辣椒(*Capsicum annuum*)中,cGMP可以调节 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ 的流量来维持离子平衡<sup>[7]</sup>。当植物受到非生物胁迫,例如渗透胁迫或盐胁迫时植物中的cGMP含量会上升5—10倍<sup>[8]</sup>。说明cGMP能增强植物对胁迫的耐受性,并作为一种信号物质在植物的胁迫响应中发挥着重要调控作用。

黑麦草(*Lolium perenne*)为禾本科黑麦草属植物,其分蘖多、产量高、质地柔软、绿期长、营养丰富、消化性好、适口性好,是重要的禾本科牧草,已成为我国大力推广的牧草种类;其再生能力强、生物量较大、易于种植、有耐盐碱潜力、能增加土壤有机质、改善土壤结构、防止水土流失,又是优质的草坪草<sup>[9-15]</sup>。而土壤盐碱化和次生盐碱化问题在世界范围内广泛存在,已经成为影响植物生长发育的重要环境因素<sup>[16]</sup>。因此,研究黑麦草一方面能为畜牧业提供足够的牧草,发展我国畜牧业;另一方面通过提高黑麦草的耐盐性,能够改善我国日益严重的土壤盐渍化和生态环境问题,目前这已成为科研工作者共同关注的问题。第二信使 $\text{NO}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{H}_2\text{S}$ 等对植物在逆境条件下的生理作用已有很多研究,但cGMP对植物在逆境条件下的生理作用研究的很少。本试验通过施加外源cGMP处理 $\text{NaCl}$ 胁迫下黑麦草种子并对其萌发及萌发过程中可溶性糖、可溶性蛋白、淀粉、淀粉酶活性及脯氨酸、相对电导率、 $\text{O}_2^-$ 产生速率、丙二醛含量变化的研究,探讨cGMP缓解盐胁迫对黑麦草种子萌发的毒害作用,旨在为在盐碱地推广黑麦草的种植以及黑麦草耐盐生理机制的研究提供一定的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于2017年5月—9月在生命科学技术学院植物生理实验室进行,供试材料为多年生黑麦草种子,购于甘肃农业科学院种子公司,千粒重为2.0034 g,室温避光保存,8-Br-cGMP购买于ApexBio公司。

### 1.2 试验方法

选取籽粒饱满,大小一致,无病虫害黑麦草种子,用0.1%的 $\text{HgCl}_2$ 溶液浸泡消毒5 min,再用蒸馏水冲洗5—6次。将消毒后的黑麦草种子随机播在铺有两层滤纸的培养皿( $\varphi=9\text{ cm}$ ),每皿放置50粒,用不同浓度(0、50、100、150、200、250 mmol/L)的 $\text{NaCl}$ 培养液和含有20  $\mu\text{mol/L}$ cGMP的不同浓度(0、50、100、150、200、250 mmol/L)的 $\text{NaCl}$ 溶液培养。所有的培养皿放入在( $25\pm 1$ ) $^\circ\text{C}$ 、相对湿度为80%、12 h光照/12 h黑暗的条件下的恒温光照培养箱中培养,光照强度4000 Lux,每24 h更换一次处理液4 mL。以胚根露出作为种子萌发的标志,每24 h记录一次,一直测定至第7天,测定其发芽指标,每组处理设置了3个重复。

另外试验设计了三个处理:(1)CK(蒸馏水);(2)100 mmol/L NaCl 溶液;(3)20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl。分别用蒸馏水、100 mmol/L NaCl 溶液、20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl 浸泡黑麦草种子 48 h,将种子置于垫有双层滤纸的培养皿( $\varphi=9$  cm)中,每皿 50 粒种子,每个处理重复 3 次,每个培养皿加处理液 4 mL,24 h 更换一次处理液。培养在(25  $\pm$  1)  $^{\circ}\text{C}$ ,12 h 光照/12 h 黑暗条件下,分别在处理后的 0、2、4、6 d 取样,用于萌发期主要物质的测定;再取 2、4、6、8 d 测定其幼苗的生理指标。

### 1.3 测定指标及方法

#### 1.3.1 种子发芽指标

发芽率(germination percentage, GP) = 7 d 内发育种子数/测试种子数  $\times$  100%<sup>[17]</sup>

发芽势(germination energy, GE) = 前 4 d 发芽种子数/测试种子总数  $\times$  100%<sup>[18]</sup>

发芽指数(GI) =  $\sum(G_t/D_t)$ <sup>[19]</sup>(式中, $D_t$  为发芽日数, $G_t$  为与  $D_t$  相应的每天发芽种子数)

活力指数(VI) = GI  $\times$  第 7 天正常幼苗平均鲜重<sup>[20]</sup>。(式中,幼苗鲜重为称取 5 株幼苗的重量)

植株全长、根长、叶长用游标卡尺测量(长度为总共 50 株植株的平均值)。

#### 1.3.2 生理指标的测定

可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 比色法测定<sup>[21]</sup>;淀粉酶活力采用 3,5-二硝基水杨酸法测定<sup>[21]</sup>;可溶性糖与淀粉含量采用蒽酮比色法测定<sup>[22]</sup>。脯氨酸采用酸性茚三酮法测定<sup>[22]</sup>;电解质渗透率(电导率)测定用 DDS-11A 型电导仪测定外渗液电导率值<sup>[22]</sup>;超氧阴离子( $\text{O}_2^-$ )产生速率用羟胺法<sup>[23]</sup>;  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的测定<sup>[24]</sup>。

### 1.4 数据统计分析

每组数据设定 3 个重复,采用 Microsoft Excel 2010 整理分析数据,使用 SPSS19.0 (Duncan 法)进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 外源 cGMP 对不同浓度盐胁迫下黑麦草种子萌发的影响

由表 1 知:与 CK 相比,随着 NaCl 浓度的升高,黑麦草的发芽率(G)呈现先升高后降低的变化趋势,不同处理差异显著( $P < 0.05$ );发芽势(GE)、发芽指数(GI)和活力指数(VI)均呈现逐渐降低的变化趋势,不同处理差异显著( $P < 0.05$ )。其中,50 mmol/L NaCl 处理的黑麦草种子比对照组芽率提高了 3.5%;而 100 mmol/L NaCl 处理的黑麦草种子的发芽率(G)、发芽势(GE)、发芽指数(GI)和活力指数(VI)分别比对照降低了 38.9%、73.5%、141.8%和 141.0%;而当 NaCl 的浓度达到 250 mmol/L 时,黑麦草种子的发芽率(GP)、发芽势(GE)、发芽指数(GI)和活力指数(VI)均达到最低,黑麦草种子基本丧失活性。在不同浓度(50、100、150、200、250 mmol/L)NaCl 胁迫下,加入 20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP 皆能提高黑麦草种子的发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数。其中对 100 mmol/L NaCl 处理的黑麦草种子萌发最为显著。20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L 处理的黑麦草种子比单独 100 mmol/L NaCl 处理的发芽率、发芽势、发芽指数和活力指数分别提高了 7.4%、133.3%、52.1%和 104.2%。

### 2.2 外源 cGMP 对盐胁迫下黑麦草种子萌发生长状况的影响

由图 1 可知:从植物的生长形态上明显看出,20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl 处理的黑麦草种子在萌发过程中,比单独 100 mmol/L NaCl 胁迫的黑麦草种子萌发时有明显的促进生长的作用。由表 2 可以得到:20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl 处理的比单独 100 mmol/L NaCl 处理的黑麦草种子的全长、根长及叶长都有显著的提高,分别提高了 2.5、2.8 倍和 2.6 倍。

### 2.3 外源 cGMP 对盐胁迫下种子萌发过程中主要物质变化的影响

在不同的处理条件下,随着处理时间的延长,黑麦草种子内可溶性蛋白含量均呈现逐渐上升的趋势(图 2)。在处理的第 2 天,100 mmol/L NaCl 和 20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl 处理的黑麦草种子内可溶性蛋

白含量显著高于对照组,且 20  $\mu\text{mol/LcGMP}+100\text{ mmol/L NaCl}$  处理的黑麦草种子内可溶性蛋白比 100  $\text{mmol/L NaCl}$  处理下的可溶性蛋白含量升高 15.7%,比对照提高了 56.1%;在处理的第 4 天,三组处理可溶性蛋白含量变化不明显;在处理的第 6 天,各处理之间差异显著 ( $P<0.05$ ),其中加入第二信使 cGMP 处理的黑麦草种子内可溶性蛋白含量比对照增加了 21.3%,比单独 100  $\text{mmol/L NaCl}$  胁迫下升高了 8.4%。

表 1 不同浓度 NaCl 对黑麦草种子萌发的影响

Table 1 Effects of different concentration of NaCl on seed germination of ryegrass

处理 Treatment	发芽率 <i>GP</i> Germination Percentage/%	发芽势 <i>GE</i> Germination Energy/%	发芽指数 <i>GI</i> Germination Index	活力指数 <i>VI</i> Vigor Index
蒸馏水 (Distilled Water)	93.8±0.07a	42.6±0.02a	27.7±0.18a	2.4±0.01a
20 $\mu\text{mol/LcGMP}$	97.8±0.04a	41.3±0.02b	22.3±1.10a	2.1±0.10a
50 $\text{mmol/L NaCl}$	96.3±0.04a	35.0±0.20a	27.2±0.31a	2.2±0.02b
20 $\mu\text{mol/LcGMP}+50\text{ mmol/L NaCl}$	97.8±0.04a	48.8±0.05a	48.1±0.38a	3.9±0.03b
100 $\text{mmol/L NaCl}$	67.5±0.05b	11.3±0.04b	11.5±0.60b	0.5±0.02c
20 $\mu\text{mol/LcGMP}+100\text{ mmol/L NaCl}$	72.5±0.04b	26.3±0.02c	17.4±1.48b	1.0±0.08c
150 $\text{mmol/L NaCl}$	33.8±0.04c	1.0±0.09bc	6.0±0.42c	0.0±0.01d
20 $\mu\text{mol/LcGMP}+150\text{ mmol/L NaCl}$	40.0±0.14c	8.8±0.02d	12.5±0.11c	0.2±0.01d
200 $\text{mmol/L NaCl}$	7.5±0.01d	0.0±0.00c	0.4±0.01d	0.0±0.01e
20 $\mu\text{mol/LcGMP}+200\text{ mmol/L NaCl}$	6.3±0.05d	2.5±0.01d	1.9±1.17d	0.0±0.01d
250 $\text{mmol/L NaCl}$	2.5±0.01d	0.0±0.00c	0.2±0.21d	0.0±0.00e
20 $\mu\text{mol/LcGMP}+250\text{ mmol/L NaCl}$	5.0±0.04d	3.8±0.02d	3.5±0.42d	0.0±0.01d

同列数值不同小写字母表示差异达 5% 显著水平

表 2 外源 cGMP 对 100  $\text{mmol/L NaCl}$  胁迫下黑麦草种子生长状况的影响

Table 2 Effects of exogenous cGMP on seed germination of growth condition under 100  $\text{mmol/L NaCl}$  stress

处理 Treatment	全长 Overall Length /mm	根长 Root Length/mm	叶长 Leaf Length/mm
100 $\text{mmol/L NaCl}$	28.0±0.17a	10.6±0.02a	15.4±0.02a
20 $\mu\text{mol/LcGMP}+100\text{ mmol/L NaCl}$	68.8 ±0.03b	29.5±0.01b	40.7±0.13a

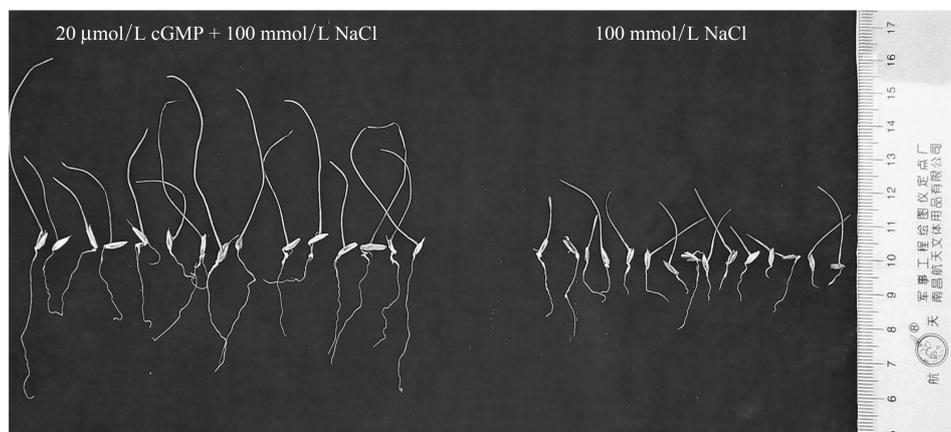


图 1 外源 cGMP 对 100  $\text{mmol/L NaCl}$  胁迫下黑麦草种子生长状况的影响

Fig.1 Effects of exogenous cGMP on seed germination of growth condition under 100  $\text{mmol/L NaCl}$  stress

在不同的处理条件下,黑麦草种子内可溶性糖含量均随着处理时间的延长整体呈现升高的趋势(图 2)。在处理的第 2 天对照组可溶性糖含量比第 0 天提高了 59.1%,而加入外源 cGMP 和单独 NaCl 胁迫下可溶性糖含量变化不明显;在处理的第 4 天,100  $\text{mmol/L NaCl}$  和 20  $\mu\text{mol/LcGMP}+100\text{ mmol/L NaCl}$  处理的黑麦草

种子内可溶性糖含量达到最大值,其中加入外源 cGMP 处理的比 100 mmol/L NaCl 单独处理和对照分别增加了 10.7%和 33.3%;在处理的第 6 天,100 mmol/L NaCl 单独处理的黑麦草种子内可溶性糖含量突然下降,而加入外源 cGMP 处理和对照略微升高,变化幅度不明显,加入外源 cGMP 处理的比对照和 100 mmol/L NaCl 单独处理的增加了 34.3%和 47.9%。

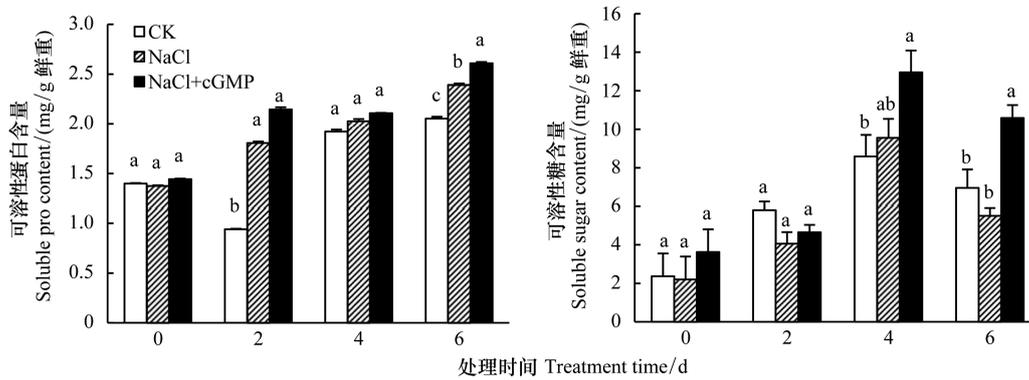


图 2 外源 cGMP 对 NaCl 胁迫下黑麦草种子萌发过程中可溶性蛋白和可溶性糖含量的影响

Fig.2 Effects of exogenous cGMP on the soluble protein and sugar content in germinating ryegrass seeds under NaCl stress

相同处理天数不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

由图 3 可知:各处理下的黑麦草种子内淀粉含量均随着处理时间的延长,整体呈现先升高后下降的变化趋势。在处理的第 2 天,三个处理淀粉含量均达到最大值,分别增加了 30.8%、28.6%、9.9%;在处理第 4 天,各处理之间差异显著 ( $P < 0.05$ ),各处理下黑麦草种子内淀粉含量迅速下降;在处理的第 6 天,不同处理下种子内淀粉含量下降并达到最低点,各处理间差异显著 ( $P < 0.05$ );其中,加入外源 cGMP 处理比单独 100 mmol/L NaCl 处理和对照分别下降了 11.3%和 50.4%。

由图 3 可知:各处理下的黑麦草种子内淀粉酶活性均随着处理时间的延长,整体呈现先升高后降低的变化趋势。在处理的第 2 天,三个处理之间差异显著 ( $P < 0.05$ ),其中对照分别比加入外源 20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP 和 100 mmol/L NaCl 单独处理的淀粉酶活性增加 15.3%、24.3%;在处理第 4 天,三个处理都达到最大值,其中对照组和施加 cGMP 处理的淀粉酶活性差异不显著,两者比单独 100 mmol/L NaCl 处理下的分别提高了 46.8%和 48.6%;在处理的第 6 天,对照组淀粉酶活性最高,分别比 100 mmol/L NaCl 和施加 cGMP 处理下的高 69.0%、29.4%,20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP 与 100 mmol/L NaCl 共同处理下的比 100 mmol/L NaCl 单独处理的淀粉酶活性提高了 53.2%。说明 cGMP 促进黑麦草种子内淀粉酶活性,加速了淀粉的水解,为种子萌发提供能量。

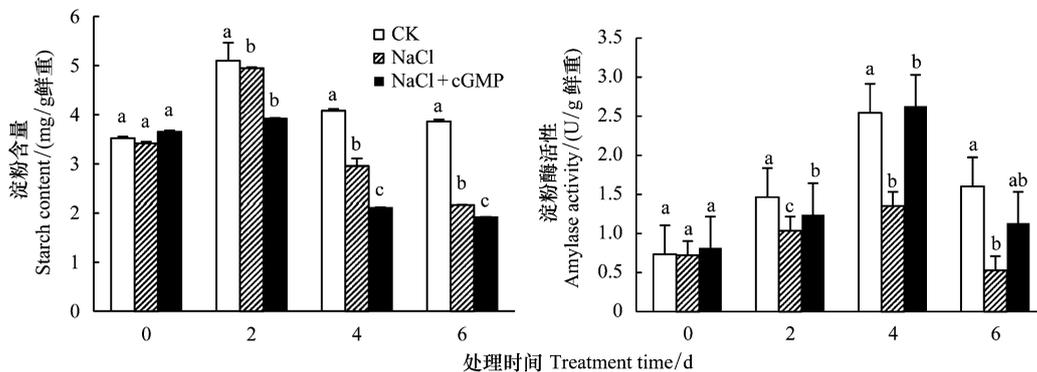


图 3 外源 cGMP 对 NaCl 胁迫下黑麦草种子萌发过程中淀粉和淀粉酶活性的影响

Fig.3 Effect of exogenous cGMP on the starch content and amylase activity in germinating ryegrass seeds under NaCl stress

## 2.4 外源 cGMP 对盐胁迫下黑麦草种子萌发过程中生理指标的影响

从图 4 可以看出:CK 与 100 mmol/L NaCl 处理下的黑麦草种子在萌发过程中的 MDA 含量都呈现上升的趋势,20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl 呈现先上升后下降的趋势,在处理的第 6 天达到最大值。在处理的第 2 天,三个处理之间存在显著性差异( $P<0.05$ );处理的第 4 天,100 mmol/L NaCl 单独处理的比 CK 与加入外源 cGMP 处理的分别增加了 3.0 倍和 1.6 倍,3 个处理之间存在显著的差异性( $P<0.05$ );在处理的第 6 天,100 mmol/L NaCl 单独处理比 CK 与加入外源 cGMP 处理的分别增加了 2.3 倍和 1.4 倍,加入外源 cGMP 的黑麦草种子内 MDA 含量达到最大值;在处理的第 8 天,CK 与加入外源 cGMP 的黑麦草种子萌发过程中 MDA 含量无明显差异,100 mmol/L NaCl 单独处理比 CK 和加入 cGMP 处理增加了 1.8 倍和 1.6 倍。

由图 4 可知:随着发芽时间的延长,黑麦草种子萌发过程中脯氨酸含量先上升后下降。盐胁迫增加了黑麦草种子萌发过程中脯氨酸含量,并在第 6 天达到最大值,而后缓慢下降,在处理的整个过程中始终高于 CK;与 100 mmol/L NaCl 单独处理相比,20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl 处理明显增加了黑麦草种子在萌发过程中脯氨酸含量,在处理的 2—8 d,分别提高了 1.5、1.5、1.7 倍和 2.2 倍。

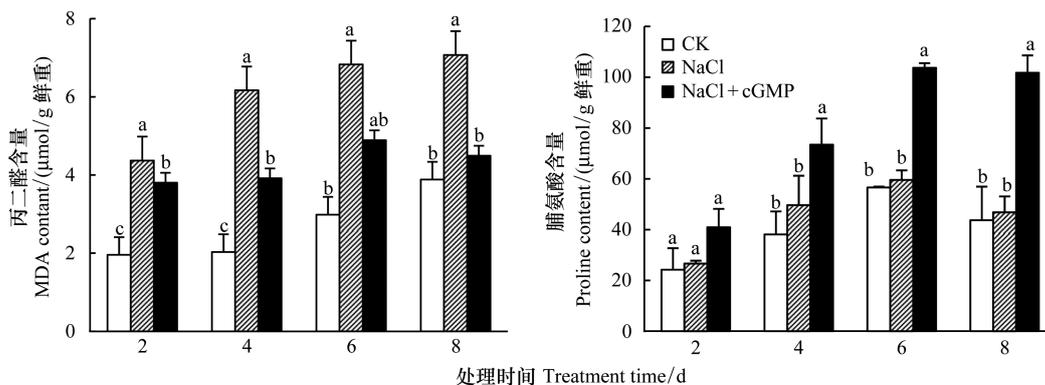


图 4 外源 cGMP 对 NaCl 胁迫下黑麦草种子萌发过程中 MDA 和脯氨酸含量的影响

Fig.4 Effect of exogenous cGMP on the MDA content and proline content in germinating ryegrass seeds under NaCl stress

由图 5 可知:随着发芽时间的延长,黑麦草种子萌发过程中  $\text{O}_2^-$  产生速率逐渐加快,整个处理过程中,3 个处理之间差异显著( $P<0.05$ )。盐胁迫明显促进了种子萌发过程中  $\text{O}_2^-$  的产生速率,而加入外源 cGMP 能明显降低黑麦草种子萌发时  $\text{O}_2^-$  的产生速率,其中在处理的第 6 天,100 mmol/L NaCl 单独处理比 CK 和 20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl 处理的黑麦草种子萌发过程中分别增加了 3.1 倍和 1.6 倍。

相对电导率可反映细胞膜受损伤的程度,如图 5 所示,100 mmol/L NaCl 处理明显增加了黑麦草的相对电导率,并且相对电导率随着处理时间的延长而显著增加,而 CK 变化不明显。20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl 处理黑麦草种子,其相对电导率小于 100 mmol/L NaCl 单独处理,在处理的第 6 天和第 8 天,100 mmol/L NaCl 处理的黑麦草的电导率分别比 CK 和 20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl 处理增加了 1.7、1.4、1.9 倍和 1.3 倍。

由图 5 可以看出:随着发芽时间的延长,黑麦草种子在萌发过程中  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量呈现先上升后下降趋势,其中在第 6 天达到最大值,整个处理过程中,各处理之间差异显著( $P<0.05$ )。盐胁迫明显增加黑麦草种子萌发过程中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的积累,而加入外源 cGMP 能显著降低盐胁迫下  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量的积累,但都比 CK 积累的  $\text{H}_2\text{O}_2$  含量高,其中在处理的第 6 天,100 mmol/L NaCl 单独处理的黑麦草种子内  $\text{H}_2\text{O}_2$  的积累量分别比 CK 和 20  $\mu\text{mol/L}$  cGMP+100 mmol/L NaCl 增加了 2.7 倍和 1.4 倍。

## 3 讨论

### 3.1 不同浓度盐胁迫下黑麦草种子萌发

在植物生长的整个生育期中,种子萌发期和幼苗生长期是最重要的两个阶段,其中种子萌发期是盐胁迫

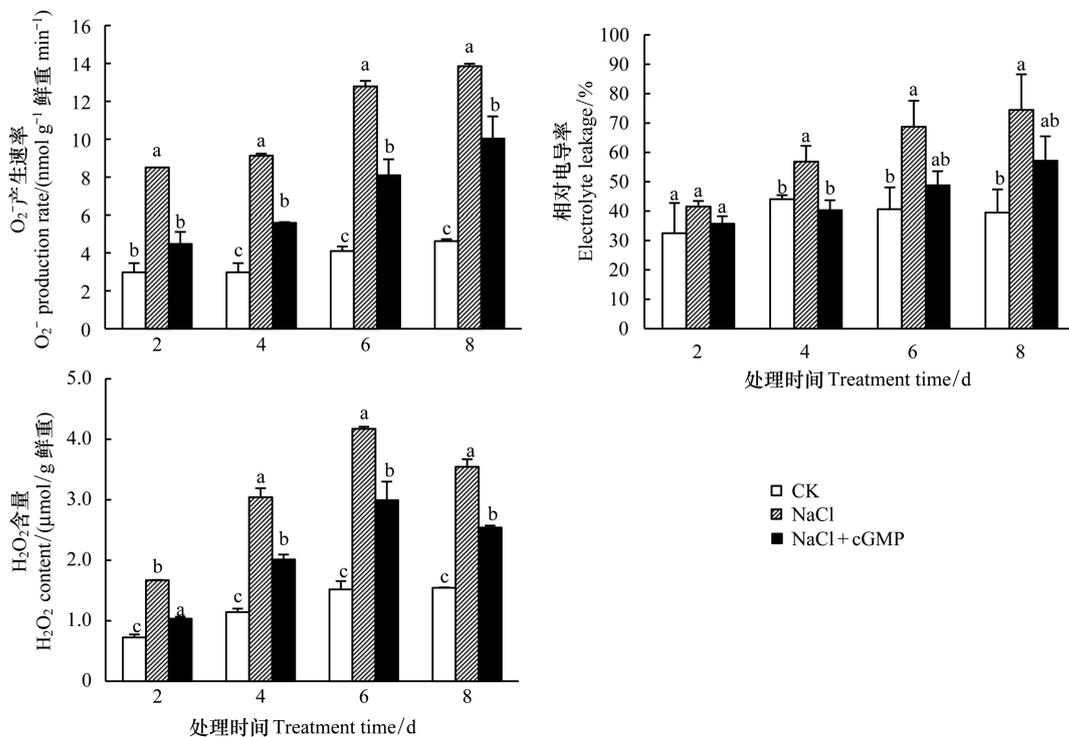


图5 外源 cGMP 对 NaCl 胁迫下黑麦草种子萌发过程中 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、相对电导率和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量的影响

Fig.5 Effect of exogenous cGMP on the O<sub>2</sub><sup>-</sup> production rate, electrolyte leakage and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in germinating ryegrass seeds under NaCl stress

响应比较敏感的阶段,决定着作物的生长及产量<sup>[25]</sup>。盐胁迫影响植物细胞的正常生长代谢过程,导致种子发芽率、发芽势和发芽指数的降低<sup>[26]</sup>。种子萌发率、发芽势和活力指数均可以反映种子发芽能力。一般情况下,发芽率与种子生活力是一致的<sup>[27]</sup>。有研究表明,cGMP 处理提高了拟南芥的抗盐性,表现在盐胁迫下促进拟南芥的生长和种子的萌发<sup>[28]</sup>。本试验发现 NaCl 胁迫对黑麦草种子的作用表现为低浓度促进,高浓度抑制。50 mmol/L 的 NaCl 处理对黑麦草种子萌发有促进作用,而当 NaCl 浓度高于 50 mmol/L 时随处理浓度的升高黑麦草种子萌发率降、发芽势、发芽指数和活力指数均呈下降趋势,且对幼苗和幼根生长的抑制作用加强,这同吴海涛等<sup>[29]</sup>研究结果一致。低浓度的盐溶液对种子萌发具有促进或影响很小,高浓度盐会对种子造成毒害而抑制其萌发,攀瑞萍等<sup>[30]</sup>认为植物在低盐浓度的生长环境能满足幼苗对水分的需求,所以不会造成盐害,并且盐中无机离子作为渗透调节物质在一定程度上还可以促进根系生长。当 NaCl 浓度达到 250 mmol/L 时,黑麦草种子的萌发率为 2.5%,种子活力基本丧失。

植物根系形态变化是生理生化变化的外在表象,而形态发生变化也必然引起内在生理生化指标的变化,二者的变化是相辅相成共同作用抵抗逆境。8-Br-cGMP 是 cGMP 的一种膜透性类似物,cGMP 作为细胞内的一种第二信使,能调节植物对生物或非生物胁迫的适应性。已有报道指出,黄瓜中 cGMP 在生长素诱导的侧根生长中起到了重要作用<sup>[3]</sup>、在绿豆中,cGMP 作为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的下游信号促进绿豆不定根的生长<sup>[31]</sup>。本试验结果表明,20 μmol/LcGMP 对 100 mmol/L NaCl 胁迫下黑麦草种子的发芽率提升作用不明显,但能明显提高黑麦草种子在 100 mmol/L NaCl 胁迫下的发芽势、发芽指数和活力指数。本试验最重要的发现是外源 cGMP 能促进盐胁迫下黑麦草种子萌发时根系的生长,同时也能够促进植株的生长。说明 cGMP 可能是通过促进盐胁迫下的种子根系发育,以此缓解盐胁迫对黑麦草种子萌发时的伤害。

### 3.2 外源 cGMP 对盐胁迫下黑麦草种子萌发时物质代谢的影响

种子萌发过程中需要物质和能量来维持其旺盛的生命活动<sup>[32]</sup>。种子在萌发期间所需要的养料和能量主要来自贮藏物质的转化和利用<sup>[33]</sup>。种子内主要的贮藏物质为淀粉、脂肪和蛋白质。这些物质在种子萌发过

程中水解为简单的营养物质,并运转到生长部位作为构成新组织的成分和产生能量的原料<sup>[34]</sup>。有研究显示 cGMP 对花青素和类黄酮合成是必需的<sup>[35]</sup>,cGMP 能够调节甘薯叶片中伤害响应因子 miR828 的表达<sup>[36]</sup>。说明 cGMP 参与调节植物的防御响应。本试验结果表明;盐胁迫显著降低了淀粉酶活性,抑制了淀粉的水解,抑制了可溶性糖和可溶性蛋白的增加。加入 cGMP 能降低种子内淀粉含量,提高淀粉酶活性,增加了可溶性糖和可溶性蛋白含量。说明,外源 cGMP 增强了盐胁迫下种子内淀粉酶活性,促进了淀粉水解,淀粉作为种子内的一种暂时的贮藏物质,不断水解为可溶性糖以满足种子萌发生长所需要的营养物质。

### 3.3 外源 cGMP 调控盐胁迫下黑麦草种子萌发时脯氨酸、MDA、电导率、O<sub>2</sub><sup>-</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量的影响

渗透调节是植物适应盐害环境的一种重要生理机制,脯氨酸在植物渗透调节中起着重要作用,可以清除活性氧,提高抗氧化能力,稳定生物大分子结构,降低细胞酸性,解除氨毒<sup>[37]</sup>等。本试验研究发现,加入外源 cGMP 能显著提高盐胁迫下黑麦草种子萌发时的脯氨酸含量,且在处理的不同时间,外源 cGMP 处理的黑麦草种子内脯氨酸含量都明显高于 CK 与 100 mmol/L NaCl 单独处理,这有利于缓解盐害对植物造成的伤害。

植物在受到盐害胁迫时,细胞内活性氧代谢平衡会被破坏从而产生活性氧,造成细胞膜系统的损害,引发或加剧膜脂过氧化的作用,最终产物主要为 MDA,并导致植物外渗物质增加,电导率增加。本试验研究发现 100 mmol/L NaCl 处理黑麦草种子萌发过程中,MDA 含量和电导率都明显高于 CK;而 20 μmol/LcGMP+100 mmol/L NaCl 处理的黑麦草种子萌发时 MDA 含量和电导率显著低于 100 mmol/L NaCl 单独处理,但都比 CK 高,说明 cGMP 通过控制 MDA 及外渗物质的含量来保护盐胁迫下植物的生长。

盐胁迫通过产生大量 ROS 使植物受害已有很多报道,本试验表明:在盐胁迫下,黑麦草种子在萌发过程中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量随发芽时间的延长明显增加,说明高浓度的 NaCl 能导致氧化胁迫,这与小麦和玉米等作物上的研究结果类似<sup>[38]</sup>。而与单独盐处理相比,20 μmol/LcGMP+100 mmol/L NaCl 处理的黑麦草种子在萌发过程中 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量显著降低,说明 cGMP 有缓解氧化胁迫的能力。

## 4 结论

盐胁迫对黑麦草种子萌发、幼芽生长、根的发育、渗透调节等生理过程均产生影响,添加外源 cGMP 能促进黑麦草种子根系的发育、幼芽生长,主要原因是:外源 cGMP 可以诱导增加黑麦草种子萌发过程中脯氨酸、可溶性蛋白等渗透调节物质含量来增强渗透调节能力,提高淀粉酶活性促进淀粉溶解最终促进种子萌发,通过减少 MDA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量及 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 产生速率来降低膜脂过氧化,减缓盐胁迫对植物细胞膜的伤害,建议在盐碱地区种植和培育黑麦草过程中,施加 20 μmol/LcGMP,以促进根的发育和幼芽生长,增强黑麦草对盐胁迫的适应能力。

### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Maronedze C, Wong A, Thomas L, Irving H, Gehring C. Cyclic nucleotide monophosphates in plants and plant signaling//Seifert R, ed. Non-canonical Cyclic Nucleotides. Cham: Springer, 2015, 238: 87-103.
- [ 2 ] Irving H R, Gehring C. Molecular methods for the study of signal transduction in plants//Gehring C, ed. Cyclic Nucleotide Signaling in Plants. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, 1016: 1-11.
- [ 3 ] Pagnussat G C, Lanteri M L, Lamattina L. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology*, 2013, 132(3): 1241-1248.
- [ 4 ] Meier S, Gehring C. Emerging roles in plant biotechnology for the second messenger cGMP-guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(19): 1687-1692.
- [ 5 ] Isner J C, Maathuis F J M. Measurement of cellular cGMP in plant cells and tissues using the endogenous fluorescent reporter FlincG. *Plant Journal*, 2011, 65(2): 329-334.
- [ 6 ] Turek I, Gehring C. The plant natriuretic peptide receptor is a guanylyl cyclase and enables cGMP-dependent signaling. *Plant Molecular Biology*, 2016, 91(3): 275-286.
- [ 7 ] Durner J, Wendehenne D, Klessig D F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(17): 10328-10333.
- [ 8 ] Rubio F, Flores P, Navarro J M, Martínez V. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  and cGMP on  $\text{Na}^{+}$  uptake in pepper plants. *Plant Science*, 2003, 165(5): 1043-1049.
- [ 9 ] 刘春英, 张学映, 朱体超, 陈光蓉, 郑章云. 不同黑麦草品种生产性能比较与优势品种筛选. *草业学报*, 2014, 23(4): 39-48.
- [ 10 ] Wallace J M, Curran W S, Mirsky S B, Ryan M R. Tolerance of interseeded annual ryegrass and red clover cover crops to residual herbicides in mid-atlantic corn cropping systems. *Weed Technology*, 2017, 31(5): 641-650.
- [ 11 ] 刘爱荣, 张远兵, 张雪梅, 何小丽, 吴倩. 空心莲子草水浸液对黑麦草和高羊茅种子发芽和幼苗生长的影响. *草业学报*, 2007, 16(5): 96-101.
- [ 12 ] 许能祥, 顾洪如, 丁成龙, 董臣飞, 程云辉, 张文洁, 王兴刚. 多花黑麦草耐盐性及其在盐土条件下饲用品质的研究. *草业学报*, 2013, 22(4): 89-98.
- [ 13 ] 魏晓艳, 梁丹妮, 庞丁铭, 兰剑. 14 个多年生黑麦草品种幼苗期对盐胁迫的生理响应. *安徽农业科学*, 2017, 45(1): 8-12.
- [ 14 ] 梁小红, 艾非凡, 钟天秀, 韩烈保. 多年生黑麦草对干旱-低温交叉适应的生理响应. *草业学报*, 2016, 25(1): 163-170.
- [ 15 ] 冯鹏, 孙力, 申晓慧, 姜成, 李如来, 李增杰, 郑海燕, 张华, 郭伟, 韩旭东, 洪亚楠. 应及富集能力的研究. *草业学报*, 2016, 25(1): 153-162.
- [ 16 ] Zhu J K. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(2): 66-71.
- [ 17 ] 薛延丰, 石志琦, 严少华, 郑建初, 常志州. 利用生理生化参数评价水葫芦沼液浸种可行性初步研究. *草业学报*, 2010, 19(5): 51-56.
- [ 18 ] 胡星云, 孙志高, 张党玉, 孙文广, 祝贺, 任鹏. 黄河口不同氮基质碱蓬种子萌发及幼苗生长对盐分及氮输入响应. *生态学报*, 2017, 37(24): 8499-8510.
- [ 19 ] 李兵兵, 魏小红, 徐严. 麻花秦艽种子休眠机理及其破除方法. *生态学报*, 2013, 33(15): 4631-4638.
- [ 20 ] 姜义宝, 郑秋红, 王成章, 郭玉霞, 李德锋. 超干贮藏对菊苣种子活力与抗氧化性的影响. *草业学报*, 2009, 18(5): 93-97.
- [ 21 ] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [ 22 ] Zhang Z L, Qu W J, Li X F. *Experimental Guide of Plant Physiology*. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2009. (in Chinese)
- [ 23 ] Wang A G, Luo G H. Quantitative relation between the reaction of hydroxylamine and superoxide anion radicals in plants. *Plant Physiology Communications*, 1990, 26(6): 55-57.
- [ 24 ] Jana S, Choudhuri M A. Glycolate metabolism of three submersed aquatic angiosperms during ageing. *Aquatic Botany*, 1982, 12: 345-354.
- [ 25 ] Xu X Y, Fan R, Zheng R, Li C M, Yu D Y. Proteomic analysis of seed germination under salt stress in soybeans. *Journal of Zhejiang University Science B: Biomedicine & Biotechnology*. 2011, 12(7): 507-517.
- [ 26 ] 王玉萍, 董雯, 张鑫, 杨茜, 张峰. 水杨酸对盐胁迫下花椰菜种子萌发及幼苗生理特性的影响. *草业学报*, 2012, 21(1): 213-219.
- [ 27 ] 杨景宁, 王彦荣. NaCl 胁迫对四种荒漠植物种子萌发的影响. *草业学报*, 2012, 21(5): 32-38.
- [ 28 ] Li J S. Studies on the mechanism of regulations of G6PDH, cGMP,  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Ca}^{2+}$  in plant adaptation to salt tolerance[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2011.
- [ 29 ] 范燕, 闵丹丹, 郭正刚, 冯葆昌, 胡小文. 多年生黑麦草种子萌发及苗期耐盐性的比较. *草业科学*, 2017, 34(4): 724-734.
- [ 30 ] 樊瑞苹, 周琴, 周波, 江海东. 盐胁迫对高羊茅生长及抗氧化系统的影响. *草业学报*, 2012, 21(1): 112-117.
- [ 31 ] Li S W, Xue L G. The interaction between  $\text{H}_2\text{O}_2$  and NO,  $\text{Ca}^{2+}$ , cGMP, and MAPKS during adventitious rooting in mung bean seedlings. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2010, 46(2): 142-148.
- [ 32 ] 张巍巍, 郑飞翔, 王效科, 冯兆忠, 欧阳志云. 臭氧对水稻根系活力、可溶性蛋白含量与抗氧化系统的影响. *植物生态学报*, 2009, 33(3): 425-432.
- [ 33 ] 列滢文, 叶龙华, 薛立. 臭氧胁迫对植物主要生理功能的影响. *生态学报*, 2014, 34(2): 294-306.
- [ 34 ] Kim Y H, Lim S, Han S H, Lee J C, Song W K, Bang W K, Kwon S Y, Lee H S, Kwak S S. Differential expression of 10 sweetpotato peroxidases in response to sulfur dioxide, ozone, and ultraviolet radiation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45(12): 908-914.
- [ 35 ] Szmjdt-Jaworska A, Jaworski K, Kopcewicz J. Cyclic GMP stimulates flower induction of *Pharbitis nil* via its influence on cGMP regulated protein kinase. *Plant Growth Regulation*, 2009, 57(2): 115-126.
- [ 36 ] Suita K, Kiryu T, Sawada M, Mitsui M, Nakagawa M, Kanamaru K, Yamagata H. Cyclic GMP acts as a common regulator for the transcriptional activation of the flavonoid biosynthetic pathway in soybean. *Planta*, 2009, 229(2): 403-413.
- [ 37 ] 樊怀福, 郭世荣, 焦彦生, 张润花, 李娟. 外源一氧化氮对 NaCl 胁迫下黄瓜幼苗生长、活性氧代谢和光合特性的影响. *生态学报*, 2007, 27(2): 546-553.
- [ 38 ] 张国明, 顾为, 吴之正, 史培军, 王静爱. 海冰水不同盐含量处理对棉花、小麦和玉米种子萌发影响. 北京师范大学: 自然科学版, 2006, 42(2): 209-212.