

DOI: 10.11686/cyxb2024400

http://cyxb.magtech.com.cn

刘沂欣, 隋晓青, 王鑫尧, 等. 外源褪黑素对盐胁迫下紫花苜蓿的缓解作用. 草业学报, 2025, 34(9): 206—214.

LIU Yi-xin, SUI Xiao-qing, WANG Xin-yao, *et al.* Mitigating effects of exogenous melatonin on alfalfa under salt stress. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(9): 206—214.

外源褪黑素对盐胁迫下紫花苜蓿的缓解作用

刘沂欣, 隋晓青*, 王鑫尧, 郎梦卿, 孙凌子寅, 吉尔尔格

(新疆农业大学草业学院, 西部干旱荒漠区草地资源与生态教育部重点实验室, 新疆草地资源与生态重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要: 盐胁迫严重制约植物的生长, 对农业可持续发展造成威胁。褪黑素是一种强大的抗氧化剂, 在不同植物抵抗各种胁迫环境中发挥着重要作用。以‘公农1号’紫花苜蓿(‘Gongnong No. 1’)为材料, 通过水培试验探究不同浓度外源褪黑素对 $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl胁迫下紫花苜蓿生理特性的影响和调节。结果显示, 外施 50 、 100 、 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑素均可缓解盐胁迫给苜蓿幼苗带来的一系列生理损伤, 例如: 增加盐胁迫下游离脯氨酸、可溶性蛋白和可溶性糖等渗透调节物质含量。增加盐胁迫下羟自由基清除率, 降低丙二醛、过氧化氢含量和相对电导率等损伤, 增加超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶、谷胱甘肽S-转移酶、谷胱甘肽还原酶等抗氧化酶活性和抗坏血酸、还原型谷胱甘肽等抗氧化物含量, 增加 K^+ 含量, 降低 Na^+ 含量以平衡离子稳态; 但 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑素会给苜蓿造成渗透应激、氧化胁迫和离子失衡等不利影响。主成分分析表明过氧化氢酶活性、过氧化氢含量和 K^+/Na^+ 可作为评价紫花苜蓿耐盐性的关键指标。运用隶属函数对 17 个生理指标进行综合评价, 结果显示, $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 褪黑素处理对盐胁迫缓解效果最佳。本研究结果进一步表明, 褪黑素通过两种方式增强苜蓿对盐胁迫的抵抗力: 一种是通过直接途径, 如直接清除活性氧; 另一种是通过间接途径, 如通过增强抗氧化酶系统、渗透调节物质等代谢物含量, 调节离子稳态。

关键词: 紫花苜蓿; 褪黑素; 盐胁迫; 缓解作用; 综合评价

Mitigating effects of exogenous melatonin on alfalfa under salt stress

LIU Yi-xin, SUI Xiao-qing*, WANG Xin-yao, LANG Meng-qing, SUN Ling-zi-yin, JIER Er-ge

College of Grassland, Xinjiang Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Resources and Ecology, Ministry of Education, Western Arid Desert Region, Xinjiang Key Laboratory of Grassland Resources and Ecology, Urumqi 830052, China

Abstract: Salt stress severely restricts plant growth and poses a threat to sustainable agricultural development. Melatonin is a powerful antioxidant that plays an important role in the resistance of different plants to various stressful environments. This research was conducted using ‘Gongnong No. 1’ alfalfa (*Medicago sativa*), and the effect and regulation of physiological characteristics of alfalfa under $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl stress when different concentrations of exogenous melatonin were applied, were investigated in hydroponically grown plants. It was found that external application of 50 , 100 and $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ melatonin alleviated various symptoms of physiological damage to alfalfa seedlings caused by salt stress. For example, under salt stress exogenous melatonin increased the content of osmotic adjustment substances such as free proline, soluble protein and soluble sugar, the hydroxyl radical scavenging rate was increased under salt stress, and the damage of malondialdehyde, hydrogen peroxide content and relative conductivity was reduced. Exogenous melatonin also increased the activity of antioxidant enzymes such as superoxide

收稿日期: 2024-10-16; 改回日期: 2024-12-02

基金项目: 农业生物育种重大项目(2022ZD0401104)和第三次新疆综合科学考察项目(2022xjkk0401)资助。

作者简介: 刘沂欣(1999—), 女, 河南鹤壁人, 在读硕士。E-mail: liuyixin202203@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: sxq303@163.com

dismutase, catalase, peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione reductase and the content of antioxidant such as ascorbic acid and reduced glutathione. Finally, exogenous melatonin increased the content of K^+ and reduced the content of Na^+ which acted to balance ionic homeostasis. However, $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ melatonin caused osmotic stress, oxidative stress and ionic imbalance in alfalfa. Principal component analysis indicated that catalase activity, hydrogen peroxide content and $K^+ : Na^+$ could be used as key indicators for evaluating alfalfa for salt tolerance. The results of a multi-trait evaluation of 17 physiological indexes using an affiliation function methodology showed that $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ melatonin treatment provided the most effective salt stress alleviation. A further insight from the results of this experiment was that melatonin enhances the resistance of alfalfa to salt stress in two ways: one is through direct pathways, such as direct scavenging of reactive oxygen species; the other is through indirect pathways, such as regulation of ionic homeostasis through the enhancement of metabolite content of the antioxidant enzyme system and osmoregulatory substances.

Key words: alfalfa; melatonin; salt stress; mitigating effects; comprehensive evaluation

盐胁迫作为普遍存在的环境胁迫因素之一,会对植物造成渗透、离子和氧化胁迫,严重制约着农业生产^[1]。植物在受到盐胁迫时,土壤或溶液中 Na^+ 和 Cl^- 的过度积累会破坏植物中的离子平衡,最终导致渗透应激、光合作用抑制和抗氧化系统失衡等一系列的改变^[2]。紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是全球栽培最早、分布最广的多年生豆科优质牧草,因其产草量高、品质好、适应性强而被誉为“牧草之王”^[3]。种植紫花苜蓿不仅可改善生态环境,还可使其成为改善天然和人工草原的优势种^[4]。随着畜牧业的快速发展,我国对高产优质牧草的需求逐年增加,目前仍有 40%~60% 的缺口,紫花苜蓿所具有的生态和经济价值使其成为饲料行业的主力军^[5-7]。

褪黑素 (melatonin, MT) 是一种常见的吲哚杂环化合物,广泛存在于植物和动物中^[8]。相关研究表明,MT 在调节植物生长和响应生物与非生物胁迫方面起重要作用,并参与调节许多生理过程,包括种子发芽、开花和结果以及矿物元素吸收等^[9-10]。近年来,随着盐渍化土地的扩大,牧草将面临盐胁迫的威胁。因此,提高牧草的耐盐性将有利于减少盐害对其的负面影响。然而,MT 对牧草盐胁迫的作用在很大程度上仍然未知。基于此,本研究以紫花苜蓿为材料,探索外源 MT 对紫花苜蓿幼苗盐胁迫的潜在作用,期望找出提高紫花苜蓿耐盐性的适宜 MT 浓度,并为苜蓿耐盐栽培措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验地点和材料

本试验于 2023 年 10 月—2024 年 5 月在西部干旱荒漠区草地资源与生态教育部重点实验室,新疆农业大学新疆草地资源与生态重点实验室进行。以‘公农 1 号’紫花苜蓿 (*M. sativa* ‘Gongnong No. 1’) 为试验材料,种子由新疆农业大学提供。褪黑素购于山东优索化工科技有限公司,纯度 99%,避光存放至 -20°C 冰箱。

1.2 试验设计

选取颗粒饱满的种子置于质量分数为 8% 的 $NaClO$ 溶液中消毒 15 min,用蒸馏水清洗 4~5 遍后将种子擦干,置于铺有双层滤纸的培养皿中,每皿 100 粒,滤纸用蒸馏水完全浸湿后,置于人工气候箱 (恒温 25°C 、湿度 80%) 中培养至发芽,光周期设置为 12 h/12 h (昼/夜),将 10 日龄幼苗用海绵包裹固定在泡沫板孔内,移苗至装有 1/2 Hoagland's 营养液 (KNO_3 、 $NH_4H_2PO_4$ 、 $MgSO_4$ 等) 的水培盒 ($290 \text{ mm} \times 130 \text{ mm} \times 110 \text{ mm}$) 内进行培养,每 3 d 更换一次培养液。4 周后挑选长势一致的苜蓿进行胁迫处理。试验共设置 10 个处理 (表 1),CK 组为空白对照,仅采用 Hoagland's 培养,每 2 d 对苜蓿叶片正反面喷施 50 mL 的蒸馏水;添加 MT 的处理 (MT 组),采用 Hoagland's 培养,每 2 d 对苜蓿叶片正反面喷施 50 mL 的 MT 溶液;N 组为未添加 MT 的盐胁迫处理,每 2 d 对苜蓿进行根灌处理;NM 组为添加 MT 的盐胁迫处理,正式胁迫开始前用不同浓度的褪黑素对其进行预处理 48 h,之后每 2 d 对苜蓿叶片正反面喷施 1 次 50 mL 的 MT。上述处理胁迫时长为 7 d,统一于傍晚进行喷施,共计喷施 3 次。

表1 各处理组分及浓度

Table 1 Treatment components and concentrations

处理 Treatment	霍格兰营养液 Hoagland's nutrient solution (g·L ⁻¹)	NaCl (mmol·L ⁻¹)	褪黑素 Melatonin (MT, μmol·L ⁻¹)	处理 Treatment	霍格兰营养液 Hoagland's nutrient solution (g·L ⁻¹)	NaCl (mmol·L ⁻¹)	褪黑素 Melatonin (MT, μmol·L ⁻¹)
CK	1.96	0	0	N	1.96	150	0
MT ₁	1.96	0	50	NM ₁	1.96	150	50
MT ₂	1.96	0	100	NM ₂	1.96	150	100
MT ₃	1.96	0	150	NM ₃	1.96	150	150
MT ₄	1.96	0	200	NM ₄	1.96	150	200

1.3 紫花苜蓿植株叶片生理指标的测定

丙二醛含量采用硫代巴比妥酸法测定^[11];相对电导率使用电导率仪(STARTER 3100C,美国)测定;可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250(Coomassie Brilliant Blue G-250)染色法测定^[12];可溶性糖含量采用蒽酮比色法测定^[12]。脯氨酸含量采用磺基水杨酸法测定^[13];超氧化物歧化酶活性采用氮蓝四唑(nitro blue tetrazolium, NBT)光还原法测定^[14];过氧化氢酶活性采用紫外吸收法测定^[11];过氧化物酶活性采用愈创木酚法测定^[12];谷胱甘肽 S-转移酶活性采用紫外吸收法测定^[13];谷胱甘肽还原酶活性采用紫外吸收法测定^[13];抗坏血酸、还原型谷胱甘肽、过氧化氢含量均使用紫外吸收法测定^[14-15];羟自由基清除率采用分光光度法测定^[16];称取 0.10 g 叶片放置于消解管,加入浓硫酸在马弗炉中消解,加入过氧化氢消解至无色,冷却后定容过滤,采用火焰光度计(Sherwood M410,英国)测定 Na⁺和 K⁺含量^[17]。以上所有测定指标均重复 3 次。

1.4 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件对试验数据进行方差分析和主成分分析(principal component analysis, PCA),用 EXCEL 2020 处理数据,使用 Origin 2024 作图。

2 结果与分析

2.1 外源 MT 对盐胁迫下紫花苜蓿叶片渗透调节物质的缓解效果

外源 MT 处理后,紫花苜蓿叶片中游离脯氨酸(free proline, Pro)、可溶性蛋白(soluble protein, SP)和可溶性糖(soluble sugar, SS)含量均有所提高,且均呈先升高后降低的趋势(图 1)。在未添加盐胁迫时,紫花苜蓿叶片中 Pro、SP、SS 含量均在 MT₃ 处理下最高,与 CK 相比分别增加了 50.35%、34.38%、102.91%,且 Pro 和 SS 含量在

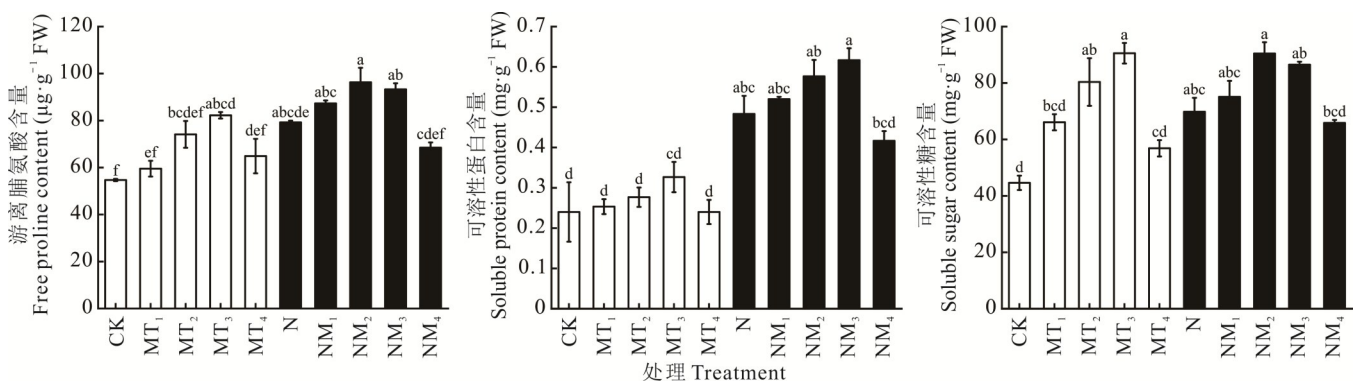


图1 外源褪黑素对盐胁迫下紫花苜蓿叶片渗透调节物质的缓解效果

Fig. 1 Mitigating effects of exogenous melatonin on osmoregulatory substances in alfalfa leaves under salt stress

FW: 鲜重 Fresh weight. 不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$), 下同。Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$), the same below.

二者之间差异显著;在给予 $150 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐胁迫处理后,各指标的含量在 N 处理下显著高于 CK ($P<0.05$)。在盐胁迫下应用外源 MT 后,紫花苜蓿叶片 Pro、SS 含量均在 NM_2 处理下最高,相比 CK 分别显著提高了 76.08%、102.73% ($P<0.05$),相比 N 处理分别增加了 21.53%、29.57%。紫花苜蓿叶片中 SP 含量在 NM_3 处理下最高,较 CK 显著提高了 154.07% ($P<0.05$),较 N 处理上升了 27.10%。

2.2 外源 MT 对盐胁迫下紫花苜蓿叶片抗氧化能力的缓解效果

2.2.1 外源 MT 对盐胁迫下紫花苜蓿叶片氧化伤害和细胞膜稳定性的缓解效果

外源 MT 处理后,在未添加盐处理时,羟自由基清除率(hydroxyl free radical clearance rate, Hf)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)含量、相对电导率(relative conductivity, RC)均在 MT_4 处理下与 CK 表现出显著性差异 ($P<0.05$),较 CK 分别增加了 56.70%、78.97%、116.52% 和 118.91%;在添加盐处理后,N 处理较 CK 分别提高了 63.39%、89.59%、105.43% 和 218.79%,且均与 CK 表现出显著性差异 ($P<0.05$)。羟自由基清除率在 NM_2 处理下达到最高值,较 N 处理增加了 40.07%。MDA、 H_2O_2 、RC 在 NM_3 处理下达到最低值,较 N 处理分别下降了 36.40%、34.21% 和 36.11%(图 2)。

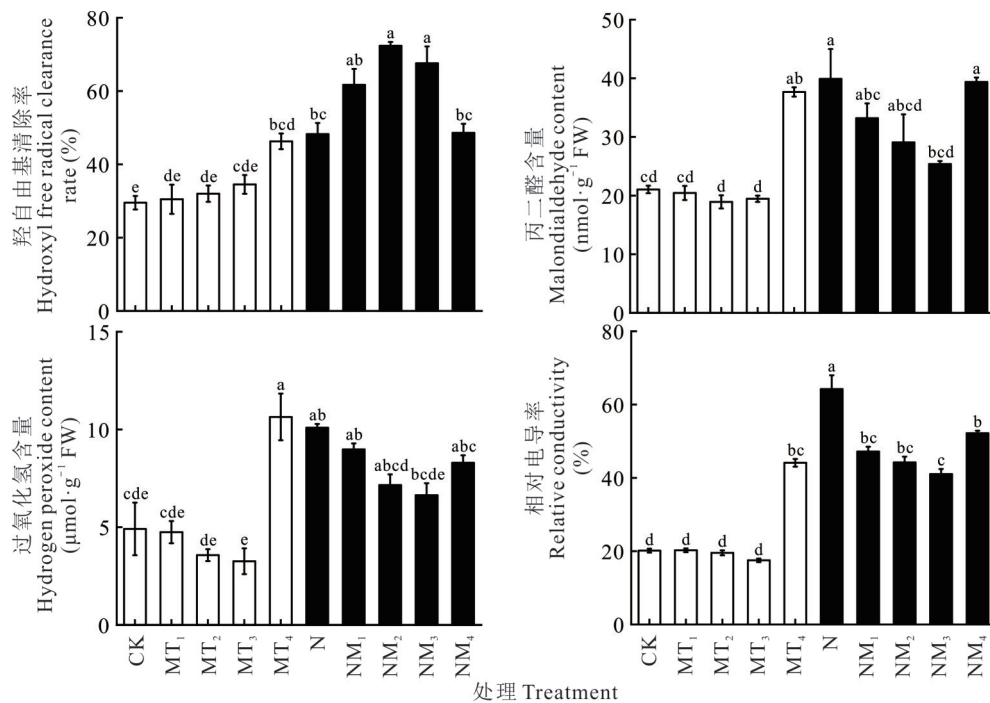


图 2 外源褪黑素对盐胁迫下紫花苜蓿叶片氧化伤害和细胞膜稳定性的缓解效果

Fig. 2 Mitigating effects of exogenous melatonin on oxidative damage and cell membrane stability in alfalfa leaves under salt stress

2.2.2 外源 MT 对盐胁迫下紫花苜蓿叶片抗氧化酶活性的缓解效果

MT 处理后,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性整体上呈上升趋势(图 3)。未添加盐胁迫时,SOD、CAT、POD、GST 活性均在 MT_3 处理下达到最高值,较 CK 分别增加了 26.21%、21.62%、45.60% 和 51.10%。GR 活性在 MT_4 处理下最高,较 CK 提高了 40.06%。SOD 活性在各处理间无显著差异 ($P>0.05$),在 MT_3 处理下,其 GST 活性较 CK 差异显著 ($P<0.05$),CAT、POD 和 GR 活性与 CK 相比均无显著差异 ($P>0.05$);添加盐胁迫后,各抗氧化酶活性均在 NM_3 处理下达到最高值。

2.2.3 外源 MT 对盐胁迫下紫花苜蓿叶片抗氧化物含量的缓解效果

外源 MT 处理后,抗坏血酸(ascorbic acid, ASA)和还原型谷胱甘肽(glutathione reduced, GSH)含量较 CK 均有所上升(图 4)。未添加盐胁迫时,ASA

含量在 MT_3 处理下达到最高值且与 CK 表现出显著性差异 ($P < 0.05$), GSH 含量在 MT_4 处理下达到最高值且与 CK 表现出显著性差异 ($P < 0.05$); 在添加盐胁迫后, N 处理的 ASA 和 GSH 含量与 CK 相比有所提高, 且均在 NM_2 处理下达到最高值, 较 CK 分别提高了 246.93%、40.09%, 且差异显著 ($P < 0.05$), 较 N 处理分别提高了 125.03% 和 110.09%。

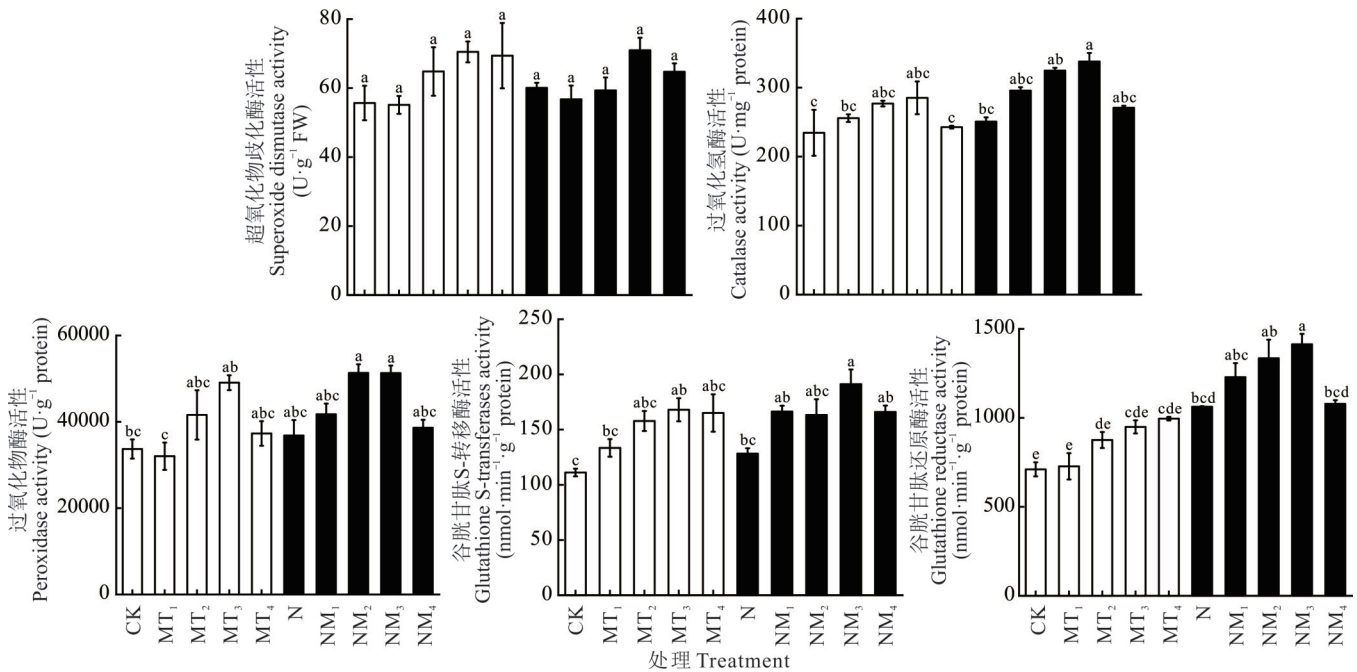


图3 外源褪黑素对盐胁迫下紫花苜蓿叶片抗氧化酶活性的缓解效果

Fig. 3 Mitigating effects of exogenous melatonin on antioxidant enzyme activities of alfalfa leaves under salt stress

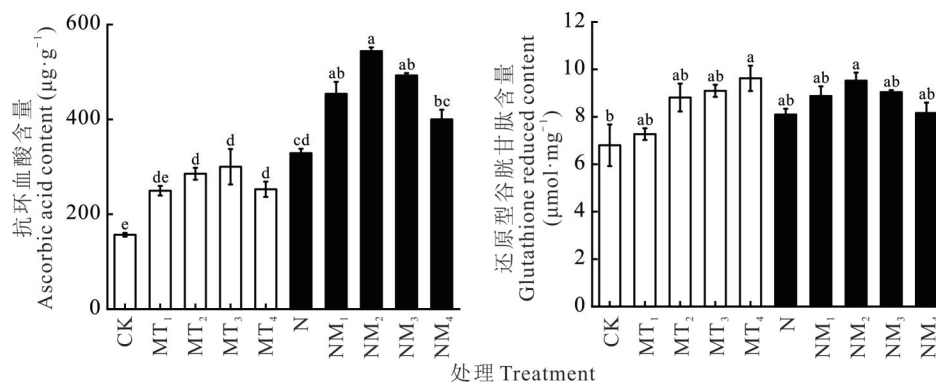


图4 外源褪黑素对盐胁迫下紫花苜蓿叶片抗氧化物含量的缓解效果

Fig. 4 Mitigating effects of exogenous melatonin on antioxidant content of alfalfa leaves under salt stress

2.3 外源MT对盐胁迫下紫花苜蓿离子稳态的缓解效果

外源MT处理后,在未添加盐胁迫时, K^+ 含量和 K^+/Na^+ 均在 MT_3 处理下达到最高值, 且均与 CK 表现出显著性差异 ($P < 0.05$), 二者在 MT_4 处理下显著低于 CK ($P < 0.05$, 图5)。而 Na^+ 含量在 MT_4 处理下达到最高值, 且与 CK 表现出显著性差异 ($P < 0.05$); 添加盐胁迫后, K^+ 含量和 K^+/Na^+ 在 N 处理下较 CK 显著下降了 45.19%、72.47% ($P < 0.05$), 且二者均在 NM_3 处理下达到最高值, 较 N 处理分别增加了 48.97%、183.67%。 Na^+ 含量在 N 处理下达到最高值, 较 CK 显著增加了 103.46% ($P < 0.05$), NM_2 处理下的 Na^+ 含量最低, 较 N 处理下降了 47.79%, 但与 NM_3 处理间差异不显著 ($P > 0.05$)。

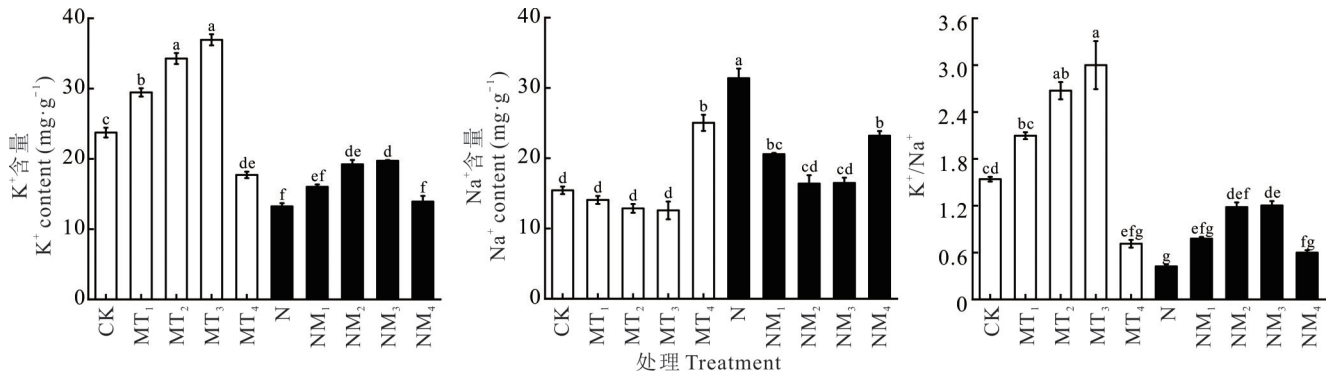


图 5 外源褪黑素对盐胁迫下紫花苜蓿离子稳态的缓解效果

Fig. 5 Mitigating effects of exogenous melatonin on ionic homeostasis in alfalfa under salt stress

2.4 主成分分析

对紫花苜蓿的 17 个生理指标进行主成分分析,获得因子载荷和贡献率(表 2)。3 个主成分累计贡献率高达 82.00%,可有效反映供试材料耐盐性的绝大部分信息。在第 1 个主成分(PC1)中,过氧化氢酶活性具有最高的因子载荷,为 0.93;在第 2 个主成分(PC2)中,过氧化氢含量具有最高的因子载荷,为 0.75;在第 3 个主成分中(PC3),K⁺/Na⁺具有最高的因子载荷,为 0.84。因此,过氧化氢酶活性、过氧化氢含量和 K⁺/Na⁺可作为筛选紫花苜蓿耐盐性的关键指标。

2.5 隶属函数综合评价

运用隶属函数对 10 个处理下紫花苜蓿的 17 个生理指标进行综合评价(表 3),经叶面喷施不同浓度 MT 处理后的平均隶属度均高于 CK,其中,在 MT 浓度为 150 μmol·L⁻¹的 NM₃处理下平均隶属度最高,为 0.73。MT 浓度为 100 μmol·L⁻¹的 NM₂处理次之,为 0.70。

3 讨论

在盐胁迫下,渗透调节是植物抵抗盐诱导的渗透胁迫的有效策略。植物在遭受逆境时会通过合成和积累有机渗透压来提高渗透调节能力,逆境下植物渗透调节物质含量的高低与植物渗透调节能力的大小密切相关^[18]。本研究中,在 NaCl 胁迫时,紫花苜蓿植株叶片中的 Pro、SP 和 SS 含量均有所增加。这表明植物会通过自身产生渗透调节物质来抵抗逆境损伤。

在 MT 处理后,其渗透调节物质水平得到进一步提高。这说明 MT 能促进植物体内渗透调节物质的产生。相关研究^[19]表明,在盐诱导的渗透胁迫下,MT 会增加高粱(*Sorghum bicolor*)幼苗中的 Pro 和 SS 水平。廖聆孜等^[20]研究表明,应用外源 MT 可显著增加盐胁迫下盐肤木(*Rhus chinensis*)幼苗的 Pro、SP 和 SS 含量。这种作用归因于 MT 刺激盐肤木叶片中代谢产物和新蛋白质的合成,并通过增强渗透调节来减轻盐胁迫带来的渗透应激。

植物为了响应盐胁迫会启动自身的抗逆调节机制,因此体内会产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS),ROS 包括羟自由基、H₂O₂ 和 MDA 等膜脂过氧化产物。ROS 过量堆积会打破细胞中 ROS 清除机制的动

表 2 主成分分析

Table 2 Principal component analysis

生理指标 Physiological index	主成分 1 PC1	主成分 2 PC2	主成分 3 PC3
过氧化氢酶 Catalase	0.93	0.07	-0.14
丙二醛 Malondialdehyde	0.92	0.19	-0.07
过氧化物酶 Peroxidase	0.88	0.28	-0.17
可溶性糖 Soluble sugar	0.86	0.14	-0.32
游离脯氨酸 Free proline	0.78	0.46	-0.11
可溶性蛋白 Soluble protein	0.76	-0.59	0.00
相对电导率 Relative conductivity	0.62	0.61	-0.13
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	0.57	0.41	0.43
谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase	0.52	0.33	0.28
还原型谷胱甘肽 Glutathione reduced	0.43	-0.81	0.15
过氧化氢 Hydrogen peroxide	-0.62	0.75	0.07
谷胱甘肽还原酶 Glutathione reductase	0.49	0.73	0.00
抗坏血酸 Ascorbic acid	0.57	-0.71	0.17
羟自由基清除率 Hydroxyl free radical clearance rate	-0.66	0.71	0.10
钾离子 K ⁺	0.54	-0.70	0.24
钠离子 Na ⁺	0.55	0.64	0.09
K ⁺ /Na ⁺	0.20	0.23	0.84
贡献率 Contribution rate (%)	44.69	29.74	7.57
累计贡献率 Cumulative contribution rate (%)	44.69	74.43	82.00

表3 隶属函数综合评价

Table 3 Comprehensive evaluation of membership functions

指标 Index	CK	MT ₁	MT ₂	MT ₃	MT ₄	N	NM ₁	NM ₂	NM ₃	NM ₄
过氧化氢酶 Catalase	0.00	0.21	0.41	0.49	0.08	0.16	0.59	0.87	1.00	0.35
丙二醛 Malondialdehyde	0.10	0.07	0.00	0.03	0.89	1.00	0.68	0.48	0.31	0.98
过氧化物酶 Peroxidase	0.09	0.00	0.50	0.88	0.27	0.25	0.50	1.00	1.00	0.34
可溶性糖 Soluble sugar	0.00	0.47	0.78	1.00	0.27	0.55	0.66	1.00	0.91	0.46
游离脯氨酸 Free proline	0.00	0.12	0.47	0.66	0.24	0.59	0.78	1.00	0.93	0.33
可溶性蛋白 Soluble protein	0.01	0.04	0.10	0.23	0.00	0.65	0.75	0.90	1.00	0.48
相对电导率 Relative conductivity	0.06	0.06	0.04	0.00	0.57	1.00	0.64	0.57	0.50	0.74
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	0.03	0.00	0.61	0.97	0.90	0.31	0.10	0.26	1.00	0.61
谷胱甘肽 S-转移酶 Glutathione S-transferase	0.00	0.28	0.58	0.71	0.67	0.21	0.69	0.65	1.00	0.68
还原型谷胱甘肽 Glutathione reduced	0.00	0.17	0.71	0.81	1.00	0.46	0.74	0.97	0.79	0.48
过氧化氢 Hydrogen peroxide	0.22	0.20	0.04	0.00	1.00	0.93	0.78	0.53	0.46	0.68
谷胱甘肽还原酶 Glutathione reductase	0.00	0.02	0.23	0.34	0.41	0.50	0.74	0.89	1.00	0.52
抗坏血酸 Ascorbic acid	0.00	0.24	0.33	0.37	0.25	0.44	0.77	1.00	0.87	0.63
羟自由基清除率 Hydroxyl free radical clearance rate	0.00	0.02	0.06	0.12	0.39	0.44	0.75	1.00	0.89	0.45
钾离子 K ⁺	0.44	0.68	0.89	1.00	0.19	0.00	0.12	0.25	0.27	0.03
钠离子 Na ⁺	0.15	0.08	0.02	0.00	0.66	1.00	0.43	0.20	0.21	0.56
K ⁺ /Na ⁺	0.43	0.65	0.87	1.00	0.11	0.00	0.14	0.29	0.30	0.07
D值 D value	0.09	0.19	0.39	0.51	0.47	0.50	0.58	0.70	0.73	0.49
排名 Ranking	10	9	8	4	7	5	3	2	1	6

态平衡,从而导致氧化损伤的形成,逆境胁迫下的植物为了抵御氧化损伤,进化出了一套体系健全的抗氧化系统,这套系统主要包括酶促系统(SOD、POD、CAT、GST、GR等)和非酶促系统(ASA、GSH等)^[10,21]。MT是一种抗氧化剂,可直接或间接清除植物中的ROS,在减轻非生物胁迫诱导的氧化应激中发挥着至关重要的作用^[22]。在本研究中,50、100、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT下的羟自由基清除率较单独盐处理显著提高。MDA、H₂O₂和RC作为鉴定植物耐盐性的重要生理指标,其水平与细胞膜结构完整性呈负相关,可直接反映植物细胞膜受损程度。先前研究^[23-27]表明,MT通过增强抗氧化能力来维持较低的MDA、H₂O₂和RC含量,以应对各种胁迫。同样,在本研究中,MT处理的植株在胁迫条件下MDA、H₂O₂和RC降低,同时SOD、CAT、POD、GST和GR活性以及ASA、GSH含量增加,这也进一步证实了MT在改善盐胁迫方面的显著作用。

叶片是重要的代谢器官之一,保持叶片中低Na⁺含量和高水平K⁺/Na⁺对维持细胞代谢至关重要^[28-29],在盐胁迫条件下,植物体内的Na⁺过度富集,会抑制K⁺的吸收并打破K⁺/Na⁺平衡,导致细胞内离子稳态失衡,造成离子毒害^[30]。先前研究表明,MT可降低盐胁迫下香椿(*Toona sinensis*)幼苗中Na⁺含量^[31]。本研究中,在盐胁迫处理下,应用MT后的紫花苜蓿植株叶片的Na⁺含量低于单独盐处理的植株。表明Na⁺含量在植株中的负荷受到了MT的抑制,与此同时,MT改善了盐胁迫下K⁺的吸收^[32],本研究也证实了这一点。

4 结论

植物体内渗透调节物质(Pro、SP、SS),抗氧化酶系统(SOD、CAT、POD、GST、GR、ASA、GSH),K⁺/Na⁺平衡与植物耐盐性密切相关。本研究表明外源施加50、100、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MT均可直接清除羟自由基、H₂O₂和MDA等活性氧,缓解盐胁迫带来的氧化损伤和渗透应激,并且通过调节Na⁺和K⁺的含量来重建离子稳态。植物的耐盐机制本身是一个复杂的调控网络,本研究仅探索了MT调控紫花苜蓿在盐胁迫下的生理生化等作用,其相关的调控基因和代谢途径尚不明晰,未来可进一步研究外源褪黑素介导紫花苜蓿内源激素合成过程及代谢途径和分子机制。

参考文献 References:

- [1] Wang J J, Lv P H, Yan D, *et al.* Exogenous melatonin improves seed germination of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(15): 8436.
- [2] Li X Y, Xie L N. Research progress in Na⁺ regulation mechanism of plants under salt stress. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(7): 148–155.
李晓院, 解莉楠. 盐胁迫下植物Na⁺调节机制的研究进展. *生物技术通报*, 2019, 35(7): 148–155.
- [3] Zhao L J, Ma D M, Wang W J, *et al.* Effect of exogenous melatonin on antioxidant capacity and photosynthetic efficiency of alfalfa seedling under salt stress. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2021, 41(8): 1355–1363.
赵丽娟, 麻冬梅, 王文静, 等. 外源褪黑素对盐胁迫下紫花苜蓿幼苗抗氧化能力以及光合作用效率的影响. *西北植物学报*, 2021, 41(8): 1355–1363.
- [4] Zhao L X, Wang L, Wen L, *et al.* Adaptation mechanism and cultivation strategy of alfalfa in saline soil. *Grassland and Turf*, 2022, 42(1): 142–149.
赵力兴, 王琳, 温丽, 等. 盐碱地紫花苜蓿的适应机制与栽培策略. *草原与草坪*, 2022, 42(1): 142–149.
- [5] Gao F, Wang T M, Lu X S. Analysis of production situation of commercial forage in China in 2021 and trend outlook in 2022. *Animal Agriculture*, 2022(3): 32–37.
高菲, 王铁梅, 卢欣石. 2021年我国商品饲草生产形势分析与2022年趋势展望. *畜牧产业*, 2022(3): 32–37.
- [6] Shi J H, Lu Q, Zhang G J, *et al.* Research progress on the effects of salt stress on growth, development, and nutritional quality of alfalfa. *Grassland and Prataculture*, 2024, 36(1): 1–7.
史金红, 卢强, 张桂杰, 等. 盐胁迫对紫花苜蓿生长发育及营养品质影响的研究进展. *草原与草业*, 2024, 36(1): 1–7.
- [7] Wang Q Q, Xie J H, Yu L Q, *et al.* Research progress and prospect of alfalfa breeding in China. *Journal of Grassland and Forage Science*, 2023(4): 1–7.
王旗旗, 解继红, 于林清, 等. 我国苜蓿育种研究进展及展望. *草学*, 2023(4): 1–7.
- [8] Zhang T G, Shi Z F, Zhang X H, *et al.* Alleviating effects of exogenous melatonin on salt stress in cucumber. *Scientia Horticulturae*, 2020, 262: 109070.
- [9] Ren J H, Ye J, Yin L N, *et al.* Exogenous melatonin improves salt tolerance by mitigating osmotic, ion, and oxidative stresses in maize seedlings. *Agronomy*, 2020, 10(5): 663.
- [10] Chen Y E, Mao J J, Sun L Q, *et al.* Exogenous melatonin enhances salt stress tolerance in maize seedlings by improving antioxidant and photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*, 2018, 164(3): 349–363.
- [11] Cui Q L. Effect of water stress on membrane permeability and malondialdehyde content in seabuckthorn cells. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2017(11): 139, 145.
崔庆利. 水分胁迫对沙棘细胞膜透性及丙二醛含量的影响. *现代农业科技*, 2017(11): 139, 145.
- [12] Wang M C. Effect of pea aphid hazard on soluble protein and tannin content changes of four alfalfa cultivars (lines). *Modern Agriculture*, 2020(8): 24–25.
王明春. 豌豆蚜危害对四种苜蓿品种(系)可溶性蛋白和单宁含量变化的影响. *现代农业*, 2020(8): 24–25.
- [13] Thompson D I, Edwards T J, Van Staden J. A novel dual-phase culture medium promotes germination and seedling establishment from immature embryos in South African *Disa* (Orchidaceae) species. *Plant Growth Regulation*, 2007, 53: 163–171.
- [14] Hu X R, Tao M, Lu X X, *et al.* Study on the genetic integrity of ultra-dried seed of rice with isozyme of α -Amy and SOD. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2007, 8(2): 228–230.
胡小荣, 陶梅, 卢新雄, 等. α -淀粉酶和超氧化物歧化酶等位酶与水稻种子超干燥保存遗传完整性的研究. *植物遗传资源学报*, 2007, 8(2): 228–230.
- [15] Munns R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 2002, 25(2): 239–250.
- [16] Zhu Y, Zhong W, Zhao X M, *et al.* Comparison of hydroxyl free radical-scavenging activity of polysaccharide from *Paeonia suffruticosa* leaves. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44(11): 341–342.
朱月, 钟尉, 赵雪梅, 等. 紫斑牡丹叶片多糖对羟自由基清除能力的比较. *江苏农业科学*, 2016, 44(11): 341–342.
- [17] Wang H, Lin X, Cao S, *et al.* Alkali tolerance in rice (*Oryza sativa* L.): growth, photosynthesis, nitrogen metabolism, and ion homeostasis. *Photosynthetica*, 2015, 53: 55–65.
- [18] Tian L H, Zhou Q P, Lu S J, *et al.* Comprehensive evaluation of drought resistance of different species of *Poa* L. grass at seedling stage. *Acta Agrestia Sinica*, 2017, 25(3): 561–566.

- 田莉华, 周青平, 卢素锦, 等. 不同种类早熟禾苗期抗旱性综合评价. 草地学报, 2017, 25(3): 561—566.
- [19] Helal N M, Saady H S, Hamada M M A, *et al.* Potentiality of melatonin for reinforcing salinity tolerance in sorghum seedlings via boosting photosynthetic pigments, ionic and osmotic homeostasis and reducing the carbonyl/oxidative stress markers. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2024, 24: 4243—4260.
- [20] Liao L Z, Yang B, Fan J, *et al.* Effects of exogenous melatonin on the growth and physiological characteristics of *Rhus chinensis* seedlings under salt stress. *Biological Resources*, 2024, 46(4): 324—333.
廖聆孜, 杨冰, 樊静, 等. 外源褪黑素对盐胁迫下盐肤木幼苗生长和生理特性的影响. 生物资源, 2024, 46(4): 324—333.
- [21] Kesawat M S, Satheesh N, Kherawat B S, *et al.* Regulation of reactive oxygen species during salt stress in plants and their crosstalk with other signaling molecules—Current perspectives and future directions. *Plants*, 2023, 12(4): 864.
- [22] Wang W W, Shen F, Wu Y C, *et al.* Summary of melatonin biosynthesis and its role in plant stress. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2022, 50(1): 1—6.
王薇薇, 沈峰, 吴永成, 等. 褪黑素生物合成及其在植物逆境胁迫中的作用综述. 江苏农业科学, 2022, 50(1): 1—6.
- [23] Jiang C Q, Cui Q R, Feng K, *et al.* Melatonin improves antioxidant capacity and ion homeostasis and enhances salt tolerance in maize seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(4): 1—9.
- [24] Zhao H L, Ye L, Wang Y P, *et al.* Melatonin increases the chilling tolerance of chloroplast in cucumber seedlings by regulating photosynthetic electron flux and the ascorbate-glutathione cycle. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 01814.
- [25] Liu Z Y, Sun L, Liu Z W, *et al.* Effect of exogenous melatonin on growth and antioxidant system of pumpkin seedlings under waterlogging stress. *PeerJ*, 2024, 12(1): e17927.
- [26] Zhao D H. Effects of exogenous abscisic acid and melatonin on physiological characteristics of alfalfa under salt stress. Yangling: Northwest A & F University, 2023.
赵东豪. 外源脱落酸和褪黑素对盐胁迫下紫花苜蓿生理特性的影响. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- [27] Liu L Y. Physiological characteristics of *Medicago sativa* in response to salt stress and analysis of root metabolites. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.
刘隆阳. 紫花苜蓿响应盐胁迫的生理特性及根代谢产物分析. 扬州: 扬州大学, 2021.
- [28] Zhu J K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(5): 441—445.
- [29] Chen Z, Cao X L, Niu J P. Effects of melatonin on morphological characteristics, mineral nutrition, nitrogen metabolism, and energy status in alfalfa under high-nitrate stress. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 694179.
- [30] Zhou D. Effects of salt stress on photosynthesis and water in plants. *Botanical Research*, 2021, 10(3): 231—238.
周丹. 盐胁迫对植物光合—水分关系的影响研究. 植物学研究, 2021, 10(3): 231—238.
- [31] Ou C, Zhang M, Yao X M, *et al.* Effect of melatonin on growth, ion absorption and photosynthesis of *Toona sinensis* seedlings under salt stress. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, 39(12): 2226—2234.
偶春, 张敏, 姚侠妹, 等. 褪黑素对盐胁迫下香椿幼苗生长及离子吸收和光合作用的影响. 西北植物学报, 2019, 39(12): 2226—2234.
- [32] Gao Q H, Guo Y Y, Wu Y, *et al.* Alleviation effects of melatonin and Ca^{2+} on melon seedlings under salt stress. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2017, 28(6): 1925—1931.
高青海, 郭远远, 吴燕, 等. 盐胁迫下外源褪黑素和 Ca^{2+} 对甜瓜幼苗的缓解效应. 应用生态学报, 2017, 28(6): 1925—1931.