

# 纯化腐植酸对 $\text{NO}_3^-$ 胁迫下黄瓜种子萌发及生理生化特性的影响

谷端银<sup>1</sup>, 高俊杰<sup>1</sup>, 焦娟<sup>1</sup>, 王秀峰<sup>2,3</sup>

(1. 泰安市农业科学研究院, 山东 泰安 271000; 2. 山东农业大学 园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271018;

3. 作物生物学国家重点实验室, 山东 泰安 271018)

**摘要:**以‘新泰密刺’和‘津优1号’黄瓜种子为试材, 采用培养皿发芽方式, 研究了添加纯化腐植酸 PHA(添加浓度 0、25、50、100、150  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 对  $\text{NO}_3^-$  胁迫下 ( $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 黄瓜种子萌发及幼芽抗氧化酶活性的影响。结果表明:  $\text{NO}_3^-$  胁迫使黄瓜种子发芽率、主根长、侧根长、侧根数、下胚轴长度和粗度以及幼芽鲜质量明显减少; 添加 PHA 处理使 2 个黄瓜品种的上述项目值都明显增加, 表明部分缓解了  $\text{NO}_3^-$  胁迫。黄瓜种子发芽过程中, 由于  $\text{NO}_3^-$  胁迫, 幼芽的电解质渗漏率显著增加、子叶中  $\alpha$ -淀粉酶活力下降、胚根脱氢酶活力增加; 胚根和胚轴中丙二醛 (MDA) 及可溶性蛋白质含量、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性均增加。添加 PHA 后, 幼芽的电解质渗漏率显著减小, 随 PHA 浓度的增加, 减小的差值变小; 子叶中  $\alpha$ -淀粉酶活力和胚根脱氢酶活力增加, 添加 PHA 浓度高时呈下降趋势; 胚根和胚轴中 MDA 含量减少, 添加 PHA 浓度高时又有增加趋势; 可溶性蛋白质含量增加, 添加 PHA 浓度高时显示下降趋势; SOD、POD、CAT 活性均呈下降趋势。黄瓜种子发芽受到  $\text{NO}_3^-$  胁迫时, 都因 PHA 的添加而表现出不同程度对  $\text{NO}_3^-$  胁迫的正向缓解, 使幼芽趋于正常。黄瓜种子发芽在  $\text{NO}_3^-$  胁迫添加 PHA 后的生理生化指标的变化也表现出品种和器官不同的感受性差异。该试验表明, 以 PHA 添加  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理对胁迫  $\text{NO}_3^-$  下黄瓜种子效果较佳。

**关键词:**纯化腐植酸;  $\text{NO}_3^-$  胁迫; 黄瓜; 种子萌发; 抗氧化酶活性

**中图分类号:**S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)09-0001-08

设施蔬菜生产由于过量施肥以及土壤水分蒸发量大等特点, 与露地生产相比其土壤物理、化学和生物学特性均发生较大的变化, 设施土壤的次生盐渍化及土壤的逐渐酸化<sup>[1]</sup>, 导致其连作障碍。土壤次生盐化的重要原因之一是  $\text{NO}_3^-$  的积累<sup>[2]</sup>, 约占耕层盐分离子总量的 47.4%<sup>[3]</sup>。 $\text{NO}_3^-$  胁迫下, 种子萌发受到抑制<sup>[4]</sup>, 抗氧化酶系统紊乱<sup>[5]</sup>, 渗透调节物质增加<sup>[6]</sup>, 植物生长受到抑制。

目前, 越来越多的外源物质在缓解  $\text{NO}_3^-$  胁迫

的研究中得到应用<sup>[6-8]</sup>。腐植酸(humic acid, HA)是有机质中重要的组成部分, 可来源于土壤、低阶煤(泥炭、褐煤、风化煤等)、动物粪便等<sup>[9]</sup>。腐植酸在促进作物生长<sup>[10-12]</sup>及提高作物抗逆性<sup>[13-14]</sup>方面有着良好的作用, 其在耐盐性方面的研究目前主要集中在对盐碱土壤的改良方面<sup>[15-17]</sup>, 而研究腐植酸直接作用于作物提高其耐盐性的研究相对较少<sup>[18]</sup>, 在缓解作物  $\text{NO}_3^-$  胁迫方面的研究更少见报道。该试验以黄瓜种子为试材, 采用培养皿发芽方式, 研究添加纯化腐植酸(purified humic acid, PHA)对  $\text{NO}_3^-$  胁迫下黄瓜种子萌发及其生理生化特性的影响, 探讨 PHA 在缓解  $\text{NO}_3^-$  胁迫、提高作物抗逆性方面的作用机理, 以期为解决设施土壤次生盐渍化提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试纯化腐植酸采用风化煤腐植酸(山东创新

**第一作者简介:**谷端银(1979-), 女, 博士, 农艺师, 研究方向为设施蔬菜与无土栽培。E-mail: guduanyin@163.com.

**责任作者:**王秀峰(1957-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为设施蔬菜与无土栽培。E-mail: xfwang@sdaa.edu.cn.

**基金项目:**山东省现代农业产业技术体系资助项目(SDAIT-05-09); 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-25)。

**收稿日期:**2017-02-09

腐植酸科技股份有限公司生产)纯化后获得,具体方法参考国际腐植酸协会(International Humic Substances Society, IHSS) (<http://www.ihss.gatech.edu/soilhafa.html>)及 AGUIRRE 等<sup>[19]</sup>的方法。

以饱满度均匀的黄瓜(*Cucumis sativus* L.)‘新泰密刺’和‘津优1号’种子为研究对象,分别在2%(w/v)次氯酸钠溶液中浸泡15 min消毒,用蒸馏水将种子清洗干净待用。

## 1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 试验设6个处理:以蒸馏水处理为对照CK<sub>1</sub>、75 mmol·L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>为CK<sub>2</sub>、75 mmol·L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+25 mg·L<sup>-1</sup> PHA(T<sub>1</sub>)、75 mmol·L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+50 mg·L<sup>-1</sup> PHA(T<sub>2</sub>)、75 mmol·L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+100 mg·L<sup>-1</sup> PHA(T<sub>3</sub>)、75 mmol·L<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>+150 mg·L<sup>-1</sup> PHA(T<sub>4</sub>)。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>供体为硝酸钾:硝酸铵:硝酸钠=1:0.5:0.5。

1.2.2 试验步骤 试验于2015年3—4月在山东农业大学园艺科学与工程学院设施蔬菜与无土栽培实验室中进行,先用上述处理液分别进行种子浸种8 h,后将Φ9 cm的培养皿中铺2层滤纸,分别

表 1

纯化腐植酸分子量、元素含量、原子比例及 E4/E6

Table 1 Molecular weight, elemental composition, atomic ratios and E4/E6 ratios of purified leonardite humic acid

	分子量 Molecular weight/(g·mol <sup>-1</sup> )	元素含量 Elemental content/%						原子比例 Atomic ratios			E4/E6
		C	H	O	N	S	灰分	C:N	H:N	O:C	
PHA	3.547×10 <sup>4</sup>	47.180	3.285	44.199	1.265	3.571	0.500	37.30	2.60	0.94	4.02

1.3.2 黄瓜种子发芽率及胚轴胚根生长量的测定 发芽百分率(G%)=N/S×100,其中N为发芽种子数,S为供试种子数;胚轴及胚根长度用刻度尺测量;侧根数取根长大于0.5 cm的记数;幼芽鲜质量随机取10粒发芽种子称质量(不带种皮)。

1.3.3 生理指标的测定 电解质渗漏率测定参考赵世杰<sup>[20]</sup>的方法;丙二醛(MDA)含量测定参考CAKMAK等<sup>[21]</sup>的方法;可溶性蛋白质含量测定参考BRADFORD<sup>[22]</sup>的方法。

1.3.4 酶活性的测定 酶液提取参考朱祝军等<sup>[23]</sup>的方法测定;α-淀粉酶活力参考GUGLIELMINETTI等<sup>[24]</sup>方法测定;脱氢酶活性参考赵世杰<sup>[20]</sup>的方法测定;超氧化物歧化酶(SOD)活性采用PROCHAZKOVA等<sup>[25]</sup>方法测定;过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性参考CAKMAK等<sup>[21]</sup>的方法测定,抗坏血酸过氧化物酶(APX)活性参考NAKANO等<sup>[26]</sup>的方法测定。以上每个指标均重复测定3次,取平均值和标准差进行数据分析。

## 1.4 数据分析

采用Excel 2003软件进行数据处理和作图,采

加入5 mL的对应处理液使滤纸充分浸润,然后每个培养皿滤纸上摆放20粒用处理液浸种的种子,培养皿上罩保鲜膜,防止水分散失。每处理5个培养皿,重复3次。将处理培养皿放在(28±1)℃培养箱中(黑暗条件)使种子发芽。在放入培养箱后的第1、2、3天进行种子发芽调查。第4天进行生长量及生理生化项目的测定。发芽处理期间,每天向培养皿中添加2 mL相应的处理液,以保持滤纸湿润。

## 1.3 项目测定

1.3.1 纯化腐植酸(PHA)的主要元素及分子量测定 PHA的元素分析采用Elementar Analysensysteme GmbH元素分析仪(型号:varioMICRO V1.5.4, CHNS Mode, Ser. No.: 15072029)进行。PHA的分子量测定采用分子排阻色谱法,光散射检测器为Wyatt DAWN HELEOS-II(红色信号);示差检测器为Wyatt Optilab(蓝色信号);色谱柱:Shodex SB-806M, Shodex SB-G保护柱;色谱条件:流动相为0.1 mol·L<sup>-1</sup>碳酸氢钠溶液;柱温为45℃;流速为0.5 mL·min<sup>-1</sup>。

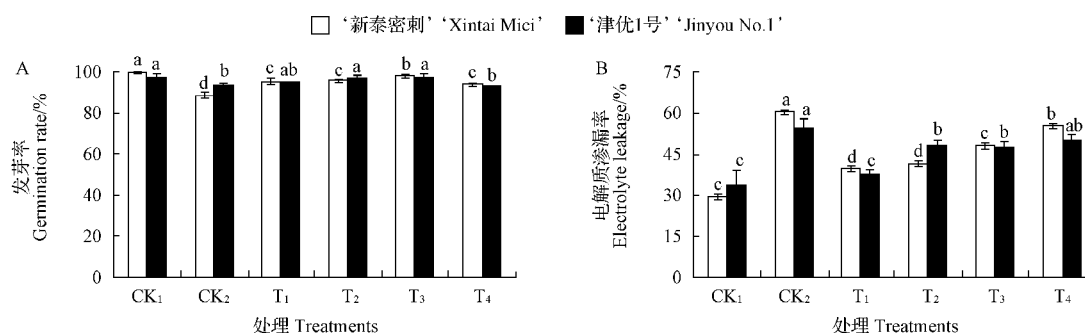
用DPS 7.55软件进行统计分析,采用Duncan法进行差异显著性检验(α=0.05)。

## 2 结果与分析

### 2.1 PHA处理对NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫下黄瓜种子发芽率及电解质渗漏率的影响

由图1A可以看出,与蒸馏水处理的对照(CK<sub>1</sub>)相比,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫(CK<sub>2</sub>)显著降低了‘新泰密刺’及‘津优1号’的种子发芽率,‘新泰密刺’发芽率降低的程度比‘津优1号’明显。PHA添加处理(T<sub>1</sub>~T<sub>4</sub>)显著缓解NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫的影响,2个品种表现也有差异。PHA处理后,部分缓解了NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫对‘新泰密刺’的影响,但没有1个处理恢复到CK的水平,其中以PHA添加100 mg·L<sup>-1</sup>(T<sub>3</sub>)的缓解效果最好。PHA处理‘津优1号’后,T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>种子发芽率都恢复到CK的水平,T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>显著缓解了NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫的影响,但T<sub>4</sub>处理没有明显的缓解效果。

由图1B可知,与蒸馏水对照(CK<sub>1</sub>)相比,NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫(CK<sub>2</sub>)使2个品种的电解质渗漏率显著增加,PHA添加处理后,电解质渗漏率比NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫单独



注:不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

Note: Different letters mean significant difference at 0.05 level. The same below.

图1 PHA处理对 $\text{NO}_3^-$ 胁迫下黄瓜种子发芽率及电解质渗漏率的影响

Fig. 1 Effects of PHA on cucumber seed germination rate and seedling electrolyte leakage under  $\text{NO}_3^-$  stress

处理(CK<sub>2</sub>)的2个品种均表现出不同程度的减小,随着PHA浓度的增加,电解质渗漏率减小的差值变小。

## 2.2 PHA处理对 $\text{NO}_3^-$ 胁迫下黄瓜胚根及胚轴生长的影响

由表1可以看出,与CK<sub>1</sub>相比,2个品种CK<sub>2</sub>黄瓜种子胚根长、侧根长、侧根数、下胚轴长及幼芽鲜质量均减少,其中‘新泰密刺’的CK<sub>2</sub>与CK<sub>1</sub>相比各项指标均达差异显著水平;‘津优1号’的CK<sub>2</sub>与CK<sub>1</sub>相比,胚根长和侧根数达到差异显著水平,其它

指标差异不显著。

在 $\text{NO}_3^-$ 胁迫下,添加PHA处理在2个品种幼芽生长指标上都表现了不同程度的胁迫缓解。‘新泰密刺’添加PHA的处理与CK<sub>2</sub>相比,胚根长、侧根长、侧根数、下胚轴长及幼芽鲜质量均有显著增加,其中,以T<sub>3</sub>处理促进效果较佳,但 $\text{NO}_3^-$ 胁迫和PHA添加都可使下胚轴增粗。‘津优1号’添加PHA的处理与CK<sub>2</sub>相比,幼芽生长指标虽表现了不同程度胁迫缓解的趋势,但不如‘新泰密刺’表现的规律性强,可能是因为不同品种的感受性差异所致。

表2 PHA处理对 $\text{NO}_3^-$ 胁迫下黄瓜幼芽胚根、侧根、胚轴形态及生长量的影响

Table 2 Effects of PHA on cucumber radical, lateral root, hypocotyls and seedling growth under  $\text{NO}_3^-$  stress

品种 Varieties	处理 Treatments	胚根长 Radicle length /cm	侧根长 Lateral root length /cm	侧根数 Lateral root number	下胚轴长 Hypocotyl length /cm	下胚轴粗 Hypocotyl diameter /cm	幼芽鲜质量 Seedling fresh weight/ (g · (10株) <sup>-1</sup> )
‘新泰密刺’ ‘Xintai Mici’	CK <sub>1</sub>	0.64±0.01a	1.91±0.16a	5.37±0.68a	5.21±0.21a	0.163±0.003b	1.30±0.07a
	CK <sub>2</sub>	0.25±0.05c	0.51±0.02d	1.47±0.21c	1.47±0.16d	0.174±0.005a	0.79±0.09b
	T <sub>1</sub>	0.46±0.06b	0.81±0.16c	2.60±0.20b	2.35±0.71c	0.173±0.002a	1.25±0.09a
	T <sub>2</sub>	0.54±0.12ab	1.02±0.12bc	2.70±0.60b	2.79±0.64bc	0.177±0.003a	1.26±0.21a
	T <sub>3</sub>	0.58±0.03ab	1.23±0.21b	3.07±0.38b	3.16±0.53b	0.174±0.002a	1.38±0.15a
	T <sub>4</sub>	0.53±0.05ab	1.13±0.08b	2.20±0.36bc	3.41±0.53b	0.165±0.003b	1.42±0.16a
‘津优1号’ ‘Jinyou No.1’	CK <sub>1</sub>	1.64±0.12a	2.04±0.23a	7.67±0.40a	3.59±0.47c	0.179±0.006c	2.04±0.06bc
	CK <sub>2</sub>	1.03±0.09bc	1.54±0.10ab	4.73±0.47d	3.58±0.49c	0.180±0.012c	1.93±0.11c
	T <sub>1</sub>	1.08±0.08bc	1.89±0.20a	5.73±0.55c	4.47±0.12a	0.185±0.001bc	2.27±0.08ab
	T <sub>2</sub>	1.12±0.06bc	1.58±0.38ab	6.97±0.15ab	3.84±0.37bc	0.194±0.006ab	2.05±0.07bc
	T <sub>3</sub>	1.21±0.04b	2.07±0.33a	7.03±0.75ab	4.20±0.12ab	0.203±0.002a	2.35±0.35a
	T <sub>4</sub>	0.93±0.14c	1.06±0.32b	6.40±0.70bc	4.05±0.06abc	0.183±0.005bc	1.91±0.01c

注:同列不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different letters in the same column mean significant difference at 0.05 level.

## 2.3 PHA处理对 $\text{NO}_3^-$ 胁迫下萌发黄瓜种子淀粉酶及脱氢酶活性的影响

$\alpha$ -淀粉酶是种子萌发初期最主要的水解酶。由图2A可知,CK<sub>2</sub>与CK<sub>1</sub>相比,2个黄瓜品种种子发芽后子叶中的 $\alpha$ -淀粉酶活性显著降低,但添加PHA处理后,表现出随PHA浓度的升高 $\alpha$ -淀粉酶活性逐

渐增强而后逐渐下降的趋势,其中‘新泰密刺’以T<sub>2</sub>处理增加程度最大,与CK<sub>2</sub>相比提高了14.9%;‘津优1号’则以T<sub>3</sub>处理增加程度最大,与CK<sub>2</sub>相比提高了19.0%。

脱氢还原酶活性反映了种子的生活力。由图2B可以看出,CK<sub>2</sub>与CK<sub>1</sub>相比, $\text{NO}_3^-$ 胁迫提高了2

个黄瓜品种胚根的脱氢还原酶活性。当添加 PHA 后,2 个黄瓜品种胚根的脱氢还原酶活性随着 PHA 添加浓度的升高,呈现出继续升高的趋势(比 CK<sub>2</sub> 的

NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫),2 个品种最高点都出现在 T<sub>3</sub> 处理后, T<sub>4</sub> 处理有所下降。

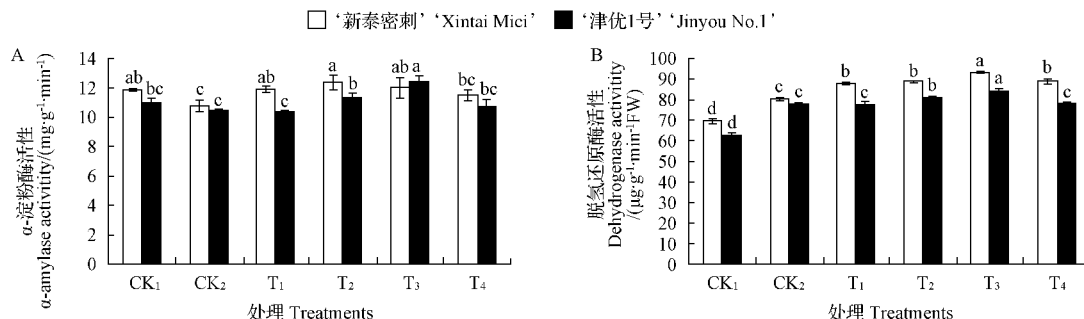


图2 PHA处理对NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫下黄瓜种子α-淀粉酶活性及脱氢还原酶活性的影响

Fig. 2 Effects of PHA on cucumber seed α-amylase activity and dehydrogenase activity under NO<sub>3</sub><sup>-</sup> stress

#### 2.4 PHA处理对NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫下黄瓜胚根及胚轴中MDA、可溶性蛋白质含量的影响

由图3A、B可以看出,胚根、胚轴中MDA含量呈现相同的变化趋势,CK<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫)处理的胚

根、胚轴中MDA含量均呈现最大值,而NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫下添加PHA的各处理(T<sub>1</sub>~T<sub>4</sub>)MDA含量降低,以T<sub>3</sub>处理含量最低,并显著低于蒸馏水对照(CK<sub>1</sub>),表现出添加PHA后缓解NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫的显著效果。

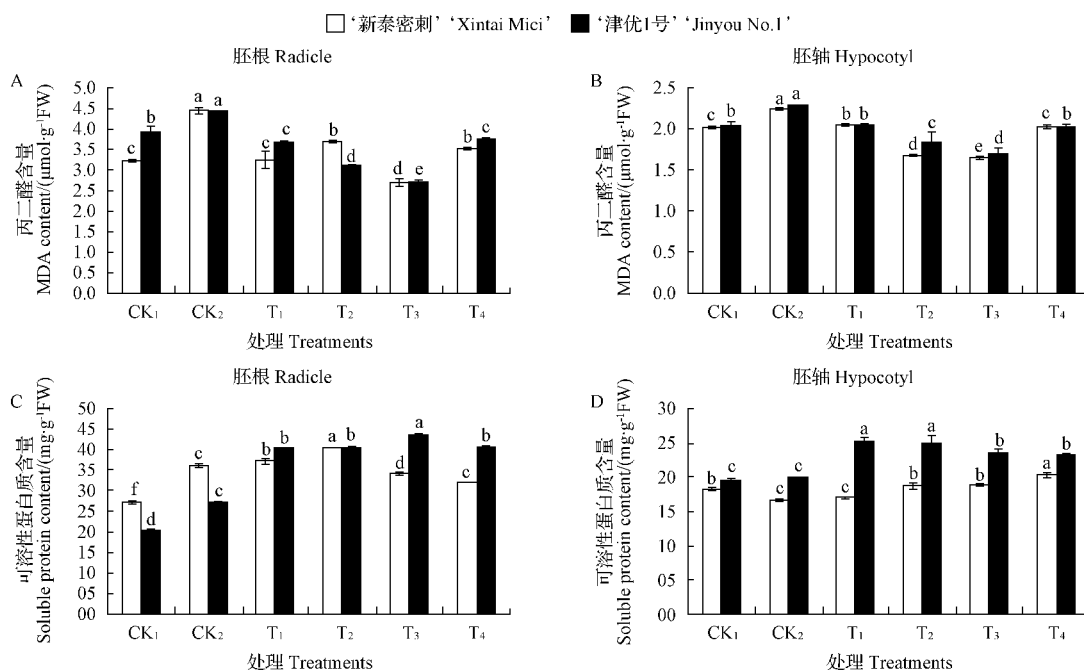


图3 PHA处理对NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫下黄瓜胚根及胚轴中MDA含量、可溶性蛋白质含量的影响

Fig. 3 Effects of PHA on cucumber content of MDA and soluble protein under NO<sub>3</sub><sup>-</sup> stress

由图3C可以看出,2个品种胚根中可溶性蛋白质含量以CK<sub>1</sub>最低,CK<sub>2</sub>比CK<sub>1</sub>明显增加,随着PHA添加浓度的升高,呈现出继续升高的趋势(比CK<sub>2</sub> NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫),‘新泰密刺’以T<sub>2</sub>处理达到最大,‘津优1号’以T<sub>3</sub>处理达到最大后均又下降。由图3D所示,2个品种胚轴中可溶性蛋白质含量各处理

间变化不如胚根的变化规律,‘津优1号’品种的胚轴中可溶性蛋白质含量CK<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫)较CK<sub>1</sub>没有增加,但添加PHA的T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>处理含量显著增加,添加浓度升高则含量减小。‘新泰密刺’品种胚轴中可溶性蛋白质含量变化规律性较差。

#### 2.5 PHA处理对NO<sub>3</sub><sup>-</sup>胁迫下黄瓜胚根及胚轴中

## 抗氧化酶活性的影响

由图 4A、B 可以看出,‘新泰密刺’胚根中 SOD 活性  $CK_2$  ( $NO_3^-$  胁迫) 比  $CK_1$  显著增高,  $NO_3^-$  胁迫下添加 PHA 各处理的 SOD 活性显著低于  $CK_2$ , 但随添加 PHA 浓度升高有增高的趋势。‘津优 1 号’胚根中 SOD 活性  $CK_2$  ( $NO_3^-$  胁迫) 虽比  $CK_1$  显著增高, 但  $NO_3^-$  胁迫下添加 PHA 各处理的 SOD 活性却都显著高于  $CK_2$ , SOD 活性最高值出现在  $CK_1$  处理。图 4B 中 2 个品种胚轴 SOD 活性均为  $CK_2$  呈现最大值, 显著高于  $CK_1$ ,  $NO_3^-$  胁迫下添加 PHA 的各处理 SOD 活性显著低于  $CK_1$  和  $CK_2$  2 个处理, PHA 添加浓度的升高, 胚轴中 SOD 活性的变化无明显规律。

如图 4C、D 所示, 与蒸馏水对照  $CK_1$  相比,  $NO_3^-$  胁迫 ( $CK_2$ ) 使 2 个品种胚根、胚轴中的 POD 活性显著增高。  $NO_3^-$  胁迫下添加 PHA 处理的 2 个品种胚根、胚轴中 POD 活性随 PHA 添加浓度的升高有降低的趋势, 胚轴中 POD 活性变化比胚根中有规律且更显著, 2 个品种中‘津优 1 号’的变化规律较明显且更规律。

由图 4 E、F 可以看出, 与蒸馏水对照  $CK_1$  相比,  $NO_3^-$  胁迫 ( $CK_2$ ) 使 2 个品种胚根、胚轴中的 CAT 活性显著增高; 添加 PHA 的各处理与  $CK_2$  相比胚根、胚轴中的 CAT 活性显著降低; 但 PHA 添加浓度较高时 ( $T_4$ ), ‘津优 1 号’胚根中 CAT 活性无降低。

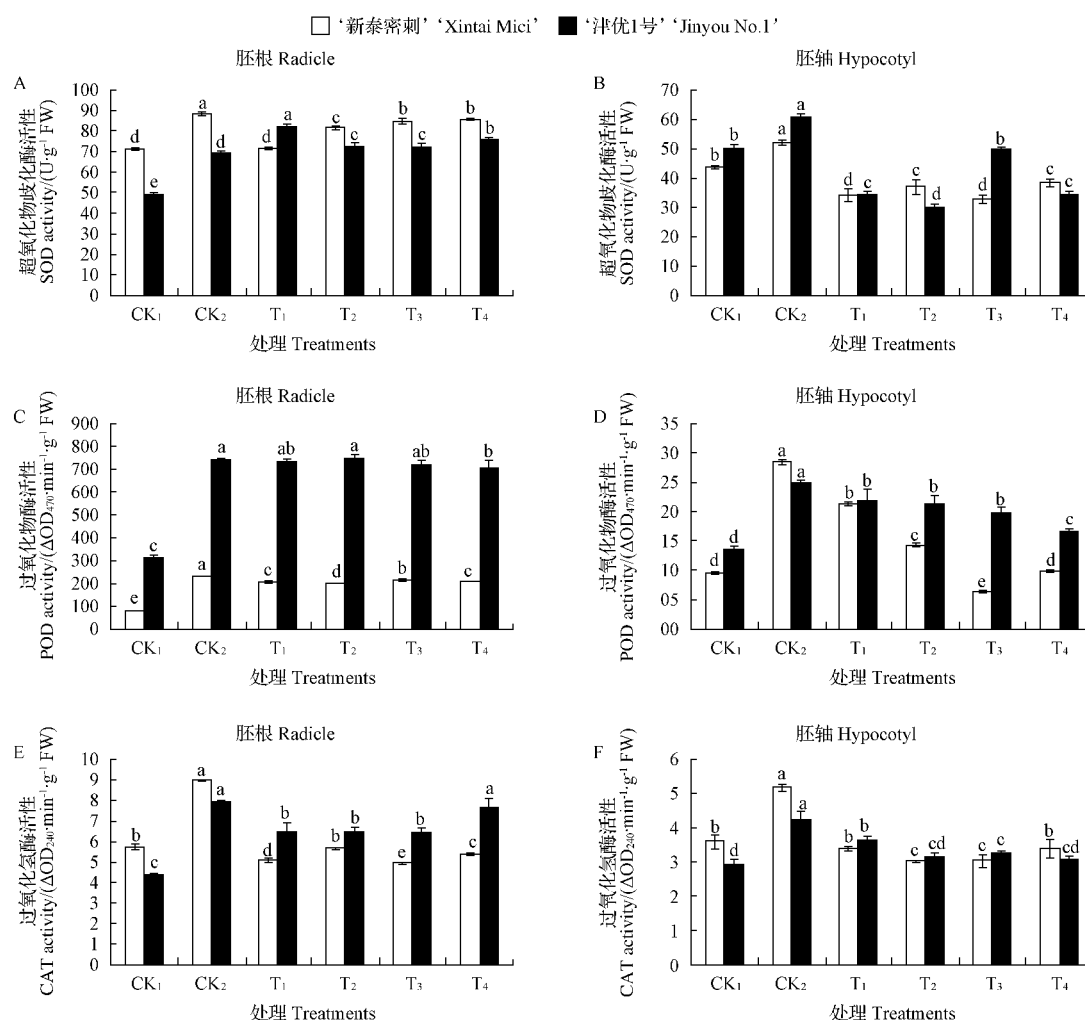


图 4 PHA 处理对  $NO_3^-$  胁迫下黄瓜胚根及胚轴中 SOD、POD、CAT 活性的影响

Fig. 4 Effects of PHA on cucumber activities of SOD, POD, CAT under  $NO_3^-$  stress

## 3 讨论

设施蔬菜生产过量施肥现象目前仍较为普遍,

设施土壤中硝酸盐积累是造成设施土壤次生盐渍化的主要原因之一<sup>[1]</sup>, 过量的硝酸盐不仅对土壤和地

下水造成污染,抑制蔬菜的生长,而且对食品安全也带来一定的风险<sup>[27-29]</sup>。通过轮作<sup>[30]</sup>、增施有机肥<sup>[31]</sup>、使用缓释肥<sup>[32]</sup>等途径可缓解土壤中硝酸盐积累对蔬菜生长的影响,而通过外源物质提高蔬菜的抗逆性也是比较有效的途径<sup>[6,8]</sup>。该试验采用  $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$  溶液胁迫进行黄瓜种子发芽,由于黄瓜种子发芽所在溶液中  $\text{NO}_3^-$  盐分过多,种子幼芽(胚)吸水困难,‘新泰密刺’和‘津优1号’2个品种的总体发芽率均降低。在添加 PHA 处理后发芽率有所提高,说明添加 PHA 对  $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$  胁迫有一定的缓解作用。王晓丽等<sup>[33]</sup>研究了腐植酸包衣对玉米种子在正常水分和水分胁迫2种条件下发芽的影响,结果表明腐植酸包衣能提高玉米种子的发芽率、发芽指数及活力指数。卢艺彬等<sup>[34]</sup>研究腐植酸对自毒物质苯丙烯酸胁迫下黄瓜种子萌发的影响,结果发现  $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  腐植酸可以缓解苯丙烯酸胁迫对种子萌发的抑制作用,种子发芽势、活力以及物质消耗率均提高。另有研究腐植酸在盐胁迫下提高小麦种子发芽率<sup>[35]</sup>、提高干旱胁迫下鸡冠花种子发芽率<sup>[36]</sup>等都与该试验结果一致。LODHI 等<sup>[37]</sup>、SANCHEZ 等<sup>[38]</sup>研究发现高浓度的腐植酸也会抑制种子萌发,原因可能是腐植酸浓度过高时带入的盐基离子也对种子产生胁迫作用。该试验中  $T_4$  处理在  $75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NO}_3^-$  胁迫下添加  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PHA 时,缓解  $\text{NO}_3^-$  胁迫的作用降低可能是此因。

$\text{NO}_3^-$  是植物重要的氮素来源<sup>[39]</sup>,同时  $\text{NO}_3^-$  也作为信号分子影响基因表达、生理代谢及物质分配等<sup>[40]</sup>,有研究证明,高浓度  $\text{NO}_3^-$  供应下,作物侧根缩短<sup>[41]</sup>、侧根数量减少<sup>[42]</sup>。该试验中在  $\text{NO}_3^-$  胁迫下,‘新泰密刺’和‘津优1号’2个品种黄瓜种子胚根长、侧根长、侧根数、下胚轴长及幼芽鲜质量,相比蒸馏水对照均降低,种子胚根及胚轴的生长受抑。而添加 PHA 处理的‘新泰密刺’和‘津优1号’黄瓜种子在  $\text{NO}_3^-$  胁迫下主根长、侧根长、侧根数均显著增加,下胚轴长和粗度也增加。陈玉玲等<sup>[43]</sup>发现,FA 能使 IAA、ABA 水平增加,MORA 等<sup>[44-46]</sup>研究表明,PHA 处理促进黄瓜根系中 NO、IAA 的含量,同时 PHA 依赖于 NO-IAA 途径介导作用提高了黄瓜根系中 ABA、ETH 的含量;另有研究证明 IAA 可以促进侧根的发生<sup>[47]</sup>,GARCÍA 等<sup>[48]</sup>研究认为,腐植酸团聚体中占主要优势的烷基、羧基、羰基结构是腐植酸在根系发挥作用的主要原因。可见,腐植酸促进根系发生发育的作用机理有待更深入的研究。

植物受高盐胁迫质膜渗透的增加是盐害的重要

特征之一。该试验结果看出,黄瓜种子发芽后受  $\text{NO}_3^-$  胁迫,幼芽细胞膜伤害加剧,电解质渗漏率迅速增加,添加 PHA 处理后电解质渗漏率明显减小,但随着 PHA 浓度的增加,电解质渗漏率减小的差值变小(图 1B);添加 PHA 也降低了胚根及胚轴中的 MDA 含量(图 3A、B),从某种程度上也说明缓解了高浓度  $\text{NO}_3^-$  胁迫对胚根及胚轴的氧化损伤,这与郭伟等<sup>[35]</sup>、马领弟等<sup>[49]</sup>、栾白等<sup>[50]</sup>、AYDIN 等<sup>[51]</sup> 研究结果一致。GARCÍA 等<sup>[52]</sup>采用从蚯蚓粪中提取的腐植酸,研究发现腐植酸影响了水稻抗氧化系统中 SOD、POD、CAT、APX 的活性,抑制了 ROS 产生和膜脂过氧化。该试验黄瓜种子发芽过程中受  $\text{NO}_3^-$  胁迫后与蒸馏水处理相比,SOD、POD、CAT 活性显著增加,以抵御高  $\text{NO}_3^-$  胁迫逆境,添加 PHA 处理后 SOD、POD、CAT 活性都有不同程度的降低,胚轴中的变化比胚根中的明显且较有规律。该试验是选取发芽第4天时的幼芽所测的胚根、胚轴酶活性,进一步研究发芽过程中动态变化或许更能说明问题。

综上所述, $\text{NO}_3^-$  胁迫使黄瓜种子发芽率、主根长、侧根长、侧根数、下胚轴长和粗度以及幼芽鲜质量明显减少,添加 PHA 处理使黄瓜2个品种的上述项目值都明显增加,表明部分缓解了  $\text{NO}_3^-$  胁迫。黄瓜种子发芽过程中,由于  $\text{NO}_3^-$  胁迫,幼芽的电解质渗漏率、子叶中  $\alpha$ -淀粉酶活性及胚根脱氢酶活性、胚根和胚轴中 MDA、可溶性蛋白质含量、SOD、POD、CAT 活性等表明生物体活性的生理生化指标的变化,都因 PHA 的添加而表现出不同程度对  $\text{NO}_3^-$  胁迫的正向缓解,使幼芽趋于正常。黄瓜种子发芽在  $\text{NO}_3^-$  胁迫添加 PHA 后的生理生化指标的变化也表现出品种和器官不同的感受性差异。该试验条件来看,以 PHA 添加  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的处理效果较佳。

### 参考文献

- [1] SHI W M, YAO J, YAN F. Vegetable cultivation under greenhouse conditions leads to rapid accumulation of nutrients, acidification and salinity of soils and groundwater contamination in South-Eastern China[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2009, 83: 73-84.
- [2] 黄绍文,王玉军,金继运,等.我国主要菜区土壤盐分、酸碱性 and 肥力状况[J].植物营养与肥料学报,2011,17(4):906-918.
- [3] 余海英,李廷轩,周健民.典型设施栽培土壤盐分变化规律及潜在的环境效应研究[J].土壤学报,2006,43(4):571-576.
- [4] 韩志平,郭晓冬,张海霞,等.硝酸钙胁迫对黄瓜种子萌发特性的影响[J].山西农业科学,2013,41(11):1186-1189.
- [5] 杨凤娟,王秀峰,魏珉,等. $\text{NO}_3^-$  胁迫下  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  对黄瓜幼苗膜质过氧化及活性氧清除酶系统的影响[J].农业工程学报,2005,21(增刊):155-158.
- [6] 焦娟,王秀峰,杨凤娟,等.外源一氧化氮对硝酸盐胁迫下黄瓜幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J].应用生态学报,2009,20(12):

3009-3014.

[7] 谷端银,王秀峰,杨凤娟,等.施用外源物质对园艺作物抗逆性影响研究进展[J].北方园艺,2016(3):195-198.

[8] HU X H, XU Z R, XU W N, et al. Application of  $\gamma$ -aminobutyric acid demonstrates a protective role of polyamine and GABA metabolism in muskmelon seedlings under  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2015, 92: 1-10

[9] SHARIF M, KHATTAK R A, SARIR M S. Effect of different levels of lignitic coal derived humic acid on growth of maize plants[J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2002, 33: 3567-3580.

[10] DU JARDIN P. The science of plant biostimulants-A bibliographic analysis[J]. European Commission(Contract 30-CE0455515/00-96, <Ad hoc study on biostimulants products>), 2012.

[11] CALVO P, NELSON L, KLOPPER J W. Agricultural uses of plant biostimulants[J]. Plant Soil, 2014, 383: 3-41.

[12] CANELLAS L P, OLIVARES F L, AGUIAR N O, et al. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture[J]. Scientia Horticulturae, 2015, 196: 15-27.

[13] CHEN Y, AVIAD T. Effects of humic substances on plant growth [M]//In MACCARTHY P, CLAPP C E, MALCOLM R L, et al. Humic substances in soil and crop science; selected readings. American Society of Agronomy Inc., Soil Science of America, Inc., Madison, WI, 1990: 161-186.

[14] MESUT K Ç, ÖNDER T, METIN T, et al. Phosphorus and humic acid application alleviate salinity stress of pepper seedling[J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(36): 5845-5851.

[15] 孙在金. 脱硫石膏与腐植酸改良滨海盐碱土的效应及机理研究[D]. 北京: 中国矿业大学, 2013.

[16] 赵秋, 高贤彪, 宁晓光, 等. 适用于滨海盐碱土改良剂的应用研究[J]. 西北农业学报, 2014, 23(3): 107-111.

[17] HANAFY A A H, DARWISH E, HAMODA S A F, et al. Effect of putrescine and humic acid on growth, yield and chemical composition of cotton plants grown under saline soil conditions[J]. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 2013, 13(4): 479-497.

[18] 郭伟, 王庆祥. 腐植酸浸种对盐碱胁迫下小麦幼苗抗氧化系统的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(10): 2539-2545.

[19] AGUIRRE E, LEMENAGER D, BACAICOA E, et al. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants[J]. Plant Physiology Biochemistry, 2009, 47: 215-223.

[20] 赵世杰. 植物生理实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.

[21] ÇAKMAK I, MARSCHNER H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves[J]. Plant Physiology, 1992, 98: 1222-1227.

[22] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.

[23] 朱祝军, 喻景权. 氮素形态和光照强度对烟草生长和  $\text{H}_2\text{O}_2$  清除酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 1998(4): 379-385.

[24] GUGLIELMINETTI L, YAMAGUCHI J, PERATA P, et al. Amylolytic activities in cereal seeds under aerobic and anaerobic condi-

tions[J]. Plant Physiology, 1995, 109: 1069-1076.

[25] PROCHAZKOVA D, SAIRAM R K, SRIVASTAVA G C, et al. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves[J]. Plant Science, 2001, 161(4): 765-771.

[26] NAKANO Y, ASADA K. Hydrogen peroxide scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast [J]. Plant Cell Physiology, 1981, 22: 867-880.

[27] ANJANA, UMAR S, IQBAL M. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2007, 12: 45-57.

[28] HAN J P, SHI J C, ZENG L Z, et al. Effects of nitrogen fertilization on the acidity and salinity of greenhouse soils[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22: 2976-2986.

[29] EGAMBERDIEVA D, RENELLA G, WIRTH S, et al. Secondary salinity effects on soil microbial biomass[J]. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46: 445-449.

[30] LECOMPTE F. Management of soil nitrate heterogeneity resulting from crop rows in a lettuce-tomato rotation under a greenhouse[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2012, 32: 811-819.

[31] ISHIKAWA K, OHMORI T, MIYAMOTO H, et al. Denitrification in soil amended with thermophile-fermented compost suppresses nitrate accumulation in plants[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97: 1349-1359.

[32] 杨俊刚, 张冬雷, 徐凯, 等. 控释肥与普通肥料混施对设施番茄生长和土壤硝态氮残留的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(18): 3782-3791.

[33] 王晓丽, 王玺, 曹宏, 等. 腐植酸包衣对玉米种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 玉米科学, 2010, 18(4): 96-98.

[34] 卢艺彬, 张丽娜, 李延. 胡敏素对苯丙烯酸胁迫下黄瓜种子萌发特性的影响[J]. 热带作物学报, 2012, 33(2): 274-278.

[35] 郭伟, 于立河. 腐植酸浸种对盐胁迫下小麦萌发种子及幼苗生理特性的影响[J]. 麦类作物学报, 2012, 32(1): 90-96.

[36] 王娟, 何平, 张春平, 等. 外源  $\text{NO}$  供体硝普钠、甜菜碱、腐植酸对干旱胁迫下鸡冠花幼苗生理指标的影响[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(4): 14-21.

[37] LODHI A, TAHIR S, IQBAL E, et al. Characterization of commercial humic acid samples and their impact on growth of fungi and plants[J]. Soil and Environment, 2013, 32(1): 63-70.

[38] SANCHEZ P L, CHEN M, PESSARAKI M, et al. Effects of temperature and salinity on germination of non-pelleted and pelleted guayule (*Parthenium argentatum* A. Gray) seeds[J]. Industrial Crops and Products, 2014, 55: 90-96.

[39] MARSCHNER M. Mineral nutrition of higher plants(2nd edition) [M]. London: Academic Press, 1995.

[40] CRAWFORD N M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth [J]. Plant Cell, 1995(7): 859-868.

[41] ZHANG H, JENNINGS A, BARLOW P, W, et al. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate[J]. Plant Biology, 1999, 96: 6529-6534.

[42] STITT M, FEIL R. Lateral root frequency decrease when nitrate accumulates in tobacco transformants with low nitrate reductase activity: consequences for the regulation of biomass partitioning between shoots and roots[J]. Plant Soil, 1999, 215: 143-153.

[43] 陈玉玲, 曹敏, 周燮, 等. 黄腐酸对冬小麦幼苗 IAA、ABA 水平的

影响及作用机理的探讨[J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 587-590.

[44] MORA V, BACAICOA E, ZAMARREÑO A M, et al. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167: 633-642.

[45] MORA V, BAIGORRI R, BACAICOA E, et al. The humic acid induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber[J]. Environ Exp Bot, 2012, 76: 24-32.

[46] MORA V, BACAICOA E, BAIGORRI R, et al. NO and IAA Key regulators in the shoot growth promoting action of humic acid in *Cucumis sativus* L. [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2014, 33: 430-439.

[47] TORREY J G. The induction of lateral roots by indole acetic acid, root decapitation[J]. Am J Bot, 1950, 37: 257-264.

[48] GARCÍA A C, SANTOS L A, IZQUIERDO F G, et al. Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.) [J]. Journal of Geochemical Exploration, 2014, 136: 48-54.

[49] 马领弟, 秦谊, 朱辉, 等. 褐煤精华液对无盐及盐胁迫下小麦萌发的影响[J]. 生命科学研究, 2014, 18(10): 423-430.

[50] 栾白, 高同国, 姜峰, 等. 微生物降解褐煤产生的黄腐酸对大豆种子萌发及主要抗氧化酶活性的影响[J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 607-610.

[51] AYDIN A, KANT C, TURAN M. Humic acid application alleviates salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage[J]. African Journal of Agricultural Research, 2012(7): 1073-1086.

[52] GARCÍA A C, SANTOS L A, IZQUIERDO F G, et al. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress[J]. Ecological Engineering, 2012, 47: 203-208.

## Effects of Purified Humic Acid on Cucumber Germination and Physiological and Biochemical Characteristics Under $\text{NO}_3^-$ Stress

GU Duanyin<sup>1</sup>, GAO Junjie<sup>1</sup>, JIAO Juan<sup>1</sup>, WANG Xiufeng<sup>2,3</sup>

(1. Taian Academy of Agricultural Sciences, Tai'an, Shandong 271000; 2. College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018; 3. State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018)

**Abstract:** In order to explore the effects of PHA on cucumber seed germination and physiological and biochemical characteristics under  $\text{NO}_3^-$  (75 mmol · L<sup>-1</sup>) stress, 'Xintai Mici' and 'Jinyou No. 1' cucumber seeds were used as experimental cultivars, treated with different PHA concentration (0, 25, 50, 100, 150 mg · L<sup>-1</sup>). The results showed that seed germination, radicle length, lateral root length, lateral root number, hypocotyl length and diameter, and seedling fresh weight were decreased under  $\text{NO}_3^-$  stress. The above indices of adding PHA treatments were increased obviously and showed that PHA could partly alleviate  $\text{NO}_3^-$  stress. The seedling electrolyte leakage rate and seed cotyledon  $\alpha$ -amylase activity were decreased but radicle dehydrogenase activity was increased under nitrate stress. MDA and soluble protein content, SOD, POD, CAT activity were increased. After adding PHA, the seedling electrolyte leakage rate was significantly reduced, but with the increasing concentration of PHA the decreases difference became smaller. Cotyledon  $\alpha$ -amylase activity and radicle dehydrogenase activity were increased and showed downward trend when added high PHA concentration. Radicle and hypocotyl MDA content decreased when treated with PHA but increased with high PHA concentration. Soluble protein content were increased but decreased with high PHA concentration. SOD, POD, CAT activity showed a downward trend treated with PHA compared with  $\text{NO}_3^-$  stress. Cucumber seed under  $\text{NO}_3^-$  stress was alleviated by adding PHA so that cucumber seedling growth became normal. The physiological and biochemical indices during cucumber seeds germination under  $\text{NO}_3^-$  stress and PHA treatments showed difference in different varieties and different organs. 100 mg · L<sup>-1</sup> PHA treatment showed the best effects.

**Keywords:** PHA;  $\text{NO}_3^-$  stress; cucumber; seed germination; antioxidant enzyme activities